

노각나무(*Stewartia koreana* Nakai)의 cDNA library 제작 및 EST 분석

임수빈^{1†} · 김준기^{1†} · 최영인¹ · 최선희¹ · 권혜진² · 송호경² · 임용표^{1*}

¹충남대학교 원예학과, ²충남대학교 산림자원학과

Construction of a Full-length cDNA Library from Korean *Stewartia* (*Stewartia koreana* Nakai) and Characterization of EST Dataset

Subin Im^{1†}, Joonki Kim^{1†}, Young In Choi¹, Sun Hee Choi¹, Hyejin Kwon²,
Hokyung Song², and Yong Pyo Lim^{1*}

¹Department of Horticulture, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

²Department of Forestry Resources, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract. In this study, we report the generation and analysis of 1,392 expressed sequence tags (ESTs) from Korean *Stewartia* (*Stewartia koreana* Nakai). A cDNA library was generated from the young leaf tissue and a total of 1,392 cDNA were partially sequenced. EST and unigene sequence quality were determined by computational filtering, manual review, and BLAST analyses. Finally, 1,301 ESTs were acquired after the removal of the vector sequence and filtering over a minimum length 100 nucleotides. A total of 893 unigene, consisting of 150 contigs and 743 singletons, was identified after assembling. Also, we identified 95 new microsatellite-containing sequences from the unigenes and classified the structure according to their repeat unit. According to homology search with BLASTX against the NCBI database, 65% of ESTs were homologous with known function and 11.6% of ESTs were matched with putative or unknown function. The remaining 23.2% of ESTs showed no significant similarity to any protein sequences found in the public database. Annotation based searches against multiple databases including wine grape and populus sequences helped to identify putative functions of ESTs and unigenes. Gene ontology (GO) classification showed that the most abundant GO terms were transport, nucleotide binding, plastid, in terms biological process, molecular function and cellular component, respectively. The sequence data will be used to characterize potential roles of new genes in *Stewartia* and provided for the useful tools as a genetic resource.

Additional key words: contig, gene ontology, homology, singleton, unigene

서 언

차나무과(Theaceae)의 노각나무속(*Stewartia*)에 속하는 노각나무(*Stewartia* L.)는 전세계적으로 30종이 중국, 일본, 미국 그리고 한국에 분포한다(Stevens et al., 2004). 한국에는 1종의 노각나무(*Stewartia koreana* Nakai ex Rehder) 특산종이 가야산, 소백산, 지리산 등에 분포하고 있으며(Shim et al., 1992), 내한성이 강해 중부이남에서도 생육이 가능한 것으로 알려져 있다. 또한 공해에 강하고 수피를 비롯한 외형의 관상적 가치가 높아 가로수, 공원수 및 정원수로 사용빈도가 높다(Dirr, 1991; Spongberg and Fordham, 1975). 그

러나 노각나무의 경제적 가치가 높음에도 국내보급은 낮은 실정이며 이는 삼목의 성공률이 낮고 종자의 이중휴면으로 인해 발아에 걸리는 시간이 2년 이상 소요되어 실생번식의 효율이 낮기 때문이다(Shim et al., 1992; Struve et al., 1999). 실제 전세계적으로 상업화되어 있는 품종은 주로 미국산이며 이는 1917년 미국인 Wilson이 지리산에서 도입한 노각나무의 개량 품종으로 알려져 있다(Dirr, 1990; Shim et al., 1993). 최근 이러한 문제를 해결하기 위해 국내 노각나무의 분류학적 검토나 식생구조, 천연집단의 I-SSR(inter-simple sequence repeat) 유전변이 분석 그리고 번식의 효율을 높이기 위한 식물체재 분화연구가 진행되어 왔다(Kwon and Song,

*Corresponding author: yplim@cnu.ac.kr

※ Received 21 December 2010; Accepted 1 February 2011. †These authors are contributed equally to this work. 본 연구는 국립생물자원관의 “야생생물 유래 유용 유전자 발굴분석 연구사업”의 지원에 의해 수행되었음.

2008; Kwon et al., 2008; Son et al., 2004; Yang et al., 2006). 이외에도 노각나무 천연 추출물의 항산화 기능, HIV-1 protease 억제기작 그리고 NO(Nitric Oxide) 생성억제 등 다양한 연구결과가 보고되고 있으며 유용생물자원으로서의 인식이 높아지고 있는 상황이다(Choi et al., 2005; Han et al., 2003; Kim et al., 2004; Min et al., 1999). 그러나 앞서 언급한 바와 같이 노각나무의 잠재적 경제적 가치에 반해 다른 목본류에 비해 상대적으로 유전체 분석연구는 매우 미미한 상황이다. 현재까지 NCBI EST database(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/dbEST/>)에 등록된 노각나무속(*Stewartia*) 전체의 유전자는 131개로 *Vitis vinifera*(wine grape) 362,375개, *Pinus taeda*(loblolly pine) 328,628개, *Malus × domestica*(apple tree) 324,515개, *Picea glauca*(white spruce) 313,110개 등에 비해 거의 관련 연구가 진행되지 않은 실정이다.

최근 노각나무의 개체군 감소율과 분포영역 및 점유면적 감소의 평가를 통하여 Chang et al.(2001)은 노각나무를 ISUN 적색목록 기준 멸종위협종으로 평가하였다. 근래 희귀, 멸종위기 생물종 및 특산종에 대한 중요성과 유전자원으로서의 인식이 점차 증가되고 있는 상황이다(ISUN, 2001). 또한 생물 다양성 협약을 통해 유전자원의 다양성이 하나의 유형으로 분류되었고 유전자원의 이용에 의해 발생하는 이익배분에 대한 협약이 이루어짐에 따라 생물체 자체를 하나의 자원으로 보는 경향이 강해지기 시작했다. 본 논문은 지리산에 자생하는 국내 특산 수종인 노각나무의 유전자원을 발굴 분석하여 국내자생식물의 유전자원 확보의 일환으로 진행되었다.

재료 및 방법

식물 재료 및 RNA 추출

노각나무 시료는 2010년 5월 경상남도 함양군 마천면 지리산(35° 23' 38.4" E 127° 42' 16.5" N)에서 유엽을 채집하고 액체질소에 동결하여 -70°C에서 보관하였다. RNA의 추출은 Chang et al.(1993)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. 잎 조직 1g을 막자 사발과 액체 질소를 사용하여 곱게 파쇄한 후 15mL의 추출 용액[2% CTAB, 2% PVP, 100mM Tris-Cl(pH 8), 25mM EDTA, 2M NaCl, 0.05% spermidine, 2% β-mercaptoethanol]을 첨가하여 녹인 후 동일 부피의 chloroform을 처리하여 섞은 후 상온에서 10,000rpm의 속도로 원심분리를 하여 상등액을 분리하였다. RNA 침전을 위해 1/4 부피의 10M LiCl를 첨가하고 4°C에서 12시간 이상 보관한 후 10,000rpm으로 20분 동안 원심 분리하여 RNA 침전물을 얻었다. RNA 침전물은 500μL의 SSTE 용액[1M

NaCl, 0.5% SDS, 10mM Tris-Cl(pH 8), 1mM EDTA(pH 8)]에 녹여 사용하였다. Total RNA로부터 Poly(A⁺) RNA의 분리는 PolyATtract mRNA isolation system(Promega, USA)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 수행하였다.

전장 cDNA library의 제작 및 염기 서열 분석

전장 cDNA enriched library의 제작을 위해 SMARTTM 기술을 사용하였다(Okayama and Berg, 1982). cDNA의 합성은 1μg의 poly(A⁺) RNA를 In-Fusion^R SMARTerTM cDNA Library Construction Kit(BD Biosciences)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 진행하였다. 제작된 library는 X-gal 선별 방법을 통해 선별하였고 이 중 1,392개 clone을 무작위로 선별하여 염기서열을 결정하였다. 선별된 각각의 clone은 96 well deep plate에서 배양 후 AccuPrep^R 96 Plasmid Extraction Kit를 사용하여 제조사의 지침에 따라 plasmid DNA를 분리하였다. 염기서열은 M13F primer를 사용하여 Big Dye Terminator Kit Ver 1.1(Applied Biosystems, USA)로 반응시킨 후 ABI3100 Genetic Analyzer(Applied Biosystems, USA) 이용하여 결정하였다.

EST 서열 분석

분석된 염기서열 중 vector 서열은 CodonCode Aligner Ver.3.7.1를 사용하여 제거하였고, 남은 clone 중 100bp 이하의 서열은 분석에서 제외하였다. 남은 서열의 assembling과 clustering은 CAP3 프로그램(<http://deepc2.psi.iastate.edu/aat/cap>)의 기본 설정을 이용하여 분석하였다. 분석된 서열중 contig로 분류되지 않은 서열은 singlet으로 분류하였으며, 각각의 서열에 대한 상동성 탐색과 gene ontology의 결정은 Blast2GO (<http://blast2go.bioinfo.cipf.es/>) 프로그램을 사용하여 분석하였다(Conesa et al., 2005). BLASTX의 cut off 값은 10⁻⁵로 설정하여 검색하였고 mapping은 E-value 10⁻⁵, annotation cut off 45, GO weight 10으로 설정하여 검색하였다. Microsatellite는 SSR Finder(<http://www.csufresno.edu/ssrfinder/>)를 사용하여 분석하였다. Di nucleotide (nt)는 5번 이상 그리고 tri-nt 이상인 경우 4번 이상 반복된 것만 microsatellite로 분류하였다(Table 1).

결과 및 고찰

노각나무 전장 cDNA library의 제작

지리산에서 채집한 노각나무의 유엽을 사용하여 total RNA를 추출하였다. 일부 목본류의 경우 조직내의 polyphenol 또는 polysaccharide의 함량이 높아 일반적으로 사용되는 guanidinium

Table 1. Characterization of the repeat structures for the identified microsatellite sequences.

Repeat unit	Repeat	Synonym	Observed No.	Total No.
Di-nt	AT	TA	3	36
	AC	CA, GT, TG	5	
	AG	GA, CT, TC	28	
Tri-nt	AAC	ACA, CAA, GTT, TTG, TGT	1	23
	AAG	AGA, GAA, CTT, TTC, TCT	1	
	AAT	ATA, TAA, ATT, TTA, TAT	1	
	ACC	CCA, CAC, GGT, GTG, TGG	2	
	AGC	GCA, CAG, GCT, CTG, TGC	10	
	ACG	CGA, GAC, CGT, GTC, TCG	1	
	AGG	GGA, GAG, CCT, CTC, TCC	4	
	ACT	CTA, TAC, AGT, GTA, TAG	1	
	ATC	TCA, CAT, GAT, ATG, TGA	1	
	GCC	CCG, CGC, GGC, GCG, CGG	1	
	Tetra-nt	ATTT	TTTA, TTAT, TATT, AAAT, AATA, ATAA, TAAA	
CAGA		AGAC, GACA, ACAG, TCTG, CTGT, TGTC, GTCT	5	
TTTG		TTGT, TGTT, GTTT, CAAA, AAAC, AACA, ACAA	1	
Penta-nt		ATAGA, CTCTC, GAAAA	3	3
Hexa-nt		AAGGAC, AAGGAG, AGAAGG, CACTGC, CATCAG, CCTCAC, CTTCTC, CTTCTG, GATGGT, GATTAA, GCCACC, TCTCCT	15	15
Complex		(AGAAGG) ₄ (AGA) ₄ , (AGGC) ₃ (AGAC) ₅ , (AT) ₉ (AG) ₂₂ , (CAC) ₇ (CAG) ₃ , (CAGG) ₃ (CAGA) ₅ , (CT) ₁₆ (GT) ₅ , (CT) ₈ (CA) ₁₅ , (GT) ₉ (GA) ₁₈ , (GTCT) ₅ (CCTG) ₃ , (TC) ₁₂ (TA) ₈ , (TTGGCG) ₄ (TTGGGG) ₂	11	11
Total				95

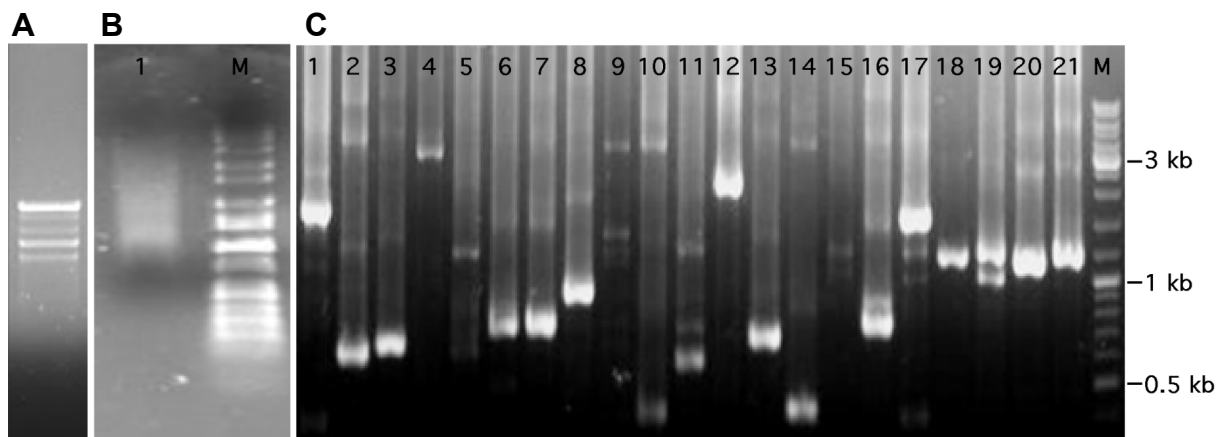


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of total RNA extracted from *Stewartia koreana* leaves. (A) size fractionated (< 500 bp) double-strand cDNA. (B) lane 1, synthesized cDNA; M, marker (C) lane 1-21, PCR products of different clones; M, marker.

thiocyanate, phenol/chloroform를 사용한 one-step extraction 어렵다. 노각나무 역시 Trizol을 사용한 방법으로 total RNA 추출이 되지 않아 Chang et al.(1993)에 의해 고안된 CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) 방법을 사용하여 추출하였다. 추출한 RNA는 1% denaturing formaldehyde

agarose gel을 사용하여 정성 분석을 진행하였다(Fig. 1A). 분리된 total RNA의 농도는 $0.517\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 였고 A_{260}/A_{280} 의 비율은 1.8(0.235/0.142)로 확인되었다. 전장 cDNA library의 제작은 SMART™ 기술을 사용하였으며(Okayama and Berg, 1982), $0.5\mu\text{g}$ 의 poly(A⁺) mRNA를 사용하여 1st strand

cDNA 합성, dC tailing, template switching을 진행하였다. 2nd cDNA 합성을 통해 만들어진 double strand(ds) cDNA는 CHROMA SPIN™ + TE-1000 column을 사용하여 500bp 이하의 cDNA를 제거하였다(Fig. 1B). 크기 선별을 완료한 ds cDNA는 in-fusion cloning 방법을 통해 pSMART2IF 벡터에 재조합을 유도한 후 *E.coli* strain *DH10B*에 electro-transformation 방법을 통해 형질전환시켰다. 형질전환된 clone 중무작위로 21개에 대해 colony PCR을 진행하여 분포를 확인한 결과 삽입 유전자의 크기는 400bp에서 2kb까지의 범위 내에 있었고 평균적 크기는 1.2kb였으며 전체의 52%가 1kb 이상으로 확인됐다(Fig. 1C).

염기서열 해독 및 분석

형질전환을 통해 얻어진 EST clone 중 1,392개를 무작위로 선별하여 염기서열을 분석하였다. 평균적인 염기서열 분석 길이는 약 1,085bp이며 전체 분석 서열 길이는 1.5×10^6 bp였다. 벡터에 삽입된 유전자의 크기별 분포는 1.2-1.3kb는 25.6% (134개), 1.1-1.2kb는 12.3%(160개), 1.0-1.1kb는 10.3%(134개)의 비율로 나타났다(Fig. 2). 이 중 벡터서열과 염기서열 분석질이 낮은 91개를 제외한 1,301개의 서열에 대한 분석을

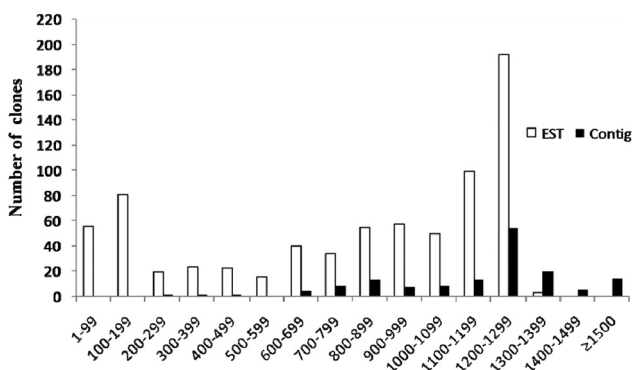


Fig. 2. Distribution of the sequence length of ESTs and contigs.

진행하였다. CAP3 프로그램을 사용하여 전체 893개의 EST cluster 중 contig 150개 singlet 743개를 확인하였다(Fig. 3). 150개의 contig 중 2-5개의 EST를 포함하는 contig가 87.5% (134/150)로 대부분을 차지하며 이 중 가장 많은 EST clone을 포함하는 것은 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit로 38개의 clone이 중복되었고 이 후 chlorophyll a/b binding protein이 28개 그리고 caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase(CCoAOMT)가 26개 빈도로 나타났다. 특히 CCoAOMT는 리그닌 전구물질 생합성에 관여하는 효소로서 다른 EST에 비해 상대적으로 높은 비율이 검출되었다. 담배의 경우 CCoAOMT가 확인된 전체 30개의 EST 중 대부분이 잎 조직에서 유래된 것으로 보아 노각나무의 유업을 사용한 결과로 나타난 조직 특이성에 기인한 것으로 사료된다.

NCBI nr database의 BLASTX 검색은 Blast2GO 프로그램을 사용하여 최소 E-value 값을 10^{-4} 으로 설정하여 상동성을 검색하였다. 이 중 no hit는 162개(11.6%), unknown gene은 324개(23.2%) 그리고 known gene은 906개(65%)로 확인되었다(Fig. 4A). 906개 known gene의 종 별 분포는 *Vitis vinifera* 380개(30.9%), *Homo sapiens* 128개(10.4%), *Populus trichocarpa* 108개(8.8%), *Ricinus communis* 80개(6.5%), *Plasmodium chabaudi* 64개(5.2%)의 순으로 나타났으며 이 중 *Vitis vinifera*와 *Populus trichocarpa* 그리고 *Ricinus communis*는 목본류로 계통 분류학적 위치가 같지 않음에도 높은 상동성을 보여 주었다(Fig. 4B). 이는 앞의 목본류들이 와인의 주재료로 사용되거나 오일이나 목재로서의 상업적 가치가 높아 많은 연구가 선행되어 나타난 결과로 생각된다. 실제로 2010년 12월 1월 기준으로 발표된 NCBI의 EST database(dbEST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/dbEST/>)에는 낙엽 활엽만목에 속하는 *Vitis vinifera*(wine grape)가 362,375개로 목본류 중에서 가장 많은 EST가 확보되어 있었으며 *Populus trichocarpa*나 *Ricinus communis* 도역시 각각 89,943개와

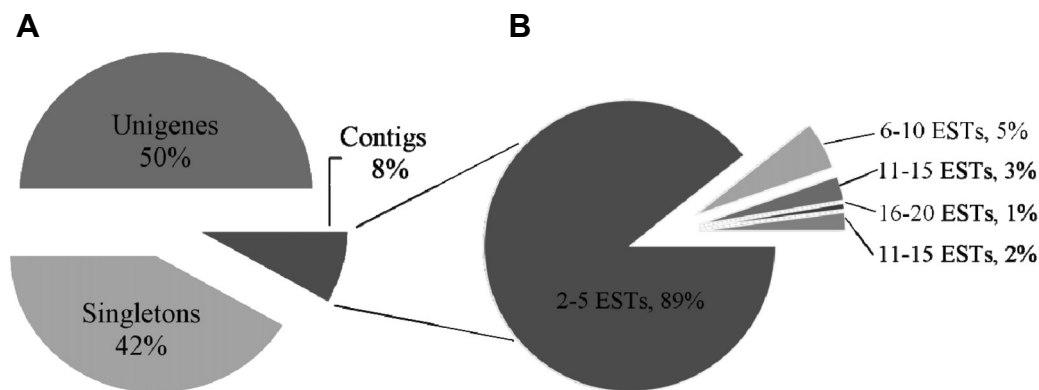


Fig. 3. Classification of all ESTs determined in this study. (A) functional annotation of ESTs with BLASTN. (B) distribution of the number of ESTs in all contigs.

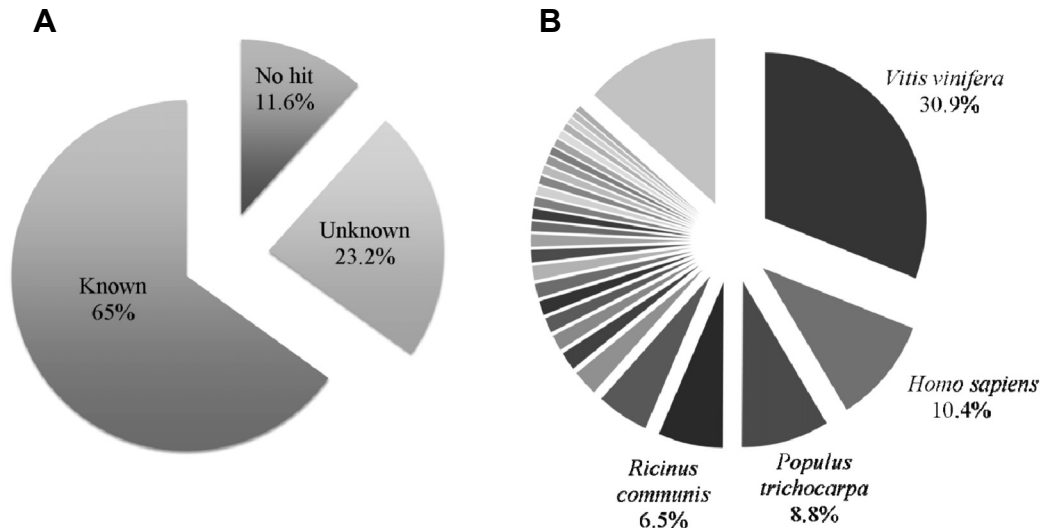


Fig. 4. Graphical representation of functional annotation and distribution of BLASTN top-hit species. (A) classification of all ESTs with BLASTN. (B) BLASTN top-hit species showing high homology with known genome sequences.

62,592개가 보고되었다(Peng et al., 2007). 이러한 현상은 *Homo sapiens*에서 더욱 두드러지게 나타난다. 인간의 경우 보고된 전체 생물종의 EST 중 12.3%(8,314,462/67,370,045)로 가장 높은 비율을 차지하고 있어 계통 분류학 위치와 상관없이 노각나무와의 일치도가 높게 나온 것으로 생각된다 (Fig. 4B).

전체 1,301 clone에 대한 gene ontology는 Blast2GO 프로그램의 mapping 기능을 사용하여 molecular function, biological process, cellular component로 분류하고 Plant Go Slim 기능을 사용하여 중복되는 GO ID를 최소화시켰다. 각각의 비율은 molecular function 13.9%, biological process 37.6%, cellular component 48.4%로 나타났다(data not shown). 전체 clone 중 적어도 한 개 이상의 GO ID가 부여된 경우는 84.9%(1,105/1,301)로 나타났으며, clone당 평균적인 GO ID는 3.9개로 나왔고 전체 clone에 대한 총 GO ID는 5,441개로 확인됐다. 기능에 따른 분류에 있어 molecular function은 nucleotide binding, biological process는 transport, cellular component는 plastid가 가장 높은 비율로 나왔다.

분리된 893개의 unigene에서 microsatellite 서열을 분리하여 구조를 분석하였다. 각각의 microsatellite는 반복된 서열의 구조에 따라 분류하였고 전체 95개의 microsatellite를 확인하였다(Table 1). Unigene내의 microsatellite의 비율은 10.6%로 다른 목본류인 참나무(18.6%)에 비해 낮은 값이 나타났다(Durand et al., 2010). Di-, tri-, tetra-, penta-, hexa-의 빈도는 각각 37.8%(36/95), 24.2%(23/95), 7.3%(7/95), 3.1%(3/95), 15.7%(15/95)로 나타났으며 복합 반복은 11.5%(11/95)로 확인되었다. 전체 microsatellite 중 (AG)_n이 29.4%(28/95)로 다른 microsatellite에 비해 가장 높은 비율이 확인됐으

며, 이는 보리, 옥수수, 벼, 수수와 밀의 EST를 기반으로 한 microsatellite 탐색 결과에서도 일치되는 결과가 관찰되었다(Kantety et al., 2002; Temnykh et al., 1999). 그러나 unigene내의 microsatellite의 비율이 다른 목본류에 비해 상대적으로 낮고 식물에서 일반적으로 높게 관찰되는 (AT)_n의 비율이 낮은 점 등을 고려해 볼 때 분리해 낸 microsatellite 전체의 비율을 반영한다고 보기 어렵고, 이는 분석에 사용된 microsatellite의 개수가 적어 나타난 현상이라고 생각된다. 현재 노각나무는 분류학적 체계에 대한 정확한 기준이 없어 동일 속내의 근연 종간에도 여러가지 학명이 혼용되고 있는 상태이며(Li, 1996; Prince and Parks, 2001) 본 연구를 통해 분리해 낸 잠재적인 95개의 microsatellite는 이들의 분자마커로서 활용될 것으로 예상된다.

본 논문에서는 지리산에서 자생하는 노각나무의 유염 조직의 EST library를 제작하여 전체 1,301개의 EST clone을 분석하였다. 전체 150개의 contig와 743개의 singleton을 분리하여 총 893개의 unigene을 분리해 냈으며 EST 서열분석을 통해 총 95개의 microsatellite를 분리해 냈다. 이중 BLASTX를 통해 상동성이 확인되지 않은 12%의 no hit 유전자는 노각나무 유염 특이적 유전자일 가능성이 높을 것으로 생각된다. 또한 contig의 중복성 분석을 통해 확인된 CCoAOMT는 총 26개의 EST를 포함하고 있었으며 이는 리그닌 전구체 합성에 관여하는 효소로서 작용하는 것이 알려져 있고 이는 산업적으로 응용 가능한 잠재적인 유용유전자이다(Anterola et al., 2002). 리그닌은 목질의 바이오메스 중 약 25-35%를 차지하는 것으로 펄프 제작에 있어 제거해야 되는 구성물질 중의 하나로 알려져 있으며, Eom et al.(2010)은 실제로 현 사시나무의 형질전환체를 제작하여 CCoAOMT 유전자의 발

현을 억제시켜 목질 내의 리그닌 조성을 감소시키는 결과를 보여 주었다. 또한 관상학적 가치가 높고 다양한 생물학적 기능을 갖고 있는 천연 물질을 포함하고 있는 노각나무는 경제적 가치가 높아 유전자원의 활용도가 높아질 것으로 생각된다. 본 연구를 통해 얻어진 노각나무의 유전자원들은 다양한 분야의 기초자료로 사용될 것으로 사료된다.

초 록

본 연구에서는 지리산에서 자생하는 한국 특산종인 노각나무(*Stewartia koreana* Nakai)의 EST library를 제작하고 서열을 분석하였다. 노각나무의 유엽을 재료로 cDNA library 만들었고 1,392개의 cDNA에 대한 부분 서열 분석을 진행하였다. EST와 unigene 서열의 분석은 컴퓨터를 기반으로 한 filtering과 수작업 그리고 NCBI의 BLAST 분석을 통해 수행하였다. 벡터 서열과 100bp 이하의 서열을 제거한 후 1,301개의 EST를 분석하였다. 전체 150개의 contig와 743개의 singleton을 분리하여 총 893개의 unigene을 분리해냈으며 서열 분석을 통해 95개의 microsatellite를 확인하였다. NCBI 데이터베이스의 BLASTX로 상동성을 검색한 결과 EST의 65%는 기능을 알고 있는 유전자와 11.6%의 EST는 아직까지 기능이 보고되지 않은 유전자와 높은 상동성을 보였다. 남아 있는 23.2%의 EST는 기존에 데이터베이스에 보고된 유전자와 상동성을 보이지 않는 유전자로 밝혀졌다. 다양한 데이터베이스를 기반으로 한 유사성 기반 기능 분석은 노각나무의 EST가 포도나무와 포플러와 높은 유사성을 보인 것을 확인하였다. 기능에 따른 분류에 있어 molecular function은 nucleotide binding, biological process는 transport, cellular component는 plastid가 가장 높은 비율로 나왔다. 본 연구를 통해 얻어진 EST 자료는 노각나무의 새로운 유전자원에 대한 연구의 기본 자료로 유용하게 활용될 것이다.

추가 주요어 : contig, gene ontology, 상동성, singleton, unigene

인용문헌

- Anterola, A.M. and N.G. Lewis. 2002. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* 61:221-294.
- Chang, C.S., H. Kim, and Y.S. Kim. 2001. Reconstruction of rare and endangered plant species in Korea based on the IUCN red list categories. *Korean J. Pl. Taxon.* 31:107-142.
- Chang, S., J. Puryear, and J. Cairney. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11:113-116.
- Choi, Y.H., S.S. Han, H.O. Lee, and S.H. Baek. 2005. Biological activity of bioactive components from *Acer ginnala* max. *Bull. Korean Chem. Soc.* 26:1450-1452.
- Conesa, A., S. Gotz, J.M. Garcia-Gomez, J. Terol, M. Talon, and M. Robles. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21:3674-3676.
- Dirr, M.A. 1990. *Manual of woody landscape plants*. 4th. ed. p. 1007. Stipes Publishing company Illinois.
- Dirr, M.A. 1991. It's time to bring *Stewartia* out of the garden closet. *Nursery Manager* 10:27-30.
- Durand, J., B. Catherine, E. Chancerel, J.-M. Frigerio, G. Vendramin, F. Sebastiani, A. Buonamici, O. Gailing, H.-P. Koelewijn, F. Villani, C. Mattioni, M. Cherubini, P. G. Goicoechea, A. Herrán, Z. Ikarán, C. Cabané, S. Ueno, F. Alberto, P.-Y. Dumoulin, E. Guichoux, A. Daruvar, A. Kremer, and C. Plomion. 2010. A fast and cost-effective approach to develop and map EST-SSR markers: oak as a case study. *BM Genomics* 11:570.
- Eom, I.Y., H.H. Kim, S.M. Lee, Y.S. Yi, and J.W. Choi. 2010. Characterization of chemical composition in Poplar wood (*Populus deltoids*) by suppression of *CCoAOMT* gene expression. *Mokchae Konghak* 38:213-222.
- Han, S.S., S.C. Lo, Y. Choi, J.H. Kim, and S.H. Baek. 2003. Antioxidant activity of crude extract and pure compounds of *Acer ginnala* Max. *Bull Korean Chem. Soc.* 25:389-391.
- ISUN. 2001. The ISUN red list catagoris (Version 3.1). ISUN Species Survival Commission. Gland. Switzerland.
- Kantety, R.V., M. La Rota, D.E. Matthews, and M.E. Sorrells. 2002. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Mol. Biol.* 48:501-510.
- Kim, Y., H.Y. Min, H.J. Park, E.J. Lee, E.J. Park, H.J. Hwang, C. Jin, Y.S. Lee, and S.K. Lee. 2004. Suppressive effects of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase (NOS) gene expression by *Calystegia soldanella* methanol extract on lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells. *Eur. J. Cancer Prev.* 13:419-424.
- Kwon, H. and H. Song. 2008. Vegetation structures and ecological properties of *Stewartia koreana* community. *Jour. Korean For. Soc.* 97:296-304.
- Kwon, H., H., Song, and M. Kim. 2008. Taxonomic review of the *Stewartia koreana* Nakai ex Rehder (Theaceae). *Korean J. Pl. Taxon.* 38:233-250.
- Li, J. 1996. A systematic study on the genera *Stewartia* and *Hartia* (Theaceae). *Acta Phytotaxonomica Sinica* 34:48-67.
- Min, B.S., K.H. Bae, Y.H. Kim, H. Miyashiro, M. Hattori, and K. Shimotohno. 1999. Screening of Korean plants against human immunodeficiency virus type 1 protease. *Phytother. Res.* 13:680-682.
- Okayama, H. and P. Berg. 1982. High efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol. Cell Biol.* 2:161-170.
- Peng, F.Y., K.E. Reida, N. Liaob, J. Schlossera, D. Lijavetzky, R. Holtb, J.M.M. Zapaterc, S. Jonesb, M. Marrab, J. Bohlmann, and S.T. Lund. 2007. Generation of ESTs in *Vitis vinifera* wine grape (Cabernet Sauvignon) and table grape (Muscat

- Hamburg) and discovery of new candidate genes with potential roles in berry development. *Gene* 402:40-50.
- Prince, L.M. and C.R. Parks. 2001. Phylogenetic relationships of Theaceae inferred from chloroplast DNA sequence data. *Am. J. Bot.* 88:2309-2320.
- Shim, K.K., B.K. Seo, K.W. Lee, K.W. Cho, and S.C. Shim. 1992. Study on the Korean native *Stewartia* (*Stewartia koreana*) I. Study on the native distribution of Korean *Stewartia* (*Stewartia koreana*) in Mt. Sobaek. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 33:413-424.
- Shim, K.K., B.K. Seo, K.W. Cho, and S.C. Shim. 1993. Study on the Korean native *Stewartia* (*Stewartia koreana*) II. Seed germination and softwood cutting of Korean *Stewartia* (*Stewartia koreana*) in Mt. Sobaek. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 34:160-166.
- Son, S.G., Y.J. Cho, and H.K. Moon. 2004. Effects of BA and NAA on adventitious shoot formation from mature zygotic of *Stewartia koreana* Nakai. *Korean J. Plant. Res.* 17:272-277.
- Spongberg, A.S. and A.J. Fordham. 1975. *Stewartias*-small trees and shrubs for all seasons. *Arnoldia* 35:165-180.
- Stevens, P.F., S. Dressler, and A.L. Weitzman. 2004. Theaceae. In *The Families and Genera of Vascular Plants*, p. 463-471. VI. Kubitzki, K. (ed.), Springer.
- Struve, D.K., B.A. Oleksak, T. Kawahara, and A. Kanazashi. 1999. Germination of Japanese *Stewartia* seeds: The effects of warm and cold stratification. *J. Envt. Horticult.* 17:197-202.
- Temnykh, S., W.D. Park, N. Ayers, S. Cartinhour, N. Hauck, L. Lipovich, Y.G. Cho, T. Ishii, and S.R. McCouch. 1999. Mapping and genome organization of microsatellites in rice (*Oryza sativa*). *Theor. Appl. Genet.* 100:697-712.
- Yang, B.H., S.D. Han, Y.B. Koo, and Y.G. Park. 2006. Genetic variation in the natural populations of Korean *Stewartia* (*Stewartia koreana* Nakai) based on I-SSR analysis. *Korean J. Plant Res.* 19:189-195.