

## 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 IV : 식물

주관연구기관	녹색식물연구소
연구책임자	이정호
발행년월	2009-12
주관부처	교육과학기술부
사업관리기관	교육과학기술부
NDSL URL	<a href="http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO201200010558">http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO201200010558</a>
IP/ID	14.49.138.138
이용시간	2017/11/03 10:21:21

### 저작권 안내

- ① NDSL에서 제공하는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, KISTI는 복제/배포/전송권을 확보하고 있습니다.
- ② NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 상업적 및 기타 영리목적으로 복제/배포/전송할 경우 사전에 KISTI의 허락을 받아야 합니다.
- ③ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 보도, 비평, 교육, 연구 등을 위하여 정당한 범위 안에서 공정한 관행에 합치되게 인용할 수 있습니다.
- ④ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 무단 복제, 전송, 배포 기타 저작권법에 위반되는 방법으로 이용할 경우 저작권법 제136조에 따라 5년 이하의 징역 또는 5천만 원 이하의 벌금에 처해질 수 있습니다.

주요 생물자원의 유전자 분석 · 연구 IV :  
식물

-멸종위기 식물종 7종 대상-

2009년 12월



국립생물자원관  
NATIONAL INSTITUTE OF BIOLOGICAL RESOURCES



# 제 출 문

국립생물자원관장 귀하

본 보고서를 “주요 생물자원의 유전자 분석·연구 : 식물”의 최종 보고서로 제출합니다.

2009년 12월

녹색식물연구소 대표이사

## [연구진]

연구책임자 : 이 정 호 (녹색식물연구소)

연 구 원 : 정 명 기 (경 상 대 학 교)

연 구 원 : 김 철 환 (전북대, 생물다양성연구소)

연구보조원 : 이 혜 연 (녹색식물연구소)

연구보조원 : 정 미 윤 (경 상 대 학 교)

연구보조원 : 심 재 경 (녹색식물연구소)

연구보조원 : 정 수 진 (녹색식물연구소)



## 요 약 문

세계적으로 생물자원은 생물산업(BT)의 기본 소재로 그 중요성이 증대되고 있다. 생물다양성협약(CBD) 및 생물 유전자원의 접근 및 이익 공유(ABS)에 따른 국가 간의 자원 주권이 강화되고 있는 실정에서, 한국 고유 생물종의 유전자원 연구는 자원 주권 확보와 지적 재산권 강화에 필수적이다. 본 연구는 녹색성장 및 생물산업에 활용할 목적으로 유전체 및 유전적 다양성 연구를 보다 체계적으로 수행하였다. 유전체 연구는 엽록체 완전 염기 서열 4종을 포함한 6종에서 엽록체 유전체 정보를 확보하였으며, 유전적 다양성 연구는 그 유전체 정보를 활용한 DNA(2종) 및 allozyme 다양성(2종) 연구를 통하여, 대상 연구종 4종에 대한 보존 대책을 제시하였다.

엽록체 유전체 연구에서, 한국 특산인 노랑붓꽃(*Iris koreana*)과 노랑무늬붓꽃(*Iris odaesanensis*)의 엽록체 유전체는 각각 150,696 및 153,623bp로 밝혀졌으며, 기저 현화 식물인 순채(*Brasenia schreberi*) 및 가시연(*Euryale ferox*)은 각각 158,835와 159,625bp로 밝혀졌다. 양치식물인 솔잎난(*Psilotum nudum*)의 13유전자를 포함한 25구간의 10.5kb를 전남과 제주 개체 비교 분석하였으며, 현화 기저식물인 죽절초(*Sarcandra glabra*)와 근연식물 2종에 대하여 IRA와 IRB의 일부인 28구간의 8.5kb를 비교 분석하였다. 붓꽃과(Iridaceae) 및 어항마름과(Cabombaceae)의 엽록체 유전체 연구에서 완전 염기 서열을 밝힌 것은 세계 최초이다.

DNA와 allozyme 다양성을 분석하여 유전적 다양성을 연구하였으며, 솔잎난의 7집단에 대한 엽록체 DNA 다양성(SSR, SNP) 연구결과 6개의 엽록체 유전형이 파악되었고, 가시연의 8군집에 대한 핵(SSR, SNP)과 엽록체(SSR, SNP) DNA 다양성 연구 결과 4개의 유전형이 파악되었다. 층층둥굴레(*Polygonatum stenophyllum*)의 7집단의 allozyme(10효소계, 22종류 유전좌위) 다양성 연구에서 8종류의 다형성 유전자위가 파악되었고, 노랑무늬붓꽃 10집단의 allozyme(10효소계, 분석된 20종류 유전좌위) 다양성 연구에서 16종류의 다형성 유전자위가 파악되었다. 집단 내 및 집단 간의 유전적 다양성과 식물의 번식 특성에 근거하여, 보존 및 복원 대책을 제시하였다. 멸종 위기식물 65종 중, 유전체 연구 46종과 유전적 다양성 연구 51종의 향후 진행할 연구에서 한국 멸종 위기종의 많은 수를 차지하고 있는 단자엽 식물의 우선 연구를 제안한다.



# 목 차

I. 서론 (연구개요) .....	7
1. 연구 배경 .....	7
2. 4차년도 연구 내용 .....	10
II. 연구 수행 계획 .....	13
1. 연구 목표 및 조직 .....	13
2. 연구 수행 계획 .....	16
III. 4차년도 연구 결과 및 고찰 .....	18
제1장 엽록체 유전체 연구 .....	18
1. 양치식물의 엽록체 유전체 연구: 솔잎난 .....	20
2. 기저 현화 식물의 엽록체 유전체 연구 .....	29
3. 단자엽 식물의 엽록체 유전체 연구: 노랑붓꽃과 노랑무늬붓꽃 .....	45
제2장 유전적 다양성 조사 .....	50
1. 양치식물의 세포질 DNA 표식자에 의한 유전적 다양성 연구: 솔잎난 .....	50
2. 기저 현화식물의 DNA 표식자에 의한 세포질 및 핵의 유전적 다양성 연구: 가시연 .....	57
3. 알로자임 표식자에 의한 멸종위기 식물 2종의 유전적 다양성 연구: 층층둥굴레 및 노랑무늬붓꽃 .....	69
IV. 제 4차년도 연구 결론 .....	81
1. 엽록체 완전 염기 서열과 의미 .....	81
2. 멸종 위기종의 유전적 다양성 분석을 통한 보존 대책 .....	87
3. 미연구 멸종 위기종 .....	95
4. ABS와 유전정보 자료 확보의 의미 .....	98
5. 유전 정보 자료의 데이터베이스에 대한 의견 .....	100
V. 참고 문헌 .....	101



## 표 목 차

표 I-1. 본 연구에서 엽록체 유전체 선행 연구 및 연구 제안 중 .....	11
표 I-2. 본 연구에서 유전적 다양성 선행 연구 및 연구 제안 중 .....	12
표 III-1-1-1. 본 연구에 이용된 제주 및 전남 지역의 솔잎난 정보 .....	22
표 III-1-1-2. 솔잎난 유전체 연구에 사용한 프라이머 .....	24
표 III-1-1-3. 솔잎난 엽록체 trnS~trnH 구간의 제주산, 전남산의 구간 비교 .....	25
표 III-1-1-4. 솔잎난 엽록체 ndhJ~trnT 구간의 제주산, 전남산의 구간 비교 .....	26
표 III-1-1-5. 솔잎난 엽록체 ycf1~orf344 구간의 제주산, 전남산의 구간 비교 .....	27
표 III-1-2-1. 홀아비꽃대과 DNA number와 Voucher 정보 .....	31
표 III-1-2-2. 홀아비꽃대과 계통 분석을 위한 matK sequence 자료 .....	33
표 III-1-2-3. 엽록체 유전체 IR구간의 Junction A의 5'부분 염기 서열 분석 .....	34
표 III-1-2-4. 엽록체 유전체 IR구간의 Junction B의 3'부분 염기 서열 분석 .....	35
표 III-1-2-5. 가시연 DNA number와 Voucher 정보 .....	40
표 III-1-2-6. 순채 DNA number와 Voucher 정보 .....	43
표 III-1-3-1. 붓꽃과 DNA number와 Voucher 정보 .....	46
표 III-2-1-1. 본 연구에 이용된 제주 및 전남의 솔잎난 7 군집 정보 .....	51
표 III-2-1-2. 지역별 엽록체 haplotype의 분포 양상 .....	54
표 III-2-1-3. 솔잎난 6 엽록체 genotype의 지역간 분포 .....	55
표 III-2-1-4. 솔잎난 6 haplotype의 군집간 분포 .....	56
표 III-2-2-1. 가시연 8군집 정보 .....	59
표 III-2-2-2. 가시연 마커로 사용된 프라이머 .....	61
표 III-2-2-3. 한국산 가시연의 세포질 및 핵 유전 변이 분포 .....	63
표 III-2-2-4. 한국산 가시연의 핵과 세포질 유전 형질에 근거한 4개의 유전형 .....	65
표 III-2-2-5. 한국산 가시연의 EM02 마커 구간에서 핵 유전 변이 분포 ..	66
표 III-2-3-1. 층층등굴레 ( <i>Polygonatum stenophyllum</i> ) 및 노랑무늬붓꽃 ( <i>Iris ochaesanensis</i> )을 대상으로 알로자임 분석에 사용된 완층계 (2종류)와 효소계(10종류) 및 발현된 임의로 정한 유전좌위 .....	72

표 III-2-3-2. 층층둥굴레 7집단에서 보이는 8종류의 다유전좌위 유전자형 .....	76
표 III-2-3-3. 층층둥굴레 7집단에서 보이는 클론의 다양도 및 유효 집단의 크기 ( $N_e$ ) 추정 .....	76
표 III-2-3-4. 층층둥굴레 7집단에서 보이는 8 종류의 다유전좌위 유전자형의 빈도(%) .....	77
표 III-2-3-5. 층층둥굴레 7집단에서 보이는 유전적 다양도 통계량 .....	77
표 III-2-3-6. 노랑무늬붓꽃 10곳 집단에서 보이는 클론의 다양도 및 유효 집단의 크기 ( $N_e$ ) 추정 .....	79
표 III-2-3-7. 노랑무늬붓꽃 10곳 집단 내 유전적 변이 및 고정계수 ( $F_{IS}$ ) .....	79
표 III-2-3-8. 층층둥굴레 다형성 유전좌위 8 곳에서 보이는 집단별 유전자형 .....	80
표 IV-1. 국립생물자원관 주요 생물자원의 유전자 분석 연구 용역에서 엽록체 유전체 완전 염기 서열이 밝혀진 멸종 위기 식물 .....	81
표 IV-2. 엽록체 유전체 완전 염기 서열이 밝혀진 기저 현화 식물 (ANITA) .....	82
표 IV-3. 엽록체 유전체 완전 염기 서열이 밝혀진 단자엽 식물 .....	84
표 IV-4. 녹색식물연구소에서 진행된 식물 자원 엽록체 유전체 완전 염기 서열 분석. ....	85
표 IV-5. 유전체 연구가 진행되지 않은 멸종 위기종 .....	96
표 IV-6. 유전적 다양성 연구가 진행되지 않은 멸종 위기종 .....	97

## 그 립 목 차

그림 I-1. 본 연구 대상종 .....	13
그림 III-1-1-1. 제주도 서귀포시 남원읍 하례리에서 채집한 솔잎난 .....	21
그림 III-1-1-2. 본 연구의 유전체 분석 구간과 PCR 프라이머 위치 .....	22
그림 III-1-1-3. 본 연구의 유전체 분석 구간과 시퀀싱 프라이머 위치 .....	23
그림 III-1-1-4. 솔잎난 3 엽록체 변이구간 .....	27
그림 III-1-1-5. 솔잎난 trnL intron 기본형의 2차 구조 .....	28
그림 III-1-2-1. 홀아비꽃대와 DNA 샘플 채취 전의 연구 재료 .....	31
그림 III-1-2-2. 죽절초 엽록체 유전체 연구 구간 .....	32
그림 III-1-2-3. 홀아비꽃대와 matK MP 계통수 .....	36

그림 III-1-2-4. 가시연	39
그림 III-1-2-5. 가시연의 엽록체 유전체 지도	41
그림 III-1-2-6. 순채	42
그림 III-1-2-7. 순채의 엽록체 유전체 지도	44
그림 III-1-3-1. 본 연구에 사용한 노랑붓꽃, 금붓꽃, 노랑무늬붓꽃	46
그림 III-1-3-2. 노랑붓꽃의 엽록체 유전체 지도	48
그림 III-1-3-3. 노랑무늬붓꽃의 엽록체 유전체 지도	49
그림 III-2-1-1. 솔잎난의 전남 화순 군집(2개체)과 제주 신희동 군집	50
그림 III-2-1-2. 솔잎난 연구 군집과 군집당 연구 표본 크기	52
그림 III-2-1-3. 솔잎난 trnL 인트론 Loop 8의 SSR	53
그림 III-2-1-4. 솔잎난 3 haplotype의 군집간 분포 양상	54
그림 III-2-2-1. 2009년 가뭄에 시달리는 가시연	58
그림 III-2-2-2. 가시연 8 군집 정보	60
그림 III-2-2-3. trnH~psbA 구간의 inversion.	62
그림 III-2-2-4. psbK~psbI IGS 구간의 SNP(C/T)와 SSR[(T) <sup>9</sup> 과 (T) <sup>10</sup> ] 마커	64
그림 III-2-2-5. 한국산 가시연의 EM02 마커 구간에서 핵 유전변이 2 type	66
그림 III-2-2-6. 한국산 가시연의 유전적 다양성과 그 형의 진화 가설	67
그림 III-2-3-1. 충충동굴레의 채집된 7곳 집단	70
그림 III-2-3-2. 노랑무늬붓꽃의 알로자임 분석을 위해 채집된 10곳 집단	71
그림 III-2-3-3. 노랑무늬붓꽃 10곳 집단을 대상으로 Nei's(1978) genetic distance 계수에 근거하여 UPGMA 방법에 의한 전형질도 (dendrogram)	80
그림 IV-1. 유효 집단의 크기가 세대 당 기대되는 근친 교배로 측정(표현)된 유전적 부동(RGD)에 끼치는 영향	94

# I. 서 론(연구 개요)

## 1. 연구 배경

### 1.1. 고유 생물자원적 배경

- 세계적으로 녹색 성장(Green New Deal)을 중심으로 한 생물 산업(Biotechnology.BT)의 기본 소재로 그 중요성이 증대되고 있다.
  - 세계각국은 유전자원의 무한한 경제적 가치를 인식하여 국가 가치를 인식하여 국가 자산으로 유전자원의 확보 및 관리에 막대한 투자를 하고 있다.
  - 경제적 가치: 생물 산업 규모로 추정 10년에 약 \$1,540억(OCED)에 이른다.
- 국제적으로 선진국은 지식 재산권 강화를 주장하고, 자원 보유국은 자국 유전자원 이용에 따른 이익 공유 등 권리를 주장하고 있다.
  - 국제식물신품종보호연맹(UPOV), 세계지적재산권기구(WIPO) 등은 유전자원의 지적 재산권 보호를 주장하고 있다.
  - 생물다양성협약(CBD), 식물유전자원국제조약(ITPGRFA)에서는 자원에 대한 접근 및 이용에 따른 규제 마련을 추진하고 있다.
  - 생물 유전자원의 접근 및 이익 공유(ABS)에 따른 국가간의 자원 주권의 강화로 인한 선진국의 자원 확보를 위한 국제 공동 연구를 추진하고 있다.
- 한국 고유 생물종의 유전자원 연구는 자원 주권 확보와 지식 재산권 강화에 필수적이나 그 연구가 미미한 실정이다.
  - 각국은 고유 생물종의 특성 평가 및 정보화 등에 막대한 투자를 해

야한다.

-한국은 고유 생물종의 유전체 연구를 포함하는 유전 정보 확보가 미미한 상황이다.

-따라서 조속한 고유 생물종의 많은 유전 정보 확보가 시급하다.

- 유용 야생 유전자원 대상 고유 생물종의 자원 연구는 그 자원의 유전 정보의 확보로 인한 한국 고유종 뿐 만 아니라 근연속, 종, 아종, 변종들에 대한 유전자 및 유전체의 비교 연구가 동시에 수행되어야만 우리나라 고유종의 중요성이 강조 될 수 있다.

## 1.2. 보존 생물학적 배경

- 우리나라의 많은 고유속, 종 아종, 변종들이 현대의 급격한 산업화에 따른 서식지 파괴, 외래 생물의 유입, 무분별한 남획 등의 이유로 집단의 수가 급격히 줄어들고 있거나 멸종 위기에 처해 있다.
- 이러한 생물종들을 효율적으로 보존 관리하는 정책을 수립하고 실행하기 위해서는 우리나라 멸종 위기 생물종들에 대한 유전적 비교 조사가 광범위하게 수행 되어야 할 것이다.
- 특정종의 복원에는 집단들에 대한 유전적 다양성의 조사가 선행되어 어떤 집단, 서식지 등을 복원해야 하는지에 대한 지표 설정이 우선적으로 파악되어야 한다.
- 특정 종에 대하여는 복원에 이용할 수 있는 유전자의 비교 분석 자료가 필요한 상태이다.
- 특히 환경부 지정 멸종 위기 1,2급 식물 65종에 대한 유전적 평가가 시급히 이루어져야 이들의 보존 및 복원에 대한 계획이 수립 될 수 있다.
- 멸종 위기 야생 식물의 증식, 복원 종합 계획에 따른 보존 단위 설정에 종 및 집단을 대상으로 하는 유전적 자료가 폭넓게 수집되어야 한다.
- 대부분의 멸종 위기종들의 유전적 연구에는 재료 확보가 우선적으로 이

루어져야 하는데 이에 대한 구체적인 대책이 마련되어야 할 것이다.

### 1.3. 정책적 배경

- 국제 생물 다양성 협약에 따라 우리나라 고유 생물종들의 생물 주권 확보를 위하여 대상 종들에 대한 유전적 식별을 위한 자료가 광범위하게 수집되어야 한다.
- 2005년부터 야생 동·식물 보호법이 발표됨에 따라 국가적인 장·단기 멸종 위기 종 보존 계획이 필요하며 이를 수행하기 위하여 해당종의 유전적 자료의 비교 분석이 필수적이다.
- 다수의 종이 고유 및 멸종 위기 종에 속하므로 연차별 우선순위를 정하여 분석 규모, 분석 종, 분석 집단, 분석 대상 유전자 분자 표지 등의 선정에 대한 종합적인 계획 수립이 우선 수행되어야 할 것이다.
- 보존과 복원의 측면에서 유전자 분석 대상의 집단 수, 아종 및 변종 수, 개체수의 선정 및 각 분류 계급 및 분류군에 알맞은 분석 대상 유전자 마커의 선정에 대한 전략적 측면이 제시되어야 할 것이다.
- 고유종 및 멸종 위기종의 유전자 정보를 DB화하여 효율적으로 활용 할 수 있는 체제의 구축이 절대적으로 필요하다.
- 국내외의 멸종 위기 야생 동·식물종의 밀거래를 원천적으로 차단하기 위한 원산지 추적이 가능한 유전자 추적 시스템이 구축되어야 할 것이다.
- 산출된 멸종 위기 종들에 대한 유전적 자료를 국립생물자원관 유전자원 실과 공동 활용하는 방향이 제시되고 국가 생물자원을 효율적으로 관리 할 수 있는 방안이 마련되어야 한다.

## 2. 4차년도 연구 내용

한국의 멸종 위기 식물은 총 65종(I급 8종, II급 57종)이 지정되어 있으며, 본 연구용역 사업은 이 멸종 위기종에 대한 유전체 및 유전적 다양성 연구를 진행하고 있다. 제 1단계 3개년 사업으로 10종에 대한 유전 다양성 연구가 진행되었고 13종에 대한 유전체 연구가 수행되었던 바, 멸종 위기종 3종과 한국 고유속 2종(금강인가목, 모데미풀)에 대한 엽록체 완전 염기 서열이 해독되었다고 보고되어 있으나, 공개되어 있지 않다. 제 2단계 1차년도에는 유전체연구 6종 및 유전적 다양성 연구 4종의 연구를 계획하였고, 이중 4종에 대한 엽록체 유전체 완전 염기 서열을 밝히는 것을 목표로 한다.

표 I-1. 본 연구에서 엽록체 유전체 선행 연구 및 연구 제안 종.

분 류	한 국 명 (과 명)	학 명	유전체분석
멸종 위기 I급 (8종)	1 광릉요강꽃(난초과)	<i>Cypripedium japonicum</i>	●
	2 나도풍란(난초과)	<i>Aerides japonicum</i>	●
	3 만년콩(콩과)	<i>Euchresta japonica</i>	●
	4 섬개야광나무(장미과)	<i>Cotoneaster wilsonii</i>	●
	5 암매(암매과)	<i>Diapensia lapponica</i> var. <i>obovata</i>	●
	6 죽백란(난초과)	<i>Cymbidium lancifolium</i>	●
	7 풍란(난초과)	<i>Neofinetia falcata</i>	●
	8 한란(난초과)	<i>Cymbidium kanran</i>	●
멸종 위기 II급 (57종 중 11종)	1 가시연(수련과)	<i>Euryale ferox</i>	○
	2 가시오갈피나무(두릅나무과)	<i>Eleutherococcus senticosus</i> (완전 염기 서열)	●
	3 개느삼(콩과)	<i>Echinosophora koreensis</i>	●
	4 노랑무늬붓꽃(붓꽃과)	<i>Iris odaesanensis</i>	○
	5 노랑붓꽃(붓꽃과)	<i>Iris koreana</i>	○
	6 미선나무(물푸레나무과)	<i>Abeliophyllum distichum</i> (완전 염기 서열)	●
	7 박달목서(물푸레나무과)	<i>Osmanthus insularis</i>	●
	8 솔잎난(솔잎난과)	<i>Psilotum nudum</i>	○
	9 순채(어항마름과)	<i>Brasenia schreberi</i>	○
	10 제주고사리삼(고사리삼과)	<i>Mankyua chejuense</i> (완전 염기 서열)	●
	11 죽절초(홀아비꽃대과)	<i>Sarcandra glabra</i>	○

○ 본 연구종    ● 1단계(3년간) 연구종

표 I-2. 본 연구에서 유전적 다양성 선행 연구 및 연구 제안 중.

분 류	한 국 명 (과 명)	학 명	다양성분석	
멸종 위기 II급 (57종 중 14종)	1	가시연(수련과)	<i>Euryale ferox</i>	○
	2	개느삼(콩과)	<i>Echinosophora koreensis</i>	●
	3	끈끈이귀개(끈끈이귀개과)	<i>Drosera peltata</i> var. <i>nipponica</i>	●
	4	노랑무늬붓꽃(붓꽃과)	<i>Iris odaesanensis</i>	○
	5	등근잎평의비름(돌나물과)	<i>Hylotelephium ussuriense</i>	●
	6	미선나무(물푸레나무과)	<i>Abeliophyllum distichum</i>	●
	7	삼백초(삼백초과)	<i>Saururus chinensis</i>	●
	8	솔나리(백합과)	<i>Lilium cernuum</i>	●
	9	솔잎난(솔잎난과)	<i>Psilotum nudum</i>	○
	10	연잎평의다리(미나리아재비과)	<i>Thalictrum coreanum</i>	●
	11	제주고사리삼(고사리삼과)	<i>Mankyua chejuense</i>	●
	12	충증둥굴레(백합과)	<i>Polygonatum stenophyllum</i>	○
	13	매감자(=한계령풀, 매자나무과)	<i>Gymnospermium microrrhynchum</i> (= <i>Leontice microrrhyncha</i> )	●
	14	황근(아욱과)	<i>Hibiscus hamabo</i>	●

○ 본 연구중    ● 1단계(3년간) 연구중

### 가. 한국의 멸종 위기 식물 6종의 유전체 연구

한국의 멸종 위기종, 노랑붓꽃, 노랑무늬붓꽃, 가시연, 순채, 솔잎난, 죽절초 등 6종에 대하여 엽록체의 10개 구간의 염기 서열을 분석하고, 이 중 4종에 대하여 엽록체 게놈 완전 염기 서열을 밝힌다.

### 나. 한국의 멸종 위기 식물 4종의 유전적 다양성 연구

- 한국의 멸종 위기종의 유전적 다양성 연구 - DNA(5군집이상, 총 50개체이상)  
가시연과 솔잎난에 대하여, 엽록체 및 미토콘드리아의 유전변이(SSR, SNP), 한 종에 대하여 핵 변이로 군집 및 개체 유전적 다양성을 연구하였다.
- 한반도 멸종 위기종의 유전적 다양성 연구 - 알로자임(allozyme, 5군집이상, 총 50개체이상)



층층동굴레와 노랑무늬붓꽃에 대하여 알로자임 분석을 통한 군집 유전적 다양성을 연구하였다.

#### 다. 주요사항

- 엽록체 완전 염기 서열 분석(4종)을 하였다.
- 세포질 유전체(엽록체, 미토콘드리아) 및 핵 SSR, SNP, INDEL 분자 표지를 이용한다.
- 3-유전체 분자 표지 및 알로자임 분석으로 유전적 다양성을 파악하였다.

#### 라. 장점과 특징

- DNA 및 알로자임으로 3-유전체 유전적 다양성을 독립적으로 분석이 가능하다.
- 단친(모계, 부계) 유전과 양친 유전 정보를 확보할 수 있다.
- 각 군집간의 유연관계를 다양한 시각으로 볼 수 있다.

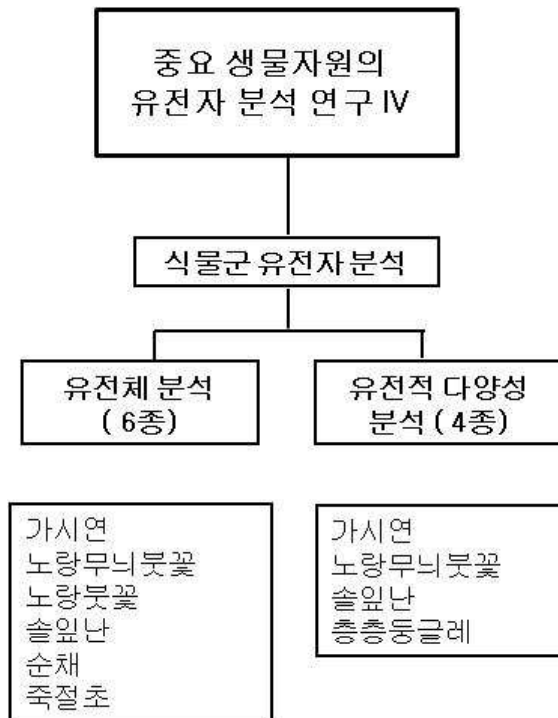


그림 I-1. 본 연구 대상종.

## II. 연구 수행 계획

### 1. 4차년도 연구 목표 및 조직

#### 1-1. 4차년도 연구 목표

- 한국의 멸종 위기 식물에 대한 유전 정보를 확보(유전체 연구)한다.
- 한국의 멸종 위기 식물에 대한 유전적 다양성을 파악(유전적 다양성 연구)한다.
- 위의 결과를 근거로 하여 보존 대책에 대한 결과를 도출한다.
- 위의 결과를 근거로 하여 유전정보의 유용성을 파악해 국립생물자원관 DB구축에 이바지한다.

#### 1-2. 연구 인원 구성

##### 가. 인적 구성 전제 조건

- 본 연구는 멸종 위기종을 대상으로 하므로 이 분야 전문가의 활용이 중요하다.
- 유전체 및 유전적 다양성은 식물 진화에 대한 3-유전체의 연관관계를 진화적 관점에서 이해하는 전문가가 필요하다.
- 엽록체 유전체 연구는 분류학적 관점의 전문 지식이 요구된다.
- 보존 대책을 위해서는 다수의 군집과 개체수의 연구가 절실히 요구된다.
- 다수의 군집과 개체수의 연구를 위해서는 비교적 적은 예산으로 가능한 알로자임 연구가 수행되어야 한다.

##### 나. 인적 구성

- 조류를 포함한 전제 식물 분류를 기반으로 한 생물자원 R&D 회사인 녹색식물연구소 팀이 본 연구를 주관하였다.
- 한국 고유 식물과 멸종 위기종의 집단 수준에서 유전적 다양성의 유일한 알로자임 전문가인 경상대 정명기 교수팀의 조력을 받았다.
- 멸종 위기종의 분포와 복원 전문가로 전북대학교 생물 다양성 센터의

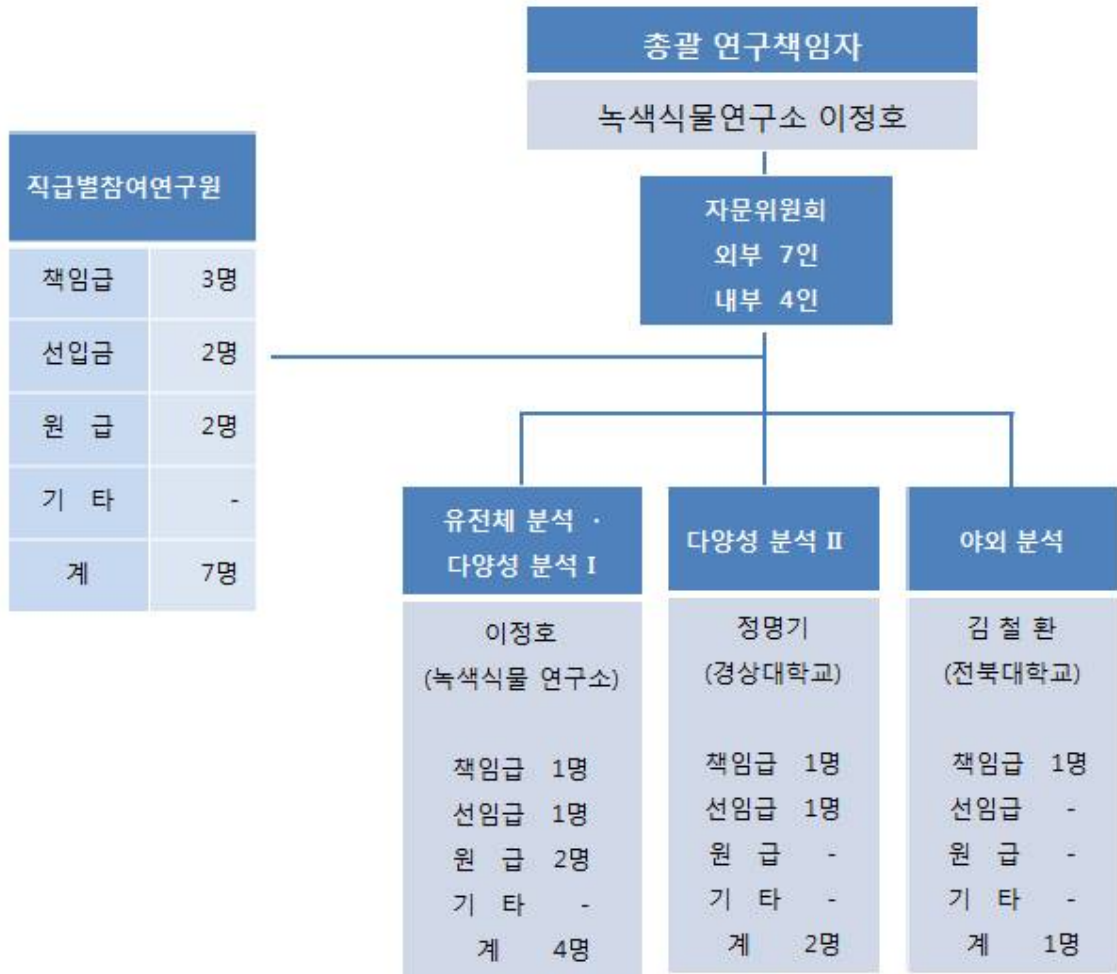
김철환 박사팀을 본 연구진에 포함하였다.

#### 다. 자문 인력 구성

○ 본 연구의 자문 위원은 국립생물자원관의 연구 총괄과의 허가를 근거로 구성하였다.

자문위원	소속 및 직위	성명
외부 자문위원		최상봉
		원효식
		김영동
		이재헌
		최홍근
		최병희
		최도일
내부 자문위원		임문수
		유 호
		구연봉
		박정미

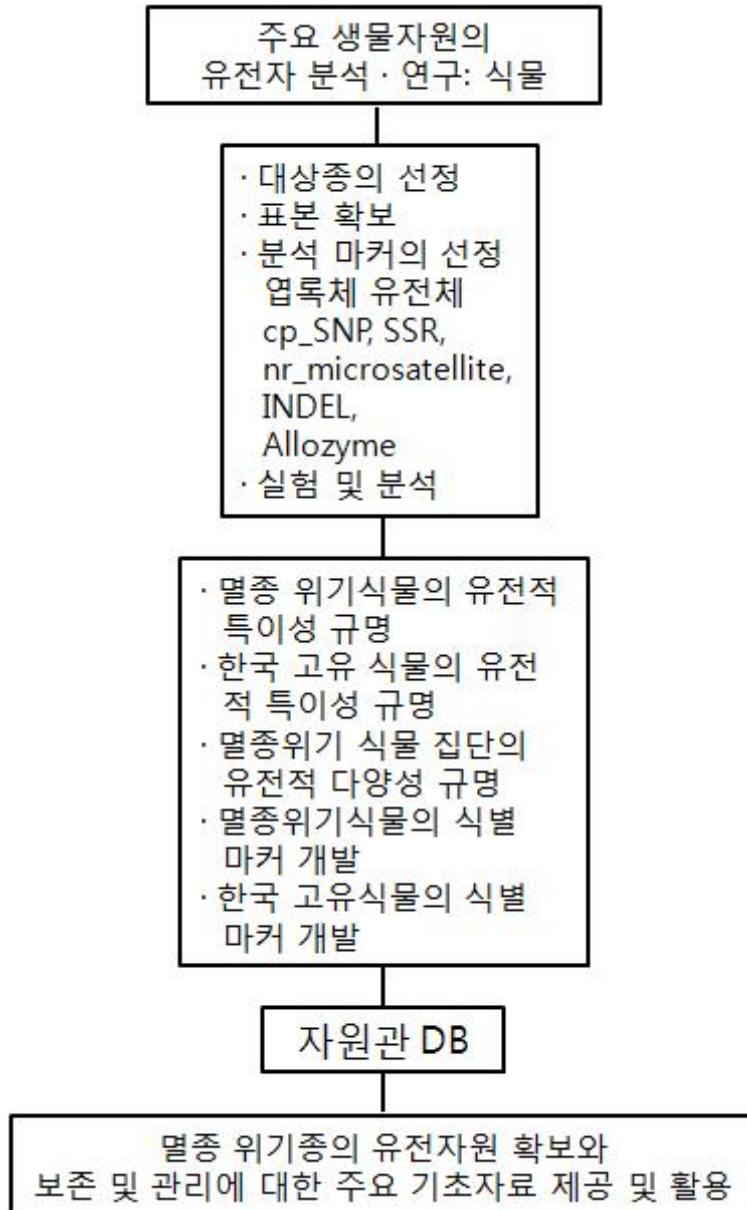
### 1-3. 연구 조직도



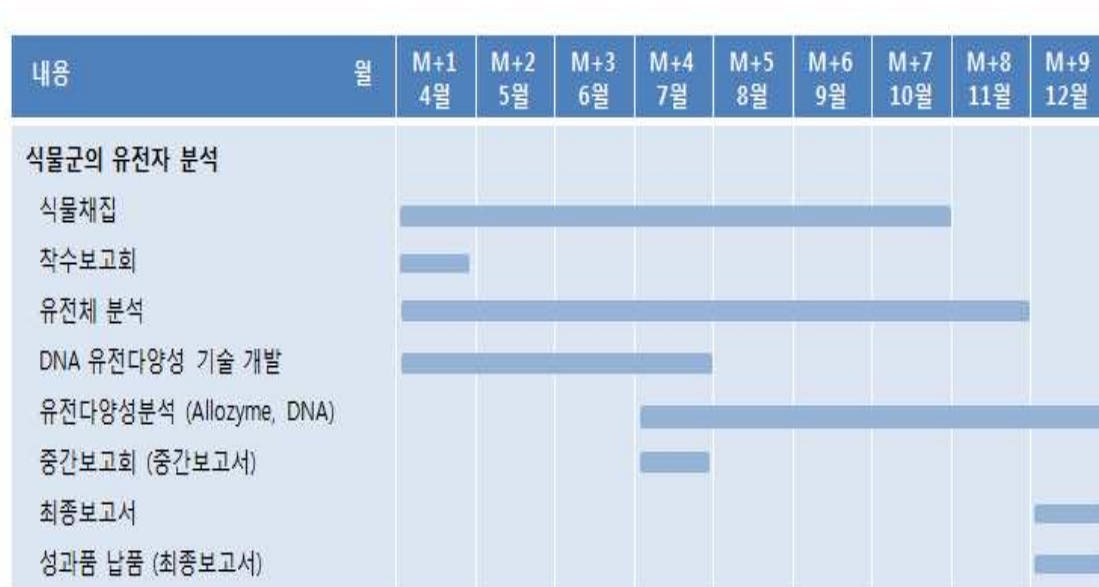
## 2. 연구 수행 계획

### 2-1. 사업 관리

#### 가. 연구 사업 계획



#### 나. 4차년도 연구 수행 계획표



#### 다. 참여 연구원별 업무 분장

이정호 소장(녹색식물연구소 소장, 서강대학교 대우교수)
식물 분야 분석 대상종 선정 및 표본 확보 분석 대상 유전자 마커 선정(유전자 부위 선정) 엽록체 유전체의 염기 서열 결정 멸종위기 및 고유 식물의 유전적 특징 분석 식물 2종의 유전적 다양성 분석(DNA 분석)
김철환 교수(전북대학교 - 생물다양성연구소)
멸종 위기종 자료 분석 멸종 위기종 식물 채집 및 분포 조사
정명기 교수(경상대학교 - 식물보존생물학실험실)
유전적 다양성 분석(2종)을 위한 식물 표본 확보 식물 2종의 유전적 다양성 분석(알로자임 분석) 식물 집단에 대한 유전자 자료의 보존 생물학적 이용 방안 제시

### III. 4차년도 연구 결과 및 고찰

#### 제1장. 엽록체 유전체 연구

육상식물 계통학은 1990년대에 J. Palmer계열의 Jansen, Manhart, Chase로 이어지는 엽록체 유전자를 이용하는 식물 계통학과 Soltis에 의해 주도된 핵 rRNA 계통학이 그 한계에 부딪히고, J. Manhart계열의 Lee(1997)의 엽록체 유전체 계통 및 다유전자 분석 방법과 J. Palmer계열의 Qiu의 미토콘드리아 유전체 연구가 융합하여, 1999년에 3-유전체 유전자를 이용한 다유전자 분석으로 현화 식물의 기원(Qiu et al. 1999, 2000, 2001, 2005)과 육상식물의 계통도를 완성(Qiu et al. 2006, 2007)하는 발전을 이루었고. 육상식물의 기원의 새로운 해석을 유전체 형질 연구(Manhart and Palmer 1990, Qiu and Lee 2000)로 제안했다. Lee and Manhart(2000, 2001, 2002a, 2002b)는 녹색식물 계통학은 엽록체 유전체 계통학적 방법으로 발전해야 한다고 주장하였고, 그 결과 엽록체 유전체 계통학은 육상식물의 계통도(Qiu et al. 2006)와 현화 식물의 계통도(Hansen et al. 2007)가 그 자리를 잡아가고 안정적 결과를 보이고 있다.

21세기의 유전연구 방법이 빠른 속도로 진행되면서, 엽록체 유전체 연구는 1990년대의 rbcL 유전자 분석 수준의 연구의미를 갖는다. 주요 식물의 유전 연구는 핵, 미토콘드리아 및 엽록체 유전체의 완전 염기 서열 분석을 하는 것이고 바이오에너지 식물만 40개이상 그 연구가 진행되고 있다. 이러한 관점에서 엽록체 유전체 연구는 하나의 유전자 분석과 같은 정도의 의미를 갖는다.

식물은 동물과 달리, 엽록체를 유전체로 가지고 있으며, 미토콘드리아는 동물의 16kb에 비해서 500kb이상의 큰 유전체를 갖는다. 육상식물의 엽록체 유전체는 약 160kb로 동물의 미토콘드리아의 약 10배의 유전체를 갖고 있다. 이 엽록체 유전체는 광합성에 관계된 유전자들이 많이 있어, 상대적으로 매우 느린 진화 속도를 갖는다. 그러나 광합성 관련 유전자 외에 진화속도가 매우 빠른 유전자와 변이율이 높은 구간이 존재함은 익히 알려져 있다. 또한, 엽록체 유전체는 식물 종류에 따라 각 유전구간의 진화속도가 다르므로 연구 대상 분류군의 엽록체 유전체 연구 없이 속단하기는 어려워 광범위한 연구는 식물 계통 규명에 매우 유리한 것으로 인식한다.

식물 분류에서 엽록체 유전체의 연구가 계속 왕성하게 진행되는 이유는 미

토콘드리아의 세포내에서 혹은 식물간 유전자 및 인트론의 평행전이, trans-splicing 인트론에 의한 유전체의 끈임 없는 재배열에 의한 계통분석의 오류가 흔히 발생하기 때문이다. 즉, PCR product의 유전자의 orthology를 의심해야 하기 때문으로 판단된다. 핵 유전체 연구를 위하여 rRNA와 이에 연관된 ITS의 연구가 오래 진행되었으나 이 구간은 식물에 2,000~3,000개가 존재하며 그 염기 서열이 한 세포내에서도 다른 것은 이미 잘 알려진 사실이고, 이에 본 연구 책임자는 육상식물 400여종에서 핵의 LSU 및 SSU 염기 서열 분석에서 그 한계성을 제시한 바 있다. 엽록체 유전자는 1 copy로 존재하거나 Inverted repeat부분에 있으며 2개 존재하더라도 그 염기 서열이 같다. 반면, 핵의 유전자는 진화적 한계로 유전자가 한 개가 존재하는 것이 거의 불가능하다. 또한 전 식물에 적용할 계통 분류학 연구를 위한 핵의 orthologous한 유전자 염기 서열을 찾기는 거의 불가능하다. 많은 유전적 다양성 분석이 핵 마커를 이용할 경우, 실험 방법에 따라 상이한 결과가 흔히 일어나는 것이 이러한 이유에서 이다.

이러한 관점에서 상대적으로 안정된 엽록체 유전체의 정보와 유전적 다양성 정보 확보 후에, 핵과 미토콘드리아 유전체 구간의 형질의 진화 관점에서 해석하고 유전적 다양성 연구에 적용하는 것이 군집 연구에 보다 정확한 해석을 가능하게 한다. 본 연구는 한국에서 자라는 멸종위기 식물의 엽록체 유전체 연구를 수행하였다. 엽록체 일부 구간의 연구는 핵과 미토콘드리아의 유전 평행 전이 산물의 오염도를 확인 할 수 없기 때문이다. 이러한 이유로, 연구 대상종의 완전 염기 서열 분석을 목표로 연구를 진행하였다.



## 1. 양치식물의 유전체 연구: 솔잎난

### 1-1. 서론

솔잎난(*Psilotum nudum*)은 잎이 없는 고사리류로 21세기 초까지 유관속 식물의 기원이 되는 화석식물로 인식되어 온 특이한 식물(Qiu & Plamer 1999; Pryer et al. 2001; Qiu et al. 2006)로 솔잎난속은 전 세계적으로 *P. complanatum* Sw.과 함께 2종 및 그 잡종으로 *Psilotum* × *intermedium* W. H. Wagner가 인식되어 있다. 근연속으로 *Tmesipteris*로 뉴 칼레도니아와(10) 호주, 뉴질랜드에 서식한다. 이 2속은 Psilophyta를 구성하는 퇴화 진화를 한 특이한 고사리류로 한국에서는 멸종 위기종으로 제주도에 서식하고 있다고 알려져 있다. 최근 이 솔잎난이 전남 2개 이상 지역에서 자생하는 것을 확인하였고, '제주도(섬)와 전남(내륙)에서 자라는 이 특이 식물이 유전적 다양성을 갖는 가'하는 의문이 생겨 그 연구를 진행하게 되었다.

고사리류의 엽록체 유전체는 4종(Gao et al. 2009)에서 완전 염기 서열이 밝혀져 있고 솔잎난(*Psilotum nudum*)의 완전 염기 서열이 2009년에 Wakasugi에 의해 밝혀져 있어, 엽록체 일부 구간을 한국과 일본, 제주와 전남 군집간의 변이 정도를 파악할 목적으로 본 연구를 수행하였다.

### 1-2. 재료 및 방법

#### 가) 식물재료

솔잎난(*Psilotum nudum*)은 제주도 해안을 따라 제주 서귀포시 하예동의 바위틈에 주로 서식하며, 전남 화순군의 암벽에도 서식한다. 깊은 뿌리를 가지며 영양번식과 포자로 번식하고 군집간 클론화된 것으로 알려져 있다. 본 식물은 그 분포가 제한되어 있어 개체수가 많지 않으므로 채집은 식물체 일부로 하였고, 제주도와 전남에서 한 개체 씩 표본을 만들었다. 본 연구에 사용한 식물은 식물체 일부를 DNA 샘플을 채취한 후, 건조기를 이용하여 70°C에서 72시간 건조하는 방식으로 석엽표본을 만들었다. 생체 사진(그림 III-1-1-1)과 Voucher정보 및 GPI DNA number는 다음(표 III-1-1-1)과 같다



그림 III-1-1-1. 제주도 서귀포시 남원읍 하례리에서 채집한 솔잎난

나) DNA분리, LPCR 증폭 및 염기 서열 결정

솔잎난의 DNA 추출은 분리가 용이하나 단단한 줄기를 이용해 추출하므로 그 추출량이 낮은 문제점을 가지고 있다. 본 연구에서는 양질의 DNA를 얻기 위해 Magnetic bead를 이용한 추출법을 사용하였다. 염기 서열은 3 엽록체 유전체 연구 구간을 2~3kb PCR을 하였고, 유전적 다양성 구간도 같은 방법으로 PCR을 하여 염기 서열을 분석하였다. PCR product는 정제 후 ABI PRISM Bigdye™ Terminator Cycle Sequencing kits ver. 3.0을 이용한 분석을 사용하여 ABI3700 Analyzer로 염기 서열을 결정하였다. 유전체 염기 서열분석은 Primer Walking(Lee 1997)을 이용하였다.

표 III-1-1-1. 본 연구에 이용된 제주 및 전남 지역의 솔잎난 정보.

학 명	채 집 지	Voucher #	GPI DNA #
<i>Psilotum nudum</i>	제주도 서귀포시 하례리	김철환 & 문명옥 20090301-1	GPI2009-001A
<i>Psilotum nudum</i>	전라남도 화순	김철환 & 문명옥 20090801-1	GPI2009-001C02

다) 엽록체 유전체 연구 구간

엽록체 구간 연구는 trnH(GUG) ~ IGS ~ psbA ~ IGS ~ trnK exon 2 ~ inton ~ (matK) ~ intron ~ trnK exon 1 ~ IGS ~ trnQ(UUG) ~ IGS ~ psbK ~ IGS ~ trnS(CGA) 의 15구간, ndhJ ~ IGS ~ trnF(GAA) ~ IGS ~

trnL(UAA) exon 1 ~ intron ~ trnL(UAA) exon 2 ~ IGS ~ trnT(UGU) 9구간, 및 ycf1 ~ IGS ~ orf344의 3구간에 대하여 기존에 알려진 일본의 솔잎난 완전 염기 서열을 한국의 두 지역에서 채집된 솔잎난에서 분석하였다. 이 구간의 유전자 배열과 염기 서열 분석에 사용된 프라이머는 그림 II-1-2와 표 II-1-2에 명시하였다. 제주 하예 및 전남 화순 군집에서 비교 분석하였다.

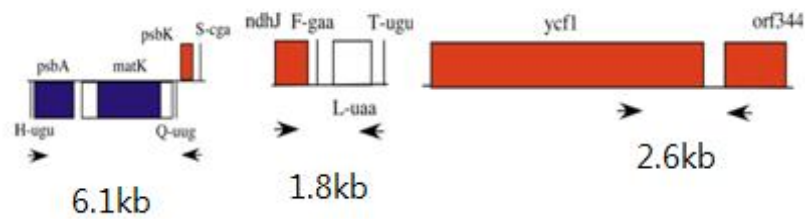


그림 III-1-1-2. 본 연구의 유전체 분석 구간과 PCR 프라이머 위치.

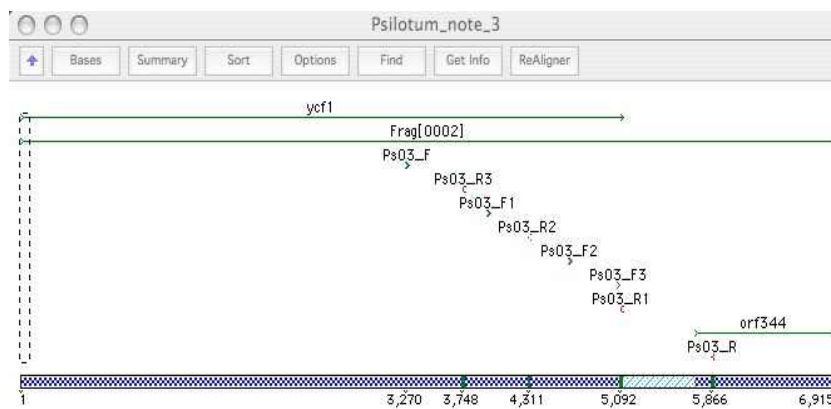
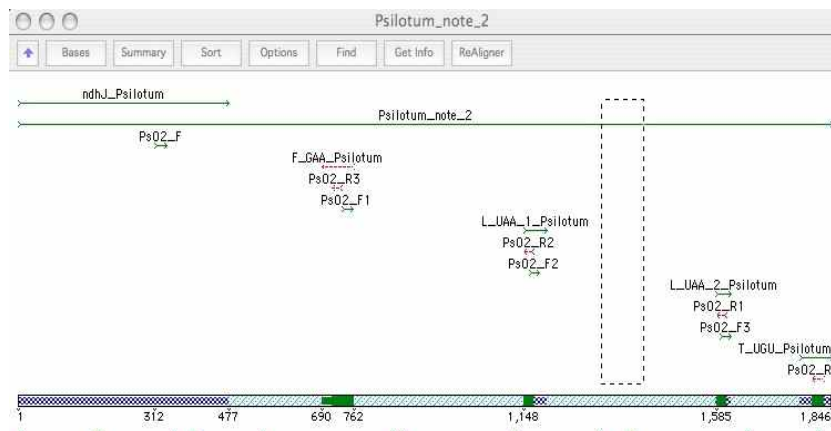
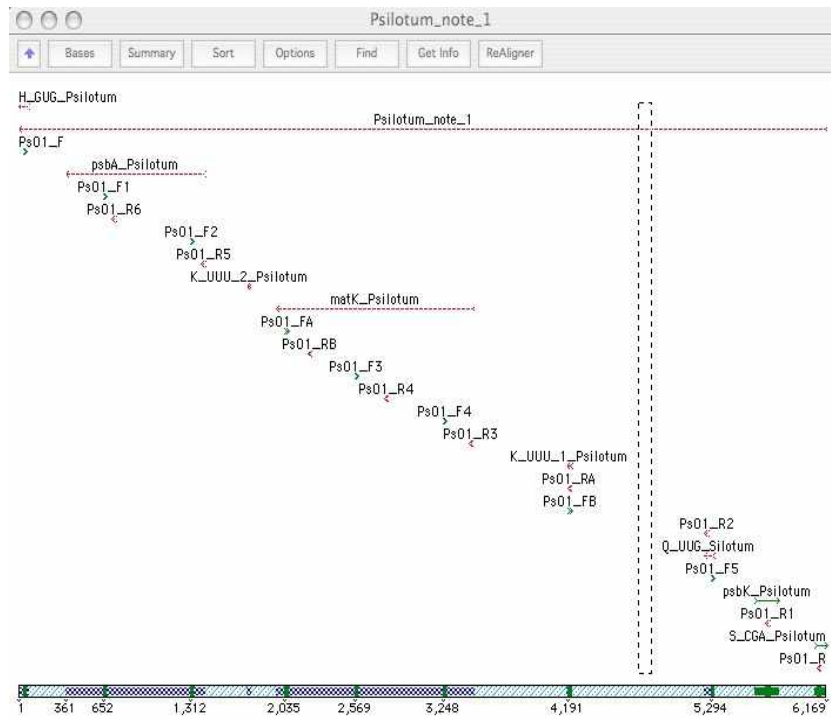


그림 III-1-1-3. 본 연구의 유전체 분석 구간과 시퀀싱 프라이머 위치.

표 III-1-1-2. 솔잎난 유전체 연구에 사용한 프라이머.

Name	Sequence	Name	Sequence
Ps01_F	CCACAATCCACTGCCTTGATCCGC	Ps02_F	GAAGAGTGCCGATTCCAAGAACGAG
Ps01_FA	TATCTAGACACCAAAAATTCTTCC	Ps02_R	CCGATGACCATCGCATTACAAGTGC
Ps01_FB	GTA CTCTACCATTGAGTTAGCAACCC	Ps02_F1	CTGCTCTACCAACTGAGCTATCCC
Ps01_R	TCGAGATCGTCGCAATTGACCAC	Ps02_F2	GACTTGAACCCTCACGGTCTGC
Ps01_RA	TCAATGGTAGAGTACTCGGC	Ps02_F3	GTCTACCATTACGCCATACCCC
Ps01_RB	GTAGAGACGGTTTATGGAGAGC	Ps02_R1	GTAATGGTAGACGCTGCGGAC
Ps01_F1	CCGACCAAAGTAACCATGAGC	Ps02_R2	GTTCAAGTCCCTCTACCCCC
Ps01_F2	CATCAAACGCCAAACCATCC	Ps02_R3	GACTGAAAATCCTCGTGTAC
Ps01_F3	GATAGTTGTATTGCCAGAATCC	Ps03_F	CTACAGAGAGATCTTTCGGCG
Ps01_F4	CTTTGAGGTCGTTTGGTTACG	Ps03_F1	CGAACATCATAAAATTGCC
Ps01_F5	CTTACCACTTGCCACGCCCC	Ps03_F2	GGATGATTCAGCACATCGTC
Ps01_R1	CACGATCGGATCAAAAATGGC	Ps03_F3	GGAAGTCGATTGCTATGC
Ps01_R2	GTTCGAATCCTCCGTC CAG	Ps03_R	GCAATCTTTCCATCCCC
Ps01_R3	CTTAGACAAGATTGGTAAAGTC	Ps03_R1	CAATCTGGACAATACATACG
Ps01_R4	GAAGCGATTGTC CAGTTGC	Ps03_R2	CGGAAGTAGGTTTCATTGCG
Ps01_R5	GACCGCAACTTTAGAAAGACGC	Ps03_R3	CACTTTTGTGGTACTATTCC
Ps01_R6	GAGAATGAGTCCGCTAACGC		

### 1-3. 결과

#### 가) 엽록체 유전체 구간 분석

표 III-1-1-3. 솔잎난 엽록체 trnS~trnH 구간의 제주산, 전남산의 구간 비교.

유전자	일본산 (Wgasugi data)	제주산	전남산	비고
(trnS_cga)	85	85		reverse
(trnS) ~ (psbK) IGS	278	278		
(psbK)	177	177		reverse
(psbK) ~ trnQ IGS	314	314		
trnQ_uug	72	72		
trnQ ~ trnK exon 1 IGS	1,016	981		
trnK_uuu exon 1	37		5	5
intron	709		709	709
matK	1,512		1,512	1,512
intron	199		199	199
trnK_uuu exon 2	25		25	25
trnK exon 2 ~ psbA IGS	323		323	323
psbA	1,062		1,062	1,062
psbA ~ trnH IGS	282		277	279
trnH_gug	78			
합계	6,169	1,907	4,112	4,114

trnH(GUG) ~ IGS ~ psbA ~ IGS ~ trnK exon 2 ~ intron ~ (matK) ~ intron ~ trnK exon 1 ~ IGS ~ trnQ(UUG) ~ IGS ~ psbK ~ IGS ~ trnS(CGA)의 연구 구간에서는 3지역 군집간의 유전자, intron 및 IGS 구간에서 그 변이가 나타나지 않았다.

표 III-1-1-4. 솔잎난 엽록체 ndhJ~trnT 구간의 제주산, 전남산의 구간 비교.

유전자	일본산	제주산	전남산	비고
ndhJ	477	163	150	
ndhJ~(trnF_gaa) IGS	212	212	212	
(trnF_gaa)	73	73	73	reverse
(trnF)~trnL exon 1 IGS	385	385	385	
trnL_uua exon 1	51	51	51	
intron	384	384	383	전남 - T deletion
trnL_uua exon 2	34	34	34	
trnL exon 2~trnT IGS	157	157	157	
trnT_uгу	73	54	54	
합계	1,846	1,513	1,499	

ndhJ ~ IGS ~ trnF(GAA) ~ IGS ~ trnL(UAA) exon 1 ~ intron ~ trnL(UAA) exon 2 ~ IGS ~ trnT(UGU) 구간의 비교 연구에서 trnL\_UAA group I intron에서 일본과 제주의 군집간에 변이가 없었으나 전남 화순에서 채집된 솔잎난에서 길이가 1 base차이를 보였다. 일본과 제주산은 (T)<sup>12</sup>이었으나 전남 화순산은 (T)<sup>11</sup>이었다.

표 III-1-1-5. 솔잎난 엽록체 ycf1~orf344 구간의 제주산, 전남산의 구간 비교.

유전자	일본산	제주산	전남산	비고
ycf1	5,112	1,844	1,829	
ycf1~orf 344 IGS	614	614	614	
orf 344	1,176	145	101	
합계	6,902	2,603	2,544	

ycf1~orf344 구간에서는 솔잎난 엽록체 ndhJ~trnT 구간에서 보인 길이차이는 없었으나, 염기 서열의 변이를 찾을 수 있었다. 이는 IGS 구간에서 A/T 및 orf344에서 A/T 변이를 발견할 수 있었다. 전남산은 (T)<sup>11</sup>-T-A genotype을 가지며, 일본/제주산은 (T)<sup>12</sup>-A-T genotype을 갖는다.

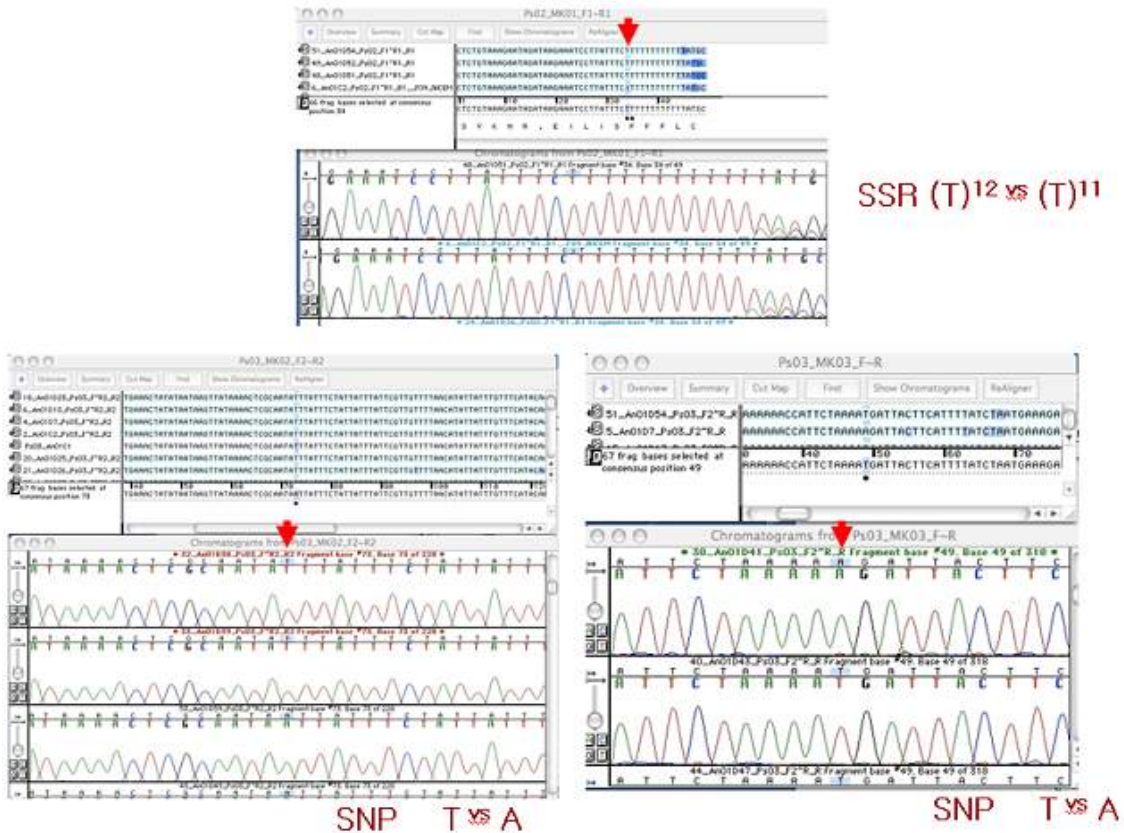


그림 III-1-1-4. 솔잎난 3 엽록체 변이 구간.



### 1-4. 고찰

trnL 인트론과 ycf1~orf344 구간에서 한국산 솔잎난의 2개체(제주산과 전남산)을 연구한 바, trnL 인트론에서 T-SSR 변이를 찾았고, ycf1~orf344 구간에서 2 SNP 변이구간을 찾았다. 이 변이에 근거해 전남산은 (T)<sup>11</sup>-T-A genotype을 가지며, 일본/제주산은 (T)<sup>12</sup>-A-T genotype으로 정의 했으며, 이를 확인하기 위하여 군집 수준에서 이들 형질에 대한 유전적 다양성 조사가 필요하다.

trnL인트론의 (T)<sup>12</sup>는 P8의 stem과 Loop 8의 접경에 위치하고 DNA polymerase가 읽는 도중 T 한 개를 읽은 것으로 추정된다. 전남 화순의 솔잎난이 그 변이 형질을 갖고 있다. 본 화순 군집의 존재는 최근에 2개체의 존재가 밝혀졌으며, 그 개체가 영양 번식했을 가능성을 배제할 수 없어 그 일대의 조사가 필요하다.

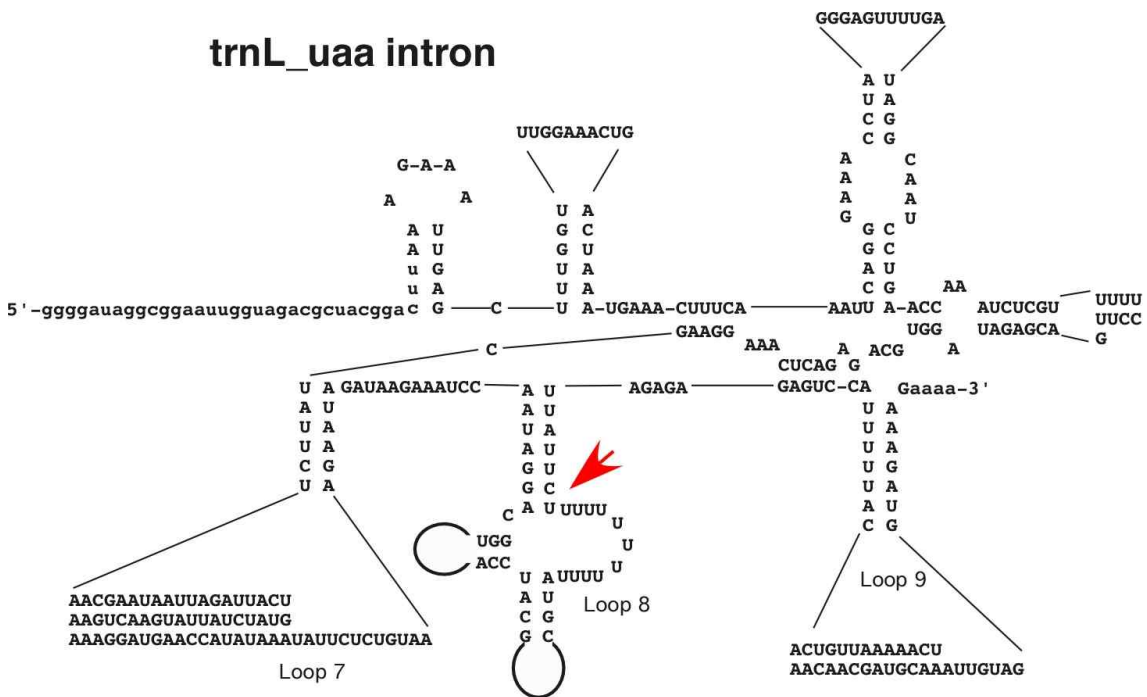


그림 III-1-1-5. 솔잎난 trnL intron 기본형의 2차 구조. 붉은 화살표는 (T)<sup>n</sup>의 위치를 나타냄.

## 2. 기저 현화 식물(ANITA)의 엽록체 유전체 연구

### 2-1. 죽절초와 근연식물의 엽록체 유전체 연구

#### 가. 서론

죽절초 [*Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai]는 홀아비꽃대과(Chloranthaceae)에 속하는 상록관목이다. 인도, 동남아시아, 중국, 대만과 한국에 분포하는 남방계 식물로서, 한국에서는 멸종 위기종 II 급으로 지정되어 있는 식물이다. 대나무처럼 줄기에 마디가 있어서 죽절초란 이름이 붙었으나 풀이 아니고 나무이다.

관목으로 키가 1m 정도에 이르고 줄기는 녹색이며 털이 없고 마디가 두드러진다. 잎은 마주나고 긴 계란모양 또는 넓은 타원형으로 길이 10~15cm, 폭 4~6cm이며 끝부분은 뾰족하고 밑 부분은 예저이며 잎 가장자리에 치아상 톱니가 있으며, 양면에 털이 없고 표면은 광택이 있고 뒷면은 황록색이며 엽병은 5~20mm이다. 꽃은 암수 한 그루이며 개화 시기는 여름으로 가지 끝에서 피며 화피는 없다. 자방은 연한 녹색이며 열매는 핵과로 둥근 모양이며 10여 개 이상 모여 달리며 전해 11월부터 다음해 3월까지 빨간색으로 달려 관상 가치가 있으며, 그 열매는 새들이 좋아하는 먹이로 약용으로 알려져 있다.

죽절초는 모든 집단이 제주도 서귀포시 지역의 하천 근처에만 분포하는 남방계식물이다. 지역적으로 제주도의 서귀포시 상호동, 호근동, 영천동, 남원읍 신예리 등지에 자생하고 있다. 현재, 복원사업의 일환으로 제주도 서귀포시에 소재하고 있는 산림청 소속 난대림연구소에서 종자 번식을 하고 있으며 수백 그루를 확보하고 있다.

죽절초 속에는 전 세계에 3종이 있으며, 한국에는 제주에 1종이 분포하고 있다. 국내에는 근연종으로 홀아비꽃대속(*Chloranthus*)의 3종이 분포하며, 이 종들은 죽절초와 달리 초본이다. 죽절초는 4속 70여종을 포함하는 홀아비꽃대과(Chloranthaceae)에 속한다.

홀아비꽃대과 식물은 각국에서는 Allergy약 등의 전통 약제로 그 연구가 활발하다. 그 생화학적 관점의 연구로 근연속 *Hedyosmum*(Acebey et al. 2007, Cárdenas et al. 1993), *Chloranthus*(Kwon et al. 2006, Tag et al. 2009), 죽절초 속의 다른 종인 *Sarcandra hainanensis*(Cao et al. 2009)가 국제적으로

알려져 있다.

이 홀아비꽃대과는 현화 식물의 4개의 주요 계통인 기저 현화 식물군 (ANITA, Basal Angiosperms), 목련류(Magnoliid), 단자엽 식물(Monocots), 쌍자엽 식물(Eudicot) 중의 어디에 속하는 지가 불확실하다(Qiu et al. 1999, Angiosperm Phylogeny Group 2003, Hansen et al. 2007, Soltis et al. 2008). 그 분류학적 위치에 대한 관심으로 분류학자 간에 관심을 갖는 식물이나 그 연구가 매우 제한되어 있다.

홀아비꽃대과 식물의 유전자 연구는 근연속 *Chloranthus*에서 엽록체 유전자 *rbcl*, *atpB*, *cp-SSU*, *cp-LSU* 계놈의 완전 염기 서열이 계놈 계통학적 (Lee & Manhart 2001, Qiu et al. 2006)관점에서 최근에 밝혀져 있고(Hansen et al. 2007), 미토콘드리아 유전자 연구는 *Chloranthus*에서 *apt1*, *mt-SSU*, *mt-LSU*, *matR* 등의 연구(Qiu et al. 1999, Qiu & Palmer 2004)가 알려져 있고, 핵유전자 연구는 *Chloranthus*에서 화피관련 유전자(Li et al. 2005) 연구와 심지어 내건성 유전자 특허(Blasing et al. 2009)연구가 알려져 있다. 유전체 연구는 근연속 외국종 *Chloranthus spicatus*의 엽록체 계놈의 완전 염기 서열이 계놈 계통학적(Lee & Manhart 2001, Qiu et al. 2006)관점에서 최근에 밝혀져 있다(Hansen et al. 2007).

본 연구는 약용자원식물이며, 한국의 멸종 위기종인 죽절초(*Sarcandra glabra*)의 자원 주권 확보를 위한 근거 자료로서 한국자생 죽절초의 유전체 정보 확보를 그 목적으로 하였다. 본 연구에서는 엽록체 유전체의 일부인 10 구간 이상을 분석하였고, 한국 근연종과 엽록체 구간을 비교 분석하였다.

## 나. 재료 및 방법

### 가) 식물재료

죽절초(*Sarcandra glabra*)는 제주도 서귀포시 난대림연구소에 보존되어 있는 나뭇가지를 채집하여 본 연구를 수행하고 있으며, 근연종으로 전북대학교 실험포장에 있는 전남에서 채집된 홀아비꽃대(*Chloranthus japonicus* Siebod), 옥녀꽃대[*Chloranthus fortunei* (A. Gray) Sloms]를 본 연구에 사용였다. 식물체 일부를 DNA 샘플을 채취한 후, 건조기를 이용하여 70°C에서 72시간 건조하는 방식으로 석엽표본을 만들었다. 생체 사진(그림 III-1-2-1)과 Voucher정보 및 GPI DNA number는 다음과 같다(표 III-1-2-1).



그림 III-1-2-1. 홀아비꽃대과 DNA 샘플을 채취 전의 연구 재료: 죽절초, 옥녀꽃대와 홀아비꽃대

표 III-1-2-1. 홀아비꽃대과 DNA number와 Voucher 정보

국 명	학 명	채 집 지	Voucher #	GPI DNA #
죽절초	<i>Sarcandra glabra</i> (Thunb.) Nakai	제주도 서귀포시 상호동 난대산림연구소 (식재: 서귀포시)	김철환 20090301-3	GPI2009-004A
옥녀꽃대	<i>Chloranthus fortunei</i> (A. Gray) Sloms	전북대포장 (전남)	김철환 20090615_1	GPI2009_C007A1
홀아비꽃대	<i>Chloranthus japonicus</i> Siebold	전북대포장 (전남)	김철환 20090615_6	GPI2009_C008A1

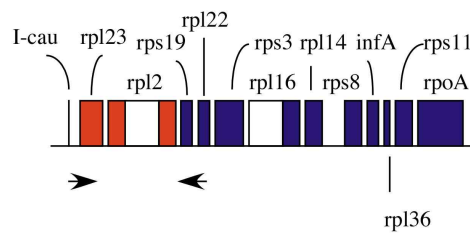
#### 나) DNA분리, LPCR 증폭 및 염기 서열 결정

홀아비꽃대과 식물의 성엽을 이용한 DNA 추출은 secondary compound가 많아 전통방법인 CTAB 추출과 초원심분리기를 이용한 분리에도 그 분리가 용이하지 않으며, PVP등은 phenolic compound제거에 용이하지 않아, GPI에서 사용하는 방법으로 양질의 DNA를 추출하였다.

본 연구를 위하여 PCR primer는 홀아비꽃대과 식물에 맞게 새로이 design하여 사용하였으며, 주요 연구 구간은 LPCR(Lee 1997)을 사용하였다. 본 유전체 구간 연구는 변이율이 높은 구간으로 알려진 trnH~psbA 및 matK 구간을 포함하는 Juncion B 3'의 trnI ~ rpl23 ~ rpl2 exon1 ~ rpl2 intron ~ trnH ~ psbA ~ trnK exon1 ~ matK ~ trnK exon의 17구간과 Juncion A 5'의 trnI ~ rpl23 ~ rpl2 exon1 ~ rpl2 intron ~ rps19 ~ rpl22의 11구간을

PCR을 해 연구에 이용하였고, 이 구간은 옥녀꽃대와 홀아비꽃대에서 동일한 방법으로 비교 분석하였다. PCR product는 다양한 방법으로 정제 후 ABI PRISM Bigdye™ Terminator Cycle Sequencing kits ver. 3.0을 이용한 분석을 사용하여 ABI3700 Analyzer로 염기 서열을 결정하였다. 유전체 염기 서열분석은 Primer Walking(Lee & Manhart 2001)을 이용하였다.

### Junction A 5'



### Junction B 3'

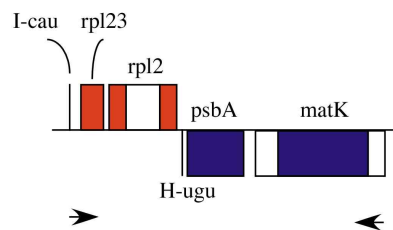


그림 III-1-2-2. 죽절초 엽록체 유전체 연구 구간: IRA와 IRB의 LSC 접경인 Junction A 5'과 Junction B 3'구간. PCR Primer 위치는 화살표로 나타내었다.

### 다) 데이터(Data) 분석

Raw data는 Sequencher 4.7에서 assemble하였으며, 유전체분석은 GCG package를 이용하였고, 인트론 분석은 GPI에서 보유한 데이터베이스(Database)를 이용해 GCG package의 FOLD이용하여 분석하였고, 유전자분석은 GPI에서 보유한 database를 이용해 GCG package과 Sequencher를 이용해 분석하였다. 유전체 지도는 Canvas 7을 이용해 분석하였다.

matK를 이용한 계통학연구를 위한 유전분석은 Clustal X와 Seal을 병행하여 정렬하고, MacClade ver. 4.08과 iWork '08을 병행하였으며, 계통분석을 위해 PAUP ver 4.0b10을 이용하여 필요에 따라 NJ, MP 및 ML분석을 하였고, Bootstrap과 Jackknife로 신뢰도를 검정하였다.

표 III-1-2-2. 홀아비꽃대과 계통 분석을 위한 matK sequence 자료.

	Taxon	국 명	GenBank ACC#	DNA 정보	비 고
홀아비꽃대과	<i>Ascarina sp.</i>		DQ401338		Qiu (Unpublished)
	<i>Chloranthus fortunei</i> (A. Gray) Sloms	옥녀꽃대		GPI2009_C007A1	본 연구
	<i>Chloranthus japonicus Siebold</i>	홀아비꽃대		GPI2009_C008A1	본 연구
	<i>Chloranthus spicatus</i>		EF380352		Hansen (2007)
	<i>Hedyosmum arborescens</i>		DQ401339		Qiu (Unpublished)
	<i>Hedyosmum mexicanum</i>		AM920646		Cabrera (2008)
	<i>Sarcandra chloranthoides</i>		DQ401340		Qiu (Unpublished)
	<i>Sarcandra glabra</i> (Thunb.) Nakai	죽절초	AF543733	GPI2009-004A	본 연구
Out group	<i>Euryale ferox</i>	가시연		GPI2009-003A	본 연구
	<i>Brasenia schreberi</i>	순채		GPI2009-010A	본 연구
	<i>Nymphaea alba</i>		NC_006050		Goremykin (2004)
	<i>Nuphar advena</i>	물양귀비	DQ354691		Raubeson (Unpublished)
	<i>Acorus americanus</i>	미국창포	NC_010093		Peery (Unpublished)

## 다. 결과

표 III-1-2-3. 엽록체 유전체 IR구간의 Junction A의 5'부분 염기 서열 분석.

유전자	죽절초 A	죽절초 B	옥녀꽃대	홀아비꽃대	비고
trnI_cau	70	70	70	71	
trnI~rpl23 IGS	81	81	80	81	동일
rpl23	354	354	366	366	(TA) <sup>n</sup> 변이
rpl23~rpl2 IGS	37	37	21	23	(T) <sup>n</sup> 변이, 1 SNP
rpl2 exon 1	391	391	391	391	(ACG)
rpl2 intron	665	665	665	665	동일
rpl2 exon 2	434	434	428	428	7bp indel
rpl2~rps19 IGS	58	58	68	62	GCCCGTAA Insertion
rps19	279	279	279	284	(GTG)
rps19~rpl22 IGS	9	9		27	2 Indel
rpl22	27	27		6	5' indel
합계	2,405	2,405	2,043	2,404	<b>9,257</b>

두 구간에 대하여 제주산 죽절초 2개체를 분석한 결과 그 염기 서열은 동일하였으나, 한국산 *Chloranthus*(옥녀꽃대, 홀아비꽃대)와 비교한 결과 rpl2 intron의 크기와 염기 서열에 차이가 없지만, 리보조말 단백질 유전자와 IGS에 구간에 대해 길이 변이와 염기 서열에 차이를 보였다. 유전자 길이의 차이는 유전자의 3'에서 stop codon의 위치 변이에 있었으며, IGS구간의 차이를 보였다.

표 III-1-2-4. 엽록체 유전체 IR구간의 Junction B의 3'부분 염기 서열 분석.

유전자	죽절초 A	죽절초 B	옥녀꽃대	홀아비꽃대	비고
trnI_cau	70	70	70	71	
trnI~rpl23 IGS	85	85	81	81	
rpl23	354	354	366	366	ACG st
rpl23~rpl2 IGS	37	37	22	23	
rpl2 exon 1	391	391	391	391	GTG st
rpl2 intron	665	665	665	665	
rpl2 exon 2	434	434	431	421	
rpl2~trnH IGS	22	22	18	18	INDEL
trnH_gug	77	77	78	78	
trnH~psbA IGS	192	192	204	192	
psbA	1,061	1,061	1,062	1,062	reverse
psbA~trnK exon 2 IGS	280	280	253	252	SSR, INDEL
trnK exon 2	24	24	25	25	reverse
trnK intron	280	280	288	274	INDEL, SSR
matK	1,524	1,524	1,548	1,569	45bp INDEL
trnK intron	627	627	679	672	(CCAT) <sup>n</sup> (ATAG) <sup>n</sup>
trnK exon 1					
합계	6,126	6,126	6,181	6,170	<b>24,603</b>



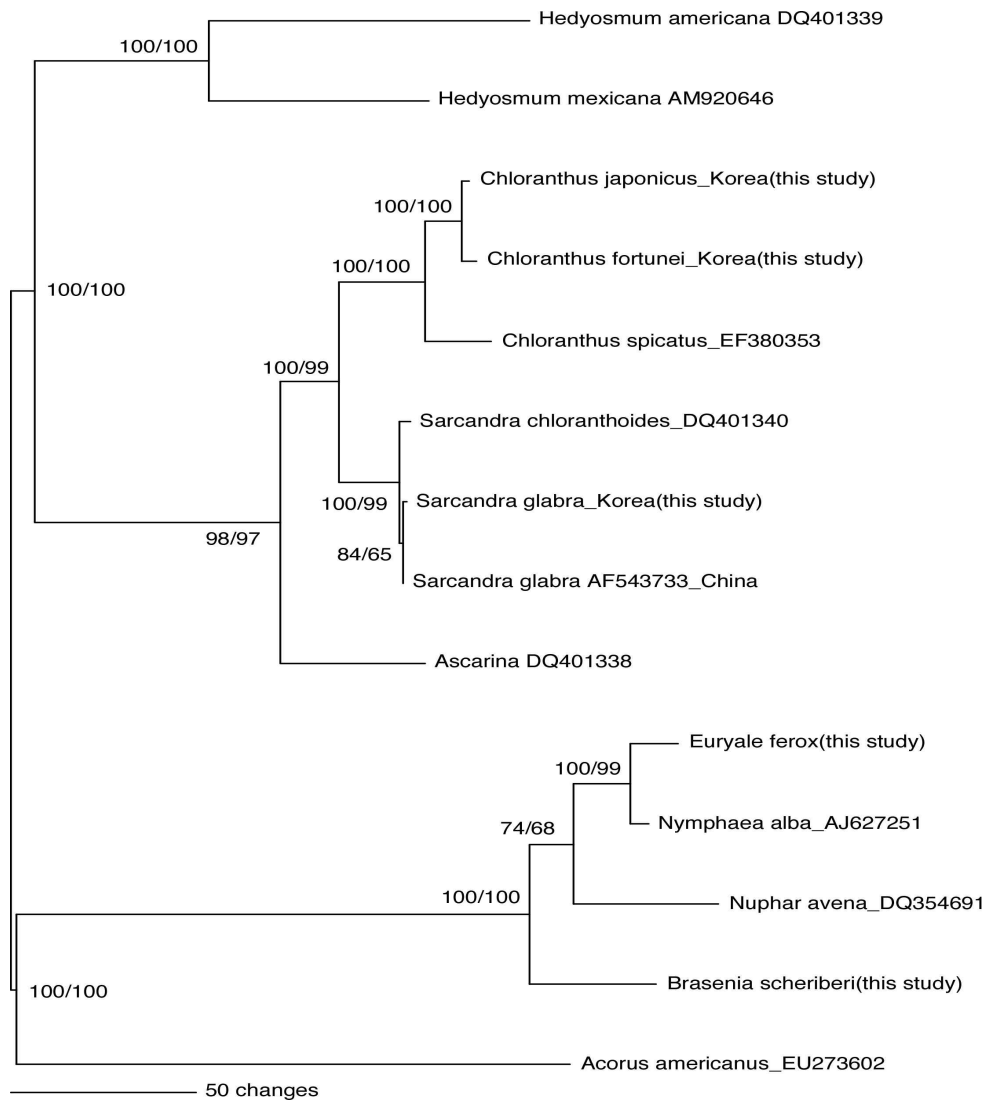


그림 III-1-2-3. 홀아비꽃대과 *matK* MP 계통수(Bootsrap/Jacknife 1,000 replication).

한국산 죽절초와 중국산 죽절초는 *matK* 염기 서열에서 차이를 보이며, 이들 유전자 염기 서열로 한국산 죽절초를 구별할 수 있다(그림 III-1-2-3).

## 라. 고찰

본 연구는 2차년도의 군집 다양성 연구를 예정하고 있었으나, 위의 변이율이 높은 구간에서 연구 대상종의 변이는 전혀 찾을 수 없었다. 제주도 난대림 연구소에서 종자발아를 통한 변식이 이루어져, 대부분의 난대림연구소의 죽절초는 같은 유전형질을 갖는 것으로 추정된다. 자연 군집간의 유전적 다양성 여부는 낮을 것으로 추정한다. 홀아비꽃대과의 식물에서 내건성 유전자에 특허(Blasing et al. 2009)가 걸려있어 이 핵 유전자 구간의 연구가 가능하다. matK를 근거하여 제주도의 죽절초는 지역적 격리로 중국 본토의 죽절초와 유전적으로 상이하다. 죽절초는 DNA 추출은 용이하지 않았고, 그 추출량이 낮아, 엽록체 유전체 완전 염기 서열 분석은 용이하지 않으며, RNA editing 현상이 일어나는 것으로 보인다.

한국산 홀아비꽃대과 식물에서는 일반적인 starting codon ATG 대신에 rpl23에서는 ACG이고 rps19에서는 GTG로 이 구간에 C/T 및 G/A의 RNA editing 없이는 생존할 수 없다.

## 2-2. 가시연 엽록체 유전체 연구

### 가. 서론

엽록체 유전체 연구대상 종인 가시연은 Basal angiosperms(ANITA, Qiu et al. 1999, 2000, 2005)에 속하는 수련과 한국의 멸종위기식물로 일년초이다. 식물이 거대한 수생식물로 경상남북도 및 전남에 주로 분포하여, 상대적으로 채집이 용이한 식물이다. 군집수준의 연구가 가능하다. 지역적으로 격리된 군집간의 변이가 있는지 또는 군집 내에서 변이 없이 homozygous한지에 대한 의문이 제기되고 있다. 엽록체 계통은 아직 알려져 있지 않으며, 근연 속으로 수련이 있다.

근연속인 “수련“의 엽록체 완전 염기 서열이 있어, 상대적으로 엽록체 계통을 쉽게 분석할 수 있을 것으로 예상되며, 기존 연구(Qiu et al. 1999, 2000, 2005)에 의해 희귀종인 Amborella (1목 1과 1속 1종)을 제외한 ANITA중 가장 Basalmost Angiosperm일 Nymphaeales에 속하는 분류학적으로 의미가 있는 종이다.

가시연은 기록에 의하면 경남 우포늪과 팔락늪(창녕), 외송늪, 대평늪과 질날늪(함안), 박실지, 정양늪, 주남저수지, 산남저수지, 진주시, 충남 홍성군 못재방죽; 대난지도; 전북 전주시와 익산시 삼기면; 광주 광역시: 전남 함평군 해보면; 경북 경산시 당음지, 소류지(경산시 화양읍) 김천시 아포저수지, 묘광동 연못; 충북 소수면 작은 연못; 대구시 신불지, 야목(강도방죽); 경기 화성군; 강원 풍호(강릉), 부곡 등지에 자생하는 것으로 알려지고 있는 수생식물로 물의 흐름이 다소 정체되어 있는 연못에 자란다. 이들의 자생지는 대부분 개발 가능성이 큰 지역에 분포하므로 생존 자체가 매우 위험한 식물로 평가 받고 있다. 본 연구는 가시연의 엽록체 유전체의 완전 염기 서열을 밝힘에 있다.

가시연(*Euryale ferox* Salisb.)은 피자식물 수련과에 속하는 식물로, 전세계에 1속 1종이 있다. 가시연은 한국, 일본, 중국, 인도, 대만 등 동북아시아 열대로부터 인도 북부의 아열대 지방까지 분포하며, 아마존 유역에 분포하는 Victoria속 식물과 가장 유연관계가 높은 식물로 알려져 있다(Otaki 1974; 양 1975 ; Kadono 1994; Les et al. 2003; Singh and Gupta 2006). 우리나라에 있어 가시연은 경북 경산 및 영천지역을 분포의 중심으로 하여 전남, 전북, 경남, 충남 등지에 분포하는 것으로 알려져 있으며, 그 개체수와 분포역의

급격한 감소로 인해 현재 환경부 멸종위기야생동식물 II급으로 지정되어 보호되고 있다. 특히, 본 종은 1년생 식물로 환경조건에 따라 해결이가 심하게 나타나며 발아율이 평균 4%이하로 낮아 번식과 이식에 어려움이 있어 복원 계획의 수립에 있어서도 큰 어려움이 있다(이, 1997). 이와 같은 멸종위기 식물의 복원 계획을 수립하기 위해서는 해당 식물의 생활사와 집단의 유전적 구조 등에 대한 기초정보가 필수적으로 필요하나, 아직까지도 가시연에 대한 체계적인 연구를 수행한 바 없다. 따라서, 가시연의 한반도내 분포 현황과 이들 가시연 집단의 유전적 구조 및 다양성을 조사하고자 한다. 특히, 가시연은 폐쇄화와 개방화를 모두 가지고 있으면서 폐쇄화에 의한 자가수분이 흔하게 일어나는 것으로 나타나고 있으며(Kadono and Schneider 1987), microsatellite를 이용한 연구에서도 동일 장소에 서식하는 가시연 개체사이에 유전적 다양성이 극히 낮은 것으로 나타났다(Quan et al. 2009). 따라서, 엽록체 유전자 및 microsatellite를 이용한 연구를 통해 한국에 자생하는 가시연 집단의 유전적 구조를 분석하는 것이 가시연의 보존대책을 마련함에 있어 필수적인 것으로 판단된다.

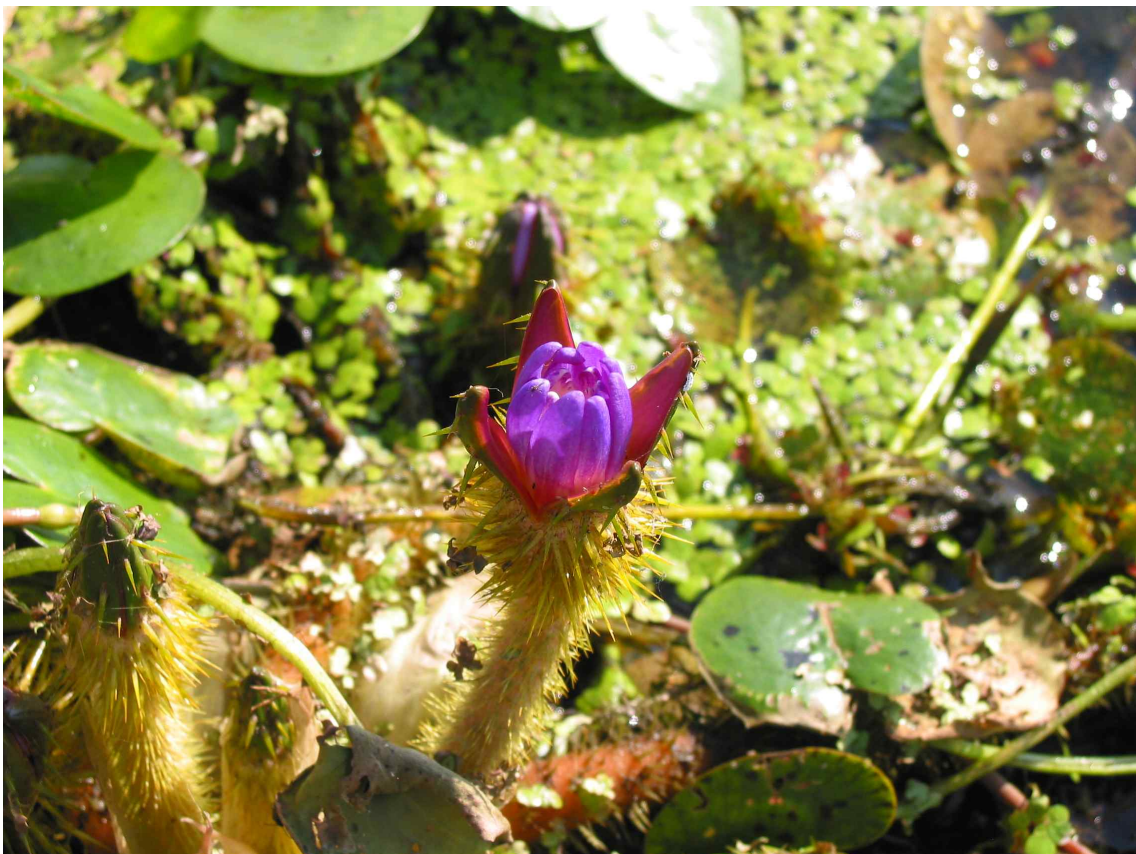


그림 III-1-2-4. 가시연.

## 나. 재료 및 방법

### 가) 식물재료

가시연(*Euryale ferox*)은 경상북도 경산시 문천지에서 채집하여 사용하였다. 본 연구에 사용한 식물은 식물체 일부를 DNA 샘플을 채취한 후, 건조기를 이용하여 70° C에서 72시간 건조하는 방식으로 석엽표본을 만들었다. 생체 사진(그림 III-1-2-4)과 Voucher정보 및 GPI DNA number는 다음과 같다(표 III-1-2-5).

표 III-1-2-5. DNA number와 Voucher 정보.

국 명	학 명	채 집 지	Voucher #	GPI DNA #
가시연	<i>Euryale ferox</i> Salisb.	경북 경산시 문천지	원효식 1860	GPI2009-003A

### 나) DNA분리, LPCR 증폭 및 염기 서열 결정

수련과 식물 성엽을 이용한 DNA 추출은 분리가 용이하나, 그 양이 낮은 문제점을 가지고 있다. 본 연구에서는 양질의 DNA를 얻기 위해 Magnetic bead를 이용한 추출법을 사용하였다. 엽록체 구조를 알기위하여 엽록체 게놈을 13개의 구간으로 나누어 20~25 kb LPCR(Lee 1997)을 이용해 그 구조를 파악하고, 1~3 kb SPCR을 이용하여 Squencher ver. 4.0(Genecode, US)를 이용해 염기 서열을 결정하였으며, SPCR에 의한 평행전이에 의한 pseudogene은 LPCR fragment에서 SPCR 확인 후 염기 서열 분석해 2차 검정과정을 수행하였다. 프라이머는 *Nymphaea*와 *Nuphar*의 엽록체 완전 염기 서열을 이용하여 수련목(Nymphaeales)에 특이하게 제작하여 사용하였다. 유전자분석을 위한 염기 서열 분석은 5~10X sequencing하여 분석하였다. PCR product는 다양한 방법으로 정제 후 ABI PRISM Bigdye™ Terminator Cycle Sequencing kits ver. 3.0을 이용한 분석을 사용하여 ABI3700 Analyzer로 염기 서열을 결정하였다. 유전체 염기 서열 분석은 Primer Walking(Lee & Manhart 2001)을 이용하였다.

다. 결과

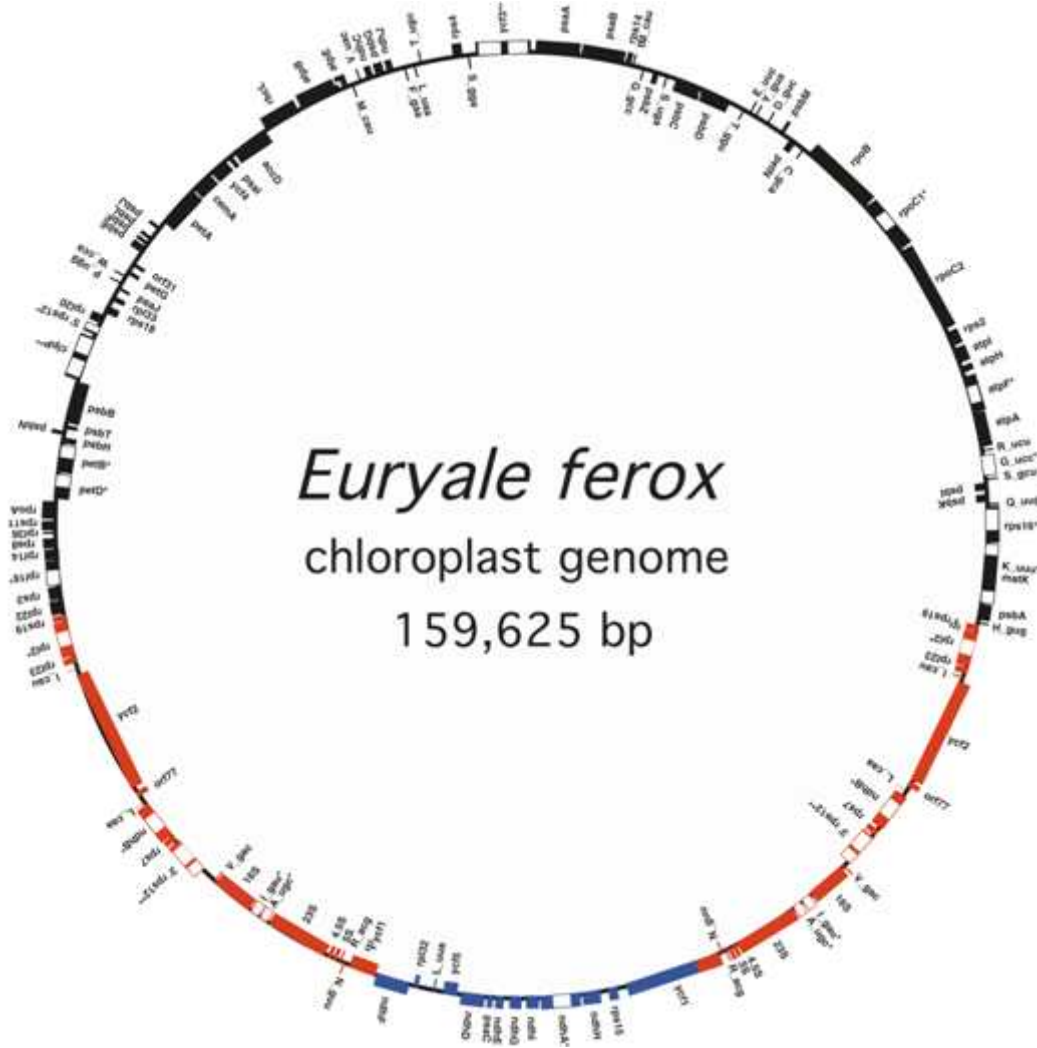


그림 III-1-2-5. 가시연의 엽록체 유전체 지도.

가시연의 엽록체 유전체 크기는 159,625bp이며, Inverted Repeat 구간의 크기는 25,027bp이고, SSC 크기는 19,866bp이다. IR은  $\Psi$ -ycf1에서 rps19의 일부를 포함한다. *Nymphaea*, *Nuphar*의 완전 염기 서열을 비교분석해 수련과 (*Nymphaeaceae*)의 기준 엽록체형을 판정할 수 있는 후속연구가 필요하다.

## 2-3. 순채 엽록체 유전체 연구

### 가. 서론

순채(*Brasenia schreberi*)는 전통적으로 수련과(Nymphaeaceae)에 속하는 것으로 알려져 있었으나 2003년 APG II system에서 어항마름과(Cabombaceae)를 지지하였다. 이과는 약 6종을 포함하고 있으며, 국내에는 한 종이 분포한다. 한국의 멸종 위기종으로 꽃은 7-10월에 피며, 한반도 남부와 제주도에 분포하는 기저 현화 식물로 근연종으로 가시연이 있고, 약용 및 식용으로 사용하는 자원식물이다. 본 연구에서는 엽록체 유전체 연구를 계획하고 있다. 수련과 식물과의 비교분석은 현존하는 가장 오래된 현화 식물인 수련목의 유전형을 판단할 수 있다.



그림 III-1-2-6. 순채(제주도 난대림 연구소).

### 나. 재료 및 방법

#### 가) 식물재료

순채(*Brasenia schreberi*)는 제주도 서귀포시 난대림 연구소 연못(제주도에 자생)에서 채집하여 사용하였다. 본 연구에 사용한 식물은 식물체 일부를 DNA 샘플을 채취한 후, 건조기를 이용하여 70°C에서 72시간 건조하는 방식으로 석엽표본을 만들었다. 생체 사진(그림 III-1-2-6)과 Voucher정보 및 GPI DNA number는 다음과 같다(표 III-1-2-6).

표 III-1-2-6. 순채 DNA number와 Voucher 정보.

국 명	학 명	채 집 지	Voucher #	GPI DNA #
순채	<i>Brasenia schreberi</i> J.F.Gmel.	제주도 난대림 연구소	김철환	GPI2009-010A

나) DNA분리, LPCR 증폭 및 염기 서열 결정

붓꽃과 식물 성엽을 이용한 DNA 추출은 분리가 용이하나, 그 양이 낮은 문제점을 가지고 있다. 본 연구에서는 양질의 DNA를 얻기 위해 Magnetic bead를 이용한 추출법을 사용하였다. 엽록체 구조를 알기위하여 엽록체 게놈을 13개의 구간으로 나누어 20~25 kb LPCR(Lee 1997)을 이용해 그 구조를 파악하고, 1~3 kb SPCR을 이용하여 Squencher ver. 4.0(Genecode, US)를 이용해 염기 서열을 결정하였으며, SPCR에 의한 평행전이에 의한 pseudogene은 LPCR fragment에서 SPCR 확인 후 염기 서열 분석해 2차 검정과정을 수행하였다. 프라이머는 Nymphaea와 Nuphar의 엽록체 완전 염기 서열을 이용하여 수련목(Nymphaeales)에 특이하게 제작하여 사용하였다. 유전자분석을 위한 염기 서열 분석은 5~10X sequencing하여 분석하였다. PCR product는 다양한 방법으로 정제 후 ABI PRISM Bigdye™ Terminator Cycle Sequencing kits ver. 3.0을 이용한 분석을 사용하여 ABI3700 Analyzer로 염기 서열을 결정하였다. 유전체 염기 서열분석은 Primer Walking(Lee & Manhart 2001)을 이용하였다.



다. 결과

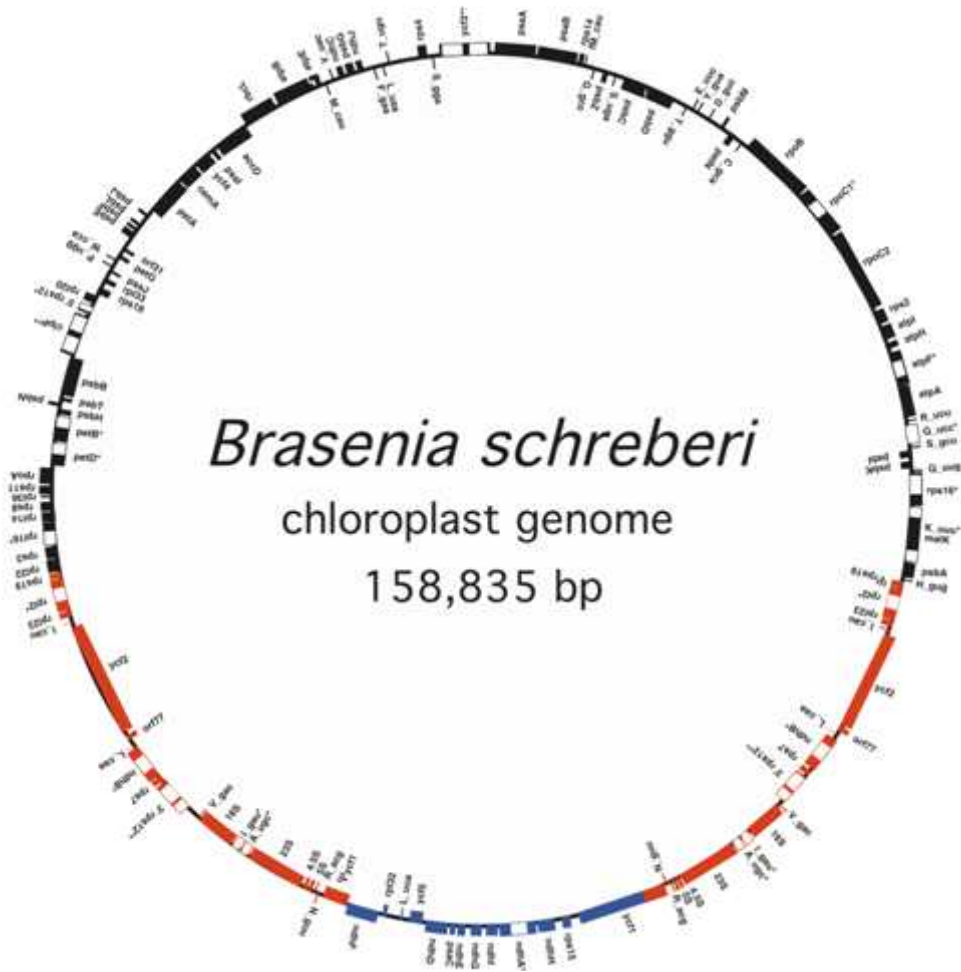


그림 III-1-2-7. 순채의 엽록체 유전체 지도.

순채의 엽록체 유전체 크기는 158,835bp이며, Inverted Repeat 구간의 크기는 25,341bp이고, SSC 크기는 19,515bp이다. IR은  $\Psi$ -ycf1에서 rps19의 일부를 포함한다. *Euryale*(가시연), *Nymphaea*, *Nuphar*의 완전 염기 서열을 비교 분석하여 수련과(Nymphaeaceae)의 기본 유전체 형을 판정하고, 본 연구 결과인 어항마름과 *Brasenia*(순채)의 엽록체 유전체를 비교 분석해 판정한 후, 현화식물의 실질적 최 기저식물군인 수련목(Nymphaeales)의 엽록체 기본 유전체형의 분석의 후속연구가 필요하다.

### 3. 단자엽식물의 엽록체 유전체 연구: 노랑붓꽃과 노랑무늬붓꽃

#### 가. 서론

전 세계적으로 주요 화훼 작물인 붓꽃속(*Iris*)은 전 세계에 약 225종이 분포하며, 국내에는 13종이 분포하는 것으로 알려져 있다. 그 중 3종이 한국의 멸종 위기종으로 되어 있다. 그 멸종 위기종 대청부채(*Iris dichotoma*)는 중국에도 분포하는 것으로 알려져 있으나, 노랑무늬붓꽃(*Iris odaesanensis*)과 노랑붓꽃(*Iris koreana*)은 금붓꽃(*Iris minutoaurea*)과 함께 한국고유종으로 한반도에 주로 분포한다. 다른 멸종 위기종인 대청부채는 대형 붓꽃인 반면, 노랑무늬붓꽃과 노랑붓꽃은 20cm정도의 소형인 붓꽃류로 한국 고유 식물자원의 의미가 있는 식물이다. 본 연구에서는 한국의 고유종이며 멸종 위기종인 노랑붓꽃과 노랑무늬붓꽃의 엽록체 유전체의 완전 염기 서열을 분석할 목적으로 본 연구를 수행하였다.

#### 나. 재료 및 방법

##### 가) 식물재료

노랑붓꽃(*Iris koreana*)은 전라북도 정읍시 내장산국립공원에 자연 보존되어 있는 식물체를 채집하였고, 노랑무늬붓꽃(*Iris odaesanensis*)은 경상북도 청송군 주왕산국립공원의 식물체를 채집하여 본 연구를 수행하였다. 근연종으로 경기도 광주군에서 금붓꽃(*Iris minutoaurea*)을 채집하여 사용하였다. 본 연구에 사용한 식물은 식물체 일부를 DNA 샘플을 채취한 후, 건조기를 이용하여 70°C에서 72시간 건조하는 방식으로 석엽표본을 만들었다. 생체 사진(그림 III-1-3-1)과 Voucher정보 및 GPI DNA number는 다음과 같다(표 III-1-3-1).



그림 III-1-3-1. 본 연구에 사용한 노랑붓꽃, 금붓꽃, 노랑무늬붓꽃.

표 III-1-3-1. 붓꽃과 DNA number와 Voucher 정보.

국명	학명	채집지	Voucher #	GPI DNA #
노랑붓꽃	<i>Iris koreana</i> Nakai	전북 정읍시 내장산	김철환, 문명옥, 황인천, 최승세 20090419_#2	GPI2009-004A
노랑무늬붓꽃	<i>Iris odaesanensis</i> Y.N. Lee	경북 청송군 부동면	이정호 20090615	GPI2009_005C

## 나) DNA분리, LPCR 증폭 및 염기 서열 결정

붓꽃과 식물 성엽을 이용한 DNA 추출은 분리가 용이하나, 그 양이 적은 문제점을 가지고 있다. 본 연구에서는 양질의 DNA를 얻기 위해 Magnetic bead를 이용한 추출법을 사용하였다. 엽록체 구조를 알기위하여 엽록체 게놈을 13개의 구간으로 나누어 20~25kb LPCR(Lee 1997)을 이용해 그 구조를 파악하고, 1~3kb SPCR을 이용하여 Squencher ver. 4.0(Genecode, US)를 이용해 염기 서열을 결정하였으며, SPCR에 의한 평행전이에 의한 pseudogene은 LPCR fragment에서 SPCR 확인 후 염기 서열 분석해 2차 검정과정을 수행하였다. 유전자분석을 위한 염기 서열 분석은 5~10 X sequencing하여 분석하였다. PCR product는 다양한 방법으로 정제 후 ABI PRISM Bigdye™ Terminator Cycle Sequencing kits ver. 3.0을 이용한 분석을 사용하여 ABI3700 Analyzer로 염기 서열을 결정하였다. 유전체 염기 서열 분석은 Primer Walking(Lee & Manhart 2001)을 이용하였다.

다. 결과

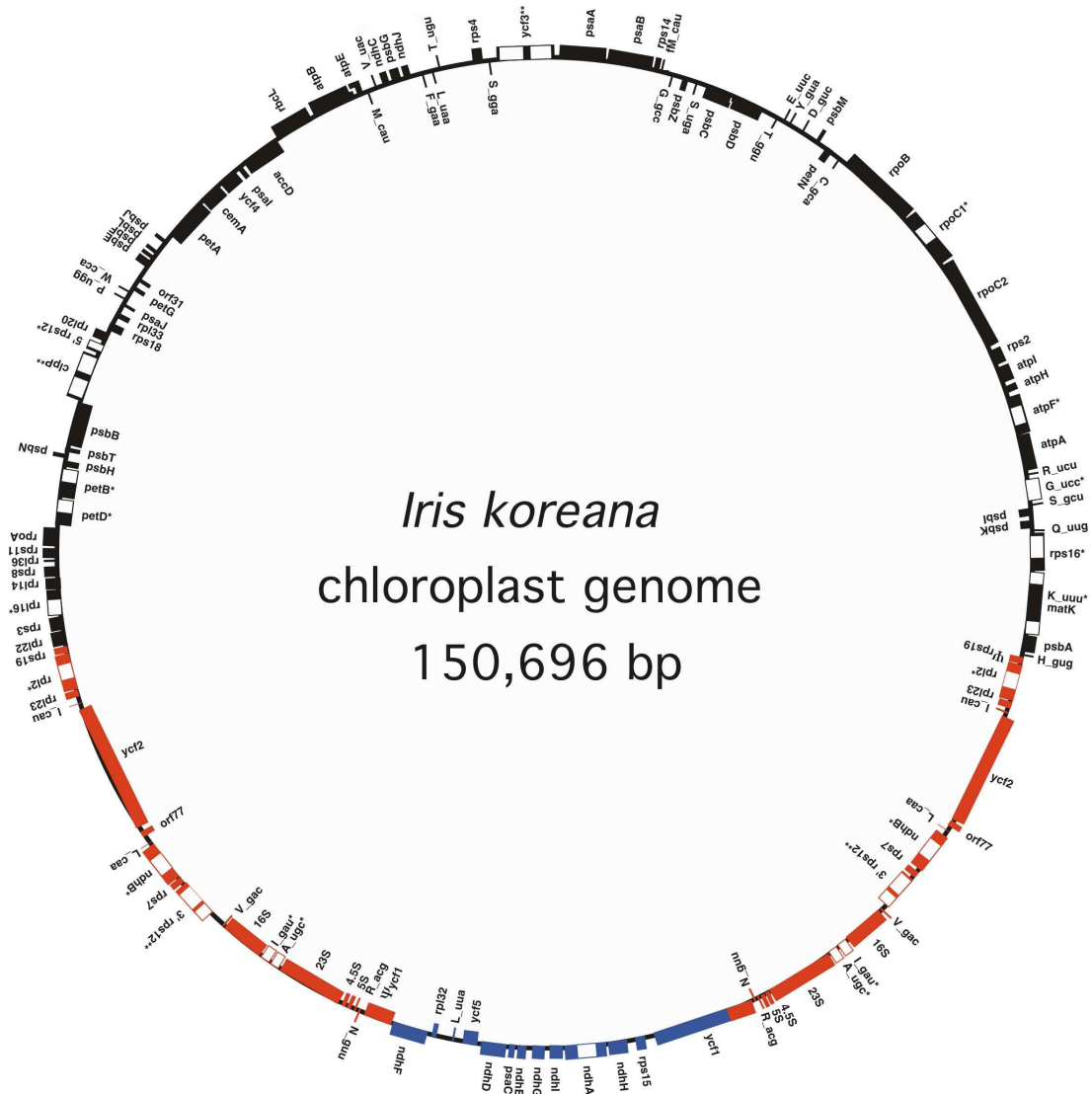


그림 III-1-3-2. 노랑붓꽃의 엽록체 유전체 지도.

노랑붓꽃의 엽록체 유전체 크기는 150,696bp이며, Inverted Repeat 구간은 크기는 25,065bp이고, LSC 크기는 83,478bp이다. IR은 Ψ-ycf1에서 rps19의 일부를 포함한다.

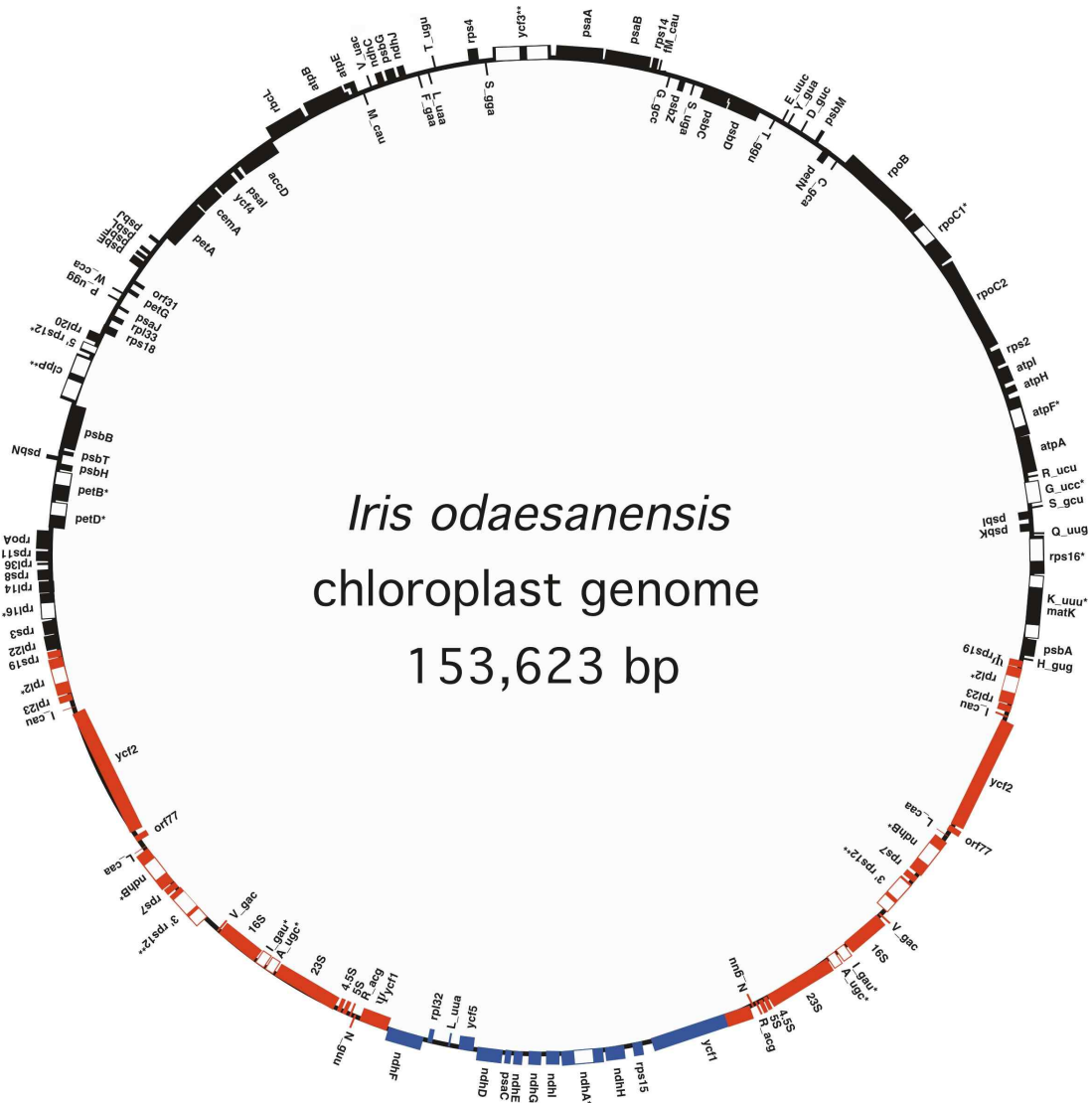


그림 III-1-3-3. 노랑무늬붓꽃의 엽록체 유전체 지도.

노랑무늬붓꽃의 엽록체 유전체 크기는 153,623bp이며, Inverted Repeat 구간 크기는 26,784bp이고, LSC 크기는 92,781bp이다. IR은  $\Psi$ -ycf1에서 rps19의 일부를 포함한다. 노랑붓꽃과 엽록체 유전체의 비교분석을 통한 붓꽃과 (Iridaceae)의 기본 유전체형 및 붓꽃류 검정 엽록체 마커 시스템 구축을 위한 후속연구가 필요하다.

## 제2장. 유전적 다양성 조사

### 1. 양치식물의 세포질 DNA 표식자에 의한 유전적 다양성 연구: 솔잎난

#### 가. 서론

솔잎난(*Psilotum nudum*)은 잎이 없는 고사리류로 21세기 초까지 유관속 식물의 기원이 되는 화석식물로 인식되어 온 잎이 없는 특이한 식물로 제주도에 서식하고 있다고 알려져 있다. 최근 전남에 그 분포가 확인되었고, 전남 화순의 군집은 그림 III-2-1-1에서 보이듯이 2개의 개체로 이루어져 있다. 본 연구의 유전체 연구에서 이 식물은 엽록체 유전체의 genotype (T)<sup>11</sup>-T-A 을 가져, 제주와 일본의 genotype (T)<sup>12</sup>-A-T에서 유별됨을 밝혔다. 본 연구에서는 극히 제한된 곳에서 작은 군집을 이루는 솔잎난의 유전형을 가능한 많은 수와 서로 다른 군집에서 그 유전형의 분포를 파악해, 과연 전남의 솔잎난의 genotype (T)<sup>11</sup>-T-A이 흔히 나타나는 솔잎난의 형질인지, 또는 분화된 특이 형질인지를 파악하여 솔잎난 보존에 필요한 정보를 얻으려고 본 연구를 수행하였다.



그림 III-2-1-1. 솔잎난의 전남 화순 군집(2 개체)과 제주 신호동 군집.

## 나. 재료 및 방법

### 가) 식물 재료

솔잎난(*Psilotum nudum*)은 해안을 따라 제주 서귀포시의 바위틈과 전남 고흥군 및 화순군의 암벽에 서식하는 식물로 깊은 뿌리를 가지며 영양번식과 포자번식을 하고 군집간 클론화 된 것으로 알려져 있다. 본 식물은 그 분포가 제한되어 있고 개체수가 적은 이유로 채집은 식물체의 일부로 하였고, 제주도와 전남에서 한 개체 씩 표본을 만들었다. 본 연구에 사용한 식물은 식물체 일부를 DNA 샘플을 채취한 후, 건조기를 이용하여 70° C에서 72시간 건조하는 방식으로 석엽표본을 만들었다. 생체 사진(그림 III-2-1-1)과 Voucher 정보 및 GPI DNA number는 다음과 같다(표 III-2-1-1).

표 III-2-1-1. 본 연구에 이용된 제주 및 전남의 솔잎난 7군집 정보.

군 집	개 체 수	채 집 지	Voucher #	GPI DNA #
제주-1	2	제주도 서귀포시 하례동	김철환 & 문명옥 20090301-1	GPI2009-001A GPI2009-001B
제주-2	2	제주도 서귀포시 호근동		GPI2009-001D01~2
제주-3	3	제주도 서귀포시 색달동		GPI2009-001D03~5
제주-4	44	제주도 서귀포시 신호동		GPI2009-001D06~50
제주-5	10	제주도 서귀포시 안달면 갑산리		GPI2009-001D51~6
전남-1	2	전라남도 화순	김철환 20090729	GPI2009-001C01~2
전남-2	3	전라남도 고흥		GPI2009-001E01~03
총 7군집	66			



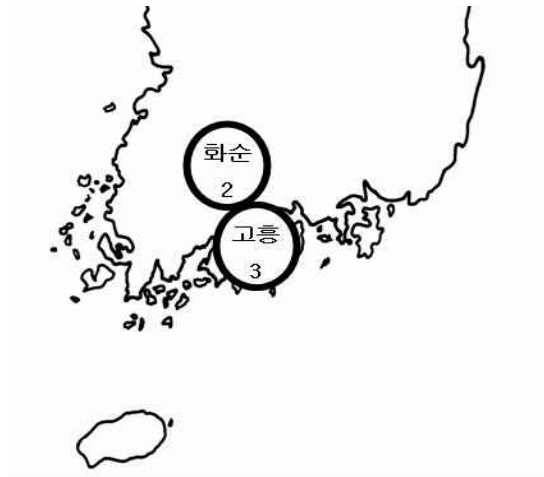


그림 III-2-1-2. 솔잎난 연구 군집과 군집당 연구 표본 크기.

#### 나) DNA분리, LPCR 증폭 및 염기 서열 결정

솔잎난의 DNA 추출은 분리가 용이하나 줄기를 이용해 추출하는데 조직이 단단해서 그 추출량이 적은 문제점을 가지고 있다. 본 연구에서는 양질의 DNA를 얻기 위해 Magnetic bead를 이용한 추출법을 사용하였다. 염기 서열은 3 염색체 유전체 연구 구간을 2~3kb PCR을 하였고, 유전 다양성 구간도 같은 방법으로 PCR을 하여 염기 서열을 분석하였다. PCR product는 다양한 방법으로 정제 후 ABI PRISM Bigdye™ Terminator Cycle Sequencing kits ver. 3.0을 이용한 분석을 사용하여 ABI3700 Analyzer로 염기 서열을 결정하였다. 유전체 염기 서열 분석은 Primer Walking(Lee & Manhart 2001)을 이용하였다.

#### 다) 3개의 Haplotype 염색체 마커

그 변이구간의 Ps02\_MK01(Ps02\_F1~R1), Ps03\_MK02(Ps03\_F2~R2), Ps03\_MK03(Ps03\_F~R)의 3개의 haplotype(2 SNP와 1 SSR 변이)을 찾아 7군집의 66개체에 대하여 그 구간의 염기 서열을 밝혀 그 분포를 조사하였다(표 III-1-1-2 참조).

라) Data 분석

Raw data는 Sequencher 4.7에서 assemble하였으며,인트론 분석은 GPI에서 보유한 database를 이용해 GCG package의 FOLD이용하여 분석하였고, 유전자분석은 GPI에서 보유한 database를 이용해 GCG package, PAUP ver. 4.0b10, Clustal X, Maclade ver. 3.08a, SE-AL ver. 2.0, DNASIS ver. 2.0을 이용해 분석하였다. trnL group I 인트론의 2차구조는 Basendahl et al(2000)과 Lee and Manhart(2003)을 따라 Mackintosh G4에서 CanvasX에서 그렸다.

다. 결과

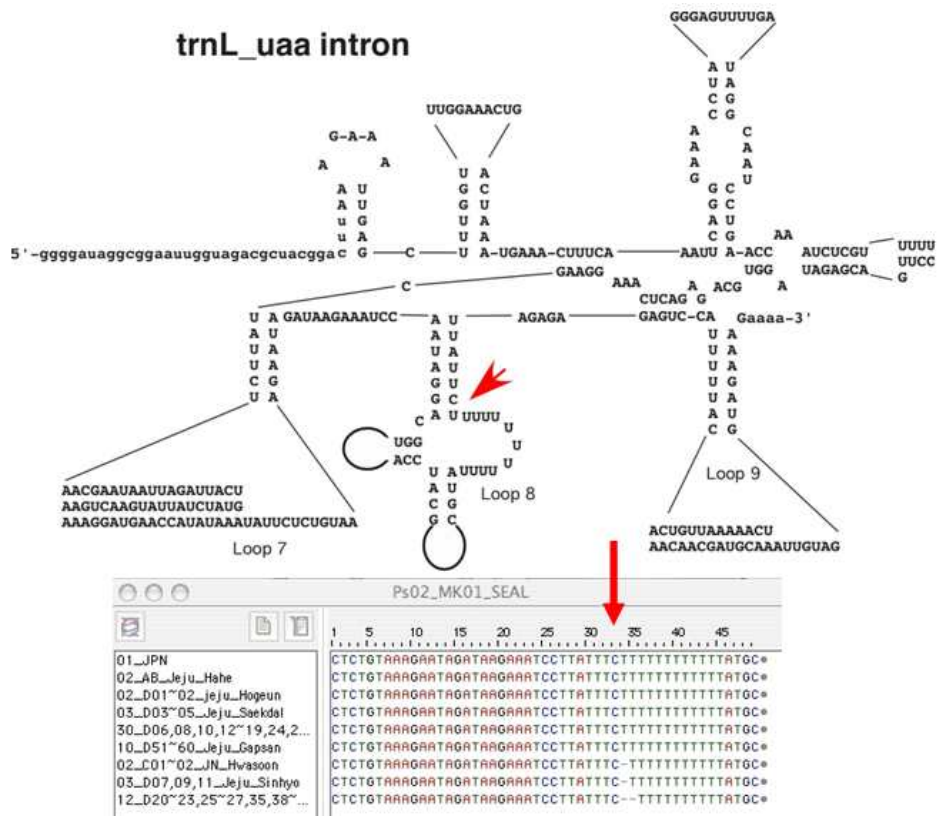


그림 III-2-1-3. 솔잎난 trnL 인트론 Loop 8의 SSR. (T)<sup>12</sup>이 기본형 (T)<sup>11</sup> 과 (T)<sup>10</sup>의 3 type이 존재함.

솔잎난 trnL 인트론 Loop 8의 SSR은 유전체 연구에서 솔잎난 유전체 연구에서 발견한 (T)<sup>12</sup>, (T)<sup>11</sup>외에 (T)<sup>10</sup>의 1종류를 추가로 확인하였다(그림 III-2-1-3). 2개의 SNP 마커 구간에서는 다른 새로운 변이가 나타나지 않았다.

SSR 마커의 경우, 7군집의 66개체에서 (T)<sup>12</sup>이 74.2%, (T)<sup>10</sup>는 18.2%로 전남 화순에서 발견된 (T)<sup>11</sup>의 7.6%의 낮은 빈도로 나타났다. Haplotype 2에서는 A(74.2%)가 Haplotype 3에서는 T(81.8%)가 우세한 것으로 나타났다(표 III-2-1-2).

표 III-2-1-2. 지역별 엽록체 haplotype의 분포 양상.

군 집	Haplotype 1			Haplotype 2		Haplotype 3	
	T <sup>12</sup>	T <sup>11</sup>	T <sup>10</sup>	T	A	T	A
제 주	46 (75.4%)	3 (4.9%)	12 (19.7%)	15 (24.6%)	46 (75.4%)	49 (80.3%)	12 (19.7%)
전 남	3 (60%)	2 (40%)	0 (0%)	2 (40%)	3 (60%)	5 (100%)	0 (0%)
전 체	49 (74.2%)	5 (7.6%)	12 (18.2%)	17 (25.8%)	49 (74.2%)	54 (81.8%)	12 (18.2%)

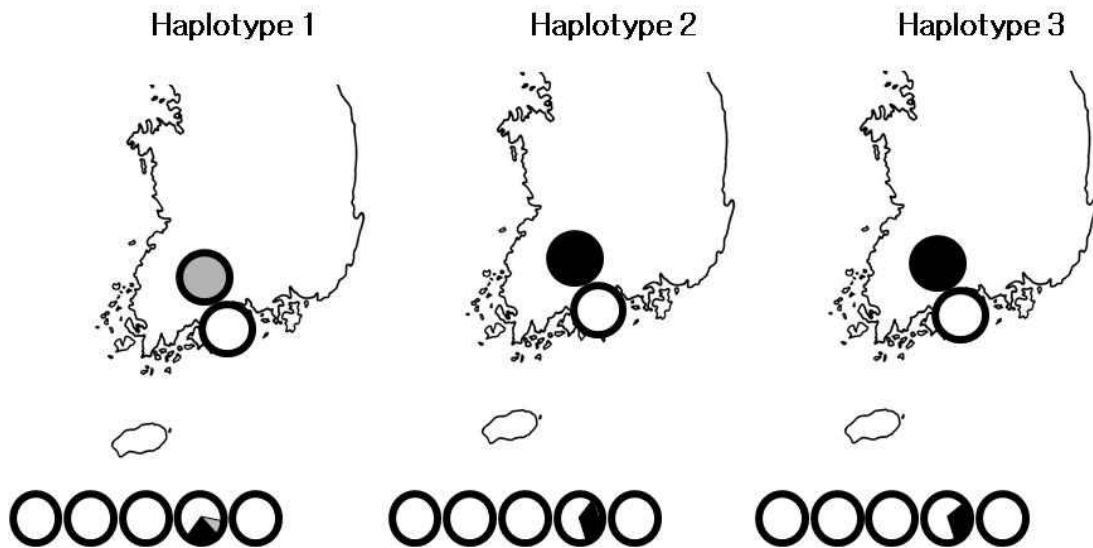


그림 III-2-1-4. 솔잎난 3 haplotype의 군집간 분포 양상. Type 1(SSR): 흑색 원은 (T)<sup>10</sup>이며, 회색은 (T)<sup>11</sup>이며, 백색은 기본형. Type 2와 Type 3는 A/T. 백색이 기본형임.

표 III-2-1-3. 솔잎난 6 엽록체 genotype의 지역간 분포.

군집	GT-1 T <sup>12</sup> -A-T	GT-2 T <sup>10</sup> -T-A	GT-3 T <sup>11</sup> -T-A	GT-4 T <sup>12</sup> -T-A	GT-5 T <sup>11</sup> -A-T	GT-6 T <sup>10</sup> -T-T	개 체 수
제주	45 (73%)	11 (18%)	2 (3.3%)	1 (1.6%)	1 (1.6%)	1 (1.6%)	61
전남	3 (60%)		2 (40%)				5
전체	48 (73%)	11 (16.7%)	4 (6.06%)	1 (1.5%)	1 (1.5%)	1 (1.5%)	66

표 III-2-1-4. 솔잎난 6 haplotype의 군집간 분포.

군집	개 체 수	Type	개 수	GPI DNA #
제주-1	2	T <sup>12</sup> -A-T	2 (100%)	GPI2009-001A, B
제주-2	2	T <sup>12</sup> -A-T	2 (100%)	GPI2009-001D01~2
제주-3	3	T <sup>12</sup> -A-T	3 (100%)	GPI2009-001D03~5
제주-4	44	T <sup>12</sup> -A-T	28 (64.5%)	GPI2009-001D06~50
		T <sup>10</sup> -T-A	11 (24.5%)	
		T <sup>11</sup> -T-A	2 (4.4%)	
		T <sup>12</sup> -T-A	1 (2.2%)	
		T <sup>11</sup> -A-T	1 (2.2%)	
		T <sup>10</sup> -T-T	1 (2.2%)	
제주-5	10	T <sup>12</sup> -A-T	10 (100%)	GPI2009-001D51~60
전남-1	2	T <sup>11</sup> -T-A	2 (100%)	GPI2009-001C01~2
전남-2	3	T <sup>12</sup> -A-T	3 (100%)	GPI2009-001E01~03
총 7 군집	66			

7군집중 신호동(제주-4) 군집만이 유전적 다양성을 가지며, 작은 군집은 동일한 유전형을 보인다(표 III-2-1-4). 3가지 Haplotype의 조합에서 genotype (T)<sup>12</sup>-A-T가 73%로 가장 우세한 으로 나타났고, genotype (T)<sup>10</sup>-T-A가 16.7%로, 전남 화순에서 발견된 genotype (T)<sup>11</sup>-T-A는 약 6%로 그 분포율이 낮다. 가장 우세한 (T)<sup>12</sup>-A-T는 7군집중 전남 고흥을 포함하는 5군집에 100%로 나타났다. 또한, 제주의 가장 큰 군집인 신호동 군집에서도 64.5% 강한 점유율

을 보인다. 단일 군집으로 전남 화순이 genotype (T)<sup>11</sup>-T-A을 가진다. 이 유전형은 신호동 군집에서 약 4%나타나, 큰 군집에서 나타날 수 있는 유전형으로 보인다. 이외에 신호동 군집에서는 각각 약 2%정도의 비율로 3개의 다른 유전형이 보인다.

## 라. 고찰

솔잎난(*Psilotum nudum*)은 해안을 따라 제주 서귀포시의 바위틈과 전남 고흥군 및 화순군의 암벽에 서식하는 식물로 깊은 뿌리를 가지며 영양번식과 포자번식을 하며 군집간 클론화 된 것으로 알려져 있다. 제한된 마커 수(3)로 분석하였을 지라도, 본연구에 사용한 솔잎난은 유전적 다양성 연구재료로 사용하기에 충분한 수의 개체를 사용하였고, 유전자 coding 염기 서열을 포함한 안정된 엽록체 구간을 연구하였기 때문에 이 연구의 결과는 신뢰할 수 있는 성과라고 판단된다. 이상의 결과를 토대로 솔잎난의 보존에 대한 제안을 하려한다.

- 1) 우리나라에서 가장 유전적 다양성이 높은(6 genotype) 신호동 군집은 보존해야 할 보호 대상 최우선 순위에 놓여야 한다.
- 2) 전남 화순 군집은 흔하지 않은 genotype이 고정되어 있는 작은 군집으로 반드시 보호해야 한다.
- 3) 전남 화순 군집이 멸종했을 시, 전남 고흥 솔잎난으로 복원하는 것보다, 유전형이 같은 신호동에 서식하고 있는 솔잎난으로 복원해야 한다.

## 2. 기저 현화식물의 DNA 표식자에 의한 세포질 및 핵의 유전적 다양성 연구: 가시연

### 가. 서론

기저 현화 식물(ANITA, Qiu et al. 1999, 2000, 2005)에 속하는 한국의 수련과 멸종위기식물로 일년초이다. 거대한 수생식물로 경상남북도 및 전남에 주로 분포하여, 상대적으로 채집이 용이한 식물이다. 군집수준의 연구가 가능하다. 지역적으로 격리된 군집간의 변이가 있느냐 또는 군집 내에서 변이 없이 homozygous하냐는 의문이 제기되고 있다. 엽록체 계통은 아직 알려져 있지 않으며, 근연속으로 수련이 있다.

근연속인 “수련”의 엽록체 완전 염기 서열이 있어, 상대적으로 엽록체 계통을 쉽게 분석할 수 있을 것으로 예상되며, 기존 연구(Qiu et al. 1999, 2000, 2005)에 의해 희귀종인 *Amborella*(1목 1과 1속 1종)을 제외한 ANITA 중 가장 Basalmost Angiosperm으로 분류학적으로 의미가 있는 종이다.

가시연(*Euryale ferox* Salisb.)은 피자식물 수련과에 속하는 식물로, 전 세계에 1속 1종이 있다. 가시연은 한국, 일본, 중국, 인도, 대만 등 동북아시아 일대로부터 인도 북부의 아열대 지방까지 분포하며, 아마존 유역에 분포하는 *Victoria*속 식물과 가장 유연관계가 높은 식물로 알려져 있다(Otaki 1974; 양 1975 ; Kadono 1994; Les et al. 2003; Singh and Gupta 2006). 우리나라에 있어 가시연은 경북 경산 및 영천지역을 분포의 중심으로 하여 전남, 전북, 경남, 충남 등지에 분포하는 것으로 알려져 있으며, 그 개체수와 분포지역의 급격한 감소로 인해 현재 환경부 멸종위기 야생식물 II급으로 지정되어 보호되고 있다(그림 III-2-2-1). 특히, 본 종은 1년생 식물로 환경 조건에 따라 해절이가 심하게 나타나며 발아율이 평균 4%이하로 낮아 번식과 이식에 어려움이 있어 복원 계획의 수립에 있어서도 큰 어려움이 있다(이, 1997). 이와 같은 멸종위기 식물의 복원 계획을 수립하기 위해서는 해당 식물의 생활사와 집단의 유전적 구조 등에 대한 기초 정보가 필요하나, 아직까지도 가시연에 대한 체계적인 연구가 진행된 바 없다. 또한, 가시연은 폐쇄화와 개방화를 모두 가지고 있으면서 폐쇄화에 의한 자가수분이 흔하게 일어나는 것으로 나타나고 있으며(Kadono and Schneider 1987), microsatellite를 이용한 연구에서도 동일 장소에 서식하는 가시연 개체사이에 유전적 다양성이 극히 낮은 것으로 나타났다(Quan et al. 2009). 따라서, 엽록체 유전자 및

microsatellite를 이용한 연구를 통해 한국에 자생하는 가시연 집단의 유전적 구조를 분석하는 것이 가시연의 보존대책을 마련함에 있어 필수적인 것으로 판단된다. 이러한 이유로 가시연의 한반도내 분포 현황과 이들 가시연 집단의 유전적 구조 및 다양성을 조사하고자 한다.



그림 III-2-2-1. 2009년 가뭄에 시달리는 가시연(경북 경산).

## 나. 재료 및 방법

### 가) 식물재료

가시연(*Euryale ferox*)은 전국을 대상으로 전라도, 경상도, 충청도의 8군집을 중심으로 본 연구를 수행하였으며, 그 채집 정보는 표 III-2-2-1에 나타나있다. 각 군집에 대하여 표본 한 점씩 채집하였으며, 각 군집당 5~10개체에 대하여 잎의 일부를 채취하여 DNA 표본을 확보하였다. 표본으로 사용한 식물은 식물체 일부를 DNA 샘플을 채취한 후, 건조기를 이용하여 70°C에서 72시간 건조하는 방식으로 석엽표본을 만들었다. 생체 사진(그림 III-2-2-1)과 Voucher정보 및 GPI DNA number는 다음과 같다(표III-2-2-1).

표 III-2-2-1. 가시연 8군집 정보.

군 집	개 체 수	채 집 지	Voucher #	GPI DNA #
충 북	5	충청북도 보은군 보은읍 지산리 둔덕지	원효식, 이정호 2913	GPI2009-03E01~05
충 남	5	충청남도 홍성군 홍성읍 고암리 역제지	-	GPI2009-03F01~05
경 북	10	경북 영천 대창 사리지	원효식 외 1881	GPI2009-03G00~09
경남 1	10	경남 창원 예오 세진 우포	원효식 외 2031	GPI2009-03H00~09
경남 2	10	경남 창원 동면 주남	원효식 외 1766	GPI2009-03I00~09
전 북	9	전북 경산 재인 동하제	원효식 외 2038	GPI2009-03J00~08
전남 1	10	전남 나주 공산 가송 도토리제	원효식 외 2034	GPI2009-03K00~09
전남 2	10	전남 장흥 안양 해창	-	GPI2009-03L00~09
총 8 군집	69			



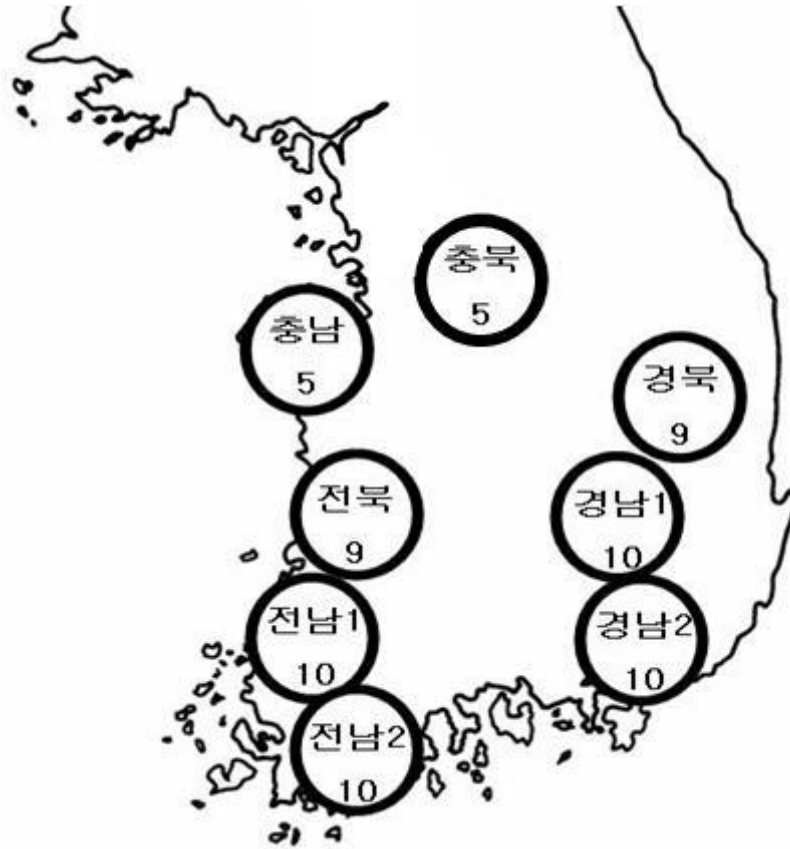


그림 III-2-2-2. 가시연 8 군집 정보.

#### 나) DNA분리, LPCR 증폭 및 염기 서열 결정

가시연의 DNA 추출은 Quiagen kit으로 쉽게 추출되었고, 마커구간을 SPCR하여 분석하였다. PCR product는 다양한 방법으로 정제 후 ABI PRISM Bigdye™ Terminator Cycle Sequencing kits ver. 3.0을 이용한 분석을 사용하여 ABI3700 Analyzer로 염기 서열을 결정하였다. 유전체 염기 서열 분석은 Primer Walking(Lee & Manhart 2001)을 이용하였다.

표 III-2-2-2. 가시연 마커로 사용된 프라이머.

Name	유전자 정보	Sequence
<b>MK01F</b>	<b>L_An_trnH_GUG_R</b>	<b>CTGCCTTRATCCACTTGGCYACATCCGCC</b>
<b>MK01R</b>	<b>An_psbA_F(1000)</b>	<b>GGTATGGAAGTWATGCAYG</b>
MK02F	An_GUU_R	CGACCAATCAGTTAACAGC
MK02R	ndhF_F(941)_Nymph	GGAGCTACCTTGGCTCTTGC
MK03F	RPS12-2_R	CAATGTGATATCTCACACC
MK03R	rps12.ti_F2	CAACAGTTCATCACGGAAG
MK04F	rpoA_F(924)_M	CATACATTATTGGACCTTTTGAG
MK04R	petD_F(1040)	CCYGAYTTGAATGATCCTG
MK05F	clpP_1R(60)	GTCGCACTATAYGTCAACCC
MK05R	psbB_R(327)	ACCCAATGCCARATAGCTGC
MK06F	petA_F(860)	GAAATAGTGCTTCAAGAYCC
MK06R	psbJ_F(25)	ATGATACTACTGGAAGGATTC
MK07F	psbE_R(3)	CGTTCTCCYGTRCTTCCAGAC
MK07R	petG_R(20)	GTAATAGGAATTAGACCTAABAC
MK08F	L_An_UGG_F	GCAGCTTGGTAGCGGTTTGTGGGTAC
MK08R	L_An_CCA_R	GTTTTGGAGACCCRCGTTCTACCGAAGTGC
MK09F	GUA_R	CTGGATTTGAACCAGCGTAG
MK09R	GGU_R	CCGATGACTTACGCCTTACC
MK10F	atpI_F(722)	AGCCGCGGCYTATATAGG
MK10R	atpH_R(172)	GTTAAAGCTTCCATAAAAAGC
MK11F	L_An_GCU_R	GHCGCYTTAGTCCACTCAGCCATCTCTCC
MK11R	L_An_UCC1_R	CRCRCTTTTACCACTAACTATAACCCGC
<b>MK12F</b>	<b>An_psbK_F(180)</b>	<b>GTKTGGCAAGCTGCTGYAAG</b>
<b>MK12R</b>	<b>An_psbI_R(3)</b>	<b>CGAANAGTTTGAGAGTAAGC</b>
<b>EM02F</b>		<b>CCCATTTCCTTTTCAGGT</b>
<b>EM02R</b>		<b>TGGTTCGTGCGGTAGAATGA</b>
EM16F		CCTACACCTCCTTGAAGAC
EM16R		GCCAAGAACATTTGTGATTC
EM22F		GCGGATGCAACAAATCTCG
EM22R		GGAAGAGCTTCTGACGATG

## 다) 마커로 사용한 프라이머

본 연구에서는 엽록체 마커로 12개의 엽록체 마커를 사용하였으며, 핵 마커로는 EM02, EM16, EM22 를 사용하였다. 이중 개체 변이를 보이는 세포질 마커 MK01과 MK12, 핵 마커 EM02 가 변이를 보여, 69개체에 대하여 염기서열 분석을 하였다. 그 프라이머 정보는 표 III-2-2-2 에 명시하였다.

## 라) Data 분석

Raw data는 Sequencher 4.7에서 assemble하였으며, 유전자간(IGS)의 분석은 SEAL을 이용하였고, 인트론 분석은 GPI에서 보유한 database를 이용해 GCG package의 FOLD이용하여 분석하였고, 유전자 분석은 GPI에서 보유한 database를 이용해 GCG package과 Sequencher를 이용해 분석하였다.

## 다. 결과

### 1) 엽록체 유전체 변이 구간

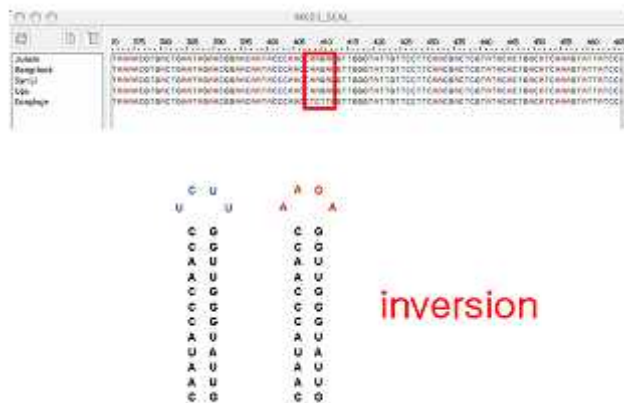


그림 III-2-2-3. trnH~psbA 구간의 inversion.

엽록체 마커 trnH~psbA 구간에서 그림 III-2-2-3에서 보이듯이 12베이스의 stem과 4베이스의 Loop를 형성하는 stem-loop 형질을 갖고 있음을 확인하였고, Loop에서 TCTT나 AAGA의 inversion 현상을 발견할 수 있었다. 이 형질을 8개 군집 69 개체에서 그 염기 서열을 분석한 결과, 연못 내에서는 그 형질이 동일하였으며, 6개의 군집에서 TCTT의 haplotype이 나왔고, 충남의 역제지와 전북의 동하제에서 AAGA haplotype이 나왔다. 그 결과는 표 III-2-2-3에 보이는 바와 같다.

표 III-2-2-3. 한국산 가시연의 세포질 및 핵 유전 변이 분포.

군집	개체 수	HT-1		HT-2		HT-3		GT-1		GT-2	
		TCTT	AAG A	C	T	T <sup>20</sup>	T <sup>9</sup>	A	G	(AG) <sup>7</sup>	(AG) <sup>12</sup>
향부	5	5	-	-	5	-	5	-	5	5	-
향파	5	-	5	-	5	-	5	-	5	5	-
연부	10	10	-	10	-	10	-	10	-	-	10
연파 1	10	10	-	-	10	-	10	-	10	10	-
연파 2	10	10	-	-	10	-	10	-	10	10	-
전부	9	-	9	-	9	-	9	-	9	9	-
전파 1	10	10	-	10	-	-	10	-	10	10	-
전파 2	10	10	-	10	-	10	-	10	-	-	10
8군집	69	55 (80%)	14 (20%)	30 (43%)	39 (57%)	20 (29%)	49 (71%)	20 (29%)	49 (71%)	49 (71%)	20 (29 %)

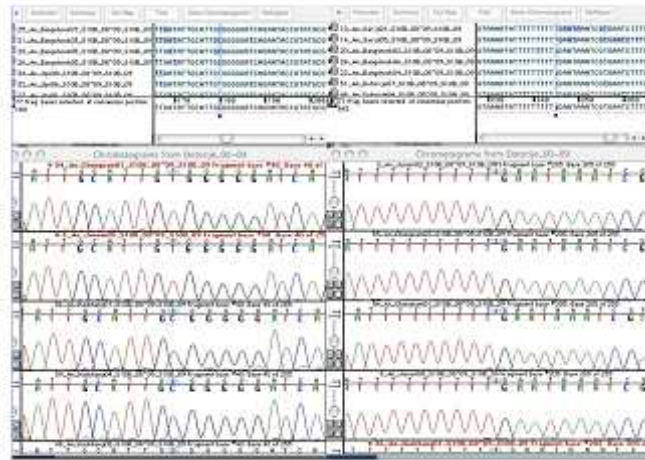


그림 III-2-2-4. psbK~psbI IGS 구간의 SNP(C/T)와 SSR[(T)<sup>9</sup> 와 (T)<sup>10</sup>] 마커.

엽록체 마커 psbK~psbI IGS 구간의 변이는 그림 III-2-2-4에서 보이듯이 SNP 및 SSR 마커를 각각 한 개씩 발견할 수 있었다. C/T의 SNP 마커 구간을 발견할 수 있었고, (T)<sup>9</sup>과 (T)<sup>10</sup>의 변이를 보이는 SSR 마커구간을 볼 수 있었다. SNP 구간의 변이는 군집 내에서는 변이가 없었으며, 8개의 군집중 3대 5의 분포를 보였다. SSR 마커 구간에서 연못 내에서 변이를 보이지 않았으며, (T)<sup>9</sup>과 (T)<sup>10</sup>의 경우 (T)<sup>9</sup>이 6군집에서 나타났고, 2군집 전남 해창 및 경북 사리지에서만 (T)<sup>10</sup>이 나타났다. 엽록체 3변이 구간의 조합으로 4가지 형의 엽록체 유전형이 나타나며, 그 분포는 표 III-2-2-4와 같다. CP-type 1은 가장 흔한 것으로 개체수의 32.3%와 군집수 37.5%에 해당하는 TCTT-T-(T)<sup>9</sup>형으로 경남 우포 및 주남 저수지와 충북 둔덕지에서 나타난다. 기본형에서 T→C의 변형으로 TCTT-C-(T)<sup>9</sup>(CP-type 3)형은 개체수의 14.5% 및 군집수의 12.5%로 전남의 도토리제가 이에 속한다. 기본형의 inversion형(CP-type 4)인 AAGA-T-(T)<sup>9</sup>형은 충남의 역제지와 전북의 동하제에서 개체수의 20.2%와 군집수의 25%가 나타난다. 이와 별도로 TCTT-C-(T)<sup>10</sup>형(CP-type 2)은 기본형의 2가지 변화, 즉, C/T의 변형과 T repeat형이 동시에 일어난 형으로 경북 사리지와 전남 해창에서 나타난다.

표 III-2-2-4. 한국산 가시연의 핵과 세포질 유전 형질에 근거한 4개의 유전형.

구 분	Type-1 TCTT-T-T <sup>9</sup> -G-(AG) <sup>7</sup>	Type-2 TCTT-C-T <sup>10</sup> -A-(AG) <sup>12</sup>	Type-3 TCTT-C-T <sup>9</sup> -G-(AG) <sup>7</sup>	Type-4 AAGA-T-T <sup>9</sup> -G-(AG) <sup>7</sup>
개체수	25 (32.3%)	20 (29%)	10 (14.5%)	14 (20.2%)
군집수	3 (37.5%)	2 (25%)	1 (12.5%)	2 (25%)

본 연구에서 경북 사리지와 전남 해창에서 나타나는 CP-type 2의 유의성을 확인하기 위하여 핵의 microsatellite 5구간 이상을 포함하는 핵 마커 3개를 가시연 69개체에서 분석하여 본 결과를 바탕으로 핵의 1 SNP 마커 구간과 2 SSR 마커 구간을 포함하는 EM02 구간을 집중 분석하였다. 이 핵 마커 구간에서 2개의 type이 나타난다(표 III-2-2-5, 그림 III-2-2-5). 그 2 type은 군집내에서 변이를 보이지 않으며, 표 III-2-2-5에 나타나는 type 2는 경북 사리지와 전남 해창에서 나타나는 CP-type 2(표 III-2-2-4)와 그 분포가 동일하다. 이 데이터를 근거로, 경북 사리지와 전남 해창의 군집은 엽록체와 핵 마커 구간에서 동일한 핵형을 갖고, 같은 기원을 갖는 군집이며, 다른 6개 군집과 유별됨을 알 수 있다.

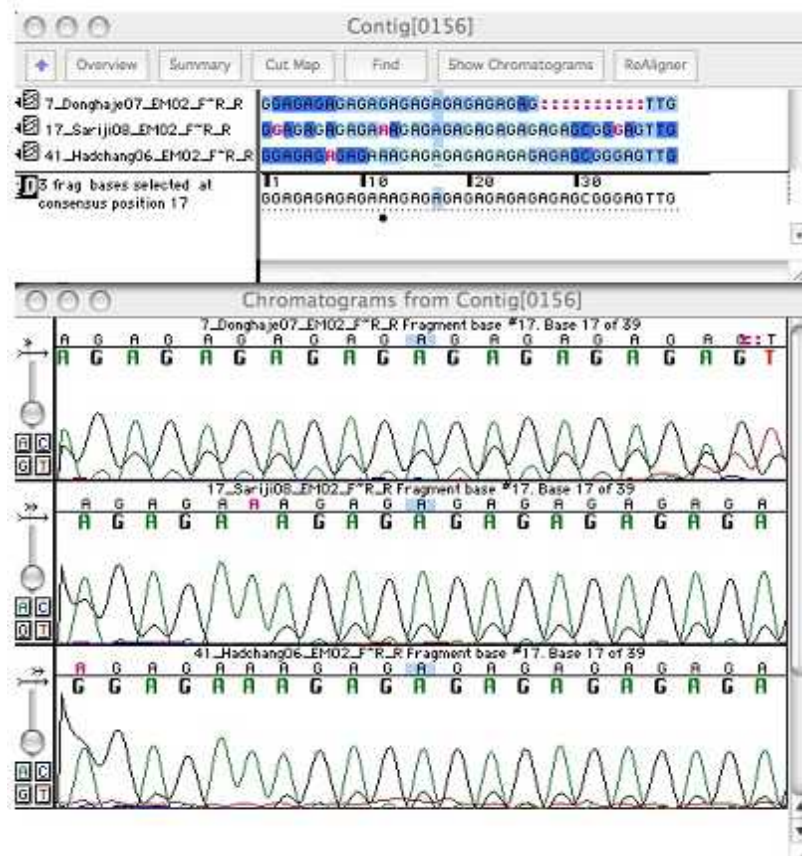


그림 III-2-2-5. 한국산 가시연의 EM02 마커 구간에서 핵 유전 변이 2 type.

표 III-2-2-5. 한국산 가시연의 EM02 마커 구간에서 핵 유전 변이 분포.

구 분	Type-1 G-(AG) <sup>7</sup>	Type-2 A-(AG) <sup>12</sup>
개체수	49 (71%)	20 (29%)
군집수	6 (75%)	2 (25%)

표 III-2-2-4에서 보듯이 엽록체 형질에 근거한 4형과 핵과 엽록체 형질을 포함한 결과와 일치한다.

## 라. 고찰

한국의 가시연 군집 연구에서 군집내에서는 변이를 나타내지 않았으며, 이는 가시연이 자가수분을 하는 일년초로 그 유전형이 군집 내에 고정되어 있는 것으로 판단되며, 군집 내에 새로운 유입이 없었음을 의미한다.

5개의 유전 변이(핵 2, 엽록체 3)를 8개 군집의 69 개체에서 연구한 한국의 가시연의 유전자형은 4 type으로 나타나며(표 III-2-2-4), 5개 형질 중 한 변이를 나타내는 것은 3 type에서 나타나며(그림 III-2-2-6), 한국의 기본 엽록체 유전형은 TCTT-T-T<sup>9</sup>이고 변이형인 AAGA-T-T<sup>9</sup>와 TCTT-C-T<sup>9</sup>는 한반도 서부에서 나타난다. 이들 세 유전형은 핵 마커 연구에서 동일한 핵형을 갖는 것이 확인 되었다. 반면, TCCTT-C-T<sup>10</sup>형(CP-type 2)은 경북 사리지와 전남 해창에서 나타나며, 위의 핵형 type과 유별되는 핵형을 가지고 있다.

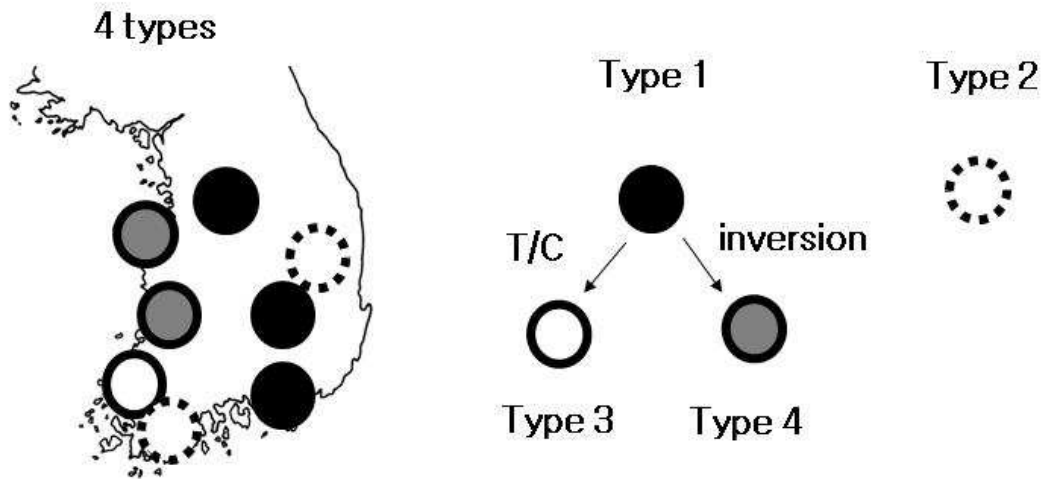


그림 III-2-2-6. 한국산 가시연의 유전적 다양성과 그 형의 진화 가설.

그 유전형의 분포를 보면 그림 III-2-2-6과 같으며, type 2는 다른 형에 비해 5가지 형질 중 3~4개의 형질이 유별되므로 기원이 다른 군집이다. 반면 type 1, 3, 4는 한 형질의 차이를 보여 type 1에서 변이형으로 type 3과 4가 생긴 것을 알 수 있다.



본 분석에 의하면, 한국 가시연 중 가장 흔한 유전형은 경남 창원과 우포의 군집과 충북에 나타나며, 그 유사군집 type 3는 전남 도토리제 군집, 충남과 전북의 근연 군집인 type 4는 type 1의 변형이다. 반면, type I과 다른 전남 해창과 경북의 사리지 군집은 동일한 유전형을 가지고 있다. 이 결과에 근거하여 다음과 같이 가시연의 보존에 대한 결론을 피력한다.

첫째, 우포를 중심으로 한 경남의 군집은 한국 가시연의 기본 군집형이므로 보호해야한다. 둘째, 전남 해산과 경북의 사리지 군집은 같은 유전형으로 타 6군집과 유별되는 군집이므로 우포군집과 더불어 보존해야 하는 특이한 군집이다. 마지막으로 type 3과 4로 전북/충남과 전남의 군집은 우포로 대변되는 type의 변이형으로 한국의 유사 변이형으로 판단된다.

### 3. 알로자임 표식자에 의한 멸종위기 식물 2종의 유전적 다양성 연구: 층층동굴레 및 노랑무늬붓꽃

#### 가. 서론

급격한 속도의 환경 변화로 인해 많은 동식물의 생존력(viability)에 관심이 높아지고 있다. 단기적으로 많은 종의 존재는 집단크기의 감소 및 소멸로부터 수적으로 복구되는 능력(ability)에 의해 결정될 것이다. 반면에, 종의 장기적인 생존력(long-term viability)은 이들 종이 지니고 있는 유전적 변이 수준과 연관이 되어있다(Vida 1994; Vrijenhoek 1994). 집단유전학 이론에 의하면, 유전적 변이 수준이 낮아진 집단에는 변화하는 환경에 적응력이 떨어져 장기적으로 종의 존재를 위협 할 것이다. 낮아진 유전적 변이 및 증가된 동형접합성(homozygosity)은 단기적으로 개체의 적응도를 낮추어 집단의 생존력 및 성장률에 영향을 줄 수 있다(Vrijenhoek 1994). 전반적으로 유전적 다양도가 결여되거나 특별한 특질(예, 질병에 대한 저항)에 대한 변이가 결여된 동식물 종은 새롭게 변하는 환경조건에 적응력이 결여 될 수 있다. 따라서 이런 종들은 절멸되기 쉽다. 어떤 종의 유전적 다양도의 유지는 그 종의 집단의 크기와 간혹 관련이 있다. 집단 유전학 이론에 의하면 집단이 수세대에 걸쳐 작게 유지된 경우(genetic drift, 유전적 부동), 집단이 소수의 창시자에 의해 형성된 경우(founder effect, 창시자 효과), 집단의 크기가 급격히 줄어드는 경우(population bottleneck, 집단의 병목 현상)에는 유전적 다양도가 소실됨을 예측하고 있다. 집단의 복구가 느리거나 집단의 크기의 변동이 빈번한 경우에는 유전적 소실이 클 것이다(Barret and Kohn 1991). 일반적으로 개체수가 적거나 멸종 위기에 처해있는 많은 식물 종은 집단의 크기나 수에서 감소를 겪어왔을 것이다(Godt et al. 1996). 이러한 감소에 대한 기록이나 정보가 부재 시에는 집단의 유전적 구조 및 다양도 연구를 통해서 역으로 집단의 역사를 추측 할 수 있다.

국내에서는 환경부에서 멸종위기 식물 65 종(I급 8종, II급 57종)을 정해 이들에 대한 단기 및 장기적 보전 정책 수립에 대한 기초자료를 제공하기 위해 2009년 연구에는 층층동굴레(*Polygonatum stenophyllum* Maxim.)와 노랑무늬붓꽃(*Iris odaesanensis* Y. N. Lee) 2종의 남한 내 집단을 대상으로 연구를 수행 하였다. 이들 2종은 무성적으로도 번식하여 클론을 형성하고 있기 때문에 무성적으로 형성된 묘조(shoots)를 제외하는 것이 중요하다(Chung et al. 2004). 본 연구에서는 집단 내 allozyme 표식자에 의해 클론을 파악하여

유효 집단 크기( $N_e$ , effective population size)를 추정하고, 유성생식에 의해 형성된 개체를 대상으로 집단내 유전적 다양도를 조사해서 이들 종과 동속 종이 비교될 정도의 유전적 변이 수준을 유지하고 있는지 여부와 집단간 유전적 유사성은 보전 및 관리 전략 수립에 중요한 고려 대상이기에 집단 간 유전적 분화 수준의 정도를 조사 진행하였다.

## 나. 연구 개발의 추진 전략 · 체계 및 연구 수행 방법

### 1) 재료 채취

#### 가) 층층동굴레

층층동굴레는 지하경에 의해 무성생식도 하기 때문에 상대적으로 큰 면적 집단(PS-3, PS-4, PS-5, PS-6)에서는 2m 간격으로, 면적이 작은 집단(PS-1, PS-2, PS-7)에서는 30cm 거리에서 allozyme 분석을 위해 채집된 묘조의 수는 318개였다(그림 III-2-3-1).

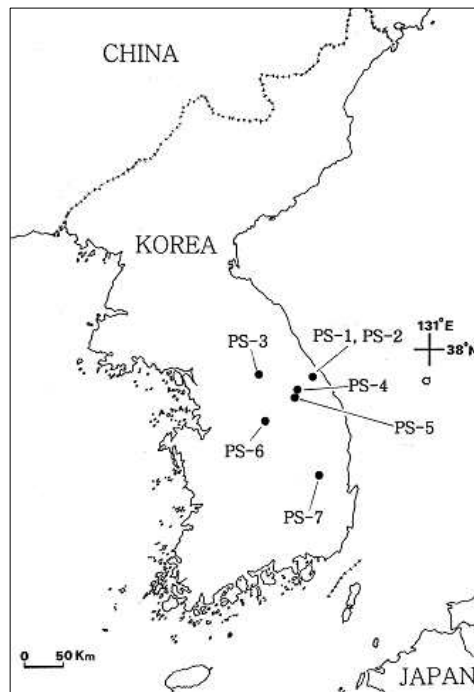


그림 III-2-3-1. 층층동굴레의 채집된 7곳 집단. PS-1(강릉 옥계면 윗집단), PS-2(강릉 옥계면 아래집단), PS-3(홍천 서면 어유포리), PS-4(정선 광하리), PS-5(영월 삼옥리), PS-6(충주 가금면 장천리), PS-7(안동 길안면 송사리).

## 나) 노랑무늬붓꽃

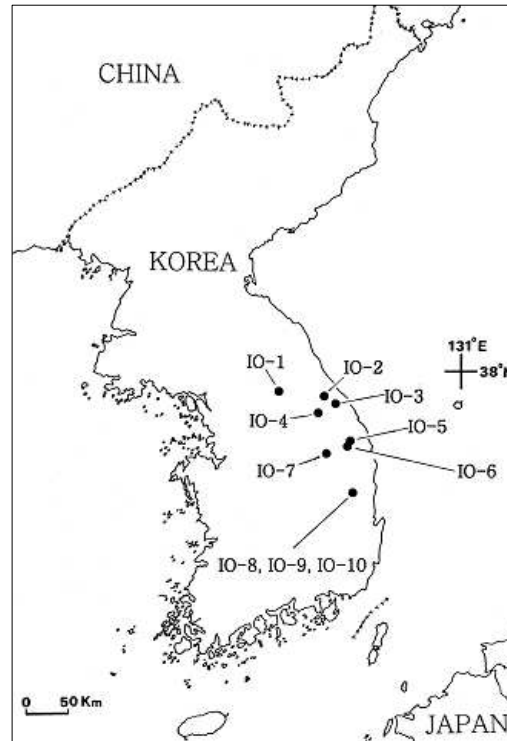


그림 III-2-3-2. 노랑무늬붓꽃의 allozyme 분석을 위해 채집된 10곳 집단. IO-1(홍천 남면), IO-2(오대산 북대사), IO-3(강릉 석병산), IO-4(평창 백석산), IO-5(태백 함백산), IO-6(봉화 석개재), IO-7(영주 소백산 제1연화봉), IO-8(청송 주왕산 주왕계곡 중간), IO-9(청송 주왕산 주왕암 입구), IO-10(청송 주왕산 주산지).

노랑무늬붓꽃은 무성생식하기 때문에 상대적으로 큰 집단에서는 2m 간격으로 작은 집단(IO-1, IO-2)에서는 많은 묘조에서 각 잎 선단 부위 5cm를 절단하여 채취하였다(그림 III-2-3-2).

## 2) 전분전기영동법

총 818 묘조에서 채집된 잎은 4°C의 얼음 상자에 저장되어 실험실로 옮겨졌다. 잎에서 효소를 추출하여 Whatman 3 MM 크로마토그래피 종이(4×6 mm 크기)에 묻혀 -70°C 초저온 냉동고에 보관하였다. 전기영동은 감자 전분(13%)을 사용하였다. 본 연구에서 10종류의 효소계를 사용하였다. 이들은

alcohol dehydrogenase(ADH, E.C.1.1.1.1), diaphorase(DIA), E.C.1.6.99.1), fluorescent esterase(FE, E.C.3.1.1.1), isocitrate dehydrogenase(IDH, E.C.1.1.1.42), malate dehydrogenase(MDH, E.C.1.1.1.37), malic enzyme(ME, E.C.1.1.1.40), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD, E.C.1.1.1.44), phosphoglucoisomerase(PGI, E.C.5.3.1.9), phosphoglucomutase (PGM, E.C.2.7.5.1) 및 triosphosphate isomerase(TPI, E.C.5.3.1.1). 이들 효소계를 발현 시키는데 사용된 완충계 및 발현된 유전좌위는 표 III-2-3-1에 제시되어있다. 젤상에서 효소 발색은 Soltis et al(1983).에 따랐고, diaphorase는 Cheliak and Pitel(1984) 방법을 따랐다. 가정된 유전좌위는 음극으로 가장 많이 전개된 아이소자임(isozyme) 부터 1, 2 등으로 정하였고 각 아이소자임 내 알로자임 또한 많이 전개된 것부터 윗첨자 a, b 등으로 정하였다.

표 III-2-3-1. 층층둥굴레(*Polygonatum stenophyllum*) 및 노랑무늬붓꽃(*Iris odaesanensis*)을 대상으로 알로자임 분석에 사용된 완충계(2종류)와 효소계(10종류) 및 발현된 임의로 정한 유전좌위(putative isozyme loci)<sup>a</sup>.

Species	Buffer system	Loci resolved
<i>Polygonatum stenophyllum</i>	6	<i>Adh-1, Adh-2, Dia-1, Dia-2, Dia-3, Dia-4, Fe-1, Fe-2, Me, Pgi-1, Pgi-2, Pgi-3, Pgm-1, Pgm-2, Tpi-1, Tpi-2</i>
	MC	<i>Idh-1, Idh-2, Mdh-1, Mdh-2, 6pgd-1, 6pgd-2</i>
<i>Iris odaesanensis</i>	6	<i>Adh, Dia-1, Dia-2, Dia-3, Fe-1, Fe-2, Me, Pgi-1, Pgi-2, Pgi-3, Pgm-1, Pgm-2, Pgm-3, Tpi-1</i>
	MC	<i>Idh-1, Idh-2, Mdh-2, Mdh-2, 6pgd-1, 6pgd-2</i>

<sup>a</sup>Abbreviations: Buffer system 6 was from Soltis et al. (1983); MC, morpholine-citrate system (pH 6.1) from Clayton and Tretiak (1972).

### 3) 클론 다양도 추정(measure of clonal diversity)

충충둥굴레와 노랑무늬붓꽃은 유성 및 무성적으로 번식하기 때문에, 유효집단 크기  $N_e$ 를 추정하기 위해, 우선 채집된 묘조가 각 집단내에서 다유전좌위에서 유전자형(multilocus genotype, MLG)이 같으면 같은 클론인지를 판별하는 것이 중요하다(Berg and Hamrick 1994; Chung and Epperson 1999; Chung et al. 2004). 이를 위하여 무작위로 “유성생식”에 의해서 형성된 2종류의 유전자형이 같을 확률( $P_G$ )을 구해야 된다.  $P_G$ 는 연관균형(linkage equilibrium) 조건하에서 유전체(genets)의 각 유전좌위내 유전자형 빈도를 제공해서 합한 추정치를 모든 유전좌위에 곱함으로써 구할 수 있다 (Berg and Hamrick 1994). 만약  $P_G$ 가 매우 낮으면(예,  $< 0.05$ ) 유성생식에 의해 형성될 가능성이 매우 낮다는 것을 의미하며, 이는 집단내에서 같은 MLG를 지닌 묘조는 클론이라고 할 수 있다. 본 보고서에서 집단내 전체 묘조수를 NT, 클론을 제외한 유전체수를 NG라고 표현한다.

멸종 위기종의 보전 측면에서  $N_e$ 의 측정은 중요하다.  $N_e$ 란 “실제” 집단내에서와 같이 같은 양의 유전적 부동(genetic drift)을 받는 “이상적”인 집단의 크기를 말한다.  $N_e$  혹은 “유효 집단 크기의 분산”은 몇가지 생태적, 생식적 변량에 의해 영향을 받는다고 알려져 있다(Crow and Kimura 1970). 예를 들면, 1)자손(progeny)의 수에서 분산, 2)성(sex) 비율의 차이 [ $N_e = 4N_mN_f/(N_m+N_f)$ ;  $N_m$ 은 수컷수,  $N_f$ 는 암컷수], 3)집단내 전체 개체수의 변동, 4)무작위 교배(random mating)에서 벗어남의 정도에 따라 실제 집단의 개체수보다  $N_e$ 는 적어진다.

집단내에서 클론 크기(the variation in ramet number per genet)의 변이를 고려한 유효 집단 크기( $N_{e(c)}$ )가  $N_G$  보다 적은 값으로 추정됨이 알려졌다 (Chung et al. 2004). 충충둥굴레와 노랑무늬붓꽃에서  $N_{e(c)}$ 를 구하기 위하여 상기 1)“자손수에서 분산”에 기초를 둔 Crow and Kimura(1970)의 Equation 7.6.13인  $(4N-2)(V_k+2)$ 공식을 이용하였다. 여기서 N 은 유전체( $N_G$ )수이며  $V_k$ 는 유전체에 의해서 만들어져 다음 세대에 전해지는 배우자(k)의 수의 분산이다. 교배가 무작위로 행해지고 집단의 크기가 일정하게 유지된다고 가정하고, 개개의 분주체(ramet)에 의해 만들어진 배우자의 수가 이항적 변이라고 가정한다면,  $V_k$ 는 각 유전체당 분주 체수와 함수 관계에 있다고 할 수 있다. 이런 가정하에서 관찰된 NG와 각 유전체당 분주체의 수를 가지고 집단내 분주체와 유전체의 생식에서 변이를 Monte Carlo 시뮬레이션을 이용하여 추정하였다. 시뮬레이션 방법에 의해 각 집단에서 1000개의 집단을 만들었다.

각 집단에서 만들어진 시뮬레이션 된 집단에서  $N_{e(c)}$ 의 평균값을 구하고 1000개의 높은 차순으로 추정값의 25번째와 976번째 값에서 95% 신뢰 구간(confidence limits)을 구하였다.

#### 4) 유전적 다양도 및 분화 분석

유전체수( $N_G$ )를 대상으로 집단내 유전적 변이 및 집단간 분화에 대한 정량화는 집단내 다형성 유전좌위수, %P; 유전좌위당 평균 대립인자 수, A; 관찰되는 이형 접합성,  $H_o$ ; 기대되는 이형 접합성,  $H_e$ 를 구하였다(Berg and Hamrick 1997). F-통계법(Wright 1965)은 집단 내( $F_{IS}$ )와 집단 간 ( $F_{ST}$ ,  $\Theta$ ) 수준에서 측정하였다(Wier and Cockerham 1984). 이 F값의 분산은 전체 유전좌위를 jackknifing하여 구하였다. Jackknifed된 F값의 평균의 유의성 검정은 bootstrap 1500 bootstrap replicates에 의한 95% 신뢰구간을 구해 판단 될 것이다. 개체수를 보정한 Nei의 유전적 거리와 동질성을 구할 것이고, 집단간 유전적 거리 계수 값으로부터 UPGMA 방법으로 전형질도를 작성하였다.

### 다. 결과

#### 1) 층층둥굴레

10종류의 효소계에서 22종류의 임의로 정한 유전좌위가 발현되었으며 8종류의 다형성 유전좌위가 파악되었다. 이들은 Dia-1, Dia-3, Mdh-1, Mdh-2, Pgi-2, Pgm-2, Tpi-1 및 Tpi-2 였다(표 III-2-3-2). 이들 8종류의 다형성유전좌위에 보이는 유전자형을 기준으로 다유전좌위유전자형 (multilocus genotype, MLG)은 단지 8종류(A, B, C, D, E, F, G, H)만 발현되었다(표 III-3-3-2). A, D, F, G 유형에는 각 유전좌위에 동형 접합자로만 구성되어 있었고 B와 E에서는 Pgm-2에 이형 접합자 ab가 보였고 C에서 Tpi-1과 Tpi-2에서 이형 접합자 ab를 지니고 H에서는 Pgi-2에서 이형 접합자 ab가 보였다(표 III-2-3-2). 집단내 같은 MLG를 지니는 묘조들이 클론(clonal ramets)인지를 판단하기 위해 PG를 구하였는데 값은 0.05보다 적은 0.026이 PS-2 집단에서 구하여졌다(표 III-2-3-3). 따라서 총 318 묘조에서 보인 8개의 MLG는 다른 유전체(genet)이라고 할 수 있다. 흥미로운 사실은 층층둥굴레 집단내에 유전체는 PS-2 와 PS-3 집단들에서는 3종류가 보였고 나머지 집단에서는 단지 1종류만

판별되었다(표 III-2-3-3). 유전자형 다양도(genotypic diversity) 척도로 표현되는 DG는 PS-2와 PS-3에서 각각 0.40과 0.53으로 계산되었고 평균적으로 0.13이었다. 이는 매우 낮은 수준이다(표 III-2-3-3). 집단내의 유전체가 1~3종류가 알려졌기에 유전체와 클론의 변이를 고려한 유효 집단 크기( $N_e(c)$ )는 매우 작았다(1.00-2.98)(표 III-2-3-3).

충청동굴레 7집단에서 5곳이 하나의 MLG로 구성되었음을 판별하였다(표 III-2-3-4). A유형은 PS-1, E는 PS-4와 PS-5, F는 PS-6 및 H 유형은 PS-7에 각각 나타났다(표 III-2-3-4). PS-2 집단은 B, C, D 유형을 PS-3에서는 E, F, G 유형을 지니고 있다.

충청동굴레 7집단내에서 유전체를 대상으로 보이는 유전적 다양도는 매우 낮았다(표 III-2-3-5). PS-1과 PS-6은 8종류의 유전좌위에 동형 접합자로 구성되었기에 집단 변이는 0(zero)였다( $\%P = 0$ ,  $A = 1$ ,  $H_e = 0$ ). 나머지 집단에서는 일부 유전좌위(Pgi-2, Pgm-2, Tpi-1, Tpi-2)에 이형 접합자를 지니는 유전자형을 지니고 있기에 매우 낮은 다양도를 보였다( $\%P = 4.6-31.8\%$ ,  $A = 1.05-1.31$ ,  $H_e = 0.023-0.134$ ). 집단내 평균 유전적 다양도는  $\%P = 7.2\%$ ,  $A = 1.07$ ,  $H_e = 0.032$ 였다. 전체 8개의 MLG에서 측정된 유전적 다양도의 통계량( $\%P = 36.4\%$ ,  $A = 1.41$ ,  $H_e = 0.118$ )들은 집단내 보다 훨씬 높았다. 이는 일부 집단들이 각각 다른 MLG 유형을 지니고 있음을 반영하고 있는 결과와 일치하며 집단간에 유전적 분화수준이 높음을 제시하고 있다.



표 III-2-3-2. 층층둥굴레 7집단에서 보이는 8종류의 다유전자좌위 유전자형.

Multilocus genotype	Locus							
	<i>Dia-1</i>	<i>Dia-3</i>	<i>Mdh-1</i>	<i>Mdh-2</i>	<i>Pgi-2</i>	<i>Pgm-2</i>	<i>Tpi-1</i>	<i>Tpi-2</i>
A	<i>bb</i>	<i>bb</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>bb</i>	<i>aa</i>
B	<i>cc</i>	<i>bb</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>ab</i>	<i>bb</i>	<i>aa</i>
C	<i>bb</i>	<i>aa</i>	<i>bb</i>	<i>bb</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>ab</i>	<i>ab</i>
D	<i>bb</i>	<i>aa</i>	<i>bb</i>	<i>bb</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>
E	<i>aa</i>	<i>bb</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>ab</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>
F	<i>aa</i>	<i>bb</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>bb</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>
G	<i>aa</i>	<i>bb</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>
H	<i>bb</i>	<i>bb</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>ab</i>	<i>bb</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>

표 III-2-3-3. 층층둥굴레 7집단에서 보이는 클론의 다양도 및 유효 집단의 크기( $N_e$ ) 추정<sup>a</sup>.

Pop	$N_T$	$N_G$	$P_G$	$D_G$	$N_{e(c)}$ (95% CI)
PS-1	26	1	na	0.00	1
PS-2	50	3	0.026	0.40	1.90 (1.54-2.33)
PS-3	50	3	na	0.53	2.98 (2.61-3.50)
PS-4	42	1	na	0.00	1
PS-5	50	1	na	0.00	1
PS-6	50	1	na	0.00	1
PS-7	50	1	na	0.00	1
Average	45.4	1.6		0.13	1.41

<sup>a</sup>Abbreviations:  $N_T$ , number of ramets (shoots);  $N_G$ , number of genets (genotypes);  $P_G$ , probability of randomly drawing two identical genotypes by sexual reproduction;  $D_G$ , genotypic diversity index;  $N_{e(c)}$ , demographic effective population size; 95% CI, 95% confidence intervals; na, not available.

표 III-2-3-4. 충충둥굴레 7집단에서 보이는 8종류의 다유전좌위 유전자형의 빈도(%).

Pop	Frequency of multilocus genotype (%)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
PS-1	100							
PS-2		12	12	76				
PS-3					30	62	8	
PS-4					100			
PS-5					100			
PS-6						100		
PS-7								100

표 III-2-3-5. 충충둥굴레 7집단에서 보이는 유전적 다양도 통계량<sup>a</sup>.

Pop	%P	A	$H_o$ (SD)	$H_e$ (SD)
PS-1	0	1	0	0
PS-2	31.8	1.31	0.076 (0.204)	0.134 (0.203)
PS-3	4.6	1.05	0.015 (0.071)	0.023 (0.107)
PS-4	4.6	1.05	0.046 (0.213)	0.023 (0.107)
PS-5	4.6	1.05	0.046 (0.213)	0.023 (0.107)
PS-6	0	1	0	0
PS-7	4.6	1.05	0.046 (0.213)	0.023 (0.107)
Average	7.2	1.07	0.033 (0.028)	0.032 (0.046)
Total	36.4	1.41	0.037 (0.092)	0.118 (0.184)

<sup>a</sup>Abbreviations: %P, percentage of polymorphic loci; A, mean number of alleles per locus;  $H_o$ , observed heterozygosity; SD, standard deviations;  $H_e$ , expected heterozygosity or gene diversity.

## 2) 노랑무늬붓꽃

한국 특산종인 노랑무늬붓꽃 10곳 집단에서 10종류의 효소계로부터 22종류의 유전좌위가 발현되었다. Mdh-1 과 Tpi-2는 발현이 좋지 않아 자료 분석에서 제외시켰다. 나머지 20종류 중 16개의 유전좌위가 다형성을 보였다. 다유전좌위유전자형(MLG)을 기준으로 각 집단내 유전체 수는 IO-1 과 IO-2

에서 각각 1종류만 보였다. 따라서  $DG = 0$ 였다(표 III-2-3-6). 나머지 집단에서 보인 유전체 수(NG)는 11종류(IO-3)에서 37(IO-5)가지 유형을 보였다. NG가 다양하기에 DG는 높았다(0.826에서 0.991). NG와 각 유전체에서 분주체 수의 변이를 고려한 유효집단크기( $N_e(c)$ )는 집단간 변이가 심하였다. IO-1과 IO-2에서는 1이었고 IO-8에서는 4.39, IO-10이 36.42였다(표 III-2-3-6). 노랑무늬붓꽃의 집단내 유전적변이 수준은 높았다(표 III-2-3-7). 평균 %P는 41.5%였고, A는 1.54, 기대되는 이형 접합성( $H_e$ )은 0.122였다. 전체 샘플(NG = 209)을 모두 고려한 다양도는 집단내 평균치보다 높았다(%P = 80%, A = 2.85,  $H_e = 0.165$ ). Nei의 HT는 0.175였고 GST는 0.202였다. 이는 전체 변이 중 집단간 때문이 약 20%이고 집단내 때문이 80%를 차지함을 의미한다. Wier and Cockerham(1984) 방법에 의한 FST는 0.191이었고 95% 신뢰구간(0.141-0.253)이 0(zero)와 겹치지 않기 때문에(귀무가설  $FST = 0$ ) 집단간 통계학적으로 유의성 있게 분지됨이 밝혀졌다. 집단내 유전적구조(FIS로 표현)가 집단간에 변이를 보였다. IO-3에서는 -0.427이었고 IO-9에서는 0.211이었다(표 III-2-3-7). 하지만 전체집단을 고려할 때 관찰된 이형 접합성이 기대되는 이형 접합성과 유의성 있게 차이가 나지 않았다(FIS = 0.069, 95% 신뢰구간 -0.035, 0.169). 이는 전반적으로 노랑무늬붓꽃 집단에서 타가수분이 일어났음을 암시하고 있다. Nei의 집단간 유전적 거리 계수로 작성한 UPGMA 전형질도에 의하면 10곳 집단이 크게 두 그룹으로 유집되었다(그림 III-2-3-3). 즉, IO-1과 IO-3 유집군과 나머지 집단들로 유집됨을 알 수 있다. 주왕산 3곳 집단(IO-8, IO-9, IO-10)은 가장 가깝게 유집되었고 이 그룹과 IO-5(함백산), IO-6(석개재), IO-2(오대산 북대사) 그리고 IO-7(소백산 제1연화봉)으로 유집되었다. UPGMA 전형질도와 일치하게 집단간 유전적 거리와 지역간의 거리와의 상관관계는 약하게 나타났다.

표 III-2-3-6. 노랑무늬붓꽃 10곳 집단에서 보이는 클론의 다양도 및 유효집단의 크기( $N_e$ ) 추정<sup>a</sup>.

Pop	$N_T$	$N_G$	$P_G$	$D_G$	$N_{e(c)}$ (95% CI)
IO-1	50	1	na	0	1
IO-2	50	1	na	0	1
IO-3	50	11	0.030	0.860	8.02 (6.66-9.50)
IO-4	50	32	0.003	0.983	24.25 (19.23-29.69)
IO-5	50	37	0.000	0.987	14.17 (10.94-18.47)
IO-6	50	32	0.006	0.991	23.97 (18.69-29.55)
IO-7	50	18	0.000	0.859	4.90 (3.81-6.28)
IO-8	50	16	0.034	0.826	4.39 (3.46-5.49)
IO-9	50	32	0.019	0.984	25.39 (20.17-30.99)
IO-10	50	29	0.012	0.976	36.42 (28.81-44.47)
Average	50	20.9	0.013	0.746	14.35
Total	500	209	0.001	0.896	

<sup>a</sup>Abbreviations:  $N_T$ , number of ramets (shoots);  $N_G$ , number of genets (genotypes);  $P_G$ , probability of randomly drawing two identical genotypes by sexual reproduction;  $D_G$ , genotypic diversity index;  $N_{e(c)}$ , demographic effective population size; 95% CI, 95% confidence intervals; not available.

표 III-2-3-7. 노랑무늬붓꽃 10곳 집단 내 유전적 변이 및 고정 계수( $F_{IS}$ )<sup>a</sup>.

Pop	%P	A	$H_o$ (SD)	$H_e$ (SD)	$F_{IS}$
IO-1	10	1.10	0.100 (0.308)	0.050 (0.154)	na
IO-2	15	1.15	0.150 (0.366)	0.075 (0.183)	na
IO-3	40	1.50	0.236 (0.351)	0.161 (0.227)	-0.427
IO-4	55	1.75	0.127 (0.207)	0.145 (0.204)	0.143
IO-5	60	1.70	0.158 (0.185)	0.167 (0.179)	0.068
IO-6	45	1.70	0.106 (0.188)	0.129 (0.202)	0.192
IO-7	50	1.70	0.211 (0.240)	0.211 (0.236)	0.027
IO-8	45	1.55	0.088 (0.131)	0.083 (0.121)	-0.063
IO-9	45	1.65	0.075 (0.146)	0.093 (0.174)	0.211
IO-10	50	1.60	0.102 (0.158)	0.104 (0.162)	0.039
Average	41.5	1.54	0.130 (0.054)	0.122 (0.050)	
Total	80	2.85	0.128 (0.110)	0.165 (0.131)	0.069

<sup>a</sup>Abbreviations: %P, percentage of polymorphic loci; A, mean number of alleles per locus;  $H_o$ , observed heterozygosity; SD, standard deviations;  $H_e$ , expected heterozygosity or gene diversity.

표 III-2-3-8. 충충둥굴레 다형성 유전자좌위 8곳에서 보이는 집단별 유전자형.  
( )안의 수는 대립인자 수.

Pop	Locus							
	<i>Dia-1</i> (3)	<i>Dia-3</i> (2)	<i>Mdh-1</i> (2)	<i>Mdh-2</i> (2)	<i>Pgi-2</i> (2)	<i>Pgm-2</i> (2)	<i>Tpi-1</i> (2)	<i>Tpi-2</i> (2)
PS-1	<i>bb</i>	<i>bb</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>bb</i>	<i>aa</i>	<i>bb</i>	<i>aa</i>
PS-2	<i>bb,cc</i>	<i>aa,bb</i>	<i>aa, bb</i>	<i>aa, bb</i>	<i>bb</i>	<i>aa, ab</i>	<i>ab, bb</i>	<i>aa, ab</i>
PS-3	<i>aa</i>	<i>bb</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>bb</i>	<i>aa, ab, bb</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>
PS-4	<i>aa</i>	<i>bb</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>bb</i>	<i>ab</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>
PS-5	<i>aa</i>	<i>bb</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>bb</i>	<i>ab</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>
PS-6	<i>aa</i>	<i>bb</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>bb</i>	<i>bb</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>
PS-7	<i>bb</i>	<i>bb</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>	<i>ab</i>	<i>bb</i>	<i>aa</i>	<i>aa</i>

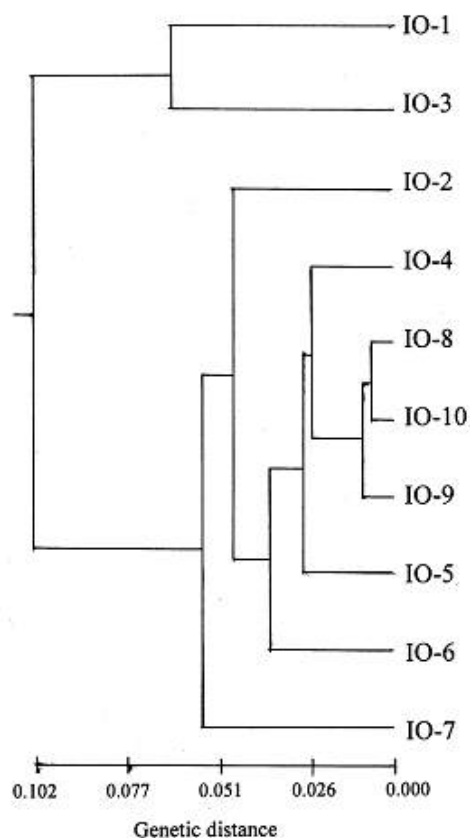


그림 III-2-3-3. 노랑무늬붓꽃 10곳 집단을 대상으로 Nei's(1978) genetic distance 계수에 근거하여 UPGMA 방법에 의한 전형질도(dendrogram).

## IV. 제 4차년도 연구 결론

### 1. 엽록체 유전체 완전 염기 서열 분석과 의미

전 세계적으로 엽록체 유전체 연구는 활발하며 약 70개 이상의 엽록체 유전체의 완전 염기 서열이 알려져 있고, 주요 농작물, 멸종 위기 희귀 식물 및 바이오 에너지 자원 식물의 연구에 중점을 두고 있다. 한국에서는 잣나무, 배추, 인삼, 오이 등의 농림 작물 유전체 완전 염기 서열이 Genbank에 등록되어 있다. 본 연구에서 기저 현화 식물군의 순채와 가시연 및 단자엽 식물의 노랑붓꽃과 노랑무늬붓꽃의 완전 염기 서열을 분석하였다. 기저 현화 식물군의 죽절초와 양치식물인 솔잎난은 엽록체 유전체 일부를 분석하였다. 이로써, 한국의 멸종 위기 식물 65종 중, 국립생물자원관 주요 생물자원의 유전자 분석 연구 용역에서 본 연구의 4종을 포함해 총 6개과의 7종의 엽록체 유전체 완전 염기 서열 분석을 마쳤다(표IV-1). 이는 한국 멸종 위기 식물의 9%에 해당한다. 어항마름과(Cabombaceae)와 붓꽃과(Iridaceae)는 세계 최초로 엽록체 유전체 완전 염기 서열을 분석한 것이다.

표 IV-1. 국립생물자원관 주요 생물자원의 유전자 분석 연구 용역에서 엽록체 유전체 완전 염기 서열이 밝혀진 멸종 위기 식물.

식물군	식물과	학명	세부 책임자	비고
양치식물 (Pteridophytes)	Ophyoglossaceae (고사리삼과)	<i>Mankyua chejuense</i> (제주 고사리삼)	김기중	1단계
기저 현화 식물 (ANITA)	Nymphaceae (수련과)	<i>Euryale ferox</i> (가시연)	이정호	본 연구
	Cabombaceae (어항마름과)	<i>Brasenia schreberi</i> (순채)	이정호	본 연구
단자엽 식물 (Monocots)	Iridaceae (붓꽃과)	<i>Iris koreana</i> (노랑붓꽃)	이정호	본 연구
		<i>Iris odaesanensis</i> (노랑무늬붓꽃)	이정호	본 연구
쌍자엽 식물 (Eudicots)	Oleaceae (물푸레나무과)	<i>Abeliophyllum distichum</i> (미선나무)	김기중	1단계
	Araliaceae (두릅나무과)	<i>Elrutherococcus senticosus</i> (가시오갈피)	김기중	1단계

## 가. 기저 현화 식물군(ANITA)

기저 현화 식물은 유용 약용식물자원으로 중요한 식물군으로 그 정보가 유용하며, 진화학적으로 현화 식물의 기원에 대한 중요한 정보를 가지고 있는 의미를 갖는다. 이 분류군은 ANITA로 저명저널인 Nature(Qiu et al. 1999)에 제안된 분류군으로 주요 유용식물이 모여 있는 식물군으로 전 세계적으로 3개과의 4종에 대해 연구보고가 있으며, 본 연구에서 이 식물군에 속하는 멸종 위기종 3종 중 2개과의 2종의 완전 염기 서열을 밝혔다(표 IV-2 참조). *Amborella*는 본 연구 주관연구자가 현화 식물의 기원을 밝힌, 호주의 뉴칼레도니아 섬에만 서식하는 희귀식물이고, *Illicium*(붓순나무류)은 신종플루의 치료제인 타미플루의 원료가 되는 식물로 알려져 있으며, 한국산 죽절초가 속하는 홀아비꽃대과 식물은 약용 관상 식물로 알려져 있다. 어항마름과와 수련과식물은 지구 온난화의 영향으로 호수 및 가정 경관용 재배식물로 한국에서 그 분포를 북쪽으로 넓혀 가고 있다. 이와 더불어, 다양한 수생식물이 외국에서 유입되고 있어 가까운 미래에 외래 식물과의 유전적 오염이 이루어 질 것으로 예상되는 상황에서, 순채(*Brasenia schreberi*)와 가시연(*Euryale ferox*)의 엽록체 유전체 완전 염기 서열을 확보한 것은 매우 유용한 정보가 될 것이며, 이 정보는 대상 식물의 복원 및 원산지 추적을 위한 마커 개발에 유용할 것이다.

표 IV-2. 엽록체 유전체 완전 염기 서열이 밝혀진 기저 현화 식물(ANITA).

식물과	학명	연구자	Genbank ACC #	비고
Amborellaceae	<i>Amborella triploda</i>	Goremykin et. al (MBE 2003)	AJ506156	1과 1속 1종
Cabombaceae (어항마름과)	<i>Brasenia schreberi</i> (순채)	Lee et al.		본 연구
Chloranthaceae (홀아비꽃대과)	<i>Chloranthus spicata</i>	Hansen et al. (MPE 2007)	EF380353	
Illiciaceae (붓순나무과)	<i>Illicium oligandrum</i>	Hansen et. al (MPE 2007)	EF380354	
Nymphaeaceae (수련과)	<i>Euryale ferox</i> (가시연)	Lee et al.		본 연구
	<i>Nuphar advena</i>	Raubeson et. al (Unpublished)	DQ354691	
	<i>Nymphaea alba</i>	Goremykin et. al. (MBE 2004)	AJ627251	

## 나. 단자엽 식물군

전 세계적으로 현화 식물중 쌍자엽 식물은 약 50개 이상의 엽록체 완전 염기 서열이 밝혀져 있는 반면, 단자엽 식물의 연구는 20종류에서 보고되어 있으나, 주로 벼과(16종류) 식물에 국한되고, 화훼류의 호접란 1종, 개구리밥 1종, 단자엽 식물의 기저 식물인 창포 2종과 마과 1종이 밝혀져 있다. 자식성 단자엽 식물인 벼과 식물 엽록체 유전체는 단자엽 식물 중 가장 진화한 형태로 단자엽 식물의 엽록체 유전체를 대표하지 못한다. 다른 극단적인 단자엽 식물의 진화형인 호접란은 많은 유전자를 잃었으며, 수생 부유 식물인 개구리밥은 그 염기 서열이 매우 변이율이 높은 것으로 알려져 있다. 마는 덩굴성 구황작물로 널리 이용되는 특징을 가지고 있다. 전반적으로 단자엽 식물은 그 형태가 쌍자엽 식물에 비해 다양하지 않은 것으로 알려져 있으나, 자식성 식물의 특성상 엽록체 유전체의 변이가 쌍자엽 식물에 비해 높은 것으로 보이며, 이러한 어려움 때문에 단자엽 식물의 유전체 연구가 미흡한 것으로 보인다.

한국의 멸종 위기종 중 단자엽 식물은 멸종위기 I급의 8종 중 5종이 있으며, 전체 멸종 위기종 65종 중 18개(28%)에 해당하나 엽록체 유전체 완전 염기 서열은 전혀 보고된 바가 없었다. 본 연구에서 수행한 한국 고유종인 붓꽃과 2종의 완전 염기 서열 분석은 한국의 멸종 위기종 유전체 정보 및 단자엽 식물의 엽록체 유전체 정보를 세계적으로 알릴 수 있는 성과라 하겠다. 자원적 관점에서, 화훼 및 식용으로 중요해 수입하고 있는 나리류(*Lilium*), 건강식 차로 사용하는 등골레류, 최고급 화훼 작물인 난초류, 수선화과의 진노랑상사화, 붓꽃과의 3종은 화훼용 생물자원적 가치를 가진다. 반면, 보존적 관점에서 보면, 많은 유사 도입종이 재배되고 있어, 이 단자엽 멸종 위기종은 유전 오염 위험에 쉽게 노출될 수 있다. 이런 관점에서, 한국의 고유종이며 멸종 위기종인 노랑붓꽃(*Iris koreana*)과 노랑무늬붓꽃(*Iris odaeansensis*)의 엽록체 유전체 완전 염기 서열 확보는 복원 및 원산지 추적을 위한 마커 개발에 유용할 뿐만 아니라, 단자엽 식물의 엽록체 유전체 연구에 큰 도움이 될 것이다.

다른 자원적 견지에서 육상식물의 바이오 알콜 생산은 전분과 셀룰로스 자원으로 야생 단자엽 식물의 선발과 육종에 박차를 가하고 있는 현실에서 단자엽 식물 자원에 대한 연구에 보다 박차를 가해야 할 것이다. 엽록체 유전체 연구 결과의 활용은 다음과 같이 이해할 수 있을 것이다.



표 IV-3. 엽록체 유전체 완전 염기 서열이 밝혀진 단자엽 식물.

식물군	학명	연구자	Genbank ACC #	비고
Acoraceae (창포과)	<i>Acorus americanus</i>	Peery et al. (unpublished)	EU273602	
	<i>Acorus calamus</i>	Hansen et al. (MBE 2007)	AJ879453	
Dioscoreaceae (마과)	<i>Dioscorea elephantipes</i>	Hansen et al. (MPE 2007)	EF380353	
Iridaceae (붓꽃과)	<i>Iris koreana</i>	Lee et al.		본 연구
	<i>Iris odaesanensis</i>	Lee et al.		본 연구
Lemnaceae (개구리밥과)	<i>Lemna minor</i>	Mardanov et al. (JME 2008)	DQ400350	
Orchidaceae (난초과)	<i>Phalaenopsis aphrodite</i> ssp. <i>formosana</i>	Chang et al. (MBE 2006)	AY916449	
Poaceae (벼과)	<i>Agrostis stolonifera</i>	Saski et al. (unpublished)	EF115543	
	<i>Bambusa oldhamii</i>	Wu et al. (Tree Physiol. 2009)	FJ970915	
	<i>Brachypodium distachyon</i>	Bortiri et al. (Online-Only)	EU325680	
	<i>Coix lacryma-jobi</i>	Leseberg et al. (Unpublished)	FJ261955	
	<i>Dendrocalamus latiflorus</i>	Wu et al. (Tree Physiol. 2009)	FJ970916	
	<i>Festuca arundinacea</i>	Cahoon et al. (Unpublished)	FJ466687	
	<i>Hordeum vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i>	Saski C et al. (Unpublished).	EF115541	
	<i>Lolium perenne</i>	Diekmann et al. (PLoS ONE 2009)	AM777385	
	<i>Oryza nivara</i>	Shahid M M et al. (Gene 2004)	AP006728	
	<i>Oryza sativa</i> ssp. <i>indica</i>	Tang et al. (Plant Physiol. 2004)	AY522329	
	<i>Oryza sativa</i> ssp. <i>japonica</i>	Hiratsuka J et al. (MGG 1989)	X15901	
	<i>Saccharum hybrid</i>	Calsa T Jr et al. (Unpublished)	AE009947	
	<i>Saccharum officinarum</i>	Asano T et al. (DNA Res 2004)	AP006714	
	<i>Sorghum bicolor</i>	Saski C et al. (Unpublished)	EF115542	
	<i>Triticum aestivum</i>	Ogihara Y et al. (MGG 2002)	AB042240	
<i>Zea mays</i>	Strittmatter G (NAR 1984)	X86563		

#### 다. 엽록체 유전체 계통학과 마커 개발

육상식물 계통학은 1990년대에 J. Palmer계열의 Jansen, Manhart, Chase로 이어지는 엽록체 유전자를 이용하는 식물 계통학과 Soltis에 의해 주도된 핵 rRNA 계통학이 그 한계에 부딪히고, J. Manhart계열의 Lee(1997)의 엽록체 유전체 계통 및 다유전자 분석 방법과 J. Palmer계열의 Qiu의 미토콘드리아 유전체 연구가 융합하여, 1999년에 3-유전체 유전자를 이용한 다유전자 분석으로 현화 식물의 기원(Qiu et al. 1999, 2000, 2001, 2005)과 육상식물의 계통도를 완성(Qiu et al. 2006, 2007)하는 발전을 이루었고. 육상식물의 기원의 새로운 해석을 유전체 형질 연구(Manhart and Palmer 1990, Qiu and Lee 2000)로 제안했다. Lee and Manhart(2000, 2001, 2002a, 2002b)는 녹색식물 계통학은 엽록체 유전체 계통학적 방법으로 발전해야 한다고 주장하였고, 그 결과 엽록체 유전체 계통학은 점차 자리를 잡아가며, 육상식물의 계통도(Qiu et al 2006)와 현화 식물의 계통도(Hansen et al. 2007)가 그 자리를 잡아가고 안정적 결과를 보이고 있다. 쌍자엽 식물을 제외한 육상식물과 조류의 엽록체 유전체의 계통학적 연구를 기다리고 있다.

표 IV-4. 녹색식물연구소에서 진행된 식물 자원 엽록체 유전체 완전 염기 서열 분석.

식물군	학명	연구자	비고
쌍자엽 식물	<i>Brassica chinensis</i> (배추)	Lee and Lim	완료
단자엽 식물	<i>Iris koreana</i> (노랑붓꽃)	Lee et al.	본연구(완료)
	<i>Iris odaesanensis</i> (노랑무늬붓꽃)	Lee et al.	본연구(완료)
ANITA	<i>Brasenia schreber</i> (순채)	Lee et al.	본연구(완료)
	<i>Euryale ferox</i> (가시연)	Lee et al.	본연구(완료)
차축조류	<i>Coleochaete orbicularis</i>	Lee	완료
	<i>Spirogyra maxima</i>	Lee	완료
녹조류	<i>Tetraselmis seuicica</i>	Lee	진행중
	<i>Caulerpa sertularioides</i>	Lee	진행중
유색조류	<i>Porphyra dentata</i> (잇바디돌김)	Lee et al.	진행중
	<i>Porphyra seriata</i> (모무늬돌김)	Lee et al.	진행중
	<i>Porphyra tenera</i> (참김)	Lee et al.	진행중
	<i>Vaucheria litorea</i>	Lee	PNAS 2008

엽록체 유전체 연구는 식물 계통 연구에만 큰 의미를 가지는 것이 아니라, 식물의 종간 및 종내 변이를 추적하는 데, 중요한 위치를 차지한다. 저명저널 Science에서 Thomas(2009)가 언급한 것과 같이 식물의 Genetic Barcode는 현 단계에서 엽록체 유전자를 쓰는 것이 바람직하다. 세계 UPOV에서는 DNA 마커에 대한 심도 있는 논의가 진행되고 있으며, genetic Barcode를 포함 안정된 DNA 마커의 이용은 기술력을 확보한 국가가 선도 할수 있도록 그와 관련된 법률도 개정될 예정이다. 현재 UPOV 회장은 한국에서 역임하고 있으며, 보다 체계적인 식물자원을 인식할 수 있는 시스템을 만들어야 할 것이다. 본 연구 책임자는 이러한 취지에서 3-유전체 마커 시스템을 주장해 오고 있으며, 그 일환으로 식용 해조류(김, 미역, 다시마)의 3-유전체 마커 시스템을 개발하고, 김의 계통주(품종)을 구별하는 1단계 연구로 엽록체 마커로 계통주를 검정할 수 있는 시스템을 확립해 가고 있다. 식물의 마커 시스템은 계통을 설명 할 수 있는 엽록체 시스템이 우선이고, 나아가 핵과 미토콘드리아 마커를 개발하고 그 안정성을 검정하는 단계가 절대적으로 필요하다.

이러한 관점에서 식물체 엽록체 유전체 연구는 식물 연구에서 가장 우선적으로 연구해야 할 과제이며, 본 연구에서 추구하는 멸종 위기종의 유전적 다양성 연구를 위한 마커, genetic barcode, 식물 원산지 추적을 위한 마커, 품종 구별을 위한 마커 개발에 유용한 기반 데이터베이스로 사용될 것이다. 물론, 엽록체 일부 구간의 연구 또한 유용하나, 식물유전체는 복제와 유전전이 (Small and Wedendel 2000; Bergthorsson et al. 2003; Richardson and Palmer 2007)가 심하게 일어나므로 결과의 신뢰도를 판단하기 어려운 것이 현실이다. 이러한 이유에서 한국의 멸종 위기종을 포함한 중요 식물의 엽록체 유전체 완전 염기 서열 분석이 필요하다.

본 연구 결과로 4개의 엽록체 유전체의 완전 염기 서열이 분석되어, 이들의 근연식물의 유전적 다양성 연구에 유용하게 사용될 것이며, 본 연구의 유전적 다양성 연구에서 그 효력을 확인 할 수 있었다.

## 2. 멸종 위기종의 유전적 다양성 분석을 통한 보존 대책

본 연구에서 4종의 유전적 다양성을 분석하였다. 연구 목적은 멸종 위기종의 서식지에서 그 유전적 특징을 파악하여 각 집단의 보존 대책을 세우는데 있다. 식물은 외부 형질의 변이로 그 보존 대책을 세우는 것이 관례로 되어 있어, 일부 멸종 위기 식물에 대해 연구가 진행되었다. 본 연구에서는 보다 근본적인 유전형질을 파악해 보존 대책을 세울 정보를 모으는 것이다. 본 연구에서 두 가지 방법으로 유전적 다양성을 파악하였다. 첫째는 유전체의 정보를 이용해 DNA 수준에서의 변이 정도를 파악해 보존 대책을 세우는 것이고, 나머지 하나는 유전적 표현형인 단백질, 즉 알로자임의 양상을 분석하여 각 집단의 분화 양상을 파악해 유전적 다양성의 특징을 보고 집단의 특성을 판정하는 것이었다.

### 가. 유전적 다양성 분석 결론

#### 1) DNA 분석

##### ① 솔잎난

본 연구에서는, 연구 기간 중 무분별한 남획으로 멸종된 제주시 군집을 제외하고, 한국에 알려진 솔잎난 개체의 대부분을 사용했다. 솔잎난에서는 엽록체 유전체의 군집의 다양성을 보이는 DNA형질을 찾는 것이 우선이었고, 이 연구에서 3개의 엽록체 DNA 변이 구간(SNP, SSR)을 찾아 그 유전적 다양성을 파악하였다. 3개의 엽록체 DNA마커구간의 변이에 근거하여, 한국에는 6개의 유전형이 존재함을 밝혔다. 연구한 7군집에서 6개 군집은 동일한 유전형을 갖고 있었다. 한 군집(전남 화순)은 다른 5개 군집과 다른 유전형을 보였다. 또한, 제주의 한 군집(제주 신호동)은 6개의 유전형을 가지는 분화하고 있는 군집이었다.

##### ② 가시연

가시연의 유전적 다양성 연구는 3개의 엽록체 DNA 변이 구간(SNP, SSR)과 2개의 핵 DNA 변이 구간(SNP, microsatellite)을 변이를 밝혔다. 한국의 가시연 군집 연구에서 8개 군집을 연구한 결과, 군집내에서 변이가 나타나지

않았으며, 이는 가시연이 자가수분을 하는 일년초로 그 유전형이 군집 내에서 고정되어 있는 것으로 판단되며, 군집 내에 외부로부터의 새로운 유입이 없었음을 의미한다.

DNA 마커를 이용한 군집의 특성은 5개의 유전 변이(핵 2, 엽록체 3)를 9개 군집의 78개체에서 연구한 한국의 가시연의 유전자형은 4가지로 나타나며, 5개 형질 중 한 변이를 나타내는 것은 3 type에서 나타나며(그림 III-2-2-6), 한국의 기본 엽록체 유전형으로 TCTT-T-T<sup>9</sup>이고 AAGA-T-T<sup>9</sup>와 TCTT-C-T<sup>9</sup>는 전국적으로 나타난다. 이들은 핵 마커 연구에서 동일한 핵형을 갖는 것이 확인되었다. 반면, TCCTT-C-T<sup>10</sup>형(CP-type 2)은 경북 사리지와 전남 해창에서 나타나며, 위의 핵형 type과 유별되는 핵형을 공유하고 있다

## 2) 알로자임 분석

### ① 층층둥굴레

남한에 자생하는 층층둥굴레는 집단내 유전적 다양도가 거의 결여된 것으로 판명되었다. 이는 역사적으로 남한에 자생하는 층층둥굴레 집단들이 유전적 부동을 받았기 때문이라고 사료된다. 유전적 부동을 받으면 1)집단간에 대립인자가 무작위 소실 후 고정 현상과 2)기대되는 이형 접합성(expected heterozygosity,  $H_e$ )이 상당히 낮아진다. 층층둥굴레 집단이 유전적 부동을 받았다는 1)의 증거로 집단별로 대립 인자의 무작위의 고정이다. 예를들면 Dia-1에서 "b"는 PS-1과 PS-7에 고정된 반면, "a"는 PS-3, PS-4, PS-5, PS-6에 나타났고, "c"는 PS-2에 나타났다. 비슷한 유형이 Dia-3, Mdh-1, Mdh-2, Pgi-2, Pgm-2, Tpi-1 과 Tpi-2 에서도 보였다(표 III-3-3-8). 층층둥굴레 7집단 내 평균  $H_e$ 는 0.032로 상당히 낮았다. 본 연구와 함께 수행한 9곳 집단에서 채집된 둥굴레(분석 묘조수 = 580)에서 보인  $H_e$ 의 집단 내 평균값 0.112보다 훨씬 낮았다. 이는 남한 자생 층층둥굴레가 유전적으로 결여됨을 암시한다.

흥미로운 사실은 PS-4와 PS-5는 같은 남한강(동강 줄기)변에 자생하는데 이 두 곳에서는 알로자임으로는 차이가 없었다. 이는 하류에 있는 PS-5 집단이 상류에 있는 PS-4에서 지하경이 홍수 때 떠내려와 최근에 정착된 것으로 사료된다. 한 가지 종류의 다유전좌위 유전자형을 지니는 PS-1, PS-4, PS-5, PS-6, PS-7집단은 유성생식에 의한 새로운 자손(progeny)의 형성이 없음을 알 수 있다. 왜냐하면, PS-4에서 Pgm-2에 "ab" 유전자형 PS-7에서는 Pgi-2에서 "ab" 유전자형만을 지니고 있기 때문이다. 만약 유성생식이 일어났다면

동형 접합자인 "aa"와 "bb"가 이들 유전좌위에 나타나야 되는데 없는 이유는 이들 집단이 하나의 클론(지하경)에 의해 강변에 정착됨을 강하게 제시하고 있다. 총 318개의 묘조 중 단지 8개의 유전자형만 보인 이유는 층층동굴레의 집단내 증식은 긴 지하경에 의한 대부분 무성생식에 의존하고 있음을 암시하고 있다. 만약 알로자임 유전좌위가 연관균형을 이루고 독립적으로 분리할 경우, 7종류 유전좌위에서는 3가지 유형의 유전자형과 1종류 유전좌위는 6가지 유형의 유전자형을 예측할 수 있는데 유성생식이 최대한 일어날 경우 13,122( $3^7 \times 6^1$ ) 종류의 다유전좌위 유전자형(MLG)을 기대할 수 있는데 7 곳 층층동굴레 집단에서 단지 8종류의 MLG만 보였다. 유성생식이 일어날 경우, PS-1과 PS-6에서는 하나의 MLG만 가능할 것이고, 3종류의 MLG는 3곳 집단(PS-3, PS-4, PS-5, PS-7)에서 보일 수 있으며, 2,187( $3^7$ )종류의 MLG가 PS-2에서 가능할 것이다

다른 흥미로운 발견은 백두대간을 기점으로 동쪽 강릉시 옥계면 산기슭과 도로 아래에 있는 PS-1과 PS-2 집단과 다른 집단들은 유전적 조성 차이가 있었다. 이들 집단은 8개 MLG 중에 A, B, C, D를 가지고 있었다. PS-1은 PS-2의 유전자형 조성에 포함(subset)되고 있음을 알 수 있다(표 III-3-3-8). 이는 PS-2는 도로 위 산기슭에 위치하고 PS-1은 PS-2에서 약 200m 위 도로 아래 발가에 위치해 있기 때문에 사람에게 의해서 흙의 이동 중 지하경이 PS-2에서 PS-1으로 이동됐음을 유추할 수 있다. 안동 길안면에 자생하는 PS-7은 면적이 강 위 등산로 약 4m<sup>2</sup> 밖에 되지 않아 대부분의 묘조에서 잎 1장씩을 채집하였는데 하나의 유전자형(전부 하나의 클론)만 존재하는 것이 파악되었다.

## ② 노랑무늬붓꽃

한반도 특산식물인 노랑무늬붓꽃은 클론도 다양하고 집단내 높은 수준의 유전적 다양도를 유지하고 있음이 본 연구에서 알 수 있었다(평균  $D_G = 0.746$ , 평균  $H_e = 0.122$ ). 이는 이 식물이 타가수분(평균  $F_{IS} = 0.069$ )이 주된 교배계로 사료되며, 타가수분이 유전적 다양도를 유지하는데 기여하였을 것이다. 현 집단에서 다양도 유지는 노랑무늬붓꽃은 과거 역사상 생육지가 안정되어 이 식물 집단들이 유전적 부동을 크게 받지 않고 안정된 조건에서 생육해왔음을 암시하고 있다. 노랑무늬붓꽃과 비슷한 생활사적 특징과 생태적 특질을 지닌 솔나리도 집단내 유전적 다양도가 높은 수준을 유지하였다(%P = 55%,  $H_e = 0.157$ ). 이들 2종은 백두대간 능선에 종종 동소적으로 생

육하고 있으며 이들 자생지는 빙하기때 빙하에 영향을 받지 않아 역사적으로 유전적 부동을 받지 않아 초기의 유전적 다양도를 잘 유지하면서 생육하고 있다는 점을 시사하고 있다. 노랑무늬붓꽃의 강원도 백두대간에 자생지(IO-3 ~ IO-7)에서 보인 유전적 다양도는 다른 집단에 비해 높았다. 이에 대한 가설(hypothesis)을 검증(test)하기 위해 자생 식물을 대상으로 현재 연구를 진행 중이다.

노랑무늬붓꽃 IO-1와 IO-2는 집단이 작았는데 다유전좌위에서 하나의 유전자형이 집단내에서 각각 보였다. 이들 두 집단에서 일부 유전좌위에서 이형 접합자가 보였다. IO-1 집단에서는 Tpi-1과 Adh 에서 "ab" 유전자형이 보였고, IO-2에서는 Dia-1, Idh-1, Idh-2에서 "ab" 유전자형을 지니고 있었다. 만약 유성생식이 일어났다면 이들 유전좌위에서 "aa"와 "bb" 유전자형이 보였어야 했다. 이는 IO-1과 IO-2가 하나의 유전자를 지닌 씨에 의해 정착해서 클론으로 번식하여 집단이 형성되었음을 암시하고 있다.

## 나. 멸종 위기종 보존 대책

### 1) 솔잎난

남방계식물로 미국에서는 남부와 하와이에 분포하며, 그 서식의 위급함이 보고되어 있는 종이다. 한국에서는 최근까지도 제주도에만 국한하여 분포하는 것으로 알려져 있지만 전남지역에도 분포한다. 이들은 남획에 의하여 국내 절멸이 우려되는 종으로 최근에도 제주도의 한 군집이 절멸되었음이 확인되기도 하였다. 솔잎난은 뿌리의 균근(micorrhiza)과 공생하는 식물로 포자와 분주로 번식할 수 있고 주로 바위틈이나 암벽에 붙어 서식하므로, 그 서식 특성상 군집이 한번 훼손되면 그 복원이 어렵다. 이러한 관점에서 절대 보호 대상 군집으로 특히 유전형으로 고정된 전남화순 군집, 유전적 다양성을 보이는 제주 신희동 군집을 추천한다. 본 연구 기간 동안 연구 대상으로 지목한 한 군집이 무분별한 남획으로 서식지에서 사라진 사례를 감안할 때, 솔잎난은 언제 멸종할 지 예측할 수 없다. 멸종 시, 복원 사업이 중요 의제가 될 것을 감안하여 다음과 같은 질문을 제시한다. 첫째, “복원을 위해 외국의 종을 도입하는 것이 옳은가?” 둘째, “전남 화순 군집 소멸시, 인근 군집인 전남 고흥(한국 일반유전형)의 솔잎난으로 복원할 것인가?”. 본 연구책임자의 의견은 전남 화순 군집 소멸 시, 이와 유전형이 같은 제주 신희동의 솔잎난을 찾아 복원하는 것이 본래의 취지에 맞다고 판단된다. 또한, 솔잎난

은 포자와 분주에 의한 번식이 가능하고, 바위가 아닌 흙에서 재배가 가능하므로 각 지방부처에서 서식지 특별 보호와 더불어, 서식지 파괴를 대비해 지역 특산 순수 계통 보존을 위한 번식이 필요할 것이다.

## 2) 가시연

가시연은 연못에 분포하는 일년생 거대식물로, 종자로 번식하는 특성을 가지고 있다. 그러나, 화분생물학적 특성상 주로 폐화수정(Cleistogamy)을 한다. 즉, 꽃이 수면 밖으로 나오기 전에 수분이 되며, 그 결과로 단자엽식물의 자식성 식물의 특성이 나타난다. 본 연구에서 3개의 엽록체마커와 2개의 핵마커를 근거로 한 유전적 다양성 연구에 근거해, 한국의 가시연은 4가지의 유전형이 있음을 밝혔으며, 한국의 기본 유전형으로 우포를 중심으로 한 경남의 군집은 한국 가시연의 기본 군집형으로, 전남 해창과 경북의 사리지 두 군집은 같은 유전형으로, 전북/충남과 전남의 군집은 우포로 대변되는 한국 기본형의 변이형으로 판단된다.

본 결과에 근거해, 상대적으로 최근에 생긴 저수지인 전남 해창과 경북의 사리지에는 백로 등 대형 조류에 의해 가시연 종자가 유입된 것으로 추정하고 있으며, 인위적인 분포확대인지는 명확하지 않다. 다만, 이 두 곳의 가시연이 동일한 유전형을 가지며, 타 지역의 가시연과 그 유전형이 달라, 한반도에 오래 동안 존재했던 유전형인지 확실하지 않다.

자연보존이 충실히 진행되는 우포를 중심으로 한 가시연 군락의 서식지 보존은 지속되어야 할 것이며, 독특한 유전형을 가진 전남 해창과 경북의 사리지의 보존 중요성을 제시한다.

## 3) 층층동굴레

유전적 부동은 양적으로 3가지 방법으로 표현될 수 있다. 기대되는 세대당 근친 교배 계수의 증가( $\Delta F = 1/2N_{ef}$ ), 세대당 대립인자 빈도의 변화(유효집단 크기의 분산) 혹은 이형 접합성의 소실을 들 수 있다. 이 중 가장 널리 사용된 개념은 근친 교배와 관련된 유효 집단의 크기이다. 위의 공식에 의하면 유효 집단 크기( $N_e$ )와 유전적 부동과의 관계는 선형 관계가 아니다. 만약  $N_e > 50$ , 유전적 부동에 영향을 적게 받을 것이다. 이 점은 층층동굴레 집단의 보전 측면에 매우 중요하다. 그림 IV-1에 표현된 이론에 의하면 층층동굴레 집단의  $N_{e(c)}$ 가 3인 경우 50인 경우보다 세대당 근친 교배(즉 유전적 부



동)가 0.010에서 0.167로 16.7배 증가한다. 유전체가 1개인 경우 50개인 경우보다 세대당 50배의 유전적 부동 효과를 받을 수 있다. 이런 점에서 층층둥굴레가 만약 역사적으로 타가수분이 주된 교배계였다면 심각한 inbreeding depression을 받아왔을 것이고 앞으로도 그럴 것이다.

클론구조 분석을 통한 유효 집단 크기 파악은 유전적 부동에 의한 유전적 다양도( $H_e$ 로 표현)의 과거 소실과 앞으로 소실될 정도를 예측하는데 암시를 제공해 줄 수 있기 때문에 중요하다(Chung et al. 2004). 크기가 제한된 집단에서 유전적 부동하에  $t$  세대 후  $H_e$ 는 순환공식인  $(1-1/(2N_e))^t$ 에 의해 비례적으로 감소한다. 층층둥굴레 PS-1, PS-4, PS-5, PS-6, PS-7 집단에서  $N_{e(c)}$ 가 1이기에  $H_e$ 의 50%의 소실은 1세대에 일어나고, PS-2 및 PS-3에서는 4세대에  $H_e$ 가 50% 감소된다. 이와 같이 작은 집단에서 클론 구조는 유전적 부동에 의해 적응력을 지닌 잠재적 유전적 변이의 소실의 속도를 강하게 가속화시킬 수 있다. 만약 유전체 수의 정확한 파악과 클론 구조 크기의 변이를 고려하지 않고 묘조수(즉 NT)만 고려한다면 근친 교배의 수준과 장기, 단기적 개체의 적응도 및 집단의 생존에 대한 부정적 영향을 과소 평가할 수 있다. 따라서 상세한 유전체 수와 클론 구조 분석을 통한 유효 집단의 크기는 멸종 위기 식물의 보존을 위한 관리 전략 수립에 꼭 고려되어야 한다.

본 연구결과는 보전 유전학(conservation genetics)적 견지에서 중요한 암시를 제시하고 있다. 층층둥굴레는 집단내 유전적 다양도가 결여되어 있고 집단간에 다른 유전자형이 클론으로 구성되어 있기 때문에, 남한의 현존 집단 중 PS-2, PS-3, PS-4(혹은 PS-5), PS-6 및 PS-7 집단을 모두 장외(ex situ) 및 장내(in situ) 보전 전략에 고려 대상으로 제시될 수 있다. 층층둥굴레 일부 집단에서 유성생식에 의해 자손(progeny)이 집단내에 생성되지 못하는 이유가 inbreeding depression 때문인지 추후 연구가 필요하다. 이럴 경우 다른 유전자형을 지닌 묘조를 거리상 가까운 집단에서 대상 지역으로 이주(introduction)시키는 것도 유전적 다양도를 높이기 위한 하나의 방법일 것이다. 현재 대부분 집단이 하나의 유전자형( $N_e=1$ )을 지니고 있기 때문에 장기적으로 유전적 부동으로 인한 부정적 영향을 감소시키기 위해 집단내 다양한 유전자형의 도입도 제시할 수 있다.

층층둥굴레 결과와 비슷한 사례를 미국 Florida 중부의 Lake Wales Ridge에만 자생하는 Florida ziziphus(*Ziziphus celata*, 갈매나무과)를 들 수 있다. 이 종은 이 지역에 5곳만 알려져 있고 3곳은 목초지역에 있다. Godt et al. (1997)은 Florida ziziphus의 알려진 5곳 집단( $n=150$  total)을 대상으로 알로자임 표식자(20 유전좌위)로 다유전좌위유전자형(MLG)으로 클론구조를 분석

하였다. 20곳 유전좌위 중 단지 5곳만 다형성을 보였다(%P=25%). 그들은 4곳은 하나의 MLG로 구성, 한 곳은 7가지 MLG로 구성되어 있음을 파악하였다. 똑같은 샘플을 USDA Forest Service에 있는 Tom Kubisiak가 DNA 표식자를 이용하여 분석하였으나 결과는 똑 같았다. 각각 하나의 MLG로 구성된 4곳이 각각 하나의 클론으로 구성되어 있고 Florida ziziphus가 자가불화합성(self-incompatible)이다(Weekley and Race 2001). 따라서 집단이 하나의 유전자형에 의해서 클론으로 형성된 곳은 유성생식은 불가능하다. 이 멸종위기종의 복구를 위해서는 유전자형이 다른 개체를 다른 곳(off-site)에서 도입(introduction) 및 생육지가 비슷한 곳에 몇가지 유전자형으로 구성되어 화합성(compatible)이 가능한 개체들을 만들어 새로운 집단들(new populations)의 조성(establishment)이 필요하다. 충충둥굴레 연구나 Florida ziziphus에 대한 연구결과가 주는 암시는 클론으로 번식하는 멸종위기식물 종을 대상으로 유전적 다양도 및 구조, 클론구조 분석은 유성생식을 통해 현존집단의 크기를 늘리거나 집단의 수를 증가시키기 위해 유전적으로 다른 개체의 도입 필요성을 강조한 예이다.

결론적으로 Florida ziziphus의 사례로 보아, 충충둥굴레의 남한 내 집단들은 특별 보존 관리 대상 종에 지속적으로 포함되어져야 된다. 현재 시급한 충충둥굴레에 대한 추가 연구는 생태학적 연구, 즉 수분생물학, 교배계 규명, inbreeding depression 파악, 종자 발아에 대한 조사를 수행할 것을 권고한다.

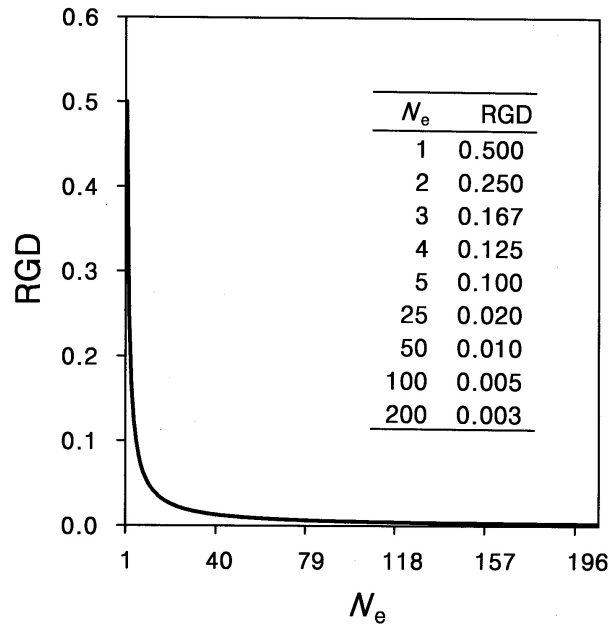


그림 IV-1. 유효 집단 크기가 세대 당 기대되는 근친 교배로 측정(표현)된 유전적 부동(RGD)에 끼치는 영향.

#### 4) 노랑무늬붓꽃

조사된 노랑무늬붓꽃 IO-1 과 IO-2는 하나의 종자나 propagule에 의해 정착되어져 무성번식에 의해 집단이 형성되었음을 알 수 있었다. 소백산 제1연화봉 집단(IO-7)과 주왕산 주왕계곡 중간 집단 (IO-8)에서는 다른 집단과 달리 상대적으로 적은 수의 유전체(각각 NG = 18, 16개)를 지니고 있고 소수의 유전체에 클론이 많이 분화되었기에  $N_e(c)$ 는 4.9와 4.39로 약 5개로 추정되었다. 집단유전학 이론에 의하면  $N_e(c)$ 가 5개인 경우 세대당 근친 교배가 0.10로 증가한다. 이 수준의 근친 교배는 첫 번째 사촌과 교배(0.0625)와 half-sib 교배(0.125)의 중간 수치이며 역사적으로 타가수분이 주된 종에서는 중요한 inbreeding depression을 야기할 수 있기 때문에 관심을 가질 필요가 있다.

UPGMA 전형질도는 크게 석병산 집단(IO-3)과 홍천 남면 집단(IO-1) 유집군과 나머지 집단 두 그룹을 제시하고 있다. 집단간 분화가 보통 수준이기에 유전적 측면에서 장기적인 장외 보존을 위하여 집단내 다양도가 높은 석병산 집단, 소백산 집단과 주왕산 집단들이 고려 대상이다.

### 3. 미연구 멸종 위기종

본 사업에서 유전적 다양성 분석을 하지 않은 종은 멸종 위기종 I급 8종, II급 43종이 있으며, 유전체 분석은 멸종 위기종 II급 46종이 아직 연구가 되지 않았다(표 IV-5, VI-6 참조). 유전적 다양성 연구는 유전체 연구가 선행되었거나 병행될 수 있는 채집이 용이한 종에 대한 연구가 바람직할 것으로 보이며, 단자엽 식물의 연구가 한국 및 전 세계적으로 미약하고, 한국의 멸종 위기종에 많은 수를 차지하고 있어 단자엽 식물의 연구가 우선되어야 한다고 사료된다.

본 연구는 멸종 위기종을 그 연구 대상으로 하고 있으며, 이 분야의 야외 조사 전문가에 대한 직접 참여가 연구의 질에 직접적으로 영향을 주며, 이 분야 전문가의 보다 많은 지원하에 참여도를 높이는 것이 중요하다.

표 IV-5. 유전체 연구가 진행되지 않은 멸종 위기종.

분 류	한 국 명 ( 과 명 )	학 명
	1 개가시나무(참나무과)	<i>Quercus gilva</i>
	2 개병풍(범의귀과)	<i>Astilboides tabularis</i>
	3 갯대추(갈매나무과)	<i>Paliurus ramosissimus</i>
	4 기생꽃(앵초과)	<i>Trientalis europaea</i> var. <i>arctica</i>
	5 갯쟁이풀(매자나무과)	<i>Jeffersonia dubia</i>
	6 끈끈이귀개(끈끈이귀개과)	<i>Drosera peltata</i> var. <i>nipponica</i>
	7 나도송마(범의귀과)	<i>Kirengeshoma koreana</i>
	8 노랑만병초(진달래과)	<i>Rhododendron aureum</i>
	9 단양쑥부쟁이(국화과)	<i>Asteraltaicus</i> var. <i>uchiyamae</i>
	10 대청부채(붓꽃과)	<i>Iris dichotoma</i>
	11 대홍란(난초과)	<i>Cymbidium macrorrhizum</i>
	12 독미나리(산형과)	<i>Cicuta virosa</i>
	13 둥근잎평의비름(돌나물과)	<i>Hylotelephium ussuriense</i>
	14 망개나무(갈매나무과)	<i>Berchemia berchemiaefolia</i>
	15 매화마름(미나리아재비과)	<i>Ranunculus kazusensis</i>
	16 무주나무(꼭두서니과)	<i>Lasianthus japonicus</i>
	17 물부추(물부추과)	<i>Isoetes japonica</i>
	18 백부자(미나리아재비과)	<i>Aconitum koreanum</i>
	19 백운란(난초과)	<i>Vexillabium yakushimensis</i>
	20 산작약(미나리아재비과)	<i>Paeonia obovata</i>
	21 삼나무말	<i>Coccophora langsdorfii</i>
	22 삼백초(삼백초과)	<i>Saururus chinensis</i>
멸종 위기 II급 (57종 중 46종)	23 선제비꽃(제비꽃과)	<i>Viola raddeana</i>
	24 섬시호(산형과)	<i>Bupleurum latissimum</i>
	25 섬개현삼(현삼과)	<i>Scrophularia takesimensis</i>
	26 세뿔투구꽃(미나리아재비과)	<i>Aconitum austrokoreense</i>
	27 솔나리(백합과)	<i>Lilium cernuum</i>
	28 솜다리(국화과)	<i>Leontopodium coreanum</i>
	29 애기등(콩과)	<i>Milletia japonica</i>
	30 연잎평의다리(미나리아재비과)	<i>Thalictrum coreanum</i>
	31 왕제비꽃(제비꽃과)	<i>Viola websteri</i>
	32 으름난초(난초과)	<i>Galeola septentrionalis</i>
	33 자주땅귀개(통발과)	<i>Utricularia yakusimensis</i>
	34 자주솜대(백합과)	<i>Smilacina bicolor</i>
	35 조름나물(조름나물과)	<i>Menyanthes trifoliata</i>
	36 지네발란(난초과)	<i>Sarcanthus (=Cleisostoma) scolopendrifolius</i>
	37 진노랑상사화(수선화과)	<i>Lycoris chinensis</i> var. <i>sinuolata</i>
	38 층층동굴레(백합과)	<i>Polygonatum stenophyllum</i>
	39 큰연영초(백합과)	<i>Trillium tschonoskii</i>
	40 털복주머니란(난초과)	<i>Cypripedium guttatum</i>
	41 파초일엽(꼬리고사리과)	<i>Asplenium antiquum</i>
	42 한계령풀(매자나무과)	<i>Leontice microrrhyncha</i>
	43 홍월굴(진달래과)	<i>Arctous ruber</i>
	44 황근(아욱과)	<i>Hibiscus hamabo</i>
	45 황기(콩과)	<i>Astragalus membranaceus</i>
	46 히어리(조록나무과)	<i>Corylopsis gotoana</i> var. <i>coreana</i>

표 IV-6. 유전적 다양성 연구가 진행되지 않은 멸종 위기종.

분 류	한 국 명 ( 과 명 )	학 명
멸종 위기 I급 (8종)	1 광릉요강꽃(난초과)	<i>Cypripedium japonicum</i>
	2 나도풍란(난초과)	<i>Aerides japonicum</i>
	3 만년콩(콩과)	<i>Euchresta japonica</i>
	4 섬개야광나무(장미과)	<i>Cotoneaster wilsonii</i>
	5 암매(암매과)	<i>Diapensia lapponica</i> var. <i>obovata</i>
	6 죽백란(난초과)	<i>Cymbidium lancifolium</i>
	7 풍란(난초과)	<i>Neofinetia falcata</i>
	8 한란(난초과)	<i>Cymbidium kanran</i>
멸종 위기 II급 (57종 중 43종)	1 가시오갈피나무(두릅나무과)	<i>Eleutherococcus senticosus</i>
	2 개가시나무(참나무과)	<i>Quercus gilva</i>
	3 개병풍(범의귀과)	<i>Astilboides tabularis</i>
	4 갯대추(갈매나무과)	<i>Paliurus ramosissimus</i>
	5 기생꽃(앵초과)	<i>Trientaliseuropaea</i> var. <i>arctica</i>
	6 갯쟁이풀(매자나무과)	<i>Jeffersonia dubia</i>
	7 나도승마(범의귀과)	<i>Kirengeshoma koreana</i>
	8 노랑만병초(진달래과)	<i>Rhododendron aureum</i>
	9 노랑붓꽃(붓꽃과)	<i>Iris koreana</i>
	10 단양쑥부쟁이(국화과)	<i>Aster altaicus</i> var. <i>uchiyamae</i>
	11 대청부채(붓꽃과)	<i>Iris dichotoma</i>
	12 대홍란(난초과)	<i>Cymbidium macrorrhizum</i>
	13 독미나리(산형과)	<i>Cicuta virosa</i>
	14 망개나무(갈매나무과)	<i>Berchemia berchemiaefolia</i>
	15 매화마름(미나리아재비과)	<i>Ranunculus katusensis</i>
	16 무주나무(꼭두서니과)	<i>Lasianthus japonicus</i>
	17 물부추(물부추과)	<i>Isoetes japonica</i>
	18 박달목서(물푸레나무과)	<i>Osmanthus insularis</i>
	19 백부자(미나리아재비과)	<i>Aconitum koreanum</i>
	20 백운란(난초과)	<i>Vexillabium yakushimensis</i>
	21 산작약(미나리아재비과)	<i>Paeonia obovata</i>
	22 삼나무말	<i>Coccophora langsdorfii</i>
	23 선제비꽃(제비꽃과)	<i>Viola raddeana</i>
	24 섬시호(산형과)	<i>Bupleurum latissimum</i>
	25 섬개현삼(현삼과)	<i>Scrophularia takesimensis</i>
	26 세뿔투구꽃(미나리아재비과)	<i>Aconitum austrokoreense</i>
	27 솜다리(국화과)	<i>Leontopodium coreanum</i>
	28 순채(수련과)	<i>Brasenia schreberi</i>
	29 애기등(콩과)	<i>Milletia japonica</i>
	30 왕제비꽃(제비꽃과)	<i>Viola websteri</i>
	31 으름난초(난초과)	<i>Galeola septentrionalis</i>
	32 자주땅귀개(통발과)	<i>Utricularia yakusimensis</i>
	33 자주솜대(백합과)	<i>Smilacina bicolor</i>
	34 조름나물(조름나물과)	<i>Menyanthes trifoliata</i>
	35 죽절초(홀아비꽃대과)	<i>Sarcandra glabra</i>
	36 지네발란(난초과)	<i>Sarcanthus (=Cleisostoma) scolopendrifolius</i>
	37 진노랑상사화(수선화과)	<i>Lycoris chinensis</i> var. <i>sinuolata</i>
	38 큰연영초(백합과)	<i>Trillium tschonoskii</i>
	39 털복주머니란(난초과)	<i>Cypripedium guttatum</i>
	40 파초일엽(꼬리고사리과)	<i>Asplenium antiquum</i>
	41 홍월굴(진달래과)	<i>Arctous ruber</i>
	42 황기(콩과)	<i>Astragalus membranaceus</i>
	43 히어리(조록나무과)	<i>Corylopsis gotoana</i> var. <i>coreana</i>

#### 4. ABS와 유전정보 자료 확보의 의미

과거 유전자원은 '인류 공동의 자산'으로 인식되어 자유로운 접근과 이용이 가능하였으나, 1992년 생물 다양성 협약(CBD)이 채택되면서 생물유전자원을 포함한 자국의 생물자원에 대한 주권적 권리를 인정하게 되었다. 선진국의 생물자원 이용으로부터 정당한 이익을 분배받지 못하고 피해를 받았다는 개발도상국의 입장이 반영되어 '유전자원의 이용으로부터 발생하는 이익의 공평한 공유'를 협약의 목적 중 하나로 채택하며 유전자원을 이용하기 위해서는 유전자원 제공국으로부터 사전 동의를 구해야 하며, 이용방법 및 적당한 이익의 공유 조건 등에 대한 상호 합의를 이룰 것을 규정해야 한다.

ABS는 각 국가의 생물자원주권을 인정, 실현하는 실질적 수단의 하나로, 이를 통해 자국의 생물자원에 대한 관리 및 규제를 제고할 수 있다. 특히 생물자원의 외부반출에 대한 규제가 가능하고 다국적기업의 국내 진출에 대한 이익 공유 요구도 가능하다. 아울러 ABS는 생물유전자원의 무분별한 이용을 방지하고 개도국과 이익을 공유함으로써 생물자원의 보존과 지속가능한 이용을 촉진 할 수 있다.

CBD 정의에 따라 모든 "실제적 또는 잠재적인 가치를 지닌 유전 물질"이 ABS의 대상이나, 다음의 유전자원은 해양생물유전자원 및 남극지역의 유전자원은 일반적으로 제외하고 있다

본 연구과제 연관으로 한국의 생물자원 보호적 관점에서 상대적으로 잘 되어 있는 개발도상국인 인도의 ABS 시스템을 보면, ABS 관련법으로 생물다양성법(Biological Diversity Act, 2002 제정), 생물다양성규칙(Biological Diversity Rule, 2004 제정), 특허법(Patent Act, 2005 개정)이 제정되어 있다. 또한, 주요기관으로 첫째 National Biodiversity Authority(NBA) : 외국인/외국기관이 인도의 생물자원 또는 관련전통지식에 대한 접근을 신청하는 경우 이의 처리와 관련된 업무를 수행하는 전담기관이 있다. 외국인/외국기관은 NBA의 승인(Approval)을 취득하여야 하며, NBA는 접근에 대한 승인(Approval)을 하는 경우, 파생되는 이익에 대한 공평한 공유를 담보할 조건을 부과한다. 둘째 Stste Biodiversity Boards(SBBs) : 내국인이 상업적 목적으로 인도의 생물자원 또는 관련 전통지식에 접근하고자 하는 경우 이의 처리와 관련된 업무를 담당하는 주정부의 부서이다. 이 경우 내국인은 해당 SBB에 사전통지(prior intimation)하여야 한다. SBB는 CBD 3대 목적에 위반하는 행위를 제어 할 권한을 가진다. 셋째 local Biodiversity Management Committees(BMCs) : 지역 생물다양성의 보존, 지속가능한 이용, 생물다양성

및 생물다양성과 관련된 지식의 연대기 등을 정리하고 출판하는 업무를 총괄하는 기관이다. 자치정부 지역 기관들에게 BMC의 설립을 권장하고 있다. NBA와 SBB 각 BMCs의 지역 내의 생물자원과 관련 전통지식의 사용과 관련된 문제에 대하여 BMC에 대한 조언·상담을 제공할 의무가 있고, 지역사회는 BMC를 통하여 PIC과 관련된 의사 결정 과정에 참여할 수 있다. 주요 제도는 접근 승인 제도와 특허 관련 제도가 있는데 접근 승인 제도는 유전자원에 대한 외국인의 이용은 물론 내국인의 이용도 제한되나 제한의 수준은 상이하다. 외국인은 원칙적 허가, 내국인은 원칙적 사전 통보해야 한다. NBA의 승인(Approval)은 인도에서 기원한 생물자원과 전통 지식에 근거한 지적재산권의 출원 이전에 획득되어야 한다. 두 번째 특허 관련 제도에 구두 전승되어 온 전통 지식은 선행 기술로 인정되는 개정특허법 25k와 원산지 출처공개제도인 개정특허법 25j로 출처 및 원산지를 미공개 또는 허위 공개 시 특허 출원 불허 또는 특허 등록을 취소한다. Biological Diversity Act 에 근거하여, NBA는 인도에서 기원한 생물자원과 관련 전통지식에 근거한 지적재산권이 외국에서 출원된 경우, 지적재산권 등록에 관하여 이의를 신청할 권한을 가진다.

접근과 이익 공유(ABS: Access to genetic resources and Benefit-Sharing)는 이제 국제적으로 인정되는 협약으로 한국의 생물자원의 체계적인 정리와 국내 자원이 타 선진국에서 무분별하게 이용되는 것을 막을 장치가 필요하다. 이러한 관점에서, 멸종 위기종과 자생종에 대한 체계적인 법 제정이 필요하나, 법에 앞서 이들 한국 생물자원의 체계적인 유전자원의 정리와 다양한 유전체 연구를 포함하는 유전적 다양성 연구를 통한 데이터베이스를 확보했을 때에 한국의 생물자원을 합법적으로 보호할 수 있다. 즉, 한국 생물자원임을 증명할 수 있는 유별성있는 지적정보를 통하여 이들 자원에 대한 주권을 보장 받을 수 있다. 이러한 관점에서 멸종 위기종과 한국 자생종에 대한 의미 있는 유전적 다양성과 유전체 연구 정보의 축적과 체계적인 DB확보 및 활용이 ABS에 대비한 국립 생물 자원관의 한 업무로 추진되어야 할 과제라고 판단된다.



## 5. 유전정보 자료의 데이터베이스에 대한 의견

1단계 및 본 연구에서 총 19종에 대해서 유전체 연구 자료가 확보되었고 또한 유전적 다양성 연구에서의 연구 결과가 축적되었다. 이러한 결과물들을 체계적으로 관리할 데이터베이스 시스템의 구축이 필요하다. 이 데이터베이스는 엽록체 유전체의 완전 염기 서열을 포함해야 할 것이며, 한국의 식물계통수 사업을 포함한 포괄적인 관리 시스템을 갖추어야 할 것이다.

국립생물자원관은 최소한 동아시아 식물군을 대표하는 데이터베이스 구축이 필요하다. GenBank는 전 세계의 데이터를 다루므로 한반도에서 일어나는 데이터분석이 용이하지 않다. 한국에서 외래 식물의 유입이 공공연히 나타나므로 연관된 데이터 확보가 국내의 식물 환경을 용이하게 추적할 수 있다. 녹색 성장이 추구해야 할 새로운 분야가 식물의 원산지 추적이며, 최근에 한국에 유입되거나, 새로운 농작물이 토착화하는 데에 대한 추적이 필요하다. 이러한 데이터의 축적은 국내 자생 식물의 유전적 오염도를 추적할 수 있는 기본 자료가 된다. 이런 데이터가 없이는 일본 중국 등 외국의 기본 자료에 의존해야 한다. 이러한 이유로 국내 멸종 위기종 및 고유종 유전체 정보의 확고한 기반 연구 자료가 국립생물자원관의 기반 구축 자료가 되어야 한다고 판단된다.

ABS 및 UPOV 협약에 따른 국제 생물자원 경쟁에 있어서 한국 생물자원의 보다 다양하고 심도 있는 유전 정보의 확보 및 데이터베이스 구축이 생물자원 주권을 확립하는데 중요한 역할을 할 것이다.

## V. 참 고 문 헌

- 김찬수 · 고정균 · 문명옥 · 송관필 · 김수영 · 김진 · 김대신 · 도재화 · 송국만.  
2008. 제주지역의 희귀식물. 국립산림과학원, 서울.
- 국립생물자원관. 2007. 주요 생물자원의 유전자 분석 · 연구 II
- 국립생물자원관. 2008. 주요 생물자원의 유전자 분석 · 연구 III
- 국립수산과학원 해조류연구센터. 2008. UPOV 대비 해조류 품종보호제도 기  
반연구.
- 국립수산과학원 해조류연구센터. 2009. UPOV 대비 해조류 품종보호제도 기  
반연구.
- 국토해양부. 2008. 국립해양생물자원관 표본 확보방안 연구보고서.
- 김철수 · 양영환 · 김태윤 · 신용만 · 강성후 · 현경식. 1999. 제주도에 자생하는  
멸종위기, 보호야생식물. 제주도, 제주발전연구원.
- 김철환 · 김용식. 2001. 2-8. 식물의 지정현황 분석 및 개선방안 - 멸종위기 야  
생동식물 및 보호야생동식물의 지정현황 분석 및 개선방안에 관한 연  
구. 한국자연보존협회 pp. 149-162
- 바이오안정성정보센터. 유전자변형생물체의 국가간이동 등에 관한 법률.
- 박만규. 1975. 한국식물 중 절멸 또는 그 위기에 있는 것과 희귀종에 관한  
조사연구. 자보협 8: 3-24
- 박재홍 · 최경. 1998. 비슬산(대구 · 달성)과 인근 산지의 식물상. 환경부.
- 선병윤 · 현진오 · 김철환. 2006. 소백산 · 덕유산 멸종위기식물원 조성방안에  
관한 연구. 환경부.
- 선병윤 · 김철환. 2009. 내장산 멸종위기식물 보전전략 수립 연구. 환경부.
- 이방훈 · 배정오 · 정무웅 · 고강석 · 김은식 · 김동호 · 허인애 · 이준배 · 차병진  
· 이창복 · 정영호 · 이우철 · 이정석 · 김삼식 · 이은복 · 김재봉. 1990.  
특정야생동식물보존대책연구(I). 국립환경연구원보 12: 237-254
- 이영노. 1981. -식물- 한국의 희귀 및 위기동식물. 자보협.
- 이영노. 1989. -식물- 한국의 희귀 및 위기 동식물도감. 한국 자연보존협회.
- 이영노. 1990. -식물- 한국의 희귀 및 위기동식물 실태조사연구. 한국 자연보  
존협회.
- 이유미 · 이원렬. 1996. 희귀 및 멸종위기 식물도감. 산림청 임업연구원 중부  
임업시험장, 서울.
- 현진오. 2002. 한반도 보호식물의 선정과 사례연구. 순천향대학교 박사학위논

문.

- 현진오. 2008. 주왕산 멸종위기식물원 조성방안 연구. 환경부.
- 현진오. 2009. 치악산 멸종위기식물 보전전략 수립 연구. 환경부.
- 현진오 · 김철환 · 신현철. 2007. 설악산 · 속리산 멸종위기식물원 조성방안 수립을 위한 연구. 환경부.
- 환경부. 2005. 야생동 · 식물보호법.
- 환경부 · 교육과학기술부 · 외교통상부 · 농수산식품부 · 지식경제부 · 보건복지가족부 · 국토해양부 · 농촌진흥청 · 산림청 · 특허청. 2009. 생물유전자원의 접근 및 이익공유(ABS) 인식제고 세미나 자료집.

Angiosperm Phylogeny Group. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141:399-436

Asano T, Tsudzuki T, Takahashi S, Shimada H, Kadowaki K. 2004. Complete nucleotide sequence of the sugarcane(*Saccharum officinarum*) chloroplast genome: a comparative analysis of four monocot chloroplast genomes *DNA Res.* 11:93-99, Genebank ACC# AP006714

Barrett SCH, Kohn JR. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. pages 3-30 in D. A. Falk and K. E. holsinger, editors. *genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, New York

Berg EE, Hamrick JL. 1994. Spatial and genetic structure of two sandhills: *Quercus laevis* and *Quercus margaretta*(Fagaceae). *American Journal of Botany* 81:7-14

Berg EE, Hamrick JL. 1997. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Canadian Journal of Forest Research* 27:415-424

Bergthorsson U, Adams KL, Thomson B, Palmer JD. 2003. Widespread horizontal transfer of mitochondrial genes in flowering plants. *Nature* 424: 197-201

Blasing O, Thimm O, Henkes S, Wesley B, Kulkarni R, Kollipara K, Reuzeau C. 2009. Plants with increased yield and/or increased tolerance to environmental stress (iy-bm). Patent WO2009077611

Bortiri E, Coleman-Derr D, Lazo G R, Anderson OD, Gu YQ. The complete chloroplast genome sequence of *Brachypodium distachyon*: sequence comparison and phylogenetic analysis of eight grass plastomes (Online-Only). Genebank ACC# EU325680

Cabrera LI, Salazar GA, Chase MW, Mayo SJ, Bogner J, Davila P. 2008. Phylogenetic relationships of aroids and duckweeds(Araceae) inferred from coding and noncoding plastid DNA. Am J Bot 95:1153-1165

Cahoon AB, Sharpe RM, Mysaypohn C, Thompson EJ, Ward AD. The complete chloroplast genome of tall fescue(*Festuca arundinacea*) and the comparison of whole plastomes from the family Poaceae(Unpublished). Genebank ACC# FJ466687

Cao C-M, Peng Y, Xu L-J, Wang Y-J, Yang J-S, Xiao P-G, 2009. Two Flavonoid dimers from *Sarcandra hainanensis*(Pei) Swamy et Bailey. CHinform. (DOI) 10.1002/chin.200951209

Chang CC, Lin HC, Lin IP, Chow TY, Chen HH, Chen WH, Cheng CH, Lin CY, Liu SM, Chang CC, Chaw SM. 2006. The chloroplast genome of *Phalaenopsis aphrodite*(Orchidaceae): Comparative analysis of evolutionary rate with that of grasses and its phylogenetic implications. Mol Biol Evol 23:279-291, Genebank ACC# AY916449

Cheliak WM, Pitel JP. 1984. Technique for starch gel electrophoresis of enzyme from forest tree species. Information report PI-X-42. Petawawa national Forestry Institute, Chalk River, Ontario, Canada

Chung MG, Epperson BK. 1999. Spatial genetic structure of clonal and

sexual reproduction in populations of *Adenophora grandiflora* (Campanulaceae). *Evolution* 53:1068-1078

Chung MY, Nason JD, Chung MG. 2004. Implications of clonal structure for effective population size and genetic drift in a rare terrestrial orchid, *Cremastra appendiculata*. *Conservation Biology* 18:1515-1524

Chung MY, Nason JD, Chung MG. 2007. Effects of population succession on demographic and genetic processes: predictions and tests in the daylily *Heemerocallis thunbergii*(Liliaceae). *Molecular Ecology* 16:2816-2829

Calsa T Jr, Carraro DM, Benatti MR, Barbosa AC, Kitajima JP, Carrer H. Structural features and transcript editing analysis of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) chloroplast genome (Unpublished). Genebank ACC# AE009947

Clayton JW, Tretiak DN. 1972. Amine citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 29:1169-1172

Crow JF, Kimura M. 1970. An introduction to population genetics theory. Harper & Row, New York

Davis JI, Petersen G, Seberg O, Stevenson DW, Hardy CR, Simmons MP, Michelangeli FA, Goldman DH, Campbell LM, Specht CD, Cohen JI. 2006. Are mitochondrial genes useful for the analysis of monocot relationships? *Taxon* 55:857-870

Diekmann K, Hodkinso TR, Fricke E, Barth S. 2008. An optimized chloroplast DNA extraction protocol for grasses (Poaceae) proves suitable for whole plastid genome sequencing and SNP detection. *PLoS ONE* 3 (7), E2813

Endress P. 2008. Perianth Biology in the Basal Grade of Extant

Angiosperms. Int J Plant Sci 169:844-862

Friis EM, Pederson KR, Crane PR. 2001. Fossil evidence of water lilies (Nymphaeales) in the early Cretaceous. Nature 410:357-360

Gao L, Yi X, Yang YX, Su YJ, Wang T. 2009. Complete chloroplast genome sequence of a tree fern *Alsophila spinulosa*: insights into evolutionary changes in fern chloroplast genomes. BMC Evol Biol 9:130

Godt MJW, Johnson BR, Hamrick JL. 1996. Genetic diversity and population size in four rare southern Appalachian plant species. Conservation Biology 10:796-805

Godt MJW, Race T, Hamrick JL. 1997. A population genetic analysis of *Ziziphus celata*, an endangered Florida shrub. Journal of Heredity 88: 531-533.

Goremykin VV, Hirsch-Ernst KI, Wolf S, Hellwig FH. 2003. Analysis of the *Amborella trichopoda* chloroplast genome sequence suggests that amborella is not a basal angiosperm. Mol Biol Evol 20:1499-1505

Goremykin VV, Holland B, Hirsch-Ernst KI, Hellwig FH. 2005. Analysis of *Acorus calamus* chloroplast genome and its phylogenetic implications. Mol Biol Evol 22:1813-1822

Goremykin VV, Hirsch-Ernst KI, Wolf S, Hellwig FH. 2004. The chloroplast genome of *Nymphaea alba*: whole-genome analyses and the problem of identifying the most basal angiosperm. Mol Biol Evol 21: 1445-1454

Hansen DR, Dastidar SG, Cai Z, Penafior C, Kuehl JV, Boore JL, Jansen RK. 2007. Phylogenetic and evolutionary implications of complete chloroplast genome sequences of four early-diverging angiosperms: *Buxus*(Buxaceae), *Chloranthus*(Chloranthaceae), *Dioscorea*(Dioscoreaceae), and

*Illicium* (Schisandraceae) Mol Phylogenet Evol 45:547-563

Hedges LV, Olkin I. 1985. Statistical methods for meta-analysis. Academic Press, San Diego

Hiratsuka J, Shimada H, Whittier R, Ishibashi T, Sakamoto M, Mori M, Kondo C, Honji Y, Sun CR, Meng BY, Li YQ, Kanno A, Nishizawa Y, Hirai A, Shinozaki K, Sugiura M. 1989. The complete sequence of the rice(*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. Mol Gen Genet 217:185-194, Genebank ACC# X15901

Kadono Y. 1994. Localities of *Euryale ferox* Salisb. in Japan. Bull. Water Plant Society, Japan 53:15-19(in Japanese)

Kadono Y, Schneider EL. 1987. The life history of *Euryale ferox* Salisb. in southwestern Japan with special reference to reproductive ecology. Pl Sp Biol 2:109-115

Lee J. 1994. Fatty oil production by *Alophia drummondii*(Iridaceae) modified oil collecting behavior of *Centris*(Centridini-Apidae). The University of Texas-Austin Master Thesis

Lee J. 1997. Gene clusters and introns of *Spirogyra maxima* chloroplast and other charophytes and their phylogenetic implications in green plants. Texas A&M University Ph.D.Thesis

Lee J. 2003. Current understanding of green plant phylogeny. Plenary Lecture. International Symposium on Plant Taxonomy: Advances and Relevance, T.M. Bhagalpur University, India

Lee J, Lee H, Park C-H. 2005. Preliminary survey of genetic makeup in three Korean endemic species of Iridaceae. Integrative Biosciences 9(spp.):

153. Daejeon, Korea

Lee J, Manhart JR. 2001. Transition from aquatic algae to land plants phylogenomic evidence. Contributed talk will be given at Botany. 2001. Albuquerque, New Mexico, USA

Lee J, Manhart JR. 2002a. Four embryophyte introns and psbB operon explains *Chlorokybus* as a basal lineage of streptophytes. *Algae* 17:53-58

Lee J, Manhart JR. 2002b. The Chloroplast rpl23 gene cluster of *Spirogyra maxima*(Charophyceae) shares many similarities with the angiosperm rpl23operon. *Algae* 17:59-68

Lee J, Manhart JR. 2003. Three orf-containing group I introns in chloroplast SSU of *Caulerpa sertularioides* (Ulvophyceae) and their evolutionary implications. *Algae* 18:183-190

Lee J, Lim YP. 2006. The complete chloroplast genomic sequence from *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* and its evolutionary implications. IHC-2006 (International Horticultural Congress), Seoul, Korea

Les DH, Crawford DJ, Kimball RT, Moody ML, Landolt E. 2003. Biogeography of discontinuously distributed hydrophytes: a molecular appraisal of intercontinental disjunctions. *Int J Plant Sci* 164:917-932

Leseberg CH Jr, Duvall MR. The complete chloroplast genome of *Coix lacryma-jobi* and a comparative analysis of plastomes in cereals (Unpublished). Genebank ACC# FJ261955

Mardanov AV, Ravin NV, Kuznetsov BB, Samigullin TH, Antonov AS, Kolganova TV, Skyabin KG. 2008. Complete sequence of the duckweed (*Lemna minor*) chloroplast genome: structural organization and phylogenetic relationships to other angiosperms. *J Mol Evol* 66:555-564, Genebank ACC# DQ400350



Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590

Nishihiro J, Washitani I. 2007. Restoration of lakeshore vegetation using sediment seed banks; studies and practices in lake kasumigaura, japan. *Global environmental reserch* 11:171-177

Ogihara Y, Isono K, Kojima T, Endo A, Hanaoka M, Shiina T, Terachi T, Utsugi S, Murata M, Mori N, Takumi S, Ikeo K, Gojobori T, Murai R, Murai K, Matsuoka Y, Ohnishi Y, Tajiri H, Tsunewaki K. 2002. Structural features of a wheat plastome as revealed by complete sequencing of chloroplast DNA. *Mol Genet Genomics* 266:740-746, Genebank ACC# AB042240

Otaki S. 1974. The distribution of *Euryale ferox* Salisbury in Japan. *J Jap Bot* 49:168-172(in Japanese).

Park C-W(ed.). 2007. The genera of vascular plants of Korea. Academy publishing co., Seoul

Peery RM, Chumley TW, Kuehl JV, Boore JL, Raubeson LA. The complete chloroplast genome of *Acorus americanus*(Unpublished). Genebank ACC# EU273602

Pryer KM, Schneider H, et al. 2001. Horsetails and ferns are a monophyletic group and the closest living relatives to seed plants. *Nature* 409:618-622.

Qiu Y-L, Dombroska O, Lee J, Li L, Whitlock BA, Bernasconi-Quadroni F, Rest J, Davis CC, Borsch T, Hilu KW, Renner SS, Soltis DE, Soltis PS, Zanis M, Cannone JJ, Gutell RR, Powell M, Savolainen V, Chatrou LW, Chase MW. 2005. Phylogenetic analyses of basal angiosperms based on nine plastid, mitochondrial, and nuclear genes. *Int J Plant Sci* 16:815-842

Qiu Y-L, Lee J 2000. Transition to a land flora: A molecular phylogenetic perspective. *J Phycol* 36:799-802(Invited review)

Qiu Y-L, Lee J, Bernasconi-Quadroni F, Soltis DE, Soltis PS, Zanis M, Zimmer EA, Chen Z, Savolainen V, Chase MW. 1999. The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. *Nature* 402:404-407(see Erratum: Qiu Y-L, Lee J, et al. 2000. *Nature* 405:101)

Qiu Y-L, Lee J, Bernasconi-Quadroni F, Soltis DE, Soltis PS, Zanis M, Zimmer EA, Chen Z, Savolainen V, Chase MW. 2000. Phylogeny of basal angiosperms: analyses of five genes from three genomes. *Int J Plant Sci* 161:S3-S27

Qiu Y-L, Lee J, Whitlock BA, Bernasconi-Quadroni F, Dombroska O. 2001. Was the ANITA Rooting of the Angiosperm Phylogeny Affected by Long-Branch Attraction. *Mol Biol Evol* 18:1745-1753

Qiu Y-L, Li L, Wang B, Chen Z, Knoop V, Groth-Malonek M, Dombroska O, Lee J, Kent L, Rest J, Estabrook GF, Hendry TA, Taylor DW, Testa CM, Ambros M, Crandall-Stotler, Duff RJ, Stech M, Frey W, Quant D, Davis CC. 2006. The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:15511-15516

Qiu Y-L, Li L, Wang B, Chen Z, Dombrowska O, Lee J, Kent L, Li R, Jobson RW, Hendry TA, Taylor DW, Testa CM, Ambros M. 2007. A non-flowering land plant phylogeny inferred from nucleotide sequences of seven chloroplast, mitochondrial and nuclear genes. *International Journal of Plant Sciences* 168:691-708

Qiu Y-L, Palmer J. 1999. "Phylogeny of early land plants: insights from genes and genomes." *Trends in Plant Science* 4:26-30

Qiu Y-L, Palmer JD. 2004. Many independent origins of trans splicing of

a plant mitochondrial group II intron. J Mol Evol 59:80-89

Quan ZL, Ke P, Ding Y. 2009. Polymorphic microsatellite markers in *Euryale ferox* Salisb.(Nymphaeaceae). Mol Ecol Resources 9:330-332

Raubeson L, Chumley T, Peery R, Dziubek C, Fourcade M, Boore J, Jansen R. Complete chloroplast sequences of *Nuphar advena*(Nymphaeaceae) and *Ranunculus macranthus*(Ranunculaceae) (Unpublished). Genebank ACC# DQ354691

Richardson AO, Palmer JD. 2007. Horizontal gene transfer in plant. J Ext Bot 58:1-9

Saski C, Fjellheim S, Lee S-B, Luo H, Rognli O Arne, Clarke J, Liu, Daniell H. Complete chloroplast genome sequences of *Agrostis stolonifera* comparative analyses with other grass genomes(Unpublished). Genebank ACC# EF115543

Saski C, Lee S-B, Tomkins J, Guda C, Jansen RK, Daniell H. Complete chloroplast genome sequences of *Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor* and comparative analyses with other grass genomes(Unpublished). Genebank ACC# EF115541

Shahid Masood M, Nishikawa T, Fukuoka S, Njenga PK, Tsudzuki T, Kadowaki K. 2004. The complete nucleotide sequence of wild rice(*Oryza nivara*) chloroplast genome: first genome wide comparative sequence analysis of wild and cultivated rice. Gene 340:133-139, Genebank ACC# AP006728

Singh MR, Gupta A. 2006. Cultivation and conservation practices of *Euryale ferox* Salisb. in Manipur. Indian Journal of Traditional Knowledge

Small RL, Wendel JF. 2000. Copy number lability and evolutionary dynamics of the *adh* gene family in diploid and tetraploid

cotton(*Gypsophium*). *Amer J Bot* 155:1913-1926

Soltis DE, Haufler HC, Darrow DC, Gastony GJ. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Amer Fern J* 73:9-27

Strittmatter G, Kossel H. 1984. Cotranscription and processing of 23S, 4.5S and 5S rRNA in chloroplasts from *Zea mays* *Nucleic Acids Res* 12 :7633-7647, Genebank ACC# X86563

Tag H, Namsab ND, Dasa AK, Kalitaa P, Mandald SC. 2008. Evaluation of anti-inflammatory potential of *Chloranthus erectus*(Buch.-Ham.) Verd. leaf extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 126:371-374

Tang J, Xia H, Cao M, Zhang X, Zeng W, Hu S, Tong W, Wang J, Wang J, Yu J, Yang H, Zhu L. 2004. A comparison of rice chloroplast genomes. *Plant Physiol* 135:412-420, Genebank ACC# AY522329

Thomas C. 2009. Plant Bar Code soon to become reality. *Science* 325:526

Vida G. 1994. Global issues of genetic diversity. Pages 9-19 in V. Loeschcke, J. Tomiuk, and S. K. Jain, editors. *Conservation genetics*. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland

Vrijenhoek RC. 1994. Genetic diversity and fitness in small populations. Pages 37-53 in V. Loeschcke, J. Tomiuk, and S. K. Jain, editors. *Conservation genetics*. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland

Wakasugi T. Complete nucleotide sequence of the chloroplast genome from a fern, *Psilotum nudum*(unpublished) Genbank ACC# NC\_003386.

Weekley CW, Race T. 2001. The breeding system of *Ziziphus celata* Judd and DW Hall(Rhamnaceae), a rare endemic plant of the Lake Wales Ridge, Florida, USA: implications for recovery. *Biological Conservation*

100:207-213

Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370

Winter JL, Friedman WE. 2009. Phylogenetic affinity of arbuscular mycorrhizal symbionts in *Psilotum nudum*. *J Plant Res* 122:485-496

Won H, Renner SS. 2006. Dating dispersal and radiation in the gymnosperm *Gnetum* (Gnetales) - clock calibration when outgroup relationships are uncertain. *Syst Biol* 55:610-622

Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:395-420

Wu FH, Kan DP, Lee SB, Daniell H, Lee YW, Lin CC, Lin NS, Lin CS. 2009. Complete nucleotide sequence of *Dendrocalamus latiflorus* and *Bambusa oldhamii* chloroplast genomes. *Tree Physiol* 29:847-856, Genbank ACC# FJ970915-6