

멸종위기어류 통사리의 환경 DNA 분석을 위한 종 특이 마커 개발

윤봉한 · 김용휘 · 성무성 · 한호섭 · 한정호¹ · 방인철*

순천향대학교 생명과학과, ¹한국수자원공사 물환경개선처

Species-specific Marker Development for Environmental DNA Assay of Endangered Bull-head Torrent Catfish, *Liobagrus obesus* by Bong Han Yun, Yong Hwi Kim, Mu Sung Sung, Ho-Seop Han, Jeong-Ho Han¹ and In-Chul Bang* (Department of Biology, Soonchunhyang University, Asan 31538, Republic of Korea; ¹Water Environmental Improvement Dept., Korea Water Resources Corporation, Deajeon 34350, Republic of Korea)

ABSTRACT We wanted to develop a real-time PCR assay capable of detecting *Liobagrus obesus* in environmental DNA (eDNA) extracted from freshwater samples using a pair of species-specific primers and probe for the endangered fish, *L. obesus*. The species-specific primers and probe were designed in consideration of single nucleotide polymorphisms between 65 species of freshwater fish living in the Republic of Korea within the cytochrome *b* (*cytb*) gene of mitochondrial DNA. The species-specific primers and probe, in the real-time PCR assay, showed high specificity as only the *L. obesus* genomic DNA (gDNA) was found to be positive in the specificity verification using 65 species gDNA of freshwater fish in the Republic of Korea. In addition, in the detection limit analysis using the serial dilution concentrations of *L. obesus* gDNA, it was found that it was possible to detect up to 0.2 pg, showing high sensitivity. Afterwards, using the species-specific primers and probe, real-time PCR assay was performed on freshwater samples obtained from 8 stations in the mid-upper basin of Geum River. As a result, the *cytb* gene of *L. obesus* was detected in total 5 stations including all 3 stations where this species was collected at the time of field survey. Therefore, the species-specific primers and probe developed in present study, and the real-time PCR assay using them, can accurately detect the *cytb* gene of *L. obesus* from eDNA samples, which can be utilized to monitor the existing habitats of this species and to discover potential new habitats.

Key words: *Liobagrus obesus*, environmental DNA, real-time PCR, species-specific marker

서 론

통사리 *Liobagrus obesus*는 메기목(order Siluriformes) 통가리과(family Amblycipitidae)에 속하는 우리나라 고유어종으로 충청북도 영동군에서 채집된 표본을 기준으로 Son *et al.* (1987)에 의하여 신종으로 보고되었다. 본 종은 금강, 만경강, 웅천천 그리고 영산강의 일부 수역에서만 제한적으로 분포하

고 있으며(Chae *et al.*, 2019; Kim and Park, 2002), 댐 건설, 하천공사 및 수질오염 등으로 인해 분포 수역이 축소되고, 서식 개체수가 감소하고 있어(NIBR, 2019), 환경부에서는 멸종위기 야생생물 I급으로 지정하여 법적으로 보호하고 있다(ME, 2017).

통사리는 여울과 소가 반복적으로 나타나는 수역의 돌과 자갈이 겹겹이 쌓인 큰 돌 밑에 은신하는 생태적 특성을 갖고 있다(Kim *et al.*, 2012). 이는 현장에서 본 종의 모니터링을 수행할 시, 족대와 투망과 같은 일반적인 어구로는 정밀한 모니터링이 어려운 점이 있다. 이에 따라, 본 종에 대한 모니터링 방법으로는 수중 잠수 관찰이 주로 활용되는데(ME, 2011), 이

저자 직위: 윤봉한(석·박사통합과정), 김용휘(박사 후 연구원), 성무성(석·박사통합과정), 한호섭(석·박사통합과정), 한정호(선임연구원), 방인철(교수)

*Corresponding author: In-Chul Bang Tel: 82-41-530-1286,

Fax: 82-41-530-1493, E-mail: incbang@sch.ac.kr

는 시간적 및 공간적으로 제약이 큰 단점이 있다.

최근 하천수에 잔존하는 환경 DNA (environmental DNA, eDNA)를 분석하여 해당 하천에 서식하는 생물상을 예측하는 기법이 많은 연구자들에 의하여 수행되고 있다(Ficetola *et al.*, 2008; Thomsen and Willerslev, 2015). 이 방법은 하천수만을 채수하여 다양한 방법으로 분석하여 하천 생물상을 예측할 수 있어 조사자의 채집 능력이나 기술로 인해 발생할 수 있는 오류를 방지할 수 있는 장점이 있다.

환경 DNA를 분석하는 방법으로는 목적에 따라 크게 두 가지 분석 방법이 알려져 있는데, 단일 종의 서식 유무를 파악할 수 있는 종 특이 마커를 이용한 PCR 분석 방법(Jo *et al.*, 2020)과 범용성이 높은 프라이머 서열을 이용해 잠재적으로 서식 가능성이 있는 많은 종을 제시할 수 있는 metabarcoding 분석 방법(Ji *et al.*, 2013)이 널리 사용되고 있다. 특히 종 특이 마커를 이용한 실시간 PCR (real-time PCR) 분석 방법은 대상 종에 대한 종 특이 프라이머와 프로브를 개발해야 하는 어려움은 있지만, 높은 검출 감도와 특이성을 갖기 때문에 분포지가 협소하거나 서식 개체수가 적은 희귀종을 포함한 멸종 위기종의 서식을 확인하는 데 매우 효과적이다(Sakata *et al.*, 2017).

미토콘드리아 DNA는 재조합 과정 없이 모계유전을 하는 특성을 가지기 때문에 종 검출을 위한 PCR 분석 연구에 보편적으로 활용되고 있으며(Taboada *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2021), 이 중에서도 종내 및 종간 염기서열 상 높은 변이율을 가지는 cytochrome *b* (*cytb*) 유전자 영역이 종 특이 프라이머를 제작하기 위한 대상 유전자 영역으로 널리 사용되고 있다(Kwon *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2014; Ye *et al.*, 2016).

본 연구에서는 멸종위기어류 통사리에 대한 높은 감도와 특이성을 갖는 한 쌍의 프라이머와 프로브를 새롭게 제작하였으며, 이를 이용한 실시간 PCR 분석으로 환경 DNA로부터 통사리의 서식 유무를 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 환경 DNA 분석

1) 어류 시료 확보 및 염기서열 분석

본 연구에서는 통사리 종 특이 프라이머 및 프로브를 제작하고 검증을 수행하기 위하여 순천향대학교 어류표본수장고(Soonchunhyang University Collection, SUC)에 99.9% 에탄올로 고정되어 보관 중인 국내 담수어류 65종의 가슴 또는 배 지느러미 침지를 분석에 사용하였다(Table 1). 통사리를 비롯한 멸종위기어류 시료의 경우, 순천향대학교에서 수행된 멸종위기어류 복원 연구(ME, 2006, 2011, 2019; MLTM, 2010, 2011, 2012)에서 사용 허가를 득한 시료를 사용하였다.

어류의 종별 Genomic DNA (gDNA)를 추출하기 위하여 HiGene™ Genomic DNA Prep Kit (BIOFACT Co., Ltd., Daejeon, Republic of Korea)를 사용하였으며, 추출한 gDNA는 NanoDrop ND-1000 분광광도계(NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA)를 이용하여 순도와 농도를 측정하였다. 이후, 미토콘드리아 DNA의 *cytb* 유전자 영역에 대한 염기서열을 증폭하기 위하여 Chang *et al.* (2014)이 제작한 프라이머(*Cytb-F*, *Cytb-R*)를 이용해 동일한 방법으로 실험에 이용하였다. 증폭한 PCR 산물은 ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였다.

확보한 *cytb* 유전자 염기서열 데이터는 FinchTV 1.4.0 (Geospiza Inc., Seattle, WA, USA)를 사용하여 trimming을 수행한 후, BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999)의 ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) 방법을 사용하여 다중정렬을 수행하였다. 확보한 1,059 bp의 *cytb* 유전자 염기서열은 NCBI의 GenBank에 등록하여 accession number(OP419974~OP420038)를 부여받았다.

2) 통사리 종 특이 프라이머 및 프로브 제작

확보한 *cytb* 유전자 영역의 염기서열을 대상으로 DnaSP 6.12.03 (Rozas *et al.*, 2017)를 사용하여 중간 유전적 변이를 나타내는 단일염기다형성(single nucleotide polymorphisms, SNPs) 부위를 탐색하였다. 이후, 통사리에게만 특이적으로 나타나는 SNPs 부위를 고려하여 종 특이 프라이머와 프로브를 제작하였다. 이들의 melting temperature (T_m) 값과 2차 구조 형성 여부 등은 Multiple Primer Analyzer tool (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)을 사용하여 확인하였다.

3) 통사리 종 특이 프라이머 및 프로브 검증 및 실시간 PCR 분석

실시간 PCR (CFX Opus 96, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 분석에 앞서 통사리 종 특이 프라이머에 대한 검증을 수행하기 위하여 일반 PCR (conventional PCR) (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 수행하였다. 일반 PCR 조성액은 AccuPower® PCR Premix Kit (BIONEER Corp., Daejeon, Republic of Korea)에 통사리 gDNA 100 ng과 정방향 및 역방향 프라이머 각각 5 μM을 넣고 3차 증류수와 총량 20 μL로 혼합하였다. 일반 PCR 조건은 95°C에서 3분간 초기변성(initial denaturation) 후, 95°C에서 30초간 변성(denaturation), 60°C에서 30초간 결합(annealing), 72°C에서 30초간 신장(extension)을 35회 반복하였으며, 마지막으로 72°C에서 5분간 최종신장(elongation)을 수행하였다. 일반 PCR 산물은 전자동 모세관 전기영동 장치(Fragment Analyzer; Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 사용하여 전기영동을 수행하였으며, PROsize 3.0.1.6 (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany)을 사용하여 밴드의 크기를 확인하였다.

Table 1. Fish specimens information analyzed in the present study to develop *Liobagrus obesus* species-specific primers and probe

Species	Locality	River system	GenBank No.	Voucher No.
			<i>cytb</i>	SUC
Cyprinidae				
<i>Carassius auratus</i>	Gongju-si, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP419974	12308
<i>Rhynchocypris oxycephalus</i>	Jincheon-gun, Chungcheongbuk-do	Geumgang River	OP419975	12094
<i>Rhodeus ocellatus</i>	Gongju-si, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP419976	26280
<i>Rhodeus uyekii</i>	Cheongyang-gun, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP419977	17540
<i>Rhodeus notatus</i>	Cheongyang-gun, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP419978	17532
<i>Tanakia lanceolata</i>	Gongju-si, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP419979	20694
<i>Tanakia koreensis</i>	Jinan-gun, Jeollabuk-do	Geumgang River	OP419980	12166
<i>Acheilognathus yamatsutae</i>	Jinan-gun, Jeollabuk-do	Geumgang River	OP419981	19375
<i>Acheilognathus rhombus</i>	Cheongyang-gun, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP419982	17490
<i>Acheilognathus macropterus</i>	Gongju-si, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP419983	20366
<i>Acheilognathus chankaensis</i>	Gongju-si, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP419984	26243
<i>Pseudorasbora parva</i>	Gongju-si, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP419985	20732
<i>Pungtungia herzi</i>	Gongju-si, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP419986	12302
<i>Pseudopungtungia nigra</i>	Jinan-gun, Jeollabuk-do	Geumgang River	OP419987	1417
<i>Coreoleuciscus splendidus</i>	Jinan-gun, Jeollabuk-do	Geumgang River	OP419988	12139
<i>Coreoleuciscus aeruginos</i>	Yangsan-si, Gyeongsangnam-do	Nakdonggang River	OP419989	17010
<i>Sarcocheilichthys variegatus wakiyae</i>	Okcheon-gun, Chungcheongbuk-do	Geumgang River	OP419990	18408
<i>Sarcocheilichthys nigripinnis morii</i>	Cheongyang-gun, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP419991	6088
<i>Gnathopogon strigatus</i>	Yeoju-si, Gyeonggi-do	Namhangang River	OP419992	26328
<i>Squalidus japonicus coreanus</i>	Gongju-si, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP419993	20735
<i>Squalidus chankaensis tsuchigae</i>	Jincheon-gun, Chungcheongbuk-do	Geumgang River	OP419994	25886
<i>Hemibarbus longirostris</i>	Cheongyang-gun, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP419995	17589
<i>Hemibarbus mylodon</i>	Jeongseon-gun, Gangwon-do	Namhangang River	OP419996	979
<i>Pseudogobio esocinus</i>	Gongju-si, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP419997	12221
<i>Abbottina rivularis</i>	Changwon-si, Gyeongsangnam-do	Nakdonggang River	OP419998	26329
<i>Microphysogobio koreensis</i>	Mungyeong-si, Gyeongsangbuk-do	Nakdonggang River	OP419999	6472
<i>Microphysogobio yaluensis</i>	Gongju-si, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP420000	12281
<i>Microphysogobio rapidus</i>	Sancheong-gun, Gyeongsangnam-do	Nakdonggang River	OP420001	7583
<i>Microphysogobio jeoni</i>	Gongju-si, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP420002	20660
<i>Gobiobotia macrocephala</i>	Yeongdong-gun, Chungcheongbuk-do	Geumgang River	OP420003	265
<i>Gobiobotia brevibarba</i>	Yeongdong-gun, Chungcheongbuk-do	Geumgang River	OP420004	233
<i>Gobiobotia naktongensis</i>	Gongju-si, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP420005	5176
<i>Zacco koreanus</i>	Jinan-gun, Jeollabuk-do	Geumgang River	OP420006	12120
<i>Zacco platypus</i>	Gongju-si, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP420007	12271
<i>Opsariichthys uncirostris amurensis</i>	Gongju-si, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP420008	20671
<i>Hemiculter leucisculus</i>	Cheongju-si, Chungcheongbuk-do	Geumgang River	OP420009	15540
<i>Squaliobarbus curriculus</i>	Seocheon-gun, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP420010	1918
Cobitidae				
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	Buyeo-gun, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP420011	2832
<i>Misgurnus mizolepis</i>	Buyeo-gun, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP420012	2801
<i>Iksookimia koreensis</i>	Jincheon-gun, Chungcheongbuk-do	Geumgang River	OP420013	12158
<i>Cobitis hankugensis</i>	Seongju-gun, Gyeongsangbuk-do	Nakdonggang River	OP420014	19471
<i>Cobitis choui</i>	Jincheon-gun, Chungcheongbuk-do	Geumgang River	OP420015	1405
<i>Cobitis nalbanti</i>	Gongju-si, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP420016	12252
<i>Kichulchoia multifasciata</i>	Miryang-si, Gyeongsangnam-do	Nakdonggang River	OP420017	17600
Nemacheilidae				
<i>Lefua costata</i>	Goesan-gun, Chungcheongbuk-do	Geumgang River	OP420018	25889

Table 1. Continued

Species	Locality	River system	GenBank No.	Voucher No.
			<i>cytb</i>	SUC
Siluridae				
<i>Silurus asotus</i>	Jinan-gun, Jeollabuk-do	Geumgang River	OP420019	25881
<i>Silurus microdorsalis</i>	Gongju-si, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP420020	25732
Bagridae				
<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>	Gongju-si, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP420021	25887
<i>Pseudobagrus koreanus</i>	Jinan-gun, Jeollabuk-do	Geumgang River	OP420022	25885
<i>Pseudobagrus brevicorpus</i>	Yeongcheon-si, Gyeongsangbuk-do	Nakdonggang River	OP420023	25882
<i>Leiocassis ussuriensis</i>	Cheongyang-gun, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP420024	6328
<i>Leiocassis nitidus</i>	Nonsan-si, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP420025	8234
Amblycipitidae				
<i>Liobagrus andersoni</i>	Pyeongchang-gun, Gangwon-do	Namhangang River	OP420026	26330
<i>Liobagrus obesus</i>	Geumsan-gun, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP420027	25894
<i>Liobagrus mediadiposalis</i>	Muju-gun, Jeollabuk-do	Geumgang River	OP420028	15591
<i>Liobagrus somjinensis</i>	Gurye-gun, Jeollanam-do	Seomjingang River	OP420029	13201
<i>Liobagrus hyeongsanensis</i>	Gyeongju-si, Gyeongsangbuk-do	Hyeongsang River	OP420030	27920
Osmeridae				
<i>Hypomesus nipponensis</i>	Jinan-gun, Jeollabuk-do	Geumgang River	OP420031	25884
Odontobutidae				
<i>Odontobutis platycephala</i>	Jinan-gun, Jeollabuk-do	Geumgang River	OP420032	12152
<i>Micropercops swinhonis</i>	Seocheon-gun, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP420033	27912
Gobiidae				
<i>Rhinogobius giurinus</i>	Hapcheon-gun, Gyeongsangnam-do	Nakdonggang River	OP420034	20889
<i>Rhinogobius brunneus</i>	Gongju-si, Chungcheongnam-do	Geumgang River	OP420035	20343
<i>Tridentiger brevispinis</i>	Uiryong-gun, Gyeongsangnam-do	Nakdonggang River	OP420036	20889
Sinipercaidae				
<i>Siniperca scherzeri</i>	Yeongdong-gun, Chungcheongbuk-do	Geumgang River	OP420037	23254
<i>Coreoperca herzi</i>	Jinan-gun, Jeollabuk-do	Geumgang River	OP420038	10756

실시간 PCR 조성액은 iQ Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 10 µL, gDNA 20 ng, 프라이머 및 프로브 각각 5 µM을 넣고 nuclease-free water (NFW)와 혼합하여 총량 20 µL가 되도록 혼합하였다. 실시간 PCR 조건은 95°C에서 2분간 초기변성 후, 95°C에서 5초간 변성, 63°C에서 5초간 결합 및 신장을 45회 반복하여 수행하였으며, 양성대조군(positive control)과 비주형대조군(non-template control, NTC)은 통사리 gDNA 20 ng과 NFW를 각각 사용하였다.

제작한 통사리 종 특이 프라이머 및 프로브는 검출한계를 분석하기 위하여 통사리 gDNA 100 ng/µL의 농도에서 10배씩 총 6번의 희석과 3회의 반복구를 두고 검량선(standard curve)을 작성하였다. 또한, 종 특이성 검증을 위하여 통사리 근연종을 비롯한 국내 담수어류 65종의 gDNA를 사용하였으며, 3회의 독립적이고 반복적인 실험을 통하여 검출한계 분석과 종 특이성 검증을 함께 수행하였다.

4) 하천수 시료 확보, 환경 DNA 추출 및 실시간 PCR 분석

하천수 시료는 2021년 9월 15~16일 금강 중·상류 유역을 대상으로 통사리의 과거 출현 기록(Son *et al.*, 1987; Son and Choo, 1988; Son and Byeon, 2004)과 연구 수행 당시의 하천 현황을 고려하여 선정한 8개 지점에서 유수 흐름에 의하여 와류가 형성되는 부분의 하천수를 2 L의 멸균채수병에 채수하여 실험실로 운반하였다(Fig. 1). 이후, 각 지점 간 샘플들에 대한 오염을 통제하기 위하여 멸균된 실험 도구들을 구분하여 사용하고 DOA-P704-AC vacuum pump (Gast Manufacturing, Inc., Benton Harbor, Mi, USA)와 0.45 µm Nylon Membrane Filters (Whatman, Marlborough, MA, USA)를 사용하여 지점별로 1 L씩 농축하였다. 필터지의 환경 DNA 추출은 HiGene™ Genomic DNA Prep Kit (BIOFACT Co., Ltd., Daejeon, Republic of Korea)를 사용하였으며, 제조사에서 제공한 설명서를 일부 수정하여 사용하였다. 즉, 세포 용해 단

계에서 필터지를 1.5 mL 튜브에 넣고 세포 용해 혼합액(Cell Lysis Solution 800 µL, Proteinase K 100 µg)으로 필터지가 완전히 잠기도록 한 후 56°C에서 1시간 동안 반응시키고 원심 분리하여 용출액만을 사용하였다. 이후 단계는 제조사의 설명서에 따라 수행하였다.

실시간 PCR 분석 방법은 gDNA 20 ng 대신에 환경 DNA 2 µL를 넣는 것을 제외하고는 위와 동일하게 수행하였다. 환경 DNA 샘플별로 10회씩 독립적으로 PCR을 수행하여 한 번이라도 cycle threshold (C_T) 값이 42 미만인 경우 양성으로 판단하였다. 이후, 양성으로 판단한 환경 DNA 샘플은 제작한 프라

이머를 이용하여 PCR을 수행한 후, 증폭 영역에 대한 염기서열을 확보하여 통사리 염기서열과 비교하였다.

2. 현장 조사

통사리의 채집 및 수중 잠수 관찰은 하천수 시료의 확보 지점과 동지점에서 수행하였으며, 금강유역환경청과 전북지방환경청의 포획 허가(제2021-27호, 제2021-42호)를 받은 후 실시하였다(Fig. 1). 채집은 2021년 9월 15~16일 지점을 기준으로 상·하류 100 m 구간에서 족대(망목 5 mm×5 mm)를 사용하여 50분간 수행하였고, 수중 잠수 관찰은 2021년 9월 24~26일 지점을 기준으로 미소서식지로 예상되는 수역에서 40분간 수행하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서 확보된 국내 담수어류 65종의 미토콘드리아 DNA 내 *cytb* 유전자 영역(1,059 bp)에 대한 염기서열을 분석한 결과, 다형성 부위(polymorphic site)는 559개인 것으로 관찰되었으며, 이 중 singleton variable site는 55개, parsimony informative site는 504개인 것으로 각각 관찰되었다. 이에 따라, 염기서열 상에서 parsimony informative site가 2~4개 연속적으로 나타나는 다형성 부위를 선별하였으며, 선별한 부위 중 통사리만을 특이적으로 증폭할 수 있도록 정방향 프라이머는 573~576 bp 위치, 역방향 프라이머는 651~652 bp 위치를 3' 말단에 포함되도록 하여 제작하였다(Table 2, Fig. 2). 제작한 통사리 중 특이 프라이머에 대한 일반 PCR 검증을 수행한 결과, PCR 산물은 114 bp 부근에서 명확하게 특이 밴드를 형성하였으며(Fig. 3A), 비특이 밴드는 관찰되지 않았다(Fig. 3B). 통사리 중 특이 프로브의 경우도 4개의 parsimony informative site가 연속적으로 나타나는 645~648 bp 위치를 3' 말단에 포함되도록 하여 제작하였다(Table 2, Fig. 2).

제작한 프라이머 및 프로브에 대한 중 특이성을 확인하기 위하여 실시간 PCR 분석을 수행한 결과, 통사리 gDNA만이 양성으로 나타났고 이외의 다른 담수어류 gDNA와 NTC는 증폭이 전혀 이루어지지 않아 제작한 프라이머 및 프로브가 대상 종인 통사리를 다른 비대상 종과 구별하는 데 매우 효과

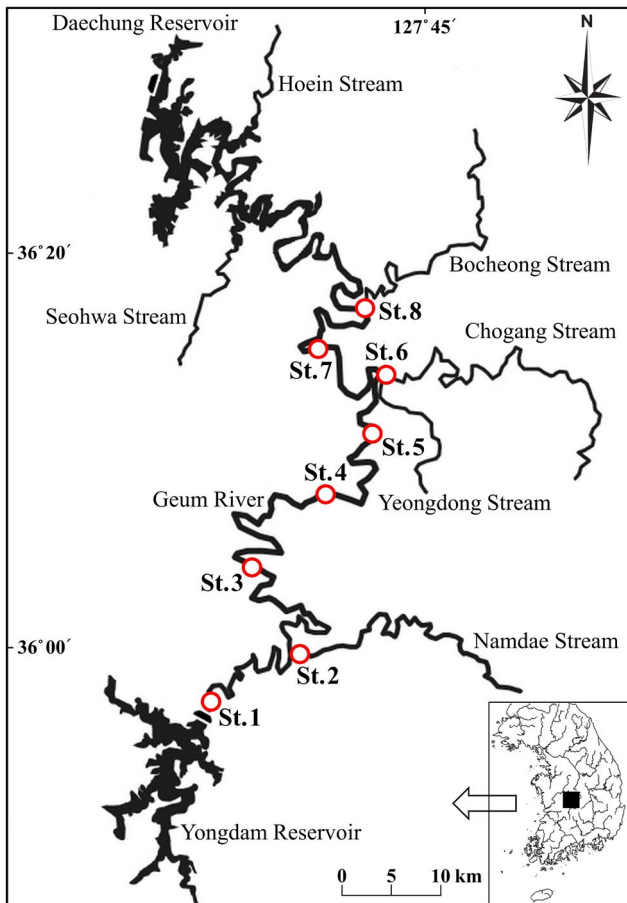


Fig. 1. Location information of study stations in the mid-upper basin of Geum River, the Republic of Korea from September 2021.

Table 2. Sequence information of *Liobagrus obesus* species-specific primers and probe developed in the present study

Primers	Sequence (5'-3')	Product size	Target gene
Forward primer	S_Lo_0605f CAGGCTCCAATAATCCCCTA	114 bp	<i>cytb</i>
Reverse primer	S_Lo_0699r ATGCCAGGGCCGTGATTAAG		
Probe*	S_Lo_0669p CTCATACAAGGACTTACTGGGGTTTATC		

*In present study, reporter and quencher were used FAM and BHQ1, respectively.

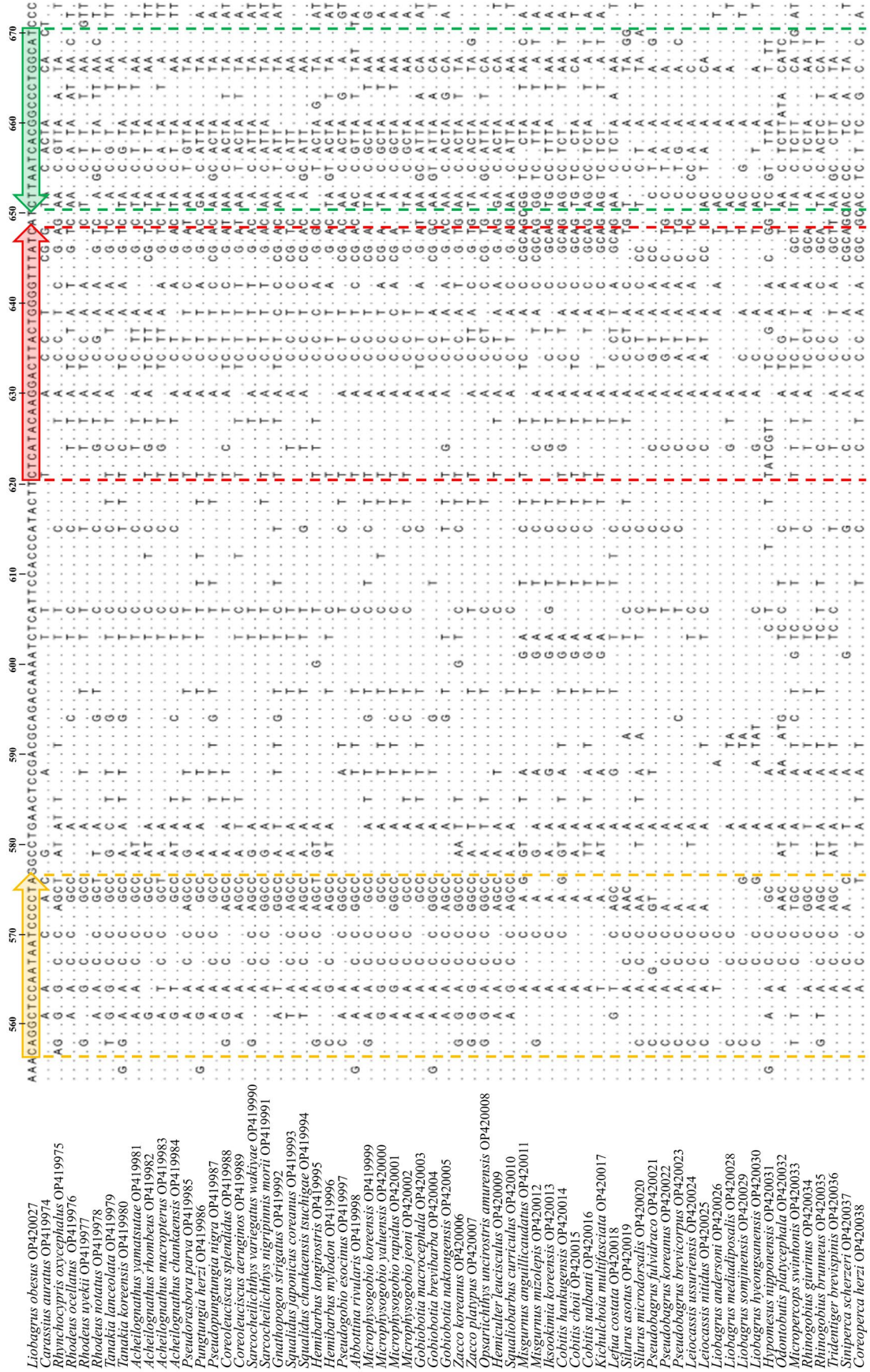


Fig. 2. Aligned partial sequences of *cytb* gene of *Liobagrus obesus* and other species analyzed in present study. GenBank accession numbers are given after the scientific names. Yellow arrow, forward primer; Green arrow, reverse primer; Red arrow, probe.

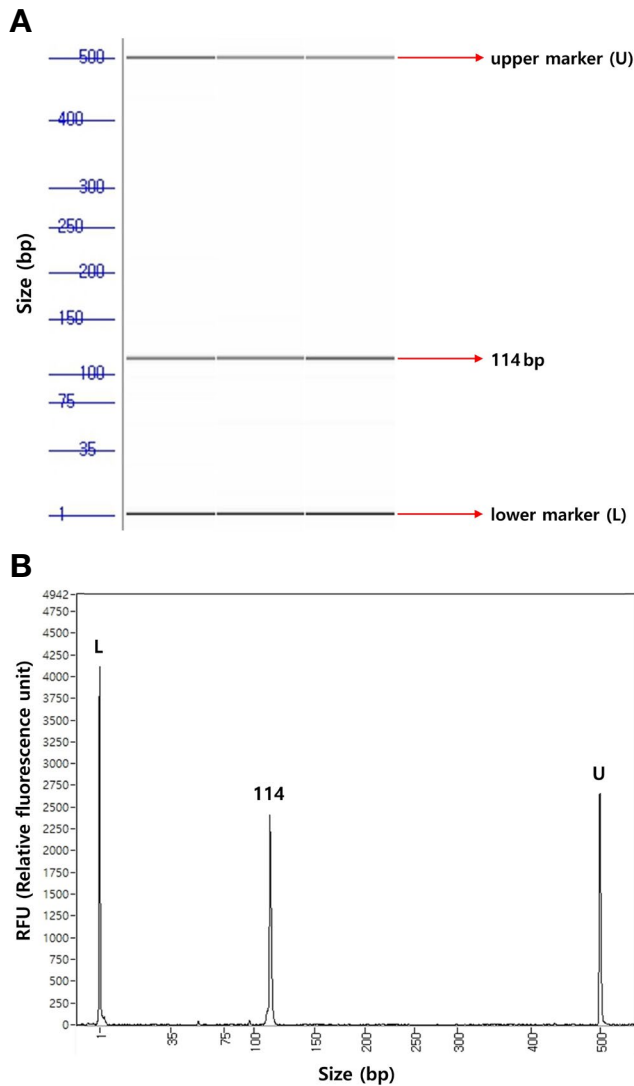


Fig. 3. Results of fragment analyzer of conventional PCR products using *Liobagrus obesus* species-specific primers. Band positions, A; Electropherogram, B.

적임을 보여주었다(Fig. 4A). 또한, 통사리 gDNA의 연속 희석 농도를 사용한 검출한계 분석에서는 통사리 gDNA의 농도에 반비례하여 C_T 값이 나타났고 0.2 pg 수준까지 검출이 가능한 것으로 나타나 높은 검출 감도를 보였으며(Fig. 4A), 검량선에서는 상관계수(R^2)가 0.996, 기울기(slope)가 -3.918 , 효율(efficiency)은 80.0%로 각각 나타났다(Fig. 4B). 국내의 멸종위기어류 여울마자 *Microphysogobio rapidus*, 꾸구리 *Gobiobotia macrocephala*, 흰수마자 *G. naktongensis*, 좁수수치 *Kichulchoia brevifasciata* 및 꼬치동자개 *Pseudobagrus brevicorpus*를 대상으로 종 특이 프라이머와 프로브 제작을 수행한 선행 연구(NIE, 2019; ME, 2020)에서는 종 특이성을 검증하는 데 있어서 24~26종의 gDNA가 사용되었으며, 검출한계 분석에서는 0.1~1 pg 수준까지 검출이 가능한 것으로 보

Table 3. Detection results of eDNA analysis and field surveys targeting *Liobagrus obesus*

Stations	eDNA analysis		Field surveys	
	C_T value* (Mean \pm SD)	Positive PCRs	Skimming nets	Scuba diving
1	38.23	1/10		
2	ND	0/10		
3	40.22	1/10		+
4	39.55 \pm 1.07	4/10		+
5	ND	0/10		
6	ND	0/10		
7	39.44 \pm 0.77	2/10		
8	38.40 \pm 0.57	2/10	+	+

*ND: not detected

고되었다. 선행 연구와 종 특이성을 검증하는 데 사용된 어종에 차이가 있으나 종수로만 비교하면, 본 연구의 검증 실험에 사용된 담수어류의 종수가 약 2배 이상 많아, 보다 많은 어종들로부터 종 특이적 프라이머를 개발할 수 있었으며, 검출한계는 유사한 수준을 나타내었다. 이러한 연구 결과들을 종합해 볼 때, 본 연구에서 개발된 통사리의 환경 DNA 분석 방법은 여러 생물의 DNA와 잠재적으로 혼합되어 존재하는 환경 DNA 상에서 적은 농도의 통사리의 *cytb* 유전자를 명확히 검출할 수 있다고 판단된다.

제작한 프라이머와 프로브를 이용하여 확보된 환경 DNA에 대한 실시간 PCR 분석을 수행한 결과, 8개 지점 중 5개 지점에서 통사리의 *cytb* 유전자에 대한 양성 반응이 나타났으며, C_T 값의 범위는 37.82~41.22인 것으로 나타났다(Table 3). 또한, 통사리에 대한 양성 반응이 나타난 5개 지점은 현장 조사에서 통사리가 확인된 3개 지점(St. 3, 금산군; St. 4, 영동군; St. 8, 옥천군)을 모두 포함하는 것으로 나타났다. 이러한 양성 반응이 나타난 지점들로부터 통사리의 검출 여부를 명확히 관찰하기 위하여 약 60 bp의 *cytb* 유전자 염기서열을 확보하였으며, 이를 통사리 조직에서 직접 추출한 DNA의 *cytb* 유전자 염기서열과 비교한 결과, 환경 DNA 샘플로부터 확보된 약 60 bp의 *cytb* 유전자 염기서열은 통사리 조직으로부터 확보된 염기서열과 100% 일치하는 것으로 나타났다. 이러한 양성 반응과 염기서열 비교 결과는 해당 지점에서 대상 종이 실제로 서식하고 있을 가능성이 매우 높은 것으로 판단되고 있다(Takahara *et al.*, 2013; Sakata *et al.*, 2017). 한편, 본 연구에서 환경 DNA 분석은 현장 조사에서 통사리가 확인되지 않은 2개 지점을 추가로 검출하여 현장 조사 결과보다 효율적인 것으로 나타났다. 이러한 결과는 일본에서 수행한 블루길 *Lepomis macrochirus* 환경 DNA 검출 연구(Takahara *et al.*, 2013), 호주에서 수행한 *Macquaria australasica* 환경 DNA 검출 연구

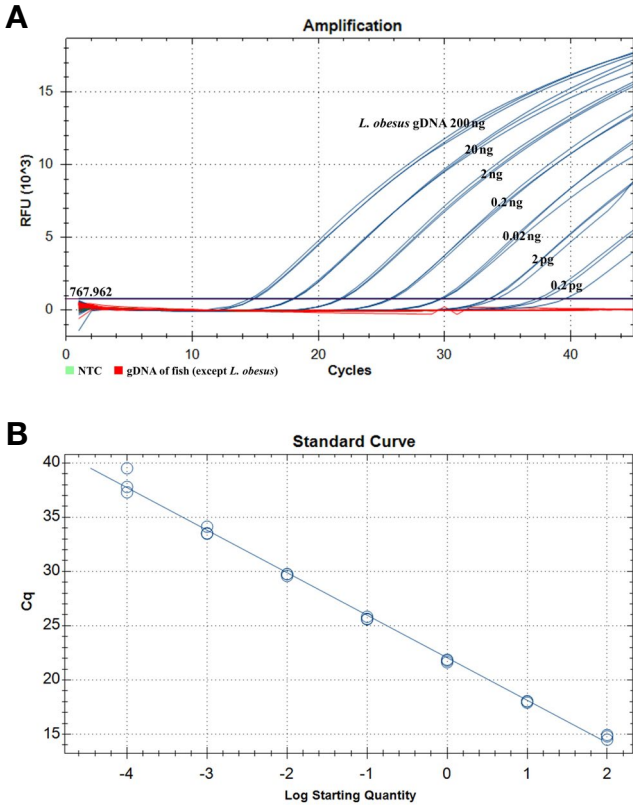


Fig. 4. Real-time PCR analyses using *Liobagrus obesus* species-specific primers and probe developed in the present study to test for detection limit and species specificity. Amplification curves, A; Standard Curve, B.

(Piggott *et al.*, 2020) 등의 결과와 잘 일치하였다.

통사리는 멸종 위협에 처한 우리나라 고유어종이므로 (ME, 2017; Chae *et al.*, 2019) 이들 개체군을 관리하고 보전하기 위한 체계적인 모니터링 방안이 마련될 필요가 있다 (Han *et al.*, 2020). 현재까지 통사리를 모니터링하기 위한 조사 방법은 조사 지점에 따라 현장에서 직접 족대와 같은 어구를 사용하여 포획하거나 돌 밑에 은신하는 본 종의 생태적 특성을 반영하여 수중 잠수 관찰이 주로 활용되었지만, 장기적인 관점에서 수행되어야 할 모니터링의 본질을 고려하면 효율적이지 못한 것으로 판단된다. 반면, 본 연구에서 개발한 통사리 종 특이 마커를 이용한 하천수 내 환경 DNA 분석 방법은 높은 검출 감도를 통해 통사리의 서식 유무를 명확히 확인할 수 있다. 또한, 조사 지점마다 하천수만을 채수하여 조사가 이루어지기 때문에 대규모 조사와 장기적인 분포 조사에도 유용하며, 이는 일본에서 30개의 저수지를 대상으로 수행한 이입종 (블루길, 배스 *Micropterus salmoides*, *M. dolomieu*) 환경 DNA 검출 연구 (Jo *et al.*, 2021)와 미국에서 컬럼비아 강을 대상으로 수행한 왕연어 *Oncorhynchus tshawytscha* 환경 DNA 검출 연구 (Laramie *et al.*, 2015) 등을 통해 입증되었다. 따라서, 통사리의

기존 서식지에 대한 모니터링과 더불어 잠재 및 신규 서식지 발굴에도 적극적으로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

멸종위기어류 통사리 *Liobagrus obesus*를 대상으로 종 특이 프라이머 한 쌍과 프로브를 제작하여 하천수 시료에서 추출된 환경 DNA로부터 통사리를 검출할 수 있는 실시간 PCR 분석 방법을 개발하고자 하였다. 통사리 종 특이 프라이머와 프로브는 미토콘드리아 DNA의 cytochrome *b* (*cytb*) 유전자 영역 내에서 국내에 서식하는 65종의 담수어류 간에 단일염기다형성 부위를 고려하여 비교한 후 제작하였다. 실시간 PCR 분석에서 제작한 프라이머 및 프로브는 국내에 서식하는 65종의 담수어류 gDNA를 이용한 특이성 검증 결과, 통사리 gDNA에서만 양성으로 나타나 높은 특이성을 보였다. 통사리 gDNA의 연속 희석 농도를 이용한 검출한계 분석에서는 0.2 pg까지 검출이 가능한 것으로 나타나 높은 감도를 보였다. 이후, 제작한 프라이머 및 프로브를 사용하여 금강 중·상류 유역의 8개 지점에서 확보한 하천수 시료를 대상으로 실시간 PCR 분석을 수행한 결과, 5개 지점에서 통사리의 *cytb* 유전자가 검출되었으며, 해당 검출 지점들은 현장 조사 당시에 통사리가 채집된 3개 지점을 모두 포함하였다. 따라서, 본 연구에서 개발한 통사리의 종 특이 프라이머와 프로브를 이용한 실시간 PCR 분석 방법은 하천수 채수로 확보한 환경 DNA로부터 통사리의 *cytb* 유전자를 검출할 수 있어 기존 서식지 모니터링과 더불어 잠재적인 신규 서식지 발굴에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

사 사

실험 설계에 도움을 주신 국립생태원 멸종위기종복원센터의 김근식 박사님께 감사의 말씀을 전합니다. 본 연구는 한국수자원공사(과제명: 댐 유역 하천의 멸종위기어류 정밀 모니터링 및 복원방안 연구 용역)와 순천향대학교의 연구비 지원을 받아 수행되었습니다.

REFERENCES

Chae, B.S., H.B. Song and J.Y. Park. 2019. A field guide to the freshwater fishes of Korea. LG Evergreen Foundation, Seoul, Republic of Korea, 355pp.
 Chang, C.H., F. Li, K.T. Shao, Y.S. Lin, T. Morosawa, S.M. Kim,

- H.Y. Koo, W. Kim, J.S. Lee, S. He, C. Smith, M. Reichard, M. Miya, T. Sado, K. Uehara, S. Lavoué, W.J. Chen and R.L. Mayden. 2014. Phylogenetic relationships of Acheilognathidae (Cypriniformes: Cyprinoidea) as revealed from evidence of both nuclear and mitochondrial gene sequence variation: evidence for necessary taxonomic revision in the family and the identification of cryptic species. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 81: 182-194. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.08.026>.
- Ficetola, G.F., C. Miaud, F. Pompanon and P. Taberlet. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.*, 4: 423-425. <http://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- Han, M.S., K.S. Choi and M.H. Ko. 2020. Has the Restoration Project of *Pseudopungtungia tenuicorpa* (Pisces: Cyprinidae) in the Jojongcheon Stream, Hangang River Failed?. *Korean J. Ichthyol.*, 32: 182-190.
- Ji, Y., L. Ashton, S.M. Pedley, D.P. Edwards, Y. Tang, A. Nakamura, R. Kitching, P.M. Dolman, P. Woodcock, F.A. Edwards, T.H. Larsen, W.W. Hsu, S. Benedick, K.C. Hamer, D.S. Wilcove, C. Bruce, X. Wang, T. Levi, M. Lott, B.C. Emerson and D.W. Yu. 2013. Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecol. Lett.*, 16: 1245-1257. <https://doi.org/10.1111/ele.12162>.
- Jo, T., A. Fukuoka, K. Uchida, A. Ushimaru and T. Minamoto. 2020. Multiplex real-time PCR enables the simultaneous detection of environmental DNA from freshwater fishes: a case study of three exotic and three threatened native fishes in Japan. *Biol. Invasions.*, 22: 455-471. <https://doi.org/10.1007/s10530-019-02102-w>.
- Jo, T., S. Ikeda, A. Fukuoka, T. Inagawa, J. Okitsu, I. Katano, D. Hideyuki, N. Katsuki, I. Hidetaka and T. Minamoto. 2021. Utility of environmental DNA analysis for effective monitoring of invasive fish species in reservoirs. *Ecosphere*, 12: e03643. <https://doi.org/10.1002/ecs2.3643>.
- Kim, H.S., H. Yang and Y.K. Hong. 2012. Spawning site characters in the natural environment of bull-head torrent catfish, *Ligabagrus obesus* (Siluriformes: Amblycipitidae) in the Gosan stream, Mangyeong river water system, Korea. *Korean J. Ichthyol.*, 24: 183-190.
- Kim, I.S. and J.Y. Park. 2002. *Freshwater Fishes of Korea*. Kyohak Publishing Co. Ltd., Seoul, Korea, 466pp.
- Kim, M.J., Y. Hong and H.Y. Kim. 2014. Authentication of Foods from Animal Origins using Gene Analysis. *Food Science and Industry*, 47: 13-19.
- Kwon, K.R., S.I. Baek and S.H. Choi. 2009. Identification of *Fel ursi* and Cattle and Pig Bile Juices by species-specific PCR and PCR-RFLP. *J. Pharmacopuncture*, 12: 13-20. <https://doi.org/10.3831/KPI.2009.12.1.013>.
- Laramie, M.B., D.S. Pilliod and C.S. Goldberg. 2015. Characterizing the distribution of an endangered salmonid using environmental DNA analysis. *Biol. Conserv.*, 183: 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.025>.
- ME (Ministry of Environment). 2006. Studies on the genetic diversity, artificial propagation and *ex situ* restoration of a threatened national monument fish *Hemibarbus mylodon*. Soonchunhyang University, Asan, Korea, 520pp.
- ME (Ministry of Environment). 2011. Culture and restoration research of endangered freshwater fish (four species include *Liobagrus obesus*). Soonchunhyang University, Asan, Korea, 359pp.
- ME (Ministry of Environment). 2017. Conservation and management laws of wildlife (amendment of enforcement regulations) (Law No. 10977).
- ME (Ministry of Environment). 2019. A study on conservation plan of endangered freshwater fish (*Microphysogobio rapidus*, *Pseudobagrus brevicorpus*). Soonchunhyang University, Asan, Korea, 214pp.
- ME (Ministry of Environment). 2020. Research on the ecological characteristic and conservation of endangered species (*Kichulchoia brevifasciata*, *Gobiobotia macrocephala*, *Microphysogobio rapidus* and *Pseudobagrus brevicorpus*). Research Center for Endangered Species, National Institute of Ecology, Yeongyang, Korea, 313pp.
- MLTM (Ministry of Land, Transport and Maritime Affairs). 2010. Culture and restoration of endangered species in the major four river drainages. Soonchunhyang University, Asan, Korea, 489pp.
- MLTM (Ministry of Land, Transport and Maritime Affairs). 2011. Culture and restoration of endangered species in the major four river drainages II. Soonchunhyang University, Asan, Korea, 363pp.
- MLTM (Ministry of Land, Transport and Maritime Affairs). 2012. Culture and restoration of endangered species in the major four river drainages III. Soonchunhyang University, Asan, Korea, 423pp.
- NIBR (National Institute of Biological Resources). 2019. Red data book of Republic of Korea, Volume 3. Freshwater fishes. Ministry of Environment, National Institute of Biological Resources, Incheon, Korea, 250pp.
- NIE (National Institute of Ecology). 2019. Specific monitoring of distribution of *Gobiobotia naktongensis* (endangered species level 1) in Geum River watershed. Research Center for Endangered Species, National Institute of Ecology, Yeongyang, Korea, 89pp.
- Piggott, M.P., S.C. Banks, B.T. Broadhurst, C.J. Fulton and M. Lintermans. 2020. Comparison of traditional and environmental DNA survey methods for detecting rare and abundant freshwater fish. *Aquat Conserv.*, 31: 173-184. <https://doi.org/10.1002/aqc.3474>.
- Rozas, J., A. Ferrer-Mata, J.C. Sánchez-DelBarrio, S. Guirao-Rico, P. Librado, S.E. Ramos-Onsins and A. Sanchez-Gracia. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol. Biol. Evol.*, 34: 3299-3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>.

- Sakata, M.K., N. Maki, H. Sugiyama and T. Minamoto. 2017. Identifying a breeding habitat of a critically endangered fish, *Acheilognathus typus*, in a natural river in Japan. *Sci. Nat.*, 104: 1-8. <https://doi.org/10.1007/s00114-017-1521-1>.
- Son, Y.M. and H.K. Byeon. 2004. Ecological characteristics and inhabitation condition of *Liobagrus obesus*. In: Proc. of Fall Academic Symposium of the Ichthyological Society of Korea, pp. 29-46.
- Son, Y.M. and I.Y. Choo. 1988. Ecological studies of catfish, genus *Liobagrus* from Korea. *Korea J. Limnol.*, 21: 243-251.
- Son, Y.M., I.S. Kim and I.Y. Choo. 1987. A new species of torrent catfish, *Liobagrus obesus* from Korea. *Korean J. Limnol.*, 20: 21-29.
- Taboada, L., A. Sánchez and C.G. Sotelo. 2017. A new real-time PCR method for rapid and specific detection of ling (*Molva molva*). *Food Chem.*, 228:469-475. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.117>.
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056584>.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
- Thomsen, P.F. and E. Willerslev. 2015. Environmental DNA-An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol. Conserv.*, 183: 4-18. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>.
- Xu, W., M. Fu, M. Huang, X. Cui, Y. Li, M. Cao, L. Wang, X. Xiong and X. Xiong. 2021. Duplex real-time PCR combined with melting curve analysis for rapid detection of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Food. Compos. Anal.*, 97: 103765. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103765>.
- Ye, J., J. Feng, S. Liu, Y. Zhang, X. Jiang and Z. Dai. 2016. Identification of four squid species by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes.*, 30: 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.01.001>.