

## mtDNA D-loop 염기서열 변이를 이용한 토종오리의 계통 분류

최누리<sup>1</sup> · 서동원<sup>1</sup> · 진선덕<sup>2</sup> · 술타나<sup>1</sup> · 허강녕<sup>3</sup> · 이준헌<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>충남대학교 동물자원생명과학과, <sup>2</sup>국립중앙과학관 자연사연구팀, <sup>3</sup>농촌진흥청 국립축산과학원 가금과

### Phylogenetic Analysis using mtDNA D-loop Sequences in Korean Native Ducks

Nu Ri Choi<sup>1</sup>, Dong Won Seo<sup>1</sup>, Seon Deok Jin<sup>2</sup>, Hasina Sultana<sup>1</sup>, Kang Nyeong Heo<sup>3</sup> and Jun Heon Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Science and Biotechnology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

<sup>2</sup>Natural History Research Team, National Science Museum, Daejeon 305-705, Korea

<sup>3</sup>Poultry Science Division, National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan 331-801, Korea

**ABSTRACT** Recently, the consumption of duck meat has been gradually increased in Korea. However, most of the duck breeds in Korea were imported from overseas. Based on the large demands for the breeding stocks of native ducks, a new project for the commercial use of the Korean native ducks has been launched. For the initial investigation of the relationships between Korean native duck (KND) with other duck breeds, the sequences from D-loop control region in mitochondrial DNA (mtDNA) was used. The results from phylogenetic analysis indicated that both KND and White Commercial Duck (WCD) breeds were classified well with wild duck breeds. However, mallard duck was not discriminated well with KND. The haplotype analysis indicated that KND and WCD have eight different haplotypes with eleven SNPs. Three haplotypes (haplotype 1, 3, 4) were shared both in KND and WCD. On the other hand, haplotype 1 was appeared only KND and haplotype 5, 6, 7, 8 were identified only in WCD population. With further verifications, the results presented here can be used for the conservation and commercialization of the Korean native ducks.

(Key words : D-loop, haplotype, Korean native duck, phylogeny)

## 서 론

오리고기는 불포화 지방산 함량이 다른 고기에 비해 높은 것으로 알려져 있으며, 불포화 지방산은 혈중 콜레스테롤을 감소시켜 혈압을 낮추는 역할로 성인병 예방에 효과적이라고 알려져 있다(Farhat and Chavez, 2000; 국길 등, 2005; 방한태 등, 2010). 최근 소비자들의 건강에 대한 관심도가 증가함에 따라 연간 1인당 오리 소비량이 2009년 2,110 g에서 2012년 3,400 g으로 증가하였고, 국내 오리 산업의 생산량도 2009년 104,639톤에서 2012년 169,568톤으로 꾸준히 증가하고 있는 추세이다(농림축산식품부, 2013). 그러나 국내에서 사육하고 있는 종오리의 90%는 영국의 Cherry Valley사와 프랑스의 Grimaud사에서 도입되는 실정이다(김학규 등, 2012). 따라서 우리나라 오리 산업의 경쟁력을 강화하고, 고품질, 고급육 생산을 위해 외래오리와 다른 유전자원을

가진 토종오리의 생산이 필요하다. 토종오리는 재래오리 및 가금화된 청둥오리로 불리는데, 그 기원은 예전부터 길러 오던 집오리와 청둥오리가 교잡되어 우리나라 기후에 적응된 품종으로 외모는 청둥오리를 닮았으나, 잘 날지 못하는 특성을 가지고 있다(축산기술연구소, 1999). 국립축산과학원은 1994년부터 토종오리를 이용하여 체계적인 혈통고정화 작업을 통해 순종화를 진행하였다(김학규 등, 2012). 그러나 순종화된 토종오리에 대한 유전적 다양성과 계통유전학적 분석 등에 대한 연구는 미비하여 개체 및 품종식별 마커가 필요한 실정이다.

mtDNA(mitochondrial DNA)는 고리모양의 이중나선 DNA로 핵 DNA와는 독립적으로 모계 유전하는 특성 때문에 재조합이 잘 일어나지 않는 특징을 가지고 있다(Clayton, 1982; Mindell et al., 1997; Delport et al., 2002). mtDNA의 여러 영역 중에서 D(displacement)-loop control 영역은 단백질을 만

\* To whom correspondence should be addressed : junheon@cnu.ac.kr

드는 해독 기능이 없으며, 종마다 고유의 특이 서열이 반복되는 tandem repeat을 가지고 있다. 또한, 타 유전자에 비해 진화속도가 빠르기 때문에 모계유전에 대한 추정 및 품종의 식별에 중요한 유전적 마커로써 이용되고 있다(Lansman et al., 1983; Ki et al., 2009).

최근, D-loop 영역을 이용한 오리의 계통분류학적 분석은 중국의 재래오리(Li et al., 2010), 러시아 극동지역의 Eastern Spot-billed Duck(*Anas zonorhyncha*)과 Mallards(*Anas platyrhynchos*)의 교잡종(Kulikova et al., 2004)에 관한 연구가 보고되었다. 국내의 경우, Jin et al.(2014)이 오리의 mtDNA D-loop 영역의 염기서열 변이를 이용한 유전적 다양성 연구가 보고된 바 있으나, 토종오리와 백색실용오리의 유전적 변이와 haplotype에 관한 연구 결과는 아직 보고되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 토종오리와 백색실용오리의 mtDNA D-loop control 영역의 염기서열을 분석하여 토종오리가 가지고 있는 고유의 haplotype을 확인하고, 토종오리와 백색실용오리, 야생오리와 계통 유전학적 유연관계를 추정하는데 목적이 있다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시 재료 및 DNA 추출

본 연구에서는 국립축산과학원 가금과에서 보유하고 있는 토종오리 20수, 백색실용오리 20수의 익정맥에서 1 mL의 혈액을 채취하여 사용하였다. Genomic DNA의 추출은 헤파린이 들어있는 튜브에서 전혈 20  $\mu$ L를 취하여 1× PBS (Phosphate Buffered Saline) 180  $\mu$ L를 첨가해 PrimePrep™ Genomic DNA isolation kit for blood kit(GeNetBio, Korea)를 이용하였다. 추출한 DNA는 NanoDrop 2000C 분광 광도계(Thermo Scientific, USA)를 이용하여 농도를 확인한 후 다음 연구가 수행될 때까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

### 2. mtDNA D-loop 염기서열 분석

mtDNA의 D-loop control 영역의 증폭을 위한 primer는 reference primer set 염기서열(Forward : 5'-GTTATTGGT-TATGCATATCGTG-3', Reverse : 5'-CCATATACGCCAAC-CGTCTC-3')을 이용하여 PCR을 수행하였다(Sorenson et al., 1999). PCR 증폭은 My-Genie96 Thermal Block(Bioneer, Korea)을 이용하였으며, 반응액은 50 ng 주형 DNA, 1× buffer, 각각의 1 pmol primer, 2.5 mM dNTPs, Prime Taq polymerase 1 unit(GeNetBio, Korea)를 첨가하여 총 20  $\mu$ L를 조성

하였다. PCR 반응 조건은 최초  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 변성(pre-denaturation) 처리 후,  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 45초,  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 45초,  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 변성-결합(annealing)-신장(extension)의 과정을 35회 반복한 후  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 7분간 마지막 신장 처리 후 반응을 종료하였다. PCR 증폭산물은 2% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. 증폭산물은 PrimePrep™ PCR Purification Kit (GeNetBio, Korea)를 이용하여 정제한 후 직접 염기서열 분석을 수행하였다.

### 3. 계통 유전학적 데이터 분석

염기서열 데이터 분석은 Bioedit Sequence Alignment Editor를 통해 염기서열을 확인한 후 ClustalW2(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)를 이용하여 D-loop control 영역을 염기정렬 하였다. Sequence divergency는 Kimura 2 parameter (K2P) 모델을 이용하여 계산하였고, 계통도 분석은 MEGA6 프로그램(Tamura et al., 2013)의 K2P를 적용한 Neighbor-Joining(NJ) 방법으로 분석하였다. 변이 부위 탐색, 유전적 변이성의 추정 및 haplotype의 계산은 DNA Sequence Polymorphism(DNasp Ver. 5.1)(Librado and Rozas, 2009) 소프트웨어를 이용하였다. 분석한 haplotype은 Bandelt et al.(1999)의 방법을 이용한 NETWORK 4.6.1.2 program을 이용하여 도식화하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 토종오리 mtDNA D-loop의 염기변이 및 Haplotype

본 연구에서 710 bp의 크기를 가진 토종오리 및 백색실용오리의 D-loop 염기서열을 분석하였으며, ClustalW2 프로그램을 이용하여 alignment를 수행한 결과, 11개의 단일 염기 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 관찰하였고, 총 8개의 haplotype으로 구분됨을 확인할 수 있었다(Table 1). 이는 Li et al.(2010)의 72개 haplotype과 Jin et al.(2014)의 45개의 haplotype과 비교하면 매우 적은 숫자이나 Li et al.(2010)의 경우, 26 품종의 집오리를 사용하였고, Jin et al.(2014)의 경우, 7종의 야생오리를 사용한 데 비해 본 연구에서는 단 두 품종인 토종오리 집단과 백색실용오리 집단을 비교하였기 때문이라고 판단된다. 또한 토종오리의 경우, 20년간 토착화되어 외부 집단이 유입되지 않아 유전적 변이 및 haplotype 다양성이 감소되었을 것이라 사료된다. 이렇게 확인된 8개의 haplotype 중에서 haplotype 1, 3, 4는 토종오리와 백색실용오리 두 품종 모두에서 나타났고, haplotype 5,

**Table 1.** The identified SNP positions and haplotypes using mtDNA D-loop control region in Korean native ducks<sup>1</sup>

Haplotype	58	89	131	156	165	189	208	233	387	544	549	No. <sup>2</sup>	Total <sup>3</sup>	Haplotype frequency
1	T	C	C	C	A	C	C	A	A	T	G	KND (7) WCD (4)	11	27.5
2	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	T	KND (1)	1	2.5
3	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	KND (5) WCD (2)	7	17.5
4	-	-	-	T	-	-	T	-	-	C	-	KND (7) WCD (8)	15	37.5
5	-	T	-	.	G	-	-	-	-	-	-	WCD (1)	1	2.5
6	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	WCD (3)	3	7.5
7	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	WCD (1)	1	2.5
8	C	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	WCD (1)	1	2.5

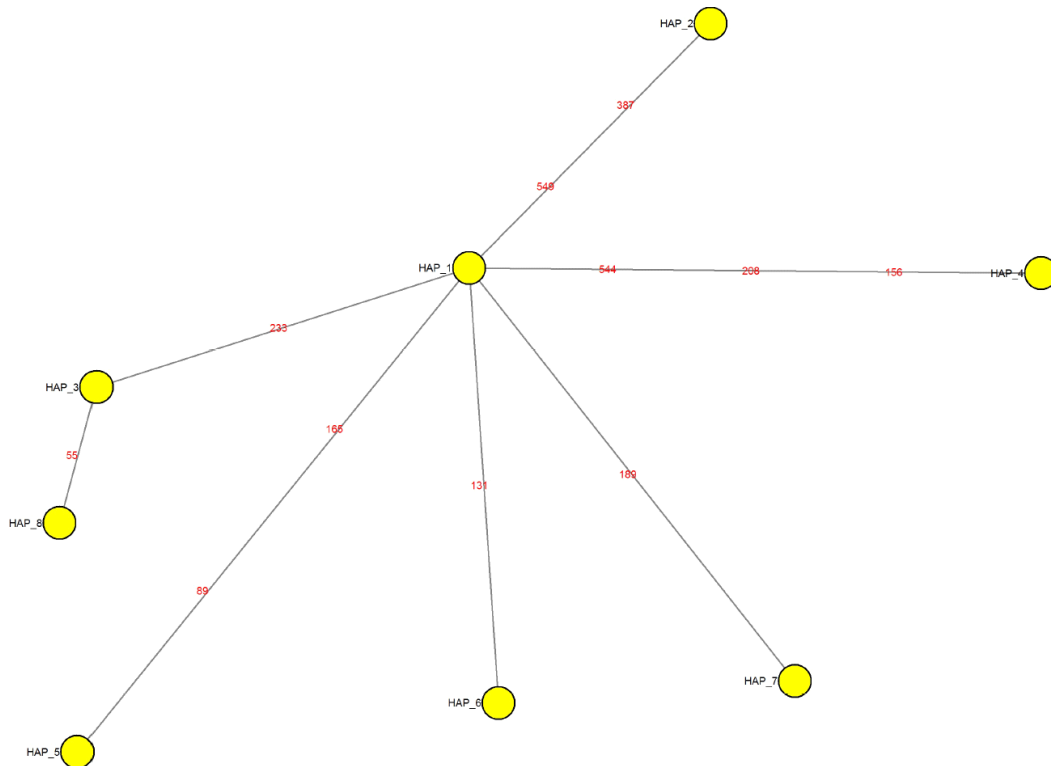
<sup>1</sup> dot (.) indicates the same nucleotide appeared in haplotype 1.

<sup>2</sup> KND and WCD indicate Korean native duck and white commercial duck, respectively.

<sup>3</sup> Total number of animals.

6, 7, 8은 백색실용오리에서만 관찰되었다. 특히 haplotype 2는 1개의 토종오리 샘플에서만 확인되어 토종오리 고유의 haplotype인지 추가 분석이 필요할 것으로 사료된다. 토종오리와 백색실용오리의 haplotype 관계를 확인하기 위해 NETWORK 4.6.1.2 프로그램을 사용하여 두 품종의 haplotype을

도식화하였다(Fig. 1). 그 결과, haplotype 1에서 다른 haplotype이 뺀어나가는 모식도가 그려져 haplotype 1 그룹과 나머지 그룹들이 연관성이 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이는 토종오리와 백색실용오리가 모계 기원을 공유하고 있는 것으로 추정할 수 있다. 그러나 mtDNA의 D-loop control



**Fig. 1.** Median-joining network profile of the haplotypes identified in Korean native ducks.

영역 내의 변이만으로는 토종오리와 백색실용오리 품종을 구분하는데 어려움이 있어, 추가적인 마커 연구가 필요할 것으로 판단된다.

2. 계통수 분석

토종오리와 백색실용오리의 유전적 거리와 토종오리와 야생오리와의 품종 차이를 확인하기 위해 Jin et al.(2014)이 이용한 한국야생오리인 쇠오리(*Anas crecca*), 고방오리(*Anas acuta*), 가창오리(*Anas formosa*), 붉은머리오리(*Anas penelope*), 청둥오리(*Anas platyrhynchos*) 중 임의로 각각 3수의 염기서열을 추가하여 계통도를 작성하였다. 이들의 개체 및 계통간의 차이를 비교 분석하기 위해 NJ법으로 염기서열의 변이 부위를 구분하였으며, 그 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 5품종의 야생오리는 각각 독립된 그룹을 형성하며 구분이 되었지만, 토종오리와 백색실용오리는 haplotype 분석 결과에서도 보았듯이 두 품종이 혼재되어 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 또한 토종오리와 백색실용오리는 청둥오리와 가까운 유연관계를 나타내고 있는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 토종오리가 지속적으로 개량하여 왔다는 축산기술연구소(1999)의 보고에서도 확인할 수 있다. Jin et al.(2014)의

연구에서도 mtDNA를 이용한 품종의 구분에서 집오리가 청둥오리 및 흰뺨검둥오리와 구분이 잘 되지 않는 결과를 확인하였다. 따라서 mtDNA의 D-loop control 영역은 청둥오리와 흰뺨검둥오리를 제외한 야생오리 품종을 구분할 때는 유용하게 활용될 수 있지만, 토종오리의 구분에는 어려움이 있어 mtDNA의 다른 영역을 이용하거나 개체 및 품종 식별력이 높은 microsatellite 마커 등의 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

3. 유전적 다양성 추정

품종 또는 집단의 유전적 다양성을 평가하는 주요 지표는 haplotype 다양성(Haplotype diversity, Hd) 지수와 염기 다양성(nucleotide diversity, Pi) 지수의 값과 관련이 있다. 토종오리와 백색실용오리의 D-loop control 영역의 염기서열 분석 결과, Hd 지수는 Table 1의 haplotype 수에서 나타났듯이 토종오리 집단이 0.726, 백색실용오리 집단이 0.800으로 백색실용오리가 토종오리 집단보다 다양성 지수가 높음을 알 수 있다(Table 2). Jin et al.(2014)은 한국 야생오리의 평균 Hd 지수를 0.91로 확인하였으며, Li et al.(2010)의 중국 domestic 오리 26품종 중 Youxian(YX) 오리와 Jingjiang Ma(JJ) 오리



Fig. 2. The constructed phylogenetic neighbor-joining tree using the D-loop control region sequences in Korean native ducks.

**Table 2.** Number of Haplotype (h), Haplotype diversity (Hd), nucleotide diversity (Pi) and average number of nucleotide difference (K) of the D-loop control region sequences in Korean native ducks.

	h	Hd	Pi	K
all	8	0.764	0.003	2.213
KND <sup>1</sup>	4	0.726	0.003	2.032
WCD <sup>1</sup>	7	0.800	0.003	2.453

<sup>1</sup> KND and WCD indicate Korean native duck and white commercial duck, respectively.

의 Hd 지수는 각각 0.833, 0.803으로 나타나, 토종오리의 Hd 지수보다 높은 것을 확인할 수 있다. 그러나 중국 domestic 오리 24품종은 토종오리보다 Hd 지수가 낮은 것을 미루어 볼 때 토종오리는 지속적인 순종화에도 불구하고 다형성이 보존되고 있거나, 유전적 개량이 덜 된 것으로 사료된다. 따라서 이들을 이용해 외부 유전자 유입 없이 품종 내 교배 계획을 수립하는 것은 다양한 특성의 계통으로의 발전 가능성이 있는 것으로 판단된다. Pi 지수는 0.003으로 토종오리 집단과 백색실용오리 집단에게 동일하게 나타났다. Jin et al. (2014)은 야생오리의 Pi 지수가 평균 0.01값을 나타내고, Li et al.(2010)은 domestic 오리 26 품종의 Pi 지수가 평균 0.115로 높게 나와 토종오리의 Pi 지수는 매우 낮음을 확인할 수 있다. 이는 domestic 오리 26품종의 전체 수가 238수를 사용한 데 비해, 토종오리와 백색실용오리의 개체 수는 집단별 20수를 사용해 상대적으로 적은 수의 샘플을 사용하였기 때문이라 사료된다. K(average number of nucleotide difference)는 토종오리와 백색실용오리에서 각각 2.032, 2.453으로 나타났다는데, 이는 백색실용오리의 염기변이가 토종오리의 염기변이보다 많기 때문이라 판단된다(Table 2).

이상의 결과로 토종오리와 백색실용오리의 D-loop control 영역 내에 11개 SNP와 8개의 haplotype을 확인할 수 있었다. D-loop control 영역의 염기서열을 분석한 결과, 토종오리와 백색실용오리는 D-loop 영역의 서로 같은 haplotype을 공유하고 있기 때문에 mtDNA의 D-loop 변이를 이용한 품종 및 개체 식별은 어려운 것으로 판단된다. 또한, 계통 분석 결과에서 토종오리의 계통군은 청둥오리와 그룹을 공유하는 것을 미루어 토종오리의 기원이 청둥오리가 개량되어 가축화 되었다는 설을 재확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 확인된 haplotype 분석 결과는 추후 토종오리의 고유성을 인정할 수 있는 기초적인 근거로 이용될 수 있을 것이다. 또한

본 연구와 더불어 microsatellite 마커나 SNP 마커를 이용하여 토종오리와 백색실용오리를 구분할 수 있는 추가 마커개발 연구가 필요하다고 사료된다.

## 적 요

최근 국내 오리고기 산업이 점진적으로 증가하고 있으나, 국내에서 생산되고 있는 대부분의 오리 종자는 수입에 의존하고 있는 실정이다. 이러한 의존도를 낮추기 위해서 국립 축산과학원에서는 토종오리 상용화 연구를 시작하였으며, 이에 토종오리 품종 및 개체 식별의 필요성이 대두되었다. 본 연구에서는 토종오리와 백색실용오리가 다른 야생오리 품종과 얼마나 연관되어 있는지를 알아보기 위해 미토콘드리아 DNA의 D-loop control 영역의 염기서열을 이용하여 계통분석을 수행하였다. 그 결과, 토종오리와 백색실용오리는 대부분의 야생오리 품종과는 구분이 잘 되지만, 청둥오리와는 분류가 되지 않는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 토종오리와 백색실용오리 품종간의 분류 또한 이들 집단이 다수의 변이와 haplotype을 공유하고 있음을 확인할 수 있었다. 분석 결과, 11개의 염기 변이가 확인되었으며, 이 변이들은 8개 haplotype으로 구성되어 있었다. 이 중 토종오리에서만 확인된 haplotype 2를 제외한 3개의 haplotype(haplotype number 1, 3, 4)에서 토종오리와 백색실용오리가 동일한 haplotype을 가진 반면, haplotype 5, 6, 7, 8은 백색실용오리에서만 확인되었다. 이상의 결과를 바탕으로 D-loop control 영역은 토종오리와 야생오리의 품종 구분을 위한 기초 자료로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

(색인어 : D-loop, Haplotype, 토종오리, 계통분류)

## 사 사

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 : N012014-02280025)의 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Bandelt HJ, Forster P, Rohlf A 1999 Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 44: 1109-1119.
- Clayton DA 1982 Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28:693-705.

- Delport W, Ferguson JWH, Bloomer P 2002 Characterization and evolution of the mitochondrial DNA control region in hornbills (*Bucerotiformes*). *J Mol Evol* 54:794-806.
- Falhat A, Chavez EZ 2000 Comparative performance, blood chemistry, and carcass composition of two lines of Penkin ducks reared mixed or separated by sex. *Poultry Sci* 79: 460-465.
- Jin SD, Hoque MR, Seo DW, Paek WK, Kang TH, Kim HK, Lee JH 2014 Phylogenetic analysis between domestic and wild duck species in Korea using mtDNA D-loop sequences. *Mol Biol Rep* 41:1645-1652.
- Ki JS, Hwang DS, Park TJ, Han SH, Lee JS 2009 A comparative analysis of the complete mitochondrial genome of the Eurasian otter *Lutra lutra* (Carnivora; Mustelidae). *Mol Biol Rep* 37:1943-1955.
- Kulikova IV, Zhuravlev YN, McCracken KG 2004 Asymmetric hybridization and sex-biased gene flow between eastern spot-billed ducks (*Anas zonorhyncha*) and Mallards (*A. platyrhynchos*) in the Russian far west. *The Auk* 121: 930-949.
- Lansman RA, Avise JC, Huettel MD 1983 Critical experimental test of the domestic cat (*Felis catus*) mitochondrial genome and a transposed mtDNA tandem repeat (*Numt*) in the nuclear genome. *Genomics* 33:299-246.
- Li HF, Zhu WQ, Song WT, Shu JT, Han W, Chen KW 2010 Origin and genetic diversity of Chinese domestic ducks. *Mol Phylogenet Evol* 57:634-640.
- Librado P, Julio R 2009 DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- Mindell DP, Sorenson MD, Huddleston CJ, Miranda JrHC, Knight A, Sawchuk SJ, Yuri T 1997 Phylogenetic relationships among and within select avian orders based on mitochondrial DNA. pp 213-247 In: *Avian Molecular Evolution and Systematics*. Academic Press, Elsevier.
- Sorenson MD, Ast JC, Dimcheff DE, Yuri T, Mindell DP 1999 Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Mol Phylogenet Evol* 12:105-114.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S 2013 MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725-2729.
- 국길 김정은 정진형 김재필 선상수 김광현 정완태 정광화 안종남 이병석 정일병 양철주 양재은 2005 알칼리장석일 라이트가 육용오리의 생산성 및 육질에 미치는 영향. *한국가금학회지* 32:245-254.
- 김학규 강보석 황보 중 김종대 허강녕 추효준 박대성 서옥석 홍의철 2012 토종오리 육용종의 생산성과 도체수율. *한국가금학회지* 39:45-52.
- 농림축산식품부 2013 오리통계자료. 농림축산식품부.
- 방한태 나채천 최희철 채현석 강환구 김동욱 김민지 서옥석 박성복 최양호 2010 국내 사육되는 육용오리 세 가지 계통의 생산성 및 도체 특성 비교 연구. *한국가금학회지* 37: 389-398.
- 축산기술연구소 1999 가금화된 청둥오리의 특성에 관한 연구. 축산시험연구보고서.
- (접수: 2014. 9. 4, 수정: 2014. 10. 5, 채택: 2014. 10. 31)