

석사학위논문

엽록체 및 핵 리보솜 DNA 염기서열에
의한 한국산 백리향속 식물의 유전 분석



제주대학교 대학원

원예학과

김미선

2003년 12월

엽록체 및 핵 리보솜 DNA 염기서열에 의한 한국산 백리향속 식물의 유전 분석

지도교수 송 관 정

김 미 선

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함



김미선의 농학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장

문 두 길



위 원

강 훈



위 원

송 관 정



제주대학교 대학교

2003년 12월

**Genetic Analysis of the Genus *Thymus* in
Korea Based on Chloroplast and Nuclear
Ribosomal DNA Sequences**

Misun Kim

(Supervised by Professor Kwan Jeong Song)



**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the
Requirements for the Degree of
MASTER OF AGRICULTURE**

**Department of Horticulture
Graduate School, Cheju National University**

December, 2003

목 차

목 차	i
Abstract	ii
List of Tables	iii
List of Figures	iv
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 식물재료	5
2. Total DNA 추출 및 정제	5
3. 이용부위의 유전자 증폭	7
4. 클로닝과 plasmid DNA 분리	9
5. 염기서열 결정	10
6. 염기서열 및 유연관계분석	10
7. SSCP 분석	11
III. 결 과	12
IV. 고 찰	32
V. 적 요	36
VI. 인용문헌	37

Abstract

The chloroplast DNA (cpDNA) and nuclear ribosomal DNA (nrDNA) sequences and single stranded conformation polymorphism (SSCP) analysis were carried out to elucidate genetic variations and phylogenetic relationships among 15 taxa of the genus *Thymus* distributed in Korea. The nucleotide lengths of the selected three regions ranged from 292 to 293 base pairs (bp) in *trnL-trnF*, from 321 to 323 bp in *psbA-trnH*, and from 624 to 625 bp in ITS region, respectively. The GC contents of the selected *Thymus* species ranged from 37.33 to 39.04% in *trnL-trnF*, from 22.74 to 26.64% in *psbA-trnH*, and from 59.13 to 59.94% in ITS region, respectively. We cloned and sequenced the selected three regions, and then compared with those nucleotide sequences. We also constructed the genetic divergences and phylogenetic trees based on the combined nucleotide sequences. These results showed that TMU and SR-1 had the highest nucleotide divergence values (0.0281) than those of any other pairs among ingroup taxa. On the other hand, TMG-3 had the lowest divergence values with two taxa isolated Sungup (SU-2 and SU-3) and 1100-W. The clear genetic differences were not found between *T. quinquecostatus* and *T. magnus*. We also identified the *T. quinquecostatus* grow above the altitude 150m were grouped with the *T. magnus* in Ullung Island.

Additional key words: Genetic variation, ITS, phylogenetic relationship, *psbA-trnH* intergenic spacer, *Thymus*, *trnL-trnF* spacer

List of Tables

Table 1. Taxa of <i>Thymus</i> and outgroup used in phylogenetic analyses.	6
Table 2. Primer sequences and references used in this study.	9
Table 3. GenBank accession numbers among 16 taxa of the genus <i>Thymus</i> and outgroup.	20
 제주대학교 중앙도서관 JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY	
Table 4. The length and GC contents of cpDNA among 16 taxa of the genus <i>Thymus</i> and outgroup.	23
Table 5. The length and GC contents of ITS 1, 5.8S, and ITS 2 regions of nrDNA from 16 taxa of the genus <i>Thymus</i> and outgroup.	24
Table 6. Sequence divergences in the combined data set (cpDNA+nrDNA) of <i>Thymus</i> species and outgroup.	25

List of Figures

Figure 1. Distribution map of the genus <i>Thymus</i>	4
Figure 2. The general structure of the two chloroplast DNA regions, <i>trnL-trnF</i> and <i>psbA-trnH</i> intergenic spacers, and the nuclear ribosomal DNA ITS region used in this study.	8
Figure 3. Electrophoresis patterns of cp DNA, <i>trnL-trnF</i> and <i>psbA-trnH</i> , and nr DNA from 16 taxa used in this study.	13
Figure 4. Sequence data matrix of the combined sequences data set (cpDNA +nrDNA).	14
Figure 5. Neighbor-joining dendrogram based on the combined sequences data set (cpDNA+nrDNA) among 16 taxa.	28
Figure 6. One of the 20 most parsimony trees based on the combined sequences data set (cpDNA+nrDNA) among 16 taxa.	29
Figure 7. A strict consensus tree derived from the 20 equally most parsimonious trees based on the combined sequences data set (cpDNA+nrDNA) among 16 taxa.	30
Figure 8. PCR-SSCP band patterns of the amplified cpDNA <i>trnL-trnF</i> and <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer regions among <i>Thymus</i> spp..	31

I. 서 론

백리향속(Genus *Thymus*) 식물은 남부 유럽 원산의 꿀풀과(Labiatae)에 속하는 다년생의 낙엽 소관목이다. 전 세계적으로 아열대에서부터 온대 지역에 걸쳐 350여 종이 자생하고 있으며, 그 중 유럽지역인 스페인과 터키에서는 60종 이상이 분포한다. 백리향이란 향기가 발끝에 묻어 백리를 간다 하여 붙여진 이름으로 우리나라에는 백리향(*T. quinquecostatus* Nakai)과 섬백리향(*T. magnus* Nakai) 2종이 자생하고 있다고 알려져 있다(정, 1958; Mabberley, 1990; Ohwi, 1984) (Fig. 1). 국내에서 백리향은 제주도, 전라도, 경상도의 표고 50~200m 내외의 낮은 산의 석회암 지대와 평안도, 강원도의 높은 산 혹은 해발 900~1,000m의 산 정상이나 잔돌이 많은 땅에서 자생하고 있다. 섬백리향은 울릉도에서 자생하는데 울릉백리향, 대화백리향, 또는 도백리향이라 불려지고 있다(정, 1958).

백리향의 잎은 대생(對生)이다. 잎모양은 타원형(橢圓形) 또는 난형(卵形)이고, 잎끝은 뾰족하거나 둔두(鈍頭)이며, 양면에 선점(腺點)이 있다. 잎의 길이는 12mm, 폭은 3-8mm이다. 꽃은 6월에 피는데 엽액에 2~4개씩 달리지만 가지 끝 부분에서 총생하기 때문에 짧은 수상으로 보인다. 소화경은 길이가 3mm이고 털이 있다. 꽃받침은 길이 5mm이며 10개의 맥이 있고 위쪽 3개의 열편은 삼각형이며 아래쪽 2개의 열편은 선형이고 털이 있다. 화관은 홍자색이며 향기가 있고 길이는 7~9mm, 지름은 5mm로서 겉에 잔털과 선점이 있다. 반면에 섬백리향은 원줄기가 백리향보다 굵고 지름이 7~10mm이며 잎의 길이가 15mm이고 꽃의 길이가 10mm이다(이, 1980).

백리향의 꽃과 전초에는 Thymol, ν -terpinene, p -Cymene 및 Camphor 등의 성분이 함유되어 있어 백리향 특유의 향기를 발산한다(Guenther, 1949; 김 등, 1994; Leung 등, 1996). 동양의 한방에서는 식물의 전초를 향경련, 발한, 진해, 구풍, 구충, 방부 효과 등의 목적으로 민간약으로 이용하여 왔다(Jackson 과 Hay, 1994; Letchamo 과 Gosselin, 1995; Mabberly, 1990). 서양에서는 백리향을 타임(Thyme)이라 부르며 프랑스, 스페인 등의 유럽지역에서는 일찍부터 방향

제, 식품(햄, 소시지, 드레싱용)등의 향료와 thymol 등의 정유(essential oil) 성분을 치약, 구강 청취제 등에 이용되어 왔다. 그 중에서 정유 성분은 주로 유럽종인 *T. vulgaris* L., *T. zygis* L.로부터 생산되며, 세계적으로는 연간 25톤 정도의 정유가 생산되고 있는 것으로 보고되고 있다(Guenther, 1949; Lawrence, 1984). 최근에는 향(aroma)을 이용한 Aromatherapy라는 원예치료법, 에센셜 오일 및 허브요리 등에 이용되는 허브(herb) 식물에 대한 세계 시장에서의 소비가 급격히 증가하면서 타임의 인기 또한 크게 상승하고 있다(Brown, 1995; Curtis, 1996; Ody, 1993).

그럼에도 불구하고 백리향속 식물의 분류가 Linnaeus에 의해 1753년에 최초로 이루어진 이래 아직까지도 종의 수에 대하여 학자간 큰 차이를 보일 정도로 이들에 대한 분류학적 체계가 명확히 설정되어 있지 않은 실정이다. 우리나라에서는 잎의 길이와 폭에 의한 형태적 특성을 토대로 백리향과 섬백리향으로 나누고 있다. 학자에 따라서는 제주도형, 울릉도형, 한반도형으로 구분하기도 한다. 그러나 지역간 및 해발고도에 따라 화색과 잎의 크기 등에 있어 종간 및 종내의 변이가 매우 다양하여 외관상으로 종 판별은 매우 어렵다(Mabberley, 1990; Ohwi, 1984; 신과 최, 1997). 또한, 백리향의 재배, 성분 분석 등에 대한 연구에서도 수집지역에 따라 차이가 많다. 그러므로 최근 한국산 백리향속 식물에 대한 명확한 분류와 함께 가치를 재평가 하여야 한다는 주장이 제기되고 있다(김 등, 1994; 김 등, 1999; 김 등, 2000). 따라서 환경의 영향을 거의 받지 않는 유전자 분석을 통한 유연관계 구명이 필요한 실정이다.

분자생물학의 방법을 이용한 deoxyribonucleic acid (DNA) 서열 분석은 종의 진화 과정을 가장 직접적으로 추론할 수 있는 중요한 방법의 하나로 종내 분류군 또는 종간의 분류군 비교에도 효과적으로 이용되고 있다(Baldwin 등, 1995; Jun 등, 2002; Jung 등, 2002; 김 등, 2003). 유전자 흐름의 최종산물이라 할 수 있는 표현형(phenotype)은 여러 요인에 의해 변하지만, DNA는 세포 내·외의 환경의 영향을 적게 받는다. 엽록체 유전자와 미토콘드리아 유전자는 핵 DNA에 비하여 염기의 치환율이 각각 1/4~1/3과 1/20정도로 변이율이 아주 낮기 때문에 식물에서 유연관계 연구에 유용하게 이용되고 있다(Crawford, 1991; Palmer 등, 1988).

이 중에서 엽록체 DNA의 비암호화 영역인 photosystem II D1 protein *psbA-trnH*(GUG) 및 *trnL*(UAA)-*trnF*(GAA) intergenic spacer 부위가 최근 계통유전학적 연구 및 종내 변이 연구에 빈번히 사용되고 있다(Baker 등, 1999; Curtis 와 Clegg, 1984; Jung 등, 2003a). 또한, 핵 리보솜 DNA (nuclear ribosomal DNA)도 반복단위의 길이 변이와 제한효소 절단 부위의 변이 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)를 가지고 있어 고등식물의 계통 분석에 이용되고 있다. 특히, 크기가 작고 고도로 보존된 핵 리보솜 DNA 부위 중 암호화영역 사이에 위치하고 있는 internal transcribed spacer (ITS) 지역은 속씨식물에서 multicopy 형태로 존재하고 변이가 다양하며, 증폭이 용이하다는 이유로 종간 또는 속간의 연관관계를 파악하는데 중요한 자료로 이용되고 있다. 그 중 18S rRNA와 5.8S rRNA 사이에 존재하는 ITS 1과 5.8S rRNA와 25S rRNA 사이에 존재하는 ITS 2가 암호화 영역인 5.8S, 18S 및 25S 등에 비하여 계통간 변이가 다양하게 나타나는 것으로 알려져 있다(Baldwin, 1992; Jung 등, 2002; Kim과 Jansen, 1994; Palmer 등, 1988; Rogers와 Bendish, 1987; White 등, 1990).



Single stranded conformation polymorphism (SSCP) 분석은 생물학에서 처음으로 도입된 방법으로서 주로 돌연변이 관찰에 쓰이며, 전기영동 수행 시 DNA 각각의 입체구조에 따라 길이가 같은 단일가닥 DNA (single-strand DNA)라도 다른 위치로 이동한다. 이는 현재 염기서열 분석을 하지 않더라도 변이를 쉽게 관찰을 할 수 있어 식물의 계통분석에 널리 이용되고 있으며, 집단간의 변이관찰에 널리 사용되고 있다(Jung 등, 2003b; Orita 등, 1989; Sato 와 Nishio, 2002; Sunnucks 등, 2000).

따라서 본 연구는 식물의 수직분포가 뚜렷하고 특수한 입지조건을 갖추고 있는 한라산에 자생하는 백리향을 중심으로 울릉도 및 한반도 본토의 백리향과 섬백리향에 대하여 엽록체 DNA 중 변화의 정도가 빠른 비암호화 영역인 *trnL-trnF*와 *psbA-trnH* intergenic spacer 부위 그리고 핵 리보솜 DNA의 ITS 지역의 염기서열과 SSCP의 비교분석을 통해 이들의 지역 및 고도별 유전적 변이 정도와 백리향속 식물들의 계통유전학적 유연관계를 밝히고자 수행하였다.



Figure 1. Distribution map of the genus *Thymus*. *Thymus* is distributed in the Old World and on the coasts of Greenland, from the Macaronesian Region (Canary Islands, Madeira and Azores), Northwest Africa north of the Sahara Desert (Morocco, Algeria, Tunisia and Libya), the mountains of Ethiopia and the southwest Arabian Mountains, the Sinai Peninsula, through the arid regions of West Asia up to the Himalayas, and reaching the limits of the tropical region up to East Asia and Japan.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료

백리향속(*Thymus*) 식물들은 신과 최(1997)의 실험결과를 토대로 수집되었다. 제주도의 해안 저지대인 성산포지역(해발 50m이하)에서 백리향 2개체, 한라산 해발 1,100m 지역에서 백리향 2개체 및 흰백리향 1개체, 성읍지역(해발 150m)에서 백리향 3개체 그리고 1,700m에서 백리향 1개체 및 울릉도에서 섬백리향 1개체를 직접 채집하였다. 강원도 설악산과 울릉도에서 채집되어 국립수목원과 경상북도 농업기술원에 각각 보존 중인 백리향 2개체 및 섬백리향 3개체를 분양받았다. 또한, 백리향속의 계통유전학적 유연관계를 명확히 하고자 백리향속과 가장 근연관계가 높은 꿀풀과(Labiatae)의 광대나물(*Lamium amplexicaule* L.)를 outgroup으로 이용하였다(Table 1). 수집된 식물의 잎은 증류수로 세척한 후 바로 total genomic DNA 추출 및 정제에 이용하거나, 초저온 냉동고(-70℃)에 보관하면서 추후에 사용하였다.

2. Total DNA 추출 및 정제

Total DNA 추출은 다당류(polysaccharide) 제거에 가장 적합한 것으로 알려진 단백질 침전법(protein precipitation technique; Dellaporta 등, 1983)을 변형하여 다음과 같이 실시하였다. 신선한 잎 1.5 g에 액체질소를 첨가하여 마쇄한 후, 일정량의 추출 완충액(100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 500 mM NaCl; 2% SDS; 1% PVP; 0.1% β -mercaptoethanol)를 첨가하여 60℃에서 30분 동안 정지시켰다. 다시 5 M potassium acetate (pH 6.5) 4 mL를 첨가하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0)에 용해시켰다. 이 용액을 원심분리하여 얻은 상정액에 동량의 isopropyl alcohol과 1/10배인

Table 1. Taxa of *Thymus* and outgroup used in phylogenetic analyses.

Taxa	Abbreviation	Collected sites
<i>T. quinquecostatus</i> Nakai	SS-1	Seongsan, Jeju, Korea
	SS-2	Seongsan, Jeju, Korea
	SU-1	Seongup, Jeju, Korea
	SU-2	Seongup, Jeju, Korea
	SU-3	Seongup, Jeju, Korea
	1100-1	Mt. Halla(alt. 1,100m)
	1100-2	Mt. Halla(alt. 1,100m)
	1100-W	Mt. Halla(alt. 1,100m)
	1700	Mt. Halla(alt. 1,700m)
	SR-1	Mt. Sorak(alt. 1,400m) ^z
	SR-2	Mt. Sorak(alt. 1,400m) ^z
<i>T. magnus</i> Nakai	TMU	Ullung Island, Korea
	TMG-1	Ullung Island, Korea ^y
	TMG-2	Ullung Island, Korea ^y
	TMG-3	Ullung Island, Korea ^y
Outgroup		
<i>Lamium amplexicaule</i> L.	Lam	NJAES, Jeju, Korea ^x

^z, ^yPlant materials were received from National Arboretum and Gyeongsangbuk-do Agricultural Research & Extension Services, respectively.

^xNJAES; National Jeju Agricultural Experiment Station.

sodium acetate (pH 7.6)를 첨가한 후 -20℃에서 2시간 동안 보관하여 DNA의 재침전을 유도하였다. 재침전된 DNA는 TE beffer에 녹인 후, RNase A (Promega, USA)와 Proteinase K (Sigma, USA)를 사용하여 남아있는 RNA와 protein을 분해하였다. 분해된 RNA와 protein을 제거하기 위해 동량의 phenol를 첨가한 후 원심분리하여 상정액을 회수하고 동량의 phenol:chloroform (1:1)을 재처리하였다. 정제된 DNA는 ethanol 침전법으로 다시 회수하여 TE buffer에 용해시켰다. 회수된 DNA는 1% agarose (Promega, USA) gel 전기영동과 UV/VIS spectrophotometer로 확인 후 적정농도로 정량하여 시료로 사용하였다.

3. 이용 부위의 유전자 증폭

유전자 분석을 위한 증폭은 식물 유전자원 연구 및 계통유전학적 유연관계 분석에 빈번히 이용되는 엽록체 유전자의 비암호 영역인 *trnL-trnF* intergenic spacer와 *psbA-trnH* intergenic spacer 부위와 핵 리보솜 유전자인 5.8S 암호화 부위를 포함한 전체 ITS 부위를 이용하였다(Fig. 2). 엽록체 DNA의 *trnL-trnF*와 *psbA-trnH* intergenic spacer의 유전자 증폭은 엽록체 전체 유전자의 염기서열이 이미 밝혀진 담배의 염기서열을 기준으로 작성된 Sang 등(1997)의 범용 primer를 사용하였다. 핵 리보솜 ITS 부위에 대한 증폭은 White 등(1990)에 의해 고안된 범용 primer를 사용하였다(Table 2).

유전자 증폭을 위한 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)의 반응 혼합액은 template DNA 10 ng, primer 각각 0.5 μM, 10x reaction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3 at 20℃, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂) 5 μL, dNTP (최종농도 200 μM; Takara, Japan) 2 μL, *Taq* DNA polymerase (Takara, Japan) 2.5 units에 멸균된 3차 증류수를 첨가하여 총 반응 용액량을 50 μL로 하였다. 유전자 증폭반응은 GeneAmp PCR System 9600 Thermal Cycler (Perkin-Elmer, USA)를 사용하여 94℃에서 2분 예열 한 다음, 94℃에서 1분, 55℃에서 1분, 72℃에서 1분으로 30 cycles 동안 증폭한 후, 72℃에서 10분을 유지시켰다. 증

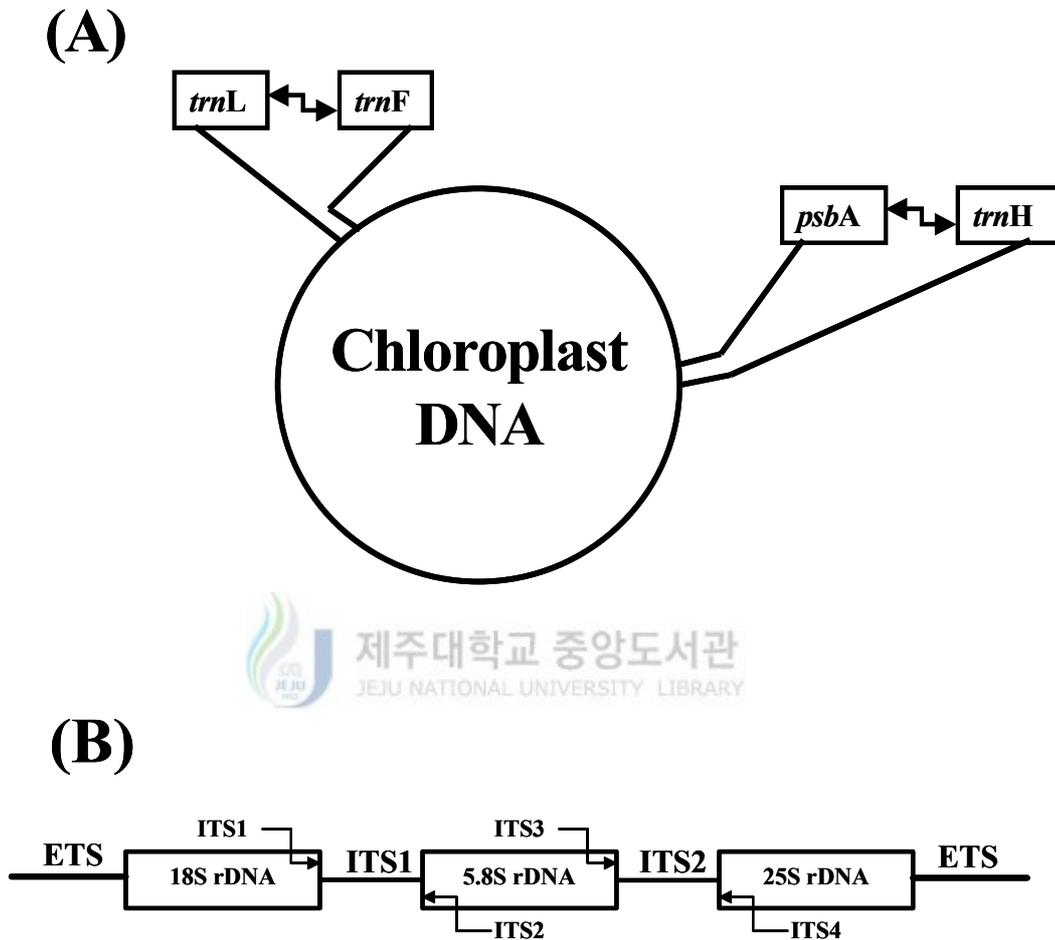


Figure 2. The general structure of the two chloroplast DNA (cpDNA) regions (A), *trnL-trnF* and *psbA-trnH* intergenic spacers, and the nuclear ribosomal DNA (nrDNA) ITS region (B) used in this study. Arrows indicate the positions and orientations of the primers used.

Table 2. Primer sequences and references used in this study.

Primer	Sequences (5'→3')	References
<i>trnL-trnF</i>		
trnLF	AAAATCGTGAAGGTTCAAGT	Sang <i>et al.</i> , 1997
trnFR	GATTTGAACTGGTGACACGA	Sang <i>et al.</i> , 1997
<i>psbA-trnH</i>		
psbAF	GTTATGCATGCCCCGTAATGC	Sang <i>et al.</i> , 1997
trnHR	CGCGCATGGTGGATTACAAA	Sang <i>et al.</i> , 1997
ITS		
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> , 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> , 1990

폭한 PCR 산물은 1x TBE buffer (Tris-Borate/ EDTA, pH 8.3)를 사용한 1% agarose gel에 ethidium bromide (EtBr) 를 첨가하여 100V에서 30분 동안 전기영동을 실시한 후 transilluminator에서 확인하였다.

4. 클로닝과 plasmid DNA 분리

확인된 PCR 산물은 TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, USA)를 사용하여 ligation하였다. 이를 42℃에서 30초간 열충격(heat-shock) 방법을 통해 Top 10F⁺ competent cell에 형질전환 시킨 후, X-gal (50 µg/mL)과 IPTG (50 µg/mL) 및 ampicillin (50 µg/mL)이 포함된 LB 배지에 도말하여 18시간 cloning하였다. 클로닝 후 선별한 white colony를 ampicillin (50 µg/mL)이 들어 있는 LB-broth 배지에서 8시간 동안 배양한 후 Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, USA)을 사용하여 plasmid DNA를 분리하였다. Plasmid DNA는 1% agarose gel에서 전기영동으로 확인하였다.

5. 염기서열 결정

엽록체 DNA의 *trnL-trnF* 및 *psbA-trnH* intergenic spacer 부위와 ITS 지역의 염기서열 분석은 기존의 Sanger 등(1977)의 사슬종결 서열분석법을 응용한 방법인 자동화된 염기서열 분석법을 이용하였다. Cy5TM AutoCycleTM Sequencing Kit (Pharmacia Biotech, USA)와 TOP Sequencing Kit (Bioneer, USA)를 병행하여 실시하였다. Cyclic sequencing을 위하여 네 개의 디디옥시뉴클레오티드 (ddA, ddC, ddG, ddT)를 Cy5가 표지된 vector inner primer인 M13-40 primer (5'-CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC-3')와 M13 reverse primer (5'-TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC-3') (Amersham Biotech, USA)를 사용하여 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 40초를 30회 실시한 다음 72°C에서 10분간을 더 유지시켰으며, stop solution을 첨가하기 전까지 4°C에서 보관하였다. 전기영동은 long read acrylamide gel (Amersham Biotech, USA)과 0.5x TBE buffer를 이용하는 ALFexpress DNA sequencer (Amersham Biotech, USA)를 사용하여 1000V에서 700분간 실시하였다. 이 과정에서 네 개의 디디옥시뉴클레오티드는 빛에 의해 감지되면서 다른 색깔의 형광을 방출한다. 염기서열 분석기가 겔의 바닥 부근에 있어 형광 올리고뉴클레오티드가 통과할 때 레이저 광선을 이용해 그들을 감지시킨다. 이때 각 올리고뉴클레오티드로부터 방출되는 형광 빛의 색깔이 탐지기로 결정된다. 이런 정보는 색깔에 해당되는 염기로 전환하도록 프로그램화된 컴퓨터로 이동하며, 이때 컴퓨터는 통과하는 각 형광밴드, 각 염기를 부호화하는 색깔의 윤곽을 출력 및 저장한다.

6. 염기서열 및 유연관계 분석

엽록체 DNA의 *trnL-trnF*, *psbA-trnH*와 nrDNA의 ITS 영역의 염기서열들간의 상관관계를 보여주기 위해 각각의 유전자들을 조합시킨 다음 Clustal W program (Higgins 등, 1992)을 이용하여 1차 정렬을 실시한 후 육안으로 최종 정렬을 수행하였다. 염기 변이율을 확인하기 위한 분지분석에서 gap은 missing

character로 처리하였다.

염기 변이율은 PHYLIP (version 3.5; Felsenstein, 1993)의 DNADIST program에서 계산되었다. 이를 바탕으로 transition : transversion을 2 : 1로 가정하여 two-parameter method (Kimura, 1980)로 유전적 거리지수를 계산하였으며, 그 결과를 기초로 하여 neighbor-joining tree를 작성하였다. 또한 계통수의 branch에 대한 신뢰도를 높이기 위하여 parsimony analysis에서 나온 bootstrap (100회) 반복결과를 모두 채택하여 consensus tree를 작성하였다. 본 연구로부터 얻어진 48개의 염기서열들은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 유전자 은행인 GenBank에 등록하였다.

7. SSCP 분석

증폭한 엽록체 DNA의 *trnL-trnF* 및 *psbA-trnH* intergenic spacer 부위에 대한 변이 양상을 관찰하기 위해 outgroup을 제외한 백리향속 전체 개체에 대하여 SSCP 분석을 수행하였다. PCR 산물 2.5 μ L과 denaturing buffer 7.5 μ L (95% formamide, 0.05% xylene cyanol, 0.05% bromophenol blue)를 혼합하여 95°C에서 3분간 열을 가한 후 즉시 얼음에 두어 정지하였다. 이를 8% non-denaturing polyacrylamide gels (acrylamide:bis-acrylamide = 49:1)로 0.5x TBE buffer를 이용하는 Hoefer SE600 unit (180×160×1.0mm) 장치를 사용하여 실온에서 18시간 150V로 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후 증류수에 EtBr 0.5 μ g/mL를 첨가한 후 10분간 염색하여 UV image analyzer에서 전기영동 분리 양상을 분석하였다.

Ⅲ. 결 과

식물의 수직분포가 뚜렷하고 특수한 입지조건을 갖추고 있는 한라산에 자생하는 백리향을 중심으로 강원도 및 울릉도에서 채집한 백리향과 섬백리향의 지역별, 고도별 유전적 변이를 관찰하기 위하여, Table 2에 제시한 각각의 primer를 이용하여 증폭한 PCR 산물은 Figure 3과 같다. 이들의 크기도 엽록체 DNA의 *trnL-trnF*에서 386 base pairs (bp) (Fig. 3A), *psbA-trnH*에서 446 bp (Fig. 3B), 그리고 핵 리보솜 DNA의 전체 ITS에서 713 bp로 관찰되었다(Fig. 3C).

각각의 증폭된 PCR 산물을 이용하여 전체 염기서열을 분석하였으며 엽록체 DNA의 *trnL-trnF* 및 *psbA-trnH* intergenic spacer의 전체 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank상에 등록된 담배 (GenBank accession No. Z00044), 애기장대(GenBank accession No. AP000423) 등 기존에 보고된 서열들과 비교하여 영역을 결정하였으며, 해당 분류군의 ITS 영역도 다른 식물에서 보고된 암호화 부위의 18S, 5.8S, 25S를 기준으로 염기서열을 결정하였다. 그리고 이들 염기서열들은 Clustal W program (Higgins 등, 1992)을 이용하여 정렬하였다(Fig. 4).

기존에 보고된 염기서열들과 비교하여 얻어진 백리향 및 섬백리향 등 16 분류군에 대한 각각의 염기서열들은 세계 유전자 은행인 NCBI의 GenBank에 등록하여 각각의 유전자에 대한 accession No.를 부여받았다(Table 3).

본 실험에 이용된 백리향과 섬백리향의 대부분 개체에서 *trnL-trnF*부위 염기서열의 크기는 292 bp로 나타났다. 그런데 성읍지역에서 채집된 개체들은 *trnL-trnF* 부위 염기서열의 크기가 293 bp로 다른 지역의 수집된 개체들보다 1 bp가 더 길었는데 이는 outgroup인 광대나물(Lam)에서의 크기와 동일한 것이다. *psbA-trnH* 부위는 *trnL-trnF* 부위보다 29 bp가 더 큰 321 bp였는데 한라산의 1,700m지역에서 수집된 개체에서만 다른 개체보다 2 bp 더 긴 특성을

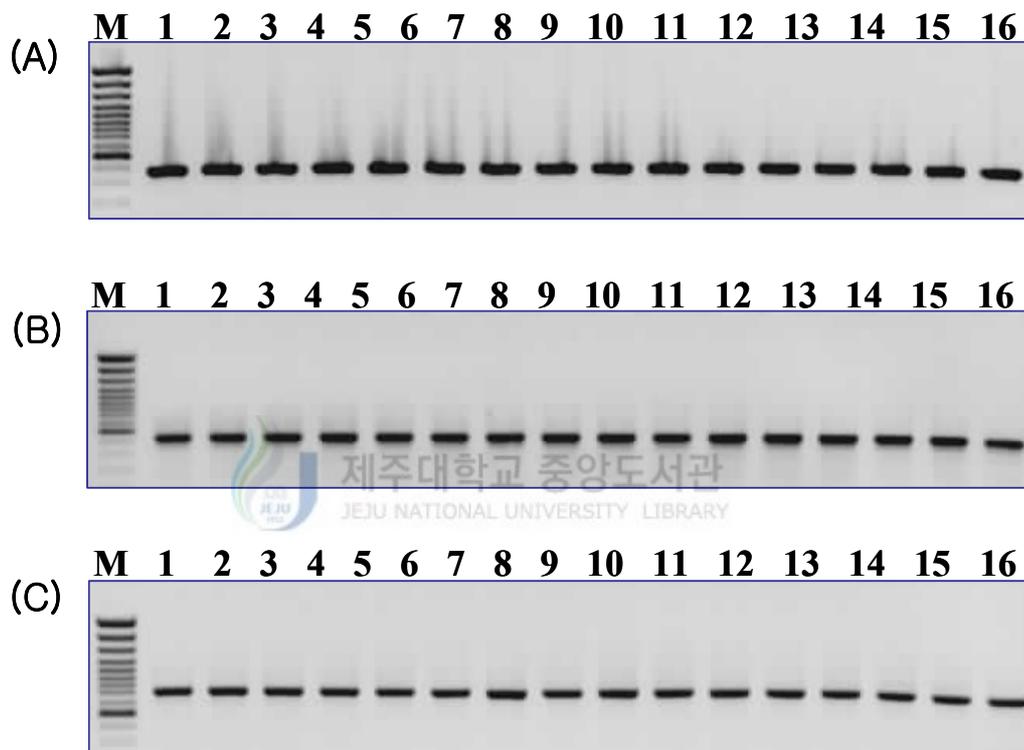


Figure 3. Electrophoresis patterns of cpDNA, *trnL-trnF* (A) and *psbA-trnH* (B), and nrDNA (C) from 16 taxa used in this study. Lane M is DNA size marker, GeneRuler™ DNA ladder plus (MBI, USA). Lane 1 to 16 are SS1, SS2, SU-1, SU-2, SU-3, 1100-1, 1100-2, 1100-W, 1700, SR-1, SR-2, TMU, TMG-1, TMG-2, TMG-3, and Lam, respectively. Species abbreviations are given Table 1.

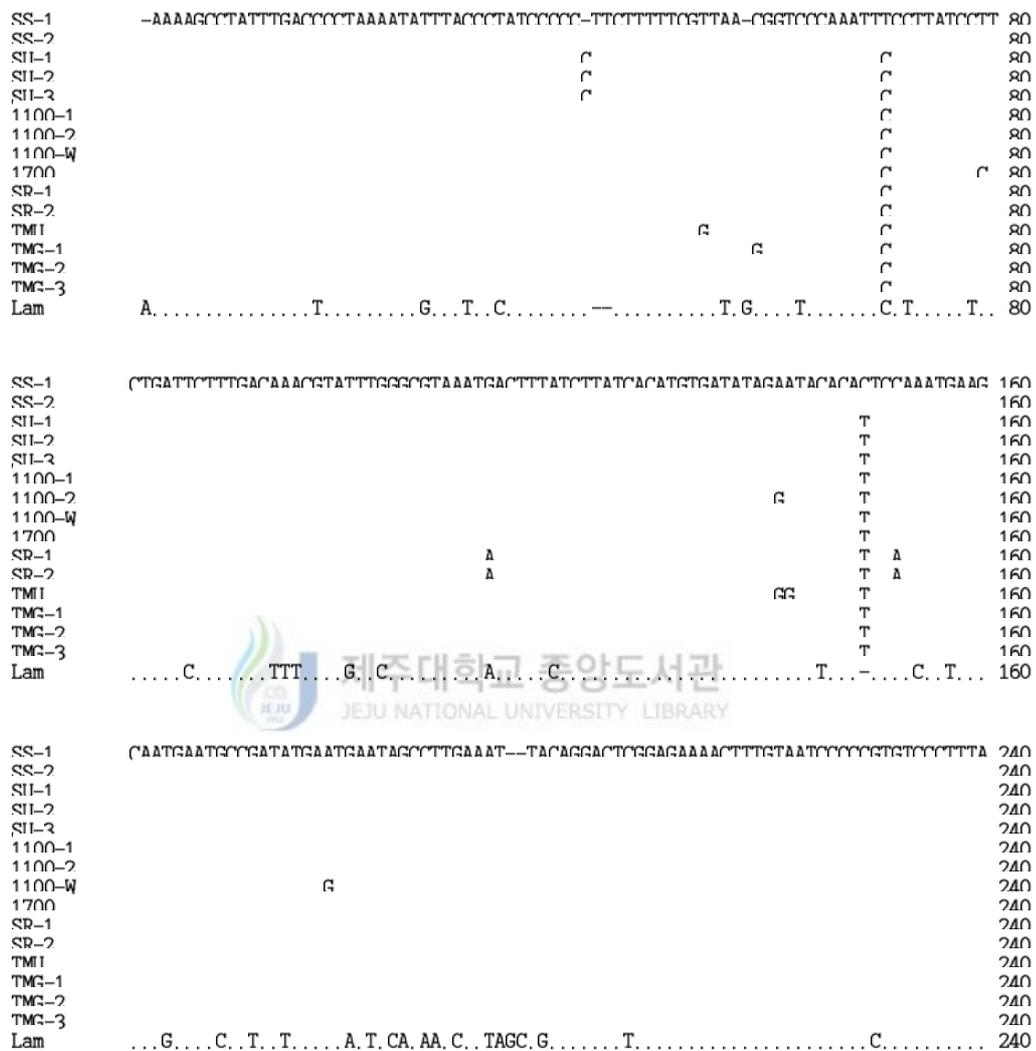


Figure 4. Sequence data matrix of the combined sequences data set (cpDNA+nrDNA). Nucleotide sequences were displayed from 5' to 3'. The *trnL-trnF*, *psbA-trnH*, and ITS regions range from 1 to 297, 298 to 622, and 623 to 1265, respectively. Dot indicate the same nucleotide as in SS-1 and dashes indicate gaps.

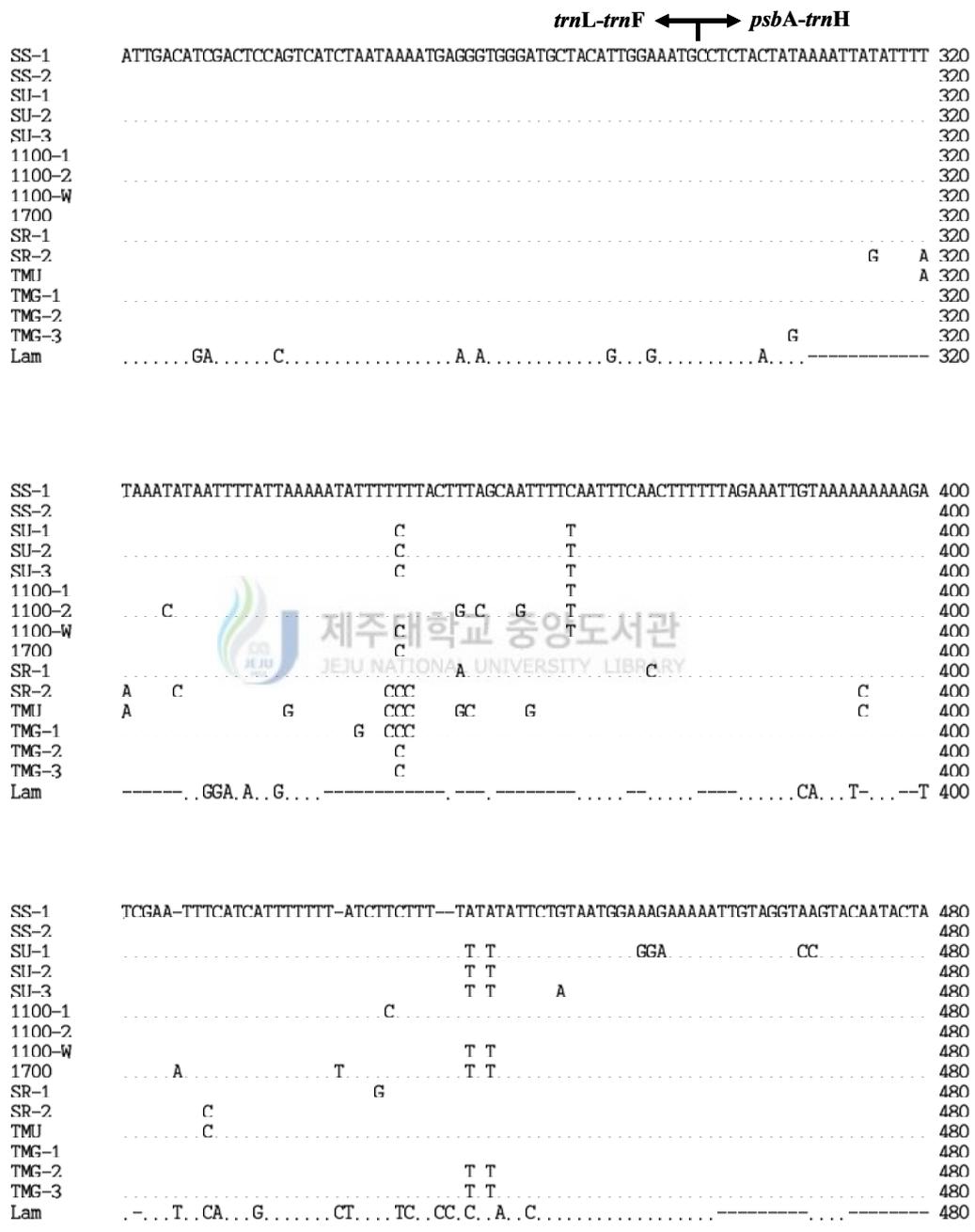


Figure 4. (Continued).

SS-1	CTAGAAAATATAGAAAAGGACTCCTGATTGAAAAGAAAATAAAGGAGCAAGAAACCCTTCTTTTTTATCAAAAAGAGGG	560
SS-2		560
SU-1		560
SU-2		560
SU-3		560
1100-1		560
1100-2		560
1100-W		560
1700		560
SR-1		560
SR-2		560
TMU		560
TMG-1		560
TMG-2		560
TMG-3		560
LamT.....T...T.....G...G...G.AG...-	560

psbA-trnH ← → ITS 1

SS-1	TTTCTTGCGCCGTATATTTATCTATTCTATTTTCAAAAACCTCCTACACACTAAGAACAAGTCTCGAA-CCTTTAAAAACA	640
SS-2		640
SU-1		640
SU-2		640
SU-3		640
1100-1		640
1100-2		640
1100-W		640
1700		640
SR-1		640
SR-2		640
TMU		640
TMG-1		640
TMG-2		640
TMG-3		640
Lam	-.A.....A...T.....C.....A..GC...G..	640

SS-1	GACCGCGAACACGTGTTTAAACAACGTTGGGGACGGTGCGGGGGTAACCCCTCGCCGTGTCCCATCTCCTGCCGGCGTGT	720
SS-2		720
SU-1		720
SU-2		720
SU-3		720
1100-1		720
1100-2		720
1100-W		720
1700		720
SR-1		720
SR-2		720
TMU		720
TMG-1		720
TMG-2		720
TMG-3		720
LamCCAA...C..ACG...C.C.GAG...CG...C.C...A.G...GGT...-G.AA...CC	720

Figure 4. (Continued).

SS-1	ATCTT-CGGGTCACGTCTGCGGGCTAACGAACCCCGCGCGGAATGCGCCAAAGGAAAACA-AAACGAAGCGTT---TCC	800
SS-2	A	800
SU-1	C	800
SU-2	C	800
SU-3	C T	800
1100-1	C	800
1100-2	C	800
1100-W	C	800
1700	C	800
SR-1	C	800
SR-2	T	800
TMU		800
TMG-1		800
TMG-2		800
TMG-3		800
Lam	-C, ACC...G---, C, GC... T, G... GC... T, G... CCCC...	800

ITS 1 ← → 5.8 S

SS-1	CCCTGGCATCCCGTTCGCGGAGTGTGCTGGGGGAGCAGACGTCTATCAAATGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCT	880
SS-2		880
SU-1		880
SU-2	C	880
SU-3		880
1100-1		880
1100-2		880
1100-W		880
1700		880
SR-1		880
SR-2		880
TMU		880
TMG-1		880
TMG-2		880
TMG-3		880
Lam	.. ACC, AG... C... G, C, A, GC... A, AAG... C... G... T...	880



SS-1	CGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTT	960
SS-2		960
SU-1		960
SU-2		960
SU-3		960
1100-1		960
1100-2		960
1100-W		960
1700		960
SR-1	T	960
SR-2		960
TMU		960
TMG-1		960
TMG-2		960
TMG-3		960
Lam		960

Figure 4. (Continued).

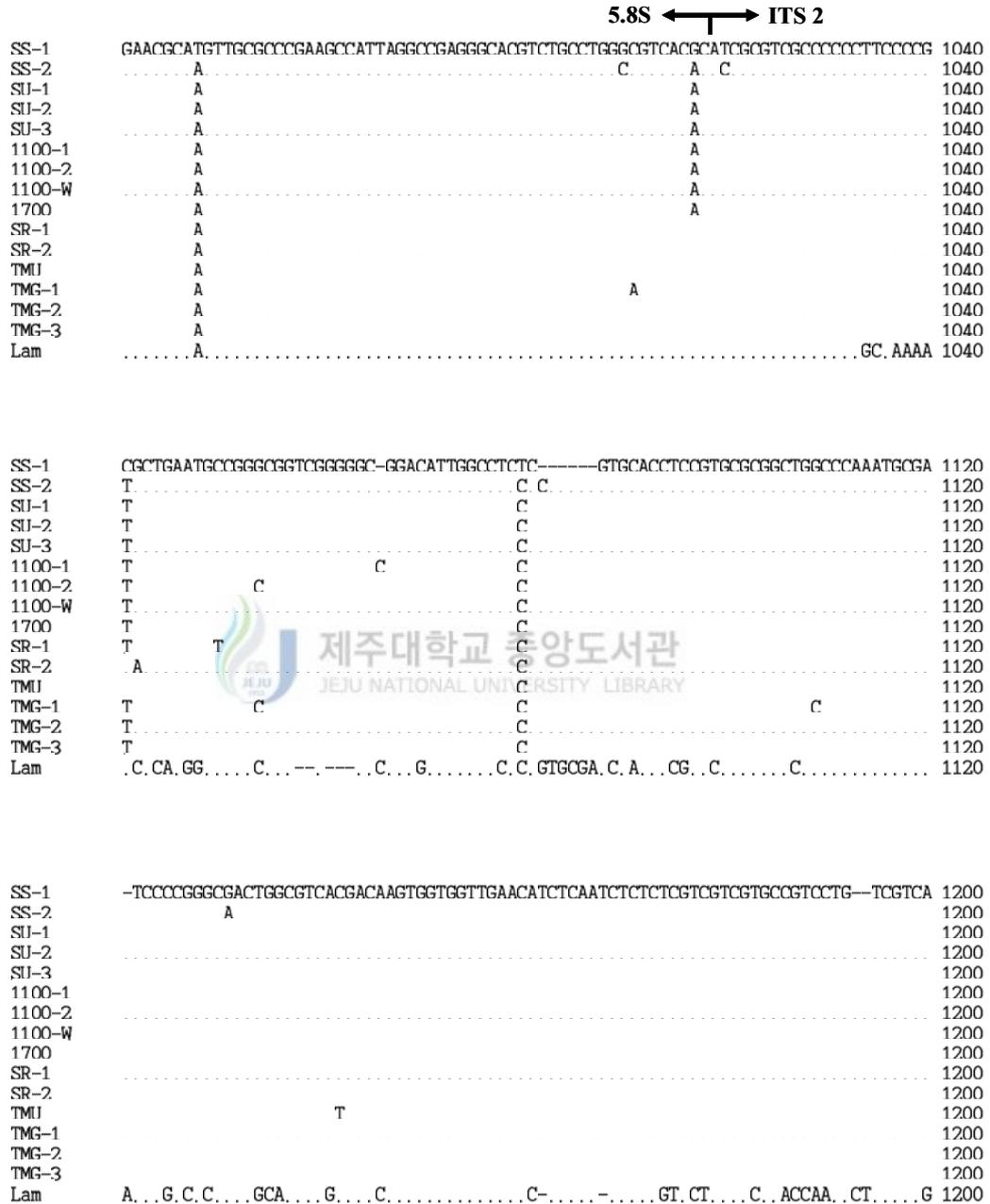


Figure 4. (Continued).

SS-1	TTACGGGAATAGTCATAAACG—ACCCAACGGTGCCGGTGCCTTAAGTGCACC—TCACCTTCGACC	1265
SS-2		1265
SU-1		1265
SU-2		1265
SU-3		1265
1100-1		1265
1100-2		1265
1100-W		1265
1700		1265
SR-1		1265
SR-2		1265
TMU		1265
TMG-1		1265
TMG-2		1265
TMG-3		1265
Lam	G . C A . CC . T . GA C . GC . A . . C T . . G . G . CA	1265

Figure 4. (Continued).



Table 3. GenBank accession numbers among 16 taxa of the genus *Thymus* and outgroup.

Taxa	Abbreviation	GenBank accession No.			
		<i>trnL-trnF</i>	<i>psbA-trnH</i>	ITS	
<i>T. quinquecostatus</i> Nakai	SS-1	AY281301	AY281310	AY443434	
	SS-2	AY281302	AY281311	AY443435	
	SU-1	AY443422	AY443429	AY443442	
	SU-2	AY443423	AY443430	AY443443	
	SU-3	AY443424	AY443431	AY443444	
	1100-1	AY281303	AY281312	AY443436	
	1100-2	AY281304	AY281313	AY443437	
	1100-W	AY443420	AY443427	AY443438	
	1700	AY443421	AY443428	AY443439	
	SR-1	AY281305	AY281314	AY443440	
	SR-2	AY281306	AY281315	AY443441	
	<i>T. magnus</i> Nakai	TMU	AY281307	AY281316	AY443445
		TMG-1	AY281308	AY281317	AY443446
TMG-2		AY443425	AY443432	AY443447	
TMG-3		AY443426	AY443433	AY443448	
Outgroup					
<i>Lamium amplexicaule</i> L.	LAM	AY281309	AY281318	AY443449	

나타냈다. 이들은 모두 광대나물에서의 크기보다 92~94 bp 길게 나타냈다 (Table 4). 백리향과 섬백리향의 핵 리보솜 DNA의 ITS 1 영역의 크기는 226~227 bp, ITS 2는 234~235 bp로 분류군 간에 염기서열 크기에 있어서 변이를 나타냈다. 그러나 5.8S 부위에서는 그 크기가 164 bp로 백리향 속에서는 모두 동일하였다(Table 5). 근연속에 속하는 광대나물(Lam)과의 비교에서는 ITS 1의 크기가 1 bp 큰 반면 ITS 2의 크기는 3~4 bp 작은 특징을 나타내었다. 이에 따라 전체 ITS 영역에서도 엽록체 DNA의 양상과는 달리 개체들 간에서도 624 bp에서 625 bp까지 1 bp차이를 보였다. 따라서 엽록체 DNA인 *trnL-trnF*와 *psbA-trnH* 부위에서는 동일 수집지역의 개체들 간에 염기서열 크기의 변화가 없었지만, 핵 리보솜 DNA인 전체 ITS 영역에서는 동일 수집지역의 개체들 간에도 1 bp 정도의 약간의 차이를 나타내는 다른 양상을 볼 수 있었다(Table 4, 5).

DNA의 구조 및 물리적인 특성을 결정하는 <G+C>의 함량은 백리향속 식물의 엽록체 DNA 중 intergenic spacer 부위인 *trnL-trnF*에서는 강원도 설악산에서 수집된 백리향인 SR-1과 SR-2가 37.33%로 가장 낮았으며, 울릉도에서 수집된 섬백리향인 TMU가 39.04%로 가장 높게 나타났다. 그리고 *psbA-trnH*에서는 제주도 성읍지역에서 수집된 SU-3이 22.74%로 가장 낮았으며, outgroup인 광대나물(Lam)이 26.64%로 가장 높게 나타났다(Table 4).

백리향속 식물의 핵 리보솜 DNA의 ITS 1 영역에서는 58.41~60.18%를 나타냈으며, 5.8S는 54.27~54.88%로, ITS2는 62.39~64.10%를 나타내었다. 전체 ITS에서는 울릉도의 섬백리향(TMG-1)이 59.13%로 가장 낮았고, outgroup인 광대나물(Lam)이 66.56%로 가장 높았다. 전체적으로 <G+C>함량은 전체 ITS와 *psbA-trnH*가 약 36~40%로 가장 높은 차이를 보였으며, *trnL-trnF*는 *psbA-trnH*보다 약 14%이상 높게 나타났다(Table 4, 5).

본 실험에서 정렬된 염기서열(Fig. 4)을 기초로 outgroup을 포함하여 변이율을 산출하였다. 엽록체 DNA 중 *trnL-trnF* 부위는 19.53% (58/297), *psbA-trnH*는 46.46% (151/325)로 *psbA-trnH*에서 더 높은 변이율을 나타냈다. 핵 리보솜에서는 ITS 1이 37.25% (76/204), 암호화 영역인 5.8S가 3.66% (6/164), 그리고 ITS 2가 37.65% (93/247)로 나타나 ITS 1과 ITS 2 지점의 변이는 거의 비슷하

게 관찰되었다.

모든 개체의 염기서열을 조합하여 Kimura (1980)의 two-parameter methods를 이용한 유전적 거리지수를 작성한 결과를 Table 6에 나타내었다. 백리향속 (*Thymus*) 식물간에는 유전적 거리지수가 0.0016~0.029로 나타났으며, 백리향속 식물과 outgroup간의 유전적 거리지수는 0.2016~0.2143로 나타났다. 종간의 유전적 거리지수에서는 TMG-3·SU-2, TMG-3·SU-3와 TMG-3·1100-W가 가장 거리지수가 낮은 0.0041를 나타낸 반면에 TMU와 SR-1이 0.0281로 가장 높은 거리지수를 나타내어 두 분류군간의 유연관계가 가장 낮게 나타났다. 백리향 개체 중에서는 SU-2·SU-3와 SU-2·1100-W, SU-3·1100-W가 가장 낮은 거리지수인 0.0016을 나타낸 반면, SR-2와 SU-1은 가장 높은 0.029의 거리지수를 보였다. 섬백리향 개체들 간에도 0.0024~0.0172의 높은 수치의 유전적 거리지수가 나타났는데 그 중에서 TMG-1·TMU와 TMG-2·TMU가 98.28%의 가장 낮은 상동성을 보였으며, TMG-2와 TMG-3가 99.76%로 가장 높은 상동성을 나타내었다.

백리향과 섬백리향의 유연관계 분석을 위하여 유전적 거리지수를 바탕으로 neighbor-joining (NJ) tree를 작성하여 개체간의 유사도를 관찰하였고(Fig. 5), 또한 parsimony 분석을 실시하여 parsimony tree를 얻었으며(Fig. 6) 계통도에 대한 신뢰도를 얻기 위하여 100 bootstrap 분석을 하여 consensus tree를 작성하였다(Fig. 7). 엽록체와 핵 리보솜 DNA 염기서열 조합에서의 NJ tree는 SR-2가 outgroup인 Lam과 근접해 있었으며, SR-1·SS-1·SS-2 그룹과 그 나머지 백리향속 개체들(SU-1, SU-2, SU-3, 1100-1, 1100-2, 1100-W, 1700, TMU, TMG-1, TMG-2, TMG-3)을 포함하는 2가지의 집단(소그룹, 대그룹)으로 나누어 졌다. 그리고 대그룹에서 형성된 집단 내에서 개체들 간에는 유연관계가 비슷하게 묶여졌다(Fig. 5). 또한 parsimony tree 분석에 의해 20가지의 tree가 제시되었고 bootstrap 결과로 작성한 consensus tree에서는 30~100%의 신뢰도를 나타내었다(Fig. 6, 7). Consensus tree 분석으로부터 제주도 저지대인 성산포 백리향(SS-1, SS-2)과 본토의 설악산 백리향(SR-1, SR-2)은 NJ tree에서와 마찬가지로 다른 개체들과는 다른 집단을 형성하였다. 그런데 성산의 백리향 개체들 간은 상당히 인접해 있으나 설악산 백리향 개체들 간에는 약간의 차

Table 4. The length and GC contents of cpDNA among 16 taxa of the genus *Thymus* and outgroup.

Taxa ^z	<i>trnL-trnF</i>		<i>psbA-trnH</i>	
	Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)
SS-1	292	38.01	321	23.36
SS-2	292	38.01	321	23.36
SU-1	293	38.23	321	23.99
SU-2	293	38.23	321	23.05
SU-3	293	38.23	321	22.74
1100-1	292	38.01	321	23.36
1100-2	292	38.36	321	24.30
1100-w	292	38.36	321	23.05
1700	292	38.36	323	23.22
SR-1	292	37.33	321	23.99
SR-2	292	37.33	321	25.86
TMU	292	39.04	321	26.48
TMG-1	292	38.01	321	24.61
TMG-2	292	38.01	321	23.36
TMG-3	292	38.01	321	23.68
Lam	293	37.88	229	26.64

^zSpecies abbreviations are given in Table 1.

Table 5. The length and GC contents of ITS 1, 5.8S, and ITS 2 regions of nrDNA from 16 taxa of the genus *Thymus* and outgroup.

Taxa ^z	Length (bp)				G+C (%)			
	ITS 1	5.8S	ITS 2	Total	ITS 1	5.8S	ITS 2	Total
SS-1	226	164	234	624	58.85	54.88	63.25	59.46
SS-2	226	164	235	625	58.41	54.27	63.40	59.20
SU-1	226	164	234	624	59.73	54.27	62.82	59.46
SU-2	226	164	234	624	60.18	54.27	63.25	59.78
SU-3	227	164	234	625	59.47	54.27	63.25	59.68
1100-1	226	164	235	625	59.73	54.27	63.40	59.68
1100-2	226	164	234	624	59.73	54.27	63.25	59.62
1100-w	226	164	234	624	59.73	54.27	63.25	59.62
1700	226	164	234	624	59.73	54.27	63.25	59.62
SR-1	226	164	234	624	59.73	54.27	62.82	59.46
SR-2	226	164	235	625	58.85	54.88	63.83	59.68
TMU	226	164	235	625	59.29	54.88	63.40	59.68
TMG-1	226	164	234	624	59.29	54.27	62.39	59.13
TMG-2	226	164	234	624	59.29	54.88	64.10	59.94
TMG-3	226	164	234	624	59.29	54.88	63.25	59.62
Lam	227	164	231	622	69.60	54.88	71.86	66.56

^zSpecies abbreviations are given in Table 1.

Table 6. Sequence divergences in the combined data set (cpDNA+nrDNA) of *Thymus* species and outgroup. Numbers below the diagonal are divergence values corrected for multiple substitutions using the two parameter model (Kimura, 1980). Identity values (%) are shown above the diagonal.

Taxon ^z	SS-1	SS-2	SU-1	SU-2	SU-3	1100-1	1100-2	1100-W
SS-1	-	99.19	97.61	98.03	98.03	98.36	97.95	98.03
SS-2	0.0081	-	97.61	98.03	98.03	98.36	97.95	98.03
SU-1	0.0239	0.0239	-	99.43	99.43	99.10	98.69	99.43
SU-2	0.0197	0.0197	0.0057	-	99.84	99.51	99.10	99.84
SU-3	0.0197	0.0197	0.0057	0.0016	-	99.51	99.10	99.84
1100-1	0.0164	0.0164	0.0090	0.0049	0.0049	-	99.43	99.51
1100-2	0.0205	0.0205	0.0131	0.0090	0.0090	0.0057	-	99.10
1100-W	0.0197	0.0197	0.0057	0.0016	0.0016	0.0049	0.0090	-
1700	0.0206	0.0206	0.0081	0.0041	0.0041	0.0074	0.0114	0.0041
SR-1	0.0131	0.0147	0.0256	0.0214	0.0214	0.0181	0.0214	0.0214
SR-2	0.0164	0.0197	0.0290	0.0247	0.0247	0.0230	0.0273	0.0247
TMU	0.0239	0.0272	0.0231	0.0189	0.0189	0.0172	0.0180	0.0189
TMG-1	0.0214	0.0231	0.0172	0.0131	0.0131	0.0114	0.0139	0.0131
TMG-2	0.0181	0.0197	0.0089	0.0049	0.0049	0.0081	0.0122	0.0049
TMG-3	0.0172	0.0189	0.0081	0.0041	0.0041	0.0073	0.0114	0.0041
Lam	0.2016	0.2099	0.2143	0.2070	0.2104	0.2067	0.2056	0.2094

^zSpecies abbreviations are given in Table 1.

Table 6. (Continued).

Taxon	1700	SR-1	SR-2	TMU	TMG-1	TMG-2	TMG-3	Lam
SS-1	97.94	98.69	98.36	97.61	97.86	98.19	98.28	79.84
SS-2	97.94	98.53	98.03	97.28	97.69	98.03	98.11	79.01
SU-1	99.19	97.44	97.10	97.69	98.28	99.11	99.19	78.57
SU-2	99.59	97.86	97.53	98.11	98.69	99.51	99.59	79.30
SU-3	99.59	97.86	97.53	98.11	98.69	99.51	99.59	78.96
1100-1	99.27	98.19	97.70	98.28	98.86	99.19	99.27	79.33
1100-2	98.86	97.86	97.27	98.20	98.61	98.78	98.86	79.44
1100-W	99.59	97.86	97.53	98.11	98.69	99.51	99.59	79.06
1700	-	97.77	97.44	98.03	98.61	99.43	99.51	78.58
SR-1	0.0223	-	98.20	97.19	97.52	97.86	97.94	79.33
SR-2	0.0256	0.0180	-	98.11	97.69	97.69	97.77	79.81
TMU	0.0197	0.0281	0.0189	-	98.28	98.28	98.36	79.06
TMG-1	0.0139	0.0248	0.0231	0.0172	-	98.86	98.94	79.06
TMG-2	0.0057	0.0214	0.0231	0.0172	0.0114	-	99.76	79.30
TMG-3	0.0049	0.0206	0.0223	0.0164	0.0106	0.0024	-	79.18
Lam	0.2142	0.2067	0.2019	0.2094	0.2094	0.2070	0.2082	-

이가 있었다. 또한 해발 1,100m의 백리향들(1100-1, 1100-2)은 같은 지역의 흰 백리향(1100-W)과는 다른 집단을 형성하고 있었다. 그리고 흰백리향(1100-W)은 오히려 해발 150m의 성읍 백리향들(SU-2, SU-3, SU-1)과 더 가깝게 인접해 있었다. 한편 해발 1,700m의 백리향은 성읍과 한라산의 해발 1,100m 지역에서 수집한 백리향과는 물론 섬백리향과도 가깝게 인접해 있는 것으로 나타났다. 또한 섬백리향 개체 간에도 상당히 밀접하게 인접해 있는 결과를 얻었다(Fig 7).

백리향속 식물에서 엽록체 DNA의 *trnL-trnF*와 *psbA-trnH* 부위를 PCR로 증폭하여 SSCP에 대한 분석결과를 Figure 8에 나타내었다. *trnL-trnF*부위에서는 개체간에 약간의 차이를 볼 수 있으나 변이 유무를 단정 지을 수 있는 정도는 아니었다(Fig. 8A). 그런데 *psbA-trnH* 부위에서는 설악산에 자생하는 백리향(SR-2)에서 다른 개체와는 상이한 밴드 양상을 관찰할 수 있었다. 또한 울릉도에서 수집된 섬백리향(TMG-1, TMG-2, TMG-3)에서도 약간의 차이를 볼 수 있었다(Fig. 8B).



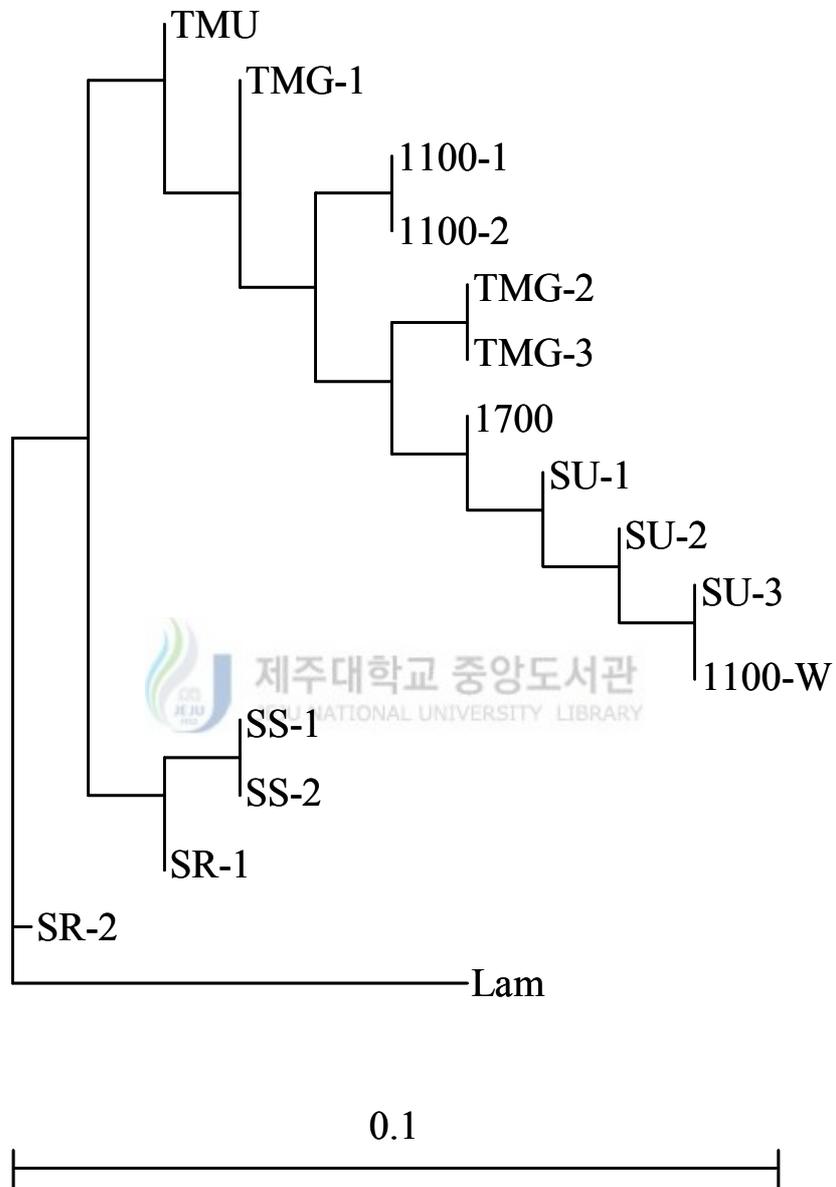


Figure 5. Neighbor-joining dendrogram based on the combined sequences data set (cpDNA+nrDNA) among 16 taxa. Lam (*Lamium amplexicaule*) was used as the outgroup taxon. Species abbreviations are shown in Table 1.

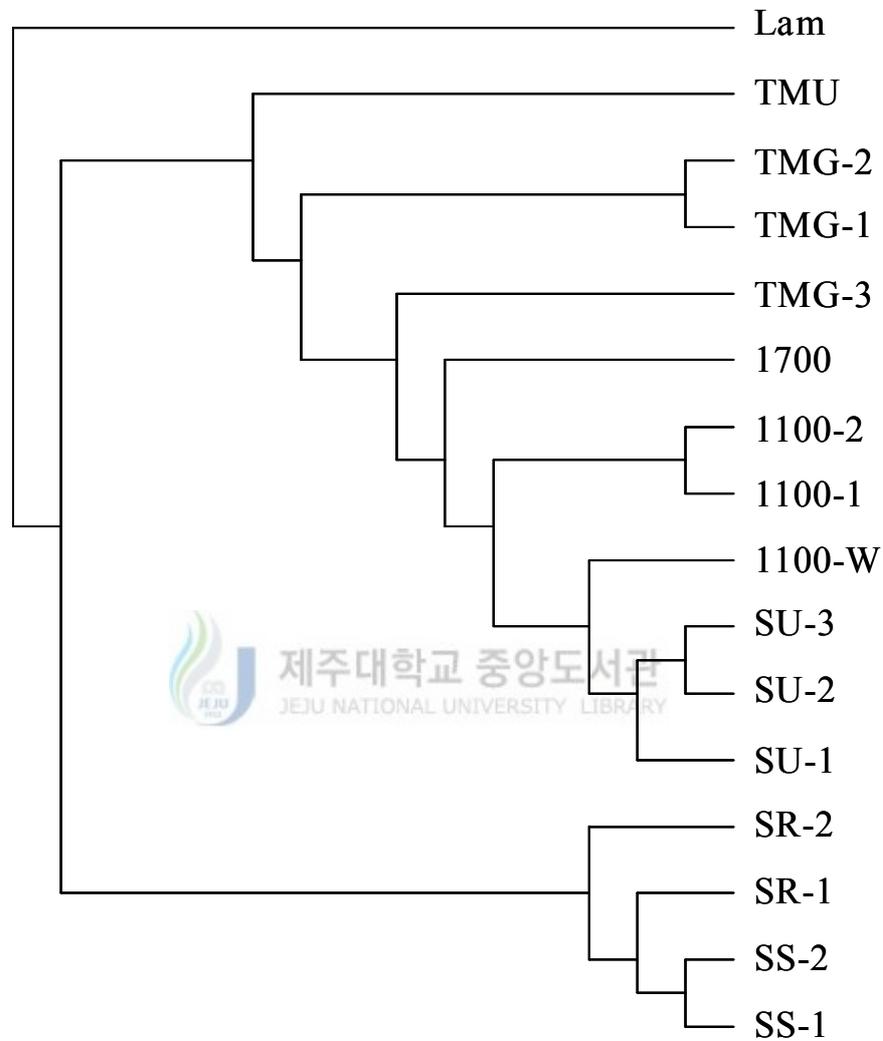


Figure 6. One of the 20 most parsimony trees based on the combined sequences data set (cpDNA+nrDNA) among 16 taxa. The tree was generated through a heuristic search with DNAPARS program in PHYLIP package. Lam (*Lamium amplexicaule*) was used as the outgroup taxon. Complete taxon names are given in Table 1.

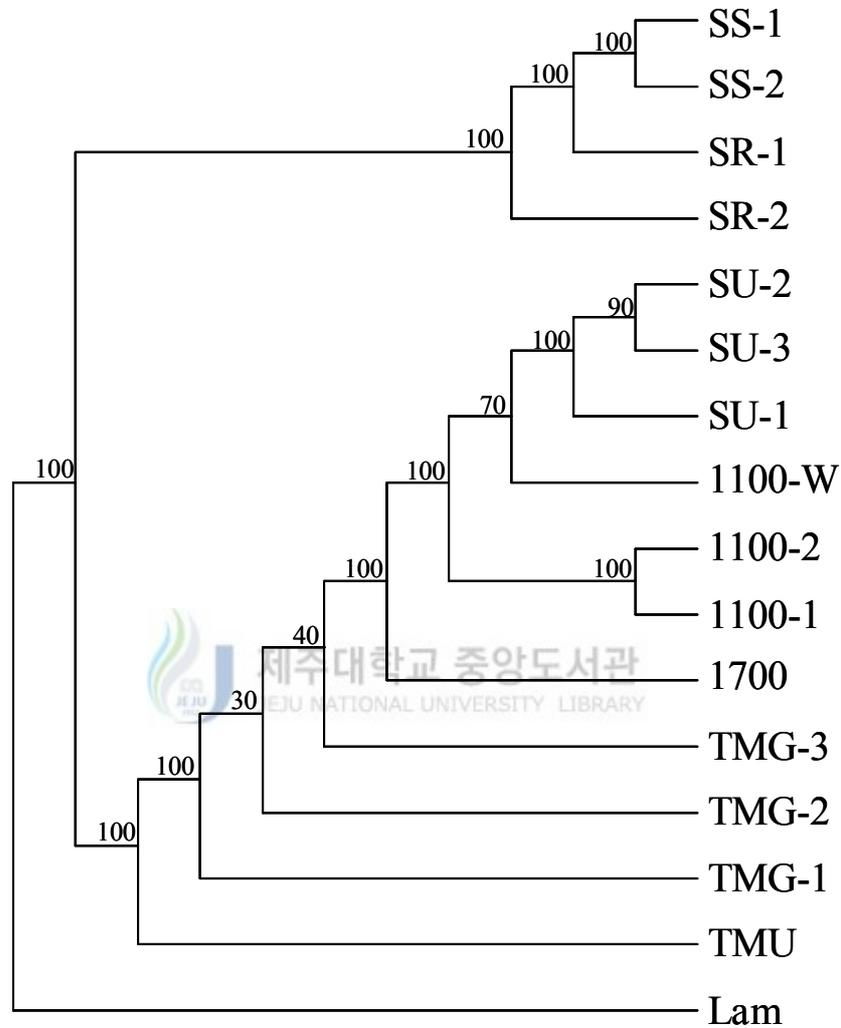


Figure 7. A strict consensus tree derived from the 20 equally most parsimonious trees based on the combined sequences data set (cpDNA+nrDNA) among 16 taxa. Bootstrap values (100 replicates) are shown on the consensus tree above the nodes. Lam (*Lamium amplexicaule*) was used as the outgroup taxon. Complete taxon names are provided in Table 1.



Figure 8. PCR-SSCP band patterns of the amplified cpDNA *trnL-trnF* (A) and *psbA-trnH* (B) intergenic spacer regions among *Thymus* spp.. Lane 1 to 15 are SS-1, SS-2, SU-1, SU-2, SU-3, 1100-1, 1100-2, 1100-W, 1700, SR-1, SR-2, TMU, TMG-1, TMG-2, and TMG-3, respectively.

IV. 고 찰

본 연구는 우리나라 백리향속 식물의 유전적 변이 분석과 계통유전학적 유연관계를 밝히기 위해 수직분포가 뚜렷하고 특수한 입지조건을 갖추고 있는 한라산에 자생하는 백리향을 중심으로, 울릉도 및 한반도 본토의 백리향과 섬백리향을 대상으로 엽록체 DNA의 *psbA-trnH*와 *trnL-trnF* intergenic spacer 부위, 그리고 핵 리보솜 DNA의 ITS영역의 염기서열을 비교하였고, SSCP 경향을 비교·분석하였다.

엽록체 DNA의 *trnL-trnF* intergenic spacer 부위의 크기는 개체간 길이의 변이를 보이면서 각각 292~293 bp를 나타내었다. 이들 백리향속 식물들에 있어 *trnL-trnF* 부위의 크기는 기존에 보고된 *Betula pubescens* (124 bp), *Quercus rubra* (168 bp) 및 *Puccinellia distans* (246 bp) 식물들의 염기서열보다 현저하게 큰 것으로 확인되었으며, *Goodyera velutina* (395 bp), *Actinidia arguta* (360 bp) 보다는 크기가 작게 나타났다(Baker 등, 1999; Gielly와 Taberlet, 1994; Jung 등, 2003a, 2003c). 그러나 Gielly와 Taberlet (1994)에 의해 보고된 *Hordeum*속 식물의 *trnL-trnF* 부위의 크기(279~296 bp)와는 유사한 경향을 보였다. 특히, 성읍지역에 자생하는 백리향(SU-1, SU-2 및 SU-3) 분류군이 다른 지역에서 채집된 백리향과 섬백리향에 비해 1 bp가 더 큰 것으로 관찰되어, 실험에 사용한 분류군 중에 유일하게 종내 길이변이를 나타내었다. *psbA-trnH* intergenic spacer 부위의 크기는 한라산 1,700m에서 채집한 개체(1700)에서만 323 bp의 크기를 나타낸 반면, 실험에 이용한 모든 분류군에서 321 bp의 크기를 나타내었다. *psbA-trnH* intergenic spacer 부위의 염기서열들은 *trnL-trnF* intergenic spacer의 염기서열에서 관찰된 특징과는 다소 차이를 보였다. 이들 엽록체 DNA의 *trnL-trnF*와 *psbA-trnH* intergenic spacer의 염기서열 비교에서도 섬백리향과 백리향 간의 중간 뚜렷한 차이점이 관찰되지 않았다.

trnL-trnF 부위의 G+C 함량은 개체간 37.33~39.04%의 차이를 보였고, *psbA-trnH* 부위는 개체간 22.74~26.64%의 차이를 나타냈다. 한편 울릉도에서 채집한 섬백리향(TMU)은 다른 개체들 보다 G+C 함량이 높게 나타났으며,

*trnL-trnF*는 0.68~1.71%, *psbA-trnH*는 0.68~2.07% 정도 높았다. 그러나 경상북도 농업기술원에서 분양받은 섬백리향 개체(TMG-1, TMG-2 및 TMG-3)들은 다른 지역에서 수집된 개체들과 차이점이 발견되지 않아 종에 따른 G+C 함량의 차이는 없는 것으로 판단되었다.

핵 리보솜 DNA의 ITS 영역에서는 각각 ITS 1이 226~227 bp, ITS 2가 234~235 bp의 크기로 약간의 변이가 나타남을 확인할 수 있었다. 이들 부위의 크기는 다른 현화식물에서 기존에 보고된 ITS 1 (186~298 bp)과 ITS 2 (187~252 bp)의 범위에 속하였다(Baldwin, 1992; Baldwin 등, 1995; Downie과 Katz-Downie, 1996; Hamby와 Zimmer, 1992; Jobst 등, 1998; Jung, 2001; Kim과 Jansen, 1994; Suh 등, 1996). 두 영역간 염기서열의 크기 비교에서는 ITS 2가 ITS 1보다 전체 염기서열에 8~9 bp 더 크게 존재함을 확인하였는데, 이러한 결과는 *Cucumis melo* (Kavanagh와 Timmis, 1988), *Oryza sativa* (Takaiwa 등, 1985), *Daucus carota* (Yokota 등, 1989), *Vigna radiata* (Schiebel과 Hemleben, 1989) 등에서 보고된 선행연구 결과들과 유사하였다. 그러나 두 영역간 염기서열의 크기가 동일하거나 1 bp 정도의 차이를 보이는 *Nicotiana rustica* (Venkateswarlu과 Nazar, 1991), *Lycopersicon esculentum* (Kiss 등, 1988) 및 *Hordeum vulgare* (Chatterton 등, 1992b) 등의 식물에서와 ITS 1의 길이가 상대적으로 ITS 2 부위 염기서열의 길이보다 큰 *Populus deltoides* (D'Ovidio, 1992), *Sinapis alba* (Rathgeber과 Capesius, 1989), *Avena sativa* (Chatterton, 1992a) 및 *Vicia faba* (Yokota 등, 1989) 등의 식물에서의 결과와는 상반되었다.

또한, 암호영역인 5.8S rRNA도 기존에 연구된 벗나무속 및 단풍나무속 식물에서의 결과와 동일한 164 bp로 나타났다(Jung, 2001; Suh 등, 1996). G+C값을 보면 ITS 1 (58.41~60.18%), 5.8S (54.27~54.88%), ITS 2 (62.39~64.10%)로 나타났는데, 이런 결과들은 단풍나무속(Suh 등, 1996)에서 보고된 ITS 1 (62.4~64.0%), 5.8S (55.4%) ITS 2 (60.9~62.3%)의 결과와 벗나무속(Jung, 2001)의 ITS 1 (58.1~65.3%), 5.8S (54.9%), ITS 2 (62.0~68.3%)의 결과와 비슷하였으며 대부분의 속씨식물에서 보고된 범위(Baldwin 등, 1995)에 속하였다. 또한 ITS 1과 ITS 2간의 G+C 함량 비교에서는 ITS 2가 ITS 1보다 더 높게 나타났는데, 이는 기존에 Torres 등(1990)이 보고한 바와 같았다. 그러나 전

체 ITS에서 G+C 함량의 평균값은 개체 간에 0.26~0.81%로 별다른 차이를 보여주지 않고 있어 종간이나 개체 간에 뚜렷한 차이점을 찾을 수가 없었다.

한편 계통간의 유연관계 분석을 위하여 실험에 이용한 모든 유전자의 염기서열을 조합하여 유전적 거리지수 및 계통수를 작성한 결과 울릉도의 섬백리향(TMU)과 설악산 백리향(SR-1)이 가장 높은 거리지수를 나타내어 두 분류군간의 유연관계가 가장 낮게 나타났다. TMG-3·SU-2, TMG-3·SU-3와 TMG-3·1100-W는 가장 거리지수가 낮게 나타나 계통유전학적 유연관계가 타 분류군에 비해 상대적으로 높게 나타났다. 전체적으로, 한라산 해발 150m 이상에서 서식하고 있는 백리향은 설악산에서 자생하는 백리향보다 울릉도에서 자생하는 섬백리향과 유연관계가 높게 나타났으나 성산의 해안지역에 자생하는 백리향은 본토인 설악산 백리향과 유연관계가 매우 높게 나타났다(Fig. 5, 6, 7).

한편 Shin과 Choi(1997)의 한국산 백리향속 식물들의 형태학적인 분류에서는 잎의 길이가 짧고 폭이 좁으며 주로 제주도에 분포하는 제주도형, 잎의 폭이 넓고, 상악 중앙 열편에 달리는 연모의 길이가 짧고 울릉도에 분포하는 울릉도형, 그리고 상악 열편들의 길이가 길고 한반도에 흔히 분포하는 한반도형 등 크게 세 집단으로 구분한 바 있다. 또한 제주도형은 본토 백리향의 한 변종일 가능성을 제시하였다. 그런데 엽록체 DNA의 *trnL-trnF*와 *psbA-trnH*의 intergenic spacer 부위와 핵 리보솜 전체 ITS 영역의 염기서열을 바탕으로 종합 분석한 결과 제주도형, 한반도형, 울릉도형이라고 제시할 수 있는 각 집단간의 뚜렷한 구별 점은 발견되지 않았다. 그러나, 본 연구에서는 제주도에 자생하는 백리향 중 해안 저지대에 자생하는 성산의 백리향의 경우 본토인 설악산의 백리향과 분류군을 형성하고, 해발 150m 이상에서 서식하는 백리향의 경우는 울릉도 섬백리향과 가까운 분류군을 형성하고 있었다. 이는 제주도에 자생하는 백리향 식물 전체를 본토형에 가깝다거나 이들의 변종이라고 보고한 신과 최(1997)의 보고와는 차이가 있었다. 그러므로 제주도형으로서의 별도 분류군으로 분류가 필요한 지에 대한 보다 많은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

엽록체 DNA의 *trnL-trnF*와 *psbA-trnH*의 intergenic spacer 부위에서의 SSCP

분석 결과에서 *trnL-trnF* 부위에서는 종내와 종간에 약간의 차이를 보이고 있지만 유전적 변이라고 단정 할 수는 없었다. 그러나 *trnL-trnF* 부위에서의 결과와는 달리 *psbA-trnH* 부위에서는 개체간 특이한 밴드가 SR-2 개체에서 관찰되었다(Fig. 8A, B). 이러한 *psbA-trnH* 부위에서의 SSCP 분석 결과는 NJ tree에서 나타난 결과와 일치하였다. 그러나, 이러한 결과들과 더불어 유전적 변이를 가진 개체인지를 구명하는 더 깊은 연구가 필요하다고 생각된다.

식물은 저온이나 고온, 염분, 건조 등 환경요인의 계절적 변화에 따라 여러 가지 생리적 변화를 거치면서 성장한다. 하지만, 예기치 못한 환경요인의 변화는 식물체에 손상을 가하고, 경우에 따라서는 치사를 유발하기도 한다. 이러한 환경요인의 변화는 유전자 조성의 변이를 일으키는 선발압의 요인으로 작용한다(Dormling, 1982; Yadav 등, 1997). 그러나 Jackson과 Hay (1994)와 김 (1994)의 연구에서와 같이 동일종 또는 동일품종이라 하더라도 재배 환경의 영향으로 성분 특성이 달라지기 때문에 생리학적, 형태 해부학적 분류가 모호해질 수 있다. 그러므로 자생식물의 유전자원을 효율적으로 보존하고 활용하기 위해서는 DNA 비교 분석을 통한 보다 정확한 평가가 필요하다.

따라서 본 연구에서는 백리향속 식물에 대한 염기서열 분석을 통한 계통유전학적 유연관계를 보다 정확하게 평가하고자 수행하였다. 본 연구결과 형태학적 분석법에 의한 선행 연구결과와는 다소 차이를 나타내었다. 이는 식물의 분류를 형태학적인 면에 초점이 맞춰 이루어진 단·다변량분석에서 이용된 식물의 표현형(잎이나 꽃받침 등의 형질)이 여러 환경 요인에 의해 변할 수 있다는 것을 고려한다면 세포 내·외의 환경의 영향을 적게 받는 객관적인 위치에 있는 DNA 분석이 많은 자료를 제공할 수 있다고 본다. 그러므로 종 분류 및 종간·개체간 계통유전학적 유연관계를 더욱 명확하게 구분하기 위해서는 한반도에 자생하는 여러 분류군의 백리향속 식물에 대한 특정 유전자의 제한효소 인지부위의 비교, DNA 지문분석 등의 연구가 필요함을 알 수 있었다.

V. 적 요

한국에 자생하는 백리향속(*Thymus*) 식물의 유전적 변이와 계통유전학적 유연관계 분석을 위하여 국내에서 수집된 15 분류군에 대하여 엽록체 및 핵 리보솜 DNA의 염기서열 분석과 single stranded conformation polymorphism (SSCP) 분석을 실시하였다. 엽록체 DNA의 *trnL-trnF*는 292~293 base pairs (bp), *psbA-trnH*는 321~323 bp였으며, nrDNA의 전체 ITS는 624~625 bp의 크기로 관찰되었다. 백리향속 식물의 G+C 함량은 *trnL-trnF* 부위에서는 개체간 37.33~39.04%, *psbA-trnH* 부위는 22.74~26.64%, 그리고 ITS 부위에서는 59.13~59.94%였다. 이들 부위의 유전자 염기서열을 분석하여 유전적 거리지수 및 계통수를 작성한 결과 백리향속 식물간에는 울릉도의 섬백리향(TMU)과 설악산에 자생하고 있는 백리향(SR-1)이 가장 높은 거리지수(0.0281)를 나타내어 두 분류군간의 유연관계가 가장 낮게 나타났다. 반면, 울릉도의 백리향 중 TMG-3은 성읍에서 채집된 백리향(SU-2와 SU-3) 및 1100-W와 가장 거리지수가 낮게 나타나 계통유전학적 유연관계가 타 분류군에 비해 상대적으로 높게 나타났다. 결과적으로 백리향과 섬백리향을 구별할 수 있는 종간의 뚜렷한 차이점은 발견되지 않았으나, 제주의 해안 저지대에 자생하는 백리향의 경우 본토인 설악산 백리향과 가까운 분류군을 형성하고, 해발 150m 이상에 서식하는 백리향의 경우는 울릉도 섬백리향과 가까운 분류군을 형성하고 있었다.

주요어: 유전적 변이, ITS, 계통유전학적 유연관계, *psbA-trnH* intergenic spacer, 백리향, *trnL-trnF* spacer

VI. 인용문헌

- Baker, W.J., C.B. Asmussen, S.C. Barrow, J. Dransfield, and T.A. Hedderson. 1999. A phylogeny study on the palm family (Palmae) based on chloroplast DNA sequences from the *trnL-trnF* region. *Pl. Syst. Evol.* 219: 111~126.
- Baldwin, B.G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. *Mol. Phy. Evol.* 1: 3~16.
- Baldwin, B.G., M.J. Sanderson, J.M. Porter, M.F. Wojcichowski, C.S. Campbell, and M.J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence of angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82: 247~277.
- Brown, D. 1995. *Encyclopedia of herbs & their uses*. Dorling Kindersley, New York. pp. 212~213, 362~363.
- Chatterton, N.J., C. Hsiao, K.H. Asay, K.B. Jensen, and R.R.-C. Wang. 1992a. Nucleotide sequence of the internal transcribed spacer region of rDNA in the primitive oat species, *Avena longiglumis* Durieu (Gramineae). *Plant Mol. Biol.* 20: 163~164.
- Chatterton, N.J., C. Hsiao, K.H. Asay, K.B. Jensen, and R.R.-C. Wang. 1992b. Nucleotide sequence of the internal transcribed spacer region of rDNA in barley, *Horidium vulgare* L. (Gramineae). *Plant Mol. Biol.* 20: 165~166.

- 정태현. 1958. 한국식물도감 목본. 신지사, 서울.
- Crawford, D.J. 1991. Plant molecular systematics: Macromolecular approaches. John Wiley and Sons, New York.
- Crutis, S.E. and M.T. Clegg. 1984. Molecular evolution of chloroplast DNA sequences. Mol. Biol. Evol. 1: 291~301.
- Curtis, S. 1996. Essential oil. Aurum, UK. pp. 120~121.
- D'Ovidio, R. 1992. Nucleotide sequence of a 5.8S rDNA gene and of the internal transcribed spacers from *Populus deltoides*. Plant Mol. Biol. 19: 1069~1072.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1: 19~21.
- Dormling, I. 1982. Frost resistance during bud flushing and shoot elongation in *Picea abies*. Silva Fennica 16: 167~177.
- Downie, S.R. and D.S. Katz-Downie. 1996. A molecular phylogeny of Apiaceae subfamily Apiodeae: Evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. Amer. J. Bot. 83: 234~251.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), ver. 3.5. Computer program distributed by the author, University of Washington, Seattle.
- Gielly, L. and P. Taberlet. 1994. Chloroplast DNA polymorphism at the intragenetic level: implications for the establishment of plant phylogenies. C. R.

Acad. Sci. Life Sci. 317: 685~692.

Guenther, E. 1949. The essential oils. D. Van Nostrand company, New Jersey.
3: 745~757.

Hamby, R.K. and E.A. Zimmer. 1992. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. In "Molecular systematics of plants" (eds., P.S. Soltis, D.E. Soltis, and J.J. Doyle,). Chapman and Hall, London, UK, pp.50~91.

Higgins, D.G., A.J. Bleasby, and R. Fuchs. 1992. Clustal V: Improved softword for multiful sequence alignment. Computer Applic. Biosci. 8: 189~191.

Jackson, S.A.L. and R.K.M. Hay. 1994. Characteristics of varieties of thyme (*Thymus vulgaris* L.) for use in the UK: Oil content, composition and related characters. J. Hort. Sci. 69: 275~281.

Jobst, J., K. King, and V. Hemleben. 1998. Molecular evolution of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and phylogenetic relationships among species of the family Cucurbitaceae. Mol. Phyl. Evol. 9: 204~219.

Jun, J.H., S.B. Jeong, and K.H. Chung. 2002. Selection of species-specific RAPD markers and genetic relationships among *Prunus* taxa. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 43: 517~522.

Jung, Y.H. 2001. Molecular phylogeny of the genus *Prunus* in Korea and Japan inferred from nuclear ribosomal and chloroplast DNA sequence. Ph.D. dissertation, Cheju National University, Korea.

- Jung, Y.H., K.H. Kim, S.H. Kang, S.J. Jun, M.Y. Oh., and S.C. Kim. 2003a. Phylogenetic analysis of the genus *Actinidia* in Korea inferred from two non-coding chloroplast DNA sequences. *Kor. J. Genetics* 24: 95~101.
- Jung, Y.H., S.C. Kim, M. Kim, K.H. Kim, H.M. Kwon, and M.Y. Oh. 2003b. Chloroplast inheritance patterns in *Actinidia* Hybrids determined by single stranded conformation polymorphism analysis. *Mol. Cells* 15: 277~282.
- Jung, Y.H., S.H. Han, and M.Y. Oh. 2002. Phylogenetic analysis of Korean *Prunus* (Rosaceae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Kor. J. Genetics* 24: 247~258.
- Jung, Y.H., Y.U. Jung, and M.Y. Oh. 2003c. Genetic variation in *Goodyera velutina* (Orchidaceae) on Jeju Island, Korea, as determined by single stranded conformation polymorphism analysis. *Genes & Genet. Syst.* (in reviewed).
- Kavanagh, T.A. and J.N. Timmi. 1988. Structure of melon rDNA and nucleotide sequence of the 17S-25S spacer region. *Theor. Appl. Genet.* 76: 673~680.
- Kim, K.-J. and R.K. Jansen. 1994. Comparisons of phylogenetic hypotheses among different data sets in dwarf dandelions (*Krigia*, Asteraceae): additional information from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Pl. Syst. Evol.* 190: 157~185.
- 김성철, 정용환, 김미선, 김천환, 고석찬, 강상헌. 2003. RAPD를 이용한 다래 나무속 식물의 유연 관계 분석. *한국원예학회지.* 44: 340~344.

- 김영희, 이종철, 최영현. 1994. 百里香과 섬百里香의 精油成分 組成. 한국약용작물학회지. 2: 234~240.
- 김예희, 이문정, 박권우. 1999. 배지의 종류와 배양액농도가 백리향(*Thymus vulgaris* L.)의 생육에 미치는 영향. 생물환경조절학회지. 8: 90~98.
- 김예희, 이문정, 박권우. 2000. 수경재배시 배양액 내 이온농도에 따른 두 종의 백리향 생육 및 정유 성분 비교. 생물환경조절학회지. 9: 79~84.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparable studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16: 111~120.
- Kiss, T., K. Mihaly, A. Steffen, and F. Solymosy. 1988. Nucleotide sequence of the 17S-25S spacer region from tomato rDNA. Nucl. Acids Res. 16: 71~79.
- Lawrence, B.M. 1984. A review of the world production of essential oils. Perfumer & Flavorist, 10: 1~16.
- 이창복. 1980. 대한식물도감. 향문사, 서울, p.658.
- Letchamo, W. and A. Gosselin. 1995. Root and shoot growth and chlorophyll content of *Taraxacum officinale* provenances as affected by defoliation and debudding under organic and hydroponic cultivation. J. Hort. Sci. 70: 279~285.
- Leung, A.Y. and S. Foster. 1996. Encyclopaedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics, John Wiley & Sons, New York.

p.492.

Linnaeus, C. 1753. *Species Plantarum*. Stockholm.

Mabberley, D.J. 1990. *The plant book*. Cambridge University Press, Cambridge.

Ody, P. 1993. *The complete medicinal herbal*. Dorling Kindersley, New York.
p.104.

Ohwi, J. 1984. *Flora of Japan*. Smithsonian Institute, Washington DC.

Orita, M., Y. Suzuki, T. Sekiya, and K. Hayashi. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874~879.

Palmer, J.D., R.K. Jansen, H.J. Michaels, M.K. Chase, and J.R. Manhart. 1988. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Ann. Mo. Bot. Garden* 75: 1180~1206.

Rathgeber, J. and I. Capesius. 1989. Nucleotide sequence of the 18S-25S spacer region from mustard DNA. *Nucl. Acids Res.* 17: 7522.

Rogers, S.O. and A.J. Bendich. 1987. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Mol. Biol.* 9: 509~520.

Sang, T., D.J. Crawford, and T.F. Stuessy. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Amer. J. Bot.* 84: 1120~1136.

- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 5463~5467.
- Sato, Y. and T. Nishio. 2002. Efficient detection of DNA polymorphism in cabbage and rice cultivars by PCR-RF-SSCP (PRS). Plant Cell Rep. 21: 276~281.
- Schiebel, K. and V. Hemleben. 1989. Spacer region from rDNA of mung bean. Nucl. Acids Res. 17: 2852.
- 신현철, 최홍근. 1997. 백리향속 식물의 수리분류학적 접근. 한국식물분류학회지. 27: 117~135.
- Suh, Y.B., H.J. Cho, S.T. Kim, and C.W. Park. 1996. Comparative analysis of ITS sequences from *Acer* species (Aceraceae) in Korea. J. plant Biol. 39: 1~8.
- Sunnucks, P., A.C.C. Wilson, L.B. Beheregaray, and K. Zenger. 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. Mol. Ecol. 9: 1699~1710.
- Takaiwa, F., K. Oono, and M. Sugiura. 1985. Nucleotide sequence of the 17S-25S spacer region from mice rDNA. Plant Mol. Biol. 4: 355~364.
- Torres, R.A., M. Ganal, and V. Hemleben. 1990. GC balance in the internal transcribed spacer ITS1 and ITS2 nuclear ribosomal DNA. J. Mol. Evol. 30: 170~181.

- Venkateswarlu, K. and R. Nazar. 1991. A conserved core structure in the 18S-25S rRNA intergenic region from tobacco, *Nicotiana rustica*. Plant Mol. Biol. 17:189~194.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. IN "PCR product: A guide to methods and applications" (eds., M. Innis, S. Gelfand, J. Sninsky, and T. White). Academic Press, San Diego, pp.315~322.
- Yadav, R.R., A. Bhattacharyya, and W.K. Park. 1997. Climate and growth relationship in blue pine (*Pinus wallichiana*) from the Western Himalaya, India. Korean J. Ecol. 20: 95~102.
- Yokota, Y., T. Kawata, Y. Iida, A. Kata, and S. Tanifuji. 1989. Nucleotide sequence of the 5.8S rRNA gene and internal transcribed spacer region in carrot and broad bean ribosomal DNA. J. Mol. Evol. 29: 294~301.

감사의 글

지난 2년이란 시간은 저에게는 너무나 짧기만 했습니다. 저를 이 자리에 당당히 설 수 있게 도와주신 모든 분께 감사드립니다.

부족한 저에게 학문의 길을 열어주셨으며 본 실험을 하나의 논문으로 완성하기까지 저를 이 자리까지 이끌어주신 송관정 교수님, 그리고 바쁘신 와중에서도 세심한 조언을 아끼지 않으신 문두길 교수님, 강훈 교수님께 마음 깊이 감사드립니다. 그리고 학부 때부터 지금까지 저에게 많은 가르침을 주신 장전의 교수님, 소인섭 교수님, 지금은 먼 타국에서 연구 중이신 박용봉 교수님께도 감사드립니다.

연구를 편히 할 수 있도록 배려해주신 제주농업시험장 강상헌 장장님, 원예작물과 권혁모 과장님을 비롯한 전직원 여러분께 감사드립니다.

본 실험의 설계에서부터 세심하게 논문 지도와 더불어 실험을 편히 할 수 있도록 아낌없는 많은 도움을 주신 제주농업시험장 식물분자육종실험실의 김성철 박사님, 분자생물학의 길을 열어 주셨으며 저에게 언제나 많은 가르침과 격려를 해주신 정용환 박사님, 저에게 커다란 힘이 되어주신 두 분께 마음 깊이 감사드립니다. 그리고 샘플 채집에 관하여 많은 도움을 주신 제주대 생물학과 송관필 선생님, 경상북도 농업기술원 이현숙 박사님께도 감사드립니다.

많은 조언과 격려를 해주신 여러 선배님 후배님들; 학부때 처음 접했던 제주대 감귤생리생태실험실의 시현오빠, 치원오빠, 석범오빠, 과수육종실의 진웅오빠, 효민, 동기인 보경, 조직배양실의 윤숙언니, 찬규오빠, 윤희, 그리고 안희언니, 민욱, 시종오빠, 농화학과의 성범오빠, 대운오빠, 지만오빠 모두 고맙습니다.

뭐 그리 바쁘냐고 애정어린 핀잔을 주던 나의 친구들 명이, 미라, 경미, 연실, 태경, 고맙다. 항상 조언과 격려로 답해준 든든한 친구 진영에게도 감사한다. 그리고 학위과정 동안 많은 어려움과 방황에 지친 저를 항상 따뜻하게 감싸준 동조오빠 고맙습니다.

사랑하는 조카 종현, 지현 그리고 열심히 응원해준 형부, 큰언니, 작은언니, 오빠 고맙습니다. 늦은 밤 아직까지도 당신에게 어리기만 한 막내딸이 들어올 때까지 텔레비전을 틀어놓고 마음 편히 주무시지 못하신 사랑하는 나의 엄마, 아빠께 이 지면으로나마 그동안 못 드렸던 감사의 말씀을 전합니다.