

Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) 표지자를 이용한 한국평의 유전적 다양성 및 아종간의 유연관계 분석

윤성일

한양대학교 자연과학대학 생명과학과

Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) Marker Analysis of Genetic Diversity in Korean *Phasianus colchicus karpowi* and Genetic Relationships Among Subspecies of *Phasianus* spp.

Seong-il Yoon

Department of Life Science, College of Natural Sciences, Hanyang University

Abstract – The level of genetic diversity and genetic relationships among Korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus karpowi*) habitat and subspecies have been investigated based on Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. Wild and domesticated Korean ring-necked pheasant, hybrids between domesticated Korean ring-necked and foreign subspecies, and four foreign subspecies; Chinese ring-necked (*P. c. torquatus*), Melanistic mutant (*P. c. mut. tenebrosus*), XL White (*P. c. mut*) and Southern green (*P. c. versicolor*) were used for comparison. On the basis of the results of AMOVA, 94.08% of genetic diversity in Korean ring-necked was allocated among individuals within habitat differences. Estimate of Φ_{st} , which represents the degree of genetic differentiation among habitats was 5.9%. Based on the dendrogram reconstructed by UPGMA, Yangpyung habitat of the eight habitats turned out to be distinct from others habitat. Interestingly, domesticated Korean ring-necked and hybrid mixture showed closer genetic relationship with four foreign subspecies than Korean ring-necked. As a consequence of AMOVA, 96.63% of genetic diversity in four foreign subspecies was allocated among individuals within subspecies. Estimate of Φ_{st} representing the degree of genetic differentiation among subspecies was 3.4%, which was lower than that among habitats of Korean ring-necked. The lower level of genetic difference among four foreign subspecies showed that these subspecies were genetically closer even though they were morphologically classified into four different subspecies. When seven habitats of Korean ring-necked pheasant and four foreign subspecies were divided into Korean and Foreign Pheasant Groups, respectively, more than 17% of genetic diversity was allocated between groups (about 4% among habitats/subspecies within groups). This observation implied that Korean ring-necked pheasant is genetically quite different from four foreign subspecies. On the basis of cluster analysis, three foreign subspecies (Chinese ring-necked pheasant, Melanistic mutant pheasant, and XL White pheasant) formed a distinct group with domesticated Korean ring-necked pheasant and hybrid mixture at 98% confidence interval.

Key words : Korean ring-necked pheasant, ISSR, AMOVA, genetic diversity, habitat, *Phasianus colchicus karpowi*

*Corresponding author: Seong-il Yoon, Tel. 02-2220-0909,
Fax. 02-2298-9646, E-mail. denny68@hanmail.net

서 론

한국꿩 (Korean ring-necked pheasant, *Phasianus colchicus karpowi*)은 닭목 꿩과에 속하는 조류이다. 꿩과 (Family Phasianidae)에는 16 속 49 종 150 아종이 존재하며 아시아지역에 가장 많은 종류가 서식하고 있다 (Johnsgard 1986; Woodard *et al.* 1993). 꿩속 (Genus *Phasianus*)에는 33 아종이 있는데, 아시아대륙에는 몽골리안꿩 (Mongolian pheasant, *P. c. mongolicus*)과 중국꿩 (Chinese ring-necked, *P. c. torquatus*)이 있고, 일본에는 녹치 (Southern Green, *P. c. versicolor*)가 분포한다. 그 외에 아프가니스탄, 이란 등 서남아시아에 서식하는 꿩으로는 Afghan white-wing (*P. c. bianchii*) 등이 있다.

꿩의 유전적 특성을 파악하기 위한 시도는 1960년대부터 수렵용으로 사육된 꿩을 비교하기 위한 목적으로 수행되어 왔다. Vohs (1966)는 꿩 혈액을 생화학적으로 분석하여 지역에 따른 꿩의 차이를 밝혔다. 그 후 혈액 단백질이나 혈액 효소의 대립유전자 출현빈도를 이용한 연구들이 시도되어, Baker 등 (1966)은 미국 일리노이, 아이오와, 캔사스 지역에서 꿩의 혈액 단백질의 대립유전자 출현 빈도가 미국 대륙의 동서간 차이가 있음을 밝혔고, Warner 등 (1988)은 꿩의 3가지 esterase의 대립유전자 출현빈도에서 지역간 차이가 있음을 보여주었다. 한편, allozyme을 이용한 꿩의 지역간 집단변이를 밝힌 연구 (Rogers 1972)가 있었으나, 이는 지리적으로 상당한 거리가 있는 집단간의 분석이었다. 이 외에 꿩의 형태적인 변이에 대한 연구도 수행되었다 (Trautman 1982). 국내에서는 육용 꿩의 우량개체 선발증식을 위한 연구의 일환으로 한국꿩의 혈액단백질 및 효소의 생화학적 유전형질에 관한 연구 (references)와 한국꿩의 보호증식을 위한 연구의 일환으로 한국꿩의 유전적 다양현상에 관한 연구가 이루어졌다. 그러나 야생에 서식하는 한국꿩의 서식지간 유전변이에 대한 연구나 한국꿩과 외국꿩의 유전적 유연관계를 비교한 연구는 수행되지 않은 상태이다.

Inter Simple Sequence Repeats (ISSR)는 simple sequence repeats (SSRs)이라는 1~5개 정도의 염기쌍이 짧게 반복되는 일련의 DNA marker (microsatellite sequence) (Litt and Luty 1989)를 PCR에 의하여 직접 증폭할 수 있는 방법이다 (Gupta *et al.* 1994; Zietkiewicz *et al.* 1994; Sanchez *et al.* 1996). 이 방법은 primer를 이용하여 PCR에 의해 genome상의 DNA를 무작위로 증폭한다는 점에서 Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)와 유사하지만, primer의 염기조성이 훨씬 단순한 만큼

PCR 수행시 primer와 template DNA간의 annealing 조건을 훨씬 어렵게 만들어 줌으로써 (annealing temperature: RAPD 36°C, ISSR 52°C) RAPD에 비해 보다 신뢰성을 높일 수 있다.

본 연구에서는 야생 및 사육하고 있는 한국꿩과 이들과 아종관계인 꿩들을 대상으로 ISSR 표지자를 이용하여 genomic DNA 상의 변이를 관찰하고, 그 결과를 통계 기법인 Analysis of Molecular Variance (AMOVA) 방법 (Excoffier *et al.* 1992)으로 분석하여 한국꿩의 서식지간, 서식지내 유전적 다양성의 분포양상 및 여러 꿩 아종들간의 유전적 유연관계를 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

1. 공시재료

한국꿩 그룹은 7개 서식지 (경기 양평, 경남 창녕, 경남 사천, 충북 단양, 전남 고흥, 전남 해남, 강원 홍천)의 야생 한국꿩, 사육 한국꿩 그리고 잡종꿩으로 분류하였다. 외국꿩 그룹은 외국꿩 4아종 (흑 뮤탄트, 백 뮤탄트, 중국 링넥, 녹치)으로 분류하였고 각각의 서식지와 아종은 subgroup으로 구분하였다. 총 91개체, 13 서식지 및 아종을 분석하였다 (Table 1).

1) 야생 한국꿩 (Korean ring-necked pheasant, *Phasianus colchicus karpowi*)

1999년 2월부터 2001년 2월까지 매해 2개 조로 나누어서 1개 조는 엽총을 이용하여 직접 야생꿩을 포획하였고 다른 1개 조는 수렵법에 편승하여 엽사들이 수확한 개체를 이용하였다. 시료는 경기도 양평 4개체, 경상남도 창녕 9개체, 경상남도 사천 7개체, 충청북도 단양 7개체, 전라남도 고흥 9개체, 전라남도 해남 9개체, 강원도 홍천 9개체를 채집하였다.

2) 사육 한국꿩 (Domesticated Korean ring-necked pheasant, *Phasianus colchicus karpowi*)

꿩 사육농가에서 인공사육하는 한국꿩의 종란을 분양받아 사육장에서 부화시켜 사육한 성조 8개체를 공시개체로 이용하였다.

3) 외국꿩 아종 : 중국 링넥 (Chinese ring-necked pheasant, *Phasianus colchicus torquatus*),

흑 뮤탄트 (Melanistic mutant, *P. c. mut. tenebrosus*), 백 뮤탄트 (XL White, *P. c. mut.*), 녹치 (Southern green, *P. c. versicolor*)

공시개체는 97년 미국에서 종란을 도입하여 사육장에서 부화시켜 사육한 성조 8개체를 이용하였다.

4) 잡종평 (Three-way cross hybrids)

외국산 평이 방사되어 자연환경에서 한국평과 혼혈을 이루었을 때 한국평의 유전적 형질에 미치는 영향을 조사하기 위해 한국산 평과 여러 아종간의 잡종평을 확보하였다. 실험에서는 흑 뮤탄트 수컷 (Melanistic mutant male)과 사육 한국평 암컷 (Domesticated Korean ring-necked female) 사이에서 나온 교배자를 사육중인 외국 아종들과 무작위 교배시켜서 유전적 다양성을 높였다. 공시재료로는 머리와 몸체의 외형이 뮤탄트를 닮고 날개의 외형은 한국평을 닮은 수컷 3개체를 이용하였다.

2. 시료채취

DNA 분석을 위한 시료는 공시재료의 간 또는 혈액을 채취하였다. 야생 한국평은 혈액의 응고로 채취가 곤란하여 간을 채취해서 시료채취용 vial에 넣어 저온으로 보관, 실험실로 운송하여 분석전까지 -20°C 냉동보관하였다. 나머지 개체는 평 사육장에서 보정한 뒤 익하정맥에서 혈액을 2 mL 채혈하여 3 cc EDTA contained bottle (녹십자의료공업사, 한국)에 담아 분석전까지 -20°C 냉동보관하였다.

3. ISSR

ISSR primer는 캐나다 British Columbia대학의 Biotechnology Laboratory로부터 구입한 16~22 nucleotides 길이의 Primer (UBC set #9)를 이용하였다(www.biotech.ubc.ca). 이 가운데 24개의 primers를 사용하여, Korean

Table 1. Number, samples of pheasants in DNA analysis experiments

Species	n (sex ratio)	Sample material
Yangpyung habitat	4 (♂2; ♀2)	Liver
Changnyung habitat	9 (♂1; ♀8)	Liver
Sacheon habitat	7 (♂5; ♀2)	Liver
Korean ¹ Danyang habitat	7 (♂3; ♀4)	Liver
Koheung habitat	9 (♂3; ♀6)	Liver
Haenam habitat	9 (♂4; ♀5)	Liver
Hongcheon habitat	9 (♂2; ♀7)	Liver
Subtotal 54		
Korean-D ²	8 (♂4; ♀4)	Blood
Ringneck ³	8 (♂4; ♀4)	Blood
Mutant ⁴	8 (♂4; ♀4)	Blood
White ⁵	8 (♂4; ♀4)	Blood
Green Pheasant ⁶	2 (♂1; ♀1)	Blood
Hybrid mixture ⁷	3 (♂)	Blood
Subtotal 37		
Total	91	

※ ¹Korean ring-necked pheasant; ²Domesticated Korean ring-necked pheasant; ³Chinese ring-necked pheasant; ⁴Melanistic mutant pheasant; ⁵XL white pheasant; ⁶Southern Green pheasant; ⁷Hybrid mixture.

ring-necked pheasant, Chinese ring-necked, Melanistic mutant, XL white에서 각각 1개씩 뽑은 시료를 대상으로 primer screening을 수행했으며, 그 중 DNA 증폭이 안정적으로 이루어지고, 증폭산물의 분획양상이 뚜렷한 8개의 primers를 선택하여 분석에 사용하였다.

DNA 증폭에 이용된 반응용액의 조성은 100 μM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.75 μM primer, 1.5 mM 10 X PCR reaction buffer (Tris-HCl 75 mM, pH 8.8, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% Tween 20), MgCl_2 1.5 mM, 2 μg Bovine Serum Albumin, AmpliTaq DNA polymerase (Advanced Biotechnologies, UK) 0.8 unit/Reaction, Template DNA 25 ng 이며 최종 부피는 25 μL 이다. PCR 반응은 MJ Research PTC200 thermal cycler (MJ Research Inc., US)을 이용하였으며, 94°C 에서 5분간 전처리시킨 후, 94°C 에서 30초간 denaturation, 52°C 에서 30초간 annealing, 72°C 에서 60초간 extension으로 45 cycles를 수행한 후 마지막 cycle은 72°C 에서 10분간 final extension을 수행하였다.

4. 전기영동

EDTA 1mM, Sucrose 40%, Bromophenol-Blue 0.025% 및 Xylene Cyanole 0.025%으로 조성한 loading buffer와 ISSR PCR product 8 μL 를 1 : 5 비율로 혼합한 후, 1X TBE buffer (890 mM Tris-Base, 890 mM Boric Acid, 20 mM

Table 2. Primers used in the present study (derived from UBC set #9)

Classification	No. of primer	Sequences
Dinucleotide primer	813	CTC TCT CTC TCT CTC TT or (CT) _n T
	814	CTC TCT CTC TCT CTC TA
	815	CTC TCT CTC TCT CTC TG
	816*	CAC ACACAC ACACAC AT
	817*	CACACACAC ACACAC AA
	822	TCT CTC TCT CTC TCT CA
	823*	TCT CTC TCT CTC TCT CC
	824	TCT CTC TCT CTC TCT CG
	827	ACACACACACAC ACA CG
	828	TGT GTGTGT GTG TGT GA
	830	TGT GTGTGT GTG TGT GG
	834*	AGAGAGAGAGAGAGAGY T
	835*	AGAGAGAGAGAG AGAGYC
	836*	AGAGAGAGAGAG AGAGYA
	842*	GAGAGAGAG AGAGAG AYG
	843	CTC TCT CTC TCT CTC TRA
	845	CTC TCT CTC TCT CTC TRG
	846	CACACACAC ACACAC ART
	854	TCT CTC TCT CTC TCT CRG
	856*	ACACACACACAC ACA CYA
859	TGTGTGTGT GTG TGT GRC	
Trinucleotide primer	864	ATG ATGATG ATG ATG ATG
	866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC
Other primer	899	CATGGTGTG GTGCAT TGT TCC A

R purine; Y pyrimidine; *selected primers for PCR amplification.

Table 3. General Design for Hierarchical Analysis of Molecular Variance (AMOVA)

Source of variance	d.f.	MSD	Expected MSD
Among region	G-1	MSD/(AG)	$\sigma_c^2 + n'\sigma_b^2 + n''\sigma_a^2$
Among population within regions	$\sum_{g=1}^G I_g - G$	MSD/(AP/WG)	$\sigma_c^2 + n\sigma_b^2$
Among individuals within population	$N - \sum I_g$	MSD/(WP)	σ_c^2
Total	N-1		

G: number of regions; I_g : number of populations at gth region; N: total number of individuals

EDTA · 2H₂O)를 사용해서 제조한 2% agarose gels에 loading하였다. 150 V 에서 3시간 동안 전기영동을 수행하여 분획한 후, ethidium bromide로 염색하고 증폭산물의 유무를 관찰하였다. DNA Size Marker로는 pGEM size ladder DNA marker (Promega, USA) 를 사용하였다.

5. 통계분석

1) 서브그룹(서식지 및 아종) 내 ISSR 변이체의 다양성

Shannon's Information index (Lewontin 1972)를 이용하였다. 총 13 서브그룹, 91개체를 대상으로 변이체의 다양성을 분석하였다(Table 1).

2) 서식지 간 및 서식지 내 (아종 간 및 아종 내) 변이 분석

서식지간 및 서식지 내 변이정도를 통계적으로 추정하기 위해 AMOVA 분석을 이용하였다. AMOVA 분석은 지역, 집단, 개체간의 계층별로 유전변이를 분석할 수 있도록 제안된 통계기법으로 전체 개체간의 유전적 거리를 지역, 집단, 개체로 나누어 분산을 구함으로써 계층별로 유전변이량과 집단간의 유전적 차이정도(Φ_{st})를 추정할 수 있다. 한국평 등의 유전적 변이 분석을 위해 증폭산물의 유무형태를 Excoffier 등 (1992)의 거리행렬(distance matrix)로 전환하였다. 전환된 자료를 이용하여 AMOVA 분석을 수행하였으며, AMOVA 분석의 계층구조를 Table 3에 나타내었다.

- Excoffier's distance = $n(1 - n_{xy}/n)$

n : total number of polymorphism band positions

n_{xy} : the number of markers shared by the two individuals

3) 유전적 거리의 추정과 유연관계 분석

유전적 거리는 Nei (1972)의 방법을 이용하여 계산하였으며, 비가중 산술법(Unweighted Pari-Group Method with Arithmetic mean)으로 유집분석을 수행했다. 유집분석결과의 통계적 신뢰도를 bootstrapping 방법으로 인위적으로 재조합한 100개의 data set을 이용하여 유연관계

Table 4. Genetic Variation for Loci in Single-Population with Shannons's Information Index (I)

Population/subspecies	Sample size	Locus	I
Melanistic mutant	8	Mean	0.2993
		St. Dev	0.2753
White mutant	8	Mean	0.2860
		St. Dev	0.2764
Chinese ring-necked	8	Mean	0.3237
		St. Dev	0.2593
Southern green	2	Mean	0.0280
		St. Dev	0.1366
Domesticated Korean ring-necked	8	Mean	0.2775
		St. Dev	0.2793
Hybrid mixture	3	Mean	0.2036
		St. Dev	0.2974
Yangpyung in Kyunggi Province (Korean ring-necked)	4	Mean	0.1922
		St. Dev	0.2824
Changnyung in KyungNam Province (Korean ring-necked)	9	Mean	0.2130
		St. Dev	0.2697
Sacheon in KyungNam Province (Korean ring-necked)	7	Mean	0.2213
		St. Dev	0.2717
Danyang in ChoongBuk Province (Korean ring-necked)	7	Mean	0.1750
		St. Dev	0.2552
Koheung in JunNam Province (Korean ring-necked)	9	Mean	0.2482
		St. Dev	0.2701
Haenam in JunNam Province (Korean ring-necked)	9	Mean	0.1825
		St. Dev	0.2585
Hongcheon in Kangwon Province (Korean ring-necked)	9	Mean	0.2567
		St. Dev	0.2601

를 비교·분석하였다.

결 과

1. 한국평과 외국평 아종의 ISSR 분석결과

Primer screen을 거친 8개의 primers를 이용하여 91개체의 시료를 분석한 결과 UBC 816은 31개, UBC 817은 35개, UBC 823은 32개, UBC 834는 44개, UBC 835는 45개, UBC 836은 41개, UBC 842는 52개, UBC 856은 42개를 나타내어 총 322개의 다형성(polymorphic) 증폭산물을 확인할 수 있었으며 단형성(monomorphic) 증폭산물은 없었다(Fig. 1).

2. 서브그룹(서식지 및 아종)내 ISSR 변이체의 다양성

야생 한국평들의 서식지내 변이체의 다양성이 외국 아종들에 비해 낮았고 외국평 아종 중 녹치의 다양성이 매우 낮은 수준으로 나타났다. 반면, 잡종평은 일본 녹치와 비슷한 정도의 적은 시료수임에도 불구하고 변이체의 다양성 정도가 일본 녹치에 비해 7배 이상 높은 것으로 나타났다.

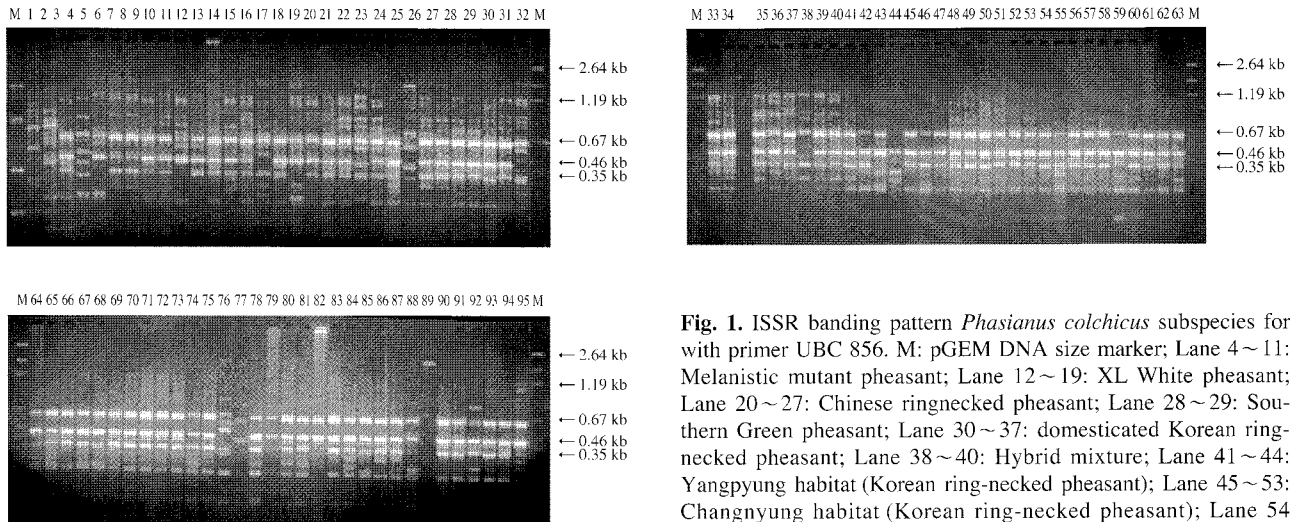


Fig. 1. ISSR banding pattern *Phasianus colchicus* subspecies for with primer UBC 856. M: pGEM DNA size marker; Lane 4~11: Melanistic mutant pheasant; Lane 12~19: XL White pheasant; Lane 20~27: Chinese ringnecked pheasant; Lane 28~29: Southern Green pheasant; Lane 30~37: domesticated Korean ring-necked pheasant; Lane 38~40: Hybrid mixture; Lane 41~44: Yangpyung habitat (Korean ring-necked pheasant); Lane 45~53: Changnyung habitat (Korean ring-necked pheasant); Lane 54~60: Sacheon habitat (Korean ring-necked pheasant); Lane 62~68: Danyang habitat (Korean ring-necked pheasant); Lane 69~77: Koheung habitat (Korean ring-necked pheasant); Lane 78~86: Haenam habitat (Korean ring-necked pheasant); Lane 87~95: Hongcheon habitat (Korean ring-necked pheasant); Lane 3, 61: missing data

Table 5. AMOVA for 13 subgroups, 91 individuals of subspecies *Phasianus colchicus*, based on 322 ISSR markers

Source of variation	df	SSD	MSD	Variance component	% of total variance	P-value
Variance among population	12	839.467	69.956	5.741	16.00	
Variance within population	78	2350.335	30.133	30.133	84.00	<0.001

*Total number of pheasant samples is 91 individuals that are divided into 13 subgroups, 54 Korean ring-necked from 7 habitats, 8 domesticated Korean ring-necked, 3 hybrid mixtures, 8 Chinese ring-necked, 8 White Mutant, 8 Melanistic Mutant, and 2 Southern Green.

**Measurements include: degrees of freedom (df), sums of squared deviations (SSD), and mean squared deviations (MSD). P-value represents the probability that by chance a more extreme variance component would be observed compared to a null distribution generated from 1000 random permutations of the data matrix.

Table 6. AMOVA for 7 habitats, 54 individuals of *Phasianus colchicus karpowi*, based on 322 ISSR markers

Source of variation	df	SSD	MSD	Variance component	% of total variance	P-value
Variance among population	6	240.0304	40.005	1.699	5.92	
Variance within population	47	1269.5437	27.012	27.012	94.08	<0.001

Table 7. AMOVA for 54 Korean ring-necked pheasant from 7 habitats and 8 domesticated Korean ring-necked pheasants, based on 322 ISSR markers

Source of variation	df	SSD	MSD	Variance component	% of total variance	P-value
Variance among population	7	402.981	57.569	3.854	12.14	
Variance within population	54	1506.294	27.894	27.894	87.86	<0.001

3. 한국평과 외국평 아종의 유전적 변이

서식지 및 아종을 포함한 전체 13 서브그룹간의 유전적 차이를 살펴보기 위해 AMOVA분석을 수행한 결과, 전체 유전 다양성 중 16%가 서브그룹간 유전적 차이에 기인하며, 84%는 서브그룹내 개체간 차이로부터 기인하는 것으로 나타났다(Table 5).

야생 한국평의 유전적 다양성의 분포양상은 전체 유

전적 다양성 중 5.92%가 야생 한국평의 서식지간 유전적 차이에 기인하여 전체 13 서브그룹(아종 및 서식지)의 서브그룹간 차이인 16%에 비해 낮은 것으로 나타났다(Table 6).

야생 한국평과 사육 한국평을 대상으로 AMOVA분석을 수행한 결과, 전체 유전 다양성 중 야생 한국평과 사육 한국평간 유전적 차이에 기인한 것은 12.14%로 야생 한국평의 서식지간 차이인 5.92%에 비해 2배 이상

높은 수치를 보였다 (Table 7).

유전적으로 다양성이 높을 것으로 추정되는 잡종평을 야생 한국평, 사육 한국평과 비교 분석한 결과 (한국평 그룹), 전체 유전적 다양성 중 잡종평, 사육 한국평, 야생 한국평간 유전적 차이는 13.46%로, 야생 한국평과 사육 한국평간 유전적 차이인 12.14%보다 약간 높은 수치를 보였다 (Table 8).

한국평 그룹과 외국평 그룹간의 유전적 차이를 비교 분석한 결과, 전체 유전 다양성 중 12.5%가 그룹간의 유전적 차이에 기인하며, 9.33%가 그룹내 서브그룹간의 차이에 기인하는 것으로 나타났다 (Table 9).

우래가 불분명한 잡종평과 사육 한국평을 중간 그룹으로 구분하여 야생 한국평 그룹 (7개 국내 서식지), 외국평 그룹과 비교분석한 결과, 전체 유전 다양성 중 17.32%는 세 그룹의 그룹간 유전적 차이에 기인하고

4.46%는 그룹내 서브그룹간 차이에 기인하는 것으로 나타났다 (Table 10). 이 결과를 한국평 그룹과 외국평 그룹의 유전적 차이 (Table 8)와 비교해보면, 그룹간 유전적 차이는 높아졌고 (>12.5%) 서브그룹간 차이는 낮아졌다 (<9.33%).

잡종평과 사육 한국평을 외국평 그룹에 포함시키고 야생 한국평 그룹 (야생 한국평 7개 국내 서식지)과 비교분석한 결과, 전체 유전 다양성 중 18.37%가 그룹간 유전적 차이에 기인하고, 4.92%가 그룹내 서브그룹간 차이에 기인하는 것으로 나타났다 (Table 11). 이 결과를 잡종평 및 사육 한국평을 한국평 그룹에 포함시켰을 경우와 비교해보면, 그룹간의 유전적 차이는 높아지고 (>12.5%) 그룹내 서브그룹간 차이는 낮아지는 것으로 나타났다 (<9.33%). 야생 한국평 그룹, 외국평 그룹 그리고 중간그룹 (사육한국평과 잡종평)간의 유전적 다양성

Table 8. AMOVA for 54 Korean ring-necked pheasant from 7 habitats, 8 domesticated Korean ring-necked pheasants and 3 hybrid mixtures, based on 322 ISSR markers

Source of variation	df	SSD	MSD	Variance component	% of total variance	P-value
Variance among population	8	474.8551	59.357	4.3729	13.46	<0.001
Variance within population	56	1574.9603	28.124	28.1243	86.54	

Table 9. AMOVA for 13 subgroups, 91 individuals of *Phasianus colchicus* subspecies in 2 groups as Korean Pheasant Group^a and the Foreign Pheasant Group^b, based on 322 ISSR markers

Source of variation	df	SSD	MSD	Variance component	% of total variance	P-value
Variance among groups	1	236.2176	236.218	4.8098	12.48	=0.008
Variance among population within groups	11	603.2493	54.841	3.5951	9.33	<0.001
Variance within population	78	2350.3353	30.133	30.1325	78.19	<0.001

*^a composed of domesticated Korean ring-necked pheasant, hybrid mixture, and Korean ring-necked pheasants from 7 habitats such as Yangpyung, Changwon, Sacheon, Danyang, Koheung, Haenam, and Hongcheon.

*^b composed of 4 foreign subspecies: *Phasianus colchicus karpowi*, Melanistic mutant pheasant, XL white pheasant and Southern green pheasant.

Table 10. AMOVA for 13 subgroups, 91 individuals of *Phasianus colchicus* in 3 groups as the Wild Korean Pheasant Group, the Foreign Pheasant Group and the Mix Group^c, based on 322 ISSR markers

Source of variation	df	SSD	MSD	Variance component	% of total variance	P-value
Variance among groups	2	420.0953	210.048	6.6714	17.32	<0.001
Variance among population within groups	10	419.3716	41.937	1.7179	4.46	
Variance within population	78	2350.3353	30.133	30.1325	78.22	

* Mix Group^c composed of domesticated Korean ring-necked pheasant and hybrid mixture.

Table 11. AMOVA for 13 subgroups, 91 individuals of subspecies *Phasianus colchicus* in 2 groups as the Wild Korean Pheasant Group^c and the Foreign-Mix Pheasant Group^d, based on 322 ISSR markers

Source of variation	df	SSD	MSD	Variance component	% of total variance	P-value
Variance among groups	1	361.7416	361.742	7.2164	18.37	<0.001
Variance among population within groups	11	477.7252	43.430	1.9343	4.92	
Variance within population	78	2350.3353	30.133	30.1325	76.71	

* Foreign-Mix Pheasant Group^d composed of Foreign Pheasant Group^b and Mix Group^d.

분포양상(Table 10)을 비교할 경우, 그룹간 유전적 차이(>17.32%)와 서브그룹간 차이(>4.46%)가 모두 미미하나 수치가 상승된 것으로 나타나, 잡종평과 사육 한국평이 유전적으로 한국평 그룹보다 외국평 그룹과 유사한 유전적 배경을 지니고 있음을 보여주었다.

외국평 4 아종, 사육 한국평 및 잡종평과의 유전적 다양성의 분포양상을 살펴보기 위해 외국평 4 아종을 사육 한국평 및 잡종평과 비교 분석한 결과, 전체 유전 다양성 중 6개 아종간 유전적 차이에 기인한 비율은 5.76%로 나타났다(Table 12). 이 결과를 한국평 그룹(사육 한국평 및 잡종평)의 유전적 다양성 분포양상과 비교해보면, 한국평 그룹의 서식지간 차이(13.46%)보다 절반이하로 감소한 것으로 사육 한국평과 잡종평이 유전적으로 한국평 그룹에 비해 외국평 그룹에 가까운 개체들로 구성되어 있음이 다시 한번 확인되었다.

외국평 4 아종의 아종간 유전 다양성의 분포양상을 살펴보기 위해 외국평 4 아종만을 대상으로 AMOVA 분석을 수행한 결과, 전체 유전적 다양성 중 외국평의 아종간 유전적 차이에 기인한 것은 3.37%로 나타났다

(Table 13). 이 결과는 외국평 4 아종과 사육한국평, 잡종평의 아종간 유전적 차이보다 낮은 것으로(<5.76%) 본 사육장에서 인공사육중인 사육 한국평과 잡종평은 유전적으로 외국평 그룹과도 어느 정도 차이가 있는 것으로 나타났다.

4. Nei의 유전적 거리 및 서브그룹(서식지 및 아종)의 유연관계

15개 서브그룹간의 유전적 유연관계를 파악하고자 Nei's distance (1972)를 이용하여 유전거리지표(genetic distance matrix) (Fig. 2)를 구하고, UPGMA 방법을 이용하여 서식지 및 아종간의 유연관계를 dendrogram으로 나타내었다(Fig. 3). 공시된 평의 유전적 유연관계는 야생 한국평 그룹과 사육 한국평 및 잡종평이 포함된 외국평 그룹의 두 분지군으로 나누어지고, 두 분지군의 유전적 거리는 0.093로 나타났다. 두 그룹내 서브그룹간의 유전적 인 거리를 살펴보면, 외국평 그룹은 녹치를 제외한 나머지 3 아종간(중국 링넥, 흑 뮤탄트, 백 뮤탄트)에는 유전적 거리가 0.029이며, 야생 한국평 그룹에서는 양평 서

Table 12. AMOVA for 4 foreign subspecies of *Phasianus colchicus karpowi* (26 individuals), the domesticated Korean ring-necked pheasant (8 individuals) and the hybrid mixture (3 individuals), based on 322 ISSR markers

Source of variation	df	SSD	MSD	Variance component	% of total variance	P-value
Variance among population	5	237.695	47.539	2.132	5.76	<0.001
Variance within population	31	1080.792	34.864	34.864	94.24	

Table 13. AMOVA for 4 foreign subspecies of 8 Chinese ring-necked pheasants, 8 Melanistic mutant pheasants, 8 XL white pheasants and 2 Southern green pheasants, based on 322 ISSR markers

Source of variation	df	SSD	MSD	Variance component	% of total variance	P-value
Variance among population	3	128.3952	42.798	1.2275	3.37	=0.023
Variance within population	22	775.3750	35.244	35.2443	96.63	

	YA	MU	WHT	RNC	JAP	DOM	MIX	GYP	KCW	KSC	CND	JKH	JHN	KHC
YA	0.0000													
MUT	0.3499	0.0000												
WHT	0.3658	0.0283	0.0000											
RNC	0.3438	0.0268	0.0292	0.0000										
JAP	0.4523	0.1231	0.1233	0.1245	0.0000									
DOM	0.3803	0.0409	0.0418	0.0358	0.1173	0.0000								
MIX	0.4081	0.0744	0.0733	0.0594	0.1852	0.0760	0.0000							
GYP	0.3348	0.1015	0.1259	0.0992	0.1693	0.1216	0.1168	0.0000						
KCW	0.3575	0.0733	0.0900	0.0778	0.1269	0.0886	0.1034	0.0502	0.0000					
KSC	0.3566	0.0928	0.1122	0.0983	0.1288	0.1132	0.1262	0.0572	0.0335	0.0000				
CND	0.3504	0.0779	0.0911	0.0809	0.1290	0.0922	0.1048	0.0563	0.0324	0.0379	0.0000			
JKH	0.3192	0.0636	0.0814	0.0620	0.1386	0.0855	0.0891	0.0515	0.0400	0.0349	0.0459	0.0000		
JHN	0.3329	0.0675	0.0845	0.0713	0.1401	0.0886	0.0888	0.0489	0.0299	0.0370	0.0312	0.0299	0.0000	
KHC	0.3143	0.0818	0.1008	0.0797	0.1579	0.1100	0.0981	0.0415	0.0446	0.0390	0.0474	0.0271	0.0257	0.0000

Fig. 2. Genetic Distance Matrix of *Phasianus colchicus karpowi* habitats and *Phasianus colchicus* subspecies. MUT: Melanistic mutant; WHT XL: white; RNC: Chinese ring-necked; JAP: Southern Green; DOM: Domesticated Korean ring-necked; MIX: Hybrid mixture; GYP: Yangpyung in Kyunggi; KCW: Changwon in KyungNam; KSC: Sacheon in KyungNam; CND: Danyang in ChoongBuk; JKH: Koheung in JunNam; JHN: Haenam in JunNam; KHC: Hongcheon in Kangwon

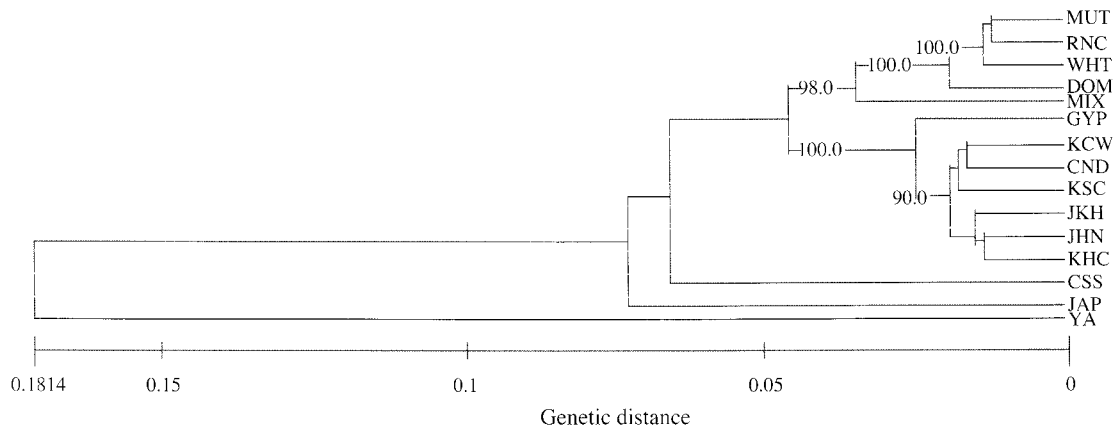


Fig. 3. dendrogram based on UPGMA of *Phasianus colchicus karpowi* habitats and *Phasianus colchicus* subspecies. The numbers at the forks indicate the number of times the group consisting of the species which are to the right of that fork occurred among the trees, out of 100.00 trees.

식지가 나머지 서식지로부터 유전적으로 구분되고 유전적인 거리는 0.05로 나타났다. 사육 한국평과 잡종평은 유전적으로 야생 한국평보다는 외국 평 그룹에 가까운 것으로 나타났지만 녹치와 쿠퍼핑을 제외한 나머지 외국 3 아종들로부터 잡종평은 0.057, 사육 한국평은 0.025의 유전적 거리를 두고 있는 것으로 나타났다.

고 찰

본 연구는 우리나라에 서식하는 한국평의 서식지간 유전적 다양성을 파악하고, 아종관계에 있는 외국평과 한국평의 유전적 유연관계를 조사하기 위해 야생 한국평, 사육 한국평, 사육 한국평과 외국평간의 잡종평, 외국평 4 아종(중국 링넥, 흑 뮤탄트, 백 뮤탄트, 녹치)을 대상으로 ISSR 표지자 분석과 AMOVA 분석을 수행하였고 그 결과는 다음과 같다.

1. 야생 한국평의 유전적 다양성

야생 한국평 서식지내 개체간 차이에 기인한 변이량은 94.08%였고, 서식지간 차이(Φ_{st})는 0.059로 야생 한국평의 서식지간 유전적 차이가 낮은 것으로 나타났다(Table 6). 양평 서식지는 다른 국내 서식지들로부터 유전적으로 구분되지만 이들과의 유전적 차이는 크지 않은 것으로 (genetic distance=0.05) 나타났다. 평의 집단간 유전적 다양성을 다룬 연구를 살펴보면, Giesel 등(1997)은 미국 아이오와주에서 각각 5~30 km 떨어진 5개의 보호 서식지로부터 ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus*)의 집단간 유전적 차이가 16%로 나타나 본 분석결과와 차이를 보였다. 이는 비록 서식지간 지리

적 거리가 멀지는 않지만 각각의 서식지가 단절되어 있기 때문에 서식지간 유전적 차이가 높아진 것으로 사료된다. 반면, Haig 등(1994)은 red-cockaded woodpeckers (*Picoides borealis*)의 14개 집단의 집단간 차이가 약 3.7%로 야생 한국평의 서식지간 유전적 차이와 비교적 가까우며 지리적으로 격리되어 있지 않을 가능성이 높은 것으로 나타났다.

2. 사육 한국평 및 잡종평의 유전적 잡종화

사육 한국평 및 잡종평이 유전적으로 야생 한국평과 가까울 것이라는 예상과는 달리 한국평 및 외국평의 유전적 유연관계에서 녹치를 제외한 외국평 3 아종과 함께 분지군을 형성하였다(Fig. 3). 이 결과에 비추어 볼 때, 사육 한국평과 잡종평이 분석에 포함된 외국 아종 이외의 임의의 아종으로부터 유래되었을 가능성을 배제할 수 없다. 잡종평의 경우에 야생 한국평과 유전적 차이를 보이는 것은 어느 정도 예상 가능한 결과였지만 사육 한국평이 잡종평과 함께 외국평은 물론 야생 한국평으로부터도 유전적 차이를 보이는 새로운 잡종으로 추정되는 것은 흥미로운 결과라고 할 수 있다.

사육 한국평의 잡종화 원인을 살펴보면, 국내 일부 평 사육농가에서 한국평의 개량목적으로 외국 아종인 중국 링넥을 한국평과 함께 사육·교배하고 있으며 본 사육장에서 종란을 분양받는 과정에서 외국 아종의 유전 형질이 섞인 사육 한국평 종란을 도입한 것으로 추정된다. 중국 링넥은 한국평과 외형적으로 매우 유사하면서 한국평에 비해 체중이 많이 나가기 때문에 국내 평 사육농가에서 중국 링넥을 사육하는 것이 간혹 관찰되고 있다. 한국평의 고유한 유전적 특성을 파악하고 이를 유지하기 위해서는 국내에서 사육중인 한국평과 야생 한국

평의 유전적 변이에 대한 전국적인 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

3. 외국평의 아종간 유전적 다양성

외국평 4 아종간 유전적 차이는 3.37%로 상당히 낮은 수치를 보였다(Table 13). 이러한 결과는 light footed clapper rails (Nusser *et al.* 1996)의 아종간 차이(58.2%)는 물론, 야생 한국평의 서식지간 차이(5.92%)보다도 낮은 수치로서 특기할 만한 결과이다. AMOVA 분석으로 상당히 낮은 아종간 유전적 차이를 보인 4 아종중, 녹치는 유전적 유연관계에서 다른 3 아종들로부터 유전적으로 멀리 떨어져 있는 것으로(genetic distance=0.1316) 나타났지만 나머지 3 아종은 여전히 유전적으로 매우 가까운 것으로(genetic distance=0.02876) 나타났다. 본 분석에 사용된 외국평들이 형태적으로는 다른 아종으로 분류되기는 하지만 유전적으로는 매우 가까운 위치에 있는 것으로 볼때, 평 아종(*Phasianus colchicus* subspecies)의 계통 분류에 대해 앞으로 분자계통학 등에 기초한 보다 다각적인 검토가 필요한 것으로 사료된다. 다만, 녹치의 특징은 분석에 사용된 시료수가 적음에 기인할 수 있음을 배제할 수 없다.

4. 야생 한국평과 외국평 4 아종의 유전적 다양성

야생 한국평 그룹(국내 7 서식지)과 외국평 그룹(외국평 4 아종)의 전체 유전변이중 그룹간의 유전적 차이는 17.32% (그룹 내 서브그룹간 차이는 약 4.46%)으로 나타났다(Table 10). 야생 한국평이 아종 관계에 있는 흑뮤탄트, 백뮤탄트, 중국링넉, 녹치의 외국평 4 아종 사이에 유전적인 차이가 매우 큰 것으로 나타나며, 이러한 양상은 평의 유전적 유연관계 분석결과에서 야생 한국평이 외국평 아종과 뚜렷하게 구분되는 것에서도 볼 수 있었다. 유연관계 분석의 Bootstrapping 방법에 의한 신뢰수준을 볼 때, 야생 한국평 그룹은 동일한 가상의 조상으로부터 유래되었음을 확인 할 수 있었다(신뢰수준 100%). 흑뮤탄트, 백뮤탄트, 중국링넉의 외국평 3 아종과 사육 한국평, 잡종평 또한 야생 한국평과 별개의 동일한 가상의 조상으로부터 유래되었음을 확인하였다(신뢰수준 98%). Nusser 등 (1996)에 의한 아종간 및 집단간 유전적 다양성 연구를 보면, 전체 유전 다양성 가운데 Yuma clapper rail과의 아종간 차이에 기인한 것은 58.2% ($P < 0.001$), light footed clapper rail의 집단간 차이에 기인한 것은 7.4%로 본 분석결과보다 모두 높게 나타나 유전 다양성의 분포양상에서 아종간 차이가 높은 것으로 나타났다.

5. 서식지 및 아종 내 ISSR 변이체의 다양성

야생 한국평들의 서식지 내 변이체의 다양성에 비해 외국 아종들의 다양성이 높은 수준이었고, 서브그룹 중 특히 잡종평의 다양성 정도는 높은 수준인 것으로 나타났다(Fig. 3). 본 연구에 사용된 잡종평들이 형태적으로 최초 교배에 사용된 원 아종(흑뮤탄트 및 사육 한국평)과 유사했지만 이들과 유전적으로 비교적 큰 차이가 나는 점과 잡종평이 유전적으로 야생 한국평보다는 외국 아종들과 가까운 점에 비추어 볼 때, 교배과정에서 유전적 다양성이 높으면서 최초 교배 아종과는 상이한 유전적 조합이 생성된 것으로 생각된다. 이미 국내에 외국평 아종이 적지 않게 도입되어 있고, 앞으로도 다양한 목적으로 외국평을 도입할 가능성이 있으므로 외국 아종의 도입이 야생 한국평의 유전적 특성에 미치는 영향과 그로 인해 초래될 수 있는 야생 한국평의 변종화에 대한 보다 체계적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

6. UPGMA 방법을 이용한 유전적 관계

각 서브그룹(서식지 및 아종)의 유전적 유연관계를 조사한 결과, 전체적으로 사육 한국평 및 잡종평이 포함된 외국평 그룹, 야생 한국평 그룹, 두 그룹에 속하지 않고 분리된 나머지 서브그룹의 세 군으로 나누어졌다. 외국평 가운데 유전적으로 매우 가까운 흑뮤탄트, 중국링넉, 백뮤탄트 3 아종은 사육 한국평, 잡종평과 함께 야생 한국평과 구별되는 하나의 분지군(分枝群)을 형성하였다. 야생 한국평 그룹은 하나의 분지군을 형성하였으며, 다른 서식지들과 유전적으로 구별되는 양평 서식지를 제외한 나머지 6 서식지간에는 유전적 거리가 0.039로 나타났다.

본 연구는 그동안 시도되지 않았던 한국평의 유전적 다양성과 한국평 및 외국평의 유전적 유연관계를 조사한 것이지만, 각 집단을 대표할만한 개체수가 충분하지 않았기 때문에 한국평의 유전적 구조를 완벽하게 파악하지 못한 한계가 있었다. 앞으로 국내 전 지역을 대상으로 각 집단을 대표할만한 시료 확보와 genome을 대상으로 개체의 유전자형을 확인할 수 있는 DNA 표지자를 분석한다면 한국평에 대한 보다 정확하고 구체적인 집단 유전학적 자료를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

한국평(Korean ring-necked Pheasant, *Phasianus colchicus karpowi*)과 외국 아종의 유전적 유연관계를 파악하

기 위해 야생 한국평, 사육 한국평, 사육 한국평과 외국평간의 잡종평, 외국평 4 아종(중국 링넥, 흑 뮤탄트, 백 뮤탄트, 녹치)을 대상으로 ISSR 표지자 분석과 AMOVA 분석을 수행하였다. 야생 한국평의 전체 유전 다양성중 94.08%가 서식지 내 개체간 유전적 차이에 기인하고, 5.9% ($\Phi_{st}=0.059$)가 서식지간 차이에 기인하였다. 사육 한국평이 유전적으로 야생 한국평 보다는 외국평 4 아종과 가깝게 나타났다. AMOVA 분석과 cluster 분석에서 사육 한국평이 야생 한국평은 물론 외국평 4 아종과도 유전적 차이를 보이는 것으로 미루어 볼 때 사육되고 있는 한국평은 한국평과 외국 아종간의 다양한 교잡에 의해 생겨난 잡종일 가능성이 높다. 외국평 4 아종(중국 링넥, 흑 뮤탄트, 백 뮤탄트, 녹치)의 전체 유전 다양성중 96.63%가 아종내 개체간 차이에 기인하고, 3.4% ($\Phi_{st}=0.034$)로 아종간 차이에 기인하여 외국평 4 아종의 아종간 유전적 차이가 야생 한국평의 서식지간 차이보다도 낮은 것으로 나타났다. 이는 본 분석에 사용된 외국평 4 아종이 형태적으로는 다른 아종으로 분류되지만 유전적으로는 매우 가까운 위치에 있음을 의미한다. 7 서식지의 야생 한국평과 외국평 4 아종을 각각 야생 한국평 그룹과 외국평 그룹으로 분류하여 두 그룹의 유전적 다양성을 분석한 결과, 전체 유전변이 중 그룹간 차이의 비율은 17% 이상(그룹 내 서식지/아종간 차이는 약 4%)으로 야생 한국평이 아종 관계인 외국평 4 아종과 상당한 유전적 차이를 보이는 것으로 나타났다. 유전적 유연관계 분석결과에서 중국 링넥, 흑 뮤탄트, 백 뮤탄트의 외국평 3 아종은 유전적으로 외국 아종에 가까운 사육 한국평, 잡종평과 함께 하나의 분지군을 형성하면서 야생 한국평 그룹으로부터 98% 신뢰수준에서 뚜렷하게 구별되었다.

참 고 문 헌

- Baker CM, C Manwell, RF Labiski and JA Harper. 1966. Molecular genetics of avian proteins. egg, blood and tissue proteins of the ring-necked pheasant, *Phasianus colchicus*. L. Comp. Biochem. Physiol. 17:467-499.
- Excoffier L, PE Smouse and JM Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131:479-491.
- Giesel JT, D Brazeau, R Koppelman and D Shiver. 1997. Ring-necked pheasant population genetic structure. J. Wildl. Manage. 61(4):1332-1338.
- Gupta M, YS Chyi, J Romero-Severson and JL Owen. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. Theor. Appl. Genet. 89:998-1006.
- Haig SM, JM Rhymer and DG Heckel. 1994. Population differentiation in randomly amplified polymorphic DNA of red-cockaded woodpeckers, *Picoides borealis*. Molecular Ecol. 3:581-595.
- Johnsgard PA. 1986. The Pheasants of the World. Oxford University Press, UK.
- Lewontin LC. 1972. The apportionment of human diversity. Evol. Biol. 6:381-98.
- Litt M and JA Luty. 1989. A hyper-variable micro-satellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am. J. Hum. Genet. 44:397-401.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. Am. Nat. 106:283-292.
- Nusser JA, RM Goto, DB Ledig, RC Fleischer and MM Miller. 1996. RAPD analysis reveals low genetic variability in the endangered light-footed clapper rail. Molecular Ecol. 5:463-473.
- Rogers JS. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. Studies in genetics. IV. Univ. of Texas, Austin. Publ. 7213:145-153.
- Sanchez de la Hoz MP, JA Davila, Y Loarce and E Ferrer. 1996. Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplification to study genetic diversity in barley. Genome 39:112-117.
- Trautman CG. 1982. History, ecology, and management of the ring-necked pheasant in South Dakota. S.D. Dep. Game, Fish, and Parks. Pierre.
- Vohs PA Jr. 1966. Blood group factors for analyzing pheasant populations. J. Wildl. Manage. 30:745-753.
- Warner RE, JB Koppelman and DP Phillip. 1988. A biochemical genetic evaluation of ring-necked pheasants. J. Wildl. Manage. 52:108-112.
- Woodard A, P Vohra and V Denton. 1993. Game bird breeders: Handbook. Hancock House Publishers Ltd.
- Zietkiewicz E, A Rafalski and D Labuda. 1994. Genomic fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics. 20: 176-183.