한국에서 수집된 돌배나무의 유전적 다양성

김문섭¹ · 김세현¹ · 한진규¹ · 송정호¹ · 김혜수¹ · 김도훈² · 권용삼^{2*}

¹국립산림과학원 산림유전자원부, ²동아대학교 생명자원과학대학 유전공학과

Genetic Diversity of Wild Pear Accessions Collected in Korea

Moon-Sup Kim¹, Sea-Hyun Kim¹, Jin-Gyu Han¹, Jeong-Ho Song¹, Hyeu-Soo Kim¹,
Do-Hoon Kim², and Yong-Sham Kwon^{2*}

¹Department of Forest Genetic Resources, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-847, Korea

²Department of Genetic Engineering, College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University,
Busan 604-714, Korea

Abstract : The objective of this study was carried out to assess genetic diversity of Korean local accessions of wild pear using morphological traits and microsatellite markers. Assessment of 14 phenotypic traits showed high variation among wild pear accessions. These parameters were not applicable genetic diversity analysis of wild pear collection due to quantitatively inherit and their expression is affected by environmental factors. Microsatellite markers were used to evaluate the genetic similarity of 62 accessions. Among 50 tested SSR markers, 16 primer pairs were selected to profile genetic diversity on the basis of high level polymorphism. These microsatellite markers showed 1 or 2 discrete amplified fragment for all of the accessions. The sixteen microsatellite loci amplified 278 alleles, with 10 to 27 alleles (average 17.385) per locus. The mean of observed heterozygosity and polymorphism information content were 0.776 and 0.836, respectively. The Jaccard's similarity coefficient ranged from 0.09 to 1.00. Two major groups were produced from all the accessions by UPGMA cluster analysis. Fifty five accessions could be discriminated except for 2 pairs. These results would be provided useful information about valuable genetic resources though assessment of genetic diversity and relationship in local pear accessions.

Keywords : Genetic polymorphism, Germplasm, Molecular marker, *Pyrus pyrifolia*, Simple sequence repeat

서 언

돌배나무(*Pyrus pyrifolia*)는 장미과에 속하는 목본성 다년생 식물로 우리나라, 일본, 중국 등 동북아시아 지역에 주로 자생하고 있다. 우리나라의 경우 전국 산간지역에 주로 분포하며 내한성이 강하고 순백색의 꽃이 화려하기 때문에 도시 공원의 경관수로 활용 가치가 크고, 열매는 한약재료로 활용도가 증가되고 있는 수종의 하나이다. 배나무는 유럽, 미국, 아프리카에서 재배되는 서양배나무(*P. communis* L.), 중국에서 유래된 북방형 돌배나무(*P. bretschneideri* Rehd., *P. ussuriensis* Maxim.), 우리나라와 일본에서 자생하고 재배되고 있는 남방

형 돌배나무(*P. pyrifolia* Nakai) 로 크게 나눌 수 있다(Bell, 1990). 우리나라에는 배나무 속 10종, 17변종, 10품종의 야생 또는 재배종이 분포하고 있으며, 일본의 남방형 돌배나무의 경우 중국과 한반도가 기원인 것으로 알려지고 있다(Shimamura 1998).

유전자원의 특성 평가는 주로 형태적 형질 조사를 활용하고 있는데 돌배나무와 같은 목본류 식물은 수령에 따른 잎, 꽃, 과실 등과 같은 형질에서 오차가 발생할 가능성이 있기 때문에 수집 유전자원의 정확한 특성 평가는 단순하지 않다. 또한, 다수의 유전자가 관여하는 양적 형질은 환경에 의해 영향을 받기 때문에 조사 형질의 연차간 변이 등과 같은 문제점을 내포하고 있으며, 형태적으로 유사한 형질을 가진 유전자원 및 품종을 구별하기가 쉽지 않다. 이러한 문제점을 해결할 수 있는 방법이 분자표지 인자에 의한 유전자원의 특성 평가 방법이다. 분자표지에 의한 배 유전자원에 대한 특성 방법은

*Corresponding author (E-mail: yskwon3@dau.ac.kr, Tel: +82-51-200-7521, Fax: +82-51-200-7505)

(Received on February 12, 2015. Revised on February 18, 2015.
Accepted on March 2, 2015.)

Inter-simple sequence repeat (ISSR) (Zhu et al. 2009), Amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Cho et al. 2009), microsatellite (Miranda et al. 2010, Rugienius et al. 2013, Sehic et al. 2012) 마커가 활용되고 있다. 최근에는 반복 재현성이 높고 유전자원내에 다형성 정도가 높은 microsatellite 방법을 주로 활용하고 있다.

Microsatellite 마커를 이용한 배나무에 대한 연구는 일본에서 가장 활발하게 이루어져 있는데 일본배나무와 서양배나무의 중간 교잡을 통해 양성된 집단을 활용한 유전자 지도 작성(Yamamoto et al. 2002), Simple sequence repeat (SSR) 마커를 이용한 품종 식별(Kimura et al. 2002), 배나무 과일과 가공품(통조림, 주스, 건조된 과일)에 대한 DNA 분석 방법 개발(Yamamoto et al. 2006), 동양배나무에서 유래된 Expressed sequence tag (EST)로 부터 새로운 SSR 마커의 개발(Nishitani et al. 2009) 등과 같은 연구 결과가 보고되고 있다. 배나무 유전자원 특성 평가에 microsatellite 마커를 사용한 예는 중국(Bao et al. 2007), 스페인(Miranda et al. 2010), 폴란드(Wolko et al. 2010), 스웨덴(Sehic et al. 2012) 등과 같은 국가에서 자국에서 수집된 유전자원 및 품종을 대상으로 8~17개의 마커를 사용하였다는 점이다. 우리나라에서는 농촌진흥청 국립원예특작과학원에서 AFLP 마커를 활용하여 일본, 중국, 미국 등에서 수집된 배나무 유전자원의 다양성 분석에 대한 연구결과만 보고되고 있다(Cho et al. 2009). 그러나 AFLP 마커 보다 반복 재현성이 높은 microsatellite 마커를 활용하여 국내에 자생하고 있는 돌배나무를 대상으로 유전적 다양성 분석에 활용된 연구 결과는 거의 없는 실정이며, 이러한 연구결과는 국내 배 품종 육성에 돌배나무 유전자원의 활용 가능성에 대한 기초 자료로 매우 유용하게 사용되리라 사료된다.

따라서 본 연구에서는 국내 전국 각지에서 수집된 돌배나무의 형태적 특성 조사 및 microsatellite 마커를 이용한 유전적 다양성 분석 등에 대한 일련의 연구를 수행하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

분석재료 및 형태적 특성 조사

본 연구에서는 국립산림과학원 수집, 보존되고 있는 시험림에서 돌배나무 62점을 공시하였다(Table 1). 공시 수집 개체 중에서 특성 조사가 가능하였던 24점에 대하여 수집 개체

당 5반복으로 하여 6개의 화기 관련 특성(과지당 꽃 수, 자방과 수술의 길이, 악통 길이와 직경, 화서 길이), 3개의 잎 특성(잎의 길이와 폭 및 엽병 길이), 5개의 과실 특성(과실 길이와 폭, 과병 길이, 과실무게, 당도)을 조사하였다.

Microsatellite 분석

공시 수집종의 잎 조직을 액체질소를 이용하여 마쇄한 다음 NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel Cat. 740 770.250, Germany) 키트를 이용하여 게놈 DNA를 분리 하였다. 추출된 DNA는 1.5% 아가로스젤에서 전기 영동하여 DNA 농도를 확인한 후 μL 당 30 ng의 농도로 희석하여 PCR 분석에 이용하였다. 돌배나무의 특성 평가에 활용된 microsatellite 마커는 염색체상 위치, 반복염기서열 정도 등을 고려하여 50개를 선정하여(Bao et al. 2007, Kimura et al. 2002, Nishitani et al. 2009, Sehic et al. 2012, Wolko et al. 2010, Yamamoto et al. 2002) 프라이머의 정방향에 FAM, VIC, NED, PET (Applied Biosystem, USA)으로 형광 표지한 다음 이를 PCR에 이용하였다. PCR 반응은 게놈 DNA 30 ng, 0.1 μM 의 SSR primer, 2.0 μL dNTP mixture (2.5 mM), Taq polymerase 1.0 U, 2.5 μL 의 10 $\times$ PCR buffer (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.0 mM MgCl_2)에 초순수를 첨가하여 전체 부피를 30 μL 로 조절하였다. PCR (C1000, BioRad, USA) 증폭은 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 denature 한 후, 55 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 annealing, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 45초간 extension을 40cycle 수행하였다. PCR 증폭 산물 1.0 μL 와 탈이온된 포름아마이드(deionized formamide) 10 μL , size marker (LIZ500 size standard) 0.25 μL 를 혼합하고 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분간 변성시킨 다음 자동염기서열 분석기(Genetic Analyzer 3130XL, Applied Biosystem, USA)를 활용하여 전기 영동 하였다. Microsatellite 마커에 의해 증폭된 대립 유전자의 크기는 GeneMapper (version 3.7) 컴퓨터 프로그램(Applied Biosystem, USA)을 이용하여 분석하였다.

유전적 다양성 분석

Microsatellite 마커의 다형성 정도를 조사하기 위하여 대립 유전자의 수, 대립 유전자의 출현빈도, 기대된 이형접합성, 관찰된 이형접합성 및 Polymorphism information content (PIC) 값은 PowerMarker (version 3.25) (Liu & Muse 2005)를 이용하여 산출하였다. NTSYSpc (version 2.10b) (Rohlf 2000) 컴퓨터 프로그램을 이용하여 Jaccard 방법에 준하여 유전적 유사도 값을 계산한 다음 unweighted pair-group method with

Table 1. Pear accessions assayed for genetic characterization using microsatellite markers.

No.	Accession name	Collection site	No.	Accession name	Collection site
1	Chiak 1	Gangwon-do Wonju	32	Bongwha 2	Gyeongsangbuk-do Bongwha
2	Chiak 2	Gangwon-do Wonju	33	Gimcheon	Gyeongsangbuk-do Gimcheon
3	Chiak 3	Gangwon-do Wonju	34	Mungyeong	Gyeongsangbuk-do Mungyeong
4	Chiak 4	Gangwon-do Wonju	35	Uljin	Gyeongsangbuk-do Uljin
5	Chiak 5	Gangwon-do Wonju	36	Yeongyang	Gyeongsangbuk-do Yeongyang
6	Chiak 6	Gangwon-do Wonju	37	Jinsangeochi 1	Jeollanam-do Gwangyang
7	Dongmyeon 1	Gangwon-do Jeongseon	38	Jinsangeochi 2	Jeollanam-do Gwangyang
8	Dongmyeon 2	Gangwon-do Jeongseon	39	Jinsangeochi 3	Jeollanam-do Gwangyang
9	Nammyeon 1	Gangwon-do Jeongseon	40	Jinsangeochi 4	Jeollanam-do Gwangyang
10	Nammyeon 2	Gangwon-do Jeongseon	41	Jinsangeochi 5	Jeollanam-do Gwangyang
11	Nammyeon 3	Gangwon-do Jeongseon	42	Okgok 1	Jeollanam-do Gwangyang
12	Nammyeon 4	Gangwon-do Jeongseon	43	Okgok 2	Jeollanam-do Gwangyang
13	Imgye 1	Gangwon-do Jeongseon	44	Okgok 3	Jeollanam-do Gwangyang
14	Imgye 2	Gangwon-do Jeongseon	45	Gokseong 1	Jeollanam-do Gokseong
15	Imgye 3	Gangwon-do Jeongseon	46	Gokseong 2	Jeollanam-do Gokseong
16	Imgye 4	Gangwon-do Jeongseon	47	Gokseong 3	Jeollanam-do Gokseong
17	Imgye 5	Gangwon-do Jeongseon	48	Piagol 1	Jeollanam-do Gurye
18	ImgyeN1	Gangwon-do Jeongseon	49	Piagol 2	Jeollanam-do Gurye
19	ImgyeN2	Gangwon-do Jeongseon	50	Piagol 3	Jeollanam-do Gurye
20	Soksa 1	Gangwon-do Pyeongchang	51	Wando	Jeollanam-do Wando
21	Soksa 2	Gangwon-do Pyeongchang	52	Okgok-supyeong	Jeollanam-do Gwangyang
22	Soksa 3	Gangwon-do Pyeongchang	53	Okryong	Jeollanam-do Gwangyang
23	Pyeongchang 1	Gangwon-do Pyeongchang	54	Muju	Jeollabuk-do Muju
24	Pyeongchang 2	Gangwon-do Pyeongchang	55	Baekryeonsa	Jeollabuk-do Muju
25	Hoengseong 1	Gangwon-do Hoengseong	56	Cheongsil	Jeollabuk-do Jinan
26	Hoengseong 2	Gangwon-do Hoengseong	57	Namyangju 1	Gyeonggi-do Namyangju
27	Hoengseong 3	Gangwon-do Hoengseong	58	Namyangju 2	Gyeonggi-do Namyangju
28	Gangreung	Gangwon-do Gangreung	59	Gwanggyo	Gyeonggi-do Suwon
29	Taebaek	Gangwon-do Taebaek	60	Pocheon	Gyeonggi-do Pocheon
30	Hongcheon	Gangwon-do Taebaek	61	Cheongseori	Rural development administration
31	Bongwha 1	Gyeongsangbuk-do Bongwha	62	Yeongmokri	Rural development administration

arithmetical average (UPGMA) (Sneath & Sokal 1973) 방법으로 집괴 분석하고 계통도를 작성한 다음 수집종별 유전적 다양성 및 유연 관계를 비교 분석하였다.

결과 및 고찰

형태적 특성 조사

국내에서 수집된 돌배나무 유전자원 62점 중 형태적 특성 조사가 가능하였던 24점에 대하여 화기, 잎, 과실에 대한 14

가지의 형태적 특성을 조사한 바(Table 2), 자방의 길이는 ‘치악 4’가 6.27 mm로 가장 짧았고 ‘임계 3’이 11.40 mm로 가장 길었으며, 수술 길이의 경우 수집 종에 따라 4.82~11.24 mm까지 다양한 변이를 나타냈다. 잎의 길이는 ‘동면 1’과 ‘황성 1’이 99 mm로 짧은 양상을 보였으며, 나머지 수집개체는 100.45~158.07 mm까지 큰 차이를 나타냈다. 돌배나무의 조사형질 중에서 가장 중요한 것으로 판단되는 과실의 무게는 수집 개체에 따라서 최소 13 g에서 254 g까지 큰 변이 양상을 나타냈다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 돌배나무의 형

태적 특성은 수집된 지역에 따라 다양한 형태적 특성 차이를 나타내는 것으로 분석되었으나, 본 연구에서 조사된 모든 형질이 환경 조건에 따라 다양한 변이를 나타내는 양적 형질이기 때문에 이를 이용하여 돌배 수집 종의 유전적 유연관계를 판단하기 어려울 것으로 사료되었다. Rugienius et al. (2013)

에 따르면 자연상태에서 자생하고 있는 배나무는 높은 이형접합성을 가지고 있어 형태적 특성 조사를 통한 다양성 평가는 정확하지 않기 때문에 분자표지에 의해 이를 해결해야 한다고 지적한 바 있다.

Table 2. Morphological characteristics of 24 pear accessions collected in Korea.

Germplasms	No. of flower per inflorescence	Length of ovary (mm)	Length of anther (mm)	Length of calyx tube (mm)	Diameter of calyx tube (mm)	Length of inflorescence (mm)	Length of leaf blade (mm)	Width of leaf blade (mm)	Length of petiole (mm)	Length of fruit (mm)	Diameter of fruit (mm)	Length of fruit stalk (mm)	Weight of fruit (g)	Sugar content (Brix)
Chiak 4	5.71 ± 0.76 ²	6.27 ± 0.86	4.82 ± 0.44	2.43 ± 0.18	2.54 ± 0.16	26.07 ± 2.05	100.45 ± 9.94	59.49 ± 4.46	20.45 ± 5.81	40.35 ± 4.59	32.65 ± 3.72	21.95 ± 6.23	31.18 ± 9.05	13.01 ± 3.42
Dongmyeon 1	6.00 ± 1.00	9.57 ± 1.25	6.94 ± 0.79	3.05 ± 0.48	2.79 ± 0.43	28.47 ± 1.93	99.43 ± 10.13	61.75 ± 5.47	20.38 ± 3.89	35.57 ± 1.78	30.58 ± 1.24	30.83 ± 8.95	24.80 ± 4.73	13.64 ± 1.10
Nammyeon 1	7.57 ± 0.98	10.61 ± 0.99	8.42 ± 0.73	2.98 ± 0.36	3.03 ± 0.32	49.73 ± 3.81	141.68 ± 10.14	76.39 ± 5.63	20.82 ± 2.21	58.57 ± 4.64	53.66 ± 5.57	38.35 ± 8.54	102.08 ± 5.98	13.73 ± 1.09
Imgye 2	7.33 ± 0.52	10.14 ± 0.66	9.06 ± 0.56	3.02 ± 0.39	2.97 ± 0.27	60.79 ± 3.58	158.07 ± 10.64	70.55 ± 7.47	27.54 ± 5.13	45.55 ± 7.88	49.84 ± 5.03	55.94 ± 6.27	41.60 ± 9.79	11.10 ± 2.76
Imgye 3	6.75 ± 0.46	11.40 ± 0.89	9.67 ± 0.65	3.10 ± 0.15	3.02 ± 0.20	61.21 ± 2.23	154.88 ± 18.73	72.04 ± 7.06	28.60 ± 5.30	56.81 ± 2.56	54.50 ± 5.37	60.17 ± 7.05	91.50 ± 9.19	9.85 ± 1.63
ImgyeN 1	5.50 ± 0.58	9.67 ± 1.73	6.93 ± 0.91	4.25 ± 0.41	4.48 ± 0.28	63.02 ± 5.04	134.11 ± 15.95	61.33 ± 8.09	40.88 ± 8.69	68.46 ± 6.25	61.57 ± 3.36	61.41 ± 4.17	149.25 ± 9.99	8.73 ± 1.07
ImgyeN 2	6.80 ± 1.10	9.67 ± 0.80	6.75 ± 0.61	2.51 ± 0.41	2.99 ± 0.32	38.74 ± 3.03	149.20 ± 10.76	62.48 ± 6.76	45.07 ± 5.76	81.97 ± 6.63	74.54 ± 7.63	27.07 ± 4.78	254.14 ± 9.73	11.36 ± 0.43
Hoengseong 1	10.50 ± 0.58	7.97 ± 0.81	6.71 ± 0.66	2.66 ± 0.27	2.82 ± 0.19	44.48 ± 2.60	99.87 ± 10.99	62.08 ± 5.85	15.83 ± 4.56	31.68 ± 1.80	28.09 ± 1.15	40.21 ± 4.44	17.60 ± 2.70	10.20 ± 1.14
Hoengseong 2	8.17 ± 2.93	8.84 ± 0.74	7.24 ± 1.04	2.50 ± 0.26	2.74 ± 0.27	43.94 ± 4.68	139.21 ± 8.32	78.87 ± 6.98	18.81 ± 2.51	53.23 ± 7.56	46.26 ± 5.88	31.54 ± 8.82	93.60 ± 8.97	11.73 ± 1.61
Jinsangeochi 2	5.25 ± 1.50	10.50 ± 1.05	7.68 ± 0.75	4.73 ± 1.18	4.42 ± 0.81	47.61 ± 3.31	149.37 ± 16.91	81.47 ± 7.06	20.19 ± 6.12	47.95 ± 5.78	42.77 ± 5.63	41.17 ± 7.13	55.70 ± 5.89	9.99 ± 1.16
Jinsangeochi 3	5.20 ± 0.84	8.33 ± 1.56	7.04 ± 0.70	4.04 ± 1.18	3.57 ± 0.89	37.21 ± 3.77	142.60 ± 10.18	76.05 ± 6.51	24.08 ± 3.18	54.28 ± 6.79	49.15 ± 4.11	37.77 ± 6.69	83.40 ± 4.46	9.59 ± 0.80
Jinsangeochi 4	6.25 ± 0.96	8.63 ± 0.83	5.86 ± 0.59	3.76 ± 0.83	3.45 ± 0.67	38.07 ± 3.90	153.78 ± 17.31	67.11 ± 5.77	27.35 ± 4.45	34.28 ± 3.50	36.28 ± 5.63	32.99 ± 5.11	24.10 ± 8.97	10.53 ± 0.77
Jinsangeochi 5	6.00 ± 1.29	10.33 ± 0.62	7.27 ± 0.93	4.68 ± 1.02	4.25 ± 0.84	44.85 ± 4.82	143.50 ± 8.51	80.67 ± 6.58	24.61 ± 2.58	43.95 ± 4.30	42.23 ± 2.86	34.50 ± 3.60	45.20 ± 6.72	9.63 ± 0.26
Okgok 1	4.43 ± 0.98	10.88 ± 0.66	10.17 ± 0.97	3.39 ± 0.45	3.43 ± 0.25	58.66 ± 6.27	136.04 ± 10.74	88.53 ± 8.07	24.52 ± 1.75	44.73 ± 6.91	41.91 ± 3.63	36.29 ± 4.63	45.50 ± 7.63	9.60 ± 0.63
Okgok 2	5.67 ± 0.58	9.51 ± 0.64	7.40 ± 0.67	4.18 ± 0.96	3.63 ± 0.59	39.38 ± 3.41	144.56 ± 10.48	76.30 ± 5.03	24.51 ± 2.55	49.57 ± 5.59	44.69 ± 3.89	35.47 ± 5.31	60.50 ± 8.44	10.00 ± 0.58
Gokseong 1	6.60 ± 0.97	8.78 ± 1.19	6.58 ± 0.94	2.36 ± 0.23	2.54 ± 0.26	48.72 ± 1.51	150.48 ± 17.41	64.58 ± 7.13	19.49 ± 5.40	37.42 ± 4.17	40.13 ± 4.60	39.56 ± 4.35	33.50 ± 3.47	12.71 ± 2.22
Gokseong 2	5.43 ± 0.79	10.08 ± 1.37	7.50 ± 0.68	3.24 ± 0.20	2.88 ± 0.31	39.67 ± 3.50	139.16 ± 10.22	69.24 ± 6.25	18.90 ± 4.65	47.88 ± 4.60	39.68 ± 6.18	76.27 ± 7.63	49.00 ± 7.73	6.87 ± 0.51
Piagol 1	6.67 ± 1.51	9.08 ± 1.82	8.05 ± 1.10	4.03 ± 0.57	4.02 ± 0.68	47.18 ± 7.52	146.71 ± 15.37	63.13 ± 7.75	26.52 ± 5.15	41.70 ± 3.47	43.93 ± 4.09	34.30 ± 7.90	44.30 ± 5.51	10.06 ± 1.52
Piagol 2	5.67 ± 1.15	8.75 ± 1.06	7.90 ± 0.74	2.69 ± 0.46	2.19 ± 0.31	35.15 ± 4.23	128.62 ± 12.58	66.48 ± 8.36	16.46 ± 2.44	28.01 ± 2.22	26.86 ± 1.45	32.60 ± 3.28	13.17 ± 2.64	13.97 ± 2.20
Cheongsil	6.57 ± 0.53	10.41 ± 0.88	11.24 ± 0.97	3.45 ± 0.20	3.07 ± 0.26	42.00 ± 2.67	141.03 ± 10.24	73.99 ± 6.80	21.72 ± 2.84	37.66 ± 2.14	38.46 ± 2.68	37.47 ± 3.37	31.80 ± 6.39	9.63 ± 0.87
Muju	5.50 ± 0.55	8.59 ± 0.74	6.47 ± 0.83	4.69 ± 0.96	3.90 ± 0.86	41.02 ± 2.84	141.64 ± 11.72	75.42 ± 8.67	25.49 ± 6.70	60.95 ± 4.58	58.20 ± 4.15	33.87 ± 7.58	142.55 ± 8.38	7.61 ± 3.51
Wando	6.20 ± 0.79	10.05 ± 0.77	8.90 ± 1.18	3.38 ± 0.79	3.86 ± 0.56	59.66 ± 6.24	142.23 ± 14.87	72.26 ± 7.34	27.26 ± 4.58	39.19 ± 2.45	33.12 ± 2.28	54.57 ± 4.48	31.80 ± 4.94	8.98 ± 0.62
Okgok-supyeong	5.60 ± 0.89	8.03 ± 0.96	7.14 ± 0.65	2.77 ± 0.26	2.73 ± 0.29	39.88 ± 5.73	147.47 ± 17.16	120.43 ± 8.87	26.09 ± 7.56	59.01 ± 8.61	54.39 ± 9.89	57.53 ± 6.52	104.67 ± 8.14	13.27 ± 2.06
Namyangju1	6.00 ± 1.00	7.89 ± 0.61	7.09 ± 0.39	3.40 ± 0.37	3.55 ± 0.38	38.60 ± 2.73	129.64 ± 13.22	70.38 ± 8.38	20.32 ± 2.77	39.69 ± 2.25	37.90 ± 2.95	30.13 ± 2.64	34.10 ± 6.87	12.35 ± 0.78

²Mean ± SD

Microsatellite 분석

돌배나무 수집개체의 유전적 다양성을 분석하기 위하여 일본(Kimura et al. 2002, Yamamoto et al. 2002), 중국(Bao et al. 2007), 폴란드(Wolko et al. 2010), 스웨덴(Sehic et al. 2012)에서 동양배나무, 서양배나무의 유전자원의 특성 평가에 활용된 microsatellite 마커와 일본에서 동양배나무 EST에서 개발된 신규 microsatellite 마커(Nishitani et al. 2009)의

반복염기 서열 및 다형성 정도를 고려하여 최종 50개의 프라이머를 선정하였다. 이들 프라이머와 돌배나무 62점의 genomic DNA와 PCR하고 증폭산물을 자동염기서열분석기를 이용하여 전기영동 하였다. 50개의 프라이머 중에서 34개는 대립유전자의 수가 6개 이하로 적을 뿐만 아니라 PIC 값도 0.3 이하로 낮게 나타나 돌배나무 수집종의 유전적 다양성 분석에 제외하였다. 최종 선정된 16개의 microsatellite 프라이머와 돌배

Table 3. Genetic parameters detected by 16 microsatellite markers in 62 pear accessions.

Microsatellite designation	Primers sequence (5' → 3')	Repeat motif	Product size (bp)	No. of putative alleles	Expected heterozygosity	Observed heterozygosity	PIC value
BGA35	F: PET-AGAGGGAGAAAGGCGATT R: GCTTCATCACCGTCTGCT	(AG)8	121-145	12	0.696	0.387	0.667
BGT23b	F: FAM-CACATTCAAAGATTAAGAT R: ACTCAGCCTTTTTTCCCAC	(TC)18.5	180-248	21	0.899	0.790	0.891
NB103a	F: FAM-CACATTCAAAGATTAAGAT R: ACTCAGCCTTTTTTCCCAC	(AG)31	75-129	20	0.878	0.758	0.868
NH001c	F: NED-AATACTAATCCTTTTTGCTAA R: TCCATTCAATCTGTCTCGGTC	(GA)21	106-144	16	0.868	0.774	0.854
NH004a	F: FAM-AGGATGGGACGAGTTTAGAG R: CCACATCTCTCAACCTACCA	(GA)19	76-119	13	0.764	0.710	0.735
NH005b	F: VIC-TGAGAAGAATTAGCCATGATGA R: TTACTACTTGCGTGCGTTCC	(GA)20	316-361	22	0.893	0.855	0.885
NH007b	F: NED-TACCTTGATGGGAACCTGAAC R: AATAGTAGATTGCAATTACTC	(AG)25	112-149	16	0.891	0.839	0.881
NH009b	F: PET-CCGAGCACTACCATTGA R: CGTCTGTTTACCGCTTCT	(AG)20	134-161	14	0.857	0.867	0.841
ENH036	F: FAM-TCCCTGCCAAACATTTTCTCTAC R: TTCCTGCCCAAGAGGTATCATAA	(CT)17	128-168	10	0.844	0.742	0.827
NH014a	F: VIC-CAAACCTAACCTAAATACC R: TGTTTCATATATTCATCACTC	(GA)17	55-102	17	0.894	0.823	0.885
NH015a	F: NED-TTGTGCCCTTTTTCCTACC R: CTTTGATGTTACCCCTTGCTG	(AG)19	100-144	18	0.879	0.968	0.867
ENH009	F: PET-CCTCAGCCTTGATCATGCAC R: GGAAGTTGTGCTAGCAAAGAAGC	(CT)11.5C (CT)10	135-200	26	0.894	0.823	0.887
ENH026	F: FAM-ACTCCCAATCTGCCTTACAAACA R: GCGTTGAGTGACCTCTTTCATTT	(CT)16.5	136-176	14	0.869	0.807	0.856
ENH029	F: VIC-GGAAGTTGTGCTAGCAAAGAAGC R: GCCTGTTTCCACTTATGCTCACT	(CT)23	169-232	27	0.894	0.823	0.887
ENH032	F: NED-AACTGGAGGGAGCTAAGGAAAATG R: CATCAAAACAAAAGTACCCGAACC	(CT)17	118-144	10	0.677	0.742	0.658
ENH033	F: PET-CCTGAGGTTATTGACCCAAAAGA R: GGTGGATACTCACTCAGTTGGAAA	(TC)15.5	151-211	22	0.899	0.774	0.893
Total				278	13.596	12.419	13.382
Mean				17.375	0.850	0.776	0.836

나무 62개 수집개체에 대한 다형성 정도를 조사한 바(Table 3), microsatellite 프라이머에 따른 대립유전자의 수는 10~27개로 다양하게 나타났으며, 총 278개의 대립유전자가 검출되었고, 마커 당 평균 대립유전자의 수는 17.4개로 나타났다. 한편, 유전자원의 다양성 정도를 나타내는 관찰된 이형접합성과 기대된 이형접합성의 평균 값이 각각 0.776과 0.850으로 높게 나타났고, 공시 수집 개체에 대한 각 마커 별 유전적 다형성 정도를 나타내는 PIC 값도 0.658~0.893까지 높은 범위에 분포하였으며, 평균값도 0.836으로 아주 높은 경향을 보였다. 그리고 16개의 microsatellite 프라이머 가운데 13개가 0.80 이상의 높은 PIC 값을 나타내어 본 연구에서 활용된 microsatellite 마커는 돌배나무 수집 개체의 특성 평가에 충분히 활용될 수 있을 것으로 나타났다.

Microsatellite 마커에 따른 각 대립유전자의 분포 빈도를 조사한 바(Fig. 1), ENH009는 192 bp에서 전체 검출된 대립

유전자 124개중 23.4%인 29개가 검출되었고, ENH033은 161 bp에서 전체 대립유전자의 24.2%가 분포되는 것으로 분석되었으며, 나머지 12개 마커(BGT23b, NB103a, NH001c, NH004a, NH005b, NH007b, NH009b, ENH036, NH014a, NH015a, ENH026, ENH029)의 대립유전자의 분포 빈도도 ENH009와 ENH033과 같이 고르게 분포하는 양상을 나타내었다. 그러나 BGA35와 ENH032의 경우 대립 유전자의 수가 10개 이상이더라도 특정한 위치에서 대립유전자가 50%이상 분포하여 PIC 값이 다른 마커에 비해 낮은 경향을 보였다.

Microsatellite 마커를 이용한 배나무 유전자원의 다형성 평가시 대립유전자의 수, 관찰된 이형접합성, 기대된 이형접합성 및 PIC 값으로 유전적 변이 양상을 비교할 수 있다. 일본의 Kimura et al. (2002)이 서양계와 동양계 배나무 등 다양한 품종을 활용하여 9개의 SSR 마커로 분석하였을 때 평균 대립유전자의 수는 14.8개임을 보고한 이래, 중국의 Bao et

Fig. 1. Histogram depicting the alleles at 2 microsatellite loci, ENH009 (A) and ENH033 (B). Base-pair size (abscissa) and the frequency at each allele (ordinate) detected by 62 pear accessions.

al. (2007)은 6개의 SSR 마커로 중국, 일본, 한국 등에서 수집한 98개의 배나무 유전자원 및 품종을 검정한 결과 평균 28개의 대립 유전자가 검출됨을 보고하였다. 폴란드의 Wolko et al. (2010)도 6개의 유럽형 배나무와 2개의 야생배나무를 19개의 SSR 마커로 분석시 5~11개의 대립유전자가 분석됨을 제시하였다. 본 연구에서도 국내에서 자생하고 있는 돌배나무 수집개체를 16개의 microsatellite 마커로 분석시 대립유전자의 수가 10~27개까지 다양하게 분포하며 평균 대립유전자의 수도 17.4개로 높게 나타나 일본, 중국, 폴란드 등의 연구자에 의해 수행한 연구결과와 유사한 microsatellite 변이양상을 나타내었다. 특정 마커에서 서로 다른 대립유전자를 가지는 관찰된 이형접합성 값은 0.776으로 일본과 중국에서 분석한 결과 보다 다소 높은 값을 나타내었는데, 이러한 연구결과는 우리나라에서 자생하는 돌배나무의 경우 번식 과정에서 자가불화합성 관련 유전자의 활성화 여부와 실생묘 상태의 번식 등과 같은 다양한 요인에 의해 유전적 변이가 발생했기 때문에 나타난 결과라고 사료된다. 한편 본 연구에서 돌배나무 수집개체의 기대된 이형접합성 값이 관찰된 이형접합성 값보다 다소 높게 나타났는데, 이는 돌배나무가 자가불화합성

에 의해 타가수정을 주로 하지만 극히 낮은 빈도로 자가수정이 일어나기 때문에 나타난 현상이며 이와 유사한 연구결과를 Bao et al. (2007)과 Miranda et al. (2010) 및 Rugienius et al. (2013)도 이와 유사한 연구 결과를 보고한 바 있다. 그리고 본 연구에서 16개의 microsatellite 마커는 분석된 평균 PIC 값은 0.836으로 아주 높게 나타나 돌배나무의 유전적 다양성 분석뿐만 아니라 우리나라 배나무 품종의 지문화 작업에도 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료되었다.

유전적 유연관계 분석

16개의 microsatellite 마커를 이용하여 278개 대립유전자의 크기를 기준으로 돌배나무 수집 개체에 대한 계통도를 작성한 바(Fig. 2), 공시 수집 개체의 전체 유사도 지수는 0.09~1.00의 범위에 속하였고, microsatellite 마커의 유전자형에 의해 2개의 대그룹으로 구분되었다. I 그룹은 강원도에서 수집된 ‘치악1’ 외 12점, 경북의 ‘봉화1,2’, ‘김천’과 ‘문정’에서 수집된 4점, 전남에서 수집된 ‘진상어치1’ 외 12점, 전북의 ‘무주’와 ‘진안’에서 수집된 3점, 경기도의 ‘남양주1,2’ 및 광교산에서 수집된 ‘광교’ 등 3점과 농촌진흥청 원예특작과학원

Fig. 2. Phenogram of 62 pear accessions resulting from UPGMA analysis based on Jaccard's similarity coefficient. The numbers (1 to 62) at right side refer to the list of pear accessions in Table 1.

에서 수집 보존된 ‘청서리’가 속하였으며, 유사도 지수 0.17에서 3개의 소그룹으로 구분되었다. I-1 그룹에 속하는 21개의 수집 개체 중에서 전남 지역에서 수집된 11점, 강원도에서 수집된 5점, 경북 지역에서 수집된 2점, 경기도에서 수집된 2점, 농촌진흥청의 ‘청서리’가 분포하였으며, 특히 전남 광양 지방에서 수집된 ‘진상어치2’, ‘진상어치5’, ‘옥곡3’, ‘옥곡수평’, ‘옥룡’은 microsatellite 마커의 유전자형에 의해 구분이 되지 않았다. I-2 그룹은 강원도에서 수집된 ‘치악2’와 7점, 경북 봉화 지역에서 수집된 ‘봉화1’, 전남 광양 지방에서 수집된 ‘옥곡2’와 구례에서 수집된 ‘피아골3’, 전북 무주에서 수집된 ‘무주’와 ‘백련사’, 진안 지역에서 수집된 ‘청실’, 경기도 수원 광교산에서 수집한 1점이 분포하였다. 강원도에서 수집된 ‘치악2’와 ‘속사2’의 경우 100%의 유전적 유사도를 나타냈으며, I-3 그룹은 ‘봉화2’ 하나의 수집종이 분포하였다.

II 그룹은 강원도에서 수집된 ‘치악3’와 16점, 경북 울진과 영양에서 수집된 2점, 전남 광양 지방에서 수집된 ‘진상어치3’와 3점과 경기도 포천에서 수집된 1점과 농촌진흥청에서 보존되고 있는 ‘영목리’가 분포하였으며, 모든 돌배나무 유전자원이 microsatellite 마커의 유전자형에 의해 뚜렷하게 구분되었다. II 그룹은 유전적 유사도 지수 0.13에서 2개의 소그룹으로 구분할 수 있었으며, II-1 그룹은 ‘치악3’, ‘임계N1’, ‘임계1’, ‘속사1’, ‘진상어치3’, ‘곡성3’, ‘포천’이 분포하였고, II-2 그룹은 강원도에서 수집된 13점, 경북 지방에서 수집된 2점, 전남 지역에서 수집된 2점, 농촌진흥청의 ‘영목리’가 포함되는 양상을 나타냈다. 이상의 결과를 분석해볼 때, 강원도에서 수집된 종이 I, II 그룹 내에 고르게 분포하는 양상을 나타내어 다른 지역에서 수집된 종보다 유전적 다양성이 높은 것으로 분석되었다.

Microsatellite 마커를 이용한 배나무 유전자의 특성 평가는 일본에서 6 *Pyrus* 속 60품종에 대하여 9개의 SSR 마커에서 검출된 133개 대립유전자를 활용하여 군집 분석하였을 때 유럽형, 중국형, 일본형 품종군으로 그룹화 됨을 보고한 이래 (Kimura et al. 2002), 중국에서 6개의 SSR marker를 98개 배나무 유전자원 및 품종을 10개의 대그룹으로 구분할 수 있음을 제시하였다(Bao et al. 2007). 스페인의 경우 141개의 배나무 유전자원 평가에 8개의 SSR 마커에서 검출된 97개의 대립유전자를 이용하여 군집분석을 실시하였을 때 3개의 대그룹으로 구분할 수 있음을 보고하였다. 본 연구에서도 우리나라에서 자생하고 있는 돌배나무 수집개체를 대상으로 16개의 microsatellite 마커에서 검출된 278개의 대립유전자를 활

용하였을 때 2개의 대그룹으로 그룹화할 수 있었다. 특히, 강원도에서 수집된 개체는 전체 그룹 내에 고르게 분포하는 양상을 보였으며, 전남지방에서 수집한 개체의 경우 17개 수집 개체 중에서 ‘진상어치3’, ‘곡성3’, ‘피아골1’, ‘피아골2’를 제외한 13개 수집종이 I 그룹 내에 분포하는 것으로 나타나 수집된 지역에 따라 유전적 변이 정도가 다른 것으로 분석되었다. 이러한 결과는 돌배나무 수집 지역의 지리적 여건, 기상환경에 따른 자가불합화성의 타파 여부, 실생묘 번식에 따른 유전적 다양성 발생 등과 같은 여러 가지 요인이 관여하였기 때문에 나타난 결과라고 사료된다. 그리고 일부 유전자원의 경우 278개의 대립유전자를 활용해도 구분이 되지 않았는데 이에 대해서 분석 마커의 수를 확대하거나 형태적 특성 검정을 병행하여 수집개체의 동일성 여부를 검토해야 될 것으로 사료된다. 한편, 본 연구에서 돌배나무 수집개체에 활용된 microsatellite 마커 16개는 대립유전자의 수도 많을 뿐만 아니라 PIC 값도 높게 나타나 이를 우리나라 배나무 품종 식별에 활용가능성 여부를 탐색한다면 실용적 활용 가치는 한층 확대 될 것으로 판단된다.

적 요

이 연구의 목적은 형태적 특성과 microsatellite 마커를 이용하여 국내에서 자생하고 있는 돌배나무 유전자원의 유전적 다양성 평가를 위하여 수행하였다. 돌배나무 14개의 형태적 특성을 조사한 바 수집종간에 높은 변이성을 나타냈으나 환경의 영향을 많이 받는 양적형질이기 때문에 정확한 특성평가가 어려웠다. 50개의 microsatellite 마커를 이용하여 62개 돌배나무 수집개체에 다형성 정도가 높은 16개를 선정하였다. 이들 마커와 돌배나무 유전자원 62점을 검정하였을 때 총 284개의 대립유전자가 나타났으며, 마커에 따라 10-27개까지 다양한 분포 양상을 나타냈다. 16개 마커의 평균 PIC 값과 관찰된 이형접합성은 각각 0.836와 0.776로 나타났다. 돌배 62개 수집개체를 microsatellite 마커에 의해 나타난 대립유전자를 근거로 Jaccard 방법에 따라 산출된 유전적 유사도는 0.09 ~ 1.00까지 넓은 범위에 속하였고, UPGMA 방법에 따라 군집분석을 실시하였을 때, 2개의 그룹으로 크게 나누어졌으며 55개 돌배나무 수집개체가 구분되는 것으로 나타났다. 본 연구 결과는 돌배나무 수집개체의 유전적 다양성과 유연관계 평가를 통해 유용한 유전자원에 대한 정보를 제공하는데 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

REFERENCES

1. Bao L, Chen K, Zhang D, Cao Y, Yamamoto T, Teng Y. 2007. Genetic diversity and similarity of pear (*Pyrus* L.) cultivars native to East Asia revealed by SSR (simple sequence repeat) markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 54: 959-971.
2. Bell RL. 1990. Pears (*Pyrus*), In: Moore JN and Ballington JR (eds.). *Genetic resources of temperate fruit and nut crops I*, International Society for Horticultural Science, Wageningen, Netherlands. pp. 665-697.
3. Cho KH, Shin IS, Kim HR, Kim JH, Heo S, Yoo KY. 2009. Analysis of genetic relationship of pear (*Pyrus* spp.) germplasms using AFLP markers. *Korean J. Breed. Sci.* 41: 444-450.
4. Kimura T, Shi YZ, Shoda M, Kotobuki K, Matsuta N, Hayashi T, Ban Y, Yamamoto T. 2002. Identification of Asian pear varieties by SSR analysis. *Breed. Sci.* 52: 115-121.
5. Miranda C, Urrestarazu J, Santesteban LG, Royo JB, Urbina V. 2010. Genetic diversity and structure in a collection of ancient Spanish pear cultivars assessed by microsatellite markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 135: 428-437.
6. Nishitani C, Terakami S, Sawamura Y, Takada N, Yamamoto T. 2009. Development of novel EST-SSR markers derived from Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Breed. Sci.* 59: 391-400.
7. Liu K, Muse SM. 2005. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21: 2128-2129.
8. Rohlf FJ. 2000. NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, ver. 2.10b. Applied Biostatistics Inc., New York.
9. Rugienius R, Blazyte A, Lukoseviciute V, Siksnianiene JB, Frercks B, Gelvonauskiene D, Gelvonauskis B, Sasnauskas A, Baniulis D, Stanys V. 2013. Genetic polymorphism of wild pear accessions collected in Lithuania. *Baltic Forestry* 19: 12-21.
10. Sehic J, Garkava-Gustavsson L, Fernandez-Fernandez F, Nybom H. 2012. Genetic diversity in a collection of European pear (*Pyrus communis*) cultivars determined with SSR markers chosen by ECPGR. *Sci. Hortic.* 145: 39-45.
11. Shimura, I. 1988. Nashi (Pear), In: Heibonsha's world encyclopedia, Vol. 36. Heibonsha, Tokyo, Japan. pp. 354-372.
12. Sneath PHA, Sokal RR. 1973. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification, Freeman WH, San Francisco.
13. Wolko L, Antkowiak W, Lenartowicz E, Bocianowski J. 2010. Genetic diversity of European pear cultivars (*Pyrus communis* L.) and wild pear (*Pyrus pyraeaster* (L.) Burgsd.) inferred from microsatellite markers analysis. *Genet. Resour. Crop Evol.* 57: 801-806.
14. Yamamoto Y, Kimura T, Hayashi T, Ban Y. 2006. DNA profiling of fresh and processed fruits in pear. *Breed. Sci.* 56: 165-171.
15. Yamamoto T, Kimura T, Sawamura Y, Manabe T, Kotobuki K, Hayashi T, Ban Y, Matsuta N. 2002. Simple sequence repeats for genetic analysis in pear. *Euphytica* 124: 129-137.
16. Yamamoto T, Kimura T, Shoda M, Imai T, Saito T, Sawamura Y, Kotobuki K, Hayashi T, Matsuta N. 2002. Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between Japanese and European pears. *Theor. Appl. Genet.* 106: 9-18.
17. Zhu L, Zhu Y, Jia B, Zhang S. 2009. Study on pear (*Pyrus* spp.) germplasm resources collected at the protection district of 'Dangshansuli' by ISSR markers. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 50: 334-340.