

자생 생물자원의 유전자 다양성 연구(동물 분야)

주관연구기관	경북대학교 산학협력단
연구책임자	황의욱
발행년월	2015-11
주관부처	환경부
사업관리기관	국립생물자원관
NDSL URL	http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO201600000376
IP/ID	14.49.138.138
이용시간	2017/11/03 09:55:55

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.

발 간 등 록 번 호
11-1480592-000956-01

국립생물자원관 2015년도 최종보고서

과업명: 자생 생물자원의 유전자 다양성
연구(동물분야)

최종보고서

2015년 11월



국립생물자원관

NATIONAL INSTITUTE OF BIOLOGICAL RESOURCES

제 출 문

국립생물자원관장 귀하

본 보고서를 「자생 생물자원의 유전자 다양성 연구(동물분야)」의 최종보고서로 제출합니다.

2015년 11월

경북대학교 산학협력단장

【연구진】

책임연구자 황의욱(경북대학교)

공동연구자 김익수(전남대학교)

공동연구자 민미숙(서울대학교)

공동연구자 원용진(이화여자대학교)

공동연구자 정종우(이화여자대학교)

요 약 문

자생 생물자원의 유전자 다양성 연구(동물 분야)

1. 용역사업의 배경 및 목적

우리나라는 기후의 특성상 많은 생물종을 가지고 있는 생물자원의 보고로, 2010년에 국립생물자원관에 의해 조사된 한반도 자생생물 수는 3만 6921종이 등록되었다. 한반도에서 자연 상태로 서식하는 한반도 고유종 및 자생생물은 세계의 유일무이한 생물자원으로 국가 기본 재산으로서의 가치가 매우 크다고 할 수 있다. 최근 나고야 의정서가 발효된 시점에서, 자생생물에 관한 지속적인 연구는 본격적인 국가 간 생물자원 전쟁에서 자생생물에 대한 주권을 지킬 수 있는 근거 자료로 활용될 수 있을 것이다. 그러나 최근 도시화와 산업화로 인한 서식지 파괴와 무분별한 남획 등으로 우리나라 고유의 생물종들이 멸종위기에 처해 있으며, 이들 멸종위기에 처해 있는 생물종에 대한 유전자 자료의 축적과 관리를 통해 고유 생물종에 대한 주권을 확보하여야 할 필요성에 직면하게 되었다. 점점 사라져가는 생물종들을 효율적으로 보전하고, 관리하는 정책을 수립하고, 그것을 실행하기 위해서는 생물의 특성 및 진화의 모든 정보를 보유하고 있는 유전적 특성을 파악하여 정확히 종을 인식하는 과정이 필수적으로 선행되어야 한다. 더불어 확보된 유전자원을 향후 학술연구와 산업에 이용하기 위하여 보유 유전자를 관리하는 체계의 구축이 필요하다. 따라서 본 연구의 목적은 우리나라에서 자생하는 멸종위기의 생물종에서 소기관 유전체의 염기서열을 결정하고, 유전체의 특성을 연구하며, 확보된 유전자원의 관리를 위한 기초자료를 제공하는 데 있다. 2006년부터 2012년까지는 환경부와 국립생물자원관에서 주요 생물자원의 유전자 분석 연구를 통하여, 멸종위기동물 및 고유종에서 총 108종에서 미토콘드리아 유전체의 염기서열을 결정하였으며 19종의 유전다양성 분석을 수행하였다. 2013년 8차년 사업에서는 종의 선정에 있어 차별성을 두어 총 11건의 주요 생물종에서 전체 미토콘드리아 유전체의 염기서열을 결정하였고, 4종의 멸종위기종 및 고유종에서 유전다양성 분석이 수행되었다. 그리고 2014년에는 멸종위기종과 고유종의 유전자(체) 관리 체계 구축의 필요성에 따라 총 20종에 대한 genome survey와 5종의 유전다양성 분석이 수행되었다. 2015년도 사업은 genome survey 분야와 소기관 유전체 분야가 분리되어 총 9종의 소기관 유전체 정보 확보와 5종의 유전다양성 연구가 수행되었다.

2. 연구사업의 범위

지난 9년간의 사업에서 유전체 분석이 끝난 종을 제외하고, 표본 확보가 가능하면서 우선적으로 유전체 정보의 확보가 필요한 종들 가운데 조류 2종, 곤충 4종, 무척추동물 3종, 총 9종을 선정하여 전체 소기관 유전체 분석을 실시하였으며, 5종의 멸종위기종을 선정하여 유전다양성 분석 연구를 수행하였다. 또한, 자원관(용역, 자체) 및 외부 연구를 통해 분석된 종들의 유전다양성 분석 연구 현황 파악 및 재분석 중 목록을 제시하였다. 소기관 유전체 연구대상종은 총 9종으로 긴점박이올빼미, 잿빛개구리매, 큰자색호랑꽃무지, 큰홍띠점박이푸른부전나비, 물장군, 대모잠자리, 기수갈고등, 나팔고등, 참달팽이를 선정하였고, 유전다양성 연구대상종은 총 5종으로 맹꽁이, 물장군, 붉은점모시나비, 흰발농게, 기수갈고등으로 선정하였다.

3. 연구방법

직접 채집 혹은 분양을 받은 연구대상종의 표본에서 DNA를 추출한 후, 1차년도부터 진행해 온 축적된 연구방법을 토대로 일반적인 프라이머 및 특이적인 프라이머를 활용하여 전체 소기관 유전체의 염기서열을 결정하였다. 이후 결정된 염기서열을 바탕으로 소기관 유전체 유전자의 동정, 구조 분석, 타 분류군과의 비교를 통한 소기관 유전체의 특성 규명 등을 수행하여 소기관 유전체의 특징을 확인하였다. 유전적 다양성 분석의 경우 종별 2~4개 집단 40개체 이상을 대상으로 하였으며, 미토콘드리아 마커, 핵 유전자 마커, microsatellite 등을 각 연구대상종에 맞게 사용하였다. 이후 염기서열 혹은 genotyping 결과를 바탕으로 유전자 마커별 유전적 다양성, 유전적 구조 등을 분석하였으며, 각 분류군별 특성 등을 비교 분석하여 보전 방법 등을 제시하고자 하였다.

4. 연구결과

가. 멸종위기종의 미토콘드리아 유전체 연구 분야

1) 조류의 유전체 특성 규명

조류의 연구대상종은 긴점박이올빼미와 잿빛개구리매 2종을 선정하였다. 긴점박이올빼미와 잿빛개구리매는 일반적인 척추동물의 미토콘드리아 유전자 구성(13개 protein-coding gene, 2개의 rRNA, 22개 tRNA 유전자) 및 배열과 일치하였다. 긴점박이올빼미의 전체 미토콘드리아 유전체의 염기서열은 총 16,636bp로서,

긴점박이올빼미가 속한 Strigiformes에서 발표된 전체 미토콘드리아 유전체 정보와 비교하면 유사한 염기서열의 길이를 보여준다(16,307~18,966bp). 잿빛개구리매의 CR은 *trnT*와 *trnP* 사이에 위치하며, pseudo control region (Ψ -CR)이 *trnE*와 *trnF* 사이에 위치하는 점은 원시 조류의 미토콘드리아 유전자 배열양상과 다른 점이라 할 수 있다. 잿빛개구리매의 단백질 암호화 유전자 중에서 *ND3*의 경우 염기서열의 frameshift 현상으로 발생한 extra base site가 존재한다. 잿빛개구리매의 CR의 구조적 특징과 Ψ CR을 포함한 비암호화 영역에서 확인한 tandem repeat sequence는 향후 개체 식별이나 종 감별을 위한 마커로 활용할 수 있는 유용한 정보로 가치가 클 것으로 예상된다.

2) 곤충의 유전체 특성 규명

곤충의 연구대상종은 큰자색호랑꽃무지, 큰홍띠점박이푸른부전나비, 물장군, 대모잠자리 총 4종을 선정하였다. 큰자색호랑꽃무지를 포함한 꽃무지과(Cetoniidae)의 곤충에 대한 특성을 분석한 결과, 큰자색호랑꽃무지는 꽃무지과내의 다른 곤충들과 달리 761 bp의 가장 작은 A+T-rich region을 보유하고 있음을 확인하였다. 큰자색호랑꽃무지의 A+T-rich region의 크기가 매우 작은 크기였으나 A+T 함량은 다른 곤충과 비슷하였으며, 단백질 유전자의 codon 수, rRNA 및 tRNA 크기 등은 알려진 꽃무지과 곤충의 범주에 속하였다. 큰홍띠점박이푸른부전나비 미토콘드리아 유전체에서는 곤충에서 가장 빈번하게 발견되는 유전자 배열과 달리 나비목에서 특이적으로 발견되는 배열로 *trnI*, *trnQ* 및 *trnM*의 순서 대신 *trnM*, *trnI* 및 *trnQ*의 배열을 갖고 있었다. A+T-rich region내에서 1개의 tRNA-like structure가 존재하였다. 이러한 유사 tRNA가 A+T-rich region에 존재할 수 있는 것은 아마 primer로 작동 후 cleave 되지 않고 남아있는 가운데 non-coding A+T-rich region의 진화율을 따라 정규 tRNA와 많이 분화한 형태로 남아있는 것으로 추정된다. 물장군의 전체 미토콘드리아 유전체에서 단백질 암호화 유전자 염기서열을 코돈 사이트별로 나누어 분석했을 때 3rd codon position이 나머지 사이트에 비해 현저히 높은 AT% 비율을 보인다. 이러한 패턴은 물장군의 근연종인 장구애비류 4종에서도 명확히 확인하였다. 물장군은 다른 노린재류에 비해 현저히 긴 미토콘드리아 유전체 염기서열을 가지고 있다. 물장군의 미토콘드리아 유전체 길이가 다른 노린재류와 차이를 보이는 이유는 control region으로 예상되는 A+T-rich region의 길이 차이로 보인다. 대모잠자리 미토콘드리아 유전체의 A+T-rich region 내에서 tRNA-like structure를 확인할 수 있었다. 두 개의 tRNA-like structure가 발견되었는데 그 중 하나는 *trnF*와 유사한 구조

이며 다른 하나는 *trnK*와 유사한 구조이다. 이러한 유사 tRNA가 A+T-rich region에 존재할 수 있는 것은 아마 primer로 작동 후 cleave되지 않고 남아 있는 가운데 non-coding A+T-rich region의 진화율을 따라 정규 tRNA와 많이 분화한 형태로 남아있는 것으로 추정된다.

3) 무척추동물의 유전체 특성 규명

무척추동물의 연구대상종은 기수갈고둥, 나팔고둥, 참달팽이 총 3종을 선정하였다. 기수갈고둥의 전체 미토콘드리아 유전체는 총 15,803bp 길이를 가지며, 기수갈고둥의 미토콘드리아 배열양상은 갈고둥상목의 4종의 유전자 배열양상과 동일하며, 연체동물의 다른 상목 준위 그룹의 유전자 배열양상과는 뚜렷한 차이를 보인다. 기수갈고둥의 단백질 암호화 유전자 영역의 염기 skewness 분석에서 특이 점은 기수갈고둥의 경우 large noncoding region을 제외하고 모든 영역에서 negative AT-skew 값을 보이는 반면 다른 *Nerita* 종들의 경우 rRNA 유전자에서 positive AT-skew 값을 보인다. 이 점을 속(genus)로 분류되는 두 그룹 간 진화적 양상에 따른 차이인지에 대해 명확한 서술을 하기는 어렵지만, 미토콘드리아 ribosomal RNA 유전자 정보를 이용하여 이 두 그룹을 구별하기 위한 분자마커로서 다른 유전자에 비해 유용성이 있을 것으로 생각된다. 나팔고둥의 전체 미토콘드리아 유전체에서 결정된 염기서열은 총 15,330bp로 확인되었다. 나팔고둥의 미토콘드리아 유전자 배열은 신생복족강 수염고둥과에 속하는 각시수염고둥과 동일한 양상을 보여 준다. 신복족목에 속하는 *Fusiturris similis*에서만 *trnV*의 위치가 *trnS(ucn)*와 *trnT* 사이에 위치하지만, 다른 신복족목에서는 *12S rRNA*와 *16S rRNA*에 위치한다. 흡강목에 속하는 각시수염고둥과 나팔고둥도 *trnV*가 두 개의 rRNA 유전자 사이에 위치함을 확인하였다. 참달팽이의 전체 미토콘드리아 유전체에서 결정된 염기서열은 총 13,979bp로 13개의 단백질 암호화 유전자 중에서 *ND5* 유전자가 1,677bp로 가장 길고, *ATP8*이 156bp로 가장 짧다. 참달팽이와 같은 유페목에 속하는 *Cepaea nemoralis*와 미토콘드리아 유전자 배열을 비교하였을 때, *trnG*와 *trnH*, *trnS*와 *ND4*의 위치가 변경되었음을 확인할 수 있었다.

나. 멸종위기종의 유전자 표지 개발 및 유전다양성 분석

1) 땃꾸이의 유전다양성 분석

국내 멸종위기동물인 땃꾸이에 대한 14개의 microsatellite marker를 처음으

로 새롭게 개발하였다. 개발된 14개의 microsatellite 유전자를 이용하여 집단유전학적 분석을 실시한 결과 국내 뿔꿩이 야생 집단들은 '매우 낮은 집단 내 유전적 다양성'을 가지고 있는 것으로 나타났다. 이는 많은 지역 집단이 절멸의 위기를 겪고 있으며, 상대적으로 이동성이 작아 낮은 수준의 메타개체군 역동성을 가지고 있을 것으로 예상된다. 전체 조사된 뿔꿩이집단 간 비교적 큰 유전적 분화가 관찰되었다. 특히 제주도 지역 집단과 내륙지역 집단 간에 매우 뚜렷한 유전적 분화양상이 관찰되었다. 이는 지역 집단 간 개체이동이 적고 적은 유효집단크기 때문일 것으로 추정할 수 있다. 우리나라 뿔꿩의 야생집단들은 크게 제주도집단과 내륙 집단, 2개의 group으로 크게 나눌 수 있었다. 연구가 수행된 뿔꿩이 대부분의 집단이 유전적 다양성이 매우 낮았고 집단 간 유전적 분화양상이 크게 나타나는 것으로 보아 집단간 개체이동이 적으며 유효개체수가 적은 것으로 판단되어 멸종위기종인 뿔꿩이 집단에 대한 보전대책이 필요할 것으로 보인다.

2) 물장군의 유전다양성 분석

멸종위기종인 물장군의 국내 개체군 유전자 분석을 진행하기 위해 김포시와 강화군 및 제주도 지역으로부터 총 41개체의 샘플을 확보하였다. 특히, 강화군 및 내륙지역에서 야생 표본을 확보하기 위한 과정에서 어려움이 많았는데, 이러한 원인으로 가뭄의 영향과 많은 농수로의 시멘트 교체가 물장군의 서식지 감소와 관련이 있는 것으로 보인다. NGS 분석 데이터를 이용하여 63개의 후보군으로부터 개체 간의, 집단 간의 변이를 보이는 10개의 microsatellite marker를 개발하였다. 개발한 microsatellite marker를 이용하여 집단유전학적 분석을 실시한 결과, 국내 물장군은 집단 내 낮은 유전적 다양성을 가지고 있는 것으로 나타났다. 이는 짧은 시간 동안 급격한 개체군의 감소와 관련이 있을 것으로 보이며, 뿐만 아니라 물장군 멸종위기종 복원을 위한 인공증식 개체들의 주기적인 방사도 영향을 미쳤을 것으로 예상된다. 강화군과 제주도 지역의 집단 간에는 유전적으로 유의미한 분화를 보였지만, 그 값이 매우 낮아 충분히 분화했다고 보기 어려웠으며, STRUCTURE 및 AMOVA 결과에서도 지역 집단 간의 변이보다는 집단에 상관없이 개체 간의 변이의 비중이 더 크다는 것이 나타났다. 이러한 결과는 1990년대 이후 서식지 파괴 및 수질오염으로 인한 급격한 개체 수 감소 및 집단의 크기 감소와 관련이 있을 것으로 판단된다. 본 연구과제로부터 얻은 국내 멸종위기종인 물장군의 집단 내 유전적 다양성 및 집단 구조에 대한 분석 결과들은 물장군 집단들의 현재 상황에 대한 이해뿐만 아니라, 추후 복원을 위한 해결방법을 찾는 데 있어 중요한 기초자료로 사용될 것이다.

3) 붉은점모시나비의 유전다양성 분석

붉은점모시나비 유전체 서열로부터 microsatellite를 탐색한 결과, 총 7,044개의 microsatellite 후보 유전자 좌위를 발견하였으며, 이중 12개의 유전자 좌위를 개발하였다. 각 유전자 좌위별 유전적 다양성을 비교한 결과, 전체 12개 유전자 좌위에서 좌위별 대립유전자는 최소 6개에서 최대 22개의 대립유전자가 관찰되었으며, 이들의 유전적 다양성은 집단 간 상당한 분화를 갖는 유전자 좌위를 확인하였다. 붉은점모시나비 40개체 전체에 대한 유전적 구조 분석 결과, 2개의 유전자 그룹으로 나뉘는 것을 확인하였다. 국내 3개 집단에 대한 집단 간 유전적 다양성을 분석한 결과, 집단별 유전자 좌위별 대립유전자는 강원도 삼척 집단에서 가장 높은 대립유전자를 보유한 집단으로 확인하였으며, 이형접합자 빈도의 경우 충북 영동 집단에서 가장 낮은 수치를 나타냈다. 세 집단에 대한 유전적 분화에 대해 분석한 결과, F_{ST} 의 경우 세 집단 간 통계적으로 유의한 유전적 분화를 나타냈으며, R_{ST} 의 경우 강원도 삼척 집단이 다른 두 집단(경북 의성과 충북 영동)과 통계적으로 유의한 분화를 나타내었다. 이러한 결과는 앞서 언급한 대로 집단 간 형태형질(앞날개 길이) 측정결과와 유사하며, 결과적으로 최소 강원도 삼척 집단은 형태형질적 및 집단유전학적 분화를 나타냈다. 결과적으로 붉은점모시나비는 전반적으로 집단 간 유전적 교류가 비교적 활발했던 것으로 유추할 수 있다. 그러므로 특정 지역에 대한 보전과 함께 발생 지역 전체에 대한 종합적 보전이 중요할 것으로 보여진다.

4) 흰발농게의 유전다양성 분석

흰발농게는 확보된 표본 중 일부를 이용하여 지앤시바이오 회사를 통해 NGS 기법 중 Hiseq4000 방법으로 흰발농게 유전체 서열 일부를 확보하였고, 그 중에서 Microsatellite 부위가 확인된 염기서열 92,925개를 얻을 수 있었다. 프라이머 3 프로그램을 이용하여 50개의 Microsatellite 유전자좌위를 증폭할 수 있는 후보군 프라이머를 선별하였으며, PCR증폭 실험 및 염기서열 확인을 통해 다형성의 반복 수를 보이는 프라이머쌍 12개를 선별하였다. 각각의 프라이머에는 형광프라이머와 결합할 수 있는 M13-tailed primer를 부착하여 multiplex PCR증폭을 통해 유전자형 분석을 수행하였다. 유전적 다양도를 분석한 결과 강화집단이 다른 두 집단에 비해 가장 높은 H_o 와 H_e 값을 보였다. Pairwise F_{ST} 와 pairwise R_{ST} 의 값을 통해 강화와 순천사이의 유전적 거리가 가장 큰 것을 확인 할 수 있었으나, 얻어진 값을 이용한 AMOVA test에서는 어떤 그룹으로 나누어도 통계적으로 유의하지 않았다. 그러나 Bayesian clustering analysis 결과 서해안집단(강화와 서천)과 남해안집단(순천)으로 2개의 유전자 그룹이 관찰되었다.

5) 기수갈고동의 유전다양성 분석

기수갈고동의 유전다양성 분석 결과 남해안 4개 집단, 제주도 1개 집단은 각 지역 집단 간에 활발한 유전적 교류가 있으며 남해안 및 제주도 집단이 하나의 거대한 metapopulation으로 존재하는 것으로 판단된다. 이러한 유전적 교류는 기수갈고동의 생활사와 관련이 있는 것으로 판단되는데, 현재 한국에서는 기수갈고동의 생활사와 관련한 정보가 없으나, 일본의 정보를 살펴보면, 기수갈고동의 부화한 유생은 부화한 벨리저 유생(연체동물의 면반을 발달시킨 시기의 유생형)은 바다에 흘러내려가서, 식물플랑크톤을 섭식하면서 오랜 기간 유생생활을 거친다. 이후 충분히 성장한 벨리저 유생은 하천의 기수역으로 거슬러 올라가서, 바닥에 붙어서 변태하고 유폐가 된다. 성장해가면서 하구를 수 Km 거슬러 올라가 근처 담수역까지 분포를 넓히는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 생활사를 고려하여 보면 성패는 기수역에 서식하지만 유생시기에 널리 확산이 가능하고 그 결과 한국 내 집단 간 유전적 분화가 없이 집단 간 활발한 유전적 교류를 하고 있는 것으로 판단된다.

다. 기 분석된 멸종위기종 유전다양성 분석 재검토

본 사업을 포함하여 멸종위기종(동물분야)의 유전다양성 분석과 관련된 사업을 검토하여 실험의 재현성 문제, 개체군 일부만이 포함된 경우, 분류학적 실체 파악이 필요한 경우 등의 사유로 재분석이 요구되는 종에 대한 목록을 작성하고자 하였다. 먼저 2007년부터 시작된 본 사업의 유전다양성 분석종에 대한 목록과 결과를 검토하였고 그 결과 재분석의 시급성을 고려하여 종 목록을 작성하고 재분석 필요성에 대해 고찰하였다. 그 결과 유전다양성 재분석이 필요한 애기뿔소뿔구리, 감돌고기, 꼬마잠자리, 수리부엉이, 수달, 새호리기, 독수리 총 7종을 선정하였다. 또한 멸종위기종의 특성상 개체수 확보가 용이하지 않아 연구 당시 소수의 개체만으로 실험을 진행하였기에 개체수를 추가 확보하여 재분석이 필요한 종으로 감돌고기, 수달, 수리부엉이, 올빼미를 선정하였다. 연구 결과 유전적으로 서로 다른 2개의 그룹으로 구분되어 추가 분석을 통해 정확한 보존단위 설정 및 분류학적 고찰이 필요한 분류군으로 새호리기, 독수리, 애기뿔소뿔구리를 선정하였다. 더불어 해외샘플을 추가하여 분석이 필요한 분류군, microsatellite 마커 분석이 필요한 분류군, 미분석 멸종위기종 가운데 유전다양성 분석이 시급한 분류군을 선정하여 제시하였다. 더불어 멸종위기종을 대상으로 하여 선행된 유전다양성 분석 연구와 관련 사업에 대한 목록을 조사하여 작성하였다.

5. 기대효과

본 연구는 서식지 파괴와 무분별한 남획 등으로 멸종위기에 처해있는 멸종위기종에 대한 유전자 자료의 확보와 관리에 기여할 것이며, 한반도 서식 주요 동물 자원의 유전자원 획득을 통하여 생물 주권 확보에 이바지 할 것이다. 멸종위기종 및 고유종의 유전적 특성을 파악하여 정확히 종을 인식하는 과정을 통해 사라져가는 생물종들을 효율적으로 보전하고 관리하는 정책을 수립하는 관련 연구자나 정책 입안자들에게 정보를 제공해줄 수 있을 것으로 기대한다.

목 차

I. 연구사업의 개요	1
1. 연구사업의 목적 및 배경	1
가. 연구사업의 배경 및 목적	1
나. 우리나라 멸종위기야생동물 관리 현황	2
다. 타 기관이나 연구 사업을 통해 이루어진 멸종위기종의 보전과 복원을 위한 연구 사례	12
라. 소기관 유전체 분석의 중요성	15
마. 유전다양성 분석의 중요성	17
바. 연구의 목표	18
2. 연구 사업의 범위	19
가. 주요생물자원의 유전자 분석·연구 사업(2006-2012)의 소기관 유전체 및 유전적 다양성 분석 생물종	19
나. 2015년도 유전자 분석대상종 및 연구 범위	24
3. 주요 내용	25
가. 멸종위기종의 미토콘드리아 유전체 연구	25
나. 멸종위기종의 유전자 표지 개발 및 유전다양성 분석 연구	25
다. 기 분석된 멸종위기종 유전다양성 분석 재검토	26
4. 연구추진계획	27
가. 연구사업의 구성	27
나. 수행조직	28
다. 연구원 편성표	28
라. 추진일정	29
II. 결과 및 고찰	30
1. 멸종위기종의 미토콘드리아 유전체 연구 분야	30
가. 서론	30
나. 재료 및 방법	31
다. 결과 및 고찰	37
1) 긴점박이올빼미	38
2) 잿빛개구리매	41
3) 큰자색호랑꽃무지	48
4) 큰홍머점박이푸른부전나비	52
5) 물장군	57
6) 대모잠자리	66
7) 기수갈고둥	71

8) 나팔고둥	79
9) 참달팽이	84
2. 멸종위기종의 유전자 표지 개발 및 유전다양성 분석	89
가. 맹꽁이	89
나. 물장군	104
다. 붉은점모시나비	118
라. 흰발농게	132
마. 기수갈고둥	147
3. 기 분석된 멸종위기종 유전다양성 분석 재검토	159
III. 결론	171
1. 세부 과제별 유전자 다양성 연구(동물분야) 사업의 결과	171
가. 주요 생물자원의 소기관 유전체 특성 규명 연구	171
나. 주요 생물자원의 유전다양성 분석	172
다. 기 분석된 멸종위기종 유전다양성 분석 재검토	173
2. 연구 성과	174
IV. 참고문헌	176

표 차례

표 I-1-1. 환경부 지정 멸종위기종의 분류군별 종 수	3
표 I-1-2. 멸종위기종으로 지정된 포유류 종 목록	4
표 I-1-3. 멸종위기종으로 지정된 조류 종 목록	5
표 I-1-4. 멸종위기종으로 지정된 양서·파충류 종 목록	7
표 I-1-5. 멸종위기종으로 지정된 어류 종 목록	8
표 I-1-6. 멸종위기종으로 지정된 곤충류 종 목록	9
표 I-1-7. 멸종위기종으로 지정된 29종의 무척추동물 종 목록	10
표 I-1-8. 미토콘드리아 유전체 및 유전다양성 분석을 수행한 고유 종 목록 ·	11
표 I-2-1. 현재까지 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 사업을 통하여 수행된 동물 소기관 유전체 분석대상종	19
표 I-2-2. 멸종위기종을 대상으로 한 유전다양성 분석의 주요 성과	22
표 I-2-3. 2015년도 미토콘드리아 유전체 분석 대상 목록	24
표 I-2-4. 2015년도 유전다양성 분석대상종	25
표 II-1-1. 소기관 유전체 분석 대상 종 및 채집지역	31
표 II-1-2. 미토콘드리아 유전체 염기서열 결정을 위해 고안된 PCR 프라이머	32
표 II-1-3. 반응 혼합물 조성과 반응 조건 예시 (Long PCR)	33
표 II-1-4. 반응 혼합물 조성과 반응 조건 예시 (Short PCR)	34
표 II-1-5. 소기관 유전체 분석 결과	37
표 II-1-6. 긴점박이올빼미 (<i>Strix uralensis</i>)의 전체 미토콘드리아 유전체 구성	40
표 II-1-7. 잣빛개구리매 (<i>Circus cyaneus</i>)의 전체 미토콘드리아 유전체 구성	43
표 II-1-8. 잣빛개구리매 (<i>Circus cyaneus</i>)의 전체 미토콘드리아 유전체 염기구성 비율	44
표 II-1-9. 잣빛개구리매의 13개 미토콘드리아 단백질 암호화 영역의 codon usage	46
표 II-1-10. 큰자색호랑꽃무지 미토콘드리아 유전체 유전자의 길이 및 위치 ·	50
표 II-1-11. 꽃무지와 곤충 완전 미토콘드리아 유전체의 특성	51
표 II-1-12. 큰홍띠점박이푸른부전나비 미토콘드리아 유전체 유전자의 길이 및 위치	54
표 II-1-13. 나비목 부전나비과 곤충 완전 미토콘드리아 유전체의 특성	55
표 II-1-14. 완전 미토콘드리아 유전체가 분석된 나비목 곤충의 13개 단백질 유전자의 codon position별 염기구성	56

표 II-1-15. 물장군(<i>Lethocerus deyrollei</i>)의 전체 미토콘드리아 유전체 구성	59
표 II-1-16. 5종 장구애비상과(Nepoidea)의 염기조성 비교	61
표 II-1-17. 잠자리목 곤충 완전 미토콘드리아 유전체의 특성	68
표 II-1-18. 대모잠자리의 미토콘드리아 유전체 요약	79
표 II-1-19. 완전 미토콘드리아 유전체가 분석된 잠자리목 곤충의 13개 단백질 유전자의 codon position별 염기구성	70
표 II-1-20. 기수갈고둥(<i>Clithon retropictus</i>)의 전체 미토콘드리아 유전체 구성	73
표 II-1-21. 5종 갈고둥류(Neritidae)의 염기조성(nucleotide composition) 비교	74
표 II-1-22. 나팔고둥 미토콘드리아 유전체의 유전자 길이 및 위치	81
표 II-1-23. 나팔고둥의 13개 미토콘드리아 단백질 암호화 영역의 Codon usage	82
표 II-1-24. 참달팽이 미토콘드리아 유전체의 유전자 길이 및 위치	86
표 II-1-25. 참달팽이 미토콘드리아 단백질 암호화 영역의 codon usage	87
표 II-2-1. 뿔뿔이의 채집 정보	91
표 II-2-2. NGS분석 자료를 기반으로 선정한 150개 microsatellite 후보군	92
표 II-2-3. 각 유전자 증폭을 위한 PCR 조건	95
표 II-2-4. 뿔뿔이에서 개발한 microsatellite 유전자 목록 및 정보	97
표 II-2-5. Microsatellite 유전자와 집단에 대한 각각의 대립인자 수	98
표 II-2-6. 뿔뿔이집단 별 유전적 다양성 지수	98
표 II-2-7. 뿔뿔이에서 개발된 microsatellite marker 14쌍의 유전적 다양성	99
표 II-2-8. 각 지역 집단 간 유전적 분화	100
표 II-2-9. 제주도 집단과 내륙 집단으로 구분한 F_{ST} , R_{ST} 기반의 AMOVA test	102
표 II-2-10. 주요 생물종의 유전적 다양성 분석 결과	102
표 II-2-11. 물장군의 채집 정보	118
표 II-2-12. NGS 결과로부터 gsAssembler v.2.8 프로그램을 이용하여 확보한 repeat 서열부분	110
표 II-2-13. 물장군에서 개발한 microsatellite 유전자 목록 정보	110
표 II-2-14. Microsatellite 유전자와 집단에 대한 각각의 대립인자 수	111
표 II-2-15. 물장군에 개발된 microsatellite 좌위별 유전적 다양성 지수	112
표 II-2-16. 물장군의 지역 집단 별 유전적 다양성 지수	112
표 II-2-17. 각 지역 집단 간 유전적 분화	113

표 II-2-18. 제주도와 강화군 집단으로 구분한 <i>Fst</i> , <i>Rst</i> 기반의 AMOVA test	114
표 II-2-19. <i>Lethocerus</i> 속의 국외 분포현황에 대한 정보	116
표 II-2-20. 물장군의 유전다양성 분석 결과	116
표 II-2-21. 붉은점모시나비 종확인 분석을 위해 사용된 primer 정보	121
표 II-2-22. 붉은점모시나비의 채집 정보	123
표 II-2-23. 붉은점모시나비 haplotype 및 <i>Parnassius</i> 속 종간의 염기서열 짝 비교	124
표 II-2-24. 12개 microsatellite 유전자 좌위의 primer 염기서열 및 motif 정보	126
표 II-2-25. 12개 microsatellite locus의 유전적 다양성 정보	127
표 II-2-26. 집단 별 유전적 다양성 정보	128
표 II-2-27. Structure Harvester 결과	128
표 II-2-28. 집단 간 microsatellites 유전적 분화	129
표 II-2-29. 붉은점모시나비의 유전다양성 분석 결과	129
표 II-2-30. 흰발농게의 채집 정보	135
표 II-2-31. 반복염기서열 개수	136
표 II-2-32. 탐색된 microsatellite 유전좌위 후보군	138
표 II-2-33. 12개 microsatellite 프라이머에 대한 유전적 다형성	141
표 II-2-34. 집단과 집단사이의 pairwise <i>Rst</i> (위)와 pairwise <i>Fst</i> (아래)	142
표 II-2-35. 세 집단의 AMOVA 결과	142
표 II-2-36. Structure Harvester를 통해 선별된 K 값	143
표 II-2-37. 흰발농게의 유전다양성 분석 결과	143
표 II-2-38. 기수갈고둥의 채집 정보	150
표 II-2-39. 새롭게 개발된 14개 기수갈고둥 microsatellite 마커의 repeat motif, allele 크기, Ta (°C), 프라이머서열 및 분석 시 사용한 형광 라벨 정보	152
표 II-2-40. 기수갈고둥 microsatellite 유전자 좌위별 유전 다양성 지수	153
표 II-2-41. 기수갈고둥 각 지역별 개체군의 개체 수 (N), 대립유전자의 수 (A), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), polymorphic information content (PIC)	154
표 II-2-42. 집단 별 유전 다양성 지수	156
표 II-2-43. 기수갈고둥 서식 집단 간 pairwise F_{ST}	156

표 II-2-44. AMOVA 결과	156
표 II-3-1. 학술진흥재단 등재학술지에서 본 과제와 관련된 저널목록	163
표 II-3-2. 학술진흥재단 학술등재후보지에서 본 과제와 관련된 저널목록 ...	164
표 II-3-3. 저널 검색사이트	165
표 III-1-1. 2015년도 주요 생물종의 소기관 유전체 특성 규명 결과	171
표 III-1-2. 2015년도 유전적 다양성 분석 결과	172
표 III-1-3. 재분석이 필요한 멸종위기종 7종과 그 사유	173
표 III-1-4. 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 사업의 기출판된 연구업적 ...	174

그림 차례

그림 I-1-1. 멸종위기종의 보전 및 복원을 위한 다양한 노력	13
그림 I-1-2. 1차년도(2006년) 분석대상종 반달가슴곰(<i>Ursus thibetanus</i> <i>ussuricus</i>)의 미토콘드리아 유전체 배열	16
그림 II-1-1. 긴점박이올빼미	38
그림 II-1-2. 긴점박이올빼미(<i>Strix uralensis</i>)의 전체 미토콘드리아 유전체	39
그림 II-1-3. 잣빛개구리매	41
그림 II-1-4. 잣빛개구리매(<i>Circus cyaneus</i>)의 전체 미토콘드리아 유전체	42
그림 II-1-5. 19종의 Accipitriformes 미토콘드리아 <i>ND3</i> 유전자에서 확인된 extra base	45
그림 II-1-6. 잣빛개구리매 미토콘드리아 유전체의 control region 구조	47
그림 II-1-7. 큰자색호랑꽃무지	48
그림 II-1-8. 큰홍띠점박이푸른부전나비	52
그림 II-1-9. 큰홍띠점박이푸른부전나비를 포함한 부전나비과의 <i>COI</i> start codon 정렬	55
그림 II-1-10. 큰홍띠점박이푸른부전나비에서 발견된 tRNA 유사구조	56
그림 II-1-11. 물장군	57
그림 II-1-12. 물장군(<i>Lethocerus deyrollei</i>)의 전체 미토콘드리아 유전체	58
그림 II-1-13. 5종 장구애비류 미토콘드리아 유전체의 코돈분포	63
그림 II-1-14. 5종 장구애비류 미토콘드리아 유전체의 RSCU	64
그림 II-1-15. 물장군 미토콘드리아 유전체의 repeat unit (218 bp)	65
그림 II-1-16. 물장군 미토콘드리아 유전체의 repeat unit (328 bp)	65
그림 II-1-17. 대모잠자리	66
그림 II-1-18. 대모잠자리의 완전 미토콘드리아 유전체지도	67
그림 II-1-19. 대모잠자리에서 발견된 tRNA 유사구조	70
그림 II-1-20. 기수갈고둥	71
그림 II-1-21. 기수갈고둥(<i>Clithon retropictus</i>)의 전체 미토콘드리아 유전체	72
그림 II-1-22. 5종 갈고둥류 미토콘드리아 유전체의 코돈분포	77
그림 II-1-23. 5종 갈고둥류 미토콘드리아 유전체의 RSCU	78
그림 II-1-24. 나팔고둥	79
그림 II-1-25. 나팔고둥 미토콘드리아 유전체의 유전자 배열과 구성	80
그림 II-1-26. 복족류 미토콘드리아 유전체의 유전자 배열에 대한 가설	83

그림 II-1-27. 참달팽이	84
그림 II-1-28. 참달팽이 미토콘드리아 유전체의 유전자 배열과 구성	85
그림 II-1-29. 복족류 미토콘드리아 유전체의 유전자 배열에 대한 가설	88
그림 II-2-1. 뿔뿔이	89
그림 II-2-2. 뿔뿔이 채집 지역(기 채집 지역 포함)	91
그림 II-2-3. Structure Harvester에 의해 나온 Delta K 값	101
그림 II-2-4. Bayesian STRUCTURE 분석을 이용한 국내 야생 뿔뿔이 집단들의 유전적 구조 분석	101
그림 II-2-5. 뿔뿔이 분포 현황(IUCN, 2015)	103
그림 II-2-6. 물장군	104
그림 II-2-7. 물장군 채집 지역	106
그림 II-2-8. 물장군 채집 방법	107
그림 II-2-9. 가뭄으로 인해 마른 저수지와 수로	109
그림 II-2-10. 국내 물장군 집단들에 대한 STRUCTURE 결과	113
그림 II-2-11. <i>Lethocerus</i> 속의 국외 분포현황	115
그림 II-2-12. 붉은점모시나비	118
그림 II-2-13. 붉은점모시나비 국내 분포도	120
그림 II-2-14. 붉은점모시나비 성충 앞날개 길이(좌) 및 집단 별 평균값 비교 (우)	125
그림 II-2-15. Sturcture 프로그램으로 분석한 개체군 구조	128
그림 II-2-16. 붉은점모시나비 국외 분포도	131
그림 II-2-17. 흰발농게	132
그림 II-2-18. 흰발농게 채집 지역	133
그림 II-2-19. 채집 지역	135
그림 II-2-20. 서식처 및 포획된 흰발농게	136
그림 II-2-21. GENEMAPPER를 이용한 유전자형 분석 결과	139
그림 II-2-22. STRUCTURE analysis	143
그림 II-2-23. 일본 흰발농게 채집 계획 지역	145
그림 II-2-24. 중국(홍콩) 흰발농게 채집계획 지역	146
그림 II-2-25. 기수갈고등	147
그림 II-2-26. 기수갈고등 채집 지역	148
그림 II-2-27. 기수갈고등 채집지와 서식 사진	151
그림 II-2-28. 기수갈고등 집단의 Sturcture 분석 결과	157
그림 II-2-29. 기수갈고등 분포도	158

I. 연구사업의 개요

1. 연구사업의 목적 및 배경

가. 연구사업의 배경 및 목적

생물자원은 살아있는 생명체, 세포, 유전자 그리고 관련된 가공 처리되지 않은 일차 정보를 포함하는 의미로, 생물공학, 보건, 생명과학 연구와 개발에 필요한 원천적 물질로 정의된다(국가생명자원현황 실태조사, 2007). 생물자원은 21세기 바이오산업 성장 동력의 필수소재로서 막대한 시장 창출의 잠재력을 지니고 있는데, 생물자원은 의약, 농업, 환경 분야에서 고부가 가치를 창출하는 필수 소재이며, 인간 문화의 주축으로 후손에게 물려주어야 할 소중한 공공의 자산으로 재인식되고 있다. 최근 국제 생물다양성 협약을 통해 자국의 생물 유전자자원에 대한 생물주권의 개념이 전 세계적으로 확산되고 있다. 국제 생물다양성 협약은 서식지 보호, 개발 규제 등을 통해 생물의 종 다양성을 보전하고, 유전자원의 이용을 통해 얻는 다양한 혜택을 유전자원 제공 국가와 이용 국가 간에 공평하게 배분하는데 그 목표를 두고 있다(국가생명자원현황 실태조사, 2007). 과거 선진국들은 동물, 식물, 미생물 등의 생물은 소유권의 대상이 아니라는 주장을 펴며 전 세계의 생물자원을 별다른 제재 없이 이용하여 그 결과물을 독점하였지만, 생물다양성 협약은 생물 유전자원 보유국의 주권적 권리임을 인정하였다. 따라서 고부가 가치를 지닌 유용한 생물자원을 선점하기 위해 국가 간의 경쟁이 가열되고 있고, 확보된 생물자원의 활용기반을 갖추기 위해 투자가 증가되고 있는 실정이다.

우리나라는 기후의 특성상 많은 생물종을 가지고 있는 생물자원의 보고이다. 그러나 도시화와 산업화로 인한 서식지 파괴와 무분별한 남획 등으로 우리나라 고유의 생물종들이 멸종위기에 처해 있다. 그러므로 우리나라 역시 멸종위기에 속해 있는 생물종에 대한 유전자 자료의 축적과 관리를 통해 고유 생물종에 대한 주권을 확보하여야 할 필요성에 직면하게 되었다. 점점 사라져 가는 생물종들을 효율적으로 보전하고, 관리하는 정책을 수립하고, 그것을 실행하기 위해서는 생물의 특성 및 진화의 모든 정보를 보유하고 있는 유전적 특성을 파악하여 정확히 종을 인식하는 과정이 필수적으로 선행되어야 한다. 더불어 확보된 유전자원을 향후 학술 연구와 산업에 이용하기 위하여 보유 유전자를 관리 하는 체계의 구축이 필요하다. 따라서 본 제안의 목적은 우리나라에서 자생하는 멸종위기의 생물종 및 고유종

에서 소기관 유전체의 염기서열을 결정하고 일부 종에서는 유전다양성 분석을 수행하여 확보된 유전자원의 특성과 다양성을 평가하여 생물자원 관리 정책 체계 구축을 지원함에 있다.

2006년부터 2012년까지는 환경부와 국립생물자원관에서 주요 생물자원의 유전자 분석 연구를 통하여, 멸종위기동물 및 고유종에서 총 108종에서 미토콘드리아 유전체의 염기서열을 결정하였으며 19종의 유전다양성 분석을 수행하였다. 2013년 8차년 사업에서는 종의 선정에 있어 차별성을 두어 총 11건의 주요 생물종에서 전체 미토콘드리아 유전체의 염기서열을 결정하였고, 4종의 멸종위기종 및 고유종에서 유전다양성 분석이 수행되었다. 그리고 2014년에는 멸종위기종과 고유종의 유전자(체) 관리 체계 구축의 필요성에 따라 총 20종에 대한 genome survey와 5종의 유전다양성 분석이 수행되었다. 2015년도 사업은 genome survey 분야와 소기관 유전체 분야가 분리되어 총 9종의 소기관 유전체 정보 확보와 5종의 유전다양성 연구가 수행되었다.

나. 우리나라 멸종위기야생동물 관리 현황

1) 우리나라 멸종위기 동물의 지정 현황 및 주요 생물자원의 유전자 분석 사업

멸종위기종이란 개체수가 적어 멸종할 위험이 높은 종을 말하는데, 많은 나라에서 멸종위기종을 보호하기 위해 사냥과 야생 서식의 개발 등을 법으로 금지하고 있다. IUCN(국제자연보호연맹)의 Red Data Book에서는 멸종의 위험도에 따라 절종종, 위기종, 희귀종 등 멸종위기등급을 부여하여 보호하고 있다. 우리나라 역시 환경부에서 야생동·식물과 그 서식 환경을 체계적으로 보호 관리하여 야생동·식물의 멸종을 예방하고 사람과 야생 동·식물이 공존하는 자연환경을 만들기 위해 [야생동·식물보호법]을 제정하여 2005년 2월 10일부터 시행하고 있다. 식물, 척추동물, 무척추동물을 총망라하여 221종을 멸종위기 I급(50종)과 II급(171종)으로 등급을 나누어 지정하여 보호하고 있다(표 I-1-1).

멸종위기종 이외의 자국의 생물자원에 대한 관심 역시 높아지고 있다. 1992년 브라질 리우데자네이루에서 열린 생물다양성협약(CBD)은 한 나라의 생물자원은 인류공동의 자산이라는 인식에서 생물자원을 가진 나라로 그 권한이 귀속된다는 패러다임의 변화를 가져 왔으며, 2010년 10월 나고야에서 열린 생물다양성 협약에서 나고야 의정서가 채택됨으로서 각 나라의 생물주권의 이행에 관한 사항이 국제적으로 규범화되는 단계에 이르고 있다. 이러한 연유로 우리나라의 생물자원에 대한 관리의 필요성이 증대하였으며, 이에 2011년 국립생물자원관과 환경부는 한

반도에만 서식하는 한국고유종 2,177종을 재정리하였으며 또한 우리나라의 생물주권을 확립하기 위해 우리나라에 살고 있는 고유종을 우선적으로 파악해야 할 필요성을 강조하였다.

개체수가 점점 감소하고 있는 멸종위기종들의 보전과 생물자원으로서의 고유종의 인식을 위한 노력에 선행되어야 할 것은 보전 및 복원하고자 하는 멸종위기종과 고유종의 정확한 유전정보를 확보하는 것이다. 이러한 노력의 일환으로 국립생물자원관에서는 2006년부터 2013년까지 멸종위기종, 고유종 또는 경제적 활용 가치가 높은 주요 생물종의 유전 정보 확보를 목표로 ‘주요 생물자원의 유전자 분석·연구’를 수행하고 있다. 8년간 이루어진 사업에서 멸종위기종 및 고유종의 전체 소기관 유전체를 분석하였는데, 동물분야에서는 총 119건의 주요 생물자원에서 소기관 유전체인 미토콘드리아 유전체의 염기서열이 결정되었다(2014년도에는 20종의genome survey가 수행되었으나 연구의 목적과 범위가 다르므로 제외하였다). 미토콘드리아 유전체의 분석이 완료된 종은 분류군별로 포유류 12종, 조류 29종, 양서·파충류 7종, 어류 32종(33건), 곤충 14종, 무척추동물 22종(24건)이다. 이와 함께 보전 및 관리가 필요한 멸종위기종, 고유종을 대상으로 유전다양성 분석이 수행되었으며, 현재까지 동물 분야에서는 27종의 유전다양성이 분석되었다.

표 I -1-1. 환경부 지정 멸종위기종의 분류군별 종 수

구 분	멸종위기야생동식물 I급	멸종위기야생동식물 II급	합 계
포 유 류	11 종	9 종	20 종
조 류	12 종	49 종	61 종
양 서·파 충 류	2 종	5 종	7 종
어 류	9 종	16 종	25 종
곤 충 류	4 종	18 종	22 종
무 척 추 동 물	4 종	27 종	31 종
식 물	9 종	68 종	77 종
해 조 류		2 종	2 종
고 등 균 류	1 종		1 종
합 계	52 종	194 종	246 종

2012년 환경부 멸종위기야생동식물 기준

가) 멸종위기종의 유전자 분석 사업

(1) 멸종위기 포유류의 유전자 분석 사업

우리나라 멸종위기 포유류는 I 급 11종, II 급 8종이 지정되어 총 19종이 지정되어 있다. 그 가운데 '주요 생물자원의 유전자 분석·연구'를 통해 총 12종의 멸종위기종 및 멸종위기 해체종의 미토콘드리아 유전체 분석이 수행되었으며, 2종의 유전다양성 분석이 수행되었다(표 I-1-2). 생물종의 학명은 국립생물자원관에서 발간한 국가생물종목록집을 따른다.

표 I-1-2. 멸종위기종으로 지정된 포유류 종 목록

분 류	한 국 명	학 명	유전체분석	다양성분석
멸종위기 I 급 (11종)	1. 호랑이	<i>Panthera tigris</i>	○	
	2. 늑대	<i>Canis lupus</i>		
	3. 대륙사슴	<i>Cervus nippon</i>		
	4. 시라소니	<i>Lynx lynx</i>		
	5. 반달가슴곰	<i>Ursus thibetanus</i>	○	
	6. 사향노루	<i>Moschus moschiferus</i>	○	
	7. 산양	<i>Naemorhedus caudatus</i>	○	
	8. 여우	<i>Vulpes vulpus</i>		
	9. 붉은박쥐	<i>Myotis formosus</i>	○	
	10. 표범	<i>Panthera pardus</i>		
	11. 수달	<i>Lutra lutra</i>	○	○
멸종위기 II 급 (8종)	1. 담비	<i>Martes flavigula</i>	○	
	2. 무산쇠족제비	<i>Mustela nivalis</i>		
	3. 물개	<i>Callorhinus ursinus</i>		
	4. 물범	<i>Phoca largha</i>	○	○
	5. 삵	<i>Prionailurus bengalensis</i>	○	
	6. 작은판코박쥐	<i>Murina ussuriensis</i>		
	7. 토끼박쥐	<i>Plecotus auritus</i>	○	
	8. 하늘다람쥐	<i>Pteromys volans</i>	○	
멸종위기종 해체종 (3종)	1. 바다사자	<i>Zalophus japonica</i>		
	2. 물범류(물범 이외 종)	<i>Phoca sp.</i>		
	3. 큰바다사자	<i>Eumetopias jubatus</i>	○	

2012년 환경부 멸종위기야생동·식물 기준, ○ : 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 수행 완료종

(2) 멸종위기 조류의 유전자 분석 사업

우리나라 멸종위기조류는 I 급 12종, II 급 49종이 지정되어 총 61종이 지정되어 있다. 그 가운데 현재까지 '주요 생물자원의 유전자 분석 · 연구'를 통해 총 29종 멸종위기종 및 멸종위기 해제종의 미토콘드리아 유전체 분석이 수행되었으며(국립생물자원관 자체 사업으로 8종에 대한 분석 수행되어 중 목록에는 총 37종이 표기됨), 5종의 유전다양성 분석이 수행되었다(표 I-1-3).

표 I-1-3. 멸종위기종으로 지정된 조류 중 목록

분 류	한 국 명	학 명	유전체분석	다양성분석
멸종위기 I 급 (12종)	1. 검독수리	<i>Aquila chrysaetos</i>	○	
	2. 넓적부리도요	<i>Eurynorhynchus pygmeus</i>		
	3. 노랑부리백로	<i>Egretta eurhophotes</i>	○	
	4. 두루미	<i>Grus japonensis</i>	○	
	5. 매	<i>Falco peregrinus</i>	○	
	6. 저어새	<i>Platalea minor</i>	○	
	7. 참수리	<i>Haliaeetus pelagicus</i>	○	
	8. 청다리도요사촌	<i>Tringa guttifer</i>		
	9. 크낙새	<i>Dryocopus javensis</i>		
	10. 흑고니	<i>Cygnus olor</i>		
	11. 황새	<i>Ciconia boyciana</i>	○	
	12. 흰꼬리수리	<i>Haliaeetus albicilla</i>	○	
멸종위기 II 급 (49종)	1. 노랑부리저어새	<i>Platalea leucorodia</i>		
	2. 개리	<i>Anser cygnoides</i>		
	3. 검은머리갈매기	<i>Larus saundersi</i>	○	
	4. 검은머리물떼새	<i>Haematopus ostralegus</i>		
	5. 검은목두루미	<i>Grus grus</i>		
	6. 고니	<i>Cygnus columbianus</i>	○	
	7. 고대(적호)갈매기	<i>Larus relictus</i>		
	8. 삼광조(긴꼬리딱새)	<i>Terpsiphone atrocaudata</i>		
	9. 긴점박이올빼미	<i>Strix uralensis</i>		
	10. 까막딱다구리	<i>Dryocopus martius</i>	○	
	11. 느시	<i>Otis tarda</i>		
	12. 독수리	<i>Aegypius monachus</i>	○	○
	13. 돛부기	<i>Gallixrex cinerea</i>	○	
	14. 먹황새	<i>Ciconia nigra</i>		
	15. 물수리	<i>Pandion haliaetus</i>	○	
	16. 벌매	<i>Pernis ptilorhynchus</i>	○	
	17. 붉은해오라기	<i>Gorsachius goisagi</i>		
	18. 뿔쇠오리	<i>Synthliboramphus wumizusume</i>		
	19. 뿔종다리	<i>Galerida cristata</i>		
	20. 새호리기	<i>Falco subbuteo</i>	○	○
	21. 솔개	<i>Milvus migrans</i>	○	
	22. 수리부엉이	<i>Bubo bubo</i>	○	○

2012년 환경부 멸종위기야생동·식물 기준, ○ : 주요 생물자원의 유전자 분석 · 연구 수행 완료종

표 I-1-3. 계속

분 류	한 국 명	학 명	유전체분석	다양성분석
	23. 알락개구리매	<i>Circus melanoleucus</i>		
	24. 알락꼬리마도요	<i>Numenius madagascariensis</i>		
	25. 올빼미	<i>Strix aluco</i>	○	○
	26. 재두루미	<i>Grus vipio</i>	○	
	27. 잿빛개구리매	<i>Circus cyaneus</i>		
	28. 조롱이	<i>Accipiter gularis</i>	○	
	29. 참매	<i>Accipiter gentilis</i>	○	
	30. 큰고니	<i>Cygnus cygnus</i>	○	
	31. 큰기러기	<i>Anser fabalis</i>	○	
	32. 큰덤불해오라기	<i>Ixobrychus eurhythmus</i>	○	
	33. 큰말뚝가리	<i>Buteo hemilasius</i>	○	
	34. 팔색조	<i>Pitta nympha</i>	○	
	35. 향라머리검독수리	<i>Aquila clanga</i>	○	
	36. 호사비오리	<i>Mergus squamatus</i>		
	37. 흑기러기	<i>Branta bernicla</i>	○	
	38. 흑두루미	<i>Grus monacha</i>	○	
	39. 흰목물떼새	<i>Charadrius placidus</i>		
	40. 흰이마기러기	<i>Anser erythrophus</i>		
	41. 흰죽지수리	<i>Aquila heliaca</i>		
	42. 검은머리족새	<i>Emberiza aureola</i>		
	43. 무당새	<i>Emberiza sulphurata</i>		
	44. 붉은배새매	<i>Accipiter soloensis</i>	○	
	45. 새매	<i>Accipiter nisus</i>	○	
	46. 섬개개비	<i>Locustella pleskei</i>		
	47. 쇠검은머리쑥새	<i>Emberiza yessoensis</i>		
	48. 흑비둘기	<i>Columba janthina</i>	○	
	49. 따오기	<i>Nipponia nippon</i>	○	
멸종위기종 해제종 (8종)	1. 가창오리	<i>Anas formosa</i>	○	○
	2. 개구리매	<i>Circus spilonotus</i>		
	3. 말뚝가리	<i>Buteo buteo</i>	○	
	4. 붉은가슴흰죽지	<i>Aythya baeri</i>		
	5. 비둘기조롱이	<i>Falco amurensis</i>	○	
	6. 시베리아흰두루미	<i>Grus leucogeranus</i>		
	7. 쇠황조롱이	<i>Falco columbarius</i>		
	8. 털발말뚝가리	<i>Buteo lagopus</i>		

2012년 환경부 멸종위기야생동·식물 기준, ○ : 주요 생물자원의 유전자 분석 · 연구 수행 완료종

(3) 멸종위기 양서·파충류의 유전자 분석 사업

양서·파충류의 경우 I 급 2종, II 급 5종이 지정되어 총 7종이 멸종위기종으로 지정되어 있다. '주요 생물자원의 유전자 분석·연구'를 통해 6종의 멸종위기 양서·파충류의 미토콘드리아 유전체 분석이 수행되었다(표 I-1-4).

표 I-1-4. 멸종위기종으로 지정된 양서·파충류 종 목록

분류	한 국 명	학 명	유전체분석	다양성분석
멸종위기 I 급 (2종)	1. 비바리뱀	<i>Sibynophis chinensis</i>	○	
	2. 수원청개구리	<i>Hyla suweonensis</i>		
멸종위기 II 급 (5종)	1. 구렁이	<i>Elaphe schrenckii</i>	○	
	2. 금개구리	<i>Rana chosenicus</i>	○	
	3. 남생이	<i>Mauremys reevesii</i>	○	
	4. 맹꽁이	<i>Kaloula borealis</i>	○	
	5. 표범장지뱀	<i>Eremias argus</i>	○	

2012년 환경부 멸종위기야생동·식물 기준, ○ : 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 수행 완료종

(4) 멸종위기 어류의 유전자 분석 사업

어류의 경우 I 급 9종, II 급 16종 총 25종이 멸종위기종으로 지정되어 있다. 현재까지 '주요 생물자원의 유전자 분석 · 연구'를 통해 멸종위기어류로 지정 또는 멸종위기종 지정이 해제된 26종의 미토콘드리아 유전체 정보가 밝혀졌으며(잔가 시고기의 경우 분류학적 검증을 위해 경상도 type이 추가적으로 분석됨), 7종의 유전다양성 분석이 수행되었다(표 I-1-5).

표 I-1-5. 멸종위기종으로 지정된 어류 중 목록

분 류	한 국 명	학 명	유전체분석	다양성분석
멸종위기 I 급 (9종)	1. 감돌고기	<i>Pseudopungtungia nigra</i>	○	○
	2. 꼬치동자개	<i>Pseudobagrus brevicarpus</i>	○	
	3. 미호종개	<i>Cobitis choii</i>	○	
	4. 얼룩새코미꾸리	<i>Koreocobitis naktongensis</i>	○	
	5. 통사리	<i>Liobagrus obesus</i>	○	
	6. 흰수마자	<i>Gobiobotia naktongensis</i>	○	
	7. 남방통사리	<i>Odontobutis obscura</i>	○	
	8. 여울마자	<i>Microphysogobio rapidus</i>	○	
	9. 꺾저기	<i>Coreoperca kawamebari</i>	○	○
멸종위기 II 급 (16종)	1. 가는돌고기	<i>Pseudopungtungia tenuicarpa</i>	○	
	2. 가시고기	<i>Pungitius sinensis</i>	○	○
	3. 꾸구리	<i>Gobiobotia macrocephala</i>	○	
	4. 다목장어	<i>Lethenteron reissneri</i>	○	
	5. 돌상어	<i>Gobiobotia brevibarba</i>	○	○
	6. 모래주사	<i>Microphysogobio koreensis</i>	○	
	7. 묵납자루	<i>Acheilognathus signifer</i>	○	○
	8. 임실납자루	<i>Acheilognathus somjinensis</i>	○	
	9. 칠성장어	<i>Lethenteron japonica</i>	○	
	10. 한독종개	<i>Cottus hangioensis</i>	○	
	11. 백조어	<i>Culter brevicauda</i>	○	
	12. 버들가지	<i>Rhynchocypris semotilus</i>	○	
	13. 부안종개	<i>Iksookimia pumila</i>	○	
	14. 열목어	<i>Brachymystax lenok tsinlingensis</i>		
	15. 참수수치	<i>Kichulchoia brevifasciata</i>	○	
	16. 한강납줄개	<i>Rhodeus pseudosericeus</i>	○	○
멸종위기종 해제종 (2종)	1. 독종개	<i>Cottus koreanus</i>	○	
	2. 잔가시고기	<i>Pungitius kaibarae</i>	○, ○(경상도)	○

2012년 환경부 멸종위기야생동·식물 기준, ○ : 주요 생물자원의 유전자 분석 · 연구 수행 완료종

(5) 멸종위기 곤충의 유전자 분석 사업

곤충의 경우 I급 4종, II급 18종 총 22종이 멸종위기종으로 지정되어 있다. 현재까지 '주요 생물자원의 유전자 분석·연구'를 통해 멸종위기곤충으로 지정 또는 멸종위기종 지정이 해제된 14종의 미토콘드리아 유전체 정보가 밝혀졌으며, 2종의 유전다양성 분석이 수행되었다(표 I-1-6).

표 I-1-6. 멸종위기종으로 지정된 곤충류 중 목록

분 류	한 국 명	학 명	유전체분석	다양성분석
멸종위기 I급 (4종)	1. 산굴뚝나비	<i>Eumenis autonoe</i>	○	
	2. 상제나비	<i>Aporia crataegi</i>		
	3. 수염풍뎅이	<i>Polyphylla laticollis manchurica</i>	○	
	4. 장수하늘소	<i>Callipogon relictus</i>		
멸종위기 II급 (18종)	1. 두점박이사슴벌레	<i>Prosopocoilus astacoides</i>	○	
	2. 깊은산부전나비	<i>Protantigius superans</i>	○	
	3. 꼬마잠자리	<i>Nannophya pygmaea</i>	○	○
	4. 뚝딱나비	<i>Cicindela anchoralis punctatissima</i>		
	5. 멋조롱박정벌레	<i>Damaster mirabilissimus mirabilissimus</i>	○	
	6. 물장군	<i>Lethocerus deyrollei</i>	○	
	7. 붉은점모시나비	<i>Parnassius bremeri</i>	○	
	8. 비단벌레	<i>Chrysochroa fulgidissima</i>	○	
	9. 소똥구리	<i>Gymnopleurus mopsus</i>		
	10. 쌍고리부전나비	<i>Spindasis takanonis</i>	○	
	11. 애기뿔소똥구리	<i>Copris tripartitus</i>	○	○
	12. 왕은점표범나비	<i>Fabriciana nerippe</i>	○	
	13. 큰자색호랑꽃무지	<i>Osmoderma opicum</i>		
	14. 노란산삼잠자리	<i>Macromia dajimoji</i>		
	15. 대모잠자리	<i>Libellula angelina</i>		
	16. 창언조롱박정벌레	<i>Damaster changeonleei</i>		
	17. 큰수리팔랑나비	<i>Bibasis striata</i>		
	18. 큰홍띠점박이푸른부전나비	<i>Shijimiaeoides divina</i>		
멸종위기종 해제종 (3종)	1. 고려집게벌레	<i>Challia fletcheri</i>	○	
	2. 울도하늘소	<i>Psacothoe hilaris</i>	○	
	3. 주홍길앞잡이	<i>Cicindela hybrida nitida</i>		

2012년 환경부 멸종위기야생동·식물 기준, ○ : 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 수행 완료종

(6) 무척추동물

무척추동물은 총 29종(I 급 5종, II 급 24종)이 멸종위기종으로 지정되어 있으며, 3종이 멸종위기종으로 신규지정될 예정이다. '주요 생물자원의 유전자 분석·연구'를 통해 18종의 미토콘드리아 유전체 정보가 밝혀졌으며 해제종을 포함하여 2종의 유전다양성 분석이 수행되었다(표 I-1-7).

표 I-1-7. 멸종위기종으로 지정된 29종의 무척추동물 중 목록

분 류	한 국 명	학 명	유전체분석	다양성분석
멸종위기 I 급 (4종)	1. 나팔고둥	<i>Charonia sauliae</i>		
	2. 두드럭조개	<i>Lamprotula coreana</i>	○	
	3. 남방방게	<i>Helice leachi</i>	○	
	4. 귀이빨대칭이	<i>Cristaria plicata</i>	○	○
멸종위기 II 급 (27종)	1. 칼세오리옆새우	<i>Gammarus zeongogensis</i>		
	2. 기수갈고둥	<i>Clithon retropictus</i>		
	3. 대추귀고둥	<i>Ellobium chinense</i>		
	4. 장수삿갓조개	<i>Tugalina vadososinuata</i>		
	5. 참달팽이	<i>Koreanohadra koreana</i>		
	6. 검붉은수지맨드라미	<i>Dendronephthya suensoni</i>	○	
	7. 갯게	<i>Chasmagnathus convexus</i>	○	
	8. 깃산호	<i>Plumarella spinosa</i>		
	9. 둔한진홍산호	<i>Euplexaura crassa</i>	○	
	10. 망상맵시산호	<i>Plexauroidea reticulata</i>		
	11. 밤수지맨드라미	<i>Dendronephthya castanea</i>		
	12. 별혹산호	<i>Verrucella stellata</i>	○	
	13. 붉은발말뚝게	<i>Sesarma intermedium</i>	○	
	14. 선침거미불가사리	<i>Ophiacantha linea</i>	○	
	15. 연수지맨드라미	<i>Dendronephthya mollis</i>	○	
	16. 유착나무돌산호	<i>Dendrophyllia cribrosa</i>	○	
	17. 의염통성게	<i>Nacospatangus alta</i>	○	
	18. 자색수지맨드라미	<i>Dendronephthya putteri</i>	○	
	19. 잔가지나무돌산호	<i>Dendrophyllia iijimai</i>		
	20. 진홍나팔돌산호	<i>Tubastraea coccinea</i>	○	
	21. 착생깃산호	<i>Plumarella adhaerans</i>		
	22. 측맵시산호	<i>Plexauroidea complexa</i>	○	
	23. 해송	<i>Antipathes japonica</i>	○	
	24. 흰수지맨드라미	<i>Dendronephthya alba</i>		
	25. 염주알다슬기	<i>Koreoleptoxis globus</i>		
	26. 울릉도달팽이	<i>Karaftohelix adamsi</i>		
	27. 흰발농게	<i>Uca lactea</i>	○	
멸종위기종 해제종 (1종)	1. 긴꼬리투구새우	<i>Triops longicaudatus</i>	○	○

2012년 환경부 멸종위기야생동·식물 기준, ○ : 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 수행 완료종

나) 고유종의 유전자 분석 사업

우리나라 고유종은 모두 2,177종이 지정되어 있다. 척추동물에서 7종, 무척추동물에서 2종의 미토콘드리아 유전체 정보가 밝혀졌으며, 7종의 척추동물과 1종의 무척추동물에서 유전다양성 분석이 수행되었다(I-1-8).

표 I-1-8. 미토콘드리아 유전체 및 유전다양성 분석을 수행한 고유 종 목록

분 류	한 국 명	학 명	유전체분석	다양성분석
포유류 (다양성 1종)	1. 제주등줄쥐	<i>Apodemus agrarius</i>		○
양서·파충류 (유전체 1종 다양성 1종)	1. 한국산개구리	<i>Rana coreana</i>	○	
	2. 제주도롱뇽	<i>Hynobius quelpaertensis</i>		○
어류 (유전체 6종 다양성 5종)	1. 큰줄납자루	<i>Acheilognathus majusculus</i>	○	
	2. 줄납자루	<i>Acheilognathus yamatsutae</i>	○	
	3. 쉬리	<i>Coreoleuciscus splendidus</i>		○
	4. 배가사리	<i>Microphysogobio longidorsalis</i>	○	
	5. 점물개	<i>Squalidus multimaculatus</i>		○
	6. 칼납자루	<i>Acheilognathus koreensis</i>		○
	7. 납지리	<i>Acheilognathus rhombeus</i>	○	
	8. 버들개	<i>Rhynchocypris steindachneri</i>	○	
	7. 곱지	<i>Coreoperca herzi</i>	○	
무척추동물 (유전체 2종)	1. 작은대칭이	<i>Anodonta arcuiformis flavotincta</i>	○	
	2. 고수유령거미	<i>Pholcus gosuensis</i>	○	
곤충 (다양성 1종)	1. 밑들이매뚜기	<i>Anapodisma miramae</i>		○

○ : 주요 생물자원의 유전자 분석 · 연구 수행 완료종, 멸종위기종은 제외한 결과

다) 기타

멸종위기종이나 고유종은 아니지만 경제적 가치가 있거나 학술적으로 의미가 있는 종에서 미토콘드리아 유전체 분석이 수행되었다. 갯강구 *Ligia exotica* 와 군부 *Liolophura japonica* 에서 전체 미토콘드리아 유전체 특성 분석이 수행되었다.

다. 타 기관이나 연구 사업을 통해 이루어진 멸종위기종의 보전과 복원을 위한 연구 사례

최근 일부 연구지원기관(환경부, 교과부 등)에서는 멸종위기종의 보전 및 복원의 중요성을 깨닫고 다양한 형태의 연구비 지원을 하고 있다. 특히 환경부의 차세대핵심연구사업을 통해 관련 멸종위기종 또는 고유종의 보전이나 복원과 관련된 연구를 지원해왔으며, 국립공원관리공단에서는 반달가슴곰복원을 위하여 유전다양성 연구를 수행하였고, 최근에는 산양의 복원을 위하여 대구지방환경청에서 배설물에 대한 유전자 분석을 수행하기도 하였다. 그 외에도 미호종개(순천향대학교 석사학위 논문), 광릉요광꽃(전북대 석사학위 논문)의 유전다양성 분석 연구가 개인 연구자들에 의해 이루어지고 있다. 각 지방자치단체에서도 멸종위기종의 복원과 관계된 많은 사업을 수행하거나 예정하고 있는데, 경상남도 창녕군은 2008년 10월 중국에서 기증한 따오기를 도입하여 번식에 성공하였고, 경상북도 안동시는 먹향새 서식지 복원 계획을 수립하고 있으며, 백조공원이 조성되었다. 이외에도 한 국과학재단에서 생물자원은행 사업을 통해 주요 생물자원이거나 유전자원의 확보를 중점적으로 지원해 왔다. 관련 기관의 열정적인 노력과 더불어 관심 있는 연구수행자가 구축한 웹사이트를 통해 멸종위기종에 관련한 다양한 정보를 제공함으로써 이에 대한 국민적 관심이 고취되고 있으며, 그 중요성이 꾸준히 제기되어 오고 있다(그림 1-1-1). 환경부에서는 멸종위기종 증식·복원에 관한 국가 정책목표와 복원 추진절차, 대상 종별 추진계획을 제시하는 '멸종위기종 증식·복원 종합계획('06 ~ '15)을 마련하여 향후 관련 학계·연구기관 등의 조사·연구·기술개발을 촉진시키고, 중앙행정기관, 지방자치단체, 학계 및 민간단체 등이 광범위하게 참여하여 멸종위기종 보전을 위한 다양한 활동을 수행하고자 노력하고 있다. 그 예로 반달가슴곰, 산양, 여우, 황새 등의 멸종위기 야생동물의 증식과 복원 기술을 개발하고, 어류의 경우, 증식하여 원종을 확보한 하천에 방류하는 복원 사업들이 추진되고 있다. 하지만 국내의 멸종위기생물종의 복원사업은 아직 본 궤도에 올라 있지 못한 것으로 판단된다. 동물에 비해 식물의 복원 사업이 좀 더 앞서 있는데, 1973년 제주도 주관으로 쉴레에 파초일엽(*Asplenium antiquum* Makino)을 식재한 것을 시작으로 본격적인 복원 기술 개발과 그에 따른 복원사업이 시도된 것으로 알려져 있다. 이후 2000년까지 26종류의 멸종위기 식물종에 대한 복원사업이 국립수목원 등 9개 단체 주관으로 제주도를 비롯한 23개 장소에서 추진되어왔다. 그러나 지금까지 수행된 복원사업의 경우, 1996년도에 수행된 왕벚나무 복원사업의 경우처럼 복원 당시의 식재 위치도, 모수(parent plant)의 출처, 증식 방법, 개체별 표찰

등에 관한 자세한 기록이 있는 것을 제외하고는 거의 대부분 1) 멸종위기종에 대한 분류학적 실체의 불확실, 2) 복원 대상종의 자생지에 대한 조사의 부족, 3) 멸종 위기종에 대한 위협 정도의 미확인 상태에서 수행되어 단지 해당 식물종을 대량으로 증식하여 원래의 훼손된 자생지에 식재하였다는 의미만을 부여할 수 있는 수준이었다. 더구나 멸종위기 식물종에 대한 유전다양성 분석이나 집단 분석 등이 제대로 이루어지지 않았음은 물론이다. 그러나 이러한 식물종 복원의 성공사례와 문제점들은 향후 동물종의 복원 사업을 위한 정책 수립에 다양한 정보를 제공해 줄 수 있을 것이다.

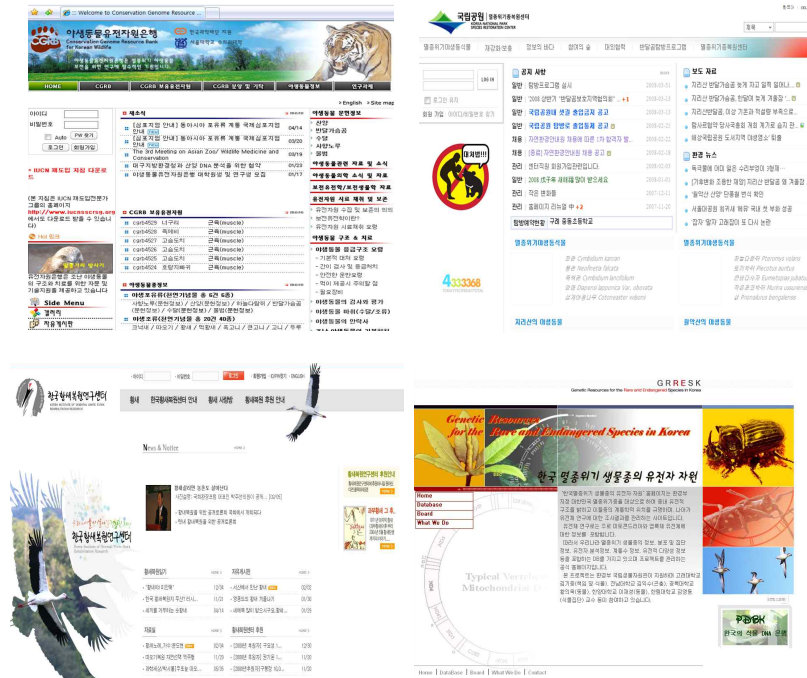


그림 I-1-1. 멸종위기종의 보전 및 복원을 위한 다양한 노력

외국에서는 멸종위기종 복원에 대한 연구 및 기술 개발을 이미 오래 전부터 장기적 복원계획(long-term recovery plan)을 수립하여 추진하고 있으며, 대표적인 예로 미국에서 멸종위기에 처해 있던 흰머리수리를 멸종위기종 목록에서 제

외하는 성과를 올리기도 하였다. 이 외에 러시아에서도 1980년대 초부터 두루미류를 비롯한 북방계 희귀조류를 복원하기 위하여 노력하고 있으며, 중국에서는 지방별 특산종 또는 희귀종들에 대하여 특성화된 인공 증식 복원 프로그램을 특화사업으로 운영하고 있는 것으로 알려지고 있다. 산시성 양현의 ‘따오기 번식센터’를 중심으로 추진해 온 따오기(*Nipponia nippon*) 인공 증식 사업은 1000개체 이상의 증식성과를 얻었으며, 우리나라와 일본 등에 분양하는 성과를 내기도 하였다.

외국의 경우 보전과 복원을 위해서 특히 생물 각 종마다 지니고 있는 내부적인 생물학적 특성 파악과 각 종에 영향을 주는 외부적 과정을 탐색하는 연구 및 그에 따른 기술 개발이 그 무엇보다도 중요한 주체가 되고 있다. 멸종위기종의 보전 및 복원 프로그램에서는, 멸종위기에 처한 개체군의 크기, 번식 체계, 유전적 구조 등 종 특이적 현상을 규명하기 위한 생태학적, 집단유전학적 연구 및 그에 따른 기술 개발과 함께 근연종과의 계통적 유연관계 파악, 서식지 환경 및 그에 미치는 인간 활동의 영향 분석 등 외부적 특성을 규명하려고 노력하고 있다. 또한, 이러한 연구 및 기술 개발을 토대로 멸종위기에 처한 식물들에 대한 복원 전략 및 기술을 확립하여 이들의 복원에 노력하고 있다. 식물을 대상으로 하는 종 복원사업은 대상 식물종의 생태적, 형태적, 유전적 특성 뿐만 아니라, 식물과 동물의 관계까지를 포함하는 전반적인 내용을 모두 조사하여 복원계획(recovery plan)을 수립한 후 수행되고 있다. 이러한 복원계획이 마련되면 계획서를 토대로 복원사업을 수행하게 되는데, 제일 먼저 자생지에 남아있는 개체를 확인하여 개체마다 모두 일련번호를 부여하여 장기적인 관점에서 보전 관리에 활용하며, 또한 내교배를 막아 유전 다양성을 높이기 위한 교잡 프로그램이 운영되고 있다. 그리고 개체군의 유전다양성을 RAPD, ISSR, PCR-RFLP, Microsatellites 기법과 같은 다양한 분자생물학 기법을 이용하여 연구하고 있다. 이밖에 주요 식물원에 식재되어 있는 자생지의 복원 개체들의 자생지 확인을 위한 유전 분석을 수행하여 유전 분석 결과를 토대로 자생지에 복원할 수 있는 개체군을 선발하고, 더 나아가 선발된 개체군의 대량 증식을 통하여 자생지에 복원하고 있다. 이밖에 수분매개자이거나 복원 대상종을 먹이로 하는 동물들을 조사하며, 복원 대상지 주민들에 대한 환경 교육을 실시하여 지역 주민들이 적극적으로 복원 프로그램에 동참할 수 있도록 함은 물론이고, 지역에 민간단체를 구성하여 전문가, 중앙정부와 지방자치단체 및 지역 주민들의 연결망을 유지하도록 유도하고 있다.

전 세계적으로 멸종위기종을 보전하고 복원하는 사업에 큰 관심을 가지고 많은 연구들이 진행되고 있다. 본 ‘주요 생물자원의 유전자 분석·연구사업’은 이러한 세계적인 동향 및 연구의 중요성과 필요성에 기반 하여 고안된 사업으로 사

라져가는 멸종위기종의 유전자원을 확보하는 일을 그 주된 목적으로 하고 있다. 본 사업은 크게 동물을 대상으로 하는 소기관 유전체 연구와 식물을 대상으로 하는 소기관 유전체 연구로 이루어져 있다. 동물의 경우 미토콘드리아 유전체를 대상으로 수행하고, 식물의 경우 엽록체 유전체를 대상으로 수행하였다. 미토콘드리아 및 엽록체 유전체는 각각 동물과 식물에서 집단 간의 유전적 변이를 파악하는데 빈도 높게 이용되며 또한 계통분석이나 종 동정을 위한 마커 개발을 위해서도 많이 이용되어 온 유전체이므로 이에 대한 광범위한 염기서열의 획득은 매우 의미 있는 자료가 될 수 있을 것이라 여겨진다.

라. 소기관 유전체 분석의 중요성

미토콘드리아 유전체는 의미있는 유전적 자원 중 하나이다(Hwang et al., 2001). 예외적인 경우도 있지만 일반적으로 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), 그리고, 1개 내지는 2개의 비암호화 부위를 포함하고 있다(그림 1-1-2). 유전체는 매우 효율적인 방법으로 배열되어 있는데, 인트론이 없고, intergenic spacers가 10bp이하로 짧으며, 두 유전자간 reading frame의 중첩(overlap) 현상이 있고, stop codon의 size가 1~2 base (T 또는 TA)로 감소된 현상이 나타나기도 한다.

이러한 미토콘드리아 유전체는 크기가 작고, 추출이 쉬워 많은 연구에 이용되어 왔다. 미토콘드리아는 모계유전(Lansman et al., 1983)이면서 다른 미토콘드리아와 recombination한다는 증거가 없는데(Clayton, 1982), 이는 미토콘드리아가 동종간의 recombination 없이 모계를 통해 전해지므로 핵 유전자에 비해 분자의 진화 역사가 좀 더 간단하다는 의미를 나타낸다. Kondo et al.(1990)은 *Drosophila*에서 미토콘드리아가 부계에서 유전되는 경우를 보여주었으나, 이것이 종 내에서의 교차를 의미하지는 않는다. 또한, 미토콘드리아는 repair system의 결여에 의해 핵 유전자에 비례해서 매우 빠르게 진화하고 있다(Brown et al., 1979). 본 사업은 멸종위기동물의 전체 미토콘드리아 유전체를 해독하고 그 특성을 연구하는 것을 중심으로 진행되어 왔는데, 멸종위기종의 미토콘드리아 유전체 염기서열 결정은 생물종의 유전자원을 확보하고 관리한다는 일차적인 목표 뿐 아니라 향후 특정종의 보전 및 관리 정책을 수립하는데 있어 다양한 정보를 제공할 수 있다. 1994년 Taberlet and Bouvet이 수행한 미토콘드리아 유전체의

control region 분석 결과를 바탕으로 프랑스 환경부는 brown bear 복원 사업을 위한 개체 도입 계획을 수립할 수 있었고, 오스트레일리아에서는 고래류의 복원을 위해 미토콘드리아 유전체의 특정 부위의 염기서열의 변이율을 조사하였다. 미국에서도 너조 복원을 위해 미토콘드리아 유전체의 염기서열을 이용하는 등 멸종위기종의 관리나 복원 사업에 미토콘드리아 유전체는 매우 중요한 정보를 제공해 오고 있다.

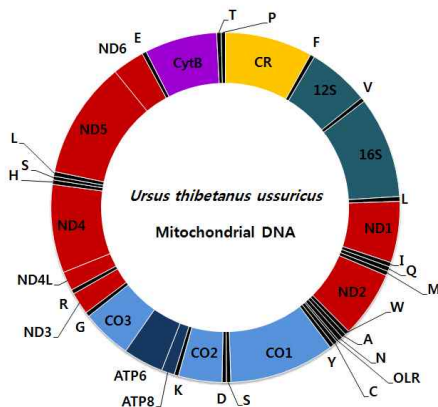


그림 I-1-2. 1차년도(2006년) 분석대상종 반달가슴곰(*Ursus thibetanus ussuricus*)의 미토콘드리아 유전체 배열

미토콘드리아 유전체의 37개 유전자 구성 요소 중 COI 영역은 동물의 barcode를 구축하는 주요 유전자이며, 16S rRNA 유전자나 control region 또는 pseudo-control region, CYTB 유전자 등은 종을 구분하거나 집단 유전학적 연구를 위한 주된 마커로서 기능해왔다. 이 외에도 COI, COII, COIII, ND1, ND2 등을 포함한 많은 유전자 영역들이 동일 목적으로 사용되어 왔다. 이들 유전자는 계통학적 마커로도 매우 유의한 것으로 판단되어 다양한 분류군에서 여러 가지 연구 목적으로 활용되어 왔다. 흥미롭게도 최근의 연구 결과들은 미토콘드리아 유전체에도 개체 간 식별이 가능할 정도의 분석력 있는 마커로 알려진 microsatellites가 존재한다는 보고들이 있어서, 향후 특정 종을 동정하거나 집단 분석에 용이한 마커로 사용될 수 있을 것으로 예측된다. 따라서 향후 적합한 이식종의 선정이나, 근연종들과의 구분을 위해서 멸종위기종의 경우(특히, 연구에 필요한 만큼의 풍부한 개체를 확보하는 것이 불가능한 경우) 미토콘드리아 유전체의 전체 염기서열을 결정하고, 그 유전자원의 상세 정보를 확보하는 일은 그 의미가 매우 크다.

마. 유전다양성 분석의 중요성

이입종과 외래종의 위협과 함께 산업화와 도시화에 따른 환경의 급격한 변화는 한반도에 서식하는 고유종 및 멸종위기 담수 어류의 생존에 심각한 위협을 가하고 있다. 개체수의 감소와 멸종위기라는 위협에 노출되어 있는 고유종의 보전과 멸종위기종의 복원에 대한 기초연구를 수행하고 정책을 마련하는 등의 실질적인 대비책이 필요한 시점이다. 보전과 복원을 위한 정책을 마련하기 위해 가장 시급이 이루어져야 할 일은 이들 집단의 유전적 다양도를 파악하는 일이다. 특정 종의 보전과 복원을 위한 전략 수립에 있어 가장 선행되어야 할 고려 대상은 집단의 유전적 유사성과 집단 간의 유전적 분화 수준을 파악하기 위해 유전적 구조와 다양성의 정도를 확인하는 것이다. 그러므로 집단별 유전적 구조와 다양성을 바탕으로 종의 역사, 종의 분화, 집단의 기원, 집단의 분화 과정 등을 설명할 수 있는 분자계통지리학적 연구와 집단유전학적 연구의 적용가능하며 이를 바탕으로 고유종 및 멸종위기종의 보전과 복원을 위한 정책적 제안을 수립할 수 있을 것이다. 국외의 경우 다양한 분류군에 걸쳐 중간 혹은 종내 수준에서 유전다양성에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 80년대 이후 미토콘드리아 DNA의 종내 변이가 확인되면서 다양한 계통지리학적, 집단유전학적 통계 방법이 개발되어(Brown and Vinograd, 1974; Upholt, 1977; Brown, 1980; Bermingham and Avise, 1986; Avise, 1992), 이를 이용한 연구가 다양한 분류군에서 여러 마커를 사용하여 폭넓게 이루어지고 종합적 결론 도출에 적용되고 있다.

- 반달가슴곰: 2004년 국립공원관리공단에서 지리산 반달가슴곰 복원사업 시작함
- 산양
 - － 2007년 국립공원관리공단에서 강원도 양구-화천에서 10개체 도입·방사함
 - － 2012년 국립공원관리공단은 설악산에서 구조했던 3마리와 양구에서 도입한 개체 1마리를 함께 방사하여 본격적인 산양 복원사업을 추진함
- 파오기: 2008년 경상남도 창녕군 우포파오기 복원센터에서 복원사업을 시작함
- 황새: 1996년 러시아 아무르지역에서 황새 유조 2마리 도입하여 황새 복원사업을 시작함

바. 연구의 목표

1) 우리나라 멸종위기종의 미토콘드리아 유전체 정보 확보 및 특성 규명

우리나라에 서식하는 멸종위기종을 대상으로 유전자원 확보를 위하여 대상종의 미토콘드리아 유전체 염기서열을 결정하는 것을 일차적인 목표로 하고 있다. 멸종위기종 9종에서 미토콘드리아 유전체 염기서열 정보를 확보한다. 염기서열 정보가 확보된 종의 미토콘드리아 유전체의 특성을 규명한다. 유전체 유전자의 동정, 구조분석을 실시하고 타 분류군의 기존자료와 비교·분석하여 미토콘드리아 유전체의 특성을 도출한다.

2) 우리나라 멸종위기종의 유전자 표지 개발 및 유전다양성 분석

우리나라 멸종위기동물을 대상으로 유전자원 확보 및 유전다양성 평가를 수행한다. 이를 바탕으로 보전단위의 설정과 같은 멸종위기종의 보전과 복원을 위한 기초자료를 제시한다. 2015년 연구에서는 총 5종의 멸종위기종에서 유전자 표지 개발 및 유전다양성 분석을 실시한다.

3) 기분석된 멸종위기종 유전다양성 분석 재검토

본 사업을 포함하여 멸종위기종 유전다양성 분석 관련 사업(동물분야)을 검토하여 실험 재현성 문제, 개체군 일부 포함, 분류학적 실체 파악 미진 등의 사유로 재분석이 필요한 종 목록을 구축한다.

4) 연구 결과 활용

본 연구 결과들을 국제적인 학술지에 게재하여 연구성과를 극대화 하는 한편, 언론 홍보를 통해 멸종위기종의 유전자원 확보와 기록, 그리고 이 종들의 보존과 관리의 중요성에 대한 대중의 인식을 제고하고, 관련 연구자나 정책 입안자들에게 정확하면서 필수적인 정보를 적시에 제공한다.

5) 차년도 사업 계획 제시

생물주권 확보 측면과 활용성의 제고라는 목표를 고려한 차년도(11차년도) 사업의 중 선정 방향 제안 및 연구 추진 전략을 수립하여, 목표에 부합하는 대상종을 최종결과보고 시에 선정하여 제시한다.

2. 연구사업의 범위

가. 주요생물자원의 유전자 분석·연구 사업(2006~2014)의 소기관 유전체 및 유전다양성 분석 생물종

1) 미토콘드리아 유전체 분석

본 사업단에 의해 수행된 9년간의 사업에서 총 116종 119건의 멸종위기동물의 미토콘드리아 유전체의 전체 염기서열을 결정하였다(표 I-2-1). 곤충을 포함하여 어류, 파충류, 조류, 포유류 등 다양한 분류군에서 대략 1,920,000bp에 해당하는 방대한 양인데, 이러한 결과는 국내 최고의 미토콘드리아 유전체 분석의 역량을 가진 연구팀이 아니라면 얻을 수 없는 성과라 생각된다. 이들 자료들은 향후 멸종위기종의 유전자원의 확보, 복원을 위한 적합한 이식종 선정, 근연종과의 종구분 등과 같은 종의 관리와 보전 및 복원 정책 수립에 매우 중요한 정보를 제공하게 될 것이다.

표 I-2-1. 현재까지 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 사업을 통하여 수행된 동물 소기관 유전체 분석대상종

소기관 유전체 염기서열 해독		
포유류 (12종)		
학 명	국 명	비 고
<i>Panthera tigris</i>	호랑이	2006년
<i>Ursus thibetanus</i>	반달가슴곰	2006년
<i>Lutra lutra</i>	수달	2006년
<i>Naemorhedus caudatus</i>	산양	2006년
<i>Moschus moschiferus</i>	사향노루	2006년
<i>Prionailurus bengalensis</i>	삿	2008년
<i>Phoca largha</i>	물범	2008년
<i>Eumetopias jubatus</i>	큰바다사자	2009년
<i>Pteromys volans</i>	하늘다람쥐	2009년
<i>Myotis formosus</i>	붉은박쥐	2010년
<i>Plecotus auritus ognevi</i>	토끼박쥐	2010년
<i>Martes flavigula</i>	담비	2012년
조류 (29종)		
<i>Ciconia boyciana</i>	황새	2006년
<i>Strix aluco</i>	올빼미	2006년
<i>Bubo bubo</i>	수리부엉이	2006년
<i>Anas formosa</i>	가창오리	2007년
<i>Anser fabalis</i>	큰기러기	2007년
<i>Grus japonensis</i>	두루미	2007년
<i>Platalea minor</i>	저어새	2007년
<i>Larus saundersi</i>	검은머리갈매기	2007년
<i>Ixobrychus eurhythmus</i>	큰덤불해오라기	2007년
<i>Falco subbuteo</i>	새호리기	2008년

표 I-2-1. 계속

<i>Accipiter gularis</i>	조롱이	2008년
<i>Aegypius monachus</i>	독수리	2008년
<i>Cygnus cygnus</i>	큰고니	2009년
<i>Grus vipio</i>	재두루미	2009년
<i>Grus monacha</i>	흑두루미	2009년
<i>Haliaeetus pelagicus</i>	참수리	2011년
<i>Aquila chrysaetos</i>	검독수리	2011년
<i>Falco peregrinus</i>	매	2011년
<i>Cygnus columbianus</i>	고니	2011년
<i>Accipiter gentilis</i>	참매	2011년
<i>Gallix cinerea</i>	뜸부기	2012년
<i>Dryocopus martius</i>	까막딱다구리	2012년
<i>Pitta nympha</i>	팔색조	2012년
<i>Branta bernicla</i>	흑기러기	2012년
<i>Accipiter soloensis</i>	붉은배새매	2012년
<i>Accipiter nisus</i>	새매	2012년
<i>Columba janthina</i>	흑비둘기	2012년
<i>Egretta eulophotes</i>	노랑부리백로	2013년
<i>Nipponia nippon</i>	따오기	2013년
양서·파충류 (7종)		
<i>Elaphe schrenckii</i>	구렁이	2006년
<i>Mauremys reevesii</i>	남생이	2006년
<i>Kaloula borealis</i>	맹꽁이	2009년
<i>Rana chosonicus</i>	금개구리	2010년
<i>Eremias argus</i>	표범장지뱀	2010년
<i>Sinyopsis chinensis</i>	비바리뱀	2010년
<i>Rana coreana</i>	한국산개구리	2012년
어류 (32종, 33건)		
<i>Pseudopungtungia nigra</i>	감돌고기	2006년
<i>Koreocobitis naktongensis</i>	얼룩새코미꾸리	2006년
<i>Pseudobagrus brevicarpus</i>	꼬치동자개	2006년
<i>Pungitius sinensis</i>	가시고기	2007년
<i>Pungitius kaibarae</i>	잔가시고기	2007년
<i>Cottus koreanus</i>	독중개	2007년
<i>Cottus hangiongensis</i>	한독중개	2007년
<i>Cobitis choii</i>	미호중개	2007년
<i>Gobiobotia breviparba</i>	돌상어	2008년
<i>Gobiobotia macrocephala</i>	꾸구리	2008년
<i>Pseudopungtungia tenuicopis</i>	가느돌고기	2008년
<i>Microphysogobio koreensis</i>	모래주사	2008년
<i>Acheilognathus somjinensis</i>	임실납자루	2008년
<i>Gobiobotia nakdongensis</i>	흰수마자	2009년
<i>Lethenteron japonica</i>	철성장어	2009년
<i>Lethenteron reissneri</i>	다묵장어	2009년
<i>Liobagrus obesus</i>	통사리	2011년
<i>Acheilognathus signifer</i>	묵납자루	2011년
<i>Odontobutis obscura</i>	남방동사리	2012년
<i>Microphysogobio rapidus</i>	여울마자	2012년
<i>Microphysogobio longidorsalis</i>	배가사리	2012년
<i>Coreoperca kawamebari</i>	꼭저기	2012년
<i>Culter brevicauda</i>	백조어	2012년
<i>Rhynchocypris semotilus</i>	버들가지	2012년
<i>Iksookimia pumila</i>	부안중개	2012년
<i>Kichulchoia brevifasciata</i>	좁수수치	2012년
<i>Rhodeus pseudosericeus</i>	한강납줄개	2012년
<i>Acheilognathus majusculus</i>	큰줄납자루	2012년
<i>Acheilognathus yamatsutae</i>	줄납자루	2012년
<i>Pungitius kaibarae</i>	잔가시고기(경상도 type)	2013년

표 I -2-1. 계속		
<i>Coreoperca herzi</i>	걱지	2013년
<i>Acheilognathus rhombeus</i>	납지리	2013년
<i>Rhynchocypris steindachneri</i>	버들개	2013년
곤충 (14종)		
<i>Nannophya pygmaea</i>	꼬마참자리	2006년
<i>Copris tripartitus</i>	애기뿔소똥구리	2006년
<i>Lethocerus deyrollei</i>	물장군	2006년
<i>Chrysochroa fulgidissima</i>	비단벌레	2007년
<i>Psacotheta hilaris</i>	올도하늘소	2007년
<i>Metopodontus blanchardi</i>	두점박이사슴벌레	2007년
<i>Polyphylla laticollis</i>	수염풍뎅이	2007년
<i>Damaster mirabilissimus mirabilissimus</i>	멋조롱박딱정벌레	2008년
<i>Challia fletcheri</i>	고려집게벌레	2008년
<i>Parnassius bremeri</i>	붉은점모시나비	2008년
<i>Fabriciana nerippe</i>	왕은점표범나비	2008년
<i>Eumenis autonoe</i>	산골독나비	2008년
<i>Protantigius superans</i>	검은산부전나비	2009년
<i>Spindasis takanonis</i>	쌍고리부전나비	2009년
무척추동물 (22종, 24건)		
<i>Cristaria plicata</i>	귀이빨대칭이	2009년
<i>Triops longicaudatus</i>	긴꼬리투구새우	2010년
<i>Chasmagnathus convexus</i>	갯게	2010년
<i>Sesarma intermedium</i>	붉은발말뚝게	2010년
<i>Lamprotula coreana</i>	두드럭조개	2010년
<i>Euplexaura crassa</i>	둔한진총산호	2010년
<i>Plexauroidea complexa</i>	촉뿔시산호	2010년
<i>Dendronephthya mollis</i>	연수지맨드라미	2010년
<i>Dendronephthya putteri</i>	자색수지맨드라미	2010년
<i>Verrucella stellata</i>	별혹산호	2010년
<i>Helice leachi</i>	남방방게	2011년
<i>Dendronephthya suensoni</i>	검붉은수지맨드라미	2011년
<i>Ophiacantha lineata</i>	선침거미불가사리	2011년
<i>Nacospatangus alta</i>	의염통성게	2011년
<i>Tubastraea coccinea</i>	진홍나팔돌산호	2011년
<i>Dendrophyllia cribrata</i>	유착나무돌산호	2011년
<i>Pholcus gosuensis</i>	고수유령거미	2012년
<i>Antipathes japonica</i>	해송	2012년
<i>Anodonta arcaiformis flavotincta</i>	작은대칭이	2012년
<i>Ligia exotica</i>	갯장구 A, C type	2013년
<i>Liolophura japonica</i>	군부 A, B type	2013년
<i>Uca lactea</i>	흰발농게	2013년

2) 유전다양성 분석

본 사업단에 의해 수행된 9년간의 사업에서 총 27종 28건의 유전다양성 분석이 수행되었다. 그 목록은 아래 표 I-2-2와 같다.

표 I-2-2. 멸종위기종을 대상으로 한 유전다양성 분석의 주요 성과

유전다양성 분석	
2007년, 5종	
학 명	국 명
<i>Lutra lutra</i>	수달
<i>Bubo bubo</i>	수리부엉이
<i>Pseudopungtungia nigra</i>	감돌고기
<i>Pungitius kaibarae</i>	잔가시고기
<i>Nannophya pygmaea</i>	꼬마잠자리
2008년, 4종	
학 명	국 명
<i>Anas formosa</i>	가창오리
<i>Strix aluco</i>	올빼미
<i>Coreoleuciscus splendidus</i>	쉬리
<i>Anapodisma miramae</i>	밀드리메뚜기
2009년, 4종	
학 명	국 명
<i>Falco subbuteo</i>	새호리기
<i>Aegypius monachus</i>	독수리
<i>Gobiobotia brevibarba</i>	돌상어
<i>Copris tripartitus</i>	애기뿔소똥구리
2011년, 2종	
학 명	국 명
<i>Pungitius sinensis</i>	가시고기
<i>Triops longicaudatus</i>	긴꼬리투구새우
2012년, 4종	
학 명	국 명
<i>Cristaria plicata</i>	귀이빨대칭이
<i>Pungitius kiabare</i>	잔가시고기
<i>Rhodeus pseudosericeus</i>	한강납줄개
<i>Phoca vitulina</i>	점박이물범
2013년, 4종	
학 명	국 명
<i>Cristaria plicata</i>	귀이빨대칭이
<i>Acheilognathus koreensis</i>	칼납자루

표 I -2-2. 계속

<i>Coreoperca kawamebari</i>	꺼저기
<i>Squalidus multimaculatus</i>	점물개
2014년, 5종	
학 명	국 명
<i>Apodemus agrarius</i>	제주등줄쥐
<i>Hynobius quelpaertensis</i>	제주도롱뇽
<i>Acheilognathus signifer</i>	묵납자루
<i>Cobitis pacifica</i>	북방종개
<i>Niwaella multifasciata</i>	수수미꾸리

나. 2015년도 유전자 분석대상종 및 연구 범위

1) 멸종위기종의 미토콘드리아 유전체 정보 확보 분야

지난 9년간의 사업에서 유전체 분석이 끝난 종을 제외하고, 본 연구의 주관기관인 국립생물자원관이 과업지시서에서 제시한 『우선적으로 미토콘드리아 유전체 정보 확보가 필요한 멸종위기종』 가운데 조류 2종, 곤충 4종, 연체동물에서 3종, 총 9종을 선정하였다. 연구대상종 9종의 목록은 표 I-2-3과 같다. 기존 과업지시서에서 제시한 쇠검은머리쭈새는 생태적 특성을 고려하였을 때 시기적으로 직접 채집이 어려운 것으로 판단되어 소장 표본 확보를 위해 연구소, 박물관, 유전자원은행 등에 문의하였지만 DNA 실험이 가능한 근육 조직 또는 혈액이 냉동 또는 액침상태로 보관되어 있는 기관이 없었다. 2곳의 기관에서 박제 표본을 가지고 있음이 확인되었지만 박제 제작 시기가 오래되었고 DNA 실험에 이용할 수 있을 만큼 충분한 양의 조직을 분양할 수 있는 기관이 없었기에 주관기관인 국립생물자원관과 협의를 통해 연구대상종을 쇠검은머리쭈새에서 잿빛개구리매로 변경하였다.

표 I-2-3. 2015년도 미토콘드리아 유전체 분석 대상 목록

분석대상종	학 명	비 고
긴점박이올빼미	<i>Strix uralensis</i>	멸종위기II급
잿빛개구리매	<i>Circus cyaneus</i>	멸종위기II급
큰자색호랑꽃무지	<i>Osmoderma opicum</i>	멸종위기II급
큰홍띠점박이푸른 부전나비	<i>Shijimiaeooides divina</i>	멸종위기II급
물장군	<i>Lethocerus deyrollei</i>	멸종위기II급
대모잠자리	<i>Libellula angelina</i>	멸종위기II급
기수갈고둥	<i>Clithon retropictus</i>	멸종위기II급
나팔고둥	<i>Charonia sauliae</i>	멸종위기I급
참달팽이	<i>Koreanohadra koreana</i>	멸종위기II급

2) 주요 동물자원의 유전다양성 분석

지난 사업에서 유전다양성 분석이 완료된 종을 제외하고, 주관기관인 국립생물자원관이 과업지시서에 제시한 5종을 선정하였다(표 I-2-4).

표 I-2-4. 2015년도 유전다양성 분석대상종

분석대상종	학 명	비 고
맹꽁이	<i>Kaloula borealis</i>	멸종위기II급
물장군	<i>Lethocerus deyrollei</i>	멸종위기II급
붉은점모시나비	<i>Parnassius bremeri</i>	멸종위기II급
흰발농게	<i>Uca lactea</i>	멸종위기II급
기수갈고둥	<i>Clithon retropictus</i>	멸종위기II급

3) 기분석된 멸종위기종 유전다양성 분석 재검토

본 사업을 포함하여 멸종위기종 유전다양성 분석 관련 사업(동물분야)을 검토하여 실험 재현성 문제, 개체군 일부 포함, 분류학적 실체 파악 미진 등의 사유로 재분석이 필요한 종 목록을 구축한다.

3. 주요 내용

가. 멸종위기종의 미토콘드리아 유전체 연구

- ▶ 조류 2종, 곤충 4종, 연체동물 3종 총 9종의 전체 미토콘드리아 유전체의 염기서열을 결정하고 유전체의 특성을 규명

나. 멸종위기종의 유전자 표지 개발 및 유전다양성 분석 연구

1) 맹꽁이 유전다양성 분석

- 표본 확보: 2개 집단, 총 40개체 이상 확보 계획
- 분석 방법: 국립생물자원관에서 기 개발된 microsatellite

마커 정보 활용

- 분석 마커: 10개 이상의 유효한 microsatellite 마커 사용

2) 물장군 유전다양성 분석

- 표본 확보: 3개 집단, 총 40개체 이상 확보 계획
- 분석 방법: 10개 이상의 유효한 Microsatellite 신규 개발 및 적용
- 분석 마커: 10개 이상의 유효한 microsatellite 마커 사용

3) 붉은점모시나비 유전다양성 분석

- 표본 확보: 2개 집단, 총 40개체 이상 확보 계획
- 분석 방법: 10개 이상의 유효한 Microsatellite 신규 개발 및 적용
- 분석 마커: 10개 이상의 유효한 microsatellite 마커 사용

4) 흰발농게의 유전다양성 분석

- 표본 확보: 2개 집단, 총 40개체 이상 확보 계획
- 분석 방법: 10개 이상의 유효한 Microsatellite 신규 개발 및 적용
- 분석 마커: 10개 이상의 유효한 microsatellite 마커 사용

5) 기수갈고둥의 유전다양성 분석

- 표본 확보: 4개 집단, 총 40개체 이상 확보 계획
- 분석 방법: 국립생물자원관에서 기 개발된 microsatellite
마커 정보 활용
- 분석 마커: 10개 이상의 유효한 microsatellite 마커 사용

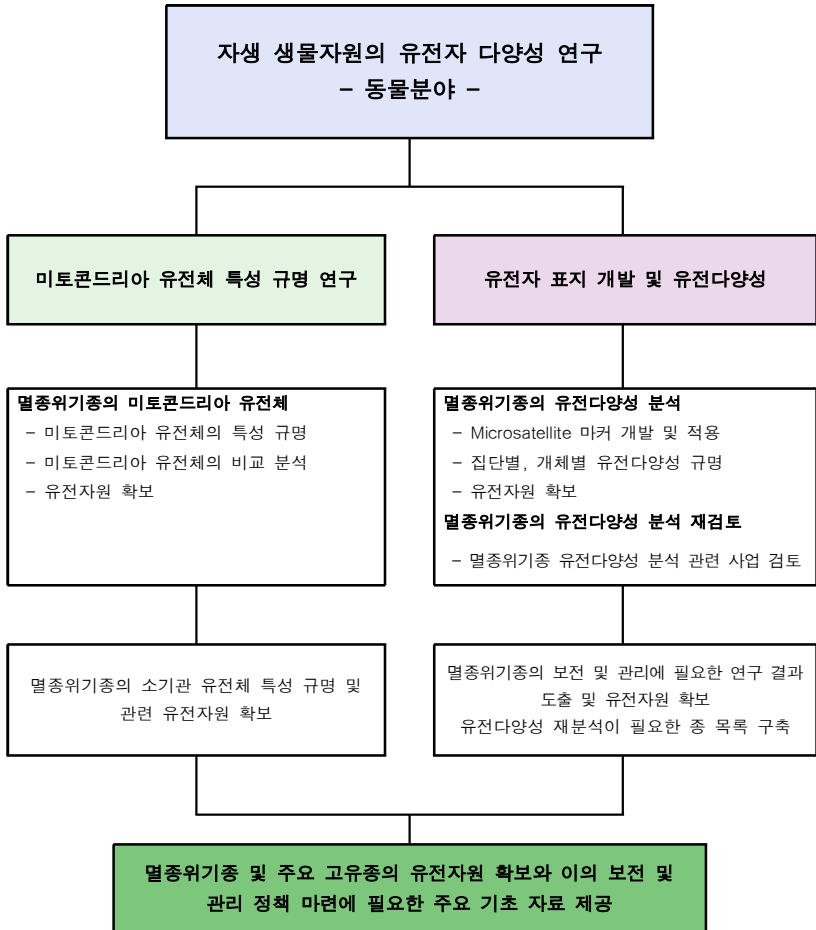
6) 당해연도를 포함한 2년간의 국내외 시료 확보 계획 제시: 이는 분류군별 상황에 따라 해외 표본 확보의 필요성을 제시하고 필요할 경우 시료 확보 계획을 구체적으로 제시함

다. 기 분석된 멸종위기종 유전다양성 분석 재검토

- ▶ 자원관(용역, 자체) 및 외부 연구를 통해 분석된 종들의 유전다양성 분석
연구 현황 파악 및 재분석 중 목록 제시함

4. 연구추진계획

가. 연구사업의 구성

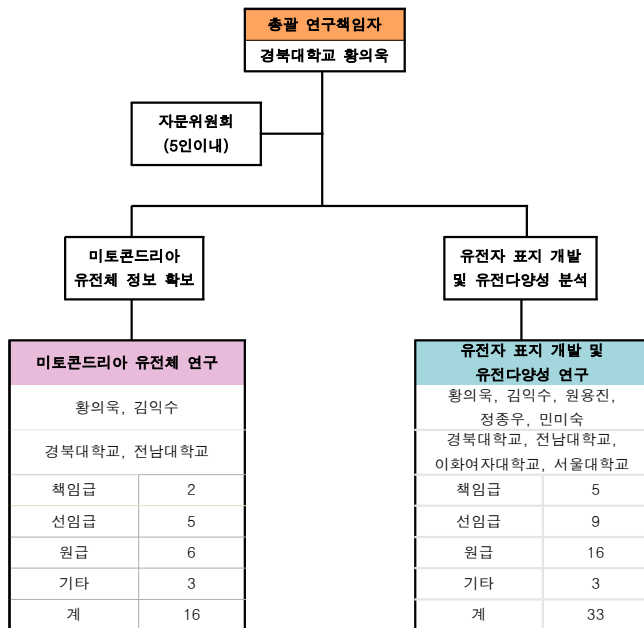


나. 수행조직

자생 생물자원의 유전자 다양성 연구(동물분야) 수행은 경북대학교 생물교육과 황의욱 교수가 총괄하고 타 대학의 분야별 전문가인 4명의 교수가 유전다양성 분석의 세부책임자로 참여하게 될 것이다.

사업팀은 유전체 분석팀, 유전다양성 분석팀으로 세분하였는데, 유전체 분석팀에는 황의욱, 김익수 교수가 멸종위기종 9종의 미토콘드리아 유전체의 염기서열 결정하고 그 특성을 규명하는 연구를 중점적으로 수행한다. 유전다양성 분석팀은 황의욱, 김익수, 원용진, 정종우, 민미숙 교수가 참여하여 각 분류군별로 유전다양성 분석을 수행한다. 자문위원회는 각 분야별 전문가들로 구성되어 본 연구에 직접적으로 반영될 수 있도록 구성한다.

다. 연구원 편성표



라. 추진일정

내용	월	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
1) 멸종위기종의 미토콘드리아 유전체 분석									
▣ 멸종위기종 9종의 표본 확보									
▣ 미토콘드리아 유전체 분석 전략 수립									
▣ 9종의 미토콘드리아 유전체 염기서열 결정									
▣ 9종의 염기서열 자료 분석									
▣ 유전체 특성규명 및 비교분석									
2) 멸종위기종의 유전자 표지 개발 및 유전다양성 분석 연구									
▣ 주요 생물종 5종의 표본 확보									
▣ 유전다양성 분석 전략 수립									
▣ NGS 분석을 통한 microsatellite 마커 개발 및 Genotyping									
▣ 유전다양성 규명 및 비교 분석									
3) 멸종위기종 유전다양성 분석 재검토									
▣ 기분석된 멸종위기종 자료 수합									
▣ 자료의 종합적 분석									
▣ 재분석이 필요한 종 목록 구축									
4) 보고회 및 보고서 작성									
▣ 착수 보고회									
▣ 중간 보고회									
▣ 최종 보고회									
▣ 최종 보고서 및 성과품 납품									

II. 결과 및 고찰

1. 멸종위기종의 미토콘드리아 유전체 연구 분야

가. 서론

개체수가 급격히 감소하는 멸종위기에 있는 동물을 보존하고 관리하는 일은 생태학적 연구 뿐 아니라 발생학, 유전학, 계통학 등의 다양한 학문적 접근이 요구된다. 그 중에서도 특히 국내 야생동물의 고유한 유전적 특성을 인지하여 정확한 종의 분류학적, 계통학적 위치를 확립하는 일은 종 보전과 관리를 위해 필수적으로 선행되어야 할 것이다.

환경보호와 생물자원의 중요성이 부각되고 보호를 위한 부단한 노력이 계속되고 있으나, 좁은 국토에서 한정된 자원으로 다양한 개발이 이루어지고 있으므로, 야생동물의 서식지는 더 협소해지고 그 수가 감소할 수 있는 위험이 언제나 존재한다. 또한 세계가 하나가 된 시점에서 외국에서 여러 가지 이유로 영입된 동물들로 인한 생태계 파괴가 사회적 문제로 떠오르고 있다. 또한, 외국에서 유입된 동물들은 우리나라 환경에 적응하여 토속화 되어 가고 있으므로 우리나라 고유의 종들에게 위협이 되고 있는 실정이다. 그러므로 현재 서식하는 우리나라 야생동물의 고유한 유전자 자원을 확보하여 관리하는 일은 매우 시급한 과제라 할 것이다. 따라서 멸종위기 조류, 곤충, 연체동물을 대상으로 미토콘드리아 유전체의 염기서열을 결정하고, 그 특성을 규명하는 것을 본 연구의 목표로 하였다.

본 연구를 위한 종은 국립생물자원관의 과업지시서에 명시된 멸종위기종 9종이며, 분류군별로 조류에서 긴점박이올빼미, 잿빛개구리매, 곤충에서 큰자색호랑꽃무지, 큰홍띠점박이푸른부전나비, 물장군, 대모잠자리, 연체동물에서 기수갈고둥, 나팔고둥, 참달팽이가 선정되었다.

나. 재료 및 방법

1) 표본 확보

본 연구에 사용된 표본은 직접 채집하거나 해당 분류군의 전문가의 도움 또는 야생동물유전자원은행에서 분양받아 확보하였다(표 II-1-1).

표 II-1-1. 소기관 유전체 분석 대상 종 및 채집지역

분석대상종	학 명	채집 지역	채집 날짜
긴점박이올빼미	<i>Strix uralensis</i>	강원도 철원군	2015. 01. 16
잣빛개구리매	<i>Circus cyaneus</i>	대구광역시 달성군	2015. 03. 30
큰자색호랑꽃무지	<i>Osmoderma opicum</i>	경상북도 영주시	2015. 07. 21
큰홍띠점박이푸른부전나비	<i>Shijimiaeoides divina</i>	충청북도 제천시	2015. 06. 24
물장군	<i>Lethocerus deyrollei</i>	제주특별자치도 제주시	2015. 08. 04
대모잠자리	<i>Libellula angelina</i>	경기도 안성시	2015. 06. 09
기수갈고동	<i>Clithon retropictus</i>	경상남도 거제시	2015. 06. 12
나팔고동	<i>Charonia sauliae</i>	제주특별자치도 서귀포시	2015. 10. 07
참달팽이	<i>Koreanohadra koreana</i>	전라남도 신안군	2015. 09. 09

2) DNA 추출

실험 대상종의 표본으로부터 DNA를 추출하기 위해 DNeasy Blood & Tissue kit (QUIAGEN Co., USA)를 이용하였으며 실험과정은 다음과 같다.

- 샘플 조직을 liquid nitrogen과 함께 섞어 조직이 가루가 될 때까지 분쇄한다.
- Liquid nitrogen을 증발시킨 후 180 μ l의 lysis buffer (ATL B^o)와 20 μ l의 proteinase K를 첨가한 후 56 $^{\circ}$ C에서 incubation한다.
- 15초 동안 vortexing후 200 μ l의 lysis buffer (AL B^o)를 첨가하여 잘 섞어준 다음 다시 200 μ l의 absolute ethanol을 넣고 섞어준다.
- 혼합액을 DNeasy Mini spin column에 넣고 8000rpm에서 1분 동안 원심분리를 한 후 걸러진 용액은 제거하고 500 μ l의 washing buffer (AW1)을 첨가하여 다시 8000rpm에서 1분 동안 원심분리 한다.
- 걸러진 용액은 버리고 두 번째 washing buffer (AW2)를 넣고 14000rpm에서 3분 동안 원심분리 하여 ethanol 잔여물을 확실히 제거시킨다.
- DNeasy mini spin column을 새로운 e-tube에 옮겨 담고 elution buffer (AE B^o)를 200 μ l 넣고 상온에서 1분여간 두었다가 8000rpm에서 1분 동안 원심 분리한다.

3) PCR 프라이머 및 PCR 조건

PCR은 universal 프라이머와 본 연구대상종인 조류, 곤충 연체동물에 특이적인 프라이머를 고안하여 실험을 진행하였다.

표 II-1-2. 미토콘드리아 유전체 염기서열 결정을 위해 고안된 PCR 프라이머

종족 구간	프라이머 이름	프라이머 염기서열
LF 1 : COI-COIII (4kb)	Lep-COI-F1	5'-TTC TAC AAA TCA TAA AGA TAT TGG-3'
	LF01-S06-R2	5'-GAT TGG AAG TCA AAT ATA CT-3'
LF 2 : ATP6-ND4 (5.3kb)	LF01-S05-F2	5'-TTT TAT TTA ATA ATT TTT TAG G-3'
	Lep-ND4-R1	5'-ATT GGT CAT GGT TTA TGT TCT TC-3'
LF 3 : ND5-IrRNA (7.5kb)	Lep-ND5-F1	5'-CTA AAA GGA ATT TGA GCT CT-3'
	Lep-IrRNA-R1	5'-GTA TTT CAT TTA CAT TGA AAA GA-3'
LF 4 : IrRNA-COI (5.5kb)	Lep-IrRNA-F1	5'-ATT ATG CTA CCT TTG TAC AGT C-3'
	Lep-COI-R1	5'-CTT CAG GAT GAC CAA AAA ATC-3'
SF1	LF03-S05-F1	5'-AAG CTT TTG GGY TCA TAC C-3'
SF2	LF03-S05-R2	5'-CAW CCT AAA TTA TTA ATW GAW GA-3'
	LF03-S06-F1	5'-TCW TCH WTA TTA ATA AAA ATA GG-3'
SF3	LF03-S06-R2	5'-GCG ATA AAT TGT AAA TTT AT-3'
	LF03-S07-F1	5'-AAT CTT CAA AAT TAT TTA TAA AG-3'
SF4	Lep-COI-R1	5'-CTT CAG GAT GAC CAA AAA ATC-3'
	LF01-S01-F1	5'-GGT ATT TCA TCA ATT TTA GG-3'
SF5	LF01-S01-R1	5'-GTC GAG GTA TTC CTG CTA-3'
	LF01-S02-F2	5'-ACW GTA GGA GGA TTA ACA GG-3'
SF6	LF01-S02-R2	5'-GTT CAA ATT AAT TCA ATT ATT TG-3'
	LF01-S03-F2	5'-TAG AAA TGG CAA CWT GAT C-3'
SF7	LF01-S03-R1	5'-CTT GCT TTC AGT CAT CTA AT-3'
	LF01-S04-F1	5'-CAG GTC GWT TAA ATC AAA C-3'
SF8	LF01-S04-R2	5'-GTT CCT TGD GGA ATT ATA TG-3'
	LF01-S05-F1	5'-TAA TTT TCA ATT TTT GAT CC-3'
SF9	LF01-S05-R1	5'-CTC GTC ATC ATT GAT ATA T-3'
	LF01-S06-F2	5'-GTW GAT TAT AGH CCW TGA CC-3'
SF10	LF01-S06-R2	5'-GAT TGG AAG TCA AAT ATA CT-3'
	LF01-S07-F1	5'-AGC ATA TGA ATA TWT WGA AGC-3'
SF11	LF01-S07-R1	5'-CAA TTT TAT CAT TAA CAG TGA-3'
	LF01-S08-F1	5'-TAG AAA TTG CAT TAA TTT THC C-3'
SF12	LF01-S08-R2	5'-CCT TAT ATA ATT TAT TTA CC-3'
	LF01-S09-F1	5'-AWA HTT CTC TTC AAC CYA WAT C-3'
SF13	LF01-S09-R2	5'-GCT TTA TCW ACT TTA AGW CA-3'
	LF01-S10-F1	5'-TCY TTW GAA TAA AAY CCA G-3'
SF14	LF01-S10-R1	5'-GAT GGD TTA GGD TTA GTT TCT T-3'
	LF01-S11-F1	5'-AAA AAA TAT AAT TTC AWC THC C-3'
SF15	LF01-S11-R2	5'-GAG CTG GDT ATA GAT TAT AT-3'
	LF01-S12-F1	5'-ATA TTT TTG AYH CCA CAA ATC-3'
SF16	LF01-S12-R2	5'-CAG GTT CAA TAA TTT TAG C-3'
	LF02-S01-F1	5'-TTA TAA TAC CHC CAA TWA C-3'
SF17	LF02-S01-R1	5'-GGT TTA ATT TTA TTA AGA ATT TG-3'
	LF02-S02-F1	5'-ATA TTA AAG TAG GAA TTA AWC-3'

	LF02-S02-R2	5'-TAA TTT TGG AGA TTA TWG AT-3'
SF18	LF02-S03-F1	5'-CCT AAA GCH CCY TCA CAA AC-3'
	LF02-S03-R1	5'-GTA ATT TTT ACW ACT GCA ATT A-3'
SF19	LF02-S04-F2	5'-TNT CAA GAA TTG CHT CWA ATG-3'
	LF02-S04-R1	5'-GAT ATT TGT CCY CAA GGT A-3'
SF20	LF02-S05-F2	5'-TAT HTH CAT ATT GGA CGA GG-3'
	LF02-S05-R1	5'-CCT TGD ATT TTT TTA TTA AAD GT-3'
SF21	LF02-S06-F2	5'-ACH CCH RTT CAT ATT CAA CC-3'
	LF02-S06-R2	5'-GCT GAA ACT AAT CGA ACT C-3'
SF22	LF02-S07-F1	5'-AAC GAG GTA AWG THC CHC G-3'
	LF02-S07-R2	5'-CTG AGT TCA AAC CGG TGT RA-3'
SF23	LF02-S08-F2	5'-GAH TTC TAA AAY CAT TAC-3'
	LF02-S08-R1	5'-GAC TGT ACA AAG GTA GCA TAA T-3'
SF24	LF03-S01-F1	5'-CAT CMA ATC TTT CAT ACA AG-3'
	LF03-S01-R2	5'-GTA TCT TGT GTA TCA GAG-3'
SF25	LF03-S02-F1	5'-ATT ATG CTA CCT TTG TAD AGT C-3'
	LF03-S02-R1	5'-GTA TTT CAT TTA CAT TGA AAA GA-3'
SF26	LF03-S03-F3	5'-CTC TGA TAC ACA AGA TAC-3'
	LF03-S03-R3	5'-CCA GCA GTT GCG GTT AAA C-3'
SF27	LF03-S04-F1	5'-AAT AGG TGA TCT AAT CCT AG-3'
	LF03-S04-R1	5'-CTA TCA GAA TAA TCC TTT WA-3'

PCR 반응 혼합물의 조성과 반응 조건은 실험하고자 하는 분류군마다 서로 다른 조성과 조건을 가지기 때문에 실험을 통해 각 분류군별 적합한 조건으로 PCR을 실행하였다. 표 II-1-3은 Long PCR 반응을 위한 혼합물의 조성과 반응 조건의 예시이다. Long PCR의 중별 Annealing 온도조건은 48℃~51℃에 맞추어 증폭하였다. 표 II-1-4은 Short PCR 반응을 위한 혼합물의 조성과 반응조건의 예시이다. Short PCR의 Annealing 온도조건은 실험 상황에 따라 50~52℃로 설정하여 증폭하였다.

표 II-1-3. 반응 혼합물 조성과 반응 조건 예시 (Long PCR)

PCR Mixture (Reaction vol: 25μℓ)		Cycle program		
Template DNA	1 μℓ	94 °C	4 min	× 1
Primer F (10 pmol/μℓ)	1 μℓ			
Primer R (10 pmol/μℓ)	1 μℓ	98 °C	10 sec	× 30
10X GC Buffer I	12.5 μℓ	48~51℃	15 min	
LATaq	0.25 μℓ	72 °C	10 min	× 1
dNTP	4 μℓ	4 °C	∞	
Dw	5.25 μℓ			
Total	25 μℓ			

표 II-1-4. 반응 혼합물 조성과 반응 조건 예시 (Short PCR)

PCR Mixture (Reaction vol: 25 μ l)		Cycle program		
Template DNA	1 μ l	94 °C	5 min	× 1
Primer F (10 pmol/ μ l)	1 μ l	94 °C	1 min	
Primer R (10 pmol/ μ l)	1 μ l	50~52°C	1 min	× 30
Dw	17 μ l	72 °C	1 min	
		72 °C	7 min	× 1
Total	20 μl	4 °C	∞	

4) PCR 반응 산물의 확인

- PCR 반응 산물을 확인하기 위하여 전기영동으로 확인하고자 하는 DNA 시료의 수와 양에 따라 1.0% agarose gel을 gel casting plate에 붓고 comb을 꽂아 15-20분간 고형화 시킨다.
- Gel running tank에 10X TAE buffer를 gel이 잠기도록 넣은 다음, PCR 반응산물 25 μ l 중에서 5 μ l와 gel loading buffer(x6) 1 μ l를 혼합한 다음 총 6 μ l를 취하여 loading 한다.
- Gel에 DNA 시료를 loading 한 다음 voltage와 current를 조절한 후 100 voltage로 50분 동안 전기영동한다.
- 전기영동이 완료되면 EtBr에 들어 있는 tank에서 5분간 염색한 다음 증류수로 5분간 탈색 후 Ultraviolet transilluminator에 올려놓고 DNA band를 확인한 후 사진 촬영을 하여 결과물의 판독에 사용한다.

5) 염기서열 결정

전기영동을 통하여 PCR 반응 산물을 확인하고, PCR purification kit를 이용하여 정제한다(QUIAGEN Co., USA). 염기서열 결정은 ABI 3700 모델을 이용하여 big-dye termination method로 수행한다.

6) 염기서열 결정

Perkin-Elmer사의 ABI Prism 377 DNA sequencer는 DNA 염기서열 자동분석 장치로서 4 dye-1 lane 방식을 채용한다. 이는 A, G, C, T를 각각 다른 형광색으로 표시하여 1 샘플을 1 lane에서 분석하도록 하는 방법으로서 한번에 36개의 sample 분석이 가능하다. 분석에 이용되는 DNA sequencing kit (Big dye termination sequencing kit)은 Perkin-Elmer사에서 제공하는 시료중 가장 version이 높은 시료로서 샘플 조작에 소요되는 시간을 단축시키며 보다 정확한

결과를 제공한다. ABI Prism DNA sequencer는 시료를 gel running 시키는 본체와 결과를 분석하는 컴퓨터가 연결되어 있다. Gel running 시 DNA fragment가 본체의 read region에 이르면 argon laser beam이 DNA에 표지된 형광색소를 활성화시키게 된다. 이를 빛의 강도에 따라 CCD camera가 선택적으로 인지하여 software에 집결시키면 컴퓨터 화면상에 gel file로 나타난다. Data 집결이 끝난 후 gel file을 analysis software가 자동으로 분석, 번역하여 염기서열화한다. 결과적으로 하나의 lane에서 550-700 base pair의 염기서열을 확인할 수 있다.

7) 미토콘드리아 유전체 특성 규명을 위한 분석

Sequencing이 완료된 연구대상종의 미토콘드리아 염기서열은 Blast search를 통하여 NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 데이터와 비교하여 염기서열의 identity를 대략 확인한다. 또한 유사도가 가장 높은 염기서열 또는 근연종의 염기서열 데이터를 이용하여 실험종과의 유사도를 계산하여 분자적 차이를 분석한다. 특히 BioEdit 7.0.9 (Hall, 1999) alignment program을 이용하여 이들 사이의 A+T 또는 G+C contents와 genetic distance matrix를 부수적으로 분석할 수 있다. 또한 MEGA 4.0 (Kumar et al., 2008) program에서 각 분석대상종간 유전적 거리를 p-distance, Kimura-2-parameter, Tamura-Nei, Tajima-Nei, Jukes-Cantor 등의 다양한 모델로 분석이 가능하다.

전체 미토콘드리아 유전체의 각 유전자의 위치가 확립이 완료되면 유전자의 특성별로 나누어 분석에 이용한다. 특히 ribosomal RNA의 경우에는 이차구조로 모델링이 가능한 영역으로서 특정 변이영역은 RNAdraw (Matzura and Weenborg, 1996), RNAfold (Vienna package server: Hofacker et al., 1994), RNAstructure 4.6 (Mathews, 2004) 등의 프로그램을 이용하여 가상의 이차구조를 찾아 그룹별 또는 분류군별로 특이적으로 만들어지는 이차구조를 제시할 수 있으며 계통수 설정에도 이용가능하다. rRNA의 경우에는 단백질 암호화 영역과 함께 계통분석에 많이 이용된다. 먼저, alignment 프로그램인 Clustal X program (Thompson et al., 1997)을 사용하여 alignment를 수행한 후 Gblocks 0.73b program을 이용하여 재정렬(realignment)을 수행한다. 계통분석을 시행하는 경우, 각 유전자의 부위마다 다른 진화의 양상을 가지므로 계통학적 의미가 있는 유전자 부위를 다시 선택하는 과정을 수행한다. 재정렬된 alignment data matrix는 이후 분자진화학적인 분석에 필요한 data의 형태인 nexus 형태의 data format으로 전환하여 PAUP* 4.0b10, MEGA v4.0, MrBayes v3.1.2.,

PHYML v2.4.4 프로그램을 사용하여 Maximum parsimony, Neighbor Joining, Maximum likelihood, Bayesian Inference 등의 분석 알고리즘을 이용하여 계통수를 작성한다. 분석이 완료된 이후에는 분석결과를 바탕으로 하여 각 종 간의 계통유연관계를 밝히는 분자계통도를 작성하고, 분자계통도의 확인은 Tree-View 프로그램을 이용한다.

다. 결과 및 고찰

멸종위기종 9종에 대한 주요 동물자원의 미토콘드리아 유전체 염기서열을 결정하고 그 특성을 규명하는 것을 목표로 하였다. 조류 2종, 곤충 4종, 연체동물 3종을 포함하여 총 9종에 대한 전체 미토콘드리아 유전체 염기서열 분석을 완료하여 총 147,049bp의 미토콘드리아 유전체 염기서열을 확보하였다(표 II-1-5).

표 II-1-5. 소기관 유전체 분석 결과

분석대상종	학 명	염기서열
긴점박이올빼미	<i>Strix uralensis</i>	16,636bp
잣빛개구리매	<i>Circus cyaneus</i>	20,173bp
큰자색호랑꽃무지	<i>Osmoderma opicum</i>	15,341bp
큰홍띠점박이푸른부전나비	<i>Shijimiaeoidea divina</i>	15,259bp
물장군	<i>Lethocerus deyrollei</i>	19,295bp
대모잠자리	<i>Libellula angelina</i>	15,233bp
기수갈고동	<i>Clithon retropictus</i>	15,803bp
나팔고동	<i>Charonia sauliae</i>	15,330bp
참달팽이	<i>Koreanohadra koreana</i>	13,979bp

1) 긴점박이올빼미 *Strix uralensis*

가) 연구대상종의 특성



- 국명: 긴점박이올빼미
- 영명: Ural owl
- 학명: *Strix uralensis*
- 지정번호: 멸종위기II급
- 계통: 올빼미목, 올빼미과

그림 II-1-1. 긴점박이올빼미

[출처: Wikipedia https://en.wikipedia.org/wiki/Ural_owl]

■ 생김새: 몸길이 61cm이다. 수컷과 암컷을 뚜렷하게 구별할 수 있는 특징은 없다. 머리는 둥근 편이고, 수리부엉이에 있는 귀깃은 없다. 눈은 검은색이고, 부리는 노란색이다. 몸 전체에 어두운 갈색의 넓은 세로줄 무늬가 있고, 가슴의 바탕색은 흰색이다. 암컷과 수컷의 이마, 머리꼭대기, 뒷머리, 뒷목은 크림색 또는 옅은 황갈색으로 각 깃털에는 검은 갈색의 폭 넓은 세로 얼룩무늬가 있고 군데군데의 깃털 끝에는 흰색의 얼룩무늬가 있다. 안반과 턱밑은 크림색, 흰색이며 각 깃털에는 검은색의 우축이 있다. 안반 주위는 크림색 또는 옅은 황갈색으로 검은색과 흰색의 얼룩점으로 된 선이 둘러싸다. 멱 중앙은 흰색으로 검은색의 축반이 있다.

■ 서식지: 고산지대의 침엽수림, 낙엽 활엽수림

■ 생활양식: 야행성으로 밤에 활동하지만 낮에 활동하는 경우도 있으며, 고목나루 구멍 등에 동자를 짓는데, 때로는 나무 밑의 땅 위, 농가의 창고, 벼랑의 구멍 등에 번식한다. 한배의 산란 수는 2~4개이다.

■ 먹이: 설치류(쥐), 식충류(딱쥐, 뒤쥐), 작은 조류, 곤충류, 등

■ 분포: 한국, 러시아, 중국, 일본

[출처: 두산백과 doopedia]

표 II-1-6. 긴점박이올빼미 (*Strix uralensis*)의 전체 미토콘드리아 유전체 구성

Gene	Strand	Position	Length	Start codon	Stop codon	Intergenic sequences
<i>trnF</i>	+	1-70	70			0
<i>12S rRNA</i>	+	71-1045	975			0
<i>trnV</i>	+	1046-1117	72			0
<i>16S rRNA</i>	+	1118-2697	1580			0
<i>trnL1</i>	+	2698-2773	76			0
<i>ND1</i>	+	2788-3747	960	ATG	AGG	14
<i>trnI</i>	+	3746-3817	72			-2
<i>trnQ</i>	-	3829-3899	71			11
<i>trnM</i>	+	3899-3967	69			-1
<i>ND2</i>	+	3968-5008	1041	ATG	TAG	0
<i>trnW</i>	+	5008-5081	74			-2
<i>trnA</i>	-	5083-5151	69			1
<i>trnN</i>	-	5153-5226	74			1
<i>trnC</i>	-	5227-5294	68			0
<i>trnY</i>	-	5295-5366	72			0
<i>COX1</i>	+	5368-6918	1551	ATG	AGG	1
<i>trnS1</i>	-	6910-6984	75			-9
<i>trnD</i>	+	6985-7053	69			0
<i>COX2</i>	+	7057-7740	684	ATG	TAA	3
<i>trnK</i>	+	7750-7819	70			9
<i>ATP8</i>	+	7821-7988	168	ATG	TAA	1
<i>ATP6</i>	+	7979-8662	684	ATG	TAA	-10
<i>COX3</i>	+	8662-9442	781	ATG	T	-1
<i>trnG</i>	+	9445-9515	71			2
<i>ND3</i>	+	9515-9866	352	ATA	TAA	-1
<i>trnR</i>	+	9869-9937	69			2
<i>ND4L</i>	+	9939-10235	297	ATG	TAA	1
<i>ND4</i>	+	10229-11606	1378	ATG	T	9
<i>trnH</i>	+	11607-11676	70			0
<i>trnS2</i>	+	11679-11744	66			2
<i>trnL2</i>	+	11747-11817	71			2
<i>ND5</i>	+	11818-13638	1821	TTG	TAA	0
<i>CytB</i>	+	13635-14786	1152	ATA	TAA	-4
<i>trnT</i>	+	14788-14856	69			1
CR		14857-16636	1780			0

2) 잿빛개구리매 *Circus cyaneus*

가) 연구대상종의 특성



- 국명: 잿빛개구리매
- 영명: Hen harrier
- 학명: *Circus cyaneus*
- 지정번호: 멸종위기II급, 천연기념물323-6호
- 계통: 수리목, 수리과

그림 II-1-3. 잿빛개구리매

[출처: <http://www.1000birds.com/latest20071007NH.htm>]

■ 생김새: 날개길이 33~40cm, 꼬리길이 22~28cm, 부리길이 1.5~2cm이다. 수컷은 이마에서 허리까지 밝은 잿빛이고 몸 아래면은 흰색이다. 날개의 끝은 검은색이고 허리의 윗꼬리덮깃은 강한 흰색인 것이 특징이다. 암컷의 어깨와 등, 날개는 다소 갈색을 띠며, 다른 개구리매류에 비해 강한 눈썹선을 가지고 있다. 갈색의 꼬리깃에는 3~5개 정도의 암갈색 띠가 있다. 홍채는 노란색이고 아성조는 갈색이다. 유사종으로는 알락개구리매가 있는데, 9번째 첫째날개깃이 6번째보다 더 길다. 알락개구리매 수컷의 경우 날개 끝의 검정색 무늬가 훨씬 더 짙고 크다. 알락개구리매 아성조의 경우 흐린 허리색과 짙은 몸 아래색을 가진다.

■ 서식지: 풀이 우거진 습지, 낮은 산이나 낮은 언덕, 하천 부근의 풀밭, 농경지 등에서 생활하는 겨울철새이다.

■ 먹이: 참새류 · 오리류 · 설치류 등

■ 번식: 4~5월에 한배에 4~5개의 알을 낳는다. 둥지는 습지나 작은 물웅덩이의 땅 위에 물풀이나 작은 나뭇가지를 쌓아 올려 접시 모양으로 만든다.

■ 분포: 시베리아 · 아무르 · 몽골 · 중국(북동부) · 유럽 등지에 분포하고, 한국 · 일본 · 동남아시아 등지에서 겨울을 난다. 한국 전역에서 볼 수 있는 겨울새이다.

[출처: 천연기념물(야생동물)의 구조, 치료 및 관리 안내서]

나) 연구결과 및 고찰

■ 잣빛개구리매 미토콘드리아 유전체의 염기서열 결정과 annotation

잣빛개구리매의 전체 미토콘드리아 유전체는 총 20,173bp로 이루어져 있으며, 13개 단백질 암호화 유전자(*COX1-3*, *ND1-6*, *ND4L*, *CYTB*, *ATP6*, *ATP8*)와 2개의 ribosomal RNA 유전자(*16S rRNA*, *12S rRNA*), 22개의 transfer RNA 유전자로 구성되어 있다(그림 II-1-4, 표 II-1-7). 잣빛개구리매의 미토콘드리아 유전자 배열양상은 멧금류의 양상과 동일하나, 전형적인 조류의 미토콘드리아 유전자 배열양상과 비교하면, control region (CR)의 위치가 상이하다. 잣빛개구리매의 CR은 *trnT*와 *trnP* 사이에 위치하며, pseudo control region (Ψ -CR)이 *trnE*와 *trnF* 사이에 위치하는 점은 원시 조류의 미토콘드리아 유전자 배열양상과 다른 점이라 할 수 있다.

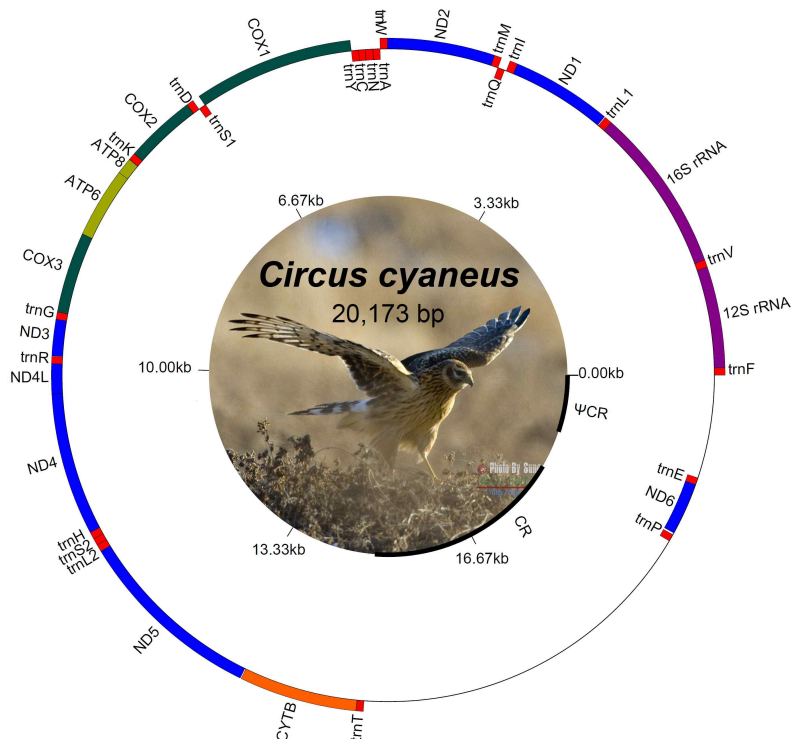


그림 II-1-4. 잣빛개구리매(*Circus cyaneus*)의 전체 미토콘드리아 유전체

표 II-1-7. 잿빛개구리매(*Circus cyaneus*)의 전체 미토콘드리아 유전체 구성

Gene	Strand	Position	Length	Start codon	Stop codon	Intergenic sequences
<i>trnF</i>	+	1-71	71			0
<i>12S rRNA</i>	+	72-1049	978			0
<i>trnV</i>	+	1050-1121	72			0
<i>16S rRNA</i>	+	1122-2721	1600			0
<i>trnL1</i>	+	2722-2795	74			0
<i>ND1</i>	+	2805-3780	978	ATG	TAA	9
<i>trnI</i>	+	3780-3854	75			-3
<i>trnQ</i>	-	3873-3943	71			18
<i>trnM</i>	+	3942-4012	71			-2
<i>ND2</i>	+	4012-5052	1041	ATG	TAG	-1
<i>trnW</i>	+	5051-5122	72			-2
<i>trnA</i>	-	5123-5193	71			0
<i>trnN</i>	-	5195-5267	73			1
<i>trnC</i>	-	5270-5336	67			2
<i>trnY</i>	-	5336-5406	71			-1
<i>COX1</i>	+	5408-6958	1551	GTG	AGG	1
<i>trnS1</i>	-	6950-7023	74			-9
<i>trnD</i>	+	7029-7097	69			5
<i>COX2</i>	+	7100-7783	684	ATG	TAA	2
<i>trnK</i>	+	7785-7854	70			1
<i>ATP8</i>	+	7857-8024	168	ATG	TAA	2
<i>ATP6</i>	+	8015-8698	684	ATG	TAA	-10
<i>COX3</i>	+	8698-9481	784	ATG	T	-1
<i>trnG</i>	+	9481-9551	71			-1
<i>ND3</i>	+	9551-9902	352	ATC	TAA	-1
<i>trnR</i>	+	9907-9975	69			4
<i>ND4L</i>	+	9977-10273	297	ATG	TAA	1
<i>ND4</i>	+	10267-11644	1378	ATG	T	-7
<i>trnH</i>	+	11645-11714	70			0
<i>trnS2</i>	+	11715-11780	66			0
<i>trnL2</i>	+	11781-11851	71			0
<i>ND5</i>	+	11852-13669	1818	ATG	TAA	0
<i>CytB</i>	+	13679-14821	1143	ATG	TAA	9
<i>trnT</i>	+	14824-14892	69			2
CR		14893-18463	3571			0
<i>trnP</i>	-	18464-18535	72			0
<i>ND6</i>	-	18554-19075	522	ATA	TAG	18
<i>trnE</i>	-	19076-19146	71			0
ΨCR		19147-20173	1027			0

젓빛개구리매의 전체 미토콘드리아 유전체를 구성하고 있는 총 37개의 유전자와 비암호화 유전자 (CR, Ψ CR)에 대한 유전체 내에서의 위치와 염기서열의 길이, 단백질 암호화 유전자의 경우 아미노산 서열의 개수, 개시코돈 및 종결코돈 등을 분석하였다. 그 결과, 젓빛개구리매의 13개 단백질 암호화 유전자의 총 길이는 11,400bp이며 젓빛개구리매 전체 미토콘드리아 유전체의 56.51%를 차지한다. 전체 유전체의 A+T contents는 56.90%이며, 단백질 암호화 부분의 A+T 구성비는 53.70%이다(표 II-1-8). 유전자 그룹별로 살펴봤을 때 CR과 Ψ CR 영역의 염기서열이 다소 AT에 치우쳐진 염기구성비를 보이고 있으나(각각 66.80, 67.10%), 이를 제외한 젓빛개구리매 미토콘드리아 유전자는 48.60~56.90% 범위의 A+T contents 결과를 보여주었다. 13개의 단백질 암호화 유전자 가운데 ND6를 제외한 나머지 12개의 유전자는 모두 H-strand에 위치하고 있었다.

대부분의 단백질 암호화 유전자의 개시코돈(start codon)은 ATG이지만, COX1의 경우 GTG (Val), ND3는 ATC (Ile), ND6는 ATA (Met)를 개시코돈으로 이용하였다. 이런 예외적인 개시코돈은 후생동물(Metazoa)에서 빈번히 사용되는 코돈이다. 종결코돈(Stop codon)은 대체로 TAA와 TAG를 사용하지만, 척추동물에서는 다른 동물그룹과 달리 AGG를 종결코돈으로 사용하는데 젓빛개구리매의 COX1 유전자에서 AGG 종결코돈을 확인하였다. 그밖에 COX3와 ND4 유전자의 경우 T와 같이 불완전한 종결코돈을 사용하였는데, 이 또한 후생동물에서 흔히 발생하는 현상으로, 생체 내에서는 전사후 번역과정에서 완전한 종결코돈으로 합성되는 것으로 알려져 있다.

표 II-1-8. 젓빛개구리매(*Circus cyaneus*)의 전체 미토콘드리아 유전체 염기구성 비율

Feature	A	T	G	C	A+T%	C+G%	AT-ske w	GC-sk ew
Whole mitogenome	0.322	0.247	0.126	0.305	56.90	43.10	0.132	-0.415
PCGs	0.292	0.245	0.132	0.331	53.70	46.30	0.088	-0.430
1 st codon position	0.286	0.200	0.217	0.294	48.60	51.10	0.177	-0.151
2 nd codon position	0.182	0.400	0.126	0.292	58.20	41.80	-0.375	-0.397
3 rd codon position	0.408	0.130	0.053	0.406	53.80	45.90	0.517	-0.769
tRNA genes	0.326	0.241	0.171	0.262	56.70	43.30	0.150	-0.210
lsRNA	0.344	0.209	0.184	0.263	55.30	44.70	0.244	-0.177
srRNA	0.307	0.204	0.199	0.290	51.10	48.90	0.202	-0.186
CR	0.335	0.333	0.109	0.223	66.80	33.20	0.003	-0.343
Ψ CR	0.465	0.206	0.053	0.277	67.10	33.00	0.386	-0.679

■ 수리목(Accipitriformes) 미토콘드리아 *ND3* 유전자의 extra base sites

잣빛개구리매의 단백질 암호화 유전자 중에서 *ND3*의 경우 염기서열의 frameshift 현상으로 발생한 extra base site가 존재한다. 이러한 extra base로 인해 1차원적 염기서열 분석에서 *ND3*를 아미노산으로 번역했을 때 유전자 중간에 종결코돈이 생기는 예리가 발생한다. *ND3* 유전자의 frameshift 현상은 많은 조류에서 빈번히 확인되는 현상이다. 잣빛개구리매가 속하는 수리목에서 현재까지 보고된 전체 미토콘드리아 유전체 정보를 바탕으로 *ND3*의 frameshift가 발생하는 염기서열 부분을 정렬했을 때 염기 시토신(C)가 extra base로 삽입되어 있는 것을 확인할 수 있었다(그림 II-1-5). 하지만 모든 수리목에서 extra base가 확인되지 않았으며, 이는 비특이적으로 발생하는 현상으로 해석되고, 진화학적 특성으로 설명되지는 않는 것으로 보인다.

	167		extra base insertion site		202
<i>Accipiter gentilis</i>	CGATTCTTTC	T	CGTAGCTA	TCCATATCTT	ACTATTGAC
<i>Accipiter nisus</i>C.	CAC.	GTC..
<i>Accipiter soloensis</i>C.C..
<i>Accipiter virgatus</i>T	C.C.C..
<i>Aegypius monachus</i>C.	CAC.C..
<i>Aquila fasciata</i>C.	CAC.C..
<i>Aquila chrysaetos</i>C.	AC.GC..
<i>Buteo buteo</i>C.	TC.CC.T
<i>Buteo buteo burmanicus</i>C.	TC.CC.T
<i>Buteo lagopus</i>C.	TC.CC.T
<i>Circus cyaneus</i>T.C.	CAC.T.CC..
<i>Nisaetus alboniger</i>C.	TC.T.CC..
<i>Nisaetus nipalensis</i>C.	AC.T.CC..
<i>Spilornis cheela</i>C.	AC.T.CC..
<i>Spizaetus nipalensis</i>C.	AC.T.CC..
<i>Spizaetus alboniger</i>C.	TC.T.CC..
<i>Cathartes aura</i>C.	CAACG
<i>Pandion haliaetus</i>C.	CC.CC..
<i>Sagittarius serpentarius</i>C.	CC.T.CT

그림 II-1-5. 19종의 Accipitriformes 미토콘드리아 *ND3* 유전자에서 확인된 extra base

■ 잿빛개구리매 미토콘드리아 유전체의 Codon Usage

잿빛개구리매의 단백질 암호화 유전자를 구성하는 코돈의 사용빈도를 분석해 보면 주로 AT rich 코돈을 선호하는 것을 볼 수 있다. 특히 AUC (Ile) - 204, UUC (Phe) - 151, CUA (Leu) - 365 유전자는 대표적인 AT rich 코돈으로 잿빛개구리매에서도 코돈 선호 경향성이 매우 높게 나타났다(표 II-1-9). 이는 후생동물 미토콘드리아 유전체에서 일반적으로 선호하는 경향성과 유사하다.

표 II-1-9. 잿빛개구리매의 13개 미토콘드리아 단백질 암호화 영역의 codon usage

Amino acids	Codons	No.	RSCU	Amino acids	Codons	No.	RSCU	Amino acids	Codon	No.	RSCU		
Nonpolar													
Ala	GCU	50	0.67	Pro	CCU	23	0.49	Leu	UUA*	61	0.53		
	GCC	146	1.97		CCC	79	1.39		UUG	20	0.17		
	GCA*	90	1.21		CCA*	116	2.04		CUU	53	0.46		
	GCG	11	0.15		CCG	5	0.09		CUC	166	1.45		
Ile	AUU	79	0.56	Val	GUU	27	0.68	Met	CUA*	365	3.19		
	AUC*	204	1.44		GUC	41	1.04		CUG	21	0.18		
Trp	UGA*	96	1.79	GUA*	70	1.77	Met	AUA	147	1.64			
	UGG	11	0.21		GUG	32		0.36	AUG*	32	0.36		
Phe	UUU	59	0.56										
	UUC*	151	1.44										
Polar													
Asn	AAU	16	0.26	Gly	GGU	18	0.33	Ser	AGU	9	0.19		
	AAC*	106	1.74		GGC	74	1.38		AGC*	48	1.02		
Cys	UGU	4	0.27	Thr	GGA*	88	1.64	UCU	28	0.6			
	UGC*	26	1.73		GGG	35	0.65		UCC	105	2.23		
Tyr	UAU	32	0.6		ACU	65	0.72	UCA*	88	1.87			
	UAC*	75	1.4		ACC	149	1.65		UCG	4	0.09		
Gln	CAA*	88	1.81		ACA*	141	1.56						
	CAG	9	0.19		ACG	6	0.07						
Acidic													
Asp	GAU	14	0.43	Glu	GAA*	78	1.73						
	GAC*	51	1.57		GAG	12	0.27						
Basic													
Arg	CGU	3	0.17	His	CAU	22	0.37	Lys	AAA	76	1.83		
	CGC	23	1.33		CAC	97	1.63		AAG	7	0.17		
	CGA	39	2.26										
	CGG	4	0.23										
Stop codon													
		UAA	7	2.55									
		UAG	2	0.73									
		AGA	0	0									
		AGG	2	0.73									

Codons for which a tRNA with matching anticodons occurs in mitochondrial are marked with asterisk(*)

■ 잿빛개구리매 미토콘드리아 유전체의 Control region 구조

젯빛개구리매의 control region (CR)은 다른 조류와 유사하게 *trnT*와 *trnP* 유전자 사이에 위치하며 전체 3,571 bp의 길이를 가진다. CR 영역은 크게 세 영역으로 구분되며(Domain I, Central Conserved Domain II, Domain III), 특히 Domain II에는 일반적으로 6개의 conserved sequence boxes가 존재하는 것으로 알려져 있으나 본 연구의 젯빛개구리매 미토콘드리아 유전체에서는 B-box를 제외한 5개의 conserved boxes를 확인했으며 해당 염기서열은 그림 II-1-6에 표기한 바와 같다. B-box의 경우 수리목에 속하는 근연종의 control region과 비교했을 때 모든 종에서 쉽게 확인되는 서열은 아니며 다른 conserved sequence box에 비해 변이가 있는 것으로 보인다.

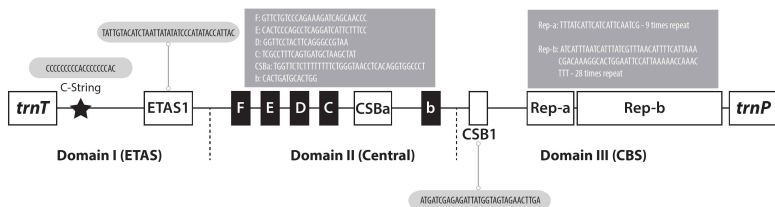


그림 II-1-6. 잿빛개구리매 미토콘드리아 유전체의 control region 구조

젯빛개구리매의 control region (CR) 영역의 특징은 2개의 패턴(Rep-a, Rep-b)으로 나누어지는 repeat region이 존재하는 점이다. Domain III에는 2개의 tandem repeat 서열이 확인되는데 Rep-a의 경우 22bp의 염기서열이 9번 반복되며, 이후 따라오는 불완전 반복서열(incomplete repeat unit) 뒤로 75bp의 염기서열이 28번 반복되는 Rep-b가 이어진다.

젯빛개구리메에서는 *trnE*와 *trnF* 유전자 사이에 Ψ CR 영역이 존재하며 전체 길이가 1,027bp이다. Ψ CR 영역에는 CR과 마찬가지로 46bp 가량의 염기서열이 명확하게 17번 반복하는 repeat 구간이 존재한다. 젯빛개구리메의 CR의 구조적 특징과 Ψ CR을 포함한 비암호화 영역에서 확인한 tandem repeat sequence는 향후 개체 식별이나 종 감별을 위한 마커로 활용할 수 있는 유용한 정보로 가치가 클 것으로 예상된다.

3) 큰자색호랑꽃무지 *Osmoderma opicum*

가) 연구대상종의 특성



- 국명: 큰자색호랑꽃무지
- 학명: *Osmoderma opicum*
- 지정번호: 멸종위기II급
- 계통: 딱정벌레목, 꽃무지과

그림 II-1-7. 큰자색호랑꽃무지

[출처: http://www.flower-beetles.com/foto/osmoderma_opicum.jpg]

■ 생김새: 몸길이 약 31mm이다. 울퉁불퉁한 딱지날개에 강한 구릿빛 광택이 돈다. 몸 빛깔은 검은빛이나 붉은빛이 감도는 갈색으로 보랏빛 또는 구릿빛 광택이 난다. 머리는 납작하며 머리방패는 약간 위로 젖혀졌고 양 옆에 세로로 솟아오른 줄이 있다. 이 줄은 수컷에서는 더듬이(촉각)구멍 근처에서 뿔같이 튀어나와 있으며 점무늬가 촘촘히 있다. 더듬이와 겹눈은 검은빛을 띤 갈색이다. 수컷의 앞가슴등판은 암컷보다 넓고 가운데에 세로로 솟아오른 2개의 줄이 뚜렷하게 있다. 앞가슴등판 중앙부는 우묵하고 전체적으로 점무늬가 촘촘히 있다. 작은방패판은 세모꼴이고 점무늬가 있다. 딱지날개(굳은날개)는 앞가슴등판보다 훨씬 넓은 특징이 있다. 딱지날개에는 작은 점무늬가 있고 중앙부와 양쪽은 울퉁불퉁하다. 몸의 배면은 검은빛을 띤 자줏빛이고 노란색의 짧은 털이 드물게 있다. 각 다리의 종아리마디 바깥쪽에 3개씩의 가시돌기가 있다.

■ 서식지: 7~8월 삼림이 울창한 산악 지역에 있는 단풍나무 등 고목의 구멍 속

■ 먹이: 꽃가루, 과실의 수액

■ 생활양식: 위협을 감지하면 사향 냄새를 풍김

■ 분포: 한국, 일본

[출처: 두산백과 doopedia]

나) 연구결과 및 고찰

■ 큰자색호랑꽃무지 미토콘드리아 유전체의 염기서열 결정과 annotation

큰자색호랑꽃무지 미토콘드리아 유전체 분석결과 그 크기는 15,341 bp로 일반적인 곤충의 미토콘드리아 유전체의 유전자 구성(13개 단백질 유전자, 2개의 rRNA 유전자, 22개의 tRNA 유전자, 1개의 non-coding region)을 보유하고 있음을 확인하였으며, 유전자 배열은 곤충에서 가장 빈번히 발견되는 배열임을 확인하였다(표 II-1-10). COI 유전자를 제외한 12개의 단백질 코딩 유전자는 전형적인 ATN 전사개시 코돈을 갖는 것을 확인하였다. 기존 딱정벌레목에서 COI 유전자의 개시 코돈은 AAA (lysine), ATT (isoleucine), CTA (leucine) 및 ATC (isoleucine) 등 다양하게 제시된 바 있어 전형적인 개시 코돈을 나타내지 않았다. 이후 2008년 보고된 논문에서 해당 영역을 정렬 후 검토한 결과, polyphaga 분류군에서는 모두 AAT (lysine), AAC (lysine)가 보전적으로 위치함을 확인하여 두 코돈을 COI 유전자의 개시 코돈으로 제시하였다(Sheffield et al., 2008). 이러한 기존 연구결과에 따라 큰자색호랑꽃무지의 COI 유전자의 개시코돈은 AAC (lysine)로 정리하였다. 큰자색호랑꽃무지를 포함한 꽃무지과(Cetoniidae)의 곤충에 대한 특성을 분석한 결과, 큰자색호랑꽃무지는 꽃무지과내의 다른 곤충들과 달리 761 bp의 가장 작은 A+T-rich region을 보유하고 있음을 확인하였다(표 II-1-11). 큰자색호랑꽃무지의 A+T-rich region의 크기가 매우 작은 크기였으나 A+T 함량은 다른 곤충과 비슷하였으며, 단백질 유전자의 codon 수, rRNA 및 tRNA 크기 등은 알려진 꽃무지과 곤충의 범주에 속하였다.

표 II-1-10. 큰자색호랑꽃무지 미토콘드리아 유전체 유전자의 길이 및 위치

Gene	Direction	Nucleotide number	Size (bp)	Anticodon	Codon	
					Start	Stop
<i>trnI</i>	F	1-64	64	GAT (31-33)		
<i>trnQ</i>	R	67-135	69	TTG (99-101)		
<i>trnM</i>	F	135-202	67	CAT (165-167)		
<i>ND2</i>	F	203-1217	1014		ATA	TAA
<i>trnW</i>	F	1219-1284	66	TCA (1250-1252)		
<i>trnC</i>	R	1277-1337	61	GCA (1301-1303)		
<i>trnY</i>	R	1339-1401	65	GTA (1376-1378)		
<i>COI</i>	F	1403-2938	1536		AAC	TAA
<i>trnL2</i>	F	2934-2998	65	TAA (2963-2965)		
<i>COII</i>	F	2999-3686	688		ATT	T-tRNA
<i>trnK</i>	F	3757-3819	71	CTT (3788-3790)		
<i>trnD</i>	F	3819-3819	63	GTC (3850-3852)		
<i>ATP8</i>	F	3820-3975	156		ATT	TAA
<i>ATP6</i>	F	3972-4640	669		ATA	TAA
<i>COIII</i>	F	4640-5423	784		ATA	T-tRNA
<i>trnG</i>	F	5424-5487	64	TCC (5456-5458)		
<i>ND3</i>	F	5488-5341	354		ATA	TAG
<i>trnA</i>	F	5840-5904	65	TGC (5869-5871)		
<i>trnR</i>	F	5904-5967	64	TCG (5935-5937)		
<i>trnN</i>	F	5967-6031	65	GTT (5994-5996)		
<i>trnS1</i>	F	6032-6098	67	TCT (6065-6067)		
<i>trnE</i>	F	6099-6162	64	TTC (6130-6132)		
<i>trnF</i>	R	6161-6224	64	GAA (6194-6197)		
<i>ND5</i>	R	6225-7941	1717		ATT	T-tRNA
<i>trnH</i>	R	7942-8005	64	GTG (7931-7933)		
<i>ND4</i>	R	8006-9341	1336		ATG	T-tRNA
<i>ND4L</i>	R	9335-9622	288		ATG	TAA
<i>trnT</i>	F	9625-9689	65	TGT (9635-9637)		
<i>trnP</i>	R	9690-9754	65	TGG (9723-9725)		
<i>ND6</i>	F	9760-10257	498		ATG	TAA
<i>CytB</i>	F	10257-11399	1143		ATG	TAG
<i>trnS2</i>	F	11398-11462	65	TGA (11428-11430)		
<i>ND1</i>	R	11481-12431	951		ATA	TAG
<i>trnL1</i>	R	12432-12495	64	TAG (12462-12464)		
<i>lrRNA</i>	R	12496-13763	1268			
<i>trnV</i>	R	13764-13832	69	TAC (13802-13800)		
<i>srRNA</i>	R	13833-14579	747			
A+T-rich region	R	14580-15341	761			

Direction of the genes is presented as F for forward and R for reverse direction.

tRNA abbreviations follow the IUPAC-IUB three-letter code.

표 II-1-11. 꽃무지과 곤충 완전 미토콘드리아 유전체의 특성

Taxon	Size (bp)	A/T content (%)	PCG ^b		<i>srRNA</i> ^c		<i>lrRNA</i> ^d		tRNA ^e		A+T-rich		GenBank accession no.	References
			No. codons ^a	AT%	Size (bp)	AT%	Size (bp)	AT%	Size (bp)	AT%	Size (bp)	AT%		
Polyphaga														
Scarabaeiformia														
Scarabaeoidea														
Scarabaeidae														
Cetoniinae														
<i>Osmoderma opicum</i>	15,341	66.9	3,711	65.6	747	69.2	1,268	71.4	1,438	70.1	761	75.8		This study
<i>Protaetia brevitarsis</i>	20,319	74.5	3,702	73.4	785	76.4	1,238	77.9	1,457	75.5	5,654	75.3	KJ830749	Kim et al. (2014)
Melolonthinae														
<i>Polyphylla laticollis</i>	14,473	69.8	3,704	68.7	589	70.2	1,286	75.5	1,443	71.8	-	-	KF544959	Kim et al. (2013)
<i>Cheirotonus jansoni</i>	17,249	65.7	3,701	64.0	777	68.1	1,294	72.7	1,446	71.4	2,590	65.1	KC428100	Shao et al. (2014)
<i>Rhopaea magnicornis</i>	17,522	75.6	3,703	68.8	800	75.6	1,279	78.7	1,444	76.1	2,827	78.3	FJ859903	Cameron et al. (2009)

4) 큰홍띠점박이푸른부전나비 *Shijimiaeoides divina* (Fixsen, 1887)

가) 연구대상종의 특성



- 국명: 큰홍띠점박이푸른부전나비
- 학명: *Shijimiaeoides divina*
- 지정번호: 멸종위기II급
- 계통: 나비목 (Lepidoptera)
부전나비과 (Lycaenidae)

그림 II-1-8. 큰홍띠점박이푸른부전나비

[출처: 네이버지식백과 <http://terms.naver.com/entry.nhn?docId=2327083&cid=46683&categoryId=46691>]

■ 생김새: 활짝 편 날개의 길이는 32~38mm이다. 날개 표면은 윤기가 나는 푸른 남색이다. 앞날개의 바깥가장자리는 검은색이다. 수컷은 앞날개 윗면 외연부에 검은색 테가 좁은 데 비해 암컷은 넓고 앞, 뒷날개 윗면에 검은색 점이 여러 개가 흩어져 있다. 그리고 암컷은 앞날개 바깥가장자리가 넓다. 날개 뒷면은 푸른 잿빛이 나는 흰색이다. 알은 높이 0.3mm, 폭 0.6mm정도이고, 처음에 연한 파란색에서 점차 잿빛 흰색으로 변한다. 애벌레의 몸길이는 17mm정도이고 짙은 모양이며 앞뒤 끝은 둥글다. 몸체는 연한 녹색이나 등선은 어두운 녹색이다. 번데기는 어두운 갈색이고 길이는 13~14mm이다.

■ 서식지: 낮은 산지의 초원

■ 먹이: 도둑놈의지팡이, 엉겅퀴꽃 등

■ 생활양식: 한 해에 한 번 5~6월 하순에 나타나 양지바른 산지의 풀밭이나 하천의 제방둑 주변을 날아다닌다. 먹이식물의 꽃잎이나 새싹에 1개씩의 알을 낳는다.

■ 분포: 한국(충청북도 및 강원도의 극히 제한된 지역에 분포), 일본

[출처: 두산백과 doopedia]

나) 연구결과 및 고찰

■ 큰홍띠점박이푸른부전나비 미토콘드리아 유전체의 염기서열 결정과 annotation

큰홍띠점박이푸른부전나비의 염기서열 분석결과 총 15,259 bp로 일반적인 유전자 구성(13개의 단백질 유전자, 2개의 rRNA 유전자, 22개의 tRNA 유전자, 1개의 non-coding region)을 보유하고 있음이 확인되었다. 곤충에서 가장 빈번하게 발견되는 유전자 배열과 달리 나비목에서 특이적으로 발견되는 배열로 *trnI*, *trnQ* 및 *trnM*의 순서 대신 *trnM*, *trnI* 및 *trnQ*의 배열을 갖고 있었다(표 II-1-12). 전체 13개의 단백질 유전자 중 12개의 단백질 유전자는 전형적인 ATN start codon을 찾을 수 있었고, *COI* 유전자에서는 다른 부전나비과 곤충과 동일한 CGA start codon을 확인하였다(그림 II-1-9).

큰홍띠점박이푸른부전나비를 포함하여 부전나비과에 속한 곤충에 대한 유전체 특성을 분석한 결과, 부전나비과에 속한 다른 곤충에서처럼 높은 A+T 함량을 확인할 수 있었다(표 II-1-13). 또한 큰홍띠점박이푸른부전나비 미토콘드리아 유전체에서 A+T-rich region내에서 1개의 tRNA-like structure가 존재하였다. 이는 AAA anticodon을 가지고 있는 *trnK*를 명시하는 구조를 가지고 있었지만, A/T nucleotide로만 이루어져 있음을 확인하였다(그림 II-1-10).

이러한 유사 tRNA가 A+T-rich region에 존재할 수 있는 것은 아마 primer로 작동 후 cleave 되지 않고 남아있는 가운데 non-coding A+T-rich region의 진화율을 따라 정규 tRNA와 많이 분화된 형태로 남아있는 것으로 추정된다.

본 연구 결과는 해외 SCI급 저널인 Mitochondrial DNA에 ‘Complete mitochondrial genome of the endangered Lycaenid butterfly *Shijimiaeoides divina* (Lepidoptera: Lycaenidae)’로 발표하였다.

표 II-1-12. 큰홍띠점박이푸른부전나비 미토콘드리아 유전체 유전자의 길이 및 위치

Gene	Direction	Nucleotide number	Size (bp)	Anticodon	Codon	
					Start	Stop
<i>trnM</i>	F	1-68	68	CAT (32-34)	-	-
<i>trnI</i>	F	69-135	67	GAT (99-101)	-	-
<i>trnQ</i>	R	133-201	69	TTG (169-171)	-	-
<i>ND2</i>	F	255-1268	1014	-	ATT	TAA
<i>trnW</i>	F	1267-1333	67	TCA (1298-1300)	-	-
<i>trnC</i>	R	1326-1390	65	GCA (1357-1359)	-	-
<i>trnY</i>	R	1391-1459	69	GTA (1423-1425)	-	-
<i>COI</i>	F	1462-2992	1531	-	CGA	T-tRNA
<i>trnL2</i>	F	2993-3059	67	TAA (3023-3025)	-	-
<i>COII</i>	F	3061-3733	673	-	ATG	T-tRNA
<i>trnK</i>	F	3734-3804	71	CTT (3764-3766)	-	-
<i>trnD</i>	F	3809-3877	69	GTC (3840-3842)	-	-
<i>ATP8</i>	F	3878-4048	171	-	ATT	TAA
<i>ATP6</i>	F	4042-4719	678	-	ATG	TAA
<i>COIII</i>	F	4727-5515	789	-	ATG	TAA
<i>trnG</i>	F	5527-5591	65	TCC (5557-5559)	-	-
<i>ND3</i>	F	5592-5945	354	-	ATT	TAG
<i>trnA</i>	F	5944-6009	66	TGC (5974-5976)	-	-
<i>trnR</i>	F	6033-6099	67	TCG (6060-6062)	-	-
<i>trnN</i>	F	6099-6164	66	GTT (6129-6131)	-	-
<i>trnS1</i>	F	6168-6229	62	TCT (6190-6192)	-	-
<i>trnE</i>	F	6235-6301	67	TTC (6266-6268)	-	-
<i>trnF</i>	R	6303-6369	67	GAA (6334-6336)	-	-
<i>ND5</i>	R	6369-8090	1722	-	ATT	TAA
<i>trnH</i>	R	8106-8171	66	GTG (8139-8141)	-	-
<i>ND4</i>	R	8172-9506	1335	-	ATG	TAA
<i>ND4L</i>	R	9506-9793	288	-	ATG	TAA
<i>trnT</i>	F	9798-9862	65	TGT (9828-9830)	-	-
<i>trnP</i>	R	9863-9927	65	TGG (9895-9897)	-	-
<i>ND6</i>	F	9930-10457	528	-	ATA	TAA
<i>CytB</i>	F	10462-11607	1146	-	ATG	TAA
<i>trnS2</i>	F	11606-11671	66	TGA (11636-11638)	-	-
<i>ND1</i>	R	11687-12628	942	-	ATG	TAA
<i>trnL1</i>	R	12630-12698	69	TAG (12667-12669)	-	-
<i>lrRNA</i>	R	12699-14045	1347	-	-	-
<i>trnV</i>	R	14046-14112	67	TAC (14080-14082)	-	-
<i>srRNA</i>	R	14110-14880	771	-	-	-
A+T-rich region		14881-15259	379	-	-	-

Direction of the genes is presented as F for forward and R for reverse direction.

	← <i>trnY</i>	<i>COI</i> →	
<i>Spindasis takanonis</i>	tttacaattttatcgcttataattcagccattttattcg	CGA	AAA TGA CTT RKWL
<i>Curetis bulis</i>	tttacaattttatcgcttataacctcagccattttattag	CGA	AAA TGA CTT RKWL
<i>Lycæna phlaeas</i>	tttacaattttatcgcttataaaactcagccattttattg	CGA	AAA TGA CTT RKWL
<i>Shijimæoides divina</i>	acaattttatogcttatactaactcagccattttattag	CGA	AAA TGA CTT RKWL
<i>Celastrina hersilia</i>	tttacaattttatcgcttataattcagccattttattag	CGA	AAA TGA CTT RKWL
<i>Cupido argiades</i>	tttacaattttatcgcttataaactcagccattttattag	CGA	AAA TGA ATT RKWI
<i>Coreana raphæalis</i>	ttacaattttatcgcttataatctcagccattttattag	CGA	AAA TGA CTT RKWL
<i>Japonica lutea</i>	ttacaattttatcgcttataattcagccattttattag	CGA	AAA TGA CTT RKWL
<i>Protantigius superans</i>	ttacaattttatcgcttataacctcagccattttattag	CGA	AAA TGA CTT RKWL

그림 II-1-9. 큰홍띠점박이푸른부전나비를 포함한 부전나비과의 *COI* start codon 정렬

표 II-1-13. 나비목 부전나비과 곤충 완전 미토콘드리아 유전체의 특성

Taxon	Size (bp)	A/T content (%)	PCG ^b		<i>srRNA</i>		<i>lrRNA</i>		tRNA		A+T-rich		GenBank accession no.	References
			No. codons ^a	AT %	Size (bp)	AT%	Size (bp)	AT%	Size (bp)	AT%	Size (bp)	AT%		
Lepidoptera														
Papilionoidea														
Lycaenidae														
Aphnaeinae														
<i>Spindasis takanonis</i>	15,349	82.4	3,717	81.0	777	84.7	1,333	85.6	1,482	83.7	371	94.6	HQ184266	Kim et al.(2011)
Curetinae														
<i>Curetis bulis</i>	15,162	81.4	3,714	80.2	763	85.7	1,321	84.9	1,456	81.2	324	92.9	JX262888	Zhang et al.(2014)
Lycaeninae														
<i>Lycæna phlaeas</i>	15,280	82.4	3,712	81.0	758	85.5	1,329	85.3	1,460	82.8	367	93.2	JX262887	Zhang et al.(2014)
Polyommatae														
<i>Shijimæoides divina</i>	15,259	82.5	3,712	81.3	768	84.6	1,347	85.7	1,470	82.7	379	91.8	This study	This study
<i>Celastrina hersilia</i>	15,302	81.5	3,721	79.9	773	85.3	1,342	85.5	1,475	82.4	338	93.2	HM243589	Xu et al.(2012)
<i>Cupido argiades</i>	15,330	81.8	3,710	80.4	771	85.9	1,378	86.1	1,471	82.3	450	90.2	KC310728	Zhang et al.(2014)
Thedinae														
<i>Coreana raphæalis</i>	15,314	82.7	3,708	81.5	777	85.8	1,390	85.3	1,461	82.8	375	94.1	DQ102703	Kim et al.(2006)
<i>Japonica lutea</i>	15,225	82.0	3,711	80.7	770	85.5	1,277	84.9	1,456	82.8	401	93.3	KM655768	Xia et al.(2015)
<i>Protantigius superans</i>	15,248	81.7	3,711	80.3	739	85.5	1,331	85.1	1,460	81.9	361	93.6	HQ184265	Kim et al.(2011)

^aTermination codons were excluded in total codon count. ^bProtein coding genes.

큰홍띠점박이푸른부전나비를 포함하여 부전나비과의 곤충에 대한 codon position별 A+T 함량을 분석한 결과, 큰홍띠점박이푸른부전나비는 1st codon position 76.7%, 2nd 71.5% 그리고 3rd 95.8%로서 3rd codon position으로부터 높은 A+T 함량을 확인할 수 있었으며 이는 타 부전나비과 유전체 특성과 동일함을 확인하였다(표 II-1-14).

trnK-like structure

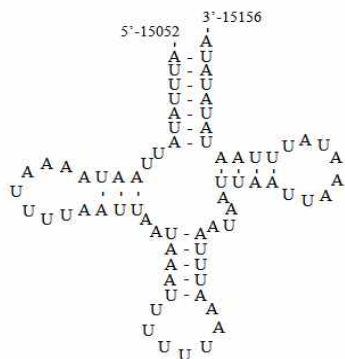


그림 II-1-10. 큰홍머점박이푸른부
전나비에서 발견된 tRNA 유사구조

표 II-1-14. 완전 미토콘드리아 유전체가 분석된 나비목 곤충의 13개 단백질 유전자의 codon position별 염기구성

Species	1st codon position				2nd codon position				3rd codon position				Overall			
	A	T	C	G	A	T	C	G	A	T	C	G	A	T	C	G
<i>Spindasis takanonis</i>	38.8	38.0	9.2	14.0	22.4	49.5	15.2	12.9	43.4	50.9	2.8	2.9	34.9	46.1	9.0	9.9
<i>Curetis bulis</i>	36.8	37.8	9.3	16.1	22.0	48.4	16.3	13.4	43.2	52.3	2.7	1.8	34.0	46.2	9.4	10.4
<i>Lycaena phlaeas</i>	38.3	37.8	9.1	14.8	22.4	48.5	15.9	13.2	43.8	52.3	2.3	1.6	34.8	46.2	9.1	9.9
<i>Shijimiaeoides divina</i>	38.2	38.5	8.9	14.4	22.3	49.2	15.4	13.1	44.4	51.4	2.3	1.9	35.0	46.4	8.9	9.8
<i>Celastrina hersilia</i>	37.3	37.9	9.1	15.7	22.0	48.6	16.2	13.3	44.1	50.0	3.5	2.4	34.4	45.5	9.6	10.5
<i>Cupido argiades</i>	38.1	37.9	9.0	15.0	22.3	49.1	15.7	13.0	43.4	50.3	3.5	2.8	34.6	45.8	9.4	10.2
<i>Coreana raphaelis</i>	38.5	37.9	8.8	14.8	22.0	49.2	15.7	13.1	45.7	51.2	2.0	1.2	35.4	46.1	8.8	9.7
<i>Japonica lutea</i>	37.4	38.0	9.2	15.4	21.7	48.9	16.1	13.3	45.2	50.9	2.7	1.3	34.8	45.9	9.3	10.0
<i>Protantgius superans</i>	37.9	37.6	9.2	15.3	22.0	49.0	15.8	13.2	44.0	50.5	3.2	2.3	34.6	45.7	9.4	10.3

5) 물장군 *Lethocerus deyrollei*

가) 연구대상종의 특성



- 국명: 물장군
- 학명: *Lethocerus deyrollei*
- 지정번호: 멸종위기II급
- 계통: 노린재목, 물장군과

그림 II-1-11. 물장군

[출처: 국립중앙과학관 <http://www.naris.go.kr/specIMG/3/8/99/1039899/JNHM-IN-0000255-01.JPG>]

■ 생김새: 몸길이는 50~70mm 내외이고 체색은 갈색이다. 머리는 몸에 비해 매우 작고 겹눈이 대부분을 차지한다. 앞다리는 넓적다리마디가 크게 팽대되어 있으며 1개의 발톱이 있다. 뒷다리의 종아리마디와 발목마디는 얇게 늘려진 형태로 보이고 가운데 다리의 종아리마디와 발목마디보다 훨씬 더 넓다. 배 끝에는 짧은 공기거리가 있다.

■ 서식지: 웅덩이, 농수로, 논, 흐름이 완만한 하천 등의 수생식물이 많이 우거져 있는 정수역으로 수심은 대체로 1m 이내로 연안대가 잘 발달된 지역

■ 먹이: 미꾸라지, 밀어 등의 민물고기를 비롯하여 게아재비, 물방개 등의 수서 곤충, 올챙이, 개구리 등 수생동물의 체액

■ 생활양식: 우리나라에서는 7~8월경 우기가 지난 뒤 폭서기에 주로 번식하는 것으로 보고되었으나, 일본에서는 장마전 5~6월에 산란하는 것으로 보고되었다. 수컷이 앞다리를 이용해 물결을 만들어 암컷을 유인하고 암컷이 동일한 행동을 반복함으로써 짝짓기 상대를 결정한다. 암컷은 산란 후 사라지며 수컷은 알이 부화할 때까지 알을 보살피며 산란장소를 떠나지 않는 특성을 가지고 있다.

■ 분포: 한국(서남해안, 도서지역 및 해안지역, 내륙의 습지, 민통선 지역 등), 일본, 중국, 대만 등

[출처: 한국의 수서곤충, 한국산 물장군의 생태학적 연구]

표 II-1-15. 물장군(*Lethocerus deyrollei*)의 전체 미토콘드리아 유전체 구성

Gene	Strand	Position	Length	Start codon	Stop codon	Intergenic sequences
<i>trnI</i>	+	1-64	64			0
<i>trnQ</i>	+	61-131	71			-4
<i>trnM</i>	+	129-199	71			-3
<i>ND2</i>	+	199-1207	1009	GTG	T	-1
<i>trnW</i>	+	1207-1274	68			-1
<i>trnC</i>	-	1265-1330	66			-10
<i>trnY</i>	-	1330-1394	65			-1
<i>COX1</i>	+	1407-2928	1522	ATA	T	12
<i>trnL</i>	+	2928-2994	67			-1
<i>COX2</i>	+	2994-3672	679	ATA	T	-1
<i>trnK</i>	+	3672-3743	72			-1
<i>trnD</i>	+	3743-3805	63			-1
<i>ATP8</i>	+	3807-3965	159	ATC	TAG	1
<i>ATP6</i>	+	3962-4639	678	ATA	TAA	-4
<i>COX3</i>	+	4632-5412	781	ATA	T	-8
<i>trnG</i>	+	5412-5475	64			-1
<i>ND3</i>	+	5475-5826	352	ATC	T	-1
<i>trnA</i>	+	5826-5890	65			-1
<i>trnR</i>	+	5891-5962	72			0
<i>trnN</i>	+	5960-6029	70			-3
<i>trnS</i>	+	6029-6097	69			-1
<i>trnE</i>	+	6097-6159	63			-1
<i>trnF</i>	-	6158-6225	68			-2
<i>ND5</i>	-	6225-7922	1698	ATG	TAA	-1
<i>trnH</i>	+	7933-7995	63			10
<i>ND4</i>	-	7995-9326	1332	ATG	TAG	-1
<i>ND4L</i>	+	9320-9628	309	ATT	TAA	-7
<i>trnT</i>	+	9636-9701	66			7
<i>trnP</i>	-	9700-9766	67			-2
<i>ND6</i>	+	9768-10262	495	ATC	TAA	1
<i>CYTb</i>	+	10262-11398	1137	ATG	TAA	-1
<i>trnS</i>	+	11398-11468	71			-1
<i>ND1</i>	-	11490-12410	921			21
<i>trnL</i>	-	12417-12481	65			6
<i>16S rRNA</i>	-	12482-13745	1264			0
<i>trnV</i>	-	13746-13817	72			0
<i>12S rRNA</i>	-	13818-14609	792			0
A+T-rich region		14610-19295	4686			0

물장군의 전체 미토콘드리아 유전체 염기서열은 총 19,295 bp로서 현재까지 보고된 111종의 노린재류(Hemiptera) 전체 미토콘드리아 유전체 염기서열과 비교했을 때 가장 긴 서열이다. 물장군의 미토콘드리아 유전체는 13개의 단백질 암호화 유전자(*ND1-6*, *ND4L*, *COX1-3*, *CYTB*, *ATP6*, *ATP8*), 2개의 ribosomal RNA 유전자(*16S rRNA*, *12S rRNA*), 22개의 transfer RNA 유전자, 1개의 A+T-rich region으로 구성되는 전형적인 후생동물의 미토콘드리아 유전체 구성과 동일하다(그림 II-1-12, 표 II-1-15). 또한 원시적인 곤충의 미토콘드리아 유전자의 배열양상과 동일한 결과를 확인하였다. 물장군의 미토콘드리아 유전체는 전반적으로 유전자 사이의 중첩구간이 다소 많은 컴팩트 한 구조를 보인다. 총 25개의 구간에서 염기의 중첩을 확인했으며 중첩된 염기는 1~10 bp의 범위를 보인다(the longest overlap (10 bp): *trnW* and *trnC*).

물장군의 전체 미토콘드리아 유전체의 염기조성을 살펴보면, 염기 A와 T에 상당히 치우쳐진 것을 알 수 있다(whole sequence: AT% = 71.2%). 이는 근연종의 미토콘드리아 유전체에서도 유사하게 나타나는 현상이며 다른 유전자 영역에 비해 단백질 암호화 유전자 전체의 AT% 비율이 68.7%로 가장 낮았다. 물장군의 단백질 암호화 유전자 염기서열을 코돈 사이트별로 나누어 분석했을 때 3rd codon position이 나머지 사이트에 비해 현저히 높은 AT% 비율을 보인다. 이러한 패턴은 물장군의 근연종인 장구애비류 4종에서도 명확히 확인되는 부분이다(표 II-1-16).

물장군의 전체 미토콘드리아 유전체 염기서열은 염기 A와 C를 다른 염기에 비해 상대적으로 많이 포함하고 있어서 positive AT-skew (0.265)와 negative GC-skew (-0.254)값으로 나타난다. 단백질 암호화 유전자 영역의 염기 skewness 분석에서 5종 장구애비류(Nepoidea)의 1st codon position은 공통적으로 positive GC-skew 값을 가진다. GC-skew 값은 다른 유전자 영역보다도 단백질 암호화 유전자 영역의 1st codon position에서만 positive 값을 나타내며 5종 장구애비류 모두에서 확인된다. AT-skew에서는 눈에 띄는 차이점을 확인할 수는 없었으나 본 연구의 대상종인 물장군의 경우 단백질 암호화 유전자의 1st codon position의 skewness 값이 모두 positive인 것을 확인했다.

표 II-1-16. 5종 장구애비상과(Nepoidea)의 염기조성 비교

	length (bp)	%A	%T	%G	%C	%A+T	AT-ske w	GC-ske w
<i>Lethocerus deyrollei</i>								
Entire sequence	19,295	45.0	26.1	10.8	18.1	71.2	0.265	-0.254
PCGs	11,067	30.8	38.0	15.0	16.3	68.7	-0.105	-0.042
1 st codon position	3,689	32.2	31.0	21.6	15.2	63.2	0.018	0.173
2 nd codon position	3,689	18.4	45.5	15.6	20.5	64.0	-0.424	-0.136
3 rd codon position	3,689	41.7	37.4	7.8	13.2	79.0	0.055	-0.258
tRNAs	1,481	39.9	33.1	12.0	15.0	73.0	0.093	-0.110
lsRNA	1,264	47.6	27.4	9.5	15.5	75.0	0.270	-0.241
srRNA	792	46.1	26.4	9.6	17.9	72.5	0.272	-0.303
A+T-rich region	4,686	48.2	27.0	7.3	17.5	75.3	0.281	-0.410
<i>Lethocerus indicus</i>								
Entire sequence	17,632	45.3	25.2	11.3	18.2	70.5	0.286	-0.232
PCGs	11,091	31.6	37.8	14.7	15.9	69.4	-0.090	-0.038
1 st codon position	3,697	33.2	31.8	20.9	14.2	65.0	0.022	0.191
2 nd codon position	3,697	19.7	44.4	15.2	20.8	64.0	-0.386	-0.157
3 rd codon position	3,697	41.9	37.4	8.1	12.6	79.3	0.056	-0.217
tRNAs	1,451	40.8	32.0	12.3	15.0	72.8	0.121	-0.099
lsRNA	1,269	48.0	26.6	9.9	15.5	74.6	0.287	-0.220
srRNA	790	46.2	25.7	10.4	17.7	71.9	0.285	-0.261
A+T-rich region	3,020	46.8	24.6	8.9	19.7	71.4	0.311	-0.376
<i>Diplonychus rusticus*</i>								
Entire sequence	14,596	41.0	28.9	12.5	17.7	69.8	0.173	-0.172
PCGs	11,094	29.4	39.0	15.5	16.1	68.3	-0.140	-0.020
1 st codon position	3,698	31.9	32.6	21.0	14.4	64.6	-0.011	0.185
2 nd codon position	3,698	18.6	45.4	15.5	20.5	64.0	-0.418	-0.140
3 rd codon position	3,698	37.6	38.8	10.1	13.5	76.4	-0.016	-0.144
tRNAs	1,440	39.7	34.9	11.9	13.5	74.6	0.065	-0.060
lsRNA	1,259	46.2	29.9	9.3	14.7	76.0	0.214	-0.225
srRNA	792	42.8	29.2	10.4	17.7	72.0	0.189	-0.262
A+T-rich region	not sequenced	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nepa hoffmanni</i>								
Entire sequence	15,774	42.7	29.3	10.7	17.3	72.0	0.186	-0.234
PCGs	11,184	31.6	40.2	14.1	14.2	71.8	-0.120	-0.004
1 st codon position	3,728	33.4	33.9	20.0	12.7	67.3	-0.007	0.221
2 nd codon position	3,728	19.3	45.5	15.2	20.1	64.7	-0.405	-0.139
3 rd codon position	3,728	42.1	41.3	7.0	9.7	83.3	0.010	-0.158
tRNAs	1,437	40.1	33.8	11.6	14.5	73.9	0.085	-0.115
lsRNA	1,256	45.9	28.5	9.7	15.8	74.4	0.234	-0.240
srRNA	785	45.2	26.8	9.8	18.2	72.0	0.257	-0.300
A+T-rich region	1,128	35.6	34.1	6.1	24.2	69.7	0.020	-0.596
<i>Laccotrephes robustus</i>								
Entire sequence	15,321	43.0	27.6	11.2	18.2	70.6	0.218	-0.236
PCGs	11,088	30.7	39.4	14.7	15.2	70.1	-0.124	-0.019
1 st codon position	3,696	33.3	32.1	20.8	13.9	65.3	0.018	0.200
2 nd codon position	3,696	19.0	45.6	15.4	20.1	64.6	-0.412	-0.131
3 rd codon position	3,696	39.9	40.5	7.9	11.8	80.4	-0.007	-0.201
tRNAs	1,436	40.0	33.1	11.6	15.3	73.1	0.095	-0.135
lsRNA	1,256	48.4	26.0	9.5	16.1	74.5	0.300	-0.259
srRNA	788	46.2	26.3	9.5	18.0	72.5	0.275	-0.309
A+T-rich region	751	32.0	33.8	6.4	27.8	65.8	-0.028	-0.627

* : nearly complete mitochondrial genome sequence (except for A+T-rich region)

■ 물장군의 RSCU (Relative synonymous codon usage) 분석

물장군의 13개 단백질 암호화 유전자는 불완전 종결코돈을 제외하고 총 3,689개의 코돈으로 구성된다. 이는 근연종의 코돈개수와도 유사한 수치이다. 본 분석에 이용한 5종의 장구애비류 단백질 암호화 유전자의 코돈들을 아미노산 성질 별로 분류했을 때 코돈분포 사항은 codon family별로 유사한 경향성을 보인다(그림 II-1-13). Codon family 중에서도 수적으로 강세를 보이는 것은 Leu2 (UUR), Ile, Phe, Met으로 CDspT 값이 65이상인 codon family이다. 이는 5종의 모든 장구애비류에서 수치적으로 차이는 있으나 이 4종류의 codon family가 가장 우세한 경향성을 보인다. RSCU 분석에서는 코돈별로 사용빈도를 분석한 것으로 AT 비율이 상대적으로 높은 AT-rich codon의 빈도가 높고, 반대로 GC-rich codon의 경우 사용빈도가 극히 적은 것을 확인할 수 있다(그림 II-1-14). 특히 물장군의 경우 단백질 암호화 유전자 내에서 CGC (R) 코돈을 찾아볼 수 없었으며, 물장군의 미토콘드리아 유전체가 AT 염기를 우선적으로 선호하는 경향에 따라 CG 염기의 선호빈도가 진화적으로 감소한 것으로 예상된다. 이러한 현상은 물장군의 근연종인 *Lethocerus indicus*와 *Nepa hoffmanni*에서도 동일하게 관찰된다.

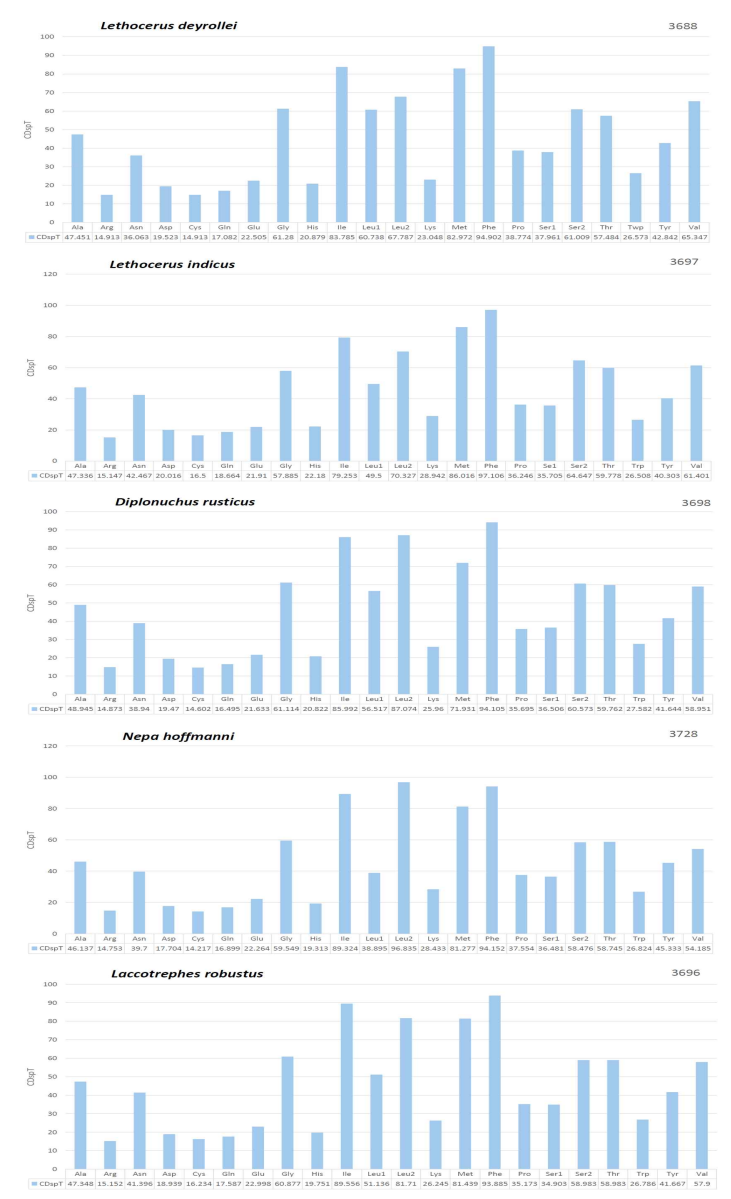


그림 II-1-13. 5종 장구애비류 미토콘드리아 유전체의 코돈분포 (CDpT, codons per thousands codons)

■ 물장군 미토콘드리아 유전체의 AT-rich region 구조

물장군은 다른 노린재류에 비해 현저히 긴 미토콘드리아 유전체 염기서열을 가지고 있다(*L. deyrollei*: 19,295 bp, *L. indicus*: 17,632 bp). 현재까지 노린재목(Hemiptera)에서는 총 111종의 전체 미토콘드리아 유전체 정보가 알려져 있으며 물장군을 제외한 나머지 종의 미토콘드리아 유전체는 14,143bp ~ 18,414bp의 길이 분포를 보인다. 물장군의 미토콘드리아 유전체 길이가 다른 노린재류와 차이를 보이는 이유는 control region으로 예상되는 A+T-rich region의 길이 차이로 보인다. 물장군의 경우 총 4,686 bp의 염기서열이 A+T-rich region에 해당되고, 이 중에는 일부 서열이 반복되는 현상(tandem repeats)을 보인다. 물장군의 tandem repeat은 2가지로 패턴이 나누어지며 218bp 길이의 염기가 11번 반복되는 패턴(그림 II-1-15)과 328bp 길이의 염기가 4번 반복되는 구조이다(그림 II-1-16).

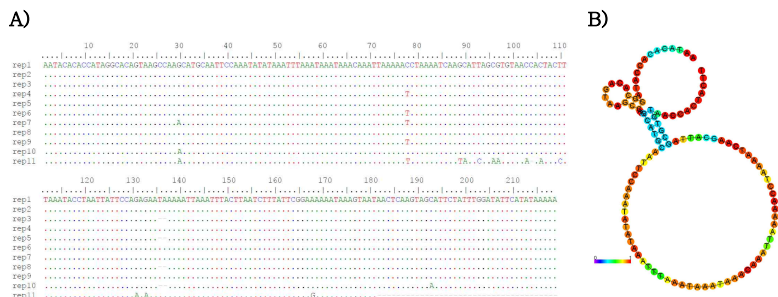


그림 II-1-15. 물장군 미토콘드리아 유전체의 repeat unit (218 bp)

A) 반복서열의 alignment, B) repeat unit의 이차구조

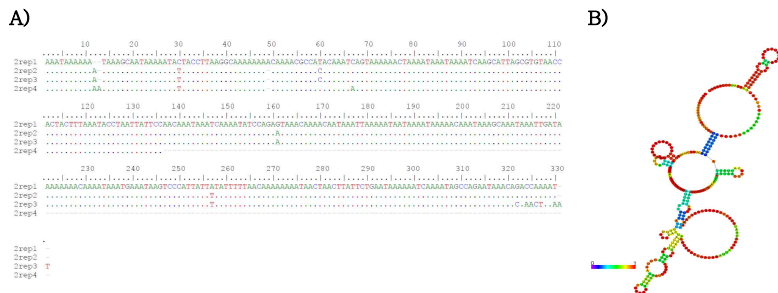


그림 II-1-16. 물장군 미토콘드리아 유전체의 repeat unit (328 bp)

A) 반복서열의 alignment, B) repeat unit의 이차구조

6) 대모잠자리 *Libellula angelina* (Selys, 1883)

가) 연구대상종의 특성



- 국명: 대모잠자리
- 영명: Bekko tombo
- 학명: *Libellula angelina*
- 지정번호: 멸종위기Ⅱ급
- 분류: 잠자리목(Odonata)
잠자리과(Libellulidae)

그림 II-1-17. 대모잠자리

[출처: 농촌진흥청 농업유전자원정보센터]

■ 생김새: 배 길이 24-31mm, 뒷날개길이 30-34mm로 암컷이 수컷보다 작다. 머리는 검은색이고, 뒷머리·이마·머리방패·윗입술조각·윗입술·아랫입술은 황갈색이다. 황갈색의 짧은 잔털이 온몸을 촘촘히 덮고 있다. 가슴은 노란색을 띤 흑갈색이고, 가운데가슴과 가슴 옆면은 황갈색이다. 배는 노란색을 띤 흑갈색이고, 등면의 가운데에 검은색 줄무늬가 굵게 배 끝까지 나 있다. 꼬리 위쪽 부속기는 갈색이고 제9마디와 길이가 같다. 꼬리 아래쪽 부속기는 황갈색인데 편평하며 위 끝은 날카롭고 위로 구부러졌다. 날개는 투명하고 흑갈색 무늬가 각 날개의 밑 부분, 가운데, 끝부분 등 3곳에 있다. 날개 맥은 흑갈색, 가두리무늬는 갈색이다. 유충은 몸길이 17~22mm로 온몸이 많은 털로 덮여 있으며 제8배마디와 제9배마디에 옆가시가 있다.

■ 서식지: 유기퇴적물이 많은 연못, 습지

■ 먹이: 파리, 하루살이, 각다귀류 등

■ 생활양식: 4월 하순부터 6월까지 볼 수 있다. 교미가 끝나면 암컷은 홀로 저수지를 날아다니며 수면 위를 치듯이 산란한다.

■ 분포: 한국(서해안, 남해안 지역), 일본, 중국

[출처: 농촌진흥청 농업유전자원정보센터, 두산백과 doopedia]

나) 연구결과 및 고찰

■ 대모잠자리 미토콘드리아 유전체의 염기서열 결정과 annotation

대모잠자리의 전체 유전체 분석결과 그 크기는 15,233 bp로 일반적인 유전자 구성(13개의 단백질 유전자, 2개의 rRNA 유전자, 22개의 tRNA 유전자, 1개의 non-coding region)을 보유하고 있음을 확인하였다. 유전자 배열은 곤충에서 가장 빈번히 발견되는 배열을 갖고 있었다(그림 II-1-18).

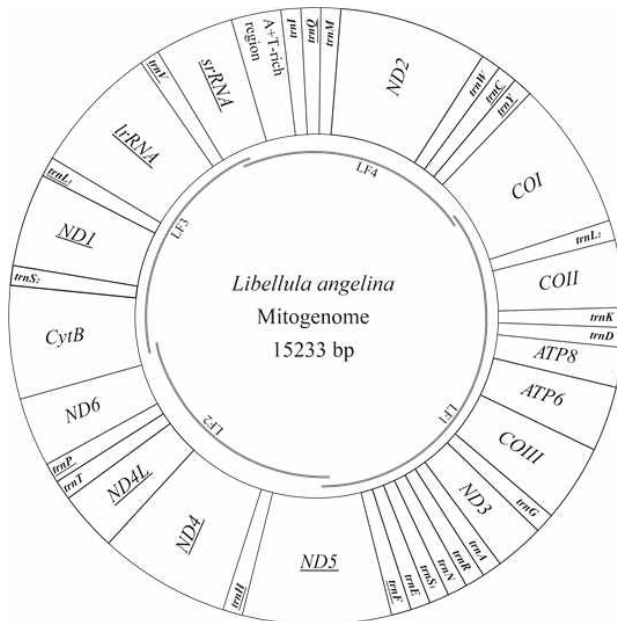


그림 II-1-18. 대모잠자리의 완전 미토콘드리아 유전체지도

기 보고된 잠자리목 분석결과와 함께 대모잠자리의 유전자 특성을 분석한 결과, 대모잠자리는 미토콘드리아 유전체의 단백질 유전자의 codon 수, rRNA 및 tRNA 크기, 각 A+T 함량 등이 알려진 잠자리과 곤충의 범주에 속하고 A+T-rich region의 크기가 529 bp임을 확인하였다(표 II-1-17).

표 II-1-17. 참자리목 곤충 완전 미토콘드리아 유전체의 특성

Taxon	Size (bp)	A/T content (%)	PCG ^b		<i>srRNA</i> ^d		<i>LrRNA</i> ^d		tRNA ^e		A+T-rich		GenBank accession no.	References
			No. codons	AT%	Size (bp)	AT%	Size (bp)	AT%	Size (bp)	AT%	Size (bp)	AT%		
Anisoptera														
Libellulidae														
<i>Brachythemis contaminata</i>	15,056	73.0	3,685	71.8	799	75.8	1,286	77.3	1,457	73.7	323	83.3	KM658172	Yu et al. (2014)
<i>Hydrobasileus croceus</i>	15,088	75.0	3,690	74.4	750	74.3	1,362	77.0	1,463	74.4	190	84.2	KM244659	Tang et al. (2014)
<i>Libellula angelina</i>	15,233	72.2	3,707	71.2	752	71.8	1,283	75.8	1,473	73.4	529	83.0		This study
<i>Orthetrum triangulare melania</i>	14,033	73.9	3,604	73.8	578	72.5	1,283	76.4	1,265	73.0	-	-	AB126005	Yamauchi et al. (2004)
Gomphidae														
<i>Ictinogomphus sp.</i>	15,393	68.6	3,722	67.2	771	70.6	1,051	70.8	1,505	70.4	585	80.7	KM244673	Tang et al. (2014)
Corduliidae														
<i>Cordulia aenea</i>	14,488	72.1	3,720	71.6	453	71.3	1,367	76.4	1,214	71.2	143	75.5	JX963627	Unpublished
Gomphidae														
<i>Davidius lunatus</i>	15,913	70.1	3,711	67.7	779	70.7	1,318	74.1	1,495	72.7	1,066	85.2	EU591677	Lee et al. (2009)
Zygoptera														
Pseudolestidae														
<i>Pseudolestes mirabilis</i>	15,122	66.3	3,713	64.7	771	69.4	1,286	72.6	1,472	69.3	407	74.2	FJ606784	Unpublished
Euphaeidae														
<i>Euphaea formosa</i>	15,700	70.6	3,704	69.2	778	70.8	1,288	74.0	1,493	71.3	919	80.3	HM126547	Lin et al. (2010)
Coenagrionidae														
<i>Ichnura pumilio</i>	15,250	73.1	3,713	72.1	782	74.9	1,290	76.0	1,482	72.7	489	86.3	KC878732	Lorenzo-Carballa et al. (2014)
Calopterygidae														
<i>Vestalis melania</i>	16,685	64.2	3,699	61.0	743	68.8	1,281	71.2	1,462	65.5	2,036	74.3	JX050224	Chen et al. (2014)
<i>Atrocalopteryx atrata</i>	15,424	69.9	3,722	68.3	787	69.3	1,289	72.9	1,466	72.1	661	87.1	KP233805	Unpublished
Platynemididae														
<i>Platynemis foliacea</i>	15,382	71.9	3,741	70.8	747	72.8	1,374	76.9	1,485	71.7	592	81.8	KP233804	Unpublished
Anisozygoptera														
Epiophlebiidae														
<i>Epiophlebia superstes</i>	15,435	71.2	3,710	69.4	777	73.4	1,309	75.3	1,491	72.8	630	87.8	JX050223	Wang et al. (2014)

(-) Not provided. ^aTermination codons were excluded in total codon count; ^bProtein coding genes; ^c*srRNA* genes; ^d*LrRNA* genes; ^etRNA genes.

전체 13개의 단백질 유전자 중 11개의 단백질 유전자는 전형적인 ATN start codon을 찾을 수 있었고, *COI* 유전자 및 *NDI* 유전자에서는 간헐적으로 미토콘드리아 유전체 start codon으로 발견되는 TTG codon을 보유하고 있었다(표 II-1-18).

대모잠자리 미토콘드리아 유전체의 A+T-rich region 내에서 tRNA-like structure를 확인할 수 있었다. 두 개의 tRNA-like structure가 발견되었는데 그 중 하나는 *trnF*와 유사한 구조이며 다른 하나는 *trnK*와 유사한 구조이다.(그림 II-1-19). 각 tRNA에 적합한 anticodon을 갖고 있고 비교적 정확한 clover-leaf structure를 갖고 있긴 하나 대부분 A/T로 구성되어 있고, 정규 tRNA와 상당한 유전적 divergence를 보유하고 있는 점으로 보아 이들의 tRNA로서의 기능은 미지수다. 또한 정규 tRNA와 정렬하였을 때, anticodon이 서로 다른 것을 확인하였다. 이러한 유사 tRNA가 A+T-rich region에 존재할 수 있는 것은 아마 primer로 작동 후 cleave되지 않고 남아 있는 가운데 non-coding A+T-rich region의 진화율을 따라 정규 tRNA와 많이 분화한 형태로 남아있는 것으로 추정된다.

표 II-1-18. 대모잠자리의 미토콘드리아 유전체 요약

Gene	Direction	Nucleotide number	Size (bp)	Anticodon	Codon	
					Start	Stop
<i>trnI</i>	F	1-64	64	GAT (30-32)	-	-
<i>trnQ</i>	R	62-129	68	TTG (97-99)	-	-
<i>trnM</i>	F	129-197	69	CAT (159-161)	-	-
<i>ND2</i>	F	198-1193	996	-	ATT	TAA
<i>trnW</i>	F	1192-1260	69	TCA (1222-1224)	-	-
<i>trnC</i>	R	1253-1321	69	GCA (1289-1291)	-	-
<i>trnY</i>	R	1321-1385	65	GTA (1352-1354)	-	-
<i>COI</i>	F	1425-2958	1534	-	TTG	T-tRNA
<i>trnL₂</i>	F	2959-3026	68	TAA (2988-2990)	-	-
<i>COII</i>	F	3027-3714	688	-	ATG	T-tRNA
<i>trnK</i>	F	3714-3787	74	CTT (3745-3747)	-	-
<i>trnD</i>	F	3786-3854	69	GTC (3816-3818)	-	-
<i>ATP8</i>	F	3855-4016	162	-	ATT	TAA
<i>ATP6</i>	F	4010-4687	678	-	ATG	TAA
<i>COIII</i>	F	4687-5474	788	-	ATG	TA-tRNA
<i>trnG</i>	F	5474-5537	64	TCC (5503-5505)	-	-
<i>ND3</i>	F	5538-5891	354	-	ATT	TAG
<i>trnA</i>	F	5890-5954	65	TGC (5919-5921)	-	-
<i>trnR</i>	F	5954-6020	67	TCG (5983-5985)	-	-
<i>trnN</i>	F	6022-6089	68	GTT (6053-6055)	-	-
<i>trnS₁</i>	F	6090-6156	67	GCT (6115-6117)	-	-
<i>trnE</i>	F	6157-6221	65	TTC (6186-6188)	-	-
<i>trnF</i>	R	6222-6285	64	GAA (6253-6255)	-	-
<i>ND5</i>	R	6285-8014	1730	-	ATT	TA-tRNA
<i>trnH</i>	R	8015-8079	65	GTG (8047-8049)	-	-
<i>ND4</i>	R	8084-9427	1344	-	ATG	TAA
<i>ND4L</i>	R	9421-9711	291	-	ATG	TAA
<i>trnT</i>	F	9714-9777	64	TGT (9743-9745)	-	-
<i>trnP</i>	R	9795-9860	66	TGG (9828-9830)	-	-
<i>ND6</i>	F	9862-10365	504	-	ATC	TAA
<i>CytB</i>	F	10365-11498	1134	-	ATG	TAA
<i>trnS₂</i>	F	11497-11563	67	TGA (11526-11528)	-	-
<i>ND1</i>	R	11580-12530	951	-	TTG	TAA
<i>trnL₁</i>	R	12532-12597	66	TAG (12566-12568)	-	-
<i>12S rRNA</i>	R	12598-13880	1283	-	-	-
<i>trnV</i>	R	13881-13950	70	TAC (13917-13919)	-	-
<i>16S rRNA</i>	R	13953-14704	752	-	-	-
A+T-rich region		14705-15233	529	-	-	-

Direction of the genes is presented as F for forward and R for reverse direction.

tRNA abbreviations follow the IUPAC-IUB one-letter code.

대모잠자리에 대한 codon position별 A+T 함량을 분석한 결과 다른 곤충과 마찬가지로 3rd codon position으로부터 82.9%의 높은 A+T 함량을 확인할 수 있었다(표 II-1-19).

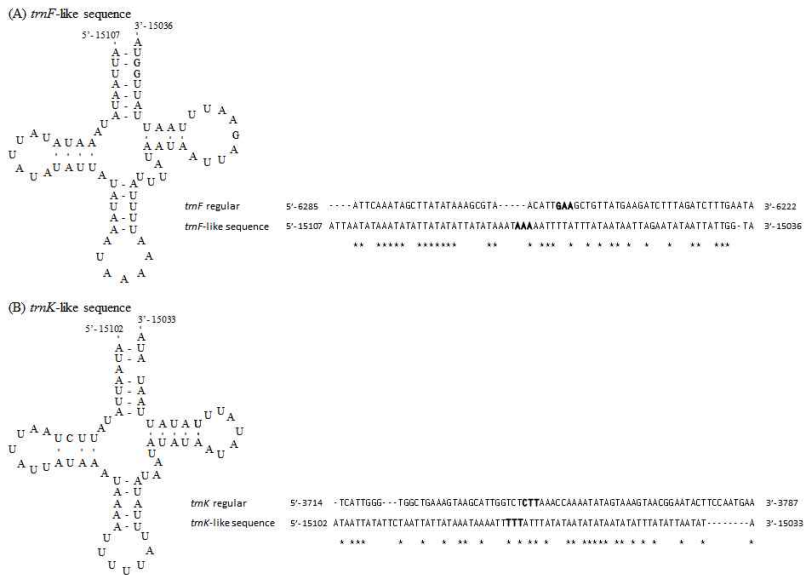


그림 II-1-19. 대모잠자리에서 발견된 tRNA 유사구조

표 II-1-19. 완전 미토콘드리아 유전체가 분석된 잠자리목 곤충의 13개 단백질 유전자의 codon position별 염기구성

Species	1st codon position				2nd codon position				3rd codon position				Overall			
	A	T	C	G	A	T	C	G	A	T	C	G	A	T	C	G
<i>Brachythemis contaminata</i>	32.1	34	13.2	20.5	19.9	46	19.6	14.5	41.5	42	10.0	6.9	31.2	40.6	14.3	14.0
<i>Hydrobasileus croceus</i>	32.3	35	12.7	20.2	20.0	46	19.4	14.4	44.8	45	5.4	4.6	32.4	42.1	12.5	13.1
<i>Libellula angelina</i>	31.6	34	13.4	21.3	19.6	46	19.6	15.2	40.9	42	9.3	7.6	30.7	40.5	14.1	14.7
<i>Orthetrum triangulare melania</i>	31.7	35	12.6	21.1	19.9	46	19.1	15.3	41.6	48	5.7	5.0	31.1	42.7	12.4	13.8
<i>Ictinogomphus sp.</i>	33.3	25	19.0	22.9	20.5	43	22.4	13.9	47.3	25	21.1	6.6	33.7	31.0	20.9	14.5
<i>Cordulia aenea</i>	34.7	27	17.4	21.3	20.5	43	22.4	13.9	48.5	35	12.6	3.5	34.6	35.1	17.5	12.9
<i>Davidius lunatus</i>	30.7	32	15.5	22.1	19.3	45	20.0	15.7	37.8	39	13.5	10.1	29.2	38.5	16.3	15.9
<i>Pseudolestes mirabilis</i>	30.8	31	15.5	23.0	19.7	44	20.7	15.2	35.7	33	18.5	13.0	28.7	36.0	18.3	17.1
<i>Euphaea formosa</i>	30.5	32	14.6	22.9	19.9	45	20.1	15.1	39.7	41	10.7	8.8	30.0	39.2	15.2	15.6
<i>Ischnura pumilio</i>	31.2	34	13.2	21.3	19.6	46	19.6	15.2	42.1	44	7.4	7.0	31.0	41.2	13.4	14.5
<i>Vestalis melania</i>	28.3	31	17.0	24.1	18.2	44	21.7	16.2	30.2	32	21.6	16.3	25.6	35.4	20.1	18.9
<i>Atrocalopteryx atrata</i>	31.9	31	15.7	21.6	18.7	45	20.7	15.3	39.7	38	12.4	9.6	30.1	38.2	16.2	15.5
<i>Platycnemis foliacea</i>	31.5	34	12.8	22.0	19.6	46	19.8	14.9	38.4	43	9.2	8.9	29.8	41.0	13.9	15.3
<i>Epiophlebia superstes</i>	31.5	33	14.0	22.0	20.3	45	19.7	14.9	40.0	42	9.7	8.2	30.5	39.9	14.5	15.1

7) 기수갈고둥 *Clithon retropictus*

가) 연구대상종의 특성



- 국명: 기수갈고둥
- 학명: *Clithon retropictus*
- 지정번호: 멸종위기II급
- 계통: 원시복족목, 갈고둥과

그림 II-1-20. 기수갈고둥

[출처: 한국의 멸종위기종 korearedlist.go.kr]

■ 생김새: 패각 형태는 둥근 난형이다. 나층은 4층이지만 성패 대부분의 각정은 침식되어 주로 체층만 남아 있다. 체색은 녹갈색 바탕에 삼각형의 노란색과 검은 색 반점이 있고, 체층에는 황갈색 띠가 2~3열 나타나며 약한 성장맥이 있다. 체층이 커서 거의 전부를 차지하기 때문에 상대적으로 나탑은 낮고 작다. 각구는 반원형이고 가장자리는 약간 두껍고, 비스듬한 내순 중앙에 작은 치상돌기가 여러 개 흔적으로 나타난다. 내순과 축순은 발달된 백색 활층으로 덮여 있고, 활층은 넓고 편평하다. 뚜껑은 반원 모양이고 석회질로 이루어져 있으며 주둥이를 덮어 막을 수 있다. 뚜껑의 표면은 매끄럽지만 안쪽 가장자리는 얇게 패어 있고, 내면에는 석회질의 돌기가 길게 나 있다. 뚜껑의 외순 가장자리를 따라 황색 선이 나타난다. 성체의 크기는 각고 14mm, 각경 14mm정도이며 전체적으로 작고 길보기에 공처럼 생겼으며, 염주알다슬기와 비슷하다. 보통 여름에 백색 난피를 돌에 산란하는 난생종이며 수명은 10년 이상으로 장수종에 해당한다.

■ 서식지: 유속이 빠르고 잔자갈이 깔려 있는 하천의 기수지역

■ 먹이: 부착조류

■ 생활양식: 7~8월 무렵 타원형의 알주머니를 바위나 조개껍데기 위에 붙인다.

■ 분포: 한국(제주도, 남해, 경북 울진, 전남 장흥·보성), 일본

[출처: 두산백과 doopedia]

■ 기수갈고등 미토콘드리아 유전체의 염기서열 결정과 annotation

Clithron retropictus
15803 bp

Genomic map showing mitochondrial and nuclear DNA regions. The map is color-coded and includes labels for various genes and tRNAs. A central image of the snake is surrounded by a scale bar indicating distances in kb.

Key features and labels on the map:

- Genes:** CO1, ND2, ND3, CO3, ND4, ND4L, ND6, ND1, ND5, ND4.
- tRNAs:** trnI, trnM, trnA, trnK, trnS, trnL, trnE, trnG, trnT, trnF, trnH, trnV, trnC, trnD, trnY, trnW, trnR, trnQ, trnN, trnK, trnM, trnS, trnL, trnE, trnG, trnT, trnF, trnH, trnV, trnC, trnD, trnY, trnW, trnR, trnQ, trnN.
- Other labels:** ATP6, ATP8, CO2, CO1, ND2, ND3, CO3, ND4, ND4L, ND6, ND1, ND5, ND4, trnI, trnM, trnA, trnK, trnS, trnL, trnE, trnG, trnT, trnF, trnH, trnV, trnC, trnD, trnY, trnW, trnR, trnQ, trnN.
- Scale bar:** 0.00kb, 2.67kb, 5.33kb, 8.00kb, 10.67kb, 13.33kb.
- Central image:** A photograph of a Clithron retropictus snake.

IP : 14.49.138.138, 2017-11-03 09:55:54

표 II-1-20. 기수갈고둥 (*Clithon retropictus*)의 전체 미토콘드리아 유전체 구성

Gene	Strand	Position	Length	Start codon	Stop codon	Intergenic sequences
<i>COX3</i>	+	1-780	780	ATG	TAA	0
<i>trnK</i>	+	814-880	67			33
<i>trnA</i>	+	900-967	67			19
<i>trnR</i>	+	981-1049	69			13
<i>trnN</i>	+	1055-1126	72			5
<i>trnI</i>	+	1136-1204	69			9
<i>ND3</i>	+	1206-1559	354	ATG	TAG	1
<i>trnS</i>	+	1563-1630	68			3
<i>ND2</i>	+	1631-2761	1131	ATG	TAA	0
<i>COX1</i>	+	2733-4280	1548	ATG	TAA	-29
<i>COX2</i>	+	4292-4981	690	ATG	TAG	10
<i>trnD</i>	+	4983-5048	66			1
<i>ATP8</i>	+	5049-5213	165	ATG	TAA	0
<i>ATP6</i>	+	5220-5921	702	ATG	TAA	6
<i>trnF</i>	-	5943-6010	68			22
<i>ND5</i>	-	6010-7723	1714	ATG	T	-1
<i>trnH</i>	-	7723-7790	68			-1
<i>ND4</i>	-	7790-9146	1357	ATA	T	-1
<i>ND4L</i>	-	9149-9442	294	ATG	TAA	2
<i>trnT</i>	+	9447-9514	68			4
<i>trnS</i>	-	9522-9588	67			7
<i>CYTb</i>	-	9593-10729	1137	ATG	TAA	4
<i>ND6</i>	-	10741-11247	507	ATG	TAA	11
<i>trnP</i>	-	11248-11315	68			0
<i>ND1</i>	-	11316-12248	933	ATG	TAG	0
<i>trnL</i>	-	12248-12316	69			0
<i>trnL</i>	-	12317-12386	70			0
<i>16S rRNA</i>	-	12387-13684	1298			0
<i>trnV</i>	-	13685-13751	67			0
<i>12S rRNA</i>	-	13752-14613	862			0
<i>trnM</i>	-	14614-14680	67			0
<i>trnY</i>	-	14685-14752	68			4
<i>trnC</i>	-	14757-14820	64			4
<i>trnW</i>	-	14821-14886	64			0
<i>trnQ</i>	-	14887-14955	69			0
<i>trnG</i>	-	14956-15022	67			0
<i>trnE</i>	-	15025-15090	66			2
large-noncoding region		15091-15803	713			0

표 II-1-21. 5종 갈고둥류(Neritidae)의 염기조성(nucleotide composition) 비교

	length (bp)	%A	%T	%G	%C	%A+T	AT-ske w	GC-ske w
<i>Clithon retropictus</i>								
Entire sequence	15,803	30.0	33.9	20.2	14.9	64.9	-0.06	0.15
PCGs	11,310	18.0	38.4	18.0	18.0	56.4	-0.36	0.00
1 st codon position	3,770	25.8	31.0	26.4	16.9	56.8	-0.09	0.22
2 nd codon position	3,770	18.1	43.0	16.3	22.4	61.1	-0.41	-0.16
3 rd codon position	3,770	32.8	41.0	11.2	14.7	73.8	-0.11	-0.14
rRNAs	2,160	30.4	36.9	16.1	16.7	67.3	-0.10	-0.02
tRNAs	1,492	30.8	32.6	18.4	18.2	63.5	-0.03	0.01
large-noncoding region	713	38.4	34.6	16.6	10.4	73.1	0.05	0.23
<i>Nerita fulgurans</i>*								
Entire sequence	15,343	30.0	34.4	21.2	14.4	64.4	-0.07	0.19
PCGs	11,346	25.8	38.0	18.5	17.8	63.7	-0.19	0.02
1 st codon position	3,782	26.2	31.0	26.2	16.8	57.0	-0.08	0.22
2 nd codon position	3,782	18.0	43.0	16.6	22.3	61.1	-0.41	-0.15
3 rd codon position	3,782	33.1	40.0	12.7	14.1	73.2	-0.09	-0.05
rRNAs	2,166	35.8	30.0	16.1	18.1	65.8	0.09	-0.06
tRNAs	1,510	31.5	32.1	21.2	15.2	63.6	-0.01	0.16
large-noncoding region	392	39.0	37.2	15.1	8.7	76.3	0.02	0.27
<i>Nerita tessellata</i>*								
Entire sequence	15,737	30.3	33.7	21.1	14.8	64.1	-0.05	0.18
PCGs	11,337	25.4	37.7	18.8	18.1	63.1	-0.19	0.02
1 st codon position	3,779	26.3	31.0	26.1	16.8	57.1	-0.08	0.22
2 nd codon position	3,779	17.8	43.0	16.8	22.4	60.8	-0.41	-0.14
3 rd codon position	3,779	32.2	39.0	13.5	15.0	71.5	-0.10	-0.05
rRNAs	2,165	35.9	30.3	16.2	17.6	66.2	0.08	-0.04
tRNAs	1,510	31.0	32.3	21.7	15.0	63.2	-0.02	0.18
large-noncoding region	799	38.5	33.5	18.9	9.0	72.1	0.07	0.35
<i>Nerita versicolor</i>*								
Entire sequence	15,866	28.8	32.8	22.5	15.9	61.7	-0.06	0.17
PCGs	11,337	24.0	36.3	20.0	19.6	60.3	-0.20	0.01
1 st codon position	3,779	26.1	30.0	26.3	17.7	56.0	-0.07	0.20
2 nd codon position	3,779	17.8	43.0	16.8	22.3	60.9	-0.41	-0.14
3 rd codon position	3,779	28.2	36.0	17.0	18.9	64.1	-0.12	-0.05
rRNAs	2,168	35.6	29.6	16.5	18.3	65.2	0.09	-0.05
tRNAs	1,513	30.2	31.9	22.0	15.9	62.1	-0.03	0.16
large-noncoding region	913	38.8	30.3	19.4	11.5	69.1	0.12	0.26
<i>Nerita melanotragus</i>*								
Entire sequence	15,252	39.6	33.9	21.2	15.2	63.6	0.08	0.16
PCGs	11,321	25.7	37.0	18.7	18.6	62.7	-0.18	0.00
1 st codon position	3,773	26.0	30.0	26.3	17.4	56.3	-0.07	0.20
2 nd codon position	3,774	18.2	43.0	16.4	22.4	61.2	-0.41	-0.15
3 rd codon position	3,774	33.0	38.0	13.3	16.0	70.6	-0.07	-0.09
rRNAs	2,165	36.1	31.1	15.9	17.0	67.2	0.07	-0.03
tRNAs	1,426	31.6	31.8	21.2	15.4	63.4	0.00	0.16
large-noncoding region	389	38.0	32.6	15.2	14.1	70.7	0.08	0.04

* : nearly complete mitochondrial genome sequences

기수갈고둥의 미토콘드리아 배열양상은 갈고둥상목의 4종의 유전자 배열양상과 동일하며, 연체동물의 다른 상목(infraorder) 준위 그룹의 유전자 배열양상과는 뚜렷한 차이를 보인다. 특히 근연 그룹으로 알려져 있는 Caenogastropoda과 비교했을 때 8.6kb에 해당하는 *trnF~12S rRNA* 유전자 영역이 전좌(invert)되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 기수갈고둥의 미토콘드리아 유전체는 일반적인 미토콘드리아 유전체의 특성상 noncoding region이 적은 컴팩트한 구조를 보인다. 하지만 *COX3~trnK* (33bp), *ATP6~trnF* (22bp), *trnK~trnA* (19bp), *trnA~trnR* (13bp)로서 다른 중생동물에 비해 유전자 사이의 갭(gap) 구간이 상당부분 존재한다.

기수갈고둥의 전체 미토콘드리아 유전체의 염기조성을 살펴보면, 염기 A와 T에 상대적으로 치우쳐진 것을 알 수 있다(whole sequence: AT% = 64.9%). 이는 근연종의 미토콘드리아 유전체에서도 유사하게 나타나는 현상이며 다른 유전자 영역에 비해 단백질 암호화 유전자 전체의 AT% 비율이 56.4%로 가장 낮았다. 기수갈고둥의 단백질 암호화 유전자 염기서열을 코돈 사이트별로 나누어 분석했을 때 3rd codon position이 나머지 사이트에 비해 현저히 높은 AT% 비율을 보인다(73.8%). 이러한 패턴은 기수갈고둥의 근연종인 *Nerita* 4종에서도 명확히 확인되는 부분이다.

기수갈고둥의 전체 미토콘드리아 유전체 염기서열은 염기 T와 G를 다른 염기에 비해 상대적으로 많이 포함하고 있어서 negative AT-skew (-0.06)와 positive GC-skew (0.15)값으로 나타난다. 단백질 암호화 유전자 영역의 염기 skewness 분석에서 특이점은 기수갈고둥의 경우 large noncoding region을 제외하고 모든 영역에서 negative AT-skew 값을 보이는 반면 다른 *Nerita* 종들의 경우 rRNA 유전자에서 positive AT-skew 값을 보인다. 이 점을 속(genus)로 분류되는 두 그룹 간 진화적 양상에 따른 차이인지에 대해 명확한 서술을 하기는 어렵지만, 미토콘드리아 ribosomal RNA 유전자 정보를 이용하여 이 두 그룹을 구별하기 위한 분자마커로서 다른 유전자에 비해 유용성이 있을 것으로 생각된다.

■ 갈고등류의 RSCU (Relative synonymous codon usage)분석

기수갈고등의 13개 단백질 암호화 유전자는 불완전 종결코돈을 제외하고 총 3,770개의 코돈으로 구성된다. 이는 근연종의 코돈개수와도 유사한 수치이다. 본 분석에 이용한 5종의 갈고등류 단백질 암호화 유전자의 코돈들을 아미노산 성질별로 분류했을 때 코돈분포 사항은 codon family별로 유사한 경향성을 보인다(그림 II-1-22). Codon family 중에서도 수적으로 강세를 보이는 것은 Leu1(CUR), Leu2(UUR), Ile, Phe, Val, Gly, Ala으로 CDspT 값이 69이상인 codon family이다. 이는 5종의 모든 갈고등류에서 수치적으로 차이는 있으나 이 6종류의 codon family가 가장 우세한 경향성을 보인다. RSCU 분석에서는 코돈별로 사용빈도를 분석한 것으로 AT 비율이 상대적으로 높은 AT-rich codon의 빈도가 높고, 반대로 GC-rich codon의 경우 사용빈도가 다소 적은 것을 확인할 수 있다(그림 II-1-23).

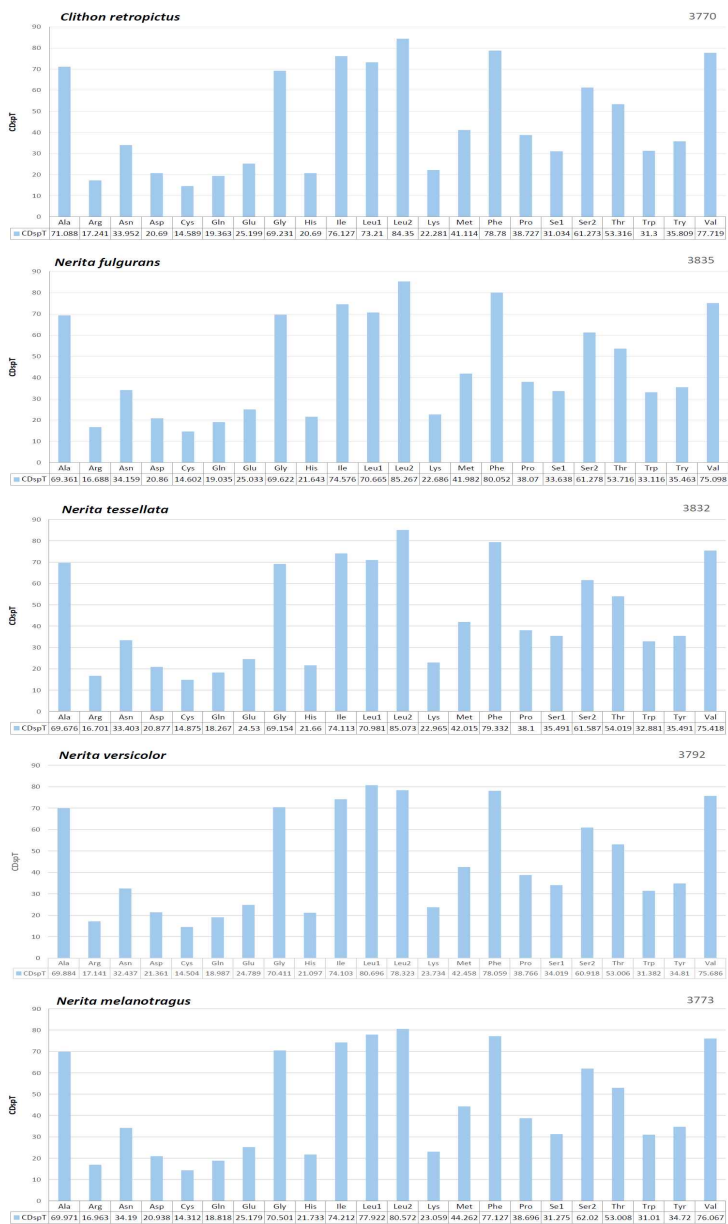


그림 II-1-22. 5종 갈고둥류 미토콘드리아 유전체의 코돈분포
(CDspT, codons per thousands codons)



그림 II-1-23. 5종 갈고둥류 미토콘드리아 유전체의 RSCU
(RSCU: Relative Synonymous Codon Usage)

8) 나팔고둥 *Charonia sauliae*

가) 연구대상종의 특성



- 국명: 나팔고둥
- 영명: Triton shell
- 학명: *Charonia sauliae*
- 지정번호: 멸종위기I급
- 계통: 흡강목, 수염고둥과

그림 II-1-24. 나팔고둥

[출처: <http://blog.naver.com/naturaleco?Redirect=Log&logNo=80045006089>]

■ 생김새: 패각 형태는 중대형이며 나뭇잎은 높은 원추형으로 나층이 8층이다. 패각은 매우 단단하고 두꺼우며, 테각과 위의 나층은 주홍색이고 체층을 비롯한 아래의 나층에서는 황색 바탕에 자갈색 구름무늬나 백색무늬가 있다. 체층의 견각은 각이 지며 주연은 둥글다. 체층과 차체층에는 굵고 낮은 돌기로 된 나륜이 2줄씩 있고 그 위의 나층들에서는 불규칙한 돌기가 있을 뿐이다. 패각 표면에는 매우 얇은 나륜과 나구가 물결모양을 이루는데, 성체에서는 나륜이 상당히 굵고 뚜렷해진다. 각구는 방추형, 외순은 두껍고 단단하며 내면은 백색, 외순연 안쪽에는 넓고 길쭉한 주름 위에 흑갈색띠가 안쪽을 향해 있다. 내순은 활층으로 체벽을 덮고 윗부분에는 백색활층으로 된 일자형의 긴 돌기 1개가 있다. 성체의 크기는 각고 220mm, 각경 100mm정도다.

■ 서식지: 수심 약 10m~200m 바다의 바위나 자갈로 된 바닥

■ 먹이: 극피동물(불가사리, 해삼 등)

■ 생활양식: 자용이체이며 체내수정을 하고 산란은 12월부터 4월까지 이루어진다. 육식성으로 극피동물을 먹고 산다. 한국에 존재하는 불가사리의 유일한 천적으로 나팔고둥 한 마리가 하루에 불가사리 한 마리 이상을 섭취한다. 12월에서 4월에 거쳐 산란하며 생존에 적절한 수온은 15℃정도이다.

■ 분포: 한국, 일본, 필리핀

[출처: 국립수산물학원 수산생명자원정보센터]

나) 연구결과 및 고찰

■ 나팔고둥 미토콘드리아 유전체의 염기서열 결정과 annotation

나팔고둥의 전체 미토콘드리아 유전체에서 결정된 염기서열은 총 15,330bp로 확인되었으며 13개의 단백질 암호화 유전자(*ATP6*, *ATP8*, *COI*, *COII*, *COIII*, *CytB*, *ND1-ND6*, *ND4L*)와 2개의 rRNA (*12S*, *16S*), 22개의 tRNA 유전자로 구성되어 있다(그림 II-1-25).

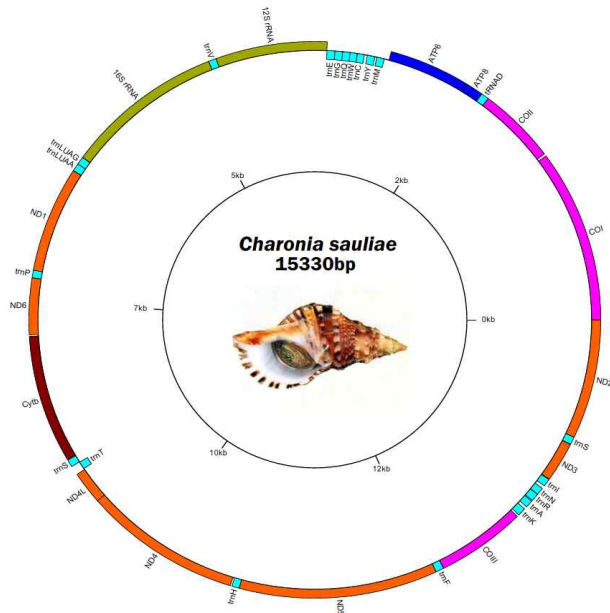


그림 II-1-25. 나팔고둥 미토콘드리아 유전체의 유전자 배열과 구성

나팔고둥의 전체 미토콘드리아 유전체를 구성하고 있는 총 37개의 유전자들에 대한 위치와 길이, 단백질 암호화 유전자의 경우에는 개시코돈과 종결코돈에 대하여 분석하였다. 그 결과는 표 II-1-22와 같다. 나팔고둥의 전체 미토콘드리아 유전체의 A+T contents는 69.31%(A: 31.40%, C: 15.24%, G:15.45%, T: 39.91%)였다. tRNA 유전자 7개를 제외한 모든 유전자가 L-strand에 위치하는 것으로 확인되었다.

표 II-1-22. 나팔고등 미토콘드리아 유전체의 유전자 길이 및 위치

Gene	C ^a	Begin	End	Length	O ^b	Start	Stop
<i>COI</i>		1	1536	1536	+21	ATG	TAA
<i>COII</i>		1558	2244	687	-2	ATG	TAA
<i>trnD</i>		2243	2310	68	+1		
<i>ATP8</i>		2312	2470	159	+5	ATG	TAA
<i>ATP6</i>		2476	3171	696	+41	ATG	TAA
<i>trnM</i>	X	3213	3280	68	+17		
<i>trnY</i>	X	3298	3366	69	+25		
<i>trnC</i>	X	3392	3456	65	0		
<i>trnW</i>	X	3457	3522	66	-3		
<i>trnQ</i>	X	3520	3586	67	0		
<i>trnG</i>	X	3587	3654	68	0		
<i>trnE</i>	X	3655	3725	71	0		
<i>12S rRNA</i>		3726	4693	968	0		
<i>trnV</i>		4694	4760	67	0		
<i>16S rRNA</i>		4761	6145	1385	0		
<i>trnL^(UAG)</i>		6146	6214	69	+1		
<i>trnL^(UAA)</i>		6216	6284	69	+1		
<i>ND1</i>		6286	7227	942	0	ATG	TAA
<i>trnP</i>		7228	7294	67	+1		
<i>ND6</i>		7296	7796	501	+13	ATG	TAA
<i>CytB</i>		7810	8949	1140	+5	ATG	TAA
<i>trnS</i>		8955	9019	65	+3		
<i>trnT</i>		9023	9091	69	+10		
<i>ND4L</i>		9102	9398	297	-7	ATG	TAA
<i>ND4</i>		9392	10765	1374	+14	ATG	TAA
<i>trnH</i>		10780	10844	65	0		
<i>ND5</i>		10845	12566	1722	0	ATG	TAA
<i>trnF</i>		12567	12637	71	0		
<i>COIII</i>		12638	13417	780	+17	ATG	TAA
<i>trnK</i>		13435	13507	73	+24		
<i>trnA</i>		13532	13598	67	+8		
<i>trnR</i>		13607	13675	69	+2		
<i>trnN</i>		13678	13743	66	+26		
<i>trnI</i>		13770	13838	69	+4		
<i>ND3</i>		13843	14196	354	+3	ATG	TAA
<i>trnS</i>		14200	14267	68	0		
<i>ND2</i>		14268	15326	1059	+4	ATG	TAA

^a Complementary: X indicates a gene transcribed from the complementary strand.

^b Overlapping: Negative numbers indicate that adjacent genes are overlapped and positive ones indicate that there are intergenic spacers between two adjacent genes.

단백질 암호화 유전자의 개시코돈(start codon)은 모든 유전자가 ATG를 사용하고, 종결코돈(stop codon)은 모든 유전자가 TAA를 사용하는 것으로 확인하였다. 나팔고둥의 13개 단백질 암호화 유전자의 총 길이는 11,247bp이며 단백질 암호화 부분의 A+T contents는 67.45%(A: 28.52%, C: 15.13%, G: 17.45%, T: 38.93%)였다(표 II-1-23).

나팔고둥의 미토콘드리아 유전체 내에는 12S rRNA, 16S rRNA의 2개 RNA가 존재하며 각각 968bp, 1385bp로 확인되었다. 나팔고둥의 22개의 tRNA 유전자는 전형적인 네오클로버 2차 구조를 가지고 있으며, 그 길이는 65~73bp 사이임을 확인하였다.

표 II-1-23. 나팔고둥의 13개 미토콘드리아 단백질 암호화 영역의 Codon usage

Amino acids	Codons	No.	Freq. (%)	Amino acids	Codons	No.	Freq. (%)	Amino acids	Codon	No.	Freq. (%)	
Nonpolar												
Ala	GCG	6	0.02	Pro	CCG	5	0.03	Leu	TTG	40	0.07	
	GCA*	82	0.32		CCA*	67	0.44		TTA*	329	0.56	
	GCT	111	0.44		CCT	69	0.45		CTG	9	0.02	
	GCC	54	0.21		CCC	11	0.07		CTA*	87	0.15	
Ile	ATT	248	0.84	Val	GTG	14	0.06	Met	CTT	98	0.17	
	ATC*	47	0.16		GTA*	117	0.48		CTC	28	0.05	
Trp	TGG	12	0.11		GTT	96	0.39		ATG*	41	0.20	
	TGA*	100	0.89		GTC	17	0.07		ATA	163	0.80	
Phe	TTT	261	0.81									
	TTC*	60	0.19									
Polar												
Asn	AAT	83	0.70	Gly	GGG	17	0.07	Ser	AGG	8	0.02	
	AAC*	35	0.30		GGA*	144	0.57		AGA	73	0.21	
Cys	TGT	32	0.73	Thr	GGT	65	0.26		AGT	45	0.13	
	TGC*	12	0.27		GGC	25	0.10		AGC*	18	0.05	
Tyr	TAT	113	0.84		ACG	6	0.03		TCG	7	0.02	
	TAC*	22	0.16		ACA*	61	0.33		TCA	82	0.23	
Gln	CAG	12	0.15		ACT	98	0.52		TCT	100	0.28	
	CAA*	69	0.85		ACC	22	0.12		TCC	21	0.06	
Acidic												
Asp	GAT	66	0.83	Glu	GAG	14	0.16					
	GAC*	14	0.18		GAA*	73	0.84					
Basic												
Arg	CGG	7	0.12	His	CAT	66	0.83	Lys	AAG	15	0.17	
	CGA	37	0.62		CAC	14	0.18		AAA	72	0.83	
	CGT	13	0.22									
	CGC	3	0.05									
Stop codon												
	TAG	0	0									
	TAA	13	1.00									

Codons for which a tRNA with matching anticodons occurs in mitochondrial are marked with asterisk(*)

9) 참달팽이 *Koreanohadra koreana*

가) 연구대상종의 특성



- 국명: 참달팽이
- 학명: *Koreanohadra koreana*
- 지정번호: 멸종위기II급
- 계통: 진유패목, 달팽이과

그림 II-1-27. 참달팽이

[출처: 시화호지킴이 최종인 사진]

■ 생김새: 패각 형태는 원추형으로 나층은 5층으로 나뉘는 낮다. 차체층 이후 나뉘는 층이 유사종인 북한산달팽이(*Koreanohadra kurodana*)보다 낮다. 패각의 체색은 변이가 있으나 주로 적갈색을 띠고, 색대는 없다. 패각 각정 층을 제외하고 전면에서 다소 불규칙한 성장맥이 촘촘하게 나타난다. 체층은 크고 둥글며 체층 저면도 둥글다. 제공은 좁고 깊으며 각구 축순에 의해 약간 가려진다. 각구는 반원형으로 성체의 각구 가장자리는 두꺼워지고 약하게 뒤로 젖혀진다. 내순에는 약한 활층의 흔적이 있다. 성체의 크기는 각고 16mm, 각경 23mm 정도다. 껍데기는 미색, 황갈색, 적갈색 등 변이가 있으며 색대를 갖는 0200형과 색대가 없는 0000형 2가지 형태가 있다.

■ 서식지: 숲 속에 습도가 높은 관목림의 나무 위

■ 먹이: 풀, 나뭇잎

■ 생활양식: 자웅동체, 건조한 곳에서도 이동이 가능

■ 분포: 한국(임진, 홍도)

[출처: 한국의 멸종위기종 korearedlist.go.kr]

나) 연구결과 및 고찰

■ 참달팽이 미토콘드리아 유전체의 염기서열 결정과 annotation

참달팽이의 전체 미토콘드리아 유전체에서 결정된 염기서열은 총 13,979bp로 확인되었으며 13개의 단백질 암호화 유전자(*ATP6*, *ATP8*, *COI*, *COII*, *COIII*, *CytB*, *ND1-ND6*, *ND4L*)와 2개의 rRNA(*12S*, *16S*), 22개의 tRNA 유전자로 구성되어 있다(그림 II-1-28). 참달팽이의 미토콘드리아 유전자 배열은 진유폐목(Eupulmonata) 달팽이과(Bradybaenidae)에 속하는 동양달팽이(*Mastigeulota kiangsinsensis*)와 동일한 양상을 보여주고 있음을 확인하였다.

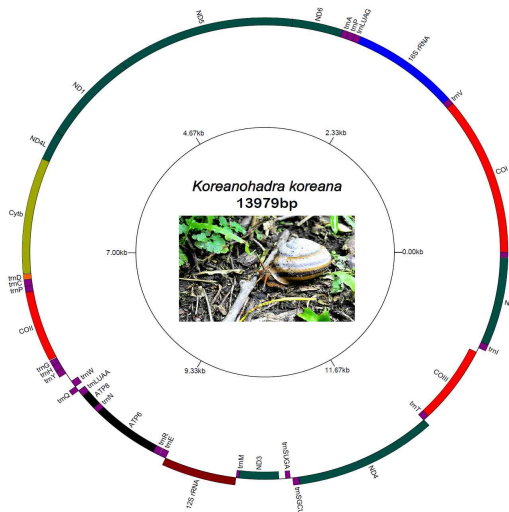


그림 II-1-28. 참달팽이 미토콘드리아 유전체의 유전자 배열과 구성

참달팽이의 전체 미토콘드리아 유전체를 구성하고 있는 총 37개의 유전자들에 대한 위치와 길이, 단백질 암호화 유전자의 경우에는 개시코돈과 종결코돈에 대하여 분석하였다. 그 결과는 표 II-1-24, 25와 같다. 참달팽이의 전체 미토콘드리아 유전체의 A+T contents는 65.43%(A: 28.43%, C: 15.97%, G: 18.61%, T: 37.09%)였다. 단백질 암호화 유전자 4개(*ATP6*, *ATP8*, *ND3*, *COIII*)와 tRNA 유전자 7개(*trnW*, *trnL*, *trnN*, *trnR*, *trnE*, *trnM*, *trnS*), *12S* rRNA 유전자가 H-strand에 위치하고, 나머지 유전자는 모두 L-strand에 위치하는 것으로 확인되었다.

표 II-1-24. 참달팽이 미토콘드리아 유전체의 유전자 길이 및 위치

Gene	C ^a	Begin	End	Length	O ^b	Start	Stop
<i>COI</i>		1	1528	1528	0	GTG	T--
<i>trnV</i>		1529	1588	60	0		
<i>16S rRNA</i>		1589	2592	1004	0		
<i>trnL^(UAG)</i>		2593	2653	61	-3		
<i>trnP</i>		2651	2713	63	+2		
<i>trnA</i>		2716	2777	62	-7		
<i>ND6</i>		2771	3253	483	-14	ATT	TAA
<i>ND5</i>		3240	4916	1677	-19	GTG	TAG
<i>ND1</i>		4898	5797	900	0	ATG	TAG
<i>ND4L</i>		5798	6100	303	-22	TTG	TAG
<i>Cytb</i>		6079	7194	1116	5	TTG	TAG
<i>trnD</i>		7200	7254	55	-4		
<i>trnC</i>		7251	7314	64	-2		
<i>trnF</i>		7313	7373	61	0		
<i>COII</i>		7374	8054	681	7	GTG	TAA
<i>trnG</i>		8062	8114	53	-1		
<i>trnH</i>		8114	8178	65	0		
<i>trnY</i>		8179	8241	63	90		
<i>trnW</i>	X	8332	8398	67	-2		
<i>trnQ</i>		8397	8447	51	-1		
<i>trnL^(UAA)</i>	X	8447	8510	64	3		
<i>ATP8</i>	X	8514	8669	156	0	ATG	TAA
<i>trnN</i>	X	8670	8728	59	1		
<i>ATP6</i>	X	8730	9383	654	-4	ATA	TAA
<i>trnR</i>	X	9380	9442	63	5		
<i>trnE</i>	X	9448	9512	65	0		
<i>12S rRNA</i>	X	9513	10208	696	0		
<i>trnM</i>	X	10209	10269	61	-35		
<i>ND3</i>	X	10235	10615	381	62	GTG	TAA
<i>trnS^(UGA)</i>	X	10678	10724	47	20		
<i>trnS^(GCU)</i>		10745	10804	60	0		
<i>ND4</i>		10805	12133	1329	-5	GTG	TAA
<i>trnT</i>	X	12129	12188	60	1		
<i>COIII</i>	X	12190	12966	777	45	ATG	T--
<i>trnI</i>		13012	13074	63	0		
<i>ND2</i>		13075	13923	849	4	GTG	TAA
<i>trnK</i>		13928	13979	52	0		

표 II-1-25. 참달팽이 미토콘드리아 단백질 암호화 영역의 codon usage

Amino acids	Codons	No.	Freq. (%)	Amino acids	Codons	No.	Freq. (%)	Amino acids	Codon	No.	Freq. (%)		
Nonpolar													
Ala	GCG	14	0.07	Pro	CCG	13	0.09	Leu	TTG	98	0.16		
	GCA*	30	0.16		CCA*	38	0.27		TTA*	266	0.42		
	GCT	82	0.44		CCT	76	0.53		CTG	24	0.04		
	GCC	62	0.33		CCC	16	0.11		CTA*	114	0.18		
Ile	ATT	194	0.82	Val	GTG	60	0.23		CTT	98	0.16		
	ATC*	44	0.18		GTA*	88	0.34		CTC	30	0.05		
Trp	TGG	44	0.47		GTT	90	0.34	Met	ATG*	50	0.27		
	TGA*	50	0.53		GTC	23	0.09		ATA	138	0.73		
Phe	TTT	228	0.75										
	TTC*	77	0.25										
Polar													
Asn	AAT	81	0.70	Gly	GGG	42	0.17	Ser	AGG	41	0.12		
	AAC*	34	0.30		GGA*	58	0.23		AGA	56	0.16		
Cys	TGT	38	0.72		GGT	120	0.47		AGT	69	0.19		
	TGC*	15	0.28		GGC	34	0.13		AGC*	17	0.05		
Tyr	TAT	136	0.77	Thr	ACG	18	0.10		TCG	14	0.04		
	TAC*	41	0.23		ACA*	51	0.27		TCA	31	0.09		
Gln	CAG	12	0.21		ACT	73	0.39		TCT	95	0.27		
	CAA*	44	0.79		ACC	44	0.24		TCC	33	0.09		
Acidic													
Asp	GAT	46	0.79	Glu	GAG	28	0.38						
	GAC*	12	0.21		GAA*	45	0.62						
Basic													
Arg	CGG	12	0.19	His	CAT	57	0.72	Lys	AAG	34	0.41		
	CGA	25	0.39		CAC	22	0.28		AAA	48	0.59		
	CGT	21	0.33										
	CGC	6	0.09										
Stop codon													
	TAG	4	0.36										
	TAA	7	0.64										

참달팽이의 13개의 단백질 암호화 유전자의 총 길이는 10,812bp이며 단백질 암호화 부분의 A+T contents는 64.95% (A: 26.06%, C: 16.60%, G: 18.45%, T: 38.88%)였다. 13개의 단백질 암호화 유전자 중에서 *ND5* 유전자가 1,677bp로 가장 길고, *ATP8*이 156bp로 가장 짧다. 단백질 암호화 유전자의 개시코돈 (start codon)은 *COIII*, *ND1*, *ATP8*는 ATG를, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND5*, *COII*는 GTG를, *ND4L*, *Cytb*는 TTG를, *ATP6*는 ATA를, *ND6*는 ATT를 개시코돈으로 사용하고, 종결코돈 (stop codon)은 2개의 유전자 (*COI*, *COIII*)를 제외하고는 모두 TAA, TAG를 사용하는 것으로 확인하였다.

[illegible]

2. 멸종위기종의 유전자 표지 개발 및 유전다양성 분석

가. 맹꽁이 *Kaloula borealis* (Barbour)



- 국명: 맹꽁이
- 영명: Narrow-Mouthed Toad 또는 Boreal Digging Toad
- 학명: *Kaloula borealis*
- 멸종위기II급
- 계통: 척추동물문 맹꽁이과

그림 II-2-1. 맹꽁이

■ 생김새: 맹꽁이는 맹꽁이과에 속하며 몸길이는 4~4.5cm 정도로 몸통은 뚜렷하게 팽대되어 있어 몸의 대부분을 이룬다. 머리는 몸통에 비해 짧고 작으며 주둥이 또한 작고 끝이 약간 둔하면서 뾰족하다. 수컷의 울음주머니는 아래턱에 하나 있다. 몸의 등면은 황색, 황갈색, 또는 암갈색 바탕에 연한 청색을 띠고 있으며 무질서한 흑색 반점들이 산재해 있고, 배면은 황갈색 바탕에 연한 황색반문들이 산재한다.

■ 서식지: 주로 평지의 물이 고여 있는 물웅덩이 주변이나 습지지역 주변의 초지에 서식하지만 낮에는 대부분 돌 밑이나 땅속 굴을 파고 들어가 있어 관찰이 어렵다.

■ 먹이: 거미류, 메뚜기, 귀뚜라미, 모기와 같은 곤충류, 지렁이와 같은 빈모류가 주된 먹이다.

■ 번식: 번식기는 6-7월로 비가 집중적으로 내리는 장마철에 번식한다. 수명은 9-10년이고 수컷은 4-6년생이 암컷은 5-7년생이 번식에 주로 참여한다.

■ 분포: 국내의 경우 제주도를 포함하여 전국 내륙의 습지지역에 산재하여 서식한다. 국외는 중국의 중앙부에서부터 동북부지역에 주로 분포한다.

[출처: 한국의 멸종위기종 korearedlist.go.kr]

1) 연구의 필요성

맹꽁이(*Kaloula borealis*)는 1989년 환경부 특정야생동·식물로 지정된 이후 1998년 멸종위기 야생동·식물 및 보호야생동·식물 지정된 바 있으며 그 후 2005년에 환경부 멸종위기 야생동·식물 II급 종으로 분류되어 법적보호를 받고 있는 양서류로서 제주도를 포함하여 한반도 내륙의 농경지 및 저지대 습지지역에 주로 분포하고 있는 종이다(김과 송, 2010; 국립생물자원관, 2011, 그림 II-2-1). 이 종은 이동성이 매우 낮으며 장마철의 짧은 번식기에 습지를 중심으로 서식 산란하는 종으로 지역 집단간 개체 이동이 많지 않을 것으로 보인다. 특히 제주도에 분포하는 맹꽁이집단은 이러한 생태적인 특성과 지리적으로 격리되어 분포하는 특징으로 미루어 본토에 분포하는 집단간의 이동성이 매우 제한될 것으로 보이며, 그 결과 집단 간 강한 유전적 구조가 예측된다. 최근 농경지의 감소와 산란지의 파괴로 인해 서식지가 감소하고 있으며, 맹꽁이의 개체수가 감소하고 집단간의 이동성이 낮아 유전적 다양성이 저하될 가능성이 있으므로 우리나라 멸종위기종의 보전을 위한 생물학적 데이터 축적이 시급히 필요한 실정이다. 또한 본 연구의 결과는 우리나라 멸종위기종에 대한 연구뿐만이 아니라 중국 동북부에 분포하는 맹꽁이의 유전다양성 및 집단 구조를 밝힐 수 있는 단초가 될 것으로 보인다.

2) 재료 및 방법

가) 표본 확보 전략

맹꽁이는 주로 번식기에 야간활동을 하는 무미류로서 이들의 채집은 여름 장마철의 아주 짧은 번식기 이외에는 채집이 매우 어렵다. 따라서 본 연구를 위하여 본 종의 분포지역으로 알려진 제주도를 비롯하여 한반도 중부내륙 습지 여러 지역을 대상으로 맹꽁이의 번식시기인 여름장마철에 주로 채집을 시도하였다. 본 연구를 위해 수집된 유전자 시료는 2014년 의왕시에서 기 확보한 시료 및 2015년에 확보한 시료이다(표 II-2-1; 그림 II-2-2). 유전자 분석시료의 확보는 맹꽁이 야생개체군의 보호를 위하여 성체의 발가락 한마디만을 자르고 샘플수집이 끝난 개체는 원래 서식지로 돌려보내는 비침습적 방식으로 수행하였다. 수집된 시료조직은 95 - 100% 에탄올에 저장하여 실험실로 운반하고 DNA 추출 전까지 -20도의 냉동고에 보관하였다.

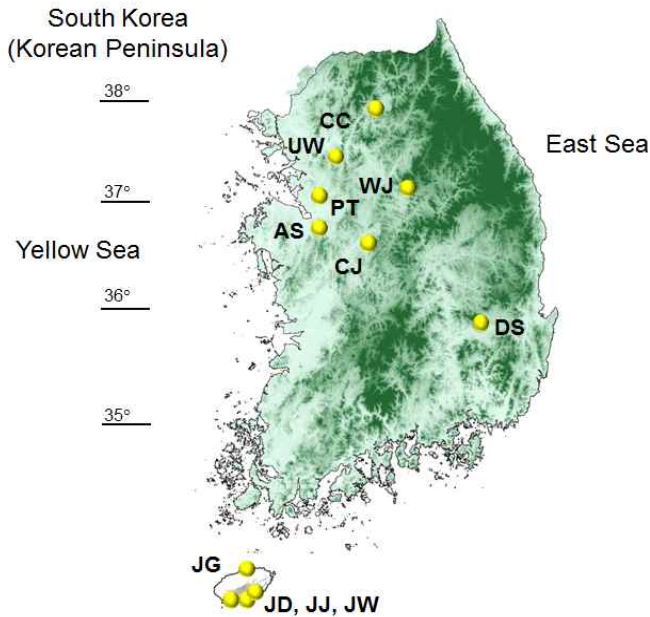


그림 II-2-2. 멍꽁이 채집 지역(기 채집 지역 포함)

표 II-2-1. 멍꽁이의 채집 정보

	채집 지역	집단 ID	채집 개체수	채집 날짜	비고
1	경기도 평택시	PT	14	2007. 06. 26	*(미제출)
2	경기도 의왕시	UW	20	2014. 06. 25	제출
3	강원도 춘천시	CC	10	2014. 07. 29	*(미제출)
4	강원도 원주시	WJ	9	2014. 07. 28	*(미제출)
5	충청남도 아산시	AS	6	2015. 08. 29	제출
6	충청북도 청주시	CJ	20	2014. 06. 27	*(미제출)
7	대구광역시 달서구	DS	7	2015. 08. 04	제출
8	제주특별자치도 서귀포시	JN	25	2013. 08. 05	*(미제출)
9	제주특별자치도 서귀포시	JW	13	2014. 07. 05	*(미제출)
10	제주특별자치도 서귀포시	JD	2	2009. 06. 12	*(미제출)
11	제주특별자치도 제주시	JG	4	2009. 06. 13	*(미제출)
			20	2015. 07. 03	제출

*(미제출) : 분석결과 신뢰도를 높이기 위해 추가 분석한 시료

나) 유전자 분석 범위

국립생물자원관에서 2014년 용역과제로 실시한 맹꽁이 genomic DNA의 차세대 염기서열 (NGS)분석 방법을 통해 얻어진 결과를 바탕으로, 반복 서열이 존재하고 증폭을 위한 프라이머를 디자인 할 수 있는 여분의 적절한 서열이 존재하는 contig를 선별하였다. 선별한 contig 중 반복서열의 횟수가 많은 순서대로 정렬한 후, 앞 순위로부터 후보 서열을 결정하였다. Microsatellite 마커에 주로 사용되는 di-nucleotide repeat에 해당하는 primer는 70쌍, tri-nucleotide repeat와 tetra-nucleotide repeat에 해당하는 primer는 각각 40쌍 씩 결정하여 총 150개의 primer쌍에 대한 marker 가용성 테스트를 수행하였으며 프라이머 정보는 표 2와 같다.

표 II-2-2. NGS분석 자료를 기반으로 선정한 150개 microsatellite 후보군

Primer name	Contig ID	Motif	Forward primer sequence (5' → 3')	Reverse primer sequence (5' → 3')
Kab001	89914580	(GA) ₁₁	CAGCCAGTTGTTCTGACGAG	ACCTCGCTCTTACCTCCAT
Kab002	89925000	(AC) ₁₂	CCCGGACATTCATTCAGTT	ATCTGCATGTGTGGACTGG
Kab003	89930612	(CA) ₁₂	TCCTTACTCCCAGAAACAGGC	TTACTTCCCGGCACCTCTTA
Kab004	89957869	(GT) ₁₁	ACTGTGGAAAGGTTTGCGTT	AACAGAGAATAAGGCCATGACAA
Kab005	89972119	(AG) ₁₁	GCTTTGGTGTCTCAGGACTTC	AGAGGACATCGCTTCCCAA
Kab006	89992887	(AG) ₁₁	GGATAAATGAAAAGCAGGCG	GCTGCTGTTTAAAGGGTGG
Kab007	90019421	(AC) ₁₁	CGCTGACCTATGTTGTGTTTCT	CCCTGCATCAATGGAGGCTA
Kab008	90039083	(CT) ₁₁	GCCTCACTGCACTATGCTGA	GGCAACTGGAATGGTAATGC
Kab009	90039975	(GT) ₁₁	GCTTGCCATGTTTGTTTTCA	AGAGCCGTTTATTTGGGTCC
Kab010	90046275	(AC) ₁₂	ATGGAGAGGGAGTGACGCTA	CAGTCCATGCTGTCTGGCTA
Kab011	89936390	(TCT) ₈	CACCACCGTGTTCAGACTTG	CTATCTCATCCAGGGGCGTA
Kab012	89946923	(CTG) ₈	GAAAGCAGCGTGTGCACTTA	TGCTAATAATGGCCGCTTTC
Kab013	89962671	(GCT) ₈	TGAAAGGTAAGCTGGATGG	CTAGTGCTGTGGCACTCTG
Kab014	89976193	(CAT) ₈	CTCCAGAATCCAAATCCACA	CTTTGCATGCCTTCTCTGTT
Kab015	89979733	(GTT) ₉	AAAACCGCAACAATGTCTCC	AAAAATGAACCGCTCATGC
Kab016	89979801	(TCA) ₈	GGAGGGTTGACCACTCATGT	TACCAGTGACAGGTTGGCTG
Kab017	89986705	(AGG) ₈	TATACAGCCAGAGCACACGG	ATGCTGCTCAAAACCATCTCA
Kab018	89997277	(TGA) ₈	AAGTTGTGCTGTACTGCCC	TTAAAGCGGTGCGTGGTTAC
Kab019	90018181	(CAG) ₈	TGTGAGGATCCCTGACATGA	GGCATGCCCTTGATTGAAGA
Kab020	90024145	(CAG) ₈	CTCGGTGAAGTTTAGCGGAC	TATGTTGTAGCGCAATGCC
Kab021	89914484	(CATA) ₆	GCAGTTGTGCTACTCCTCC	GTTTCAGGGTAACCTGGTGG
Kab022	89918830	(CATA) ₆	TAGGGAAACGGCTTGTGTC	GAGGCAGCAGAAGAGGTTGT
Kab023	89924146	(TGA) ₆	TGCCAGCTTCATTAACATATGTG	TGCCTACATGAATAAGGCACTG
Kab024	89929268	(CAAT) ₆	TGTTGGCCTAACTCAGGTGAC	TTGCGCATTAGGTACACAA
Kab025	89931754	(ATA) ₆	CAAACATTGCCAGAACAGA	AGCTCCACCACAAAACCTGCT
Kab026	89947409	(CCAT) ₆	GATCAGGATCCTCGTCCAGA	ACTCCATGTTTGCGATTCT
Kab027	89973841	(GTA) ₆	GTTCTCGCTAGTGACAGGG	AATGTTAGCTCTGAGGGGCA
Kab028	89976281	(ACAT) ₆	CGTGTATGATGCAAACTCC	TTTTCTGCGACACCTCAATG
Kab029	89985801	(CTTT) ₆	TGCAGACATTGAGTCTGGC	TGTTGACACAGACTGAATGG
Kab030	89993445	(CCAG) ₆	ATGATGCCGGATACAAGAGG	GTAAGCCTGTCTCTCCACC
Kab031	89936368	(AC) ₁₁	GGCCAAGCAATTTTACAT	TGATTTTCACTGGGAATGGG
Kab032	89940442	(CA) ₁₁	CTGTGATGTATGTGGAGGG	TTAGCTGGATGATAAGGGCG
Kab033	89957533	(TG) ₁₂	TGAAAATCGTGTAGGTTCTGC	GCTAGATTTGAACCGCCAA
Kab034	89968345	(GT) ₁₁	CCTGGTGTGTGGGTACCTTT	TGTTTGGAAACACTTGGGA
Kab035	89974943	(CT) ₁₁	CACACCCAAAAGGGTATTG	TTGGTCTTGGTATGGGTGT
Kab036	89985579	(TG) ₁₂	TGGATAAGATTTGATGGCAGG	AAGTGTCAAGTCACTTGGGG

Kab037	90008177	(AC) ₁₂	AAACTCTGCTCTGCTTTGCC	GCCTGTGTATGATGCTGTA
Kab038	90014491	(GA) ₁₁	ATACCGAAAAATCCCCAAA	AGATGCTCGACAGAGGAAGC
Kab039	90026681	(AC) ₁₁	TCTTGTGAATTCTCCAGCC	TGTTCTGGCAGTTTGTGG
Kab040	90045873	(CA) ₁₁	AAAAGGGGGTAGCATATCC	GACGAGTACAGCTCTCTTA
Kab041	90046407	(AC) ₁₁	CAGTACTGGAGCGAGGGAAG	GCTGTGGTGTGTGAGAGAGC
Kab042	90054991	(AC) ₁₁	AAAGTTTAGTGGGGTGTGCG	GATCATTGTGATGGTGGCAG
Kab043	90066223	(AC) ₁₂	TGTAATTGGGGCTGCTTGT	GGCATTAAAGCTGAAGCCAA
Kab044	90069258	(TC) ₁₁	GACTCGGGAGTAAAGCACG	ACAAGCTAAGGCTTGCCAAAC
Kab045	90071570	(GT) ₁₁	CGGCATGGCAGAGAATTTAT	AGGGTGTATCCACCGTTCA
Kab046	90078912	(GT) ₁₂	TGTACAGTGGGACAGTCATGTG	TTTTCCAATTCTCATAGGCCA
Kab047	90087088	(AC) ₁₁	AAAGGCCAAAAATATCAGTCCA	AGCATGTCCGGATGTTCTGT
Kab048	90095573	(TG) ₁₁	TATGGTGGCAGTCAGACAGG	GCAGGCCAGTCTGCATATTT
Kab049	90105071	(AC) ₁₂	CAGAGCATCTTCAATGCAGG	AGCAGGTGTATGCAATTTTG
Kab050	90110603	(TG) ₁₁	GGCACCCTGGTAAGATAAGG	CTAGAGAAAAAGCAGCACG
Kab051	90118011	(TC) ₁₁	TGCAGGATGATCTCTGTGGT	CCAGTTAGTGTCCAGGCCAT
Kab052	90120173	(TG) ₁₁	TTTATTTACCACTGCTTCTTGA	TGCCGTGATTTGAAAAGTTC
Kab053	90126917	(CT) ₁₀	TTGCCACTCTTCAACCATCAG	AATCCAAGATACGGCCACAG
Kab054	90127181	(TC) ₁₁	AGGCTATAGGGCCAGTCTCT	GATCATGTACACCCCAAGG
Kab055	90127391	(AC) ₁₀	GCATGCAGTGTACCATGTACAG	GAGCCATGGAAACAGAAACT
Kab056	90128383	(AC) ₁₁	CGACTCTGAGCAGAACCCACA	CTCCCTCTGTCCATTCTTGC
Kab057	90131459	(AG) ₁₀	TAGTATGCCTGCCTCTGCCT	GTGGGCAGATTTGGAAAAAT
Kab058	90133251	(AC) ₁₂	TCCATCTACAAGTTCACTGCAA	CAATTTTGTGCCAAAGAATGAA
Kab059	90134171	(CA) ₁₁	TGCAGCCTCTTTTCTGATT	CCCTGTGAATAGCATGTGGG
Kab060	90138349	(CA) ₁₀	ACAGTGGTGTAGGGGATGGA	ATCTCCACACACCCCTGTCT
Kab061	90018667	(ATC) ₉	TGCTCTTTCTCCCTCTTCCC	AGGAATGATGAGGATGTGGC
Kab062	90033933	(AGG) ₈	TAAGTGCTCTCCTGCCGTTT	CAAACTGTAAGCAGCCAGCA
Kab063	90036149	(TGC) ₈	AGAGGCAGCCTGATGTGAGT	CAGGGAGAAGGTTGAGGATG
Kab064	90056965	(ATC) ₈	ATGCAGTCCAATGAGGGAAAG	GGGAAAGAGAAAAGGCCAGAAA
Kab065	90059961	(AGC) ₈	AGCTTTGGCAGATACCTGGA	TGTGGGCTGCTATTAGACTTCA
Kab066	90062527	(CAG) ₈	GAGACCGTGTCCCAGTGAGT	GGAATGAGTGATCAGGCTGG
Kab067	90062695	(TGA) ₈	CCCCTAGAAAATGCCATGAA	TTGAAAACGTGCGGCTGAT
Kab068	90069532	(TGT) ₈	TTACAGGGAAGCAGGCTTGT	CTCCTTGACACTGAGGACA
Kab069	90073686	(TGA) ₈	TACCCCGTAAGCATTGTATG	AGTGACATCTCTATCAATGTGC
Kab070	90100583	(ATG) ₉	AAGAGAAGACCGTGGTGGTG	TGGCTATACGGTGAAGATCCA
Kab071	90112717	(CAG) ₇	ATGTCCCAAAACAGTCAAGGC	AGCACAGTAATTGGCCATCC
Kab072	90118537	(TTC) ₇	CCAGCCACTCCATTTCTGTT	ATGGCTGGTGTGGTGCACT
Kab073	90119149	(CAT) ₇	CAAAAATTGATTGAATCTGAGTCAT	GCAGGAGAGAGAAATGGGAA
Kab074	90131255	(TCA) ₇	GGACAATATGGACATTCCTCG	TAAGCCTTGGGGCTATGAGA
Kab075	90131317	(AGC) ₇	GCACAATATGGACCGATGAA	CTGAAGGGGGAAAAATGTATCA
Kab076	90132491	(TGC) ₇	TGTAGATGGGAGCAGGGACT	CATCACAGAGTTCAACCCCT
Kab077	90133445	(CTG) ₈	CTGTGACCTCTTAGCGTCCC	TTGAATTTGGAGTTTACGAAGGA
Kab078	90134461	(TGC) ₇	GGGCTTTTACACAGGGGAT	TGTCAAATGAAGTGCCCTGG
Kab079	90134943	(TAC) ₇	GGGGTATTCTGTGGCTTTCA	ATACAGGGCAGCTGGAAGCAC
Kab080	90136695	(TGC) ₇	TATGATGTTGAATCCGCTGC	GGGTTAAATTCACAAGGCCA
Kab081	89999085	(GGA) ₆	TACCTTGTCTCCCTGTAG	CAACGTAAACACTTCATCCA
Kab082	90007887	(TCAC) ₆	TTCCAAGCTTTATGTGTGCAA	AAGGGTGGGTGCAATATGAG
Kab083	90017985	(TGT) ₆	AGAGCCAAACTTTTGAGCCA	AACGACATCAACTGTGTTGC
Kab084	90022395	(TACA) ₆	AGGAGGTCGACAGTGCTGAT	CATGGGCTAGGTTGTTTCT
Kab085	90029773	(AGT) ₆	TGCACCATTACACTGTGAGGA	TCAAACATCTGGGAGACGAG
Kab086	90041659	(CATT) ₆	AGATAGACACACAACATGCACA	AGCAGTCACTCAGAGCGACA
Kab087	90043417	(AACT) ₆	AACCATGAGCTGAGTATCGG	AACCCCTGAAGCTATCCAC
Kab088	90043437	(ATGT) ₆	CTTTTGTGAACACCAAGGTT	TGCGGAGAGACATGGTTTAAAG
Kab089	90044751	(CTAA) ₆	GGGCCATATAATGTGCTTT	CACTCAAACTCTTCAGCATCA
Kab090	90046041	(ATGT) ₆	AAGTAGAGGGGACAAGTCGTG	ACTCCGTTAAATTGAGCCCT
Kab091	90052079	(TCTG) ₆	TGTGGGATCGTGTAGGTGAA	ACAGGTGTTTCCCCAGATCA
Kab092	90063471	(TGT) ₆	CCTGGGGTTAGGGTTCATGT	AACCCCTAAACCTGACCACAAA
Kab093	90075160	(TTGA) ₆	GCAAGAACCTCTGGAGCAAT	GGATCTTCAGCTTGTCTGTC
Kab094	90075182	(AACA) ₆	TTGTCTCCATCTTTGCATTTG	CCACCCCTCACTCCGATAAA
Kab095	90084132	(GTAT) ₆	ATGTGCGATGGACAATAGCA	CAGCAAACTGATGAGCTGGA
Kab096	90087880	(TTCA) ₆	GGCAAAAATGCACCAAAAAT	GCACAGTGTGCTGATGTA

Kab097	90091217	(GACA) ₆	GACGGGGTTGCAGTAAGTGT	TTACGGGGGCAATAAGTCTG
Kab098	90112905	(ATAG) ₆	CCCTTTGAGGTTGAGATGCT	ATAAGGGGTGCTGACTGCAA
Kab099	90124785	(TTCA) ₅	TGAGATTTTTCTTGACACC	AAACAGGAGAATGAAGGGCA
Kab100	90126795	(GATA) ₆	AAATGGACCCCTCCATGTGAT	TGGCAGCCCTAGATGAGACT
Kab101	90109961	(GT) ₁₀	TGTCCTGACCTGAATCAATTGA	ACTGCAGTCCAAGGAGGAGA
Kab102	90109753	(AC) ₁₀	CACCAAGGCAACTTGGTGT	TTGGTATAGACTCCGGGCAC
Kab103	90108137	(AC) ₁₀	TCTGGGGCCCTTTTTAACTT	GCGGGGAAACGTTTACATAG
Kab104	90101943	(GT) ₁₀	GAACGTGCTCTCCAATAGCC	GTTGAGGGTGGAGGAAAAACA
Kab105	90101193	(GT) ₁₀	CCCTCAAAGGTGTAGGTCCA	TCACTGTGAGGTCTCTGTGTG
Kab106	90100683	(GT) ₁₀	CCAGAAATGTTTTCTTGCGA	GATGCATGGCAGAAACATTG
Kab107	90097351	(AC) ₁₀	TTTTCTGCTTTAAATGGGCG	CACCTGAAGCAAAGGGGAAAA
Kab108	90091367	(CA) ₁₀	GCCGGAGTGGGTTAGAATTA	AACCTGTAGGGGAGAAGGGA
Kab109	90090337	(AG) ₁₀	AAAGGTGAGCAGACTTGGCT	AATCCCGTGCTGTAAATG
Kab110	90081460	(CA) ₁₀	CTGCGTACTGCTTGCACAAT	GTGCACATTGCTGCATTTCG
Kab111	90077808	(AG) ₁₀	AGTGCTCTCAGCTGTTGACAT	CAGTGCTTGCAAGTGTCTCT
Kab112	90077278	(GA) ₁₀	TGGCTAGCAAAAGCAACCTT	GCATTGTGCTCTGAGTAA
Kab113	90073934	(AC) ₁₀	TGTGTTTGCAATGTTGGTGTG	CCCCCAGGATTACCTGATTC
Kab114	90072200	(TG) ₁₀	AGCCAATGAGGAGCAATGAG	TCATACACGTGCCATTGGT
Kab115	90071204	(AG) ₁₀	CCAAAATGATGATGGGGAAC	CACCTTGTGCTCTGAGTGC
Kab116	90070034	(AC) ₁₀	GCAGTATTTTGCCAAGGACC	TGATACTGGGAACCTGCTCA
Kab117	90069428	(GT) ₁₀	AAGAACTGCAGGCAAAACCAC	ACCCTATCATGCTTTTGCTTA
Kab118	90067325	(GT) ₁₀	GAACAAGATCTGTGCCGGTT	GAGGGAGGGCTCTGGGTTTAC
Kab119	90059907	(TG) ₁₀	TAAAGCGCTCCACGTACTCA	ACCGAGTCTATCAGCGCAGT
Kab120	90057029	(CA) ₁₀	AGCGAGCTGAGGTGAATTGT	CAGTCAGGTAGGGCTCTGC
Kab121	90031441	(CA) ₁₀	CCAAGAGGCTTAATGGCAAA	AACAGGACTCACCGTCTCTG
Kab122	90030687	(CT) ₁₀	CACGCATGTGACACAGACAG	GCCAGGAAGAGTCACGTGTT
Kab123	90026333	(GT) ₁₀	CTGCCACCCCTATTCTGTGA	GGATGATGGAAGCTACACAAA
Kab124	90022519	(GT) ₁₀	CCACACACACTGTAAAAGGGAA	TTCCTCCCTGGGAATCAAGAA
Kab125	90011823	(AC) ₁₀	GTTTGGGAAGCCAGAGAGC	TGTTGGAATGTAGAAATTGAGAA
Kab126	90011625	(CA) ₁₀	AACGTGCGTAGAGACCTATCCA	GCTGTACAAGAGCAGGAGGG
Kab127	90004149	(AG) ₁₀	CTGTACTGAAGGGGAACGG	GTCCTCAGTATGAGCAATG
Kab128	90003219	(AC) ₁₀	ACTGGGACTCCAGAACATGG	GTCCCAAGTGGGGAAAAATG
Kab129	90001313	(GT) ₁₀	GCCATCTCCTCAAAACAGACA	TTCCGGAATCAACACTAGCC
Kab130	89989359	(AG) ₁₀	TAACACACCATCTGTGCCGT	ACCCAAGGTGTCAGGATGTC
Kab131	90111745	(GTG) ₇	GCCACAAAGCAGCCAATAAT	TACGCTCACTGTGGAGACCA
Kab132	90106401	(CTG) ₇	CTGTTTAACCACTTCCCCGA	CTGTTGTGCTGAGCAAAAAA
Kab133	90105407	(CAT) ₇	TAGCAAAGCACCATGGACTG	AAACATCTTTGTGTCTTGGGA
Kab134	90103969	(CAG) ₇	AATTATCAGCAGCAGCAGCA	CTCTGCTAGTTCTCGCTGCC
Kab135	90102989	(TTG) ₇	GCATTTTGTGTTTGTATGAGCTT	CCTTGACACAAATGCAAATG
Kab136	90094467	(CAT) ₇	TATCAGCCAGCAACAAGCAC	GTCCCTGTGAAGGGGCAGTT
Kab137	90093165	(GCA) ₇	CATGAGTGTTTTGCCGCTCAC	GAGTGCTCGTGATTGGGGT
Kab138	90091623	(ATC) ₇	TTTGCTGTATCTGTGGCTC	TGAGATTGTGACAAGGCCAC
Kab139	90086138	(TCA) ₇	CACAACAGCCTACAGACTCAGG	CACCTTGACGCTGTGAAGGCA
Kab140	90086110	(GCA) ₇	CCTGCATGTCTTCTCCCAT	AGCCAGCTGTGAACTAAGG
Kab141	90124095	(ATT) ₅	TCCATTGTGTGGGAATAGCA	TAAAGAAACAGGGGCAACC
Kab142	90121351	(AAAT) ₅	TTTGCCAAACTTCATAGCAAA	CCATTGGAACAGTGTGTGTC
Kab143	90118775	(ATT) ₅	CTGAACTCTGCGCTGTGAT	GTAATCAGGCGCAAGGGACAA
Kab144	90117227	(CATT) ₅	TTGCTTAAATGCCAGTGCAA	ACACAGTCTCCTATAGAACAGCAA
Kab145	90111253	(TGT) ₅	AGTCTTTAAACCCCGCTGTA	AAGGCAACATTACCATCCCA
Kab146	90105235	(TGAA) ₅	AGATGGCTGATCAGTAGGGTTT	TGCCATTCTCTTTTGTCTCT
Kab147	90102485	(AAAT) ₅	AGTAGCCAGATGCAGCCAGT	GCAGCAACTTAGACATGGCA
Kab148	90101373	(TGT) ₅	CCTCACCCCAATGGCTACTA	GCCTATTCCCATCTCCCAAT
Kab149	90095217	(TAA) ₅	TGGTAGCCTTTGGTAGGATTG	GTGTGACCAACATCCACTGC
Kab150	90093391	(TGAA) ₅	TGAATCACACTGTACATTCTGC	GGAAACCTAATGATGGGCAA

3) 실험 방법

- DNA 추출은 비침습적 방법에 의해 수집된 발가락 시료에서 DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen co., USA) 또는 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)을 사용하여 genomic DNA를 추출하였다.
- Primer 가용성 테스트를 위한 DNA는 총 8개체로, 제주특별자치도 제주시 한림읍 상대리 집단 (JG) 과 경기도 의왕시 집단 (UW)에서 각각 4개체씩을 분석에 사용하였다.
- PCR 시료는 Total volume 10 μ l를 기준으로 하였으며 PCR 조건은 표 II-2-3과 같다.

표 II-2-3. 각 유전자 증폭을 위한 PCR 조건

95°C	56°C	72°C	
5min	-	-	
30 s	30 s	30 s	x 30 회
-	-	10 min	

- PCR 산물은 2% TBE agarose gel을 이용하여 전기영동을 하였다. 전기영동 후 결과는 GelDoc을 이용하여 밴드를 확인하고 사진을 찍었다. 이를 통해 집단 내 변이와 집단 간 변이를 간접적으로 확인하고 형광 primer 제작이 가능한 primer 14개 쌍을 선정하였다. 선정된 14개의 primer쌍 중 forward primer의 5'에 형광 표지(6-FAM, NED, HEX)를 labeling하는 primer를 주문 제작하였다.
- 형광표지 물질로 labeling된 primer를 이용하여 단편분석을 위한 PCR을 실시하였으며, 동일한 PCR 조건으로 각 유전자 시료를 증폭하였다. 증폭된 유전자 시료는 형광 fragment의 깨짐 현상을 막기 위해 최대한 빛을 차단하여 보관하였다.
- PCR이 끝난 시료는 동일한 개체의 경우, 2 - 3개 종류 (6-FAM + NED + HEX 혹은 6-FAM + HEX)의 형광이 표지된 PCR 시료를 혼합하였고 혼합된 시료는 Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems) 및 GeneScan™ 500 ROX™ dye size standard (Applied Biosystems)와 일정 비율로 섞어 서울대학교 농생명과학공동기기원 내 분석기관인 NICEM에 의뢰하여 단편 분석인 genotyping 분석을 실시하였다 (ABI 3730xl DNA Analyzer). 분석결과는 Gene Mapper와 Peak Scanner v1.0으로 확인한 후, 그 수치를 Excel 파일로 저장하였다. 이 파일을 다시 각 프로그램에 맞는 포맷으로 변경하여 분석을 실시하였다.

4) 결과 및 고찰

본 연구결과에는 올해 과업 범위는 아나 연구 결과의 신뢰성을 높이고자 기존 확보 시료들을 본 사업과는 무관하게 추가 분석한 결과를 포함하여 작성하였다.

가) NGS에서 SSR 마커 선별 결과

Di-nucleotide 반복된 서열 9,671개 중 70개, tri-nucleotide 1,324개 중 40개, tetra-nucleotide 477개 중 40개, 총 150개를 선정하여 test하였다(표 II-2-2). 이 선별된 후보군을 이용하여 제주도 대정읍 집단 (JD)에서 annealing 온도 56 °C(Ta)에서 증폭이 되는지 확인하였다. 테스트 후 집단 내 혹은 집단 간에 변이가 있는지 제주특별자치도 제주시 한림읍 집단과 경기도 의왕시 집단에서 각각 4개체씩을 사용하여 PCR을 실시한 후 전기영동하여 증폭 band의 크기를 가시화하여 육안으로 확인하였다.

나) 선정된 microsatellite primer를 이용한 다양성 분석

마커 가용성 테스트를 실시한 후 최종적으로 선정되어 분석에 사용된 총 14개의 microsatellite 유전자의 프라이머 정보는 표 표 II-2-4와 같다. 선정 시 di-nucleotide의 경우 10회 이상 반복, tri-nucleotide의 경우 8회 이상 반복, tetra-nucleotide의 경우 6회 이상 반복하는 유전자를 선택하였다. 또한 선정 시 annealing 온도를 56도로 그리고 증폭된 fragment의 크기를 300 bp 미만이 되도록 조절하였다.

표 II-2-4. 맹꽂이에서 개발한 microsatellite 유전자 목록 및 정보

Locus	Motif	Fluorescent	Primer sequence (5' → 3')	Allele size range(bp)	Ta (°C)
Kab001	(GA) ₁₁	HEX	F : CAGCCAGTTGTTCTGACGAG R : ACCTCGCTCTTACCCTCCAT	200-208	56
Kab002	(AC) ₁₂	6-FAM	F : CCCGGACATTCAGTT R : ATCTGCACTGTGTGGACTGG	193-231	56
Kab005	(AG) ₁₁	6-FAM	F : GCTTTGGTGCTCAGGACTTC R : AGAGGACATCGTCTCCCAA	185-195	56
Kab006	(AG) ₁₁	HEX	F : GGATAAATGAAAAGCAGGCG R : GCTGCTGTTTAAAGGGTGG	251-270	56
Kab007	(AC) ₁₁	6-FAM	F : CGCTGACATGTGTGTGTTCT R : CCCTGCACTAATGGAGGCTA	251-287	56
Kab017	(AGG) ₈	HEX	F : TATACAGCCAGACACACGG R : ATGCTGCTCAAACCATCTCA	215-236	56
Kab018	(TGA) ₈	NED	F : AAGTTGTGCTGTACTGCC R : TTAAGCGGTGGTGGTTAC	228-249	56
Kab023	(TGTA) ₆	6-FAM	F : TGCCAGCTTCATTAACATATGTG R : TGCCTACATGAATAAGGCAGTC	209-217	56
Kab024	(CAAT) ₆	HEX	F : TGTGGCCCTAACTCAGGTGAC R : TTCGCCATTAGTCCACAA	259-279	56
Kab034	(GT) ₁₁	6-FAM	F : CTGTGTGTGGGTACTCTT R : TGTTTTGGAACACTTTGGGA	211-223	56
Kab036	(TG) ₁₂	HEX	F : TGGATAAGATTGTATGGCAGG R : AAGTGTCAAGTCACTTGGGG	217-225	56
Kab040	(CA) ₁₁	6-FAM	F : AAAAGGGGTAGCATCATCC R : GCAGGATCAGCCTCCTCTTA	277-291	56
Kab046	(GT) ₁₂	HEX	F : TGTACAGTGGGACAGTCATGTG R : TTTTCCAATTCTCATAGAGCCA	267-281	56
Kab048	(TG) ₁₁	NED	F : TATGGTGGCAGTCAGACAGG R : GCAGGCCAGTCTGCATATT	236-264	56

각 집단과 유전자 별 대립인자의 수를 비교한 결과는 표 4와 같다. 전체 14개의 유전자에서 3 - 8개의 대립인자가 발견되어 상당히 낮은 다양성을 가지고 있는 것으로 확인되었다. 각 유전자 별 비교에서 Kab002, Kab046, Kab048가 전체 8개의 대립인자가 발견되어 가장 다양하게 나타났으며, Kab023은 전체 집단에서 3개의 대립인자만이 발견되어 다양성이 낮았으며, 대부분의 집단에서 1-2개의 대립인자 정도만 발견되어 단순한 양상을 나타내었다. 집단별 대립인자수를 비교할 때, 제주도 4개 집단이 비교적 높은 다양성을 보여주었으나, 내륙 집단들은 이에 비해 상당히 낮은 다양성을 나타내었다. 전체 유전자 중 Kab046은 조사된 모든 맹꽂이집단에서 다형성을 나타내었다. 또한 제주도 집단의 경우 1개를 제외한 3개

의 집단 (서귀포시 남원읍(JN)과 안덕면(JW), 제주도 한림읍(JG))의 경우 모든 유전자에서 다형성을 나타내었다. 각 지점 별 채집 개체수가 다르기 때문에 집단 간 직접 비교가 어려우나, 채집 개체수를 고려한 대립인자 다양성인 allelic richness를 비교한 결과 대부분의 집단 별 그리고 유전자 별 수치는 매우 낮아 1 - 2 사이였다.

표 II-2-5. Microsatellite 유전자와 집단에 대한 각각의 대립인자 수

Locus	JN	JW	JD	JG	DS	AS	CJ	PT	UW	CC	WJ	Total
Kab001	2	4	2	2	1	1	1	1	1	1	1	4
Kab002	2	4	1	4	1	4	3	3	2	4	3	8
Kab005	2	4	3	4	1	1	1	1	1	1	1	4
Kab006	3	3	1	4	1	1	2	1	1	1	1	6
Kab007	3	4	3	4	2	1	3	1	2	1	2	6
Kab017	2	3	3	4	1	1	1	1	2	2	1	5
Kab018	2	4	3	3	1	1	2	1	1	1	1	4
Kab023	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	3
Kab024	3	4	4	5	3	3	3	3	4	1	3	6
Kab034	3	4	3	4	3	3	3	3	3	3	1	6
Kab036	3	3	2	3	1	2	2	1	3	1	1	5
Kab040	2	2	2	4	1	2	3	2	2	2	2	6
Kab046	2	6	2	5	3	2	3	4	4	3	3	8
Kab048	2	5	3	7	1	1	1	1	2	1	1	8

맹꽁이집단별 유전적 다양성을 비교 분석한 결과는 표 II-2-6과 같다.

표 II-2-6. 맹꽁이집단 별 유전적 다양성 지수 : 총 대립인자(A), 대립인자 풍부도(A_R), 근친계수(F_{IS}), 이형접합자빈도 관측치(H_O)와 예측치(H_E)

Population ID	A	A_R	H_E	H_O	F_{IS}
JN	2.357	1.396	0.396	0.394	0.004
JW	3.714	1.594	0.594	0.513	0.129
JD	2.429	1.631	0.736	0.708	0.056
JG	3.929	1.581	0.581	0.509	0.114
DS	1.571	1.182	0.510	0.543	-0.070
AS	1.714	1.191	0.444	0.361	0.202
CJ	2.071	1.262	0.407	0.422	-0.039
PT	1.714	1.163	0.457	0.429	0.064
UW	2.071	1.241	0.374	0.344	0.081
CC	1.643	1.152	0.426	0.360	0.163
WJ	1.571	1.189	0.528	0.556	-0.055

앞서 표 II-2-5에 나타난 결과와 같이 제주도 집단들의 대립인자 다양성이 내륙에 비해 비교적 높은 것으로 나타났으며 이러한 경향성은 대립인자 풍부도 (allelic richness)에서도 나타났다. 이형접합자 빈도 값에서도 제주도와 내륙 간 큰 차이는 보이지 않았지만 제주도 집단들이 이형접합자 빈도 값이 약간 높게 나타나고 있었다. 집단 별로 볼 때, F_{IS} (근친계수)값은 대부분 0에 가까운 수치였으나, 일부 아산(AS)과 춘천(CC)집단의 경우 다소 높은 수치를 나타내었다. 이는 그 집단의 유전적 다양성이 매우 낮게 나타나 단순한 sampling error의 결과일 가능성도 있지만 집단내 근친교배의 가능성도 고려해 볼 수 있겠다.

각 유전자 별 유전적 다양성 수치를 비교한 결과는 표 II-2-7과 같다. 전체 14개위 유전자 중 Kab002, Kab024, Kab034, Kab046 등의 유전자가 높은 이형접합자 빈도 값을 보였다. Kab006의 다양성은 가장 낮은 수준이었다. 뚜렷하게 높은 F_{IS} 수치를 보이는 유전자는 없었지만, Kab002, Kab007, Kab024, Kab040 등에서 null allele들이 존재할 가능성이 확인되었다. 대부분, 제주도 제주시 집단(JG)이 null allele의 존재와 관련되어 있었고, Kab040의 경우, 춘천(CC) 집단에서 null allele이 존재할 가능성이 있었다. 전체적으로 비교적 높은 F_{ST} 와 R_{ST} 값을 보이고 있었는데, 이는 집단 내 유전적 다양성의 결여 때문일 것으로 사료된다.

표 II-2-7. 맹꽁이에서 개발된 microsatellite marker 14쌍의 유전적 다양성

유전자	A	A_R	H_E	H_O	F_{IS}	F_{ST}	R_{ST}	Population having null alleles
Kab001	4	1.496	0.186	0.120	0.133	0.302	0.307	No evidence
Kab002	8	1.290	0.487	0.463	0.143	0.233	0.366	JG
Kab005	4	1.418	0.215	0.244	0.078	0.402	0.050	No evidence
Kab006	6	1.649	0.128	0.104	0.161	0.144	0.102	No evidence
Kab007	6	1.410	0.384	0.329	0.254	0.196	0.148	JG, JW
Kab017	5	1.595	0.220	0.242	-0.085	0.487	0.446	No evidence
Kab018	4	1.805	0.232	0.198	0.124	0.438	0.357	No evidence
Kab023	3	1.795	0.162	0.147	-0.019	0.342	0.295	No evidence
Kab024	6	1.659	0.589	0.615	0.031	0.270	0.013	JG
Kab034	6	1.195	0.523	0.507	0.123	0.386	0.438	No evidence
Kab036	5	1.363	0.274	0.250	-0.026	0.237	0.088	No evidence
Kab040	6	1.446	0.412	0.292	0.002	0.354	0.532	CC
Kab046	8	1.225	0.497	0.500	0.129	0.402	0.385	No evidence
Kab048	8	1.765	0.218	0.248	-0.007	0.646	0.817	No evidence

전체 14개 유전자를 이용하여 Pairwise- F_{ST} 와 R_{ST} 를 계산하여 집단간 유전적 분화 정도를 나타낸 값은 표 II-2-8과 같다. 표 II-2-8에서와 같이 제주 집

단과 내륙 집단 간에는 F_{ST} 와 R_{ST} 값이 크게 나타나 뚜렷한 유전적 분화가 관찰되었다. 제주도 지역 내 4개 집단들의 경우에도 서귀포시 남원(JN)집단이 다른 제주도지역 집단들(JW, JD, JG)과는 유전적 분화정도가 크게 나타나고 있었다. 또한 내륙 지역의 집단들에서도 일부 집단들은 타 집단들과 뚜렷하게 분화되어 나타났다. 특히 춘천(CC) 집단은 내륙 내 다른 집단들과 뚜렷하게 구분되었으며, 춘천 집단 이외에도 대구(DS), 평택(PT) 등 나머지 내륙 집단들도 상대적으로 그 분화정도가 큰 것으로 확인되었다(표 II-2-8).

표 II-2-8. 각 지역 집단 간 유전적 분화(Pairwise- F_{ST} , R_{ST})

	JN	JW	JD	JG	DS	AS	CJ	PT	UW	CC	WJ
JN		0.100	0.261	0.179	0.423	0.511	0.432	0.622	0.572	0.561	0.446
JW	0.225		<u>-0.071</u>	0.071	0.319	0.368	0.342	0.471	0.444	0.466	0.335
JD	0.291	<u>-0.014</u>		<u>-0.156</u>	0.404	0.700	0.501	0.753	0.690	0.774	0.411
JG	0.212	0.047	<u>0.012</u>		0.400	0.454	0.450	0.515	0.510	0.510	0.420
DS	0.449	0.387	<u>0.569</u>	0.403		0.202	<u>0.081</u>	0.364	0.354	0.390	<u>-0.011</u>
AS	0.435	0.359	0.527	0.383	0.153		<u>0.026</u>	0.417	0.152	0.413	0.223
CJ	0.435	0.389	0.474	0.398	0.226	0.102		0.189	0.115	0.257	0.130
PT	0.484	0.436	0.623	0.435	0.202	0.234	0.256		0.103	0.684	0.353
UW	0.425	0.392	0.512	0.395	0.228	0.080	0.122	0.180		0.471	0.342
CC	0.454	0.392	0.604	0.414	0.419	0.404	0.386	0.433	0.335		0.334
WJ	0.472	0.407	0.569	0.415	0.233	0.090	0.174	0.246	0.133	0.430	

※ F_{ST} 는 왼쪽 아래에 삼각형 모양으로, R_{ST} 는 오른쪽 위에 역삼각형 모양으로 표시하였다. 밑줄로 표시된 수치는 통계적 유의성이 없는 부분을 나타내었다($p < 0.05$).

계산된 집단 간 유전적 분화 값들을 큰 group으로 구조화하기 위하여, Bayesian 통계를 활용한 STRUCTURE 분석을 실시하였다. 먼저 가장 적절한 group (cluster)의 수를 정하기 위해 Structure Harvester (v.0.6.94)를 이용하여 가장 높은 delta K 값을 구하였으며(그림 II-2-3), $K = 2$ 에서 가장 높은 수치가 나타났다. 이는 전체 genotyping 분석에서 얻어진 결과를 근거로 할 때 우리나라 땀곰이의 야생집단들은 크게 2개의 그룹으로 나눌 수 있음을 의미한다. 또한 본 분석에서는 $K = 2$ 뿐만 아니라 $K = 3$ 과 4일 때에도 분석을 하여 비교자료로 활용하고자 하였다.

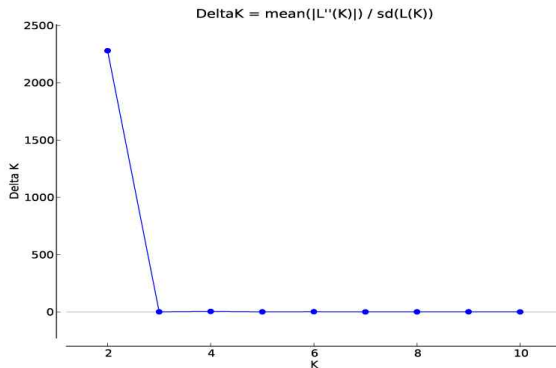


그림 II-2-3. Structure Harvester에 의해 나온 Delta K 값

Bayesian STRUCTURE 분석 결과에서 우리나라 야생 멧꿀이 집단은 제주도 집단들과 기타 나머지 내륙 집단들로 크게 2개의 group으로 뚜렷하게 나뉘는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 경향성은 K 값을 증가시켜도 크게 달라지지 않는 것을 볼 수 있다(그림 II-2-4). 그러나 세분된 구조 (K=4)에서는 제주도집단에서 남원(JN)집단이 집단구조가 나타나고 있었으며, 내륙집단에서도 춘천(CC)집단이 집단구조를 나타내는 양상을 보여주고 있었다.



그림 II-2-4. Bayesian STRUCTURE 분석을 이용한 국내 야생 멧꿀이 집단들의 유전적 구조 분석

STRUCTURE의 결과를 바탕으로 2개의 group (제주와 내륙)으로 집단을 구분하였을 때의 통계적 유의성을 AMOVA test를 통하여 검증하였다(표 II-2-9). 제주와 내륙 집단간 유전적 분화가 전체 유전적 변이에 차지하는 기여도가 30%를 넘어, 일반적으로 종 내 집단 간 유전적 변이 연구에서 나타나는 양상과는 큰 차이를 보였다. 또한 Group 내 집단 간 유전적 차이도 group 간 (제주 vs 내륙) 차이에 비하면 낮은 수치였으나 비교적 높은 수치를 보였다.

표 II-2-9. 제주도 집단과 내륙 집단으로 구분한 F_{ST} , R_{ST} 기반의 AMOVA test

Source of variation	F_{ST}		R_{ST}	
	d.f.	Percentage of variation	d.f.	Percentage of variation
Among groups	1	32.78	1	37.71
Among populations within groups	9	12.56	9	11.04
Among individuals within population	139	3.63	139	-1.19
Residuals	150	51.02	150	52.43

5) 결론

표 II-2-10. 땀퐁이의 유전다양성 분석 결과

종 명		완료 여부	유전자 마커	확보 집단/ 개체수	세부 책임자
학 명	한국명				
<i>Kaloula borealis</i>	땀퐁이	완료	microsatellite 마커	11/150	민미숙

- 국내 멸종위기동물인 땀퐁이에 대한 14개의 microsatellite marker를 처음으로 새롭게 개발하였다.
- 개발된 14개의 microsatellite 유전자를 이용하여 집단유전학적 분석을 실시한 결과 국내 땀퐁이 야생 집단들은 '매우 낮은 집단 내 유전적 다양성'을 가지고 있는 것으로 나타났다. 이는 많은 지역 집단이 절멸의 위기를 겪고 있으며, 상대적으로 이동성이 작아 낮은 수준의 메타개체군 역동성을 가지고 있을 것으로 예상된다.

- 전체 조사된 뿔코이집단 간 비교적 큰 유전적 분화가 관찰 되었다. 특히 제주도 지역 집단과 내륙지역 집단 간에 매우 뚜렷한 유전적 분화양상이 관찰되었다. 이는 지역 집단 간 개체이동이 적고 적은 유효집단크기 때문일 것으로 추정할 수 있다.
- 우리나라 뿔코이의 야생집단들은 크게 제주도집단과 내륙집단, 2개의 group으로 크게 나눌 수 있었다.
- 연구가 수행된 뿔코이 대부분의 집단이 유전적 다양성이 매우 낮았고 집단간 유전적 분화양상이 크게 나타나는 것으로 보아 집단간 개체이동이 적으며 유효 개체수가 적은 것으로 판단되어 멸종위기종인 뿔코이 집단에 대한 보전대책이 필요할 것으로 보인다.
- 아울러, 우리나라 뿔코이의 지리적, 진화적 기원을 파악하기 위하여 중국 등 인접국가의 자료 및 유전자 비교분석을 위한 샘플이 필요하며 mtDNA 유전자에 대한 분석이 추가로 필요하다고 본다.

■ 해외 표본 확보 계획

동북아시아에만 분포하는 뿔코이는 우리나라의 한반도 지역과 중국지역에만 서식하는 종으로 (IUCN, 2015, 그림 II-2-5) 우리나라의 경우는 멸종위기동물로 지정되어 있으나, IUCN red data에서는 LC로 기록되었다. 그러나 이 기록은 오래된 평가의 결과이며 현재 중국내에서도 이들의 분포가 한정되어 있으며 개발과 매우 짧은 번식기의 특성으로 점점 개체 확인이 어려운 중이다. 따라서 중국 표본의 수집은 양서류를 연구하는 중국학자와의 국제협력관계를 구축해야 표본 확보가 가능 할 것으로 사료된다.



그림 II-2-5. 뿔코이 분포 현황 (IUCN, 2015)

나. 물장군 *Lethocerus deyrollei*



- 국명: 물장군
- 영명: Giant water bug
- 학명: *Lethocerus deyrollei*
- 멸종위기II급
- 계통: 절지동물문 노린재목 물장군과

그림 II-2-6. 물장군

[출처: 국립중앙과학관 <http://www.naris.go.kr/specIMG/3/8/99/1039899/JNHM-IN-0000255-01.JPG>]

■ 생김새: 몸길이는 50~70mm 내외이고 체색은 갈색이다. 머리는 몸에 비해 매우 작고 겹눈이 대부분을 차지한다. 앞다리는 넓적다리마디가 크게 팽대되어 있으며 1개의 발톱이 있다. 뒷다리의 종아리마디와 발목마디는 얇게 눌려진 형태로 보이고 가운데 다리의 종아리마디와 발목마디보다 훨씬 더 넓다. 배 끝에는 짧은 공기거리가 있다.

■ 서식지: 웅덩이, 농수로, 논 그리고 흐름이 완만한 하천 등의 수생식물이 많이 우거져 있는 정수역으로 수심은 대체로 1m이내로 연안대가 잘 발달된 지역에서 나타난다.

■ 먹이: 미꾸라지, 밀어 등의 민물고기를 비롯하여 개아재비, 장구애비, 물방개 등의 수서 곤충, 올챙이나 자기 몸보다 큰 개구리까지 포식하는 것으로 알려져 있다.

■ 번식: 우리나라에서는 7~8월경 우기가 지난 뒤 폭서기에 주로 번식하는 것으로 보고되었으나, 일본에서는 장마전 5~6월에 산란하는 것으로 보고되었다. 수컷이 앞다리를 이용해 물결을 만들어 암컷을 유인하고 암컷이 동일한 행동을 반복함으로써 짝짓기 상대를 결정한다. 암컷은 산란 후 사라지며 수컷은 알이 부화할 때까지 알을 보살피며 산란장소를 떠나지 않는 특성을 가지고 있다.

■ 분포: 한국, 일본, 중국, 대만 등지에 분포하고 있으며 한반도에서는 서남해안 도서지역 및 해안지역, 내륙의 습지, 민통선 지역 등에 국한하여 분포한다.

[출처: 한국의 수서곤충, 한국산 물장군의 생태학적 연구]

1) 연구의 필요성

물장군 *Lethocerus deyrollei* Vuillefroy은 노린재목(Hemiptera) 물장군과(Belostomatidae) 곤충으로서 한국, 일본, 중국, 대만 등지의 호수나 연못 등의 정수역 수변에 서식한다. 우리나라 담수생태계에서 가장 큰 수서곤충이며 몸길이가 최대 65mm에 이를 뿐 아니라 먹이사슬에 있어서도 정점에 위치하고 있다. 최근에는 물장군이 유해 외래종인 황소개구리를 공격하여 포식하는 것으로 알려져 교란종 제거에도 중요한 역할을 할 것으로 예상되고 있다.

과거 물장군은 우리나라 전역의 웅덩이, 습지, 농수로 등에 서식하는 것으로 알려져 있었다. 그러나 최근 농지 개발, 서식처 파괴, 수질 오염 등으로 인하여 분포 지역과 개체군 수가 급격히 감소함에 따라 현재는 한반도 서해안의 도서지역과 제주도, 내륙 일부 지역에서만 관찰되고 있다. 이에 따라 1998년부터 환경부 멸종위기종(현재 환경부 멸종위기야생동식물 II급)으로 지정되어 법적 보호를 받고 있다. 현재 강원도 횡성의 홀로세 생태보전연구소, 제주의 생물종다양성연구소 등에서 물장군을 보전 및 복원하기 위한 연구들이 수행 중이고, 횡성군의 경우 2012년부터 매해 물장군 30~50쌍을 방사하는 행사를 벌이고 있으며 제주에서는 2011년과 2012년에 40마리를 방사한 바 있다.

이와 같이 물장군이 높은 보호가치로 상당한 관심을 받고 있음에도 불구하고 국내에서 물장군에 대한 생태적, 유전적 기초 연구는 거의 수행된 바가 없다. 가까운 일본의 경우 물장군에 대한 연구가 매우 활발한 편으로 70년대 말부터 물장군의 생태에 관한 기초 연구를 비롯하여 다양한 연구들이 진척되고 있으나 한국과 마찬가지로 유전적 측면에서의 연구는 거의 없다.

2010년 채택된 나고야의정사의 ‘유전자원의 접근 및 이익공유’에 대한 규정 이후로 전 국제적으로 유전자원 확보를 위한 치열한 경쟁이 벌어지고 있음을 고려할 때, 중국과 일본 등 인접 국가들에도 서식하고 있는 물장군에 관한 유전 정보 확보는 생물자원의 국가주권 확보라는 측면에서 매우 시급하다고 할 수 있다. 따라서 중국과 일본 등 국외에 서식하고 있는 개체와의 유전적 비교를 통해 한국 물장군 집단의 유전적 고유성 입증에 필요하다. 본 연구에서는 이를 위한 기초 연구로서 국내에 분포하고 있는 물장군의 주요 서식지 세 곳을 대상으로 물장군의 유전 정보들을 조사하고 집단 수준에서 유전적 패턴과 다양성을 검토하고자 한다.

II

2) 재료 및 방법

가) 표본 확보 전략

물장군은 한반도 전역의 웅덩이나 호숫가에 서식하는 것으로 알려져 있으나, 1990년대부터 서식지 파괴와 수질 오염 등으로 그 개체수와 서식 지역이 점차 감소하였다. 따라서 물장군의 서식지는 한반도 내에서 상당히 조각화되었다고 볼 수 있으며, 각 서식지 간 지리적 거리를 고려할 때 그들 간의 유전적 교류는 거의 불가능할 것으로 판단된다. 본 연구에서는 한반도 내 물장군의 유전다양성과 집단 간 유전적 차이, 특이성 등을 규명하기 위하여 주요 서식지에서 각각 최소 한 집단을 채집하여 분석을 진행하였다. 일반적으로 집단 유전학적 분석을 위해서는 한 집단 당 최소 10-15개체가 요구되지만 물장군은 보호종으로 지정되어 있기 때문에 각 집단 별로 위와 같은 최소 개체수를 만족시키기에 어려움이 따랐다. 따라서 본 연구에서는 각 집단별로 최소 개체수를 만족시키기보다는 최종적으로 최소 세 집단 총 40개체 이상을 채집하여 유전자 정보를 확보하고자 하였다. 표본은 내륙 지역의 인천광역시 강화군과 김포시에서 확보되었으며, 그 밖에 제주광역시에서도 확보되었다. 채집은 주간채집과 야간채집으로 진행하였는데, 주간에는 물웅덩이와 농수로, 하천 등에서 족대 및 뜰채를 사용하였고, 야간에는 성충을 유도하기 위해 500W 수은등 사용하였다.

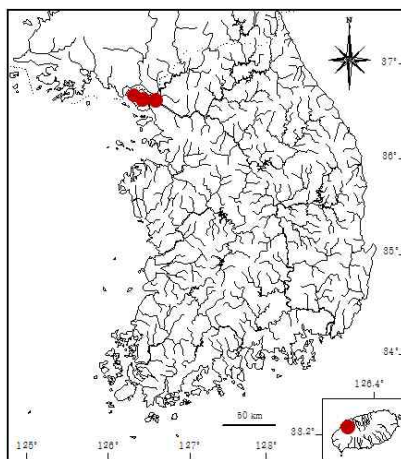


그림 II-2-7. 물장군 채집지역(강화군, 경기도 김포시, 제주도)



<야간 등화채집>



<주간 채집-죽대 및 뜰채 이용>

그림 II-2-8. 물장군 채집 방법

나) 유전자 분석 범위

본 연구에서는 물장군의 집단 유전학적 분석을 위하여 NGS 데이터로부터 새롭게 다형성을 나타내는 10개 이상의 microsatellite 유전마커를 개발하였고, 이를 이용하여 집단 분석에 활용할 것이다.

3) 실험 방법

수집된 다리 및 몸통 시료에서 DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, USA)을 사용하여 DNA를 추출한다.

- 본 연구 사업으로 얻어진 유전체 서열로부터 적절한 부위의 microsatellite 유전부위들을 탐색하고 이를 증폭하는 프라이머를 개발하여 10개 이상의 유효한 다양성이 높은 마커를 확인한다.
- 성공적으로 증폭되는 프라이머 세트를 10개 이상 선별한 후, 한 쪽 프라이머에 형광염료(FAM, HEX)를 표지하여 PCR을 수행하고 ABI3130으로 genotyping을 실시한다.
- Genotype 데이터는 STRUCTURE (Pritchard et al., 2000)를 통해 집단의 유전적 집단구조를 살펴보고, GENEALEX, ARLEQUIN, FSTAT 등의 컴퓨터 프로그램을 통해 물장군 집단 사이의 유전적 분화도와 패턴, 다양성 등을 분석한다.

4) 결과 및 고찰

가) 시료 확보

표본은 아래의 지도상에 표시된 바와 같이 강화군 지역에서 20개체, 제주도 지역에서 20개체, 경기도 김포지역에서 1개체를 확보하여 최소 3집단 41개체를 확보하였다(표 II-2-11). 확보된 표본들은 모두 알코올에 보관되었다. 본 과제를 수행하기 위해 고려대학교 배연재 교수님으로부터 강화군 지역에서 채집된 성충 20개체의 다리 두 개씩을 기탁 받았다. 제주도에서 확보한 20개체의 샘플들 중에서 6개 개체는 모두 유충시기에 채집되었으며, 이번 과제 기간 동안 채집을 통해 확보하였다. 나머지 14개 개체들은 제주생물종다양성연구소로부터 성충시기의 인공증식개체를 양도받았다. 김포에서는 본 연구시기 동안 성충시기의 1개체를 채집하여, 성충의 다리를 포함한 몸 전체 표본을 확보하였다.

표 II-2-11. 물장군의 채집 정보

	채집 지역	집단 ID	채집 개체수	채집 날짜
1	경기도 강화군	GA	10개체	2006. 11. 20
2	경기도 강화군	GA	10개체	2006. 07. 03
3	경기도 김포시	GI	1개체	2015. 10. 03
4	제주특별자치도 제주시	JE	6개체	2015. 08. 04
5	제주생물종다양성연구소	JE	14개체	2015. 11. 20

경기·강원 내륙지역 뿐 및 강화군 및 제주도 지역에 수차례 방문을 하였음에도 불구하고, 채집에 어려움을 겪었다. 이러한 원인 중의 한 가지로 올해 심각한 가뭄의 영향이 의심되는데, 이로 인해 저수지, 호수, 연못과 같은 정수역의 물이 메말라 물장군의 서식지가 파괴된 것으로 보인다. 뿐만 아니라 채집을 하던 도중 많은 농수로들이 시멘트로 교체된 것을 확인하였는데, 이 역시 개체수의 감소와 관련이 있는 것으로 예상된다(그림 II-2-9).



그림 II-2-9. 가뭄으로 인해 마른 저수지와 수로(강화군, 2015년 7월)

나) 유전자 분석

■ DNA 추출

전체 물장군 41개체의 다리부분으로부터 Qiagen 사의 DNeasy Blood and tissue kit를 사용하여 물장군의 genomic DNA를 추출하였다. 강화군의 샘플의 경우 다리 두 개 중 한 개를 DNA 추출을 위해 사용하였으며, 제주도 샘플의 경우에는 유충의 다리 및 조직의 양이 부족한 경우에는 머리 부분의 조직으로부터 DNA를 추출하였다. 김포 샘플의 경우 성충의 다리 한 쪽을 DNA 추출에 사용하였으며, 확보한 DNA는 -20°C 에 보관하였다.

■ Microsatellite 마커 개발

Microsatellite 프라이머 개발을 위한 NGS 분석에는 제주도에서 채집한 물장군 샘플을 사용하였다. NGS 분석 결과로부터 얻은 contig 를 assemble 하기 위해 gsAssembler v.2.8 과 platanus Assembler 두 개의 프로그램을 사용하였으며, gsAssembler v.2.8 프로그램을 이용하여 얻은 repeat 좌위들에 대한 정보를 아래에 표로 정리하였다(표 II-2-12). 두 개의 프로그램을 통해 얻은 di-nucleotide 반복 서열에서 53개, tri-nucleotide 반복 서열에서 10개를 후보군으로 선정하여 전체 63개의 후보군에 대해 제주도와 강화군 집단에서 각각 6개 체씩을 사용하여 PCR을 실시한 후 증폭 여부와 집단 간 변이 여부를 확인하여 마커를 개발하였다. 마커 선정 시, di-nucleotide 위주로 선정하였으며, 최대한 반복수가 많은 contig 로 선정하고자 하였으나 NGS 결과가 좋지 않아, 적은 반복수를 보이더라도 개체 간, 집단 간 변이 여부를 테스트하여 마커를 개발하였다.

표 II-2-12. NGS 결과로부터 gsAssembler v.2.8 프로그램을 이용하여 확보한 repeat 서열부분

Motif	Frequency	%
Di-repeat		
AC (AC/CA/TG/GT)	1	0.78%
AG (AG/GA/TC/CT)	3	2.34%
AT (AT/TA)	6	4.69%
CG (CG/GC)	118	92.19%
Tri-repeat		509
AAT (AAT/ATA/TAA/ATT/TTA/TAT)	7	1.38%
AAG (AAG/AGA/GAA/CTT/TTC/TCT)	9	1.77%
AAC (AAC/ACA/CAA/GTT/TTG/TGT)	6	1.18%
ATG (ATG/TGA/GAT/CAT/ATC/TCA)	21	4.13%
AGT (AGT/GTA/TAG/ACT/CTA/TAC)	1	0.20%
AGG (AGG/GGA/GAG/CCT/CTC/TCC)	3	0.59%
AGC (AGC/GCA/CAG/GCT/CTG/TGC)	135	26.52%
ACG (ACG/CGA/GAC/CGT/GTC/TCG)	14	2.75%
ACC (ACC/CCA/CAC/GGT/GTG/TGG)	48	9.43%
GGC (GGC/GCG/CGG/GCC/CCG/CGC)	265	52.06%
Tetra-repeat		
CCGC	1	50.00%
TTAA	1	50.00%
Hexa-repeat		
GGCTCT	1	50.00%
CAACGG	1	50.00%

최종적으로 di-nucleotide 반복 서열 8개, tri-nucleotide 반복 서열 2개를 선정하여, 총 10개의 microsatellite 마커를 개발하였다(표 II-2-12). 각 마커를 포함하고 있는 10개의 contig 서열은 GenBank에 등록하였다(표 II-2-13).

표II-2-13. 물장군에서 개발한 microsatellite 유전자 목록 정보

Locus	Accession no.	Motif	Flourescent	Primer sequences (5' > 3')	Allele size range (bp)	Ta (°C)
Lede347	KU230514	(CG) ₅	6-FAM	F: CAGGTTGTGCAGGATCTGGT R: TCCATGAGGACATTCTGCGG	169-213	53
Lede455	KU230512	(TA) ₅	6-FAM	F: CTGCTGCAACCACTGAAAC R: GTAGACGGGAAAGGTGCAA	202-240	53
Lede952	KU230513	(GC) ₅	6-FAM	F: CGTCGATGATGATAACGCC R: GAGAACGTGTTGGCCAAAGG	210-248	52
Lede1112	KU230515	(GC) ₅	HEX	F: AAGATATCGAAGCCAGCCG R: ACCAGCCATTGTCCATCTGG	193-241	53
Lede1204	KU230516	(GC) ₅	HEX	F: TCGGGGCAGACGAGATTATC R: GATCATGCCGCGTTATTCG	185-201	53

Lede1400	KU230517	(GC) ₆	FAM	F: CGTTTGAAGCTGGTCGAGGGT R: TTACGATGGACAGGCGGATG	228-246	53
Lede1697	KU230518	(GC) ₆	HEX	F: GCGTCAGAATACGTTGTCCG R: AAGACTCCAAGCTGGTGGTG	226-236	53
Lede3366	KU230519	(CTG) ₄	HEX	F: AGAGCAACTTCAAGACCGGC R: ACCATATGCCAAACCGGTGGT	242-266	52
Lede3585	KU230520	(GCC) ₄	6-FAM	F: ATGTGACGCGGATTCTCCAG R: ATAAAAACCGTGCCCTTCGCC	168-255	52
Lede5172	KU230521	(GC) ₇	6-FAM	F: GAAGGTGTCCAGCCACTGT R: AGTTGGAAGTGGACGAGCTG	148-190	53

■ 선정된 microsatellite primer를 이용한 다양성 분석

NGS 데이터를 바탕으로 개발한 microsatellite 마커 10개를 이용하여 총 3개 집단의 41개체를 대상으로 분석을 수행하였다. 전체 10개의 유전자에서 3-6개의 대립인자가 발견되어 상당히 낮은 다양성을 가지고 있는 것으로 확인되었으며, Led455와 Led3585 좌위가 6개로 가장 많았고 Led1112, Led1204, Led1697, Led3366, Led5172 좌위들이 3개로 가장 적었다. 전체적으로 봤을 때, 10개의 좌위 중 5개의 좌위가 3개의 대립인자를 가지고 있어 전반적으로 개발된 마커들의 유전자 다양성은 낮았다.

표 II-2-14. Microsatellite 유전자와 집단에 대한 각각의 대립인자 수

Locus	JE	GA	GI	Total
Lede347	3	1	2	4
Lede455	4	4	1	6
Lede952	5	2	2	5
Lede1112	2	3	1	3
Lede1204	2	2	1	3
Lede1400	4	2	2	4
Lede1697	2	1	2	3
Lede3366	3	2	2	3
Lede3585	6	3	2	6
Lede5172	2	2	2	3

대립인자 풍부도를 비교했을 때, Led3585 좌위가 1.606 으로 가장 높았으며, Led1697 좌위가 1.048로 가장 낮았다. 유전자 좌위별 FIS, FST 및 RST 구하는 과정에서 김포 집단은 한 개체만을 포함하고 있기 때문에, 결과에 실제로 다 크게 영향을 줄 것을 고려하여 제외하고 계산하였다. Led347, Led455, Led952 좌위가 상대적으로 큰 근친계수(FIS) 값을 보였으며, FST와 RST 값은 전반적으로 낮은 값을 나타냈다.

표 II-2-15. 물장군에서 개발된 microsatellite 좌위별 유전적 다양성 지수: 총 대립인자(A), 대립인자 풍부도(A_R), 이형접합자빈도 관측지(H_O), 예측지(H_E), 근친계수(F_{IS}), 및 F_{ST} 와 R_{ST}

Locus	* A	* A_R	* H_E	* H_O	* F_{IS}	* F_{ST}	** R_{ST}
Lede347	4	1.118	0.228	0.367	0.476	0.046	-0.013
Lede455	6	1.586	0.356	0.083	0.776	0.054	0.065
Lede952	5	1.226	0.288	0.400	0.472	-0.004	-0.024
Lede1112	3	1.338	0.199	0.267	-0.319	0.204	0.239
Lede1204	3	1.095	0.063	0.067	-0.041	0.021	0.013
Lede1400	4	1.439	0.419	0.617	-0.097	0.176	0.235
Lede1697	3	1.048	0.183	0.350	0.000	0.000	0.000
Lede3366	3	1.242	0.315	0.433	0.349	-0.023	0.017
Lede3585	6	1.606	0.550	0.817	-0.235	0.061	0.103
Lede5172	3	1.506	0.485	0.900	-0.770	0.039	0.039

집단 별 유전적 다양성 지수를 관찰했을 때, 김포 집단은 위에서 설명했던 바와 같이 한 개체밖에 없기 때문에 제대로 된 결과를 얻지 못하였다. 제주도와 강화군에서 채집된 개체들의 경우, 제주도 집단의 개체들이 더 높은 유전적 다양성을 보였다. F_{IS} 의 경우, 두 집단 모두 0에 가까운 값을 보였다.

표 II-2-16. 물장군의 지역 집단 별 유전적 다양성 지수

Population ID	A	A_R	H_E	H_O	F_{IS}
JE	0.3606	1.36	0.351	0.355	0.015
GA	0.23	1.23	0.225	0.235	-0.021
GI	NA	1.7	0.350	0.700	NA

제주도와 강화군의 집단 간에는 유전자 분화도가 크지는 않았으나 유의미한 값($F_{ST}=0.078$, $R_{ST}=0.010$, $P\text{-value}<0.05$)을 나타내었다. 김포 집단의 경우, 제주도와 강화군과 비교했을 때 상대적으로 큰 유전자 분화도를 보였지만, 이는 유의미하지 않았다(표 II-2-17).

표 II-2-17. 각 지역 집단 간 유전적 분화 (Pairwise- F_{ST} , R_{ST})

	JE	GA	GI
JE		0.010	-0.010
GA	0.078		0.137
GI	0.255	0.452	

※ F_{ST} 는 왼쪽 아래에 삼각형 모양으로, R_{ST} 는 오른쪽 위에 역삼각형 모양으로 표시하였다. 유의미한 값의 경우 진하게 표시하였다(P -value<0.05).

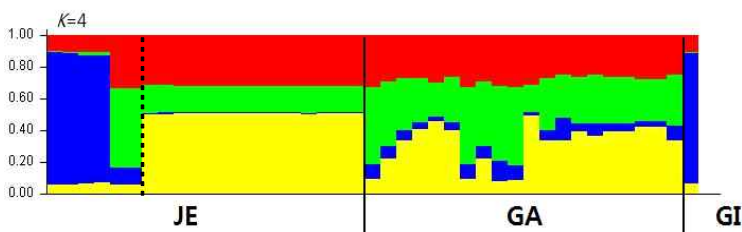


그림 II-2-10. 국내 물장군 집단들에 대한 STRUCTURE 결과($K=4$)

STRUCTURE 분석을 통해 물장군의 집단 유전학적 구조를 살펴보고자 하였다. 그 결과, 지역에 따라 나뉠 것이라 예상했던 것과는 다르게 $K = 4$ 에서 가장 높은 확률 값을 나타냈으며, 제주도와 강화군 및 김포 지역 간의 뚜렷한 유전적 구조는 관찰하기 어려웠다. 흥미로운 점은 올해 채집된 제주도 집단 내에서도 두 개로 구분되는 집단 구조가 관찰되었다는 점이다. 제주도에서 채집된 개체들 중 일부는 김포에서 채집된 개체와 유전적으로 더 유사하였으며, 나머지 제주지역의 개체들은 강화군 집단과 더 유사한 집단 구조를 나타내었다. 인공증식개체들의 경우에는 점선으로 나누어 따로 표시하였는데, 마찬가지로 강화군 집단과 유사한 집단 구조를 보였다. 인공증식개체들의 경우에는 여러 개체들이 하나의 통일된 유전형질을 가지고 있어 따로 분화한 집단처럼 보이지만, 실제로는 한 개체로부터 인공적으로 많은 개체들을 증식했기 때문에 각기 다른 개체라도 유전적으로는 거의 동일한 형질을 가질 가능성이 높기 때문에 야생 물장군의 집단 유전학적 분석에서는 분석된 개체 수만큼의 의미를 지니지 않는다는 점을 고려하였다(그림 II-2-10).

STRUCTURE 분석 결과로는 뚜렷한 유전적 구조를 관찰하기 어려웠다. 따라서 AMOVA 분석은 지역에 따라 제주도와 강화군 집단을 각각의 그룹으로 나누어

진행하였다. 결과에 따르면, FST, RST 에 관계없이 유전적 변이 중 제주도와 강화군 집단 간의 변이보다는 개체 간의 변이들이 더 많은 부분을 차지하고 있었다. 지역 집단 간 유전적 분화도(FST) 및 STRUCTURE, AMOVA 결과들을 미루어 볼 때, 강화군, 제주도 및 김포에 서식하고 있는 물장군 집단 간에는 유전적으로 충분히 분화가 일어나지 않은 것으로 보여진다. 이러한 결과는 물장군 집단 간에 지속적인 교류가 있어 발생한 결과라기보다는 짧은 시간 동안 급격히 개체수가 줄어든 결과로 예상되어진다. 과거 물장군은 우리나라 전역에 서식하는 것으로 알려져 있는데, 1990년대부터 현재까지는 채 30년이 안 될 정도로 진화적으로 매우 짧은 시간이기 때문에 강화군과 제주도 집단 사이에 지리적 거리가 매우 멀더라도 유사한 유전적 집단 구조를 보일 수 있다. 또 다른 원인으로 각 집단의 매우 작은 유효 개체군의 크기는 유전자 부동에 의한 영향을 많이 받기 때문에 한 집단 내에서 개체 간의 변이가 커질 수 있는데, 이러한 영향으로 AMOVA에서 집단 간의 유전적 분화보다는 개체 간의 유전적 변이가 더 많은 비중을 차지하고 있는 것으로 보여진다.

표 II-2-18. 제주도와 강화군 집단으로 구분한 F_{ST} , R_{ST} 기반의 AMOVA test

Source of variation	F_{ST}		R_{ST}	
	d.f.	Percentage of variation(%)	d.f.	Percentage of variation(%)
Among groups	1	7	1	8
Among populations within group	38	0	38	0
Among individuals within population	40	93	40	92

■ 해외 표본 확보 계획

한국의 서식하는 물장군 생물종인 *Lethocerus deyrollei*의 경우에는, 세계생물다양성정보기구인 GIBF (Global Biodiversity Information Facility, <http://www.gbif.org/>)에 따르면 일본, 한국, 중국 동부지역 등에 분포하고 있다고 보고되었다. 특히 일본에서 이 종에 대한 연구가 많이 보고되었는데, 참고 문헌들에 따르면 2000년도에 일본 고베 시(Kobe)의 효고 현(Hyogo prefecture)에서 관찰 기록이 있으며(Hirai, T., and Hidaka, K., 2002), 같은 지역(효고 현)에서 2010년에도 기록된 바 있다(Ohba, S., et al., 2012). 뿐만 아니라 2001년에도 일본 오사카 부(Osaka)의 노세 초(Nose)의 미쿠사 산(Mt. Mikusa)에서도 보고

되었다(Mukai, Y., et al., 2005). 이러한 기록들을 살펴보았을 때, 가장 최근까지 보고가 되었던 고베 시의 효고 현에서 채집 가능성이 가장 높을 것으로 예상된다. 그러나 일본에서도 *L. deyrollei* 종의 개체수가 단기간에 급격히 감소하여 2000년에 일본 적색목록에 등록되었기 때문에, 한국에서와 마찬가지로 채집이 쉽지 않을 것으로 예상된다.

한국의 물장군(*L. deyrollei*)와 같은 속에 있는 종으로는 *L. americanus*, *L. deyrollei*, *L. distinctifemur*, *L. indicus*, *L. medius*, *L. uhleri* 등이 있다. *L. americanus*는 북미와 캐나다 지역에 분포하고 있으며, *L. Indicus*는 인도, 태국, 미얀마, 베트남 등지에서 보고되었다. *L. distinctifemur*는 호주에 분포하고 있으며, *L. uhleri*는 미국의 중, 북부 지방에 분포하는 것으로 보고되었다(그림 II-2-11, 표 II-2-14). *Lethocerus* 속이 전세계적으로 넓게 분포하고 있음에도 불구하고, 아직까지 *Lethocerus* 속 내의 *L. deyrollei* 종과 다른 종들 간의 유전 서열에 기반한 계통학적 관계에 대한 연구 결과가 충분치 않기 때문에, 근연종 간의 연구를 위한 시료 확보가 필요할 것으로 보인다.

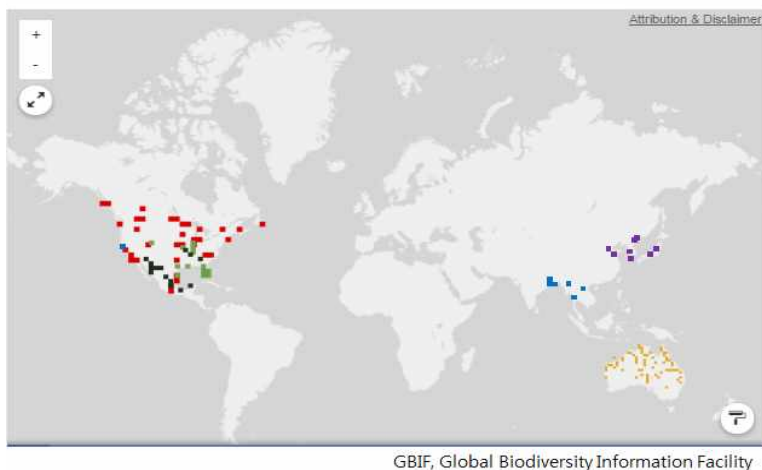


그림 II-2-11. *Lethocerus* 속의 국외 분포현황

(색깔들로 표시된 점들은 각기 다른 *Lethocerus* 종들의 분포를 나타냄)

표 II-2-19. *Lethocerus* 속의 국외 분포현황에 대한 정보(위의 지도에서 표시된 색깔정보를 나타냄)

Genus <i>Lethocerus</i>	Color	Area
<i>L. americanus</i>	빨간색	미국의 북부지역, 캐나다
<i>L. deyrollei</i>	보라색	한국, 중국, 일본, 동인도차이나 반도 및 러시아 아무르 지역
<i>L. distinctifemur</i>	노란색	호주
<i>L. Indicus</i>	파란색	인도, 태국, 미얀마, 베트남
<i>L. Medius</i>	진한 녹색	캐리비안, 미국의 중, 북부 지역
<i>L. uhleri</i>	연두색	미국의 중, 북부 지역

5) 결론

표 II-2-20. 물장군의 유전다양성 분석 결과

종 명		완료 여부	유전자 마커	확보 집단/ 개체수	세부 책임자
학 명	한국명				
<i>Lethocerus deyrollei</i>	물장군	완료	microsatellite	3집단/41개체	원용진

- 멸종위기종인 물장군의 국내 개체군 유전자 분석을 진행하기 위해, 본 연구자들은 김포시와 강화군 및 제주도 지역으로부터 총 41개체의 샘플을 확보하였다. 특히, 강화군 및 내륙지역에서 야생 표본을 확보하기 위한 과정에서 어려움이 많았는데, 이러한 원인으로 가뭄의 영향과 많은 농수로의 시멘트 교체가 물장군의 서식지 감소와 관련이 있는 것으로 보인다.
- NGS 분석 데이터를 이용하여 63개의 후보군으로부터 개체 간의, 집단 간의 변이를 보이는 10개의 microsatellite marker를 개발하였다.
- 개발한 microsatellite marker를 이용하여 집단유전학적 분석을 실시한 결과, 국내 물장군은 집단 내 낮은 유전적 다양성을 가지고 있는 것으로 나타났다. 이는 짧은 시간 동안 급격한 개체군의 감소와 관련이 있을 것으로 보이며, 뿐만 아니라 물장군 멸종위기종 복원을 위한 인공증식 개체들의 주기적인 방사도 영향을 미쳤을 것으로 예상된다.

- 강화군과 제주도 지역의 집단 간에는 유전적으로 유의미한 분화를 보였지만, 그 값이 매우 낮아 충분히 분화했다고 보기 어려웠으며, STRUCTURE 및 AMOVA 결과에서도 지역 집단 간의 변이보다는 집단에 상관없이 개체 간의 변이의 비중이 더 크다는 것이 나타났다. 이러한 결과는 1990년대 이후 서식지 파괴 및 수질오염으로 인한 급격한 개체 수 감소 및 집단의 크기 감소와 관련이 있을 것으로 판단된다.
- 본 연구과제로부터 얻은 국내 멸종위기종인 물장군의 집단 내 유전적 다양성 및 집단 구조에 대한 분석 결과들은 물장군 집단들의 현재 상황에 대한 이해뿐만 아니라, 추후 복원을 위한 해결방법을 찾는 데 있어 중요한 기초자료로 사용될 것이다.

다. 붉은점모시나비 *Parnassius bremeri*



- 국명: 붉은점모시나비
- 영명: Red-spotted apollo butterfly
- 학명: *Parnassius bremeri*
- 멸종위기 II급
- 계통: 곤충강 나비목 호랑나비과

그림 II-2-12. 붉은점모시나비

■ 생김새: 날개 편 길이 33-42mm. 몸은 검고, 앞가슴에 황갈색 털이 뽁뽁하다. 날개는 흰 바탕에 검은 점과 붉은 점이 있는데, 뒷날개에 2개의 붉은 점이 뚜렷하다. 특히 암컷 쪽에서 더 뚜렷하다. 앞날개 기부와 뒷날개가 검다. 근연종인 모시나비와 닮았지만 더 크고 날개에 붉은 점이 있어 차이가 난다.

■ 서식지: 먹이식물인 기린초가 자라는 바위산이나 강가에 산다.

■ 먹이: 돌나물과의 ‘기린초’ *Sedum*속 기린초(*Sedum Kamtschaticum*), 가는 기린초(*S. aizoon*), 애기기린초(*S. middendorffianum*), 섬기린초(*S. takesimense*), 속리기린초(*S. zokuriense*)

■ 번식: 암컷은 먹이식물 주위의 마른 풀에 알을 낳고 알 상태로 겨울을 난 뒤, 이른 봄에 애벌레가 성장한다. 5월초에 대부분 번데기가 된다. 성충은 연 1회, 5-6월초에 나타난다.

■ 분포: 한반도에는 제주도와 울릉도를 뺀 전국에 국지적으로 분포하는데, 최근 서식지가 급감하여, 경남북과 충북, 강원도의 극히 일부 지역에만 분포한다. 국제적으로 중국의 북동부 지역과 러시아 시베리아 부근에서 분포한다고 알려져 있다.

[출처: 한국곤충생태도감, 한국나비도감]

1) 연구의 필요성

붉은점모시나비(*Parnassius bremeri*, 호랑나비과, 나비목)는 러시아, 한국, 중국 등지에 발생하는 종으로 우리나라에서는 멸종위기야생동식물 2급으로 지정된 보호종이다. 서식지는 주로 산지의 암반지대, 산지의 절개지, 강변의 암석지, 산 정상부의 암반 등과 같이 양지바른 초원지대에 서식하며 먹이식물은 *Sedum*속의 기린초, 가는기린초, 애기기린초, 섬기린초, 속리기린초 등으로 알려져 있다(Ko et al., 2004; Kim et al., 1999). 붉은점모시나비는 1980년대 18곳, 90년대 16곳 그리고 200년 이후 단지 3곳이 보고되는 등 급격한 감소를 기록하고 있는 종으로(Park and Kim, 1997; Ko et al., 2004), 현재 대략 강원도 삼척, 강원도 정선, 경북 의성, 충북 옥천, 경남 거창, 경남 의령 및 경남 고성에서 발견되었다는 보고가 있으나 이들 중 강원도 삼척 및 경남 의성에서 일정 개체군을 형성하고 있는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 2011a; 2011b). 특히 경북 의성의 경우 붉은점모시나비의 패치 이동 패턴 연구과정에서 2011년 5월 일일 최대 개체군 크기는 231마리로 보고된 바 있다(Kim et al., 2011a).

붉은점모시나비가 속한 *Parnassius*속은 학자에 따라 약 7~8개의 아속으로 분류되며 세계적으로 60종 정도가 발생한다고 알려져 있다(Wikipedia). 또한 고도에 따라 날개색이 다른 특징을 갖고 있으며 국내에는 붉은점모시나비와 함께 모시나비(*P. stubbendorffii*), 왕붉은점모시나비(*P. nomion*), 그리고 황모시나비(*P. eversmanni*)가 발생한다(국가생물종지식정보시스템). 그간 붉은점모시나비의 생태, 메타개체군 이동양상, 기주식물, 대체서식처 연구 등 다양한 연구가 수행된 바 있으나(Park and Kim, 1997; Kim et al., 1999; Ko et al., 2004; Kim et al., 2011a, 2011b, 2011c; Kim et al., 2012) 집단의 유전적 측면에서 연구는 전무한 실정이다. 다만 Kim et al. (2009)에 의해 완전 mitochondrial genome에 대한 구성과 진화적 특징에 대해 보고된 바 있으며 붉은점모시나비 내 안점의 다형성으로 cryptic species의 존재 여부를 분석하기 위한 DNA 바코드 연구가 수행된 바 있다(이대암, 미발표 자료).

종의 멸종은 지구온난화, 서식처 파괴, 파편화 등 다양한 이유에 의해 촉발될 수 있는데 이러한 재앙으로부터 종을 보호하기 위하여 해당 종의 서식처 내 이동양상과 서식처 복원 연구, 도입 집단의 적응양상 연구 등이 필요하며 멸종위기종의 현지 서식처 복원, 도입, 복원집단의 유전적 적절성 등 다양한 이유에서 집단 유전학적 연구는 그 중요성이 있다고 할 수 있다. 특히 집단의 동형접합성(Homozygosity) 정도 및 주변 집단과의 유전적 관련성(Genetic relationship)에

대한 연구는 멸종위기종의 장기적인 지속을 위해 반드시 연구되어야 할 분야로 이를 위한 집단유전학적 연구가 필요한 실정이며 붉은점모시나비는 아시아 소수 국가에서만 발견되고, 기후 변화를 예측할 수 있는 몇 안 되는 나비종으로 이에 대한 연구는 이와 유사한 분포를 갖는 나비류의 보전을 위해 많은 시사점을 제공할 수 있을 것으로 판단된다.

2) 재료 및 방법

가) 표본 확보 전략

국내 개체군의 경우 문헌조사에 따르면 대략 강원도 삼척, 강원도 정선, 경북 의성, 충북 옥천, 경남 거창, 경남 의령 및 경남 고성에서 발견되었다는 보고가 있으나 이들 중 강원도 삼척 및 경남 의성에서만 일정 개체군 크기를 형성한다고 알려져 있다. 붉은점모시나비의 국내 개체군의 유전적 다양성과 국내 개체군내/간 유전적 특이성 규명을 위하여 7개 발생 지역 중 최소 2개 지역(삼척과 의성)을 중심으로 40개체 이상을 확보할 수 있도록 채집하였다(그림 II-2-13).

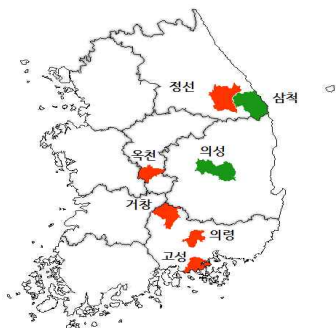


그림 II-2-13. 붉은점모시나비 국내 분포도
(녹색: 일정 개체군, 빨강: 극 소수 개체)

국제적으로 붉은점모시나비는 중국 및 러시아에 발생한다고 알려져 있다 (Zakharov, 2001). 중국에서는 북동부의 산둥반도(Shandong), 헤이룽장(Heilongjiang) 근접 지역에서 발생하며, 러시아에서는 시베리아 남부의 자바이칼(Transbaikalia), 아무르주(Amur), 연해주(Primorye) 및 사할린 쿠릴섬(Kunashir Island)에 걸쳐 발생한다. 그러나 중국은 *Parnassius*에 속한 종들에 대한

국외반출금지 규정이 있어 표본 확보가 어려운 상황이며, 러시아의 경우 붉은점모시나비(*P. bremeri*)와 왕붉은점모시나비(*P. nomion*)종의 잡종(Hybridization)이 보고된 바 있어(Zakharov, 2001) 향후 국내 집단과 국외 집단과의 비교는 어려울 것으로 판단된다. 따라서 붉은점모시나비의 국외 표본 확보는 국외 기관과 공식적 협력관계를 구축해야만 표본확보가 가능할 것이며 최소 수년의 시간이 필요할 것이다.

나) 유전자 분석 범위

붉은점모시나비의 국내 집단 내 유전적 다양성 분석을 위하여 Next Generation Sequencing (NGS) 방법을 통하여 10개 이상의 유효한 microsatellite 유전자 좌위를 개발하였다. 또한, 확보된 붉은점모시나비의 종 확인(species identification)을 위하여 미토콘드리아 유전체 내 COI(바코드영역) 유전자 일부분을 분석하였고, 집단 별 형태적 특성의 차이를 확인하기 위하여 붉은점모시나비 성충의 날개편 길이를 집단별 비교하였다.

다) 종 확인을 위한 COI (바코드영역)유전자 및 형태 분석

DNA 추출은 붉은점모시나비 다리(1~2개)에서 DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, USA)를 이용하였으며(표 II-2-21), 유전자 증폭은 Folmer et al. (1995)이 개발한 프라이머를 이용하여 각 개체별 유전자를 증폭 후 양방향에 대한 염기서열을 확보하였다. 이후 40개체에 대한 haplotype을 분석하고 각 타입과 GenBank에 기 등록된 *Parnassius* 종의 동일 영역 염기서열을 확보 후 pairwise 비교를 수행하였다. 또한, 형태적 분류를 위하여 형태분류를 수행하며, 각 집단 별 형태적 차이의 유무를 확인하기 위하여 앞날개 길이를 측정하여 집단 별 비교하였다. 집단별 평균값의 차이를 위하여 JMP software (SAS)를 이용하여 통계분석을 수행하였다.

표 II-2-21. 붉은점모시나비 종확인 분석을 위해 사용된 primer 정보

분석마커	Primer	Primer sequence
COI	LCO1490	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G
	HCO2198	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA

라) Microsatellite 개발 및 분석

- 붉은점모시나비 NGS 분석을 통하여 확보한 유전체 서열로부터 QDD 프로그램을 이용하여 적절한 microsatellite 영역을 탐색하고, 이를 증폭하는 프라이머

를 개발하여 10개 이상의 유효한 다양성이 높은 마커를 확인하였다.

- 성공적인 증폭을 보이는 프라이머 세트를 10개 이상 선별한 후, 한 쪽 프라이머에 형광염료(FAM, HEX, TET 등)로 표지하여 PCR을 수행한 후 genotyping을 실시하였다.
- 유전자형 분석은 Arlequin 3.5(Excoffier and Lischer, 2010) 및 Genepop 4.2.1 (Raymond and Rousset, 1995; Rousset, 2008)을 이용하여 유전자 좌위별 이형접합도(heterozygosity)의 관찰값(H_0)과 하디-바인베르크 평형(HWE)상태에서의 예측값(H_E)을 계산하였다. 각 집단의 유전적 다양성을 나타내는 유효개체군 크기(effective population size)는 NeEstimator v 2.01에 의해 측정되었으며, 각 집단의 병목현상에 대한 여부는 Bottleneck v1.2.02에서 Wilcoxon test를 사용하여 구하였다. 또한 전체적인 유전적 분화에 의한 집단의 구조를 파악하기 위하여 Structure v2.3.4를 이용하였다. 집단 간 유전적 분화는 F_{ST} 와 R_{ST} 값을 계산하였으며, 유의성 분석은 Arlequin 3.5 프로그램을 이용하여 분석하였다. Inbreeding coefficient(F_{IS})는 FSTAT 2.9.3.2(Goudet, 1995)를 이용하여 계산하였다.

3) 실험 방법

- DNA 추출은 비침습적 방법에 의해 수집된 발가락 시료에서 DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, USA)을 사용한다.
- 기존 연구 사업으로 얻어진 유전체 서열로부터 적절한 부위의 microsatellite 유전부위들을 탐색하고 이를 증폭하는 프라이머를 개발하여 10개 이상의 유효한 다양성이 높은 마커를 확인한다.
- 성공적으로 증폭되는 프라이머 세트를 10개 이상 선별한 후, 한 쪽 프라이머에 형광염료(FAM, HEX, TET 등)를 표지하여 PCR을 수행하고 ABI3130으로 genotyping을 실시한다.
- Genotype 데이터는 STRUCTURE (Pritchard et al., 2000)를 통해 집단의 유전적 집단구조를 살펴보고, GENEALLEX, ARLEQUIN 등의 컴퓨터 프로그램을 통해 맹공이 집단 사이의 유전적 분화도와 패턴, 다양성 등을 분석한다.

4) 결과 및 고찰

가) 시료 확보

최소 2개 지역, 40개체 이상의 붉은점모시나비 확보를 위하여 3개 지역(강원도 삼척, 경북 의성, 충북 영동)을 채집 대상으로 선정하였고 각 해당 환경청에 포획허가서를 제출하고 허가 받은 후 붉은점모시나비 생체를 채집하였다. 채집 후 5일 내 포획신고서를 제출하여 멸종위기 야생생물의 포획에 대한 신고를 마무리하였다. 현재 강원도 삼척시 일대에서 20개체, 경상북도 의성에서 10개체, 충청북도 영동군에서 10개체를 포획하여 총 3개 지역 40개체에 대한 표본 확보를 완료하였다(표 II-2-22).

표 II-2-22. 붉은점모시나비의 채집 정보

	채집 지역	채집 개체수	채집 날짜
1	강원도 삼척	20개체	2015. 06. 22
			2015. 06. 23
2	경북 의성	10개체	2015. 06. 10
3	충북 영동	10개체	2015. 06. 19

나) 종 확인을 위한 COI (바코드영역)유전자 및 형태 분석

국내 분포하는 붉은점모시나비 집단에 대한 COI(바코드영역)유전자 분석 결과, 총 9개 haplotype일 확인되었다. 이들 개체간 염기변이율은 최소 0.152%(1 bp), 최대 0.608%(4 bp) 차이로 모두 1% 미만의 낮은 염기변이율을 나타냈다. 반면, *Parnassius* 속 다른 종과 비교결과, *P. stubbendorffii* 와 최소 5.319%(35 bp), *P. nomion*과 최소 4.103%(27 bp) 차이가 남을 확인하였으며, 이러한 결과는 본 연구에서 분석된 40개체는 DNA 측면에서 모두 붉은점모시나비 1종임을 나타냈다(표 II-2-23).

표 II-2-23. 붉은점모시나비 haplotype 및 *Parnassius* 속 종간의 염기서열
작 비교

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 PBBAR1	-	0.152	0.456	0.152	0.152	0.152	0.152	0.304	0.152	5.471	4.255
2 PBBAR2	1	-	0.608	0.304	0.304	0.304	0.304	0.456	0.304	5.319	4.407
3 PBBAR3	3	4	-	0.304	0.304	0.608	0.608	0.456	0.608	5.623	4.407
4 PBBAR4	1	2	2	-	0.304	0.304	0.304	0.152	0.304	5.623	4.407
5 PBBAR5	1	2	2	2	-	0.304	0.304	0.456	0.304	5.319	4.103
6 PBBAR6	1	2	4	2	2	-	0.304	0.456	0.304	5.623	4.407
7 PBBAR7	1	2	4	2	2	2	-	0.456	0.304	5.471	4.103
8 PBBAR8	2	3	3	1	3	3	3	-	0.456	5.775	4.559
9 PBBAR9	1	2	4	2	2	2	2	3	-	5.319	4.103
10 <i>P. stubbendorffii</i>	36	35	37	37	35	37	36	38	35	-	6.383
11 <i>P. nomion</i>	28	29	29	29	27	29	27	30	27	42	-

Number above the diagonal are mean distance values numbers below the diagonal are absolute distance values.

국내 3개 집단에서 확보한 40개체에 대해 일반적으로 나비류 종의 형태적 특성으로 규명을 위해 측정되는 알려진 앞날개 길이, 날개바탕색, 외연부의 검은띠무늬 등의 형태 분류를 수행한 결과, 모두 붉은점모시나비로 동정되었다. 각 집단간 형태적 차이 유무를 확인하기 위하여 가장 손쉽게 측정할 수 있는 앞날개 길이를 측정하였으며, 측정에는 통계적 유의성을 분석하기 위하여 개체수가 적은 암컷은 제외하고 수컷만 측정하여 비교하였다. 그 결과, 경북 의성 집단은 총 10개체 중 수컷 9개체에 대해 측정하였으며, 약 37 ~ 45 mm의 범주로 확인하였고, 강원도 삼척 집단은 총 20개체 중 수컷 16개체에 대해 측정한 결과, 약 35 ~ 39 mm, 충북 영동 집단은 약 37 ~ 42 mm 범주로 확인하였다. 각 집단 간 앞날개 길이의 평균은 경북 의성 41 mm, 강원도 삼척 37 mm, 충북 영동 39 mm로 확인하였다. 영동과 의성은 유사한 가운데 강원도 삼척이 가장 짧은 앞날개편 길이를 보유했음을 나타냈고, 집단간 평균 값의 차이는 통계적으로 유의함을 확인하였다($p < 0.0001$) (그림 II-2-14).

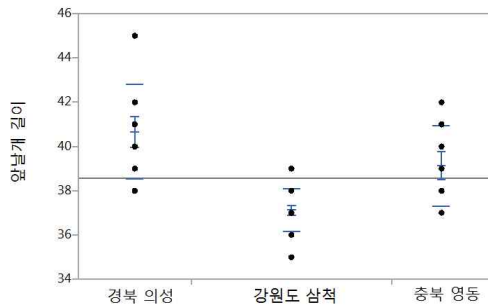


그림 II-2-14. 붉은점모시나비 성충 앞날개 길이(좌) 및 집단 별 평균값 비교 (우)

다) Microsatellite 개발 및 분석

■ 유전체 서열 확보 및 microsatellite 유전자 좌위 선정

QDD 프로그램 패키지를 이용하여 붉은점모시나비 유전체 서열로부터 적절한 microsatellite를 탐색한 결과, di- 1,923개, tri- 3,726개, tetra- 1,139개, penta- 226개, hexa-30개로 총 7,044개의 microsatellite 후보 유전자 좌위를 발견하였다. 이 중에서 단일반복서열이 혼합된 위를 제외하고, di-, tri-를 가진 유전자 좌위 후보군 중에서 primer design이 가능하고, 안정된 증폭 효율을 나타낸 12개의 유전자 좌위를 선정하였다(표 II-2-24).

표 II-2-24. 12개 microsatellite 유전자 좌위의 primer 염기서열 및 motif 정보

Locus	Primer sequence (5' - 3')	GC	Motifs	Repeat	Expect size	Mini size
18	ATGTTTGTAGCTTATGTTCT	30	AT	42	190	106
	GAAATGCCAAAAATTTTGAG	30				
37	ATAAATCGTCTTTAAGAGGG	35	AT	37	236	162
	TTAGATTTCCGAAAAGTCAT	30				
65	ATTTGCAGTAGTATTCATGT	30	ATT	9	290	263
	ACTATGGCAAATATCCAATT	30				
1218	TGAAATTATAAGAGCGAGTT	30	AG	27	255	201
	GCTTATTATTGCACATTTC	30				
8095	AGATATGTAATGTCCGAAAG	35	AAT	13	236	197
	TAAACATGTGTAGTTGGAAG	30				
36120	TTTACTACCAACCTTAACGT	35	AT	43	284	198
	TCACTCATTTAAATAGCGAT	30				
58365	AGTGGATAAAACCGAAATAA	30	AAT	10	103	73
	GTGTGATAGTTGTGGAATAT	35				
60526	TGTAGGATTACCGTTAAATC	35	AT	42	285	201
	ATATACTAATTGGGGTGCT	35				
90873	CTAGATTATGACGAAACAGT	35	AC	27	200	146
	GTAATTTGTTCTCTCGTAT	35				
290815	AGCAGGTATTAATTGGATAC	35	AC	28	240	184
	AATATTGTGTATGTTTGCAC	30				
312299	CTTATCAGCTTATCACAACT	35	GT	32	277	213
	TCAATAGTACGAGTCATTTT	35				
144310	GCCAGATTGTAAAAATTGTT	30	AAT	10	273	243
	CTATGTAAAAAGTGGGAGAA	35				

■ Microsatellite 유전자 좌위별 유전적 다양성

총 3개의 집단 40개체에 대해 microsatellite 12개 유전자 좌위에 대한 분석을 완료하였다(표 II-2-25). 전체 12개 locus에서 유전자 좌위별 대립유전자는 최소 6개(65)에서 최대 22개(312299)의 대립유전자가 관찰되었으며, 이들의 유전적 다양성은 0.4766 ~ 0.8981 범주로 전체 평균 0.702로 높은 수준이었으며, locus 290815에서 가장 높은 다양성을 확인하였다. 이형접합자 관측치는 0.500(37)에서 1.000 (18, 1218, 60526) 범주이며, 이형접합자 예측치는 0.487(37)에서 0.905 (290815)까지 나타났다. 전체적으로 낮은 F_{IS} 값을 나타내었으나, Hardy-Weinberg equilibrium에서 유의미하게 벗어나는 유전자 좌위는 없었다. 집단의 분화도를 나타내는 F_{ST} 와 R_{ST} 는 모두 “144310” 유전자 좌위에서 가장 낮은 수치(-0.002 및 -0.073)를 나타내어 집단 간 상당한 분화를 갖는 유전자 좌위로 추정된다.

표 II-2-25. 12개 microsatellite locus의 유전적 다양성 정보: 총 대립유전자 (A), 대립유전자 풍부도 (A_R), 근친계수 (F_{IS}), 이형접합자빈도 관측치 (H_O)와 예측치 (H_E), 유전적 분화도 (F_{ST} , R_{ST})

Locus	A	A_R	F_{IS}	H_O	H_E	F_{ST}	R_{ST}	Diversity	PIC
18	13	8.156	-0.167	1.000	0.862	0.027	0.113*	0.8625	0.8479
37	10	4.773	-0.042	0.500	0.487	0.009	-0.011	0.4766	0.4604
65	6	3.825	-0.525	0.983	0.654	0.042	0.014	0.6531	0.5904
1218	17	9.684	-0.151	1.000	0.872	0.033*	0.169	0.8781	0.8681
8095	16	8.080	-0.126	0.883	0.853	0.048*	0.077	0.8156	0.7997
36120	14	7.692	-0.036	0.833	0.843	0.032	-0.014	0.8275	0.8101
58365	15	7.011	-0.100	0.867	0.787	0.063*	0.209	0.7966	0.7717
60526	12	7.217	-0.200	1.000	0.832	0.003	-0.012	0.8266	0.8060
90873	12	6.910	-0.225	0.967	0.797	0.014	0.023	0.7932	0.7675
290815	16	9.634	0.017	0.900	0.905	0.033*	0.151*	0.8981	0.8896
312299	22	9.716	-0.094	0.917	0.880	0.061*	0.033	0.8706	0.8599
144310	11	6.599	0.117	0.725	0.740	-0.002	-0.073	0.7502	0.7280

■ 집단 간 유전적 다양성 비교

국내 3개 집단에 대한 집단 간 유전적 다양성을 분석하였다(표 II-2-26). 집단별 유전자 좌위별 대립유전자는 강원도 삼척이 43개로 상대적으로 높은 대립유전자를 보유한 집단으로 확인하였으며, 나머지 경북 의성과 충북 영동은 각각 19 및 17개를 보유함을 확인하였다. 이형접합자 빈도의 경우 충북 영동 집단에서 0.84722로 가장 낮은 수치를 나타냈으며, 경북 의성 집단이 0.90556으로 가장 높게 나타났다. 집단 별 F_{IS} (근친계수)를 비교한 결과, 세 집단 모두 -값으로 전반적으로 낮은 수치를 나타냈으며, 그 중 경북 의성 집단이 -0.155로 가장 낮은 근친계수를 나타냄을 확인하였다. 각 집단별 유전적 병목현상의 가능성에 대한 측정 결과, 어떠한 유의성도 보이지 않았으며, mode shift (allele class distribution) test에서 모두 정상적인 L 형태의 대립유전자 분포를 보이는 것으로 나타나 세 집단은 유전적 병목현상에 대한 가능성은 나타나지 않음을 확인하였다. 유효집단 크기는 강원도 삼척 12.9, 경북 의성 8.9, 충북 영동 9.8로 많은 개체가 분석된 강원도 삼척 집단에서 상대적으로 높게 나타났다.

표 II-2-26. 집단 별 유전적 다양성 정보: 총 대립유전자(A), 근친계수(F_{IS}), 대립유전자 풍부도(A_R), 이형접합자빈도 관측치(H_O)와 예측치(H_E), 유효집단 크기(N_e), Bottleneck-Wilcoxon test, Bottleneck-mode shift (allele class distribution) test

Pop (ID)	N	A	A_R	F_{IS}	H_O	H_E	N_e (CI)	Bottleneck	Mode
강원도 삼척	20	43	7.085	-0.129	0.89101	0.79208	12.9 (6.8-205.8)	0.46973	L-shaped
경북 의성	10	19	6.668	-0.155	0.90556	0.79018	8.6 (4.8-82)	0.96973	L-shaped
충북 영동	10	17	7.130	-0.121	0.84722	0.76045	9.8 (5.0-∞)	0.38037	L-shaped

■ 개체군의 유전적 구조 분석

붉은점모시나비 40개체 전체에 대한 유전적 구조를 설명하기 위해 3개 개체군들에 대한 Structure 분석 결과, 2개의 유전자 그룹(Delta $K=0.128822$)으로 나뉘는 것을 확인하였다(그림 II-2-15; 표 II-2-27).

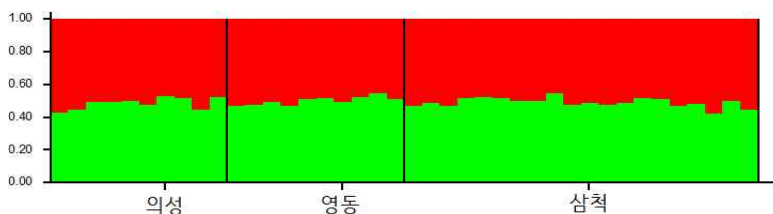


그림 II-2-15. Structure 프로그램으로 분석한 개체군 구조($K=2$)

표 II-2-27. Structure Harvester 결과

K	Reps	Mean $\ln P(K)$	Stdev $\ln P(K)$	$\ln'(K)$	$ \ln''(K) $	Delta K
1	10	-1995.05	0.959456	—	—	—
2	10	-2001.85	9.625689	-6.8	1.24	0.128822
3	10	-2009.89	19.27079	-8.04	—	—

■ 집단간 유전적 분화도 및 변이 비교

세 집단에 대한 microsatellite 유전자 좌위를 이용한 세 집단의 유전적 분화도를 비교하기 위하여 집단 간 F_{ST} 와 R_{ST} 를 측정하였다(표 II-2-28). 그 결과, F_{ST} 의 경우 세 집단 간 통계적으로 유의한 유전적 분화를 나타냈으며, R_{ST} 의 경우 강원도 삼척 집단이 다른 두 집단(경북 의성과 충북 영동)과 통계적으로 유의한

분화를 나타내었다($p < 0.01$). 이러한 결과는 앞서 언급한 대로 집단 간 형태형질 (앞날개 길이) 측정결과와 유사하며, 결과적으로 최소 강원도 삼척 집단은 형태형질적 및 집단유전학적 분화를 나타냈다.

표 II-2-28. 집단 간 microsatellites 유전적 분화 (Pairwise- F_{ST} 와 $-R_{ST}$)

	경북 의성	충북 영동	강원도 삼척
경북 의성	0	-0.00533	0.07562*
충북 영동	0.01862*	0	0.05974*
강원도 삼척	0.02486*	0.03599*	0

(아래쪽이 $-F_{ST}$ 를 나타내며 위쪽이 $-R_{ST}$ 수치를 나타낸다; *: significant at $p < 0.01$)

5) 결론

표 II-2-29. 붉은점모시나비의 유전다양성 분석 결과

종 명		완료 여부	유전자 마커	확보 집단/ 개체수	세부 책임자
학 명	한국명				
<i>Parnassius bremeri</i>	붉은점모시나비	완료	<i>COI</i> microsatellite	1개국/3개 집단/ 40개체	김익수

-붉은점모시나비 유전체 서열로부터 microsatellite를 탐색한 결과, 총 7,044개의 microsatellite 후보 유전자 좌위를 발견하였으며, 이중 12개의 유전자 좌위를 개발하였다.

-개발된 12개 유전자 좌위에 대해 붉은점모시나비 총 3개의 집단 40개체에 대한 분석을 완료하여, 유전자 좌위별 유전적 다양성, 집단 간 유전적 다양성을 분석 후 비교하였다.

-각 유전자 좌위별 유전적 다양성을 비교한 결과, 전체 12개 유전자 좌위에서 좌위별 대립유전자는 최소 6개에서 최대 22개의 대립유전자가 관찰되었으며, 이들의 유전적 다양성은 0.4766 ~ 0.8981 범주로 전체 평균 0.702로 높은 수준임을 확인하였다. 전체적으로 낮은 F_{IS} 값을 나타내었으나, Hardy-Weinberg equilibrium에서 유의미하게 벗어나는 유전자 좌위는 없었으며, 집단의 분화도를 나타내는 F_{ST} 와 R_{ST} 는 모두 “144310” 유전자 좌위에서 가장 낮은 수치 (-0.002 및 -0.073)를 나타내어 집단 간 상당한 분화를 갖는 유전자 좌위를 확인하였다.

-붉은점모시나비 40개체 전체에 대한 유전적 구조 분석 결과, 2개의 유전자 그룹으로 나뉘는 것을 확인하였다. 국내 3개 집단에 대한 집단 간 유전적 다양성을 분석한 결과, 집단별 유전자 좌위별 대립유전자는 강원도 삼척 집단에서 가장 높은 대립유전자를 보유한 집단으로 확인하였으며, 이형접합자 빈도의 경우 충북 영동 집단에서 가장 낮은 수치를 나타냈다. 집단 별 F_{IS} (근친계수)를 비교한 결과, 세 집단 모두 -값으로 전반적으로 낮은 수치를 나타냈으며, 그 중 경북 의성 집단이 -0.155 로 가장 낮은 근친계수를 나타냄을 확인하였다. 각 집단별 유전적 병목현상의 가능성에 대한 측정 결과, 어떠한 유의성도 보이지 않았으며, 모두 정상적인 L 형태의 대립유전자 분포를 보이는 것으로 나타내어 현 세 집단은 유전적 병목현상에 대한 가능성은 나타나지 않음을 확인하였다.

-세 집단에 대한 유전적 분화에 대해 분석한 결과, F_{ST} 의 경우 세 집단 간 통계적으로 유의한 유전적 분화를 나타냈으며, R_{ST} 의 경우 강원도 삼척 집단이 다른 두 집단(경북 의성과 충북 영동)과 통계적으로 유의한 분화를 나타내었다. 이러한 결과는 앞서 언급한 대로 집단 간 형태형질(앞날개 길이) 측정결과와 유사하며, 결과적으로 최소 강원도 삼척 집단은 형태형질적 및 집단유전학적 분화를 나타냈다. 결과적으로 붉은점모시나비는 전반적으로 집단 간 유전적 교류가 비교적 활발했던 것으로 유추할 수 있다. 그러므로 특정 지역에 대한 보전과 함께 발생 지역 전체에 대한 종합적 보전이 중요할 것으로 보여진다.

■ 해외 표본 확보 계획

국제적으로 붉은점모시나비는 중국 및 러시아에 발생한다고 알려져 있다 (Zakharov, 2001). 중국에서는 북동부의 산둥반도(Shandong), 헤이룽장(Heilongjiang) 근접 지역에서 발생하며, 러시아에서는 시베리아 남부의 자바이칼(Transbaikalia), 아무르주(Amur), 연해주(Primorye) 및 사할린 쿠릴섬(Kunashir Island)에 걸쳐 발생한다. 그러나 중국은 Parnassius에 속한 종들에 대한 국외반출금지 규정이 있어 표본 확보가 어려운 상황이며, 러시아의 경우 붉은점모시나비(*P. bremeri*)와 왕붉은점모시나비(*P. nomion*)종의 잡종(Hybridization)이 보고된 바 있어(Zakharov, 2001) 향후 국내 집단과 비교를 위해서는 확보한 표본에 대해 면밀한 종 동정이 필수적이다. 따라서 붉은점모시나비의 국외 표본 확보는 러시아에서 직접 채집하거나 국외 기관과 공식적 협력관계를 구축해야만 표본 확보가 가능할 것이다.

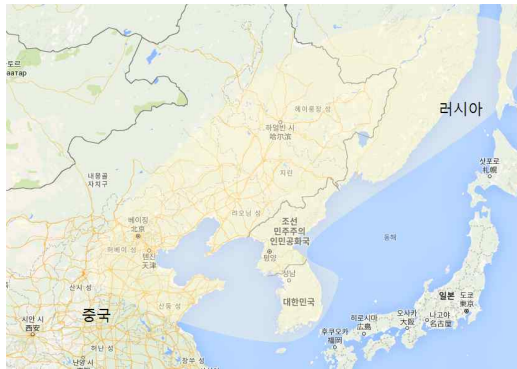


그림 II-2-16. 붉은점모시나비 국외 분포도

라. 흰발농게 *Uca lactea* (De Haan, 1835)



- 국명: 흰발농게
- 영명: Milky fiddler crab
- 학명: *Uca lactea*
- 멸종위기II급
- 계통: 절지동물문 갑각아문 연갑강

그림 II-2-17. 흰발농게

■ 생김새: 갑각의 윤곽은 앞이 넓고 뒤가 좁은 사다리꼴이다. 이마는 비교적 넓어서 갑각 나비의 1/8~1/6 정도이며, 차츰 좁아지면서 어느 정도 앞 아래쪽으로 돌출하였다. 갑각의 등면은 앞뒤로 많이 기울어져서 원기둥의 곡면 같다. 양 옆면은 눈뿔니 바로 뒤에서부터 비스듬히 잘린 것 같으며 그 윤곽은 붓끝 모양이다. 등면의 양 눈구역 및 이마구역에는 홈이 있으며, H자 모양의 홈은 뚜렷하지 않다. 암컷의 집게다리는 매우 작고 대칭인데, 수컷에 있어서는 어느 한 쪽이 다른 쪽에 비해 매우 커서 앞마디의 길이는 갑각 나비의 2배 이상 되는 것도 있으며 그 크기는 크게 변이하므로 1.5배가 안 되는 것도 있다. 큰 집게다리의 손은 희다. 수컷의 큰 집게다리의 생김새는 다음과 같다. 긴마디는 그 기부가 가늘지만 끝으로 갈수록 매우 굵어지며, 아랫모서리에 뾰족뾰족한 과립들이 있고 윗모서리 및 그 근처에도 뾰족한 과립들이 있다.

■ 서식지: 조간대의 상조선 근처의 모래가 섞인 진흙질 바닥에 수직으로 구멍을 파고 산다.

■ 먹이: 작은 집게를 이용하여 토양 표층의 퇴적물을 집어 섭취한다. 퇴적물 속 유기물이 일차적인 먹이원이며, 이것이 부족하다면 해조류, 미생물, 균류, 썩어가는 파편들을 섭취하기도 한다.

■ 번식: 수컷은 큰 집게다리를 흔들어 암컷에게 구애한다. 교미 후 암컷은 자신이 선택한 수컷이 파놓은 굴에 들어가 산란한다.

■ 분포: 중국, 대만, 남한, 일본을 포함하는 서태평양 일부 지역

[출처: 한국동식물도감]

1) 연구의 필요성

집단의 크기가 크게 감소한 멸종위기종의 상태와 유전적 구조를 파악하는 것은 매우 중요 하다. 흰발농게는 최근 들어 집단이 크게 감소하면서 2012년 5월에 멸종위기 2급으로 분류되어 보호되고 있다. 흰발농게의 현재 상태와 보존 전략을 세우기 위해 필요한 집단유전학적 연구가 수행되지 않았다. microsatellite는 멸종위기종의 평가와 보존 전략 수립에 중요한 정보를 제공할 수 있다. 흰발농게의 현재 상태의 평가와 보존전략 수립에 필요한 microsatellite 마커를 개발하고 그 특성을 규명하고자 한다.

2) 재료 및 방법

가) 표본 확보 전략

서해안과 남해를 중심으로 흰발농게의 서식이 알려진 3개 지역(강화, 서천, 순천. 그림 X)을 대상으로 표본을 확보하고자 하였으며, 멸종위기 보호종이기 때문에 각 지방환경유역청에 허가를 받아 채집을 하였다. 강화지역은 한강유역환경청, 서천지역은 금강유역환경청, 순천지역은 영산강유역환경청에 허가를 받았으며 채집허가조건은 각 지역 당 20개체까지의 흰발농게를 채집하고 개체의 개별 사진 촬영 후 부속지 1개 또는 한 쌍을 얻은 후 재 방사하는 것이었다. 그리고 채집 5일 이내에 포획신고서를 작성하여 각 지방환경유역청에 제출하였다.



그림 II-2-18. 흰발농게 채집 지역

나) 유전자 분석 범위

흰발농게의 국내 집단 내 유전적 다양성 분석을 위하여 NGS 분석을 통하여 10개 이상의 유효한 microsatellite 유전자좌위를 개발하고, 이를 이용하여 흰발농게 집단의 유전적 특성을 규명하였다.

3) 실험 방법

- DNA 추출은 비침습적 방법에 의해 수집된 발가락 시료에서 DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, USA)을 사용한다.
- DNA 추출은 수집된 흰발농게의 부속지에서 DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, USA)을 사용하여 추출한다.
- 기존 연구 사업으로 얻어진 유전체 서열로부터 적절한 부위의 microsatellite 유전부위들을 탐색하고 이를 증폭하는 프라이머를 개발하여 10개 이상의 유효한 다양성이 높은 마커를 확인한다.
- 지앤시 바이오 회사를 통해 얻어진 전체 서열로부터 반복 염기서열이 포함된 프라이머를 디자인 후 PCR증폭 및 염기서열 확인을 통해 다양성이 높은 10개 이상의 microsatellite 유전부위를 탐색한다.
- 성공적으로 증폭되는 프라이머 세트를 10개 이상 선별한 후, 한 쪽 프라이머에 형광염료(FAM, HEX, TET 등)를 표지하여 PCR을 수행하고 ABI3130으로 genotyping을 실시한다.
- Genotype 데이터는 STRUCTURE (Pritchard et al., 2000)를 통해 집단의 유전적 집단구조를 살펴보고, GENEALEX, ARLEQUIN 등의 컴퓨터 프로그램을 통해 흰발농게 집단 사이의 유전적 분화도와 패턴, 다양성 등을 분석한다.

4) 결과 및 고찰

가) 시료 확보

- 강화 초지리에서 흰발농게의 근연종인 농게 7개체, 흰발농게 5개체의 표본을 확보하였다.
- 순천시 해룡면 와온해변에서 흰발농게 20개체의 표본을 확보하였다.
- 서천군 마서면에서 흰발농게 20개체의 표본을 확보하였다.
- 포획된 흰발농게는 각각의 개체번호를 부여하고 개체별 사진기록을 남긴 뒤 5번째 다리쌍을 채취·방사하였다.

표 II-2-30. 흰발농게의 채집 정보

	종명	채집 지역	집단 ID	채집 개체수	채집날짜
1	농게	인천광역시 강화군	GH-UA	7개체	2015. 06. 17
2	흰발농게	전라남도 순천시	SuCH	20개체	2015. 06. 20
3	흰발농게	인천광역시 강화군	GH-UL	5개체	2015. 09. 04
4	흰발농게	충청남도 서천군	SeoCH	20개체	2015. 10. 23



그림 II-2-19. 채집 지역



그림 II-2-20. 서식처 및 포획된 흰발농게

<Microsatellite 개발>

■ 유전체 서열 확보

지앤시바이오 회사를 통해 NGS기법 중 Hiseq4000 방법을 이용하여 microsatellite 유전좌위가 포함된 염기서열을 확보하였다. 얻어진 DNA조각(contig) 중 500bp 이상의 염기서열은 223,779개이며, 이중 microsatellite 유전좌위가 존재하는 contig는 95,925개였다. 그리고 이 contig내에 존재하는 microsatellite 부위에 해당하는 repeat(di- ~ hexa- repeat)부위는 158,996개가 존재하고 있음을 확인 할 수 있었다(표 II-2-31).

표 II-2-31. 반복염기서열 개수

Motif	frequency
Di-repeat	43,515
Tri-repeat	86,213
Tetra-repeat	26,617
Penta-repeat	2,208
Hexa-repeat	807
total	158,996

■ 프라이머 개발

microsatellite 유전좌위가 존재하는 contig의 염기서열에서 repeat부위가 포함된 염기서열 일부를 잘라내어 Primer3(v.0.4.0) 소프트웨어를 이용하여 프라이머 서열을 제작했다(표 II-2-32). 50개의 Microsatellite 유전좌위 후보군을 탐색하고, PCR증폭이 잘 되는 클론을 선별하였다.

· PCR은 Takara r taq(Takara, Otsu, Shiga, Japan)을 이용하였고, 이때 혼합물의 조성과 온도설정은 아래와 같다.

DNA Template	1.0 μ l
10X buffer	2.5 μ l
dNTP	0.7 μ l
MgCl ₂	1.5 μ l
Each primer	each 0.5 μ l
Taq polymerase	0.3 μ l
DW	18.0 μ l
Total	25.0 μ l

	X35				
95°C	94°C	AT	72°C	72°C	4°C
5:00	1:00	1:00	1:30	7:00	∞

· Annealing 온도(AT)를 45°C, 50°C, 55°C, 60°C로 설정한 상태에서 테스트 PCR을 각각 수행하였으며, PCR 증폭 결과를 확인한 후 세밀하게 조정하였다.

· Band가 확실하게 확인된 PCR 산물은 염기서열 분석 업체를 통해 염기서열을 얻는다. 얻어진 염기서열에서 Microsatellite 유전좌위의 유무 및 다형성(polymorphic)의 반복수를 갖는지 확인하였다.

· 50개의 Microsatellite 프라이머 후보군 중에서 반복서열이 존재하는 프라이머쌍은 38개였으며, 이 중 다형성을 갖고 있는 프라이머쌍은 12개임을 확인하였다.

· 다형성이 확인된 12개의 Microsatellite 유전좌위로 multiplex PCR 증폭을 위해 각각의 염기서열의 길이를 고려하여 각각의 형광프라이머와 결합 할 수 있는 M13-tailed primer가 부착된 프라이머를 제작 주문한다.

이용된 M13-tailed primer는 다음과 같다.

FAM	TTT CCC AGT CAC GAC GTT G
VIC	GGA AAC AGC TAT GAC CA
PET	GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G
Tail	GTT TCT T

· 여기서 tail은 각 프라이머의 reverse방향의 5' end에 부착하는 염기서열로, 이는 genotyping 분석할 때 taq polymerase에 의한 stutter를 방지하기 위함이다.

· M13-tailed primer를 부착 후 PCR증폭이 되는지 확인하기 위한 테스트 PCR 증폭실험을 수행한다. 실험방법은 위의 테스트 PCR 증폭실험과 동일하다.

표 II-2-32. 탐색된 microsatellite 유전좌위 후보군

Clone	Forward Reverse	5' - 3' 5' - 3'	Size range(bp)	microsatellite 정보
UL01	Forward Reverse	GCA GTG GC ATA CCA TAA TTC G AGC CGC CTT AAC AAC AAG TC	255-257	(TG) ⁸
UL09	Forward Reverse	TAC GTG CTT TCA CAC GCA AT TGT AGC CCC TCC AGT TGT TC	239-241	(GT) ⁸
UL11	Forward Reverse	ATG TGC ATG TAT TGG CAA GC AGC CAA GAC ACA ACC AGG AG	199-203	(TG) ⁶
UL12	Forward Reverse	CAC GCT GTA GGT CTT GTC CA AGC CAA AGT GTT GCT CGT TC	233-255	(GT) ¹⁴
UL14	Forward Reverse	CTG ACT GGC AAC AAC AGG TG CAT GCG AAA TGA GAC AAA GC	199-207	(GT) ¹¹ , (TA) ⁵ CA(TA) ⁵
UL17	Forward Reverse	GAG ATC ATA CCA GAA CTT TC TCG TAG CAG TGT AGT TTA AC	219-233	(GT) ¹³
UL18	Forward Reverse	TAT TAC TGA TCG TTG GGT A TTT TCT CTC ACA CTG TAC TC	313-333	(GT) ⁸
UL21	Forward Reverse	CAA GAG GTG TGC ATA GAG TAG ACT GTG GAT AAG AAA GG	269-297	(GA) ⁸
UL25	Forward Reverse	AGT GTG AGG GAA GTA GTA GT GCT CTA CGA AAA CTT ACT TA	265-291	(CA) ²⁰
UL27	Forward Reverse	TCT CAA ACA TGG CAA GCA CT GCG CGC CGT ACT AAT AAA CA	235-257	(TC) ¹³
UL29	Forward Reverse	CCT TCT GGC TTC TGG TAT TCT GCC CAT TTT CTC CAC TCC AC	195-181	(CA) ¹² , (TC) ⁶
UL32	Forward Reverse	TTG TTT TCT GAA GCC ACC GG AGA AAG CAC AGA CAA TCT CAT CA	233-251	(TTG) ⁴ , (TAT) ¹⁴

■ 유전자형 분석

· 개발된 12개의 Microsatellite 유전좌위를 이용하여 흰발농게 45개체에 대한 유전자형 분석을 실시하였다.

· 위의 PCR증폭으로 얻어진 PCR산물을 DNA 분석기에 넣어 을 실시하였고, 이때 size마커는 HEX500을 이용하였다. 밴드의 크기와 유전자형은 GeneMapper software 5 (ABI)를 이용하여 결정하였다.

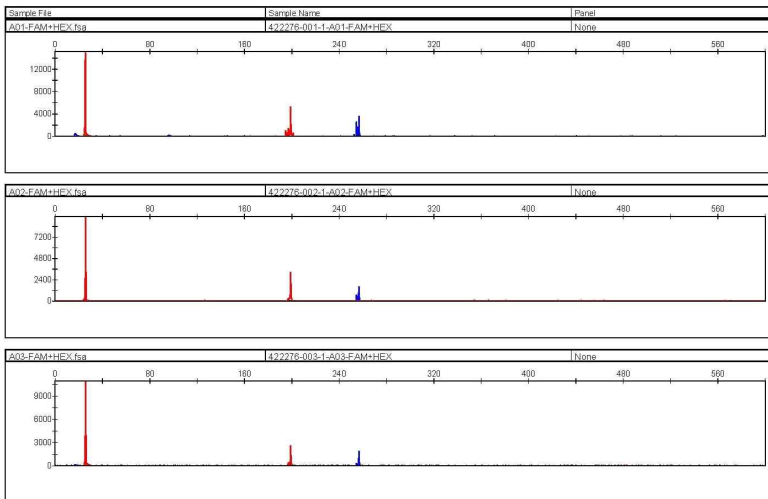


그림 II-2-21. GENEMAPPER를 이용한 유전자형 분석 결과

· 유전자형 분석 결과를 ARLEQUIN 이나 STRUCTURE와 같은 범용프로그램에 이용될 수 있도록 raw data를 입력하여 정리하였다.

· ARLEQUIN 3.5(Excoffier and Lischer, 2010)을 이용하여 number of allele (N_A), 유전좌위별 이형접합도(heterozygosity)의 관찰값(H_0)과 하디-바인베르크 평형(HWE)상태에서의 예측값(H_E)을 계산하였다. 그리고 유전좌위 사이의 독립 여부를 판단하기 위해 GENEPOP 4.2.1 (Raymond and Rousset, 1995; Rousset, 2008)을 이용하여 연관비평형(LD) 검사를 실시하였다.

· Inbreeding coefficient(F_{IS})는 FASTAT2.9.3.2(Goudet, 1995)를 이용하여 계산하였다.

· 집단 내 개체사이(F_{IS}), 그룹 내 집단사이(F_{SC})와 그룹 사이(F_{ST})에 분포하

는 유전적 변이의 상대적인 양은 AMOVA(analysis of molecular variation)를 이용하여 분석하였다. 이때 AMOVA분석은 microsatellite의 돌연변이 모형인 infinite allele model (F_{ST})과 stepwise mutation model (R_{ST}) 각각에 기초하였다. 집단과 집단 사이의 상호(pairwise) F_{ST} , 또는 상호(pairwise) R_{ST} 의 계산과 유의성 분석은 ARLEQUIN 3.5 프로그램을 이용하여 실시하였다.

· STRUCTURE2.3.4(Pritchard et al., 2000)를 이용하여 유전자형을 가지고 집단의 유전적 구조를 분석하였다. Ancestry model로 admixture model을 선택하였으며, 샘플링 지역에 대한 정보(LOCPRIOR)에 대한 옵션을 설정하였다. K를 1부터 5까지 변화시키면서 clustering analysis를 실시하였고, 각 K에 대해 25회씩 반복 수행하였다. 각각의 run은 Markov Chain Monte Carlo(MCMC)기법을 이용하여 1,000,000 cycle을 수행하였고, burnin period로 50,000을 설정하였다. 얻어진 결과는 STRUCTURE HARVESTER(Earl & vonHoldt 2012)를 이용하여 가장 적절한 K값을 선택하였다.

<Microsatellite 유전자형 분석>

■ 유전적 다양도

· 유전적 다양도를 분석한 결과 전체 loci에서 각 집단의 평균 number of allele per locus(A)는 3.08-6.75였으며, 각 집단이 나타내는 전체 loci에서 H_o 와 H_E 의 평균값은 0.451-0.556과 0.558-0.63이었다(표 II-2-33).

· 강화(GH)집단은 다른 두 집단과 비교하여 가장 높은 값의 H_o 와 H_E 를 나타냈다(표 X).

· UL21, UL25, UL27은 서천(SeoCH)과 순천(SuCH)집단에서, UL11은 순천집단에서만 non-random deviation from HWE를 나타냈다(표 II-2-33).

· 12개의 loci는 서로 독립이다.

표 II-2-33. 12개 Microsatellite 프라이머에 대한 유전적 다형성

Locus	서천(SeoCH)						강화(GH)						순천(SuCH)					
	N_A	A_R	H_O	H_E	HWE	F_{IS}	N_A	A_R	H_O	H_E	HWE	F_{IS}	N_A	A_R	H_O	H_E	HWE	F_{IS}
UL01	2	1	0.100	0.097		-0.027	1	0		no test done			2	1	0.550	0.409		-0.357
UL09	2	1	0.150	0.224		0.337	1	0		no test done			2	1	0.100	0.185		0.465
UL11	2	1	0.250	0.296		0.159	2	1	0.400	0.356		-0.143	4	4	0.200	0.383	**	0.485
UL12	9	11	0.800	0.813		0.016	4	8	0.400	0.711		0.467	8	12	0.600	0.818		0.272
UL14	4	4	0.500	0.506		0.013	3	2	0.400	0.378		-0.067	4	3	0.550	0.613		0.105
UL17	8	8	0.950	0.804		-0.188	6	8	1.000	0.889		-0.143	5	10	0.300	0.278		-0.081
UL18	11	11	0.750	0.836		0.105	4	8	0.400	0.822		0.543	7	8	0.700	0.803		0.131
UL21	10	13	0.235	0.870	**	0.736	1	0		no test done			8	12	0.333	0.743	**	0.558
UL25	15	25	0.684	0.930	**	0.270	6	13	0.800	0.844		0.059	12	17	0.650	0.890	**	0.275
UL27	11	11	0.600	0.873	**	0.318	4	4	0.600	0.778		0.250	8	9	0.579	0.852	**	0.327
UL29	2	1	0.050	0.050		0.000	2	1	0.200	0.200		0.000	4	9	0.200	0.191		-0.048
UL32	5	0	0.850	0.691		-0.238	3	2	0.800	0.689		-0.185	5	6	0.650	0.533		-0.226
	6.75	7.75	0.493	0.583		0.157	3.08	5.22	0.556	0.630		0.130	5.19	7.66	0.451	0.558		0.196

N_A , number of alleles; H_O , observed heterozygosity; H_E , expected heterozygosity; F_{IS} , inbreeding coefficient; HWE, result of exact test to deviation from Hardy-Weinberg Equilibrium
**, $p < 0.05$

■ 집단의 유전적 구조

· 세 개의 집단 사이의 pairwise F_{ST} 와 pairwise R_{ST} 는 각각 -0.004-0.093와 0.044-0.25를 나타냈다. Pairwise F_{ST} 와 pairwise R_{ST} 의 값은 약간의 차이를 보였으나 강화와 순천사이의 유전적 거리가 가장 큰 것은 동일하였다(표 II-2-34).

표 II-2-34. 집단과 집단사이의 pairwise R_{ST} (위)와 pairwise F_{ST} (아래)

	서천(SeoCH)	강화(GH)	순천(SuCH)
서천(SeoCH)		0.169	0.044
강화(GH)	-0.004		0.250
순천(SuCH)	0.057	0.093	

통계적으로 유의한 값은 굵은 글씨로 표시함

· 앞서 계산된 pairwise F_{ST} 와 pairwise R_{ST} 에서 나온 결과를 토대로 집단들을 그룹으로 나누어 AMOVA test를 수행하였으나, 어떠한 그룹도 통계적으로 유의하지 못하였다(표 II-2-35).

표 II-2-35. 세 집단의 AMOVA 결과

Group	Source of variation	Pairwise R_{ST}			Pairwise F_{ST}		
		Percentage of variance	p-value	fixation indexes	Percentage of variance	p-value	fixation indexes
(SeoCH+GH)(SuCH)	Among groups	-11.05	0.671	-0.111	6.77	0.326	0.068
	Among population within groups	20.04	0.0361	0.180	-0.35	0.723	-0.004
	Within populations	91.02	0.006	0.006	93.58	0.000	0.064
(SuCH+GH)(SeoCH)	Among groups	-21.1	1.000	-0.2110	-4.99	1.000	0.091
	Among population within groups	28.59	0.001	0.2360	9.56	0.000	0.091
	Within populations	92.51	0.006	0.075	95.44	0.000	0.046
(SuCH+SeoCH)(GH)	Among groups	17.28	0.326	0.173	-1.19	0.665	-0.012
	Among population within groups	3.65	0.069	0.044	5.79	0.000	0.057
	Within populations	79.08	0.008	0.209	95.4	0.000	0.046

· Bayesian clustering analysis 결과를 STRUCTURE HARVESTER로 분석한 결과 $K = 2$ 일 때 가장 높은 ΔK 값이 관찰되었고, STRUCTURE analysis에서 추정된 barplot에서 서천과 강화집단이 순천집단과 뚜렷하게 구분되는 것을 볼 수 있었다(표 II-2-36, 그림 II-2-22).

표 II-2-36. Structure Harvester를 통해 선별된 K 값

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	25	-1445.58	0.479	—	—	—
2	25	-1435.13	9.356	10.444	77.764	8.311
3	25	-1502.45	35.097	-67.32	17.648	0.503
4	25	-1587.42	63.311	-84.968	111.844	1.767
5	25	-1560.54	70.411	26.876	—	—

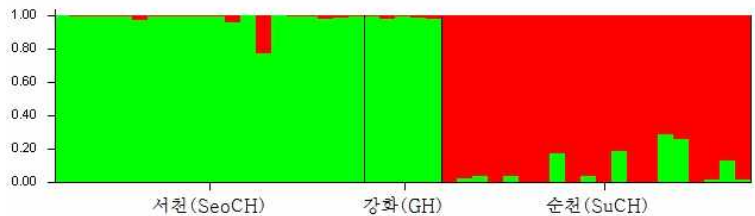


그림 II-2-22. STRUCTURE analysis, $K=2$

5) 결론

표 II-2-34. 흰발농게의 유전다양성 분석 결과

종 명		원료 여부	유전자 마커	확보 집단/ 개체수	세부 책임자
학 명	한국명				
<i>Uca lactea</i>	흰발농게	원료	microsatellite 12개	국내 3개 집단/ 45개체	정종우

최근 들어 집단이 크게 감소하고 흰발농게는 2012년 멸종위기종 2급으로 분류되어 보호되고 있지만, 현재 서식상태와 보존 전략을 세우기 위해 필요한 집단유전학적 연구는 수행되어있지 않았다. Microsatellite는 멸종위기종의 평가와 보존 전략 수립에 중요한 정보를 제공할 수 있기 때문에 우리는 흰발농게에 적합한

Microsatellite 마커를 개발하고 집단유전학적 분석을 하고자 하였다.

마커를 개발하기 앞 서 흰발농게의 서식처 확인 및 표본 확보를 수행하였다. 국내 3지역(강화, 서천, 순천)에서 흰발농게 서식지를 확인하였으며, 멸종위기종임을 감안하여 45개체의 부족지 일부를 확보 후 방사 하였다.

확보된 표본 중 일부를 이용하여 지앤시바이오 회사를 통해 NGS기법 중 Hiseq4000방법으로 흰발농게 유전체 서열 일부를 확보하였고, 그 중에서 Microsatellite 부위가 확인된 염기서열 92,925개를 얻을 수 있었다.

프라이머3 프로그램을 이용하여 50개의 Microsatellite 유전좌위를 증폭할 수 있는 후보군 프라이머를 선별하였으며, PCR증폭 실험 및 염기서열 확인을 통해 다형성의 반복수를 보이는 프라이머쌍 12개를 선별하였다. 각각의 프라이머에는 형광 프라이머와 결합할 수 있는 M13-tailed primer를 부착하여 multiplex PCR증폭을 통해 유전자형 분석을 수행하였다.

유전적 다양도를 분석한 결과 강화집단이 다른 두 집단에 비해 가장 높은 H_O 와 H_E 값을 보였다. Pairwise F_{ST} 와 pairwise R_{ST} 의 값을 통해 강화와 순천사이의 유전적 거리가 가장 큰 것을 확인 할 수 있었으나, 얻어진 값을 이용한 AMOVA test에서는 어떤 그룹으로 나누어도 통계적으로 유의하지 않았다. 그러나 Bayesian clustering analysis 결과 서해안집단(강화와 서천)과 남해안집단(순천)으로 2개의 유전자 그룹이 관찰되었다.

■ 해외 표본 확보 계획

－ 일본

문헌[Sakagami, Maki, et al. "Claw-waving behavior by male *Uca lactea* (Brachyura, Ocypodidae) in vegetated and un-vegetated habitats." *Journal of Crustacean Biology* 35.2 (2015): 155-158.]을 통해 분포가 확인된 일본 도쿠시마현의 Nagaura Island(永浦島)의 조간대에서 표본을 확보 할 예정이다. 또는 2009년 흰발농게가 집단으로 서식하고 있다고 알려진 일본의 구마모토현 가미야마쿠사시 마쓰시마지역에서 채집하고자 한다(그림 II-2-23).

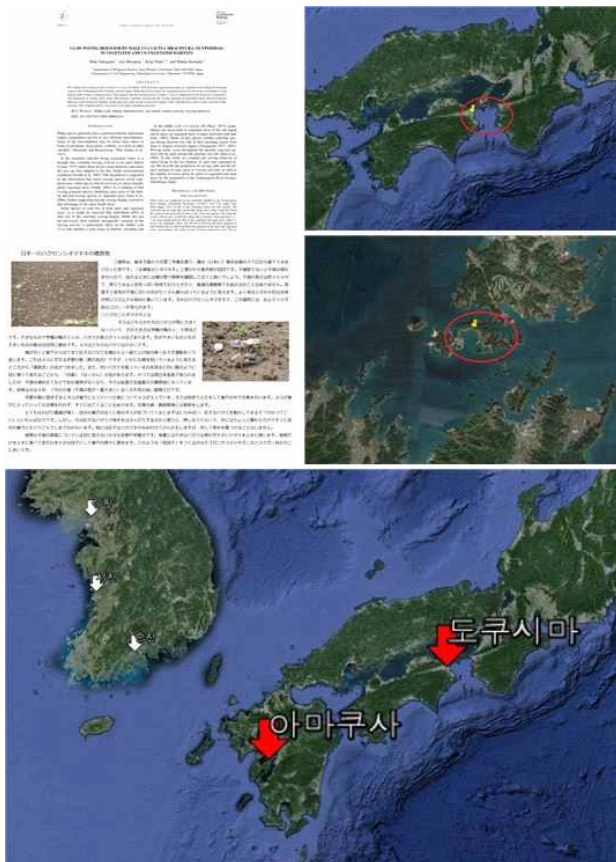


그림 II-2-23. 일본 흰발농게 채집계획 지역

- 중국

문헌[Shin et al., 2004. Behavioral adaptations of the fiddler crabs *Uca vocans borealis* (Crane) and *Uca lactea lactea* (De Haan) for coexistence on an intertidal shore. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology 37: 147-160.)을 통해 분포가 확인된 홍콩의 Ting Kok 해변에서 표본을 확보한다(그림 II-2-24).

마. 기수갈고둥 *Clithon retropictus*



- 국명: 기수갈고둥
- 학명: *Clithon retropictus*
- 지정번호: 멸종위기II급
- 계통: 원시복족목, 갈고둥과

그림 II-2-25. 기수갈고둥

[출처: 네이버 지식백과]

■ 생김새: 껍각 형태는 둥근 난형이다. 나중은 4층이지만 성패 대부분의 각정은 침식되어 주로 체층만 남아 있다. 채색은 녹색색 바탕에 삼각형의 노란색과 검은색 반점이 있고, 체층에는 황갈색 띠가 2~3열 나타나며 약한 성장맥이 있다. 체층이 커서 거의 전부를 차지하기 때문에 상대적으로 나뭇은 낮고 작다. 각구는 반원형이고 가장자리는 약간 두껍고, 비스듬한 내순 중앙에 작은 치상돌기가 여러 개 혼적으로 나타난다. 내순과 축순은 발달된 백색 활층으로 덮여 있고, 활층은 넓고 편평하다. 뚜껑은 반원 모양이고 석회질로 이루어져 있으며 주둥이를 덮어 막을 수 있다. 뚜껑의 표면은 매끌매끌하지만 안쪽 가장자리는 얇게 패어 있고, 내면에는 석회질의 돌기가 길게 나 있다. 뚜껑의 외순 가장자리를 따라 황색 선이 나타난다. 성체의 크기는 각고 14mm, 각경 14mm정도이며 전체적으로 작고 겉보기에 공처럼 생겼으며, 염주알다슬기와 비슷하다. 보통 여름에 백색 난괴를 둘에 산란하는 난생종이며 수명은 10년 이상으로 장수종에 해당한다.

■ 서식지: 유속이 빠르고 잔자갈이 깔려 있는 하천의 기수지역

■ 먹이: 부착조류

■ 생활양식: 7~8월 무렵 타원형의 알주머니를 바위나 조개껍데기 위에 붙인다.

■ 분포: 한국(제주도, 남해, 경북 울진, 전남 장흥·보성), 일본

[출처: 국립생물자원관 한국의 멸종위기종]

1) 연구의 필요성

기수갈고둥(*Clithon retropictus*)는 연체동물문 갈고둥과에 속하며 국내에서는 제주도와 남해의 일부 기수역에 국지적으로 분포하는 것으로 알려져 있다. 국외에는 일본에 분포하는 것으로 알려져 있다. 유속이 완만하며 자갈 또는 호박돌로 구성된 하천형 기수역에 제한적으로 서식하나, 수질오염과 하구의 개발로 인해 개체수가 줄어들어 멸종위기II급으로 지정되어 있다. 현재까지 기수갈고둥에 관한 연구는 국내외 거의 이루어지지 않았다. 최근 제주도의 제주시 인근에서 새로운 서식지가 확인되었으며(Noseworthy, et al., 2013), 2014년에는 기존의 서식지로 알려진 제주도, 남해를 제외한 동해안의 울진에서 서식이 언론에 보도가 되었다. 멸종위기종으로 지정되어 있으며, 개체수가 줄어들고 있는 기수갈고둥의 개체군 복원이나 보전을 위해서는 자세한 유전적 구조 파악이 시급한 실정이다.

2) 표본 확보 전략

기수갈고둥은 한국에서는 남해안과 제주도, 국외에는 일본에 서식하는 것으로 알려져 있다. 이 중 본 연구진은 현재 까지 국내에 밝혀진 서식지점 중 최소 4개 지점 이상에서 집단 별 10개체 이상, 총 40개체 이상을 확보하여 국내 개체군 간의 유전적 구조 및 특이성을 확인하고자 한다(그림 II-2-22). 1차년도에는 국내의 표본 확보 및 분석을 수행하였으며, 2차년도에는 서식이 알려진 일본의 개체를 확보하여 국내 및 국외 개체군간의 유전다양성 비교를 수행하고자 한다. 이를 통해 분류학적, 계통지리학적 정보를 축적하고, 이를 통해 멸종위기종인 기수갈고둥의 복원을 위한 유전정보를 축적할 것이다.



그림 II-2-26. 기수갈고둥 채집 지역

3) 유전자 분석 범위

기수갈고등의 유전다양성 분석을 위하여 기존에 국립생물자원관 연구사업을 통해 획득한 NGS 데이터를 기반으로 새로운 14개의 microsatellite 마커를 개발하였으며, 개발된 14개의 microsatellite 마커를 이용하여 유전 다양성을 분석한다.

4) 실험 방법

■ DNA 추출

실험 대상종의 표본으로부터 DNA를 추출하기 위해 DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN Co., USA)를 이용하였다.

■ PCR primer

기존 연구 사업으로 얻어진 유전체 서열로부터 적절한 부위의 microsatellite 유전부위들을 탐색하고 이를 증폭하는 프라이머를 개발하여 10개 이상의 유효한 다양성이 높은 마커를 확인하였다. 이를 통해 최종 14개의 유효한 마커를 확인하였으며 프라이머 정보는 표 II-2-27와 같다.

■ PCR

PCR 반응 혼합물의 조성과 반응 조건은 실험하고자 하는 유전자마다 다르다. 따라서 예비 실험을 통해 조건을 맞춘 후 실험을 진행한다. PCR 반응 후 얻은 결과물은 전기영동을 통하여 확인하고, ABI 3700 모델을 이용하여 genotyping을 수행한다.

■ 유전적 다양성 분석

Genotype 데이터는 먼저 MicroChecker (Van Oosterhout et al., 2004) 프로그램을 이용하여 scoring 오류, 비대립유전자의 유무, large dropout을 확인하였다. 이후 기본적인 microsatellite 마커의 유전 다양성 지수인 대립인자 수 (A), 대립인자 풍부도 (A_R), 이형접합자 빈도 예측치 (H_e), 관측치 (H_o), 근친계수 (F_{IS}), Gene diversity, 집단간 유전적 차이를 나타내는 F_{ST} , R_{ST} 는 FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001), ARLEQUIN 3.1 (Excoffier et al., 2005), GENEPOP 3.4 (Raymond and Rousset, 2004)을 이용하여 수치를 구하였다. PIC (polymorphic information content)는 PICcalc 온라인 프로그램을 이용하여 측정하였다. 각 집단의 유효개체군 크기는 NeEstimator 2.01 (Do et al., 2014)를 이용하여 측정하였다. 집단의 유전적 집단구조를 Bayesian 방법을 통해 clustering 해주는 STRUCTURE (Pritchard et al., 2000)를 이용하였으며, K 값은 1~5, burn-in은 100,000step,

MCMC는 5,000,000을 반복하였다. 모두 10번을 반복 수행하였으며, 산출된 값은 Structure Harvester에서 가장 적절한 cluster의 수를 산출하였다.

5) 결과 및 고찰

가) 시료 확보

기수갈고둥 표본 확보를 위하여 전국 5개 지점(경남 마산, 창원, 거제, 전남 장흥, 제주도 서귀포시)을 선정 하였으며, 각 지역의 환경청의 포획 허가를 득한 후 현재 포획을 모두 완료하였다. 총 66개체를 확보하였으며, 제주특별자치도 서귀포시를 제외한 모든 지점에서 15개체를 확보하였다(표 II-2-38). 포획지점의 사진과 포획 당시의 개체 사진은 그림 II-2-27과 같다.

표 II-2-38. 기수갈고둥의 채집 정보

	채집 지역	집단 ID	채집 개체수	채집 날짜
1	전라남도 장흥군	AY	15개체	2015. 06. 16
2	경상남도 창원시	GS	15개체	2015. 06. 12
3	경상남도 마산시	JD	15개체	2015. 06. 12
4	경상남도 거제시	YC	15개체	2015. 06. 12
5	제주특별자치도 서귀포시	TR	6개체	2015. 06. 16



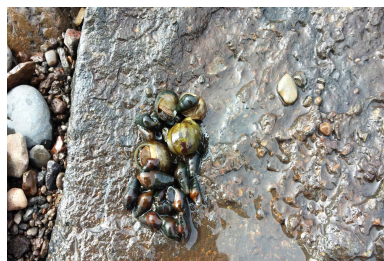
<거제시 서식지와 확인된 기수갈고둥>



<창원시 서식지와 확인된 기수갈고둥>



<장흥군 서식지와 확인된 기수갈고둥>



<제주특별자치도 서귀포시 서식지와 확인된 기수갈고둥>

그림 II-2-27. 기수갈고둥 채집지와 서식 사진

나) Microsatellite 마커 개발

기수갈고둥의 microsaetllite 마커 개발을 위하여 NGS 데이터에서 반복서열을 가지고 있는 염기서열을 추출하였으며 이 중 Di, Tri, Tetra microsatellite 반복 모티프를 추출하였다. Microsatellite 모티프는 최소 5번 이상 반복하는 것을 추출하였다. 총 Di-repeat은 전체 contig 중 374,181개, Tri는 53,952개, Tetra는 31,332개가 확인되었다. 이 중 가장 많은 빈도를 나타낸 것은 [AC]_n(45.9%), 그 다음으로는 [AG]_n(31.4%)으로 나타났다. Tri와 Tetra 중 가장 많은 빈도를 나타낸 것은 [ATG]_n(2.7%), [AGAC]_n(0.3%)로 나타났다. 이들 microsatellite 좌위 중 적어도 6번 이상 반복 횟수를 가진 70개의 contig를 무작위로 선정하여 프라이머쌍을 제작하였다. 이 후 제작된 프라이머를 집단 별 2개체씩을 대상으로 PCR성공 여부 및 증폭된 염기서열이 다형성을 가지는지 확인하였다. 그 결과 총 15개의 프라이머 쌍에서 다형성이 확인되어 전체 기수갈고둥 집단의 유전다양성을 확인하기 위한 분석에 사용하였다. 새롭게 개발된 microsatellite 마커의 정보는 아래 표 II-2-39과 같다.

표 II-2-39. 새롭게 개발된 14개 기수갈고둥 microsatellite 마커의 repeat motif, allele 크기, Ta (°C), 프라이머서열 및 분석 시 사용한 형광 라벨 정보

No.	Locus	Repeat motif	Allele size	Ta (°C)	Primer sequence (5'→3')	Fluorescent label
1	CRe09	AC	271-293	55	F: GGAAGCAACTCCTTATTCTGCCG R: TTTGTGCGAGTGTTTGACCCCTTG	PET
2	CRe11	AC	164-172	60	F: ACTTCCCATACCTCAGTCGCCG R: GGCAGGCCGGAATTAATGTATGC	VIC
3	CRe15	ACG	126-165	60	F: CCACAACCACTTCCACCACCAAC R: ACCTTCTCCATCACCGGTGTATGC	FAM
4	CRe22	AGG	155-174	55	F: CCCTTATGCACTATGATTTG R: GTCCTCTTCATTTGAACATG	FAM
5	CRe32	CCTG	252-260	60	F: AGGCTCCTCAAAGGAAGACAGCG R: GCAAAGCAAAGAAGCCAGCTGG	VIC
6	CRe44	AG	122-132	60	F: CTGATGGTTCGATTCTACAGTCCC R: CGATTTCAACAGCGCCGG	FAM
7	CRe45	AG	189-201	60	F: AAGAATGAATTTTGAGCAGCTGC R: AGCATTATCTGCGAGAGGAAGGGC	PET
8	CRe47	CA	218-238	60	F: GATCGTCTGCTGCTGTGTTGAAGAC R: AGAATGCCAGGGACTAGTGAGAAGC	VIC
9	CRe50	CT	272-324	60	F: TTTCCCTGCAAAACAAGACACAAAG R: TGACAACCAAGAACTGCTTCATGTG	PET
10	CRe52	CT	214-262	60	F: TCGACTTGGCTGTCTCTGTTTAC R: TCGAGCCGACAAGGAAATTTGAAC	VIC
11	CRe54	GA	202-216	60	F: AAATGTCGCCGCTACACGCC R: TCTAACCGATCAGAGTTGCCGATG	PET
12	CRe59	ACC	290-332	60	F: TTTAGCGCCGCTACCATCTCTG R: CTGAGGGGAATCCTTGGAGTAGG	PET
13	CRe64	CAA	113-143	60	F: CATGCGACTTAGGGCGAAATTC R: CCAAAGAAATCTCATGTGCCATG	FAM
14	CRe66	CAG	158-173	60	F: CGAAGACAACCTAGTCATCGGCACTG R: GACATGATCTGGAATGGCATCTCC	FAM

다) Microsatellite 유전 다양성

NGS 데이터를 바탕으로 기수갈고둥의 microsatellite 마커 14개가 개발이 되었으며, 이를 이용하여 총 6개 집단 66개체를 대상으로 분석을 수행하였다(표 II-2-39, 40). Microchecker를 이용한 분석에서 각 유전자 좌위는 모두 scoring 오류 및 비대립유전자는 없는 것으로 확인되었다. 총 100개의 대립인자가 66개체에서 확인이 되었고 대립인자의 길이는 113~332bp 범위로 나타났다. 각 좌위별 대립인자는 3~18개, 평균 7.142개로 나타났으며, 가장 많은 18개는 Cre54좌위에서 가장 적은 3개는 Cre11, Cre32이었다. 대립인자 풍부도는 3.000~17.815의 범위로 평균 7.113이었다. 대립인자 풍부도는 Cre52(17.815)에서 가장 높았으며, 가장 낮은 수치는 Cre11, Cre32(3.000)이었다. F_{ST} 와 R_{ST} 수치는 전체적으로 낮게 나타났다.

표 II-2-40. 기수갈고둥 microsatellite 유전자 좌위별 유전 다양성 지수. 대립유전자의 수(A), 대립인자 풍부도(A_R), 이형접합자빈도 예측치(H_E), 관측치(H_O), F_{IS} , F_{ST} , R_{ST}

Locus	A	A_R	H_E	H_O	F_{IS}	F_{ST}	R_{ST}
Cre09	7	6.999	0.379	0.337	-0.133	0.008	0.013
Cre11	3	3.000	0.152	0.157	0.034	0.004	0.015
Cre15	5	4.969	0.348	0.307	-0.122	-0.017	-0.017
Cre22	6	5.939	0.288	0.310	0.081	-0.014	-0.015
Cre32	3	3.000	0.167	0.183	0.096	-0.008	0.020
Cre44	6	6.000	0.578	0.692	0.116	0.070	0.145
Cre45	7	6.999	0.500	0.585	0.142	0.008	0.048
Cre47	9	8.939	0.364	0.505*	0.244	0.060	0.199
Cre50	11	10.969	0.646	0.684	0.041	0.019	0.005
Cre52	18	17.815	0.530	0.569	0.058	0.013	0.012
Cre54	6	5.969	0.636	0.644	0.006	0.008	-0.031
Cre59	5	4.985	0.338	0.445*	0.243	-0.005	-0.025
Cre64	8	7.999	0.652	0.654	-0.006	0.012	-0.011
Cre66	6	5.999	0.697	0.740	0.062	-0.004	0.020
Mean/Total	7.142	7.113	0.448	0.489	0.067	0.015	0.003

*: Significant deviation from HWE after Bonferroni's correction ($P < 0.00357$).

집단 별 좌위별 유전 다양성 지수를 표 II-2-42에 나타내었다. 평균 대립인자의 수는 마산시 진동리 집단이 평균 5.36개로 가장 많았으며, 서귀포 예래동 집단이 3.71개로 가장 낮았다. 전체 대립인자 중 21개가 특정 집단에만 출현하였으며, 장흥군 안양면 집단에서 5개, 창원시 구산면 집단에서 3개, 마산시 진동리 집단에서 6개, 거제시 연초면 집단에서 6개, 서귀포 예래동 집단에서 2개가 출현하였다. 대립인자 예측치와 관찰치는 상대적으로 낮았으며, 서귀포시 예래동 집단이 가장 높았으며($H_e=0.558$, $H_o=0.490$), 장흥군 안양면 집단이 가장 낮았다($H_e=0.451$, $H_o=0.419$). 평균 PIC 지수는 0.404~0.469범위로 나타났는데, 서귀포시 예래동 집단이 0.469로 가장 높았으며, 장흥군 안양면 집단이 가장 낮았다. Gene diversity 지수 역시 서귀포시 예래동 집단(0.566)이 가장 높았으며, 장흥군 안양면 집단(0.452)이 가장 낮았다. 하지만 서귀포시 예래동 집단은 다른 집단에 비해 개체수가 6개체로 적어 나타나는 현상이라 판단된다.

표 II-2-41. 기수갈고등 각 지역별 개체군의 개체 수 (N), 대립유전자의 수 (A), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), polymorphic information content (PIC)

Locus	장흥군 안양면(AY, N=15)					창원시 구산면(GS, N=15)				
	Gene diversity = 0.452 ± 0.232					Gene diversity = 0.471 ± 0.196				
	A(U)	A _R	H _e	H _o	PIC	A(U)	A _R	H _e	H _o	PIC
CRe09	3	1.533	0.131	0.133	0.123	4	2.623	0.409	0.467	0.376
CRe11	3	2.090	0.301	0.267	0.271	2	1.267	0.067	0.067	0.062
CRe15	4(1)	2.154	0.303	0.333	0.276	4	2.205	0.306	0.333	0.282
CRe22	4	1.800	0.193	0.200	0.181	3	2.354	0.398	0.333	0.351
CRe32	2	1.267	0.067	0.067	0.062	2	1.621	0.186	0.200	0.164
CRe44	5	3.590	0.733	0.667	0.658	5(1)	2.938	0.499	0.400	0.455
CRe45	3	2.436	0.439	0.533	0.383	5	3.172	0.575	0.533	0.520
CRe47	4	3.006	0.591	0.467	0.520	4	2.964	0.563	0.400	0.500
CRe50	7(1)	3.907	0.690	0.533	0.637	8(1)	4.152	0.724	0.733	0.673
CRe52	10(2)	4.007	0.641	0.533	0.605	5(1)	2.775	0.455	0.533	0.416
CRe54	3	2.916	0.680	0.800	0.584	4	2.681	0.540	0.467	0.460
CRe59	3(1)	2.000	0.297	0.333	0.260	4	2.671	0.451	0.267	0.407
CRe64	4	2.916	0.586	0.467	0.512	6	3.185	0.598	0.667	0.532
CRe66	4	3.098	0.662	0.533	0.579	5	4.222	0.807	0.800	0.745
Mean	4.21	2.623	0.451	0.419	0.404	4.32	2.774	0.470	0.443	0.424

A(U), number of alleles (unique alleles); A_R, allele richness; H_o, observed heterozygosity; H_e, expected heterozygosity; PIC, polymorphic information content; *: Significant deviation from HWE after Bonferroni's correction (P<0.00357).

표 II-2-41. 계속

Locus	마산시 진동리(JD, N=15)					거제시 연초면(YC, N=15)				
	Gene diversity = 0.491 ± 0.209					Gene diversity = 0.480 ± 0.221				
	A(U)	A _R	H _e	H _o	PIC	A(U)	A _R	H _e	H _o	PIC
CRe09	6(1)	2.738	0.414	0.467	0.386	4	2.205	0.306	0.333	0.282
CRe11	3	1.533	0.131	0.133	0.123	2	1.267	0.067	0.067	0.064
CRe15	3	2.082	0.343	0.400	0.294	2	2.241	0.352	0.400	0.314
CRe22	5(1)	2.421	0.359	0.267	0.330	3(1)	2.000	0.297	0.333	0.260
CRe32	3	1.736	0.191	0.067	0.175	3	1.887	0.246	0.267	0.221
CRe44	5	3.231	0.605	0.667	0.543	4	3.453	0.724	0.600	0.645
CRe45	7(1)	3.825	0.662	0.533	0.614	4	3.006	0.591	0.400	0.520
CRe47	4	2.002	0.251	0.267	0.232	5(1)	2.471	0.361	0.333	0.335
CRe50	7(1)	3.359	0.552	0.533	0.513	5	3.333	0.678	0.667	0.597
CRe52	11(2)	4.626	0.745	0.733	0.704	7(2)	2.600	0.366	0.333	0.345
CRe54	4	3.118	0.623	0.667	0.550	6(1)	3.654	0.736	0.667	0.661
CRe59	4	2.905	0.531	0.533	0.475	4	3.017	0.568	0.267*	0.507
CRe64	7	4.016	0.715	0.600	0.660	6	3.387	0.634	0.733	0.570
CRe66	6	3.881	0.743	0.733	0.667	5	3.980	0.775	0.800	0.709
Mean	5.36	2.962	0.490	0.471	0.448	4.29	2.750	0.479	0.443	0.431

Locus	서귀포 예래동(YR, N=6)					Total(N=66)				
	Gene diversity = 0.566 ± 0.257					Gene diversity = 0.487 ± 0.197				
	A(U)	A _R	H _e	H _o	PIC	A(U)	A _R	H _e	H _o	PIC
CRe09	4	3.242	0.561	0.667	0.476	7	2.332	0.379	0.337	0.323
CRe11	3	2.333	0.318	0.333	0.957	3	1.590	0.152	0.157	0.150
CRe15	2	1.667	0.167	0.167	0.988	5	2.099	0.348	0.307	0.286
CRe22	3	2.333	0.318	0.333	0.957	6	2.155	0.288	0.310	0.292
CRe32	2	1.909	0.303	0.333	0.961	3	1.664	0.167	0.183	0.173
CRe44	4	4.000	0.821	0.500	0.707	6	3.491	0.578	0.692	0.640
CRe45	4	3.558	0.712	0.500	0.766	7	3.314	0.500	0.585	0.555
CRe47	6(2)	4.889	0.848	0.333*	0.606	9	2.978	0.364	0.505*	0.478
CRe50	5	4.556	0.822	1.000	0.664	11	3.898	0.646	0.684	0.655
CRe52	5	3.909	0.667	0.500	0.784	18	3.562	0.530	0.569	0.555
CRe54	3	2.665	0.591	0.500	0.853	6	3.086	0.636	0.644	0.581
CRe59	2	1.800	0.200	0.200	0.984	5	2.613	0.338	0.445*	0.414
CRe64	5	4.238	0.803	1.000	0.674	8	3.551	0.652	0.654	0.616
CRe66	4	3.331	0.682	0.500	0.791	6	3.806	0.697	0.740	0.695
Mean	3.71	3.174	0.558	0.490	0.469	7.14	2.867	0.448	0.487	0.458

A(U), number of alleles (unique alleles); A_R, allele richness; H_o, observed heterozygosity; H_e, expected heterozygosity; PIC, polymorphic information content; *: Significant deviation from HWE after Bonferroni's correction (P<0.00357).

표 II-2-42. 집단 별 유전 다양성 지수. 대립유전자의 수(A), 대립인자 풍부도(A_R), 이형접합자빈도 예측치(H_0), 관측치(H_0), F_{ST} , R_{ST} , 유효집단 크기(N_e)

Population	N	A	A_R	H_0	H_0	F_{ST}	N_e
1. 장흥군 안양면	15	4.21	2.623	0.451	0.419	0.073	193.2 (22.4- ∞)
2. 창원시 구산면	15	4.32	2.774	0.470	0.443	0.059	223.5 (27.3- ∞)
3. 마산시 진동리	15	5.36	2.962	0.490	0.471	0.040	∞ (49.7- ∞)
4. 거제시 연초면	15	4.29	2.750	0.479	0.443	0.077	33.8 (13.8- ∞)
5. 서귀포시 예래동	6	3.71	3.174	0.558	0.490	0.134	∞ (47.7- ∞)

전체 14개 microsatellite 좌위를 사용한 기수갈고둥의 집단 간 F_{ST} 수치는 0.003~0.026의 범위로 전체적으로 낮은 수치를 나타내었다(표 II-2-43). 마산시 진동리 집단과 서귀포시 예래동 집단 간의 유전적 분화가 가장 큰 것으로 나타났으나 그 수치가 매우 낮았다.

표 II-2-43. 기수갈고둥 서식 집단 간 pairwise F_{ST}

Population	1	2	3	4	5
1. 장흥군 안양면	-				
2. 창원시 구산면	0.026	-			
3. 마산시 진동리	0.025	0.003	-		
4. 거제시 연초면	0.020	0.014	0.004	-	
5. 서귀포시 예래동	0.003	0.022	0.030	0.027	-

표 II-2-44. AMOVA 결과

Source of variation	d.f	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among populations	4	19.017	0.05520	1.63
Within populations	127	422.150	3.32402	96.37
Total	131	441.167		

이러한 결과는 AMOVA 분석 결과에서도 나타나는데, 대부분의 유전 변이가 집단 간에 아닌 개체 간에 집중되어 있었다(표 II-2-44). 이러한 결과로 미루어 볼 때 이번 연구에 사용한 남해안 4개 집단, 제주도 1개 집단은 각 지역 집단 간에 활발한 유전적 교류가 있으며 남해안 및 제주도 집단이 하나의 거대한 metapopulation으로 존재하는 것으로 판단된다. 이와 같은 결과는 Bayesian structure 분석 결과에서도 나타났다. 아래 그림에서와 같이 Delta K, Evanno method를 이용한 결과 모두 K=2 일 때 가장 수치가 높은 것으로 나타났지만, 지역에 따른 집단 구분이 되지 않았다.

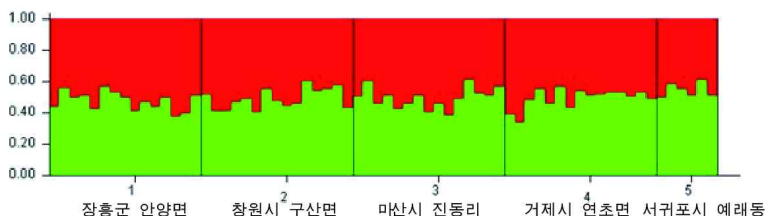


그림 II-2-28. 기수갈고둥 집단의 Structure 분석 결과(K=2)

이러한 유전적 교류는 기수갈고둥의 생활사와 관련이 있는 것으로 판단되는데, 현재 한국에서는 기수갈고둥의 생활사와 관련한 정보가 없으나, 일본의 정보를 살펴보면, 기수갈고둥의 부화한 유생은 부화한 벨리저 유생(연체동물의 면반을 발달시킨 시기의 유생형)은 바다에 흘러내려가서, 식물플랑크톤을 섭식하면서 오랜 기간 유생생활을 거친다. 이후 충분히 성장한 벨리저 유생은 하천의 기수역으로 거슬러 올라가서, 바닥에 붙어서 변태하고 유패가 된다. 성장해가면서 하구를 수 Km 거슬러 올라가 근처 담수역까지 분포를 넓히는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 생활사를 고려하여 보면 성패는 기수역에 서식하지만 유생시기에 널리 확산이 가능하고 그 결과 한국 내 집단 간 유전적 분화가 없이 집단 간 활발한 유전적 교류를 하고 있는 것으로 판단된다.

■ 해외 표본 확보 계획

기수갈고둥은 한국이외에 일본 및 대만에 분포하는 것으로 알려져 있다. 일본에서는 남해안과 제주도, 국외에는 일본에 서식하는 것으로 알려져 있다. 이 중 일본에서는 혼슈 지역과 큐슈 지역에 분포하며 특히 혼슈 지역의 경우 한국과 가까운 동해안 연안 집단과 대평양측 연안 집단으로 구분 되는 것으로 알려져 있다. 2차년도 연구가

진행된다면 일본의 태평양측 집단과 동해 집단으로 구분하여 확보를 하고자 하며, 일본 표본의 확보는 오사카교육대학교의 담수패류 전문가인 Takaki Kondo 교수와 연구 네트워크를 형성하여 공동으로 연구를 수행할 것이다. 이후 확보된 표본을 바탕으로 국내 및 국외 개체군간의 유전다양성 비교를 수행하고자 하며 이를 통해 국내 및 동아시아에 서식하는 기수갈고둥의 유전다양성, 분류학적, 계통지리학적 정보를 축적하고, 이를 통해 멸종위기종인 기수갈고둥의 보전을 위한 기초 유전정보를 축적할 것이다.



그림 II-2-29. 기수갈고둥 분포도

3. 기 분석된 멸종위기종 유전다양성 분석 재검토

본 사업을 포함하여 멸종위기종(동물분야)의 유전다양성 분석과 관련된 사업을 검토하여 실험의 재현성 문제, 개체군 일부만이 포함된 경우, 분류학적 실체 파악이 필요한 경우 등의 사유로 재분석이 요구되는 종에 대한 목록을 작성하고자 하였다. 먼저 2007년부터 시작된 본 사업의 유전다양성 분석종에 대한 목록과 결과를 검토하였고 그 결과 재분석의 시급성을 고려하여 중 목록을 작성하고 재분석 필요성에 대해 고찰하였다. 분석 필요성과 중 목록 구축을 위해 각 분류군의 전문가와 기수행 연구책임자에게 자문을 요청하였다.

가. 유전다양성 재분석이 필요한 중 목록

순위	종명	사유
1	애기뿔소똥구리	분류학적 실체 검증 시급, 국내외 표본 추가 분석 필요, microsatellite 마커 분석 필요
2	감돌고기	극히 적은 수의 개체수만이 분석이 이용되어 전면적인 재분석 필요, 표본 추가 분석 필요, microsatellite 마커 분석 필요
3	꼬마잠자리	보전단위 설정 시급, 국내외 표본 추가 분석 필요, microsatellite 마커 분석 필요
4	수리부엉이	표본 추가 분석 필요, microsatellite 마커 분석 필요
5	수달	표본 추가 분석 필요, microsatellite 마커 분석 필요
6	새호리기	microsatellite 마커 분석을 통해 구분되는 2개의 유전적 집단의 검증 필요
7	독수리	표본 추가 분석 필요, microsatellite 마커 분석을 통해 구분되는 2개의 유전적 집단의 검증 필요

나. 멸종위기종의 특성상 개체수 확보가 용이하지 않아 연구 당시 소수의 개체만으로 실험을 진행하였기에 개체수를 추가 확보하여 재분석이 필요한 분류군

① 감돌고기

15개체만을 대상으로 실험을 수행하였으므로 개체수를 추가하여 재분석 할 필요가 있음. 현재 금강수계 및 웅천천에 서식하는 것으로 알려져 있으며, 금

강수계의 개체수 확보는 용이할 것으로 판단함

② 수달, 수리부엉이, 올빼미

20~25개체 내외의 개체수를 대상으로 분석이 이루어졌음. 분류군의 특성상 분석 당시 더 많은 개체수를 확보하기는 어려웠을 것으로 판단됨. 현재까지 추가 채집된 개체수가 확보되어 있다면 우선적으로 재분석이 필요함

- 수달: 표본의 추가 확보가 가능함
- 수리부엉이: 표본의 추가 확보가 가능함
- 올빼미: 많은 수의 표본 추가 확보는 불가능함. 국내 표본 소장 기관을 통해 확보 가능성을 재검토 할 필요가 있음

다. 연구 결과 유전적으로 서로 다른 2개의 그룹으로 구분되어 추가 분석을 통해 정확한 보존단위 설정 및 분류학적 고찰이 필요한 분류군

① 새호리기

COI 분석에서 국내에 2개의 유전적 그룹이 있는 것으로 확인되었으므로 개체수를 추가하고 마커를 다양화하여 재분석이 필요한 것으로 판단됨

② 독수리

CytB 분석에서 유전적으로 다른 1개체를 확인하였으므로 추가 분석이 요구됨

③ 애기뿔소뿔구리

2개의 유전적으로 분리되는 그룹이 확인됨. 그 차이는 종 수준 정도까지가 의심되므로 SSR 분석을 포함한 분류학적 검증이 필요함

라. 해외샘플을 추가하여 분석이 필요한 분류군

- ① 조류, 곤충 및 무척추동물 분야에서 해외 표본과 비교 분석이 필요하거나, 비교가 가능한 대상종이 다수 일 것이라 판단됨. 이는 각 분류군 전문가나 사업을 진행할 연구진에게 확보 가능성에 대해 확인이 필요함
- ② 국내 개체군 분석 결과, 새호리기, 독수리, 애기뿔소뿔구리의 경우 유전적으로 확연히 구분 되는 2개의 그룹이 나타나는 결과를 보이고 있음. 해외 동일종과의 추가 비교 분석이 필요함
- ③ 조류의 경우에는 해외 표본의 추가 확보가 어려운 상황으로 판단됨. 곤충의 경우는 가능성이 있는 것으로 판단되는데, 꼬마잠자리의 경우 현재 중국, 일본, 대만 등에서 발생한다고 알려져 있어 국외 개체군과의 비교를 통한 국내 개체군의 유전적 다양성 재검토가 필요할 것으로 판단됨

마. Microsatellite 마커 분석

- ① 2009년까지 이루어진 유전다양성 분석은 짧은 핵 혹은 미토콘드리아 유전자 서열을 비교하여 다양성을 확인하였는데, 그 결과를 검증하거나 보완하기 위해 microsatellite 마커를 이용한 다양성 분석이 추가 되어야 할 필요성이 있음 (2007년부터 2009년까지의 유전다양성 분석 현황 참조)
- ② 당시 microsatellite 마커 발굴은 전 세계적으로 그 양이 많지 않았고, 마커 발굴 실험에는 시간과 실험 경비가 많이 드는 한계가 있었으므로 용역의 형태로 1년 이내의 단기 과제로는 연구기간이 짧아 마커를 개발하고 적용하는데 어려움이 있었음
- ③ 최근 NGS를 이용한 효율적 마커개발이 가능해짐에 따라 이를 이용한 microsatellite 마커 개발 연구를 재 수행할 필요가 있음
 - 예기뿔소똥구리: microsatellite 마커 개발이 필요함
 - 감돌고기: microsatellite 마커 개발이 필요함
 - 꼬마잠자리: 미토콘드리아 COI 유전자가 세세한 지역적 분할상황을 반영할 수 없는 점과 현 SSR 분석이 용이해진 점을 고려하여 보다 확실한 지역적 관련성과 분할, 다양성에 대한 정보 확보와 이를 통한 우선 보전 구역 설정이 매우 시급하므로 이를 위한 SSR 분석이 필요함. 꼬마잠자리는 미토콘드리아 full-genome도 보고되지 않음
 - 수달: 현재 외국과 국내에서 microsatellite 마커가 개발되어 있음
 - 수리부엉이: 현재 외국에서 microsatellite 마커가 일부 개발되어 있음
 - 새호리기, 독수리: microsatellite 마커 개발을 통한 재분석 가능함

바. 미분석 멸종위기종 가운데 유전다양성 분석이 시급한 종 목록

멸종위기종 가운데 유전다양성분석이 이루어지지 않은 종 가운데 표본 확보 가능성, 다양성 분석의 필요성 등을 고려하여 종 목록을 작성함

분류군	종명	선정 사유
양서류	금개구리	지금까지 중국에 서식하는 <i>Pleophylax plancyi</i> 의 한국 아종으로 생각되어 왔지만 별개의 종으로 분리되기도 함. 그러므로 아종 및 종 단위의 분류학적 검증이 필요함
어류	미호중개 흰수마자 남방동사리 한독중개	국외 표본(아무르강 또는 일본)과의 비교 분석을 통해 분류학적 검증이 필요함
곤충	상제나비	1990년대 이후 발생기록이 없어 국내 상제나비의 복원문제가 시급한 실정임. 주변 발생국(중국, 몽골, 러시아 및 일본)의 시료와 함께 유전적 다양성을 비교 후 가장 유사한 지역에서 도입을 시도해야 함. 현 중국, 몽골, 러시아 및 일본에서 표본 확보가 가능하나 국내의 경우 10개체 미만 이 확보 가능함
	대모잠자리	국외 분포지역(중국)과 비교 후 국내 대모잠자리의 유전적
	왕은점표범나비	다양성의 현실을 이해하고 우선 보전지역을 설정할 데이터를
	쌍꼬리부전나비	를 축적할 필요가 있음
무척추 동물	두드럭조개	한강, 금강 수계에서만 발견되었으나 한강 수계 집단은 절멸한 것으로 판단됨. 금강 수계 집단의 유전적 다양성의 확인이 필요함
	참달팽이	분류학적 실체 파악이 힘들기 때문에 검증이 필요함
	붉은발말뚝개	개체수 확보가 용이하며 해외 표본 확보 가능성이 높음

사. 멸종위기종을 대상으로 하여 선행된 유전다양성 분석 연구와 관련 사업에 대한 조사

기분석된 멸종위기종 유전다양성 분석 제검토를 위해 본 사업을 포함하여 멸종위기종 유전다양성 분석 연구와 관련 사업(동물분야)을 검토하였다.

기분석된 멸종위기종에서 유전다양성 논문을 대상으로 조사, 자료의 신뢰성 확보를 위하여 학계에 검증된 학술지를 선정하였다. 우리나라에서 발행되는 등재학술지를 중심으로 해당 분류군의 유전다양성 논문을 대상으로 조사를 실행한다. 국내에서 발행하는 등재학술지는 전 분야에 걸쳐 1,438개, 등재후보학술지는 631개가 있다(표 II-3-1, 표 II-3-2). 자료의 신뢰성을 확보하기 위하여 학계에 검증된 학술지를 선별하였다. 최대한 많은 논문 자료를 찾아내기 위해서는 다양한 저널 검색사이트를 사용하여 빠지는 자료가 없도록 하는 것도 중요하다. 우선은 학술지에 투고된 논문을 위주로 검색하지만, 해외 저널 검색사이트, 주요 대학의 도서관, 공공 기관 및 국회 도서관 등의 사이트를 이용하여 논문과 자료를 수집하였다(표 II-3-3).

표 II-3-1. 학술진흥재단 등재학술지에서 본 과제와 관련된 저널목록

등재후보 선정연도	분야	학술지명	학술지외국어명	발행기관명	ISSN	등재연도
2006	자연	농업생명과학연구		경상대학교 농업생명과학연구원	1598-5504	2009년 등재
1999	자연	BMB Reports	BMB reports	생화학분자생물학회	1976-6696	2002년 등재
2001	자연	Entomological Research	Entomological Research	한국곤충학회	1748-5967	2003년 등재
1999	자연	한국과학교육학회지	Journal of the Korean Association for in Science Education	한국과학교육학회	1226-5187	2002년 등재
2001	자연	한국동물분류학회지	The Korean Journal of Systematic Zoology	한국동물분류학회	1018-192X	2004년 등재
1998	자연	Molecules and Cells	Molecules and Cells	한국분자세포생물학회	1016-8478	2001년 등재
2001	자연	생명과학회지	Korean Journal of Life Science	한국생명과학회	1225-9918	2004년 등재
2001	자연	한국생태학회지(Journal of Ecology and Field Biology)	Journal of Ecology and Field Biology	한국생태학회	1225-0317	2004년 등재
1999	자연	한국유전학회지	Genes and Genomics	한국유전학회	1226-654X	2004년 등재
2000	자연	ALGAE	ALGAE	한국조류학회	1226-2617	2004년 등재
1999	자연	Animal Cells and Systems	Animal Cells and Systems	한국통합생물학회	1976-8354	2001년 등재
1999	자연	한국하천호수학회지	Korean Journal of Limnology	한국하천호수학회	1976-8087	2002년 등재
2001	자연	한국환경과학회지		한국환경과학회	1225-4517	2004년 등재
1999	농수해	한국수산과학회지	Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences	한국수산과학회	1226-9204	2003년 등재
2003	농수해	수산해양교육연구	JOURNAL OF FISHERIES AND MARINE SCIENCES EDUCATION	한국수산해양교육학회	1229-8999	2006년 등재
2003	농수해	한국어류학회지	Korean Journal of Ichthyology	한국어류학회	1225-8598	2008년 등재
2000	농수해	한국응용곤충학회지	Korean Journal of Applied Entomology	한국응용곤충학회	1225-0171	2002년 등재
2001	농수해	Journal of Asia-Pacific Entomology	Journal of Asia-Pacific Entomology	한국응용곤충학회	1226-8615	2003년 등재
2000	농수해	Journal of Applied Biological Chemistry	Journal of Applied Biological Chemistry	한국응용생명화학회	1976-0442	2003년 등재
1999	농수해	Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry	Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry	한국응용생명화학회	1738-2203	2001년 등재
2003	농수해	The Korean Journal of Malacology	The Korean Journal of Malacology	한국패류학회	1225-3480	2010년 등재
2003	농수해	해양정책연구	Ocean Policy Research	한국해양수산개발원	1225-0341	2006년 등재
2000	농수해	Ocean and Polar Research	Ocean and Polar Research	한국해양연구원	1598-141X	2002년 등재

1999	농수해	Ocean Science Journal	Ocean Science Journal	한국해양연구원/한국해양학회	1738-5261	2006년 등재
1999	농수해	바다	JOURNAL OF THE KOREAN SOCIETY OF OCEANOGRAPHY	한국해양학회	1226-2978	2006년 등재
2003	농수해	한국해양환경공학회지		한국해양환경공학회	1226-7414	2005년 등재
2002	농수해	한국환경농학회지	The Korean Society of Environmental Agriculture	한국환경농학회	1225-3537	2004년 등재
2001	농수해	한국환경복원기술학회지	Journal of the Korea Society for Environmental Restoration Technology	한국환경복원기술학회	1229-3032	2003년 등재
2000	농수해	한국환경생태학회지	KOREAN JOURNAL OF ENVIRONMENT AND ECOLOG	한국환경생태학회	1229-3857	2005년 등재

표 II-3-2. 학술진흥재단 학술등재후보지에서 본 과제와 관련된 저널목록

등재후보 선정연도	분야	학술지명	학술지외국어명	발행기관명	ISSN
2007	자연	Molecular & Cellular Toxicology	Molecular & Cellular Toxicology	대한독성 유전단백체학회	1738-642X
2003	자연	Journal of Experimental and Biomedical Science	Journal of Experimental and Biomedical Science	대한의생명과학회	1738-3226
2010	자연	대한의학유전학회지		대한의학유전학회	
2010	자연	조선자연과학논문집		조선대학교 기초과학연구원	
2006	자연	고생물학회지	Journal of the paleontological Society of Korea	한국고생물학회	1225-0929
2010	자연	과학수사학		한국과학수사학회	
2009	자연	BioChip Journal	BioChip Journal	한국바이오칩학회	1976-0280
2005	자연	발생과 생식	DEVELOPMENT & REPRODUCTION	한국발생생물학회	1226-6752
2006	자연	Genomics & Informatics	Genomics & Informatics	한국유전체학회	1598-866X

표 II-3-3. 저널 검색사이트

저널 검색사이트		
해외 검색 사이트	 <p>http://archivesic.ccsd.cnrs.fr</p>	 <p>http://www.ndsl.kr</p>
	 <p>http://eiop.or.at/erpa</p>	 <p>http://www.riss.kr</p>
	 <p>http://nsdl.org</p>	 <p>http://kiss.kstudy.com</p>
	 <p>http://www.jstor.org</p>	 <p>http://www.dbpia.co.kr</p>



① 멸종위기종으로 선정된 모든 종(246종)을 대상으로 하여 유전다양성 분석이 이루어진 연구와 관련 사업(동물분야)을 조사함

■ 멸종위기종을 분류군별(포유류, 조류, 양서·파충류, 어류, 곤충류, 무척추동물)로 나눠서 유전다양성 분석을 통해 국내외 학회지에 논문으로 발표하였거나 보고서로 작성된 연구들을 위주로 검토함

② 유전다양성 분석에 사용된 주요 분자 마커를 조사하고 정리함

■ Isozyme, allozyme 등의 효소, microsatellite, AFLP, 미토콘드리아 유전체(12S rDNA, COI, Cytb, CR 영역 등)와 핵 유전체(ITS 영역 등)의 유전다양성 분석을 위해 사용된 분자 마커를 조사하고 정리함

③ 유전다양성 분석을 위해 샘플이 채집된 지역과 개체수를 조사하고 정리함

④ 관련 분야 자문 위원 활용

■ 멸종위기종 전체를 대상으로 유전다양성 연구 현황을 파악해야 하기 때문에 정확한 조사를 위해서는 각 분류군별 전문가의 조언이나 검증 과정이 필요함. 정확한 연구결과의 완성도 제고를 위하여 관련 분류군 전문가에게 자문을 구하고, 검토를 거침

<유전다양성분석 연구 현황>

분류군	국명	개체수	지역	분석 마커 ^a	참고문헌 ^b	주관기관
조류	개리	48	러시아(2)	CR	Poyarkov et al., 2010	
	독수리	173	유럽(2), 아시아(5)	CytB, microsatellite 19개 좌위	Poulakakis et al., 2008	
	따오기	36	중국(2)	CR	Zhang et al., 2004	
	올빼미	184	서유럽(14)	microsatellite 7개 좌위	Brito, 2007	
	팔색조	32	한국(6), 대만(1)	COI, CytB	김은미 외, 2014	
	황새	9	러시아(3)	CR	Onuma et al., 2011	
	흰꼬리수리	120	에스토니아, 폴란드, 세르비아 각 1개 지점	CR, microsatellite	Langguth et al., 2013	
		218	에스토니아, 독일, 라플랜드, 스웨덴, 러시아, 노르웨이 각 1개 지점	microsatellite 26개 좌위	Hailer et al., 2006	
		123	독일, 오스트리아, 체코, 스웨덴	CR, microsatellite 7개 좌위	Honnen et al., 2010	
		237	유럽 (10), 아시아(1)	CR	Hailer et al., 2007	
포유류	대륙사슴	133	체코(17), 러시아(2)	CR, CytB	Krojerová-Prokešová et al., 2013	
		59	중국(4)	CR	WU et al., 2004	
	물개	405	북동 태평양(9)	CR, CytB	Pinsky et al., 2010	
	물범	66	오호츠크 해(2), 동해 (1) 지점	CR, tRNA-Pro, tRNA-Thr	Mizuno et al., 2003	
		31	일본(6)	CytB	Nakagawa et al., 2010	
	산양	66	한국	CR	전수원, 2015	석사학위논문 (서울대학교)
		68	한국(4)	microsatellite 12개 좌위	Choi et al., 2015	
		6	한국(2)	CytB	Koh et al., 2002	
	삵	20	국내(6), 일본(1)	CytB	김영섭 외, 2010	

분류군	국명	개체수	지역	분석 마커 ^a	참고문헌 ^b	비고
포유류	살	12	국내(3)	IRBP, CytB, 12S rDNA	박남정, 2011	석사학위논문 (충북대학교)
		121	국내(3)	IRBP, CytB, 12S rDNA	함의정, 2013	박사학위논문 (충북대학교)
	수달	496	스코틀랜드(24)	microsatellite 10개 좌위	Dallas et al., 1999	
		57	이스라엘(4)	microsatellite 12개 좌위	Cohen et al., 2013	
		589	유럽(19)	CR, CytB, tRNA-Thr, tRNA-Pro, tRNA-Phe, 12S rDNA, microsatellite 11개 좌위	Mucci et al., 2010	
		197	스웨덴(4), 핀란드(4)	CR, microsatellite 12개 좌위	Honnen et al., 2015	
		229	독일(2), 덴마크, 스웨덴	CR, microsatellite 12개 좌위	Honnen et al., 2011	
		129	유럽(9)	CR	Cassens et al., 2000	
	스라소니	702	캐나다	microsatellite 14개 좌위	Koen et al., 2014	
	큰바다사자	1106	알래스카 79개 지점(서식지별)	CR, microsatellite 36개 좌위	O'Corry-Crowe et al., 2014	
		9	알래스카	microsatellite 8개 좌위	Huebinger et al., 2007	
		208	알래스카, 러시아 해안 21개 지점(서식지별)	CR, microsatellite 6개 좌위	Trujillo et al., 2004	
		668	알래스카, 러시아 해안 32개 지점(서식지별)	Mt DNA, microsatellite 13개 좌위	Hoffman et al., 2006	
		336	알래스카, 러시아 해안 43개 지점(서식지별)	CR, CytB	Harlin-Cognat o et al., 2006	
	토끼박쥐	20	스코틀랜드(3)	microsatellite 5개 좌위	Burland et al., 1999	
		35	유럽(10)	16S, ND1, D-loop	Kiefer et al., 2002	
	표범	12	러시아, 한국(3)	CR, ND5, microsatellite 25개 좌위	Uphyrkina et al., 2001	

분류군	국명	개체수	지역	분석 마커 ^a	참고문헌 ^b	주관기관
포유류	호랑이	39	미국(3), 러시아(1), 에스 토니아(1), 우크라이나(1)	Mt DNA, DRB, microsatellite 30개 좌위	Luo et al., 2004	
		95	러시아극동지역(2)	CR, microsatellite 12개 좌위	Henry et al., 2009	
		105	유럽(4), 아메리카(2), 아 시아(8)	Mt DNA, microsatellite 30개 좌위	Luo et al., 2008	
		3	미국, 일본	ND2, COI, ND5, ND6, CytB	Lee et al., 2012	
양서파 충류	비바리뱀	11	제주도	CytB		환경부, 2011
	수원청개구리	68	한국(7)	COI, CytB,	Chun et al., 2012	
	구렁이	45	한국, 러시아, 중국	COI, CytB, 12S rRNA	An et al., 2010	
	금개구리	78	한국(11), 중국(1)	CR, CytB	Min et al., 2008	
	남생이	92	한국, 중국	CytB	박선미, 2015	석사학위논문 (제주대학교)
			한국, 중국, 일본, 대만	CR, CytB	Suzuki et al., 2011	
	맹꽁이	178	한국(11), 중국(1)	allozyme	Yang et al., 2000	
	표범장지뱀	110	한국(10)	microsatellite 9개 좌위	Park et al., 2014	
어류	감돌고기	88	한국(3)	CytB, AFLP, microsatellite	김근식, 2012	
		15	금강	CR		국립생물자원관, 2007
	꼬치동자개	104	낙동강(4)	microsatellite	김근식, 2008	석사학위논문 (순천향대학교)
	남방동사리	995	일본	allozyme	Sakai et al., 1998	
	미호총개	67	한국(3)	AFLP, microsatellite	환경부, 2009a	환경부
	얼룩새코미꾸리	94	한국(15)	AFLP, microsatellite	환경부, 2011a	환경부
	통사리	113	한국(4)	AFLP	환경부, 2010	환경부
	흰수마자	165	한국(6)	CytB, AFLP, microsatellite	김근식, 2012	
	가는돌고기	119	한국(4)	CytB, AFLP, microsatellite	김근식, 2012	

분류군	국명	개체수	지역	분석 마커 ^a	참고문헌 ^b	주관기관
어류	가시고기	80	한국(7)	COI, CytB, microsatellite	Chu, 2013	
	꺼저기	82	한국(7), 일본(1)	COI, CytB, microsatellite		국립생물자원관, 2013
	꾸구리	120	한국(4)	CytB, AFLP, microsatellite	김근식, 2012	
	돌상어	120	한국(4)	CytB, AFLP, microsatellite	김근식, 2012	
		50	한강(3), 금강(2)	CR, CytB		국립생물자원관, 2009
	모래주사	56	한국(2)	CytB, AFLP, microsatellite	김근식, 2012	
	묵납자루	90	한국(3)	AFLP	환경부, 2010	환경부
		80	한국(5)	COI, CytB, microsatellite		국립생물자원관, 2014
	열목어	53	중국(4)	CR	Liu et al., 2015	
	줄수수치	83	한국(9)	CytB, ENC1, myh6, SH3, PX3	Kim et al., 2013	
	칠성장어	156	일본(5)	allozyme	Yamazaki and Goto, 1998	
	한강납줄개	100	한국(6)	12S rRNA, COI, 16S rRNA, CytB, microsatellite		국립생물자원관, 2012
	한독줄개	15	한국(1)	AFLP	변 등, 2009	
곤충류	꼬마잠자리	68	전국	COI		국립생물자원관
	애기뿔소뿔구리	69	한국(5)	COI, CytB, ITS2	Kang et al., 2012	
무척추 동물	귀이빨대칭이	51	한국(7)	COI		국립생물자원관
		137	한국(7), 일본(4), 베트남(3)	CR1, CR2, COI, microsatellite		국립생물자원관
	남방방개	25	한국(2)	microsatellite	환경부, 2009b	환경부
	갯개	27	한국(4)	microsatellite 9개 좌위	환경부, 2009b	환경부
	대추귀고동	60	한국(6)	COI, microsatellite 14개 좌위		국립생물자원관, 2013
	붉은발말통게	76	한국(5)	microsatellite 18개 좌위	환경부, 2009b	환경부

^a **AFLP**: amplified fragment length polymorphism; **COI**: cytochrome oxidase; **CR**: control region; **CytB**: cytochrome c oxidase; **ENC**: Ectoderm-neural cortex protein; **IRBP**: Retinol-binding protein; **ITS**: Internal transcribed spacer; **myh**: Myosin heavy chain; **ND**: NADH dehydrogenase subunit

^b<첨부 자료1> 참고

III. 결론

자생 생물자원의 유전자 다양성 연구(동물분야) 연구는 멸종위기종의 유전자원 확보를 목적으로 지난 2006년부터 현재까지 총10년에 걸쳐 수행되었다. 2015년도 10차년도 연구에서는 주요 생물종(조류, 곤충, 연체동물)에서 총 9건의 전체 소기관 유전체를 해독하고, 주요 생물종 5종의 유전다양성 분석 수행을 목표로 하였다.

1. 세부과제별 유전자 다양성 연구(동물분야) 사업의 결과

가. 주요 생물자원의 소기관 유전체 특성 규명 연구

금년 연구를 통하여 조류 2종, 곤충 4종, 연체동물 3종, 총 9종의 전체 미토콘드리아 유전체가 완전히 해독되었다. 그 연구 결과는 표 III-1-1과 같다.

표 III-1-1. 2015년도 주요 생물종의 소기관 유전체 특성 규명 결과

분류군	종 명		염기서열	세부 책임자
	한글명	학 명		
조류	긴점박이올빼미	<i>Strix uralensis</i>	16,363bp	황의욱
	잣빛개구리매	<i>Circus cyaneus</i>	20,173bp	황의욱
곤충	큰자색호랑꽃무지	<i>Osmoderma opicum</i>	15,341bp	김익수
	큰홍띠점박이푸른부전나비	<i>Shijimiaeoides divina</i>	15,259bp	김익수
	물장군	<i>Lethocerus deyrollei</i>	19,295bp	황의욱
	대모잠자리	<i>Libellula angelina</i>	15,233bp	김익수
	기수갈고동	<i>Clithon retropictus</i>	15,803bp	황의욱
연체동물	나팔고동	<i>Charonia sauliae</i>	15,330bp	황의욱
	참달팽이	<i>Koreanohadra koreana</i>	13,979bp	황의욱

나. 주요 생물자원의 유전다양성 분석

본 10차년도 연구를 통해 주요 생물종의 유전다양성은 맹꽁이, 물장군, 붉은점 모시나비, 흰발농게, 기수갈고둥 총 5종의 분석이 이루어졌으며 분석 연구 결과는 표 III-1-2와 같다.

표 III-1-2. 2015년도 유전다양성 분석 결과

종 명		유전자 마커	확보 집단 /개체수	세부책임자
한글명	학 명			
맹꽁이	<i>Kaloula borealis</i>	microsatellite	11개 집단 /150개체	민미숙
물장군	<i>Lethocerus deyrollei</i>	microsatellite	3개 집단 /41개체	원용진
붉은점모시나비	<i>Parnassius bremeri</i>	COI, microsatellite	3개 집단 /40개체	김익수
흰발농게	<i>Uca lactea</i>	microsatellite	3개 집단 /45개체	정종우
기수갈고둥	<i>Clithon retropictus</i>	microsatellite	5개 집단 /66개체	황의욱

다. 기 분석된 멸종위기종 유전다양성 분석 재검토

본 사업을 포함하여 멸종위기종(동물분야)의 유전다양성 분석과 관련된 사업을 검토하여 실험의 재현성 문제, 개체군 일부만이 포함된 경우, 분류학적 실체 파악이 필요한 경우 등의 사유로 재분석이 우선적으로 요구되는 종에 대한 목록을 작성하였다. 그 결과 애기뿔소똥구리, 감돌고기, 꼬마잠자리, 수리부엉이, 수달, 새호리기, 독수리 7종을 선정하여 제시하였다.

표 III-1-3. 재분석이 필요한 멸종위기종 7종과 그 사유

순위	종명	사유
1	애기뿔소똥구리	분류학적 실체 검증 시급, 국내외 표본 추가 분석 필요, microsatellite 마커 분석 필요
2	감돌고기	극히 적은 수의 개체수만이 분석이 이용되어 전면적인 재 분석 필요, 표본 추가 분석 필요, microsatellite 마커 분석 필요
3	꼬마잠자리	보전단위 설정 시급, 국내외 표본 추가 분석 필요, microsatellite 마커 분석 필요
4	수리부엉이	표본 추가 분석 필요, microsatellite 마커 분석 필요
5	수달	표본 추가 분석 필요, microsatellite 마커 분석 필요
6	새호리기	microsatellite 마커 분석을 통해 구분되는 2개의 유전적 집단의 검증 필요
7	독수리	표본 추가 분석 필요, microsatellite 마커 분석을 통해 구분되는 2개의 유전적 집단의 검증 필요

2. 연구 성과

본 연구에서 얻은 연구 결과들을 논문으로 작성하여 전 세계 유수의 학술지에 게재하여 학문적 성과를 인정받고 있다. 현재까지 사업단의 세부 책임자가 본 사업과 관련한 내용으로 학술지에 게재한 논문과 출판 중인 논문들을 목록으로 작성하였다. 현재까지 본 사업단에서 출판한 논문과 게재 예정 논문은 SCI 32편, SCIE 3편으로 총 35편이다(표 III-1-4).

표 III-1-4. 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 사업의 기출판된 연구업적

논문 제목	저널명	비고	세부 책임자
Mitochondrial Genome of the Eurasian Otter <i>Lutra lutra</i> (Mammalia, Carnivora, Mustelidae).	Gene and Genomics	2009년 출판 31권 1호 19-27	황의욱
Complete mitochondrial genome of a Korean spotted seal <i>Phoca largha</i> (Mammalia, Pinnipedia, Phocidae) : Genetic differences among individuals of <i>P. largha</i> and <i>P. virulina</i> .	Mitochondrial DNA	2009년 출판 20권 5-6호 105-106	
Mitochondrial genome of a Korean colubrid snake <i>Elaphe schrenckii</i> (Reptilia: Squamata: Colubridae).	Mitochondrial DNA	2009년 출판 20권 5-6호 107-109	
Complete mitochondrial genome of a Steller sea lion <i>Eumetopias jubatus</i> (Carnivora, Otariidae)	Mitochondrial DNA	2010년 출판 21권 2호 54-56	
Complete mitochondrial genome of the Korean goral <i>Naemorhaedus caudatus</i> (Ruminantia, Bovidae, Antilopinae) and conserved domains of control regions in Caprini	Mitochondrial DNA	2010년 출판 21권 3-4호 62-64	
Mitochondrial genome of the Korean musk deer <i>Moschus moschiferus</i> (Artiodactyla, Ruminantia, Moschidae)	Mitochondrial DNA	2010년 출판 21권 3-4호 65-67	
Mitochondrial genome phylogeny among the five subspecies of Asiatic black bear, and comprehensive analysis of their control regions.	Mitochondrial DNA	2010년 출판 21권 3-4호 105-114	
Complete mitochondrial genome of the longtail tadpole shrimp <i>Triops longicaudatus</i> (Crustacea, Branchiopoda, Notostraca)	Mitochondrial DNA	2010년 출판 21권 5호 170-172	
Complete mitochondrial genome of the Korean stumpy bullhead <i>Pseudobagrus brevicarpus</i> (Siluriformes, Bagridae)	Mitochondrial DNA	2011년 출판 22권 3호 44-46	
Complete mitochondrial genome of the Seoul frog <i>Rana chosonica</i> (Amphibia, Ranidae): Comparison of <i>R. chosonica</i> and <i>R. plancyi</i> .	Mitochondrial DNA	2011년 출판 22권 3호 53-54	
Complete mitochondrial genome of the Baikai teal <i>Anas formosa</i> (Aves, Anseriformes, Anatidae)	Mitochondrial DNA	2011년 출판 22권 3호 74-76	
Complete mitochondrial genome of the Hodgson's bat <i>Myotis formosus</i> (Mammalia, Chiroptera, Vespertilionidae)	Mitochondrial DNA	2011년 출판 22권 4호 71-73	
Complete mitochondrial genome of the black-headed snake <i>Sibynophis collaris</i> (Squamata, Serpentes, Colubridae)	Mitochondrial DNA	2011년 출판 22권 4호 77-79	
Mitochondrial genome of the cockscomb pearl mussel <i>Cristaria plicata</i> (Bivalvia, Unionoida, Unionidae)	Mitochondrial DNA	2012년 출판 23권 1호 39-41	
Complete mitochondrial genome of the peregrine falcon <i>Falco peregrinus</i> (Aves, Falconiformes, Falconidae): genetic differences between the two individuals	Mitochondrial DNA	2012년 출판 23권 2호 139-141	
Complete mitochondrial genome of the Saunders's gull <i>Chroicocephalus saundersi</i> (Charadriiformes, Laridae)	Mitochondrial DNA	2012년 출판 23권 2호 134-136	

Complete mitochondrial genome of the Bewick's swan <i>Cygnus columbianus bewickii</i> (Aves, Anseriformes, Anatidae)	Mitochondrial DNA	2012년 출판 23권 2호 129-130	
Complete mitochondrial genome of <i>Achellognathus signifer</i> (Cypriniformes, Cyprinidae): Comparison of light-strand replication origins from six Achellognathus species	Mitochondrial DNA	2012년 출판 23권 4호 306-307	
Complete mitochondrial genome of <i>Liobagrus obesus</i> (Siluriformes, Amblycipitidae)	Mitochondrial DNA	2012년 출판 23권 4호 303-305	
Complete mitochondrial genome of the Eurasian flying squirrel <i>Pteromys volans</i> (Sciuromorpha, Scuriidae) and revision of rodent phylogeny.	Mol. Biol. Rep.	2013년 2월 40권 2호 1917-1926	
POPULATION GENETIC STRUCTURE AND PHYLOGENETIC ORIGIN OF <i>TRIOPS LONGICAUDATUS</i> (BRANCHIOPODA: NOTOSTRACA) ON THE KOREAN PENINSULA	Crustacean Biology	2013년 출판 33월 3호 382-391	
Complete mitochondrial genome of <i>Dendronephthya putteri</i> (Octocorallia, Alcyonacea) and useful candidate for developing DNA barcode markers of <i>Dendronephthya</i> species	Mitochondrial DNA	2015년 출판 26권 4호 627-628	
Complete mitochondrial genome of the Japanese wood pigeon, <i>Columba janthina janthina</i> (Columbiformes, Columbidae)	Mitochondrial DNA	2015년 in press	
A comprehensive analysis of three Asiatic black bear mitochondrial genomes (Subspecies: <i>Ussuricus</i> , <i>Formosanus</i> , <i>Mupinensis</i>) with emphasis on the complete mtDNA sequence of <i>Ursus thibetanus ussuricus</i> (Ursidae).	Mitochondrial DNA	2008년 출판 19권 418-429	
Unusual mitochondrial genome structure of the freshwater goby <i>Odontobutis platycephala</i> : rearrangement of tRNAs and an additional non-coding region	Journal of Fish Biology	2008년 출판 73권 414-428	이재성
The complete mitogenome of the hydrothermal vent crab <i>Xenograpsus testudinatus</i> (Decapoda, Brachyura) and comparison with brachyuran crabs	Comparative Biochemistry and Physiology, Part D	2009년 출판 4권 4호 290-299	
Mitochondrial DNA Sequence Variation of the Tiny Dragonfly, <i>Nannophya pygmaea</i> (Odonata: Libellulidae).	International Journal of Industrial Entomology	2007년 출판 15권 1호 47-58	
Complete mitogenome sequence of the jewel beetle, <i>Chrysochroa fulgidissima</i> (Coleoptera: Buprestidae)	Mitochondrial DNA	2009년 출판 20권 2-3호 46-60	
Complete mitochondrial genome sequence of the yellow-spotted long-horned beetle <i>Psecothea hilaris</i> (Coleoptera: Cerambycidae) and comparison with other coleopteran insects.	Mol. Cell.	2009년 출판 27권 4호 429-441	김익수
Complete Nucleotide Sequence and Organization of the Mitogenome of the Red-Spotted Apollo Butterfly, <i>Parnassius bremeri</i> (Lepidoptera: Papilionidae) and Comparison with Other Lepidopteran Insects.	Mol. Cell.	2009년 출판 28권 4호 347-363	
Complete mitochondrial genome of the endangered Lycaenid butterfly <i>Shilimiaeoides divina</i> (Lepidoptera: Lycaenidae)	Mitochondrial DNA	2015년 출판	
Estimation of divergence times in cnidarian evolution based on mitochondrial protein-coding genes and the fossil record	Molecular Phylogenetics and Evolution	2012년 출판 62권 1호 329-345	원용진
Mitochondria genetic diversity and phylogenetic relationships of Siberian flying squirrel (<i>Pteromys volans</i>) populations.	Animal Cells and Systems	2009년 출판 12권 269-277	
Genetic status of Asiatic black bear (<i>Ursus thibetanus</i>) reintroduced in to South Korea based on mitochondrial DNA and microsatellite analysis	Journal of Heredity	2011년 출판 102권 2호 165-174	이 항
Pseudo but actually genuin: <i>Rhodeus pseudosericeus</i> provides insight into the phylogeographic history of the Amur bitterling	Animal Cells and Systems	2014년 8월 출판 18권 4호 275-281	석호영

IV. 참고문헌

- 고상범, 이정현, 오홍식. 2011. 맹꽁이 개체군의 연령구조분석. 한국환경생태학회지
- 국립공원관리공단. 2005. 멸종위기종 증식·복원에 관한 연구.
- 국립생물자원관. 2007. 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 II.
- 국립생물자원관. 2008. 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 III.
- 국립생물자원관. 2009. 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 IV.
- 국립생물자원관. 2010. 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 V.
- 국립생물자원관. 2010. 한반도 생물자원 포털 (<http://www.nibr.go.kr/species/home/main.jsp>)
- 국립생물자원관. 2011. 한국의 멸종위기 야생동·식물 적색자료집 양서류·파충류. 환경부
- 국립생물자원관. 2014. 자생 생물자원의 유전자 다양성 연구-주요 동물자원의 유전자(체) 다양성 연구.
- 국립수산과학원 해조류연구센터. 2008. UPOV 대비 해조류 품종보호제도 기반 연구.
- 국립수산과학원 해조류연구센터. 2009. UPOV 대비 해조류 품종보호제도 기반 연구.
- 국토해양부. 2008. 국립해양생물자원관 표본 확보방안 연구보고서.
- 김선이, 윤태중, 김동건, 조신일, 배연재. 2008. 월동 전후 물장군(*Lethocerus deyrollei*: 물장군과, 노린재목) 개체군의 형태적 특징, 한국응용곤충학회지, 111-115.
- 김종범, 송재영. 2010. 한국의 양서파충류. 월드사이언스
- 김철수. 2007. 제주도내 멸종위기야생식물의 분포와 식생. 제주대학교 박사논문.
- 생명공학정책연구센터. 2007. 국가생명자원현황 실태조사.
- 세계자연보전연맹 종보전위원회의 재도입을 위한 지침. 2006. (IUCN Guidelines for Re-introductions, Reintroduction Specialist Group(SSC/IUCN) 한글판 번역 및 출판: 한국야생동물유전자원은행(www.cgrb.org) 및 한국식물전문가그룹.
- 양서영, 김종범, 민미숙, 서재화, 강영진. 2001. 한국의 양서류. 아카데미서적
- 원두희, 권순직, 정영철. 한국의 수서곤충. (주)생태조사단, 415pp.
- 윤일병. 1995. 수서곤충검색도설. 정행사, 262pp.
- 이일. 2006. 멸종위기종 미호종개(*Iksookimia choui*)의 분가계통 및 유전 다양성. 순천향대학교 석사학위논문
- 이정현, 장환진, 서재화. 2011. 한국 양서·파충류 생태도감. 국립환경과학원

- 이창복. 1993. 대한식물도감. 향문사.
- 조신일. 2003. 한국산 물장군 (*Lethocerus deyrollei*)의 생태학적 연구. 서울여자대학교대학원, 62pp.
- 환경부. 2006. 소백산·덕유산 멸종위기식물원 조성방안에 관한 연구.
- 환경부. 2006. 2006~2015 멸종위기야생동·식물 증식·복원 종합계획.
- 환경부. 2008. 다도해 멸종위기식물원 조성방안에 관한 연구.
- 환경부. 2009. 내장산 멸종위기식물 보전 전략 수립 연구.
- Abascal, F., Zardoya, R. and Posada, D., 2005. ProTest : selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, 21: 2104-2105.
- Adachi, J. and Hasegawa, M., 1996. Model of amino acid substitution in proteins encoded by mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol*, 42: 459-468.
- Akaike, H., 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Contr*, 19: 716-723.
- Amphibiaweb., 2014. <http://amphibiaweb.org>.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Pengrlich, C. D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., Young, I. G., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290: 457-465.
- Attardi G., 1985. Animal mitochondrial DNA: An extreme example of genetic economy, *Int Rev Cytol*, 93: 93-145.
- Bae, J. S., Kim, I., Kim, S. R., Jin, B. R. and Sohn, H. D., 2001. Mitochondrial DNA sequence variation of the mushroom pest flies, *Lycoriella mali* (Diptera: Sciaridae), and, *Coboldia fuscipes* (Diptera: Scatopsidae), in Korea. *App. Entomol. Zool. Jpn*, 36: 451-457.
- Bae, J. S., Kim, I., Sohn, H. D. and Jin, B. R., 2004. The mitochondrial genome of the firefly, *Pyrocoelia rufa*: complete DNA sequence, genome organization, and comparison with other insects. *Mole. Phylogen. Evol*, 32: 978-985.
- Bailey, N. W., Gwynne, D. T. and Ritchie, M. G., 2005. Are solitary and gregarious Mormon crickets (*Anabrus simplex*, Orthoptera, Tettigoniidae) genetically distinct? *Heredity*, 95: 166-173.
- Bendich, A. J. et al., 2004. Circular chloroplast chromosome: The grand

- illusion. *The Plant Cell*, 16: 1661–1666.
- Bibb, M. J., Van Etten, R. A., Wright, C. T., Walberg, M. W., Clayton, D. A., 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell*, 26: 167–180.
- Bossuyt, F., Milinkovitch, M. C., 2001. Amphibians as indicators of early Tertiary “out-of-India” dispersal of vertebrates. *Science*, 292: 93–95.
- Bremer, K., 1994. Bremer support and tree stability. *Cladistics*, 10: 295–304.
- Brookfield, J. F. Y., 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5: 453–455.
- 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: 111–119.
- Chakraborty, R., De Andrade, M., Daiger, S. P. and Budowle, B., 1992. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Annals of Human Genetics*, 56: 45–47.
- Che, J., Chen H. M., Yang, J. X., Jin, J. Q., Yuan, K. J., Murphy, R. W. and Zhang, Y. P., 2012. Universal COI primers for DNA barcoding amphibians. *Molecular Ecology Resources*, 12: 247–258.
- Chen, C. A., Wallace, C. C., and Wolstenholme, J., 2002. Analysis of the mitochondrial 12S rRNA gene supports a two-clade hypothesis of the evolutionary history of scleractinian corals. *Mol. Phylogenet Evol*, 23: 137–149.
- Chen, M. Y., Chaw, S. M., Wang, J. F., Villanueva, R. J. T., Nuñez, O. M. and Lin, C. P. 2015. Mitochondrial genome of a flashwing demoiselle, *Vestalis melania* from the Philippine Archipelago. *Mitochondrial DNA*,

26: 720–721.

- Chun, C. S., 1961. A morphological study on the Belostomatidae and Nepidae from Korea. *Bull. Dept. Biol., Korea Univ.*, 3: 9–11.
- Clayton, D. A., 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, 28: 693–705.
- 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.
- Doda, J. N., Wright, C. T., Clayton, D. A., 1981. Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 78: 6116–6120.
- Duellman, W. E. and Trueb, L., 1986. *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill, New York. 670.
- Earl, D. A., 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4: 359–361.
- Evanno, G., Regnaut, S., and Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.*, 14: 2611–2620.
- Excoffier, L., Lischer, H. E. L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3): 564–567.
- Fabricius, K. E., 2001. *Soft corals and sea fans: a comprehensive guide to the tropical shallow-water genera of the central West Pacific, the Indian Ocean and the Red Sea*. (Townsville, Australian Institute of Marine Science).
- Farris, J., Albert, V., Källersjö, M., Lipscomb, D. and Kluge, A., 1996. Parsimony Jackknifing outperforms Neighbor-joining. *Cladistics*, 12: 99–124.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies : an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 789–791.
- Finn, D. S., Blouin, M. S., Lytle, D. A., 2007. Population genetic structure

- reveals terrestrial affinities for a headwater stream insect. *Freshwater Biology*, 52: 1881–1897.
- Fitch, W. M., 1971. Toward defining the course of evolution: minimal change for a specific tree topology. *Syst. Zool.*, 20: 406–416.
- Flook, P. K., Rowell, C. H. and Gellissen, G., 1995. The sequence, organization, and evolution of the *Locusta migratoria* mitochondrial genome. *J. Mol. Evol.*, 41: 928–941.
- Frankham, R., Ballou, J. D. and Briscoe, D. A., 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.
- Fresco, J. R. and Alberts, B. M., 1960. The accommodation of noncomplementary bases in helical polyribonucleotides and deoxyribonucleic acids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 46: 311–321.
- Fukami, H., Budd, A. F., Paulay, G., Sole-Cava, A., Allen Chen, C., Iwao, K. and Knowlton, N., 2004. Conventional taxonomy obscures deep divergence between Pacific and Atlantic corals. *Nature* 427, 832–835.
- Gibson, T. D., Higgins. and Thompson, J., 1994. Clustal X program. EMBL, Heidelberg, Germany.
- Goudet, J., 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of heredity*, 86: 485–486.
- Guindon, S., Lethiec, F., Duroux, P. and Gascuel, O., 2005. PHYML: Online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res*, 33: 557–559.
- Gutell, R. R., Gray, M. W., Schnare, M. N., 1993. A compilation of large subunit (23S and 23S-like) ribosomal RNA structures. *Nucleic Acids Res*, 21: 3055–3074.
- Hajibabaei, M., Janzen, D. H., Burns, J. M., Hallwachs, W. and Hebert, P. D., 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 968–971.
- Hamrick, J. L. and Godt, M. J. W., 1996. Conservation Genetics of Endemic Plant Species. In: *Avise J. C., Hamrick J. L., eds.*

- Conservation Genetics: Case Histories from Nature. New York: Chapman and Hall, 281–304.
- Hansen, D. R. et al., 2007. Phylogenetic and evolutionary implications of complete chloroplast genome sequences of four early-diverging angiosperms: *Buxus*(Buxaceae), *Chloranthus*(Chloranthaceae), *Dioscorea* (Dioscoreaceae), and *Illicium* (Schisandraceae). *Mol Phylogenet Evol*, 45: 547–563.
- Hebsgaard, M. B., Andersen, N. M., Damgaard, J., 2004. Phylogeny of the true water bugs (Nepomorpha: Hemiptera–Heteroptera) based on 16S and 28S rDNA and morphology. *Systematic Entomology*, 29: 488–508.
- Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22: 4673–4680.
- Hirai, T. and Hidaka, K., 2002. Anuran-dependent predation by the giant water bug, *Lethocerus deyrollei* (Hemiptera; Belostomatidae), in rice fields of Japan, *Ecological research*, 17: 655–661.
- Hudson, R. R., Slatkin, M. and Maddison, W. P., 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132: 583–589.
- Huelsenbeck, J. P., and Ronquist, F., 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny *Bioinformatics*, 17: 754–755.
- Hwang, U. W., Friedrich, M., Tautz, D., Park, C. 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 utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *Korean J. Parasit*, 37(4): 215–228.
- Irwin, D. M., Kocher, T. D. and Wilson, A. C., 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol*, 32: 128–144.
- IUCN., 2014. <http://iucnredlist.org>
- Ivanova, M. V., Zemlak, T. S., Hanner, R. H. and Hebert, Paul, D. N., 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology*

Notes.

- Iwabe, N., Hara, Y., Kumazawa, Y., Shibamoto, K., Saito, Y., Miyata, T., Katoh, K., 2005. Sister group relationship of turtles to the birdcrocodilian clade revealed by nuclear DNA-coded proteins. *Mol Biol, Evol*, 22: 810–813.
- Johns, G. C., Avise, J. C., 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Mol Biol Evol*, 15: 1481–1490.
- Kartavtsev, Y. P., Lee, J. S., 2006. Analysis of nucleotide diversity at genes Cyt-b and Co-1 on population, species, and genera levels. Applicability of DNA and allozyme data in genetics of speciation. *Russian J Genet*, 42: 341–362.
- Kawai, Y. and Tanida, K. (Eds.), 2005. Aquatic insects of Japan: Manual with keys and illustrations. Tokai Univ. Press, Kanagawa, Japan.
- Kim, B., Kong, S., Song, J., Won, Y., 2008. Molecular Phylogeny and Divergence Time Estimation of the Soft Coral *Dendronephthya gigantea* (Alcyonacea: Nephthidae), *Korean J. Syst. Zool*, 24: 327–332.
- Kim, B. J., Lee, Y. S., An, J. H., Park, H. C., Okumura, H., Lee, H. and Min, M. S., 2008. Species and sex Identification of the Korean goral (*Nemorhaedus caudatus*) by molecular analysis of non-invasive samples. *Mol. Cells* September, 26: 314–318.
- Kim, D. S., Cho, Y. B., Koh, J. K., 1999. The factors of local disappearance and a plan of restoration for *Parnassius bremeri* form Okchon-gun, Korea. *Korean Journal of Environment*, 17: 469–479.
- Kim, D. S., Park, D. S., Kwon, Y. J., Seo, S. J., Kim, C. H., Park, S. J., Kim, D. H., Kim, J. S., Yu, H. M., 2011. Metapopulation structure and movement of a threatened butterfly *Parnassius bremeri* (Lepidoptera: Papilionidae) in Korea. *Korean Journal of Applied Entomology*, 50: 97–105.
- Kim, D. S., Kwon, Y. J., Kim, D. H., Kim, C. H., Seo, M. H., Park, S. J., Yeon, M. H., Lee, D. B., 2011a. Habitat restoration initiative for endangered species *Parnassius bremeri* (Lepidoptera: Papilionidae) in Korea. *Journal of the Korean Institute of Landscape Architecture*, 39:

98–106.

- Kim, D. S., Kwon, Y. J., Kim, D. H., Kim, C. H., Seo, M. H., Park, S. J., Yeon, M. H., Lee, D. B., 2011b. Evaluation of alternative habitat patches for the endangered *Parnassius bremeri* (Lepidoptera: Papilionidae) in Korea: evaluation of Ansa-myeon, Uiseong-gun, Gyeongdangbuk-do, Korea. Journal of the Korean Institute of Landscape Architecture, 39: 98–106.
- Kim, D. S., Park, S. J., Cho, Y., Kim, K. D., Tho, J. W., Seo, H. S., Shin, Y. K., Suh, M. H., Oh, G. J., 2012. The analysis and conservation of patch network of endangered butterfly *Parnassius bremeri* (Lepidoptera: Papilionidae) in fragmented landscapes. Korean Journal of Applied Entomology, 51: 23–31.
- Kim, I., Lee, E. M., Seol, K. Y., Yun, E. Y., Lee, Y. B., Hwang, J. S. and Jin, B. R. 2006. The mitochondrial genome of the Korean hairstreak, *Coreana raphaelis* (Lepidoptera: Lycaenidae). Insect Mol. Biol., 15: 217–225.
- Kim, I. C., Jung, S. O., Lee, Y. M., Lee, C. J., Park, J. K., Lee, J. S., 2005. The complete mitochondrial genome of the rayfish *Raja porosa* (Chondrichthyes Rajidae). DNA Seq, 16: 187–194.
- Kim, J. S., Park, J. S., Kim, M. J., Kang, P. D., Kim, S. G., Jin, B. R., Han, Y. S. and Kim, I., 2012. Complete nucleotide sequence and organization of the mitochondrial genome of eri-silkworm, *Samia cynthia ricini* (Lepidoptera: Saturniidae). J. Asia-Pac. Entomol., 14: 162–173.
- Kim, K. J., Jansen, R. K., 1994. Comparisons of phylogenetic hypotheses among different data sets in dwarf dandelions (*Krigia*, Asteraceae): additional information from internal transcribed spacer sequences oh nuclear rivosomal DNA. Pl Syst Evol, 190: 157–185.
- Kim, K. J. and Lee, H. L., 2004. Complete chloroplast genome sequences from Korean ginseng (*Panax schinseng* Nees) and comparative analysis of sequence evolution among 17 vascular plants. DNA Research, 11: 247–261.

- Kim, K. Y., Lim, Y. H. and Bang, I.C., (Unpublished). The complete nucleotide sequence and phylogenetic analysis of the mitochondrial genome in the three species of genus *Hemibarbus* and *Coreoleuciscus splendidus*.
- Kim, K. Y., Lim, Y. H., Bang, I. C. and Nam, Y. K., (Unpublished). The complete mitogenome sequences and phylogenetic analysis of two *Coreoleuciscus splendidus* strains.
- Kim, M. I., Baek, J. Y., Kim, M. J., Jeong, H. C., Kim, K. G., Bae, C. H., Han, Y. S., Jin, B. R., Kim, I., 2009. Complete nucleotide sequence and organization of the mitogenome of the red-spotted apollo butterfly, *Parnassius bremeri* (Lepidoptera: Papilionidae) and comparison with other lepidopteran insects. *Molecules and Cells*, 29: 1–10.
- Kim, M. J., Kang, A. R., Jeong, H. C., Kim, K. G. and Kim, I. 2011. Reconstructing intraordinal relationships in Lepidoptera using mitochondrial genome data with the description of two newly sequenced lycaenids, *Spindasis takanonis* and *Protantigius superans* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 61: 436–445.
- 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.
- Ko, M. S., Lee, J. S., Kim, C. H., Kim, S. S., Park, K. T., 2004. Distributional Data and Ecological Characteristics of *Parnassius bremeri* Bremer in Korea. *Korean Journal of Application of Entomology*, 43: 7–14.
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edward, S. V., Paabo, S., Villalbalnca, F. X. and Wilson, A. C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 30–36.
- 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.
- Kuhner, M. K., 2006. "LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters." *Bioinformatics* 22(6): 768–770.

- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B. and Nei, M. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 17: 1244–1245.
- 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.
- Lavin, M., Herendeen, P. S. and Wojciechowski, M. F., 2005. Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the tertiary. *Syst Biol*, 54(4): 575–594.
- Lawrence, J. F. and Newton, A. F. Jr., 1982. Evolution and classification of beetles. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13: 261–290.
- Lee, E. M., Hong, M. Y., Kim, M. I., Kim, M. J., Park, H. C., Kim, K. Y., Lee, I. H., Bae, C. H., Jin, B. R., Kim, I. 2009. The complete mitogenome sequences of the palaeopteran insects *Ephemera orientalis* (Ephemeroptera: Ephemeridae) and *Davidius lunatus* (Odonata: Gomphidae). *Genome* 52: 810–817.
- Lee, J., 1997. Gene clusters and introns of *Spirogyra maxima* chloroplast and other charophytes and their phylogenetic implications in green plants. Texas A&M University Ph.D. Thesis.
- Lee, J., 2000. Phylogeny of Charophytes – evidence from the chloroplast genome. Invited talk given at Deep Green – College Park, University of Maryland, USA.
- Lee, J., 2003. Current understanding of green plant phylogeny. Plenary Lecture. International Symposium on Plant Taxonomy: Advances and Relevance, T.M. Bhagalpur University, India.
- Lee, J. and Manhart, J. R., 2001. Transition from aquatic algae to land plants– phylogenomic evidence. Contributed talk will be given at Botany 2001, Albuquerque, New Mexico, USA.
- Lee, J. and Manhart, J. R., 2002a. Four embryophyte introns and psbB operon explains *Chlorokybus* as a basal lineage of streptophytes. *Algae*, 17: 53–58.
- Lee, J. and Manhart, J. R., 2002b. The Chloroplast rpl23 gene cluster of *Spirogyra maxima* (Charophyceae) shares many similarities with the

- angiosperm rpl23operon. *Algae*, 17: 59–68.
- Lee, J. and Manhart, J. R., 2003. Three orf-containing group I introns in chloroplast SSU of *Caulerpa sertularioides* (Ulvophyceae) and their evolutionary implications. *Algae*, 18: 183–190.
- Lee, M. Y., Hong, Y. J., Park, S. K., Kim, Y. J., Choi, T. Y., Lee, H. and Min, M. S., 2008. Application of two complementary molecular sexing methods for East Asian bird species. *Genes and Genomics*, 30(4): 365–372.
- Lee, M. Y., Lisovsky, A. A., Park, S. K., Obolenskaya, E. V., Dokuchaev, N. E., Zhang, Y., Yu, L., Kim, Y. J., Voloshina, I., Choi, T. Y., Min, M. S. and Lee, H., 2008. Mitochondrial cytochrome b sequence variation and population structure of Siberian chipmunk (*Tamias sibiricus*) in northeastern Asia and population substructure of the species in South Korea. *MOLECULES AND CELLS* December, 26: 1–10.
- Lee, S. C., Bae, J. S., Kim, I., Yang, W. J., Kim, J. K., Kim, K. Y., Sohn, H. D. and Jin, B. R., 2003. Mitochondrial DNA sequence-based population genetic structure of the firefly, *Pyrocoelia rufa* (Coleoptera: Lampyridae). *Biochem. Genet*, 41: 427–452.
- Lee, S. C., Jin, B. R., Kim, S. E., Kim, J. K., Yang, S. R., Yoon, H. J., Im, S. H. and Sohn, H. D., 2000. Mitochondrial DNA sequence variation of the firefly, *Pyrocoelia rufa*. *Korean J. Appl. Entomol*, 39: 181–191.
- Lee, S. T. and Park, E. J., 1982a. A Cladistic analysis of the Korean Oleaceae. *Korean J. Bot*, 25: 57–64.
- Lee, Y. S., Oh, J., Kim, Y. U., Kim, N., Yang, S. and Hwang, U. W., 2007. Mitome: dynamic and interactive database for comparative mitochondrial genomics in metazoan animals. *Nucleic Acid Research*, 36: D938–D942.
- Lei, Y., Xu, C., Xu, C. and Wang, R. 2014. The complete mitochondrial genome of *Celastrina hersilia* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Mitochondrial DNA*, 1–2.
- Li, J., Choi, Y. S., Kim, I., Sohn, H. D. and Jin, B. R., 2004. Genetic analysis of the diamondback moth, *Plutella xylostella*, collected from China using mitochondrial COI gene sequence. *Int. J. Indust. Entomol*, 9: 137–144.

- Li, J., Choi, Y. S., Kim, I., Sohn, H. D. and Jin, B. R., 2006. Genetic variation of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) in China inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Eur. J. Entomol*, 103: 605–611.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451–1452.
- Lin, C. P., Chen, M. Y., Huang, J. P. 2010. The complete mitochondrial genome and phylogenomics of a damselfly, *Euphaea formosa* support a basal Odonata within the Pterygota. *Gene*, 468: 20–29.
- 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.
- Lorenzo-Carballa, M. O., Thompson, D. J., Cordero-Rivera, A., Watts, P. C. 2014. Next generation sequencing yields the complete mitochondrial genome of the scarce blue-tailed damselfly, *Ischnura pumilio*. *Mitochondrial DNA* 25, 247–248.
- Lowe, T. M. and Eddy, S. R., 1997. tRNA-scan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res*, 25: 955–964.
- Manhart, J. R. and Palmer, J., 1990. The gain of two chloroplast tRNA introns marks the green algal ancestors of land plants. *Nature*, 345: 268–270.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J., 1982. *Molecular Cloning*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- McFadden, C. S., France, S. C., Sanchez, J. A. and Alderslade, P., 2006. A molecular phylogenetic analysis of the Octocorallia (Cnidaria: Anthozoa) based on mitochondrial protein-coding sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 41: 513–527.
- Medina, M., Collins, A. G., Takaoka, T. L., Kuehl, J. V. and Boore, J. L., 2006. Naked corals: skeleton loss in Scleractinia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 9096–9100.

- Milligan, B. G., Leebens-Mack, J. and Strand, A. E., 1994. Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. *Molecular Ecology*, 12: 844–855.
- Mindell, D. P., Sorenson, M. D. and Dimcheff, D. E., 1998. Multiple independent origins of mitochondrial gene order in birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95(18): 10693–10697.
- Moritz, C., 1994. Defining 'evolutionary significant unit' for conservation. *Trends Ecol. Evol.*, 9: 373–375.
- Mukai, Y., Baba, N., and Ishii, M., 2005. The water system of traditional rice paddies as an important habitat of the giant water bug, *Lethocerus deyrollei* (Heteroptera: Belostomatidae), *Jornal of Insect Conservation*, 9: 121–129.
- Muraji, M., Tachikawa, S., 2000. Phylogenetic analysis of water striders (Hemiptera: Gerroidea) based on partial sequences of mitochondrial and nuclear ribosomal RNA genes. *Entomological Science*, 3: 611–615.
- Nakai, T., 1920. On *Abeliophyllum distichum*. *Bot. Mag. Tokyo*, 34: 249–251.
- Nei, M., 1982. Proceedings of the sixth international congress of human genetics, eds. by B. Bonn-Tamir, T. Cohen and in Human genetics, the unfolding genome. Evolution of human races at the gene level. Part A: 167–181.
- Nei, M., 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nittinger, F., Haring, E., Pinsker, W., Wink, Michael and Gamauf, A., 2005. ut of Africa? Phylogenetic relationships between *Falco biarmicus* and other hierofalcons (Aves Falconidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 43(4): 321–331.
- 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, S. J., 1994a. A role for molecular genetics in biological conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 5748–5755.

- O'Brien, S. J., 1994b. Genetic and phylogenetic analyses of endangered species. *Annu. Rev. Genet.*, 28: 467–489.
- Ohashi, H., 1973. Euchrestaeae, a new tribe of the family Leguminosae. *J. Jap. Bot.*, 48: 225–234.
- Ohba, S., Izumi, Y., and Tsummuki, H., 2012. Effect of loach consumption on the reproduction of giant water bug *Kirkaldyia deyrolli*: dietary selection, reproductive performance, and nutritional evaluation. *Journal of Insect Conservation*, 16: 829–838.
- Oshida, T., Abramov, A., Yanagawa, H. and Masuda, R., 2005. Phylogeography of the Russian flying squirrel (*Pteromys volans*): Implication of refugia theory in arboreal small mammal of Eurasia. *Mol. Ecol.*, 14: 1191–1196.
- Palumbi, S., Martin, A., Romano, S., McMillan, W. O., Stice, L., Grabowski, G., 1991. The simple fool's guide to PCR, v.2.0. Edited by Palumbi S. Honolulu, HI: Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory. University of Hawaii.
- Park, C. W., 2007. The genera of vascular plants of Korea. Academy publishing co., Seoul.
- Park, K. T., Kim, S. S., 1997. Atlas of butterflies. Korea Research institute of bioscience and biotechnology and center for insect systematic, Korea.
- Peakall, R. and Smouse, P. E., 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28: 2537–2539.
- Pereira, S. L. and Baker, A. J., 2004. Vicariant speciation of curassows (Aves, Cracidae): a hypothesis based on mitochondrial DNA phylogeny. *The Auk*, 121(3): 682–694.
- Perez-Goodwyn, P. J., 2006. Taxonomic revision of the subfamily Lethocerinae Lauck & Menke (Heteroptera: Belostomatidae), Stuttgarter Beitrage zur Naturkunde. A (Biologie), 695: 1–71.
- Pont-Kingdon, G., Okada, N. A., Macfarlane, J. L., Beagley, C. T., Watkins-Sims, C. D., Cavalier-Smith, T., Clark-Walker, G. D. and Wolstenholme, D. R., 1998. Mitochondrial DNA of the coral Sarcophyton

- glaucum contains a gene for a homologue of bacterial MutS: a possible case of gene transfer from the nucleus to the mitochondrion. *J Mol Evol*, 46: 419–431.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- Qiu, Y. L. et al. 1999. The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. *Nature* 402:404–407 (see Erratum: Qiu Y–L, Lee J, et al. 2000. *Nature*, 405: 101).
- Qiu, Y. L. et al. 2000. Phylogeny of basal angiosperms: analyses of five genes from three genomes. *Int J Plant Sci*, 161: S3–S2.7
- Qiu, Y. L. and Lee, J., 2000. Transition to a land flora: A molecular phylogenetic perspective. *J Phycol*, 36: 799–802 (Invited review).
- Qiu, Y. L. et al. 2001. Was the ANITA Rooting of the Angiosperm Phylogeny Affected by Long–Branch Attraction. *Mol Biol Evol*, 18: 1745–1753.
- Qiu, Y. L. et al. 2005. Phylogenetic analyses of basal angiosperms based on nine plastid, mitochondrial, and nuclear genes. *Int J Plant Sci* 16: 815–842.
- Qiu, Y. L. et al. 2006. The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 15511–15516.
- Qiu, Y. L. et al. 2007. A non–flowering land plant phylogeny inferred from nucleotide sequences of seven chloroplast, mitochondrial and nuclear genes. *International Journal of Plant Sciences*, 168: 691–708.
- Qiu, Y. L. and Palmer, J., 1999. "Phylogeny of early land plants: insights from genes and genomes." *Trends in Plant Science*, 4: 26–30.
- Qiu, Y. L. and Palmer, J., 2004. Many independent origins of trans splicing of a plant mitochondrial group II intron. *J Mol Evol*, 59: 80–89.
- Rafael, O. de S., Streicher, J. W., Sekonyela, R., Forlani, M. C., Loader, S. P., Greenbaum, E., Richards, S. and Haddad, C. F. B., 2012. Molecular phylogeny of microhylid frogs (Anura: Microhylidae) with emphasis on relationships among New World genera. *BMC Evolutionary Biology*.

- doi: 10.1186/1471-2148-12-241.
- Raymond, M. and Rousset, F., 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of heredity*, 86: 248–249.
- Rehder, A., 1940. *Manual of Cultivated Trees and Shrubs*, Second ed. The Macmillan Company, New York, NY.
- Rentz, D. C. and Miller, G. R., 1971. Ecological and faunistic notes on a collection of Orthoptera from South Korea. *Ent. News*, 82: 253–273.
- Rousset, F., 2008. Genepop'007: a complete reimplement of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources*, 8: 103–106.
- Rozas, J. and Rozas, R., 1995. DnaSP, DNA sequence polymorphism: an interactive program for estimating Population Genetics parameters from DNA sequence data. *Comput. Applic. Biosci*, 11: 621–625.
- Rumpho, M. E., Worful, J. M., Lee, J., Kannan, K., Tyler, M., Bhattacharya, D., Moustafa, A. and Manhart, J. R., 2008. Horizontal gene transfer of the algal nuclear gene *psbO* to the photosynthetic sea slug *Elysia chlorotica*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 17867–17871.
- Saitou, N. and Nei, M., 1987. The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol*, 4: 406–425.
- Sakagami, M., Miyajima, A., Wada, K., and Kamada, M., 2015. Claw-waving behavior by male *Uca lactea* (Brachyura, Ocypodidae) in vegetated and un-vegetated habitats. *Journal of Crustacean Biology*, 35: 155–158.
- Schultheis, A. S., Weigt, L. A. and Hendricks, A. C., 2002. Arrangement and structural conservation of the mitochondrial control region of two species of Plecoptera: utility of tandem repeat-containing regions in studies of population genetics and evolutionary history. *Insect Mol Biol*, 11: 605–610.
- Shin, P. K. S., Yiu, M. W., and Cheung, S. G., 2004. Behavioural adaptations of the fiddler crabs *Uca vocans borealis* (Crane) and *Uca lactea lactea* (De Haan) for coexistence on an intertidal shore. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 37: 147–160.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994.

- Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 651–701.
- 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 composition of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am*, 87: 651–701.
- Snow, D. W. and Perrins, C. M., 1998. *The Birds of the Western Palearctic Concise Edition*.
- Swofford, D. L., 1998. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony and other methods. Version 4.0 Sinauer Asso. Inc., Massachusetts, USA.
- Swofford, D. L., 2000. PAUP (beta), version 4.0b10. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Swofford D. L., 2002. PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods) Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- 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.
- Tamada, T., Kurose, N. and Masuda, R. Genetic diversity in domestic cats *Felis catus* of the Tsushima Islands, based on mitochondrial DNA cytochrome *b* and control region nucleotide sequences. *Zool. Sci.*, 22(6): 627–633.
- Tamada, T., Siriaronrat, B., Subramaniam, V., Hamachi, M., Lin, L. K., Oshida, T., Rerkamnuaychoke, W. and Masuda, R., 2008. Molecular diversity and phylogeography of the Asian leopard cat, *Felis bengalensis*, inferred from mitochondrial and Y-chromosomal DNA sequences. *Zool. Sci.*, 25: 154–163.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis(MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 1596–1599.
- Tanaka, U. T., Matsui, M., Chen, S. L. et al., 1998. Phylogenetic relationships of brown frogs from Taiwan and Japan assessed by

- mitochondrial cytochrome b gene sequences (*Rana*: Ranidae). Zoological Science, 15: 283-288.
- Tang, M., Tan, M., Meng, G., Yang, S., Su, X., Liu, S., Song, W., Li, Y., Wu, Q., Zhang, A., Zhou, X. 2014. Multiplex sequencing of pooled mitochondrial genomes—a crucial step toward biodiversity analysis using mito-metagenomics. Nucleic Acids Res., 42, e166–e166.
- Taylor, H., 1945. Cytotaxonomy and phylogeny of the Oleaceae. Brittonia, 5: 337–369.
- Teacher, A. G. F., Griffiths, D. J., 2011. HapStar: automated haplotype network layout and visualization. Molecular Ecology Resources, 11(1): 151–153.
- Thomas, C., 2009. Plant Bar Code soon to become reality. Science, 325: 526.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G., 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res, 24: 173–216.
- Townzen, J. S., Brower, A. V., Judd, D. D., 2008. Identification of mosquito bloodmeals using mitochondrial cytochrome oxidase subunit I and cytochrome b gene sequences. Medical and Veterinary Entomology, 22: 386–393.
- Wang, J. F., Chen, M. Y., Chaw, S. M., Morii, Y., Yoshimura, M., Sota, T., Lin, C. P. 2015. Complete mitochondrial genome of an enigmatic dragonfly, *Epiophlebia superstes* (Odonata, Epiophlebiidae). Mitochondrial DNA, 26, 718–719.
- Weir, B. S. and Cockerham, C. C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution, 38: 1358–1370.
- Wink, M., Seibold, I., Lotfikhah, F. and Bednarek, W., 1998. Molecular systematics of holarctic raptors (Order Falconiformes). In: Chancellor, R.D., Meyburg, B.-U. & Ferrero, J.J. (eds.): Holarctic Birds of Prey: 29–48.
- Xia, X., Zhang, L. and Hao, J. S. 2015. The complete mitochondrial genome of the Orange Hairstreak *Japonica lutea* (Lepidoptera: Lycaenidae: Theclinae). Mitochondrial DNA, 1–3.

- Yamauchi, M. M., Miya, M. U., Nishida, M. 2004. Use of a PCR-based approach for sequencing whole mitochondrial genomes of insects: two examples (cockroach and dragonfly) based on the method developed for decapod crustaceans. *Insect Mol. Biol.*, 13: 435–442.
- Yamaguchi, T., and Tabata, S., 2004. Territory usage and defence of the fiddler crab, *Uca lactea* (De Haan) (Decapoda, Brachyura, Ocypodidae). *Crustaceana*, 77: 1055–1080.
- Yu, P., Cheng, X., Ma, Y., Yu, D., Zhang, J. 2014. The complete mitochondrial genome of *Brachythemis contaminata* (Odonata: Libellulidae). *Mitochondrial DNA*, 1–2.
- Zakharov, E. V., 2001. Natural hybridization between two swallowtail species *Parnassius nomion* and *Parnassius bremeri* (Lepidoptera, Papilionidae) shown by RAPD-PCR. *Russian Journal of Genetics*, 37: 375–383.
- Zhang, L., Huang, D., Sun, X., Hao, J., Hao, J., Peng, C. and Yang, Q. 2013–a. The complete mitochondrial genome of *Cupido argiades* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Mitochondrial DNA*, 24: 475–477.
- Zhang, L., Hao, J. S., Huang, D. Y., Sun, X. Y., Hao, J. J., Peng, C. M. and Yang, Q. 2013–b. Complete mitochondrial genomes of the Bright Sunbeam *Curetis bulis* and the Small Copper *Lycaena phlaeas* (Lepidoptera: Lycaenidae) and their phylogenetic implications. *Genet. Mol. Res.*, 12: 4434–4445.
- Zug, G. R., 1993. *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. Academic Press. San Diego, 527.

<첨부 자료 I>

- 국립생물자원관. 2007. 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 II.
- 국립생물자원관. 2009. 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 IV.
- 국립생물자원관. 2012. 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 VII.
- 국립생물자원관. 2013. 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 VIII.
- 국립생물자원관. 2014. 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 IX.
- 김근식. 2012. 한국산 모래무지아과(Gobioninae) 멸종위기 어류의 보전유전학적 연구. 순천향대학교 박사논문.
- 김근식, 윤영은, 강인중, 양상근, 방인철. 2009. 금강과 만경강에 서식하는 멸종위기 어류 감돌고기 *Pseudopungtungia nigra*의 AFLP에 의한 유전 다양성 및 집단구조. 한국어류학회지, 21: 76-80.
- 김영섭, 유미현, 정배동, 김종택. 2010. Mitochondrial DNA Cytochrome *b* 분석을 통한 한국 내 삶의 유전적 다양성 조사. 한국가축위생학회지, 33: 353-359.
- 김은미, 전연선, 김세재, 강창완, 원현규, 정길상. 2014. 제주도 한반도 및 대만 내 팔색조의 생태적 서식특성 분석을 위한 유전적 접근. 한국환경복원기술학회지, 17: 81-90.
- 변화근, 김근식, 송하운, 방인철. 2009. 한국산 독중개속 어류 개체군들의 형태 변이 및 AFLP 분석을 통한 유전 변이. 한국어류학회지, 21: 67-75.
- 환경부. 2009a. 멸종위기어류 미호종개의 유전 다양성 분석, 인공증식 및 생태계 복원 기술 개발에 관한 연구.
- 환경부. 2009b. 환경부 지정 멸종위기 종(계류)의 증식·복원을 위한 연구.
- 환경부. 2010. 4대강 서식 멸종위기 담수어류 증식·복원 연구.
- 환경부. 2011a. 멸종위기어류 얼룩새코미꾸리의 인공증식 및 방류종묘 모니터링 체계 구축.
- 환경부. 2011b. 멸종위기 토종 파충류의 표준증식기술 개발 및 기초생태 연구.
- An, J., Kim, M. J., Park, D., Lee, J. Krukov, V., Kim, K. S., Lee, H. and Min, M. S., 2010. Development of 10 microsatellite loci from the Korean Ratsnake (*Elaphe schrenckii*) and its application across *Elaphe* species from South Korea, Russia, and China. Genes & Genomics, 32: 401-405.
- Brito, P. H., 2007. Contrasting patterns of mitochondrial and microsatellite genetic structure among Western European populations of tawny owls

- (*Strix aluco*). *Molecular Ecology*, 16: 3423-3437.
- Burland, T. M., Barratt, E. M., Beaumont, M. A. and Racey, P. A., 1999. Population genetic structure and gene flow in a gleaning bat, *Plecotus auritus*. *Proceedings of the Royal Society B*, 266: 975-980.
- Cassens, I., Tiedemann, R., Suchentrunk, F. and Hartl, G. B., 2000. Mitochondrial DNA Variation in the European Otter (*Lutra lutra*) and the Use of Spatial Autocorrelation Analysis in Conservation. *Journal of Heredity*, 91: 31-35.
- Choi, S. K., Chun, S., An, J., Lee, M. Y., Kim, H. J., Min, M. S., Kwon, S. W., Choi, T. Y., Lee, H. and Kim, K. S., 2015. Genetic diversity and population structure of the long-tailed goral, *Naemorhedus caudatus*, in South Korea. *Genes & Genetic Systems*, 90: 31-41.
- Chu, J. Y., 2013. Population Structure and Genetic Diversity of Amur nine-spined Stickleback in South Korea. Yeungnam University, M.A. Thesis, pp. 61.
- Chun, S., Chung, E., Voloshina, J., Chong, J. R., Lee, H. and Min, M. S., 2012. Genetic Diversity of Korean Tree Frog (*Hyla suweonensis* and *Hyla japonica*): Assessed by Mitochondrial Cytochrome *b* Gene and Cytochrome Oxidase Subunit I Gene. *Korean Journal of Herpetology*, 4: 31-41.
- Cohen, T. M., Narkiss, T., Dolev, A., Ben-Ari, Y., Kronfeld-Schor, N., Guter, A., Saltz, D. and Bar-Gal, K., 2013. Genetic Diversity of the Eurasian Otter (*Lutra lutra*) Population in Israel. *Journal of Heredity*, 104: 192-201.
- Dallas, J. F., Bacon, P. J., Carss, D. N., Conroy, J. W. H., Green, R., Jefferies, D. J., Kruuk, H., Marshall, F., Piertney, S. B. and Racey, P. A., 1999. Genetic diversity in the Eurasian otter, *Lutra lutra*, in Scotland. Evidence from microsatellite polymorphism. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68: 73-86.
- Hailer, F., Helander, B., Folkestad, A. O., Ganusevich, S. A., Garstad, S., Hauff, P., Koren, C., Nygård, T., Volke, V., Vilà, C. and Ellegren, H., 2006. Bottlenecked but long-lived: high genetic diversity retained in white-tailed eagles upon recovery from population decline. *Biology*

- Letters, 2: 316-319.
- Hailer, F., Helander, B., Folkestad, A. O., Ganusevich, S. A., Garstad, S., Hauff, P., Koren, C., Materov, V. B., Nygård, T., Rudnick, J. A., Shiraki, S., Skarphedinsson, K., Volke, V., Wille, F. and Vilà, C., 2007. Phylogeography of the white-tailed eagle, a generalist with large dispersal capacity. *Journal of Biogeography*, 34: 1193-1206.
- Harlin-Cognato, A., Bickham, J. W., Laughlin, T. R. and Honeycutt, R. L., 2006. Glacial refugia and the phylogeography of Steller's sea lion (*Eumatopias jubatus*) in the North Pacific. *Journal of Evolutionary Biology*, 19: 955-969.
- Henry, P., Miquelle, D., Suimoto, T., McCullough, D. R., Caccone, A. and Russello, M. A., 2009. *In situ* population structure and *ex situ* representation of the endangered Amur tiger. *Molecular Biology*, 18: 3173-3184.
- Hoffman, J. I., Matson, C. W., Amos, W., Loughlins, T. R. and Bickham, J. W., 2006. Deep genetic subdivision within a continuously distributed and highly vagile marine mammal, the Steller's sea lion (*Eumatopias jubatus*). *Molecular Ecology*, 15: 2821-2832.
- Honnen, A. C., Hailer, F., Kenntner, N., Literák, I., Dubská, L. and Zachos, F. E., 2010. Mitochondrial DNA and nuclear microsatellites reveal high diversity and genetic structure in an avian top predator, the white-tailed sea eagle, in central Europe. *Biological Journal of the Linnean Society*, 99: 727-737.
- Honnen, A. C., Petersen, B., Kaßler, L., Elmeros, M., Roos, A., Sommer, R. S. and Zachos, F. E., 2011. Genetic structure of Eurasian otter (*Lutra lutra*, Carnivora: Mustelidae) populations from the western Baltic sea region and its implications for the recolonization of north-western Germany. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 49: 169-175.
- Honnen, A. C., Roos, A., Stjernberg, T. and Zachos, F. E., 2015. Genetic analysis of Eurasian otters (*Lutra lutra*) reveals high admixture in Finland and pronounced differentiation in Sweden. *Mammalian Biology*, 80: 47-53.

- Huebinger, R. M., Louis Jr, E. E., Gelatt, T., Rea, L. D. and Bickham, J. W., 2007. Characterization of eight microsatellite loci in Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). *Molecular Ecology Notes*, 7: 1097-1099.
- Kang, A. R., Kim, K. G., Park, J. W. and Kim, I., 2012. Genetic diversity of the dung beetle, *Copris tripartitus* (Coleoptera: Scarabaeidae), that is endangered in Korea. *Entomological Research*, 42: 247-261.
- Kiefer, A., Mayer, F., Kosuch, J., von Helversen, O. and Veith, M., 2002. Conflicting molecular phylogenies of European long-eared bats (*Plecotus*) can be explained by cryptic diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25: 557-566.
- Kim, D., Conway, K. W., Jeon, H. B., Kwon, Y. S. and Won, Y. J., 2013. High genetic diversity within the morphologically conservative dwarf loach, *Kichulchoia brevifasciata* (Teleostei: Cobitidae), an endangered freshwater fish from South Korea. *Conservation Genetics*, 14: 757-769.
- Koen, E. L., Bowman, J., Murray, D. L. and Wilson, P. J., 2014. Climate change reduces genetic diversity of Canada lynx at the trailing range edge. *Ecography*, 37: 754-762.
- Koh, H. S., Yang, B. G., Lee, B. K. and Lee, J. H., 2002. Sequence Diversity of Mitochondrial Cytochrome *b* Gene in Grey Goral *Naemorhedus caudatus* (Artiodactyla, Bovidae) from Korea. *The Korean Journal of Systematic Zoology*, 18: 13-21.
- Krojerová-Prokešová, J., Barančeková, M., Voloshina, I., Myslenkov, A., Lamka, J., and Koubek, P., 2013. Dybowski's Sika Deer (*Cervus nippon hortulorum*): Genetic Divergence between Natural Primorian and Introduced Czech Populations. *Journal of Heredity*, 104: 312-326.
- Langguth, T., Honnen, A. C., Hailer, F., Mizera, T., Skoric, S., Väli, Ü. and Zachos, F. E., 2013. Genetic structure and phylogeography of a European flagship species, the white-tailed sea eagle *Haliaeetus albicilla*. *Journal of Avian Biology*, 44: 263-271.
- Lee, M., Y., Hyun, J. Y., Lee, S. J., An, J., Lee, E., Min, M. S., Kimura, J., Kawada, S. i., Kurihara, N., Luo, S. J., O' Brien, S. J., Johnson, W. E. and Lee, H., 2012. Subspecific Status of the Korean Tiger Inferred by Ancient DNA Analysis, *Animal Systematics, Evolution and Diversity*, 28:

48-53.

- Liu, H., Li, Y., Liu, X., Xiong, D., Wang, L., Zou, G., Wei, Q., 2015. Phylogeographic structure of *Brachymystax lenok* tsinlingensis (Salmonidae) populations in the Qinling Mountains, Shaanxi, based on mtDNA control region. Mitochondrial DNA, 26: 532-537.
- Luo, S. J., Kim, J. H., Johnson, W. E., van der Walt, J., Martensn, J., Yuhki, N., Miquelle, D. G., Uphyrkina, O., Goodrich, J. M., Quigley, H. B., Tilson, R., Brady, G., Martelli, P., Subramaniam, V., McDougal, C., Hean, S., Huang, S. -Q., Pan, W., Karanth, U. K., Sunquist, M., Smith, J. L. D. and O' Brien, 2004. Phylogeography and Genetic Ancestry of Tigers (*Panthera tigris*). PLoS Biology, 2: e442.
- Luo, S. J., Johnson, W. E., Martenson, J., Antunes, A., Martelli, P., Uphyrkina, O., Traylor-Holzer, K., Smith, J. L. D. and O' Brein, S. J., 2008. Subspecies Genetic Assignments of Worldwide Captive Tigers Increase Conservation Value of Captive Populations. Current Biology, 18: 592-596.
- Min, M. -S., Park, S. K., Che, J., Park, D. S. and Lee, H., 2008. Genetic Diversity among Local Populations of the Gold-spotted Pond Frog, *Rana plancyi chosonica* (Amphibia: Ranidae), Assessed by Mitochondrial Cytochrome *b* Gene and Control Region Sequences. Korean Journal of Systematic Zoology, 24: 25-32.
- Mizuno, A. W., Onuma, M., Takahashi, M. and Ohtaishi, N., 2003. Population Genetic Structure of the Spotted Seal *Phoca largha* along the Coast of Hokkaido, Based on Mitochondrial DNA Sequences. Zoological Science, 20: 783-788.
- Mucci, N., Arrendal, J., Ansorge, H., Bailey, M., Bodner, M., Delibes, M., Ferrando, A., Fournier, P., Fournier, C., Godoy, J. A., Hajkova, P., Hauer, S., Heggberget, T. M., Heidecke, D., Kirjavainen, H., Krueger, H., Kvaloy, K., Lafontaine, L., Lanszki, J., Lemarchand, C., Liukko, U. M., Loeschcke, V., Ludwig, G., Madsen, A. B., Mercier, L., Ozolins, J., Paunovic, M., Pertoldi, C., Piriz, A., Prigioni, C., Santos-Reis, M., Luis, T. S., Stjernberg, T., Schmid, H., Suchentrunk, F., Teubner, J., Tornberg, R., Zinke, O. and Randi, E., 2010. Genetic diversity and

- landscape genetic structure of otter (*Lutra lutra*) populations in Europe. Conservation Genetics, 11: 583-599.
- Nakagawa, E., Kobayashi, M., Suzuki, M. and Tsubota, T., 2010. Genetic Variation in the Harbor Seal (*Phoca vitulina*) and Spotted Seal (*Phoca largha*) Around Hokkaido, Japan, Based on Mitochondrial Cytochrome *b* Sequences. Zoological Science, 27: 263-268.
- O' Corry-Crowe, G., Gelatt, T., Rea, L., Bonin, C. and Rehberg, M., 2014. Crossing to safety: dispersal, colonization and mate choice in evolutionarily distinct populations of Steller sea lions, *Eumetopias jubatus*. Molecular Ecology, 23: 5415-5434.
- Onuma, M., Kocherga, M., Tyagunin, V., Parilov, M., Sasin, A., Edyta, S. and Kuwana, T., 2011. Evaluation of Genetic Diversity of Wild Oriental White Stork (*Ciconia boyciana*) in Russia and Their Phylogenetic Relationship with Extinct Populations in Japan. Japanese Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 16: 139-144.
- Park, H. C., Suk, H. Y., Jeong, E. J., Park, D. S., Lee, H. and Min, M. S., 2014. Population genetic structure of endangered Mongolian racerunner (*Eremias argus*) from the Korean Peninsula. Molecular Biology Reports, 41: 7339-7347.
- Pinsky, M. L., Newsome, S. D., Dickerson, B. R., Fang, Y., Tuinen, M., V., Kennett, D. J., Ream, R. R. and Hadly, E. A., 2010. Dispersal provided resilience to range collapse in a marine mammal: insights from the past to inform conservation biology. Molecular Ecology, 19: 2418-2429.
- Poulakakis, N., Antoniou, A., Mantziou, G., Parmakelis, A., Skartsi, T., Vasilakis, D., Elorriaga, J., Piente, J. D. L., Gavashelishvili, A., Ghasabyan, M., Katzner, T., Mcgrady, M., Batbayar, N., Fuller, M. and Natsagdorj, T., 2008. Population structure, diversity, and phylogeography in the near-threatened Eurasian black vultures *Aegypius monachus* (Falconiformes; Accipitridae) in Europe: insights from microsatellite and mitochondrial DNA variation. Biological Journal of the Linnean Society, 95: 859-872.
- Poyarkov, N. D., Klenova, A. V. and Kholodova, M. V., 2010. Genetic Diversity of Swan Goose (*Anser cygnoides* L.) in Russia: Analysis of

- the Mitochondrial DNA Control Region Polymorphism. Russian Journal of Genetics, 46: 493-496.
- Sakai, H., Yamamoto, C. and Iwata, A., 1998. Genetic divergence, variation and zoogeography of a freshwater goby, *Odontobutis obscura*. Ichthyological Research, 45: 363-376.
- Suzuki, D., Ota, H., Oh, H. S. and Hikida, T., 2011. Origin of Japanese Populations of Reeves' Pond Turtle, *Mauremys reevesii* (Reptilia: Geoemydidae), as Inferred by a Molecular Approach. Chelonian Conservation and Biology, 10: 237-249.
- Trujillo, R. G., Loughlin, T. R., Gemmell, N. J., Patton, J. C. and Bickham, J. W., 2004. Variation in Microsatellites and mtDNA across the Range of the Steller Sea Lion, *Eumetopias jubatus*. Journal of Mammalogy, 85: 338-346.
- Uphyrkina, O., Johnson, W. E., Quigley, H., Miquelle, D., Marker, L., Bush, M. and O' Brien, S. J., 2001. Phylogenetics, genome diversity and origin of modern leopard, *Panthera pardus*. Molecular Ecology, 10: 2617-2633.
- Wu, H., Wan, Q. H. and Fang, S. G., 2004. Two genetically distinct units of the Chinese sika deer (*Cervus nippon*): Analyses of mitochondrial DNA variation. Biological Conservation, 119: 183-190.
- Yamazaki, Y. and Goto, A., 1998. Genetic structure and differentiation of four *Lethenteron* taxa from the Far East, deduced from allozyme analysis. Environmental Biology, 52: 149-161.
- Yang, S. Y., Kim, J. B., Min, M. S., Sun, J. H. and Kang, Y. J., 2000. Genetic diversity and population structure of *kaloula borealis* (anura, microhylidae) in Korea. Korean Journal of Biological Sciences, 4: 39-44.
- Zhang, B., Fang, S. G. and Xi, Y. M., 2004. Low genetic diversity in the Endangered Crested Ibis *Nipponia nippon* and implications for conservation. Bird Conservation International, 14: 183-190.

자생 생물자원의 유전자 다양성 연구(동물 분야)

발행일: 2015년 11월

발행인: 국립생물자원관장

발행처: 국립생물자원관 동물자원과

본 보고서는 멸종 위기종의 유전자원 확보와 보존 및 관리를 위한 유전자 분석 연구 결과를 수록하였습니다. 국립생물자원관의 사전 승인 없이 본 보고서의 무단 복사 및 전제를 금합니다. 본 보고서의 대하여 문의하고자 하는 경우에는 국립생물자원관 동물자원과(전화: 032-590-7360, 7157 팩스: 032-590-7250)로 연락바랍니다.

