

한우 생산이력제에 활용 가능한 Microsatellite의 분석과 선발

임현태*·민희식*·문원곤*·이재봉*·김재환*·조인철**·이학교***·이용욱****·이정규*·전진태*
경상대학교 응용생명과학부*, 농촌진흥청 난지농업연구소**,
한경대학교 유전정보연구소***, (주)젠닥스****

Analysis and Selection of Microsatellites Markers for Individual Traceability System in Hanwoo

H. T. Lim*, H. S. Min*, W. G. Moon*, J. B. Lee*, J. H. Kim*, I. C. Cho**, H. K. Lee***,
Y. W. Lee****, J. G. Lee* and J. T. Jeon*
Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University*,
National Institute of Subtropical Agriculture, R. D. A.**,
Genetic Informatics Center, Hankeong National University***, GenDocs Cooperation****

ABSTRACT

To test applicability to the Hanwoo traceability system, twenty microsatellite markers were selected and analyzed. MSA, CERVUS, FSTAT, GENEPOP, API_CALC and PHYLIP software was employed serially to estimate heterozygosity, polymorphic information content, F-statistics, identity probability, exclusion probability and genetic distance. Eleven microsatellite markers (*TGLA53*, *TGLA227*, *ETH185*, *TGLA122*, *BM4305*, *INRA23*, *ILSTS013*, *BMS1747*, *BM2113*, *BL1009*, and *ETH3*) were selected based on their high heterozygosity values. Identity probability using these markers is one hundred times higher than when using StockMakers™ of Applied Biosystems. This indicates the selected microsatellite markers are appropriate and effective for use in the Hanwoo traceability system. Additionally, estimates of D_A genetic distance and pairwise- F_{ST} can be utilized to identify genetic relationships between adjacent farms.

(Key words : Hanwoo, Trscability, Microsatellite, Heterozygosity)

I. 서 론

건강에 대한 관심이 늘어나면서 식육에 대한 소비자들의 요구도 단순히 양적인 측면에서 안정성과 질 위주로 변화하고 있으며, 특히 생산지(브랜드) 그리고 생산에서 소비에 이르는 유통과정상의 신뢰성을 중요하게 생각하고 있다. 이런 변화에 따라 유럽연합에서는 유통되는 쇠고기에 대한 생산이력제를 실시하여 개체번호, 생산지, 생산자 등 다양한 정보를 표시함으로써

써 축산물의 신뢰성을 높이고 있다. 최근 들어 한우육의 경우에도 수량적인 측면보다는 축산물의 안전성과 품질, 제품을 구매하는데 있어서 제품의 진위성 등에 초점이 맞춰지고 있는 실정이다. 특히 축산시장의 개방화가 가속화되면서 수입쇠고기 및 생육의 수입이 자유화됨에 따라 한우를 이들과 차별하기 위한 품종 혹은 개체를 정확하게 동정할 수 있는 기법이 절실히 요구되고 있다.

가축을 포함한 동물 및 그의 생산물의 동정

Corresponding author : J. T. Jeon, Department of Animal Science, Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Gyeongnam, Korea. Tel: 055-751-5516. Fax: 055-756-7171. E-mail: jtjeon@nongae.gsnu.ac.kr.

을 위한 방법으로 기존에는 혈액형 및 생화학적 지표의 다형성 분석방법을 사용하였으나 이런 기법들은 분석을 위해 사용되는 조직들이 한계가 있다는 단점을 가지고 있다. 더구나 소에 있어서 혈액형검사는 정확한 부계혈통을 결정하지 못하는 단점이 있다(Glowatzki-Mullis 등, 1995). 이로 인해 최근 들어 DNA 다형성에 기초한 다양한 유전적 분석방법들이 개발되었으며, 이를 이용하여 품종간 및 개체간의 동정이 이루어지고 있다(Pelman 등, 1998).

Microsatellite(MS)는 1-5 bp의 일정 염기서열이 반복되는 특징을 갖으며, 포유류의 게놈 전체에서 대략 50,000~100,000 좌위에서 나타난다. 또한 이들은 상대적으로 높은 다형성을 나타내며, polymerase chain reaction(PCR) 기법을 이용한 이들의 증폭을 통하여 쉽게 이들의 대립유전자형을 분석할 수 있다. 현재 소에서 약 천 개의 MS 좌위가 밝혀져 있으며, 이들의 특성 및 염색체상의 위치파악이 이루어져 왔다. 이들 중 품종간, 개체간 다형성이 높은 MS marker들을 선별하여 혈통검정을 위한 수단으로서 사용되고 있다(Barendse 등, 1994; Kappes 등, 1997). 이 과정에서 여러 개의 primer를 혼합하여 증폭하는 multiplex PCR 기법이 사용되고 있으며, 이를 통하여 효율적인 혈통검정 및 연관지도 작성 등이 행해지고 있다. 이러한 분석을 통하여 인간을 포함한 포유류, 어류, 식물 등을 대상으로 이루어지는 집단유전분야에서 유전적 다양성에 기초한 집단간, 집단내 유전성분과 연관성 분석을 위한 중요한 DNA marker로서 인지되고 있다(Achmann 등, 2004; Ayub 등, 2003; Borrell 등, 2004; Fang 등, 2005; Jakse 등, 2004; Metta 등, 2004).

전 세계적으로 유전자원 보존과 연관되어 재래가축의 중요성이 부각되면서 European cattle, Spanish native cattle, Belgian cattle, French cattle 등 각 지역을 대표하는 재래 소품종들을 대상으로 MS 분석을 통하여 각 품종의 유전적 특성을 파악하고 타 품종과의 차별화에 노력을 기울이고 있다(Maudet 등, 2002; MacHugh 등, 1998; Martin-Burriel 등, 1999; Peelman 등, 1998; Schnabel 등, 2000). 그러나 MS 분석을 통한 한

우의 유전적인 분석은 미흡하여 개체간의 동정은 물론 타 품종간의 정확한 식별에 사용가능성 여부에 대한 연구(Yoon 등, 2005)가 수행되고는 있으나 미미한 실정이다.

따라서 본 연구는 경상남도 4 지역의 농장을 대상으로 20개 MS 좌위를 분석하여 각 좌위에 대한 대립유전자형의 빈도와 분포를 기초로 한우의 생산이력체에 적용 가능한 MS set를 선별하고, 집단간, 개체간의 유전적 다형성 지표 및 동일개체 출현빈도 등을 추정할 수 있는 통계 분석방법의 설정을 위하여 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시 동물과 DNA

한우의 혈액은 경상남도의 사천(Sa), 고성(Go) 진성(Ji), 군북(Gu)의 4개 지역 한우농가에서 각각 40두, 43두, 33두, 47두 총 163두의 번식우 혈액을 채취하여 분석에 사용하였다. 한우의 혈액에서 genomic DNA의 분리는 Genomic DNA 추출 키트(Promega, USA)를 이용하였다.

2. MS marker의 선별

본 실험에 사용된 MS marker는 Applied Biosystems사의 Stockmarker™, International Society for Animal Genetics(http://www.isag.org.uk/02_PV_panels_LPCGH.doc)와 Roslin 연구소(<http://www.projects.roslin.ac.uk/cdiv/markers.html>)에서 제안한 소의 다형성 분석용 MS marker들을 기초로 하여 선정하였다.

3. Multiplex PCR 및 MS 분석

Multiplex PCR은 template DNA 0.03 μ g, set primer 각각 0.7, 0.4, 0.8, 0.1 μ mol, Taq DNA polymerase 0.5 unit (TaKaRa, Japan), 10 \times buffer 1 μ l, 0.25 mM dNTP의 조성에 증류수를 첨가하여 최종 부피를 10 μ l로 반응하였으며, PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 15분간 denaturation을 실시한 후 94 $^{\circ}$ C에서 50초, 55 $^{\circ}$ C에서 70초, 72 $^{\circ}$ C에서 60

초를 1 cycle로 하여 32회 반복하였다. 그 후 72°C에서 1시간, 25°C에서 2시간 extension 후 4°C에서 종료하였다. PCR 산물은 ABI-310 자동염기서열 분석장치(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 크기별로 분류되도록 전기영동하고, GeneScan version 2.1(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 크기와 표식자의 종류별로 분류한 후 Microsoft Excel(Microsoft, USA)을 이용하여 자료를 취합하였다.

4. 자료의 통계분석체계 설정

MS marker들의 대립유전자 분포, Nei(1972)의 방법을 이용한 D_A 유전적 거리지수 matrix의 추정과 분석 프로그램간 입력자료 형태의 변환은 Microsatellite Analyzer(MSA) version 3.15 (Dieringer와 Schlatterer, 2002)를 이용하였다. 농장간 D_A 유전적 거리지수 matrix는 neighbor-joining(NJ) 방법(Saitou와 Nei, 1987)에 의한 계통유연관계 tree를 추정하는데 사용하였으며, NJ tree의 분절점에 대한 확률 추정치는 1000회 반복된 bootstrap resampling 방법을 이용하였다. 최종적으로 NJ tree의 구축과 도식화는 PHYLIP version 3.63 package(Felsenstein, 2004)를 이용하였다. Weir와 Hill(2002) 추정법에 의한 F -통계량(F_{st} , F_{it} , F_{is} 및 농장간 pairwise- F_{st})은 FSTAT version 2.9.3(Goudet, 2001)과 GENEPOP version 3.4(Raymond와 Rousset, 1995)를 사용하여 계산하였다. F -통계량 추정치에 대한 유의성 검정은 Goudet(2001)이 제안한 방법에 의하여 permutation test를 실시하여 얻었으며, 계산된 확률값(P)은 type I error를 줄이기 위하여 Bonferroni 과정을 적용하여 보정하였다. Marker의 다형성 지수인 heterozygosity(He)와 polymorphic information content(PIC) 그리고 exclusion probability(PE)는 Cervus version 2.0(Marshall 등, 1998)을 이용하였다. 또한 추정된 F_{st} 와 F_{is} 값에 근거하여 무작위 교배집단과 반형매 교배집단에서의 동일개체 출현가능확률은 API-CALC version 1.0(Ayres와 Overall, 2004)을 사용하여 계산하였다.

III. 결과 및 고찰

본 연구는 한우 생산이력제 시행시 최적의 DNA 검사에 활용 가능한 microsatellite 분석과 선발을 위하여 실시하였다.

Applied Biosystems사, ISAG 및 Roslin 연구소 등에서 소의 다형성 분석에 사용되도록 권장된 MS marker 중 20종을 Table 1에서 보는 바와 같이 선발하였다. PCR을 위한 MS primer는 NCBI의 Mapviewer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/mapviewer>)에 보고되어 있는 정보를 이용하였고, PCR 조건 및 PCR 산물의 크기 등을 고려해 가능한 적은 수의 set로 분류하기 위하여 multiplex PCR 조건을 조사하였고 최종적으로 Table 1에 나타난 바와 같이 4개의 set로 분류하였다. 설정된 set중 4번째 set에는 *ETH185* 만이 포함되어 있는데 이는 Table 1의 annealing temperature에 나타난 바와 같이 다른 MS에 비하여 온도가 가장 높아 다른 set와 혼합할 경우 정확한 PCR 수행이 어렵기 때문이다. 차후 이 MS가 한우 생산이력제에 적용되기 위해서는 touch down PCR 방법 등을 이용하여 보다 세밀한 multiplex PCR 조건을 설정해야 할 것이다.

20개 MS에 대한 실험자료 분석과정은 Fig. 1에 도식화하였다. 즉, multiplex PCR에 의한 PCR 산물은 ABI-310 자동염기서열 분석장치(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 크기별 형광 표식자별로 분류하고 Microsoft Excel 프로그램(Microsoft, USA)을 이용하여 원 자료를 취합하였다. 취합된 자료는 Excel file의 형태로 MSA version 3.15 프로그램(Dieringer와 Schlatterer, 2002)을 이용하여 allele frequency, D_A 유전적 거리지수, allele의 분포 등 기초분석과 자료파일의 변환을 실시하였다. 변환된 자료파일은 다형성지수(He 와 PIC)를 추정하기 위한 CERVUS version 2.0 프로그램(Marshall 등, 1998)과 F -통계량을 추정하기 위한 FSTAT version 2.9.3(Goudet, 2001)과 GENEPOP version 3.4 프로그램(Raymond와 Rousset, 1995)에 사용되었으며, D_A 유전적 거리지수와 bootstrap 자료는 농장간 phylogenetic tree와 분절점 확률치를

Table 1. Groups of microsatellite markers amplified in multiplex PCRs

Multiplex group no.	Locus	Chromosome	Fluorescent label	μM primers	Annealing temp °C	Source
1	<i>TGLA227</i>	18	FAM	0.2	56°C	Cattle
	<i>BM4305</i>	14	FAM	0.2	58°C	Cattle
	<i>SPS115</i>	15	FAM	0.1	58°C	Cattle
	<i>TGLA122</i>	21	JOE	0.2	58°C	Cattle
	<i>ETH3</i>	19	TAMRA	0.2	60°C	Cattle
	<i>ETH10</i>	5	TAMRA	0.1	58°C	Cattle
	<i>BM1818</i>	23	TAMRA	0.4	56°C	Cattle
2	<i>TGLA126</i>	20	JOE	0.2	58°C	Cattle
	<i>TGLA53</i>	16	JOE	0.1	60°C	Cattle
	<i>INRA23</i>	3	JOE	0.2	61°C	Cattle
	<i>ETH225</i>	9	TAMRA	0.1	60°C	Cattle
3	<i>BMS2113</i>	2	FAM	0.4	58°C	Cattle
	<i>BL1009</i>	14	FAM	0.2	58°C	Cattle
	<i>ILSTS006</i>	7	FAM	0.2	54°C	Cattle
	<i>ILSTS103</i>	21	FAM	0.2	58°C	Cattle
	<i>BMS1747</i>	14	JOE	0.2	58°C	Cattle
	<i>ILSTS013</i>	9	JOE	0.2	58°C	Cattle
	<i>ILSTS028</i>	11	TAMRA	0.2	58°C	Cattle
	<i>BM1824</i>	1	TAMRA	0.1	58°C	Cattle
4	<i>ETH185</i>	17	JOE	0.2	66°C	Cattle

Each multiplex group is run in a separate gel lane. Primer sequences and chromosome locations were from the Bovine mapviewer of NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/mapviewer>).

Fig. 1. The strategy for data analysis and selection of MS markers for Hanwoo traceability. For the detailed information, see results and discussion in the text.

계산하기 위하여 PHYLIP version 3.2 프로그램 (Felsenstein, 2004)에 이용되었다. 최종적으로 *F*-통계량은 API-CALC version 1.0 프로그램(Ayres 와 Overall, 2004)을 이용한 동일개체 출현확률을 계산하는데 사용하였다.

MSA version 3.15와 CERVUS version 2.0 프로그램을 이용하여 분석한 MS별 allele의 분포

와 *He* 및 *PIC* 추정치는 Table 2에 나타내었다. 이 중 가장 많은 allele의 개수는 *ILSTS006*에서 나타난 22개였으며, 가장 높은 *He*와 *PIC* 값을 갖는 MS는 *TGLA53*(0.914)과 *BL1009*(0.876)였다. 이러한 결과는 allele의 개수가 많더라도 출현빈도가 편위될 수 있음을 나타내는 것이며, *He*와 *PIC* 값의 최상위 MS가 다른 것은 allele의 개

Table 2. Characterization of 20 microsatellite markers in the Hanwoo population used in this study

Locus	<i>N</i>	No. of alleles	Size range(bp)	<i>He</i>	<i>PIC</i>
<i>TGLA227</i>	163	12	82 ~ 112	0.865	0.832
<i>SPS115</i>	163	9	248 ~ 270	0.687	0.825
<i>ETH3</i>	163	7	121 ~ 133	0.724	0.738
<i>BM1818</i>	163	13	166 ~ 278	0.589	0.621
<i>BM4305</i>	163	13	147 ~ 171	0.810	0.795
<i>TGLA122</i>	163	20	136 ~ 186	0.822	0.848
<i>ETH10</i>	163	12	214 ~ 230	0.693	0.857
<i>BM2113</i>	163	15	128 ~ 159	0.755	0.852
<i>ILSTS028</i>	163	6	136 ~ 164	0.429	0.346
<i>BM1824</i>	162	8	178 ~ 198	0.722	0.626
<i>ETH185</i>	163	9	228 ~ 244	0.834	0.756
<i>ILSTS006</i>	160	22	198 ~ 310	0.625	0.857
<i>BL1009</i>	163	21	159 ~ 185	0.724	0.876
<i>ILSTS103</i>	161	15	131 ~ 301	0.615	0.830
<i>ILSTS013</i>	159	10	123 ~ 143	0.736	0.814
<i>TGLA126</i>	163	6	122 ~ 132	0.693	0.613
<i>ETH225</i>	162	8	141 ~ 163	0.642	0.724
<i>TGLA53</i>	163	16	156 ~ 189	0.914	0.866
<i>INRA23</i>	163	14	126 ~ 222	0.785	0.756
<i>BMS1747</i>	162	7	91 ~ 105	0.759	0.699

수와 빈도에 의한 추정 계산식 차이에 의한 것으로 사료된다.

FSTAT version 2.9.3과 GENEPOP version 3.4 프로그램을 이용하여 추정된 MS별 F_{ST} , F_{IT} , F_{IS} 값은 Table 3에 나타내었다. 추정된 F -통계량에 대한 유의성 검정은 귀무가설(H_0)인 “추정된 F -통계치들이 0의 값으로부터 유의적인 차이가 존재하지 않는다.”에 대하여 수행하였다(Goudet, 2001). 여기서 F_{IS} 는 이형접합체의 감소 정도를 나타내는 척도로써 근친도 정도를 대별하는 지수이며, 양의 값은 근친도가 존재함을, 음의 값은 존재하지 않음을 나타낸다. 또한 F_{ST} 는 고정 지수로서 genetic drift에 의한 subpopulation의 이형접합체 감소 추이를 나타내는 지수이며, F_{IT} 는 전체집단에 대한 개체들의 모든 근친도 값을 나타내는 지수로 이들을 통하여 집단간 유전변이와 집단내 개체들의 근친정도를 파악하는데 이용할 수 있다. MS별 농장간 유전적 분화 정도를 나타내는 F_{ST} 추정치는 0.2418에서 -0.0018의 비교적 낮은 수준을 나타내었으며, 추정된 MS별 F_{ST} 값을 고려해 볼 때 *BM1818*, *BM4305*와 *BM1824*를 제외한 모든 MS에서 4개의 대상 농장간 유전적 분화가 유의적으로 존재함을 알 수 있었다. 전체 MS에 대한 F_{IS} 추정치는 유의적 결과를 보이지 않았지만, MS 개개별 F_{IS} 추정치에서는 *SPS115*, *BM1818*, *ILST006*, *BL1009*와 *ETH225*에서 유의적으로 이형접합체가 감소하는 것으로 나타났다.

추정된 F -통계량을 이용하여 무작위 교배 집단과 반형매 교배집단을 가정하여 MS 유전자형의 동일한 개체 출현확률 (probability of identity; PI 와 probability of identity from half sibs; $PI_{half-sibs}$)과 친자감정확률 (probability of parent exclusion when both parents are unconfirmed; PE_{pu} 와 probability of paternity exclusion; PE)을 API-CALC version 1.0과 Cervus version 2.0을 이용하여 추정하였으며, 그 결과는 Table 4에 나타내었다. 전체 20개의 MS를 사용할 경우 무작위 교배집단에서 PI 는 3.08×10^{-26} 로, $PI_{half-sibs}$ 는 1.44×10^{-45} 으로 추정되었다. 이러한 추정치의 의미는 국내의 한육우 집단을 적은 두수의 보증종모우들의 절대적인 유전적 기여

Table 3. Results of F -statistics per locus in the Hanwoo population used in this study

Locus	F-statistics		
	F_{ST}	F_{IT}	F_{IS}
<i>TGLA227</i>	0.0094*	-0.0118	-0.0215
<i>SPS115</i>	0.0588**	0.2010**	0.1511**
<i>ETH3</i>	0.0426**	0.0773*	0.0362
<i>BM1818</i>	-0.0018	0.1232**	0.1248**
<i>BM4305</i>	0.0167	0.0152	-0.0015
<i>TGLA122</i>	0.0227**	0.0547*	0.0327
<i>ETH10</i>	0.1933**	0.2448*	0.0638
<i>BM2113</i>	0.1896**	0.1727	-0.0209
<i>ILSTS028</i>	0.0197**	-0.0900	-0.1119
<i>BM1824</i>	0.0023	-0.0559	-0.0583
<i>ETH185</i>	0.0106**	-0.0580	-0.0694
<i>ILSTS006</i>	0.1957**	0.3192**	0.1535**
<i>BL1009</i>	0.1206**	0.2101**	0.1018**
<i>ILSTS103</i>	0.2354**	0.3192**	0.1097
<i>ILSTS013</i>	0.2418**	0.1734	-0.0902
<i>TGLA126</i>	0.0060*	-0.0592	-0.0656
<i>ETH225</i>	0.1041**	0.1831**	0.0881*
<i>TGLA53</i>	0.0115*	-0.0351	-0.0472
<i>INRA23</i>	0.0146**	0.0019	-0.0129
<i>BMS1747</i>	0.0225**	-0.0190	-0.0424
Global	0.0367**	0.0504**	0.0143

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

에 의한 거대한 반형매 집단으로 가정하고 국내 한육우의 전체 사육두수 1,666,000 두(2004년 12월 현재, 농림부 농업자료실)를 고려해 보더라도 동일개체가 출현할 확률이 없는 것으로 보아도 무방할 것으로 사료된다. 또한 20개의

MS를 친자감정에 이용할 경우에도 부 또는 모의 교배기록, 유전자형이 파악된 경우에는 100% 친자감정이 가능할 것으로 사료된다.

20개의 MS중 상위 11개의 MS를 *He*와 *PI* 추정치에 근거하여 선발하였으며, 이들의 *PI*와 *PI_{half-sibs}*를 계산한 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 Applied Biosystems사의 StockMakers™ 보다 더 낮은 값이 추정되어 한우의 생산이력제에 보다 적합한 것으로 나타났다. 특히 *He* 추정치에 의하여 선발한 11개의 MS markers (*TGLA53*, *TGLA227*, *ETH185*, *TGLA122*, *BM4305*, *INRA23*, *ILSTS013*, *BMS1747*, *BM2113*, *BL1009*와 *ETH3*)는 StockMakers™와 비교하여

100배 정도의 동일개체 출현확률이 낮은 것으로 추정되었다. 그러나 한우의 생산이력제에 적용할 MS는 다음의 세 가지 조건을 고려하여 최종적으로 선발되어야 한다. 첫 번째는 충분하고 유의적인 개체의 판별능력이고 두 번째는 genotyping의 용이성 그리고 세 번째는 genotyping 단가를 고려하여야 한다. 이러한 세 가지 조건을 동시에 충족하기 위해서는 MS의 *He* 또는 *PI* 값이 높고 multiplex PCR이 최소의 set로 묶여질 수 있어야 한다. 현재 Applied Biosystems사의 StockMakers™는 *TGLA227*, *BM2113*, *TGLA53*, *ETH10*, *SPS115*, *TGLA126*, *TGLA122*, *ETH3*, *ETH225*, *BM1824*, *INRA23* 등

Table 4. Expected mean heterozygosity(*H_e*), probability of identity(*PI*) among genotypes of random individuals, probability of identity among genotypes from random half sibs(*PI_{half-sibs}*), exclusionary power of the second parent(*PE*) and the probability of parent exclusion estimated using 20 microsatellites in this study when both parents are unconfirmed(*PE_{pu}*)

Multiplex ¹⁾	<i>H_e</i>	<i>PI</i>	<i>PI_{half-sibs}</i>	<i>PE_{pu}</i>	<i>PE</i>
Set 1 & 2	0.791	1.55×10^{-14}	4.10×10^{-10}	0.998510	0.999976
Set 3 & 4	0.725	1.09×10^{-17}	1.42×10^{-10}	0.981904	0.998975
Total	0.761	1.44×10^{-45}	3.08×10^{-26}	0.999973	1.000000

¹⁾ For the detailed information, refer to Table 1.

Table 5. Expected probability of identity(*PI*) among genotypes of random individuals, probability of identity among genotypes from random half sibs(*PI_{half-sibs}*), exclusionary power of the second parent(*PE*), and the probability of parent exclusion when both parents are unconfirmed(*PE_{pu}*)

Selected by	<i>PI</i>	<i>PI_{half-sibs}</i>	<i>PE_{pu}</i>	<i>PE</i>
<i>H_e</i> ¹⁾	1.08×10^{-22}	6.04×10^{-14}	0.998949	0.999985
<i>PI</i> ²⁾	4.58×10^{-21}	9.00×10^{-13}	0.999352	0.999992
<i>ABP</i> ³⁾	1.78×10^{-19}	1.04×10^{-12}	0.998165	0.999968

¹⁾ Top 11 microsatellites, *TGLA53*, *TGLA227*, *ETH185*, *TGLA122*, *BM4305*, *INRA23*, *ILSTS013*, *BMS1747*, *BM2113*, *BM2113*, *BL1009* and *ETH3*, selected by *He* value.

²⁾ Top 11 microsatellites, *TGLA53*, *TGLA122*, *BL1009*, *TGLA227*, *SPS115*, *BM4305*, *ILSTS103*, *ETH185*, *INRA23*, *ETH3* and *ETH225*, selected by *PI* value.

³⁾ Eleven microsatellites, *TGLA227*, *BM2113*, *TGLA53*, *ETH10*, *SPS115*, *TGLA126*, *TGLA122*, *ETH3*, *ETH225*, *BM1824*, and *INRA23*, composing StockMakers™ manufactured by Applied Biosystems.

Table 6. D_A genetic distance (above diagonal) and pairwise- F_{ST} (below diagonal) between farms in the four regions

	Sa	Go	Ji	Gu
Sa		0.05096	0.12501	0.10640
Go	0.00643**		0.10916	0.10658
Ji	0.05291**	0.05426**		0.06954
Gu	0.04119**	0.04989**	0.01528**	

** P < 0.01

Fig. 2. A neighbor joining tree of genetic relationship among farms in the four regions using D_A genetic distance estimated from 20 microsatellite loci. The number on the node is percentage bootstrap value in 1000 replications.

11개의 MS가 하나의 multiplex set로 되어 있다. 따라서 본 연구에서 제안된 H_e 또는 PIC 추정치의 상위 11 순위에 의하여 선발된 MS들도 최소 하나 또는 두 개의 multiplex set로 구성될 수 있도록 추가 연구를 수행할 필요가 있다.

4개 지역 농장간 D_A 유전적 거리지수와 pairwise- F_{ST} 값을 추정하여 비교한 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 두 가지 추정치 모두에서 가장 가까운 유전적 거리 값을 나타내는 농장은 고성과 사천 지역의 농장으로 실제 이 두 지역은 다른 2개 지역과 비교하여 지리적으로 근접된 지역이다. Nei(1972)의 model로부터 산출된 D_A 유전적 거리지수를 기초로 PHYLIP package(version 3.63)를 사용하여 NJ tree를 작성한 결과 유전적 거리지수에서 확인한 것과

동일하게 고성과 사천이 하나의 그룹으로, 진성과 군북이 또 다른 하나의 그룹으로 묶여짐을 확인하였다(Fig. 2). 이러한 결과들에 대하여 단정적인 설명은 불가능하지만 근접한 지역 내에서의 동일 보증정모우 정액의 공급 또는 상호 판매와 입식 등이 발생하였을 가능성은 배제 할 수 없으며, 이 결과를 근접지역내 농장간 교배지침의 자료로 활용하여 지나친 근친도에 의한 생산성 저하를 방지하는데 적용될 수 있으리라 사료된다.

IV. 요약

한우의 생산이력제에 활용 가능한 20종의 microsatellite marker를 선정하고 다형성지수, F -통계량, 동일개체 출현확률, 친자감별 확률 및 유전적 거리지수 등을 MSA, CERVUS, FSTAT, GENEPOP, API-CALC 및 PHYLIP 프로그램 등을 연계적으로 활용하여 추정하였다. Heterozygosity 추정치에 근거하여 선발한 11개의 microsatellite(*TGLA53*, *TGLA227*, *ETH185*, *TGLA122*, *BM4305*, *INRA23*, *ILSTS013*, *BMS1747*, *BM2113*, *BM2113*, *BL1009*와 *ETH3*)는 Applied Biosystems사의 StockMakersTM와 비교하여 100배 정도의 동일개체 출현확률이 낮아 한우의 생산이력제 적용에 보다 효율적인 것으로 나타났다. 또한 D_A 유전적 거리지수와 pairwise- F_{ST} 추정치를 활용하여 근접지역의 농장간 근연관계의 정도를 파악할 수 있는 자료로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 사 사

본 연구는 농촌진흥청 ‘바이오그린 21사업’의 지원에 의해 이루어진 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

VI. 인 용 문 헌

- Achmann, R., Curik, I., Dovic, P., Kavar, T., Bodo, I., Habe, F., Marti, E., Solkner, J. and Brem, G. 2004. Microsatellite diversity, population subdivision and gene flow in the Lipizzan horse. *Anim. Genet.* 35:285-292.
- Ayres, K. L. and Overall, A. D. J. 2004. API-CALC 1.0: a computer program for calculating the average probability of identity allowing for substructure, inbreeding and the presence of close relatives. *Molecular Ecology Notes* 4:315-318.
- Ayub, Q., Mansoor, A., Ismail, M., Khaliq, S., Mohyuddin, A., Hameed, A., Mazhar, K., Rehman, S., Siddiqi, S., Papaioannou, M., Piazza, A., Cavalli-Sforza, L. L. and Mehdi, S. Q. 2003. Reconstruction of human evolutionary tree using polymorphic autosomal microsatellites. *Am. J. Phys. Anthropol.* 122:259-268.
- Barendse, W., Armitage, S. M., Kossarek, L. M., Shalom, A., Kirkpatrick, B. W., Ryan, A. M., Clayton, D., Li, L., Neiberghs, H. L. and Zhang, N. 1994. A genetic linkage map of the bovine genome. *Nat. Genet.* 6:227-235.
- Borrell, Y. J., Pineda, H., McCarthy, I., Vazquez, E., Sanchez, J.A. and Lizana, G. B. 2004. Correlations between fitness and heterozygosity at allozyme and microsatellite loci in the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Heredity* 92:585-593.
- Dieringer, D. and Schlatterer, C. 2002. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* 3(1):167-169.
- Fang, M., Hu, X., Jiang, T., Braunschweig, M., Hu, L., Du, Z., Feng, J., Zhang, Q., Wu, C. and Li, N. 2005. The phylogeny of Chinese indigenous pig breeds inferred from microsatellite markers. *Anim. Genet.* 36:7-13.
- Felsenstein, J. 2004. A package of programs for inferring phylogenies (version 3.63). Available from <http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Glowatzki-Mullis, M.-L., Gaillard, C., Wigger, G. and Fries, R. 1995. Microsatellite-based parentage control in cattle. *Anim. Genet.* 26:7-12.
- Jakse, J., Satovic, Z. and Javornik, B. 2004. Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulus lupulus* L.). *Genome* 47:889-899.
- Kappes, SM., Keele, J. W., Stone, R. T., McGraw, R. A., Sonstegard, T. S., Smith, T. P., Lopez-Corrales, N. L. and Beattie, C. W. 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res.* 7:235-249.
- MacHugh, D. E., Loftus, R. T., Cunningham, P. and Bradley, D. G. 1998. Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Anim. Genet.* 29:333-340.
- Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E. B. and Pemberton, J. M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7: 639-655.
- Martin-Burriel, I., Garcia-Muro, E. and Zaragoza, P. 1999. Genetic diversity analysis of six Spanish native cattle breeds using microsatellites. *Anim. Genet.* 30:177-182.
- Maudet, C., Luikart, G. and Taberlet, P. 2002. Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *J. Anim. Sci.* 80:942-950.
- Metta, M., Kanginakudru, S., Gudiseva, N. and Nagaraju, J. 2004. Genetic characterization of the Indian cattle breeds, Ongole and Deoni (*Bos indicus*), using microsatellite markers - a preliminary study. *BMC. Genet.* 5:16.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106:283-292.
- Peelman, L. J., Mortiaux, F., Van, Zeveren, A., Dansercoer, A., Mommens, G., Coopman, F., Bouquet, Y., Burny, A., Renaville, R. and

- Portetelle, D. 1998. Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four Belgian cattle breeds. *Anim. Genet.* 29: 161-167.
20. Raymond, M. and Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity* 86: 248-249.
21. Saitou, N. and Nei, M. 1997. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
22. Schnabel, R. D., Ward, T. J. and Derr, J. N. 2000. Validation of 15 microsatellites for parentage testing in North American bison, Bison bison and domestic cattle. *Anim. Genet.* 31: 360-366.
23. Weir, B. S. and Hill, W. G. 2002. Estimating F-statistics. *Annu. Rev. Genet.* 36:721-50.
24. Yoon, D. H., Kong, H. S., Oh, J. D., Lee, J. H., Cho, B. W., Kim, J. D., Jeon, K. J., Jo, C. Y., Jeon, G. J. and Lee, H. K. 2005. Establishment of an Individual Identification System Based on Microsatellite Polymorphisms in Korean Cattle (Hanwoo). *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 18: 762-766 (접수일자 : 2005. 5. 13. / 채택일자 : 2005. 7. 15.)