



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](#)

碩士學位論文

아비목의 Chromo-Helicase-DNA binding
(*CHD*) 유전자 다형성과 성감별

濟州大學校 大學院

獸醫學科

文智煥

2012年 8月

아비목의 Chromo-Helicase-DNA binding
(CHD) 유전자 다형성과 성감별

指導教授 尹永玟

文智煥

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함

2012年 8月

文智煥의 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함

審査委員長 _____ (印)

委 員 _____ (印)

委 員 _____ (印)

濟州大學校 大學院

2012年 8月

초 록

아비목의 Chromo-Helicase-DNA binding (*CHD*) 유전자 다형성과 성감별

문 지 환

(지도 교수 : 윤 영 민)

제주대학교 대학원

수의학과

조류의 성감별은 진화, 생태 및 질병연구에서 중요하다. 일부 조류는 외형적 특징으로 성감별이 가능하지만 그렇지 않은 경우가 더 많다. 최근 특이 primer를 이용한 분자생물학적 방법으로 간편하고 정확하게 성감별을 할 수 있지만 다양한 종에서 동일 primer 조건으로 확인되지 않는 경우가 많다. 현재 겨울철새인 아비목에 대한 적합한 primer 조건 및 Chromo-Helicase-DNA binding (*CHD*) gene의 염기서열 분석이 이루어져있지 않은 상태이다. 본 연구에서는 제주야생구조센터에서 구조된 조류 중 폐사체를 부검하여 암수가 확인된 12종 15마리, 암수 구별된 아비목 6마리와 확인되지 않은 아비목 16마리를 대상으로 실험하였다. 성감별을 위해서 기존에 알려진 P2-P8, P2-NP-MP, 2550F-2718R primer를 이용하여 확인하였고 증폭된 PCR 산물에 대해서 염기서열 분석하고 유사성을 비교분석하였다. 암수 확인이 된 개체에 대해서 P2-P8, P2-NP-MP, 2550F-2718R primer로 확인한 결과 종에 따른 다른 결과가 나왔다. 아비목에서 성감별에 적합한 primer는 2550F-2718R이었으

며, 아비목 총 22마리에 대한 성판별 결과 암컷 아비 2/3(67%), 회색머리아비 10/13(80%), 큰회색머리아비 4/6(75%) 였다. 아비목 3종 에 대한 *CHD-Z*와 *CHD-W* 유전자의 유사성 조사에서 아비와 회색머리아비는 각각 97%와, 98%, 회색머리아비와 큰회색머리아비는 98%와 98%, 아비와 큰회색머리아비 99%와 98%의 유사성을 보였다. 이상의 결과에서 외형적으로 구분이 어려운 아비목에 대한 성감별 조건을 확인하였고 아비목 3종에 대한 *CHD* 유전자 염기서열의 차이와 이를 통한 종감별 가능성을 제시하였다.

주요어: Chromo-Helicase-DNA binding (*CHD*) 유전자, 성감별, 다형성, 아비목

목 차

I. 서	론	1
II. 재료 및 방법	4	
III. 결	과	8
IV. 고	찰	16
V. 결	론	20
VI. 참 고 문 헌	21	
영 문 초 록	26	

I. 서 론

조류의 성감별은 포유류의 성감별과는 달리 깃털색이나 외형으로 구별이 확연한 몇 종(닭, 꿩, 공작새 등)을 제외하고는, 외형 및 형태학적으로 구별하기 힘들다. 성 성숙이 덜 된 어린 새에서는 더욱 구별이 힘들다(13). 특히, 참새목의 60%는 깃털색이나 형태학적으로 암수가 매우 유사하여 구분이 어렵다(28). 지금까지 알려진 조류의 성감별 방법으로는 행동 관찰 (behavior observation), 포란반(brood patch)의 유무, 외부형태학적 특성 (morphometric traits), 복강개복이나 복강내시경을 통한 성선(gonads by laparotomy or laparoscopy) 확인, 성 염색체(sex chromosomes) 및 분자생물학적 검사가 있다(6, 13). 이들 중에서 분자생물학적 방법은 소량의 시료(깃털, 분변, 혈액)만으로도 성감별을 할 수 있으며, 다른 검사방법 보다 더 간편하고, 정확하며 효과적인 방법이기에 최근 성감별에 널리 사용되고 있다(3, 11, 19, 23, 30).

포유류의 성염색체에서 수컷은 이형접합 염색체쌍(XY), 암컷은 동형접합 염색체쌍(XX) 이다. 이와 달리 조류에서 수컷은 동형접합 염색체쌍(ZZ), 암컷은 이형접합 염색체쌍(ZW) 이다. 포유류에서는 성 특이적인 sex-determining region Y (*Sry*), zinc finger Y or X-chromosome (*ZFY/ZFX*), 또는 *amelogenine* 유전자가 성감별에 활용된다(5, 34, 35). Griffiths 등 (1996)이 조류 성염색체 W 내에 Chromo-Helicase-DNA binding (*CHD*) gene을 보고함으로써, 분자생물학 방법을 이용한 성감별이 활용되었다(14). 이후 조류에서 성감별을 위한 유전자는 *CHD1W/CHD1Z* (17), EE0.6 (22)과 *Wpkci* (20, 26)으로 PCR이나 Southern blot 검사를 통해서 확인하고 있다. Griffiths 등 (1998)은 P2-P8 특이 성감별 primer set를 사용하여 27종의 조류 성감별을 성공적으로 실시하였고(17), Ito 등

(2003)은 Amplification refractory mutation system (ARMS)에 기초하여 *CHD1Z*와 *CHD1W* 특정 부위를 확인하여 매목(Falconiformes)의 맹금류 종에서 효과적인 성감별 방법을 보고하였다(21). 또한 몇몇 연구에서 PCR-RFLP *Nla*III, Intron PCR assay와 CSL (crane sex-linked DNA)을 이용한 성감별(4, 12, 18, 31, 32), 멸종위기종을 대상으로 깃털이나 소량의 혈액을 이용한 성감별(3, 11, 23), 멸종위기종의 분변을 통한 DNA 추출과 성감별을 보고하였다(30). 또한 *CHD* 유전자와 *cytochrome b* 유전자를 이용하여 검은머리직박구리(*Pycnonotus sinensis*)와 그 근연종인 *Pycnonotus taivanus*의 종 성감별과 유전자형을 분석한 바 있다(9).

지금도 보고되지 않은 종에 대한 성감별 연구가 진행되고 있으며, 분자생물학 기법을 이용하여 *CHD1W*와 *CHD1Z*의 PCR산물의 크기가 비슷하거나 유전적 변이로 인해 유전자 증폭되지 않는 경우 새로운 성염색체 부위를 이용한 연구가 보고되고 있다(6, 10, 20, 26, 33). 모든 종의 조류에서 동일 조건으로 성감별이 되지않기에 각 종에 대한 조건(primer sets) 비교분석과 종에 적합한 조건의 제시가 필요하다(13).

우리나라에 기록된 4종의 아비목(Gaviiformes) 조류 중 겨울철새로 흔히 도래하는 종은 아비(Red-throated Loon, *Gavia stellata*), 회색머리아비(Pacific Loon, *Gavia pacifica*), 큰회색머리아비(Black-throated Loon, *Gavia arctica*) 등 3종으로, 이들의 비번식기 깃은 암수 색깔과 형태가 동일하고 크기도 비슷하여 형태적으로 암수 및 종의 식별이 어렵다. 번식깃을 지닌 성조 이외의 아비류는 성별이나 연령뿐만 아니라 종의 식별도 곤란할 수 있는 무리로서(1), 특히 비번식기에 해안에서 월동하는 생태적 특징으로 인해 유류유출 사고에 의해 오염된 개체의 식별은 매우 어려울 수 있다(7). 아비의 성감별은 생태, 질병 및 환경오염 감시에 중요한 의미를 가지나 아비목 조류의 *CHD* 유전자형 분석을 통한 성감별 및 종 동정에 관한 연구는

현재까지 전무한 실정이다.

본 연구는 제주야생동물구조센터에서 구조된 아비목 조류 중에서 부검을 통해서 성별이 확인된 암수와 확인되지 않은 개체를 대상으로 성감별에 적합한 조건을 확인하였다. 그리고 아비목 3종간의 *CHD* 유전자형을 분석하고 종간 *CHD*의 염기서열에 따른 유전자 차이를 비교분석하여 종 동정의 가능성도 알아보았다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 시료

실험에 사용한 조류는 2011년 1월부터 2012년 4월까지 제주도 제주야생동물구조센터에 구조되어 부검 또는 육안을 통해 형태적으로 성감별이 된 조류 12종 15마리(아비목 3종 6마리 포함)와 성감별이 확인이 되지 않은 아비목 3종 16마리(아비 1마리, 회색머리아비 11마리, 큰회색머리아비 4마리) 등 총 31마리를 대상으로 하였다(Table 1). 성감별을 위해 조류의 액와정맥(axillary vein)으로 부터 0.5ml 채혈하여 헤파린튜브에 각각 20 μ l 분주하고, 즉시 DNA를 추출하거나 향후 DNA 추출 시까지 -70°C 에 보관하였다.

Table 1. The list of bird species used in this study

Order	Family	Scientific name	Korean name	Sample size			
				male	female	unknown	total
Anseriformes	Anatidae	<i>Anser anser</i>	거위	1	-	-	1
Charadriiformes	Laridae	<i>Larus crassirostris</i>	괭이갈매기	-	1	-	1
Ciconiiformes	Ardeidae	<i>Ixobrychus eurhythmus</i>	큰덤불해오라기	-	1	-	1
Ciconiiformes	Ardeidae	<i>Ardea cinerea</i>	왜가리	1	-	-	1
Ciconiiformes	Ardeidae	<i>Nycticorax nycticorax</i>	해오라기	1	-	-	1
Columbiformes	Columbidae	<i>Columba livia</i>	집비둘기	1	-	-	1
Falconiformes	Accipitridae	<i>Accipiter nisus</i>	새매	-	1	-	1
Falconiformes	Falconidae	<i>Falco peregrinus</i>	매	1	-	-	1
Pelecaniformes	Phalacrocoracidae	<i>Phalacrocorax carbo</i>	민물가마우지	1	-	-	1
Gaviiformes	Gaviidae	<i>Gavia stellata</i>	아비	1	1	1	3
Gaviiformes	Gaviidae	<i>Gavia pacifica</i>	회색머리아비	1	1	11	13
Gaviiformes	Gaviidae	<i>Gavia arctica</i>	큰회색머리아비	1	1	4	6
Total				9	6	16	31

2. DNA 추출

Genomic DNA (gDNA)는 헤파린 튜브로 처리한 20 μ l 전혈로부터 G-Dex IITM blood DNA extraction (Intron, Korea) 키트를 사용하여 추출하였으며, 최종 gDNA 농도는 100ng/ μ l (Nanoveu, USA)가 되도록 TE buffer로 희석 조정하였다.

3. 성감별을 위한 대조군 개체

암수 구분이 명확한 형태적 특징을 가지는 개체와 부검을 통하여 확인이 된 개체를 대조군으로 설정하여 PCR 조건 실험을 실시하였다(암수 확인 개체: 9종 9마리, 아비목: 3종, 6마리)(Table 1).

4. 중합효소연쇄반응(PCR)

암수가 확인된 개체 DNA에 대한 *CHD* 유전자 증폭은 2X TOPsimple DyeMIX (aliquot)-n *Taq* (Enzynomics, Korea) 키트를 사용하여 Thermo cycler (TAKARA, Japan)로 유전자 증폭을 실시하였고 PCR 산물은 2% 아가로즈젤에 전기 영동한 후 확인하였다. PCR에 사용된 primer sets (Table 2) 및 PCR 조건(Table 3)은 기존 연구에 준하여 실시하였다(Griffiths 등, 1998; Ito 등 2003; Fridolfsson과 Ellegren, 1999). 아비목 총 21마리(아비 3, 회색머리아비 13, 큰회색머리아비 6)에 대해서도 위와 동일한 조건으로 PCR을 실시하였다 (Table 2, Table 3).

Table 2. The sequences of AVIAN *CHD* gene primer sets

Primer	Sequence (5' → 3')	Reference
P2	TCTGCATCGCTAAATCCTTT	Griffiths <i>et al</i> , 1998
P8	CTCCAAGGATGAGRAAYTG	
P2	TCTGCATCGCTAAATCCTTT	Ito <i>et al</i> , 2003
NP	GAGAACTGTGCAAAACAG	
MP	AGTCACTATCAGATCCGGAA	
2550F	GTTACTGATTTCGTCTACGAGA	Fridolfsson & Ellegren, 1999
2718R	ATTGAAATGATCCAGTGCTTG	

Table 3. PCR condition of each primer set for *CHD* gene amplification

Primer		Temp	Time	Cycles
P2 P8	Initial denaturation	94°C	5 min	35
	Denaturation	94°C	30 sec	
	Annealing	50°C	30 sec	
	Extension	72°C	40 sec	
	Final extension	72°C	5 min	
P2 NP MP	Initial denaturation	94°C	5 min	35
	Denaturation	94°C	30 sec	
	Annealing	50°C	30 sec	
	Extension	72°C	40 sec	
	Final extension	72°C	5 min	
2550F 2718R	Initial denaturation	94°C	5 min	30
	1 st Denaturation	94°C	30 sec	
	1 st Annealing	54°C	15 sec	
	1 st Extension	72°C	30 sec	
	2 nd Denaturation	94°C	30 sec	
	2 nd Annealing	50°C	30 sec	
	2 nd Extension	72°C	40 sec	
	Final extension	72°C	5 min	

5. 염기서열 분석

아비목 3종(아비, 회색머리아비, 큰회색머리아비)의 *CHD-Z/W*의 염기서열 분석을 위하여 PCR 산물을 T-vector에 클로닝한 후 분석하였다. 아비목 *CHD-Z*와 *CHD-W*의 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동 한 후 MEGA-Bead[®] gel extraction kit (Intron, Korea)를 사용하여 gel elution 하고 이것을 T-vector TOPcloner (Enzymomics, Korea)에 클로닝하였다. PCR 산물이 삽입된 vector를 *E. Coli* (DH-5 α)에 transformation 하고, 삽입이 확인된 *E. Coli*에 대해서는 ampicillin 함유 LB broth에 배양(37°C, overnight)하였다. 배양된 *E. Coli*를 원심분리하고 QIAGEN[®] Plasmid mini kit (QIAGEN, USA)를 이용하여 plasmid를 추출하고, 염기서열분석을 의뢰하였다(Solgent, Korea).

6. 아비목 간의 상동관계 분석

아비목 3종(아비, 회색머리아비, 큰회색머리아비)의 *CHD* 유전자에 대한 염기서열 비교분석은 웹사이트 프로그램(www.justbio.com)을 이용하여 실시하였다. 그리고 아비목 3종의 상동관계 분석을 확인하기 위하여 National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 자료와 비교하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 암수 확인된 종에서 기존 primer set 확인

야생조류 중 부검으로 성감별이 확인된 9종에서 대해서 *CHD* gene region을 각 특이 primer set으로 PCR한 결과, P2-P8 primer set에서 부검 결과와 동일한 종은 7종이었다(Figure 1). P2-NP-MP primer set에서는 9종 모두 비특이적 밴드가 관찰되어 성별을 명확히 구별할 수 없었다(Figure 2). 2550F-2718R primer set에서는 9종 중 7종이 일치되는 결과를 보였다(Figure 3).

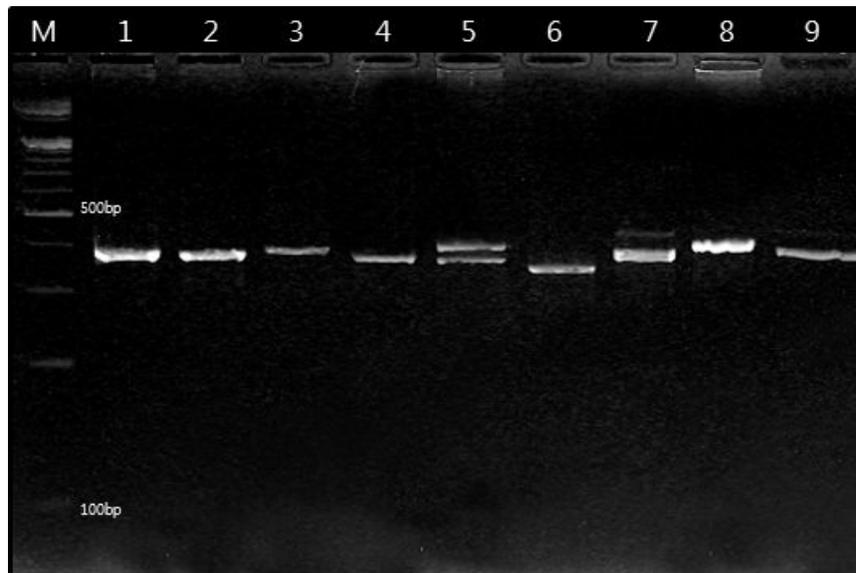


Figure 1. Electrophoresis pattern of *CHD* Z/W gene in 9 species after PCR with P2 and P8 primer set. M: 100bp ladder, line 1: *Ardea cinerea*, 2: *Nycticorax nycticorax*, 3: *Accipiter nisus*, 4: *Columba livia*, 5: *Larus crassirostris*, 6: *Anser anser*, 7: *Ixobrychus eurhythmus*, 8: *Falco peregrinus*, 9: *Phalacrocorax carbo*

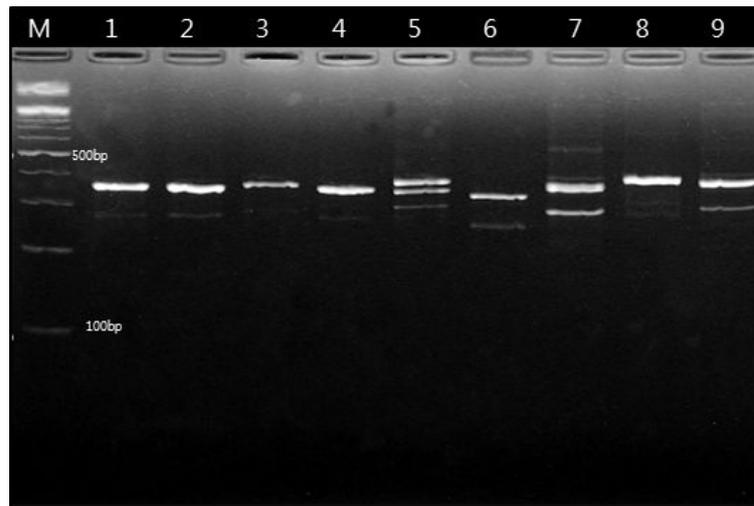


Figure 2. Electrophoresis pattern of *CHD Z/W* gene in 9 species after PCR with P2-NP-MP primer set. M: 100bp ladder, line 1: *Ardea cinerea*, 2: *Nycticorax nycticorax*, 3: *Accipiter nisus*, 4: *Columba livia*, 5: *Larus crassirostris*, 6: *Anser anser*, 7: *Ixobrychus eurhythmus*, 8: *Falco peregrinus*, 9: *Phalacrocorax carbo*

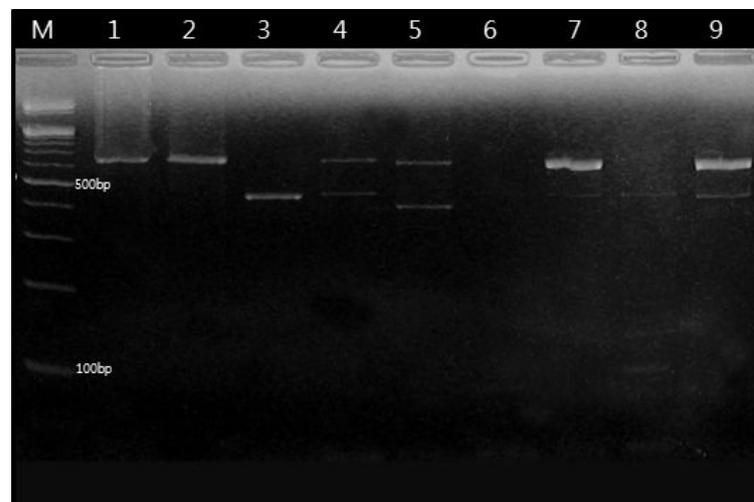


Figure 3. Electrophoresis pattern of *CHD Z/W* gene in 9 species after PCR with 2550F and 2718R primer set. M: 100bp ladder, line 1: *Ardea cinerea*, 2: *Nycticorax nycticorax*, 3: *Accipiter nisus*, 4: *Columba livia*, 5: *Larus crassirostris*, 6: *Anser anser*, 7: *Ixobrychus eurhythmus*, 8: *Falco peregrinus*, 9: *Phalacrocorax carbo*

2. 아비목에서 P2-P8, P2-NP-MP, 2550F-2718R 비교

아비목 3종(아비, 회색머리아비, 큰회색머리아비) 중에서 부검으로 암수가 확인된 암수 각 1마리 중 *CHD* gene 특이 primer 2550F-2718R로 PCR한 결과 아비목 3종 모두에서 수컷(ZZ) 1밴드, 암컷(ZW) 2밴드가 확실히 관찰되었다(Figure 4). 그러나 P2-P8 primer에서는 불명확한 밴드가, P2-NP-MP primer에서는 불필요한 비특이적 밴드가 관찰되었다(Figure 5).

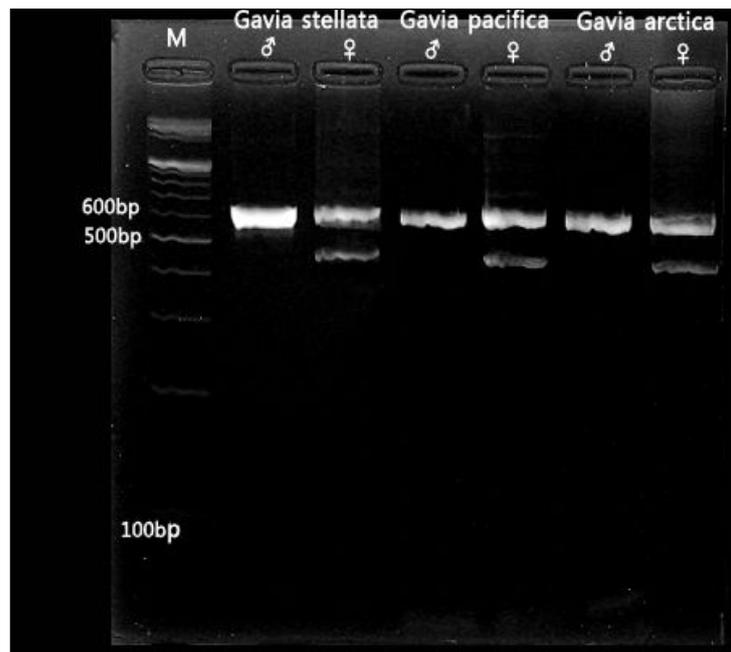
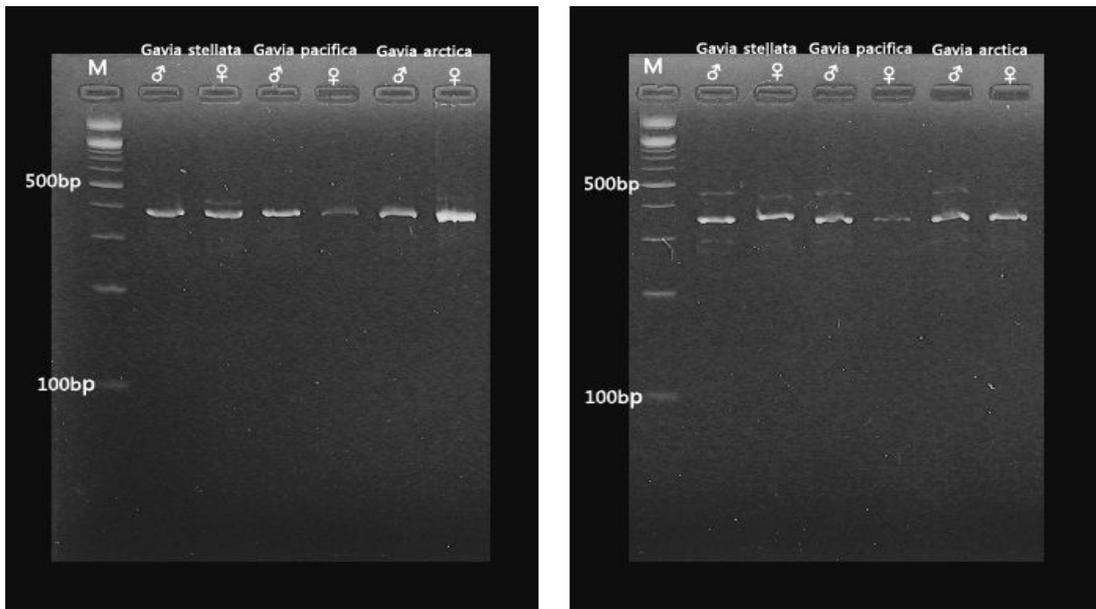


Figure 4. Electrophoresis pattern of *CHD* Z/W gene after PCR amplification with the 2550F-2718R primer in 3 Gaviiformes species (*Gavia stellata*, *G. pacifica*, *G. arctica*). M: 100bp. Z: 647~650bp, W:461~464bp.



(A)

(B)

Figure 5. Electrophoresis pattern of *CHD Z/W* gene after PCR amplification with the P2-P8 primer (A) and P2-NP-MP primer (B) in 3 Gaviiformes species (*Gavia stellata*, *G. pacifica*, *G. arctica*). M: 100bp.

위의 실험의 결과를 토대로 아비목 조류의 성별을 감별하는데 있어서 2550F-2718R primer을 이용하는 것이 적합한 것으로 확인되었다. 본 실험 대상 아비목 총 22마리 중에서 암컷의 비율은 아비 2/3(67%), 회색머리아비 10/13(80%), 큰회색머리아비 4/6(75%) 등으로 수컷에 비해 개체수가 많은 것으로 나타났다(Table 4).

Table 4. Sex identification by PCR in Gaviiformes

Gaviiformes species	Control group (known sex)			Study group (unknown sex)			Sum		
	M	F	Total	M	F	Total	M	F	Total
<i>Gavia stellata</i>	1	1	2	0	1	1	1	2	3
<i>Gavia pacifica</i>	1	1	2	2	9	11	3	10	13
<i>Gavia arctica</i>	1	1	2	1	3	4	2	4	6
Total	3	3	6	3	13	16	6	16	22

3. 아비목 *CHD* 유전자 염기서열 및 상동관계 분석

아비목 3종(*Gavia stellata*, *Gavia pacifica*, *Gavia arctica*)에 대한 2550F-2718R로 PCR한 결과에서 *CHD-W* 크기는 각각 461, 464와 463 bp 였고(Table 5), *CHD-Z*는 각각 650, 648와 649 bp 였다(Table 6). *CHD-W*와 *CHD-Z* 유전자의 상동관계 조사에서 아비와 회색머리아비는 각각 97%와 98%, 회색머리아비와 큰회색머리아비 98%와 98%, 아비와 큰회색머리아비는 99%와 98%의 유사성을 보였다(Figure 6, 7).

Table 5. The *CHD-W* gene sequences in 3 Gaviiformes species

Species	<i>CHD-W</i> gene sequencing
<i>Gavia stellata</i> (461bp)	GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCTCT CAGATGGTGAGGATGCTAGACATCCTAGCAGAGTATTTGAAGTATCGT CAGTTTCCCTTTTCAGGTAAGAATTTTGCTGGTAGTAGCCAAGAAGCCTT GATCTTTACCACTTTATCTTAAGAAAAGTGCCTTGTTGTAGAAAGACTT ATGAAAGTTTAATTTTATGTACAGGAAAAGACTGGCAATTACTATATGC TAAAAAGTATTTTGAAATGAACTAATGAATTAGAAAGATGAAGTGTTA CATTATTCTTATTCCCTCCCCCCCCCAATTGTTTTGGCAATTGAGAATTCAA GTTGCTCTGATTAGAATATAGTAGAAGTTCCTTTTTAACTGTATTAATCA ATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAAGGGGAATTGAGGAAACA AGCACTGGATCATTTCAT
<i>Gavia pacifica</i> (464bp)	GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCTCT CAGATGGTGAGGATGCTAGACATCCTAGCAGAGTATTTGAAGTATCGT CAGTTTCCCTTTTCAGGTAAGAATTTTGCTGGTAGTAGCCAAGAAGCCTT GATCTTTACCACTTTATCTTAAGAAAAGTGCCTTGTTGTAGAAAGACTT ATGAAAGTTTAATTTTATGTACAGGAAAAGACTGGCAATTACTATATGC TAAATAATATTTTGAAATGAACTGATGAATTAGAAAGATGAAGTGTTA CATTACTCTTATTCCCCCCCCCCCCCAATTGTTTTGGCAATTGAGAATT CAAGTTGCTCTGATTAGAATATAGTAGAAGTTCCTTTTTAACTGTATTAT TCAATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAGGGGGAATTGAGGAA GCAAGCACTGGATCATTTCAT
<i>Gavia arctica</i> (463bp)	GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCTCT CAGATGGTGAGGATGCTAGACATCCTAGCAGAGTATTTGAAGTATCGT CAGTTTCCCTTTTCAGGTAAGAATTTTGCTGGTAGTAGCCAAGAAGCCTT GATCTTTACCACTTTATCTTAAGAAAAGTGCCTTGTTGTAGAAAGACTT ATGAAAGTTAATTTTATGTACAGGAAAAGACTGGCAATTACTATATGCT AAATAGTATTTTGAAATGAACTGATGAATTAGAAAGATGAAGTGTTAC ATTACTCTTATTCCCCCCCCCCCCCAATTGTTGTTTTGGCAATTGAGAATTC AAGTTGCTCTGATTAGAATATAGTAGAAGTTCCTTTTTAACTGTATTATT CAATCTCTTTAGAGACTTGATGGATCAATAAAAGGGGGAATTGAGGAAA CAAGCACTGGATCATTTCAT

Table 6. The *CHD-Z* gene sequences in 3 Gaviiformes species

Species	<i>CHD-Z</i> gene sequencing
<i>Gavia stellata</i> (650bp)	GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCA CAGATGGTGC GGATGCTGGACATCCTAGCAGAGTATTTGAAGTATCGTC AGTTTCCCTTTCAGGTAAGAATCTTGGTAGTAGCAGCCAAGAAGCTTTG GTCTGGAATATAGCAAAAATCATTCTTTACTCTGAGTAAACAAGTTGTC TG TAGATTATGGAATCTCCATCCTCTGTGATGTTCAAAGCCTCCTGGAC CTGACCTTGGGCAACATGTTTTAGCTGTTCTGCCTGAGTAGGGGAGTT AGATAGGATGACCTCGAGAGGTCCCATGCAACCTCACCTGTTTTTTGTG ATTATGTGATCTTTACCACTTTTCTTACGAAAAGATATAAGAAAAAGTGT TCTTTCCATAAAAAGACCAGCAATTGTTATAGGCTAAATAATATTTTGAA ATTAAATTGATGAATCAAAAACTATGTGAAGTGTTGCATTATTTTTTTC CCCTCACATAACAGTTGTGGCAGTTGAGAATTCAAATTGCTCTGATTTTG AATATACTGTAAGAATTACTTTTTAACTGTAGTATAACAATCTCTTTAGAG GCTGGATGGATCAATAAAAAGGGGAATTGAGGAAACAAGCACTGGATCA TTCAAT
<i>Gavia pacifica</i> (648bp)	GTTACTGATTCGTCCACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCA CAGATGGTGC GGATGCTGGACATCCTAGCAGAGTATTTGAAGTATCGTC AGTTTCCCTTTCAGGTAAGAATCTTGGTAGTAGCAGCCAAGAAGCTTTG GTCTGGAATATAGCAAAAATCGTTTCTTTACTCCGAGTAAACAAGTTGTC TG TAGATTATGGAATCTCCATCCTCTGTGATGTTCAAAGCCTCCTGGAC CTGACCTTGGGCAACATGTTTTAGCTGTTCTGCCTGAGTAGGGGAGTT AGTTAGGATGACCGCGAGAGGTCCCATGCAACCTCAACTATTTTGTGAT TATGTGATCTTTACCACTTTTCTTACGAAAATATATAAGAAAAAGTGTT TTCCATAAAAAGACCAGCAATTGTTATAGGCTAAATAGTATTTTGAAAT TAAACTGATGAATCAAAAAATTATGTGAAGTGTTGCATTATTTTTTCCC CTCACATAACAGTTGTGGCAGTTGAGAACTCAGATTGCTCTGATTTTGA ATATACTGTAAGAATTATTTTTTAACTGTAGTATAACAATCTCTTTAGAGG CTGGATGGATCAATAAAAAGGGGAATTGAGGAAACAAGCACTGGATCAT TTCAAT
<i>Gavia arctica</i> (649bp)	GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCA CAGATGGTGC GGATGCTGGACATCCTAGCAGAGTATTTGAAGTATCGTC AGTTTCCCTTTCAGGTAAGAATCTTGGTAGTAGCAGCCAAGAAGCTTTG GTCTGGAATATAGCAAAAATCGTTTCTTTACTCCGAGTAAACAAGTTGTC TGTTAGATTATGGAATCTCCATCCTCTGTGATGTTCAAAGCCTCCTGGA CCTGACCTTGGGCAACATGTTTTAGCTGTTCTGCCTGAGTAGGGGAGT TAGTTAGGATGACTGCGAGAGGTCCCATGCGACCTCAACTATTTTGTGA TTATGTGATCTTTACCACTTTTCTTACGAAAATATGTAAGAAAAAGTGTT CTTTCCATAAAAAGACCAGCAATTGTTATAGGCTAAATAGTATTTTGAAA TTAAACTGATGAATCAAAAAATTATGTGAAGTGTTGCATTATTTTTTCC CCTCACATAACAGTTGTGGCAGTTGAGAATTCAGATTGCTCTGATTTTGA ATATACTGTAAGAATTATTTTTTAACTGTAGTATAACAATCTCTTTAGAGG CTGGATGGATCAATAAAAAGGGGAATTGAGGAAACAAGCACTGGATCAT TTCAAT

```

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

Gavia_stellata_CHD-W      GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCTCTCAGATGGTGAG
Gavia_arctica_CHD-W       GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCTCTCAGATGGTGAG
Gavia_pacifica_CHD-W     GTTACTGATTCGTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTACTGATTTTCTCTCAGATGGTGAG
*****

Gavia_stellata_CHD-W      GATGCTAGACATCCTAGCAGAGTATTTGAAGTATCGTCAGTTTCCCTTTCAGGTAAGAAT
Gavia_arctica_CHD-W       GATGCTAGACATCCTAGCAGAGTATTTGAAGTATCGTCAGTTTCCCTTTCAGGTAAGAAT
Gavia_pacifica_CHD-W     GATGCTAGACATCCTAGCAGAGTATTTGAAGTATCGTCAGTTTCCCTTTCAGGTAAGAAT
*****

Gavia_stellata_CHD-W      TTGCTGGTAGTAGCCAAGAAGCCTTGATCTTTACCCTTTTATCTTAAGAAAAGTGTCCT
Gavia_arctica_CHD-W       TTGCTGGTAGTAGCCAAGAAGCCTTGATCTTTACCCTTTTATCTTAAGAAAAGTGTCCT
Gavia_pacifica_CHD-W     TTGCTGGTAGTAGCCAAGAAGCCTTGATCTTTACCCTTTTATCTTAAGAAAAGTGTCCT
*****

Gavia_stellata_CHD-W      TGTGTAGAAAAGACTTATGAAAGTTTAAATTTTATGTACAGGAAAAGACTGGCAATTACTA
Gavia_arctica_CHD-W       TGTGTAGAAAAGACTTATGAAAGTTTAAATTTTATGTACAGGAAAAGACTGGCAATTACTA
Gavia_pacifica_CHD-W     TGTGTAGAAAAGACTTATGAAAGTTTAAATTTTATGTACAGGAAAAGACTGGCAATTACTA
*****

Gavia_stellata_CHD-W      TATGCTAAAAAGTATTTTGAAGTAACTAATGAATTAGAAAAGATGAAGTGTACATTAT
Gavia_arctica_CHD-W       TATGCTAAATAGTATTTTGAAGTAACTGATGAATTAGAAAAGATGAAGTGTACATTAC
Gavia_pacifica_CHD-W     TATGCTAAATAATATTTTGAAGTAACTGATGAATTAGAAAAGATGAAGTGTACATTAC
***** * *****

Gavia_stellata_CHD-W      TCTTATTCCTCCCCCCCCCAATTGTT---TTGGCAATTGAGAATCAAGTTGCTCTGATTA
Gavia_arctica_CHD-W       TCTTATTCCTCCCCCCCCCAATTGTTGTTTGGCAATTGAGAATCAAGTTGCTCTGATTA
Gavia_pacifica_CHD-W     TCTTATTCCTCCCCCCCCCAATTGTTTGGCAATTGAGAATCAAGTTGCTCTGATTA
***** ***** ** *****

Gavia_stellata_CHD-W      GAATATAGTAGAAGTTCCTTTTTAACTGTATTAACTCAATCTCTTTAGAGACTTGTGGAT
Gavia_arctica_CHD-W       GAATATAGTAGAAGTTCCTTTTTAACTGTATTAACTCAATCTCTTTAGAGACTTGTGGAT
Gavia_pacifica_CHD-W     GAATATAGTAGAAGTTCCTTTTTAACTGTATTAACTCAATCTCTTTAGAGACTTGTGGAT
*****

Gavia_stellata_CHD-W      CAATAAAGGGGAATTGAGGAACAAGCACTGGATCATTTCAT
Gavia_arctica_CHD-W       CAATAAAGGGGAATTGAGGAACAAGCACTGGATCATTTCAT
Gavia_pacifica_CHD-W     CAATAAAGGGGAATTGAGGAAGCAAGCACTGGATCATTTCAT
*****

```

Figure 6. *CHD-W* gene multiple sequence alignment in 3 Gaviiformes species (*Gavia stellata*, *Gavia pacifica*, *Gavia arctica*).

```

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

Gavia_pacifica_CHD-Z      GTTACTGATTGCTCCACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCACAGATGGTGCG
Gavia_arctica_CHD-Z      GTTACTGATTGCTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCACAGATGGTGCG
Gavia_stellata_CHD-Z     GTTACTGATTGCTCTACGAGAACGTGGCAACAGAGTTCTGATTTTCTCACAGATGGTGCG
*****

Gavia_pacifica_CHD-Z      GATGCTGGACATCCTAGCAGAGTATTTGAAGTATCGTCAGTTTCCCTTTCAGGTAAGAAT
Gavia_arctica_CHD-Z      GATGCTGGACATCCTAGCAGAGTATTTGAAGTATCGTCAGTTTCCCTTTCAGGTAAGAAT
Gavia_stellata_CHD-Z     GATGCTGGACATCCTAGCAGAGTATTTGAAGTATCGTCAGTTTCCCTTTCAGGTAAGAAT
*****

Gavia_pacifica_CHD-Z      CTTGGTAGTAGCAGCCAAGAAGCTTTGGTCTGGAATATAGCAAAAATCGTTTCTTTACTC
Gavia_arctica_CHD-Z      CTTGGTAGTAGCAGCCAAGAAGCTTTGGTCTGGAATATAGCAAAAATCGTTTCTTTACTC
Gavia_stellata_CHD-Z     CTTGGTAGTAGCAGCCAAGAAGCTTTGGTCTGGAATATAGCAAAAATCAITTCITTTACTC
*****

Gavia_pacifica_CHD-Z      CGAGTAAACAAGTTGTCTGT-AGATTATGGAATCTCCATCCTCTGTGATGTTCAAAGCC
Gavia_arctica_CHD-Z      CGAGTAAACAAGTTGTCTGT-AGATTATGGAATCTCCATCCTCTGTGATGTTCAAAGCC
Gavia_stellata_CHD-Z     TGAGTAAACAAGTTGTCTGT-AGATTATGGAATCTCCATCCTCTGTGATGTTCAAAGCC
*****

Gavia_pacifica_CHD-Z      TCCTGGACCTGACCTTGGGCAACATGTTTTAGCTGTTCCCTGCCTGAGTAGGGGAGTTAGT
Gavia_arctica_CHD-Z      TCCTGGACCTGACCTTGGGCAACATGTTTTAGCTGTTCCCTGCCTGAGTAGGGGAGTTAGT
Gavia_stellata_CHD-Z     TCCTGGACCTGACCTTGGGCAACATGTTTTAGCTGTTCCCTGCCTGAGTAGGGGAGTTAGA
*****

Gavia_pacifica_CHD-Z      TAGGATGACCCGAGAGGTCCTCATGCAACCTCAACTATTTT--GTGATTATGTGATCTTT
Gavia_arctica_CHD-Z      TAGGATGACTGCGAGAGGTCCTCATGCGACCTCAACTATTTT--GTGATTATGTGATCTTT
Gavia_stellata_CHD-Z     TAGGATGACCTCGAGAGGTCCTCATGCAACCTCACCTGTTTTTTGTGATTATGTGATCTTT
*****

Gavia_pacifica_CHD-Z      ACCACTTTTCTTACGAAAATATATAAGAAAAAGTGTCTTTCCATAAAAAGACCAGCAAT
Gavia_arctica_CHD-Z      ACCACTTTTCTTACGAAAATATGTAAGAAAAAGTGTCTTTCCATAAAAAGACCAGCAAT
Gavia_stellata_CHD-Z     ACCACTTTTCTTACGAAAAGATATAAGAAAAAGTGTCTTTCCATAAAAAGACCAGCAAT
*****

Gavia_pacifica_CHD-Z      TGTATAGGCTAAATAGTATTTTGAATTAAGTATGAAATCAAAAATATATGTGAAGTG
Gavia_arctica_CHD-Z      TGTATAGGCTAAATAGTATTTTGAATTAAGTATGAAATCAAAAATATATGTGAAGTG
Gavia_stellata_CHD-Z     TGTATAGGCTAAATAATATTTTGAATTAAGTATGAAATCAAAAATATATGTGAAGTG
*****

Gavia_pacifica_CHD-Z      TTGCATTATTTTTTCCCTCACATAACAGTTGTGGCAGTTGAGAATCAGATTGCTCTG
Gavia_arctica_CHD-Z      TTGCATTATTTTTTCCCTCACATAACAGTTGTGGCAGTTGAGAATCAGATTGCTCTG
Gavia_stellata_CHD-Z     TTGCATTATTTTTTCCCTCACATAACAGTTGTGGCAGTTGAGAATCAAATTGCTCTG
*****

Gavia_pacifica_CHD-Z      ATTTTGAATATACTGTAAGAATTATTTTTTAACTGTAGTATAACAATCTCTTTAGAGGCTG
Gavia_arctica_CHD-Z      ATTTTGAATATACTGTAAGAATTATTTTTTAACTGTAGTATAACAATCTCTTTAGAGGCTG
Gavia_stellata_CHD-Z     ATTTTGAATATACTGTAAGAATTACTTTTTTAACTGTAGTATAACAATCTCTTTAGAGGCTG
*****

Gavia_pacifica_CHD-Z      GATGGATCAATAAAAAGGGGAATTGAGGAAACAAGCACTGGATCATTTCAT
Gavia_arctica_CHD-Z      GATGGATCAATAAAAAGGGGAATTGAGGAAACAAGCACTGGATCATTTCAT
Gavia_stellata_CHD-Z     GATGGATCAATAAAAAGGGGAATTGAGGAAACAAGCACTGGATCATTTCAT
*****

```

Figure 7. *CHD-Z* gene multiple sequence alignment in 3 Gaviiformes species (*Gavia stellata*, *Gavia pacifica*, *Gavia arctica*)

IV. 고 찰

조류의 암수는 외부 형태 및 행동학적 그리고 분자생물학적 방법으로 알 수 있다. 형태학적으로 성적 두형태성(sexual dimorphism)이 명확한 조류는 육안적으로 성감별이 가능하지만, 참새목(Passeriformes) 조류의 60% 이상은 암수 생김새가 유사(sexual monomorphism)하여 외형적 특징만으로는 성별을 감별하는 것은 제한적이다(15, 28). 그리고 포란반(brood patch)의 유무에 의한 성감별은 조류의 포란 습성과 번식기에 한정되기에 이 방법 또한 정확히 감별하기에는 어려움이 있다. 조류의 성감별 중 복강 개복술이나 복강내시경을 통해서 성선을 확인하는 방법은 가장 정확한 방법 이기는 하지만 마취, 개복이나 복강경 준비 시간과 비용이 소요되고 침습적이기에 필요한 경우에만 제한적으로 활용되고 있다(6, 13, 29). 유전자형으로 구분하는 방법 중 핵형분석(Karyotyping)은 혈중 세포배양, 세포분열 유도 및 염색을 통해서 성염색체를 확인하는 방법으로 종간의 염색체 수가 다르고(약 80개 전후), 준비하는데 오랜 시간이 걸리며 염색체 복제가 잘 안 되는 경우가 있어서 연구목적 이외 성감별만을 위해서는 무리가 있다(2).

기준에 사용되어왔던 조류 성감별의 어려움을 극복하기 위해 Griffith 등 (1998)은 성염색체 내에 존재하는 chromo-helicase DNA binding(*CHD*) gene의 Z/W PCR amplication의 크기 차이로 감별하는 방법을 제시하였고, 이 방법은 비침습적이면서 정확한 방법이기에 멸종위기종의 보전과 훼손된 사체를 이용한 생태연구, 진화와 계통 연구에 활용되고 있다(9, 30). Fridolfsson과 Ellegren (1999)은 *CHD* 유전자의 다른 인트론 부위가 조류의 성감별에 주요한 부위가 될 수 있다고 제시하면서(16), 조류의 유전적 변이로 인해서 성감별이 되지않은 종에서 활용되어 왔다. Ong (2007)은 조류의 깃털을 이용하여 *CHD* 유전자 성감별을 실시하였다(27). 그러나 다양한

종에 대해서 아직 연구되어 있지않을 뿐만 아니라 동일 분류군 내에서의 변이로 인해서 성감별에 어려움이 되고 있다. 예를들어, 매목(Falconiformes) 내에서도 동일 조건의 같은 primer로 성감별이 되지 않는 경우도 있다(8, 21, 32).

본 연구에서는 지금까지 연구 보고된 적이 없는 겨울철새 아비목 조류에 대해서 분자생물학적 기법을 이용하여 *CHD* 유전자로 성감별을 하였다. 아비목 조류의 성감별에 앞서 현재 활용되고 있는 P2-P8, P2-NP-MP, 2550F-2718R를 이용하여 암수가 확인된 9종 9마리에 대해서 성감별을 실시한 결과 종에 따라서 각 primer별로 차이가 있었다.

P2-P8 primer를 이용한 검사 결과에서, 새매와 민물가마우지는 부검 결과와 달랐다. 현재 민물가마우지에 대한 조류 성감별 연구논문은 찾을 수 없었으며, GeneBank에서 염기서열 및 변이 관련된 자료도 없는 상태였다. 새매의 결과가 일치하지 않은 것은 매목(Falconiformes)에서 P2-P8 primer로 증폭한 경우 암수 모두 동일한 성(ZZ)으로 관찰되는 보고가 있다(8, 21). 두 종을 제외한 다른 종에서 성감별의 결과는 부검 결과와 일치하였다.

P2-NP-MP primer를 이용한 검사 결과에서, 두 개 이상의 증폭산물로 인해서 성감별을 하는데 어려움이 있었다. NP primer를 이용한 연구보고에서도 *CHD* 유전자 증폭과정에서 2개(Z/W) 증폭이외 다른 결과를 보인다고 하였다(12). P2-NP-MP primer set은 P2-P8 primer만으로 매목(Falconiformes)의 성감별이 되지 않아서 선택 개발한 것(21)으로, 이후 다른 39목의 종에서 성감별이 가능하다는 실험 결과를 보고하였다(24). 그러나 모든 조류의 종에 적용시키기에는 제한적이다.

2550F-2718R primer를 이용한 결과에서, 거위와 새매는 성감별이 되지 않았다. 거위는 P2-P8으로 성감별되나, 새매는 P2-P8과 마찬가지로 암수에서 동일한 성(ZZ)으로 관찰되는 결과만을 보여 성감별에 활용하기엔 부적합

할 것으로 판단된다.

부검으로 암수가 확인된 아비목에 대해서 동일하게 P2-P8, P2-NP-MP, 2550F-2718R primer를 적용하여 실험한 결과 2550F-2718R가 아비목 암수 구분에 적합함이 확인되었다. P2-P8는 회색머리아비의 암컷에서 결과를 나타내지않아 성감별하기에 부적합한 것으로 판단되며, P2-NP-MP는 한가지 증폭이외 비특이적인 증폭으로 인해서 성감별에 부적합한 것으로 확인되었다. 2550F-2718R는 펭귄목(Sphenisciformes), 기러기목(Anseriformes) 등의 조류에서 성감별하기 위해 사용되는 primer set이다. 본 연구 결과에서도 아비목의 성감별에 적합한 것으로 확인되었다. 2550F-2718R는 물새류의 성감별에 사용되는 특이 primer set이라고 판단된다.

아비목 3종에 대해서 2550F-2718R primer set를 이용하여 증폭한 산물을 염기서열 분석한 결과, *CHD-Z*와 *W* 크기는 아비가 각각 650 bp, 461 bp, 회색머리아비가 648 bp, 464 bp, 큰회색머리아비가 649 bp, 463 bp였다. 아비목 3종의 *CHD* 유전자 염기서열을 분석한 결과 중간 차이를 보였다(Figure 6, 7). 아비목 3종에서 *CHD-Z*는 97~99% 유사도를 *CHD-W*는 각각 98% 유사도를 나타내었다. 현재 다른 조류의 종 감별은 *Cytochrome b*을 이용한 연구보고(9)가 있었다. 아비목 3종의 감별은 *CHD* 유전자 변이 부위에 대한 PCR-RFLP 혹은 변이 부위를 포함한 감별 primer 제작을 통해서 가능할 것으로 판단된다. 비번식깃의 아비목 조류는 형태적인 특징이 유사하여 종식별에 어려움이 있었는데(1), 아비 종감별의 수단으로 가치가 있을 것으로 판단된다. 본 실험에 사용된 아비목의 3종에 대해서 성감별한 결과 암컷의 비율이 높았다. 제주야생동물구조센터에서 구조된 아비류는 대부분 기름오염에서 구출된 개체로서 성별에 관계없이 무작위로 선별되었을 것이나 아마도 암컷에 편향된 성비(sex ratio)는 암수의 월동지 분화 등 생태적 요인과 관련이 있을 것으로 보인다. 향후 좀 더 많은 개체 확보 및 조사 연구를 통해서 생태연구나 기후변화의 감시 방법으로 활용될 수 있을 것이

다.

본 실험에서 아직까지 연구되지않은 아비목 조류 성감별에 적합한 primer와 조건을 확인하였고, 아비목 3종에 대한 CHD Z/W 유전자 염기서열과 중간 비교를 실시하였다. 본 결과가 아비목의 생태 연구에 기초자료가 될 수 있을 것으로 판단된다.

V. 결 론

제주야생동물구조센터에서 구조된 조류의 혈액으로 성감별 판별하고, 거울 철새 아비목의 *CHD* 유전자 클로닝과 염기서열을 분석한 결과 다음과 같다.

P2-P8 primer set을 이용한 암수 성감별은 부검으로 확인된 품종과 일치하는 것이 9종 중 7종, P2-NP-MP는 9종 중 2종, 2550F-2718R은 9종 중 7종이었다.

아비목 암수 성감별을 위해서 2550F-2718R primer set이 부적합하였다. 그리고 이를 이용한 증폭산물에서 *CHD-W*는 461~464bp, *CHD-Z*는 648~650bp 였다. 아비목 3종간 *CHD-Z*의 유사성은 97~99%이며, *CHD-W*는 98% 였다.

아비목의 성감별에는 2550F-2718R primer set이 적합하며, 아비목 3종간 염기서열의 차이를 통해서 종 감별도 가능하리라 판단된다.

VI. 참고 문헌

1. Appleby RH, Madge SC, Mullarney K. Identification of divers in immature and winter plumages. *Brit Birds* 1986; 79(8): 365-391
2. Archawaranon M. Rapid sexing Hill Mynah *Gracula religiosa* by sex chromosomes. *Biotechnology* 2004; 3: 160-164.
3. Aun RTS, Kumaran JV, Gender identification of domesticated chicken using a PCR-based method. *Pertanika J Trop Agric Sci* 2010; 33: 329-336
4. Bermúdez-Humarán LG, Chávez-Zamarripa P, Guzmán-Velasco A, Leal-Garza CH, Montes de Oca-Luna R. Loss of Restriction Site *Dde I*, Used for Avian Molecular Sexing, in *Oreophasis derbianus*. *Reprod Domest Anim* 2002; 37: 321-323.
5. Bryja J, Konečný A. Fast sex identification in wild mammals using PCR amplification of the *Sry* gene. *Folia Zool Brno* 2003; 52: 269-274.
6. Camphuysen C.J. De herkenning van duikers Gaviidae in de hand. [The identification of divers in the hand]. *Sula* 1995; 9: 45-64
7. Cerit H, Avanus K. Sex identification in avian species using DNA typing methods. *Worlds Poult Sci J* 2007; 63: 91-99.
8. Chang HW, Chou TC, Gu DL, Cheng CA. An improved PCR method for gender identification of eagles. *Mol Cell Probes* 2008; 22: 184-188.
9. Chang HW, Chou YC, Su YF, Cheng CA, Yao CT, Tsai CL, Lee HC, Wen CH, Cheng CC. Molecular phylogeny of the *Pycnonotus*

- sinensis* and *Pycnonotus taivanus* in Taiwan based on sequence variations of nuclear *CHD* and mitochondrial *cytochrome b* genes. *Biochemical systematics and ecology* 2010; 2: 195–201
10. Dawson DA, Darby S, Hunter FM, Krupa AP, Jones I L, Burker T. A critique of avian *CHD*-based molecular sexing protocols illustrated by a *Z*-chromosome polymorphism detected in auklets. *Mol Ecol Notes* 2001; 1: 201–204.
 11. Donohue KC, Dulyu Jr AM. Sex determination of red-tailed hawks (*Buteo jamicensis calurus*) using DNA analysis and morphometrics. *Field Omithol* 2006; 77: 74–79.
 12. Duan Wand Fuerst PA. Isolation of a Sex-Linked DNA Sequence in Cranes. *J Hered* 2001; 92: 392–397.
 13. Dubiec A, Zagalska-Neubauer M. Molecular techniques for sex identification in birds. *Biological lett* 2006; 43: 3–12.
 14. Ellegren H. First gene on the avian W chromosome (*CHD*) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proc Biol Sci* 1996; 263: 1635–1644.
 15. Fillon V, Sequela A. Chromosomal sexing of birds. *Rev Med Vet* 1995; 146: 53–58.
 16. Fridolfsson AK, Ellegren H. A simple and universal methods for molecular sexing of non-ratitebirds. *J Avian Biol* 1999; 30: 116–121.
 17. Griffiths R, Double M, Orr K, Dawson R. A DNA test to sex most birds. *Mol Ecol* 1998; 7: 1071–1075.
 18. Hammond JBW, Spanswick G, Mawn JA. Extraction of DNA from preserved animal specimens for use in randomly amplified

- polymorphic DNA analysis. *Anal Biochem* 1996; 240: 298–300.
19. Hattori K, Burdin AM, Onuma M, Suzuki M, Ohtaishi N. Sex determination in the sea otter (*Enhydra lutris*) from tissue and dental pulp using PCR amplification. *Can J Zool* 2003; 81: 52–56.
 20. Hori T, Asakawa S, Itoh Y, Shimizu N, Mizuno S. Wpkci, encoding an altered form of PKCI, is conserved widely on the avian W chromosome and expressed in early female embryos: implication of its role in female sex determination. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 3645–3660.
 21. Ito H, Sudo-Yamaji A, Abe M, Murase T, Tsubota T. Sex Identification by Alternative Polymerase Chain Reaction Methods in Falconiformes. *J Zool Sci* 2003; 20: 339–344.
 22. Itoh Y, Suzuki M, Ogawa A, Munechika K, Murata K, Mizuno S. Identification of the sex of a wide range of Carinatae birds by PCR using primer sets selected from chicken EE0.6 and its related sequences. *J Hered* 2001; 92: 315–321.
 23. Naim DM, Nor SAM, Baharuddin MH. Non-invasive sex identification of the white-bellied sea eagle (*Haliaeetus leucogaster*) through genetic analysis of feathers. *Genetics and Molecular Research* 2011; 10: 2505–2510.
 24. Lee MY, Hong YJ, Park SK, Kim YJ, Choi TY, Lee H, Min MS. Application of Two Complementary Molecular Sexing Methods for East Asian Bird Species. *Genes & Genomics* 2008; 30: 365–372.
 25. Lee WS, Koo TH, Park JY. *A Field Guide to the Birds of Korea*.

- LG Evergreen Foundation 2000: 13–328.
26. O'Neill M, Binder M, Smith C, Andrews J, Reed K, Smith M, Millar C, Lambert D, Sinclair A. ASW: a gene with conserved avian W-linkage and female specific expression in chick embryonic gonad. *Development Genes and Evolution* 2000; 210: 243–249.
 27. Ong AH, Vellayan S. An evaluation of CHD-specific primer sets for sex typing of birds from feathers. *Zoo Biol* 2008; 27: 62–69.
 28. Price T, Birch GL. Repeated evolution of sexual color dimorphism in passerine birds. *Auk* 1996; 113: 842–848.
 29. Richner H. Avian laparoscopy as a field technique for sexing birds and an assessment of its effects on wild birds. *J Field Ornithol* 1989; 60: 137–142.
 30. Robertson BC, Minot EO, Lambert DM. Molecular sexing of individual kakapo, *Strigops habroptilus* Aves, from faeces. *Mol Ecol* 1999; 8: 1347–1350.
 31. Sabo TJ, Kesseli R, Halverson JL, Nisbet ICT, Hatch JJ. PCR-based method for sexing roseate terns (*Sterna dougallii*). *Auk* 1994; 111: 1023–1027.
 32. Sacchi P, Soglia D, Maione S, Meneguz G, Campora M, Rasero R. A non-invasive test for sex identification in Short-toed Eagle (*Circus gallicus*). *Mol Cell Probes* 2004; 18: 193–196.
 33. Väli Ü, Elts J. Molecular sexing of Eurasian Woodcock *Scolopax rusticola*. *Wader Study Group Bull* 2002; 98: 48.
 34. Williams CL, Breck SW, Baker BW. Genetic methods improve accuracy of gender determination in beavers. *J Mammal* 2004;

85: 1145–1148.

35. Yamamoto K, Tsubota T, Komatsu T, Katayama A, Murase T, Kita I, Kudo T. Sex Identification of Japanese Black Bear, *Ursus thibetanus japonicus*, by PCR based on Amelogenin Gene. *Theriogenology* 2002; 64: 505–508.

Abstract

Sex Identification and Polymorphism of Chromo-Helicase-DNA binding Gene (*CHD*) in Gaviiformes

Ji-Hwan Moon

(Supervised by Professor : Young-min Yun)

Department of Veterinary Medicine
Graduate School, Jeju National University

Avian sex identification plays important roles in evolution, breeding, ecology and avian disease research. Sex identification of some avian species can be determined by morphological traits alone, but that's not in numerous species. Molecular methods using specific primer sets to easily and accurately the sex identification, but the same primer sets in various species are often not identified. Currently, it is not achieved appropriate primer set and sequence analysis of Chromo-Helicase-DNA binding (*CHD*) gene of winter migrant Gaviiformes

In this study, sex determined birds which rescued from Jeju Wildlife Rescue Center by autopsy are 9 species 9 birds, sexually 3 species (Gaviiformes), and undetermined 16 birds (Gaviiformes) were studied. Gaviiformes were confirmed sex identification using

previously known for the *CHD* gene primer sets (P2-P8, P2-NP-MP, 2550F-2718R), were analyzed *CHD*-Z/W sequencing and Homology analysis on amplified PCR product.

There are confirmed different results between 2 species using P2-P8, P2-NP-MP, 2550F-2718R about the sexually identified bird. 2550F-2718R is appropriate primer set in Gaviiformes, female ratio results of sex identification of unidentified 16 Gaviiformes is *Gavia stellata* 2/3 (67%), *Gavia pacifica* 10/13 (80%), *Gavia arctica* 4/6 (75%). The results of homology analysis of *CHD*-Z gene is between *Gavia stellata* and *Gavia pacifica* 97%, *Gavia pascifica* and *Gavia arctica* 98%, *Gavia stellata* and *Gavia pacifica* 99%. The results of *CHD*-W Gene is all 98%.

These results are not separated from the outward appearance three species primer set for the sex was determined, species discrimination using *CHD* gene with genetic differences will be possible.

KEY WORDS: Chromo-Helicase-DNA binding (*CHD*) gene, sex identification, polymorphism, Gaviiformes

감사의 글

어느새 시간은 흘러 10년이라는 시간이 지났습니다. 10년 전은 진로걱정을 하던 고등학교 3학년 시절이었는데, 그때의 고민은 ‘내가 정말 좋아하는 일은 무엇이고, 난 무엇을 향해 가야 행복할 수 있는가?’라는 고민 이었는데, 그 고민을 해결하기까지 10년이라는 세월이 흘렀습니다. 수의대 재학시절 수의학 외의 길에 상당히 심취도 했었고, 동경도 했던 때가 있었습니다. 그리고 시간의 흐름에 몸을 던져 시간을 허송세월 보냈던 시절도 있었습니다. 그러한 시절이 가끔은 타임머신 타고 다시 형클어진 매듭을 바로 잡고 싶던 망상도 종종했었던 시간도 있었습니다. 그러한 세월을 혹자는 성인이 되기 전에 겪는 오춘기라고 부르더군요. 사춘기를 넘어 오춘기가 찾아온 시절을 보내고 나서야 10년 전의 그 고민에서 해방을 맞게 되었습니다. 지나고 나서야 알고 후회되는 것들은 어찌면, 지금을 좀 더 알차게 보낼 수 있게 되는 원동력이라 생각합니다. 제가 성숙할 수 있도록 도와주신 많은 분들께 감사합니다. 그리고 이제 그 10년의 고민의 끝에 얻은 해답을 향해 나아가려 합니다.

이제는 어느덧 엄마와 아빠라고 부르기에 부쩍 커버린 저이지만, 항상 어린애마냥 투정부리는 저를 다독여주며 올바른 길로 이끌어주시고, 후원해주신 부모님께 감사합니다. 아무런 준비도 되지 않았던 저를 이끌어주신 윤영민 교수님 항상 감사합니다. 바쁘신 일정에 제가 큰 짐이 되어드린 것 같아 항상 죄송스러우며, 지금의 부족한 부분은 빨리 채워가도록 하겠습니다. 늘 어디에 가서든 교수님의 훌륭한 가르침에 보답하도록 열심히 하겠습니다. 환한 웃음으로 농담을 건네시며 내과실의 아버지, 이경갑교수님 항상 감사합니다. 대학원 수업마다 기다려졌던 교수님의 좋은 강의와 만찬은 항상 그립습니다. 뜬금없이 학부생 졸업논문으로 병원경영학이라는 테마를 가지고 강태영 교수님을 찾아뵈었을 때, 교수님의 적극적인 지원 덕에 학부생시절의

좋은 추억이 생겨 감사합니다. 교수님의 따뜻한 충고와 조언은 항상 깊이 새기며 열심히 하겠습니다. 학부생시절 갈팡질팡하던 시절에 좋지 않은 모습으로 마무리하게 되어버린 것 같아 항상 죄송한 김재훈교수님. 교수님의 쓴소리와 격려의 말을 되새기며 좋은 수의사가 되도록 하겠습니다. 혜성같이 나타나서 도와주셨던 손원근 교수님 감사합니다. 덕분에 마무리가 잘 되어 항상 감사합니다. 진희 누나, 항상 부족한 제게 길잡이로 이끌어주신거 너무너무 감사합니다. 내과실에 일주일에 한 번씩 나타나서 사라지고, 학부 시절부터 내과실 일원이 아니다보니 거리감을 가지게 되어 잘 해주지 못해 미안한 후배님들. 많은 고민이 아니더라도, 혹여나 내가 해줄 수 있는 상담이 있다면 언제든지 해주세요. 영신이형 덕분에 좋은 마무리 하게 되었습니다. 고마워요. 6년간 함께하며 서로의 든든한 버팀목으로 견디게 되었던 우리 동기들. 공방수 3기 전우들! 지금은 각자의 길에서 수련을 시작해야 되는 다시 초년생의 입장이겠지만, 재미있는 시련과 과정이니 다들 힘내자고요~

어렸을 땐, 군림하던 형이었지만 어느 순간 친구처럼 조언과 가끔은 주객이 전도 되어 서로 고민상담 해 준 브라더 땡큐, 어느새 형이 아빠가 되는데 참 실감이 나진 않네. 한없이 못 챙겨주는 오빠라서 항상 미안하고 담보와 자주의 부양마저 넘겨버려 미안한 시스터, 나중에 용돈 두둑히 줄테니 조금만 참아줘. 한없이 날 찾아 돌아다니다 이제는 내가 없어짐이 당연하게 느껴질 담보와 자주, 머나먼 서울 생활에 너희들이 없으니 심심하긴 하구나... 형수님, 이쁜 조카 맞이할 준비는 잘 하시겠죠? 형도 한동안 떨어져 지내겠지만 가끔씩 보면 애뜻함도 많을 거예요. 어여 이쁜 조카 빨리 보고 싶네요.

마지막으로 나의 에너지 소피. 내 이야기 들어줘서 고맙고, 오래 걸리진 않을 거니깐, 멀리 있음에 가지 못 하는 게 아쉽지만 나중에 이러한 시간도 추억의 안주거리겠지? - 내일이 더 기대가 되는 사람이...