희귀식물인 눈향나무(*Juniperus chinensis* var. *sargentii*)의 공간분포에 따른 遺傳構造 및 遺傳的 多樣性

崔亨淳* · 洪庚洛 · 鄭載珉[1] · 金元雨
국립산림과학원, [1]국립수목원

적 요: 눈향나무(*Juniperus chinensis* var. *sargentii* Henry)는 사할린, 일본 등의 동북아시아와 한반도에서는 전국의 고산지대에서 자라는 상록성 소관목으로서 희귀 및 멸종 위기 식물(산림청)로 지정되어 있다. 본 연구에서는 한라산에 서식하는 눈향나무 집단의 분포형태 및 특성, 유전적 다양성과 공간적 유전구조를 파악하였다. 조사구(40 m × 60 m)에는 총 131개의 눈향나무 clump가 자생하고 있었으며 이들 전체 본수를 대상으로 군집지수를 계산한 바, 임의분포하고 있음을 확인하였다. 모든 개체들에 대하여 ISSR 유전자형을 비교한 결과, 15개체는 클론으로, 나머지는 각기 서로 다른 genet으로 구성되어 있었다. 21개의 ISSR 표지자를 바탕으로 계산한 Shannon의 다양성지수(I=0.463)는 적은 개체수와 제한적 분포에도 불구하고 유전적 다양성이 다른 수종에 비해 비교적 높은 편으로 나타났다. 공간적 자기상관 분석방법을 이용하여 공간적 유전구조를 파악한 결과, 조사지역내의 눈향나무 집단은 8 m 이내에서 유전적으로 유사한 군락구조를 갖고 있는 것으로 나타났으며, 클론 번식이 공간적 유전 구조에 미치는 영향은 거의 없는 것으로 판단되었다.

검색어: 공간적 유전구조, 군집지수, 눈향나무, 유전다양성, 클론

서 론

눈향나무(*Juniperus chinensis* var. *sargentii* Henry)는 일본, 타이완, 사할린 등에 분포하며, 국내에서는 한라산, 지리산, 소백산, 설악산 등 전국의 700 m 이상의 고산지대에 자생하고 있다. 수고는 50 cm 이하, 길이 5 m 내외로 포복성이 있는 고산성 상록침엽관목이며 관상수로 널리 이용되고 있다. 꽃은 一家花, 자웅이주(dioecious)이고, 열매는 구과로서 꽃이 핀 다음해에 익는다(이창복 1989). 눈향나무는 세계적으로도 그 분포가 동북아시아에 한정되어 있으며, 우리나라에는 전국 고산지대에만 제한적으로 분포하고 각 서식지내에 개체수도 적어서 희귀·멸종 위기 식물로 지정(산림청 보존우선순위 41위)되어 있다(산림청 1997). 따라서 눈향나무 천연집단의 보존 및 이를 위한 연구가 시급한 실정이지만, 아직까지 눈향나무에 관한 생태적, 유전적 연구는 이루어지지 않고 있다.

눈향나무는 원대가 서지 않고 기울어져 퍼지면서 많은 가지를 내고, 실생번식과 더불어 땅에 닿은 가지에서 뿌리를 내려 clump를 형성하는 클론번식을 겸하고 있다. 실생 및 클론번식을 겸하는 식물은 형성된 clump의 유전적 구성, 즉 clonality를 분석해야 유전변이의 양과 패턴 등의 정보를 정확히 예측할 수 있기 때문에, 집단의 유전적 연구와 병행하여 clonality를 파악해야 한다(Coates 1998, Ueno *et al*. 2000, Chung and Epperson 2000). 또한 식물체는 서식지의 환경에 따라 독특한 공간적 유전 구조를 형성하고 있다. 일반적으로 집단내 개체의 위치와 유전변이의 분포 관계는 공간적 자기상관분석에 의해 파악할 수 있는데(Legendre 1993), 이러한 공간적 유전구조는 교배양식, 번식전략, 종자 및 화분의 비산, 자연선택 등의 여러 요인에 영향을 받아 형성될 수 있다(Epperson 1997). 개체수가 적고 보존가치가 높은 식물의 효율적인 보존을 위해서는 집단의 생태적 특성, 보유하고 있는 유전변이의 양, 집단 내 형성되어 있는 공간적 유전구조 등을 파악하는 것이 매우 중요하다(Waller *et al*. 1987, Godt and Hamrick 1998). 본 연구는 이와 같은 목적으로 ISSR 표지자를 이용하여 한라산에서 서식하고 있는 눈향나무의 공간분포에 따른 유전 구조와 유전다양성을 파악하고자 한다.

재료 및 방법

조사지역의 개황 및 공시재료

본 연구의 조사지는 한라산 영실지역(해발고 약 1,650 m, 남서사면)의 완만한 경사지(4～6°)다. 조사지 주변에는 철쭉(*Rhododendron schlippenbachii*), 시로미(*Empetrum nigrum* var. *japonicum*), 주목(*Taxus cuspidata*), 섬매발톱나무(*Berberis amurensis* var. *quelpaertensis*), 백리향(*Thymus quinquecostatus*) 등이 서식하고 있다. 가로 40 m(남서방향), 세로 60 m(북동방향)의 조사구를 설치하고, 조사구에 분포하는 총 131개의 눈향나무 clump의 크기와 위치를 기록하였다. 13개 clump에서 각각 침엽시료를 채취하고, 단일 clump의 유전적 동질성을 파악하기 위하여 한 clump(4 m

* Corresponding author; Phone: 82-31-290-1147, Fax: 82-31-290-1040, e-mail: forgene@empal.com

× 4 m)에서 일정한 간격을 두고 8개의 잎을 채취하였다.

ISSR PCR

CTAB(Cetyltrimethyl ammonium bromide)추출 방법을 이용하여 침엽조직에서 total DNA를 추출하였다(Milligan 1992). UBC (University of British Columbia)에서 제작한 ISSR primer 50개로 예비실험을 하였으며, 이 중 증폭산물의 재현성 및 다형성을 고려하여 7개의 primer를 선발하였다(Table 1). ISSR PCR의 반응용액의 조성은 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 μM dNTPs, 40 ng/μL primer, 10 ng template DNA, 1.0 unit *Taq* polymerase 조건으로 실험을 하였으며(강 등 2003), PCR cycle은 PTC-200 (MJ-Research Com.) 기기를 이용하여 94℃/30초, 50~54℃/60초, 72℃/60초의 과정을 45회 반복하고, 72℃/5분간 처리하여 증폭을 완료시켰다. 증폭산물을 1.8% agarose gel에 전기영동을 하였다.

자료분석

Clark와 Evans(1954)의 군집지수(Aggregation index, *R*)를 사용하여 조사지역내의 눈향나무 시료의 분포형태를 파악하고, 밀도, 피도, clump간 평균거리, clump의 평균면적 등을 구하여 집단의 개황을 분석하였다.

ISSR PCR에 의해 생성된 다형성 증폭산물을 바탕으로 POPGENE (Yeh *et al*. 1997) 프로그램을 이용하여 Shannon의 다양성 지수 (diversity index, *I*; Lewontin 1972)를 구하여 눈향나무 집단의 유전적 다양성을 추정하였고, 모든 개체의 유전자형을 비교하여 clump별 genet의 구성 여부를 파악하였다.

공간적 유전구조를 구명하기 위해 Tanimoto distance를 이용하여 눈향나무 집단의 공간적 자기상관 분석을 실시하였다. 자료분석을 위해 SGS 프로그램(Degen *et al*. 2001)을 이용하였으며, Tanimoto distance의 공식은 다음과 같다.

$$D_T = 1 - \left(\frac{c}{a + b - c} \right)$$

D_T : A 개체와 B개체 간의 Tanimoto distance

a : A 개체에 존재하는 ISSR PCR의 증폭산물의 수

b : B 개체에 존재하는 ISSR PCR의 증폭산물의 수

c : A, B 두 개체에 공통으로 존재하는 ISSR PCR의 증폭산물의 수

Table 1. The primers used for ISSR-PCR of *Juniperus chinensis* var. *sargentii*

Primer name	G+C content(%)	NP[1]	Primer sequences(5'-3')
UBC-807	47	5	AGA GAG AGA GAG AGA GT
UBC-808	53	2	AGA GAG AGA GAG AGA GC
UBC-811	53	3	GAG AGA GAG AGA GAG AC
UBC-813	47	4	CTC TCT CTC TCT CTC TT
UBC-823	53	3	TCT CTC TCT CTC TCT CC
UBC-841	53	1	GAG AGA GAG AGA GAG AY[2]C
UBC-847	53	3	CAC ACA CAC ACA CAC AR[3]C

1. NP : number of polymorphic markers.
2. Y = C or T.
3. R = A or G.

결 과

눈향나무 집단의 공간분포

조사구 2,400 m^2(40 m × 60 m) 내에, clump의 총 수는 131개로 밀도는 0.05개/m^2였다(Fig. 1). 눈향나무는 장·단경 6 cm × 5 cm의 가장 작은 clump로부터 7 m × 8 m의 가장 큰 clump까지 다양한 크기로 분포하고 있었다. 눈향나무가 차지하는 총 면적은 475.7 m^2으로 피도는 15.9%였고, clump의 평균지름은 1.5 m(±0.14), 평균면적은 3.63 m^2(±0.63), clump 중심간 평균 거리는 1.82 m(±0.11)였다. Clark와 Evans(1954)의 군집지수(*R*)는 개체들의 공간적 분포가 임의 분포일 경우는 1이고, 0에 가까울수록 밀집분포를 나타내며, 1보다 클 경우는 균일한 분포를 의미한다(Krebs 1999). 채집한 눈향나무의 위치자료를 바탕으로 군집지수를 계산한 결과, 군집지수는 1.013 으로 통계적으로(α=0.001) 눈향나무 clump들이 공간적으로 임의분포하고 있음을 알 수 있었다.

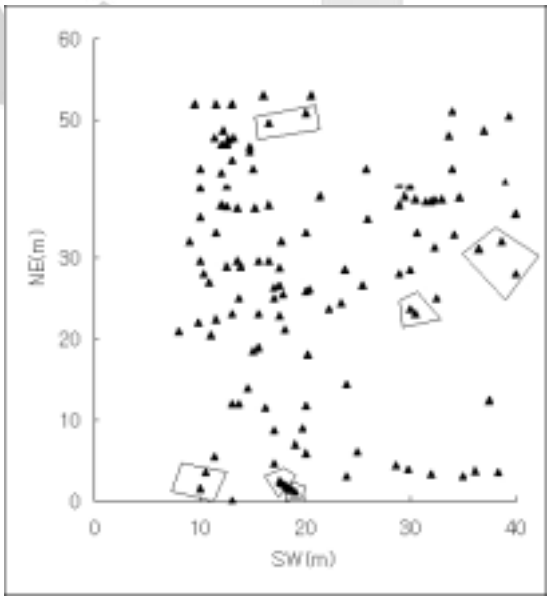

Fig. 1. Distribution of *Juniperus chinensis* var. *sargentii* in the study site. The spatial pattern of these clumps is random (Aggregation index = 1.013, non-significant at 1% level). Clumps in blocks have the same genotypes.

눈향나무 집단의 유전구조

7개 ISSR primer에서 생산된 총 76개의 증폭산물중, 단형성 증폭산물은 55개, 다형성 증폭산물은 21개로서, 다형성 증폭산물의 비율은 28%였다. 131 개체에 대한 Shannon의 다양성지수는 0.463으로 나타났다.

21개 다형성 표지자를 이용하여 모든 개체의 유전자형(multilocus genotype)을 비교한 결과, 총 131 개체 중 유전자형이 동일한 두 clump가 네 쌍, 세 clump는 한 쌍, 네 clump 한 쌍이 나타났으며, 나머지 116개체는 서로 다른 유전자형을 나타내어 총 122개의 유전자형이 존재하는 것으로 추정되었다. 동일한 유전자형을 가진 clump들은 거리가 근접해 있으며(Fig. 1), 특별한 물리적 장애물이 존재하지 않았으므로 동일한 클론으로 판단할 수 있었다. Clump 내의 유전적 구성을 판별하기 위해 한 clump(4 m×4 m)에서 채취한 8개 시료들의 유전자형을 분석한 결과, 4개체와 2개체가 각각 같은 유전자형을 나타냈고, 나머지 2개체는 각기 달라 총 4개의 유전자형으로 이루어져 있는 것으로 나타났다. 눈향나무의 각 clump들은 대부분은 서로 다른 genet으로 구성되어 있으며, 간혹 몇 개의 clump가 한 genet을 구성하거나, 한 clump가 몇 개의 genet으로 구성되어 있는 것으로 나타났다.

Tanimoto distance를 이용한 공간적 자기상관성 분석을 실시한 결과, 조사지역 내의 눈향나무 집단은 8 m 이내에서 유전적으로 유사한 군락(genetic patch)을 형성하였고, 8 m 이상의 구간에서는 임의분포를 나타내었다(Fig. 2). 공간적 유전구조는 클론형성의 정도에 따라 영향을 받으므로(Reusch *et al*. 1999) 클론으로 판단된 clump들을 제외시킨 후 집단의 유전구조를 파악한 결과, 앞의 결과와 동일하게 8 m 이내에서 유전적 구조가 형성되었다.

고 찰

ISSR 표지자로 분석한 목본식물의 Shannon의 다양성지수는

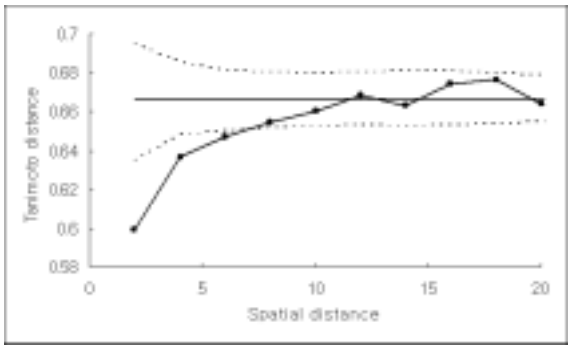

Fig. 2. Correlogram for *Juniperus chinensis* var. *sargentii* using Tanimoto genetic distance with 21 ISSR markers. The solid line is the observed value, the horizontal straight line means the random structure (expected value as 0.67), and the two dotted lines indicate the upper and the lower confidence limit at 95% level from 3,000 permutations.

은행나무(*Ginkgo biloba*)의 경우 0.379(Hong *et al*. 2001), 비자나무(*Torreya nucifera*)는 0.453(Hong *et al*. 2000), 시로미(*Empetrum nigrum* var. *japonicum*)는 0.531(최 등 2004), *Quercus*의 여러 수종들은 0.346~0.375(최 2001)로 보고되어서 눈향나무의 다양성 지수(0.463)가 비교적 높은 편에 속하는 것으로 생각된다. 일반적으로 종자 및 영양번식을 겸하는 수종들이 종자번식이나 영양번식만을 하는 수종보다 유전적 다양성이 높게 나타나는데(Hamrick *et al*. 1992), 이런 경향에 대하여 포복성 참나무인 *Quercus havardii*의 경우 무성번식보다는 유성 번식한 개체들에 의해 유전적 변이가 유지된다고 설명하였고(Mayes *et al*. 1998), *Ilex leucoclada*(Torimaru *et al*. 2003)와 *Vaccinium stamineum* (Kreher *et al*. 2000)의 경우에는 유성번식으로 생산된 종자에 의해 genet이 형성되었기 때문에 유전적 다양성이 높다고 보고하였다. 고산지역이라는 제한된 분포와 비교적 적은 개체수에도 불구하고 눈향나무의 유전적 다양성이 높은 이유는 대부분의 clump들이 각기 다른 genet으로 이루어진 것에서 알 수 있듯이, 무성생식(클론번식)보다는 유성생식(실생)에 의해 개체가 전파되고 집단이 형성되는 비율이 높기 때문인 것으로 생각된다.

실생과 클론번식을 겸하는 식물들은 종의 특성이나 서식환경에 따라 clump를 구성하는 유전적 조성이 매우 다양하며, clump별 genet의 구성에 대한 다양한 연구가 이루어져 왔다. *Ilex leucoclada*의 경우에는 모든 clump들이 한 개 이상의 genet으로 구성되어 있었고(Torimaru *et al*. 2003), *Vaccinium stamineum*의 경우는 각 clump들은 서로 다른 genet으로 이루어져 있고, 대부분의 clump들이 한 개 이상의 genet으로 이루어져 있는 것으로 보고되었다(Kreher *et al*. 2000). 눈향나무의 경우에는 대부분 clump별로 상이한 유전적 구성을 갖고 있었지만, 클론으로 이루어진 몇 개의 clump가 존재하기도 하였다. 또한, 본 연구의 자료분석에서 clump내부의 모든 개체들은 동일한 유전자형을 갖고 있다고 가정하였으나, 일정 면적 이상의 clump는 몇 개의 genet으로 이루어져 있는 것으로 나타났다.

공간자기상관 분석의 결과, 클론번식이 유전구조 형성에는 거의 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며, 보전학적인 측면에서 제주도 눈향나무 집단의 현지외 유전자 보존을 위한 개체의 선발시 최소한 8 m 이상의 거리를 두어야 할 것으로 판단된다. 클론번식을 겸하는 식물의 공간적 유전구조에 대한 연구결과를 살펴보면, 관목성 식물인 우묵사스레피(*Eurya emarginata*; Chung and Epperson 2000)와 복분자(*Rubus coreanus*; 강 등 2003)의 경우에는 각각 24 m와 20 m 이내에서 공간적 유전구조가 형성되었다. 수고가 3 m에 이르는 우묵사스레피나 복분자에 비해 눈향나무는 수고가 작아 유전적 구조의 크기가 상대적으로 제한된 것으로 보이며, 이는 수고가 50 cm 내외인 시로미(*Empetrum nigrum* var. *japonicum*)와 도라지모싯대(*Adenophora grandiflora*)의 경우에 각각 10 m와 12 m 이내로 비교적 작게 유전구조가 형성된 것에서도 알 수 있다(최 등 2004, Chung and Epperson 1999). 또한 눈향나무의 개체 크기가 작고 조사지의 경사가 완만하여 종자의 분산이 제한되어 있으며, 유전적으로 이

질적인 clump의 분포가 유전적 구조를 작게 형성하는데 기여한 것으로 생각된다(Epperson 1992, Heuertz *et al*. 2003).

인용문헌

강범용, 홍경낙, 정재민, 홍용표. 2003. I-SSR 표지자를 이용한 치악산 복분자딸기(*Rubus coreanus*)의 공간분포에 따른 유전구조. 한국임학회지 92: 558-566.

산림청. 1997. 희귀 및 멸종위기 식물도감. 생명의 나무. 서울. 21 p.

이창복. 1989. 대한식물도감. 향문사. 서울 67 p.

최태봉. 2001. 국내 상록성 참나무류의 유전적 구조 및 다양성과 붉가시나무 집단의 보전전략. 서울대학교 박사학위 논문. 189 p.

최형순, 홍경낙, 정재민, 강범용, 김원우. 2004. 한라산 시로미(*Empetrum nigrum* var. *japonicum*)의 유전적 다양성 및 공간적 유전구조. 한국임학회지 93: 175-180.

Chung, M.G. and B.K. Epperson. 1999. Spatial genetic structure of clonal and sexual reproduction of *Adenophora grandiflora* (Campanulaceae). Evolution 53: 1068-1078.

Chung, M.G. and B.K. Epperson. 2000. Clonal and spatial genetic structure in *Eurya emarginata* (Theaceae). Heredity 84: 170-177.

Clark, P.J. and F.C. Evans. 1954. Distance to nearest neighbor as a measure of spatial relationship in populations. Ecology 35: 445- 453.

Coates, D.J. 1998. Genetic diversity and population genetic structure in the rare chittering grass wattle *Acacia anomala* Court. Aust. J. Bot. 36: 22-27.

Degen, B., R. Petit and A. Kremer. 2001. SGS - Spatial Genetic Software: A computer program for analysis of spatial genetic and phenotypic structures of individuals and populations. J. Heredity 92: 447-448.

Epperson, B.K. 1992. Spatial structure of genetic variation within populations of forest trees. New Forests 6: 257-278.

Epperson, B.K. 1997. Gene dispersal and spatial genetic structure. Evolution 51: 672-681.

Godt, M.J. and J.L. Hamrick. 1998. Allozyme diversity in the endangered pitcher plant *Sarracenia rubra* spp. *alalbamensis* (Sarraceniaceae) and its close relative *S. rubra*. Am. J. Bot. 85: 802-810.

Hamrick, J.L., M.J. Godt and S.L. Sherman-Bryoles. 1992. Factors influencing levles of genetic diversity in woody plant species. New Forests 6: 95-124.

Heuertz, M., X. Vekemans, J.F. Hausman, M. Palada and O.J. Hardy. 2003. Estimating seed vs. pollen dispersal from spatial genetic structure in the common ash. Mol. Ecol. 12: 2483-2495.

Hong, Y.P., K.J. Cho, K.N. Hong and E.M. Shin. 2001. Diversity of I-SSR variants in *Ginkgo biloba* L. planted in 6 regions of Korea. J. Korean For. Soc. 90: 169-175.

Hong, Y.P., K.J. Cho, Y.Y. Kim, E.M. Shin and S.K. Pyo. 2000. Diversity of I-SSR variants in the population of *Torreya nucifera*. J. Korean For. Soc. 89: 167-172.

Krebs, C.J. 1999. Ecological Methodology (2nd ed.). Addison-Welsey Educational. California. pp. 192-193.

Kreher, S.A., S.A. Fore and B.S. Collins. 2000. Genetic variation within and among patches of the clonal species, *Vaccinium stamineum* L. Mol. Ecol. 9: 1247-1252.

Legendre, P. 1993. Spatial autocorrelation: trouble or new paradigm? Ecology 74: 1659-1673.

Lewontin, R.C. 1972. The apportionment of human diversity. Evol. Biol. 6: 381-398.

Mayes, S.M., A. McGinley and C.R. Werth. 1998. Clonal population structure and genetic variation in sand-shinnery oak, *Quercus havardii* (Fagaceae). Am. J. Bot. 85: 1609-1617.

Milligan, B.G. 1992. Plant DNA isolation. *In* A.R. Hoelzel (ed.) Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach. Oxford University. New York. pp. 65-66.

Reusch, B.H., T.W. Hurkiede, W.T. Stam and J.L. Olsen. 1999. Differentiating between clonal growth and limited gene flow using spatial autocorrelation of microsatellites. Heredity 83: 120-126.

Torimaru, T., N. Tomaru, N. Nushimura and S. Yamamoto. 2003. Clonal diversity and genetic differentiation in *Ilex leucoclada* M. patches in an old-growth beech forest. Mol. Ecol. 12: 809-818.

Waller, D.M., D.M. O'Malley and S.C. Gawler. 1987. Genetic variation in the extreme endemic *Pedicularis furbishiae* (Scrophulariaceae). Conservation Biol. 1: 335-340.

Ueno, S., N. Tomaru, H. Yoshimaru, T. Tanabe and S. Yamamoto. 2000. Genetic structure of *Camellia japonica* L. in an old-growth evergreen forest, Tsushima, Japan. Mol. Ecol. 9: 647-656.

Yeh, F.C., R. Yang, T.B.J. Boyle, Z.H. Ye and J.X. Mao. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre. University of Alberta. Canada.

(2004년 5월 24일 접수; 2004년 9월 20일 채택)

Spatial Genetic Structure and Genetic Diversity of a Rare Endemic *Juniperus chinensis* var. *sargentii* in Mt. Halla, Korea

Choi, Hyung-Soon , Kyung-Nak Hong , Jae-Min Chung[1] and Won-Woo Kim
Department of Forest Genetic Resources, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea
[1]Korea National Arboretum, Pocheon-gun Kyunggi-do 487-821, Korea

ABSTRACT : *Juniperus chinensis* var. *sargentii* Henry is a short and creeping evergreen shrub which reaches about 50 cm in height and occurs in the northeast Asia and in high mountains over the South Korea. Its distribution is restricted, and the number of individuals are gradually decreasing. This study was conducted to estimate spatial pattern, genetic diversity and spatial genetic structure of *J. chinensis* var. *sargentii*. A total of 131 clumps were studied in the study area (40 m x 60 m). The spatial pattern of this population was random (Aggregation index *R*=1.031). In spite of the small number and the limited distribution, the level of genetic diversity (Shannon's index *I*=0.463) was relatively high as compared with those of other plant species with similar ecological characteristics. ISSR genotypes of all individuals were investigated to find the genetic relationship of clumps and genets. Fifteen clumps were composed to be clones, and a total of 116 unique genotypes were composed by separate genets. Spatial autocorrelation analysis using Tanimoto distance showed that the genetic patch was established within 8 m. The effect of clonal reproduction on genetic structure was almost nothing.

Key words : Aggregation index, Genet, Genetic diversity, ISSR marker, *Juniperus chinensis* var. *sargentii*, Spatial genetic structure