

흰나리(*Lilium formosanum* Wallace) 식별을 위한 CAPS 마커의 개발

정성진¹ · 이가연¹ · 윤아라^{1,2} · 장지영^{1,3} · 김진국⁴ · 이금주^{1*}

¹충남대학교 농업생명과학대학 원예학과, ²한국화학연구원, ³한국생명공학연구원, ⁴국립농산물품질관리원 충남지원

Development of CAPS marker for identifying a Formosan lily (*Lilium formosanum*)

Sung Jin Chung¹, Ka Youn Lee¹, A Ra Yoon^{1,2}, Ji Young Jang^{1,3}, Jin Kug Kim⁴, Geung-Joo Lee^{1*}

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

²Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-600, Korea

³Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea

⁴National Agricultural Products Quality Management Service, Daejeon 301-825, Korea

Received on 16 June 2014, revised on 30 June 2014, accepted on 30 June 2014

Abstract : This study was conducted to identify lily species native to Korea from formosan lily (*Lilium formosanum*) belonging to Longiflorum section. Due to flowering time, flower color and orientation, long shelf life and resistant to diseases, the native lily species can be valuable genetic resources for interspecific hybrids. One of the chloroplast genes, *matK*, was used to clone and sequence to explore any base changes. The *matK* was successfully amplified into 1,539 bp (94% of the gene) and phylogenetic tree demonstrated 6 clades for those 11 lily species used in this study. There were one or two base substitutions among 10 lilies native to Korea, while formosan lily native to Taiwan exhibited 6 base substitutions in *matK* gene, rendering it genetically distant. A restriction enzyme NruI recognized one of the six base changes, and digested the *matK* gene of 10 native lily species only, but not in formosan lily. The confirmed cleavage characteristic of the target region in *matK* gene was designed into a CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) marker which will be available to estimate compatibility of interspecific hybridization and to trace the pedigree when those native lilies are crossed with the formosan lily.

Key words : Lilium, Genotype identification, *matK* gene, Molecular marker

I. 서론

백합(나리; 속명 *Lilium*)은 북반구 온대지역에 약 100여 종(species)이 생육하는 것으로 알려졌고, 영국 왕립원예 학회(Royal Horticultural Society)에서 9개 그룹(division)으로 분류하고 있으며 우리나라에 자생하는 것은 이 중 대부분 *Sinomartagon*, *Martagon*, *Leucolirion* 그룹에 속한다(Hwang et al., 2011; Royal Horticultural Society, 2007). 백합은 우리나라 절화 품목 중 장미, 국화에 이어 3위에 이르는 경제적으로 매우 중요한 원예작물로 2012년

재배면적 192 ha에서 약 4,100만본이 생산되어 년 322억 원 이상의 판매금액을 보인 소득작물이다(Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 2013).

우리나라에서 주로 발견되는 대부분의 Asiatic 계통의 나리는 다양한 화색과 병 저항성 등 우량 형질을 보유하고 있어 종간 또는 속간 교잡을 통한 새로운 품종의 개발에 유용하게 활용될 수 있는 유전자원이다(Chung et al., 2009; Jeong and Kwon, 1995). 하지만 최근의 산업화 및 무차별한 자생 식물의 채취와 관리부족으로 이러한 유용 자생 나리의 소실이 급격화되고 있어 유전자원의 보존과 체계적인 식물학적 분류에 대한 필요성이 대두되고 있다(Jeong and Kwon, 1995). 식물 신품종에 대한 지적 재산권 인정을 위

*Corresponding author: Tel: +82-42-821-5734

E-mail address: gilee@cnu.ac.kr

한 국제 식물신품종 보호동맹(International union for the protection of new varieties of plants; UPOV)의 식물 신품종 보호제도가 도입되면서 우리나라도 2002년 1월에 50번째 정식 회원국으로 가입하였다(Choi, 2002; Kochhar, 2004). 이에 따라 자국 원산지 식물의 중요성이 더욱 강조되고, 이를 활용한 신품종 육성의 경우 로열티 지불이 의무화되게 되었다. 따라서 국내 자생 및 도입 나리의 경우 원산지 증명 및 자원화 전략과 노력이 절실했다고 할 수 있다.

대부분 상업종은 Asiatic, Oriental 및 Longiflorum 교잡종이 주를 이루고 있지만 이들간의 중간교잡종인 LA (Longiflorum x Asiatic 교잡종), LO (Longiflorum x Oriental 교잡종), OT (Oriental x Trumpet 교잡종), 그리고 OA (Oriental x Asiatic 교잡종) 계통들이 등장하면서 각각의 그룹이 가지고 있는 우량 형질을 유지하면서 단점 형질을 대체하는 시도가 활발해지고 있다(Lim and Tuyl, 2006). 그 중에서 흰나리(*Lilium formosanum*)는 Longiflorum 그룹에 속하며 흰백색을 가지고 있어 국내 자생종 Asiatic 백합에서 찾기 힘든 화색을 보유하고 있고, 이 두 그룹간의 LA 교잡종의 신품종 보호를 위해서는 정확한 계통의 규명이 필요하게 될 것이다.

분자마커는 식물의 DNA 특정 타겟 영역의 염기서열 변화를 이용하여 종내 변이종 또는 특정 지역의 환경에 순화된 생태형(ecotype)과 같이 유전적으로 유사한 백합 유전자원의 식별에 유용하게 활용될 수 있다(Xi et al., 2012). 염록체와 같이 모계를 통해 유전이 되는 세포 소기관의 DNA 영역을 이용하는 *rbcL* (광합성 탄소고정에 관여하는 Rubisco 유전자 영역) 또는 *matK* (*matulase*) 유전자 영역은 염기서열의 길이와 염기의 종류의 변화가 상대적으로 높은 빈도로 발생하여 유사한 유전자원간의 유전적 유연관계 분석과 유전자원을 구분하는 바코드로 활용되어져 왔다(Hayashi and Kawano, 2000). 즉 유전적으로 유연관계가 먼 유전자원들은 이들 핵 또는 염록체의 DNA 영역에서 많은 염기 변화를 보이고 있어 상대적으로 유전 다양성이 높다고 볼 수 있다.

하지만 유전 다양성 또는 유연관계의 분석을 위해 이들 특정 DNA 영역을 활용한 보고는 많이 있었지만, 염기서열의 변화를 활용하여 분자마커로 개발하는 연구는 백합의 경우 전무한 실정이다. 따라서 본 연구의 목적은 모계로부터 유전되는 *matK* 유전자 영역의 염기서열 정보를 활용하

여 흰나리(대만 원산)와 이들로부터 유래된 교잡종으로부터 자생나리를 구분할 수 있는 CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) 마커의 개발을 위해 활용 가능한 제한효소의 선정과 유전자원 간에 식별 가능성을 검증하는데 있다.

II. 재료 및 방법

1. 나리 유전자원

본 연구에 사용된 백합은 한국생명공학연구원에서 수집 관리중인 흰나리와 강원도 평창에서 구입하여 충남대학교 원예학과에서 관리중인 10종(날개하늘나리, 땅나리, 솔나리, 중나리, 참나리, 털중나리, 하늘나리, 말나리, 섬말나리, 하늘말나리)의 자생나리를 비교 대상으로 이용하였다(Table 1).

2. 잎 샘플링 및 DNA 추출

제능 DNA 추출은 충남대학교 온실에서 관리 중이던 자생나리의 어린 잎을 잘라내어 액체질소로 급냉시켜 마쇄한 후 HiGene genomic DNA prep kit (BIOFACT, Daejeon)를 이용하였다. 추출한 DNA는 DU-730 UV/Vis Spectrophotometer (Beckman coulter, CA)와 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 추출한 DNA의 정량 및 정성분석을 수행하였다.

3. 나리 *matK* 영역의 증폭 및 염기서열 확보분석

실험에 이용한 나리의 *matK* 염기서열은 미국 NCBI에 공개되어 있는 유전정보를 이용하여 제작한 프라이머(F : ATGGAAGAATTACAAGGG, R : CTAATTATTACCAGGTC)와 DNA 증폭기(Takara TP600, Takara, Japan)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분간 일차적으로 변성을 유도한 후 94°C에서 30초간 denaturation, 53°C에서 30초간 annealing 그리고 72°C에서 1분 50초간 extension 과정을 35회 반복한 후 72°C에서 5분간 PCR 산물의 안정화를 수행하였다. PCR 완료 후 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 PCR 산물의 증폭 여부를 확인한 후 T-Blunt vector (Biofact)에 PCR 산물을 삽입한 후

Table 1. *Lilium* species used in this study and their flowering characteristics.

Species	Division ¹⁾	Flowering time ²⁾	Flower color ²⁾	Leaf arrange ²⁾	Korean name
<i>Lilium dauricum</i> Ker-Gawler	Asiatic	July-Aug.	Yellow red	Alternate	Nalgae Haneul Nari
<i>Lilium callosum</i> Siebold & Zucc.	Asiatic	mid-late July	Orange, Yellow	Alternate	Tdang Nari
<i>Lilium cernuum</i> Kom.	Asiatic	mid-late July	Pink	Alternate	Sol Nari
<i>Lilium leichtlinii</i> (Regel) Baker	Asiatic	mid July-mid Aug.	Orange	Alternate	Joong Nari
<i>Lilium lancifolium</i> Thunb.	Asiatic	mid July-late Aug.	Red orange	Alternate	Cham Nari
<i>Lilium amabile</i> Palibin	Asiatic	early June-mid July	Orange	Alternate	Teoljoong Nari
<i>Lilium concolor</i> Salisb.	Asiatic	early-mid June	Red orange	Alternate	Haneul Nari
<i>Lilium distichum</i> Nakai	Martagon	late July-mid Aug.	Yellow orange	Whorled	Mal Nari
<i>Lilium hansonii</i> Leichtl.	Martagon	early-late July	Yellow	Whorled	Seommal Nari
<i>Lilium tsingtauense</i> Gilg	Martagon	mid June-mid July	Orange, Yellow orange	Whorled	Haneul Mal Nari
<i>Lilium formosanum</i> Wallace	Longiflorum	mid Aug.-early Sep.	White	Alternate	Heen Nari

¹⁾Each species were classified based on the nine divisions from the international lily register and checklist (RHS, 2007)

²⁾Parts of information obtained from Harden (2007), Jeong et al. (1989) and National Institute of Biological Resources (www.nibr.go.kr)

M13(-20) primer 쌍을 이용하여 염기서열을 분석하였다. 모든 염기서열은 ABI 3130 XL Genetic analyzer (Applied Biosystems)을 이용하여 확인하였고, 백합 *matK* 염기서열의 상동성 분석은 GENETYX-WIN Software Ver. 5.0 (Genetyx)과 Bioedit software Ver. 7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)를 이용하여 수행하였다.

4. 나리 *matK* 염기서열을 이용한 염기서열 유사도 분석

본 연구에서 확보한 자생나리의 *matK* 염기서열을 이용한 유사도 분석은 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software (ver. 6.0, <http://www.megasoftware.net/index.html>)의 UPGMA 법을 이용하여 작성하였다 (Tamura et al., 2013).

5. 흰나리 식별 CAPS 마커전환 및 검증

백합의 CAPS 마커 개발과 분석을 위해 본 연구에서 확보한 *matK*의 염기서열에 존재하는 모든 제한효소의 위치를 GENETYX-WIN Software Ver. 5.0 (Genetyx)을 이용하여 탐색하였다. *matK* 염기서열을 기반으로 한 CAPS 마커 (Lily_ *matK*) 검증을 위한 PCR 반응은 *matK* primer 정보를 기반으로 DNA 증폭기(Takara TP600, Takara, Japan)

를 이용하였으며 PCR 조건은 염기서열을 확인할 때와 동일한 조건으로 수행하였다. 10 uL의 PCR 산물과 5 unit의 NruI 제한효소(Enzymomics, Daejeon) 그리고 1X Ez Buffer III가 포함된 20 uL 반응액은 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 1.2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 CAPS 마커 검증을 수행하였다.

III. 결과 및 고찰

본 연구에 이용된 우리나라 자생 나리(Asiatic 및 Martagon 그룹)는 화색이 다양하고 개화시기가 비교적 빠른 특성이 있어, 꽃이 크고 향기가 강한 Oriental 계통 또는 흰나리와 같은 순백색의 향기가 있는 *Longiflorum* 계통들과 중간 교잡을 통해 우량 신품종 개발의 유전적 소재로 유용하다고 볼 수 있다(Table 1). 특히 Sinomartagon Division에 속하는 Asiatic 계통의 우리나라 자생나리는 *Fusarium* 또는 Lily mottle virus (*LMoV*) 같은 병원균에 대한 저항성을 가지고 있어 내병성 신품종 육성의 교배친으로도 그 가치가 높다고 할 수 있다(Shahin et al., 2011).

본 연구에 사용된 11 종의 나리 모두에서 *matK* 유전자는 1,539 bp 길이로 PCR 증폭에 성공하였고 이는 기존의 1,641 bp 전체 길이의 약 94%에 해당하는 수준이었다(Hayashi and Kawano, 2000). 예상했던 것처럼 유사도 분석 결과 우리나라 자생나리가 속하는 Asiatic과 Martagon 그룹 (Table 1)과 달리 Longiflorum 그룹에 속하는 흰나리의

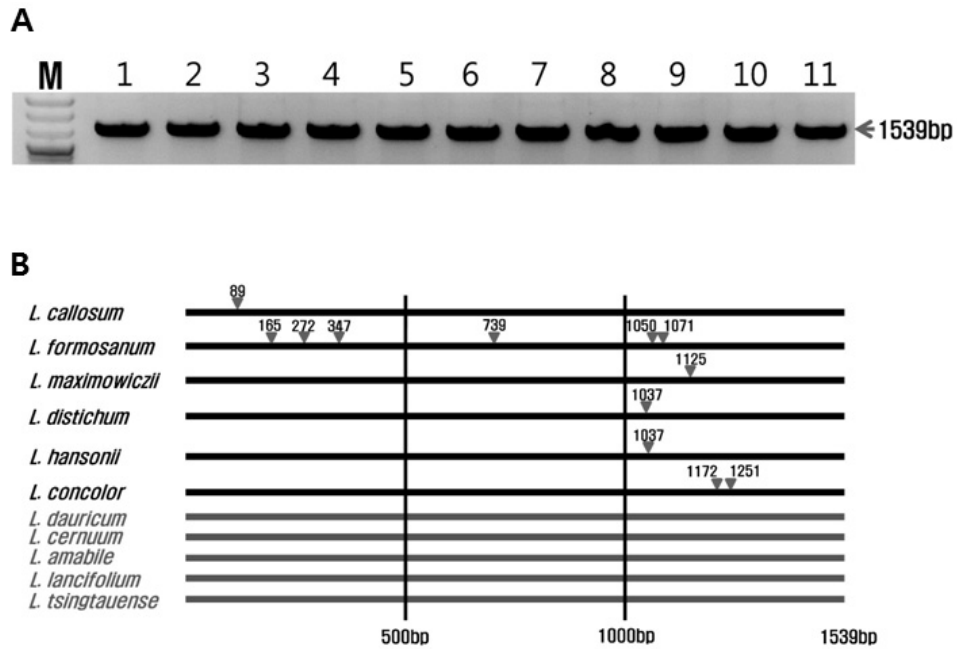


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the amplified fragments shown with size marker (M) from a genomic PCR analysis (A), and aligned *matK* sequence of 11 Korean *Lilium* landrace species (B). Lanes 1. *L. dauricum*; 2. *L. callosum*; 3. *L. cernuum*; 4. *L. leichtinii* var. *maximowiczii*; 5. *L. lancifolium*; 6. *L. amabile*; 7. *L. concolor* var. *partheneion*; 8. *L. distichum*; 9. *L. hansonii*; 10. *L. tsingtauense*; 11. *L. formosanum*. (A, top). Inverted triangles (▼) indicate different nucleotide sequence sites of the *matK* gene (B, bottom).

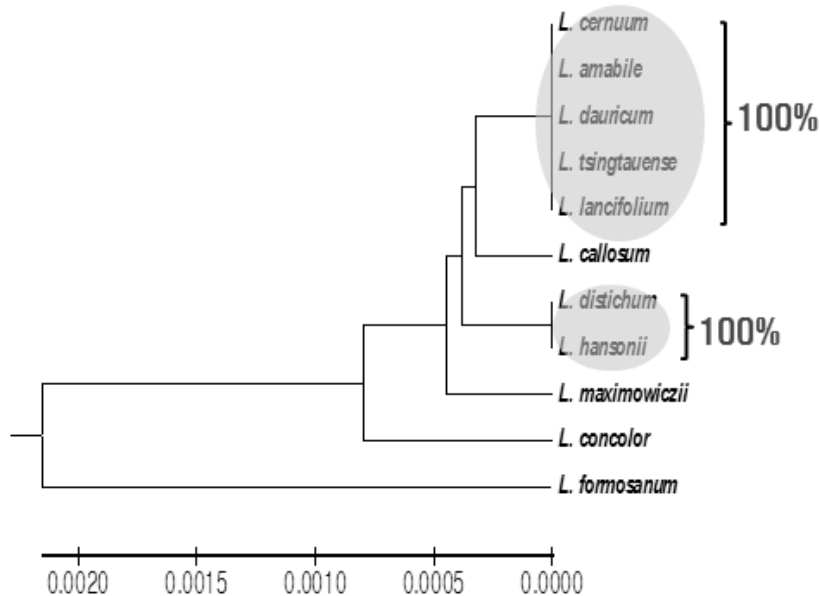


Fig. 2. Phylogenetic tree of 11 lily species constructed from *matK* gene sequences using the UPGMA method.

matK 유전자 부위에서 상당히 많은 염기서열 변화가 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 1 and Fig. 2).

matK 유전자 부위의 염기서열에 근거하여 유전적 근연성을 분류해 본 결과 11종의 나리 유전자원은 6개 그룹으로 분류할 수 있었다(Fig. 2). 첫 번째 그룹은 모두 *matK* 유전자 염기서열이 100% 일치하는 것들로 솔나리, 털중나리,

날개하늘나리, 하늘말나리 그리고 참나리가 속하였다. 두 번째는 땅나리가 속하는 그룹으로 89번 염기서열이 기존 나리들과 차이가 있었다. 세 번째는 Martagon 그룹에 속하는 자생나리로 말나리와 섬말나리 2가지 종 모두 염기서열이 동일하였고 공통적으로 1,037번 염기서열이 다른 종과 차이를 보였다. 네 번째와 다섯 번째 그룹은 중나리가

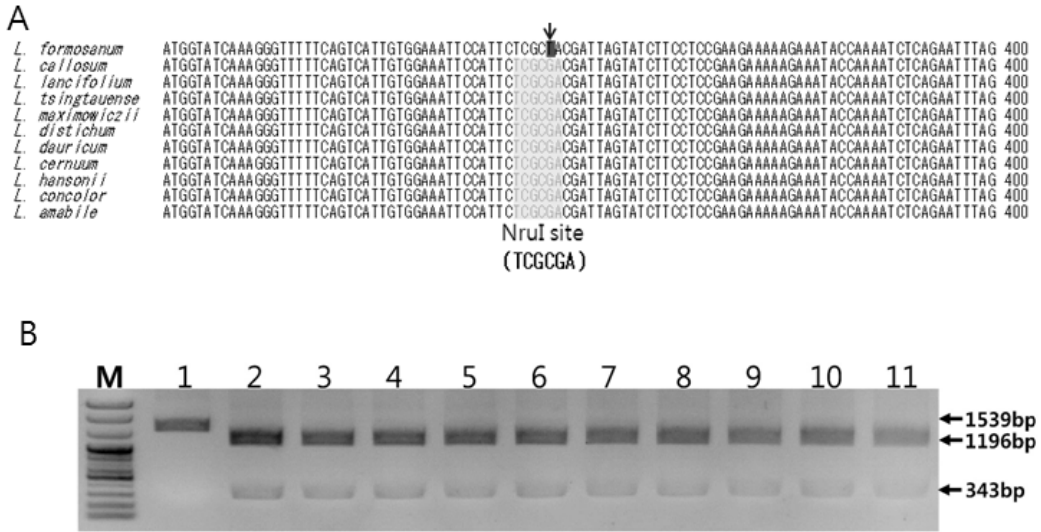


Fig. 3. Conversion of the lily *matK* gene into a *NruI* CAPS marker. A. The recognition site of *NruI* (TCG ↑ CGA) is affected by one SNP at position 343 (G→T transition). B. The restriction enzyme *NruI* undigested PCR product (1,539 bp) of *L. formosanum*, but the other lilies revealed two fragments (1,196 and 343 bp) by enzyme digestion at the target site. Relevant fragment sizes (bp) are denoted on right side and DNA size marker (M) on left side.

1,125번에서, 하늘나리가 1,172와 1,251번 염기에서 변화를 보였다. 마지막 여섯 번째 그룹에는 흰나리가 포함되었고, 다른 10종의 자생나리와 특이적으로 *matK* 유전자 전 영역의 6곳에서 염기변화를 관찰할 수 있었다.

예상했던 것과는 달리 Martagon 그룹의 3개 나리(말나리, 섬말나리, 하늘말나리) 중에서 말나리와 섬말나리의 *matK* 유전자 염기서열이 나머지 하늘말나리와 달리 염기 치환이 한 곳에서 있음이 확인되었다(Fig. 1). 따라서 우리나라 자생 나리의 종 구분에 *matK* 유전자 단독으로는 어려울 것으로 판단되고, 다른 핵에 있는 리보솜 DNA 영역인 ITS (internal transcribed spacer) 또는 염색체 *rbcL* 유전자 등의 영역이 포괄적으로 활용될 필요가 있다고 여겨진다(Sultana et al., 2011). 기존의 연구에서도 *matK* 유전자 염기서열의 변화로는 우리나라 자생나리가 속한 Sino-martagon 또는 martagon 그룹이 여러 개의 유전적 그룹으로 나뉘고 있음을 보고하고 있다(Hayashi and Kawano, 2000).

대만 원산의 흰나리는 영국 왕립원예학회(Royal Horticultural Society) 분류상 대부분 식물체의 크기가 큰 흰색 백합의 원조인 Longiflorum 그룹에 속하는 것으로 우리나라 자생종과의 교배 친화성이 높을 것으로 판단된다(Lim and Tuyl, 2006; Hwang et al., 2012). 본 연구의 분석 대상인 *matK* 유전자는 우리나라 자생종 10종과 대만 원산

지의 흰나리와 확연히 차이를 보이는 염기치환 현상을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이 들 염기치환 부위에 작용하는 제한효소를 GENETYX-WIN Software를 이용하여 탐색한 결과 *NruI* 제한효소가 TCG/CGA 부위에 작용하는 것을 확인할 수 있었고, 자생나리 10 종으로부터 대만 원산의 흰나리를 식별할 수 있는 마커의 개발 가능성을 보여 주었다(Fig. 3).

matK 유전자 부위를 동일한 프라이머를 이용하여 증폭한 뒤 *NruI* 제한효소를 처리한 결과 예상했던 결과대로 10종의 자생나리는 모두 타겟 부위가 효소에 의해 절단되어 1,196 bp와 343 bp 두 개의 조각으로 나누어지는 반면 흰나리는 343번 염기서열이 G에서 T로 염기치환이 일어나 제한효소의 작용이 불가능하여 기존의 1,539 bp 단일 유전자 조각을 나타내었다(Fig. 3).

본 연구에서 식별마커의 개발에 활용된 *matK* 유전자는 엽록체 유전자 중에서 최근 식물분류학 측면에서 관심이 증가하고 있다(Barthet and Hilu, 2007). 그 이유는 DNA 바코드로 이용되는 다른 *rbcL* 유전자에 비하여 염기서열의 변화가 3 배가 높고, 아미노산은 6 배나 높은 변화를 일으킬 수 있다고 알려졌고, 이러한 높은 염기변화의 원인으로 아미노산을 결정하는 염기 코돈 3개의 위치에서 비교적 동등한 비율(속씨식물의 경우 각각 62%, 57%, 66%)로 변화가 가능하기 때문으로 해석하고 있다(Hayashi and Kawano,

2000; Hilu and Liang, 1997).

IV. 결론

본 연구는 대만 원산의 Longiflorum 계통의 흰나리(*L. formosanum*)를 Asiatic 및 Martagon 계통의 10종 자생나리 또는 이들로부터 유래한 교잡종들의 식별이 가능한 분자마커의 개발을 위해 수행되었다. 상대적으로 염기치환 및 아미노산 변화가 높은 염색체 유전자의 일종인 *matK* 유전자를 이용하여 이들 11종의 염기서열 분석과 제한효소 작용부위를 탐색한 결과 10 종의 자생나리 분류와 식별을 위해서는 또다른 분자마커 개발 기법이 요구되어졌다. 하지만 이들 10 종의 자생나리로부터 대만 원산의 흰나리는 *matK* 유전자 염기서열에 많은 치환이 있었음을 확인하였고, 이 중 NruI 제한효소가 작용하는 부위에 기존 자생나리와 차이를 보이는 부위를 발견하였다. 이 부위에 제한효소를 처리한 결과 자생나리에서는 제한효소가 작용하여 2개의 단편으로 유전자가 절단되는 반면 흰나리는 1,539 bp 한 개의 DNA 절편으로 구분되어져 성공적으로 식별이 가능한 CAPS 마커를 검증할 수 있었다. 본 연구에서 개발된 마커를 이용하면 LA (Longiflorum x Asiatic 교잡종) 또는 MA (Martagon x Asiatic 교잡종)와 같은 중간 교잡종 개발을 위한 교배친간의 교잡 가능성 분석과 신품종들의 계통 추적에 활용될 수 있을 것으로 여겨진다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원 Golden Seed Project (project no. 213003-04-1-SBQ10)의 지원에 의해 이루어졌습니다.

참고 문헌

Barthet MM, Hilu KW. 2007. Expression of : Function and evolutionary implications. *American Journal of Botany* 94:1402-1412.

Choi GJ. 2002. International union for the protection of new varieties of plants (UPOV) and 1991 UPOV act. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology* 20:28.

Chung MY, Chung JD, Tuyl JM, Lim KB. 2009. GISH analysis of subsequent progeny crossed with 2n-gametes of F₁

oriental-asiatic interspecific hybrid in lily. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology* 27:649-656.

Hayashi K, Kawano S. 2000. Molecular systematics of *Lilium* and allied genera (Liliaceae): Phylogenetic relationships among *Lilium* and related genera based on the *rbcL* and gene sequence data. *Plant Species Biology* 15:73-93.

Harden GJ. 2007. *Lilium formosanum* A. Wallace. PlantNET-New South Wales Flora Online (<http://plantnet.rbg.gov.au>) Sydney, New South Wales.

Hilu KW, Liang H. 1997. The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics. *American Journal of Botany* 84:830-839.

Hwang YJ, Kim HH, Kim JB, Lim KB. 2011. Karyotype analysis of *Lilium tigrinum* by FISH. *Horticulture, Environment and Biotechnology* 52:292-297.

Hwang YJ, Lucidos JG, Ahn BJ, Ahn HG, Lim KB. 2012. Crossing affinity of oriental hybrid 'Siberia' and Korean native lily species. *Flower Research Journal* 20(4):167-171.

Jeong JH, Kim KS, Yeom DY, Hong YP. 1989. Studies on the distribution and eco-morphological characteristics of the Korean native lilies. *Korean Journal of Horticultural Science* 7:180-182.

Jeong JH, Kwon ST. 1995. Studies on the in vitro culture of Korean native *Lilium cernum*. *Daesan Collection of Treatises* 3:1-11.

Kochhar S. 2004. System perspective for IPR protection in the plant kingdom. *Journal of Intellectual Property Rights* 9: 342-355.

Lim KG, van Tuyl JM. 2006. Lily: *Lilium* hybrids. In *Flower breeding and genetics. Issues, challenges and opportunities for the 21st century* edited by Anderson NO. pp.517-537. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. 2013. 2012 Floriculture statistical yearbook.

Royal Horticultural Society. 2007. The international lily register and checklist. Alden Group, London, UK.

Shahin A, Arens P, van Heusden AW, van der Linden G, van Kaauwen Martijn, Khan N, Schouten HJ, van de Weg WE, Visser RGF, van Tuyl JM. 2011. Genetic mapping in *Lilium*: mapping of major genes and quantitative trait loci for several ornamental traits and disease resistances. *Plant Breeding* 130:372-382.

Sultana S, Lim YP, Bang J-W, Choi H-W. 2011. Internal transcribed spacer (ITS) and genetic variations in *Lilium* native to Korea. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 52:502-510.

Tamura K, Glen S, Daniel P, Alan F, Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.

Xi M, Sun L, Qiu S, Liu J, Xu J, Shi J. 2012. In vitro mutagenesis and identification of mutants via ISSR in lily (*Lilium longiflorum*). *Plant Cell Reports* 31:1043-1051.