



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

한국 남생이 집단에서
미토콘드리아 *CYTB* 서열의
다형성과 계통 유연관계

제주대학교 교육대학원

생물교육전공

박 선 미

2015년 8월

한국 남생이 집단에서
미토콘드리아 *CYTB* 서열의
다형성과 계통 유연관계

지도교수 오 홍 식

박 선 미

이 논문을 교육학 석사학위 논문으로 제출함

2015년 6월

박선미의 교육학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

제주대학교 교육대학원

2015년 6월

Phylogenetic Relationships based on the
Polymorphism of Mitochondrial Cytochrome b
Gene Sequences in *Mauremys reevesii*
Population in Korea

Seon-Mi Park
(Supervised by Professor Hong-Shik Oh)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of
Master of Education

2015. 6.

This thesis has been examined and approved.

Thesis director, Seung-Ho Hong, Prof. Department of Science Education

Department of Biology Education
GRADUATE SCHOOL OF EDUCATION
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

<국문초록>

한국 남생이 집단에서 미토콘드리아 *CYTB* 서열의 다형성과 계통 유연관계

박 선 미

제주대학교 교육대학원 생물교육전공

지도교수 오 홍 식

본 연구는 남생이 미토콘드리아 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA) cytochrome b(*CYTB*) 유전자를 이용하여 한국 남생이 집단과 중국 남생이 집단의 mtDNA 다형성과 계통구조를 비교하고, 동아시아 집단들과의 계통 유연관계를 밝히기 위하여 수행하였다. 남생이의 꼬리, 등갑, 혈액 등에서 genomic DNA를 추출하였고, *CYTB* 유전자 서열을 분석하였다. 한국 남생이 집단(n=47)의 haplotype을 분석한 결과, 총 6가지 haplotype(Kor01-Kor06)으로 구분되었고, 대부분 Kor01(n=19)과 Kor03(n=23) haplotype에 포함되었다. 중국 남생이 집단(n=40)도 6가지 haplotype(Chi01-Chi06)으로 나뉘며, 30개체의 *CYTB* 서열이 Chi01에서 발견되었다. 한국과 중국의 남생이들을 모두 함께 분석한 결과에서 *CYTB* 유전자 서열(n=87)은 7가지 haplotype(KChi01-KChi07)으로 구분되었고, KChi01(n=53)과 KChi03(n=23)에서 많은 개체들이 포함되었다. 동아시아 남생이의 *CYTB* 유전자 서열(n=226) 전체는 총 6가지 haplotype(Hap01-Hap06)으로 구분되었다. 한국, 중국, 일본의 남생이 집단에서는 각각 4개의 haplotype이 있었으며, 대만 집단에서는 3개의 haplotype이 확인되었다. 중국 남생이 집단은 Hap01, Hap02, Hap04, Hap05에 포함되었고, Hap01이 85.0%(n=34)의 높은 빈도를 보였다. 한국 남생이 집단은 Hap01, Hap03, Hap04, Hap05에 포함되었고, Hap03에서

51.0%(n=24)로 높은 빈도를 보였다. 동아시아 남생이 집단의 *CYTB* 서열들 간의 유전적 거리지수는 0.0009-0.0212 사이에 있는 것으로 나타났다. 동아시아 남생이 집단에서 발견된 6가지 haplotype 중에서 한국 남생이의 *CYTB* 서열만으로 구성된 haplotype은 확인되지 않았다. 반면, 한국의 남생이가 다수 포함된 Hap03에서 중국 남생이의 *CYTB* 서열이 전혀 발견되지 않은 점은 한국 집단과 중국 집단이 지리적으로 격리되어 진화한 결과로 추정되며, 현생 남생이에 대한 한국 고유 집단과 중국 고유 집단을 나누는 기준이 될 수 있을 것으로 기대된다. 동아시아 남생이 집단의 haplotype들은 계통수 상에서 모두 단계통적(monophyletic)인 양상을 보여 하나의 선조집단에서 진화한 집단들로 판단되며, 추가적인 이동과 지리적인 격리 이후 지역 내 진화과정을 거친 것으로 추정된다. 본 연구에서 분석하지 못한 다양한 서식지로부터 충분한 시료를 확보한 이후, 미토콘드리아 DNA의 다른 유전자 서열들과 핵 DNA microsatellite(MS) marker 등을 이용한 추가적인 연구가 진행된다면, 향후 한국 남생이 집단을 비롯한 중국, 일본, 대만 등 동아시아 남생이의 유전적 집단구조와 계통 유연관계를 이해할 수 있는 좋은 자료가 될 것으로 기대된다.

목 차

국문초록	i
목 차	iii
표 목차	iv
그림 목차	v
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 실험재료	4
2. Genomic DNA 추출	4
3. 중합효소 연쇄반응	4
4. DNA 서열 결정	5
5. 계통구조 분석	5
6. 계통 유연관계 분석	6
III. 결 과	7
1. 남생이 <i>CYTB</i> 서열의 확인	7
2. 한국 남생이 집단의 haplotype 유형과 계통 유연관계	11
3. 중국 남생이 집단의 haplotype 유형과 계통 유연관계	13
4. 한국-중국 남생이 집단의 haplotype 유형과 계통 유연관계	15
5. 동아시아 남생이 집단의 haplotype 유형과 지역적 분포	17
6. 동아시아 남생이 집단의 계통 유연관계	20
IV. 고 찰	22
1. 한국 남생이 집단의 유전적 모계 구조	22
2. 중국 남생이 집단의 유전적 모계 구조	22
3. 동아시아 남생이 집단의 관계	23
V. 참고문헌	27
영문초록	35

List of Tables

Table 1. The primer sequence for mtDNA <i>CYTB</i> gene amplification	5
Table 2. <i>CYTB</i> sequences of <i>M. reevesii</i> used in this study	7
Table 3. A list of specimens and sequence data used in the analysis of <i>CYTB</i> gene sequences	8
Table 4. Genetic distances among 6 haplotypes based on <i>CYTB</i> gene sequences of <i>M. reevesii</i> in Republic of Korea	11
Table 5. Genetic distances among 6 haplotypes based on <i>CYTB</i> gene sequences of <i>M. reevesii</i> in China	13
Table 6. Genetic distances among 7 haplotypes based on <i>CYTB</i> gene sequences of <i>M. reevesii</i> in China and Republic of Korea	15
Table 7. Distribution of <i>CYTB</i> haplotypes of <i>M. reevesii</i> in East Asia	17
Table 8. Nucleotide substitution in <i>CYTB</i> gene sequences among 6 haplotypes	19
Table 9. Genetic distances among 6 haplotypes based on <i>CYTB</i> gene sequences of <i>M. reevesii</i> in East Asia	20

List of Figures

- Figure 1. The PCR amplification in *M. reevesii* using *CYTB* primers. 7
- Figure 2. NJ tree based on genetic distances of *CYTB* haplotypes of *M. reevesii* in Republic of Korea and its related species. 12
- Figure 3. NJ tree based on genetic distances of *CYTB* haplotypes of *M. reevesii* in China and its related species. 14
- Figure 4. NJ tree based on genetic distances of *CYTB* haplotypes of *M. reevesii* in China and Republic of Korea between its related species. 16
- Figure 5. Biogeographical distribution of *CYTB* haplotypes of *M. reevesii* in East Asia. 18
- Figure 6. NJ tree based on genetic distances of *CYTB* haplotypes of *M. reevesii* in East Asia and its related species. 21

I. 서론

전 세계적으로 거북목(Testudines)은 14 과(family), 319 종(species)과 146 아종(subspecies)이 서식하고 있다(Bickham *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2012). 우리나라에 서식하는 거북목은 8 종이 알려져 있으며(국립생물자원관, 2011a), 이 중 담수거북에는 남생이(*Mauremys reevesii*), 자라(*Pelodiscus sinensis*), 외래종인 붉은귀거북(*Trachemys scripta elegans*)이 있다(송, 2007).

남생이는 파충강(Reptilia) 거북목 남생이과(Geomydidae)에 속하며, Gray(1831)에 의해 *Emys reevesii*로 처음 기재되었고, *Geoclemys*, *Damonia*, *Chinemys* 속 등으로 분류체계에 변화를 거쳤다. 이후 *Mauremys* 속으로 구분해야 한다는 의견이 제기되어(Feldman and Parham, 2004), 현재 *Mauremys reevesii*로 통용되고 있다(국립생물자원관, 2011b; International Union for the Conservation of Nature, IUCN, 2015). 남생이는 주로 오염되지 않은 일부 하천, 강이나 호수 등 유속이 느린 담수에 서식하는데, 국내에서는 제주도를 비롯한 도서지방을 제외한 한반도 전역에 분포한다(송, 2007; 국립생물자원관, 2011b; 국립환경과학원, 2011). 국외에는 일본, 중국, 타이완에 분포하는 것으로 알려져 있다(Lovich *et al.*, 1985; Chen and Lue, 2010; 국립생물자원관, 2011b; 국립환경과학원, 2011; van Dijk *et al.*, 2012).

경제개발 위주의 사회변화에 따른 극심한 환경오염, 인간에 의한 생태계 파괴, 남획, 기후변화에 따른 서식지 소실 등의 이유로 남생이의 개체수가 급격히 감소하고 있다. 또한 1970년대 이후 종교활동, 애완용, 식용 또는 약재용으로 붉은귀거북, 노랑배거북(*Trachemys scripta scripta*), 보석거북(*Mauremys sinensis*) 등을 비롯한 다양한 거북류가 수입되었고, 이들 중 상당수는 자연생태계로 유출되어 비슷한 행동양식과 서식지를 가진 남생이의 생존을 위협하고 있다. 수입된 거북류 중에는 중국 등 해외에서 생산되거나 수집된 남생이 종도 포함된 것으로 알려져 있다(오와 흥, 2007; 문화재청, 2010; 국립생물자원관, 2011b, 2012). 현재 남생이는 천연기념물 제453호와 멸종위기 야생생물 II급으로 지정되었다(문화재

청, 2006; 환경부, 2006). 국제적으로는 IUCN의 적색목록(Red List)에 등재되어 있으며, CITES(Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora)의 부속서 III에 포함되어 국제거래를 규제하고 있다 (CITES, 2015; IUCN, 2015).

2000년 이후 생물자원에 대한 인식의 변화로 자원의 확보, 보존, 관리 및 활용에 많은 관심이 집중되고 있으며, 이에 따른 연구도 활발히 진행되고 있다. 특히 분자생물학적 실험기법의 발전은 다양한 생물종에 대한 연구 분야를 확대하고 심화할 수 있는 기회를 제공하고 있다. 동물의 계통발생 및 진화학적 연구는 형태학적 형질의 차이를 기준으로 연구되었으나, DNA 분자를 다룰 수 있는 실험 기법들이 개발되면서 다양한 생물체를 대상으로 DNA를 이용한 분자유전학적 연구성과들이 보고되고 있으며(Harris *et al.*, 1998; 송 등, 2003, 2004; 조 등, 2004; 이 등, 2005; Iverson *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2011; 박 등, 2011; 한 등, 2014), DNA 서열을 기반으로 하는 유전체 변이 연구도 이루어지고 있다. 미토콘드리아는 단일 세포내에 수 백에서 수 만 개까지 존재하여 적은 시료를 이용하더라도 다수의 DNA 분자들을 확보할 수 있으며, 미토콘드리아 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)는 양쪽 부모 모두에 의해 전달되는 것이 아니라 모계유전을 하는 생체분자이다. 또한 mtDNA는 DNA 재조합이 일어나지 않으며, 핵 DNA 보다 돌연변이 발생률이 높고 진화속도가 빠르기 때문에 종내 유전적 다양성에 대한 분석이 많이 이루어졌다(Brown *et al.*, 1979; Clayton, 1982; Birky *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1999; Prusak *et al.*, 2011).

현재까지 국내외에서 이루어진 남생이에 대한 연구는 분포현황 및 서식 특성 분석, 서식처 복원, 유전적 특성과 다양성 등이 있다(Honda *et al.*, 2002; Eo, 2006; Parham *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009; Kaiser *et al.*, 2010; Lee, 2010; Chang *et al.*, 2012; 김 등, 2013; 조, 2014). 또한 남생이를 포함하는 *Mauremys* 속에서 교잡종, 종 식별, 계통진화학적 기원에 관한 분자 수준의 연구(Fong and Chen, 2010; Suzuki *et al.*, 2011, 2014; Xia *et al.*, 2011)와, 남생이의 미토콘드리아 전체 염기 서열을 통하여 거북목에 속하는 종간 계통 유연관계가 보고된 바 있다(Shin, 2008). 이처럼 남생이에 대한 분자유전학적 연구들이 진행되었음에도 아직까지 한국에 서식하는 남생이 집단과 중국 남생이 집단과의 분자유전학적

연관성에 대해 명확하게 밝혀진 예는 없는 실정이다.

본 연구는 남생이 *CYTB* 서열의 haplotype 분석을 통해 한국 남생이 집단과 중국 남생이 집단의 mtDNA 다형성과 이에 따른 모계 계통구조를 비교하고, 기존에 보고된 동아시아 집단들과의 계통 유연관계를 밝히기 위하여 이루어졌다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

연구에 이용한 남생이 시료 중 1개체는 경상남도 진주시 이반성면 용암리에서 직접 수집하였고, 한국 남생이 48개체와 중국 남생이 43개체의 혈액과 조직 등을 국립공원연구원을 통해 제공받아 DNA 분리에 이용하였다.

2. Genomic DNA 추출

조직과 혈액 시료에서 DNeasy Blood & Tissue Kit(Qiagen, USA)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였고, 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)의 주형으로 이용하였다.

3. 중합효소 연쇄반응

추출한 DNA를 주형으로 mtDNA *CYTB* 유전자를 증폭하였다. PCR 증폭에 사용된 primer는 National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 database 상에 보고된 남생이 mtDNA 서열(NCBI accession no. FJ469674)을 이용하여 제작하였다(Table 1). PCR 반응은 DNA 1 μ l, 10 \times reaction buffer 2 μ l, 10 mM dNTP 2 μ l, *Taq* polymerase(Genet Bio, Republic of Korea) 0.5 μ l (5units/ μ l), 10pmole primer 각각 1 μ l씩 넣고, 증류수를 첨가하여 최종 20 μ l로 반응하였다. PCR 증폭은 Eppendorf Mastercycler Gradient(Eppendorf, Germany)를 이용하였다. 조직에서 추출한 DNA를 주형으로 PCR 증폭을 하는 경우에는 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 초기변성 후, 95 $^{\circ}$ C에서 1분, 55 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분을 1회로 하는

cycle을 35회 반복수행 하였으며, 72°C에서 5분간 최종 신장하였고, 혈액에서 추출한 DNA를 주형으로 하는 경우에는 95°C에서 3분간 초기변성 후, 94°C에서 1분, 54°C에서 1분, 72°C에서 1분을 1회로 하여 40회 반복수행 하였으며, 72°C에서 5분간 최종 신장하였다. PCR 증폭산물은 ethidium bromide가 함유된 1.5% agarose gel 상에서 전기영동하여 확인하였다.

Table 1. The primer sequence for mtDNA *CYTB* gene amplification.

Name	Primer Sequence (5'→ 3')
NS_CYTB_F	GAC TTT AAC CAA GAC CCG TGA TTT
NS_CYTB_R	AAG GTT TGG AGC CTT CTC TTT TGA

4. DNA 서열 결정

증폭된 PCR 산물은 QIAex II Gel Extraction Kit(Qiagen, USA)를 이용하여 정제하였고, 염기서열 분석은 ABI 3130xl Genetic Analyzer(ABI, USA)를 이용하여 direct-sequencing을 수행하였다. 결정된 서열을 육안으로 확인한 후, BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 검색을 통해 NCBI의 database 상에 보고된 서열과 비교하였다.

5. 계통구조 분석

본 연구를 통해 얻은 남생이 mtDNA *CYTB* 유전자 서열들과 기존에 NCBI의 database 상에 보고된 서열들을 모두 수집하였고, 염기서열에 대한 다중정렬은 CLUSTAL W program(Thompson *et al.*, 1994)을 이용하여 수행하였다. 염기서열의 haplotype의 결정은 DnaSP v5 program(Librado and Rozas, 2009)을 이용

하여 결정하였다.

6. 계통 유연관계 분석

정렬된 서열들 간의 유전적 거리지수의 산출과 neighbor-joining(NJ) tree의 작성은 PHYLIP program package ver. 3.695(Felsenstein, 1993)의 DNADIST와 NEIGHBOR 프로그램을 통해 작성하였고(Saitou and Nei, 1987), 유전적 거리지수는 Kimura's two parameter method(Kimura, 1980)에 근거하여 transition : transversion의 비를 1 : 2로 가정하여 산출하였다.

III. 결 과

1. 남생이 *CYTB* 서열의 확인

남생이 genomic DNA를 추출하여 *CYTB* 유전자를 분석하기 위해서 PCR primer를 제작하였고, 이를 이용하여 PCR 증폭한 결과, 총 78개체의 *CYTB* 유전자 절편을 증폭하였다(Figure 1). 결정된 남생이 *CYTB* 유전자 서열을 BLAST 검색으로 확인한 결과, *M. reevesii*의 mitochondrial genome 서열(NCBI accession no. AB561908)에서 *CYTB* 유전자 영역에 해당된다는 것을 알게 되었다(97.7%-100%). 결정된 78개의 남생이 *CYTB* 유전자 서열은 NCBI database에 등록하였고, 본 연구에 사용된 모든 *CYTB* 유전자 서열은 Table 2와 Table 3에 제시하였다.

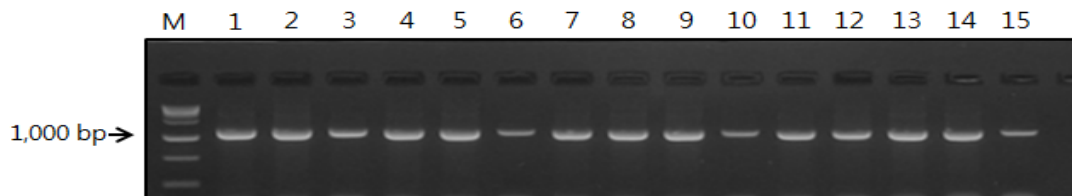


Figure 1. The PCR amplification in *M. reevesii* using *CYTB* primers. M is 1kb DNA Ladder Marker.

Table 2. *CYTB* sequences of *M. reevesii* used in this study

Country	No. of <i>CYTB</i> sequences		
	This study	Previous reports	Total
Republic of Korea	42	5	47
China	36	4	40
Taiwan	-	5	5
Japan	-	134	134
Total	78	148	226

Table 3. A list of specimens and sequence data used in the analysis of *CYTB* gene sequences

Specimen	Species	Country	Reference	Accession no.
KN01	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921566
KN1-1	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921567
KN2-1	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921568
KN5-1	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921569
KN6-1	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921570
KN11	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921571
KN12	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921572
KN13	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921573
KN14	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921574
KN15	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921575
KN16	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921576
KN17	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921577
KN18	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921578
KN19	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921579
KN20	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921580
KB01	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921539
KB02	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921540
KB03	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921541
KB04	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921542
KB05	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921543
KB09	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921544
KB10	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921545
KB11	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921546
KB12	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921547
KB13	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921548
KB14	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921549
KB15	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921550
KB16	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921551
KB17	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921552
KB18	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921553
KB19	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921554
KB20	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921555
KB21	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921556
KB22	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921557
KB23	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921558
KB24	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921559

- Continued -

Specimen	Species	Country	Reference	Accession no.
KB25	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921560
KB26	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921561
KB27	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921562
KB28	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921563
KB30	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921564
KB31	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	This study	KR921565
KKF732683	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	Jang <i>et al.</i> , 2014	KF732683
KKM289199	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	Jang <i>et al.</i> , 2014	KM289199
KKM289198	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	Jang <i>et al.</i> , 2014	KM289198
KAB562027	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	Suzuki <i>et al.</i> , 2011	AB562027
KJQ798814	<i>M. reevesii</i>	Republic of Korea	Jeong <i>et al.</i> , 2012	JQ798814
CN02	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921503
CN03	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921504
CN04	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921505
CN05	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921506
CN07	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921507
CN08	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921508
CN09	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921509
CN10	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921510
CN12	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921511
CN15	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921512
CN16	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921513
CN17	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921514
CN18	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921515
CN19	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921516
CN20	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921517
CN21	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921518
CN22	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921519
CN23	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921520
CN24	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921521
CN26	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921522
CN27	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921523
CN28	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921524
CN29	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921525
CN30	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921526
CN31	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921527
CN33	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921528

- Continued -

Specimen	Species	Country	Reference	Accession no.
CN34	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921529
CN35	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921530
CN36	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921531
CN37	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921532
CN38	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921533
CN39	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921534
CN40	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921535
CN41	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921536
CN42	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921537
CN43	<i>M. reevesii</i>	China	This study	KR921538
CHQ442410	<i>M. reevesii</i>	China	Xia <i>et al.</i> , 2011	HQ442410
CHQ442412	<i>M. reevesii</i>	China	Xia <i>et al.</i> , 2011	HQ442412
CHQ442411	<i>M. reevesii</i>	China	Xia <i>et al.</i> , 2011	HQ442411
CAJ519497	<i>M. reevesii</i>	China	Barth <i>et al.</i> , 2002	AJ519497
JAB571605- JAB571615	<i>M. reevesii</i>	Japan	Suzuki <i>et al.</i> , 2011	AB571605- AB571615
JAB561906- JAB562026	<i>M. reevesii</i>	Japan	Suzuki <i>et al.</i> , 2011	AB561906- AB562026
JAB920783	<i>M. reevesii</i>	Japan	Fujii <i>et al.</i> , 2014	AB920783
JAB920782	<i>M. reevesii</i>	Japan	Fujii <i>et al.</i> , 2014	AB920782
TAB562028	<i>M. reevesii</i>	Taiwan	Suzuki <i>et al.</i> , 2011	AB562028
TFJ026854	<i>M. reevesii</i>	Taiwan	Lee <i>et al.</i> , 2009	FJ026854
TFJ026853	<i>M. reevesii</i>	Taiwan	Lee <i>et al.</i> , 2009	FJ026853
TFJ026852	<i>M. reevesii</i>	Taiwan	Lee <i>et al.</i> , 2009	FJ026852
TFJ026830	<i>M. reevesii</i>	Taiwan	Lee <i>et al.</i> , 2009	FJ026830
HQ442419	<i>M. annamensis</i>	China	Xia <i>et al.</i> , 2011	HQ442419
HQ442418	<i>M. japonica</i>	China	Xia <i>et al.</i> , 2011	HQ442418
HQ442417	<i>M. mutica</i>	China	Xia <i>et al.</i> , 2011	HQ442417
HQ442409	<i>M. sinensis</i>	China	Xia <i>et al.</i> , 2011	HQ442409
HQ442416	<i>Sacalia bealei</i>	China	Xia <i>et al.</i> , 2011	HQ442416

2. 한국 남생이 집단의 haplotype 유형과 계통 유연관계

한국 남생이 집단(n=47) 내에서 haplotype의 분포 및 연관성을 확인하기 위하여 직접 분석한 한국 남생이 집단의 *CYTB* 유전자 서열과, 보고된 서열정보를 수집하여 haplotype을 분석한 결과, 총 6가지 haplotype(Kor01-Kor06)으로 구분되었다. 대부분 Kor01(n=19)과 Kor03(n=23) haplotype에 포함되었고, 그 중 Kor03(48.9%) haplotype이 가장 많은 서열을 포함하고 있는 것으로 나타났다.

한국 남생이 집단의 유전적 거리지수는 Table 4에 제시하였다. Table 4에서 알 수 있는 것처럼 Kor01과 Kor02의 유전적 거리지수는 0.0020으로 가장 가까웠으며, Kor04와 Kor06의 유전적 거리지수가 0.0148로 가장 먼 것으로 확인되었다. Kor01과 Kor03의 유전적 거리지수(0.0076)도 비교적 가깝게 나타났다. 유전적 거리지수를 바탕으로 한국 남생이 집단의 계통 유연관계를 NJ tree로 나타내었다 (Figure 2). Iverson *et al.*(2007)의 연구를 참고하여 남생이과에 속하는 *Sacalia bealei*(Beal's eyed turtle)를 outgroup으로 선정하였다. NJ tree 분지 양상에서, 한국 남생이 집단의 6개의 haplotype들은 Kor01, Kor02, Kor04, Kor05를 포함하는 K1 cluster와 Kor03, Kor06을 포함하는 K2 cluster로 구분되었으나, 전체적으로 계통수 상에서 모두 단계통적(monophyletic)인 양상을 보였다.

Table 4. Genetic distances among 6 haplotypes based on *CYTB* gene sequences of *M. reevesii* in Republic of Korea

	Kor01	Kor02	Kor03	Kor04	Kor05	Kor06
Kor01	-					
Kor02	0.0020	-				
Kor03	0.0076	0.0049	-			
Kor04	0.0136	0.0089	0.0104	-		
Kor05	0.0100	0.0079	0.0076	0.0036	-	
Kor06	0.0116	0.0082	0.0022	0.0148	0.0103	-

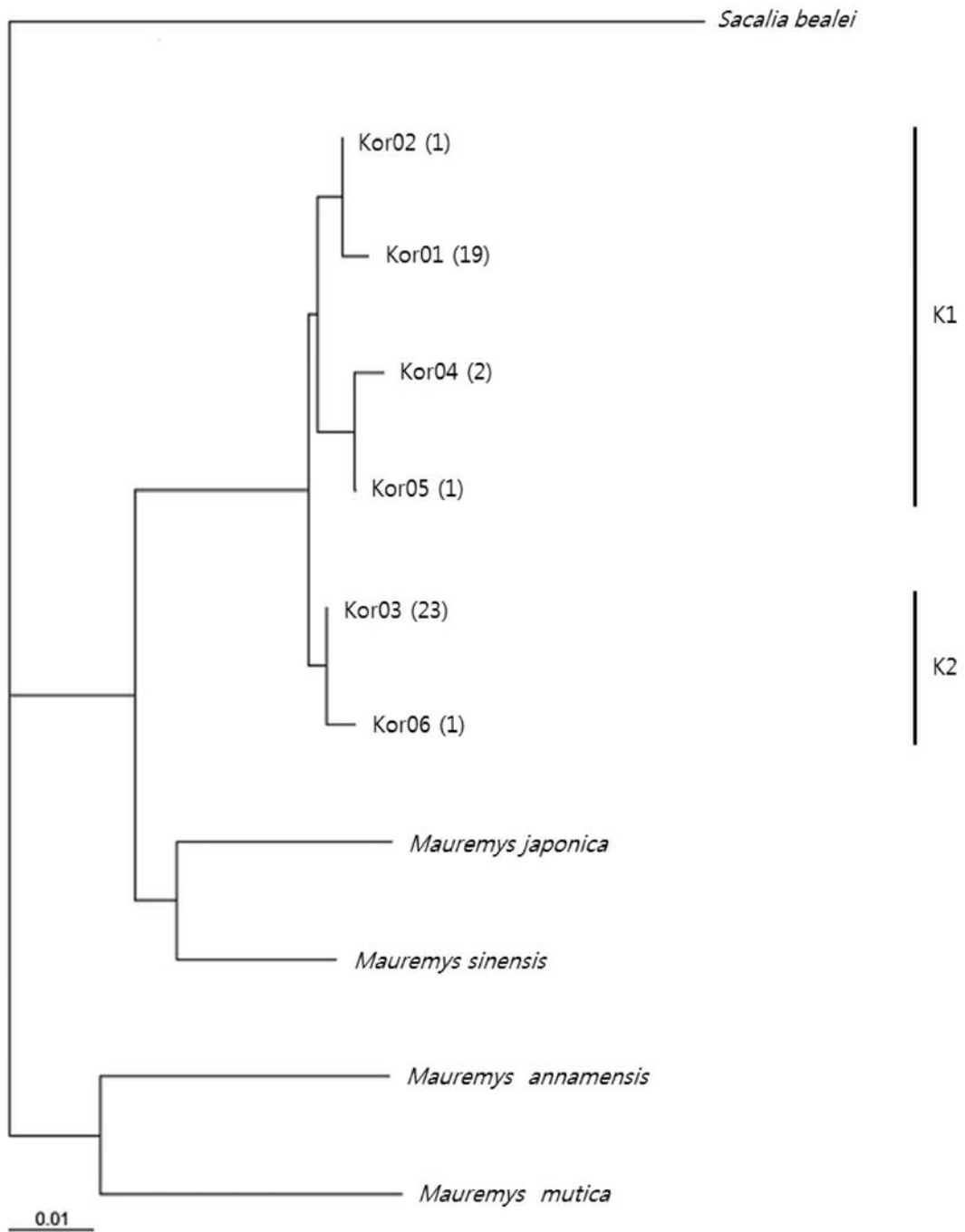


Figure 2. NJ tree based on genetic distances of *CYTb* haplotypes of *M. reevesii* in Republic of Korea and its related species. The *CYTb* sequence of *Sacalia bealei* was used for outgroup-rooting.

3. 중국 남생이 집단의 haplotype 유형과 계통 유연관계

중국 남생이 집단(n=40)에서 결정된 *CYTB* 서열의 haplotype을 분석한 결과, 총 6가지 haplotype(Chi01-Chi06)으로 구분되었고, 대부분 Chi01(n=30) haplotype에 포함되었다.

중국 남생이 집단의 유전적 거리지수는 Table 5에 제시하였다. Chi01과 Chi06, Chi02와 Chi03의 유전적 거리지수는 0.0010으로 가장 가깝게 나타났고, Chi03과 Chi05의 유전적 거리지수는 0.0119로 가장 멀었다.

Table 5. Genetic distances among 6 haplotypes based on *CYTB* gene sequences of *M. reevesii* in China

	Chi01	Chi02	Chi03	Chi04	Chi05	Chi06
Chi01	-					
Chi02	0.0069	-				
Chi03	0.0079	0.0010	-			
Chi04	0.0020	0.0089	0.0099	-		
Chi05	0.0040	0.0109	0.0119	0.0059	-	
Chi06	0.0010	0.0079	0.0089	0.0030	0.0030	-

유전적 거리지수를 바탕으로 한국 남생이 집단의 계통 유연관계를 NJ tree로 나타내었다(Figure 3). 남생이과에 속하는 *Sacalia bealei*를 outgroup으로 선정하였다. NJ tree 분지 양상에서, 중국 남생이 집단의 6개의 haplotype들은 Chi01, Chi04, Chi05, Chi06을 포함하는 C1 cluster와 Chi02, Chi03을 포함하는 C2 cluster로 구분되었으나, 전체적으로 계통수 상에서 모두 단계통적인 양상을 보였다.

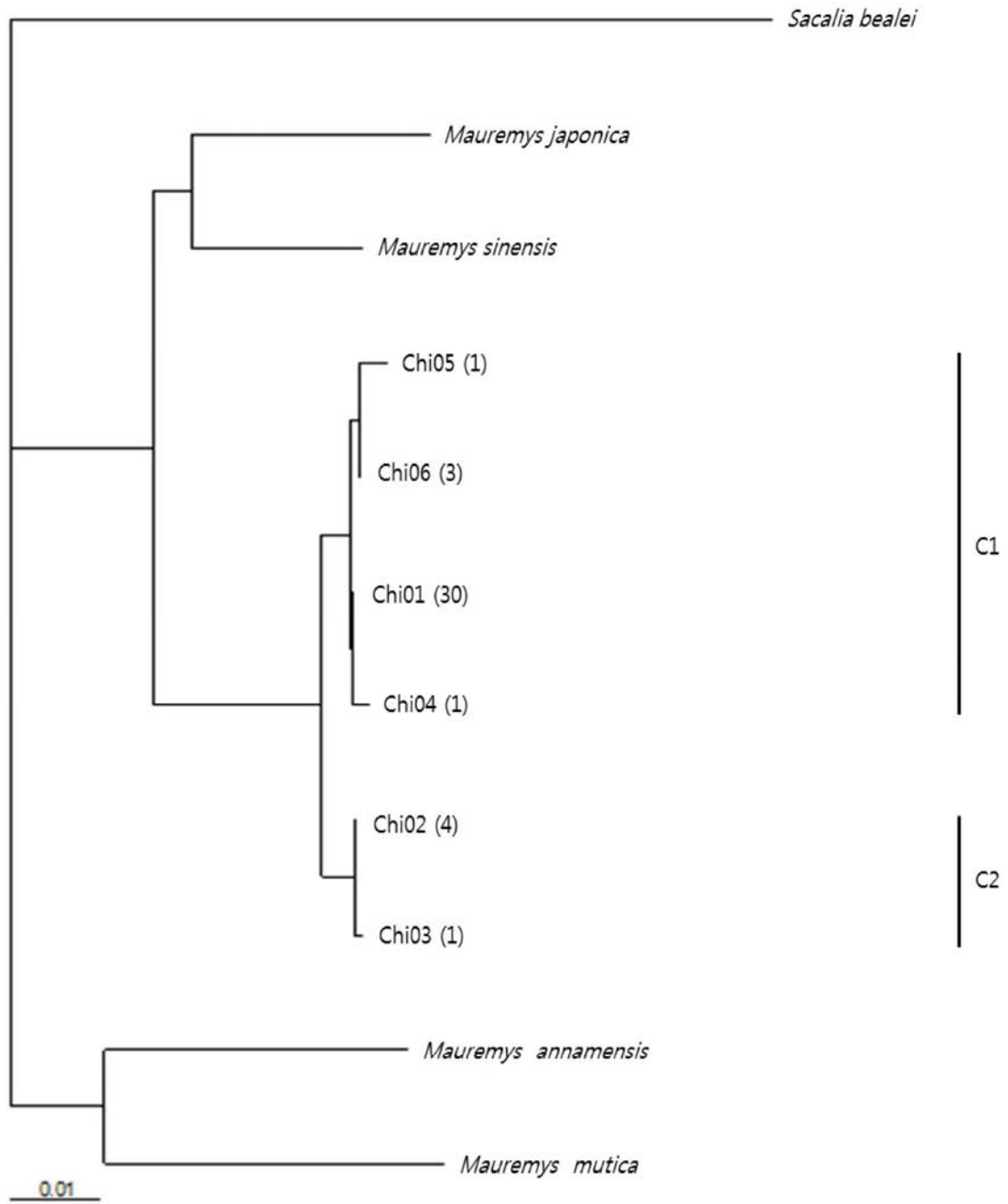


Figure 3. NJ tree based on genetic distances of *CYTB* haplotypes of *M. reevesii* in China and its related species. The *CYTB* sequence of *Sacalia bealei* was used for outgroup-rooting.

4. 한국-중국 남생이 집단의 haplotype 유형과 계통 유연관계

한국과 중국 남생이 집단에서 결정된 *CYTB* 서열 전체(n=87)에 대한 haplotype을 분석하였다. *CYTB* haplotype은 총 7가지 KChi01-KChi07로 구분되었고, KChi01(n=53)과 KChi03(n=23) haplotype이 높은 빈도를 나타내었다. 3개의 한국 남생이-특이적 haplotype(KChi02, KChi03, KChi07)과 1개의 중국 남생이-특이적 haplotype(KChi04)이 확인되었다. 한국 남생이 집단의 haplotype 분포에서 Kor01과 Kor03에 포함되었던 서열들은 각각 KChi01과 KChi03에 모두 포함되는 것으로 확인되었고, 중국 남생이 집단의 haplotype 분포에서 Chi01에 포함되었던 서열들은 KChi01에 모두 포함되었다.

한국과 중국 남생이 집단의 유전적 거리지수는 Table 6에 제시하였다. 가장 가까운 유전적 거리지수는 0.0010으로 KChi01과 KChi02, KChi05와 KChi06에서 나타났고, 가장 먼 유전적 거리지수는 0.0469로 KChi01과 KChi07에서 나타났다.

한국과 중국 남생이 집단의 계통 유연관계는 남생이과에 속하는 *Sacalia bealei*를 outgroup으로 선정하여 NJ tree로 나타내었다(Figure 4). NJ tree 분지양상에서, 한국-중국 남생이 집단의 7개의 haplotype들은 KChi01, KChi02, KChi04, KChi05, KChi06을 포함하는 KC1 cluster와 KChi03, KChi07을 포함하는 KC2 cluster로 구분되었으나, 전체적으로 계통수 상에서 모두 단계통적인 양상을 보였다.

Table 6. Genetic distances among 7 haplotypes based on *CYTB* gene sequences of *M. reevesii* in China and Republic of Korea

	KChi01	KChi02	KChi03	KChi04	KChi05	KChi06	KChi07
KChi01	-						
KChi02	0.0010	-					
KChi03	0.0113	0.0049	-				
KChi04	0.0020	0.0030	0.0059	-			
KChi05	0.0069	0.0079	0.0069	0.0089	-		
KChi06	0.0079	0.0089	0.0079	0.0099	0.0010	-	
KChi07	0.0469	0.0082	0.0033	0.0093	0.0106	0.0118	-

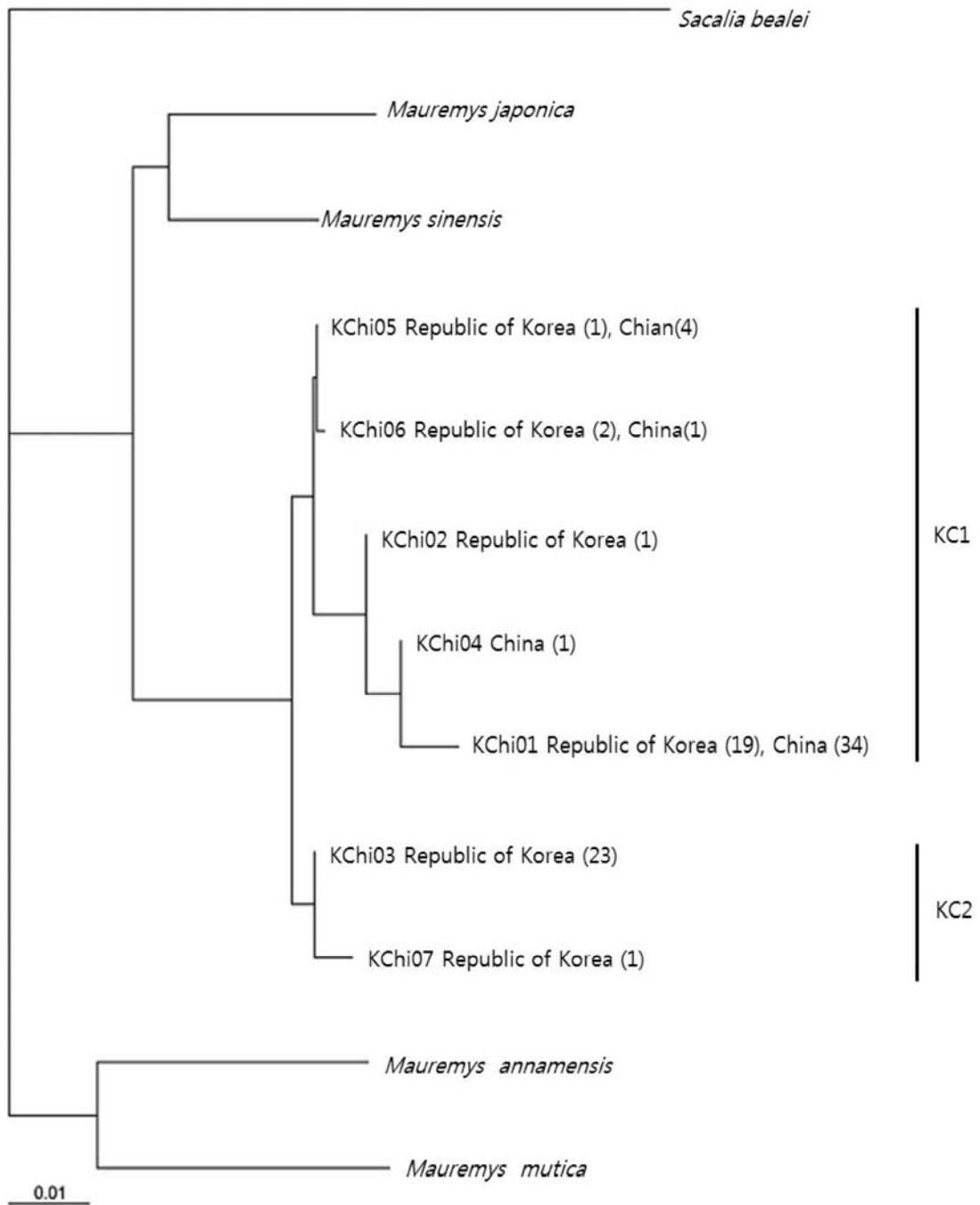


Figure 4. NJ tree based on genetic distances of *CYTb* haplotypes of *M. reevesii* in China and Republic of Korea between its related species. The *CYTb* sequence of *Sacalia bealei* was used for outgroup-rooting.

5. 동아시아 남생이 집단의 haplotype 유형과 지역적 분포

기존에 동아시아 지역에서 보고된 남생이의 *CYTB* 서열들과 본 연구에서 결정된 서열들을 모두 합하여 총 226개 서열의 haplotype 분포와 계통 유연관계 분석을 수행하였다. 동아시아 남생이 *CYTB* 유전자 서열 전체는 총 6가지 haplotype(Hap01-Hap06)으로 구분되었다(Table 7). 발견된 haplotype 중에서 Hap03은 128개의 서열(56.6%)을 포함하고 있었다. 이들 중 대부분은 한국(n=24)과 일본(n=103) 집단에서 유래된 것으로 확인되었고, 이 외에도 대만 남생이 서열 1개가 발견되었으나, 중국 집단의 *CYTB* 서열은 전혀 발견되지 않았다.

Table 7. Distribution of *CYTB* haplotypes of *M. reevesii* in East Asia

Haplotype	Country				Total
	Republic of Korea	China	Japan	Taiwan	
Hap01	20 (42.6%)	34 (85.0%)	28 (20.9%)	3 (60.0%)	85
Hap02		1 (2.5%)			1
Hap03	24 (51.1%)		103 (76.9%)	1 (20.0%)	128
Hap04	2 (4.2%)	1 (2.5%)		1 (20.0%)	4
Hap05	1 (2.1%)	4 (10.0%)	2 (1.5%)		7
Hap06			1 (0.7%)		1
Total	47	40	134	5	226

국가별 haplotype의 분포를 살펴보면, 한국, 중국, 일본의 남생이 집단에서 각각 4개의 haplotype이 있었고, 대만 남생이 집단에서는 3개의 haplotype이 발견되었다. 한국-중국 남생이 집단의 *CYTB* 유전자 서열의 haplotype 중에서 KChi01과 KChi03의 서열들은 동아시아 전체에서 발견된 haplotype 중에서는 각각 Hap01과 Hap03에서 발견되었다. 동아시아 남생이 집단의 전체 6개의 haplotype 중에서 일본 남생이 집단은 Hap01, Hap03, Hap05, Hap06으로 구분되었다. Hap01은 28개, Hap05는 2개, Hap06은 1개의 *CYTB* 서열을 포함하였고,

Hap03은 103개의 서열(76.9%)을 포함하여 가장 높은 빈도를 보였다.

중국 남생이 집단은 Hap01, Hap02, Hap04, Hap05로 구분되었으며, Hap01에서는 34개의 서열(85.0%)로, 중국 남생이 집단 중에서 가장 많은 서열들이 포함되었다. Hap02와 Hap04에서는 각각 1개의 서열이 있었고, Hap05에서는 4개의 *CYT B* 서열들이 포함되는 것으로 나타났다.

한국 남생이 집단은 Hap01, Hap03, Hap04, Hap05로 구분되었다. Hap01에서는 20개, Hap03에서는 24개, Hap04에서는 2개, Hap05에서는 1개의 *CYT B* 서열이 포함되었다. 분석에 이용한 한국 남생이 집단의 *CYT B* 서열 총 47개 중에서 24개의 서열이 Hap03에 포함되어 있어 51.1%로 높은 빈도를 보였다.

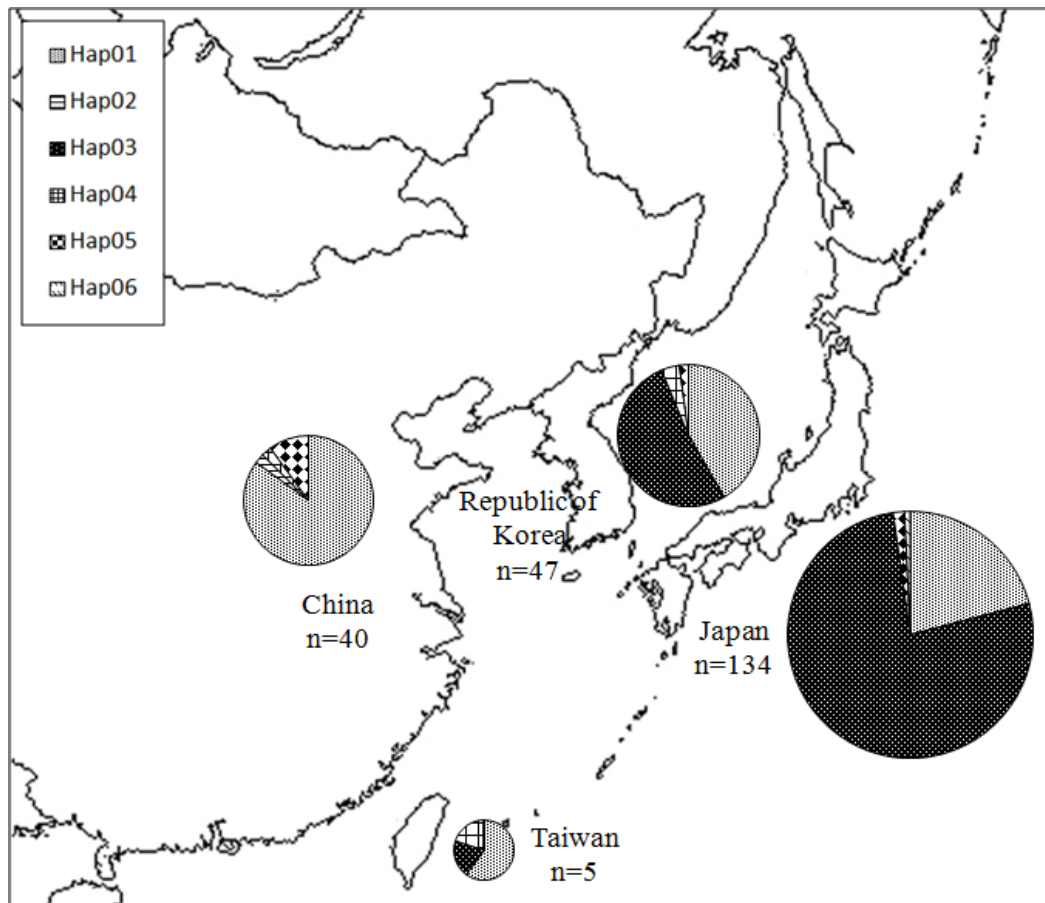


Figure 5. Biogeographical distribution of *CYT B* haplotypes of *M. reevesii* in East Asia.

Figure 5는 동아시아 남생이 집단 mtDNA *CYTB* 유전자 서열의 haplotype의 지역별 분포를 나타낸 것이다. Hap01은 한국, 중국, 일본, 대만 등 동아시아 4개국 남생이 집단 모두에서 발견되었다. 한국과 일본의 남생이들은 Hap03이 가장 많은 빈도를 나타내었고, 중국과 대만에서는 Hap01이 가장 많이 발견되었다. Hap02는 중국 집단에서만 Hap06은 일본에서만 발견되었다. 한국 남생이 집단의 *CYTB* 서열만 포함하는 haplotype은 없는 것으로 확인되었다. Hap05는 대만을 제외한 한국, 중국, 일본의 서열을 포함하였고, Hap04는 일본을 제외한 한국, 중국, 대만의 서열을 포함하고 있는 것으로 나타났다.

Table 8. Nucleotide substitution in *CYTB* gene sequences among 6 haplotypes

Haplotype	No. of substitution	Nucleotide position in <i>CYTB</i> sequence													
		1	2	2	2	2	3	5	5	5	7	9	9	9	9
		6	0	0	4	8	9	5	5	6	1	4	4	7	8
		5	2	6	6	1	6	2	8	7	8	0	7	3	4
Hap01	0	C	G	A	T	G	T	T	C	T	T	C	C	T	T
Hap02	1	.	.	G
Hap03	6	C	.	T	.	C	G	G	.	C
Hap04	8	T	A	.	C	.	C	C	.	C	C	.	.	C	.
Hap05	7	T	.	.	C	.	C	C	.	C	C	.	.	C	.
Hap06	1	A

동아시아 남생이에서 확인된 6개의 haplotype에 해당하는 *CYTB* 유전자 서열들을 다중정렬한 결과에서 검출된 다형 염기서열들은 Table 8에 제시하였다. 염기서열의 다형성은 14개 부위에서 염기치환 현상이 확인되었다. 단 1개의 염기치환이 관찰된 haplotype은 Hap02와 Hap06으로, Hap02는 206번째 염기서열에서 G로 염기치환이 나타났고, Hap06은 281번째 자리에서 A로 염기치환이 일어난 것으로 나타났다. Hap03, Hap04, Hap05는 각각 6개, 8개, 7개의 자리에서 염기치환이 관찰되었다.

6. 동아시아 남생이 집단의 계통 유연관계

동아시아 지역에 분포하는 남생이 집단들의 계통 유연관계를 확인하기 위하여 *CYTB* 서열들 간의 유전적 거리지수를 분석한 결과는 Table 9에 제시하였다. Hap04와 Hap05에 포함되는 서열들 사이의 유전적 거리지수는 0.0009로 가장 근연으로 나타났고, Hap03과 Hap04의 유전적 거리지수가 0.0212로 가장 먼 유연관계를 나타내었다. Hap01과 Hap03의 유전적 거리지수는 0.0060으로, 이는 한국 남생이 집단의 haplotype 내에서 비교한 Kor01과 Kor03의 유전적 거리지수 (0.0076)보다 가깝게 나타났다.

동아시아 남생이 집단에서 발견된 mtDNA *CYTB* 서열의 haplotype들과 근연종의 *CYTB* 서열들 간의 NJ tree를 작성하여 Figure 6에 제시하였다. 남생이과에 속하는 *Sacalia bealei*를 outgroup으로 선정하였다. NJ tree 분지 양상에서, 동아시아 남생이 집단의 6개의 haplotype들은 Hap04와 Hap05를 포함하는 A1 cluster와 Hap01, Hap02, Hap03, Hap06을 포함하는 A2 cluster로 구분되었다. A2 cluster는 동아시아 남생이 집단의 대부분의 서열(n=215)을 포함하여 95.1%의 높은 빈도를 보였다. 동아시아 남생이 집단은 전체적으로 하나의 그룹을 형성하면서 계통수 상에서 모두 단계통적인 양상을 보였다.

Table 9. Genetic distances among 6 haplotypes based on *CYTB* gene sequences of *M. reevesii* in East Asia

	Hap01	Hap02	Hap03	Hap04	Hap05	Hap06
Hap01	-					
Hap02	0.0010	-				
Hap03	0.0060	0.0079	-			
Hap04	0.0080	0.0099	0.0212	-		
Hap05	0.0070	0.0089	0.0089	0.0009	-	
Hap06	0.0010	0.0030	0.0175	0.0109	0.0080	-

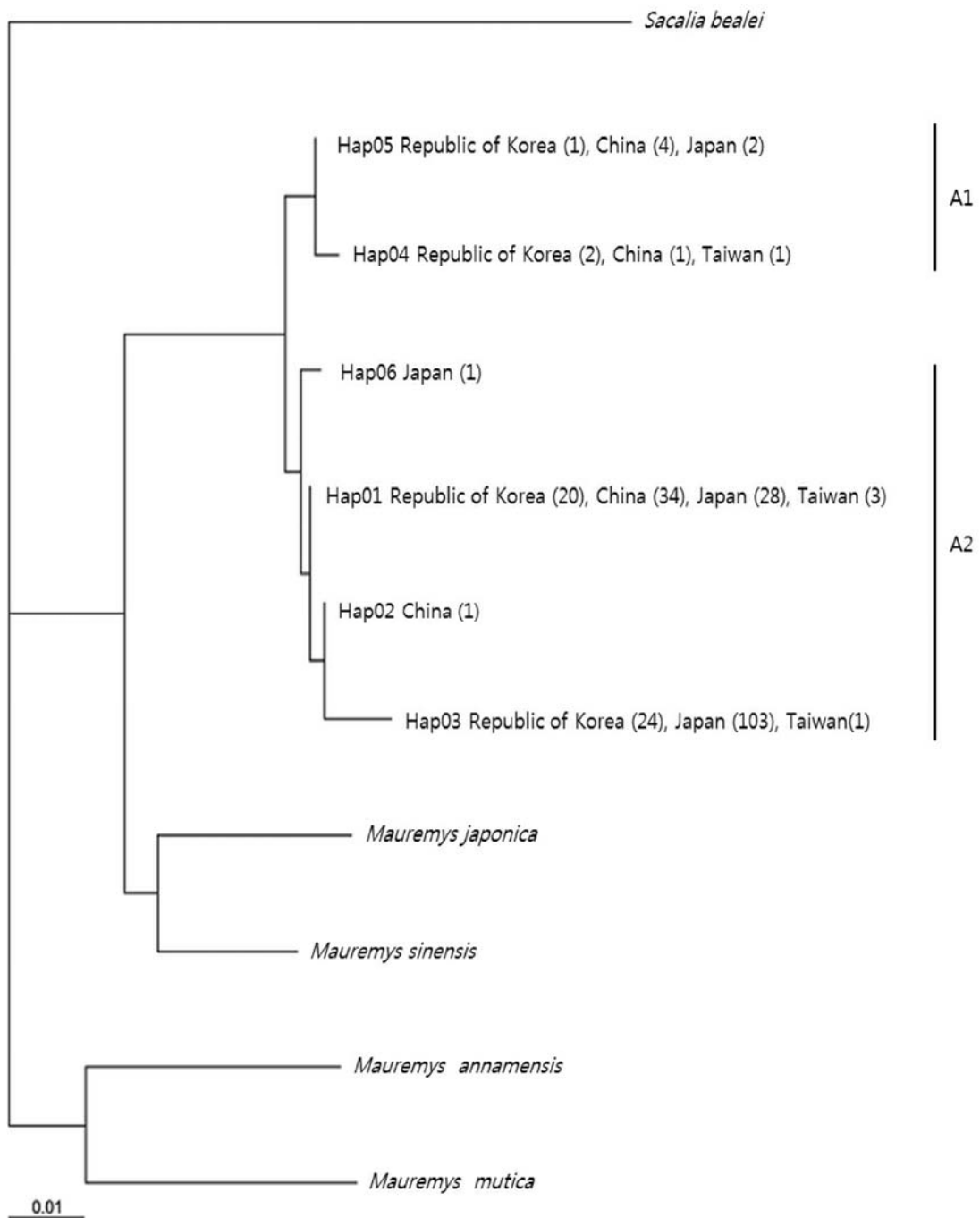


Figure 6. NJ tree based on genetic distances of *CYTB* haplotypes of *M. reevesii* in East Asia and its related species. The *CYTB* sequence of *Sacalia bealei* was used for outgroup-rooting.

IV. 고찰

1. 한국 남생이 집단의 유전적 모계 구조

한국에 서식하고 있는 남생이의 증식·복원 연구에 의하면 남생이는 중국남부에서 기원한 종으로 한반도에 오랜 기간 동안 서식해 왔으며, 이동수단의 발달로 단시간에 많은 개체들이 종교행사용, 애완용, 약재용을 목적으로 중국에서 수입되었다(국립공원관리공단, 2013). 한국 남생이 집단의 경우, mtDNA *CYTB* 유전자 서열이 6개의 haplotype으로 구분되어 모계가 다수의 선조집단에서 유래되었을 것으로 판단된다. 또한, NJ tree(Figure 2) 분지 양상에서 K1, K2 cluster로 구분되는 양상은 중국이 기원으로 알려진 남생이의 이주역사에서 적어도 2차례 이상 한반도로 유입된 것으로 생각된다.

2. 중국 남생이 집단의 유전적 모계 구조

중국 남생이 집단의 *CYTB* 서열들은 6개의 haplotype으로 구분되어, 여러 개의 모계 선조에서 진화한 집단으로 추정된다. 남생이 집단의 유래 및 계통유전학적 분석에 대한 Suzuki *et al.*(2011)의 연구에서는 중국 남생이 서열을 분석에 이용하였고, 동일한 서열이 확인되어 그 집단의 남생이는 중국 남생이에서 기원하였다고 보고하였다. 본 연구의 분석에서도 동일한 중국 남생이 서열을 이용하였고, 이 서열은 중국 남생이 집단의 haplotype 중에서 빈도가 가장 높게 나타난 Chi01(n=30)에 포함되어 Chi01이 중국 남생이 집단에서 주를 이루는 모계일 것으로 추측된다. NJ tree(Figure 3) 분지 양상에서 C1, C2 cluster로 구분되는 양상은 크게는 두개의 모계유전의 그룹을 형성하고 있는 것으로 보이며, Chi04에 포함되었던 서열은 C1 cluster의 Chi01에서 파생된 서열인 것으로 판단된다.

3. 동아시아 남생이 집단의 관계

남생이를 포함하여 많은 수의 거북류가 종교적 방생, 애완용, 식용, 약재용 등의 목적으로 다양한 경로를 통해서 중국으로부터 인접 국가로 유입되고 있다고 보고되었다(Cheung and Dedgeon, 2006; Fong and Chen, 2010). 대만의 경우 남생이는 상업적으로 가치가 높아 많은 거래가 이루어지고 있고, 밀수와 같은 불법적인 국경 무역으로 인해 개체군 생존에 위협을 받고 있는 종으로 보고하였다(Chen and Lue, 2010). 일본의 경우 18세기 후반에 한국에서 남생이가 유입되어 일본 서부에 분포하였으며 점차적으로 동쪽으로 확장하여 현재 후쿠오카와 혼슈 지방에 걸쳐 한국과 동일한 남생이 집단이 분포하는 것으로 보고되었고(Suzuki *et al.*, 2011), 중국의 문화혁명 이후 1970년대부터 본격적으로 중국 남생이가 유입된 것으로 알려져 있다(국립생물자원관, 2012). 동아시아 남생이 집단(n=226)의 총 6개의 haplotype 중에서 Hap01에 포함된 한국 남생이 집단(n=20), 일본 남생이 집단(n=28), 대만 남생이 집단(n=3)은 동일 haplotype에 분포하는 중국 남생이 집단과 같은 계통인 것으로 판단되며, 최근 중국에서 유입된 남생이일 가능성을 배제할 수는 없다. 또한, Hap01의 분포에서 중국 남생이 집단이 가장 높게 나타나 동아시아 남생이 집단의 선조로 추정된다. 왜냐하면 이 분포는 중국과 가까운 타이완, 한국, 일본 순으로 낮아지는 지리적 경사(geographic decline)를 보이는 것으로 보아, 오래 전에 남생이의 이동경로를 말해주는 단서가 될 수 있기 때문이다.

일본 남생이 집단과 인근 국가의 남생이 집단의 *CYTB* 유전자 서열과 control region을 분석한 Suzuki *et al.*(2011)의 연구에서는, 일본 남생이 집단의 *CYTB* 서열이 한국, 중국, 대만의 남생이 집단과 비슷하거나 동일하게 나타나는 것을 확인하였다. 또한 유전적 거리지수를 분석한 결과, 일본과 한국은 0.05%-0.22%, 일본과 대만은 0.00%-0.05%, 일본과 중국은 0.00%-0.10%로 유전적 거리지수가 가깝게 나타나 일본 남생이 집단은 일본 고유종이 아니라 한국, 중국, 대만 등 인접 국가에서 다양한 목적으로 인위적으로 유입된 개체라 보고하였다. 본 연구의 Hap01과 Hap03에서 한국과 일본 남생이 집단의 비중이 크고, 유전적 거리지수(Table 9)가 비교적 낮게 나타났으며, NJ tree(Figure 6) 분지 양상도 가깝게

나타났다. 이상의 결과들은 일본 남생이 집단이 한국 남생이 집단과 모계적으로 근연의 관계를 보이며, 일본 남생이 집단의 일부는 한국 남생이 집단을 모계로 하여 유입되었을 것으로 추정된다.

남생이의 mtDNA를 이용하여 거북목 내에서의 계통 유연관계를 분석하여 중국과 한국의 남생이가 동일한 집단을 형성하고 있다고 보고한 연구(Shin, 2008)는 국가별 남생이 집단들을 비교한 것이 아니라 거북목 수준의 종 간 비교에 따른 결과에서 추정된 가설이다. 기존에 한반도에 살고 있던 한국 남생이 집단과 중국 본토에서 수입한 중국 남생이 집단은 동일한 종이며, 생물학적 지위(niche)도 동일하지만, 계통 분류상 두개의 그룹(중국과 한국)으로 명확히 나누어진다고 보고되었다(국립공원관리공단, 2013). 한국-중국 남생이 집단의 haplotype 분석 결과, Figure 4에서 KC2 cluster로 구분되었던 KChi03(n=23), KChi07(n=1)은 한국 남생이 집단만을 포함하고 있어, 과거 지질시대에 대륙이 나뉘면서 분리되어 진화한 그룹으로 추측된다. 20세기 이후 언제부터 중국산 남생이들이 수입되었는지 확인되진 않았으나, 남생이가 1970년대 또는 경제 성장기인 1980년대부터 방사용, 또는 애완용으로 국내에 유입되었을 것이라는 보고(국립생물자원관, 2012)는 KC1 cluster에서 발견되는 한국-중국 남생이들이 공통으로 출현하는 양상에 대한 해석에 실마리가 될 수 있을 것이다. 즉, 중국으로부터 남생이가 애완용, 식용 등의 목적으로 다양한 경로를 통해서 한국으로 도입되었고, 이들 중 일부가 한국의 자연생태계로 유입된 후 다시 포획되어 분석된 결과라 하겠다. 이에 따라 한국 고유집단과 중국에서 유입된 남생이들이 동일한 haplotype에서 검출되는 것으로 생각된다.

국내에 서식하는 남생이를 분석한 결과 크게 2가지 형으로, 한국 남생이와 중국 남생이로 구분하였다. 한국 남생이는 중국 남생이에 비하여 체형이 길고, 어두운 흑갈색을 띠며, 복갑판 사이의 선은 회색 빛을 띠는 경우가 많은 반면에 중국 남생이는 체형이 둥글고, 적갈색을 띠며 복갑판 사이의 선이 밝은 노란색을 띠는 경우가 많았으며, 동일한 장소에 서식하고 있는 남생이 개체의 유전자 분석 결과 한국 개체와 중국 개체가 모두 확인되어, 유전자 오염의 가능성이 매우 높다고 하였다(국립생물자원관, 2012). 한국 남생이와 중국 남생이의 혈액을 이용하여 mtDNA haplotype을 분석한 Eo(2006)의 연구에서는 한국과 중국 남생이 집단

이 11개의 haplotype들로 구분되었고, 이 중 6개의 한국 남생이-특이적 haplotype과 2개의 중국 남생이-특이적 haplotype이 발견되었으며, 유전적 거리 지수가 0.001-0.009로 나타나 유의성이 있는 차이를 발견할 수 없었다고 보고하였다. 한국-중국 집단 분석의 총 7개의 haplotype에서 3개의 한국 남생이-특이적 haplotype과 1개의 중국 남생이-특이적 haplotype이 발견되었다(Figure 4). Eo(2006)의 연구와 본 연구에서 발견된 haplotype 수의 차이는 연구에 이용한 서열 수의 차이에 의한 결과로 생각된다. 또한 동아시아 남생이 집단의 6개의 haplotype 중에서 한국 남생이-특이적 haplotype은 발견되지 않았지만, *CYTB* 서열의 대부분이 Hap01(n=85)과 Hap03(n=128)에 포함되었고, 아울러 Hap03은 중국 남생이에서는 전혀 나타나지 않았으며 그 분포는 대만(20.0%), 한국(51.0%), 일본(79.9%) 순으로 높아지고 있다(Table 7). 이는 단언할 수 없으나 중국 남생이와는 기원이 다른 선조에서 분지되어 오래 전에 각기 진화해 온 것으로 추정된다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, Hap03은 한국 남생이 고유의 haplotype인 것으로 판단되며, KC2 cluster와 Hap03을 기준으로 한국과 중국 남생이 집단을 구분할 수 있을 것이라 생각된다.

동아시아 남생이 집단의 haplotype의 분포를 살펴보면, 전체적으로 국가별 남생이들이 서로 혼재되는 경향을 보이지만, 각 국가별로 다수의 서열을 포함하는 haplotype은 서로 구분되는 양상을 나타내었고, 남생이 집단의 6개의 haplotype들은 계통수 상에서 모두 단계통적인 양상을 보이는 것으로 보아, 한국과 중국을 포함한 일본, 대만 등의 동아시아 남생이 집단은 크게는 하나의 선조집단에서 진화한 것으로 보이며, 초기의 확장 이후에도 추가적인 이동과 지리적인 격리 이후 지역 내 진화과정을 거친 것으로 추정된다. 결과적으로 현재 한국의 남생이 집단은 우리나라 고유집단으로 추정되는 것과 외부에서 유입된 것으로 추정되는 집단이 공존하고 있다고 판단된다.

한국을 비롯한 동아시아 남생이 집단의 mtDNA *CYTB* 유전자 서열을 토대로 유전적 다양성 및 계통 유연관계를 분석한 결과 동아시아 남생이 집단은 진화과정을 통해 유전적으로 모계가 다양한 개체가 서식하고 있다고 판단된다. 비록 분석에 이용한 서열이 일부 지역에 편중되어 있다는 한계가 있지만, 이번 연구에서

분석한 유전자 서열과 유전적 다양성 및 계통 유연관계는 향후 남생이의 보존 및 유전적 특성을 이용한 모계 분석 등에 유용한 정보를 제공할 것이라 생각된다. 다양한 서식지에서 수집된 충분한 수의 남생이를 대상으로 mtDNA control region이나 *cytochrome c oxidase I subunit(CO I)* 등 다른 유전자 서열의 정보와 핵 DNA MS marker 등을 이용한 추가적인 분석이 이루어진다면, 한국, 중국, 대만, 일본 등 동아시아 남생이의 모계유전 및 계통 유연관계를 보다 명확히 해석할 수 있을 것으로 기대된다.

V. 참고문헌

- 국립공원관리공단. 2013. 남생이 증식·복원 연구. 국립공원관리공단, 86pp.
- 국립생물자원관. 2011a. 국가 생물종 목록집 「척추동물」. 국립생물자원관, pp. 201-203.
- 국립생물자원관. 2011b. 한국의 멸종위기 야생동·식물 적색자료집 양서류·파충류. 국립생물자원관, 125pp.
- 국립생물자원관. 2012. 남생이(*Chinemys reevesii*) 증식·복원 연구 III. 국립생물자원관, 151pp.
- 국립환경과학원. 2011. 한국 양서류·파충류 생태도감. 국립환경과학원, pp. 236-239.
- 김수련, 이지현, 송재영, 장민호, 성현찬, 조동길. 2013. 남생이 서식처 복원을 위한 서식처 모형 연구. 한국환경복원기술학회지, 16(2): 115-125.
- 문화재청. 2006. 2006 문화재연감. 문화재청, pp. 51-59.
- 문화재청. 2010. 천연기념물 동물(종) 지정 검토 및 효율적 관리방안. 문화재청, 357pp.
- 박문성, 임현태, 오기철, 문영록, 김종갑, 전진태. 2011. 경남지역 수달(*Lutra lutra*)의 mitochondrial DNA D-loop지역과 microsatellite marker를 이용한 계통유전학적 유연관계 분석. 생명과학회지, 21(3): 385-392.
- 송재영. 2007. 한국산 파충류의 현황과 분포. 한국환경생물학회지, 25(2): 124-138.

- 송재영, 신정아, 장민호, 윤병수, 정규희. 2004. 미토콘드리아 16S rDNA 부분 염기서열을 이용한 한국산 개구리 속(Amphibia: Ranidae)의 종간, 종내 변이에 대한 연구. 한국환경생물학회지, 22(1): 66-74.
- 송재영, 윤병수, 오홍식, 정규희. 2003. 미토콘드리아 16S rDNA를 이용한 아무르산 개구리(양서강: 개구리과)의 유전적 다양성. 한국환경생물학회지, 21(1): 5-51.
- 오홍식, 홍창의. 2007. 제주도에 이입된 황소개구리(*Rana catesbeiana*)와 붉은귀거북(*Trachemys scripta elegans*)의 서식실태 및 관리방안. 한국환경생태학회지, 21(4): 311-317.
- 이지영, 심재한, 정인실. 2005. 미토콘드리아 ND1/tRNA 유전자 서열 비교를 통한 국내 서식 황소개구리의 유전적 다양성 조사. 한국생태학회지, 28(6): 375-382.
- 조신일. 2014. 천연기념물 제435호, 멸종위기종 II급 한국산 남생이(*Mauremys reevesii* Chen & Lue 2010)의 생태학적 복원을 위한 연구. 서울여자대학교 대학원 박사학위 논문, 119pp.
- 조인철, 한상현, 최유림, 고문석, 이정규, 이준현, 전진태. 2004. 돼지 *Duroc* 품종에서 미토콘드리아 유전체 서열의 특성과 집단 유전적 다양성. 동물자원지, 46(6): 937-946.
- 한상현, 이영돈, 백혜자, 오홍식, 노충환. 2014. 미토콘드리아 *COI* 유전자 서열의 다형성과 반수체형에 근거한 한국산 붉바리(*Epinephelus akaara*)의 유전적 구조와 계통 유연관계. 생명과학회지, 24(6): 626-632.
- 환경부. 2006. 멸종위기야생동·식물 증식·복원 종합계획(2006~2015). 환경부, 183pp.

- Barth, D., D. Bernhard, D. Guicking, M. Stock and U. Fritz. 2002. Is *Chinemys megalocephala* FANG, 1934 a valid species? New insights based on mitochondrial DNA sequence data. *Salamandra*, Rheinbach, 38(4): 213-232.
- Bickham, J. W., J. B. Iverson, J. F. Parham, H. D. Philippen, A. G. J. Rhodin, H. B. Shaffer, P. Q. Spinks and P. P. van Dijk. 2007. An annotated list of modern turtle terminal taxa with comments on areas of taxonomic instability and recent change. *Chelonian Research Monographs*, 4: 173-199.
- Birky, C. W., P. Fuerst and T. Maruyama. 1989. Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: Equilibrium expectation, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison of nuclear genes. *Genetics*, 121: 613-627.
- Brown, W. M., M. Jr. George and A. C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76: 1967-1971.
- Chang, M. H., J. Y. Song and K. S. Koo. 2012. The status of distribution for native freshwater turtles in Korea, with remarks on taxonomic position. *Korean Journal of Environment and Biology*, 30(2): 151-155.
- Chen, T. H. and K. Y. Lue. 2010. Population status and distribution of freshwater turtles in Taiwan. *Fauna & Flora International*, *Oryx*, 44: 261-266.
- Chen, T. H., H. C. Lin and H. C. Chang. 2000. Current status and utilization of the chelonians in Taiwan. *Chelonian Research Monographs*, 2: 45-51.

- Cheung, S. M. and D. Dudgeon. 2006. Quantifying the Asian turtle crisis: market surveys in southern China, 2000–2003. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 16: 751–770.
- CITES. 2015. Appendices I, II and III. <www.cites.org/eng/app/appendices.php>.
- Clayton, D. A. 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, 28: 693–705.
- Eo, K. Y. 2006. Studies on morphology, hematology, and genetic diversity of Korean Reeve's turtle (*Chinemys reevesii*). Master thesis. Konkuk University, 80pp.
- Feldman, C. R. and J. F. Parham. 2004. Molecular systematics of Old World stripe-necked turtles (Testudines: *Mauremys*). *Asiatic Herpetological Research*, 10: 28–37.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) ver. 3.572, Computer program distributed by the author, University of Washington, Seattle, WA.
- Fong, J. J. and T. H. Chen. 2010. DNA evidence for the hybridization of wild turtles in Taiwan: possible genetic pollution from trade animals. *Conservation Genetics*, 11: 2061–2066.
- Fujii, R., H. Ota and M. Toda. 2014. Genetic and morphological assessments of hybridization between two non-native Geoemydid turtles, *Mauremys reevesii* and *Mauremys mutica*, in Northcentral Japan. *Chelonian Conservation and Biology*, 13(2): 191–201.

- Gray, J. E. 1831. Synopsis Reptilium: or short descriptions of the species of reptiles. Part I.-Cataphracta. Tortoises, crocodiles, and enaliosaurians. Treuttel, Wurtz, and Company, London, 85pp.
- Han, S. H., M. S. Ko, H. Y. Jeong, S. S. Lee, H. S. Oh and I. C. Cho. 2011. Maternal origins of the Jeju native pig inferred from PCR-RFLP haplotypes and molecular phylogeny for mitochondrial DNA *CYTB* gene sequences. *Journal of Life Science*, 21(3): 341-348.
- Harris, D. J., E. N. Arnold and R. H. Thomas. 1998. Relationships of lacertid lizards (Reptilia: Lacertidae) estimated from mitochondrial DNA sequences and morphology. *Proceeding of the Royal Society B*, 265: 1939-1948.
- Honda, M., Y. Yasukawa and H. Ota. 2002. Phylogeny of the Eurasian freshwater turtles of the genus *Mauremys* Gray 1869 (Testudines), with special references to a close affinity of *Mauremys japonica* with *Chinemys reevesii*. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 40: 195-200.
- IUCN. 2015. *Mauremys reevesii*. The IUCN red list of threatened species. version 2015.2. <www.iucnredlist.org>.
- Iverson, J. B., R. M. Brown, T. S. Akre, T. J. Near, M. Le, R. C. Thomson and D. E. Starkey. 2007. In search of the tree of life for turtles. *Chelonian Research Monographs*, 4: 85-106.
- Kaiser, H., V. L. Carvalho, P. Freed and M. O'Shea. 2010. A widely traveled turtle: *Mauremys reevesii* (Testudines: Geoemydidae) in Timor-Leste. *Herpetology Notes*, 3: 93-96.

- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparable studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Lee, H. J. 2010. Distribution and characteristics of Reeve's Turtle (*Chinemys reevesii*) populations in Jeolla-do and Gyeongsangnam-do. Master thesis. Kangwon National University, 48pp.
- Lee, J. C. I., L. C. Tsai, S. P. Liao, A. Linacre and H. M. Hsieh. 2009. Species identification using the cytochrome b gene of commercial turtle shells. *Forensic Science International: Genetics*, 3: 67-73.
- Lee, J. E., D. E. Yang, Y. R. Kim, H. Lee, H. L. Lee, S. Y. Yang and H. Y. Lee. 1999. Genetic relationships of *Rana amurensis* based on mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Korean Journal of Biological Sciences*, 3: 303-309.
- Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451-1452.
- Lovich, J. E., C. H. Ernst and S. W. Gotte. 1985. Geographic variation in the Asiatic Turtle *Chinemys reevesii* (Gray) and the status of *Geoclemys grangeri* Schmidt. *Journal of Herpetology*, 19(2): 238-245.
- Oh, D. J., T. W. Kim, M. H. Chang, S. H. Han, H. S. Oh and S. J. Kim. 2011. Mitochondrial genome sequences of the striped field mice *Apodemus agrarius coreae* and *Apodemus agrarius chejuensis*. *Mitochondrial DNA*, 22(5-6): 165-167.

- Parham, J. F., J. R. Macey, T. J. Papenfuss, C. R. Feldman, O. Turkowan, R. Polymeni and J. Boore. 2006. The phylogeny of Mediterranean tortoises and their close relatives based on complete mitochondrial genome sequences from museum specimens. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38: 50–64.
- Prusak, B., B. Najbar, S. Mitrus, G. Gorecki, U. Rogalla, G. Grzybowski, A. Hryniewicz, R. Wroblewski, R. Bochen and T. Grzybowski. 2011. Distribution of mitochondrial haplotypes (*cytb*) in Polish populations of *Emys orbicularis* (L., 1758). *Biologia*, 66(5): 893–898.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4): 406–425.
- Shin, H. W. 2008. Complete mitochondrial genome of a Reeves's turtle *Mauremys reevesii* (Reptilia, Testudines, Geoemydidae). Master thesis. Kyungpook National University, 49pp.
- Suzuki, D., H. Ota, H. S. Oh and T. Hikida. 2011. Origin of Japanese populations of Reeves' pond turtle, *Mauremys reevesii* (Reptilia: Geomydidae), as inferred by a molecular approach. *Chelonian Conservation and Biology*, 10(2): 237 - 249.
- Suzuki, D., T. Yabe and T. Hikida. 2014. Hybridization between *Mauremys japonica* and *Mauremys reevesii* inferred by nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Journal of Herpetology*, 48(4): 445–454.

- 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 research*, 22: 4673-4680.
- van Dijk, P. P., J. B. Iverson, H. B. Shaffer, R. Bour and A. G. J. Rhodin. 2012. Turtles of the World, 2012 Update: Annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution, and conservation status. *Chelonian Research Monographs*, 5: 243-328.
- Xia, X., L. Wang, L. Nie, Z. Huang, Y. Jiang, W. Jing and L. Liu. 2011. Interspecific hybridization between *Mauremys reevesii* and *Mauremys sinensis*: Evidence from morphology and DNA sequence data. *African Journal of Biotechnology*, 10(35): 6716-6724.

<summary>

Phylogenetic Relationships based on the Polymorphism of Mitochondrial Cytochrome b Gene Sequences in *Mauremys reevesii* Population in Korea

Seon-Mi Park

Major in Biology Education, Graduate School of Education, Jeju National University

(Supervised by Professor Hong-Shik Oh)

This study was carried out to compare the maternal lineages of Reeve's Turtle (*Mauremys reevesii*) populations of China and Korea and to reveal a phylogenetic relationship using mitochondrial DNA (mtDNA) polymorphisms of cytochrome b (*CYTB*) gene sequences of East Asia. Genomic DNAs were extracted from the tail, plastron, blood and other tissues. The *CYTB* gene fragments were amplified using polymerase chain reaction (PCR) and their sequences were analyzed. As a result, it was found that the Korean Reeve's Turtle population could be classified into 6 haplotypes (Kor01-Kor06) and most of their *CYTB* sequences were included in Kor01 (n=19) and Kor03 (n=23). Reeve's Turtles of China were divided into 6 haplotypes (Chi01-Chi06), and 30 *CYTB* sequences were included in Chi01. Reeve's Turtles of China and Korea were grouped into 7 haplotypes (KChi01-KChi07) and most of their *CYTB* sequences were included in KChi01 (n=53) and KChi03 (n=23). On the other hand, *CYTB* sequences of Reeve's Turtles of East Asia were divided into 6 haplotypes (Hap01-Hap06) and Reeve's Turtle populations of Korea, China and Japan, 4 haplotypes were observed in each,

and 3 haplotypes in Reeve's Turtle population of Taiwan. Chinese Reeve's Turtles were found Hap01, Hap02, Hap04, and Hap05, and Hap01 was shown to have the highest frequency of 85.0% (n=34). Korean Reeve's Turtles were found in Hap01, Hap03, Hap04, and Hap05, and Hap03 was shown to have the highest frequency of 52.1% (n=24). It was also found that the genetic distances between *CYTB* sequences of Reeve's Turtles of East Asia was in a range of 0.0009–0.0212. Although there was no haplotype which includes only the *CYTB* sequence exclusive for Reeve's Turtles of Korea, since no *CYTB* sequence of Reeve's Turtles of China was found in Hap03, it would be possible that Reeve's Turtles of Korea categorized in Hap03 are separated from Reeve's Turtles of China. The haplotypes of Reeve's Turtles of East Asia were monophyletic, which indicated that they had been evolved from a single maternal ancestor group, but went through local evolution processes after geographical migration and isolation between Chinese Continent and Korean Peninsula. Therefore, to reveal the maternal inheritance and a phylogenetic relationship between Reeve's Turtles of Korea, China, Japan, Taiwan and any other East Asian countries, it would be necessary to study using the nuclear DNA microsatellite (MS) marker and others.