

Original article

환경유전자의 국내 담수어류 모니터링 적용 연구

김정희 · 조현빈¹ · 장민호² · 우승현² · 조영호³ · 윤주덕^{4,*}

주식회사 에코리서치, ¹전남대학교 수산과학연구소, ²국립생태원 환경영향평가팀,
³국립생태원 연구정책부, ⁴국립생태원 멸종위기종복원센터

Application of Environmental DNA for Monitoring of Freshwater Fish in Korea. Jeong-Hui Kim (0000-0003-2331-4232), Hyunbin Jo¹ (0000-0001-8064-7880), Min-Ho Chang² (0000-0002-6000-9299), Seung-Hyun Woo² (0000-0002-9360-8853), Youngho Cho³ (0000-0001-5672-5121) and Ju-Duk Yoon^{4,*} (0000-0003-1667-327x) (EcoResearch incorporated, Gongju 32588, Republic of Korea; ¹Fisheries Science Institute, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea; ²Environment Impact Assessment Team, National Institute of Ecology, Seocheon 33657, Republic of Korea; ³Department of Research Policy, National Institute of Ecology, Seocheon 33657, Republic of Korea; ⁴Research Center for Endangered species, National Institute of Ecology, Yeongyang 36531, Republic of Korea)

Abstract In this study, to discuss on the applicability of eDNA as a new method to investigate fish diversity at streams, we applied eDNA at 4 streams (Geum River, Ji Stream, Hwangji Stream, Seomjin River), where endangered species are inhabits, with conventional survey (cast net and kick net). The average (\pm standard deviation) number of species investigated by eDNA were 19 species (± 4.4), and it was relatively higher than average of conventional survey, 10 species (± 4.8). Most of case, in this study, eDNA was more efficient than conventional survey. However, there were errors on species identification of Korean endemic species and aliied species from eDNA, and it seems the universal primer (MiFish primer set) is not suitable for them. Furthermore, some of endangered species, caught by conventional method, was not detected by eDNA. As the present universal primer is not suitable for identify the every freshwater fish species in Korea, the complementing or development of universal primer is needed, and the eDNA application after species specific marker development for detecting specific species like endangered species should be considered. In conclusion, if the manual for field survey method by eDNA is developed, we expect applicability enlargement for water ecosystem survey.

Key words: eDNA, endangered species, freshwater fish, MiFish primer, next generation sequencing

서 론

환경유전자 (environmental DNA, eDNA)는 흙, 퇴적물, 수체 등 다양한 환경에 잔존하는 생물의 유전자를 의미하

며, 배설물, 땀, 침, 피부조직, 털 등 다양한 형태를 띠고 있다 (Taberlet *et al.*, 2012, Thomsen and Willerslev, 2015). eDNA는 1987년 흡속 침전물로부터 미생물 DNA를 추출 (Ogram *et al.*, 1987)하면서 처음 언급되기 시작했으며, 2000년대 들어와서야 활용되기 시작했다. 최근 유전자 분석 기술의 진보로 미량의 유전자를 분석할 수 있는 기술이 개발되면서, 환경에 잔존하고 있는 유전자를 통해 생물의 서식 유무를 파악하는 연구가 전 세계적으로 진행되

Manuscript received 25 February 2020, revised 17 March 2020, revision accepted 17 March 2020

* Corresponding author: Tel: +82-54-680-7360, Fax: +82-54-680-7329
E-mail: grandblue@nie.re.kr, zmszmsqkek@hanmail.net

© The Korean Society of Limnology. All rights reserved.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provide the original work is properly cited.

고 있다(Ficetola *et al.*, 2008; Jerde *et al.*, 2011; Minamoto *et al.*, 2012). 특히, 하천, 호수, 바다와 같은 수환경에서는 서식하는 모든 생물에 대한 유전정보가 물에 포함되어 있으며, 이는 비교적 간편하게 획득하고 분석할 수 있기 때문에 수생생물들을 대상으로 많은 연구들이 수행되고 있다(Sassoubre *et al.*, 2016; Shaw *et al.*, 2016; Evans *et al.*, 2017). 구체적으로 생물다양성 (Andersen *et al.*, 2011; Thomsen *et al.*, 2012a; DiBattista *et al.*, 2017; Nakagawa *et al.*, 2018), 종 분포(Takahara *et al.*, 2013; Yamamoto *et al.*, 2016), 희소종 확인(Thomsen *et al.*, 2012b; Keskin *et al.*, 2016; Piggott 2016; Doi *et al.*, 2017)에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

eDNA를 활용한 수생생물 조사는 수체 내 잔존 유전자를 분석하기 때문에 포획을 통한 종의 출현 유무 파악 없이도 생물의 존재 여부를 확인할 수 있는 방법이다. eDNA 조사는 지점의 현장수 시료만 확보하면 되기 때문에 조사 지점에 대한 접근성, 생물의 불균일한 분포 등과 같이 조사 환경에 의한 영향이 적으며, 현장 조사 시 소요되는 인력 및 시간을 절감할 수 있는 장점이 존재한다(Laramie, *et al.*, 2015). 뿐만 아니라, eDNA 연구 결과에서 전통적인 생물 조사 방법과 비교하여 다양한 종이 확인되었으며(e.g. Dejean *et al.*, 2012; Takahara *et al.*, 2013), 희소하게 분포하는 종의 서식 여부가 확인되었다(Jerde *et al.*, 2011). 따라서 수생생물 연구에서의 eDNA 조사는 직접포획 조사 방법의 단점을 보완할 수 있는 효과적인 방법이다.

수생생물 중 상위포식자이자 이동성이 큰 어류의 경우 주로 어구(투망, 족대, 정치망, 자망 등)를 활용한 채집을 통해서 종 다양성을 확인한다. 직접포획에 의한 방식은 어구별 단위노력당 어획량(catch per unit effort, CPUE)과 같은 정량적인 결과를 산출할 수 있고, 채집되는 종들을 연구자들이 직접 확인할 수 있다는 장점이 있다. 반면, 각 어구들의 형태 및 특성상 존재하는 편향성(gear selectivity)으로 인하여 조사 대상 지역의 어류 다양성 및 특정종의 개체군 크기가 저평가될 수 있는 문제가 있다(Bonar *et al.*, 2009; Yoon *et al.*, 2015). 또한 채집이 어려운 환경에 서식하거나 멸종위기종과 같이 개체수가 적은 종들을 확인하지 못할 가능성이 높으며(Thomsen *et al.*, 2012b), 이를 채집하기 위해서는 많은 시간과 인력이 소요되어야 한다. 따라서, 직접포획의 단점을 보완하기 위해서 어류 조사에 있어서 eDNA를 활용하는 방안에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다.

미국(U.S Geological Survey, USGS)과 덴마크(eDNA center)에서 eDNA 조사를 국가 차원에서 활용하고 있으며, 일본(The eDNA Society)에서도 많은 연구자들에 의

해서 연구가 이루어지고 있다. 국내도 eDNA의 활용을 높일 필요가 있으나, 현재까지는 제한적인 연구만 수행되어, 보다 활발한 연구를 통해 국내에 적합한 방법 정립 및 조사 체계 정착이 필요한 상황이다. 본 연구에서는 담수생태계 중 하천에 서식하는 어류를 조사하기 위한 방법으로 eDNA를 적용하였다. 특히, 개체수가 적고 채집이 어려운 멸종위기종이 서식하는 하천에 대해서 eDNA를 활용하여 어종의 다양성을 확인하였으며, 이를 통해 국내 수환경 연구에서의 eDNA의 적용 가능성을 파악하였다.

재료 및 방법

1. 조사지점

eDNA의 적용 가능성 평가를 위한 조사는 금강 본류, 지천(금강 지류), 낙동강 황지천, 섬진강 본류의 4개 지점을 대상으로 실시되었다(Fig. 1). 지점 선정은 어류상과 멸종위기종의 서식 유무 확인 가능성 파악을 위해 문헌상 멸종위기종이 1종 이상(금강, 감돌고기; 지천, 흰수마자; 황지천, 얼룩새코미꾸리; 섬진강, 큰줄납자루) 서식하는 지점을 선정하였다.

2. eDNA 분석

1) 현장 채수 및 필터링

eDNA 분석을 위한 물 시료 채수 및 필터링에 대한 전반적인 과정은 USGS의 “Environmental DNA sampling protocol (Laramie, *et al.*, 2015)”을 따랐다. 현장 채수 및 필터는 2018년 7월 11~12일에 이루어졌다. 채수 시 오염(contamination)을 방지하기 위하여 지점별로 조사 및 필터링 도구를 구분하여 사용하였다. 조사 지점에서 물 시료는 채수병(2L)을 이용하여 3개의 샘플(n=3 for each site)을 확보하였으며, 채수된 시료는 hand vacuum pump(Nalgene, Thermo Scientific, U.S.)를 이용하여 현장에서 필터하였다. 필터는 eDNA 필터 시 발생 가능한 오염 방지를 위해서 Nalgene analytical test filter funnel(Cellulose nitrate; Volume 250 mL; Pore size 0.45 µm; diameter 47 mm; Thermo Scientific, U.S.)을 사용하였으며, 지점별로 750 mL의 원수를 필터하였다. 이후 필터지는 보관을 위해 실리카겔이 들어있는 지퍼백에 개별로 보관하여 실험실로 이송하였으며, 분석 시까지 -20°C에 냉동보관하였다. 현장에서 필터 후 남은 물 시료는 드라이아이스 박스를 이용하여 실험실로 옮겨 -20°C 미만의 냉장고에 보관하였다.

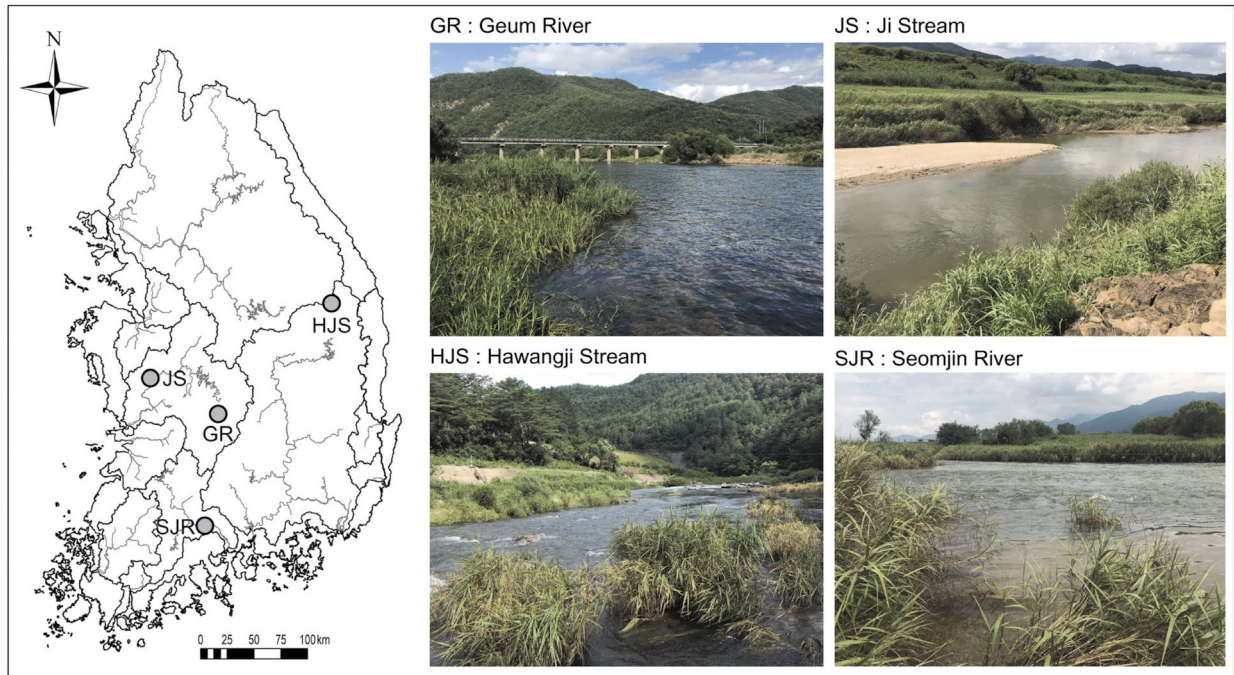


Fig. 1. Map of the study sites.

Table 1. Universal primer information applied to the study.

Target organisms (region)	Name	Primer sequences	References
Fish (12S)	MiFish-U-F	GTCGGTAAAACCTCGTGCCAGC	Miya <i>et al.</i> , 2015
	MiFish-U-R	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG	

2) DNA 추출

지점별 현장에서 이동, 보관된 필터지의 DNA 추출은 DNeasy PowerWater Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 manufacture 권고에 따라 직접 DNA를 추출하였으며, 추출된 DNA는 -20°C 이하의 냉장고에 보관하였다.

3) Universal primer 선정

물 속 eDNA에 포함된 어류 DNA 염기서열을 증폭하기 위해 다양한 유전자 마커 (genetic marker)를 대상으로 기존에 개발된 primer 세트를 확보하였으며, 그중 어류를 대상으로 한 eDNA의 실험에 많이 사용되고 있는 MiFish primer 세트(Miya *et al.*, 2015)를 선정하였다(Table 1).

4) PCR 반응

어류의 eDNA를 증폭하기 위해 전체 25 µL의 양(DNA template 5 µL, AccuPrime SuperMix II 12 µL, forward primer 1.25 µL, reverse primer 1.25 µL, BSA 0.5 µL, D.W.

5 µL)으로 1st PCR을 수행하였다. PCR 조건은 initial denaturation 95°C에서 5 min, 이후 PCR 반응(denaturation 95°C에서 20 sec, annealing 58°C에서 15 sec, extension 68°C에서 1 min) 35회를 수행하고, final extension 68°C에서 7 min을 수행하였다. PCR 반응 이후, 전기영동을 통해 밴드를 확인하였다. 특이적 밴드의 DNA 증폭산물을 메스를 이용하여 추출하고, 이후 QIAquick Gel Extraction Kit Fluorometry (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였다.

2nd PCR은 샘플 index 정보가 삽입된 primer 세트를 이용하여 수행하였다. 이후 Qubit (Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 DNA 농도를 측정 후, 각 샘플의 농도에 따라 용량을 조절하여 풀링(pooling)하였다.

5) NGS 분석 및 데이터 정리

Nextseq (Iumina, CA, USA)을 이용하여 next generation sequencing (NGS) 분석을 수행하였으며, 획득된 염기서열

은 VSEARCH를 이용하여 unique OTUs를 산출하였다. 산출된 OTUs를 GenBank Database에 등록되어 있는 염기서열 정보를 대상으로 BLASTn을 수행($\geq 99\%$)하였으며, 동정된(assigned) OTUs 정보를 현장 조사결과 비교 및 전문가 의견 검토를 통해 지점별 종 리스트를 작성하였다.

3. 어류 채집

조사 방법에 따른 어류 다양성 비교를 위해서 국내에서 보편적으로 사용되는 어구를 활용한 채집 방법을 통해 조사 지점의 어류 다양성을 확인하고 eDNA 분석결과와 비교하였다. 조사는 환경부에서 발간된 “생물측정망 조사 및 평가지침”의 하천 조사 방법으로 사용되는 투망(망목, 7×7 mm)과 족대(망목, 5×5 mm)를 활용하였으며, 투망은 조사 구간 내 10회, 족대는 이동 거리를 포함하여 30분 동안 조사를 실시하였다(NIER, 2016). 조사 지점별 어류 채집은 eDNA 현장 조사 시점과 동일한 시기에 실시하였다. 채집된 어류는 Kim and Park (2002)를 참고하여 현장에서 동정 후 분류하였으며, 종 다양성 비교를 위해서 종별 출현 유무만을 기록하였다. 출현한 종 목록은 eDNA 분석결과와의 OTUs 양이 많은 종에서 적은 종 순서로 배열하였다. 멸종위기 야생생물로 보호 중인 감돌고기(금강유역환경청 허가번호 제 2018-5호), 흰수마자(금강유역환경청 허가번호 제 2018-5호), 얼룩새코미꾸리(원주지방환경청 허가번호 제 2018-3호), 큰줄납자루(영산강유역환경청 허가번호 제 2018-11호)는 “야생생물 보호 및 관리에 관한 법률” 제 14조 제1항 및 동일 법 제13조 제2항의 규정에 따라 수계를 관리하는 각 환경청으로부터 멸종위기종 포획·방사 허가서를 발급 후 채집을 시행하였다.

결과 및 고찰

NGS 분석을 통해 얻어진 염기서열(paired end)은 총 5,850,476개이며, 샘플당 평균 487,540개의 염기서열이 얻어졌다. VSEARCH를 활용하여 필터된 unique OTUs는 총 2,717개를 확인하였다. 이후 NCBI GenBank의 데이터를 바탕으로 BLASTn 분석을 실시하여, 전문가 검토를 통해 지점별 OTUs를 확인한 결과 14~24로 확인되었으며, 이는 각 지점에 서식하는 종 수를 대변하는 결과이다(Table 2, 3). 지점별 최종 OTUs에 대한 염기서열의 개수는 황지천이 1,133,075개로 가장 많았으며, 지천이 32,696개로 가장 적었다.

eDNA 조사를 통해서 확인된 종 수는 지점 평균(\pm 표준편차) 19종(± 4.4)이며, 이는 어구를 이용한 조사의 10종

(± 4.8)과 비교하여 높은 수치이다. 지점별 비교 시 금강, 지천, 황지천에서 eDNA를 통해서 확인된 종 수가 어구를 이용한 조사와 비교하여 많은 것으로 확인되었으며, 섬진강은 어구를 이용한 조사에서 eDNA (14종) 조사보다 3종이 많은 17종이 채집되어 반대의 결과를 보였다(Tables 2, 3). eDNA를 활용한 어류상 조사 시 직접 확인을 통한 어류 조사 방법인 통발(fish pots), 낚시(angling), 정치망(fyke nets), 자망(gill net), 스노쿨(snorkeling), 지인망(seine), 저인망(trawl)과 비교하여 높은 효율을 나타내는 것으로 제시되고 있다(Dejean *et al.*, 2012; Thomsen *et al.*, 2012a; Takahara *et al.*, 2013). 본 연구의 대부분 지점에서 문헌과 유사한 결과를 확인하였으나, 섬진강 지점에서는 어구를 이용한 조사에서 더 많은 종이 확인되었다(Table 3). eDNA 분석을 위한 샘플링(채수) 시 대상지점의 모든 생물의 유전자를 확보할 수 없고, 현장 채수는 일반적인 현장 조사와 마찬가지로 순간적으로 이루어지기 때문에 샘플링 시 확보되지 않으면 확인할 수 없다. 또한 물의 흐름이 없는 환경보다 물의 흐름이 있는 환경에서 eDNA 분석을 통한 종의 탐색이 어려운 것으로 보고되어 있다(Rees *et al.*, 2014). 조사가 이루어진 4개 지점은 규모, 수심, 유량, 유속 등 환경의 차이가 있었으며, 모든 지점에서 물의 흐름이 빠르게 나타났다(Fig. 1). 더불어 조사 방법에 대한 경험 및 국내 환경에 적합한 매뉴얼이 없기 때문에, 지점의 특성을 고려한 조사가 이루어지지 못해서 섬진강 지점의 eDNA 조사의 효율이 낮게 나타난 것으로 판단된다. 따라서, 결과의 효율성을 높이고 정량화를 위해서는 국내 환경에 적용 가능한 표준화된 조사 방법이 필요하다. 미국(U.S Geological Survey, USGS), 일본(The eDNA society) 등에서는 이미 eDNA 현장 조사를 위한 매뉴얼이 개발되어 있으며, 국가별 환경에 맞춰 개발된 매뉴얼은 조사의 편의뿐만 아니라 결과의 신뢰도를 높일 수 있다. 국내의 경우 eDNA 연구가 개인적인 수준에 그치고 있어서(e.g. Alam, 2020), 보편적 생태계 조사를 위한 방법 검증 및 매뉴얼 개발에 대한 개발이 필요하다.

어구를 활용한 조사와 eDNA를 병용할 경우 지점 평균 23.3종(± 4.4)의 어류가 확인되며, 지점별 구분 시 19종에서 27종의 서식이 확인된다(Fig. 2). 이를 해당 환경에 서식하는 전체 종으로 가정할 때, eDNA 조사는 지점 평균 83.1%(± 20.1), 어구를 활용한 조사는 지점 평균 43.0%(± 17.4)의 종 다양성을 확인할 수 있다. 현재 국내 하천에 대한 어류 조사는 대부분 투망과 족대 조사를 통해 이루어지고 있다. 본 연구 결과에 의하면 이러한 방법이 해당 환경에 서식하는 약 43%의 어류 종을 확인할 수 있으며, 이는 eDNA 조사 결과와 비교하여 종 다양성을 확인에 대한

Table 2. Fish species list identified by eDNA and conventional survey methods in the Geum River and the Ji Stream.

Species	Geum River				Ji Stream			
	eDNA survey		Conventional survey	Total	Species	eDNA survey		
	Number of read	%				Number of read	%	Conventional survey
<i>Zacco temminckii</i> (<i>Zacco koreanus</i>)*	48,920	31	0	0	<i>Squaliobarbus curriculus</i>	8,509	26	0
<i>Pungtungia herzi</i>	42,054	26.7	0	0	<i>Opsariichthys uncirostris amurensis</i>	4,560	13.9	0
<i>Zacco platypus</i>	19,536	12.4	0	0	<i>Cyprinus carpio</i>	4,081	12.5	0
<i>Coreoperca herzi</i>	11,453	7.3	0	0	<i>Zacco platypus</i>	2,901	8.9	0
<i>Pseudobagrus koreanus</i>	10,255	6.5	0	0	<i>Odontobutis interrupta</i>	2,549	7.8	0
<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>	8,250	5.2	0	0	<i>Tridentiger obscurus</i> (<i>Tridentiger brevispinis</i>)	2,096	6.4	0
<i>Siniperca scherzeri</i>	5,801	3.7	0	0	<i>Pseudogobio esocinus</i>	1,370	4.2	0
<i>Gobiobotia berevibarba</i>	3,315	2.1	0	0	<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>	1,167	3.6	0
<i>Hemibarbus longirostris</i>	2,483	1.6	0	0	<i>Hemibarbus longirostris</i>	903	2.8	0
<i>Pseudogobio esocinus</i>	2,273	1.4	0	0	<i>Carassius auratus</i>	754	2.3	0
<i>Acheilognathus signifer</i> (<i>Acheilognathus koreanus</i>)*	1,716	1.1	0	0	<i>Culter brevicauda</i>	719	2.2	0
<i>Sarococheilichthys variegatus wakiyae</i>	1,513	1	0	0	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	611	1.9	0
<i>Hemibarbus labeo</i>	7	<0.1	0	0	<i>Pseudorasbora parva</i>	485	1.5	0
<i>Microphysogobio yaluensis</i>	4	<0.1	0	0	<i>Microphysogobio yaluensis</i>	470	1.4	0
<i>Carassius auratus</i>	4	<0.1	0	0	<i>Squalidus chankaensis tsuchigae</i> (<i>Squalidus japonicus coreanus</i>)	370	1.1	0
<i>Opsariichthys uncirostris amurensis</i>	3	<0.1	0	0	<i>Micropterus salmoides</i>	334	1	0
<i>Micropterus salmoides</i>	1	<0.1	0	0	<i>Channa argus</i>	247	0.8	0
<i>Odontobutis interrupta</i>	0	0	0	0	<i>Rhodeus uyekii</i>	232	0.7	0
	0	0	0	0	<i>Pseudobagrus koreanus</i>	221	0.7	0
					<i>Acheilognathus rhombeus</i>	71	0.2	0
					<i>Carassius cuvieri</i>	26	0.1	0
					<i>Hemibarbus labeo</i>	18	0.1	0
					<i>Odontobutis platycephala</i>	1	<0.1	0
					<i>Misgurnus mizolepis</i>	1	<0.1	0
					<i>Acheilognathus lanceolata</i>	0	0	0
					<i>Microphysogobio jeoni</i>	0	0	0
					<i>Hemibarbus labeo</i>	0	0	0
Total number of read	157,588			Total number of read	32,696			
Number of species	17			Number of species	24			

*Suspicious identification by eDNA; parentheses, identification by survey or literature

Table 3. Fish species list identified by eDNA and conventional survey methods in the Hawangji Stream and the Seomjin River.

Species	Hawangji Stream			Seomjin River		
	eDNA survey		Conventional survey	eDNA survey		Conventional survey
	Number of read	%		Number of read	%	
<i>Pungtungia herzi</i>	744,404	65.7	0	60,938	38.9	0
<i>Zacco temminckii</i> (<i>Zacco koreanus</i>)*	153,240	13.5	0	51,515	32.9	0
<i>Rhynchocypris oxycephalus</i>	97,907	8.6	0	21,769	13.9	0
<i>Koreocobitis rotungicaudata</i> (<i>Koreocobitis naktongensis</i>)*	52,430	4.6	0	13,736	8.8	0
<i>Coreoleuciscus splendidus</i>	36,152	3.2	0	8,775	5.6	0
<i>Silurus microdorsalis</i>	13,018	1.1	0	3	<0.1	0
<i>Liobagrus andersoni</i> (<i>Liobagrus mediatiposalis</i>)*	12,762	1.1	0	3	<0.1	0
<i>Squalidus gracilis majimae</i>	7,590	0.7	0	2	<0.1	0
<i>Odontobutis platycephala</i>	5,778	0.5	0	2	<0.1	0
<i>Iksookinia koreensis</i> (<i>Iksookinia longicorpa</i>)*	5,024	0.4	0	1	<0.1	0
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	2,541	0.2	0	1	<0.1	0
<i>Anguilla japonica</i>	2,194	0.2	0	1	<0.1	0
<i>Zacco platypus</i>	14	<0.1	0	1	<0.1	0
<i>Niwaella multifasciata</i>	8	<0.1	0	1	<0.1	0
<i>Carassius auratus</i>	3	<0.1	0	0	0	0
<i>Opsaritchthys uncirostris amurensis</i>	3	<0.1	0	0	0	0
<i>Misgurnus mizolepis</i>	3	<0.1	0	0	0	0
<i>Brachymystax lenok tsilingensis</i>	1	<0.1	0	0	0	0
<i>Gobiobotia brevibarba</i>	1	<0.1	0	0	0	0
<i>Pseudogobio esocinus</i>	1	<0.1	0	0	0	0
<i>Pseudorasbora parva</i>	1	<0.1	0	0	0	0
<i>Siniperca scherzeri</i>						0
<i>Squalidus chankaensis tsuchigae</i>						0
<i>Acheilognathus majuscultus</i>						0
<i>Abbottina rivularis</i>						0
<i>Sarcocheilichthys nigripinnis morii</i>						0
Total number of read	1,133,075		7	156,748		17
Number of species	21		7	14		17

*Suspicious identification by eDNA; parentheses, identification by survey or literature

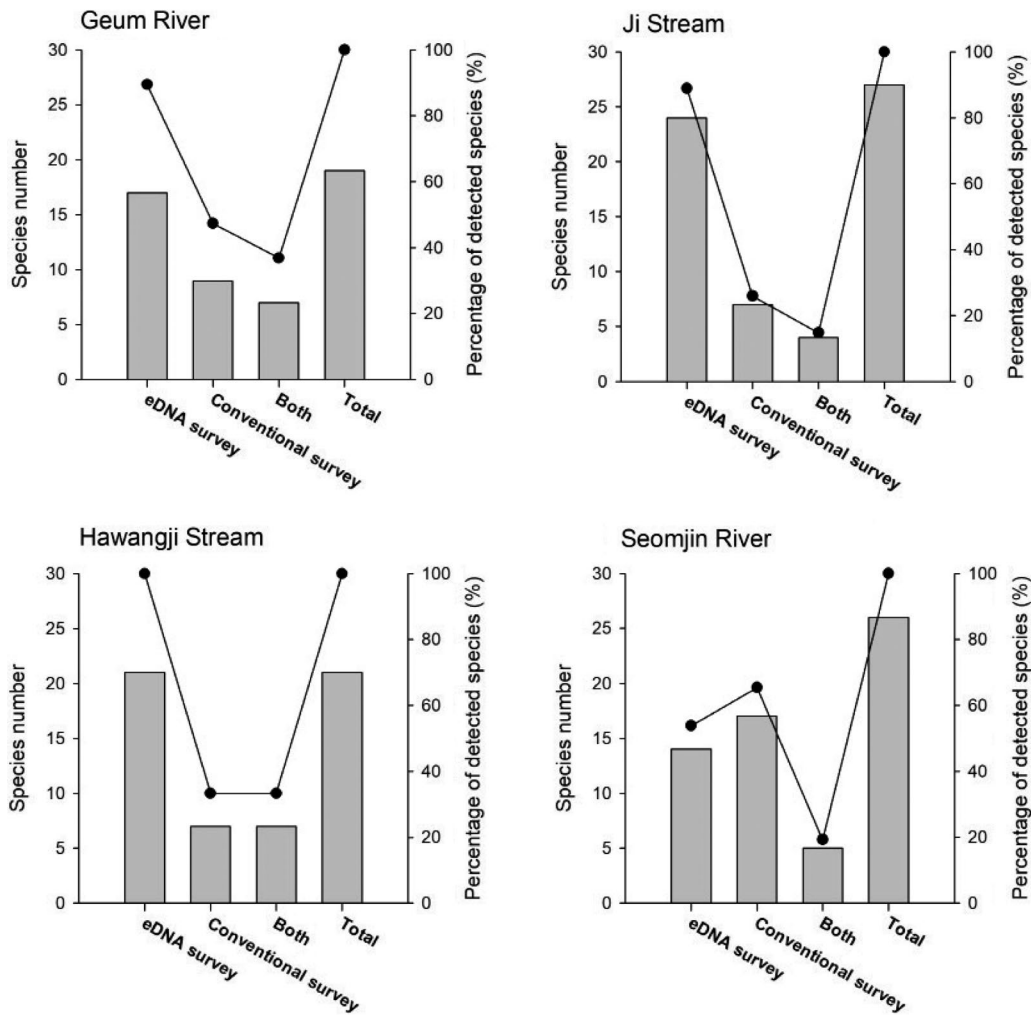


Fig. 2. Fish species diversity identified by eDNA and conventional survey methods of each study sites (bar graph; species number, line graph; percentage of detected species).

효율이 매우 낮음을 말해준다. 직접적인 포획을 통해 현장의 어류상을 확인하기 위해서는 장기간 다양한 어구를 이용할 필요가 있으며, 이 또한 조사지역에 서식하는 어류들의 생리, 생태, 형태적 특성에 따라 사용 어구가 적합하지 않으면, 포획되지 않을 확률이 높다(Bonar *et al.*, 2009). 따라서, 장기간 연구가 아닌 일년 단위 조사를 수행하는 국내 연구의 특성상 정확한 어류상 파악을 위해서는 사전 조사 형식의 eDNA 조사를 병행하는 방식이 필수적으로 적용되어야 할 것으로 판단된다.

eDNA는 희소한 분포를 하는 종들과 멸종위기종, 외래종 등 수생생물의 출현을 확인하는 데 있어서 효과적인 방법이다(Jerde *et al.*, 2011). 경제성 어종인 뱀장어는 어구에 잘 채집되지 않지만 eDNA 방법을 활용한 조사에서 서식이 잘 확인된다(Itakura *et al.*, 2019; Takeuchi *et al.*, 2019).

또한 외부에서 유입된 침입종(블루길)의 분포를 확인하기 위해서 eDNA 방법이 활용되는 등(Takahara *et al.*, 2013), 채집이 어려운 특정종의 서식을 확인하기 위한 연구가 다수 진행 중이다. 멸종위기종은 개체군의 크기가 작고, 종 특이적 생태 습성으로 인하여 보편적인 어구로 채집이 어려운 종이다. 멸종위기종 서식 확인을 위해 보완적인 방법으로 eDNA 방법을 활용한 결과, 채집을 통해 나타난 결과와 다소 차이를 보였다. 금강은 어구 조사에서 채집된 감돌고기가 eDNA 조사에서도 확인되었으며, 이외 돌상어와 묵납자루 등 멸종위기종이 추가로 확인되었다. 이 중 묵납자루는 칼납자루의 오류로 판단된다. 황지천은 직접 포획 조사에서 채집된 얼룩새코미꾸리가 eDNA 조사에서 확인되지 않았으며, 근연종인 새코미꾸리가 확인되었다. 황지천 지역은 얼룩새코미꾸리의 주요 서식지이지만, 최근 새

코미꾸리의 이입이 이루어졌다(Chae *et al.*, 2019). 따라서 현재 결과만으로는 새코미꾸리 서식 개체군의 eDNA가 확인되었을 가능성도 있으나, MiFish primer가 근연종인 얼룩새코미꾸리를 구분하지 못했을 가능성을 배제할 수 없다. 이외 eDNA 결과에서 열목어와 돌상어가 확인되었으나, 돌상어는 낙동강 수계에 서식하지 않는 종으로 오류로 판단된다. 섬진강은 어구 조사에서 큰줄납자루가 채집되었으나, eDNA 조사에서는 확인되지 않았다. 지천은 문헌 조사를 통해 목표로 한 흰수마자가 모든 조사에서 확인되지 않았으며, 백조어 한 종만 eDNA 조사를 통해 확인되었다.

멸종위기종을 제외한 일부 종(갈겨니, 새코미꾸리, 통가리, 참종개, 검정망둑, 참물개)에 대해서 염기서열 정보(NCBI database, Bold systems)의 불완전성과 universal primer의 적절성, 염기서열의 짧은 단편 길이로 인한 eDNA 조사 결과의 오류 가능성(eDNA 조사에서 확인되었으나, 기존 문헌 및 과거 조사에서 서식이 확인되지 않는 종)이 확인되었다(Tables 2, 3). 금강의 경우 eDNA 조사에서 확인된 갈겨니는 근연종인 참갈겨니인 것으로 확인되며, 실제로 어구를 이용한 조사에서 참갈겨니가 출현하였다. 황지천 역시 금강과 동일하게 갈겨니가 동정되었으나, 현장 조사에서는 참갈겨니의 서식이 확인되었다. 또한 새코미꾸리, 통가리, 참종개 역시 각각 근연종인 얼룩새코미꾸리, 자가사리, 왕종개의 오류 가능성이 있다. 섬진강에서는 오류 가능성이 확인되지 않았으며, 지천에서 검정망둑, 참물개가 각각 근연종인 민물검정망둑과 물개로 판단된다.

현재 국제적으로 어류 eDNA 연구를 위한 3개의 universal primer set(Riaz *et al.*, 2011; Miya *et al.*, 2015; Shaw *et al.*, 2016)가 보고되어 있다. 해외에서 개발된 universal primer set은 보편적으로 서식하는 종 및 분자생물학적 연구가 많이 이루어진 종에 대해서는 명확한 구분이 될 수 있지만, 국내에만 서식하는 고유종에 대해서는 구분이 어려울 수 있다. 본 연구에서 오류로 확인되는 종 중, 갈겨니와 검정망둑을 제외한 모든 종이 한국 고유종이다. 멸종위기종 역시 대부분 고유종으로(2019년 기준 27종 중 19종이 고유종) universal primer의 적용에 한계가 있으며, 멸종위기종 특성상 개체군의 크기가 작아 분석에 충분한 eDNA 양을 확보하기 어려운 점이 있다. 고유종이 아닌 갈겨니와 관련하여, 2005년에 Kim and Oh(2005)에 의해서 참갈겨니가 신종 및 고유종으로 등록되었으며, 이 시기 이전에는 국내에서 갈겨니로 분류되었다. 검정망둑과 민물검정망둑은 분류학적 형질이 매우 유사하여 분류학적 동정 키(key)가 명확하게 나타나는 일부 성체를 제외한 개체들을 육안으로 분류하기 어려운 근연종이다. 특히, 국내 하천 환경에서 MiFish primer를 이용한 eDNA 연구에서도 검정망둑만이 확인되어(Alam, 2020),

본 연구에 사용된 primer로 두 종이 구분되지 않음을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 현재 개발된 universal primer의 국내 담수환경에서의 적용에 대한 한계를 명확하게 보여주고 있으며, 보다 명확한 종 다양성 확인을 위해서는 고유종을 포함한 국내종에 적합한 primer 개발이 필요한 것으로 사료된다. 이와 함께 멸종위기종 탐색을 위해서는 목표종에 대한 종 특이적 마커 개발을 통해, 결과의 정확성을 높이는 방법을 고려할 필요가 있다. 국내에서 흰수마자를 대상으로 종 특이적 마커(Cytochrome b 영역 활용)를 개발하여 서식을 확인하는 연구가 이루어지고 있으며(NIE, 2019), 다른 종에 대해서도 마커 개발이 이루어질 경우 멸종위기종 서식 확인에 대한 eDNA 방법의 적용이 보다 빨라질 수 있을 것으로 판단된다.

eDNA는 어류의 다양성을 확인하는 데 있어서 인력 및 시간을 절감할 수 있는 장점이 존재하며, 무엇보다 어구를 활용한 채집과 비교하여 많은 종을 확인할 수 있다(Laramie, *et al.*, 2015). 본 연구에서 어구를 활용한 채집과 비교하여 종 다양성이 높게 나타났으며, 멸종위기종과 같은 희소종의 서식을 확인하였다. 반면, 한국 고유종을 포함한 근연종 및 일부 멸종위기종의 동정에 오류가 확인되어 정확한 종 동정을 위한 보완이 반드시 필요할 것으로 판단된다. 특히, 조사의 목적에 따라 지점의 종 다양성을 확인하기 위한 메타바코딩(NGS) 방법의 적용을 위해서는 국내 서식 어종을 보다 정확하게 구분할 수 있는 universal primer의 보완 및 개발이 필요하며, 멸종위기종과 같은 특정종의 서식 확인을 위해서는 종특이적 마커 개발을 통한 적용이 고려되어야 한다. 이러한 과정 이후 국내 환경에 적합한 현장 조사 방법에 대한 추가적인 검증을 통해 보편적으로 활용 가능한 eDNA 조사 매뉴얼이 만들어질 경우, 결과의 신뢰를 담보한 eDNA 조사의 활용이 증대될 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 멸종위기종이 서식하는 4개 하천(금강, 지천, 황지천, 섬진강)에서 환경유전자(environmental DNA, eDNA)와 보편적 어구를 이용한 조사 방법을 적용하여 지점별 종 다양성을 확인하고, 이를 통해 eDNA의 활용을 고찰하였다. eDNA 조사를 통해서 확인된 종 수는 지점 평균(±표준편차) 19종(±4.4)이며, 이는 어구를 이용한 정량 조사의 10종(±4.8)과 비교하여 높게 나타났다. 대부분의 지점에서 eDNA 조사가 어구를 이용한 조사보다 효율이 높게 나타났다. 반면 eDNA 조사 결과 고유종 및 근연종에 대해서 동정의 오류가 확인되어, universal primer (MiFish primer

set)에 대한 국내 적용의 한계를 확인하였다. 또한 멸종위기종의 서식 여부도 일부 종에 대해서 eDNA 조사 결과가 현장 조사 및 문헌과의 차이를 보였다. 현재 개발된 universal primer는 국내에서 서식하는 모든 담수종의 서식을 확인하는 데 있어서 결과의 신뢰성을 담보할 수 없기 때문에 universal primer의 보완 및 개발이 필요하며, 멸종위기종과 같은 특정종의 서식 확인을 위해서는 종특이적 마커 개발을 통한 적용이 고려되어야 한다. 마지막으로 eDNA의 현장 조사 방법에 대한 매뉴얼이 개발될 경우, 수생태계 조사에 대한 활용성이 증대될 수 있을 것이다.

저자정보 김정희(주식회사 에코리서치 대표이사), 조현빈(전남대학교 수산과학연구소 연구교수), 장민호(국립생태원 환경영향평가팀 선임연구원), 우승현(국립생태원 환경영향평가팀 전임연구원), 조영호(국립생태원 연구정책부 책임연구원), 윤주덕(국립생태원 멸종위기종복원센터 책임연구원)

저자기도 개념설정: 윤주덕, 조사 및 채집: 윤주덕, 김정희, 장민호, 우승현, 조영호, 자료분석: 조현빈, 원고작성: 김정희

이해관계 본 논문에는 이해관계 충돌의 여지가 없음.

연구비 본 논문은 환경부의 재원으로 국립생태원의 지원을 받아 수행하였습니다(NIE-기반연구-2018-04).

REFERENCES

- Alam, J. 2020. Assessment of fish biodiversity in Korean rivers using the environmental DNA metabarcoding technique. Doctor degree. Pukyong National University.
- Andersen, K., K.L. Bird, M. Rasmussen, J. Haile, H. Breuning-Madsen, K.H. Kjaer, L. Orlando, M.T.P. Geilbert and E. Willerslev. 2011. Meta-barcoding of 'dirt' DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. *Molecular Ecology* **21**: 1966-1979.
- Bonar, S.A., W.A. Hubert and D.W. Willis. 2009. Standard Methods for Sampling North American Freshwater Fishes. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- Chae, B., H. Song and J.Y. Park. 2019. A field guide to the freshwater fishes of Korea. LG Evergreen Foundation. Seoul.
- Dejean, T., A. Valentini, C. Miquel, P. Taberlet, E. Bellemain and C. Miaud. 2012. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology* **49**: 953-959.
- DiBattista, J.D., D.J. Coker, T.H. Sinclair-Taylor, M. Stat, M.L. Berumen and M. Bunce. 2017. Assessing the utility of eDNA as a tool to survey reef-fish communities in the Red Sea. *Coral Reefs* **36**: 1245-1252.
- Doi, H., I. Katano, Y. Sakata, R. Souma, T. Kosuge, M. Nagano, K. Ikeda, K. Yano and K. Tojo. 2017. Detection of an endangered aquatic heteropteran using environmental DNA in a wetland ecosystem. *Royal Society Open Science* **4**: 170568.
- Evans, N.T., Y. Li, M.A. Renshaw, B.P. Olds, K. Deiner, C.R. Turner and M.E. Pfrender. 2017. Fish community assessment with eDNA metabarcoding: effects of sampling design and bioinformatic filtering. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **74**: 1362-1374.
- Ficetola, G.F., C. Miaud, F. Pompanon and P. Taberlet. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* **4**: 423-425.
- Itakura, H., R. Wakiya, S. Yamamoto, K. Kaifu, T. Sato and T. Minamoto. 2019. Environmental DNA analysis reveals the spatial distribution, abundance, and biomass of Japanese eels at the river-basin scale. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **29**: 361-373.
- Jerde, C.L., A.R. Mahon, W.L. Chadderton and D.M. Lodge. 2011. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters* **4**: 150-157.
- Keskin, E., E.M. Unal and H.H. Atar. 2016. Detection of rare and invasive freshwater fish species using eDNA pyrosequencing: Lake Iznik ichthyofauna revised. *Biochemical Systematics and Ecology* **67**: 29-36.
- Kim, I.S. and J.Y. Park. 2002. Freshwater fishes of Korea. Kyo-Hak Publishing Co, Seoul.
- Kim, I.S., M.K. Oh and K. Hosoya. 2005. A new species of cyprinid fish, *Zacco koreanus* with redescription of *Z. temminckii* (Cyprinidae) from Korea. *Korean Journal of Ichthyology* **17**: 1-7.
- Laramie, M.B., D.S. Pilliod, C.S. Goldberg and K.M. Strickler. 2015. Environmental DNA sampling protocol-filtering water to capture DNA from aquatic organisms (No. 2-A13). US Geological Survey.
- Minamoto, T., H. Yamanaka, T. Takahara, M.N. Honjo and Z.I. Kawabata. 2012. Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology* **13**: 193-197.
- Miya, M., Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J.Y. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, M. Kondoh and W. Iwasaki. 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science* **2**: 150088.
- Nakagawa, H., S. Yamamoto, Y. Sato, T. Sado, T. Minamoto and M. Miya. 2018. Comparing local-and regional-scale estimations of the diversity of stream fish using eDNA metabarcoding and conventional observation methods.

- Freshwater Biology* **63**: 569-580.
- NIE. 2019. Specific monitoring of distribution of *Gobiobotia naktongensis* (endangered species level 1) in Geum River watershed. National Institute of Ecology, Yeongyang.
- NIER. 2016. Biomonitoring survey and assessment manual. National institute of environmental research. Incheon.
- Ogram, A., G.S. Saylor and T. Barkay. 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods* **7**: 57-66.
- Piggott, M.P. 2016. Evaluating the effects of laboratory protocols on eDNA detection probability for an endangered freshwater fish. *Ecology and Evolution* **6**: 2739-2750.
- Rees, H.C., B.C. Maddison, D.J. Middleditch, J.R. Patmore and K.C. Gough. 2014. The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology* **51**: 1450-1459.
- Riaz, T., W. Shehzad, A. Viari, F. Pompanon, P. Taberlet and E. Coissac. 2011. ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Research* **39**: e145-e145.
- Sassoubre, L.M., K.M. Yamahara, L.D. Gardner, B.A. Block and A.B. Boehm. 2016. Quantification of environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three marine fish. *Environmental Science & Technology* **50**: 10456-10464.
- Shaw, J.L., L.J. Clarke, S.D. Wedderburn, T.C. Barnes, L.S. Weyrich and A. Cooper. 2016. Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system. *Biological Conservation* **197**: 131-138.
- Taberlet, P., E. Coissac, M. Hajibabaei and L.H. Rieseberg. 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* **21**: 1789-1793.
- Takahara, T., T. Minamoto and H. Doi. 2013. Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLoS One* **8**: e56584.
- Takeuchi, A., S. Watanabe, S. Yamamoto, M.J. Miller, T. Fukuba, T. Miwa, T. Okino, T. Minamoto and K. Tsukamoto. 2019. First use of oceanic environmental DNA to study the spawning ecology of the Japanese eel. *Anguilla japonica*. *Marine Ecology Progress Series* **609**: 187-196.
- Thomsen, P.F. and E. Willerslev. 2015. Environmental DNA - An emerging bio tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* **187**: 4-18
- Thomsen, P.F., J. Kielgast, L.L. Iversen, P.R. Møller, M. Rasmussen and E. Willerslev. 2012a. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS One* **7**: e41732.
- Thomsen, P.F., J. Kielgast, L.L. Iversen, C. Wiuf, M. Rasmussen, M.T. Gilbert, L. Orlando and E. Willerslev. 2012b. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology* **21**: 2565-2573.
- Yamamoto, S., K. Minami, K. Fukaya, K. Takahashi, H. Sawada, H. Murakami, S. Tsuji, H. Hashizume, S. Kubonaga, T. Horiuchi, M. Hongo, J. Nishida, Y. Okugawa, A. Fujiwara, M. Fukuda, S. Hidaka, K.W. Suzuki, M. Miya, H. Araki, H. Yamanaka, A. Maruyama, K. Miyashita, R. Masuda, T. Minamoto and M. Kondoh. 2016. Environmental DNA as a 'snapshot' of fish distribution: A case study of Japanese jack mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *PLoS One* **11**: e0149786.
- Yoon, J.D., J.H. Kim, H.J. Lee and M.H. Jang. 2015. Use of the cast net for monitoring fish status in reservoirs distributed in the Korean peninsula. *Journal of Ecology and Environment* **38**: 383-388.