NDSL
National Digital Science Library

주요 생물자원의 유전자 분석·연구 I -멸종위기 생물종 20종 대상-

주관연구기관	고려대학교
연구책임자	김기중
발행년월	2007-02
주관부처	환경부
사업관리기관	환경부
NDSL URL	http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO201200010557
IP/ID	14.49.138.138
이용시간	2017/11/03 17:04:40

저작권 안내

① NDSL에서 제공하는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, KISTI는 복제/배포/전송권을 확보하고 있습니다.

② NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 상업적 및 기타 영리목적으로 복제/배포/전송할 경우 사전에 KISTI의 허락을 받아야 합니다.

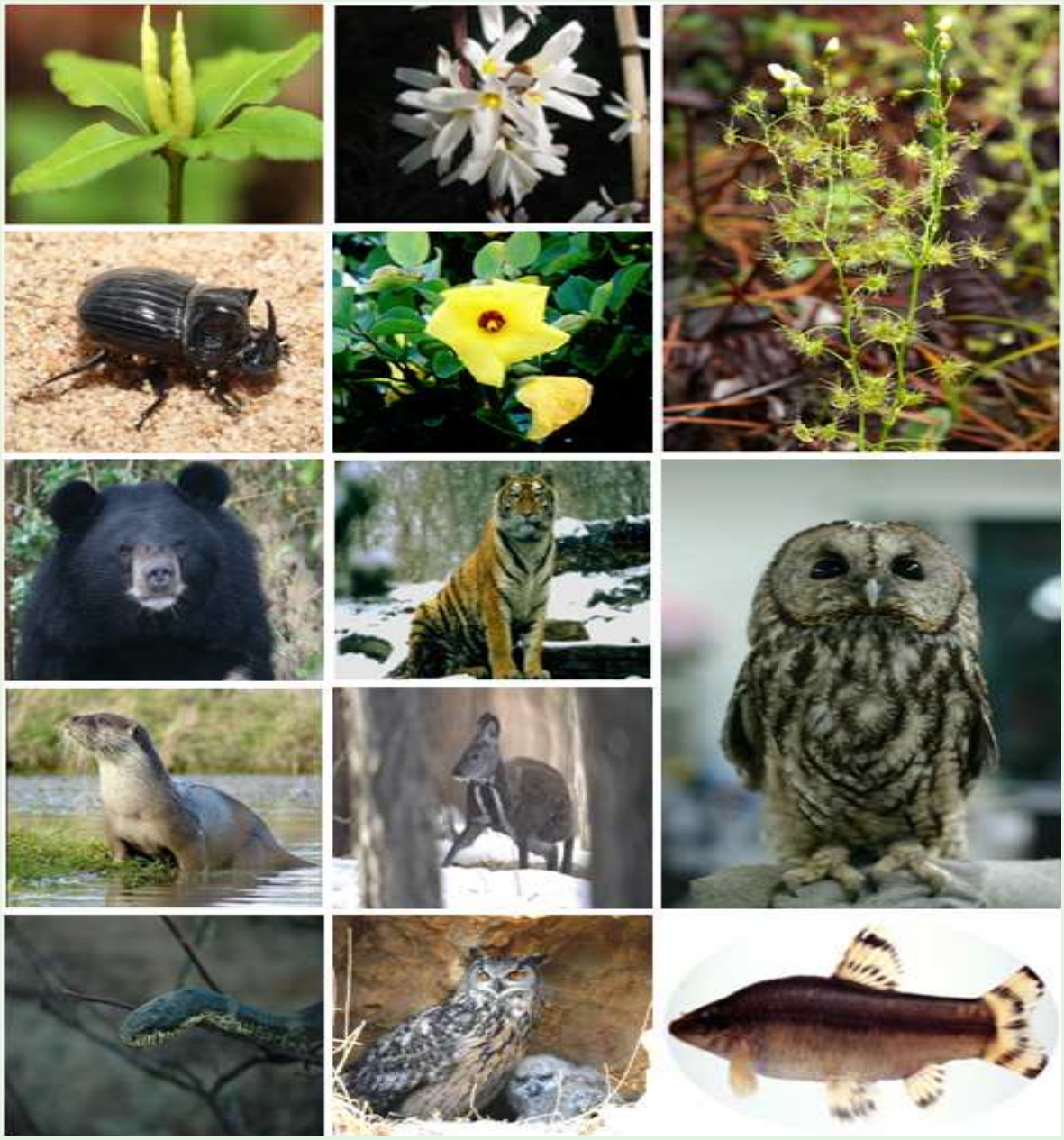
③ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 보도, 비평, 교육, 연구 등을 위하여 정당한 범위 안에서 공정한 관행에 합치되게 인용할 수 있습니다.

④ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 무단 복제, 전송, 배포 기타 저작권법에 위반되는 방법으로 이용할 경우 저작권법 제136조에 따라 5년 이하의 징역 또는 5천만 원 이하의 벌금에 처해질 수 있습니다.

KiSTi
www.kisti.re.kr

주요 생물자원의 유전자 분석·연구 I

-멸종위기 생물종 20종 대상-



2007 년 2 월

환 경 부

MINISTRY OF ENVIRONMENT

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

제 출 문

환경부 장관 귀하

본 보고서를 「주요생물자원의 유전자 분석·연구」의 최종 보고서로 제출합니다.

2007 년 2 월

고려대학교 산학협력단장

【연구진】

연구책임자 : 김기중 (고려대학교)
연 구 원 : 김영동 (한림대학교)
연 구 원 : 이 항 (서울대학교)
연 구 원 : 한호연 (연세대학교)
연 구 원 : 황의욱 (경북대학교)

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

<목 차>

Ⅰ. 서론 ····· 1

1. 연구배경 ····· 1
2. 연구1차년도 주요연구 내용 ····· 3
3. 사업수행계획 ····· 4
4. 연구의 추진계획 ····· 22
5. 참고문헌 ····· 27

Ⅱ. 멸종위기 식물종의 유전자 분석 ····· 31

Ⅱ-1. 미선나무의 엽록체 유전체 분석 및 계통 연구 ····· 31

1. 서론 ····· 31
2. 재료 및 방법 ····· 33
3. 결과 및 고찰 ····· 36
4. 참고문헌 ····· 46

Ⅱ-2. 제주고사리삼의 엽록체 유전체 분석 및 계통 연구 ····· 49

1. 서론 ····· 49
2. 재료 및 방법 ····· 51
3. 결과 및 고찰 ····· 54
4. 참고문헌 ····· 65

Ⅲ. 멸종위기 식물종의 유전적 다양성 분석 ····· 67

1. 서론 ····· 67
2. 재료 및 방법 ····· 67
3. 결과 및 고찰 ····· 73
4. 결론 ····· 92
5. 참고문헌 ····· 93

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

<목 차 (계속)>

Ⅳ. 멸종위기 곤충종의 유전자 분석 ····· 95

1. 서론 ····· 95

2. 재료 및 방법 ····· 96

3. 결과 및 고찰 ····· 102

4. 결론 및 종합 ····· 115

Ⅴ. 멸종위기 척추동물종의 유전자 분석 ····· 117

1. 서론 ····· 117

2. 실험 방법 ····· 123

3. 실험 결과 ····· 135

4. 고찰 ····· 302

5. 참고 문헌 ····· 304

Ⅵ. 멸종위기 생물종의 유전자 분석 · 연구 방향 ····· 309

1. 주요생물자원 유전자 분석의 필요성 및 향후 주요생물자원 유전자분석연구사업 방향 제시 ····· 309

2. 보전생물학적 측면에서 유전적 분석 가이드라인 제시 ····· 311

3. 보존생물학적 측면에서 유전적 분석 자료의 활용방안 제시 ····· 327

4. 향후 주요 생물종 유전자 분석연구사업의 방향에 대한 정책적 제언 - 보전생물학적 관점에서- ····· 338

5. 참고문헌 ····· 343

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

< 표 목 차 >

표I-1	척추동물의 선정 기준 및 야생동물자원은행(별표표시)에 DNA 분석용 샘플의 확보 유무	6
표I-2	엽록체 게놈 중 단백질을 만드는 유전자의 진화속도를 비교한 자료	11
표I-3	멸종위기종의 미토콘드리아 유전체 연구 현황	16
표Ⅱ-1-1	미선나무와 비교하여 엽록체 염기서열에 이용한 ndhF와 rbcL유전자의 염기서열 정보	33
표Ⅱ-1-2	미선나무 엽록체 게놈 해독지역의 유전자 길이와 그 산물	38
표Ⅱ-2-1	제주고사리삼 엽록체 게놈 분석에 사용된 primer set	53
표Ⅱ-2-2	제주고사리삼 엽록체 유전자의 염기서열	63
표Ⅲ-1	끈끈이귀개 3개 집단 45개 개체를 대상으로 분석에 이용한 9개 ISSR 프라이머와 증폭밴드 수	75
표Ⅲ-2	9개 프라이머를 이용한 끈끈이귀개 3개집단 45개체의 증폭밴드의 유무를 나타내는 도표	76
표Ⅲ-3	끈끈이귀개 3개 집단 내의 대립인자에 대한 통계수치	77
표Ⅲ-4	ITS 염기서열에 기초한 황근 개체 간의 pairwise distance 도표	78
표Ⅲ-5	ITS 염기서열 중 황근 개체 간에 변이가 있는 위치	86
표Ⅲ-6	황근 3개 집단 52개를 대상으로 분석에 이용한 15개의 ISSR primer와 증폭밴드 수	88
표Ⅲ-7	UBC 프라이머를 이용한 황근 3개 집단 52개체의 증폭밴드의 유무를 나타내는 도표	90
표Ⅲ-8	황근의 3개 집단 내의 대립인자에 대한 통계 수치	91
표IV-1	분석대상 19종 23개체 목록	98
표IV-2	프라이머 고안을 위해 곤총 9종의 전체 미토콘드리아 염기서열을 정렬한 결과의 일부분	99
표IV-3	8개 유전자 마커를 PCR 증폭하는데 사용된 프라이머 목록	102
표IV-4	8개 유전자 마커를 증폭하는데 사용된 프라이머 상 및 증폭된 길이	102
표Ⅴ-1	멸종위기종의 미토콘드리아 유전체 연구 현황	120
표Ⅴ-2	16s rDNA와 CO1 영역을 증폭하는 universal primer 서열	124
표Ⅴ-3	반달가슴곰에서 사용된 primer 염기서열	136
표Ⅴ-4	16S rRNA gene과 CO1 gene 사이 (약 4.5kb)를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건	136

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

< 표 목 차 (계속)>

표Ⅴ-5 16S rRNA gene과 CO1 gene 사이 (약 9kb)를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 ····· 137

표Ⅴ-6 호랑이에서 사용된 primer 염기서열 ····· 157

표Ⅴ-7 12S rRNA gene과 CO1 gene 사이 (약 4.5kb)를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 ····· 158

표Ⅴ-8 CO1 gene과 ND5 gene 사이 (약 6.2kb)를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 ····· 158

표Ⅴ-9 ND5 gene과 16S rRNA gene 사이 (약 5.7kb)를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 ····· 158

표Ⅴ-10 수달에서 사용된 primer 염기서열 ····· 172

표Ⅴ-11 16S rRNA gene과 CO1 gene 사이 (약 4.3kb)를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 ····· 173

표Ⅴ-12 16S rRNA gene과 tRNA-Leu 사이 (약 9kb)를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 ····· 173

표Ⅴ-13 산양에서 사용된 primer 염기서열 ····· 184

표Ⅴ-14 16S rRNA gene과 tRNA-Leu 사이 (약 6.8kb)를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 ····· 185

표Ⅴ-15 16S rRNA-ND2, ND2-CO1, CO1-CO3, CO3-ND4, ND4-tRNA-Leu를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 ····· 185

표Ⅴ-16 사향노루에서 사용된 primer 염기서열 ····· 194

표Ⅴ-17 16S rRNA gene과 tRNA-Leu 사이 (약 6.8kb와 약 9kb)를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 ····· 194

표Ⅴ-18 황새에서 사용된 primer 염기서열 ····· 205

표Ⅴ-19 CO1gene과Cytbgene사이를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 (Cico1-Cico2 primer) ····· 206

표Ⅴ-20 CO1gene과Cytbgene사이를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 (Cico3-Cico4 prim ····· 206

표Ⅴ-21 수리부엉이에서 사용된 primer 염기서열 ····· 218

표Ⅴ-22 CO1gene과Cytbgene사이를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 (BHCO-BLCYT primer) ····· 219

표Ⅴ-23 CO1gene과Cytbgene사이를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 (BLCO-BHCYT primer) ····· 219

표Ⅴ-24 수리부엉이에서 사용된 primer 염기서열 ····· 230

표Ⅴ-25 CO1gene과Cytbgene사이를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 (Strix1-Strix2 primer) ····· 230

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

< 표 목 차 (계속)>

표Ⅴ-26 CO1gene과Cytbgene사이를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 (Strix3-Strix4 primer) ····· 231

표Ⅴ-27 남생이에서 사용된 primer 염기서열 ····· 240

표Ⅴ-28 16S rRNA gene과 CO1 gene 사이 (약 4.2kb)를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 ····· 240

표Ⅴ-29 CO1-CO3, CO3-ND4, ND4-CYTB,CYTB-16S rRNA를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 ····· 241

표Ⅴ-30 구렁이에서 사용된 primer 염기서열 ····· 255

표Ⅴ-31 CO1-CO3, CO3-ND4, ND4-CyT,CytB-16S rRNA를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 ····· 255

표Ⅴ-32 감돌고기에서 사용된 primer 염기서열 ····· 266

표Ⅴ-33 16S rRNA gene과 tRNA-Leu gene 사이 (약 7kb)를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 ····· 267

표Ⅴ-34 16S rRNA gene과 tRNA-Leu gene 사이 (약 9kb)를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 ····· 267

표Ⅴ-35 얼룩새코미꾸리에서 사용된 primer 염기서열 ····· 281

표Ⅴ-36 16S rRNA gene과 tRNA-Leu gene 사이 (약 7kb)를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 ····· 281

표Ⅴ-37 16S rRNA gene과 tRNA-Leu gene 사이 (약 9kb)를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 ····· 282

표Ⅴ-38 꼬치동자개에서 사용된 primer 염기서열 ····· 292

표Ⅴ-39 16S rRNA gene과 tRNA-Leu gene 사이 (약 7kb)를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 ····· 292

표Ⅴ-40 16S rRNA gene과 tRNA-Leu gene 사이 (약 9kb)를 증폭하기 위한 Long range PCR 조건 ····· 293

표Ⅴ-41 척추동물 13종의 염기서열 분석 결과 ····· 302

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

< 그 림 목 차 >

그림I-1 완전히 해독된 한국인삼의 엽록체 게놈 ····· 10

그림I-2 일반적인 척추동물의 미토콘드리아 유전체 지도 ····· 15

그림Ⅱ-1-1 미선나무의 꽃과 열매 ····· 32

그림Ⅱ-1-2 미선나무 엽록체 유전체의 분석지역 유전자 지도 ····· 37

그림Ⅱ-1-3 미선나무 엽록체 유전체의 염기서열과 해독결과 ····· 38

그림Ⅱ-1-4 미선나무속의 계통학적 위치를 나타내는 계통수 (MP) ····· 41

그림Ⅱ-1-5 미선나무속의 계통학적 위치를 나타내는 계통수 (ML) ····· 43

그림Ⅱ-1-6 미선나무속의 계통학적 위치를 나타내는 계통수 (NPL) ····· 44

그림Ⅱ-2-1 이식하여 고려대학교 온실에 재배중인 제주고사리삼 ····· 50

그림Ⅱ-2-2 제주고사리삼의 계통학적 위치를 나타내는 최대절약 계통수 (trn L-F region) ····· 57

그림Ⅱ-2-3 제주고사리삼의 계통학적 위치를 나타내는 엄밀합의 계통수 (trn L-F region) ····· 58

그림Ⅱ-2-4 제주고사리삼의 계통학적 위치를 나타내는 최대절약 계통수 (rbcL) ····· 59

그림Ⅱ-2-5 제주고사리삼의 계통학적 위치를 나타내는 다수합의 계통수 (rbcL) ····· 60

그림Ⅱ-2-6 제주고사리삼의 계통학적 위치를 나타내는 엄밀합의 계통수 (rbcL) ····· 61

그림Ⅱ-2-7 제주고사리삼 엽록체 유전체의 분석지역 유전자 지도 ····· 62

그림Ⅲ-1 끈끈이귀개의 서식처 환경 ····· 68

그림Ⅲ-2 황근의 서식처 환경 ····· 69

그림Ⅲ-3 황근 채집지 ····· 69

그림Ⅲ-4 제주도 북제주군 하도리 황근 집단 채집개체의 분포도 ····· 70

그림Ⅲ-5 제주도 남제주군 세화리 황근 집단 채집개체의 분포도 ····· 70

그림Ⅲ-6 제주도 남제주군 오조리 식상봉 화은 자생지 내 채집개체의 분포도 ····· 71

그림Ⅲ-7 끈끈이귀개의 ITS 염기서열 비교분석 결과 ····· 77

그림Ⅲ-8 ISSR 증폭유무를 이용하여 유집분석 한 끈끈이귀개 개체 및 집단 간의 유전적 관계 도표 ····· 79

그림Ⅲ-9 집단 1,2,3을 대상으로 ITS 염기서열을 결정하여 정렬한 염기서열 ····· 80

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

< 그 림 목 차 (계속) >

그림Ⅲ-10 황근 3개 집단 52개 개체간의 관계를 나타내는 UPGMA 유집도 ····· 87

그림Ⅲ-11 UBC 835와 816 두 개 프라이머를 이용한 집단 간의 차이 ····· 89

그림Ⅲ-12 황근 3개 집단 52개 개체의 ISSR 자료를 이용한 UPGMA 유집도 ····· 91

그림Ⅳ-1 애기뿔소똥구리의사진 ····· 97

그림Ⅳ-2 곤충류 9종의 미토콘드리아 염기서열을 비교하여 차이를 나타낸 그래프 ····· 100

그림Ⅳ-3 12S 마커의 PCR 증폭결과를 아가로즈젤 상에서 분리한 사진 ····· 103

그림Ⅳ-4 12S염기서열에입각한 neighbor-joining 계통수 ····· 104

그림Ⅳ-5 16S 마커의 PCR 증폭결과를 아가로즈젤 상에서 분리한 사진 ····· 105

그림Ⅳ-6 16S염기서열에입각한 neighbor-joining 계통수 ····· 105

그림Ⅳ-7 COI 마커의 PCR 증폭결과를 아가로즈젤 상에서 분리한 사진 ····· 106

그림Ⅳ-8 COI염기서열에입각한 neighbor-joining 계통수 ····· 107

그림Ⅳ-9 COⅡ 마커의 PCR 증폭결과를 아가로즈젤 상에서 분리한 사진 ····· 108

그림Ⅳ-10 COⅡ염기서열에입각한 neighbor-joining 계통수 ····· 108

그림Ⅳ-11 COⅢ 마커의 PCR 증폭결과를 아가로즈젤 상에서 분리한 사진 ····· 109

그림Ⅳ-12 COⅢ염기서열에입각한 neighbor-joining 계통수 ····· 110

그림Ⅳ-13 ND1 마커의 PCR 증폭결과를 아가로즈젤 상에서 분리한 사진 ····· 111

그림Ⅳ-14 ND1등의염기서열에입각한 neighbor-joining 계통수 ····· 111

그림Ⅳ-15 ND4+ND4L 마커의 PCR 증폭결과를 아가로즈젤 상에서 분리한 사진 ····· 112

그림Ⅳ-16 ND4+ND4L염기서열에입각한 neighbor-joining 계통수 ····· 113

그림Ⅳ-17 CytB 마커의 PCR 증폭결과를 아가로즈젤 상에서 분리한 사진 ····· 114

그림Ⅳ-18 CytB염기서열에입각한 neighbor-joining 계통수 ····· 114

그림Ⅴ-1 일반적인 척추동물의 미토콘드리아 유전체 지도 ····· 118

그림Ⅴ-2 올빼미목의 cytochrome b 유전자에서 specific primer의 제작과정 ····· 125

그림Ⅴ-3 PCR 반응 혼합물의 조성의 예 ····· 125

그림Ⅴ-4 PCR 반응 조건의 예 ····· 125

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

< 그 림 목 차 (계속) >

그림Ⅴ-5 PTC-220 ····· 126
그림Ⅴ-6 PCR 원리 ····· 126
그림Ⅴ-7 Agarose gel documentation system ····· 128
그림Ⅴ-8 PCR 결과 ····· 128
그림Ⅴ-9 척추동물 미토콘드리아 유전체의 모식도 위에 표시된 universal primer ····· 129
그림Ⅴ-10 Long range PCR 반응 조성의 예 ····· 130
그림Ⅴ-11 Long range PCR 반응 조건의 예 ····· 130
그림Ⅴ-12 transformation 과정 ····· 131
그림Ⅴ-13 계통분석을 위한 프로그램 ····· 133
그림Ⅴ-14 주요 척추동물의 미토콘드리아 유전체 분석 protocol ····· 134
그림Ⅴ-15 반달가슴곰 ····· 135
그림Ⅴ-16 반달가슴곰의 미토콘드리아 유전체 지도 ····· 137
그림Ⅴ-17 반달가슴곰의 미토콘드리아의 tRNA 2차 구조 ····· 138
그림Ⅴ-18 호랑이 ····· 158
그림Ⅴ-19 호랑이의 미토콘드리아 유전체 지도 ····· 159
그림Ⅴ-20 호랑이의 미토콘드리아의 tRNA 2차 구조 ····· 159
그림Ⅴ-21 수달 ····· 171
그림Ⅴ-22 Total genomic DNA ····· 171
그림Ⅴ-23 약 4.3kb PCR product ····· 174
그림Ⅴ-24 약 9kb PCR product ····· 174
그림Ⅴ-25 제한효소(EcoR1)로 처리한 plasmid ····· 174
그림Ⅴ-26 수달의 전체 미토콘드리아 유전체 중에서 16S rRNA와 CO1 유전자 사이의 유전자 배열 ····· 175
그림Ⅴ-27 수달의 미토콘드리아 유전체중에서 16SrRNA와 CO1 유전자 사이에 있는 tRNA의 2차 구조 ····· 175
그림Ⅴ-28 산양 ····· 183
그림Ⅴ-29 Total genomic DNA ····· 183
그림Ⅴ-30 약 6.8kb PCR product ····· 186

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

< 그 림 목 차 (계속) >

그림Ⅴ-31 PCR product (1,2) ····· 186
그림Ⅴ-32 PCR product (1,2,3) ····· 187
그림Ⅴ-33 산양의 tRNA-Leu의 2차 구조 ····· 187
그림Ⅴ-34 사향노루 ····· 192
그림Ⅴ-35 Total genomic DNA (1,2,3) ····· 193
그림Ⅴ-36 사향노루의 PCR product ····· 194
그림Ⅴ-37 사향노루의 미토콘드리아 유전체 중에서 16S rRNA와 tRNA-Leu 유전자 사이에 있는 tRNA의 구조 ····· 195
그림Ⅴ-38 황새 ····· 204
그림Ⅴ-39 Total cellular DNA ····· 204
그림Ⅴ-40 PCR product 사진 ····· 207
그림Ⅴ-41 황새의 미토콘드리아 유전체 배열 ····· 208
그림Ⅴ-42 황새 미토콘드리아의 tRNA 2차 구조 ····· 208
그림Ⅴ-43 수리부엉이 ····· 217
그림Ⅴ-44 PCR product 사진 ····· 220
그림Ⅴ-45 수리부엉이의 미토콘드리아 유전체 ····· 221
그림Ⅴ-46 수리부엉이 미토콘드리아의 tRNA 2차 구조 ····· 221
그림Ⅴ-47 올빼미 ····· 229
그림Ⅴ-48 PCR product 사진 ····· 231
그림Ⅴ-49 올빼미의 미토콘드리아 유전체 ····· 232
그림Ⅴ-50 올빼미 미토콘드리아의 tRNA 2차 구조 ····· 232
그림Ⅴ-51 남생이 ····· 239
그림Ⅴ-52 Total genomic DNA (1,2) ····· 239
그림Ⅴ-53 약 4.2kb PCR product ····· 241
그림Ⅴ-54 CO1-CO3와 CO3-ND4 PCR product ····· 241
그림Ⅴ-55 ND4-CYTB PCR product ····· 242
그림Ⅴ-56 제한효소(EcoR1)로 처리한 plasmid ····· 242
그림Ⅴ-57 제한효소(EcoR1)로 처리한 plasmid (1-6) ····· 242

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

< 그 림 목 차 (계속) >

그림Ⅴ-58 남생이의 미토콘드리아 유전체 중에서 16S rRNA와 CO1 유전자 사이에있는 tRNA의 구조 ····· 243

그림Ⅴ-59 구렁이 ····· 254

그림Ⅴ-60 구렁이 Long range PCR product ····· 256

그림Ⅴ-61 구렁이의 tRNA 2차 구조 ····· 256

그림Ⅴ-62 감돌고기 ····· 265

그림Ⅴ-63 어류에서 사용되어진 primer strategy ····· 266

그림Ⅴ-64 감돌고기 PCR product (1,2,3) ····· 267

그림Ⅴ-65 감돌고기 미토콘드리아의 tRNA 2차 구조 ····· 268

그림Ⅴ-66 얼룩새코미꾸리 ····· 280

그림Ⅴ-67 어류에서 사용되어진 primer strategy ····· 281

그림Ⅴ-68 얼룩새코미꾸리 PCR product ····· 282

그림Ⅴ-69 얼룩새코미꾸리 미토콘드리아의 tRNA 2차 구조 ····· 283

그림Ⅴ-70 꼬치동자개 ····· 291

그림Ⅴ-71 어류에서 사용되어진 primer strategy ····· 292

그림Ⅵ-1 야생동물 유전자원 시료 수집의 국가체계 제안 ····· 323

그림Ⅵ-2 분류군별 유전자연구센터의 네트워크 ····· 342

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Ⅰ. 서 론

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Ⅰ. 서론 (연구 개요)

1. 연구 배경

1.1. 고유생물자원적 배경

▪ 21세기에는 생물 산업 (Biotechnology, BT)이 인간문화의 주축을 이룰 것으로 예견되며 생물의 유전자자원은 생물 산업의 원천이다. 생물 유전자자원을 원천소재로 하여 개발되는 상품들의 시장규모는 연간 5천억불 ~ 8천억불로 추정되고 있으며, 2010년도에는 이보다 4~5배 정도 증가될 것으로 예견된다.

▪ 국제 생물다양성 협약에 따라 자국의 생물자원에 대한 생물주권의 개념이 확산되고 있으며 우리나라 고유종들에 대한 주권을 주장할 근거로 유전적 특이성을 입증하여야 한다.

▪ 우리나라는 기후의 특성상 많은 고유생물종을 갖고 있는 생물자원의 보고이며 우리나라 고유 생물종들을 대상으로 유전자분석을 통해 우리나라 종임을 확인할 수 있는 자료의 확보가 시급히 요청되고 있다.

▪ 우리나라 고유종 뿐 만 아니라 근연 속, 종, 아종, 변종들에 대한 유전자의 비교연구가 동시에 수행되어야만 우리나라 고유종의 중요성이 강조될 수 있다.

1.2. 보존생물학적 배경

▪ 우리나라의 많은 고유속, 종, 아종, 변종들이 현대의 급격한 산업화에 따른 서식지 파괴, 외래생물의 유입, 무불별한 남획 등의 이유로 개체군의 수가 급격히 줄어들고 있거나 멸종 위기에 처해 있다.

▪ 이러한 생물종들을 효율적으로 보존 관리하는 정책을 수립하고 실행하기 위해서는 우리나라 멸종위기 생물종들에 대한 유전적 비교조사가 광범위하게 수행 되어야 한다.

▪ 특정종의 복원에는 개체군들에 대한 유전적 다양성의 조사가 선행되어 어떤 개체군, 서식지 등을 복원해야할지 지표 설정이 우선적으로 파악되어야 한다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

▪ 특정 종에 대하여는 생물종 복원에 이용할 수 있는 유전자의 비교분석 자료가 필요한 상태이다.

▪ 특히 환경부 지정 멸종위기 1, 2급 동식물 252종에 대한 유전적 평가가 시급히 이루어져야 이들의 보존 및 복원에 대한 계획이 수립될 수 있다.

▪ 멸종위기 야생동·식물의 증식·복원 종합계획에 따른 보존단위 설정에 종 및 집단을 대상으로 하는 유전적 자료가 폭넓게 수집되어야 한다.

▪ 대부분의 멸종위기종들의 유전적 연구에는 재료확보가 우선적으로 이루어져야 하는데 이에 대한 구체적인 대책이 마련되어야 한다..

1.3. 정책적 배경

▪ 국제 생물다양성협약에 따라 우리나라 고유생물종들의 생물 주권확보를 위하여 대상종들에 대한 유전적 식별을 위한 자료가 광범위하게 수집되어야 한다.

▪ 2005년부터 야생 동·식물 보호법이 발효됨에 따라 국가적인 장·단기 멸종 위기종 보존계획이 필요하며 이를 수행하기 위하여 해당종의 유전적 자료의 비교 분석이 필수적이다.

▪ 다수의 종이 고유 및 멸종 위기종에 속하므로 연차별 우선순위를 정하여 분석규모, 분석종, 분석집단, 분석대상 유전자마커 등의 선정에 대한 종합적인 계획수립이 우선 수행되어야 한다.

▪ 보존과 복원의 측면에서 유전자 분석 대상의 개체군수, 아종 및 변종 수, 개체수의 선정 및 각 분류 계급 및 분류군에 알맞은 분석대상 유전자마커의 선정에 대한 전략적 측면이 제시되어야 한다.

▪ 고유종 및 멸종 위기종의 유전자 정보를 DB화하여 효율적으로 활용할 수 있는 체제의 구축이 매우 필요하다.

▪ 국내외의 멸종위기 야생동·식물종의 밀거래를 원천적으로 차단하기위한 원산지 추적이 가능한 유전자 추적 시스템이 구축되어야한다.

▪ 산출된 멸종위기 종들에 대한 유전적 자료를 국립 생물 자원관 유전자원실과 공동 활용하는 방향이 제시되고 국가생물자원을 효율적으로 관리할 수 있는 방안이 마련되어야 한다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

2. 연구 1차년도 주요 연구내용

2.1. 고유 식물의 엽록체 및 핵 게놈 염기서열 결정

▪ 우리나라 고유속 식물종이며 멸종 위기종인 제주고사리삼과 미선나무의 핵 및 엽록체, 미토콘드리아 10개 유전자 부위 15 Kb 지역의 염기서열을 결정한다.

▪ 이들의 근연종과의 염기서열 비교분석 및 자료의 비교분석을 통하여 한국 고유속의 타당성을 입증하고 식별마커를 개발한다.

▪ 우리나라가 분포 북방한계인 멸종 위기종 황근과 끈끈이주걱의 집단을 대상으로 핵 ITS 염기서열 및 ISSR 분석을 통하여 개체군간 및 개체간의 유전적 다양성을 파악한다.

2.2. 멸종 위기 척추동물 종들의 미토콘드리아의 유전적 다양성 파악

▪ 멸종위기 척추동물 13종을 대상으로 미토콘드리아 전체 유전체의 염기서열을 해독한다.

▪ 근연종, 아종, 변종 집단과의 비교 분석을 위한 우리나라 고유종, 멸종위기종의 유전적 특성 규명 및 보존생물학에 이용할 수 있는 근거를 마련한다.

2.3. 곤충류의 핵 및 미토콘드리아 염기서열 결정

▪ 멸종 위기 곤충류 3종을 대상으로 핵 및 미토콘드리아 8개 유전자 지역의 염기서열을 결정한다.

▪ 근연종들과 비교 분석을 통하여 유전적 식별마커, 계통학적 유연관계를 규명하고 보존생물학적 집단연구를 위한 마커개발의 근거를 마련한다.

2.4. 우리나라 멸종 위기종의 유전자 database 구축

▪ 장기적인 안목으로 고유종 및 멸종 위기종의 유전자자원 활용을 위한 database 구축한다.

▪ 고유종 및 멸종위기종 자료, DNA 염기서열 자료, 집단유전학적 자료 등을 종합한 database를 구축한다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3. 사업수행 계획

3.1. 연구 1차년도 유전자 분석 대상 생물종 선정

3.1.1. 식물종의 선정

▪ 환경부가 연구 용역사업 공모시 공고한 고유종 및 멸종위기 식물종 56종 중 집단유전학적 분석을 위하여 2종, 한국 고유종 계통연구를 위하여 2종을 선정하였다.

▪ 고유종 계통연구를 위한 유전자 분석종의 선정

- 우선 우리나라 고유속 식물 6속 중에 하나인 제주고사리삼속 (*Mankyua*)과 미선나무속 (*Abeliophyllum*)을 선정하였다. 이들 2종은 학문적으로 매우 흥미로우며 후자의 경우 관상용 식물로 개발할 뛰어난 가치를 가지는 식물로, 이들 2종은 계통학적 위치가 매우 흥미로운 종이다.

▪ 집단연구를 위한 유전자 분석종의 선정

- 개체군이 비교적 크고, 분석에 필요한 잎을 제거하여도 식물체에 해가 없으며, 분포적으로 북방한계에 해당하고, 멸종위기에 처해 있으며 우리나라 국화인 무궁화와 근연이어서 상징성이 높은 황근(*Hibiscus hamabo*)을 선정하였다. 황근은 제주도에 6개 집단, 완도-소완도에 1개 집단이 알려졌으나 완도-소완도 집단은 이미 자연 상태에서는 멸종한 것으로 파악된다.

- 또 다른 집단 유전학적 유전자 분석 대상종으로는 끈끈이귀개 (*Drosera peltata*)를 선정하였다. 끈끈이귀개는 개체의 크기는 작으나 다수의 개체로 구성된 개체군이 전남지역에서 발견되고 있으며 지하 구근을 가지므로 지상부를 제거하여도 개체군이 크기에 영향을 미치지 않는다.

3.1.2. 향후 식물종의 선정

▪ 2007년에서 2014년의 년차별 분석 대상종은 우리나라 고유속 식물(6속), 우리나라 고유종 식물, 멸종 위기의 정도, 개체군의 크기, 분포영역, 개체의 크기, 상징성 보존 및 복원의 필요성, 샘플의 확보가능성, 경제적 중요도, 학문적 연구의 중요도 등 여러 가지요인을 종합 분석하여 연차별 계획을 수립할 예정이다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

▪ 2007년 분석대상종의 경우 2006년도에 확보하는 것이 바람직하여, 당해연도 분석 sample은 전년도에 한국의 식물 DNA은행에 확보하여 분양하는 시스템을 구축할 필요성이 있다.

▪ 우리나라 특산속식물인 제주고사리삼 (*Mankyua*), 미선나무속(*Abeliophyllum*), 금강인가목속 (*Pentactina*), 개느삼속 (*Echinosophora*), 금강초롱속 (*Hanabusaya*), 모데미풀속 (*Megaleranthis*)의 경우 연차별로 엽록체 게놈의 완전한 염기서열 결정이 필요하다고 사료된다.

3.1.3. 전체 미토콘드리아 게놈분석을 위한 척추동물대상종의 선정 및 근거

▪ 대상종 선정에 있어 다음 요인을 고려하였다.

- 정확한 채집 지역과 시기 등 기록이 명확한 국내 개체군이나 아종의 유전자 샘플 확보 여부, 향후 확보 가능성 및 집단분석이 가능한 샘플의 수 확보 여부.

- 해당종의 복원사업의 시급성 (2005년, 2006년 환경부 멸종위기종 연구 결과 참조)

▪ 포유류 분석 대상종 (표 I-1):

- 환경부 공시 대상종 9종 중 현재 샘플이 확보되어 있지 않고 앞으로 확보 가능성도 불확실하며, 복원 시급성도 높지 않은 표범과, 복원 시급성은 높으나 샘플 확보 여부가 불투명한 스라소니도 제외하고, 다음 7종을 선정하였다. 이 중 복원 시급성이 높지 않은 호랑이와 대륙사슴은 분석후보 종으로 포함시켰다.

- 포유류 분석 대상종 (5종) : 반달가슴곰, 호랑이, 산양, 사향노루, 수달

- 포유류 분석 후보 대상종 (2종) : 사향노루, 여우

▪ 조류 분석 대상종 :

- 환경부가 공시한 4종 중 샘플이 확보되어 있지 않고 향후 확보 가능성도 불투명한 크낙새를 제외한 올빼미, 수리부엉이, 황새 등 3종을 선정하였다.

- 조류 분석 대상종 (3종) : 올빼미, 수리부엉이, 황새

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 I-1. 척추동물의 선정 기준 및 야생동물자원은행(별표표시)에 DNA 분석용 샘플의 확보 유무

	종	*유전자샘플 기확보 여부	샘플 향후 확보 가능성	*집단분석용 샘플 확보 여부	복원 시급성 (2005용역)	잠재적유전자 분석 대상종
포유류	반달가슴곰	○		○	높음	○
	여우	○			높음	○
	산양	○		○	높음	○
	호랑이	×	○		보통	?
	표범	×	?		보통	×
	사향노루	○			높음	○
	스라소니	×	?		높음	×
	대륙사슴	×	○		높음	○
	수달	○		○	높음	○
조류	올빼미	○		○	보통	○
	황새	○			높음	○
	수리부엉이	○		○	보통	○
	크낙새	×	?		높음	×
양서 파충류	남생이	○			보통	?
	구렁이	○			보통	?
어류	꼬치동자개	○		○	높음	○
	통사리		○		높음	○
	감돌고기	○			높음	○
	임실납자루		○		높음	○
	얼룩새코미꾸리	○			높음	○
	미호종개		○		높음	○
곤충류	소똥구리	○			높음	○
	애기뿔소똥구리	○			보통	○
	장수하늘소	○			높음	?
	꼬마잠자리	○			보통	○
	상제나비		○		높음	○
	비단벌레	○			보통	?
	물장군	○			높음	○

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

▪ 양서 파충류 분석 대상종 :

- 환경부가 공시한 남생이와 구렁이 2종 모두를 분석후보 대상종으로 선정하였다.

▪ 어류 :

- 환경부가 공시한 6종의 멸종 위기종 가운데 우리나라 고유종으로서 계통학적 중요성과 샘플 확보의 유용성을 고려하여 총 3종을 선정하였다.

- 어류 분석 대상종 (3종) : 감돌고기, 얼룩새코미꾸리, 꼬치동자개

- 감돌고기 *Pseudopungtungia nigr*a (잉어목 잉어과) : 서식처의 파괴로 개체수가 현저히 감소하고 있는 우리나라 고유종이다.

- 얼룩새코미꾸리 *Koreocobitis naktongensis* (잉어목 미꾸라지과): 우리나라 고유종으로 낙동강 수계에만 분포하고 있다.

- 꼬치동자개 *Pseudobagrus brevicorpus* (메기목 동자개과): 하천 상류의 맑은 물에 서식하는 야생성종으로 우리나라 고유종이며, 낙동강 수계에서만 서식한다.

3.1.4. 곤충류 분석대상종의 선정

▪ 환경부가 공시한 7종의 멸종 위기종 가운데 계통학적, 생태학적 중요성과 샘플 확보의 유용성을 고려하여 총 3종을 선정하였다.

▪ 곤충류 분석 대상종 (3종) : 꼬마잠자리, 애기뿔소똥구리, 물장군

▪ 물장군 *Lethocerus deyrollei* (노린재목 물장군과) : 노린재류 곤충 가운데 가장 큰 종으로 최근 수질 오염으로 그 수가 급격히 줄었다.

▪ 꼬마잠자리 (*Nanophya pygmaea*): 우리나라 잠자리목 중에서 가장 소형이며 최근 서식처의 감소 또는 질 저하 때문에 최근에 그 수가 급감하였다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

▪ 애기뿔소똥구리 (*Copris tripartitus*): 소와 말의 똥을 섭식하는 종으로서 우리를 이용한 가축의 집단사육과 가축용 항생제의 남용 때문에 그 수가 격감된 종이다.

3.2. 분석 대상종의 유전자 분석 • 연구

3.2.1. 식물종의 유전자 분석을 위한 개요

▪ 20세기 말부터 세계의 선진각국은 생물자원의 중요성에 눈을 돌리기 시작하여 21C에 이르러 각각의 생물 종들이 갖고 있는 고유한 유전자자원을 확보하기 위한 노력을 배가하고 있다. 이중에서도 특히 고등식물의 유전자 자원의 확보와 활용은 그 중심에 서있다. 특히, 식물자원으로부터 AIDS치료제와 항암제와 같은 새로운 신약의 개발, 식량자원식물의 개량, 새로운 원예자원식물의 개발 및 개량, 방향족 자원식물의 개발, 기호식품 및 색소자원식물의 개발 등은 현재의 각종 식물의 게놈 프로젝트와 연결하여 급속도로 추진되고 있다. 따라서 구미의 선진각국은 일찍이 아마존유역이나 열대 아시아 국가들에 식물학자들을 보내 식물자원을 채집하여 이로부터 신물질을 찾는 일과 유전자 자원을 확보하는데 국가적으로 많은 예산을 투자하고 있다. 이의 결과로 선진국들과 이들 생물자원을 보유한 개발도상국간의 **생물자원에 관한 주권**에 관한 문제가 점점 첨예화되고 있다.

▪ 다른 한편으로 19C의 산업화 이후 20C에 걸쳐 가속화된 인간의 자연간섭, 자연개발, 자연파괴의 결과로 지구상의 생물 종의 멸종속도는 매우 빠른 속도로 증가하고 있다. 이는 결과적으로 지구상에서 그 생물 종들이 보유하고 있는 유전자 자원의 사라짐을 의미하는 것이다. 특히 인간에 의한 식물 서식지파괴는 곧 복잡하게 얽혀있는 생태계의 교란과 생태계 구성 종들의 멸종을 의미한다. 생태계의 구성인자들 중에서도 생산자에 해당하는 식물 종들의 사라짐은 지구생태계의 교란을 의미한다. 따라서 UNESCO를 위시한 UN의 기구들에서는 생물 종들을 보호하기 위한 **생물종다양성협약**을 이미 추진하였고 우리 나라도 이를 받아드려 생물 종 보존에 심혈을 기울이고 있다. 그러나 이러한 국제적 노력에도 불구하고 생물 종의 멸종속도는 최근 들어 오히려 증가하고 있는 추세이다. 따라서 생물 종들이 멸종되기 이전에 이들의 유전자 자원을 확보하여 각종 연구를 통한 새로운 유전자 자원의 개발에 이용하게 하려는 것은 시급한 과제이다. 이중에서도 **식물의 유전자 자원확보가 가장 긴급한 현안**이다.

▪ 우리나라 고유 식물의 DNA자원을 확보하여 그 특성을 밝혀 보관・관리하고 연구및 자원관

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

리에 이용하고자 하는 환경부의 주요생물자원유전자분석 연구과제는 국가적으로 우선적으로 수행되어야 필연성을 가지고 있다. 나아가, 우리나라는 지정학적 특성 때문에 **특산식물종**들이 많아 이들 자원의 확보와 체계적인 관리는 어느 나라들보다도 우선적으로 수행되어야할 필연성을 갖고 있다. 또한 예로부터 많은 자원식물들을 식용, 약용 등으로 일상생활에 이용하고 있다. 세계적으로 고유식물의 유전자를 활용하기위한 국가적인 사업은 1994년 정도부터 미국, 영국 등에서 개념이 발전하기 시작하여 미국에서는 1998년, 영국에서는 2000년에 공식적으로 출발하였다.

▪ 앞으로 지속적인 지원이 이루어진다면, 우리나라 식물자원의 관리 및 복원 측면에서 양적·질적 발전이 있을 것이다.

3.2.2. 식물 분자마커의 선정 이유

▪ 식물의 경우는 핵, 미토콘드리아, 엽록체 게놈 등 3개의 게놈을 가지고 있다. 식물의 유전정보의 대다수는 핵 게놈에 존재하지만 게놈의 크기가 크고, 진핵세포의 많은 intron 과 exon으로 구성되어 있어서 특정 유전자의 염기 서열을 genomic DNA로부터 분석하여 식물종의 보존이나 식별에 이용 하는데는 제한적이며 nuclear rDNA ITS지역, alcoholdehydrogenase의 특정 intron 부위 등 극히 부분적으로 이용된다. ITS 지역의 경우는 예외로 식물의 종간관계를 이해하는데 매우 널리 이용된다. 식물 미토콘드리아 게놈의 경우 동물 미토콘드리아와는 달리 크기가 크고 (보통400kb~4,000kb 범위) 구조적으로 매우 불안정하며, 염기서열은 매우 보존적이어서 속, 종 수준 또는 그 이하의 분류군의 계통관계나 식별에 이용은 거의 의미가 없다.

▪ 다행스럽게 식물의 경우 엽록체 게놈이 160Kb 내외로(동물 미토콘드리아 게놈의 10배 크기), 구조적으로 안정적이며 염기서열 수준에서는 noncoding 지역의 경우 종의 식별이 가능한 지역에서 coding 지역의 경우 속, 과 등의 높은 분류군의 계통 연구 및 식별에 널리 이용되고 있다. 따라서 한국 특산속 식물의 타당성, 식별, 보존 전략을 세우는데 엽록체 게놈의 염기서열을 광범위하게 활용이 가능하다(Palmer 1991, Shinozaki et al. 1986).

▪ 식물 엽록체 게놈은 120여개의 유전자가 배열되어 있는데 IR지역, SSC지역, LSC지역으로 대별되며 (그림 I-1 참고) 구조적으로 매우 안정하지만 가끔 IR지역의 수축 및 팽창, 역위, 전좌와 같은 구조적 변이가 나타나기도 한다(Doyle et al. 1992, Doyle et al. 1996, Hoot and Palmer 1994, Jansen and Palmer 1987, Knox et al. 1993, Milligan et al. 1989, Ogihara et al. 1988, Palmer et al. 1987, Raubeson and Jansen 1992). 그러나 원핵세포의 게놈이면서도 intron이 15개정도 존재하

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

며 유전자의 배열이 거의 일정하여 특정 유전자 부위에 primer를 만들어 중간에 끼인 noncoding 지역의 염기서열을 결정하기가 비교적 쉽다. 현재 20여종의 고등식물 염기서열이 완전히 해독되었고(Hiratsuka et al., 1989; Shinozaki et al., 1986; Kim and Lee, 2004), 현재 선진국의 몇몇 실험실에서 30~40여개의 full genome sequencing project가 진행되고 있고, 본 연구의 주관 연구자 실험실에서도 고려인삼 (그림 I-1 참조), 가시오가피, 쟈스민, 개나리 등 여러 식물을 대상으로 full genome sequencing이 완료되었거나 진행 중이다. 우리나라 특산속 식물들에 대한 full genome sequencing이 필요하다. 또한 염기서열의 변이가 큰 noncoding지역은 고유종의 식별, 아종 및 변종의 식별과 유전적 변이의 비교 분석에도 유용성이 보고되고 있다. 엽록체 게놈에 존재하는 120여개의 유전자 중 84개의 유전자가 단백질로 전사되는데 유전자에 따라서 진화속도가 크게 다르다 (표 I-2 참조) 따라서 어떤 보존적인 유전자는 고등 분류군의 계통에만 이용될 수 있으나 빨리 진화하는 유전자의 염기서열은 근연속이나 속내의 뚜렷한 종간의 유연관계를 논의하는데도 이용될 수 있다.

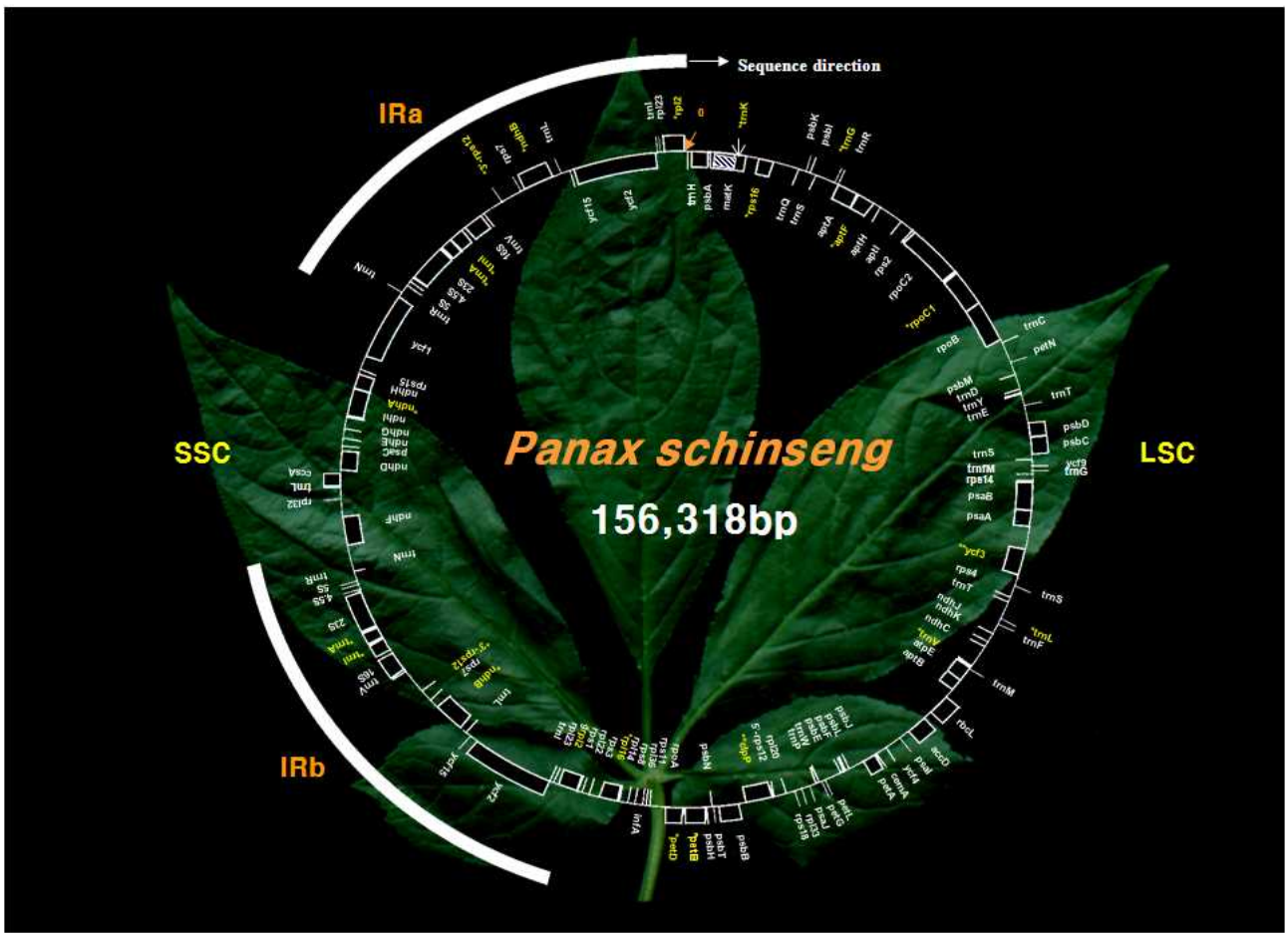


그림 I-1. 완전히 해독된 한국인삼의 엽록체 게놈 (출전 : Kim & Lee 2004)

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 I-2. 엽록체 게놈 중 단백질을 만드는 유전자의 진화속도를 비교한 자료 (출전 : Kim & Lee 2004)

Table 4. Pairwise distance of nucleotide and protein substitutions among 16 fully sequenced vascular plants.

Order	Gene Name	Region	DNA (D)	DNA (SE)	Protein (D)	Protein (SE)	Average length	Range of length	Missing taxa	Functional groups of genes
1	*rrn16*	IR	0.03342	0.00241			1493	1490-1504		Ribosomal RNA
2	*rrn23*	IR	0.04196	0.00208			2824	2796-2888		Ribosomal RNA
3	*rrn5*	IR	0.04716	0.01020			121	121-123		Ribosomal RNA
4	*rrn4.5*	IR	0.07489	0.01654			102	95-104		Ribosomal RNA
5	*psbA*	LSC	0.09771	0.00502	0.01830	0.00424	1055	954-1062		Photosystem II
6	*psbD*	LSC	0.11154	0.00592	0.02838	0.00474	1062	1062		Photosystem II
7	*rps12*	IR/LSC	0.11189	0.01010	0.08267	0.01300	375	372-408		Small ribosomal subunit
8	*psbE*	LSC	0.11359	0.01198	0.05191	0.01107	252	252		Photosystem II
9	*psbL*	LSC	0.11825	0.01954	0.07544	0.02315	117	117		Photosystem II
10	*petB*	LSC	0.12389	0.00720	0.03547	0.00668	648	648		Cytochrom b/f complex
11	*petN*	LSC	0.12641	0.02443	0.07845	0.01813	90	90-93		Cytochrom b/f complex
12	*psbF*	LSC	0.12939	0.01894	0.05342	0.01723	120	120		Photosystem II
13	*atpH*	LSC	0.12999	0.01453	0.02726	0.00851	246	246		ATP synthase
14	*psaB*	LSC	0.13068	0.00401	0.05236	0.00440	2205	2205-2208		Photosystem I
15	*psaA*	LSC	0.13116	0.00432	0.05460	0.00425	2258	2253-2325		Photosystem I
16	*psbC*	LSC	0.13125	0.00595	0.04067	0.00503	1420	1386-1422		Photosystem II
17	*psaC*	SSC	0.13146	0.01457	0.03807	0.01231	246	246		Photosystem I
18	*rps7*	IR	0.13258	0.00942	0.16435	0.01519	467	443-474		Small ribosomal subunit
19	*petD*	LSC	0.13662	0.01091	0.04296	0.00811	487	483-528		Cytochrom b/f complex
20	*petG*	LSC	0.13805	0.02096	0.06667	0.02042	114	114		Cytochrom b/f complex
21	*psbN*	LSC	0.14010	0.02125	0.07907	0.01937	132	132		Photosystem II
22	*ndhB*	IR	0.14049	0.00538	0.13035	0.00649	1521	1479-1533	*Pinus*	NADH-dehydrogenase
23	*psbB*	LSC	0.14153	0.00683	0.06235	0.00580	1527	1527		Photosystem II
24	*psbI*	LSC	0.14644	0.02255	0.04745	0.01698	114	111-159		Photosystem II
25	*rbcL*	LSC	0.14737	0.00521	0.06339	0.00705	1428	1428-1431		Large subunit of rubisco
26	*ycf3*	LSC	0.15258	0.01054	0.10148	0.01054	509	477-552		Photosystem I
27	*psbZ*	LSC	0.15735	0.01705	0.13831	0.02186	189	189		Photosystem II
28	*atpB*	LSC	0.15871	0.00768	0.08588	0.00700	1494	1479-1503		ATP synthase
29	*psbJ*	LSC	0.16370	0.02443	0.12083	0.03277	123	123		Photosystem II
30	*rpl36*	LSC	0.16823	0.02564	0.10698	0.02657	114	114		Large ribosomal subunit
31	*atpA*	LSC	0.17323	0.00682	0.10957	0.00821	1508	1296-1536		ATP synthase
32	*atpI*	LSC	0.17469	0.00909	0.11054	0.01130	745	738-750		ATP synthase
33	*ndhC*	LSC	0.17715	0.01411	0.15460	0.01814	363	363	*Pinus*	NADH-dehydrogenase
34	*psbT*	LSC	0.17840	0.02855	0.07451	0.02484	106	99-117		Photosystem II
35	*ndhH*	SSC	0.17846	0.00766	0.12609	0.01026	1182	1182-1185	*Pinus*	NADH-dehydrogenase
36	*rpl2*	IR	0.18197	0.00842	0.17612	0.01093	822	792-834		Large ribosomal subunit
37	*petA*	LSC	0.18434	0.00893	0.14600	0.01046	963	957-966		Cytochrom b/f complex
38	*psbM*	LSC	0.18791	0.02693	0.12302	0.03034	107	105-114		Photosystem II
39	*ndhJ*	SSC	0.19092	0.01189	0.16272	0.01587	515	468-543	*Pinus*	NADH-dehydrogenase
40	*rpl16*	LSC	0.19238	0.01391	0.15891	0.01994	408	405-414		Large ribosomal subunit
41	*ndhJ*	LSC	0.19317	0.01116	0.15316	0.01649	478	477-480	*Pinus*	NADH-dehydrogenase
42	*ycf15*	IR	0.19632	0.02404	0.23260	0.03162	215	147-303	*Psilotum,Adiantum, Pinus,Oryza,Triticum, Zea,Lotus,Medicago, Arabidopsis*	ORF of unknown function
43	*ndhK*	LSC	0.20777	0.01018	0.18824	0.01513	786	624-858	*Pinus*	NADH-dehydrogenase
44	*rpl14*	LSC	0.20959	0.01557	0.18813	0.01777	370	366-372		Large ribosomal subunit
45	*psbH*	LSC	0.21464	0.02027	0.18525	0.03082	224	219-240		Photosystem II

D and SE indicate average percentage distances and standard errors, respectively, from 16×16/2 pariwise comparisions. DNA distances are corrected by Kimura's 2-parameter model and protein distances are represented as a proportion of amino acid sites. All pairwise distances are calculated under the pairwise deletion of sequence alignments.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 I-2. (계속)

Table 4. continued.

Order	Gene Name	Region	DNA (D)	DNA (SE)	Protein (D)	Protein (SE)	Average length	Range of length	Missing taxa	Functional groups of genes
46	*rps16*	LSC	0.21793	0.01903	0.22007	0.02261	254	237-267	*Psilotum,Pinus, Medicago,*	Small ribosomal subunit
47	*rpl23*	IR	0.21925	0.01796	0.26126	0.02027	280	267-288		Large ribosomal subunit
48	*ndhA*	SSC	0.21950	0.00949	0.19240	0.01198	1094	1083-1116	*Pinus*	NADH-dehydrogenase
49	*rpoB*	LSC	0.22061	0.00453	0.20380	0.00622	3217	3183-3237		DNA-dep. RNA polyerase
50	*rps14*	LSC	0.22224	0.01763	0.20336	0.02247	305	300-312		Small ribosomal subunit
51	*rps11*	LSC	0.22609	0.01465	0.22847	0.01982	416	393-435		Small ribosomal subunit
52	*psaI*	LSC	0.22691	0.02869	0.25873	0.03702	113	102-159		Photosystem I
53	*rpoC1*	LSC	0.22906	0.00649	0.21566	0.00881	2054	2025-2091		DNA-dep. RNA polyerase
54	*petL*	LSC	0.22995	0.03048	0.21260	0.03632	104	96-210	*Pinus*	Cytochrom b/f complex
55	*ndhD*	SSC	0.23113	0.00784	0.21221	0.01008	1501	1494-1509	*Pinus*	NADH-dehydrogenase
56	*psaJ*	LSC	0.23610	0.02990	0.15837	0.03299	132	129-135		Photosystem I
57	*ndhE*	SSC	0.23750	0.01593	0.18347	0.02129	305	281-321	*Pinus* (pseudo gene)	NADH-dehydrogenase
58	*rps2*	LSC	0.23934	0.01063	0.23078	0.01359	711	705-720		Small ribosomal subunit
59	*rps19*	LSC	0.24206	0.01788	0.24744	0.02614	280	279-282		Small ribosomal subunit
60	*psbK*	LSC	0.24389	0.02491	0.25059	0.03449	183	177-186		Photosystem II
61	*rps18*	LSC	0.24745	0.01713	0.27164	0.02551	339	228-513		Small ribosomal subunit
62	*atpE*	LSC	0.25304	0.01479	0.24918	0.01998	407	399-423		ATP synthase
63	*rps4*	LSC	0.25800	0.01264	0.23374	0.01615	604	594-606		Small ribosomal subunit
64	*ndhG*	SSC	0.27613	0.01439	0.27690	0.01571	538	531-594	*Pinus*	NADH-dehydrogenase
65	*atpF*	LSC	0.27740	0.01458	0.28902	0.01668	554	543-555		ATP synthase
66	*clpP*	LSC	0.27908	0.01344	0.28943	0.01694	615	588-750		Protease
67	*rps8*	LSC	0.28861	0.01771	0.27066	0.02222	404	381-417		Small ribosomal subunit
68	*rpl33*	LSC	0.29377	0.02668	0.28397	0.03265	202	198-207		Large ribosomal subunit
69	*rps3*	LSC	0.29731	0.01313	0.30530	0.01648	665	645-720		Small ribosomal subunit
70	*ycf4*	LSC	0.30054	0.01417	0.30378	0.01688	517	555-708		ORF of unknown function
71	*rpoA*	LSC	0.30221	0.01194	0.31824	0.01366	1022	990-1104		DNA-dep. RNA polyerase
72	*ndhF*	SSC	0.30984	0.00774	0.30930	0.01025	2225	2190-2244	*Pinus*	NADH-dehydrogenase
73	*cemA*	LSC	0.31229	0.01591	0.35133	0.01652	734	687-1395		Envelop memb. protein
74	*rpl20*	LSC	0.31653	0.01887	0.33411	0.02448	367	345-393		Large ribosomal subunit
75	*rpoC2*	LSC	0.32531	0.00595	0.33161	0.00687	4185	3675-4584		DNA-dep. RNA polyerase
76	*rpl32*	SSC	0.32777	0.03064	0.35232	0.04093	174	153-213	*Oryza*	Large ribosomal subunit
77	*ccsA*	LSC	0.33437	0.01238	0.34809	0.01554	960	933-987		c-type cyt. synthase gene
78	*rps15*	SSC	0.35131	0.02456	0.33899	0.02624	267	237-276		Small ribosomal subunit
79	*ycf2*	IR	0.35436	0.00528	0.36290	0.00321	6737	6315-6942	*Pinus, Oryza, Triticum, Zea,Medicago,*	ORF of unknown function
80	*infA*	LSC	0.36436	0.02659	0.34403	0.02808	263	177-342	*Lotus,Medicago, Arabidopsis, Oenothera*	Transl. initiation factor
81	*rpl22*	LSC	0.38701	0.02143	0.41830	0.02384	443	351-600	*Lotus,Medicago*	Large ribosomal subunit
82	*accD*	LSC	0.41108	0.01269	0.36457	0.01379	1367	933-1623	*Oryza, Triticum, Zea Medicago*	ACCase
83	*matK*	LSC	0.45796	0.01211	0.46324	0.01026	1536	1440-1635		Maturase
84	*ycf1*	IR-SSC	0.53394	0.00590	0.60534	0.00525	5568	5091-7305	*Oryza, Triticum, Zea*	ORF of unknown function

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.2.3. 식물의 유전자 분석 marker 선정

▪ 고유 식물의 식별 및 계통을 위한 분자 Marker 선정 (총 13.9Kb region)

- nuclear ribosomal DNA ITS region (~700bp)

- chloroplast rbcL (~1,400bp), accD (~1,500bp), ndhF (~22,200bp), atpB (~1,500) rbcL-atpB spacer (~800bp), ndhJ, ndhK, ndhC gene 등

▪ 집단 유전학적 분석 marker 선정

- ISSR marker 분석

- 핵 ribosomal RNA ITS 지역의 염기서열 분석

3.2.4. 척추동물종의 미토콘드리아 게놈분석 연구의 개요

▪ 멸종위기에 있는 동물을 복원하거나 개체수가 급격히 감소하는 동물을 관리하는 일은 생태학적 연구 뿐 아니라 발생학, 유전학, 계통학 등의 다양한 학문적 접근이 필요하다. 특히 국내 야생동물의 고유한 유전적 특성을 인지하여 정확한 종의 분류학적, 계통학적 위치를 확립하는 일은 종 보존과 복원의 기본이며, 필수이다.

▪ 환경보호와 생물자원의 중요성이 부각되고 보호를 위한 부단한 노력이 계속되고 있으나, 좁은 국토에서 한정된 자원으로 경제계획과 국토의 개발 계획이 이루어지기 때문에 야생동물의 서식지가 더 협소해지고 그 수가 더 감소할 위험이 언제나 존재한다. 또한 세계가 하나가 된 시점에서 외부에서 영입된 동물들로 인한 생태계 파괴가 사회적 문제로 떠오르고 외국에서 유입된 동물이 우리나라 환경에 적응하여 토속화 되어 가고 있으므로 우리나라의 고유한 종들이 위협을 받고 있다. 그러므로 현재 존재하는 우리나라 야생동물의 고유한 유전자 자원의 확보가 무엇보다 시급하다.

▪ 여러 유전자 중에서도 다양한 생물군에서 계통분류를 목적으로 또는 생태계 모니터링을 위한 마커로서 사용되고 있는 미토콘드리아 유전체는 매우 중요하고 의미 있는 유전적 자원 중 하나이다 (Hwang and Kim 1999, Hwang et al., 2001).

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

▪ 모든 척추동물의 미토콘드리아 유전체는 2개의 rRNA (12S rRNA, 16S rRNA), 22개의 tRNA, 13개의 단백질 암호 유전자 (COⅠ, COⅡ, COⅢ, ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6, ATP6, ATP8, CytB), 1개 내지는 2개의 noncoding region을 포함하고 있다 (그림 I-2). 유전체는 매우 효율적인 방법으로 배열되어 있으며, 인트론이 없고, intergenic spacers가 10bp 이하로 짧다. 또한 어떤 두 유전자간 reading frame의 중첩(overlap) 현상이 있고, stop codon의 size가 1-2 base (T 또는 TA)로 감소된 현상을 나타내기도 한다.

▪ 미토콘드리아 유전체를 이용하여 척추동물간의 계통관계와 진화를 밝히려는 노력이 부단히 이루어지고 있는데, 이는 미토콘드리아 유전체의 크기가 작고, 추출이 쉽다는 이유 외에 몇 가지의 장점을 가지고 있기 때문이다. 첫째, 미토콘드리아는 모계유전이고 (Lansman et al., 1983), 두 번째는 다른 미토콘드리아와 recombination한다는 증거가 없다 (Clayton, 1982, Hayashi et al., 1985). 그 의미는 척추동물의 미토콘드리아가 동종간의 recombination 없이 모계를 통해 전해지므로 핵 유전자에 비해 미토콘드리아 분자의 진화 역사가 좀 더 간단하다는 뜻이다. Kondo et al.(1990)은 *Drosophila* 에서 미토콘드리아가 부모에게서 유전되는 경우를 보여주었으나, 이것이 종내에서의 교차를 의미하지는 않는다. 세 번째로 미토콘드리아는 repair system의 결여에 의해 핵 유전자에 비례해서 빠르게 진화하고 있다 (Brown et al., 1979).

▪ 미토콘드리아 유전체는 핵 유전체와는 독립적으로 복제, 전사, 번역이 일어나며, 미토콘드리아의 생존에 필요한 필수적인 몇몇 유전자만이 남아 있고, 수 많은 유전자들이 핵 내로 전이되었을 것이라 추정되고 있다. 미토콘드리아 유전체는 미토콘드리아의 존재를 설명해 줄 수 있는 열쇠이며, 이를 기초로 하여 미토콘드리아의 기능에 관한 생화학적인 경로를 규명할 수 있도록 해준다. 뿐만 아니라 미토콘드리아 유전체로부터 얻을 수 있는 유용한 자료들로부터 동물의 계통학적인 유연관계와 종의 진화 역사를 추론하거나, 생태계 모니터링과 관련하여 분자 마커의 개발을 위한 훌륭한 후보군 중 하나여서 미토콘드리아 유전체에 대한 연구의 관심이 그 어느 때보다도 증폭되어져 있다. 이러한 이유로 최근 2~3년 사이에 미토콘드리아 유전체 정보의 양이 폭발적으로 증가하고 있다.

▪ 미토콘드리아 유전체 염기서열을 밝힌 후 다양한 분석 방법을 통하면 기존의 형태 형질이나 핵 유전체로부터 추론한 계통분석들에서 해결하지 못했던 심각한 계통분류학적 문제들을 신속히 해결할 수 있을 뿐만 아니라 환경오염지표 등을 포함한 생태계 모니터링의 체계적인 시스템 구축에도 매우 유용할 것이다. 또한 미토콘드리아 유전체의 빠른 염기 치환속도는 생물종간을 감별하거나 심지어 집단 간 혹은 개체 간을 식별하는 마커를 개발하는데 많은 도움을 줄 것이다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

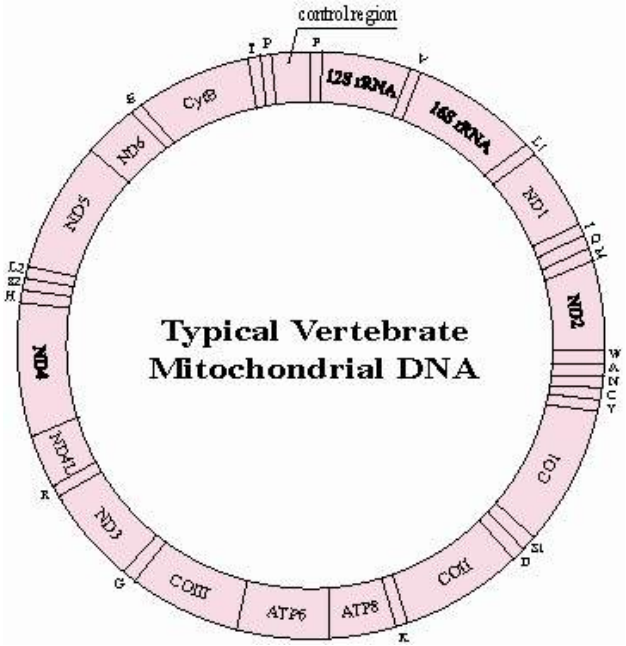


그림 I-2. 일반적인 척추동물의 미토콘드리아 유전체 지도. 13개의 단백질 암호화 유전자, 22개의 tRNA 유전자, 2개의 rRNA 유전자, 1개의 조절부위 등을 보여주고 있다.

▪ 미토콘드리아 유전체의 이러한 광범위한 유용성에도 불구하고, 보호야생동물에서의 미토콘드리아 유전체의 연구는 매우 미진한 실정이다. 멸종 위기종으로 선정된 제 총 9종의 포유류, 4종의 조류, 2종의 양서·파충류, 6종의 어류 가운데 우리나라에 서식하는 종의 미토콘드리아 유전체 연구는 단 1종도 되어 있지 않았으며, 외국에 서식하는 종 역시 조류인 황새 *Ciconia boyciana* 단 1종의 미토콘드리아 정보가 알려져 있을 뿐 이었다 (표 I-4). 멸종위기종과 같은 과 (Family)의 범위 내에서 근연종의 미토콘드리아 유전체 연구 실정을 조사해 본 결과 포유류 3과에서 7종, 양서류 2과에서 2종, 조류 2과에서 3종, 어류 3과에서 12종에서 미토콘드리아 유전체의 염기서열이 밝혀졌을 뿐이어서 전 세계적으로 미토콘드리아 유전체의 연구가 매우 미진한 상태임을 알 수 있다 (표 I-3).

▪ 본 연구에서는 멸종 위기종으로 선정된 총 28종의 동물 종 가운데 곤충을 제외한 13종의 야생동물에서 전체 미토콘드리아 유전체 염기서열을 결정하고, 그 특성을 규명하고자 한다. 얻어진 결과들을 근거로 하여 분자계통분류학적, 진화학적 연구를 수행하여 종의 복원과 보존에 필수적인 자료를 제공하게 될 것이다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 I-3. 멸종위기종의 근연종에 대한 미토콘드리아 유전체 연구 현황

분 류	종 명	미토콘드리아 유전체 연구	근연종의 미토콘드리아 유전체 연구 현황	GenBank No.
포유류				
식육목				
개과	*Vulpes vulpes peculiosa* (여우)	-	-	-
족제비과	*Lutra lutra* (수달)	-	-	-
고양이과	*Panthera tigris* (호랑이)	-	*Acinonyx jubatus* (왕치타) (Burger et al. 2004)	NC_005212
	Felis pardus (표범)	-	*Felis catus* (고양이) (Lopez et al. 1996)	NC_001700
	Eurasian lynx (스라소니)	-	-	-
곰과	*Ursus thibetanus ussuricus* (반달가슴곰)	-	*Ursus maritimus* (북극곰) (Delisle and Strobeck 2002)	NC_003428
			Ursus arctos (알래스카불곰) (Delisle and Strobeck 2002)	NC_003427
			Ursus americanus (아메리카큰곰) (Delisle and Strobeck 2002)	NC_003426
소목				
소과	*Naemorhedus caudatus* (산양)	-	*Capra hircus* (염소) (Feligini and Parma 2003)	NC_005044
			Ovis aries (면양) (Hiendleder et al. 1998)	NC_001941
사슴과	*Cervus nippon mantchuricus* (대륙사슴)	-	-	-
	Moschus moschiferus parvipes (사향노루)	-	-	-
양서・파충류				
거북목				
남생이과	*Geoclemys(Chinemys) reevesii* (남생이)	-	*Chinemys reevesi* (리브스 거북) (unpublished)	NC_006082
뱀과	*Elaphe schrenckii* (구렁이)	-	*Dinodon semicarinatus* (Colubrid 뱀)(Kumazawa1998)	NC_001945

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 I-3. (계속)

분 류	종 명	미토콘드리아 유전체 연구	근연종의 미토콘드리아 유전체 연구 현황	GenBank No.
조류				
올빼미목				
올빼미과	*Strix aluco* (올빼미)	-	*Ninox novaeseelandiae* (Morepork 올빼미) (Harrison 2004)	NC_005932
	Bubo bubo (Linnaeus) (수리부엉이)	-	-	-
황새목				
황새과	*Ciconia boyciana* (황새)	○	*Ciconia boyciana* (황새) (unpublished)	NC_002196
딱따구리목			*Ciconia ciconia* (유럽황새) (unpublished)	NC_002197
딱따구리과	*Dryocopus javensis* (크낙새)	-	-	-
어류				
잉어목				
잉어과	*Acheilognathus somjinensis* (임실납자루)	-	*Danio rerio* (지브라피쉬) (Broughton 2001)	NC_002333
	Pseudopungtungia nigra (감돌고기)	-	*Coreoleuciscus splendidus* (쉬리) (unpublished)	NC_007783
			Hemibarbus longirostris (참마자) (unpublished)	NC_007784
			Hemibarbus labeo (누치) (unpublished)	NC_007785
			Hemibarbus mylodon (어름치) (unpublished)	NC_007786
			Cyprinus carpio (잉어) (Chang et al. 1994)	NC_001606
			Carassius auratus (금붕어) (unpublished)	NC_006580
			Carassius carassius (붕어) (unpublished)	NC_006291
			Sarcocheilichthys variegatus (참중고기) (Saitoh et al. 2003)	NC_004694

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 I-3. (계속)

분 류	종 명	미토콘드리아 유전체 연구	근연종의 미토콘드리아 유전체 연구 현황	GenBank No.
어류				
미꾸라지과	*Cobitis choii* (미호종개)	-	*Cobitis sinensis* (기름종개) (unpublished)	NC_007229
	Koreocobitis naktongensis (얼룩새코미꾸리)	-	*Cobitis striata* (줄종개) (Saitoh et al. 2003)	NC_004695
메기목				
퉁가리과	*Liobagrus obesus* (퉁사리)	-	-	-
동자개과	*Pseudobagrus brevicorpus* (꼬치동자개)	-	*Pseudobagrus torkiensis* (백리드캣피쉬) (Saitoh et al. 2003)	NC_004697

3.2.5. 척추동물종의 분석 marker 선정

▪ Mitochondria full genome sequence

3.2.6. 곤충종류의 분석 marker 선정

▪ 곤충을 대상으로 미토콘드리아와 핵 DNA에서 총 8개의 유전자를 선정하여 염기서열을 분석하고자 한다.

▪ 미토콘드리아에서는 총 36개의 유전자 가운데 12S rRNA, 18S rRNA, CO I , CO II, CO III, CytB, ND1, ND4, ND4L 9개의 유전자를 선정하였다.

▪ 미토콘드리아의 16S rRNA 유전자는 변이가 심한 영역과 보존적인 영역이 모두 존재하고 있으며, CO I , CytB 영역은 계통학적으로 매우 유용한 유전자로 알려져 있어 marker 제작에 매우 용이한 유전자이다.

▪ 특히 COI 의 경우 DNA barcoding marker로 다양한 분류군을 대상으로 염기서열과 Primer 들이 알려져 있다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.3. 집단을 대상으로 한 유전적 다양성 분석 및 활용 방안

3.3.1. 유전적 다양성이 낮을 경우 원인분석과 대책마련

- 집단연구의 경우 유전자 다양성이 낮을 경우 원인을 분석한다.
- 복원에 활용하기 위한 유전자 다양성 유지방안을 제시한다.
- 집단의 이주 복원 계획 수립 시 참고자료를 제시한다.

3.3.2. 개체수가 적은 생물종의 멸종시 대체 생물 후보종 제시 및 개체수 증식 방안 제시

- 유전적 다양성이 높은 개체군을 선정한다.
- 이주 가능한 집단 변종, 아종의 유전적 다양성을 제시한다.
- 원집단과 가장 유전적으로 유연관계가 높은 집단을 제시한다.
- 증식연구를 위한 개체군을 선정한다.

3.3.3. 대상 생물종 우선순위 결정을 위한 기준 제시

- 다음에 예시한 요인들을 고려하여 한반도 생물종 중 유전자 분석이 필요한 종의 예비 리스트를 작성한다. 다수의 전문가의 의견이 집약된 객관적인 우선순위 결정의 기준을 마련하기 위하여 전문가들의 합의하에 각 요인에 경중을 고려한 가중치를 준 점수를 부여한다. 여러 전문가들이 각 요인에 대한 점수를 매기고, 점수화된 가중치에 따라 각 요인의 점수를 집계하여 객관적인 유전자 분석 대상종의 우선순위를 마련한다.

- 보존 및 복원에 있어 시급성
- 기록이 명확한 국내 개체군과 해외 개체군의 유전자 샘플기 확보 여부
- 향후 샘플 확보 가능성
- 집단분석이 가능한 샘플의 수 확보 또는 확보 가능성 여부
- 집단분석이 용이한 마커의 존재 여부
- 기존 연구결과의 가용성 여부

- 모든 대상종은 종 이하 수준의 계통분석이 필요하며, 위 요인 중 라)집단분석이 가능한 샘플의 수 확보 또는 확보 가능성 여부, 그리고 마) 집단분석이 용이한 마커의 존재 여부에 따라

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

집단분석 추진 여부를 결정한다. 결정된 우선순위에 따라 단계별로 장기적인 유전자 분석 계획을 마련한다.

3.3.4. 샘플 수집을 위한 집단 선정

▪ 가용한 국내외 개체군 크기와 생물 지리학적 정보를 활용하여 유전적으로, 생태적으로 분화되어 있을 가능성이 큰 집단의 샘플을 수집하는 것을 목표로 한다. 그러나 지역적인 샘플 수집의 용이성 여부도 고려대상이 될 것이다.

3.3.5. 유전자 샘플 확보 방안 (동물)

▪ 국내샘플 : 야생동물유전자원은행에 수집, 보존된 유전자 샘플을 활용한다. 환경부에서 추진하고 있는 야생동물구조관리센터, 각 지방환경청, 생태조사단, 도로공사와 지자체의 로드킬 샘플, 검찰과 경찰에 압수되는 밀렵 개체 샘플 등을 활용하는 방안을 제시한다. 종에 따라 비침습적(non-invasive)인 샘플 수집방법 활용방안을 제시한다.

▪ 해외 샘플 : 야생동물유전자원은행이 구축해 놓은 해외 유전자원 교류와 협력 네트워크를 활용한다. 샘플 교류의 용이성을 위해 CITES 등록기관을 지정하여 CITES 허가절차를 간소화하는 방안을 제시한다. 샘플 교류의 활성화를 위한 유전자 샘플 교류 원칙을 제시한다. 샘플 교류가 어려울 경우 해당국의 유전학자와 공동연구를 추진한다.

3.3.6. 동물 집단분석을 위한 유전자마커 선정

▪ 동물의 경우, 계통분석을 위하여는 주로 미토콘드리아 유전자를 사용하되, 각 종에서 가장 널리 사용되는 유전자 2-3개를 문헌조사를 통해 선정한다. 경우에 따라 변이가 심한 핵내 유전자 마커를 사용할 수도 있다. 집단분석을 위하여는 주로 마이크로새털라이트(microsatellite) 마커를 사용한다. 해당종의 마커가 개발되어 있지 않은 경우에는 근연종의 마이크로새털라이트 마커를 활용하도록 하고, 이것이 여의치 않으면 해당종의 특이적인 마커 개발의 필요성을 검토한다. 이 때, 해당종의 유전자 분석 우선순위와 마커 개발에 필요한 비용과 시간을 고려한다.

3.3.7. 동물 집단분석을 위한 마커유전자 분석

▪ 미토콘드리아 유전자 마커의 경우 conserve된 기존 primer를 이용하거나 새로 설계한다. PCR 증폭 후 염기서열을 결정하되, PCR sequencing에 의한 염기서열 결정이 어려운 경우 클

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

로닝을 시도할 수 있다. 마이크로새털라이트 마커는 형광 표지된 primer를 합성하여 자동시퀀서로 genotyping을 한다.

3.3.8. 자료 분석

▪ 계통 분석: 조사 분석된 유전자들의 염기서열은 CLUSTAL X 프로그램을 이용하여 multiple alignment를 수행하고 각 종 및 집단 또는 개체들에 대한 계통적 유연관계는 PAUP 또는 Mega3 Program을 이용하여 pair-wise distance와 phylogenetic tree를 구하여 비교분석한다.

▪ 집단 분석: 유전자 빈도와 유전자형 빈도의 기대치를 계산하고 HW 평형의 위배여부를 분석한다. 이형접합도의 관찰치(Ho)와 기대치(He)를 계산하여 집단 내와 집단 간 유전적 다양성을 비교하며, 가능한 집단들에서는 F 통계치에 의해 아집단 간 분화의 정도와 유전자 흐름의 정도를 계산한다.

3.3.9. 자료의 이용

▪ 계통 분석에 의하여 생성된 종 내 지역적 개체군 간의 유전적 거리와 계통도, 기존의 형태에 근거한 아종분류 체계, 지역적 개체군의 생태적, 환경적 특성, 근연종에서의 유전자 분석결과 등을 종합하여 종 내의 보존단위를 확립하는 방안을 제시한다. 집단 분석에 의하여 유전적 다양성을 비교하고, 다양성이 저하된 집단에서는 역사적, 환경적, 생태적 요인을 고려하여 다양성 저하의 원인을 분석한다. 아집단 간 분화의 정도와 유전자 흐름의 정도를 계산하고, 인위적인 집단 간 분화를 방지하고 자연적인 유전자 흐름을 유지하기 위한 방안을 제시한다.

3.4. 주요 유전자원 관리 방안

3.4.1. 재료 및 DNA 자원 관리 방향

- “국립생물자원관” 유전자원실에 duplicate 분양 보관
- 한국의 식물DNA은행에 보관
- “국립생물자원관” 야생동물 유전자은행에 보관

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.4.2. 유전자 분석 결과의 DB 구축 및 효율적인 관리 시스템 구축

- 멸종위기종의 Taxonomic Database
- 멸종위기종의 DNA Sequence Database
- 멸종위기종의 계통학적 연관관계 Database
- 멸종위기종의 유전적 다양성 Database
- 연속적인 update가 가능하도록 구축

4. 연구의 추진계획

4.1. 연구자의 구성

- 사업팀 구성

식물연구부, 동물연구부, 정책연구부를 두며 식물연구부에 김기중, 김영동 교수가 참여하고 동물연구부에 이항, 황의욱, 한호연 교수가 참여하고, 정책연구부는 모든 연구자들이 관여하도록 한다. 각 연구교수는 5개 학교의 5개 연구실에 분산되어 있으며 박사 후 연구원 또는 대학원생을 연구조원으로 활용하여 독립적으로 각자의 분야에서 연구 프로젝트를 진행한다.

- 자문위원회 : 본 사업 참여자들이 sampling 과정에서 DB구축과정까지 전 과정에 대하여 도움이 필요할 경우 도움을 받을 수 있는 전문가로 구성된 자문위원회를 4인 내외로 위촉하여 의견을 수렴하도록 한다.

- 평가위원회 : 본 사업의 발주 기관인 환경부 자연자원과의 담당자와 협의하여 환경부의 연구용역 사업취지를 잘 이해하는 전문가, 사업담당 부서의 책임자 등을 포함하는 7인 이내의 평가위원단을 구성하여 착수보고회, 중간평가회, 최종평가회 등의 과정에서 사업 진행사항과 내용을 객관적으로 평가하고 의견을 줄 수 있도록 한다.

- 사업실적 관리

- 사업팀 homepage를 구축하고 이를 활용하여 실험결과, 염기서열정보, 자료 분석 결과 등 자료를 모으고 관리하여 사업의 진척도를 자체 점검하고 실험 결과를 수시로 update할 수 있는 시스템을 구축한다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

4.2. 추진 계획



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

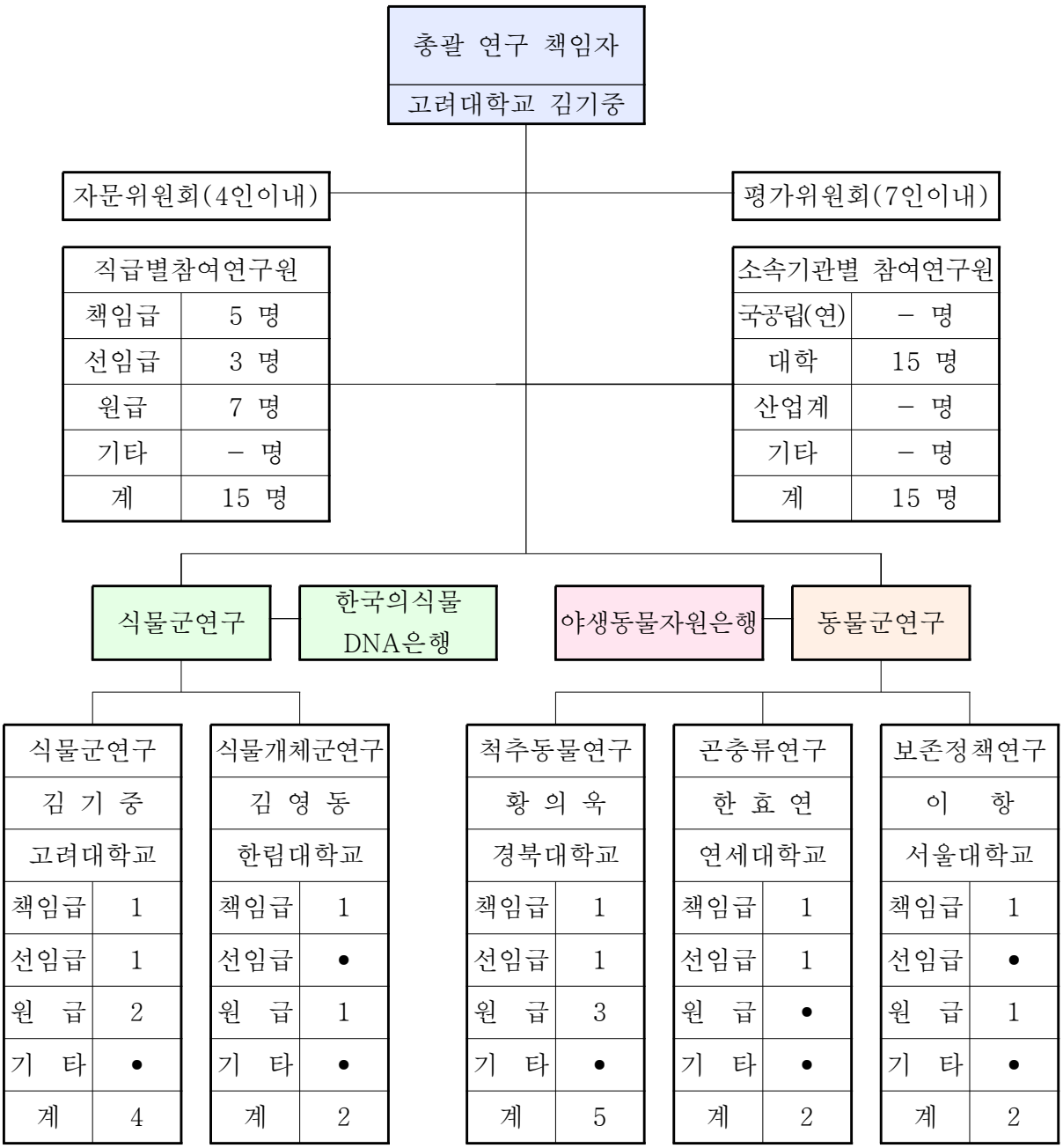
▪ 월별추진일정표 (10개월)

내용 \ 월	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1
1) 식물군의 유전자 분석										
• 분석대상 식물종 선정 및 재료확보	■									
• 분석대상 식물 개체군 선정 및 재료확보(종1)	■									
• 분석대상 식물 개체군 선정 및 재료확보(종2)			■							
• 분석대상종 마커선정	■									
• 분석대상종의 염기서열 분석		■	■	■						
• 분석대상종과 근연종의 염기서열 비교 분석			■	■	■	■				
• 개체군 분석 마커 확립		■		■						
• 개체군의 비교 분석			■	■	■	■	■			
• 개체군 자료의 비교분석						■	■	■		
2) 미토콘드리아 Genome 분석연구(척추동물)										
• 척추동물 13종의 선정 및 재료 확보	■									
• 미토콘드리아 게놈 분석 전략 수립	■									
• 13종의 염기서열 결정		■	■	■	■	■				
• 13종의 염기서열 자료 분석			■	■	■	■	■			
• 근연집단, 근연아종, 근연종의 염기서열 비교 분석					■	■	■	■		
• 염기서열자료의 비교 분석 및 계통수 작성						■	■	■	■	
3) 곤충류 3종의 유전자 분석										
• 곤충류 3종의 선정 및 재료 확보	■									
• 곤충류 분석 마커 확립 및 유전자 분석		■	■	■	■					
• 근연종과의 유전자 마커의 비교 분석			■	■	■	■				
4) DB구축 및 정책적 제안										
• 연차별 유전자 분석 전략 확립	■	■	■	■						
• 연차별 유전자 분석 대상종, 집단 선정가이드라인 확립		■	■	■	■					
• DB 구축을 위한 기획 및 실행				■	■	■	■	■		
• 자료의 종합적 분석						■	■	■	■	
• 유전자 자원의 보존적 활용방안 연구 및 제시						■	■	■	■	
5) 보고회 및 보고서 작성										
• 착수 보고회	■									
• 중간 보고회					■					
• 최종 보고회									■	
• 1차년도 최종 보고서 납품										■

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

4.3. 수행조직 및 업무분담

4.3.1. 사업추진을 위한 연구원편성표



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

4.3.2. 사업추진 분담내역

1) 김기중 교수(고려대학교 – 분자계통학실험실)
○ 사업총괄 및 보고서 작성 ○ 식물분야 분석대상 종선정 ○ 대상분석 유전자마커선정 (10개 유전자부위) ○ 엽록체 게놈 및 핵 게놈 분석 (염기서열 결정) ○ 전체 자료의 유합분석 ○ 유전자자료 DB구축에 대한 기획 및 추진 ○ 우리나라 고유종의 분자식별정보의 활용 방안제시 ○ 멸종위기종 보존에 유전자자료의 적용 방안 제시 ○ 정책적 제안
2) 김영동 교수(한림대학교-식물분자계통학실험실)
○ 개체군 분석을 위한 식물 재료 채집 ○ 개체군 분석을 위한 마커 선정 ○ 식물 2종의 개체군 간 유전적다양성 분석(염기서열결정 및 ISSR 마커분석) ○ 식물 집단에 대한 유전자 자료의 보존적 적용
3) 황의욱 교수(경북대학교-동물분자계통학실험실)
○ 척추동물 (포유류, 조류, 양서류, 파충류, 어류) 13종의 종 선정 ○ 척추동물 13종의 미토콘드리아 게놈 염기서열 분석 전략 확립 ○ 척추동물 13종의 미토콘드리아 게놈 염기서열 결정 ○ 척추동물 13종의 미토콘드리아 게놈 염기서열 자료분석 ○ 척추동물 13종의 미토콘드리아 게놈 염기서열 annotation ○ 필요한 경우 근연집단, 근연아종, 근연종과의 염기서열 비교분석
4) 한호연 교수(연세대학교-곤충분자계통학실험실)
○ 곤충류 3종의 종 선정 ○ 곤충류 3종의 채집 또는 재료 확보 ○ 곤충류 3종 분석 marker 선정 및 개발 ○ 곤충류 3종 유전자 분석 (염기서열결정) ○ 곤충류 3종과 근연종의 유전자 비교 분석 ○ 곤충류의 유전자 분석 자료의 고유종식별에 이용방안 제시 ○ 곤충류의 유전자 분석 자료의 보존적 활용 방안 제시
5) 이 항 교수(서울대학교-수의과대학)
○ 척추동물 유전자 분석종의 선별 ○ 척추동물 유전자 분석 시료 제공 ○ 연차별 척추동물 분석대상 종 선별 ○ 보존생물학적 측면에서 유전적 분석 가이드라인 제시 ○ 보존생물학적 측면에서 유전적 분석 자료의 활용방안 제시

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

5. 참고문헌

Doyle, J. J., J. I. Davis, R. I. Soreng, D. Garvin, and M. J. Anderson. 1992. Chloroplast DNA inversions and the origin of the grass family (Poaceae). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7722-7726.

Doyle, J. J., J. L. Doyle, J. A. Ballenger, and J. D. Palmer. 1996. The distribution and phylogenetic significance of a 50-kb chloroplast DNA inversion in the flowering plant family Leguminosae. Mol. Phylogen. Evol. 5:429-438.

Hiratsuka, J., H. Shimada, R. Whittier et al. (15 co-authors). 1989. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. Mol. Gen. Genet. 217:185-194.

Hoot, S. B., and J. D. Palmer. 1994. Structural rearrangements, including parallel inversions, within the chloroplast genome of *Anemone* and related genera. J. Mol. Evol. 38: 274-281.

Jansen, R. K., and J. D. Palmer. 1987a. A chloroplast DNA inversion marks an ancient evolutionary split in the sunflower family (Asteraceae). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5818-5822

Kim, K.-J., and H.-L. Lee. 2004. Complete chloroplast genome sequences from Korean ginseng (*Panax schinseng*Nees) and comparative analysis of sequence evolution among 17 vascular plants. DNA Res. 11:247-261.

Knox, E. B., S. R. Downie, and J. D. Palmer. 1993. Chloroplast genome rearrangements and the evolution of giant lobelias from herbaceous ancestors. Mol. Biol. Evol. 10: 414-430.

Milligan, B. G., J. N. Hampton, and J. D. Palmer. 1989. Dispersed repeats and structural reorganization in subclover chloroplast DNA. Mol. Biol. Evol. 6:355-368.

Ogihara, Y., T. Terachi, and T. Sasakuma. 1988. Intramolecular recombination of chloroplast genome mediated by short direct-repeat sequences in wheat species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8573-8577.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Palmer, J. D. 1991. Plastid chromosomes: structure and evolution. Pp.5-53 *in* I. K. Vasil and L. Bogorad, eds. Cell culture and somatic cell genetics in plants, vol. 7A, The molecular biology of plastids. Academic Press, San Diego.

Palmer J. D., J. M. Nugent, and L. A. Herbon. 1987. Unusual structure of geranium chloroplast DNA: a triple-sized inverted repeat, extensive gene duplications, multiple inversions and two repeat families. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:769-773.

Raubeson, L. A., and R. K. Jansen. 1992. Chloroplast DNA evidence on the ancient evolutionary split in vascular land plants. Science 255:1697-1699.

Shinozaki, K., M. Ohme, M. Tanaka et al. (23 co-authors). 1986. The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. EMBO J. 5:2043-2049.

Brown, W. M., George, M., Jr. and Wilson, A. C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76: 1967-1971.

Burger, P. A., Steinborn, R., Walzer, C., Petit, T., Mueller, M. and Schwarzenberger, F. 2004. Analysis of the mitochondrial genome of cheetahs (*Acinonyx jubatus*) with neurodegenerative disease. Gene 338 (1); 111-119.

Clayton, D. A. 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. Cell 28: 693-705.

Delisle, I. and Strobeck, C. 2002. Conserved primers for rapid sequencing of the complete mitochondrial genome from carnivores, applied to three species of bears. Mol. Biol. Evol. 19 (3); 357-361.

Feligini, M. and Parma, P. 2003. The complete nucleotide sequence of goat (*capra hircus*) mitochondrial genome. DNA Seq. 14 (3); 199-203.

Harrison, G. L., McLenachan, P. A., Phillips, M. J., Slack, K. E., Cooper, A. and Penny, D. 2004. Four New avian mitochondrial genomes help get to basic evolutionary questions in the late cretaceous. Mol. Biol. Evol. 21 (6); 974-983.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Hayashi, J-I., Tagashira, Y. and Yoshida, M. C., 1985. Absence of extensive recombination between inter- and intraspecies mitochondrial DNA in mammalian cells. Exp. Cell Res. 160: 387-396.

Hiendleder, S., Mainz, K., Plante, Y. and Lewalski, H. 1998. Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no evidence for contributions from urial and argali sheep. J. Hered. 89 (2); 113-120.

Hwang, U. W., Friedrich, M. Tautz, C., Park, J. and Kim, W. 2001. Mitochondrial protein phylogeny joins myriapods with chelicerates. Nature 413;154-157.

Hwang, U. W. and Kim, W. 1999. General properties and phylogenetic utilites of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. Korean J. Parasit. 37 (4); 215-228.

Kondo, R., Satta, Y., Matsuura, E. T., Isiwa, H., Tagahata, N. and Chigusa, S. I. 1990. Incomplete maternal transmission mitochondrial DNA in *Drosophila*. Genetics 126: 367-379.

Kumazawa, Y., Ota, H., Nishida, M. and Ozawa, T. 1998. The complete nucleotide sequence of a snake (Dinodon semicarinatus) mitochondrial genome with two identical control regions. Genetics 150 (1): 313-329.

Lansman, R. A., Avise, J. C, and Huettel, M. D. 1983. Critical experimental test of the possibility of "paternal leakage" of mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 1969-1971.

Lopez, J. V., Cevario, S. and O'Brien, S. J. 1996. Complete nucleotide sequences of the domestic cat (*Felis catus*) mitochondrial genome and a transposed mtDNA tandem repeat (Numt) in the nuclear genome. Genomics 33 (2): 229-246.

Saitoh, K., Miya, M., Inoue, . G., Ishiguro, N. B. and Nishida, M. 2003. Mitochondrial genomics of ostariophysan fishes: perspectives on phylogeny and biogeography. J. Mol. Evol. 56 (4): 464-472.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Ⅱ. 멸종위기 식물종의 유전자 분석

Ⅱ-1. 미선나무의 엽록체 유전체 분석 및 계통 연구

Ⅱ-2. 제주고사리삼의 엽록체 유전체 분석 및 계통 연구

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

II. 멸종위기 식물종의 유전자 분석

II-1. 미선나무의 엽록체 유전체 분석 및 계통 연구

1. 서론

미선나무속(*Abeliophyllum* Nakai)은 단일종으로 구성된 한국 특산속으로 Nakai(1919)에 의하여 충청북도 진천군의 표본을 기준으로 하여 (Nakai Collection Numbers 8147~8150) 기재되었다. 미선나무 (*Abeliphyllum distichum* Nakai)를 신속・신종으로 기재할 당시 Nakai는 열매의 특징을 들어 향선나무속(*Fontanesia* Labill.)에 가깝다고 기록하였다. 특히 열매가 납작한 부채모양이며 자방은 2실이고, 각 실마다 하나의 씨가 위로부터 달려 있는 모양이 *Fontanesia*에 유사하나, 꽃은 액상총상화서이며, 화관이 잘 발달된 통꽃으로 복와상이고, 줄기의 수조직이 계단상으로 되어 있는 점이 *Fontanesia*와는 구별되며, 이의 특징들로 보아 개나리속(*Forsythia* Vahl.)과도 유사성이 깊음을 기록하였다(Nakai, 1920). 그러나, 그는 열매의 특징을 강조하여 *Forsythia* 보다는 *Fontanesia*와의 관계를 더 강조하였다.

우리나라의 미선나무 자생지는 현재까지 모두 다섯 군데가 천연기념물로 지정되었다. 그러나 본 속의 기준표본 채집지인 충청북도 진천군의 자생지(천연기념물 14호)는 완전히 파괴되어, 1969년 천연기념물에서 해제되었으나 최근 복원사업이 진행 중이다. 따라서 충청북도 괴산군 장연면 송덕리 (천연기념물 147호), 충청북도 괴산군 장연면 추점리 (천연기념물 220호), 충청북도 괴산군 칠성면 율지리 (천연기념물 221호), 충청북도 영동군 영동읍 매천리 (천연기념물 364호)등의 자생지가 천연기념물로 남아있으나 대부분 최근에 복원된 개체들로 구성되어있다(Anonymous, 1998). 또한 이들 충청북도 지역과는 멀리 떨어진, 전라북도의 변산반도일대의 미선나무 자생지가 최근에 알려지기 시작하였다. 전라북도 변산반도 자생지는 충청북도의 자생지들보다 많은 개체수가 분포한다. 또한 경기도 일대에서도 최근 보고되고 있으나 자생이라기보다는 자생화된 개체들로 생각된다. 다행스럽게도 지금은 멸종된 충청북도 진천군의 기준표본 채집지에서 이식한 3개체가 미국의 Arnold Arboretum에 자라고 있으며, 이들 개체를 삽목하여 번식시킨 clone들이 영국의 Kew Garden을 비롯하여 세계의 여러 식물원에 퍼져있다. 또한 미선나무의 삽목 방법이 널리 보급되어 관상수로 서울지역에 심고 있으며, 평양의 대성동 중앙식물원에 재식되어 있는 것도 북한의 천연기념물 (등록번호 12호)로 지정되어 있다(Lee and Lee, 1994).

Nakai(1919, 1920) 이후 *Abeliophyllum*은 연구자에 따라 *Fontanesia*가 속하는 Fontaneseae 족 또는 *Forsythia*가 속하는 Forsytheae족으로 처리되었다. 예로, 열매의 해부학적 자료는 주

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

로 *Fontanesia*와의 근연관계를 강조하였고(Taylor, 1945; Johnson, 1957), 염색체의 연구는 *Forsythia*와 같은 X=14로, X=13인 *Fontanesia*와는 구별되었으며(Taylor, 1945; Maekawa, 1962; Lim and Ko, 1989), 계단상의 수 조직 및 화관의 형태 등의 특징은 *Forsythia*와의 연관을, 화분의 발아구 특징(Lee and Park, 1982a, b) 등은 *Fontanesia*와의 유사성을 시사하고 있다. 그러나 Flavonoid (Harborne and Green, 1980), 종자해부(Rohwer, 1993), 목재해부(Bass *et al.*, 1988), 단백질의 면역학적 관계(Piechura and Fairbrothers, 1983) 연구 등의 자료는 이들 연관관계에 대한 설득력 있는 결과를 제공하지 못하고 있다. 독립적인 마커로 핵 rDNA의 internal transcribed spacer (ITS) 지역의 염기서열을 이용하여 평가한 *Fontanesia, Forsythia, Abeliophyllum*속의 연관관계 연구(Kim et al., 2000) 는 한국특산속인 *Abeliophyllum*이 *Forsythia* 속과 자매군 관계를 형성하여 *Fontanesia* 속과 공유하는 열매와 화분립의 특징들이 원시공유형질 또는 평행진화의 결과임을 제시하였다.

그러나, 위의 연구는 올리브과 내의 비교적 제한된 속을 이용한 연구 결과로써 국지적인 해답을 얻었다고 볼 수 있다. 따라서 우리나라 특산속인 *Abeliophyllum*의 계통학적 위치를 보다 명확하게 밝히고, 형질의 진화방향을 이해하며, 우리나라 특산속의 유전적 구조를 밝히기 위하여 엽록체 유전체를 폭넓게 비교분석하였다. 먼저 152 Kb로 추정되는 엽록체 유전체의 10분의 1에 해당하는 15.2 Kb에 해당하는 지역의 염기서열을 연속적으로 결정하였다. 이 지역은 trnK-petA 지역으로 trnK-trnL-trnF-ndhJ-ndhK-ndhC-trnV-trnM-atpE-atpB-rbcL-accD-psaI-ycf4-cemA-petA 유전자들이 포함되고 이들 사이의 intergenic spacer와 intron 등이 포함된다. 이와는 별도로 small single copy region의 ndhF 유전자 지역도 포함시켰다. 이와 더불어 rbcL과 ndhF 유전자의 경우는 모든 Oleaceae 속 및 다수의 근연과의 속들을 대상으로 염기서열을 결정하여 *Abeliophyllum*의 계통연구에 이용하였다.



그림 Ⅱ-1-1. 미선나무의 꽃과 열매

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

2. 재료 및 방법

2.1. 식물재료

*Abeliophyllum*의 경우 기준표본 채집지인 충청북도 진천군에서 이식하여 미국 Arnold Arboretum에 재식하고 있는 개체와, 전라북도 부안군 변산반도의 개체 등 두 가지 다른 개체를 이용하였다. 본 연구에서는 단일 종으로 구성된 *Abeliophyllum*을 비롯하여 근연속으로 모든 Oleaceae속을 선정하였고, 한 속내에서도 되도록 아속, 절, 아절 등이 모두 포함되도록 선정하였다 (표 II-1-1). 외군으로는 올리브과와 연관이 깊다고 생각하는 모든 속을 포함하였다.

표 II-1-1. 미선나무와 비교하여 엽록체 염기서열에 이용한 올리브과 및 외군의 종, 출전, 증거표본 정보 및 본 연구자에 의하여 GenBank에 저장한 ndhF와 rbcL유전자의 염기서열 정보

Groups based on leaf characters or taxonomic group	Scientific name and accession information[1)]	*ndhF*/*rbcL* sequences[2)]
Opposite lvs.	*Jasminum abyssinicum* Hochst. ex DC. (Kew335-71-03007)	+/DQ673258
Opposite lvs.	*Jasminum le-ratii* Schltr.(Kew083-65-08303)	DQ673271/ DQ673257
Opposite lvs.	*Jasminum simplicifolium* G. Forst. (Kew000-73-12904)	DQ673270/ DQ673298
Alternate lvs.	*Jasminum fruticans* L. (Kew448-82-04854)	DQ673268/ DQ673297
Alternate lvs.	*Jasminum subhumile* W. W. Sm. (Kew336-68-33602)	DQ673269/ DQ673259
Opposite lvs -Primulina	*Jasminum mesnyi* Hance (Edinburgh 19697040)	DQ673267/ DQ673296
Opposite lvs -Primulina	*Jasminum nudiflorum* Lindl. (UCONN 199200212)	DQ673255/ DQ673255
Menodora	*Menodora longiflora* Engelm. ex A. Gray (B. L. Turner 15965, TEX)	DQ673273/ DQ673260
Menodora	*Menodora spinescens* A. Gray (J. D. Morefield 4399, MO)	DQ673272/ DQ673299
Fontanesieae	*Fontanesia phillyraeoides* Labill. v.*phillyraeoides* (AA 1542-80-13)	DQ673263/ DQ673293
Forsythieae	*Abeliophyllum distichum* Nakai (AA 178-16-8)	DQ673262/ DQ673292
Forsythieae	*Forsythia europaea* Degen & Baldacci (AA 10198-1917)	DQ673264/ DQ673256
Myxopyreae	*Myxopyrum hainanense* L. C. Chia (K.-J. Kim et al. 2000-508, KUS)	DQ673265/ DQ673294
Myxopyreae	*Nyctanthes arbor-tristis* L. (Kuriachen s.n., SPU)	DQ673266/ DQ673295
Oleeae-Fraxininae	*Fraxinus chinensis* Roxb. (AA 8161-A)	DQ673275/ DQ673301
Oleeae-Ligustrinae	*Ligustrum vulgare* L. (K.-J. Kim 1997-70)	DQ673276/ DQ673302
Oleeae-Ligustrinae	*Syringa vulgaris* L. (Edinburgh 19644264)	DQ673277/ DQ673303
Oleeae-Oleinae	*Chionanthus virginicus* L. (UCONN s.n.)	DQ673283/ DQ673309

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 Ⅱ-1-1. (계속)

Groups based on leaf characters or taxonomic group	Scientific name and accession information[1)]	*ndhF*/*rbcL* sequences[2)]
Oleeae-Oleinae	*Forestiera angustifolia* Torr. (B. L. Turner 755, TEX)	DQ673284/ DQ673310
Oleeae-Oleinae	*Haenianthus salicifolius* Griseb. (K.-J. Kim 1992-39, KUS)	DQ673282/ DQ673308
Oleeae-Oleinae	*Nestegis sandwicensis* (A. Gray) Deg et al. (Kew336-68-33601)	DQ673279/ DQ673305
Oleeae-Oleinae	*Noronhia emarginata* Thou. (Fairchild FG-61-496)	DQ673281/ DQ673307
Oleeae-Oleinae	*Notelaea ovata* R. Br. (B. J. Conn. 3102, MO)	DQ673280/ DQ673306
Oleeae-Oleinae	*Olea europaea* L. (UCONN 198500974)	DQ673278/ DQ673304
Oleeae-Oleinae	*Osmanthus americana*Benth. & Hook. f. (Kew349-67-34901)	DQ673285/ DQ673311
Oleeae-Oleinae	*Phillyrea angustifolia* L. (Kew186-74-01825)	DQ673286/ DQ673312
Oleeae-Oleinae	*Picconia excelsa* DC. (W. R. Sykes 473/69, MO)	DQ673288/ DQ673314
Oleeae-Schreberinae	*Comoranthus minor* H. Perrier (P. B. Phillipson et al. 3706, MO)	DQ673287/ DQ673313
Oleeae-Schreberinae	*Schrebera alata* Welw. (Kew 000-69-18826)	DQ673274/ DQ673300
Outgroup	*Carlemannia tetragona* Hook. f. (K.-J. Kim et al. 2004-1433, KUS)	DQ673290/ DQ673316
Outgroup	*Silvianthus bracteatus* Hook. f. (K.-J. Kim et al. 2004-1430, KUS)	DQ673289/ DQ673315
Outgroup	*Menyanthes trifoliata* L.	L39388/L14006
Outgroup	*Aster cordifolius* L. (R. K. Jansen 906, MICH)	L39449/ DQ673291
Outgroup	*Hedera helix* L.	AF130203/L01924
Outgroup	*Cornus florida*L.	AF130220/L11215
Outgroup	*Nicotiana tabacum* L.	N001879/N001879
Outgroup	*Gelsemium sempervirens* Ait.	AF130170/L14397
Outgroup	*Clerodendrum trichotomum* Thunb. ex A. Murray/ *Clerodendrum fragrans* Willd.	AF130146/L11689
Outgroup	*Callicarpa dichotoma* Raeusch.	L36395/L14393
Outgroup	*Buddleja davidii* Franch.	AF130143/L14392
Outgroup	*Digitalis purpurea* L.	AF130150/L01902

[1)] Plant materials are from the living collections of Kew (Royal Botanic Garden, Kew), Edinburgh (Royal Botanic Garden, Edinburgh), Fairchild (Fairchild Tropical Botanic Garden, Miami), UCONN (Greenhouse of the University of Connecticutat Storrs), and AA (Arnold Arboretum, Boston), field collections from China, India, and USA (all voucher specimens are deposited at the indicated herbaria), and herbarium at MO (Missouri Botanic Garden) and TEX (University of Texas at Austin).

[2)] GenBank accession numbers with DQ initials are the new sequence reported from this study; other sequences are from GenBank.

특히 *Abeliophyllum*과 연관이 깊다고 생각되는 *Fontanesia*의 경우 3 분류군 2종으로 구성되어 있으나 (Kim, 1998), 본 연구에서는 중국현지와 중국에서 이식하여 미국의 Arnold

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Arboretum에 제식한 2 분류군을 본 연구에 이용하였다. *Forsythia*의 경우 세계적으로 11종이 분포하지만 (Kim, 1999), 이전의 연구에서 *Forsythia* 속이 단계통군임이 증명되었으므로 어느 분류군을 선정하여도 문제가 없으므로 본 연구에서는 지리적 분포를 고려하여 유럽원산인 *Forsythia europaea* Degen & Baldacci 와 중국원산인 *F. viridissima* Lindl. 을 이용하였다 (Table II-1-1). 이들 재료들은 전세계의 식물원과 야생 자생지에서 채집된 것들이다.

2.2. 실험방법

▪ **DNA 추출·정제:** 자생지 또는 재식지에서 증거표본과 5g 정도의 잎을 채취하여 실험실로 운반한 후 액체질소와 함께 잎을 갈아 가루로 만든 후, 일반적인 2×CTAB 추출방법으로 60℃에서 DNA를 추출하였다 (Doyle and Doyle, 1987). 추출된 total DNA는 1×TE buffer에 녹인 후 EtBr-CsCl 농도구배 초원심분리 과정에 의하여 60,000rpm으로 DNA band를 분리하였다 (Palmer, 1986). 분리된 DNA는 분자량 12,000을 걸러내는 투과막 (Spectrum Lab., Rancho Dominguez, California, USA)을 이용하여 투석시켜 정제한 후 증폭에 이용하였다.

▪ **trnK-petA 유전자 지역 증폭, 정제, 및 염기서열 결정:** 15.2 Kb 지역의 유전자 배열이 인삼의 엽록체 유전자 배열과 동일하다는 것을 본 연구자의 선행연구에서 이미 알고 있었기 때문에 인삼의 엽록체 염기서열 (Kim and Lee, 2004), 담배의 엽록체 염기서열 (Shinonzaki et al., 1987), 올리브과 자스민의 엽록체 염기서열 (Lee et al., 2007) 등과 비교하여 20여쌍의 Primer를 제작하고 이를 이용하여 trnK-petA유전자 지역을 중복되도록 연속적으로 증폭하였다. 각 증폭 산물은 약 1 Kb 정도의 길이였다. 증폭조건은 Kim 과 Jansen(1994)의 조건과 동일하다. 증폭된 DNA는 agarose gel에서 확인한 후 QIAquick PCR Purification Kit (QUIAGEN Co., Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였다. 정제된 DNA 150 ng을 염기서열 결정반응에 이용하였다. 염기서열 결정반응은 ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing System을 이용하여 Perkin Elmer 9600 PCR 기기에서 25 cycle 반응을 수행하였다. 이때 반응조건은 primer 1.6 pmole, DNA 150 ng, BigDye Terminator 4㎕ 등이었고, PCR 조건은 96℃ 10초, 50℃ 5초, 60℃ 4초의 cycle을 25회 반복하였다. Cycle sequencing 반응을 마친 DNA는 일반적인 EtOH 침전 과정을 통하여 정제한 후 ABI 3770 자동염기서열분석기를 이용 염기서열을 분리하여 읽었다.

▪ **DNA 염기서열 assembelage 와 Annotation:** 양쪽방향으로 결정한 염기서열은 Sequencer (4.2. version, Gene Code Corporation, Ann Arbor, Michigan)를 이용하여 편집하였다. 양방향으로 읽은 1 Kb 정도 길이의 서열은 서로 중복되므로 쉽게 contig assemble이 가능

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

하였다. 전체 염기서열은 인삼과 담배의 엽록체 게놈을 model로 하여 각 유전자의 유사도를 BLAST 비교하여 annotation 하였다. trn 유전자의 경우는 tRNAscan-SE (version 1.21, Lowe and Eddy 1997)프로그램을 이용하여 구조를 결정하였다.

▪ **ndhF와 rbcL 유전자의 비교분석**: 표 II-1에 표시한 전체 종들을 대상으로 ndhF 유전자와 규치 유전자의 염기서열을 결정하였다. 먼저 이들 종들에 대하여 두 개의 유전자를 증폭하고, 정제한후, 염기서열을 결정하였다 (Kim et al., 2005; Lee et al., 2007). 각 종별로 편집한 염기서열은 Clustal X program (Gibson *et al.*, 1994)을 이용하여 정열하였다. 정열결과 *Abeliophyllum distichum*의 두 집단의 염기서열은 동일하였으므로 단일 분류군으로 처리하였다. 정열된 자료는 NEXUS format으로 전환한 후 PAUP (4.0 version, Swofford, 2000)을 이용하여 기본적인 절약분석(parsimony analysis), Bootstrap 분석(Felsenstein, 1985), NJ분석 (Saitou and Nei, 1987; Farris *et al.*, 1996) 등을 수행하였다. Parsimony-bootstrap 분석 및 NJ-bootstrap 분석은 1,000회 반복하였다. ML tree는 Modeltest (Posada and Cradall 1998)의 결과를 바탕으로 Model을 선정하여 tree를 추론 하였다. ML tree에서 node strength는 Beyessian 분석결과를 표시하였다. 이를 바탕으로 r8s 프로그램(Sanderson 2002)을 이용하여 *Abeliophyllum*의 divergence time을 추론하였다. 시간의 추정에는 표준시간으로 화석기록이 존재하는 외군에서 *Cornus*와 내군에서 *Fraxinus* 및 *Osmanthus*가 이용되었다(Kim et al., 2005; Lee et al., 2007).

3. 결과 및 고찰

3.1. 엽록체 유전체 분석결과

본 연구에서는 우리나라 특산속 식물인 미선나무의 엽록체유전체를 분석하였다. 엽록체 유전체의 약 10분에 1에 해당하는 trnK - petA 유전자 사이의 15,035 bp를 해독하였으며 이 사이에는 trnL* - trnF* - ndhJ - ndhK - ndhC - trnV - trnM* - atpE - atpB - rbcL* - accD* - psaI* - yef4* - cemA* 유전자가 포함 된다 (이 중 중요표를 한 8개 유전자는 숫자가 증가하는 sense strand로, 나머지 6개 유전자는 숫자가 감소하는 antisense strand로 전사된다, 그림 2 참조). 이들 14개 유전자중 trnL 과 trnV 유전자 두 개가 인트론을 1개씩 가지고 있으며, 그 길이는 가각 475bp 와 474bp 이었으며(표 II-1-2 참조) 모두 group II 인트론이다. trnL, trnF, trnV, trnM 등 4개의 trn 유전자는 특이적인 2차구조를 이룬다.

ndhJ, ndhK, ndhC 유전자는 하나의 cistron으로 전사되는 것으로 생각되며 transcription initiation을 위한 ribosome binding site는 ndhC gene의 upstream에 존재하는 것으로 파악된다. 마찬가지로 atpB 와 atpE gene의 경우도 하나의 transcription unit으로 전사되며 ribosome

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

binding site는 atpB gene의 upstream에 존재한다. rbcL gene에서 cemA gene에 이르는 5개 유전자는 같은 방향으로 전사되나 각각 전사되는 것으로 파악된다.

이중 accD gene의 경우 유전적으로 가장 불안정한 유전자로 평가되며, 미선나무의 경우 길이가 1,012 bp로 구성된다. 일반적으로 accD gene의 길이가 1,500 bp 이상(인삼의 경우 1,515 bp, 담배의 경우 1,539 bp)임을 비교하여 볼 때 미선나무의 accD gene의 경우 길이가 500 bp 정도 감소되어 있음을 알 수 있다. 이들 염기서열을 align한 결과 5′의 약 500 bp가 결실되어 있음을 확인 할 수 있었다. 올리브과의 여러 속에 대한 연구에서도 accD gene의 5′ portion이 산발적으로 결실된 것이 확인되어 이에 대한 분포와 진화기전을 밝히는 연구를 진행 중이다. atpB gene과 atpE gene은 4개 bp가 서로 중첩된 것으로 나타났다. 이들 두 개 유전자는 atpB gene의 마지막 2개 codon AAA/TGA/ 가 다른 frame으로 읽혀 atpE gene의 AA/ATG/A 로 읽히기 때문이며 이와 같은 overlapping 현상은 인삼, 담배와 같은 다른 식물의 엽록체 게놈에서도 알려졌다. 전체해독 결과는 그림 II-1-3과 같다.

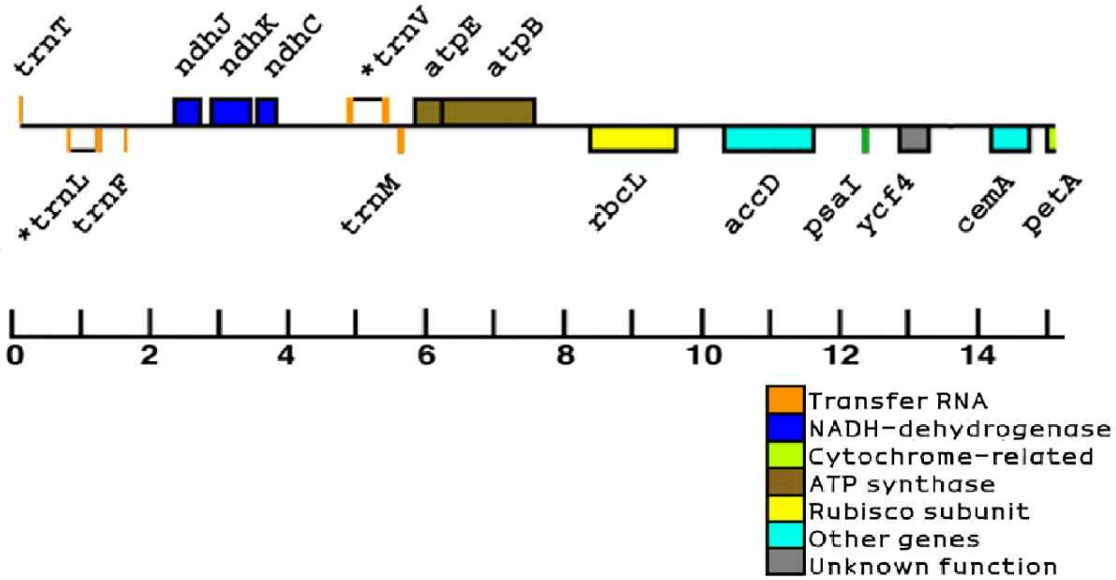


그림 II-1-2. 미선나무 엽록체 유전체의 분석지역 유전자 지도

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 Ⅱ-1-2. 미선나무 엽록체게놈 해독지역의 유전자 길이와 그 산물

시작	끝	길이 (bp)	유전자	유전자 산물
1	543	68	tRNA-Leu (UAA) (intron 475bp 포함)	partial cds tRNA-Leu
891	963	73	tRNA-Phe (GAA)	tRNA-Phe
2106	1630	477	ndhJ	NADH dehydrogenase 19kD subunit
2889	2212	678	ndhK	NADH dehydrogenase 32kD subunit
3307	2945	363	ndhC	NADH dehydrogenase ND3 subunit
5036	4389	73	tRNA-Val (UAC) (intron 575bp 포함)	tRNA-Val
5217	5289	73	tRNA-Met (CAU)	tRNA-Met
5908	5507	402	atpE	ATPase epsilon subunit
7401	5905	1497	atpB	ATPase beta subunit
8175	9608	1434	rbcL	RuBisCo large subunit
10272	11783	1512	accD	acetyl-CoA carboxylase beta subunit
12077	12187	111	psaI	PSI reaction center subunit VIII
12634	13188	555	ycf4	ycf4 protein
14068	14757	690	cemA	potentail heme-binding protein
14985	15035	51	petA	partial cds cytochrome f

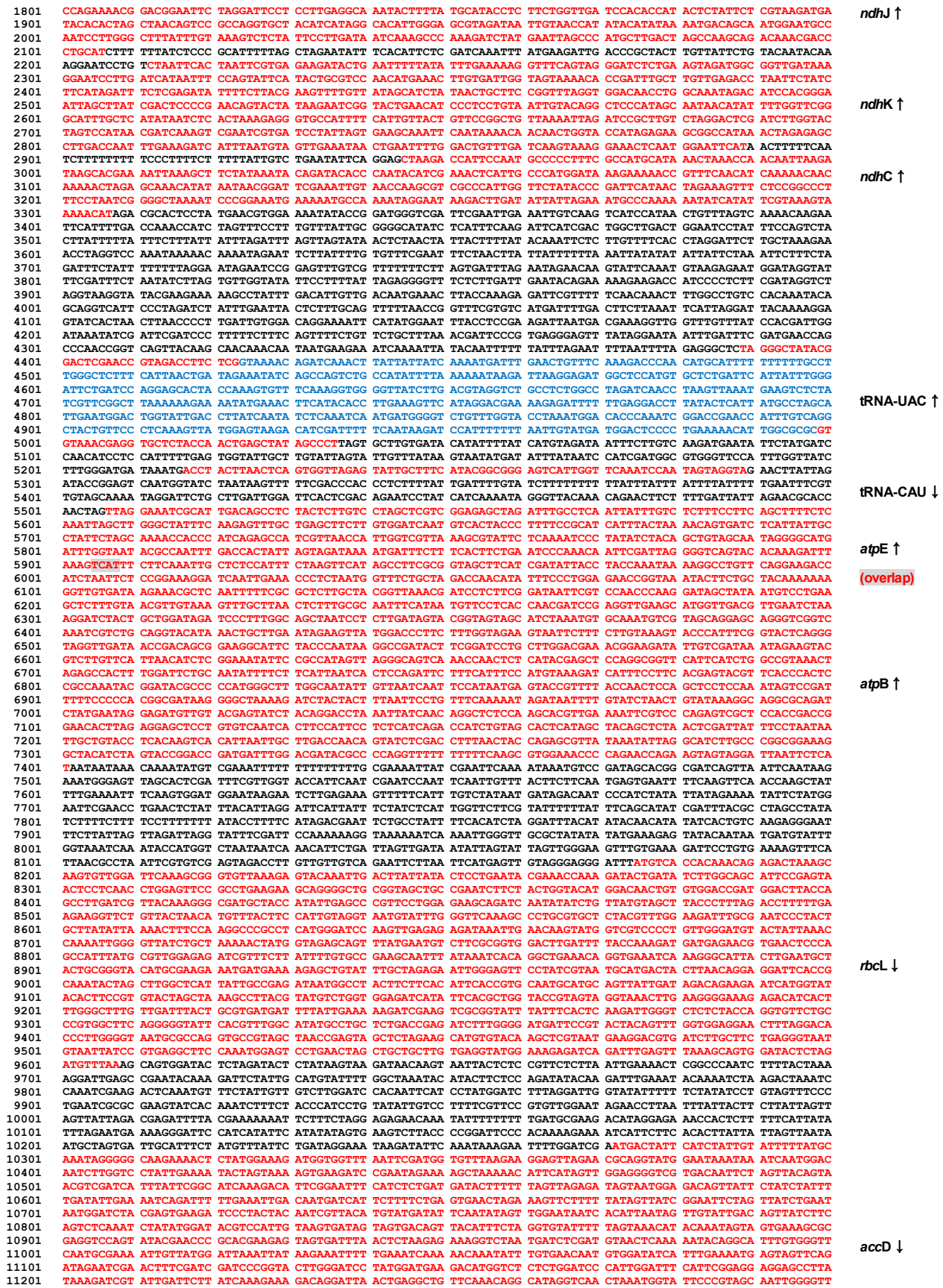
Notes) **Sequence in red color - Coding segment or Exon**
Sequence in black color - Intergenic spacer
Sequence in blue color - Intron
Sequence in green color - Coding segment within intron
The direction of arrow indicate transcription orientation

```
   1  GGTAGACGCT ACGGACTTAA TTGGATTGAG CCTTGGTATG GAAACCTACT AAGTGGTTAC TTTCAAATTC AGAGAAACCC CGGAATTAAT AAAAATGGGC
 101  AATCCTGAGC CAAATCCTGT TTTCCCAAAA CAAAGGTTCA GAAAGAAAAA AAGGATAGGT GCAGAGACTC AATGGAAGCT GTTCTAACAA ATGGAGTTGA
 201  CTGCGTTGGT AGAGGAATCT TTTCATCGAA ACTTCAGAAA GGATGAAGGA TAAACGTATA TATTGAATAC TATATCAAAT GATTAATGAC GACCCGAATC
 301  TCTATCTCTA TTTTTTTATA TGAAAAGTGG AAGAATTGAT TCCACATTGA AGAAAGAATC GAATATTCAT TGATCAAATC ATTCACTCCA TAGTCTGATA
 401  GATCTTTTAA AGAACTGATT AATCGGACGA GAATAAAGAT AGAGTCCCAT TCTACATGTC AATACCGGCA ACAATGAAAT TTATAGTAAA AGGAAAATCC
 501  GTCGACTTTA AAAATCGTGA GGGTTCAAGT CCCTCTATCC CCAAAAAGCC TATTTGACTC CCCAAATATT TATCCTATCC CTTTTTCGTT AGCAGTTCCA
 601  AATTCCTTAT CTTTCTCATT CACTCTATTC TTTTACAAAC GTATTTGAGC GTAAATGATT TTCTCTTATC ACATGTGATA TATAATACAC ATCCAAATTA
 701  AGCAAGGAAT CCCCATTTGA ATGATTCACA ATCAATATCA TTACTCATAC TGAAATTAAC AAAGTCGTCT TTTTGAAGAT CTAAGAAATT CCAGGACTTG
 801  GAGAAAACTT TGTAATCCCC CCTTGTCCTT TTAATTGACA TAGACCCCAG TCATCTAATA AAATGAGGAT GGGATGCTAC ATTGGGAATG GTCGGGATAG
 901  CTCAGCTGGT AGAGCAGAGG ACTGAAAATC CTCGTGTCAC CAGTTCAAAT CTGGTTCCTG GCACATGATT CATTTGTATG AGTCTCTCAA TTATAAATTA
1001  ATTGATATGA ATCGAGATAC GTATTCATTT CTAATCTAGA TCATAATACA TACTTTTATC TATCTTAGCG AGATATACCC CATCTATTTT ATAGATGGGT
1101  AGAGTTTTTT AAATAAAGTA TCTAAAAGAA TGAAATTCTA TTTTCTCTTT TTTTTTTTTC TTTCGTTCAA AAAAAATGTT AATACTTCAT ACATATTTGA
1201  AAGGTTAAAT TCGTTGGTTG AAAGACTAAA AAGTCGAAGT TGAAAGAGAC AAGATTCGGT TCAGATACCA TAAAAATAAA GAAAATCCGA TAACCTTTCA
1301  TTTGTTTGTA TTTTCTCTTT CATATTCGAT TTCTTAATTC GTCCCGACAT GACTTTCTAG AACCGGTCTA AGTAATGTGC GCAGTACAAA GTTCATGATG
1401  CAGAACGCGT TTGATTCATC CTATTGGTTT GGCTCATACG AGATAAGTAT CTTACAAATA AATGTAAGAA TCCCAACGAA TCCCCAATTC TGTCTTTTTT
1501  TGTTAGCCTA TACCATAATT CCCTAATAGA AATGAAACTT CAATATAGAA TTATTCTGGT TAATCTAGAA CCGAAAGTAC AACCCTTGAA TCTCTGAAAT
1601  TGTATAAGTG GAAATTAGTT TCTTATCATT CAATGAGCAT CTTGTATTTC ATAAAAATTG GGGGCAATAT AATCCTTACG TAAGGGCCAT CCTATCCAAC
1701  TTTCAGGCAT TAAGATACGT TTCAAGCGTG GATGATTATC ATAAGAGATT CCCAACATAT CATAAGATTC TCGTTCTTGA AAATCCACAC TTTTCCAAAC
```

tRNA-UAA ↓

tRNA-GAA ↓

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



그림 II-1-3. 미선나무 엽록체 유전체의 염기서열과 해독결과

3.2. 계통분석의 결과

미선나무속의 계통학적 위치와 형질의 진화 방향을 판단하기 위하여 올리브과 모든 속을 포함한 47종의 ndhF gene과 rbcL gene의 염기서열을 기초로 계통수를 제작하였다. 두 개 유전자가 모두 엽록체 유전자이므로 이를 유합하여 약 2,900 bp 길이의 자료를 산출하였다. 올리브과 24개 속을 대상으로 같은 속내에서는 다른 아속, 절, 아절이 포함되도록 여러 종을 선발하였으며 올리브과 이외에 14개 속을 외군으로 이용하여 총 61종이 이용되었다. 최대절약분석(MP), Maximum Likelihood (ML) 분석을 수행하였고 bootstrapping과 Bayesian 분석(BA)를 통하여 각각 절의 단계통성을 평가하였다.

MP분석에서는 1개의 최대절약계통수가 산출되었으며 (그림 II-1-4), 각 node의 신뢰도는 10,000번의 bootstrapping 분석결과를 토대로 %로 표시하였다. 대부분의 절은 50% 이상의 bootstrap 값으로 지지되었다. 먼저 외군 중 Carlemanniaceae가 Oleaceae의 자매과로 인지되었다. Carlemanniaceae는 *Silvianthus*와 *Carlemannia* 등 2개 속으로 구성되어 있으며, Shaw(1957)에 의하여 과로 기재되었으나, 이후 여러 연구자들에 의하여 인동과(Caprifoliaceae) 또는 꼭두서니과 (Rubiaceae) 등에 포함되기도 하였고 현재까지 과의 위치가 불분명한 분류군이다. 지리적 분포패턴을 보면 2속은 열대~아열대 아시아 (인도차이나, 동인도, 중국 남부지역)에 비교적 좁게 분포한다. 본 연구에서 중국 운남성 남부에서 두 속을 모두

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

채집하여 연구에 이용하였는데 이전에는 분류학자들에 의하여 전혀 언급이 안 된 올리브과와 연관이 깊은 것으로 본 연구에서 결과가 나와 이를 논문으로 출판하기 위한 작업을 진행 중이다.

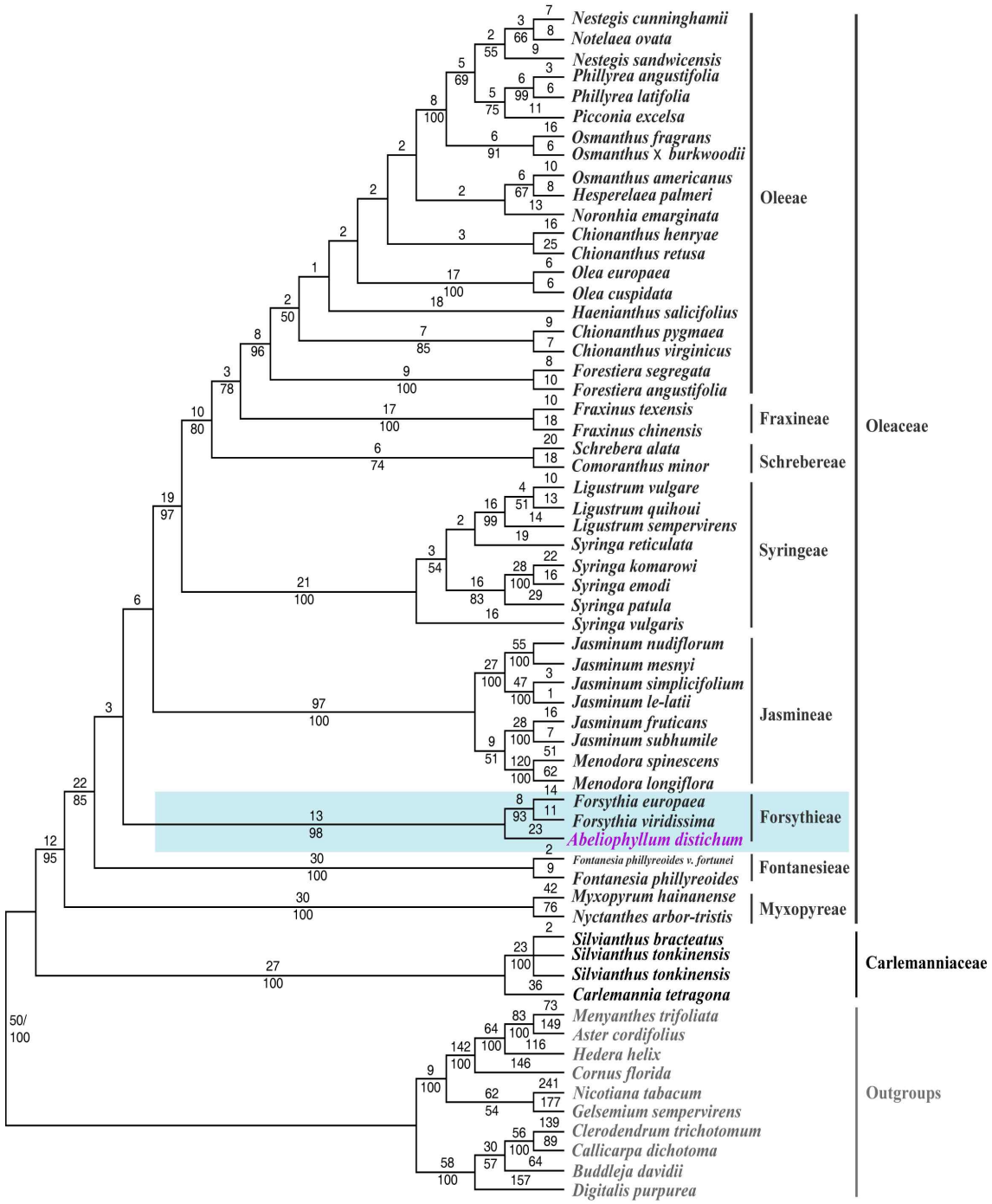


그림 Ⅱ-1-4. 미선나무속의 계통학적 위치를 나타내는 계통수. (본 계통수는 ndhF와 rbcL 유전자의 염기서열을 기초로 하여 최대절약분석을 하였으며, 각 절의 신뢰도는 1만번의 bootstrap 분석 결과를 %로 표시한 것이다)

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

올리브과 내에서는 *Myxopyrum*과 *Nyctanthes*가 기저분류군이고 다음이 *Fontanesia* (향선나무속), 그 다음이 미선나무와 개나리속이 속하는 개나리 족의 순으로 분지한 것으로 파악되었다. *Myxopyrum*속과 *Nyctanthes*속은 모두 열대~아열대 아시아속으로 Carlemanniaceae와 분포영역이 크게 중첩된다. 따라서 올리브과가 열대~아열대 아시아에서 기원했을 것이라는 이론을 뒷받침한다. MP tree의 경우 향선나무족, 개나리족, 자스민족의 유연관계의 지지도가 낮아 (50% 미만) 이들 속의 관계가 어떤 것인지는 확실하지 않으나, 미선나무속이 개나리속과 함께 개나리족에 속함은 매우 뚜렷하다 (98%지지). 이를 ML분석과 BA분석을 한 결과 (그림 II-1-5) 올리브과 내에서 Myxopyceae가 먼저 분지하고 향선나무족, 개나리족, 다른 족들의 3각 관계는 풀리지 않으나, 이들 3개 군이 오래 전에 독립적인 진화 계열을 형성함은 MP계통수와 같은 결론이다.

이 ML계통수를 근거로 하여 *Cornus*속(외군)과 *Fraxinus*(내군)속의 화석기록을 바탕으로 하여 주요 분류군의 기원시기를 추정한 결과는 그림 II-1-6과 같다. 그림 II-1-6의 분지기점 추정방법은 non-parametric penalized likelihood (NPL) 방법을 이용한 것으로 이는 현재까지의 연대 추정방법 중 가장 정확한 것으로 평가되는 방법으로 두 개의 조정시점에 각각의 화석 자료를 이용한 결과 그 신뢰도는 증가한다. 결과 올리브과는 중세 백악기에 이미 기원하였으며 (1억년전) Myxopyreae족, 향선나무족, 개나리족, 다른 올리브과의 군들은 이미 중세 백악기 말에 (8천~6천5백만년 전) 분화하기 시작하였고, 개나리족 내에서 개나리속과 미선나무속은 6천만년전인 신생대 Paleocene에 분화되었음을 제시하였다. 이는 우리나라 특산속인 미선나무가 매우 오래 전에 형성되어 오늘에 이르는 고생특산속 임을 의미한다.

3.3. 미선나무속(*Abeliophyllum*)의 형질진화 및 기원시점

엽록체 유전자 염기서열 (ndhF+rbcL)을 이용한 계통수들은 한결 같이 한국 특산 *Abeliophyllum* 속이 *Forsythia* (개나리)속과 가장 가까운 유연관계를 가짐을 보여주고 있다. 이 결과는 ITS 염기서열에 의한 결과 (Kim et al. 2000)와 같으며 *Abeliophyllum* 과 *Forsythia*를 하나의 즉 Forsythiae로 처리하는 분류 System과 일치 한다.

Fontanesia (향선나무)속의 경우는 단일속을 형성하며 개나리족의 두 속이 분지하기 이전에 기원하였다. 또한 Oleaceae에서 Myxopyreae 족이 가장원시적인 기저군을 형성함을 볼 때 Myxopyreae, Fontanesieae, Forsythieae 등이 공통적으로 갖고 있는 열매 형질(건과, 시과)은 원시적인 형질임이 입증되었다. 따라서 향선나무속 (*Fontanesia*)과 미선나무속 (*Abeliophyllum*)이 갖는 부채모양의 열매 특징은 원시 공유형질이고, 화분립의 형질도 같은 상태로 판단된다. 미선나무와 개나리의 꽃의 유사성, 염색체의 기본수 (X=14) 등은 원시 형질을 유지하는데 비하여 개나리의 열매는 삭과로 발전한 단독파생형질로 판단된다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

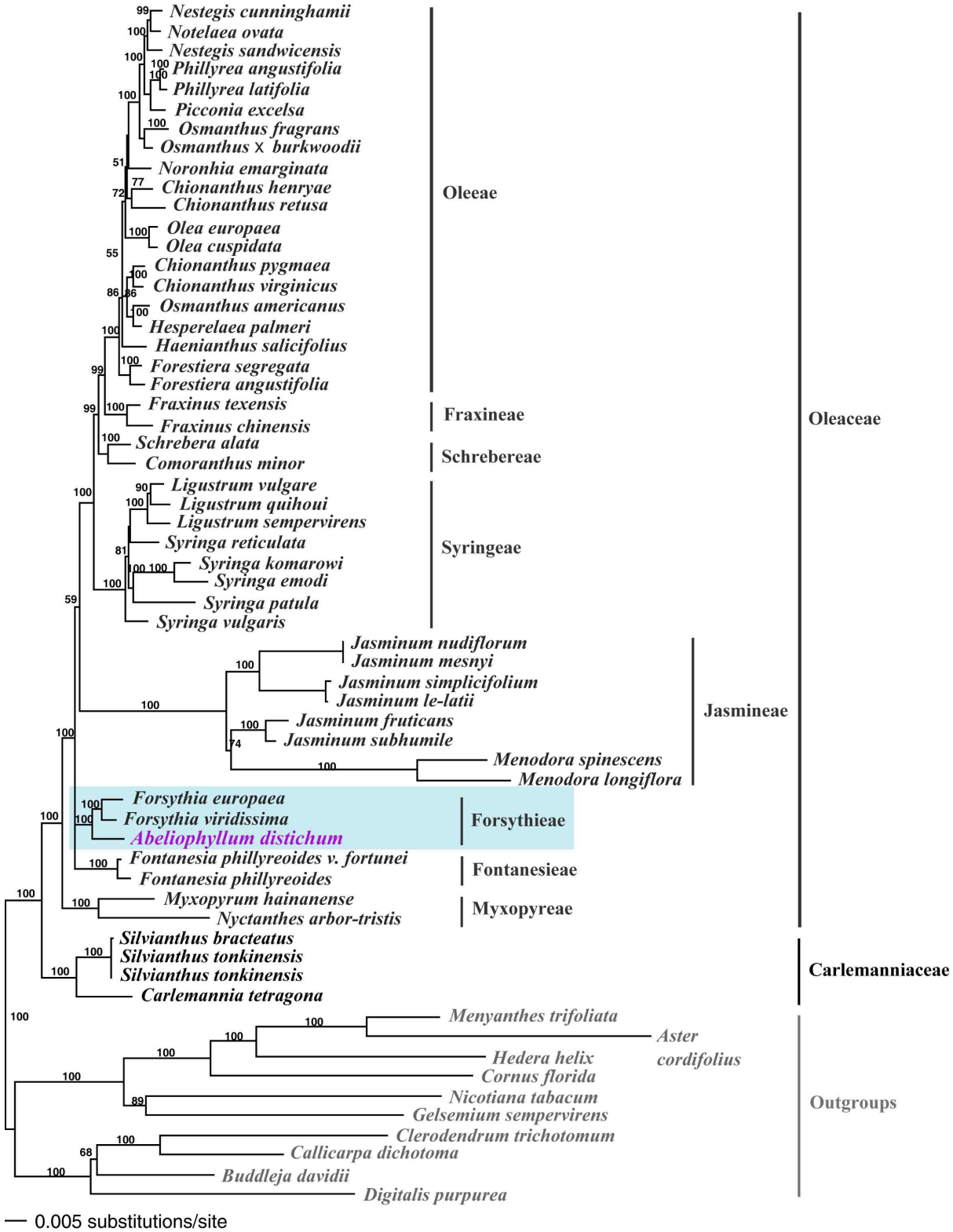


그림 II-1-5. 미선나무속의 계통학적 위치를 나타내는 계통수. (본 계통수는 ndhF와 rbcL 유전자의 염기서열을 기초로 하여 Maximum Likelihood 분석을 하였으며, 각 절의 신뢰도는 4만번의 Baysian 분석 결과를 %로 표시한 것이다)

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

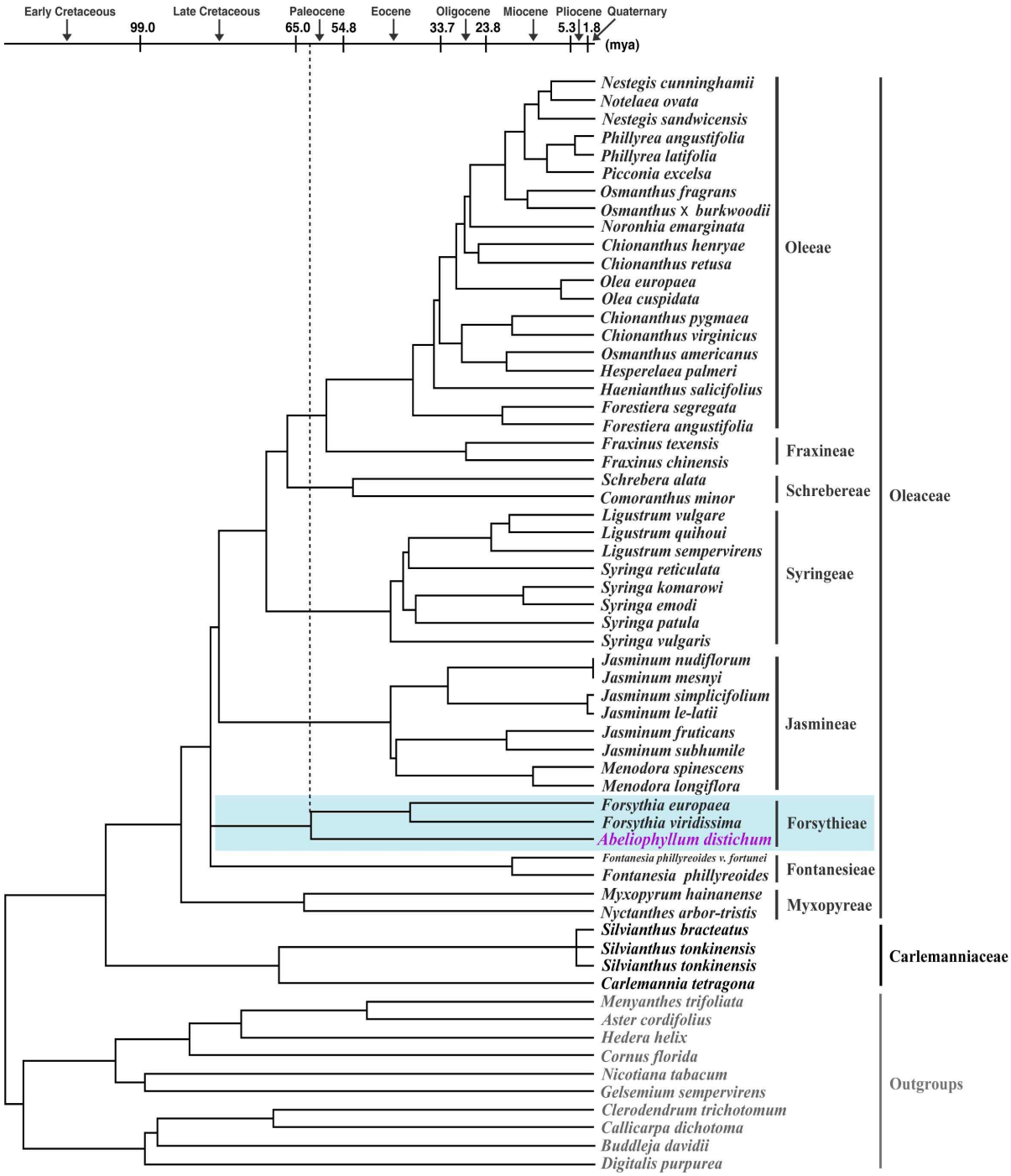


그림 II-1-6. 미선나무속의 기원시점을 추정한 계통수. (기원시점은 그림 II-1-5의 ML계통수를 근거로 non-parametric penalized likelihood 방법을 이용하였고, 기준 시점은 *Cornus*와 *Fraxinus* 화석을 동시에 이용하였다.)

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

ndhF와 rbcL의 염기서열 분석결과는 기존의 미선나무의 계통학적 연관관계에 뚜렷한 증거를 제시하였다. 나아가 분자시계의 적용은 우리나라 특산속이 언제 기원하였는지를 뚜렷이 보여주고 있다. 예로 향선나무족과 개나리족은 중생대 중기 백악기인 8천만년 전에 분지하였고 개나리족내의 개나리속과 우리나라 특산속인 미선나무속은 신생대 Paleocene (6천만년 전)에 기원한 것을 보여주고 있다. 이는 대부분의 올리브과내의 속들이 분화되기 이전이다. 즉 우리나라 특산속 미선나무속은 매우 오래전에 기원한 특산속이라는 것이다. 따라서 유전적으로 독특한 특성을 유지하고 있음을 보여주고 있다.

3.4. 미선나무 엽록체 유전체 분석 및 계통수 연구의 보전적 활용과 의의

미선나무는 한국 특산속으로 기재되었으나 일부 연구자들은 꽃의 구조가 개나리속에 유사하다고 하여 흰개나리로 부르기도 한다. 그러나 본 연구 결과에서 뚜렷이 나타나는 바와 같이 개나리속과는 많은 염기서열의 차이로 구별되지만 유연관계는 깊은 것으로 파악된다. 또한 열매가 부채모양이라는 특징으로 향선나무에 가깝다고 주장하기도 하나 향선나무속과는 뚜렷이 구별된다. 그러나 이들 3속이 모두 올리브과내의 기저군을 형성함이 입증되었다. 미선나무는 계통학적으로 개나리속과 자매군을 형성하지만 본 연구에서 밝힌 바와 같이 개나리속과 미선나무속은 신생대 초기인 Paleocene에 해당하는 6천만년 전에 이미 분화한 것으로 추정된다. 이는 미선나무속이 올리브과의 대부분의 속 (예로 물푸레나무속, 쥐똥나무속, 라일락속, 목서목, 올리브속, 이팝나무속 등) 들이 분지하기 이전에 이미 형성되었음을 강력히 시사한다. 즉, 미선나무속은 기원적으로 보아 매우 오래 전에 (6천만년전) 한반도에서 형성되어 현재까지 현존하거나 한반도 인근의 다른 지역에서 형성되어 한반도로 이동하여 일부 개체들이 남아 있을 가능성이 높음을 의미한다. 이는 근연인 개나리속이 우리나라와 (일본 1종) 중국 동북부에만 분포한다는 사실과, 향선나무속이 중국과 서아시아에 분포함을 생각해볼 때 미선나무가 오래전 한반도 또는 인근에서 기원했음을 시사한다. 우리나라 특산식물속 들의 계통연구에 의하면 인근속 내로 포함되는 결과를 보여주지만 (예로, 금강초롱속이 초롱꽃속에 포함), 미선나무속은 매우 독특한 속으로 계통학적으로도 오래 전에 형성되어 현지까지 생육하고 있음을보여주고 있다.

미선나무속은 우리나라 고유속, 특산속, 오래전에 형성된 고생특산속(Paleoendemic genus)으로 평가된다. 우리나라에서 Arnold Arboretum으로 이식된 개체가 모체가 되어 서구 여러 식물원에 보급되어 있으나 열매형성이 되지 않은 특징으로 종자번식은 불가능한 상태이다. 이는 꽃이 pin과 drum 형 중 하나만 유출되었을 가능성이 높다. 그러나 우리나라의 경우 열매성숙이 가능하고 다섯 곳의 자생지가 알려져 있는 관계로 이들 유전자원의 보고이다. 본 연구에서 우리나라 특산속 으로서의 지위가 확실하게 입증된 만큼, 앞으로 우리나라의 생육개체 (영양번식 한 개체 제외) 들에 대한 유전적 다양성 분석이 수행되어야 보전 및 복원계획에 이들 자료가 적극 이용될 수 있을 것이다. 미선나무속이 6천만년전에 형성되었다면 생육집단 간에 많은

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

유전적 이질화가 진행되어 이들이 실험과정에서 검출될 것이며, 우리나라 분포집단이 최근에 형성되었다면 유전적 변이가 적을 것이기 때문이다. 이들 집단이 오랫동안 서로 단절되었는지 또는 최근에 분화한 것인지 등의 집단 역사에 대한 흥미로운 결과를 도출할 것이다.

4. 참고문헌

Anonymous, 1998. Natural monuments of Korea. Korean Natural Heritage Conservation Division, Seongjonsa, Seoul.

Baas, P., P. M. Esser, M. E. T. van der Westen, and M. Zaudee. 1988. Wood anatomy of the Oleaceae. IAWA Bulletin 9: 103-182.

Baldwin, B. G. 1992. Phylogenetic utility of the international transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA in plants : an example from the compositae Mol. Phyl. Evol. 1: 3-16.

Bremer, K. 1994. Bremer support and tree stability. Cladistics 10: 295-304.

Doyle, J. J. and J. A. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quintities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19: 11-15.

Farris, J., V. Albert., M. Kallersjo, D. Lipscomb and A. Kluge. 1996. Parsimony Jackknifing outperforms Neighbor-joining. Cladistics 12 : 99-124.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies : an approch using the bootstrep. Evolution 39: 789-791.

Gibson, T., D. Higgins and J. Thompson, 1994. Clustal X program. EMBL, Heidelberg, Germany.

Harborne, J. B. and P. S. Green. 1980. A chemotaxonomic survey of flavonoids in leaves of the Oleaceae. Bot. J. Linn. Soc. 81: 155-167.

Hillis, D. M. and M. T. Dixon. 1989. Vertebrate phylogeny : evidence from 28S ribosomal DNA sequence. - In Fernholm, B. Bremer, H. Jornvall (Eds.) : The hierarchy of life, pp. 355-367. Nobel Symposium 70. Amsterdam, Elsevier.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Johnson, L. A. S. 1957. A review of the family Oleaceae. Contr. New South Wales Natl. Herb. 2: 396-418.

Kim, K.-J. 1997. Chloroplast DNA evidence for the phylogenetic position of *Abeliophyllum*(Oleaceae). Adv. Pl. Mol. Syst. 1 : 72(Abs.)

Kim, K.-J. 1998. A new species of *Fontanesia* (Oleaceae) from China and revision of the genus. J. Pl. Biol. 41: 142-145.

Kim, K.-J. 1999. Molecular phylogeny of *Forsyhtia* (Oleaceae) based on chloroplast DNA variation. Pl. Syst. Evol. 218: 113-123.

Kim, K.-J. and R. K. Jansen 1994. Comparisious of phylogenetic hypotheses among different data sets in dwarf dandelious(*Krigia,* Asteraceae) : additional information from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. Pl. Syst. Evol. 190: 157-185.

Kim, K.-J. and R. K. Jansen. 1998. A Chloroplast DNA phylogeny of Lilacs (*Syringa* - Oleaceae) : plastome groups show a strong correlation with crossing grous. Amer. J. Bot. 85: 1338-1351.

Lee, S.-D. and K.-C. Lee, 1994. Natural monuments of North Korea. Agricultural Publ., Pyeongyang.

Lee, S. T. and E. J. Park. 1982a. A Cladistic analysis of the Korean Oleaceae. Korean J. Bot. 25: 57-64.

Lee, S. T. and E. J. Park. 1982b. A palynotaxonomic study of the Korean Oleaceae. J. Korean Pl. Tax. 12: 1-11.

Lim, S. C. and S. C. Ko, 1989. A cytotaxonomical study on some species of Korean *Forsythia*. Korean J. Pl. Tax. 19; 229-239.

Maekawa, F. 1962. Major polyploid, with special refesence to the phylogeny of Oleaceae. J. Jap. Bot. 37: 25-27.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Nakai, T. 1919. Genus novum Oleaceaerum in Corea media inventum. Bot. Mag. (Tokyo) 33 : 153-154.

Nakai, T. 1920. On *Abeliophyllum distichum*. Bot. Mag. Tokyo 34: 249-251.

Palmer, J. D. 1986. Isolation and Structural analysis of chloroplast DNA. Meth. Enzymol. 118: 167-186.

Piechura, J. E. and D. E. Fairbrothers. 1983. The use of protein-serological charaeters in the systematics of the family Oleaceae. Amer. J. Bot. 75: 780-789.

Rohwer, J. G. 1993. A preliminary survey of the fruits and seeds of the Oleaceae. Bot. Jahrb. Syst. 115: 271-291.

Rohwer, J. G. 1995. Fruit and seed structures in *Menodora* (Oleaceae) : a comparison with *Jasminum*. Bot. Acta 108: 163-168.

Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.

Steyermark, J. A. 1932. A revision of the genus *Menodora*. Ann. Missouri Bot. Gard. 19: 87-176.

Suh, Y., L. B. Thien, H. E. Reeve and E. A. Zimmer. 1993. Molecular evolution and Phylogenic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. Amer. J. Bot. 80: 1042-1055.
Swofford, D. L. 1998. PAUP : Phylogenetic analysis using parsimony and other methods. Version 4.0 Sinauer Asso. Inc., Massachusetts, USA

Taylor, H. 1945. Cytotaxonomy and phylogeny of the Oleaceae. Brittonia 5 : 337-367.

Turner, B. 1991. An overview of the North American species of *Menodora* (Oleaceae). Phytologia 71: 340-356.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Ⅱ-2. 제주고사리삼(Mankyua chejuense)의 엽록체 유전체 분석 및 계통 연구

1. 서론

우리나라 특산속인 제주고사리삼속(Genus *Mankyua*)은 1998년 제주도에서 처음 발견되어 Sun등 (2001)에 의해 출판되어진 고사리삼과 (Ophioglossaceae)의 한 속이다. 고사리삼과는 양치식물 중에서도 가장 원시적인 군으로 오랫동안 인식되어 왔으나(Bower 1926, Wagner 1990), 화석학적 기록은 매우 빈약하여 비교적 최근인 신생대 3기에야 기록되고 있다 (Rotherwell and Stockey 1989). 제주고사리삼속이 기재되기 전 고사리삼과는 일반적으로 고사리삼속 (*Botrychium*), 나도고사리삼속 (*Ophioglossum*), *Helminthostachys* 속등 3개 속으로 인식되어 왔다((Bower 1926, Wagner 1990)). 그러나 광의의 고사리삼속 (*Botrychium s.l.)* 은 협의의 *Botrichium, Scepteridium, Japanobotrichium, Botripus* 등 4속으로 인지되기도 하며 (Kato 1987), 광의의 나도고사리삼속 (*Ophioglossum s.l.)*은 협의의 *Ophioglosssum, Rhizoglossum, Ophioderma, Cheioglossa* 등 4속으로 세분되기도 한다 (Presl 1845).

제주고사리삼 (*Mankyua chejuense* B.-Y. Sun, M.H. Kim & C.H. Kim)은 제주도에서만 서식하는 것으로 알려져 있는 단일종으로 구성된 우리나라 특산속 식물로 1998년 처음 서식지가 알려진 후 주로 제주도의 동북부 지역의 상록수림 하에서 현재까지 20여개의 군락이 발견되고 있다 (그림 II-2-1). 제주고사리삼은 고사리삼과의 일반적인 특징을 가지고 있으면서도 기존의 고사리삼속 (*Botrychium*), 나도고사리삼속 (*Ophioglossum*), *Helminthostachys* 속과는 뚜렷이 구별되는 다른 형태학적 특징을 보인다. 형태학적인 형질을 비교하면 제주고사리삼속은 고사리삼속이나 나도고사리삼속과는 포자엽의 형태, 잎의 형태, 뿌리줄기의 형태 등에서 뚜렷이 구별되지만 *Helminthostachys*속과는 유사한 특징이 많은 편으로 이 들 두 속의 공통적인 특징은 다음과 같다.

1) 생장엽이 깊게 갈라진 형태이다.
2) 포자엽이 선형으로 생장엽에서 나온다.
3) 잎 배열이 일정하지 않다.
4) 뿌리줄기가 기는 줄기이다.
5) 생장엽의 엽맥이 두 개로 갈라진다.

제주고사리삼속과 *Helminthostachys* 속은 이러한 공통적인 특징에도 불구하고 포자낭의 돌출여부와 포자엽의 자루유무에 의해 뚜렷이 구별되는데, 제주고사리삼속(*Mankyua*)은 포자낭이 돌출되어 있고 종열이며 포자엽이 생장엽 기부에서 자루가 없이 바로 올라오는 반면, *Helminthostachys* 속은 포자낭이 함몰되어 있고 횡열이며 포자엽이 긴 자루를 가진다(Sun et al, 2001).

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Hauk et al. (2003)은 고사리삼과의 형태학적인 특징과 엽록체 게놈상의 trnL과 trnF 사이의 intergenic region과 rbcL gene의 염기서열에 기초한 분자계통학적인 분석 결과를 이용하여 과거에 9개 속으로도 나누는 분류시스템 보다는 일반적으로 고사리삼속(*Botrychium*), 나도고사리삼속(*Ophioglossum*), *Helminthostachys*의 3개 속으로 구분하는 광의의 분류시스템이 더 타당함을 입증한 바 있다. 그어나 이 연구에 제주고사리삼속은 이용되지 못하였다.



그림 Ⅱ-2-1. 자생 서식지(위)와 이식하여 고려대학교 온실에 재배 중(아래)인 제주고사리삼 (*Mankyua chejuense*)

형태학적 특징을 고려할 때 제주고사리삼속은 *Helminthostachys*와 가장 가까운 유연관계를 형성할 것으로 예상된다. 그러나 이러한 예견을 독립적인 자료로 입증한 경우는 없으며 우리나라특산속의 계통학적 위치도 밝혀지지 않은 상태이다. 따라서 본 연구는 우리나라 고유속인 제주고사리삼속의 계통학적 위치를 밝히는 것을 주목적으로 하였다. 이를 위해 고사리삼과 종들

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

의 염기서열 정보가 이미 확보되어 있는 trnL과 trnF gene 사이의 intergenic region과 rbcL gene의 염기서열 정보를 이용하여 계통수를 작성하고 이 계통수를 통해 제주고사리삼의 분자계통학적 위치를 논의하고자 한다.

두가지 유전자 염기서열에 기초한 계통학적 연구와 더불어 본 연구에서는 제주고사리삼의 엽록체 게놈의 해독과 진화 메카니즘의 규명에 초점을 두었다. 일반적으로 양치류는 과거 고생대 석탄기 초기에 지구상에 출현하여 번성하다가 현재에까지 잔존하여 진화해 온 것으로 알려져 있다. 피자식물의 진화역사와 비교할 때 양치류는 그 진화의 역사가 오래된 만큼 분류군 간의 유전적 변이 및 게놈 구조상의 변이가 매우 큰 분류군으로 인식된다. 그러나 자료의 부족으로 이에 대한 결론은 시기상조이다. 최근 들어 고등식물의 엽록체 게놈에 대한 진화학적 연구가 활발하게 진행되어 온 반면, 양치류의 경우 공작고사리(*Adiantum capillus-veneris*)(Wolf et al. 2003)와 솔잎난(*Psiotum nudum*)(Wakaski et al. unpublished, GenBank AP004638) 두 종만 완전하게 엽록체 게놈이 해독되어 있다.

이에 본 연구에서는 우리나라 고유속인 제주고사리삼의 엽록체 게놈의 완전해독을 목표로 연구를 수행하고 있다. 현재 1차 년도에는 15 kb 정도의 분석이 완료된 상태이다. 이 결과는 제주고사리삼의 엽록체 게놈 진화뿐만 아니라 양지식물의 게놈 진화 메카니즘을 논의하는데도 중요한 자료를 제공할 것이다.

2. 재료 및 방법

2.1. 식물재료 및 분류군의 선정

제주고사리삼은 현재 제주도 서북부 상록수림내에 20여 개의 집단이 자생하고 있는 것으로 알려져 있다. 이중 선흘리 집단의 개체들을 채집하였다. 채집당시 시기적으로 영양엽이 지고 있는 상태여서 6개체를 실험실에 이식하여 성장 시킨 후 DNA용 재료를 확보하였다. 이렇게 생육한 한 개체와 야외에서 직접 DNA 추출용 잎을 채취한 두 개체를 엽록체 DNA 염기서열 분석용 식물재료로 이용하였다. Hauk et al.(2003)에 의해 분석된바 있는 고사리삼과의 3개 속(고사리삼속, 나도고사리삼속, *Helminthostachys* 속)에 대한 실험 결과를 토대로 trnL-F의 intergenic region 경우, 본 실험실에서 확보한 제주고사리삼 3개체, 고사리삼 (*Bo. ternatum*) 1개체, 나도고사리삼 (*Op. vulgatum.*) 1개체의 생체를 이용하였다. 또한 고사리삼속 (*Botrychium*) 22종, *Helminthostachys* 1종, 나도고사리삼 (*Ophioglossum*) 10종의 염기서열 정보가 분석에 포함되었고 *Angiopteris*와 *Psilotum*의 2개 속을 Outgroup으로 사용하였다. rbcL의 경우에는 본 실험실에서 확보한 제주고사리삼 3개체와 고사리삼속 26종, *Helminthostachys* 1종, 나도고사리삼 12종이 분석에 사용되었고 *Angiopteris, Psilotum, Marattia, Danaea,*

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

*Tmesipteris*의 5개 속을 Outgroup으로 사용하였다. 분석에 필요한 DNA염기서열은 GenBank의 데이터베이스를 통하여 입수했다.

2.2. DNA 분리, PCR증폭 및 염기서열 결정

전체 genomic DNA는 잎을 이용하여 CTAB 추출방법 (Doyle and Doyle,1987)으로 분리한 후에 CsCl-EtBr 농도구배 초고속 원심분리 과정과 투석과정을 거쳐 정제한 후 사용하였다 (Kim and Jansen, 1994).

제주고사리삼의 분자계통학적 위치를 밝히기 위하여 엽록체 게놈 중 고사리삼과 식물의 염기서열이 밝혀져 있는 trnL과 trnF gene 사이의 intergenic region과 rbcL gene을 선택하였다. trnL과 trnF gene 사이의 intergenic region의 증폭을 위해서 Taberlet et al. (1991)이 설계한 Primer 중 2가지 primer (trn1:5′-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3′; trn6: 5′-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3′)를 이용하여 PCR 반응 (①94℃ 4min, ②94℃ 1min, ③55℃ 30sec, ④72℃ 1min, ②～④ 30번 반복, ⑤72℃ 7min)을 통해 Target region을 증폭한 후, 얻어진 PCR product를 Qiagen사의 PCR purification kit (Cat. No. 28106)으로 정제하였다. 정제된 PCR product는 Applied Biosystems 사의 ABI PRISM BigDye^{TM} Terminator Cycle Sequencing kits을 이용하여 sequecing 반응을 위한 template DNA로 사용하였다. Sequencing 반응이 끝난 후 정제된 PCR product는 ABI PRISM 3730XL Anayzer를 이용하여 염기서열을 결정하였다. rbcL gene의 경우에는 Hauk (1995)에 사용된 rbcL primer (rbcL for: 5′-ATGTCACCACCAACAGAAACTAAAGCAAGT-3′; rbcL re: 5′-CTTCACAAGCAGCAGCTAGTTCAGGACTCC-3′)를 이용하여 동일한 방법으로 염기서열을 결정하였다.

2.3. Data 분석

본 실험을 통해 얻어진 제주고사리삼의 trnL-F 지역 및 rbcL gene의 염기서열 정보와 GenBank를 통해 확보한 염기서열 정보를 유합한 후, Clustal X로 정열하고 MEGA 3.1을 통해 gap을 조정하여 계통수 제작에 이용하였다. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP version 4.0,Swofford, 2000) 프로그램을 이용하여 최대절약분석 (maximum parsimony)을 실시하였으며 heuristic search를 이용하였다. 또 얻어진 최절약계통수 (most parsimonious trees)를 이용하여 Bootstrap 값 (1,000회 반복)을 산출하였다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

2.4. 제주고사리삼의 엽록체 게놈 분석방법

제주고사리삼의 엽록체 게놈 연구를 위한 PCR primer 제작은 GenBank에 기록된 공작고사리 (*Adiantum capillus-veneris*), 솔잎난 (*Psiotum nudum*)의 전체 게놈 염기서열을 이용하여 본 실험실에서 자체적으로 고안한 것을 사용하였다. 엽록체 게놈의 염기서열을 결정하기 위해 제작된 primer의 염기서열 정보는 표1에 정리하였다. 제주고사리삼은 전체 genomic DNA를 TaKaRa LA Tag^{TM}을 이용하여 3~4개의 유전자를 포함하는 넓은 지역을 증폭시키는 Long-range PCR을 한 후, 다시 internal primer를 제작하여 내부의 염기서열을 얻는 방식을 채택하였다 (표 II-2-1).

표 II-2-1. 제주고사리삼 엽록체 게놈 분석에 사용된 primer set

primer name	Sequences(5'-3')	Target gene
a7	GTTTCAACTCGCGACAGTCA	trnG
a10	GAAAACTAACTGCGGCTTGC	
T1	GCCGGGATAGCTCAGTTGGT	ndhJ, ndhK, trnM (T1-T7, T5-T9, T8-T13)
T5	GTACTGTAGGAATCYGTACT	
T7	GTTGTTGCTTYATTGAATTT	
T8	AGGGCTATACGGATTYGAAC	
T9	GCTATAGCTCAGYGGTAGAG	
T13	CGTTACAAGGAACTTCAAGA	
T12	ACTAACATATTTWCCCGGAG	atpE, atpB (T12-T22,T20-TR14)
T22	GAGTGCCACAGATGGTYTAA	
T20	ACAGATACACCYCCATGAGC	
TR14	TATTTCCCAACCATGGGGYG	
R5	CGTGAAGCTAGTAAGTGGAG	accD (R5-R9, R8-R10)
R8	ACCGATGCTRTTCAAACAGG	
R9	GAAATTTTWGCCATTTGCAT	
R10	GGTAGGTAAGATGCTGTCAT	
R14	CRCCCCATGGTTGGGAAATA	petA, petG (R14-R242, R189-RpsbJ)
R242	GGAGATGCAGAAATAGTACTTCAAGA	
R189	CGGATGCGTCGGATGGACGTCA	
RpsbJ	GCTTATTCGGGGTTAGGATCATC	
R11	CATTTCGCTCGCCGCTACTACGGGAATGGC	trnA (R11-R100)
R100	GGCCATCCTGGACTTGAACCAGAGACCTCG	

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3. 결과 및 고찰

3.1. 제주고사리삼의 분자계통학적 위치

본 실험에서는 제주고사리삼 3개체, 고사리삼 1개체, 나도고사리삼 1개체 등 5개체의 trnL-F 지역 염기서열을 결정하였다. 20종의 *Botrychium* 계열(*Botrypus* 2종, *Sceptridium* 6종, *Botrychium* 12종), 1종의 *Helmintostachys*, 9종의 *Ophioglossum* 계열(*Cheiroglossa* 1종 , *Ophioglossum* 9종), 외군으로 *Angioptris*와 *Psilotum* 등 총 32종의 trnL-F 지역 염기서열은 NCBI GenBank에서 취득하여 사용하였다.

총 37개 염기서열을 정열한 결과 그 길이는 541 bp 였으며 이중 133 site 가 염기서열이 일정하였고 428 site 가 변이가 있었으며, 변이가 있는 site 중 331개 site 가 계통학적으로 정보를 갖는 site 이었다. 실제 한 site에서 1개 이상의 계통학적 정보가 있는 서열이 가능하므로 계통학적으로 정보를 갖는 형질 수는 이보다 많을 것이다. 이들 형질을 가지고 계통분석을 한 결과 908 단계에서 최대 절약수가 찾아졌다. 최대절약수의 CI=0.6861, RI=0.8545 이었다. 이중 1개의 최대절약수 (그림 II-2-2)와 엄밀합의수 (그림 II-2-3)를 제시하였다. 최대절약수에는 10,000번의 뷰추스트랩 분석에서 산출된 각 절의 지지도를 % 로 표시하였다 (그림 II-2-2). 엄밀합의수(그림 II-2-3)와 선택한 하나의 최대절약수 (그림 II-2-2)는 끝 분류군에서 해상능의 차이를 약간 보일뿐 전반적인 계통수 위상은 동일하였다.

trnL-F 계통수는 *Angiopteris* 와 *Psilotum*을 외군으로 이용하였을 때 Ophioglossaceae 가 단계통 임을 지지하였다. Ophioglossaceae 내에서는 크게 *Ophioglossum* 계열과 (98% 지지) *Botrychium* 계열 (98% 지지)로 대별되고 그 사이에 *Mankyua* 와 *Helmintostachys* 속이 위치하였다. 광의의 나도고사리삼속 (*Ophioglossum*) 내에서는 *Cheiroglossa* 속이 기저부에 위치하고 다른 *Ophioglossum*은 하나의 단계통군을 형성 하였다. 즉 *Cheiroglossa*를 독립된 속으로 인정하던지 *Ophioglossum*에 포함시키던지 하는 견해는 집합의 개념으로 어디까지 포함시키느냐의 차이이지 다계통군이나 측계통군은 아니라는 것이다. 광의의 *Botrychium*의 경우 기저부에 두 종의 *Botrypus* 가 측계통군으로 위치하고 *Sceptridium*과 *Botrychium* 이 각각 단계통군을 형성하는데 각각 94% 와 97% 로 지지되었다.

엄밀합의수 (그림 II-2-3)에서 한국특산속인 제주고사리삼 (*Mankyua*)의 경우 *Helmintostachys*와 단계통군을 형성하였으나 이 절은 50% 이하의 뷰추스트랩 값으로 지지되었다. 또한 두 개의 군으로 연결되는 절간 길이가 매우 길어서 이미 오래전에 두 속이 분화되었음을 제시하였다. 즉 제주고사리삼과 *Helmintostachys*의 경우 계통학적으로는 자매군의 관계가 있으나 두 속은 뚜렷이 구별되는 독립적인 속으로 처리함이 타당함을 제시한다.

rbcL 유전자의 경우도 *Mankyua* 3개체 *Botrychium* 과 *Ophioglossum* 각 1개체의 염기서열을 결정하였다. 이와 더불어 GenBank에서 24 종의 *Botrychium* 계열 (15종 *Botrychium*, 8

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

종 *Sceptridium,* 2종 *Botrypus*), 11종의 *Ophioglossum* 계열 (*Ophioglossum* 9종, *Cheiroglossa* 1종, *Ophioderma* 1종) 1종의 *Helmintostachys,* 5종의 외군 (*Angiopteris, Marattia, Danaea, Psilotum,* 및 *Tmesipteris*)을 본 연구에 이용하였다.

정열한 유전자의 전체 길이는 1,212 bp 이었으며 이중 823 site 가 염기서열이 일정하였고 389 site 가 변이를 보였으며 변이를 보이는 site 중 330개 site가 계통학적으로 유용한 정보를 갖는 site 이었고 59 site 가 단독파생형질을 갖는 site 이었다. 이를 이용하여 최대절약분석을 수행해 본 결과 882 단계에서 최대절약수가 얻어졌다 (CI=0.5544, RI=0.8462). 등가계통수는 12개가 발견되었으며 그중 하나의 계통수 (그림 II-2-4) 와 다수합의수 (그림 II-2-5), 엄밀합의수 (그림 II-2-6)를 제시하였다. 다수합의수의 경우 제시한 계통수 (그림 II-2-5) 와 같으나 엄밀합의수에서는 *Helmintostachys* 와 *Mankyua* 가 단계통군을 형성하지 않고 계통수의 기저부에서 *Mankyua, Helmintostachys, Ophioglossum* 계열, *Botrychium* 계열 등 4개의 독립적인 계열을 형성하는 것이 다를 뿐이다.

따라서 rbcL 계통수의 경우도 trnL-F의 계통수와 매우 일치한 결과를 보여준다. 먼저 Ophiglossaceae 는 단계통군이며, 100% 로 지지되며 크게 *Ophioglossum* 계열과 (90% 지지) *Botrychium* 계열 (99% 지지) 로 대별되고, *Mankyua* 와 *Helmintostachys* 가 그 중간에 위치한다. *Ophioglossum* 계열은 다시 *Ophioglossum s.s., Cheiroglossa, Opioderma* 로 구별할 수 있으나 *Chieroglossa* 와 *Ophioderma* 가 단계통군을 형성하고 *Ophioglossum s.s.* 와 구별되기는 하나 상호간의 변이 폭은 크지 않는 것으로 판단되어 광의의 *Ophioglossum* 으로 묶는 것이 더 타당하다. 그러나 3속 또는 2속으로 분리도 가능함을 보여준다.

Mankyua 와 *Helmintostachys*의 경우 대부분의 최대절약수가 *Ophioglossum* 쪽 보다는 *Botrychium*과의 연관관계를 제시하지만 이 절의 지지도는 50% 이하이고 엄밀합의수에서 이 node는 붕괴된다. *Mankyua* 와 *Helmintostachys* 단계통성도 대부분이 최대절약수에서 지지되나 지지도는 50% 이하이고 엄밀합의수에서는 붕괴된다. 즉 두 개의 속이 유연관계를 갖기는 하지만 독집적인 속으로 처리함이 보다 타당함을 제시한다. *Mankyua* 와 *Helmintostachys* 를 제외한 *Botrychium s.l.* 계열(99% 지지)은 기저부에 *Botrypus* 2종이 측계통군으로 위치하고 *Botrypus* 를 제외한 나머지군 (92% 지지) *Botrychium*을 협의의 *Botrychium* 과 *Sceptridium* 으로 나누는 것도 의의는 있으나 Ophiglossaceae를 *Ophioglossum, Helmintostachys, Mankyua, Botrychium* 등 4속으로 인지하는 것이 보다 더 개관적인 것으로 판단된다.

Ophiglossaceae 를 4개 속으로 나눌지 또는 더 세분할지는 본과제와는 다른 차원의 이야기이므로 더 이상 여기서는 논의하지 않기로 한다. 그러나 4속으로 인지하던 또는 8~10 속으로 인지하던 *Mankyua*가 독립적인 속으로 처리되어야 하고, *Helmintostachys*와 유연관계가 있음은 두가지의 유전자자료가 뚜렷하게 보여주는 공통 결과이다. trnL-F 와 rbcL 분석결과를 동시에 고려하여 볼 때, 하나는 단백질 coding 지역이고 진화속도가 느리며, 다른 하나는 이와는 반대로 noncoding 지역으로 진화속도가 빠르지만, 비슷한 결과를 보여준다. 이를 놓고 판단

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

해 볼때 한국특산속 *Mankyua* 가 *Helmintostachys* 와 단계통군을 형성할 가능성이 높다. 그러나 이들 둘 간의 단계통성의 정도는 두 개의 유전자 마커로 충분히 해결되지 못한다. 그러나 이들자료는 고사리삼과과 여러개의 속으로 처리되기 전에 우선적으로 *Helmintostachys, Mankyua, Botrichium, Ophioglossum* 등의 4개 속으로 인지되어야 함을 분명하게 보여준다. 고사리삼속과 나도고사리삼속을 잘게 여러 개의 속으로 나누는 일은 다음단계의 일로 평가된다. 즉 제주고사리삼속은 뚜렷한 한국특산속이라는 결론이다. 따라서 본 속은 진화과정 중 오래전에 형성되어 제주도의 일부지역에 살아남아 있는 고생고유식물 임이 입증되었다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

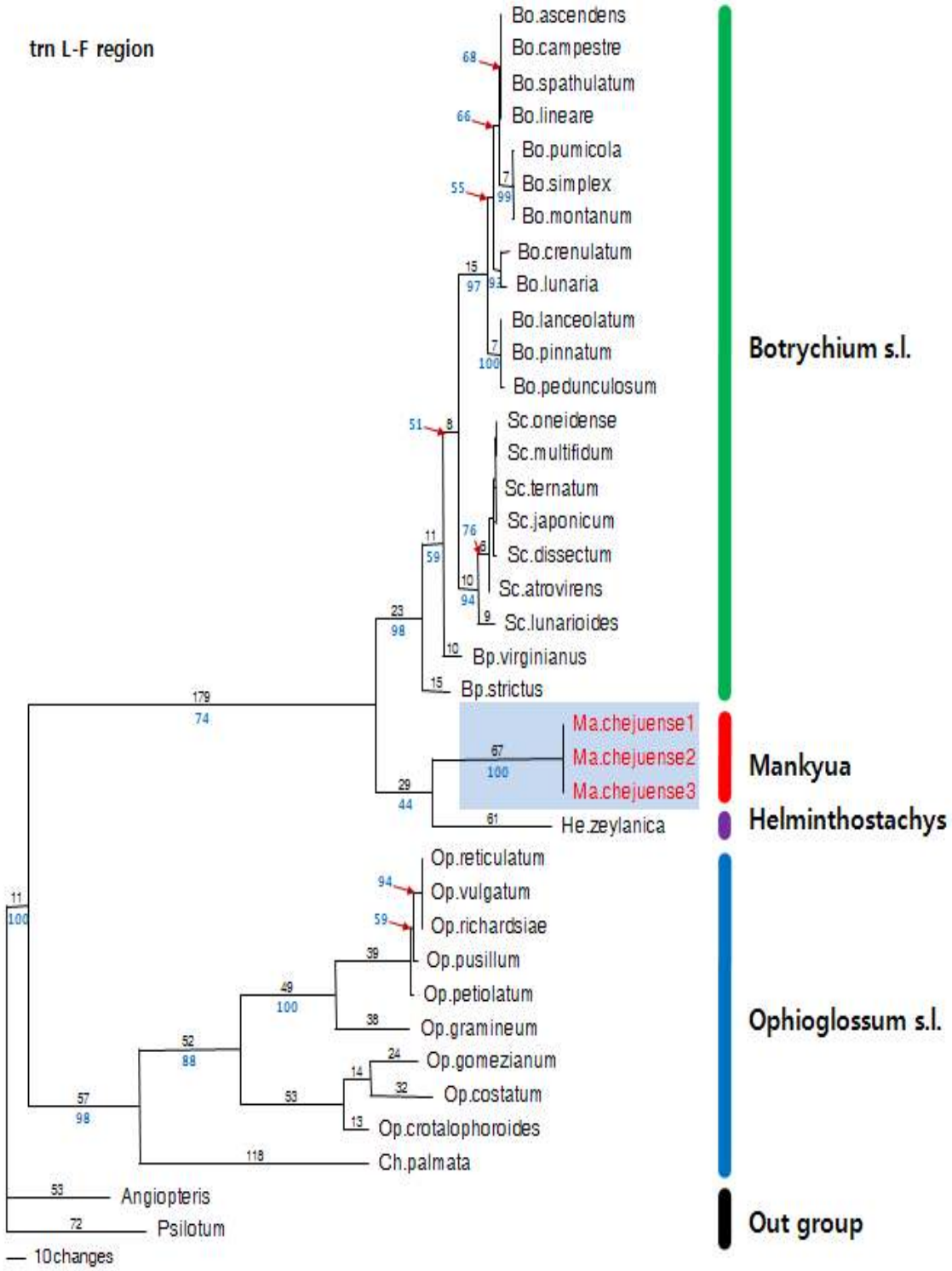


그림 Ⅱ-2-2. 제주고사리삼 (*Mankyua chejuense*)의 계통학적 위치를 나타내는 최대절약 계통수 각절의 아래부분에 나타내는 숫자는 %로 나타낸 bootstrap 값이다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

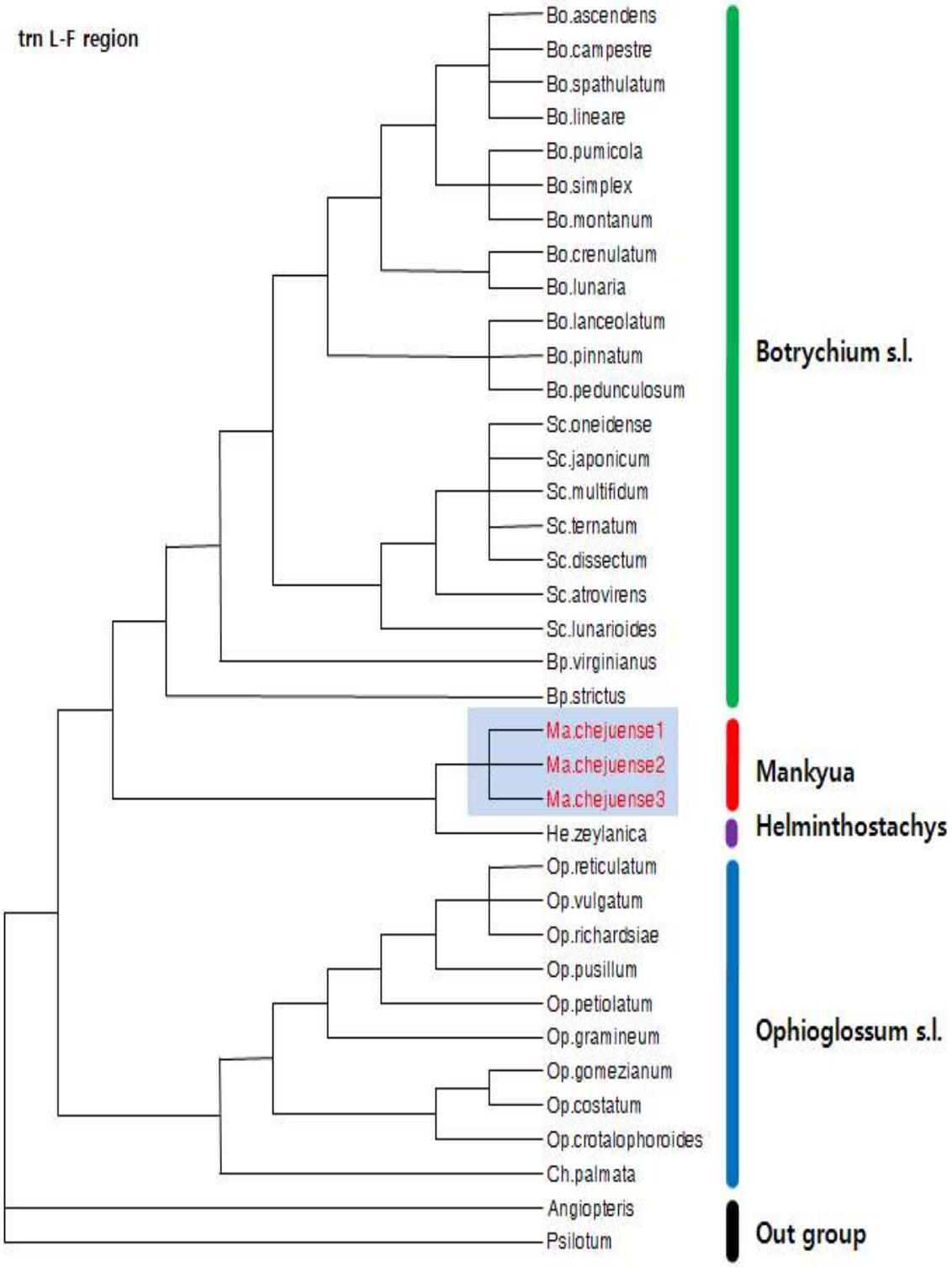


그림 Ⅱ-2-3. 제주고사리삼 (*Mankyua chejuense*)의 계통학적 위치를 나타내는 엄밀합의 계통수

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

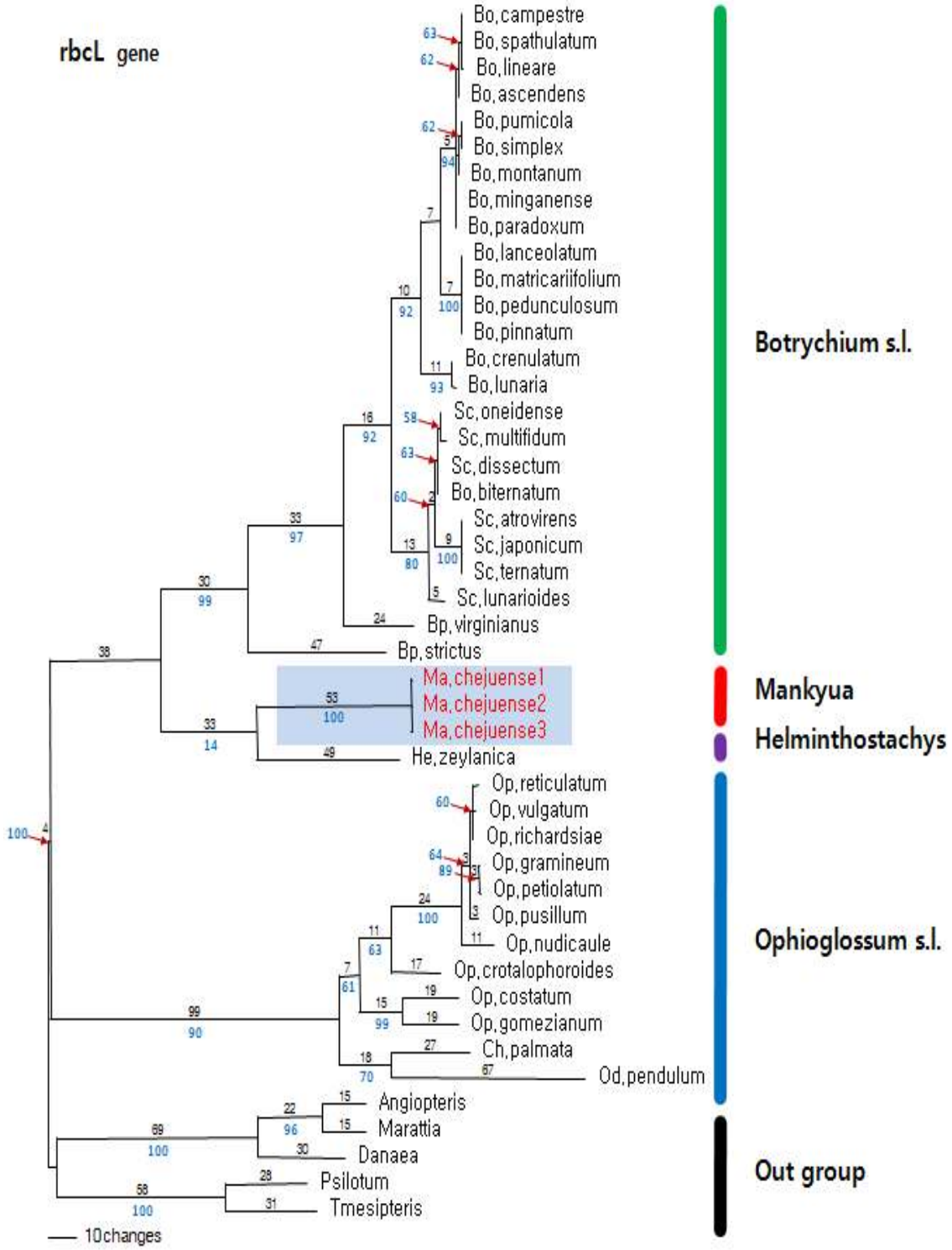


그림 Ⅱ-2-4. 제주고사리삼 (*Mankyua chejuense*)의 계통학적 위치를 나타내는 최대절약 계통수 각절의 아래부분에 나타내는 숫자는 %로 나타낸 bootstrap 값이다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

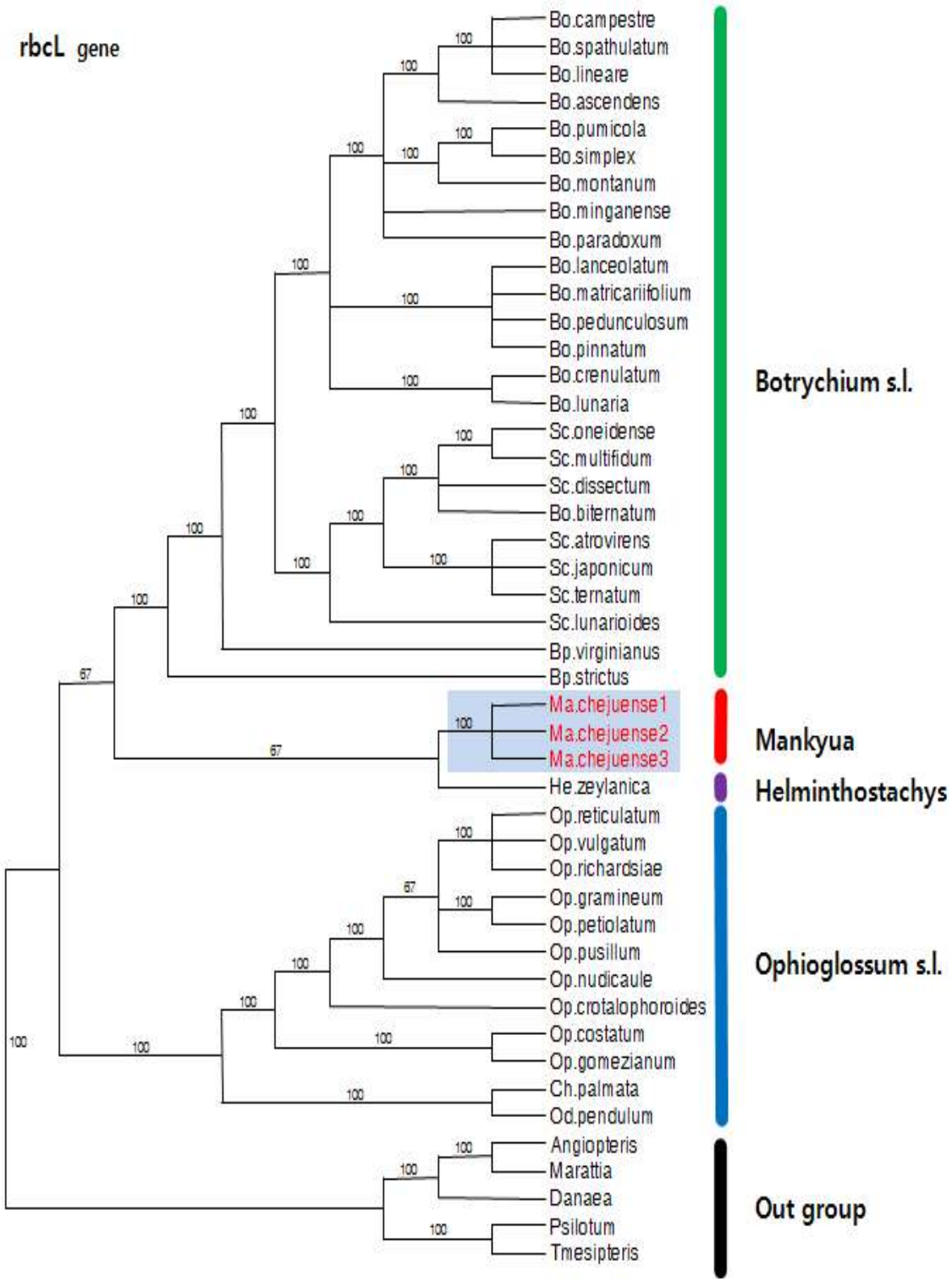


그림 Ⅱ-2-5. 제주고사리삼 (*Mankyua chejuense*)의 계통학적 위치를 나타내는 다수합의 계통수

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

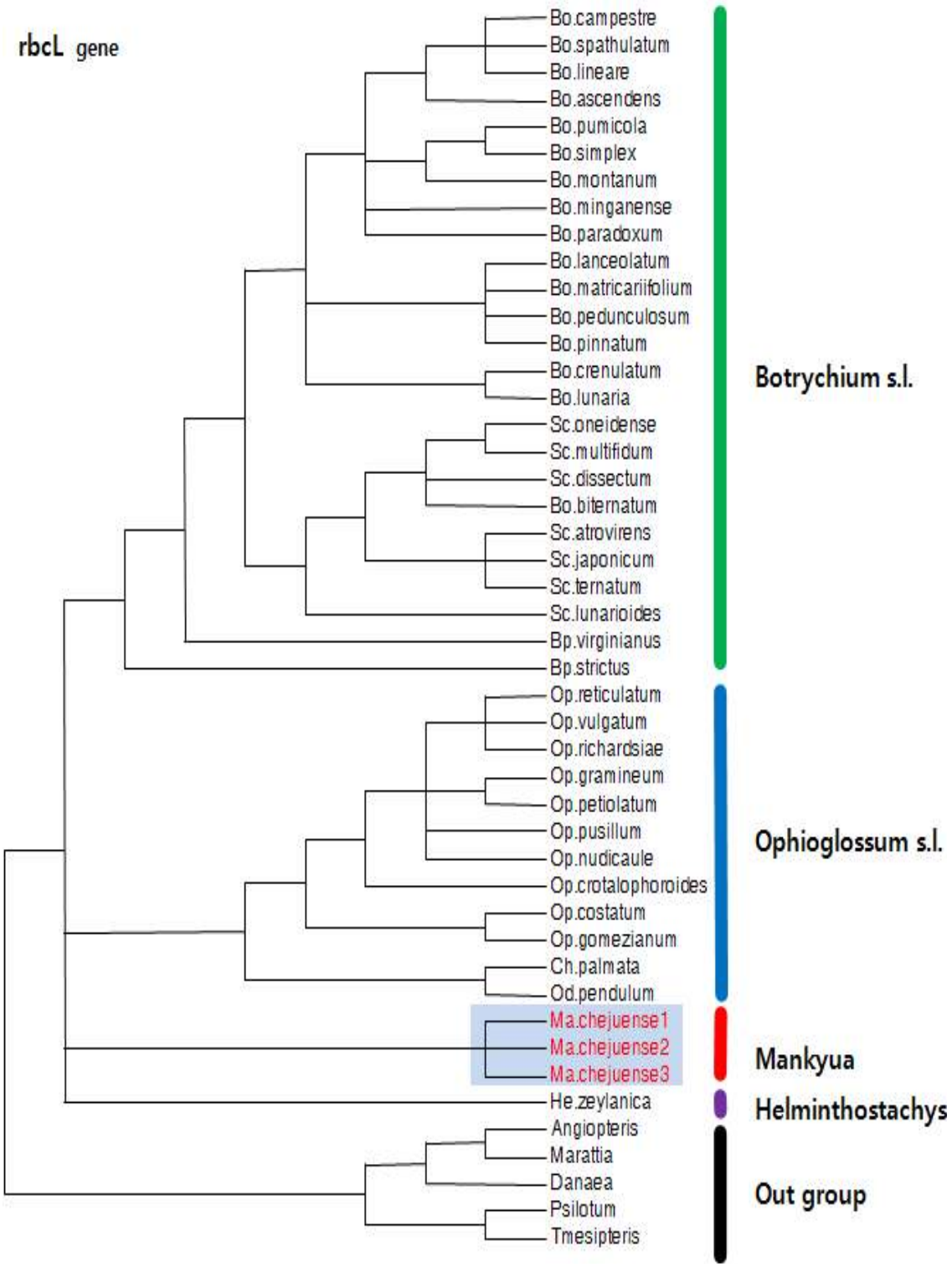


그림 Ⅱ-2-6. 제주고사리삼 (*Mankyua chejuense*)의 계통학적 위치를 나타내는 엄밀합의 계통수

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.2. 제주고사리삼의 엽록체 게놈 분석

약 160 Kb 정도로 추정되는 제주고사리삼의 엽록체 게놈을 그 10분의 1정도 해독하였다 (그림 II-2-7). 해독된 지역은 3개의 지역으로 구성되는데 trnQ, trnA(인트론 포함), ndhJ-petG 지역 등이다. 이중 ndhJ-petG 지역은 ndhJ, ndhK, ndhC, trnM, atpE, atpB, rbcL, accD, petA, petG 등 10개 유전자와 이들 사이의 intergenic spacer가 포함된다. 따라서 총 12개 유전자와 이들 사이의 spacer 및 인트론 등이 포함된다. 이들 해독지역의 유전자 지도는 그림 7에 표시하였으며 해독된 염기서열을 annotation한 결과는 그림 II-2-8에 표시하였다. 아직까지 이들 유전자들의 염기서열로만 보아서는 엽록체 게놈의 구조적 변화를 예측하기 어려우나 여러 지역에서 부분적인 서열이 관찰되는 것으로 보아 역위와 같은 현상이 존재할 것으로 추정된다. 각 유전자의 염기서열 정보는 한국멸종위기생물종의 유전자 자원 홈페이지의 데이터베이스에서 확인 할 수 있다.

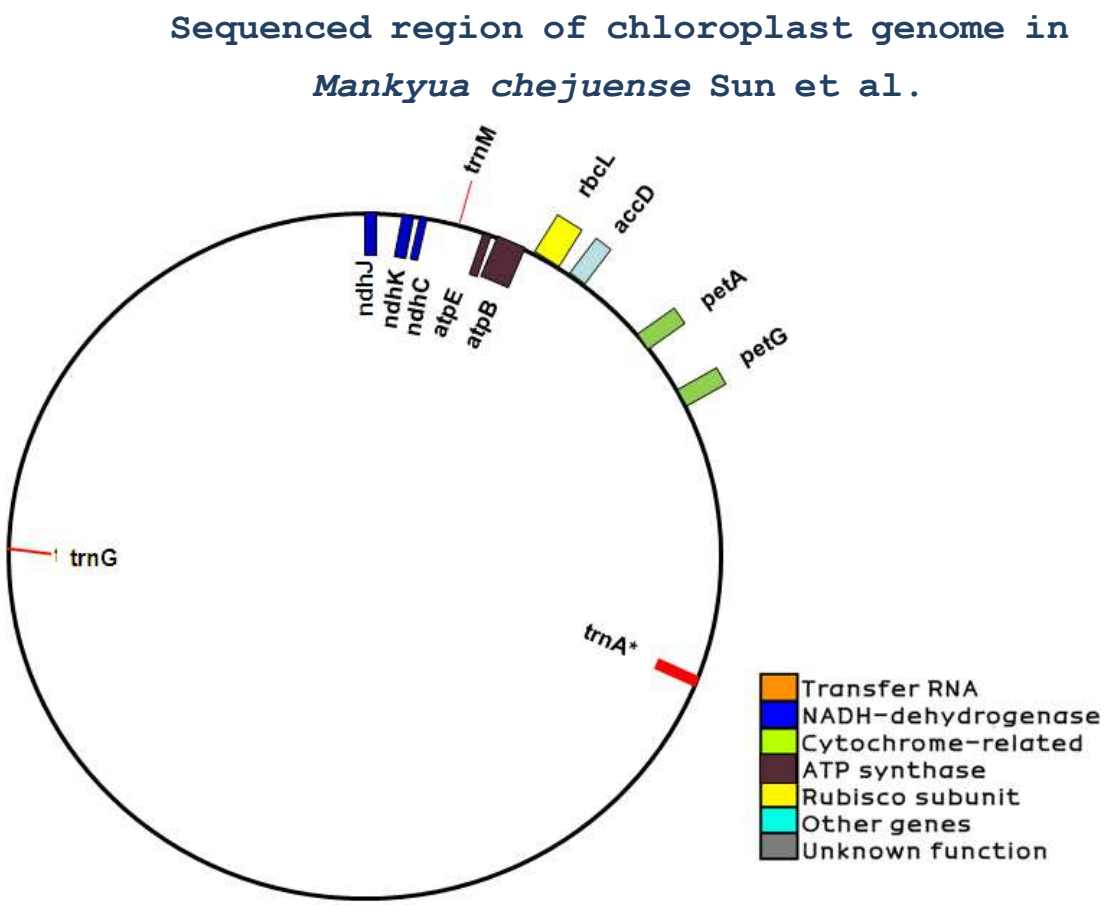


그림 II-2-7. 제주고사리삼 엽록체 유전체의 분석지역 유전자 지도

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 Ⅱ-2-2. 제주고사리삼 엽록체 유전자의 염기서열

Notes) **Sequence in red color - Coding segment or Exon**
Sequence in black color - Intergenic spacer
Sequence in blue color - Intron
Sequence in green color - Coding segment within intron
The direction of arrow indicate transcription orientation

```
   1  TGTAAATCCC ATTTATATTA GCAGAAGGAC TATCTGTTAG ACATTGATTC ATTGTCCTTC GTCCACGAAC TTTATTCAGG TAATACCTAA CTATTTGTTC
 101  TAAAGTTCTA TCTGCCGCCT CAAGTTCATT AACTCGATAA TGATTAACAT CTGCAAGGAT TACATCAGAA TCGGAAGATA GAGACGCTCG ATCTACAAAA
 201  TTCTGTAAAT CTTCCTGCAG AATACTGGAA GTACATGTTG GAGTTAATAC GATCAAATCG GGACGTTGTT CTTTATCCTT TCGATTTATA TTATTAACAA
 301  CTCGTTCTTG AGATCCACGT GCTAATACAT GGCGATCCAC CATGCTAGCA GTTACTGGTG TGAAATCTCT CTCTCTTTCT AACATAGAAC GCATTACATT
 401  GAAATAATCA TCCCCCAGAG GAGCATGCAT TACAGCATGA ACATTTTTAA AAGAACTAGC TACTCGTAAA GTCCCAATAT GAGCAGGGCC GGCATACATC
 501  CAATATGCTA ATTTCATGAA TTGTTAATTT CGTGGTTTTA CTATTATACA TTGAAGGAAG ATATCTCTCA CCTTATCAAG CTTATCATCG AAATAATAGA
 601  TTAGAATATC TGTCAATGAG ACGCTGCTAA CGGGAAATCA ATCGTGCCTC CATTACAATC GCACTATACC CCATTTGGAT ATCATAAAAC AGCATGATAT
 701  ATTAAAGCCA AAGAAAATCT GGGACGGAAG GATTCGAACC TCCGAGTGGC GGGATCAAAA CCCGATGCCT TACCACTTGG CCACGCCCCA AATCTATAAA
 801  ATATTAGTAA TACTTAATAT ACTCATCTTC CTAAAATTGT CAACCTATGC ATTTTGATCA AATTAATTAA ATGAATTCAG TAAGTAAAAA AATAAAAAGT
 901  TTTTAAATAA TAGAGATTGA GTGAATGATT CATTAGCTAT TTGTTCGTCG GGTTTGGTAA AATGTTGTGG AGAATCTATC ATAGCCATAA AACCAGTAGC
1001  CTTTGGAATG AAGTACATCC AAAGGATATN GTAGTCACAA TTTANGGATC GATACATTAT CCTAAAAGAG AATTTTTTGT TACTGGAGAA TAAAAATGCT
1101  AGTTATGCTT AATGCCTATT CGGAAAGTAA CCTGTATTTT ACCAATATTC AGCTTGCCAA ATTACCCGAA GCTTATGCTA TTTTCGATCC AATTGTGGAT
1201  GTAATGCCAG TATACCAGGT TTTCCTC
```

tRNA-UCC ↑

```
   1  GTCGCCGCTT CAATCTGGTT TCTGGCATGG CTTCTGCTGA ATTAATTTGC TAGCACTATG AAGTTTCTTT TTTCATTTTC CTCCATTCAA TCACAATTGG
 101  GTAAATTCTC AAAACATGGA GATCAAGTAA CTGTCAGAAT GAACAGAGTT CAATTTCATT CGTATTTAGT AAGCATCTTG TGACTCATAA AAATTGGGTA
 201  CAATGTAATC TTTGCGTAAG GGCCAACCAA TCCAACTTTC AGGCATTAAT ATGCGTTTAA GATATGGATG ATTCTCATAG ATAATTCCCA ACATATCATA
 301  AGACTCCCGC TCTTGAAAAT AAGCACTCTT CCGAATCCAG AAGACAGAGG GAATTCTGGG ATCTTTTCTC GAAACCAGTA TTTTTATACA TATCTCTTCT
 401  GGCTGATCCG CATTATCATG TACTTTCGTG AGATGATATA CACTAGCCAG AAGTCCTCCC GGCATCACAT CATAGGCACA TTGGGAACGA AGATAATTAA
 501  AACCATAAGT ATATAAAGCG ACAGCTACGG AAGGCCAATT TTCAGATTTG ATTTGTAAAA TTTCAACTCC TTGATAATCA AAACCCAGGG GTCTATGAGC
 601  CAATTTATGC TTAGCTAGCC AGGCAGATAA TCGTCCCCGC ATTTTAATTT TTGAATCACT ATTGGTAATA CTATCATAAT TGAATATCAT TCTTCTATTT
 701  ATTTTCCCAA AAATATATCC ACTTCCTCGT TCCTCAATAG TAATCCCTCA TTATTTGATT CAACACTTAT TTTAGACTCG TCTGAAGCTG TCTTTGAAGG
 801  GATATCTAAG AAAGTTTTTG AGAATTGATT GGAGAGTTGT TGATTTTNTT TTTTAANANG AANTCTAATT NTAANNCTAA ANTGANGTTT GAGAAGGAAA
 901  ACCCCATTTT TTTTTTTTGA TTCAAAAGGA TCCCTATATA TTTCTTGAGC TACTTTCTTA CGGAGTTTCG TTATAGCATC TATAATAGCT TCAGGCTTAG
1001  GTGGACAACC CGGCAAGTAA ATATCTACAG GGATCAATTT ATCCACACCG CGGACAGTAC TGTAGGAATC GGTACTAAAC ATACCCCCTG TTATAGTACA
1101  GGCCCCCATG GCAATCACAT ATTTTGGTTC AGGCATTTGT TCATATAACC TTACTAAGGA AGGCGCCATT TTCATGGTGA TAGTACCTGC TGTTACTATG
1201  AGATCGGCTT GTCTGGGACT AGATCGTGGT ACTAGACCGT AACGATCAAA ATCGAATCGT GAACCGATTA ATGAGGCGAA TTCAATGAAA CAGCAACTAG
1301  TACCATAAAG TAATGGCCAT AAACTGGAGA GTCTAGCCCA ATTTGCAAAA TCATTAAGAT TCGTTAAAAA AATTGAATTC GGTGTATCCC GATCAAGAGA
1401  GGAAAACTCT GCAGAATTAA TCAATGGATT CATGAAATGA TTGAAATTCT TATTATAATC CGTGAATCTT GTGGTTAAGA CCATTCCAAT GCTCCTTTTC
1501  GCCATGCATA GGCCAAACCA ACAATTAAAA TAAATACAAA AATTGGGGCT TCAACGAAAG CGGGTATGCC TAATTCATCA AAACTTGCAG CCCATGGATA
1601  AAGGAAGATT GTTTCGACAT CAAAAATTAC AAAGACTAGT GCGAACATAT AATAACGGAT CTGGAATTGG ATCCAAGCAT TTCCCGTTGG CTCTATACCC
1701  GACTCATAAC TAGTAAGCTT TTCTGGTCTT TTACTACTAG GTGCTAAAAG TCCTGATATT AGAAATGCTA ATATAGGAAG AAGACTAACT ATCGATAGGA
1801  ATATCCGAAA GGATTCGTAT TTAGGGAGCA AAAACATAGA TTATGTTCCT GTTGCAAAAA TTGGATAACA TGAGTCCTTC TCTATCTCAT TATTTTCCAG
1901  AAAGATATTG GGTCAATTTT GAATATCAAT AAAGATTCTG TTTGATTAAT AATATGCTAT CTCTATAGAG TTTTTCTAAT GTAATAACTA TTTCAAAGAA
2001  TCTACCGTTT GAAGAGTTTA TGCATAATTG TGAAAAATCG TTTCAGGAAT TAGGGCTATA CGGATTCGAA CCGTAGACCT TCTCGGTGAG ACAGATCGAA
2101  ATCAACAAAA ATAGAAATCC GAACTGTTTC AGGAACCCAA CATGCATATC TTTTCCGCAT TGGGCTCATT CATCGACCAA AGAATGCATT AGTCGATTTA
2201  CCATCCTTCT TCCATTAGTG GAATAATAAG ATGGTTCCGT GTGTTCGACG AATTCCTTCG AACCGATCCC AAAGTCTTTC AAGAAGTTTC TAAATGTTGA
2301  CACAGGTTTG CTTTTCCGGG CATGGATTTA CTCAAAAAGA GCCTCTATCG TTTTGGAGAA CTTCATACAC CTTGAAGCTC ACAGGACGAG AAAAAGAATA
2401  TCTTGAGGTC CTCGTAACTA CCCCTACCAT CCCTAGCATT GAATGACCTA CAATTTACCA TATCAACTTG ATTATCAATC CCTTTTCCAT TACTGAAAAA
2501  TTGAATCTTT TGTTATGCTA CCGTTCTCCC GAAATAATGG ATAGAGTAAA ACACAAATCT TTCACTTTTA GCGAATCGGG AAAATCGATG AACTTACTAT
2601  TCTTGAAAAG CATCGGCGCA CGTGTAAACG AGGTGCTCTA CCGCTGAGCC ATAGCCCTTA ATTACTACTA ATTTTATTAC ATTATCTTAT CTATACTTAT
2701  TAGTTCTTGT CAAGCTATAT GTTACATCAT GGGGAACATT CTAATTAAAT CAAATCTTTA TAAAGCTTAT TGTTTGCAAT TCCATATATC TGTTAGAATA
2801  GGTATATCTG TTAGAATAGG TTGAATTCCA ATTAAAAAAA AAAAGGACCT ACTTACCTCA TTGGTTAAAG TATCGCTTTC AAACGGCGAG AGTCATTGGT
2901  TCAAATCCAA AAGNNGGAAA ANCTTTTNGG ANNCCGGGGG TTTTANGGAA TATCCAATAA GCTTTNCNTG ATGAAAGGAA AAGGGGGGAA GGAAGGTAAA
3001  TAAAAAGGAA CGGTAACTCT CCAGTGGGTA GAAAACGTCC TCTATTTTGT CATACCTATT TCTGAGCAAT AAATGGATTA ATGCAAAATC TATTCTCAAA
3101  TAATATTTAT AACATCTCAA TTGACATTTA TTGTTTCTAA TCTTGCTTTT GCTCTTTTGA AGGCTAAATT AGCTTCAATA GTTTCTTTTT TTCCCTTTGC
3201  TCGAGCCATA TCTGTTTGGG CTTTCTGAAA AGCATCCTGA GCTTCCTCGG GATTAATATC AATAGCTCTT TCCGCTTCGT TCACCAATAT AGTTATTTGA
3301  TTGTTATCTA TTGTGGCAAA ACCCCCCATC AAAGCCATAT TAGACCATTG TTCATTAATA CGTATTCTCA TAACTCCAAT ATCTAGGGCT GTTAGAAGTG
3401  GGGCATGATT AGGCAAAATA CCGATTTGAC CACTATTAGT GGATAGAATT TATTCCTGAA CCTCGGAATT CCAAACAATC CGATTCGGGG CCATTACACG
3501  AAGATTCAAT ATCATCTTTC TAATCAACTC CCCGCTTGTA AAATCGCANC TTTTGCAGCT CGGTTCACCA NNATTACCCA ATAAATAAAA AGCTTGTTCG
3601  GGAAGCTTGT CCAATTCTCC GGAAAGAATC ATTGGAAAAC CGTTANTGGT TTATATCAAG ANTAACATNN CTCCCTGGNG AACCCGTAAA AACTTCAGCT
3701  AGCGNACAAA GGTTTCNANA GGAANCGTTC AATCTNTCGC GCTCTNGCTA CTGTTAAACG GTCCTCCTCT GATAATTCAT CCAGTCCAAG AATAGCTATA
3801  ATGTCTTGAG GTTCCTTATA ACGTTGCAGG GTTTGTTTAA CCCCTTGGGC AGTTTCATAA TGCTCCTCAC CCACAATCGA GGGTTGCAGC ATAGTTGAAG
3901  TTGAATCTAG AGGATCTACG GCCGGATAAA TGCCCTTTGC GGCTAATCCT CTTGAAAGAA CAGTAGTAGC GTCTAGATGT GCAAATGTTG TAGCAGGAGC
4001  TGGGTCAGTC AAGTCATCAG CAGGTACGTA AACTGCTTGA ATGGAAGTTA TAGACCCTTC CTTAGTAGAA GTGATCCTTT CTTGTAAGGC ACCCATCTCT
4101  GTGCTTAGGG TCGGTTGGTA ACCCACGGCA GAAGGCATTC TACCTAATAA GGCAGAAACC TCAGATCCTG CTTGTACAAA ACGGAAAATA TTATCAATAA
4201  ATAAAAGTAC ATCTTGCTTA TTAACATCCC GGAAATATTC GGCCATTGTT AAAGCAGTTA AGCCAACCCT CATGCGAGCT CCTGGCGATT CATTCATTTG
4301  ACCATATACT AGAGCTACTT TTGATTTCGA TACATTTTGT TCATTAATGA CTCCTGATTC TTTCATTTCC ATGTAGAGAT CATTACCTTC GCGCGTACGT
4401  TCCCCCACTC CGCCAAATAC AGAGACACCC CCATGAGCTT TGGCAATGTT ATTGATCGAT TCCATGATAA GAACTGTCTT TCCAACTCCG GCTCCTCCAA
4501  ATAATCCAAT TTTTCCTCCG CGACGATAAG GAGCTAGAAG ATCCACCACT TTAATGCCAG TCTCAAATAT GGATAGTTTG GTATCCAATT GTGTAAAAGC
4601  AGGGGCAGAT TTGTGAATAG AAGACGTCTC GCCAATGTCT ATAGGGCCTA GATCATCAAC TGGTTCTCCA AGAACATTTA AAATTCGTCC AAGAGTAACT
4701  TGACCAACAG GAACGCTGAG AGGAGCTCCC GTATCGATAA CTCTCATTCC TCTCGTTAGA CCATCTGTAG CACTCATAGC TACGGTTCTA ACCTTATTAT
4801  TTCCCAATAA TTGCTGTACC TCACAAGTAA CATTAATCTG CTGACCTGCT GGGTTTTGTC CTTCGACGAT TAAAGAATTA TAAATATTGG GTGTTTTGCC
4901  TGGAGAAAAA GTTGCATCCA GTACTGGACC AATAATTTGA GTAATATAAC CGATATTTTG TTCTATTGAA GTGGAAGCCC TAAAAGTAAG AAAGTTGATT
5001  TTCATAGAGA TTCATTAGAT TAATTTCATT CGATTACTAT ACCAAGAAAA TGTTGGGCAT CGAATTATCG ATCAATAATG TTGGAAAACT CAAGATTTAA
5101  ATTCTTCATC AATTTATTGT ATTGTACAAT GTGGATTGAG AATAATCATT GAAACAAGTT CCTTAAACAT CCATAGAAAA TGGAAATCAA AAATTATTAG
5201  TTTTTCTAAG GAATAATTCA ATGTATATGT ACATATGCAT ATGCATTATA CGGAGAAAGA ACAATCCATT CATTGATCCT CCAATTTTTA TTGTTCCCCT
5301  GACCGAACTA TCTTCTCTTA TTTCCATTGG TCAGTCCAAT AGTAGTTATA TTTCTGAATC AATATATAGA TAAAATCAAA AAGACATTTC ATTATTAATT
5401  GCATCAGGCG AGGGATCTAA AATCTAGGTT GCATTATGCA TCATGTGCAA TATAAAATGT TAGTGTTTCC CTTTCAAGAG AAACTTCTGC GTGAATATCC
5501  TACGAGTCTA TTGAAAACGG TTTACGTTCC GTAGTGGATA TTTCATTTAT GCCGAGCAGA CCTCATCCTT GCAGGAGTAA TTGATTGAGT TGTAAGGAGG
5601  GACCTATGTC ACCACAAACG GAGACTAAAG CAAGTGTTGG ATTCAAAGCT GGTGTTAAGG ATTATCGATT GACCTATTTT ACCCCTGATT ATGAAACCAA
5701  GGATACCGAT ATCCTAGCAG CTTTTCGAAT GACTCCTCAA CCTGGAGTAC CAGCCGAGGA AGCAGGAGCT GCAGTAGCTG CTGAATCTTC CACCGGTACA
5801  TGGACCACTG TATGGACCGA TGGACTTACT AGCCTTGATC GTTATAAAGG CCGATGCTAT GATATCGAAC CTGTTCCAGG GGAAGAAAAT CAATACATTG
5901  CTTATGTAGC ATATCCTCTA GACCTTTTCG AAGAAGGTTC TGTTACCAAC ATGTTTACCT CTATTGTAGG TAACGTATTT GGATTCAAGG CATTGAAAGC
6001  TTTACGGTTG GAAGATTTAA GAATTCCCCC TGCTTATTCT AAGACTTTCA TAGGCCCGCC TCACGGTATT CAAGTCGAGA GGGATAAATT AAACAAATAT
6101  GGTCGTCCCT TGTTAGGATG TACCATCAAA CCGAAATTGG GATTATCTGC CAAAAATTAT GGTAGAGCTG TTTATGAATG CTTACGTGGC GGGCTTGACT
6201  TCACCAAAGA TGATGAAAAC GTGAATTCCC AACCGTTCAT GCGTTGGAGA GATCGTTTCC TATTCGTGGC AGAAGCTCTC TTCAAATCGC AAGCCGAAAC
6301  GGGTGAAATT AAGGGGCATT ACTTGAATGC TACCGCAGGT ACTTGTGAGG AAATGTTAAA AAGAGCAAGA TTTGCTCGAG AATTGGGAGT GCCCATTGTA
```

ndhJ ↑

ndhK ↑

(overlap)

ndhC ↑

tRNA-CAU ↓

atpE ↑

atpB ↑

(overlap)

rbcL ↓

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
6401  ATGCACGATT ATTTGACAGG AGGGTTTACT GCAAATACTA CTTTAGCCTT TTACTGTCGG GATAATGGTC TACTTCTTCA CATTCATCGT GCAATGCATG
6501  CTGTTATTGA TAGACAAAAA AATCATGGTA TGCATTTCCG CGTATTGGCT AAAGCTTTGC GTATGTCTGG CGGGGATCAT GTTCATGCCG GGACTGTAGT
6601  CGGTAAGCTT GAGGGAGAAC GCGATATAAC TTTAGGCTTC GTTGATCTAC TTCGTGACGA TTACATTGAA AAAGATCGAA GCCGCGGCAT TTATTTCACC
6701  CAAGACTGGG TATCTATGCC AGGTGTGCTG CCTGTAGCTT CGGGAGGCAT CCACGTTTGG CATATGCCTG CTCTAACTGA AATCTTCGGG GATGATTCCG
6801  TATTACAATT CGGTGGGGGA ACTTTGGGGC ACCCTTGGGG TAATGCACCT GGTGCAGTAG CTAATCGGGT TGCTTTGGAA GCTTGTGTAC AGGCTCGTAA
6901  TGAAGGACGT GATCTTGCTC GTGAAGGTAA TGAAATATTC
```

```
   1  TGGAAAGAGA TTAAGTTCGA ATTTCAGGCA GTTGACACAC TTGACAAATG AAATTAAATT CCTTATTTCA TCTTGCTTCT CATTTCAGGT AATACTCCTC
 101  TAGCAGATTA AGCGAAAGAA TATTGGGAGA GAGAGATAGA TGCATATACT ATTCTCTCCC TCTCAATATC CTGTCTGTAC GGAACGAAGT AGGGTTGGTA
 201  ACTCAGTGGA TCAGAGTTTA TGGTTCCGAA CCATAAGGTC GAGGGTTCGA ATCCCTCCTA GCCCATTGAA AATTTCTATT TTATCTTTCC CATATAAGGA
 301  GTCCCATTAG GAAGAACTGG AAGATATACT TCATTTTTGG TGAATTCCCA TAATGAATTA TCCAAGGCTT TTGGATAATC GAACAATAAG TTCTAGCATA
 401  CCATTAGTAA TACGAAGGGA TTAATTAAGA TTAATTCTTA ACCCATTCCG ATCTGAATCC TTTTCTCTTT CTAAAGAAAA AAGAATTCTC TGTGTTTGTG
 501  ATTGCATGAC TAGTTTAAAG AGTTCGAGAA GTATCAAAAT TGTTTATTTA GCAAAAAAAG ATAGATGAGG AAATTATTAC GTCTCTAGCG GATTGGTTTG
 601  AAGACAAACG CAAATATGGT GGATTGATTG GAGCTCTTAT TGAAAAAGCT ACCAAAAGGT ATGTTCTTAG TGAGAGGGAA AGAAATAGGT CGATAAGTAT
 701  TGACACTAAT AAAGGATTAT GGACTCGGTG TGACAATTGT GAAAATATGT TATATGTTAA ATTTCTGAAA CAGAATAAAC GTGTTTGTGA AGAATGCGGT
 801  TATCATCTCC AAATGGATGG TACAGAAAGA ATTGAACCTT TAATTGATCG TGGCACTTGG ATTCCTATGG ATGAAGATAT GGTTGCGCGA GATGTTCTTG
 901  AATTCCATGA TGAGGAATCT TATAAAGACC GTATTGCTTT CTCTCAGAAA CGCACAGGTT TGACCGACGC TATTCAAACA GGTATAGGAA AGTTAAATGG
1001  TATTTCCGTT GCACTAGGTG TTATGGATTT TCAATTTATG GGCGGTAGTA TGGGTTCTGT AGTGGGTGAA AAGATTACTC GTCTAATTGA ACGTGCTACT
1101  CAAGAATCTC TCCCATTAAT TCTTGTTTGT TCTTCTGGTG GAGCACGCAT GCAGGAAGGG ACATTGAGTC TAATGCAAAT GGCAAAGATC TCATCTGTTT
1201  TACAGATCCA CCAGGTACAA AGAGGGTTAC TTTACATAAC AATCCTTACT TATCCTACTA CCGGCGGTGT AACCGCCAGC TTTGGTATGT TGGGGGATCT
1301  TATTATTGCT GAACCTAAAG CATACATTGC ATTTGCTGGG AAGAGAGTGA TTGAACAGAC ATTGCGTCAA AAAATACCTG ATGGTTTTCA AGTAGCTGAA
1401  TCTTCATTCG ATCATGGTTT ACTCGATTTA ATAGTACCGC GTAATCTTTT AAAAGGTGTT CTTAGTGAGA TATTCGAACT TTATGCTTCA GCCCTATGCA
1501  GAATGTGAGT CTAACAAATT CTTGAAATTA TATTTGATAG ATGAATCCTT ACTGAGTAAA TGAATAGTTC TGATACAATA TATCCTATTT GGATGGAAGG
1601  TCCTTTTATA GCAATCAACT TTCGAGTTTA GTAAGATGTG GTATCTTATC AAATTATCCA ATTTGGAAAA TCCCAAAAAT TTTTCTCTAT CGAAAGCTTA
1702  TTAATAAATC CAAGTAAGAG ATTGCAGAAC TTTCCCATGC ATTTGTAAAG AGCACAGTAT AATAGATATG GGTATGTATA TGTATGAGCT CCAATGATCT
1801  CATCCATATA GTTCTATAAA AAAAAATAAT TATTCGTTGA TATA
```

accD ↓

```
   1  AACTCTAGGA TTTGCTCACG ACAAGTACGT AATATCCTGT TTCGTTTCAA CCTTTCCAGT TATCTTAGAT ACTGTTTTTA AATATTGGAT CTTTCGCCAT
 101  TTGAATCGTA TATCTCCCTC GATTGTAGCG ACTTATCATA CAATGAGTGA ATAAGAAATG ACTGTTTTGA AAAGATGGTC AAAAGAGATT GTCTTTATAG
 201  TTACCAGAAT AGCATAATTT TATAAAATAG CTTACAACCA GGATGTCCAA TGGCAACCTA TTCGAATAAA TATTTGATAC TAATAATCGA ACTATGCAGA
 301  ACAGGAATCA TAATAACTGG GTGAAAGAAT GGGCGACTCA ATCGATTTTG ATTCCGATCA TTTTATGTGT AATAATCTGG CCATCTGTAT CACATGCCTA
 401  CCCCATTTAT GCGCAGCAGG GCTACGATAA TCCCAGAGAA GCAACTGGAC GTATCGTATG TGCCAATTGT CATCTAGCAA AAAAACCTGT GGATATTGAG
 501  GTTCCACAAT CGGTACTTCC TAATACTGTA TTTGAAGCAA TTGTTAAAAT CCCTTACGAT AAGCAAGTAA AACAAGTACT TAGTAATGGA AAAAAGGGGG
 601  GTCTAAATGT AGGAGCTGTC CTTATTCTAC CTAAGAGGTT TGAATTAGCT CCTCCTGATC GTATTCCTGC CGAAATGAAG GAAAAAATAG GGGATCTCAC
 701  ATTATTTCAA AATTATCGTC CTGAAGATAA GAATATTATT GTAATAGGAC CAGTTCCTGG TAAAACATAT AGTGAGATCG TATTTCCTAT TCTCTCGCCA
 801  GATCCTGCTA TTGATAAAGA AGCGCATTTT TTGAAATATC CCATTTATG TAGGGGGAAA TAGAGGTAGA GGACAGATCT ATCCCGATGG TAGTAAAAGC
 901  AATAATACGG TTTATGGTGC TTCTACAACA GGAATAATAA CTAAAATATT ACGCAAAGAG AAGGGTGGAT ATGAAGTAAC TATTAAAAGA ACATCAGATG
1001  GTCGTCAAAT AGTTGATACT ATACCTCCAG GACCAGAACT TATTATTTCA GAGGGTGAAT CTATCGAAGT TGATCAATCT TTAACTAGTA ATCCCAATGT
1101  TGGTGGATTT GGACAAGGAG ATGCGGAAAT AGTACTTCAA GATCCTTTAC GTATTCAAGG TCTTTTATTA TTCTTCGTAT CAGTCATTCT GGCACAGATA
1201  TTCCTGGTGC TTAAGAAGAA ACAGTTTGAA AAAGTGCAAT TGGCTGAAAT GAATTTCTAG ATATGCATGT CCTAAATATC GACAAAATTT GCCAAGGAAT
1301  TTTTAGATTT TACCATCAAT TGTGAGAGTC CCTTTATTTT CCTTATTCCT AACGAAATAA AGTGAGTTAG AAATTGGTAT GTTATAAATG AATATGTTTG
1401  TCCCATTTGA ATGGGAAGAT TCTAGTATTT TTTTTCTGG TTCGTTTTTG TAGAAAAAAA AAAAAGTTTT AGAACTATTG AGTAAACATT ATGGGAAGTT
1501  CGGAAGCTTG ACCTAATTAA AAAATAAAAT TATTTCATAC ATACAATATA AAAGATATTA AAATTTATTT TTCCTTAACC GATTAACTTT AAGAAAGCCC
1601  ATCTTATTTT ATTTTGTTTT TCTACTTTGT TATGAATAGA TAGAAAATGT TATCTAAATT TGGTTCATAT TATTCAATAT AGTGATAGAG AGCTCTTCTG
1702  CTTGAATTCC CTGAAACGAT TCATTCTAAC GTTCTATCAT CAATACGAAT AGTTTGAGAT TAAATTATAA ATAATGGAGT CGGAAAGACT TTATCTTCCA
1801  ATAGAATCTG GAACAGGTAA AGTCTCTCCA ACTCGAGAAA TTGTCTATCC TCCTGAATAG AAACAAAATA GGCTGTCCCT C
```

petA ↓

```
   1  CGCAGGGGCG CTCTCCGTAT ACCAGAACAT GATTAGCTCC GTATATTCGT GTAGGACAAG GTTAATTACT AGAACATATA GTAGTTAAAA GTGCAGAATC
 101  TACCAATACA TTTCAGAAAC CTTGTTAAGT TGTCAATCAT ATACCAGAGG TATCTTTAAA ACGTACTGGA TCAGTATAGT CAGCCTTCTC TAAACGCGGC
 201  AATGGAACTT CAGAACTTGA AAGTAGTATT CGTATATAAA TTTTGACCTC TTGTTAATAT CTTACCATCA TTTAACATTA CAAAAATTCC TTATTATATT
 301  AACTGATGGA AGATCCCTTA AAATCAAGGA TATCTCGTGA GCTTCGAGAT AAAAACCGTG AATAATCTAC TCTTGAAGAG GATTTCTAAA GATTCCAGTG
 401  AAATCATAGG AATGGTTTGA TTGAAGCAAA AATGGTACTA ATGGTGAAGT TCCTAGAAAG TTCAAAATTC TAAAAGAGAC TAAATTGGGA CTTGATTCAG
 501  TATTATTTGT TCAAAAAGCT TGATTCAGTA TTACTTATCC AAAAAGTCTA AGAGGTCACT TTTGCAGGGT AAAATCATTG GTCTCTCATA CATTGAAATA
 601  CATTGAACTT AATCTTATCG TTTGAATAAA ACCAAAGCTC GATTTTTAAT CTTTTTCAAT TATGAAGAAA ATGATGAACA GGTACTCTGT CCTAATTTAT
 701  AAGAATACAT TTTTATTTCT GGGGAGAATC TTAGGATATT TCTTCATAGA GTTGTATACT ACACTTGTTG ATGTAAATGA CTATATTATT TCATGCTTAC
 801  TTTATTTAGT TATTCAGGAT TTCTATTGGT TGTATTGATC TTTACTTTAG TATTATTCAT CGGTTTAAAT AAGATACGTC TAATTTGACA TAGAAGTAGG
 901  GGAAGACCTA TTTCTATCCA GGTTATGCAA ATCCCACTGC ATTTCCCAAT GCTTCCTAGT GACTGATATT TTCATCAATT CCAAAGGACG TATGGGTTAG
1001  ATACTACCCT TGTTCACTCA AAATAAAATG GTTGAAGCCT TACTTTCCGG GATCGTTTTG GGTTTGATCC CAATAACTTT AGCTGGGTTA TTTGTAACTG
1101  CATATTTGCA GTATCGACGT GGTGATCGAT TGGATCTTTG ATTGACAGTT TCGACAATTC TGGTATAGTT TTTTGTCATT TCCAATGGAC CCCTCTGAGC
1201  GAATAGAGGG GTTATATCCT ATAAAATGTT TGATCAATAG GAATAAATGG GAAGTGATAG AAGTTTAAAT TCAATCCTTT ATTCATTTAA ATTCAATCCT
      TTATTCAAAG TATCACGCTC TATAGGATTG AACCCTACGA CTCAGTTG
```

petG ↓

```
   1  CGCGGGGGAA TCCCGAGAGA AGCGTTCATG CATGCTCCAC TTGGCCTGGG CAGGGGGATA TAGCTCAGTT GGTAGAGCTT CGCTTTTGCA ATTGGGTCGT
 101  TGCGCTTACG GGTTGGATGC CTAATTGTCT AGGAGGTAAT GATAGTATCT CTTACCCAAA CCGGTGGCTA ACTCTTCCTC AGGAATGGGG AGAAGGACTG
 201  GAACATGCCA CTGAAAAACT CTACTGAGAC AAAGATGGGC TGTCGGAAGT GTAGAGAAGG TAGGATGGTT AGTTGGTTAG ATCCAGTGCG GATCGTACAT
 301  GGGCGATAGT TGGAGTCGGC GGCTCTTCCA GGGTTACCTT ATCCGGAATC CCTGGGGAAG AGGATCAGGT TGGCCCTTGC GAACAGCTTG ATGCACTATC
 401  TCTCTTCAAC CCCTAAAGCA CGATGTGGCA GAAGGAACGA GAAGCCATGG ACCGACCCCA TCCCCTCCAC CCCGTAGGAA CTACGAGATC GCCCCAGGGA
 501  TGCCGAAGGC ACCCGCGGGG GTCACAGACC GACCATAGAA ACTGATTCAA GAAGTGGAAT GCATTAGCTG TCTGCTCTGG TTGGCAGTAA GGGTCGGAGA
 601  AGGGCAACCA CTCATTGTTA AGACCGAAGG GTCGGGCGGA AAGGAGGAAT AGTTCTTAGC TATTGGTTCT CCCGCAGCTC GGGAGGATCC AGCTGCAAGA
 701  ATCCCAACTC GGTGCCTTTT GAACAGAGTT GCTCTTCGGA GAGCACGGTA CGATGAAAGT TGTAGGCTGT GTTCGGGGGG GAGTCATCGT CCATCGCCGG
 801  CCTCTATGGC AGAATCAGTC AGAGAGGCCT GAGAGACGGT GGCTTACCCT GTGGCGAAAG TCAGCGGTTC GAATCCGCTT GTCTCCAGCC TGTGATCTGA
 901  TTTAATACAA TGGCATATGA TAGGGATGAA ATAATCTCGA TTTCTAGTGG GCAAGCTGGC CCATGATCTT GTATTTATGG ACGTTGATAA GATCCCCTAT
1001  TTAGCACCTC GGGATGGCAT AGCCCTTCAA TGGCGAGGTT CAAACGAAGA AGGGCTTATG GTGGATACCT AGGCACCCAG AGACGAAGAA GGGCGTAGCA
1101  ATCGACGAAA TGCTTCGGGG AGCTGAAAAC AAGCATAGAT CCGGAGATTC CCGAATAGGT TAACCTTTTG AACTGCTGCT GAATCCATAG GCAGGCAAGA
1201  GACAACCTGG CGAACTGAAA CATCTTAG
```

tRNA-UGC ↑

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

본 연구에서는 엽록체 DNA의 trnL과 trnF gene 사이의 intergenic region과 rbcL gene의 염기서열 정보를 이용하여 고사리삼과 내에서 신속으로 분류된 제주고사리삼속의 분자계통학적 위치를 처음으로 밝혔다. 본 연구 결과 제주고사리삼속(*Mankyua*)이 과내의 다른 속과는 뚜렷이 구별되는 독립된 속으로, 형태학적으로 가장 유사하다고 알려진 *Helminthostachys* 속과 자매군을 형성하고 있음이 지지되었다. 이는 우리나라 특산속인 제주고사리삼(*Mankyua chejuense*)이 독립된 하나의 속으로 인식 가능함을 분자계통학적으로 입증한 첫 번째 연구로 이 결과는 고사리삼과(Ophioglossaceae)의 계통정립에 중요한 자료가 될 것이다.

이와 더불어 본 연구과정 중 제주고사리삼의 엽록체 게놈 분석을 통해 엽록체 게놈상의 12개 유전자의 염기서열 정보를 확보하였다. 이 결과는 앞으로 제주고사리삼의 진화적 메카니즘을 밝히는데 중요한 정보를 제공할 뿐 아니라 생물 유전자 주권 확립면에서도 널리 활용될 것으로 기대된다.

4. 참고문헌

Doyle J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA from grape vine leaves by a modified procedure. Phytochem Bull 19:11-15

Gandolfo M. A., Nixon K. C., Crepet W. L. and Ratcliffe G. E. 1997. A new fossil fern assignable to Gleichejaceae from Late Cretaceous sediments of New Jersey. American Journal of Botany 84(4): 483 - -493.

Hauk W.D. 1995 A molecular assessment of relationships among cryptic species of *Botrychium* subgenus *Botrychium* (Ophioglossaceae). American Fern Journal 81: 7-23

Hauk W.D., Parks CR, Chase MW. 2003. Phylogenetic studies of Ophioglossaceae : evidence from rbcL and trnL-F plastid DNA sequences and morphology. Mol Phylogenet Evol. 28(1):131-51.

Kato M. 1987. A Phylogenetic classification of ophioglossaceae. Gard. Bull. Singapore 40:1-14.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Kim, Y.-D. and R. K. Jansen. 1994. Characterization and phylogenetic distribution of a structural change in chloroplast DNAs of Berberidaceae. Plant Systematics and Evolution 193: 107-114

Presl, K. B. 1845. Supplementum tentamis pteridophyta .Abh. Bohm. Ges. WISS. 4:301-320
Rothwell G.O. W and Stockey R. A. 1989. Fossil ophioglossales in the paleocene of Western north america .Amer. J. Bot.76(5): 637-644

Sun B.-Y., Kim M.H.& Kim C.H. 2001. *Mankyua* (Ophioglossaceae): A New Fern Genus from Cheju Island, Korea. Taxon 50: 1019-1024

Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. 1991. Universal primers for amplication of tree noncoding region of chloroplast DNA. Plant Molec. Biol. 17: 1105-1109

Wagner, W.H. Jr., and Wagner F.S. 1990. Moonworts (*Botrychium* subg. *Botrychium*) of the upper Great Lakes region, U.S.A. and Canada, with descriptions of two new species. Contr. Univ. Mich. Herb. 17:313-325

Wolf P.G, Rowe C.A., Sinclain R.B., Hasebe M. 2003. Complete Nuclotide Sequence of the Chloroplast Genome from a Leptosporangiate Fern, Adiantum capillus-veneri L. DNA Res. 10: 59-65

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Ⅲ. 멸종위기 식물종의 유전적 다양성 분석

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Ⅲ. 멸종위기 식물종의 유전적 다양성 분석
- 끈끈이귀개와 황근의 집단유전적 연구 -

1. 서론

우리나라 멸종위기 생물종의 유전적 다양성 분석 자료는 멸종위기의 원인을 파악하고 보존 및 복원 우선순위를 결정하고, 어느 집단 및 개체를 보존하여야 하는지를 결정하는데 필수 불가결한 자료이다. DNA 를 이용한 집단 및 개체들 간의 유전적 다양성분석에는 주로 RFLP, RAFP , AFLP , ISSR , SSR , 등이 Marker들이 주로 이용되어 왔지만 최근에는 자료의 재현성과 용이성 및 형질 평가에 대한 객관성을 이유로 AFLP, ISSR, DNA 염기서열 자료가 주로 이용된다. 본 연구에서는 ISSR 자료와 DNA 염기서열 자료를 이용하여 황근과 끈끈이귀개 집단의 유전적 다양성을 평가하고 이를 이용하여 보존과 복원 목적에 활용하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료채집

2.1.1. 끈끈이귀개 (*Drosera peltata* var. *nipponica* (Masam.) Ohwi)

끈끈이귀개 집단은 우리나라 남서부의 도서지역에 생육하는 것이 알려졌다. 완도군 보길도의 집단이 두 곳에서 알려져 있고 소흑산도 집단이 보고된 바 있다. 2004년도에 본 연구진은 소흑산도를 방문하였으나 그 집단은 찾지 못하였고 2006년 5월 완도군 보길도 집단을 예상으로 하였으며 2006년 8월 중국 운남성 집단 3개체를 채집하여 연구에 포함시켰다.

- 집단 1: 12개체. 완도군 보길도 집단. (보존을 위해 정확한 위치 표시 안함)
- 집단 2: 30개체. 완도군 보길도 집단 무덤가 집단. (보존을 위해 정확한 위치 표시 안함)
- 집단 3: 중국운남성 서북부 우롱주산의 집단으로 매우 흔하다. 3 개체를 본 연구에 이용하였다.

집단 1과 2는 100m 정도 떨어져 있으며 집단 1의 경우는 개체수가 100여개로 비교적 적지만, 집단 2는 수천개체로 구성되어 있는 국내 최대의 집단이다. 무덤가의 집단으로 주변에는 산벚나무, 생강나무, 윤노리나무, 광나무, 다정큼나무, 가막살나무, 말오줌때, 종가시나무, 사스레피나무, 곰솔, 다릅나무, 밥풀고사리등이 흔히 자란다 (그림 III-1).

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



그림 Ⅲ-1. 끈끈이귀개의 서식지 환경(왼쪽)과 꽃(중간) 및 열매(오른쪽)가 맺힌 개체

2.1.2. 황근 (*Hibiscus hamabo* Siebold & Zucc.)

황근의 경우 재료는 2005년 10월과 2006년 5월에 채집하였다 (그림 Ⅲ-2). 우리나라에서 황근은 제주도에 6개 집단, 완도군의 소안도에서 알려졌는데 완도 소안도 집단은 이미 멸종하였고 제주도에만 6개 집단이 생육하는 것으로 알려졌다. 본 연구기관에 제주도 5개 집단을 모두 채집하였으나 집단내의 개체군의 크기와 자연성을 고려하여 5개 집단 중 3개 집단만을 연구에 포함시켰다. (채집지 위치는 그림 Ⅲ-3 참조). 각 집단별 채집된 개체 수는 다음과 같다.

집단 1: 제주도 북제주군 하도리 집단-18개체 채집. 위치는 다음 그림과 같다. (그림 Ⅲ-4)
집단 2: 제주도 남제주군 오조리 집단-17개체 채집. 위치는 다음 그림과 같다. (그림 Ⅲ-5)
집단 3: 제주도 남제주군 세화리 집단-17개체 채집. 위치는 다음 그림과 같다. (그림 Ⅲ-6)

그 외에 제주도 남제주군 온평리 집단 10개체 (그림 Ⅲ-3의 4번 지역), 제주도 남제주군 서귀포 집단 10개체 채집 (그림 Ⅲ-3의 5번 지역), 제주도 남제주군 일과 1리 집단 (그림 Ⅲ-3의 6번 지역) 10개체 등을 채집하였으나 본 연구에는 이용하지 않았다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



그림 Ⅲ-2. 황근의 서식지 환경



그림 Ⅲ-3. 제주도의 황근 자생지 및 채집지

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

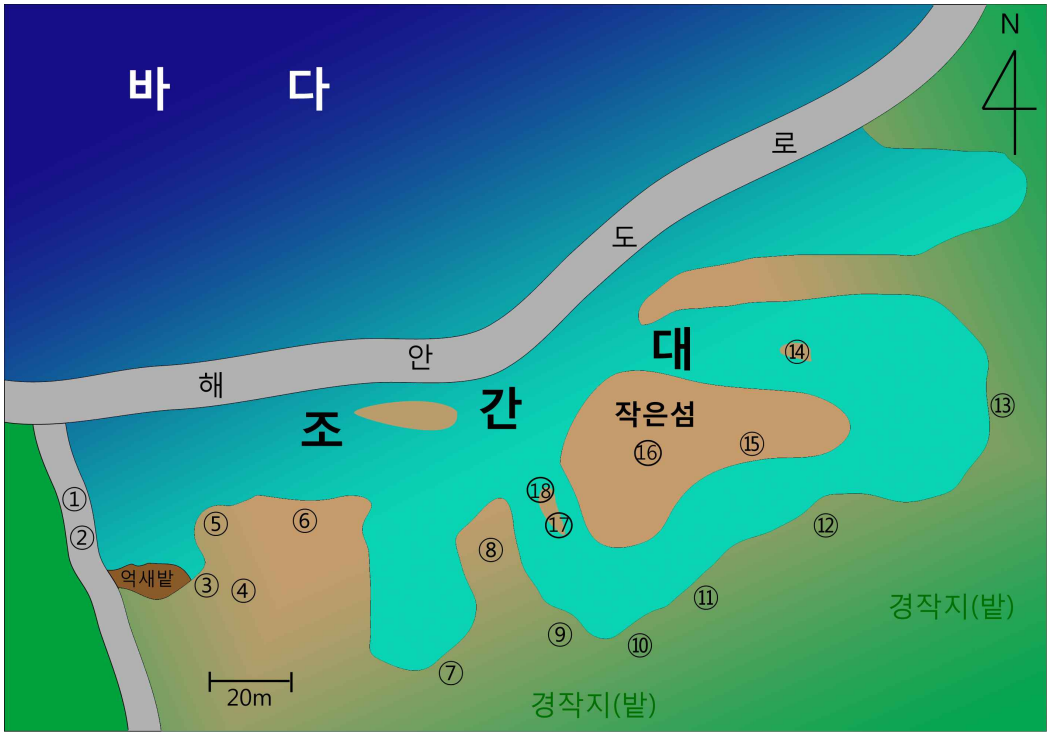


그림 Ⅲ-4. 제주도 북제주군 하도리 황근 집단 채집개체의 분포도

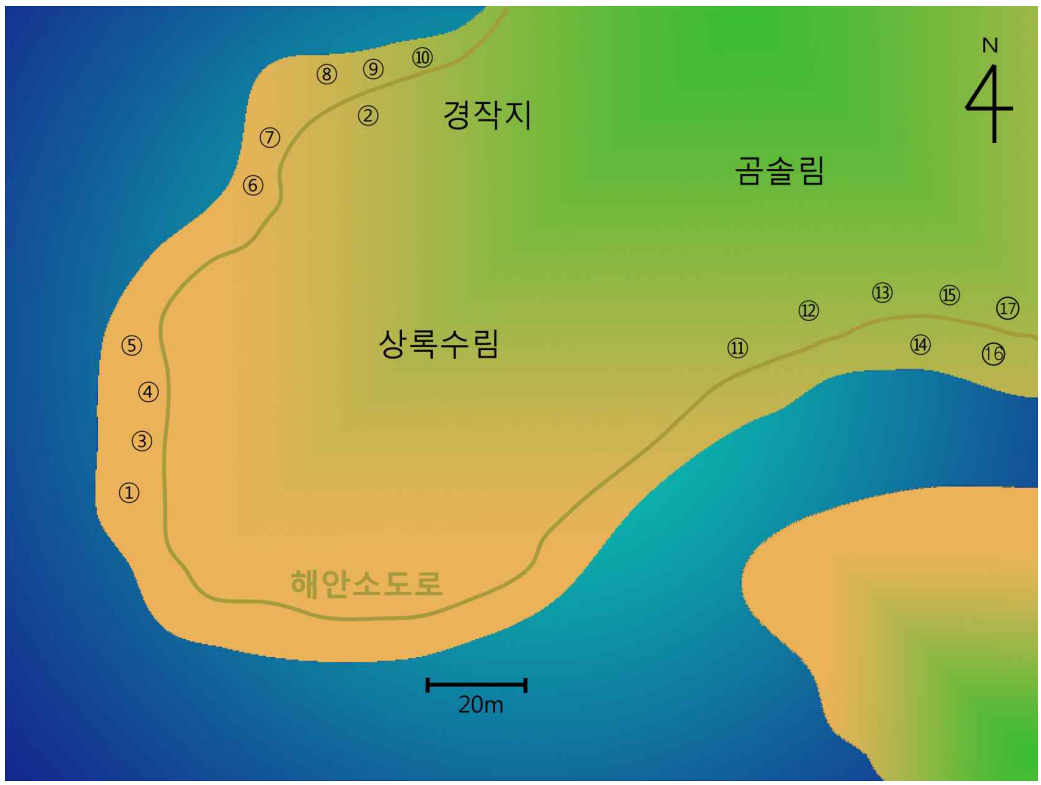


그림 Ⅲ-5. 제주도 남제주군 오조리 식상봉 황근 자생지 내 채집개체의 분포도

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

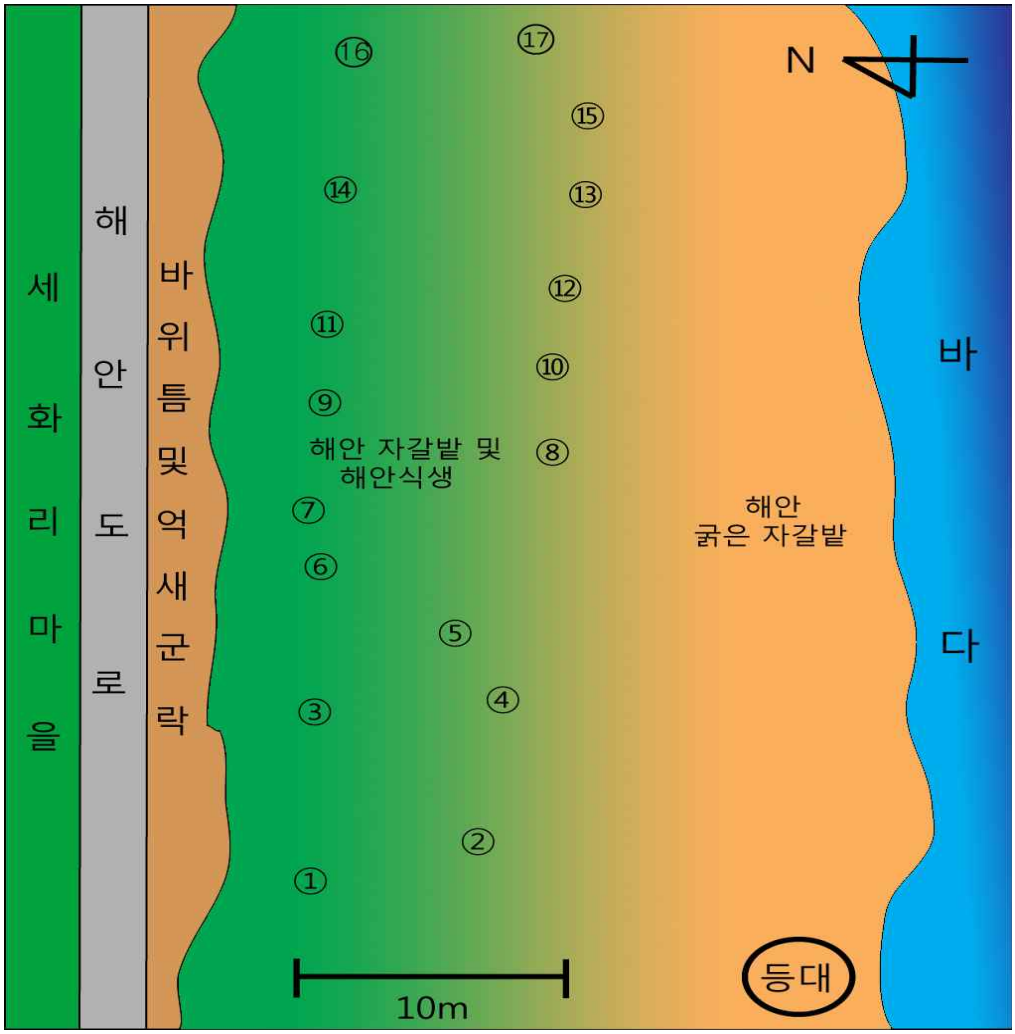


그림 III-6. 제주도 남제주군 세화리 황근 집단 채집개체의 분포도

2.2. ITS 염기서열 변이분석

2.2.1. DNA 추출

황근의 DNA는 채취된 연한 잎 5g을 액체질소로 갈아 CTAB 방법(Doyle and Doyle, 1987)으로 추출하였고, 이 total DNA를 1X TE buffer에 녹인 후 EtBr-CsCl 농도구배 초원심분리방법(60,000rpm, 7시간) 및 투석법으로 정제하였다(Palmer, 1986). 끈끈이귀개의 DNA는 한 개체에서 취할 수 있는 잎의 양이 너무 작아 DNeasy kit (QIAGEN, Germany)를 이용하여 사용자 매뉴얼에 따라 추출하였다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

2.2.2. PCR

Polymerase chain reaction (PCR)은 주형 DNA 20-50 ng, 10X buffer 10 µl, 200 µM의 dNTPs 8 µl, 50 pmol의 프라이머 각 1 µl, 2.5 units의 Promega flexi Go. Taq 및 증류수가 포함된 총 100 µl의 반응액을 95℃에서 3분 동안 1차 해리한 후, 해리 95℃ 1분, annealing 50℃ 1분, extension 72℃ 1분으로 구성된 반응을 30회 반복한 후 최종적으로 72℃에서 10분간 extension하여 수행하였다(Applied Biosystems Gene Amp. PCR system 9700 사용). PCR 반응액은 QIAquick Gel extraction kit (Qiagen Inc., Valencia, CA)로 정제하였으며 이를 통해 얻어진 DNA를 염기서열 결정에 사용하였다. PCR과 염기서열 결정에는 White *et al.*(1990)에 의해 제작된 프라이머를 사용하였으나 프라이머 ITS1 의 경우 다음과 같이 밑줄 친 두 개의 염기를 달리하는 primer (5'-GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG-3')를 별도로 제작하여 사용하였다. 염기서열은 PCR 산물을 클로닝과정을 거치지 않고 직접 ABI PRISM 377 (PE Applied Biosystems) 염기서열 자동분석기를 이용해 결정하였다.

2.2.3. 염기서열 분석

결정된 염기서열의 ITS 1, 2 구간은 기존의 연구 결과(Kim *et al.*, 2004)와 비교하여 결정하였고, Clustal W (ver. 1.6, Thompson *et al.*, 1995) 및 최종 수작업으로 정렬하였다. 정렬 결과 발생한 gap은 이후 분석과정에서 결여형질(missing characters)로 처리하였다. 각 ITS 유형간의 sequence divergence 분석 및 계통수제작은 PAUP* ver. 4.0b (Swofford, 2002)를 사용하여 수행하였다.

2.3. ISSR을 이용한 유전적 다양성 분석

2.3.1. 끈끈이귀개

ITS 염기서열 결정에 사용한 DNA 동일한 DNA를 ISSR 실험에 사용하였다. PCR 반응은 ITS 염기서열 결정을 위한 조건을 따르되 denaturation (98℃, 40초), annealing (45℃, 1분), extention (72℃, 2분)을 간 총 40회 반복하여 수행하였다. 프라이머는 UBC(University of British Columbia)에서 제공하는 프라이머 가운데 UBC801~878, 881 등 총 79개 primer를 사용하였으며, 이 가운데 판독 가능한 DNA 밴드를 제공한 9개 프라이머(UBC 816, UBC 818, UBC 825, UBC 834, UBC 836, UBC 841, UBC 847, UBC 851, UBC 864)를 확정한 뒤 이들을 최종 ISSR 분석에 사용하였다. 얻어진 DNA 밴드의 유무를 각각 1/0으로 코딩하여 자료행렬로 전환한 후, 이를 이용하여 집단별 유전적 다양성 분석하였고 (POPGEGE ver. 1.31, Yeh et al. 1999), UPGMA tree를 제작하여(PAUP* ver. 4.0b, Swofford 2002) 각 개체간 또는 집단간 유집분석을 실행하였다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

2.3.2. 황근

ITS 염기서열 결정에 사용한 DNA 동일한 DNA를 ISSR 실험에 사용하였다. PCR 반응은 ITS 염기서열 결정을 위한 조건을 따르되 denaturation (98℃, 40초), annealing (45℃, 1분), extention (72℃, 2분)을 간 총 40회 반복하여 수행하였다. 프라이머는 UBC(University of British Columbia)에서 제공하는 프라이머 가운데 UBC801~878, 881 등 총 79개 primer를 사용하였으며, 이 가운데 판독 가능한 DNA 밴드를 제공한 15개 프라이머(UBC 808, UBC 811, UBC 812, UBC 816, UBC 818, UBC 827, UBC 835, UBC 836, UBC 840, UBC 841, UBC 842, UBC 846, UBC 853, UBC 856, UBC 861)를 확정한 뒤 이들을 최종 ISSR 분석에 사용하였다. 얻어진 DNA 밴드의 유무를 각각 1/0으로 코딩하여 자료행렬로 전환한 후, 이를 이용하여 집단별 유전적 다양성 분석하였고(POPGEGE ver. 1.31, Yeh et al. 1999), UPGMA tree를 제작하여(PAUP* ver. 4.0b, Swofford 2002) 각 개체간 또는 집단간 유집분석을 실행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 끈끈이귀개 (*Drosera peltata* var. *nipponica*) 집단에 대한 유전적 다양성 분석

3.1.1. ITS 염기서열 변이분석

ITS 지역에 대한 염기서열 분석 결과, 조사된 개체 모두 ITS 1 지역은 283bp, 5.8s 지역은 163bp, ITS 2 지역은 237bp인 것으로 나타났다(그림 III-7). 3개 집단, 총 45 개체의 ITS sequences, 30.7kb의 DNA 염기서열이 본 연구를 통해 결정되었다. 그러나 이들 집단간 또는 개체간 ITS 염기서열의 변이는 관측되지 않았다. 중국집단을 포함한 3개 집단의 모든 개체가 동일한 ITS 염기서열을 보인 점은 이 종이 집단을 형성해가는 생식 양상과 매우 관계가 깊은 것으로 생각된다. 이는 앞으로 이 종을 대상으로 한 생식생물학적 연구가 필요함을 의미한다. 본 연구결과 ITS 염기서열 비교분석이 집단의 유전적 다양성을 파악하는데 전혀 도움이 되지 않음을 알 수 있었다.

3.1.2. ISSR을 이용한 유전적 다양성 분석

분석을 위해 사용된 총 79개 SSR primer 가운데 9개 primer로부터 분석 가능한 DNA 밴드가 증폭되었다. 이들 primer로부터 총 62개 DNA 밴드를 얻었는데 이 가운데 UBC 818과 UBC 834로부터 각각 12개, 10개의 밴드가 증폭되어 가장 많은 밴드가 얻어졌다. 반면, UBC 841와 UBC 864로부터는 각각 3개씩의 밴드가 증폭되어 가장 낮은 수치를 보였다 (표 III-1).

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

이들의 유무를 0/1로 코딩하여 자료행렬은 표 III-2에 나타내었다. 이 자료행렬을 통해 유전적 변이 양상을 분석한 결과 전체적으로는 56개의 loci가 다형이었고, 집단별로는 집단 1이 41개, 집단 2가 36개, 집단 3은 5개의 loci가 다형을 나타내었다. 각 유전좌위에서 관측된 평균 대립인자의 수는 전체적으로는 1.9032로 나타났고, 집단별로는 집단 1이 1.6613으로 가장 컸고, 집단 2가 1.5806, 집단 3이 1.0806으로 나타났다. 한편 전체 유전좌위 중 약 90.32%가 다형이었는데, 집단별로는 집단 1이 66.13%로 가장 높았고, 집단 2가 58.06%, 집단 3은 8.06%가 다형을 나타내는 등 집단 1의 유전적 다양성 지표가 가장 높은 것으로 나타났다 (표 III-3).

한편 ISSR 자료를 이용하여 UPGMA dendrogram를 작성한 결과 집단별 유집은 나타나지 않았고 집단 3 (중국집단) 역시 집단 1, 2와 섞여서 유집되었다 (그림 III-8). 집단 2에 속하는 1개체 (39번)를 제외했을 때 집단 1의 개체들이 dendrogram의 기부에 주로 위치하는 양상을 보였다. 특히 집단 1의 12번 개체는 조사된 다른 모든 개체들과 가장 유전적으로 이질적인 특징을 보였다. 본 연구결과 미세하나마더 높은 다양성 지표를 나타내고, dendrogram 에서도 기부에 위치한 집단 1을 우선적으로 보존하는 것이 더 타당할 것으로 판단되었다.

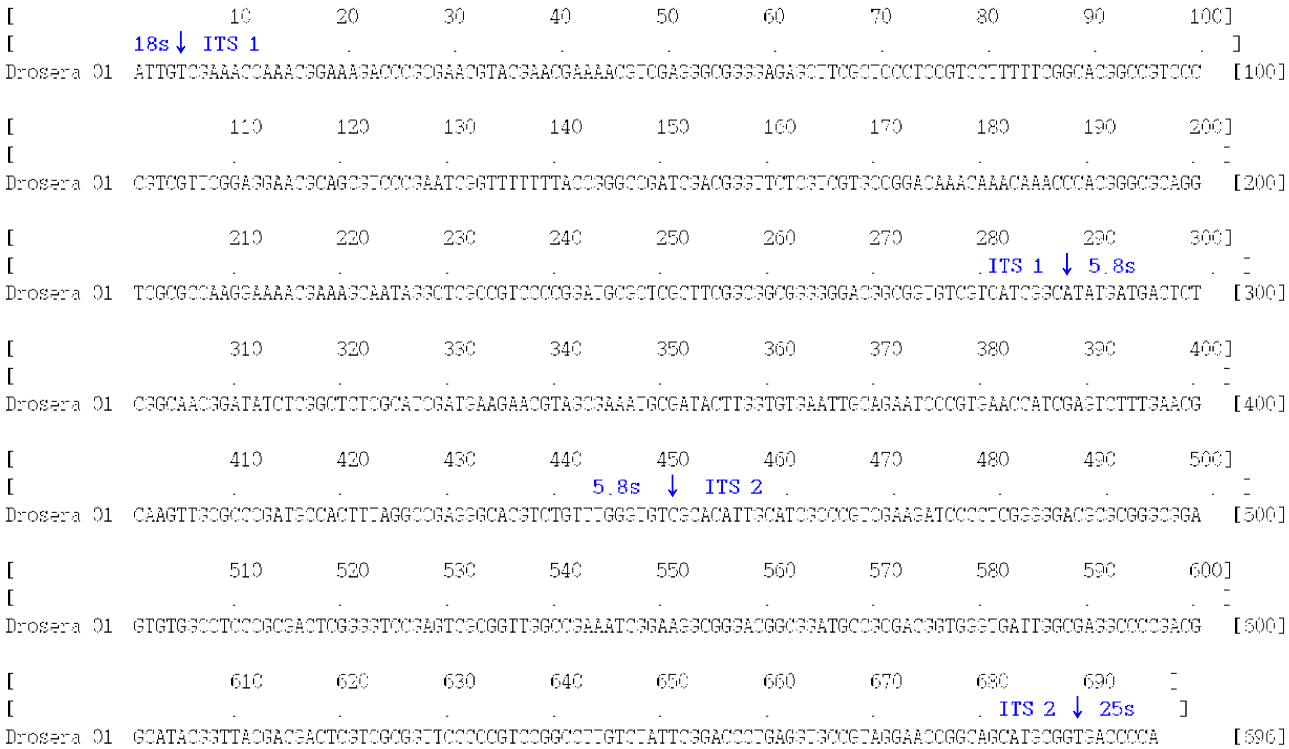


그림 III-7. 끈끈이귀개의 ITS 염기서열 비교분석 결과

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 Ⅲ-1. 끈끈이귀개 3개 집단 45개 개체를 대상으로 분석에 이용한 9개 ISSR 프라이머와 증폭밴드 수

primer	primer sequence	number of DNA band
UBC 816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	6
UBC 818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	12
UBC 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	9
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	10
UBC 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	7
UBC 841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	3
UBC 847	CAC ACA CAC ACA CAC ARC	8
UBC 851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG	4
UBC 864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	3
total		62

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 Ⅲ-2. 9개 프라이머를 이용한 끈끈이귀개 3개집단 45개체의 증폭밴드의 유무를 나타내는 도표

UBC primer / DNA no.	816	818	825	834	836	841	847	851	864
Drosera01	00101100001111100000001100000000111111000000110011100000100100								
Drosera02	00110000001011100000001100000000111111000000110011111000100110								
Drosera03	00110000000011000000000100010000101111000000100011100000110101								
Drosera04	00100010000011000010001100001000101111000000110011111000100001								
Drosera05	00101000000010000100001110000000101111000000100011110000101000								
Drosera06	00111101011011000000001110000000111011110000111011111001100000								
Drosera07	00100010001011000000001100000000111110001000100011010000100000								
Drosera08	00111000001010000000001100000000111111000000100011110000100000								
Drosera09	00100000001011100111001100000000111111000000100011110000100011								
Drosera10	01111110000011100000001100001100111011111000011001111000100001								
Drosera11	00110000001011100000001110000000111111000000100011110000110100								
Drosera12	00100000001111000000100101100000111101100000100011000011100110								
Drosera13	00101101001011100000001100000000111111000000111011110010100000								
Drosera14	10111010011011100000001100000100111111000000111011111000100000								
Drosera15	00111100001011100000001100000100111111000000111011111010100000								
Drosera16	00111110001011100000001100000000111111000100111011111110100000								
Drosera17	10110000001011100000001100000000111111000000111011111000100000								
Drosera18	00111000001011100000001100000000111111000100111011111010100000								
Drosera19	00111000001011100000001100000000111111000100111011110010100000								
Drosera20	00111000001011100000001100000000111111000100111011111000100000								
Drosera21	10111001001011100000101100000000111111000100111111111110100000								
Drosera22	00101000001011100000001100000000111111000100110011111000100000								
Drosera23	00111001001011100000101100000000111111000111111111111110100000								
Drosera24	10101100001011110000001100000100111111000100111011110000100000								
Drosera25	00110100001011100000001100000000111111000000100011110010100000								
Drosera26	01101000001010100000001100000000111111000000100011100000100000								
Drosera27	00101001101010101000001100000000111111000000100011100010100000								
Drosera28	00110010000011100000001110000100111111000000100011101010100000								
Drosera29	00111000011011100000001100000100111111000000110011110010100000								
Drosera30	00100000001011100000001110000100111111100000100011000000100000								
Drosera31	00111000001011100000001110000100111111000000110011110000100000								
Drosera32	00111000001011100000001100000100111111000100111111110000100000								
Drosera33	00101000001011101000011110000000111011000000101011100000100000								
Drosera34	00110000001011100100001110000000111011000000100011110000100000								
Drosera35	00111000001011100000001100000000111111000100000011110010100000								
Drosera36	00111000001011100000001110000000111111000000110011110010100000								
Drosera37	00111100001011100000001100000000111111000100111011111010100000								
Drosera38	00111100001011110100001100000010111111000111111111111110100000								
Drosera39	00100000101010101100111100000000101101000000000011100000100000								
Drosera40	00111001001011100000001100000000111111000111111011111110100000								
Drosera41	00110000011011100000001100000000001111000000100011000010100000								
Drosera42	10111100001011100000001100000000111111000000111011110010100000								
Drosera052	00100000001001100000001110000000111111000000100011110000110000								
Drosera260	00100001001001100000001100000000111111000000100011110000100000								
Drosera304	00100000001001100000001100000001111111000000100011111000110000								

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 Ⅲ-3. 끈끈이귀개 3개 집단 내의 대립인자에 대한 통계수치

population #	ss	na	ne	h	I	np	fp
population 1	12	1.6613±0.4771	1.2544±0.3194	0.1607±0.1707	0.2575±0.2429	41	66.13
population 2	30	1.5806±0.4975	1.2260±0.3141	0.1414±0.1725	0.2246±0.2486	36	58.06
population 3	3	1.0806±0.2745	1.0430±0.1582	0.0272±0.0951	0.0417±0.1440	5	8.06
total	45	1.9032±0.2981	1.2346±0.2801	0.1562±0.1537	0.2619±0.2129	56	90.32

ss = sample size (number of individuals)
na = Observed number of alleles (mean and standard variation)
ne = Effective number of alleles (mean and standard variation)
h = Nei's gene diversity (mean and standard variation)
I = Shannon's Information index (mean and standard variation)
np = The number of polymorphic loci
fp = The percentage of polymorphic loci
[refer Nei (1987) and POPGENE program manual for more information on the statistics]

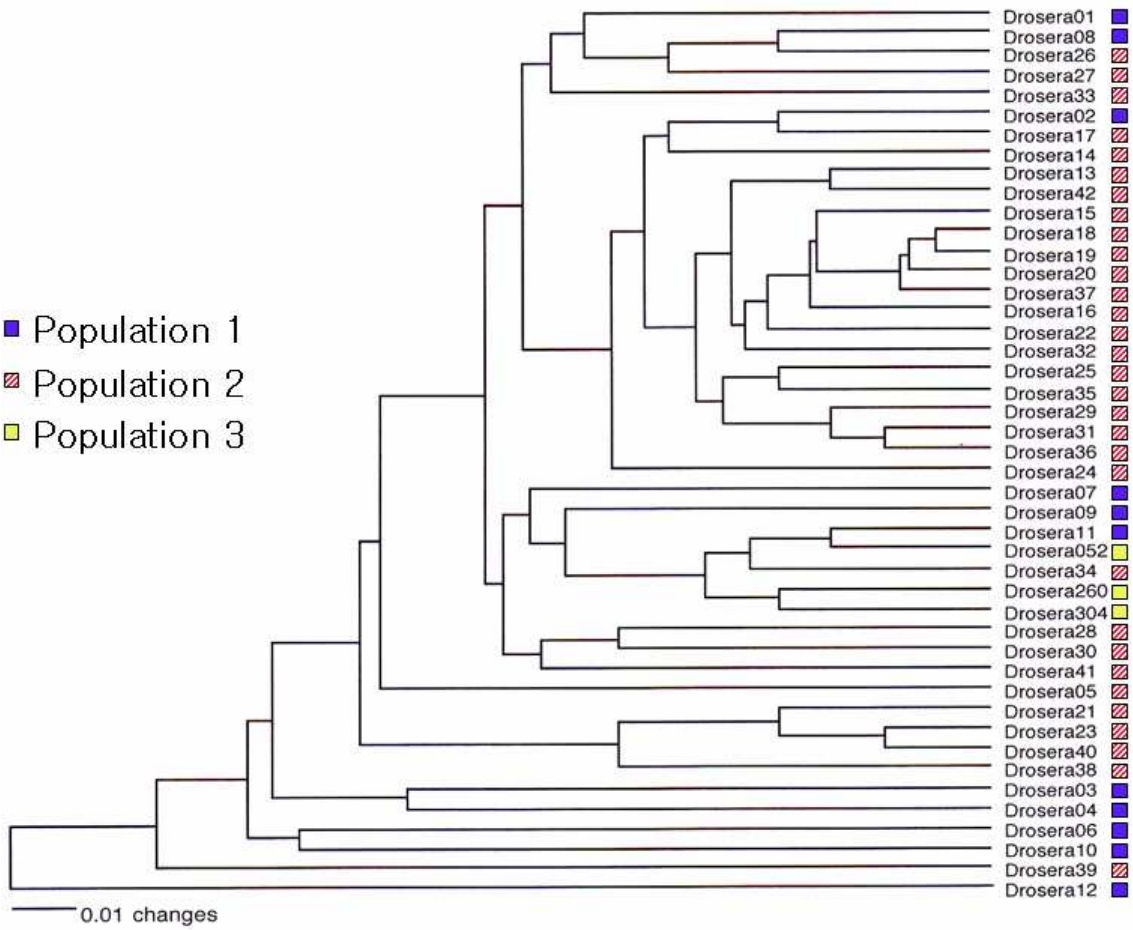


그림 Ⅲ-8. ISSR 증폭유무를 이용하여 유집분석 (UPGMA)한 끈끈이귀개 개체 및 집단 간의 유전적 관계 도표

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3. 2. 황근 집단에 대한 유전적 다양성 분석

3.2.1. ITS 염기서열 변이분석

ITS 지역에 대한 염기서열 분석 결과, 황근의 경우 조사된 개체 가운데 ITS 1 지역은 290~291bp, 5.8s 지역은 162bp, ITS 2 지역은 331bp인 것으로 나타났다 (그림 III-9). 따라서 3개 집단, 총 52 개체의 ITS sequences, 40.8kb의 DNA 염기서열이 본 연구를 통해 결정되었다. 모든 개체의 ITS 염기서열을 정렬한 결과 ITS 1지역에서 관측된 길이 변이는 모두 집단 1의 개체 사이에서만 발견되었다. 각 집단별 염기서열 변이는 집단 1에서는 총 17개 뉴클레오티드 위치가 다형이었으나, 집단 2와 3에서는 다형을 나타내는 뉴클레오티드가 없이 모든 개체가 동일한 염기서열을 나타내었다.

전체 개체 간의 염기서열 분기도를 Kimura의 2 parameter 방법으로 추산한 결과 가장 높은 값인 1.904 (K2P value × 100)이 Hibscus1-10 (1집단)과 Hibiscus1-3, Hibiscus1-6, Hibiscus1-8 사이에서, 그리고 Hibiscus1-9와 Hibiscus1-18 및 Hibiscus2-1 사이에서 관측되었다. 한편 Hibiscus2-3을 제외한 집단 2와 집단 3의 모든 개체의 ITS 염기서열은 동일하였고 따라서 분기도는 0으로 나타났다 (표 III-4). 전체 염기서열은 그림 III-9에 나타내었고 이 가운데 변이를 보이는 뉴클레오티드 17개는 따로 표 III-5에 따로 구분하여 나타내었다.

표 Ⅲ-4. ITS 염기서열에 기초한 황근 개체 간의 pairwise distance 도표

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 Hibiscus1-1	-	0	11	0	0	11	0	11	0	0	11	7	0	9	0	0	0	11	11	10
2 Hibiscus1-2	0.000	-	10	0	1	10	0	10	2	0	10	7	0	8	0	0	0	10	10	9
3 Hibiscus1-3	1.609	1.455	-	3	7	0	6	0	13	10	2	0	6	0	2	11	9	0	0	0
4 Hibiscus1-4	0.000	0.000	0.436	-	1	3	0	3	2	0	4	2	0	2	0	0	0	3	3	3
5 Hibiscus1-5	0.000	0.145	1.025	0.147	-	7	1	7	1	0	8	6	1	5	1	1	1	7	7	6
6 Hibiscus1-6	1.609	1.455	0.000	0.436	1.025	-	6	0	13	10	2	0	6	0	2	11	9	0	0	0
7 Hibiscus1-7	0.000	0.000	0.872	0.000	0.147	0.872	-	6	2	0	7	4	0	5	0	0	0	6	6	5
8 Hibiscus1-8	1.609	1.455	0.000	0.436	1.025	0.000	0.872	-	13	10	2	0	6	0	2	11	9	0	0	0
9 Hibiscus1-9	0.000	0.290	1.904	0.294	0.145	1.904	0.293	1.904	-	0	13	9	2	11	2	2	2	13	13	12
10 Hibiscus1-10	0.000	0.000	1.464	0.000	0.000	1.464	0.000	1.464	0.000	-	10	7	0	8	0	0	0	10	10	9
11 Hibiscus1-11	1.608	1.457	0.288	0.585	1.173	0.288	1.021	0.288	1.904	1.461	-	2	7	2	3	11	9	2	2	2
12 Hibiscus1-12	1.021	1.016	0.000	0.289	0.876	0.000	0.580	0.000	1.316	1.024	0.291	-	4	0	1	7	6	0	0	0
13 Hibiscus1-13	0.000	0.000	0.876	0.000	0.145	0.876	0.000	0.876	0.291	0.000	1.024	0.582	-	4	0	0	0	6	6	6
14 Hibiscus1-14	1.315	1.163	0.000	0.292	0.731	0.000	0.727	0.000	1.611	1.167	0.288	0.000	0.582	-	1	9	7	0	0	0
15 Hibiscus1-15	0.000	0.000	0.289	0.000	0.147	0.289	0.000	0.289	0.294	0.000	0.436	0.144	0.000	0.144	-	0	0	2	2	2
16 Hibiscus1-17	0.000	0.000	1.606	0.000	0.145	1.606	0.000	1.606	0.289	0.000	1.606	1.019	0.000	1.312	0.000	-	0	11	11	10
17 Hibiscus1-16	0.000	0.000	1.312	0.000	0.146	1.312	0.000	1.312	0.291	0.000	1.312	0.871	0.000	1.019	0.000	0.000	-	9	9	9
18 Hibiscus1-18	1.609	1.455	0.000	0.436	1.025	0.000	0.872	0.000	1.904	1.464	0.288	0.000	0.876	0.000	0.289	1.606	1.312	-	0	0
19 Hibiscus2-1*	1.609	1.455	0.000	0.436	1.025	0.000	0.872	0.000	1.904	1.464	0.288	0.000	0.876	0.000	0.289	1.606	1.312	0.000	-	0
20 Hibiscus2-3	1.463	1.309	0.000	0.436	0.878	0.000	0.725	0.000	1.757	1.318	0.288	0.000	0.875	0.000	0.289	1.460	1.311	0.000	0.000	-

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

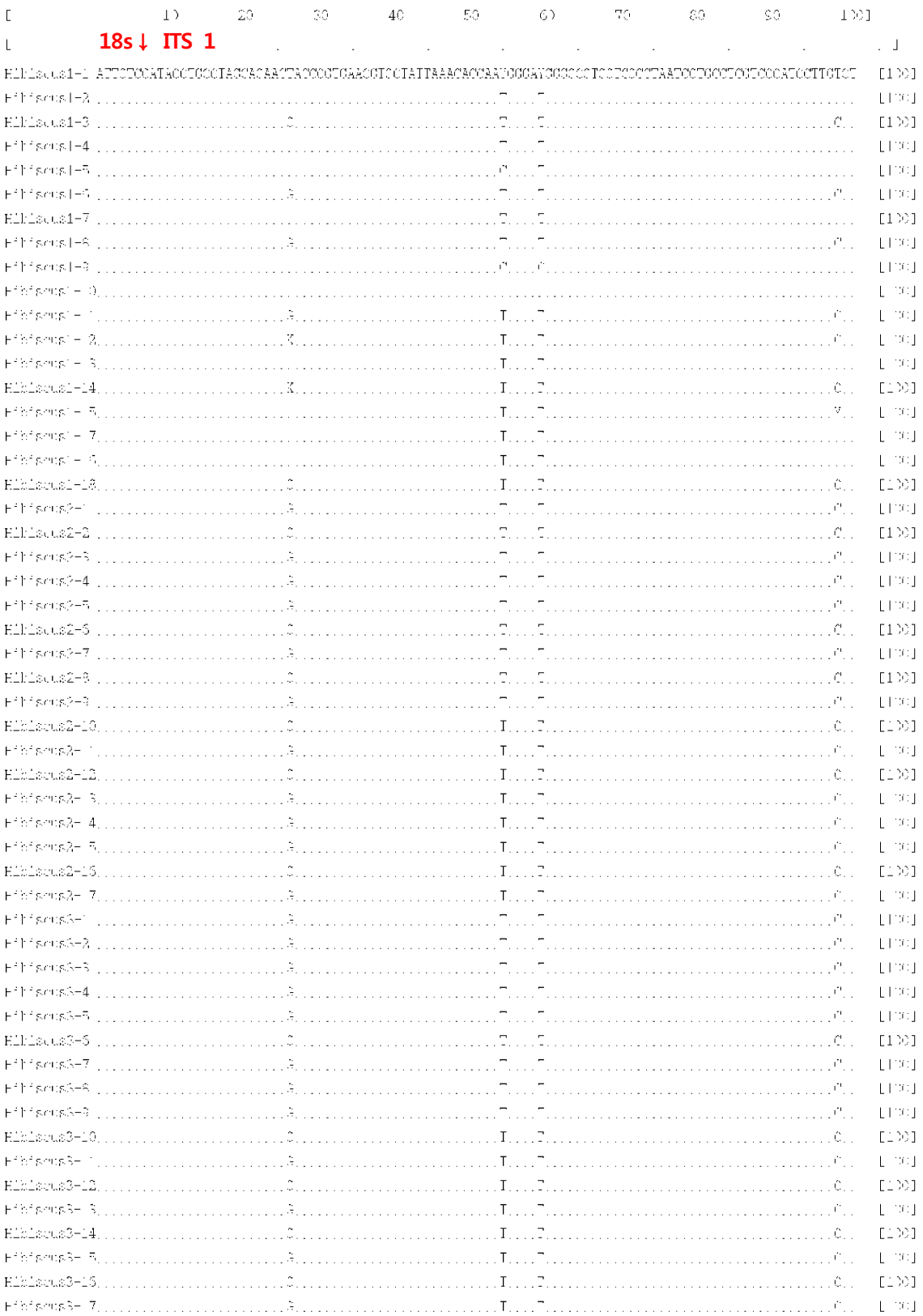


그림 Ⅲ-9. 집단 1 (18개체), 집단 2 (17개체), 집단 3 (17개체)를 대상으로 ITS 염기서열을 결정하여 정렬한 서열

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

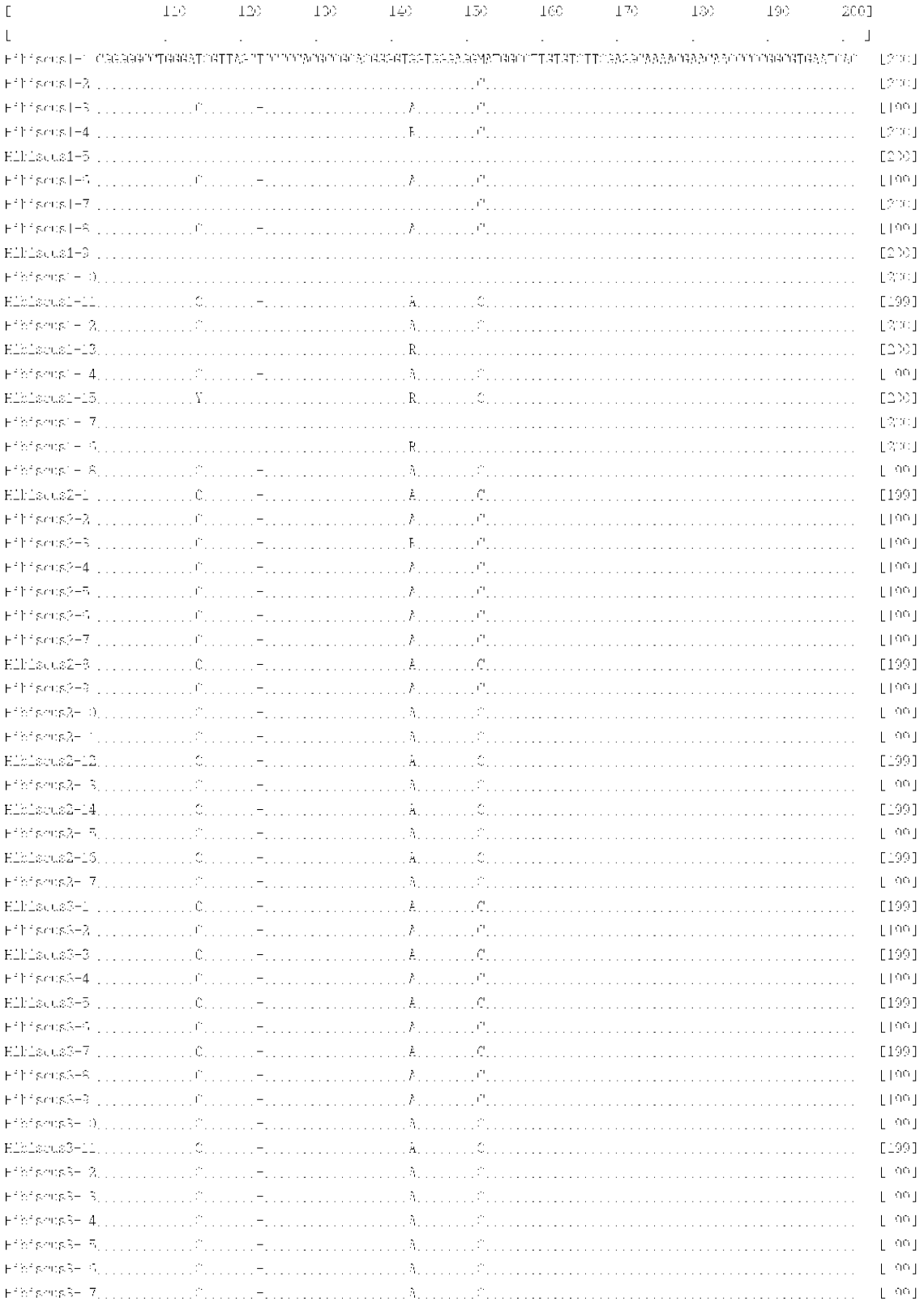


그림 Ⅲ-9. (계속)

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

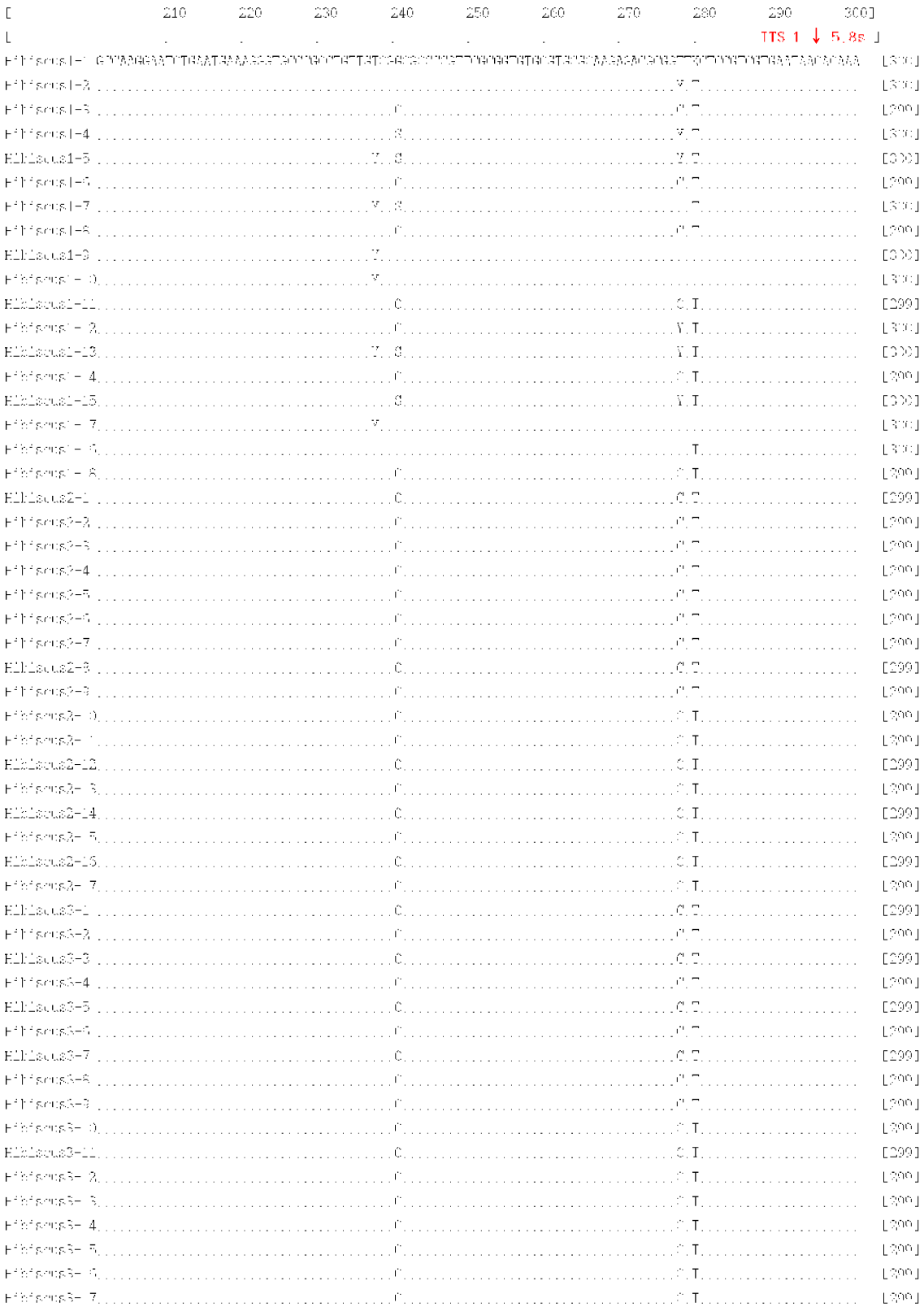


그림 Ⅲ-9. (계속)

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

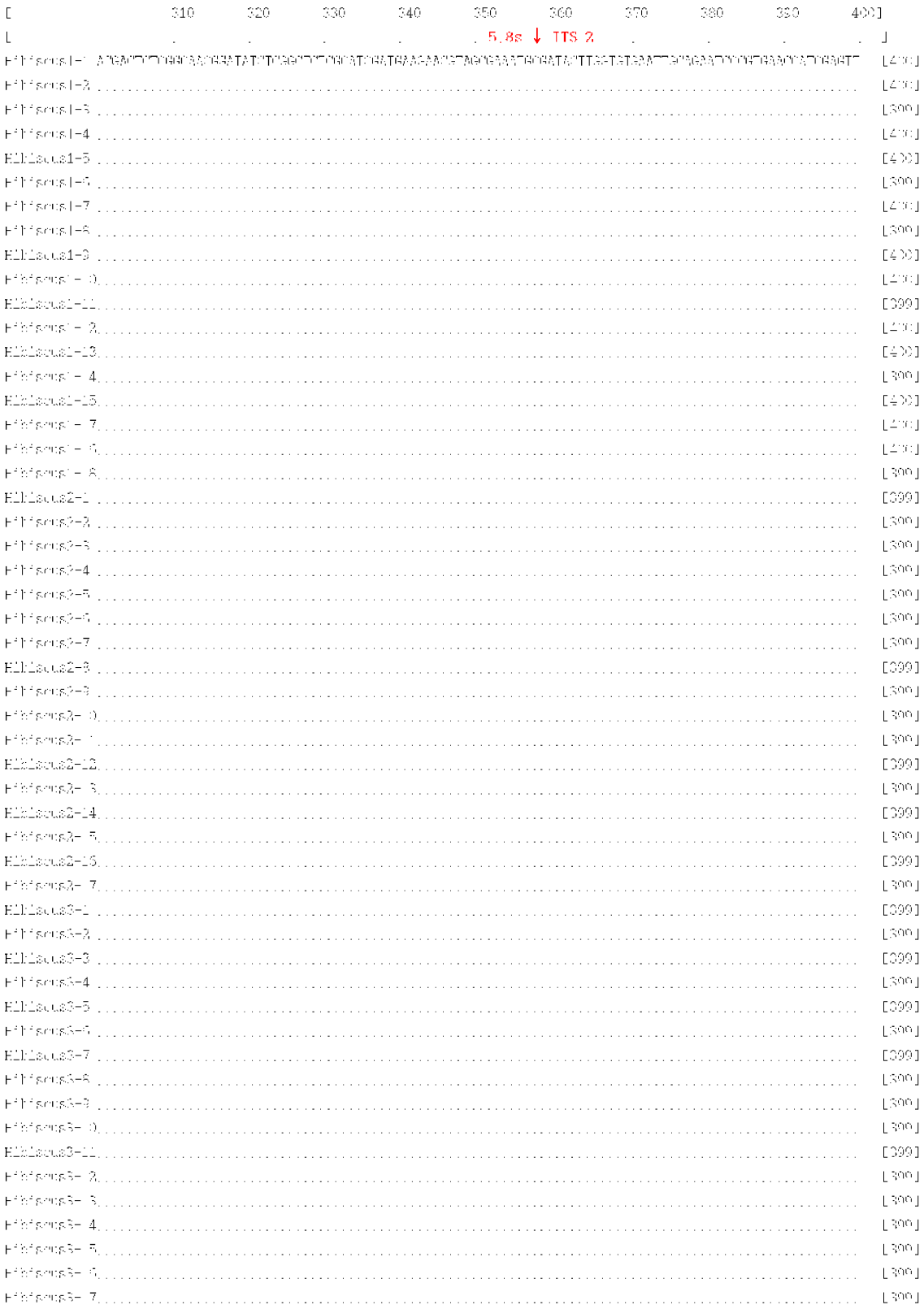


그림 Ⅲ-9. (계속)

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

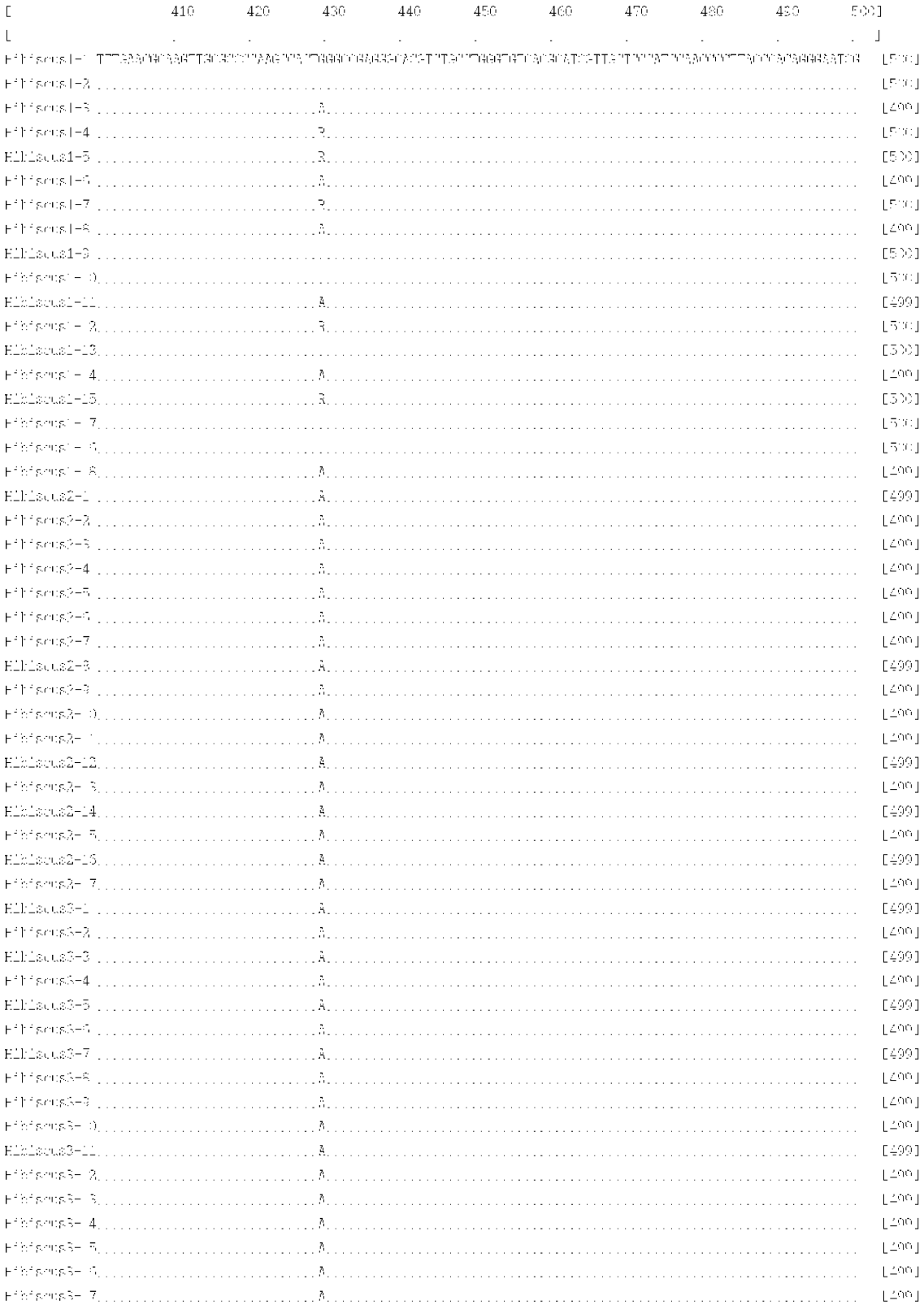


그림 Ⅲ-9. (계속)

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

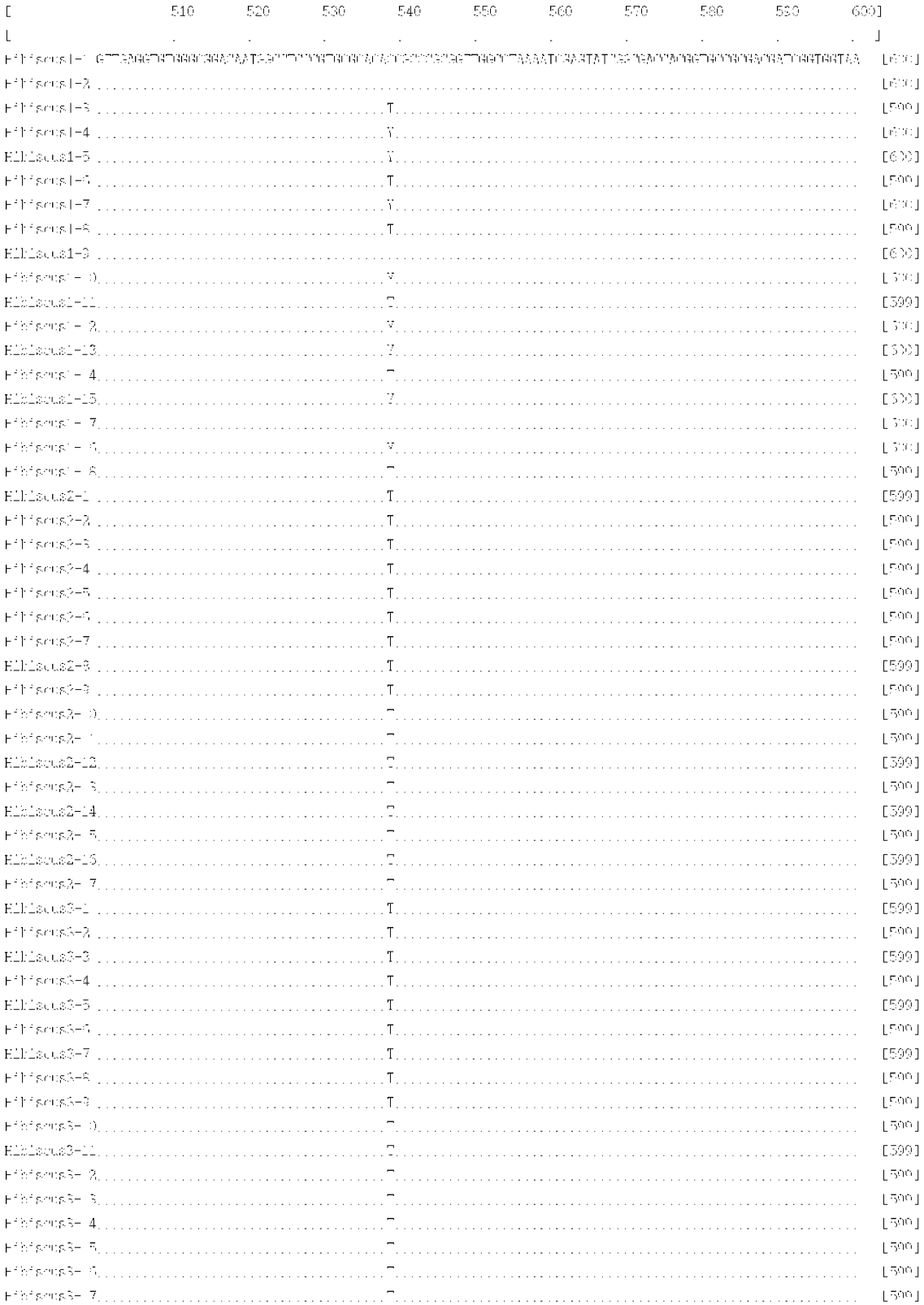


그림 Ⅲ-9. (계속)

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

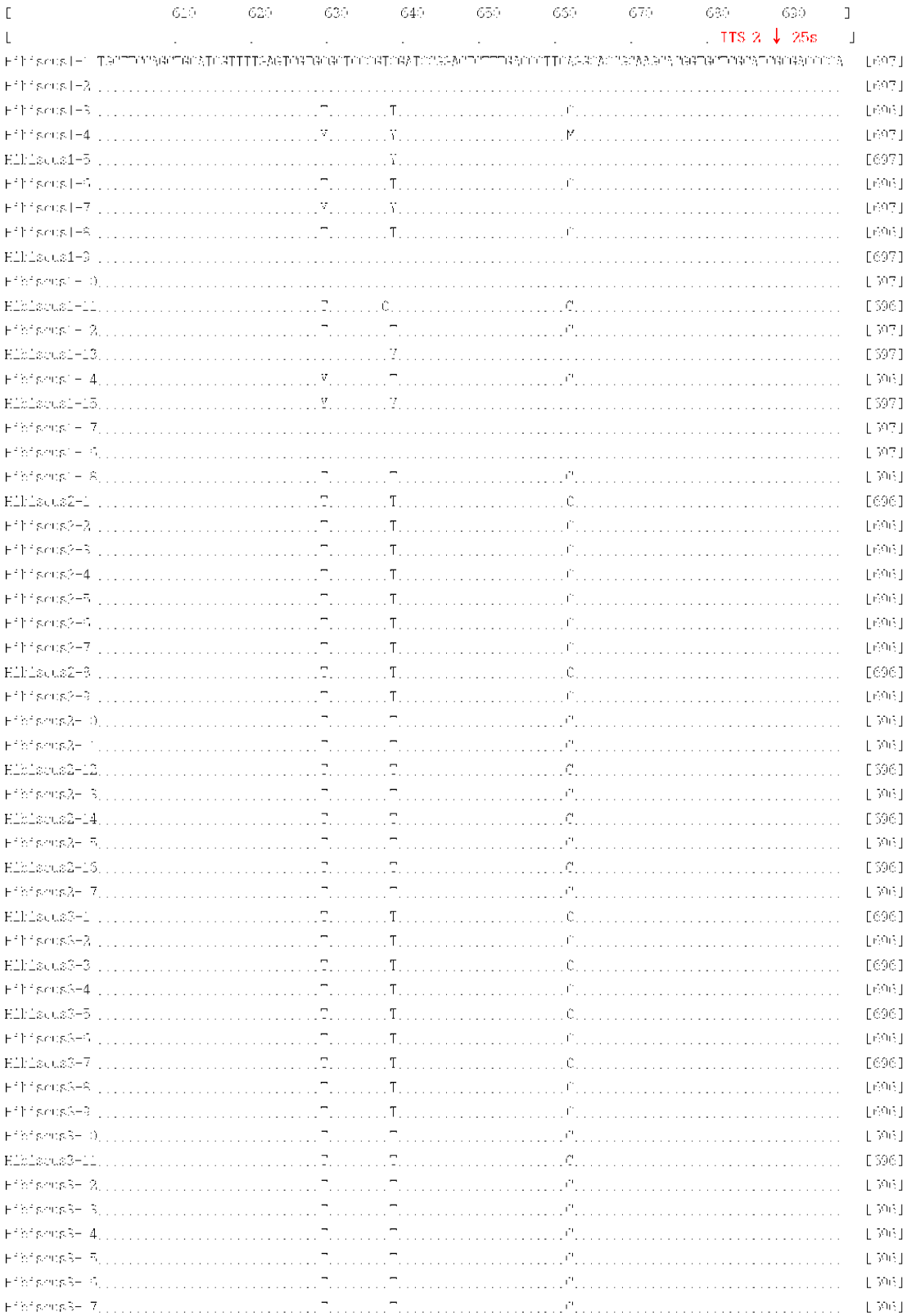


그림 Ⅲ-9. (계속)

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 Ⅲ-5. ITS 염기서열 중 황근 개체 간에 변이가 있는 위치

nucleotide position / DNA no.	ITS 1										ITS 2							
	26	54	59	98	114	122	142	151	237	240	277	279	430	539	630	638	639	662
Hibiscus1-1	T	Y	Y	T	T	T	G	M	T	G	T	K	G	C	C	T	C	A
Hibiscus1-2	.	T	T	.	.	.	.	C	.	.	Y	T	.	.	.	.	.	.
Hibiscus1-3	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus1-4	.	T	T	.	.	.	R	C	.	S	Y	T	R	Y	Y	.	Y	M
Hibiscus1-5	.	C	T	.	.	.	.	.	Y	S	Y	T	R	Y	.	.	Y	.
Hibiscus1-6	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus1-7	.	T	T	.	.	.	.	C	Y	S	.	T	R	Y	Y	.	Y	.
Hibiscus1-8	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus1-9	.	C	C	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hibiscus1-10	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	Y	.	.	.	.
Hibiscus1-11	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	C	.	C
Hibiscus1-12	K	T	T	C	C	.	A	C	.	C	Y	T	R	Y	T	.	T	C
Hibiscus1-13	.	T	T	.	.	.	R	.	Y	S	Y	T	.	Y	.	.	Y	.
Hibiscus1-14	K	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	Y	.	T	C
Hibiscus1-15	.	T	T	Y	Y	.	R	C	.	S	Y	T	R	Y	Y	.	Y	.
Hibiscus1-17	.	T	T	.	.	.	.	.	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hibiscus1-16	.	T	T	.	.	.	R	.	.	.	.	T	.	Y	.	.	.	.
Hibiscus1-18	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus2-1	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus2-2	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus2-3	G	T	T	C	C	-	R	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus2-4	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus2-5	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus2-6	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus2-7	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus2-8	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus2-9	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus2-10	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus2-11	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus2-12	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus2-13	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus2-14	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus2-15	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus2-16	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus2-17	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus3-1	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus3-2	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus3-3	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus3-4	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus3-5	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus3-6	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus3-7	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus3-8	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus3-9	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus3-10	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus3-11	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus3-12	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus3-13	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus3-14	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus3-15	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus3-16	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C
Hibiscus3-17	G	T	T	C	C	-	A	C	.	C	C	T	A	T	T	.	T	C

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

한편, ITS 염기서열 변이를 UPGMA 방법으로 유집한 결과 집단 1의 일부 개체는 집단 2와 3에 속하는 개체와 ITS 염기서열이 완전히 동일하였고 그 결과는 그림 III-10과 같은 dendrogram으로 나타내었다.

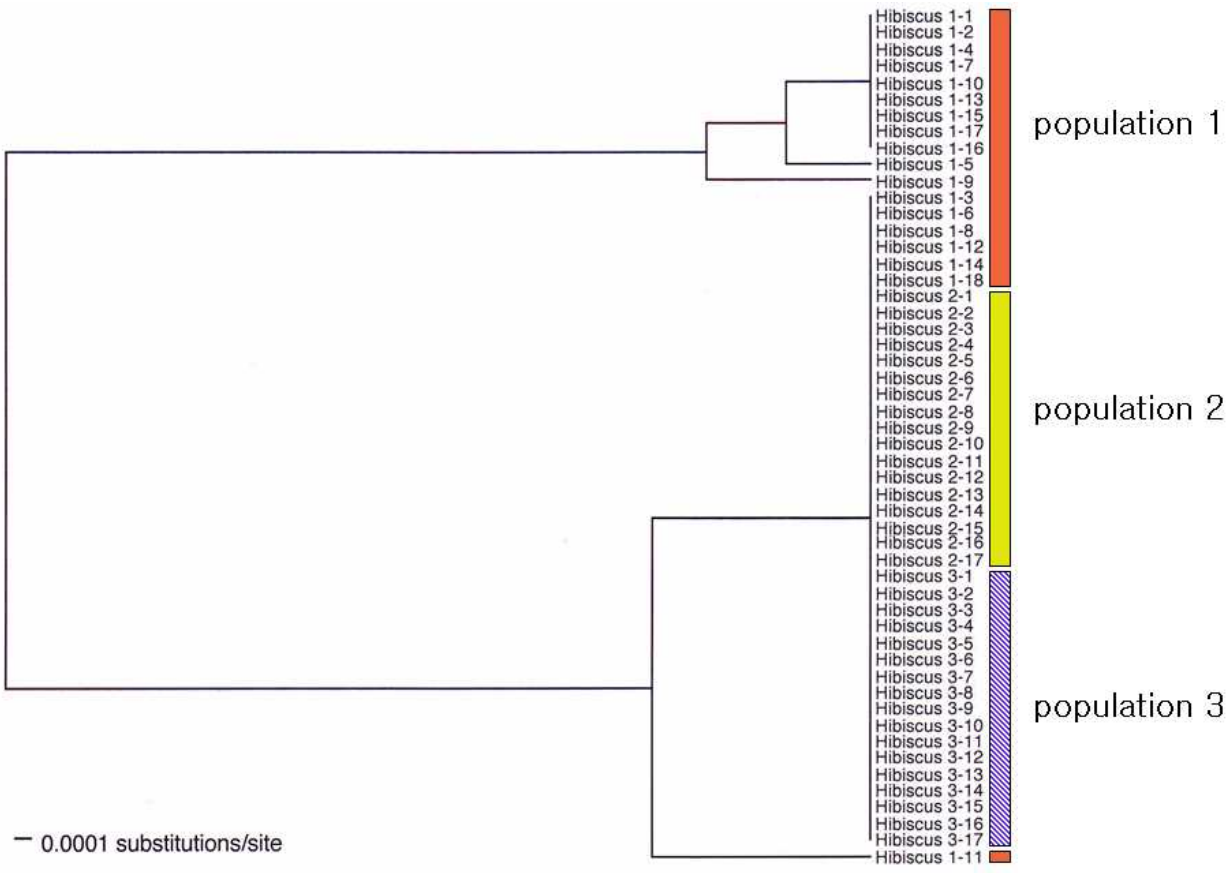


그림 III-10. 황근 3개 집단 52개 개체 간의 관계를 나타내는 UPGMA 유집도

3.3.2. ISSR을 이용한 유전적 다양성 분석

분석을 위해 사용된 총 79개 SSR primer 가운데 15개 primer로부터 분석 가능한 DNA 밴드가 증폭되었다. 이들 primer로부터 총 97개 DNA 밴드를 얻었는데 이 가운데 UBC 818과 UBC 827로부터 각각 13개, 11개의 밴드가 증폭되어 가장 많은 밴드가 얻어졌다. 반면, UBC 836과 UBC 846으로부터는 각각 1개와 3개의 밴드가 증폭되어 가장 낮은 수치를 보였다 (표 III-6). 한편 일부 primer (예를 들어 UBC 835)는 집단간 차이를 뚜렷하게 구분하는 것으로 나타났으나 전혀 변이를 나타내지 못한 primer도 있었다 (그림 III-11).

이들의 유무를 0/1로 코딩하여 자료행렬은 표 III-7에 나타내었다. 이 자료행렬을 통해 유

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

전적 변이 양상을 분석한 결과 전체적으로는 74개의 loci가 다형이었고, 집단별로는 집단 1이 69개, 집단 2가 25개, 집단 3은 29개의 loci가 다형을 나타내었다. 각 유전좌위에서 관측된 평균 대립인자의 수는 전체적으로는 1.7629으로 나타났고, 집단별로는 집단 1이 1.7113으로 가장 컸고, 집단 2가 1.2577, 집단 3이 1.2990으로 나타났다. 한편 전체 유전좌위 중 약 76.29%가 다형이었는데, 집단별로는 집단 1이 71.13%로 가장 높았고, 집단 2가 25.77%, 집단 3은 29.90%가 다형을 나타내는 등 집단 1의 유전적 다양성 지표가 가장 높은 것으로 나타났다 (표 III-8).

한편, ISSR 자료를 이용하여 UPGMA dendrogram를 작성한 결과 집단 2와 집단 3은 각각 집단별 유집이 강하게 이루어지는 반면 집단 1의 경우 일부 개체가 집단 2와 3과 유집되었다(그림 III-12). 전체적으로 보았을 때, 집단 1의 개체들이 dendrogram의 기부에 주로 위치하는 양상을 보였다. 특히 집단 1의 16번 개체는 조사된 다른 모든 개체들과 가장 유전적으로 이질적인 특징을 보였다. 이와 같은 연구 결과는 ITS 분석 결과와도 정확히 일치하는 것이어서 주목된다. 향후 황근 집단에 대한 보존 대책을 수립할 때, 이와 같은 유전적 다양성 분석결과를 지표로 활용하여, 집단 1을 더 우선적으로 보존할 것을 제안하는 것이 더 타당하리라고 판단된다.

표 III-6. 황근 3개 집단 52개를 대상으로 분석에 이용한 15개의 ISSR Primer와 증폭밴드 수

primer	primer sequence	number of DNA band
UBC 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	10
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	4
UBC 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	6
UBC 816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	4
UBC 818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	13
UBC 827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	11
UBC 835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	4
UBC 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	1
UBC 840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	4
UBC 841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	10
UBC 842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	9
UBC 846	CAC ACA CAC ACA CAC ART	3
UBC 853	TCT CTC TCT CTC TCT CRT	4
UBC 856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	7
UBC 861	ACC ACC ACC ACC ACC ACC	7
total		97

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

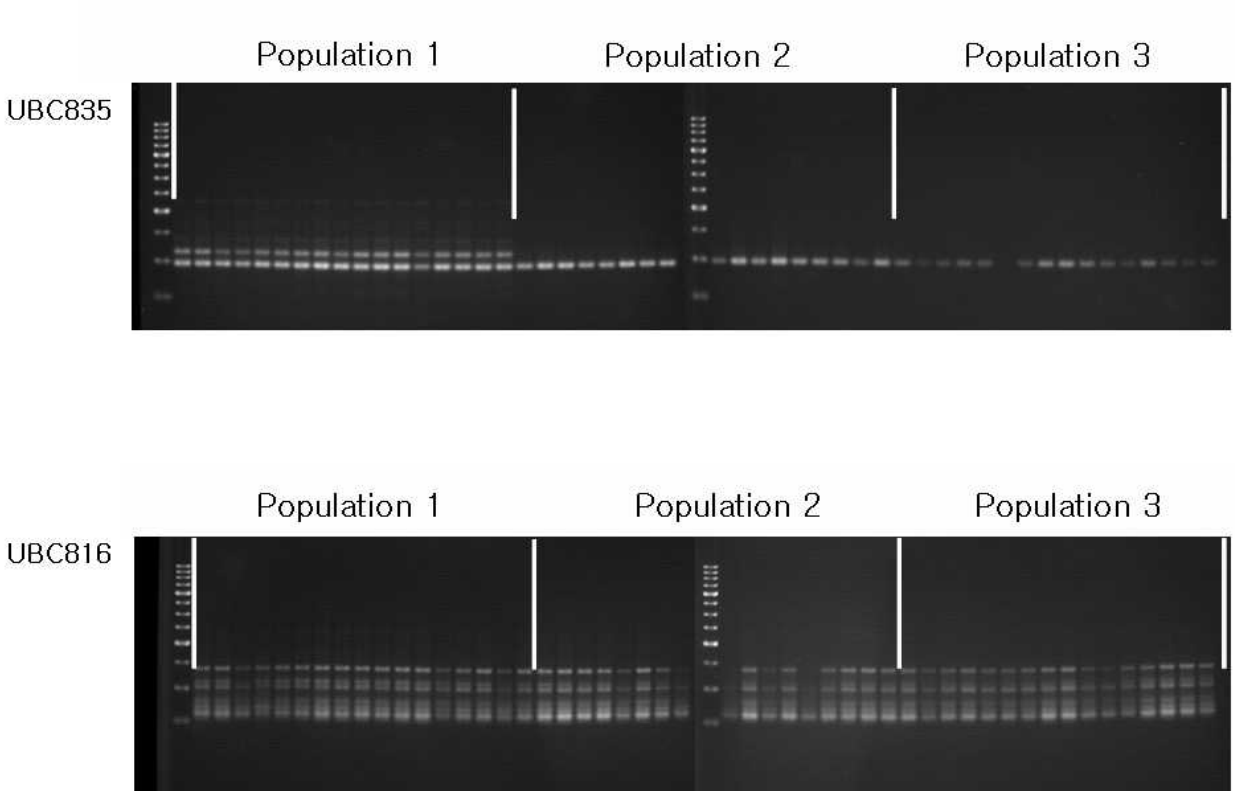


그림 Ⅲ-11. UBC 835와 816 두 개 프라이머를 이용한 집단 간의 차이. (UBC 835의 경우 집단 1이 집단 2-3과 뚜렷이 구별된다.)

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 Ⅲ-7. UBC 프라이머를 이용한 황근 3개 집단 52 개체의 증폭밴드의 유무를 나타내는 도표

UBC primer no. / DNA no.	808	811	812	816	818	827	835	836	840	841	842	846	853	856	861
Hibiscus 1-01	1111010000111001111011111110000001110100001001010000011001111111111110111011101000011110011011100														
Hibiscus 1-02	1110011100111011111011101100000001110000001011110000011101111111111111111011111000011110011111100														
Hibiscus 1-03	0100010000111011111011100100000001110010001011110000011101111111111111111111111000011110011111100														
Hibiscus 1-04	1110111100111111011101110010000000111000000000101000001000111111111111011111111111001110001111100														
Hibiscus 1-05	1111010100111011111011101100000001110000000011010100011101111111111111111111111101011111011011110														
Hibiscus 1-06	1110111000111011111011110100000001111000000011010100011101111111111110111111111010011110011011100														
Hibiscus 1-07	1110111000111010111011110110000111110111111011101011001110111111111111011111111100011111011011100														
Hibiscus 1-08	1110111000111011111011101100001011111100000011010011110001111111111110111111111101011101111011100														
Hibiscus 1-09	0110001000111010111011110000001001111100000001010011011001111111111110111111111011111110011011100														
Hibiscus 1-10	1110001000111011111011111100000001110100011011010101111101111111111111111111111011011101011111100														
Hibiscus 1-11	1110011000111011111111101101000001111101100001010111011101111111111111111111111111100011011100														
Hibiscus 1-12	1110111000111011111011111110100001111000010011010111010101111111111111111111111111011100011011110														
Hibiscus 1-13	1010011000111011111011111000100001111000000001010000010001111111111100111111111101110001101100														
Hibiscus 1-14	1110010000111011111011111100000001111110001011110001010101111111111111111100000000111001111111 0														
Hibiscus 1-15	1110011000111011111011101100000001111100001011110100011001111111111111111111111101111011111100														
Hibiscus 1-16	???????????0110?????011110000000000???????????000100000101011100111111100000100000000000000010000000														
Hibiscus 1-17	1100110000111011111011111100010111110010011000010000010001111111111101110111111110101000000001100														
Hibiscus 1-18	0000000001111011111011110100000001111000001011110000010101111111111111111011111000111000111111110														
Hibiscus 2-01	1110111000111011111011100100000001110100000011110000010111111111111111111011111000011110011111101														
Hibiscus 2-02	1110111000111011111011100100000001110110001011110000010101111111111111111011111000011110011111101														
Hibiscus 2-03	1010101000011011111011100100000001110100001011110000010111111111111111111011111010011110011111101														
Hibiscus 2-04	1110100000111011111011100100000001110011100011110000010101111111111111111011111010011110011111101														
Hibiscus 2-05	0110000000111011111011100100000001110010001011110000010101111111111111011011100000011110011111100														
Hibiscus 2-06	1010011000111011111011100100000001110000000011110000010101111111111111111011111010011110011111110														
Hibiscus 2-07	1110001000111011111011100100001001110000001011010000010101111111111111111011111010011110011111101														
Hibiscus 2-08	1110001000111011111011100100000001110000000011110000010101111111111111111011111000011110011111100														
Hibiscus 2-09	1010001000111011111011100100000001110000000011110000010101111111111111011011101000011110011111110														
Hibiscus 2-10	1010011000111011111011100100000??????????????1111000004???41111111111111111111111011011100111111110														
Hibiscus 2-11	1010001100111011111011100100000001110100000011110000010111111111111111111011101000011110011111100														
Hibiscus 2-12	1110011100111011111011100100000001110100000011110000010101111111111111111111111000011110011111101														
Hibiscus 2-13	1010001100111011111011100100000001110100001011110000010101111111111111011011110000111100111111110														
Hibiscus 2-14	1110001000111011111011100100000001110000001011110000010101111111111111011111111011110011111100														
Hibiscus 2-15	1110011000111011111011100100000001110010001011110000011101111111111111111011111101110011111101														
Hibiscus 2-16	1010011000111011111011100100001001110000001011110000010101111111111111111111111001110011111101														
Hibiscus 2-17	??????????1110111111011100100000001110100000011110000010101111111111111111011111110111001111101														
Hibiscus 3-01	1110101000111011111011100100000001111100001011110000010101111111111110111111111101110001111110														
Hibiscus 3-02	1110100000111011111011110100000001111100001011110000011101111111111111111111111001110001111110														
Hibiscus 3-03	1110100000111011111011110100000001110100001011110000010001111111111110111111111001110001111110														
Hibiscus 3-04	1100100000111011111011110100000001111101100011110000011001111111111111111111111101110001111110														
Hibiscus 3-05	1100100000111011111011100100000001111100001011110000010001111111111111111111111101110001111110														
Hibiscus 3-06	1110111000111111111011110100000001111000001011110000011001111111111111111111111011111000111110														
Hibiscus 3-07	1100110000111111111011100110100001111000001011010000010001111111111110111111011111010111000111110														
Hibiscus 3-08	1100110000111111111011100100100001110000001011110000010001111111111110111111111111010111000111110														
Hibiscus 3-09	1110111000111011111011100100000001111100001011110000010101111111111110111111111111010111000111110														
Hibiscus 3-10	1110111000111011111011110100100001111100001011110000011101111111111111111111111111100011111110														
Hibiscus 3-11	1110110000111111111011100100101001110010001011110000011101111111111111111111111111100011111110														
Hibiscus 3-12	1110111000111011111011110100100011111100001011110000011101111111111111111111111111100011111110														
Hibiscus 3-13	1110110000111010011011100100000001110000001011110000010001111111111111111111111101110001111110														
Hibiscus 3-14	1110110000111010011011110100100001110000001011111000011001111111111110111111111111010111000111110														
Hibiscus 3-15	1110111000111011111011110100000001110000001011110000010101111111111111111111111101110011100011110														
Hibiscus 3-16	1110110000111011111011110100000001110000001011110000010001111111111111111111111101110001111110														
Hibiscus 3-17	1110110010111111001101110010000000111110000101111000001100111111111111111111111111100011111110														

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 Ⅲ-8. 황근의 3개 집단 내의 대립인자에 대한 통계 수치

	ss	na	ne	h	I	np	fp
population 1	18	1.7113±0.4555	1.3782±0.3531	0.2266±0.1907	0.3441±0.2693	69	71.13
population 2	17	1.2577±0.4397	1.1222±0.2537	0.0762±0.1476	0.1181±0.2196	25	25.77
population 3	17	1.2990±0.4602	1.1549±0.3006	0.0914±0.1674	0.1382±0.2429	29	29.90
total	52	1.7629±0.4275	1.2881±0.3368	0.1789±0.1759	0.2845±0.2455	74	76.29

ss = sample size (number of individuals)
na = Observed number of alleles (mean and standard variation)
ne = Effective number of alleles (mean and standard variation)
h = gene diversity (mean and standard variation)
I = Shannon's Information index (mean and standard variation)
np = The number of polymorphic loci
fp = The percentage of polymorphic loci
[refer Nei (1987) and POPGENE program manual for more information on the statistics]

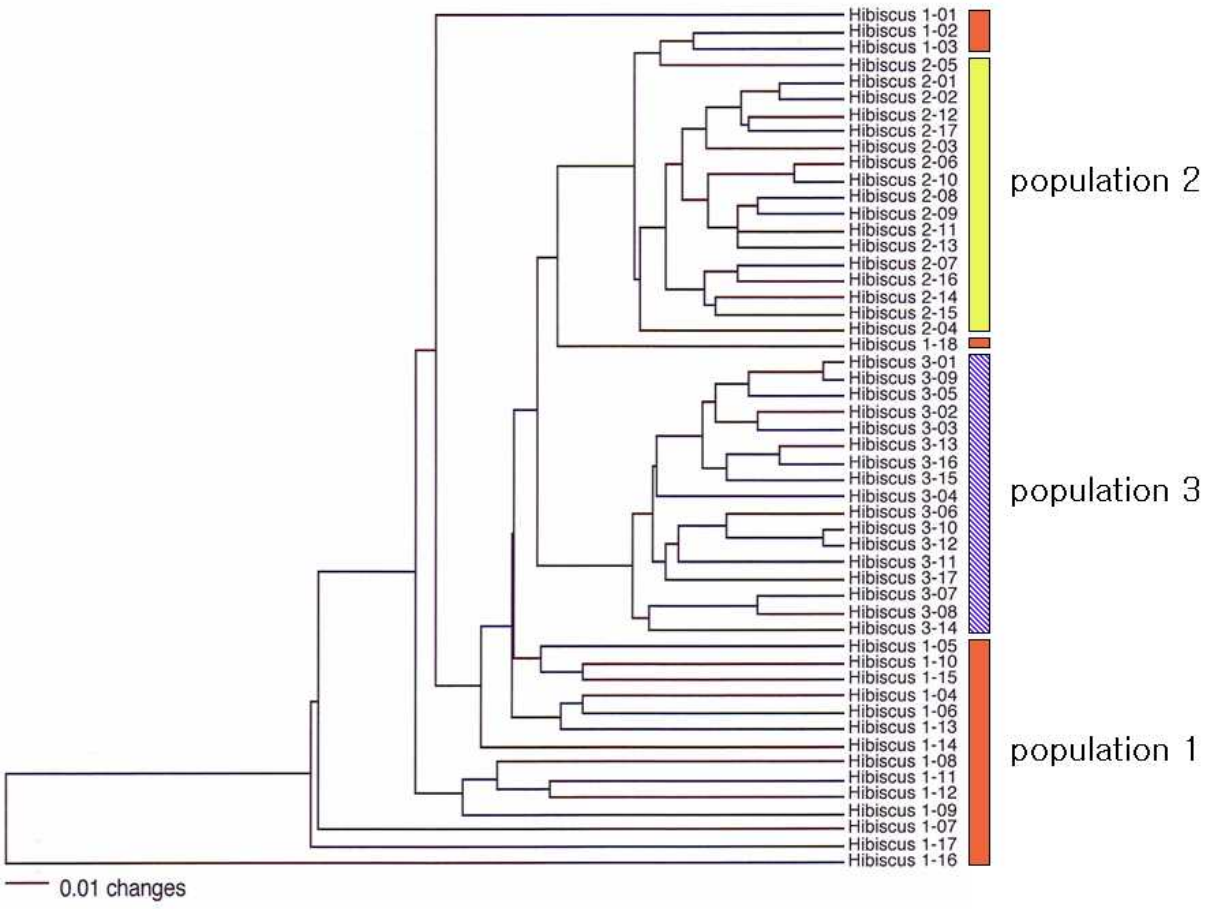


그림 Ⅲ-12. 황근 3개 집단 52개 개체의 ISSR 자료를 이용한 UPGMA 유집도

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

4. 결론

국내 희귀식물에 대한 유전적 다양성 분석은 종 보존을 위한 정책을 수립하는데 긴요한 과학적 판단근거로 활용될 수 있다. 이는 비슷한 조건일 경우 유전적 다양성이 더 높은 집단을 우선적으로 보존하는 것이 종 보존 전략상 더 유리하다는 보존생물학 및 진화유전학적 이론에 기초한 것이다.

본 연구에서는 황근과 끈끈이귀개를 대상으로 이와 같은 연구를 수행하였고, 그 결과 황근 집단의 경우 집단 1이 ITS 염기서열 변이나 ISSR 분석 결과 모두에서 월등히 더 높은 유전적 다양성을 나타낸 것을 확인할 수 있었다. 따라서 제주 지역의 황근 자생지에 대한 모든 지역을 보존하되 특히 집단 1에 대해서는 각별한 관심을 기울여 보존하는 것이 종 보존을 위한 가장 유효하리라고 판단된다.

한편, 끈끈이귀개의 경우 국내 2 집단가 유전적 다양성의 정도가 거의 유사한 것으로 확인되었으나, ISSR 분석 결과 집단 1이 집단 2에 비해 상대적으로 더 높은 유전적 다양성 지표(각 유전좌위당 평균 대립인자 수, 다형을 나타내는 유전좌위의 수)에서 다소 높은 값을 나타내었다. 특히 각 집단을 분석하기 위해 포함한 개체수가 집단 1이 12개체, 집단 2가 30개체인 점을 고려한다면 집단 1의 유전적 다양성이 보다 높은 것으로 판단할 수 있다. 한편, 끈끈이귀개의 ITS 염기서열은 중국 집단의 개체를 포함하는 모든 종에서 전혀 변이가 없는 것으로 나타나 본 연구에서 함께 조사했던 황근과 매우 대조적인 결과를 나타내었다. 이러한 차이의 원인을 규명하기 위해서는 종 생물학적 연구, 특히 이들이 어떤 식으로 결실하며, 번식해나가는지를 알아보는 생식생물학적 연구가 이루어져야 하리라고 본다.

끝으로, 본 유전적 다양성 분석 연구, 특히 황근을 대상으로 수행된 연구를 통해, 각 집단의 유전적 다양성을 파악함에 있어서 유전자 염기서열 분석과 ISSR 연구를 병행하는 것이 결론의 신뢰성과 타당성을 높이는데 매우 긍정적인 영향을 주는 것으로 파악되었다. 국내 희귀식물에 대한 이와 같은 유전적 다양성 분석자료가 축적된다면 향후 각종 종 보존대책 수립에 중요한 정책 판단 근거가 될 수 있을 것이다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

5. 참고문헌

Kim, Y.-D., S.-H. Kim, L. R. Landrum. 2004. Taxonomin and phytogeographic implications from ITS phylogeny in *Berberis* (Berberidaceae). J Plant Res. 117: 175-182.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of the base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. J. of Mol. Evol. 16: 111-120.

Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.

Swofford, D.L. 2002. PAUP*, phylogenetic analysis using parsimony(*and other methods), version 4.0b. Sinauer, Sunderland.

Yeh, F. C., Yang, R.-C., Boyle T., Ye B.J., Z-H., and Mao, J. X. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Ⅳ. 멸종위기 곤충종의 유전자 분석

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Ⅳ. 멸종위기 곤충종의 유전자 분석

1. 서론

곤충류(Class Insecta)는 현재 95만 여종이 기록되어 전세계적으로 알려진 모든 생물종의 과반수 이상을 차지하고 있는 방대한 분류군으로서 특히 육상 및 담수생태계에서 매우 중요한 역할을 하고 있다. 예를 들면 수많은 식식성 곤충은 산림 및 초원생태계에서 1차 소비자로서 먹이사슬의 원활한 연결에 중요한 역할을 한다. 꿀벌, 꽃등에, 나비류를 비롯한 화분매개충류들은 대다수 속씨식물의 생식에 결정적인 역할을 하여 육상생태계를 유지시킨다. 이 외에도 부식성곤충, 수서곤충, 포식 및 기생성곤충 등이 생태계에서 필수적인 요소들이다. 또한 위생해충, 농림 및 산림해충, 천적곤충 등의 다소 인위적인 범주에 속하는 수많은 곤충들은 인간의 복지에 직·간접적인 영향을 미친다. 최근의 통계에 의하면 한국에는 491과 11,153종의 곤충이 알려져 있으나, 실제 서식하는 곤충의 수는 50,000종이 넘을 것으로 추산하고 있다 (Kwon, 1997).

결국 곤충의 경우에는 파악되지 않은 종들이 알려진 종들보다도 많은 상황이며, 이들 중 많은 종들이 서식처의 파괴 등의 원인에 의해 멸종위기에 놓인 것은 의심할 여지가 없을 것이다. 단지 현재 한국의 곤충분류학적 지식의 수준으로는 이들 멸종위기종들을 속속들이 파악하는 것이 불가능할 뿐이다. 2005년 고시된 환경부의 “야생동·식물보호기본계획”에 따르면 현재 멸종위기야생동식물 1급으로 5종이 II급으로는 15종이 선정되어 있으며, 이는 전체 기록종의 0.2%에도 못 미치는 수치이다. 이는 기록종의 22%가 선정된 포유류, 18%인 조류와 15%인 양서파충류에 비해 매우 비합리적인 수치이며, 앞으로 한국의 곤충상에 대한 지식이 축적되면서 수많은 추가적인 멸종위기종들이 파악되어 선정될 것으로 생각된다. 현재 고시되어있는 20종의 멸종위기 곤충종들은 과거부터 비교적 널리 알려져 있던 종들로서 현재 그 숫자가 위험할 정도로 감소한 것이 확실히 파악된 경우들이며, 이들에 대한 보전은 미발굴 멸종위기 곤충의 보전을 위하여 상징적인 의미를 갖는 것으로 생각된다. 또한 이들의 서식처보전을 통하여 비슷한 서식처에 소속된 종들의 보전까지 가능하다는 점도 강조할 필요가 있다.

이번 용역과제는 현재 고시되어있는 멸종위기종 중 3종을 선정하여 DNA 마커를 개발하는데 그 목적이 있다. 또한 선정된 마커의 염기서열을 근연종들과 비교분석하여 개체군수준 혹은 종 이상의 수준에서 계통적인 분석을 시도할 때 참고자료로 사용할 수 있는 기초적인 자료를 제공하고자 하였다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

2. 재료 및 방법

2.1. 곤충류 분석대상종의 선정

RFP에서 제시한 총 7종의 멸종위기종 중에서 계통학적·생태학적 중요성과 샘플 확보의 용이성을 고려하여 꼬마잠자리, 물장군, 애기뿔소똥구리를 선정하였다. 이들은 요행이 아니면 거의 개체군 확인이 불가능한 장수하늘소나 비단벌레 등과는 달리, 아직도 어느 정도 채집이 가능한 종들이다.

꼬마잠자리(*Nanophya pygmaea*)는 우리나라 잠자리 중에서 가장 소형이며 일본, 대만, 동남아시아 등지에도 분포한다. 이들은 주로 생태적 보존의 가치가 높은 고산 습지이거나 인적이 드문 잘 보존된 습지를 대표하는 깃대종으로 볼 수 있으며, 이와 같은 서식처의 감소 또는 질저하 때문에 최근에 그 수가 급감하였다. 꼬마잠자리의 서식처보전을 통하여 많은 습지성 생물의 보전에도 크게 이바지 할 수 있을 것이다. 이들은 현재 환경부 차세대 과제를 통하여 복원 및 증식대상 곤충으로 선정되어 있어 시료의 획득이 용이하였으며, 서울여대 배연재 교수의 협조로 각기 다른 지역에서 채집한 3개체를 실험에 사용하였다.

물장군(*Lethocerus deyrollei*)은 꼬마잠자리 외에 유일하게 습지성 멸종위기종으로 선정되어 있다. 이들은 노린재목 물장군과(Belostomatidae)에 속하며, 우리나라의 수서곤충 중에서 가장 크기가 크고 (53-61mm) 심미적 가치가 있으며, 수컷이 알을 지키며 기르는 독특한 습성으로 말미암아 습지생태계 보전의 깃대종이나 환경교육 재료로 활용된다. 물장군은 진수서곤충으로서 연못, 농수로, 웅덩이, 습지 등 정수역에서 서식한다. 예전에는 농경지의 습지 등에서 흔히 발견되었으나 도시화, 산업화에 따른 습지의 감소와 오염으로 지금은 한반도의 남서 해안의 연안지역과 도서지역, 제주도 등 매우 제한된 지역의 습지에서만이 불규칙적으로 발견될 정도로 국내의 개체군은 절멸위기에 놓여있다. 물장군 역시 현재 환경부 차세대 과제를 통하여 복원 및 증식대상 곤충으로 선정되어 있어 시료의 획득이 비교적 용이하였으며, 증식과제를 수행하고 있는 서울여대 배연재 교수로부터 협조를 받았다.

애기뿔소똥구리(*Copris tripartitus*)는 소와 말의 똥을 섭식하는 종으로서 우리를 이용한 가축의 집단사육과 가축용 항생제의 남용 때문에 그 수가 격감된 종이다 (그림 IV-1). 현재 남한에서는 거의 찾아볼 수 없는 소똥구리(*Gymnopleurus mopsus*)와는 달리, 애기뿔소똥구리는 간혹 방목장에서 찾아 볼 수 있는 종이다. 시료로 사용된 개체들은 강원도 횡성군의 방목장에서 채집하였다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



그림 IV-1. 애기뿔소똥구리의 사진 (2006년 5월, 강원도 횡성군)

멸종위기종 3종만의 염기서열 분석으로는 대상종의 계통적 위치확인이나 개체군 분석에 유용한 마커를 찾는 것이 용이하지 않기 때문에, 비교분석을 위하여 15종의 염기서열을 추가적으로 획득하여 총 19종 23개체를 분석하였다 (표 IV-1). 이들 중 10종 14개체는 직접 실험을 통하여 획득하였고 9종은 Genbank에 적립되어 있는 염기서열을 이용하였다. 또한 분석의 정확성과 종내의 변이를 부분적으로 확인하기 위하여 멸종위기종의 경우에는 복수의 개체를 사용하여 분석하였다 (꼬마잠자리 3개체, 물장군 2개체, 애기뿔소똥구리 2개체).

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 IV-1. 분석대상 19종 23개체 목록. 9종은 GenBank에서 획득함.

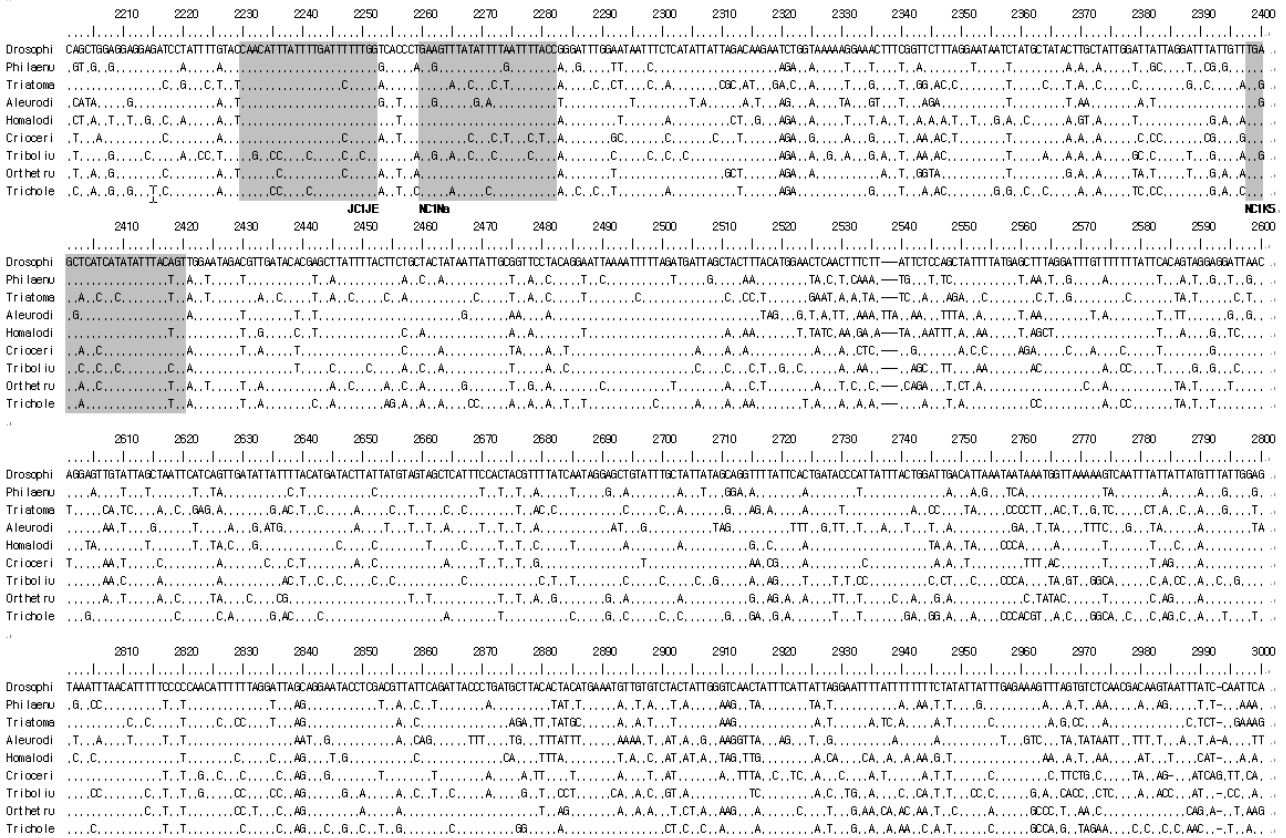
	학명	일반명	채집정보 / Genbank Accession 번호
잠자리목			
1	*Nannophya pygmaea*	꼬마잠자리-1	경북 문경시 농암면 율수리 습지, 2006/6/17, 배연재
2	*Nannophya pygmaea*	꼬마잠자리-2	인천 무의도, 2006/6/9, 배연재
3	*Nannophya pygmaea*	꼬마잠자리-3	곡성 신기리, 2006/5/12, 배연재
4	*Pantala flavescens*	된장잠자리	연세매지캠퍼스, 2006/8/23, 석상욱, 차동준
5	*Anax nigrofasciatus*	먹줄왕잠자리	연세매지캠퍼스, 2006/5/20, 변혜우
6	*Orthetrum triangulare*	큰밀잠자리	AB126005
딱정벌레목			
7	*Copris tripartitus*	애기뿔소똥구리-1	횡성군 갑천면 상대리 방목지, 2006/5/26, 이현석등
8	*Copris tripartitus*	애기뿔소똥구리-2	횡성군 갑천면 상대리 방목지, 2006/5/26, 이현석등
9	*Copris ochus*	뿔소똥구리	횡성군 갑천면 상대리 방목지, 2006/5/26, 이현석등
10	*Crioceris duodecimpunctata*	아스파라거스잎벌레	NC_003372
11	*Tribolium castaneum*	밀가루벌레	NC_003081
노린재목(이시아목)			
12	*Lethocerus deyrollei*	물장군-1	교동도 면민회관테니스장, 2006/6/9, 배연재
13	*Lethocerus deyrollei*	물장군-2	교동도 면민회관테니스장, 2006/6/10, 배연재
14	*Ranatra chinensis*	게아재비	연세매지캠퍼스, 2006/8/3, 변혜우, 석상욱
15	*Laccotrephes japonensis*	장구애비	귀래, 2006/8/26, 이현석등
노린재목(동시아목)			
16	*Philaenus spumarius*	거품벌레의 일종	NC_005944
17	*Triatoma dimidiate*	가루이의 일종	NC_002609
18	*Aleurodicus dugesii*	가루이의 일종	NC_005939
19	*Homalodisca coagulate*	매미충의 일종	NC_006899
파리목			
20	*Itosigo bellus Ito*	이토과실파리	강원도 인제군 점봉산, 1996/8/18, 한호연, 변혜우
21	*Acanthonevra pteropleuralis*	줄과실파리	?
22	*Drosophila yakuba*	초파리의 일종	NC_001322
좀목			
23	*Tricholepidion gertschi*	좀의 일종	NC_005437

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

2.2. 곤충류 유전자분석 마커 선정

분석대상종들이 근연관계가 먼 잠자리목, 노린재목, 딱정벌레목으로 흩어져 있었으므로, 적합한 프라이머를 고안하기기 위해서는 추가적으로 다양한 곤충의 비교가 필요하였다. 따라서 현재 미토콘드리아 genome 전체가 알려진 파리목, 딱정벌레목, 잠자리목, 노린재목 곤충 9종의 염기서열을 정렬하여 PCR 프라이머들을 고안하였다 (표 IV-2). 또한 염기서열 각 부분의 변이를 개략적으로 파악하기 위하여 그림 2와 같은 변이표를 작성하여 사용하였다. 여기에 문헌을 통하여 확인된 프라이머 부분들을 확인하여 검증을 실시하기도 하였다.

표 IV-2. 프라이머 고안을 위해 곤충 9종의 전체 미토콘드리아 염기서열을 정렬한 결과의 일부분. Genbank에서 추출한 분석종: *Drosophila yakuba, Philaenus spumarius, Tricholepidion gertschi, Aleurodicus dugesii, Homalodisca coagulate, Crioceris duodecimpunctata, Tribolium castaneum, Orthetrum triangulare, Tricholepidion gertschi.*



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

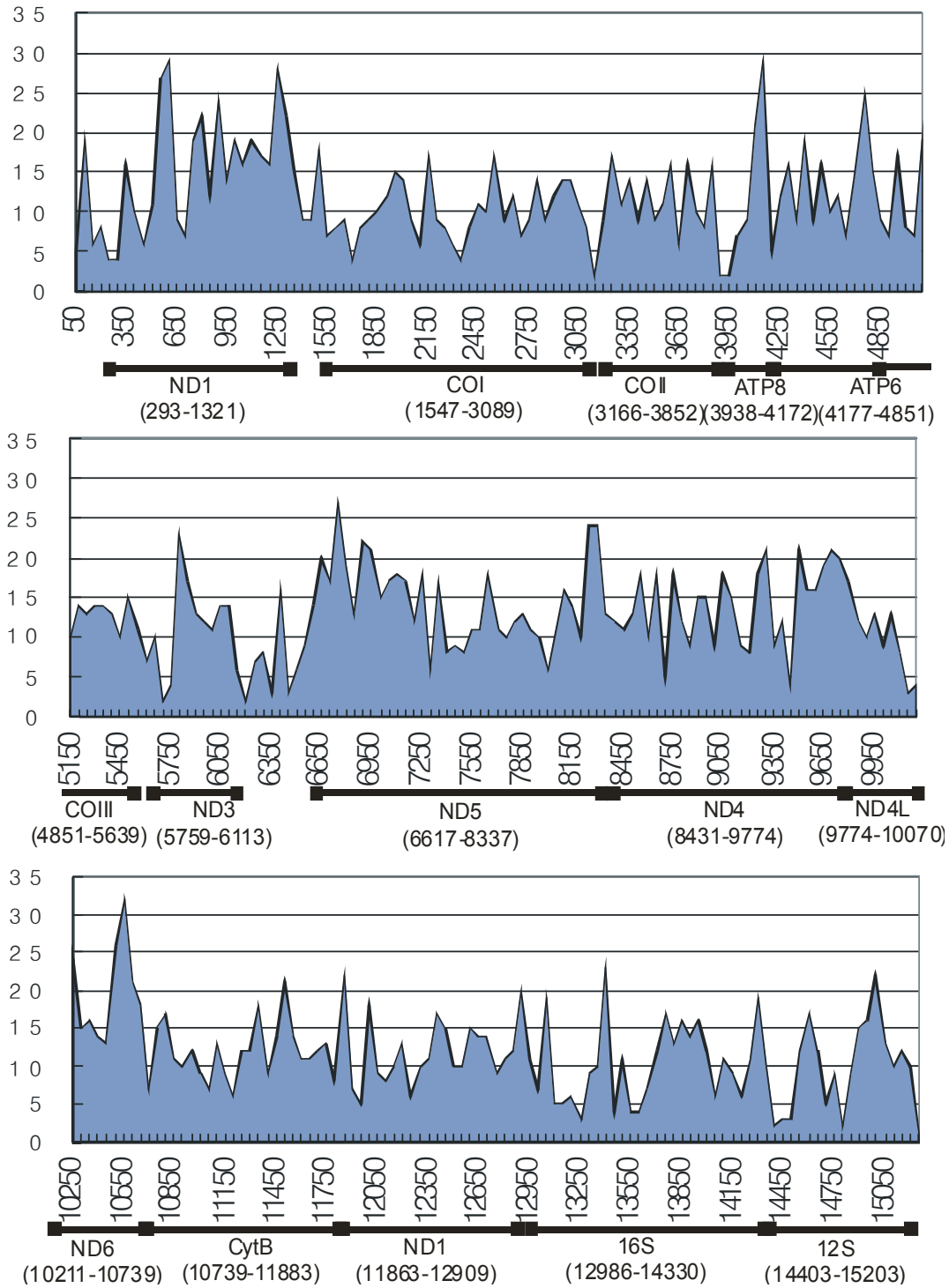


그림 Ⅳ-2. 곤충류 9종의 미토콘드리아 염기서열 을 비교하여 차이를 나타내는 염기의 숫자를 50 염기 단위로 표시한 그래프. X축: 5' 말단부터의 염기서열 일련번호; Y축: 변이가 있는 염기의 숫자. 각 유전자 부분을 표시하였으며 AT rich region은 제외하였다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

2.3. 핵산추출, PCR 및 염기서열 분석

핵산추출방법은 한 개체의 곤충을 재료로 실험할 수 있도록 한 표준실험법(Sheppard et al. 1992)을 변형시킨 방식을 사용하고 있다(Han & McPheron 1997). 이 방식에서는 55℃에서 proteinase-K 등을 사용하여 30분~48시간 동안 재료를 덥히는 등 몇 가지 방법을 개선하여 핵산 추출양이 최대로 될 수 있도록 하였다. 추가로 최근에 시판되고 있는 핵산추출 키트(예, Qiagen DNeasy kit)들도 추출양이나 질로 볼 때 손색이 없으므로 편리하게 사용하고 있다. 냉동표본의 경우 한쪽 다리만 절단하여 사용하더라도 충분한 핵산을 추출할 수 있으며 나머지는 증빙표본(voucher specimen)으로 보관하고 있다. 전개체를 핵산추출에 사용하는 건조 또는 알코올표본의 경우에도 날개를 절단하여 증빙표본으로 보관하였다. 이미 추출된 핵산으로부터 해당 부분을 PCR 방식으로 증폭한 뒤 직접 정제하거나, 다수의 밴드가 보일시에는 아가로즈젤 전기영동(agarose gel electrophoresis)으로 분리시킨다. 이렇게 분리된 DNA 는 Gene Clean kit 등으로 정제한 후 Invitrogen에서 공급하는 TA Cloning kit로 Cloning 하여 DNA sequencing을 위한 주형을 만든다. Sequencing은 분자생물학 관련 실험대행업체인 Bionics사에 맡겨 수행하고 있다.

2.4. 염기서열 정열 및 계통분석

일단 각 종별 염기서열이 확인되면 이들은 CLUSTAL X 소프트웨어(version 1.81, 2000; Thompson et al. 1997)를 사용하여 정열(aligning)하였으며 이는 다시 BioEdit 소프트웨어(ver. 7.01, 2004, Hall 1999)로 정리 및 수정하였다. Ribosomal RNA 또는 tRNA 유전자의 경우는 염기서열 정렬은 염기의 결손이나 추가가 상대적으로 많았으나, 단백질 코딩부분들은 염기의 결손과 추가가 거의 없으므로 정렬에는 문제가 없다. 계통적인 분석을 위해서는 PAUP* (ver. 4.0b, Swofford 2001)과 MEGA (ver. 3.0, Kumar et al. 2004) 소프트웨어를 주로 사용하였다.

획득된 자료행렬에 기초하여 Neighbour-Joining 방식으로 계통수를 작성한 후 각 종 또는 상위분류군들이 예측대로 묶여지는지, 또는 종내 개체들 간의 변이는 어느 정도인지 확인하면서 각 마커들의 유용성을 분석하였다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3. 결과 및 고찰

3.1. 곤충류의 유전자분석용 마커 개발

그림 IV-2에서와 같이 Genbank에서 획득한 9종 곤충의 미토콘드리아 genome 염기서열을 정렬한 결과에 입각하여 9개 유전자 14개부분의 프라이머를 우선적으로 고안하여 검증실험을 실시하였다. 이들 중에서 PCR 증폭이 확인된 8개 마커를 선정하여 실험에 임하였다 (표 IV-3). 각 프라이머 쌍으로 증폭된 염기쌍의 숫자와, annealing temperature는 표 IV-4에 표시하였다.

표 IV-3. 8개 유전자 마커를 PCR증폭하는데 사용된 프라이머 목록

Gene	PRIMER 명	단축명	SQUENCE
Cox1	C1-J-1718	JC1Fa	GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC
	C1-N-2191	NC1Na	CCCGGTAAAATTAAAATATAAACTTC
Cox2	TL2-J-3043	JCO2AA	TGGCAGATTAGTGCAATGGATTTAA
	TK-N-3768	NCO2B	ACTTGCTTTCAGTCATCTAATG
Cox3	C3-J-5014	JCO3A	TTATTTATTGCATCAGAAGT
	C3-N-5460	NCO3B	TCAACAAAATGTCAGTATCA
ND4	N4-J-9235	JN4A	TCAAAAAATAAATAAAATATAAATAA
	TT-N-9859	NN4B	TTACAAGACCAATGTTTTTATTAAACTA
CB	CB-J-10933	JCB1	TATGTTTTACCTTGAGGACAAATATC
	CB-N-11367	NCB2	ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT
ND1	N1-J-12074	JND1Y	TCTGATTCACCTTCAGCAAAATC
	LR-N-12866	NND1Z	ACATGATCTGAGTTCAAACCGG
16S	LR-J-12883	R16R	CACCGGTTTGAACTCAGATC
	LR-N-13398	F16F	CGCCTGTTTAACAAAAACAT
12S	SR-J-14233	J12bi	AAGAGCGACGGGCGATGTGT
	SR-N-14588	N12ai	AAACTAGGATTAGATACCCTATTAT

표 IV-4. 8개 유전자 마커를 증폭하는데 사용된 프라이머 쌍 및 증폭된 길이 (*Drosophila yakuba* 기준), annealing 온도.

Gene	PRIMER 쌍	길이(bp)	Annealing
COI	C1-J-1718 / C1-N-2191	524	60°C
COII	TL2-J-3043 / TK-N-3768	771	55°C
COIII	C3-J-5014 / C3-N-5460	485	45°C
ND4	N4-J-9235 / TT-N-9859	677	60°C
CytB	CB-J-10933 / CB-N-11367	485	50°C
ND1	N1-J-12074 / LR-N-12866	792	55°C
16S	LR-J-12883 / LR-N-13398	554	50°C
12S	SR-J-14233 / SR-N-14588	399	55°C

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

개발된 마커 중에서 실험대상 분류군 전부에서 사용가능했던 마커는 다음 5개였다: COI, COII, ND1, 16S, 12S. 그러나 CytB의 경우 물장군에서는 증폭이 되지 않았으며, COIII와 ND4의 경우에는 잠자리목에서만 사용할 수 있었다. 3개 목에서 동시에 사용할 수 있는 마커를 찾다보니 그 특이성이 다소 떨어지는 것은 당연한 일이나, 앞으로 보다 좁은 범위의 분류군을 다룰 경우 좀 더 특이성이 높고, 긴 부분을 증폭하여 사용할 수 있는 추가적인 마커의 개발이 가능하다. 다음에는 각 마커별 결과를 표시하였다.

3.1.1. 곤충의 12S 마커

12S 마커의 경우에 누락된 분류군이 없이 약 400bp 정도를 증폭할 수 있었다. 과거에도 다양한 분류군에서 많이 사용되어 검증된 부분이라 아가로즈젤 상에서 매우 깨끗하게 분리되었다 (그림 IV-3). 이들을 분석하여 Clustal X로 정렬한 결과 gap을 포함하여 417bp의 자료행렬을 만들 수 있었으며 그림 IV-4와 같은 계통도를 산출할 수 있었다. 이 계통도는 이번 연구과제의 대상 멸종위기종들을 명확히 동정할 수 있도록 구분해 주었으며 이들을 포함하는 잠자리목, 딱정벌레목, 이시아목 또한 명확히 구분해 주었으므로, 종 이상에서 목 수준까지의 계통적 위치를 검증하는데 유용한 유전적 마커로 사료된다. 종 이하의 데이터를 보면 꼬마잠자리 3개체에서는 3개 base에서, 애기뿔소똥구리 2개체에서 5개 base, 그리고 물장군 2개체에서는 3개 base의 차이를 확인할 수 있었다. 따라서 개체군 수준의 연구에서도 상당히 유용한 마커로서 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

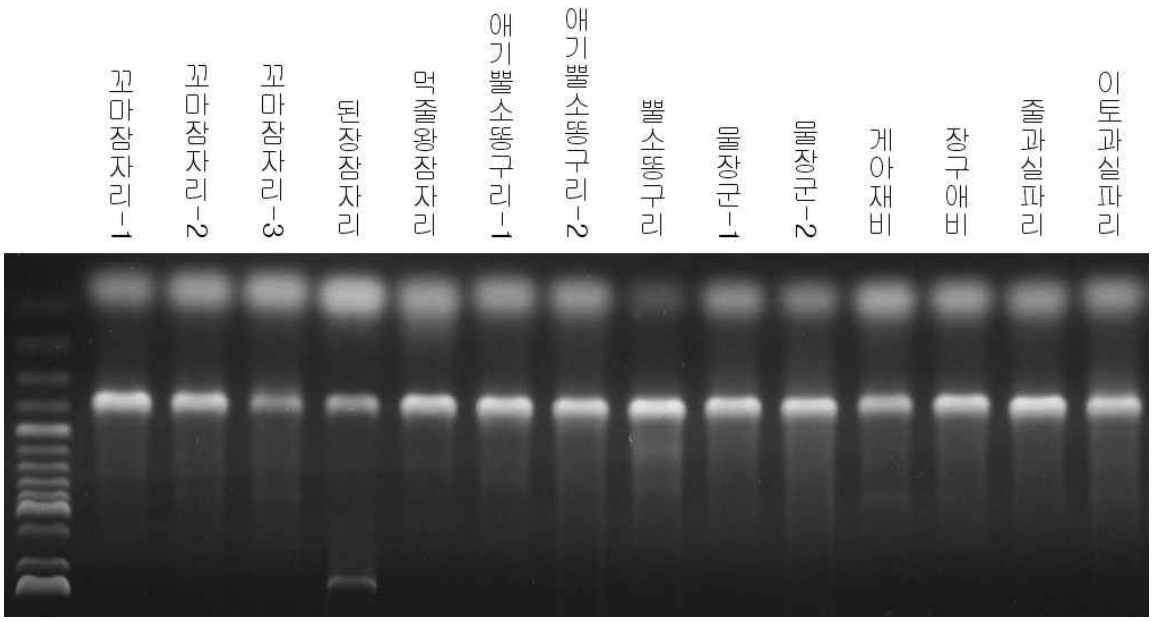


그림 IV-3. 12S 마커의 PCR 증폭결과를 아가로즈젤 상에서 분리한 사진.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

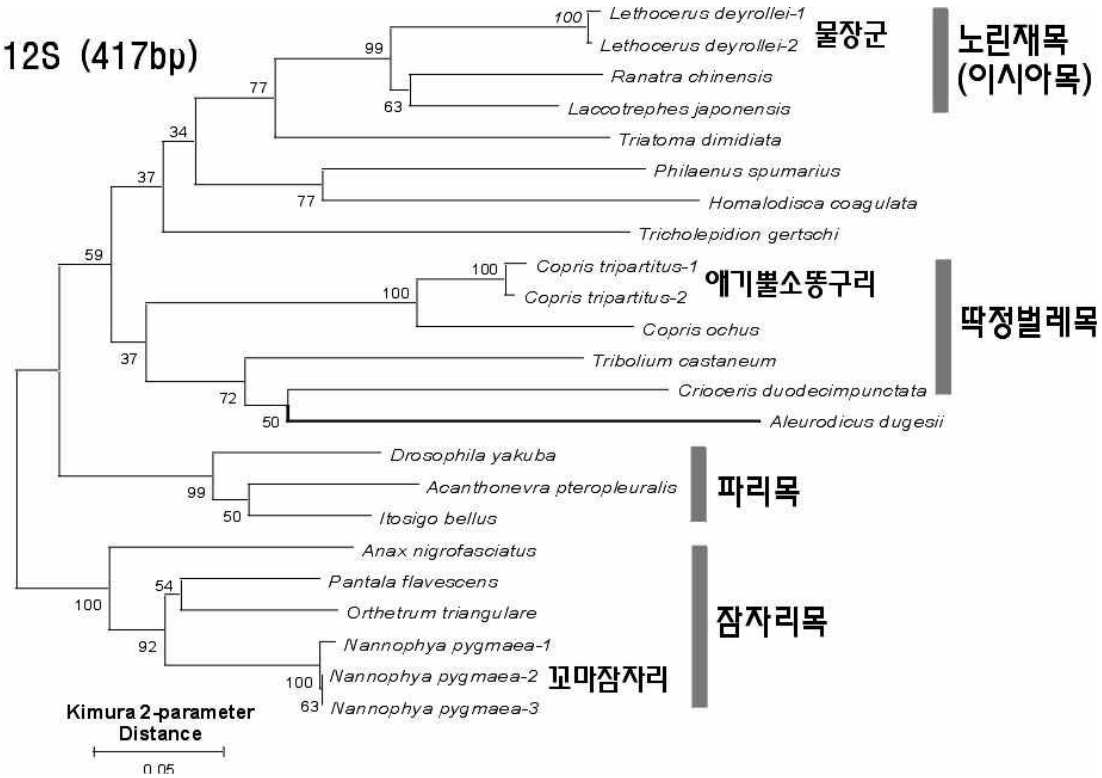


그림 IV-4. 12S 염기서열에 입각한 neighbour-joining 계통수. 가지에 표기한 숫자는 bootstrap values.

3.1.2. 곤충의 16S 마커

16S 마커 역시 누락된 분류군이 없이 약 550bp 정도를 증폭할 수 있었으며. 과거에도 다양한 분류군에서 많이 사용되어 검증된 부분이라 아가로즈젤 상에서 매우 깨끗하게 분리되었다(그림 IV-5). 이들을 분석하여 Clustal X로 정렬한 결과 gap을 포함하여 579bp의 자료행렬을 만들 수 있었으며 그림 IV-6과 같은 계통도를 산출할 수 있었다. 이 계통도는 이번 연구과제의 대상 멸종위기종들을 명확히 동정할 수 있도록 구분해 주었으며 이들을 포함하는 잠자리목, 딱정벌레목, 이시아목 또한 명확히 구분해 주었으므로, 종 이상에서 목 수준까지의 계통적 위치를 검증하는데 유용한 유전적 마커로 사료된다. 종 이하의 데이터를 보면 꼬마잠자리 3개체에서 4개 base, 애기뿔소똥구리 2개체에서 3개 base의 차이를 확인할 수 있었으나, 물장군 2개체에서는 완전히 동일한 염기서열을 확인하였다. 따라서 개체군 수준에서는 12S 보다는 다소 보전적인 것으로 사료된다. 그러나 꼬마잠자리의 경우에는 4개의 변이가 확인되었으므로, 12S와 함께 사용하여 개체군연구와 종 이상의 계통적 연구를 동시에 수행한다면 좋은 결과를 낳을 수 있을 것으로 사료된다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

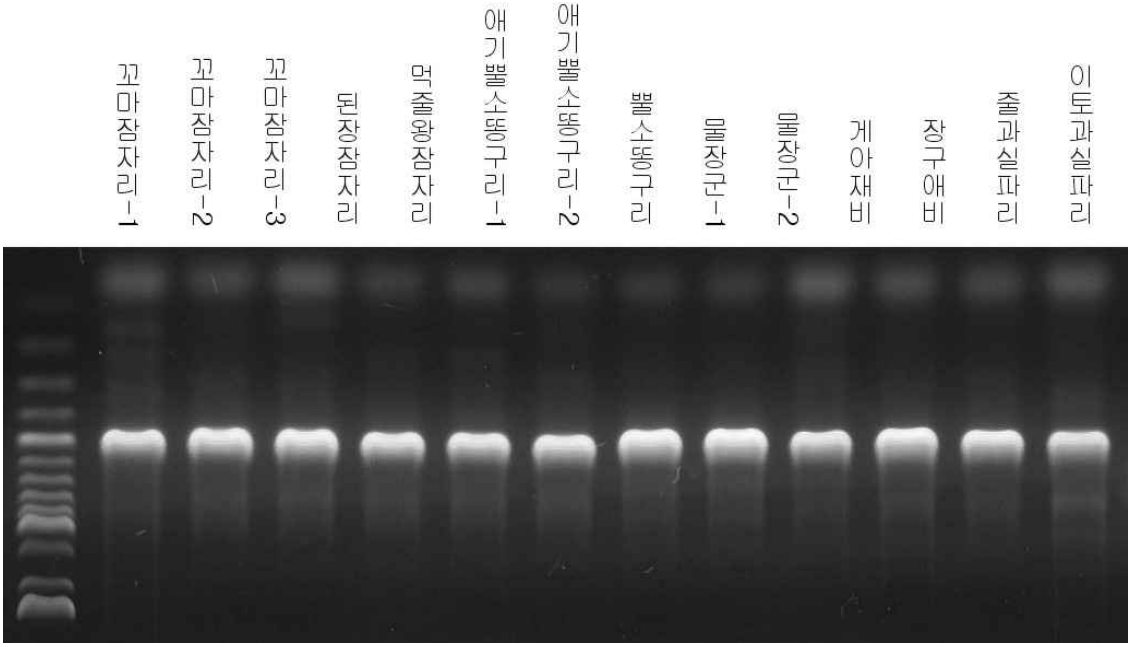


그림 IV-5. 16S 마커의 PCR 증폭결과를 아가로즈젤 상에서 분리한 사진.

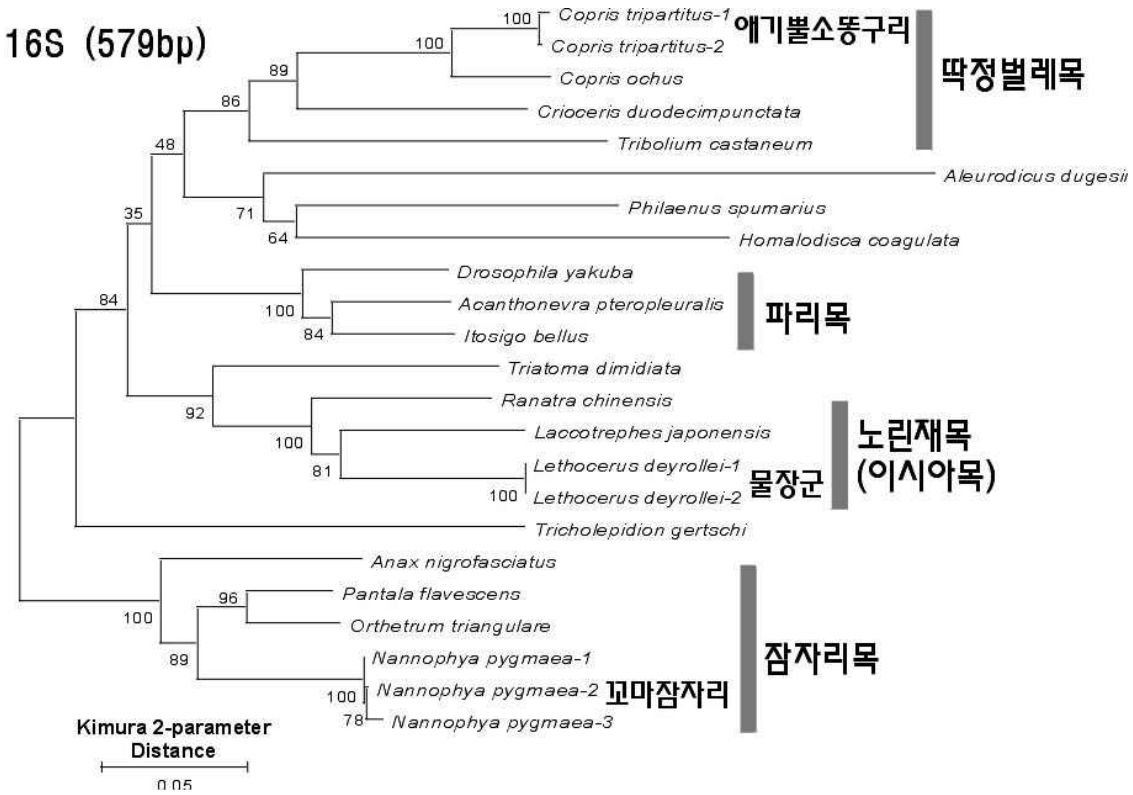


그림 IV-6. 16S 염기서열에 입각한 neighbour-joining 계통수. 가지에 표기한 숫자는 bootstrap values.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.1.3. 곤충의 COI 마커

COI 마커는 524bp 정도를 증폭할 수 있었으며, 과거에도 다양한 분류군에서 많이 사용되어 검증된 부분이라 아가로즈젤 상에서 매우 대부분 깨끗하게 분리되었다 (그림 IV-7). 그러나 특이하게도 물장군 중 1개체는 PCR 결과가 희미하게 나타났으며, 몇 번의 반복실험에도 계속 비슷한 결과가 나온 것을 볼 때 프라이머 부분에 변이가 있는 것으로 생각되었다. 따라서 앞으로 물장군의 실험을 위해서는 좀 더 특이적인 프라이머를 고안해야 할 것으로 생각된다. 또한 애기뿔소똥구리의 1종에서는 pseudogene으로 추정되는 염기서열이 나와 이를 분석에서 제거하였다. 나머지 염기서열들을 Clustal X로 정렬한 결과 gap을 포함하여 527bp의 자료행렬을 만들 수 있었으며, 그림 IV-8과 같은 계통도를 산출할 수 있었다. 이 계통도는 목 수준에서는 잠자리목과 파리목을 묶어주었으나, 딱정벌레목과 이시아목에 속하는 종들을 묶지는 못하였다. 또한 계통수 기부에 비해 말단가지의 길이(branch length)가 긴 것으로 보아, 12S나 16S에 비해 훨씬 빠른 속도로 진화한 것으로 사료된다. 그러나 종 이하의 데이터를 보면 꼬마잠자리 3개체에서 4 base부분의 차이가 확인되었으나, 애기뿔소똥구리와 물장군은 1개체씩만이 분석되었으므로 변이의 정도는 파악할 수 없었다. 따라서 COI의 경우에는 개체군연구 및 근연종간의 분석에 사용될 수 있는 유용한 마커로 사료된다. 현재 COI 부분은 DNA 바코드 부분으로서 주로 종의 식별에 전세계적으로 많이 사용되고 있다.

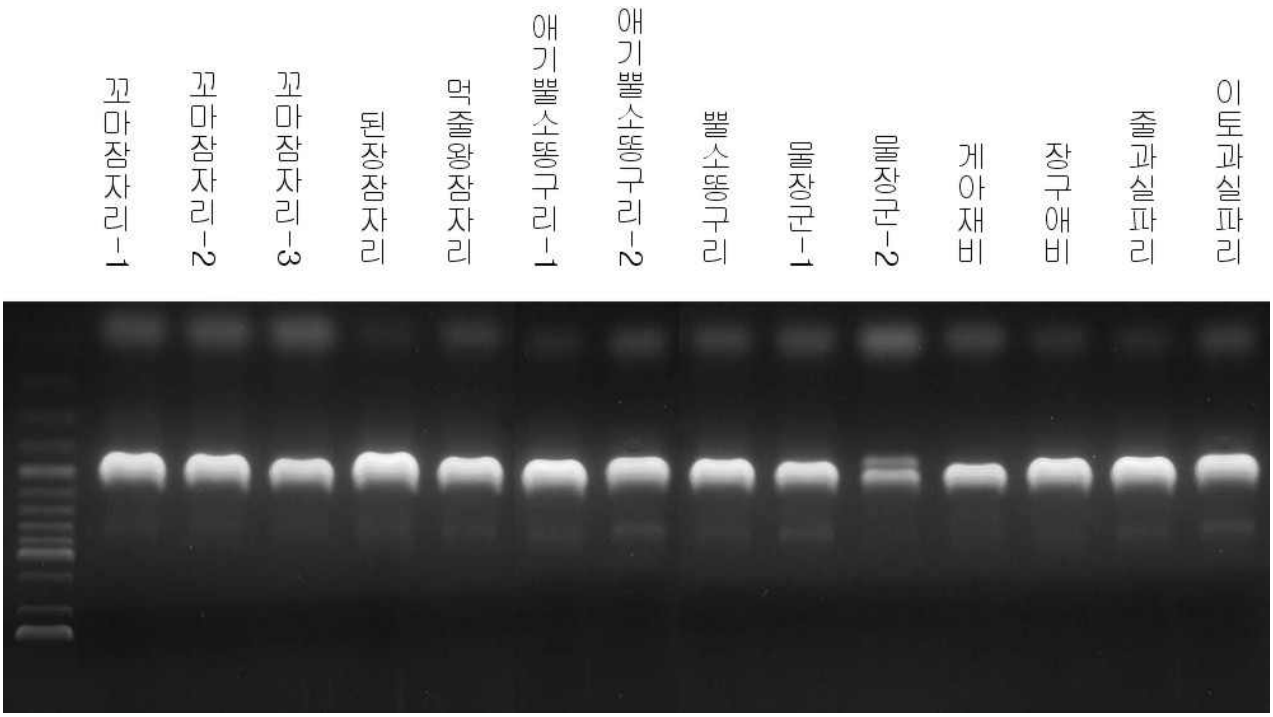


그림 IV-7. COI 마커의 PCR 증폭결과를 아가로즈젤 상에서 분리한 사진.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

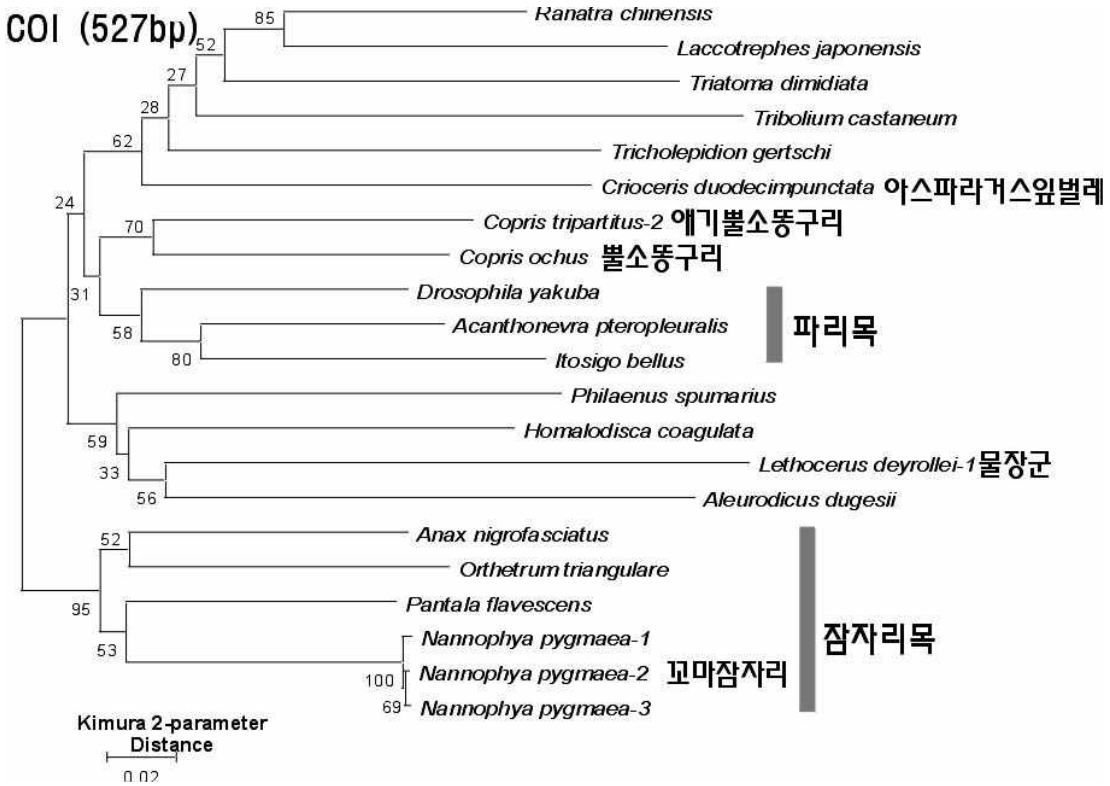


그림 IV-8. COI 염기서열에 입각한 neighbour-joining 계통수. 가지에 표기한 숫자는 bootstrap values.

3.1.4. 곤충의 COII 마커

COII 마커는 약 771bp 정도를 증폭할 수 있었으며. 과거에도 다양한 분류군에서 많이 사용되어 검증된 부분이라 아가로즈젤 상에서 매우 깨끗하게 분리되었다 (그림 IV-9). 그러나 뿔소똥구리의 경우 염기서열분석에서 pseudogene으로 추정되는 결과가 나와, 이를 제외한 나머지를 분석하였다. 이들 염기서열에서 정렬이 용이하지 않은 앞뒤 쪽 t-RNA 부분을 제외하고, 669bp의 자료행렬을 만들 수 있었으며 그림 IV-10과 같은 계통도를 산출할 수 있었다. 이 계통도는 이번 연구과제의 대상 멸종 위기종들을 명확히 동정할 수 있도록 구분해 주었으며 이들을 포함하는 잠자리목, 딱정벌레목, 이시아목 또한 명확히 구분해 주었으므로, 종 이상에서 목 수준까지의 계통적 위치를 검증하는데 유용한 유전적 마커로 사료된다. 종 이하의 데이터를 보면 꼬마잠자리 3개체에서 3개 base에서, 애기뿔소똥구리 2개체에서 4개 base, 그리고 물장군 2개체에서는 4부분의 차이를 확인할 수 있었다. 따라서 개체군 수준의 연구에서도 상당히 유용한 마커로서 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

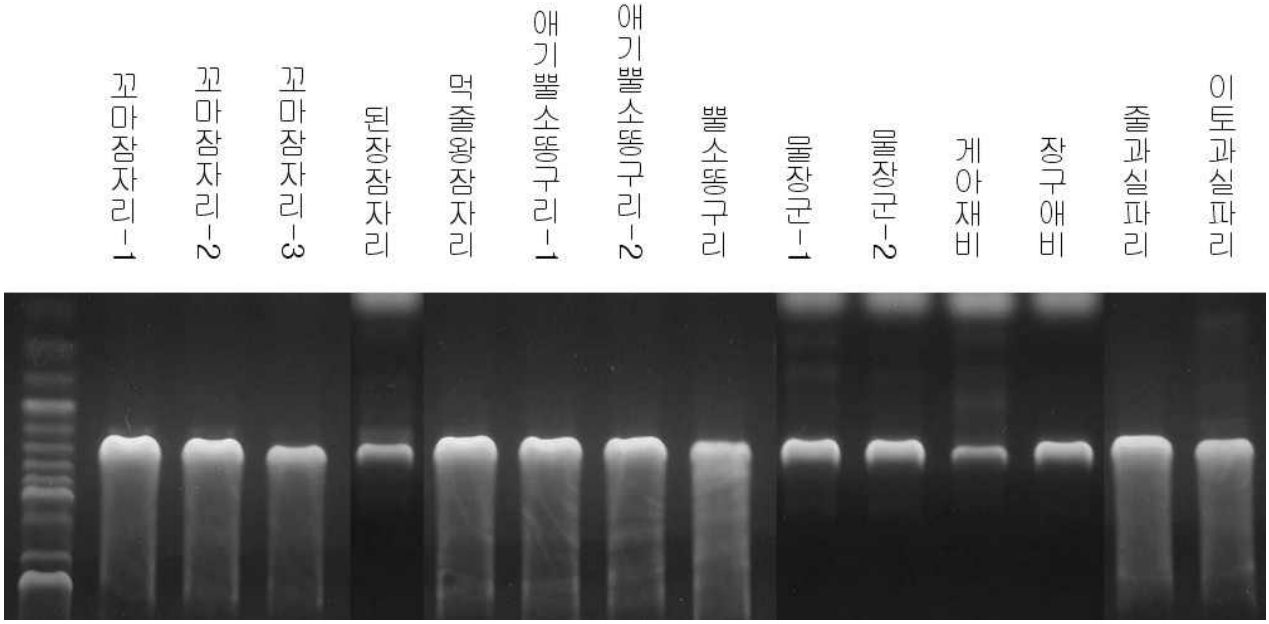


그림 IV-9. COII 마커의 PCR 증폭결과를 아가로즈젤 상에서 분리한 사진.

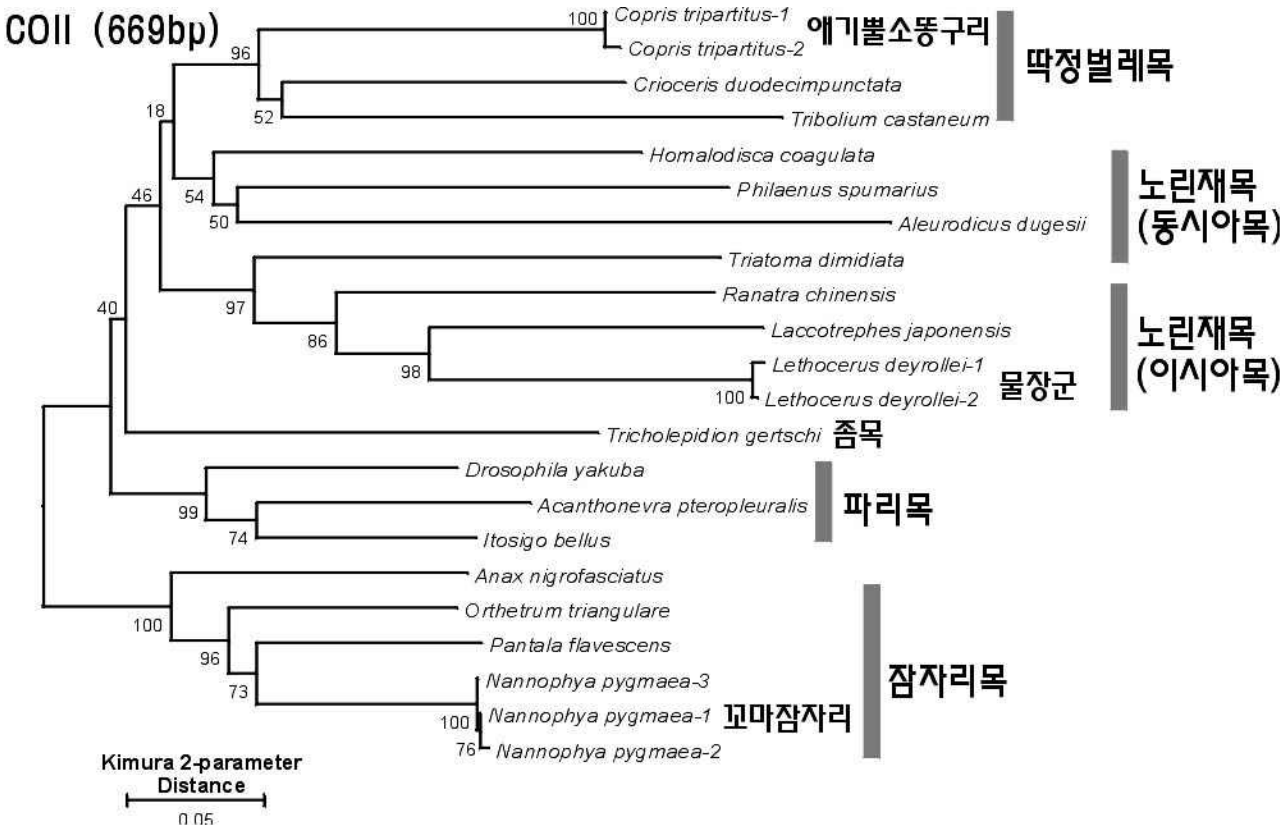


그림 IV-10. COII 염기서열에 입각한 neighbour-joining 계통수. 가지에 표기한 숫자는 bootstrap values.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.1.5. 곤충의 COIII 마커

COIII 마커의 경우 전체적으로 증폭결과가 불규칙하게 나왔으며, 멸종위기종 중에서는 꼬마잠자리만이 명확한 단일 밴드가 확인되었다 (그림 IV-11). 아마도 다양한 목을 포괄하는 universal primer를 디자인하기에는 해당부분 염기의 변이가 너무 심했던 것으로 생각된다. 잠자리목의 경우 먹줄왕잠자리와 된장잠자리는 다수의 밴드가 나왔지만, gel purification을 통하여 염기서열 분석의 주형을 확보하여 실험을 실시하였다. 따라서 잠자리목과 Genbank에서 획득한 염기서열만을 통합분석하였다. 그러나 애기뿔소똥구리와 물장군의 경우에도 후일 목특이적(order-specific) 프라이머를 획득하여 독자적인 분석은 가능할 것으로 사료된다.

약 485bp 정도를 증폭하여 자료행렬을 만들 수 있었으며 그림 IV-12와 같은 계통도를 산출할 수 있었다. 이 계통도는 멸종위기종인 꼬마잠자리를 명확히 동정할 수 있도록 구분해 주었으나, 그 외의 종들의 계통적 위치를 확인하는 것은 다른 종의 염기서열의 부족으로 인해 가능하지 않았다. 종 이하의 데이터를 보면 꼬마잠자리 3개체에서 염기서열이 모두 동일한 것으로 보아 개체군단위의 분석에는 적절하지 못한 것으로 사료된다.

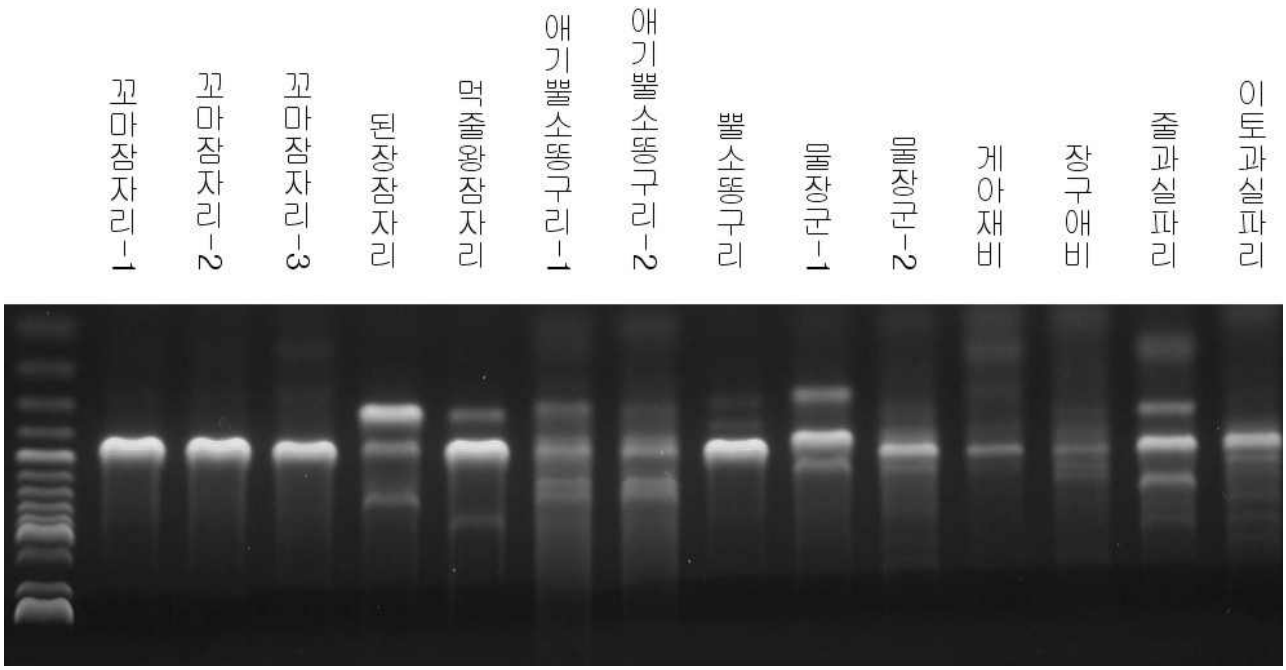


그림 IV-11. COIII 마커의 PCR 증폭결과를 아가로즈젤 상에서 분리한 사진.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

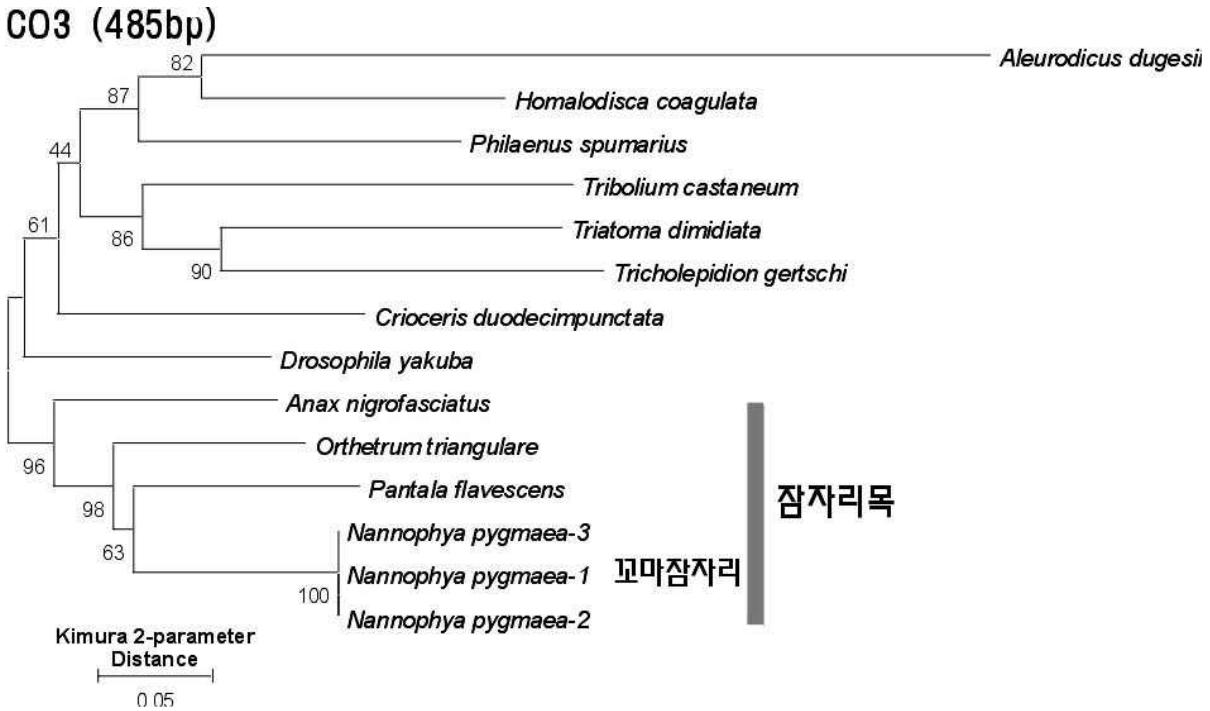


그림 IV-12. COIII 염기서열에 입각한 neighbour-joining 계통수. 가지에 표기한 숫자는 bootstrap values.

3.1.6. 곤충의 ND1 마커(ND1 일부 + tRNA-Leu +16S 일부)

ND1 마커는 실제로는 ND1의 끝부분과 t-RNA-Leu, 그리고 16S rRNA 앞부분을 약간 포함하는 염기서열로서 각 종별로 790bp 내외를 깨끗하게 증폭할 수 있었다 (그림 IV-13). 그러나 애기뿔소똥구리와 뿔소똥구리의 경우 증폭결과에서 다중밴드가 나타나 클로닝을 통해서도 애기뿔소똥구리 1개체의 염기서열을 획득하는데 그쳤다. Clustal X를 이용하여 851bp의 자료행렬을 만들어 그림 IV-14와 같은 계통도를 산출할 수 있었다. 이 계통도는 이번 연구과제의 대상 멸종위기종들을 명확히 동정할 수 있도록 구분해 주었으며 이들을 포함하는 잠자리목, 딱정벌레목, 이시아목 또한 명확히 구분해 주었으므로, 종 이상에서 목 수준까지의 계통적 위치를 검증하는데 유용한 유전적 마커로 사료된다. 종 이하의 데이터를 보면 꼬마잠자리 3개체에서 10개 base에서 그리고 물장군 2개체에서는 2부분의 차이를 확인할 수 있었다. 따라서 개체군 수준의 에서도 상당히 유용한 마커로서 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

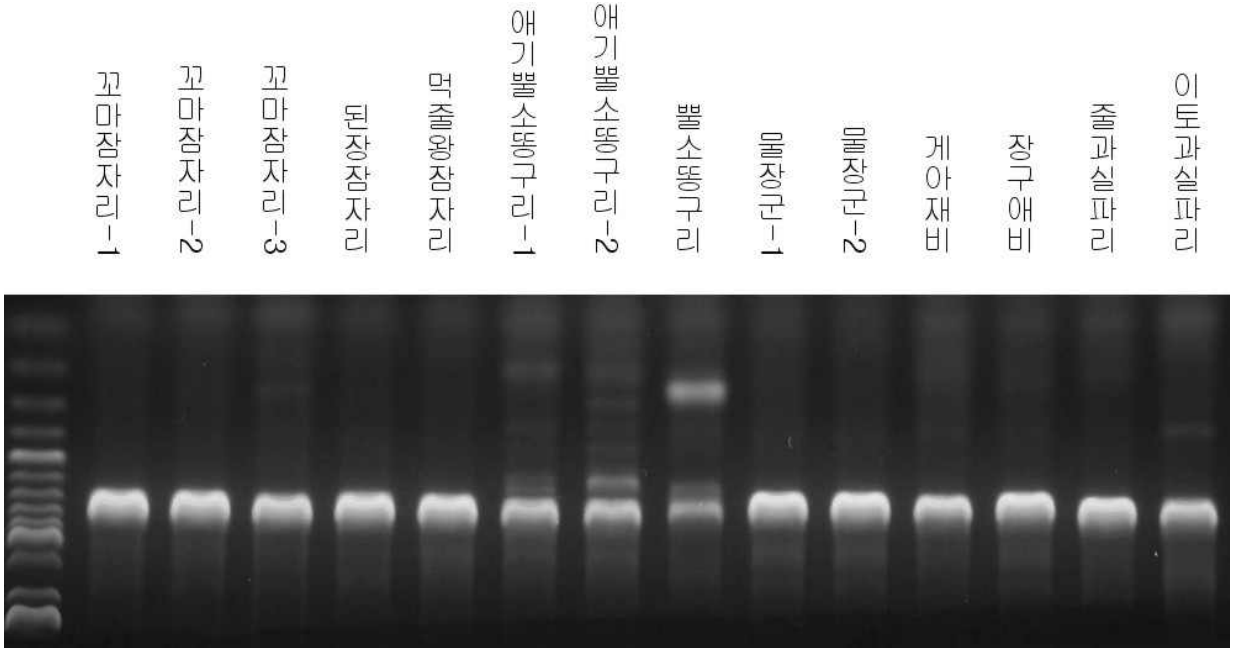


그림 IV-13. ND1 마커의 PCR 증폭결과를 아가로즈젤 상에서 분리한 사진.

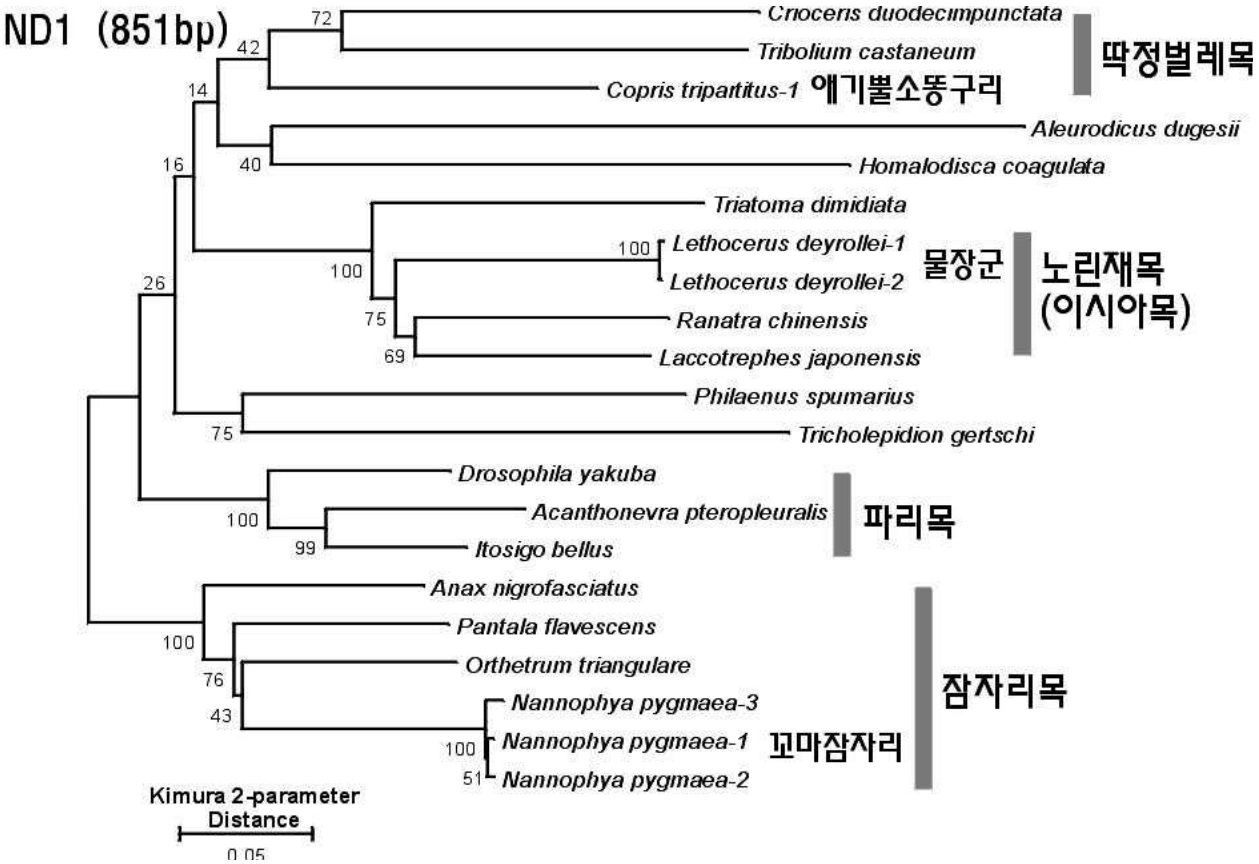


그림 IV-14. ND1등의 염기서열에 입각한 neighbour-joining 계통수. 가지에 표기한 숫자는 bootstrap values.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.1.7. 곤충의 ND4+ND4L 마커

ND4+ND4L 마커의 경우 전체적으로 증폭결과가 불규칙하게 나왔으며, 된장잠자리, 먹줄왕잠자리, 줄과실파리, 이토과실파리에서만 명확한 단일 밴드가 확인되었다 (그림 IV-15). 아마도 다양한 목을 포괄하는 universal primer를 디자인하기에는 해당부분 염기의 변이가 너무 심했던 것으로 생각된다. 복수의 밴드가 나온 꼬마잠자리의 경우에 gel purification을 통하여 염기서열 분석의 주형을 확보하여 실험을 실시하였다. 따라서 멸종위기종을 포함하는 잠자리목과 단일밴드가 나온 파리목 그리고 Genbank에서 추출한 염기서열만을 분석하였다. 그러나 애기뿔소똥구리와 물장군의 경우에도 목특이적(order-specific) 프라이머를 획득하여 독자적인 분석은 가능할 것으로 사료된다.

약 670bp 정도를 증폭하여 Clustal X로 정렬한 후 692bp의 자료행렬을 만들 수 있었으며 그림 IV-16과 같은 계통도를 산출할 수 있었다. 이 계통도는 멸종위기종인 꼬마잠자리를 명확히 동정할 수 있도록 구분해 주었으나, 그 외의 종들의 계통적 위치를 확인하는 것은 다른 종의 염기서열의 부족으로 인해 가능하지 않았다. 종 이하의 데이터를 보면 꼬마잠자리 3개체에서 단 2개의 base에서 차이를 나타내는 것으로 보아 개체군단위의 분석에는 유용하지 못한 것으로 사료된다.

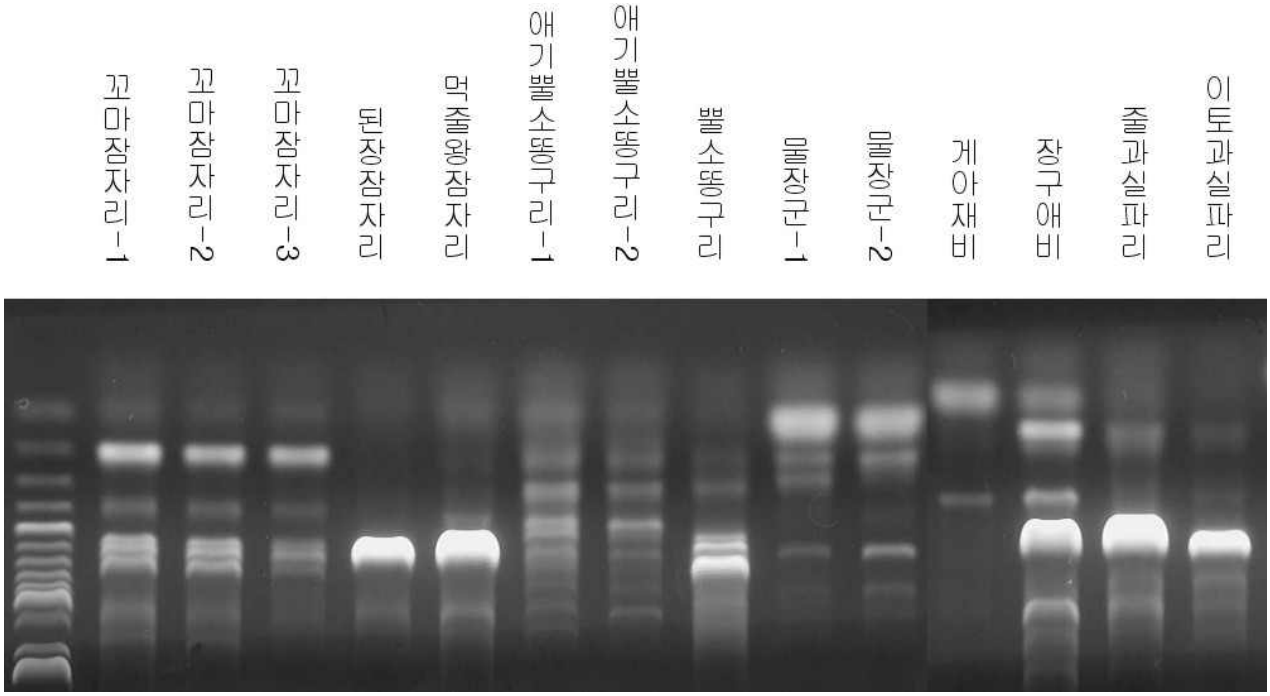


그림 IV-15. ND4+ND4L 마커의 PCR 증폭결과를 아가로즈젤 상에서 분리한 사진.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

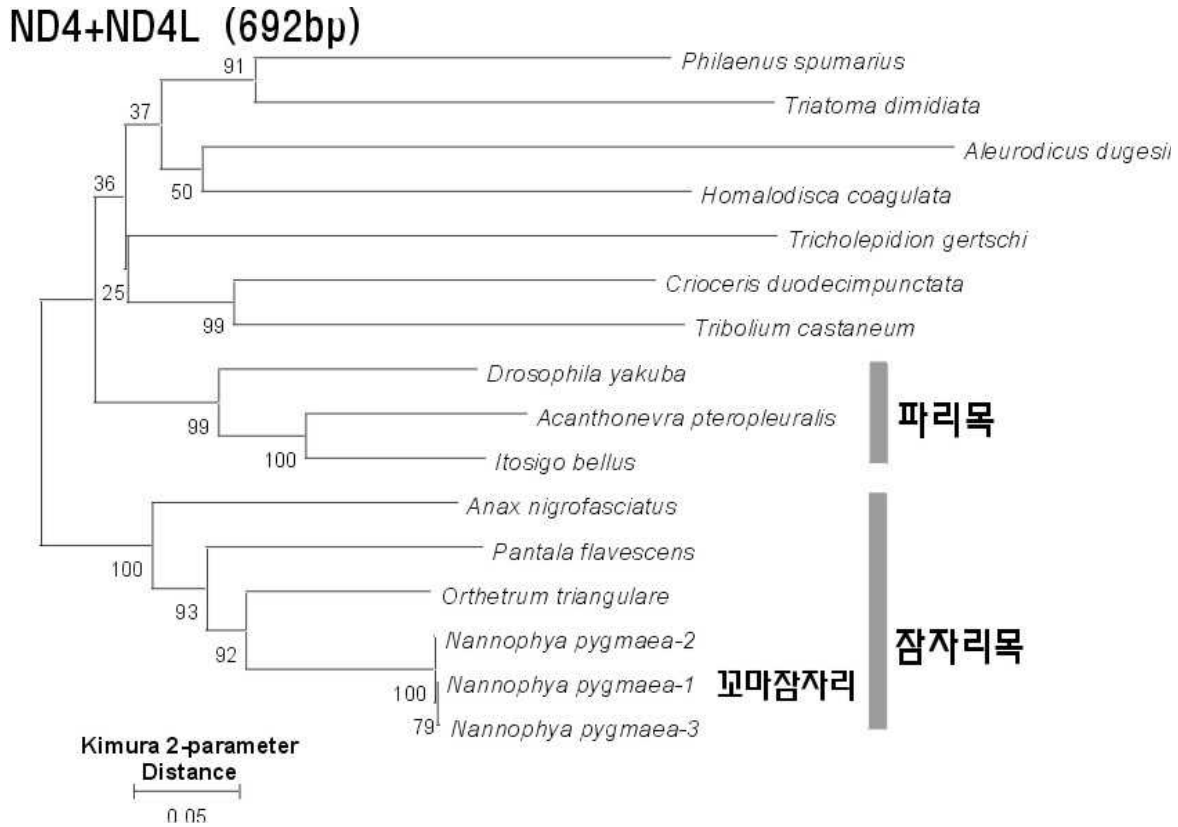


그림 IV-16. ND4+ND4L 염기서열에 입각한 neighbour-joining 계통수. 가지에 표기한 숫자는 bootstrap values.

3.1.8. 곤충의 CytB 마커

CytB 마커는 485bp 정도를 증폭할 수 있었으며, 과거에도 다양한 분류군에서 많이 사용되어 검증된 부분이라 아가로즈젤 상에서 대부분 깨끗하게 분리되었다 (그림 IV-17). 그러나 특이하게도 물장군 2개체의 경우에는 전혀 증폭이 되지 않았으므로 아마도 프라이머 부분에 변이가 있는 것으로 생각되었다. 따라서 앞으로 물장군의 실험을 위해서는 좀 더 특이적인 프라이머를 고안해야 할 것으로 생각된다. 나머지 염기서열들에 기초하여 자료행렬을 만들어 그림 IV-18과 같은 계통도를 산출할 수 있었다. 이 계통도는 목 수준에서는 잠자리목과 파리목을 각각 묶어주었으나, 딱정벌레목과 이시아목에 속하는 종들을 묶지는 못하였다. 또한 계통수 기부에 비해 말단가지의 길이(branch length)가 긴 것으로 보아, 12S나 16S에 비해 훨씬 빠른 속도로 진화한 것으로 사료된다. 그러나 종 이하의 데이터를 보면 꼬마잠자리 3개체에서 4bp의 차이가 확인되었으며, 애기뿔소똥구리 2개체에서는 2부분의 차이를 발견하였다. 따라서 CytB의 경우에는 개체군연구 및 근연종간의 분석에 사용될 수 있는 유용한 마커로 사료된다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

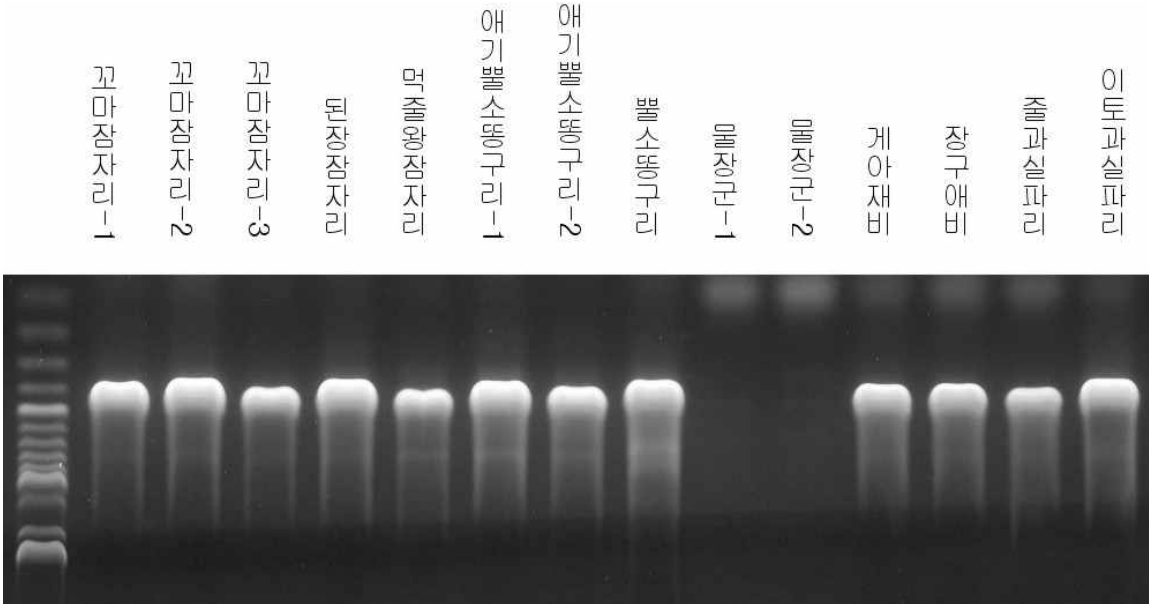


그림 IV-17. CytB 마커의 PCR 증폭결과를 아가로즈젤 상에서 분리한 사진.

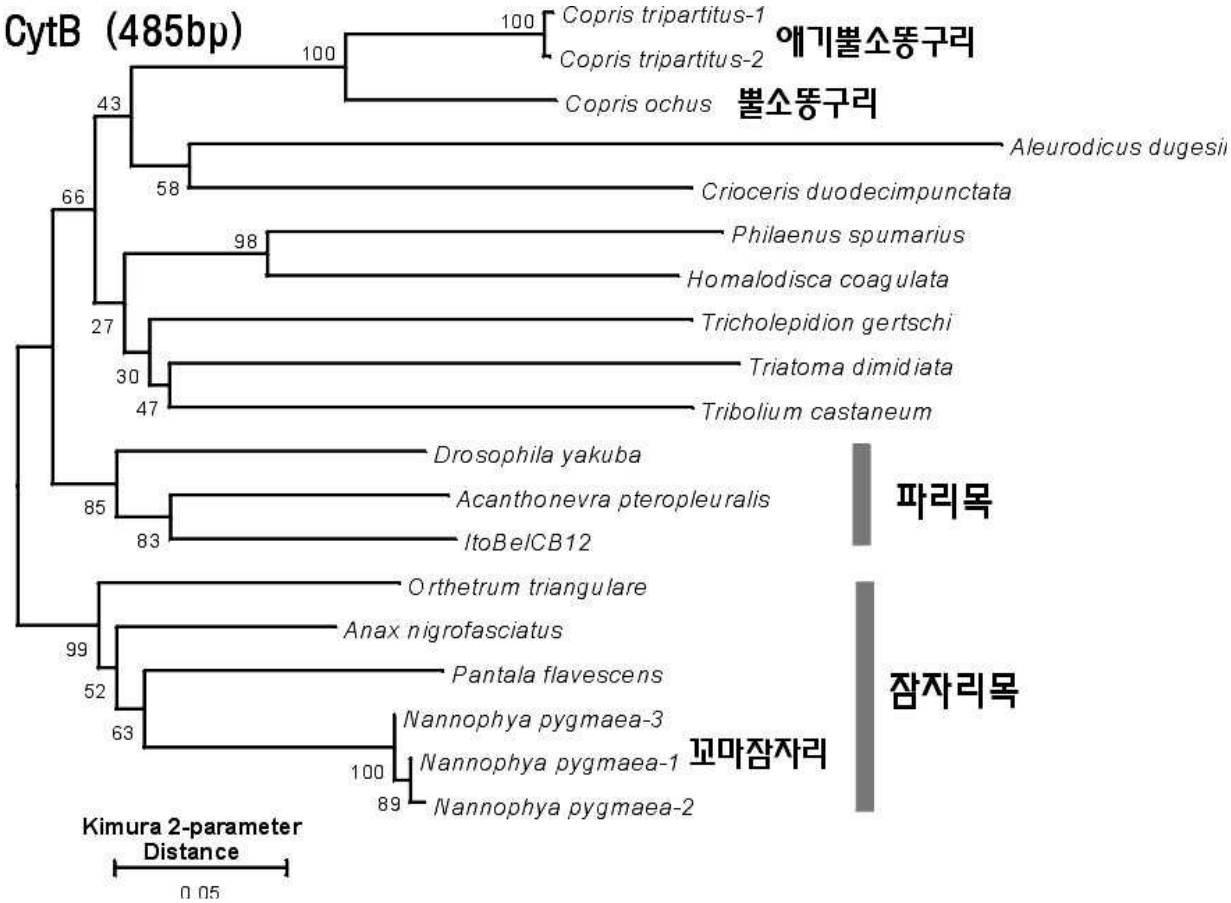


그림 IV-18. CytB 염기서열에 입각한 neighbour-joining 계통수. 가지에 표기한 숫자는 bootstrap values.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

4. 결론 및 종합

이번 연구과제를 통하여 멸종위기종인 꼬마잠자리, 애기뿔소똥구리, 물장군의 미토콘드리아 염기서열을 분석하여 앞으로의 계통연구 및 개체군 수준의 분석을 위한 유전자 마커를 개발하여 검증하고자 하였고 그 결과를 다음과 같이 요약할 수 있다.

- 3종의 멸종위기종(꼬마잠자리, 애기뿔소똥구리, 물장군)을 분석할 수 있는 마커를 확인하기 위해 대상종과 근연분류군의 염기서열들을 비교분석하였다. 즉 꼬마잠자리 3개체와 잠자리목 3종, 애기뿔소똥구리 2개체와 딱정벌레목 4종, 그리고 물장군 2개체는 노린재목 2종과 비교하였다. 추가적으로 7종의 유시류 곤충도 포함시켜 종합적으로 분석하였다. 전체적으로 19종 23개체를 다루었으며 이 중 10종 14개체는 직접 염기서열을 획득하였고, 9종은 Genbank에서 획득하였다.

- 이미 알려진 다양한 곤충의 미토콘드리아 genome 염기서열을 분석하여 9개 유전자에 관련된 14개 마커 후보 부분의 PCR 검증을 실시하여 다음 8개의 마커를 개발하였다.
  - 잠자리목, 노린재목, 딱정벌레목에서 사용할 수 있는 5개의 마커
    : 12S, 16S, COI, COII, ND1
  - 잠자리목 특이적 2개 마커
    : COIII, ND4
  - 잠자리목/딱정벌레목 특이적 1개 마커
    : CytB

- 또한 이들의 염기서열에 입각하여 계통적인 분석을 실시하여 각 마커별로 개체군 수준 또는 그 이상의 분류계급에서 유용하게 활용할 수 있는지 검증하였다. 특히 12S와 16S의 경우 종내의 개체군과 종이상의 계통분석에 동시에 사용될 수 있는 유용한 마커들인 것으로 확인되었으며. COI, COII, ND1, CytB의 경우에도 12S나 16S에 비해 상위분류군을 구분하는 해상력은 떨어지나 개체군 수준에서는 손색없이 사용할 수 있는 마커로 판단이 되었다. COIII와 ND4는 그 증폭결과가 불량하여 그 유용성을 검증하는데 한계가 있었으나 앞으로 목 또는 과 이하의 분류군 분석을 위한 특이적인 프라이머를 개발하여 유용하게 사용할 수 있는 충분한 소지가 있는 것으로 사료된다.

- 결국 이번 과제를 통하여 대상 멸종위기종들의 분류학적 위치를 검증하고, 종보전을 위해 필수적인 개체군분석연구에 기반이 될 수 있는 중요한 자료들이 축적되었다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Ⅴ. 멸종위기 척추동물종의 유전자 분석

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Ⅴ. 멸종위기 척추동물종의 유전자 분석
- 13종의 미토콘드리아 유전체 분석 -

1. 서론

멸종위기에 있는 동물을 복원하거나 개체수가 급격히 감소하는 동물을 관리하는 일은 생태학적 연구 뿐 아니라 발생학, 유전학, 계통학 등의 다양한 학문적 접근이 필요하다. 특히 국내 야생동물의 고유한 유전적 특성을 인지하여 정확한 종의 분류학적, 계통학적 위치를 확립하는 일은 종 보전과 복원의 기본이며, 필수이다.

환경보호와 생물자원의 중요성이 부각되고 보호를 위한 부단한 노력이 계속되고 있으나, 좁은 국토에서 한정된 자원으로 경제계획과 국토의 개발 계획이 이루어지기 때문에 야생동물의 서식지가 더 협소해지고 그 수가 더 감소할 위험이 언제나 존재한다. 또한 세계가 하나가 된 시점에서 외부에서 영입된 동물들로 인한 생태계 파괴가 사회적 문제로 떠오르고 외국에서 유입된 동물이 우리나라 환경에 적응하여 토속화 되어 가고 있으므로 우리나라의 고유한 종들이 위협을 받고 있다. 그러므로 현재 존재하는 우리나라 야생동물의 고유한 유전자 자원의 확보가 무엇보다 시급하다.

여러 유전자 중에서도 다양한 생물군에서 계통분류를 목적으로 또는 생태계 모니터링을 위한 마커로서 사용되고 있는 미토콘드리아 유전체는 매우 중요하고 의미 있는 유전적 자원 중 하나이다(Hwang and Kim 1999, Hwang et al., 2001).

모든 척추동물의 미토콘드리아 유전체는 2개의 rRNA(12S rRNA, 16S rRNA), 22개의 tRNA, 13개의 단백질 암호 유전자(COⅠ, COⅡ, COⅢ, ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6, ATP6, ATP8, CytB), 1개 내지는 2개의 noncoding region을 포함하고 있다 (그림 V-1). 유전체는 매우 효율적인 방법으로 배열되어 있으며, 인트론이 없고, intergenic spacers가 10bp 이하로 짧다. 또한 어떤 두 유전자간 reading frame의 중첩(overlap) 현상이 있고, stop codon의 size가 1-2 base (T 또는 TA)로 감소된 현상을 나타내기도 한다.

미토콘드리아 유전체를 이용하여 척추동물간의 계통관계와 진화를 밝히려는 노력이 부단히 이루어지고 있는데, 이는 미토콘드리아 유전체의 크기가 작고, 추출이 쉽다는 이유 외에 몇 가지의 장점을 가지고 있기 때문이다. 첫째, 미토콘드리아는 모계유전이고 (Lansman et al., 1983), 두 번째는 다른 미토콘드리아와 recombination한다는 증거가 없다 (Clayton, 1982,

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Hayashi et al., 1985). 그 의미는 척추동물의 미토콘드리아가 동종간의 recombination 없이 모계를 통해 전해지므로 핵 유전자에 비해 미토콘드리아 분자의 진화 역사가 좀 더 간단하다는 뜻이다. Kondo et al. (1990)은 *Drosophila* 에서 미토콘드리아가 부모에게서 유전되는 경우를 보여주었으나, 이것이 종내에서의 교차를 의미하지는 않는다. 세 번째로 미토콘드리아는 repair system의 결여에 의해 핵 유전자에 비례해서 빠르게 진화하고 있다 (Brown et al., 1979).

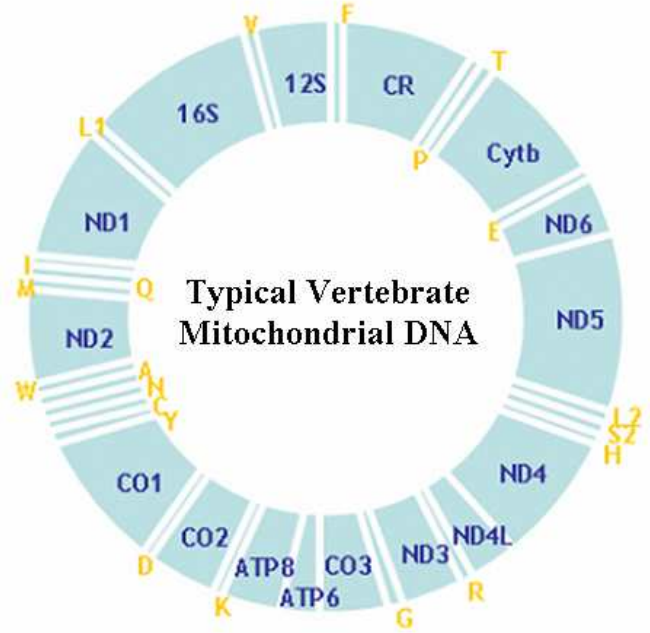


그림 V-1. 일반적인 척추동물의 미토콘드리아 유전체 지도. 13개의 단백질 암호화 유전자, 22개의 tRNA 유전자, 2개의 rRNA 유전자, 1개의 조절부위 등을 보여주고 있다.

미토콘드리아 유전체는 핵 유전체와는 독립적으로 복제, 전사, 번역이 일어나며, 미토콘드리아의 생존에 필요한 필수적인 몇몇 유전자만이 남아 있고, 수 많은 유전자들이 핵 내로 전이되었을 것이라 추정되고 있다. 미토콘드리아 유전체는 미토콘드리아의 존재를 설명해 줄 수 있는 열쇠이며, 이를 기초로 하여 미토콘드리아의 기능에 관한 생화학적인 경로를 규명할 수 있도록 해준다. 뿐만 아니라 미토콘드리아 유전체로부터 얻을 수 있는 유용한 자료들로부터 동물의 계통학적인 유연관계와 종의 진화 역사를 추론하거나, 생태계 모니터링과 관련하여 분자 마커의 개발을 위한 훌륭한 후보군 중 하나여서 미토콘드리아 유전체에 대한 연구의 관심이 그 어느 때보다도 증폭되어져 있다. 이러한 이유로 최근 2~3년 사이에 미토콘드리아 유전체 정보의 양이 폭발적으로 증가하고 있다.

미토콘드리아 유전체 염기서열을 밝힌 후 다양한 분석 방법을 통하면 기존의 형태 형질이나 핵 유전체로부터 추론한 계통분석들에서 해결하지 못했던 심각한 계통분류학적 문제들을 신속히 해결할 수 있을 뿐만 아니라 환경오염지표 등을 포함한 생태계 모니터링의 체계적인

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

시스템 구축에도 매우 유용할 것이다. 또한 미토콘드리아 유전체의 빠른 염기 치환속도는 생물 종간을 감별하거나 심지어 집단 간 혹은 개체 간을 식별하는 마커를 개발하는데 많은 도움을 줄 것이다.

미토콘드리아 유전체의 이러한 광범위한 유용성에도 불구하고, 보호야생동물에서의 미토콘드리아 유전체의 연구는 매우 미진한 실정이다. 멸종위기종으로 선정된 제 총 9종의 포유류, 4종의 조류, 2종의 양서 · 파충류, 6종의 어류 가운데 우리나라에 서식하는 종의 미토콘드리아 유전체 연구는 단 1종도 되어 있지 않았으며, 외국에 서식하는 종 역시 조류인 황새 *Ciconia boyciana* 단 1종의 미토콘드리아 정보가 알려져 있을 뿐이었다(표 1). 멸종위기종과 같은 과(Family)의 범위 내에서 근연종의 미토콘드리아 유전체 연구 실정을 조사해 본 결과 포유류 3과에서 7종, 양서류 2과에서 2종, 조류 2과에서 3종, 어류 3과에서 12종에서 미토콘드리아 유전체의 염기서열이 밝혀졌을 뿐이어서 전 세계적으로 미토콘드리아 유전체의 연구가 매우 미진한 상태임을 알 수 있다 (표 V-1).

본 연구에서는 멸종위기종으로 선정된 총 28종의 동물 종 가운데 곤충을 제외하고, 포유류 5종(반달가슴곰, 호랑이, 수달, 산양, 사향노루), 조류 3종(황새, 수리부엉이, 올빼미), 파충류 2종(남생이, 구렁이), 어류 3종(감돌고기, 얼룩새코미꾸리, 꼬치동자개), 총 13종의 척추동물에서 전체 미토콘드리아 유전체 염기서열을 결정하고, 그 특성을 규명하고자 하였다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 V-1. 멸종위기종의 미토콘드리아 유전체 연구 현황

분 류	종 명	미토콘드리아 유전체 연구	근연종의 미토콘드리아 유전체 연구 현황	GenBank No.
포유류				
식육목				
개과	*Vulpes vulpes peculiosa* (여우)	-	-	-
족제비과	*Lutra lutra* (수달)	-	-	-
고양이과	*Panthera tigris* (호랑이)	-	*Acinonyx jubatus* (왕치타) (Burger et al. 2004)	NC_005212
	Felis pardus (표범)	-	*Felis catus* (고양이) (Lopez et al. 1996)	NC_001700
	Eurasian lynx (스라소니)	-	-	-
곰과	*Ursus thibetanus ussuricus* (반달가슴곰)	-	*Ursus maritimus* (북극곰) (Delisle and Strobeck 2002)	NC_003428
			Ursus arctos (알래스카불곰) (Delisle and Strobeck 2002)	NC_003427
			Ursus americanus (아메리카큰곰) (Delisle and Strobeck 2002)	NC_003426
소목				
소과	*Naemorhedus caudatus* (산양)	-	*Capra hircus* (염소) (Feligini and Parma 2003)	NC_005044
			Ovis aries (면양) (Hiendleder et al. 1998)	NC_001941
사슴과	*Cervus nippon mantchuricus* (대륙사슴)	-	-	-
	Moschus moschiferus parvipes (사향노루)	-	-	-
양서 · 파충류				
거북목				
남생이과	*Geoclemys(Chinemys) reevesii* (남생이)	-	*Chinemys reevesi* (리브스 거북) (unpublished)	NC_006082
뱀과	*Elaphe schrenckii* (구렁이)	-	*Dinodon semicarinatus* (Colubrid 뱀) Kumazawa(1998)	NC_001945

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 V-1. (계속)

분 류	종 명	미토콘드리아 유전체 연구	근연종의 미토콘드리아 유전체 연구 현황	GenBank No.
조류				
올빼미목				
올빼미과	*Strix aluco* (올빼미)	-	*Ninox novaeseelandiae* (Morepork 올빼미) (Harrison 2004)	NC_005932
	Bubo bubo (Linnaeus) (수리부엉이)	-	-	-
황새목				
황새과	*Ciconia boyciana* (황새)	○	*Ciconia boyciana* (황새) (unpublished)	NC_002196
딱따구리목			*Ciconia ciconia* (유럽황새) (unpublished)	NC_002197
딱따구리과	*Dryocopus javensis* (크낙새)	-	-	-
어류				
잉어목				
잉어과	*Acheilognathus somjinensis* (임실납자루)	-	*Danio rerio* (지브라피쉬) (Broughton 2001)	NC_002333
	Pseudopungtungia nigra (감돌고기)	-	*Coreoleuciscus splendidus* (쉬리) (unpublished)	NC_007783
			Hemibarbus longirostris (참마자) (unpublished)	NC_007784
			Hemibarbus labeo (누치) (unpublished)	NC_007785
			Hemibarbus mylodon (어름치) (unpublished)	NC_007786
			Cyprinus carpio (잉어) (Chang et al. 1994)	NC_001606
			Carassius auratus (금붕어) (unpublished)	NC_006580
			Carassius carassius (붕어) (unpublished)	NC_006291
			Sarcocheilichthys variegatus (참중고기) (Saitoh et al. 2003)	NC_004694

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 V-1. (계속)

분 류	종 명	미토콘드리아 유전체 연구	근연종의 미토콘드리아 유전체 연구 현황	GenBank No.
어류				
미꾸라지과	*Cobitis choii* (미호종개)	-	*Cobitis sinensis* (기름종개) (unpublished)	NC_007229
	Koreocobitis naktongensis (얼룩새코미꾸리)	-	*Cobitis striata* (줄종개) (Saitoh et al. 2003)	NC_004695
메기목				
퉁가리과	*Liobagrus obesus* (퉁사리)	-	-	-
동자개과	*Pseudobagrus brevicorpus* (꼬치동자개)	-	*Pseudobagrus torkiensis* (백리드캣피쉬) (Saitoh et al. 2003)	NC_004697

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

2. 실험방법

2.1. 표본채집 및 동정

연구에 필요한 대상 종을 선정한 다음 서식처로부터 시료를 확보한다. 실험 재료로 사용될 표본들은 가급적 살아있는 상태로 실험실에 운반하거나, 아니면 100%에탄올에 넣어서 운반하는 것이 좋다. 문헌을 참조하여 직접 동정하거나 전문가의 도움을 받아 동정한다. 실험에 필요한 일부분을 추출한 다음 나머지 샘플은 생체로 냉동, 보관하는 것이 가장 좋은 방법이며 에탄올에 고정 시키거나 건조표본으로 만들어 보관할 수 있다. 포르말린에 보관하면 생물 표본의 색깔을 포함한 형태형질의 보존을 위해서는 매우 좋으나, 시간이 지날수록 DNA가 파괴되며 추출양이 줄어드는 단점이 있다.

2.2. Total genomic DNA추출

아래의 두 방법(Hom Buffer, DNeasy Tissue Kit)중에서 가능한 방법을 이용할 수 있다.

2.2.1. Hom Buffer 방법

- 채집한 동물로부터 조직을 25㎎정도 면도칼이나 실험용 칼을 이용하여 떼어 낸다.
- 막자사발에 조직을 넣어 액체질소를 부어가면서 간다.
- 잘게 간 조직에 500㎕의 Hom buffer를 넣고 섞은 다음, 25㎕의 10% SDS를 넣는다.
  *Hom Buffer의 조성 : 160 mM Saccharose, 80mM EDTA, 100 mM Tris-Cl(pH8.0)
- 10㎕의 proteinase K(15mg/ml)와 1㎕의 RNase (100mg/ml)을 넣고 37℃에서 16hr동안 incubation 시킨다.
- incubation한 solution과 동일한 volume의 phenol을 넣고 5분간 흔들어준다.
- 3분간 3000rpm에서 원심분리를 한 다음, 상층액을 얻는다.
- (5)와 (6)의 과정을 한 번 더 반복한다.
- 얻은 상층액과 동일한 volume의 $CHCl_3$을 넣고 1분간 3000rpm에서 원심분리 한다.
- 10% volume의 3M NaoAc (pH 6.0) 와 2배 volume의 100% pre-chilled EtOH를 넣고 섞어 준다.
- 20~25℃에서 10분간 둔다.
- 10분간 3000rpm에서 원심분리 한 후 상층액을 버린 후 건조시킨다.
- TE buffer나 DW(증류수)를 100㎕ 넣어 dissolve시킨다

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

▪ DNA 추출이 끝난 후 사용하고 남아있는 대상 동물은 채집지 및 서식처에 대한 간단한 기재와 함께 99% 에탄올에 고정시켜 보관한다.

2.2.2. DNeasy Tissue Kit(Qiagen Co., USA) 이용법

▪ 채집한 동물로부터 조직을 25㎎정도 면도칼이나 실험용 칼을 이용하여 떼어낸다.
▪ 막자사발에 조직을 넣어 액체질소를 부어가면서 간다.
▪ DNeasy Tissue Kit(Qiagen Co., USA)의 DNA 추출 protocol 과정을 통해 추출 한다.
▪ DNA 추출이 끝난 후 사용하고 남아있는 대상 동물은 채집지 및 서식처에 대한 간단한 기재와 함께 99% 에탄올에 고정시켜 보관한다.

2.3. 기초 염기서열 자료의 확보

(PCR 증폭 실험에 의한 미토콘드리아 유전자 좌위의 염기서열 확보)

후생동물의 미토콘드리아 DNA는 약 15~16kb 정도의 circle DNA로서 보통 37개의 유전자 좌위가 'head-to-tail'의 형식으로 되어 있다. (Wolsteholme, 1992). 이들 각각의 유전자 배열방식은 분류군에 따라 매우 보존적이기도 하지만 보통의 경우 문 (phylum) 준위의 분류군이 달라지면 유전자 배열순서 (gene arrangement)를 예측하는 것은 매우 어렵다. 따라서, Long range-PCR을 위한 anchoring할 수 있는 primer제작 부위의 염기서열을 결정하는 것이 무엇보다도 중요하다. 요약하면 다음과 같다. 따라서, 미토콘드리아 DNA 중 비교적 보존적인 영역으로서 알려진 16S rRNA 또는 CO1의 universal primer를 사용하여 우선적으로 PCR하였다.

2.3.1. Universal primer의 사용

미토콘드리아 유전체의 염기서열 분석에서 널리 이용되고 있는 미토콘드리아 DNA중 16S rRNA와 CO1 유전자 좌위의 universal primer set (Simon et al., 1994; Folmer et al., 1994)을 이용하여 PCR 반응을 수행한다(표 V-2).

표 V-2. 16S rDNA와 CO1 영역을 증폭하는 universal primer 서열

Primer name	Primer Sequence
16SA	5′-CGC CTG TTT AHC AAA AAC AT-3′
16SB	5‘-CCG GTY TGA ACT ACR ATC A-3′
HCO2198	5′-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT GA-3′
LCO1490	5′-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3′

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

2.3.2. Specific primer design

실험하고자 하는 표본과 계통학적으로 연관성 있는 몇 개의 분류군에서 이미 알려져 있는 유전자 정보를 GenBank에서 얻어 alignment 한 후 종 특이적 primer를 제작한다(그림 V-2).

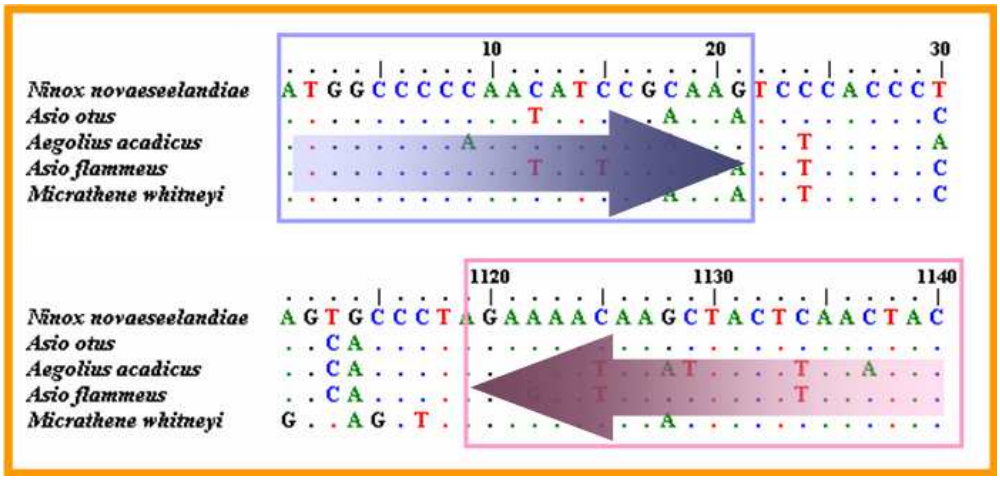


그림 V-2. 올빼미목의 Cytochrome b 유전자에서 specific primer CtyB-A와 CytB-B의 제작 과정

2.3.3. PCR 반응을 위한 반응혼합물의 조성 및 조건

PCR 반응 혼합물의 조성과 반응 조건은 실험하고자 하는 분류군마다 서로 다른 조성과 조건을 가지기 때문에 장기간의 실험을 통해 점차 보완해 나간다. 그림 V-3과 V-4는 PCR 반응을 위한 혼합물 조성과 반응 조건의 예시이다.

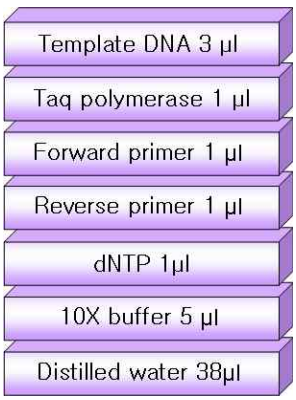


그림 V-3. PCR 반응 혼합물의 조성의 예

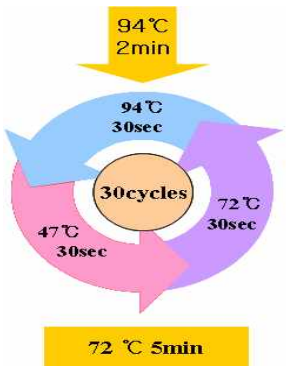


그림 V-4. PCR 반응 조건의 예

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

2.3.4. PCR기기 작동법

PTC-220 DNA Engine Dyad™ Peltier Thermal Cycler (MJ Research Co., USA) 기기의 사용법은 다음과 같다 (그림 V-5).



그림 V-5. PTC-220

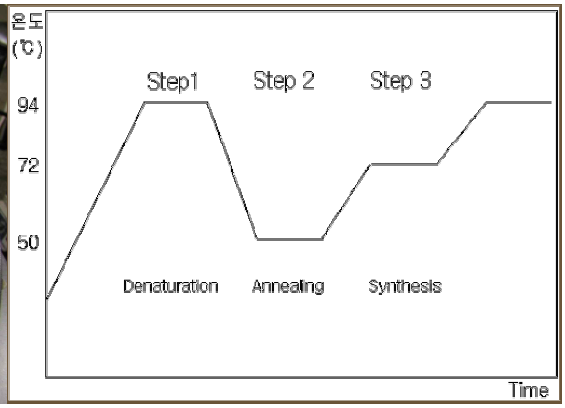


그림 V-6. PCR 원리

- Step 1 : primer, dNTP, 내열성 DNA polymerase를 mixture로 만들고, 목적으로 하는 두 가닥 DNA 단편을 denaturation 한다. (94℃, 30 sec)
- Step 2 : 열변성에 의해 생긴 한 가닥 주형 DNA에 primer를 annealing한다. (50℃, 30 sec)
- Step 3 : DNA polymerase에 의한 상보성 DNA를 합성한다. (72℃, 1 min) (그림 6)

- PCR 기계의 전원을 켠 다음, 다음과 같은 조건을 입력한다.
- Initial denaturation 94℃, 2분, 1회
- Denaturation 94℃, 30초
- Primer annealing 47℃, 30초
- Extension 72℃, 30분, ①부터 ④ 까지 총 30회 반복 하도록 입력한다.
- Final extension 72℃, 5분, 1회
- 위와 같이 입력을 완료하고 프로그램 실행을 준비한다.

2.3.5. PCR 반응혼합물 조성

- 250 ㎕의 tube에 다음과 같이 PCR 반응액을 총 50 ㎕를 만든다.
- 5 ㎕의 10X Reaction Buffer를 넣는다
  [100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 0.01% Gelatin]
- 농도가 10 mM인 dNTP를 1 ㎕를 넣는다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

- 각각의 농도가 10mM인 프라이머를 각각 1 ㎕를 넣는다.
- Template로 사용할 genomic DNA 2 ㎕를 넣는다.
- 5units의 *Taq* DNA Polymerase 1㎕를 넣는다.
- 39 ㎕ 증류수 첨가하여 총 50 ㎕ 반응액을 제조한 다음 PCR 기계에 반응물이 들어있는 tube를 넣고 입력된 프로그램을 실행시킨다.

2.3.6. PCR반응이 일어나지 않을 때

- annealing 온도를 조절한다.
- DNA, priemr양을 늘려본다.
- PCR cycle수를 늘려본다.
- $MgCI_2$를 넣어본다.

2.4. PCR 반응산물의 확인

PCR 반응 산물은 다음과 같은 절차에 따라 확인하였다.

- PCR 반응이 종료된 후 PCR 반응액 들어 있는 tube를 꺼내어 gel 확인 전까지 4℃에 냉장 보관 한다.
- PCR 반응 산물을 확인하기 위하여 전기영동으로 확인하고자 하는 DNA 시료의 수와 양에 따라 1% agarose gel을 gel casting plate에 붓고 comb을 꽂아 15~20분간 고형화 시킨다.
- Gel running tank에 10X TAE buffer를 gel이 잠기도록 넣은 다음, PCR 반응산물 50㎕ 중에서 5㎕와 gel loading buffer(x6) 1㎕를 혼합한 다음 총6㎕를 취하여 loading 한다.
- gel에 DNA 시료를 loading 한 다음 Power supply의 전원을 키고 voltage와 current를 조절한 후 80 voltage로 40분간 전기영동한다 (그림 V-7).
- 전기영동이 완료되면 power supply의 전원을 완전히 끄고 gel을 조심스럽게 꺼낸 다음 EtBr이 들어 있는 tank에서 5분간 염색한 다음 증류수로 5분간 탈색 한 후 Ultraviolet ransilluminator에 올려 놓고 DNA band를 확인한다 (그림 V-8).
- PCR band의 크기를 확인 한 후 사진을 촬영을 하여 결과물의 판독에 사용한다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

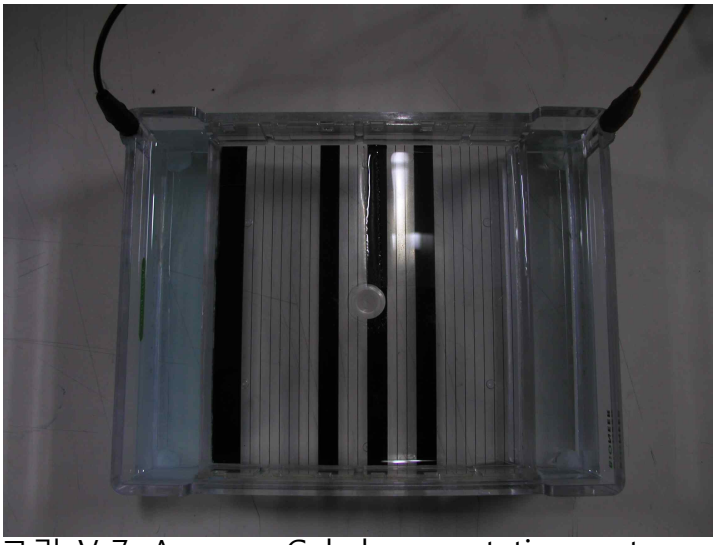


그림 V-7. Agarose Gel documentation system

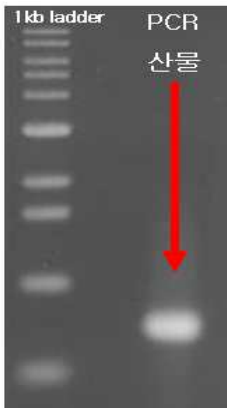


그림 V-8. PCR 결과

2.5. PCR product sequencing

▪ PCR에 의해 증폭된 DNA를 PCR purification kit를 이용하여 정제한다 (Qiagen Co., USA). 염기서열전문업체인 (예: 제노텍, 마크로젠 등)에 의뢰하여 direct sequencing 기법을 이용하여 염기서열을 결정한다.

▪ 결정된 염기서열을 NCBI (genebank)에서 blast search를 한 다음 Clustal X program을 사용하여 염기서열을 정렬한다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

2.6. Long range-PCR primer 제작

Long range-PCR primer의 제작은 다음과 같은 절차로 이루어졌다.

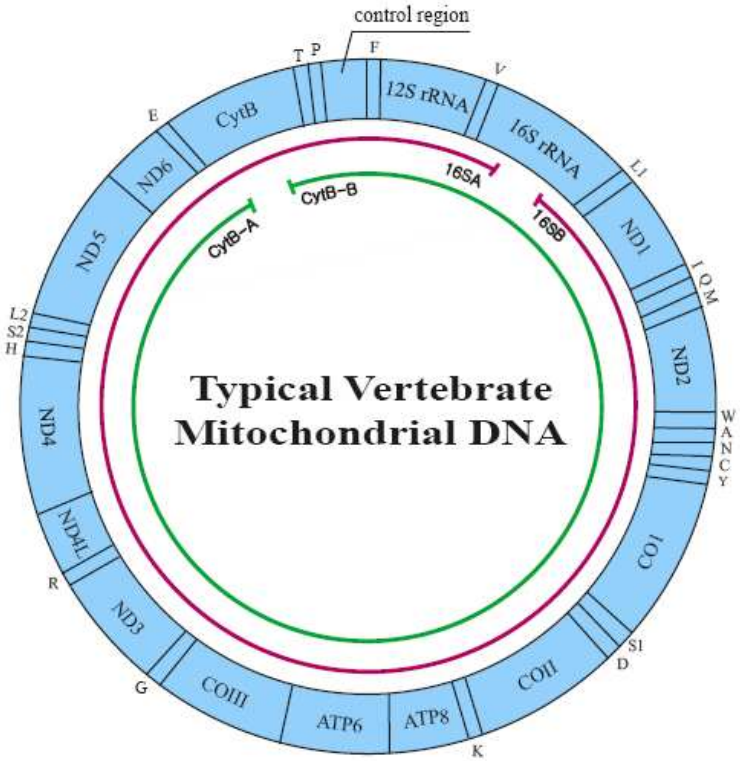


그림 V-9. 척추동물 미토콘드리아 유전체의 모식도 위에 표시된 16SA와 16SB는 universal primer이며, 이 primer로 PCR 된 결과를 바탕으로 양 방향으로 long PCR primer를 제작하고 CtyB-A와 CytB-B는 조류에서 제작된 specific priemr로서 그 결과를 바탕으로 양 방향으로 long PCR primer를 제작하여, long PCR하여 전체 미콘드리아 유전체의 염기서열을 결정한다.

- Long range-PCR(대략 16kb> PCR 산물> 2kb) primer 고안
  위의 방법들을 통해 결정된 16S rDNA 부분 염기서열을 기초로 개체 특이적 long PCR primer을 제작 (Oligo 4.0 program 사용)
- Oligo 제작업체(예: 코스모진텍 등)에 Oligo 합성 주문

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

2.7. Long PCR

- Long PCR (예상되는 PCR product의 크기가 약 16kb> PCR산물> 3kb일 때)

- Long PCR mixture 조성 및 반응 조건
  (Expand Long Template PCR System Cat. No. 1681842)

Long PCR 은 반응 혼합물의 조성과 반응 조건에 민감하기 때문에 매우 중요하다. 그림 V-10과 V-11은 Long PCR 반응을 위한 혼합물 조성과 반응 조건의 예시이다.

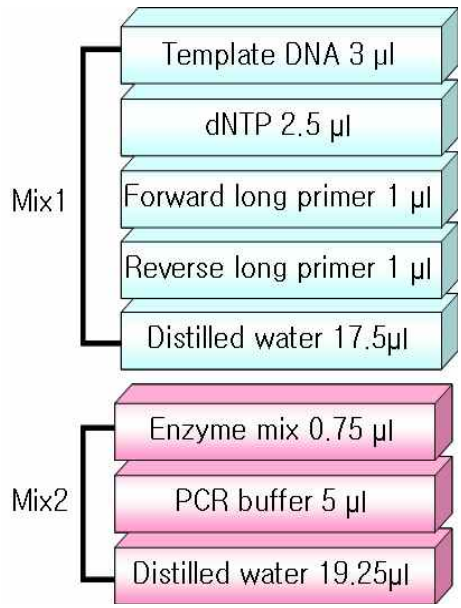


그림 V-10. Long PCR 반응 조성의 예

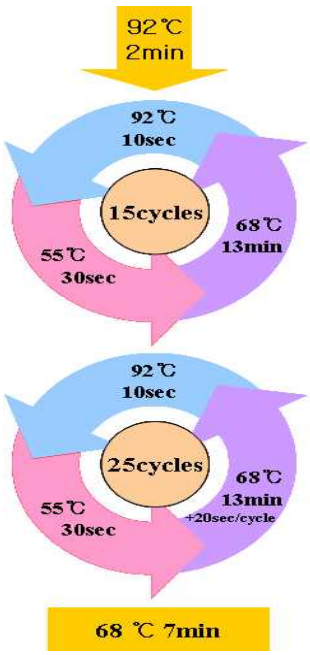


그림 V-11. Long PCR 반응 조건의 예

2.8. PCR product cloning

2.8.1. Preparation of the vector and inserts (제한효소로 절단, Ligation)

Long PCR product의 크기가 15kb정도 되므로 이것을 한번에 넣어서 cloning하기에는 무리가 있기 때문에 벡터인 pGEM-T-easy vector(Promega Co.,USA), PUC19 또는 pBluescript에서 제한효소 자리가 존재하는 제한효소를 선택해서 PCR product를 cutting한 다음 벡터와 insert를 16시간동안 T-A ligation시킨다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

2.8.2. Transformation by Inoue method

- competent cell을 꺼내어 손으로 녹인 후 10min, on ice
- 200㎕에 DNA 100ng까지 넣을 수 있다. volume은 10㎕를 넘지 않는다.
  여러번 swirling (positive control : plasmid DNA, negative control : no DNA) 30min, on ice.
- 42℃ heat shock, 90sec.(no shaking)
- Put in ice. 1-2min(충분히 식힌다.)
- 800㎕ LB를 넣고 37℃에서 45min 둔다. (효율을 높이기 위해 이 시간동안 225rpm이하로 shaking incubation도 가능)
- 원심분리 4000rpm 1min 후 상등액을 붓는다. 20mM MgSO4 와 antibiotics가 포함된 plate에 약 100-200㎕ 정도를 도말 (그림 V-12)
- 12-16hr 37℃ 배양

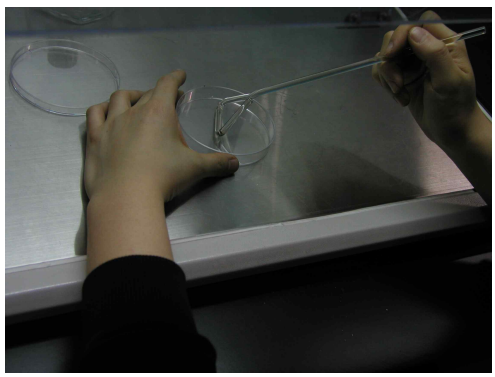


그림 V-12. transformation 과정

2.8.3. Plasmid isolation in *Escherichia coli*

(ex, DH-5α)

- 3~5ml ALB media에 키운 박테리아를 24℃, 13,000rpm에서 1분동안 원심분리하여 분리된 상층액은 버린다.
- Resuspend Solution I (Sonication Buffer)을 100㎕ 넣고 5분동안 vortexing한다.
- Solution Ⅱ(fresh ; Lysis Buffer)(0.2N NaCl, 1% SDS)을 200㎕ 넣고, 0.4N NaOH를 100㎕ 넣은 다음 2% SDS를 100㎕ 넣어서 5분 동안 천천히 lysis한다. (절대 vortexing하면 안됨)
- Solution Ⅲ(Neutralization Buffer)를 150㎕ 넣고 inverting한다.
- 15,000rpm(충분리)에서 10min동안 원심분리한다.
- 상층액 supernatant(DNA)를 새 튜브에 담는다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

- 총 450㎕의 2배 volume인 EtOH 900㎕ 넣고 inverting한다.
- -20℃에서 30분 동안 보관하거나 -70℃ 15-20분정도 보관한다.
- 12,000~15,000rpm에서 10분 동안 원심분리 한 다음 상층액은 버린다.
- TE (RNase 20㎍/ml , pH 7.6)를 200㎕ 넣고 vortexing한다.
- -20℃에 보관한다.
- 65℃(for degradation protein & RNA)에서 10 min동안 열을 가한다.
- [Phenol : chloroform : Isoamylalcohol(25:24:1) 동일volume]을 넣어준다 : 필요할 경우 CHCl3만으로 200㎕→ vortex →10k에서 10분 동안 원심분리한다.
- 상층액을 새로운 E. tube에 옮긴다.
- EtOH conc. (17번의 2배 volume)을 400㎕ 넣어준다.
- -70℃에서 15 - 20분간 보관한다.
- 15k에서 10분 동안 원심분리한다.
- 상층액은 버린다.
- 70% EtOH로 100 - 200㎕ 넣어서 약 30초정도 washing한다.
- 건조시킨다. (Vaccum chamber or 전깃불에 거꾸로 매달아서)
- TE를 50㎕(pH 7.6)넣어서 dissolve시킨다.
- -70℃, -20℃ 또는 4℃에 보관한다.
- 이렇게 해서 뽑은 plasmid DNA를 원하는 크기의 insert DNA가 포함되어 있는지 agarose gel에서 전기영동으로 확인한다.
- 원하는 크기의 plasmid를 적당한 제한효소로 잘라 insert DNA의 크기를 1% agarose gel에서 확인한다.

2.9. 염기서열 결정, 분석

- 염기서열 분석은 ddNTP를 이용한 Sanger method를 주로 사용하며, Big Dye Terminator를 사용하여 염기서열을 결정한다.
- Automatic sequencer에서 얻어진 결과들을 sequence analysis program(ABI)을 이용하여 기초적인 분석을 마무리하고, GeneJockey II, Ver. 1.6 (BIOSOFT Inc., Cambridge, UK), BioEdit, DNASIS등과 같은 프로그램을 이용하여 얻어진 염기서열들의 세부적인 특성들을 보다 면밀히 관찰한다.
- 실험을 통하여 얻어진 염기서열을 alignment할 수 있는 program이 필요하며 이를 위해서 Clustal X program (Thompson et al., 1997)을 사용한다.
- Sequence alignment의 배열이 안정되지 않고 변이가 심하여 align이 불가능한 부분들은 간

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

혹 계통연구에서 제외시키는데 이를 위한 porgram이 Gblock program (Castresana, 2000)이다. 여러 유전자를 concatenation할 때도 유용한 프로그램이다.

2.10. 분자계통학적 분석

- PAUP 4.0b, MEGA 3.0, Tree-puzzle 5.0, MrBayes 3.0 또는 PHYLIP program 등을 이용하여 다양한 계통분석 실시한다 (그림 V-13).
  (예: Parsimony analysis, Neighbor Joining analysis, Maximum Likelihood analysis, Minimum Evolution analysis, Bayesian analysis 등)

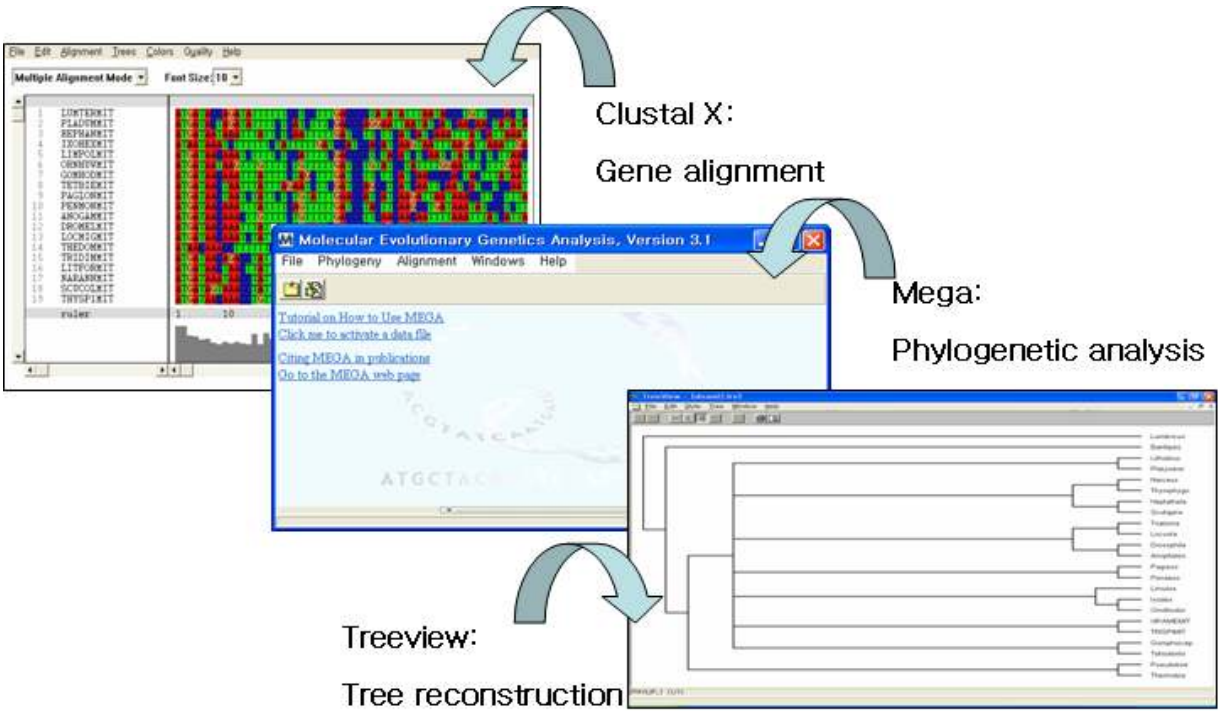


그림 V-13. 계통분석을 위한 프로그램

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

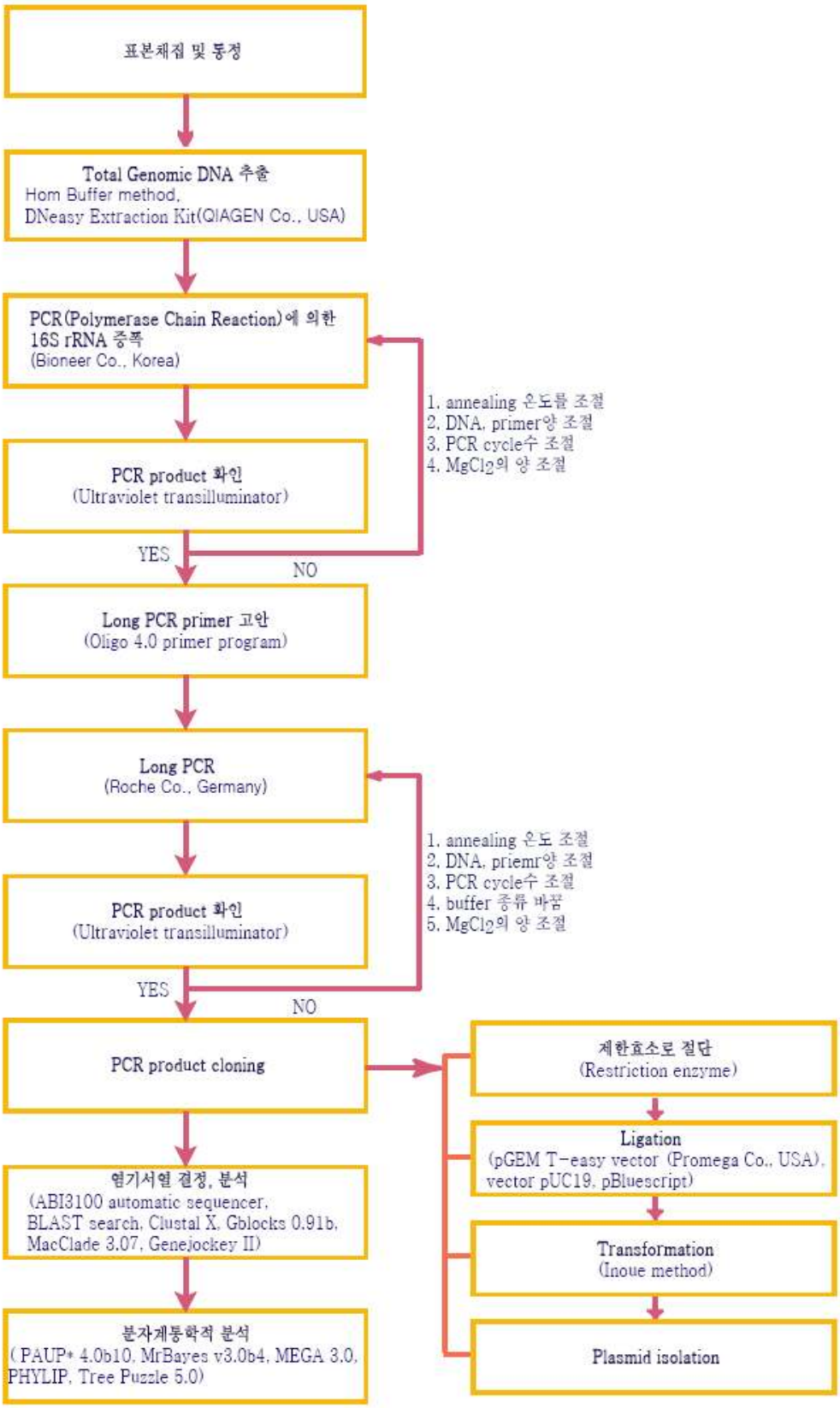


그림 V-14. 주요 척추동물의 미토콘드리아 유전체 분석 protocol

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3. 실험 결과

3.1. 반달가슴곰 (*Selenarctos thibetanus ussuricus*)



그림 V-15. 반달가슴곰

- 계통 (Systematics)
  Phylum Chordata 척삭동물 문
  Class Mammalia 포유 강
  Order Carnivora 식육 목
  Family Ursidae 곰 과
- 기상 (Diagnosis)
  몸길이 : 1.9m
  꼬리길이 : 8cm
- 서식처 (Habitat)
  지리산 북부 전역의 1,500 m 이상인 고산지대 활엽수림에 서식

아시아흑곰의 아종인 반달가슴곰은 웅담채취로 인하여 국제적으로 그 수가 감소해가고 있으며 지역적으로 서식지 훼손 및 밀렵으로 인해 분단, 고립이후 멸종해가고 있다. 한국, 중국 북동부, 연해주 등지에 분포하며, 특히, 북한에는 많은 수가 생존하고 있으나 남한지역에는 지리산국립공원일대와 강원도 북부산악지대 및 비무장부근에 소수가 간신히 살아남고 있으나, 남획(濫獲)과 6 ·25전쟁 등으로 인해서 서식수가 격감(激減)하여 향후 20년 이내 멸종할 위험성이 대단히 높다. 현재 환경부지정 멸종위기 Ⅰ급으로 지정하여 보호하고 있다 (그림 V-15).

3.1.1. Total genomic DNA 추출

반달가슴곰 근육조직의 일부 (25mg)를 떼어내어 DNeasy Tissue kit (Qiagen, Co.)의 추출 과정을 이용하여 total genomic DNA를 추출한다.

3.1.2. Primer 제작

모든 연구 대상종들로부터 universal primer 2 sets를 이용하여 16S rRNA gene과 CO1 gene 사이 약 4.5kb와 11kb PCR product를 얻고자 하였다 (표 V-3).

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 V-3. 반달가슴곰에서 사용된 primer 염기서열

Primer name	Primer Sequence	Gene region
16SA	5'-CGC CTG TTT AHC AAA AAC AT-3'	16S rRNA ~CO1
HCO2498	5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'	
16SB	5'-CCG GTY TGA ACT CAR ATC A-3'	16S rRNA ~CO1
LCO1490	5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'	

3.1.3. PCR 증폭

표 V-4. 16S rRNA gene과 CO1 gene 사이 (약 4.5kb)를 증폭하기 위한 Long range-PCR 조건

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1㎕
Reverse primer	1㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	17.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	19.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	14 cycles
52℃	30sec	
68℃	3min30sec	
92℃	10sec	24 cycles
52℃	30sec	
68℃	3min30sec +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

* Long PCR 반응조건(Annealing time은 Long PCR manual을 참조하였음; Expand Long Template PCR System Cat. No. 1681842)

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 V-5. 16S rRNA gene과 CO1 gene 사이 (약 9kb)를 증폭하기 위한 Long range-PCR 조건

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1.5㎕
Reverse primer	1.5㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	16.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	19.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	14 cycles
50℃	30sec	
68℃	9min	
92℃	10sec	24 cycles
50℃	30sec	
68℃	9min +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

3.1.4. 염기서열 결정

전체 11kb, 4.2kb PCR product를 분석한 결과 전체 genome 중에서 ND4 유전자와 ND1 유전자 사이 10,172bp와 ND2 유전자와 ATP6 유전자 사이 5,384bp를 밝혔으며, 이 두 fragment 사이에 trnI, trnQ, trnM의 3개의 tRNA가 현재 분석 중에 있다. 앞서 연구되어진 곰과(Ursidae)의 다른 종과의 유전체 비교에서 뚜렷이 나타나는 차이점을 찾지 못했으며, 전형적인 형태의 유전자 배열상태를 가지고 있다 (그림 V-16, V-17).

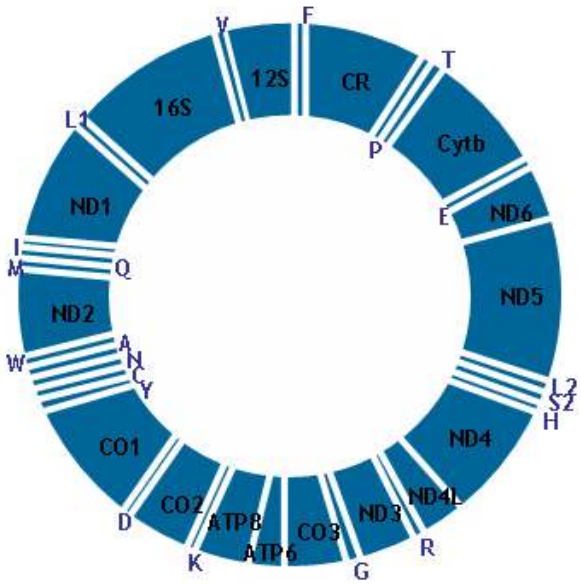


그림 V-16. 반달가슴곰의 미토콘드리아 유전체 지도

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

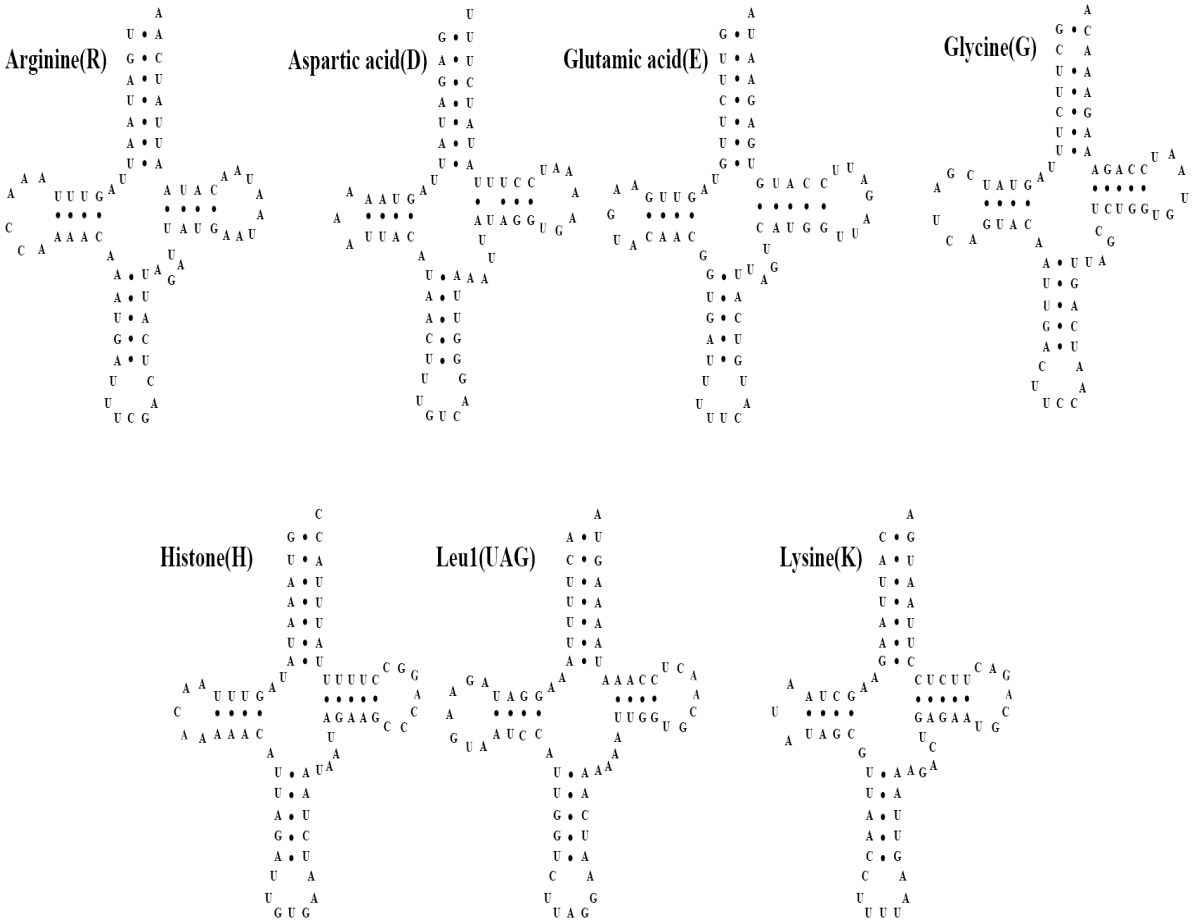


그림 V-17. 반달가슴곰 미토콘드리아의 tRNA 2차 구조

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

▪ 반달가슴곰의 염기서열 및 annotation (15,556bp)

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        10         20         30         40         50         60         70
TACCGACTCC CTATCAGCCN CCTTACTAGC TCTTACAACA TGACTACTGC CTCTGATACT AATAGCAAGT
```

→ **ND4**

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        80         90        100        110        120        130        140
CAATCCCACC TATCAAAGGA GACCCTGACC CGAAAGAAAC TATATATCAC TATACTGGTC CTCCTACAGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       150        160        170        180        190        200        210
TATTCCTGAT TATAACCTTT TCTGCTATAG AGCTAATCCT GTTCTATATC TTGTTCGAAG CCACCCTAAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       220        230        240        250        260        270        280
ACCTACTCTA ATTATTATTA CTCGATGAGG GAATCAAACA GAACGATTAA ACGCGGGCCT TTACTTTCTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       290        300        310        320        330        340        350
TTTTATACTC TAGTAGGATC TTTACCACTG CTAATTGCAT TACTACATAC TCAAAACAAT CTAGGTACCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       360        370        380        390        400        410        420
TAAATCTTCT CATAATACAA TACTGAATCC AGCCCCTGCC AAACTCCTGA TCCAGTGTCT TCCTGTGACT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       430        440        450        460        470        480        490
AGCATGTATA ATAGCATTCA TAGTAAAAAT ACCTCTGTAT GGCCTTCACT TGTGATTGCC AAAAGCACAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       500        510        520        530        540        550        560
GTAGAAGCCC CCATCGCAGG ATCTATAGTG CTTGCCGCCG TACTCCTAAA ACTAGGAGGC TACGGCATGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       570        580        590        600        610        620        630
TACGAATTAC AACACTACTT GACCCTCTAA CAAGCTTCAT GGCCTACCCC TTCATAATAC TCTCACTATG

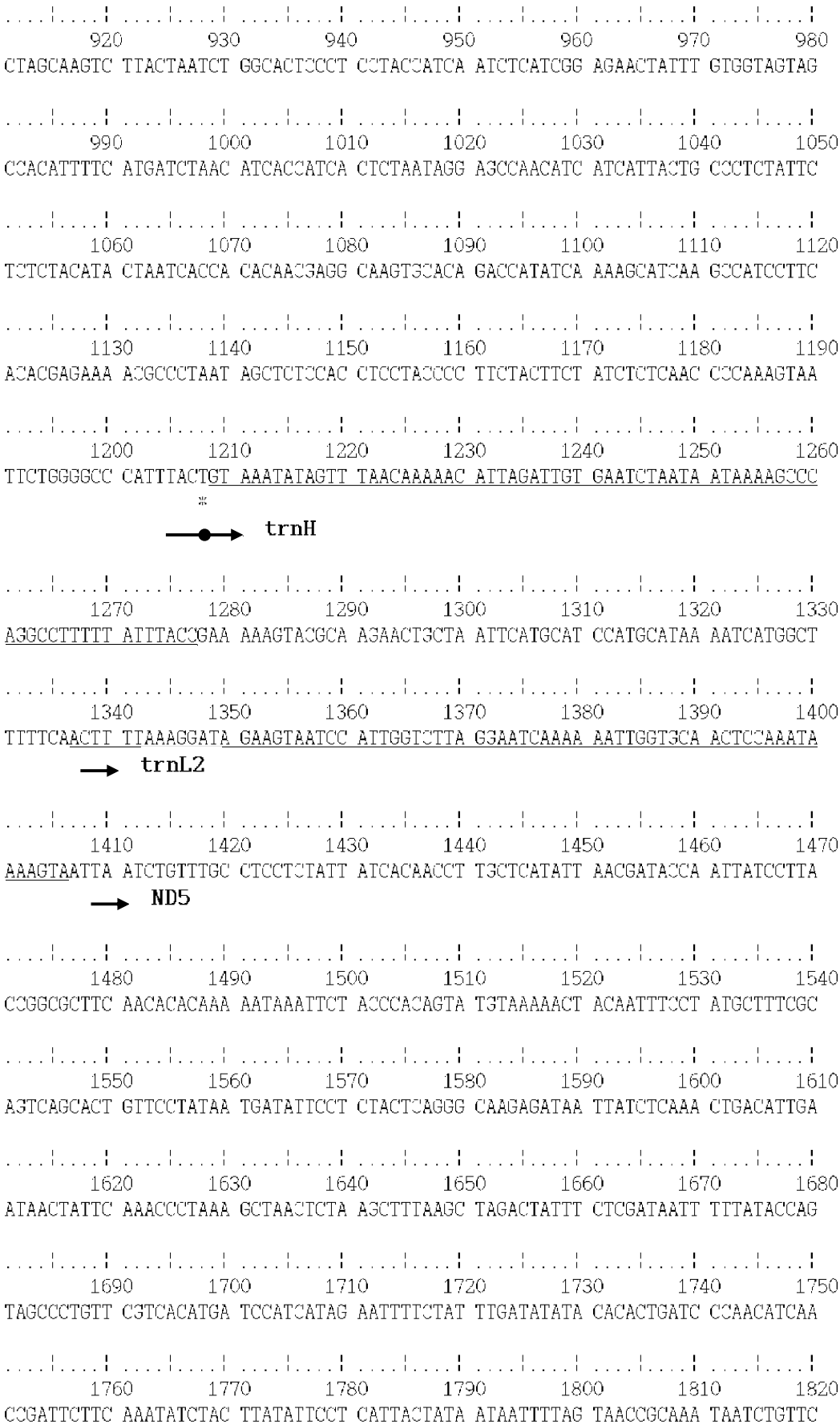
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       640        650        660        670        680        690        700
GGGCATAATC ATAACAAGTT CTATTTGCCT GCGCCAAACG GATTTAAAGT CCCTAATTGC TTACTCCTCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       710        720        730        740        750        760        770
GTTAGTCATA TAGCCCTAGT CATTGTAGCA GTATTGATCC AAACTCCATG AAGCTATATA GGAGCAACAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       780        790        800        810        820        830        840
CCTTAATAGT TGCCCATGGA CTAACATCCT CCATGCTATT CTGTCTTGCA AACTCCAACT ATGAACGAGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       850        860        870        880        890        900        910
CCATAGCCGA ACTATAATCC TTGCGCCGAGG TCTACAAACA CTCCTTCCAC TTATAGCAGC TTGATGACTA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1830       1840       1850       1860       1870       1880       1890
CAACTATTCA TCGGCTGAGA AGGGGTAGGA ATCATATCTT TCCTCCTTAT TGGGTGATGA TACGGACGAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1900       1910       1920       1930       1940       1950       1960
CAGATGCCAA TACAGCTGCT CTACAGGCAG TCGTATATAA CCGCATCGGA GACGTAGGCT TTATTATAGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1970       1980       1990       2000       2010       2020       2030
CATAGCCTGA TTTTTACTCA ATACAAATGC ACGAGACTTC CAACAAATCT TTGCAATCGA ACATGACAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2040       2050       2060       2070       2080       2090       2100
CTTAATATCC CACTAGCAGG ACTACTCCTA GCAGCCACTG GAAAATCAGC CCAATTCGGC CTTCATCCAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2110       2120       2130       2140       2150       2160       2170
GACTTCCATC AGCCATAGAA GGACCCACTC CTGTTTCAGC CCTACTCCAC TCCAGTACAA TAGTAGTAGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2180       2190       2200       2210       2220       2230       2240
AGGGGTATTT CTTCTAATCC GATTTCACCC CTTAATGGAA CATAATAAGA CCATCCAAAC AGCCGCCCTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2250       2260       2270       2280       2290       2300       2310
TGCTTAGGAG CAATAACAAC CCTATTTACA GCAGCCTGCG CTCTCACCCA AAATGACATT AAAAAGATTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2320       2330       2340       2350       2360       2370       2380
TTGCCTTCTC CACCTCAAGC CAACTAGGAT TAATAATCGT AACAATTGGG ATTAACCAAC CCCATTTAGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2390       2400       2410       2420       2430       2440       2450
ATTCCTACAT ATCTGCATAC ACGCATTTTT CAAGGCCATA CTGTTTATAT GCTCTGGATC CATTATCCAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2460       2470       2480       2490       2500       2510       2520
AGTCTAAATG ACGAACAAGA CATCCGAAAA ATAGGAGGCC TATTCAAAGT CTTACCACTT ACCACCACTG

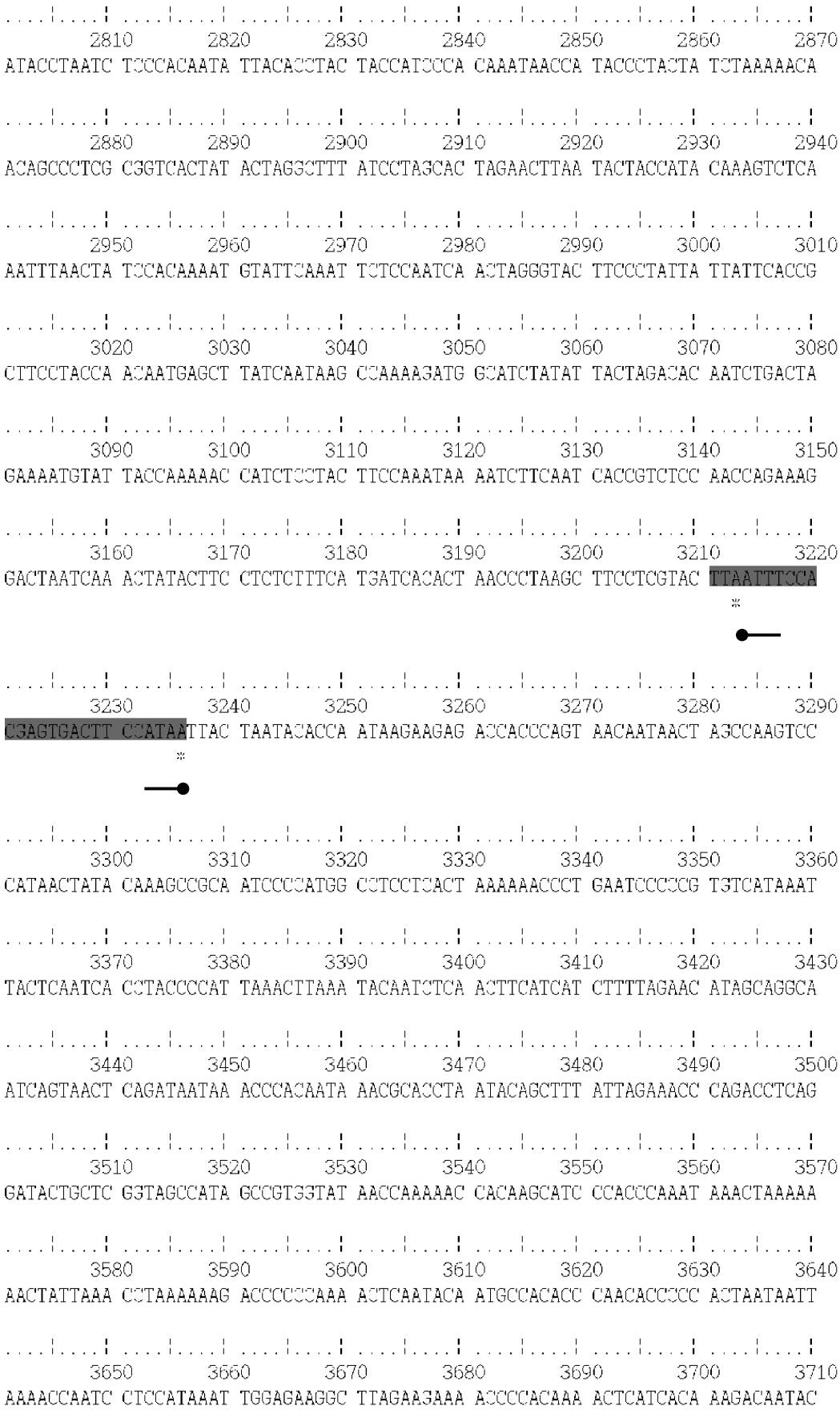
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2530       2540       2550       2560       2570       2580       2590
CACTAATTAT TGGAACTCTA GCACTCACAG GTATACCTTT CCTAACAGGA TTTTACTCTA AAGACCTAAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2600       2610       2620       2630       2640       2650       2660
TATCGAGACC GCCAATACGT TGTATACCAA CGCCTGAGCC CTACTAATAA CTCTCGTCGC CACATCCATA

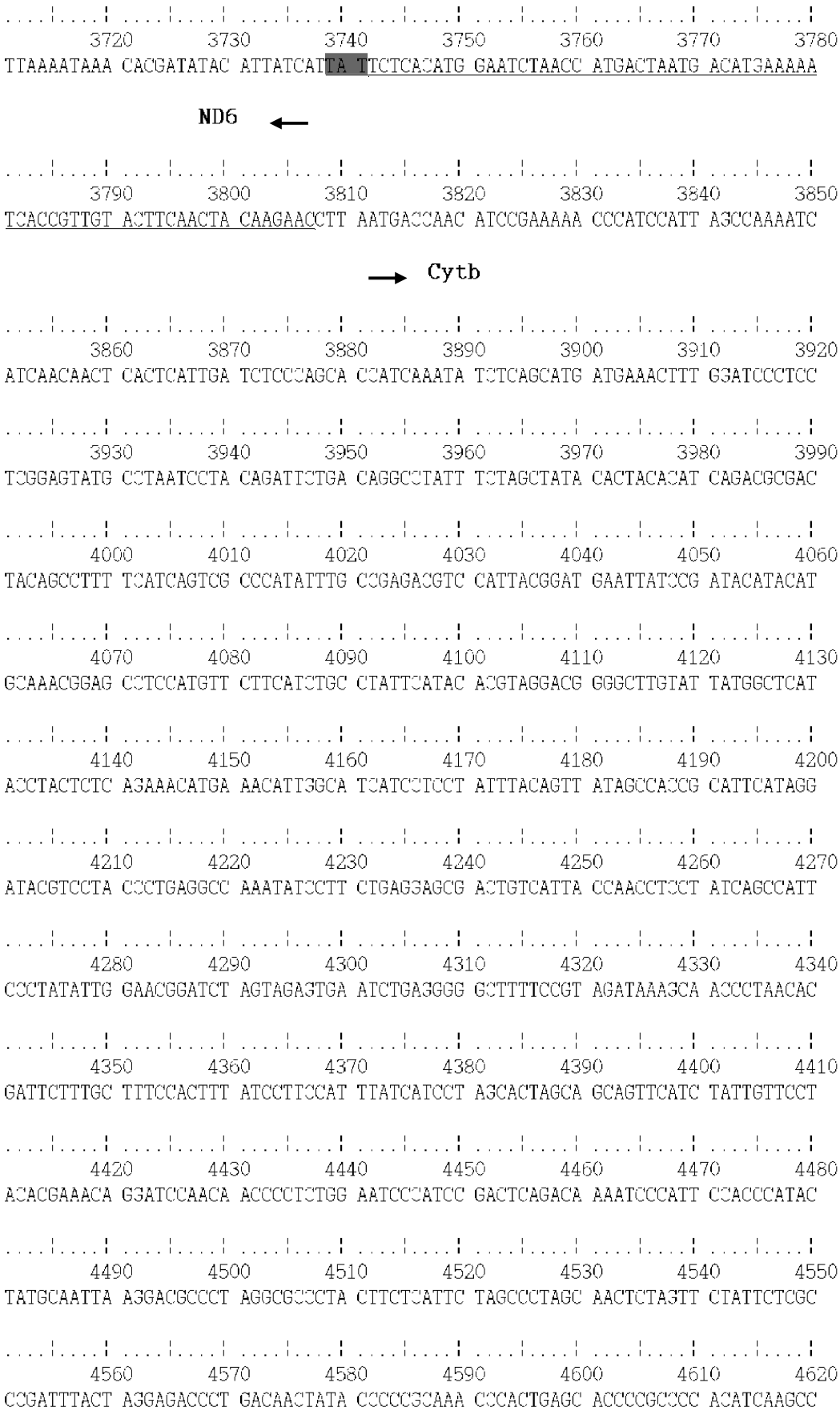
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2670       2680       2690       2700       2710       2720       2730
ACCGCTGCCT ACAGTACTCG AATTGTATTT TTCGCACTTC TAGGACAACC TCGCTTTAAC CCTGCTATTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2740       2750       2760       2770       2780       2790       2800
TCATCAACGA GAATAATCCT CTCTTGGTTA ACTCCATCAA GCGTCTACTT CTAGGAAGTA TTTTCGCAGG
```

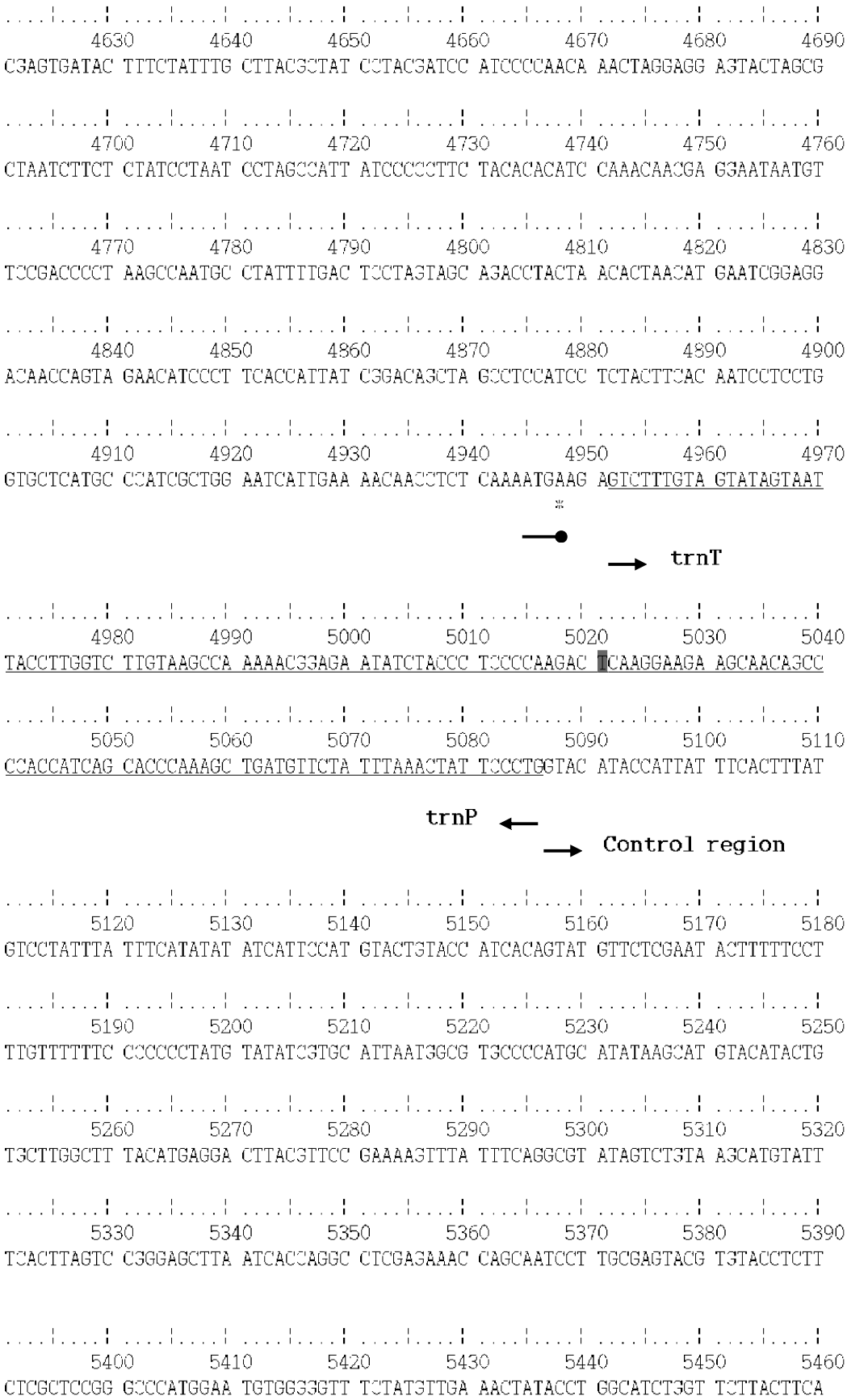
IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5470       5480       5490       5500       5510       5520       5530
G3GCCATGAT A3CTCTAGAT TCCAATCCTA CTAACCCTTC AAATGGGACA TCTCGAT3GA CTAATGACTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5540       5550       5560       5570       5580       5590       5600
ATCAGCCCAT GATCACACAT AACTGT3GTG TCATGCATTT G3TATCTTTT AATTTTTAGG G3GGGAACTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5610       5620       5630       5640       5650       5660       5670
GCTATGACTC A3CTATGACC GTAAA33TCT C3TCGCAGTC AAATAATTTG TAGCTGG3CT TATTTATCTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5680       5690       5700       5710       5720       5730       5740
TCACGGGTCG G3CATAGATA CCCATAAGGG GCTATTCAGT CAATGGTTAC GGGGCATATA GTATGTAAAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5750       5760       5770       5780       5790       5800       5810
ACCACTGAAT C3AACGAACA CGCATGTGTA C3CACGCGTA C3CATATGTA CGCATATGTA C3CATATGTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5820       5830       5840       5850       5860       5870       5880
C3CACGTGTA C3CACGTGTA CGCATGTGTA C3CATGTGTA C3CATGTGTA CGCATGTGTA C3CACGTGTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5890       5900       5910       5920       5930       5940       5950
C3CACGTGTA C3CACGTGTA CGCATGTGTA C3CATGTGTA C3CACGTGTA CGCACGTGTA C3CACGTGTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5960       5970       5980       5990       6000       6010       6020
C3CACGTGTA C3CACGTGTA CGCACGTGTA C3CACGTGTA C3CACGTGTA CGCACGTGTA C3CACGTGTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6030       6040       6050       6060       6070       6080       6090
C3CACGTGTA C3CACGTGTA CGCACGTGTA C3CACGTGTA C3CACGTGTA CGCACGTGTA C3CACGTGTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6100       6110       6120       6130       6140       6150       6160
C3CACGTGTA C3CACGTGTA CGCACGTGTA C3CGC3CGTT TTTAGATATT AACTTAGCTT AATCAAACCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6170       6180       6190       6200       6210       6220       6230
CCCTTACCCC CCGTAACTTC AAGGAGCTTA C3CACATTTA TGATTGTCCT GCCAAACCCC AAAAACAAGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6240       6250       6260       6270       6280       6290       6300
CTAAATGCAC GTGCAAACAT GAAGCTATTA CACCCAAAAT CCCACATAAT AAGCTAAAAT TCCCAGCCAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6310       6320       6330       6340       6350       6360       6370
ATAATCACTA CAATCACAGG CATGAGACTT TAAATTAAGA TCTATCTATA GATATTTTTT TTTTTACTCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6380       6390       6400       6410       6420       6430       6440
GTCTCCCTCC TATTGATTTT TCCGTTATTA TCACTTTTTT AGCCACGAGC TTCTACTAAA TTATCCCATA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       6450       6460       6470       6480       6490       6500       6510
TAAATCCCAA AACCAACCGC GTTTATGTAG CTTAATAATA AAGCAAGGCA CTGAAAATGC CTAGACGAGT
```

→ trnF

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       6520       6530       6540       6550       6560       6570       6580
TGTATAACCC CATAAACATA AAGGTTTGGT CCTAGCCTTC CCATTAGCTA TTAACAAGAT TACACATGTA
```

→ 12S rRNA

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       6590       6600       6610       6620       6630       6640       6650
AGTCTCCGCG CTCCAGTGAA AATGCCCTTT GGATCTTAAA GTGATCTGAA GGAGCGGGCA TCAAGCACAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       6660       6670       6680       6690       6700       6710       6720
CCCTCCCCGG TAGCTTATAA CGCCTTGCTC AGCCACACCC CCACGGGATA CAGCAGTGAT AAAAATTAAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       6730       6740       6750       6760       6770       6780       6790
CCATAAACGA AAGTTTGACT AAGCTATGTT GATTAAAGGG TTGGTTAATT TCGTGCCAGC CACCGCGGTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       6800       6810       6820       6830       6840       6850       6860
ATACGATTGA CCCAAGTTAA TAGGCCCACG GCGTAAAGCG TGTGAAAGAA AAAAATTTTT CCCCCATTAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       6870       6880       6890       6900       6910       6920       6930
AGTTAAAGTT TAATCAAGCT GTAAAAAGCT ACCAATAACA CTAAAATAGA CTACGAAAGT GACTTTAATA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       6940       6950       6960       6970       6980       6990       7000
CTCTCAACCA CGCGACAGCT AAGATCCAAA CTGGGATTAG ATACCCCACT ATGCTTAGCC TTAAACATAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       7010       7020       7030       7040       7050       7060       7070
ATAATTTATC AAACAAAATT ATTCGCCAGA GAACTACTAG CAACGGCTTA AAACTCAAAG GACTTGGCGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       7080       7090       7100       7110       7120       7130       7140
TGCTTTAAAC CCCCCTAGAG GAGCCTGTTC TGTAATCGAT AAACCCCGAT AGACCTCACC ACCCCTTGCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       7150       7160       7170       7180       7190       7200       7210
AATCCAGTCT ATATACCGCC ATCTTCAGCA AACCCTTAAA AGGAAAAAGA GTAAGCACAA TCATCTTGCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       7220       7230       7240       7250       7260       7270       7280
TAAAAAAGTT AGGTCAAGGT GTAACTCATG GGATGGGAAG AAATGGGCTA CATTTTCTAT TCAAGAACAA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       7290       7300       7310       7320       7330       7340       7350
CCTACGAAAG TTTTTATGAA ACTAAAAACT AAAGGTGGAT TTAGTAGTAA ACCAAGAATA GAGAGCTTGG
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
        7360       7370       7380       7390       7400       7410       7420
TTGAATAAGG CAATGAAGCA CGCACACACC GCCCGTCACC CTCCTCAAGT GGCACAAGTC AAATATAACC

        7430       7440       7450       7460       7470       7480       7490
TATTAAAACC AAATAAAACG CAAGAGGAGG CAAGTCGTAA CAAGGTAAGC GTACTGGAAA GTGTGCTTGG

        7500       7510       7520       7530       7540       7550       7560
ATAAACCAAA GTGTAGCTTA AACAAAGTAT CTGGCTTACA CCCAGAAGAT TTCACGTATG TGACCGCTTT
```

trnV

```
        7570       7580       7590       7600       7610       7620       7630
GAGCCCAGAG CTAGCCCAGA CAATAACCGA TTAAACTACC ACAGGCCAAT TAAATAAAAC ATTCAGTAGC
```

16S rRNA

```
        7640       7650       7660       7670       7680       7690       7700
GCAATTAAAG TATAGGAGAT AGAAATTCTT TAGATCGGAG CTATAGAGAA AGTACCGCAA GGGGACGATG

        7710       7720       7730       7740       7750       7760       7770
AAAGATTACC CAAAGTGATA AACAGCAAAG ATTACCCCTT CTACCTTTTG CATAATGAGT TAGCCAGAAA

        7780       7790       7800       7810       7820       7830       7840
TAACCTAACA AAGAGAACTT AAGCTAGGTC CCCCGAAACC AGACGAGCTA CCTATGAACA ATCCACTGGG

        7850       7860       7870       7880       7890       7900       7910
GTAAACTCAT CTATGTTGCA AAATAGTGAG AAGATTTGTA GGTAGAGGTG AAAAGCCTAA CGAGCCTGGT

        7920       7930       7940       7950       7960       7970       7980
GATAGCTGGT TGCCCAGAAT AGAACTTCAG TTCAACTTTA AACTTGCCTA CAAAACTTAG ATAATTTTAA

        7990       8000       8010       8020       8030       8040       8050
TGCAAGTTTA AAATATATTC TAAAAAGGTA CAGCTTTTTA GAATCAAGGA TACAACCTTA CTTAGAGAGT

        8060       8070       8080       8090       8100       8110       8120
AAATACTGAT TAAACCATAG TAGGCCTAGA AGCAGCCATC AATTAAGAAA GCGTTTAAGC TCAACATCCA

        8130       8140       8150       8160       8170       8180       8190
TGTCAACTTA ATACCAAAAG TATTTAATCA ACTCCTAATA TAACAACTGG GCTAATCTAT TTTAATATAG
        8200       8210       8220       8230       8240       8250       8260
AAGCAATAAT GCTAATATGA GTAACGAGAG ATACCTCTCC AACGCATAAG CCTATAACAG CAACGGATAA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        8270       8280       8290       8300       8310       8320       8330
CCACTGATAG TTAACAACAA CGTAGAAATA ACCCAACAAT AAAACATCTA CCAAACCAAT TGTTAATCCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        8340       8350       8360       8370       8380       8390       8400
ACACAGGTAT GCGACTAAGG AAAGATTAAA AGAAGTAAAA GGAACTCGGC AAACACAAAT CCCGCCTGTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        8410       8420       8430       8440       8450       8460       8470
TACCAAAAAC ATCACCTCCA GCATTCCCAG TATTGGAGGC AGTGCCTGCC CGGTGACATT AGTTAAACGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        8480       8490       8500       8510       8520       8530       8540
CCGCGGTATT CTGACCGTGC AAAGGTAGCA TAATCATTTG TTCTCTAAAT AAGGACTTGT ATGAAAGGCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        8550       8560       8570       8580       8590       8600       8610
ACACGAGGGT TTAACTGTCT CTTACTTCCA ATCAGTGAAA TTGACCTTCC CGTGAAGAGG CGGGAATAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        8620       8630       8640       8650       8660       8670       8680
ACAATAAGAC GAGAAGACCC TATGGAGCTT TAATTAACTA GCTCAAAAGA ATCTACCTAC CAGACCGACA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        8690       8700       8710       8720       8730       8740       8750
GGAACAACAT ACTCCTTCCA TGAGCTAACA ATTTAGGTTG GGGCGACCTC GGAGCATAAA ACAACCTCCG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        8760       8770       8780       8790       8800       8810       8820
AGTGATATTA ATCTAGACGT ACCAGTCAAA ATGCTCACTT ACTTATTGAT CCAAAAACCT CTTTGATCAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        8830       8840       8850       8860       8870       8880       8890
CGGAACAAGT TACCCTAGGG ATAACAGCGC AATCCTATTT AAGAGTCCAT ATCGACAATA GGGTTTACGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        8900       8910       8920       8930       8940       8950       8960
CCTCGATGTT GGATCAGGAC ATCCTAATGG TGCAGCAGCT ATTAAGGGTT CGTTTGTTCA ACGATTAAAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        8970       8980       8990       9000       9010       9020       9030
TCCTACGTGA TCTGAGTTCA GACCGGAGCA ATCCAGGTCG GTTTCTATCT ATTTAAACAA CCTCTCCCGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        9040       9050       9060       9070       9080       9090       9100
TACGAAAGGA CAAGAGAAGT AAGGCCTCCC TCACTGAGGC GCCTTAAGAC CAATAGATGA TTTAATCTAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        9110       9120       9130       9140       9150       9160       9170
ATCCAGTAAG TCTATCCCCA ATACTGCCCA AGAGACAGGG CTTTGTTAGG GTGGCAGAGC CCGGTGATTG
                                                 ⟶ trnL1

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        9180       9190       9200       9210       9220       9230       9240
CATAAAACTT AAACCTTTAT ATTCAGGGGT TCAAATCCTC TCCCTAACAT TATGTTTATA ATCAACACTA
                                                    ⟶ ND1
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        9250       9260       9270       9280       9290       9300       9310
TCTCACTAGT TGTACCCATT CTCCTTGCCG TAGCCTTCTT AACACTAGTA GAGCGAAAAG TACTAGGCTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        9320       9330       9340       9350       9360       9370       9380
TATACAACTT CGTAAAGGAC CAAACATTGT AGGGCCCTAC GGTCTCCTAC AACCTGTCGC AGATGCTGTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        9390       9400       9410       9420       9430       9440       9450
AAACTTTTCA CCAAAGAGCC TCTACGCCCA CTCACATCAT CTGCGACTAT ATTCATTATG GCCCCTATTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        9460       9470       9480       9490       9500       9510       9520
TGGCTCTAAC ACTGGCCCTA ACCATGTGAA TTCCCCTACC AATGCCATAT CCCCTTGTCA ATATAAACCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        9530       9540       9550       9560       9570       9580       9590
CGGAGTACTA TTCATACTAG CAATATCAAG CCTAGCTGTA TACTCTATCC TTTGATCAGG ATGAGCTTCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        9600       9610       9620       9630       9640       9650       9660
AATTCAAAAT ACGCTCTGAT CGGAGCCCTA CGGGCCGTAG CCCAGACAAT TTCATATGAA GTCACATTAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        9670       9680       9690       9700       9710       9720       9730
CTATTATCCT CCCATCAGTC CTACTAATGA ATGGCTCATT CGCACTTTCC ACTTTAATTA CTACTCAAGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        9740       9750       9760       9770       9780       9790       9800
GCACCTCTGA CTAATCTTCC CTGCATGACC CCTAGCCATG ATATGATTTA TTTCCACCCT AGCAGAAACC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        9810       9820       9830       9840       9850       9860       9870
AACCGAGCCC CCTTCGACCT AGCAGAAGGA GAATCAGAAC TGGTCTCAGG TTTTAACGTT GAGTACGCGG

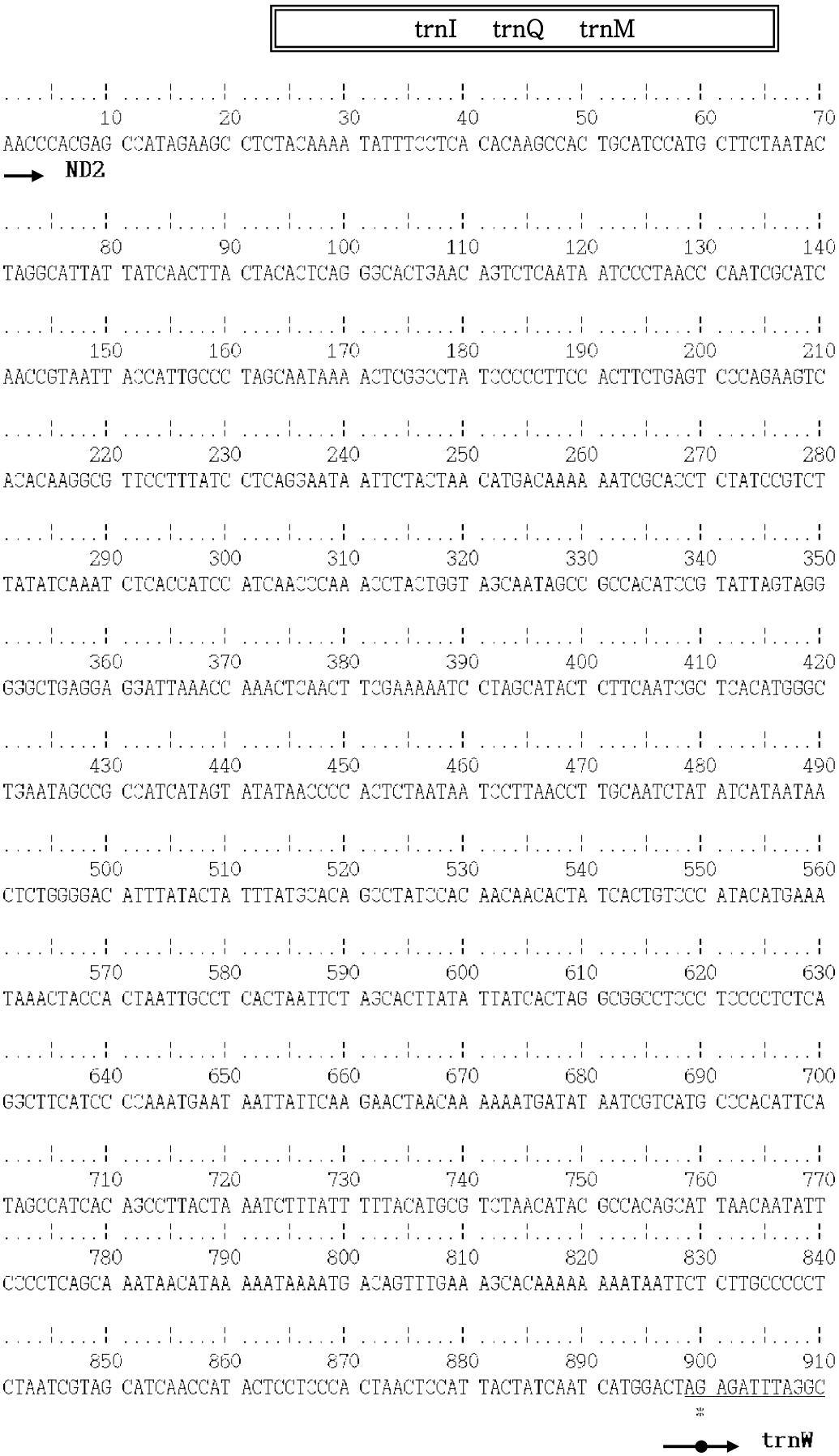
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        9880       9890       9900       9910       9920       9930       9940
CAGGTCCGTT CGCCCTATTT TTCCTAGCAG AATATACTAA TATCATTATA ATAAATGCCC TCACGACTAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        9950       9960       9970       9980       9990      10000      10010
CCTGTTCTTC GGGGCATTTC ATAATCCCTA CATACCAGAA CTGTACACTG TCAATTTCAC CGTANAAACA

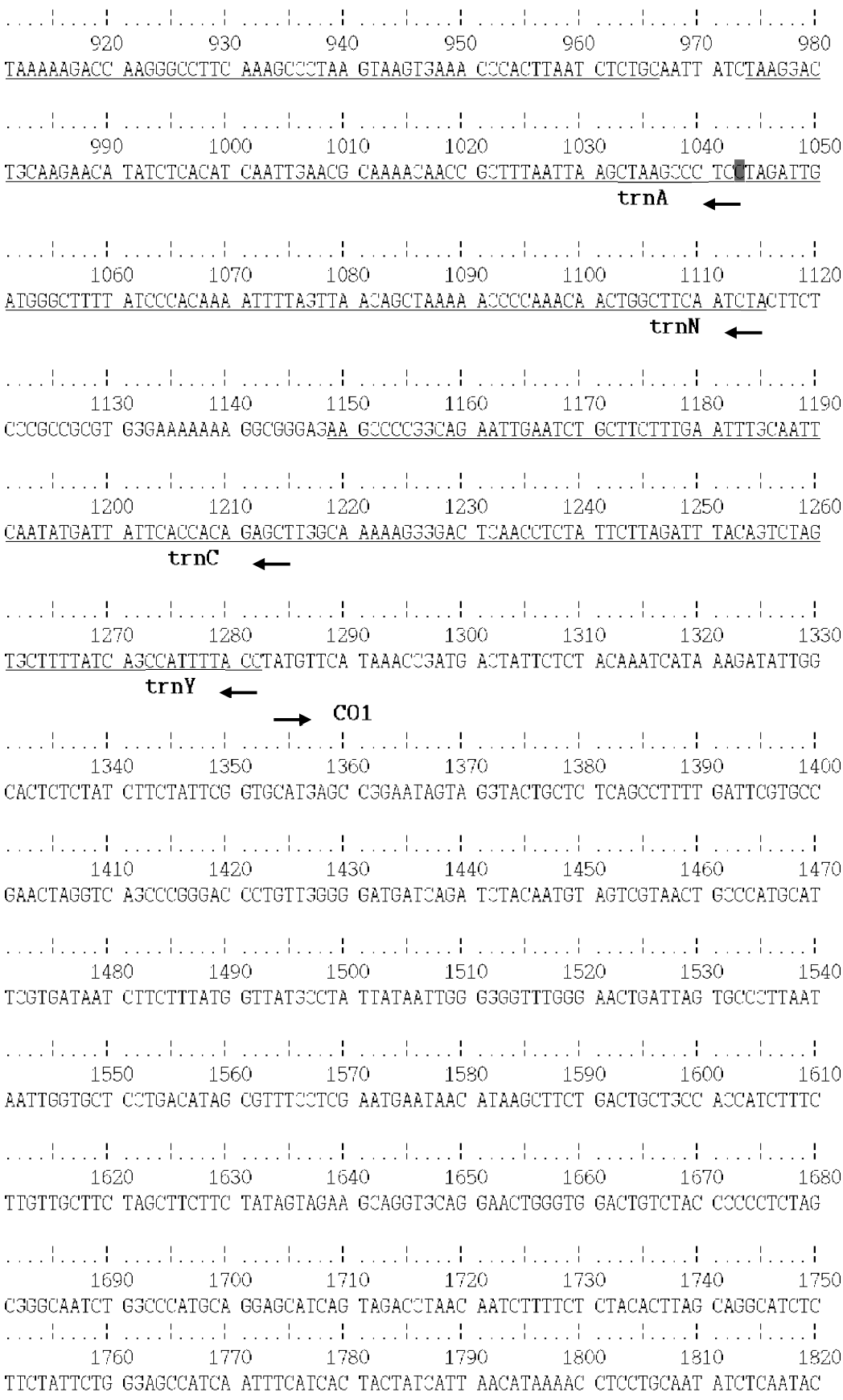
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       10020      10030      10040      10050      10060      10070      10080
CTACTCTTAA CAGCTTCCTT CCTATGAATC CGTGCATCAT ATCCCCGATT CCGATATGAC CAACTAATGC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       10090      10100      10110      10120      10130      10140      10150
ATCTGCTATG AAAAAACTTC CTACCCCTTA CACTAGCCCT GTGCATGTGA CATGTAACAC TACCCATTAT

....|....| ....|....| ..
       10160      10170
CACAGCAAGC ATTCCCCCCC AA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1830       1840       1850       1860       1870       1880       1890
CAAACCCCTC TGTTTGTGTG ATCAGTCCTA ATCACGGCAG TGCTTCTTCT TTTATCTCTG CCAGTCTTGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1900       1910       1920       1930       1940       1950       1960
CGGCTGGGAT TACCATACTA CTTACAGATC GAAACCTCAA CACTACCTTT TTTGACCCAG CCGGAGGGGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1970       1980       1990       2000       2010       2020       2030
AGATCCTATT CTGTACCAAC ACTTGTTTTG ATTCTTCGGA CACCCTGAGG TTTATATCCT AATTCTTCCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2040       2050       2060       2070       2080       2090       2100
GGGTTCGGAA TGATCTCTCA CATTGTCACT TATTACTCAG GAAAAAAAGA GCCTTTCGGC TACATGGGTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2110       2120       2130       2140       2150       2160       2170
TAGTCTGAGC GATAATATCC ATTGGATTCT TAGGATTTAT CGTGTGAGCT CATCATATGT TTACCGTAGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2180       2190       2200       2210       2220       2230       2240
TATAGATGTC GACACACGAG CTTACTTCAC TTCAGCTACC ATAATTATTG CAATCCCAAC AGGAGTCAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2250       2260       2270       2280       2290       2300       2310
GTATTTAGCT GACTAGCTAC CCTGCACGGA GGGAATATTA AATGATCTCC TGCTATAATA TGAGCCCTAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2320       2330       2340       2350       2360       2370       2380
GCTTTATTTT TCTGTTTACA GTAGGGGGCC TTACAGGAAT TGTCCTAGCT AATTCGTCTC TAGACATTGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2390       2400       2410       2420       2430       2440       2450
TCTCCATGAC ACATATTATG TGGTAGCCCA TTTCCACTAT GTGCTGTCAA TAGGAGCTGT CTTTGCCATT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2460       2470       2480       2490       2500       2510       2520
ATAGGAGGAT TTGTCCACTG ATTTCCACTG TTTTCAGGCT ATACACTTAA TAATACATGA GCAAAGATTC

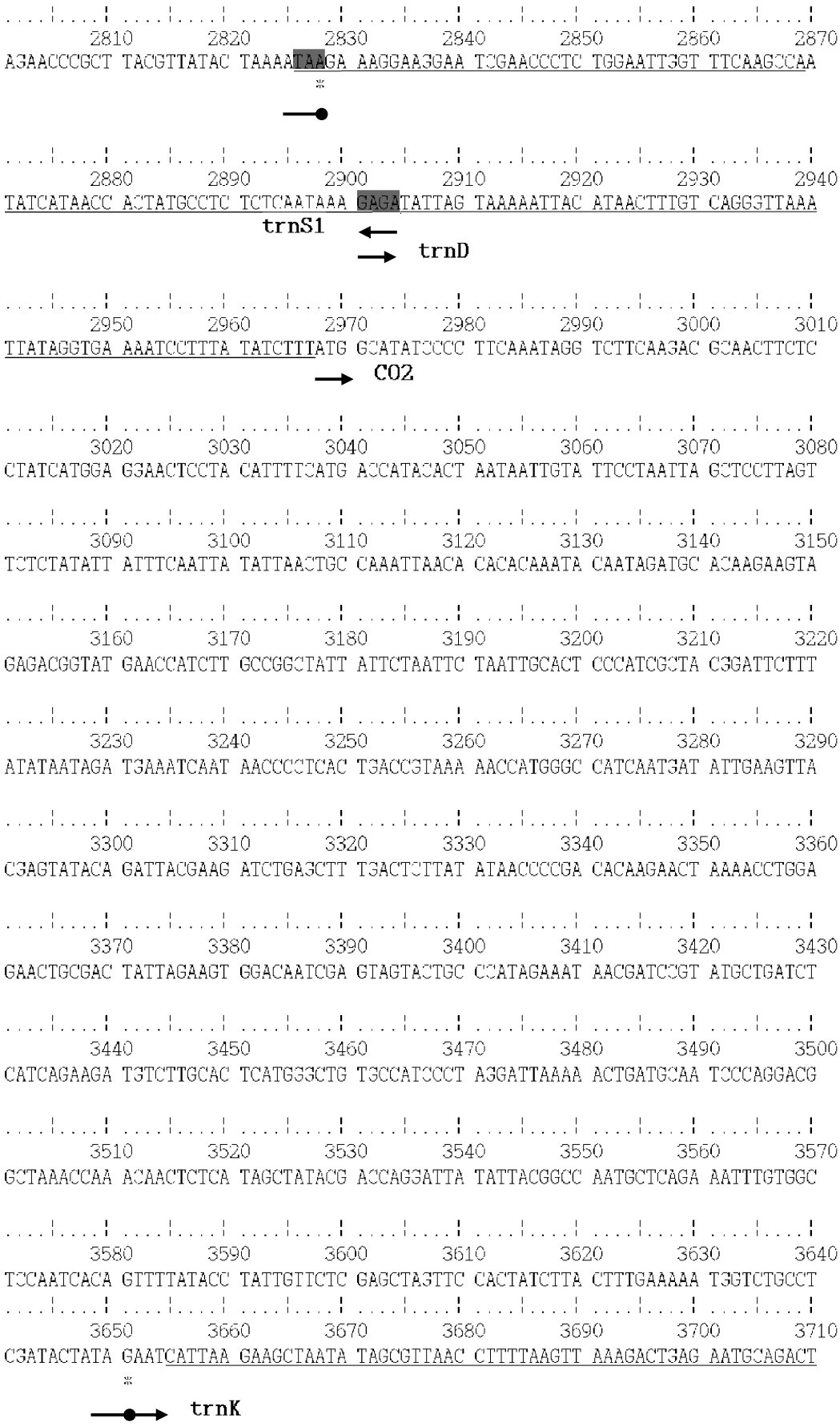
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2530       2540       2550       2560       2570       2580       2590
ACTTCATAAT CATATTCGTT GGGGTTAATA TAACTTTCTT TCCCCAACAT TTCCTGGGCC TGTCGGGAAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2600       2610       2620       2630       2640       2650       2660
GCCTCGGCGA TATTCCGACT ATCCAGATGC CTACACAATA TGAAATACAG TATCTTCTAT AGGCTCATTC

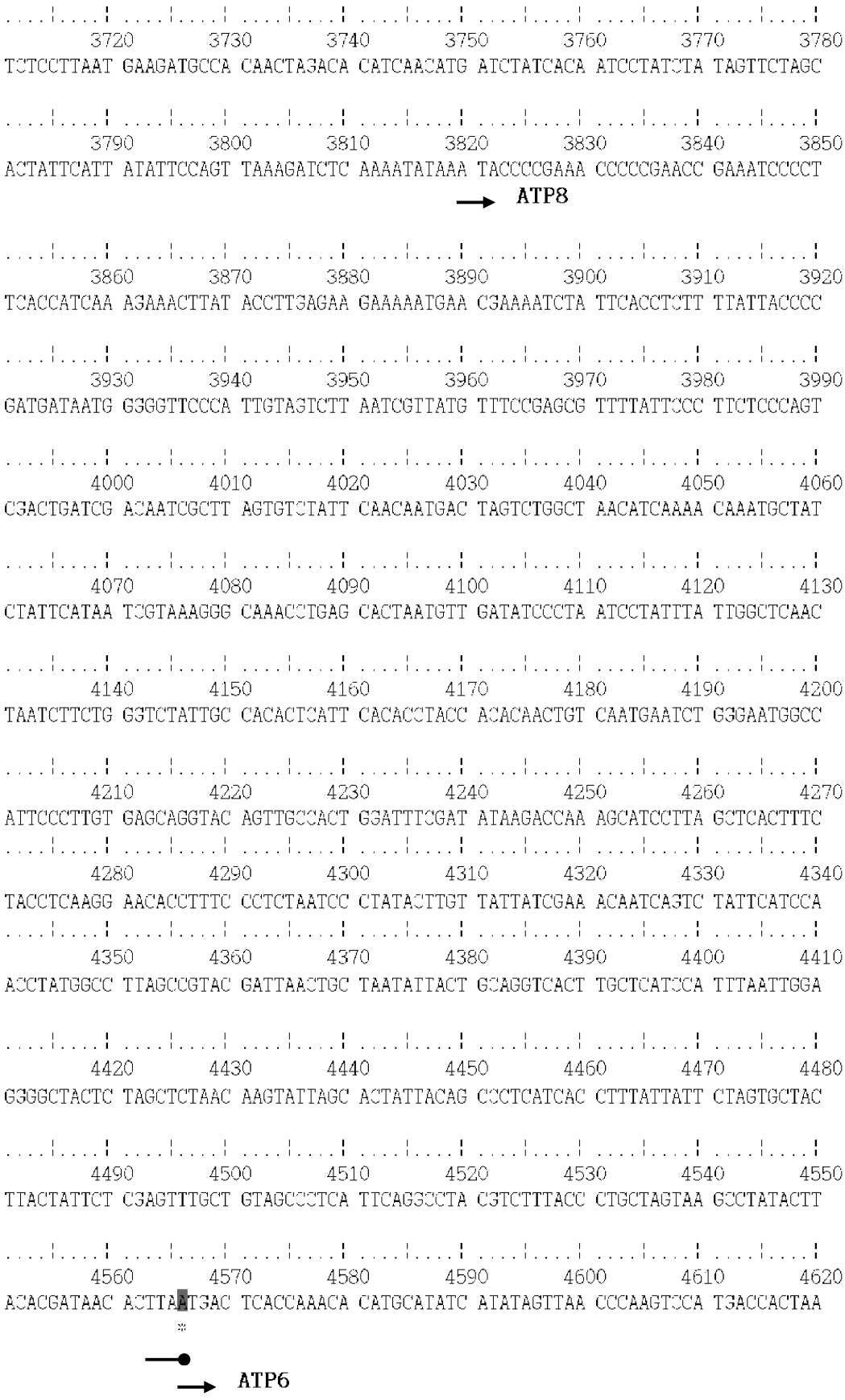
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2670       2680       2690       2700       2710       2720       2730
ATTTCACTAA CAGCAGTTAT ACTAATAATT TTCATGATTT GGGAGGCCTT TGCATCAAAG CGAGAGGTAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2740       2750       2760       2770       2780       2790       2800
CAGTGGTAGA ACTCACTTCA ACCAATATTG AATGACTACA TGGATGTCCT CCTCCGTACC ATACATTTGA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4630       4640       4650       4660       4670       4680       4690
CAGGAGCCCT TTCAGCCCTT CTTATAACAT CAGGACTAAT CATATGATTC CACTTTAACT CTATATTCTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4700       4710       4720       4730       4740       4750       4760
GCTATCGCTA GGCCTTACAA CCAACATACT TACTATATAC CAATGATGAC GGGATATTAT TCGAGAGAGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4770       4780       4790       4800       4810       4820       4830
ACCTTTCAGG GTCATCACAC CCCCGTTGTC CAAAAAGGAC TGCGGTACGG AATAGTCCTA TTTATCGTAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4840       4850       4860       4870       4880       4890       4900
CAGAAGTATT CTTCTTCGCA GGATTCTTCT GAGCTTTTTA TCACTCAAGC CTAGCACCCA CTCCCGAACT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4910       4920       4930       4940       4950       4960       4970
GGGGGCATGC TGACCACCCA CAGGTATTAC TCCCCTGAAC CCGCTAGAAG TACCACTTCT CAATACTTCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4980       4990       5000       5010       5020       5030       5040
GTACTTCTTG CATCCGGAGT GTCCATTACC TGAGCTCACC ACAGCTTAAT AGAGGGAAGC CGCAAGCACA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5050       5060       5070       5080       5090       5100       5110
TGCTTCAGGC CCTATTTATT ACTATCTCTC TAGGCGTGTA CTTCACACTT CTACAAGCCT CAGAGTATTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5120       5130       5140       5150       5160       5170       5180
TGAGGCGTCC TTCACTATCT CAGATGGAGT CTATGGCTCA ACTTTCTTCA TAGCGACTGG ATTTCACGGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5190       5200       5210       5220       5230       5240       5250
CTTCATGTAA TTATTGGCTC AACTTTTCTC ACAGTCTGTT TCCTACGGCA ACTACATTTT CATTTTACAT
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5260       5270       5280       5290       5300       5310       5320
CAAGCCACCA TTTCGGCTTT GAAGCAGCAG CATGATATTG ACACTTCGTA GATGTCGTAT GACTATTCCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....
        5330       5340       5350       5360       5370       5380
ATACGTTTCT ATCTATTGAT GAGGGTCTTG CTTCTTTAGT ATCGATCAGT ACAATTGACT TCCA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.2. 호랑이 (*Panthera tigris coreensis*)



그림 V-18. 호랑이

- 계통 (Systematics)
  Phylum Chordata 척삭동물 문
  Class Mammalia 포유 강
  Order Carnivora 식육 목
  Family Felidae 고양이 과
- 기상 (Diagnosis)
  몸길이 : 1.86~4m
- 서식처 (Habitat)
  한대 또는 열대지역의 산림·관목림·덤불에서 생활.

호랑이는 우리 민족뿐만 아니라 중국이나 그 외 여러 나라에서도 권위상징으로 여기며 호피를 무척 귀한 물품으로 여겨왔다. 결과적으로 호랑이는 인간의 잘못된 이기심으로 말미암아 사냥의 표적이 되었고 우리나라의 경우 일제 강점기에 민족성을 상징하는 호랑이 말살 정책으로 위험한 동물을 잡아 없앤다는 미명아래 대대적인 호랑이 소탕작전으로 전국의 호랑이의 대부분이 죽어갔다. 얼마 남지 않은 호랑이는 6.25 전쟁과 개발에 의해 서식지가 파괴되어 결국 남한에서 멸종하게 되었다. 현재 북한에 몇 마리가 서식하고 있는 정도이며 시베리아 보호구역 안에 약간의 백두산호랑이(한국호랑이)가 종을 이어가고 있다 (그림 V-18).

3.2.1. Total genomic DNA 추출

호랑이 근육조직의 일부 (25mg)를 떼어내어 DNeasy Tissue kit (Qiagen, Co.)의 추출과정을 이용하여 total genomic DNA를 추출한다.

3.2.2. Primer 제작

일부 선행연구를 통하여 밝혀진 식육목의 염기서열을 이용하여, 12S rRNA-CO1, CO1-ND5, ND5-16S rRNA 3부분의 유전자 영역을 증폭하기 위한 primer를 제작하였다 (표 V-6).

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 V-6. 호랑이에서 사용된 primer 염기서열

Primer name	Primer Sequence	Gene region
Car1A	5'-GGA GAT AAG TCG TAA CAA GGT AAG CA-3'	12S rRNA ~ CO1
Car1B	5'-GGA GGA GGA CAT CCA TGT AGT CAT TC-3'	
Car2A	5'-GCT CAT TTA TTT CAC TAA CAG CAG T-3'	CO1 ~ ND5
Car2B	5'-GAG TTA GTA ATA GGG CTC AGG GGT T-3'	
Car3A	5'-CAG CTA CCA GGC TCG TTA G-3'	ND5 ~ 16S rRNA
Car3B	5'-TAC TCC TGT TTC AGC CCT ACT CCA-3'	

3.2.3. PCR 증폭

표 V-7. 12S rRNA와 CO1 gene 사이 (약 5.8kb)를 증폭하기 위한 Long range-PCR 조건

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1㎕
Reverse primer	1㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	17.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	19.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	14 cycles
54℃	30sec	
68℃	5min	
92℃	10sec	24 cycles
54℃	30sec	
68℃	5min +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 V-8. CO1과 ND5 gene 사이 (약 6.2kb)를 증폭하기 위한 Long range-PCR 조건

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1㎕
Reverse primer	1㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	17.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	19.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	14 cycles
54℃	30sec	
68℃	5min	
92℃	10sec	24 cycles
54℃	30sec	
68℃	5min +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

표 V-9. ND5과 16S rRNA gene 사이 (약 5.7kb)를 증폭하기 위한 Long range-PCR 조건

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1㎕
Reverse primer	1㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	17.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	19.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	14 cycles
54℃	30sec	
68℃	5min	
92℃	10sec	24 cycles
54℃	30sec	
68℃	5min +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

3.2.4. 염기서열 결정

16S rRNA-CO1, CO1-ND5, ND5-16S rRNA 3개의 PCR fragment를 분석한 결과 ND5 유

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

전자에서 trnT까지 2,943bp, control region에서 16S rRNA 영역까지 2,666bp, 16S rRNA에서 CO1유전자까지 4,193bp를 얻었다. 이 유전체는 4개의 protein region, 1개의 rRNA, 1개의 control region, 7개의 tRNA 영역, 3개의 partial gene (CO1, 16S rRNA, ND5)으로 총 13개의 유전자 염기서열을 확인하였다. 전체적인 유전자 배열상태는 척추동물의 전형적인 형태를 가진다 (그림 V-19, V-20).

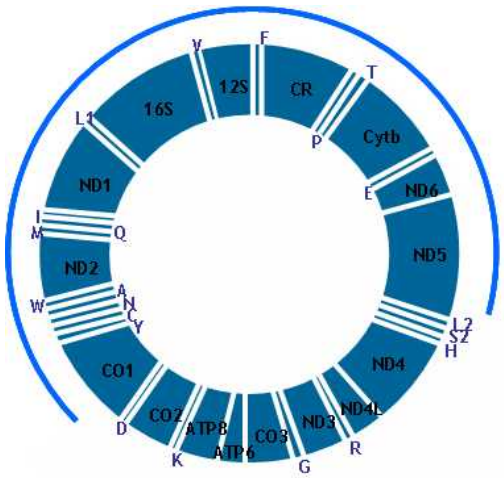


그림 V-19. 호랑이의 미토콘드리아 유전체 지도 (외곽선은 현재까지 분석된 영역)

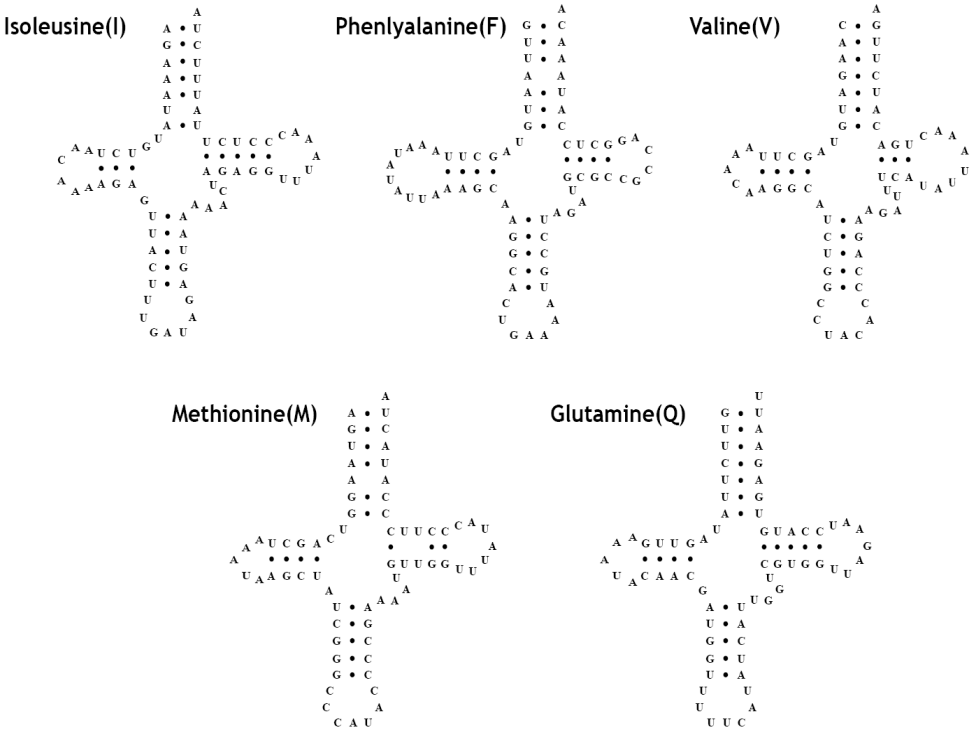


그림 V-20. 호랑이 미토콘드리아의 tRNA 2차 구조

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

▪ 호랑이의 염기서열 및 annotation (9,807bp)

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        10         20         30         40         50         60         70
CACATATCAC GCGTTGGGAG CTCTCCATAT GGTCGACCTG CAGGCGGCCG CGAATTCACT AGTGATTCTC
```

→ **ND5**

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        80         90        100        110        120        130        140
CTGTTTCAGC CCTACTCCAC TCAAGCACAA TAGTTGTAGC CGGAGTCTTC TTATTAATCC GCTTCCACCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       150        160        170        180        190        200        210
ACTCATAGAA CAAAATAAAG CCATACAAAC CCTCACTCTA TGCCTGGGGG CCATCACAAC CCTATTCACA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       220        230        240        250        260        270        280
GCCATCTGTG CCCTCACACA AAATGATATT AAAAAAATTG TTGCTTTCTC AACTTCAAGC CAATTAGGCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       290        300        310        320        330        340        350
TGATAATCGT TACTATCGGA ATTAACCAAC CCTACCTTGC ATTCCTGCAT ATCTGCACAC ACGCATTTTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       360        370        380        390        400        410        420
TAAAGCCATA TTATTCATGT GCTCCGGATC AATTATCCAC AGTCTAAACG ACGAGCAAGA TATTCGAAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       430        440        450        460        470        480        490
ATAGGCGGAC TATATAAACC AATACCCTTT ACTACCACCT CCCTTATTAT CGGAAGCCTC GCATTAACAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       500        510        520        530        540        550        560
GCATGCCATT CCTAACAGGC TTTTACTCCA AAGACCTAAT CATCGAGACA GCCAATACGT CGTATACCAA

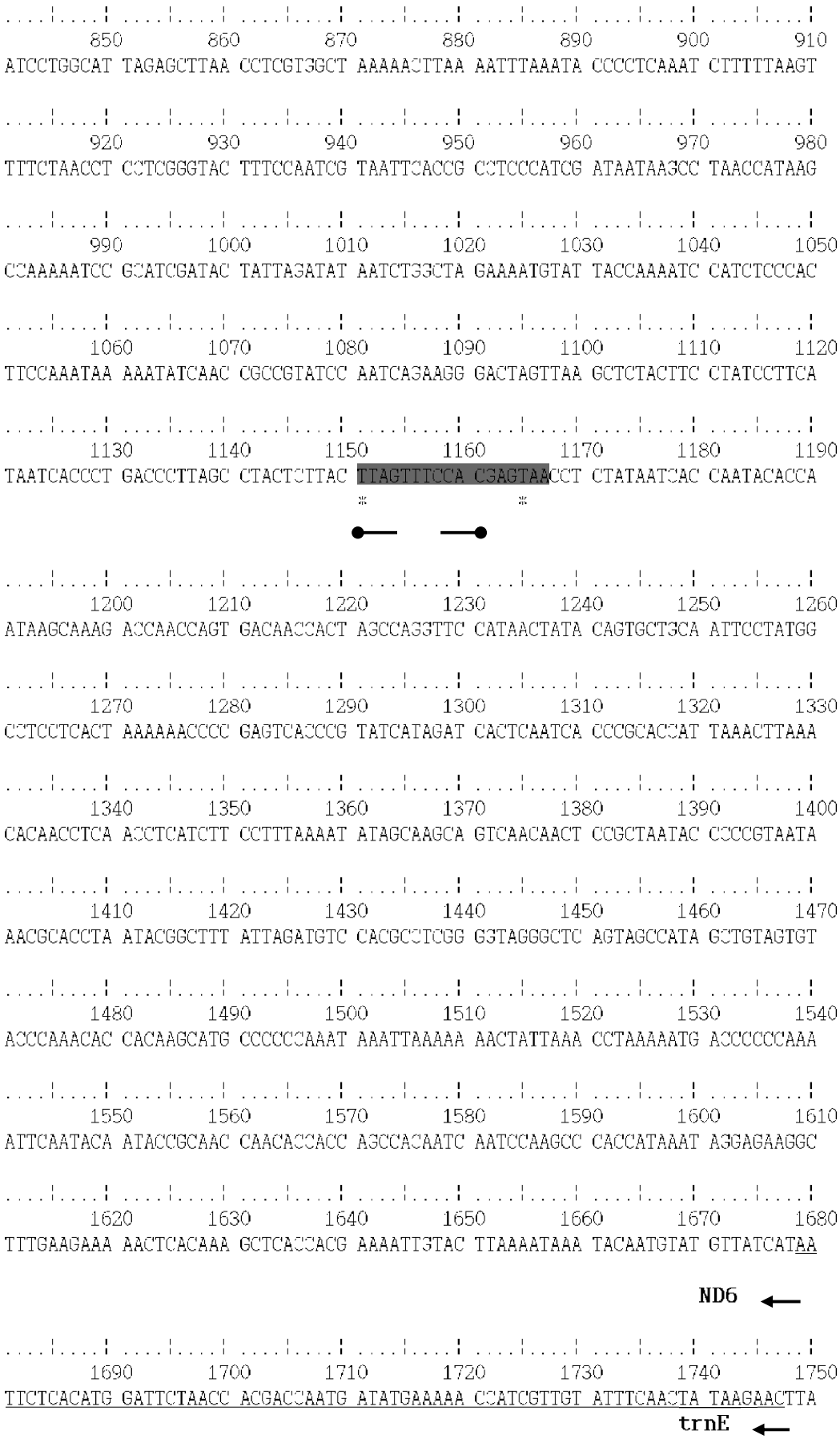
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       570        580        590        600        610        620        630
CGCCTGAGCC CTATTGGTCA CTCTCATTGC TACATCCCTC ACAGCCGCCT ATAGTACTCG AATCATATTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       640        650        660        670        680        690        700
TTTGCACTCC TGGGGCAACC CCGATTCAAC TCCCTAAGCC CAATCAATGA AAACAACCCC CACCTCATCA

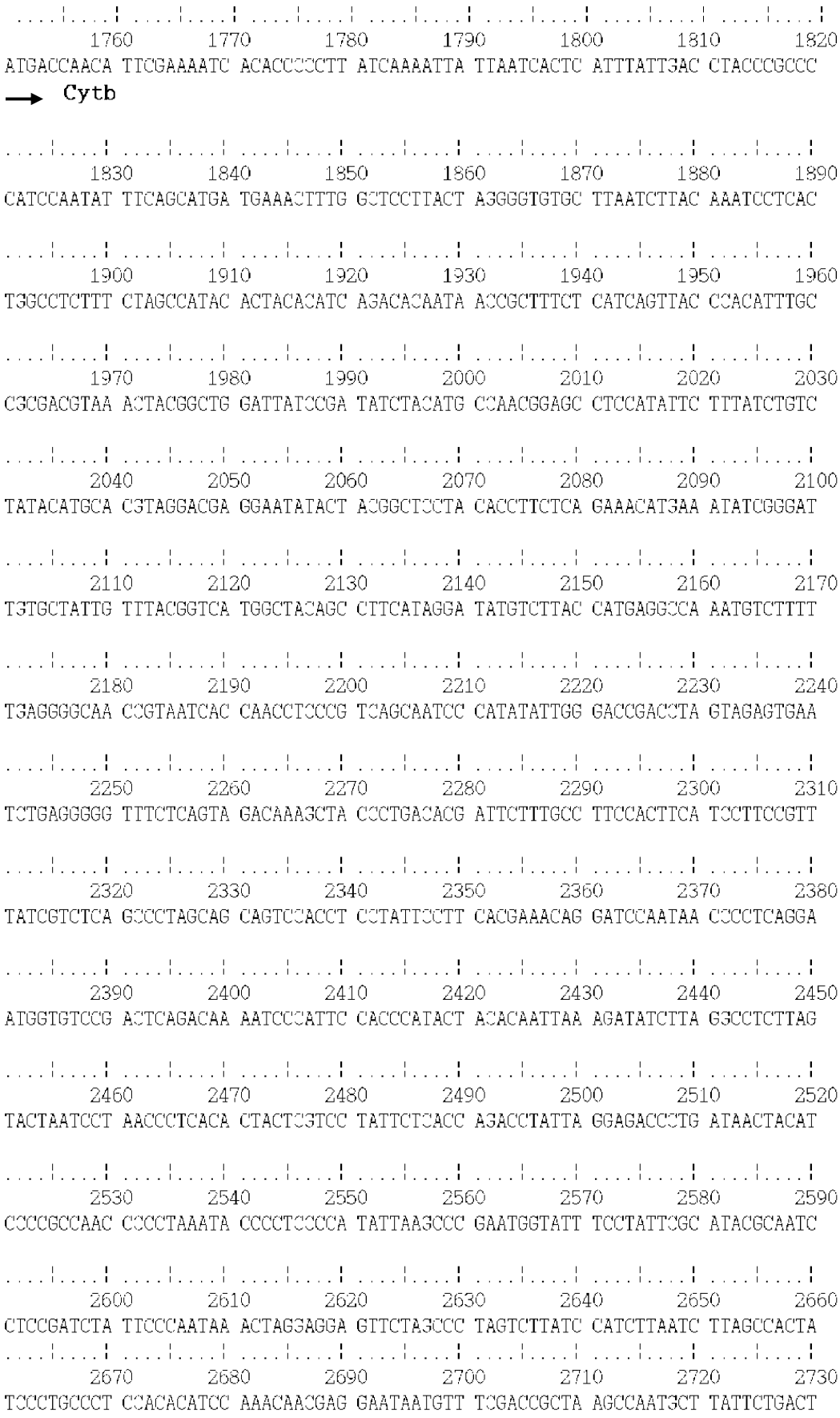
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       710        720        730        740        750        760        770
ACTCCATTAA ACGTCTCTTA ATTGGAAGCA TTTTTGCGGG ATACTTGATC TCCCATAACA TCCCCCCAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       780        790        800        810        820        830        840
GACCATCCCA CAAATGACCA TACCCTGCCA CCTAAAACTA ACTGCTCTCG CCATGACCAT CATAGGCTTT
```

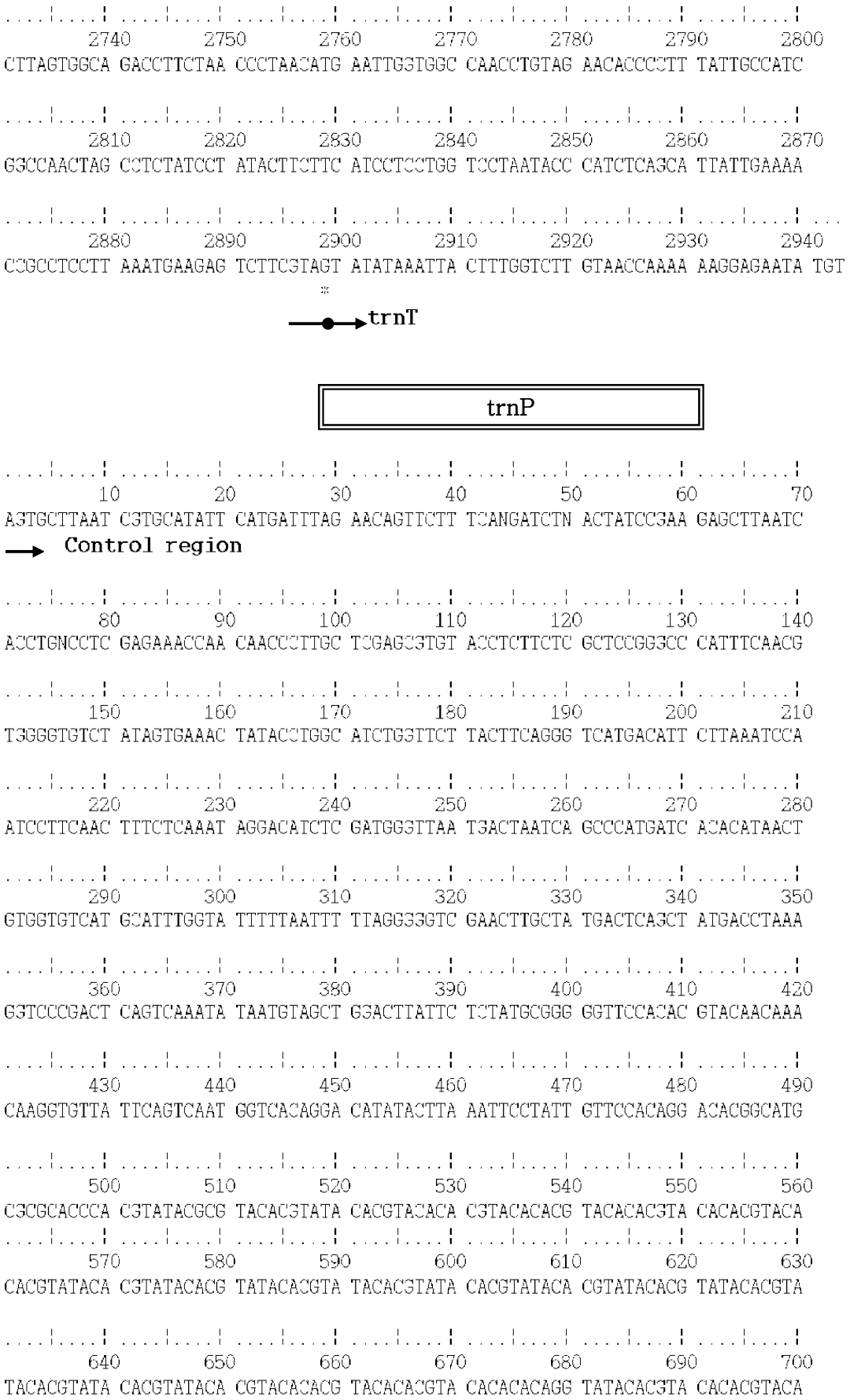
IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        710        720        730        740        750        760        770
CACGTACACA GGTACACACG TATACACGTA TACACGTATA CACGTATACG CGTACACGTA CACACGTACA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        780        790        800        810        820        830        840
CACGTACACA CGTACACACG TACACACGTA CACACGTACA CACGTACACA CGTACACACG TACACACGTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        850        860        870        880        890        900        910
CACACGTACA CACGTATACA CGTATACACG TATACACGTA TACACGTATA CACGTATACA CGTATACACG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        920        930        940        950        960        970        980
TATACACATG CAAACTTTTT TGATTTAGTA AATAATTAGC TTAACCAAAC CCCCCTTACC CCCCGTTAAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        990       1000       1010       1020       1030       1040       1050
CTTATTTATT ATAGTACGTG TTTATTTCTG TCTTGCCAAA CCCCAAAAAC AAGACTAAAC CCGTATCTAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1060       1070       1080       1090       1100       1110       1120
GCACAAGGCC TAAGATTAAC GTTTACAAAC TCTACCAACC CCATCATTAC CAATTATTAA TACTAAATCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1130       1140       1150       1160       1170       1180       1190
TAACTTCGTT CGCAGTTATC TATAGATACG ACAACCCGAT CTCTAATTCG TCCCTATCGA ACAATATTTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1200       1210       1220       1230       1240       1250       1260
CATACCCAAC AACCCTATGT CTTGGTTAAT GTAGCTTAAA TATATTAAAG CAAGGCACTG AAAATGCCTA

                                  ⟶ trnF

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1270       1280       1290       1300       1310       1320       1330
GATGGGCCGC CAGGCTCCAT AAACATAAAG GTTTGGTCCT AGCCTTTCCA TTAGTTGTTA ATAAAATTAC

                                  ⟶ 12S rRNA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1340       1350       1360       1370       1380       1390       1400
ACATGCAAGC CTCCGCATCC CGGTGAAAAT GCCCTCTAAA TCACCCAGCG ATCCAAAAGA GCCGGTATCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1410       1420       1430       1440       1450       1460       1470
AGTACACAAC CATTGTAGCC CATGACACCT TGCTCAGCCA CACCCCCACG GGACACAGCA GTGATAAAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1480       1490       1500       1510       1520       1530       1540
TTAAGCCATG AATGAAAGTT CGACTAAGCT ATATTAAATT AGGGTTGGTA AATTTCGTGC CAGCCACCGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1550       1560       1570       1580       1590       1600       1610
GGTCATACGA TTAACCCAAA CTAATAGACC CACGGCGTAA AGCGTGTTAC AGAAAAAAGT ATACTAAAGT
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1620       1630       1640       1650       1660       1670       1680
TAAGCCTTAA CTAGGCTGTA AAAAGCCACA GTTAACGTAA AAATACAGCA CGAAAGTAAC TTTAATATTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1690       1700       1710       1720       1730       1740       1750
CTGACCACAC GATAGCTAAG ACCCAAACTG GGATTAGATA CCCCACTATG CTTAGCCCTA AACCTAGATA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1760       1770       1780       1790       1800       1810       1820
GTTAACCCAA ACAAAACTAT CCGCCAGAGA ACTACTAGCA ACAGCTTAAA ACTCAAAGGA CTTGGCGGTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1830       1840       1850       1860       1870       1880       1890
CTTTATATCC CTCTAGAGGA GCCTGTTCCA TAATCGATAA ACCCCGATAA ACCTCACCAT CTCTTGCTAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1900       1910       1920       1930       1940       1950       1960
TTCAGCCTAT ATACCGCCAT CTTCAGCAAA CCCTAAAAAG GAAGAAAAGT AAGCACAAGT ATCTTAACAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1970       1980       1990       2000       2010       2020       2030
AAAAAAGTTA GGTCAAGGTG TAGCCCATGA GATGGGGAAG TAATGGGCTA CATTTTCTAT AACTAGAACA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2040       2050       2060       2070       2080       2090       2100
TCCACGAAAA TCCTTATGAA ATTAAGTATT AAAGGAGGAT TTAGTAGTAA ATTCGAGAAT AGAGAGCTCG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2110       2120       2130       2140       2150       2160       2170
ATTGAATCGG GCCATGAAGC ACGCACACAC CGCCCGTCAC CCTCCTCAAG TGATTAGACC CCAAAGAAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2180       2190       2200       2210       2220       2230       2240
CTATTCAAAC CACTACACCC ACAAGAGGAG ACAAGTCGTA ACAAGGTAAG CATACTGGAA AGTGTGCTTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2250       2260       2270       2280       2290       2300       2310
GATAACAAGA TGTAGCTTAA ACAAGGCATC TGGCCTACAC CCAGAAGATT TCATATTAAA CTGACCATCT
      ⟶ trnV

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2320       2330       2340       2350       2360       2370       2380
TGAGCTAGAG CTAGCCCAAC TACCCATAAA CACAACTAAC ATTAGAAAGT AAAACAAAAC ATTTAGTTAC
   ⟶ 16S rRNA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2390       2400       2410       2420       2430       2440       2450
TCTAAAAAGT ATAGGAGATA GAAATTTAAC TCGGCGCTAT AGAAAAAGTA CCGCAAGGGA ATGATGAAAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2460       2470       2480       2490       2500       2510       2520
AAAAAACTAA AAGCACTATA CAGCAAAGAT TACCCCTTGT ACCTTTTGCA TAATGAATTA GCTAGAATAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2530       2540       2550       2560       2570       2580       2590
CCTAACAAAG AGAACTTCAG CTAGGCCCCC CGAAACCAGA CGAGCTACCC ATAAACAATC TATTACAGGA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|.
        2600       2610       2620       2630       2640       2650       2660
TGAACTCGTC TATGTTGCAA AATAGTGAGA AGATTTATGG GTAGAGGTGA AAAGCCTAAC GAGCCTGGTG ATAGCG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         10         20         30         40         50         60         70
TCCATATGGT CGACCTGCAG GCGGCCGCGA ATTCACTAGT GATTCGCCTG TTTAACAAAA ACATCACCTC
→ 16S rRNA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         80         90        100        110        120        130        140
AAGCATTTCC AGTATTAGAG GCACTGCCTG CCCAGTGACA TTAGTTAAAC GGCCGCGGTA TCCTGACCGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        150        160        170        180        190        200        210
GCAAAGGTAG CATAATCATT TGTTCCTTAA ATAGGGACTT GTATGAATGG CCACACGAGG GCTTTACTGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        220        230        240        250        260        270        280
CTCTTACTTC CAATCCGTGA AATTGACCTT CCCGTGAAGA GGCGGGAATA TGACAATAAG ACGAGAAGAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        290        300        310        320        330        340        350
CCTATGGAGC TTTAATTAAC CGACCCAAAG AGACCTTGAT AATCAACCGA CAGGGATAAC AAACCTCTAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        360        370        380        390        400        410        420
CATGGGTCGA CAATTTAGGT TGGGGTGACC TCGGAGAATA AAACAACCTC CGAGTGATTT AAATCTAGAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        430        440        450        460        470        480        490
TAACCAGTCG AAAGTATTAC ATCACTTATT GATCCAAAAA CTTGATCAAC GGAACAAGTT ACCCTAGGGA

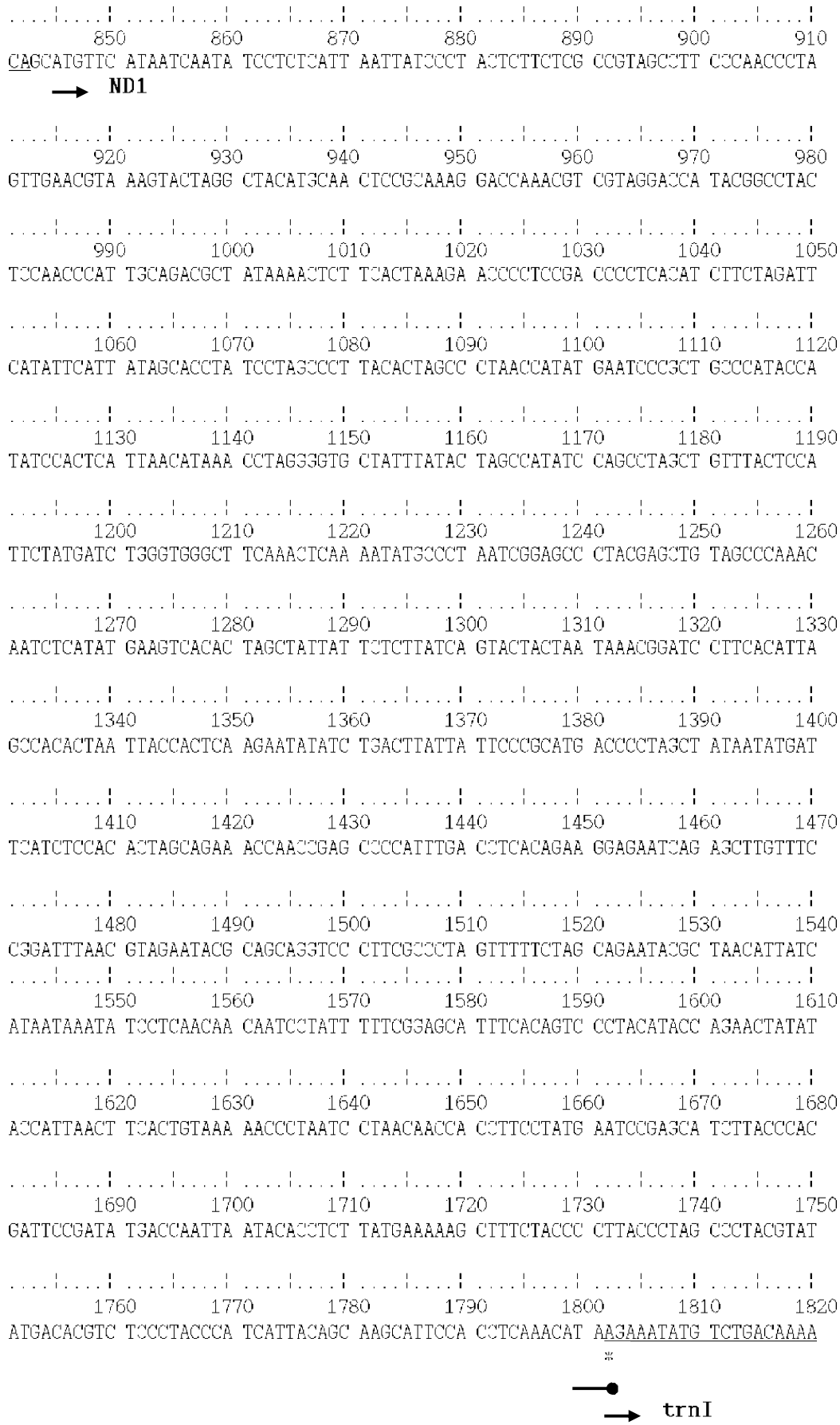
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        500        510        520        530        540        550        560
TAACAGCGCA ATCCTATTTC AGAGTCCATA TCGACAATAG GGTTTACGAC CTCGATGTTG GACCAGGACA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        570        580        590        600        610        620        630
TCCCGATGGT GCAGCAGCTA TCAAAGGTTC GTTTGTTCAA CGATTACCGG AGTAATCCAG GTCGGTTTCT
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        640        650        660        670        680        690        700
ATCTATTAAA TAATTTCTCC CAGTACGAAA GGACAAGAGA AATAAGGCCC ACTTTACCAA AGCGCCTTTA

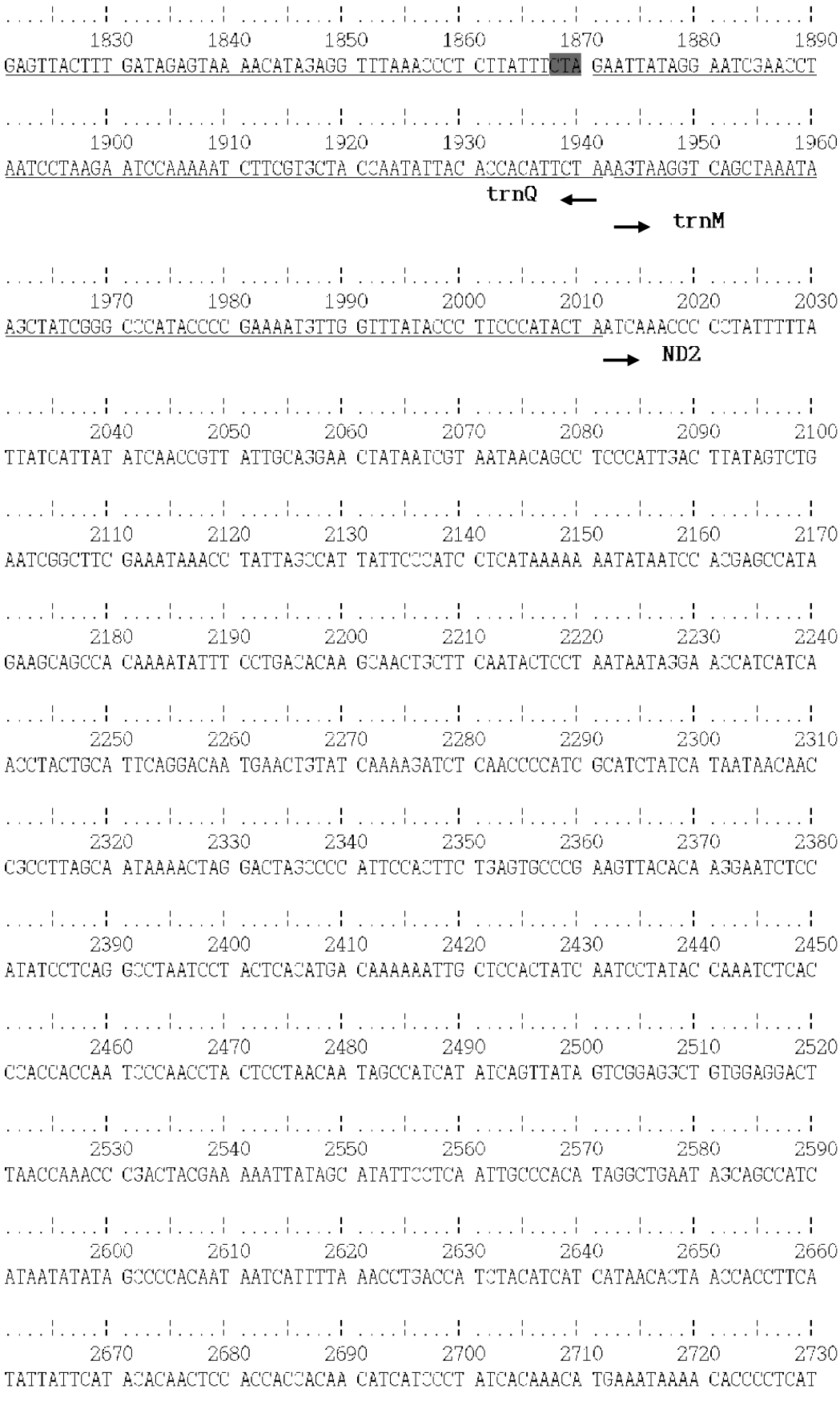
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        710        720        730        740        750        760        770
ACCAAATAGA TGATATAATC TCAATCTAGA CAGTTTACCT AAACACACCG CCCGAGAGCT CGGGTTTGTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        780        790        800        810        820        830        840
AGGGTGGCAG AGCCCGGTAA GTGCATAAAA CTTAAGCTTT TATTATCAGA GGTTCAACTC CTCTCCCTAA
→ trnL1
```

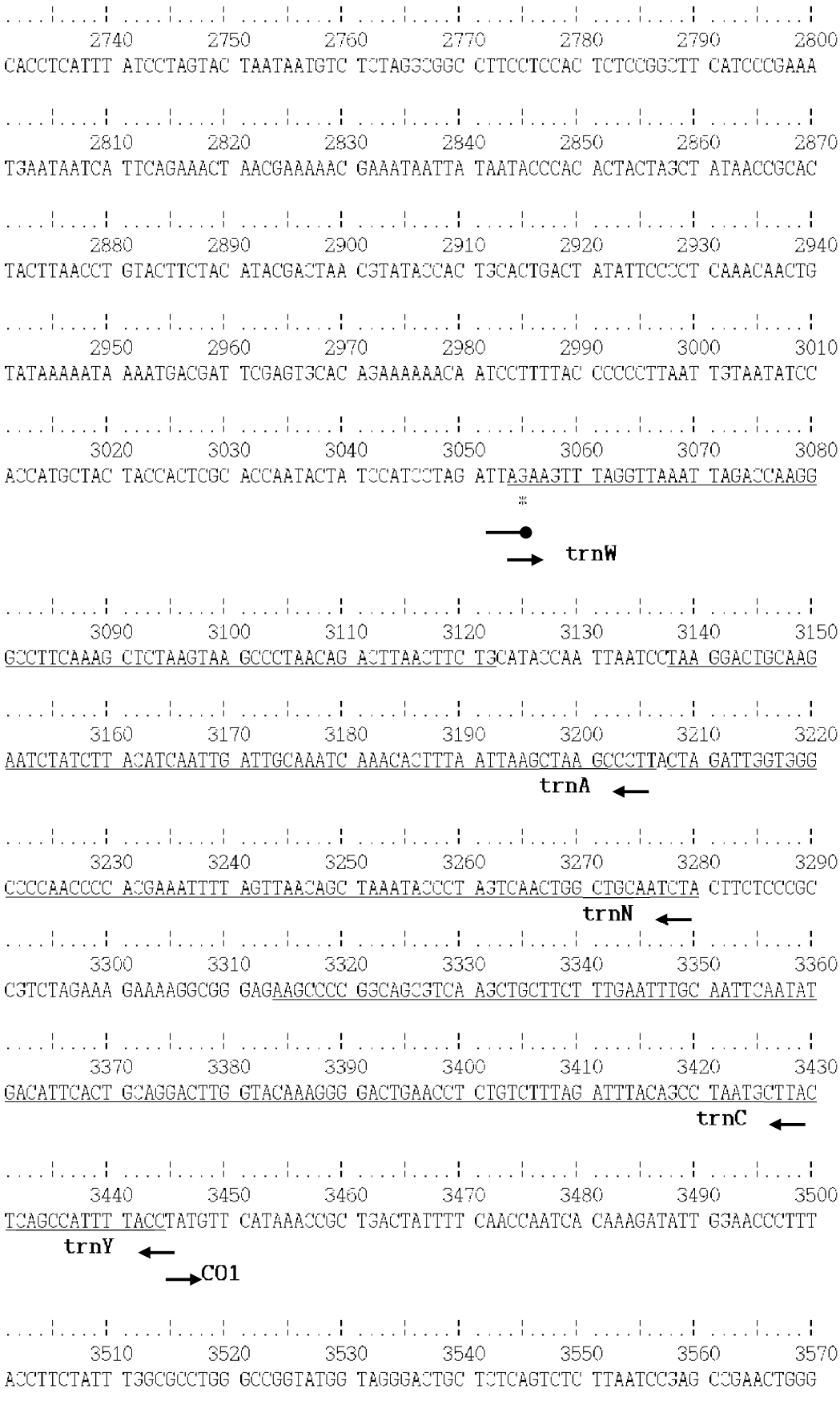
IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3580       3590       3600       3610       3620       3630       3640
TCAACCTGGC ACGCTACTAG GGGACGACCA AATTTATAAT GTAGTCGTCA CCGCCCATGC CTTTGTAATA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3650       3660       3670       3680       3690       3700       3710
ATCTTCTTTA TAGTAATGCC TATTATGATT GGAGGATTCG GAAACTGATT GGTTCCATTA ATAATTGGAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3720       3730       3740       3750       3760       3770       3780
CCCCCGATAT AGCATTCCCT CGAATGAATA ATATGAGCTT CTGACTCCTT CCCCCGTCTT TCCTACTTTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3790       3800       3810       3820       3830       3840       3850
GCTCGCATCA TCTATGGTAG AGGCTGGAGC AGGGACTGGA TGGACAGTAT ACCCACCTCT AGCCGGCAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3860       3870       3880       3890       3900       3910       3920
CTAGCTCATG CAGGAGCATC CGTAGATCTA ACTATTTTTT CACTACACCT AGCAGGTGTC TCCTCAATCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3930       3940       3950       3960       3970       3980       3990
TAGGTGCTAT TAATTTTATT ACTACTATTA TTAATATAAA ACCCCCTGCT ATATCCCAAT ATCAAACACC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4000       4010       4020       4030       4040       4050       4060
CCTATTTGTC TGATCGGTTT TAATCACTGC TGTATTGCTA CTTCTATCAC TACCAGTTTT AGCAGCAGGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4070       4080       4090       4100       4110       4120       4130
ATCACTATAC TACTGACAGA TCGAAAATCTG AACACCACAT TTTTTGACCC CCGCCGGAGG AGGGGATCCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|...
        4140       4150       4160       4170       4180       4190
ATCTTACTTA TATCAACACC TATTCTGATT TTTTGGTCAC CCTGAAGTta aATCgattcC CGCGGCCG
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.3. 수달 (*Lutra lutra*)



그림 V-21. 수달

- **계통 (Systematics)**
  Phylum Chordata 척삭동물 문
  Class Mammalia 포유류 강
  Order Carnivora 식육 목
  Family Mustelidae 족제비 과
- **기상 (Diagnosis)**
  몸길이 : 645-712㎜,
  꼬리길이 : 390-495㎜
- **서식처 (Habitat)**
  하천, 호수가, 물가에 있는 바위 구멍 또는 나무뿌리 밑 등

수달은 학자들간에 견해가 있지만 세계적으로 13~15종으로 분류되어지고 있다. 수달은 식육목 족제비과에 속하는 포유류로 수달이 수달아과를 이루고 있으며, 그 중에 한국에 서식하는 수달은 *Lutra lutra* 한 종만이 보고되고 있다. 수달은 수환경의 먹이사슬에서 최고 정점에 위치하며, 수환경의 조절자 역할을 수행하고 있다. IUCN의 보고서에 따르면 "수달은 해당 지역 수환경의 건강도를 판단할 수 있는 수환경의 지표종(Indicator)이다" 라고 보고하고 있으며 (IUCN/SSC, 1990), 수생생태계의 질서, 즉 먹이사슬을 균형있게 조절해주는 핵심종(keystone species)으로 그 역할이 중요시되고 있다 (그림 V-21).

3.3.1. Total genomic DNA 추출

수달 근육조직을 25mg 정도 떼어내어 DNeasy Tissue kit (Qiagen, CO.)의 DNA 추출 protocol과정을 통해 total genomic DNA를 추출하여 PCR을 위한 template로 사용하였다 (그림 V-22).

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

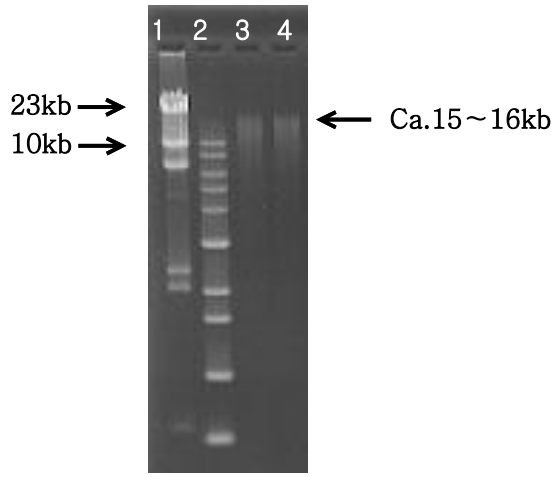


그림 V-22. Total genomic DNA
1. λ/HindⅢ marker : (위에서부터 23kb, 9.4kb, 6.5kb, 4.3kb, 2.3kb)
2. 1kb DNA ladder : (위에서부터 10kb, 8kb, 6kb, 5kb, 4kb, 3kb, 2kb, 16kb, 1kb, 500bp)
3. 수달 1차 DNA
4. 수달 2차 DNA

3.3.2. Primer 고안

미토콘드리아 유전체 중에서 비교적 보존적인 영역으로서 알려진 16S rRNA와 CO1 유전자 영역의 universal primer를 이용하여 PCR 중합반응을 우선적으로 수행하여 약 4.3kb PCR product를 얻었다. 얻어진 PCR product를 cloning하여 분석한 결과 염기서열이 정확하지 않아서 염기서열의 보정을 위해 척삭동물에서 사용되는 universal primer를 이용하여 16S rRNA와 CO1 유전자 영역을 포함하는 16S rRNA에서 tRNA-Leu 유전자(약 9kb)까지 다시 증폭하였다 (표 V-10).

표 V-10. 수달에서 사용된 primer 염기서열

Primer name	Primer Sequence	Gene region
16SA	5'- CGC CTG TTT AHC AAA AAC AT -3'	16S rRNA ~CO1
HCO2198	5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT GA-3'	
S-LA-16S-L	5'- GAT GTT GGA TCA GGA CAT CCC AAT GGT GCA-3'	16S rRNA ~tRNA-Leu
H-12321-Leu	5'- GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G -3'	

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.3.3. PCR 증폭

표 V-11. 16S rRNA와 CO1 사이(약 4.3kb)를 증폭하기 위한 Long PCR 조건

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1.5㎕
Reverse primer	1.5㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	16.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	19.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	10 cycles
47℃	30sec	
68℃	5min	
92℃	10sec	20 cycles
47℃	30sec	
68℃	5min +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

표 V-12. 16S rRNA와 tRNA-Leu 사이(약 9kb)를 증폭하기 위한 Long PCR 조건

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1.5㎕
Reverse primer	1.5㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	16.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	19.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	10 cycles
49℃	30sec	
68℃	5min	
92℃	10sec	20 cycles
49℃	30sec	
68℃	5min +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

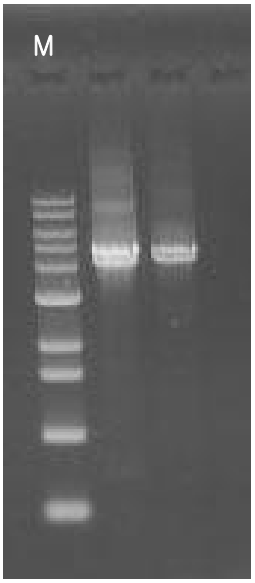


그림 V-23.약 4.3kb PCR prodcut M:1kbDNA ladder

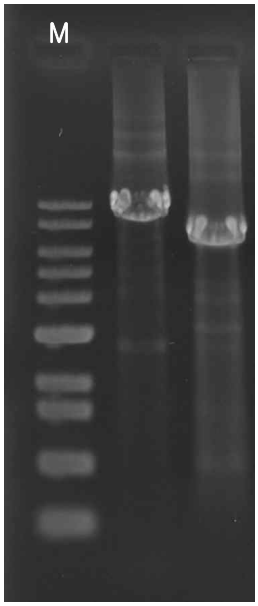


그림 V-24. 약 9kb PCR prodcut M:1kbDNA ladder

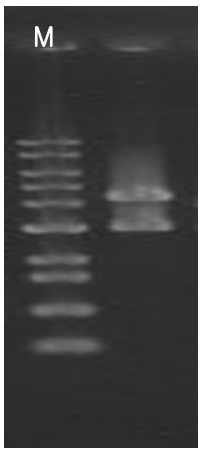


그림 V-25.제한효소(EcoR1)로 처리한 plasmid M : 1kb DNA ladder

3.3.4. 염기서열 결정

수달의 전체 미토콘드리아 유전체 중에서 16S rRNA~CO1 유전자 사이의 4.431bp를 결정하였고, ND4 유전자의 일부분인 1,474bp를 결정하였다. 16S rRNA~CO1 사이의 유전자 배열은 전형적인 척삭동물의 유전자 배열과 동일하였지만, 16S rRNA~CO1 유전자 사이에 존재하는 tRNA-Ile, tRNA-Met, tRNA-Ala, tRNA-Asn은 tRNA의 2차 구조를 도식화해주는 tRNAScan 프로그램으로 찾을 수 없어서 눈으로 보정하려 했지만 전형적인 구조에서 벗어나 있어서 찾을 수 없었다. tRNA-Ser(AGN)은 전형적으로 CO1과 tRNA-Asp 유전자 사이에 위치하고 있지만 수달에서는 tRNA-Trp와 tRNA-Cys 사이에 위치하고 있다. 6개의 tRNA(tRNA-Cys, tRNA-Tyr, tRNA-Gln, tRNA-Trp, tRNA-Ser, tRNA-Leu)는 전형적인 네

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

잎클로버 형태를 가지고 있었다 (그림 V-26, V-27).

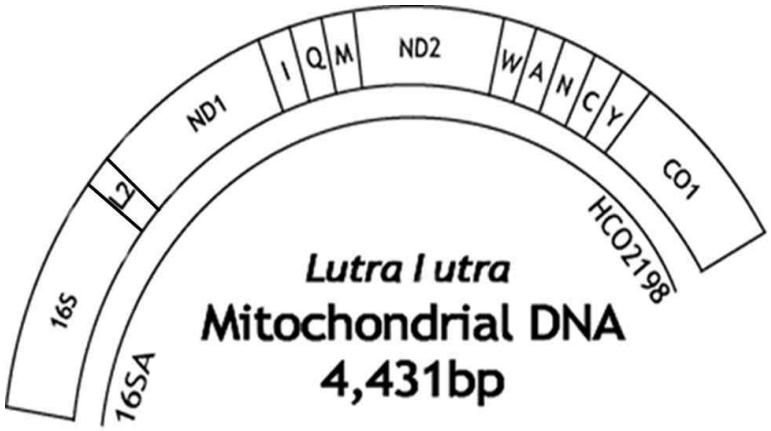


그림 V-26. 수달의 전체 미토콘드리아 유전체 중에서 16S rRNA와 CO1 유전자 사이의 유전자 배열

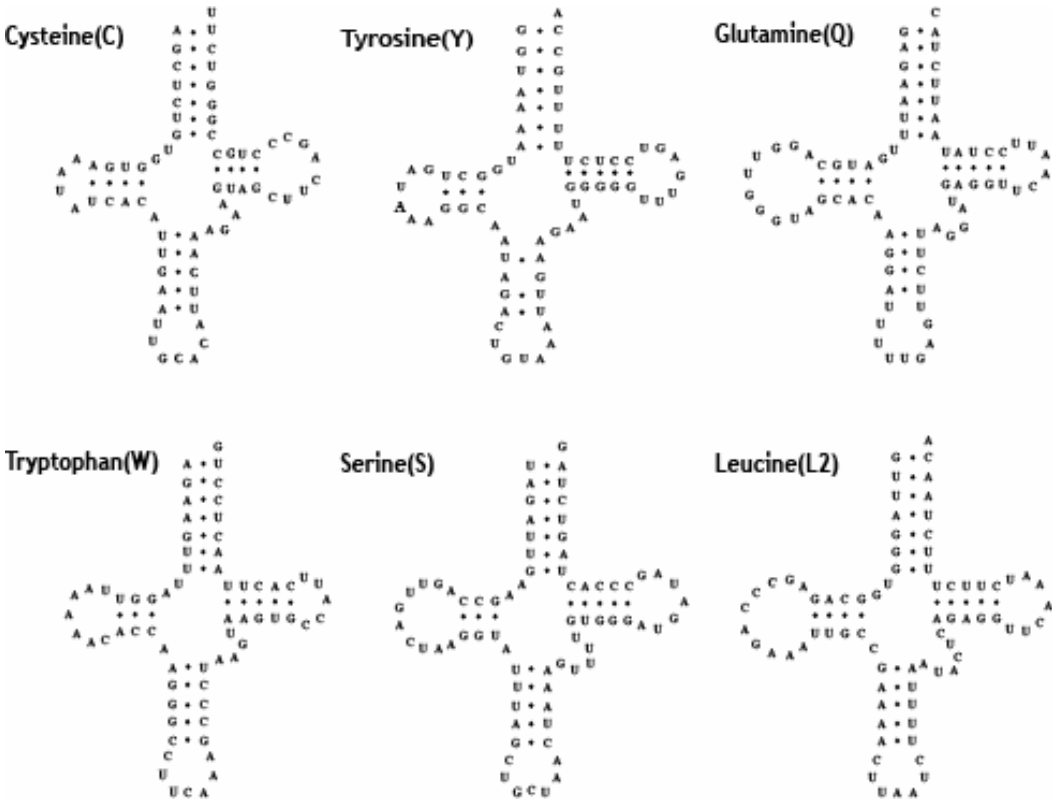


그림 V-27. 수달의 미토콘드리아 유전체 중에서
16S rRNA와 CO1 유전자 사이에 있는 tRNA의 2차 구조

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

▪ 수달의 염기서열 및 annotation(5,905bp)

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        10         20         30         40         50         60         70
CGCCTGCTTA CCAAAAACAT CACCTCCTGC CTGCCCAGTA GTGGAGGCAC TTCCTGCCCA GTGACACCAG
```

16s rRNA ⟶

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        80         90        100        110        120        130        140
TTAAACGGCC CCGGTATCCT GACCTTGCAA AGGTAGCATA ATCATTTGTT CTCTAAATAA GGACTTGTGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       150        160        170        180        190        200        210
GGATGGCCAC ACGAGGGTTT AATGTCTCTT ACTTCAAATC AGTGAAATTG ACCTTCCCGT GAAGAGGCAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       220        230        240        250        260        270        280
GAATACACTA ATAAGAGGAG AGGACCCTAT GGAGCTTCAA TTAACTAGTC CATAATAAGT CTATTTAAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       290        300        310        320        330        340        350
ATCAATTAGG CATAACACAA TCTTATTAAT GGATTAACAA CTTAGGTTGG GGGCGCCTGG GTGGCTCAGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       360        370        380        390        400        410        420
GGGTTAAAGC CTCTGCTTTC AGCTCGGGTC ATGATCCCAA GGTTCTGGGA TCAAGCCCCA CATCGGGCTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       430        440        450        460        470        480        490
CCTGCTCAGC AGGGAGTCTG CTTTCCTTCC TCTTTCTCAG CCTGCCTCTC TGCCTACTTG TGATCTGTCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       500        510        520        530        540        550        560
GTCGAATAAA TAAATAAAAT CTTAAAAAAA AACAATTTAG GTTGGGGTGA CCTCAGAGAA TAAAATACCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       570        580        590        600        610        620        630
CTGACTGATG CAAATACAGA TAAACCAGTT GAAGTATAGT ATCAGTTATT GATCCAAGAA ATTTGATCAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       640        650        660        670        680        690        700
TGGAACAAGT TACCATAGGG ATAACAGCAC AATCCTATTT GAGCGTCCAT ATCAACAATA GGGTTTACGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       710        720        730        740        750        760        770
CCTCGATGTT GGATCAGGAC ATCCCAATGG TGCAACAGCT ACTAAAGTTT CGTTTGTTCA ACTATTAAAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       780        790        800        810        820        830        840
TTCTATGTGT CTGAGTTCCG ACAGGAGCAA TCCAGATTGG TTTCTATATA TTACAACAAC TTCTTCCAGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       850        860        870        880        890        900        910
ATGAAAGGAC AAGAGAAGTA AGACCTATTA TATCGGAATG CCTTAGGACT AATAGAGGAT ATAATCTTAA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
        920        930        940        950        960        970        980
TCTTAATAGT CCACCTTCAT TTCATAGCCC TAGAGATAGG ACTTGTTAGG GTGGCAGAGC CCAGAAATTG

        990       1000       1010       1020       1030       1040       1050
CCGAAAACTT AATCTTTTAT ACTCAGAGGT TCAAATCTTC TTTCTAACAT TATGTTTACA ATGAATATCA
```

trnL2 ⟶ **ND1** ⟶

```
       1060       1070       1080       1090       1100       1110       1120
TTTCACTAAC TGTACCTATC CTACTTGCTG TAGCCTTTCT AACATTAGTG GAACAAAAAA ATCCTAGGGT

       1130       1140       1150       1160       1170       1180       1190
ATATTCAACT CCATAAAGGC CCAAACATCA TAGGACCCTT TGGTCTCTTG CAACCAATTA CAGATGCCAT

       1200       1210       1220       1230       1240       1250       1260
AAAACTATTC ACTAAAGAAC CTTTATGACC CTTAACCTCA CCTATCACTA TATTTGTAAT AGCCCCAATC

       1270       1280       1290       1300       1310       1320       1330
CTAGCCCTAA CACTAGCCTT AACCATATGA ATCCCATTAC CAATATCTTA CCCTCTCATC AATATAAACC

       1340       1350       1360       1370       1380       1390       1400
TAGGAATCCT ATTCATACTA GCAATATCAA GCCTAGCTGT TTACTCTATT TTATGGTCCA GATGAGCCTT

       1410       1420       1430       1440       1450       1460       1470
AAACTCAAAA TATGCCCTAA TTGGGGCCCT TCCAGCTGTA GCCCAAACAA TTTCCTACGA AGTCACACTA

       1480       1490       1500       1510       1520       1530       1540
GCCATTATCC TCCTATCAGT ACTATTAATA AATGGCTCTT TTATCCTATC CACACTTATT ACTACACAAG

       1550       1560       1570       1580       1590       1600       1610
AACACCTATG TCTAATCCTC CCCATGTGAC CCCTAGCTAT AATATGATTT ATCTCAACCC TAGCAGAAAC

       1620       1630       1640       1650       1660       1670       1680
CAACCACGCC CCATTTGACT TAATAGAAGG AGAATCAGAA TTAGTTTCCA GATTCAACGT CAAATAGGCA

       1690       1700       1710       1720       1730       1740       1750
GCCGGACCAT TTTTCCTATT TATTCCATCC TATTATTTCC ACCCTATTTT TGCTAGCTGA ATATGCCACA

       1760       1770       1780       1790       1800       1810       1820
ATTATTATAA TAAATATCTT TACAACTATC CTGTTTTTTG GTGCATTCCA CACCCCATAC TTACCAGAAC
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1830       1840       1850       1860       1870       1880       1890
TATTCTTCAT CAAATTTACC ATAAAAACAC TTCTAATAAC AACTTCCTTC TTATGAATTA GAGCATCCTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1900       1910       1920       1930       1940       1950       1960
TTCATGATTC CGTTATTATC AACTCATACA TTTATTGTGA AAAACCTTTC TCCCCCTGAC ACTAGCCCTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1970       1980       1990       2000       2010       2020       2030
TGCATATGAC ATGTAGCCTT ACCCATTATA AGAGCAAGTT ATTCCTCCCC AAACATAAGA AATATATCTG
         *
```



```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       2040       2050       2060       2070       2080       2090       2100
ATAAAAGAGT TACTTTGATT ATAGAGGTTC GAGCCCTCTT ATTTGTAGAA TTATAGGAAT TGAACCTCAT
```

trnQ ←

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       2110       2120       2130       2140       2150       2160       2170
CCTAAGAACT CAAAAATCCT TGTGCTACCC AACCTGCATC AAATTCTACA GTAAGGTCAG CTAAATAAGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       2180       2190       2200       2210       2220       2230       2240
TGTCGGGCCC ATATTCCAAA AATGTTGGTT TATCCCCTTC CCATACTAAT TAAACCCCCC ATCCTTATAT
```

ND2 →

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       2250       2260       2270       2280       2290       2300       2310
TATGATATCA ACTGTCATTT CAGGAAACGT TAAAGTACTT ATAAGCTCTC ACTGACTGAC GATCTGAATA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       2320       2330       2340       2350       2360       2370       2380
GGATTTGAAA TAAATATACT AGCTATTATC CCTATTTTAA TAAAAAAAAA AACTCAATAC ATGAGCCACA

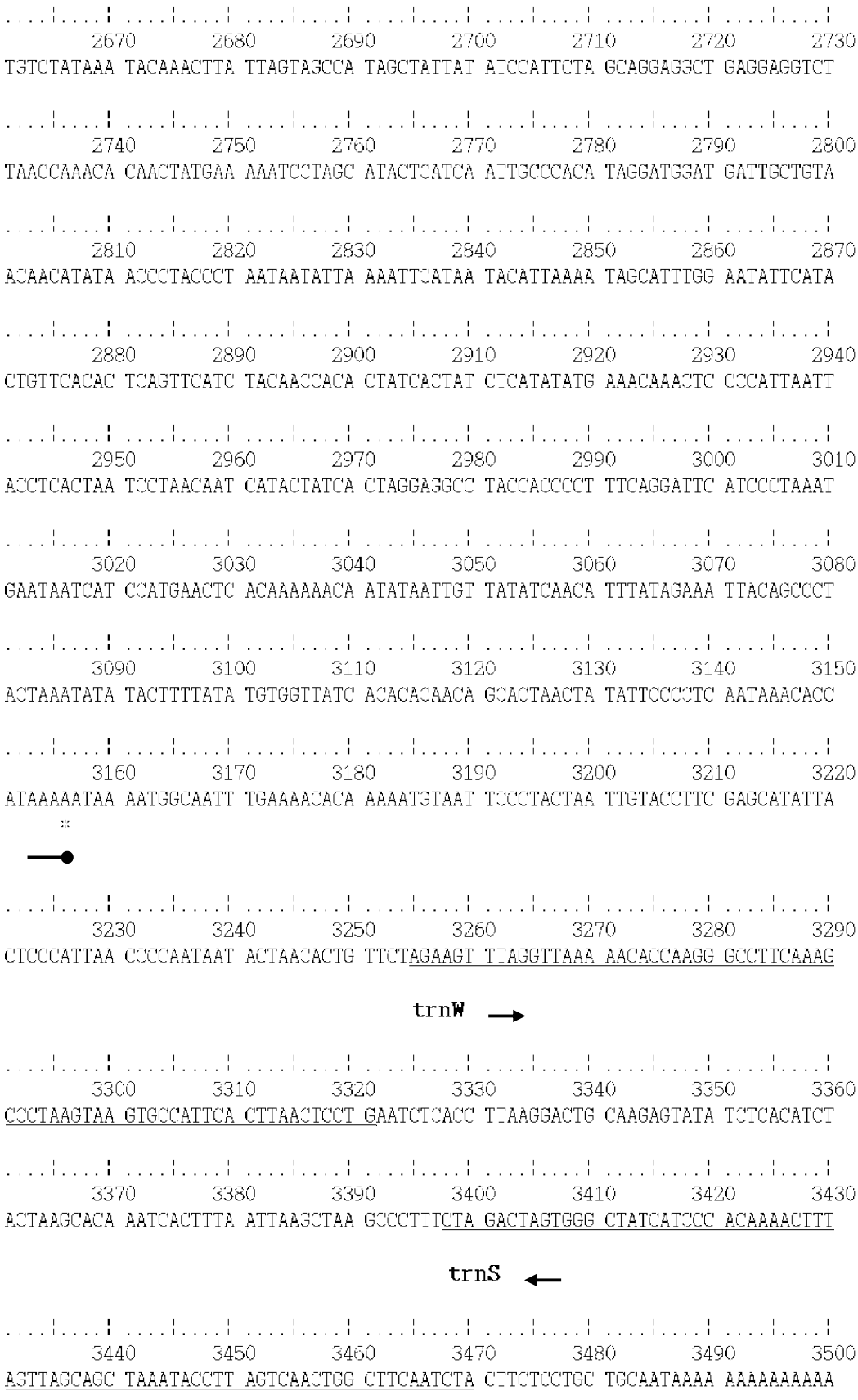
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       2390       2400       2410       2420       2430       2440       2450
GAAGCATCAA TAAAATATTT TCTTACCTAA GCCACTGCAT CTATACTCTT AATATTAGGA ATTATTATTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       2460       2470       2480       2490       2500       2510       2520
GCCTACTATT GACAGGACAA TGAACAATAC CAAATACCCC TAACCCAATT GCATCAAACA TAATAACAGT

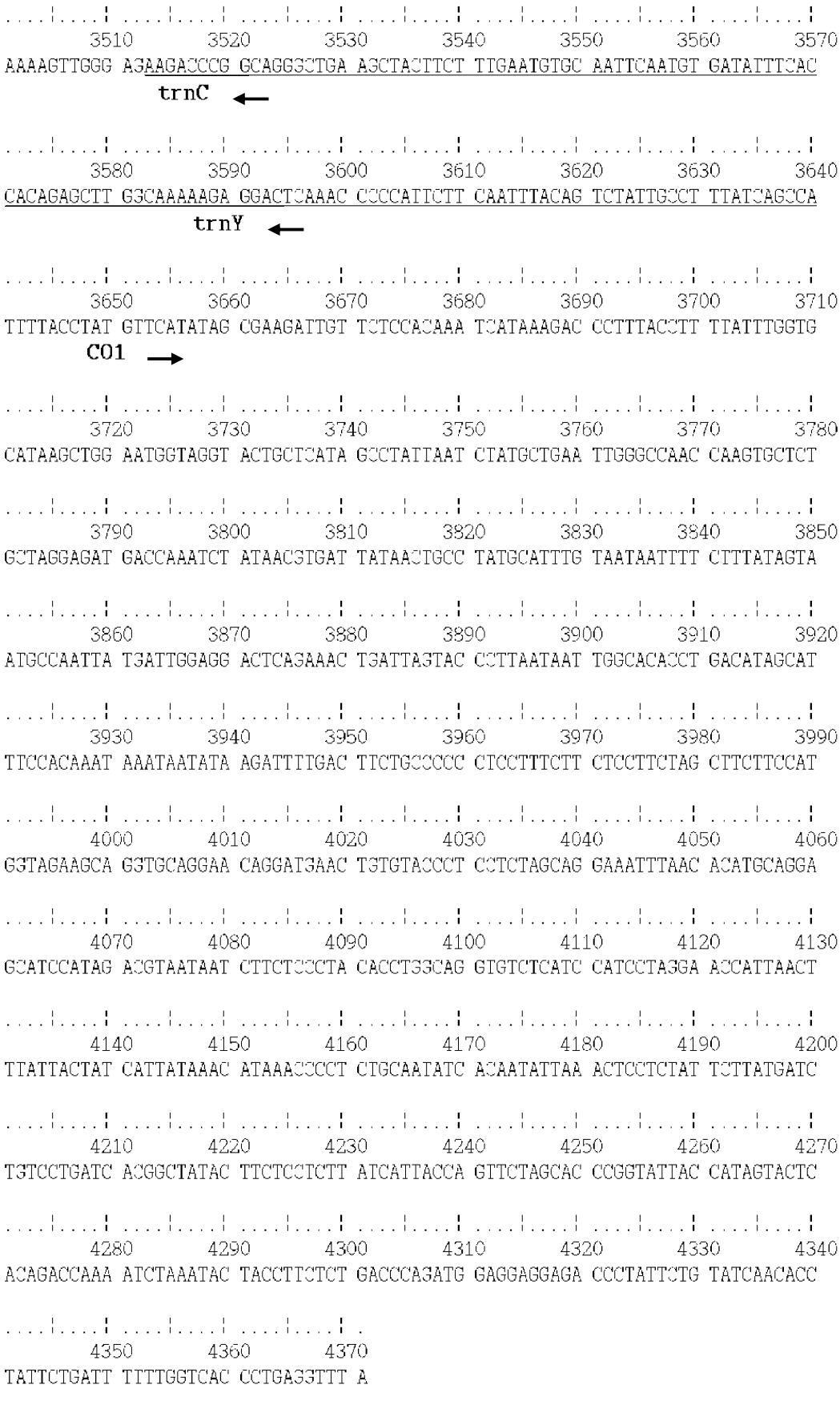
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       2530       2540       2550       2560       2570       2580       2590
AGCTCTGGCA ATAAAATTAG GACTATCACC TTTCCACTTC TGAGTACCTG AAGTAACCCA AGGAATCCCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       2600       2610       2620       2630       2640       2650       2660
CTATCATCAG AAATAATTCT ACTAACCTGA CAAAAAATCG CCCCCTTATC TGTTCTATAC CAAATCTCTG
```

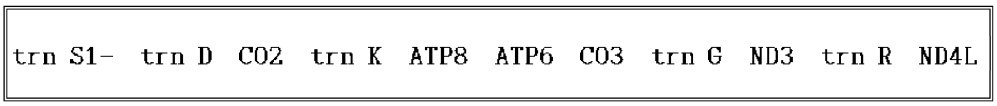
IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38




```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        10        20        30        40        50        60        70
TTGCACCAAG AGTTTTTGGT CCCTTGACCA ATGGATAACT ACTATCCTTT AAAAGTTGAA AACGCCATGT

ND4 →

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        80        90       100       110       120       130       140
TTTTATACAT GGGAGCACGA GTTAGCAGTT CTTGCATAAT GCTTTTTCGG TAAATAAAAA GGTTTGAGCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       150       160       170       180       190       200       210
TTTACTGTTA GATTCACAAT CTAATGTTTT TGTTAAACTA TATTTACAGT AGATAGGGCC TAGGATGATT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       220       230       240       250       260       270       280
TTGGGGTTAA GTGAGAGGAG TAGGAGGGGT AGCAAGTGGA GAACTATTAG GGAGTTTTCT CGCGTGAACG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       290       300       310       320       330       340       350
ATGGTTTAAT ATTTTTGATG TGATGTGTAA GTTTTCCACG TTGTGTGGTA ATTAGTATAT ATAGGGAGTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       360       370       380       390       400       410       420
TAGGGCTGTG ATAGTGATGT TGACTCCTAT TAAGATAATG GTGATATTGG ATCATGAAAA TGAGGATATT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       430       440       450       460       470       480       490
ACCACGAATA GTTCCCCTAC TAAGTTGATT GTAGGGGGTA GGGCTAGGTT AGTTAGGCTG GCGAGTAATC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       500       510       520       530       540       550       560
ATCATGTGGC TATTAGCGGT AGGAGTATTT GTAGGCCTCG TGCGAGGATT ATGGTGCGAC TGTGAATGCG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       570       580       590       600       610       620       630
TTCGTAGTTG GAGTTAGCTA AGCAGAATAA TAGGGATGAT GTTAGGCCGT GGGCGACTAT TAGGGCTGTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       640       650       660       670       680       690       700
GCTCCAGCAT AACTTCATGG TGATTGGATG AGCACTGCTA TGATTACTAA GGCCATGTGG CTGACGGAAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       710       720       730       740       750       760       770
AGTAGGCAAT CAGGGATTTT AGGTCCGTTT GGCGTAGGCA GATGGAGCTT GTCATGATTA TTCCCCATAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       780       790       800       810       820       830       840
GGACAGTATT ATAAATGGGT AGGCCATGTG GTTTGTTAGT GGATTTAGTA GTACGGTGAT TCGCATTATT
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        850        860        870        880        890        900        910
CCGTATCCGC CTAGCTTAAG GAGTACAGCA GCAAGTACCA TGGATCCAGC AATGGGGGCT TCTACATGAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        920        930        940        950        960        970        980
CTTTTGGGAG TCACAGGTGA AGACCGTATA GTGGCATTTT TACTATGAAT GCCATTATAC ATGCTAGCCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        990       1000       1010       1020       1030       1040       1050
TAGTACCATG TTAAATCATG AGTTTGGCAG GGGTTGTGCT CAGTATTGGA TTACTAACAG GTTTAGGGTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1060       1070       1080       1090       1100       1110       1120
CCTAGGTTGT TTTGGAGTCA CAGTAGGGCA ATCATAAGAG GTAGGGAGCC CACTAGAGTG TAAAATAGGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1130       1140       1150       1160       1170       1180       1190
AGTATAGGCC AGCATTTAGG CGCTCCGTTT GGTTACCCCT TCGGGTAATG ATAATTAGTG TTGGCATGAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1200       1210       1220       1230       1240       1250       1260
TGTGGCTTCA AATACAATAT AAAATATGAT TAGTTCTGTA GCGGTTAAAT GTTATGATTA GGAGTAGCTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1270       1280       1290       1300       1310       1320       1330
TAGTGTTCCT AGTATTGTAA TATATAGCTT TTTTCGGGAG AGGGTTCTCT TTCCATAGGT GATGTTGGCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1340       1350       1360       1370       1380       1390       1400
TGCTATGAGT ATTAAAGGGA GAAGTCATGT TGTGAGTATT AATAGGGTAG TTGATTAGGG AATCCTCAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....
       1410       1420       1430       1440       1450       1460       1470
ATATAGTGTT GAGAGATTCT GGGTGTTGTC CGGAATTTGG TTGAGGTTTA TTTGGATTGA TTAGGCTGAT TATC
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.4. 산양 (*Nemorhaedus goral raddeanus*)



- 계통 (Systematics)
  Phylum Chordata 척삭동물 문
  Class Mammalia 포유류 강
  Order Carnivora 식육 목
  Family Bovidae 소 과
- 기상 (Diagnosis)
  몸길이 : 129cm
  뿔길이 : 13cm
- 서식처 (Habitat)
  경사진 바위틈에서 살며 사람이나 다른 동물들이 드나들 수 없는 바위구멍

그림 V-28. 산양

산양은 세계적으로 국한된 지역에 5종이 기록되었다. 우리나라에 분포된 본 아종은 티베트 포메 고원, 네팔, 중국의 하북성(河北省), 사천성, 운남성과 시베리아 동·남부 등지에 분포한다. 현재 산양은 멸종위기종으로 전남 목포에서 백두산에 이르기까지 전역에서 분산적으로 소수가 밀렵되어 왔으나 점차 감소되어 최근에는 멸종의 위기에 처해 있다 (그림 V-28).

3.4.1. Total genomic DNA 추출

산양의 근육조직을 25mg 정도 떼어내어 DNeasy Tissue kit (Qiagen, CO.)의 DNA 추출 protocol과정을 통해 total genomic DNA를 추출하여 PCR을 위한 template로 사용하였다 (그림 V-29).

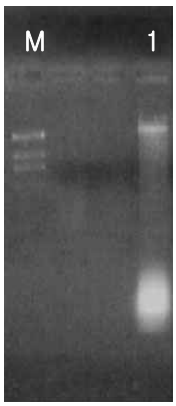


그림 V-29. Total genomic DNA
M : 1kb DNA ladder (위에서부터 10kb, 8kb, 6kb, 5kb, 4kb, 3kb, 2kb, 16kb, 1kb, 500bp)
1. 산양 DNA

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.4.2. Primer 고안

척추동물에서 universal하게 사용되는 primer를 이용하여 16S rRNA에서 tRNA-Leu까지(약 6.8kb)를 PCR 중합반응을 수행하였다. 나머지 약 9kb에 해당하는 미토콘드리아 유전체를 5조각(16S rRNA~ND2; 약 2.5kb, ND2~CO1; 약 2.5kb, CO1~CO3; 약 2kb, CO3~ND4; 약 2.5kb, ND4~tRNA-Leu; 약 900bp)으로 나누어 PCR 중합반응을 하였다 (표 V-13).

표 V-13. 산양에서 사용된 primer 염기서열

Primer name	Primer Sequence	Gene region
S-LA-16S-H	5'- TGC ACC ATT AGG ATG TCC TGA TCC AAC ATC -3'	16S rRNA ~ tRNA-Leu
L-12321-Leu	5'-GGT CTT AGG AAC CAA AAA CTC TTG GTG CAA-3'	
16SA	5'- CGC CTG TTT AHC AAA AAC AT -3'	16S rRNA ~ ND2
rND2-2H	5'- TCA AAT GGK GCT CGR TTD GTT TC -3'	
rND2-5L	5'- TTA CCC WCG AGC AAC WGA AGC-3'	ND2 ~ CO1
rCO1-1H	5'- TAG TGG AAR TGK GCT ACT AC-3'	
rCO1-4L	5'-TAC TCA GAC TAC CCA GAY GC-3'	CO1 ~ CO3
uCO3-1L	5'-ATA GTW GAC CCM AGC CCA TGA CC-3'	
uCO3-1H	5'-AAY GTC TCG TCA TCA TTG-3'	CO3 ~ ND4
rND4-3L	5'-CCA AAA GCC CAY GTA GAR GC-3'	
rND4-2H	5'-GAT GTT AAK CCG TGG GCR ATT AT-3'	ND4 ~ tRNA-Leu
H-12321-Leu	5'- GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G -3'	

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.4.3. PCR 증폭

표 V-14. 16S rRNA와 tRNA-Leu 사이(약 6.8kb)를 증폭하기 위한 Long PCR 조건

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1.5㎕
Reverse primer	1.5㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	16.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	19.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	10 cycles
47℃	30sec	
68℃	5min	
92℃	10sec	20 cycles
47℃	30sec	
68℃	5min +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

표 V-15. 16S rRNA~ND2(약 2.5kb), ND2~CO1(약 2.5kb), CO1~CO3(약 2kb) CO3~ND4(약 2.5kb), ND4~tRNA-Leu(약 900bp)를 증폭하기 위한 Long PCR 조건

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1.5㎕
Reverse primer	1.5㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	16.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	19.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	10 cycles
47℃	30sec	
68℃	2min 15sec	
92℃	10sec	20 cycles
47℃	30sec	
68℃	2min 15sec +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

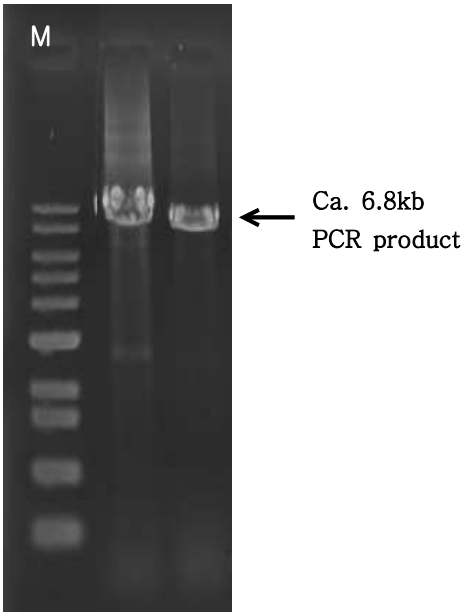


그림 V-30.약 6.8kb PCR prodcut
M : 1kb DNA ladder

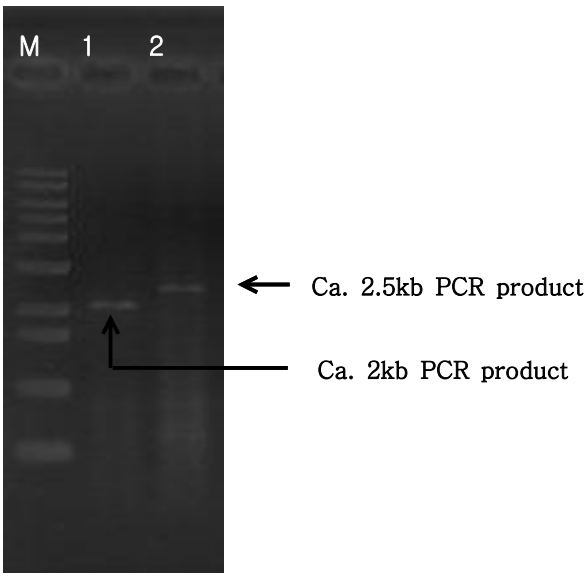


그림 V-31. PCR prodcut
M : 1kb DNA ladder
1. CO1~CO3 PCR prodcut(약 2kb)
2. CO3~ND4 PCR prodcut(약 2.5kb)

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

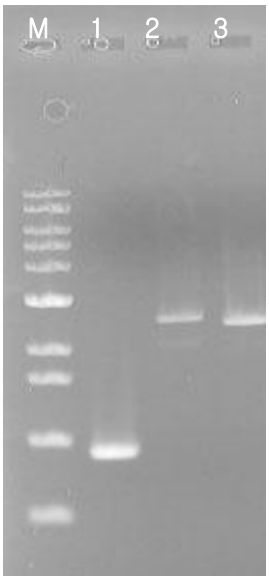


그림 V-32. PCR prodcut
M : 1kb DNA ladder
1. ND4~tRNA-Leu PCR prodcut(약 900bp)
2. 16S rRNA~ND2 PCR prodcut(약 2.5kb)
3. ND2~CO1 PCR prodcut(약 2.5kb)

3.4.4. 염기서열 결정

산양의 전체 미토콘드리아 유전체 염기서열주에서 tRNA-Leu에서 ND5까지 780bp를 결정하였고, 12S rRNA에서 16S rRNA 유전자까지 1,936bp를 결정하였다. 12S rRNA와 16S rRNA 유전자 사이에 위치하는 tRNA-Val은 전형적인 네잎클로버 구조를 가지고 있다 (그림 V-33).

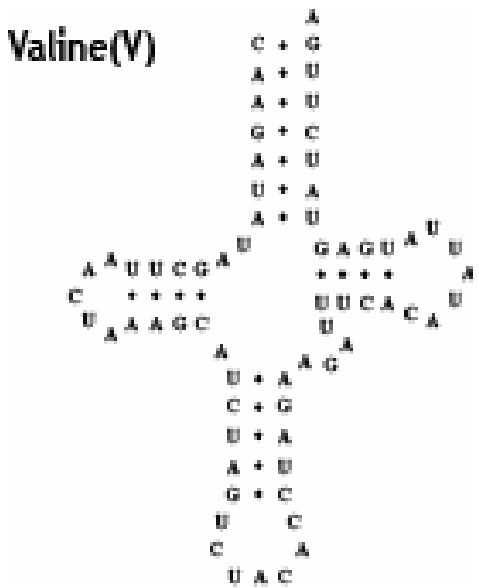


그림 V-33. 산양의 tRNA-Leu의 2차 구조

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

▪ 산양의 염기서열 및 annotaion(2,716bp)

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         10         20         30         40         50         60         70
GGTCTTAGGA ACCAAAAACT CTTGGTGCAA CTCCAAATAA AAGTAATTAA CCTATTTTCT TCCTTCACAT

trnL1 ⟶  ND5 ⟶

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         80         90        100        110        120        130        140
TAACAACCCT AATCCTACTA ACCGCACCTA TTATAGCAAC TAACCTCAAC ACCTATAAAT CCTCCAATTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        150        160        170        180        190        200        210
CCCCTTATAC GTAAAAACAA CTATCTCATA TGCCTTCATC ACCAGCATAA TTCCCACAAT AATATTTATT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        220        230        240        250        260        270        280
CACACAGGAC AAGAAACAAT CATTTCAAAC TGACACTGAC TAACTATTCA AACCCTTAAA CTATCTCTCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        290        300        310        320        330        340        350
GCTTCAAAAT AGACTACTTC TCAATAATGT TTATCCCAGT AGCACTATTC GTTACGTGAT CCATCATAGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        360        370        380        390        400        410        420
GTTCTCAATA TGATATATAC ACTCAGACCC CAACATTAAC CAATTTTTCA AATATCTACT CCTATTTCTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        430        440        450        460        470        480        490
ATCACAATAC TTATTCTCGT CACCGCAAAC AACCTCTTCC AACTATTTAT CGGCTGAGAG GGAGTAGGAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        500        510        520        530        540        550        560
TTATATCATT CTTACTAATC GGGTGATGAT ATGGACGAAC AGACGCAAAC ACAGCAGCCC TACAAGCAAT

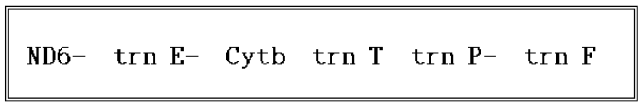
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        570        580        590        600        610        620        630
TCTATATAAC CGCATTGGCG ACATCGGATT TATCCTAGCA ATAGCATGAT TCCTAGCTAA TCTTAATACC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        640        650        660        670        680        690        700
TGAGATCTTC AACAGATCTT TATACTAAAA CCAGACAACT CAAATTTACC CCTAATAGGC CTTACACTAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        710        720        730        740        750        760        770
CTGCAACCGG AAAATCCGCA CAATTTGGCC TACACCCATG ACTACCCTCC GCAATAGAAG GCCCAACTCC

....|....|
        780
CGTCTCAGCA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38




```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        10        20        30        40        50        60        70
ACTATGCTTA GCCCTAAACA TAAATAATTA TAAAAACAAA ATTATTCGCC AGAGTACTAC CGGCAACAGC
```

12S rRNA →

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        80        90       100       110       120       130       140
CTAAAACTCA AAGGACTTGG CGGTGCTTTA TACCCACCTA GAGGAGCCTG TTCTGTAATC GATAAACCCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       150       160       170       180       190       200       210
GATAAACCTC ACCAATCCTT GCTAATTCAG TCTATATACC GCCATCTCCA GCAAGCCCTA AAAAGGAACA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       220       230       240       250       260       270       280
AAAGCAAGCT CAATCATATT ACATAAAGAC GTTAGGTCAA GGTGTAACCA ATGGAATGGG AAGAAATGGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       290       300       310       320       330       340       350
CTACATTTTC TATCTCTAGA AAATTTATAT ACGAAAGCCA CTATGAAACT AATGGCTAAA GGAGGATTTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       360       370       380       390       400       410       420
GCAGTAAACT AAGAATAGAG TGCTTAGTTG AAATAGGCCA TGAAGCACGC ACACACCGCC CGTCACCCTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       430       440       450       460       470       480       490
CTCAAGTAAA CACGATGTAC TTAAATCTAA CCACCATACA TCAACCCTAT GAGAGGAGAC AAGTCGTAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       500       510       520       530       540       550       560
AAGGTAAGCA TACTGGAAAG TGTGCTTGGA TAAACCAAGA TATAGCTTAA CTAAAGCATC TAGTCTACAC
```

trnV →

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       570       580       590       600       610       620       630
CTAGAAGATT TCACATATTA TGAGTATCTT GAACTATATC TAGCCCAACC TTCCCCCCAT ACCAAAACAA
```

16S rRNA →

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       640       650       660       670       680       690       700
ACTAAAACAA AACATTTACC CTGGCTAAAA GTATAGGAGA TAGAAATTTT AACACGGCGC TATAGAGAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       710       720       730       740       750       760       770
GTACCGTAAG GGAACGATGA AAGAAAAAAT CAAAGTACAA AAAAGCAAAG ATTAACCCTT GTACCTTTTG
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        780        790        800        810        820        830        840
CATAATGAGT TAACGAGCAA AAACTTAACG AAACGAATTT CAGCTAAGTA CCCCGAAACC AGACGAGCTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        850        860        870        880        890        900        910
CTCATGAACA GTTTATTAGA ACCAACTCAT CTATGTGGCA AAATAGTGAG AAGATTTATG AGTAGAGGTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        920        930        940        950        960        970        980
ACACGCCTAA CGAGCCTGGT GATAGCTGGT TGTCCAGAAA ATGAATCTTA GTTCAGCCTT AAAGATACCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        990       1000       1010       1020       1030       1040       1050
AAAATATAAA CAAATTTACT GTATCTTTAA AAGTTAGTCT AAAAAGGTAC AGCCTTTTAG AAACGGATAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1060       1070       1080       1090       1100       1110       1120
AACCTTAACT AGAGAGTAAG ATATAACAAG ACCATAGTAG GCCTAAAAGC AGCCACCAAT TAAGAAAGCG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1130       1140       1150       1160       1170       1180       1190
TTAAAGCTCA ACAATAAAGA CAATATTAAT TCCAAAAATA GACAACTAGC TCCTAGCCCA ATACTGGACC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1200       1210       1220       1230       1240       1250       1260
ATTCTATTAT CAAATAGAAG TAATAATGTT AACATGAGTA ACAAGAAATA TTTTCTCCTC GCACAAGTTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1270       1280       1290       1300       1310       1320       1330
AAGTCAGTAC CTGATAATAC CCTGACTGTT AACAGTAAAT AAAAATAATC CAACAATAAA TAATTTATTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1340       1350       1360       1370       1380       1390       1400
ATTGTACTGT TAACCCAACA CAGGAGTGCG TCCAGGAAAG ATTAAAAGAA GTAAAAGGAA CTCGGCAAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1410       1420       1430       1440       1450       1460       1470
ACAAACTCCG CCTGTTTACC AAAAACATCA CCTCTAGCAT CTCCAGTATT AGAGGCACTG CCTGCCCAGT

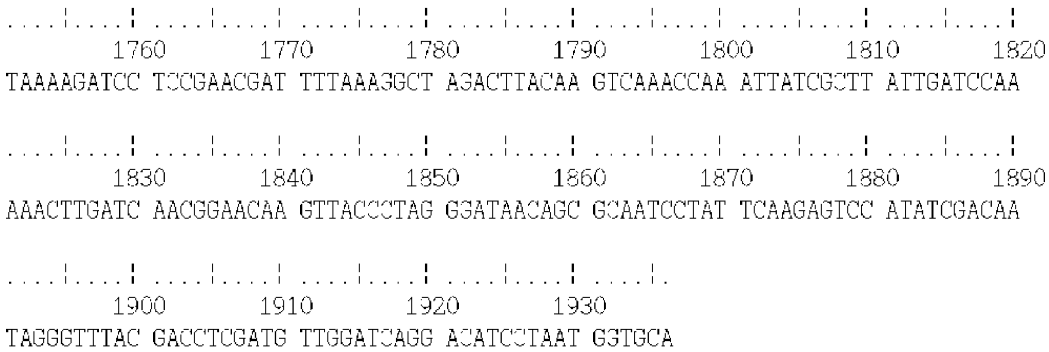
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1480       1490       1500       1510       1520       1530       1540
GACTAGACGT TAAACGGCCG CGGTATCCTG ACCGTGCAAA GGTAGCATAA TCATTTGTTC TCTAAATAAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1550       1560       1570       1580       1590       1600       1610
GACTTGTATG AATGGCAACA CGAGAGTTTT ACTGTCTCTT ACTTCCAATC AGTGAAATTG ACCTCCCCGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1620       1630       1640       1650       1660       1670       1680
GAAGAGGCGG GGATAAGCTA ACAAGACGAG AAGACCGTAT GGAGCTTTAA CTAACTAACC CATAGAAAAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1690       1700       1710       1720       1730       1740       1750
ACAATTAACC ACCAAGGGAT AACAACATTC TTTATGGGCT AGCAGTTTTG GTTGGGGCGA CCTCGGAGAA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.5. 사향노루 (*Moschus moschiferus parvipes*)



- 계통 (Systematics)
  Phylum Chordata 척삭동물 문
  Class Mammalia 포유류 강
  Order Carnivora 식육 목
  Family Moschidae 사향노루 과
- 기상 (Diagnosis)
  몸길이 : 65~87㎝
  키 75~105㎝
- 서식처 (Habitat)
  바위가 많은 해발 1,000m 이상의 높은 산에서 서식

그림 V-34. 사향노루

사향노루는 사슴과 중에서도 가장 원시적인 동물로 한국, 중국, 중앙아시아, 사할린, 시베리아, 몽고 등지에 분포한다. 배쪽에 사향주머니가 있는 수컷은, 교미시기에 암컷을 유인하기 위해 이곳에서 냄새를 풍긴다. 사향은 동물성 향료 및 약재로 가장 비싸게 쓰이기 때문에 마구잡아 들여서 현재는 그 수가 급격히 감소하였다.
사향노루는 계속되는 사냥과 생태계 파괴로 인해 멸종위기에 있는 동물이므로 멸종위기종으로 지정하여 보호하고 있다 (그림 V-34).

3.5.1. Total genomic DNA 추출

사향노루의 근육조직을 25mg 정도 떼어내어 DNeasy Tissue kit (Qiagen, CO.)의 DNA 추출 protocol과정을 통해 total genomic DNA를 추출하여 PCR을 위한 template로 사용하였다 (그림 V-35).

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

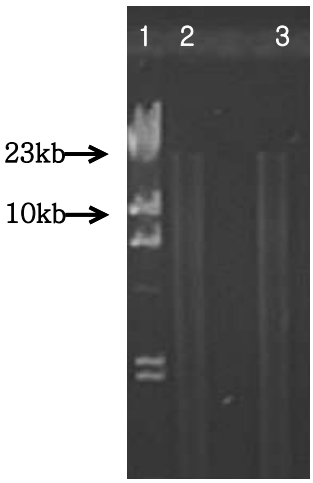


그림 V-35. Total genomic DNA
1. λ/HindⅢ marker : (위에서부터 23kb, 9.4kb, 6.5kb, 4.3kb, 2.3kb)
2. 사향노루 1차 DNA
3. 사향노루 2차 DNA

3.5.2. Primer 고안

척삭동물에서 universal하게 사용되는 primer를 이용하여 16S rRNA에서 tRNA-Leu까지(약 6.8kb)를 PCR 중합반응을 우선적으로 수행하였고, 나머지 미토콘드리아 유전체를 PCR하여 약 9kb PCR product를 얻었다 (표 V-16, V-17, 그림 V-36).

표 V-16. 사향노루에서 사용된 primer 염기서열

Primer name	Primer Sequence	Gene region
S-LA-16S-H	5'- TGC ACC ATT AGG ATG TCC TGA TCC AAC ATC -3'	16S rRNA ~ tRNA-Leu (약 6.8kb)
L-12321-Leu	5'-GGT CTT AGG AAC CAA AAA CTC TTG GTG CAA-3'	
S-LA-16S-L	5'-GAT GTT GGA TCA GGA CAT CCC AAT GGT GCA-3'	16S rRNA ~ tRNA-Leu (약 9kb)
H-12321-Leu	5'- GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G -3'	

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

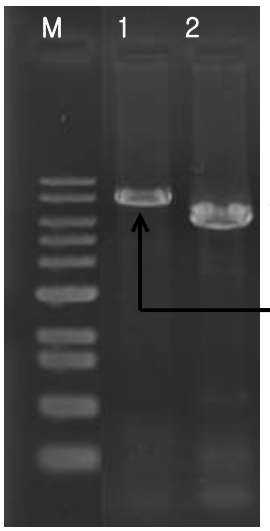
3.5.3. PCR 증폭

표 V-17. 16S rRNA와 tRNA-Leu 사이(약 6.8kb와 약 9kb)를 증폭하기 위한 Long PCR 조건

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1.5㎕
Reverse primer	1.5㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	16.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	19.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	10 cycles
47℃	30sec	
68℃	5min	
92℃	10sec	20 cycles
47℃	30sec	
68℃	5min +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	



Ca. 6.8kb PCR product

Ca. 9kb PCR product

그림 V-36.사향노루의 PCR prodcut
M : 1kb DNA ladder
1. 약 6.8kb PCR product
2. 약 9kb PCR product

3.5.4. 염기서열 결정

사향노루의 전체 미토콘드리아 유전체 중에서 ND5에서 16S rRNA 유전자까지 7,092bp의 염기서열을 결정하였다. ND5~16S rRNA의 유전자 배열은 전형적인 배열은 보여주었고, tRNA의 2차 구조도 전형적인 네잎클로버 형태를 갖고 있었다 (그림 V-37).

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

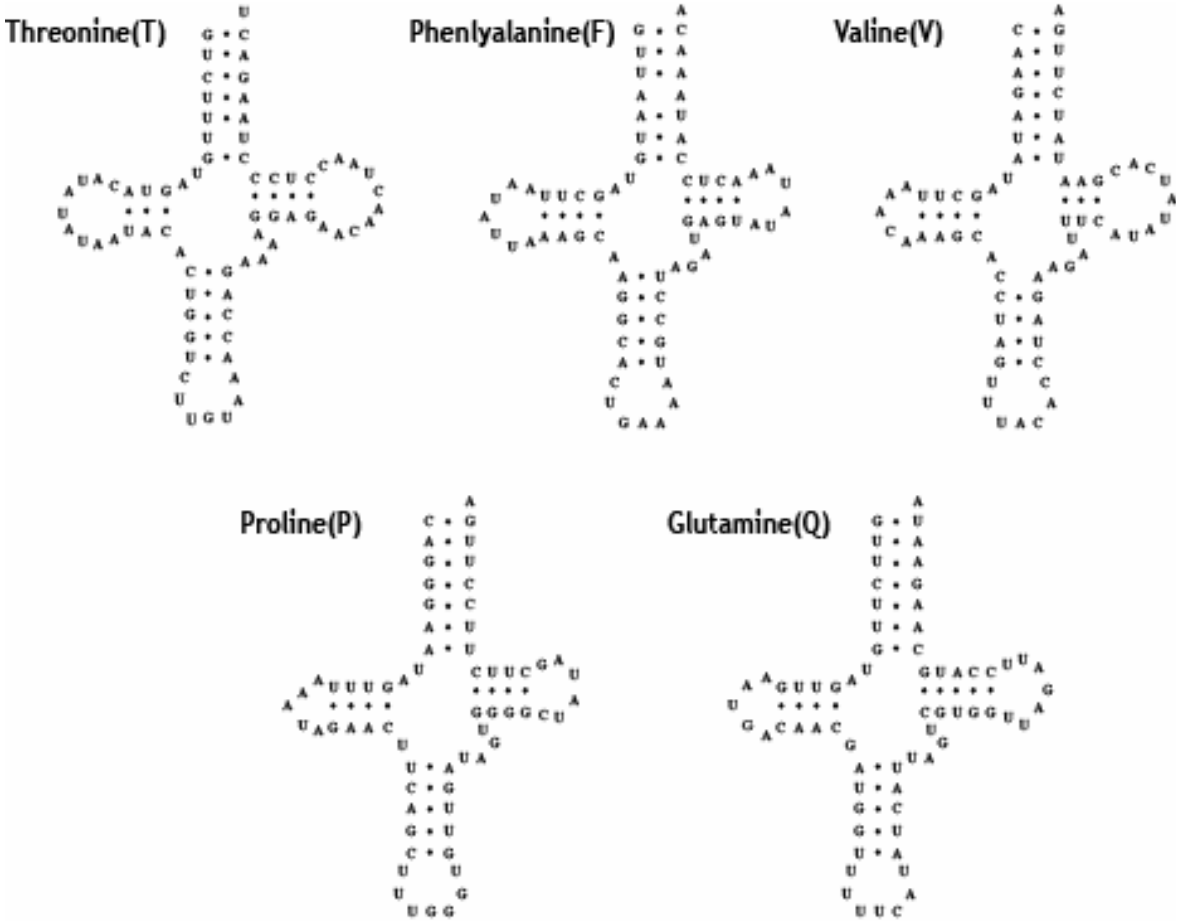
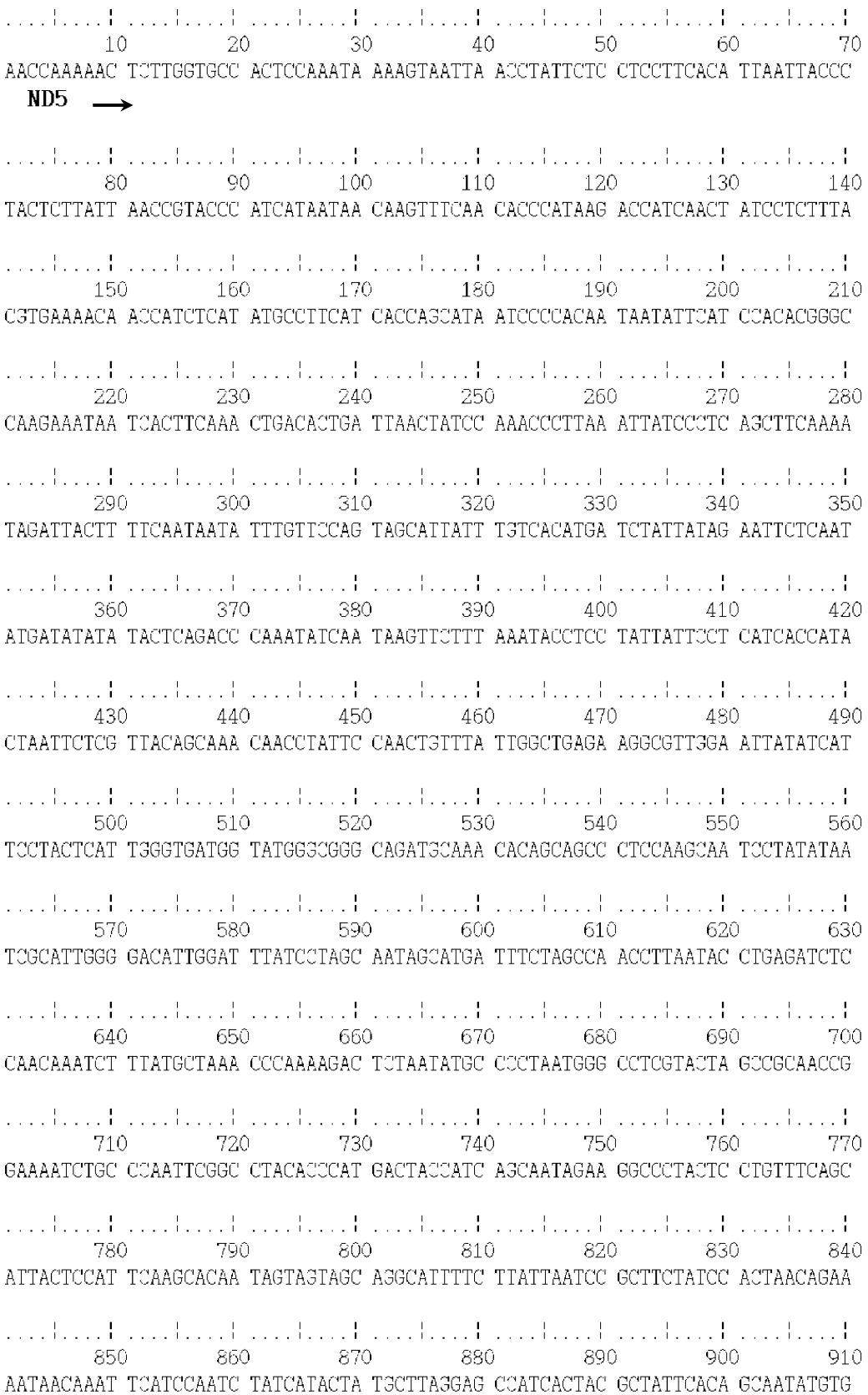


그림 V-37. 사향노루의 미토콘드리아 유전체 중에서
16S rRNA와 tRNA-Leu 유전자 사이에 있는 tRNA의 구조

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

▪ 사향노루의 염기서열 및 annotation (7,092bp)



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        920        930        940        950        960        970        980
CCCTCACCCA AAACGACATT AAAAAATCGT TGCCTTCTCC ACATCTAGCC AATTAGGCCT GATAATAGTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        990       1000       1010       1020       1030       1040       1050
ACAATTGGCA TTAATCAACC ATATCTAGCA TTCCTTCATA TCTGCACCCA CGCTTTCTTT AAAGCTATAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1060       1070       1080       1090       1100       1110       1120
TATTTATATG CTCCGGTTCC ATTATCCACA GCCTAAATGA TGAACAAGAC ATTCGAAAAA TAGGAGGCCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1130       1140       1150       1160       1170       1180       1190
ATTTAAAGCA ATACCATTCA CCACAACAGC CCTAATCATT GGCAGCCTTG CACTAACAGG AATCCCCTTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1200       1210       1220       1230       1240       1250       1260
CTTACCGGAT TCTATTCCAA AGACCTAATT ATCGAAGCTG CTAATACGTC ATATACCAAC GCCTGAGCCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1270       1280       1290       1300       1310       1320       1330
TCTTAACAAC ATTAATTGCC ACCTCTTTCA CAGCTATCTA CAGTACCCGC ATCATCTTCT TTGCACTCCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1340       1350       1360       1370       1380       1390       1400
AGGACAGCCC CGATTTTCAA CCCTAATTAC CATTAATGAA AACAACCCCT TTTTAATTAA TTCCATCAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1410       1420       1430       1440       1450       1460       1470
CGCCTTCTAA TCGGAAGCCT TTTCGCCGGG TTCATCATCT CAAACAACAT TCCTCCAACA ACAGTACCCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1480       1490       1500       1510       1520       1530       1540
AAATAACTAT ACCTCACTAC CTAAAAATAA CAGCCCTAGC AGTTACAATC CTAGGTTTCA TTCTAGCATT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1550       1560       1570       1580       1590       1600       1610
AGAAATTAAT AATCTAACCC AAAATCTAAA ATTTAATCAC CCATCAAGCA TATTTAAATT CTCCAATCTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1620       1630       1640       1650       1660       1670       1680
CTAGGGTACT TTCCCACAAT CATACATCGT CTAGCTCCCT ATTTAAACCT AACAATAAGC CAAAAATCAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1690       1700       1710       1720       1730       1740       1750
CATCCTCTCT CCTAGATCTA ATCTGACTAG AAAATATCCT ACCAAAAACT ACCTCACTAA TCCAAATAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1760       1770       1780       1790       1800       1810       1820
CATATCCATA ATAATCACAA ACCAAAAAGG CCTAATCAAA CTATACTTTC TTTCCTTCCT AGTCACAATT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1830       1840       1850       1860       1870       1880       1890
CTCACTAGTA TTATTCTATT TAATTTCCAC GAGTAATTTC CATAATAACT ACAACACCAA TTAATAAAGA
    *                  *
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1900       1910       1920       1930       1940       1950       1960
CCAACCAGTT ACAATAACTA ATCAAGTACC ATAACTATAT AAAGCCGCAA TCCCCATAGC CTCCTCACTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1970       1980       1990       2000       2010       2020       2030
AAAAATCCAG AATCTCCCGT ATCATAAATT ACTCAATCCC CCAAACCATT AAACTTAAAC ACAATCTCTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2040       2050       2060       2070       2080       2090       2100
CCTCCTCATT CTTCAACACA TAATAAACTA TCACAAACTC CATTAACAAA CCAGTAATAA AAGCTCCCAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2110       2120       2130       2140       2150       2160       2170
AACAGTTTTA TTAGAGACCC AAATCTCAGG GTACTGTTCT GTAGCCATAG CTGTCGTATA ACCAAAAACT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2180       2190       2200       2210       2220       2230       2240
ACTATCATTC CCCCTAAATA AATTAAAAAA ACTATTAAAC CCAAAAAAGA CCCACCAAAA TTCAACACAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2250       2260       2270       2280       2290       2300       2310
TCCCACAACC AACTCCACCA CTCACAATCA ACCCTAATCC CCCATAAATA GGCGAAGGTT TCGAAGAAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2320       2330       2340       2350       2360       2370       2380
CCCCACGAAA CCAATCACAA AAACTACACT CAAAATAAAT ACAATATATA CTATCATTAT TCTTGCATGG

  ND6 ←

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2390       2400       2410       2420       2430       2440       2450
AATCTAACCA CGACTAATGA TATGAAAAAC CATCGTTGTC ATTCAACTAC AAGAACACTA ATGACCAATA

      trnE ←                                                    Cytb →

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2460       2470       2480       2490       2500       2510       2520
TCCGAAAATC CCACCCATTA ATAAAAATTG TAAACAATGC ATTCATCGAC CTCCCAGCCC CATCAAACAT

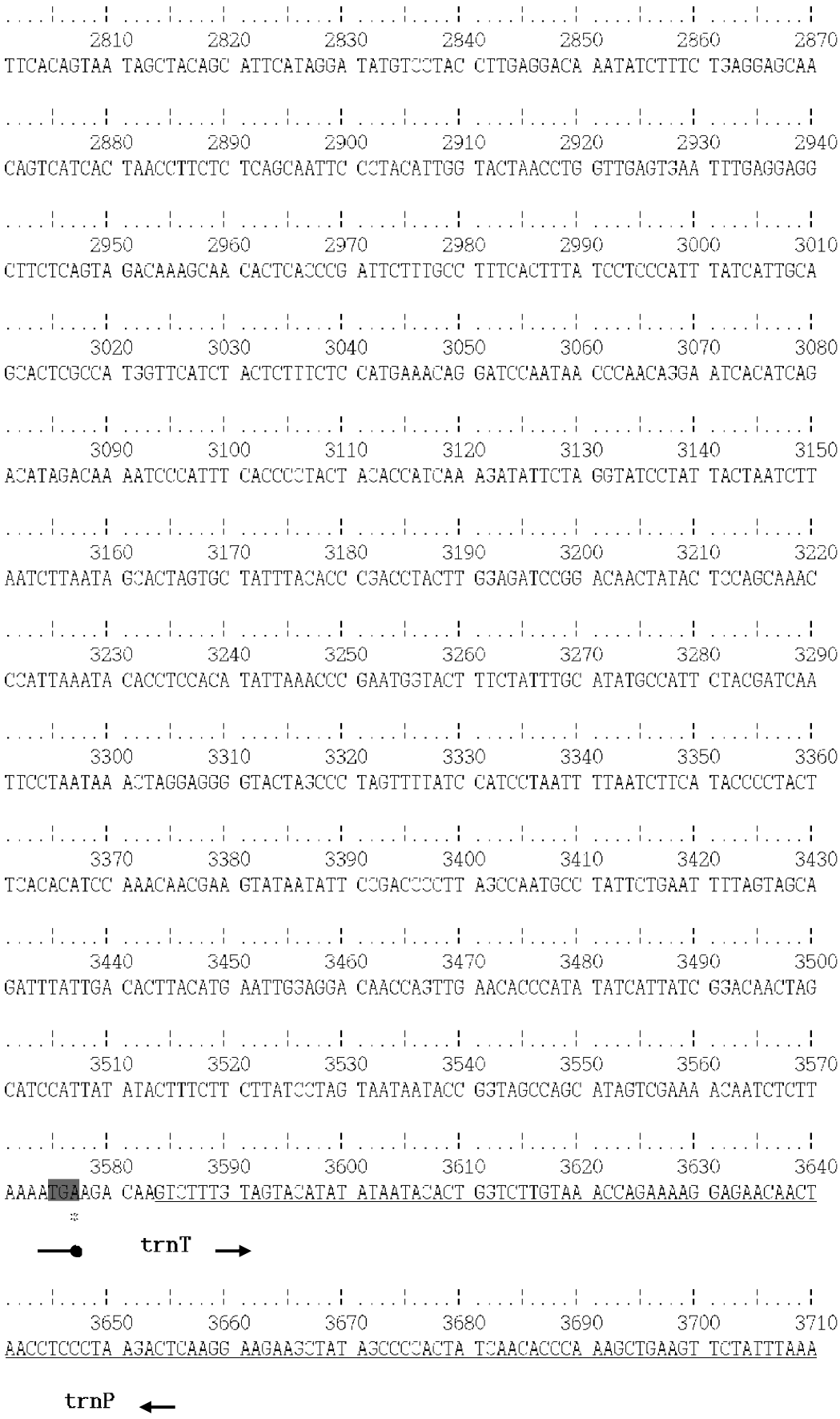
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2530       2540       2550       2560       2570       2580       2590
CTCATCCTGG TGAAATTTCG GCTCCCTACT AGGCATCTGC CTAATCCTTC AAATCCTAAC AGGCCTATTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2600       2610       2620       2630       2640       2650       2660
CTAGCAATAC ATTACACCTC TGACACAATA ACAGCATTTT CTTCTGTTAC TCACATTTGC CGAGACGTTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2670       2680       2690       2700       2710       2720       2730
ACTATGGCTG AATTATTCGA TACATACATG CAAATGGAGC ATCAATATTC TTTATCTGCC TGTTTATACA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2740       2750       2760       2770       2780       2790       2800
TGTAGGACGA GGCCTATACT ACGGATCATA TATATTTCTA GAAACATGAA ACATTGGAGT TATTCTCCTA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3720       3730       3740       3750       3760       3770       3780
CTATTCCCTG ACAACTATTG ATATACCCTC ATAACTATTA AGAACTTTTT CAGTATTAAA ATTCTCAAAA
```

Control region

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3790       3800       3810       3820       3830       3840       3850
TTTCCAATAG TTCAACACTA ATTTTAGACT CAATAACATA ATAACTGTCC TATAATTAAT AATGTACAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3860       3870       3880       3890       3900       3910       3920
TTTCATTTAT ATATAAATAA ACTCATAATA TTAATGTAAT AGAACATAAC GGTGTATAGT ACATAATATT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3930       3940       3950       3960       3970       3980       3990
AATGTACTAG GACATATTAT GTATATAGTA CATTATATTA TATGCCCCAT GCATATAAGC AAGTATAATA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4000       4010       4020       4030       4040       4050       4060
ATTCATTGAA AGTACATAGT ACATATAGTT GTTAATCGTA CATAGTGCAT TAAGTCAAAT CAATTCTTGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4070       4080       4090       4100       4110       4120       4130
CAACATGCAT ATCCCGTCCC CTAGATCACG AGCTTGATCA CCATGCCGCG TGAAACCAGC AACCCGCTTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4140       4150       4160       4170       4180       4190       4200
GCAGGGATCC CTCTTCTCGC TCCGGGCCCA TGATTCGTGG GGGTAGCTAT TTAATGAACT TTATCAGACA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4210       4220       4230       4240       4250       4260       4270
TCTGGTTCTT TCTTCAGGGC CATGTTCTTA AGATCGCCCA TTCTTTCCTC TTAAATAAGA CATCTCGATG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4280       4290       4300       4310       4320       4330       4340
GACTAGTGAC TAATCAGCCC ATGCTCACAC ATAACTGTGC TGTCATACAT TTGGTATTTT TTAATTTTTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4350       4360       4370       4380       4390       4400       4410
GGGATGCTTG GACTCAGCTA TGGCCGTCTG AGGCCCTGAC CCGGAGCATA AATTGTAGCT GAACTTAACT


....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4420       4430       4440       4450       4460       4470       4480
GCACCTTGAG CATCACCATA ATGGTAGGCA TGAGCATTAT AGTCCATGGT AGCAGGACAT AAAACTGTAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4490       4500       4510       4520       4530       4540       4550
TATACATATT AATCCATATC CCCCCTTCCC CCCTTATATA CCCACCACCA TTTTTGACAC ACTCCCCCCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4560       4570       4580       4590       4600       4610       4620
AGATACTTAT TCAAATTTAT TACGTTTTCA ATACTCAAAT TAGCACTCCA TATAAAATAA GCATGTAAGT
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4630       4640       4650       4660       4670       4680       4690
GCTTGCTTAC ATCACAATAC CCAGTTAATG TAGCTTAATA TTAAAGCAAG GCACTGAAAA TGCCTAGATG
```

trnF →

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4700       4710       4720       4730       4740       4750       4760
AGTATATAAA CTCCATAAAC ACACAGGTTT GGTCCCAGCC TTCCTATTGA TTCTTAATAA ACTTACACAT
```

12S rRNA →

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4770       4780       4790       4800       4810       4820       4830
GCAAGCATCC ACGCCCCGGT GAAAATGCCC TCCGAGTCAA CAGAACCAAG AGGAGCAGGT ATCAAGCACA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4840       4850       4860       4870       4880       4890       4900
CACTTTGTAG CTCATAACAC CTTGCTTAAC CACACCCCCA CGGGAAACAG CAGTGATAGA AATTAAGCCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4910       4920       4930       4940       4950       4960       4970
TAAACGAAAG TTTGACTAAG TTATATTAAT TAGGGTTGGT AAATCTCGTG CCAGCCACCG CGGTCATACG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4980       4990       5000       5010       5020       5030       5040
ATTAACCCAA GTTAATAGGA ATACGGCGTA AAGCGTGTTA AAGCCCTCTA CCAAATAGAG TTAAATTTTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5050       5060       5070       5080       5090       5100       5110
ATTAAGCTGT AAAAAGCCAT AATTATAACA AAAATAAATG ACGAAAGTAA CTCTATAACC GCTGATACAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5120       5130       5140       5150       5160       5170       5180
TATAGCTAAG ACCCAAACTG GGATTAGATA CCCCACTATG CTTAGCCCTA AACACAAATA ATTATACAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5190       5200       5210       5220       5230       5240       5250
AAAATTATTC GCCAGAGTAC TACCAGCAAC AGCTTAAAAC TCAAAGGACT TGGCGGTGCT TCACACCCTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5260       5270       5280       5290       5300       5310       5320
CTAGAGGAGC CTGTTCTATA ATCGATAAAC CCCGATAAAC CTTACCAATC CTTGCTAATA CAGTCTATAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5330       5340       5350       5360       5370       5380       5390
ACCGCCATCT TCAGCAAACC CTAAAAAGGA ACAAAAGTAA GCACAATCAT AATACACAAA AACGTTAGGT
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5400       5410       5420       5430       5440       5450       5460
CAAGGTGTAA CCTATGGAAT GGGAAGAAAT GGGCTACATT TTCTATCTCA AGAAAACTCA TATACGAAAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5470       5480       5490       5500       5510       5520       5530
TTATTATGAA ACTAATAACC AAAGGAGGAT TTAGTAGTAA ACTAAGAATA GAGTGCTTAG TTGAATTAGG
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5540       5550       5560       5570       5580       5590       5600
CCATGAAGCA CGCACACACC GCCCGTCACC CTCCTCAAAT AAACATGATG CACCAAAACA TATTTAAACA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5610       5620       5630       5640       5650       5660       5670
CATTAACTAC ATGAGAGGAG ACAAGTCGTA ACAAGGTAAG CATACTGGAA AGTGTGCTTG GACAAATCAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5680       5690       5700       5710       5720       5730       5740
GATATAGCTT AAACAAAGCA CCTAGTTTAC ACCTAGAAGA TTTCATATAT CACGAATATC TTGAACCAAA

    trnV ⟶

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5750       5760       5770       5780       5790       5800       5810
GCTAGCCCAC AATTTCACTC AACCTAACAA TCAAAGCAAA ATAAAACAAA ACATTTATTT AATACCTTAA

   16s rRNA ⟶

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5820       5830       5840       5850       5860       5870       5880
AGTATAGGAG ATAGAAATTT TAACTTGGCG CTATAGAGAA AGTACCGTAA GGGAACGATG AAAGAAAATA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5890       5900       5910       5920       5930       5940       5950
TTCAAAGTAT AAAAAAGCAA AGATTACCCC TTGTACCTTT TGCATAATGA GTTAACTAGT ATGAAGCTTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5960       5970       5980       5990       6000       6010       6020
ACAAAACGAA TTTCAGCTAA GCCACCCGAA ACCAGACGAG CTACCTATGA ACAGTTTATT AAGAACCAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6030       6040       6050       6060       6070       6080       6090
TCATCTATGT AGCAAAATAG TGAGAAGATT TATAGGTAGA GGTGACACGC CCAACGAGCC TGGTGATAGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6100       6110       6120       6130       6140       6150       6160
TGGTTGTCCA GGAAATGAAT CTAAGTTCAG CTTTAAATAT ACTAAAAACC AAACAAATTT CACTGTATTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6170       6180       6190       6200       6210       6220       6230
TTAAAAGTTA GTCTAAAAAG GTACAGCCTT TTAGAAACGG ATACAACCTT GACTAGAGAG TAAAATCTAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6240       6250       6260       6270       6280       6290       6300
TAACACCATA GTAGGCTTAA AAGCAGCCAC CAATTAAGAA AGCGTTAAAG CTCAACAATA ACAATAATAC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6310       6320       6330       6340       6350       6360       6370
TAATTCCACT AGTAAACAAT CAACTCCTAG CCCAATACTG GACCAATCTA TTAAAAAATA GAAGCAACAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6380       6390       6400       6410       6420       6430       6440
TGTTAACATG AGTAACAAGA AGTACCTTCT CCTTGCATAA GTTTAAGTCA GTACCTGATA ATACTCTGAC
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6450       6460       6470       6480       6490       6500       6510
TATTAACAGC AAATAAAATC AACCCAACAA TAAATAATTT ATTAATCATA CTGTTAATCC AACACAGGAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6520       6530       6540       6550       6560       6570       6580
TGCACTCAAG GAAAGATTAA AAGAAGTAAA AGGAACTCGG CAAGCACGAA CCCCGCCTGT TTACCAAAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6590       6600       6610       6620       6630       6640       6650
CATCACCTCC AGCATTTCCA ATATTGGAGG CACTGCCTGC CCAGTGACAA CCGTTAAACG GCCGCGGTAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6660       6670       6680       6690       6700       6710       6720
CCTGACCGTG CAAAGGTAGC ATAATCATTT GTTCTCTAAA TAAGGACTTG TATGAATGGC CACACGAGGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6730       6740       6750       6760       6770       6780       6790
TTCTACTGTC TCTTACTTCC AATCAGTGAA ATTGACCTTT CCGTGAAGAG GCGGAAATAA ACCGATAAGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6800       6810       6820       6830       6840       6850       6860
CGAGAAGACC CTATGGAGCT TTAACTAACT AGCCTAAAGA AAACAAACAC AACCACCAAG GGATAATAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6870       6880       6890       6900       6910       6920       6930
ACTCTCAATA GGCTAGCAGT TTTGGTTGGG GTGACCTCGG AGAATAAAAA ATCCTCCGAA CGATTCTAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6940       6950       6960       6970       6980       6990       7000
GACTAGACCA ACAAGTCAAA CCACAATATC GCTCATTGAT CCAAAGAAAT TTGATCAACG GAACAAGTTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        7010       7020       7030       7040       7050       7060       7070
CCCTAGGGAT AACAGCGCAA TCCTATTTAA GAGTCCATAT CGACAATAGG GTTTACGACC TCGATGTTGG

....|....| ....|....| ..
        7080       7090
ATCAGGACAT CCTAATGGTG CA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.6. 황새 (*Ciconia boyciana*)



그림 V-38. 황새

- **계통 (Systematics)**
  Phylum Chordata 척삭동물 문
  Class Aves 조 강
  Order Ciconiiformes 황새 목
  Family Ciconiidae 황새 과
- **기상 (Diagnosis)**
  몸길이 : 1,120㎜,
- **서식처 (Habitat)**
  습지, 하천 주변 등

전 세계적으로 12속 17종의 황새가 보고되어 있으며, 화석종도 20종 알려져 있다. 우리나라에의 경우 광복이전에는 매우 흔한 텃새로 알려져 있었으나, 6.25 전쟁을 전후로 하여 밀렵과 환경오염으로 그 수가 급격히 줄었다. 1971년 충청북도 음성에서 1쌍이 마지막으로 번식하였으나 밀렵으로 수컷이 죽은 후 텃새로서는 절멸되어 현재 우리나라에서 볼 수 있는 황새는 모두 겨울철새이다. 전 세계적으로도 그 수가 줄어 IUCN의 red data book에 등록되어 국제적으로도 보호 받고 있으며, 우리나라에서는 환경부 지정 멸종위기 Ⅰ급으로 지정되어 있다 (그림 V-38).

3.6.1. Total genomic DNA 추출

황새의 근육조직을 약 25mg 정도 떼어내어 DNeasy Tissue kit (Qiagen, CO.)를 이용하여 total genomic DNA를 추출하였다. Genomic DNA 추출 후 추출된 DNA의 양을 측정하기 위하여 전기 영동하여 DNA의 농도를 측정하였다 (그림 39).

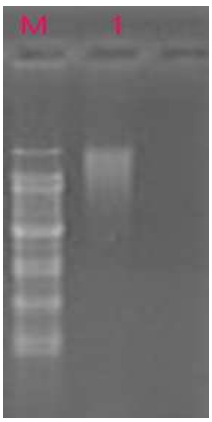


그림 V-39. Total cellular DNA

M. λ/HindⅢ marker : (위에서부터 23kb, 9.4kb, 6.5kb, 4.3kb, 2.3kb)

1. 황새의 genomic DNA

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.6.2. Primer 고안

비교적 보존적인 영역으로서 알려진 CO1 유전자 영역의 universal primer와 조류에 특이적인 cytochrome b 유전자 영역의 primer를 이용하여 짧은 PCR을 수행하고 그 결과를 바탕으로 황새에 특이적인 long PCR primer를 고안하였다 (표 V-18).

표 V-18. 황새에서 사용된 primer 염기서열

Primer name	Primer Sequence	Gene region
HCO2198	5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT GA-3'	CO1 gene
LCO	5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G -3'	
H-16065	5'-CTA AGA AGG GTG GAG TCT TCA GTT TTT GGT TTA CAA GAC-3'	Cytochrome b gene
L-14995	5'-CTC CCA GCC CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AAC TTC G-3'	
Cico1	5'-CCC ATG CTT TCG TAA TAA TCT TCT TC-3'	CO1과 Cytb 유전자 사이 약 8kb
Cico2	5'-AGG TTC AGA ATA GGA GTT GGG ATA GA-3'	
Cico3	5'-AGT TGT GAT GAA GTT GAT TGC TCC TA-3'	Cytb와 CO1 유전자 사이 약 9.7kb
Cico4	5'-CAT TCT TCG CCC TAC ACT TTC TTC TC-3'	

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.6.3. PCR 증폭

표 V-19. CO1과 Cytb 사이를 증폭하기 위한 Long PCR 조건
(Cico1-Cico 2 primer 이용)

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1.5㎕
Reverse primer	1.5㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	16.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	19.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	15 cycles
55℃	30sec	
68℃	8min	
92℃	10sec	25 cycles
58℃	30sec	
68℃	8min +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

* Long PCR 반응조건(Annealing time은 Long PCR manual을 참조하였음; Expand Long Template PCR System Cat. No. 1681842)

표 V-20. CO1과 Cytb 사이를 증폭하기 위한 Long PCR 조건
(Cico3-Cico4 primer 이용)

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1.5㎕
Reverse primer	1.5㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	16.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	19.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	15 cycles
58℃	30sec	
68℃	5min	
92℃	10sec	25 cycles
58℃	30sec	
68℃	5min +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

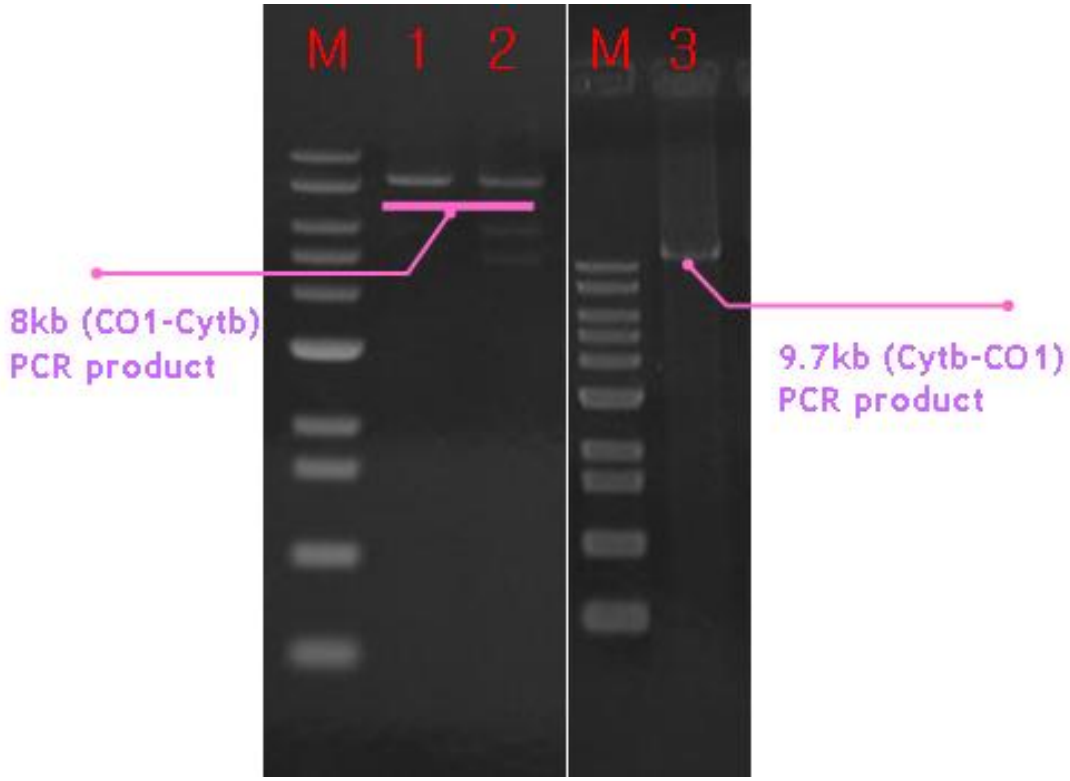


사진 V-40. PCR product 사진

M: marker, 1 and 2: 8kb 영역, 3: 9.7kb 영역

3.6.4. 염기서열 결정

황새의 전체 미토콘드리아 유전체 가운데 cytochrome b 유전자에서 ND4 유전자 사이의 1,330 bp, control region에서 16S rRNA 유전자 사이의 2,349bp, ND1 유전자에서 CO1 유전자 사이 2,527bp의 염기서열의 분석이 이루어져 총 6,206bp가 결정되었다. 유전자의 배열은 일반적인 척추동물의 배열과 동일하였다. 이 영역 사이에는 총 10개의 tRNA가 존재하였는데 모두 매우 전형적인 네잎클로버 형태를 가지고 있다 (그림 V-41, V-42).

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

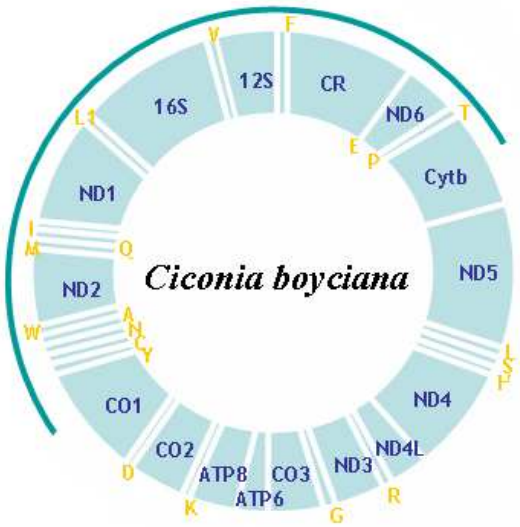


그림 V-41. 황새의 미토콘드리아 유전체 배열
(외곽선은 현재 결정된 유전자 영역)

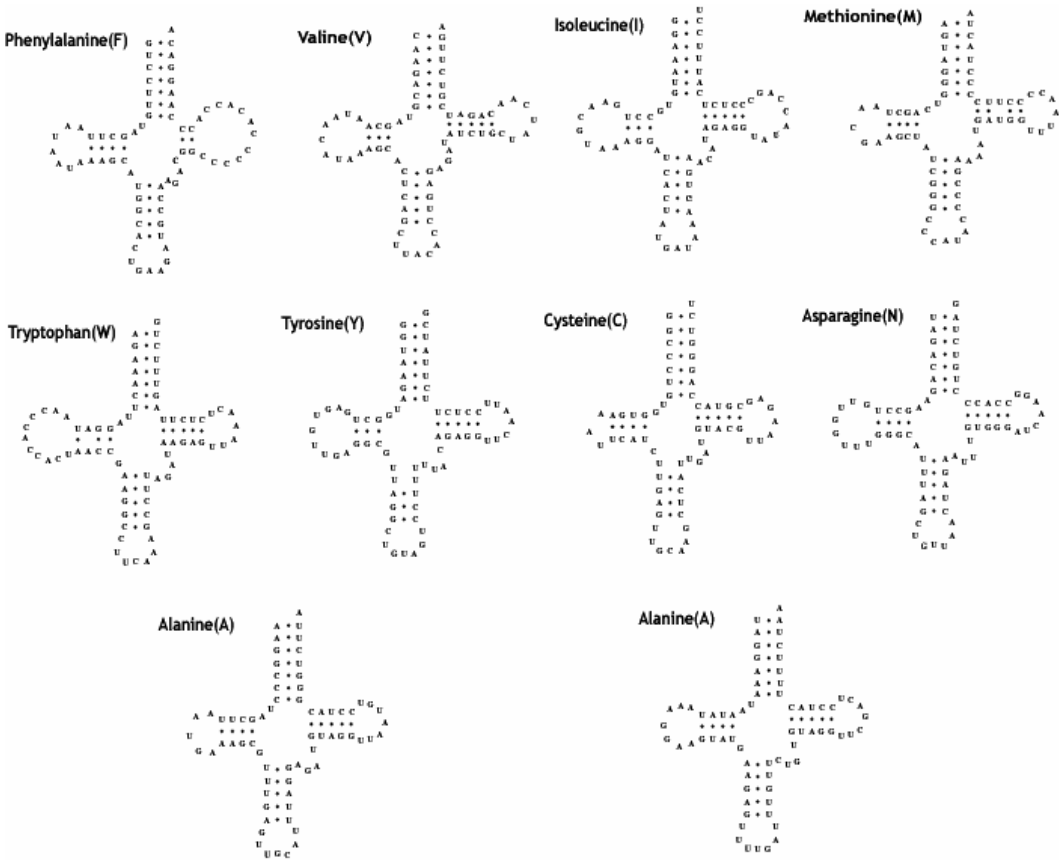
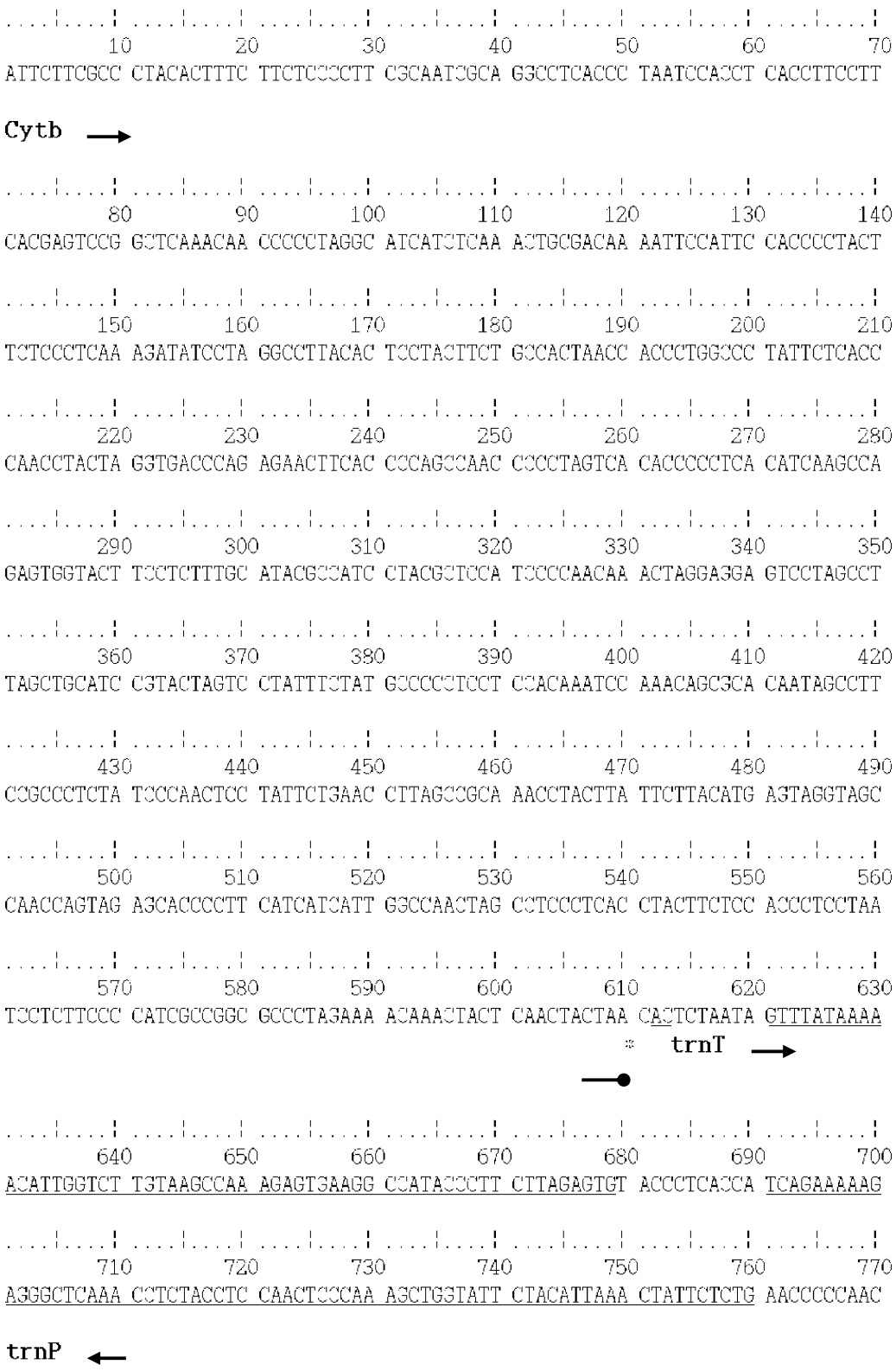


그림 V-42. 황새 미토콘드리아의 tRNA 2차 구조

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

▪ 황새의 염기서열 및 annotation(6,206bp)



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        780        790        800        810        820        830        840
CTAAACTGCT CGAATCGTCC CACGAGATAG CCCTCGTACA ACCTCCAGTA CAACGAACAG CGTCAGCAGC
*
```

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        850        860        870        880        890        900        910
AACCCCCATC CCCCTATCAG AAATATTCCT GCCCCCTCCG AATAGAACAT TGCCACCCCA CTAAAATCTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        920        930        940        950        960        970        980
GCCGAGCAAA AGACAAACCC CCACTATCAA CCGTAACCAC CCCCACCTTC CAGCACTCAG CAAAACCTCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        990       1000       1010       1020       1030       1040       1050
AACAGCCCCC CCAACCATCA GCACCAAAAT AAGCCCCACA CCATACATTA CAACTTGCCG GCTCCCCCAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1060       1070       1080       1090       1100       1110       1120
GCTTCGGGAA AAGGATCCGC CGCCAAAGCC ACCGAATAAA CAAAAACTAC CAGCATCCCC CCCAGATACA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1130       1140       1150       1160       1170       1180       1190
CCATAAACAG TACAAGCGAT ACAAAGGAAG CTCCCAAACT CAGTAGCCAG CCGCACCCTA CAACAGACGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1200       1210       1220       1230       1240       1250       1260
CACAACCAAA CCAACTACCC CATAGTAGGG AGAAGGGTTA GATGCAACCG CCAATGCCCC TAGGGCAAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1270       1280       1290       1300       1310       1320       1330
CACCCCCCTA AAAGAAACAT AAAATAAGCC ATACTAATTC CTACTTGGCC TCTCTCCAAG ATCTGCGGCC
```

ND6

trnE, Control region

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        10         20         30         40         50         60         70
AAAAACAAAC AAACAAACAA CAAANAACAA ACAACAAACA AACAAACAAC AAACAAACAA CAAACAAACA
```

Control region

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        80         90        100        110        120        130        140
AACAACAAAC AAACAAACAA CAAACAAACA ACAAACAAAC AAACAACAAA CAAACAAACA ACAAACAAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       150        160        170        180        190        200        210
AAACAAACAC AGCCTCAACC GTCCTTGTAG CTTACAACTA AAGCATGGCA CTGAAGATGC CAAGACGGCT
```

trnF

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        220        230        240        250        260        270        280
GCCATATGCA CCCAAGGACA AAAGACTTAG TCCTAACCTT ACCGTTAACT TTTGCTAAAT ATATACATGC

                          12S rRNA ⟶

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        290        300        310        320        330        340        350
AAGTATCCGC ACCCCAGTGT AAATGCCCCA GATTTCTTAC CTAGATGAAG GGAGCGGGTA TCAGGCACAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        360        370        380        390        400        410        420
CCACTGTTGT AGCCCAAGAC ACCTTGCTTA GCCACACCCC CACGGGCACT CAGCAGTAAT TAACATTAGG

        430        440        450        460        470        480        490
CAATAAGTGT AAACTTGGCT TAGTTATAGC AACATCCAGG GTTGGTAAAT CTTGTGCCAG CCACCGCGGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        500        510        520        530        540        550        560
CACACAAGAA ACCCAAGTTA ACTGCAATCG GCGTAAAGAG TGGTACCACA TTGTCACAAC AACTAGGATT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         570        580        590        600        610        620        630
AAAGTACAAC TGAGCTGTCA TAAGCCAAAG ATGCACCTAA AACCACCCTC AAGACGATCC TAGCAACTAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        640        650        660        670        680        690        700
GACTGATTAA GCCCACGAAA GCTAAGGCAC AAACTGGGAT TAGATACCCC ACTATGCTTA GCCCTAAATC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        710        720        730        740        750        760        770
TTGGTACTTA CCCTACTAAA GTACCCGCCC GAGAACTACG AGCACAAACG CTTAAAACTC TAGGGACTTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        780        790        800        810        820        830        840
GCGGTGCCCC AAACCCACCT AGAGGAGCCT GTTCTGTAAT CGATAACCCA CGATACACCC AACCGCCCCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        850        860        870        880        890        900        910
TGCCAAAGCA GCCTACATAC CGCCGTCGCC AGCTCACCTT CCTTGAGAGC CCAACAGTGA GCACAACAGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        920        930        940        950        960        970        980
TACCCCCGCT AGCAAGACAG GTCAAGGTAT AGCCTATGGG TCGGAAGAAA TGGGCTACAT TTTCTAAGAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        990       1000       1010       1020       1030       1040       1050
AGAAAACTTA CGAAAAGGGG CATGAAACAG CCCCTAGAAG GCGGATTTAG CAGTAAAGGG GGATAATAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1060       1070       1080       1090       1100       1110       1120
GCCCTCTTTA AACTGGCCCT GGGGCACGTA CATACCGCCC GTCACCCTCC TCATAAGCTA CCAAACCACC
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1130       1140       1150       1160       1170       1180       1190
ATACCTAATA CCCCCACCAG CCGAAGATGA GGTAAGTCGT AACAAGGTAA GTGTACCGGA AGGTGCACTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1200       1210       1220       1230       1240       1250       1260
AGCACACACA AGACGTAGCT ATAACATAAA GCACTCAGCT TACACCTGAG AGATATCTGC TATCAACAGA
```

trnV →

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1270       1280       1290       1300       1310       1320       1330
TCGTCTTGAA GCCTACTCTG GCTCGACCTA ACCATACCCA CCACACATAG TACATCAAAA ATTAACTTTA
```

16S rRNA →

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1340       1350       1360       1370       1380       1390       1400
CCTCCAAACT AAAACATTCT TCTTACTTAG TATAGGTGAT AGAAAAGGAC CCCCCCGGCG CGATAGAGAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1410       1420       1430       1440       1450       1460       1470
CCTGTACCGT AAGGGAAAGA TGAAATAACA ATGAAAACCC AAGCACCAAA CAGCAAAGAT CAACCCTTGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1480       1490       1500       1510       1520       1530       1540
ACCTCTCGCA TCATGATTTA GCAAGAACAA CCAAGCAAAA CGAATTTAAG CTTGCCACCC CGAAACCTGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1550       1560       1570       1580       1590       1600       1610
GCGAGCTACT CACAAGCAGC TACCCCTGAG CGAACCCGTC TCTGTTGCAA AAGAGTGGGA TGACTTGTTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1620       1630       1640       1650       1660       1670       1680
GTAGAGGTGA AAAGCCAACC GAGCCAGGTG ATAGCTGGTT GCCCGTGAAA TGAATCTCAG TTCCCCCTTA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1690       1700       1710       1720       1730       1740       1750
ACTCCTCTCC ATGGATCACC TAACAACCCC CAATGTAGTG AGTCAAGAGT AATTTAAAGG AGGTACAGCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1760       1770       1780       1790       1800       1810       1820
CCTTTAAAAA AGAACACAAT CTCCTCTAGC GGATAAAACA ACCCACTACT TACATGCCTC CAAACTGTGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1830       1840       1850       1860       1870       1880       1890
GCCTTTAAGC AGCCATCAAC AAAGAGTGCG TCAAAGCGCT ACACTTAAAA ATCCAAAGAC AACATGACTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1900       1910       1920       1930       1940       1950       1960
CCTTACCACT AACGGGCTAA CCTATGCCAA TAGGAGAATT AATGCTAAAA TAAGTAACCA GGGACTACCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      1970       1980       1990       2000       2010       2020       2030
CTCTCAGGCG CAAGCTTACA TTATCACATT GTTAACAGGC TATTCAAATA CCATAACTCC AACAAGACTA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2040       2050       2060       2070       2080       2090       2100
AGTATTAAAC CCACCCTGTT AACCCAACCC AGGAGCGCCC ATTAGAAAGA TTAAAATCTG TAAAAGGAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2110       2120       2130       2140       2150       2160       2170
TAGGCAAACC CAGGGCCCGA CTGTTTACCA AAAACATAGC CTTCAGCCGA CCAAGTATTG AAGGTGATGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2180       2190       2200       2210       2220       2230       2240
CTGCCCAGTG ACCCCCTGTT CAACGGCCGC GGTATCCTAA CCGTGCGAAG GTAGCGCAAT CAATTGTCTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2250       2260       2270       2280       2290       2300       2310
ATAAATCGAG ACTTGTATGA ACGGTTAAAC GAGGTCCTAA CTGTCTCTTA CAGATAATCA GTGAAATTGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....
        2320       2330       2340
TCTCCCCGTG CAAAGGCAGG GATAAACACA TAAGACGAG
```

~16S rRNA, trn L2 , ND1 ~

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          10         20         30         40         50         60         70
AGGCTTCCTA GGAATCCGTG CCTCCTACCC AGGATTTCGC TATGACCAAG TTATACATCT CCTGTGAAAA
ND1 ⟶

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          80         90        100        110        120        130        140
AACTTCCTTC CACTAACATT AGCACTATGC CTCTGGCACA CAAGCATACC AATCTGCTAC GCAGGCCTAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         150        160        170        180        190        200        210
CTCCTTATCT AAGGAAATGT GCCTGAACGT AAAGGATCAC TATGATAAAG TGAACATAGA GGTATACCAG
            *
          ⟵●trnI ⟶

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         220        230        240        250        260        270        280
CCCTCTCATT TCCTAAGAAA CCTTAGAAAA GTAGGAGTCG AACCTACACA GAAGAAATCA AAACTCTTCA
                        trnQ ⟵

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         290        300        310        320        330        340        350
TACTTCCTTT ATATTATTTC CTAGTAGGGT CAGCTAACGA AGCTATCGGG CCCATACCCC GAAAATGATG
                                                    trnM ⟶

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         360        370        380        390        400        410        420
GTTTAACCCC TTCCCCTACT AATGAACCCA CATGCAACAC TAATTTTCTC ACTAAGTCTT CTCCTAGGAA
                          ND2 ⟶
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        430        440        450        460        470        480        490
CAACCATCAC AATCTCAAGC AACCATTGAA TAATAGCCTG AATAGGACTA GAAATTAATA CCCTCGCTAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        500        510        520        530        540        550        560
CCTCCCCCTC ATCTCAAAAT CCCATCACCC TCGAGCCATC GAAGCCGCAA TCAAATACTT TCTAGTCCAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        570        580        590        600        610        620        630
GCAACTGCCT CTACACTAGT CCTCTTCTCA AGTACAATTA ATGCATGATT CACAGGACAA TGGGACATCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        640        650        660        670        680        690        700
CCCAGCTAAG CCACCCAACA TCCTCCCTCC TCCTGACAAC AGCAATTGCA ATAAAACTAG GCCTAGTGCC


....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        710        720        730        740        750        760        770
ATCCCATTTC TGATTCCCAG AAGTACTTCA AGGCTCATCC CTAACCACTG CTCTATTACT ATCAACAATA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        780        790        800        810        820        830        840
ATAAAATTCC CCCCAATCAC CATTCTTTTC CTAACATCCC CATCCCTTAA CCCAACACTA CTAACCACCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        850        860        870        880        890        900        910
TAGCCATTGC CTCAGCCGCC CTAGGGGGCT GAATAGGACT AAACCAAACC CAAACCCGAA AAATCCTAGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        920        930        940        950        960        970        980
CTTCTCCTCC ATCTCCCACC TAGGCTGGAT AGCCACCATC ATTGTCTACG ACCCCAAACT CACCCTACTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        990       1000       1010       1020       1030       1040       1050
ACCTTCTACC TCTACACCCT AATGACTGCC ACCATTTTTA TTACCCTCAA CACAACCAAA GTCCTAAAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1060       1070       1080       1090       1100       1110       1120
TATCAACAAT AATAACCTCA TGAACAAAAG CCCCCGTGCT AAATACCACC CTAATACTCG CCTTACTCTC

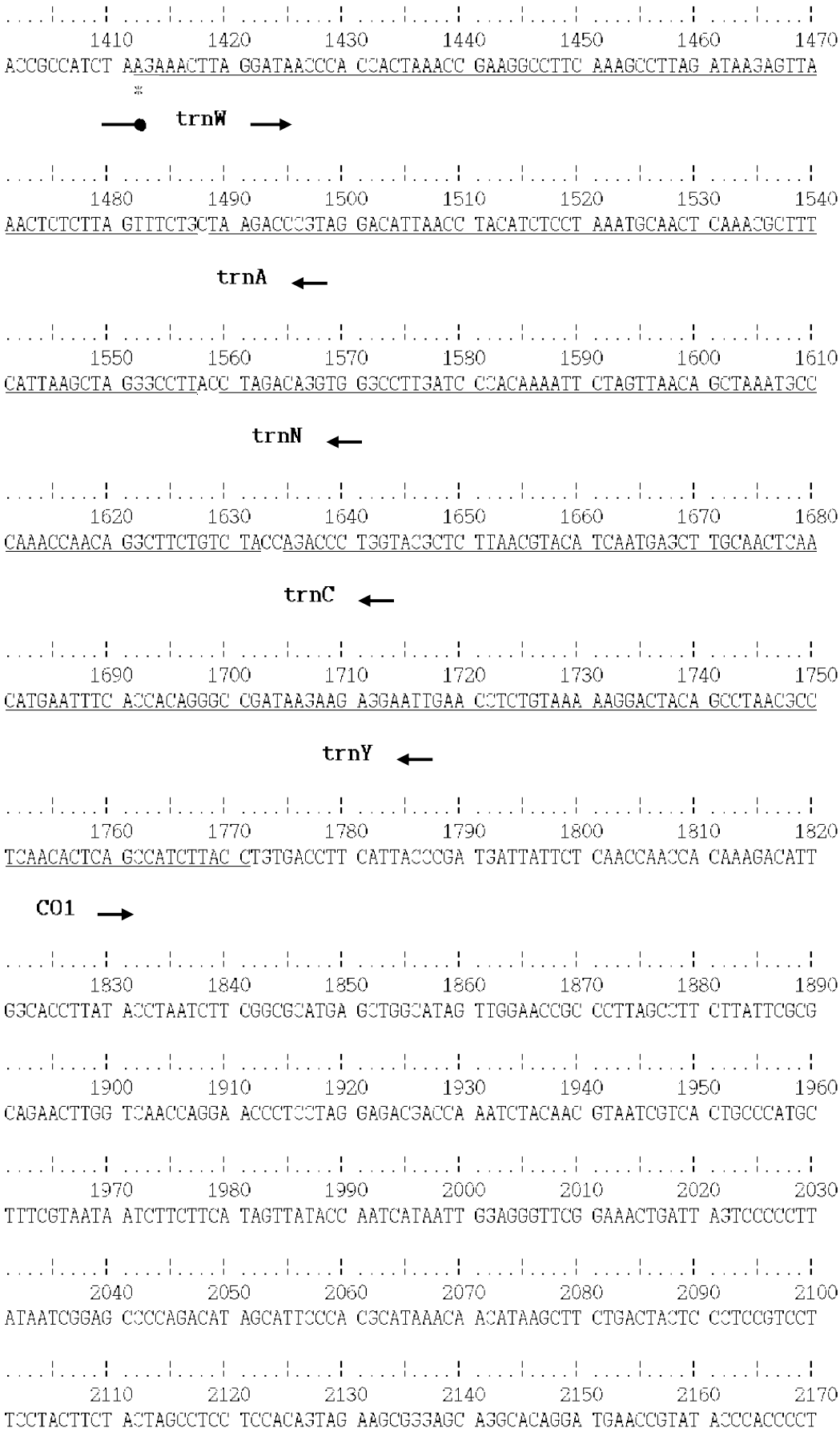
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1130       1140       1150       1160       1170       1180       1190
CCTGGCAGGC CTTCCCCCAC TGACAGGCTT CCTGCCTAAA TGGCTCATCA TCCAAGAACT AACTAAACAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1200       1210       1220       1230       1240       1250       1260
GAAATAACTG CAACAGCCAC AACCATTGCC ATACTCTCAC TACTAGGACT ATTCTTCTAC CTACGTCTTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1270       1280       1290       1300       1310       1320       1330
CATACTACTC AACAATCACA CTCCCGCCAA ACTCCACAAA CCACATAAAA CAATGGCATA TTGATAAACC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1340       1350       1360       1370       1380       1390       1400
AACACCCGCC CTAACCGCCA TTCTCATATC CCTGTCAACC CTACTACTAC CCCTCTCCCC CATAATCTTA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2180       2190       2200       2210       2220       2230       2240
AGCCGGCAAT TTAGCCCACG CTGGAGCCTC AGTAGACCTA GCCATCTTCT CCCTCCACCT AGCAGGTGTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2250       2260       2270       2280       2290       2300       2310
TCCTCAATCC TAGGAGCAAT CAACTTCATC ACAACCGCCA TCAACATAAA ACCTCCTGCC CTATCACAGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2320       2330       2340       2350       2360       2370       2380
ACCAAACCCC CCTATTCGTA TGATCCGTCC TTATCACTGC CGTCCTACTA CTACTATCTC TTCCAGTCCT
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2390       2400       2410       2420       2430       2440       2450
CGCTGCCGGC ATTACTATAC TACTTACAGA CCGAAACCTA AACACCACAT TCTTTGACCC TGCTGGAGGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|..
        2460       2470       2480       2490       2500       2510       2520
GGAGATCCTG TCCTATACCA ACACCTCTTC TGATTCTTCG GCCACCCAGA AGTCTACATT CTGATCCTCC CTGGATT
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.7. 수리부엉이 (*Bubo bubo*)



그림 V-43. 수리부엉이

- **계통 (Systematics)**
  Phylum Chordata 척삭동물 문
  Class Aves 조 강
  Order Strigiformes 올빼미 목
  Family Strigidae 올빼미 과
- **기상 (Diagnosis)**
  몸길이 : 700㎜,
- **서식처 (Habitat)**
  전국적으로 분포하며 산지, 바위굴 등

올빼미류는 남극대륙을 제외한 전 대륙에 서식하며, 산지에서 습지에 이르기까지 다양한 서식지에 분포한다. 지금까지 전 세계적으로 올빼미과는 24속 194종으로 분류되고 있으며(König *et al.*, 1999), 우리나라에는 8속 11종이 알려져 있다 (그림 V-43).

수리부엉이는 유라시아 대륙에 널리 분포하는 대형 올빼미이며, 14종의 아종으로 나뉜다 (König *et al.*, 1999; Clements, 2000). 우리나라에 서식하는 수리부엉이는 *B. bubo kiautschensis*로 우리나라와 중국남부에 주로 분포하고 있다.

수리부엉이는 주로 작은 새, 설치류 등을 사냥하며 살기 때문에 농경지가 줄고, 농약 사용과 환경오염이 늘어나면서 그 수가 점차 감소하고 있어 환경부지정 멸종위기 Ⅱ급종으로 분류되어 있다.

3.7.1. Total genomic DNA 추출

수리부엉이의 근육조직을 약 15mg 정도 떼어내어 DNeasy Tissue kit (Qiagen, CO.)를 이용하여 total genomic DNA를 추출하였다. Genomic DNA 추출 후 추출된 DNA의 양을 측정하기 위하여 전기영동하여 DNA의 농도를 측정하였다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.7.2. Primer 고안

비교적 보존적인 영역으로서 알려진 CO1 유전자 영역의 universal primer와 조류에 특이적인 cytochrome b 유전자 영역의 primer를 이용하여 짧은 PCR을 수행하고 그 결과를 바탕으로 수리부엉이에 특이적인 long PCR primer를 고안하였다 (표 V-21).

표 V-21. 수리부엉이에서 사용된 primer 염기서열

Primer name	Primer Sequence	Gene region
HCO2198	5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT GA-3'	CO1 gene
LCO	5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G -3'	
H-16065	5'-CTA AGA AGG GTG GAG TCT TCA GTT TTT GGT TTA CAA GAC-3'	Cytochrome b gene
L-14995	5'-CTC CCA GCC CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AAC TTC G-3'	
BHCO	5'-CAC TGC CCT TAG CCT ACT CAT CC-3'	CO1-Cyt b 약 8kb
BLCYT	5'-TTG GAT TTG TGG AGG AGT GGG AC-3'	
BLCO	5'-AGA ATc AGA AGA GGT GTT GGT AT-3'	Cyt b - CO1 약 8.3kb
BHCYT	5'-ACT CAG GCT CAA ACA ACC CAC TA-3'	

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.7.3. PCR 증폭

표 V-22. CO1과 Cyt b 사이를 증폭하기 위한 Long PCR 조건
(BHCO-BLCYT primer 이용)

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1.5㎕
Reverse primer	1.5㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	16.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	19.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	10 cycles
56℃	30sec	
68℃	8min	
92℃	10sec	20 cycles
56℃	30sec	
68℃	8min +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

* Long PCR 반응조건(Annealing time은 Long PCR manual을 참조하였음; Expand Longemplate PCR System Cat. No. 1681842)

표 V-23. CO1과 Cyt b 사이를 증폭하기 위한 Long PCR 조건
(BLCO-BHCYT primer 이용)

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1.5㎕
Reverse primer	1.5㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	16.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	19.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	15 cycles
59℃	30sec	
68℃	8min	
92℃	10sec	25 cycles
59℃	30sec	
68℃	8min +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

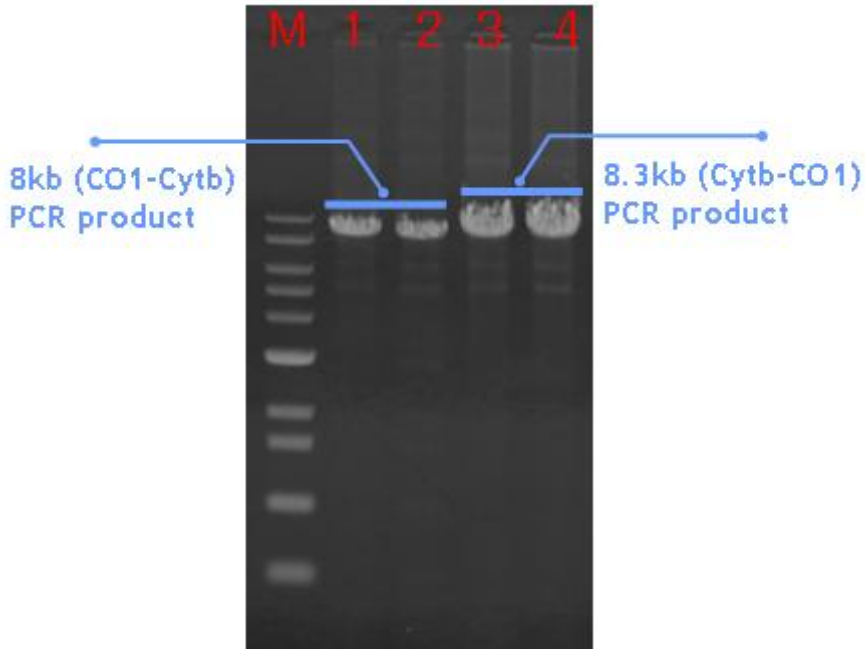


사진 V-44. PCR product 사진

M: marker, 1 and 2: 8kb 영역, 3 and 4: 8.3kb 영역

3.7.4. 염기서열 결정

수리부엉이의 전체 미토콘드리아 유전체 가운데 cytochrome b 유전자에서 16S rRNA 유전자 사이의 5,932 bp의 염기서열이 결정되었다. 유전자의 배열은 일반적인 척추동물의 배열과 거의 동일하였는데, 조류에서는 일반적으로 trn P-ND6-trn E 영역이 cytochorm b-trn T와 control region 사이에 있는 반면 수리부엉이에서는 control region 내에 위치하고 있어 주행성 맹금류인 매(*Falco peregrinus*), 말똥가리(*Buteo buteo*)와 동일한 구조임을 확인하였다. 그러나 같은 과에 속하는 야행성 맹금류인 *Ninox novaeseelandiae*의 경우에는 전형적인 구조를 가지고 있으므로 맹금류만의 특징은 아닌 것으로 생각된다. 이 영역 사이에는 총 5개의 tRNA가 존재하였는데 proline을 제외한 4개의 tRNA는 매우 전형적인 네잎클로버 형태를 가지고 있었다 (그림 V-45, V-46).

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

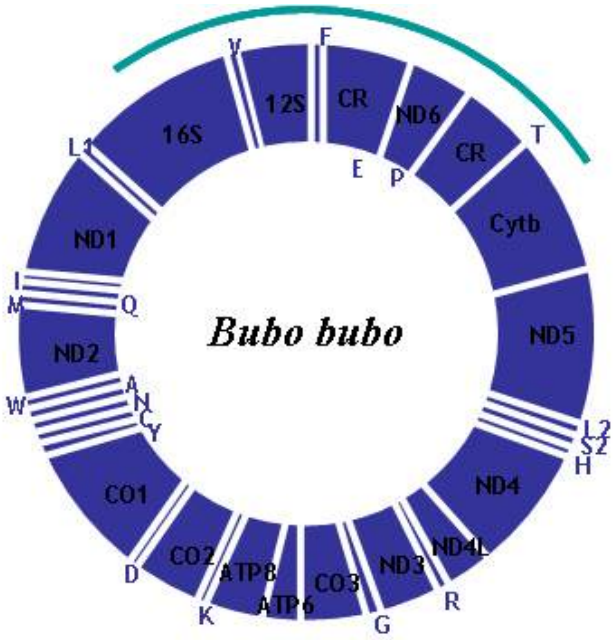


그림 V-45. 수리부엉이의 미토콘드리아 유전체
(외곽선은 현재 결정된 염기서열 부위)

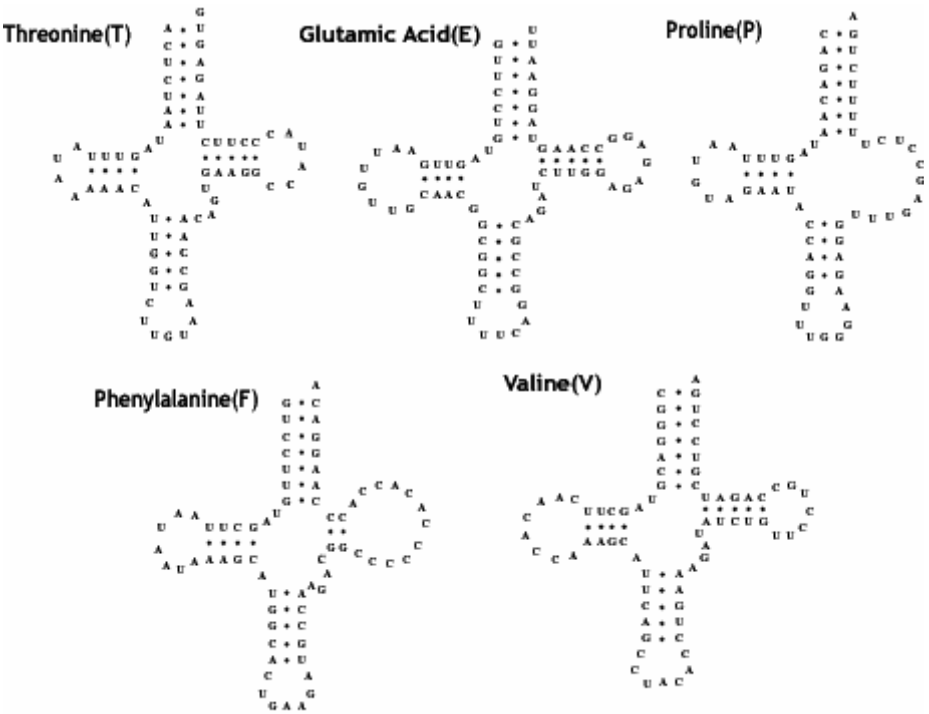


그림 V-46. 수리부엉이 미토콘드리아의 tRNA 2차 구조

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

▪ 수리부엉이의 염기서열 및 annotation (5,932bp)

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        10         20         30         40         50         60         70
ACTCAGGCTC AAACAACCCA CTAGGAATCA CATCAGACTG CGACAAAATC CCATTCCACC CCTACTTCTC
Cytb ⟶

 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         80         90        100        110        120        130        140
TATAAAAGAC ACCCTAGGAC TTGCACTAAT GCTCCTCCCC CTAACAACCT TAGCCTTATT CTCACCCACC

 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        150        160        170        180        190        200        210
CTACTCGGCG ACCCAGAAAA CTTTACACCA GCAAACCCCC TAGTCACCCC TCCCCACATC AAACCAGAAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        220        230        240        250        260        270        280
GGTACTTCCT ATTTGCCTAC GCCATTTTAC GCTCAATCCC CAATAAACTA GGAGGAGTAC TGGCTCTAGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        290        300        310        320        330        340        350
CGCTTCCGTG CTGATCTTAC TCTTAGTCCC ACTCCTCCAC AAATCCAAAC AACGTGCAAT GACCTTCCGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        360        370        380        390        400        410        420
CCACTCTCCC AATTTCTCTT CTGAACCCTA GCTGCCAACC TACTAATCCT AACATGAGTA GGCAGCCAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        430        440        450        460        470        480        490
CAGTAGAACA CCCATTTATC ATTATCGGCC AGCTGGCCTC CATTACCTAC TTCACAACGA TCCTCATCCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        500        510        520        530        540        550        560
TTTCCCTACA GTCAGCACCC TAGAAAACAA ACTACTCAAC TACTAAACTC TAATAGTTTA TAAAAACATT
                                                 *
                                            ⟵trnT ⟶

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        570        580        590        600        610        620        630
GGTCTTGTAA ACCAAAAAATG AGGGCTCCTC CCCTCTTAGA GTTCGCCCCC GCTAAAATAA TATCCCATAT
                                                 Control Rregion ⟶

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        640        650        660        670        680        690        700
TTATTTCTGC CAACTCTATC CAAGGCTTAC AGCCCAAAAA CCGCCGTTAA CCAACTCTTA ACTATAGAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        710        720        730        740        750        760        770
CCCCTAATAA AGGCAATCCC TCTGGCCCCC CCTTACCCCC CCGGCCTCTG GGATTGCCCT TTATGCCGCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        780        790        800        810        820        830        840
CGGGATGTAT AATTGTACAT TAAACCCCCC ACCACATAAA CATACCATGT ATGTATTAAT ATCATACCAT
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        850        860        870        880        890        900        910
CCATGTACTC AAAACATACC ATTCATGTAC CATACACATG CCATTAATGT ACTAAGTATA TAACATTAAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        920        930        940        950        960        970        980
GCTCTACCAA CACCACAACC ATGACAAAAT AACAGCCTAT CCATGACATA ACAACATCCC ATCCATGTAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        990       1000       1010       1020       1030       1040       1050
AACACACATA CCATCCATGT ACACCGAATA CCAAAATCCA TGCTATACGA ATATACAATC CATGCTCCCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1060       1070       1080       1090       1100       1110       1120
CAAACATACT ATCCATGTAA CACGACCAAC TATCCATTCC CTAAACACAT TACATCCATG CATCCTACCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1130       1140       1150       1160       1170       1180       1190
TACAACAGCC AACAGGATAA ACTCTTCTAG TCAACGGCTC TACTTTCAAG GTCTGATCAA GTAATGGTTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1200       1210       1220       1230       1240       1250       1260
CACCTAAAGC CAACTATCTC GCTTTCGTGC CTAAACCATG GCCCTCACGA TAAGTAATAA GGATAGGTCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1270       1280       1290       1300       1310       1320       1330
CAAGATACGA ATATTCCGCA CGGACAGCTA GCGCAGCTGT AACACCCCAT CTAGCCACGA ATTGCTCGTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1340       1350       1360       1370       1380       1390       1400
GGGCCCTCAG ACGGGAGACA AGGTTATTTA TTAATCGTAC TTCTCACGTG AAATCAGCTA CCTGCGGCGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1410       1420       1430       1440       1450       1460       1470
CAGTAAGATC CATCACGCCC AGCTTCAGGC CCATTCTTTC CCCCTACACC CCTAGCCCTA CTTGCACTTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1480       1490       1500       1510       1520       1530       1540
TGCGCCTCTG GTTCCTCGGT CAGGGCCATC TCTCTATTCA TCCCCTCAAC TTGCTCTTCA CCGATACATC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1550       1560       1570       1580       1590       1600       1610
TGGTTGGCTA TTTATCACCA TTCTCCCTCT TAATCGTATC ACCGGTAGTC CCTTTACCTC TCTTCCCTTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1620       1630       1640       1650       1660       1670       1680
TTTTTATTTT AGACTTCACT CTGCCCTTCA AGTGCAACGG GTCCTACGGT TTGTGGACAT GCGCATCTGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1690       1700       1710       1720       1730       1740       1750
TTATGCTATC GACAACAGTT CTCGCCCTCC CCAGAACGCT TTGATGTTAT GGCGTAAAGA TATGGGGAAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1760       1770       1780       1790       1800       1810       1820
CACCTTAACA CTGATGCACT TTGTCTTCCA TTCAGTACTG ATATCTTTCA CATAGCTCCT ATTATGTTGC
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1830       1840       1850       1860       1870       1880       1890
TATTTATTGA ATGGTTGCAG GACATAAACC TTTATATTAC CAATTGCTCT GAACTTTCTA ACAACACCAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1900       1910       1920       1930       1940       1950       1960
TAAAACCCAA CCAAAATTCG TTTCAAATCA AATCAAATTT TATCGTCACA CCCTTATCAC ACCATCAGCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1970       1980       1990       2000       2010       2020       2030
CCCAAGTTTC ATTAATAACC CGATCGTTCG TTCCACACAC AGTTTTATCC AAACTTTATT CGACGATAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2040       2050       2060       2070       2080       2090       2100
GCCTAAATAT CCCCACCAAC GACACAATCC AACAAACAAT CCCTACCTTT AACCAGAGGG CGCTCCAATT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2110       2120       2130       2140       2150       2160       2170
TACGCAACTA TCCCCCATCA ACCAGCATCA CTAAACAACC AACTAACAAC TCCCCCTCCT CATCTCTCCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2180       2190       2200       2210       2220       2230       2240
ACAACCAGCA CCCCAAAAAA CAAACCCCTT TACCATAACT CCAACAACCC ATAAAAACAC TGGTCTTAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         2250       2260       2270       2280       2290       2300       2310
CAAAAATGAA GGTTCTTCTC CTCCTAGAGT TCGCCGCCCC GCTCAGAAAA AGAGGACTTA AACCTCTACC
                                                trnP ←

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2320       2330       2340       2350       2360       2370       2380
TCCAACTCCC AAAGCTGGTA TTCTCCACTA AACTATTTTC TGATATCCCT AAACGGCCCG AATAGCCCCC
                                          *
                                          ●—

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2390       2400       2410       2420       2430       2440       2450
CGAGACAACC CCCGCACAAC CTCCAGAACA ACAAACAAAG TCAACAGCAA CCCCCACCCC GCCACCAAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         2460       2470       2480       2490       2500       2510       2520
ACATTCCTAC CCCCCACGAA TAGAAAAGAG AAACCCCACT AAAATCAAAC CGAACAAAAA ACGTACCCAC

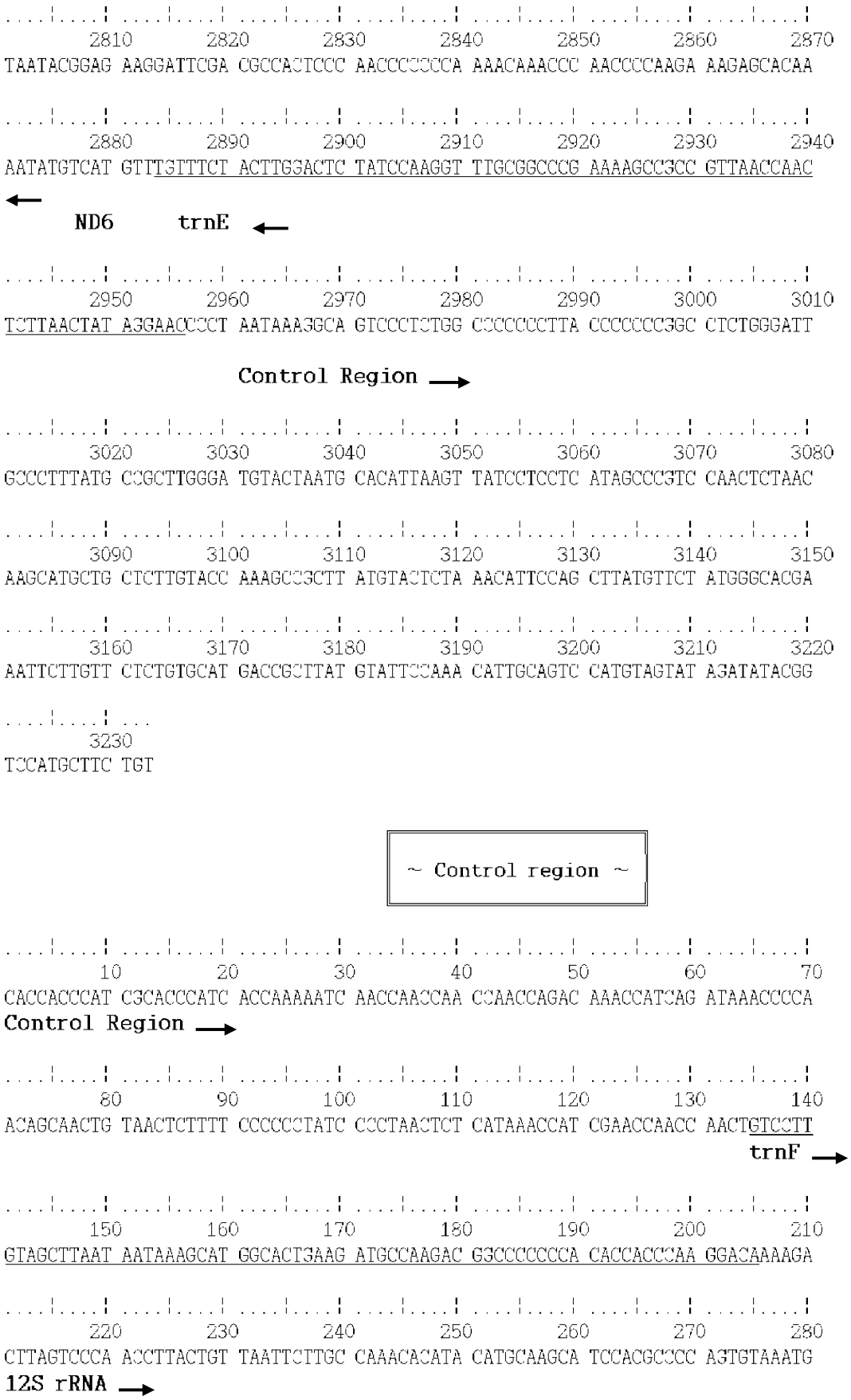
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2530       2540       2550       2560       2570       2580       2590
ACTATCTACC GCATCCACCA CAAACCCAGA ACCGCCAATT AACCCCCACC CAACCACCCC CGCCACAAGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2600       2610       2620       2630       2640       2650       2660
ACCACGACTA AACCCGCACC GCGCCCTACA ACACGCCAAT CCCCCCAAGC CTCCGGGAAC GGGTCCGCCG

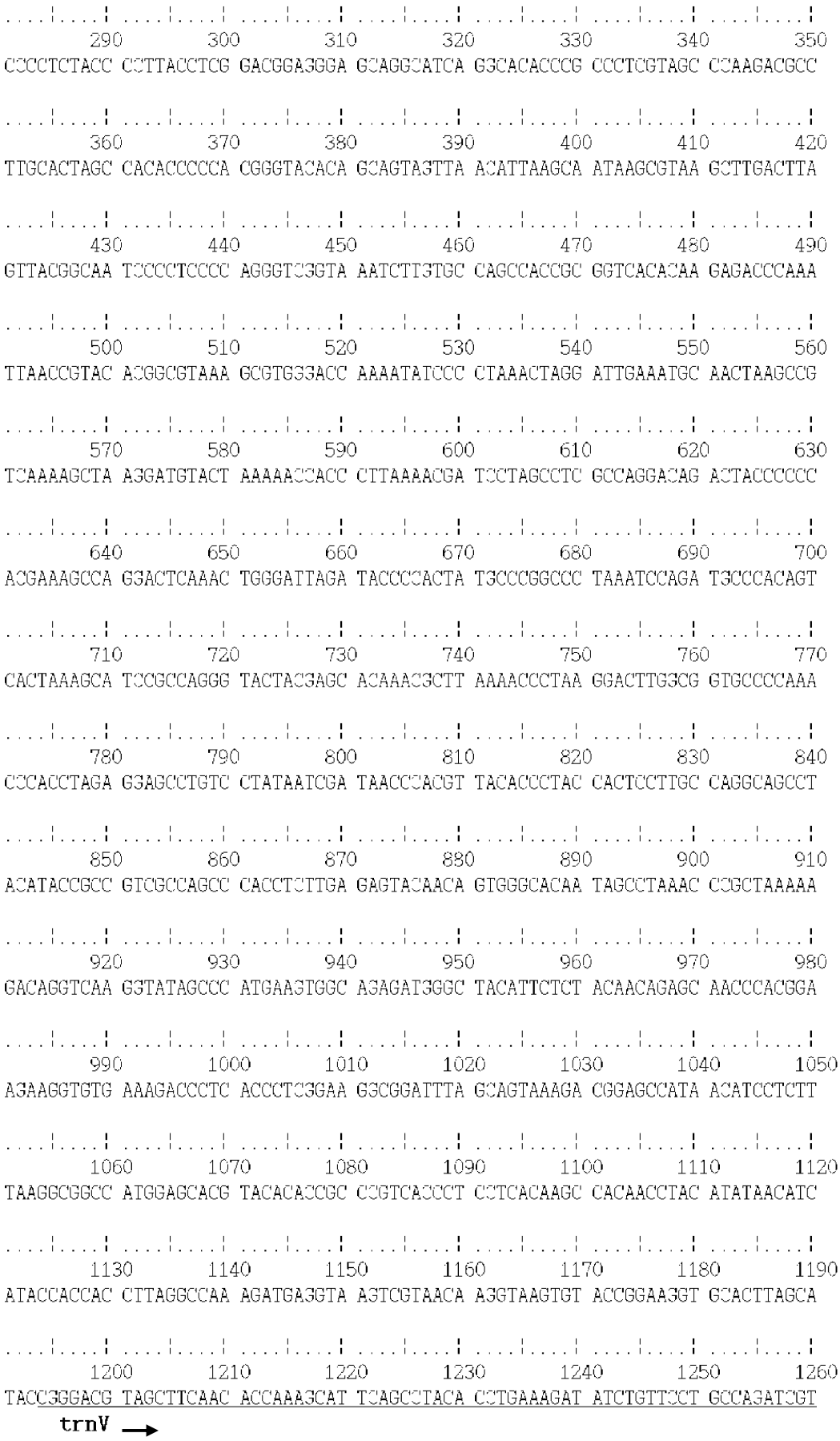
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2670       2680       2690       2700       2710       2720       2730
CTAAAGCCAC CGAATACACA AACACCACCA ACATTCCCCC TAAATACACC ATAAACACGA CCAACGACAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2740       2750       2760       2770       2780       2790       2800
AAACGAAACC CCCAAACTCA ACAACCATCC ACAACCACAA ACTGACCCCA ACACCAACCC CACAACCCCG
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1270       1280       1290       1300       1310       1320       1330
CCTGAAGCCA ACCTCTAGCC CAACCCCAAA CCAACAGAAT ACACTCCCCC CCTCAACTAA AACATTCTCC

      16S rRNA ⟶

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1340       1350       1360       1370       1380       1390       1400
TTAACCTAGT ATAGGCGATA GAAAAGAACC CCCCCGAGCG CAATAGAGAC CATGTACCGT AAGGGAAAGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1410       1420       1430       1440       1450       1460       1470
TGAAATAACA ATGAAACCCA AAGCAACAAA CAGCAAAGAT AGACCCTTGT ACCTTTTGCA TCATGATTTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1480       1490       1500       1510       1520       1530       1540
GCAAGAACAA CCAAGCAAAG CGAACTTGAG CTTGCCTCCC CGAAACCTGA GCGAGCTACT TGCAAGCAGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1550       1560       1570       1580       1590       1600       1610
TGTACTGCCG AGCGAACCCA TCTCTGTCGC AAAAGAGTGG GACGACTTGC TAGTAGAGGT GAAAAGCCTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1620       1630       1640       1650       1660       1670       1680
TCGAGCCAGG TGATAGCTGG TTGCCTGTGA AACGAATCTA AGTTCCCCCT TGGCCCCATC CCCACCTGAC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1690       1700       1710       1720       1730       1740       1750
ACACGACCCG ACATGAGAGG GCCAAGAGTG CTTTAAAGGG GGTACAGCCC CTTTAAAATA GGATACAACC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1760       1770       1780       1790       1800       1810       1820
TCTACTAGAG GATAACACCC CGCTACACCC CACAGTAGGC CTTTAAGCAG CCACCAACAA AGAGTGCGTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1830       1840       1850       1860       1870       1880       1890
AAAGCTCAAC ACCACAAAAA TCCAATGAAC AGCAAGACTC CGTTCTCACT AACAGGCTAA TCTATGAACA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1900       1910       1920       1930       1940       1950       1960
TAGAAGAATC AATGCTAAAA TGAGTAACCT GGGCCCTCCC CTCTTAAGCG CAAACTTACA TCACCACATT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1970       1980       1990       2000       2010       2020       2030
ATTAACAGAC CAAACCATAT ATGCTAAATC CAAGCAAGAA TAAAATATTA ACTAACCCTG TTAGCCCAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2040       2050       2060       2070       2080       2090       2100
CCAGGAGCGC CTGCTAGAAA GATTTAAATC TGTAAAAGGA ACTAGGCAAA CCCAAGGCCC GACTGTTTAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2110       2120       2130       2140       2150       2160       2170
CAAAAACATA GCCTTCAGCC CACCAAGTAT TGAAGGTGAC GCCTGCCCGG TGACTCTGTG TTCAACGGCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2180       2190       2200       2210       2220       2230       2240
GCGGTATCCT AACCGTGCAA AGGTAGCGCA ATCAATTGTC CCATAAATCG AGACCTGTAT GAACGGCCAA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2250       2260       2270       2280       2290       2300       2310
ACGAGGTCTT AACTGTCTCT TACAGATAAT CAGTGAAATT GATCCCCCTG TACAAAAGCA GGGATACACC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         2320       2330       2340       2350       2360       2370       2380
CACAAGACGA GAAGACCCTG TGGAACTTAA AAATCAACGG CCACCCCACA AGCCTCCCCC TTTCCCCCGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2390       2400       2410       2420       2430       2440       2450
AGGACTCCCC CCAATACACC AAACTGGCCA CTATTTTTTG GTTGGGGCGA CCTTGGAGAA AAACAAACCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2460       2470       2480       2490       2500       2510       2520
TCCAAAACAA AGACCACACC TCTTGACCAA GAGCAGCACC TCAACGTACT AACAGTAACC AGACCCAATA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2530       2540       2550       2560       2570       2580       2590
GCAATTGAGC AATGAACCAA GCTACCCCAG GGATAACAGC GCAATCCCCC CCAAGAGCCC CTATCGACGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2600       2610       2620       2630       2640       2650       2660
GGGGGTTTAC GACCTCGATG TTGGATCAGG ACATCCTAAT GGTGCAGCCG CTATTAAGGG TTCGTTTGTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....
        2670       2680       2690
CAACGATTAA CAGTCCTACG TGATCTGAGT TCAGACCGG
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.8. 올빼미 (*Strix aluco*)



- **계통 (Systematics)**
  Phylum Chordata 척삭동물 문
  Class Aves 조 강
  Order Strigiformes 올빼미 목
  Family Strigidae 올빼미 과
- **기상 (Diagnosis)**
  몸길이 : 380㎜,
- **서식처 (Habitat)**
  전국적으로 분포하며 평지, 산지 등

그림 V-47. 올빼미 (*Strix aluco*)

올빼미는 머리가 둥글고 귀깃털이 없는 것이 특징이며, 전국적으로 분포하나 흔치 않는 텃새이다. 주로 밤에 사냥을 하고 수리부엉이와 마찬가지로 작은 새나 설치류 등을 사냥한다. 그 수가 점차 감소하고 있어 환경부지정 멸종위기 Ⅱ급 종으로 분류되어 있다 (그림 V-47).

3.8.1. Total genomic DNA 추출

올빼미의 근육조직을 약 25mg 정도 떼어내어 DNeasy Tissue kit (Qiagen, CO.)를 이용하여 total genomic DNA를 추출하였다. Genomic DNA 추출 후 추출된 DNA의 양을 측정하기 위하여 전기 영동하여 DNA의 농도를 측정하였다.

3.8.2. Primer 고안

비교적 보존적인 영역으로서 알려진 CO1 유전자 영역의 universal primer와 조류에 특이적인 cytochrome b 유전자 영역의 primer를 이용하여 짧은 PCR을 수행하고 그 결과를 바탕으로 올빼미에 특이적인 long PCR primer를 고안하였다 (표 V-24).

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 V-24. 올빼미에서 사용된 primer 염기서열

Primer name	Primer Sequence	Gene region
HCO2198	5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT GA-3'	CO1 gene
LCO	5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G -3'	
H-16065	5'-CTA AGA AGG GTG GAG TCT TCA GTT TTT GGT TTA CAA GAC-3'	Cytochrome b gene
L-14995	5'-CTC CCA GCC CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AAC TTC G-3'	
Strix1	5'-TTT CCA CCC TCA TTC CTA CTC CTA TT-3'	CO1-Cyt b 약 8kb
Strix2	5'-GTT TAT TGG GGA TTG AGC GTA GGA TG-3'	
Strix3	5'-CAG AAG ATT ATT ACA AAG GCA TGG GC-3'	Cyt b - CO1 약 8.2kb
Strix4	5'-AAT TCC ACC CCT ACT TCT CCA TAA AA-3'	

3.8.3. PCR 증폭

표 V-25. CO1과 Cyt b 사이를 증폭하기 위한 Long PCR 조건
(Strix1-Strix 2 primer 이용)

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1.5㎕
Reverse primer	1.5㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	16.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	19.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	10 cycles
56℃	30sec	
68℃	8min	
92℃	10sec	20 cycles
56℃	30sec	
68℃	8min +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 V-26. CO1과 Cyt b 사이를 증폭하기 위한 Long PCR 조건
(Strix3-Strix4 primer 이용)

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1.5㎕
Reverse primer	1.5㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	16.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	19.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	15 cycles
58℃	30sec	
68℃	8min	
92℃	10sec	25 cycles
58℃	30sec	
68℃	8min +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

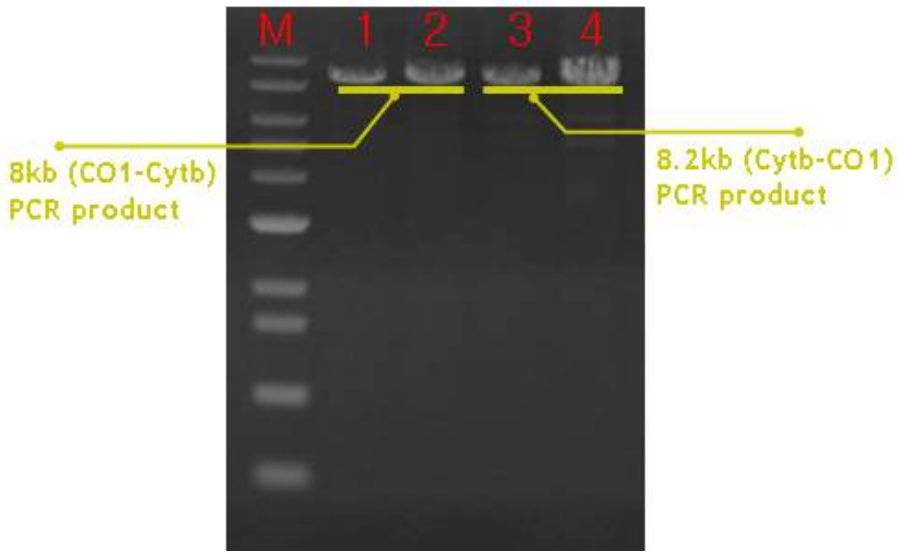


사진 V-48. PCR product 사진
M: marker, 1 and 2: 8kb 영역, 3 and 4: 8.2kb 영역

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.8.4. 염기서열 결정

올빼미의 전체 미토콘드리아 유전체 가운데 12S rRNA 유전자에서 CO1유전자 사이의 3,630 bp의 염기서열과 cytochrome b 유전자 840bp가 결정되었다. 유전자의 배열은 일반적인 조류의 미토콘드리아 유전체의 배열과 동일하였다. 이 영역 사이에는 총 8개의 tRNA가 있으며 모두 매우 전형적인 네잎클로버 형태를 가지고 있었다 (그림 V-49, V-50).

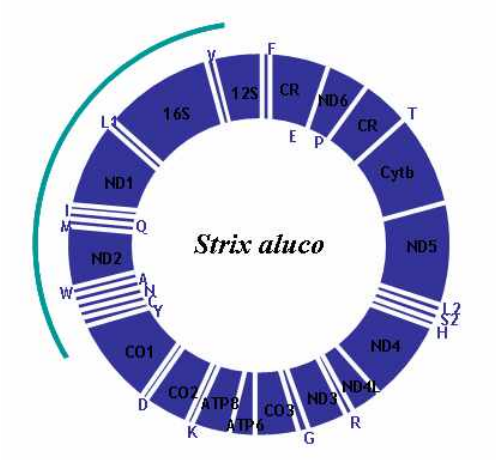


그림 V-49. 올빼미의 미토콘드리아 유전체 (외곽선은 분석 완료된 염기서열 부위)

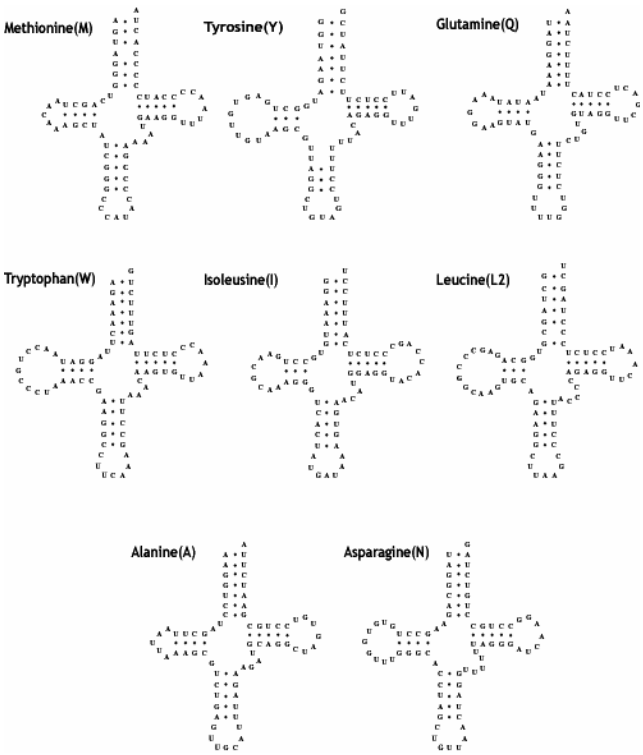


그림 V-50. 올빼미 미토콘드리아의 tRNA 2차 구조

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

▪ 올빼미의 염기서열 및 annotation(4,470bp)

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        10         20         30         40         50         60         70
CACCATCATG CAGCATCCGC ATCCCAGTGT GAATGCCCAT CCACCCTGCC AGAGGTAGAA GGAGCAGGCA
```

12S rRNA ⟶

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        80         90        100        110        120        130        140
TCAGGCACGC ACCCTTGTAG CCCAAAACGC CTTGCATCAG CCACACCCCC ACGGGCACTC AGCAGTAGTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       150        160        170        180        190        200        210
AACATTAAGC AATAAGCGTA AGCTTGACTT AGTTATGGCA ACACCTCCTC AGGGTCGGTA AATCTTGTGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       220        230        240        250        260        270        280
CAGCCACCGC GGTCACACAA GAGACCCAAA TTAACCGTAC ACGGCGTAAA GAGTGGGACC ACAATATCCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       290        300        310        320        330        340        350
CCAAACTAGG GTTAAAATAC AACCAAGCTG TTATAAGCCC AAGATGCACT AAAACCCACC ATTAAAACGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       360        370        380        390        400        410        420
CCCTAGCAAT CAAGATAAAC AGCCCCCCAC GAAAGCCAGG ACTCAAACTG GGATTAGATA CCCCACTATG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       430        440        450        460        470        480        490
CCTGGCCCTA AATCCAGATA TTCATCACCA CTAGAACATC CGCCAGGGTA CTACGAGCAC AAACGCTTAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       500        510        520        530        540        550        560
AACCCTAAGG ACTTGGCGGT GTCCCAAACC CACCTAGAGG AGCCTGTCCT ATAACCGATA ACCCACGATG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       570        580        590        600        610        620        630
CACCCAACCA CCCCTCGCCG AACAGCCTAC ATACCGCCGT CGTCAGTCCA CCTTTTGAGA GCACAATAGT

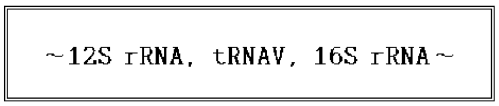
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       640        650        660        670        680        690        700
GGGCACAACA GCTCTCACGC TAAAAAGACA GGTCAAGGTA TAGCCCATGG GGTGGAAGAG ATGGGCTACA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       710        720        730        740        750        760        770
CTCTCTGCCA ACAGAGAACC TTTCACCGGAA AAGGGTGTGA AACCTCACCC TCAGAAGCCG GATTTAGCAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       780        790        800        810        820        830        840
TAAAGACGGA GCCATAATAC CCCCTTTAAG ACGGCCCTGG GACACGTACA TACCGCCCGT CACCCTCATC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       850        860        870        880
ACAAGCCACA CCCCCCACGA AATTATACCA CCACCCAGGC
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38




```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        10        20        30        40        50        60        70
CGCCTGGTTT ATCAAAAACA TAGCCTTCAG CACACCAAGT ATTGGAGGTG ACGCCTGCCC AGTGACACCA
16s rRNA ⟶

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        80        90       100       110       120       130       140
TGTTCAACGG CCGCGGTATC CTAACCGTGC GAAGGTAGCG CAATCAATTG TCTCATAAAT CGGGACCTGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       150       160       170       180       190       200       210
ATGAATGGCT AAACGAGGCC TTAACTGTCT CTTACAGACA ATCAGTGAAA TTGATCCCCC CGTGCAAAAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       220       230       240       250       260       270       280
CAGGGATACA CCCATAAGAC GAGAAGACCC TGTGGAACTT GAAAATCACC GGTCACCACA TACGAACCTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       290       300       310       320       330       340       350
CCCCCTAAAG GACATTCCCC CAACACAGCA TTGACCGCCA TTTTTCGGTT GGGGCGACCT TGGAGAAAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       360       370       380       390       400       410       420
CAAATCCTCC AAAACAAAGA CCACACCTCT TAACCAAGAG CAACATCTCA ACGTGCCAAT AGCAACCAGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       430       440       450       460       470       480       490
TCCAATAACA ATTGAACAAT GAACCAAGCT ACCCCAGGGA TAACAGCGCA ATCTCCTCCA AGAGCCCCTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       500       510       520       530       540       550       560
TCGACGAGGA GGTTTACGAC CTCGATGTTG GATCAGGACA TCCTAATGGT GCAGCCGCTA TTAAGGGTTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       570       580       590       600       610       620       630
GTTTGTTCAA CGATTAATAG TCCTACGTGA TCTGAGTTCA GACCGGAGCA ATCCAGGTCG GTTTCTATCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       640       650       660       670       680       690       700
ATGACGGACT CTTCCCAGTA CGAAAGGACC GGAAGAGTGA GGCCAATGCC ACCACAGCAC GCCCCCAAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       710       720       730       740       750       760       770
AAACAATGAC CTCAACTCAA TTACCAACAC CTACATTCGC CCTAGACAAG GGCAGCTAGC GTGGCAGAGC
    trnL2 ⟶

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       780       790       800       810       820       830       840
CCGGCAAGTG CAAAAGGCTT AAGCCCTTTA CCCCAGAGGT TCAAATCCTC TCCCTAGCTT CCAACACCTA
                                                                ND1 ⟶
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        850        860        870        880        890        900        910
CCTATGATCA ACCTTATTAT AACACTATCC TACATCGTCC CAATCCTAGT CGCTGTAGCC TTCCTTACTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        920        930        940        950        960        970        980
TCGTAGAACG GAAAATCTTA AGCTATATAC AAGCCCGAAA AGGCCCCAAC ATCGTAGGCC CATTCGGCCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        990       1000       1010       1020       1030       1040       1050
CCTGCAACCT GTAGCTGACG GTGTAAAACT ATTTATCAAA GAACCCATCC AACCATCCAC ATCTTCACCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1060       1070       1080       1090       1100       1110       1120
CTCCTATTTA CCATAACCCC TCTACTAGCC CTCCTACTCG CACTTACAAT CTGAACCCCC CTCCCCCTAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1130       1140       1150       1160       1170       1180       1190
CATTTCCCCT TGCCGACCTT AACCTCGGCC TCCTATTCTT GCTGGCTATA TCAAGCCTAG CAGTATACTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1200       1210       1220       1230       1240       1250       1260
CATTCTCTGA TCTGGCTGAG CCTCAAACTC AAAATATGCC CTGATCGGGG CACTACGAGC TGTAGCACAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1270       1280       1290       1300       1310       1320       1330
ACTATCTCCT ACGAAGTCAC ACTGGCCATC ATCCTCCTGT CCGTAATCAT ACTAAGCGGC AACTACTCCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1340       1350       1360       1370       1380       1390       1400
TAAACACCCT CGCCACAACA CAAGAACCTT TATGCCTCCT CTTTTCAACA TGACCCCTGA CAATAATATG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1410       1420       1430       1440       1450       1460       1470
ATTCATCTCC ACTCTGGCTG AGACCAACCG TGCCCCATTT GACCTCACTG AAGGGGAATC CGAACTAGTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1480       1490       1500       1510       1520       1530       1540
TCAGGATTTA ACGTAGAGTA TGCCGCAGGA CCATTCGCCC TATTCTTCCT AGCTGAATAC GCAAACATTA

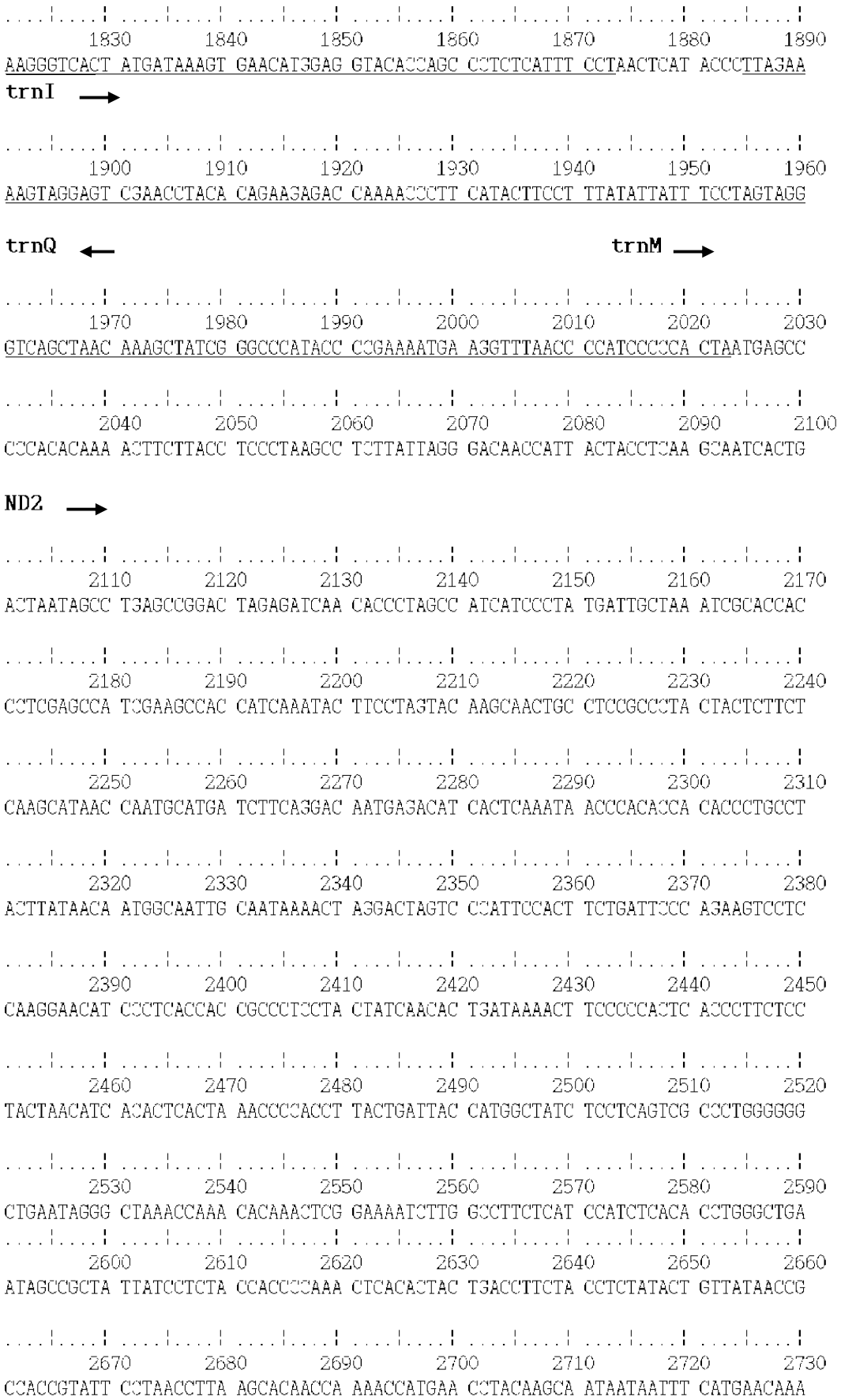
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1550       1560       1570       1580       1590       1600       1610
TACTAATAAA CACACTAACT GCAATCCTAT TCCTTAATCC CAACATACTA ACCCTGTCCT CAGAAATACT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1620       1630       1640       1650       1660       1670       1680
CCCAACAACT CTAGCTACAG AGACCCTACT CCTATCATCC TGCTTCCTAT GAATTCGCGC CTCCTACCCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1690       1700       1710       1720       1730       1740       1750
CGATTTCGAT ATGACCAACT CATGCACCTT CTCTGAAAAA ACTTCCTACC CCTAACACTC GCATTATGCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1760       1770       1780       1790       1800       1810       1820
TCTGACACAC TAGCATACCA ATCTGCTATG CAGGACTGCC CCCTTGCCTA AGGAAATGTG CCTGAACGCA
                                                        *
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2740       2750       2760       2770       2780       2790       2800
AGCCCCCGTA CTAAACACAA CCCTCATACT AACCCTACTC TCACTGGCAG GACTGCCGCC TCTAACCGGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2810       2820       2830       2840       2850       2860       2870
TTCCTACCAA AATGACTTAT CCTCCAAGAA CTAACCAACC AGGAACTAGC CCCCACAGCC ACAATTATCG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2880       2890       2900       2910       2920       2930       2940
CCATACTATC ACTCCTAGGA TTATTCTTCT ACCTACGACT CGCATACTAC TCAACAATCA CCCTTCCGCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2950       2960       2970       2980       2990       3000       3010
AAACTCTACA ACCCACATAA AACAATGACA CACCAATAAC CCAACAAGCA CCACCATTGC CTCCCTCACC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3020       3030       3040       3050       3060       3070       3080
TCCTCATCAA CATTACTCCA ACCACTCTCC CCAACAATCC TAGCCTCCAT CTAGAAACTT AGGATAACCT
                                                          trnW ⟶

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3090       3100       3110       3120       3130       3140       3150
GCCCTAAACC GAAGGCCTTC AAAGCCTTAA ACAAGAGTTA AACCCTCTTA GTTTCTGCTA AGATTCGCAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3160       3170       3180       3190       3200       3210       3220
GACACTAGCC TGCATCTTCT AAATGCAACT CAGACGCTTT AATTAAGCTA GGACCTTACT AGACAGATGG
trnA ⟵

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3230       3240       3250       3260       3270       3280       3290
GCCTTGATCC CATAAAAACC TAGTTAACAG CTAGGTGCCC AAACCACACA GGCTTCTGCC TACCAGACCC
trnN ⟵

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3300       3310       3320       3330       3340       3350       3360
TGGCGCATTC TCAATGCACA TCAATGAGCT TGCAACTCAA CATGAATTCT TCACCACAGG GCCGATAAGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3370       3380       3390       3400       3410       3420       3430
AGAGGAATCA AACCTCTGTA AAAAGGACTA CAGCCTAACG CTTACAACAC TCAGCCATCT TACCTATGAC
trnY ⟵

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3440       3450       3460       3470       3480       3490       3500
ATTCATCAAT CGATGATTAT TCTCAACCAA CCACAAAGAC ATTGGCACCC TCTACCTAAT CTTCGGCACA
CO1 ⟶

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3510       3520       3530       3540       3550       3560       3570
TGAGCCGGCA TAGTTGGCAC TGCCCTTAGC CTGCTCATCC GAGCCGAACT AGGCCAACCC GGAACACTTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
3580       3590       3600       3610       3620       3630
TAGGTGACGA TCAAATCTAC AATGTAATCG TTACCGCCCC TGCCTTTGTA ATAATCTTCT
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38




```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        10         20         30         40         50         60         70
TTTTCGTAAC TATTAGAGTG CTAGTAGTTG AGTAGTTTGT TTTCTAAGGT GCTGATTATG GGAAAGAGAA

Cytb ⟶

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        80         90        100        110        120        130        140
TAAGGATTGT TATGAAGTAG GTAGCAGAGG CTAGTTGGCC AATGATGATG AAGGGGTGTT CTACTGGTTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       150        160        170        180        190        200        210
GCTGCCTACT CATGTTAGGA TTAGGAGGTT GGTGACTAAG GCTCANAAGA GGAGTTGGGA GAGTGGGCGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       220        230        240        250        260        270        280
AAGGTTATTG TGCGTTGTTT GGACTTATGG AGGAGGGGAA TTAAAAGTAG GATTAGTACG GAGGCAGCTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       290        300        310        320        330        340        350
GTGCAAGTAC TCCTCCTAGT TTATTGGGGA TTGAGCGTAG GATGGCGTAG GCAAACAGGA AGTATCACTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       360        370        380        390        400        410        420
TGGTTTAATG TGGGGTGGGG TGATTAGGGG GTTTGCTGGT GTAAAATTTT CTGGGTCGCC AAGTAGGTTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       430        440        450        460        470        480        490
GGTGCGAATA GAGCTAGGGT TGTTAGGGGT AGGAGTATTA ATGTCAGTCC TAGGGTGTCT TTTATGGAGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       500        510        520        530        540        550        560
AGTAGGGGTG GAATGGGATT TTGTCACAGT CCGATGAAAT TCCTAGGGGG TTGTTTGANC CTGAGTCGTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       570        580        590        600        610        620        630
GAGGAAGGTT AGGTGAATTA GTGTAAGACC TGCAATTAGA AAGGGGAGAA GGAAGTGTAG GGCGAAGAAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       640        650        660        670        680        690        700
 CGTGTTAGTG TTGGATTGTC TACTGAGAAT CCGCCTCAGG CTCATTCTAC AAGGGTTTGG CCGATATAGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       710        720        730        740        750        760        770
GGATGGCTGA AAACAGATTA GTAATGACGG TTGCCCCTCA GAATGATATT TGGCCTCATG GGAGAACGTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       780        790        800        810        820        830        840
NCCTACGAAG GCTGTTGCTA TAAGGGTCAG TAAAAGAATG ACACCTGTGT TTCAGGTCTC TTTGTATAGG
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.9. 남생이 (*Chinemys reevesi*)



그림 V-51. 남생이

- 계통 (Systematics)
  Phylum Chordata 척삭동물 문
  Class Reptilia 파충 강
  Order Testudinata 거북이 목
  Family Emydidae 남생이 과
- 기상 (Diagnosis)
  등딱지 길이 : 20~25cm
  최대성장크기 : 47㎝(암컷,1991)
- 서식처 (Habitat)
  주로 강이나 늪지역 등 물이나 물가에 생활하는 반수생 거북

우리선조의 민화에 많이 등장하였으며, 전국 하천에 흔하게 볼 수 있었던 파충류로써 자리잡고 있었으나, 하천의 콘크리트 직강화 골재 채취 등으로 산림감소와 소실 및 하천의 오염과 외래 종(붉은귀거북이)의 확산으로 인하여 급격히 감소하고 있다. 민간이나 한방에서는 자양, 강장, 보신 등으로 효과가 있다고 알려져 약으로 이용하려고 무분별한 남획을 하여 더욱더 감소를 부추기고 있다 (그림 V-51).

3.9.1. Total genomic DNA 추출

남생이의 근육조직을 25mg 정도 떼어내어 DNeasy Tissue kit (Qiagen, CO.)의 DNA 추출 protocol과정을 통해 total genomic DNA를 추출하여 PCR을 위한 template로 사용하였다 (그림 V-52).

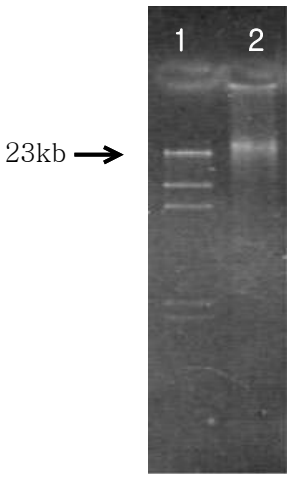


그림 V-52. Total genomic DNA
1. λ/HindⅢ marker
; (위에서부터 23kb, 9.4kb, 6.5kb, 4.3kb, 2.3kb)
2. 남생이 DNA

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.9.2. primer 고안

후생동물의 계통분류에 널리 이용되고 있는 미토콘드리아 DNA중 16S rRNA, CO1 유전자 좌위의 universal primer set (Folmer et al., 1994; 표 27)을 이용하여 우선적으로 16S rRNA, CO1 유전자 사이의 약 4.2kb를 PCR 중합반응으로 수행하였다. 나머지 미토콘드리아 염기서열 전체 (약 11~12kb)를 결정하기 위해서 파충류에서 universal하게 사용되는 primer set(Kumazawa et al., 2004; 표 26)을 사용하여 모두 4부분(CO1~CO3; 약2kb, CO3~ND4; 약 2.5kb, ND4~CYTB; 약 4kb, CYTB~16S rRNA; 약 3kb)으로 나누어 PCR 중합반응을 실행하였다.

표 V-27. 남생이에서 사용된 primer 염기서열

Primer name	Primer Sequence
16SA	5'-CGC CTG TTT AHC AAA AAC AT-3'
16SB	5'-CCG GTY TGA ACT ACR ATC A-3'
HCO2198	5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT GA-
LCO1490	5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'
rCO1-4L	5'-TAC TCA GAC TAC CCA GAY GC-3'
uCO3-1L	5'-ATA GTW GAC CCM AGC CCA TGA CC-3'
rND4-3L	5'-CCA AAA GCC CAY GTA GAR GC-3'
uCO3-1H	5'-AAY GTC TCG TCA TCA TTG-3'
rND4-2H	5'-GAT GTT AAK CCG TGG GCR ATT AT-3'
rCytb-1H	5'-GCG TAG GCR AAT AGG AAG TAT CA-3'

3.9.3. PCR 증폭

표 V-28. 16S rRNA와 CO1 사이 (약 4.2kb) 증폭을 위한 Long PCR 조건

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1.5㎕
Reverse primer	1.5㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	16.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	19.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	10 cycles
50℃	30sec	
68℃	5min	
92℃	10sec	20 cycles
50℃	30sec	
68℃	5min +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

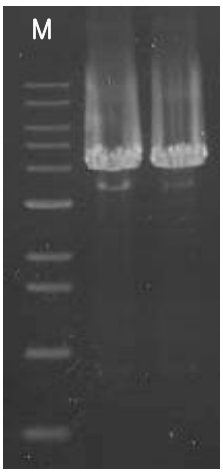
IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 V-29. CO1~CO3 (약2kb), CO3~ND4 (약 2.5kb), ND4~CYTB (약 4kb), CYTB~16S rRNA (약 3kb) 증폭을 위한 Long PCR 조건

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1.5㎕
Reverse primer	1.5㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	16.5㎕
Total	25㎕

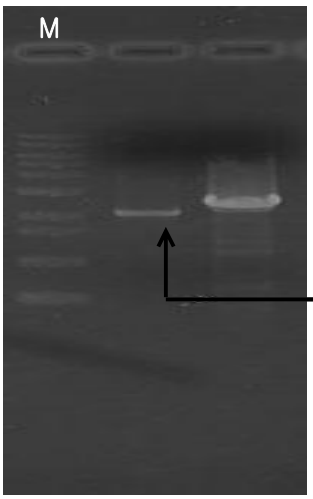
mix 2	
10X buffer	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	19.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	10 cycles
47℃	30sec	
68℃	2min 15sec	
92℃	10sec	20 cycles
47℃	30sec	
68℃	2min 15sec +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	



Ca. 4.2kb
PCR product

그림 V-53. 약 4.2kb PCR prodcut
M : 1kb DNA ladder



CO1~CO3(Ca. 2kb)
PCR product
CO3~ND(Ca. 2.5kb)
PCR product

그림 V-54. CO1~CO3(Ca. 2kb)와 CO3~ND4 (Ca. 2.5kb) PCR product
M : 1kb DNA ladder

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

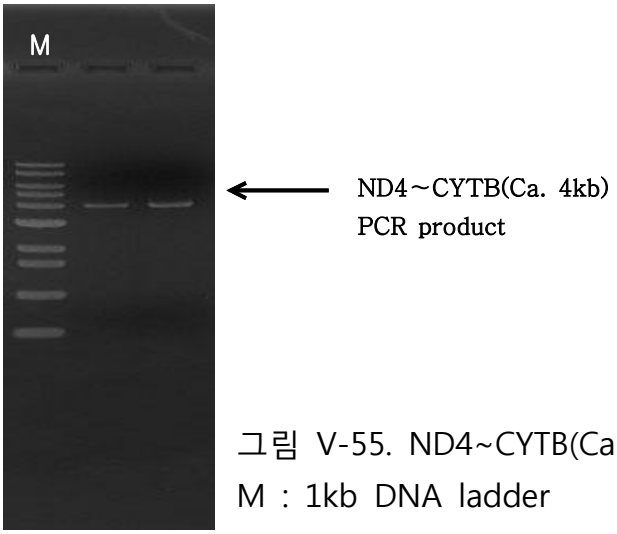


그림 V-55. ND4~CYTB(Ca. 4kb) PCR product
M : 1kb DNA ladder

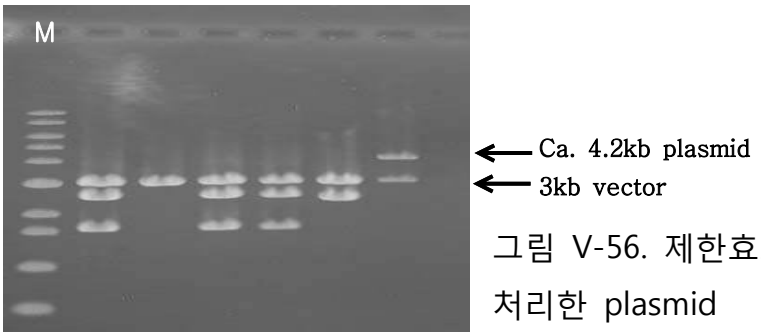


그림 V-56. 제한효소(EcoR1)로
처리한 plasmid

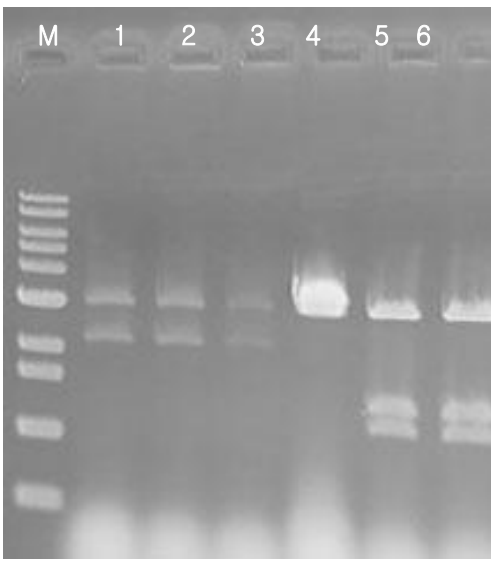


그림 V-57. 제한효소(EcoR1)로
처리한 plasmid
M : 1kb DNA ladder
1~3 : Ca. 2kb PCR product 삽입됨
5, 6 : Ca. 2.5kb PCR product 삽입됨

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.9.4. 염기서열 결정

남생이의 전체 미토콘드리아 유전체 염기서열 중에서 CO1에서 CO3 유전자 사이의 일부분인 2,200bp를 결정하였고, ND4에서 cytb 유전자 사이의 일부분인 2,105bp를 결정하였다. 이어서, 16S rRNA에서 CO1 유전자 사이에 4,167bp의 염기서열을 결정하였다. 16S rRNA에서 CO1 유전자 사이의 배열은 전형적인 배열순서를 보여주고 있었고, tRNA의 2차 구조 또한 전형적인 네잎클로버 형태를 갖고 있었다 (그림 V-58).

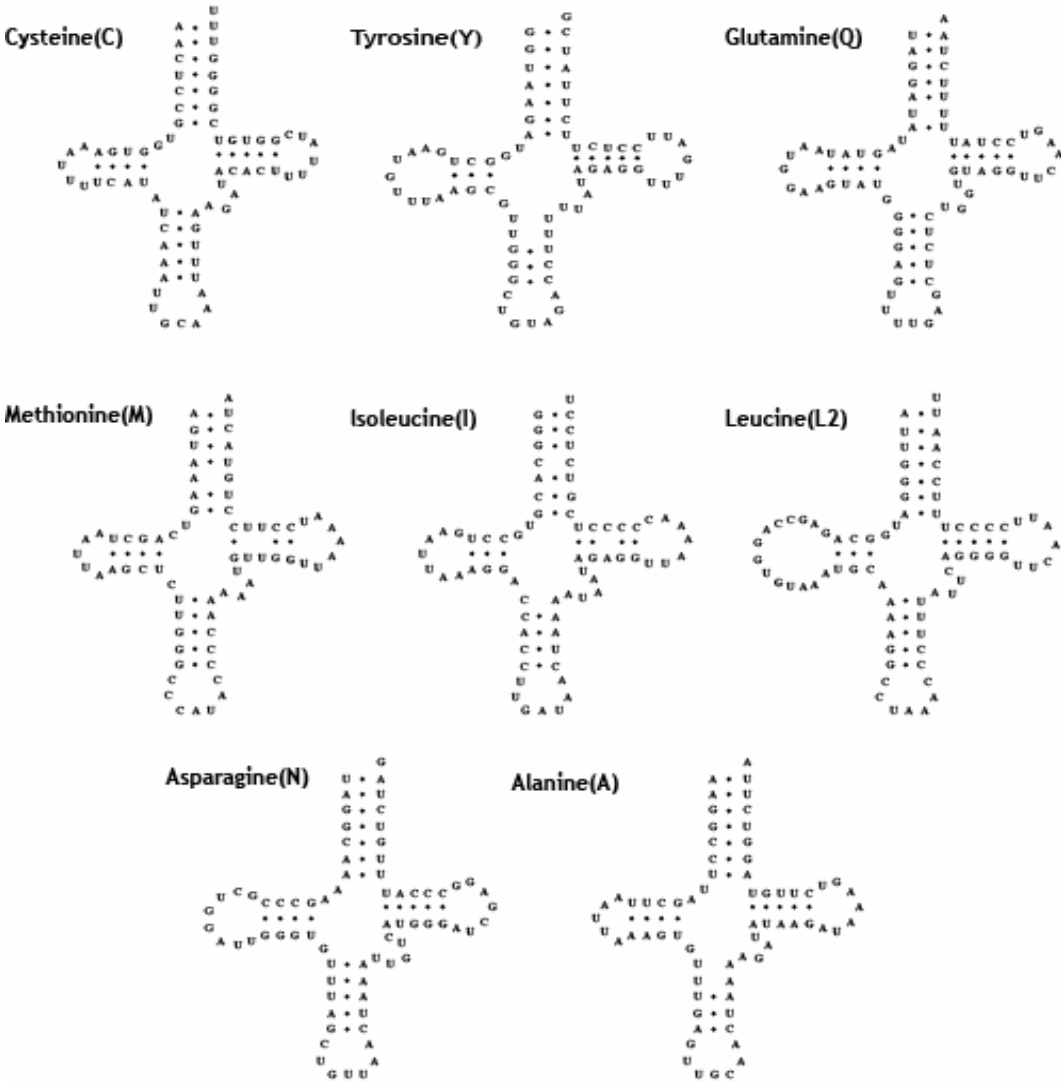


그림 V-58. 남생이의 미토콘드리아 유전체 중에서
16S rRNA와 CO1 유전자 사이에 있는 tRNA의 구조

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

▪ 남생이의 염기서열 및 annotation (4,305bp)

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         10         20         30         40         50         60         70
TACTCAGACT ACCCAGACGC ATACACCCTA TGAAATTCTA TCTCATCAAT CGGATCTCTA ATCTCCCTAA
```

C01 →

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         80         90        100        110        120        130        140
TAGCAGTAAT TATAATAATA TTCATTATTT GAGAAGCATT CTCTTCAAAA CGAAAAGTAA TAACAGTTGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        150        160        170        180        190        200        210
ACTCACAACT ACTAATGTTG AATGATTACA CGGCTGCCCA CCCCCATACC ACACCTACGA AGAGCCAGCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        220        230        240        250        260        270        280
CATGTTCAAA CCCAAGAAAG GAGGGAATCG AACCCCCTTA AACTAGTTTC AAGCCAATCA CATAACCTTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        290        300        310        320        330        340        350
ATGTTTCCTT CTTATAAGAC GTTAGTAAAA CACATTACTT AACCTTGTCA AGGTTAAATT ATAGGTTTAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        360        370        380        390        400        410        420
ACCCTTTACG ACTTAATGGC ACATCCATTT CAATTAGGAT TTCAAGACGC AATATCGCCC ATCATAGAAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        430        440        450        460        470        480        490
AACTACACCA CTTTCATGAT CATACCCTAA TAATTGTATT CTTAATTAGC ACCCTAGTAC TATATATCAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        500        510        520        530        540        550        560
CACCTTAATA ATAACAACTA AACTAACATA TACCAACACT ATAAATGCTC AAGAAGTAGA AATAATTTGA

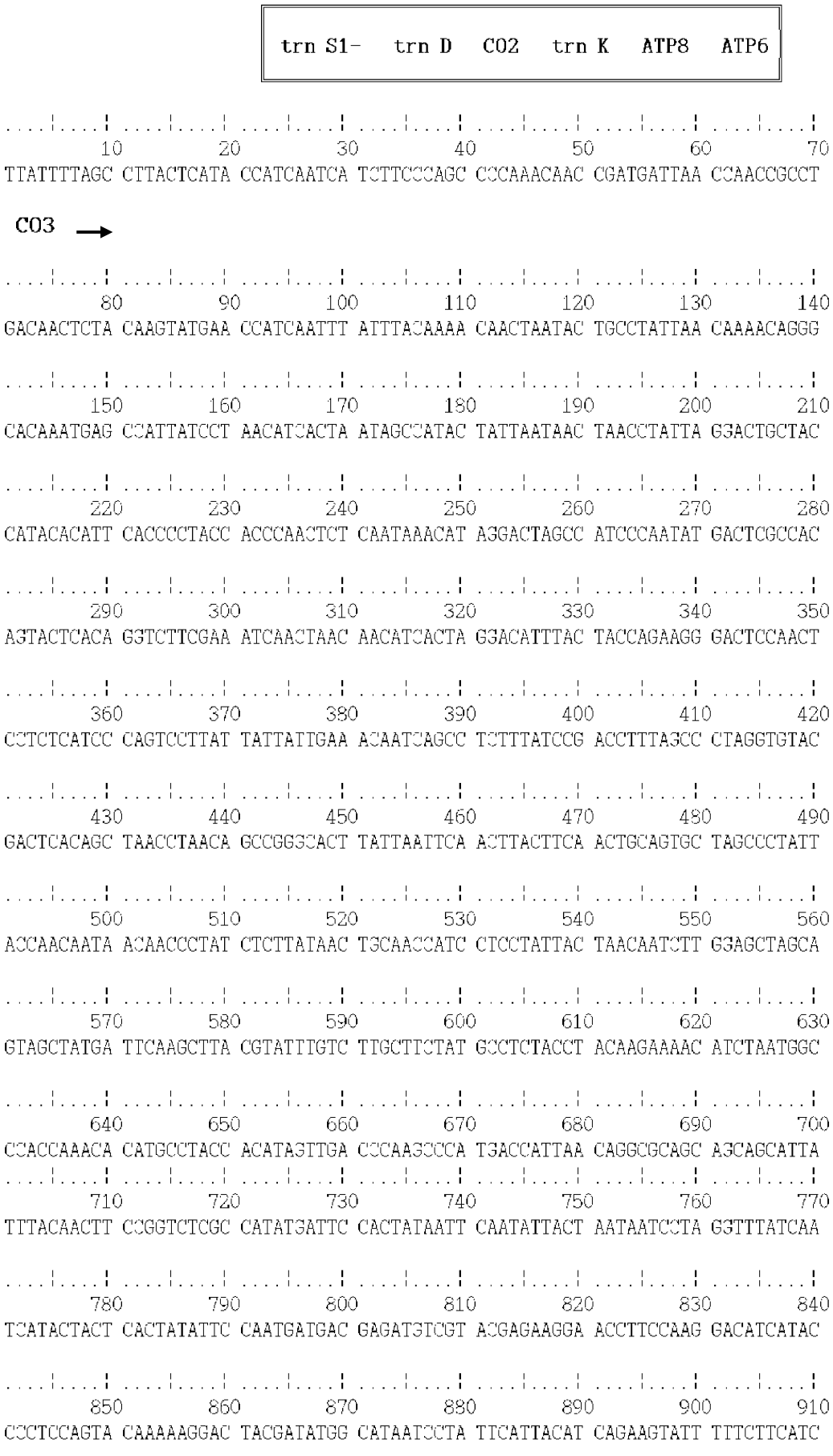
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        570        580        590        600        610        620        630
ACTGTCTTAC CAGCTATCGT CCTAATCACC ATCGCACTGC CATCCCTACG AGTCCTTTAC CTAATAGACG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        640        650        660        670        680        690        700
AAATCAACAA CCCACACCTG ACTATTAAAG CCATAGGACA TCAATGATAT TGAACATATG AGTACACTGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        710        720        730        740        750        760        770
TTACAAAAAT CTTGAATTTG ACTCCTATAT GATCCCAACC CAAACCTTCC GAACGGACAT TTCCGACTTC

....|....| ..
        780
TAGAAGTAGA CC
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        920        930        940        950        960        970        980
GGATTCTTCT GAGCTTTTTA CCATTCAAGC CTAGCCCCCA CACCAGACCT AGGAGGATGT TGACCCCCAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        990       1000       1010       1020       1030       1040       1050
CAGGAATTAC ACCACTAAAC CCATTTGAAG TGCCCCTACT AAACACAGCA GTCTTATTAG CCTCAGGTGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1060       1070       1080       1090       1100       1110       1120
AACAATCACA TGAGCTCACC ACAGCTTAAT AGAAGCCAAC CGAAGCCAAA CCACTCAAGC CCTTAGTCTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1130       1140       1150       1160       1170       1180       1190
ACAATTTTAC TGGGACTATA CTTCACAGCA TTACAAGCCA TAGAATACTA TGAAGCACCA TTCACAATTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1200       1210       1220       1230       1240       1250       1260
CTGATGGTGT ATACGGTTCT ACATTCTTTG TCGCAACAGG CTTCCACGGA TTACACGTAA TCATTGGATC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1270       1280       1290       1300       1310       1320       1330
CACATTCTTA ATTGTATGCC TACTACGACA AATTAAATAC CATTTCACCT CCACCCACCA CTTTGGATTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1340       1350       1360       1370       1380       1390       1400
GAAGCAGCTG CTTGATACTG ACATTTTGTA GACGTTGTAT GGCTCTTCTT ATACGTATCA ATCTATTGAT

....|....| ....|...
       1410
GAGGCTCATA CTTTTCTA
```

trn G ND3 trn R ND4L

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         10         20         30         40         50         60         70
CTATCCTGTT GACTCACCCC AATAATAATC ATAGCTGGCC AAAACAATAT AACCATAGAA CCTACTCCAC
```

ND4 →

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         80         90        100        110        120        130        140
GAAAACGAAC TTTTATCTTT ATTACCATTT TACTACAAAT CTCACTAATT CTAGCTTTTT CAACAACAGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        150        160        170        180        190        200        210
ATTAATCATA TTCTTCATCG CATTTGAATC TACATTACTC CCCACACTAG TAATCATTAC ACGTTGAGGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        220        230        240        250        260        270        280
GGCCAAATAG AACGACTAAA CGCCGGAACC TACTTCTTAT TTTACACTCT TATCGGGTCT CTGCCACTAT
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        290        300        310        320        330        340        350
TAGTAGCCCT CTTAACCACG CAAACCTTCA GCGGCACCCT ATCTATTTGC ACATTGCAAC TATCCACCTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        360        370        380        390        400        410        420
CCCTAGCATA ATAAACCCAT GAACCCACAC AATATGATGA CTCGCACTAT TTACTGCTTT CATAATTAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        430        440        450        460        470        480        490
ATACCCTTAT ACGGACTACA CCTATGATTA CCTAAAGCAC ACGTAGAGGC CCCAATCGCA GGATCAATAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        500        510        520        530        540        550        560
TCCTAGCAGC AGTGTTACTT AAACTAAGGG GATATGGCAT TATCCGTATA ACAATAACAC TAGCCCCGCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        570        580        590        600        610        620        630
GTTAAAAATG CTCTCCTACC CCTTCATAAT ATTAGCACTA TGAGGAGTAA TCATAACTGG CTTTATCTGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        640        650        660        670        680        690        700
CTACGCCAAA CAGACCTAAA ATCATTAATT GCTTATTCAT CCGTAGGTCA TATAGGCTTA GTTATCGCTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        710        720        730        740        750        760        770
CAGCACTAAC ACGAACTGAA TGAGCATGTA CCGGAGCCAT CACACTTATA ATCGCCCACG GCTTAACATC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        780        790        800        810        820        830        840
ATCAATACTT TTCTGCCTAG CCAACACAAA CTATGAACGA ACCAATAGCC GAACACTACT TTTAGCCCGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        850        860        870        880        890        900        910
AACATACAAC TACTACTACC CTTAATAGGA CTATGATGAT TCTCAGCTAG TCTGACCAAC ATGGCCCTTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        920        930        940        950        960        970        980
CGCCAACCAT TAATCTAATA GGAGAACTAA CCATTATTGT CTCACTATTC AATTGATCAA ATACTACAAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        990       1000       1010       1020       1030       1040       1050
CCTAATAACA GGATTAGGAA CCCTACTAAC CGCCGCCTAT ACCCTATACA TACTAATCAC CACCCAATGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1060       1070       1080       1090       1100       1110       1120
GGAGAAACCC CTTCATACAC AAAAACAATC CCCCCTACCC ACACACGAGA ACATCTACTC ATAATACTTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1130       1140       1150       1160       1170       1180       1190
ATATACTACC AATAGCACTA CTAATAGCAA AACCAGAATT AATCCAAGGC ACCTAAACAC CTTGCATCGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1200       1210       1220       1230       1240       1250       1260
TAATATAGTT TCAAAACAAA CGTTAGACTG TGGCTCTAAA AATAGGAGTT AAAATCTCCT TATAAACCGA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ...
       1270       1280       1290       1300       1310
GAGAGGTATT ATACAATAAG AACTGCTAAC TCCTATATCT GAGACTAACC ACC
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38




```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         10         20         30         40         50         60         70
ACAACTCATT CATCGATCTN CCAAGTCCCA ATAAAATGTA TGGGGGATGA AACTTCGGAT CAATAAAGAC

Cytb ⟶

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         80         90        100        110        120        130        140
ACGATGGGTA ATCATACAAA TCACACNGGA GTGTAAATAG CAATACACTA ATCACCAGAC ATCTCACTAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        150        160        170        180        190        200        210
CATGCTCATC AGTAGCCCAT ATCACCGGAG ACGTACAATA CGGATGACTT ATCCGCAATA TACGTGCCAA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        220        230        240        250        260        270        280
CGGGGCCTCC ATGTTCTTCA TATGCATTTA CCTCCACATA GGCCGAGGAC TTTAATATGG ATCATACTTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        290        300        310        320        330        340        350
TACAAAGAAA CCTGAAACAC AGGAATCATC CTACTATTCC TAACTATAGC CACTGCATTC GTAGGTTACG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        360        370        380        390        400        410        420
TCCTACCATG AGGTCAAATA TCATTCTGGG GCGCCACTGT CATCACCAAC CTACTATCGG CCACCCCTTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        430        440        450        460        470        480        490
CATCGGCAAT ACCCTTGTAC AATGAATTTG AGGGGGGTTA TCAGTAGACA ATGCCACCCT AACCCGATTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        500        510        520        530        540        550        560
TTCACCTTTC ACTTTCTACT TCCCTTTGCT ATTGCCGGTT TAGCAGCTGT ACATTTACTC TTCCTCCACG

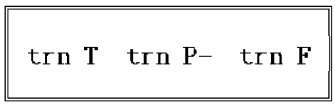
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        570        580        590        600        610        620        630
AAACCGGATC AAACAATCCA ACAGGATTAA ACTCAAACGC CGACAAAATC CCTTTCCACC CCTACTTCTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        640        650        660        670        680        690        700
ATACAAAGAC TTACTAGGCC TCATCTTAAT ACTTACTCTC CTACTTATCC TAGCATTGTT CTTCCCAAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        710        720        730        740        750        760        770
CTCCTAGGTG ACCCGGACAA CTTCACACCA GCTAATCCAT TATCCACTCC CCCCCACATT AAACCAGAAT

....|....| ....|....| ..
        780        790
GATACTTCCT ATTTGCCTAC GC
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38




```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        10         20         30         40         50         60         70
CGCCTGTTTA TCAAAAACAT AGCCCCTAGC CACACAAGTA TTAGGGGTAA TGCCTGCCCA GTGACACTGT
16s rRNA ⟶

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        80         90        100        110        120        130        140
TAAACGGCCG CGGTATCCTA ACCGTGCAAA GGTAGCGTAA TCACTTGTCT TTAAATAAA GACTAGAATG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       150        160        170        180        190        200        210
AATGGCCAAA CGAGGTTCTA CCTGTCTCTT ACAAATAATC AGTGAAATTG ATCTTCCTGT GCAAAAGCAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       220        230        240        250        260        270        280
GAATAACATT ATAAGACGAG AAGACCCTGT GGAACTTCAA ATACAAATCA ACTATCCTCG ATACCCGCCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       290        300        310        320        330        340        350
ACGGGCCCAT ATCAAACTAG CACATGATTT ATATTTTCGG TTGGGGCGAC CTTGGAGTAA AATAAAACCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       360        370        380        390        400        410        420
CCAATAAAAG AGTTCTCTCT AAACCTAGAC CTACCACCCA AAGTGCTTCC GGCAAAACGA TCCAATATAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       430        440        450        460        470        480        490
TTGATCAACG AACCAAGCTA CCCCAGGGAT AACAGCGCAA TCCCATCCTA GAGTCCCTAT CGACGATGGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       500        510        520        530        540        550        560
GTTTACGACC TCGATGTTGG ATCAGGACAT CCTGATGGTG CAGCCGCTAT CAAGGGTTCG TTTGTTCAAC

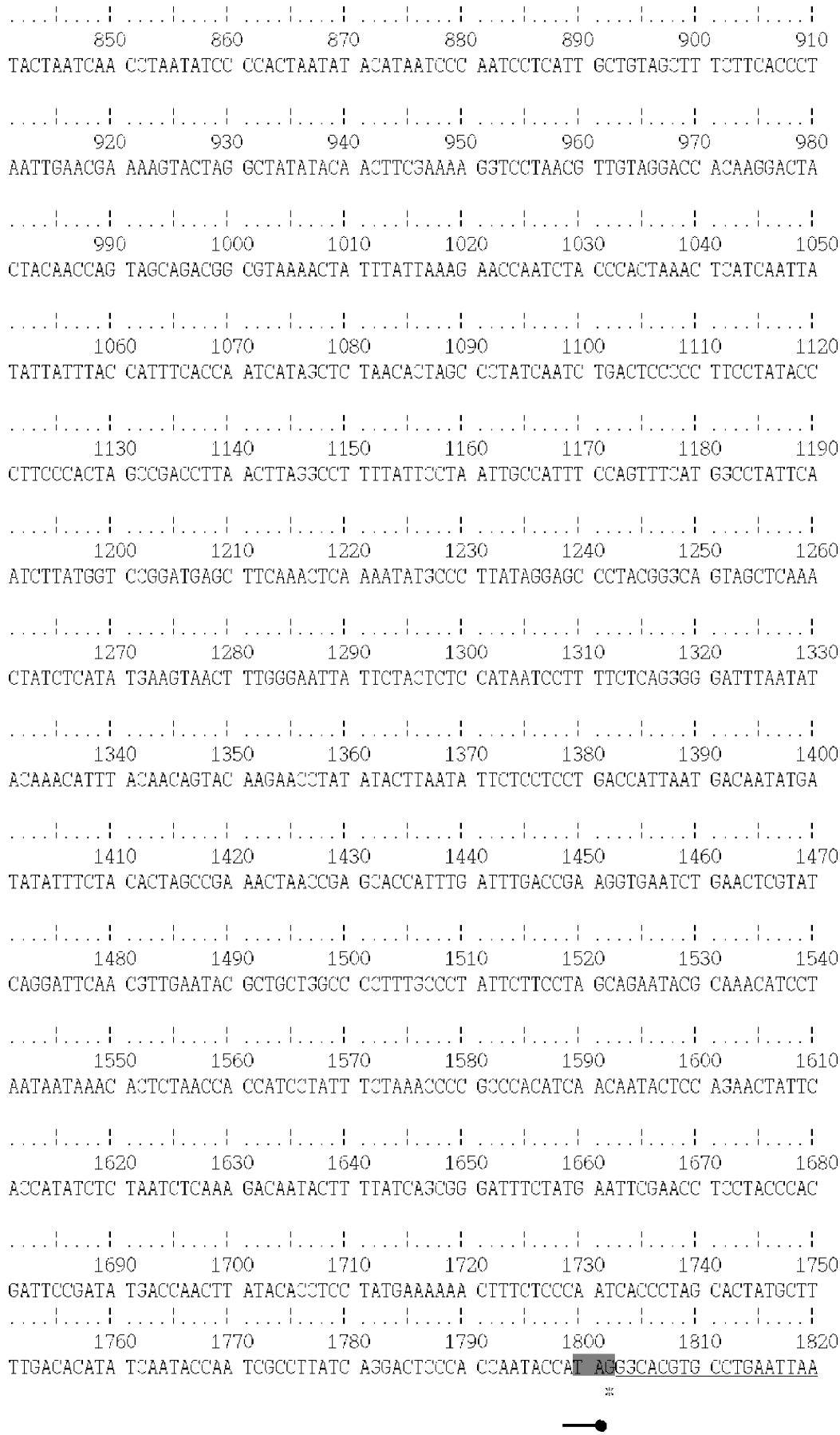
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       570        580        590        600        610        620        630
GATTAATAGT CCTACGTGAT CTGAGTTCAG ACCGGAGCAA TCCAGGTCGG TTTCTATCTA TAAACTTAAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       640        650        660        670        680        690        700
TCTTTTCTAG TACGAAAGGA CCGAAAAGAC AAGGCCTATA CTAAAAACAA GCCTTACCTT ACATTAGTGA

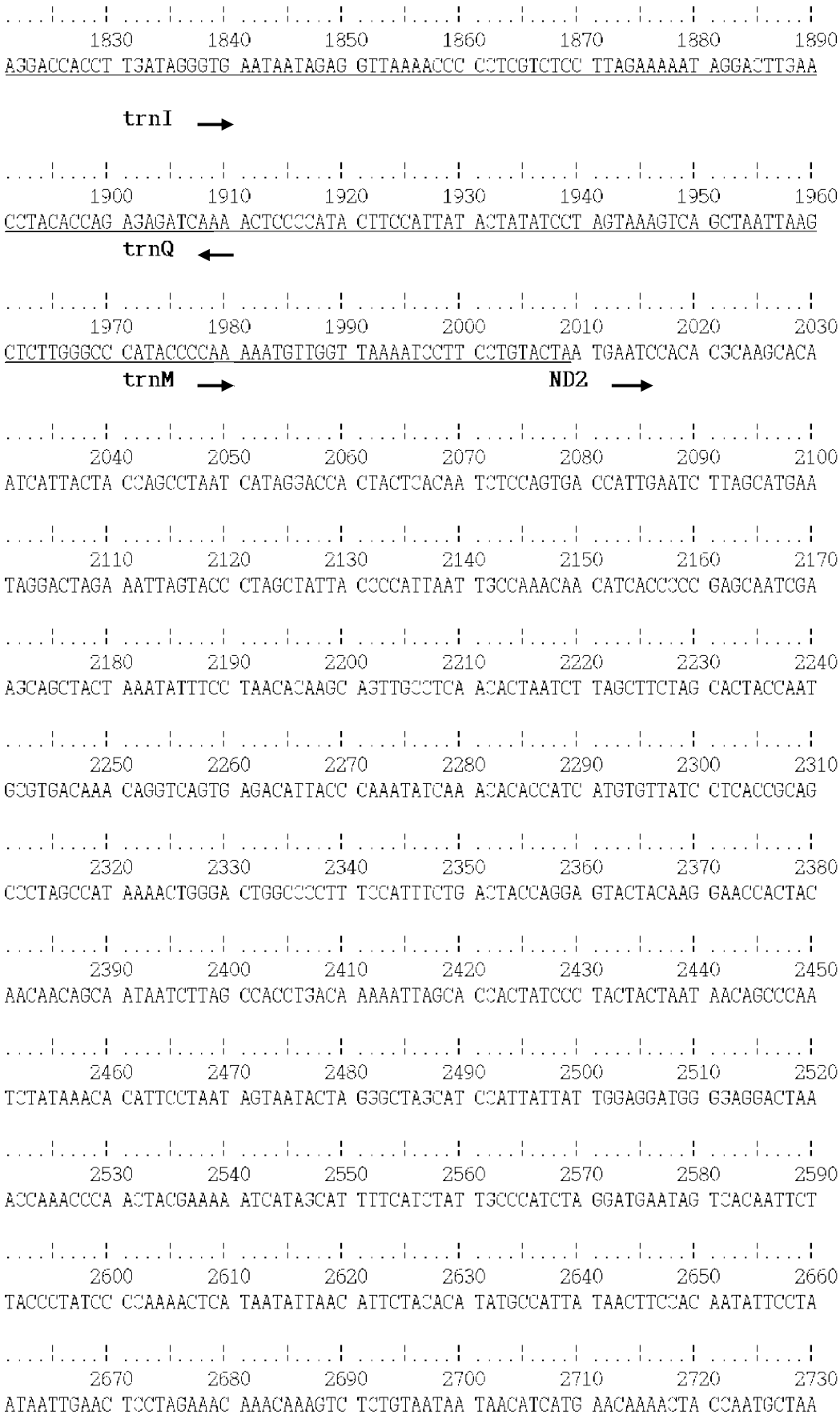
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       710        720        730        740        750        760        770
AAACAACTCA ACTAATAATA AGACAAACAA ATCACAGCCC TAAAAAAGGG CCTAATTGGG ATGGCAGAGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       780        790        800        810        820        830        840
CAGGTGTAAA TGCAAAAGGC CTAAACCCTT TATTCAGGGG TTCAATTCCC CTTTCCAATT ATGAAAATAC
trnL2 ⟶                                                          ND1 ⟶
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2740       2750       2760       2770       2780       2790       2800
ACGCCACAAT AATACTCATC CTTATATCAT TAGCAGGTCT GCCACCACTA ACAGGATTTA TACCCAAATG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2810       2820       2830       2840       2850       2860       2870
ATTAATCATT CAAGAATTAT CTAAACAACA CATATACTTC ACCGCCACTA CAATAATTAT TATATCAATA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2880       2890       2900       2910       2920       2930       2940
CTAAGCCTAT TCTTCTATCT ACGAACCTCA TACCAAGCAA CCATTACATT ATCCCCAAAC TCCACCAGCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2950       2960       2970       2980       2990       3000       3010
CCTCACAACA ATGACGGCAC AAGCCCAACC AAACACACTA TCTCACCCCA ATAATTATAC TATCCACCAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3020       3030       3040       3050       3060       3070       3080
ATTACTTCCG ATCGTACCAA CCTTATTAGC CATCACCTAG AAACTTAGGA TCTGACCACA CCCAAACCAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3090       3100       3110       3120       3130       3140       3150
GGGCCTTCAA AGCCCCAAAC AAGAGATAAA ACCTCTTAGT TTCTGCTAAG ACCTACAAGA CTTTATCTTA
                                                    *
                                                trnA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3160       3170       3180       3190       3200       3210       3220
TATCTAATGA ATGCAACTCA AACACTTTAA TTAAGCTAAG GCCTTACTAG ACAAATGGGC CTCGATCCCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3230       3240       3250       3260       3270       3280       3290
TGACAATTTA GTTAACAGCT AAACACCCAA TCCAGCGGGC TTTTGCCTAC TTTTCCCGCT CTCTAAAAAA
      trnN
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3300       3310       3320       3330       3340       3350       3360
GCGGGAAAAC CCCGACACCG ATAAAAGTGT ATCTTCAAAT TTGCAATTTG ATATGAAAAT TTCACCACGG
      trnC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3370       3380       3390       3400       3410       3420       3430
AGTTCGATAA GAAGAGGAAT CAAACCTCTA TAAAAAGGTC TACAGCCCAA CGCTTAAACA TTCAGCCATC
 trnY
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3440       3450       3460       3470       3480       3490       3500
TTACCTGTGT TTTTAACCCG CTGATTTTTT TCTACAAACC ACAAAGACAT TGGCACCCTA TATTTGATTT
           CO1
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3510       3520       3530       3540       3550       3560       3570
TCGGGGCCTG AGCAGGTATA GTAGGCACAG CATTAAGTTT ATTAATCCGC GCAGAATTAA GCCAACCTGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3580       3590       3600       3610       3620       3630       3640
AGCCCTCCTA GGGGACGACC AAATCTATAA TGTTATCGTT ACAGCCCATG CCTTTATCAT AATTTTCTTC
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3650       3660       3670       3680       3690       3700       3710
ATGGTTATAC CCGTTATAAT CGGCGGCTTT GGAAACTGAC TTGTACCTTT AATGATCGGA GCGCCAGATA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3720       3730       3740       3750       3760       3770       3780
TGGCATTCCC ACGTATAAAC AATATAAGCT TCTGGCTTCT ACCCCCATCC CTACTTTTAC TTCTGGCCTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3790       3800       3810       3820       3830       3840       3850
CTCAGGAATT GAAGCAGGCG CAGGCACAGG CTGAACTGTG TACCCACCAT TAGCTGGAAA CCTAGCCCAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3860       3870       3880       3890       3900       3910       3920
GCTGGCGCCT CTGTAGATCT AACTATCTTT TCCCTTCACC TAGCAGGTGT GTCATCAATT TTAGGGGCCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3930       3940       3950       3960       3970       3980       3990
TCAACTTTAT CACCACAGCA ATTAACATAA AATCTCCAGC TATATCACAG TACCAAACAC CCTTATTTGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4000       4010       4020       4030       4040       4050       4060
GTGATCTGTA CTTATTACAG CCGTCCTATT ACTACTCTCG CTACCAGTAC TCACCGCAGG TGTTACTATA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4070       4080       4090       4100       4110       4120       4130
TTACTCACAG ACCGAAACCT AAATACAACC TTCTTCGACC CTTCAGGGGG AGGGGACCCA ATTTTATATC

....|....| ....|....| ....|....| ....|..
        4140       4150       4160
AACACCTGTT TTGATTTTTT GGTCACCCTG AAGTTAA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.10. 구렁이 (*Elaphe schrenckii*)



- 계통 (Systematics)
  Phylum Chordata 척삭동물 문
  Class Reptillia 파충 강
  Order Squamata 뱀 목
  Family Colubridae 뱀 과
- 기상 (Diagnosis)
  몸길이 : 1.5~1.8m
- 서식처 (Habitat)
  민가의 돌담이나 방죽, 밭둑의 돌틈에 서식.

그림 V-59. 구렁이

구렁이 또한 여느 멸종위기 동물군과 마찬가지로 무분별한 밀렵행위와 그로인한 서식지 훼손으로 인하여 현재 한국산 구렁이 종은 모두 멸종 위기종으로 지정하고 있다 (그림 V-59).

3.10.1. Total genomic DNA 추출

구렁이 근육조직의 일부 (25mg)를 떼어내어 DNeasy Tissue kit (Qiagen, Co.)의 추출과정을 이용하여 total genomic DNA를 추출한다.

3.10.2. Primer 제작

일부 선행연구를 통하여 밝혀진 뱀 과의 염기서열을 이용하여, 12S rRNA-CO1, CO1-ND5, ND5-16S rRNA 3부분의 유전자 영역을 증폭하기 위한 primer를 제작하였다 (표 V-30).

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 V-30. 구렁이에서 사용된 primer 염기서열

Primer name	Primer Sequence	Gene region
rCO1-4L	5'-TAC TCA GAC TAC CCA GAY GC-3'	CO1
uCO3-1L	5'-ATA GTW GAC CCM AGC CCA TGA CC-3'	~CO3
rND4-3L	5'-CCA AAA GCC CAY GTA GAR GC-3'	CO3
uCO3-1H	5'-AAY GTC TCG TCA TCA TTG-3'	~ND4
rND4-2H	5'-GAT GTT AAK CCG TGG GCR ATT AT-3'	ND5
rCytb-1H	5'-GCG TAG GCR AAT AGG AAG TAT CA-3'	~16S rRNA
rCytb-2L	5'-TGA GGA CAA ATA TCM TTC TGA GG-3'	Cytb
r16S-5H	5'-TTT ATY RRG YAA CCA GCT ATC-3'	~16S rRNA
r16S-2L	5'-CRA CTG TTT ACC AAA AAC AT-3'	16S rRNA
rND2-2H	5'-ATT GAT GAG WAK GCT ATR ATT TTT CG-3'	~ND2
rND2-1L	5'-GCC CCM YTM CAC TTC TGA-3'	ND2
rCO1-1H	5'-TAG TGG AAR TGW ART GKG CTA CTA C-3'	~CO1
rCO1-4L	5'-TAC TCA GAC TAC CCA GAY GC-3'	CO1
uCO3-1H	5'-AAY GTC TCG TCA TCA TTG-3'	~CO3

3.10.3. PCR 증폭

표 V-31. CO1~CO3 (약2kb), CO3~ND4 (약2.5kb), ND4~Cyt (약4kb), Cytb~16S rRNA (약3kb), 16S rRNA~ND2 (약 3kb), ND2~CO1 (약3kb)를 증폭하기 위한 Long range-PCR 조건

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1.5㎕
Reverse primer	1.5㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	16.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	19.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	10 cycles
47℃	30sec	
68℃	2min15sec	
92℃	10sec	20 cycles
47℃	30sec	
68℃	2min 15sec +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

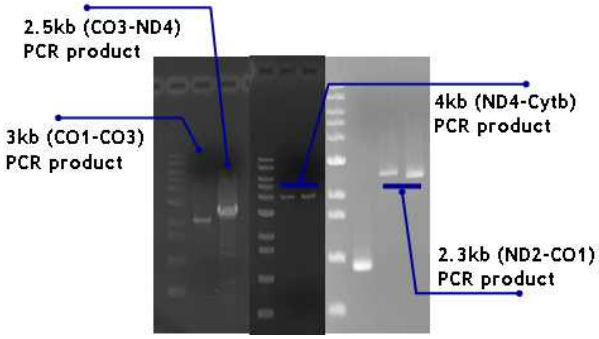


그림 V-60. 구렁이 Long range-PCR product

3.10.4. 염기서열 결정

구렁이의 전체 미토콘드리아 유전체 염기서열 중에서 ND2에서 CO1 유전자 사이의 일부분인 2,357bp를 결정하였고, CO1에서 ND4 유전자 사이의 일부분인 4,466bp를 결정하였다. 전체적인 유전자 사이의 배열은 전형적인 배열순서를 보여주고 있었고, tRNA의 2차 구조 또한 전형적인 네잎클로버 형태를 갖고 있었다 (그림 V-61).

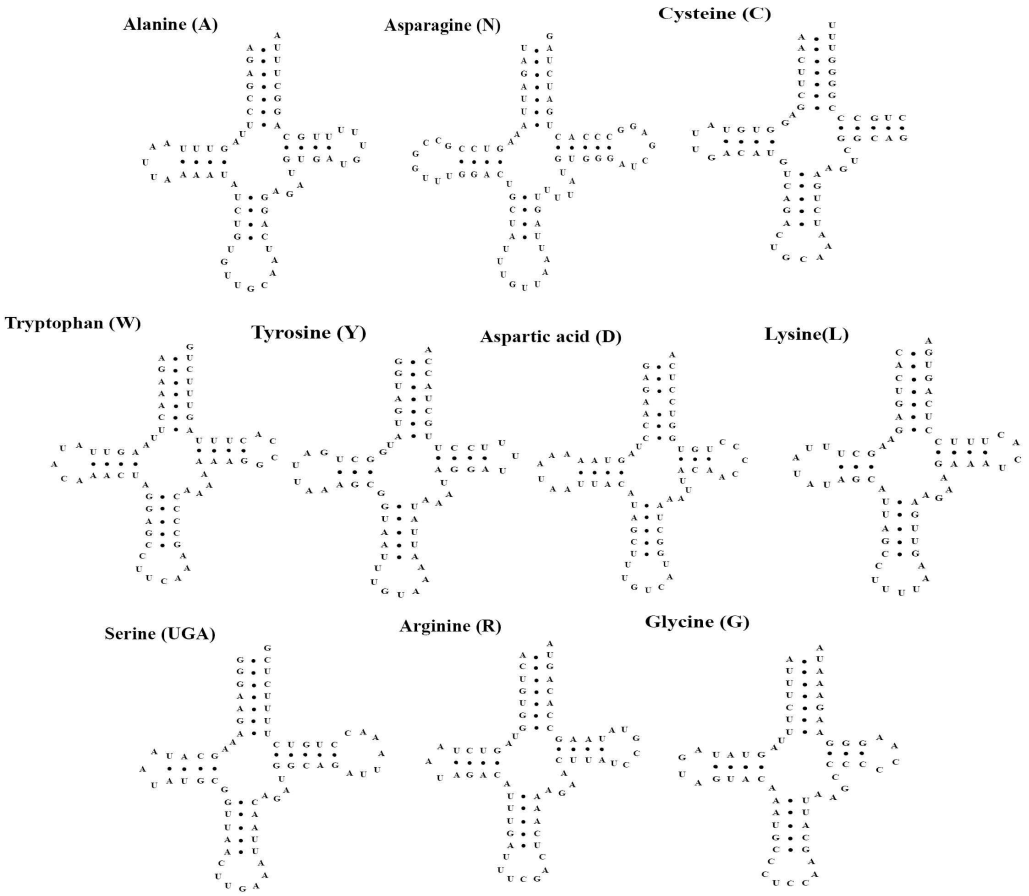
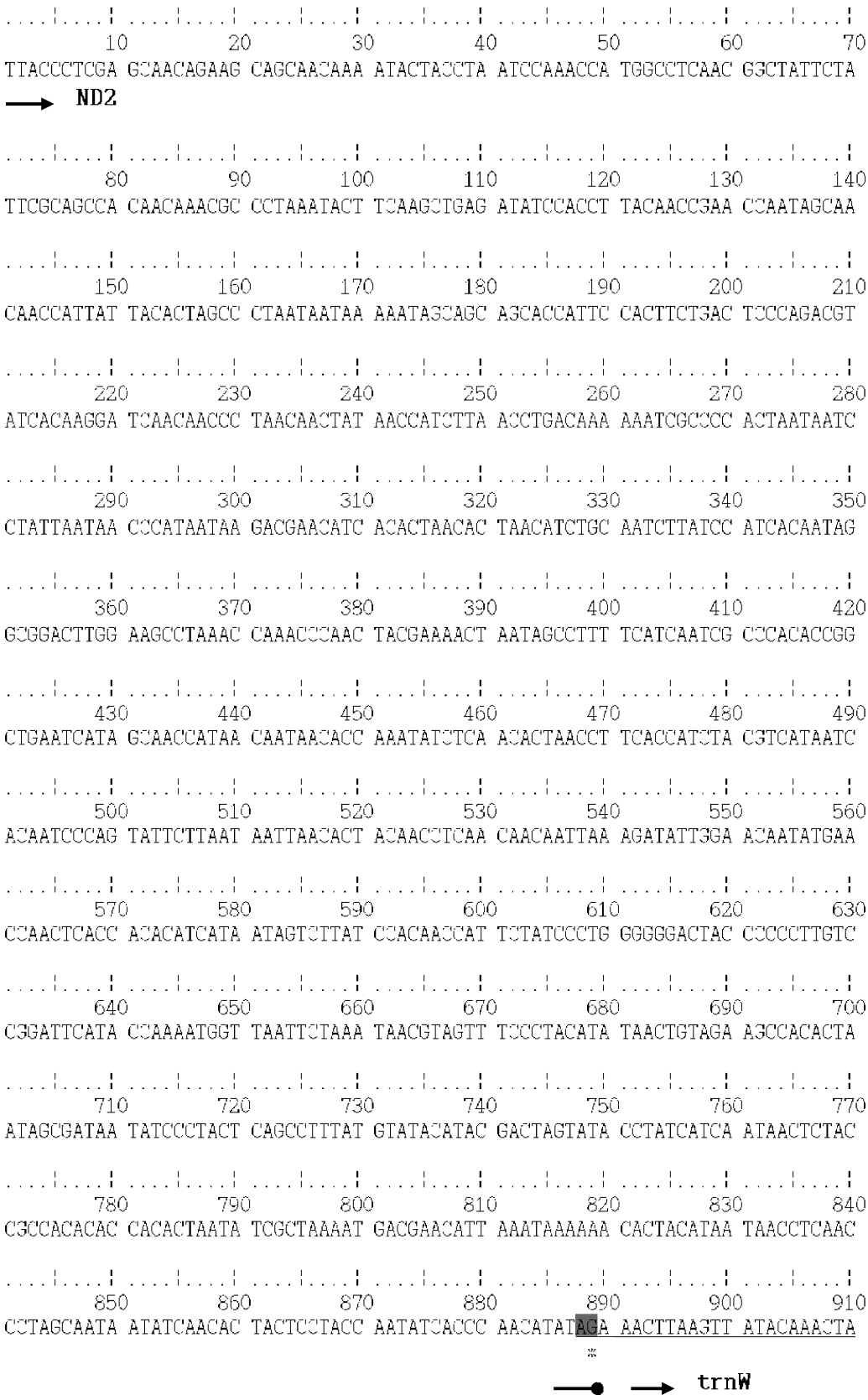


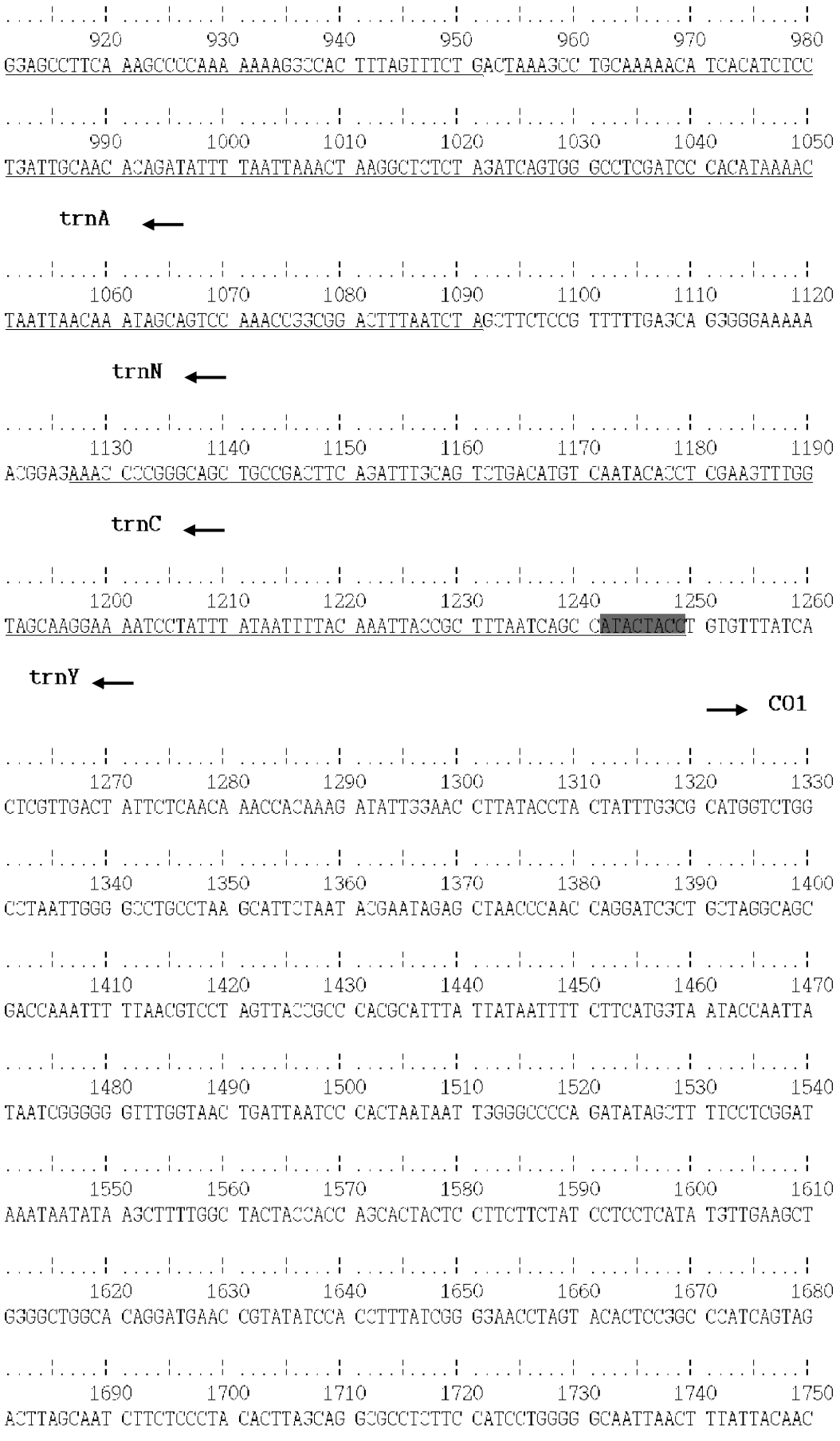
그림 V-61. 구렁이의 tRNA 2차 구조

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

▪ 구렁이의 염기서열 및 annotation (6,823bp)



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1760       1770       1780       1790       1800       1810       1820
ATGCATTAAT ATAAAACCAA AATCCATACC AATATTCAAC ATTCCTCTAT TTGTTTGATC AGTACTTATC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1830       1840       1850       1860       1870       1880       1890
ACCGCCATTA TACTACTTTT AGCCTTACCA GTATTAGCAG CAGCAATTAC CATATTATTA ACCGACCGAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1900       1910       1920       1930       1940       1950       1960
ATCTAAACAC CTCTTTCTTT GACCCTTGCG GGGGGGGAGA CCCAGTATTA TTTCAACACC TATTCTGATT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1970       1980       1990       2000       2010       2020       2030
CTTTGGCCAC CCAGAAGTAT ATATTCTCAT TCTGCCAGGA TTTGGCATTG TATCAAGTAT TATTACATTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2040       2050       2060       2070       2080       2090       2100
TATACCGGAA AAAAAAACAC ATTTGGATAC ACAAGTATGA TTTGAGCAAT AATATCCATT GCTATCTTAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2110       2120       2130       2140       2150       2160       2170
GCTTTGTAGT CTGAGCCCAC CACATGTTCA CTGTAGGTCT AGATATTGAC AGCCGAGCCT ACTTCACAGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2180       2190       2200       2210       2220       2230       2240
AGCAACAATA ATTATCGCAA TCCCAACCGG AATCAAAGTA TTTGGTTGAT TAGCCACTTT AGCAGGAGGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2250       2260       2270       2280       2290       2300       2310
CAAATTAAAT GACAAACCCC AATCTACTGA GCGCTTGGCT TCATCTTTCT ATTCACCGTA GGCGGAATAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|..
        2320       2330       2340       2350
CCGGAATCAT CCTAGCAAAC TCCTCACTAG ATATTGTACT ACATGAC



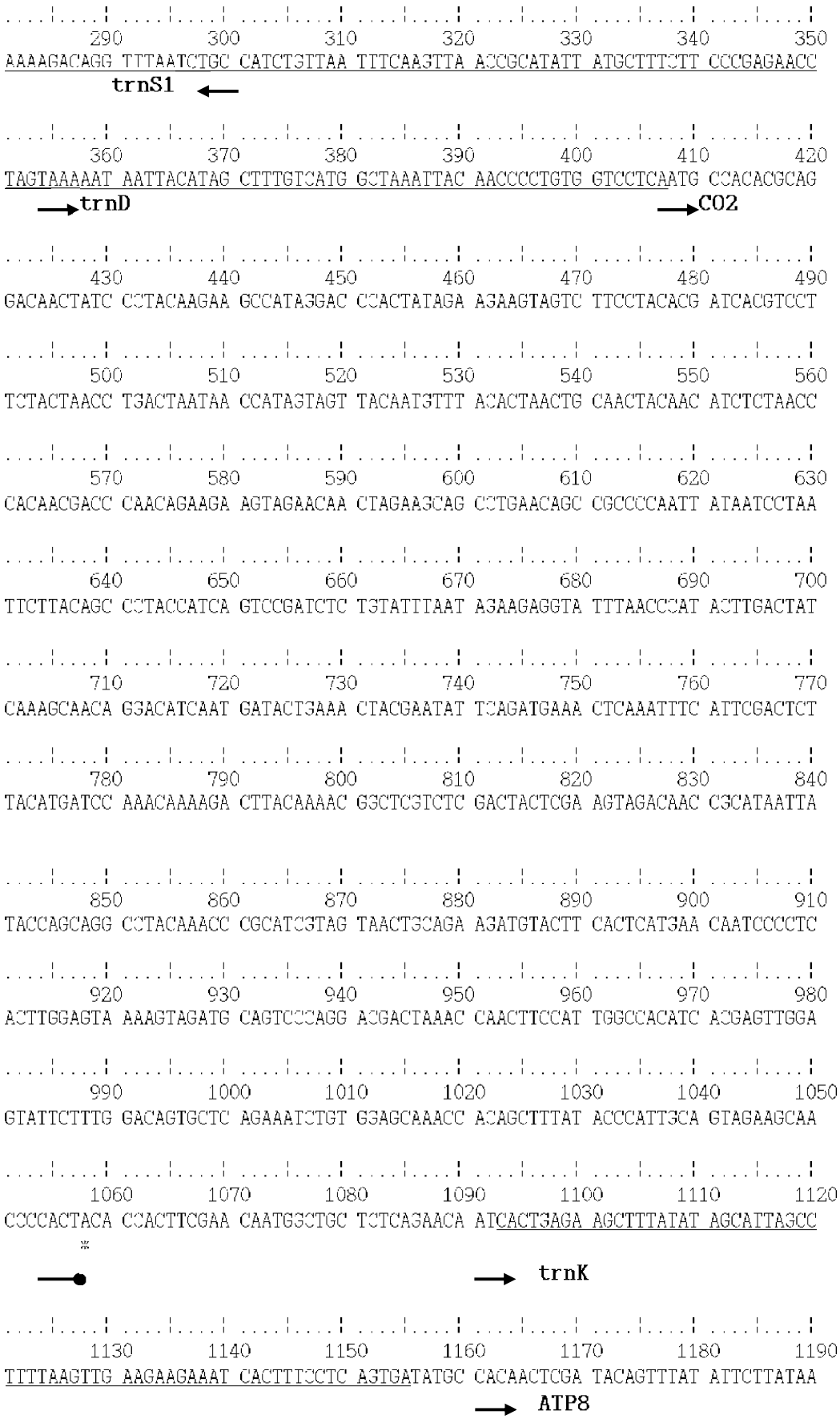
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          10         20         30         40         50         60         70
TTACTCAGAC TACCCAGACG CTTTTACCCT ATGAAACACA CTATCCTCAA TCGGATCAAC CATCTCTATA
→ C01

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
          80         90        100        110        120        130        140
GTGGCAGTGC TTATATCCCT ATTCATTGTA TGAGAAGCGC TAACATGTAA ACGAGAAATT CACATACCCC

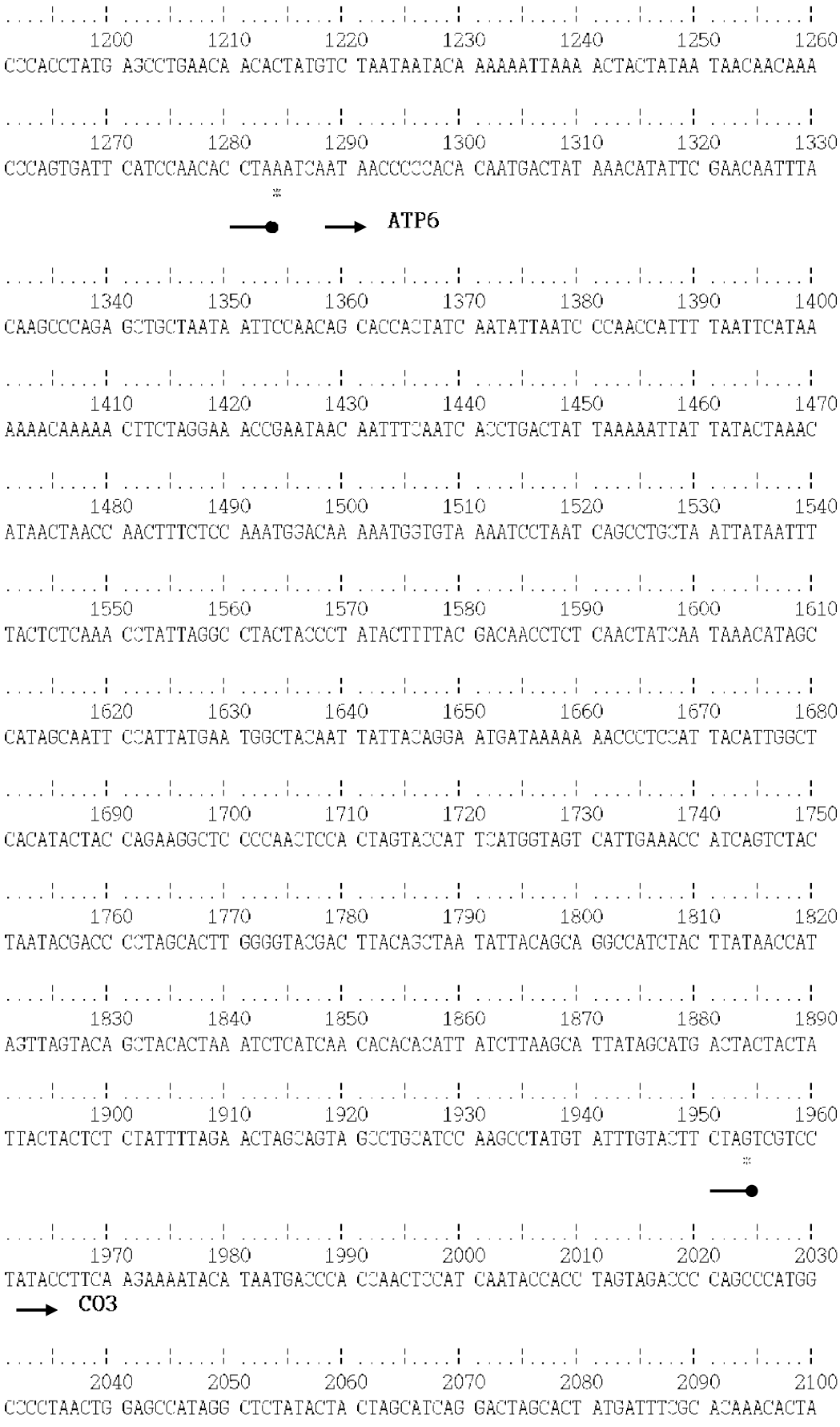
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         150        160        170        180        190        200        210
TAGGAAAAAA AACACATGTA GAATGATTTT TTGGCTCCCC ACCACCACAC CACACGCACA CAGAACCAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         220        230        240        250        260        270        280
ATTCATACTA AACAACACAT TCGCCCCAAT TCGAAACCTT ATCTCATACA TAGAATGACC TTGACCCGAG
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2110       2120       2130       2140       2150       2160       2170
CAACAGTACT AAAAATAGGA TTATTAACCC TACTACTAAC CATATTTCAA TGATGACGAG ACATTAGTAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2180       2190       2200       2210       2220       2230       2240
GAGAAAGCAC ATACCAAGGA CACCACACAA AAGGCGTACA AAAAAACATA CGATACGGCA TGATCCTATT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2250       2260       2270       2280       2290       2300       2310
CATTACATCA GAAGTGTTCT TCTTCCTTGG GTTCTTCTGA GCACTATACC ACGTAAGCCT AGTCCCAACC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2320       2330       2340       2350       2360       2370       2380
CCAGAACTTG GGGCAGAGTG ACCACCAACT GGAATTACCC CACTTAACCC CACAGAAGTA CCACTATTAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2390       2400       2410       2420       2430       2440       2450
ACACAGCCGT CCTTCTCTCA TCAGGAGCAA CAATTACATG ATCACACCAC ACCATAATAA AAGGAAACAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2460       2470       2480       2490       2500       2510       2520
AAAAGAATCA ACTTACGCCC TTATAATCAC CATCGCCCTG GGGGTTTACT TTACAGCCCT GCAAGCATCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2530       2540       2550       2560       2570       2580       2590
GAATATGTGG AAACCCCATT TACTATCTCA GATAGTGTAT ACGGCCCACT ATTCTTTGTA GCTACAGGAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2600       2610       2620       2630       2640       2650       2660
TTCACGGCCT ACATGTTATA ATTGGAACCA CATTTCTAAC AATCTGCATA ATCCGCCTTA TTAAACACCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2670       2680       2690       2700       2710       2720       2730
CTTTACAACC ACCCACCACT TTGGATATGA AGCAGCTATC TGGTATTGAC ACTTCGTTGA CATTGTATGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2740       2750       2760       2770       2780       2790       2800
CTATTTCTGT ATATCTCAGT CTACTGATGA GGGTCCTATT TCTTTAGTAT AGTAGTACAA ATGCCCTCCA
      *
 ---●                          ---►  trnG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2810       2820       2830       2840       2850       2860       2870
AGCATTAAGC CCCCCAAGGG AAGAAATAAT GAACCTCATC ACCCTTATCA CAATAGCTAT AGTAACATCA

                                  ---►  ND3

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2880       2890       2900       2910       2920       2930       2940
ACAGCACTAT ACATAATCAA TATTCACATC ATCATAAAAC CTGATACTAA TAAATTATCA CCCTATGAGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2950       2960       2970       2980       2990       3000       3010
GTGGTTTTGA CCCACTAGGA GATGCTCGAA CCCCAATCTC AATCCAGTTC TTCCTAATTG CAATTCTATT
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3020       3030       3040       3050       3060       3070       3080
TATTTTATTT GACCTAGAAA TCGTACTCTT ACTCCCAACC CCATGAAGCA TAAGTACAAA CCCCCCAAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3090       3100       3110       3120       3130       3140       3150
ACAACTATCA CACTAATTAT AACACTACTA ACAATTCTAA CACTAGGCCT AATATACGAA TGACTACAGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3160       3170       3180       3190       3200       3210       3220
GTGGATTAGA ATGAACAGAA TACTGTGGTA GTCTAATAGA CATTTGATTT CGACTCAAAA GAACTTATCC
        *
      ---●          ---→ trnR

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3230       3240       3250       3260       3270       3280       3290
GTATAAGCCA CAGTAGTGGG ACTAATAAAA ACTTCCTTGT ACTTAATATT TATAATTACT ATCACTGCCA
      ---→ ND4L

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3300       3310       3320       3330       3340       3350       3360
TATCACTACA ACATAAACAC CTAATACTAG CCCTAATGTG TGTGGAAACT ATAATACTTA TCGTATTTAC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3370       3380       3390       3400       3410       3420       3430
GATACTAGTT TTATTCACCT CCACTTCACT AACCATATCA CAAATTCCAA TACCCATTAT CCTATTAACA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3440       3450       3460       3470       3480       3490       3500
ATTTCAGTGT GCGGGGCAGC TGTGGGCCTA AGCCTAGTAG TTGCAATTAC ACGAACCCAC GGAAACGACT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3510       3520       3530       3540       3550       3560       3570
TTCTAAAAAA CTTAAACCTA CTATAATGAT AAAAATTATT TATAGCACTA TAGCACTTAT TCCAATAGTG
      *
    ---●    ---→ ND4

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3580       3590       3600       3610       3620       3630       3640
CTAATACTAA AACCTAAAAT ACTCTACCAA ATAACAACCA CATATTCATT TATAATCGCC CTCCTCAGCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3650       3660       3670       3680       3690       3700       3710
TAAGCTTATT AGAACCAAAC TCCAATACAC ACCTCCACCT CGACCACACA TCAGCCCCAC TACTATCACT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3720       3730       3740       3750       3760       3770       3780
CTCATACTGA CTTCTACCAC TAACTATTAT AGCTAGCCAA CACATAATAA CTAAAGAACC AATACAACGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3790       3800       3810       3820       3830       3840       3850
CAACGAACAC TACTTACAAC CCTAATTATT CTACAACTAT TTATCTCCTT AACATTCATA GCCTCTAACC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3860       3870       3880       3890       3900       3910       3920
TAACTCTTAT ATATGTTATA TTTGAAGCTA CCCTAATCCC AACTCTAGTT ATCATCACGC GATGAGGACA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3930       3940       3950       3960       3970       3980       3990
ACAAGCTGAA CGTTTAACCG CAGGTACCTA CTTTATACTA TATACATTAA CAACCTCAAT ACCCCTATTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4000       4010       4020       4030       4040       4050       4060
ATAGCTATTC TATTCCTTAA TAATATAACA AAGACTCCAA CTCTATTTAT ACAAATAATA CAACCAACTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4070       4080       4090       4100       4110       4120       4130
GCCCCTGAAC AGAACTTATA CTATGAATAG CCTGTTTAGG GGCTTTCTTA GCAAAAATAC CGGTCTATGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4140       4150       4160       4170       4180       4190       4200
CCTTCACCTA TGACTACCAA AAGCTCACGT AGAAGCCCCA ATCGCAGGAT CCATAGTACT AGCCGCAATC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4210       4220       4230       4240       4250       4260       4270
CTACTAAAAC TTGGCGGCTA CGGTATTATT CGAATAATAC AAATTCTACC TACAATAAAA ACAGATATAT


....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4280       4290       4300       4310       4320       4330       4340
TCCTACCATT CATCGTTCTT GCTCTCTGAG GGGCAACACT AGCTAATTTA GTCTGTCTTC AACAAACAGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4350       4360       4370       4380       4390       4400       4410
CCTAAAATCC CTTATTGCAT ATTCATCTAT TAGCCACATG GGGTTGGTCA TTGCTGCAAT CATGATCCAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|.
        4420       4430       4440       4450       4460
ACACAATGAA GTTTAGCAGG GGCCATAGCC CTAATAATTG CCCACGGCTT AACATC
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.11. 감돌고기 (*Pseudopungtungia nigra*)



- 계통 (Systematics)
  Phylum Chordata 척삭동물 문
  Class Actinopterygii 조기 강
  Order Cypriniformes 잉어 목
  Family Cyprinidae 잉어 과
- 기상 (Diagnosis)
  몸길이 : 7.7~10.6cm
- 서식처 (Habitat)
  수심이 30~100cm 안팎인 강 중류, 바닥에 자갈이 깔린 맑은 물에 10여마리의 소단위로 무리지어 생활.

그림 V-62. 감돌고기

감돌고기는 잉어목 잉어과 모래무지아과로서 2005년 2월 환경부에서 시행한 야생동식물보호법에 의해 멸종위기야생동식물 Ⅰ급으로 지정된 어류이다 (그림 V-62). 전 세계에서 대한민국에만 분포하는 한국고유종이며 금강 중상류, 만경강, 웅천천에 서식하고 있으나 환경오염, 댐 축조 등으로 근래에 그 수가 급감하고 있다. 특히, 최근 조사결과에 따르면 웅천천에서는 발견되지 않고 있다.

3.11.1. Sample 준비

어류채집의 다양한 방법을 이용하여 감돌고기의 집단 서식처인 전라북도 무주군 무주읍 장백리 남대천에서 대상종의 시료를 확보하였다. 실험 재료로 쓰게 될 표본은 가급적 살아있는 상태로 (혹은 냉동상태) 실험실에 운반하여 total genomic DNA 추출에 이용한다.

3.11.2. Total genomic DNA 추출

감돌고기 생체의 근육조직의 일부 (25mg)를 떼어내어 DNeasy Tissue kit (Qiagen, Co.)의 추출과정을 이용하여 total genomic DNA를 추출한다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.11.3. Primer 제작

감돌고기의 미토콘드리아 분석 연구에 앞서 선행연구 자료 (Kawaguchi et al., 2001 and Miya and Nishida, 1999, 2000b)를 토대로 어류 분류군의 universal primer를 제작하였다(그림 V-63, 표 V-32). 고안되어진 primer는 16S rRNA와 tRNA-Leu2 유전자의 양방향 영역의 2set (16SH-LeuL, 16SL-LeuL)이다.

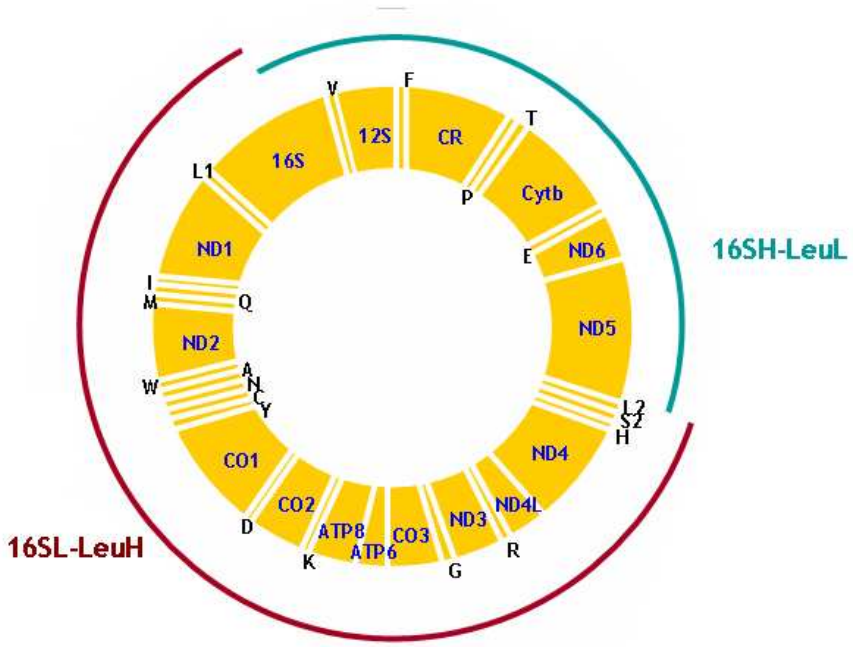


그림 V-63. 어류에서 사용되어진 primer strategy

표 V-32. 감돌고기에서 사용된 primer 염기서열

Primer name	Primer Sequence	Gene region
S-LA-16S-H	5'-TGC ACC ATT AGG ATG TCC TGA TCC AAC ATC-3'	16S rRNA ~tRNA-Leu
L-12321-Leu	5'-GGT CTT AGG AAC CAA AAA CTC TTG GTG CAA-3'	
S-LA-16S-L	5'- GAT GTT GGA TCA GGA CAT CCC AAT GGT GCA-3'	16S rRNA ~tRNA-Leu
H-12321-Leu	5'- GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G -3'	

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.11.4. PCR 증폭

표 V-33. 16S rRNA gene과 tRNA-Leu gene 사이 (약 7kb)를 증폭하기 위한 Long range-PCR 조건

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1㎕
Reverse primer	1㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	17.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
$MgCl_2$	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	14.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	14 cycles
57℃	30sec	
68℃	6min	
92℃	10sec	24 cycles
57℃	30sec	
68℃	6min +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

표 V-34. 16S rRNA gene과 tRNA-Leu gene 사이 (약 9kb)를 증폭하기 위한 Long range-PCR 조건

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1㎕
Reverse primer	1㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	17.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
$MgCl_2$	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	14.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	14 cycles
53℃	30sec	
68℃	7min	
92℃	10sec	24 cycles
53℃	30sec	
68℃	7min +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

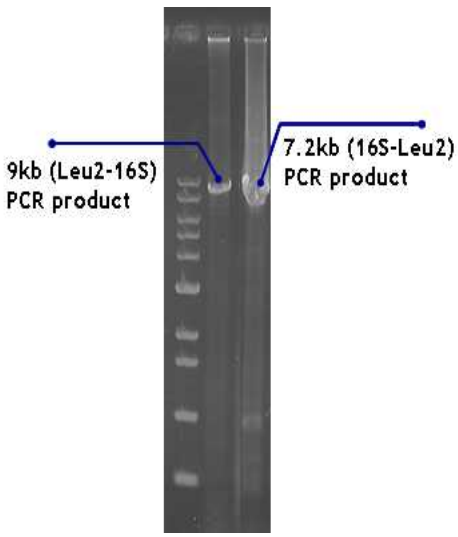


그림 V-64. 감돌고기 PCR product
① 1kb ladder
② 9kb PCR product
③ 7.2kb PCR product

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.11.5. 염기서열 결정

얻어진 PCR product 9kb와 7.2kb를 염기서열 분석한 결과 ND5 유전자에서부터 tRNA Aspartic acid까지 전체 9,961bp를 결정하였다. 이 유전체는 4개의 protein coding 영역, 2개의 rRNA 영역, 1개의 control region, 11개의 tRNA 영역, 2개의 partial gene (trnN, ND5)으로 구성되어 총 18개의 새로운 유전자 데이터를 추가하였다. 감돌고기의 유전자 배열은 다른 어류들과 비교했을 때 전형적인 형태를 지닌다 (그림 V-65).

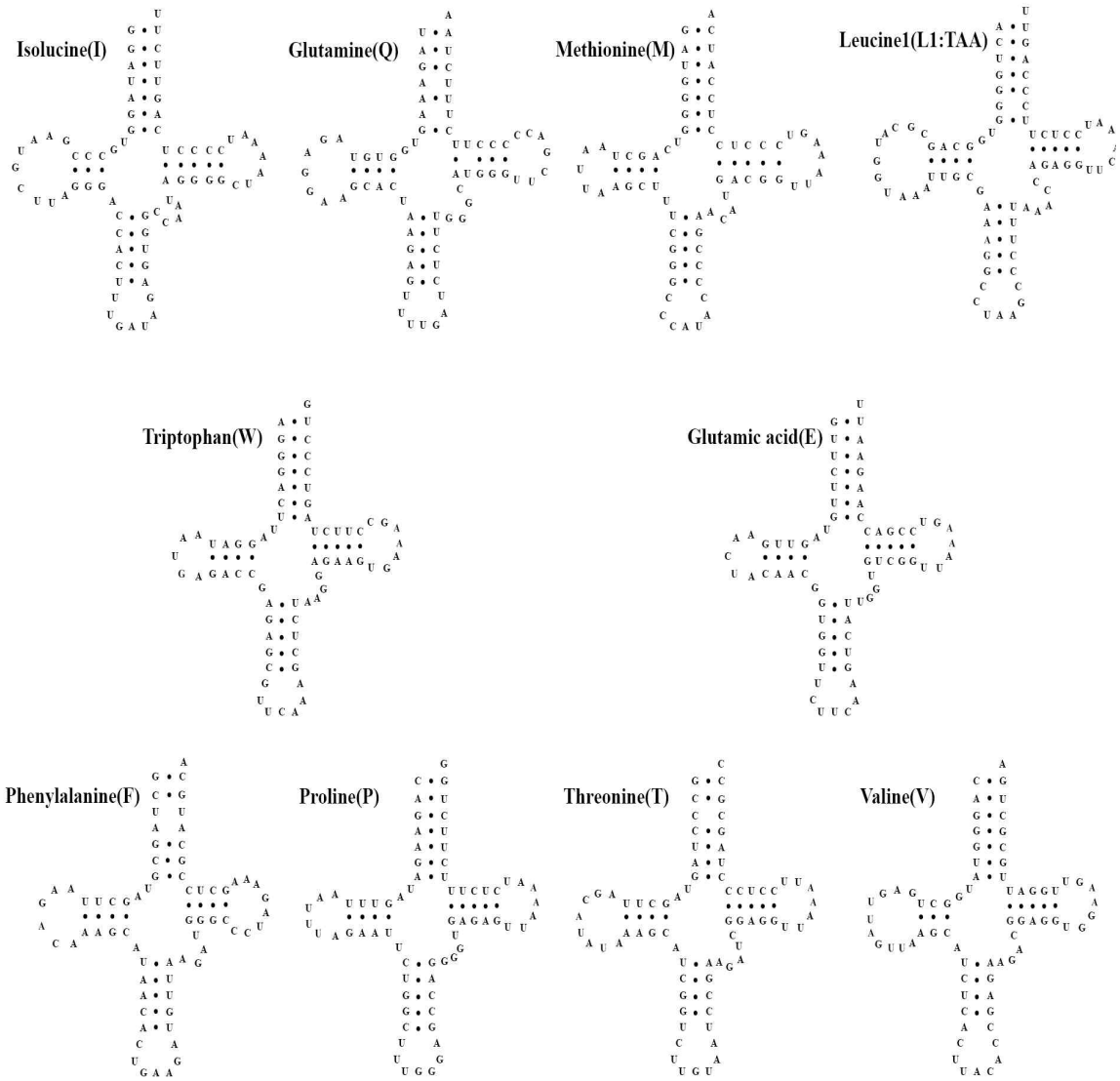


그림 V-65. 감돌고기 미토콘드리아의 tRNA 2차 구조

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

▪ 감돌고기의 염기서열 및 annotation (9,961bp)

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        10         20         30         40         50         60         70
CCATATGGTC GACCTGCAGG CGGCCGCGAA TTCACTAGTG ATTGGGTCTT AGGAACCAAA AACTCTTGGT
trnL1          ⟶  ND5

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        80         90        100        110        120        130        140
GCAAATCCAA GTGGAAGCTA TGAATCCAAC AACACTGATT ATATCCTCCT CACTTATTTT AGTAATTGTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       150        160        170        180        190        200        210
ATTCTTACAC TTCCACTATT AACAACACTA ACTCCTCAGC CTAAAAACCC AGAATGAGCA AGCACACATG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       220        230        240        250        260        270        280
TCAAGACCGC CGTCAGCACC GCATTTTTCG TTAGCCTCCT GCCCCTTATG ATTTTTTTAG ATCAAGGAAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       290        300        310        320        330        340        350
AGAAAGTGTA ACTACAAACT GACAATGAAT GAATACACAC ACATTTGACA CAAATATTAG CTTTAAATTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       360        370        380        390        400        410        420
GACCATTACT CTCTTATCTT TACCCCTATT GCCCTTTATG TTACATGATC GATTTTAGAG TTTGCGCTAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       430        440        450        460        470        480        490
GATATATACA CTCTGACCCA AACATAAACC GGTTCTTCAA ATATCTCCTC CTGTTTTTAG TAGCTATGAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       500        510        520        530        540        550        560
TACCCTTGTT ACAGCTAACA ACATATTCCA GCTATTTATT GGCTGAGAAG GAGTGGGAAT TATATCCTTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       570        580        590        600        610        620        630
TTACTAATCG GATGGTGATA TGGACGAGCG GACGCTAATA CAGCGGCCTT ACAGGCCGTG ATCTATAATC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       640        650        660        670        680        690        700
GGGTAGGAGA CATCGGATTA ATCTTAACCA TGGCTTGATT TGCAATAAAC CTGAACTCCT GAGAAATTCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       710        720        730        740        750        760        770
GCAAATCTTC TTACTATCAA AAAACTTTGG CATAACAGTC CGTCTTCTTG GACTTATTCT TGCGGCAACG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       780        790        800        810        820        830        840
GGAAAATCGG CGCAATTTGG CCTACATCCC TGGCTCCCTT CTGCCATGGA GGGCCCCACG CCAGTATCTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       850        860        870        880        890        900        910
CCCTACTGCA CTCTAGCACT ATAGTAGTTG CTGGGATCTT CCTACTAATC CGTCTTCACC CTCTTATAGA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        920        930        940        950        960        970        980
GAAAAATGAA ACCGCACTAA CAATTTGCCT ATGTTTAGGA GCCCTAACAA CCCTATTTAC AGCCACTTGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        990       1000       1010       1020       1030       1040       1050
GCTCTAACCC AAAATGACAT CAAGAAAATC GTAGCTTTTT CAACATCCAG TCAGCTAGGC CTAATAATAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1060       1070       1080       1090       1100       1110       1120
TTACGATTGG CCTAAACCTA CCACAATTGG CATTCCTACA CATCTGCACA CATGCCTTTT TTAAAGCTAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1130       1140       1150       1160       1170       1180       1190
ACTATTTTTA TGCTCCGGGT CTATTATTCA CAGTCTAAAC GACGAACAGG ATATCCGGAA AATAGGAGGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1200       1210       1220       1230       1240       1250       1260
CTTCATAACC TAATACCCGC TACCTCGACT TACCTAACAA TCGGAAGCCT AGCGCTGACA GGAACCCCAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1270       1280       1290       1300       1310       1320       1330
TCCTAGCCGG GTTTTACTCA AAGGATGCTA TTATTGAAGC CCTAAACACC TCACACCTTA ACGCCTGAGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1340       1350       1360       1370       1380       1390       1400
CCTAATTCTT ACGCTAATCG CCACATCATT CACTGCCGTC TATAGCTTCC GAGTTGTATT TTTTGTAACC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1410       1420       1430       1440       1450       1460       1470
ATGGGAGTCC CTCGATTTCT ACCACTGTCC CCCATCAACG AAAATAACCC ATTAGTGATT AACCCTATCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1480       1490       1500       1510       1520       1530       1540
AACGACTTGC CTGAGGAAGC ATTATTGCAG GACTTATTAT TACATCTAAC TTCCTCCCCT CAAAAACTCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1550       1560       1570       1580       1590       1600       1610
TATTATAACA ATACCAATAA CCTTAAAAAT AGCAGCCTTA ATAGTTACTA TTATAGGACT CTTAGTAGCA

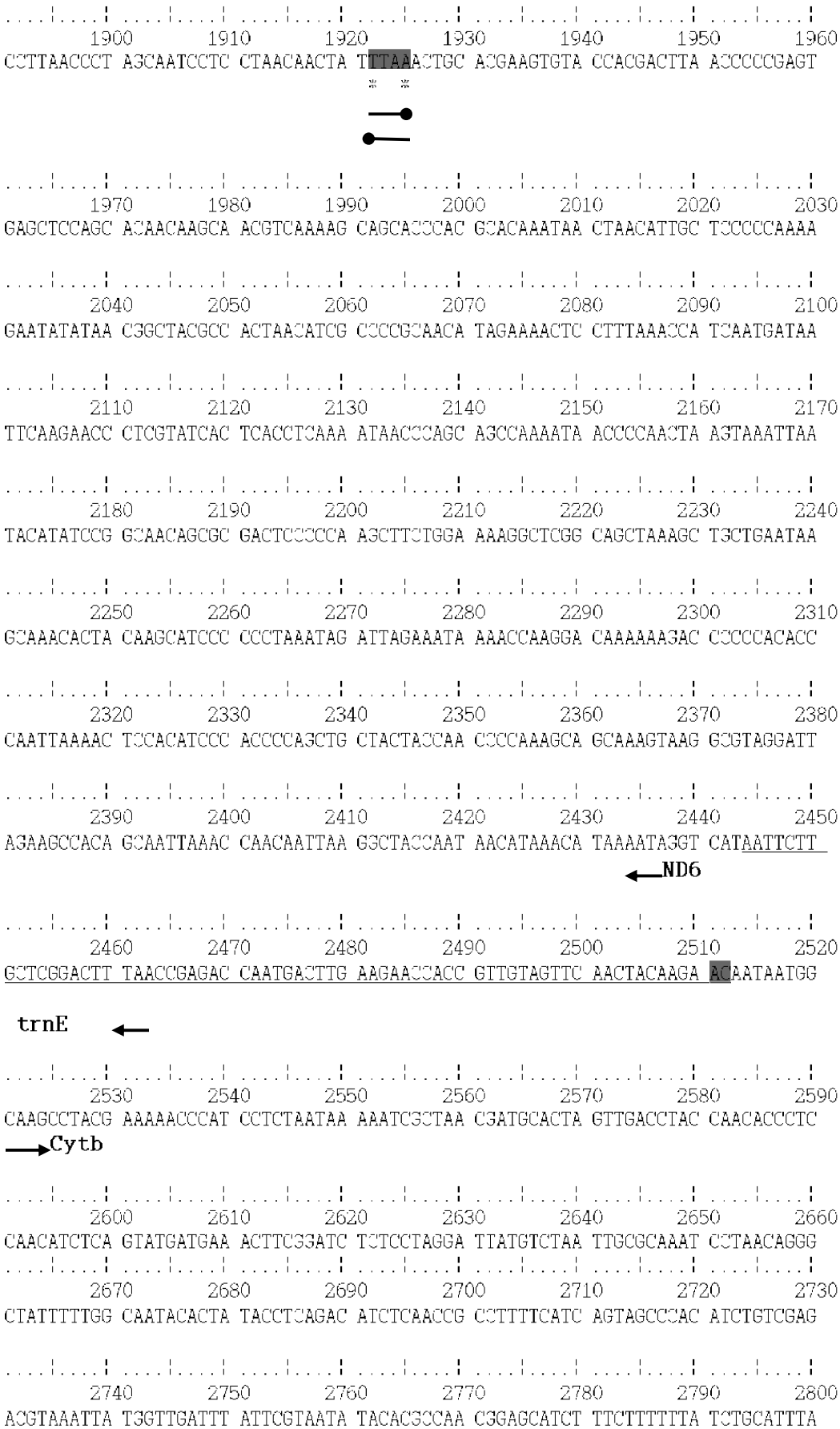
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1620       1630       1640       1650       1660       1670       1680
ATAGAATTAA CAGCCATAAC CACTAAACAA ACCAAAGTTA CCCCTACGAT TTACTCACAT AATTTTTCAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1690       1700       1710       1720       1730       1740       1750
ATATATTAGG GTACTTTCCT GCAATAATTC ACCGGCTACC CCCCAAACTC AACTTGACCC TAGGACAGTC

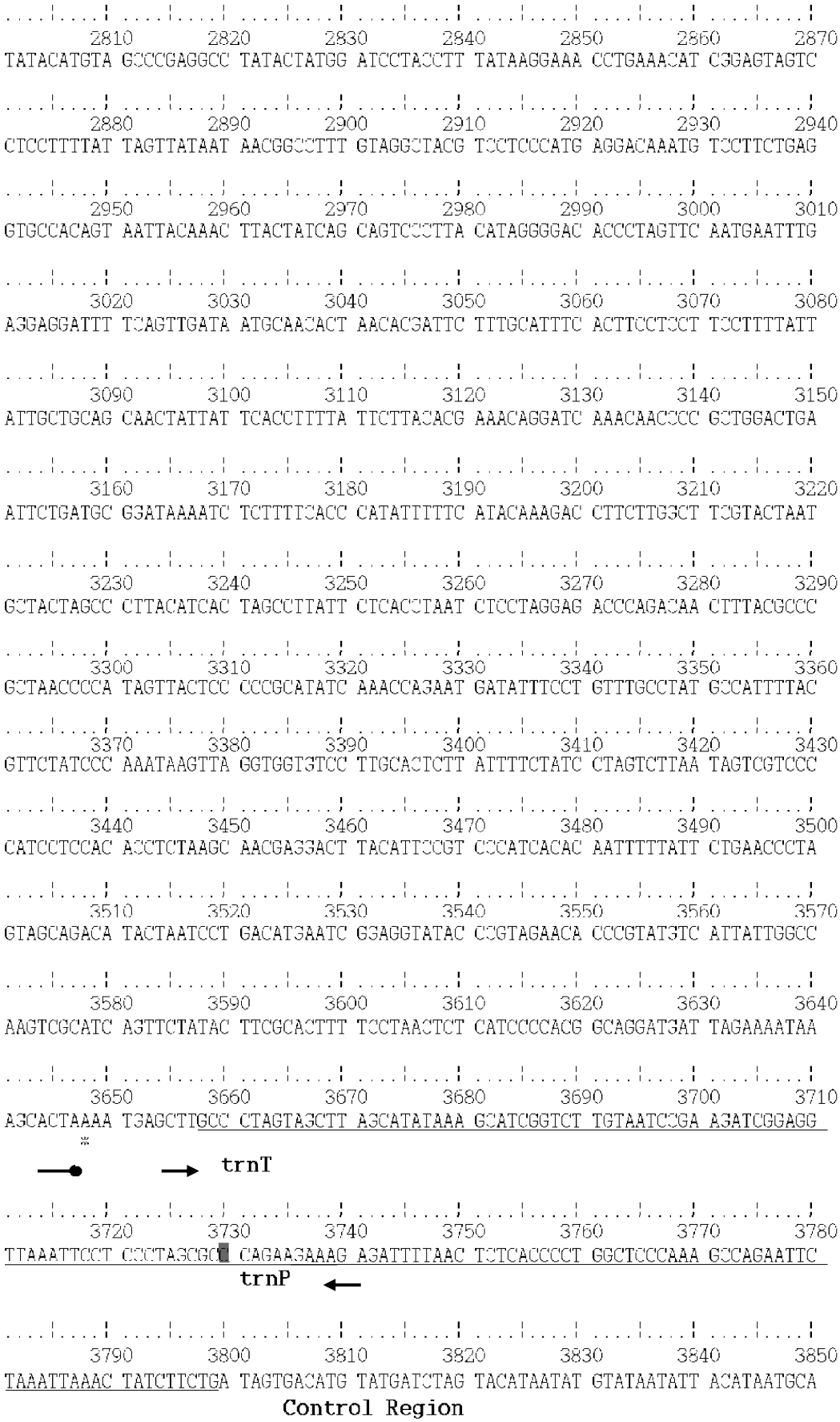
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1760       1770       1780       1790       1800       1810       1820
GATTGCCACA AAACTTGACC AAACATGGTA TGAAATCTCA GGCCCAAAAG GATTGGCACT TACCCAAATA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1830       1840       1850       1860       1870       1880       1890
TTTATATCAA AAGTTACAAG TGACATTCAA CGAGGCATAA TTAAAACATA TTTAACCATT TTTCTTCTGA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3860       3870       3880       3890       3900       3910       3920
TTAGTACTTA TATATGTATT ATAACCATTA AATTATTTTA ACCCCAAAGC AAGTACTAAC GTCCTAATCG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3930       3940       3950       3960       3970       3980       3990
TACATAAGAC AAATTATTAA AACTCAAGAA TAATTTATTT TAACCCGGGA AATAGATTCA TCCCCAAAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4000       4010       4020       4030       4040       4050       4060
TTGGCTCTCA AATGTTTCCT TGAAATAACC AACTAAGATT TAAATATAGA ATCTTAATGC AGTAAGAGAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4070       4080       4090       4100       4110       4120       4130
CACCAACCTT GCCATATAAG GCATCCTATT CATGATAGAA TCAGGGACAC TTAACTAGGT TAAGGTATTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4140       4150       4160       4170       4180       4190       4200
TATGAACTAT TCCTTGTATC TTGGTTTCTA TCTCAGGTAT TGTTCTATTA AGTTCCCCCT CTCCTTACTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4210       4220       4230       4240       4250       4260       4270
AAACTGGCAT ATTGGTTACT GGTGTAATTA CATACTCCTC GTTACCCAAC ATGCCGGGCG TTCTTTTATA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4280       4290       4300       4310       4320       4330       4340
TGCATAGGGT TCCTCTTTTA GGTTTCCTTT CACCTTGCAT ATCAGAGTGC AGGCTCAATA AAAAAATCAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4350       4360       4370       4380       4390       4400       4410
GGTTGAACAC TTATTCTTGT CTTAGTTAAC CTAGGTTCAT TATTAAAAGA CATAACTTAA GAATACATAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4420       4430       4440       4450       4460       4470       4480
TAATAACTCA AGTGCATACA TACCTATTCC TTCTTCAACT TACCCTTATA TATATGCCCC CCTTTTGGTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4490       4500       4510       4520       4530       4540       4550
TCTGCGCGAC AAACCCCCCT ACCCCCTTCG CTCAGCGAGT CCTGTTATCC TTGTCAAACC CCGAAACCAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4560       4570       4580       4590       4600       4610       4620
GGAAGGTCCG AGAACGTGCA GGCCAACAAG TTGGGGATAA GGATTAGCCA TCTGCATTGT ATATATATAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4630       4640       4650       4660       4670       4680       4690
ATGCATATCG CGTTAAATCA CCATATTAAT TCCGTAAATT TTAGCCCTAA AGACTCTACT AAAAAATTTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4700       4710       4720       4730       4740       4750       4760
GAAAAATCTC AATGCAAGAA AATCCAACAT TTATAGCGCT AGCGTAGCTT AATACAAAGC ATAACACTGA
                                          ---------->
                                                trnF

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4770       4780       4790       4800       4810       4820       4830
AGATGTTAAG ATGGGCCCTA GAAAGCTCCG CATGCACAAA GGCATGGTCC CGACCTTACC ATTAGCTATA
                                          ---------->
                                                12S rRNA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4840       4850       4860       4870       4880       4890       4900
ACCTAACTTA CACATGCAAG TCTCCGCAAC CCTGTGAGTA TGCCCTCAAT CCCCCGCCCG GGGACGAGGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4910       4920       4930       4940       4950       4960       4970
GTGGGCATCA GGCACAAATT TTTAGCCCAA GACGCCTAGC CAAGCCACAC CCCCAAGGGA ATTCAGCAGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4980       4990       5000       5010       5020       5030       5040
GATAAACATT AAGCCATAAG TGAAAACTTG ACTCAGTTAA GGTTAAGAGG GCCGGTAAAA CTCGTGCCAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5050       5060       5070       5080       5090       5100       5110
CCACCGCGGT TAAACGAGAG GCCCTAGTTA ATAGTATTAC GGCGTAAAGG GTGGTTAAGG ATATAATTAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5120       5130       5140       5150       5160       5170       5180
ATAAAGTCAA ATGGCCCTTT GGCTGTCATA CGCTTCCAGG TGTCCGAAGT CCAACCACAC GAAAGTAACT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5190       5200       5210       5220       5230       5240       5250
TTAATAAAAC CAACCTGACT CCACGAAAGC TGAGGAACAA ACTGGGATTA GATACCCCAC TATGCTCAGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5260       5270       5280       5290       5300       5310       5320
CATAAACCTA GATGTCGCAA TACAATCAGA CATCCGCCAG GGTACTACGA GCATCAGCTT GAAACCCAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5330       5340       5350       5360       5370       5380       5390
GGACCTGACG GTGCCTTAGA CCCCCCTAGA GGAGCCTGTT CTAGAACCGA TAACCCCCGT TAAACCTCAC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5400       5410       5420       5430       5440       5450       5460
CACTTCTAGC CATCCCAGCC TATATACCGC CGTCGCCAGC TTACCCTGTG AAGGCAACAA AAGTAAGCAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5470       5480       5490       5500       5510       5520       5530
AATGGGCACA ACCCAGAACG TCAGGTCGAG GTGTAGCGTA CGAAGTGGGA AGAAATGGGC TACATTTTCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5540       5550       5560       5570       5580       5590       5600
ATCATAGAAC ACTACGAACA TGCAACATGA AATAGTGCTT GAAGGAGGAT TTAGTAGTAA AAAGGAAGCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5610       5620       5630       5640       5650       5660       5670
GAGTGTCCTT TTGAACCCGG CTCTAAGGCG CGTACACACC GCCCGTCACT CTCCCCTGTC AAAATGCAAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5680       5690       5700       5710       5720       5730       5740
TAAAGATAAT TAATACTAAA GCACTGACAA GGGGAGGCAA GTCGTAACAT GGTAAGTGTA CCGGAAGGTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5750       5760       5770       5780       5790       5800       5810
CACTTGGATT AAACTCAGGG TATGGCTGAG TTAGTTAAGC ATCTCACTTA CACCGAGAAG ACATCCATGC
```

*

trnV

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5820       5830       5840       5850       5860       5870       5880
AAGTTGGATT GCCCTGAGCT AAACAGCTAG CTTAATAATC AATTTAACAT AACACTGTTT ATACCAAGAA

                          ⟶ 16S rRNA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5890       5900       5910       5920       5930       5940       5950
ATGACCTTAA CATCAAAACT AAACCATTTT TTTACCTGAG TATGGGAGAC AGAAAAGGTT CAACCCGAAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5960       5970       5980       5990       6000       6010       6020
CAATAGAGAA AGTACCGCAA GGGAAAGCTG AAAGAGAAGT GAAATAACCC ATATAAGCAC AAAGAAACAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6030       6040       6050       6060       6070       6080       6090
AGACTAAACC TTGTACCTTT TGCATCATGA TTTAGCCAGT AATCTCGAGC AAAGAGACCT TTAGTTTGAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6100       6110       6120       6130       6140       6150       6160
ACCCCGAAAC CAGGTGAGCT ACCCCGAGAC AGCCTATTAA ACTTAGGGCT AACCCGTCTC TGTGGCAAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6170       6180       6190       6200       6210       6220       6230
GAGTGGGAAG AGCTCCGGGT AGAAGTGACA GACCTACCGA ACCTGGTAAT AGCTGGTTGC CTGAGAAATG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6240       6250       6260       6270       6280       6290       6300
GATAGAAGTT CAGCCTTGCA CATCCCCCAA TCAAAAATCT TTATTTAAGA TACTAGGGAA AAATGCGAGA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6310       6320       6330       6340       6350       6360       6370
GTTAGTTAGA GGGGGTACAG CCCCTCTAAC AAAGGATACA ACCTTAGCAG GAGGATAAAG ATCAAAATAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6380       6390       6400       6410       6420       6430       6440
ATAAAACACT CTGTTCTAGT GGGCCTAAAA GCAGCCATCT ACATAGAAAG CGTTAAAGCT CAGACAGAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6450       6460       6470       6480       6490       6500       6510
GAAGTTTATT ATTCTGATAA TAAATCTTAT TCCCCTAACA GTATCAGGCC ACCCCATGCC CCCATGGAGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6520       6530       6540       6550       6560       6570       6580
AAATTATGCT AAAATGAGTA ACAAGAAGAT TTGCTCTTCT CCGAGCACAA GTGTAGACCA GATCGGACAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6590       6600       6610       6620       6630       6640       6650
ACCGCTGGAA ATTAACGAGC CCAACCAAAG AGGGCAATGT GGACAACAAA AAAACCAAGA AAATCCCACA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6660       6670       6680       6690       6700       6710       6720
ACTTAAATAT CGTTAATCCC ACACTGGAGT GCTATATATT AAAGGAAAGA CTAAAAGAAA GGGAAGGAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6730       6740       6750       6760       6770       6780       6790
TCGGCAAACA CAAGCCTCGC CTGTTTACCA AAAACATCGC CTCCTGCAAA TTATTAAGTA TAGGAGGTCC
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      6800       6810       6820       6830       6840       6850       6860
AGCCTGCCCA GTGACTACGG GTTCAACGGC CGCGGTATTT TGACCGTGCA AAGGTAGCGC AATCACTTGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      6870       6880       6890       6900       6910       6920       6930
CTTTTAAATA GAGACCTGTA TGAATGGCCA AACGAGGGCT TAACTGTCTC CCCCTTCCAG TCAGTGAAAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      6940       6950       6960       6970       6980       6990       7000
TGATCTATCC GTGCAGAAGC GGGTGTAATT ATACAAGACG AGAAGACCCT TTGGAGCTTA AGGTACAAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      7010       7020       7030       7040       7050       7060       7070
CTCAATCACG TTAAACAACT TAATAAAGAA CATAAACTTA GTGGAAAATG AAGATTTACC TTCGGTTGGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      7080       7090       7100       7110       7120       7130       7140
GCGACCGCGG AGGAGAAACT AGCCTCCGAG TGGAATGGGC TAATCCCTAA AACCAAGAGA GACATCTCTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      7150       7160       7170       7180       7190       7200       7210
AGTCACAGAA CATCTGACCA AAAATGATCC GGCAAACAGC CGATCAACGA ACCAAGTTAC CCTAGGGATA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      7220       7230       7240       7250       7260       7270       7280
ACAGCGCAAT CCTCTCCCAG AGTCCATATC GACGAGGGGG TTTACGACCT CGATGTGGTG CAGCCGCTAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      7290       7300       7310       7320       7330       7340       7350
TAAGGGTTCG TTTGTTCAAC GATTAAAGTC CTACGTGATC TGAGTTCAGA CCGGAGTAAT CCAGGTCAGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      7360       7370       7380       7390       7400       7410       7420
TTCTATCTGT AATGCTACTT TTCCTAGTAC GAAAGGATCG GAAAAGAGGG GCCAATACTT AAAGCACGCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      7430       7440       7450       7460       7470       7480       7490
CCACCCCTAA TTAATGAAAA CAAATAAATT AAGTAAAGGG AGGGCCTAAA CCCTGCCGCC CAAAATAAGG
                                                                      *

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      7500       7510       7520       7530       7540       7550       7560
GCATACTGGG GTGGCAGAGC ATGGTAAATT GCGAAAGGCC TAAGCCCTTT AAACCAGAGG TTCAAATCCT
    --> trnL1

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      7570       7580       7590       7600       7610       7620       7630
CTTCCCAGTT TATGCTAAGC ACTCTACTAA ATCACCTCAT TAATCCCCTG GCCTATATTG TGCCCGTCCT
                --> ND1

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      7640       7650       7660       7670       7680       7690       7700
TCTAGCAGTA GCTTTCCTAA CCCTAATTGA ACGAAAAGTA CTGGGTTATA TGCAACTACG GAAGGGTCCA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        7710       7720       7730       7740       7750       7760       7770
AATGTAGTAG GACCTTATGG TCTACTTCAG CCTATTGCCG ATGGAGTCAA ACTATTTATT AAAGAACCCG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        7780       7790       7800       7810       7820       7830       7840
TACGTCCCTC TACATCATCC CCATTTCTAT TTTTAGCAAC CCCCATCCTT GCATCGACCC TAGCTATAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        7850       7860       7870       7880       7890       7900       7910
ATTATGAGCC CCAATACCTA TACCATTTCC AGTAGTTGAC CTAAATTTAG GGGTCCTATT TATCTTGGCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        7920       7930       7940       7950       7960       7970       7980
TTATCTAGCC TTGCGGTCTA TTCTATTTTA GGTTCCGGAT GAGCATCAAA CTCAAAATAT GCCCTAATTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        7990       8000       8010       8020       8030       8040       8050
GGGCCCTCCG GGCAGTAGCC CAAACAATTT CTTACGAGGT AAGCCTTGGA CTTATTTTAC TATCAGTAAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        8060       8070       8080       8090       8100       8110       8120
TATCTTTTCA GGGGGATATA CCCTTCAAAC ATTCAACACG GCCCAAGAAA GCATTTGATT ACTAGCCCCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        8130       8140       8150       8160       8170       8180       8190
GCATGGCCCC TAGCTGCAAT ATGGTATATT TCTACATTGG CCGAAACAAA CCGAGCACCC TTTGATTTGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        8200       8210       8220       8230       8240       8250       8260
CAGAAGGTGA ATCAGAATTA GTCTCAGGCT TCAACGTAGA GTACGCAGGG GGGCCCTTTG CCCTATTCTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        8270       8280       8290       8300       8310       8320       8330
TCTAGCCGAA TATGCAAACA TTTTACTAAT AAATACATTA TCAGCCGTCC TATTTCTAGG TACATCAAAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        8340       8350       8360       8370       8380       8390       8400
TTCCCTGGTA TACCCGAACT AACAACAATT GGACTCATAA CAAAAGCCGC GTTCCTATCA ATAGTATTTC

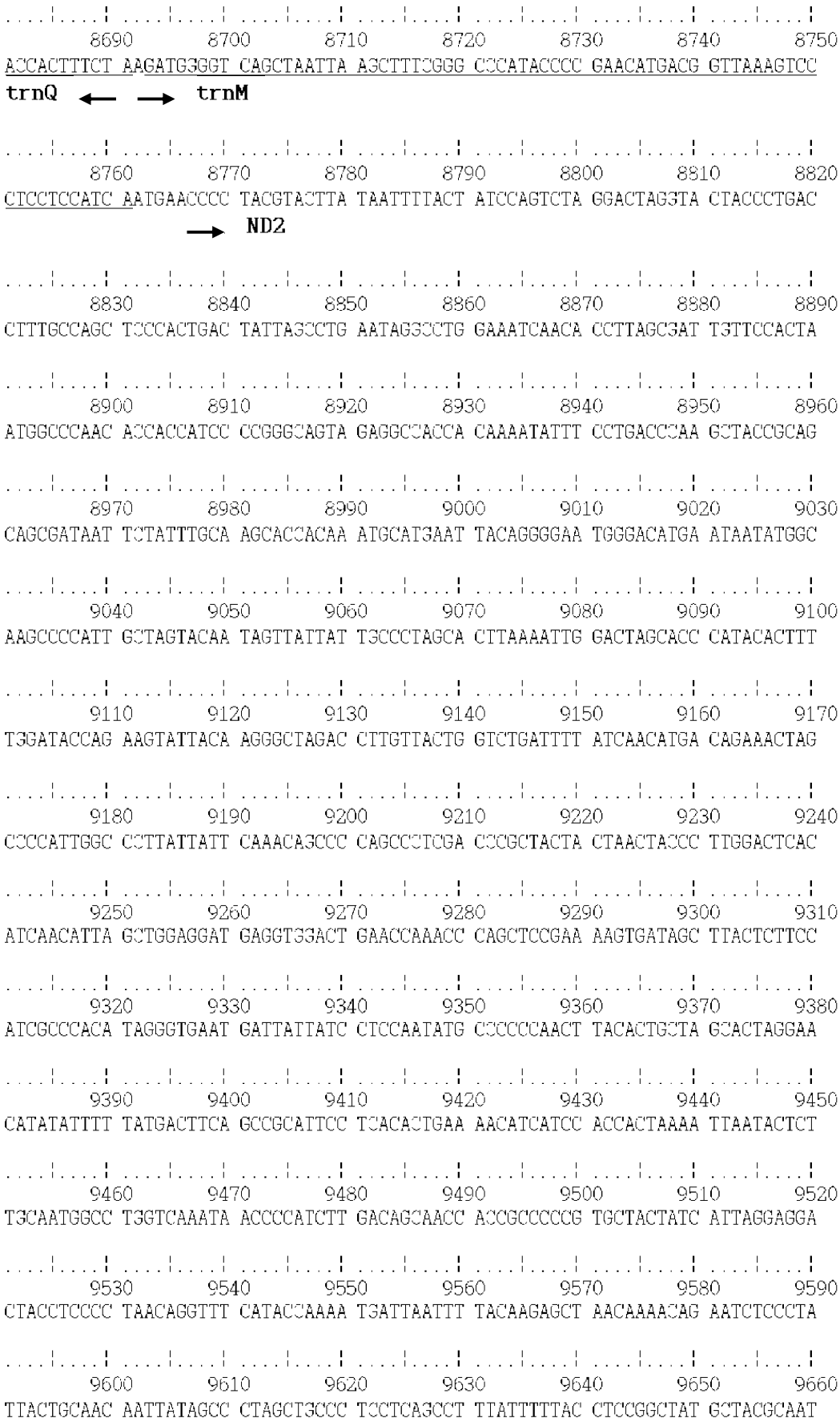
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        8410       8420       8430       8440       8450       8460       8470
TATGAGTACG GGCCTCATAC CCTCGGTTTC GATATGACCA ACTAATACAC CTCGTTTGAA AGAACTTTTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        8480       8490       8500       8510       8520       8530       8540
GCCCCTAACC TTAGCCCTAG TTTTATGGCA TATTGCCTTG CCCATTGCGC TAGCGGGCCT CCCACCACAA

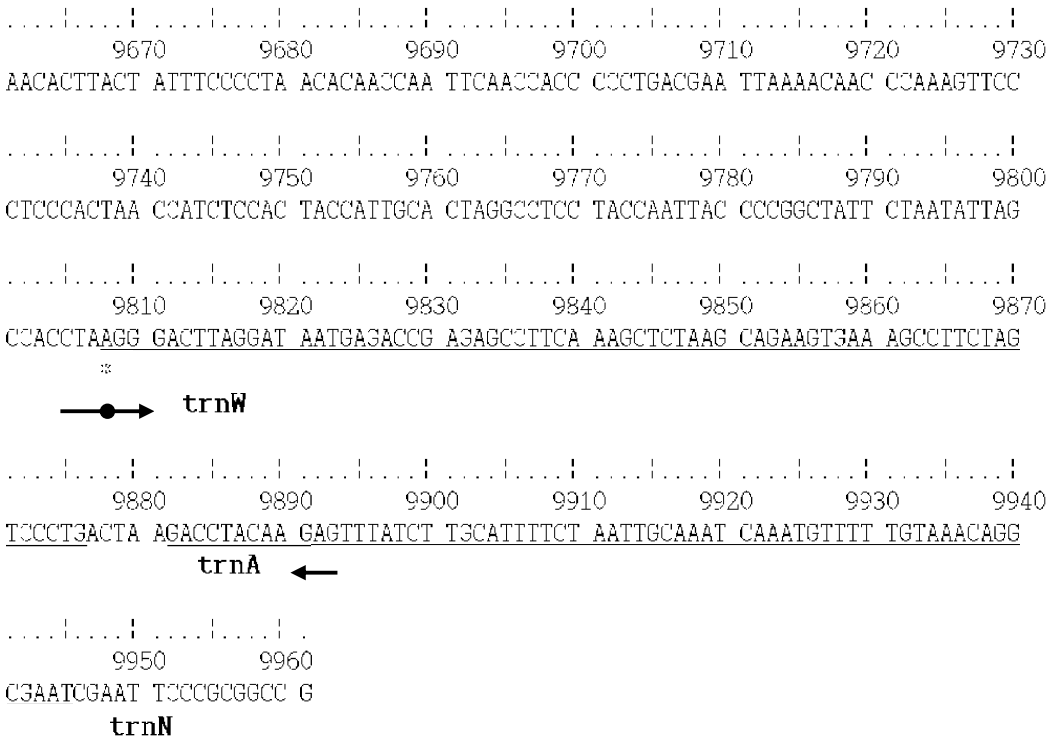
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        8550       8560       8570       8580       8590       8600       8610
TTATAGCCCA GGAACTGTGC CCGAATGCTT AGGGACCACT TTGATAGAGT GGCCAATAGG GGCTAAAATC
      *
 ●——  ——▶ trnI

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        8620       8630       8640       8650       8660       8670       8680
CCCTCAGTTC TTAGAAAGAA GGGGGTCGAA CCCATGCCCA AGAGATCAAA ACTCTTAGTG CTTCCTCTAC
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.12. 얼룩새코미꾸리 (*Koreocobitis naktongensis*)



- 계통 (Systematics)
  Phylum Chordata 척삭동물 문
  Class Actinopterygii 조기 강
  Order Cypriniformes 잉어 목
  Family Cobitidae 미꾸리과
- 기상 (Diagnosis)
  몸길이 : 10~16cm
- 서식처 (Habitat)
  물살이 빠르고 바닥에 큰 돌이나 자갈이 많이 깔린 하천의 중상류지역에서 생활.

그림 V-66. 얼룩새코미꾸리

얼룩새코미꾸리는 잉어목 미꾸리과의 어류로서 2005년 2월 환경부가 시행한 야생동식물보호법에 의해 멸종위기야생동식물 Ⅰ급으로 지정되어 보호되고 있으며 낙동강수계에만 제한적으로 분포한다 (그림 V-66).

3.12.1. Sample 준비

어류채집의 다양한 방법을 이용하여 얼룩새코미꾸리의 집단 서식처인 경상북도 영천시 임고면 금호강에서 대상종의 시료를 확보하였다. 실험 재료로 쓸 표본은 가급적 살아있는 상태로 (혹은 냉동상태) 실험실에 운반하여 total genomic DNA 추출에 이용한다.

3.12.2. Total genomic DNA 추출

얼룩새코미꾸리 생체 근육조직의 일부 (25mg)를 떼어내어 DNeasy Tissue kit (Qiagen, Co.)의 추출과정을 이용하여 total genomic DNA를 추출한다.

3.12.3. Primer 제작

얼룩새코미꾸리의 미토콘드리아 분석 연구에 앞서 선행연구 자료 (Kawaguchi et al., 2001 and Miya and Nishida, 1999, 2000b)를 토대로 어류 분류군의 universal primer를 제작하였다 (그림 V-67, 표 V-35). 고안되어진 primer는 16S rRNA와 tRNA-Leu2 유전자의 양방향 영역의 2set (16SH-LeuL, 16SL-LeuL)이다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

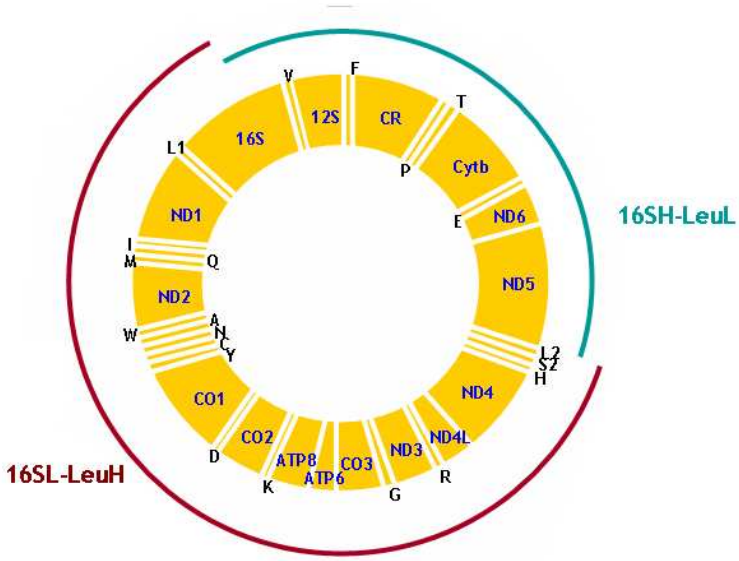


그림 V-67. 어류에서 사용되어진 primer strategy

표 V-35. 감돌고기에서 사용된 primer 염기서열

Primer name	Primer Sequence	Gene region
S-LA-16S-H	5'-TGC ACC ATT AGG ATG TCC TGA TCC AAC ATC-3'	16S rRNA ~tRNA-Leu
L-12321-Leu	5'-GGT CTT AGG AAC CAA AAA CTC TTG GTG CAA-3'	
S-LA-16S-L	5'- GAT GTT GGA TCA GGA CAT CCC AAT GGT GCA-3'	16S rRNA ~tRNA-Leu
H-12321-Leu	5'- GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G -3'	

3.12.4. PCR 증폭

표 V-36. 16S rRNA gene과 tRNA-Leu gene 사이 (약 7kb)를 증폭하기 위한 Long range-PCR 조건

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1㎕
Reverse primer	1㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	17.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
$MgCl_2$	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	14.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	14 cycles
57℃	30sec	
68℃	6min	
92℃	10sec	24 cycles
57℃	30sec	
68℃	6min +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

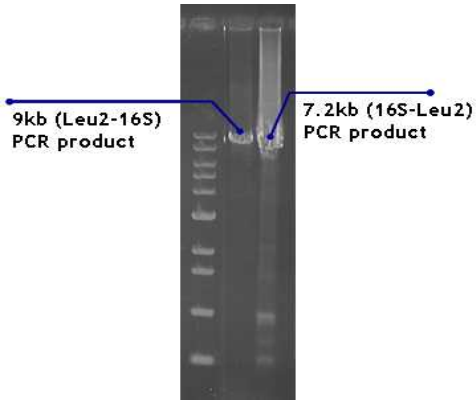


그림 V-68. 얼룩새코미꾸리 PCR product
① 1kb ladder
② 9kb PCR product
③ 7.2kb PCR product

표 V-37. 16S rRNA gene과 tRNA-Leu gene 사이 (약 9kb)를 증폭하기 위한 Long range-PCR 조건

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1㎕
Reverse primer	1㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	17.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
$MgCl_2$	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	14.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	14 cycles
53℃	30sec	
68℃	7min	
92℃	10sec	24 cycles
53℃	30sec	
68℃	7min +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

3.12.5. 염기서열 결정

9kb와 7.2kb PCR product의 염기서열 분석 결과 trnL2 유전자에서부터 16S rRNA 유전자까지 7,281bp의 서열을 얻었다. 이 유전체는 3개의 protein coding 영역, 1개의 rRNA 영역, 1개의 control region, 5개의 tRNA 영역, 2개의 partial gene (16S rRNA, trnL2)으로 구성되어 총 10개의 유전자 데이터를 얻었다. 얼룩새코미꾸리의 유전자 배열은 어류의 전형적인 형태를 그대로 가진다 (그림 V-69).

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

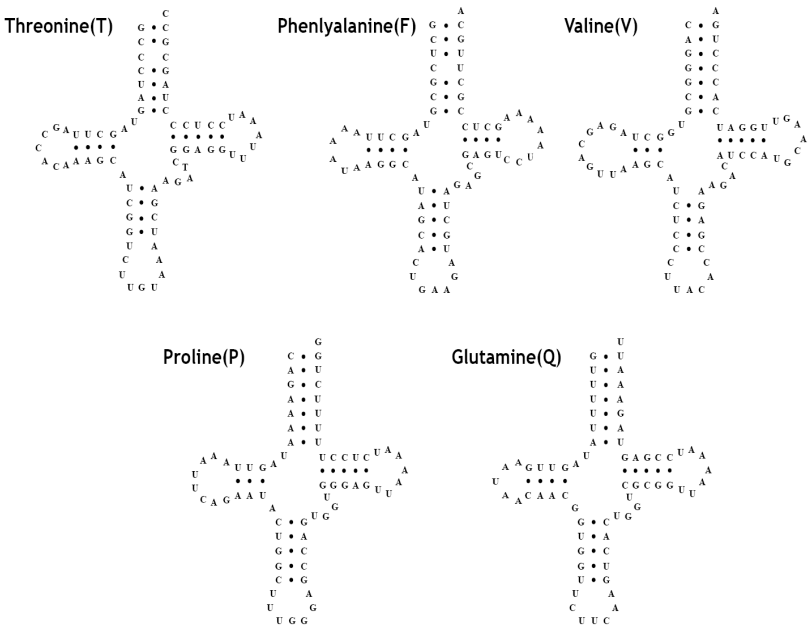


그림 V-69. 얼룩새코미꾸리 미토콘드리아의 tRNA 2차 구조

▪ 얼룩새코미꾸리의 염기서열 및 annotation (7,281bp)

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        10        20        30        40        50        60        70
CTCCATATGG TCGACCTGCA GGCGGCCGCG AATTCACTAG TGATTGGTCT TAGGAACCAA AAACTCTTGG
trnL2                                                  ND5

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        80        90       100       110       120       130       140
TGCAAATCCA AGTAAAAGCT ATGCACCCAA CAACCCTGAC CCTATCTTCC TCACTAATTC TGGTAATTGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       150       160       170       180       190       200       210
TATTCTCATC TACCCCCTTC TAACCACCCT CAATCCTCAC CCACAAAACC AAAAATGAGC AATCATACAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       220       230       240       250       260       270       280
GTTAAAACCG CCGTAAGTAC TGCATTCCTA GTAAGCCTTT TACCATTAAT AATTTTCCTC GACCAGGGCG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       290       300       310       320       330       340       350
CCGAAGTTAT TGTCACAAAC TGACACTGAA TGAATACCTC CCCATTTGAT ATTAACCTCA GCTTCAAGTT
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       360       370       380       390       400       410       420
TGACCAATAC TCCATCATTT TCACACCCAT TGCCCTATAC GTAACTTGAT CCATCCTTGA ATTTGCATCC
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        430        440        450        460        470        480        490
TGGTATATAC ACTCCGACCC ACTTATAAAC CGATTCTTTA AATATCTACT ACTGTTTCTT GTAGCTATAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        500        510        520        530        540        550        560
TTACACTCGT CACCGCGAAC AACATATTTC AGCTTTTTAT CGGCTGGGAA GGGGTGGGGA TCATATCCTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        570        580        590        600        610        620        630
TCTTCTCATC GGCTGATGAT ATGGACGAGC AGATGCCAAT ACAGCAGCCT TACAAGCCGT CCTATATAAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        640        650        660        670        680        690        700
CGAGTGGGTG ATATTGGATT AATTATAACC ATAGCCTGAC TTGCAATAAA CCTTAATTCA TGAGAAATTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        710        720        730        740        750        760        770
AACAAATTTT TTTCTTATCA AAAAATTTTG ATATGACCCT GCCCCTCCTA GGCCTAATCT TAGCCGCAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        780        790        800        810        820        830        840
TGGAAAATCA GCCCAATTTG GGCTTCACCC TTGACTACCC TCCGCCATGG AGGGCCCTAC GCCAGTATCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        850        860        870        880        890        900        910
GCCCTACTTC ACTCCAGCAC CATAGTTGTG GCTGGAATTT TTTTACTCAT TCGCCTACAC CCACTCATAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        920        930        940        950        960        970        980
AAGAAAACAG CCTTGCACTA ACAACCTGCC TCTGCTTGGG GGCCATTACA ACCTTATTTA CAGCAGCCTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        990       1000       1010       1020       1030       1040       1050
TGCCCTTACC CAGAATGATA TTAAAAAAAT TGTTGCATTC TCTACATCAA GCCAGCTCGG GCTTATAATA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1060       1070       1080       1090       1100       1110       1120
GTTACTGTAG GGCTAAACCA GCCTCAATTG GCATTTCTCC ATATCTGTAC ACACGCTTTC TTTAAAGCAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1130       1140       1150       1160       1170       1180       1190
TATTATTTCT ATGCTCAGGG TCTATTATTC ACAGCCTAAA TGATGAACAA GACATTCGAA AAATGGGGGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1200       1210       1220       1230       1240       1250       1260
TCTCCAAAAC CTAATACCCC TAACCTCAAC CTGCCTGACA ATCGGTAGTC TAGCACTAAC AGGCACCCCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1270       1280       1290       1300       1310       1320       1330
TTTTTAGCCG GCTTTTTCTC AAAAGATGCT ATTATTGAGG CCCTAAATAC CTCTCACCTA AACGCCTGAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1340       1350       1360       1370       1380       1390       1400
CCCTAATCCT CACTCTCATC GCCACCTCTT TCACCGCAGT ATATAGCCTC CGCGTAGTGT ATTTCGTCAC
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1410       1420       1430       1440       1450       1460       1470
AATAGGCACA CCCCGATTTC TTCCTCTATC ACCAATTAAT GAAAATAACC CCTCAGTTAT CAACCCAATC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1480       1490       1500       1510       1520       1530       1540
AAACGACTCG CCTGGGGTAG CATTATTGCT GGATTAATCA TTACATCAAA TTTTTTACCC TCAAAAACAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1550       1560       1570       1580       1590       1600       1610
CTATTATAAG TATACCCCTC ACCCTCAAAT TAGCAGCCTT GCTAGTCACA ATCATTGGCC TACTTACTGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1620       1630       1640       1650       1660       1670       1680
CCTAGAACTA ACTGCTCTGA CCAATAAACA ATTTAAAATT ACCCCTAAAA TTCCACTACA CCACTTCTCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1690       1700       1710       1720       1730       1740       1750
AACATACTAG GCTATTTTCC AACAATTATT CACCGACTTG CCCCCAAACT TAACCTAGCC TTAGGTCAAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1760       1770       1780       1790       1800       1810       1820
CAATCGCCAC TCAACTAGTT GACCAAACAT GATTTGAAGC CGCGGGCCCA AAGGGCATAT CCTCGCTCCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1830       1840       1850       1860       1870       1880       1890
AGTAAAAATA GCTAAAACTG TAAGTGATGC ACAACAAGGT ATAATCAAAA CCTACCTAAT AATTTTTCTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1900       1910       1920       1930       1940       1950       1960
TTAACCACAA CCATTGCCAT CCTTCTAGCC ATGGCTTAAA CCGCTCGAAG AGAGCCCCGG CTTAACCCTC
  **
```



```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1970       1980       1990       2000       2010       2020       2030
GAGTCAACTC TAAAACTACA AATAAAGTTA AAAGCAGTAC CCACGCACAA ATTACTAATA CACCCCCTCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2040       2050       2060       2070       2080       2090       2100
CGACGAATAT ATTATAGCCA CACCACTAAT ATCCCCCCGC AACATGGAAA ACTCCTTAAA AGTATCAATT

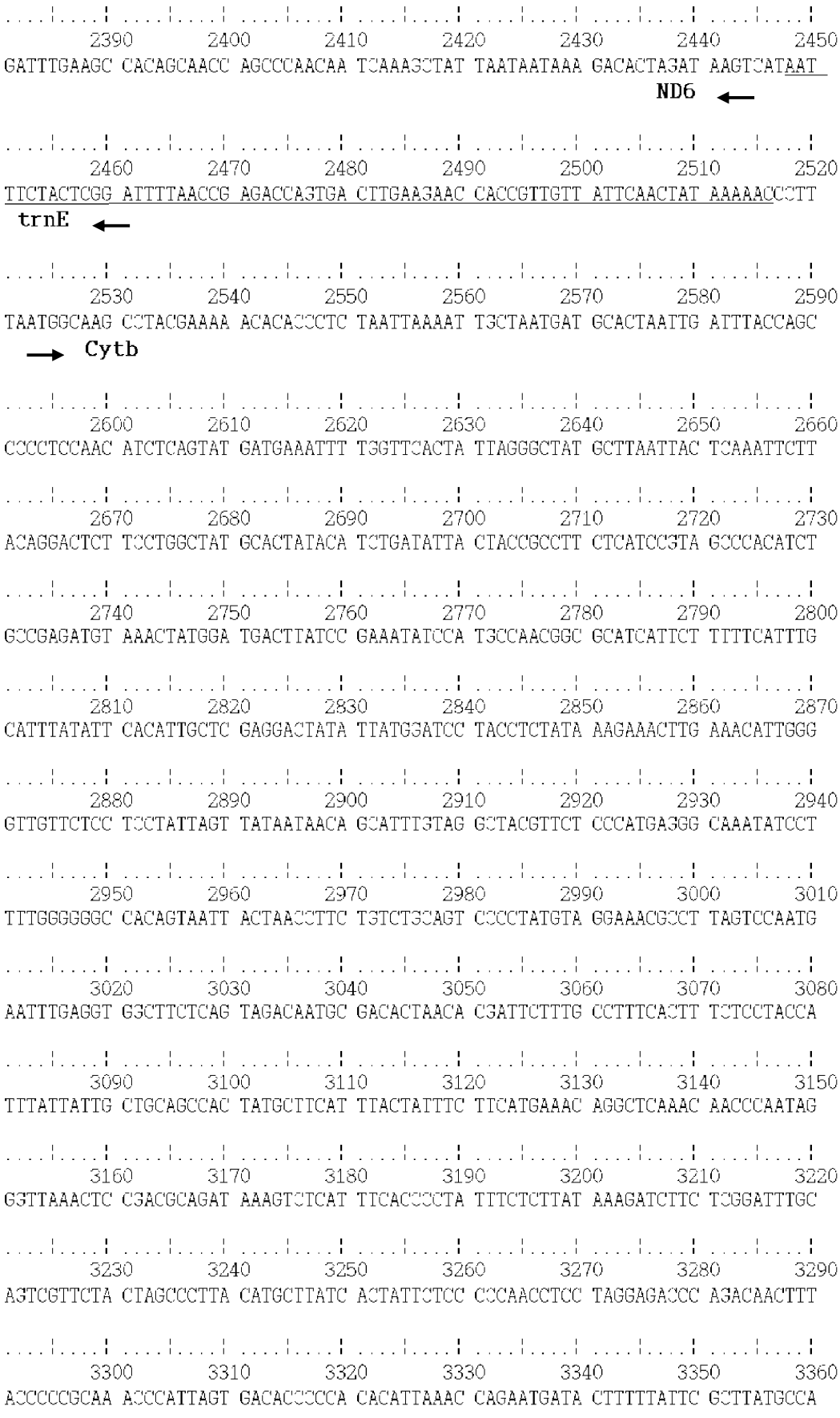
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2110       2120       2130       2140       2150       2160       2170
ACTATTCAAG AGCCCTCATA TCAGTCCGCG TAAAAAAAAT TTATTACTGA TCCCACACCA ACTAAATAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2180       2190       2200       2210       2220       2230       2240
CTAAAACATA GCCCAACACA GAACGATCGC CTCAAGACTC CGGAAATGGC TCAGCTGCCA AAGCAGCTGA

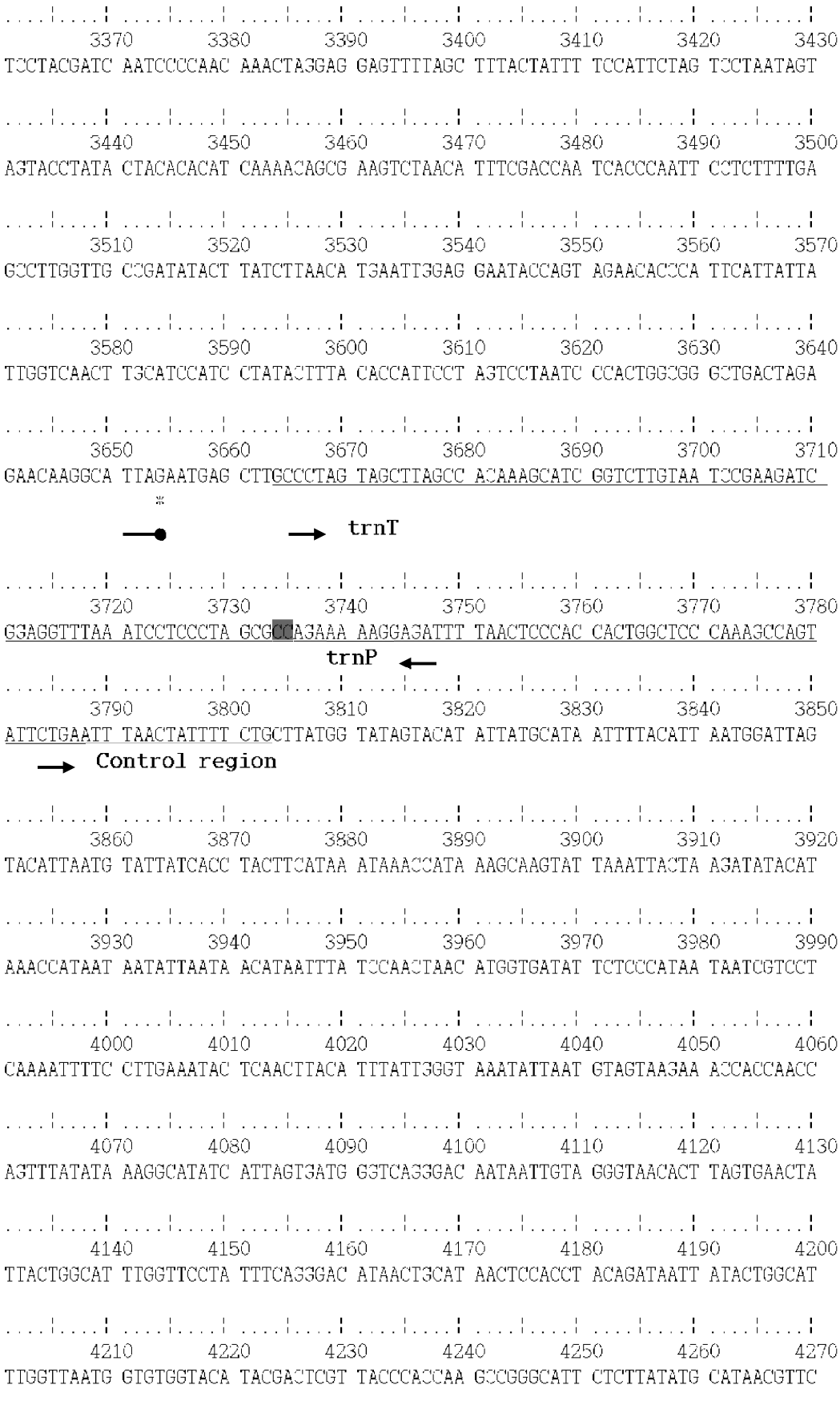
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2250       2260       2270       2280       2290       2300       2310
ATAAGCAAAC ACTACGAGTA TCCCCCCTAA ATAAATCAAA AAAAGAACTA ATGATAAAAA AGATCCCCCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        2320       2330       2340       2350       2360       2370       2380
TGGCTAATTA AAATACCACA CCCAACCCCC GCTGCCACCA CCAACCCCAA AGCAGCAAAA TAAGGTGCTG
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4280       4290       4300       4310       4320       4330       4340
TCCTTTTGGT TTACCTTTCC TATACATCCC AGAGTGCAGG CTCAAATAAC AAAACAAGGT GGAACATTTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4350       4360       4370       4380       4390       4400       4410
TCTTGCTCGA CTTAATATAA GTGAATGATA AAAAGACATA ACTCAAGCAT TACATATGTT TAAATCAAGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4420       4430       4440       4450       4460       4470       4480
GCATAACACA TCCTTATTCA ACACAGCTTT ATACTATATG CCCCCTTTTG GTTTTTGCGC GACAAACCCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4490       4500       4510       4520       4530       4540       4550
CTTACCCCCT ACGCTGGGCG ATTCCTGTTT ATTCTTGTCA AACCCCGAAA CCAAGAAAGA CTCGACTAAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4560       4570       4580       4590       4600       4610       4620
CGCATCAAAA TCAACAAGTT GTAGTAAGTG TTGACTTATG CCACCACATT ATATATATAT ATATAACATA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4630       4640       4650       4660       4670       4680       4690
AAATATGCAT ATAATAATTT TTATGAATAC CCAAAAACCA GCATTAAATT TTAATAAAAC ATTGTCAATC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4700       4710       4720       4730       4740       4750       4760
CTAACTTATC AGAGAATAAA TATGCTCGCG TAGCTTAAAA TAAGGCATAG CACTGAAGAT GCTAAGATGA
                                 ---------->
                                   trnF

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4770       4780       4790       4800       4810       4820       4830
GCCCTAAAAA GCTCCGCTTG CATAAAGGCT TGGTCCTGAC TTTACCATCA GCTTTAGCCA AATTTACACA
                                 ---------->
                                   12S rRNA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4840       4850       4860       4870       4880       4890       4900
TGCAAGTCTC CGCAAACCCG TGAGAATGCC CTCAATCCCC CGCCCGGGGA CGAGGAGCAG GCATCAGGCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4910       4920       4930       4940       4950       4960       4970
CAAATTTTTA GCCCAAGACG CCTTGCCACG CCACACCCCC AAGGGAACTC AGCAGTGATA AATATTAAGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4980       4990       5000       5010       5020       5030       5040
CATAAGTGAA AACTTGACTT AGTTAGGGAT AAGAGGGCCG GTAAAACTCG TGCCAGCCAC CGCGGTTATA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5050       5060       5070       5080       5090       5100       5110
CGAGAGGCCC CAGTTGATGG ACGCGGCGTA AAGGGTGGTT AAGGTCTAAC ATTAATAAAG CCAAAAGACT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5120       5130       5140       5150       5160       5170       5180
TCTTGGCCGT CATACGCCCC TGAATGCCTG AAATTCACAC ACGAAAGTAG CTTTAACATC AGCCCACCTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5190       5200       5210       5220       5230       5240       5250
ACCCCACGAA AACTGAGAAA CAAACTGGGA TTAGATACCC CACTATGCTC AGCCGTAAAC TTAGACGTTA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5260       5270       5280       5290       5300       5310       5320
TTTCACAATA AACGTCCGCC AGGGTACTAC GAGCATTAGC TTAAAACCCA AAGGACTTGG CGGTGCCTTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5330       5340       5350       5360       5370       5380       5390
GACCCCCCTA GAGGAGCCTG TTCTAGAACC GATAACCCCC GTTAAACCTC ACCACTTCTG GTCACCCCCG
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5400       5410       5420       5430       5440       5450       5460
CCTATATACC GCCGTCGTCA GCTTACCCTG TGAAGGACTA ATAGTAAGCA AAGTGGACAT ACTCCAAAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5470       5480       5490       5500       5510       5520       5530
GTCAGGTCGA GGTGTAGCGA ACGAAGTGGG AAGAAATGGG CTACATTTTC TTTTACAAGA ATACCACGGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5540       5550       5560       5570       5580       5590       5600
CAACACTATG AAAACTAGTG CTCGAAGGAG GATTTAGTAG TAAAAAGGAA ATAGAGTGTC CTTTTGAACC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5610       5620       5630       5640       5650       5660       5670
CGGCTCTGAG GCGCGTACAC ACCGCCCGTC ACTCTCCCCG CTAAATAGCA ACAAACGTTA TTAACACAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5680       5690       5700       5710       5720       5730       5740
AGCACAAACA AGGGGAGGCA AGTCGTAACA TGGTAAGTGT ACCGGAAGGT GCACTTGGAT CAAATCAGGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5750       5760       5770       5780       5790       5800       5810
CGTGGCTGAG ACAGTTAAGC ATCTCCCTTA CACCGAGAAG ACATCCATGC AAGTTGGATC ACCCTGAGCT
trnV ⟶

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5820       5830       5840       5850       5860       5870       5880
AAACAGCTAG CTTAATTACC ACACTAAATT AATAATATAT ATAAATTAGC AAAACCTAAA ATTAATAACC
16S rRNA ⟶

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5890       5900       5910       5920       5930       5940       5950
AAACCATTTT TCCACCTAAG TACGGGAGAC GAAAAAGGTC CCATGAGCAA TAGAAAAAGT ACCGCAAGGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5960       5970       5980       5990       6000       6010       6020
AAAGCTGAAA GAGCAATGAA ATAAGTCATA CAAGCACAAA AAAGCAGAGA CTAGCACTCG TACCTTTTGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6030       6040       6050       6060       6070       6080       6090
ATCATGATTT AGCAAGAACC CAACAAGCAA AGAGACCTTT AGTTTGTTAC CCCGAAACCA AGTGAGCTAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6100       6110       6120       6130       6140       6150       6160
CCCGGGACAG CCTAAAAGGG CCAACCCGTC TCTGTGGCAA AAGAGTGGGA AGAGCCCCGG GTAGAGGTGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6170       6180       6190       6200       6210       6220       6230
CAGACCTACC GAACTTGGTG ATAGCTGGTT GCCTAAGAAA TGAATAGAAG TTCAGCCTCG TGCTCCCTTT
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6240       6250       6260       6270       6280       6290       6300
AATCAAATAA GTAATATCTA CTATAGAAAA TAAGAAAAAC ATGAGAGTTA GTTAAAGAGG GTACAGCCCC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6310       6320       6330       6340       6350       6360       6370
TTTGACCAAG GATACAACTT TAATAGGAGG ATAGGGATTA TAATTAAAAA AATTATTGTT TCAGTGGGCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6380       6390       6400       6410       6420       6430       6440
TAAAAGCAGC CACCTGCACA GAAAGCGTTA AAGCTCAGAC AATACGAAAT TTATTATTTC AATAGTCCAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6450       6460       6470       6480       6490       6500       6510
CCCACTCCCC TACTTATACT GGGCCGCCCC ATGACATCAT GGGAGAGATT ATGCTAAAAT GAGTAACAAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6520       6530       6540       6550       6560       6570       6580
AGACAACACT TCTCTCCAAG CACAAGTGTA AGCCAGCCCG GATGAACCAC TGGCAATTAA CGAACCCAAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6590       6600       6610       6620       6630       6640       6650
AAAAGAGGGC AATGTAGCCA ATATAAGACA CAAGAAAATT GTACAATATA TAATCGTTAA ACCCACACTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6660       6670       6680       6690       6700       6710       6720
GAGTGCCTCA AGGAAAGACT AAAAAAAAGG GAAGGAACTC GGCAAACCCA AGCCTCGCCT GTTTACCAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6730       6740       6750       6760       6770       6780       6790
AACATCGCCT CCTGCAAAAT TCAAGGTATA GGAGGTCCAG CCTGCCCAGT GACCACAAGT TCAacgGCCG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6800       6810       6820       6830       6840       6850       6860
CGGTATTttg AccGTGCAAA GGTAGCGCAA TCACTTGTCT TTTAAATGAA GACCTGTATG AATGGCCAAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6870       6880       6890       6900       6910       6920       6930
CGAGGGCTTA GCTGTCTCCC CTTTTAAGTC AGTGAAATTG ATCTGCCCGT GCAGAAGCGG ACATACATAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6940       6950       6960       6970       6980       6990       7000
ACAAGACGAG AAGACCCTTT GGAGCTTAAG GTTCAACCCC AACCGCGTCA AACAACTTTA TAAATAAGGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        7010       7020       7030       7040       7050       7060       7070
ATAAACCTAG CGGAAAATGG GACTTTACCT TCGGTTGGGG CGACCACGGA GAAAAAATCA TCCTCCGAGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        7080       7090       7100       7110       7120       7130       7140
GGACTGGGCC AACAAGCCTA AAACTAAGAA AGACATTTCT AAGCCACAGA AAATCTGACC AGCAATGATC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        7150       7160       7170       7180       7190       7200       7210
CGGCCTGTAG GCCGATCAAC GGACCAAGTT ACCCTAGGGA TAACAGCGCA ATCCTCTCCC AGAGTCCATA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|.
        7220       7230       7240       7250       7260       7270       7280
TCGACGAGGG GGTTTACGAC CTCGATGtgg ATCAGGGCAT CCTAATGGTG CAAATCGAAt TCCCGCGGCCG
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.13. 꼬치동자개 (*Peudobagrus brevicorpus*)



그림 V-70. 꼬치동자개

- 계통 (Systematics)
  Phylum Chordata 척삭동물 문
  Class Actinopterygii 조기 강
  Order Siluriformes 메기 목
  Family Bagridae 동자개 과
- 기상 (Diagnosis)
  몸길이 : 63~92㎝
- 서식처 (Habitat)
  물이 맑고 바닥에 자갈이나 큰 돌이 깔린 하천 상류지역의 소에서 생활.

꼬치동자개는 메기목 동자개과로 대한민국의 고유종이며 멸종위기야생동식물 I 급이며 천연기념물 제455호로서 낙동강 일부 수역에만 제한적으로 분포하고 있다 (그림 70).

3.13.1. Sample 준비

어류채집의 다양한 방법을 이용하여 꼬치동자개의 집단 서식처인 경상북도 영천시 임고면 금호강에서 대상종의 시료를 확보하였다. 실험 재료로 쓰여질 표본은 가급적 살아있는 상태로 (혹은 냉동상태) 실험실에 운반하여 total genomic DNA 추출에 이용한다.

3.13.2. Total genomic DNA 추출

꼬치동자개 생체의 근육조직의 일부 (25mg)를 떼어내어 DNeasy Tissue kit (Qiagen, Co.)의 추출과정을 이용하여 total genomic DNA를 추출한다.

3.13.3. Primer 제작

꼬치동자개의 미토콘드리아 분석 연구에 앞서 선행연구 자료 (Kawaguchi et al., 2001 and Miya and Nishida, 1999, 2000b)를 토대로 어류 분류군의 universal primer를 제작하였다 (그림 V-71, 표 V-38). 고안되어진 primer는 16S rRNA와 tRNA-Leu2 유전자의 양방향 영역의 2set (16SH-LeuL, 16SL-LeuL)이다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

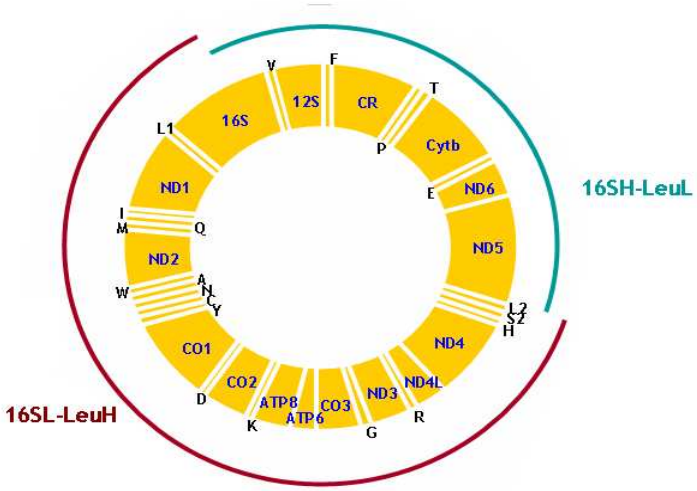


그림 V-71. 어류에서 사용되어진 primer strategy

표 V-38. 꼬치동자개에서 사용된 primer 염기서열

Primer name	Primer Sequence	Gene region
S-LA-16S-H	5'-TGC ACC ATT AGG ATG TCC TGA TCC AAC ATC-3'	16S rRNA ~tRNA-Leu
L-12321-Leu	5'-GGT CTT AGG AAC CAA AAA CTC TTG GTG CAA-3'	
S-LA-16S-L	5'- GAT GTT GGA TCA GGA CAT CCC AAT GGT GCA-3'	16S rRNA ~tRNA-Leu
H-12321-Leu	5'- GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G -3'	

3.13.4. PCR 증폭

표 V-39. 16S rRNA gene과 tRNA-Leu gene 사이 (약 7kb)를 증폭하기 위한 Long range-PCR 조건

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1㎕
Reverse primer	1㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	17.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
$MgCl_2$	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	14.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	14 cycles
57℃	30sec	
68℃	6min	
92℃	10sec	24 cycles
57℃	30sec	
68℃	6min +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

표 V-40. 16S rRNA gene과 tRNA-Leu gene 사이 (약 9kb)를 증폭하기 위한 Long range-PCR 조건

mix 1	
dNTP(10mM)	2.5㎕
Forward primer	1㎕
Reverse primer	1㎕
Template DNA	3㎕
D. W.	17.5㎕
Total	25㎕

mix 2	
10X buffer	5㎕
$MgCl_2$	5㎕
Taq polymerase	0.75㎕
D. W	14.25㎕
Total	25㎕

Temp	Time	Cycle
92℃	2min	
92℃	10sec	14 cycles
53℃	30sec	
68℃	7min	
92℃	10sec	24 cycles
53℃	30sec	
68℃	7min +20sec/cycle	
68℃	7min	
4℃	forever	

3.13.5. 염기서열 결정

9kb와 7.2kb PCR product의 염기서열 분석 결과 trnS2 유전자에서부터 16S rRNA 유전자까지 7,196bp의 염기서열을 결정하였다. 이 유전체는 3개의 protein coding 영역, 1개의 rRNA 영역, 1개의 control region, 6개의 tRNA 영역, 2개의 partial gene (16S rRNA, trnS2)으로 구성되어 총 11개의 유전자 데이터를 얻었다. 꼬치동자개의 유전체 분석은 앞서 분석된 잉어목의 어류 2종과는 다른 메기목 어류이지만 동일한 형태의 유전자 배열 상태를 보임을 확인하였다.

▪ 꼬치동자개의 염기서열 및 annotation (7,196bp)

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        10        20        30        40        50        60        70
TCTCCATATG GTCGACCTGC AGGCGGCCGC GAATTCACTA GTGATTGGTC TTAGGAACCA AAAACTCTTG
                                  ⟶ trnL2

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        80        90       100       110       120       130       140
GTGCAAATCC AAGTAAAAGC TATGCACCCA ACAACCCTGA CCCTATCTTC CTCACCAATT CTGGTAATTG
                                  ⟶ ND5
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       150        160        170        180        190        200        210
CTATTCTCAT CTACCCCCTT CTAACCACCC TCAATCCTCA CCCACAAAAC CAAAAATGAG CAATCATACA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       220        230        240        250        260        270        280
CGTTAAAACC GCCGTAAGTA CTGCATTCCT AGTAAGCCTT TTACCATTAA TAATTTTCCT CGACCAGGGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       290        300        310        320        330        340        350
GCCGAAGTTA TTGTCACAAA CTGACACTGA ATGAATACCT CCCCATTTGA TATTAACCTC AGCTTCAAGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       360        370        380        390        400        410        420
TTGACCAATA CTCCATCATT TTCACACCCA TTGCCCTATA CGTAACTTGA TCCGTCCTTG AATTTGCATC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       430        440        450        460        470        480        490
CTGGTATATA CACTCCGACC CACTTATAAA CCGATTCTTT AAATATCTAC TACTGTTTCT TGTAGCTATA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       500        510        520        530        540        550        560
ATTACACTCG TCACCGCGAA CAACATATTT CAGCTTTTTA TCAGCTGGGA AGGGGTGGGG ATCATATCCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       570        580        590        600        610        620        630
TTCTTCTCAT CGGCTGATGA TATGGACGAG CAGATGCCAA TACAGCAGCC TTACAAGCCG TCCTATATAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       640        650        660        670        680        690        700
TCGAGTGGGT GATATTGGAT TAATTATAAC CATAGCCTGA CTTGCAATAA ACCTTAATTC ATGAGAAATT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       710        720        730        740        750        760        770
CAACAAATTT TTTTCTTATC AAAAAATTTT GATATGACCC TGCCCCTCCT AGGCCTAATC TTAGCCGCAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       780        790        800        810        820        830        840
CTGGAAAATC AGCCCAATTT GGGCTTCACC CTTGACTACC CTCCGCCATG GAGGGCCCTA CGCCAGTATC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       850        860        870        880        890        900        910
TGCCCTACTT CACTCCAGCA CCATAGTTGT GGCTGGAATT TTTTTACTCA TCCGCCTACA CCCACTCATA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       920        930        940        950        960        970        980
GAAGAAAACA GCCTTGCACT AACAACCTGC CTCTGCTTGG GGGCCATTAC AACCTTATTT ACAGCAGCCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       990       1000       1010       1020       1030       1040       1050
GTGCCCTTAC CCAGAATGAT ATTAAAAAAA TTGTTGCATT CTCTACATCA AGCCAGCTCG GGCTTATAAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
       1060       1070       1080       1090       1100       1110       1120
AGTTACTGTA GGGCTAAACC AGCCTCAATT GGCATTTCTC CATATCTGTA CACACGCTTT CTTTAAAGCG
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1130       1140       1150       1160       1170       1180       1190
ATATTATTTC TATGCTCAGG GTCTATTATT CACAGCCTAA ATGATGAACA AGACATTCGA AAAATGGGGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1200       1210       1220       1230       1240       1250       1260
GTCTCCAAAA CCTAATACCC CTAACCTCAA CCTGCCTGAC AATCGGTAGT CTAGCACTAA CAGGCACCCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1270       1280       1290       1300       1310       1320       1330
CTTTTTAGCC GGCTTTTTCT CAAAAGATGC TATTATTGAG GCCCTAAATA CCTCTCACCT AAACGCCTGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1340       1350       1360       1370       1380       1390       1400
GCCCTAATCC TCACTCTCAT CGCCACCTCT TTCACCGCAG TATATAGCCT CCGCGTAGTG TATTTCGTCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1410       1420       1430       1440       1450       1460       1470
CAATAGGCAC ACCCCGATTT CTTCCTCTAT CACCAATTAA TGAAAATAAC CCCTCAGTTA TCAACCCAAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1480       1490       1500       1510       1520       1530       1540
CAAACGACTC GCCTGGGGTA GCATTATTGC TGGATTAATC ATTACATCAA ATTTTTTACC CTCAAAAACA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1550       1560       1570       1580       1590       1600       1610
CCTATTATAA GTATACCCCT CACCCTCAAA TTAGCAGCCT TGCTAGTCAC AATCATTGGC CTACTTACTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1620       1630       1640       1650       1660       1670       1680
CCCTAGAACT AACTGCTCTG ACCAATAAAC AATTTAAAAT CACCCCTAAA ATTCCACTAC ACCACTTCTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1690       1700       1710       1720       1730       1740       1750
AAACATACTA GGCTATTTTC CAACAATTAT TCACCGACTT GCCCCCAAAC TTAACCTAGC CTTAGGTCAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1760       1770       1780       1790       1800       1810       1820
TCAATCGCCA CTCAACTAGT TGACCAAACA TGATTTGAAG CCGCGGGCCC AAAGGGCATA TCCTCGCTCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1830       1840       1850       1860       1870       1880       1890
AAGTAAAAAT AGCTAAAACT GTAAGTGATG CACAACAAGG TATAATCAAA ACCTACCTAA TAATTTTTCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1900       1910       1920       1930       1940       1950       1960
ATTAACCACA ACCATTGCCA TCCTTCTAGC CATGGCTTAA ACCGCTCGAA GAGAGCCCCG GCTTAACCCT
 *   *
```



```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        1970       1980       1990       2000       2010       2020       2030
CGAGTCAACT CTAAAACTAC AAATAAAGTT AAAAGCAGTA CCCACGCACA AATTACTAAT ACACCCCCTC
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
        2040       2050       2060       2070       2080       2090       2100
CCGACGAATA TATTATAGCC ACACCACTAA TATCCCCCCG CAACATGGAA AACTCCTTAA AAGTATCAAT

        2110       2120       2130       2140       2150       2160       2170
TACTATTCAA GAGCCCTCAT ATCAGTCCGC GTAAAAAAAA TTTATTACTG ATCCCACACC AACTAAATAA

        2180       2190       2200       2210       2220       2230       2240
ACTAAAACAT AGCCCAACAC AGAACGATCG CCTCAAGACT CCGGAAATGG CTCAGCTGCC AAAGCAGCTG

        2250       2260       2270       2280       2290       2300       2310
AATAAGCAAA CACTACGAGT ATCCCCCCTA AATAAATCAA AAAAAGAACT AATGATAAAA AAGATCCCCC

        2320       2330       2340       2350       2360       2370       2380
ATGGCTAATT AAAATACCAC ACCCAACCCC CGCTGCCACC ACCAACCCCA AAGCAGCAAA ATAAGGTGCT

        2390       2400       2410       2420       2430       2440       2450
GGATTTGAAG CCACAGCAAC CAGCCCAACA ATCAAAGCTA TTAATAATAA AGACACTAGA TAAGTCATAA
                                                          ND6 <--

        2460       2470       2480       2490       2500       2510       2520
TTTCTACTCG GATTTTAACC GAGACCAGTG ACTTGAAGAA CCACCGTTGT TATTCAACTA TAAAAACCCT
          trnE <--

        2530       2540       2550       2560       2570       2580       2590
TTAATGGCAA GCCTACGAAA AACACACCCT CTAATTAAAA TTGCTAATGA TGCACTAATT GATTTACCAG
   --> Cytb

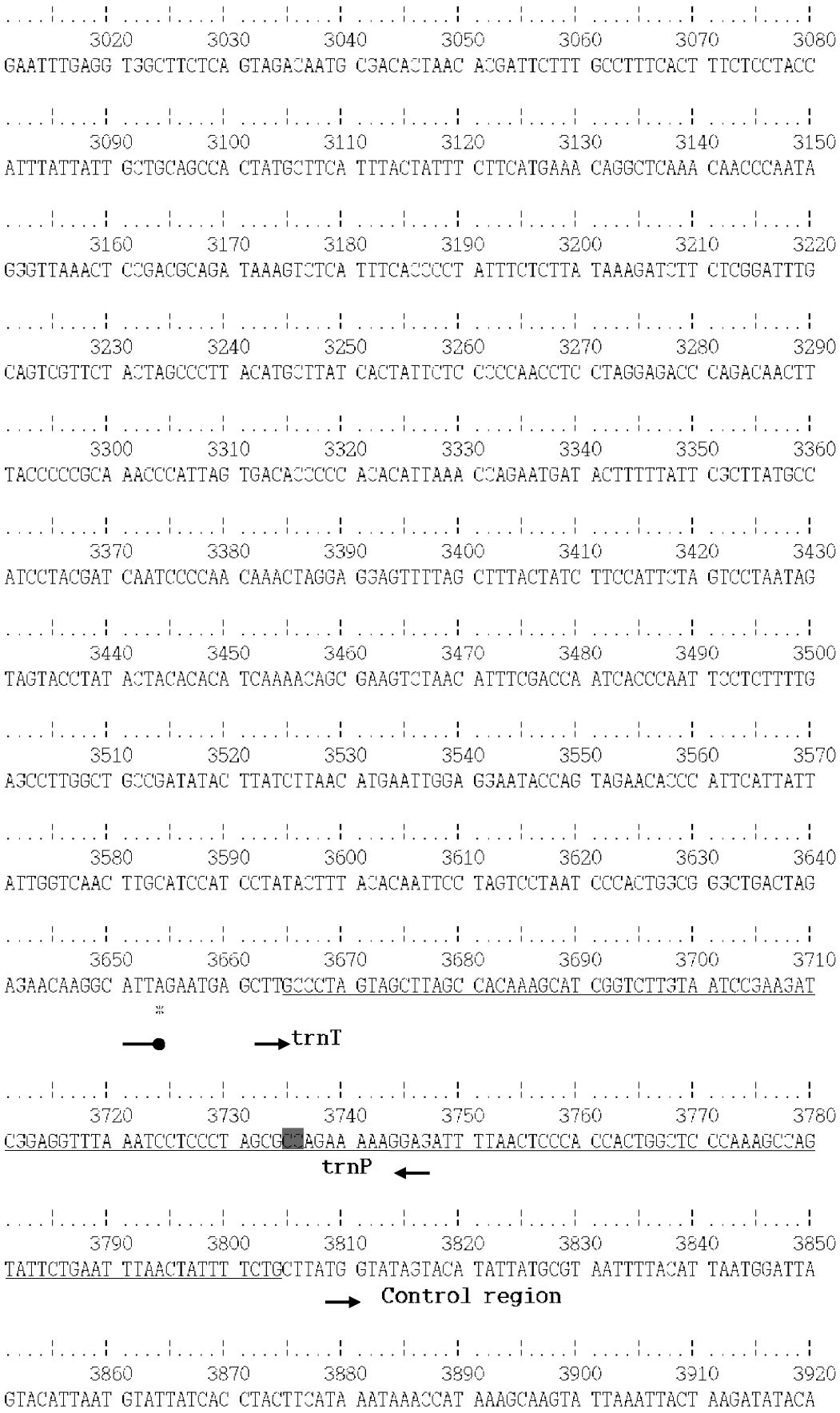
        2600       2610       2620       2630       2640       2650       2660
CCCCCTCCAA CATCTCAGTA TGATGAAATT TTGGTTCACT ATTAGGGCTA TGCTTAATTA CTCAAATTCT
        2670       2680       2690       2700       2710       2720       2730
TACAGGACTC TTCCTGGCTA TGCACTATAC ATCTGATATT ACTACCGCCT TCTCATCCGT AGCCCACATC

        2740       2750       2760       2770       2780       2790       2800
TGCCGAGATG TAAACTATGG ATGACTTATC CGAAATATCC ATGCCAACGG CGCATCATTC TTTTTCATTT
        2810       2820       2830       2840       2850       2860       2870
GCATTTATAT TCACATTGCT CGAGGACTAT ATTATGGATC CTACCTCTAT AAAGAAACTT GAAACATTGG

        2880       2890       2900       2910       2920       2930       2940
GGTTGTTCTC CTCCTATTAG TTATAATAAC AGCATTTGTA GGCTACGTTC TCCCATGAGG GCAAATATCC

        2950       2960       2970       2980       2990       3000       3010
TTTTGGGGGG CCACAGTAAT TACTAACCTT CTGTCTTCAG TCCCCTATGT AGGAAACGCC TTAGTCCAAT
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        3930       3940       3950       3960       3970       3980       3990
TAAACCATAA TAATATTAAT AACATAATTT ATCCAACTAA CATGGTGATA TTCCCCCATA ATAATCGTCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4000       4010       4020       4030       4040       4050       4060
TCAAAATTTT CCTTGAAATA CTCAACTTAC ATTTATTGGG TAAATATTAA TGTAGTAAGA AACCACCAAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4070       4080       4090       4100       4110       4120       4130
CAGTTTATAT AAAGGCATAT CATTAGTGAT GGGTCAGGGA CAATAATTGT AGGGTAACAC TTAGTGAACT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4140       4150       4160       4170       4180       4190       4200
ATTACTGGCA TTTGGTTCCT ATTTCAGGGA CATAACTGCA TAACTCCACC TACAGATAAT TATACTGGCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4210       4220       4230       4240       4250       4260       4270
TTTGGTTAAT GGTGTGGTAC ATACGACTCG TTACCCACCA AGCCGGGCAT TCTCTTATAT GCATAACGTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4280       4290       4300       4310       4320       4330       4340
CTCCTTTTGG TTTACCTTTC CTATACATCC CAGAGTGCAG GCTCAAATAA CAAAACAAGG TGGAACATTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4350       4360       4370       4380       4390       4400       4410
TTCTTGCTCG ACTTAATATA AGTGAATGAT AAAAAGACAT AACTCAAGCA TTACATATGT TTAAATCAAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4420       4430       4440       4450       4460       4470       4480
TGCATAACAC ATCCTTATTC AACACAGCTT TATACTATAT GCCCCCTTTT GGTTTTTGCG CGACAAACCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4490       4500       4510       4520       4530       4540       4550
CCTTATCCCC TACGCTGGGC GATTCCTGTT TATTCTTGTC AAACCCCGAA ACCAAGAAAG ACTCGACTAA

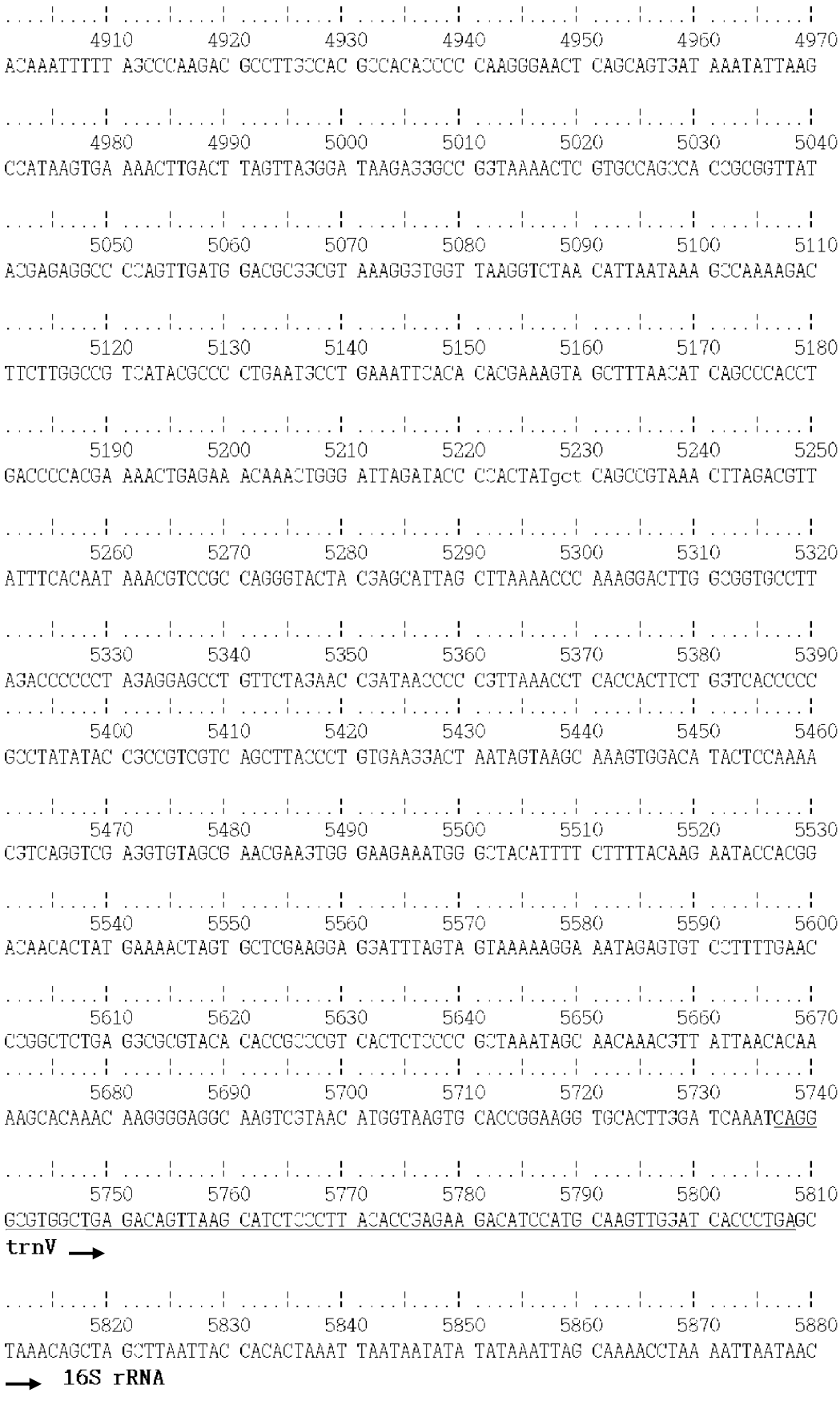
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4560       4570       4580       4590       4600       4610       4620
GCGCATCAAA ATCAACAAGT TGTAGTAAGT GTTGACTTAT GCCACCACAT TATATATATA TATATAACAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4630       4640       4650       4660       4670       4680       4690
AAAATATGCA TATAATAATT TTTATGAATA CCCAAAAACC AGCATTAAAT TTTAATAAAA CATTGTCAAT
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4700       4710       4720       4730       4740       4750       4760
CCTAACTTAT CAGAGAATAA ATATGCTCGC GTAGCTTAAA ATAAAGCATA GCACTGAAGA TGCTAAGATG
                                  → trnF

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4770       4780       4790       4800       4810       4820       4830
AGCCCTAAAA AGCTCCGCTT GCATAAAGGC TTGGTCCTGA CTTTACCATC AGCTTTAGCC AAATTTACAC
                                  → 12S rRNA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        4840       4850       4860       4870       4880       4890       4900
ATGCAAGTCT CCGCAAACCC GTGAGAATGC CCTCAATCCC CCGCCCGGGG ACGAGGAGCA GGCATCAGGC
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5890       5900       5910       5920       5930       5940       5950
CAAACCATTT TTCCACCTAA GTACGGGAGA CGAAAAAGGT CCCATGAGCA ATAGAAAAAG TACCGCAAGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        5960       5970       5980       5990       6000       6010       6020
GAAAGCTGAA AGAGCAATGA AATAAGTCAT ACAAGCACAA AAAAGCAGAG ACTAGCACTC GTACCTTTTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6030       6040       6050       6060       6070       6080       6090
CATCATGATT TAGCAAGAAC CCAACAAGCA AAGAGACCTT TAGTTTGTTA CCCCGAAACC AAGTGAGCTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6100       6110       6120       6130       6140       6150       6160
CCCCGGGACA GCCTAAAAGG GCCAACCCGT CTCTGTGGCA AAAGAGTGGG AAGAGCCCCG GGTAGAGGTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6170       6180       6190       6200       6210       6220       6230
ACAGACCTAC CGAACTTGGT GATAGCTGGT TGCCTAAGAA ATGAATAGAA GTTCAGCCTC GAGCTCCCTT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6240       6250       6260       6270       6280       6290       6300
TAATCAAATA AGTAATATCT ACTATAGAAA ATAAGAAAAA CATGAGAGTT AGTTAAAGAG GGTACAGCCC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6310       6320       6330       6340       6350       6360       6370
CTTTGACCAA GGATACAACT TTAATAGGAG GATAGGGATT ATAATTAAAA AAATTATTGT TTCAGTGGGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6380       6390       6400       6410       6420       6430       6440
CTAAAAGCAG CCACCTGCAC AGAAAGCGTT AAAGCTCAGA CAATACGAAA TTTATTATTT CAATAGTCCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6450       6460       6470       6480       6490       6500       6510
TCCCACTCCC CTACTTATAC TGGGCCGCCC CATGACATCA TGGGAGAGAT TATGCTAAAA TGAGTAACAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6520       6530       6540       6550       6560       6570       6580
GAGACAACAC TTCTCTCCAA GCACAAGTGT AAGCCAGCCC GGATGAACCA CTGGCAATTA ACGAACCCAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6590       6600       6610       6620       6630       6640       6650
TAAAAGAGGG CAATGTAGCC AATATAAGAC ACAAGAAAAT TGTACAATAT ATAATCGTTA AACCCACACT
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6660       6670       6680       6690       6700       6710       6720
GGAGTGCCTC AAGGAAAGAC TAAAAAAAAG GGAAGGAACT CGGCAAACCC AAGCCTCGCC TGTTTACCAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6730       6740       6750       6760       6770       6780       6790
AAACATCGCC TCCTGCAAAA TTCAAGGTAT AGGAGGTCCA GCCTGCCCAG TGACCACAAG TTCAACGGCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6800       6810       6820       6830       6840       6850       6860
GCGGTATTTT GACCGTGCAA AGGTAGCGCA ATCACTTGTC TTTTAAATGA AGACCTGTAT GAATGGCCAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6870       6880       6890       6900       6910       6920       6930
ACGAGGGCTT AGCTGTCTCC CCTTTTAAGT CAGTGAAATT GATCTGCCCG TGCAGAAGCG GACATACATA
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        6940       6950       6960       6970       6980       6990       7000
TACAAGACGA GAAGACCCTT TGGAGCTTAA GGTTCAACCC CAACCGCGTC AAACAACTTT ATAAATAAGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        7010       7020       7030       7040       7050       7060       7070
AATAAACCTA GCGGAAAATG GGACTTTACC TTCGGTTGGG GCGACCACGG AGAAAAAATC ATCCTCCGAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        7080       7090       7100       7110       7120       7130       7140
TGGACTGGGC CAACAAGCCT AAAACTAAGA AAGACATTTC TAAGCCACAG AAAATCTGAC CAGCAATGAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|.
        7150       7160       7170       7180       7190
CCGGCCTGTA GGCCGATCAA CGGACCAAGT TACCCTAGGG ATAACAGCGC AATCCT
```

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

4. 고찰

4.1. 연구 결과 요약

척추동물13종의 미토콘드리아 유전체 분석을 실시하여 총 93,250bp의 염기서열을 확인하였다 (표 V-41). 짧은 시간내에 동시다발적인 실험이 이루어졌고 분석의 시간이 매우 지연되었기 때문에 전체 염기서열을 보고서상에 표기하기는 못하였으나 나머지 영역의 염기서열을 현재 분석중이므로 곧 그 결과를 얻을 수 있을 것이다 (DB 참조: http//grresk.korea.ac.kr).

표 V-41. 척추동물 13종의 염기서열 분석 결과

종 명	완료된 염기서열
1. 반달가슴곰	15,556bp
2. 호랑이	9,807bp
3. 수달	5,905bp
4. 산양	2,716bp
5. 사향노루	7,092bp
6. 황새	6,206bp
7. 수리부엉이	5,932bp
8. 올빼미	4,470bp
9. 남생이	4,305bp
10. 구렁이	6,823bp
11. 감돌고기	9,961bp
12. 얼룩새코미꾸리	7,281bp
13. 꼬치동자개	7,196bp

4.2 전체 미토콘드리아 염기서열의 활용방안

연구 목적에서도 뚜렷이 나타나있듯 본 연구를 통하여 얻어진 연구 결과들은 멸종 위기종의 유전자 자원 보전을 위한 매우 의미 있는 결과물이라고 할 수 있다. 주로 부분적인 염기서열들로만 이루어진 기존의 연구 유전자 결과물들은 유전자 자원의 보전을 위해 그 한계가 있

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

을 수밖에 없음은 자명한 일이다. 핵 내의 유전체 전체의 염기서열 분석이 이루어지면 좋겠으나, 현실 여건상 쉽지 않은 일이기에 그 대안으로 미토콘드리아 전체 유전체의 염기서열을 밝히는 것은 의미가 있다고 생각된다. 더욱이 관련 연구 분야에서 미토콘드리아 유전체의 components들을 연구 대상 유전자로서 사용하는 빈도가 최근에 부쩍 증가하는 양상을 보이는 것은 이 소기관 유전체의 가치와 다양한 분야에서의 활용 가능성을 반증하는 것이라고 할 수 있겠다. 다음은 본 연구결과의 상세 기대효과와 활용방안의 예시이다.

- 멸종위기 동물종의 소기관유전체 유전자원을 확보, DB화함으로서 멸종위기종의 유전자원 보전에 기여할 수 있다. 즉, 기초자료의 확보와 보전으로서의 의미가 크다.
- 연구 대상종에서 결정된 전체 미토콘드리아 유전체의 염기서열은 근연종의 미토콘드리아 유전체 염기서열 결정 시 용이성을 증대시켜준다.
- 근연종이나 외래 유입종과의 유전적 차이를 밝히는 데에 활용될 수 있으며, 종 동정을 위한 마커 개발에 활용할 수 있다.
- 미토콘드리아 유전체의 진화(nucleotide substitution, deletion, insertion 등) 속도가 핵 내의 유전체보다는 평균적으로 10배 이상 빠른 것으로 알려져 있어, 멸종 위기종의 분자진화학적 특성을 이해하는 데에 활용될 수 있다.
- 미토콘드리아 유전체 내에서 일어나는 gene loss, gene rearrangement, gene duplication 등은 관련 동물군의 계통유연관계를 추정하거나, 비교유전체학적 연구를 수행하는 데에 매우 의미 있는 정보를 제공해 준다.
- 다양한 척추동물군의 미토콘드리아 유전체의 특성(변이 패턴, 속도, 진화적 특성, 동물군별 특이성 등)을 이해하는 것은 종국적으로 인간 미토콘드리아 유전체의 변이 양상과 진화적 특성을 규명하는 데에도 긍정적으로 활용될 수 있다.
- 본 연구의 지속적인 시행은 미토콘드리아 유전체 연구의 세계적인 흐름을 주도할 수 기반 조성에 매우 크게 이바지할 수 있을 것으로 기대된다.

4.3. 향후 연구계획

계획대비 미진한 연구결과 부분은 2월 중에 대부분 완료될 것을 기대하고 있다. 13종으로부터 미토콘드리아 유전체의 전체 염기서열을 밝히는 것은 1년이 채 되지 않는 짧은 연구 기간과 연구 내용에 비해 상대적으로 적은 연구비 규모로 인해 결코 쉽지 않은 일이었음을 밝히고 싶다. 연구의 용이성과 효율성을 증대시키고 연구의 지향점을 보다 명확히 하기위해 다음과 같이 향후의 연구 방향과 개선점을 기술한다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

- 멸종위기종이나 감소추세종을 대상으로 미토콘드리아 전체 유전체 염기서열을 결정하는 사업은 환경부와 같은 정부 기관에서 지속적으로 추진해 나가야할 사업 중 하나임이 분명하며, 본 사업의 특성상 계속 과제로 장기간에 걸쳐 시행될 수 있어야 한다.
- 다만, 1년이라는 연구 기간 동안 수행이 가능한 보다 현실적인 종 수의 결정이 필요하다. 지난해와 동일한 연구여건(연구비 규모와 연구 기간)이라고 가정했을 때, 합리적인 연구 대상 종 수는 4종-5종 정도가 최대라고 사료된다. 만약 매년 10종 이상(혹은 그 이상)의 결과물을 도출하기 원한다면, 본 연구에 추가로 참여하는 대학원생의 인건비와 재료비 추가 등을 감안하여 연구비를 증액, 현실화할 필요가 있을 것으로 생각된다.
- 또한 한해에 다양한 분류군(포유류, 어류, 조류, 파충류 등)으로부터 미토콘드리아 유전체 연구를 수행하는 것 보다는 (본 연구가 지속적으로 이루어질 연구라는 가정하에) 년차별로 분류군을 구분하여 연구를 수행하는 것이 보다 효율적인 연구 방향이라 생각된다.
- 위와 같은 이유로, 차년도 연구에서는 여러 분류군 중 하나의 분류군(예: 어류)을 우선 선정하고, 이를 중심으로 5종의 멸종위기종으로부터 전체 미토콘드리아 유전체 염기서열을 결정하는 것이 보다 합리적인 연구 방향일 것으로 사료된다. 이후로는 중장기적인 플랜을 가지고 분류군을 연차별로 나누어, 매년 체계적으로 연구를 수행해 나가면 좋을 것이다.

5. 참고문헌

Broughton, R. E., Milam, J. E. and Roe, B. A. 2001. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. Genome Res. 11 (11); 1958-1967.

Brown, W. M., George, M., Jr. and Wilson, A. C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76: 1967-1971.

Burger, P. A., Steinborn, R., Walzer, C., Petit, T., Mueller, M. and Schwarzenberger, F. 2004. Analysis of the mitochondrial genome of cheetahs (*Acinonyx jubatus*) with neurodegenerative disease. Gene 338 (1); 111-119.

Chang, Y. S., Huang, F. L. and Lo, T. B. 1994. The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome. J. Mol. Evol. 38 (2); 138-155.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Clayton, D. A. 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. Cell 28: 693-705.

Clements, J. F. 2000. Birds of the world. Ibis, CA. pp. 162-178.

Delisle, I. and Strobeck, C. 2002. Conserved primers for rapid sequencing of the complete mitochondrial genome from carnivores, applied to three species of bears. Mol. Biol. Evol. 19 (3); 357-361.

Feligini, M. and Parma, P. 2003. The complete nucleotide sequence of goat (*capra hircus*) mitochondrial genome. DNA Seq. 14 (3); 199-203.

Folmer, O., Black, M. Hoeh, R. Lutz, R. A. and Vrijenhoek, R. 1994. DNAprimers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 3: 294-299.

Gillespie, J. J., Yoder, M. J. and Wharton, A. 2005. Predicted secondary structur for 28S and 18S rRNA from Ichneumonoidea (Insecta: Hymenoptera: Apocrita): Impact on sequence alignment and phylogeny estimation. J. Mol. Evol. 26; 114-137.

Harrison, G. L., McLenachan, P. A., Phillips, M. J., Slack, K. E., Cooper, A. and Penny, D. 2004. Four New avian mitochondrial genomes help get to basic evolutionary questions in the late cretaceous. Mol. Biol. Evol. 21 (6); 974-983.

Hashi, J-I., Tagashira, Y. and Yoshida, M. C., 1985. Absence of extensive recombination between inter- and intraspecies mitochondrial DNA in mammalian cells. Exp. Cell Res. 160: 387-396.

Hiendleder, S., Mainz, K., Plante, Y. and Lewalski, H. 1998. Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no evidence for contributions from urial and argali sheep. J. Hered. 89 (2); 113-120.

Hwang, U. W., Friedrich, M. Tautz, C., Park, J. and Kim, W. 2001. Mitochondrial protein phylogeny joins myriapods with chelicerates. Nature 413;154-157.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Hwang, U. W. and Kim, W. 1999. General properties and phylogenetic utilites of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. Korean J. Parasit. 37 (4); 215-228.

Kondo, R., Satta, Y., Matsuura, E. T., Isiwa, H., Tagahata, N. and Chigusa, S. I. 1990. Incomplete maternal transmission mitochondrial DNA in *Drosophila*. Genetics 126: 367-379.

König, C., Weick, F., and Becking, J. H. 1999. OWLS: A guide to the owls of the world. Yale University Press, New haven.

Kumazawa, Y. and Hideki, E. 2004. Mitchondrial Genome of the Komodo Dragon: Efficient Sequencing Method with Reptile-Oriented Primers and Novel Gene Rearrangements. DNA research 11: 115-125.

Kumazawa, Y., Ota, H., Nishida, M. and Ozawa, T. 1998. The complete nucleotide sequence of a snake (Dinodon semicarinatus) mitochondrial genome with two identical control regions. Genetics 150 (1): 313-329.

Lansman, R. A., Avise, J. C, and Huettel, M. D. 1983. Critical experimental test of the possibility of "paternal leakage" of mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 1969-1971.

Lopez, J. V., Cevario, S. and O'Brien, S. J. 1996. Complete nucleotide sequences of the domestic cat (*Felis catus*) mitochondrial genome and a transposed mtDNA tandem repeat (Numt) in the nuclear genome. Genomics 33 (2): 229-246.

Miya, M. and Nishida, M. 1999. Organization of the mitochondrial genome of a deep-sea fish *Gonostoma gracile* (Teleostei: Stomiiformes): first example of transfer RNA gene rearrangements in bony fishes. Mar. Biol. Biotechnol. 1: 416-426.

Miya, M. and Nishida, M. 2000. Molecular systematics of the deep-sea fish genus *Gonostoma* (Stomiiforemes: Gonostomatidae): two paraphyletic clades and resurrection of Sigmops. Copeia. 2000: 378-389.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Saitoh, K., Miya, M., Inoue, . G., Ishiguro, N. B. and Nishida, M. 2003. Mitochondrial genomics of ostariophysan fishes: perspectives on phylogeny and biogeography. J. Mol. Evol. 56 (4): 464-472.

Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A. Crespi, B., Liu, H. and Flook, P. 1994. Evolution weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a comilation of conserved polymerase chain reaction primers. Ann. Entolmlo. Soc. Amer. 87:651-701.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F. Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. 1997. The Clustal X window interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 24: 4876-4882.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Ⅵ. 멸종위기 생물종의 유전자 분석 · 연구 방향

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Ⅵ. 멸종위기 생물종의 유전자 분석·연구 방향

1. 주요생물자원 유전자 분석의 필요성 및 향후 주요생물자원 유전자분석연구사업 방향 제시

1.1. 연차별 척추동물 분석대상 종 선정을 위한 우선순위의 기준 제시

다음에 예시한 요인들을 고려하여 한반도 생물종 중 유전자 분석이 필요한 종의 예비 리스트를 작성한다. 다수의 전문가의 의견이 집약된 객관적인 우선순위 결정의 기준을 마련하기 위하여 전문가들의 합의하에 각 요인에 경중을 고려한 가중치를 준 점수를 부여한다. 여러 전문가들이 각 요인에 대한 점수를 매기고, 점수화된 가중치에 따라 각 요인의 점수를 집계하여 객관적인 유전자 분석 대상종의 우선순위를 마련한다.

1.1.1. 보전 및 복원에 있어 시급성

개체군 상태와 보전에 있어 시급성 여부를 판단하기 위해서 멸종위기종 지정 여부, 천연기념물 지정 여부, IUCN 적색목록 상태, CITES 기재상태 등의 공식적, 법적 지위와 기록을 참고한다. 또한 환경부 발표 멸종위기종 복원계획을 참고한다.

1.1.2. 계통분석을 위하여 기록이 명확한 국내 개체군과 해외 개체군의 유전자 샘플 확보 여부 및 향후 샘플 확보 가능성

아무리 유전자 분석이 시급하고 중요하다 하더라도 샘플이 확보되어 있지 않거나 앞으로 확보할 수 있는 가능성이 낮다면 유전자 분석을 수행할 수 없다. 그러므로 우선순위 결정에 있어 샘플 확보 여부와 확보 가능성을 고려하여야 한다.

1.1.3. 계통분석 또는 집단분석이 가능한 샘플의 수 확보 또는 확보 가능성 여부

계통분석을 위해서는 집단, 아종 또는 종 당 수 개의 개체 샘플로도 분석이 가능할 수 있지만 집단분석을 위해서는 적어도 수십 개체 이상의 샘플 확보가 가능하여야 한다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

1.1.4. 집단분석이 용이한 마커의 존재 여부

집단분석을 위해서는 미토콘드리아, RAPD, ISSR, minisatellite, microsatellite 등의 마커를 사용할 수 있다. 이 중 집단분석에 가장 유용한 마커인 microsatellite은 그 마커 개발에 상당한 시간과 자원이 요구되기 때문에 해당종 또는 근연종에서 이미 개발된 마커가 존재하는지 여부를 고려하여야 한다. 유용한 마커가 존재하지 않는다면 마커 개발이 선행되어야 한다.

1.1.5. 해당종 또는 근연종에 관한 기존 유전자 연구결과의 가용성 여부

해당종과 근연종에 대한 어느 정도의 연구 결과가 이미 존재한다면, 기존 연구와 같은 방법 및 유전자 마커를 사용하여 연구를 지속함으로 연구 결과를 비교, 분석, 해석하기가 훨씬 용이할 수 있다.

1.1.6. 사회, 경제, 문화적 중요성을 가지는 깃대종 여부

어떤 종은 비록 멸종위기종은 아니지만 한국의 사회, 경제, 문화적으로 중요한 의미를 지닐 수 있다. 예를 들어 멧돼지는 멸종위기종도 아니고 오히려 개체수가 과다하여 문제가 될 수 있는 종이지만, 한국에서 집돼지와 교배가 가능한 근연종이기 때문에 사회, 경제적 중요성을 가진다. 즉 멧돼지의 강인한 유전자를 이용하여 집돼지의 질병에 대한 저항성 강화, 육질개선 등 품종개량에 이용할 수 있으며, 아시아 전체 야생 멧돼지 집단의 유전적 분석을 통하여 아시아 지역 집돼지 및 한국의 토종집돼지의 기원에 대한 연구가 가능하다. 또한 구제역, 오제스키병 등 축산 분야에 커다란 영향을 미치는 질병 전파 양상에 대한 자료를 얻는 것도 가능하다.

1.1.7. 생태계 건강의 지표종 여부

생태계 변화 양상을 모니터링할 수 있는 지표종으로서 역할을 하기 위해서는 해당종의 유전적 배경에 대한 자료가 필요하다. 멸종위기종 보다는 오히려 모니터링 지역을 대표하는 우점종이 지표종으로서 더 적합할 수 있다.

1.1.8. 공중 보건적 중요성

어떤 종은 사람에게 전파되는 인수공통질병의 매개자로서 중요한 역할을 할 수 있다. 예를 들어 한강 이북 지역에서 너구리는 광견병의 주요한 매개자로서 공중보건적으로 대단히 높

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

은 중요성을 지닌다. 광견병은 이미 일부 지역에서 한강을 남하하여 지속적으로 확산되고 있는 추세이기 때문에 너구리의 기본적인 생태와 분산(dispersal) 양상, 그리고 분류 및 유전학적 정보는 광견병의 전파 경로에 대한 중요한 단서를 제공할 수 있기 때문에 비록 너구리가 멸종위기종이 아니더라도 그 유전적 연구가 시급하게 된다.

1.1.9. 학문적 중요성

어떤 종은 최근 학계에서 논쟁이 되고 있는 분류, 진화, 생태, 보전 등의 문제와 연관되어 있어 있을 수 있으며, 이러한 종은 학문적 중요성을 지닌다.

1.1.10. 고유종 또는 분류학적으로 독특한 위치에 있는 종

고라니(*Hydropotes inermis*)는 비록 우리나라에서는 매우 흔한 종이지만 세계적으로는 중국 일부 지역과 한반도에서만 서식하는 독특한 종이다. 더욱이 중국의 고라니 개체군은 멸종위협에 처해 있어 우리나라 고라니의 유전적 독특성에 대한 연구가 절실한 실정이다.

2. 보전생물학적 측면에서 유전적 분석 가이드라인 제시

2.1 유전자 분석이 보전에 중요한 이유

2.1.1. 보전유전학의 배경과 목표

보전유전학은 생물다양성의 감소라는 지구적 위기에 대처하는 과학적 방법을 모색하는 보전생물학의 중요한 한 분야로써, 생물다양성을 보전하고 종의 멸종 추세를 반전시키거나 감소시키는 것을 목표로 하며, 이 목표를 위하여 유전학적 이론과 기법을 응용하는 비교적 신생 학문분야이다 (Frankham 등, 2002).

보전유전학이 '보전'하고자 하는 생물다양성이란 지구상에 존재하는 모든 다양한 생명 형태를 말하며, 여기에는 보통 세 가지 단계의 다양성, 즉 생태계 다양성, 종 다양성, 유전적 다양성을 포함한다. 이 세 가지 형태의 다양성 모두가 현재 전지구적 범위로 감소되고 있으며, 그 급진적 감소 추세는 인류에게 경종을 울리고 있다. 세계자연보전연맹(IUCN, 1996) 보고에 의하면 척추동물의 모든 강(class)에서 50% 이상의 종들이 크고 작은 멸종위협에 직면하여 있다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

식물에서도 12.5%의 관속식물 (vascular plant)이 위협에 처하여 있는 것으로 보고되어 있다. 1600년대 이후 400년 간 멸종된 동식물 종의 수는 800종 이상으로 기록되어 있으며, 그 수는 1900년대 이후 급격히 증가하는 추세이다. 더욱이, 많은 무척추동물 및 식물들이 학자들에 의하여 발견되고 기록되기 이전에 이미 멸종 되었을 가능성이 크다는 것도 고려해야 할 요소이다.

여러 가지 다른 방법에 의하여 계산된 현재의 멸종 속도는 자연에서 통상적으로 일어나는 멸종 속도의 1000배에 이르는 것으로 추정되고 있으며, 한 추정방법에 의하면 포유류와 조류에 있어서 현재의 멸종 비율이 화석기록에 의하여 추정된 자연에서의 통상적 멸종 비율의 5000 - 10000배에 이르는 것으로 되어 있다.

이러한 높은 비율의 멸종과 생물다양성 감소의 원인은 무엇인가? 그 주된 원인은 잘 알려진 바와 같이 서식지 감소, 외래종의 침입, 과도한 이용, 환경오염 등이며, 이들 원인들은 모두 직·간접적으로 인간의 활동, 그리고 인구의 급격한 증가와 연관되어 있다. 인간과 관련된 활동으로 인하여 특정 종의 개체군 크기가 심각하게 감소하게 되면, 그 종의 생존은 확률적 영향(storchastic effects)에 크게 영향을 받게 된다. 확률적 영향이란 소수개체군이 겪게 되는 환경적(environmental), 개체군통계학적(demographic), 그리고 재난에 의한 영향(catastrophic), 유전적(근교퇴화와 유전적 다양성의 감소) 요인에 의한 개체군 크기의 요동을 의미하며, 비록 특정 개체군이 감소하게 된 본래의 원인(서식지 감소, 밀렵, 외래종의 침입 등)이 제거된다 할지라도 소수개체군이 겪게 되는 이러한 문제들은 계속해서 종의 생존확률(또는 멸종확률)에 영향을 미치게 된다.

이러한 소수개체군이 받게 되는 영향은 보전생물학에 있어 주요한 연구과제이며, 보전유전학은 특히 이들 중 유전적 영향과 그 영향을 최소화시키는 유전적 관리방안에 관심을 가진다. 그러므로 소수개체군의 멸종에 미치는 유전적 요소는 세 단계의 생물다양성, 즉 생태계, 종, 유전적 다양성 중 세 번째 다양성과 직접적 관련이 있으며 또 종 다양성의 보전에 있어 필수적인 요소가 된다. 보전유전학은 하나의 응용학문으로서 전통적인 진화생물학, 집단 및 정량유전학, 분류학에 그 뿌리를 두고 있다.

왜 우리는 종의 멸종과 생물다양성의 감소를 최소화하기 위하여 노력하여야 하는가? 생물다양성은 인류에게 어떠한 가치를 제공하는가? 말할 것도 없이 인류는 지금까지 생존을 위하여 생물다양성의 구성요소가 제공하는 다양한 자원에 의존하여 왔다. 이러한 생물자원에는 식품, 의약품, 의복을 위한 천연섬유, 고무, 목재 등이 포함된다. 식물에 의한 산소의 생산, 산림에 의한 기후의 조절, 영양소의 순환, 자연적 천적에 의한 작물의 보호, 곤충에 의한 작물의

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

수분 등, 생태계는 그 가치를 헤아릴 수 없는 많은 생물학적 기능들을 인류를 포함한 모든 생명체에게 무료 서비스로 제공하고 있다. 또한 인간은 살아있는 다양한 종류의 생물로부터 심미적, 정서적 즐거움을 얻는다. 예를 들어 장식용 원예식물을 재배하거나 애완동물을 키우는 일, 동식물원을 방문하거나 국립공원, 자연보호지구, 생태관광지를 탐방하는 활동 등을 통하여 정서적인 만족감을 느끼는 것이다.

이렇게 생물다양성이 우리에게 제공하는 유익한 측면 이외에도 윤리적인 이유에 의하여 생물다양성을 보전하여야 하는 당위성을 찾을 수도 있으며, 많은 사람들은 이 윤리적 동기를 생물다양성과 종 보전의 가장 중요한 이유로 생각한다. 즉, 이 지구상의 어떠한 종도 다른 종을 멸종에 이르게 할 권리가 없다는 것이다. 인간이 단순히 고등한 생물이기 때문에 다른 종을 멸종시킬 권리를 가질 수 없으며, 오히려 예민한 지구 생태계의 균형을 지키고 보호함으로 모든 다른 생명체와 더불어 살아가야 할 더 큰 책임을 진다는 것이다. 이러한 사상은 어느 인간 종족도 다른 종족을 학살할 권리가 없다는 믿음과도 상통한다.

2.1.2. 보전유전학의 응용분야

보전유전학이 구체적으로 멸종의 방지와 생물다양성의 보전에 기여할 수 있는 방법으로 다음과 같은 응용분야들이 있다.

- 분류학적 불확실성을 해소하거나 종 내의 보전단위(conservation unit) 또는 관리단위(management unit)을 확립하는데 도움을 준다.

멸종위기종의 명확한 분류는 종에 대한 이해를 도우며 종 내에도 구별해서 관리하여야 할 개체군을 식별할 수 있도록 한다. 이것은 지역적으로 특이한 아종 또는 관리단위를 구별하고 잡종화를 방지함으로 그 지역의 생태에 적합하게 진화한 개체군을 보전할 수 있게 한다. 예를 들어 한국산양(Amur goral)의 분자계통에 관한 최신 연구결과는 한국산양이 중국남서부나 일본산양과는 유전적인 차이가 있으며 러시아(연해주)의 산양과 가깝다는 것을 보여 줌으로, 러시아산양의 생태자료가 한국산양의 보전에 응용될 수 있음을 시사한다(Min et al, 2002). 또한 지리산 반달가슴곰 개체군을 보강하기 위한 재도입에 사용될 개체들은 지리산 개체군과 같은 아종 또는 관리단위에 속한 것이어야 할 것이며, 여기에 미토콘드리아 DNA 염기서열 분석이나 핵 내 마커 분석 등 유전학적 해석이 크게 도움이 되었다. 정확한 종과 아종의 분류는 멸종위기종의 보호를 위한 법률제정에 있어 보호대상이 되는 종의 구분을 명확히 함으로 법 해석과 집행에 있어 혼선을 예방할 수 있다. 한편 한정된 자원으로 보호대상이 되는 모든 동물에 대하여 똑같은 지원이 불가능하므로 보호대상의 우선순위를 정할 때 분류학의 도움을 받을 수

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

있다. 즉, 분류학적으로 독특한 것, 혹은 계통학적 분리점이 깊은 종이 그렇지 않은 종보다 보전대상으로서 우선순위를 가질 것이다.

▪ 유전적 건강성에 문제가 있는 개체군을 식별하고 집단구조와 유전자 흐름을 파악할 수 있다.

유전자 마커 분석으로 개체군들의 유전적 다양성을 비교함으로 유전적 건강성에 문제가 있는 개체군을 식별할 수 있고, 또한 집단유전학적 분석에 의하여 집단구조와 집단 사이의 유전자 흐름의 정도를 파악함으로 적절한 관리방안을 수립할 수 있다(O'Brien 1994 a, b).

▪ 근친퇴화와 유전적 다양성의 감소를 최소화시키는 개체군의 유전적 관리방법을 제시함으로 멸종위험도를 낮출 수 있다.

멸종위기에 처한 많은 소수개체군들과 동물원 등과 같은 서식지외 보전기관에서 번식되는 개체군은 흔히 근친교배도가 높으며 유전적 다양성이 감소되어 있다. 근친교배는 생식능력과 생존능력을 감퇴시키며 따라서 직접적으로 멸종위험도를 증가시킨다. 개체군의 유전적 다양성이 낮아지면 그 개체군이 환경변화에 적응할 수 있는 능력이 약화되고 따라서 장기적인 생존능력이 줄어든다. 근친교배와 유전적 다양성의 감소로 인하여 생존능력이 약화된 개체군의 유명한 예가 Florida panther의 경우로서, 정자의 질과 양의 감소, 기형정자 등 근친퇴화의 영향이 보고되었다(O'Brien 등, 1990). 이러한 보전유전학 및 보전생물학적 연구 결과에 근거하여, 보전당국은 유전적으로 가장 가까운 텍사스의 개체들을 도입함으로 이러한 악영향을 극복할 수 있었다. 비록 체계적 연구는 없었지만, 우리나라의 지리산 반달가슴곰 개체군도 현재 5내지 8 마리를 넘지 못하므로 근친퇴화와 유전적 다양성의 감소를 피하지 못할 것으로 추정된다. 따라서 2001년에 IUCN/SSC 산하의 Conservation Breeding Specialist Group (CBSG) 협력에 의한 지리산 반달가슴곰 개체군 생존능력 분석(Population and Habitat Viability Assessment, PHVA)에 의하면, 이 개체군의 생존확률은 향후 20년 간 50%를 넘지 못한다(Lee 등, 2001). 이러한 근거에 의하여 환경부와 국립공원관리공단은 본래의 지리산 반달가슴곰과 유전적으로 가까운 개체들을 지리산에 재도입하는 프로젝트를 추진하고 있다.

▪ 비침습적 방법(non-invasive sampling)에 의한 유전적 분석 기법은 개체군 보전에 필수적인 생태정보를 얻는데 이용될 수 있다.

즉 털이나 분변 DNA를 이용한 유전적 분석은 개체식별, 암수구별, 번식 구조, 개체군의 구조, 개체수, 유전적 다양성의 정도, 서식범위 등의 정보를 얻는데 이용될 수 있다. 예를 들어

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

피레네 산맥의 불곰 개체군은 분변의 DNA 및 발자국 분석에 의하여 그 개체군 크기와 암수비율, 서식범위를 결정할 수 있었고 이것은 관리대책 수립에 중요한 도움을 주었다(Taberlet 등, 1997).

▪ 분자유전학은 야생동물의 보호를 위한 법 집행에 있어서도 중요한 역할을 할 수 있다.

예를 들어 밀렵한 동물로 제조한 것으로 의심받는 한약재, 박제품, 육류 등이 가축에서 나온 것인지 혹은 보호대상인 야생동물로 제조한 제품인지를 구별하는 데 DNA 분석은 결정적인 역할을 할 수 있다. 야생동물유전자원은행에서는 제주도 검찰청에서 의뢰한 밀렵된 야생동물의 고기로 의심되는 시료를 유전자 분석을 통해서 실제로 수렵이 금지된 종이나 성별을 판정하여 밀렵단속에 기여한 사례가 있다 (An et al, 2007)

2.2. 보전생물학에 응용하기 위한 유전자 분석 전략 및 마커의 선택

2.2.1. 보전단위 설정을 위한 계통연구 전략 및 마커의 선정

보전유전학적 응용을 위한 유전자 분석의 첫 번째 목적은 보전단위(conservation unit) 또는 관리단위(management unit)을 확립하는 일이다. 보전단위 또는 관리단위란 보전 혹은 관리를 위하여 유지되어야 할 종 내의 분류군을 의미한다. 종 자체가 보전단위가 될 수도 있지만, 대개의 경우 종 내의 유전적 변이를 보전하기 위하여 아종, 품종, 변종 등의 종 이하의 분류단위가 보전단위가 된다.

보전단위가 정확히 설정되지 못한다면 멸종위기에 처한 집단임에도 불구하고 부정확한 분류로 인하여 법적 보호를 받지 못하게 되어 멸종이라는 결과에 이를 수도 있고, 또 반대로 흔한 분류군임에도 불구하고 잘못된 보전단위 설정으로 인하여 과도한 보호를 한다면 정작 보호를 받아야 할 집단에게 투입되어야 할 예산과 노력을 허비하는 결과를 초래할 수도 있다. 별도로 분리하여 관리되었어야 할 종 또는 아종이 섞여짐으로 잡종화에 의한 멸종, 또는 잡종약세 현상이 나타날 수도 있고, 또는 반대로 종이나 아종을 너무 세분하여 관리함으로 근친퇴화 현상을 겪고 있는 집단에게 새로운 유전자를 주입할 기회가 박탈될 수도 있다 (Frankham 등, 2002). 또한 정확한 종 및 아종의 분류는 해당종 또는 아종의 생물학적 특성을 이해하는데 커다란 도움을 줌으로서 해당종의 보전에 기여한다.

종 내의 보전단위 설정을 위하여 전통적인 아종(subspecies) 단위를 사용할 수도 있으나, 많은 경우에 아종의 분류는 주로 형태지리적 비교에만 근거하거나 빈약한 자료에 의하여 구분

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

되어 집단의 진화적 배경을 정확히 반영하지 못하는 약점을 안고 있다. 이러한 약점을 보완하기 위하여 "진화적으로 의미있는 단위 (Evolutionary Significant Unit, ESU)" 개념이 소개되었고 지난 15년 동안 보전생물학자들 사이에 사용되어 왔다 (Ryder, 1986; Waples, 1991; Moritz, 1994). 그러나 ESU 개념에 대한 정의에 있어서는 학자들 간에 논란이 있어 왔으며, 시기에 따라 그 의미가 변천되어 왔다 (Crandall, 2000; Fraser와 Bernatchez, 2001). 초기에는 ESU를 구분하기 위하여 생태적 자료와 유전적 자료를 함께 사용하는 경향이었으나 점차 유전적 연구방법이 발달하면서 비교적 객관적인 연구가 용이한 유전적 자료만으로 ESU의 구분을 시도하는 경우가 증가하였다. 따라서 이에 대한 비판이 제기되었으며 최근 보전생물학의 경향은 유전적 자료와 생태적 자료를 함께 강조하고 (Crandall, 2000), 또 ESU의 정의를 한 가지의 도그마에 국한시킬 것이 아니라 경우에 따라 한 가지 또는 여러 가지 정의를 탄력적으로 응용하여야 한다는 주장도 있다 (Fraser와 Bernatchez, 2001).

그러므로 보전단위를 확립하기 위하여 종 수준보다 상위의 분류체계를 확립하는 일도 필요하지만, 현재 주로 시급한 문제가 되고 있고 불명확한 것은 종 이상의 분류보다는 종 이하의 분류단위이며, 종 수준 이하의 분류 정보가 보전에 있어 시급한 실정이다.

가까운 예를 들어 현재 환경부에서 의욕적으로 추진하고 있는 반달가슴곰 복원사업의 경우, 종 이상의 분류에서 현재 보전에 있어 특히 불명확한 것은 없다. 물론 전 세계 곰과 동물의 8개 종 사이의 진화적 근연관계에 있어 아직도 불확실한 점이 있기는 하지만, 8개의 종을 기본적으로 구분하는 것은 유전자 분석에 의존할 필요도 없이 외형상으로도 매우 명확한 일이다. 즉 복원을 위한 개체 선정에 있어 이 개체가 반달가슴곰이냐 불곰이냐, 혹은 말레이곰이냐 느림보곰이냐를 구분하는 것은 누가 보아도 명확하다는 것이다. 문제는 같은 반달가슴곰 종 내에서 이 개체가 어느 아종 또는 보전단위에 속하느냐가 되며, 이것은 외형상으로 명확히 구분하기 어려운 경우가 대부분이기 때문에 유전자 분석의 도움이 필요한 것이다. 따라서 종 이상 분류에서 불명확한 부분인 곰과 동물의 서로 다른 종 사이의 근연관계를 명확히 하기 위해 대대적인 유전자 분석계획을 세운다면, 학문적인 목적과 호기심 충족을 위해서는 도움이 될지는 몰라도 한국의 반달가슴곰 개체군 보전과 복원을 위해서는 그리 큰 도움이 되지 못하며, 따라서 보전과 복원을 위해 효율적으로 사용되어야 할 재원이 크게 낭비될 수 있다.

만일 반달가슴곰(*Ursus thibetanus*)이라는 종 자체를 하나의 보전단위로 간주한다면, 우리는 고민할 필요도 없이 국내에 넘쳐나는 곰 농장의 반달가슴곰 중 어떤 개체든지 사용할 수가 있게 된다. 그러나 반달가슴곰은 남아시아의 아프가니스탄과 파키스탄, 인도, 동남아시아, 중국, 러시아 연해주, 일본에 걸쳐 넓은 지역에 서로 매우 다른 환경에서 서식하고 있기 때문에 이들 사이에 상당한 유전적, 형태적 및 생태적 변이가 존재한다. 그런데 이를 무시하고 이

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

들 지역의 집단들 사이에 개체들을 인위적으로 이동시켜 섞어서 번식을 시킨다면, 오랜 세월에 걸쳐 반달가슴곰 각 지역 집단이 지역적 생태와 환경특성에 맞게 진화하여 온 유전적 다양성을 보전할 수 없게 되며, 이것은 장기적으로 반달가슴곰의 보전에 악영향을 미치게 된다.

그러므로 대부분 보전 및 복원계획 수립에 있어서 가장 우선적으로 필요한 연구가 종 이하의 보전단위를 명확히 설정하는 일이며, 이것이 보전생물학과 보전유전학의 기본원칙이다. 즉 우리의 반달가슴곰 복원에 있어서는 한반도의 반달가슴곰이 속하는 보전단위가 무엇이냐 하는 것을 우선 결정한 다음 가능한 그 보전단위에 속하는 집단의 개체를 도입해야 하는 것이다. 이러한 유전적 연구가 이미 한국야생동물유전자원은행에 의하여 일부 수행되었고 그 결과에 근거하여 현재 환경부는 지리산 반달가슴곰 복원사업을 위한 개체들을 러시아와 북한에서 수입하여 방사하였다 (이 등, 2004)

그러므로 향후 이루어질 어떠한 복원계획에 있어서도 이러한 원칙은 고수되어야 하며, 명확한 보전단위 수립을 위한 유전자 분석이 보전과 복원을 위한 유전자 분석의 최우선 목표가 되어야 한다.

어떠한 분류학적 연구에서도 마찬가지이지만 분자유전학적 방법에 의한 계통분류는 분류군 또는 집단 사이의 유전자 염기서열 또는 유전자형의 유사성과 상이성을 기초로 분석을 하게 된다. 그러므로 계통연구 대상이 되는 분류군 내에 분화가 가능한 모든 하위분류군 또는 집단의 시료를 확보하는 것이 중요한 관건이 된다. 예를 들어 우리나라의 고유종(또는 아종)을 확인하기 위한 유전자 연구를 위해서는 우리나라에 서식하는 종 뿐 아니라 이와 유사한 다른 종(또는 아종)의 유전자를 비교 해야만 고유종 여부를 밝힐 수가 있다. 우리나라에 서식하는 종의 유전자 염기서열만 해독하여 고유종임을 주장할 수는 없는 일이며, 학문적으로도 그 가치는 매우 적을 것이다.

종 내의 보전단위를 확립하기 위한 유전자 분석에는 주로 미토콘드리아 유전자 마커가 사용된다. 미토콘드리아 유전자는 핵 유전자보다 진화속도가 빠르며 모계 유전을 하고 재조합이 일어나지 않아 종 이하의 계통분석에 유리한 이점을 갖고 있다. 미토콘드리아의 어느 유전자나 부위를 사용할 것인가는 해당 분류군 또는 종마다 다른 특이성을 갖고 있다. 대개 해당 분류군이나 종의 계통연구를 위해 이미 밝혀져 있는 유전자를 사용하는 것이 다른 종 또는 집단과의 비교분석을 가능하게 하기 때문에 문헌 및 Genbank와 같은 데이터베이스를 검색해서 해당 분류군을 위해 이미 사용된 마커 유전자를 확인할 필요가 있다.

미토콘드리아 전체 게놈 염기서열을 읽어서 유전자 분석에 사용하는 것도 앞으로의 경향

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

이며 계통분석의 중요한 도구가 될 수 있다. 그러나 아직도 미토콘드리아 전체 게놈 해독과 분석은 상당한 시간과 인력, 자금이 필요한 일이기 때문에 이 방법은 종 이상의 계통분석과 연구를 위해 주로 사용되며, 종 이하의 보전단위 설정을 위해서는 아직까지 거의 응용되지 않고 있다. 또한 비록 한반도 내 자생종 또는 고유종의 미토콘드리아 게놈 서열을 확보하였다 할지라도 그 근연종이나 아종의 게놈 서열이 확보되지 않는 이상 보전이나 계통연구에 있어 그 효용가치는 매우 제한적이 될 것이다. 오히려 해당종에서 많은 연구자들이 이미 광범위하게 사용하고 있는 특정 유전자 서열만 제한적으로 읽어서 분석에 사용함으로써 더 적은 비용과 노력으로 더 많은 샘플을 분석하는 것이 보전단위를 확립하기 위한 유전자 분석의 효율적인 방법이 될 수 있다. 그러므로 미토콘드리아 전체 게놈 분석을 계획한다면 그 목적을 명확히 하고 필요하다면 게놈 분석이 필요한 특정 분류군을 위주로 하여 장기적으로 계획, 실행하는 것이 한정된 유전자 분석 자원을 효과적으로 사용하는 길이 될 것이다.

2.2.2. 유전적 다양성 측정, 비교, 및 집단분석을 위한 연구전략 및 마커의 선정

유전적 다양성이란 종 또는 집단 내에 존재하는 여러 다양한 유전적 형태를 말한다. 인류라는 종 안에 황인종, 백인종, 흑인종 등의 다양한 인종이 존재하고, 한국인 안에서도 그 생김새와 성격이 제각각인 다양한 개인들이 존재하는 것은 바로 이 유전적 다양성 때문이다. 한 종이 야생에서 생존해 나가는데 있어 이 유전적 다양성은 필수적이다. 혹시 급격한 환경의 변화나 질병의 위협 속에서도 유전적 다양성 덕분에 살아남는 개체에 의하여 종이 존속되는 것이다. 그러나 많은 멸종위기종의 경우 개체군의 크기가 줄어들면 필연적으로 근친번식 정도가 증가하게 되고 개체들의 유전적 구조가 서로 비슷하게 된다. 즉 유전적 다양성이 줄어드는 것이다. 이렇게 되면 근교약세 현상에 의하여 동식물들의 생존능력이 퇴화하게 된다. 바로 이러한 근친번식에 의하여 순종의 애견이 만들어지게 된다. 푸들 개를 만들기 위하여는 여러 대에 걸친 근친번식이 필요하며, 이 때문에 순종 푸들의 모양은 모두 비슷하고 유전적 다양성은 매우 낮다. 반면에, 잡종견은 그 다음 세대에 어떤 개가 나올지 예측이 힘들 정도로 유전적 다양성이 풍부하다. 그러므로 잡종견일수록 병치레도 별로 없고 새끼도 많이 낳으며 수명도 길다. 사람이 푸들을 집에서 기를 때는 유전적 다양성이 적다는 것이 큰 문제가 안 되지만, 푸들이 야생에서 살아갈 능력은 없다. 즉 유전적 다양성이 적어진다는 것은 동식물이 자연 상태에서 생존해 나갈 능력이 떨어진다는 것을 의미한다. 야생동식물에게 있어 유전적 다양성이 종과 개체군의 장기적 생존에 있어 중요한 인자의 하나라는 것은 이미 많은 연구결과에 의하여 입증되어 있다.

집단 내 또는 집단 간의 유전적 다양성은 유전자 분석결과를 유전적 다형성(polymorphism), 이형접합도(heterozygosity), 대립유전자 다양성(allelic diversity) 등의 형태로

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

서 구체적 숫자로 표현하고 비교할 수 있다. 그러므로 한 집단의 유전적 건강성과 장기적 생존 능력을 판단하는 수단으로서 유전적 다양성을 측정하는 일은 보전생물학에서 매우 중요한 의미를 갖는다. 유전적 다양성의 측정을 위해 사용되는 유전자 마커는 매우 다양하며 기술이 발달함에 따라 사용되는 마커도 발전하여 왔다. 예를 들어 단백질 전기영동에 의한 동위효소의 분리기법은 초기에 집단유전학 분석을 위해 널리 사용되었으나 DNA를 다루는 기술이 진보되고 유전자 분석비용이 낮아짐에 따라 이제 주로 DNA 마커를 사용하게 되었다. DNA 분석에 기반한 마커나 기법으로는 DNA fingerprinting (minisatellites), RAPD, AFLP, 미토콘리아 DNA, microsatellite DNA, RFLP, SNP 등이 있다. 이 중 보전유전학의 집단분석에 있어서 초창기에 많이 사용되었던 DNA fingerprinting, RAPD, RFLP 등은 이제 대부분 microsatellite에 그 자리를 내어 주게 되었다.

Microsatellite은 대개 1-5개 정도의 짧은 염기서열이 연속적으로 반복되어 나타나는 DNA 분절이며 대부분 진핵생물의 게놈에 비교적 고르게 분산되어 존재한다. Microsatellite은 DNA fingerprinting에 사용되는 minisatellite 등에 비해 그 길이가 매우 짧기 때문에 아주 적은 양의 DNA 시료로도 PCR 증폭에 의하여 안정적으로 분석할 수 있다는 장점이 있다. 이것은 멸종위기종의 보전유전학에 있어 매우 중요한 이점인데, 그 이유는 멸종위기종은 그 본질상 다량의 혈액이나 조직 샘플을 구하는 것이 불가능하지 않으면 매우 어렵기 때문이다. 멸종위기종의 유전자 분석에 사용되는 유전자 샘플은 비침습적인 방법(non-invasive method)으로 수집되는 분변, 털 등의 시료가 주가 되며 이러한 소량의 유전자 시료를 분석하기 위해서는 PCR에 의한 안정적인 증폭이 가능해야 한다. 또한 microsatellite은 매우 높은 집단 내 다양성과 공우성(co-dominance)을 보이기 때문에 RAPD나 AFLP 등에 비해 명료한 해석이 가능하고 실험의 반복성과 안정성이 높아 신뢰성 있는 마커로 멸종위기종의 보전유전학과 집단유전학적 분석에 의한 집단구조와 유전자 흐름의 연구에 널리 사용되고 있다 (Beaumont and Bruford, 1998; Bruford and Wayne, 1993; Buchanan et al., 1996; Bowcock et al., 1994).

또 microsatellite 마커는 개체 간에 매우 변이도가 높고 소량의 시료로도 분석이 가능하기 때문에 몇 개의 유전좌 마커를 조합하면 높은 신뢰도의 개체식별에 이용할 수 있다. 사람과 일부 가축에 있어서 이러한 기법은 이미 보편화되어 있어 범죄수사와 친자확인, 사체확인, 혈통관리 등에 광범위하게 이용되고 있다. 멸종위기종을 포함한 야생동식물의 관리에 있어서도 microsatellite에 의한 개체식별법과 유전자 분석에 의한 성감별법을 이용하여 개체군의 크기, 서식행동범위 및 암수비율 결정, 사회구조, 복원을 위해 방사된 개체의 추적조사 등 생태적 연구에 널리 이용되고 있는 실정이다. 이러한 생태적 정보는 전통적인 생태조사 방법으로는 얻을 수 없었거나 얻기가 매우 어려웠던 자료들이며, 이제 생태조사연구에서 이러한 유전적 분석도구를 이용하는 것은 세계적인 경향이 되고 있다. 여기에서 핵심적인 역할을 하는 유전자 마커

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

가 바로 microsatellite이며, 따라서 향후 보전생물학적 관점에서 생물종의 유전자 분석연구를 계획함에 있어 microsatellite marker의 개발과 응용은 필수적인 위치를 차지하여야 할 것이다 (Innan et al., 1997; McCouch et al., 1997; Taberlet et al., 1997; Foran et al., 1997; Nsubuga et al., 2004; Ruiz-Garcia et al., 2005).

다만 microsatellite은 각 종마다 마커 개발이 독립적으로 이루어져야 하며, 이 마커 개발에는 상당한 시간과 비용이 필요하다는 불리한 점이 있다. 어떤 분류군에서는 가까운 근연종에서 개발된 microsatellite 마커를 이용할 수 있는 경우도 있다. 예를 들어 한국산양(Korean goral, *Nemorhaedus caudatus*)에서 개발된 마커는 가까운 속인 일본산양(Japanese serow, *Capricornis crispus*)의 유전자 분석에도 이용되었다 (An et al., 2005). 그러나 많은 경우 연구 대상종의 마커를 새로 개발해야만 하는데, 마커 개발 기술의 진보로 개발에 필요한 시간과 비용이 계속 낮아지고 있다 (An et al., 2005). 그러므로 향후 국내 생물자원 및 멸종위기종 보전과 복원을 위한 유전자 분석 정책수립에 있어 보전유전학의 필수적인 도구로 자리 잡고 있는 microsatellite marker 개발을 위한 계획이 반드시 포함되어야 할 것이다.

2.3. 분석 생물 대상종의 샘플 확보 방안

2.3.1. 야생 동물 자원 은행의 재료 이용 방안

야생동물유전자원은행은 과학기술부에 의하여 2002년 국가지정 연구소재은행의 하나로 지정된 이후 현재까지 국내에서 유일하게 야생동물 (포유류, 조류, 양서 및 파충류) 유전자원 시료를 체계적으로 수집, 확보, 보존, 연구, 관리, 분양하고 있는 기관으로 기능하고 있다. 야생동물유전자원은행에서 2002년 9월부터 2007년 2월까지 4년 6개월 동안 확보한 유전자원 시료는 290종에서 유래한 총 3945개체의 시료에 달한다. 또한 같은 기간 동안 분양한 시료 수는 2,809건에 이르고 있다. 각 개체에서는 다양한 조직, 혈액 등의 시료가 여러 형태로 보존되고 있기 때문에 실제 확보한 시료 수는 20,000점 이상에 이른다. 야생동물유전자원은행이 구축한 유전자원 시료 수집망은 야생동물구조센터 네트워크에 크게 의존하고 있다. 야생동물유전자원은행은 이러한 네트워크 구축을 위하여 일선 야생동물구조센터에 야생동물 구조활동에 필요한 수의학적 기술지원을 제공하고 있으며, 체계적인 구조활동과 유전자원 수집망 구축을 연계시키기 위한 야생동물 구조치료교육 프로그램 개발, 구조지침서 저술, 유전자원 연구, 야생동물 보전을 위한 학술활동 등 활발한 활동을 하고 있다.

또한 야생동물유전자원은행은 멸종위기종 보전과 복원의 기반이 되는 보전단위 설정 및

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

유전적 다양성 분석연구에 있어 한반도 인근 지역과 국가의 야생동물 유전자 시료와 공동연구의 중요성을 인식하고 초기부터 해외 유전자 시료 수집 및 공동연구망 구축을 위해 많은 노력을 기울여 왔다. 그리하여 지금 야생동물유전자원은행은 러시아, 중국, 동남아시아, 일본 등에 유전자 시료 확보와 공동연구를 위한 튼튼한 네트워크를 구축하는데 성공하였다. 야생동물유전자원은행이 지금까지 구축한 국제협력망은 향후 주요 생물종의 유전적 연구에 필수적인 해외 유전자 시료를 확보하는데 있어 중요한 역할을 할 수 있을 것이며, 해외 유전자원 시료 확보에 있어 국가기관이 아닌 대학으로서 가지는 이점을 최대한 활용할 수 있을 것이다.

더욱이 야생동물유전자원은행은 국내 야생동물 보전유전학 연구에 있어서도 선구자적 역할을 해왔다. 야생동물유전자원은행은 2001년 4월 세계자연보전연맹 보전번식전문가그룹(CBSG/SSC/IUCN) 및 환경부와 협력하여 지리산 반달가슴곰 개체군 및 서식지 생존능력 평가 (PHVA) 워크샵을 개최하였고 (Lee et al, 2001), 그 결과와 지침에 따라 동북아시아 반달가슴곰의 보전단위 설정에 관한 연구를 수행하여 환경부의 반달가슴곰 복원프로젝트를 위한 학술적, 이론적 기반을 제공하였다 (이, 2004). 또한 멸종위기 야생동물의 보전유전학적 연구 및 집단유전학, 개체식별, 생태유전학 연구에 필수적인 역할을 하는 microsatellite marker들을 세계 최초로 개발하는데 성공하였고(Kim et al, 2004; An et al, 2005), 현재 이를 응용하는 연구를 수행 중이다. 이 외 유전자 분석에 의한 법의학적 연구 (An et al, 2007), 수달, 삵, 여우, 고라니, 너구리, 다람쥐 등 멸종위기종을 포함하는 한국 야생동물의 보전단위 설정, 유전적 다양성 및 개체 확인 연구 등을 수행하고 있다.

그동안 야생동물유전자원은행이 국내외 야생동물 유전자 시료를 확보, 수집, 가공, 보관, DB화, 연구를 위해 구축해 놓은 시스템과 네트워크는 향후 주요 생물종의 유전자 분석연구를 위한 시료로서 중요한 기반이 될 것이며, 이러한 시스템과 네트워크를 유지하기 위한 지원 방안 및 향후 주요 분류군을 위한 유사한 센터들을 설립, 네트워크화 하는 방안도 주요 생물종 유전자 분석연구의 장기계획에 포함되는 것이 바람직하다.

2.3.2. 야생동물유전자원은행과 국립생물자원관의 유전자원실과 연계 방안 제시

그 동안의 야생동물유전자원은행의 유전자원 시료 확보와 보존, 분양체계 구축 경험은 향후 국립생물자원관이 비슷한 사업을 개발, 발전, 확대시키는데 중요한 자산이 될 수 있다. 이를 위하여 국립생물자원관과 야생동물유전자원은행은 다음과 같은 분야에서 협력과 역할분담이 가능할 것으로 생각된다.

- 야생동물유전자원은행은 국립생물자원관이 유전자원 시료를 확보, 수집, 가공, 관리, 보존하는데 필요한 기법을 전수하고 전문 인력을 훈련시키는데 기여할 수 있다.
- 야생동물유전자원은행과 국립생물자원관은 야생동물 유전자원 시료 수집망 구축에 있어 상

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

호 보완적인 협력을 할 수 있다. 한 기관이 위에 열거한 모든 수집망을 구축하고 유지하는 것은 불가능한 일이므로 상호보완적인 협력이 필요하다. 예를 들어 생물자원관은 좀 더 공식적이고 국가기관이 관련된 수집망 구축에 집중할 수 있으며, 야생동물유전자원은행은 비공식적인 민간단체들의 연결망 구축에 더 치중하는 등 역할 분담이 가능하다.

- 양 기관은 상호 구축한 시료 수집망으로부터 확보한 시료와 정보를 서로 공유하여 국가적으로 중요한 재산인 유전자원시료가 안전하게 이중으로 보존, 관리되도록 협력할 수 있다.
- 양 기관은 각자 확보, 보존하고 있는 시료의 공동 데이터베이스를 구축하여 상호 연동되도록 함으로 국가 전체적인 유전자원 보유현황파악과 이용자의 검색 편리성에 있어 중요한 기여를 할 수 있다.
- 양 기관은 야생동물 유전자 시료를 이용한 야생동물종의 유전적 다양성 및 분화, 분자계통 연구 등에 있어 공동 또는 협동연구체계를 갖출 수 있다. 야생동물유전자원은행은 대학에 위치하고 있어 교육기관으로서 인력확보와 교육프로그램 등의 운영에 이점이 있으며, 생물자원관은 다양한 생물시료 확보와 접근성에 있어 이점이 있으므로 상호보완적인 연구협력 관계를 유지할 수 있다.
- 야생동물유전자원은행이 지금까지 구축한 국제협력망은 향후 야생동물의 유전적 연구에 필수적인 해외 유전자원 시료를 확보하는데 있어 중요한 역할을 할 수 있다. 해외 유전자원 시료 확보에 있어 국가기관이 아닌 대학으로서 가지는 이점을 최대한 활용할 수 있을 것이다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

2.3.3. 야생 집단으로부터 채집 및 이용 방안

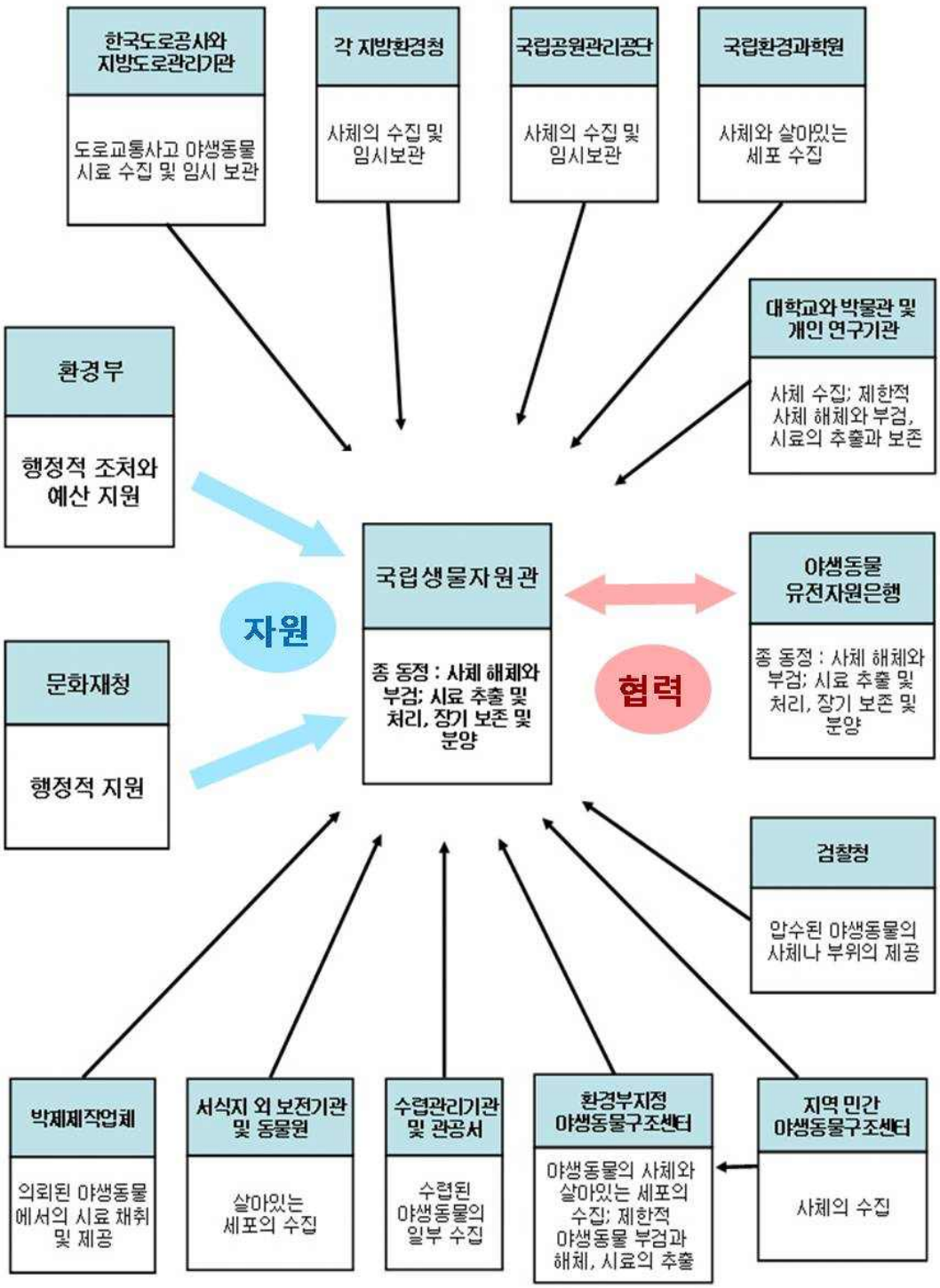


그림 VI-1. 야생동물 유전자원 시료 수집의 국가체계 제안.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

2.3.4. 채집시 유전자 분석 재료의 수집에 가이드라인 제시

2.3.4.1. 야생동물 유전자 샘플 확보와 수집에서의 원칙

여러 분류군의 유전자 시료 중에서도 야생동물, 특히 포유류와 조류의 유전자원 시료는 식물이나 하등동물 시료와 달리 능동적인 수집을 위한 포획작업이 쉽지 않으며, 여기에는 많은 노력과 시간, 자금이 필요할 뿐 아니라 안전 및 윤리적인 문제에 봉착할 가능성도 있다. 더욱이 야생동물의 유전자 샘플에는 야생동물 뿐 아니라 사람과 가축에 치명적인 병원체가 오염되어 있을 가능성이 있기 때문에 그 수집에 있어 항상 질병전파 문제를 고려하여야 한다. 그러므로 향후 야생동물의 유전자 샘플 수집체계 구축 및 수집활동에 있어 이러한 특성을 감안하여 다음과 같은 방향과 원칙을 제시한다.

- 수집 활동에 있어 수집자나 연구자의 안전과 건강을 최우선으로 고려하여야 한다. 많은 야생동물의 질병이 사람에게도 전파될 수 있는 인수공통전염병이기 때문에 시료를 다룰 때 질병에 감염될 가능성을 항상 고려하여야 한다. 또한 로드킬 사체 등을 수집할 때 추가적인 교통사고에 의해 수집자의 안전이 위험에 빠지는 일이 없어야 한다.

- 시료 수집활동으로 인하여 생태계를 교란시키는 일이 없어야 한다. 예를 들어 적절한 안전장치 없이 야생동물의 사체나 조직 시료를 다루고 이동시킨다면 알지 못하는 사이 같은 종이나 다른 종, 심지어 사람과 가축에게도 질병을 전파시켜 생태계에 위해를 초래하거나 경제적 손실 또는 인명의 손실을 가져올 수 있다. 최근 문제가 되고 있는 조류인플루엔자나 광견병, SARS와 같은 인수공통전염병은 대표적인 예이다. 그러므로 야생동물 유전자 시료 수집과 운반에 있어 질병을 전파시킬 위험을 최소화하기 위해 모든 노력을 기울여야 한다.

- 수집대상 동물개체의 건강, 복지, 안전을 고려해야 한다. 수집행위로 인하여 개체의 생명이나 복지, 안전을 위태롭게 하는 경우에는 반드시 그에 합당한 이유가 있어야 하고 개체의 희생에 비해 얻는 이득이 훨씬 큰 경우에만 가능하다(예를 들어 인수공통질병 연구를 위한 설치류의 포획). 그러한 경우에도 동물복지를 고려한 인도적인 방법으로 포획하여야 하고 최소한의 공포와 고통을 주는 방법으로 시료를 채취하여야 한다.

- 야생동물 사체시료 수집에 있어 가능한 모든 경우에 야생동물 폐사의 원인을 규명하기 위한 최선의 노력을 기울여야 하며, 사인규명과 시료확보를 동시에 추구하여야 한다. 특히 멸종위기종이거나 전염성 질병이 의심될 때에는 정확한 사인규명을 최우선의 목표로 하여야

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

한다. 정확한 사인규명을 통해서만 멸종위기 개체군을 위협하는 요인을 밝혀내고 이에 대한 적절한 대책을 마련할 수 있으며, 전염성 질병은 생태계와 인간 및 가축 모두에게 큰 위협이 될 수 있기 때문이다.

- 야생동물 유전자원 시료를 수집하는 일은 많은 노력과 시간이 필요한 일이기 때문에 시료를 확보할 수 있는 모든 기회를 활용할 필요가 있다. 여기에는 야외 생태 조사 시 간혹 발견되는 야생동물의 사체를 수집하는 일, 야생동물 구조과정에서 발생하는 사체 수집, 로드킬 사체, 밀렵된 사체 등 다양한 기회를 최대한 활용하여 시료를 확보하여야 한다.

- 야생동물 유전자 시료는 그 개개의 시료와 관련된 최대한의 정보가 정확하게 기록되고 그 시료 고유의 식별번호와 함께 데이터베이스화 되어 함께 보존되어야만 가장 높은 가치를 지니게 된다. 만일 정확하지 않은 정보가 입력된다면, 예를 들어 어떤 시료와 함께 입력되어 있는 채집지역 정보에 오류가 있다면 나중에 이를 분석할 때 전혀 엉뚱한 결과가 나오게 될 것이고, 연구자는 매우 커다란 혼란에 빠지게 될 수 있다. 그러므로 잘못된 정보와 함께 수집된 시료는 차라리 없느니만 못한 결과를 가져올 수도 있다는 것을 명심하고 정확한 정보와 함께 시료에도 명확한 표지를 하여 시료와 관련정보가 항상 정확히 연계되도록 하여야 한다.

- 야생동물 유전자 시료를 수집할 때는 수집된 시료가 해당종의 전체 집단을 대표할 수 있는 샘플로서 가치를 가지도록 지역, 연령, 성별, 시기, 시료의 형태 등에 있어 치우침이 없이 최대한 무작위적으로 수집하는 것이 바람직하다. 주어진 기회를 활용하여 수집하는 경우, 이런 대표성을 가지는 샘플을 확보하는 것이 쉬운 일은 아닐 것이나 가능한 한 치우침이 없는 시료를 수집할 수 있도록 노력할 필요가 있다.

- 가능하면 다양한 분류군과 종의 시료가 수집될 수 있도록 노력하는 것이 바람직하다. 특히 멸종위기종과 쉽게 구할 수 없는 시료를 확보하기 위해 더 많은 노력을 기울여야 한다.

- 유전자 시료를 수집할 때 가급적 여러 연구 분야에 활용할 수 있도록 다양한 형태의 시료들을 동시에 채집, 확보하는 것이 바람직하다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

2.3.4.2. 유전자 시료 보존, 분양, 연구, 관리체계 구축에서의 방향 및 원칙

- 시료의 장기적이고 안정적인 보존을 위한 안전장치가 필요하다. 많은 노력을 들여 수집, 확보한 시료를 한 군데만 보관하면 여러 형태의 자연 또는 인위적인 재해와 사고에 취약하게 된다. 안정적으로 보존하기 위해서는 단일 기관이나 장소가 아니라 동일한 시료를 여러 기관이나 장소에 분산하여 보존하는 시스템을 개발하여야 한다. 또 한 가지 시료를 여러 형태로 가공하여 보존하는 방법도 도움이 될 수 있다. 예를 들어 조직시료의 일부를 분할하여 -80℃ 이하의 냉동고에 보존하거나, 보존용 완충액에 침지하여 보존하는 방법, 알코올액에 보존하는 방법, 또는 DNA를 추출하여 보존하는 등 여러 각도에서의 보존방법을 병행하는 것이 바람직하다. 냉동 시료의 장기 보존을 위해서 정전에 대비한 비상전원의 확보도 필요하다.

- 시료 및 관련정보를 체계적으로 유지, 관리할 수 있는 시스템과 데이터베이스의 개발이 병행되어야 한다. 입수되는 각각의 실물 시료와 함께 관련된 모든 정보가 시료의 고유번호와 정확히 연계되어 DB화 되어 유지, 관리되어야만 수집된 시료는 최대한의 가치를 지니게 된다.

- 생물자원 시료는 각 분류군별로 나뉘어져 수집되는 경향이 강하므로 수집된 시료의 최대한 활용을 위해서는 각 수집보존기관들을 연결하는 DB 네트워킹이 필요하다. 이러한 네트워킹은 각 수집보존기관의 관리자나 국가적 생물자원 조정기구가 손쉽게 현재의 상황을 파악하고 취약부문을 분석하여 국가 생물자원 확보를 위한 로드맵 구상에 도움을 줄 것이며 수집, 확보된 생물자원 시료가 최대한 활용되게 할 것이다.

- 시료에 관한 정보는 공개되어야 하며 적절한 절차를 거쳐 자격을 갖춘 연구자들에게 분양, 이용되어야 한다. 만일 수집, 확보된 생물자원 시료가 활용되지 못하고 단지 보관만 된다면, 시료 확보의 의미를 찾기는 어려울 것이다. 생물자원 시료 확보의 목적은 현재와 미래의 연구자들이 이를 이용하여 생물다양성과 보전, 이용에 관한 연구를 돕는 것에 있다. 다만, 일반적인 형태 표본과는 달리 유전자 시료의 경우, 시료를 이용하면서 시료가 사용되어 없어지게 되므로 현재의 이용과 미래세대를 위한 보존 사이에 적절한 조화를 이루기 위한 지침 개발이 필요하게 된다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3. 보존생물학적 측면에서 유전적 분석 자료의 활용방안 제시

3.1. 보전유전학적 관점에서 필요한 유전자 자료의 산출 가이드라인 제시

3.1.1. 보전단위 설정을 위한 유전자 분석 자료의 산출

보전단위 또는 관리단위 설정을 위한 종 이하의 계통분석을 위해서는 해당종이 분포하는 전 지역을 포괄하는 시료를 확보, 분석할 필요가 있다. 대부분의 경우 아종 또는 진화적으로 의미있는 단위(ESU, Evolutionary Significant Unit)를 설정하기 위한 집단 간의 유전적 거리에는 종에 따른, 또는 분류군에 따른 진화역사의 특이성이 존재하므로 종을 뛰어넘는 일률적인 기준을 적용하기는 불가능하다. 그러므로 아종이나 보전단위 설정을 위한 유전적 거리의 기준은 개개종이나 분류군마다 달라지며, 정확한 기준을 확립하기 위해서는 종의 분포지역 내 분화가 가능한 모든 집단의 샘플을 수집하여 주로 변이가 심한 미토콘드리아 DNA 일부 또는 핵유전자 일부의 염기서열을 결정한 후 전체적인 집단 간 유전적 거리를 계산하고 계통도를 작성하여 분석 후, 뚜렷이 분화되어 있는 집단 간의 유전적 거리와 유전적 구조에 대한 종합적 정보에 더하여 생태적, 형태적, 생물지리적 자료와 특징에 근거한 총괄적인 해석과 판단 하에 아종 또는 보전단위를 제안하게 된다.

많은 경우, 특히 고등척추동물의 경우 한반도 자생종 또는 근연종의 분포범위는 한반도 인근지역인 중국, 러시아 극동지역, 일본은 물론 동남아시아 및 유라시아 대륙을 포괄하는 경우가 많다. 그러므로 이러한 종들의 보전단위 설정과 계통연구를 위한 유전자 분석 과정이 단시일에 이루어지기는 어려울 것이며, 멸종 위기종 및 생물자원 보전 및 복원을 위한 장기 계획하에 해외 유전자 시료 확보와 공동협력연구를 위한 국제 네트워크 기반 구축에 꾸준한 투자가 필요하다.

3.1.2. 집단유전학적 분석을 위한 유전자 분석 자료의 산출

미토콘드리아 일부 유전자를 이용한 보전단위 설정연구를 위해서는 분화가 가능한 집단별로 2-5개체 이상 시료를 확보하는 것으로 충분히 종 이하 계통분석이 가능할 수 있다. 물론 가능하다면 더 많은 시료를 확보하는 것이 바람직하다. 해독이 필요한 유전자는 종에 따라 달라진다. 해당종에서 이미 해독이 되어 있어 비교할 수 있는 염기서열이 많은 유전자나 변이 정도가 높은 부위를 선택하는 것이 바람직하며, 이것은 종마다 다를 수 있다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

집단 내 및 집단 간 유전적 다양성의 비교, 유전자 흐름, 집단구조와 분화 등 보전을 위한 집단유전학적 분석을 위해서는 한 집단 내 최소 20개체 이상, 가능한 경우 50개체 정도의 시료를 확보하고 분석할 필요가 있다. 만일 집단분석을 위해 미토콘드리아 유전자를 사용한다면 가장 변이도가 심한 control region (D-loop)이 바람직하다. 더 세밀한 집단분석을 위해서는 microsatellite 마커를 이용할 필요가 있으며 이를 위해서는 이미 해당종을 위해 개발된 마커가 존재하는지, 또는 근연종의 마커를 응용할 수 있는지 확인해야 한다. 만일 해당종을 위한 마커가 존재하지 않는다면 다른 마커를 이용하든지 또는 새로운 microsatellite 마커 개발이 선행되어야 한다.

집단유전학적 분석을 위한 유전자 시료 역시 그 확보에 있어 오랜 시간과 노력의 투자가 필요한 종이 많다. 특히 멸종위기종이나 서식범위가 넓은 포유류와 같은 고등척추동물의 경우 충분한 크기의 개체군 자체가 존재하지 않거나 시료 채집이 불가능하지 않으면 매우 어려운 경우가 대부분이다. 또한 비교 대상인 집단이 국내에 존재하지 않을 수 있으며, 그렇지 않다 할지라도 한반도 인근지역 또는 다른 지역의 집단과 비교해야 할 필요가 있는 경우가 많다. 더군다나 집단유전학적 분석을 위해서는 계통분석보다 훨씬 더 많은 수의 개체 샘플이 필요하며 이를 위하여 역시 국내 및 해외 유전자 시료 확보와 공동협력연구를 위한 국제 네트워크 기반 구축이 중요한 선결조건이 된다.

주요 생물종의 국내 및 해외 유전자 시료 확보, 수집, 보전, 이용, 관리, 그리고 유전자 분석연구를 위한 국제적 연구협력 네트워크는 분류군에 따른 특성을 존중하여 주요 분류군 별로 이루어지는 것이 바람직하며, 주요 분류군 별로 유전자 수집, 보존과 연구에 있어 전문성이 있고 특성화되어 있는 기존의 우수한 연구집단이나 센터를 지정하거나 지원하는 방안을 생각할 수 있다. (예를 들어 환경부 지정 식물 DNA 연구센터, 곤충유전자연구센터, 포유류 유전자원 연구센터, 등) 이러한 센터에서는 체계적으로 국내 또는 해외 유전자 시료를 수집, 확보한 후 엄밀한 검증과 DB화 작업을 거쳐 일정한 자격을 갖춘 국내 연구자 사이에 공유하도록 하여야 할 것이다. 또한 가능한 경우 시료를 분주하여 동일한 시료를 두 군데 이상의 국내 기관에 분산 보관, 보존하여 땀흘려 수집한 귀중한 유전자 시료를 안전하게 미래세대에 넘겨 주어 미래의 생물자원 보전과 복원에 이용될 수 있도록 해야 할 것이다. 이를 위하여 지금 건설 중인 국립생물자원관 내에 유전자원 관리부서를 설립하여 유전자의 수집과 보존, 분양, 연구 업무를 총괄토록 하는 방안을 고려할 필요가 있다. 국립생물자원관 내 유전자원 관리부서는 환경부 지정 분류군 별 유전자연구센터들과 협력하여 주요 생물종 유전자 시료 수집, 보존, DB화, 분양 업무를 지원, 감독하며 자체적인 수집과 보존, 연구업무와 이들 센터들의 업무를 총괄조정하는 일을 맡을 수 있을 것이다. 이러한 국가적인 생물자원 유전자 수집, 보존과 연구의 기반이 구축되어야 생물주권 확립 및 생물자원 보전 및 복원을 위한 장기적인 계획을 이론과 학술적으

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

로 뒷받침할 수 있을 것이며, 단단한 보전생물학적 기초 위에 명목상이 아닌 실질적인 생물자원 보전과 복원이 이루어질 수 있을 것이다.

3.2. 보전유전학적 관점에서 복원에 필요한 유전학적 정보의 활용 방안 제시

유전적 다양성에 문제가 있는 단편화된 서식지의 고립된, 또는 소수 개체군 관리에 있어서는 다음과 같은 순서의 유전적 원칙들을 고려하여야 한다.

3.2.1. 유전적 문제의 진단

멸종위기 개체군의 적합한 유전적 관리를 위하여는 개체군의 현재 유전적 건강성에 관한 다음 세 가지 질문에 대한 답을 얻어야 하며, 이를 위하여는 집단유전학적 분석이 필요하다.

- 해당 멸종 위기종 또는 개체군의 유전적 다양성이 감소 또는 소실되었는가?
- 근친퇴화가 일어나고 있는가?
- 개체군이 유전적으로 분할되어 있는가?

집단유전학적 분석을 이용한 개체군의 유전적 다양성 비교에 의해 유전적 건강성에 문제가 있는 개체군을 확인할 수 있으며, 보전과 복원의 우선순위 결정에 있어 이러한 정보는 매우 유용하게 사용된다. 또한 F 통계 기법을 이용한 집단유전학적 분석으로 서식지 단편화에 의한 집단의 분할 및 분화 정도와 유전자 흐름의 정도를 계산할 수 있다. 이러한 집단 분할에 관한 정보는 분할되지 않은 집단과 비교해서 정상적인 유전자 흐름의 정도와 문제 집단의 감소 정도를 알 수 있게 하며, 서식지 단편화 문제에 대한 대책을 마련하는 기초를 제공해 준다.

3.2.2. 개체군 크기의 증가

멸종위기 개체군 관리의 첫 번째 목표는 개체군 숫자를 증가시키는 것이다. 그럼으로 작은 개체군이 필연적으로 갖게 되는 확률적(우연적; stochastic) 위협요인들, 즉 개체군 크기의 불안정성에 의한 위협, 환경적 위협, 재난에 의한 위협, 유전적인 위협요인에 의한 영향들을 경감시킬 수 있다. 개체군 크기의 증가를 위하여는 먼저 개체군 감소가 일어난 원인을 규명 및 제거하며, 개체군 감소 경향을 중단시키고 회복시키기 위한 조치를 취하여야 할 것이다. 여기에는 밀렵단속, 보호구역 지정, 서식지의 질을 향상시키기 위한 조치, 개체군에 영향을 미치는 오염물질의 경감, 경쟁자나 포식자의 제거, 그리고 필요하다면 먹이자원의 보충과 같은 조치를 생각할 수 있다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.2.3. 유전적 다양성이 감소된 소수 개체군의 복원

작은 개체군 크기로 인하여 근친번식이 일어났고 유전적다양성이 감소된 개체군의 유전적 건강성을 회복하기 위하여는 다른 개체군으로부터 새로운 개체를 도입하는 적극적인 관리 전략이 필요하다.

(1) 새로운 유전자의 도입을 위한 개체의 선택

새로운 유전자의 도입을 위한 개체는 가능하다면 근친번식이 되지 않은 개체가 바람직하다. 그러나 설사 근친번식 된 개체라 할지라도 도입될 지역의 작은 개체군과 유전적으로 근연관계가 없는 개체들을 사용할 수도 있다. 근친번식이 이미 일어난 개체군에서 개체들을 도입하여야만 할 때에는 서로 간에 유전적으로 분화된 여러 개체군에서 도입을 추진함으로 유전적다양성을 높일 수 있다. 또는 이들 근친번식이 일어났지만 분화된 여러 개체군의 개체들을 서로 교차 번식시켜 유전적다양성이 증진된 새로운 개체군을 만들고, 이를 도입원으로 삼는 것을 고려할 수 있다.

만일 복원시키고자 하는 개체군과 같은 아종단위 내에 다른 개체군이 존재하지 않는다면, 같은 종의 다른 아종단위에서의 도입을 고려할 수 있다.

만일 해당 종 전체에 어떤 다른 개체군도 존재하지 않는다면, 서로 교차번식이 가능한 근연종의 개체를 이용하는 것이 유일한 해결책일 수 있다. 그러나 이종간의 교배 시 심각한 이계교배퇴화(outbreeding depression) 현상이 나타날 우려가 있기 때문에, 이종간의 교배는 그 필요성이 매우 클 때에만 시도해야 한다. 또한 교차 번식된 F1과 그 후손들이 완전한 번식능력을 갖는다는 것을 실험적으로 확인한 후 시행하여야 한다.

(2) 유전적 다양성이 소실된 단일 개체군으로 이루어진 종의 관리

유전적으로 볼 때 최악의 상황은 이미 근친번식이 일어난 단 하나의 개체군으로만 이루어져 있는 멸종위기종의 경우이다. 이 경우, 도입을 추진할 어떤 다른 아종이나 근연종도 없기 때문에 개체군 관리에 다음과 같은 기본적 원칙을 적용하는 외의 다른 방법이 없게 된다.

- 개체군 크기를 증가시킨다.
- 가능하면 개체군을 몇 개의 다른 지역으로 분산시킨다. (한 지역의 환경적 재난으로 인하여

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

한꺼번에 멸종되는 위험도를 최소화하기 위하여)

- 환경적 조건을 우호적으로 만듦으로 번식률을 증가 시킨다. (예를 들어 포식자와 경쟁자를 제거한다)
- 비우호적인 환경적 변화가 개체군에게 영향을 주지 않도록 개체군을 보호한다. (예를 들어 외래성 질병의 도입을 막기 위한 검역과 방역을 시행하고, 유해종, 포식종, 경쟁종의 도입을 막기 위한 조치가 있어야 하며, 이러한 환경적 변화를 조기에 감지할 수 있는 모니터링 체계가 필요할 것이다)

3.2.4. 파편화된 개체군의 유전적 관리

유전자 분석 결과 및 생태 조사 결과가 멸종위기종 개체군이 분할되고 파편화된 서식지에서 살아가고 있다는 것을 보인다면, 이들의 유전적 다양성을 최대한 보존하고 근친퇴화와 멸종의 위험도를 감소시키기 위하여 다음과 같은 관리방법을 선택할 수 있다.

- 서식지 범위를 증가시킨다.
- 가용한 서식지의 적합도를 증진시킨다. (서식밀도를 높인다)
- 인위적인 이입(translocation)에 의하여 이주율(migration rate)을 높인다. (개체를 이동시키거나, 또는 정자를 채취하여 인공수정 시키는 등의 방법으로 배우자만 이동시킬 수도 있다)
- 서식지로서 적합하지만 이미 개체군이 멸종된 지역에 새로운 개체군을 확립한다.
- 서식지 간의 통로(corridor)를 만든다.

인위적인 개체의 이동, 특히 대형동물의 이동은 대단히 비용이 많이 드는 일이다. 더구나 그 과정에서 사고, 상해, 질병전파, 사회구조와 행동의 교란 등, 부작용이 있을 수 있으므로 신중히 시행되어야 하며, 세계자연보전연맹 재도입전문가그룹(Reintroduction Specialist Group; RSG/SSC/IUCN)이 작성한 재도입 지침(IUCN Guidlines for Re-introductions; 한글판, 야생동물유전자원은행 번역출판 참조)에 따라 시행되어야 한다. 인공수정은 개체의 이동에 비해 비용이 적게 들 수 있으나 그 방법이 확립되어 있는 종이 제한되어 있다.

개체나 배우자의 인위적 이동에 의해 유전자 흐름을 조절하기 위해서는 다음 사항들을 결정하여야 한다.

- 어떤 개체를 이동시킬 것인가.
- 얼마나 많은 개체를 이동시킬 것인가.
- 얼마나 자주 이동시킬 것인가.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

- 어디에서 어디로 이동시킬 것인가.
- 이동을 언제 시작하고 언제 끝낼 것인가.

분할된 개체군 사이의 유전자 흐름을 설계하기 위한 이러한 변수들은 너무 복잡하기 때문에 컴퓨터를 이용한 가상적 시뮬레이션이 필요하다 (Vortex 등을 이용한 Populaiton Viability Analysis).

3.2.5. 멸종위기종의 보전을 위한 보호구역 설정에 있어 유전적 문제

보호구역 설계에 있어 고려하여야 할 유전적 문제에는 다음과 같은 것이 있다.

- 보호구역의 면적이 해당종의 장기적 생존을 보장할 수 있는 최소한의 개체군을 수용할 수 있는 크기인가.
- 해당종이 보호구역의 서식지에 적응되어 있는가.
- 한 개의 커다란 보호구역이 나은가 아니면 여러 개의 작은 보호구역이 나은가. [Single Large or Several Small (SLOSS)]

여러 자료들에 의하면, 장기적인 유전적 생존력을 유지하기 위하여는 최소한 수 백 마리 이상의 유효개체군크기(effective population size)가 필요하다. 대개 유효개체군크기는 실제 개체군 크기의 10-20%에 불과하므로 최소 수 천 마리 이상의 실제 개체군 크기를 유지할 수 있는 면적의 보호구역이 필요하게 된다.

유전적 관점으로만 보게 되면, 각각의 보호구역에 멸종위험이 존재하는 작은 보호구역 여러 개보다는 하나의 큰 보호구역이 유전적 건강성을 유지하는데 더 효과적이다. 그러나 실제에 있어 전염성 질병과 같은 일시의 재난에 취약한 한 개의 보호구역 보다는 여러 개의 보호구역 설정이 더 큰 안전성을 가지게 된다. 이상적인 타협안은 최소한 크기 이상의 보호구역을 여러 지역에 설정하되, 그들 사이에 자연적인 또는 인위적인 유전자 흐름이 이루어지도록 보장하는 것이다. 그러나 실제에 있어 보호구역의 설정에는 생물학적 요인 뿐 아니라 수많은 정치적, 사회적 요인을 고려하여야만 한다.

3.2.6. 유전자 침투와 잡종화 (Introgression and hybridization)

유전자 침투란 한 종 또는 아종에서 다른 종 또는 아종으로 유전자가 이동하는 것을 말한다. 이것은 주로 취약한 종이 서식하는 범위 내에 인위적으로 외래종을 도입할 때 일어난다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

유전자 침투가 일어났는지는 여러 가지 유전자 마커를 검사함으로 확인할 수 있다.

유전자 침투 문제를 해결 또는 경감시키는 방법으로는 1) 외래종 개체를 제거하거나, 2) 외래종과 토착종 사이에 태어난 잡종 개체를 제거하거나, 3) 토착종 개체수를 증가시키거나, 또는 4) 토착종 순종을 격리시키는 방법이 있을 수 있으나 이 모두가 현실적으로 그리 쉽지 않은 방법들이다.

3.2.7. 수확(harvest)의 유전적 영향

흔히 수렵이나 밀렵하는 사람들은 특정한 표현형을 나타내는 개체 또는 특정한 성별의 개체를 선택적으로 수확하기 때문에 개체군의 유전적 구조에 커다란 영향을 미칠 수 있다. 이러한 영향에는 성비의 변화에 의한 유효개체수의 감소, 번식률과 생존율의 저하, 유전적다양성의 감소, 유전적 구성의 변화, 표현형의 변화가 포함된다. 이에 대한 대책은 최대한 무작위적인 수확이 이루어지도록 제도를 마련하는 것이다.

3.2.8. 복원을 위한 사육 개체군의 유전적 관리

멸종위기종의 유전자 분석 연구는 동물원이나 식물원과 같은 서식지외 보전기관에서 복원을 위한 재도입에 사용될 멸종위기종 사육, 번식 관리에 있어서도 응용될 수 있다.

18, 19세기의 동물원은 야생동물의 소비자였으나, 20세기에 들어와 동물원의 사회적 역할에는 근본적인 변화가 일어났다. 21세기 동물원의 주제어는 “보전(conservation)"이며, 환경센터 또는 보전센터로서의 사회적 역할이 강조되고 있다. 이러한 경향은 최근 세계동물원수족관협회(World Association of Zoos and Aquarium, WAZA)에서 발간한 “세계 동물원수족관 보전전략”에 잘 드러나 있다.
(Building a Future for Wildlife: The Zoo and Aquarium Conservation Strategy. Published by World Association of Zoos and Aquarium. 2005
http://www.waza.org/conservation/index.php?main=conservation&view=strategies)

3.2.8.1. 사육번식과 재도입 과정에 필요한 단계들

멸종위기종의 사육번식과 복원(재도입)의 전체 과정을 다음과 같이 정리할 수 있다.

- 야생개체군의 쇠퇴와 이와 동반하는 유전적 쇠퇴
- 사육개체군의 확립 (기반확립; foundation)

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

- 사육개체군의 크기를 안정된 수준으로 증가시킴 (성장; Growth)
- 사육개체군의 안정적, 장기적 관리 (유지관리; Maintenance)
- 복원(재도입)을 위한 개체의 선택
- 재도입된 야생개체군의 관리

그러므로 사육개체군의 관리단계를 1) 개체군 기반확립, 2) 성장, 3) 유지관리의 세 단계로 나눌 수 있으며 각 단계에서의 관리 지향점은 다르다:

1) 개체군 기반확립 단계에서는 사육기법 개발을 위한 기초적 연구와 번식조건의 확립에 초점이 맞추어진다.
2) 성장단계에서는 최대한 빠른 증식으로 개체군을 팽창시켜 여러 군데 분산된 개체군을 확립하는 것이 중요하다.
3) 유지관리 단계에서는 사육개체군의 번식프로그램의 유전적 관리목표에 따라 정해진 개체군 크기를 일정하게 유지시키면서 유전적 다양성을 최대한 보전하는 것이 관리의 핵심이다.

일반적으로 사육개체군이 목표로 한 크기에 도달하기 전까지는 복원과 재도입 등을 위하여 개체를 소비시키지 않는 것이 원칙이다.

3.2.8.2. 사육개체군의 기반확립 단계

사육개체군을 확립하기 이전에 분류상 불명확한 점을 해소하여야 하며 관리단위(보전단위)를 명확히 하여야 잡종화를 예방할 수 있다. 혈통이 명확하지 않은 개체들을 서식지외 번식프로그램에 사용하여 많은 잡종화된 개체를 생산한 뒤에야 기반개체(founders)들이 잘못 분류되었었다는 사실이 밝혀져 프로그램 자체가 최소된 적도 있다.

야생개체군의 유전적다양성(이형접합율, heterozygosity)의 98% 이상을 사육개체군으로 옮기기 위해서는 30마리 이상의 기반개체들이 필요하다. 또 0.05 이상의 유전자빈도를 가지는 대립유전자를 사육개체군에 95%의 확률로 옮기기 위해서도 30마리 이상의 기반개체들이 필요하다. 그러므로 유전적 bottleneck 현상을 극복하기 위해서는 최소 20 내지 30마리 이상의 유전적으로 유효한 크기의 기반개체군을 확보하는 것이 바람직하다. 그러므로 이 정도 크기의 기반개체군을 확립하기 위해서는 아직도 상당한 크기의 야생개체군이 존재하고 있을 때 서식지외 보전프로그램을 시작하여야 하며, IUCN은 멸종위기종의 사육번식 프로그램을 야생개체들이 1000마리 이상 남아 있을 때 시작하도록 권고하고 있다. 그래야만 1) 아직 근친번식되지 않은 기반개체를 야생에서 확보할 수 있고, 2) 사육번식 프로그램을 위하여 야생개체를 포획하게 되더라도 야생개체군에 큰 영향을 주지 않게 되며, 3) 적합한 사육기법을 개발하는데 필요한 시간을 벌게 된다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

3.2.8.3. 사육개체군의 성장 단계

이 단계에서 사육번식 프로그램의 목표는 최단기간 내에 개체군의 크기를 프로그램이 미리 설정한 크기에 도달시키도록 하는 것이다. 번식가능한 모든 성체에서 최대한의 후손을 생산하도록 시도한다. 이 과정에서 유전적 관리의 중요성은 그렇게 강조되지 않으며, 아주 가까운 근친끼리의 번식을 억제하는 정도에서 유지된다.

현재 대부분 멸종위기종을 위한 사육번식 프로그램이 설정하는 목표는 향후 100년간 유전적다양성의 90%를 보전하는 것이다. 이 목표를 달성하기 위하여 필요한 유효개체군 크기는 해당종의 세대 간 간격에 반비례한다. 즉 평균 세대 간 간격이 짧은 종은 세대 간 간격이 큰 종보다 같은 정도의 유전적 다양성을 보전하기 위하여 더 많은 수의 개체를 필요로 하며, N_e=475/L의 식으로 나타낼 수 있다(L=세대간격의 평균 년수; generation length in years). 또한 사육번식 개체군 크기의 목표를 어느 정도로 해야 할 것인지를 결정하는데 영향을 주는 요인으로는 기반개체군 영향(founder effects), 유효 대 실제개체군 크기의 비율, 목표하는 개체군 크기에 도달하는데 걸리는 시간 등이 있다.

3.2.8.4. 사육개체군의 유지에 있어 유전적 관리

사육개체군의 유지과정에서 발생하는 유전적 문제에는 다음과 같은 것들이 있다.

- 근친퇴화
- 유전적 다양성의 감소
- 해로운 돌연변이의 축적
- 야생환경에는 해롭지만 사육환경에는 이로운 방향으로의 유전적 적응
- 잡종약세

사육개체군의 유전적 관리의 목표은 사육개체군의 기원이 되는 야생개체군의 유전적 다양성을 최대한 보존시키는 것이 되어야 한다. 즉 사육개체군의 기반개체들은 야생개체군을 대표하는 샘플로 간주되고, 이 샘플에 유전적 변화가 일어나는 것을 최소한으로 하는 것, 즉 사육개체군에서의 진화과정을 멈추게 하는 것이 유전적 관리의 목표이다. 이를 위하여는:

- 기반개체의 수를 충분히 확보함으로 초기 사육개체군의 유전적 다양성을 최대한 확보한다.
- 나이든 개체를 번식에 사용하든지 또는 냉동보존기법을 이용함으로 세대 간 시간 간격을 최대한 증가시킨다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

- 개체군 크기를 최대한 증가시킨다.
- 실개체군에 대한 유효개체군 크기의 비율(N_e/N)을 최대한 증가시킨다.

이 네 가지 중 N_e/N를 증가시키는 것은 사육개체군에서 가장 실용적인 응용이 가능한 항목이며, 여기에는 다음과 같은 방법이 포함된다.

- 가족의 크기(family size)를 고르게 한다. (가족 크기는 한 개체가 일생동안 생산하는 후손의 수)
- 성비를 50:50으로 똑같이 만든다. 예를 들어, 가능하면 하렘(harem) 구조를 피한다.
- 세대 간 개체군 크기를 고르게 한다.
- 세대 간 시간 간격을 최대한으로 늘린다.

유전적다양성을 보존하고 가족의 크기를 일정하게 하기 위한 번식관리 프로그램 중 가장 효과적인 것은 평균 친척계수(mean kinship coefficient; mk)에 근거한 친척도를 최소화(minimization of kinship)하는 방법이다. 친척도(kinship or coancestry)는 두 개체 간에 가상의 후손이 태어났을 때 그 후손개체의 근친계수(inbreeding coefficient)를 말한다. 평균 친척계수는 한 개체와 개체군 내 자기 자신을 포함한 모든 개체와의 사이의 모든 친척도의 평균치를 말한다.

그러므로 개체군 내에서 mk가 낮을수록 유전적으로 중요한 개체이며 번식에 있어 우선순위를 갖는다. 이러한 번식 전략은 유전적 다양성을 최대한 보존하며 가족 크기를 고르게 하는 효과를 가져 온다. 가족 크기를 고르게 하는 것은 사육개체군이 유전적으로 사육환경에 적응되는 것을 경감시키는 효과도 있다. 이때 주의할 점은 첫 째, mk의 차이가 너무 큰 개체들 사이에 짝을 짓지 않는 것이 좋으며, 둘째, mk가 비슷하게 낮다 할지라도 아주 근연관계가 큰 개체들 사이에 근친번식을 시키지 않는 것이 바람직하다.

그룹으로 관리되는 사육개체군은 근친교배를 최대한 억제하는 원칙에 따라 관리한다.

3.2.8.5. 보조번식기법과 유전자원은행

인공수정: 저렴한 비용으로 유전자를 이동시킬 수 있다. 성비와 가족크기를 일정하게 하는데 유효할 수 있다.

동결보존: 생식세포, 수정란, 씨앗, 조직 등을 동결보존하는 것은 세대 간 시간 간격을 늘리는 효과가 있다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

복제: 이론적으로 야생개체의 biopsy 로 얻어진 체세포를 복제한다면 야생개체를 제거하지 않고도 충분한 사육개체군을 확립할 수 있을 것이다. 그러나 이 기법이 실용화되기 위해서는 아직도 수많은 난관을 극복하여야 한다.

3.2.8.6. 멸종위기종의 유전병 관리

열성으로 유전되는 유전병의 잠재적 보인자를 제거하기는 대단히 어려우며 최대한 보인자로 의심되는 개체들 사이의 교배를 억제함으로 유전병의 표현형이 나타나지 않도록 노력하는 것이 최선의 방책일 수 있다.

3.2.8.7. 사육 상태로의 유전적 적응의 최소화

- 사육 상태에서의 세대수를 최소화 한다: 가능한 신속한 재도입 추진; 동결보존기법 이용; 나이든 개체를 번식에 이용 등.
- 사육 상태에서 선택을 최소화 시킨다: 사육환경을 최대한 자연환경에 가깝도록 함; mk의 최소화
- 사육개체군의 크기를 최소화: 개체군 크기가 클수록 사육 상태에서 유리한 형질이 선택될 확률이 커진다. 그러므로 근친퇴화의 위험을 방지하는 한도 내에서 개체군 크기를 작게 하거나 또는 전체개체군을 부분적으로 격리된 아개체군으로 분할하는 방안을 고려할 수 있다.

3.2.8.8. 복원을 위한 재도입에 있어 유전적 관리

- 사육개체군이 미리 설정된 크기에 도달하기 전에는 일반적으로 재도입을 시도하지 않는다. 근친계수가 낮고 유전적다양성이 높은 개체가 바람직하다. 근친번식에 의하여 태어난 개체는 번식 및 생존능력이 약화되어 있을 가능성이 크다.
- 사육 상태에서 야생으로 재도입된 개체는 사망률이 높을 것이고, 특히 재도입 프로젝트의 초기에는 더 높을 것이다. 그러므로 재도입에 있어, 특히 초기에 사육개체군에게 유전적으로 가치 있는 동물을 재도입에 사용하는 것은 현명하지 않다.
- 만일 재도입에 사용될 개체군을 선택할 여지가 있다면, 재도입될 지역의 환경과 가장 가까운 환경을 가진 지역에서 유래한 개체군을 사용하는 것이 바람직하다.
- 같은 보전단위에 속한 여러 지역에서 유래한 개체군들의 개체들을 혼합하여 재도입에 사용함으로 유전적 다양성을 높일 수 있다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

▪ 또는 여러 개체군들을 섞어 교차번식 시킨 후손을 사용함으로 생존력의 향상을 기대할 수 있으나, 동시에 잡종약세의 가능성에 주의하여야 한다.
▪ 자체적 생존능력이 없는 야생개체군을 보충하기 위하여 지속적으로 사육 증식된 개체들을 사용하는 것은 다음과 같은 위험성을 고려하여야 한다.
  - 유효개체군 크기를 감소시킨다.
  - 사육 상태에 유전적으로 적응시킴으로 야생에서의 생존능력을 약화시킨다.
  - 근친퇴화를 일으킨다.

4. 향후 주요 생물종 유전자 분석연구사업의 방향에 대한 정책적 제언- 보전생물학적 관점에서

4.1. 보전과 복원을 위한 유전자 분석의 최우선순위는 종 내 보전 단위의 설정

멸종위기종의 보전과 복원에 응용하기 위한 유전자 분석의 첫 번째 단계는 보전단위(conservation unit)를 확립하는 일이며, 이는 보전생물학의 기본원칙이다. 대개의 경우 종 내의 유전적 변이를 보전하기 위하여 아종, 품종, 변종 등의 종 이하의 분류단위가 보전단위가 된다. 그러므로 현재 보전에 있어 시급한 문제가 되는 것은 종 이상의 분류보다는 종 이하의 분류단위이다.

앞에서도 언급한 것처럼 현재 환경부에서 의욕적으로 추진하고 있는 반달가슴곰 복원사업의 경우, 종 이상의 분류에서 현재 보전에 있어 특히 불명확한 것은 없다. 곰과의 8개의 종을 기본적으로 구분하는 것은 유전자 분석에 의존할 필요도 없이 외형상으로도 매우 명확한 일이다. 즉 복원을 위한 개체 선정에 있어 이 개체가 반달가슴곰이냐 불곰이냐, 혹은 말레이곰이냐 느림보곰이냐를 구분하는 것은 누가 보아도 명확하다는 것이다. 문제는 같은 반달가슴곰 종 내에서 이 개체가 어느 아종 또는 보전단위에 속하느냐가 되며, 이것은 외형상으로 명확히 구분하기 어려운 경우가 대부분이기 때문에 유전자 분석의 도움이 절실히 필요한 것이다. 따라서 종 이상 분류에서 불명확한 부분인 곰과 동물의 서로 다른 종 사이의 근연관계를 명확히 하기 위해 대대적인 유전자 분석계획을 세운다면, 학문적인 목적과 호기심 충족을 위해서는 도움이 될지는 몰라도 한국의 반달가슴곰 개체군 보전과 복원을 위해서는 그리 큰 도움이 되지 못하며, 따라서 보전과 복원을 위해 효율적으로 사용되어야 할 유전자 분석 재원이 크게 낭비될 수 있다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

그러므로 향후 이루어질 어떠한 복원계획에 있어서도 이러한 보전생물학의 원칙은 고수되어야 하며, 명확한 보전단위 수립을 위한 유전자 분석이 보전과 복원을 위한 유전자 분석의 최우선 목표가 되어야 한다. 이러한 보전단위 설정을 위한 연구는 복원사업이 시작되기 적어도 수 년 전에 시작하는 것이 바람직하다. 보전단위 설정을 위한 연구는 대개 여러 국가와 지역에 걸친 해당 멸종위기종의 유전자 시료를 수집하고 공동연구 네트워크를 구축해야 하며, 여기에 수 년의 시간이 걸리는 것이 보통이기 때문이다. 그러므로 환경부가 수립한 멸종 위기종 복원의 대상종이 역시 유전자 분석의 최우선 대상종이 되어야 한다.

4.2. 보전과 복원을 위한 종 내 보전단위의 설정에 필요한 마커 유전자 선정

종 내의 보전단위를 확립하기 위한 유전자 분석에는 주로 미토콘드리아 유전자 마커가 사용된다. 미토콘드리아 유전자는 핵 유전자보다 진화속도가 빠르며 모계 유전을 하고 재조합이 일어나지 않아 종 이하의 계통분석에 유리한 이점을 갖고 있다. 미토콘드리아의 어느 유전자나 부위를 사용할 것인가는 해당 분류군 또는 종마다 다른 특이성을 갖고 있다. 대개 해당 분류군이나 종의 계통연구를 위해 이미 밝혀져 있는 유전자를 사용하는 것이 다른 종 또는 집단과의 비교분석을 가능하게 하기 때문에 문헌 및 Genbank와 같은 데이터베이스를 검색해서 해당 분류군을 위해 이미 사용된 마커 유전자를 확인할 필요가 있다.

미토콘드리아 전체 게놈 염기서열을 읽어서 유전자 분석에 사용하는 것도 앞으로의 경향이며 계통분석의 중요한 도구가 될 수 있다. 그러나 아직도 미토콘드리아 전체 게놈 해독과 분석은 상당한 시간과 인력, 자금이 필요한 일이기 때문에 이 방법은 종 이상의 계통분석과 연구를 위해 주로 사용되며, 종 이하의 보전단위 설정을 위해서는 아직까지 거의 응용되지 않고 있다. 종 이하의 보전단위 설정을 위해서는 광범위한 지역의 많은 시료들의 염기서열을 결정하고 변이가 있는 부분을 비교해야 하는데, 그 모든 개체의 미토콘드리아 게놈을 분석하는 것은 시간과 비용의 낭비일 뿐 아니라 그 효용성도 별로 크지 않다. 같은 종 안에서 미토콘드리아 DNA 중 변이가 있는 부분은 그렇게 많지 않기 때문이다.

또한 비록 한반도 내 자생종 또는 고유종의 미토콘드리아 게놈 서열을 확보하였다 할지라도 그 근연종이나 아종의 게놈 서열이 확보되지 않는 이상 보전이나 계통연구에 있어 그 효용가치는 매우 제한적이 될 것이다. 오히려 해당 종에서 많은 연구자들이 이미 광범위하게 사용하고 있는 특정 유전자 서열만 제한적으로 읽어서 분석에 사용함으로써 더 적은 비용과 노력으로 더 많은 샘플을 분석하는 것이 보전단위를 확립하기 위한 유전자 분석의 효율적인 방법이 될 수 있다. 그러므로 미토콘드리아 전체 게놈 분석을 계획한다면 그 목적을 명확히 하고

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

필요하다면 게놈 분석이 필요한 특정 분류군을 위주로 하여 장기적으로 계획, 실행하는 것이 한정된 유전자 분석 자원을 효과적으로 사용하는 길이 될 것이다.

4.3. 유전적 다양성 측정, 비교, 및 집단분석을 위한 마커 선정 및 개발

야생동식물에게 있어 유전적 다양성이 종과 개체군의 장기적 생존에 있어 중요한 인자의 하나라는 것은 이미 많은 연구결과에 의하여 입증되어 있기 때문에 한 집단의 유전적 건강성과 장기적 생존능력을 판단하는 수단으로서 유전적 다양성을 측정하는 일은 보전생물학에서 매우 중요한 의미를 갖는다. 또한 유전적 다양성과 관련하여 집단유전학적 분석에 의한 집단구조와 유전자 흐름의 연구 데이터는 보전을 위한 관리에 필수적인 정보를 제공한다.

세계적으로 최신 보전유전학 연구에 있어 유전적 다양성의 측정과 집단분석을 위한 유전자 마커는 microsatellite이 대세를 이루고 있다. Microsatellite은 그 길이가 매우 짧기 때문에 아주 적은 양의 DNA 시료로도 PCR 증폭에 의하여 안정적으로 분석할 수 있다는 장점이 있다. 이것은 그 본질상 다량의 혈액이나 조직 샘플을 구하는 것이 매우 어려운 멸종위기종의 보전유전학 연구에 있어 매우 중요한 이점이다. 멸종위기종의 유전자 분석에 사용되는 샘플은 비침습적인 방법(non-invasive method)으로 수집되는 분변, 털 등의 시료가 주가 되며 이러한 소량의 유전자 시료를 분석하기 위해서는 PCR에 의한 안정적인 증폭이 가능해야 한다. 또한 microsatellite은 매우 높은 집단 내 다양성과 공우성(co-dominance)을 보이기 때문에 RAPD나 AFLP 등에 비해 명료한 해석이 가능하고 실험의 반복성과 안정성이 높아 신뢰성 있는 마커로 멸종위기종의 보전유전학과 집단유전학적 분석에 의한 집단구조와 유전자 흐름의 연구에 널리 사용되고 있다 (Beaumont and Bruford, 1998; Bruford and Wayne, 1993; Buchanan et al., 1996; Bowcock et al., 1994).

또 microsatellite 마커는 개체 간에 매우 변이도가 높고 소량의 시료로도 분석이 가능하기 때문에 몇 개의 유전자 마커를 조합하면 높은 신뢰도의 개체식별에 이용할 수 있다. 멸종위기종을 포함한 야생동식물의 관리에 있어서도 microsatellite에 의한 개체식별법과 유전자 분석에 의한 성감별법을 이용하여 개체군의 크기, 서식행동범위 및 암수비율 결정, 사회구조, 복원을 위해 방사된 개체의 추적조사 등 생태적 연구에 널리 이용되고 있는 실정이다. 이러한 생태적 정보는 전통적인 생태조사 방법으로는 얻을 수 없었거나 얻기가 매우 어려웠던 자료들이며, 이제 생태조사연구에서 이러한 유전적 분석도구를 이용하는 것은 세계적인 경향이 되고 있다. 여기에서 핵심적인 역할을 하는 유전자 마커가 바로 microsatellite이며, 따라서 향후 보전생물학적 관점에서 생물종의 유전자 분석연구를 계획함에 있어 microsatellite marker의 개발과 응용은 필수적인 위치를 차지하여야 할 것이다 (Innan et al., 1997; McCouch et al., 1997;

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Taberlet et al., 1997; Foran et al., 1997; Nsubuga et al., 2004; Ruiz-Garcia et al., 2005).

다만 microsatellite은 각 종마다 마커 개발이 독립적으로 이루어져야 하며, 이 마커 개발에는 상당한 시간과 비용이 필요하다는 특수성이 있다. 어떤 분류군에서는 가까운 근연종에서 개발된 microsatellite 마커를 이용할 수 있는 경우도 있다. 예를 들어 한국산양(Korean goral, *Nemorhaedus caudatus*)에서 개발된 마커는 가까운 속인 일본산양(Japanese serow, *Capricornis crispus*)의 유전자 분석에도 이용되었다 (An et al., 2005). 그러나 많은 경우 연구 대상종의 마커를 새로 개발해야만 하는데, 마커 개발 기술의 진보로 개발에 필요한 시간과 비용이 계속 낮아지고 있다 (An et al., 2005). 그러므로 향후 국내 생물자원 및 멸종 위기종 보전과 복원을 위한 유전자 분석 정책수립에 있어 보전유전학의 필수적인 도구로 자리 잡고 있는 microsatellite marker 개발을 위한 계획이 반드시 포함되어야 할 것이다.

4.4. 주요 분류군별 유전자연구센터의 지정 및 지원, 네트워크화

주요 생물종의 유전자 분석연구를 통하여 우리나라 고유종을 확인하여 생물주권을 확립할 수 있고 멸종위기종의 보전과 복원사업을 위한 학문적 토대를 다질 수 있다. 이 사업은 장기적으로 일관성 있게 추진해야 할 국가적 사업으로서 수 년간의 용역연구로 그 목표를 이루기는 어렵다고 본다. 유전자 분석연구 사업을 성공적으로 수행하기 위해서는 추진주체가 다음과 같은 전제조건을 갖출 필요가 있다:

- 주요 분류군 별로 체계적이고 장기적인 국내 및 해외 유전자 샘플 수집, 보존, 관리 체계와 국제협력 네트워크가 구축되어야 하고,
- 유전자 분석, 그리고 계통학적, 집단유전학적 및 보전유전학적 해석과 응용이 가능한 해당 분류군의 전문가가 있어야 하며,
- 유전자 분석을 위한 고가의 시설과 기구, 장비, 공간이 갖추어져 있어야 한다.

어느 한 기관에서 모든 분류군의 유전자 분석연구 사업을 위한 조건을 갖추고 추진하는 것은 불가능하며, 주요 분류군 별로 이러한 조건을 갖춘 센터들을 지정하고 지원하여 이들을 연결하는 네트워크를 구축하는 것이 효과적인 방안의 하나로 생각된다. 다행히 오래 전부터 국가적인 유전자 분석연구사업의 중요성을 인식하고 국내외 샘플 수집과 보존·관리 네트워크 및 전문가 양성 체계 구축, 유전자 마커 개발을 추진해 온 몇 군데의 대학 내 우수한 센터들이 존재하기 때문에(예; 한국 식물 DNA 은행 및 야생동물유전자원은행), 이들을 중심으로 주요 분류군 별 유전자연구센터를 환경부에서 지정하고 장기적으로 지원할 수 있는 방안이 필요해

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

보인다. 그럼으로 한 두해의 용역연구가 끝나면 추진주체가 교체될 때마다 예상되는 샘플 확보 및 수집 그리고 전문가 연구 네트워크 체계의 불안정성과 혼란을 방지하고 장기간 일관성 있는 사업수행이 가능할 수 있을 것이다. 이러한 주요 분류군 별 (가칭)유전자연구센터와 국립생물자원관의 협력관계를 그림 VI-2에 도시하였다.

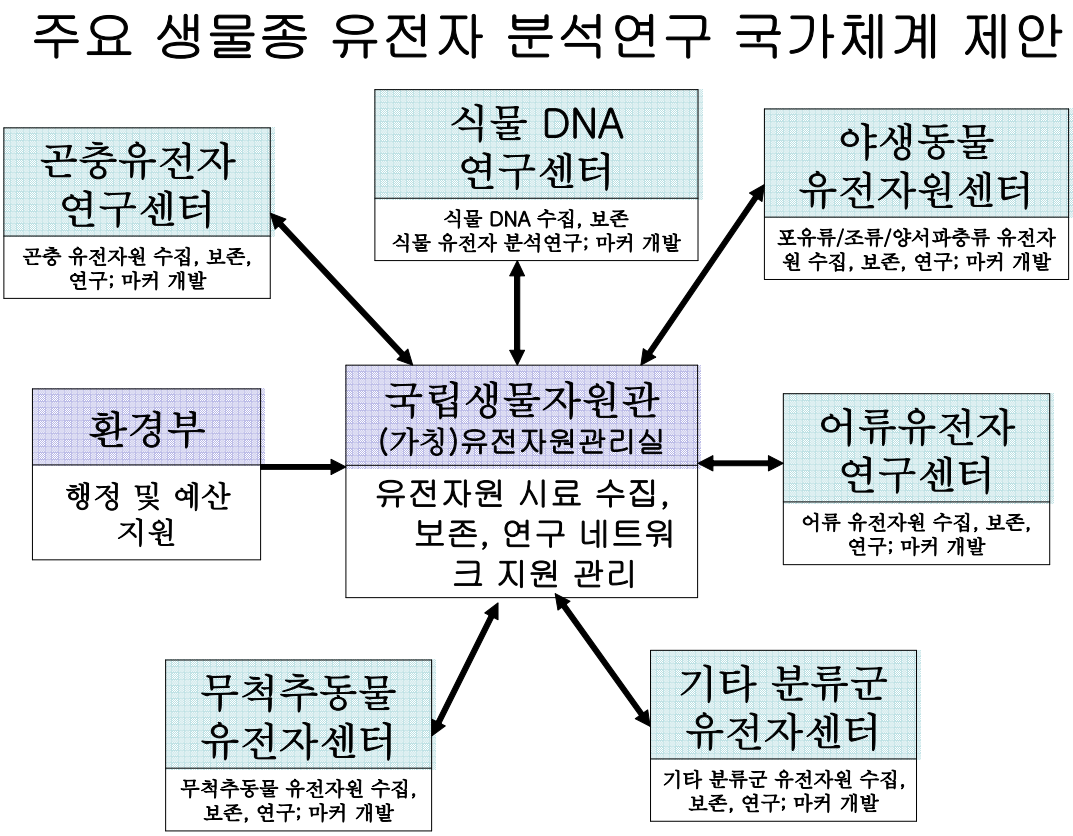


그림 VI-2. 분류군별 유전자연구센터의 네트워크

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

5. 참고문헌

이 항 (연구책임자). 진화적으로 의미있는 단위 (ESU) 개념에 의한 동북아시아 반달가슴곰 보전단위 설정 연구. 2004. 환경부

세계자연보전연맹 종보전위원회의 재도입을 위한 지침. 2006. (IUCN Guidlines for Re-introductions, Reintroduction Specialist Group/SSC/IUCN) 한글판 번역 및 출판: 한국야생동물유전자원은행(www.cgrb.org) 및 한국식물전문가그룹

An J, Mi-Sook Min, Julie A. Sommer, Edward E. Louis, Jr, Rick A. Brenneman, Soo-whan Kwon, Nam Sik Shin, and Hang Lee. Isolation and charaterization of 15 microsatellite loci in the Korean Goral (Nemorhaedus caudatus). Molecular Ecology Note 2005; 5:421-423

An J, Mu-yeong Lee, Mi-Sook Min, Mun-Han Lee, Hang Lee A molecular genetic approach for species identification of mammals and sex determination of birds in a forensic case of poaching from South Korea. Forensic Science International 2007 (In Press)

Beaumont, M. A., and Bruford, M. W. (1998) Microsatellites in conservation genetics. In: Microsatellites: Evolution and Applications, pp. 165-182. Oxford University Press, New York.

Bowcock, A. M., Ruiz-Linares, A., Tomfohrde, J., Minch, E., Kidd, J. R. and Cavalli-Sforza, L. L. (1994) High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. Nature 368: 455-457.

Bruford, M. W. and Wayne, R. K. (1993) Microsatellites and their application to population genetic studies. Genome and Evolution 3: 939-942.

Buchanan, F. C., Friesen, M. K., Littlejohn, R. P. and Clayton, J. W. (1996) Microsatellites from the beluga whale Delphinapterus leucas. Mol. Ecol. 5: 571-575.

Crandall, K. A., Bininda-Emonds, O. R. P., Mace, G. M., and Wayne, R. K. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. Trends Ecol. Evol. 15(7): 290-295

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Foran, D. R., Minta, S. C., and Heinemeyer, K. S. 1997. DNA-based analysis of hair to identify species and individuals for population research and monitoring. Wildl. Soc. Bull., 25(4), 840-847

Frankham R, Ballou JD, and Briscoe DA. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge, UK

Fraser, D. J. and Bernatchez, L. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. Mol. Ecol. 10: 2741-2752

Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M., and Wallace, D. C. 1980 Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 6715-6719

Gum, B., Gross, R., and Kuehn, R. 2005. Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of European grayling (Tymallus thymallus): evidence for secondry contact zones in central Europe. Molecular Ecology, 14,1707-1725

Innan, H., Terauchi, R., and Miyashita, N. T. (1997) Microsatellite polymorphism in natural populations of the wild plant Arabidopsis thaliana. Genetics. 146: 1441-1452.

Kim KS, M.-S. Min, J.-H. An, and H. Lee. Cross-species amplification of bovidae microsatellites and low diversity of the endangered Korean goral. Journal of Heredity 2004; 95(6):521-525

Lee H, Garshelis D, Seal US, Shillcox J (editors). Asiatic Black Bears PHVA Final Relport. 2001. Conservation Breeding Specialist Group (IUCN/SSC), Apple Valley, MN, USA

Lee, H., Garshelis, D., Seal, U. S., and Shillcox, J. (Editors). 2001. Asiatic Black Bears PHVA: Final Report. The Conservation Breeding Specialist Group, Apple Valley, MN, USA

Manel, S., Bellemain, E., Swenson, J. E., and Francois, O. 2004. Assumed and inferred spatial structure of populations: the Scandinavian brown bears revisited. Molecular Ecology 13: 1327-1331

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Masuda, R., Murata, K., Aiurzaniin, A., and Yoshida, M. C. 1998. Phylogenetic status of brown bears Ursus arctos of Asia: A preliminary result inferred from mitochondrial DNA control region sequences. Hereditas 128: 277-280

Matsuhashi, T., Masuda, R., Mano, T., and Yoshida, M. C. 1999. Microevolution of the mitochondrial DNA control region in the Japanese brown bear (Ursus arctos) population. Mol. Biol. Evol. 16(5): 676-684

Matthew, A. C., Amstrup, S. C. and Garner, G. W. 1991. Interspecific and intraspecific mitochondrial DNA variation in North American bears (Ursus). Can. J. Zool. 69: 2985-2992

McCouch, S. R., Chen, X., Panaud, O., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y. G., Huang, N., Ishii, T., and Blair, M. (1997) Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. Plant Mol. Biol. 35: 89-99.

Min MS, Hideo Okumura, Dong-Jun Jo, Jung-Hwa An, Kyung-Seok Kim, Chang-Bae Kim, Nam-Sik Shin, Mun-Han Lee, Chang-Hoon Han, Inna V. Voloshina and Hang Lee Molecular phylogenetic status of the Korean goral and Japanese serow based on the partial sequence of mitochondrial cytochrome b gene. Molecules and Cells 2004; 17(2):365-372

Moritz, C. 1994. Defining 'evolutionary significant unit' for conservation. Trends Ecol. Evol. 9: 373-375

Nsubuga, A. M., Robbins, M. M., Roeder, D., Morin, A., Boesch, C., and Vigilant, L. 2004. Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method. Molecular Ecology 13: 2089-2094

O'Brien SJ, Roelke ME, Yuhki N, Richards KW, Johnson WE, Franklin WL, Anderson AE, Bass OLJ, Belden RC and Martenson JS. 1990. Genetic introgression within the Florida panther Felis concolor coryi. Natl. Geogr. Res. 6:485-494.

O'Brien SJ. A role for molecular genetics in biological conservation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. 91:5748-5755.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

O'Brien SJ. Genetic and phylogenetic analyses of endangered species. Annu. Rev. Genet. 1994. 28:467-489.

Palumbi SR and Cipriano F. Species identification using genetic tools: the value of nuclear and mitochondrial gene sequences in whale conservation. J. Hered. 1998. 89:459-464.

Randi, E., Gentile, L., Boscagli, G., Huber, D., and Roth, H. U. 1994. Mitochondrial DNA sequence divergence among some west European brown bear (Ursus arctos L.) populations. Lessons for conservation. Heredity 73: 480-489

Ruiz-Garcia, M., 2003. Molecular population genetic analysis of the spectacled bear (Tremarctos ornatus) in the northern Andean area. Hereditas 138: 81-93

Ruiz-Garcia, M., Orozco-terWengel, P., Castellanos, A., and Arias, L. 2005. Microsatellite analysis of the spectacled bear (Tremarctos ornatus) across its range distribution. Genes Genet. Syst. 80: 57-69

Ryder OA, McLaren A, Brenner S, Zhang Y and Benirschke K. DNA banks for endangered animal species. Science 2000. 288:275-277.

Ryder, O. A. 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. Trends Ecol. Evol. 1: 9-10

Taberlet P, Camarra JJ, Griffin S, Uhres E, Hanotte O, Waits LP, Dubois-Paganon C, Burke T, Bouvet J. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. Mol. Ecol. 1997. 6:869-876.

Taberlet, P. and Bouvet, J. 1994. Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear Ursus arctos in Europe. Proc. R. Soc. Lond. B 255: 195-200

Talbot, S. L. and Shields, G. F. 1996. A phylogeny of the bears (Ursidae) inferred from complete sequences of three mitochondrial genes. Molecular Phylogenetics and Evolution 5(3): 567-575

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

Valderrama, X., Karesh, W. B., Wildman, D. E., and Melnick, D. J. 1999. Noninvasive methods for collecting fresh hair tissue. Mol. Ecol. 8: 1749-1752

Waits, L. P., Talbot, S. L., Ward, R. H., and Shields, G. F. 1998. Mitochondrial DNA phylogeography of the North American brown bear and implications for conservation. Conservation Biology 12(2): 408-417

Waits, L., Taberlet, P., Swenson, J., Sandegren, F., and Franzen, R. 2000. Nuclear DNA microsatellite analysis of geneticd diversity and gene flow in the Scandinavian brown bear (Ursus arctos). Molecular Ecology 9: 421-431

Wan, Q. H., Wu, H., Fujihara, T., and Fang, S. G. 2004. Which genetic marker for which conservation genetic issue? Electrophoresis, 25, 2165-2176

Waples, R. S. 1991. Pacific salmon, Oncorhynchus spp., and the definition of 'species' under the endangered species act. Mar. Fish. Rev. 53: 11-22

Wilson, A. C., Cann, R. L., Carr, S. M., George, M., Gyllensten, U. B., Helm-Bychowski, K. M., Higuchi, R. G., Palumbi, S. R., Prager, E. M., Sage, R. D., and Stoneking, M. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. Biol. J. Linn. Soc. 26: 375-400

Yoo HS, Jae-Yong Eah, Jong-Soo Kim, Young-Jun Kim, Mi-Sook Min, Woon-Kee Paek, Hang Lee, and Chang-Bae Kim.DNA barcoding Korean birds. Mol. Cells 2006, 22(3):323-327

Zhang, Y and Ryder, O. A. 1994. Phylogenetic relationships of bears (the ursidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 3(4): 351-359

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

주요생물자원의 유전자 분석·연구

발행일 : 2007년 2월

발행인 : 환경부 장관

발행처 : 환경부 자연보전국 자연자원과

본 보고서는 멸종 위기 생물종의 보전, 관리, 복원을 위하여 이들 종을 대상으로 유전자 분석을 수행한 결과를 수록하였습니다. 환경부의 사전승인 없이 본 보고서의 무단복사 및 전재를 금합니다. 본 보고서에 대하여 문의하고자 하는 경우에는 환경부 자연보전국 자연자원과 (전화 02-2110-6748, 팩스 02-504-9292)로 연락바랍니다.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38

한국 멸종위기 생물종의 유전자 자원 홈페이지

(http://grresk.korea.ac.kr)



IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 17:04:38