

자생붓꽃의 형태적 특성 및 RAPD 마커에 의한 유연관계 분석

홍성미, 고재철*

대구가톨릭대학교 생명자연학부

Morphological Characteristics and Genetic Relationship by RAPD Marker in *Iris* spp.

Seong Mi Hong, Jae Chul Koh*

Catholic university of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea

ABSTRACT This study was conducted to observe the morphological characteristics and to analyse genetic relationship using RAPD markers in 9 species of *Iris*. The period of flowering was shown very broad among 9 species of *Iris*, from April 22 to June 9. The flower stalk was fluctuated from 9.0 cm (*I. rossii*) to 104.0 cm (*I. ensata*). *I. ensata* has the largest flower size and followed by *I. laevigata*, *I. tectorum*, *I. sanguinea*, *I. pseudacorus*, *I. lactea*, *I. rossii*, *I. minutoaurea*, *I. odaesanensis*. Among the 108 amplified bands by PCR with 8 random primers, 107 showed polymorphism and only one showed monomorphism among 9 species of *Iris*. The average dissimilarity coefficient among 9 species of *Iris* was 0.252. The range of dissimilarity coefficient was shown as from 0.095 to 0.609. Nine species were divided into three groups. The first group was *I. tectorum*, and the second group was *I. lactea*, *I. laevigata*, *I. pseudacorus*, *I. odaesanensis*. *I. minutoaurea*, *I. rossii*, *I. sanguinea*, *I. ensata* were belong to group three.

Key words: *Iris* species, RAPD, genetic diversity.

서 론

우리나라는 4계절이 뚜렷하고 남북으로 길게 위치하며 대륙과 해안에 접하고 있어 식물자원의 유입이 유리하여 매우 많은 자생식물이 분포하고 있다. 최근에는 우리기후 풍토에 장기간 적응해 온 자생식물의 중요성을 인식하고 자생식물을 이용한 절화, 분화 조경 식물의 요구가 높아지고 있어 자생식물의 수집과 더불어 자생식물의 개발이 시급한 문제로 대두되고 있다. 우리나라에 분포되고 있는 많은 자생식물 중 붓꽃 속 식물 (*Iris* spp.)은 북반구의 온대 지역을 중심으로 자라고 있으며 우리나라에는 13종이 자생되고 있다 (Sim 1988). 붓꽃은 한국, 일본, 시베리아 동부가 원산지이며 전국 각지의 평

지와 산간지에 분포한다 (Lee 1980). 붓꽃은 산성토양에서 잘 자라며 양지바르고 건조하지 않은 곳에서 자생하고 있으며 약간 습하게만 해주면 전국 어디서나 기르기가 쉽다. 꽃창포는 북반구 온대 원산지로 전국 각지에 분포하고 있으며 온도가 서늘한 중산간지의 습기가 많은 곳에서 잘 자라고 보수력이 있는 토양에서 좋은 생육을 한다 (Chung et al. 1993). 타래 붓꽃은 한국, 중국이 원산지로 전국 각지에 분포하고 있으며 평지에서 생육이 잘되며 뿌리는 직근으로 한발에 극히 강하며 절토지의 산사태가 우려되는 조경지피 식물 개발에 유효하다. 제비붓꽃은 한국, 중국, 러시아 일본이 원산지이며 우리나라에는 산지나 들판의 습지에 생육이 잘 되고 있다. 그 외 우리나라에 자생하고 있는 붓꽃속 식물은 솔붓꽃, 난장이 붓꽃, 금붓꽃, 각시붓꽃, 노랑무늬붓꽃, 노랑붓꽃 등이 있다.

붓꽃의 연구는 주로 자생종을 수집하고 형태적 특성을 조사하여 종의 분류에 그치고 있다. 작물개량에 있어 유전자원

*Corresponding author Tel 053-850-3240 Fax 053-850-3449
E-mail: jckoh@cu.ac.kr

의 다양한 정보는 매우 중요하며 종간의 유전적 연관성 평가는 새로운 유전자 도입을 위한 자료로 활용되고 있다 (Sneath and Sokal 1973). 다양한 지역에 분포되어 다년간 적응되어온 붓꽃종은 육종 재료로 활용하는데 유전적 변이의 정도에 따라 활용가치가 평가되고 있다.

작물의 유전적 유연관계를 평가하는 방법으로 지금까지는 식물의 형태적 특성에 근거하여 왔으나 최근에는 분자수준에서 분석하는 것이 가능하게 되었다. RAPD는 종의 분류와 유연 관계 (Karihaloo et al. 1995), 유전자원평가 (Kawase et al. 1993), 외래유전자 도입확인 (Tsutoma and Yabuya 1985; Welsh and McClelland 1990 et al. 1990), 집단유전학의 양적형 질분석 (Williams et al. 1990), 유용 유전형질을 탐지할 수 있는 표지인자 개발 (Michelmore et al. 1991) 등에 이용되고 있다. 국내에서도 RAPD를 이용한 식물의 유연관계에 관한 연구가 한국자생차나무 (Oh and Hong 1995), 구기자 (Park et al. 1996), 마늘 (Lee et al. 1996), 무궁화 (Lee et al. 1996), 수박 (Shin et al. 1996), 금강초롱꽃 (Yoo et al. 1996) 등에서 수행되었다.

본 실험은 국내에서 자생되고 있는 붓꽃속 식물을 수집하여 형태적인 생육 특성을 조사하고 RAPD 분석을 통하여 유전적인 다양성과 계통간 근연성을 분석하여 붓꽃 유전자원의 평가와 선발을 위한 기초자료를 얻고자 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 형태적 특성

공시재료는 전국각지에서 자생하고 있는 붓꽃속 식물을 15개 장소에서 수집하여 교내 포장에 재식하였으며 수집종 중에서 9종을 공시재료로 하여 개화일, 화경장, 엽장, 엽폭, 삭과장, 외화피장, 화색에 대하여 조사하였다. 각 수집종의 형태적 특성 조사는 종별 10개체를 조사하고 평균과 표준편차로 나타냈으며 조사방법은 농촌진흥청 조사기준에 준하였다.

DNA 분리 및 정제

PCR에 사용된 DNA 추출 재료는 재식된 수집종에서 채취한 종자를 샤례에 파종하여 25°C 항온기 내에서 발아된 유엽을 사용하였다. 붓꽃의 DNA 분리는 Brunel (1992) 등의 방법을 변형하여 이용하였다. 유엽 1g을 채취하여 1.5 mL microcentrifuge tube에 넣은 후 액체질소를 넣고 완전히 마쇄한 후 extraction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM β -mercaptoethanol) 450 μ L를 첨가하였다. 여기에 20% SDS 40 μ L를 넣고 65°C에서 10분간 반응 시킨 후 5M Potassium acetate 200 μ L를 넣고, -20°C에서 20분간 방치한 후 12,000 rpm에

서 20분간 원심분리하여 상등액을 취했다. RNA와 단백질 제거를 위해 1 mg/mL의 RNase를 원심분리한 상등액에 넣고 37°C에 20분간 반응시켜 식물세포의 RNA와 단백질을 제거한 다음 phenol 3회, chloroform/isoamylalcohol (24:1, v/v)에 1회 정제하여 맑은 층을 취한 후 isopropylalcohol을 첨가하여 DNA 침전을 유도하고 -20°C에서 30분이상 방치하였다. 12,000 rpm에 10분간 원심분리하여 pellet화 된 DNA를 얻어 70% ethylalcohol에 1회 세척하고 상온에서 vacuum으로 건조시킨 후, 이를 TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)에 녹여 genomic DNA로 사용하였다. PCR 반응의 반응용액은 붓꽃의 total genomic DNA 2 μ L(500 ng), primer 5 μ L, 2.5 mM dNTP 4 μ L, 10×PCR buffer 5 μ L, 2unit Taq polymerase 1 μ L(Promega, USA)와 나머지는 멀균수로 최종 volume을 50 μ L가 되게 맞추었다.

PCR

PCR 반응은 Perkin Elmer DNA thermal cycler 2400을 사용하였고, RAPD를 위한 PCR 반응은 pre-denaturation 94°C 5분, 1 cycle 후, denaturation 94°C 1분, annealing 35°C 2분, extension 72°C 2분 30초로 총 40 cycle을 시행하였으며 post-extension은 72°C에서 10분 동안 수행하였다. 증폭된 DNA는 EtBr 존재하에 1.2% Agarose gel에서 전기영동 후 반응물은 UV광선하에서 사진 촬영하여 분석에 사용하였다.

PCR을 위하여 Operon Technologies Inc.로부터 구입한 random primer를 사용하였다. Primer 선발에 의하여 총 40개의 primer들 중 polymorphism이 나타나지 않는 primer를 제외한 8종류의 primer를 선발하였다 (Table 1).

종간 유연관계 분석

PCR 결과 얻어진 밴드는 모든 붓꽃 수집종에 대하여 존재하는 polymorphic 밴드의 유무에 의해 계산하였다. 수집종간의 비유사도(dissimilarity($1-S_j$))는 Jaccard's coefficient ($S_j=w/(w+x+y)$)를 기초로 하여 두 수집종 (A, B)에 모두

Table 1. Random primers showed polymorphism in *Iris* species.

No.code	Sequence	Tm value (°C)	GC content (%)
ope-02	GGTGCAGGAA	34	70
ope-03	CCAGATGCAC	32	60
ope-04	GTCACATGCC	32	60
ope-06	AAGACCCCTC	32	60
ope-07	AGATGCAGCC	32	60
ope-11	GAGTCTCAGG	32	60
ope-12	TTATCGCCCC	32	60
ope-14	TGCGGCTGAG	34	70

positive(존재하는 밴드)한 것을 w, A만 positive하고 B는 negative(존재하지 않는 밴드)한 것을 x, A는 negative하고 B만 positive한 것을 y로 하였다(Rickwood and Hames 1993). Dendrogram작성을 위한 통계적 분석은 Dissimilarity matrix 법에 기초한 Phentree의 nearest neighbor program을 사용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

형태적 특성

Table 2에 나타난 바와 같이 개화시기는 노랑무늬붓꽃(*I. odaesanensis*)과 금붓꽃(*I. minutoaurea*), 각시붓꽃(*I. rossii*)이 4월 22일 가장 일찍 개화하기 시작하였으며, 꽃창포는 6월 9일로 가장 늦게 개화하였다. 개화시기가 빠른 노랑무늬붓꽃, 각시붓꽃과 금붓꽃은 다른 종들에 비해 화경, 엽장, 엽폭, 삭과장이 작게 나타났다. 엽장은 노랑꽃창포가 가장 길었으며 꽃창포는 82 cm로 나타났으며 한국 특산종인 노랑무늬붓꽃은 각시붓꽃과 같이 28 cm로 나타났다. 엽폭의 크기는 각시붓꽃이 0.5 cm로 가장 좁았으며 그 외의 공식종들은 1~2 cm의 폭을 나타내었다. 꽃창포의 경우 화경장이 104 cm로 가장 길었으며 화경 길이가 가장 짧은 각시붓꽃 9.0 cm와 매우 큰 차이를 보였다. 꽃창포의 경우에 있어서는 자생지가 다른 태백산과 봉화 종의 외화피장으로 본 생육 특성은 차이를 보였다. 꽃의 형태는 외화피 3 장과 내화피 3 장으로 구분되며 꽃의 크기는 꽃창포가 가장 컼으며 제비붓꽃, 연미붓꽃, 노랑꽃창포, 타래붓꽃, 붓꽃, 각시붓꽃, 노랑무늬붓꽃, 금붓꽃 순으로 나타났다. 개화수정 후에 성숙된 삭과장의 크기는 타래붓꽃이 가장 길었고, 꽃창포는 3 cm 내외로 원형에 가까운 등근형으로 나타나 삭과장의 형태가 종에 따라 상이하게 나타났다. 화색에 있어서는 붓꽃은 가장 진한 자색을 보였고, 꽃창포는 적자색을 보였다. 개화시기가 빠른 각시붓꽃은 자색, 노랑무늬붓꽃은 흰색의 화피에 중앙에 노랑색의 밀선이 있었다.

Table 2. Morphological Characteristics of *Iris* species.

Species	Flower-ring period	Leaf		Flower stalk (cm)	Outer perianth length (cm)	Capsule length (cm)	Flower color
		length (cm)	width (cm)				
<i>I. laevigata</i>	5.8	68.1±4.7	2.2±0.2	79.0±7.0	9.0±0.4	6.3±0.8	blue purple
<i>I. lensata</i>	6.8	82.0±8.6	1.7±0.7	90.2±11.2	8.3±0.2	3.3±0.5	Pale red purple
<i>I. tectorum</i>	5.8	43.0±7.0	2.1±0.2	75.0±14.0	6.8±0.4	6.8±0.6	Dark purple
<i>I. pseudacorus</i>	5.13	86.0±8.6	2.2±0.3	74.0±7.2	6.5±0.4	5.5±0.6	Yellow
<i>I. lensata</i>	6.9	77.6±14.8	1.3±0.3	104.0±12.0	9.2±0.1	3.2±0.3	Pale red purple
<i>I. lactea</i>	4.25	80.9±12.6	1.0±0.2	38.0±3.5	6.0±0.2	7.8±0.3	Pale blue purple
<i>I. sanguinea</i>	5.10	68.1±4.7	1.9±0.3	82.0±14.8	5.9±0.3	4.7±0.3	blue purple
<i>I. odaesanensis</i>	4.22	28.6±8.4	1.2±0.4	9.3±1.3	3.3±0.2	3.1±0.3	White
<i>I. rossii</i>	4.22	28.0±3.2	0.5±0.1	9.0±1.2	4.5±0.2	0.6±0.2	Purple
<i>I. minutoaurea</i>	4.22	40.1±7.2	1.0±0.1	10.0±1.2	3.1±0.1	2.6±0.3	Yellow

RAPD 분석

국내 자생지에서 수집한 붓꽃 9 종과 8 개의 primer를 이용하여 PCR한 결과 증폭된 총 밴드수는 108 개가 관찰되었으며 각 primer마다 증폭된 밴드수는 11 개에서 17 개까지 나타났으며 primer당 나타난 평균 밴드 수는 13.5 개였다. 증폭된 밴드에 의해 나타난 종간의 다양성은 99%로 나타났으며 이와 같은 결과는 RAPD를 이용한 마늘의 유연관계분석(Lee et al. 1996)과 PCR 기술을 이용한 산마늘의 종내변이(Kim et al. 1997)와 RAPD법을 이용한 수박의 유전변이 탐색(Shin et al. 1996), 증폭된 DNA 다변성에 의한 삼지구엽초의 종내변이(Yoo et al. 1997)와 비교해 볼 때 다양한 종간의 변화 양상을 알 수 있고, RAPD를 이용한 마늘의 유연 관계분석(Lee et al. 1996)과 RAPD 방법을 이용한 구기자의 분류 및 동정(Park 1996)에서 나타난 속간 분석의 밴드 양상보다 훨씬 다양함을 알 수 있다. Primer 8 종류로 10 개의 total genomic 붓꽃 DNA를 PCR로 증폭하여 얻어진 밴드의 다양한 패턴에서 (Figure 1,2) primer 2는 Lane 1과 3, lanes 11과 15에서 유사한 밴드

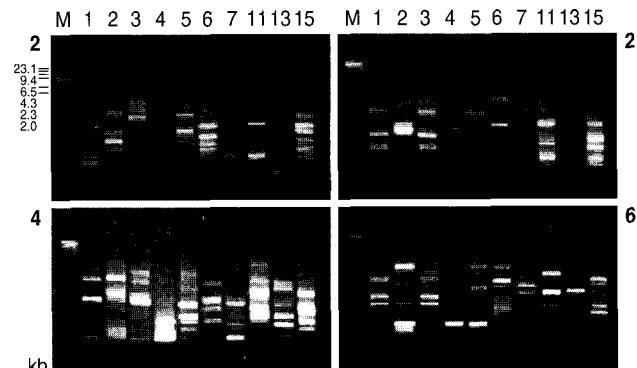


Figure 1. DNA banding patterns from 9 species of *Iris* using operon primer 2, 3, 4, and 6. Lane M indicates λ Hind III size marker. Lane 1: *I. laevigata*, lane 2, and 5: *I. lensata*, lane 3: *I. tectorum*, lane 4: *I. pseudacorus*, lane 6: *I. lactea*, lane 7: *I. sanguinea*, lane 11: *I. odaesanensis*, lane 13: *I. rossii*, lane 15: *I. minutoaurea*

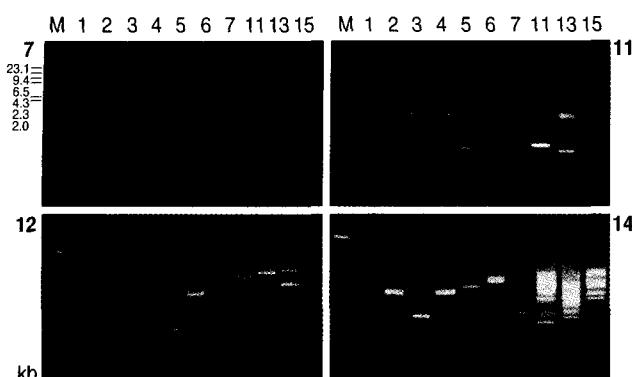


Figure 2. DNA banding patterns from 9 species of *Iris* using operon primer 7, 11, 12, and 14. Lane M indicates λ Hind III size marker. Lane 1: *I. laevigata*, lane 2, and 5: *I. ensata*, lane 3: *I. tectorum*, lane 4: *I. pseudacorus*, lane 6: *I. lactea*, lane 7: *I. sanguinea*, lane 11: *I. odaesanensis*, lane 13: *I. rossii*, lane 15: *I. minutoaurea*

패턴을 볼 수 있었고, primer 3은 lane 6과 15, primer 4는 lane 1과 3, primer 6은 lane 1과 3, primer 7은 lane 3과 7, primer 11은 lane 2와 4, primer 14는 lane 1과 3, lane 2와 4, lane 11과 15에서 유사한 밴드가 2개 이상 2.0 kb이하에서 다양하게 나타났다. 유사한 밴드의 유무와 형태적인 생육 특성을 함께 고려해보았을 때, primer 2, 4, 7, 14에서는 제비붓꽃 (lane 1)과 연미붓꽃 (lane 3)간의 개화기의 일치와 화경장, 삭과장의 크기가 비슷함을 알 수 있었다. Primer 2, 4, 6, 14에서 증폭된 DNA 단편이 개화기를 결정 하는 표지인자로 사용될 가능성이 있으나 개화기와 이 표지인자간의 정확한 관계를 먼저 밝혀 볼 필요가 있다고 생각된다.

Figure 1과 Figure 2에서 보는 바와 같이 증폭된 DNA 단편의 크기는 대부분 2.0 kb이하로써 작게 나타났다. 다형성은 agarose gel상의 밴드의 유무로 판정하였으며 유연 관계를 밝히기 위하여 Jaccard's coefficient(S_J)에 의해 비유사도($1-S_J$)를 구하였다. $1-S_J$ 에 의한 RAPD 분석은 108 개의 다형성 밴드를 사용하였으며, 각 수집종간에 유연관계를 비교하기 위한 비유사도는 Phentree의 Nearest Neighbor Program에 의한 dendrogram 작성에 사용 하였다. 평균적인 비유사도는 0.252로 나타났으며, 각 수집종간의 비유사도는 0.095에서 0.699로 다양하게 나타났다. 가장 낮은 비유사정도는 노랑꽃창포와 노랑무늬붓꽃간의 0.095이고, 가장 높은 비유사도는 연미붓꽃과 제비붓꽃간의 0.699로 나타났다 (Figure 3).

수집된 자생종 붓꽃식물은 크게 I 군, II 군, III 군으로 분류되었다. I 군에는 연미붓꽃, II 군에는 타래붓꽃, 제비붓꽃, 노랑꽃창포, 노랑무늬붓꽃이 속하였고, III 군에는 금붓꽃, 각시붓꽃, 꽃창포, 붓꽃으로 나타났다. 이상의 RAPD 분석의 결과로 수집된 붓꽃의 유전적 연관 관계를 규명할 수 있었다.

본 실험의 결과 붓꽃 개량에 있어 자생 붓꽃 유전자원의 다양한 정보는 매우 중요하며 종간의 유전적 평가는 새로운 유전자 도입을 위한 기초자료로 활용될 수 있다. 또한 본 실험을 기초로 종간 교잡의 결과 F1식물에서 나타나는 유전적 변

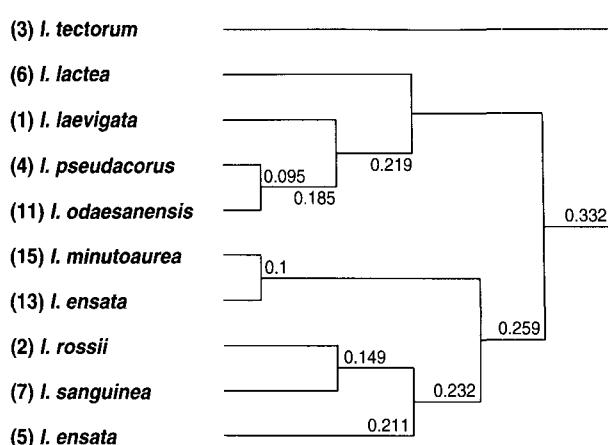


Figure 3. Genetic relationship using 108 RAPD markers of *Iris* species

이 양상의 연구로써 모본과 부본의 유전적 특성을 가지는 새로운 표지인자를 찾을 수가 있을 것으로 생각되었다.

적  요

본 연구는 붓꽃속 식물의 형태적 특성 조사와 RAPD 분석을 통해 유전적 다양성과 근연성을 밝히고 유전자 도입을 위한 기초적인 자료를 얻기 위하여 실시하였다. RAPD를 이용하여 국내에서 수집한 자생붓꽃종의 DNA 다형성을 조사한 결과 40 개의 primer중 8 개의 유용한 primer가 선별되었고 이들 primer는 108 개의 밴드를 나타내었다. 이들 중 다형성 밴드는 107 개였다. Jaccard ($1-S_J$)법에 의한 비유사도 계수는 0.095~0.699로 나타났고, dendrogram에서 나타난 유전적 근연성은 크게 세 개의 군으로 분류되었다. I 군은 연미붓꽃, II 군은 타래붓꽃, 제비붓꽃, 노랑꽃창포, 노랑무늬붓꽃이 속해 있으며, III 군은 금붓꽃, 각시붓꽃, 붓꽃, 꽃창포가 속해 있었다.

인용문헌

- Brunel D (1992) An alternative rapid method of plant DNA extraction for PCR analyses. Nucleic Acids Res 20: 4676
- Chung BK, Park EH, Yoo SO, Park YJ, Bae CH (1993). A study on the growth environment, characteristics of *Iris ensata* Thunb, var. spontanea Nakai native to Korea. J Kor Flower Res Soc 2(2): 45-54
- Demeke T, Kawchuk LM, Lynch DR (1993) Identification variants by random amplified polymorphic DNA analysis. Amer Potato J 70: 561-569
- Fritsch P, Hanson MA, Park PE, Reisberg LH (1993) Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related of

- flowering plants. Plant Mol Bio 11: 10~20
- Karihaloo JL, Brauner S, Gottlieb LD (1995) Random amplified polymorphic DNA variation in the eggplant, *Solanum melongena* L.(Solanaceae). Theor Appl Genet 90: 767~770
- Kawase K, Mizutani H, Yoshioka M, Fukuba S (1990) Propagation of Iris tissue culture. 1. Propagation of yellow flag (*Iris pseudacorus* L.) by culture of flower stalks. J Japan Soc Hort Sci 52(2): 644~645
- Kawase K, Ikeuchi A, Yoshika M, Umemachi T (1993) Propagation of Iris tissue culture. 4. Propagation of yellow flag in vitro culture of perianth bases. J Japan Soc Hort Sci 62(2): 504~505
- Kim WB, Yoo KO, Ryu SY, Seo JT (1997) Transpecific variations of the *Allium victorialis* var. *platyphyllum* by polymerase chain reaction. Kor J Breed 38(2): 129~132
- Lee TB (1980) Illustrated flora of Korea. pp. 228~230. HyangMoonSa.
- Lee SH, Kim CH, Song WS, Nou IS (1996) Phylogenetic relationship and genetic relationship and genetic variation among varieties of *Hibiscus syriacus* based on RAPD analysis. Kor. J. Breed 28(4):445~456
- Lee YK, Yoon YH, Chung IS, Lee JS, Lim SJ, Song IG, Kim DU (1996) Analysis of genetic relationship by RAPD technique in *Allium sativum* L. Korean J Breed 28(3): 332~341
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. Genome 34(6): 1021~1027
- Oh MJ, Hong BH (1995) Genetic relationship among korean native tea trees(*Camellia sinensis* L.) using RAPD markers. Kor J Breed 27(2): 140~147
- Park SY, Kim H, Lee BC, Sung CK, Lim YP (1996) Identification classification of *Lycium chinense* Mill. cultivars by RAPD analysis. Kor J Breed 28(3): 221~226
- Rickwood D, Hames BD (1993) Biological Data Analysis. A practical approach. Oxford university press. New York. pp. 225
- Shin JS, Lee SJ, Park KW (1996) Genetic diversity in watermelon (*Citrullus vulgaris* L.) germplasm through RAPD analysis. Kor J Breed 27(1): 94~107
- Sim JK (1988) A taxonomic study on Iridaceae in Korea. pp 1~57. Korea University.
- Sneath PHT, Sokal PR (1973) Principles of Numerical Taxonomy. p 216. WH. Freeman & Co., San Francisco, USA
- Tsutomu Yabuta (1985) Amphidiploids between *Iris laevigata* Fisch. and *I. ensata* Thunb. Induced through in vitro culture of embryos treated with colchicine. Japan J Breed 35: 136~144
- Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primer. Nucleic Acids Res 18: 7213~7218
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 18: 6531~653
- Yoo KO, Ahn SD, Yu CY, Pak KY, Lim HT (1997) Intraspecific variations of the *Epimedium koreanum* by randomly and specifically amplified polymorphic DNA markers. J Kor Hort Sci 38(2): 183~187
- Yoo KO, Lee WC, Kim NS, Lim HT (1996) Comparative studies on the (*Hanabusaya asiatica*) and its allied groups based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. J Kor Hort Sci 37(2): 324~328

(접수일자 2003년 8월 6일, 수리일자 2004년 3월 2일)