

비침습적 분변 샘플을 이용한 우리나라 월동 기러기류의 유전분석

김민경·원용진¹·이상돈*

이화여자대학교 환경공학과, ¹이화여자대학교 에코과학부

Use of Genetic Techniques to Analyze Wintering Population of Geese in Korea with Noninvasive Feces Samples

Min Kyung Kim, Yong Jin Won¹ and Sang Don Lee*

Department of Environmental Science and Engineering, College of Engineering, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

¹Division of EcoScience, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Abstract – This study was intended to test the feasibility of genetic analysis of wintering population of geese using their feces samples. This noninvasive approach is quite significant and effective because we do not need to capture or harm geese to obtain the samples. We collected the feces from two different populations of wintering geese in Korea in 2007. Finally thirty two feces were analyzed through a molecular genetic method. As a result, 14 haplotypes were identified and classified into two groups, white-fronted geese (*Anser albifrons*) and bean geese (*Anser fabalis*). We established the method to make molecular genetic experiment more efficient using the feces. This study has a significance as the first genetic result on wintering population of geese in Korea using noninvasive sampling method.

Key words : geese, feces, natural monument, molecular method, noninvasive sampling

서론

지구상에 존재하는 기러기목 (Anseriformes), 오리과 (Anatidae) 조류는 총 155종으로 그 중 기러기속 (*Anser*) 과 흑기러기속 (*Branta*)은 15종이며, 우리나라에는 개리 (*Anser cygnoides*), 흑기러기 (*Branta bernicla orientalis*), 흰이마기러기 (*Anser erythropus*), 큰기러기 (*Anser fabalis*), 쇠기러기 (*Anser albifrons*), 흰기러기 (*Anser caerulescens hyperboreus*), 회색기러기 (*Anser anser*) 등 7종이 도래한다 (박과 원 1993). 우리나라에서는 사라져가고 있는 개

리와 흑기러기를 천연기념물 제325호로 지정하고 있으며 (문화재정보센터), 개리, 흑기러기, 흰이마기러기, 큰기러기를 멸종위기종 2급으로 지정하여 보호하고 있다. 우리나라에서 월동하는 기러기류 중 쇠기러기와 큰기러기는 최우점종이며, 개리와 흑기러기도 월동한다 (박과 원 1993). 이들은 만, 간척지, 농경지, 못, 호수, 하천 등의 습지에서 서식한다. 기러기류는 우리나라에서 월동하는 대표적 조류이나 그에 대한 연구가 많이 이루어지고 있지 않고 그나마도 관찰식 방법이 주를 이루고 있어 보다 정량적인 연구방법의 도입이 필요하다.

분자유전학은 보전생물학과 야생동물 관리에 있어서 매우 큰 유용성을 가진다 (Paxinos et al. 1997). 분자유전학적 방법을 이용하여 알기 어려운 종이나 개체들을 비

* Corresponding author: Sang-Don Lee, Tel. 02-3277-3545, Fax. 02-2-3277-3545, E-mail. lsd@ewha.ac.kr

침습적(noninvasive)으로 동정할 수 있으며, 또 이를 이용해 종 특이적인 유전적 마커를 개발할 수 있다(Paxinos *et al.* 1997; Reed *et al.* 1997; Deagle *et al.* 2005). 이러한 분자유전학적 기법은 세계 여러 분야에서 응용되어 발전해나가고 있는 연구 분야로서, 생태학에서도 도입 접목되어 이용되고 있다.

털과 분변, 조류의 펠렛 등과 같은 비침습적 샘플은 야생에 서식하는 동물의 유전적 연구에 있어서 매우 중요할 뿐만 아니라 특히 멸종위기종이나 보호종 및 천연기념물에 관한 연구에 있어서는 매우 중요한 역할을 한다. 또한 배설물이나 조류의 펠렛으로부터의 종 동정은 해당 종뿐만 아니라 그 종의 먹이 분석까지도 할 수 있다는 점에서 유용하다(Cottrell *et al.* 1996; Trites and Joy 2005). 털과 분변을 이용한 포유류 연구에 있어서는 세계적으로 여러 연구가 이루어졌지만(Taberlet *et al.* 1997; Kurose *et al.* 2005) 조류의 경우에는 최근에 들어서야 몇몇 연구가 이루어졌다(Segelbacher 2002; Idaghdour *et al.* 2003; Horvath *et al.* 2005). 또한 조류의 분변은 조류 인플루엔자나 조류 분변에 서식하는 박테리아에 관한 연구 등 여러 측면으로 연구를 진행할 수 있다는 점에서 매우 중요한 샘플로 이용되며, 이에 관해서는 전 세계적

으로 많은 학자들이 연구하고 있다(Chambers *et al.* 2001; Hamilton *et al.* 2006).

분자유전학 실험에서 조직이나, 혈액과 같은 순수한 샘플에서는 실험의 성공률이 매우 높은 반면, 분변과 같이 순수한 샘플이 아닌 경우에는 실험적으로 어려움이 따른다. 그러나 직접 중을 잡아야 가능한 혈액 샘플과 달리, 분변은 야생에 서식하고 있는 종에게 직접적으로 위해를 가하지 않고도 그 종에 대해 연구가 가능하므로 이 점을 극복하기 위해 실제로 많은 연구들이 진행 중이며(Lampa *et al.* 2008), 본 연구에서도 분변을 이용한 실험의 성공률을 높이기 위한 방안이 필요하였다.

본 연구의 대상인 기러기류는 우리나라 대표적 월동 조류로써, 그들의 분변은 야외에서 쉽게 찾을 수 있다. 또한 그들의 분변을 이용하여 큰기러기 등과 같은 멸종위기종 및 개리 등과 같은 천연기념물이 속해 있는 기러기류의 유전 분석은 의미가 있다.

그러므로 본 연구는 분변을 이용하는 분자유전학적 분석 실험의 효율을 높일 수 있는 방법을 제시하고자 하며, 우리나라에 월동하러 온 기러기류들로부터 미토콘드리아 ND2 유전자 염기서열을 파악하고 이들의 지역적, 그리고 종간의 유전적 차이를 분석하고자 한다.

재료 및 방법

1. 분변 샘플의 채집

본 연구를 위한 기러기류 분변 채집은 우리나라 전역에 월동하기 위하여 온 기러기류를 대상으로 2007년 겨울(2007년 1월 18일, 2007년 3월 10일) 두 차례에 걸쳐 지역적으로 떨어진 두 지역(충청남도 당진, 경상남도 주남저수지)에서 실시하였다(Fig. 1). 이 지역은 모두 우리나라에서 겨울 철새의 월동지로 알려져 있는 곳이다. 충청남도 당진군 석문방조제는 바다와 육지의 경계로, 철새들이 월동하기에 좋은 갈대숲이 펼쳐져 있으며, 넓은 지역의 농경지를 가지고 있다. 경상남도 창원시 주남저수지는 한반도의 남단에 위치해 기후가 따뜻하고 주변 논에서 먹이를 쉽게 구할 수 있는 지역으로 우리나라 철새 서식지로 매우 유명한 곳이다(김 등 1999).

2. 유전 분석

유전적 분석의 샘플 간 오염을 막기 위하여 야외 필드의 샘플은 각각 50 mL falcon tube에 담도록 하였다. 분변에서 얻어지는 DNA 분석의 효율을 높이기 위하여 준비된 아이스박스에 바로 담아 실험실 -20°C 냉동고

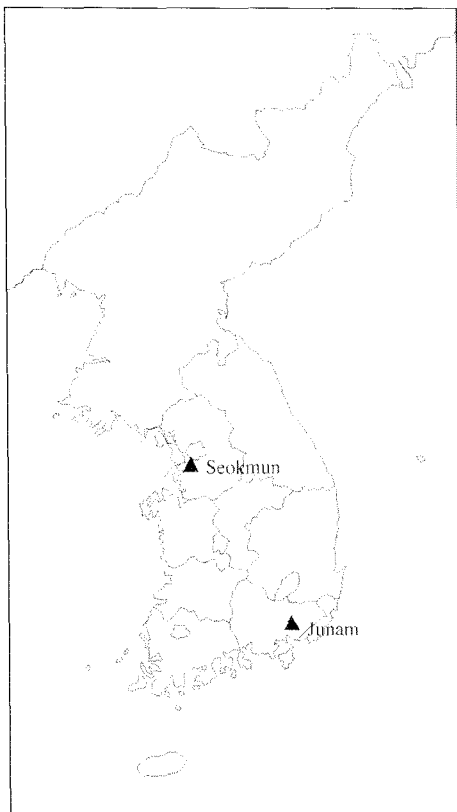


Fig. 1. A map showing the sampling sites of geese feces.

Table 1. The new primer set made for species identification of geese

Primer name	Strand	Sequence
ND2_AA_F	F	5'-CCTTACGCGACCCCAATCA-3'
ND2_AA_R	R	5'-AGGATTTTGC GTTTGTGT-3'

에 보관하였다.

샘플은 녹지 않도록 얼음 위에서 작업하고 180~220 mg 정도의 분변을 잘라 2 mL tube에 담았다. DNA extraction 과정은 QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)을 이용하였다. PCR은 2번의 PCR 과정을 거치는데 먼저 mtDNA 중 ND2 region을 증폭할 수 있는 primer인 L-5212, H-5766을 이용하였다 (Sorenson *et al.* 1999). 또한 그 안의 primer를 새로 제작하여 nested PCR을 수행하는데, 새로 제작된 primer는 ND2_AA_F와 ND2_AA_R로 명명하였다 (Table 1). 1차 PCR은 2 µL의 10× BSA와 2 µL의 10× buffer, 1.6 µL의 dNTPs, 1 µL의 양방향 primer와 3 µL의 genomic DNA를 넣고 0.2 µL의 taq DNA polymerase를 넣고 total volume을 20 µL로 맞추었다. 2차 PCR은 1차 PCR product 샘플을 template로 하여 2 µL의 10× BSA와 2 µL의 10× buffer, 1.6 µL의 dNTPs, 1 µL의 양방향 primer와 0.2 µL의 taq DNA polymerase를 넣고 total volume을 20 µL로 맞추었다. PCR 반응조건은 94°C에서 denaturation 30초, 58°C에서 annealing 1분, 72°C에서 extension 1분으로 하여 총 40회 반복하였다. PCR DNA 산물은 Zymoclean Gel DNA Recovery kit을 이용하여 gel purification하고 자동 DNA 서열분석기 (ABI 3700, PE Applied Biosystems)에서 direct sequencing을 실시하였다. 확인된 sequence는 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에 등록되어 있는 종과 실제로 동정된 기러기류 sequence data와 함께 확인하였다. 또 각 haplotype의 Neighbor-Joining tree를 그리기 위해서 MEGA4 program을 이용하였다.

결과 및 고찰

본 연구는 2007년 우리나라에서 월동하러 온 기러기류들의 32개 분변 샘플을 이용하여 분자유전학적 분석을 하였다.

분변 샘플의 실험 효율을 높이기 위해 기러기류에만 적용할 수 있는 특이적인 primer를 새로이 제작하여 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 두 번 적용하는 nested PCR을 실시하였다. 이를 통해 우리는 분변에서도 실험 결과를 좀 더 수월하게 얻을 수 있었으며, 각 종에

Table 2. Summary of the haplotypes from the feces samples analyzed

Name of haplotype	Sample size	Location
Haplotype 1 (H1)	7	Junam
Haplotype 2 (H2)	1	
Haplotype 3 (H3)	1	
Haplotype 4 (H4)	1	
Haplotype 5 (H5)	3	Seokmun
Haplotype 6 (H6)	4	
Haplotype 7 (H7)	1	
Haplotype 8 (H8)	1	
Haplotype 9 (H9)	1	
Haplotype 10 (H10)	1	
Haplotype 11 (H11)	3	
Haplotype 12 (H12)	6	
Haplotype 13 (H13)	1	
Haplotype 14 (H14)	1	
Total	32	

맞는 특이적 primer를 제작한다면, 이 nested PCR은 다른 분변 분석에서도 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

이들의 분변 샘플에서 염기서열을 분석한 결과 염기서열이 다른 총 14개의 haplotype을 얻을 수 있었다 (Table 2). 이들은 또한 NCBI GenBank에 등록되어 있는 쇠기러기 (*A. albifrons*) sequence data (AF363031)와 동정된 큰기러기 (*A. fabalis*) sequence data와 함께 분석되었다. 각 haplotype, 쇠기러기의 AF363031과 큰기러기, 그리고 외군 (outgroup)으로 이용된 캐나다기러기 (*Branta canadensis*)의 DNA sequence data는 Fig. 2에 정리하였다.

지역별로 살펴보면, 주남저수지에서는 총 4개의 haplotype이 나타났으며, 석문방조제에서는 총 10개의 haplotype이 나타났다 (Table 2).

또한 본 연구에서는 외군 (outgroup)을 캐나다기러기로 설정하여 Neighbor-Joining tree를 그려보았다 (Fig. 3). 이를 통해 본 연구의 샘플은 크게 큰기러기에 속하는 그룹과 쇠기러기에 속하는 그룹으로 나뉘었다. 주남저수지 샘플과 석문방조제의 H13 샘플은 쇠기러기 그룹에 속하며, 나머지 석문방조제 샘플은 모두 큰기러기 그룹에 묶임을 알 수 있었다.

본 연구는 분변을 이용한 비침습적인 방법으로 우리나라에 월동하러 온 기러기류들의 분자유전학적 실험을 수행한 최초의 결과이다. 분변을 이용한 연구는 야생에 서식하고 있는 종을 직접적으로 잡아야 하는 어려움과 종에 가해지는 위해를 극복할 수 있는 연구방법이므로 큰 의의가 있다. 또한 본 연구는 이런 분변을 이용한 실험의 효율성을 높일 수 있는 방법에 대한 결과를 얻었다. 그러나 본 연구에서 얻은 결과가 제한적이므로, 차후

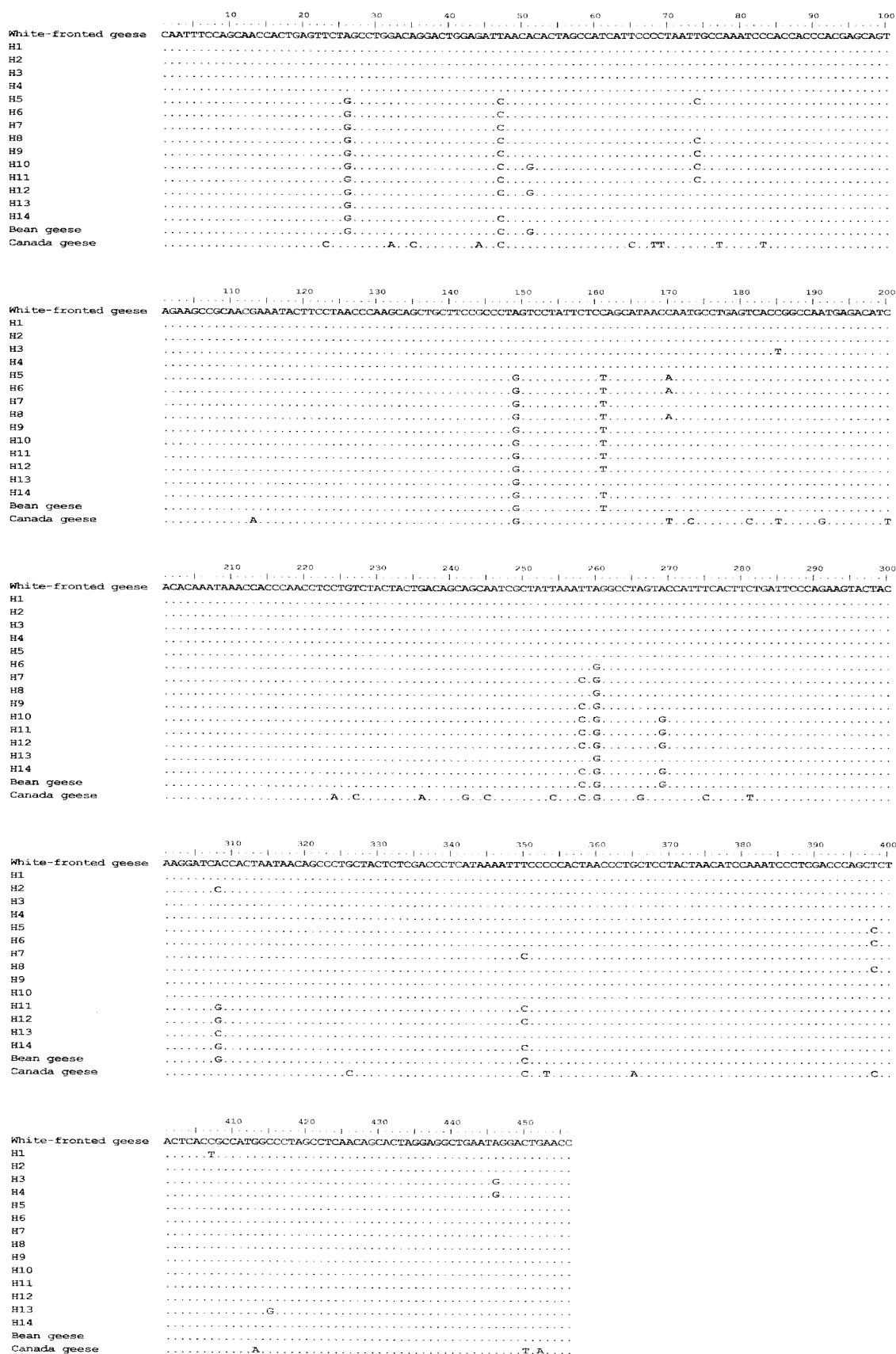


Fig. 2. DNA sequence information and haplotype patterns of ND2 gene from the samples of geese feces, Bean geese and Canada geese.

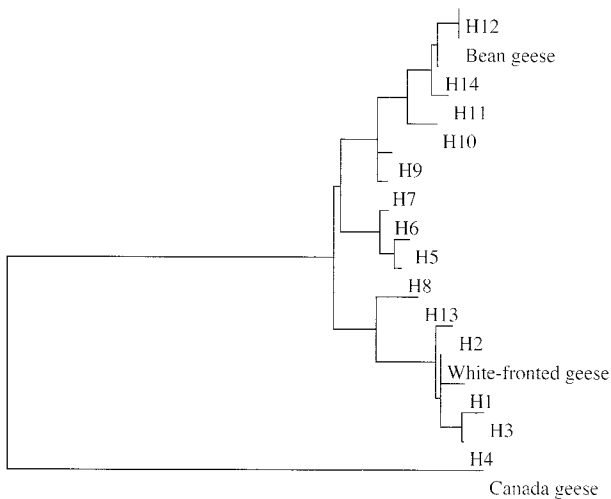


Fig. 3. A neighbor-joining tree of the haplotypes, Bean geese and White-fronted geese (AF363031). The Canadian geese (DQ019124) is the outgroup.

샘플 수를 증가하여 더 많은 data를 확보한다면, 우리나라 월동 기러기류들의 유전적 data와 지역 및 연도별 관계에 관한 더 많은 정보를 알아낼 수 있을 것으로 판단된다.

적 요

본 연구는 비침습적 분변 샘플을 이용하여 기러기류의 유전분석이 가능한지 알아보고자 수행되었다. 또한 본 연구에서는 분변을 이용한 연구의 실험적 효율성을 높이는 방법이 요구되었다. 따라서 2007년 한국에서 월동하는 겨울 기러기류의 분변을 서로 다른 두 집단에서 채집하였고, 최종적으로 총 32개 분변 샘플이 분자유전학적 기법으로 분석되었다. 그 결과 총 14개의 haplotype이 나타났으며, 이는 쇠기러기 (*Anser albifrons*)와 큰기러기 (*Anser fabalis*) 그룹으로 분류되었다. 분변을 이용한 연구는 야생에 서식하고 있는 종에게 직접적인 위협을 가하지 않는 방법으로 큰 의미가 있다. 본 연구를 통하여 분변 샘플을 이용한 분자유전학적 실험의 효율성을 높일 수 있는 연구방법이 찾아졌으며, 또한 이 결과는 비침습적 분변 샘플을 이용한 우리나라 월동 기러기류의 첫 번째 연구로서 그 의미가 있다.

사 사

본 연구는 학술진흥재단의 기초지원과제의 기금 및

수자원의 지속적 확보기술개발사업단의 연구비지원(1-0-3)에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- 김인규, 김창숙, 함규황. 1999. 최근 10년('89~'98)간 주남저수지 조류의 종수 및 개체수 변동에 관한 연구. 한국조류학회지. 6:127-132.
- 문화재정보센터(http://www.cha.go.kr/newinfo/Culresult_Db_View.jsp?VdkVgwKey=16,03250000,ZZ&queryText=V_KDCD=16).
- 박진영, 원병오. 1993. 주남저수지에 도래하는 큰기러기와 쇠기러기의 월동생태. 경희대학교 한국조류연구소. 4:1-24.
- Chambers PA, PS Duggan, JM Forbes and J Heritage. 2001. A rapid, reliable method for the extraction from avian faeces of total bacterial DNA to be used as a template for the detection of antibiotic resistance genes. J. Antimicrob. Chemoth. 47:239-246.
- Cottrell PE, AW Trites and EH Miller. 1996. Assessing the use of hard parts in faeces to identify harbour seal prey: results of captive-feeding trials. Can. J. Zool. 74:875-880.
- Deagle BE, DJ Tollit, SN Jarman, MA Hindell, AW Trites and NJ Gales. 2005. Molecular scatology as a tool to study diet: analysis of prey DNA in scats from captive Steller sea lions. Mol. Ecol. 14:1831-1842.
- Hamilton MJ, T Yan and MJ Sadowsky. 2006. Development of goose- and duck-specific markers to determine source of *Escherichia coli* in waterways. Appl. Environ. Microb. 72:4012-4019.
- Horvath MB, B Martinez-Cruz, JJ Negro, L Kalmar and JA Godoy. 2005. An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. J. Avian Biol. 36:84-88.
- Idaghdour Y, D Broderick and A Korrida. 2003. Faeces as a source of DNA for molecular studies in a threatened population of great bustards. Conserv. Genet. 4:789-792.
- Kurose N, R Masuda and M Tatara. 2005. Fecal DNA analysis for identifying species and sex of sympatric carnivores: A noninvasive method for conservation on the Tsushima islands, Japan. J. Hered. 96(6):688-697.
- Lampa S, B Gruber, K Henle and M Hoehn. 2008. An optimisation approach to increase DNA amplification success of otter faeces. Conserv. Genet. 9:201-210.
- Paxinos E, C McIntosh, K Ralls and R Fleischer. 1997. A non-invasive method for distinguishing among canid species: amplification and enzyme restriction of DNA from dung. Mol. Ecol. 6:483-486.
- Reed JZ, DJ Tollit, PM Thompson and W Amos. 1997. Mole-

- cular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. *Mol. Ecol.* 6:225-234.
- Segelbacher G. 2002. Noninvasive genetic analysis in birds: testing reliability of feather samples. *Mol. Ecol.* 2:367-369.
- Sorenson MD, JC Ast, ED Dimcheff, T Yuri and DP Mindell. 1999. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Mol. Phylogenet. Evol.* 12:105-144.
- Taberlet P, JJ Cammara, S Griffin, E Uhres, O Hanotte, LP Waits, C Dubois-Paganon, T Burke and J Bouvet. 1997. Non-invasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Mol. Ecol.* 6:869-876.
- Trites AW and R Joy. 2005. Dietary analysis from fecal samples: how many scats are enough? *J. Mammal.* 86:704-712.

Manuscript Received: April 24, 2008

Revision Accepted: August 27, 2008

Responsible Editor: Du Pyo Lee