

국내 재배지의 산초(*Zanthoxylum schinifolium*)와 초피(*Zanthoxylum piperitum*)의 형태학적 특성과 유전적 다양성

류재혁^{1,2}, 최해식², 유재일³, 배창휴^{2,4*}

¹한국원자력연구원 정읍첨단방사선연구소 방사선육종연구실, ²순천대학교 대학원 식물생산과학부, ³기초과학연구원 식물노화수명연구단, ⁴순천대학교 웰빙자원학과

Morphological Characteristics and Genetic Diversity Analysis of Cultivated Sancho (*Zanthoxylum schinifolium*) and Chopi (*Zanthoxylum piperitum*) in Korea

Jaihyunk Ryu^{1,2}, Hae-Sik Choi², Jae-il Lyu³ and Chang-Hyu Bae^{2,4*}

¹Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research, Jeongeup 56212, Korea
²Department of Plant Production Sciences, Graduate School of Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea
³Center for Plant Aging Research, Institute for Basic Science (IBS), Daegu 42988, Korea
⁴Department of Well-being Bioresources, Suncheon National University, Suncheon 57922, Korea

Abstract - The morphological characteristics and genetic relationships among 32 germplasms of *Zanthoxylum schinifolium* and *Zanthoxylum piperitum* collected from two farms in Korea were investigated. The traits with the most variability were seed color, leaf size, and spine size. The intraspecific polymorphism of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* was 96.5% and 60.3%, respectively. The genetic diversity and Shannon's information index values ranged from 0.11 to 0.33 and 0.19 to 0.50, with average values of 0.26 and 0.42, respectively. Two ISSR primers (UBC861 and UBC862) were able to distinguish the different species. The genetic similarity matrix (GSM) revealed variability among the accessions ranging from 0.116 to 0.816. The intraspecific GSM for *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* was 0.177–0.780 and 0.250–0.816, respectively. The GSM findings indicate that *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* accessions have high genetic diversity and possess germplasms qualifying as good genetic resources for cross breeding. The clustering analysis separated *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* into independent groups, and all accessions could be classified into three categories. *Z. Schinifolium* var. *nermis* belonged to independent groups. Comparison of the clusters based on morphological analysis with those based on ISSR data resulted in an unclear pattern of division among the accessions. The study findings indicate that *Z. schinifolium* and *Z. piperitum* accessions have genetic diversity, and ISSR markers were useful for identifying *Z. schinifolium* and *Z. piperitum*.

Key words - *Z. schinifolium*, *Z. piperitum*, Genetic diversity, ISSR

서 언

산초나무(*Zanthoxylum schinifolium*S.)와 초피나무(*Zanthoxylum piperitum*)는 운향과(芸香科 Rutaceae) 산초나무속(*Zanthoxylum*)에 속하며, 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 등 동아시아에 널리

자생한다(Lee, 1999). 산초나무속 식물들은 동아시아 지역에서 오랜 기간 향신료와 약재로 이용된 유용약용식물자원으로 초피나무, 산초나무 또는 화초(*Z. bungeanum*M.)의 잘 익은 열매껍질을 모두 산초(*Zanthoxylum Peel*)라 하여 온리약(溫裏藥)으로 이용하며, 복부냉증을 제거하고 구토와 설사를 멈추게 하고 회충·간디스토마·치통·지루성 피부염에도 효과가 있다(Korea Food and Drug Administration, 2012; Choi, 2012; Yoon and

*교신저자: chbae@sunchon.ac.kr
Tel. +82-61-750-3214

Kim, 2010).

산초나무는 높이 3 m 정도의 낙엽관목으로서 줄기와 가지에 는 가시가 서로 어긋난다. 잎은 어긋나고 자루가 있는 길이 8~20 cm의 우상복엽이며, 13~23개의 소엽은 넓은 피침형 또는 난형으로 길이 1.5~5 cm, 폭 6~15 cm로서 끝이 뾰족하고 가장자 리에 잔 톱니가 있다(Choi, 2012; Lee, 1999). 개화기는 8~9월 이며, 꽃은 연한 녹색으로 지름 3 mm 정도로 산방화서를 이루며, 작은 꽃자루에 마디가 있고, 꽃받침 조각과 꽃잎은 각각 5개이 고 수꽃에 5개의 수술이 있다. 초피나무는 가지에 달리는 가시 가 마주나고, 잎 가장자리의 톱니 수가 3~5개 정도로 적고 꽃잎 이 없으며, 또한 열매가 붉은빛이 도는 갈색으로 익는 점에서 산 초나무와 다르다(Choi, 2012; Yoon and Kim, 2010; Lee, 1999).

산초속 식물의 유전적 다양성에 관한 연구로 최근 해외에서 AFLP 및 SRAP 마커를 활용한 연구가 보고되었다(Feng *et al.*, 2015; Gupta and Mandi, 2013). 국내에서는 rDNA-ITS 영역의 염기서열 분석에 의한 산초의 유전자 마커 개발 연구, 형태학적 특성과 기능성 성분 함량에 관한 연구(Kim *et al.*, 2015; Ko and Han, 1996; Kim *et al.*, 1993)가 진행되었다. 유전자원의 평가 는 전통적으로 형태학적 특성, 생화학적 특성 등을 이용하였으 나 이러한 방법들은 변이 빈도가 낮고 효율이 낮은 한계성이 있 다. 이러한 한계를 극복하기 위해 분자생물학적인 방법인 분자 마커를 이용하여 품종분류, 유전적 다양성 및 유연관계분석, 형 질연관 마커 탐색 등을 수행하고 있다. 이 중 ISSR 마커는 4~10 회 반복된 염기서열을 바탕으로 특정 프라이머에 의해 식물체 genome 상의 반복된 염기서열이 상보적으로 증폭되어 품종간 다형성을 나타내며, 5'이나 3' 끝에 2~4개의 임의의 염기를 가지는 16~18 bp의 반복서열로 구성된 단일 프라이머를 PCR 증폭시 킨 일종의 분자마커이다(Zietkiewicz *et al.*, 1994; Fang and Roose, 1997). 이러한 반복서열은 genome 내에 풍부하게 존재 하기 때문에 ISSR 프라이머들은 여러 지점에서 증폭이 가능하 여 서로 다른 개체들 사이에서 이러한 증폭산물들이 다형성을 나타내게 된다(Godwin *et al.*, 1997; Russel *et al.*, 1997). 이러한 장점으로 ISSR 분석은 집단 유전변이 분석, 유전자 탐색 등에 널 리 이용되고 있다(Ryu and Bae 2012; Ryu and Bae, 2011; Tsumura *et al.*, 1996).

본 연구는 국내 농가에서 재배되고 있는 산초 및 초피유전자 원을 비교하여 분자생물학적 분류와 유전자원평가에 ISSR 마 커적용 가능성을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 DNA 추출

본 연구에 사용된 재료는 장수지역과 구례지역의 산초재배 농가에서 수집한 27 계통의 산초와 초피재배 농가에서 수집한 5계통으로 총 32수집계통을 공시하였다(Table 1). DNA는 CTAB 방법(Fang *et al.*, 1992)에 따라 추출하여 0.8% agarose gel에서 전기영동 후 밴드를 확인하고, Nanodrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Netherlands)를 이용하여 농도를 측정하였고, 최종농도를 20 ng/ μ l로 희석하였다.

형태학적 특성 조사

형태학적 특성 조사는 각 산초 및 초피나무 계통의 종피색(적 색, 청색, 진보라 진청색), 잎의 크기(소: 1 cm 미만, 중: 1.1~4 cm 대: 4.1 cm 이상)와 가시크기(없음, 소: 1~2 mm, 중: 3~5 mm, 대: 5 mm 이상)를 포함한 3가지 형질을 각각 3반복으로 측정하여 비교하였다(Choi, 2012, Korea National Arboretum, 2016).

ISSR 분석

20개의 ISSR 프라이머(UBC primer Set No. 9, University of British Columbia, Canada)로 예비실험을 실시한 후의 밴드 가 명확하고 다형성이 우수한 12개의 프라이머를 선택하여 ISSR 분석에 이용하였다(Table 2). PCR 반응액의 조성은 주형 DNA 20 ng/ μ l, *Taq* polymerase 1 unit, 10 \times PCR reaction buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.3; 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl₂), 0.2 mM dNTP, 10 pmol 프라이머로 25 μ l 혼합하여 사용하였 다. PCR 반응은 Gene Amp 2700 (Applied Biosystem)을 사용하 여 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 초기 변성시킨 후 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 pre-denaturation, 50 $^{\circ}$ C에서 30초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension과정을 45회 수행한 후 최종적으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후 종료하였다. PCR이 완료된 후의 증폭산물 15 μ l를 1.6% agarose gel에 loading하여 전기영동(50V, 60분간)한 후 EtBr로 염색하여 GelDocXR (Bio-rad, USA)을 사용하여 주요 밴드를 확인하였다.

Data 분석

형태학적 특성 조사 결과를 피어슨 상관계수(pearson correlation coefficient)를 이용하여 평균연결법으로 군집분석을 실시하였 다. ISSR로 분석된 DNA 밴드 양상은 이진수를 이용하여 밴드 유·무에 따라 1과 0으로 data를 표시하여 Jaccard계수 (Jaccard

coefficient)로 유전적 유사도지수를 산출하고 평균연결법 (average linkage method)으로 군집분석을 SPSS V.12 (SPSS Inc., USA)를 이용하여 실시하였다.

형태학적으로 분류된 5개(*Z. Schinifolium*, *Z. Schinifolium* var. *subinermis*, *Z. Schinifolium* var. *nermis*, *Z. Schinifolium* var. *microphyllum*, *Zanthoxylum piperitum*) 종간의 유전자 다양도(GD) 샤논의 정보지수(S.I), 전체 유전적 다양도(Ht), 종 내 유전적 다양도(Hs), 종간의 분화정도(Gst), 종간 유전적 유

사도는 POPGENE v1.32 프로그램을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

형태학적 특성 및 군집분석

산초와 초피 유전자원의 형태학적 특성은 Table 1 및 Fig. 1과 같다. 산초와 초피 유전자원의 열매색은 구례농가의 육성 3 계통을 제외하고 모두 적색이다. 구례농가의 육성계통 중 17번 (민

Table 1. The morphological characteristics of the 32 accessions of genus *Zanthoxylum* used in this study

No.	Species	Seed color	Leaf size	Spiny size	Sampling region
1	<i>Z. Schinifolium</i>	Red	Middle	Mid	Jangsu
2	<i>Z. Schinifolium</i>	Red	Middle	Mid	Jangsu
3	<i>Z. Schinifolium</i>	Red	Middle	Mid	Jangsu
4	<i>Z. Schinifolium</i>	Red	Middle	Mid	Jangsu
5	<i>Z. Schinifolium</i>	Red	Middle	Mid	Jangsu
6	<i>Z. Schinifolium</i>	Red	Middle	Mid	Jangsu
7	<i>Z. Schinifolium</i> var. <i>subinermis</i>	Red	Middle	Small	Jangsu
8	<i>Z. Schinifolium</i>	Red	Middle	Large	Jangsu
9	<i>Z. Schinifolium</i>	Red	Middle	Mid	Jangsu
10	<i>Z. Schinifolium</i>	Red	Large	Mid	Jangsu
11	<i>Z. Schinifolium</i> var. <i>microphyllum</i>	Red	Small	Mid	Jangsu
12	<i>Z. Schinifolium</i>	Red	Middle	Mid	Jangsu
13	<i>Z. Schinifolium</i>	Red	Middle	Mid	Jangsu
14	<i>Z. Schinifolium</i>	Red	Middle	Mid	Jangsu
15	<i>Z. Schinifolium</i>	Red	Middle	Mid	Jangsu
16	<i>Z. Schinifolium</i>	Red	Middle	Mid	Jangsu
17	<i>Z. Schinifolium</i> var. <i>nermis</i>	Green	Middle	None	Gurye
18	<i>Z. Schinifolium</i>	Dark purple	Middle	Large	Gurye
19	<i>Z. Schinifolium</i> var. <i>subinermis</i>	Red	Middle	Small	Gurye
20	<i>Z. Schinifolium</i>	Dark green	Middle	Small	Gurye
21	<i>Z. Schinifolium</i> var. <i>subinermis</i>	Red	Middle	Small	Gurye
22	<i>Z. Schinifolium</i>	Red	Middle	Large	Gurye
23	<i>Z. Schinifolium</i>	Red	Middle	Large	Gurye
24	<i>Z. Schinifolium</i>	Red	Middle	Large	Gurye
25	<i>Z. Schinifolium</i>	Red	Middle	Large	Gurye
26	<i>Z. Schinifolium</i>	Red	Middle	Large	Gurye
27	<i>Z. Schinifolium</i>	Red	Middle	Large	Gurye
28		Red	Small	Small	Gurye
29		Red	Small	Small	Gurye
30	<i>Z. piperitum</i>	Red	Small	Mid	Gurye
31		Red	Small	Mid	Gurye
32		Red	Small	Mid	Gurye

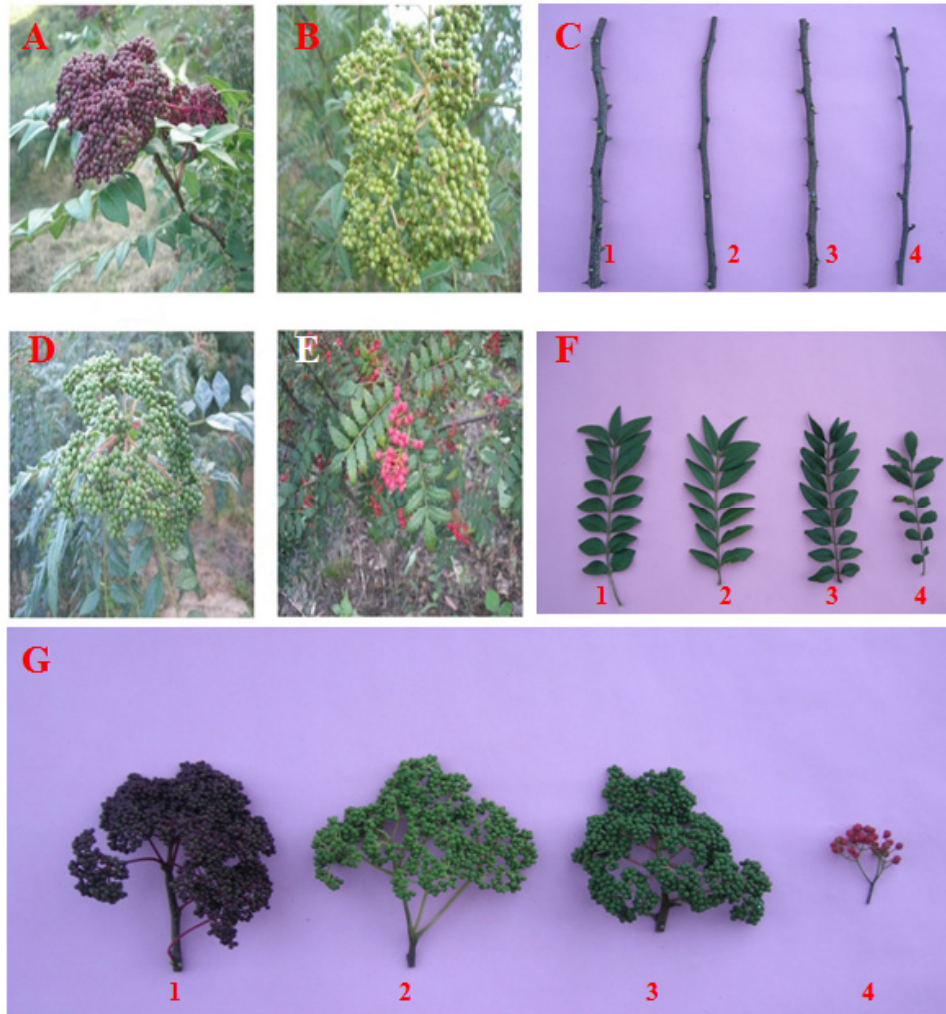


Fig. 1. Morphological characteristics of *Zanthoxylum schinifolium* and *Zanthoxylum piperitum*. A: *Z. schinifolium* (No. 18) B: *Schinifolium* var. *nermis* (No. 17), C: Spiny size (C-1: Large C-2: None, C-3: Mid, C-4: Small), D: *Z. schinifolium* (No. 20), E: *Z. piperitum*, F: Lesf shape and size (F-1: *Z. schinifolium*, F-2: *Z. Schinifolium* var. *nermis*, F-3: var. *microphyllum*, F-4: *Z. piperitum*), G: Seed color (G-1: Dark purple, G-2: Green, G-3: Dark green, G-4: *Z. piperitum*) (Choi, 2012).

산초 계통은 청색(Fig. 1-G-2), 18번 계통은 진보라색(Fig. 1-G-1), 20번 계통은 암청색(Fig. 1-G-3)으로 구분되었다. 잎과 가지의 모양은 산초나무의 잎이 기수우상복엽으로 외부형태는 유사하나 초피나무는 산초에 비해 잎 크기가 작으며, 잔톱니가 있다(Fig. 1-F). 산초나무의 형태학적 분류는 가시의 길이가 짧고 잎이 달걀 모양 또는 달걀 모양의 타원형인 것을 전주산초 (*Z. Schinifolium* var. *subinermis*), 가시가 없는 것을 민산초 (*Z. Schinifolium* var. *nermis*), 잎이 좁고 작은 것을 좁산초(*Z. Schinifolium* var. *microphyllum*)로 분류한다(Lee, 1999, Korea Aational Arboretum, 2016). 이를 기준으로 3계통(No. 7, 19, 21)이 전주산초로 분류되었으며, 구레 육성 계통 중 가시가 없는

계통(No. 17)은 민산초, 잎이 작은 계통(No. 11)은 좁산초로 분류되었다.

형태학적 특성으로 군집분석을 실시한 결과(Fig. 2), 유사도 0.866에서 4개의 그룹과 유집되지 않은 6 계통으로 나뉘었다. I 그룹에는 적색 열매, 작은 잎, 중간가시크기인 초피나무 유전자원 3개 계통과(No. 30, 31, 32) 좁산초 계통(No. 11)이 유집되었다. II 그룹에는 적색 열매, 중간크기 잎, 큰가시의 특성을 가진 구레농가의 6개 계통(No. 22, 23, 24, 25, 26, 27)과 장수농가 1 계통(No. 8)이 유집되었다. III 그룹에는 적색 열매, 중간크기 잎, 중간가시크기인 장수 농가의 12개 계통(No. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 13, 14, 15, 16)이 유집되었으며, IV 그룹에는 전주산초 3계

통(No. 7, 19, 21)이 유집되었다. 6 계통(No. 10, 28, 29, 17, 18, 20)은 독립적으로 존재하였다. 현재 산초나무와 초피나무의 형태학적 분류 중 종피색은 산초나무가 적색, 초피나무는 적갈색으로 구분하였다(Yoon and Kim, 2010; Lee, 1999). Kim *et al.*

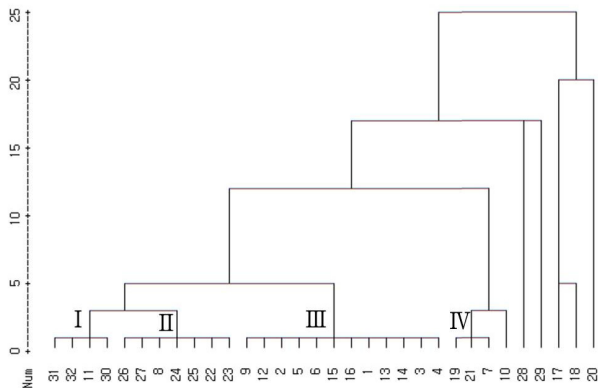


Fig. 2. Dendrogram illustrating morphological relationships among 32 accessions of *Z. Schinifolium* and *Z. piperitum* generated by cluster analysis with average linkage method.

(2015)은 초피나무, 산초나무, 화초(花椒)의 열매껍질을 종단 위에서 정확하게 구별함과 동시에 혼·오용 가능성이 있는 같은 속의 왕초피나무(*Z. coreanum*) 열매껍질에 대한 구별이 필요함을 제기하였다. 따라서 본 연구에서도 산초나무 유전자원의 다양한 열매색(녹색, 적색, 진보라색, 암녹색)에 대한 추가적인 검토가 필요한 것으로 판단된다.

DNA 밴드 양상

20개의 ISSR 프라이머 중 다형성과 재현성이 높은 12개의 프라이머(Table 2)를 국내 재배농가에서 수집한 산초 및 초피나무 32계통을 분석한 결과, 산초나무에서 수집계통간 증폭된 각 프라이머별 총 밴드수는 최소 4개(UBC 861)에서 최대 11개(UBC 827, UBC 835) 사이로 한 프라이머 조합당 평균 밴드 수는 7.3 개였고, 다형성 밴드는 최소 3개(UBC 861)에서 최대 11개(UBC 827, 835)로 평균 7.1개의 다형성 밴드가 검출되었다(Table 2). 또한 초피나무에서 수집계통간 증폭된 각 프라이머별 총 밴드 수는 최소 2개(UBC 811)에서 최대 9개(UBC 861) 사이로 한 프라이머 조합당 평균 밴드수는 4.8개였고, 다형성 밴드수는 최소

Table 2. Sequence of the ISSR primers, genetic diversity within and between five *Zanthoxylum* species

Primer	Sequence ^z	<i>Z. schinifolium</i>			<i>Z. piperitum</i>			GD ^v	S.I. ^u	Ht ^t	Hs ^s	Gst ^f
		TB ^y	PB ^x	PR ^w	TB	PB	PR					
UBC811	(GA) ₈ C	5	5	100	2	1	50	0.20	0.32	0.13	0.08	0.16
UBC824	(TC) ₈ G	6	6	100	5	5	100	0.11	0.19	0.08	0.05	0.13
UBC827	(AC) ₈ G	11	11	100	4	4	100	0.29	0.45	0.31	0.12	0.49
UBC835	(AG) ₈ YC	11	11	100	4	4	100	0.28	0.44	0.26	0.08	0.51
UBC840	(GA) ₈ YT	5	5	100	6	1	16.6	0.33	0.50	0.35	0.07	0.73
UBC842	(CT) ₈ RA	10	10	100	4	0	0	0.29	0.45	0.29	0.10	0.47
UBC847	(CA) ₈ RC	8	8	100	3	1	33.3	0.27	0.43	0.22	0.10	0.40
UBC856	(AC) ₈ YA	7	6	85.7	6	5	83.3	0.21	0.35	0.21	0.09	0.44
UBC861	(ACC) ₅	4	3	75.0	9	6	66.3	0.23	0.37	0.25	0.08	0.55
UBC862	(AGC) ₅	6	6	100	4	4	100	0.32	0.49	0.34	0.13	0.58
UBC889	DBD(AC) ₇	9	8	88.8	7	7	100	0.32	0.48	0.32	0.10	0.62
UBC891	HVH(TG) ₇	6	6	100	3	1	33.3	0.32	0.49	0.38	0.09	0.76
Total		88	85	96.5	58	35	60.3	-	-	-	-	-
Mean		7.3	7.1	9.7	4.8	2.9	6.0	0.26	0.42	0.26	0.09	0.66

^zTUB base code : B(C,G,T), D(A,G,T), R(A,G), Y(C,G), H(A,C,T), ^yTB: No. of total bands, ^xPB: No. of polymorphic bands, ^wPR: polymorphic rate (%), ^vGD: Nei's (1973) gene diversity, ^uS.I: Shannon's Information index (Shannon and Weaver 1949), ^tHt: Total gene diversity (Nei's 1978). ^sHs: Genetic diversity within-populations (Nei's 1978). ^fGst: Coefficient of gene differentiation (Nei's 1978).

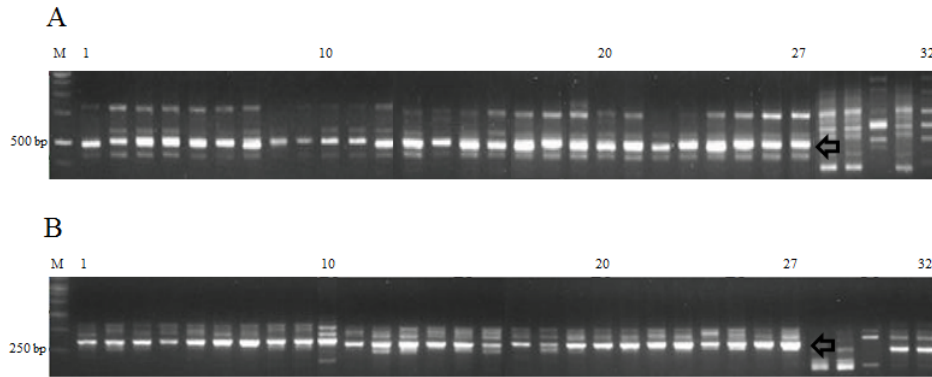


Fig. 3. ISSR electrophoresis profiles for 32 accessions of *Z. Schinifolium* and *Z. piperitum*. Amplification products were separated on agarose gels (1.6%) in 1×TAE buffer and photographed using gel documentation system (Bio-rad, USA). Lane M : 1 kb ladder marker. Primer names were included in Table 2.

0개(UBC 835, UBC 842)에서 최대 7개(UBC 889)로 평균 2.9개의 다형성 밴드가 검출되었다. 산초나무 수집종간의 유전자 단편의 다형성 비율은 증폭된 총 88개 밴드 중 85개의 다형성 밴드가 검출되어 96.5%였으며, 초피나무 수집종은 총 58개 밴드 중 다형성 밴드는 35개로 60.3%의 다형성을 나타내었다. 이는 운향과 귤나무속(genus *citrus*) 35 수집종을 12개 ISSR 프라이머로 분석하여 최저 4개에서 최고 14개 사이로 프라이머당 8.33개의 밴드가 검출되고, 다형성 밴드는 최저 2개에서 최고 9개, 프라이머당 평균 5.2개의 다형성 밴드가 검출된 보고(Ugun *et al.*, 2010)보다 본 연구결과 산초나무에서 총 DNA 절편수는 약간 작고 다형성 밴드는 많은 수준이었다. 또한 Kim (2004)이 국내 3개 산초나무 자생지역에서 수집한 33계통을 대상으로 8개 RAPD 프라이머로 분석하여 30.3%의 다형성을 나타낸 결과보다 높은 수준이며, 중국의 7개 지역에서 수집한 138개체의 *Citrus hongheensis*를 ISSR 분석한 결과인 95.10%와 유사한 수준이었다.

형태학적으로 분류된 5개 종간 각 프라이머별 유전적 다양도(GD)는 최소 0.11(UBC 824)에서 최대 0.33(UBC 840) 사이로 평균 0.26을 나타내었다. 샤논의 정보지수(S.I)는 최소 0.19(UBC 824)에서 최대 0.50(UBC 840) 사이로 평균 0.42였다. 이는 중국의 175개 산초나무속 유전자원을 sequence-related amplified polymorphism (SRAP) 마커로 분석한 결과 나타난 평균 GD값 0.28, 평균 S.I 0.42와 유사한 수준이었다(Feng *et al.*, 2015). 유전좌위 수준에서 전체 종간 유전적 다양도(Ht)는 최소 0.08(UBC 824)에서 최대 0.38(UBC 891) 사이로 평균 0.26이었고, 종간에 분화정도를 나타내는 Gst값도 Ht값과 유사한 경향으로 UBC824에서 최소(0.13), UBC891에서 최대(0.76)을 나타

내었다. 종내 변이를 나타내는 Hs값은 최소 0.08(UBC824)에서 최대 0.13(UBC862) 사이로 평균 0.09였다. Ryu *et al.* (2015)은 타가수정으로 인해 유전적 변이가 심한 차나무(*Camellia sinensis* L.)의 국내 재배지와 야생집단을 ISSR 마커로 분석한 결과 Ht(0.230~0.274), Hs(0.158~0.185), Gst(0.193~0.423)로 본 연구결과에 비해 낮은 수준이다.

종 특이적 밴드는 산초나무 수집 계통의 UBC 861 프라이머 500 bp 영역과 UBC 862 프라이머 300 bp 영역에서 특이적인 밴드가 검출되었다(Fig. 3). 따라서 PCR을 이용한 특이적 DNA 마커를 이용하여 산초나무와 초피나무 계통의 구별이 가능한 것으로 판단된다. ISSR 마커는 계통 내에 풍부하게 존재하는 반복염기(SSR)를 이용하기 때문에 다수의 위치에서 개체간 다형성을 나타내어 종간 변이를 검출하는데 유용하며(Godwin *et al.*, 1997; Russel *et al.*, 1997; Tsumura *et al.*, 1996), 올리프(*Olea europaea*), 연속(*Nelumbo*)에서도 종특이적 또는 품종특이적 ISSR 마커가 확인되었다(Ryu *et al.*, 2010; Paula *et al.*, 2007).

유전적 유사도 지수

산초나무 및 초피나무 유전자원의 종간에 유전적 차이 및 종내 변이정도를 비교하여 산초나무 신품종 육종의 기초자료로 활용하고자 유전적 유사도 지수를 산출하였다(Table 3). 총 32 수집계통간의 유전적 유사도 지수는 최저 0.116 (No.8과 31)에서 최고 0.816 (No.28과 29) 사이로 32개 수집계통의 유전적 유사도 평균값은 0.417이었다. 산초나무의 종내 유전적 유사도 지수는 최저 0.177 (No.10과 18)에서 최고 0.780 (No.21과 23) 사이로 산초 27계통의 평균 유전적 유사도 지수는 0.479였다. 초피나무의 종내 유전적 유사도 지수는 최저 0.250 (No. 27과 31)

농가의 산초 6계통(No. 18, 20, 22, 23, 24, 25) 및 전주산초 2계통(No. 19, 21)이 유집되었다. V 그룹에는 장수지역 12개 산초 계통(No. 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16)과 전주산초 1계통(No. 7)이 유집되었으며, 장수 산초 계통(No. 13)과 구례 농가의 민산초 계통(No. 17)은 유전적 유사도가 낮게 나타나 독립적으로 존재하였다. 종자수량이 우수한(Choi, 2012) 구례 농가의 우량 육성 4개 계통들(No. 18, 19, 20, 21)은 같은 IV 그룹에 유집되었으며, 군집분석 결과 동일한 수집지역 계통들은 같은 그룹에 유집되었다. Kim *et al.* (2015)은 국내와 중국의 산초나무, 초피나무, 화초나무, 왕초피나무(*Z. coreanum*) 25 수집종을 대상으로 rDNA-ITS 영역의 염기서열을 분석한 결과, 초피나무, 화초나무, 왕초피나무는 큰 그룹으로 유집되었고, 산초는 분리되어 단일 그룹의 유집된 결과와 일치하였다. 또한 좁산초와 전주 산초 계통들은 산초 계통들과 분리되지 않았는데, 이는 ribosomal DNA 영역의 염기서열로 좁산초, 전주산초, 민산초를 분석한 결과 중간 분리되지 않아 분류학적으로 기준이 불명확하다는 연구 결과와 일치하였다(Sun *et al.*, 2010).

유전적 다양성 분석 결과 유집된 계통간의 형태학적 특성(종피색, 잎 크기 및 가시유무의 정도)의 차이와 연관성은 구례 접목 육성 계통(No. 17)이 유집되지 않은 점은 일치하였으나 열매색과 가시와 잎의 크기에 대한 상관관계는 나타나지 않았다. 지역간의 상관성은 형태학적 특성과 유전적 다양성 분석 간에 있어 3계통(No. 7, 8, 11)을 제외하고 지역 간에 유집되어 유사하였다. Kim (2004)은 경상도와 강원도의 3개 야생 산초나무 집단의 RAPD 기법으로 군집 분석한 결과 지역 간에 연관성 없이 유집된 결과를 보고하고 있어 이와는 상이하였다. 산초는 자웅이주가 혼재되어 특이한 교잡 양태를 나타낸다(Choi, 2012). 따라서 본 연구에서는 수집 장소에 따른 차이보다는 장수 및 구례 지역 재배자원의 수집 기원이 다르거나 또는 양 지역 재배농가에서 산초 유전자원이 집단 내에서 유무성 번식된 결과로 인해 두 지역 간에 유전적으로 매우 상이함을 나타낸 것으로 생각해 볼 수 있다.

적 요

국내 농가에서 재배되고 있는 산초 및 초피유전자원의 형태학적 특성과 유전적 다양성을 분석하여 분자생물학적 분류와 유전자원평가에 활용하고자 하였다. 산초 수집계통간의 유전적 다형성은 증폭된 총 88개 밴드 중 85개의 다형성 밴드가 검출되어 96.5%였으며, 초피나무 수집계통은 총 58개 밴드 중 다형

성 밴드는 35개로 60.3%의 다형성을 나타내었다. 산초나무 수집 계통의 UBC 861 프라이머 500 bp 영역과 UBC 862 프라이머 300 bp 영역에서 종 특이적인 밴드가 검출되었다. 신품종 육성의 기초자료로 활용하고자 유전적 유사도 지수를 산출한 결과, 총 32계통간의 유전적 유사도 지수는 최저 0.116에서 최고 0.816 사이로 산초나무의 종내 유전적 유사도 지수는 0.177~0.780, 초피나무의 종내 유전적 유사도 지수는 0.250~0.816 사이로 낮게 나타나 교배육종 소재로 활용이 기대된다. 군집분석 결과, 유전적 유사도 지수 0.302에서 산초나무와 초피나무 수집 계통이 분리되어 산초나무 2개 그룹과 초피나무 1개 그룹으로 유집되었다. 반면 유집된 그룹과 형태학적 특성과 연관성은 없었다. 본 연구 결과를 바탕으로 ISSR 마커로 산초와 초피의 중간 구분 마커 개발이 기대되며, 유전적 유사도를 바탕으로 교배육종 소재 선발의 가능성이 평가되었다.

사 사

이 논문은 박사학위 논문(Choi, 2012)의 일부임.

References

- Ali, A., Y.M. Choi, D.Y. Hyun, S. Lee, S. Oh, H.J. Park, Y.H. Cho and M.C. Lee. 2016. EST-SSR Based Genetic diversity and population structure among Korean landraces of foxtail millet (*Setaria italica* L.). Korean J. Plant Res. 29(3):322-330.
- Choi, H.S. 2012. Different growth, genetic trait and biological activity in Korean *Zanthoxylum* genus accession. Department of Plant Production Sciences, Ph.D. Thesis, Sunchon National Univ., Korea. pp. 6-47 (in Korean).
- Fang, D.Q. and M.L. Roose. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence markers. Theor. Appl. Genet. 95:408-417.
- Fang, G., S. Hammar and R. Grumet. 1992. A quick inexpensive method of removing polysaccharides from plant genomic DNA. Biotechniques 13(1):52-55.
- Feng, S.F., T. Yang, Z. Liu, L. Chen, N. Hou, Y. Wang and A. Wei. 2015. Genetic diversity and relationships of wild and cultivated *Zanthoxylum* germplasms based on sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. Genet Resour. Crop Evol. 62:1193-1204.
- Godwin, I.D., E.A.B. Aiken and L.W. Smith. 1997. Application of

- inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* 18:1524-1528.
- Gupta, D.D and S.S Mandi. 2013. Species specific AFLP markers for authentication of *Zanthoxylum acanthopodium* & *Zanthoxylum oxyphyllum*. *J. Med. Plants* 1(6):1-9.
- Kim, C.W. 2004. Regional seed characteristics, propagation and genetical diversity by RAPD analysis of *Zanthoxylum schinifolium*. Department of Forest Resources, M.S. Thesis, Kangwon National Univ., Korea. pp. 1-34 (in Korean).
- Kim, Y.D., S.K. Kang and M.R. Oh. 1993. A study on the ichthyotoxic constituents of Chopi (*Zanthoxylum piperitum* DC). *Korean Soc. Food Nutr.* 22(5):617-620 (in Korean).
- Kim, W.J., Y. Ji, Y.M. Lee, Y.M. Kang, G. Choi and B.C. Moon. 2015. Development of molecular markers for the authentication of *Zanthoxyli pericarpium* by the analysis of rDNA-ITS DNA barcode regions. *Kor. J. Herbology* 30(3):41-47 (in Korean).
- Korea National Arboretum. 2016. www.nature.go.kr
- Korea food and drug administration. 2012. The Korean Pharmacopoeia Tenth Edition. Seoul, Korea. p. 1152.
- Ko, Y.S. and H.J. Han. 1996. Chemical constituents of Korean chopi (*Zanthoxylum piperitum*) and sancho (*Zanthoxylum schinifolium*). *Korean J. Food Sci. Technol.* 28(1):19-27 (in Korean).
- Lee, T.B. 1999. Illustrated Flora of Korea. Hyangmoonsa Publishing Co., Seoul, Korea. p. 696 (in Korean).
- Moller A.P., L.Z. Garamszeg and C.N. Spottiswoode. 2008. Genetic similarity, breeding distribution range and sexual selection. *J. Evol. Biol.* 21: 213-225
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70(12):3321-3323.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Paula, M.L., L.B. Jose, S. Gomes, J. Meirinhos, L. Santos and G.P. Henrique. 2007. RAPD and ISSR molecular markers in *Olea europaea* L.: Genetic variability and molecular cultivar identification. *Genet Resour. Crop Evol.* 54:117-128.
- Ryu, J.H., G.L. Choi, J.L. Lyu, S.C. Lee, J.U. Chun, D.Y. Shin and C.-H. Bae. 2010. Genetic relationship analysis of genus *Nelumbo* accessions based on inter-simple sequence repeats (ISSR). *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 18(2):86-92 (in Korean).
- Ryu, J.H. and C.H. Bae. 2011. Genetic diversity and relationship analysis of *Taraxacum officinale* Weber and *Taraxacum coreanum* Nakai accessions based on inter-simple sequence repeats (ISSR) markers. *Korean Journal of Medical Crop Science* 19(3):149-156 (in Korean).
- Ryu, J.H. and C.H. Bae. 2012. Genetic diversity and relationship analysis of genus *Taraxacum* accessions collected in Korea. *Korean J. Plant Res.* 25(3): 329-338.
- Ryu, J.H., S.O. Mun, K.J. Kim and C.-H. Bae. 2015. Genetic Diversity Analysis of the Wild and the Cultivated Tea (*Camellia sinesis* L. O. Kuntze) Plants in Southern Korea. *J. Kor. Tea Society* 21(2):76-84.
- Russel, T.R., J.D. Fuller, M. Macaulay, B.G. Hatz, A. Jahoor, W.P. Powell and R. Waugh. 1997. Direct comparison of level of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* 95:714-722.
- Shannon, C.E. and W. Weaver. 1949. The mathematical theory of communication. Univ. of Illinois Press, Urbana, USA. pp. 1-54.
- Sun, Y.L., W.G. Park, O.W. Kwon and S.K. Hong. 2010. Ribosomal DNA internal transcribed spacer 1 and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Zanthoxylum schinifolium*. *Afr. J. Biotechnol.* 9(30):4661-4673.
- Tsumura, Y., K. Ohba and S.H. Strauss. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor Appl. Genet.* 92:40-45.
- Ugun, A., O. Gulsen, T. Yesiloglu, Y. Aka-Kacar and O. Tuzcu. 2010. Distinguishing grapefruit and pummelo accessions using ISSR Markers. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 46(4):170-177.
- Yi, J.Y., G.A. Lee, W.C. Chung, Y.Y. Lee, J.G. Kwak and S.Y. Lee. 2015. Morphological and genetic stability of dormant apple winter buds after cryopreservation. *Korean J. Plant Res.* 28(6):697-703.
- Yoon, K.W. and M.Y. Kim. 2010. Korean Medicinal Plants. Shinkwang Publishing Co., Seoul, Korea. p. 222 (in Korean)
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by SSR anchored PCR amplification. *Genomics* 20:176-183.

(Received 27 August 2016 ; Revised 4 October 2016 ; Accepted 14 October 2016)