

염소의 DNA 개체식별을 위한 초위성체 마커 개발

김가은, 김관우, 김동교, 김승창, 조해열, 이은도, 정상욱, 문성실, 이진욱, 김찬란, 최봉환*
농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원센터

Development of Microsatellite Markers for DNA Individual Identification of goats

Ga-Eun Kim, Kwan-Woo Kim, Dongkyo Kim, Seungchang Kim, Hae-Yeol Jo,
Eun Do Lee, Sang-Wook Chung, Seong Sil Mun, Jinwook Lee, Chan-Lan Kim,
Bong-Hwan Choi

Animal Genetic Resources Research Center, National Institute of Animal Science, RDA

요약 본 연구의 목적은 염소 및 염소고기의 부정 유통을 근절하고 과학적인 혈통관리를 통한 염소 개량 효과의 극대화를 위하여 염소 개체식별 및 친자감정 DNA 감식법 개발하는 것이다. 염소의 대립유전자 판별 오류를 줄이고 분석 결과의 신뢰도와 정확도를 높이기 위해 3반복과 4반복 microsatellite 좌위들로 이루어진 새로운 염소 개체식별 유전자 마커 15종(KCH004, KCH006, KCH015, KCH027, KCH047, KCH067, KCH086, KCH114, KCH117, KCH121, KCH122, KCH134, KCH153, KCH165, KCH212)을 개발하였다. 선발된 15개의 좌위를 이용하여 염소 96두에 대하여 다중 PCR(multiplex PCR) 초위성체 유전자형 결정을 실시한 결과, 총 54개에 대립유전자가 발견되었으며 좌위별로 평균 3.60개의 대립유전자를 가지는 것으로 확인되었다. 마커의 다형성과 정보력의 척도인 PIC(Polymorphism Information Contents) 값은 0.090(KCH153)~0.545(KCH121)로 나타났으며 KCH006, KCH015, KCH114, KCH121 좌위들은 PIC 0.35 이상이었고 전체 15종 마커의 평균PIC 값은 0.28을 가지는 것으로 확인되어 개체식별 마커로서 다형성이 있음이 검증되었다. 개발한 마커를 활용하여 재래흑염소(당진, 장수, 통영 계통)와 외국 5품종(알파인, 보어, 누비안, 자아넨, 토겐부르크)의 유전적 특성을 분석하였으며, 총 6품종 8계통 집단과 각각의 유전자 마커의 이형접합률(Heterozygosity)을 측정하였다. 기대 이형접합률은 0.167(누비안)~0.467(보어) 범위 내로, 재래흑염소는 0.393(당진), 0.415(통영), 0.437(장수)의 값을 가지는 것으로 나타났다. 재래흑염소(당진, 장수, 통영)와 외국 5품종들 간의 유연관계 분석은 특정 대립유전자 빈도를 근거로 한 유전적 거리의 추정으로 이루어졌다. 재래흑염소와 보어 집단 간 유전적 거리가 가장 가깝고 자아넨과 가장 먼 것으로 나타났다. 염소의 유전적 분화 양상을 확인함으로써 개발된 15종의 마커가 개체식별, 친자감정의 유전자 감식뿐만 아니라 염소 유전적 다양성 및 유연관계 분석에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Abstract The purpose of this study was to develop individual goat identification and paternity DNA testing methods to eradicate the illegal distribution of goats and goat meat and maximize the effects of goat improvement through scientific pedigree management. To reduce goat allele discrimination errors and increase the reliability and accuracy of the analysis, 15 new goat individual identification genetic markers consisting of 3- and 4-repeat microsatellite loci (KCH004, KCH006, KCH015, KCH027, KCH047, KCH067, KCH086, KCH114, KCH117, KCH121, KCH122, KCH134, KCH153, KCH165, KCH212) were developed. As a result of performing multiplex polymerase chain reaction (PCR) microsatellite genotyping on 96 goats using the selected 15 loci, a total of 54 alleles were found, and it was confirmed that each locus had an average of 3.60 alleles. The polymorphism information content (PIC) value, which is a measure of polymorphism and information power of markers, ranged from 0.090 (KCH153) to 0.545 (KCH121), and loci KCH006, KCH015, KCH114, and KCH121 had a PIC of 0.35 or higher. The average PIC value of all 15 markers was confirmed to be 0.28, and it was verified that there was a polymorphism as an individual identification marker. Using the developed markers, the genetic characteristics of native black goats (Dangjin, Jangsu, and Tongyeong lines) and five foreign breeds (Alpine, Boer, Nubian, Saanen, and Toggenburg) were analyzed. The heterozygosity of the genetic markers was measured. The expected heterozygous ratio was found to be within the range of 0.167 (Nubian) to 0.467 (Boer), and the native black goat had values of 0.393 (Dangjin), 0.415 (Tongyeong), and 0.437 (Jangsu). The analysis of the affinity relationship between native black goats (Dangjin, Jangsu, and Tongyeong) and the five foreign breeds was performed by estimating the genetic distance based on specific allele frequencies. It was found that the genetic distance between the native black goat and the Boer population was the closest and it was farthest from Saanen. It is believed that the 15 markers developed by confirming the genetic differentiation patterns of goats can be used not only for individual identification and paternity genetic identification but also for goat genetic diversity and related relationship analysis.

Keywords : Goat, Microsatellite Marker, DNA Identification, Paternity Test, Genetic Distance

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(과제번호: PJ01678601)의 지원에 의해 이루어지고, 2023년도 농촌진흥청 국립축산과학원 전문연구원 과정 지원 사업에 의해 이루어진 것임.

*Corresponding Author : Bong-Hwan Choi(National Institute of Animal Science, RDA)

email: bhchoi@korea.kr

Received September 7, 2023

Revised October 17, 2023

Accepted November 3, 2023

Published November 30, 2023

1. 서론

국내 축산업으로서 염소 시장은 급속히 성장하고 있으며 사육 방식도 전업화, 규모화 추세로 전환되면서 염소 산업의 활성화 단계에 진입하고 있다. 농림축산식품부 2021년 기타가축통계 보고서에 따르면 국내 2011년에 염소 사육농가수 14만호, 사육두수 24만두에서 2021년에는 각각 11만호, 45만두로 농가수는 줄어들고, 사육두수는 두 배 가까이 늘어났다. 그러나 국내 재래흑염소 기반의 교잡종 염소는 사육기간이 길어지면서 생산비가 증가함에 따라 외래종과의 가격 편차가 심화되었으며, 이로 인해 수입되어진 염소고기나 양고기를 국내산 염소고기로 둔갑시켜 불법으로 유통하는 사례들이 발생하고 있다. 이에 따라 국내 염소의 경쟁력을 제고시키기 위하여 육량 및 육질을 개선하라는 생산자의 요청과 함께 염소고기 원산지에 대한 소비자의 불신과 식품 안전성에 대한 관심이 높아지게 되었다. 이에 국내 염소 산업에서는 생산자와 소비자의 신뢰도를 제고시키기 위해 쇠고기 이력제[1]와 같은 염소고기 이력제를 고려함으로써 정확한 혈통관리를 통한 개량 효과 극대화하고 철저한 이력관리를 통한 부정유통을 근절할 수 있을 것이다. 염소의 생산, 도축, 가공, 유통 등 일련의 과정을 기록하고 개체식별번호를 부여하여 이표를 통해 이력관리를 하더라도 이표 탈락 또는 고의적인 위변조가 가능하여 원산지 확인 불가 및 부정 유통의 근간이 될 수 있다. 이러한 문제점들을 해결하기 위해 DNA marker를 활용하여 과학적이고 체계적으로 염소의 개체를 식별하고 국내 염소 고기와 수입 염소 고기를 구별하는 기술 개발이 필요하다.

특히, 초위성체 마커(microsatellite marker)는 개체 식별, 친자감정 및 집단의 유연관계를 분석할 수 있는 유전자 영역으로 가장 성공적이고 효율적인 수단으로 널리 이용되고 있다[2]. 초위성체 마커는 1~6개의 짧은 염기서열이 반복된 구간으로, 반복서열의 증가나 감소가 일어나 높은 다형성(polymorphism)을 가지는 특징이 있다[3]. 이러한 이유로 개체식별, 친자감정, 혈통분석(pedigree analysis) 및 유전적 다양성 분석을 통한 집단유전학 및 계통분류 연구에도 널리 활용되고 있다[4]. 1990년대부터 소과 동물의 microsatellite loci에 대한 연구가 시작된 이래로[5], 염소의 개체식별 및 유전적 다양성 연구를 위해 많은 marker들이 제안되었으며[6], 국내에서도 초위성체 마커를 활용하여 염소의 유전적 다양성을 연구하였다[7,8]. 다중 PCR(multiplex PCR)의 유전자형 결정시 분석 오류가 발생할 수 있는 2 반복의 초

위성체 마커 보다는 3반복, 4반복의 초위성체 마커가 발굴되고 있다. 이러한 마커들은 염기단위(motif)의 수가 많아 다형성은 적으나, 분석 오류가 발생할 확률이 낮고 유전자형을 판단하기 수월하여 분석 결과의 정확도를 높일 수 있다는 장점이 있다[9]. 따라서 분석 오류를 줄이고 정확하고 신속한 개체식별 및 친자감정 DNA 감식법을 개발하기 위해서는 1회의 PCR을 시행하여 3~4 반복으로 구성된 15개 초위성체 마커를 사용하는 것이 효과적인 것으로 사료된다.

본 연구는 염소 사육 농가의 과학적인 혈통관리를 통한 염소 개량 효과를 극대화하고 염소고기의 DNA 이력 추적제의 기반 기술을 개발함으로써 염소 고기 부정 유통을 근절하고 소비자에게 안심 먹거리 제공할 수 있다. 또한, 염소 개체식별 및 친자감정 DNA 감식법 개발뿐만 아니라 재래흑염소와 외래종 염소 간의 유전적 근연관계 및 재래흑염소 (당진, 장수, 통영)의 계통 간 유전적 다양성 분석을 통한 집단유전학 및 계통분류 연구에서도 활용 가능성을 제시할 수 있게 되었다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시 재료 및 DNA 추출

본 연구의 공시재료는 농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원센터에서 제공한 재래흑염소 3계통의 당진축(kd) 10두, 장수축(kj) 9두, 통영축(kt) 9두가 활용되었고 외국품종으로는 알파인(a) 6두, 보어(b) 20두, 누비안(n) 2두, 자야넨(s) 20두, 토젠부르크(t) 20두가 이용되어 총 96두를 사용하였다.

Wizard Genomic DNA purification kit(Promega, USA)를 이용하여 혈액 3ml로부터 genomic DNA를 추출하였으며 추출된 DNA는 Nanodrop Spectrometer를 이용하여 260nm~280nm에서 흡광도를 측정하여 농도와 순도를 확인하였다.

2.2 Microsatellite marker 제작

SSRomeDatabase(<http://mggm-lab.easymomics.kr/index.php>)에 보고된 tri-, tetra nucleotide repeat microsatellite loci를 발굴하였으며 이를 Primer3 plus를 통해 primer로 제작하였다. 후보 좌위들은 single PCR 및 전기영동을 통해 1차적인 선별작업을 거쳤으며 후에 multiplex PCR을 통해 다형성과 증폭 안정성이 입증된 좌위들만을 선별하여 최종 15개의

좌위들을 선발하였다. 선발된 좌위들은 단편의 증폭 크기와 좌위들 간의 반응성을 고려하여 5'말단 형광표지(FAM, VIC, NED, PET) forward primer로 제작하였다.

2.3 Multiplex PCR 수행 및 genotyping

Template DNA(10ng/ul) 6ul에 15종의 Primer (Forward/Reverse, 10pm/ul)를 각각 0.2ul씩 분주하고 10x reaction Buffer(genetBio, Korea) 5ul, 10m dNTP(GenetBio, Korea) 4ul, HS Taq polymerase 2.2ul 첨가 후, 총 용량 25ul이 되도록 증류수를 추가하였다. GeneAmp PCR system 9700(Applied Biosystem, USA)기기를 이용하여 Multiplex PCR을 수행하였으며, PCR 조건은 pre-denaturation(1cycle): 95°C/15min → 1phase(9cycle): 94°C/40sec-61°C/40sec-72°C/1min → 2phase(5cycle): 94°C/40sec-60°C/40sec-72°C/1min → 3phase(25cycle): 94°C/40sec-59°C/40sec-72°C/1min 증폭하였고 마지막으로 65°C/30min 마무리 반응시켰다. PCR 산물을 1:80 비율로 희석시킨 후 1ul을 PCR 96 well plate에 분주하고 Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems, USA)와 size standard (GeneScan™ 500LIZ®; Applied Biosystems, USA) 100:1 비율로 혼합한 mixture 9ul를 첨가하여 총 10ul의 반응물이 되도록 맞춘 후, Septa로 PCR plate를 sealing하여 95°C에서 5분간 denaturation 시켰다. 반응이 끝난 plate를 바로 얼음에 chilling하여 자동염기서열분석장치 ABI 3500xl genetic analyzer(Applied Biosystems, USA)으로 모세관 전기영동을 수행한 뒤 GeneMapper v.6.0 software(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 대립유전자형을 판독하였다.

2.4 통계분석

Microsatellite Toolkit software[10]를 통한 통계분석을 실시하여 locus 별 대립유전자의 수와 대립유전자 빈도(allele frequency), 관측이형접합률(Observed heterozygosity), 기대이형접합률(Expected heterozygosity) 그리고 PIC(Polymorphism Information Content)를 산출하였다[Eq. 1].

$$Het_E = 1 - \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right) \quad (1)$$

$$PIC\ value = 1 - \left(\sum_{i=1}^n P_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} P_i^2 \sum_{i=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

Where, n : number of alleles

P_i · P_j : frequency of ith and jth alleles

HetE : expected heterozygosity

PIC : Polymorphism Information Content

집단 간 유연관계 분석을 위해 [11]의 방법을 근거로 한 DISPAN package[12]를 이용하여 Da genetic distance를 추정하였고, Neighbor-Joining method[13]를 통해 집단 간의 유전적 거리를 근거로 한 phylogenetic tree를 작성하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 Microsatellite Toolkit 분석을 통한 microsatellite marker의 유용성 검사

SSRome Database에서 보고된 염소 초위성체 마커(13,582개) 중에서 1차적으로 3반복, 4반복 마커(5,830개)를 선발한 뒤, 각 염색체 내 영역의 위치, 증폭산물의 크기, 반복수 등을 고려하여 2차적으로 마커(220개)를 선발하였다. 각 마커들은 PCR을 수행하여 유전자 증폭 여부를 가려서 최종 KCH004, KCH006, KCH015, KCH027, KCH047, KCH067, KCH086, KCH114, KCH117, KCH121, KCH122, KCH134, KCH153, KCH165 KCH212, 총 15 종의 초위성체 마커를 선발하였다[Table 1]. 선발된 마커는 염소 집단인 재래흑염소 3계통의 당진축(kd) 10두, 장수축(kj) 9두, 통영축(kt) 9두, 외국품종인 알파인(a) 6두, 보어(b) 20두, 누비안(n) 2두, 자아넨(s) 20두, 토겐부르크(t) 20두, 총 96두를 대상으로 multiplex PCR과 모세관 전기영동 및 GeneMapper v.6.0를 사용해 마커별 대립유전자(allele) 빈도와 관찰이형접합도(Ho), 기대이형접합도(He) 및 PIC(Polymorphism Information Content)를 측정하여 개체식별 및 친자감별 마커로서 적합성을 판단하였다.

총 15종의 microsatellite loci에서 총 54개의 대립유전자(allele)가 발견되었으며 평균 3.60개의 대립유전자를 가지는 것으로 확인되었다. 초위성체 마커를 이용하여 집단의 유전적 거리(genetic distance)를 추정할 때 오류(standard error)를 줄이기 위해서는 대립유전자의 수가 최소 4개 이상일 것을 제안하였다[14,15]. 집단 내 기대 이형접합도(He)은 0.068(KCH086) ~0.632(KCH121), 관측이형접합도(Ho)은 0.069(KCH086) ~0.931(KCH114)을 보였으며, 전체 초위성체 마커의 증폭 크기는 129~412bp 범위를 보였다[Table 2].

Table 1. List of 15 microsatellite markers

Marker	Chr*	Repeat unit	Dye	Forward primer (5' --> 3')	Reverse primer (5' --> 3')
KCH004	10	TGC	FAM	GTCATCCTTTTCAGCTCCTTTCT	GTATGGGGTCGCACAGAGTC
KCH006	10	AAC	VIC	CTGTTTCTCCTTCCCACCCC	GAATCCTTAAGAGGGGCCCG
KCH015	10	ATAG	NED	ACGCTTCAATGACACCAGGA	AAAAGGGCTCTCGTGATCGG
KCH027	10	TAG	FAM	GGGTGCCATCCATAGGATC	CTCATGACTCTCCCAGGGA
KCH047	10	AGC	NED	GCTACAAGTCAGGCACGACT	AGGGCCCCCTCTTCTTCTAG
KCH067	10	ATGG	FAM	TTTCTCACGCTAACCCCGTC	AGAATCCTCTGCCCAGGACT
KCH086	10	TGC	FAM	TGTCTTCAATGCCACAGGG	CCAGGTGCTGAGAGTTTACGT
KCH114	2	GCT	VIC	ACAGGAAGTATGAGGGGGTCA	TGGAAAGTAGCCACACAGC
KCH117	2	GCAT	NED	GGTAGAGTCTGCCTGCAGTG	GTCGCAGTCAGTCAGTCACA
KCH121	3	TATC	VIC	CCCACATGCAATGCAACCAA	TCATCGCTGACCTGTGTTTGT
KCH122	3	TTCA	VIC	GGCTGGGCACCTTCTCTCTT	AGCTGAGAACACTGAGGCAC
KCH134	6	GTG	NED	CCAGAGGTGTGGAGCATCAG	AGTAGCTGTTTCGCACTTCCC
KCH153	11	AGC	PET	GCAGATGTTCCACACCAGGA	GGCTGGGGCAGATGACATAG
KCH165	15	CAGG	PET	GTAGCTGAAGTGCTCCCCTC	AAGGGGACAACGCAGAGAAG
KCH212	26	AGG	PET	CTGGACCTGGTAAAAGTCCC	CAGCCCAATCTGTCTCGGAG

* Chr : chromosome number

Table 2. Number of allele, Product size(bp), Expected heterozygosity (He) and Observed heterozygosity (Ho) within population for 15 microsatellite markers

Marker	Num. of allele	Product size(bp)	He	Ho
KCH004	3	138-147	0.396	0.543
KCH006	3	143-149	0.432	0.344
KCH015	7	129-165	0.530	0.537
KCH027	2	195-230	0.216	0.208
KCH047	4	220-241	0.373	0.426
KCH067	5	282-318	0.390	0.376
KCH086	2	373-392	0.068	0.069
KCH114	3	222-243	0.533	0.931
KCH117	2	373-393	0.200	0.161
KCH121	8	293-321	0.632	0.667
KCH122	3	374-394	0.282	0.252
KCH134	2	307-319	0.251	0.275
KCH153	3	361-412	0.102	0.105
KCH165	4	159-183	0.344	0.337
KCH212	3	318-327	0.412	0.383

초위성체 마커의 다형성을 평가하는 척도로써 PIC가 주로 이용되는데 PIC 값이 0.500 이상인 경우 다형성이 매우 높은 것으로 효율성이 높은 마커로(Highly informative) 여겨지며, 0.25~0.50 사이일 경우 사용하

기에 적합한 마커(reasonably informative)로 판단된 다[16]. 염소 집단에서 이용된 초위성체 마커들의 PIC 값은 KCH121(0.545)가 가장 높았고 그 외에도 KCH006 KCH015, KCH114가 평균 0.35 이상의 PIC 값을 가졌으며, 나머지 마커들은 0.052~0.350 사이의 PIC 수치를 나타냈다. 염소 8개 품종들의 PIC 평균을 보았을 때 자아넨(0.331)이 가장 높은 값을 보였고, 누비안(0.102)이 가장 낮은 값을 보였으며, 전체 8 품종의 평균 값은 0.276이었다. 재래흑염소 3계통을 보면 통영축(0.313), 장수축(0.304), 당진축(0.295) 순으로 평균 PIC값 이상을 보였고 외국 5품종의 평균 PIC 값은 0.260으로 계산되었다[Table 3]. 전반적으로 다소 낮은 PIC 값의 원인은 본 연구에 활용된 3반복, 4반복 초위성체 마커의 다형성이 2반복 초위성체 마커에 비해 낮고, 각 품종당 이용된 공시동물의 두수가 충분하지 못한 것으로 사료된다.

기존의 염소 개체 식별 및 친자감정을 위한 초위성체 마커들은 대부분 2반복 초위성체 마커들이어서 유전자형 결정시에 stutter 현상 및 2bp로 인접한 대립유전자 분포로 인한 정확하고 신속한 대립유전자형 판별의 어려움이 있었고, 이 문제를 해결하기 위해 새로운 3반복, 4반복 초위성체 마커를 개발하여 다형성(polymorphism) 검증 및 법과학적 유의성을 평가하였다.

Table 3. Polymorphic information content(PIC) value of 15 microsatellite markers in 8 goat populations

Marker	Populations*								Mean
	AL	BO	KD	KJ	KT	NU	SA	TO	
KCH004	0.141	0.305	0.372	0.441	0.441	0.305	0.174	0.238	0.302
KCH006	0.424	0.369	0.222	0.489	0.239	0.000	0.527	0.555	0.353
KCH015	0.239	0.611	0.247	0.569	0.468	0.305	0.545	0.558	0.443
KCH027	0.000	0.288	0.090	0.239	0.239	0.000	0.247	0.305	0.176
KCH047	0.346	0.276	0.492	0.178	0.569	0.000	0.288	0.288	0.305
KCH067	0.505	0.310	0.436	0.099	0.099	0.000	0.675	0.506	0.329
KCH086	0.000	0.365	0.000	0.000	0.000	0.000	0.048	0.000	0.052
KCH114	0.477	0.410	0.375	0.375	0.375	0.305	0.375	0.374	0.383
KCH117	0.000	0.000	0.305	0.362	0.239	0.000	0.048	0.288	0.155
KCH121	0.272	0.660	0.554	0.603	0.611	0.305	0.665	0.686	0.545
KCH122	0.000	0.410	0.492	0.178	0.544	0.000	0.129	0.090	0.231
KCH134	0.368	0.375	0.000	0.000	0.000	0.000	0.342	0.374	0.182
KCH153	0.141	0.090	0.090	0.000	0.178	0.000	0.129	0.090	0.090
KCH165	0.535	0.164	0.222	0.468	0.286	0.000	0.398	0.214	0.286
KCH212	0.000	0.000	0.534	0.553	0.404	0.305	0.372	0.359	0.316
Mean	0.230	0.309	0.295	0.304	0.313	0.102	0.331	0.328	0.276

* AL: Alpine, BO: Boer, KD: Korean Dangjin, KJ: Korean Jangsu, KT: Korean Tongyeong, NU: Nubian, SA: Saanen, and TO: Toggenburg

3.2 재래흑염소의 유전적 특성 및 외래 품종 간의 유연관계 분석

염소 8개 집단의 유전적 다양성을 분석하기 위하여 집단별 대립유전자의 수 및 이형접합율을 Microsatellite Toolkit software을 이용하여 산출하였다. 재래흑염소 집단에서 활용되는 대립유전자의 수가 당진 계통 2.33, 장수 계통 2.40, 통영 계통 2.40으로 나타났고, 외국종 집단은 알파인 2.00, 보어 2.53, 누비안 1.33, 자아넨 2.67, 토겐부르크 2.60으로 나타났다. 이는 각 품종 집단의 크기가 작은 것에 기인한 것으로 보이며 특히 샘플의 수가 10두 이하인 누비안, 알파인 집단의 대립유전자 수가 다른 집단에 비해 현저히 낮은 것을 확인할 수 있었다. 염소 8개 집단의 대립유전자 수는 2.67(SA)~1.33(NU)를 가지는 것으로 나타났고, 평균 대립유전자 수는 2.28개로 나타났다.

일반적으로 유전적 다양성을 분석하는데 있어 초위성체 마커로 사용하기 위해서는 이형접합율이 0.3~0.8를 충족되어야 하는데[17], 본 연구에서는 염소 품종별 기대 이형접합율은 평균 0.344이고 최저 0.167(NU)에서 최고 0.394(TO)의 수치를 보였다(Table 4). 재래흑염소 3계통의 기대 이형접합율은 0.369(KD), 0.373(KJ), 0.383(KT)으로 전체 외국품종의 평균 0.325보다는 높은 0.375의 평균값을 보여서 외국품종에 비해 상대적으로 다양성이 높은 것으로 볼 수 있다.

Table 4. Genetic diversity; Sample size, number of allele, Expected Heterozygosity(Exp Hz), and Observed Heterozygosity(Obs Hz) in 8 goat populations

Population	Sample size	No Alleles	Exp Hz	Obs Hz
AL	6	2.00	0.294	0.322
BO	20	2.53	0.379	0.467
KD	10	2.33	0.369	0.393
KJ	9	2.40	0.373	0.437
KT	9	2.40	0.383	0.415
NU	2	1.33	0.167	0.167
SA	20	2.67	0.393	0.430
TO	20	2.60	0.394	0.363

재래흑염소와 외국품종 간의 유전적 연관성을 알아보기 위해 재래흑염소 당진축(10), 장수축(9), 통영축(9) 및 외국품종의 알파인(6), 보어(20), 누비안(2), 자아넨(20), 토겐부르크(20), 총 96두를 대상으로 하여 분석을 실시하였다. MS toolkit software 분석에서 구해진 Da genetic distance matrix를 DISPAN 프로그램에 도입하여 유전적 거리를 계산하여 이를 근거로 Neighbor-Joining method를 통한 Phylogenetic tree를 작성하였다.

재래흑염소 3계통과 외국품종 5품종과의 유전적 근연관계를 나타내는 NJ Phylogenetic trees는 도식화되었으며[Fig. 1], 계통발생적으로 유연 관계를 분석할 때 신

Table 5. DA genetic distance matrix estimated from the frequencies of 15 microsatellite loci among the 8 goat populations

	AL	BO	KD	KJ	KT	NU	SA	TO
AL								
BO	0.2914							
KD	0.3581	0.2337						
KJ	0.4508	0.3159	0.0873					
KT	0.4261	0.2206	0.0243	0.0691				
NU	0.2955	0.2763	0.3703	0.4040	0.3238			
SA	0.1042	0.1932	0.2407	0.2634	0.2202	0.1458		
TO	0.1322	0.1577	0.2552	0.2470	0.2313	0.1406	0.0112	

AL: Alpine, BO: Boer, KD: Korean Dangjin, KJ: Korean Jangsu, KT: Korean Tongyeong, NU: Nubian, SA: Saanen, and TO: Toggenburg

뢰도(degree of confidence)를 나타내는 bootstrap values는 1,000회의 반복 실험을 통해 백분율로서 각 cluster의 꼭짓점에 표기되었다. 재래흑염소 집단 간의 유전적 거리는 장수축과 당진축 간은 0.087, 통영축과 당진축 0.024, 통영축과 장수축 0.069으로 재래흑염소 집단 간은 유전적으로 가까운 집단으로 표현되었다. 통영축과 당진축이 유전적으로 보다 가까운 집단으로 표현되었으며, 장수축과 당진축은 재래흑염소 집단에서 좀 더 먼 유전적 근연관계를 보였다. 외국품종에서는 알파인이 0.451(장수축), 0.426(통영축), 0.358(당진축) 순으로 재래흑염소 집단과 유전적 거리가 가장 멀었다. 그에 비해 보이종은 재래흑염소 통영축 집단과의 유전적 거리가 0.221로 가장 가까운 집단으로 나타났다[Table 5].

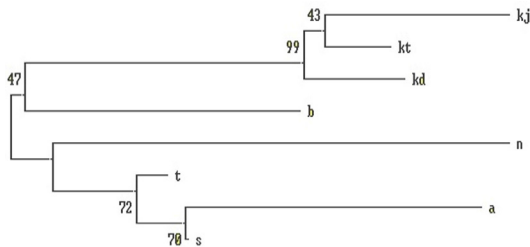


Fig. 1. NJ Phylogenetic trees showing the genetic relationships among 8 goat populations based on DA genetic distance. The numbers indicate bootstrap values in percentage after 1,000 resampling.

kj : Koran Black Goat(Jangsu), kt : Koran Black Goat(Tongyeong), kd : Koran Black Goat(Dangjin), b : Boer Goats, n : Nubian Goats, t : Toggenburg Goats, a : Alpine Goats, s : Saanen Goats

4. 요약 및 결론

본 연구의 결론은 염소 개체식별 및 친자감정을 위한 유전자 감식법에 있어 대립유전자 판별 오류 줄이고 분석 결과의 신뢰도와 정확도를 높이기 위해 새로운 염소 개체식별 유전자 마커 15종을 개발하였다. 선발된 15종의 초위성체 마커를 다중 PCR(multiplex PCR)을 실시한 결과, 총 54개에 대립유전자가 발견되었으며 좌위별로 평균 3.60개의 대립유전자를 가지는 것으로 확인되었다. 염소 집단 내 기대 이형접합율(He)은 0.068(KCH086) ~ 0.532(KCH121), 관측이형접합율(Ho)은 0.069(KCH086)~0.931(KCH1114)을 보였으며, 전체 초위성체 마커의 증폭 크기는 129bp~412bp 범위를 보였다. 초위성체 마커의 다형성과 정보력의 척도인 PIC값은 KCH121(0.545)가 가장 높았고 그 외에도 KCH015, KCH006, KCh114가 평균 0.350 이상의 PIC값을 가졌으며, 나머지 마커들은 0.052~0.350 사이의 PIC 수치를 나타냈다. 염소 8개 품종들의 PIC 평균을 보았을 때 자야넨(0.331)이 가장 높은 값을 보였고, 누비안(0.102)이 가장 낮은 값을 보였으며, 전체 8품종의 평균값은 0.276이었다. 재래흑염소 3계통을 보면 통영축(0.313), 장수축(0.304), 당진축(0.295) 순으로 평균 PIC값 이상을 보였고 외국 5품종의 평균 PIC값은 0.260으로 계산되었다. 재래흑염소(당진, 장수, 통영 계통)와 외국 5품종(알파인, 보어, 누비안, 자야넨, 토겐부르크) 집단별 기대 이형접합율은 0.167(누비안)~0.467(보어) 범위 내로, 재래흑염소는 0.393(당진), 0.415(통영), 0.437(장수)의 값을 가지는 것으로 나타났다. 재래흑염소 집단 간의 유전적 거리는 장수축과 당진축 간은 0.087, 통영축과 당진

축 0.024, 통영축과 장수축 0.069으로 재래흑염소 집단 간은 유전적으로 가까운 집단으로 표현되었다. 통영축과 당진축이 유전적으로 보다 가까운 집단으로 표현되었으며, 장수축과 당진축은 재래흑염소 집단에서 좀 더 먼 유전적 근연관계를 보였다. 외국품종에서는 알파인이 0.451(장수축), 0.426(통영축), 0.358(당진축) 순으로 재래흑염소 집단과 유전적 거리가 가장 멀었다. 그에 비해 보어종은 재래흑염소 통영축 집단과의 유전적 거리가 0.221로 가장 가까운 집단으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 개발한 15종의 초위성체 마커들은 염소 개체식별, 친자감정의 유전자 감식뿐만 아니라 염소 유전적 다양성 및 유연관계 분석에 활용될 수 있을 것으로 사료되었고, 이러한 유전자 감식 기술은 염소고기에 대한 체계적인 이력관리사업에 활용 가능성이 있음을 시사하였다.

References

- [1] Lee, S. H. 2007. Establishment of Microsatellite Marker Set for the Individual Identification its Application in the Hanwoo Industry. Ph. D. Dissertation. GyengSang National University, Jinju, Korea.
- [2] M. E. Fernández, D. E. Goszczynski, J. P. Lirón, E. E. Villegas-Castagnasso, M. H. Carino, M. V. Ripoli, et al., "Comparison of the effectiveness of microsatellites and SNP panels for genetic identification, traceability and assessment of parentage in an inbred Angus herd", *Genetics and Molecular Biology*, Vol.36, pp.185-191, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572013000200008>
- [3] D. Tautz, "Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers", *Nucleic Acids Research*, Vol.17, No.16, pp. 6463-6471, 1989.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/17.16.6463>
- [4] J. Delgado, A. Martínez, A. Acosta, L. Alvarez, E. Armstrong, E. Camacho, et al., "Genetic characterization of LatinAmerican Creole cattle using microsatellite markers", *Animal Genetics*, Vol.43, No.1, pp.2-10, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2052.2011.02207.x>
- [5] W. Barendse, S. M. Armitage, A. M. Ryan, S. S. Moore, D. Clayton, M. Georges, et al., "A genetic map of DNA loci on bovine chromosome 1", *Genomics*, Vol.18, No.3, pp.602-608, 1993.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0888-7543\(05\)80362-3](https://doi.org/10.1016/S0888-7543(05)80362-3)
- [6] N. Saitbekova, C. Gaillard, G. Obexer-Ruff and G. Dolf, "Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis", *Animal Genetics*, Vol.30, NO.1, pp.36-41, 1999.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2052.1999.00429.x>
- [7] S. Suh, M. Byun, Y.-S. Kim, M.-J. Kim, S.-B. Choi, Y.-G. Ko, et al., "Analysis of genetic diversity and relationships of Korean Native Goat populations by microsatellite markers", *Journal of Life Science*, Vol.22, NO.11, pp.1493-1499, 2012.
- [8] B. K. Park, Y. S. Kim, J. Seong and H. S. Kong, "Analysis of genetic diversity and relationships of Korean native black goat using microsatellite markers", *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, Vol.34, NO.3, pp. 183-189, 2019.
- [9] J. Bacher, L. F. Hennes, T. Gu, A. Tereba, K. A. Micka, C. J. Sprecher, et al., "Pentanucleotide repeats: highly polymorphic genetic markers displaying minimal stutter artifact", *Proceedings from the Ninth International Symposium on Human Identification*, 1999.
- [10] S. Park, "The microsatellite toolkit for MS Excel 97 or 2000. Molecular population genetics laboratory, Smurfit Institute of Genetics", Trinity College, Dublin, Vol.2, 1999.
- [11] M. Nei, F. Tajima and Y. Tateno, "Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data: II. Gene frequency data", *Journal of Molecular Evolution*, Vol.19, pp.153-170, 1983.
- [12] T. Ota, "DISPAN. Genetic Distance and Phylogenetic Analysis. Pennsylvania State University", University Park PA, USA, 1993.
- [13] N. Saitou and M. Nei, "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees", *Molecular Biology and Evolution*, Vol.4, No.4, pp.406-425, 1987
- [14] J. Barker, "A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds", *In Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Guelph*, pp.501-508, 1994.
- [15] H. Chung, T. Kim, B. Choi, G. Jang, J. Lee, K. Lee and J. Ha, "Isolation and characterization of the bovine microsatellite loci", *Biochemical Genetics*, Vol.44, pp.518-532, 2006.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10528-006-9055-9>
- [16] D. Botstein, R. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis, "Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms", *American Journal of Human Genetics*, Vol.32, No.3, pp.314, 1980.
- [17] N. Takezaki and M. Nei, "Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA", *Genetics*, Vol.144, No.1, pp.389-399, 1996.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/genetics/144.1.389>

김 가 은(Ga-Eun Kim)

[정회원]



- 2022년 2월 : 전남대학교 대학원 동물공학과 (농학석사)
- 2022년 4월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 전문연구원

<관심분야>

가축번식, 가축육종

김 승 창(Seungchang Kim)

[정회원]



- 1999년 2월 : 전남대학교 대학원 생물학과 (이학석사)
- 2009년 2월 : 전남대학교 대학원 생물학과 (이학박사)
- 2018년 2월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

유전육종, 유전자원 관리

김 관 우(Kwan-Woo Kim)

[정회원]



- 2015년 2월 : 충남대학교 대학원 축산학과 (농학석사)
- 2018년 8월 : 충남대학교 대학원 축산학과 (농학박사)
- 2022년 1월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

가축번식, 가축육종

조 해 열(Hae-Yeol Jo)

[정회원]



- 1996년 5월 : 농촌진흥청 국립축산과학원 위생서기
- 2002년 6월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 위생주사보

<관심분야>

가축번식, 가축사양

김 동 교(Dong-kyo Kim)

[정회원]



- 2015년 2월 : 충남대학교 대학원 축산학과 (농학석사)
- 2012년 10월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

가축사양, 생명자원

이 은 도(Eun-Do Lee)

[정회원]



- 2018년 2월 : 충남대학교 대학원 축산학과 (농학석사)
- 2021년 3월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 산학연구원

<관심분야>

가축번식, 가축육종

정 상 욱(Sang Uk Chung)

[정회원]



- 2021년 2월 : 건국대학교 대학원 동물산업과학전공 (농학석사)
- 2023년 3월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 전문연구원

<관심분야>
가축사양, 가축번식

김 찬 란(Chan-Lan Kim)

[정회원]



- 1999년 2월 : 서울대학교 수의학과 (수의학 학사)
- 2005년 3월 : 일본 기후연합대학원 오비히로대학 수의공중보건학과 (응용수의학 박사)
- 2006년 7월 ~ 2014년 9월 : 농림 축산검역본부 수의연구사
- 2014년 10월 ~ 현재 : 국립축산과학원 수의연구사

<관심분야>
예방수의학, 중소동물 임상, 수의공중보건학

문 성 실(Mun-Seong Sil)

[정회원]



- 1988년 2월 : 서영대학교 전자계산과 (전문학사)
- 2006년 8월 : 국립평생진흥원 학점은행제 (컴퓨터공학사)
- 2004년 9월 ~ 2019년 9월 : 국립 축산과학원 연구원
- 2021년 6월 ~ 현재 : 국립축산과학원 연구원

<관심분야>
정보경영, 정보통신

최 봉 환(Bong-Hwan Choi)

[정회원]



- 2000년 8월 : 전남대학교 낙농학과 (농학박사)
- 2002년 6월 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사
- 2021년 3월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구관

<관심분야>
동물유전체, 동물분자생리학

이 진 욱(Jinwook Lee)

[정회원]



- 2015년 2월 : 전북대학교 대학원 축산학과 (농학석사)
- 2020년 8월 : 전북대학교 대학원 축산학과 (농학박사)
- 2016년 10월 ~ 현재 : 농촌진흥청 농업연구사

<관심분야>
영양유전체, 반추미생물