

Original article

## 환경유전자 연구를 위한 NCBI Nucleotide 데이터베이스에 등록된 국내 생물 목록 현황

곽인실<sup>1,2,\*</sup> · 지창우<sup>2</sup> · 김원석<sup>1</sup> · 공동수<sup>3</sup>

<sup>1</sup>전남대학교 해양융합과학과, <sup>2</sup>전남대학교 수산과학연구소, <sup>3</sup>경기대학교 생명과학과

**The List of Korean Organisms Registered in the NCBI Nucleotide Database for Environmental DNA Research.** *Ihn-Sil Kwak*<sup>1,2,\*</sup> (0000-0002-1010-3965), *Chang Woo Ji*<sup>2</sup> (0000-0001-6133-9399), *Won-Seok Kim*<sup>1</sup> (0000-0003-3368-3891) and *Dongsoo Kong*<sup>3</sup> (0000-0001-8438-3229) (<sup>1</sup>Department of Ocean Integrated Science, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea; <sup>2</sup>Fisheries Science Institute, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea; <sup>3</sup>Kyonggi University, Suwon 16227, Republic of Korea)

**Abstract** Recently, with the development of genetic technology, interest in environmental DNA (eDNA) to study biodiversity according to molecular biological approaches is increasing. Environmental DNA has many advantages over traditional research methods for biological communities distributed in the environment but highly depends on the established base sequence database. This study conducted a comprehensive analysis of the habitat status and classification at the genus level, which is mainly used in eDNA (12S rRNA, 16S rRNA, 18S rRNA, COI, and CYTB), focusing on Korean registration taxon groups (phytoplankton, zooplankton, macroinvertebrates, and fish). As a result, phytoplankton and zooplankton showed the highest taxa proportion in 18S rRNA, and macroinvertebrates observed the highest ratio in the nucleotide sequence database in COI. In fish, all genes except 18S rRNA showed a high taxon ratio. Based on the Korean registration taxon group, the gene construction of the top 20 genera according to bio density observed that most of the phytoplankton were registered in 18S rRNA, and the most significant number of COI nucleotide sequences were established in macroinvertebrates. In addition, it was confirmed that there is a nucleotide sequence for the top 20 genera in 12S rRNA, 16S rRNA, and CYTB in fish. These results provided comprehensive information on the genes suitable for eDNA research for each taxon group.

**Key words:** eDNA, NCBI nucleotide database, registration ratio, 18S rRNA, cytochrome c oxidase subunit I

## 서론

수환경 내 생물다양성 파악 및 군집 연구는 주로 현미경과 트랩, 직접적인 채집 도구(그물, 서버넷, 드렛지) 등을

통해 정보를 확보하였으나(Burivalova *et al.*, 2019; Rajan *et al.*, 2019), 동물플랑크톤과 미소 곤충의 경우 육안 식별 및 분류가 쉽지 않다는 연구 보고가 많다(Park *et al.*, 2019; Oh *et al.*, 2019). 이와 같은 방법은 생물표본에 대한 동정이 전문가 의존적이며, 많은 노동과 시간을 필요로 하기 때문에 일부 분류군에 편중된 연구결과를 유도하기도 하였다(Stoeckle *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020). 최근 주

Manuscript received 7 November 2022, revised 14 December 2022,  
revision accepted 17 December 2022  
\* Corresponding author: Tel: +82-61-659-7148, Fax: +82-961-0244  
E-mail: iskwak@chonnam.ac.kr

© 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.

목받고 있는 DNA sequencing 기술은 상대적으로 적은 비용과 시간 소모라는 장점과 함께 표준화가 상대적으로 잘 되어있어 높은 재현성과 함께 시간 및 공간적 생물다양성 파악이 용이한 장점이 있다(Beng and Corlett, 2020; Kwak *et al.*, 2021; Rangaswamy *et al.*, 2022; Song *et al.*, 2022). 특히, eDNA (environmental DNA, 환경유전자) 연구에 적용되는 차세대 염기서열분석(next-generation sequencers, NGS)의 급격한 발전은 서식지에 존재하는 생물의 모든 DNA를 감지하여 빠르게 생물 다양성 및 군집 정보를 획득할 수 있는 장점을 제공하였다(Thomsen and Willerslev, 2015).

eDNA를 이용하여 환경 내 생물을 탐색하기 위해서는 목표로 하는 분류군에 따라 프라이머를 선정해야 한다. 예를 들어, 어류를 탐지하기 위한 프라이머로 가장 많이 활용되고 있는 MiFish 프라이머는 12S rRNA 유전자를 기반으로 하며(Miya *et al.*, 2015), 진핵생물을 목표로 할 때는 18S rRNA를 기반으로 하는 1380F-1510R 프라이머(Amaral-Zettler *et al.*, 2009) 등을 활용한다. 이와 같이 연구 대상에 따른 프라이머 선정은 연구의 결과에 큰 영향을 줄 수 있는 요소로 작용한다(Bylemans *et al.*, 2018). 현재 이루어지는 모니터링 조사는 어류, 저서, 플랑크톤 등 분류군에 따라 조사방법이 달라 분류군 간에 비교가 어려운 부분이 있으며 평가등급도 분류군마다 다르게 이루어지고 있다. 반면에 eDNA는 사용한 프라이머를 통해 비교할 수 있는 장점이 있다. 그러나 획득한 유전자 정보를 분석할 데이터베이스의 질과 양이 연구에 많은 영향을 줄 수 있으며(Keck *et al.*, 2017; Weigand *et al.*, 2019), 양적으로 충분하지 않은 참조 서열 데이터베이스는 eDNA 연구에서 단점으로 작용할 수도 있다고 보고되었다(Weigand *et al.*, 2019; Ji *et al.*, 2022). 따라서 분석 대상에 따른 프라이머 선정을 위해서는 데이터베이스에 등록된 염기 서열 정보의 질과 양을 고려하여야 한다.

유전자 데이터베이스로 가장 많이 활용되고 있는 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 내 염기(nucleotide) 데이터베이스는 방대한 데이터가 구축되어 있어 eDNA 연구 중 taxonomy assignment 단계에서 활발하게 이용되고 있다. 국내 존재하는 생물에 대한 유전적 정보가 등록되어 있지 않거나 부재한다면 실제 연구에서 고품질의 eDNA 분석 연구결과를 얻기가 어려운 부분이 있다. 우리나라에서도 eDNA에 대한 연구 및 사회적 관심이 증가하고 있어 국내 종에 대한 정보 및 데이터베이스 구축 필요성이 증가하고 있으나, 현재 서열 및 유전자 정보는 NCBI와 같은 해외 데이터베이스에 대한 의존성이 크며 국내 서식 생물의 유전 정보에 대한 통계적 분석 및

고찰은 사용자가 쉽게 접근할 수 있는 DB 파이프라인이 구축되어 있지 않아 연구자의 분석력에 의존하고 있다. 따라서, 본 연구에서는 국립생물자원관에 등록된 5만 여종의 생물정보와 NCBI 염기 데이터베이스를 비교하여 수서 생물 분류군별 유전자 구축 현황을 분석하였다. 또한, 담수와 기수, 해양의 서식처에 따른 생물별로 구분하여 유전자 구축정보를 확인하였다. 이를 위해 비교 조사에 사용한 유전자는 eDNA 연구에 있어 가장 활발하게 이용되고 있는 12S rRNA, 16S rRNA, 18S rRNA, COI (Cytochrome c oxidase subunit I)과 CYTB (Cytochrome b)를 대상으로 현황을 파악하였으며 국내 우점 담수 생물에 대한 유전자 등록 유무를 조사하였다.

## 재료 및 방법

유전자 종류에 따른 생물 서열 목록과 정보는 가장 정보가 많이 축적 등록되어 있는 NCBI의 염기 데이터베이스(NCBI, 2021)의 자료를 이용하였다. 12S rRNA와 16S rRNA, 18S rRNA 서열 정보와 목록은 각각 12S와 16S, 18S로 검색하여 활용하였으며 Cytochrome c oxidase subunit I과 Cytochrome b 서열 정보와 목록은 COI과 CYTB로 검색한 후 활용하였다. 그리고 각 유전자의 NCBI의 서열 정보와 목록에서 ‘Unidentified’와 ‘Uncultured’와 같은 불확실한 서열 정보는 제외하고 국내 생물 종 목록과 비교하였다. 우리나라 생물 종 목록은 국립생물자원관에서 제공하는 국가생물종목록(NIBR, 2022)을 이용하였다. 우리나라 생물 종 목록은 2022년 4월 기준 총 56,248종이 수록되어 있으며 동물계(Animalia), 식물계(Plantae), 유색조식물계(Chromista), 균계(Fungi), 원생생물계(Protista) 등으로 나누어 통계 자료를 제공하고 있다.

본 연구에서는 어류(Fish)와 미삭동물(Urochordata)은 척삭동물군(Chordata)으로 구분하였다. 저서무척추동물군(Macroinvertebrate)은 수서곤충(Aquatic insect)과 수서곤충을 제외한 절지동물(Arthropoda) 및 연체동물(Mollusca), 환형동물(Annelida) 등을 포함하여 저서무척추동물군으로 나누었다. 동물플랑크톤군은 요각류(Copepoda)와 지각류(Cladocera), 윤충류(Rotifera), 원생생물계를 포함하여 선별하였다. 식물플랑크톤(Phytoplankton)은 윤조류(Charophyta), 녹조류(Chlorophyta), 홍조류(Rhodophyta)와 유색조식물계를 포함하였다.

추출된 척삭동물군과 저서무척추동물군, 동물플랑크톤군, 식물플랑크톤군의 속(Genus)을 서식처에 따라 담수 및 기수, 해수로 나누었다. 각 생물군 중 ‘하천 수생태계 현황

**Table 1.** Registration number of Korean aquatic organisms in NCBI nucleotide database according to taxon.

| Taxon             | Gene     | Phylum | Class | Order | Family | Genus |
|-------------------|----------|--------|-------|-------|--------|-------|
| Phytoplankton     | 12S rRNA | 6      | 8     | 12    | 13     | 13    |
|                   | 16S rRNA | 11     | 27    | 96    | 182    | 334   |
|                   | 18S rRNA | 13     | 35    | 129   | 277    | 656   |
|                   | COI      | 12     | 21    | 71    | 124    | 280   |
|                   | CYTB     | 7      | 11    | 25    | 38     | 48    |
| Zooplankton       | 12S rRNA | 15     | 24    | 47    | 94     | 145   |
|                   | 16S rRNA | 21     | 44    | 83    | 209    | 338   |
|                   | 18S rRNA | 23     | 65    | 144   | 469    | 861   |
|                   | COI      | 15     | 28    | 67    | 236    | 452   |
|                   | CYTB     | 13     | 22    | 49    | 127    | 162   |
| Macroinvertebrate | 12S rRNA | 14     | 30    | 118   | 441    | 982   |
|                   | 16S rRNA | 16     | 37    | 152   | 668    | 1728  |
|                   | 18S rRNA | 22     | 45    | 171   | 707    | 1645  |
|                   | COI      | 18     | 38    | 160   | 714    | 1948  |
|                   | CYTB     | 16     | 33    | 123   | 428    | 846   |
| Fish              | 12S rRNA | 2      | 6     | 46    | 224    | 712   |
|                   | 16S rRNA | 2      | 6     | 46    | 224    | 688   |
|                   | 18S rRNA | 2      | 6     | 36    | 135    | 245   |
|                   | COI      | 2      | 6     | 46    | 224    | 692   |
|                   | CYTB     | 2      | 6     | 46    | 216    | 628   |

조사 및 건강성 평가(MERK, 2020b)' 조사 자료에서 출현한 생물은 담수 생물로 구분하였으며 '하구 수생태계 현황 조사 및 건강성 평가(MERK, 2020a)'에서 출현한 생물은 기수 생물로 구분하였다. 마찬가지로 '국가 해양생태계 종합조사(KOEM, 2019)'에서 출현한 생물종은 해양 생물로 구분하였다. 또한 국가생물종 목록에는 있으나 서식처가 구분이 되지 않은 생물에 대해서는 국립낙동강생물자원관과 국립해양생물자원관에서 제공하는 '담수생물종 목록(NNIBR, 2022)'과 '국가 해양수산생물종 목록집(NMBIK, 2017)'을 참고하여 해당 속의 서식처를 담수와 해수로 구분하였다. 더불어 해외의 데이터베이스(AlgaeBase, 2022; WORMS, 2022)에서 속명을 검색하여 서식처가 구분된 생물에 대해서도 데이터베이스와 교차검증을 하였다. 담수 및 해수에서 모두 출현하는 생물 속에 대해서는 기수에도 출현하는 것으로 처리하였다. 본 조사는 종(Species) 수준에서는 처리해야 할 정보량(약 100억회 종 목록 비교)이 너무 많아 속(Genus)을 기본 단위로 하여 서식처 구분 및 NCBI 염기 서열 데이터베이스와 비교(약 10억회 속 목록 비교)하였다. 각 분류군 및 유전자, 서식처에 따른 등록 속 비율은(국내 속 수/NCBI 등록 속 수)×100의 공식을 이용

하여 계산하였다. 비율이 100%가 되면 국가생물종목록의 해당 분류군과 서식처에 있는 모든 속의 유전자 서열 정보가 NCBI에 등록되어 있다는 것을 나타낸다.

추가적으로 국내에 서식하는 생물 중 우점생물의 유전자 등록 유무를 조사하기 위해 2008년부터 2018년까지 조사된 '하천 수생태계 현황 조사 및 건강성 평가' 자료의 속 목록과 NCBI 등록 속 목록을 비교 검토하였다. 해당 기간 조사된 돌말류와 저서무척추동물, 어류의 생물 밀도량에 따라 상위 20속에 대한 유전자 등록 유무에 대해 파악하였다.

## 결 과

### 1. 분류군 및 유전자에 따른 NCBI 등록 정보

NCBI에 등록된 12S, 16S, 18S rRNA와 COI 유전자 서열 정보는 각각 약 28만, 54만, 129만, 353만개가 등록되어 있으며 중복 등록된 정보와 'Unidentified'와 같은 불확실한 정보를 제외하면 각각 18,982속, 36,070속, 46,497

Table 2. Registration number and ratio of Korean aquatic organisms in genus level on NCBI nucleotide database according to taxon and habitats

| Korean registration genus | 12S rRNA                        |                |        | 16S rRNA                        |                |        | 18S rRNA                        |                |        | COI                             |                |        | CYTB                            |                |        |
|---------------------------|---------------------------------|----------------|--------|---------------------------------|----------------|--------|---------------------------------|----------------|--------|---------------------------------|----------------|--------|---------------------------------|----------------|--------|
|                           | Ratio of registration genus (%) |                |        | Ratio of registration genus (%) |                |        | Ratio of registration genus (%) |                |        | Ratio of registration genus (%) |                |        | Ratio of registration genus (%) |                |        |
|                           | Freshwater                      | Brackish water | Marine | Freshwater                      | Brackish water | Marine | Freshwater                      | Brackish water | Marine | Freshwater                      | Brackish water | Marine | Freshwater                      | Brackish water | Marine |
| Phytoplankton             | 122                             | 230            | 103    | 1.30                            | 28.69          | 33.98  | 25.22                           | 78.23          | 66.52  | 18.85                           | 19.42          | 14.78  | 2.46                            | 1.94           | 1.74   |
| Diatom                    | 63                              | 41             | 75     | 0.06                            | 87.30          | 55.61  | 84.90                           | 75.73          | 66.52  | 18.85                           | 19.42          | 14.78  | 2.46                            | 1.94           | 1.74   |
| Cyanobacteria             | 173                             | 94             | 53     | 1.06                            | 25.43          | 35.85  | 34.04                           | 71.41          | 92.85  | 4.05                            | 7.55           | 5.32   | 1.73                            | 5.66           | 4.26   |
| Chlorophyta               | 25                              | 103            | 17     | 0.00                            | 24.00          | 32.94  | 29.13                           | 80.00          | 64.08  | 12.00                           | 41.18          | 49.51  | 0.00                            | 0.00           | 1.94   |
| Flagellates               | 51                              | 194            | 46     | 0.00                            | 29.41          | 30.43  | 25.26                           | 71.55          | 55.15  | 82.35                           | 86.96          | 71.84  | 11.76                           | 13.04          | 11.86  |
| Phyophyceae               | 120                             | 112            | 68     | 0.00                            | 33.33          | 39.71  | 32.14                           | 81.83          | 85.29  | 19.17                           | 25.00          | 18.75  | 7.50                            | 10.29          | 8.04   |
| etc                       | 93                              | 388            | 55     | 7.27                            | 10.75          | 18.18  | 15.72                           | 64.52          | 44.85  | 54.84                           | 58.18          | 39.43  | 15.05                           | 14.55          | 10.05  |
| Zooplankton               | 47                              | 4              | 21     | 0.00                            | 71.00          | 61.70  | 100.00                          | 68.09          | 100.00 | 89.36                           | 0.00           | 75.00  | 29.79                           | 0.00           | 0.00   |
| Ctenophora                | 66                              | 22             | 96     | 9.09                            | 10.61          | 23.81  | 22.73                           | 86.36          | 86.36  | 57.58                           | 82.71          | 86.36  | 7.58                            | 9.52           | 13.64  |
| Rotifera                  | 125                             | 614            | 96     | 6.25                            | 17.60          | 20.83  | 8.96                            | 48.75          | 52.77  | 11.20                           | 13.54          | 5.70   | 7.20                            | 8.33           | 2.61   |
| Protista                  | 35                              | 259            | 5      | 40.00                           | 25.48          | 60.00  | 44.48                           | 71.43          | 88.00  | 57.14                           | 60.00          | 53.28  | 11.43                           | 60.00          | 29.34  |
| etc                       | 534                             | 0              | 56     | 0.00                            | 60.11          | 76.79  | 0.00                            | 67.98          | 91.07  | 90.82                           | 98.23          | 0.00   | 42.32                           | 55.36          | 0.00   |
| Macroinvertebrate         | 69                              | 627            | 71     | 34.93                           | 46.67          | 67.61  | 56.78                           | 49.28          | 56.34  | 44.82                           | 60.87          | 7.87   | 56.46                           | 43.66          | 26.32  |
| Aquatic insect            | 83                              | 947            | 80     | 50.00                           | 31.57          | 78.31  | 62.20                           | 67.47          | 71.25  | 49.05                           | 77.11          | 75.00  | 61.46                           | 46.99          | 58.75  |
| Mollusca                  | 92                              | 257            | 47     | 19.84                           | 46.30          | 78.72  | 47.70                           | 71.91          | 74.47  | 79.35                           | 87.33          | 71.26  | 21.74                           | 27.66          | 22.96  |
| Annelida                  | 109                             | 37             | 37     | 24.86                           | 39.45          | 40.54  | 50.00                           | 71.39          | 70.27  | 62.39                           | 72.97          | 56.00  | 26.61                           | 21.62          | 24.29  |
| etc                       | 6                               | 37             | 0      | 13.51                           | 33.33          | 0.00   | 16.22                           | 100.00         | 0.00   | 100.00                          | 0.00           | 70.27  | 66.67                           | 0.00           | 24.32  |
| Chordata                  | 98                              | 679            | 29     | 95.71                           | 88.78          | 89.46  | 92.34                           | 38.78          | 62.07  | 85.71                           | 93.10          | 93.52  | 91.84                           | 89.46          | 83.86  |
| Urochordata               | 98                              | 679            | 29     | 95.71                           | 88.78          | 89.46  | 92.34                           | 38.78          | 62.07  | 85.71                           | 93.10          | 93.52  | 91.84                           | 89.46          | 83.86  |
| Fish                      | 98                              | 679            | 29     | 95.71                           | 88.78          | 89.46  | 92.34                           | 38.78          | 62.07  | 85.71                           | 93.10          | 93.52  | 91.84                           | 89.46          | 83.86  |

속, 47,139속으로 조사되었다. 우리나라 식물플랑크톤은 NCBI 염기 데이터베이스에 18S rRNA가 13문 35강 129목 277과 656속이 등록되어 다른 유전자에 비해 가장 많은 데이터가 있음을 확인하였다(Table 1). 식물플랑크톤 16S rRNA는 11문 27강 96목 182과 334속으로 18S rRNA 다음으로 많았으며 12S rRNA는 13속에 불과하였다. 동물플랑크톤에서도 18S rRNA 유전자가 23문 65강 144목 469과 861속으로 가장 많은 자료가 등록된 것으로 나타났다. 동물플랑크톤 COI 유전자는 15문 28강 67문 236과 452속으로 18S rRNA 다음으로 가장 많은 분류군 정보가 나타났다. 저서무척추동물에서는 COI 유전자가 가장 많은 분류군을 보이며 18문 38강 160문 714과 1,948속을 보였다. 두 번째로 많은 유전자는 16S rRNA로 16문 37강 152문 668과 1,728속을 보였다. 어류는 12S rRNA가 2문 6강 46목 224과 712속으로 가장 많은 유전자 서열 정보가 등록된 것으로 나타났다. 다음으로는 16S rRNA, COI, CYTB가 각각 688속, 692속, 628속을 보여 비슷한 유전자 데이터 양을 보였으며 18S rRNA가 245속으로 가장 낮은 어류 데이터 양을 보였다.

2. 유전자 및 서식 환경에 따른 NCBI 등록 생물

담수-기수-해양 서식환경에 따른 국내 생물 속에 대한 자료 정보를 NCBI 염기데이터베이스와 비교하였다(Table 2). 식물플랑크톤은 담수환경 내에서는 녹조류가 173속, 기수역과 해양에서는 규조류(Bacillariophyta)가 각각 103속, 230속으로 가장 많은 속 수를 보였다. 동물플랑크톤은 모든 서식처 환경 내에서 원생생물 분류군이 담수 125속, 기수 96속, 해양 614속으로 가장 많았다. 지각류는 모든 서식환경에서 가장 속 수가 적었다. 저서무척추동물 중 수서 곤충은 534속으로 가장 많았으며, 기수역과 해양에서는 연체동물류(Mollusca)가 각각 80속과 947속으로 많이 분포 서식하는 것으로 나타났다. 해양에서는 어류가 679속이 서식하는 것으로 확인되었으며 담수와 기수역이 각각 98속과 29속이 서식하는 것으로 나타났다.

등록 속 비율을 확인해 본 결과, 어류는 18S rRNA를 제외한 다른 유전자와 서식처에서 90% 가까운 높은 비율을 보였다. 저서무척추동물은 12S rRNA와 CYTB에서는 비교적 등록 속 비율이 낮았지만 16S와 18S rRNA, COI에서는 일부 등록 속 비율이 낮은 생물군을 제외하면 70%에 가깝게 높았다. 동물플랑크톤과 식물플랑크톤은 18S rRNA에서 높은 등록 속 비율을 보였다. 특히 다른 유전자에서는 낮은 비율을 보였던 식물플랑크톤 분류군은 전부 50% 이상의 등록 속 비율을 보였다. 동물플랑크톤의 경우에도

**Table 3.** The top dominant 20 genera in ‘Stream/River ecosystem survey and health assessment (2008~2018)’ of Korea and the presence or absence on the NCBI base database according to gene. The ranks were sorted in descending order within each taxon.

| Taxon             | Order               | Family            | Genus                 | 12S | 16S | 18S | COI | CYTB |
|-------------------|---------------------|-------------------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|------|
| Phytoplankton     | Mastogloiales       | Achnantheaceae    | <i>Achnanthes</i>     |     | ○   | ○   |     |      |
|                   | Bacillariales       | Bacillariaceae    | <i>Nitzschia</i>      |     | ○   | ○   | ○   |      |
|                   | Naviculales         | Naviculaceae      | <i>Navicula</i>       | ○   | ○   | ○   | ○   |      |
|                   | Fragilariales       | Fragilariaceae    | <i>Fragilaria</i>     |     | ○   | ○   |     |      |
|                   | Cymbellales         | Cymbellaceae      | <i>Cymbella</i>       |     | ○   | ○   |     |      |
|                   | Cymbellales         | Gomphonemataceae  | <i>Gomphonema</i>     |     |     | ○   |     |      |
|                   | Cocconeidales       | Cocconeidaceae    | <i>Cocconeis</i>      |     |     | ○   |     |      |
|                   | Melosirales         | Melosiraceae      | <i>Melosira</i>       |     | ○   | ○   | ○   |      |
|                   | Stephanodiscales    | Stephanodiscaceae | <i>Cyclotella</i>     |     | ○   | ○   | ○   |      |
|                   | Cymbellales         | Gomphonemataceae  | <i>Reimeria</i>       |     |     | ○   |     |      |
|                   | Aulacoseirales      | Aulacoseiraceae   | <i>Aulacoseira</i>    |     | ○   | ○   |     |      |
|                   | Fragilariales       | Fragilariaceae    | <i>Synedra</i>        |     | ○   | ○   |     |      |
|                   | Fragilariales       | Fragilariaceae    | <i>Hannaea</i>        |     |     |     |     |      |
|                   | Tabellariales       | Tabellariaceae    | <i>Diatoma</i>        |     | ○   | ○   |     |      |
|                   | Thalassiosiphysales | Catenulaceae      | <i>Amphora</i>        |     | ○   | ○   |     |      |
|                   | Surirellales        | Surirellaceae     | <i>Surirella</i>      |     |     | ○   |     |      |
|                   | Cymbellales         | Rhoicospheniaceae | <i>Rhoicosphenia</i>  |     |     | ○   |     |      |
|                   | Bacillariales       | Bacillariaceae    | <i>Denticula</i>      |     |     | ○   |     |      |
|                   | Naviculales         | Pinnulariaceae    | <i>Pinnularia</i>     |     | ○   | ○   | ○   |      |
|                   | Naviculales         | Naviculaceae      | <i>Caloneis</i>       |     |     | ○   |     |      |
| Macroinvertebrate | Diptera             | Chironomidae      | Chironomidae          |     | ○   | ○   | ○   | ○    |
|                   | Trichoptera         | Hydropsychidae    | <i>Hydropsyche</i>    | ○   | ○   | ○   | ○   | ○    |
|                   | Tubificida          | Tubificidae       | <i>Limnodrilus</i>    | ○   | ○   | ○   | ○   | ○    |
|                   | Ephemeroptera       | Baetidae          | <i>Baetis</i>         | ○   | ○   | ○   | ○   | ○    |
|                   | Trichoptera         | Hydropsychidae    | <i>Cheumatopsyche</i> | ○   | ○   | ○   | ○   | ○    |
|                   | Ephemeroptera       | Heptageniidae     | <i>Ecdyonurus</i>     | ○   | ○   | ○   | ○   | ○    |
|                   | Ephemeroptera       | Ephemerellidae    | <i>Teloganopsis</i>   |     | ○   | ○   | ○   |      |
|                   | Ephemeroptera       | Heptageniidae     | <i>Epeorus</i>        | ○   | ○   | ○   | ○   | ○    |
|                   | Isopoda             | Asellidae         | <i>Asellus</i>        | ○   | ○   | ○   | ○   | ○    |
|                   | Ephemeroptera       | Leptophlebiidae   | <i>Choroterpes</i>    | ○   | ○   | ○   | ○   | ○    |
|                   | Ephemeroptera       | Baetidae          | <i>Baetiella</i>      |     |     | ○   | ○   |      |
|                   | Tricladida          | Planariidae       | <i>Dugesia</i>        |     |     |     |     |      |
|                   | Unassigned Order    | Pleuroceridae     | <i>Semisulcospira</i> | ○   | ○   |     | ○   | ○    |
|                   | Ephemeroptera       | Caenidae          | <i>Caenis</i>         | ○   | ○   | ○   | ○   | ○    |
|                   | Diptera             | Limoniidae        | <i>Antocha</i>        |     |     | ○   | ○   |      |
|                   | Diptera             | Simuliidae        | <i>Simulium</i>       |     |     |     |     |      |
|                   | Ephemeroptera       | Ephemeridae       | <i>Ephemera</i>       | ○   | ○   | ○   | ○   | ○    |
|                   | Amphipoda           | Gammaridae        | <i>Gammarus</i>       | ○   | ○   | ○   | ○   | ○    |
|                   | Ephemeroptera       | Ephemerellidae    | <i>Serratella</i>     | ○   | ○   | ○   | ○   | ○    |
|                   | Trichoptera         | Hydropsychidae    | <i>Macrostemum</i>    | ○   | ○   | ○   | ○   | ○    |

18S rRNA에서 50% 이상의 높은 비율을 보였으나 해양 요각류의 경우에는 등록 속 비율이 50%를 넘지 못하는 경우도 있었다. 원핵생물(Prokaryote)인 남조류(Cyanobacteria)

는 국가생물종 목록에 기재된 속 수는 총 98속으로 나타났으며 16S rRNA에서는 80%에 가까운 높은 등록 속 비율을 보였다.



Table 3. Continued.

| Taxon | Order         | Family     | Genus                  | 12S | 16S | 18S | COI | CYTB |
|-------|---------------|------------|------------------------|-----|-----|-----|-----|------|
| Fish  | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Zacco</i>           | ○   | ○   |     | ○   | ○    |
|       | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Rhynchocypris</i>   | ○   | ○   |     | ○   | ○    |
|       | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Carassius</i>       | ○   | ○   | ○   | ○   | ○    |
|       | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Squalidus</i>       | ○   | ○   |     | ○   | ○    |
|       | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Pungtungia</i>      | ○   | ○   |     | ○   | ○    |
|       | Perciformes   | Gobiidae   | <i>Tridentiger</i>     | ○   | ○   |     | ○   | ○    |
|       | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Acheilognathus</i>  | ○   | ○   |     | ○   | ○    |
|       | Perciformes   | Gobiidae   | <i>Rhinogobius</i>     | ○   | ○   |     | ○   | ○    |
|       | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Pseudogobio</i>     | ○   | ○   |     |     | ○    |
|       | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Hemiculter</i>      | ○   | ○   |     | ○   | ○    |
|       | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Microphysogobio</i> | ○   | ○   |     | ○   | ○    |
|       | Mugiliformes  | Mugilidae  | <i>Mugil</i>           | ○   | ○   | ○   | ○   | ○    |
|       | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Pseudorasbora</i>   | ○   | ○   | ○   | ○   | ○    |
|       | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Hemibarbus</i>      | ○   | ○   |     | ○   | ○    |
|       | Osmeriformes  | Osmeridae  | <i>Plecoglossus</i>    | ○   | ○   | ○   | ○   | ○    |
|       | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Rhodeus</i>         | ○   | ○   |     | ○   | ○    |
|       | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Coreoleuciscus</i>  | ○   | ○   |     | ○   | ○    |
|       | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Opsariichthys</i>   | ○   | ○   |     | ○   | ○    |
|       | Mugiliformes  | Mugilidae  | <i>Chelon</i>          | ○   | ○   | ○   | ○   | ○    |
|       | Cypriniformes | Cyprinidae | <i>Tribolodon</i>      | ○   | ○   | ○   | ○   | ○    |

2008년부터 2018년까지 조사된 ‘하천 수생태계 현황 조사 및 건강성 평가’ 자료에서 우점 생물과 유전자 등록 유무는 Table 3과 같다. 18S rRNA에서는 낫돌말속(*Hannaea*)을 제외한 모든 속이 등록된 것으로 나타났다. 어류를 대상으로 유전자를 확인해본 결과, 12S rRNA, 16S rRNA, CYTB에서 상위 20속에 대한 유전자 정보가 있으나 COI에서는 모래무지속(*Pseudogobio*)이 등록되지 않았다. 저서무척추동물에서는 COI 유전자가 상위 20속 중 플라나리아속(*Dugesia*)와 먹파리속(*Simulium*)을 제외하고 모두 등록되어 있고 18S rRNA에서는 다슬기속(*Semisulcospira*)의 서열 정보가 등록되지 않은 것으로 확인되었다.

## 고찰

본 연구에서는 eDNA 연구에 가장 활발하게 이용되고 있는 5개 유전자(12S rRNA, 16S rRNA, 18S rRNA, COI, CYTB)를 이용하여 국내 수서 생물 분류군을 대상으로 NCBI nucleotide 데이터베이스 내 존재하는 염기서열에 대한 정보를 분석하였다. 그 결과 각 유전자에 따라 구축되어 있는 분류군별 데이터베이스의 차이가 발생하는 것

으로 확인되었다(Table 2). 동-식물플랑크톤 생물군이 가장 많이 등록되어 있는 유전자는 18S rRNA로 조사되었으나 저서무척추동물은 COI이 가장 많이 등록된 것으로 나타났다. 척삭동물 중 척추동물인 어류는 서식지에 따라 다소 차이가 있지만 어류의 경우 18S rRNA를 제외한 모든 유전자에서 90% 가까운 높은 등록 속 비율을 보였으나 미삭동물은 18S rRNA와 COI에서만 높은 등록 속 비율을 보였다. 데이터베이스의 양적인 관점에서 요약하면, 동식물플랑크톤을 탐지하기 위해서는 18S rRNA를 사용하는 것이 연구에 용이하고 저서무척추동물은 COI을 사용하는 것이 좋으며 어류는 기존의 12S나 16S rRNA를 사용하는 것이 유리할 것이다. 최근에는 COI을 이용한 저서무척추동물 eDNA 연구가 많이 이루어지고 있다(Carraro *et al.*, 2020; Rivera *et al.*, 2021). 저서무척추동물의 18S rRNA 등록 속 비율은 COI에 비해 다소 낮으나 18S rRNA를 이용하면 동식물플랑크톤과 저서무척추동물을 함께 조사할 수 있어 연구의 효율성과 비용을 고려하면, 18S rRNA를 이용하여 eDNA 연구도 고려해볼 만하다. 어류는 12S rRNA와 16S rRNA를 이용한 연구가 많이 보고되었다(Miya *et al.*, 2015; Shu *et al.*, 2020). 하지만 16S rRNA를 이용한다면 어류뿐만 아니라 원핵생물인 남조류를 같이 탐지할 수도 있다. 따라서 수서생물 군집 전체를 종합적으로 조사하기 위

한 eDNA 조합은 16S와 18S rRNA 조합하며, 일부 분류군을 집중적으로 조사하는 경우에는 COI이나 12S rRNA도 고려해볼 만하다. 다른 연구에서도 정확한 분류군 탐색을 위해 2가지 이상의 프라이머를 이용한 eDNA 분석도 제안되고 있다(Shu *et al.*, 2020; Djurhuus *et al.*, 2020).

본 연구에서 확인한 분류군 중 밀도 자료가 많이 축적되어 있는 식물플랑크톤과 저서무척추동물, 어류에 대한 유전자 종류에 따른 등록을 조사한 결과, 일부 속을 제외한 상위 20개 속은 대부분 등록이 되어 있는 것으로 확인되었다. 하지만 전체 속 수에 비해 등록 속 비율이 아직 충분하지 않은 분류군도 있었다. 예로 해양에 서식하는 요각류와 윤충류는 전체 유전자 내에서 차지하는 등록 속 비율이 50%에 불과하고 수서곤충과 동물플랑크톤을 제외한 절지동물류도 담수와 해수에서 50%를 넘지 못하였다. 그러므로 아직 등록이 되지 않은 비우점 분류군에 대한 유전자 정보가 조사-등록되면 국내 고유종이나 멸종위기종과 같은 희소종 연구 조사에 도움이 될 수 있을 것이다.

끝으로 본 연구에서는 eDNA 데이터베이스의 양적인 요소만을 주로 고려하여 분석하였다. 데이터베이스의 질적인 요소는 국내 서식 분류군에 대한 유전자 정보 및 eDNA 연구에서 변별력 차이로 나타날 수 있으며, 연구자의 분류군에 대한 전문성과 유전정보 보유 현황에 따라 연구 결과의 해석과 분석에 차이를 가질 수 있다. 따라서 차후 연구에서는 유전자 또는 프라이머 종류에 따른 서열의 질적 차이에 따른 연구가 필요할 것이다. 본 조사 결과는 국내 생물종에 대한 염기서열 데이터베이스 구축에 대한 기초 정보로 활용될 수 있을 것이며 eDNA 분석에서의 탐색 효율성과 정확도에 기여를 할 수 있을 것으로 판단된다.

## 적 요

국내 서식하는 수서 생물(식물플랑크톤, 동물플랑크톤, 저서대형무척추동물, 어류)에 대한 eDNA 연구에 주요 이용되는 유전자인 12S rRNA와 16S rRNA, 18S rRNA, COI, CYTB를 대상으로 속(Genus) 수준의 등록 현황을 조사하였다. 그 결과 식물플랑크톤과 동물플랑크톤은 18S rRNA에서 가장 높은 등록 속 비율을 보였으며, 저서무척추동물은 COI에서 가장 높은 등록 속 비율을 확인하였다. 어류에서는 18S rRNA를 제외한 모든 유전자에서 90%에 가까운 높은 비율을 보였다. 분류군에 따른 우점 생물의 상위 20속에 대한 유전자 등록 현황은 식물플랑크톤은 18S rRNA에서 19속이, 저서무척추동물은 COI에서 18개 속이 등록되어 있었다. 어류에서는 12S rRNA, 16S rRNA, CYTB에

서 상위 20의 모든 유전자 염기서열이 존재함을 확인하였다. 본 자료 분석을 통하여 각 분류군별 eDNA 연구에 적합한 유전자 데이터베이스의 양적인 정보를 파악하였다.

**저자정보** 곽인실(전남대학교 교수), 지창우(전남대학교 연구 교수), 김원석(전남대학교 해양융합과학과 대학원생), 공동수(경기대학교 교수)

**저자기여도** 연구설계: 곽인실, 지창우, 자료 수집 및 관리: 지창우, 김원석, 자료분석: 지창우, 김원석, 원고작성: 모든 저자, 과제관리: 곽인실, 공동수, 원고 수정 및 검토: 모든 저자

**이해관계** 본 연구는 이해관계의 충돌 여지가 없습니다.

**연구비** 본 결과물은 환경부의 재원으로 한국환경산업기술원 수생태계 건강성 확보 기술개발사업의 지원(과제번호: 2021003050001, 2022003050006)과 한국연구재단의 지원(NRF-2018R1A6A1A03024314)을 받아 연구되었습니다.

## REFERENCES

- AlgaeBase. 2022. Listing the World's Algae. <https://www.algae-base.org>.
- Amaral-Zettler, L.A., E.A. McCliment, H.W. Ducklow and S.M. Huse. 2009. A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes. *Plos One* 4(7): e6372.
- Beng, K.C. and R.T. Corlett. 2020. Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects. *Biodiversity and Conservation* 29(7): 2089-2121.
- Burivalova, Z., E.T. Game and R.A. Butler. 2019. The sound of a trophic forest. *Science* 363(6422): 28-29.
- Bylemans, J., D.M. Gleeson, C.M. Hardy and E. Furlan. 2018. Toward an ecoregion scale evaluation of eDNA metabarcoding primers: A case study for the freshwater fish biodiversity of the Murray-Darling Basin (Australia). *Ecology and Evolution* 8: 8697-8712.
- Carraro, L., E. Mächler, R. Wüthrich and F. Altermatt. 2020. Environmental DNA allows upscaling spatial patterns of biodiversity in freshwater ecosystems. *Nature Communications* 11(1): 1-12.
- Djurhuus, A., C.J. Closek, R.P. Kelly, K.J. Pitz, R.P. Michisaki, H.A. Starks, K.R. Walz, E.A. Andruszkiewicz, E. Olesin, K. Hubbard, E. Montes, D. Otis, F.E. Muller-Karger, F.P. Chavez, A.B. Boehm and M. Breitbart. 2020. Environmental DNA reveals seasonal shifts and potential interactions in a marine community. *Nature Communications*

- 11(1): 1-9.
- Ji, C.W., H.-J. Oh, K.-H. Chang, Y.-S. Park and I.-S. Kwak. 2022. A Comparative Analyzing of Zooplankton Community Diversity in Surface Layer Water of Reservoir Via eDNA Metabarcoding and Microscopy. *Diversity* **14**: 797.
- Keck, F., V. Vasselon, K. Tapolczai, F. Rimet and A. Bouchez. 2017. Freshwater biomonitoring in the Information Age. *Frontiers in Ecology and the Environment* **15**: 266-274.
- KOEM (Korea marine environment management corporation). 2019. National marine ecosystem monitoring program.
- Kwak, I.S., Y.S. Park and K.H. Chang. 2021. Application and utilization of environmental DNA technology for biodiversity in water ecosystems. *Korean Journal of Ecology and Environment* **54**(3): 151-155.
- MERK (Ministry of Environment in Republic of Korea). 2020a. Estuarine Ecosystem Monitoring and Assessment Project.
- MERK (Ministry of Environment in Republic of Korea). 2020b. Stream/River ecosystem survey and health assessment.
- Miya, M., Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J.Y. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Tamanaka, 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**(7): 150088.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2021. NCBI Nucleotide database. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>.
- NIBR (National Institute of Biological Resources). 2022. National list of Korea. National Institute of Biological Resources. Incheon, Korea, Accessed 31 Dec 2022. <https://species.nibr.go.kr>.
- NMBIK (National Marine Biodiversity Institute of Korea). 2017. National list of marine species. <https://www.mabik.re.kr/html/kr/#txt>.
- NNIBR (Nakdonggang National Institute of Biological Resources). 2022. List of freshwater species in Korea. <https://fbp.nnibr.re.kr/portal/>.
- Oh, H.-J., Y.-J. Chae, Y. Choi, D. Ku, Y.-J. Heo, I.-S. Kwak, H. Jo, Y.-S. Park, K.-H. Chang, H.-W. Kim. 2019. Review and Suggestions for Applying DNA Sequencing to Zooplankton Researches: from Taxonomic Approaches to Biological Interaction Analysis. *Korean Journal of Ecology and Environment* **54**: 156-169.
- Park, Y., J.-H. Lee, J.-R. Cho, G.-S. Lee, C.W. Ji. 2019. A survey for manual identification rate of insect images on different image quality. *The Journal of the Korean Society of International Agriculture* **31**(4): 424-427.
- Rajan, S.C., K. Athira, R. Jaishanker, N.P. Sooraj and V. Sarojkumar. 2019. Rapid assessment of biodiversity using aquatic indices. *Biodiversity and Conservation* **28**: 2371-2383.
- Rangaswamy, R., C.W. Ji, W.S. Kim, J.W. Park, Y.J. Kim and I.S. Kwak. 2022. Profiling analysis of filter feeder Polypedilum (Chironomidae) gut contents using eDNA metabarcoding following contrasting habitat types-weir and stream. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **19**(17): 10945.
- Rivera, S.F., V. Vasselon, N. Mary, O. Monnier, F. Rimet and A. Bouchez. 2021. Exploring the capacity of aquatic biofilms to act as environmental DNA samplers: test on macroinvertebrate communities in rivers. *Science of the Total Environment* **763**: 144208.
- Shu, L., A. Ludwig and Z. Peng. 2020. Standards for methods utilizing environmental DNA for detection of fish species. *Genes* **11**(3): 296.
- Song, H., W.S. Kim, J.W. Park and I.S. Kwak. 2022. Identification of bacterial communities in laboratory-adapted *Glyptotendipes tokunagai* and wild-stream-inhabiting *Chironomus flaviplumus*. *Microorganisms* **10**(11): 2107.
- Stoeckle, B.C., R. Kuehn and J. Geist. 2016. Environmental DNA as a monitoring tool for the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.): a substitute for classical monitoring approaches? *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **26**(6): 1120-1129.
- Thomsen, P.F. and E. Willerslev. 2015. Environmental DNA-an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* **183**: 4-18.
- Weigand, H., A.J. Beermann, F. Čiampor, F.O. Costa, Z. Csabai, S. Duarte, M.F. Geiger, M. Grabowski, F. Rimet and B. Rulik. 2019. DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work. *Science of the Total Environment* **678**: 499-524.
- WORMS. 2022. World Register of Marine Species. <https://www.marinespecies.org>.
- Zhang, Y., M. Pavlovska, E. Stoica, I. Prekrasna, J. Yang, J. Slobodnik, X. Zhang and E. Dykyi. 2020. Holistic pelagic biodiversity monitoring of the Black Sea via eDNA metabarcoding approach: From bacteria to marine mammals. *Environmental International* **135**: 105307.