

제주도 황근(*Hibiscus hamabo*) 집단들의 유전적 다양성

김영동* · 김기중¹ · 김성희 · 김형태¹

한림대학교 생명과학과 · 고려대학교 생명공학원¹

제주도에 자생하는 희귀식물종인 황근(아욱과) 3개 집단을 대상으로 ITS 염기서열 변이와 ISSR 변이를 분석하는 방법으로 유전적 다양성을 조사하였다. 집단 1(북제주군 하도리 집단)에 포함된 18개체의 ITS 염기서열을 분석한 결과 총 14개 지점(다형 뉴클레오티드까지 포함하면 17개 지점)에서 뉴클레오티드 변이가 관측되었으며, 각 개체들은 최소 1개에서 최대 13개 뉴클레오티드 지점에서 염기서열의 차이를 보였다. 그러나 집단 2(남제주군 오조리 집단) 17개체와 집단 3(남제주군 새화리 집단) 17개체의 ITS 염기서열은 모두 동일한 것으로 확인되었다. ISSR 변이분석 방법에 의해 생산된 자료를 분석한 결과 역시, 집단 1이 집단 2와 3에 비해 상대적으로 더 높은 유전적 다양성 지표들을 나타내었다. 이와 같은 결과는 집단 2와 3의 형성 과정에서 극심한 유전적 부동이 존재했었으며, 이후 인접 집단으로부터 이들 집단으로의 유전자 유입이 매우 제한적이었던 반면, 집단 1은 오랫동안 개체군이 안정적으로 유지되어왔기 때문으로 해석되었다. 우리나라에 자생하는 황근을 보존하기 위해서는 유전적 다양성이 월등히 더 높은 하도리 집단을 우선적으로 보존하는 것이 매우 중요하며, 만일 현지의 보존이 필요할 경우 하도리 집단에 포함된 개체를 집중적으로 활용하는 것이 더 효율적일 것으로 판단된다.

주요어 : 자생 집단 보존, 황근, 희귀식물, ITS, ISSR

황근(*Hibiscus hamabo* Siebold & Zucc.)은 아욱과의 낙엽성 관목으로 우리나라와 일본 남부 및 중국 남부 해안가에 제한적으로 분포하는 것으로 알려져 있다(Ohwi 1984). 우리나라에는 완도-소안도에 1개 집단이, 제주도 남동해안을 따라 8개 집단이 분포하는 것으로 보고되었다(Ahn *et al.*, 2003; Ahn, 2003). 황근은 2002년 자연환경보전법 시행령에 의해 보호 야생식물 52종 가운데 하나로 지정된 희귀식물로서 국내 자생집단에 대한 적절한 보존대책을 필요로 하는 식물이다. 현재까지 황근에 대해서는 Ahn (2003) 및 Ahn *et al.* (2003)에 의해 분포와 자생지 생태적 특성 연구가 이루어진 바 있으나, 종 및 집단 보존을 위한 유전적 다양성에 대한 연구는 아직까지 이루어진 바가 없다.

*교신저자 : 전화 033-248-2095, 전송 033-256-3420, ydkim@hallym.ac.kr

생물집단의 유전적 다양성에 대한 연구는 유전자 유입 등 생물종 진화 요인에 대한 이해의 폭을 넓혀준다는 점에서 중요한 의의가 있다(Avise, 1994). 특히, 희귀종 또는 멸종위기 생물종 집단의 유전적 다양성 분석 자료는 개체수 감소의 원인을 파악하고, 어느 집단 및 개체를 우선적으로 보존하여야 하는지를 결정하는데 필수불가결한 자료이다(Milligan *et al.*, 1994; Hamrick and Godt, 1996). 집단유전학적 연구는 동위효소를 이용하는 것이 일반적이지만, 최근에는 DNA를 이용하는 경우가 많아지고 있다. DNA를 이용한 집단 및 개체들 간의 유전적 다양성 연구에는 여러 분석기법 즉, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ISSR-PCR (Inter-Simple Sequence Repeat Polymerase Chain Reaction), SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism), 고변이 유전자의 염기서열 분석 등이 있다. 이 가운데 ISSR-PCR 기법은 자료 산출의 재현성과 실험과정 및 자료분석 등에 있어서 상대적으로 용이한 것이 장점이어서 최근 멸종위기 식물집단의 유전적 다양성을 연구하는데 자주 사용되고 있다(Camacho and Liston, 2001; Xiao *et al.*, 2004; Ge *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2006). 한편, 염기서열 분석기법의 경우, 핵 리보솜 DNA의 ITS 지역 염기서열 자료가 집단간 및 개체간 변이를 연구하는데 이용되기도 하였다(Jousson *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2005). 본 연구에서는 황근을 대상으로 ISSR 자료와 핵 리보솜 DNA의 ITS 지역 염기서열 자료를 이용하여 제주도 3개 황근집단의 유전적 다양성을 평가하고자 하였다.

재 료 및 방 법

1. 재료 채집

우리나라에서 황근은 제주도에 8개 집단, 완도군의 소안도 1개 집단이 있는 것으로 알려져 있는데 완도 소안도 집단은 본 연구기간 중 확인할 수 없었고, 제주도에서는 6개 집단을 확인하였다. 확인된 6개 집단중 개체군의 크기와 자연성을 고려하여 북제주군 하도리 집단(Population 1), 남제주군 오조리(Population 2) 및 세화리 집단(Population 3, Fig. 1) 등 3개 집단만을 본 연구에 포함시켰다. 하도리 집단과 오조리 집단은 약 8km, 오조리 집단과 세화리 집단은 약 20km, 그리고 하도리 집단과 세화리 집단은 약 26km가량 떨어져 있다. 각 집단 내에서 17~18개체를 채집하였으며, 채집된 각 개체간의 거리는 대략 5m 이상이 되도록 하였다. 각 집단의 위치와 집단별로 채집된 개체수는 Table 1과 같다.

2. ITS 염기서열 변이분석

(1) DNA 추출

황근의 DNA는 채취된 연한 잎 5g을 액체질소로 갈아 CTAB 방법(Doyle and Doyle, 1987)



Fig. 1. The native population of *Hibiscus hamabo* Siebold & Zucc. in Sehvari (population -3), Namjeju-gun, Jeju-do, Korea (upper left) with the largest individuals (4 m in height and 8 m in width, upper right), the fruiting stage in November (lower left), and the flowering stage in July (lower right).

Table 1. Locality of populations and the number of individuals sampled from each population.

Population	locality (latitude, longitude)	no. of individuals
1	Bukjeju-gun, Hadori (N33°31'05.1", E126°54'04.1")	18 (Hibiscus1-1~18)
2	Namjeju-gun, Ohjori (N33°27'44.5", E126°55'14.1")	17 (Hibiscus2-1~17)
3	Namjeju-gun, Sehvari (N33°18'06.8", E126°48'41.2")	17 (Hibiscus3-1~17)

으로 추출하였고, 추출된 DNA를 1× TE buffer에 녹인 후 EtBr-CsCl 농도구배 초원심분리 방법(60,000 rpm, 7시간) 및 투석법으로 정제하였다(Palmer, 1986).

(2) PCR

Polymerase chain reaction (PCR)은 주형 DNA 20-50 ng, 10X buffer 10 μ l, 200 μ M의 dNTPs 8 μ l, 50 pmol의 프라이머 각 1 μ l, 2.5 units의 Promega Flexi GoTaq (Promega Corp., Madison, WI) 및 증류수가 포함된 총 100 μ l의 반응액을 95°C에서 3분 동안 1차 해리한 후, 해리 95°C 1분, annealing 50°C 1분, extension 72°C 1분으로 구성된 반응을 30회 반복한 후 최종적으로 72°C에서 10분간 extension하여 수행하였다(Applied Biosystems Gene Amp. PCR system 9700 사용). PCR 반응액은 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA)로 정제하였으며 이를 통해 얻어진 DNA를 염기서열 결정에 사용하였다. PCR과 염기서열 결정에는 White *et al.*(1990)에 의해 제작된 프라이머를 사용하였으나 프라이머 ITS1의 경우 다음과 같이 밑줄 친 두 개의 염기를 달리하는 프라이머 (5'-GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG-3')를 별도로 제작하여 사용하였다. 정제된 PCR 산물은 DNA 클로닝과정을 거치지 않고 직접 ABI PRISM 377 (PE Applied Biosystems) 염기서열 자동분석기를 이용해 염기서열을 결정하는데 사용하였다.

(3) 염기서열 분석

결정된 염기서열의 ITS 1, 2 구간은 기존의 연구 결과(Kim *et al.*, 2004)와 비교하여 결정하였고, Clustal W (ver. 1.6, Thompson *et al.*, 1995) 및 최종 수작업으로 정렬하였다. 정렬 결과 발생한 공란은 이후 분석과정에서 결여형질(missing characters)로 처리하였다. 각 ITS 유형간의 염기서열 분기도 추산 및 수지도(dendrogram) 제작은 PAUP* ver. 4.0b (Swofford, 2002)를 사용하여 수행하였다. 계통유연관계를 규명하는 것이 본 연구의 목적이 아니기 때문에, 수지도는 UPGMA방법을 이용해 제작하였다.

3. ISSR을 이용한 유전적 다양성 분석

ITS 염기서열 결정에 사용한 DNA와 동일한 DNA를 ISSR 실험에 사용하였다. PCR 반응은 ITS 염기서열 결정을 위한 조건을 따르되 해리(98°C, 40초), annealing (45°C, 1분), extension (72°C, 2분)을 간 총 40회 반복하여 수행하였다. 프라이머는 UBC(University of British Columbia)에서 제공하는 프라이머 가운데 UBC801~878, 881 등 총 79개 프라이머를 사용하였으며, 이 가운데 관독 가능한 DNA 밴드를 제공한 15개 프라이머(UBC 808, UBC 811, UBC 812, UBC 816, UBC 818, UBC 827, UBC 835, UBC 836, UBC 840, UBC 841, UBC 842, UBC 846, UBC 853, UBC 856, UBC 861)를 확정된 뒤 이들을 최종 ISSR 분석에 사용하였다. 얻어진 DNA 밴드의 유무를 각각 1/0으로 코딩하여 자료행렬로 전환한 후, 이를 이용하여 집단별 유전적 다양성을 분석하였고(POPGEGE ver. 1.31, Yeh *et al.*, 1999), UPGMA tree 제작을 통해(PAUP* ver. 4.0b, Swofford, 2002) 각 개체간 유집분석을 실행하였다.

18s ↓ ITS 1
 Hibiscus1-1 ATTGTGATACCTGCCTAGCAGAACTACCGTGAACGTGCTATTAACACCAAYGGGAYGGGGCGTGGTCGCCTAATCGTGCCCTCGTCCCATCCTTGTCT [100]

Hibiscus1-1 CGGGGGCCTGGGATCGTTAAGTCCCCACGCCGCACGGGGTGGTGGGAGMATGGCCTTGTGTCTTCGAGGCAAACGAACAACCCCGGGCGTGAATCAC [200]

Hibiscus1-1 GCCAAGGAATCTGAATGAAAGGGTGCCCGCTGTTGTGCGGCCCGTTTCGCGGTGTGCGTGCAGCAAGAGACGGGTTKCTCCGTGCGTAACACAAA [300] ITS 1 ↓ 5.8s

Hibiscus1-1 ACGACTCTGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTT [400] 5.8s ↓ ITS 2

Hibiscus1-1 TTTGAACGCAAGTTGCGCCCAAGCCACTGGGCCGAGGGCACGCTGCGCTGGGTGTACGCGATCGTTGCTCCCATCCAACCCCTTACCCACAGGGAATCG [500]

Hibiscus1-1 GTTGAGGTGTGGCGGACAATGGCTCCCGTGGCGCACACCGCCCGGGTTGGCTAAAAATCGAGTATCGCGACCACGGTCCCGGACGATCGGTGGTAA [600]

Hibiscus1-1 TGCTCCAGCTGCATCGTTTGTAGTGTGCGCTCCCGTGCATCCGGACTCTTTGACCCTTCAGGCACCGCAAGCACGGTGTCTCGCATCGCGACCCCA [697] ITS 2 ↓ 25s

Fig. 2. ITS sequence of Hibiscus1-1 of *Hibiscus hamabo* in Korea.

결 과

1. ITS 염기서열 변이분석

ITS 지역에 대한 염기서열 분석 결과, 황근의 경우 조사된 개체 가운데 ITS 1 지역은 290-291 bp, 5.8s 지역은 162 bp, ITS 2 지역은 331 bp인 것으로 나타났다(Fig. 2, Table 2). 모든 개체의 ITS 염기서열을 정렬한 결과 ITS 1지역에서 1 bp 길이 변이가 발견되었다(Table 2). 각 집단별 염기서열 변이는 집단 1에서는 총 14개 뉴클레오티드 지점에서 변이가 관측되었는데, M, T, K 등 다형 뉴클레오티드에 의한 변이까지 포함하면 총 17개 지점에 변이가 존재하는 것으로 확인되었다. 그러나 다형 뉴클레오티드 한 개를 지닌 개체, Hibiscus2-3을 제외한 집단 2와 3의 모든 개체에서는 변이를 나타내는 뉴클레오티드 지점이 전혀 없었다(Table 2).

전체 개체 간의 염기서열 분기도를 Kimura (1980) 의 2 parameter 방법으로 추산한 결과 가장 높은 값인 1.904(K2P value × 100)이 Hibiscus1-10과 Hibiscus1-3, Hibiscus1-6, Hibiscus1-8 사이에서, 그리고 Hibiscus1-9와 Hibiscus1-18 및 Hibiscus2-1 사이에서 관측되었다. 한편 Hibiscus2-3을 제외한 집단 2와 집단 3의 모든 개체의 ITS 염기서열은 동일하였고 따라서 분기도는 0으로 나타났다(Table 3).

한편, ITS 염기서열 변이를 UPGMA 방법으로 유집한 결과 염기서열이 동일한 집단 2, 집단 3의 모든 개체와 집단 1의 일부 개체가 하나로 유집되었다. 집단 2와 3에 속하는 개체와 ITS 염기서열이 완전히 동일하였고 그 결과 집단 1은 하나의 무리로 유집되지 않았다(Fig. 3).

2. ISSR-PCR을 이용한 유전적 다양성 분석

분석을 위해 사용된 총 79개 SSR 프라이머 가운데 15개 프라이머로부터 분석 가능한

Table 2. Variable nucleotide positions of the ITS sequences from 52 accessions of *Hibiscus hamabo* in Jeju Island, Korea (refer Fig. 1 for nucleotide position). The nucleotide matches Hibiscus1-1 is marked as “·”. Hyphen(-) denotes a gap introduced by sequence alignment. Hibiscus2-1* represents all individuals in population 2 (except Hibiscus2-3) and population 3 which are identical in the ITS sequence.

nucleotide position DNA no.	ITS 1 (26-240)										ITS 2 (277-662)							
	26	54	59	98	114	122	142	151	237	240	277	279	430	539	630	638	639	662
Hibiscus1-1	T	Y	Y	T	T	T	G	M	T	G	T	K	G	C	C	T	C	A
Hibiscus1-2	·	T	T	·	·	·	·	C	·	·	Y	T	·	·	·	·	·	·
Hibiscus1-3	G	T	T	C	C	-	A	C	·	C	C	T	A	T	T	·	T	C
Hibiscus1-4	·	T	T	·	·	·	R	C	·	S	Y	T	R	Y	Y	·	Y	M
Hibiscus1-5	·	C	T	·	·	·	·	·	Y	S	Y	T	R	Y	·	·	Y	·
Hibiscus1-6	G	T	T	C	C	-	A	C	·	C	C	T	A	T	T	·	T	C
Hibiscus1-7	·	T	T	·	·	·	·	C	Y	S	·	T	R	Y	Y	·	Y	·
Hibiscus1-8	G	T	T	C	C	-	A	C	·	C	C	T	A	T	T	·	T	C
Hibiscus1-9	·	C	C	·	·	·	·	·	Y	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Hibiscus1-10	·	·	·	·	·	·	·	·	Y	·	·	·	·	Y	·	·	·	·
Hibiscus1-11	G	T	T	C	C	-	A	C	·	C	C	T	A	T	T	C	·	C
Hibiscus1-12	K	T	T	C	C	·	A	C	·	C	Y	T	R	Y	T	·	T	C
Hibiscus1-13	·	T	T	·	·	·	R	·	Y	S	Y	T	·	Y	·	·	Y	·
Hibiscus1-14	K	T	T	C	C	-	A	C	·	C	C	T	A	T	Y	·	T	C
Hibiscus1-15	·	T	T	Y	Y	·	R	C	·	S	Y	T	R	Y	Y	·	Y	·
Hibiscus1-17	·	T	T	·	·	·	·	·	Y	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Hibiscus1-16	·	T	T	·	·	·	R	·	·	·	·	T	·	Y	·	·	·	·
Hibiscus1-18	G	T	T	C	C	-	A	C	·	C	C	T	A	T	T	·	T	C
Hibiscus2-1*	G	T	T	C	C	-	A	C	·	C	C	T	A	T	T	·	T	C
Hibiscus2-3	G	T	T	C	C	-	R	C	·	C	C	T	A	T	T	·	T	C

DNA 밴드가 증폭되었다. 이들 프라이머로부터 총 97개 DNA 밴드를 얻었는데 이 가운데 UBC 818과 UBC 827로부터 각각 13개, 11개의 밴드가 증폭되어 가장 많은 밴드가 얻어졌다. 반면, UBC 836과 UBC 846으로부터는 각각 1개와 3개의 밴드가 증폭되어 가장 낮은 수치를 보였다(Table 4).

이들 밴드의 유무를 0/1로 코딩하여 유전적 변이 양상을 분석한 결과 전체적으로는 74개의 유전좌위가 다형이었고, 집단별로는 집단 1이 69개, 집단 2가 25개, 집단 3은 29개의 유전좌위가 다형을 나타내었다. 각 유전좌위에서 관측된 평균 대립인자의 수는 전체적으로는 1.7629로 나타났고, 집단별로는 집단 1이 1.7113으로 가장 컸고, 집단 2가 1.2577, 집단 3이 1.2990으로 나타났다. 한편 전체 유전좌위 중 약 76.29%가 다형이었는데, 집단별로는 집단 1이 71.13%로 가장 높았고, 집단 2가 25.77%, 집단 3은 29.90%가 다형을 나타내었다. 또한 Nei (1973)의 유전적 다양성 척도인 “h” 값역시 집단 1이 0.2266인 반면 집단 2와 3은 각각 0.0762와 0.0914로 나타나는 등 모든 면에서 집단 1의 유전적 다양성 지표가 가장 높은 것으로 나타났다(Table 5).

한편, ISSR 자료를 이용하여 UPGMA 계통수를 작성한 결과 집단 2와 집단 3의 개체들은

Table 3. Pair-wise ITS sequence distance among 20 accessions of *Hibiscus hamabo* in Korea. Absolute distances are shown above the diagonal, and sequence divergence values estimated by Kimura 2-parameter distance ($\times 100$) method are below diagonal. Hibiscus 2-1* represents all species in population 2 (except Hibiscus2-3) and population 3 which are identical in the ITS sequence.

sample no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 Hibiscus1-1	-	0	11	0	0	11	0	11	0	0	11	7	0	9	0	0	0	11	11	10
2 Hibiscus1-2	0.00	-	10	0	1	10	0	10	2	0	10	7	0	8	0	0	0	10	10	9
3 Hibiscus1-3	1.61	1.46	-	3	7	0	6	0	13	10	2	0	6	0	2	11	9	0	0	0
4 Hibiscus1-4	0.00	0.00	0.44	-	1	3	0	3	2	0	4	2	0	2	0	0	0	3	3	3
5 Hibiscus1-5	0.00	0.15	1.03	0.15	-	7	1	7	1	0	8	6	1	5	1	1	1	7	7	6
6 Hibiscus1-6	1.61	1.46	0.00	0.44	1.03	-	6	0	13	10	2	0	6	0	2	11	9	0	0	0
7 Hibiscus1-7	0.00	0.00	0.87	0.00	0.15	0.87	-	6	2	0	7	4	0	5	0	0	0	6	6	5
8 Hibiscus1-8	1.61	1.46	0.00	0.44	1.03	0.00	0.87	-	13	10	2	0	6	0	2	11	9	0	0	0
9 Hibiscus1-9	0.00	0.29	1.90	0.29	0.15	1.90	0.29	1.90	-	0	13	9	2	11	2	2	2	13	13	12
10 Hibiscus1-10	0.00	0.00	1.46	0.00	0.00	1.46	0.00	1.46	0.00	-	10	7	0	8	0	0	0	10	10	9
11 Hibiscus1-11	1.61	1.46	0.29	0.59	1.17	0.29	1.02	0.29	1.90	1.46	-	2	7	2	3	11	9	2	2	2
12 Hibiscus1-12	1.02	1.02	0.00	0.29	0.88	0.00	0.58	0.00	1.32	1.02	0.29	-	4	0	1	7	6	0	0	0
13 Hibiscus1-13	0.00	0.00	0.88	0.00	0.15	0.88	0.00	0.88	0.29	0.00	1.02	0.58	-	4	0	0	0	6	6	6
14 Hibiscus1-14	1.32	1.16	0.00	0.29	0.73	0.00	0.73	0.00	1.61	1.17	0.29	0.00	0.58	-	1	9	7	0	0	0
15 Hibiscus1-15	0.00	0.00	0.29	0.00	0.15	0.29	0.00	0.29	0.29	0.00	0.44	0.14	0.00	0.14	-	0	0	2	2	2
16 Hibiscus1-17	0.00	0.00	1.61	0.00	0.15	1.61	0.00	1.61	0.29	0.00	1.61	1.02	0.00	1.31	0.00	-	0	11	11	10
17 Hibiscus1-16	0.00	0.00	1.31	0.00	0.15	1.31	0.00	1.31	0.29	0.00	1.31	0.87	0.00	1.02	0.00	0.00	-	9	9	9
18 Hibiscus1-18	1.61	1.46	0.00	0.44	1.03	0.00	0.87	0.00	1.90	1.46	0.29	0.00	0.88	0.00	0.29	1.61	1.31	-	0	0
19 Hibiscus2-1*	1.61	1.46	0.00	0.44	1.03	0.00	0.87	0.00	1.90	1.46	0.29	0.00	0.88	0.00	0.29	1.61	1.31	0.00	-	0
20 Hibiscus2-3	1.46	1.31	0.00	0.44	0.88	0.00	0.73	0.00	1.76	1.32	0.29	0.00	0.88	0.00	0.29	1.46	1.31	0.00	0.00	-

각각 집단별로 유집이 이루어졌던 반면 집단 1의 경우 일부 개체가 집단 2와 3과 유집되었다 (Fig. 4). 전체적으로 보았을 때, ITS 염기서열 자료에 의한 유집결과와 마찬가지로 집단 1의 개체들이 전형질도의 기부에 주로 위치하는 양상을 보였다.

고 찰

본 연구에서 가장 주목할 만한 연구 결과는 북제주군 하도리 황근 집단 (집단 1, 18개체)에서 ITS염기서열 변이가 매우 높게 관측되었다는 것이다. 길이 변이를 제외하더라도, 전체 685 bp 가운데 14개의 뉴클레오티드 지점에서 변이가 확인되었는데 이는 최근에 조사된 우리나라 돼지풀 (*Ambrosia artemisiifolia*) 집단 전체에서 관측된 것(652 bp 가운데 14개 사이트에서 변이가 확인됨)과 같은 수치이다(Kim *et al.*, 2005). Andreasen and Baldwin (2001)은

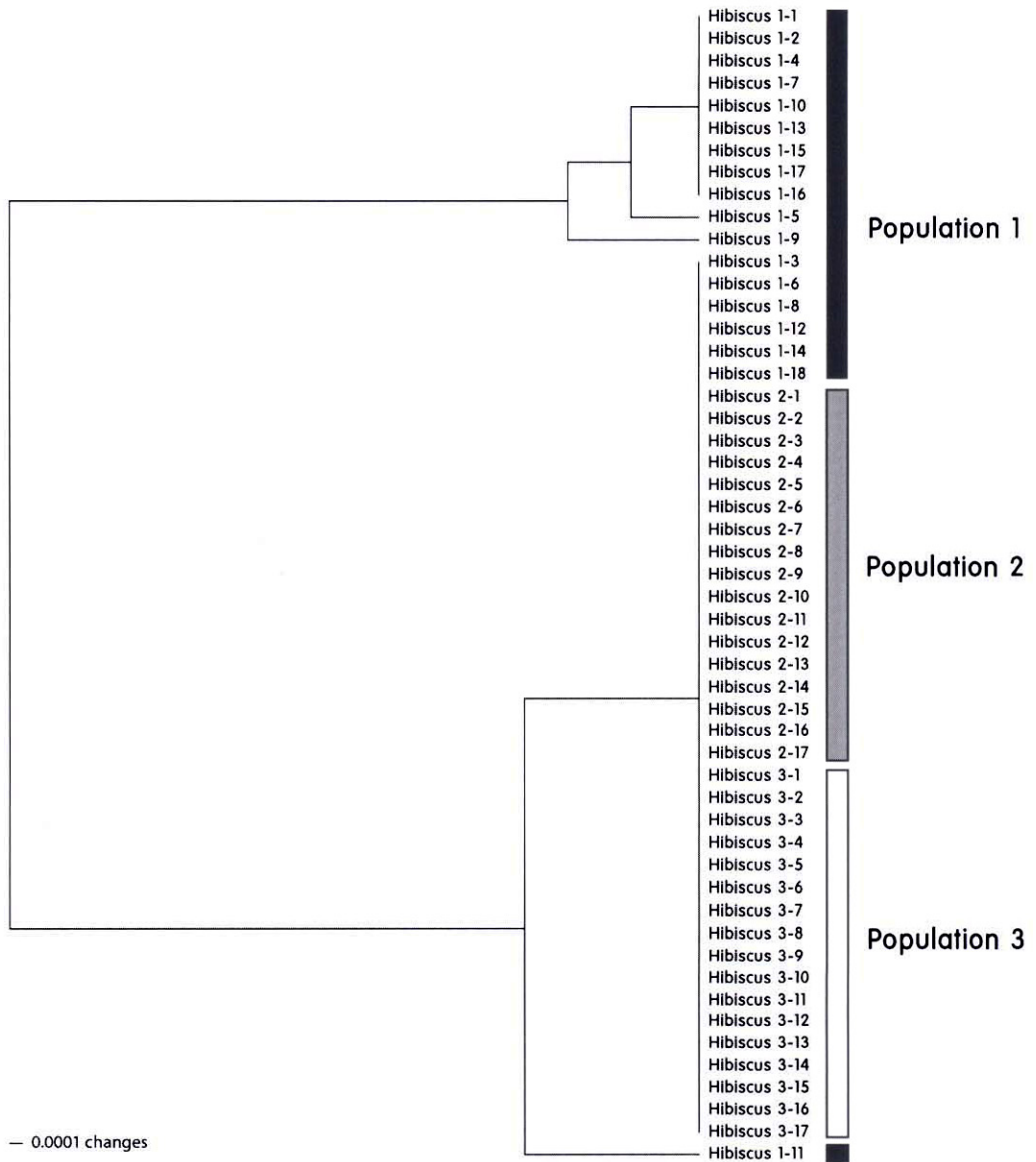


Fig. 3. UPGMA tree based on nuclear ribosomal ITS sequences from 3 populations of *Hibiscus hamabo* in Jeju Island, Korea. Black, gray, and white bars represent population 1, 2, and 3, respectively. Refer Table 1 for OTU and population information.

Table 4. List of primers provided reproducible DNA band and the number of DNA bands for the selected primers used in ISSR study for *Hibiscus hamabo*.

Primer	Primer sequence	Number of DNA band
UBC 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	10
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	4
UBC 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	6
UBC 816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	4
UBC 818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	13
UBC 827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	11
UBC 835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	4
UBC 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	1
UBC 840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	4
UBC 841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	10
UBC 842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	9
UBC 846	CAC ACA CAC ACA CAC ART	3
UBC 853	TCT CTC TCT CTC TCT CRT	4
UBC 856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	7
UBC 861	ACC ACC ACC ACC ACC ACC	7
Total		97

Table 5. Summary of genetic variation statistics for the ISSR loci examined from *Hibiscus hamabo* populations in Jeju Island, Korea.

Population	ss	na	ne	h	np	fp*
1	18	1.7113±0.4555	1.3782±0.3531	0.2266±0.1907	69	71.13
2	17	1.2577±0.4397	1.1222±0.2537	0.0762±0.1476	25	25.77
3	17	1.2990±0.4602	1.1549±0.3006	0.0914±0.1674	29	29.90
Total	52	1.7629±0.4275	1.2881±0.3368	0.1789±0.1759	74	76.29

*ss = sample size (number of individuals); na = observed number of alleles (mean and standard variation); ne = effective number of alleles (mean and standard variation); h = gene diversity (mean and standard variation; Nei, 1973); np = the number of polymorphic loci; fp = the percentage of polymorphic loci

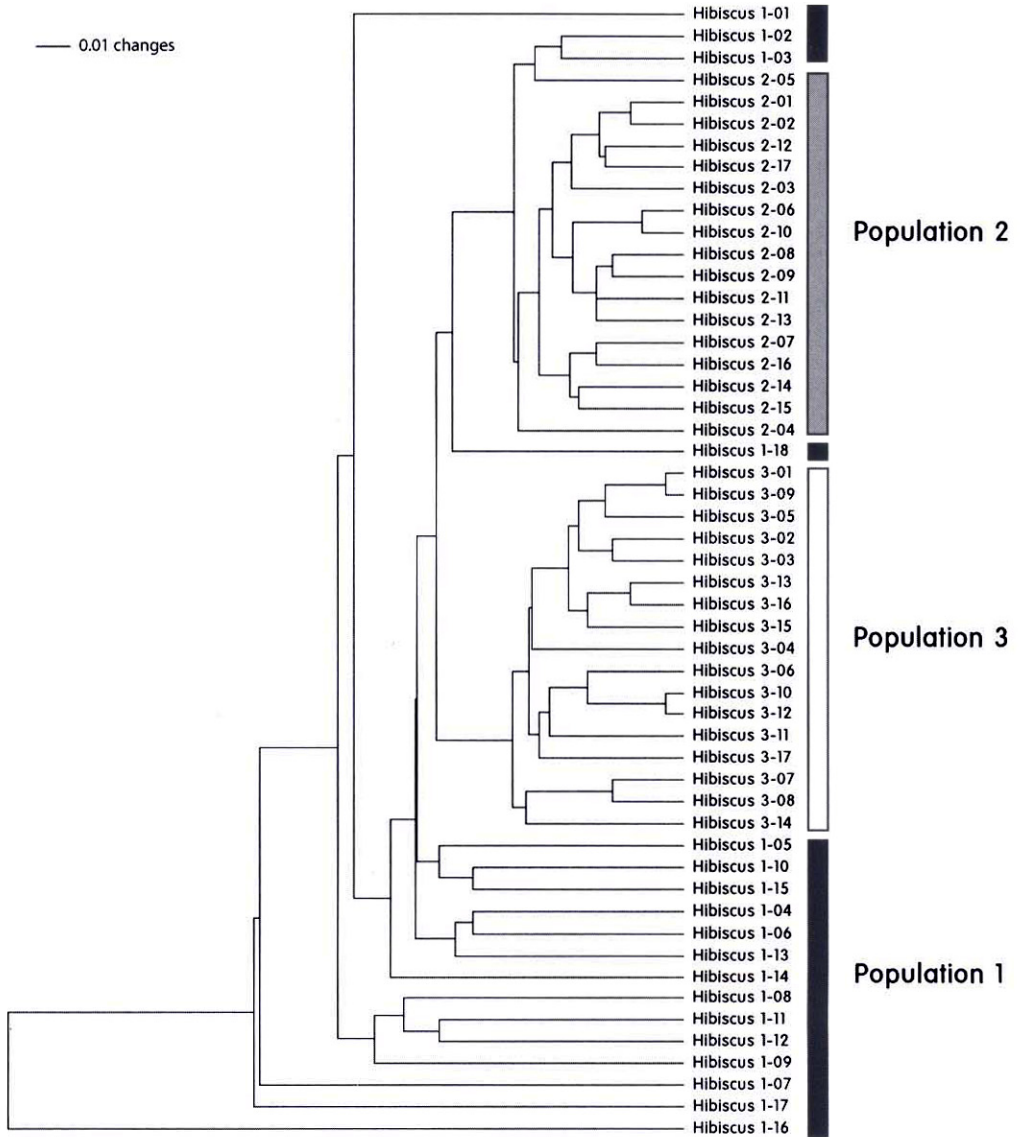


Fig. 4. UPGMA tree based on ISSR data for 3 populations of *Hibiscus hamabo* in Jeju Island, Korea. Black, gray, white bars represent population 1, 2, and 3, respectively. Refer Table 1 for OTU and population information.

아욱과의 *Sidalcea*를 대상으로 수행한 ITS 염기서열 계통분석 연구에서 일년생 초본이 다년생 초본 또는 관목에 비해 염기서열 진화속도가 더 빠른 것을 보고함으로써 세대기간이 짧을수록 분자진화율이 더 높다는 기존의 가설을 지지한 바 있다. 돼지풀이 일년생 초본이고 조사된 총 개체수가 145개체였다는 점을 감안하면 관목인 황근 집단 18개체에서 조사된 ITS 염기서열 변이 정도는 매우 높은 수준이다. 한편, *Lomatium grayi* (산형과) 8개 집단을 대상으로 수행된 ITS 염기서열 변이 연구에서는 전체 집단 간에 단 2개 뉴클레오티드 지점에서만 변이가 관측된 바가 있다(Soltis and Kuzoff, 1993). 이처럼 ITS 염기서열의 변이는 분류군마다 편차가 크기 때문에, 돼지풀이나 황근과 같이 종내 ITS 염기서열 변이도가 높은 분류군의 ITS 염기서열을 중간 계통유연관계 연구에 적용할 때, 종을 대표하는 개체 여럿을 계통 연구에 포함시키거나, 그렇지 못할 경우에는 얻어진 분석결과를 해석할 때 주의를 기울일 필요가 있다.

본 연구에 포함된 황근집단 및 개체수가 제한적이라는 점을 고려하더라도 황근집단 1과 집단 2, 3 사이에서 관측된 14개 뉴클레오티드 지점에서의 차이는 주목할 만하다. 즉, 집단 1 내에서 ITS 염기서열 변이가 높게 관측된 것과는 대조적으로 집단 2와 3 내에서는 Hibscus 2-3을 제외하고 전혀 변이가 관측되지 않아 집단 1과 다른 집단들 간에 뚜렷한 차이가 나타난 것이다. 집단들의 유전적 분화는 종 또는 집단이 겪어온 장시간의 진화적 역사, 즉 서식지 이동, 서식지 절단 및 이에 따른 집단의 고립과, 유전자 부동, 돌연변이, 교배 시스템, 유전자 유입의 제한 등이 복합적으로 작용한 결과이다 (Schaal et al., 1998). 제주도 황근 집단 2와 3에서 ITS 염기서열의 변이가 없다는 것은 이들 집단이 과거에 극심한 유전자 부동을 겪었으며, 이후 인접 집단으로부터 유전자 유입이 매우 제한적이었음을 암시한다. 한편 집단 1에서 관측된 높은 유전적 다양성은 상대적으로 오랜 기간 동안 집단규모에 급격한 변화 없이 집단 1이 안정적으로 유지되어온 결과로 해석된다. ISSR 분석 결과 역시 집단내 평균 유전자 다양성에 있어서 집단 1이 집단 2, 3에 비해 각각 2.5-3.0배 높은 것으로 조사됨으로써 ITS 염기서열 분석 결과와 일치하는 양상을 나타내었다(Table 4).

국내 희귀식물에 대한 유전적 다양성 분석은 종 보존을 위한 정책을 수립하는데 긴요한 과학적 판단근거로 활용될 수 있다. 이는 비슷한 조건일 경우 유전적 다양성이 더 높은 집단을 우선적으로 보존하는 것이 종 보존 전략상 더 유리하다는 보존생물학 및 진화유전학적 이론에 기초한 것이다(Milligan et al., 1994; Hamrick and Godt, 1996). 본 연구 결과 황근 집단의 경우 집단 1이 ITS 염기서열 변이나 ISSR 자료에 기초한 유전적 다양성 지표에 있어서 월등히 높은 값을 나타낸 것을 확인할 수 있었다. 또한 ITS 염기서열 및 ISSR 자료에 기초한 계통수 역시 집단 2와 3의 개체들이 집단 1의 변이 범위 안에 포함되고 있음을 보여준다. 이와 같은 유전적 다양성 분석결과는 황근집단에 대한 보존 대책을 수립할 때 집단 1(하도리 집단)을 우선적으로 보존해야 할 것을 제안하는 근거로 활용될 수 있을 것이다. 따라서 제주 지역의 황근 자생지에 대한 모든 지역을 보존하되, 특히 집단 1에 대해서는 각별한 관심을 기울여 보존하는 것이 국내 자생지 보존을 위해 가장 유효하리라고 판단되며, 만일 현지의 보존이 필요할 경우 집단 1에 속하는 개체들을 집중적으로 활용하는 것이 효율적이라고 생각된다.

다. 국내 희귀식물에 대한 이와 같은 유전적 다양성 분석자료가 축적된다면 향후 각종 희귀종 또는 멸종위기종 보존대책 수립이 보다 과학적이고 체계적으로 이루어질 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 2006-2007환경부 멸종위기종 유전자 분석사업의 일부로 수행되었습니다. 현지 조사에 참여한 이동근, 김영규 님께 감사드립니다. 연구에 이용한 DNA는 국가지정 연구소재은행인 “한국의 식물 DNA”에 소장되었습니다.

인 용 문 헌

- Andreasen, K. and B. Baldwin. 2001. Unequal evolutionary rates between annual and perennial lineages of checker mallows (*Sidalcea*, Malvaceae): Evidence from 18S-26S rDNA internal and external transcribed spacers. *Mol. Biol. Evol.* 18: 936-944.
- Avise, J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall, London.
- Camacho, F. J. and A. Liston. 2001. Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) based on inter-simple sequence repeats (ISSR). *Amer. J. Bot.* 88: 1065-1070.
- Chung, J. M., B. C. Lee, J. S. Kim, C.-W. Park, M. Y. Chung and M. G. Chung. 2006. Fine-scale genetic structure among genetic individuals of the clone-forming monotypic genus *Echinosophora koreensis* (Fabaceae). *Annals of Botany* 98: 165-173.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Ge, X.-J., Y. Yu, Y.-M. Yuan, H.-W. Huang and C. Yan. 2005. Genetic diversity and geographic differentiation in endangered *Ammopiptanthus* (Leguminosae) populations in desert regions of northwest China as revealed by ISSR analysis. *Ann. Bot.* 95: 843-851.
- Hamrick J. L. and M. J. W. Godt. 1996. Conservation Genetics of Endemic Plant Species. In: Avise J. C., Hamrick J. L., eds. Conservation Genetics: Case Histories from Nature. New York: Chapman and Hall, pp 281-304.
- Jousson, O., J. Pawlowski, L. Zaninetti, F. W. Zechman, F. Dini, G. Di Guiseppe, R. Woodfield, A. Millar and A. Meinesz. 2000. Invasive alga reaches California. *Nature* 408: 157-158.
- Kim, Y.-D., S.-H. Kim and L. R. Landrum. 2004. Taxonomy and phylogeographic implications from ITS phylogeny in *Berberis* (Berberidaceae). *J. Plant Res.* 117: 175-182.
- Kim, Y.-D., C.-W. Park, B.-Y. Sun, K.-J. Kim, E.-J. Lee and S.-H. Kim. 2005. ITS sequence variations in common ragweed and giant ragweed. *Korean J. Pl. Taxon.* 35: 273-285 (in Korean).
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of the base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*

- 16: 111-120.
- Milligan, B. G., J. Leebens-Mack and A. E. Strand. 1994. Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. *Molecular Ecology* 12: 844-855.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70: 3321-3323.
- Palmer, J. D. 1986. Isolation and structural analysis of chloroplast DNA. *Meth. Enzymol.* 118: 167-186.
- Schaal, B. A., D. A. Hayworth, K. M. Olsen, J. T. Rauscher and W. A. Smith. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* 7: 465-474.
- Soltis P. S. and R. K. Kuzoff. 1993. ITS sequence variation within and among populations of *Lomatium grayi* and *L. laevigatum* (Umbelliferae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 2: 166-170.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*, phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4.0b. Sinauer, Sunderland.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson. 1995. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- White, T. J., T. Birns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis, M., D. Gelfand, J. Sninsky and T. White (eds.), Academic Press, San Diego, Pp. 315-322.
- Yeh, F. C., R. C. Yang and T. Boyle. 1999. POPGENE. Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis. Release 1.31. Edmonton: University of Alberta, Canada.
- Xiao, L.-Q., X.-J. Ge, X. Gong, G. Hao and S.-X. Zheng. 2004. ISSR variation in the endemic and endangered plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae). *Ann. Bot.* 94: 133-138.
- Xiao, M., Q. Li, L. Wang, L. Guo, J. Li, L. Tang and F. Chen. 2006. ISSR analysis of the genetic diversity of the endangered species *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying from Western Sichuan Province, China. *J. Integrative Plant Biology* 48: 1140-1146.

Genetic Diversity in Three Populations of *Hibiscus hamabo* (Malvaceae) in Jeju Island, Korea

Young-Dong Kim*, Ki-Joong Kim¹, Sung-Hee Kim and
Hyeong-Tae Kim¹

Department of Life Science, Hallym University, Chunchon 200-702, Korea;

¹School of Life Sciences & Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Using internal transcribed spacer (ITS) sequences and inter-simple sequence repeats (ISSRs) data, genetic diversity of a rare species, *Hibiscus hamabo* Siebold & Zucc. was examined for 3 populations in Jeju Island, Korea. A total of 14 nucleotide (excluding 3 ambiguous nucleotide) site variation in the ITS was observed from 18 individuals (Population 1, Hadori), which differed up to 13 bp in pair-wise comparison. On the contrary, the ITS sequences of all individuals in Populations 2 and 3 were identical. Genetic diversity estimates including Nei's gene diversity (h) generated by ISSR data were substantially high in Population 1 compared to other two populations. Low genetic variation in Populations 1 and 2 is considered due to genetic drift (bottleneck effect) and limited gene flow in these populations. Considering the differences in genetic diversity, protection of the Population 1(Hadori) is very critical for *in situ* conservation of *Hibiscus hamabo* in Korea. If *ex situ* conservation is required, making the full use of Population 1 will be most efficient.

Key words: Conservation, *Hibiscus hamabo*, ISSR, ITS, rare plant

*Corresponding author: Phone +82-33-248-2095, Fax +82-33-256-3420, ydkim@hallym.ac.kr