

잣나무 엽록체 Simple Sequence Repeat 표지자 개발 및 특성 분석

이제완* · 백승훈 · 홍경낙 · 홍용표 · 이석우 · 안지영
국립산림과학원 산림유전자원과

Development and Characterization of Chloroplast Simple Sequence Repeat markers in *Pinus koraiensis*

Jei-Wan Lee*, Seung-Hoon Baek, Kyung-Nak Hong, Yong-Pyo Hong,
Seok-Woo Lee and Ji-Young Ahn

Division of Forest Genetic Resources, National Institute of Forest Science, Suwon 16631, Korea

요약: 본 연구에서는 잣나무 엽록체 DNA의 전체 염기서열을 기반으로 엽록체 SSR(chloroplast simple sequence repeat) 영역을 특이적으로 증폭하는 primer를 개발하고 그 특성을 분석하였다. 잣나무 엽록체 DNA에서 총 30개의 SSR 영역을 탐색하였으며, 이들 영역을 증폭하기 위한 30개의 primer를 제작하였다. 모든 primer가 잣나무를 대상으로 PCR 증폭이 가능하였다. 근연종에 대한 primer의 중간 전환률은 잣나무와 동일한 아속(Subgenus *Strobus*)에 속하는 눈잣나무(100%)와 섬잣나무(97%)에서 가장 높게 나타났다. 반면 소나무아속(Subgenus *Pinus*)에 속하는 소나무와 구주소나무에서의 중간 전환률은 73%로 비교적 낮게 나타났다. 점봉산 잣나무 집단을 대상으로 조사한 결과 13개의 유전자좌에서 다형성이 관찰되었으며, 평균 haploid 다양도(H)는 0.512로 계산되었다. 다형적 유전자좌로부터 조합된 haplotype의 수(N)는 25개로 확인되었고, haplotype 다양도(H_c)는 0.992로 매우 높게 나타났다. 집단내 독특하게 관찰되는 haplotype은 22개(88%)로 전체 28개체 중에서 22개체(79%)를 식별하였다. 본 연구에서 개발한 cpSSR primer는 높은 중간 전환률을 나타냄에 따라 소나무속의 근연종, 특히 잣나무아속 수종에 활용 가능성이 높고, 잣나무 유전변이 분석을 위한 충분한 다형성을 제공하는 유용한 표지자로 판단된다.

Abstract: Novel cpSSR primers were developed based on the sequence information of the *Pinus koraiensis* chloroplast genome. A total of 30 cpSSR loci were detected in the chloroplast genome, and a total of 30 primer sets flanking those loci were designed. All primer sets were successfully amplified for chloroplast DNA in *P. koraiensis*. The cross-species transferability of the 30 primer sets was considerably high in *P. pumila* (100%) and *P. paviflora* (97%) belonging to the same Subgenus (*Strobus*) of *P. koraiensis*. Meanwhile, the transferability was relatively low (73%) in *P. densiflora* and *P. sylvestris* belonging to Subgenus *Pinus*. A total of 13 cpSSR loci out of the 30 loci were polymorphic in the Mt. Jumbong population of *P. koraiensis*. The mean of haploid diversity(H) was 0.512. The number of haplotypes(N) and the haplotype diversity(H_c) were 25 and 0.992, respectively. Of the 25 haplotypes, 22 were unique in the analyzed population. The unique haplotypes differentiated 22 individuals (79%) from the total of 28 individuals. In conclusion, the novel cpSSR primers developed in this study would be applicable to other *Pinus* species, especially the subgenus *Strobus*, and provide a high level of polymorphism for the study of genetic variation of *P. koraiensis*.

Key words: *Pinus koraiensis*, SSR, microsatellite, chloroplast DNA, genetic diversity, transferability

서론

생물 개체 또는 집단에 존재하는 유전변이와 구조 분석은 유전다양성의 평가를 위한 핵심 요소이다. 분자표지자(molecular marker)는 세포내 분자 수준에서 유전변이를 탐색 및 비교할 수 있는 기법으로 생물종내 유전다양성과 지

역적인 분포 및 유전구조 분석에 다양하게 활용된다. 분자표지자를 이용한 유전다양성 평가는 유전자원 보존을 위한 효율적인 전략을 제시할 수 있다(Graudal et al., 2014).

염기서열 정보를 기반으로 개발되는 분자표지자는 임의표지자와 비교하여 분석의 안정성 및 재현성이 높고(Lee et al., 2011), 분자표지자가 개발된 종과 유전적으로 근연인 종에서 염기서열 유사성에 근거하여 분자표지자 개발 단계를 생략하고 직접적으로 분자표지자를 활용할 수 있

*Corresponding author
E-mail: leejeiwan@korea.kr

다. 그러나 유전적 유연관계가 멀수록 염기서열의 유사성이 감소함에 따라 개발된 분자표지자를 광범위한 생물종에 활용하는데 한계가 있으며, 중간 동일한 유전자좌가 분석되지 않을 가능성이 높다. 따라서 분자표지자가 증폭하는 유전자좌에 대한 다형성 정보를 정확하게 확인하고, 개체 또는 집단에 존재하는 다형성을 충분히 확보하기 위한 다수의 분자표지자를 개발하기 위하여 분석대상 종의 염기서열을 기반으로 분자표지자를 직접 개발할 필요가 있다(Bang et al., 2010; Lee, 2010).

DNA 염기서열을 기반으로 개발되는 대표적인 분자표지자인 SSR(simple sequence repeat) 표지자는 게놈에 산재하는 짧은 염기서열의 반복단위(motif)로 구성된 영역으로 microsatellite 또는 STR(short tandem repeat) 등의 용어와 혼용되기도 한다. RAPD와 ISSR로 대변되는 임의 표지자(arbitrary primer) 기법은 주로 primer가 주형 DNA와 결합하는 부위에 존재하는 돌연변이에 기인하는 다형성을 나타내는 반면, SSR 표지자는 증폭된 DNA 영역에 포함된 염기서열의 반복단위의 차이에 의한 다형성을 나타낸다. 일반적으로 SSR은 DNA 복제과정에서 나타나는 것으로 추정되는 DNA 중합효소 미끄러짐(DNA polymerase slippage) 및 감수분열 시 불균등 교차(unequal crossing-over)에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다(Schlötterer and Tautz, 1992; Sia et al., 1997).

SSR은 핵 DNA(nuclear DNA) 뿐만 아니라 엽록체 DNA에도 존재하는데, 엽록체 DNA는 재조합을 거치지 않고 부모 중 한 쪽에 의해서만 후대에 유전되기 때문에 핵 DNA 보다 돌연변이율이 낮은 것으로 알려져 있다(Wolfe et al., 1987). 그럼에도 불구하고 엽록체 DNA에 존재하는 SSR의 돌연변이율은 $3.2\sim 7.9 \times 10^{-5}$ (돌연변이/유전자좌/세대)로 엽록체 DNA 게놈의 다른 영역의 돌연변이율 보다 상대적으로 높아(Provan et al., 1999), 유전변이 연구에 다양하게 활용되어 왔다(Provan et al., 1998; Hong et al., 2005; 2006). 특히, 침엽수에서는 엽록체 DNA가 부계 유전되는 특성에 따라 cpSSR(chloroplast simple sequence repeat)을 이용하여 화분 이동에 따른 유전자 유동(gene flow) 양상과 가계 분석(parentage analysis) 연구에 활용될 수 있다.

잣나무(*Pinus koraiensis*)는 한반도를 비롯한 중국 동북 및 러시아, 일본 혼슈 지방에 분포하고, 우리나라에서 잣나무의 천연 임분은 설악산, 오대산, 지리산, 점봉산 등 비교적 고산지대에 분포하고 있다(Kong, 2004). 잣나무는 용재수로서의 가치가 높을 뿐 아니라 잣 열매 생산의 경제적 가치가 높아 우리나라 산림자원 조성을 위한 중요 조림 수종이다. 잣나무 유전변이 연구와 관련하여 주로 동위효소, RAPD 및 ISSR과 같은 핵 DNA에 대한 표지자를 이용한 연구가 수행되었다(Potenko and Velokov, 1998; Hong et al., 2001; Feng et al., 2006). Feng et al.(2011)

과 Hong et al.(2013)은 소나무, 곰솔 등 근연종에서 보고된 cpSSR primer를 이용하여 잣나무 자연집단에서 교배양식을 분석한 바 있으나, cpSSR 표지자를 이용한 잣나무 자연집단의 유전변이 연구는 수행되지 않았다. 한편, Filiz and Koc(2014)는 잣나무를 포함하는 소나무과 수종의 cpSSR 영역에 대한 특성을 분석하였으나, cpSSR 영역을 증폭하는 primer 정보는 분석되지 않았다. Sun and Feng(2011)은 잣나무 cpSSR 표지자를 일부 보고하였으나, 분석가능한 표지자의 수와 다형성이 충분하지 않았다. 따라서 엽록체 DNA 수준에서 잣나무 집단의 유전변이량과 분포를 보다 정확히 추정하기 위해서 잣나무에 적용 가능한 충분한 수의 cpSSR 표지자의 개발이 필요하다.

본 연구는 잣나무 집단의 유전변이 분석을 위한 cpSSR 표지자를 개발하기 위하여 엽록체 DNA의 전체 염기서열에 근거하여 cpSSR 영역을 탐색하였으며, 이들 영역을 특이적으로 증폭하는 cpSSR 표지자를 개발하고 특성 분석을 수행하였다.

재료 및 방법

1. cpSSR 탐색 및 특이 primer 제작

미국국립생물정보센터(www.ncbi.nlm.nih.gov)에 등록된 잣나무의 전체 엽록체 DNA 염기서열(GenBank Acc. No. AY228468)을 대상으로 ChloroMitoSSRD 2.00(Sablok et al., 2013)과 IMEx 프로그램(Mudunuri and Nagarajaram, 2007)을 이용하여 cpSSR 영역을 탐색하였다. 탐색 조건은 염기서열의 반복단위(motif)가 1개에서 6개의 염기로 구성되고, 반복되는 총 염기의 길이는 최소 12bp 이상으로 하였다. SSR 영역의 구조를 고려하여 치환, 삽입 또는 결실로 인한 motif의 변화가 없는 완전한 SSR 영역만을 분석하였다. 탐색된 cpSSR 영역을 증폭하기 위한 특이 primer 제작은 Primer3 프로그램(Untergasser et al., 2012)을 이용하였으며, primer 길이는 18~22 base pair(bp), 증폭산물의 길이는 250~300 bp, T_m 값은 57~63로 조정하였다.

2. PCR 분석 및 cpSSR 다형성 확인

잣나무의 cpSSR 특이 primer의 증폭 양상 및 소나무속 근연종에서 적용 가능성 여부를 확인하기 위하여 잣나무, 소나무(*Pinus densiflora*), 곰솔(*P. thunbergii*), 구주소나무(*P. sylvestris*), 테다소나무(*P. taeda*), 리기다소나무(*P. rigida*), 섬잣나무(*P. parviflora*) 및 눈잣나무(*P. pumila*)에 대하여 각 수종 당 5개체를 대상으로 PCR 증폭을 실시하였다. DNA는 DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen, Germany)을 이용하여 제조사의 설명에 따라 추출하였다. PCR 분석을 위한 반응용액은 12 μ L당 20 ng template DNA, 1 \times reaction buffer, 0.2 μ M primer mix, 0.1 mM dNTPs,

1 mM MgCl₂, 1U DiaStar™ Taq DNA polymerase(SolGent, Korea)로 조성하였다. PCR 증폭은 95°C에서 5분간 초기 DNA 변성 처리 후 95°C에서 30초간 DNA 변성, 60°C에서 30초간 주형 DNA와 primer 결합, 72°C에서 30초간 DNA 신장 과정을 35회 반복하였으며, 추가적으로 72°C에서 10분간 신장 과정을 수행하였다. PCR 증폭산물은 Ethidium Bromide을 포함하는 2% agarose gel을 이용하여 전기영동 하였으며, 자외선을 조사하여 증폭된 DNA 밴드의 유무를 확인하였다. 잣나무를 포함한 근연종에서 안정적인 증폭이 확인된 primer를 대상으로 잣나무 집단 내 다형성을 확인하기 위하여 점봉산 지역의 잣나무 집단 (28개체)을 대상으로 PCR 분석을 수행하였으며, 분석 조건은 위와 동일하였다. 증폭산물의 분획을 위해 Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer(Applied Biosystem, USA)를 이용해서 capillary 전기영동을 수행하였으며, 이를 위하여 PCR 분석에 사용된 primer에 FAM(Fluorescein amidite) 형광물질을 첨가하였다. PCR 증폭산물을 Hi-Di Formamide와 GeneScan™-500 ROX size standard(Applied

Biosystems)와 혼합하여 분획하였다. 증폭산물의 유전자 형은 Gene Mapper v5.0 software(Applied Biosystem, USA)를 이용하여 결정하였다. 전기영동에서 확인된 다형성이 실제 목표한 cpSSR 영역에서 기인했는지 여부를 확인하기 위하여 다형적 증폭산물의 염기서열 분석을 수행하였다(Macrogen, Korea).

3. 유전 통계 분석

잣나무 집단에서 분석된 cpSSR 증폭 결과에 따라 GenAlEx 6.2 프로그램(Peakall and Smouse, 2006) 을 이용하여 각 유전자좌별 대립유전자수(A_i), 유효대립유전자 수(A_e), haploid 다양도(H : haploid genetic diversity; Peakall et al., 1995) 및 Shannon의 다양성지수(Shannon's Information Index: I)를 계산하였다. 집단내 각 개체별로 관찰된 변이의 조합에 근거하여 haplotype 수(N)를 결정하였으며, 집단내 유효 haplotype의 수(N_e)는 $N_e = 1/\sum p_i^2$ 의 수식(p 는 i 번째 haplotype의 상대빈도)에 따라 계산하였다. 집단내 haplotype 다양도(H_e : unbiased haplotype diversity)는

Table 1. cpSSR loci and primer sequences in *Pinus koraiensis*.

| cpSSR loci | Motif | SSR Location | | Forward primer | Reverse primer |
|------------|--------|------------------------|------------|-------------------------|-------------------------|
| pkcpSSR1 | AATT | <i>atpF</i> | genic | AGATCTCCAAGGGCTCTTCC | CCAATGCTGAACTGACAACC |
| pkcpSSR2 | CCTTC | <i>atpF-atpH</i> | intergenic | CATATGCTCGCCCCTCATAG | TTCTACTTCGGTCGGAAAG |
| pkcpSSR3 | T | <i>atpF-atpH</i> | intergenic | ATGAATCTTTCGACCGAAG | ATTGCGAGACAACCAGAAGC |
| pkcpSSR6 | A | <i>rpoC1</i> | genic | CTCAGGATCGGACGTGAAAG | TATTGTCGGAAGGGAGGAG |
| pkcpSSR7 | A | <i>rpoB-trnC</i> | intergenic | AACGCTCCCTCATTTTCATC | AGTCCATTTACGTTGGTTG |
| pkcpSSR8 | T | <i>psbJ-petA</i> | intergenic | TTTGTAAAAACCCGAACATGAG | TAATTGGGTTTCCGATCCTG |
| pkcpSSR9 | TTTA | PikoCp204 | genic | GTTCCTTCCCGCTCTCTTC | CGAACCTAAAGCTACATTGC |
| pkcpSSR10 | T | PiKoCp215 | genic | CAAGGTGGTCACTTCCATTTTC | CCCCAAGAACAAGAGGATTG |
| pkcpSSR11 | T | PikoCp222 | genic | CTTATCGAGATCGATGGATTGG | TTTGACTGCACGATGGATTG |
| pkcpSSR12 | T | PikoCp230 | genic | TGCAAAGGTATCGTTCATGG | TGCTAATGATGGAACAGGTTTG |
| pkcpSSR13 | A | <i>psbH-petB</i> | intergenic | TGGATGGGGAACACTACTGCTC | AAGTCGCACACCCATATTCC |
| pkcpSSR14 | T | <i>petD</i> | genic | GAATCCATTTCTGTCGTTCCAG | CGTGGAAATATCGAAAGAAATC |
| pkcpSSR15 | A | <i>rpl14-rpl16</i> | intergenic | TTATTTTTCGGGCTCCACTG | GAAACCGTCGCTAGAGCAG |
| pkcpSSR16 | T | <i>rps19-rpl2</i> | intergenic | CATTGCGGGTACAATGACAG | TGATGCTTCAATCCTTCGTC |
| pkcpSSR17 | T | <i>rpl23-psbA</i> | intergenic | TTGGTTCCTTTCCAATAGACG | AACAGCGGCTAGATCCAGAG |
| pkcpSSR18 | T | <i>ycf3</i> | genic | GAATCTTTGCAAGAAGGATGG | TACGGTCGTTCAATCCATTG |
| pkcpSSR19 | AT | PikoCp941 | genic | GTAATAATCCATCCGGAGACG | ATCTTCGAGGTGCTCAATGG |
| pkcpSSR20 | AT | PikoCp311 | genic | GTATTTTGGTCCGGAAAGG | TCTACTTACGAATGGGATTGAAC |
| pkcpSSR21 | TTTGA | <i>trnG-psbZ</i> | intergenic | TGTTCAATCCCATTCGTAAG | GATCGGATCAGTCTTTTTTG |
| pkcpSSR22 | T | <i>psbZ-trnS</i> | intergenic | TGATCCCCAATTTTCAATTC | CCGAGGGACAACCTCTATTTC |
| pkcpSSR23 | A | PikoCp125 | genic | CCGAGGGGGTAGAATAGAAG | GGCGGGATAGGAGTATTTTC |
| pkcpSSR24 | AGGT | PikoCr497 | genic | CGAAAGATGGTTATCGGTTTC | TTTTGCCGAGTTCCTTAGAG |
| pkcpSSR25 | GTGATG | <i>ycf1</i> | genic | TTTCCTTTTCGAGTCTTTGG | AGTCCGACGATAATCTGAC |
| pkcpSSR26 | T | PikoCp604 | genic | TTCCGTTTCATCAATGTGAG | ATCGGGAATCAGAGATGAAC |
| pkcpSSR27 | ATTT | PikoCp493 | genic | ATGAGCGCCTTGACTCTATC | TGGATATTGCGAAATGTGAC |
| pkcpSSR28 | A | PikoCp621 | genic | TGCATAAAGGAAGGGAATATG | TTGGGGTGATAGTGGAAAAG |
| pkcpSSR29 | AAAG | <i>rps12</i> | genic | ACGGGTTCAAGTCAAATAGC | TGAAAGATCTCCCTCCAAC |
| pkcpSSR30 | T | PikoCp633 | genic | TGTTACCCCTACCTCCACTC | TTATTACCTTCTCGCGTATG |
| pkcpSSR31 | AT | PikoCp356- <i>trnL</i> | intergenic | AAAAAGAAAGGATGTTTCAGTCG | TCGTACGAGATTTGCCATTG |
| pkcpSSR32 | T | <i>ycf2</i> | genic | TGGATTTGGTCCATGGATTG | TCCGATTCGTTGTCATTTTC |

$H_e = (n(n-1))^{-1} (1 - \sum p_i^2)$ 의 수식(p 는 i 번째 haplotype의 상대빈도; n 은 개체수)에 따라 계산하였다(Nei, 1978).

결 과

1. cpSSR 분포 및 빈도

잣나무의 전체 엽록체 DNA 염기서열을 대상으로 cpSSR을 탐색한 결과 치환, 삽입 또는 결실로 인한 motif의 변화가 없는 30개의 완전한 cpSSR이 확인되었으며 (Table 1), 이는 117,190 bp의 전체 엽록체 DNA에 대하여 3,906 bp 당 1개에 해당한다. cpSSR이 존재하는 위치에 따라 구분하면 유전자 부위에 19개(63.3%)가 존재하며, 그 중 3개는 intron 부위에 존재하는 것으로 확인되었다. cpSSR motif를 구성하는 염기서열의 수에 따라 구분하면 단일염기로 구성된 cpSSR의 비율이 65.6%로 가장 높았으며, 6개의 염기로 구성된 cpSSR이 3.1%로 가장 낮게 나

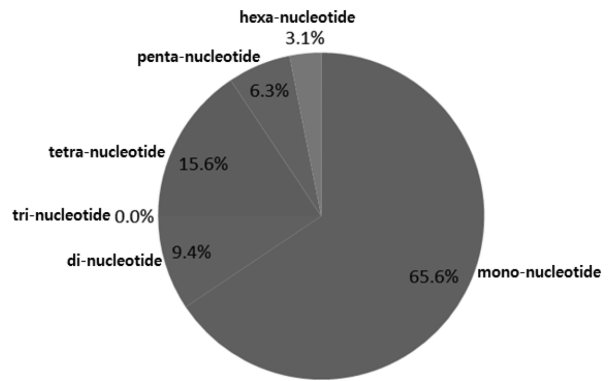


Figure 1. Classification of cpSSR region in *P. koraiensis*.

타났다(Figure 1).

2. cpSSR primer의 종간 전환률 및 다형성

잣나무 엽록체 DNA 염기서열 정보에 근거하여 cpSSR

Table 2. Cross-species amplification and transferability of *P. koraiensis* cpSSR primers in closely related *Pinus* species.

| cpSSR primer | <i>Pinus densiflora</i> | <i>Pinus thunbergii</i> | <i>Pinus sylvestris</i> | <i>Pinus taeda</i> | <i>Pinus rigida</i> | <i>Pinus koraiensis</i> | <i>Pinus parviflora</i> | <i>Pinus pumila</i> |
|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|---------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|
| pkcpSSR1 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR2 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR3 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR6 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR7 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR8 | - | + | - | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR9 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR10 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR11 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR12 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR13 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR14 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR15 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR16 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR17 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR18 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR19 | - | - | - | + | + | + | - | + |
| pkcpSSR20 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR21 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR22 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR23 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR24 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR25 | - | - | - | - | - | + | + | + |
| pkcpSSR26 | - | - | - | - | - | + | + | + |
| pkcpSSR27 | - | - | - | - | - | + | + | + |
| pkcpSSR28 | - | - | - | - | - | + | + | + |
| pkcpSSR29 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR30 | - | - | - | - | - | + | + | + |
| pkcpSSR31 | - | - | - | + | + | + | + | + |
| pkcpSSR32 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Cross-species transferability | 73% | 77% | 73% | 83% | 83% | 100% | 97% | 100% |

‘+’ and ‘-’ indicate success and failure in PCR amplification, respectively.

영역을 증폭할 수 있는 30개의 primer set를 제작하였다 (Table 1). 이들 primer를 사용하여 잣나무를 대상으로 분석한 결과 모든 primer에서 안정적인 PCR 증폭이 가능하였다. 국내에 분포하거나 도입된 소나무속 수종인 소나무, 곰솔, 구주소나무, 테다소나무, 리기다소나무, 섬잣나무 및 눈잣나무를 대상으로 잣나무 cpSSR primer를 사용한 PCR 증폭 여부를 확인한 결과 총 22개(73.3%)의 primer가 모든 수종에서 증폭이 가능하였다. 잣나무 cpSSR primer의 중간 전환률(transferability)은 눈잣나무에서 100%를 나타내었으며, 섬잣나무에서 97%를 나타내었다. 테다소나무와 리기다소나무에서는 공통적으로 83%의 중간 전환률을 나타내었으며, 소나무와 곰솔 그리고 구주소나무에서는 73~77%로 상대적으로 낮게 나타났다. 한편, 8개의 primer에서 주형 DNA의 결합 부위에서의 염기서열 변이에 따른 PCR 증폭산물의 유/무에 의한 다형성이 관찰되었다(Table 2). pkcpSSR25, pkcpSSR26, pkcpSSR27, pkcpSSR28 및 pkcpSSR30 primer에서 잣나무류에 속하는 잣나무, 섬잣나무 및 눈잣나무에서만 공통적으로 증폭산물이 관찰된 반면, 그 밖의 수종에서는 증폭산물이 관찰되지 않았다. pkcpSSR31 primer는 테다소나무, 리기다소나무 및 잣나무류 수종에서 공히 증폭산물이 관찰된 반면, 소나무, 곰솔 및 구주소나무에서는 증폭산물이 관찰되지 않았다. 전체적으로 근연관계의 수종에서 PCR 증폭 결과가 유사하였으며, 잣나무류 수종에서 중간 전환률이 높은 경향을 나타내었다.

3. 잣나무 다형적 cpSSR 표지자 유전특성

점봉산의 잣나무 집단을 대상으로 30개의 cpSSR primer를 적용한 결과 총 13개의 유전자좌에서 다형성이 관찰되었다(Table 3). 유전자좌별 평균 대립유전자 수(A)는 3.385로 나타났으며, 평균 유효대립유전자수(A_e)는 2.164로 확인되었다. 유전자좌별 평균 Shannon의 다양성 지수(I)와 평균 haploid 다양도(H)는 각각 0.881과 0.512로 계산되었으며, pkcpSSR18 유전자좌에서 1.351과 0.707로 가장 높았다. 분석된 cpSSR 유전자좌의 대립유전자의 조합에 따라 점봉산 집단에서 관찰된 haplotype의 수(N)는 25개였으며, 유효 haplotype의 수(N_e)는 23.1로 계산되었다. 집단에서 독특하게 관찰되는 haplotype(unique haplotype)은 22개(88%)로 확인되었으며, 전체 개체 중 22개체(79%)가 식별이 가능하였다. 유전자좌별 집단내 개체에서 관찰되는 대립유전자 조합에 의한 haplotype의 분포에 따른 다양성을 나타내는 haplotype 다양도(H_e)는 0.992로 나타났다.

잣나무 집단에서 PCR 및 전기영동을 통하여 확인된 다형성이 실제 탐색된 cpSSR motif의 반복수 차이에 의한 다형성인지 여부를 확인하기 위하여 개체간 다형적 증폭산물의 염기서열을 분석한 결과 pkcpSSR32 유전자좌를

Table 3. Summary of genetic diversity for thirteen polymorphic cpSSR primers.

| cpSSR loci | A | A_e | I | H |
|------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| pkcpSSR7 | 3 | 1.894 | 0.798 | 0.472 |
| pkcpSSR10 | 3 | 2.178 | 0.876 | 0.541 |
| pkcpSSR11 | 3 | 2.279 | 0.898 | 0.561 |
| pkcpSSR16 | 3 | 2.240 | 0.890 | 0.554 |
| pkcpSSR18 | 5 | 3.409 | 1.351 | 0.707 |
| pkcpSSR23 | 3 | 2.240 | 0.890 | 0.554 |
| pkcpSSR28 | 4 | 2.481 | 1.058 | 0.597 |
| pkcpSSR3 | 4 | 2.613 | 1.108 | 0.617 |
| pkcpSSR6 | 4 | 2.190 | 0.926 | 0.543 |
| pkcpSSR15 | 3 | 1.640 | 0.665 | 0.390 |
| pkcpSSR17 | 4 | 1.950 | 0.901 | 0.487 |
| pkcpSSR26 | 3 | 1.782 | 0.759 | 0.439 |
| pkcpSSR32 | 2 | 1.237 | 0.340 | 0.191 |
| mean(S.D) ^z | 3.385 (0.768) | 2.164 (0.523) | 0.881 (0.236) | 0.512 (0.126) |
| $N(N_e) / H_e^y$ | 25(23.1) / 0.992 | | | |

A =number of alleles; A_e =number of effective alleles; I =Shannon's Information index; H =haploid genetic diversity; N =number of haplotypes; N_e =number of effective haplotypes; H_e =unbiased haplotype diversity

^zNumbers in parentheses indicate standard deviations.

^yValues were estimated in Mt. Jumbong population.

제외한 모든 유전자좌에서 각 cpSSR motif의 반복수 차이에 의한 다형성임이 확인되었다. ChloroMitoSSRDB 2.00과 IMEx 프로그램을 이용하여 cpSSR 영역을 탐색한 결과에서 pkcpSSR32는 한 개의 염기(T)로 구성된 12bp 길이의 반복서열이 존재하는 것으로 최초에는 확인되었으나(Table 1), 실제 집단내 개체를 대상으로 증폭한 산물의 염기서열 분석 결과에서는 최초에 확인되었던 한 개의 염기(T)로 구성된 SSR 영역에서는 다형성이 관찰되지 않은 반면, 인접된 영역에서 다섯 개의 염기 'AATAT'로 구성된 motif의 반복수 차이에 의한 다형성이 관찰되었다 (Figure 2).

고 찰

1. cpSSR의 분포 및 빈도

엽록체 게놈은 개체내 유전적으로 동질한(homogeneous) DNA 분자로, 육상식물에서는 30~50개의 RNA 유전자를 포함하며, 크기는 110~200 kb로 분포한다(Sugiura, 1992). 잣나무의 전체 엽록체 DNA 염기서열(Acc. No. AY228468)의 길이는 117,190 bp로 소나무과의 다른 수종과 비교하여 유사한 수준이다(Table 4). 잣나무를 포함하는 소나무과 수종에서 엽록체 게놈의 크기는 평균 약 119 kb로 다른 식물 종과 비교하여 작은 편인데, 이는 잣나무를 포함하는 침엽수에서 두 개의 역위 반복 영역(IR; Inverted

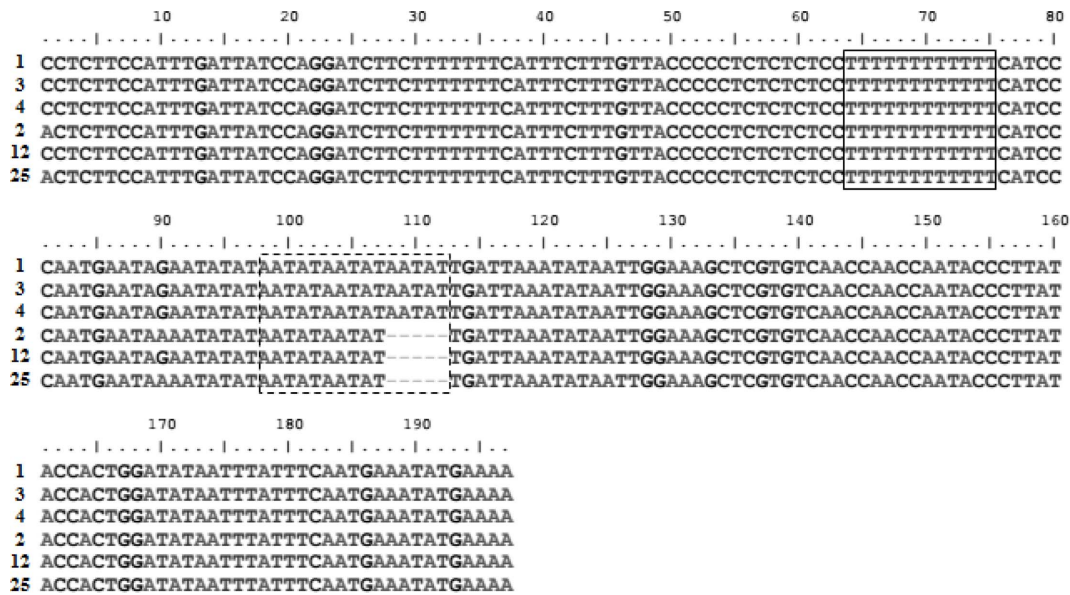


Figure 2. Examples of the polymorphic patterns resulted from sequencing analysis in pkcpSSR32 locus. The solid and dotted boxes indicate the expected mono-nucleotide repeats and the observed polymorphic region with penta-nucleotide repeats, respectively. Numbers shown in left side of the panel indicate the sequenced individuals.

Repeat) 중 하나가 진화과정에서 소실된 결과에 기인한다 (Strauss et al., 1988; Raubeson and Jansen, 1992). 엽록체 게놈의 염기서열은 유전적으로 근연관계의 종에서 높은 유사성을 나타내며, cpSSR 영역 또한 유사하게 분포하는 것으로 알려져 있다(Vendramin et al., 1996).

Filiz and Koc(2014)이 소나무과 수종에서 cpSSR의 분포 및 특성을 분석한 결과에서 탐색된 cpSSR의 수는 *Cedrus deodara*에서 87개로 가장 적었으며, *Pinus krempfii*에서 130개로 가장 많은 것으로 나타났다. 잣나무에서는 128개의 cpSSR이 탐색되었는데, 본 연구에서 탐색된 결과(30개)와 큰 차이를 나타내었다. 이러한 결과는 동일한 DNA 정보로부터 cpSSR을 탐색하는 조건이 상이함에 따른 결과로 추정될 수 있는데, Filiz and Koc(2014)의 연구에서는 단일염기 반복일 경우 최소 8bp, 두 개의 염기는 최소 5반복(10 bp), 3~5개 염기는 최소 3반복(9~15 bp) 이상으로 구성된 cpSSR을 대상으로 탐색한 반면, 본 연구에서는 위 조건보다 비교적 제한된 12bp 이상의 cpSSR(1~6개 염기)을 대상으로 탐색한 결과로 사료된다. 한편, 진핵생물에서 세포내 게놈 위치에 상관없이 단일염기로 구성된 SSR의 비율이 가장 많은 것으로 보고되었다(Tóth et al., 2000). 임목을 포함하는 육상 식물의 엽록체 게놈에서도 단일염기로 구성된 cpSSR의 비율이 가장 높은 것으로 보고된 바 있다(Powell et al., 1995; Deguilloux et al., 2004; Melotto-Passarin et al., 2011). 본 연구에서도 단일염기로 구성된 cpSSR의 비율이 65.6%로 가장 높게 나타나 기존 결과들과 유사한 경향이었으며, 소나무과에서 보고된 52.4% 보다는 약간 높은 수치를 나타내었다(Filiz and

Koc, 2014).

2. cpSSR primer의 종간 전환률

Primer의 종간 전환률(cross-species transferability)은 염기서열의 유사성에 근거하여 primer가 개발된 종과 유전적으로 근연관계인 종에 적용 가능한 정도를 나타낸다. 본 연구에서 개발된 30개의 잣나무 primer를 소나무속의 7 수종을 대상으로 종간 전환률을 분석한 결과 소나무아속 (Subgenus *Pinus*)에 속하는 소나무와 구주소나무에서 73%로 가장 낮았으며, 곰솔에서 78%, 테다소나무와 리기다소나무에서 83%로 나타났다. 반면, 잣나무와 함께 잣나무아속(Subgenus *Strobus*)에 속하는 눈잣나무와 섬잣나무에서 각각 100%와 97%로 매우 높게 나타났다. 곰솔에서 보고된 cpSSR 표지자의 경우에도 소나무아속에 속하는 *P. bruita*, *P. halepensis*, *P. pinaster*, *P. pinea* 및 구주소나무에서 100%의 종간 전환률을 나타내었다(Vendramin et al., 1996). 이러한 결과와 비교할 때, 소나무속의 경우 cpSSR primer의 종간 전환률은 아속 수준의 유연관계에서 크게 달라지는 것으로 사료된다. 이는 소나무아속과 잣나무아속 수종의 엽록체 DNA 염기서열 길이 변이의 차이에 의해서 추정될 수 있다. 잣나무아속에 속하는 잣나무와 스트로브잣나무(*P. strobus*)의 엽록체 DNA 염기서열 길이는 1,614 bp이었으며(Table 4), 정렬된 전체 염기서열의 0.8%에 해당하는 914개의 부위에서만 변이가 탐색되어 유사성이 매우 높은 것으로 확인되었다(자료 미제시). 또한 소나무속의 마쑤니아소나무(*P. massoniana*)와 곰솔의 경우 염기서열 길이의 차이는 불과 32 bp이었으며, 변

Table 4. Comparison of chloroplast genome size in Pinaceae species.

| Species | Acc. No. ^z | Size(bp) |
|--|-----------------------|----------|
| <i>Abies koreana</i> | KP742350 | 121,373 |
| <i>Pinus strobus</i> | KP099650 | 115,576 |
| <i>Pinus massoniana</i> | KC427272 | 119,739 |
| <i>Picea sitchensis</i> | EU998739 | 120,176 |
| <i>Pseudotsuga sinensis</i> var. <i>wilsoniana</i> | AB601120 | 122,513 |
| <i>Pinus lambertiana</i> | EU998743 | 117,239 |
| <i>Picea morrisonicola</i> | AB480556 | 124,168 |
| <i>Larix decidua</i> | AB501189 | 122,474 |
| <i>Picea abies</i> | HF937082 | 124,084 |
| <i>Pinus thunbergii</i> | D17510 | 119,707 |
| <i>Cathaya argyrophylla</i> | AB547400 | 107,122 |
| <i>Cedrus deodara</i> | AB480043 | 119,299 |
| <i>Keteleeria davidiana</i> | AP010820 | 117,720 |
| <i>Pinus monophylla</i> | EU998745 | 116,479 |
| <i>Pinus nelsonii</i> | EU998746 | 116,834 |
| <i>Pinus gerardiana</i> | EU998741 | 117,618 |
| <i>Pinus krempfii</i> | EU998742 | 116,989 |
| <i>Pinus koraiensis</i> | AY228468 | 117,190 |
| <i>Pinus contorta</i> | EU998740 | 120,438 |
| Mean | | 118,776 |

^zGenBank accession numbers in NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>)

이 부위는 정렬된 전체 염기서열의 0.3%(413개)로 역시 염기서열 유사성이 매우 높은 것으로 나타났다. 반면, 잣나무아속의 잣나무와 소나무아속의 곰솔 간 엽록체 DNA 염기서열 길이 차이는 약 2,500 bp이었고, 전체 염기서열의 4%(4,986개)가 변이 부위로 확인되었다. 이는 동일 아속 수준에서 엽록체 DNA 염기서열의 변이가 큰 것으로 추정될 수 있다. 이러한 차이로 인하여 잣나무와 동일 아속 수준인 눈잣나무와 섬잣나무에서 primer의 중간 전환률이 높은 것으로 판단되며, 이들 수준의 엽록체 DNA에 분포하는 유전변이 분석에 효율적인 적용이 가능할 것으로 생각된다.

3. 잣나무 다형적 cpSSR 표지자의 유전특성

cpSSR haplotype 다양도는 각 유전자좌에서 대립유전자의 분포 양상에 따라 다르게 나타난다. 즉, 집단에서 관찰되는 cpSSR 유전자좌별 대립유전자의 종류가 많고 고르게 분포할수록 haplotype 다양도가 높으며 haplotype에 의한 개체식별력이 높게 나타난다. 잣나무의 근연종에서 cpSSR 표지자를 이용하여 분석된 haplotype 다양도는 소나무 집단에서 평균 0.987로 보고되었으며(Hong et al., 2006), 구주소나무에서 0.977(Provan et al., 1998), *P. albicaulis*에서 0.907(Richardson et al., 2002)로 보고된

바 있다. 이들 결과와 비교할 때 본 연구에서 계산된 잣나무 집단의 haplotype 다양도는 0.992로 상당히 높은 수치로서 13개의 cpSSR 유전자좌에 대한 haplotype이 매우 다양하게 존재하는 것을 의미한다(Table 3). 본 연구에서 확인된 25개의 haplotype 중에서 집단내에서 독특하게 관찰되는 haplotype이 22개(88%)로 확인되었으며, 28개체로부터 22개체(79%)가 식별이 가능하였다. Provan et al.(1998)이 영국 지역에 분포하는 *P. sylvestris* 집단을 대상으로 13개의 cpSSR 표지자를 분석한 결과를 보면 집단별로 47.1~80%가 독특한 haplotype으로 나타났으며, 분석된 개체의 38.3~63.8%를 식별하였다. 이러한 결과와 비교할 때 본 연구의 잣나무 cpSSR로부터 확인된 haplotype의 개체 식별력은 매우 높은 수준이며, 잣나무 유전변이 분석을 위한 충분한 다형성을 제공하는 유용한 표지자로 판단된다.

결론

본 연구는 잣나무 cpSSR 표지자를 개발하기 위하여 엽록체 DNA의 전체 염기서열에 근거하여 cpSSR 영역을 탐색하였으며, 탐색된 cpSSR 영역에 특이적인 primer를 개발하고 특성을 분석하였다. 본 연구에서 확인된 잣나무 집단의 haplotype 수와 다양도는 기 보고된 임목 수종과 비교하여 매우 높은 수준이었으며, 잣나무 집단의 유전변이 분석에 충분한 다형성을 제공하는 분자표지자로서 유용할 것으로 사료된다. 잣나무 cpSSR primer의 소나무속 근연종에 대한 중간 전환률은 소나무와 구주소나무에서 73%로 비교적 낮았으며, 눈잣나무에서 100%, 섬잣나무에서 97%로 매우 높은 수치를 나타내었다. 따라서 잣나무 cpSSR primer는 소나무속, 특히 눈잣나무와 섬잣나무 같은 잣나무아속 수준의 엽록체 DNA 유전변이 분석에 활용성이 높은 것으로 판단된다.

References

Bang, K.H., Lee, J.W., Kim, Y.C., Kim, D.H., Lee, E.H., and Jeung, J.U. 2010. Construction of genomic DNA library of Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) and development of sequence-tagged sites. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 33(9): 1579-1588.

Deguilloux, M.F., Pemonge, M.H., and Petit, R. J. 2004. Use of chloroplast microsatellites to differentiate oak populations. *Annals of Forest Science* 61(8): 825-830.

Demesure, B., Sodji, N., and Petit, R.J. 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4(1): 129-134.

Feng, F.J., Han, S.J., and Wang, H.M. 2006. Genetic diversity and genetic differentiation of natural *Pinus koraiensis*

- population. *Journal of Forestry Research* 17(1): 21-24.
- Feng, F.J., Zhao, D., Sui, X., and Sun, X.Y. 2011. Study on mating system of *Pinus koraiensis* in natural population based on cpSSR technology. In *Advanced Materials Research* 183: 700-704.
- Filiz, E. and Koc, I. 2014. Assessment of chloroplast microsatellite from pine family (Pinaceae) by using bioinformatics tools. *Indian Journal of Biotechnology* 13: 34-40.
- Grauda, L., Aravanopoulos, F., Bennadji, Z., Changtragoon, S., Fady, B., Kjær, E.D., Loo, J., Ramamonjisoa, L., and Vendramin, G.G. 2014. Global to local genetic diversity indicators of evolutionary potential in tree species within and outside forests. *Forest Ecology and Management* 333: 35-51.
- Grivet, D., Heinze, B., Vendramin, G.G., and Petit, R.J. 2001. Genome walking with consensus primers: application to the large single copy region of chloroplast DNA. *Molecular Ecology Notes* 1(4): 345-349.
- Hong, K.N., Kwon, Y.J., Chung, J.M., Shin, C.H., Hong, Y.P., and Kang, B.Y. 2001. Spatial genetic structure at a Korean pine (*Pinus koraiensis*) stand on Mt. Jumbong in Korea based on isozyme studies. *Journal of Korean Forest Society* 90(1): 43-54.
- Hong, Y.P., Kwon, H.Y., Han, S.U., Choi, W.Y., and Kim, Y.Y. 2005. Identification of true full sib progenies of Japanese red pine via cpSSR haplotyping. *Journal of Korean Forest Society* 94(3): 178-182.
- Hong, Y.P., Kwon, H.Y., and Kim, Y.Y. 2006. Distribution pattern of cpSSR variants in Korean populations of Japanese red pine. *Journal of Korean Forest Society* 95(4): 435-442.
- Hong, Y.P., Kim, Y.M., Ahn, J.Y., and Park, J.I. 2012. Mating system of seed orchard of Japanese red pines revealed by DNA markers. *Journal of Korean Forest Society* 99(3): 344-352.
- Hong, Y.P., Ahn, J.Y., Kim, Y.M., Hong, K.N., and Yang, B.H. 2013. Mating System in Natural Population of *Pinus koraiensis* at Mt. Seorak Based on Allozyme and cpSSR Markers. *Journal of Korean Forest Society* 102(2): 264-271.
- Kong, W.S. 2004. Species Composition and Distribution of Native Korean Conifers. *The Korean Geographical Society* 39(4): 528-543.
- Lee, J.W. 2010. Development of DNA markers for identification of Korean ginseng cultivars. Dongguk University, Ph. D. thesis paper. pp. 113.
- Lee, J.W., Kim, Y.C., Jo, I.H., Seo, A.Y., Lee, J.H., Kim, O.T., Hyun D.Y., Cha S.W., Bang K.H., and Cho, J.H. 2011. Development of an ISSR-derived SCAR marker in Korean ginseng cultivars (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Journal of Ginseng Research* 35(1): 52-59.
- Melotto-Passarini, D.M., Tambarussi, E.V., Dressano, K., De Martin, V.F., and Carrer, H. 2011. Characterization of chloroplast DNA microsatellites from *Saccharum* spp and related species. *Genetics Molecular Research* 10(3): 2024-2033.
- Mudunuri, S.B. and Nagarajaram, H.A. 2007. IMEx: imperfect microsatellite extractor. *Bioinformatics* 23(10): 1181-1187.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89(3): 583-590.
- Peakall, R.O.D. and Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6(1): 288-295.
- Potenko, V.V., and Velikov, A.V. 1998. Genetic diversity and differentiation of natural populations of *Pinus koraiensis* (Sieb. et Zucc.) in Russia. *Silvae Genetica* 47(4): 202-207.
- Powell, W., Morgante, M., McDevitt, R., Vendramin, G.G., and Rafalski, J.A. 1995. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: applications to the population genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(17): 7759-7763.
- Provan, J., Powell, W., and Hollingsworth, P.M. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 16(3): 142-147.
- Provan, J., Soranzo, N., Wilson, N.J., Goldstein, D.B., and Powell, W. 1999. A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics* 153(2): 943-947.
- Provan, J., Soranzo, N., Wilson, N.J., McNicol, J.W., Forrest, G.I., Cottrell, J., and Powell, W. 1998. Gene pool variation in Caledonian and European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple sequence repeats. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 265(1407): 1697-1705.
- Raubeson, L.A. and Jansen, R.K. 1992. A rare chloroplast-DNA structural mutation is shared by all conifers. *Biochemical Systematics and Ecology* 20(1): 17-24.
- Richardson, B.A., Brunsfeld, S.J., and Klopfenstein, N.B. 2002. DNA from bird-dispersed seed and wind-disseminated pollen provides insights into postglacial colonization and population genetic structure of whitebark pine (*Pinus albicaulis*). *Molecular Ecology* 11(2): 215-227.
- Sablok, G., Mudunuri, S.B., Patnana, S., Popova, M., Fares, M.A., and La Porta, N. 2013. ChloroMitoSSRDB 2.0: Open source repository of perfect and imperfect repeats in organelle genomes for evolutionary genomics. *DNA Research* 20(2): 127-133.
- Schlotterer, C. and Tautz, D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research* 20(2): 211-215.
- Sia, E.A., Jinks-Robertson, S., and Petes, T.D. 1997. Genetic control of microsatellite stability. *Mutation Research* 383: 61-70.
- Strauss, S.H., Palmer, J.D., Howe, G.T., and Doerksen, A.H. 1988. Chloroplast genomes of two conifers lack a large inverted repeat and are extensively rearranged. *Proceed-*

- ings of the National Academy of Sciences 85(11): 3898-3902.
- Sugiura, M. 1992. The chloroplast genome. *Plant Molecular Biology* 19: 149-168.
- Sun, X. and Feng, F. 2011. Development and Analysis on Microsatellite Sequence of Chloroplast DNA of *Pinus koraiensis*. In *Bioinformatics and Biomedical Engineering, (iCBBE) 2011 5th International Conference*. IEEE. pp. 1-4.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., and Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17(5): 1105-1109.
- Tóth, G., Gáspári, Z., and Jurka, J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 10(7): 967-981.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., and Rozen, S.G. 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15): e115-e115.
- Vendramin, G.G., Lelli, L., Rossi, P., and Morgante, M. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology* 5(4): 595-598.
- Wolfe, K.H., Li, W.H., and Sharp, P.M. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84(24): 9054-9058.

(Received: July 10, 2015; Accepted: August 10, 2015)