NIE-기반연구-2021-45



Genetic diversity and peculiarity of the endangered species

멸종위기종복원센터 복원연구실

Research Center for Endangered Species

문정찬 외 14명

# 2021

# 국립생태원

National Institute of Ecology

연구진			
문정찬	복원연구실	멸종위기종원헬스팀	선임연구원(연구책임)
김진용	복원연구실	멸종위기종원헬스팀	전임연구원
박다솜	복원연구실	멸종위기종원헬스팀	전임연구원
김희종	복원연구실	멸종위기종원헬스팀	차장
김영건	복원연구실	포유류팀	선임연구원
최진	복원연구실	포유류팀	차장
주은진	복원연구실	조류팀	전임연구원
김근식	복원연구실	어류・양서파충류팀	선임연구원
유나경	복원연구실	어류・양서파충류팀	전임연구원
장금희	복원연구실	곤충·무척추동물팀	책임연구원
박종대	복원연구실	곤충・무척추동물팀	전임연구원
최예진	복원연구실	곤충・무척추동물팀	계장
이병두	복원연구실	식물팀	선임연구원
김성준	복원연구실	식물팀	전임연구원
박형빈	복원연구실	식물팀	전임연구원

# 요약문

(수달: Lutra lutra) 우리나라에서 샘플링된 수달을 사용하여 개체식별을 위한 초위성체 마커 41개의 유전자 증폭 효율을 확인 하였다. 증폭 효율이 좋은 선택된 마커는 다중증폭 실험을 위해 프라이머를 다시 제작하여 증폭 산물의 길이를 조절 하였다. 최종적으로 수달의 성별과 개체식별이 가능한 다중증폭을 위한 16개의 마커를 선정하였다.

(양비둘기: Columba rupestris) 멸종위기 양비둘기의 증식·복원 전략 수립을 위해 국내 개체군의 유전적 다양성과 국내·외 개체군 간 유전적 차이를 확인하고 양비둘기 순종·잡종 판별을 위한 마커 개발을 실시하였다. 국내 집단인 구례, 고흥, 의령은 유전적인 차이를 보이지 않았고, 국내 개체는 러시아 및 몽골 개체군과도 유전적 차이를 보이지 않아 유전적 다양성을 증진할 수 있는 증식 및 복원 전략 수립이 필요한 것으로 판단된다. WGS를 활용하여 잡종 판별을 위한 InDels 마커 11개를 선정하였다. 양비둘기와 집비둘기 잡종 1세대(F1)는 꼬리깃에서 잡종의 특이한 표현형을 보였다. 선정된 11개의 마커는 모두 양비둘기와 집비둘기를 뚜렷하게 구분할 수 있었으며, 잡종 F1의 경우 모두 50%의 순종 비율을 보여주었고 양비둘기와 잡종의 자손의 경우 68~77%의 순종 비율을 보여 주어 잡종 판별 마커로서 활용도가 높은 것으로 확인되었다.

(흰수마자: Gobiobotia naktongensis) 금강 흰수마자 미토콘드리아 전장 유전체 분석 결과 전체 길이는 16,607 bp로 유전자의 구성은 전형적인 척추동물과 유사하였다. 분자계통학적으로 동일종인 낙동강 흰수마자에 비해 중국에 서식하는 *G. pappenheimi*와 더욱 유사하였다. 따라서 고황하 시스템이 존재했다는 중요한 증거로 이용될 수 있을 것이다.

(금개구리: Pelophylax chosenicus) 2019년 국립생태원 내 수생식물원에 금개구리 준성체 600개체를 방사하였다. 방사개체들의 성공적인 정착여부를 판단하기 위하여 그들의 번식유무 확인을 하였다. 번식여부는 유전분석을 통하여 친자확인을 실시하였다. 유전분석을 위하여 선행연구의 Primer를 활용하였으며, PCR 효율성을 높이기 위하여 Multiplex-PCR 세트 구성을

- ii -

하였다. 현재 peak scanner 프로그램을 이용하여 분석중이며, 추후 분석을 통한 친자관계를 확인할 예정이다.

(수원청개구리: Dryophytes suweonensis) 수원청개구리의 원종을 확인하기 위해 nuclear DNA 영역인 POMC, TYR, SIAH, RAG1, C-MYC를 분석하였고 mitochondrial 12S rDNA 영역을 대상으로 HRM analysis를 실시하였다. HRM 분석 결과 수원청개구리와 청개구리의 melting temperature의 구분이 뚜렷하게 나타나 청개구리 23개체, 수원청개구리 33개체로 확인되었으며 1개체는 동정이 확실하게 되지 않았다. nuDNA를 이용한 STRUCTURE harvester 분석을 통해 K = 2에서 가장 높은 delta K 값을 보여, 적정 집단 수는 2개로 나타났다. 또한, STRUCTURE 분석 결과, 청개구리과 2종 중 해당하는 Q 값이 0.995 이상일 경우 해당 종으로 구분하였으며 그 외에는 잡종으로 추정한 결과 수원청개구리는 12개체, 청개구리는 8개체, 이들의 교잡종은 37개체로 나타났다.

(여울마자: Microphysogobio rapidus) 여울마자와 돌마자의 분변 메타바코딩 분석결과 돌마자의 주요먹이원은 Hemibarbus labeo, Cymbella excisa에 매우 집중되어 있는 반면, 여울마자는 추가적으로 Eolimna minima, Tetradesmus dimorphus, Fistulifera pelliculosa를 비교적 높은 비율로 섭식하는 것으로 나타났다.

(소똥구리: Gymnopleurus mopsus) 소똥구리는 딱정벌레목 소똥구리과에 속하는 곤충이다. 우리나라에는 전국에 분포하였으나 1970년대 이후 멸종된 것으로 여겨진다. 소똥구리 복원을 위해 2019년 7월과 8월 두 차례 몽골 동부와 남부 지역에서 소똥구리 개체군을 각각 도입하였다. 본 연구에서는 소똥구리의 전체 미토콘드리아 유전체를 확보하기 위해 NGS를 기반으로 연구를 수행하여 일부분의 미토콘드리아 유전체 염기서열을 확보하였다.

(참달팽이: Koreanohadra koreana) 우리나라에서 멸종 위기에 처한 참달팽이(멸종위기 II급)(복족강: 달팽이과)의 전체 미토콘드리아 유전체를 결정하고 분석하였다. 전체 미토콘드리아 유전체는 13,986 bp 길이로 13개의 단백질암호화 유전자, 22개의 tRNA, 2개의 rRNA 로 구성되어 있다. 염기의 조성은 A는 28.29%, G는 18.67%, C는 15.86%, T는 37.19%이다. 미토콘드리아 유전체의 12개 단백질암호화 유전자를 이용하여 maximum likelihood (ML) 분석을 수행하였다. 참달팽이는 울릉도달팽이와 함께 달팽이과(Bradybaenidae)에 속하고, 외줄달팽이과(Camaenidae)와 자매군을 형성하였다.

(나도풍란: Sedirea japonica) 나도풍란은 한국의 멸종위기종으로 등록되어 있지만 다른 국가의 대엽풍란과 구별 할 수 있는 마커유전자가 없다. 이 연구에서는 엽록체의 *matK*, *trnH-psbA* 유전자와 핵의 ITS 염기서열을 이용하여 한국의 4개 지역의 나도풍란 시료와 일본의 대엽풍란 염기서열을 비교하였다. 분석결과, *matK* 유전자의 염기서열이 한국의 4개 지역에서는 유전적 차이가 없었고 일본의 대엽풍란과 많은 차이를 보였다.

목	차	
---	---	--

참여연구원
요약문 ii
목 차 ······ v
표목차
그림목차
Abstract xiii
I. 서론 ······1
Ⅱ. 연구 내용 및 방법
1. 수달 개체식별을 위한 마커 표준화
2. 양비둘기 복원을 위한 유전자 활용 연구
3. 멸종위기 어류·양서파충류 유전자 연구
4. 참달팽이와 소똥구리 미토콘드리아 유전체 연구
5. 멸종위기종 나도풍란 유전자 분석을 통한 원종 확인 35
Ⅲ. 연구 결과 및 고찰
1. 수달 개체식별을 위한 마커 표준화
2. 양비둘기 복원을 위한 유전자 활용 연구 43
3. 멸종위기 어류·양서파충류 유전자 연구 80
4. 참달팽이와 소똥구리 미토콘드리아 유전체 연구 106
5. 멸종위기종 나도풍란 유전자 분석을 통한 원종 확인 113

IV.	결론 및	제언	118
v.	참고문헌		122

# 표 목 차

표. 1. 수달 개체식별용 초위성체 마커 정보4
표. 2. 수달 성감별용 마커 정보
표. 3. PCR 반응 조건
표. 4. 실험을 위한 샘플 수집 및 DNA 추과출을 완료한 비둘기류
집단 구성 및 개체수9
표. 5. 비둘기류 mtDNA 증폭을 위해 활용된 프라이머 정보 10
표. 6. 비둘기류 mtDNA cytochrom B와 D-loop PCR 증폭을 위한 조건 11
표. 7. 분석에 사용한 WGS 데이터베이스 출처 및 종명
표. 8. 두 종 간 InDel 변이가 확인된 구간의 프라이머 정보 14
표. 9. 본 연구에 이용한 금개구리 microsatellite 프라이머 정보 21
표. 10. 핵 DNA 증폭을 위해 사용된 프라이머
표. 11. 핵 DNA 증폭을 위해 새로 제작된 프리어머
표. 12. 미토콘드리아 DNA 증폭을 위해 사용된 프라이머
표. 13. 분변 분석을 위해 사용된 프라이머
표. 14. 참달팽이 NGS raw data 생산 정보
표. 15. 소똥구리 NGS raw data 생산 정보
표. 16. 참달팽이 quality trim 후 결과
표. 17. 소똥구리 quality trim 후 결과
표. 18. 확보된 참달팽이 미토콘드리아 서열
표. 19. 확보된 소똥구리 미토콘드리아 서열
표. 20. 참달팽이 reference mapping 결과
표. 21. 소똥구리 reference mapping 결과

표.	22.	소똥구리 reference mapping 결과	33
표.	23.	소똥구리 reference mapping 결과	33
표.	24.	미토콘드리아 완전장 서열 분석 결과	33
표.	25.	소똥구리 미토콘드리아 유전자에서 증폭된 산물로부터 서열의	
		BLAST 결과 ·····	34
표.	26.	소똥구리 미토콘드리아 서열 확인을 위해 탐색된 contig assemble	
		결과	34
표.	25.	PCR 반응 조건	36
표.	26.	바코드 유전자 증폭 프라이머 정보	36
표.	27.	국내 양비둘기 개체군의 유전자 다양성 분석	43
표.	28.	국내 개체군 간 AMOVA 분석	46
표.	29.	비둘기과 두 종의 WGS 데이터 생산 및 맵핑 결과	47
표.	30.	양비둘기와 집비둘기 게놈의 InDels 병이 추출 결과	49
표.	31.	추출된 InDels의 염기서열 변이 정보	49
표.	32.	마커 테스트에 활용된 양비둘기와 집비둘기의 개체 정보	50
표.	33.	양비둘기와 집비둘기 간 번식 정보	66
표.	34.	잡종 실험에 활용된 부모 개체 4쌍의 순종 비율 결과	78
표.	35.	잡종 1세대 8개체의 순종 비율 결과	79
표.	36.	금강 흰수마자 미토콘드리아 게놈의 유전자 구성 및 위치	81
표.	37.	흰수마자 및 동일속 어류 5종의 뉴클레오티드 구성 특성	82
표.	38.	금개구리 친자 확인을 위한 테스트한 프라이머 조합	90
표.	39.	청개구리류 대상으로한 핵 DNA 5개의 variable sites	92
표.	40.	Proopiomelanocortin(POMC) 영역에서 나타난 variable sites	95
표.	41.	Tyrosinase(TYR) 영역에서 나타난 variable sites	97

표.	42.	E3 ubiquitin protein ligase 1(SIAS) 영역에서 나타난 variable sites ·· 98
표.	43.	V(D)J recombination-activating protein 1(RAG 1) 영역에서 나타난
		variable sites
표.	44.	Transcriptional regulator Myc-like (C-MYC) 영역에서 나타난
		variable sites
표.	45.	HRM 분석 및 STRUCTURE 분석을 통한 청개구리류 동정
		결과
표.	46.	참달팽이의 전체 미토콘드리아 유전체 구성 107
표.	47.	소똥구리에서 확보된 미토콘드리아 assembly_contig 서열의
		BLAST 결과
표.	48.	미토콘드리아로 분류된 BLAST 결과
표.	49.	애기뿔소똥구리 미토콘드리아 BLAST 결과
표.	50.	애기뿔소똥구리 미토콘드리아 BLAST 된 contig의 mapping
		결과
표.	51.	COX1 유전자 맵핑 결과
표.	52.	소똥구리 근연종의 GC-content 결과112

# 그림목차

그림. 1. 수달 표준 DNA 확보
그림. 2. 초성위체 마커 다중유전자 증폭 세트
그림. 3. 양비둘기의 국내 분포 법위와 국내 샘플 채취 지역 8
그림. 4. 참달팽이 개체로부터 DNA 추출 확인 결과
그림. 5. 소똥구리 개체로부터 DNA 추출 확인 결과
그림. 6. 참달팽이 NGS WGS library QC 결과
그림. 7. 소똥구리 NGS WGS library QC 결과
그림. 8. 안동, 거체, 제주, 영양 수집 개체
그림. 9. 수달 초위성체 유전자 증폭 결과
그림. 10. 수달 초위성체 마커 다중유전자 증폭 세트 구성 39
그림. 11. 수달 초위성체 마커 다중유전자 증폭 결과
그림. 12. 수달 초위성체 마커 다중유전자 세트 1 증폭 결과 39
그림. 13. 수달 초위성체 마커 다중유전자 증폭 결과 40
그림. 14. 수달 초위성체 마커 다중유전자 증폭 결과 41
그림. 15. 국외 개체군 간 Pairwise Fst 분석 44
그림. 16. 국내 개체군 간 Pairwise Fst 분석 45
그림. 17. 양비둘기 개체군과 집비둘기 개체군 간의 haplotype network
분석
그림. 18. 추출된 InDels의 염기서열 변이 정보
그림. 19. 양비둘기와 집비둘기를 대상으로 선별된 프라이머 HM 1~68의
1차 테스트

그림.	20.	1차 테스트에서 통과된 프라이머를 대상으로 개체수를 늘린
		추가 테스트
그림.	21.	양비둘기 x 집비둘기 잡종 실험 개체들과 그 사이에서 태어난
		F1 개체들을 활용한 2차 테스트 결과61
그림.	22.	잡종 실험에 활용된 양비둘기 표현형
그림.	23.	잡종 실험에 활용된 집비둘기 표현형
그림.	24.	양비둘기와 집비둘기 사이에서 태어난 F1의 표현형 73
그림.	25.	잡종 생산에 활용된 양비둘기와 집비둘기 4쌍 Fl 8개체의
		마커 테스트 결과
그림.	26.	금강 흰수마자 미토콘드리아 단백질 암화와 유전자의 At- 및
		GC Skew
그림.	27.	금강 흰수마자 미토콘드리아 단백질 암호화 유전자의 RSCU…83
그림.	28.	Gobiobotia 속 어류의 미토콘드리아 단백질 암호화 유전자의
		평균 Ka/Ks 비율 비교 84
그림.	29.	한국 흰수마자 2집단 및 중국 G. papenheimi의 미토콘드리아
		내 tRNA 2차 구조 비교
그림.	30.	모래무지아과 어류들의 분자계통도
그림.	31.	금개구리 11개의 microsatellite 마커의 PCR 증폭 0.8%
		아가로스젤 전기영동상88
그림.	32.	Multiplex-PCR 세트 구성을 위한 아가로즈 전기영동상 89
그림.	33.	금개구리 10개의 microsatellite 마커의 multeplex-PCR genotype 상··91
그림.	34.	HRM 분석을 통한 청개구리과 2종의 normalized and shifted
		melting curve

그림.	35.	Multiple-sequencing 기반 청개구리과 2종의 STRUCTURE Delta K
		및 Q values
그림.	36.	돌마자와 여울마자의 분변 메타바코딩 분석 결과도 105
그림.	37.	참달팽이 미토콘드리아 유전체의 유전자 배결과 구성106
그림.	38.	복종류 미토콘드리아 유전체의 유전자 배열데 대한 가설… 108
그림.	39.	참달팽이 미토콘드리아 유전체를 근거한 인근 분류군과의
		계통유연관계
그림.	40.	ITS 염기서열 분석
그림.	41.	MatK 염기서열 분석
그림.	42.	trnH-psbA 염기서열 분석117

## Abstract

(*Lutra lutra*) Fourty one microsatellite markers which can be used for individual identification of otter were tested for amplipication efficiency in Eurasian otter DNA sampled in South Korea. Primer pairs of selected markers for multiplex PCR were redesigned for better visualization of bands on a gel. Finally, sixteen markers for multiplex PCR set were selected to determine sex and individual identification.

(*Columba rupestris*) For establishing the conservation management of *Columba rupestris* populations endangered in South Korea, genetic diversity and differentiation were verified, and hybrid markers were developed. *Columba rupestris* that inhabited South Korea were not genetically distinct from Mongolian and Russian populations, and The Gurye, Goheung, and Uiryeong populations showed lower genetic diversity and indicated low genetic differentiation. Eleven InDel markers were selected for hybrid identification using WGS. The first generation (F1) of *Columba rupestris* and *Columba livia domestica* showed a specific hybrid phenotype in the tail feathers. All of the 11 selected markers were able to clearly distinguish between *Columba rupestris* and *columba livia domestica*. In the case of F1, all of them showed a 50% pure breed ratio using 11 markers. The offsping of *Columba rupestris* and expected hybrid individual showed a 68  $\sim$  77% of pure breed ratio.

(Gobiobotia naktongensis) As a result of the full-length genome analysis of the mitochondrial DNA of Gobiobotia nakdongensis in Geumgang, the total length was 16,607 bp, and the composition of the gene was similar to that of vertebrates typically. It was more similar to *G. pappenheimi* living in China compared to the same species, *G. nakdongensis* in Nakdong-River in molecular phylogenetics. Therefore, it can be used as important evidence that the Paleo Hwangho River system existed.

(*Pelophylax chosenicus*) In 2019, 600 juveniles *Pelophylax chosenicus* were released into the Aquatic Garden in the National Institute of Ecology. To determine the successful settlement of the released *P. chosenicus*, we checked their breeding

status. Reproductive status was conducted through DNA paternity identification. For genetic analysis, primers from previous studies were used, and a Multiplex-PCR set was constructed to increase PCR efficiency. It is currently being analyzed using the peak scanner program, and research on paternity will be conducted in the future.

(*Dryophytes suweonensis*) We analyzed nuclear DNA (nuDNA) regions POMC, TYR, SIAH, RAG1, and C-MYC, and conducted HRM analysis based on the mitochondrial 12S rDNA to identify the pure breeds of *Dryophytes suweonensis*. As a result of HRM analysis, there was a clear distinction between the melting temperature of *D. suweonensis* and *D. japonica*, and 23 *D. japonica* and 33 *D. suweonensis* were identified, and one individual was clearly not identified. STRUCTURE harvester analysis using nuDNA showed the highest delta K value at K = 2, and the optimal number of populations was two. As a result of the STRUCTURE analysis, if the Q value was 0.995 or higher among the two species of tree frog, it was classified as the species. Otherwise, it was assumed to be a hybrid. As a result, there were 12 *D. suweonensis*, 8 *D. japonica*, and 37 hybrids.

(*Microphysogobio rapidus*) As a result of fecal metabarcoding analysis of *Microphysogobio rapidus* and *M. yaluensis*, the main food resources of *M. yaluensis* were very concentrated in *Hemibarbus labeo* and *Cymbella excisa*, while *M. rapidus* additionally feed on *Eolimna minima*, *Tetradesmus dimorphus*, and *Fistulifera pelliculosa* at a relatively high rate.

(*Gymnopleurus mopsus*) The dung beetle, *Gymnopleurus mopsus* (Coleoptera: Scarabaeidae), is one of endangered species in South Korea. It was last recorded in 1971. To restore this species, we introduced *G. mopsus* populations from eastern and southern regions of Mongolia in July 2019 and August 2019, respectively. In this study, the mitochondrial genome of *G. mopsus* was partial sequenced and characterized based on NGS.

(Koreanohadra koreana) The mitochondrial genome of the Endangered snail Koreanohadra koreana (Gastropoda: Bradybaenidae) from South Korea is determined and characterized in detail. It is 13,986 bp in length being composed of 13 protein-coding genes (PCGs), 22 transfer RNA genes (tRNAs), two ribosomal RNA genes (rRNAs), and one control region. It has a base composition of 28.29% for A, 18.67% for G, 15.86% for C, and 37.19% for T. The phylogenetic trees reconstructed based on the maximum-likelihood (ML) method confirmed that K. *koreana* belongs to the Bradybaenidae clade in the monophyletic gastropod family Camaenidae.

(Sedirea japonica) Although Sedirea japonica is an endangered plant species registered in South Korea, no molecular markers are currently available to distinguish it from different countries. We performed molecular authentication of four samples of Sedirea japonica from different regions using DNA sequences in the trnH-psbA, matK (from chloroplast DNA) and ITS (from nuclear ribosomal DNA). In the comparison of four regions in Korea, we identified different nucleotide sequences of the matK gene in Korean-Japanese.

생물자원 특히, 야생 동·식물은 자연환경 건강성의 중요한 지표이며 경제적 자원이다. 이런 동·식물은 생태계의 기본 구성요소로서 우리의 삶을 풍요롭게 해주고 자연 생태계의 특성을 나타내주는 고유의 가치를 지니고 있다. 다양한 먹이사슬과 구조로 형성된 생태계는 각자 기능적으로 연결되어 있으며 그 구성원 각각이 경제적 가치를 지니고 있다. 이러한 생물자원의 중요성은 여러 나라가 참여하는 생물다양성협약(Convention on biological diversity, CBD, 1992)이 채택되면서 생물유전자원을 포함한 자국 생물자원의 가치에 대한 인식이 높아졌다. 2010년 생물다양성 협약 당사국총회에서 "유전자원의 접근 및 이익 공유(Access to genetic resources and Benefit-Sharing, ABS)"를 위한 나고야 의정서를 채택하고 2014년 10월 나고야의정서를 발효, 2017년 "유전자원 접근 및 이익 공유에 관한 법률" 제정, 2018년 이 법률을 전면 시행 하여 각 국가의 생물자원주권을 인정하고 실현하는 실질적 수단의 하나로서 자국의 생물자원에 대한 관리 및 규제를 제고 할 수 있는 법률을 제정 및 시행되고 있다.

우리나라는 1994년에 154번째 회원국으로 가입하며 멸종위기종을 포함한 야생동·식물의 보전·보호에 관심을 가지게 되고, 정부(환경부)의 주도하에 야생생물의 멸종 예방 및 생물 다양성 증진을 목적으로 2004년 야생동식물 보호법을 제정하였으며, 현재 우리나라 멸종위기 야생동식물은 1급 60종, 11급 207종, 총 267종을 멸종위기종으로 지정하였다. 환경부는 "멸종위기 야생생물 보전종합계획"을 2018년 추진하면서 멸종위기종 267종 중 반달가슴곰, 산양, 여우, 수달 등이 포함된 64종을 복원대상종으로 선정하고 그 중 우선복원대상종(25종)을 향후 10년간 조사·연구·복원사업을 추진한다고 발표하였다. 멸종위기종복원센터는 2018년 10월 국립생태원의 한 본부로서 개원을 한 후 멸종위기종의 증식·복원 ·보전을 위한 연구를 수행하고 있다.

분자 유전학적 분석을 기반으로 하는 집단 유전학 연구는 최근 분석 기법의 급속한 발전과 더불어 멸종위기종의 복원과 같은 분야에서도 많은 관심이 집중 되고 있는 연구 분야이다. 이런 집단유전학에서 나온 결과들은 야생동물의 건강성을 체크하거나 멸종의 원인을 밝히고 멸종으로의 진행을 막기 위한 방안을 마련하여 생물 다양성을 제공하는 근거로 사용되는 보전유전학으로 발전

- 1 -

되어 왔다.

미토콘드리아 DNA는 재조합 과정이 없이 모계유전을 하기 때문에 한 개체에 한 종류의 미토콘드리아만 존재하며(Hauswith and Laipias, 1985), 핵 DNA에 비해 5~10배 높은 돌연변이율을 보이고, 핵 DNA에 비해 구조가 간단하기 때문에 분자계통학적 분석, 집단유전학에 기반을 둔 유전다양성 및 유전적 구조를 밝히는데 매우 유용하게 이용되고 있다(Irwin et al., 1991; Howard and Berlocher, 1998; Kocher and Stepien, 1997; DeWoody and Avise, 2000).

Microsatellite DNA는 특정 염기 서열이 반복되는 짧은 DNA 단편으로 핵 염색체 전역에 골고루 존재하며, 재현성이 높고, 극소량의 시료로도 분석이 용이하다는 장점이 있다(Liu and Cordes, 2004; Liu, 2011). 개체간 다형성이 아주 높아 개체를 식별할 수 있는 분석능력이 좋으며, Hardy-Weinberg 평형가설에 기초하기 때문에 집단의 유전다양성, 유전적 구조, 근교약세, 병목현상, 집단의 이동 등을 규명하는 연구에 널리 활용되고 있다(Tautz, 1989; Jarne and Lagoda, 1996). 또한 microsatellite maker는 멘델유전 법칙을 기반으로 하기 때문에 친자감별 연구에도 활용되고 있다(McConnell et al., 1995; Nelson et al., 1998; Smith et al., 1998; Beacham et al., 2000; Sunnucks, 2000).

본 과제는 환경부의 "멸종위기 야생생물 보전종합계획"에 따라 멸종위기종복원센터에서 수행하는 유전자연구 과제로서 우선복원대상종과 복원대상종을 대상으로 원종확인, 잡종판별, 유전다양성 분석 등 유전자 분석 기법을 개발하고 그 기법을 활용하여 멸종위기종의 증식·복원·보전에 기여하고자 한다.

# Ⅱ. 연구 내용 및 방법

### 1. 수달 개체식별을 위한 유전자 마커 표준화

수달은 식육목 족제비과 수달아과에 속하는 반수생 포유동물로 수생태계의 건강성을 판단할 수 있는 지표종이자 먹이사슬을 균형 있게 조절해주는 핵심종으로 생태학적 보전가치가 높은 종이다(환경부, 2016). 과거 모피수확으로 개체수가 급감하였으며, 수질오염과 서식지 파괴 등으로 멸종위기에 처해 있어 멸종위기종 I급 및 천연기념물로 지정·보호되고 있다. 수달 보전·복원하기 위해 서식실태 조사(서식지 위협요인 파악, 메타개체군 크기 파악 등) 및 유전적 연구(개체식별, 성판별, 유전적 다양성 연구 등)가 활발히 이뤄지고 있다. 본 연구에서는 개발되어 있는 유전자 마커의 표준화를 통해 연구 결과를 통합적으로 관리할 수 있는 기틀을 마련하고자 하였다.

#### 가. 수달 표준 DNA 확보

(1) 로드킬된 수달 사체의 근육조직으로부터 DNeasy Blood & Tissue kit(Qiagen Co., USA)를 이용해 genomic DNA를 추출하여 총 100ug의 표준 DNA를 확보하였다(그림 1). 이는 유전자 증폭을 위한 주형 DNA로 사용하였다.



M: 1kb DNA ladder marker DNA: Otter DNA

그림 1. 수달 표준 DNA 확보

## 나. 수달 개체식별을 위한 초위성체(Microsatellite) 유전자 분석

(1) 수달 초위성체 유전자 증폭을 위한 프라이머 제작

수달 핵 DNA 초위성체(Microsatellite) 유전자에 특이적인 41쌍의 프라이머(Dallas & Piertney, 1998; Beheler, Fike, Murfitt, Rhodes & Serfass, 2004; Beheler, Fike, Dharmarajan, Rhodes & Serfass, 2005; Huang, Hsu, Lee & Li, 2005)를 (쥐바이오니아에 의뢰하여 제작하였다(표 1.).

#### 표 1. 수달 개체식별용 초위성체 마커 정보

No.	Locus Accession No		Primer sequence $(5' \rightarrow 3')$	Motif	Size range	Reference
1	Lut435	Y16297	F: TGAAGCCCAGCTTGGTACTTC R: ACAGACAGTATCCAAGGGACCTG	CA	170-200	
2	Lut453	Y16298	F: AGTGCTTTGTACTTGGTAATGG R: AGACTGAAAGCTCTGTGAGGTC	CA	175-203	
3	Lut457	Y16299	F: CAGGTTTATGGCTTTATGGCTTTC R: CAGGGTTTGATTTCTGGTGAGG	CA	224-252	
4	Lut604	Y16300	F: TATGATCCTGGTAGATTAACTTTGTG R: TTTCAACAATTCATGCTGGAAC	(GATA) <sub>n</sub> GAA	197-211	
5	Lut615	Y16301	F: TGCAAAATTAGGCATTTCATTCC R: ATTCTCTTTTGCCCTTTGCTTC	(GATA) <sub>n</sub> GAT	244-262	
6	Lut701	Y16302	F: GGAAACTGTTAAAGGAGCTCACC R: CAGTGTTCATAAGGATGCTCCTAC	GATA	192-208	
			* R2: ATCCCTCCTGTGCTGACTTC		(216)	
7	1-+715	V16202	F: TTCACAATAGCCAAGATATGGAC R: TGGCATAATATCCTTTCTCATGG	(GATA)₄GAT	197-217	Dallas & Piertney, 1998
(	LUTT/15	<b>9</b> 110303	<ul> <li>※ F2: GCCAAGATATGGACCCAATCTAAG</li> <li>※ R2: GCTCAGGTTCCATCCATGTC</li> </ul>	(GATÂ) <sub>12</sub>	(224)	
8	1+717	717 V16304	F: TGTTGCCTTCAGAGTCCTGTG R: GTCAGGCATTGTAACATATTCTCAG	(GATA)6GAT	175-203	
0	1.01/1/	110004	<ul> <li>※F2: GGGGTCAAGGAGATACCAAGTAT</li> <li>※R2: TTGTAACATATTCTCAGGTTCTGGG</li> </ul>	(GATA) <sub>10</sub>	(148)	
9	Lut733	Y16293	F: GATCTCATTTTAAATGTTCTTACCAC R: TGGTTCTCTTGCAGGATCTG	GATA	164-192	
10	Lut782	Y16294	F: AGATATCACTAAGCAATACACGATG R: CAAAGACTGAGCAAAACAAGC	GATA	161-197	
11	Lut818	Y16295	F: AAGGATGTGAAACAGCATTG R: CCATTTTATACACATAAATCGGAT	GATA	150-178	
12	Lut832	Y16296	F: TGATACTTTCTACCCAGGTGTC R: TCCTTAGCATTATCTTATTTACCAC	GATA/GAT	178-198	
13	Lut833	Y16292	F: CAAATATCCTTTGGACAGTCAG R: GAAGTTATCTAATTTGGCAGTGG	TC/AC/GA	155-183	
14	RIO_01	AY268051	F: AAGGGCACCTCGAGACAAT R: CATGCTTGACCTTGAGCAAC	(GATA) <sub>9</sub> (GAT) <sub>4</sub>	264-280	
15	RIO_02	AY268052	F: GTAGAGTGGGGGCGCCTAAG R: TGTCCTTGGAAGAGACATGC	(TC) <sub>9</sub> (AC) <sub>12</sub> (G A) <sub>4</sub>	184-198	Beheler, Fike, Murfitt, Rhodes
16	RIO_03	AY268053	F: ATCAGCCTGAGTCCCTGAAC R: ACAGCCAGAACCAAAAGACA	(CT) <sub>26</sub> (CA) <sub>7</sub>	194-218	& Serfass, 2004
17	RIO_04	AY268054	F: CAAGCACCAACTCCTCAAT R: CCACAAGCCAGATTCCTCTC	(GT) <sub>5</sub> (GT) <sub>15</sub>	255-273	

	18	RIO_05	AY268055	F: GGGTTAAAGCCTCTGCCTTC R: AGGGGATACCGGATCATTTC	(AGG) <sub>10</sub> (GAO <sub>3</sub> (GAO <sub>4</sub>	316-354	
	19	RIO_06	AY268056	F: GCCAAGATGGCAACTACTCC R: GAAGCACATTCTCTCTCCATCA	(TCTA) <sub>2</sub> (TCTA) <sub>8</sub>	252-264	
	20	RIO_07	AY268057	F: AAGCACTTCCAGATATCAGTTGC R: CCCAACTTGAGTGGGACTTT	(AC) <sub>21</sub>	167-177	
	21	RIO_08	AY268058	F: TTTCCAGAGCCAATTTGTCA R: CTTGCCTGCTGACATTGAAG	(TG) <sub>15</sub>	204-214	
	22	RIO_09	AY268059	F: GCTCTATTATTAGGAGCAAACCA R: AGCTGGCTTGGAATTCTCTC	(AG) <sub>11</sub>	252-256	
	23	RIO_10	AY268060	F: CATTCGTGGACATTCGGTAA R: GGCAAGGAATCCTGGTTATG	(CT) <sub>4</sub> (AC) <sub>17</sub>	243-259	
-	24	RIO_11	AY833262	F: TCTTCCACTTTTCAATTTAGGTA R: GCCCAAGGTTCACTATCAAG	(AC) <sub>14</sub>	156-168	
	25	RIO_12	AY833263	F: GTATCGTCCAGGCTGCTCTC R: CCACAGCCAGCTCTGAATAA	(AG) <sub>12</sub>	207-213	
	26	RIO_13	AY833264	F: GCTCAGCTGTGCAGAATGAT R: GCACACGTGGTAAGATGAGC	(GT) <sub>20</sub>	254-274	
	27	RIO_14	AY833265	F: CTACCAGCCGTTTGTGTGTGAG R: GCTTGTCCCTCTACCTCTGC	(GT) <sub>11</sub>	286-294	
	28	RIO_15	AY833266	F: AGTGCACAGTGGTGGTCTTG R: TCCTGATTCTGCTTGGTTCA	(TC) <sub>8</sub> (CA) <sub>10</sub>	253-261	
	29	RIO_16	AY833267	F: GGTGCTTCTTAAGGAACTGAGC R: ATTTATTGGGCATGGAAGCA	(GT) <sub>14</sub>	266-280	Beheler, Fike,
				※R2: GCAGAATTCAGTGTCACAGTAGA		(247)	Dhamarajan, Phodes &
	30	RIO_17	AY833268	F: GGTTGCGAAGATAAGCAAGG R: CAAGTGTTTAAAGTGTGTGTGTGT	(GTCT) <sub>5</sub> (CT) <sub>7</sub>	172-178	Serfass, 2005
	31	RIO_18	AY833269	F: TTCCATTGTCTCTTGGCTTG R: CCCTCTCCACACTTGTGCTC	(CT) <sub>6</sub> (CTAT) <sub>14</sub>	140-165	
	32	RT() 19	AV833270	F: GGTCCCAGGTGCAAATCTTA R: GATTTGGGTCTTCCAATGGTT	(CT) <sub>12</sub>	273-285	
	02	10_10	11000210	<ul> <li>※F2: ATCTTAGAAGCTCAGTCCTGCT</li> <li>※R2: CCAGATTTGGGTCTTCCAATGG</li> </ul>	(ATCT) <sub>9</sub>	(258)	
	33	RIO_20	AY833271	F: CTAGCTCTGCCACCTAACCAG R: ACAGCGTGGTCCTGACCTT	(GT) <sub>10</sub> (GTCT) <sub>4</sub>	245-259	
	34	040T02	AY786983	F: AGGTCCTGAACCAAGACATTTAAT R: TCACAGTAACCCAGATGATTTTG	(GAAA) <sub>16</sub>	145-193	
	35	040T04	AY786984	F: AACTCTGACTCTGGGTGGAGGTGTT R: GCCTGGGAGGCAGCATGATTAGT	(GAAA) <sub>16</sub>	178-210	
	36	040T05	AY786985	F: TGGAGAAAAGCATTATCTTACTG R: ATTCAGGGAGGCAGGAGAGC	(GAAA) <sub>14</sub>	165-191	
	37	0401107	AY786986	F: CACAGTGAAGGGTGACCAGATCACC R: CCACCTCATCCCAAATGATCCTCT	(GAAA) <sub>12</sub> GAACA(G AAA) <sub>9</sub>	182-200	
	38	040T14	AY786987	F: GGTCCAAGTCCAAGCCTGCCT R: TTCATATTCTTCAGGTGAATCCCAT	(GAAA) <sub>13</sub>	123-139	Huang, Hsu, Lee & Li,
	39	040T17	AY786988	F: ATCAGGTATGAGGATACATTTACCT R: TGCAACCTACTTCTATATGAATTT	(GAAA)13	153-169	2005
				* HZ: CAUGIATUAUGATACATITACCTCC * R2: ATTITATACTTCAGTAGAAAGTGCAC		(145)	
	40	04OT19	AY786989	R: TTAAATCCACATCTGTGACTCTGCA	(GAAA) <sub>12</sub>	197-219	
				*R2: TCCACATCTGTGACTCTGCA		(213)	
	41	040T22	AY786990	F: CTATCTGACCATTGTCCCATGA R: ACCCATGTAGGGTGCCATGCT	(GAAA) <sub>16</sub>	149-157	

※ 본 과제에서 새로 만든 프라이머

(2) 수달 초위성체 마커 선별을 위한 유전자 증폭 효율 검증

41개의 수달 초위성체 유전자를 증폭하기 위한 PCR 조성 및 조건은 표3의 PCR 조건(1)을 이용해 PCR을 수행하였다. 그 후 2% 아가로스 겔 상에서 전기영동법으로 유전자 증폭여부를 확인하였다.

(3) 수달 초위성체 마커 다중유전자 증폭(Multiplex-PCR) 조건 확립

위의 방법으로 선별된 수달 초위성체 마커의 크기를 조절하고(표 1) 수달 성판별을 위한 유전자 마커를 포함하여 네 개의 다중유전자 증폭(Multiplex-PCR) 세트를 구성하였다(그림 2). PCR 조성 및 조건은 표 3의 PCR 조건(1)을 이용해 실험을 수행하였다. 그 후 2% 아가로스 겔 상에서 전기영동법으로 유전자 증폭 산물의 크기 및 효율을 확인하였다.

그 다음, 각각 다중유전자 증폭 세트별로 프라이머의 유전자 증폭 효율에 따라 0.3~0.6uM(최종 농도)로 혼합한 프라이머 혼합액을 만들어 다중유전자 증폭에 사용하였다. PCR 조성은 100ng genomic DNA, 1XPCR buffer, 0.3mM each dNTP, 0.3~0.6uM each primer, 1.25 unit Ex Taq DNA polymerase를 혼합하여 총 50ul용량으로 반응하였다. PCR 조건은 표 3의 PCR 조건(1)-(3)를 이용해 실험을 수행한 뒤 2.5% 아가로스 겔 상에서 전기영동법으로 유전자 증폭 여부 및 증폭 산물의 크기를 확인하였으나 유전자 증폭이 확인되지 않아 아래의 방법으로 실험을 수행하였다.



그림 2. 초위성체 마커 다중유전자 증폭 세트

두 개 또는 세 개 초위성체 마커 다중유전자 증폭 방법을 고안하였다. PCR 조성은 100ng genomic DNA, 1XPCR buffer, 0.2mM each dNTP, 0.15uM each primer, 1.25 unit Ex Taq DNA polymerase를 혼합하여 총 50ul용량으로 반응하였다. PCR 조건은 표 3의 PCR 조건(4)를 이용해 실험을 수행한 뒤 2.5% 아가로스 겔 상에서 전기영동법으로 유전자 증폭 여부 및 증폭 산물의 크기를 확인하였다.

(4) 수달 성감별을 위한 유전자 마커

수달 성감별을 위하여 미국유전자은행(NCBI)에 보고된 수달의 ZFX(AB491906), ZFY(AB491597) 유전자 서열을 확보하여 프라이머를 제작하였다(표 2). PCR 조성 및 조건은 표 3의 PCR 조건(1)을 이용해 실험을 수행하였다. 그 후 2.5% 아가로스 겔 상에서 전기영동법으로 유전자 증폭 산물의 크기 및 효율을 확인하였다.

표 2. 수달 성감별용 마커 정보

No.	Locus	Accession No.	Primer sequence $(5' \rightarrow 3')$	size(bp)
1	ZFX	AB491606	F: CCACAGAGGTGTTGTGATGG R: CCCAGGCAATCATTCATGAATATC	103
2	ZFY	AB491597	F: TCTCTTTCGTTGAAGGACAGTG R: GAGTGATCGAGCCAAGTTCC	120

#### 표 3. PCR 반응 조건

반응 조건	DNA polymerase			PCR cyclin	ng condition			
		Predenaturation	Denaturatio	n Anne	ealing I	Extension	Final	extension
PCR 조건(1)	Ex Taq DNA polymerase*	0000 (0	98°C (10 sec	c) 56°C (	30 sec) 72	°C (40 sec)	5000	(10
-()	(TaKaRa, Tokyo, Japan)	98°C (2 min)		33	cycle		72°C	(10 min)
		Predenaturation	Denaturation	Annealing	Denaturation	Extension	Final	extension
PCR 조건(2)	Ex Taq DNA polymerase	9	98°C (15 sec) :	55°C (25 sec)	98°C (15 sec)	72°C (25 sec)		
	(TaKaRa, Tokyo, Japan)	98°C (2 min)	15 c	ycle	25 c	ycle	-	-
		Predenaturation	Denatu	ration	Annea	aling	Final	extension
PCR 조건(3)	Ex Taq DNA polymerase		98°C (1	5 sec)	60°C (2	5 sec)		
	(TaKaRa, Tokyo, Japan)	98°C (2 min)		50	cycle			-
		Predenaturation	Denaturation	Annealing	Denaturation	Extension	Final	extension
PCR 조건(4)	Ex Taq DNA polymerase		98°C (15 sec)	56°C (30 sec)	98°C (15 sec)	60°C (30 sec)	7200	(10
	(TaKaKa, Tokyo, Japan)	98°C (2 min)	15 c	ycle	20 c	ycle	- 72°C	(10 min)
	1							

\* PCR 조성: 100ng genomic DNA, 1XPCR buffer, 0.2mM each dNTP, 0.3uM each primer, 1.25 unit Ex Taq DNA polymerase

### 2. 양비둘기 복원을 위한 유전자 활용 연구

가. 국내 개체군 유전다양성 및 국내·외 개체군 간 유전적 차이 분석

(1) 샘플 수집 및 DNA 추출

양비둘기 유전 분석을 위해 실험에 활용된 양비둘기 샘플은 총 51개체이다. 양비둘기는 고흥(GH)와 구례(GR), 의령(UR)에서 증식을 위해 포획하여(그림 3) 멸종위기종복원센터로 도입한 개체들이고 집비둘기(LD)는 구례와 의령에서 잡종화 위협 제거를 위해 포획한 개체들이다 (표 4). DNA 추출은 혈액 시료를 활용하였고 혈액 채취량은 Wildlife Ethics Committee - Collection of Blood Wildlife Policy(2017)에서 제안하는 체중의 1% 이하인 약 2.2~2.7cc 이하로 진행하였다. 모든 샘플은 Qiagen blood and tissue kit을 이용하여 DNA를 추출하였고, 각 샘플의 sexing 과정에서 gel loading으로 genomic DNA의 존재와 quality를 추정 하였다.



그림 3. 양비둘기의 국내 분포 범위와 국내 샘플 채취 지역 (Kim et al, 2022)

Species	mtDNA Region	Populations	No. of samples	Sources; collecting locality	Accession No.
		D	1	Ovyurskiy Kozhuun, Tuva, Russia	GQ481614.1
		Kussia	2	Mongun-Taiginskiy Kozhuun, Tuva, Russia	GQ481612.1 GQ481610.1
	COI	Mongolia	3	Bayan Ovoo, Hentiy, Mongolia	NC_031867.1 (reference sequence) GQ481613.1 GQ481615.1
			1	Dornod Aymag, Dornod, Mongolia	GQ481611.1
Columba rupestris		South Korea	47	Goheung, Gurye, and Uiryeong, South Korea	In this study
	Cyt b and Dloop	Goheung	9	Goheung, Jeollanamdo, South Korea	In this study
		Gurye	18	Gurye, Jeollanamdo, South Korea	In this study
		Uiryeong	24	Uiryeong, Kyungsangnamdo,S outh Korea	In this study
		Mongolia	1	Bayan Ovoo, Hentiy, Mongolia	NC_031867.1 (reference sequence)
Columba livia domestica	Cyt b and Dloop	South Korea	15	Gurye, Uiryeong, Yeongyang, Mokpo, Guangyang, and Yeosu, South Korea	In this study
Columba livia	Cyt b and Dloop	China	1	Wuhu, Anhui, China	NC_013978.1 (reference sequence)

표 4. 실험을 위한 샘플 수집 및 DNA 추출을 완료한 비둘기류 집단 구성 및 개체 수 (Kim et al, 2022)

(2) 프라이머선정 및 PCR 증폭

분석을 위해 mtDNA 구간 중 Cytochrome oxidase subunit 1 (COI), Cytochrom b (cyt b), D-loop 구간을 활용하였다. COI 구간 증폭을 위해 Bird F1과 Bird R1 프라이머(Primer)를 사용하였고, cyt b 구간의 유전자 증폭을 위해 JinF와 JinR 프라이머를, D-loop 구간의 유전자 증폭을 위해 Gol\_DF,

- 9 -

Gol\_DR, 129\_GolF, 317\_GolR, KXH0\_F, KXH5\_R 프라이머를 이용하였다 (표 5). cyt b의 경우 최근까지 연구된 프라이머를 활용할 경우 약 300bp의 길이를 가지는 것으로 확인되어(Awad et al. 2015), NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 등록된 개체(GeneBank accession number: NC\_031867)의 mtDNA 정보를 토대로 Geneious 8.0.5 프로그램을 이용하여 자체적으로 프라이머(PCR 산물 길이는 약 1000bp)를 제작하였다. D-loop의 경우, 약 1400bp의 길이를 커버하기 위해 2쌍의 프라이머(Gol\_DF, Gol\_DR, KXH0\_F, KXH5\_R)와 1쌍의 inner 프라이머(129\_GolF, 317\_GolR)를 사용하였다. 그리고 12S rRNA gene과 인접해 있는 말단 부분은 약 5~52bp 이상의 tandem repeats를 보이는 구간이므로 염기서열(sequence) 분석에 어려움이 많아 제외 하였다(Goldberg et al, 2011). PCR 증폭은 2 x Lamp Taq PCR Pre-Mix(BioFact)를 사용하여 총 30µl을 (표 6)의 조건으로 증폭하였다. PCR product의 정제와 염기서열 분석은 외부업체(Macrogen)를 통해 수행하였다.

Gene	Primer	Sequence(5'-3')	Reference
COL	BirdF1	TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC	Johnsen et al.
	BirdR1	ACGTGGGAGATAATTCCAAATCCTG	(2010)
ant b	JinF	TTCTATCCCTCCATAGACCTGT	자체제작
cyt b	JinR	CGATGTTTTCATAAACTATTAGAGT	자체제작
	Gol_DF	TCACGTGAAACCAGCAACTC	Goldberg(2011)
	Gol_DR	GGTAAGGTTAGGACTAAGTC	Goldberg(2011)
Dloop	129_GolF	CCATTTCAGTCCGTGATCGC	Goldberg(2011)
D-100p	317_GolR	AGTGCATCAGTGTAAAGGTG	Goldberg(2011)
	KXH0_F	TGTCCTATGTACTACAGTGCATCG	Ando(2014)
	KXH5_R	ATGGCCCTGACATAGGAACCAGAG	Ando(2014)

표 5. 비둘기류 mtDNA 증폭을 위해 활용된 프라이머 정보 (Kim et al, 2022)

	Pre-		Replication cycle					
Primer	denatu ration	Denaturation	Annealing	Extention	Cycles	Extention		
COI	94℃,	94°C 1.00	58°C 1.00	72°C 1.00	35	72℃,		
601	4:00	<i><i>J</i>10, 1.00</i>	000, 1.00	720, 1.00		5:00		
L'E.D	94℃,	Q4 °C 1.00	58°C 1.00	72°C 1.00	35	72℃,		
JIIII'''K	4:00	940, 1.00	380, 1.00	720, 1.00	55	5:00		
GolDF+	94℃,	04°C 1.00	50°C 1.00	72°C 1.00	25	<b>72℃</b> ,		
GolDR	4:00	94 C, 1:00	58 C, 1:00	720, 1:00	35	5:00		
KXH0F+	94℃,	04°C 1.00	E0℃ 1.00	72°C 0.20	25	72℃,		
KXH5R	4:00	94 (, 1:00	59C, 1:00	720,0:30	35	5:00		

표 6. 비둘기류 mtDNA cytochrom B와 D-loop PCR 증폭을 위한 조건 (Kim et al, 2022)

#### (3) 자료 분석

국내 개체군의 유전 다양성과 유전적 거리 분석, haplotype netwok 분석을 위해 cyt b(987bp)와 D-loop(1424bp)의 염기서열을 하나로 연결하여 분석에 활용하였고(Tamada et al. 2008), 국외 개체군과 유전적 거리 분석을 위해서 COI(603bp)를 활용하였다. 분석을 위해 NCBI에서 양비둘기와 바위비둘기의 reference sequence와 그 외 등록된 개체들의 sequence를 다운로드하여 분석에 활용하였으며, 각 개체의 샘플채취 지역과 정보는 표 2-1에 기록하였다. 염기서열 확인 및 편집과 alignment는 Geneious 8.0.5 프로그램을 이용하여 수행하였다. 유전적 다양성(haplotype diversity) 분석은 DNAsp v6.0을 이용하였고, 유전적 거리(genetic distance) 분석은 Arlequin 3.5.2.과 R v.4.1.0.을 활용하였다. Haplotype network 분석은 PopArt 1.7 프로그램을 이용하여 Median-Joining network 방법으로 분석을 실시하였다.

#### 나. 양비둘기 잡종 판별을 위한 마커개발

(1) WGS 데이터 분석

양비둘기 잡종 판별 마커 개발을 위해 동물자원의 유전자 다양성 연구

4단계 1차년도(국립생물자원관, 2018)에서 수행한 양비둘기 및 집비둘기의 WGS (Whole Genome Sequencing) 데이터를 활용하였다. WGS 분석에 사용된 샘플은 양비둘기 7개체, 집비둘기 1개체, 바위비둘기 6개체이고 데이터 출처 및 상세 내용은 표 7과 같다.두 종의 WGS 서열 맵핑과 insertion/deletion polymorphism (InDels)를 확인하기 위해 기존 보고된 표준 게놈 전장유전체(reference)인 Cliv\_1.0 개체의 데이터를 활용하였다. 마커개발을 위해 우선 양비둘기와 집비둘기 두 집단 간의 InDel Homozygous 변이를 추출 및 확인하였다. 변이 추출 조건으로 두 집단 간 서로 다른 유전체 변이가 나오는 경우로써, 집비둘기 그룹에서 Reference homo 변이로 확인되고 양비둘기 그룹에서 Alteration homo 유전체 변이가 나오는 경우를 추출하여 두 그룹 간 차이를 보이는 region을 추출하였다. 이 과정에서 모계유전인 mtDNA와 repeat 구간인 microsatellite 구간은 분류하여 분석에서 제외하였다. 양비둘기 WGS 분석 개체 중 4개체는 부모·자식 간의 관계인 개체를 포함시켜(표 7) 세대 유전으로 인한 변이가 발생하는 region은 제외할 수 있게 설계하였다.

국명/학명	품종명	자료 출처	채집 지역	샘플번호	비고
			전남 고흥군	IN3903	부
			전남 고흥군	IN3905	모
양비눌기		국립생물	전남 고흥군	IN3897	증식 1
(Columba	-	자원관	전남 고흥군	IN3902	증식 2
rupestris)			경남 의령군	IN3848	-
1.17.0.110)			전남 구례군	IN3907	-
		NCBI	-	SRS346866	-
집비둘기		그리끼ㅁ			
(Cdunta livia	-	于自勿室	경기 고양시	IN3788	_
domestica)		사원관			

표 7. 분석에 사용한 WGS 데이터베이스 출처 및 종명 (국립생물자원관, 2018)

국명/학명	품종명	자료 출처	채집 지역	샘플번호	비고
	Danish Tumbler		-	Assembly name (Cliv_1.0)	-
바위비둘기	English pouter		-	SRS346884	-
( <i>Columba</i>	Fantail	NCBI	-	SRS346865	-
livia	Parlor roller		-	SRS346899	-
11 (14)	Scandaroon		-	SRS346873	-
	Chinese owl		-	SRS346877	-

(2) 테스트 프라이머 선정 및 마커 테스트

양비둘기와 집비둘기의 잡종 개체 선별 마커 개발을 위해 양비둘기와 집비둘기 간 InDel 다형성 (polymorphism)이 확인되고 base pair의 크기가 큰 순서대로 InDel을 정렬하였다. 20bp 이상이 되는 InDel 구간은 총 1,712개로 나타났으며, 이 중 데이터의 오류와 중복 등이 확인 되는 구간을 제외하였고 InDel의 base pair (bp)가 34 bp 이상인 구간 총 68개를 추출하였다. 양비둘기와 집비둘기 간 InDel length가 50bp 이상인 구간은 19개 (HM (hybrid marker) 1~19), 40bp 이상인 구간은 19개 (HM 20~36), 34bp 이상인 구간은 32개 (HM 37~68)이다. 추출된 68개 구간의 프라이머 (표 8)를 제작하여 1, 2차 테스트를 실시하였다. 1, 2차 마커 테스트는 이종 간의 잡종 교배의 경우, 그 자손 F1이 두 종의 특징을 반반씩 가진다는 유전법칙을 전제로 실시하였다. 1차 테스트는 양비둘기와 집비둘기 두 종을 명확하게 구분 가능한 종 특이적인 구간을 선별하기 위한 것으로서, 68개의 프라이머(구간)를 양비둘기 16개체와 집비둘기 14개체에 적용하여 PCR 및 Gel loading 후 육안으로 base pair를 확인하여 두 종 간 차이를 보이는 구간(프라이머)을 선별하였다. 1차적으로 선별된 프라이머는 2차 테스트에서 멸종위기종복원센터에서 생산한 잡종 1세대(F1)를 대상으로 부모 개체와 F1의 유전 형질을 확인하는 실험을 실시하였다. 멸종위기종복원센터에서 잡종 실험을 실시한 양비둘기와 집비둘기 4쌍과 이들의 잡종 F1 8개체를 활용하여 1차적으로 선택된 프라이머를 대상으로 PCR 및 Gel loading하여 부모 개체와 F1 개체들의 밴드 패턴을 육안으로 확인하였다. 2차 테스트에서는 잡종 1세대인 F1은 부모의 형질을 하나씩 물려받는다는 전제를 성립함을 조건으로 하며, PCR 및 Gel loading 후 doble band를 보이는 구간(프라이머)을 최종적으로 선별하여 양비둘기와 집비둘기의 잡종 판별 마커로 선정하였다.

- 13 -

표 8. 두 종 간 InDel 변이가 확인된 구간의 프라이머 정보

	InDel				Product	
Primer	length	Туре	Gene	Primer (F, R)	size	
name	(bp)				(bp)	
			exon-XR_0024			
		intergenic	07624.1-1-exon	CTGTTGACCACTGTGGATTGTC		
HM 1	53	region	-XR 002407542	GTCCTATCATTGGTTGTCCCTC	340	
		- 0	.1-1			
	0.1	intron_va		CTTGGATAACTACAGAGCAGGG	220	
HM 2	84	riant	SCYL2	CCCGATATGGTACCCTTTGT	338	
	08	intron_va	ICV1	GTTTCTACAGAACACCAGACCC	257	
	90	riant	1511	ATAGTGACTCTTCCCAGACACG	337	
HM 4	66	intron_va	COI 23 4 1	CTTCCCTCTCTCTTCATCAGTG	354	
	00	riant	0123711	CATAGGAAGGGCAGTACATCTC		
HM 5	50	intron_va	SDK1	GAAGTTAGGCAGTGTACGTTCC	377	
		riant		CCTTTGAAATGTCGTGGC		
HM 6	54	intergenic	KIF16B-exon-X	GTAAGAGCTGAGCAATACACCC	361	
		_region	R_272157.2-1	AGCTCAGTATTGCAGAGAGAGG		
HM 7	52	intergenic	exon-XR_0024	CTTGTAGCTCAGAAGCAGTAGGG	397	
		_region	17011.1-1-C1D	ACTCAGTGGACTCCTGATGTCT		
HM 8	105	intron_va	FBXL17	CAGGTCAGTTAAGATGGAGGAG	395	
		riant		GICICITICCACGAGGTACAATC		
HM 9	64	intergenic	DTWD2-DMX	ACCATGGTCTGACAAGAGAGC	388	
		_region	L1	CAGCACAACAAACCIGCAC		
1116 40		intergenic	XR_002419528.	CTATCTTGACAGCTAAGTCGGG	0.71	
HM 10	80	region		TACTTGTAGGTCTGGGGACAAC	371	
		- 0	1-1			
	10	intergenic	IMEM/4-exon	GGTGACCCTGTTATACATAGCC		
HM 11	49	_region	-XR_002419776	GAGAAGACAGCTGGGAAAGTC	318	
		- 0 · .	.1-1			
HM 12	56	intron_va	HSPA12A	GTCTCCTTTGAGGGGAATACAC	256	
		riant				
HM 13	53	intron_va	SMYD3		198	
		intron va				
HM 14	79	minon_va	LOC102083807		252	
		intron va				
HM 15	60	riant	GALNT17	GATGATCATTGAGGGTCTCTTCC	364	
		intron va		GACAGCCTGACTTCTAATGAcc		
HM 16	104	riant	PDHA1	CAATCTGCCTTGACATCCAC	180	

Duine ou	InDel				Product
rimer	length	Туре	Gene	Primer (F, R)	size
name	(bp)				(bp)
HM 17	86	intron_va riant	ADD2	CTTTGCTGGTCCCTGAAGT GGGGACAACGAAACGTTAG	272
HM 8	73	inframe_ deletion	LOC110356040	GATGGTATCTGTGATGTCACCC gGGTTGTCCCTTAAGTCTGAGT	332
HM 19	133	intragenic _variant	LOC102085182	GTTACGTATCCACAGACAGCAG GACCCTGAAGGTAAGTTGCAGT	341
HM 20	41	intergenic _region	VIPR2-ZMYN D11	GTTCAGTCTGGGAACAATGG CTAGTCAATGGACTGGAGTTGG	250
HM 21	42	intron_va riant	DPYD	CATTGACTCAGGCTTTCACC GAACTAGGAGTCTGGATCTAGGG	383
HM 22	49	intergenic _region	exon-XR_0024 11026.1-1-exon -XR_002411022 .1-1	GTGTATGTGGACTCACAGGATG GGTGGATGTTGGAGATCAGT	351
HM 23	42	intron_va riant	PCDH7	GGTACAAAACCAAGTGTGGG CTGTGATGTTAGTTACGCCCTC	232
HM 24	48	intron_va riant	TUBGCP5	ACACTCAACCTCTGAGTAGGGAG CCATACCGTTGCTTTACGG	328
HM 251	40	intron_va riant	SGCD	AGAGCAGAGATTCCCCTGTAG CTGCTACTCCTTCCTTCCAAG	359
HM 26	42	intron_va riant	LOC102090285	GTCATAGGGACACCTTACATGG CCCACAAGGTTCTCATGGT	352
HM 27	46	intron_va riant	MEF2C	TCTGGTCTGTAAGAGACACTGC GCACTAACCCATGTCCCTAAG	383
HM 28	47	intron_va riant	PCMTD1	GTGCAGGGAAGCAACACTAT CTGGCTGACCTTCCTATCTACAG	261
HM 29	43	intergenic _region	exon-XR_0024 18568.1-1-EGF R	AGGTGTACACAGGAGACTCACAG TAGGGTACCTATGATGAGGCAG	383
HM 30	41	intergenic _region	exon-XR_0024 19835.1-1-exon -XR_002419765 .1-1	TTGCTCGGATGATTGGAC GTATCCACTTACTGTGCACTGGC	397
HM 31	49	intron_va riant	PHF24	AATCTCCTCTCCCTCATAGCAG GACACATCACATCCACTCCAG	297
HM 32	46	intron_va riant	LOC102083625	GAGACCTGACAAGCTGACAGAC CTACTCCTAAGTTCAGTGGAGGC	382

Duine en	InDel				Product
Primer	length	Туре	Gene	Primer (F, R)	size
name	(bp)				(bp)
HM 33	44	intron_va riant	LRBA	GGCAACACAGACAGAAGAACAG CTGTGGAAGTAGCGTGTAGTACC	275
HM 34	42	3_prime_ UTR_vari ant	PRELID3A	GGGGTACAAGACCAAGATAAGC GTATCTGTATGTTCAGCCCTGC	150
HM 35	43	intron_va riant	НООКЗ	GTCTCACCTCGTGTGACAGATAC GAAGTACCTGGAAAGGCTGAAG	344
HM 36	41	intron_va riant	LOC102087194	CAGAGTCCCAGACACTATGACAC CTCTCCAGGCTCAAGGAATAAG	288
HM 37	40	intron_va riant	CFAP54	GCTAGCTGTGTCTTTGGTAGGT CTACAGGAGTTGGAGTCAGAGAC	313
HM 38	39	intron_va riant	PTPRD	CACGCAGTCTACAGAAGGACTA CTTGAACCTGGAACCTGCT	261
HM 39	39	intergenic _region	exon-XR_0024 13668.1-1-exon -XR_002413592 .1-1	CCTAAGTGAGAATGGGAGACAG GGGAGAGAGAGAGCACATATTCAC	367
HM 40	39	intergenic _region	LARP1-exon-X R_002414971.1 -1	CTGTTGGCTCCTAAAGACTGCT CTGTTGACAGGGAACTCCAG	312
HM 41	39	intron_va riant	NCAM2	GTCAGATTATCAGTGTGAGGGG CGGTGTATAAAGCTACCCTGTG	241
HM 42	39	intron_va riant	LOC102094075	TGCAGTCACCACTACCTACTTG CTTCTCTCAAGTCTTTCCAGCC	361
HM 43	38	intron_va riant	ABCC8	GTTAGTACTCCTCCTGTCCCATC ATAGTGATCCACGACTACCTGC	383
HM 44	38	intergenic _region	exon-XR_0024 11415.1-1-HC N1	TACTTGGACCCACTCAGTAAGC GTCACTTGTCCCATACACCTCT	199
HM 45	38	intron_va riant	TMEM229B	ACAGAGAGGGCAGAGAGAGAGAGAGTC AAGTACGTGGTGTAGAACTGGC	313
HM 46	38	intergenic _region	exon-XR_0024 18139.1-1-exon -XR_002418121 .1-1	AGGTGTGCTGTTAGGTTAGGG ACCAACAGAACAGGTCAGGA	153
HM 47	38	intron_va riant	DTNBP1	GTCACAGCTACCAGTTGTCTCAC CTATGCCTGCTGTCTACTTCTG	346

D	InDel				Product
Primer	length	Туре	Gene	Primer (F, R)	size
name	(dd)				(bp)
			exon-XR_0024		
	~ -	intergenic	11013.1-1-exon	GAATAGGAAGGGGTCTCCTAAC	
HM 48	37	_region	-XR_002411039	GATCTGTCTGCATCTCTGCTC	304
			.1-1		
			PHAX-exon-X		
HM 49	37	intergenic	R_002413933.1	GtTATCACTCATCTGAGCACCC	393
		_region	-1	ATAGGCAAGACAGACAGGACAG	
LIM EO	26	intron_va	A CD2	CTGTCCTGGCAGATCTTCAT	202
HM 30	36	riant	ACP2	TCTCTAACAGAGTCTGGGTCGT	382
HM 51	36	intron_va	BTBD9	GCTATTCAGGAACACAGTCTCC	327
	50	riant		GTTGAGCGTGCTCATACTTGTC	527
HM 52	36	intergenic	SHANK3-ACR	AGAACAGACACACACAGAGG	193
		_region		GTCCTGGTGTAACGTAGGAGTAG	
HM 53	36	intron_va	KCNH8	GCTGTGAAGTCTCTTGCCAT	180
		riant		GIACCICAACATCICCCIGAIG	
HM 54	36	intron_va	ZC3H7A	GCCACAGTGAAGGATAGAATGC	391
		riant	avon XP 0024	CHAGICICICITECTICC	
	36	36 intergenic _region	227(F 1 1 L OC	CCCCTGAGTGCAGGAGTATAA TCTACCACATCCTCTGTCTTCC	051
HM 55			23765.1-1-LOC		251
			102089320		
LIM 56	26	intergenic	4707.1.1 aven V	CCTGAGACCTCAAGTCCTGTAT CAGCTGTGCAGAACTGAAAC	221
FIM 50	30	_region	4/0/.1-1-exolf-A		221
		intergenic	K_002424669.1-1		
HM 57	36	rogion	1	GTGTCTGTACCCTGCTGTAAT	333
			exon-XR 0024		
HM 58	35	intergenic	23481 1-1-TGF	CTGACATGTTCTCTGCTGCTTC	239
11111 00	00	_region	BR2	ACAGTGGTTTGACCTGTACTCC	200
		intron va	DIKZ	GGGTGCTTTGTATCATCTGC	
HM 59	35	riant	LDLRAD3	CAGGATCCAATGAAGACCAC	398
		intergenic	CELF4-exon-XR	TTGGGCAGGTTTATGCAC	
HM 60	35	region	002416079.1-1	TTGGAGCCTCTTTGCTTC	238
		- 0 	 exon-XR_00241		
HM 61	35	5 intergenic _region	6512.1-1-exon-X	TATGGACCAAGAAGAGGGACTC	381
			R_002416506.1-1		
	25	intron_va		TATGTGAGGCCACAGAAAGC	262
HIM 62	35	riant		GTCCTGGTGAGAAGCATAAACC	363

Drimor	InDel				Product
rimer	length	Туре	Gene	Primer (F, R)	size
name	(bp)				(bp)
ЦМ 62	25	intergenic	HSD17B4-PRR	CGTCTGGTCTCATCCAAAAG	208
	33	_region	16	TAGTGGGTGAACAATCCAGC	590
	25	downstre	exon-XR_0024	CACACAGGAGCAAAGCATTC	224
HIM 64	35	am_gene	20591.1-1	GATACCATTTCGCAGAGGAG	334
			exon-XR_00242		
HM 65	35	intergenic	0591.1-1-exon-X	CACACAGGAGCAAAGCATTC	334
_		_region	R_002420609.1-1	GATACCATTICGCAGAGGAG	
ЧМ 66	35	intron_va	DDVN	CAATGGCTACTGATGCTACC	237
1 11 1 00	33	riant		TGTGTAGACCCTGTGTTCACC	237
<b>НМ 67</b>	35	intergenic	HGF-exon-XR	TAGATGGTGCCTAAAAGCCC	373
11111 07	35	_region	_002425946.1-1	GCTCATTGAGGACTAGAGGAGA	575
HM 68	34	intergenic	PICC-DNM3	AGGCCTGATTGTACCGTCTAC	338
1 1111 00	34	_region		CAGTGGAGTAAAGGACCATCTC	550

#### 다. 양비둘기와 집비둘기 간 잡종 1세대의 표현형 비교 및 순종 비율 테스트

양비둘기와 집비둘기의 잡종 표현형 및 생식적 격리, 유전적 변이 파악을 위 해 멸종위기종복원센터내의 사육장에서 양비둘기와 집비둘기 암·수 한 쌍을 각 사육장에 배치하였다. 총 개체수는 양비둘기 암컷 2, 숫컷 2 그리고 집비둘 기 암컷 2, 숫컷 2로 총 8개체가 짝을 이루어 총 4개의 사육장에 배치하였다. 이외 구례에서 자연적으로 발생한 잡종 쌍인 양비둘기 암컷과 집비둘기 수컷을 포획 후 멸종위기종복원센터로 이관하여 실험에 포함하였다. 잡종 쌍의 배치 및 실험은 21년 6월부터 12월 31일까지 실시되었다. 차후 생산되는 알의 한배 산란수와 번식 횟수, 번식일, 유조의 개체 깃털 표현형 확인, 암·수 차이에 의 한 자손 표현형의 차이를 확인하였다. 생산된 유조는 상완정맥에서 주사기를 이용하여 0.1ml 이하의 혈액을 채취하여 sexing 및 DNA 추출을 실시하였다.

순종 비율을 확인하기 위해 선별된 마커와 잡종 실험에 활용된 번식쌍과 생 산된 F1을 대상으로 마커를 테스트해 보았다. 양비둘기의 밴드가 나오면 1점, 밴드가 두 줄인 잡종의 밴드가 나오면 0.5점, 집비둘기의 밴드가 나오면 0점을 주어 모든 값을 합산한 후 마커의 개수를 나누어 % 값을 구하였다.

### 3. 멸종위기종 어류·양서파충류 유전자 연구

#### 가. 흰수마자 미토콘드리아 유전체 확보

본 연구에 이용한 흰수마자는 환경부 「야생생물 보호 및 관리에 관한 법률」에 의거하여 2020년 7월 낙동강 남강에서 족대를 이용해 포획을 수행하였다. 포획한 흰수마자는 마취제인 MS222 (Aqualife TMS, Syndel Laboratories, Ltd., Canada)에 침지시켜 마취한 후, 꼬리지느러미 일부를 멸균한 가위를 이용해 절단하여 99.9% 에탄올에 담아 실험실로 운반하였다. 마취한 흰수마자는 하천수에 옥시테트라사이클린(oxytetracycline) 100 ppm을 처리한 다음 약 30분간 약욕하여 다시 방류하였다.

실험실로 운반한 꼬리지느러미로부터 Asahida et al. (1996)의 TNES-Urea 버피를 사용하여 게놈 DNA를 추출하였다 그 이후 미토콘드리아 유전체는 Kim et al. (2012)의 방법에 따라 두 개의 영역으로 나뉘어 중복 PCR 증폭 반응을 수행한 다음, 25개의 프라이머를 사용하여 프라이머 워킹 방법으로 염기서열을 확보하였다. DNA 서열 분석 소프트웨어 인 Sequencher 5.0 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI)을 사용하여 contigs를 조합하였다. 낙동강에 서식하는 횐수마자의 미토콘드리아 유전체를 포함하여 Gobioninae 아과에 속하는 77 종의 미토콘드리아 유전체 서열을 GenBank 데이터베이스를 기준으로 비교 분석하여 단백질 코딩 영역과 리보솜 RNA (rRNA) 유전자에 주석을 달았다. tRNA 유전자는 tRNAscan-SE 1.21를 이용하여 확인하였다.

PCG (protein coding genes), rRNA (ribosomal RNA), tRNA (transfer RNA)를 포함한 모든 미토콘드리아 유전자는 분석을 위해 H-가닥으로 재배열하였다. 모든 PCG의 정확한 시작 및 중지 코돈 식별을 위해 MEGA-X 소프트웨어(Kumar et al., 2018) 내에 포함되어 있는 ClustalX 2.0 (Larkin et al., 2007)를 이용하였다. 이후 MEGA-X 소프트웨어를 이용해 동일속(genus Gobiobotia)에 포함되어 있는 모든 종들에 대한 염기서열 성분을 분석하였다. 염기성분편향을 추정하기 위해 금강 흰수마자의 미토콘드리아 유전자들의 비대칭성은 AT-skew = [A - T]/[G - C]/[G + C] (Perna and Kocher, 1995)의 공식을 이용해 계산하였다. 또한 MEGA-X 소프트웨어(Kumar et al. 2018)를 사용하여 금강 흰수마자 유사 유전체의 상대적 동의 코돈 사용(RSCU) 값을

- 19 -

계산했다. DnaSP v5를 사용하여 계산된 Gobiobotia속 4종의 중지 코돈을 제외한 13개 PCG의 Ka/Ks비율을 계산하였다(Librado and Rozas 2009).

이 후 분자 계통 분석을 위해 Inoue et al. (2005)에 따라 유전자 매트릭스를 4개로 분할하였다. 미토콘드리아 유전자 nad6을 제외한 12 개의 단백질 코딩 유전자의 서열은 세 번째 코돈 위치를 제외한 코돈 위치(즉, 코돈 삼중 체의 첫 번째 및 두 번째 위치)에 따라 분할하였고, 2 개의 rRNA 및 22 개의 tRNA 유전자에서 명확하게 정렬 된 영역은 Gblocks Server를 사용하여 분기 영역을 제거한 후 획득하였다. 단백질 코딩 유전자, rRNA 및 tRNA 유전자의 첫 번째 및 두 번째 코돈 위치에 대한 3617, 3617, 2527 및 1498 bp의 뉴클레오티드 매트릭스를 각각 얻은 후 fasta형식으로 저장하였다.

분자계통학적 분석은 RAxML 7.0.4 (Stamatakis 2006; Stamatakis et al. 2008)을 이용하여 maximum likelihood (ML) 분석을 수행하였으며, 외그룹으로 L. waleckii 및 Tribolodon hakonensis를 사용하였다. RAxML 검색은 기본 maximum parsimony 트리 대신 단일 프로그램 실행 ("-f a"옵션)에서 최고 점수의 ML 트리를 기준하였고, 최고 점수로 산출된 GTRGAMMAI 모델을 이용하였다. 통계 분석은 1,000번의 반복을 통한 부스트랩 값을 기준하였다.

#### 나. 금개구리 친자확인

우리 센터 내 증식중인 금개구리 부모 개체(27개체) 및 이 들의 자손인 F1 개체(119개체)의 유전시료와 방사지인 국립생태원 수생식물원 내 개체(46개체)들을 대상으로 멸균면봉을 30초에서 1분간 물린 뒤 구강세포를 채취하였고, DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 의거하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, USA)을 이용하여 10ng/ul로 농도보정을 한 뒤 PCR에 이용하였다.

본 연구에 이용한 microsatellite 마커는 국립생물자원관에서 제작한 '자생 생물자원의 유전자 다양성 연구(동물분야 - 3단계 3차년도)'내에 기재되어 있는 마커를 이용하였다(Hwang et al., 2017). 각 프라이머에 대한 정보는 표 9에 기입하였다.

1차로 마커의 증폭효율 분석을 위해 Bioneer PCR premix (Bioneer, Korea)을
이용해 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94°C 3분 이후 94°C 30초, 56°C 30초, 72°C 30초를 35회 반복한 다음 최종적으로 72°C 5분간 수행하였다. PCR 산물은 0.8% 아가로즈젤에 전기영동하여 확인하였다.

Multiplex-PCR마커의 증폭은 QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 매뉴얼에 의거하여 진행하였다. PCR을 완료한 산물은 3.0% 아가로즈젤을 이용하여 확인한 다음 genotyping을 위해 마크로젠에 GENESCAN을 의뢰해 분석하였다. 분석파일은 peak scanner 버전 1.0을 이용해 분석하였다.

표 9. 본 연구에 이용한 금개구리 microsatellite 프라이머 정보

Locus	Dye	SSR	Size (bp)	프라이머
aba1027	6 EAM	(474)	182 210	F GCACAAACTGTTGCTGCCTA
c1101027	0-FAM	$(AIA)_{15}$	165-210	R TCCGTCCAAAGCCTGATTAC
abo1055	6 EAM	$(\Lambda C)$	182 201	F TATCTGTTTGCAGCCACCTG
CII01055	0-1 ANI	$(AC)_{21}$	165-201	R GTCAGGTCCATTTAGAGCCG
cho1058	HEY	(GT).	222 256	F ACATCCTAACACCGGAGTGG
0101038	IILA	$(01)_{20}$	222-230	R CAGGACCATATCAACATGCAA
cho1066	HEY	$(\Lambda T C T)_{-}$	2/0 321	F TCTTGGTAGGCAGCCTCATT
C1101000	IILA		249-321	R CGCTAAAACACCTTTTGGGA
cho1081	HEX	$(\Delta G \Delta T)_{ij}$	138-202	F GCCATCCCTGTCCAATACAC
CHOTOOT	IILA		130-202	R CGTTCACCCCACTTCAGATT
cho1084	HEX	$(TAG)_{10}$	180-219	F CCCTGATCCCACTGCTGTAT
CHOIDO	IILA	(170)]8	100-217	R TGGAGAAGCTTCACAACGTC
cho1085	6-FAM	$(TC)_{27}$	229-263	F TGCACTTTAATGGAGTCCCA
CH01005	0-171111	$(1C)_{2}$	229-205	R ATGGTCACCGTTTGGTCAAT
cho1094	HEX	$(GATA)_{12}$	200-232	F GTTTCCTGGCAATACATGGG
CH01074	11L/X	(GIIII)]3	200-252	R GCTGGAGGTACTGGAACTGC
cho1113	HEX	$(GA)_{22}$	181_211	F TTGCAGAAAACTGGCTCAGA
chorris	IILA	$(UA)_{23}$	101-211	R CAATTGACTCCCTCCCATTG
cho1115	HEX	(TG) <sub>22</sub>	174_212	F ATCTGTGGACTGGGGGTCTTG
	IILA	(10)22	1/7-212	R ACAGAGGCTCCTCGTTCAAA
cho1110	6-EAM	$(AC)_{\alpha}$	249-283	F TTGACATTTTAACAGGGGAGTG
0101119	0-1 AM	(AC)21	279-203	R CCAGCCTATCATAACCAAGGA

#### 다. 수원청개구리 종판별 마커 개발

본 연구의 수원청개구리 시료는 충남 아산, 충북 충주, 경기 평택, 전북 익산 지역 등에 서식하는 개체를 채집하여 사용하였다. 채집 방법은 수원청개구리의 활동 시간대인 야간에 주 서식지인 논 일대를 걸어다니며 울음소리를 내는 개체들을 직접 포획하였다.

수원청개구리의 DNA 추출은 비 침습적 방법으로 개구리의 입에 멸균면봉 (Hanchang medic, Korea)을 약 30초에서 1분간 물린 뒤, 구강내세포를 확보하여 추출하였다. 본 방법은 Goldberg and Schwalbe (2003)을 참고하였다. DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Germany)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 의거하여 게놈 DNA를 추출하였다.

효과적인 핵 유전자 마커를 생산할 수 있는 영역을 탐색하기 위해 핵 유전체 중에서 Ras Homolog Family Member D (RHOD), E3 ubiquitin protein ligase 1 (SIAH), tyrosinase (Tyr), proopiomelanocortin (POMC) V(D)J recombination-activating protein 1 (RAG1)과 transcriptional regulator Myc-like (c-myc) 유전자의 두 번째 엑손 영역을 PCR 증폭할 수 있는 프라이머를 디자인하기 위해 GenBank에서 이용 가능한 청개구리류의 유전정보를 내려받았다. 유전자 정보는 BioEdit 7.2 (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)의 ClustalW (Thompson et al., 1997)를 이용하여 다중서열정렬을 수행한 후, 보존성이 높은 부분의 염기서열 정보를 바탕으로 프라이머를 제작하였다(표 10).

표	10.	핵	DNA	증폭을	위해	사용된	프라이	머	
---	-----	---	-----	-----	----	-----	-----	---	--

Primers	Sequences (5'-3')	Total bases	Expected amplicon sizes (bp)
RHOD F	ACCATGAACGGAACAGAAGGYCC	23	330
RHOD R	GTAGCGAAGAARCCTTCAAMGTA	23	
SIAH F	TCGAGTGCCCCGTGTGYTTYGAYTA	25	380
SIAH R	GGRAGRTTAATGTCKGTGGCAA	22	
TYR F	GGCAGAGGAWCRTGCCAAGATGT	23	528
TYR R	GMAGGRAATGGTGAAGTTCTCA	22	
RAG1 F	AGYGAGAAGCATGGCTGTGG	21	913
RAG1 R	TTGCCTTCACTBGCCCARGC	20	
POMC F	GAGTCACCRGTGTTYCCHGG	20	482
POMC R	CTTTKGGTGGATCKGCCCATCGRAA	25	

C-MYC F	CCCACACGGTCBCCYAGC	18	358
C-MYC R	AGGGTCHATGCATTCAGVACT	21	
* Y=C or T;	R=A or G; V= G or A or C; B=C or G	or T, M=A or C,	W=A or T, K=G or T

PCR 반응은 20 µl 용적의 AccuPower PCR Premix Kit (Bioneer, 대한민국)에 청개구리와 수원청개구리 각 1개체씩의 게놈 DNA 100 ng과 5 µM의 각 프라이머 1 µl를 넣은 후, 94℃에서 3분 간 초기 열변성 반응을 시킨 후, 94℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 45초의 순환 반응을 38회 실시하였다. 최종적으로 72℃ 5분간의 신장 반응을 시킨 후, PCR 반응의 성공 여부를 GelRed (Invitrogen, USA)로 염색된 2% 아가로즈 겔에서 전기영동하여 확인하였다. 증폭된 PCR 산물을 AccuPrep PCR Purification Kit (Bioneer, 대한민국)를 이용하여 정제한 후, Macrogen Inc.(Macrogen, 대한민국)에서 시퀀싱 분석을 수행하였다. 결정된 염기서열은 Sequencher (Gene Codes Corporation, USA)을 사용하여 편집하고 각

올해 포획한 수원청개구리 및 청개구리 총 30개체를 대상으로 위와 동일한 과정으로 게놈 DNA를 추출하였으며, 핵 유전체 중에서 E3 ubiquitin protein ligase 1 (SIAH), tyrosinase (Tyr), proopiomelanocortin (POMC), V(D)J recombination-activating protein 1 (RAG1)과 transcriptional regulator Myc-like (c-myc) 유전자를 대상으로 청개구리와 수원청개구리의 핵 DNA 영역의 증폭 성공률 및 증폭효율을 높이기 위하여 확보된 청개구리와 수원청개구리의 핵 DNA 영역 염기서열들을 대상으로 프라이머들을 새롭게 제작하였다(표 11).

유전자별로 다중서열정렬을 실시하여 온전한 서열 정보를 얻었다.

Primers	Sequences (5'-3')	Total bases
SIAH F	TGGCAAGAAAAACAATATCCTCTC	24
SIAH R	ATGTCAGAGCGGACATCTTGT	21
TYR F	TGTGCCAGGGCGCGAAG	17
TYR R	TTAGTGGGATTGACGATMGRGAAA	24
RAG1 F	AACCTGTGTGTTTAATGCTGGC	22
RAG1 R	TCGGGCAAAGTTTCCATTCATTC	23
POMC F	AACGTCCGRAAGTACGTCATGA	22
POMC R	CCATCGRAAGTGATGCATTTTGTA	24

표 11. 핵 DNA 증폭을 위해 새로 제작된 프라이머

C MYC P T A CTCCC A TTCACCA TMCPC 20	CTGA 23
C-MIC K TAUTUUUATTUACUATMUKU 20	RG 20

\* R=A or G, M=A or C

제작한 프라이머의 유효성 확인을 위해 PCR 반응을 Platinum Hot Start PCR Master Mix 2X (Invitrogen, USA) 5 µl와 게놈 DNA 100 ng, 5 µM의 각 프라이머 1 µl를 넣은 후, 94℃에서 2분 간 초기 열변성 반응을 시킨 후, 94℃ 30초, 56℃ 30초, 72℃ 30초의 순환 반응을 38회 실시하였다. 최종적으로 72℃ 1분간의 신장 반응을 시킨 후, PCR 반응의 성공 여부를 GelRed (Invitrogen, USA)로 염색된 2% 아가로즈 겔에서 전기영동하여 확인하였다.

올해 포획한 수원청개구리 및 청개구리 총 57개체를 대상으로 위와 동일한 과정으로 게놈 DNA를 추출하였으며, 미토콘드리아 12S ribosomal DNA (rDNA) 영역을 대상으로 PCR 증폭할 수 있는 프라이머들을 새롭게 제작하였다(표 12). 프라이머를 디자인하기 위해 GenBank에서 이용 가능한 청개구리류의 유전정보를 내려받았다. 유전자 정보는 BioEdit 7.2.5 (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html)의 ClustalW (Thompson et al., 1997)를 이용하여 다중서열정렬을 수행한 후, 보존성이 높은 부분의 염기서열 정보를 바탕으로 프라이머를 제작하였다.

미토콘드리아 12S rDNA 영역을 대상으로 HRM qPCR 증폭반응을 수행하기 위해 20 µl 용적의 MeltDoctorTM HRM Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에 게놈 DNA 20 ng과 5 µM의 각 프라이머 1 µl를 넣은 후, 초기변성반응을 95℃에서 10분간 1회 실시하였고 이후 변성반응 95℃에서 15초, 결합/연장반응 60℃에서 1분 총 40회 실시하였다. Meltcurve 및 dissociation 단계에서는 변성반응을 95℃에서 10초, 결합반응은 60℃에서 1분, high resolution melting은 95℃에서 15초, 결합반응은 60℃에서 15초로 HRM 분석을 수행하였다.

표 12. 미토콘드리아 DNA 증폭을 위해 사용된 프라이머

Primers	Sequences (5'-3')	Total bases
HYL-12S-0250f	GTTACACCACGAGGCTCA	18
HYL-12S-0343r	TGAGTTTCTTAAGAACAAGCG	21

수원청개구리와 청개구리의 잡종화 정도의 패턴을 확인하기 위해 베이지안 클러스터링 알고리즘(Bayesian clustering algorithm)을 이용하는 STRUCTURE 분석을 수행하였다. STRUCTURE v. 2.3.4. (Pritchard et al., 2000) 프로그램을 이용하였고, STRUCTURE Harvester (Earl and Vonholdt, 2012) 프로그램의 △K method을 사용하여 최적의 K 값을 결정하였다.

## 라. 여울마자 분변을 이용한 메타바코딩

본 연구에 이용한 여울마자(Microphysogobio rapidus)는 환경부 「야생생물 보호 및 관리에 관한 법률」에 의거하여 2019년 10월 낙동강 남강에서 투망을 이용해 10개체 포획을 수행하였다. 그리고 비교군으로 돌마자 역시 동일한 방법으로 10개체를 포획하였다. 포획한 여울마자 및 돌마자는 각각 한 마리씩 생수를 이용해 세척 한 다음 생수가 들어 있는 100 ml 멸균통에 담아 약 20분간 보관하여 배변을 유도하였다. 이 후 포획한 여울마자와 돌마자는 포획지역에 다시 방류하였다. 배변을 완료한 물은 cellulose nitrate 필터를 이용해 모두 거른 다음 실리카겔이 들어있는 지퍼백에 담아 실험실로 운반하였다.

Total DNA는 각 필터를 가위로 잘게 잘라 PowerSoil® DNA Isolation Kit (Cat. No. 12888, Qiagen, Düsseldorf, Germany)의 매뉴얼에 의거하여 추출하였다. 차세대염기서열(Next generation sequencing) 분석을 위해 Illumina 18S Metagenomic Sequencing Library 프로토콜 (San Diego, CA, USA)의 매뉴얼에 의거해 준비하였다. 라이브러리의 양, 품질, 무결성 검증을 위해 PicoGreen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 및 VICTOR Nivo Multimode Microplate Reader (PerkinElmer, Akron, OH, USA)를 이용하여 측정하였다. 분변 내 다양한 생물 분석을 위해 18S rRNA 유전자를 선택하였으며, 18S V9 프라이머(표 13)를 사용하여 각 샘플별 증폭을 수행하였다.

표 13. 분변 분석을 위해 사용된 프라이머

Primers	Sequences (5'-3')
18S V9 F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCC TGCCHTTTGTACACAC
18S V9 R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCC TTCYGCAGGTTCACCTAC

PCR 조건은 추출한 total DNA를 18S V9 프라이머로 95°C에서 3분간 pre-denaturing을 수행한 다음 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초로 25사이클을 반복하였다. 이후 final extension은 72°C에서 5분간 수행하였다. 다음으로 인덱스 PCR은 95°C에서 3분간 pre-denaturing을 수행한 다음 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초로 8사이클을 반복한 다음 final extension으로 72°C에서 3분간 수행하였다. 최종 산물을 대상으로 표준화 한 다음 종 별로 풀링을 하였으며, 이 때 PicoGreen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하였다. 또한 제작한 라이브러리의 크기는 LabChip GX HT DNA High Sensitivity Kit (PerkinElmer, Akron, OH, USA)를 사용하여 확인하였다.

구축한 라이브러리의 NGS 분석은 MiSeq ™ 플랫폼 (Illumina, San Diego, CA, USA)을 사용하여 진행하였다(Macrogen Inc., 서울, 대한민국). 바이오인포 분석 으로는 CD-HIT-OTU 프로그램을 이용해 트리밍 한 다음 rDnaTools를 사용하여 키메라 서열을 제거하였다. 결합은 FLASH (Fast Length Adjustment of SHort reads) 버전 1.2.11를 사용하였으며, 이 후 OTU결정 및 클러스트링은 Qiime 버 전 1.9와 UCLUST를 사용하였으며, 97% cut-off를 기준으로 도출하였다. OTU 염기서열의 특성 분석을 위해 BLASTn과 UCLUST를 이용하여 주석을 달고, 유 사종의 분류학적 위치를 결정하였다.

## 4. 참달팽이와 소똥구리 미토콘드리아 유전체 연구

참달팽이는 멸종위기종 II 급으로 전 세계에서 유일하게 전남 신안군 홍도에만 서식하는 우리나라 고유종이다. 참달팽이는 저차소비자로서 주로 식물을 섭식하고, 일부는 잡식성으로 동물의 사체를 분해하는 역할을 하며, 다양한 생물에 훌륭한 먹이원으로 이용되는 등 생태학적으로 중요한 종임에도 불구하고 이에 대한 연구는 전무한 실정이다. 이동성이 적어 그 지역의 환경상태를 대변할 수 있으며, 살충제 또는 제초제 성분에 취약하여, 환경 친화적으로 재배된 농작물의 생물학적 지표로서의 잠재력을 보유하고 있는 종이다. 멸종위기종인 참달팽이의 보전과 생물자원으로서의 고유종의 인식을 위한 노력에 선행되어야 할 것은 보전 및 복원하고자 하는 멸종위기종의 정확한 유전정보를 확보하는 것이다. 본 연구에서는 참달팽이를 대상으로 유전자원 확보를 위하여 미토콘드리아 유전체 염기서열을 결정하는 것을 목표로 하였다. 염기서열을 확보 후 타 분류군의 기존자료와 비교 분석하여 미토콘드리아 유전체의 특성을 도출하였고, 인근 분류군과의 계통학적유연관계를 규명하였다.

소똥구리는 제주도를 포함한 한반도 전역에 서식한 것으로 기록되어 있다(Paik, 1976; Kim, 2012). Paik(1976)에 따르면 적어도 1964년까지는 우리나라의 소똥구리류 중 우점종이었던 것으로 보이며, 1970년 이후 공식적으로 발견된 개체가 없는 것으로 보고되어 현재 지역절멸종(RE, regionally extinct)으로 판단된다(환경부, 2013). 소똥구리는 생태계 물질순환에 기여하고 분변 내에 해충의 증식을 억제하는 역할을 수행하기 때문에 토양생태계 건강성을 상징하는 곤충이며, 예부터 우리에게 정서적으로도 친숙한 곤충이기 때문에 복원의 가치가 높은 종이다. 따라서 멸종위기종인 소똥구리의 유전자원 확보를 위하여 NGS 기반 미토콘드리아 유전체 염기서열을 확보하고, 인근 분류군과 비교·분석하여 미토콘드리아 유전체 특성을 도출하고자 하였다.

#### 가. DNA 추출 및 QC 결과

(1) 참달팽이 개체 조직 일부를 사용하여 DNA를 추출(QIAGEN, DNeasy Blood & Tissue kit 사용)하였고, 그 결과는 다음과 같다(그림 4).



그림 4. 참달팽이 개체로부터 DNA 추출 확인 결과

- (2) 총 5개 개체 DNA 중에서 가장 퀄리티가 좋은 "1-1-2"번 시료를 선발하여 다음 NGS library 제작에 사용하였다.
- (3) 소똥구리 개체 조직 일부를 사용하여 DNA를 추출(QIAGEN, DNeasy Blood & Tissue kit 사용)하였고, 그 결과는 다음과 같다(그림 5).
- (4) 1차 추출은 허벅지 근육 용해액으로부터 추출(D-F), 2차 추출은 허벅지 전체 파쇄 후 용해액으로부터 추출(D-F-2)한 DNA를 NGS library 제작에 사용하였다.



분류	Lane	Sample	정보	Name	Conc. (ng/ul)	Vol. (ul)	Total
	1	a	수컷	O-M	6.48		194ng
쇠똥구리	2	Omnogobi	암컷	O-F	2.749	30	82ng
(1차 추출)	3		수컷	D-M	16.98		509ng
	4	Dornogobi	암컷	D-F	17.62		528ng
(2차 추출)	5	Dornogobi	암컷	D-F-2	23.0	50	1150ng

그림 5. 소똥구리 개체로부터 DNA 추출 확인 결과

## 나. NGS용 whole genome shotgun (WGS) library 제작

- (1) 선발된 DNA lug을 사용하여 550bp 사이즈의 illumina용 library를<br/>제작하였다.
- (2) Illumina library는 QIAGEN 사의 QIAseq FX single cell DNA library 매뉴얼에 따라 제작하였다.
- (3) 제작된 library는 Agilent사의 Tape Station HS 5000 screen tape을 사용하여
   사이즈를 확인하고, Light cycle qPCR 방법으로 농도를 측정하였다.
- (4) 이상의 방법으로 확인한 library QC 결과는 다음과 같다(그림 6, 7).



그림 6. 참달팽이 NGS WGS library QC 결과

※ Tape Station HS D5000 Screen Tape & Light Cycle qPCR 사용



그림 7. 소똥구리 NGS WGS library QC 결과

## 다. Illumina sequencing 및 data clean up 결과

- (1) 상기의 library를 사용하여 Illumina 사의 HiseqX10을 사용하여 150PE로 샘플
   당 각 5G씩 sequencing을 진행하였다.
- (2) Sequencing 에는 HiSeq X HD Reagent Kit v2.5. 방법을 사용하여 진행 하였으며, 그 결과 얻어진 raw data 정보는 아래와 같다(표 14, 15).

#### 표 14. 참달팽이 NGS raw data 생산 정보

	Sample ID	Total read bases (bp)	Total reads	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
	1-1-2	44,770,690	6,760,374,190	41.97	58.03	96.51	93.11
•	Sample ID :Sample nam Total read bases :Total Total reads :Total numl o the sum of read land GC(%) :GC content. AT(%) :AT content.	ne. number of bases sequenced. ber of reads. For Illumina pair I read 2.	ed-end sequencing	, this valu	e refers t	90	
• /	Q20(%) :Ratio of bases Q30(%) :Ratio of bases	that have phred quality score that have phred quality score	ofover 20. ofover 30.				

## 표 15. 소똥구리 NGS raw data 생산 정보

Sample ID	Total read bases (bp)	Total reads	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
D-F	7,404,564,652	49,036,852	49.24	50.76	96.65	92.76
D-F-2	6,306,244,408	41,763,208	52.23	47.77	92.17	85.45

· Sample ID : Sample name.

· Total read bases : Total number of bases sequenced.

Total reads : Total number of reads. For Illumina paired-end sequencing, this value refers t
o the sum of read 1and read 2.

· GC(%) :GC content.

· AT(%):AT content.

+ Q20(%) :Ratio of bases that have phred quality score of over 20.

 $\cdot$  Q30(%) :Ratio of bases that have phred quality score of over 30.

(3) High quality read data를 얻기 위해 TrimGalore v0.6.1을 사용해 low quality(Q30 미만) 서열과 sequence adapter의 제거를 진행 하였고, 그 결과는 다음과 같다(표 16, 17).

#### 표 16. 참달팽이 quality trim 후 결과

112	Commis ID	Raw data		Trimed data (Q30)			
지표	Sample ID	#Reads	Read bases (bp)	#Reads	Read bases (bp)	(%)	
참달팽이	1-1-2	44,770,690	6,760,374,190	44,141,627	5,961,123,784	88.2	

표 17. 소똥구리 quality trim 후 결과

Cample ID	시퀀싱 ID	R	aw data	Trimed data (Q30)				
Sample ID		#Reads	Read bases (bp)	#Reads	Read bases (bp)	(%)		
	D-F	49,036,852	7,404,564,652	47,837,858	6,854,525,050	92.6		
D-F	D-F-2	41,763,208	6,306,244,408	41,331,795	5,833,092,145	92.5		
	sum	90,800,060	13,710,809,060	89,169,653	12,687,617,195	92.5		

(4) 위에서 얻어진 high quality read 중에서 미토콘드리아 서열만 분리하기 위해 deconseq v0.4.3 을 사용하여 미토콘드리아 DB에 BWA방식으로 align을 진행하였다. 그 결과 얻어진 미토콘드리아 서열은 다음과 같다(표 18, 19).

표 18. 확보된 참달팽이 미토콘드리아 서열

112	Commis ID	미토콘드리아 서열 (Coverage≥40%, Identity≥70%)						
시묘	Sample ID	#Reads	Read bases (bp)	(%)				
참달팽이	1-1-2	11,827	1,641,372	0.028				

표 19. 확보된 소똥구리 미토콘드리아 서열

Cample ID		미토콘드리아 서열 (Coverage≥40%, Identity≥70%)							
Sample ID	시전 3 10	#Reads	Read bases (bp)	(%)					
	D-F	1,395	158,416	0.002					
D-F	D-F-2	9,144	1,322,056	0.023					
	sum	10,539	1,480,472	0.012					

## 다. 미토콘드리아 서열 분석 결과

(1) 근연종 미토콘드리아 서열을 탐색하여 reference를 선발하였고, 최종 reference (KU237291.1) 서열에 read 서열을 맵핑(sMapper v2.8 사용) 한 결과는 다음과 같다(표 20). 소똥구리는 결과가 좋지 않아서 3개 조건으로 분석을 진행하였다(표 21~23).

표 20. 참달팽이 reference mapping 결과

Sample ID	Reference ID	Mapped Reads	Mapped Reads(%)	Coverage (%)	Description	Contig 수
1-1-2	KU237291.1	11,751	0.00%	100.00%	UNVERIFIED: Fruticicola koreana mitochondrion sequence	1

	표 21.	소똥구리	reference	mapping	결과(Identity	70%.	Coverage	40%)
--	-------	------	-----------	---------	-------------	------	----------	------

Sample ID	Reference ID	Reference Len (bp)	Mapped Reads	Coverage (%)	Description	#Contig	Contig Lne (bp)	평균 Contig 길이	Remarks	
	MG253030.1	15,457	684	46.65%	Copris tripartitus mitochondrion	44	7,164	162.8		
D-F	NC_089689.1	14,802	571	49.12%	Dichotomius schiffler mitachondrion	38	7,260	191,1	전체 Read 맵핑	
	KU 739465.1	15,554	347	46.18%	Coprophanaeus sp. BMNH679884 mitochondrion, partial genom	38	7,175	188.8		
	MG253030.1	15,457	105	37,45%	Copris tripartitus mitochondrion	29	5,728	197.5	미토콘드리아 Read	
	NC_089689.1	14,802	87	49.12%	Dichotomius schiffleri mitochondrion	29	6004	207.0	맵핑	

표 22. 소똥구리 reference mapping 결과(Identity 60%, Coverage 20%)

맵핑 옵션 ( Id	entity ≥ 60%, Co	werage ≥ 20%	9						
Sample ID	Reference ID	Reference Len (bp)	Mapped Reads	Coverage (%)	Description	#Contig	Contig Lne (bp)	평균 Contig 길이	Remarks
DE	MG253030.1	15,457	190	45.16%	Copris tripartitus mitochondrion, complete genome	36	6,925	192.4	미토콘드리아 Read
U-r	NC_089689.1	14,802	223	51.53%	Dichotomius schiffleri mitochondrion, complete genome	35	7,626	217.9	법평

표 23. 소똥구리 reference mapping 결과(Identity 50%, Coverage 10%)

Sample ID	Reference ID	Reference Len (bp)	Mapped Reads	Coverage (%)	Description	#Contig	Contig Lne (bp)	평균 Contig 길이	Remarks	
0.5	MG253030.1	15,457	35,929	81.20%	Copris tripartitus mitochondrion, complete genome	101	12,426	123.0	전제 Read	
U+F	NC_089689.1	14802	29,234	81,63%	Dichotomius schiffler mitochondron, complete genome	88	12,026	136.7	믭픵	

(2) 상기의 방법으로 확보된 mapping 서열의 error를 보정하기 위해 proovread
 v2.14.0 로 errorcorrection을 진행 하여 최종 서열을 확보하였고, Prokka v 1.10
 와 BLAST 프로그램을 사용하여 CDS 및 RNA 서열을 예측하였다(표 24).

표 24. 미토콘드리아 완전장 서열 분석결과

74	참달팽이							
TE	Ref. KU237291.1	1-1-2						
contigs	1	1						
sequence	GTGCGTTGATTCTTTTCCACAAATCATAAAGATATTGGA	GTGCGTTGATTCTTTTCCACAAATCATA						
bases	13,979	13,986						
CDS	13	13						
tRNA	21	22						
rRNA	2	2						

(3) 소똥구리는 맵핑 분석 결과 근연종 reference 서열을 사용하는 분석

방법으로는 완전장 확보가 어려운 관계로, reference 탐색을 위해 일부 서열을 PCR 로 증폭하여 sanger sequencing을 실시하였다.

(4) 증폭된 산물로부터 확보된 서열은 약 592bp이며, NCBI BLAST 결과 높은 identity를 가지는 reference 종의 확인이 불가능하였다(표 25).

표 25. 소똥구리 미토콘드리아 유전자에서 증폭된 산물로부터 확보된 서열의 BLAST 결과

	select all 100 sequences selected	GenBank	Graphics		Distance tree of results			MSA Viewer	
	Description	Sicientific Name	Max	Total	Guery	value	Per	Acc. Lon	Accession
	Coprochanaous so BMNH579884 milechandrian partial genome	Concentananuo se BMNH679884	795	795	99%	0.0	90,95%	16554	811739465.1
	Dichetomise schiffen mitochendrion complete genome	Dichotomius schiffleti	719	219	100%	0.0	88.61%	14802	NC_039689.1
	Abacus affinis youch at BMMH11425232 mitochandrion, complete genome	Atoxicsia affinita	005	665	2875	0.0	87.3116	16842	BT876002.1
	Abacus allina minichandriso somethe ganame	Atcesses affinite	665	665	98%	0.0	07.31%	16844	KTZ00530 1
	Trox so. TROQ1 mitochondrion, partial genome	Irox sm. TROG1	660	660	100%	0.0	86.78%	11622	JX412734.1
	Popilia mutans mitochondrips, complete panome	Popillia mutana	632	632	59%	10-176	86.27%	16192	NC_056126.1
	Onitis faicatus mitechondrion partial genome	Onitis falcatus	630	630	99%	de-176	86.10%	15763	KU739466 1
	Ocyana aphthalmious mitochondrion partial geneme	Covers epithelmicus	617	617	99%	3e-172	85.69%	16087	KX987323.1
	Techines subterraneous mitechondrion, partial genome	Tachinus subterraneus	614	614	96%	40-171	85 7675	10673	KX087351.1
	Onthoshauss pulks mitochendrion partial genome	Cothenbergus, pulles	6.1.6	614	99%	44-171	85 57%	15287	8317,39496,1
	Mimela aptondens mitochondrion, complete genome	Informatia sistemutana	612	612	99%	10-170	85.55%	15148	342064554.1
	Ochthebius quedricollis voucher IBE «ESP» AN140 mitochendrion complete generee	Clothtebius guadricollis	612	612	94%	10-170	86.52%	16510	NC_052888.1
	Ontheshagus, hasmalasus, mitochondrion, partial, genome	Onthochague, tuematopus	608	698	9915	20-109	06.35%	15301	KL1732470.1
	Phalops and a mitochondrise, partial sensitie	Phalops ardea	606	606	100%	70-169	86.28%	16240	KU739473 1
	Onthophagus, gracilipes milliochondrian, partial panome	Onthonhadus stacilises	606	606	99%	7e-169	05.31%	15342	KU739465.5
	Aphodium fosters mitochondrion partial genome	Aphodius footens	60.1	601	98%	3e-167	05.31%	15907	KX087240.1
	Astenus konesaks mitochandrion, partial genome	Astemus Juonessius	601	601	100%	34-167	86.12%	17451	KT780626.1
	Aphedius Justens Isolate DML40 milochondrion	Aphodius fostens	603	601	28%	3e-167	85 31%	14032	MI862436.1
	Ochthebius so. IBE-ESP-AN77 voucher IBE-ESP-AN77 mitechandrian complete genom	eOchthebius op IBE AN77	597	597	9.4%	40-166	86.36%	16477	MT022996.1
-	Ochthebiss notifis youcher IBE-ESP- AF122 mitechandrise, complete asnome	Ochthebias nobilis	692	592	96%	24-164	85.54%	16074	NC_052901.1

 (5) 확보된 592bp 서열로부터 BLAST 분석을 통해 contig를 2개 확인하였으며, 이를 다시 assemble하여 확인 한 결과 KU739465.1에서 query coverage 97.3%, identity 90.3%로 확인되었다(표 26).

표 26. 소똥구리 미토콘드리아 서열 확인을 위해 탐색된 contig assemble 결과

ID	Sequence	Len (bp)			
DF_pcr (1)	CCAGCATTATAAGATTTAATATTTTGATAATAAATTACT	592			
	↓ 전체 Contig 서 열에 BLAST				
	4				
ID	Sequence	Len (bp)			
NODE_9742 (2)	AGTTTCAATATTTGTATTATCAATAATATTATTAATTATT	802			
NODE_24911 (3)	TTTATATCATTTTTTAGAGCTGCTTATTCTTTATATTTAT	337			
	Assembly (① + ② + ③)				
	4				
ID	Sequence	Len (bp)		Query Cov	Per. Ident
Contig1	TTTATATCATTTTTTAGAGCTGCTTATTCTTTATATTTAT	1323	 KU739465.1	97.0%	90.3%

## 5. 멸종위기종 나도풍란 유전자 분석을 통한 원종 확인

나도풍란은 멸종위기 야생생물 1급 식물로서 전 세계적으로 중국, 일본, 대한민국에 분포한다. 우리나라에서는 제주도와 남해안 도서지역에서 자생한 기록이 있다. 나도풍란은 상록성 활엽수림의 바위나 나무줄기에 붙어서 자라는 착생란으로 고도 200m 이하에서 서식이 확인되며 생육 적정 온도는 15-25℃로 겨울철 기온이 5℃ 이하로 내려가지 않는 조건에서 생육하는 것으로 확인된다. 현재는 인위적인 채취에 의해 개체가 소실되어 최근 관찰 기록이 없어 야생에서 절멸로 추정된다. 따라서 나도풍란의 서식지내 복원을 위해 대량증식 기술 개발 및 복원 연구가 수행되어 제주도 일부지역에 인공증식하여 복원한 개체들이 존재한다.

나도풍란은 잎과 꽃이 아름다워 관상가치가 높아 일본, 대만 등에서 원예종으로 유입되어 대엽풍란으로 유통되고 있으며, 국내의 과거 주요 자생지는 도서지역으로 지리적으로 격리된 지역에 분포한다. 따라서 지리적 차이에 따른 유전적인 차이가 예상되며, 복원을 위해 증식한 개체로 인한 유전적 교란 예방을 위해 지리적인 차이를 명확히 확인 할 수 있는 마커 개발 등의 유전학적 연구가 요구된다.

#### 가. 연구내용

국내 증식 복원 개체와 원예상 유통 개체의 유전자 분리 후, 바코드유전자(MatK, ITS, TmH-psbA) 염기서열 비교 분석을 통한 유전 정보 확보

나. 연구방법

(1) 재료 및 DNA 추출

본 연구에 사용된 나도풍란은 4개체가 이용되었으며, 원예종(안동), 거제(농업기술원), 국립수목원에서 복원한 제주(비자림), 영양(국립생태원 멸종위기종복원센터)에서 재식중인 개체를 이용하였다(그림8). 각각의 개체에서 신선한 잎을 채취하여 Exgene Plant SV(GeneAll)를 이용하여 나도풍란 total DNA를 분리하였다.

- 35 -



(2) PCR 반응 조건 확인

분리한 DNA 1 ul를 BioFACT 2X Lamp Taq PCR 반응액에 첨가하였다. 반응 조건은 표1의 정보를 이용하여 증폭하였다. 바코드유전자 증폭 프라이머는 표2의 염기서열 정보를 사용하여 증폭하였다. 증폭 후 eco-dye로 DNA를 염색하여 아가로스 전기영동 실험으로 증폭된 유전자를 확인하였다.

표 25. PCR 반응 조건

Genes	Primer	Predenaturation	Final extension			
MatK	MatK_390F/MatK_1326R	94°C (3 min)	94°C (1 min)	57°C (30 sec)	72°C (45 sec)	72°C (10 min)
ITS	ITS_17SE/ITS_26SE	94°C (3 min)	94°C (1 min)	60°C (30 sec)	72°C (45 sec)	72°C (10 min)
trnH-psbA	psbA/trnH(GUG)	94°C (3 min)	94°C (1 min)	54°C (30 sec)	72°C (45 sec)	72°C (10 min)

#### 표 26. 바코드 유전자 증폭 프라이머 정보

Genes	Primer	Sequences
MatK	MatK_390F	5'- CGATCTATTCATTCAATATTTC
	MatK_1326R	5'- TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT
ITS	ITS_17SE	5'- ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG
	ITS_26SE	5'- TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC
trnH-psbA	psbA	5'- CGAAGCTCCATCTACAAATGG
	trnH(GUG)	5'- ACTGCCTTGATCCACTTGGC

(3) 나도풍란 유전자 염기서열 분석

나도풍란 유전자의 DNA 염기 서열과 NCBI에 등록된 국내 나도풍란 및 일본 대엽풍란 염기서열 기준으로 alignment를 작성하였고, 염기서열의 변화를 Blo-Edit 프로그램을 이용하여 분석하였다

# Ⅲ. 연구 결과 및 고찰

## 1. 수달 개체식별을 위한 유전자 마커 표준화

#### 가. 수달 개체식별을 위한 초위성체 유전자 분석

(1) 초위성체 마커 선별을 위한 유전자 증폭 효율 검증

수달 초위성체 유전자 04OT계열, Lut계열, RIO계열 등 총 41개의 프라이머의 유전자 증폭 효율을 검증한 결과 04OT02, 04, 07, 17, 22, Lut435, 453, 457, 701, 717, 733, 782, 833 및 RIO\_03, 04, 08, 10 총 17개의 프라이머가 반응이 잘 일어난 것을 확인하였다(그림9). RIO계열의 경우 반응이 일어나지 않거나, smear 현상이 확인되었다. 이는 국내 서식하는 수달(Lutra lutra)의 근연종인 북아메리카 수달(Lontra canadensis)에서 개발된 프라이머로 국내 서식하는 수달에 적용하기는 부적절하다고 판단된다.



그림 9. 수달 초위성체 유전자 증폭 결과(M: 100bp DNA Ladder marker)

(2) 초위성체 마커 다중유전자 증폭(Multiplex-PCR) 조건 확립

현재 개체식별을 위해서는 최소 7개의 초위성체 마커를 각각 분석해야 되는 번거로움이 있다. 분석 효율을 높일 수 있는 다중유전자 증폭 조건을 확립하기 위해 실험을 수행하였다.

위의 결과에서 유전자 증폭이 확인된 16개의 초위성체 마커와 2개의 성판별을 위한 마커를 증폭 크기를 고려하여 배열한 뒤 네 개의 다중 유전자 증폭 세트를 구성하여 유전자 증폭 효율 및 증폭산물 크기를 확인하였다(그림 10). 그 후 증폭 효율에 따라 프라이머 농도를 조절하고 혼합한 뒤 PCR 조건(1)을 이용해 PCR을 수행했지만 초위성체 마커의 증폭이 확인되지 않았다(그림 11). 다중 유전자 증폭 조건을 확립하기 위해 표 3의 조건(1)-(3)을 이용해 PCR을 다시 수행했지만 초위성체 마커의 증폭이 확인되지 않았다(그림 12).



그림 10. 수달 초위성체 마커 다중유전자 증폭 세트 구성

(M: 100bp DNA Ladder marker)



그림 11. 수달 초위성체 마커 다중유전자 증폭 결과(PCR 조건(1))

(M: 100bp DNA Ladder marker)



그림 12. 수달 초위성체 마커 다중유전자 세트 1 증폭 결과(PCR 조건(1)-(3)) (M: 100bp DNA Ladder marker)

기존에 구성한 초위성체 마커 다중유전자 증폭 세트에서는 유전자 증폭이 확인되지 않아 두 개의 초위성체 마커 다중유전자 증폭 방법을 고안하였다. 세트를 구성했던 마커 중 가장 사이즈가 작은 마커에 다른 사이즈의 마커들을 하나씩 혼합하여 실험을 수행하였다. 그 결과, Lut453 또는 Lut604 마커에 다른 마커들을 혼합했을 때는 Lut453 또는 Lut604 마커의 유전자 증폭만 확인되었고 Lut717에 다른 마커들을 혼합했을 때는 Lut717 및 다른 마커들의 증폭이 모두 확인되지 않았다. 이와는 다르게 040T17 마커와 040T04, Lut701, Lut715, RIO\_16, Lut615, RIO\_04 유전자 마커를 혼합하였을 때 두개의 마커의 증폭이 모두 확인되었다(그림 13).



그림 13. 수달 초위성체 마커 다중유전자 증폭(2개) 결과

(M: 100bp DNA Ladder marker)

그림 13의 결과를 토대로, 세트를 구성했던 마커 중 가장 사이즈가 작은 마커에 다른 사이즈의 마커들을 두개씩 혼합하여 총 세 개의 초위성체 마커 다중유전자 증폭 방법을 고안하였다. 그 결과, Lut453 마커와 Lut833·Lut782·Lut818를 혼합하고 다른 마커들을 혼합했을 때 세 개의 초위성체 마커 다중유전자 증폭이 확인됐다. 하지만, 다른 마커들 경우에는 1개 혹은 2개 초위성체 마커의 증폭만 확인되었다(그림 14).

세 개의 초위성체 마커의 증폭이 모두 확인된 프라이머에 형광물질을 부착한 후 유전자형 분석을 통해 최종적으로 초위성체 다중유전자 증폭 세트를 구성·표준화하여 향후 실험에 활용할 계획이다.



그림 14. 수달 초위성체 마커 다중유전자 증폭(3개) 결과

(M: 100bp DNA Ladder marker)



그림 14. 수달 초위성체 마커 다중유전자 증폭(3개) 결과(계속) (M: 100bp DNA Ladder marker)

## 2. 양비둘기 복원을 위한 유전자 활용 연구

#### 가. 국내 개체군 유전다양성 및 국내·외 개체군 간 유전적 차이 분석

(1) 국내 양비둘기 개체군의 유전적 다양성 파악

세 지역 중 haplotype diversity가 가장 높은 지역은 고흥으로 확인되었고, 가장 낮은 지역은 구례로 확인되었다 (표 27). Nucleotide diversity가 가장 높은 지역은 의령으로 확인되었고, 가장 낮은 지역은 동일하게 구례로 확인되었다. 국내 서식하는 양비둘기 전체의 nucleotide diversity는 0.00226 으로, haplotype diversity는 0.874로 확인되었다. 국내 집단 중 의령 집단은 집비둘기가 섞여 있는 것이 현장에서 자주 확인이 되었고 haplotype network 분석에서도 일부 양비둘기에서 잡종화가 확인 되어(그림 17) 의령 집단의 높은 유전 다양성은 잡종화와 역교배(back cross) 인해 증가되었을 가능성이 있다. 타 연구에서 진행된 멸종위기 비둘기류의 연구 보고에 의하면, 일본 흑비둘기(Japanese wood pigeon)의 haplotype diversity는 평균 0.7, nucleotide diversity는 0.0037(Seki et al, 2007), Red-headed Wood Pigeon의 haplotype diversity는 평균 0.12, nucleotide diversity는 0.001을 보여 유전 다양성이 매우 낮다고 보고하고 있다(Young and Allard 1997). 그에 비해 본 연구의 구례, 고흥, 의령 집단의 nucleotide diversity는 0.00025와 0.00022, 0.00054를 보여 특히 nucleotide diversity의 수치를 비교하면 타 멸종위기 비둘기류에 비해 현저하게 낮은 유전 다양성을 보이는 것으로 판단된다.

Region	n	$N_{ m haps}$	k	S	h	π
GH	9	7	3.833	13	0.917±0.092	0.00170
GR	18	8	2.346	11	0.752±0.103	0.00104
UR	24	11	7.500	43	$0.862 \pm 0.053$	0.00332
GH + GR + UR	51	20	5.104	55	0.874±0.031	0.00226

표 27. 국내 양비둘기 개체군의 유전자 다양성 분석 (Kim et al, 2022)

K= average number of nucleotide differences, S=number of polymorphic sites, h=haplotype diversity,  $\pi$ =nucleotide diversity (2) 양비둘기 국내·외 개체군간 유전적 차이 확인

국내 개체군과 몽골, 러시아 개체군과의 유전적 차이를 비교하기 위해 COI 구가을 확인한 결과, 국내 개체군은 몽골 개체군과 유전적 차이가 없는 것으로 나타났고, 러시아 개체군과도 차이가 없는 것으로 나타났다 (그림 15). 몽골개체군과 러시아 개체군은 유전적 차이가 있는 것으로 확인되었다 (그림 15). 멸종위기종의 복원과 종 유전 다양성을 높이기 위해서는 새로운 유전자의 도입 및 유전자 확산, 흐름이 중요한 역할을 한다. 예를 들어, 미국의 경우 멸종위기종의 복원 및 유전다양성을 증진하기 위해 one migrant per generation (OMPG)의 개념을 20세기 중반부터 고려하기 시작하였다 (Wright 1931; Slatkin 1987). OMPG는 고립된 개체군의 근교약세를 완화하고 유전다양성을 유지 및 증진하기 위해 개체군 한 세대에 한 개체 도입을 기본 이론으로 한다 (Wright 1931; Mills and Allendorf 1996; Wang 2004). 이 법칙은 최근에 특정 종의 개체군에 구체적인 도입 개체수를 제시하기까지 이르렀다 (Mills and Allendorf 1996; Wang 2004). 본 연구의 결과에서 한국 개체군과 러시아, 몽골 개체군의 유전적 차이를 보이지 않았고 개체군 유전 다양성이 낮은 것으로 확인되어 OMPG와 같은 새로운 개체의 인위적인 유입으로 근교약세 등 유전적 문제들의 해결을 모색할 필요가 있을 것으로 사료된다.



그림 15. 국외 개체군 간 Pairwise Fst 분석 (Kim et al, 2022)

(3) 양비둘기 국내 개체군간 유전적 차이 확인

국내 개체군간 유전적 거리를 분석한 결과, 의령, 고흥, 구례 개체군은 서로 간 유전적 차이가 없는 것으로 확인되었다(그림 16). 양비둘기 reference sequence(CR(ref))는 고흥과 의령 개체군과 매우 가까운 것으로 확인되었고, 구례 개체군과도 가까운 것으로 확인되었다(그림 16). 집비둘기 개체군과는 모든 개체군이 매우 거리가 먼 것으로 확인되었다(그림 16).

국내 개체군간 AMOVA 분석 결과, 국내 개체군간 variation은 6.88%로 매우 낮게 나타났으며, 개체군 안에서의 variation이 93.12%로 매우 높게 나타났다(표 28). 국내 양비둘기 개체군 및 개체의 종 및 순종 확인을 위해 양비둘기와 가장 근연종이 바위비둘기와 haplotype network 분석 결과, 구례와 고흥 개체군 모두 양비둘기 reference sequence (CR(ref))와 같은 그룹에 속하였고, 구례, 고흥, 의령 개체군은 매우 유사한 haplotype을 공유하는 것으로 확인되었다(그림 17). 의령 개체 중 2개체가 바위비둘기 그룹에 속하는 것을 확인하여, 의령 개체군의 일부는 잡종화의 위협에 처해 있는 것으로 확인 되었다(그림 17). 차후 잡종 개체 구별을 위한 마커의 개발이 시급한 것으로 판단된다.



그림 16. 국내 개체군 간 Pairwise Fst 분석 (Kim et al, 2022)

Source of variation	df	Sum of squares	Variance components	% variation	P-value	Fixation indices
CytB & Dloop						
Among populations	2	10.774	0.18314	6.88	0.02933	0.06881
Within populations	48	118.960	2.47833	93.12		
Total	51	139.734	2.66147			

표 28. 국내 개체군간 AMOVA 분석 (Kim et al, 2022)



그림 17. 양비둘기 개체군과 집비둘기 개체군 간의 haplotype network 분석(Kim et al, 2022)

## 나. 양비둘기 잡종 판별을 위한 마커개발

#### (1) WGS 데이터 분석

(가) 양비둘기와 집비둘기의 표준게놈 전장 유전체 서열 맵핑

양비둘기와 집비둘기 각 7개체의 Whole genome re-sequencing 데이터 생산 및 맵핑의 결과는 표 29와 같다. 각 샘플은 32.86 ~ 127.27 GB의 raw data를 생산하였으며, Quality score 30의 값은 85.42 ~ 90.87%로 나타났다. 각 개체의 시퀀싱된 전체 리드들 중에서 88.00% ~ 94.45%의 리드들이 8.61 ~ 45.67 read depth와 함께 맵핑되었다. 특히 맵핑된 리드들에 대한 지놈 커버리지 분석 시, 전체 데이터에 대해 99.20% ~ 99.93%의 커버리지를 보였다.

표 29. 비둘기과 두 종의 WGS 데이터 생산 및 맵핑 결과

	<b>T</b> ( )	<b>T</b> ( )	Total	Clean	$\geq$	Mapped	Avera	coverage
Sample	Total	Total	Bases	bases	Q30	reads	ge	1X rate
ID	Reads	Bases	(Gb)	(%)	(%)	(%)	Depth	(%)
Hill-pigeo n-IN3903	325,341 ,186	32,859,4 59,786	32.86	30,845,14 8,789 (93.87)	90.66	261,873, 223 (91.85)	24	99.48
Hill-pigeo n-IN3905	355,011 ,462	35,856,1 57,662	35.86	33,608,68 1,358 (93.73)	90.67	276,116, 716 (90.59)	25.29	99.50
Hill-pigeo n-IN3907	344,113 ,806	34,755,4 94,406	34.76	32,394,33 2,576 (93.21)	90.03	270,266, 666 (90.75)	24.75	99.49
Hill-pigeo n-IN3897	388,529 ,680	39,241,4 97,680	39.24	36,706,79 9,973 (93.54)	90.38	307,866, 339 (91.36)	28.22	99.51
Hill-pigeo n-IN3902	348,531 ,282	35,201,6 59,482	35.20	32,943,84 8,789 (93.59)	90.27	281,324, 540 (92.05)	25.78	99.49
Hill-pigeo n-IN3848	335,614 ,864	33,897,1 01,264	33.90	31,643,44 0,301 (93.35)	90.30	248,908, 138 (88.43)	22.78	99.46
Hill-pigeo n-SRS346 866	226,867 ,820	22,459,9 14,180	22.46	20,665,26 7,749 (92.01)	89.33	164,757, 170 (90.56)	14.62	99.25

Sample	Total	Total	Total	Clean	$\geq$	Mapped	Avera	coverage
Jampie	Doodo	Deces	Bases	bases	Q30	reads	ge	1X_rate
ID	Reaus	bases	(Gb)	(%)	(%)	(%)	Depth	(%)
Rock-pige on-IN3788	351,605 ,922	35,512,1 98,122	35.51	33,473,12 7,621 (94.26)	90.75	295,469, 081 (94.45)	27.13	99.68
Rock-pige on-SRS34 6884	177,625 ,518	15,986,2 96,620	15.99	14,963,53 6,957 (93.60)	92.25	131,798, 183 (90.02)	10.75	99.20
Rock-pige on-SRS34 6865	365,462 ,072	36,911,6 69,272	36.91	32,310,06 7,662 (87.53)	86.70	269,526, 200 (90.97)	24.4	99.63
Rock-pige on-SRS34 6899	124,255 ,874	11,183,0 28,660	11.18	10,441,88 8,935 (93.37)	92.66	99,093,7 72 (90.20)	8.07	98.74
Rock-pige on-SRS34 6873	160,289 ,452	14,426,0 50,680	14.43	12,613,80 7,349 (87.44)	85.42	124,883, 569 (91.25)	10	98.81
Rock-pige on-SRS34 6877	139,794 ,568	12,581,5 11,120	12.58	11,330,70 4,326 (90.06)	88.38	106,727, 310 (89.13)	8.61	98.61
Rock-pieg on-Cliv_1_0	1,618,8 48,510	127,271, 228,520	127.27	80,404,06 0,169 (63.18)	85.82	517,743, 459 (88.00)	45.67	99.93

(나) 양비둘기와 집비둘기 집단 내 게놈의 InDels 변이 추출 및 두 집단 간 Heterozygous 변이 추출

Genom Analysis Toolkit (GATK)을 이용하여 양비둘기와 집비둘기의 변이 분석 결과, 226,030 ~ 814,877의 InDels를 확인하였다 (표 30). 양비둘기 집단 내 homo는 573,905 ~ 451,230의 InDel이 확인되었고, 집비둘기 집단 내 homo는 278,226 ~ 27,384의 InDel이 확인되었다. 추출된 변이 정보는 Intron에 43.83%로 가장 많은 비율로 위치하였고 Intergenic이 24.13%, exon 영역은 2.69%로 확인되었다 (표 31, 그림 18). 최종적으로 양비둘기의 7개체와 집비둘기 7개체 내에서 homo를 보이고 두 집단 간 hetero를 보이는 InDel은 87,335개로 확인 되었다.

표	30.	양비둘기와	집비둘기	게놈의	InDels	변이	추출	결과
---	-----	-------	------	-----	--------	----	----	----

Sample ID	InDel				
Sample iD	Homo	Hetero	Subtotal		
Hill-pigeon-IN3903	573,905	231,756	805,661		
Hill-pigeon-IN3905	560,700	244,724	805,424		
Hill-pigeon-IN3907	551,728	241,624	793,352		
Hill-pigeon-IN3897	554,981	259,896	814,877		
Hill-pigeon-IN3902	571,252	235,040	806,292		
Hill-pigeon-IN3848	535,554	233,064	768,618		
Hill-pigeon-SRS346866	451,230	226,154	677,384		
Rock-pigeon-IN3788	278,226	430,118	708,344		
Rock-pigeon-SRS346884	264,744	183,556	448,300		
Rock-pigeon-SRS346865	283,893	198,898	482,791		
Rock-pigeon-SRS346899	230,743	77,117	307,860		
Rock-pigeon-SRS346873	253,676	90,466	344,142		
Rock-pigeon-SRS346877	242,258	92,549	334,807		
Rock-piegon-Cliv_1_0	27,384	198,646	226,030		

## 표 31. 추출된 InDels의 염기서열 변이 정보

Type(alphabetical order)	Count	Percent
DOWNSTREAM	3,443,130	9.54%
EXON	972,718	2.69%
INTERGENIC	8,712,664	24.13%
INTRON	15,824,569	43.83%
NONE	3,385,177	9.38%
SPLICE_SITE_ACCEPTOR	3,066	0.01%
SPLICE_SITE_DONOR	2,844	0.01%
SPLICE_SITE_REGION	58,222	0.16%
TRANSCRIPT	433	0.00%
UPSTREAM	3,324,084	9.21%
UTR_3_PRIME	290,996	0.81%
UTR_5_PRIME	86,444	0.24%



그림 18. 추출된 InDels의 염기서열 변이 정보

(2) 1차 마커 테스트

양비둘기와 집비둘기의 잡종을 구별할 수 있는 마커를 개발하기 위해 1차 적으로 양비둘기와 집비둘기를 명확히 구분 가능한 종 특이적인 구간 선별을 위한 테스트를 실시하였다. 앞서 추출된 87,335개 InDel polymorphism 중 InDel의 base pair가 길이가 가장 긴 순서대로 분류하여 34 base pair 이상인 구간 총 68개를 선별하였다. 총 68개의 프라이머를 대상으로 테스트가 실시되었으며, HM 1 ~ 36번까지는 양비둘기 5개체, 집비둘기 5개체로 테스트를 한 후, 두 종간 InDel polymorphism을 보이는 프라이머를 양비둘기 16개체, 집비둘기 14개체로 추가 테스트 실시하였다. HM 37 ~68번 까지는 앞선 테스트에서 변이를 심하게 보이는 2개체를 각각 선별 하여 양비둘기 2개체, 집비둘기 2개체로 테스트 후, 마찬가지로 비둘기 16개체, 집비둘기 14개체로 추가 테스트 실시하였다. 분석에 사용된 개체정보는 표 32에 정리하였다.

표 32. 마커 테스트에 활용된 양비둘기와 집비둘기의 개체 정보

<u>柔</u>	성별	가락지 번호	포획장소(출신지)	비고
양비둘기	F	080-03166	구례군	16개체 분석 대상
양비둘기	М	080-03200	구례군	16개체 분석 대상

조 0	성별	가락지 번호	포획장소(출신지)	비고
양비둘기	М	080-05552	구례군	16개체 분석 대상
양비둘기	F	080-05554	구례군	16개체 분석 대상
양비둘기	F	080-05555	구례군	16개체 분석 대상
양비둘기	F	080-05562	구례군	16개체 분석 대상, 5개체 분석 대상
양비둘기	F	080-05563	구례군	16개체 분석 대상
양비둘기	М	080-05564	구례군	16개체 분석 대상
양비둘기	М	080-05567	구례군	16개체 분석 대상, 2개체 분석 대상
양비둘기	F	080-05565	구례군	16개체 분석 대상, 2개체 분석 대상
양비둘기	F	080-05568	구례군	16개체 분석 대상
양비둘기	М	151	고흥군	16개체 분석 대상
양비둘기	М	152	고흥군	16개체 분석 대상
양비둘기	М	153	고흥군	16개체 분석 대상, 5개체 분석 대상
양비둘기	М	154	고흥군	16개체 분석 대상
양비둘기	F	155	고흥군	16개체 분석 대상
양비둘기	М	080-05570	구례군	5개체 분석 대상
양비둘기	F	070-02412	구례군	5개체 분석 대상
양비둘기	М	070-02415	구례군	5개체 분석 대상
집비둘기	F	080-07123	구례군	14개체 분석 대상
집비둘기	F	080-07124	구례군	14개체 분석 대상 2개체 분석 대상
집비둘기	F	080-07153	센터(구례군x의령 구)	14개체 분석 대상 2개체 분석 대상
집비둘기	F	080-07154	센터(구례군x의령 군(=)	14개체 분석 대상
집비둘기	F	080-05571	구례	14개체 분석 대상
집비둘기	М	NIBRGR605608	여수	14개체 분석 대상
집비둘기	М	NIBRGR605648	광양	14개체 분석 대상 5개체 분석 대상
집비둘기	М	NIBRGR605632	목포	14개체 분석 대상
집비둘기	М	NIBRGR605633	광양	14개체 분석 대상
집비둘기	F	080-05572	구례	14개체 분석 대상
집비둘기	F	080-05574	구례	14개체 분석 대상 5개체 분석 대상

조	성별	가락지 번호	포획장소(출신지)	비고
집비둘기	М	080-05575	구례	14개체 분석 대상
집비둘기	F	080-05576	구례	14개체 분석 대상
집비둘기	М	080-05577	구례	14개체 분석 대상
집비둘기	М	080-07108	의령	5개체 분석 대상
집비둘기	М	080-05573	구례	5개체 분석 대상
집비둘기	М	080-07125	구례	5개체 분석 대상

테스트 결과, 총 19개의 구간이 양비둘기와 집비둘기를 구분하는 종 특이적인 마커로서 적합한 것으로 확인되었다. 확인된 프라이머는 HM 22, 30, 31, 32, 37, 41, 42, 43, 45, 50, 51, 54, 55, 56, 59, 60, 61, 66, 68 이다 (그림 19). 선별된 프라이머는 두 종간 base pair가 뚜렷이 구분이 되는 구간이며, 제외된 프라이머들은 두 종간 base pair의 차이를 보이지 않거나, double band가 뜨는 경우, band가 섞여 나오는 경우, PCR이 제대로 되지 않는 경우였다.

그림 19. 양비둘기와 집비둘기를 대상으로 선별된 프라이머 HM 1~68의 1차 테 스트. 선별된 프라이머는 굵은 글씨로 표기.





\_\_\_\_\_

집비둘기









선별된 총 19개의 구간의 프라이머를 대상으로 실험 개체수를 늘려 양비둘기 16개체와 집비둘기 14개체로 추가 테스트를 실시하였다. 테스트 결과, 총 13개의 프라이머 HM 30, 32, 37, 41, 42, 43, 45, 51, 55, 56, 59, 60, 68 이 추가된 개체에서도 두 종간 base pair 차이가 뚜렷이 나는 것으로 확인되어 최종적으로 1차 테스트에 통과하였다 (그림 20). 제외된 프라이머는 양비둘기에서 집비둘기 밴드가 뜨거나 혹은 그 반대, double band가 뜨는 경우, PCR 증폭에 어려움이 있는 경우였다. 그림 20. 1차 테스트에서 통과된 프라이머를 대상으로 개체수를 늘린 추가 테스 트. 선별된 프라이머는 굵은 글씨로 표기.



HM 32 (집비둘기)




- 58 -





HM 68 (집비둘기)

HM 68 (집비둘기)

(3) 2차 마커 테스트

두 종을 뚜렷이 구분할 수 있는 구간을 선별하는 1차 테스트에 통과한 13개의 프라이머를 대상으로 2차 테스트를 실시하였다. 2차 테스트는 멸종위기종복원센 터에서 증식한 양비둘기 3개체와 구례, 의령에서 포획한 집비둘기 3개체로 짝을 형성하여 그 사이에 태어난 잡종 F1의 유전 형질을 확인하는 테스트를 실시하였 다. 선별된 프라이머들은 모두 양비둘기와 집비둘기가 확연한 base pair의 차이를 보이므로, 그 사이에 태어난 F1은 양비둘기와 집비둘기의 형질을 가지는 double band의 형태를 보일것이다라는 전제를 토대로 하였다. 최종적으로 선별된 마커는 HM 30, 32, 37, 41, 42, 43, 45, 51, 55, 56, 59, 총 11개로서 잡종 자손인 F1은 모 두 double band를 보이는 것으로 확인되었다 (그림 21). 그 외 HM 60과 68은 부모 개체에서 양비둘기와 집비둘기의 band가 뚜렷이 구분되었지만, 그 자손인 F1에서

- 60 -

일부 개체가 한 줄의 band를 보였다. 이는 잡종 F1의 경우 양쪽 부모에게서 각각 하나의 유전형질을 물려받는다는 유전법칙에 위배되며, 잡종 1세대의 유전적 형 질을 제대로 확인 할 수없는 구간으로 판명되므로 마커 선정에서 제외하였다. 선 별된 11개의 마커는 잡종 1세대의 유전 형질을 유전법칙에 따라 제대로 설명하고 있으며, 부모의 형질을 각각 한 개씩 물려받은 F1의 특성을 명확히 보여주고 있 다.

그림 21. 양비둘기 x 집비둘기 잡종 실험 개체들과 그 사이에서 태어난 F1 개체 들을 활용한 2차 테스트 결과. 마커로 선정된 프라이머는 푸른색 표기.





		HM 42
Columba rupestris (Gurve x Goheung) S F F 07116 07104 07101 X Columba Iivla F S 06(red) 07125 07108	=	Hybrid F1: C. rupestris x-C.livia 1 2 3 4 5 6 07116 07104 07101 X 06(red) 07125 07108
		HM 43
Columba rupestris (Gurye × Goheung)	=	Hybrid F1: C. rupestris x C.livia Hybrid F1: C. rupestris x C.livia 1 2 -3 4 5 6 07116 07104 07101 X 06(red) 07125 07108
		HM 45
Columba rupestris (Gurye × Goheung) <ul> <li></li></ul>	=	Hybrid F1: C. rupestris x C.livia 1 2 3 4 5 6 07116 07104 07101 X 06(red) 07125 07108





## 다. 양비둘기와 집비둘기 간 잡종 1세대(F1)의 표현형 및 잡종 비율 테스트

(1) 잡종 번식 결과

잡종 생산을 위해 양비둘기 5개체 집비둘기 5개체를 활용하여, 총 5쌍으로부터 F1을 생산하였다. All-2번 사육장에서 번식한 쌍은 경남 구례군에서 자연 번식을 하던 쌍과 F1 새끼를 멸종위기종복원센터로 도입하여 사육하였다. 그 외 양비둘 기는 멸종위기종복원센터에서 구례와 고흥 개체 사이에서 태어난 증식 개체이고 집비둘기는 구례군에서 양비둘기 집단에 섞여 있던 집비둘기들을 포획하여 복원 센터로 이송한 개체들이다. 6월부터 12월까지 번식 쌍을 사육장에 배치하여 번식 을 유도한 결과, A9-1 사육장에 번식하던 쌍을 제외하고는 모두 1번 이상의 번식 을 확인하였다 (표 33). 번식한 쌍은 모두 6~7월 사이 한 번의 번식을 하였고, A10-1번 사육장의 쌍이 11월에 2차 번식을 시도하였지만 부화에 실패하였다. 산 란한 쌍으로부터 확인된 한배산란수는 모두 2개로 확인되었고, 대부분의 알은 부 화에 성공하여 7마리의 유조를 생산하였으나 최종적으로 살아서 이소한 개체는 단 2개체였다 (표 33).

번식 쌍	사육장	번식 횟수	산란일	부화일	한배 신란수	한배 새끼 수	이소 개체
양비둘기(080-07103, 수) x	A9-1	0	_	_	_	_	_
집비둘기(080-07154, 암)		_					
양비둘기(080-07116, 수)							1
х	A10-2	1	21.7.12.	21.7.22.	2	2	(080-0
집비둘기(R06, 암)							2414)
양비둘기(080-07104, 암)			21.7.12.	21.7.22.	2	2	0
x 집비둘기(080-07125, 수)	A10-1	2	21.11.9.	_	2	_	_
양비둥기(080-07101 안)							1
8 HE HOUSE BILLIN	A10-2	1	2176	91 7 95	2	2	(이소
조 지비드키(000_07100 소)	AIU U		21.7.0.	21.7.20.	2	2	후
집미굴기(060-07106, 干)							폐사)
양비둘기(080-00514, 암)							1
Х	A11-2	1	21.6.10.	21.6.30.	2	1	(080-0
집비둘기(080-05573, 수)							2402)

표 33. 양비둘기와 집비둘기 간 번식 정보

(2) 잡종 1세대의 표현형 비교

잡종 1세대 생산에 활용된 양비둘기의 표현형을 확인한 결과, 모든 개체에서 양 비둘기의 특징을 가장 잘 나타내는 꼬리깃 흰색선이 뚜렷하게 나타났다 (그림 22). 전체적인 외형에서 나타나는 회색톤에는 색의 섞임이 없었으며, 큰날개덮깃

- 66 -

과 가운데날개덮깃의 검은선 2줄도 뚜렷했고 첫째, 둘째날개깃 끝의 검은 선도 뚜렷하게 확인 되었다. 붉은 다리와 검은 부리, 초록색과 보라색이 도는 목, 빨간 눈동자도 양비둘기의 전형적인 표현형을 띄는 것으로 확인되었다.



그림 22. 잡종 실험에 활용된 양비둘기 표현형





집비둘기 (Columba livia domestica)는 전 세계적으로 다양한 아종을 가지고 있다. 잡종 실험에 활용된 국내 서식 집비둘기는 모두 다양한 아종의 표현형을 가지고 있는 것으로 확인되었으며, 일부 섞여 있는 경우도 확인되었다 (그림 23). 양비둘기와의 가장 눈에 띠는 차이점은 꼬리 끝에 흰색선으로 집비둘기의 모든 아종들은 이러한 특징을 보이지 않는다. 실험에 활용된 5 개체 중 4개체는 Columba livia livia의 전형적인 표현형을 가진 것으로 확인되었고, 일부 개체는 머리와 날 개에 흰색이 섞여 있는 잡종의 형태를 띠었다. 가락지 번호 080-07108은 Columba livia gymnocycla와 비교적 유사한 형태로 집비둘기 무리에서 흔히 관찰되는 표현

형 중 하나인 것으로 확인 되었다. 080-07108은 다른 개체에 비해 양비둘기와 표 현형의 차이가 크게 나타나지만 1번의 산란 후 (알 2개) 1마리의 새끼가 이소하였 다. 양비둘기와 가장 표현형의 차이가 많이 나는 개체였지만 교잡 가능성에 집비 둘기 표현형은 크게 상관이 없는 것으로 추측된다. 이소한 새끼는 얼마 지나지 않아 폐사하였다.



그림 23. 잡종 실험에 활용된 집비둘기 표현형





총 7마리의 새끼 중 폐사하지 않고 이소하여 성조의 깃털을 가지게 된 개체는 총 2개체였다. 잡종 1세대인 F1의 표현형은 그림 24과 같다. 두 개체 모두 부모에 서 큰 차이를 보이는 외형은 꼬리깃의 흰색선과 첫째, 둘째 날개깃의 검은색 비 율이다. F1에서도 역시 꼬리깃의 흰색선과 첫째, 둘째 날개깃의 검은색 비율에서 차이를 보였는데, 꼬리깃의 흰색선이 부분적으로 나타난 형태를 띠었고 첫째, 둘 째 날개깃의 검은색도 양비둘기에 비해 짙어진 것으로 확인되었다. 그 외 다른 형태적 변화는 확인되지 않았다. 특이한 것은 구례 화엄사에서 번식 쌍을 이루었 다가 포획된 양비둘기(070-00514)와 집비둘기(080-05573) 쌍 중 집비둘기의 형태가 멸종센터에서 생산한 F1의 형태와 유사하였다. 집비둘기 080-05573의 꼬리깃을 보 면 흰색의 형태가 드문드문 보이는 것을 볼 수 있다.

그림 24. 양비둘기와 집비둘기 사이에서 태어난 F1의 표현형





#### (3) 마커를 활용한 순종 비율 테스트

잡종 실험에 활용된 5쌍 중 번식을 성공한 4쌍과, 생산된 F1 8개체를 대상으로 선별된 11개의 마커를 테스트하여 순종의 비율을 산정해 보았다. 각 개체에 대한 11개 마커의 테스트 결과는 그림 25와 같다. 양비둘기의 밴드가 나오면 1점, 밴드 가 두 줄인 잡종의 밴드가 나오면 0.5점, 집비둘기의 밴드가 나오면 0점을 주어 모든 값을 합산한 후 마커의 개수인 11을 나누어 % 값을 계산해 본 결과, 잡종 생산에 부모로 활용된 양비둘기는 모든 마커에서 양비둘기 밴드를 보여 선정된 마커의 기준으로는 100% 양비둘기를 나타내었다 (표 34). 부모로 활용된 집비둘 기의 경우도 3개체는 양비둘기일 확률이 0%로 확인 되었다. 한편, 구례 화엄사에 서 번식하고 있는 개체를 포획해 온 080-05573의 경우 모든 마커에서 double band 가 확인되어 50 %의 양비둘기 순종 비율을 것으로 확인되었다 (표 34). 이 개체 는 앞선 결과인 표현형의 비교에서도 F1의 꼬리깃과 매우 유사한 형태를 띠었다.

잡종 1세대의 경우, 부모에서 양비둘기 100%와 집비둘기 100% 개체가 잡종을 생산하였을 경우 그 자손은 모두 50% 잡종의 결과를 보여주었다 (표 35). 그러나 잡종 7, 8번 개체의 경우 부모인 집비둘기가 50%의 잡종을 이미 보인 경우라 그 의 자손의 경우 68 ~77%의 순종 비율을 보여주어 양비둘기의 유전적 특징을 더 많이 보유한 것으로 나타났다 (표 35). 그림 25. 잡종 생산에 활용된 양비둘기와 집비둘기 4쌍, F1 8개체의 마커 테스 트 결과





Columba rupestris (Gurye × Goheung) (Gurye.) T					
07116 07104 07101 00514	-	Hybrid	F1: C. rupestris × C.livi	ia	
X		1 2	3 4	5 6	7 8
Columba livia		0/116	07104	07101	00514
÷ \$ \$ \$		X 06(red)	X 07125	X 07108	x 05573
06(red) 07125 07108 05573					
		HM 45			
Columba rupestris (Gurye x <u>Goheung</u> ) (Gurye )					
↑         ♀         ♀         ♀         ♀           07116         07104         07101         00514		Hybrid	E1: C rupestris v C lis	/ia	1.7
		1 2		5 6	7 8
x	=				
Columba <u>livia</u>	- 1	07116 X 06(red)	07104 X 07125	07101 X 07108	00514 X 05573
U6(160) 0/125 0/108 055/3					
		HM 51			
Columba rupestris (Gurye x Goheung) (Gurye )					
\$ <del>9</del> <del>9</del> <del>9</del>	-				
07116 07104 07101 00514					
Х	-				
Columba livia	- 64				00514 X 05573
* * * *					
06(red) 07125 07108 05573					
		HM 55			



표 34. 잡종 실험에 활용된 부모 개체 4쌍의 순종 비율 결과

ID	양비둘기 마커 수	잡종 마커 수	집비둘기 마커 수	순종 비율
	(n x 1)	(n x 0.5)	(n x 0)	
07116	11 x 1	-	_	100 %
07104	11 x 1	_	_	100 %
07101	11 x 1	_	_	100 %
00514	11 x 1	_	_	100 %
06(red)	-	_	11 x 0	0 %
07125	_	_	11 x 0	0 %
07108	_	_	11 x 0	0 %
05573	_	11 x 0.5	-	50 %

	양비둘기 마커 수	잡종 마커 수	집비둘기 마커 수	<u>ح</u>
ID	(n x 1)	(n x 0.5)	(n x 0)	순종 비율
1	_	11 x 0.5	_	50 %
2	_	11 x 0.5	_	50 %
3	_	11 x 0.5	-	50 %
4	_	11 x 0.5	_	50 %
5	-	11 x 0.5	_	50 %
6	_	11 x 0.5	_	50 %
7	4 x 1	7 x 0.5	1 x 0	68.18 %
8	9 x 1	5 x 0.5	_	77.27 %

표 35. 잡종 1세대 8개체의 순종 비율 결과

# 3. 멸종위기종 어류·양서파충류 유전자 연구

## 가. 흰수마자 미토콘드리아 유전체 확보

본 연구에서 분석한 낙동강 횐수마자(*G. naktongensis*)의 미토콘드리아 유전체 전체 길이는 16,607 bp로 나타났으며, 13개의 단백질 코딩 유전자, 2개의 rRNA 유전자 및 22개의 tRNA 유전자로 구성되어 있어 전형적인 척추동물과 유사하 였고, 다른 cyprinid 종과 동일하였다(표 36). ND6을 제외한 12개의 PCG와 8개 의 tRNA 유전자가 heavy 가닥이였고, 복제원점(origin of replication)은 light 가닥 이였다. 미토콘드리아 유전자 간의 서열 중복은 10개의 유전자에서 총 27 bp, 1~7 bp 범위에서 발견되었다. 가장 두드러진 중복서열이 나타난 유전자는 ATP8과 ATP6 사이, 그리고 ND4L과 ND4 사이에서 발견되었으며, 나머지들은 PCG와 tRNA 유전자들 사이에서 발견되었다. 대부분의 PCG는 ATG (putative start codon)로 시작했지만, 이 중 CO1 유전자의 시작코돈은 GTG로 대부분의 척추동물과 동일한 양상을 보였다. 13개의 PCG 중 10개의 종결코돈은 완벽한 형태(TAA 또는 TAG)로 나타났으나, 나머지 3개 유전자(CO2, CO3, CYB)는 불 완전한 형태의 종결 코돈(T 또는 TA) 형태로 나타났다. 이러한 불완전한 종결 코돈은 mRNA 전사 과정 중 폴리아데닐화에 의해 TAA로 전환될 수 있어 발현 에는 큰 영향을 주지 않는다.

동일속 어류들과 휜수마자 두 집단의 뉴클레오티드 구성을 비교한 결과를 표 37에 제시하였다. 이 중 금강 흰수마자의 뉴클레오티드 구성은 A = 30.3%, G = 16.8%, T = 26.3%, C = 26.3%로 다른 동일속 어류들과 유사하게 아데닌과 티민의 함량이 56.9%로 편향성을 보였다.

			Size	Spacer (+)/	Start/Stop	Anti-
Gene	$Strand^*$	Positions		- · · ·	-	
			(bp)	Overlap(-)**	codon	codons
tRNA <sup>Phe</sup>	Н	1-69	69	0		GAA
12S rRNA	Н	70-1031	962	0		
tRNA <sup>val</sup>	Н	1032-1103	72	0		TAC
16S rRNA	Н	1104-2791	1688	0		
tRNA <sup>Leu2</sup>	Η	2792-2867	76	0		TAA
ND1	Η	2868-3842	975	0	ATG/TAA	
tRNA <sup>lle</sup>	Η	3846-3917	72	3		GAT
tRNA <sup>Gln</sup>	L	3916-3986	71	-2		TTG
tRNA <sup>Met</sup>	Н	3988-4056	69	1		CAT
ND2	Н	4057-5103	1047	0	ATG/TAA	
tRNA <sup>Trp</sup>	Н	5103-5173	71	-1		TCA
tRNA <sup>Ala</sup>	L	5176-5244	69	2		TGC
tRNA <sup>Asn</sup>	L	5246-5318	73	1		GTT
OL	L	5319-5349	31	0		
tRNA <sup>Cys</sup>	L	5350-5417	68	0		GCA
tRNA <sup>Tyr</sup>	L	5419-5489	71	1		GTA
CO1	Ĥ	5491-7041	1551	1	GTG/TAA	
tRNA <sup>Ser2</sup>	L	7042-7112	71	0		TGA
tRNA <sup>Asp</sup>	Ĥ	7116-7187	72	3		GTC
CO2	H	7201-7891	691	13	ATG/T	
tRNA <sup>Lys</sup>	Н	7892-7967	76	0		TTT
ATP8	Н	7969-8133	165	1	ATG/TAA	
ATP6	Н	8127-8810	684	-7	ATG/TAA	
CO3	Н	8810-9594	785	-1	ATG/TA	
tRNA <sup>Gly</sup>	H	9594-9665	72	-1		TCC
ND3	H	9666-10016	351	0	ATG/TAG	
tRNA <sup>Arg</sup>	H	10015-10083	69	-2		TCG
ND4L	Н	10084-10380	297	0	ATG/TAA	
ND4	H	10374-11756	1383	-7	ATG/TAG	
tRNA <sup>His</sup>	Н	11756-11824	69	-1		GTG
tRNA <sup>Ser1</sup>	Н	11825-11893	69	0		GCT
tRNA <sup>Leu1</sup>	H	11895-11967	73	1		TAG
ND5	H	11968-13803	1836	Ō	ATG/TAA	
ND6	Ĺ	13800-14321	522	-4	ATG/TAG	
tRNA <sup>Glu</sup>	Ē	14322-14390	69	0		TTC
CYB	Ĥ	14395-15535	1141	4	ATG/T	
tRNA <sup>Thr</sup>	Ĥ	15536-15607	72	Ō		TGT
tRNA <sup>Pro</sup>	Ĺ	15607-15676	70	-1		TGG
CR	H	15677-16607	931	0		

표 36. 금강 흰수마자 미토콘드리아 게놈의 유전자 구성 및 위치

\* H and L refer to genes transcribed in the heavy and the light strand, respectively. \*\* The number in the parenthesis indicates nucleotide base(s) of the intergenic spacer (positive number) or overlap (negative number).

Species	Populations	Accession	Size	Whole	e mitog	enome	composi	tion
-	-	number	(bp)	А	G	Т	С	A + T
			· • /	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
G. naktongensis	Geum-River	-	16633	30.3	16.8	26.6	26.3	56.9
G. naktongensis	Nakdong-River	KC353467	16635	30.4	16.8	26.6	26.3	57.0
G. pappenheimi	-	KU314697	16631	30.2	16.9	26.6	26.3	56.8
G. brevibarba	-	FJ515919	16620	28.8	18.2	26.1	26.8	55.0
G. intermedia	-	KF667523	16634	27.6	19.1	26.1	27.2	53.7
G. macrocephala	-	FJ515918	16637	29.4	17.9	25.4	27.2	54.8

표 37. 흰수마자 및 동일속 어류 5종의 뉴클레오티드 구성 특성

금강 흰수마자 13개 PCG 중 AT-skew는 ND6(-0.462)을 제외하고 0에 가까운 수치인 -0.072~0.117 범위로 나타났으며, 음수의 AT-skew와 양수의 AT-skew수 는 비슷하게 나타났다(그림 26). 모든 GC-skew는 ND6(0.423)을 제외하고 -0.428 에서 -0.179까지 모두 음수로 나타났다. 이 결과는 대부분의 PCG에 더 많은 C 뉴클레오타이드가 존재한다는 것을 의미하며, ND6은 음수의 AT 및 양수의 GC-skew 제시했으며, 그 결과는 대부분의 담수어류 가닥 비대칭성과 일치한다.



그림 26. 금강 흰수마자 미토콘드리아 단백질 암호화 유전자의 AT- 및 GC-skew.

금강 흰수마자의 PCG는 총 3857개의 코돈으로 이루어져 있으며, 아미노산 Ala, Arg, Gly, Leul, Pro, Serl, Ser2, Thr와 Val은 4개의 다른 코돈에 의해 암호 화 되어 있고, 나머지는 1~3개의 코돈으로 암호화되어 있었다. RSCU 분석 결 과 Leul (CUA), Arg (CGA), Ser2 (UCA)를 인코딩하는 코돈이 가장 많이 나타 났으며, Leu2 (UUG), Thr (ACG), Ala (GCG)가 가장 적게 나타났다(그림 27). RSCU 분석 결과 3번 위치에서 가장 많이 사용된 코돈이 아데닌(A)였으며, 가 장 적게 사용된 코돈이 구아닌(G)으로 나타나 3번 위치에서는 티민(T)이나 구 아닌(G)보다 A나 C가 더 많이 사용된 것으로 나타나 A+T 콘텐츠 및 13개의 PCG의 AT/GC-skew는 코돈 사용과 밀접한 관련이 있었다.



그림 27. 금강 흰수마자 미토콘드리아 단백질 암호화 유전자의 RSCU.

Gobiobotia 속 어류 중 전체 PCGs의 Ka/Ks 비율은 1이하(범위 : 0.024~0.100) 로, 강력한 음성(정화) 선택을 받고 있는 것으로 나타남에 따라 환경변화가 유 전적 기능을 변화시킬 만큼 크지 않음을 시사했다(그림 28).

동일 종인 금강 흰수마자, 낙동강 흰수마자 및 유사종인 중국의 *G.* pappenheimi를 대상으로 tRNA의 구조적 차이를 비교한 결과 22개의 tRNA 중 11개, 총 17 염기서열간 치환, 삽입 또는 결실 등의 차이를 보였다. 이 중에서 도 tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>에서는 낙동강 흰수마자에서 acceptor- 와 anticodon-stems 부 위에 염기치환으로 인해 두 종과 구조적 차이를 보였으며(그림 29), tRNA<sup>Arp</sup> 및 tRNA<sup>Trp</sup>에서는 중국 *G. pappenheimi*에서만 D-loop 영역의 크기에서 구조적 차이 를 보였다.



그림 28. Gobiobotia 속 어류의 미토콘드리아 단백질 암호화 유전자의 평균 Ka/Ks 비율 비교.

tRNA<sup>His</sup>에서는 금강 흰수마자만 acceptor-stem과 TΨC-stems 사이, 그리고 anticodon-stem과TΨC-stems의 길이에서 구조적 차이를 보였다. tRNA는 loop 영 역을 제외하고 비교적 보존성이 높은 특성을 가지고 있으며, 특히 일반적으로 TΨC- 및 D-stem 영역은 loop 영역에 비해 더 많이 보존되었다(Vilmi et al. 2005). tRNA 유전자 내의 점 돌연변이는 tRNA 대사에 대한 구조적 또는 기능 적(또는 두 가지 모두) 기능에 영향을 미칠 가능성이 있다(Helm et al. 2000). 따 라서 비교한 두 종 및 두 집단의 흰수마자는 분류학적으로 차이를 보일 가능성 이 있다.

금강에 서식하는 흰수마자를 포함하여 모래무지아과(sub-family Gobioninae)의 대표적인 종의 미토콘드리아 유전체를 대상으로 ML방법을 이용한 분자계통 분 석을 수행한 결과 모래무지아과에 속한 종은 단계통군을 형성하였고, 흰수마 자가 포함되어 있는 Gobiobotia 속 어류들은 *Xenophysogobio nudicorpa*와 군집되 어 다른 모래무지아과 어류들과 명확하게 구분되었다(그림 30).

금강 흰수마자는 동일종이며, 모식지인 낙동강에 서식하는 흰수마자에 비해 중국에 서식하는 *G. pappenheimi*와 100%의 부스트랩값을 보이며 더욱 가까운 것으로 나타났다. Lindberg (1972)와 Nishimura (1974)에 따르면 빙하기에 해수면 이 하강하였을 때 우리나라의 한강과 금강은 중국 본토의 황하강과 연결된 것

- 84 -

으로 보고한 바 있다. 이 결과는 한강, 임진, 금강 등이 속한 서한아지역과 중 국 본토의 황하강이 연결되는 고황하 시스템이 존재했다는 중요한 증거로 이용 될 수 있을 것이며, 흰수마자의 분류학적 정리의 필요성을 나타내고 있다.



그림 29. 한국 흰수마자 2집단 및 중국 *G. papenheimi*의 미토콘드리아 내 tRNA 2 차 구조 비교. 빨간색 화살표는 점 돌연변이를 나타내고 빨간색 상자는 구조적 변 화를 나타냄. D-loop 영역의 숫자는 뉴클레오티드 서열의 길이를 나타냄.



그림 30. 모래무지아과 어류들의 분자계통도. 분자계통도는 RAxML프로그램을 이 용하여 maximum likelihood (ML) 분석을 수행하였으며, 각 branch 위의 값은 1,000 번의 부스트랩값을 의미함.

## 나. 금개구리 친자확인

2017년 국립생물자원관에서 선행연구 한 자료를 기반으로 금개구리 microsatellite 프라이머 총 11개 중 cho1027을 제외한 10개의 프라이머 세트에서 효율적으로 증폭이 가능하였다(그림 31).



그림 31. 금개구리 11개의 microsatellite 마커의 PCR 증폭 0.8% 아가로즈젤 전기영 동상. 1 lane, cho1119; 2 lane, cho1115; 3 lane, cho1113; 4 lane, cho1094; 5 lane, cho1085; 6 lane, cho1084; 7 lane, cho1081; 8 lane, cho1066; 9 lane : Ladder; 10 lane, cho1058; 11 lane, cho1055; 12 lane, cho1027

실험의 효율성을 높이고 분석단가를 절감하기 위한 mutiplex-PCR 세트 구성 을 위한 아가로즈젤 상을 분석한 결과 세트2번과 3번에서 기대하는 크기의 증 폭밴드가 확인되었기에 다음 실험에 이용하였다(그림 32). 각 세트에 이용한 프 라이머들의 정보는 표 38에 정리하였다.

1119	1115	1113	1094	1085	1084	1081	1066	1058	1055	larans	1-1	1-2	2.1	2.2	3-1	3-2
a.																
_																
-						=										
											1055 1066 1081	1115 1119 1094	1055 1119 1113	1081 1094 1085	1055 1058 1081	1094 1113 1119
											1058 1113	1084	1066	1084	1066	108
1119	1115	1113	1094	1085	1084	1081	1066	1058	1055		4-1	4-2	5-1	5-2	6-1	6-2
	-	7		-	=	=	-	=	-	-		- 1	- 1	= 1	-	-
-																
-					-	-	_	_								
					-						1055	1094 1113	1055	1094	1055	1094

그림 32. Multiplex-PCR 세트 구성을 위한 아가로즈 전기영동상. 각 lanes의 위에 마커의 이름 및 세트의 이름이 설명되어 있고, 전기영동상 아래 부분에 각 세트를 구성하고 있는 마커의 이름이 기입되어 있음.

표 38. 금개구리 친자 확인을 위해 테스트한 프라이머 조합

No.	Locus	Dye		Primer sequences (5'-3')
	1 1055		F	TATCTGTTTGCAGCCACCTG
	cho1055	IAMKA	R	GTCAGGTCCATTTAGAGCCG
	1 1000		F	TCTTGGTAGGCAGCCTCATT
	cho1066	6-FAM	R	CGCTAAAACACCTTTTGGGA
G 4 <b>2</b> 1	.1.1112	HEY	F	TTGCAGAAAACTGGCTCAGA
Set2-1	cno1113	ПЕА	R	CAATTGACTCCCTCCCATTG
	aba1115	6 EAM	F	ATCTGTGGACTGGGGTCTTG
	CII01115	0-PAIVI	R	ACAGAGGCTCCTCGTTCAAA
	cho1110	UEV	F	TTGACATTTTAACAGGGGAGTG
	0101119	IILA	R	CCAGCCTATCATAACCAAGGA
	cho1058	ταμρα	F	ACATCCTAACACCGGAGTGG
	0101050	IAMINA	R	CAGGACCATATCAACATGCAA
	cho1081	HEX	F	GCCATCCCTGTCCAATACAC
	CHOTOOT	IILA	R	CGTTCACCCCACTTCAGATT
Sat 2 2	cho1084	6 FAM	F	CCCTGATCCCACTGCTGTAT
5012-2	CHUIDIO	0-1 Alvi	R	TGGAGAAGCTTCACAACGTC
	cho1085	6 FAM	F	TGCACTTTAATGGAGTCCCA
		0-ΓΑΝΙ	R	ATGGTCACCGTTTGGTCAAT
	cho1004	ΤΛΜΡΛ	F	GTTTCCTGGCAATACATGGG
	CII01094	IAWKA	R	GCTGGAGGTACTGGAACTGC
	cho1055		F	TATCTGTTTGCAGCCACCTG
	0101055	IAMINA	R	GTCAGGTCCATTTAGAGCCG
	aba1058	тамра	F	ACATCCTAACACCGGAGTGG
	0101038	IAMINA	R	CAGGACCATATCAACATGCAA
Sat2 1	aba1066	6 FAM	F	TCTTGGTAGGCAGCCTCATT
5015-1	chorooo	0-PAIN	R	CGCTAAAACACCTTTTGGGA
	abo1081	UEV	F	GCCATCCCTGTCCAATACAC
	CHOTOOT	IILA	R	CGTTCACCCCACTTCAGATT
	aba1084	6 EAM	F	CCCTGATCCCACTGCTGTAT
	CII01084	0-ΓΑΝΙ	R	TGGAGAAGCTTCACAACGTC
	aba1085	6 EAM	F	TGCACTTTAATGGAGTCCCA
	ch01085	0-ΓΑΝΙ	R	ATGGTCACCGTTTGGTCAAT
	aha1004		F	GTTTCCTGGCAATACATGGG
	CII01094	IAMA	R	GCTGGAGGTACTGGAACTGC
Sat 2 2	aha1112	HEV	F	TTGCAGAAAACTGGCTCAGA
Sel3-2	ch01115	ΠΕΛ	R	CAATTGACTCCCTCCCATTG
	aha1115	6 5 1 1	F	ATCTGTGGACTGGGGTCTTG
	cn01113	6-FAM	R	ACAGAGGCTCCTCGTTCAAA
	abo1110	LIEV	F	TTGACATTTTAACAGGGGAGTG
	cho1119	ПЕЛ	R	CCAGCCTATCATAACCAAGGA

Multiplex-PCR 세트2와 세트3의 genotyping 분석결과 세트2에 비해 세트3에서 peak의 높이가 일정하고, 각각의 마커간의 간섭과 누락이 없었다(그림 33). 따라 서 세트3을 이용하여 PCR을 진행하였으며, genotyping 결과를 peak scanner 버 전 1.0을 이용해 분석 중이며, 추후 Bioinformation 정리를 통하여 금개구리 원 종, F1, 방사개체 등을 대상으로 친자확인 효율성 및 친자관계 분석을 수행할 예정이다.



그림 33. 금개구리 10개의 microsatellite 마커의 mutiplex-PCR genotype 상.

#### 다. 수원청개구리 종판별 마커 개발

핵 DNA 영역인 POMC를 분석한 결과 총 58개체에서 성공적으로 분석이 이 루어졌다. 분석이 가능한 염기서열은 총 372 bp로 나타났다. 이 중 9 bp의 variable sites가 나타났다(표 39, 표 40). TYR을 분석한 결과, 총 58개체에서 성 공적으로 분석이 이루어졌다. 분석이 가능한 염기서열은 총 361 bp로 나타났다. 이 중 9 bp의 variable sites가 나타났다(표 39, 표 41). SIAH를 분석한 결과 총 60개체에서 분석이 성공적으로 이루어졌으며 분석이 가능한 염기서열은 총 267 bp로 확인되었다. 이 중 3 bp의 variable sites가 나타났으며 잡종 현상은 나타나 지 않았다(표 39, 표 42). RAG1 및 C-MYC을 분석한 결과 56개체 모두 성공적 으로 분석이 이루어졌으며 RAG1에서는 11 bp, C-MYC에서는 5 bp의 variable sites가 확인되었다(표 43, 표 44). 핵 DNA 5개에서는 총 청개구리와 수원청개 구리 종 간 차이가 나는 변이서열 16개를 확보하였으며, 일부 형태적으로 수원 청개구리인 개체와 청개구리인 개체 모두에서 종 간 변이 서열 중 double peak 양상을 보이는 개체들이 다수 존재하였다.

Gene	Taxa	bp	Variable sites	PI	S
POMC	58	372	9	7	2
TYR	58	361	9	9	-
SIAH	60	267	3	3	-
C-MYC	56	301	5	2	3
RAG1	56	561	11	9	2

표 39. 청개구리류 대상으로한 핵 DNA 5개의 variable sites

PI: Parsimony Informative Sites, S: Singleton Variable Sites

미토콘드리아 12S rDNA 영역을 대상으로 HRM 분석한 결과, 청개구리는 23 개체, 수원청개구리는 33개체로 확인되었으며 1개체는 동정이 확실하게 되지 않았다. Melting temperature는 수원청개구리 원종은 79.0~79.3℃로 나타났고 청 개구리 원종은 77.7~78.0℃로 나타나 두 종이 확실하게 구분이 되었다(그림 34). 그러나 그 중 한 개체는 78.6℃의 온도로 나타나 HRM 분석을 통해서는 확실하 게 동정하지 못하여 HRM을 이용한 미토콘드리아 종 동정성공률은 약 97.88% 였다.
STRUCTURE 프로그램을 이용해 반복적으로 산출한 Q값들을 기준으로 적정 집단 수 산정을 위해 STRUCTURE harvester 분석을 수행한 결과 K = 2에서 가 장 높은 delta K값을 보였다. 따라서 적정 집단 수는 2개로 나타났고, 이 중 K = 2의 결과 중에서 maximum likelihood 값이 가장 낮은 그래프를 선택한 결과 를 그림 35에 제시하였다. 청개구리과 2종의 정확한 종 동정을 위해서 미토콘 드리아 DNA 결과 및 STRUCTURE 분석 결과를 표 2-15에 정리하였다. 이 중 STRUCTURE 분석 결과 중 두 종 중 해당하는 Q 값이 0.995 이상일 경우 해당 종으로 구분하였으며, 그 외에는 잡종으로 추정한 결과 수원청개구리는 12개체, 청개구리는 8개체, 이들의 교잡종은 37개체로 나타났다(표 2-15).



그림 34. HRM 분석을 통한 청개구리과 2종의 normalized and shifted melting curve.



그림 35. Multiple-sequencing 기반 청개구리과 2종의 STRUCTURE Delta K (위) 및 Q values.

	Variable Sites (bp)													
	76	91	93	98	106	109	183	192	201	216	225	277	282	306
D. japonica	А	G	А	А	G	G	С	G	С	А	G	С	G	С
D. suweonensis	А	С	G	А	G	G	Т	А	С	А	А	С	Α	Т
AW01_4	G	G	Α	А	G	G	С	G	С	А	G	С	G	С
AW02_4	R	S	R	А	G	G	Y	R	С	А	G	С	R	Y
BD01	А	С	G	А	G	G	Т	Α	С	А	А	С	Α	Т
BD02	А	С	G	А	G	G	Т	А	S	А	G	С	Α	Т
BD03	А	С	G	А	R	G	Т	А	С	А	R	С	Α	Т
BD04	R	S	S	Α	R	G	Y	R	С	А	G	С	R	Y
BD05	А	G	Α	А	G	G	С	G	С	А	G	С	G	С
BD06	А	С	G	Α	G	G	Т	Α	С	А	R	С	Α	Т
CN01_4	R	S	R	Α	G	G	Y	R	С	А	G	С	R	Y
CN01_5	А	С	G	А	G	G	Т	Α	С	А	G	С	Α	Т
CN02_4	А	С	G	А	G	G	Т	Α	S	А	G	С	Α	Т
CN02_5	А	С	G	А	G	G	Т	А	С	А	G	С	Α	Т
DJ	А	G	Α	А	G	G	С	R	С	А	G	С	G	С
GL01_4	А	S	R	Α	G	G	Y	R	С	А	G	С	R	Y
GL02_4	R	S	R	А	G	G	Y	R	С	А	G	С	R	Y
GL02_5	R	S	R	Α	G	G	С	R	С	А	G	М	R	Y
GL03_4	А	G	Α	А	G	G	С	G	С	А	G	С	G	С
GL03_5	А	G	Α	А	G	G	С	G	С	А	G	С	G	С
HW01_4	А	С	G	А	G	G	Т	Α	S	А	G	С	Α	Т
HW02_4	А	G	Α	Α	G	G	С	G	С	А	G	С	G	С
HW02_5	R	S	R	Α	G	G	Y	R	С	А	G	С	R	Y
HY01	А	G	Α	Α	G	G	С	R	С	А	G	М	G	С
HY02	G	G	Α	А	G	G	С	G	С	А	G	С	G	С
HY03	А	G	Α	А	G	G	С	R	С	А	G	С	G	С
HY04	А	G	Α	А	G	G	С	G	С	А	G	С	G	С
JN01	А	С	G	А	G	G	Т	А	С	А	G	С	Α	Т
JN02	R	S	R	А	G	G	Y	R	С	А	G	С	R	Y
JN03	А	С	G	А	G	R	Т	Α	С	А	G	С	Α	Т
JR01_5	А	С	G	А	G	G	Т	Α	С	А	G	С	Α	Т
JR02_5	А	С	G	А	G	G	Т	А	С	А	G	С	Α	Т
JR03_5	R	S	R	А	G	G	Y	R	S	А	G	С	R	Y
JR	А	S	Α	Α	G	G	С	R	С	А	G	С	R	С

표 40. Proopiomelanocortin (POMC) 영역에서 나타난 variable sites (bp)

		Variable Sites (bp)													
	76	91	93	98	106	109	183	192	201	216	225	277	282	306	
MW01	А	С	G	А	G	G	Т	А	С	А	G	С	Α	Т	
MW01_5	А	С	G	Α	G	G	Т	А	S	А	R	С	Α	Т	
MW02	А	С	G	Α	G	G	Т	А	S	А	G	С	Α	Т	
MW02_5	А	С	G	Α	G	G	Т	А	S	А	G	С	Α	Т	
MW03	А	С	G	Α	G	G	Т	А	С	А	G	С	Α	Т	
MW03_5	R	S	S	Α	G	G	Y	R	С	А	G	С	R	Y	
MW04	R	S	R	Α	G	G	Y	R	С	А	G	С	R	Y	
MW04_5	А	С	G	A	G	G	Т	А	С	А	G	С	Α	Т	
MW05_5	R	S	R	Α	G	G	Y	R	С	А	G	С	R	Y	
MW0_5	А	С	G	Α	G	G	Т	А	С	А	G	С	Α	Т	
SG01	А	С	G	Α	G	G	Т	А	С	А	G	С	Α	Т	
SG02	А	С	R	Α	R	G	Т	А	С	А	G	С	Α	Т	
SG03	А	С	R	Α	G	G	Т	А	С	А	G	С	Α	Т	
SG04	А	С	G	Α	G	R	Т	А	С	G	R	С	Α	Т	
SJ01_5	А	S	R	Α	G	G	Y	R	S	А	G	С	R	Y	
SJ02_5	А	S	R	М	G	G	Y	R	С	А	G	С	R	Y	
SR01	G	G	А	Α	G	G	С	G	С	А	G	С	G	С	
SR02	G	G	Α	Α	G	G	С	G	С	А	G	С	G	С	
SR03	G	G	Α	Α	G	G	С	G	С	А	G	С	G	С	
SR04	А	G	А	Α	G	G	С	G	С	А	G	С	G	С	
SW01_5	А	G	А	Α	G	G	С	G	С	А	G	С	G	С	
SW02_5	R	G	А	A	G	G	С	G	С	А	G	С	G	С	
YI01	R	S	R	A	G	G	Y	R	С	А	G	С	R	Y	
YI02	R	G	А	A	G	G	С	G	С	А	G	С	G	С	
YI03	R	S	R	Α	G	G	Y	R	С	А	G	С	R	Y	

					Variable	Sites (bp)				
	1	12	25	125	202	229	256	260	308	361
D. japonica	G	С	Т	Т	G	С	Т	С	С	А
D. suweonensis	А	С	Т	Т	Α	С	Т	С	С	G
AW01_4	G	С	Т	Т	А	С	Т	С	С	Α
AW02 4	G	С	Т	Т	Α	S	Y	С	Y	G
BD01	А	С	Т	Т	А	С	Т	С	С	G
BD02	А	С	Т	Т	А	С	Т	С	С	G
BD03	А	С	Т	Т	А	С	Т	С	С	G
BD04	G	С	Т	Т	А	С	Y	С	С	G
BD05	G	Ċ	Ť	T	Δ	Š	v	Ĉ	v	Δ
BD05	Δ	Č	т	т	Δ	Č	Ť	Č	Ċ	G
CN01 4	Λ	C	т	Т	л л	C	T	C	v	G
CN01_4	A .	C	T	Т	A A	C	T	C	C I	G
CN01_5	A	C	I T	T	A	C	I T	C	C	C
CIN02_4	A	C	I T	I T	A	C	I	C	C	G
CIN02_5	A	C	I	I	A	C		C	C	G
DJ	G	C	1	1	A	5	Y	C	C	G
GL01_4	G	С	T	T	R	С	Y	С	T	A
GL02_4	A	C	Т	Т	Α	С	Т	С	Y	G
GL02_5	G	C	Т	Т	Α	С	Т	С	Y	A
GL03_4	А	С	Т	Т	Α	С	Y	С	С	G
GL03_5	G	С	Т	Т	Α	С	Т	С	Т	Α
HW01_4	А	С	Т	Т	А	С	Т	С	С	G
HW02 4	А	С	Т	Т	А	С	Т	С	Y	G
HW02 <sup>5</sup>	G	С	Т	А	А	С	Т	С	Y	G
HY01	G	Т	Y	Т	G	G	С	С	Т	А
HY02	G	С	Т	Т	А	С	Т	С	Т	А
HY03	G	Y	С	Т	G	S	С	С	Т	А
HY04	G	Č	Ť	T	Ā	S	Ŷ	Ē	Č	G
INIO2	G	Č	т	т	Δ	S	v	C	v	G
JN02 IN03	Δ	C	т	Т	л л	C	т	C	Ċ	P
JIN05 ID	A .	C	T	Т	A A	c c	V	C	C	G
	A	C	I T	T	A	S C	T	C	C	C
JK01_5	A	C	I T	I T	A	C	T	C	C	G
JK02_5	A	C	I	I	A	C	I	C	C	G
JK03_5	A	C	I	I	A	C	I	C	C	G
MW01	A	C	1	1	A	C	1	C	C	G
MW01_5	A	С	T	T	A	С	T	С	С	G
MW02	A	C	Т	Т	Α	С	Т	С	С	G
MW02_5	A	С	Т	Т	Α	С	Т	С	С	G
MW03	A	C	Т	Т	Α	С	Т	С	С	G
MW03_5	A	C	Т	Т	А	S	Т	С	С	G
MW04	А	С	Т	Т	Α	С	Т	С	С	G
MW04_5	А	С	Т	А	Α	С	Y	С	С	G
MW0_5	А	С	Т	Т	Α	С	Т	С	С	G
SG01	А	С	Т	Т	А	С	Т	С	С	G
SG02	А	С	Т	Т	А	С	Т	С	С	G
SG03	А	С	Т	Т	А	С	Т	С	С	G
SG04	А	С	Т	Т	А	С	Т	С	С	G
SJ01 5	А	С	Т	Т	А	С	Т	С	С	G
SJ02_5	A	Č	Ť	T	A	Ċ	T	Ē	Ŷ	G
SR01	G	C	T	Т	R	Ğ	Т	C	v	Δ
SP02	G	v	Ċ	Т	D	G	v	v	т	Λ Λ
SP02	G	C	т	Т	D	C	т	C I	v	Λ Λ
SILUS SILUS	G		I T	I T	ľ. A	C	I T	C	1 T	A
SKU4 SW01 5	G	C	I T	I T	A	C	I V	C	I C	A
SW01_5	G		1	1	A	C	Y V	C	C	G
SW02_5	G	U T	1	1	A	C	Y	C	C	G
TYR_AS1	G	Т	Y	T	G	G	Y	C	T	A
TYR_DS	A	C	T	T	A	C	T	C	c	G
TYR_HY	G	C	Т	Т	Α	С	Т	С	Y	Α
YI01	G	C	Т	Т	А	S	Y	С	С	G
YI02	G	C	Т	Т	А	С	Y	С	Y	Α

표 41. Tyrosinase (TYR) 영역에서 나타난 variable sites (bp)

	1	6	133	175	250	263
D. japonica	Т	A	А	G	Т	С
D. suweonensis	C	A	A	Ā	Т	Ċ
AW01 4	Y	А	А	R	Т	С
AW02 <sup>4</sup>	Т	А	А	R	Т	С
$BD0\overline{1}$	С	А	А	А	Т	С
BD02	С	А	А	А	Т	С
BD03	Č	A	A	A	T	Č
BD04	C	A	A	A	Ť	Č
BD05	T	A	A	G	Ť	C
BD05	Ċ	A	A	A	Ť	C
CN01_4	т	Δ	Δ	R	T	C
$CN01_{5}$	V		A A	D	Т	C
$CN02_4$	C		A A		Т	C
$CN02_4$	С Т	A	A	D A	Т	C
CN02_5	T	A	A	K C	I T	C
	T	A	A	G		C
GL01_4 CL02_4	T	G	A	U D	Т Т	C
GL02_4	I 	A	A	K	I	C
GL02_5	1	A	w	G	I	C
GL03_4	T	R	A	R	Т	C
GL03_5	T	A	A	R	Т	C
HW01_4	<u> </u>	A	А	A	Т	С
HW02_4	T	R	A	R	Т	С
HW02_5	t	A	А	G	Т	С
HY01	T	A	А	G	Т	С
HY02	Т	R	А	G	Т	С
HY03	Т	R	Α	G	Т	С
HY04	Т	R	Α	G	Т	С
JN02	Т	A	Α	R	Т	С
JN03	С	A	Α	Α	Т	С
JR	Т	Α	Α	R	Т	С
JR01_5	Т	А	А	R	Т	С
JR02_5	Т	А	А	R	Т	С
JR03_5	С	А	А	Α	Т	С
MW01	С	А	А	R	Т	С
MW01_5	С	А	А	Α	Т	С
MW02_5	Т	А	А	R	Т	С
MW02	С	А	А	Α	Т	С
MW03 5	Т	А	А	R	Т	С
MW03	С	А	А	Α	Т	С
MW04 5	С	Α	А	R	Т	С
$MW0\overline{4}$	С	А	А	Α	Т	С
MW05 5	Т	А	А	R	Т	С
MW0 5	С	А	А	Α	Т	С
$SG0\overline{1}$	С	А	А	Α	Т	С
SG02	С	А	А	А	Т	С
SG03	Č	A	A	A	T	Č
SG04	Č	A	A	A	Ť	Č
SIAH ASI	Т	G	A	G	Ť	Č
SIAH DS	Ċ	A	A	A	Ť	Č
SIAH HY	T	G	A	G	Ť	Č
SI01_5	C	Δ	Δ	Δ	Ť	C
SJ02 5	v	A	A	R	Ť	č
SR01	Т	Δ	Δ	G	Т	v
SR01	T	R	Δ	G	т Т	ſ
SR02	Т		л л	G	Т	Č
STO5	Т	D	л л	G	Т	C
SKU4 SW01 5	T	К р	A	P	1 T	C
SW01_3 SW02_5	T	К р	A	P	1 T	C
5 W 02_3		IX.	A	R D	1	C
1 10 I V10 2		A	A	K D		C
1 102 VI02	T	A	A A	K		C
1105		A	A	NT NT		L.

표 42. E3 ubiquitin protein ligase 1 (SIAH) 영역에서 나타난 variable sites (bp)

								Varia	ble Sites	(bp)							
	1	97	122	169	187	262	283	308	322	385	391	430	460	482	496	510	511
D. japonica	Α	Α	С	С	С	Т	С	С	G	Т	С	Т	Т	G	G	Т	G
D. suweonensis	G	Т	С	С	С	С	С	С	С	Т	С	С	С	Α	G	С	G
AW01_4	Α	Α	С	С	С	Т	С	С	G	Т	С	Т	Т	G	G	С	G
AW02_4	Α	Α	С	С	С	Т	С	С	G	Т	С	Т	Т	G	G	С	G
BD01	G	Т	С	С	С	С	С	С	С	Т	С	С	С	Α	G	С	G
BD02	G	Т	С	С	G	С	А	С	С	Т	С	С	С	Α	G	С	G
BD03	G	Т	С	С	С	С	С	С	С	Т	С	С	С	Α	G	С	G
BD04	G	Т	С	С	С	С	С	С	С	Т	С	С	С	Α	G	С	G
BD05	Α	Α	С	С	С	Т	С	С	G	Т	С	Т	Т	G	G	С	G
BD06	G	Т	С	С	S	С	М	С	С	Т	С	С	С	Α	G	С	G
CN01_4	G	Т	С	С	С	С	С	С	С	Y	С	С	С	Α	G	С	G
CN01_5	G	Т	С	С	С	С	С	С	С	Y	С	С	С	Α	G	С	G
CN02_4	G	Т	С	Т	С	С	С	С	С	Т	С	С	С	Α	G	С	G
CN02_5	G	Т	С	С	С	С	С	С	С	Y	С	С	С	Α	G	С	G
DJ	Α	W	С	С	С	Y	С	С	G	Т	С	Y	Y	R	G	С	G
GL01_4	Α	Α	С	S	С	Т	С	С	G	Т	С	Т	Т	G	R	С	G
GL02_4	Α	Α	С	С	С	Т	С	С	G	Т	С	Т	Т	G	R	С	G
GL02_5	Α	Α	С	С	С	Т	С	С	G	Т	С	Т	Т	G	R	С	G
GL03_4	Α	A	С	С	С	Т	С	С	G	Т	С	Т	Т	G	G	С	G
GL03_5	Α	Α	С	С	С	Т	С	С	G	Т	С	Т	Т	G	G	С	G
HW01_4	G	Т	С	С	С	С	С	С	С	Y	С	С	С	Α	G	С	G
HW02_4	Α	Α	С	S	С	Т	С	С	G	Т	С	Т	Т	G	G	С	G
HW02_5	Α	Α	С	S	С	Т	С	С	G	Т	С	Т	Т	G	G	С	G
HY01	Α	Α	С	С	С	Т	С	С	G	Т	С	Т	Т	G	G	Т	G
HY02	Α	А	С	С	С	Т	С	С	G	Т	С	Т	Т	G	G	С	G
HY03	Α	A	С	С	С	Т	С	С	G	Т	С	Т	Т	G	G	С	G
HY04	Α	W	С	С	С	Y	С	С	S	Т	С	Y	Y	R	G	Y	G
JN01	G	Т	С	С	С	С	С	С	С	Т	С	С	С	Α	G	С	G
JN02	Α	W	С	С	С	Y	С	С	S	Т	С	Y	Y	R	G	С	G
JN03	G	Т	С	С	С	С	С	С	С	Т	С	С	С	Α	G	С	G
JR	G	W	C	С	S	Y	М	С	S	Т	С	Y	Y	R	G	С	G
JR01_5	G	Т	C	С	S	С	М	С	С	Т	С	С	С	А	G	С	G
JR03_5	G	Т	C	С	С	С	C	С	С	Т	С	С	С	Α	G	С	G
MW01	G	Т	С	С	С	С	С	С	С	Y	С	С	С	Α	G	С	G
MW01_5	G	Т	С	С	С	С	C	С	С	Т	С	С	С	Α	G	С	G
MW02	G	Т	С	С	S	С	М	С	С	Т	С	С	С	Α	G	С	G

표 43. V(D)J recombination-activating protein 1 (RAG 1) 영역에서 나타난 variable sites (bp)

	Variable Sites (bp)																
	1	97	122	169	187	262	283	308	322	385	391	430	460	482	496	510	511
MW02_5	G	Т	С	Y	С	С	С	С	С	Y	С	С	С	Α	G	С	G
MW03	G	Т	С	С	С	С	С	С	С	Y	С	С	С	Α	G	С	G
MW03_5	G	Т	С	Y	S	С	М	С	С	Т	С	С	С	Α	G	С	G
MW04	G	Т	С	Y	С	С	С	С	С	Т	С	С	С	Α	G	С	G
MW04_5	G	Т	С	С	S	С	М	С	С	Y	С	С	С	Α	G	С	G
MW05_5	G	Т	С	Y	С	С	С	С	С	Y	С	С	С	Α	G	С	G
MW0_5	G	Т	С	Y	С	С	С	С	С	Т	С	С	С	Α	G	С	G
SG01	G	Т	С	С	С	С	С	С	С	Т	С	С	С	Α	G	С	G
SG02	G	Т	С	Y	С	С	С	С	С	Т	С	С	С	Α	G	С	G
SG03	G	Т	С	С	S	С	М	С	С	Т	С	С	С	Α	G	С	G
SG04	G	Т	С	С	С	С	С	С	С	Т	С	С	С	Α	G	С	G
SJ01_5	G	Т	С	С	G	С	Α	С	С	Т	С	С	С	Α	G	С	G
SJ02_5	G	W	С	С	S	Y	М	С	S	Т	С	Y	Y	R	G	С	G
SR01	Α	Α	С	С	С	Т	С	С	G	Т	С	Т	Т	G	G	С	G
SR02	Α	Α	С	С	С	Т	С	М	G	Т	С	Т	Т	G	G	С	G
SR03	Α	Α	С	С	С	Т	С	С	G	Т	С	Т	Т	G	G	С	G
SR04	Α	Α	С	С	С	Т	С	С	G	Т	С	Т	Т	G	G	С	G
SW01_5	Α	Α	С	С	С	Т	С	С	G	Т	С	Т	Т	G	G	С	R
SW02_5	Α	W	С	С	С	Т	С	С	G	Т	Y	Y	Y	R	G	С	R
YI01	G	Т	С	Y	С	С	С	С	С	Т	С	С	С	Α	G	С	G
YI02	А	W	Y	С	С	Y	С	С	S	Т	С	Y	Y	R	G	С	G
YI03	G	Т	С	С	С	С	С	С	С	Y	С	С	С	Α	G	С	G

			V	ariable Sites (	bp)		
·	42	144	243	268	279	288	297
D. japonica	С	А	G	А	Т	С	А
D suveonensis	Δ	C	Δ	Δ	G	Č	Δ
D. Suwconclusis	A .	C	C A	A	T	C	A
AW01_4	A	C	U D	A	1 V	C	A
AW02_4	A	C	ĸ	A	K	C	A
BD01	А	С	R	Α	G	C	А
BD02	А	С	R	А	G	C	А
BD03	А	С	А	А	G	С	А
BD04	А	С	G	А	G	С	А
BD05	Δ	Č	G	Δ	T	Č	Δ
CN01 4	A .	C		A	C I	C	A .
CN01_4	A	C	A	A	G	C	A
CN01_5	A	С	A	A	G	С	А
CN02_4	Α	С	G	А	G	C	А
CN02 5	А	С	А	А	G	С	А
$DJ^{-}$	А	С	G	А	K	С	А
GI 01 4	Δ	Ċ	G	Δ	Т	Ċ	Δ
GL01_4 CL02_4	^	C	C	A .	V	C	^
GL02_4	A	C	U	A	Т	C	A
GL02_5	A	С	G	А	1	С	A
GL03_4	A	С	G	A	Т	C	A
GL03_5	А	С	G	А	Т	C	А
HW01 4	А	С	А	А	G	С	А
HW024	А	С	G	А	Т	С	А
$HW02_5$	^	Ċ	P	A	K	C	^
11W02_5	A .	C	C	A	T	C	A .
HY01	A	C	G	A	1	C	A
HY02_5	A	С	G	А	1	С	А
HY03	A	С	G	A	T	C	A
HY04	А	С	G	А	K	C	А
JN01	А	С	G	А	G	С	А
JN02	А	С	R	R	G	С	А
IN03	А	С	G	А	G	С	А
ID	^	C	D	A .	G	C	^
	A	C	K A	A .	C	C	A
JR01_5	A	C	A	A	G	C	A
JR02_5	A	С	R	A	G	С	A
JR03_5	А	С	R	Α	G	C	А
MW01	А	С	G	Α	G	S	А
MW01 5	А	С	G	А	G	С	А
MW02	А	С	R	А	G	С	А
MW02 5	A .	Č	D	A .	G	Č	A .
	A	C	R D	A .	G	C	A
M W03	A	C	ĸ	A	G	C	A
MW03_5	A	С	A	A	G	C	A
MW04	А	С	А	А	G	C	А
MW04 5	А	С	G	А	G	С	А
MW05_5	А	С	R	А	G	С	А
MW0_5	Δ	Ċ	G	Δ	G	Ċ	Δ
SC01	A .	C	C	A	C	C	A .
5001	A	C	0	A	0	C	A
SG02	A	C	ĸ	A	G	C	А
SG03	Α	С	G	А	G	C	А
SG04	А	С	R	А	G	C	А
SJ01 5	А	С	R	А	G	С	А
SJ02_5	А	С	G	А	К	C	А
SR01	A.	C C	G	٨	T	Č	^
SILUI	A .	C	C C	A .	T		A .
SK02	A	c	G	A	1	U C	A
SR03	А	С	G	Α	T	C	А
SR04	А	С	G	А	Т	C	А
SW01 5	А	С	G	А	Т	C	А
YI01	А	С	G	А	G	С	А
Y102	A	Č	R	A	ĸ	Č	A
VI03	A	C	D	л л	G	Č	G
1 103	A	C	K	А	U	U U	U

표 44. Transcriptional regulator Myc-like (C-MYC) 영역에서 나타난 variable sites (bp)

	STRUCTU	RE results	HRM res mitochono	ults using trial DNA	Results of
	D. japonicus	D. suweonensis	Melting temperature	Results of HRM	identification
AW01 5	0.975	0.025	77.1	J	HY
$AW02^{5}$	0.757	0.243	77.8	J	HY
BD01	0.004	0.996	79.1	S	S
BD02	0.004	0.996	79.2	S	S
BD03	0.004	0.996	79.2	S	S
BD04	0.248	0.752	79.2	S	HY
BD05	0.995	0.005	77.9	J	J
BD06	0.005	0.995	79.0	S	S
CN01_4	0.227	0.773	79.3	S	HY
CN01_5	0.006	0.994	79.3	S	HY
CN02_4	0.005	0.995	79.3	S	S
CN02_5	0.007	0.993	79.3	S	HY
DJ	0.777	0.223	78.0	J	HY
GL01_4	0.870	0.130	77.7	J	HY
GL02_4	0.721	0.279	77.7	J	HY
GL02_5	0.878	0.122	77.8	J	HY
GL03_4	0.972	0.028	77.6	J	HY
GL03_5	0.994	0.006	77.8	J	HY
HW01_4	0.004	0.996	79.0	S	S
HW02_4	0.974	0.026	77.6	J	HY
HW02_5	0.743	0.257	77.8	J	HY
HY01	0.995	0.005	77.7	J	J
HY02	0.995	0.005	78.0	J	J
HY03	0.994	0.006	78.0	J	J
HY04	0.786	0.214	78.0	J	HY
JN01	0.014	0.986	79.3	S	HY
JN02	0.346	0.654	78.1	J	HY
JN03	0.245	0.755	79.3	S	HY
JR	0.037	0.963	79.3	S	HY
JR01_5	0.182	0.818	79.3	S	HY
JR02_5	0.198	0.802	79.3	S	HY
JR03_5	0.228	0.772	79.3	S	HY
MW01	0.006	0.994	79.3	S	HY
MW01_5	0.005	0.995	79.3	S	S
MW02	0.004	0.996	79.2	S	S
MW02_5	0.007	0.993	79.5	S	HY
MW03	0.005	0.995	79.1	S	S
MW03_5	0.209	0.791	79.4	S	HY

표 45. HRM 분석 및 STRUCTURE 분석을 통한 청개구리류 동정 결과

	STRUCTU	JRE results eotide DNA	HRM res mitochond	ults using Irial DNA	Results of
	D. japonicus	D. suweonensis	Melting temperature	Results of HRM	identification
MW04	0.160	0.840	79.3	S	HY
MW04_5	0.012	0.988	79.3	S	HY
MW05_5	0.244	0.756	79.2	S	HY
MW0_5	0.005	0.995	79.2	S	S
SG01	0.005	0.995	79.3	S	S
SG02	0.008	0.992	79.1	S	HY
SG03	0.008	0.992	79.1	S	HY
SG04	0.004	0.996	79.3	S	S
SJ01_5	0.129	0.871	79.3	S	HY
SJ02_5	0.406	0.594	78.6	-	HY
SR01	0.996	0.004	77.8	J	J
SR02	0.996	0.004	77.8	J	J
SR03	0.995	0.005	78.0	J	J
SR04	0.995	0.005	77.9	J	J
SW01_5	0.992	0.008	77.7	J	HY
SW02_5	0.853	0.147	77.8	J	HY
YI01	0.284	0.716	79.2	S	HY
YI02	0.774	0.226	78.0	J	HY
YI03	0.274	0.726	79.3	S	HY

\* J = 청개구리, S = 수원청개구리, HY = 교잡

#### 라. 여울마자 분변을 이용한 메타바코딩

여울마자 및 돌마자 분변을 대상으로 메타바코딩을 수행한 결과 총 OTUs의 수는 382개로 나타났다. 이 중 query coverage와 identity percentage 를 85%이상으로 1차 필터링을 수행한 결과 85개로 조사되었다.

돌마자의 분변에서는 총 56개의 OTUs가 확인되었으며, 여울마자의 분변 에서는 총 72개의 OTUs가 확인되었다. OTU클러스트링 결과 돌마자 분변은 101,761 reads가 클러스트링 되었으며, 여울마자 분변은 88,923 reads가 클러 스트링 되었다. 돌마자와 여울마자 분변 모두에서 돌말류(Bacillariophyta) OTUs가 각각 16개, 21개로 가장 많았으며, 그 밖에 녹조식물(Chlorophyta), 윤형동물(Rotifera) 등의 OTUs가 다수 존재하였다. 그 밖에 척추동물 (Chordata), 편형동물(Platyhelminthes), 섬모충류(Ciliophora)에 속하는 OTUs가 일부 나타났다(그림 36).

종 별로 보면 돌마자와 여울마자 모두 가장 많은 reads를 차지하고 있는 OTU는 누치(Hemibarbus labeo)로 각각 71,572개, 58,982개로 가장 많았고, 이어서 Cymbella excisa (order: Cymbellales)가 각각 28,009개, 11,229개로 두 번째로 많았다. 그 다음으로는 Eolimna minima (order: Naviculales)가 각각 323개, 3,497개로 조사되었다. 가장 많은 reads 순으로 상위 10종을 비교한 결과 돌마자와 여울마자 분변에서 공통으로 Hemibarbus labeo, Cymbella excisa, Eolimna minima, Tetradesmus dimorphus, Fistulifera pelliculosa 5종이 나타난 반면 돌마자에서만 Navicula cryptocephala, Trichotria tetractis, Fragilaria nanana, Desmodesmus sp.가 나타났으며, 여울마자에서만 Melosira varians, Nitzschia amphibia, Cloniophora spicata, Gomphonema sp.가 나타나 다소 차이를 보였다. 또한 비율로 보았을 때도 돌마자는 상위 2개의 OTUs 가 99%를 차지하는데 비해, 여울마자는 상위 2개의 OTUs가 79%로 차이를 보였다. 이는 돌마자와 여울마자의 식성 차이를 알 수 있으며, 돌마자는 특 정 먹이원을 섭취하는 것을 선호하는 양상을 보이는 반면 여울마자는 다양 한 먹이원을 필요로 하는 것으로 사료되어 향후 이에 대한 계절적 변동양 상을 비교 분석할 필요가 있을 것으로 판단된다.



그림 36. 돌마자와 여울마자의 분변 메타바코딩 분석 결과도. 상위 10개의 OTUs를 대상으로 작성되었음. 위, 돌마자; 아래, 여울마자

## 4. 참달팽이와 소똥구리 미토콘드리아 유전체 연구

### 가. 참달팽이 미토콘드리아 유전체 염기서열 결정 및 계통분석

(1) 상기의 방법으로 확보된 완전장 서열과 예측된 유전자 정보를 바탕으로 Organellar GenomeDRAW v 1.3.1을 사용하여 circular map을 작성하였다(그림 37, 표 46).



그림 37. 참달팽이 미토콘드리아 유전체의 유전자 배열과 구성

(2) 참달팽이 미토콘드리아 유전체의 염기서열 결정과 annotation 참달팽이의 전체 미토콘드리아 유전체에서 결정된 염기서열은 총 13,986bp로 확인되었으며 13개의 단백질 암호와 유전자(ATP6, ATP8, COXI, COX II, COX III, CytB, ND1-ND6, ND4L)와 2개의 rRNA(12S, 16S), 22개의 tRNA 유전자로 구성되어 있다(그림 37).

	Charles	Pos	ition	L th	Start	Stop	Intergenic
Gene	Strand	start	end	Length	codon	codon	sequences
cox1	+	1	1528	1528	GTG	T	0
trnV	+	1529	1588	60			0
rrnL(UAG)	+	1589	2593	1005			0
trnL	+	2594	2654	61			-3
trnP	+	2652	2714	63			+2
trnA	+	2717	2778	62			-7
nad6	+	2772	3257	486	ATT	TAA	-14
nad5	+	3244	4920	1677	GTG	TAG	-19
nad1	+	4902	5801	900	ATG	TAG	0
nad4l	+	5802	6104	303	TTG	TAG	-22
cytb	+	6083	7198	1116	TTG	TAG	+5
trnD	+	7204	7258	55			-4
trnC	+	7255	7318	64			-2
trnF	+	7317	7377	61			0
сох2	+	7378	8058	681	GTG	TAA	+5
trnG	+	8064	8116	53			-1
trnH	+	8116	8180	65			0
trnY	+	8181	8243	63			+90
trnW	-	8334	8398	65			-2
trnQ	+	8397	8447	51			-1
trnL(UAA)	-	8447	8510	64			+3
atp8	-	8514	8669	156	ATG	TAA	0
trnN	-	8670	8728	59			+1
atp6	-	8730	9380	651	ATG	TAA	-1
trnR	-	9380	9442	63			+5
trnE	-	9448	9512	65			0
rrnS	-	9513	10208	696			0
trnM	-	10209	10270	62			0
nad3	-	10270	10615	346	GTG	T	+7
trnS(UGA)	-	10623	10682	60			+65
trnS(GCU)	+	10748	10807	60			0
nad4	+	10808	12136	1329	GTG	TAA	-5
trnT	-	12132	12191	60			0
сох3	-	12192	12970	779	ATG	T	+45
trnl	+	13015	13076	62			0
nad2	+	13077	13925	849	GTG	TAA	+2
trnk	+	13928	13986	59			+7

표 46. 참달팽이(Koreanohadra koreano)의 전체 미토콘드리아 유전체 구성

참달팽이의 12S rRNA 유전자의 길이는 696bp이고, 16S rRNA 유전자는 1005bp이며, 일반적으로 무척추동물의 2개의 RNA 유전자 사이에는 trnV가 위치하는데, 참달팽이는 12S rRNA와 16S rRNA가 떨어져 있음을 확인되었다. 참달팽이와 같은 병안목(Stylommatophora)에 속하는 *Cepaea nemoralis*와 미토콘드리아 유전자 배열을 비교하였을 때, trnG와 trnH, trnS와 ND4의 위치가 변경되었음을 확인할 수 있었다. 또한, 같은 달팽이상과에 속하는 거제외줄달팽이(멸종II급)과 울릉도달팽이(멸종II급)와는 같은 유전자 배열 양상을 보였다(그림 38).



그림 38. 복족류 미토콘드리아 유전체의 유전자 배열에 대한 가설. Ce.: ephalopoda(두족강); Ve.: Vetigastropoda(고복족강); Ca.: Caenogastropoda(신생복족아강); He.: Heterobranchia(이새강); Oc.:Octopoda(문어목); Pl.: Pleurotomarioidea; Ne.: Neogastropoda(신복족목); Li.: Littorinimorpha(총알고둥목); Pu.: Pulmonata(유폐하강); St.: Stylommatophora(병안목) (3) 참달팽이 미토콘드리아 유전체를 근거한 인근 분류군과의 계통분석
본 연구에서는 참달팽이의 미토콘드리아 유전체의 12개 단백질암호화
유전자를 이용하여 maximum likelihood (ML) 분석을 수행하였다. 외군으로
Galba pervia, Aplysia californica 2종을 지정하였으며, 참달팽이를 포함하여
총 10종의 Stylommatophoran mtgenome을 분석에 이용하였다. 참달팽이는
울릉도달팽이와 함께 달팽이과(Bradybaenidae)에 속하고, 외줄달팽이과(Camaenidae)와
자매군을 형성한다. 본 분석에서는 외줄달팽이과와 달팽이과가 서로
자매군을 형성하는 것을 높은 신뢰도 값(BP 98)으로 지지하고 있다(그림
39).



그림 39. 참달팽이 미토콘드리아 유전체를 근거한 인근 분류군과의 계통유연관계

#### 나. 소똥구리 미토콘드리아 유전체 염기서열 결정

(1) 소똥구리 미토콘드리아 유전체의 염기서열 결정

소똥구리 미토콘드리아 염기서열을 어셈블리하여 얻은 328,413개의 contig 서열을 다시 NCBI NT DB에 BLAST하였고, 그 결과는 다음과 같다(표 47).

Rank	Hsp	Query	e-value	Bit	Query (enoth(bp))	Target length(bp)	Target	Target	Query coverage(%)	Target coverage(%)	Matches (bp)	Identity (%)	Query	Query	Target	Target end	Strand
1	1	NODE 1 ler	0	7186.4	50.674	4.649.235	CP042861	Providencia sp. 1709051003 chron	18.4	0.2	9.425	80.7	28.190	37.503	2 385 956	2 395 314	1
- 1	1	NODE 2 les	0	5570.6	45.930	3,020,833	CP060720	Vagococcus caminhilus strain AT	20.2	0.3	0380	777	7.975	17 239	1547675	1,556,988	
1	1	NODE 3 lar	0	9361.8	41 898	4651 003	AP022371	Providencia rettoeri BMI 7496 DN	23.1	0.2	9.742	84.7	30 345	40.024	2158 734	2 168 402	
1	1	NODE 4 les	0	5038.8	39,355	3,020,833	CP060720	Vanococcus camiphilus strain AT	14.0	0.2	5.553	83.3	10716	16,237	1.084.437	1.089.939	
1	1	NODE 5 ler	0	51389.7	39,247	3,990,106	CP023536	Providencia alcalifaciens strain FC	72.2	0.7	28.346	99.4	1	28.344	2,622,958	2,651,301	
- 1	1	NODE 6 les	0	15217.5	38,573	4309166	CP029736	Providencia rettoeri strain AR 008	431	0.4	16,716	83.3	17.542	34.171	264 501	281133	-
1	1	NODE 7 les	0	65887.7	36,709	3,996,106	CP023536	Providencia alcalifaciens strain FC	100.0	0.9	36,709	991	1	36,709	2 369 186	2.405.892	-
1	1	NODE 8 ler	0	65019.8	35,685	4.033.976	CP059346	Providencia alcalifaciens strain 17	99.8	0.9	35,609	996	78	35.685	3 314 561	3,350,168	
1	1	NODE 9 ler	0	55904.7	34.820	4033.976	CP059346	Providencia alcalifaciens strain 17	89.6	80	31,218	99.0	3623	34.820	2.059.240	2 090 447	1 3
	1	NODE 10 M	0	7926.9	34,397	4573.616	CP031123	Providencia sp. WCHPHu000369 s	25.6	0.7	8.849	83.0	25,606	34 397	3.912.889	3,921,680	1 3
1	1	NODE 11 I	0	6608.4	34,131	4.605,722	CP053896	Providencia rettoeri strain YPR31	27.6	0.2	9.542	79.6	21,770	31,173	619.637	629.089	
1	1	NODE 12 In	0	29734.0	34.128	4.033.976	CP059346	Providencia alcalifaciens strain 17	48.8	0.4	16.672	98.9	116	16.761	497,589	514,249	1 0
1	1	NODE 13 I	0	28025.9	33,467	3,990,106	CP023536	Providencia alcalifaciens strain FD	46.2	0.4	15.480	99.3	13.615	29.092	1.366.437	1.381.916	
1	1	NODE 14 I	0	11793.8	32,202	4 518 601	CP027418	Providencia rettoeri strain FDAAR	42.5	0.3	13,732	82.4	12.924	26.605	264 303	277.931	1
1	1	NODE 15 Is	0	9299.0	32.021	4.573.616	CP031123	Providencia sp. WCHPHu000369 s	23.8	0.2	7.642	88.7	9.411	17.038	274.257	281.882	1 8
1	1	NODE 16 le	0	57906.5	31.817	4.033.976	CP059346	Providencia alcalifaciens strain 17	100.0	0.8	31.817	99.5	1	31,817	2.466.196	2,498,011	
1	1	NODE 17 le	0	57088.4	31,382	3,990,106	CP023536	Providencia alcalifaciens strain FD	99.8	0.8	31,306	99.6	1	31,305	1.915.514	1.946.817	1
1	1	NODE 18 I	0	2898.5	30,770	3.020.833	CP060720	Vagococcus camiphilus strain AT	12.5	0.1	3.883	80.6	13161	16.992	2.665.626	2,669,461	
1	1	NODE 19 I	0	51639.0	30,754	4.033,976	CP059346	Providencia alcalifaciens strain 17	92.2	0.7	28.353	99.5	1	28.349	2.755.121	2,783,471	-
1	1	NODE 20 le	0	4808.0	30,305	4,518,601	CP027418	Providencia rettgeri strain FDAAR	25.2	0.2	7,668	78.2	10,668	18,290	4,460,681	4,468,277	
1	1	NODE 21 Je	0	5729.4	30,206	4,573,616	CP031123	Providencia sp. WCHPHu000369 s	13.2	0.1	3,996	92.6	22,974	26,963	1,899,147	1,903,137	1
1	1	NODE 22 1	0	54492.1	29.809	4.033.976	CP059346	Providencia alcalifaciens strain 17	100.0	0.7	29.809	99.7	1	29.809	795.033	824,840	1 4
1	1	NODE 23 1	0	13370.9	29.807	4.623.927	CP042860	Providencia sp. 1701091 chromos	49.6	0.3	14.851	83.1	13,350	28.120	3.081.931	3.096.712	1 3
1	1	NODE 24 le	0	53025.8	28,979	4.033,976	CP059346	Providencia alcalifaciens strain 17	100.0	0.7	28.979	99.7	1	28,979	2.220.621	2,249,597	-
1	1	NODE 25 In	0	6200.3	27.533	3.020,833	CP060720	Vagococcus camiphilus strain AT	32.2	0.3	8,956	79.5	15,508	24.363	3.007,708	3,016,576	
1	1	NODE 26 le	0	8510.5	27,258	4,649,235	CP042861	Providencia sp. 1709051003 chron	33.3	0.2	9.173	83.7	4,293	13.378	249.227	258,344	0.0
1	1	NODE 27 1	0	48339.0	26,955	3,990,106	CP023536	Providencia alcalifaciens strain FD	100.0	0.7	26,957	99.0	1	26,955	2,662,202	2,689,158	1
1	1	NODE 28 1	0	21507.2	26,673	4,033,976	CP059346	Providencia alcalifaciens strain 17	44.8	0.3	11,938	99.2	14,097	26,033	667,932	679,868	1
1	1	NODE_29_1	0	17972.7	26,519	4,033,976	CP059346	Providencia alcalifaciens strain 17	37.5	0.2	9,943	99.3	77	10.017	3,297,622	3,307,546	1
1	1	NODE 30 le	0	1424.9	26,440	3.020,833	CP060720	Vagococcus camiphilus strain AT	5.3	0.0	1,402	85.0	25,040	26,440	1,664,136	1,665,536	1 8
1	1	NODE_31_I	0	1556.0	26,165	3,020,833	CP060720	Vagococcus carniphilus strain AT	9.5	0.1	2,505	78.2	97	2,579	2,631,508	2,633,991	
1	1	NODE 32 1	0	45811.0	25,966	4,033,976	CP059346	Providencia alcalifaciens strain 17	96.5	0.6	25,056	99.7	1	25,056	3,828,120	3,853,175	1 12
1	1	NODE_33_le	0	38690.3	25,507	4,033,976	CP059346	Providencia alcalifaciens strain 17	84.4	0.5	21,573	99.1	3,978	25,507	1,533,889	1,555,460	0.0
1	1	NODE_34_le	0	9077.4	25,112	4,623,927	CP042860	Providencia sp. 1701091 chromos	45.6	0.2	11,544	81.1	1,520	12,964	1,709,155	1,720,638	
1	1	NODE_35_le	8.95E-66	268.9	24,557	4,344,873	CP016020	Bacillus weihaiensis strain Alg07	2,8	0.0	702	74.1	22,710	23,400	2,783,792	2,784,482	
1	1	NODE_36_H	0	3923,4	24,461	4,518,601	CP027438	Providencia rettgeri strain FDAAR	33.0	0.2	8,158	75.7	4,897	12,966	3,655,631	3,663,712	-
1	1	NODE 37 1	0	42584.9	24,458	3,990,106	CP023536	Providencia alcalifaciens strain FC	96.3	0.6	23,573	99.3	902	24,458	3,105,958	3,129,529	1
. 4		NODE 20 L		2.08.03	24.420	4 519 601	CD027410	Benuidancia estenari steala EDAAR	20.6	0.2	0.752	70.6	6.071	16 639	3527976	3547546	0.00

표 47. 소똥구리에서 확보된 미토콘드리아 assembly\_contig 서열의 BLAST 결과(일부만 표시)

(2) BLAST 결과의 target description에서 미토콘드리아에 해당하는 결과를 탐색한 결과, 49개의 contig가 미토콘드리아로 분류되었고, 그 중 17개가 곤충으로 분류되었다(표 48).

#### 표 48. 미토콘드리아로 분류된 BLAST 결과

	10000	Query	and the second	Bit	Query	Target	Target		Target	Query	Target	Matches	Identity	Query	Query	Target	Target	
Rank	Hsp	name	e-value	score	length(bp)	length(bp)	accession	是将	description	coverage(%)	coverage(%)	(bp)	(96)	start	end	start	end	Strand
1	1	NODE 13054	0	1181.1	999	14,802	NC_039689	공중	Dichotomius schiffleri mitochond	100.0	6.7	1,003	88.0	1	999	8,241	9,239	-1
1	1	NODE 12827	0	1002.0	1,017	15,457	NC_045923	관중	Copris tripartitus mitochondrion.	97.2	6.4	991	85.0	4	992	10,712	11,700	1
1	1	NODE 4828 le	3.3E-175	629.0	2,334	1,930	XM_023447975	곤충	PREDICTED: Lucilia cuprina ATP s	40.2	48.2	944	79.0	604	1.542	608	1.537	-1
1	1	NODE 15359	0	889.4	853	14.802	NC 039689	四表	Dichotomius schiffleri mitochond	99.1	5.5	850	86.5	1	845	5.679	6,486	1
1	1	NODE 16228	0	1031.6	802	15.554	KU739465	곤충	Coprophanaeus sp. BMNH679884	96.0	4.9	771	90.9	33	802	6.970	7.736	
1	1	NODE 24355	3.4E-144	523.7	523	18.626	KT696268	고충.	Scarabaeidae sp. BMNH 1274750	98.3	2.9	533	85.0	10	523	10.391	10.923	-1
1	1	NODE_24844_	2E-151	547.7	512	13,659	KU739457	곤충	Phalops barbicomis mitochondric	99.8	3.8	515	86.0	1	511	3,853	4,366	1
1	1	NODE 25968 1	1.5E-157	568.0	491	1,226	AY039363	고충	Gymnopleurus mopsus cytochron	87.6	35.1	432	90.5	2	431	727	1.156	1
2 1	8 1	NODE 40938	1.7E-100	377.8	319	13.659	KU739457	고중	Phalops barbicomis mitochondrid	99.7	2.4	327	88.1	1	318	912	1,236	-1
1	2	NODE 45283	9.23E-83	318.7	292	15,287	KU739496	곤충	Onthophagus pullus mitochondri	99.0	1.9	290	86.6	3	291	9,408	9.696	-1
1	1	NODE 51861	1.76E-94	357.5	266	16,799	KT696269	근충	Scarabaeidae sp. 8MNH 1274752	100.0	1.6	272	90.8	1	266	2.465	2.734	1
1	1	NODE 53067	1.12E-36	165.5	262	15.428	KU739493	고충	Eurystemus hamaticollis mitochor	63.7	1.0	168	85.1	1	167	12.471	12.631	-1
1	-1	NODE 56803	1.05E-51	215.3	251	36.035	KU739469	22	Bubas bubalus mitochondrion, pa	56.2	0.9	141	94.3	1	141	1	140	-1
1	1	NODE 18046	7.378-23	121.2	716	516	EU646016	고충	Penthicodes farinosa isolate FULC	19.1	26.6	138	82.6	557	693	282	418	-1
1	1	NODE 37877	2.61E-14	91.6	342	2.372	XM 017267111	고종	PREDICTED: Drosophila elegans r	25.7	3.7	90	85.6	137	224	1,268	1.355	1
1	1	NODE 11703	1.17E-12	87.9	1.106	14,350	KY773689	고충	Monochamus sutor mitochondrio	7.5	0.6	85	85.9	125	207	5.295	5.377	1.1
1	1	NODE 32722	2.99E-19	108.2	390	1,506	XM 011068173	고충	PREDICTED: Acromymex echinati	16.4	4.2	64	96.0	96	159	1.443	1.506	-1
1	1	NODE 65106	1.95-103	387.1	231	29.008	HG530139	갑파트	Galactomyces candidum complete	100.0	0.8	236	96.6	1	231	14.731	14,966	1
1	1	NODE 16151	1.4E-20	113.8	806	1,318	FJ810090	군류.	Phytophthora inundata NADH de	52.5	32.3	433	72.1	40	462	522	947	1
1	1	NODE 1005 le	6.65E-12	87.9	6.098	63.682	FQ859090	<b>治县</b> 。	Piriformospora indica DSM 11827	2.8	0.3	178	76.4	2.775	2.947	53.398	53,570	1
1	1	NODE 57995	7.87E-63	252.3	248	1.689	KM042216	<b>₩</b> ₩.	Phialocephala sp. SA-2014 strain	96.0	14.1	240	85.8	1	238	1.243	1,480	1
1	1	NODE 37853	5.54E-26	130.4	342	40.948	KU501222	교류.	Monodopsis sp. MarTras21 mitoc	73.1	0.6	257	76.7	93	342	14.825	15.074	-1
1	1	NODE 61001	2.6E-107	400.0	241	646	LC548622	나봐	Spodoptera exigua Ngo2 3 mitod	98.3	36.7	237	97.0	2	238	178	414	-1
1	1	NODE 63085	2.22E-13	87.9	236	99,907	MN642622	녹색리	Trebouxia sp. A1-2 mitochondrior	22.5	0.1	53	96.2	63	115	98,988	99.040	-1
1	1	NODE 52516	3.77E-91	346.4	264	486	XM_035597471	답배7	PREDICTED: Spodoptera frugipero	98.9	54.1	264	90.5	2	262	36	298	1
1	1	NODE_2954_1e	4.57E-16	100.8	3,281	1,330	XM_034652966	대왕진	PREDICTED: Alluropoda melanole	3.7	9.2	124	81.5	956	1,078	866	988	-1
1	1	NODE_49930_	1.19E-26	132.2	272	3,481	XM_008809828	「日本の	PREDICTED: Phoenix dactylifera g	53.7	4.2	147	83.0	15	160	2,312	2,457	-1
1	1	NODE_22486_	1.64E-08	73.1	567	1,236	XM_003288742	SELS	Dictyostellum purpureum mitoche	15.9	7.3	90	81.1	277	366	1.102	1,191	-1
1	1	NODE 59602	4.59E-70	276.3	244	16,569	JQ703492	사람	Homo sapiens clone 2963 mitoch	77.0	1.1	188	93.1	18	205	1,768	1.955	-3
1	1	NODE_17841_	7.62E-08	71.3	724	3,119	XM_024600525	사시니	PREDICTED: Populus trichocarpa	9.0	2.1	66	B6.4	397	461	248	313	-1
1	1	NODE_47984	2.9E-142	516.3	279	631	GU270651	새우	Gammarus gageoensis isolate KK	100.0	44.2	279	100.0	1	279	336	614	-1
1	1	NODE_224145	1.57E-22	117.5	145	4,963	LC219397	식물)	Dioscorea rotundata mitochondri	51.7	1.5	75	94.7	69	143	4,758	4,832	-1
1	1	NODE_2619_16	0	699.2	3,548	4,684	LC219400	식물)	Dioscorea rotundata mitochondri	27.1	20.5	972	80.0	1,827	2,787	3,722	4,681	-1
1	1	NODE 1428 Jr	0	678.8	4,978	4,684	LC219400	식물	Dioscorea rotundata mitochondri	24.1	25.3	1,211	77.3	2,004	3,202	3,497	4,681	1
1	1	NODE_9417_le	0	2508.9	1,358	4,335	LC219405	식물	Dioscorea rotundata mitochondri	100.0	31.3	1,358	100.0	1	1,358	1,541	2,898	1
1	1	NODE_12855_	0	1873.6	1.014	4,335	LC219405	식물	Dioscorea rotundata mitochondri	100.0	23.4	1,014	100.0	1	1.014	2,822	3,835	1
1	1	NODE_5883_1e	0	2987.2	1,995	4,335	LC219405	식물	Dioscorea rotundata mitochondri	81.1	37.3	1,617	100.0	379	1,995	1	1,617	1
1	1	NODE 51027	2.8E-132	483.1	268	45,056	LC219425	석물	Dioscorea rotundata mitochondri	100.0	0.6	268	99.3	1	268	1,356	1.622	-1
1	1	NODE_36795	3.46E-18	104.5	351	1,435	XM_020661565	암보험	PREDICTED: Amborella trichopod	59.5	14.6	210	75.7	141	349	541	749	-1
1	1	NODE_52438	1.45E-45	195.0	264	15,333	NC_044469	엽새의	Gammarus lacustris mitochondric	91.3	1.6	244	81.6	9	249	6,024	6,263	-1
1	1	NODE_250824	8.42E-35	158.1	135	37,366	NC_042669	杰森:	Macrocystis integrifolia mitochon	86.7	0.3	117	91.5	18	134	1,727	1,840	1
1	1	NODE_604_ler	2.4E-17	106.4	7.969	1,443	XM_024807341	환대이	[Candida] sorbophila Serine hydri	2.7	14.8	216	75.9	4,717	4,929	160	372	1
1	1	NODE_23604_	4.22E-24	124.8	539	1,473	XM_024807878	칸디t	[Candida] sorbophila Histidinet	30.8	11.3	168	80.4	352	517	259	424	-1
1	1	NODE_4028_1e	4.4E-75	296.6	2,665	54,989	AP014838	TIE	Pythium insidiosum mitochondria	19.2	0.9	515	77.3	1,098	1,608	31,890	32,400	-1
-1	1	NODE_48097_	7.45E-14	89.8	278	6,732	LC053795	a:====	Hydra vulgaris mitochondrial chro	56.1	2.3	159	77.4	68	223	5,832	5,987	-1
1	1	NODE 7931 Je	1.995-76	300.3	1,574	69,158	KC353359		Seculamonas ecuadoriensis strain	15.4	0.4	243	88.9	1,031	1,273	2,210	2,452	1
1	1	NODE_58673_	1.086-11	82.4	246	14,029	KM083123		Mastigeulota kiangsinensis vouci	38.6	0.7	96	82.3	105	199	10,126	10.220	1
1	1	NODE_4856_1e	8.98E-17	102.7	2,327	73,520	KX013548		Cymbomonas tetramitiformis stra	7.8	0.2	183	77.0	1,433	1,613	55,154	55,334	-1
1	1	NODE 52417	3.29E-07	67.6	264	14,810	MH592132		Pseudoniphargus morenoi mitoch	17.0	0.3	45	93.3	220	264	9,980	10,024	-1

(3) 곤충 미토콘드리아로 분류된 contig 서열을 다시 애기뿔소똥구리 미토콘드리아 서열에 BLAST하여 확인한 결과는 다음과 같다(표 49, 50).

#### 표 49. 애기뿔소똥구리 미토콘드리아 BLAST 결과

		Query	STAND!	Bit	Query	Target	Target	Target	Query	Target	Matches	Identity	Query	Query	Target	Target	encua
папк	risp	name	e-value	score	length(bp)	length(bp)	accession	description	coverage(%)	coverage(%)	(bp)	(96)	start	end	start	end	Strang
1	1	NODE_56803_	2.66E-32	126.7	251	15457	NC_045923	Copris tripartitus mitochondrion,	35.5	0.6	91	92.3	1	89	57	146	+1
1	1	NODE_25968_	2.91E-99	350.1	491	15457	NC_045923	Copris tripartitus mitochondrion,	84.7	2.7	417	83.7	1	416	3216	3631	1
1	1	NODE_15359_	1.94E-63	232.0	853	15457	NC_045923	Copris tripartitus mitochondrion,	20.6	1.1	178	91.0	369	544	6246	6416	1
1	2	NODE_15359_	1.23E-20	89.8	853	15457	NC_045923	Copris tripartitus mitochondrion.	9.8	0.5	85	85.9	770	853	6681	6764	1
1	. 2	NODE_16228_	5.31E-29	117.5	802	15457	NC_045923	Copris tripartitus mitochondrion,	9,7	0.5	78	93.6	56	133	7259	7336	1
1	1	NODE_16228_	1.11E-50	189.5	802	15457	NC_045923	Copris tripartitus mitochondrion,	16.1	0.8	129	93.0	601	729	7801	7929	1
1	2	NODE_13054_	8.53E-33	130.4	999	15457	NC_045923	Copris tripartitus mitochondrion,	15.1	1.0	151	821	849	999	8549	8699	-1
1	1	NODE_13054_	1.83E-34	135.9	999	15457	NC_045923	Copris tripartitus mitochondrion,	11.2	0.7	112	88.4	407	518	9030	9141	-1
1	1	NODE 12827	1.36E-75	272.6	1017	15457	NC 045923	Copris tripartitus mitochondrion.	24.4	1.6	248	88.3	745	992	11453	11700	1

표 50. 애기뿔소똥구리 미토콘드리아 BLAST 된 contig의 mapping 결과

	0.44	249		510			7.0				10	14		12.02	15.88
	1. H. H.	CDS-cox1	CDS-atp8	CDS-cost		CDS-nac	5				CD5-na	id4L CD5-cytb			 
CD5	CDS-nad2	-	2D5-cax2 CD5-at	0	CD5-nad3			0	105-rad4		-	CD5-nadó		DS-nadl	-
Mapping contigs PCR result	2					2	e e		15	Œ	-		205		

(4) 애기뿔소동구리 미토콘드리아 서열 맵핑율이 현저히 낮아 서열 확보가 어려웠고, 어셈블리 contig 서열에서 COX1 유전자 부위가 확인되지 않아 COX1 유전자 확인을 위해 전체 곤충 COX1 유전자(2,700개)에 read를 맵핑하는 방법으로 추가 분석을 진행하고 있다. 현재까지 확인 된 결과는 다음과 같다(표 51).

표 51. COX1 유전자 맵핑 결과(일부만 표기)

Genomic Accession ID	Name	Mapped Reads	Coverage (%)
NC 028196.1	Megaphragma amalphitanum	2,175	7196
NC_014272.1	Cotesia vestalis	3,572	60%
NC 013063.1	Rhopalomyia pomum	2,840	5796
NC 028518.1	Drosophila formosana	3,609	56%
NC 028017.1	Megachile sculpturalis	5,335	5696
NC 026468.1	Hylaeus dilatatus	2,497	56%
NC 025289.1	Orthogonalys pulchella	2.575	55%
NC 017007.1	Philanthus triangulum	32,152	5596
NC 014278.1	Spathius aprili	7,893	55%
NC 025503.1	Liposcelis entomophila	315	55%
NC 021401.1	Apis florea	1.152	54%
NC 024581.1	Aphis gossypii	434	5396
NC 006158.1	Schizaphis graminum	704	52%
NC 022682.1	Cavariella salicicola	2.876	50%
NC 011115.1	Oedaleus decorus asiaticus	1.317	4996
NC 014398.1	Teinopalpus aureus	2.362	49%
NC 011114.1	Gastrimargus marmoratus	2,291	4996
NC 029327.1	Oedaleus infernalis	1.866	48%
NC 012708.1	Diadeoma semiclausum	3.874	4896
NC 021100.1	Paphnutius ruficeps	182	4796
NC 005939.1	Aleurodicus dugesii	522	4796
NC 011923.1	Bombus hypocrita sapporensis	509	4796
NC 013252.1	Rhopaea magnicomis	204	4796
NC 023839.1	Liposcelis decolor	6.326	47%
NC 014295.1	Apis cerana	3,481	4696
NC 012842.1	Hydrometra greeni	811	46%
NC 0081411	Adoxophyes honmai	88	4696
NC 023083.1	Apolygus lucorum	1.620	4696
NC 024664.1	Allantus luctifer	1.125	46%
NC 024056.1	Bemisia afer	139	4596
NC 011324.1	Chaetosoma scaritides	2.361	45%
NC 025241.1	Scirtothrips dorsalis	962	45%
NC 015999.1	Ibidoecus bisignatus	3.976	4596
NC 015478.1	Gomphocerus sibiricus tibetanus	463	4496
NC 014224.1	Sasakia charonda	13,313	4396
NC 006133.1	Pteronarcys princeps	223	43%
NC 022727.1	Diuraphis noxia	597	42%
NC 007702.1	Tamolanica tamolana	494	4296
NC 026865.1	Pelecinus polyturator	1.506	4296
NC 013257.1	Ditaxis biseriata	509	4296
NC 011303.1	Acrida willemsei	960	4296
NC 016469.1	Damaster mirabilissimus mirabilissimus	718	41.%

(5) 또한, 현재까지 확인된 후보 레퍼런스의 GC-content를 분석한 결과 AT%가 77~78%로 매우 높은 것으로 확인되어, 전체 read 중 AT(%)가 70이상인 read만 별도 분류하여 assemble 하는 방식으로 시도를 해 보고 있다(표 52).

표 52. 소똥구리 근연종 서열의 GC-content 결과

Acc ID	Description	A #	T #	G #	C #	AT(%)	GC(%)
KU739465.1	Coprophanaeus sp.	6,267	5,776	1,390	2,121	77.4	22.6
NC_039689.1	Dichotomius schiffleri	5,921	5,529	1,318	2,034	77.4	22.6
MG253030.1	Copris tripartitus	6,334	5,826	1,329	1,968	78.7	21.3

#### 5. 멸종위기종 나도풍란 유전자 분석을 통한 원종 확인

멸종위기종복원센터에서 증식된 나도풍란 개체들의 원종 확인 및 유전적 다양성 검증을 위하여 멸종위기종복원센터에서 인공 증식된 1개체와 원예종 1개체를 임의로 선정하여 모체와 함께 개체들의 유전자를 비교하였다. MatK, ITS, TrnH-psbA 유전자 프라이머를 이용하여 유전자 증폭 후 염기서열을 분석하였다. 증폭된 ITS 유전자의 염기서열은 국내 자생 개체와의 동일종 여부 확인을 위해 사용되었다. 그 결과 NCBI 제공 일본 자생 대엽풍란(Japan)와 국내 나도풍란인 거제 농업기술원(Geoje), 제주도 비자림(Bijarim), 멸종위기종복원센터 인공증식 개체(NIE), 원예종(Horti) 간의 ITS 염기서열 차이는 없었다(그림 40). 이런 결과로부터 비교를 위해 사용 된 모든 개체가 나도풍란(Sedirea japonica) 동일 종 임을 확인 할 수 있었다.

MatK 마커 유전자를 이용한 추가 분석을 위해 NCBI에서 제공되는 일본 자생 대엽풍란 MatK 염기서열(Japan)와 거제 농업기술원(Geoje), 제주도 비자림(Bijarim), 멸종위기종복원센터 인공증식 개체(NIE), 원예종(Horti)의 염기서열을 분석하였다. 센터 인공증식 개체(NIE)는 일본 대엽풍란(Japan)과의 비교에서 총 24개의 염기서열 차이를 보였나, 국내 자생지 나도풍란 거제 농업기술원(Geoje), 제주도 비자림(Bijarim), 멸종위기종복원센터 인공증식 개체(NIE), 원예종(Horti) 와는 염기서열이 동일하였다(그림 41). 추가적으로, NCBI(미국생물정보센터)에 등록된 국내 자생지 나도풍란(KC704591, KC704592, KC704593; Kim et al. 2014)와 염기서열이 동일하였다(data not shown).

자생지에 따른 염기서열 차이 분석을 위해, 바코드유전자 중 비교적 염기서열의 변이가 높아 개체들 간의 지리적 차이를 확인하기 위해 많이 사용되는 trnH-psbA 유전자의 염기서열 변이를 확인하였다(그림 42). 염기서열 분석 결과 채집 지역의 차이에도 염기서열 결과가 동일한 것으로 확인 되었으며, 원예종 개체의 염기서열도 동일하였다.

MatK, ITS, trnH-psbA 마커 유전자 염기서열 분석 결과 멸종위기종복원센터 인공증식 개체는 다른 국내 보유 나도풍란과 동일한 종임을 추정 할 수 있었다. 국내 유통 원예종의 경우, 기원을 알 수 없는 재배개체들이 원예용으로 유통 되고 있다. 대부분의 재배개체들은 일본 및 중국에서 유입되어 증식된 것으로 추정하고 있으나, 일부 난 애호가나 상인들은 우리나라에서 기원한 개체를 증식 한 것이라고도 한다. 현재까지는 이들의 주장을 뒷받침 할 근거가 없었으나, 본 연구의 결과 국내에서 유통되고 있는 원예종과 인공증식된 개체들이 DB에 제공되는 일본 종과는 염기서열의 차이가 많이 난다는 것을 확인 할 수 있었다. 확보된 개체수가 제한적이고 DB에서 제공되는 정보만으로 분석을 수행하여 명확히 결론지을 수 없지만, 국내 유통 화훼종이 국내종에서 유래되어 유통 되고 있을 가능성을 보여준다.

GAGGGGGCGCGCGAAGGACGGCGAAACCCCCAAACGGCCCAGATTCGCGCCCAAGGGAACTTCGGAAAACACGAGCCCGGCATCGGGTCATCGGGC GAGGGGGCCGCGGCGAAGGACGGCCGAAACCCCAAACCGGCGCAGATTGGCGCCCAAGGGAACTTGTGAAAAAACACGAGCCCGGCATCGGGTCATCGTGG GAGGGGGCCCCCCGAAGGACGGCCGAAACCCCCAACCGGCGCAGATTGGCGCCCAAGGGAACTTGTGAAAAACACGAGCCCGGCATCGGGTCATCGTGG GAGGGGGGCCGCGGCGAAGGACGGCCGAAACCCGCAGATTGGCGCCAAGGGAACTTGTGAAAAAACACGGGCCCGGCATCGGGTCATCGTGG GAGGGGGCCCCGGGCGAAGGACGGCCGAAACCCCAAACCGGCGCAGATTGGCGCCAAGGGAACTTGTGAAAAAACACGAGCCCGGCATCGGGTCATCGTGG GAGGGGGCCCCGGGCGAAGGACGGCCGAAACCCCAAACCGGCGCAGATTGGCGCCAAGGGAACTTGTGAAAAAACACGAGCCCGGCATCGGGTCATCGTGG GGCGGAGCGGCGTTGCGCGCCGCACGTATTGACACGACTCTCGACAATGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACGTGG GGCGGAGCGCGTTGCGCGCCGCACGTATTGACACGACTCTCGACAATGGATATCTCGGCTCTCGCATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACGTGG GGCGGAGCGCGTTGCGCCCCCCACGTATTGACACGACTCTCGACAATGGATATCTCGGCTCTCGCATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACGTGG GGCGGAGCGGCGCGCGCGCGCGCACGTATTGACACGACTCTCGACAATGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACGTGG GGCGGAGCGCGTTGCGCCGCCGCACGTATTGACACGACTCTCGACAATGGATATCTCGGCTCTCGCATGGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACGTGG TGCGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCAATCGGTCGAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCGTTGCG TGCGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTGCGCCCGAGGCCAATCGGTCGAGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCGTTGCG TGCGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCAATCGGTCGAGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCGTTGCG TGCGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCAATCGGTCGAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCGTTGCG TGCGAATTGCAGAATCCCGCGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCAATCGGTCGAGGGCACGTCCGCGCGTCAAGCGTTGCG TGCGAATTGCAGAATCCCGCGGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCAATCGGTCGAGGGCACGTCGGCCTCGGCGTCAAGCGTTGCG GAGCGGGTTATCGTCTCATTGGCCACGAACAACGAGGGTGGATGAAACCTGCCGCGGGCAAGGCCTGCGTTGTCTCGTGCCCGGGCCCGGGAGAAGATTAG GAGCGGGTTATCGTCTCATTGGCCACGAACAACGAGGGGTGGATGAAACCTGCCGCGGGCAAGGCCTGCGTTGTCTCGTGCCGGCCCGGGAGAAGATTAG ACCCTTCGTGCGATCCCATCCCACGCGCCGCCCCCGTGCGGCGGCTTGGAAT ACCCTTCGTGCGATCCCATCCCACGCGCCGCCCCCGTGCGGCGGCTTGGAAT ACCCTTCGTGCGATCCCATCCCACGCGCCGCCCCCGTGCGGCGGCTTGGAAT ACCCTTCGTGCGATCCCATCCCACGCGCCGCCCCCGTGCGGCGGCTTGGAAT ACCCTTCGTGCGATCCCATCCCACGCGCCGCCCCCGTGCGGCGGCTTGGAAT ACCCTTCGTGCGATCCCATCCCACGCGCCGCCCCCGTGCGGCGGCTTGGAAT

그림 40. ITS 염기서열 분석



그림 2. MatK 염기서열 분석



그림 42. trnH-psbA 염기서열 분석

## Ⅳ. 결론 및 제언

(수달) 종을 보전, 관리하기 위해서는 그 지역에 서식하는 개체군의 크기를 정확히 파악하는 것이 우선적으로 수행되어야 한다(환경부, 2008). 이를 위해서는 생태학적 모니터링과 유전학적 분석이 동반되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 수달 개체식별을 위한 초위성체 마커 41개의 증폭 효율을 확인하였고 수달 성별 및 개체식별이 가능한 다중유전자 증폭 방법을 고안하였다. 향후 더 많은 연구를 통해 유전자 마커를 표준화하여 연구 결과를 통합적으로 관리할 수 있는 기틀을 마련한다며 국내 수달의 메타개체군 크기 파악 및 유전적 다양성 증진에 이바지 할 수 있을 거라고 기대된다.

(양비둘기) 유전적 다양성 연구의 결과, 구례와 고흥, 의령 집단은 다른 멸종위기종 비둘기류에 비해 낮은 유전적 다양성을 보여 개체군 감소에 따른 유적적 부동과 근교약세 등의 위협이 우려된다. 양비둘기 집단 간의 유전적 거리 분석 결과, 국내 집단인 구례, 고흥, 의령은 유전적인 차이를 보이지 않은 것으로 확인되었고 국내 개체군은 러시아 및 몽골 개체군과도 유전적인 차이를 보이지 않아, 국내 개체군간 지역적 차이를 두어 증식 및 복원하는 관리 방법은 크게 의미가 없을 것으로 사료되고 유전적 다양성을 증진할 수 있는 방안을 모색하는 것이 양비둘기 복원에 보다 중요할 것으로 판단된다. Haplotype network 결과는 의령 개체군의 잡종화가 일부 진행되고 있음을 보여주므로 잡종 판별 마커 개발을 통한 복원 관리 방안이 시급한 것으로 판단된다.

양비둘기 잡종 판별 마커 개발을 위해 양비둘기와 집비둘기의 WGS 데이터를 활용하여 두 종간 InDel 변이를 추출하였다. 두 종간의 InDel 변이는 총 87,335개가 확인 되었으며, 종간 base pair 차이가 큰 순서대로 68개 구간의 프라이머를 제작하여 테스트를 실시하였다. 1차로 양비둘기와 집비둘기를 명확히 구분 가능한 종 특이적인 구간을 테스트 하여 총 13개의 마커를 선별하였다. 2차 마커 테스트는 멸종위기종복원센터에서 생산한 잡종 1세대를 대상으로 부모 개체와 F1의 유전 형질을 확인하는 실험을 실시하였다. 마커 테스트는 이종 간의 잡종 교배의 경우, 그 자손 F1은 두

- 118 -

종의 특징을 반반씩 가진다는 유전법칙을 전제로 하였고 그 결과, 최종적으로 HM 30, 32, 37, 41, 42, 43, 45, 51, 55, 56, 59 총 11개의 마커가 F1 개체 전체에서 double band를 보여 최종 잡종 판별 마커로 선정되었다.

멸종위기종복원센터에서 생산한 잡종 1세대와 부모의 표현형의 비교 후 선정된 마커를 활용한 순종 비율을 산정해 보았다. 양비둘기와 집비둘기의 가장 뚜렷한 표현형의 차이는 꼬리깃의 흰색선이였으며, 잡종 1세대는 꼬리깃에 흰색 부분이 드문드문 드러나는 것으로 확인되어, 양비둘기의 혈통이 섞여 있음을 간단하게 확인하는 지표로서 활용 가능할 것으로 기대되다. 양비둘기와 집비둘기의 표현형이 뚜렷이 구분되는 부모 개체는 선정된 11개 마커 모두 100%의 확연한 bp의 차이를 보여 표현형과의 비교를 통한 마커의 정확도와 활용성 기준에 적합한 것으로 확인되었다. 부모개체 중 구례 화엄사에서 양비둘기와 자연 번식을 하던 개체를 포획해 온 집비둘기 한 개체(080-05573)는 표현형 확인 결과에서 잡종 F1과 매우 흡사한 형태를 띠었고 마커 테스트로도 50%의 순종 비율을 보여주었다. 마커를 통한 순종 비율 테스트에서 양비둘기 100%, 집비둘기 100% 쌍으로부터 생산된 경우 6개체 모두 50% 비율의 순종 비율을 F1의 보여주었고. 080-05573으로부터 생산되 F1은 68.18 ~ 77.27%의 순종 비율을 보여주어 양비둘기와 양비둘기 x 집비둘기 잡종 사이의 자손인 경우 양비둘기에 더욱 가까운 유전적 특징을 가지는 것으로 확인되었다.

(어류, 양서파충류) 우리나라 금강에 서식하는 흰수마자의 미토콘드리아 유전체 확보를 성공적으로 이루었으며, Gobiobotia 속의 진화적 특성을 밝혔다. 더불어 금강에 서식하는 흰수마자가 동일종인 낙동강 흰수마자에 비해 중국 본토에 서식하는 *G. papenheimi*와 분자계통학적으로 가까운 유연관계 있는 것을 밝힘으로써 고황하 시스템이 존재하였음을 알 수 있었다. 또한 흰수마자의 원기재는 낙동강으로 금강 및 한강 흰수마자의 분류학적 재검토의 필요성을 보이고 있다. 금개구리는 기존에 개발한 microsatellite 마커 10개를 대상으로 multiplex-PCR 조건을 확립하면서 2개 세트(각 5개)로 고도화를 완료함에 따라 추후 친자확인, 집단구조 분석 등의 과정 전반에 걸쳐 효율성을 크게 증진할 수 있었다. 수원청개구리는 미토콘드리아 DNA 영역 중 12S rDNA 영역을 이용해 모계를 판별하였으며, HRM 분석을 이용해 신속하게 모계를 동정할 수 있는 시스템을 개발하였고, 더불어 핵 DNA 5개 영역에서 나타나는 변이서열들을 이용해 수원청개구리와 청개구리, 그 둘 사이의 교잡종을 판별할 수 있는 방법을 개발하였다. 해당 방법을 이용해 증식·복원에 기초가 될 수 있는 원종판별을 수행함으로써 체계적인 연구의 기반을 마련하였다. 마지막으로 여울마자의 주요 먹이원 분석을 수행함으로써 유사종인 돌마자와의 차이를 밝혀냈고, 더불어 인공성숙을 위한 먹이원의 종류를 확인함으로써 난질향상을 위한 증거로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

(소통구리, 참달팽이) 점점 사라져 가는 생물종들을 효율적으로 보전하고, 관리하는 정책을 수립하고, 그것을 실행하기 위해서는 생물의 특성 및 진화의 모든 정보를 보유하고 있는 유전적 특성을 파악하여 정확히 종을 인식하는 과정이 필수적으로 선행되어야 한다. 따라서 본 연구에서 참달팽이와 소통구리의 미토콘드리아 유전체 특성 연구를 통한 광범위한 염기서열의 획득은 집단 간의 유전적 변이를 파악, 계통분석이나 종 동정을 위한 마커 개발 등에 아주 유용하게 사용될 수 있는 매우 의미 있는 자료가 될 수 있을 것이다.

(나도풍란) 국내 보유 나도풍란 개체와 DB 등록 개체와 바코드 유전자를 이용한 염기서열 분석 결과 채집한 국내 보유 개체와 원예상에 유통되고 있는 원예종의 염기서열이 동일 한 것이 확인되었다. 그러나 현재까지 사용한 바코드 마커로는 개체의 지리적 차이를 확인 하는데 어려움이 있어 추가적인 마커 선별 및 분석을 통해 국내 자생지역 간의 유전적 다양성 확인할 필요성이 있다. 또한, 자생지에 서식하고 있는 개체가 최근 발견 되지 않고 있으며 기관 및 개인 보유 개체의 명확한 채집지 확인이 불가능해 분석에 어려움이 있어 추가적인 개체 확보를 통해 해결해 나가야 할 것으로 사료된다. 국내·외 유전적 차이 확인을 위해서는 국제 협의를 통해 일본, 중국, 대만 개체 시료 채취를 통한 분석이 요구된다.

## V. 참고문헌

조신일, 나수미, 안치경, 김현정, 정유정, 임양묵 & 이훈복. (2017). 한국산 남생 이와 외래종 붉은귀거북의 서식지 이용 패턴 비교 분석. 한국환경생태학회 지, 31(4), 397-408.

환경부 국립생물자원관. (2008). 수달의 분류학적 고찰 및 지리적 변이연구. 환경부 국립생물자원관. (2012). 남생이 증식복원연구 최종보고서(3차년도). 환경부 국립생물자원관. (2013). 한국의 멸종위기 야생생물 적색자료집 곤충 II. 환경부 한강유역환경청. (2016). 한강수계 생물상 조사 및 수달 복원 타당성 조사. 환경부 국립생물자원관. (2018). 동물자원의 유전자 다양성 연구(4단계 1차).

- Asahida, T., Kobayashi, T., Saitoh, K. and Nakayama, I. (1996). Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fisheries Science*, 62, 727-730.
- Awad, A., Khalil, S. R. and Abd-Elhakim, Y. M. (2015). Molecular phylogeny of some avian species using Cytochrome b gene sequence analysis. *Iranian journal* of veterinary research, 16(2), 218.
- Beacham, T. D., Pollard, S. and Le, K. D. (2000). Microsatellite DNA population structure and stock identification of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Nass and Skeena Rivers in Northern British Columbia. *Marine Biotechnology*, 2, 587-600.
- Boavida, I., Santos, J. M., Cortes, R. V., Pinheiro, A. N. and Ferreira, M. T. (2010). Assessment of instream structures for habitat improvement for two critically endangered fish species. *Ecological Studies*, 45, 113-124.
- DeWoody, J. A. and Avise, J. C. (2000). Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J. Fish Biol.*,

56, 461-473.

- Goldberg, C. S., Kaplan, M. E. and Schwalbe, C. R. (2003). From the frog's mouth: buccal swabs for collection of DNA from amphibians. *Herpetological Review*, 34(3), 220.
- Goldberg, J., Trewick, S. A. and Powlesland, R. G. (2011). Population structure and biogeography of Hemiphaga pigeons (Aves: Columbidae) on islands in the New Zealand region. *Journal of Biogeography*, 38(2), 285-298.
- Hauswith, W.W. and Laipias, P. J. (1985). Length heterogeneity of a conserved displacement-loop sequence in human mitochondrial DNA. *Nucl. Acids Res.*, 13, 8093-8104.
- Helm, M., Brule, H., Friede, D., Giege, R., Putz, D. and Florentz, C. (2000). Search for characteristic structural features of mammalian mitochondrial tRNAs. *RNA*, 6, 1356–1379.
- Howard, D. J. and Berlocher, S. H. (1998). Endless forms: species and speciation. Oxford Univ. Press, 470 pp.
- Inoue, J. G., Miya, M., Venkatesh, B. and Nishida, M. (2005). The mitochondrial genome of Indonesian coelacanth *Latimeria menadoensis* (Sarcopterygii: Coelacanthiformes) and divergence time estimation between the two coelacanths. *Gene*, 349, 227-235.
- Irwin, D. M., Kocher, T. D. and Wilson, A. C. (1991). Evolution of cytochrome b gene of mammals. J. Mol. Evol., 32, 12-144.
- Jarne, P. and Lagoda, P. J. G. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.*, 11, 424-429.
- Kim, J. I. (2012). Insect Fauna of Korea. National Institute of Biological Resources, Ministry of Environment. 209pp.

- Kim, J. Y., Eo, S. H., Kang, S. G., Hwang, J. E., Yeo, Y. G. and Yoon, J. M. (2022). Population genetic structure and conservation management of hill pigoens (*Columba rupestris*) recently endangered in South Korea. *Gene and Genomics*, 1-8.
- Kim, K. Y. and Bang, I. C. (2012). Phylogeny and speciation time estimation of two *Koreocobitis* species (Teleostei; Cypriniformes; Cobitidae) endemic to Korea inferred from their complete mitogenomic sequences. *Genes Genomics*, 34, 35-42.
- Kocher, T. D. and Stepien, C. A. (1997). Molecular systematics of fishes. Academic Press, 313pp.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M. Knyaz, C. and Tamura. K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology Evolution*, 35(6), 1547-1549.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.
- Librado, P. and Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.
- Liu, Z. (2011). Next Generation Sequencing and Whole Genome Selection in Aquaculture. Wiley-Blackwell, pp. 3-19.
- Liu, Z. J. and Cordes, J. F. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquacult.*, 238, 1-37.
- McConnell, S., Hamilton, L., Morris, D., Cook, D., Paquet, D., Bentzen, P. and Wright, J. (1995). Isolation of salmonid microsatellite loci and their application to the population genetics of Canadian east coast stocks of Atlantic salmon. *Aquacult.*, 137, 19-30.

- Mills, L. S. and Allendorf, F. W. (1996). The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conserv. Biol.*, 10, 1509-1518.
- Nishimura, S. (1974). Origin and history of the Japan Sea: an approach from biogeographic standpoint. Tsukiji Shokan, Tokyo (in Japanese).
- Nelson, R. J., Beacham, T. D. and Small, M. P. (1998). Microsatellite analysis of the population structure of a Vancouber Island sockeye salmon (*Onchrhynchus merka*) stock complex using nondenaturing gel electrophoresis. *Mol. Mar. Biotechnol.*, 7, 312-319.
- Paik, W. H. (1976). Biology of the Dung Beetles in Korea. Seoul National University Collegue of Agriculture Bulletin, 1, 153-194.
- Perna, N. T. and Kocher, T. D. (1995). Patterns of nucleotide composition at fourfold degenerate sites of animal mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 41, 353-358.
- Seki, S. I., Takano, H., Kawakami, K., Kotaka, N., Endo, A. and Takehara, K. (2007). Distribution and genetic structure of the Japanese wood pigeon (*Columba janthina*) endemic to the islands of East Asia. *Conservation genetics*. 8(5), 1109-1121.
- Slatkin, M. (1987). Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science.* 236, 787 792.
- Smith, C. T., Koop, B. F. and Nelson, R. J. (1998). Isolation and characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) microsatellites and their use in other salmonids. *Mol. Ecol.*, 7, 1614-1616.
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22, 2688-2690.

- Stamatakis, A., Hoover, P. and Rougemont, J. (2008). A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic Biology*, 57, 758-771.
- Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecol. and Evol.*, 15, 199-203.
- Tamada, T., Siriaroonrat, B., Subramaniam, V., Hamachi, M., Lin, L. K., Oshida, T. and Masuda, R. (2008). Molecular diversity and phylogeography of the Asian leopard cat, Felis bengalensis, inferred from mitochondrial and Y-chromosomal DNA sequences. *Zoological Science*, 25(2), 154-163.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Acids Res.*, 17, 6463-6471.
- Vilmi, T., Moilanen, J. S. Finnilä, S. and Majamaa, K. (2005). Sequence variation in the tRNA genes of human mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 60(5), 587-97.
- Wang, J. (2004). Application of the one migrant per generation rule to conservation and management. *Conserv. Biol.*, 18, 332-343.
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. Genetics, 16, 97-159.
- Young, D. L. and Allard, M. W. (1997). Conservation genetics of the plain pigeon Columba inornata in Puerto Rico and the Dominican Republic. *Mol. Ecol.*, 6, 877-879.

# 멸종위기종 유전다양성 및 고유성 연구(21년)

Genetic diversity and peculiarity of the endangered species(2021)

2022년 2월 15일
조도순
국립생태원
충청남도 서천군 마서면 금강로 1210
문정찬, 김진용, 박다솜, 김희종, 김영건, 최진, 주은진, 김근식, 유나경, 장금희, 박종대, 최예진, 이병두, 김성준, 박형빈
054-680-7452
www.nie.re.kr
(주)전우용사촌
979-11-6698-112-8 (93400)

① 국립생태원

이 책은 저작권법에 의해 보호를 받는 저작물이므로 무단 전재와 무단 복제를 할 수 없습니다.