

산딸나무 변이개체 선발을 위한 ISSR marker 이용

최경*, 김혁진¹, 권영한, 박광우, 오승환
국립수목원, ¹대전대 생명과학과

Use of ISSR Marker for the Variant Identification in *Cornus kousa* Bueg.

Kyung Choi*, Hyuk Jin Kim¹, Young Han Kwon, Kwang Woo Park and Seung Hwan Oh

Korea National Arboretum, Pocheon 487-821, Korea

¹Department of Life Science, Daejeon University, Daejeon 300-716, Korea

Abstract - For the variant identification of Korean dogwood, *Cornus kousa* Bueg., we investigated useful genetic marker using the ISSR primer. The overall amplicons was 58 in six primers and the mean number of amplicons per primer was 9.67. The UPGMA dendrogram based on the genetic distance showed two major clusters composed of pink-bracted and white-bracted groups respectively. And white-bracted group was divided to two groups, island and inland groups. This result showed that ISSR analysis provides useful markers for the variant identification even in the seedling or young tree of *Cornus kousa*, especially pink-bracted individuals of Isl. Oenaro.

Key words - *Cornus kousa*, Pink-bracted korean dogwood, ISSR primer, Isl. Oenaro

서 언

층층나무속(*Cornus* L.)은 층층나무과(Cornaceae)에 속하며, 교목, 관목 그리고 초본성으로 구성된 약 55종이 북반구, 동아시아, 북미 동부와 북부지역에 넓게 분포하고 있다(Fan and Xiang, 2001). 일반적으로 층층나무속 식물들은 꽃과 열매의 색이 아름다워 관상용으로 많이 식재되어 지고 있으며, 한약재 재료와 식재료의 천연방부제로도 사용되고 있다(Vareed *et al.*, 2006).

한반도에는 층층나무(*C. controversa*), 말채나무(*C. walteri*), 곱의말채(*C. macrophylla*), 흰말채나무(*C. alba*), 산수유(*C. officinalis*), 풀산딸나무(*C. canadensis*), 산딸나무(*C. kousa*) 등 7종이 자생하고 있으며, 관상용으로 미국산딸나무(*C. florida*)가 도입되어 식재되고 있다. 이들 중에서 산딸나무는 흰색의 큰 포가 꽃을 둘러싸고 있어 관상용으로 많이 식재되고 있으며, 가을에 익는 붉은 열매는 아름다울 뿐만 아니라 맛이 좋아 술의 재료로 사용되기도 한다. 또한 병해충에 대해 높은 내성을 가지고 있어 조경수로 널리 사용되어 지고 있으며, 최근 들어 미국의 연구자들이 우리나라의 산딸나무를 도입하여 포의 형태와 색이 다양한 새로운 품종개발을 시도하고 있다. 그 결과 내한성과 탄저병에 특히 약한 미국산딸나무와 우리 산딸나무의 교잡을 통해 병충해에 강하면서 화색이 붉은 품종이 만들어지기도 하였다(김, 2002).

한국산 산딸나무에 대한 연구는 산딸나무 잎의 성분 조사(Ryu and

Yook, 1971), 열매 추출물의 면역조절 기능에 대한 연구(Kim *et al.*, 2002), 군락의 생태적 특성조사(Ahn and Shim, 2003), 그리고 외부 형태 형질에 대한 연구(Park *et al.*, 2005) 등이 수행되었다. 김(2002)과 심 등(2004)은 산딸나무의 신품종에 대한 연구를 통해 주로 산딸나무 자생지와 재배지에서 화포의 색이 붉거나 열매의 크기가 큰 종을 선발하여 형태적 특성, 개화기 등을 비교하고, 삽목과 접수를 통하여 신품종을 선발, 육성하고자 하였다.

본 연구팀은 전남 고흥군 외나로도도의 식물상을 조사하던 중 흰색의 포를 가진 산딸나무 개체들과 분홍색의 포를 가진 산딸나무 개체가 혼생하고 있는 집단을 발견하였다. 외나로도 지역에 서식하는 분홍색 개체는 흰색의 개체에 비해 전체적으로 잎이 붉은색을 띠며, 포의 크기가 흰색의 개체보다 다소 대형인 점에서 관상용으로 개발하여 이용할 만한 가치를 충분히 가지고 있는 것으로 사려되었다. 그러나, 유목이거나 꽃이 없는 경우, 외부형태적 특징만으로 일반 개체와 변이 개체를 구별하는 것은 불가능하였다. 따라서 본 연구에서는 꽃이 없는 상태에서도 흰색의 포를 가지는 일반적인 산딸나무개체와 분홍색 포를 가지는 산딸나무개체를 구분할 수 있는 marker를 찾기 위해 ISSR 분석을 수행하였다.

ISSR(Inter-simple sequence repeats) 표지자 분석은 5' 이나 3' 의 끝에 2-4개의 임의의 염기를 가지는 16-18bp의 반복서열로 구성된 단일 primer를 PCR을 이용하여 증폭시키는 일종의 분자 marker 중의 하나이다(Zietkiewicz *et al.*, 1994). 이 방법은 비교적 간단하

*교신저자(E-mail) : kchoi69@foa.go.kr

며, 비용이 적게 들고, RAPD 방법에 비해 많은 정보를 가지고 있고 재현성이 높은 장점이 있다. 이러한 반복서열은 genome 내에 풍부하게 존재하기 때문에 ISSR primer들은 여러 지역에서 증폭가능하여 서로 다른 개체들 사이에서 이러한 증폭산물들이 다형성을 나타내게 된다 (Godwin *et al.*, 1997; Wolfe and Liston, 1998; Yang *et al.*, 2006). 이러한 장점으로 ISSR분석은 집단 유전변이 분석, 유전자탐색 등에 널리 이용되고 있다(Huang and Sun, 2000; Liu and Wendel, 2001). 또한 밀과 벼의 품종, 옥수수 등 작물들을 구분하고, 소철과 같은 멸종 위기식물에 대한 유전적 변이를 조사하기 위한 연구에서도 ISSR marker가 사용되고 있다(Kantety *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2001; Nagaraju *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2004).

이와 같이 지금까지 ISSR 분석 방법에 의해 산딸나무의 흰색과 분홍색 포를 가진 개체의 식별은 이루어진 바 없어, 향후 분홍색 포를 가진 산딸나무의 품종개발에 기초자료로 활용하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

재료

전남 고흥군 외나로도 지역에서 채집한 6개체들과 한라산, 돌산도, 덕유산, 지리산, 민주지산, 광릉숲 등지에서 채집된 개체를 포함하여 13개체를 재료로 사용하였다. 한라산, 돌산도, 덕유산, 민주지산 개체는 대전대학교 표본관에 소장된 식엽표본을 대여하여 사용하였다. 외나로도과 광릉숲에서 채집한 개체들은 증거표본을 제작하였다 (Table 1).

DNA 추출 및 ISSR 분석

Total genomic DNA는 액체질소를 이용하여 잎을 막자사발에서

미세한 가루가 되도록 마쇄한 후, G-Spin™ kit (Intron)를 이용하여 추출하였다. 추출한 DNA는 1.2% Agarose gel로 전기영동한 후 $1 \times 10^{-4}\%$ EtBr로 염색하여 UV illuminator상에서 marker와의 밝기 정도를 비교하는 spot-test를 실시하여 그 농도를 계산하여 PCR반응에 사용하였다.

ISSR결편의 증폭반응은 Perkin-Elmer 9700 thermal cycler를 이용하여 수행하였다. PCR반응은 전체 $50\mu\text{l}$ 부피로 행하였으며, Primer는 UBC(Biotechnology Laboratory of University of British Columbia)에서 제작된 UBC #801에서 #850의 50개 primer를 이용하였다. PCR 조건은 94°C에서 1분, 45°C에서 2분, 72°C에서 2분을 35회 반복한 후 72°C에서 7분동안 더 유지시켰다. Primer screening을 통해 각 primer별로 3회 이상의 반복실험을 수행하여 재현성이 뚜렷한 것만을 유용한 primer로 결정하였다. 증폭된 DNA product는 1.5% agarose gel (1X TBE, pH 8.0)로 전기영동하여 UV-illuminator상에서 1D-PCR program(Kodak Software, 2002)을 이용하여 band의 정확한 위치와 존재유무 및 크기를 확인하고 이를 촬영하였다. 분자량의 비교를 위한 marker로는 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen)를 사용하였다.

자료분석

촬영된 gel 사진에 나타난 각 band를 하나의 형질로 취급하여 유, 무에 따라 각기 1과 0으로 표시하고, 전체 개체들(운명분류단위, OTU)에 대한 자료행렬을 작성하였다. 유집분석은 PAUP* 4.0(version 4.08b; Swofford, 2003) program을 이용하여, UPGMA(비가중산술법, Unweighted pair group method with arithmetic mean)방법에 의한 Dendrogram을 작성하고 각 OTU간의 유전적 유사성을 검토하였다.

Table 1. Materials and collection data of *Cornus kousa* Buerg. which were used in ISSR analysis

Symbol	Localities	Specimen
OP1	Isl.Oenaro, Goheung-gun, Jeollanam-do	Park,K.W. 040561
OP2	Isl.Oenaro, Goheung-gun, Jeollanam-do	Park,K.W. 040562
OP3	Isl.Oenaro, Goheung-gun, Jeollanam-do	Park,K.W. 040566
OW1	Isl.Oenaro, Goheung-gun, Jeollanam-do	Park,K.W. 040565
OW2	Isl.Oenaro, Goheung-gun, Jeollanam-do	Park,K.W. 040563
OW3	Isl.Oenaro, Goheung-gun, Jeollanam-do	Park,K.W. 040568
Halla	Mt.Halla, Seogwipo-shi, Jeju-do	J.H.Kim <i>et al.</i> 2000
Dolsan	Isl. Dolsan, Yeosu-shi, Jeollanam-do	J.H.Kim, Yeosu 5-30615-040
Jiri	Mt.Chiri, Sancheong-gun, Gyeongsangnam-do	J.H.Kim <i>et al.</i> 2002-4317
Deogyu	Mt.Deogyu, Muju-gun, Jeollabuk-do	H.J.Kim s.n. Jun.26.2005
Minju	Mt.Minjuji, Yeongdong-gun, Chungcheongbuk-do	T.S.Kim <i>et al.</i> s.n. May 22, 2000
GW1	National Arboretum, Pocheon-shi, Gyeonggi-do	H.J.Kim s.n. Jun.24.2005
GW2	National Arboretum, Pocheon-shi, Gyeonggi-do	H.J.Kim s.n. Jun.24.2005

결과 및 고찰

본 실험에 사용된 ISSR primer는 총 50개였고, 그 중 primer screening을 통해 전체 13개체에서 다형성을 나타내는 반응이 일어난 primer는 UBC #809, #826, #827, #840, #846, #850 등 6개였다(Fig. 1).

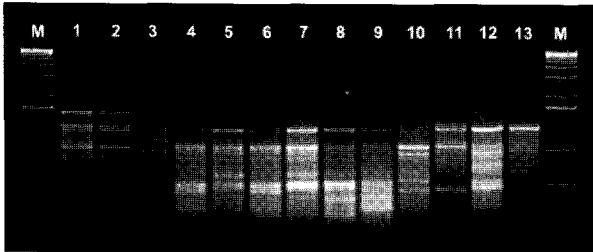


Fig. 1. An example of ISSR profiles of *Cornus kousa*. ISSR PCR was performed with UBC primer #827. M: marker (1 kb plus ladder), 1: OP1, 2: OP2, 3: OP3, 4: OW1, 5: OW2, 6: OW3, 7: Halla, 8: Dolsan, 9: Jiri, 10: Deogyu, 11: Minju, 12: GW1, 13: GW2.

산딸나무 13개 개체에 대한 6개 primer에 의한 ISSR 분석결과 총 58개의 증폭산물을 확인할 수 있었고, primer 당 평균 9.67개의 다형성 증폭산물을 얻을 수 있었다(Table 2). 이중 20.6%에 달하는 12개의 밴드는 전 개체에서 공통적으로 나타났다. 6개 ISSR primer에서 얻은 총 58개의 증폭산물을 토대로 Nei(1972)의 유전적 거리에 의한 비유사도지수행렬을 구하였다(Table 3). 흰색 포를 가지는 산딸나무 개체들은 0.019에서 0.076의 유전적 상의성을 나타냈으며, 분홍색 포를 가지는 산딸나무개체들은 0.024에서 0.029로 흰색 개체들보다는 유전적 다양성이 낮았다.

ISSR 분석결과를 기초로 UPGMA방법에 의한 유집분석을 수행한 결과 산딸나무 개체들은 크게 3개로 유집되었다(Fig. 2). 포가 분홍색 이면서 외나로도에서 채집된 개체들(OP1~3)이 먼저 유집되었다(cluster I). 포가 흰색인 일반적인 산딸나무들은 하나의 cluster로 유집된 후, 다시 남부도서지역인 제주도 한라산, 외나로도, 돌산도 지역에서 채집된 개체들이 같이 유집되고(cluster II), 중부내륙지역인 지리산, 덕유산, 민주지산, 광릉에서 채집한 개체들이 같이 유집되었다(cluster III).

Table 2. The list of 6 ISSR primers and the result for *Cornus kousa*

Primer	Sequence (5'→3')	Total no. of bands	No. of polymorphic bands	Fragment size range (bp)
UBC809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	6	6	200-1000
UBC826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	15	12	200-1500
UBC827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	9	7	200-1500
UBC840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	9	7	200-1500
UBC846	CAC ACA CAC ACA CAC ART	11	9	200-1500
UBC850	GTG TGT GTG TGT GTG TYC	8	5	200-1500
Total		58	46	
Mean/primer		9.67		

* Primers of ISSR markers were synthesised by Biotechnology Laboratory of British Columbia University (Vancouver, British Columbia, Canada).

Table 3. Genetic dissimilarity matrix calculated by Nei(1979)'s genetic distance based on ISSR analysis of *Cornus kousa*

	OP1	OP2	OP3	OW1	OW2	OW3	Halla	Dolsan	Jiri	Deogyu	Minju	GW1	GW2
OP1	-												
OP2	0.02997	-											
OP3	0.02745	0.02409	-										
OW1	0.05634	0.03969	0.05634	-									
OW2	0.07278	0.05449	0.08029	0.03181	-								
OW3	0.05634	0.04579	0.05634	0.0191	0.02134	-							
Halla	0.06561	0.05449	0.06561	0.043	0.02871	0.03181	-						
Dolsan	0.05275	0.03731	0.05275	0.03839	0.02504	0.02791	0.03004	-					
Jiri	0.06341	0.05275	0.07747	0.05331	0.03839	0.05331	0.04958	0.03423	-				
Deogyu	0.06253	0.05743	0.06253	0.07324	0.06048	0.06539	0.07581	0.06079	0.05834	-			
Minju	0.07324	0.06797	0.09015	0.06797	0.05634	0.07546	0.06322	0.05681	0.04814	0.03731	-		
GW1	0.06048	0.05584	0.08406	0.05634	0.03969	0.04341	0.05873	0.04663	0.03278	0.04723	0.04389	-	
GW2	0.05873	0.06109	0.08029	0.06136	0.05112	0.04889	0.03953	0.04603	0.03839	0.04645	0.03142	0.02812	-

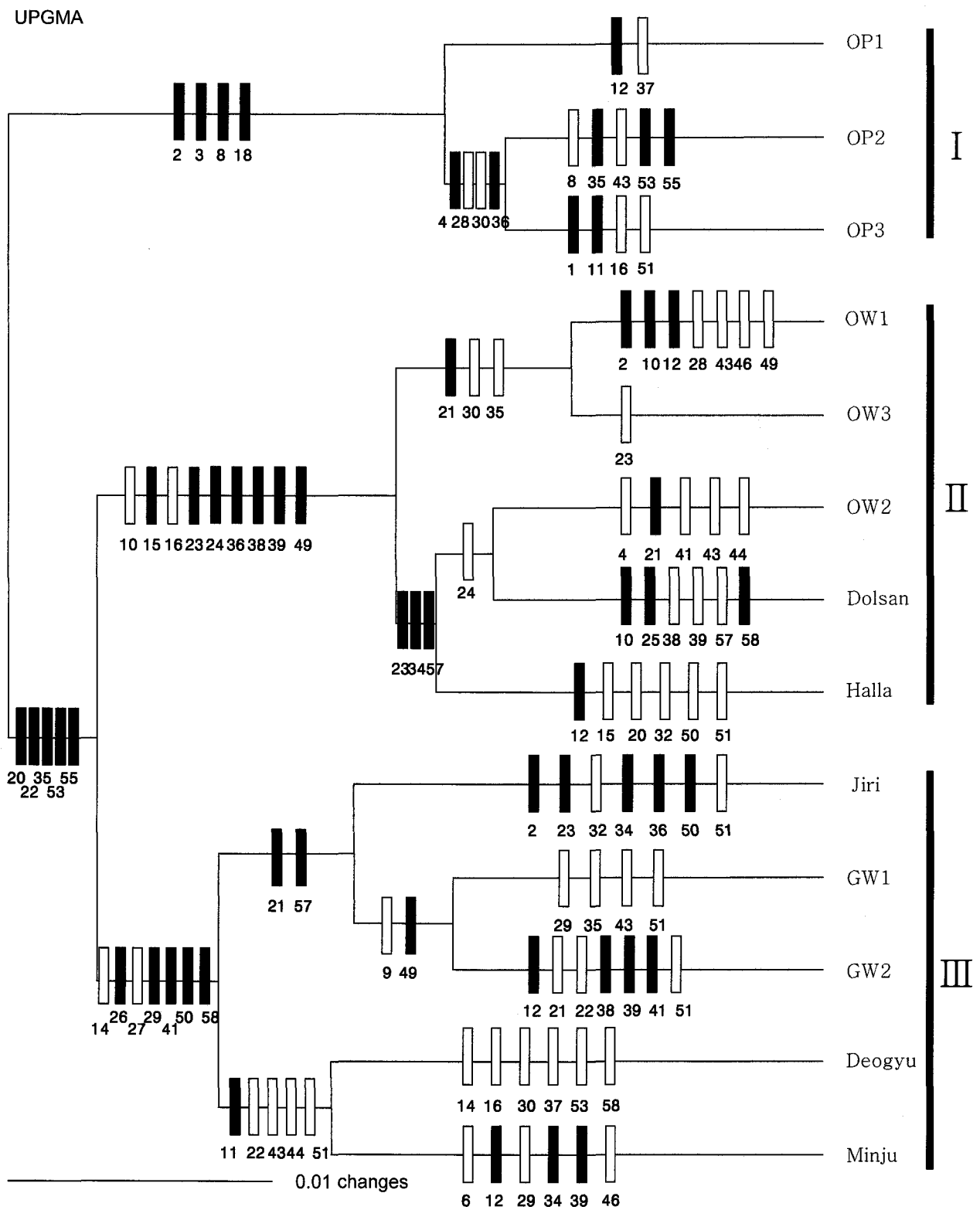


Fig. 2. A UPGMA dendrogram based on Nei's (1972) genetic distance. Black bar: band present, white bar: band absent.

증폭된 band profile들을 비교해 보면 분홍색 개체들이 흰색개체들에 비해 밴드 패턴이 단순하게 나왔다. 또한 산딸나무 화색의 변이에 따른 유전적 다양성을 조사한 결과 전체 58개의 밴드 중에서 UBC #826, #827 primer에서 증폭된 2, 3, 8, 18번 밴드가 외나로도 산딸나무 분홍개체를 유집하는 주요형질로 판단되며, 이중 3번과 18번 밴드는 이들 분홍개체들에서만 증폭되었다. 또한 UBC #809, #827, #846 primer에서 증폭된 20, 22, 35, 53, 55번 밴드가 비록 일부 개체에서는 나오지 않았으나, 산딸나무 흰색 개체를 유집하는 주요형질로 밝혀졌다. 따라서 이들 5개 primer에서 증폭된 9개 밴드는 분홍개체와 일반 개체를 구분할 수 있는 유용한 marker로서 사용이 가능하며, 특히 UBC #826, #827 primer는 분홍 개체들의 선발을 위해 이용 가능한 것으로 판단되었다.

Lai et al. (2001)은 야생차와 재배차 품종의 비교 연구에서 ISSR marker가 이들 품종 구분에 매우 유용한 marker가 될 수 있음을 보고하였다. 또한 최근 일본에서는 골풀의 품종을 식별하는 방법으로 ISSR marker를 연구하여 특허출원하였다(<http://jstore.jst.go.jp>, 特開 2005-168310).

본 연구 결과 산딸나무 개체들에서 화색의 변이에 따라 조경수목을 선택할 때 특정 ISSR primer는 꽃이 없거나 유목상태에서도 분홍색 포를 가진 개체를 선발할 수 있는 marker로서 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

우리나라의 자생 산딸나무는 층을 이루며 수평으로 퍼지는 가지와 개엽후 6월에 피는 흰색의 포가 아름다울 뿐만 아니라 내한성과 내병성이 뛰어나다. 이들 중 자연상태에서 포의 색과 형태에서 조경수로서 개발할 만한 가치가 있는 변이를 보이는 개체들을 관찰할 수 있었다. 본 연구결과를 토대로 이러한 개체들을 선발하여 재배 품종화 시키고 신 품종으로 육성함으로써 우리 식물자원의 직접적인 해외 수출을 막고 UR 대체 원예조경소재 식물로서도 이용할 수 있을 것이다.

적 요

외나로도 식물상을 조사하던 중 분홍색 포를 가진 산딸나무 개체를 발견하였다. 흰색 포를 가지는 일반 산딸나무 개체와 식별가능한 유전자 marker를 탐색하기 위하여 ISSR primer를 사용하였다. 50개의 primer 중 6개 primer에서 총 58개의 증폭산물을 관찰할 수 있었으며, primer당 평균 9.67개가 증폭되었다. UPGMA 방법에 의한 유집분석을 수행한 결과, 산딸나무 개체들은 포가 분홍색인 개체들과 흰색인 개체들이 따로 유집되었으며, 흰색인 개체들은 도서지역 개체들과 내륙지역 개체들로 유집되었다. 산딸나무 화색의 변이에 따른 유전적 다양성 조사 결과, 특정 ISSR primer는 꽃이 없는 상태에서 변이 개체를 구분할 수 있는 유용한 marker로 사용될 수 있는 것으로 사려되었다.

사 사

귀중한 표본의 대여를 허락해 주신 대전대학교 표본관(TUT)장 및

관계자에게 감사를 드립니다.

인용문헌

- Ahn, Y.-H. and K.-K. Shim. 2003. Native *Cornus kousa* Community and its habitat in Jeju Island. J. of the Environment Sciences 12: 15-22.
- Fan, C. and Q.Y. Xiang. 2001. Phylogenetic relationships within *Cornus* (Cornaceae) based on 26S rDNA sequences. American Journal of Botany 88: 1131-1138.
- Godwin, I.D., E.A.B. Aitken and L.W. Smith. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. Electrophoresis 18: 1524-1528.
- Huang, J.C. and M. Sun. 2000. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of Chloroplast DNA. Theor. Appl. Genet. 100: 1050-1060.
- Kantety, R.V., X. Zeng, J.L. Bennetzen and B.E. Zehr. 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequences repeat (ISSR) amplification. Molecular Breeding 1: 365-373.
- Kim, D. H., Y. Kashi, G. Zur, Y.D. Poleg, S.W. Lee, K.B. Shim and C.W. Kang. 2001. Article : Genetic Relationships among Sesame (*Sesamum indicum*) Accessions using Inter-Simple Sequence Repeats (ISSRs) Markers. Kor. J. Breed. 33(4): 527-269 (in Korean).
- Kim, J.S., C.H. Oh, H. Jeon, K.S. Lee and S.Y. Ma. 2002. Immuno-regulatory Property of Fruit-Extracts of *Cornus kousa* Burg. Korean J. Medicinal Crop Sci. 10: 327-332 (in Korean).
- Lai, J.-A., W.-C. Yang and J.-Y. Hsiao. 2001. An assessment of genetic relationships in cultivated tea clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers. Bot. Bull. Acad. Sin. 42: 93-100.
- Lee, S.-W., Y.-M. Kim and W.-W. Kim. 2003. Lack of allozyme and ISSR variation in the Rare endemic tree species, *Berchemia berchemiaefolia* (Rhamnaceae) in Korea. Ann. For. Sci. 60: 357-360 (in Korean).
- Liu, B. and J.F. Wendel. 2001. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. Molecular Ecology Notes 1: 205-208.
- Nagaraju, L., M. Kathirvel, R. Ramesh Kumar, E.A. Siddiq and S. E. Hasnain. 2002. Genetic analysis of traditional and evolved

- Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. PNAS 99: 5836-5841.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist 106: 283-292.
- Park, H-S., Y-J. Cho, H-G. Chung, S-H. Kim and D-J. Chung. 2005. Morphological characteristics for selected individuals in *Cornus kousa* Buerger. Korean J. Plant Res. 8: 235-243.
- Ryu, K.S. and C.S. Yook. 1971. On the constituents of leaves of *Cornus kousa* Buergeri. Kor. J. Pharmacog. 2: 41-42.
- Vareed, S.K., M.K. Reddy, Robert E. Schutzki and M.G. Nair. 2006. Anthocyanins in *Cornus alternifolia*, *Cornus controversa*, *Coruns kousa* and *Cornus florida* fruits with health benefits. Life Science 78: 777-784.
- Wolfe, A.D. and A. Liston. 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: Soltis, D.E., P.S. Soltis, J.J. Doyle (ed.), Molecular systematics of plant. II. DNA sequencing. Chapman and Hall. New York, pp. 432-486.
- Xiao, L.-Q., X.-J. Ge, X. Gong, G. Hao and S.-X. Zheng. 2004. ISSR variation in the endemic and endangered plant *Cycas quzhouensis* (Cycadaceae). Annals of Botany 94: 133-138.
- Yang, B.-H., S.-D. Han, Y.-B. Koo and Y.-G. Park. 2006. Genetic variation in the Natural population of Korean *Stewartia* (*Stewartia koreana* Nakai) based on I-SSR analysis. Korean J. Plant Res. 19: 189-195 (in Korean).
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176-183.
- 김영혜. 2002. 자생 산딸나무의 신품종 육성에 관한 연구. 성균관대학교 박사학위논문. pp. 158.
- 심경구, 하유미, 김영혜, 김동수, 이선아. 2004. 조생종 대파형 산딸나무 신품종 선발. 한국조경학회지 32: 120-129.

(접수일 2006.5.4 ; 수락일 2006.7.27)