

고라니의 식이물 분석에 있어 Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis(PCR-DGGE)의 이용 가능성 연구¹

박지은² · 김백준³ · 이상돈^{4*}

A Study of Potential of Diet Analysis in the Korean Water Deer(*Hydropotes inermis argyropus*) using Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis(PCR-DGGE)¹

Ji-Eun Park², Baek-Jun Kim³, Sang-Don Lee^{4*}

요 약

이 연구의 목적은 고라니(*Hydropotes inermis argyropus*)의 위내용물을 대상으로 PCR-DGGE 방법을 이용하여 그 식이습성을 조사하는데 있다. 이 연구를 위해, 강원도 철원과 전라남도 동부지역 등에서 자연사 혹은 로드킬에 의해 죽은 고라니 사체의 위에서 식이물 샘플을 채취하였다. 총 44개체의 위내용물에서 각각 DNA를 추출하였고, 두 가지의 프라이머(rbcLZ1과 rbcL19bR)를 이용하여 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit(rbcL) gene을 PCR 증폭하였다. 44개의 샘플 중 29 샘플에서 성공적으로 PCR을 수행하였다. 이 29개 partial rbcL gene의 PCR product는 PCR-DGGE에 이용되었다. 식이물에 대한 분석결과 총 6과의 식물이 확인되었다. 강원도 철원의 경우, 5과가 나타난 반면, 전라남도 동부의 경우, 3과만이 확인되었다. 이 연구에서는 중수준의 먹이식물의 구별에는 실패하였지만, 차후 이 PCR-DGGE 기법은 고라니를 포함한 초식동물의 식이습성을 분석하는데 하나의 가능성 있는 방법이 될 것으로 생각된다.

주요어: 고라니, 먹이, 한국, 분자생물학적 방법, 엽록체 유전자

ABSTRACT

The aim of this study is to examine feeding habits of the Korean water deer(*Hydropotes inermis argyropus*) from its rumen contents using a PCR-DGGE method. For this study, rumen contents were collected from water deer causalities by natural death or road-kill in two different sites(Cheorwon, Gangwon province and the Eastern part of Jeonnam province). DNA was extracted from rumen contents of a total of 44 individuals. Two primers, rbcLZ1aF(GC) and rbcL19bR, were used for PCR amplifications of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (rbcL) gene. Among 44 samples, twenty-nine samples were successfully amplified by PCRs. The 29 PCR products of partial rbcL gene were applied for PCR-DGGE. Totally, six families of plants

1 접수 2009년 10월 30일, 수정(1차: 2010년 3월 9일, 2차: 2010년 6월 24일), 게재확정 2010년 6월 25일
Received 30 October 2009; Revised(1st: 9 March 2010, 2nd: 24 June 2010); Accepted 25 June 2010

2 이화여자대학교 에코과학부 Division of EcoScience, Ewha Womans University, Seoul(120-750), Korea

3 서울대학교 수의과대학 수의학과 Conservation Genome Resource Bank for Korean Wildlife(CGRB), College of Veterinary Medicine and BK21 Program for Veterinary Science, Seoul National University, Seoul(151-742), Korea

4 이화여자대학교 공과대학 환경공학과 Department of Environmental Science and Engineering, College of Engineering, Ewha Womans University, Seoul(120-750), Korea

* 교신저자 Corresponding author(bsd@ewha.ac.kr) Tel: +82-2-3277-3545, Fax: +82-2-3277-3275

were detected from the diet analyses. Five families of plants were found in Cheorwon, Gangwon province, but only three families of plants were found in the Eastern part of Jeonnam province. The PCR-DGGE method will provide us with a potential tool to study feeding habits of ungulates including water deer, even though our results failed to identify the prey plants at the level of species.

KEY WORDS: WATER DEER, FOOD, KOREA, MOLECULAR METHOD, CHLOROPLAST GENE

서론

고라니는 전 세계적으로 한국, 중국, 영국과 프랑스 일부에만 서식하고 있는 종으로 알려져 있다. 우리나라의 경우에는 제주도, 울릉도, 독도 등을 제외한 한반도 전역에 서식하고 있고, 우제목(*Artiodactyla*) 사슴과(*Cervidae*) 고라니속(*Hydropotes*) 고라니(*Hydropotes inermis*) 중의 한 아종(Subspecies)인 *H. inermis argyropus*가 서식하고 있다. 한편, 중국의 경우에는 다른 아종인 *H. inermis inermis*가 양쯔강 남쪽에 분포하고 있다(Cooke and Farrell, 1998).

우리나라에 서식하고 있는 고라니는 과거 식량과 약용을 위한 밀렵으로 그 개체수가 급격히 줄어 들었던 경우도 있었지만, 최근 그 개체수가 다시 증가하여 남한의 거의 대부분의 지역에 서식하고 있으나 정확한 개체수는 아직까지 산정된 적이 없다(Won and Smith, 1999). 현재 남한 내에서 고라니는 야생동물보호법에 따라 지역적으로 서식밀도가 높아 농업, 임업 등에 피해를 주는 유해야생동물과 수렵동물로 지정되어 있다. 중국의 경우, 서식지의 파괴와 파편화로 인한 서식지 감소로 그 개체수가 급격히 감소한 것으로 알려져 있다(Zhang, 1998). 현재 야생에서 서식하는 고라니의 개체수는 약 10,000 여 마리로 추정되고 있다(Butzler, 1990). IUCN에서 발표한 멸종위기 동물목록에 고라니는 국제적 보호종으로 지정되었다(Wemmer, 1998).

이처럼 고라니는 국제적으로 보호종으로 지정되어 있지만, 그 개체수가 많은 우리나라에서는 보호종으로 지정되지 못하고 있다. 그러나 고라니의 합리적인 관리를 위해서는 이 종에 대한 정확한 자료의 축적이 필요할 것이다. 현재 고라니에 대한 정확한 분포, 밀도, 먹이, 서식지 등과 관련된 생태적인 연구는 전반적으로 미흡한 실정이다.

야생동물관리에 있어 가장 중요한 부분 중의 하나는 야생동물의 식물과 식이습성에 관한 연구이다. 이러한 연구는 야생동물이 이용하는 서식지에 대한 수용능력(carrying capacity, K)과 개체군 역동성(population dynamics)을 파악하는데 중요한 부분으로 알려져 있다(Ramirez et al., 1997). 한편, 야생동물의 식이습성에 대한 연구방법에는 야생에서 동물의 섭식행동이나 섭식흔적을 직접 육안으로 관

찰하는 방법과 배설물이나 위내용물을 분석하는 조사방법이 이용되고 있다. 우리나라에서 수행된 식이습성에 관한 연구로는 인공증식장에서 산양(*Nemorhaedus caudatus*)이 이용한 먹이식물과 야생에서 산양이 이용한 먹이식물을 기록한 연구가 있다(Yang, 2002). 또한 농장에서 사육하는 대륙사슴(*Cervus nippon*)을 대상으로 먹이식물을 조사한 연구가 있다(Lee et al., 1990). 한편, 고라니의 경우에는 월악산국립공원에서 식혼을 조사하여 먹이식물을 조사한 연구(Lee, 2003)와 배설물을 대상으로 microhistological method를 이용하여 먹이식물을 분석한 연구가 있다(Kim, 2007). 그러나 아직까지 위내용물을 이용하여 식이식물을 분석한 연구는 국내에서 이루어지고 있지 못한 실정이다. 국외의 경우, 일본의 대륙사슴(*Cervus nippon*)의 위내용물을 이용하여 식이식을 분석한 연구가 있는데, 10개의 지역에서 147마리의 개체를 이용하여 지역적인 차이를 비교한 바 있다(Seiki and Hironori, 2007). 이와 유사하게, 오스트리아에서는 서로 다른 식생구조를 보이는 두 지역에서 117마리 *Rusa deer*(*Cervus timorensis russa*)의 위내용물을 분석하여 식이식의 지역적 비교와 계절적 비교 연구가 수행된 바 있다(Degarine-Wichatitsky et al., 2005). 또한 미국의 알래스카에서는 13마리의 Sitka black-tailed deer (*Odocoileus hemionus sitkensis*)의 위내용물과 배설물을 이용하여 식이식을 분석하여 서로 비교한 연구가 수행된 바 있다(Hanley et al., 1985).

이 연구에서는 이전에 수행된 육안으로 식이습성을 분석하는 방법이 아닌 Polymerase Chain Reaction-Denaturation Gradient Gel Electrophoresis(PCR-DGGE) 기법을 이용하여 한국고라니의 식이식물을 분석하였다. 이 PCR-DGGE 기법은 원래 미생물군집의 다양성을 분석하기 위해 사용되어 왔으나(Muyzer et al., 1993), 최근 들어 야생동물의 먹이종을 분석하는데 이용되기 시작하였다(Deagle et al., 2005a; 2005b; Tollit et al., 2009), 그러나 아직까지 초식동물에 적용된 바 없다. 이 연구의 목적은 이 PCR-DGGE 기법을 이용하여 한국고라니의 식이식을 분석하고 서로 다른 두 지역간의 차이를 비교하기 위함이다.

재료 및 방법

1. 샘플 수집

이 실험에 이용된 샘플들은 2008년 5~10월까지 총 다섯 번에 걸쳐 서울대 야생동물유전자원은행(CGRB: Conservation Genome Resource Bank for Korean Wildlife)을 통하여 자연사 혹은 로드킬에 의해 죽은 고라니로부터 채취되었다. 무게가 약 8-16kg 사이의 성체 암컷 20개체, 수컷 21개체 그리고 성별미상의 3개체로 모두 44개체의 고라니에서 위 내용물 샘플을 얻을 수 있었다. 이 44개체 중 20개체는 강원도 철원지역에서, 17개체는 전라남도 동부지역에서, 7개체는 미확인 지역에서 수집되었다(Figure 1). 20개체 철원샘플의 경우, 암컷과 수컷이 각각 10개체씩이며 수집된 날짜가 12~2월인 5개체, 3~5월인 8개체, 6~8월인 3개체, 9~11월인 4개체였다. 17개체 전라남도 동부지역 샘플의 경우, 암컷과 수컷이 각각 7개체와 8개체이며, 성별미상이 2개체이며 수집된 날짜가 12~2월인 2개체, 9~11월인 1개체, 날짜미정인 14개체였다. 이 고라니의 위 내용물 샘플들은 실험 전까지 비닐백에 넣어진 상태로 -20°C에서 냉동 보관되었다.

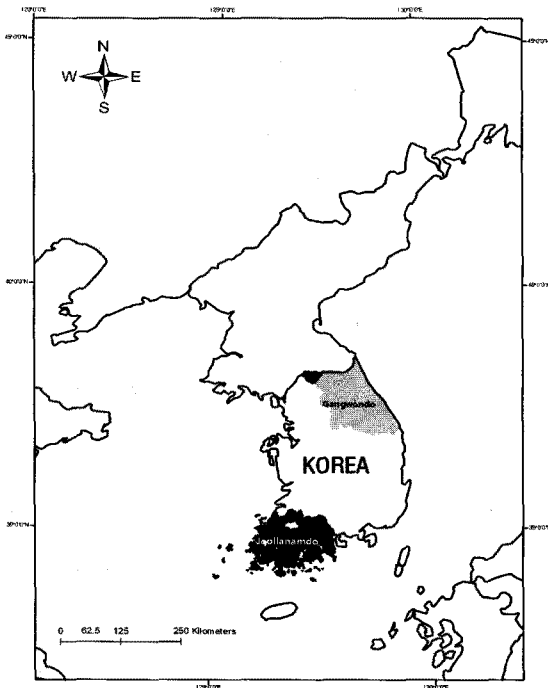


Figure 1. Map of the sampling sites(Cheorwon, Gangwon province and the Eastern parts of Jeonnam province)

2. 위내용물 추출

위내용물의 추출은 Chamrad and Box(1964)의 방법을 따랐다. -20°C에서 냉동 보관된 샘플들은 위 속에서 내용물을 꺼내기 용이하게 상온에서 약 12시간 해동시켰다. 해동된 위의 네 개의 위 중 제 1위의 중앙부분을 절개하고 제 1위 내용물만을 꺼내어 그 위내용물 2mm의 채 위에 겹쳐 올려놓은 5mm의 채 위에 담았다. 이후 채 위의 위내용물에 물을 부어가며 남아있는 식이물의 형태가 최대한 상하지 않도록 조심히 풀어주어 미세한 찌꺼기들은 씻어 내어 어느 정도 온전한 식이물만을 채에 걸렀다. 이렇게 채에 걸러진 식이물들은 petri-dish 위에 잘 펼친 후 60°C 오븐에서 항량 건조시켰다. 건조된 고라니의 위내용물은 다시 비닐백에 담아 각 개체별로 따로 보관하였다. 건조된 샘플들은 각각 1/10씩 500ml falcon tube에 넣고 샘플 번호를 표시해 두었다. 이렇게 1/10씩 덜어 놓은 샘플들을 각각 막자사발에 넣고 액체질소를 식이물이 잠길 만큼 부은 후 식이물이 동결되면 신속하게 갈아주었다. 곱게 갈린 44개체의 위 내용물을 0.1 g씩 각각 2 ml tube에 담고 샘플번호를 표시해 두었다. 마지막으로 LaboPass™ Tissue mini kit(Cosmo)를 이용해 DNA를 추출하였고 -20°C에 냉동 보관하였다.

3. rbcL 유전자의 PCR 증폭

고라니 위내용물의 식이물 다양성을 확인하기 위해서 엽록체 유전자 중 광합성의 탄소고정에 관여하는 효소의 large subunit를 coding하는 ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase (rbcL) gene의 증폭 primer인 rbcLZ1aFGC: 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CAT GTC ACC ACC AAC AGA GAC TAA AGC-3'; rbcL19bR: 5'-CTT CTT CAG GTG GAA CTC CAG-3'을 이용하여 PCR을 수행하였다(Hofreiter *et al.*, 2000). Forward primer인 rbcLZ1aF에는 GC clamp를 붙여 사용하였다. GC clamp를 붙인 부분은 밑줄로 표시되어있다. PCR 조성은 2µl의 DNA, 2µl의 10X Mg²⁺ free buffer(iNtRON), 2µl의 10X BSA(iNtRON), 1.6µl의 Mg²⁺ free buffer(iNtRON), 1.6µl의 dNTPs(iNtRON), primer 각각 0.1µl, *i-Star Taq* polymerase(iNtRON) 0.1µl를 넣고 dH₂O로 total volume을 20µl로 맞추었다. PCR 반응조건은 94°C에서 denaturing 3분 한 후 94°C에서 40초간 denaturing, 45°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 extension 40초로 하여 총 45회 반복한 후 final extension을 위하여 72°C에서 3분간 반응시켰다. 이 때 이용된 PCR machine은 PTC-100(Peltier Thermal Cycler)이며, negative control도 함께 수행하였다. PCR 증폭 여부를 확인하기 위하여 2%

agarose gel에서 전기영동하여 DNA 밴드를 확인하였다.

4. PCR-DGGE

PCR product는 BioRad Dcode System(Bio-Rad Laboratories)으로 PCR-DGGE를 수행하여 분석하였다. Denaturing gradient gel 9% polyacrylamide(37.5: 1 = acrylamide: bisacrylamide)에 urea와 formamide를 30-65%의 농도구배가 형성 되도록 첨가하여 gradient former로 제작하였다. 이와 같이 제작된 gel을 1X TAE buffer (40 mM tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA)가 든 60°C의 항온수조안에 담고 PCR product 20 μ l을 loading dye 20 μ l과 함께 well에 loading하여 60°C, 100V에서 15시간 동안 전기영동하였다. 전기영동 끝난 후 gel은 50 μ l ethidium bromide(EtBr)를 첨가한 1X TAE buffer 500ml에서 10분간 staining한 후 500ml 1X TAE buffer에서 20분간 destaining하여 UV로 밴드를 확인하였다.

5. PCR-DGGE 밴드의 PCR 증폭

Denaturing gradient gel 상에서 각각 다른 위치로 분리된 밴드는 잘라내어 각각 1.5 ml tube에 넣고 잘게 부수어 dH₂O 100 μ l를 첨가하여 20분간 냉장보관 한 후, 원심분리(14,000 rpm, 10분)하여 상등액만을 취하였다. 이 상등액을 GC clamp가 없는 동일한 primer인 rbcLZ1aF: 5'-ATG TCA CCA CCA ACA GAG ACT AAA GC-3'; rbcL19bR: 5'-CTT CTT CAG GTG GAA CTC CAG-3'을 이용하여 PCR을 수행하였다(Hofreiter *et al.*, 2000). PCR 조성은 1 μ l의 상등액, 2 μ l의 10X Mg²⁺ free buffer(iNtRON), 2 μ l의 10X BSA(iNtRON), 1.6 μ l의 Mg²⁺ free buffer(iNtRON), 1.6 μ l의 dNTPs(iNtRON), primer 각각 0.1 μ l, *i-Star Taq* polymerase(iNtRON) 0.1 μ l를 넣고 dH₂O로 total volume을 20 μ l로 맞추었다. PCR 반응조건은 94°C에서 denaturing 3분 한 후 94°C에서 40초간 denaturing, 45°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 extension 40초로 하여 총 45회 반복한 후 extension을 위하여 72°C에서 3분간 반응시켰다. PCR은 PTC-100(Peltier Thermal Cycler)를 이용하였으며, negative control도 함께 수행하였다. 증폭된 PCR 반응물은 2% agarose gel에서 전기영동하여 증폭여부를 확인하였다. 밴드가 확인된 상등액만 다시 전과 동일한 조건으로 PCR하여 전체 40 μ l의 PCR product를 Zymoclean™ Gel DNA Recovery kit(ZYMO RESEARCH)를 이용하여 정제하였다.

6. 염기서열 분석

정제된 PCR product는 Automatic DNA sequencing machine(ABI 3730; PE applied Biosystem)을 이용하여 염기서열을 분석하였다. 이렇게 얻어진 염기서열은 AlignIR version 2.0(LI-COR Bioscience)을 사용하여 염기서열들을 편집하고 정렬하였다. 정렬된 염기서열들을 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 Blast search program을 통해 GenBank database의 염기서열과 비교하여 각각의 과를 확인하였다.

결 과

1. rbcL 유전자의 PCR 증폭

강원도 철원지역, 전라남도 동부지역, 지역미정의 44개체의 고라니 위내용물을 각각 개체별로 0.1 g(식물이 혼합된 샘플)씩 따로 분주한 후 DNA를 추출하였다. rbcL gene을 증폭하기 위하여 primer rbcLZ1aFGC와 rbcL19bR을 이용한 PCR을 수행하였다. 그 후 증폭산물의 증폭여부를 알아보기 위해 agarose gel 상에서 전기영동을 실시한 결과, 증폭된 산물의 길이가 약 200bp 정도로 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 강원도 철원지역의 고라니 8개체 샘플, 전라남도 동부지역의 고라니 15개체 샘플, 지역미정의 고라니 6개체 샘플로 모두 29개(약 66%)의 샘플이 증폭되었다.

2. PCR-DGGE

PCR을 통하여 증폭된 29개의 샘플 중에서 여러 번의 PCR결과 육안으로 항상 일정 한 밝기를 나타낸 17개의 샘플에 대해서만 PCR-DGGE를 수행하였다. 17개의 샘플 중 강원도 철원지역의 샘플이 6개, 전라남도 동부지역의 샘플이 11개로 각 지역별로 샘플을 나누어 PCR-DGGE를 수행하였다. PCR-DGGE의 결과, 강원도 철원의 경우는 Figure 2와 같이 나타났고 전라남도 순천의 경우 Figure 3과 같이 나타났다. Figure 2와 3에서 보는 바와 같이 gel 상에 band들이 다양한 위치에 있음을 확인할 수 있었다. 강원도 철원 샘플의 경우에는 전체적으로 38개의 band가 확인되었고 한 샘플 당 4-11개의 band들이 확인되었다. 전라남도 동부지역 샘플의 경우에는 전체적으로 65개의 band가 확인되었고 한 샘플 당 4-8개의 band들이 확인되었다.

3. 염기서열 분석

DGGE profile 상의 각 band들이 어떤 식물에서 유래했는지 알아보기 위하여 서로 다른 위치에 있는 band들을 잘라 염기서열을 분석하였다(Figure 2, Figure 3). 분석에 이용

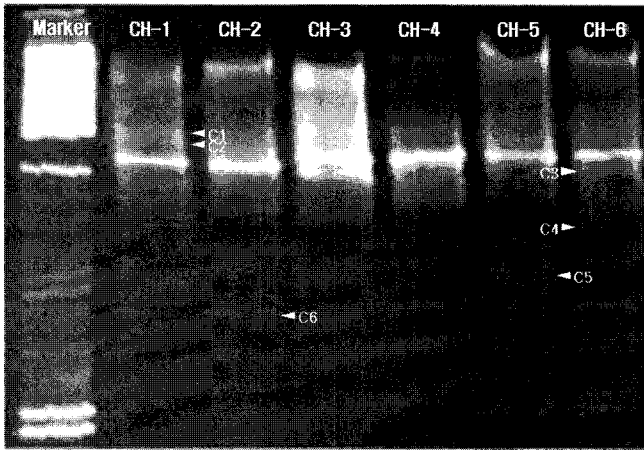


Figure 2. Denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) profile based on rbcL DNA generated from rumen contents of the Korean water deer from Cheorwon, Gangwon province. The DGGE bands indicated by arrow were extracted and sequenced. The C1-C6 bands were identified with 98% similarity through BLAST search in NCBI website(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). (CH-1: Cheorwon sample 1; CH-2: Cheorwon sample 2; CH-3: Cheorwon sample 3; CH-4: Cheorwon sample 4; CH-5: Cheorwon sample 5; CH-6: Cheorwon sample 6)

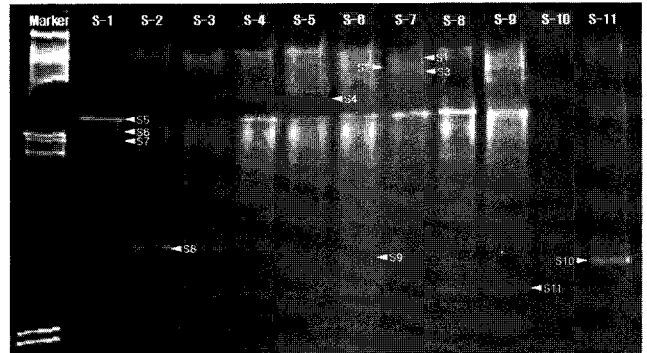


Figure 3. Denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) profile based on rbcL DNA generated from rumen contents of the Korean water deer from the Eastern part of Jeonnam province. The DGGE bands indicated by arrow were extracted and sequenced. The S1-S11 bands were identified with 98% similarity through BLAST search in NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). (S-1: Jeonnam sample 1; S-2: Jeonnam sample 2; S-3: Jeonnam sample 3; S-4: Jeonnam sample 4; S-5: Jeonnam sample 5; S-6: Jeonnam sample 6; S-7: Jeonnam sample 7; S-8: Jeonnam sample 8; S-9: Jeonnam sample 9; S-10: Jeonnam sample 10; S-11: Jeonnam sample 11).

된 염기서열의 길이는 110bp으로 Figure 4에 나타나 있다. 강원도 철원의 경우 전체 38개 중 6개의 band(C1-C6)에 대하여 염기서열 분석이 성공하였고, 전라남도 동부지역의 경우 전체 65개 중 11개의 band(S1-S11)에 대하여 염기서

열 분석이 성공하였다. 이렇게 분석된 염기서열들은 NCBI의 GenBank database를 이용하여 그 유사성을 비교하였다. NCBI에서 Blast search 결과 중 최대 상동성을 보이는 것을 결과로 출력하였다. 그러나 종수준의 구분은 중간 염기서열

		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
Onagraceae	C1	CTTGAGGAGTTACTCTGAATGCTGCCAGATATCACTAICTTTGGTTTCGATTTCAGGAGTATAATAAGTCAGTTTATAATCTTTTAACGCCGGCTTTGAATCCAACACTT										
Rosaceae	C2G.....A.....G.....A.....G.....A.....C.....A.....C.....										
Compositae	C3GA.....C.....A.....A.....A.....A.....C.....										
Polygonaceae	C4GA.....TG.G.A.G.G.....A.G.....T.A.....T.....A.A.....										
	C5GA.....TGG.A.GC.G.....A.G.....A.....T.....A.A.....										
Ranunculaceae	C6G.....C.....G.....G.....A.....T.A.G.C.....A.T.....G.....C.....										
Rosaceae	S1GA.....A.C.....A.....A.....A.....A.....										
	S2GA.....A.C.....A.....A.....A.....A.....										
	S3GA.....A.C.....A.....A.....A.....A.....										
	S4GA.....A.C.C.....A.....A.....A.....A.....										
	S5GA.....A.C.C.....A.....A.....A.....A.....										
Vitaceae	S6GA.....A.C.C.....A.....A.....A.....A.....										
	S7GA.....A.C.C.....A.....A.....A.....A.....										
Polygonaceae	S8G.....GG.....C.A.....A.G.....A.....A.....										
	S9GA.....TGG.A.GC.G.....A.G.....A.....T.....A.A.....										
	S10GA.....TGG.A.GC.G.....A.G.....A.....T.....A.A.....										
	S11GA.....TGG.A.G.G.....A.G.....A.....G.T.....A.A.....C.....										

Figure 4. The 110bp rbcL sequences from 17 plant species(C1-C6: samples collected from Cheorwon, Gangwon province; S1-S11: samples from the Eastern part of Jeonnam)

의 변이가 적어 불가능하였다. 대신 최대 상동성을 보이는 종들을 하나의 과로 묶어 구분하였다. 강원도 철원의 경우 C1은 바늘꽃과(Onagraceae), C2는 장미과(Rosaceae), C3은 국화과(Compositae), C4-C5는 마디풀과(Polygonaceae), C6은 미나리아재비과(Ranunculaceae)로 확인되었다. 전라남도 동부지역의 경우 S1-S7은 장미과, S8은 포도과(Vitaceae), S9-S11은 마디풀과로 확인되었다.

고찰

PCR-DGGE 기법은 미생물의 군집 다양성 비교 연구에 유용한 방법으로 주로 사용되어 오고 있으나(Muyzer *et al.*, 1993), 아직까지 고라니를 비롯한 초식동물의 식물 분석에 이용되어진 바는 없다. 식물의 분석을 위해 PCR-DGGE를 사용한 이전의 연구를 보면 바다사자(Steller sea lion, *Eumetopias jubatus*)의 분변을 이용하여 먹이를 분석한 연구(Deagle *et al.*, 2005b)가 있으며 Giant squid(*Architeuthis sp.*)의 장내용물을 이용한 먹이 연구(Deagle *et al.*, 2005a)가 있다. 이 연구에서는 PCR-DGGE의 적용가능성을 고라니의 위내용물을 대상으로 타진해 보고, 육안분석(예, 식흔, 위내용물, 배설물)과 더불어 식물 분석의 유용한 방법으로 사용될 수 있을지를 알아보았다.

PCR-DGGE를 이용한 이번 연구에서 고라니 식물 분석의 결과 바늘꽃과, 미나리아재비과, 포도과, 장미과, 마디풀과, 국화과로 전체 6과가 확인되었다. 위에서 추출된 식물의 대부분이 동정될 것이라는 가정 하에 실험이 수행되었지만 예상했던 것에 미치지 못하는 결과를 얻었다. 그 이유로는 심하게 건조된 샘플에서 DNA를 추출하였기 때문에 DNA를 충분히 추출하지 못하였고($n=29/44$, about 66%), 또한 DGGE profile상의 각각 band들을 잘라낼 때 이웃한 band가 일부 포함되어 정확한 염기서열 정보를 얻지 못하였기 때문으로 추측된다. 한편, 식물의 rbcL gene의 유전적 거리가 종간에 큰 차이를 보이지 않는 특성상 110bp의 짧은 염기서열 정보로는 종수준의 구별이 가능하지 못한 것으로 생각된다. 지역별로는 강원도 철원의 경우 5과, 전라남도 동부지역의 경우 3과가 확인되었다. 철원이 전라남도 동부지역에 비해 조금 더 다양한 식이식물의 양상을 보이거나 제한적인 염기서열 정보로 인하여 정확한 해석을 어려울 것으로 생각된다.

이 연구에서는 종수준의 식이식물의 구별에는 성공하지 못하였고 이용된 샘플의 수가 적다는 단점이 있지만, 아직까지 고라니를 포함한 초식동물에 시도된 적 없었던 PCR-DGGE 기법을 식물 분석에 적용해 보았다는 것에 의의가 있는 것으로 생각된다. 향후 연구에서 신선한 샘플의 이용과 보다 긴 염기서열정보를 이용한다면 식물 분석

에 널리 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 샘플링된 고라니가 서식하는 서식지에서 채집된 식물의 염기서열 분석 정보를 참고자료로 이용한다면 식물을 종수준까지도 구별할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

저자들은 NIER grant(16000-16001-2)와 SWRRC grant(1-0-3), SmartHighWay(1-2-1)의 지원에 감사드립니다. 또한 연구에 필요한 샘플들을 분양해 주신 야생동물유전자원은행의 이항 교수님께 진심으로 감사드립니다.

인용문헌

- Butzler, W.(1990) Grzimek's Encyclopedia Mammals, Volume five. McGraw-Hill Publishing Company, New York, pp. 198-199.
- Chamrad, A.D. and T.W. Box(1964) A point frame for sampling rumen contents. J. Wildl. Manage. 28: 473-477.
- Cooke, A. and L. Farrell(1998) Chinese Water Deer. The Mammal Society, London and the British Deer Society, Fordingbridge, pp. 1-32.
- Deagle, B.E., S.N. Jarman, D. Pemberton and N.J. Gales(2005a) Genetic screening for prey in the gut contents from a Giant squid. J. Hered. 96: 417-423.
- Deagle, B.E., D.J. Tollit, S.N. Jarman, M.A. Hindell, A.W. Trites and N.J. Gales(2005b) Molecular scatology as a tool to study diet: analysis of prey DNA in scats from captive Steller sea lions. Mol. Ecol. 14: 1831-1842.
- Degarine-wichatitsky, M., Y. Soubeyran, D. Maillard and P. Duncan(2005) The diets of introduced rusa deer(*Cervus timorensis rusa*) in a native sclerophyll forest and a native rainforest of New Caledonia. New Zealand J. Zool. 32: 117-126.
- Hanley, T.A., D.E. Spalinger, K.A. Hanley and J.W. Schoen(1985) Relationships between fecal and rumen analyses for deer diet assessments in Southeastern Alaska. Northwest Science 59: 10-16.
- Hofreiter, M., H.N. Poinar, W.G. Spaulding, K. Bauer, P.S. Martin, G. Possnert and S. Paabo(2000) A molecular analysis of ground sloth diet through the last glaciation. Mol. Ecol. 9: 1975-1984.
- Kim, E.K.(2007) Food diet analysis of Korean water deer using a microhistological method. M.S. thesis, Kangwon Univ., Rep. of Korea. pp. 1-49.
- Lee, B.K.(2003) Morphological, Ecological and DNA Taxonomic Characteristics of Chinese Water Deer(*Hydropotes inermis Swinhoe*). Ph.D. thesis, Chungbuk national Univ., Rep. of Korea, pp. 1-101.

- Lee, J.H., I.D. Lee and H.S. Lee(1990) Studies on the Utilization of Browse by the Sika Deer(*Cervus nippon*). Korean J. Anim. Sci. 32: 100-108.
- Muyzer, G., E.C. de Waal and A.G. Uitterlinden(1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified gene coding for 16S rRNA. Applied and Environ. Microbiol. 59: 695-700.
- Ramirez, R.G., J.B. Quintanilla and J. Aranda(1997) White-tailed food habits in northeastern Mexico. Small Rum. Res. 25: 141-146.
- Seiki, T. and U. Hironori(2007) Meso-scale variation in winter food composition of sika deer in Tochigi Prefecture, central Japan. Mammal Study 32: 115-120.
- Seo, M.H.(2006) Analysis of Asiatic Black Bear's foods by using feces. M.S. thesis, Kookmin Univ., Rep. of Korea, pp. 1-53.
- Tollit, D.J., A.D. Schulze, A.W. Trites, P.F. Olesiuk, S.J. Crockford, T.S. Gelatt, R.R. Ream and K.M. Miller(2009) Development and application of DNA techniques for validating and improving pinniped diet estimates. Ecol. Appl. 19: 889-905.
- Wemmer, C.(1998) Deer, status survey and conservation action plan. IUCN, SSC deer specialist group, 69pp.
- Won, C.M. and K.G. Smith(1999) History and current status of mammals of the Korean peninsula. Mam. Rev. 29: 3-36.
- Yang, B.G.(2002) Systematics, ecology and current population status of the goral, *Naemorhedus caudatus*, in Korea. Ph.D. thesis, Chungbuk national Univ., Rep. of Korea. pp. 1-137.
- Zhang, E.(1998) Uniparental female care in the Chinese water deer at Whipsnade Wild animal park, England. Acta Theriol. Sinica 18: 178-183.