

우리나라 민간인통제구역 내 수계 어류에 대한 비교분석: 직접조사 결과와 eDNA를 통한 간접조사 결과 비교

엄순재* · 김내영 · 설민아 · 김지영

국립생태원

Comparative Analysis of Freshwater Fish Species in Civilian Control Zone in South Korea: A Comparison between Direct Survey Results and Indirect Assessment via eDNA by Soon-Jae Eum*, Naeyoung Kim, Min-A Seol and Ji Young Kim (National Institute Ecology, Seocheon 33657, Republic of Korea)

ABSTRACT South Korea is the only divided nation globally, marked by a military demarcation line establishing demilitarized and civilian control zones, ensuring national security. Consequently, these areas exhibit relatively minimal ecological disruption compared to other regions. However, the threat to safety persists due to the presence of unexploded ordnances and landmines, imposing significant constraints on ecological research. To address this, we conducted a comparative study utilizing eDNA analysis as a supplementary and alternative approach within three points of the “Road of Peace” - Inje, Yanggu, and Hwacheon courses, located within the civilian control zone. Direct surveys and indirect eDNA sampling were carried out in May, July, and September of 2022. Genetic material obtained from the samples underwent amplification, library preparation, MiSeq sequencing, and subsequent ASV generation for indirect analysis. These results were then compared with the findings of direct surveys. Our findings revealed the detection of eDNA for both observed species at the Yanggu-1 point, and for two out of four species at Yanggu-2. Hwacheon-1 displayed the detection of eDNA for one out of one observed species, whereas Hwacheon-2 yielded seven out of twelve, Hwacheon-3 showed four out of six, and all one observed species at Hwacheon-4 exhibited eDNA detection. Consequently, approximately 69% of the fish species identified through direct surveys were confirmed by indirect eDNA analysis. It is necessary to verify if certain fish species, such as the continental trout and catfish, have genetic information registered in the NCBI database. Additionally, it is believed that further marker development research utilizing different genetic sequences is essential. Given the limitations imposed by the hazardous nature of the surveyed civilian control zone, eDNA analysis proves to be a suitable supplement for fish research in the area.

Key words: Civilian Control Zone, eDNA, fish species, road of peace

서 론

우리나라는 전 세계 유일한 분단국가로 남과 북을 분리하는 군사분계선(Military Demarcation Line: MDL)이 존재한다. 이

군사분계선을 기준으로 남과 북으로 각각 2 km의 거리를 두고 비무장지대(Demilitarized Zone: DMZ)가 존재하며 군사 작전 상 민간인의 출입을 통제하기 위해 군사분계선의 이남 10 km 범위 이내에서 민간인통제선(Civilian Control Line, CCL)이 지정되어 있다(NGII, 2020). DMZ와 CCL 사이의 공간을 민간인통제구역(Civilian Control Zone: CCZ)이라고 하여, UN의 관할지역인 DMZ와는 달리 영농민의 농업 활동, 평화의 길 관광 등의 목적에 따라 제한적으로 출입이 가능하며, 우리나라 다른 지역에

저자 직위: 엄순재(전임연구원), 김내영(연구원), 설민아(연구원), 김지영(전문위원)

*Corresponding author: Soon Jae Eum Tel: 82-41-950-5687, E-mail: soon84@nie.re.kr

비해 생태계 교란이 비교적 적은 지역 중 하나이다.

그중 비무장지대 접경지역 인근의 생태문화 및 역사 자원을 통해 자유, 평화 등을 체험할 수 있는 노선을 만들었으며, 이를 평화의 길이라 칭하고 있다(MCST, 2022). 이 평화의 길은 3개 일반지역 그리고 7개 접경지역에 총 11개의 노선으로 이루어져 있다. 접경지역에 위치한 8개 노선이 CCZ에 자리잡고 있으며, 이 중 2개 노선은 CCZ에서 시작하여, DMZ 내부로 들어가는 노선이다.

DMZ 및 CCZ 모두 출입에 대한 제한과 아직까지 제거되지 못한 유실지뢰 및 불발탄들이 곳곳에 산재되어 있기 때문에 인간의 손길이 거의 닿지 않은 자연 그대로의 형태를 보이고 있는 동시에(Lee *et al.*, 2007) 사람이 직접 입수하여 이루어지는 수계조사에서 연구자의 안전을 위해서 더욱 더 많은 제한이 적용된다. 본 연구에서는 이를 보완하기 위해 환경유전자(Environmental DNA, eDNA) 검출법을 적용하였다. eDNA는 동물의 배설물, 침, 소변 및 피부세포에서 유래하는 DNA가 섞인 토양, 물 등의 환경에서 추출하는 DNA를 뜻한다(Rees *et al.*, 2014). eDNA가 미생물, 식물 및 척추동물을 포함한 광범위한 유기체에서 유래한다는 사실을 이용하여, 현재 존재하는 식물과 동물의 생물다양성을 정성적, 정량적으로 판단할 수 있는 기준을 제시함으로써, 관찰이 어려운 종을 연구하는 데 이용되어 왔다(Pedersen *et al.*, 2015). 이렇듯 eDNA를 이용한 연구는 종의 보전 및 관리 개선에 큰 가능성을 가지고 있다(Barnes *et al.*, 2014)

우리나라에서는 국내 침입외래종 미국가재의 분포 현황(Jung *et al.*, 2022)이나, 하천 어류 군집 분석(Yoon *et al.*, 2023), 외래거북 검출(Baek *et al.*, 2018)과 같이 주로 담수에서 이미 많은 연구가 진행되고 있으며, 국외에서는 알래스카 매머드 생존 날짜 추정, 북극의 지난 50,000년간의 식생 역사를 밝혀내는 등의 연구(Pedersen *et al.*, 2015)가 진행되었다. 아울러, 미국 몬트레이 만에서 해양 척추동물 모니터링을 위해 이용되기도 했고(Andruszkiewicz *et al.*, 2017), 일본 마이즈루 만에서 진행된 연

구에 따르면 인간활동으로부터 격리된 수환경에서 eDNA를 이용한 방법은 어류 분포와 생물량 추정에 더욱 효과적이라는 연구 결과를 도출했다(Yamamoto *et al.*, 2016).

본 연구는 우리나라 CCZ 내 하천에서 채취한 물 시료에 존재하는 eDNA를 통해 해당 하천에 서식하고 있는 어류의 유전자를 분석하고 직접조사 결과와 비교하여, 직접조사 결과의 타당성을 확보하고 그 결과를 보완할 뿐만 아니라, 생물다양성 보전 등 정책적 지원을 위한 기초자료를 제공하는 데 목적이 있다.

재료 및 방법

1. Study site

본 연구는 대한민국 CCZ에 위치하고 있는 평화의 길 인제노선, 양구노선 그리고 화천노선 내 존재하는 수계에서 2022년 5월, 7월, 9월로 총 3회 수행되었다. 인제노선 및 양구노선에서는 각각 2개소에서 연구를 수행하였으며, 상대적으로 넓은 화천노선에서는 총 5개소에서 연구를 수행하였다(Table 1, Fig. 1). 다만, 민간인통제구역의 특성상 군인과 함께 이동하며, 군 통제하에 연구 수행을 하여 지속적으로 조사 및 물 시료 채취를 할 수 없는 경우도 발생하였다.

2. Direct survey

본 연구는 직접조사 연구 결과를 뒷받침하고 더 나아가 안전상의 문제 등으로 수행이 불가능한 지역에서 직접조사를 보완하고자 하는 것이 목적이기에 비교분석을 위해 현장에서 직접조사 또한 수행하였다(Fig. 2).

정성 및 정량 조사를 위하여 직접조사는 제5차 전국자연환경조사지침(NIE, 2019)을 따라 족대(4×4 mm)를 사용하였고, 안

Table 1. GPS coordinates of study site

No.	Sample name	Site	GPS coordinate		River, Stream
			Latitude	Longitude	
1	Inje-1	Inje course	38°19'32.78"	128°15'49.87"	Hangang, Inbukchen
2	Inje-2		38°18'28.27"	128°15'52.43"	
3	Yanggu-1	Yanggu course	38°17'10.30"	128°1'59.18"	Hangang, Suibchen
4	Yanggu-2		38°16'44.54"	128°1'30.00"	
5	Hwacheon-1	Hwacheon course	38°15'33.71"	127°44'28.98"	Hangang, Bukhangang
6	Hwacheon-2		38°15'0.57"	127°47'7.23"	
7	Hwacheon-3		38°15'44.71"	127°48'8.13"	
8	Hwacheon-4		38°16'10.44"	127°48'57.14"	
9	Hwacheon-5		38°14'23.97"	127°50'3.38"	

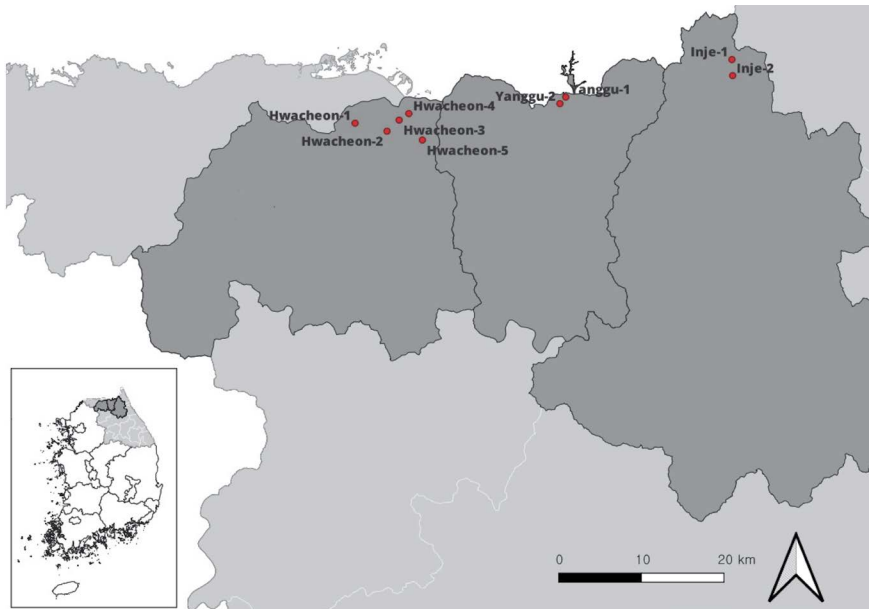


Fig. 1. The Map of fish species comparative study sites.

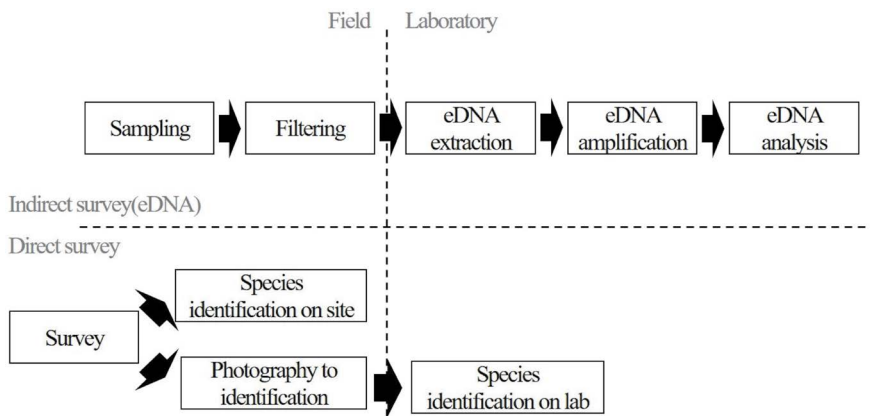


Fig. 2. Flowchart of direct survey and indirect survey (eDNA) research.

전문제 등 현지 사정으로 인해 출입이 제한된 지점은 육안으로 관찰하였다. 채집된 어류는 현장에서 동정 후 즉시 방류하였으며, 동정이 어려운 경우, 사진 촬영 후 방류하였다. 표본제작 등에 필요한 소수의 개체는 10% 포르말린액에 고정하거나 산채로 실험실에 운반하여 작업하였다(NIE, 2023).

종 동정은 Kim (1997)과 Kim and Park (2002), Kim *et al.* (2005)에 따라 동정을 실시하고, 학명은 국가생물종목록(NIBR, 2022)을 따랐다.

3. Indirect survey: eDNA sampling

CCZ는 수계로의 진입이 원칙적으로 제한되어 있고, 직접조사를 포함한 eDNA 채집 또한 군에서 사전 지뢰 수색 등 안전이 확

보된 상황에서만 일부 구간에 대해 조사가 가능하다. 시료를 채취하는 작업은 비교적 안전하다고 판단되는 위치에서 자체적으로 제작한 채수 도구를 이용하여 채수하였다. 채수 도구는 약 15 m 로프와 연결되어 있는 바구니에 멸균된 Y bag (50 × 75 cm)을 넣어, 물 시료를 채취할 때마다 교체하여 유전자 오염과 미생물 오염으로 인한 유전물질 파괴를 최소화하였다. 채수작업은 각 지점별 다리 위에서 최대한 안전을 확보한 다음 수행하였으며, 각 지점별 다리 양 끝 및 중앙에서 1회씩 총 3회 물을 채수하고 이들을 균일하게 섞은 뒤 2L 채수백으로 옮겨 담았다(NIE, 2022a, 2023).

미생물로 인한 오염을 최소화하기 위해 Y bag에서 물을 병으로 옮겨 담을 때 흘러나오는 물의 처음 일정량을 버리고 중간물

을 취했다.

물 시료는 채수 즉시 냉장 보관하여, 전처리 과정을 수행할 수 있는 공간으로 이동할 때까지 냉장 상태를 유지하였으며, 안정적인 공간에서 전처리 과정을 수행하였다.

4. Indirect survey: eDNA analysis preprocessing

전처리 과정은 필터링을 통해 물 시료 안의 eDNA를 필터에 모으고, eDNA 파괴를 최소화하기 위해 건조 보관하는 과정이다. 필터링은 안정적인 환경에서 의료용 석션기를 사용하였으며, 최대 600 mmHg, 최소 400 mmHg 이상의 조건에서, GF/C 필터 (1.2 μm)를 통해 필터링을 수행하였다(Lacoursière-Roussel *et al.*, 2016). 필터링 후 물은 버리고 유전물질을 포함하고 있는 필터만 취하여, 멸균된 20 mL 유리 바이알에 보관하였고, blue silica gel (Duksan)을 이용하여 건조시켰다. 50 mL conical tube에 silica gel을 채워 넣고 그 위에 필터가 들어가 있는 20 mL tube를 뒤집어 필터가 silica gel에 닿지 않게 넣은 채로 파라필름으로 conical tube 입구를 막았다. 수시로 silica gel을 교체하여 수분을 제거하고, 완전히 건조될 때까지 냉장 상태(4°C)로 보관하였다(Hinlo *et al.*, 2017; NIE, 2023).

5. Indirect survey: DNA extraction

건조시킨 GF/C 필터에 있는 유전물질은 DNeasy PowerWater Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 추출하였다. 추출 방법은 kit에 동봉되어 있는 Quick Start protocol을 따르되, 필터에

포집된 세포와 조직을 파쇄하여 DNA를 추출하는 과정을 더 세밀하게 수행하였다. 파쇄하는 방법은 건조된 필터를 2 mL tube로 옮기고, 멸균된 가위로 필터의 입자 크기를 약 1 mm² 크기로 1차 파쇄하였다. 1차 파쇄한 filter에, DNeasy PowerWater kit의 PW1 buffer를 파쇄된 여과지가 충분히 적셔지도록 1 mL를 넣은 뒤, 5 mm stainless steel bead를 2개 넣고, 56°C에서 10분간 가열을 하였다. 이후, TissueLyser (TissueLyser II, Qiagen, Cat. No. 85300)를 이용하여 30 round/s로 10분간 파쇄하였다. 그 이후의 과정은 kit에 포함되어 있는 Quick Start protocol을 따라 유전자를 추출하였고, 유전자 증폭 실험에 사용하였다(NIE, 2023).

6. Indirect survey: DNA amplification

유전자 증폭은 AccuPower Gold Multiplex PCR PreMix (Bioneer)를 사용하였고, MiFish-U primer를 사용하여 nested PCR을 수행하였다(Miya *et al.*, 2015). 2차 PCR 과정에서는 MiSeq을 수행하기 위해 일정 길이의 adaptor sequence를 추가하여 paired-end library를 제작하였다(Table 2), PCR 조건은 90°C에서 4분간 denaturation 과정을 수행한 뒤, 90°C에서 30초 동안 denaturation, 60°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초 동안 synthesis 과정을 총 35 cycle 수행하였고, 마지막 synthesis 과정은 72°C에서 4분간 수행하고 4°C에서 종료하였다(NIE, 2022a, 2023). 1차 PCR 조건과 2차 PCR 조건은 동일하게 수행하였다(Fig. 3).

Table 2. Information of nested PCR primer sets

Target organisms (Region)	Name	Primer sequences
Fish (12S rRNA)	MiFish-U-F	5'-GTCGGTAAAACCTCGTGCCAGC-3'
	MiFish-U-R	5'-CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG-3'
	NGS-MiFish-U-F	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNGTCGGTAAAACCTCGTGCCAGC-3'
	NGS-MiFish-U-R	5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG-3'

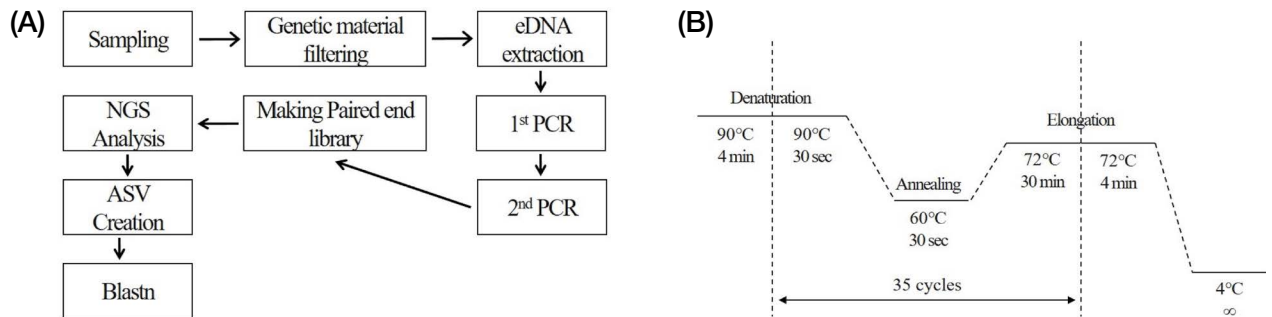


Fig. 3. PCR method (A) schematic diagram of eDNA research, (B) schematic diagram of optimal PCR condition.

7. Indirect survey: library analysis

제작된 library는 MacroGen 사를 통해 MiSeq을 수행하였다. MiSeq을 통해 얻은 raw data는 DADA2 pipeline을 통해 ASV (Amplicon Sequence Variant)를 생성하고, 분석에 활용하였다. ASV는 정방향으로 160 bp, 역방향으로 160 bp씩 잘라 중간에서 중첩되는 부분을 연결하여 생성하였다(Fig. 4). 염기서열을 통한 중 분석에서는 염기서열이 99% 이상 일치하는 서열은 중으로써 정리하였고, 염기서열이 구분되지 않을 정도로 유사한 중

들에 대해서는 결과에서 제외하였다.

결 과

1. 어류 eDNA 검출

우리나라 CCZ에 위치한 평화의 길 인제, 양구, 화천노선 3개소에서 환경유전자는 총 1,886,463 read가 검출되었다. 그중 유의한 어류 read는 총 903,250이었다. 그 외 미생물 및 chimeric DNA 그리고 포유류, 조류, 양서류, 저서무척추동물군의 유전자로 추정되는 유전자가 983,213 read가 검출되었다.

어류는 3개 지역에서 eDNA를 통해 총 29종(13과 24속)을 확인하였으며, 같은 날 전문가를 통한 직접조사 결과 확인된 17종(10과 16속)과 비교하였다(Fig. 5).

2. 평화의 길 인제노선 내 하천 어류상

인제-1 지점은 총 3회 모두 eDNA 분석을 위한 채수작업이 완료되었으며, 인제-2 지점의 샘플링은 총 2회 수행되었다. 직접 조사는 안전상의 문제로 불가하였다. 인제-1 지점에서는 금강모치, 쌀미꾸리, 열목어, 가물치 4종의 유전자가 검출되었으며, 인제-2 지점에서는 금강모치 (*Rhynchocypris kumgangensis*), 버들가지 (*R. semotilus*), 참갈겨니 (*Zacco koreanus*), 열목어 (*Brachymystax lenok tsinlingensis*) 4종의 유전자가 검출되었다.

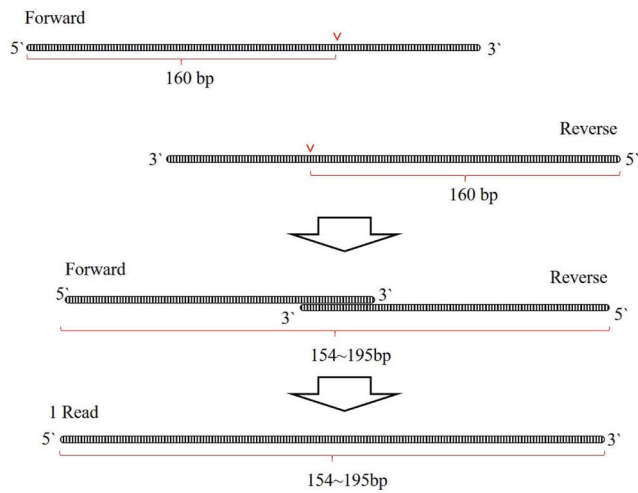


Fig. 4. ASV read creation from NGS analysis results.

Table 3. The fish species comparison data on 'Road of Peace' Inje course

Species	Direct survey*		Indirect survey (eDNA)		Accession number of target species
	Inje-1	Inje-2	Inje-1	Inje-2	
Cypriniformes 잉어목					
Cyprinidae 잉어과					
<i>Rhynchocypris kumgangensis</i> 금강모치			○	○	NC_019614 ¹
<i>Rhynchocypris semotilus</i> 버들가지				○	NC_029341 ²
<i>Zacco koreanus</i> 참갈겨니				○	ON479181
Balitoridae 종개과					
<i>Lefua costata</i> 쌀미꾸리			○		NC_029385
Salmoniformes 연어목					
Salmonidae 연어과					
<i>Brachymystax lenok tsinlingensis</i> 열목어			○	○	JQ675732
Perciformes 농어목					
Channidae 가물치과					
<i>Channa argus</i> 가물치			○		MG751766
Number of species observed	N/A	N/A	4	4	
Number of species shared (percentage)**			N/A	N/A	

*Not surveyed due to safety concerns

**Number of species shared/number of species observed: Countermeasure rate by indirect/direct survey

¹Yun et al., 2012, ²Yu et al., 2015.

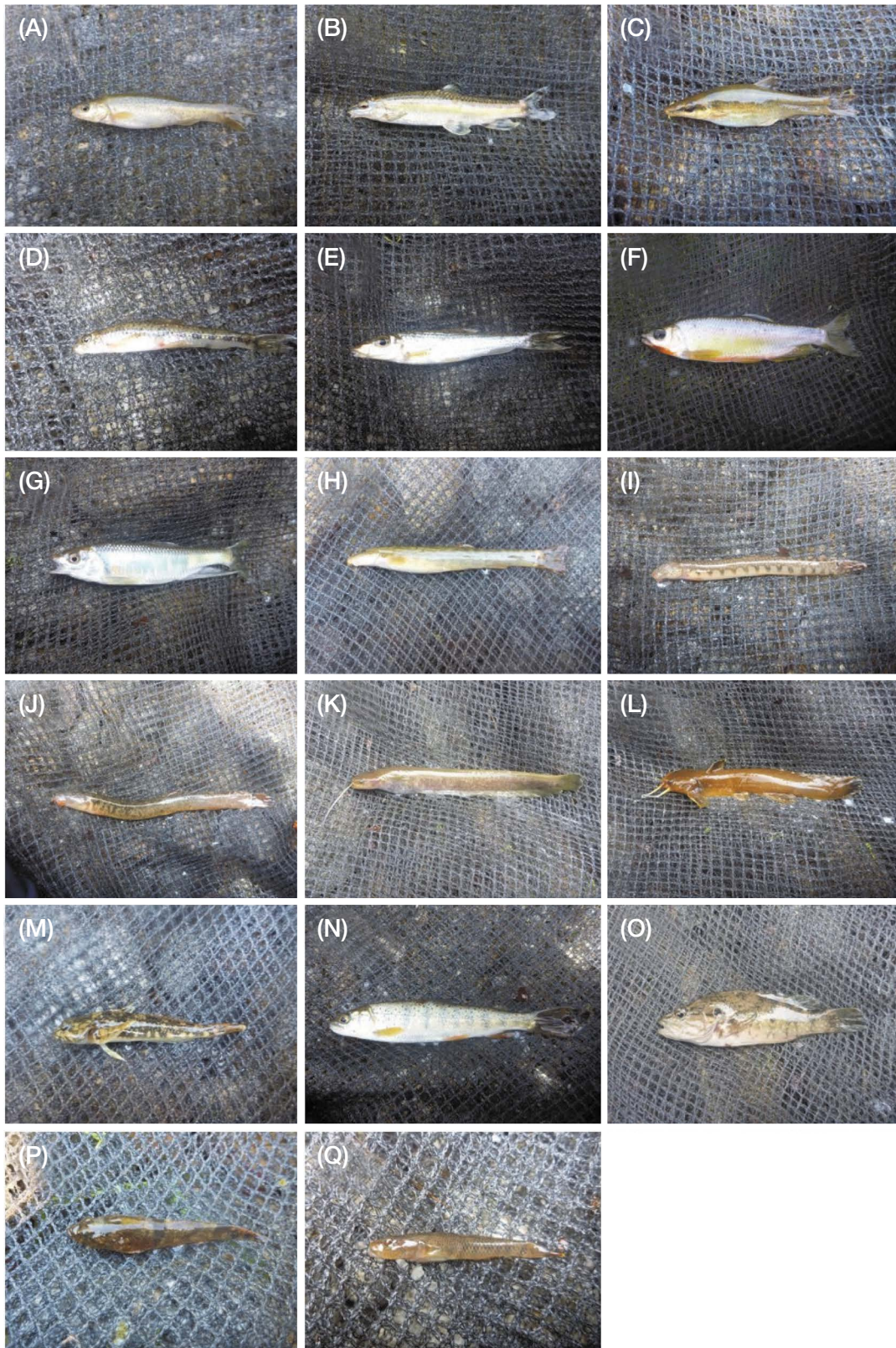


Fig. 5. Fish species of seventeen confirmed from direct survey. A: *Rhynchocypris oxycephalus*, B: *Coreoleuciscus splendidus*, C: *Pungtungia herzi*, D: *Microphysogobio yaluensis*, E: *Hemibarbus longirostris*, F: *Zacco koreanus*, G: *Zacco platypus*, H: *Orthrias nudus*, I: *Iksookimia koreensis*, J: *Koreocobitis rotundicaudata*, K: *Silurus microdorsalis*, L: *Liobagrus andersoni*, M: *Cottus koreanus*, N: *Brachymystax lenok tsinlingensis*, O: *Coreoperca herzi*, P: *Odontobutis platycephala*, Q: *Rhinogobius brunneus*.

Table 4. The fish species comparison data on 'Road of Peace' Yanggu course

Species	Direct survey (2020)		Direct survey (2022)		Indirect survey (eDNA, 2022)		Accession number of target species
	Yanggu-1	Yanggu-2*	Yanggu-1	Yanggu-2	Yanggu-1	Yanggu-2	
Cypriniformes 잉어목							
Cyprinidae 잉어과							
<i>Rhynchocypris oxycephalus</i> 버들치			○	○			NC_018818 ¹
<i>Zacco koreanus</i> 참갈겨니					○	○	ON479181
<i>Zacco platypus</i> 피라미						○	ON479185
Balitoridae 종개과							
<i>Orthrias nudus</i> 대륙종개				○			
<i>Orthrias toni</i> 종개					○	○	EU670809
<i>Lefua costata</i> 쌀미꾸리						○	NC_029385
Salmoniformes 연어목							
Salmonidae 연어과							
<i>Brachymystax lenok tsinlingensis</i> 열목어			○	○	○	○	JQ675732
Scorpaeniformes 솜뱅이목							
Cottidae 독중개과							
<i>Cottus koreanus</i> 독중개	○			○	○	○	NC_014849 ²
Number of species observed	1	N/A	2	4	4	6	
Number of species shared (percentage)**	N/A	N/A	2 (100%)	2 (50%)	2 (50%)	2 (33%)	

*Survey was not conducted

**Number of species shared/ number of species observed: Countermeasure rate by indirect/direct survey

¹Imoto et al., 2013, ²Hwang et al., 2013a

다만, 직접조사가 진행되지 못해 직접조사와 간접조사를 비교할 수 없었다(Table 3).

3. 평화의 길 양구노선 내 하천 어류상

안전상의 문제로 인해 양구-1 지점은 2회만 조사되었으며, 직접조사 또한 조사가 제한되었다. 양구-2 지점은 직접조사와 eDNA 채집 모두 3회 정상적으로 수행하였다. 양구지점에서 직접조사와 간접조사(eDNA) 간에 동일한 결과를 보이는 것은 양구-1 지점과 양구-2 지점 모두 열목어, 독중개(*Cottus koreanus*) 2종이다. 이외 직접조사에서는 서식이 확인되었으나, eDNA에서는 검출되지 않은 생물종은 버들치(*R. oxycephalus*), 대륙종개(*Orthrias nudus*) 2종이었다. 양구-1 지점에서는 참갈겨니, 종개(*O. toni*)가 eDNA에서만 검출되어 총 4종이 검출되었으며, 양구-2 지점에서는 참갈겨니, 피라미(*Z. platypus*), 종개, 쌀미꾸리(*Lefua costata*)가 검출되어 총 6종이 검출되었다(Table 4).

4. 평화의 길 화천노선 내 하천 어류상

안전상의 문제로 통제되어 총 2회에 걸쳐 조사가 수행되었고, 화천-3 및 화천-4의 경우 1회만 조사가 수행되었다.

화천-1 지점은 직접조사에서 독중개 1종만 관찰되었으며, 이

종은 eDNA에서도 검출되었다. 이외, eDNA에서 15종이 더 검출되어 총 16종이 검출되었다. 화천-2 지점에서는 직접조사와 eDNA 간 공통으로 조사된 종은 쉬리(*Coreoleuciscus splendendus*), 돌고기(*Pungtungia herzi*) 등 총 7종으로, 참마자(*Hemibarbus longirostris*), 대륙종개, 참종개(*Iksookimia koreensis*), 미유기(*Silurus microdorsalis*), 통가리(*Liobagrus anderson*)의 유전자가 검출되지 않았다. 반면 쌀미꾸리와 생태계교란 생물인 블루길(*Lepomis macrochirus*)과 배스(*Micropterus salmoides*) 총 3종이 추가로 eDNA를 통해 검출되었다. 화천-3 지점에서는 돌마자(*Microphysogobio yaluensis*)를 제외한 5종 모두 eDNA가 검출되었으며, 쉬리 등 5개 종이 추가로 검출되었다. 화천-4 지점에서 수행한 직접조사에서는 참갈겨니 1종만 관찰되었고, 간접조사에서는 참갈겨니를 포함한 13종의 eDNA가 검출되었다. 화천-5에서는 직접조사 시 관찰된 어류는 없었으나, 12종의 어류의 eDNA가 검출되었다(Table 5).

5. 직접조사와 eDNA를 통한 간접조사 비교

우리나라 CCZ 내 9개 지점에서 직접조사와 eDNA를 통한 간접조사를 비교한 결과, 직접조사한 어류의 약 69%는 eDNA를 통해서도 간접적인 조사가 가능한 것을 확인할 수 있었다. 하지

Table 5. Continued

Species	Direct survey (2020)					Direct survey (2022)					Indirect survey (eDNA, 2022)					Accession number of target species	
	HC-1	HC-2	HC-3	HC-4	HC-5	HC-1	HC-2	HC-3	HC-4	HC-5	HC-1	HC-2	HC-3	HC-4	HC-5		
	N/A	8	3	4	0	1	12	6	1	0	16	10	10	13	12		
Perciformes 농어목																	
Centropomidae 썩지과																	
<i>Coreoperca herzi</i> 썩지		○															ON479132
Centrarchidae 검정우럭과																	
<i>Lepomis macrochirus</i> 블루길							○										OQ793724
<i>Micropterus salmoides</i> 메스											○						OK945936
Odontobutidae 동사리과																	
<i>Odontobutis platycephala</i> 동사리		○															NC_010199 ¹¹
Gobiidae 망둑어과																	
<i>Rhinogobius brunneus</i> 밀어																	NC_028435
Number of species observed	1	8	3	4	0	1	12	6	1	0	16	10	10	13	12		
Number of species shared (percentage)*	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	1 (100%)	7 (58%)	5 (83%)	1 (100%)	0	1 (6%)	7 (70%)	5 (50%)	1 (8%)	0		

* Number of species shared/ number of species observed; Countermeasure rate by indirect/direct survey
¹Zhu et al., 2018, ²Yun et al., 2012, ³Yu et al., 2015, ⁴Hwang et al., 2013b, ⁵Hwang et al., 2013c, ⁶Miya et al., 2015, ⁷Kim and Bang, 2012, ⁸Yang et al., 2019, ⁹Lee et al., 2016, ¹⁰Hwang et al., 2013b, ¹¹Ki et al., 2008

만, 검출되어야 함에도 검출이 되지 않는 종과 해당 수계에서 나올 수 없는 어류가 나오는 등의 문제점을 확인할 수 있었다. 반면, eDNA를 통해 확인된 어류의 단 25%만이 직접조사 결과에서 확인이 되었다(Table 6). 이렇듯 직접조사하기에 위험한 환경에서는 eDNA를 통한 어류상 조사는 보완책으로써 활용이 가능하며, 해당 하천 전체에 서식하고 있는 어류에 대한 정성적인 연구 결과를 얻고자 할 경우에도 활용이 가능하다.

고 찰

우리나라 CCZ 내 존재하는 평화의 길 노선 중 3개 노선에 위치한 하천에서 직접조사와 eDNA를 통한 간접조사를 수행하였다. 평화의 길 인제노선은 군의 원활한 협조에도 불구하고, 연구자의 안전문제로 인해 수계로 직접 들어가 조사하는 방법은 제한되었고, eDNA 확보를 위한 채수 작업과 이를 통한 eDNA 분석만 가능하였다. 인제-1 지점에서는 계곡부에서 관찰하기 어려운 가물치의 유전자가 검출되었는데, 조사지점의 상류에 군부대가 존재함에 따라 부대 내에서 가물치를 섭취한 후 버려진 잔해와 함께 유전자가 떠내려와 검출되었을 가능성이 높은 것으로 판단된다. 이러한 사례는 CCZ의 특성상 수계에 인접한 군부대가 많아 발생하는 경우가 있다(NIE, 2022a).

양구의 두 지점은 연결된 하천으로써 상류부터 떠내려온 유전 물질들이 모두 검출되는 eDNA의 특성상 지점조사를 하는 직접 조사와는 차이점이 발생할 수 있다(He et al., 2022). 특히, 양구 지역에서 대륙종개는 직접조사에서는 발견되었지만, eDNA를 통한 간접조사에서는 검출되지 않았으며, 같은 속의 종개만 검출되었다. 이는 조사지점보다 상류지점에서 흘러내려온 종개의 유전자만 검출되었을 가능성도 있지만, NCBI에 등재된 유전정보를 바탕으로 검출하는 분자유전학의 특성상 대륙종개가 종개로 오동정된 상태로 등재하였을 가능성과, 동일속에 속하는 대륙종개와 종개 두 종이 불과 3 bp의 차이를 보이는 상황으로 보아 서식지가 나뉜 뒤 오랜 시간이 지나며 생기는 서식지 간의 차이일 가능성이 있을 것으로 생각된다(Jang et al., 2017).

평화의 길 화천노선은 연구자들의 안전성 확보가 매우 어려운 지역으로 제한사항이 많았던 지역이다. 화천노선에서는 미유기의 염기서열과 98% 일치하는 메기속의 1개 종이 검출되었다. 우리나라에 서식하는 메기속 생물이 메기와 미유기 2개 종임을 보았을 때(Kim and Park, 2002), 해당 종은 미유기일 가능성은 매우 높으나, 일치율이 98~96%로 낮아 결과에는 포함하지 않았다. 하지만, 지속적으로 검출되고 있는 미유기로 추정되는 유전자의 142번째 염기서열에서부터 cytosine이 연속적으로 9~11 bp가 읽히고 있는데, NCBI에 등재되어 있는 미유기의 염기서열에는 해당 부위의 시토신은 불과 6 bp만 가지고 있기에 이렇게 낮은 결과를 보이고 있다. 동일한 염기서열이 이렇듯 길게 존

Table 6. The countermeasure rate between direct survey and indirect survey

	Number of observed value							Total	Rate of countermeasure
	Yanggu-1	Yanggu-2	Hwacheon-1	Hwacheon-2	Hwacheon-3	Hwacheon-4	Hwacheon-5		
Direct survey	2	4	1	12	6	1	0	26	25% (18/71)
Indirect survey	4	6	16	10	10	13	12	71	69% (18/26)
Number of shared	2	2	1	7	5	1	0	18	

재하면 이러한 오류가 충분히 발생할 가능성이 높다고 판단되어, 다른 서열부를 이용한 마커 개발 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한, 한강 및 북한강 하천에 포함이 되는 화천구간에서는 발견될 수 없는 버들가지가 발견되었다. 적은 양의 read가 확인되었다면, 유전자 오염 등을 고려해볼 수 있겠지만 470여 개의 read가 확인되어 유전자 오염이나, 유전자가 증폭되며 발생한 오류일 가능성은 매우 희박할 것으로 판단된다. 버들가지는 우리나라에서만 서식하고 있는 한반도 고유종이며, 환경부 지정 멸종위기 야생생물로 보호받고 있는 종인 만큼(NIE, 2022b) 유전정보와 시료가 부족하여, NCBI에 등재되어 있는 염기서열은 분석 전 오동정된 상태로 유전분석이 이루어졌을 가능성이 있을 것으로 생각된다. 특히, 국립생물자원관 국가생물종 목록에는 등재되어 있지 않은 버들피리와 100% 일치하는 결과를 보였기에(Xu *et al.*, 2014) 버들피리(*R. lagowskii*)가 버들가지로 오동정된 상태로 NCBI에 등재되어 발생한 오류일 가능성이 매우 높다고 판단되었다. 또한, 우리나라에서는 버들개(*R. steindachneri*)와 버들피리 간의 종 분류 문제가 있기에 버들가지와 버들개, 버들피리에 대한 Whole genome sequencing 등 추가적인 연구가 반드시 필요할 것으로 생각된다.

평화의 길 인제노선, 2개 지점, 양구노선 1개 지점, 화천노선 5개 지점에 대해 2020년 6월 국립생태원에 의해 선행 연구된 바 있으나, 당시에는 현장에서 직접조사만 수행하였고 eDNA에 대한 연구는 수행되지 않아 선행 연구와의 결과 비교는 직접조사만 가능하였다.

양구노선은 2020년 조사 당시 독종개 1종만 출현하였다(NIE, 2022a). 본 연구에서는 1개 지점을 더 조사하여 직접조사에서는 버들치, 대륙종개, 열목어가 추가적으로 출현하였으며, 간접조사에서는 상기된 바와 같이 참갈겨니, 피라미, 종개, 쌀미꾸리 등 6종의 eDNA가 추가적으로 확인되었다(Table 4). 이러한 결과는 조사지점수 및 조사 횟수의 증가로 인한 영향인 것으로 판단된다.

화천노선의 경우 2020년 선행 조사에서 확인되었던 금강모치, 갈겨니(*Z. temminckii*)의 서식이 2022년에 확인되지 않았다. 반면, 2020년에는 확인되지 않았던 돌마자, 참마자, 피라미 등 8종의 어류가 추가적으로 서식이 확인되었다. 지점별로는 화천-3에서 금강모치, 쉬리, 갈겨니 등 3종, 화천-4에서 금강모치, 쉬리, 갈

겨니, 미유기 등 4종의 어류가 2022년 직접조사에서는 확인되지 않았고, 화천-2에서 참마자, 참갈겨니 등 5종, 화천-3에서 돌마자, 참마자, 피라미 등 6종의 추가 서식이 확인되었다. 2020년 선행 연구에서는 단 1회만 조사되었기에 이러한 차이가 보이는 것으로 추정되며, 2022년에 서식이 확인되지 않은 어류 중 일부는 eDNA가 발견되어 각 어류들이 상류로 서식지를 옮긴 것으로 추정된다. 그리고 화천-1 및 화천-5 지점에서 수행한 직접조사 결과는 선행 연구와 동일한 결과를 보였으나, 간접조사에서는 각각 15종, 12종이 더 관찰되어 간접조사에서 확인된 어류들이 각 지점의 상류에 서식하고 있을 가능성이 높을 것으로 판단된다(Table 5).

본 연구에서 직접조사와 간접조사를 비교할 수 없는 인제의 데이터를 제외하고 양구노선과 화천노선에서의 확인된 종 수를 비교하면, 직접조사를 통해 확인된 종 중, eDNA를 이용한 간접조사에서도 확인된 경우는 69%로 높다. 반면에, eDNA를 통한 간접조사에서 확인된 종이 직접조사에서 발견된 경우는 25%에 불과하다. 기존에 진행된 금강 본류, 지천, 낙동강 황지천, 섬진강 본류에서 진행된 기존 선행 연구에서는 직접조사에서 확인된 종이 eDNA를 통한 간접조사에서도 발견된 경우는 58%이며, eDNA를 통해 확인된 종이 직접조사에서 발견된 비율은 30%로, 일반적으로 eDNA를 통한 연구에서 더 많은 종이 검출된 바 있다(Kim *et al.*, 2020). 이러한 결과는 점조사를 수행하는 직접조사와 상류에서부터 조사지점까지 선조사가 이루어지는 eDNA를 통한 간접조사 간의 차이가 가장 큰 것으로 보이며, 간혹 직접조사에서 잘 발견이 되지 않는 종들이 eDNA를 통한 조사에서만 검출되어 발생하는 차이점으로 보인다.

반면, 지역별 연구방법에 따라, 어종에 따라 eDNA를 통한 조사연구 결과와 직접조사 간의 격차가 매우 적거나 eDNA 출현빈도가 더 높게 조사된 바 있어(Zhu *et al.*, 2023) 이번 연구에서는 eDNA 연구 결과가 직접조사 연구 결과의 69%를 보완하는 것이 가능하지만, 직접조사 결과와 eDNA 조사 결과의 차를 줄이기 위해서는 서식하는 어류에 대한 사전 조사와 이에 맞는 sediment eDNA 실험 등 다양한 실험 방법을 접목하게 된다면 직접조사에 대한 eDNA의 검출빈도가 더 늘어날 것으로 예상된다.

이렇듯 분명히 CCZ 혹은 DMZ와 같이 연구자의 안전을 위해 직접적인 조사가 쉽지 않은 지역에서는 eDNA를 적용한 간

접조사가 보완책으로써 활용이 가능할 것으로 판단된다. 또한 보다 더 정확한 결과를 얻기 위해서는 정확한 종 동정 및 각 수계에 따른 어류 미토콘드리아 전장유전체염기서열정보(Whole genome sequencing) 연구 등 아직까지 많은 연구가 필요할 것으로 판단된다.

요 약

우리나라는 전 세계에서 유일한 분단국가로 군사분계선을 가지고 있다. 군사분계선을 기준으로 비무장지대 및 민간인통제구역이 설정되었고, 국가보안 및 안전을 위해 출입이 통제되고 있어, 우리나라 다른 지역에 비해 생태계 교란이 비교적 적은 지역이다. 하지만 유실지뢰 및 불발탄들로 인해 안전이 위협받음에 따라 생태계 연구에 많은 제한사항이 발생하기 때문에, 연구를 보완 및 대체하기 위해 eDNA 분석법을 활용하여 민간인통제구역 내부에 존재하는 평화의 길 세 지점에서 직접조사와 eDNA를 이용한 간접조사를 실시하고 비교했다.

평화의 길 인제노선, 양구노선, 화천노선 세 지점에서 2022년 5, 7, 9월에 직접조사와 eDNA 시료 채취를 진행했으며, 시료에서 채취한 유전자를 증폭한 후 library를 제작하여 Miseq를 수행하고 ASV를 생성하여 간접조사를 완료했다. 이후, 직접조사 결과와 비교했다.

그 결과 양구-1 지점에서 관찰된 2종 모두 eDNA가 검출되었으며, 양구-2 지점에서 관찰된 4종 중 2종의 eDNA가 검출되었다. 화천-1에서 관찰된 1종 중 1종의 eDNA가 검출되었고, 화천-2에서 12종 중 7종, 화천-3에서는 6종 중 4종, 화천-4에서 관찰된 1종 모두 eDNA가 검출되어 직접조사 결과 확인된 종의 약 69%의 어류의 eDNA가 검출된 간접조사 결과를 확인했다.

대륙종개, 메기 등 일부 어류가 오동정된 상태로 NCBI에 유전 정보가 등재된 것은 아닌지 확인이 필요하고, 다른 서열부를 이용한 마커 개발 연구가 필요할 것으로 생각되며, 위험성 때문에 조사가 제한적인 CCZ 지역 어류 연구의 보완책으로써 적합할 것으로 생각된다.

사 사

이 논문은 2022년 DMZ 평화의 길 생태계 조사(NIE-수탁연구-2022-87)의 일환으로 연구되었습니다.

REFERENCES

Andruszkiewicz, E.A., H.A. Starks, F.P. Chavez, L.M. Sassoubre, B.A. Block and A.B. Boehm. 2017. Biomonitoring of marine

- vertebrates in Monterey Bay using eDNA metabarcoding. *PLoS One*, 12: e0176343.
- Baek, H.J., S.H. Kim and N.Y. Kim. 2018. Detecting *Mauremys sinensis* introduced species using eDNA. *The Korean Research Society of Herpetologists*. 15pp.
- Barnes, M.A., C.R. Turner, C.L. Jerde, M.A. Renshaw, W.L. Chadderton and D.M. Lodge. 2014. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environ. Sci. Technol.*, 48: 1819-1827.
- He, W., D. Xu, Y. Liang, L. Ren and D. Fang. 2022. Using eDNA to assess the fish diversity and spatial characteristics in the Changjiang River-Shijiu Lake connected system. *Ecol. Indic.*, 139: 108968. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.108968>.
- Hinlo, R., D. Gleeson, M. Lintermans and E. Furlan. 2017. Methods to maximize recovery of environmental DNA from water samples. *PLoS One*, 12: e0179251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179251>.
- Hwang, D.S., H.K. Byeon and J.S. Lee. 2013a. Complete mitochondrial genome of the freshwater sculpin *Cottus koreanus* (Scorpaeniformes, Cottidae). *Mitochondrial DNA*, 24: 490-491. <https://doi.org/10.3109/19401736.2013.770500>.
- Hwang, D.S., W.O. Lee and J.S. Lee. 2013b. Complete mitochondrial genome of the Korean bitterling *Acheilognathus intermedia* (Cypriniformes; Cyprinidae). *Mitochondrial DNA*, 24: 416-417. <https://doi.org/10.3109/19401736.2013.766179>.
- Hwang, D.S., W.O. Lee and J.S. Lee. 2013c. Complete mitochondrial genome of the striped bitterling *Acheilognathus yamatsutae* (Cypriniformes; Cyprinidae). *Mitochondrial DNA*, 24: 676-677. <https://doi.org/10.3109/19401736.2013.773988>.
- Imoto, J.M., K. Saitoh, T. Sasaki, T. Yonezawa, J. Adachi, Y.P. Kartavtsev, M. Miya, M. Nishida and N. Hanzawa. 2013. Phylogeny and biogeography of highly diverged freshwater fish species (Leuciscinae, Cyprinidae, Teleostei) inferred from mitochondrial genome analysis. *Gene*, 514: 112-124.
- Jang, S.K., M.H. Ko, Y.S. Kwan and Y.J. Won. 2017. Population genetic structure of the Korean endemic species, *Iksookimia pacifica* (Pisces: Cobitidae) distributed in northeast Korea. *Korean J. Environ. Ecol.*, 31: 461-471. <https://doi.org/10.13047/KJEE.2017.31.5.461>.
- Jung, S.W., J.H. Lee, K. Tadashi, P.J. Kim and S.H. Kim. 2022. Distribution status of invasive alien species (*Procambarus clarkii* (Girard, 1852)) using biomonitoring with environmental DNA in South Korea. *Korean J. Environ. Ecol.*, 36: 368-380.
- Ki, J.S., S.O. Jung, D.S. Hwang, Y.M. Lee and J.S. Lee. 2008. Unusual mitochondrial genome structure of the freshwater goby *Odonotobutis platycephala*: rearrangement of tRNAs and an additional non-coding region. *J. Fish Biol.* 73: 414-428. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.01911>.
- Kim, I.S. 1997. Illustrated encyclopedia of fauna & flora of Korea, Vol. 37, Freshwater fishes. Ministry of Education. Yeongi, 629pp.
- Kim, I.S. and J.Y. Park. 2002. Freshwater fish of Korea. Kyohak Publishing Co. Ltd., Seoul, 247-250, 465pp.

- Kim, I.S., Y. Choi, C.L. Lee, Y.J. Lee, B.J. Kim and J.H. Kim. 2005. Illustrated book of Korean fishes. Kyohak Publishing Co. Ltd., Seoul, 615pp.
- Kim, J.H., H.B. Jo, M.H. Chang, S.H. Woo, Y.H. Cho and J.D. Yoon. 2020. Application of environmental DNA for monitoring of freshwater fish in Korea. *KJEE*, 53: 63-72. <https://doi.org/10.11614/KSL.2020.53.1.063>.
- Kim, K.Y. and I.C. Bang. 2012. Phylogeny and speciation time estimation of two *Koreocobitis* species (Teleostei; Cypriniformes; Cobitidae) endemic to Korea inferred from their complete mitogenomic sequences. *Genes Genom.*, 34: 35-42.
- Lacoursière-Roussel, A., M. Rosabal and L. Bernatchez. 2016. Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: variability among capture methods and environmental conditions. *Mol. Ecol. Resour.*, 16: 1401-1414. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12522>.
- Lee, C.K., Y.S. Yoon and S.K. Lee. 2007. Investigating the relationships among perceived value, satisfaction, and recommendations: The case of the Korean DMZ. *Tour. Manag.*, 28: 204-214.
- Lee, S.K., J.H. Kim and H.Y. Song. 2016. Complete mitochondrial genome of the Korean torrent catfish *Liobagrus andersoni* (Siluriformes, amblycipitidae). *Mitochondrial DNA B Resour.*, 1: 779-780. <https://doi.org/10.1080/23802359.2016.1242389>.
- MCST (Ministry of Culture, Sports and Tourism). 2022. Explore Peaceful Journey through 11 Routes of the Road of Peace in the Demilitarized Zone (DMZ). Ministry of Culture, Sports and Tourism. Sejong.
- 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. *R. Soc. Open Sci.*, 2: 150088. <https://doi.org/10.1098/rsos.150088>.
- NIBR (National Institute of Biological Resources). 2022. National Species List of KOREA II. National Institute of Biological Resources. Incheon, pp. 99-143.
- NIE (National Institute of Ecology). 2019. The Fifth National Ecosystem Survey Guideline. National Institute of Ecology, Seochon.
- NIE (National Institute of Ecology). 2022a. 2021 Report on the Ecological Survey of the DMZ road of peace. National Institute of Ecology. Seochon, pp. 295-317, pp. 385-410.
- NIE (National Institute of Ecology). 2022b. Endangered Wildlife at a Glance. National Institute of Ecology, Seochon, 621pp.
- NIE (National Institute of Ecology). 2023. 2022 Report on the Ecological Survey of the DMZ road of peace. National Institute of Ecology, Seochon, pp. 302, pp. 385-410, 406pp.
- NGII (National Geographic Information Institute). 2020. The National Atlas of Korea II. National Geographic Information Institute. Suwon, 96pp.
- Pedersen, M.W., S. Overballe-Petersen, L. Ermini, C.D. Sarkissian, J. Haile, M. Hellstrom, J. Spens, P.F. Thomsen, K. Bohmann, E. Cappellini, I.B. Schnell, N.A. Wales, C. Carøe, P.F. Campos, A.M.Z. Schmidt, M.T.P. Gilbert, A.J. Hansen, L. Orlando and E. Willerslev. 2015. Ancient and modern environmental DNA. *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.*, 370: 1660. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0383>.
- 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. *J. Appl. Ecol.*, 51: 1450-1459. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12306>.
- Xu, W., A. Chen, R. Xia and C. Fu. 2014. Complete mitochondrial genome of *Rhynchocypris cf. lagowskii* (Cypriniformes: Cyprinidae). *Mitochondrial DNA*, 25: 379-380. <https://doi.org/10.3109/19401736.2013.809432>.
- 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.
- Yang, N., Y. Li, Z. Liu, Q. Chen and Y. Shen. 2019. The complete mitochondrial genome of *Silurus asotus* (Siluriformes: Siluridae: Silurus) and its phylogenetic analysis. *Mitochondrial DNA B Resour.*, 4: 2377-2378. <https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1630335>.
- Yoon, M.R., S.E. Oh, Y.S. Cho, H.J. Ahn, M.J. Kwak, S.H. Han, T.H. Kim, K.H. Lee, S.M. Hong and J.Y. Jeong. 2023. Using eDNA metabarcoding for the analysis of fish communities in rivers. *J. Environ. Anal. Health Toxicol.*, 26: 89-96.
- Yu, J.N., B.J. Kim, C.M. Kim, J.H. Yeo and S.O. Kim. 2015. The complete mitochondrial genome of the black star fat minnow (*Rhynchocypris semotilus*), an endemic and endangered fish of Korea. *Mitochondrial DNA A: DNA Mapp. Seq. Anal.*, 28: 114-115. <https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1111348>.
- Yun, Y.E., J.N. Yu, S.O. Kim and M.H. Kwak. 2012. The complete mitochondrial genome of Kumgang fat minnow *Rhynchocypris kumgangensis* (Cypriniformes, Leuciscinae) in Korea. *Mitochondrial DNA*, 23: 347-349. <https://doi.org/10.3109/19401736.2012.690752>.
- Zhu, K., L. Gong, L. Jiang, L. Liu, Z. Lu and B.J. Liu. 2018. Phylogenetic analysis of the complete mitochondrial genome of *Anguilla japonica* (Anguilliformes, Anguillidae). *Mitochondrial DNA B Resour.*, 3: 536-537. <https://doi.org/10.1080/23802359.2018.1467225>.
- Zhu, M., M. Kurobi, T. Kobayashi, T. Yamakawa, T. Sado, K. Kodama, T. Horiguchi and M. Miya. 2023. Comparison of fish fauna evaluated using aqueous eDNA, sedimentary eDNA, and catch surveys in Tokyo Bay, Central Japan. *J. Mar. Syst.*, 240: 103886. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2023.103886>.