

## Microsatellite 마커를 이용한 은행나무 천연기념물의 DNA 지문 분석

이제완 · 이민우 · 안지영<sup>ID\*</sup> · 홍경낙 · 백승훈 · 김상철

국립산림과학원 산림유전자원과

### DNA Fingerprinting Analysis of Natural Monument *Ginkgo* Trees Using Microsatellite Markers

Jei-Wan Lee, Min-Woo Lee, Ji-Young Ahn<sup>ID\*</sup>, Kyung-Nak Hong,  
Seung-Hoon Baek and Sang-Chul Kim

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

**요약:** 본 연구는 국내 천연기념물 은행나무 23개체를 대상으로 8개의 microsatellite 마커를 이용하여 DNA 지문분석을 수행하였다. 그 결과, 평균 대립유전자수는 6.875개, 평균 이형접합도 관찰치와 기대치는 각각 0.711과 0.710로 나타났다. 이러한 수치는 동일한 마커로 일본 및 중국 은행나무에서 분석된 기존 연구 결과와 유사하였다. 분석된 8개 마커의 다형성 정보량(PIC) 값 및 개체식별력(PD)은 각각 0.677과 0.9999로 높은 개체식별 효율을 나타내었다. 실제 유전형을 비교한 결과에서도 모든 천연기념물 은행나무와 추가로 분석된 일반 은행나무 13개체가 모두 식별되었다. 천연기념물 은행나무에서 계산된 PIC 값을 기준으로 상위 3개의 마커(Ging06, Gb60, Gb61)에서 계산된 개체인식력과 개체식별력이 각각  $8.045 \times 10^{-5}$  및 99.99%로 계산되므로, 이들 3개의 마커가 은행나무 개체식별을 위한 DNA 지문 분석에 우선 적용이 가능할 것이다. 본 연구의 DNA 지문 분석 결과는 천연기념물 은행나무의 관리와 후계목 육성 및 은행나무 선발 개체의 유전적 동일성 검정에 유용한 자료로 활용될 것으로 판단된다.

**Abstract:** This study describes DNA fingerprinting analysis of twenty-three natural monument individuals of *Ginkgo biloba* using eight microsatellite markers. The average number of observed alleles was 6.875, and the expected heterozygosity and the observed heterozygosity were 0.711 and 0.710, respectively. This results were similar to those of the previous studies on *Ginkgo* trees analyzed by same markers in China and Japan. PIC value and PD were calculated at 0.677 and 0.9999 respectively, indicating a high individual identification efficiency. In fact, all of the natural monument ginkgo trees and additionally analyzed thirteen general ginkgo trees were identified by genotype comparison. PI and PD calculated in three markers (Ging06, Gb60, Gb61) with the highest PIC values calculated in natural monument ginkgo trees were  $8.045 \times 10^{-5}$  and 99.99%, respectively. Thus, these three markers could be preferentially used in DNA fingerprinting for identifying ginkgo tree individuals. The results in this study will be useful for management of natural monument ginkgo trees, proliferation of their progeny and genetic identification of individuals selected in breeding process.

**Key words:** *Ginkgo biloba*, natural monument, microsatellite marker, power of discrimination, DNA fingerprinting

## 서론

천연기념물은 독특한 자연환경에 적응한 동·식물과 장시간에 걸쳐 형성된 특이한 지형, 지물, 지질, 광물, 동

굴, 생물학적 생성물 또는 특별한 자연현상으로(Lee et al., 2000), 오랜 역사와 문화, 경관 및 학술적 가치가 높이 평가된다(Kim, 2012a). 생명력이 없는 사물 또는 지형과 같은 천연기념물은 천재지변과 인위적인 피해가 없다면, 장기간 보존될 가능성이 있다. 반면, 생물 천연기념물은 수명이 다하여 자연사로 소실될 우려가 있고, 환경변화에 따라 생존에 위협이 되는 상황에 처해지는 경우 비생물 천연기념물에 비해 보존이 쉽지 않다. 그러므로 생

\* Corresponding author

E-mail: gee330@korea.kr

ORCID

Ji-Young Ahn <sup>ID</sup> <http://orcid.org/0000-0002-8598-2474>

물 천연기념물을 보존하고 관리하기 위한 적절한 방법이 마련될 필요가 있다(Hong et al., 2009).

국내 천연기념물은 부속문화재를 포함하여 총 455건이 지정되어 있고, 식물 천연기념물은 261건이 포함되어 있다. 그 중 노거수는 169건으로 식물 지정건수의 약 65%에 해당한다. 수종별 단일 건으로 지정된 노거수 단목은 32건, 은행나무 22건, 느티나무 18건, 소나무 15건 등이 있다(Son et al., 2016). 노거수 천연기념물은 수백 년에 이르는 오랜 시간을 우리 민족의 역사와 함께하며, 특정 지역이나 마을의 풍속을 형성하는데 영향을 미쳐왔다. 최근 기후변화와 태풍, 화재와 같은 천재지변은 천연기념물 노거수의 치명적인 소실 위험이 될 수 있다(KCHA, 2015).

은행나무(*Ginkgo biloba*)는 현존하는 수목류 중 출현기간이 가장 오래된 식물로 약 3억 년 전 중생대에 지구상에 출현하여 현재까지도 원시적 종의 형태를 유지하고 있다(Go, 2010; Shen et al., 2005). 은행나무는 낙엽 교목으로 높이 60m, 지름 4m까지 자라며, 암꽃과 수꽃이 별개의 개체에서 형성되는 암수딴그루로 꽃은 4월경 잎과 더불어 피고, 종자(은행)는 10월에 결실한다(Chang et al., 2011). 은행나무는 중국의 귀주성, 운남성 등 서남부 지역에 자연 분포하는 것으로 보고되었으며(Shen et al., 2005), 일본, 유럽, 미국 등 여러 나라에 도입되어 가로수와 공원으로 널리 식재되었다(Hong et al., 2001; Jacobs and Browner, 2000). 우리나라의 은행나무는 승려나 학자 또는 상인의 교역을 통해 중국으로부터 도입된 것으로 추정된다(Soh and Yoon, 2011; Go, 2010).

천연기념물의 보호와 관련한 유전학적 연구로써 동물에서는 산양 집단을 대상으로 미토콘드리아 DNA의 cytochrome b 영역의 염기서열 변이에 대한 연구(Yoo et al., 2008)와 유전다양성에 대한 연구(KCHA, 2011)가 수행되었으며, 그 밖에 천연기념물 동물 중 보호 및 관리 방안을 마련하기 위한 연구(KCHA, 2016) 등이 수행된 바 있다. 한편 나무의 경우 천연기념물로 지정된 노거수의 토양 환경, 활력도, 수피의 건전도 및 동공의 유무 여부 등 생육이나 생리, 생태적 조사가 주로 수행되었으며(Kim, 2011; Kim, 2012b), 복토 및 석축 등 관리 시설이 생육에 미치는 영향에 대한 연구가 수행된 바 있다(Son et al., 2016). DNA 마커를 이용한 유전학적 연구로는 Hong et al.(2009)이 소나무 천연기념물 노거수를 대상으로 microsatellite 마커를 이용하여 DNA 지문분석을 수행한 바 있으며, Kang et al.(1999)은 RAPD marker를 이용하여 천연기념물 느티나무의 유연관계를 보고한 바 있다. 그러나 은행나무 천연기념물에 대하여 DNA 마커를 이용한 유전학적 연구는 실시된 바 없다.

DNA 마커를 이용한 개체식별 또는 DNA 지문분석

(fingerprinting)은 개체의 고유한 유전적 식별 정보를 의미하며, 범죄나 야생생물의 과학수사, 보존 및 생태 유전학 분야에서 집단의 크기, 개체의 서식지 환경 모니터링 등에 활용되고 있다(Wait et al., 2001).

Microsatellite 마커는 다형성과 재현성이 높은 공우성 마커로 집단유전학, 육종 및 개체식별 연구에 유용하다(Kalia et al., 2010; Varshney et al., 2005). 본 연구는 국내 천연기념물 은행나무의 보존 및 관리 효율의 향상을 위하여, microsatellite 마커를 이용하여 천연기념물 은행나무의 개체 간 다양성과 유연관계를 분석하고 개체식별 정보를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료 채취 및 DNA 추출

Microsatellite 마커 분석을 위하여 22건의 천연기념물 은행나무로부터 잎을 채취하였다(Table 1). 채취된 잎을 조직파쇄기(Fastprep, MPbio, USA)를 이용하여 마쇄한 후 DNA 추출 키트(DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, Germany)를 이용하여 제조사의 설명에 따라 genomic DNA를 추출하였다. 천연기념물 은행나무의 유전형을 일반 은행나무와 비교하기 위하여 국립산림과학원 DNA bank에 저장된

**Table 1. Designation number, name of cultural properties including locations of 22 natural monuments of *Ginkgo Biloba*.**

| Designation No. | Name of cultural properties                   |
|-----------------|-----------------------------------------------|
| 30              | Ginkgo Tree of Yongmunsa Temple, Yangpyeong   |
| 59 <sup>z</sup> | Ginkgo Tree of Munmyo Confucian Shrine, Seoul |
| 64              | Ginkgo Tree of Guryang-ri, Ulju               |
| 76              | Ginkgo Tree of Hasong-ri, Yeongwol            |
| 84              | Ginkgo Tree of Yogwang-ri, Geumsan            |
| 165             | Ginkgo Tree of Eumnae-ri, Goesan              |
| 166             | Ginkgo Tree of Jangdeok-ri, Gangneung         |
| 167             | Ginkgo Tree of Bangye-ri, Wonju               |
| 175             | Ginkgo Tree of Yonggye-ri, Andong             |
| 223             | Ginkgo Tree of Yeongguksa Temple, Yeongdong   |
| 225             | Ginkgo Tree of Nongso-ri, Gumi                |
| 300             | Ginkgo Tree of Joryong-ri, Gimcheon           |
| 301             | Ginkgo Tree of Daejeon-ri, Cheongdo           |
| 302             | Ginkgo Tree of Segan-ri, Uiryeong             |
| 303             | Ginkgo Tree of Yasa-ri, Hwasun                |
| 304             | Ginkgo Tree of Boreumdo Island, Ganghwa       |
| 320             | Ginkgo Tree of Juam-ri, Buyeo                 |
| 365             | Ginkgo Tree of Boseoksa Temple, Geumsan       |
| 385             | Ginkgo Tree of Seongdong-ri, Gangjin          |
| 402             | Ginkgo Tree of Jeokcheonsa Temple, Cheongdo   |
| 406             | Ginkgo Tree of Ungok-ri, Hamyang              |
| 482             | Ginkgo Tree of Bongan-ri, Damyang             |

<sup>z</sup> There are two ginkgo trees in the site of designated No. 59. Thus twenty-three individuals were analysed in this study.

일반 은행나무 13개체의 DNA를 분석에 포함하였다. 추출된 DNA는 분광광도계(NANO DROP 2000, Thermo scientific, USA)로 정량한 후 최종농도 5 ng/ul로 조정하여 이후 분석에 사용하였다.

## 2. microsatellite 마커 분석

은행나무에서 개발된 16개의 microsatellite 마커(Yan et al., 2006; Yan et al., 2009)를 이용하여 국내 천연기념물 은행나무 개체 간 다형성을 분석하였다. 각 마커의 forward primer의 5' 말단에 M13 oligonucleotide를 첨가하여 PCR을 통해 합성되는 DNA template에 형광 dye FAM이 첨가된 M13 FAM dye-labeled primer(Yan et al., 2009)가 결합하도록 변경하였다(Table 2). PCR 분석을 위한 반응액

은 총 15  $\mu$ l로 조정하였으며, 20 ng의 주형 DNA, 0.2 mM의 dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub>와 1 unit의 DNA 중합효소(Taq DNA polymerase, Rbc Bioscience, Taiwan)를 포함하였다. PCR 조건은 94°C에서 초기 열변성(denaturation) 5분, 94°C에서 열변성 1분, 58°C에서 결합(annealing) 30초, 72°C에서 1분간의 신장(extension)이 이루어지는 과정을 35회 반복한 후 72°C에서 최종 10분간 신장하는 과정으로 구성하였다. PCR 증폭산물의 확인은 PCR 산물과 포름아마이드(Hi-Di Formamide, Applied Biosystems, USA) 및 사이즈 스탠다드(GeneScan 500 ROX Size Standard, Applied Biosystems, USA)를 혼합하여 DNA 분석기(ABI 3730xl DNA Analyzer, Applied Biosystems, USA)를 이용하였다. 증폭산물의 분석은 Gene Mapper analysis software

**Table 2. Information of polymorphic microsatellite markers and genetic diversity in national monument *G. biloba*.**

| Locus  |   | Primer sequence (5'–3')<br>(F: forward, R: reverse)             | Ta<br>(°C) | Repeat motif                          | Yan et al.(2009) |                |                | This study |                |                |                |
|--------|---|-----------------------------------------------------------------|------------|---------------------------------------|------------------|----------------|----------------|------------|----------------|----------------|----------------|
|        |   |                                                                 |            |                                       | A                | H <sub>o</sub> | H <sub>e</sub> | A          | A <sub>e</sub> | H <sub>o</sub> | H <sub>e</sub> |
| Ging04 | F | <u>TGTAACGACGCGCCAGT</u> <sup>z</sup> CACTCCAAGTAG<br>AATAGGGAT | 54         | (TC) <sub>7</sub> AA(GA) <sub>9</sub> | 3                | 0.667          | 0.640          | 3          | 2.079          | 0.652          | 0.519          |
|        | R | GTCTTAGTCATAATTGACTAAATAC                                       |            |                                       |                  |                |                |            |                |                |                |
| Ging06 | F | <u>TGTAACGACGCGCCAGT</u> GGTGAATGGTCA<br>CTAGAAGTT              | 54         | (GA) <sub>14</sub>                    | 13               | 0.952          | 0.897          | 13         | 7.197          | 0.826          | 0.861          |
|        | R | GCCAAAAACATCATGTTATAAG                                          |            |                                       |                  |                |                |            |                |                |                |
| Ging11 | F | <u>TGTAACGACGCGCCAGT</u> GATTTTAAAGGG<br>ACTCAAGGTCG            | 54         | (TG) <sub>8</sub> (AG) <sub>9</sub>   | 6                | 0.667          | 0.789          | 8          | 4.620          | 0.870          | 0.784          |
|        | R | CCCATAATTAGCCAATGGCAA                                           |            |                                       |                  |                |                |            |                |                |                |
| Mean   |   |                                                                 |            |                                       | 7.3              | 0.762          | 0.775          | 8.0        | 4.632          | 0.783          | 0.721          |

| Locus      |   | Primer sequence (5'–3')                          | Ta<br>(°C) | Repeat motif                          | Yan et al.(2009) |                |                | This study |                |                |                |
|------------|---|--------------------------------------------------|------------|---------------------------------------|------------------|----------------|----------------|------------|----------------|----------------|----------------|
|            |   |                                                  |            |                                       | A                | H <sub>o</sub> | H <sub>e</sub> | A          | A <sub>e</sub> | H <sub>o</sub> | H <sub>e</sub> |
| Gb43       | F | <u>TGTAACGACGCGCCAGT</u> GGCTCATCCACT<br>CTTATTG | 58         | (GT) <sub>16</sub>                    | 5                | 0.583          | 0.755          | 4          | 1.577          | 0.348          | 0.366          |
|            | R | TTTGAAAGCGTGTAGTCC                               |            |                                       |                  |                |                |            |                |                |                |
| Gb48       | F | <u>TGTAACGACGCGCCAGT</u> AGGGTGTACCAT<br>CCATTC  | 60         | (TC) <sub>16</sub> (AC) <sub>23</sub> | 8                | 0.542          | 0.802          | 6          | 3.515          | 0.652          | 0.716          |
|            | R | TAGGCATCAATACCATGAACT                            |            |                                       |                  |                |                |            |                |                |                |
| Gb60       | F | <u>TGTAACGACGCGCCAGT</u> CCTTCAAGGTTTC<br>AAATT  | 55         | (TG) <sub>10</sub> (AG) <sub>16</sub> | 7                | 0.708          | 0.835          | 9          | 6.453          | 0.773          | 0.845          |
|            | R | ACCACCATAGGAGGATAA                               |            |                                       |                  |                |                |            |                |                |                |
| Gb61       | F | <u>TGTAACGACGCGCCAGT</u> GAGCCTGATGCT<br>TAGTAGA | 62         | (GT) <sub>18</sub>                    | 12               | 0.583          | 0.902          | 7          | 5.539          | 0.826          | 0.819          |
|            | R | ATGTTTCCAGGTTGTTCT                               |            |                                       |                  |                |                |            |                |                |                |
| Gb65       | F | <u>TGTAACGACGCGCCAGT</u> ATGACTTGGCCT<br>TTACGA  | 58         | (TC) <sub>8</sub> (AC) <sub>15</sub>  | 5                | 0.417          | 0.501          | 5          | 4.372          | 0.739          | 0.771          |
|            | R | GAGGACTTTGCCTCTGTG                               |            |                                       |                  |                |                |            |                |                |                |
| Mean       |   |                                                  |            |                                       | 7.4              | 0.567          | 0.759          | 6.20       | 4.291          | 0.668          | 0.703          |
| Total Mean |   |                                                  |            |                                       | -                | -              | -              | 6.875      | 4.419          | 0.711          | 0.710          |

<sup>z</sup> M13 oligonucleotide sequences of forward primers are underlined.

를 이용하였으며, 증폭산물 크기를 기준으로 유전자형을 결정하였다.

### 3. microsatellite 마커 유전통계분석

유전통계량 추정은 GeneAEx 6.4 프로그램(Peakall and Smouse, 2006)을 이용하여 대립유전자 수( $A$ ), 유효대립유전자 수( $A_e$ ), 이형접합도 관찰치( $H_o$ ), 이형접합도 기대치( $H_e$ )를 측정하였다. 은행나무의 개체식별을 위하여 분석된 microsatellite 마커의 다형성 정보량(polymorphism information content, PIC)은 Powermarker 3.23(Liu and Muse, 2005) 프로그램을 이용하여 Botstein et al.(1980)의 방법으로 계산하였다. 분석된 마커에서 임의로 선택된 두 개체 간 동일한 유전형이 나타날 확률(좌확률)을 의미하는 개체인식력(PI, Probability of Identity)과 개체식별력(PD, Probability of Discrimination)은 다음의 수식을 이용하여 계산하였다(Waits et al., 2001).

$$PI = \sum p_i^4 + \sum \sum (2p_i p_j)^2$$

( $P_i$  와  $P_j$  는 각각  $i$  번째와  $j$  번째 대립유전자의 빈도를 의미함)

$$PD = 1 - PI$$

분석된 마커 조합에서 나타나는 누적 개체인식력(CPI)은 각 마커의 개체인식력을 모두 곱하여 계산하였으며, 누적 개체식별력(CPD)은 다음의 수식을 이용하여 계산하였다.

$$CPD = 1 - CPI$$

개체간 유전적 유연관계를 분석하기 위하여 DARwin6(Perrier et al., 2003)을 이용하여 simple matching 방법으로 개체 간 비유사도를 계산하고, UPGMA 계통도를 작성하였다. 개체간 유전적 거리와 지리적 거리와의 상관관계를 분석하기 위하여 GeneAEx 6.4 프로그램을 이용하여 Mantel 검정을 실시하였고, permutation을 100회 실시하여 유의성을 검정하였다. 개체 간 유전적 거리는 GeneAEx 6.4 프로그램의 Codom-Genotype distance 방법으로 계산되었다.

## 결과 및 고찰

### 1. 천연기념물 은행나무의 유전다양성

국내 천연기념물 은행나무 23개체를 대상으로 Yan et al.(2006)과 Yan et al.(2009)이 보고한 16개의 은행나무

microsatellite 마커를 이용하여 개체별 유전형을 분석한 결과, 총 8개의 유전자좌에서 다형성이 관찰되었으며, 평균 대립유전자수( $A$ )는 6.875개로 나타났다(Table 2). Ging06 유전자좌에서 가장 많은 13개의 대립유전자가 확인되었고, Ging04 유전자좌에서 가장 적은 3개의 대립유전자가 확인되었다. 이러한 결과는 Ging04와 Ging06 마커가 최초 보고된 일본 니시쿄토 지역의 은행나무에서 관찰된 대립유전자수와 동일하였다(Yan et al. 2006). Ging11의 경우 본 연구에서 8개의 대립유전자가 관찰되어 상기된 기존 연구에서 나타난 6개보다 많은 대립유전자수를 나타내었다(Table 2). 본 연구의 Gb43, Gb48, Gb60, Gb61, Gb65 마커에서 관찰된 대립유전자수는 이들 마커가 최초 보고된 중국 은행나무 집단과 비교할 때, Gb65의 경우 5개로 동일하였고, GB60은 9개로 중국 집단(7개)보다 많았으며, Gb43, Gb48, Gb61은 각각 4개, 6개, 7개의 대립유전자가 관찰되어 중국집단(각각 5개, 8개, 12개)보다 적게 관찰되었다(Table 2). 본 연구와 일본 집단(Yan et al. 2006)에서 공통적으로 분석된 Ging04, Ging06 및 Ging11 마커의 평균 대립유전자 수는 각각 8.0개와 7.3개로 본 연구에서 근소하게 높게 나타났으나 통계적 유의성은 나타나지 않았다( $t$ -test,  $P=0.880$ ). 본 연구와 중국 집단(Yan et al. 2009)에서 공통적으로 분석된 Gb43, Gb48, Gb60, Gb61 및 Gb65 마커의 경우 평균 대립유전자 수는 각각 6.2개와 7.4개로 본 연구에서 다소 낮게 나타났으나 역시 통계적 유의성은 나타나지 않았다( $t$ -test,  $P=0.461$ ).

국내 천연기념물 은행나무에서 8개 마커로 분석된 평균 이형접합도 관측치( $H_o$ )와 평균 이형접합도 기대치( $H_e$ )는 각각 0.711(0.652~0.870)과 0.710(0.366~0.845)으로 나타났다(Table 2). 이러한 결과는 동일한 마커로 분석된 중국과 일본의 은행나무에서 나타난 값과 유사하였다(Table 2). 또한, Nybom(2004)이 여러 식물종에서 microsatellite 마커로 분석된 유전다양성 자료를 식물의 분포, 교배양식 및 종자 산포 등의 생활사적 특징에 따라 메타분석한 자료와 비교할 때, 은행나무의 생활사적 특징에 해당하는 다년생 식물( $H_e=0.680$ ), 특산 또는 좁은 분포 지역을 나타내는 종( $H_e=0.420$ ), 타가수정 식물( $H_e=0.650$ )의 유전다양성 보다 높게 나타났고, 종자 분산이 동물의 섭식에 의해 이루어지는 식물( $H_e=0.730$ )과 유사하였다. 또한, 천연기념물 은행나무의 이형접합도 기대치는 microsatellite 마커로 분석된 소나무( $H_e=0.614$ ; Kim et al., 2015), 사시나무( $H_e=0.603$ ; Lee et al., 2011), 황철나무( $H_e=0.687$ ; Lee et al., 2009) 집단에서 이형접합도 기대치와 유사하거나 다소 높은 수준을 나타내었다.

은행나무는 중국에 자연집단이 분포하며, 이들 집단은 플라이스토세 빙하기 동안 중국 남서부 지역에 피난처를

형성하였고, 빙하기 이후 점차 분포 면적이 확대되었다 (Shen et al., 2005). 인류의 문화 발달과 교역에 따른 이동이 활발해지면서 은행나무는 인위적 이동과 식재를 통하여 여러 나라에 도입되어 활용되어 왔다(Echenard et al., 2008). 우리나라에 은행나무가 도입된 시기는 정확히 알 수 없지만, 중국으로부터 불교가 전파되는 과정에서 전해졌을 것으로 짐작되고 있다. 양평 용문사 은행나무(천연기념물 제 30호)의 수령이 1,100년으로 알려진 것을 고려할 때, 최소 1,100년 전에 이미 은행나무가 우리나라에 도입된 것으로 보이며, 우리나라에 불교가 전파된 시기가 4세기경임을 고려하면 아마도 이 시기부터 은행나무가 도입되었을 것으로 추정될 수 있을 것이다(Soh and Yoon, 2011; Park, 2009; Park et al., 2010).

Gong et al.(2008)과 Zhao et al.(2010)은 우리나라, 중국 그리고 일본에 분포하는 은행나무 노거수를 대상으로 cpDNA의 *trnK*와 *trnS-trnG* 영역의 염기서열을 분석한 결과 중국 은행나무에서 가장 많은 8개의 haplotype을 확인하였으며, 우리나라와 일본 은행나무에서는 각각 1개와 2개의 haplotype이 분포하는 것으로 보고하였다. 이는 자연 분포하는 식물종의 분포 중심지에서 유전다양성이 높게 나타나는 점과 은행나무 엽록체 DNA가 종자를 통한 모계 유전양상을 나타내는 점을 고려할 때 우리나라와 일본의 은행나무는 중국으로부터 빈도가 높은 특정 haplotype을 갖는 개체들이 제한적으로 도입되어 증식되었다는 것을 의미한다(Gong et al., 2008; Zhao et al., 2010). 이러한 경우 도입 과정에서 은행나무가 자연 분포하는 중국과 비교하여 제한된 유전자 풀을 보유한 소수의 개체들이 도입됨으로써 근연 개체간의 교배로 인하여 이형접합도가 감소할 것으로 예상할 수 있다. 그럼에도 불구하고 천연기념물 은행나무에서 관찰된 이형접합도는 중

국 집단과 비교하여 유사한 수준이었으며(Table 2), 은행나무의 생활사적인 특징에 해당하는 이형접합도보다 다소 높거나 유사한 값을 나타내었다(Nybom, 2004). 이는 기본적으로 은행나무가 암나무와 수나무가 별개의 개체로 존재하는 자웅이주 식물로 모든 개체가 타가수정을 하기 때문인 것으로 추측될 수 있다(Zhao et al., 2010). 또한 본 연구에서 분석된 핵 DNA의 microsatellite 영역이 반수체인 엽록체 DNA 보다 돌연변이율이 높은 특성에 기인할 수 있으며(Lee et al., 2015), 초기 도입과정에서 엽록체 DNA와 달리 핵 DNA의 충분한 유전자 풀을 보유한 다수의 개체들이 도입되었거나, 오랜 기간 동안 유전적으로 다양한 개체들이 반복적으로 도입되었을 가능성을 배제할 수 없는 결과로 사료된다.

한편, 은행나무 천연기념물의 수령이 약 400~1,100년으로 추정되는데(Lee, 2006), 이는 각각의 천연기념물 은행나무의 식재 시기가 다양한 것을 의미한다. 이러한 오랜 시간 동안 초기 도입된 은행나무로부터 세대에 걸쳐 증식된 개체들이 마을, 향교, 사찰 등에 다양하게 식재되고 반복적으로 증식되었을 것으로 추측될 수 있다. 도입된 은행나무에서 타가교배에 의한 개체들이 증식되고 사람에게 의하여 원거리간의 인위적인 이동과 식재가 반복되면서 유전적으로 이질적인 개체들의 혼입에 의하여 높은 이형접합도가 유지된 결과로 사료된다.

## 2. 천연기념물 은행나무 개체식별 및 유연관계

23개체의 천연기념물 은행나무에서 분석된 8개의 microsatellite 마커의 평균 다형성 정보량(PIC)은 Gb43 마커에서 0.339로 가장 낮게 나타났고, Ging06 마커에서 0.847로 가장 높게 나타났으며, 평균 0.677로 나타났다 (Table 3). 일반적으로 다형성 정보량의 값이 0.440~

Table 3. Information on individual identification estimated by eight microsatellite markers in national monument *G. biloba*.

| Marker        | PIC          | PI by locus                              | CPI by locus combination                 | CPD by locus combination                 |
|---------------|--------------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| <b>Ging06</b> | <b>0.847</b> | <b><math>3.343 \times 10^{-2}</math></b> | <b><math>3.343 \times 10^{-2}</math></b> | <b><math>9.666 \times 10^{-1}</math></b> |
| <b>Gb60</b>   | <b>0.826</b> | <b><math>4.284 \times 10^{-2}</math></b> | <b><math>1.432 \times 10^{-3}</math></b> | <b><math>9.986 \times 10^{-1}</math></b> |
| <b>Gb61</b>   | <b>0.796</b> | <b><math>5.617 \times 10^{-2}</math></b> | <b><math>8.045 \times 10^{-5}</math></b> | <b><math>9.999 \times 10^{-1}</math></b> |
| Ging11        | 0.755        | $7.578 \times 10^{-2}$                   | $6.096 \times 10^{-6}$                   | $9.999 \times 10^{-1}$                   |
| Gb65          | 0.733        | $9.068 \times 10^{-2}$                   | $5.528 \times 10^{-7}$                   | $9.999 \times 10^{-1}$                   |
| Gb48          | 0.680        | $1.160 \times 10^{-1}$                   | $6.410 \times 10^{-8}$                   | $9.999 \times 10^{-1}$                   |
| Ging04        | 0.436        | $3.143 \times 10^{-1}$                   | $2.015 \times 10^{-8}$                   | $9.999 \times 10^{-1}$                   |
| Gb43          | 0.339        | $4.290 \times 10^{-1}$                   | $8.644 \times 10^{-9}$                   | $9.999 \times 10^{-1}$                   |

PIC, polymorphism information content; PI, probability of identity; PD, power of discrimination; CPI, cumulated probability of identity; CPD, cumulated probability of discrimination. Marker lists are listed in descending order by PIC value.

0.700이면 대립유전자의 유전양상을 추적하기 위한 적절한 수준의 다형성 정보를 갖는 것을 고려할 때 (Hildebrand et al., 1992), 본 연구에서 분석된 마커들은 국내 천연기념물 은행나무의 개체식별에 충분한 다형성을 제공하는 것을 의미한다.

임의의 두 개체 간 동일한 유전형이 나타날 확률을 의미하는 개체인식력(PI, Probability of Identity)은 Ging06 마커에서  $3.34 \times 10^{-2}$ 으로 가장 낮은 값을 나타내었으며, Gb43 마커에서  $4.29 \times 10^{-1}$ 으로 가장 높은 값을 나타내었고, 전반적으로 마커의 다형성 정보량이 높을수록 개체인식력 또한 높게 나타났다(Table 3). 8개의 마커를 모두 이용하는 경우 천연기념물 은행나무에서 누적된 개체인식력은  $8.644 \times 10^{-9}$ 에 불과하여 임의의 두 개체 간 동일한 유전형이 나타날 확률이 극히 낮은 것으로 확인되었다. 이는 천연기념물 은행나무에서 8개 마커의 누적된 개체식별력이 99.9999% 이상으로 모든 천연기념물 은행나무 개체를 식별할 수 있다는 것을 의미한다. 실제 분석된 개체들의 유전형을 비교한 결과에서도 모든 개체가 고유의 유전형으로 식별되는 것을 확인하였다.

천연기념물 은행나무 개체의 유전형이 일반 은행나무와 식별되는지 여부를 확인하기 위하여 가로수로 식재된 일반 은행나무 13개체를 포함하여, 천연기념물 개체에서 분석된 다형성 정보량과 개체식별력을 고려하지 않고 4개의 마커(Gb61, Gb60, Gb48, Gb43)를 임의로 선발하여 분석한 결과 유전형을 기준으로 천연기념물을 포함한 총 36개체의 은행나무가 모두 식별이 가능하였다. 이 분석에서 4개 마커의 누적 개체인식력은  $6.442 \times 10^{-5}$ 으로 나타났으며, 개체식별력은 99.9%로 계산되었다(Table 4). 이는 천연기념물만을 대상으로 분석한 결과에서 PIC 값과 개체인식력이 가장 높은 Ging06, Gb60, Gb61 마커에서 누적된 개체인식력( $8.045 \times 10^{-5}$ )에 상당하는 수준이다(Table 3). 결론적으로 초기 분석된 8개의 마커를 모두 분석하지 않더라도 천연기념물 은행나무 개체를 일반 은행나무와

비교하여 독특한 유전형으로 식별할 수 있을 뿐만 아니라 일반 은행나무의 개체 식별도 가능하다는 것을 의미할 수 있다(Cho et al., 2007). 따라서 산술적으로 8개의 마커 중 천연기념물 은행나무를 대상으로 계산된 PIC 값과 개체인식력에서 상위에 있는 3개의 마커(Ging06, Gb60, Gb61)에서 누적된 개체인식력이  $8.045 \times 10^{-5}$ 이고, 개체식별력이 99.99%로 계산되므로(Table 3), 국내 천연기념물 은행나무 개체를 식별하는 경우 이들 3개의 마커를 우선적으로 분석하더라도 모든 개체를 충분히 식별할 수 있을 것이며, 일반 은행나무 개체로부터 식별이 가능할 뿐만 아니라 일반 은행나무 개체도 충분히 식별할 수 있을 것으로 예상된다(Waits et al., 2001).

유전적 비유사도에 근거한 UPGMA 계통수를 작성하여 천연기념물 은행나무 개체간 유전적 유연관계를 분석한 결과 지리적 위치에 따른 유전적 유연관계는 관찰되지 않았으며(Figure 1), Mantel 검정에서도 지리적 거리와 유전적 거리 간 상관성이 나타나지 않았다( $R^2=0.034$ ). 이러한 결과는 전술한 바와 같이 은행나무가 중국에서 도입된 수종으로 우리나라에는 오래 전부터 인위적으로 식재되어 왔으며, 사람들의 이주와 경제적 목적에 따라 증식되어 처음 도입된 곳 이외의 다양한 지역으로 퍼져나갔을 가능성이 높기 때문인 것으로 사료된다. 한편, 청도 지역에 매우 인접하여 위치하고 있는 지정번호 301호와 402호 및 의령지역의 302호 은행나무가 유전적으로 근연관계를 나타내었다. 또한, 지정번호 59호의 서울 문묘 은행나무의 경우 천연기념물 보호 펜스 내에 두 그루의 노거수가 존재하는데 이들 두 개체에서도 비교적 근연관계가 관찰되었다. 이는 상기 은행나무들이 식재될 당시 공통의 모수에서 증식된 근연(혈연)관계의 개체들이 동일 장소 또는 인접 지역에 식재되었거나, 전술한 바와 같이 인위적인 이주와 식재 과정에서 우연히 유전적으로 유사한 개체가 식재된 결과로 사료된다.

**Table 4. Information on individual identification estimated by randomly selected four microsatellite markers in national monument *G. biloba*.**

| Marker | PI by locus            | CPI by locus combination | CPD by locus combination |
|--------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Gb60   | $5.077 \times 10^{-2}$ | $5.077 \times 10^{-2}$   | $9.492 \times 10^{-1}$   |
| Gb61   | $4.727 \times 10^{-2}$ | $2.400 \times 10^{-3}$   | $9.998 \times 10^{-1}$   |
| Gb48   | $1.091 \times 10^{-1}$ | $2.618 \times 10^{-4}$   | $9.999 \times 10^{-1}$   |
| Gb43   | $2.460 \times 10^{-1}$ | $6.442 \times 10^{-5}$   | $9.999 \times 10^{-1}$   |

PI, probability of identity; PD, power of discrimination; CPI, cumulated probability of identity; CPD, cumulated probability of discrimination.

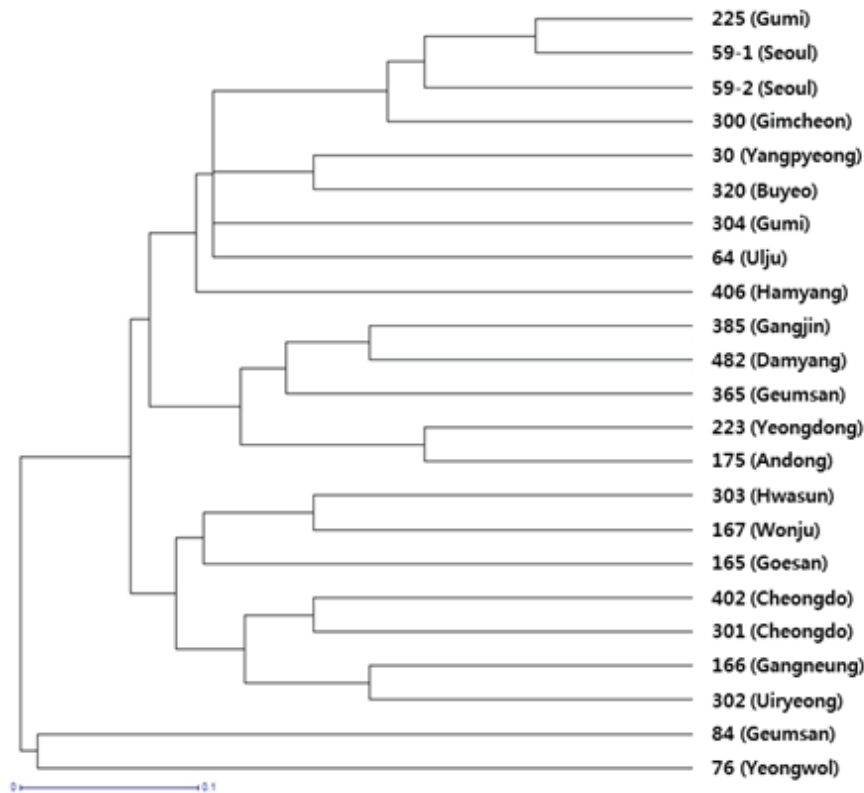


Figure 1. UPGMA tree based on genetic dissimilarity among twenty-three natural monument Ginkgo trees. Designation numbers are in right side of the tree with locations.

## 결론

은행나무뿐만 아니라 대부분의 천연기념물 노거수는 독특한 생물학적 특성과 역사적, 문화적으로 매우 중요한 가치를 지니고 있다. 나무의 수명이 추정되는 바로 최대 몇 백에서 천 년 이상의 시간을 생존할 수 있는 것으로 알려져 있지만, 살아 있는 생명체로서 언젠가 소실될 수밖에 없는 것이 현실이다. 본 연구에서 분석된 천연기념물 은행나무의 개체식별 정보는 노거수에 대한 생리적, 생태적 측면에서의 보존 방안과는 다른 형태의 보존 연구로서 인식될 필요가 있다. 왜냐하면 생리적, 생태적 연구 또는 물리적 외과 수술 등의 처치를 통한 보존은 현존하는 천연기념물 노거수의 적절한 관리방안을 도출하거나 생명연장을 위한 직접적인 방법이기 때문이다. 그러나 개체식별 정보는 현존하는 천연기념물 노거수에 대하여 고유 유전정보를 이용한 관리와 불가피한 소실에 따른 후계목 육성에 보다 활용도가 높을 것으로 기대된다. 즉 현존하는 노거수의 고유 유전정보를 확보하고 그로부터 증식된 후계목이 유전적으로 천연기념물의 후계목인지 여부를 증명하거나 관리하는 데 활용할 수 있다(KCHA,

2015). 그러한 측면에서 본 연구에서 8개의 microsatellite 마커로 분석된 천연기념물 은행나무 각각의 유전형 정보는 천연기념물 은행나무의 관리와 후계목 육성뿐만 아니라, 은행나무 우수개체 육성과 증식 및 관리에 매우 유용할 것으로 사료된다. 특히 본 연구에서 확인된 각 마커의 개체인식력의 순위에 따라 Ging06, Gb60, Gb61 마커를 우선적으로 적용하고, 유전형이 동일하여 분석이 불가능한 경우 추가적인 분석을 실시함으로써 분석 효율을 향상시킬 수 있다.

## References

- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314.
- Chang, C.S., Kim, H. and Chang, K.S. 2011. Illustrated Encyclopedia of Fauna and Flora of Korea. 43. Woody plants. Design Post. Gyeonggi-do. Korea. pp. 511.
- Cho, B.W., Jung, J.H., Kim, S.U., Kim, H.S., Lee, H.G., Jo, G.J. and Song, K.D. 2007. Establishment of genetic

- characteristics and individual identification system using microsatellite loci in Jeju native horse. *Journal of Life Science* 17: 1441-1446.
- Echenard, V., Lefort, F., Calmin, G., Perroulaz, R. and Belhagri, L. 2008. A new and improved automated technology for early sex determination of *Ginkgo biloba*. *Arboriculture and Urban Forestry* 34(5): 300-307.
- Go, G.H. 2010. Our trees that we should protect. 3. *Ginkgo* trees. Dasan Books. Seoul, Korea. pp. 161.
- Gong, W., Zeng, Z., Chen, Y.Y., Chen, C., Qiu, Y.X. and Fu, C.X. 2008. Glacial refugia of *Ginkgo biloba* and human impact on its genetic diversity: evidence from chloroplast DNA. *Journal of Integrative Plant Biology* 50(3): 368-374.
- Hildebrand, W.H., Madrigal, J.A., Little, A.M. and Parham, P. 1992. HLA-Bw22: a family of molecules with identity to HLA-B7 in the alpha 1-helix. *Journal of Immunology* 148(4): 1155-1162.
- Hong, Y.P., Cho, K.J., Hong, K.N. and Shin, E.M. 2001. Diversity of I-SSR variants in *Ginkgo biloba* L. planted in 6 regions of Korea. *Journal of Korean Forest Society* 90(2): 169-175.
- Hong, Y.P., Kim, Y.M., Ahn, J.Y., Yang, B.H. and Hur, S.D. 2009. DNA fingerprinting of old big trees of natural monument. pp. 230-231 In: Korean Forest Society. Proceedings of Korean Forest Society. Dongguk University. Seoul, Republic of Korea.
- Jacobs, B.P. and Browner, W.S. 2000. *Ginkgo biloba*: a living fossil. *The American Journal of Medicine* 108: 341-342.
- Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R. and Dhawan, A.K. 2010. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177: 309-334.
- Kang, K.H., Chong, Y.J. and Kim, H.N. 1999. The genetic relationship of *Zelkova serrata* registered the natural monument using RAPD markers. *Korean Journal of Environmental Biology* 17(1): 89-94.
- Kim, H.J. 2011. Growth conditions of natural monument old big trees in Gyeongsangnamdo, Korea. *Journal of Korean Environmental Restoration Technology* 14: 103-112.
- Kim, H.J. 2012a. The status and the characteristic of natural resources in UNESCO sacred natural site, South Korea. *Journal of Korea Contents Association* 12: 492-501.
- Kim, H.J. 2012b. Soil status and management of natural monument plants: focusing on the big old tree of Chungnambuk. *Journal of Korean Institute of Traditional Landscape Architecture* 10: 41-50.
- Kim, Y.M., Hong, K.N., Park, Y.J., Hong, Y. P. and Park, J.I. 2015. Estimating the parameters of pollen flow and mating system in *Pinus densiflora* Population in Buan, South Korea, using Microsatellite Markers. *Korean Journal of Plant Resources* 28(1): 101-110.
- KCHA (Korea Cultural Heritage Administration). 2011. A study on genetic diversity in Korean natural monuments long-tailed goral (*Naemorhedus caudatus*). pp. 30.
- KCHA (Korea Cultural Heritage Administration). 2015. A study on nurturing progeny of Korean natural monuments big old trees. pp. 246.
- KCHA (Korea Cultural Heritage Administration). 2016. A study on drawing up measures for conservation and management of Korean natural monuments fauna species. pp. 238.
- Lee, J.H., Han, S.Y., Choi, K. and Cho, H.J. 2000. Measuring preservation value of oriental arber forest in Taegu City. *Journal of Forest Recreation* 4: 55-66.
- Lee, J.W., Baek, S.H., Hong, K.N., Hong, Y.P., Lee, S.W. and Ahn, J.Y. 2015. Development and characterization of chloroplast simple sequence repeat markers in *Pinus koraiensis*. *Journal of Korean Forest Society* 104(4): 549-557.
- Lee, K.J. 2006. Natural monument in Korea. Big old trees. Academy. Seoul, Korea. pp. 390.
- Lee, K.M., Kim, Y.Y. and Chung, J.M. 2009. Genetic diversity of natural populations of *Populus maximowiczii* Henry in Korea based on microsatellite marker analysis. *Proceeding of Journal of Korea Forest Society* pp. 259-260.
- Lee, K.M., Kim, Y.Y. and Jung, O.H. 2011. Genetic variation in populations of *Populus davidiana* Dode based on microsatellite marker analysis. *Genes and Genomics* 33: 163-171.
- Liu, K. and Muse, S.V. 2005. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21(9): 2128-2129.
- Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in Plants. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155.
- Park, S.J. 2009. Exploration of cultural trees in Korea. Wangeuiseojae. Seoul, pp. 411.
- Park, W.K., Oh, J.A., Kim, Y.J., Kim, S.K., Park, S.Y., Son, B.H. and Choi, S.I. 2010. Species of wooden buddhist statues of the late Joseon dynasty in Jeollado. South Korea. *Korea Furniture Society* 21(1): 72-82.
- Peakall, R. and Smouse, P.E. 2006. GeneAlex 6: genetic analysis in Excel. population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Perrier, X., Flori, A. and Bonnot, F. 2003. Data analysis methods. pp. 43-76. In: Hamon P., Seguin, M., Perrier, X. and Glaszmann, J.C. (ed). Genetic diversity of cultivated tropical plants. Enfield Science Publishers. Montpellier. France.

- Shen, L., Chen, X.Y., Zhang, X., Li, Y.Y., Fu, C.X. and Qiu, Y.X. 2005. Genetic variation of *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae) based on cpDNA PCR-RFLPs: inference of glacial refugia. *Heredity* 94: 396-401.
- Soh, W.Y. and Yoon, S. 2011. Science, culture and mystery of ginkgo. S-wave Science. Seoul, Republic of Korea. pp. 204.
- Son, J.W., Shin, J.H. and Lee, J.J. 2016. An analysis on vitality status of big old trees preserved as natural monuments based on artificial management. *Korean Journal of Environment and Ecology* 30(3): 415-422.
- Varshney, R.K., Graner, A. and Sorrells, M.E. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *TRENDS in Biotechnology* 23: 48-55.
- Yan, X.F., Lian, C.L. and Hogetsu, T. 2006. Development of microsatellite markers in ginkgo (*Ginkgo biloba* L.). *Molecular Ecology Notes* 6: 301-302.
- Yan, X.L., Chen, Y.Y., Guan, B.C. and Fu, C.X. 2009. Eleven novel microsatellite markers developed from the living fossil *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae). *Conservation Genetics* 10: 1277-1279.
- Yoo, M.H., Kim, Y.S., Rho, J.R. and Kim, J.T. 2008. Phylogenetic study of the Korean goral by mitochondrial DNA cytochrome b gene sequence analysis. *Laboratory Animal Research* 24: 33-37.
- Waits, L.P., Luikart, G. and Taberlet, P. 2001. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. *Molecular Ecology* 10: 249-256.
- Zhao, Y., Paule, J., Fu, C. and Koch, M.A. 2010. Out of China: distribution history of *Ginkgo biloba* L. *TAXON* 59(2): 495-504.

---

(Received: September 22, 2017; Accepted: December 6, 2017)