ISSR(Inter Simple Sequence Repeats) Maker를 이용한 국내외 모감주나무(*Koelreuteria paniculata* Laxm.) 집단의 유전변이 분석

Analysis of Genetic Variation in *Koelreuteria paniculata* Laxm. Populations with I-SSR Markers

안지영[1*], Michael S. Dosmann[2], Thomas H. Whitlow[2], 강호덕[1]
동국대학교 산림자원학과[1], Urban Horticulture Institute, Cornell University[2]

1. 연구목적

모감주나무(*Koelreuteria paniculata* Laxm.)는 무환자나무(Sapindaceae)과로서 한국, 중국, 일본 등의 동아시아 지역에서 자생하는 낙엽 소교목이다. 우리나라에서는 안면도, 완도, 포항, 월악산, 남해, 대구, 거제 등에 군락이 존재하고 있다. 특히, 본 수종은 우리나라에서 해안가 주변에 극히 제한적으로 분포하고 있을 뿐만 아니라 최근에는 자생지가 훼손되고 있어 안면도와 포항 군락지는 천연기념물로 지정되어 있다. 현재, 모감주나무와 같이 소규모로 격리되어 분포하고 있는 희귀종 또는 멸종 위기종의 경우 유전변이가 매우 적은 것으로 보고되고 있으며(Lesica *et al.*, 1988; Wheeler *et al.*, 1995), 이러한 종의 유전적 다양성을 보존하기 위한 시급한 조치가 필요한 것으로 인식되고 있다(Falk and Holsinger, 1991).

ISSR(Inter-Simple Sequence Repeats) PCR 분석법은 여러 식물을 대상으로 종이나 변종 및 클론들에 대한 분화를 구명하는 연구에 쓰이고 있으며, RFLP 방법의 간편성과 신속성을 능가하는 동시에, 동위효소를 이용한 방법의 단점인 다형적으로 보이지 않는 특성들까지도 검정할 수 있고, RAPD의 단점인 재현성 문제를 극복할 수 있다. ISSR은 기존의 방법들에 의해 유전적 거리가 너무 가깝게 추정된 종이나 개체들을 재선별하여 보다 정확한 분화의 구명에 이용되고 있다(Son *et al.*, 2000).

따라서 본 연구는 국내에 알려진 집단뿐 아니라 북한, 중국, 일본의 모감주나무 집단까지의 유전적 차이를 ISSR marker를 이용하여 분석하고 모감주나무 유전자원 보전의 기초를 마련하고자 한다.

2. 연구 방법

1) 식물재료

국내 집단인 안흥, 안면도, 완도, 포항(대동배, 발산리), 월악산(보덕암, 중봉) 지역과, 북한(National Arboretum 71219), 중국(NACPEC02-059, Rock14994, SICH210, H&M2308, H&M 2119, T.T.YÜ 14214, S.B.G. 362), 일본(WH890)까지 총 16개 집단(Table 1, Fig 1.)에서 채취한 잎을 이용하여 modified CTAB 방법으로 Total DNA를 추출하였다.

2) ISSR PCR 분석

총 34개의 ISSR UBC primer(University of British Coolumbia, Canada)를 이용하였고(Table 2), PCR 분석은 총 20㎕당 10ng의 Template DNA 2.5㎕, Primer 2㎕, Premix[10mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 0.5㎕, 25mM $MgCl_2$ 2.5㎕, 10 X buffer 2.5㎕, 0.5 unit *Taq* Polymerase; Superbio)10㎕, ddH_2O 5.5㎕를 첨가하였다. PCR 조건은 94℃에서 30초간 denaturation, 45℃에서 annealing, 72℃에서 10분간 extraction으로 총 45회 반응시켰다. PCR 증폭산물을 1X TAE buffer에 1.2%의 Agarose gel을 이용하여 크기별로 분획하여 관찰하였다. 증폭산물 유무에 따라 '0' 또는 '1'로 data를 정리한 다음, NTSYS-pc(Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System; v2.01) program을 이용하여 유사도를 계산하였고, 집단간의 유연관계를 UPGMA(Unweight Pair-Group Method using Arithmetic Average)법으로 수행하였다.

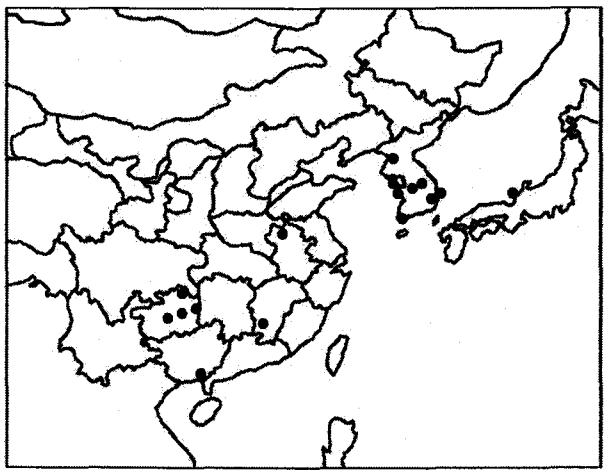

Fig 1. Map of sampling location of *Koelreuteria paniculata* Laxm.

Table 1. Collection sites of *Koelreuteria paniculata* Laxm.

Country	Location	Latitude(N)	Longitude(E)	Reference
S. Korea	Anheung	36.6820°	126.1198°	Protected population near harbor
	Anmyondo	36.5071°	126.3333°	Small feral population near Bangpo beach
	Wando	34.3644°	126.6418°	Protected population at Kalmun-ri
	Pohang	36.2690°	129.5026°	Site near Balsan 1-Ri
	Pohang	36.7570°	129.5454°	westernmost edge of population near Tae Bo 1-Ri
	Woraksan	36.9004°	128.0900°	Population near Bodeokam hermitage
	Woraksan	36.8893°	128.0886°	Population in Joonbong Valley
N. Korea	--	--	--	National Arboretum 71219, protected population National Arboretum
China	Yang Cheng,Shanxi	35.2800°	112.4907°	NACPEC(North America-China Plant Exploration Consortium) 2002
	Lower Tebbu,Gansu	34.2300°	103.0100°	Rock 14994, Royal Botanic Garden Edinburgh 1968-7722(seedling of)
	Jiuzhaigo, Sichuan	32.9000°	104.0667°	SICH 210, Morris Arboretum 89035B(clone of)
	Ma Er Kang, Sichuan	31.9075°	102.0406°	H&M 2308. Quarryhill Botanic Garden 2000-263
	Yajiang, Sichuan	30.0378°	100.9925°	H&M 2119, Quarryhill Botanic Garden 1998-018D(seedling of)
	Muli,Kehsy, Yunnan	23.5900°	105.2200°	T.T.Yü 14214, US National Arboretum 26653(seedling of)
	Mt.Heng,Hunan	27.2500°	112.6833°	SBG 362, Sparse Forest along roadside
Japan	Kunimimura, Ayukaya, Ayukawashimachi	36.0833°	136.0333°	WH 890,Morris Arboretum 88052A (clone of)

Table 2. Sequences of used UBC primer for ISSR

Primers	Sequences (5' → 3')	Primers	Sequences (5' → 3')
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	UBC 841	GAG AGA GAG AGA GAG AC(T)C
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	UBC 842	GAG AGA GAG AGA GAGAC(T)G
UBC 813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	UBC 843	CTC TCT CTC TCT CTC TA(G)A
UBC 814	CTC TCT CTC TCT CTC TTG	UBC 844	CTC TCT CTC TCT CTC TG(A)C
UBC 815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	UBC 846	CAC ACA CAC ACA CACAG(A)T
UBC 824	TCT CTC TCT CTC TCT CG	UBC 856	ACA CAC ACA CAC ACACC(T)A
UBC 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	UBC 857	ACA CAC ACA CAC ACA CT(C)G
UBC 826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	UBC 864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
UBC 835	AGA GAG AGA GAG AGA GC(T)C	UBC 866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC
UBC 840	GAG AGA GAG AGA GAG AC(T)T	HD-2	CAA CAA CAA CAA CAA

3. 결과 및 고찰

총 34개의 primer를 이용하여 DNA를 증폭시켰고, 34개의 UBC primer중에서 다형성을 보이는 20개의 Primer를 선발하여 분석하였다. UBC 842에서 가장 많은 수의 다형성 밴드가 나타났으며, 같은 포항지역에서도 발산과 대동배의 경우, 전혀 다른 밴드 양상이 나타났다. 즉, UBC 807, 815, 841, 842 에서는 대동배가 많이 증폭되되어 진하게 나타난 반면, 발산은 증폭의 정도가 낮아 희미하거나 아예 나타나지 않았으며, 중국 7번 샘플(S.B.G. 362)의 경우 다른 중국 샘플과 다르게 UBC 815, 807에서1200bp 크기의 진한 밴드가 나타나 다른 양상을 보였다. 중봉의 경우 UBC 807을 포함한 적은 수의 primer에서 증폭이 되었다(Fig 2.).

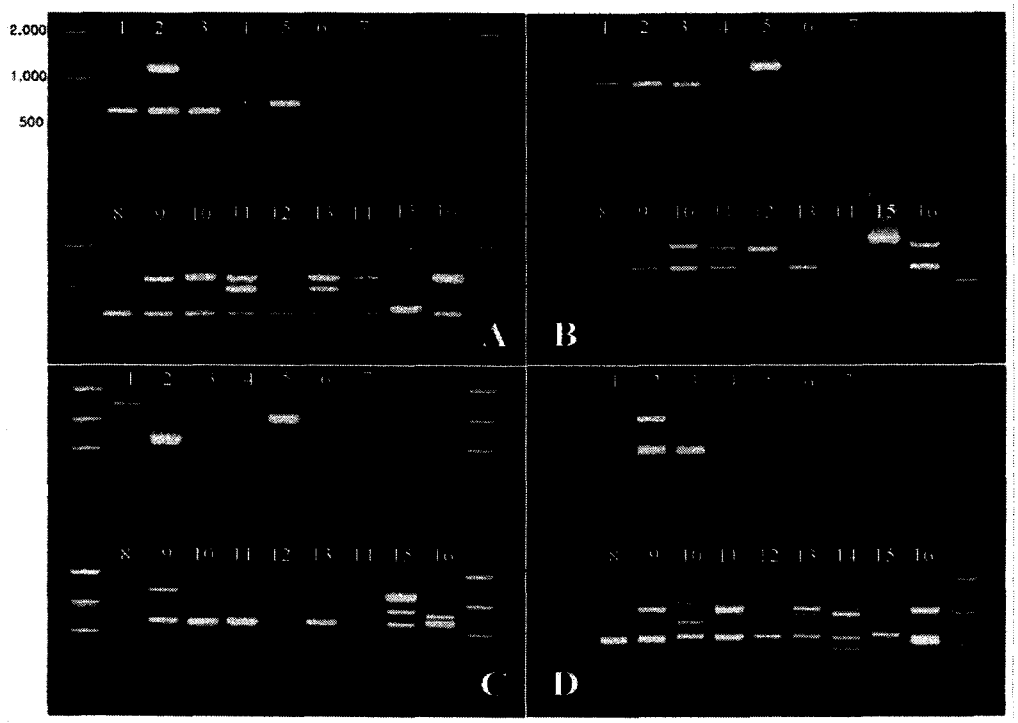

Fig 2. I-SSR amplicon profiles of *Koelreuteria paniculata* Laxm.
[1:Anheung, 2:Anmyondo, 3:Wando, 4:Balsan(Pohang), 5:TaeDongBae(Pohang) 6:Bodeokam(Woraksan), 7:Joonbong valley(Woraksan) in Korea, 8:North Korea(National Arboretum71219), China(9:NACPE C02-059, 10:Rock14994, 11:SICH210, 12:H&M2308,13:H&M 2119, 14:T.T.YÜ14214, 15:S.B.G. 362;total seven samples and Japan(16:WH 890)](A: UBC 807, B: UBC 815, C: UBC 841, D: UBC 842)

유연관계를 분석한 결과, 포항 지역 내 발산과 대동배 집단은 유전적 차이 정도가 0.30 이상으로 나타났다. 한편, 안면도 집단은 중국 7을 제외한 다른 국외 샘플과 유전적 거리가 먼 것으로 나타났으며, 완도와 일본은 매우 가까운 것으로 나타났다.유일하게 내륙에 위치한 월악산 지역의 경우 중봉과 보덕암의 유전적 거리가 매우 가까운 것으로 나타났으며 특히, 보덕암 집단은 포항의 발산과 가까운 것으로 나타났다(Fig 3.).

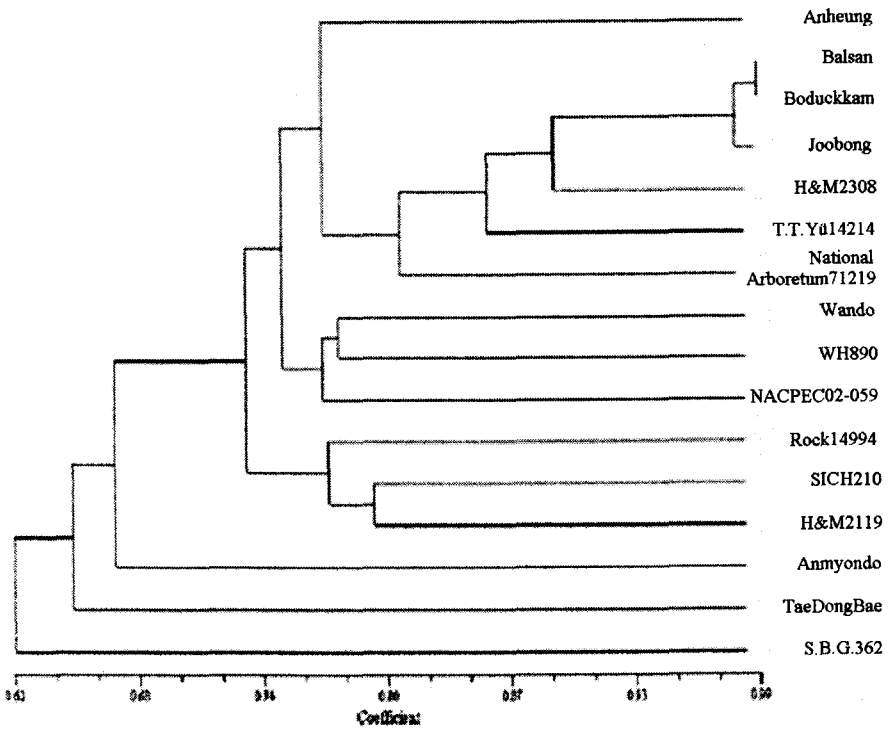

Fig 3. Dendrogram of the 16 populations of *Koelreuteria paniculata* Laxm. UPGMA cluster analysis that obtained by 20 primers.

위 결과를 통해 국내 모감주나무 집단 중 일부가 중국과 유전적으로 가깝게 나타난 것을 볼 수 있으나 좀 더 정확한 국내 모감주나무 기원에 대한 가설을 확인하기 위해서는 중국 내 모든 모감주나무 집단과 국내 모감주나무 집단을 대상으로 하되, 각 집단별로 적어도 10~15개 이상의 집단을 대상으로 집단유전분석이 이루어질 필요가 있다.