

<원 저>

들소(*Bos javanicus*)로 밝혀진 호랑이 기념품: DNA 염기서열 분석에 의한 종 확인

이서진 · 현지연 · 민미숙 · 이무영 · 이 항*

서울대학교 수의과대학 야생동물유전자원은행 및 수의과학연구소
(접수: 2013년 3월 15일, 수정: 2013년 8월 6일, 게재승인: 2013년 11월 5일)

Souvenir made of tiger part revealed to be Banteng (*Bos javanicus*): species identification using DNA sequence analysis

Seo-Jin Lee, Jee Yun Hyun, Mi-Sook Min, Mu-Yeong Lee, Hang Lee*

Conservation Genome Resource Bank for Korean Wildlife (CGRB) and Research Institute for Veterinary Science,
College of Veterinary Medicine, Seoul National University

(Received: March 15, 2013; Revised: August 6, 2013; Accepted: November 5, 2013)

Abstract : Tigers are one of the most endangered species over the world and protected internationally or locally. However, they are still traded illegally for the Traditional East Asia Medicine or souvenirs / mementos as well as fake products. In the present study, to identify the species of the specimen known as the tiger's genitalia that was sold for mementos in China, two approaches of genetic tools and morphological comparisons were applied. On the basis of the entire sequences of mitochondrial cytochrome *b* gene (1,140 bp), the result of nucleotide comparisons showed that the specimen examined here is matched with banteng, *Bos javanicus* (Identities = 1,138/1,140; 99%). In addition, the examination of external morphological characters revealed that the genitalia of the specimen is much more similar to the one of cows, not to tigers. The outcomes highlighted that there are still some fake products of tigers traded in market and molecular genetic tools could help identifying species of wildlife products.

Keywords : banteng, cytochrome *b* gene, species identification, tiger

서 론

야생동물 신체의 일부에 대한 불법적 또는 합법적 거래는 야생동물 보호와 보전에 있어 매우 중요한 장애 요인이다. 보호대상 여부를 막론하고 2000년부터 2007년 사이에 살아 있는 야생동물 13,356,588마리와 야생동물에서 유래한 부위 30,309,815개가 합법적으로 동남아에서 수출되었다고 한다 [2]. 특히 아시아에서는 과학적으로 효과가 입증되지 않은 동아시아 전통의약품(traditional East Asian medicines), 장신구, 야생고기 등 많은 야생동물들이 상업적으로 거래되고 있다 [2, 6, 15, 24, 27]. 이로 인해 밀렵 또는 과도한 수렵이 자행되고 있으며 멸종위기 야생동물, 특히 대형 포유류의 생존을 크게 위협하고 있다.

이에 시장에서 불법적으로 거래되고 있는 야생 동·식물의 출처를 밝히고, 야생 동·식물의 보존과 관리 방법을 개선할 수 있는 유전학적 방법을 이용한 모니터링에 관심이 증가되고 있다. 유전학적 방법을 이용한 모니터링의 사례로는

이탈리아에서 미토콘드리아 cytochrome *b* 유전자와 microsatellite를 적용하여 수렵이 금지된 멧돼지를 확인하고, 이를 사냥한 범인을 체포하여 처벌한 사례와 [17], 법적 보호종인 늑대가 지속적으로 밀렵 및 밀거래 되고 있음을 미토콘드리아 control-region 유전자와 microsatellite를 이용하여 확인한 사례가 있다 [3]. 이뿐만 아니라, 미토콘드리아 유전자와 microsatellite를 이용한 DNA 감식법은 고래 고기의 불법적인 유통경로를 추적하고 출처 확인이 가능하도록 해 줌으로써 야생동물의 효과적인 관리와 보전에 크게 기여하고 있다 [1].

호랑이(*Panthera tigris*, *P. t.*)는 과거, 아시아 전역에 서식하였으나 [9, 20] 현재 약 3,000마리 정도가 고립되고 분할된 야생 서식지에 흩어져 서식하고 있는 것으로 알려져 있다 [4, 5, 22]. 전체 9아종 중 3아종(Javan, *P. t. sondaica*; Bali, *P. t. balica*; Caspian, *P. t. virgata*)은 멸종되었고, 한 아종은 야생에서 멸종된 것으로 보이며(Amoy, *P. t. amoyensis*), 5 아종(Bengali, *P. t. tigris*; Indochinese, *P. t.*

*Corresponding author

Tel: +82-2-880-1274, Fax: +82-2-888-2754

E-mail: hanglee@snu.ac.kr

corbetti; Amur, *P. t. altica*; Sumatran, *P. t. sumatrae*; Malayan, *P. t. jacksoni*)만 야생에서 현존하고 있다 [18, 19, 22, 26]. 호랑이의 보전과 효율적인 관리에 대한 국제적 관심이 매우 높아짐에 따라 국내·외에서 법적 보호를 받고 있다(멸종 위기에 처한 야생동·식물종의 국제거래에 관한 협약(Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna, CITES) 부속서 I급, 세계자연보전연맹 적색목록 위기 등급, 환경부지정 멸종위기 야생동식물 I급). 이러한 국제적 보전 노력과 관심 그리고 법에 의한 보호에도 불구하고 호랑이를 비롯한 대형고양이과 동물의 부위는 정력제 및 원기회복에 좋은 것으로 인식되어 보신용 또는 치료용 약으로써 거래되고 있다 [16, 30].

본 연구에서는 호랑이의 생식기라고 알려진 기념품의 진위여부와 그 정확한 유래를 확인하고자 외부형태 비교와 유전적 분석을 통해 종 동정을 실시하였고, 결과는 야생동물 부위로 거래되고 있는 상당수 물품이 실제로는 위조된 것일 수 있음을 보여주었다.

재료 및 방법

분석 시료

실험을 위한 시료는 중국에서 호랑이의 생식기로 거래되어, 실온에서 10년 이상 보관된 것으로 본 연구에 사용하였다(Fig. 1).



Fig. 1. The specimen assumed to be male genitalia from tiger by the owner. Arrows are sampling places for DNA extraction.

외부 형태

생식기의 육안 형태 식별을 위해, 미국 Fish & Wildlife Service(USFWS)에서 발행한 호랑이 생식기를 구별하는 지침에 따라 비교 관찰하였다(Table 1) [30].

유전학적 접근

Genomic DNA는 서로 다른 세 위치에서 드릴을 이용하여 시료 내부의 가루를 모아 QIAamp DNA Micro kit (Qiagen, USA)을 사용하여 DNA를 추출하였다(Fig. 1). 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 호랑이를 대상으로 개발된 특이적 primer set [5]와 일반적으로 포유류에서 종 식별을 위해 사용되는 보편적인 primer L14724와 H15915를 사용하였다 [14]. PCR조건은 touchdown PCR과 일반 PCR을 이용하였으며 Table 2와 같다. PCR product는 1% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다. 증폭된 유전자의 염기서열 결정은 BigDye Terminators v 3.1 Kit(Applied Biosystems, USA)로 반응한 후 ABI3730xl DNA Analyzer(Applied Biosystems)를 이용하여 수행하였다. 유전자 염기서열은 Geneious Pro 5 프로그램을 이용하여 조합하였으며 [25], 조합된 염기서열은 NCBI의 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)를 통해 비교하였다.

Table 1. Guideline that can be used to identify a tiger as a suspicious species source when investigating dried genitalia [30]

To eliminate tiger, consider the following characteristics
A dried penis CANNOT be from tiger if
1) very obvious barbs or spines cover the tip (It is probably from a large ungulate.)
2) it has a large baculum visible on x-ray (It is probably from a carnivore.)
3) it is long (> 8 inches) from tip to scrotum (It is probably deer, cattle, or horse.)

Table 2. Polymerase chain reaction condition for the amplification of mitochondrial DNA cytochrome *b* gene

	94°C	60~50°C	72°C	Cycle (s)
Driscoll <i>et al.</i> [4] primer set	4 min	-	-	1
	15 sec	30 sec (-0.5°C)*	15 sec	21
		50°C		
	15 sec	30 sec	15 sec	20
	-	-	7 min	1
			4°C keep	
	94°C	44°C	72°C	Cycle (s)
Kocher <i>et al.</i> [14] primer set	4 min	-	-	1
	1 min	45 sec	1 min 20 sec	32
	-	-	7 min	1
			4°C keep	

*The annealing temperature is decreased 0.5°C in each annealing cycles.

결 과

형태적 접근

USFWS에서 제시한 외부형태의 기준에 따르면, 대형고양이과 동물의 생식기는 끝부분에 가시가 있고, 끝에서 약 2 cm 정도 존재한다. 또한 가시는 0.7 mm로 매우 작으며 건조된 생식기에서 겨우 발견할 수 있다. 이와 비교하여 보았을 때 본 연구에 사용된 시료의 외부형태는 생식기 선단부분에 뚜렷한 가시가 덮여 있었고, 음낭으로부터 생식기 끝까지의 길이가 20 cm 이상이었다(Fig. 1). 이는 USFWS의 지침서 표1에 따라 사슴(deer), 소(cattle), 말(horse) 등, 유제류의 생식기일 가능성을 보여주는 것이다.

유전학적 접근

시료의 오염 및 실험의 안정성을 확보하기 위해 대조검토(Cross-check) 조사방법을 적용하여 생식기의 세 위치로부터 얻은 시료로부터 Genomic DNA를 성공적으로 추출하였다. 추출한 DNA 1, 2, 3은 호랑이 아종을 구별할 수 있도록 개발된 여덟 개의 primer set 중 CytbF/CytbR primer set(PS1)에서만 증폭되었으며, 나머지 primer set에서는 증폭되지 않았다. 이러한 결과는 앞서 형태적 방법에 의해 밝혀진 것처럼 호랑이 생식기가 아닐 가능성을 보여주었다(호랑이 특이적인 프라이머를 사용하였기 때문에, 호랑이가 아닐 경우 증폭에 있어서 실패한다). 이에 따라 확실한 종 식별을 위해 종 동정에 많이 사용되는 cytochrome *b* 유전자를 증폭하기 위해 L14724/H15915 primer set(PS2)을 이용하여 PCR을 실시하였고, 성공적으로 증폭하였다. 염기서열 비교분석 결과, 생식기의 서로 다른 세 위치로부터 얻은 시료에서 추출한 DNA로부터 얻은 cytochrome *b* 유전자(1,140 bp)의 염기서열은 100% 일치하였다. 확보된 염기서열 PS1(122 bp)과 PS2(1,140 bp)를 NCBI의 BLAST를 통해 비교한 결과, 각각 들소(*Bos javanicus*)와 99%(121/122), 99%(1,138/1,140)의 유사성을 보였으며, 다음으로, PS1의 경우 가알소(*Bos frontalis*)와 97%(118/122), PS2의 경우 인도들소(*Bos gaurus*)와 95%(1,086/1,140)의 유사성을 나타내었다.

고 찰

합법 또는 불법으로 지구상에서 거래되지 않는 야생동물은 거의 없을 것이다. 건강보조식품으로, 장식이나 애완용으로, 고기와 가죽을 얻기 위해서, 향수나 약품의 성분으로 가공하기 위한 거래가 이루어지고 있다. 많은 불법적 야생동물 거래는 밀렵을 통해 이루어지고 있으나 때로는 CITES 협약을 피하여 야생에서 잡힌 동물을 사육 하에 번식시킨 동물로 서류를 위조하여 거래가 이루어지는 경우도 있다. 심지어 법적으로 금지된 멸종위기 종의 거래가 동물원 또는 식물원 등을 통해 CITES 허가를 받아 합법적으로 이루어지기도 한다 [29]. 뿐만 아니라 밀렵과 밀거래가 이루어지고 있는 곳에서는 경제적 가치가 높은 종들의 경우, 그 수가 급격히 감

소되어 멸종위기에 처해 있어 실제로는 대상종을 포획하기 어려운 경우가 많다. 이런 경우에는 그와 유사한 형태를 지닌 다른 종의 부위가 위조품으로 대신 거래되는 경우가 있다. 예를 들어, 소(cattle), 개(dog) 그리고 사슴(deer)의 생식기가 호랑이와 바다표범(seal)의 생식기로 둔갑하여 거래되고 있다고 한다 [30]. 중국의 한 음식점에서는 호랑이 고기를 판매하고 있다고 알려졌으나, 중국 국무원 국가입업국에서 DNA조사 결과 당나귀 고기로 밝혀졌다(연합뉴스 2005-09-09). 그 외 국내에서도 1985년 6월 26일 경향신문에 따르면 국립보건원 분석 결과 당시 판매되고 있는 웅담의 90%가 가짜인 것으로 밝혀졌다. 또한, 사슴의 생식기를 해구신으로, 돼지쓸개를 웅담으로, 물뱀을 백사로 둔갑하여 비싼 가격에 거래를 하였으며(SBS뉴스, 연합뉴스 2006-02-14), 밀반입된 호랑이 가죽을 국립생물자원관에서 DNA분석결과 호랑이가 아닌 개로 밝혀진 사례가 있다(연합뉴스 2011-04-24). 이처럼 이번 연구를 통해 확인된 호랑이뿐만 아니라 다른 야생동물도 다른 종으로 둔갑하여 밀거래가 성행하고 있음을 확인할 수 있다.

본 연구에서는 호랑이 생식기로 알려진 시료를 형태적 및 유전학적 접근을 통해 종 식별을 시도하였다. 형태학적 확인은 USFWS의 지침서를 따라 비교하였고, 유전학적 확인은 최근 종 식별을 위해서 다양한 종에 적용되고 있으며 많은 데이터가 확보되어 있는 미토콘드리아 cytochrome *b* 유전자를 이용하여 수행하였다 [11, 12, 14, 27]. 그 결과 호랑이 생식기로 알고 있던 시료는 형태적 및 유전적 확인을 통해, 호랑이가 아닌 동남아시아에 서식하는 들소(*B. javanicus*, banteng)의 생식기로 확인되었다.

야생 동·식물 부위를 약재로 사용하는 동아시아의 전통 의약품은 중국 등지에서 약 5,000년의 역사를 가지고 있으나, 그 효과에 대해서 과학적으로 입증되지 않은 경우가 많다. 호랑이 생식기는 최음제 또는 강장제의 효능이 있다고 생각되어 수프나 차로 이용한다고 하며 [30], 호랑이의 발톱, 이빨, 꼬리, 지방 등 거의 모든 부위가 여러 의약품으로 이용되고 있다 [21]. 뿐만 아니라, 안전하고 효과적인 약품이 개발되어 있음에도 불구하고, 간세포에 좋은 우루소데옥시콜산(ursodeoxycholic acid)이 곰의 담즙에서 처음 발견되었다는 이유로 곰의 담즙을 사용하기 위해 비위생적이며, 비윤리적인 환경을 통해 불법거래가 이루어지고 있다 [7, 8, 10, 13, 14, 23, 28]. Wong 등 [29]에 의하면 감기 환자들을 대상으로 위약과 중국전통의학(traditional Chinese medicine)의 한 방법인 식물을 이용한 임상실험 결과 그 차이가 거의 없음을 확인 할 수 있었다 [29]. 따라서, 전통의약품을 이용하는 데 있어 그에 대한 안정성과 효과입증 연구가 필요하다.

본 연구 결과는 비싼 가격에 거래되고 있는 호랑이 부위가 실제로는 흔한 가죽에서 유래된 제품일 가능성이 있다는 사실을 다시 한 번 확인해 주었다. 이는 야생동물에서 유래한 상품 구입을 자제해야 할 부가적인 이유를 제공해 준다. 이와 더불어, 유전학적 종 동정 방법은 야생동물 유래 상품의 형태적 동정이 어려울 때, 종 동정을 가능하게 하여 적절

한 법적 조치를 취할 수 있는 근거를 제시해 줄 수 있을 것이다. 이러한 방법은 위조된 상품을 확인하기 위한 목적에도 유용하게 쓰일 수 있을 것이다. 이는 결국 멸종위기 야생동물의 효율적인 보전과 관리에도 기여하게 될 것이다.

감사의 글

이 논문은 2012년 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행되었습니다(NRF-2012S1A5B6034265; 인간동물문화연구). 일부 지원을 해준 서울대학교 수의과학연구소와 연구에 사용된 시료를 익명으로 기증해주신 분께 감사드립니다.

References

- Baker CS, Steel D, Choi Y, Lee H, Kim KS, Choi SK, Ma YU, Hambleton C, Psihoyos L, Brownell RL, Funahashi N. Genetic evidence of illegal trade in protected whales links Japan with the US and South Korea. *Biol Lett* 2010, **6**, 647-650.
- Bryan C. Asia's Wildlife Trade. *Natl Geogr Mag* 2010, January, 2-25.
- Caniglia R, Fabbri E, Greco C, Galaverni M, Randi E. Forensic DNA against wildlife poaching: identification of a serial wolf killing in Italy. *Forensic Sci Int Genet* 2010, **4**, 334-338.
- Dinerstein E, Loucks C, Wikramanayake E, Ginsberg J, Sanderson E, Seidensticker J, Forrest J, Bryja G, Heydlauff A, Klenzendorf S, Leimgruber P, Mills J, O'Brien TG, Shrestha M, Simons R, Songer M. The fate of wild tigers. *Bioscience* 2007, **57**, 508-514.
- Driscoll CA, Yamaguchi N, Bar-Gal GK, Roca AL, Luo SJ, Macdonald DW, O'Brien SJ. Mitochondrial phylogeography illuminates the origin of the extinct caspian tiger and its relationship to the amur tiger. *PLoS One* 2009, **4**, e4125.
- Dubey B, Meganathan PR, Haque I. DNA mini-barcoding: an approach for forensic identification of some endangered Indian snake species. *Forensic Sci Int Genet* 2011, **5**, 181-184.
- Espinoza EO, Shafer JA, Hagey LR. International trade in bear gall bladders: forensic source inference. *J Forensic Sci* 1993, **38**, 1363-1371.
- Hagey LR, Crombie DL, Espinosa E, Carey MC, Igimi H, Hofmann AF. Ursodeoxycholic acid in the Ursidae: biliary bile acids of bears, pandas, and related carnivores. *J Lipid Res* 1993, **34**, 1911-1917.
- Hemmer H. The phylogeny of the tiger (*Panthera tigris*). In: Tilson RL, Seal US (eds.). *Tigers of the World: The Biology, Biopolitics, Management and Conservation of an Endangered Species*. pp. 28-35, NJ: Noyes Publications, Park Ridge, 1987.
- Hammarsten O. Untersuchungen über die gallen einiger polarthiere. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1901, **32**, 435-466.
- Hsieh HM, Chiang HL, Tsai LC, Lai SY, Huang NE, Linacre A, Lee JCI. Cytochrome *b* gene for species identification of the conservation animals. *Forensic Sci Int* 2001, **122**, 7-18.
- Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *J Mol Evol* 1991, **32**, 128-144.
- Iwasaki T. Über the Konsitution der ursodeoxycholsaure. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1936, **244**, 181-193.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, **86**, 6196-6200.
- Lee JCI, Tsai LC, Liao SP, Linacre A, Hsieh HM. Species identification using the cytochrome *b* gene of commercial turtle shells. *Forensic Sci Int Genet* 2009, **3**, 67-73.
- Linacre A, Tobe SS. On the trial of tigers—tracking tiger in traditional East Asian medicine. *FSI genetics supplement series* 2008, **1**, 603-604.
- Lorenzini R. DNA forensics and the poaching of wildlife in Italy: a case study. *Forensic Sci Int* 2005, **153**, 218-221.
- Luo SJ, Johnson WE, Martenson J, Antunes A, Martelli P, Uphyrkina O, Traylor-Holzer K, Smith JLD, O'Brien SJ. Subspecies genetic assignments of worldwide captive tigers increase conservation value of captive populations. *Curr Biol* 2008, **18**, 592-596.
- Luo SJ, Kim JH, Johnson WE, der Walt J, Martenson J, Yuhki N, Miquelle DG, Uphyrkina O, Goodrich JM, Quigley HB, Tilson R, Brady G, Martelli P, Subramaniam V, McDougal C, Hean S, Huang SQ, Pan W, Karanth UK, Sunquist M, Smith JLD, O'Brien SJ. Phylogeography and genetic ancestry of tigers (*Panthera tigris*). *PLoS Biol* 2004, **2**, e442.
- Mazák V. *Panthera tigris*. *Mammalian Species*. 1981, **152**, 1-8.
- Mills JA, Jackson P. *Killed for a Cure: A Review of the Worldwide Trade in Tiger Bone*. TRAFFIC International, Cambridge, 1994.
- Morell V. *Wildlife biology. Can the wild tiger survive?* *Science* 2007, **317**, 1312-1314.
- Nowak G, Norén UG, Wernerson A, Marschall HU, Möller L, Ericzon BG. Enteral donor pre-treatment with ursodeoxycholic acid protects the liver against ischaemia-reperfusion injury in rats. *Transpl Int* 2005, **17**, 804-809.
- Peppin L, McEwing R, Carvalho GR, Ogden R. A DNA-Based approach for the forensic identification of Asiatic black bear (*Ursus thibetanus*) in a traditional Asian medicine. *J Forensic Sci* 2008, **53**, 1358-1362.
- Pereira F, Carneiro J, Matthiesen R, van Asch B, Pinto N, Gusmão L, Amorim A. Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences. *Nucleic Acids Res* 2010, **38**, e203.
- Tilson R, Defu H, Muntifering J, Nyhus PJ. Dramatic decline of wild South China tigers *Panthera tigris amoyensis*: field survey of priority tiger reserves. *Oryx* 2004, **38**, 40-47.
- Tsai LC, Huang MT, Hsiao CT, Lin ACY, Chen SJ, Lee JCI, Hsieh HM. Species identification of animal specimens by cytochrome *b* gene. *Forensic Sci J* 2007, **6**, 63-65.
- Twiss MP, Thomas VG. Illegal harvests of black bears, sale of black bear parts, and the Canadian legislative response. *Wildl Soc Bull* 1999, **27**, 692-697.
- Wong WCW, Lee A, Lam AT, Li KT, Leung CYM, Leung PC, Wong ELY, Tang JL. Effectiveness of a Chinese herbal

medicine preparation in the treatment of cough in uncomplicated upper respiratory tract infection: a randomized double-blinded placebo-control trial. *Cough* 2006, **2**, 5

30. **Yates BC**. Distinguishing real vs fake tiger penises.

Identification guides for wildlife law enforcement No. 6. USFWS, National Fish and Wildlife Forensics Laboratory, Ashland, 2005.