

발간등록번호
11-1480592-000407-01

## 주요 생물자원의 유전자 분석·연구

### '12 멸종위기생물종의 유전자 분석 연구: 식물분야

2012년 12월



**국립생물자원관**

National Institute of Biological Resources

주요 생물자원의 유전자 분석·연구

'12 멸종위기생물종의 유전자 분석 연구:  
식물분야

2012년 12월



**국립생물자원관**

National Institute of Biological Resources

## 제 출 문

### 국립생물자원관장 귀하

본 보고서를 “주요 생물자원의 유전자 분석·연구: ‘12 멸종위기 생물종의 유전적 분석연구: 식물분야”의 최종보고서로 제출합니다.

2011년 12월

연구 기관: 대구대학교 컨소시엄

연구수행기간: 2012.04.16 ~ 2012.12.15

연구책임자 : 원 효 식 (대 구 대 학 교)

협동연구자 : 이 정 호 (녹색식물연구소)

공동연구원 : 강 혜 순 (성신여자대학교)

공동연구원 : 김 영 철 (한국자생식물원)

## 요 약 문

1. 제목: 주요 생물자원의 유전자 분석·연구: '12 멸종위기생물종의 유전자 분석 연구: 식물분야
  
2. 용역사업 배경 및 목적
  - 멸종위기 동식물의 유전적 다양성 파악 및 이를 근거로 한 보전, 복원 및 관리방안 수립
  - 경제적 활용 가치가 높은 주요 생물종에 대한 집단 유전학적 분석 및 계통분석 분자 마커의 발굴 및 유전체 정보 확보
  
3. 과업의 범위
  - 멸종위기종의 소기관 유전체 분석: 독미나리
  - 멸종위기종의 유전다양성 분석: 독미나리, 비자나무, 자주솜대, 노랑만병초 및 만병초
  - 멸종위기종의 Genomics 기반 연구: 게놈 프로젝트 수행을 위한 후보종 5종 선정
  
4. 연구 내용 및 방법
  - 가. 멸종위기종의 소기관 유전체 분석:

독미나리 엽록체 유전체를 총 11개 구간으로 나누어 10-30 kb L-PCR을 통해 증폭하며, SSC, IR, LLC 구간의 크기를 추정 → 2-4 kb S-PCR을 통해 시퀀싱하여 전체 염기서열 결정, 유전자 annotation 및 유사 분류군과 비교 연구
  
  - 나. 멸종위기종의 유전다양성 분석:
    - 독미나리: 6개 집단 96개체 채집 및 DNA 추출; AFLP 분석을 통해 집단내, 집단간 유전적 다양성 분석 수행
    - 비자나무: 제주도 평대리 비자나무숲에서 자연집단 128개체와 식재목

20개체를 채집, DNA 추출; 비자나무의 연령, 성, 서식위치 등에 대한 공간 분석과 microsatellite를 이용한 유전적 다양성 분석 수행

- 자주솜대: 9개 집단 261개체 확보; 7개 집단 192개체에 대해 AFLP 분석 수행; 유전적 거리와 지리적 거리와의 상관관계, 집단 간의 유전적 변이 분석 수행; 자주솜대와 유연분류군을 대상으로 엽록체 *rbcL* 및 *matK* 유전자 구간 염기서열 분석 및 계통 분석
- 노랑만병초 및 만병초: 한국, 중국, 일본, 러시아 등 4개국 6개 지역 13 집단으로부터 337개체의 노랑만병초 DNA 시료 확보; 만병초의 경우 지리산, 태백산, 오대산, 설악산, 방태산, 울릉도 및 일본 Gifu현 등 총 13집단에서 352개체의 DNA 시료 확보; 철쭉과 식물을 대상으로 엽록체 *rbcL* 및 핵 *xdh* 유전자 염기서열 계통분석 수행

다. 멸종위기종의 Genomics 기반 연구: 멸종위기종, 신규지정검토종, 해제검토종 등을 포함 96종에 대해 배수성 검증, 게놈 크기 추정, 시료 확보 가능성, 경제적 가치 및 활용도 분석 등을 통해 게놈 분석 후보 대상종 선정

## 5. 연구 결과

가. 멸종위기종의 소기관 유전체 분석: 독미나리의 엽록체 유전체는 154,572 bp로 밝혀졌으며, 당근과 마찬가지로 4개의 rRNA 유전자, 30개의 tRNA 유전자, 75개의 단백질 coding 유전자와 4개의 conserved ORF를 가지고 있음.

나. 멸종위기종의 유전다양성 분석:

- 독미나리: AFLP 분석 결과 집단내 변이가 집단간 변이보다 높으며, 강원도 집단 간에는 집단간의 gene flow가 낮은 것으로 판단되며, 강원도 집단과 군산집단은 엽록체 IGS 구간에서 유별되는 것으로 나타남.
- 비자나무: 전수 조사 결과 성비는 1:1이 아니라 수나무로 약간 편향된 것으로 나타났으며, microsatellite 분석 결과 0.5-0.6 km 지점에서 유전적 이질성이 출현하며, 137 개체로부터 96개의 genotype을 구분해

낼 수 있었음. 유전적 변이는 공간적 양상이 나타나지 않음.

- 자주솥대: AFLP 분석 결과 지리적 거리에 따른 유전적인 격리가 존재함을 확인하였으며, 지역간(중부 vs. 남부)의 유전적 변이가 전체 변이의 42%를 대변하며, 지역 내의 집단 간의 유전적 변이는 크지 않은 것으로 나타났음. 이러한 지리적인 격리 양상은 자주솥대의 생육에 있어 기온이 직접적인 영향을 미치기 때문인 것으로 파악되었음. 계통분석 결과 자주솥대는 한국에만 분포하는 특산종인 것으로 확인됨.
- 노랑만병초 및 만병초: 엽록체와 핵 유전자 염기서열 분석결과 노랑만병초와 만병초가 다른 철쭉과 식물과 뚜렷이 구분되나, 이들 중 사이에는 공유하는 유전자형이 나타나며, 잡종 및 chloroplast capture에 의한 것으로 판단됨

다. 멸종위기종의 Genomics 기반 연구: 후보종 평가를 통해 총 21종의 예비 후보종을 선정하였으며, 이들 중 가시오갈피, 제비동자꽃, 제비붓꽃, 솔붓꽃, 각시수련, 큰바늘꽃을 대상으로 게놈 크기 추정 및 시료를 확보하였음.

## 6. 결론

독미나리 엽록체 유전체 정보로부터 산형과 엽록체 유전체의 특성을 확인하였으며, 높은 변이율을 보이는 IGS 구간을 활용, 산형과 식물 식별을 위한 marker로 개발이 가능할 것으로 판단된다. 독미나리의 경우 강원도 집단과 군산 집단은 구분하여 관리할 필요가 있다.

비자나무 제주도 집단의 경우 비교적 높은 유전적 다양성이 나타나며, 개발된 microsatellite를 활용하여 후계목 선정 및 개체 식별에 이용할 수 있다. 자주솥대의 경우 비교적 높은 유전적 다양성을 보여 집단의 멸종에 대한 위협은 적으나, 기온에 대해 민감한 특성으로 볼 때 남부 집단은 장차 분포범위가 축소될 위험이 있어 이들 집단에 대한 장기 모니터링이 필요하다. 노랑만병초와 만병초의 경우 이들 동북아집단 간에 복잡한 양상의 잡종화와 진화가 일어났을 것으로 파악되었으며, 이에 대한 확인 작업이 유전다양성 분석에 선행되어야 한다.

## 7. 활용방안

본 연구결과는 분석된 분류군들의 보전, 증식, 복원 및 관리에 활용될 것이며, 확보된 개체의 확증표본 및 DNA 시료 및 염기서열 정보는 국립생물자원관 야생생물유전자원센터에서 활용될 것이다.

## Abstract

This research was pursued to reveal the chloroplast genome structure and sequence of *Cicuta virosa* L. (Apiaceae) and to analyze the genetic diversity of four endangered species of Korea - *C. virosa*, *Torreya nucifera* Siebold & Zucc. (Taxaceae), *Maianthemum bicolor* (Nakai) Cubey (Asparagaceae), *Rhododendron aureum* Georgi and *R. brachycarpum* D. Don (Ericaceae), so that we can suggest conservation, rehabilitation and management strategy for those endangered species.

For the chloroplast genome study of *C. virosa*, we have done 11 long PCRs to cover the whole chloroplast genome. From the size of the fragment, we estimated the relative length of SSC, IRs, and LLC regions. Then, multiples of short PCRs covering 2-4 kb were done to amplify and sequence. Finally, we obtained the full sequence of *C. virosa* chloroplast genome and annotated the genes within. As a result, we found out that the whole chloroplast genome of *C. virosa* is 154,572 bp and is consisted of 4 rRNA genes, 30 tRNAs, 75 protein coding genes, and 4 conserved ORFs. The gene contents of *C. virosa* is identical to those of *Daucus carota*, only one chloroplast genome reported from Apiaceae so far, but with length variations in the intergenic spacers. This information will be useful in designing molecular markers to identify Apiaceae species efficiently.

For the genetic diversity analysis of *C. virosa*, we obtained samples from 96 individuals of 6 populations, and AFLP analysis was done. The result indicates that more genetic variation resides within the population than between the populations. Also two regional groups - Gangwon and Gunsan - are distinguished by one bp variation in the chloroplast IGS region. This suggests that we should treat those regional groups separately in considering conservation and management strategy.

We sampled and analyzed microsatellite markers for 128 wild individuals and 20 planted individuals of *T. nucifera* living in Juju Pyeongdaeri protected forest. The geographic position, sex, ages were analyzed with their genetic variation. As results, we discovered that the sex ratio is a little bit skewed toward male, unlike the previous report

that it is 1:1. 96 genotypes were identified from 137 individuals from the microsatellite marker analysis. However, there is no distinct geographic pattern in the genetic variation. This information can be used in selecting the future generation of *T. nucifera* and studying the detailed population dynamics.

We sampled 261 individuals from 9 populations of *M. bicolor* from Mt. Jiri, Mt. Dukyoo, Mt. Taebaek, Mt. Odae, and Mt. Seorak and 192 individuals of 7 populations were analyzed by AFLP. The result showed typical isolation-by-distance pattern - genetic distance increases as geographic distance increases. 42% of genetic variation are represented by regional (Southern vs. Central part of Korea) groups, while there is not much genetic variation explainable by between-populations variation within the region. It seems that the temperature works as limiting factor for the distribution of the species, which is adapted to a cooler temperature than its relative common species *M. japonica*. This indicates that *M. bicolor* is more susceptible to the global warming, especially the two southern populations in Mt. Jiri and Mt. Dukyoo need long-term monitoring for their survival and population size changes. Molecular phylogenetic study of the group clearly presented evidence that *M. bicolor* is distinct and unique endemic species of Korea, distinct from *M. japonica* and *M. dahurica*.

For *R. aureum*, 337 individuals of 13 populations from Korea, China, Japan, and Sakhaline were sampled for genetic diversity analysis. For *R. brachycarpum*, 352 individuals of 13 populations from Mt. Jiri, Mt. Taebaek, Mt. Odae, Mt. Bangtae, Mt. Seorak, Ulleung Isl. of Korea and Gifu prefecture of Japan were sampled, too. Molecular phylogenetic analysis of nuclear and chloroplast of representatives of *R. aureum* and *R. brachycarpum* populations, together with other Ericaceae species in Korea, presented that there exists evidence of hybridization and chloroplast capture between *R. aureum* and *R. brachycarpum*. This may have been caused by complex hybridization and evolution process between the two species, and further taxonomic and phylogenetic researches are required before we undergo genetic analysis of those populations.

For future full genome research of Korean endangered species, we have assessed 96 species for their accessibility, amount of DNA sample available per individual, economic utility, C-value, ploidy level, and relevance to the international genome research project. We selected 21 candidate species for genome research and finally selected 6 species - *Eleutherococcus senticosus* (Araliaceae), *Lychnis wilfordii* (Caryophyllaceae), *Iris laevigata* and *I. ruthenica* var. *nana* (Iridaceae), *Nymphaea tetragona* var. *minima* (Nymphaeaceae), and *Epilobium hirsutum* (Onagraceae) - for C-value estimation and ploidy level assessment.

# 목 차

체출문  
요약문  
Abstract  
목차  
표 목차  
그림목차

I. 연구 개요 .....	1
1. 연구 목적 및 배경 .....	1
2. 연구 범위 .....	4
3. 주요 연구 내용 .....	10
II. 연구 수행 조직 및 계획 .....	15
1. 수행 조직 .....	15
2. 업무 분장 .....	19
3. 연구 계획 .....	21
III. 연구 재료, 방법, 결과 및 고찰 .....	23
1. 엽록체 genome 분야 .....	23
2. 유전적 다양성 분석 .....	42
가. 독미나리 유전적 다양성 분석 .....	42
나. 비자나무 유전적 다양성 분석 .....	56
다. 자주솨대 유전적 다양성 분석 .....	80
라. 노랑만병초 및 만병초 .....	101
3. Genomics 기반 연구 분야 .....	113
IV. 활용 방안 .....	126
V. 참고 문헌 .....	128
VI. 부록 .....	138

## 표 목 차

표 1. 소기관 유전체 분석이 완료된 분류군 목록 .....	5
표 2. 유전다양성 분석이 완료된 분류군 목록 .....	6
표 3. 당해연도(2012년) 유전적 다양성 분석 대상종 .....	6
표 4. 환경부 지정 멸종위기 식물종 목록 .....	7
표 5. 연구 참여 인력 .....	18
표 6. 수행조직 및 업무분장 .....	19
표 7. 자문위원회 구성 .....	20
표 8. 연구 수행 일정표 .....	22
표 9. 독미나리 엽록체 유전체의 단백질 유전자 조성 .....	30
표 10. 독미나리 엽록체 유전체의 rRNA 및 tRNA 유전자 조성 .....	31
표 11. 독미나리 엽록체 유전체의 inverted repeat region 유전자 .....	31
표 12. 산형목에서 알려진 엽록체 유전체 유전자의 크기 비교표 .....	33
표 13. 산형목에서 알려진 엽록체 유전체 rRNA와 tRNA 유전자 크기 비교표 .....	35
표 14. 산형목에서 알려진 엽록체 유전체 인트론의 크기 비교표 .....	36
표 15. 산형목에서 알려진 엽록체 유전체의 overlapping gene 크기 비교 ..	38
표 16. 산형목에서 알려진 엽록체 유전체의 pseudo-gene 크기 비교표 .....	38
표 17. 본 연구에 이용된 강원 및 전북의 독미나리 4군집 정보 .....	43
표 18. AFLP 분석에 사용된 adapters와 primers .....	46
표 19. 독미나리 6개체군의 유전다양성 .....	49
표 20. 독미나리 개체군의 분자변이분석 (AMOVA) 결과 .....	50
표 21. 독미나리 개체군의 각 집단 간 Nei's unbiased genetic distance .....	51
표 22. 독미나리 개체군의 각 집단 간 지리적 거리 (Km) .....	51
표 23. 비자나무 시료 확보현황 .....	60
표 24. 지역별, 구역별 암수 개체 수와 성비 .....	66
표 25. 비자나무 자연집단과 식재집단의 유전다양성 .....	71
표 26. 서식위치에 따른 비자나무 자연집단의 유전다양성 .....	72
표 27. 비자나무 자연집단과 식재집단의 AMOVA 분석 .....	72
표 28. 서식위치(지역)에 따른 비자나무 자연집단의 AMOVA 분석 .....	73
표 29. 자주솜대 유전다양성 시료 채취 현황 .....	85
표 30. AFLP 분석에 사용된 adapters와 primers .....	87
표 31. 자주솜대의 엽록체 <i>rbcL</i> 및 <i>matK</i> 염기서열 정보 .....	89
표 32. 자주솜대의 분포 경향성 파악을 위한 자주솜대 최저 분포 고도와	

분포 지역의 좌표 정보 .....	92
표 33. 자주솨대 집단의 유전다양성 .....	93
표 34. 자주솨대 집단간의 Nei의 비편차 유전거리와 지리적 거리 (km) .....	94
표 35. 자주솨대 집단의 분자변이 분석(AMOVA) 결과 .....	95
표 36. 노랑만병초 분포지역 .....	104
표 37. 노랑만병초 시료 확보 현황 .....	106
표 38. 만병초 시료 확보 현황 .....	107
표 39. 한국산 철쭉과 식물의 계통분석에 사용된 샘플 목록 .....	108
표 40. 게놈 분석 후보종 평가 기준표 .....	114
표 41. 게놈 프로젝트 후보 평가 결과 .....	116
표 42. 선정된 게놈 프로젝트 후보종 .....	123
표 43. 최종 선정된 게놈 프로젝트 후보종의 C-value 및 염색체 수 .....	124

## 그림 목 차

그림 1. 연구 수행 조직도 .....	15
그림 2. 연구 수행 전략 .....	21
그림 3. 독미나리와 미나리 형태 .....	24
그림 4. 당근의 엽록체 유전체 지도 .....	26
그림 5. 엽록체 유전체 완전 염기 서열 분석 방법 .....	27
그림 6. 독미나리의 엽록체 유전체 지도 .....	29
그림 7. 산형목 7종의 <i>trnC-GCA</i> , <i>trnL-CAA</i> , <i>trnS-UGA</i> 유전자 염기서열 및 2차 구조 비교 .....	37
그림 8. mVISTA분석을 통한 독미나리와 당근의 염기서열 비교 .....	39
그림 9. 독미나리를 기준으로 한 근연목인 Apiales와 Asterales 유전체 염기서열의 mVISTA 분석 .....	40
그림 10. 독미나리 4개 군집 전경 .....	44
그림 11. 독미나리의 연구대상 6 군집의 위치 .....	45
그림 12. Chromatogram of Selective-amplification PCR product .....	48
그림 13. 독미나리 개체군의 유전다양성과 개체군의 크기 사이의 관계를 나타내는 회귀직선 .....	49
그림 14. 독미나리 개체군의 AFLP 자료를 이용한 PCO 분석 결과 .....	50
그림 15. AFLP 결과를 분석한 UMGMA clustering (rooted) .....	52
그림 16. AFLP 결과를 분석한 UMGMA clustering (unrooted) .....	53
그림 17. 군집 D(군산 군집)과 강원 군집간의 엽록체 SSR 차이 .....	53
그림 18. 군산 군집과 강원군집의 엽록체 유전자 구간의 SNP 마커 .....	54
그림 19. 우리나라 비자나무 단목과 개체군 분포지 .....	58
그림 20. 제주도 평대리 비자나무숲의 위치 .....	59
그림 21. 비자나무 자연목과 식재목의 위치 .....	60
그림 22. <i>Torreya jackii</i> 에서 개발된 microsatellite marker를 <i>T. nucifera</i> 에 적용한 결과 .....	63
그림 23. 비자나무에서 증폭된 TJ10 microsatellite marker의 coding .....	63
그림 24. 비자나무숲 내 (A) 지역별, (B) 성별, (C) dbh 등급별에 따른 비자나무의 공간 분포 .....	65
그림 25. dbh에 따른 비자나무의 암수 개체 누적빈도 .....	66
그림 26. 비자나무숲 내 암수 개체들의 (A) 지도화된 암수 개체의 분포. (B) 공간분포를 확인하기 위한 Ripley <i>K</i> 의 결과 .....	68

그림 27. 비자나무숲 조사지의 공간적 유전구조 .....	74
그림 28. 비자나무 집단 의 STRUCTURE 분석결과 .....	75
그림 29. 비자나무 집단 의 microsatellite를 이용한 fingerprinting .....	79
그림 30. 자주솜대(한반도 생물자원포털)와 분포 현황 .....	82
그림 31. 자주솜대 의 성적 이형성 .....	84
그림 32. 동굴레속에서 개발된 microsatellite marker를 자주솜대에 적용한 결과 .....	86
그림 33. 자주솜대 집단 의 AFLP 자료를 이용한 PCO 분석 결과 .....	94
그림 34. 자주솜대 집단 의 Mantel test 결과 .....	95
그림 35. 자주솜대 및 유연분류군 cp <i>matK</i> 유전자 염기서열 분석 결과 얻어진 neighbor-joining tree (Kimura 2-parameter model) .....	97
그림 36. 자주솜대 및 유연분류군 cp <i>rbcL</i> 유전자 염기서열 분석 결과 얻어진 neighbor-joining tree (Kimura 2-parameter model) .....	98
그림 37. 자주솜대 의 분포 경향성 파악 .....	99
그림 38. 노랑만병초와 만병초 .....	103
그림 39. 노랑만병초 및 만병초 분포도 .....	103
그림 40. 한국산 철쭉과 식물 의 계통적 유연관계 분석 .....	110
그림 41. 노랑만병초와 만병초 핵 <i>xdh</i> 유전자 잡종 유형 의 기원에 대한 가설 .....	111
그림 42. 확보된 유전체 연구 후보종 .....	125

# I. 연구 개요

## 1. 연구 목적 및 배경

- 생물자원의 보전·복원 대책을 수립하기 위해서는 생물체의 형태, 해부구조, 생태적 특성 뿐 아니라, 생물 특성 및 진화의 모든 정보를 보유하고 있는 유전적 특성을 파악하여 정확히 종을 인식하는 과정이 필수
- 미래 생물산업의 기초가 되는 유전자원을 확보하여 학술연구 및 산업적 이용에 활용하기 위해서는 유전자 분석·연구 및 관리체계 구축이 필요

### 가. 당해연도 연구 목적

- 한국의 멸종 위기 생물종에 대한 소기관 유전체 전체 염기서열을 파악한다.
- 한국의 멸종 위기 생물종의 유전적 다양성을 파악한다.
- 위의 결과를 근거로 하여 대상종의 보존·복원 및 관리 방안을 수립한다.
- 유전자원 및 유전정보를 확보하여 학술연구 및 산업적 이용에 활용한다.
- 멸종위기종, 고유종 및 경제적 활용 가치가 높은 주요 생물종에 대한 집단 유전학적 분석 및 계통분석 분자 마커의 발굴 및 유전체 정보를 확보한다.
- 연구 대상종의 확증표본 및 유전자 샘플을 확보한다.
- 연구 성과를 학회 발표 및 논문으로 게재한다.

### 나. 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(OECD)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 해야한다.
  - 한국은 고유 생물종의 유전체 연구를 포함하는 유전 정보 확보가 미비한 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.

#### 다. 보존 생물학적 배경

- 우리나라의 많은 고유속, 종 아종, 변종들이 현대의 급격한 산업화에 따른 서식지 파괴, 외래 생물의 유입, 무분별한 남획 등의 이유로 집단 의 수가 급격히 줄어들고 있거나 멸종 위기에 처해 있다.
- 이러한 생물종들을 효율적으로 보존 관리하는 정책을 수립하고 실행 하기 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 이루어져야 하는데 이에 대한 구체적인 대책이 마련되어야 할 것이다.

#### 라. 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 활용할 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 유전자원실과 공동 활용하는 방향이 제시되고 국가 생물자원을 효율적으로 관리할 수 있는 방안이 마련되어야 한다.

## 2. 연구 범위

### 가. 멸종위기생물종의 소기관 유전체 분석

- 본 연구에서는 기존 연도<표 1, 2 참조>에서 분석 완료된 종을 제외한 멸종위기종 1종을 대상으로 엽록체 전체 유전체 염기서열을 분석
- 대상종: 독미나리 (*Cicuta virosa* L., Apiaceae)

<표 1> 소기관 유전체 분석이 완료된 분류군 목록

연구 내용		분석 완료종		
		고등식물	척추동물	곤충
계통분석 또는 유전체 연구 (121종)	'06* (18종)	제주고사리삼 <sup>†</sup> , 미선나무 <sup>†</sup>	반달가슴곰, 호랑이, 산양, 사향노루, 수달, 올빼미, 수리부엉이, 황새, 남생이, 구렁이, 얼룩새코미꾸리, 감돌고기, 꼬치동자개	애기뿔소똥구리, 꼬마잠자리, 물장군
	'07* (23종)	금강초롱꽃 <sup>†</sup> , 모데미풀 <sup>†</sup> , 개느삼 <sup>†</sup> , 광릉요강꽃, 털개불알꽃, 나도풍란, 한란, 죽백란	큰덤불해오라기, 두루미, 가창오리, 검은머리갈매기, 저어새, 큰기러기, 미호종개, 가시고기, 잔가시고기, 독종개, 한독종개	두점박이사슴벌레, 울도하늘소, 수염풍뎅이, 비단벌레
	'08* (22종)	금강인가목속 <sup>†</sup> , 만년콩, 암매, 섬개야광나무, 풍란, 가시오가피, 박달목서	새홀리기, 조롱이, 독수리, 샅, 점박이물범, 모래주사, 가는돌고기, 꾸구리, 임실납자루, 돌상어	붉은점모시나비, 왕은점표범나비, 산굴뚝나비, 멋조롱박딱정벌레, 고려집게벌레
	'09 (18종)	솔잎란, 죽절초, 가시연꽃, 순채, 노랑붓꽃, 노랑무늬붓꽃	큰바다사자, 하늘다람쥐, 큰고니, 재두루미, 흑두루미, 흰수마자, 다목장어, 칠성장어, 맹꽁이	쌍꼬리부전나비, 깊은산부전나비, 귀이빨대칭이
	'10 (20종)	충충둥굴레, 솔나리	붉은박쥐, 토끼박쥐, 금개구리, 표범장지뱀, 비바리뱀, 말뚝가리, 큰말뚝가리, 향라머리검독수리, 물수리	긴꼬리투구새우, 갯게, 붉은발말뚝게, 두드럭조개, 둔한진충산호, 측맷시산호, 연수지맨드라미, 자색수지맨드라미, 별혹산호
	'11 (20종)	대청부채, 진노랑상사화	참수리, 검독수리, 매, 고니, 참매, 통사리, 목납자루, 흰꼬리수리, 벌매, 솔개, 비둘기조롱이, 여우	남방방게, 검붉은수지맨드라미, 선침거미불가사리, 의염통성게, 진홍나팔돌산호, 유착나무돌산호

\*2006-2008년 유전체 분석 사업의 경우 한국 특산속(†)을 대상으로 전체 엽록체 유전체 염기서열 분석이 수행되었으나, 나머지 분류군의 경우 유전체 일부 구간에 대해서만 분석이 수행됨.

<표 2> 유전다양성 분석이 완료된 분류군 목록

연구 내용		분석 완료종		
		고등식물	척추동물	곤충
유전적 다양성 분석 (40종)	'06 (2종)	끈끈이귀개, 황근		
	'07 (10종)	개느삼, 미선나무, 모데미풀, 한계령풀, 제주고사리삼	수달, 수리부엉이, 감돌고기, 가는돌고기	꼬마잠자리
	'08 (8종)	삼백초, 연잎평의다리, 솔나리, 둥근잎평의비름	가창오리, 올빼미, 쉬리	밑드리메뚜기
	'09 (8종)	가시연꽃, 솔잎란, 층층등굴레, 노랑무늬붓꽃	돌상어, 독수리, 새홀리기	애기빨소똥구리
	'10 (6종)	대청부채, 진노랑상사화, 단양쭉부쟁이, 노랑붓꽃, 금붓꽃		흰개미
	'11 (6종)	산작약, 백부자	고라니*, 여우*, 가시고기	긴꼬리투구새우

### 나. 멸종위기생물종의 유전적 다양성 분석

- 본 연구에서는 독미나리, 자주솜대, 비자나무, 노랑만병초를 대상으로 유전적 다양성 분석을 수행

<표 3> 당해연도(2012년) 유전적 다양성 분석 대상종

분석대상종	학명	비고
독미나리	<i>Cicuta virosa</i> L. (산형과)	멸종위기 II급
비자나무	<i>Torreya nucifera</i> Siebold & Zucc. (주목과)	-
자주솜대	<i>Maianthemum bicolor</i> (Nakai) Cubey (비짜루과)	2012년 5월 멸종위기II급에서 해제됨
노랑만병초	<i>Rhododendron aureum</i> Georgi (철쭉과)	멸종위기 II급
만병초	<i>R. brachycarpum</i> D. Don (철쭉과)	-

## 다. 멸종위기생물종의 Genomics 기반연구

- 향후 **계놈 프로젝트**를 수행하기 위한 후보종을 선정하기 위하여 멸종위기종 <표 4 참조> 중 **5종 이상 후보종 선정**
- 2011년 발표된 지정후보종, 신규지정검토종, 해제검토종 등도 선정 대상에 포함

**<표 4> 환경부 지정 멸종위기 식물종 목록**

국명	과	학명	등급	비고
암매	돌매화나무과	<i>Diapensia lapponica</i> L. var. <i>obovata</i> F. Schmidt	I	
만년콩	콩과	<i>Euchresta japonica</i> Hook. f. ex Regel	I	
광릉요강꽃	난과	<i>Cypripedium japonicum</i> Thunb.	I	
나도풍란	난과	<i>Sedirea japonica</i> (Linden & Rchb. f.) Garay & H. R. Sweet	I	
죽백란	난과	<i>Cymbidium lancifolium</i> Hook.	I	
풍란	난과	<i>Neofinetia falcata</i> (Thunb.) Hu	I	
한란	난과	<i>Cymbidium kanran</i> Makino	I	
섬개야광나무	장미과	<i>Cotoneaster wilsonii</i> Nakai	I	
털복주머니란	난과	<i>Cypripedium guttatum</i> Sw.	II	I급으로 변경
진노랑상사화	수선화과	<i>Lycoris chinensis</i> Traub var. <i>sinuolata</i> K. Tae & S. C. Ko	II	
독미나리	산형과	<i>Cicuta virosa</i> L.	II	
섬시호	산형과	<i>Bupleurum latissimum</i> Nakai	II	
가시오갈피나무	두릅나무과	<i>Eleutherococcus senticosus</i> (Rupr. & Maxim.) Maxim.	II	
파초일엽	꼬리고사리과	<i>Asplenium antiquum</i> Makino	II	
단양쑥부쟁이	국화과	<i>Aster altaicus</i> Willd. var. <i>uchiyamae</i> Kitam.	II	
순채	순채과	<i>Brasenia schreberi</i> J. F. Gmel.	II	
죽절초	홀아비꽃대과	<i>Sarcandra glabra</i> (Thunb.) Nakai	II	
노랑만병초	진달래과	<i>Rhododendron aureum</i> Georgi	II	
홍월귤	진달래과	<i>Arctous alpinus</i> (L.) Nied. var. <i>japonicus</i> (Nakai) Takeda	II	
나도승마	수국과	<i>Kirengeshoma koreana</i> Nakai	II	
노랑붓꽃	붓꽃과	<i>Iris koreana</i> Nakai	II	
대청부채	붓꽃과	<i>Iris dichotoma</i> Pall.	II	
조름나물	조름나무과	<i>Menyanthes trifoliata</i> L.	II	

제주고사리삼	고사리삼과	<i>Mankyua chejuense</i> B. Y. Sun, M. H. Kim & C. H. Kim	II	
대홍란	난과	<i>Cymbidium macrorrhizum</i> Lindl.	II	
백운란	난과	<i>Vexillabium yakusimense</i> (Yamam.) F. Maek. var. <i>nakaianum</i> (F. Maek.) T. B. Lee	II	
으름난초	난과	<i>Cyrtosia septentrionalis</i> (Rchb. f.) Garay	II	
지네발란	난과	<i>Cleisostoma scolopendrifolium</i> (Makino) Garay	II	
산작약	작약과	<i>Paeonia obovata</i> Maxim.	II	
기생꽃	앵초과	<i>Trientalis europaea</i> L. subsp. <i>arctica</i> (Fisch. ex Hook.) Hultén	II	
솔잎란	솔잎란과	<i>Psilotum nudum</i> (L.) P. Beauv.	II	
백부자	미나리아재비과	<i>Aconitum coreanum</i> (H. Lév.) Rapaics	II	
세뿔투구꽃	미나리아재비과	<i>Aconitum austrokoreense</i> Koidz.	II	
연잎쟁의다리	미나리아재비과	<i>Thalictrum coreanum</i> H. Lév.	II	
무주나무	꼭두서니과	<i>Lasianthus japonicus</i> Miq.	II	
삼백초	삼백초과	<i>Saururus chinensis</i> (Lour.) Baill.	II	
개명풍	범의귀과	<i>Astilboides tabularis</i> (Hemsl.) Engl.	II	
섬현삼	현삼과	<i>Scrophularia takesimensis</i> Nakai	II	
선제비꽃	제비꽃과	<i>Viola raddeana</i> Regel	II	
왕제비꽃	제비꽃과	<i>Viola websteri</i> Hemsl.	II	
참골담초	콩과	<i>Caragana koreana</i> Nakai ex Cheng		지정후보종
참물부추	물부추과	<i>Isoetes coreana</i> Y. H. Chung & H. K. Choi		지정후보종
섬국수나무	장미과	<i>Physocarpus insularis</i> (Nakai) Nakai		지정후보종
서울개발나물	산형과	<i>Pterygopleurum neurophyllum</i> (Maxim.) Kitag.	II	신규지정
한라솜다리	국화과	<i>Leontopodium hallaisanense</i> Hand.-Mazz.	II	신규지정
분홍장구채	석죽과	<i>Silene capitata</i> Kom.	II	신규지정
제비동자꽃	석죽과	<i>Lychnis wilfordii</i> (Regel) Maxim.	II	신규지정
닷꽃	용담과	<i>Halenia corniculata</i> (L.) Cornaz	II	신규지정
대성쓴풀	용담과	<i>Anagallidium dichotomum</i> (L.) Griseb.	II	신규지정
솔붓꽃	붓꽃과	<i>Iris ruthenica</i> Ker Gawl. var. <i>nana</i> Maxim.	II	신규지정
제비붓꽃	붓꽃과	<i>Iris laevigata</i> Fisch. ex Turcz.	II	신규지정
날개하늘나리	백합과	<i>Lilium dauricum</i> Ker Gawl.	II	신규지정
초령목	목련과	<i>Michelia compressa</i> (Maxim.) Sarg.	II	신규지정
칠보치마	취꼬리풀과	<i>Metanarthecium luteo-viride</i> Maxim.	II	신규지정

각시수련	수련과	<i>Nymphaea tetragona</i> Georgi var. <i>minima</i> (Nakai) W.T.Lee	II	신규지정
큰바늘꽃	바늘꽃과	<i>Epilobium hirsutum</i> L.	II	신규지정
개불알꽃(북주머니란)	난과	<i>Cypripedium macranthos</i> Sw.	II	신규지정
구름병아리난초	난과	<i>Gymnadenia cucullata</i> (L.) Rich.	II	신규지정
금자란	난과	<i>Gastrochilus fuscopunctatus</i> (Hayata) Hayata	II	신규지정
비자란	난과	<i>Thrixspermum japonicum</i> (Miq.) Rchb. f.	II	신규지정
석곡	난과	<i>Dendrobium moniliforme</i> Sw.	II	신규지정
차걸이난	난과	<i>Oberonia japonica</i> (Maxim.) Makino	II	신규지정
콩짜개난	난과	<i>Bulbophyllum drymoglossum</i> Maxim.	II	신규지정
탐라란	난과	<i>Gastrochilus japonicus</i> (Makino) Schltr.	II	신규지정
해오라기난초	난과	<i>Habenaria radiata</i> (Thunb.) Spreng.	II	신규지정
백양더부살이	열당과	<i>Orobanche filicicola</i> Nakai	II	신규지정
물고사리	물고사리과	<i>Ceratopteris thalictroides</i> (L.) Brongn.	II	신규지정
갯봄맞이	앵초과	<i>Glaux maritima</i> L. var. <i>obtusifolia</i> Fernald	II	신규지정
애기송이풀	현삼과	<i>Pedicularis ishidozana</i> Koidz. & Ohwi	II	신규지정
전주물꼬리풀	현삼과	<i>Dysophylla yatabeana</i> Makino	II	신규지정
한라송이풀	현삼과	<i>Pedicularis hallaisanensis</i> Hurusawa	II	신규지정
넓은잎제비꽃	제비꽃과	<i>Viola mirabilis</i> L.	II	신규지정
자주습대	비짜루과	<i>Smilacina bicolor</i> Nakai	II	해제
층층둥굴레	비짜루과	<i>Polygonatum stenophyllum</i> Maxim.	II	해제검토
습다리	국화과	<i>Leontopodium coreanum</i> Nakai	II	해제
깽깽이풀	매자나무과	<i>Jeffersonia dubia</i> (Maxim.) Benth. & Hook. f. ex Baker & S. Moore	II	해제
한계령풀	매자나무과	<i>Gymnospermium microrrhynchum</i> (S. Moore) Takht.	II	해제
둥근잎평의비름	돌나물과	<i>Hylotelephium ussuriense</i> (Kom.) H. Ohba	II	해제
개느삼	콩과	<i>Sophora koreensis</i> Nakai	II	해제
애기등	콩과	<i>Wisteria japonica</i> Siebold & Zucc.	II	해제
황기	콩과	<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	II	해제
개가시나무	너도밤나무과	<i>Quercus gilva</i> Blume	II	해제검토
히어리	조록나무과	<i>Corylopsis glabrescens</i> Franch. & Sav. var. <i>gotoana</i> (Makino) T. Yamanaka	II	해제
노랑무늬붓꽃	붓꽃과	<i>Iris odaesanensis</i> Y. N. Lee	II	해제

물부추	물부추과	<i>Isoetes japonica</i> A. Br.	II	해제
솔나리	백합과	<i>Lilium cernuum</i> Kom.	II	해제
큰연령초	여로과	<i>Trillium camschatcense</i> Ker Gawl.	II	해제
박달목서	물푸레나무과	<i>Osmanthus insularis</i> Koidz.	II	해제
매화마름	미나리아재비과	<i>Ranunculus trichophyllus</i> Chaix var. <i>kadzusensis</i> (Makino) Wiegleb	II	해제검토
갯대추나무	갈매나무과	<i>Paliurus ramosissimus</i> (Lour.) Poir.	II	해제
망개나무	갈매나무과	<i>Berchemia berchemiifolia</i> (Makino) Koidz.	II	해제
끈끈이귀개	끈끈이귀개과	<i>Drosera peltata</i> Sm. ex Willd. var. <i>nipponica</i> (Masam.) Ohwi	II	해제후보종
자주땅귀개	통발과	<i>Utricularia yakusimensis</i> Masam.	II	해제후보종
황근	아욱과	<i>Hibiscus hamabo</i> Siebold & Zucc.	II	해제후보종
가시연꽃	난과	<i>Euryale ferox</i> Salisb.	II	해제후보종
미선나무	물푸레나무과	<i>Abeliophyllum distichum</i> Nakai	II	해제후보종

### 3. 주요 연구 내용

#### 가. 기존연구

##### (1) 제 1단계사업(2006~2008)

- 식물 엽록체 유전체 연구로는 우리나라 특산 속, 종 및 멸종위기종 중 17종의 식물에 대해 엽록체 전체 또는 일부 구간에 대한 연구가 수행되었다. 우리나라 특산 속인 제주고사리삼, 미선나무, 모데미풀, 금강초롱꽃, 개느삼, 금강인가목속의 경우 엽록체 전체 구간에 대한 연구가 수행되었다(표 1). 동물 미토콘드리아 유전체 연구로는 48종의 동물에 대해 미토콘드리아 전체 또는 일부 구간의 염기서열이 확보되었다(표 1).
- 유전적 다양성 연구로는 우리나라 특산 속, 종 및 멸종위기종 중 11종의 식물과 9종의 동물에 대해 유전다양성 연구가 수행되었다(표 2).
- 유전다양성 분석은 식물의 경우 핵 ITS, iSSR 및 allozyme 분석을 수행하였으며, 동물의 경우 미토콘드리아 marker 부위에 대한 염기서열

결정 및 변이 분석을 수행하였다.

- 유전자원 활용을 위한 database 및 집단유전학적 자료 등을 종합한 database를 구축할 것으로 제안되었으나 아직 시행되지 있다. 또한, 위 사업의 결과가 완전히 공개되지 않은 상황이다.

## (2) 제 2단계 사업(2009~2011)

- 식물 엽록체 유전체 연구로는 솔잎란, 죽절초, 가시연꽃, 순채, 노랑붓꽃, 노랑무늬 붓꽃, 층층등굴레, 솔나리, 대청부채, 진노랑상사화 등 10종의 멸종위기종 식물에 대해 엽록체 전체 구간 염기서열이 확보되었다. 멸종위기종 동물의 경우 48종에 대해 미토콘드리아 전체 구간의 염기서열이 확보되었다(표 1).

- 멸종위기종 유전 다양성 연구 - DNA

식물의 경우, 가시연꽃('09), 솔잎란('09), 대청부채('10), 진노랑상사화('10), 단양쭉부쟁이('10), 산작약('11), 백부자('11)에 대하여 엽록체 및 미토콘드리아의 유전변이(SSR, SNP), microsatellite 분석(대청부채 및 진노랑상사화, 산작약 및 백부자), AFLP 분석(단양쭉부쟁이) 등을 통해 집단의 유전적 다양성을 분석하였다(표 2). 동물의 경우 돌상어, 독수리, 새홀리기, 애기뿔소똥구리, 흰개미, 가시고기, 긴꼬리투구새우, 고라니, 여우 등을 대상으로 미토콘드리아 marker구간의 염기서열 결정 및 변이 분석과 microsatellite 분석(가시고기, 긴꼬리투구새우, 고라니, 여우)을 수행하였다.

- 멸종위기종의 유전 다양성 연구 - allozyme.

층층등굴레('09)와 노랑무늬붓꽃('09)에 대하여 알로자임 분석을 통한 군집 및 개체 유전다양성을 연구하였다(표 2).

- 노랑붓꽃과 금붓꽃의 분류학적 위치 재설정 연구('10)- 형태분석 및 DNA 염기서열 계통분류학적 연구

*mark*, *ycf1* 유전자를 비롯한 엽록체 marker 구간 및 핵 *xdh* 유전자, nrITS 구간 염기서열을 이용한 계통분류학적 연구 및 비교형태학적 연구를 통해 노랑붓꽃과 금붓꽃의 분류학적 한계 및 위치를 연구

하였다(표 2).

- 산작약과 백작약의 분류학적 실체 규명 (11): 엽록체 *matK* 유전자, 핵 *xdh* 유전자 및 미토콘드리아 *nadI* exon b-c intron 구간 염기서열 분석을 통해 산작약과 백작약이 독립된 분류군임을 규명하였다(표 2).

## 나. 당해연도(2012) 주요 연구 내용

### (1) 멸종위기생물종의 소기관 유전체 분석

본 연구에서는 멸종위기종인 독미나리(*Cicuta virosa* L., 산형과) 1종을 대상으로 엽록체 전체 유전체의 염기서열을 분석하였다. 확보된 염기서열은 기존에 보고된 현화식물의 유전체 구조 및 유전자 염기서열과 비교하여 독미나리의 유전체 구조 및 유전자를 동정해 내며, 특히 산형과에서 엽록체 전체 유전체가 보고된 당근(*Daucus carota* L.) 및 산형과와 가까운 두릅나무과의 인삼(*Panax ginseng*) 및 가시오갈피(*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim.) (Yi et al., 2012) 등과의 비교 분석을 수행하였다.

독미나리의 경우 서식지의 보전기관인 신구대학에서 2010년도에 강원도 강릉시에서 수집되어 종자로 번식되고 있으며, 이를 대상으로 하여 연구를 수행하였다. 확보된 확증표본, 생체조직, gDNA 등은 『유전자원 시료 관리 및 수장 표준화』 방법에 따라 국립생물자원관에 제출하며, 유전체 염기서열은 NCBI GenBank format에 따라 annotation하여 제출한다.

### (2) 멸종위기생물종의 유전적 다양성 분석

본 연구에서는 독미나리, 비자나무, 자주솜대, 노랑만병초 및 만병초 등 멸종위기종 4종과 유연분류군 1종을 대상으로 샘플 확보 및 유전적 다양성 분석을 수행하였다(표 3).

독미나리의 경우 엽록체 유전체 분석 및 유전적 다양성 분석을 동시에 진행하였으며, 신구대학 식물원에서 2010년도에 강원도 강릉시, 평창시, 횡성

군 및 전북 군산시 등에서 확보한 종자 및 시료를 대상으로 분석을 수행하였다. 또한, 최근 서식지가 새로이 발견된 강원도 횡성 일대에 대한 추가 조사를 통해 유전 다양성 및 유전자 흐름의 경향에 대해 파악해 보고자 하였다. 독미나리의 경우 (주)녹색식물연구소와 신구대학과의 예비 연구가 이미 진행된 바 있어, 엽록체 일부 변이구간에 대한 기초자료를 바탕으로 **엽록체 변이구간에 대한 분석 및 AFLP 분석**을 수행하였다.

**비자나무**의 경우 제주도 평대리의 비자나무 군락지에 서식하는 개체를 대상으로 이들 개체의 연령, 유전적 공간구조 등을 종합적으로 분석하고자 하였다. 특히, 자웅이주인 개체의 특성을 고려해 성을 고려하여 시료를 채취하였으며, 정밀한 개체의 위치를 파악, O-ring 통계량을 이용해 공간구조를 분석하였다. 비자나무의 유전적 다양성 분석은 **microsatellite 분석**을 적용하였으며, 이를 위해 중국의 동속 분류군인 *Torreya jackii* Chun에 대해 개발된 **microsatellite marker**(Li et al., 2011)를 적용하였다.

**자주솨대의 경우** 지리산, 덕유산, 태백산, 오대산, 설악산 등의 5개 지역에서 100개체 이상을 대상으로 유전적 다양성 분석을 수행하였으며, 특히 김 (1997)과 Kim & Lee (1998)이 자주솨대의 변종으로 보고한 연두솨대(var. *flavovirens*)의 실체를 파악하기 위해 유연 분류군을 포함한 계통분석을 동시에 수행하였다. **계통학적 분석**을 위해 엽록체 *matK* 유전자와 *rbcL* 유전자를 증폭하여 염기서열을 밝혔으며, **유전다양성 분석**은 **AFLP 분석**을 적용하였다.

**노랑만병초**의 경우 국내에서 보고된 유일한 분포지는 설악산 1개 장소로, 일본, 중국, 러시아 등지에도 분포하는 것으로 알려져 있다. 노랑만병초의 경우 국내 집단과 백두산지역, 러시아 사할린 및 일본 Gifu현 지역 등 국외 3개 지역 이상을 대상으로 하여 **1집단당 최소 25개체 이상**으로부터 유전자원 시료를 확보하였다. 시료는 공간적 분포 및 거리간 유전자 이동 등을 고려하여 line transect를 적용, 최소한 5 m 이상 거리를 두고 채취하였다. 유전자원 시료 외에 서식지별로 **living collection**을 확보, 서식지의 보전기관(한국자생식물원)에 기탁하여 관리, 보전하도록 하였다. **만병초**의 경우 설악산, 오대산, 방태산, 태백산, 지리산, 울릉도 등 국내 6개 지역과 일본 Gifu현의 1개 지역 등을 대상으로 **1 집단당 20개체 이상**으로부터 유전자원 시료를 확보하였다. 노랑만병초와 만병초의 **계통적 유연관계**를 파악하기 위해 **엽록체 *rbcL* 유전자 및 핵 *xdh* 유전자** 구간의 염기서열을 증폭, 분석하였다. 유전적 다양성 분석을 위한 유전자 다양성 문헌의 확보 및 기 보고된 분자마

커를 조사하였다.

이상의 연구결과 얻어진 자료를 토대로, 대상 종의 보존, 관리 방안을 제시하며, 대상종의 위협 요인(불법채취, 서식지 파괴, 기후 변화 등)에 대한 고찰 등을 수행하였다. 또한, 대상종의 생태특성과 집단 분석 결과를 종합하여 해당 종의 증식, 복원 방법, 관리 방안 및 보전 대책을 제시하였다. 확보된 확보표본, 생체조직, gDNA 등은 『유전자원 시료 관리 및 수장 표준화』 방법에 따라 국립생물자원관에 제출하며, 유전자 염기서열은 NCBI GenBank format에 따라 annotation하여 제출한다.

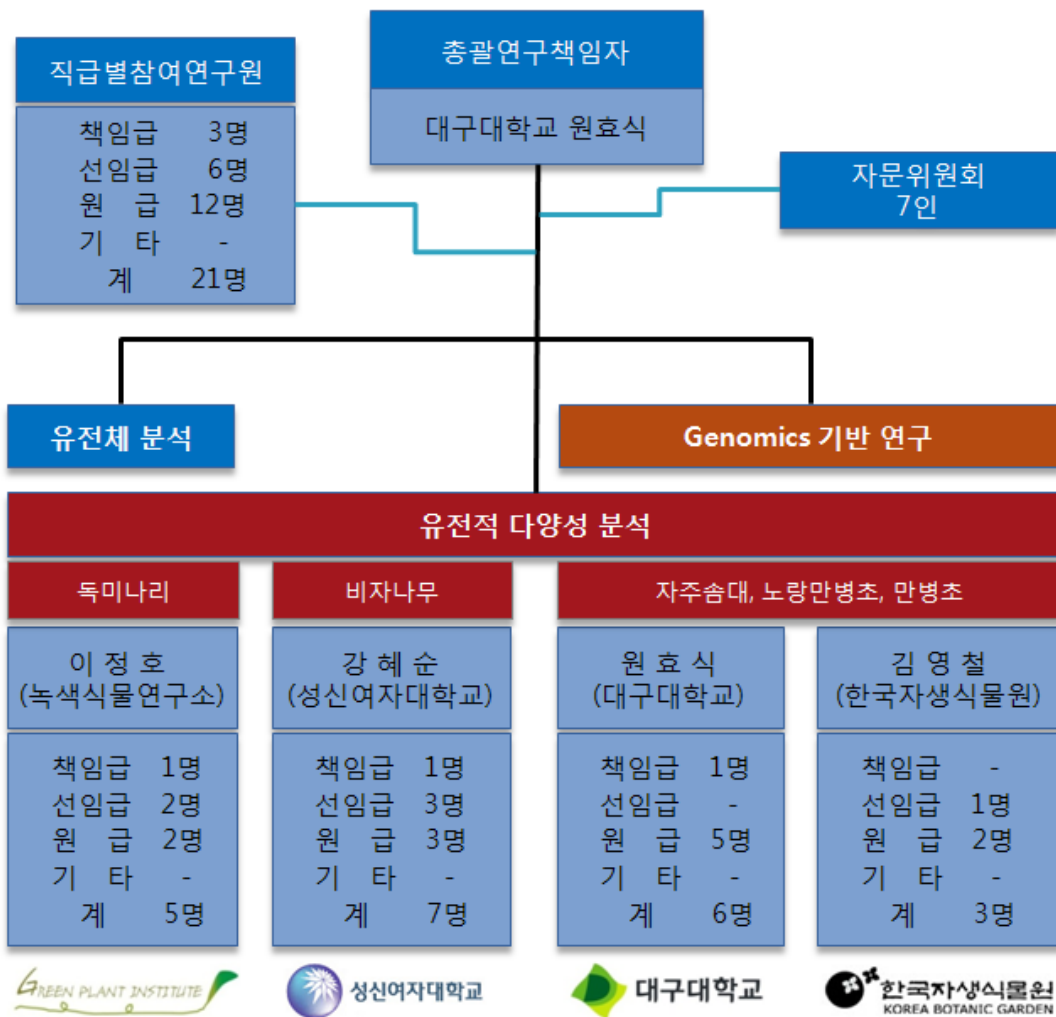
### (3) 멸종위기생물종의 Genomics 기반연구

본 연구에서는 향후 계놈 프로젝트를 수행하기 위한 후보종을 선정하기 위하여 멸종위기종을 대상으로 5종 이상 후보종을 선정하였다. 후보종의 선정기준으로는 유전체 배수성의 검증, 계놈 크기 추정, 생태적 특징, 수정양상 및 수분매개체 분석, 실질적 시료 확보 가능량, 경제적 가치 및 생물산업계 등의 활용도 분석 등으로 하며, 동시에 해당 분류군의 인공증식 방법, 근연관계가 높은 종의 국내외 연구현황 파악 및 Genomics 연구 후 파급효과 분석 등에 연구도 수행하였다. 선정된 후보종 중 우수한 개체를 선발하여 서식지의 보존기관(한국자생식물원)에 기탁하여 이들을 관리, 보존하도록 하여 추후 자원관에서 연구를 수행할 때 사용할수록 유지 관리한다. 목본성인 경우 가능하면 무성생식 방법을 사용하여 개체를 유지할 수 있도록 하였으며, 초본성의 경우 종자 등을 확보하여 순계 유지가 가능하도록 하였다. 확보된 후보종은 당해연도를 포함하여 최소한 2년간 유지하도록 하며, 이후 유지, 관리가 필요할 경우에는 자원관과 협의하여 추가적인 관리 방안을 제시하도록 하였다. 선정된 후보종에 대해서는 5장 이상의 사진자료를 비롯한 상세한 자료를 제시하도록 하였다.

## II. 연구 수행 조직 및 계획

### 1. 수행조직 및 업무분장

#### 가. 연구 조직도



<그림 1> 연구 수행 조직도.

나. 연혁

주관업체 일반현황 및 연혁

기관명	대구대학교	대표자	홍 덕 루
사업 분야	교육기관		
주소	경북 경산시 진량읍 내리리 15번지		
전화 번호	053-850-5147		
회사설립년도	1956년 5월 1일		
해당부문 종사기간	1956년 5월 1일 - 현재까지		
<u>주요연혁</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1957. 3.29 : 한국사회사업학교 인가</li> <li>- 1981. 6. 1 : 점자도서관 개관</li> <li>- 1981.10.20 : 대구대학교 교명 변경 승인</li> <li>- 1982. 3. 2 : 제1대 총장 이태영박사 취임</li> <li>- 1983.12. 5 : 중앙도서관 준공 및 개관</li> <li>- 1999. 3.31 : 사범대학 전국 최우수 대학 선정</li> <li>- 2005. 7.27 : 중앙도서관 증축</li> <li>- 2008.10. 1 : 종합복지관 증축 공사 기공식</li> </ul>		

### 협동업체 일반현황 및 연혁

회 사 명	주)녹색식물연구소	대 표 자	이정호
사 업 분 야	환경생태분류조사연구, 학술용역, BT R&D (bioenergy, etc)		
주 소	경기도 수원시 권선구 서호로 89 서울대학교 농생명과학 창업지원센터 2동-205호		
전 화 번 호	031-278-1904		
회 사 설 립 년 도	<b>2006년 11월</b>		
해당부문 종사기간	2006년 11월 ~ 2012년 4월 (5년6개월)		
<u>주요연혁</u>			
<p>2006. 11. 주)녹색식물연구소 설립 (서울시 청량리)</p> <p>2007. 06. 서울대학교 농생명과학 창업지원센터로 입주 (수원시 서둔동)</p> <p>2007. 09. 주)녹색식물연구소 연구전담부서 설립</p> <p>2008. 11. 벤처기업인증</p> <p>2008. 11. 미국학술회지(PNAS) 표지 논문 출간</p> <p>2008. 12. 기업부설연구소 설립</p>			
<u>주요 연구용역 완수실적</u>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 김 품종 구분을 위한 엽록체 마커개발(남해수산연구소 2008)</li> <li>- 주요생물자원의 유전자분석연구: 식물(국립생물자원관 2009)</li> <li>- 김 품종 검정을 위한 엽록체 마커개발(남해수산연구소 2009)</li> <li>- 주요생물자원의 유전자분석연구: 식물유전체(국립생물자원관 2010)</li> <li>- 주요생물자원의 유전자분석연구: 식물 유전다양성(국립생물자원관 2010)</li> <li>- 김 품종 확인을 위한 엽록체 마커개발(해조류바이오센터 2010)</li> <li>- 잔류농약 국제기준 조화를 위한 식품 원료 분류 설정을 위한 연구 (식품의약안전청 2011)</li> <li>- 주요생물자원의 유전자분석연구: 식물유전체(국립생물자원관 2011)</li> <li>- 주요생물자원의 유전자분석연구: 식물 유전다양성(국립생물자원관 2011)</li> <li>- 김 품종 확인을 위한 유전자 마커개발(해조류바이오센터 2011)</li> </ul>			

<표 5> 연구 참여 인력

성명	주민등록번호	소속기관(대학)	참여임무	참여시작	참여율 (%)
		소속부서(학과)	최종학위	참여종료	
원효식	700310-*****	대구대학교	연구책임자	2012.04	30
		생명과학과	박사	2012.12	
진봄비	870224-*****	대구대학교	연구보조원	2012.04	20
		생명과학과	박사과정	2012.12	
김주환	840315-*****	대구대학교	연구보조원	2012.04	20
		생명과학과	박사과정	2012.12	
임창건	841117-*****	대구대학교	연구보조원	2012.04	20
		생명과학과	박사과정	2012.12	
백승훈	850517-*****	대구대학교	연구보조원	2012.04	15
		생명과학과	석사과정	2012.12	
최선아	860913-*****	대구대학교	연구보조원	2012.04	15
		생명과학과	석사과정	2012.12	
강혜순	560111-*****	성신여자대학교	연구원	2012.04	20
		생명과학·화학과	박사	2012.12	
장은미	640321-*****	(주)지인컨설팅	연구원	2012.04	10
		이화여대	박사	2012.12	
신휴석	000000-*****	(주)지인컨설팅	연구원	2012.04	10
		시립대학교	박사	2012.12	
홍경낙	650727-*****	산림과학원	연구원	2012.04	10 (무급)
		산림유전자원과	박사	2012.12	
신수경	851017-*****	산림과학원	연구보조원	2012.04	10 (무급)
		산림유전자원과	석사	2012.12	
김차연	890109-*****	성신여자대학교	연구보조원	2012.04	15
		생명과학·화학과	석사과정	2012.12	
우성현	900402-*****	성신여자대학교	연구보조원	2012.04	15
		생명과학·화학과	학부과정	2012.09	
주미경	880719-*****	성신여자대학교	연구보조원	2012.10	15
		글로벌의학과	조교	2012.12	
김영철	661222-*****	한국자생식물원	연구원	2012.04	10
		연구실장	석사	2012.12	
채현희	801220-*****	한국자생식물원	연구원	2012.04	10
		팀장	석사	2012.12	
김대현	800118-*****	한국자생식물원	연구원	2012.04	10
		팀장	학사	2012.12	
이정호	680904-*****	녹색식물연구소	연구원	2012.04	35
		부설연구소	박사	2012.12	
이혜연	710322-*****	녹색식물연구소	연구원	2012.04	70
		부설연구소	박사	2012.12	
심재경	760612-*****	녹색식물연구소	연구원	2012.04	45
		부설연구소	석사	2012.12	
박지혜	840224-*****	녹색식물연구소	연구보조원	2012.04	70
		부설연구소	석사	2012.12	
이민지	861204-*****	녹색식물연구소	연구보조원	2012.04	50
		부설연구소	석사	2012.12	

## 2. 업무 분장

<표 6> 수행조직 및 업무분장

연구팀	업무분장
<p>대구대학교 연구팀 &lt;원효식 교수&gt;</p>	<p>연구 사업 총괄 자주솥대 유전다양성 분석 및 집단유전학적 분석 노랑만병초 및 만병초 시료 확보 및 계통적 유연관계 분석, 유전적 다양성 분석 방안 연구 genomics 기반 연구 - 후보종 선정 및 평가</p>
<p>녹색식물연구소 연구팀 &lt;이정호 소장&gt;</p>	<p>독미나리 유전체 분석 독미나리 유전적 다양성 분석 및 집단유전학적 분석 독미나리 유전다양성 제고 방안 제시</p>
<p>성신여대 연구팀 &lt;강혜순 교수&gt; (주)지인컨설팅</p>	<p>비자나무의 유전적 다양성 분석 비자나무의 유전적 공간구조 분석 비자나무 후계림 조성 방안 및 유전다양성 제고 방안 제시</p>
<p>한국자생식물원 연구팀 &lt;김영철 실장&gt;</p>	<p>독미나리, 자주솥대, 노랑만병초 및 만병초의 분석 시료 채취, 생태환경 및 생식 과정 등 분석 대상종의 증식 보전 관리방안 연구 노랑만병초 및 만병초, genomics 기반 연구 대상종 관리 보존, 증식 genomics 기반 연구 - 후보종 선정 및 평가</p>

<표 7> 자문위원회 구성

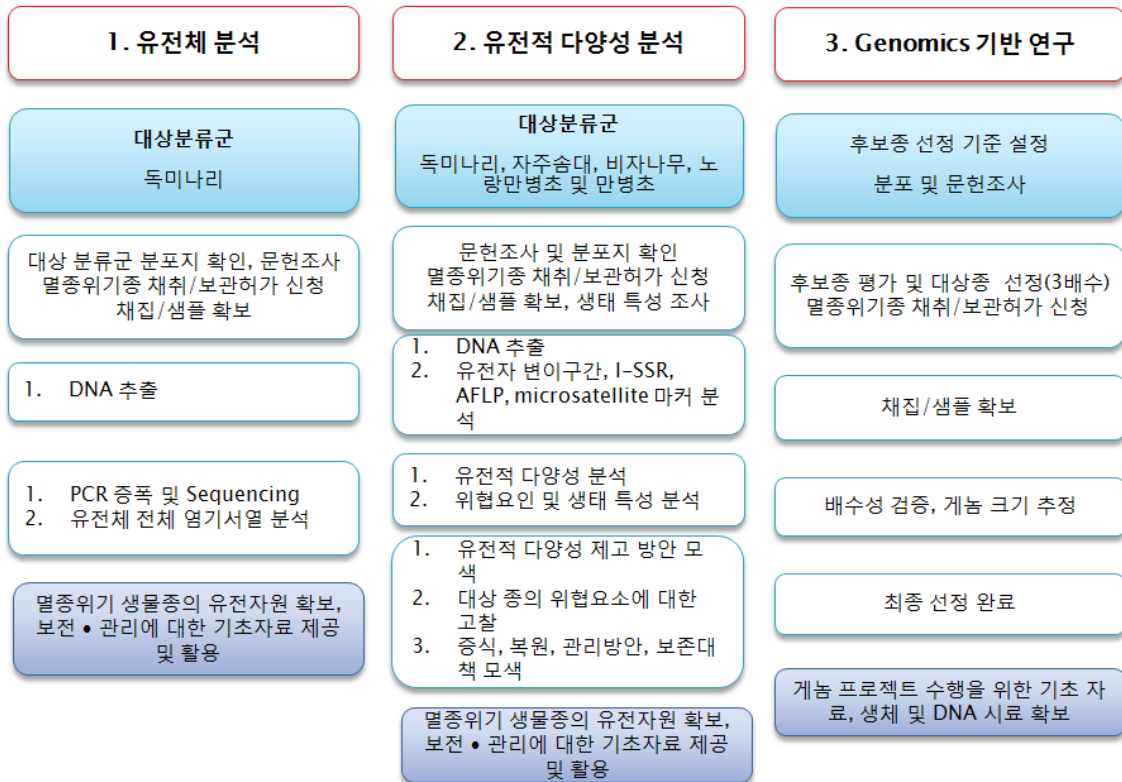
성명	소속 및 직위	기타
박범석	국립농업과학원 차세대유전체연구사업단장	
이희재	농림수산기술기획평가원 전략기획본부장	
최익영	서울대학교 농업과학공동기기센터 유전체분석센터장	
현진오	(주)동북아식물연구소 소장	
천영진	한국환경영향·평가연구원	

### 3. 연구 계획

#### 가. 연구 사업 기간:

2012년 04월 16일 - 2012년 12월 15일 (8개월간)

#### 나. 연구 사업 전략 및 계획



<그림 2> 연구 수행 전략

<표 8> 연구 수행 일정표

연구기간: 2012년 4월 16일 - 12월 15일

구 분	M+1	M+2	M+3	M+4	M+5	M+6	M+7	M+8
착수보고회	■							
현지조사/식물채집								
◆ 독미나리	■				■			
◆ 비자나무	■	■			■			
◆ 자주솜대	■		■	■	■			
◆ 노랑만병초/만병초	■		■	■	■			
유전체 분석								
◆ 증폭 및 시퀀싱	■	■	■	■	■			
◆ 유전체 분석				■	■	■	■	
유전다양성 분석								
◆ 마커 개발		■	■	■	■			
◆ 마커 분석			■	■	■	■	■	
◆ 자료해석				■	■	■	■	
Genomics 기반 연구								
◆ 후보종 평가	■	■	■	■	■	■		
◆ 후보종 확보		■	■	■	■	■	■	
중간보고서 작성				■				
중간보고회				■				
초안보고서 작성							■	
최종보고회								■
성과품 납품								■

(회색선: 서식지의 보전기관의 샘플 확보 및 분석)

### III. 연구 결과

#### 1. 엽록체 genome 분야

##### 가. 서론

산형과는 434속의 3,700종 이상을 포함하는 현화식물 중 가장 큰 속의 하나이고, 약용, 향료, 쌈을 포함한 엽채류 등을 다수 포함한다. 국제식품분류기준(CODEX)에는 한국의 엽채소류로 당귀와 미나리가 포함되어 있다. 이 산형과의 멸종위기종은 독미나리와 섬시호가 멸종 위기종 II급에 포함되어 있으며, 독미나리는 이웃 일본에서도 멸절위기 식물로 관심을 갖고 있다. 이 독미나리는 한국인이 사용하는 쌈과 요리에 사용하는 미나리와 같이 자라며 수생식물이다. 철학자 소크라테스는 Hemlock(*Conium* or *Cicuta*)의즙액으로 만들어진 독배를 마시고 죽은 것으로 알려질 만큼, 독미나리(Water hemlock)의 뿌리진액에 신경독성을 가진 맹독성 Cicutoxin을 함유하고 있다. 이 성분은 1876년 Boehm에 의해 분리되었고, 1949년 Clarke에 의해 결정화되었다. 그 구조식은  $\text{HOCH}_2(\text{CH}_2)_2(\text{C}=\text{C})_2(\text{CH}=\text{CH})_3\text{CHOHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 로 밝혀져 있으며, 이 neurotoxin에 기인하여 어린 가축을 죽이거나, 인명에게도 피해를 보이는 극독식물이다. 이 독미나리의 유전체 정보는 알려져 있지 않다.

산형과의 식물분류와 계통학 연구는 근연종간 변이가 형태적으로 용이하지 않고, 유전 정보가 제한적이어서 *rbcL*과 nr-ITS에 의존하나 그 변이가 매우 낮은 것으로 알려져 있어, 전 세계적으로 그 연구가 미흡하다. 또한, 산형과의 유전체 연구는 경제적 중요성에 비해 다른 분류군보다 유전 정보가 매우 제한적으로 알려져 있어 유용정보를 갖는 구간확보가 필요한 실정이다. 산형과의 유전체 연구는 당근(*Daucus carota*)에 대한 연구에 의존하고 있으며, 당근의 경우, 엽록체의 완전 염기서열이 Ruhlman *et al.* (2006)에 알려져 있고, 핵 유전체에 대한 기반연구(Cavagnaro *et al.* 2011)가 진행 중에 있다. 자원보존이라는 관점에서 산형과의 식물로 섬시호(*Bupleurum latissimum*)와 독미나리(*Cicuta virosa*)의 2종이 멸종위기 식물로 보호되고 있어 그 유전정보를 확보하는 것은 자원 주권을 보호한다는 관점에서 큰 의미를 갖는다고 하겠다.



<그림 3> 독미나리와 미나리 형태. A. 산형과 특이 화서를 보이는 독미나리 화서 B. 서식지에서의 독미나리 C. 서식지에서 공존하는 미나리와 독미나리. 왼쪽 화살표는 미나리 줄기를 보여 주며, 오른쪽 화살표는 독미나리의 엽병을 보여준다. D. 왼쪽의 화살표는 미나리의 각진 줄기의 마디를 나타내며, 오른쪽 화살표(흰색)는 수염뿌리사이에 두꺼운 지하경을 나타낸다.

독미나리(*Cicuta virosa*)는 유독식물로, 약용식물, 건강보조식품으로 알려져 있는 다년생 초본 습지 식물이다. 한국·중국·유럽·북아메리카 등에 널리 분포하는 유독식물로서 한국에서는 대관령 북쪽 습지에서 자라며 심은 것은 남부지방에서도 잘 자라는 것으로 알려져 있다. 식물체는 높이가 1 m에 달하고 전체에 털이 없다. 지하경은 굵으며 녹색이고 마디가 있으며 마디사이에는 속이 비어 있고 지하경 끝에서 속이 빈 지상경이 자라며 가지가 갈라진다. 근생엽과 밑부분의 잎은 엽병이 길고 삼각상 난형이며 길이 30~50 cm로서 2회 우상으로 갈라지고 최종엽편은 선상 피침형 또는 넓은 피침형이며 끝이 뾰족하고 길이 3~8 cm, 너비 7~20 mm로서 가장자리에 뾰족한 톱니가 있으며 위로 올라가면서 잎이 작아지고 엽병이 없어진다. 대산경 끝에는

20개 정도의 산변이 있으며 총포편은 없고 소산경은 길이 3~7 cm로서 10여 개의 꽃이 달리며 선상의 소총포편이 있고 6~8월에 백색 꽃이 핀다. 소화경은 길이 8~10 mm이며 꽃잎과 수술은 각각 5개이고 자방은 하립이다. 열매는 난상 구형이며 길이 2.5 mm로서 녹색이고 굵은 능선이 있으며 능선 사이에 1개의 유관이 있다. 염색체는  $n=11$ 이다.

독미나리는 2005년 3월 멸종위기야생동식물 보호법의 개정으로 멸종위기야생식물에 추가된 식물이다. 최초 자생지로 알려진 강원도 강릉시 왕산면 대기리에는 도로확대 포장 공사가 진행되고, 다른 자생군락지에서는 산업단지 조성공사 때문에 자생지가 훼손되고 있어 종합적인 서식지외 보전 대책이 필요한 종이다. 2009년 서식지보존기관으로 선정된 신구대학에서 독미나리의 증식을 수행하고 있다.

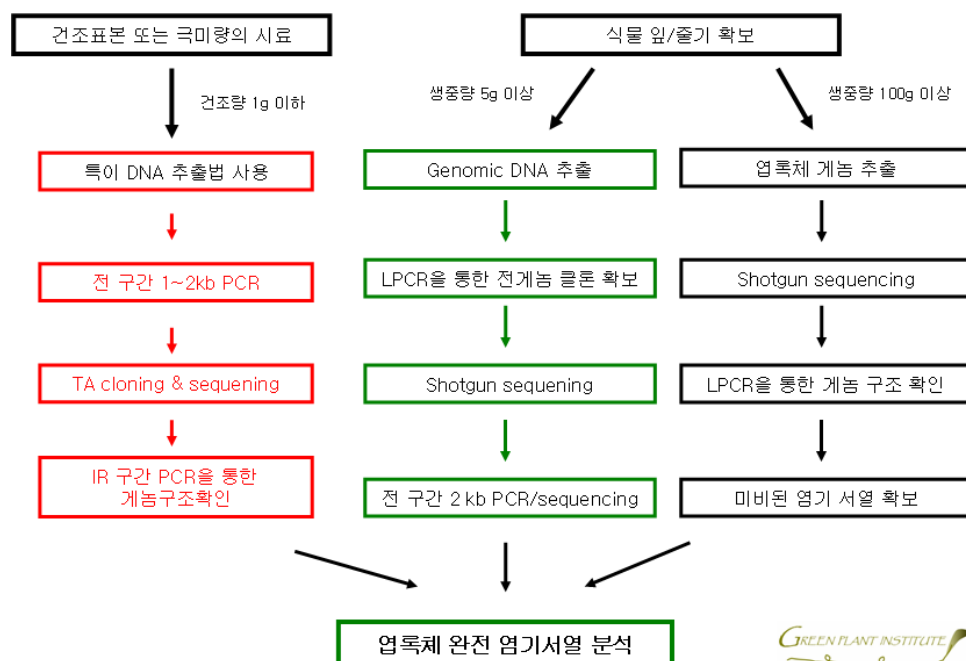


## 나. 엽록체 유전체 재료 및 연구방법

### (1) 연구재료

본 연구재료인 독미나리(*Cicuta virosa*)는 신구대학에서 서식지 보존을 위한 연구로 신구대학 식물원(당시 식물원장 황환주 교수) 이재선에 의해 2010년 10월 7일에 강원도 강릉시(A 군집)에서 수집하여 제공된 14개의 잎 중 A13을 본 연구에 reference로 사용하였고(DNA No.: GPI2010\_22A13), 본 연구의 엽록체 유전체 연구는 한국에서 가장 큰 군집인 강원도 횡성군의 군집에서 채집한 생체(DNA No.: GPI2012\_22E08)를 이용하여 본 연구를 수행하였다. 멸종위기종의 군집에 영향을 최소화하기 위하여, 식물체의 잎 일부를 채취해서 연구하는 방법으로 연구를 진행하였다.

### 멸종 위기종 엽록체 게놈분석



<그림 5> 엽록체 유전체 완전 염기 서열 분석 방법

## (2) 엽록체 구조 연구

엽록체 유전체를 총 11구간으로 나누어 22개의 L-PCR 프라이머(약 30-mer)를 제작하여, 10~30 kb L-PCR을 수행하며, 동시에 SSC, IR 및 LSC 구간의 크기를 추정한다. rRNA오페론이 나누어져 있지 않으면, SSC구간의 SPCR/sequencing을 통해 얻어진 IR에서 SSC의 Junction A2 구간과 Junction B1 구간을 SSC 중앙부위에서 IR 중앙부위로 20~30 kb LPCR로 그 구조를 확인한다. 다음 단계로 Junction A1과 Junction B2 구간을 LSC의 주위구간에서 먼 구간까지 단계적으로 LCR로 IR의 크기를 측정한다. 이 단계에서 엽록체 유전체의 구조를 확립하였다.

## (3) SPCR과 sequencing

일단 오페론 단계의 검정이 끝나면, 오페론 내의 유전자 단위의 SPCR(2~3 kb)을 통한 PCR product를 sequencing한다. 오페론이 3'에 마주하거나, ori 구간, tRNA유전자의 pseudo-copy가 있을 때, multiple microsatellite 구간에서 sequencing이 용이하지 않으며, 이 경우 TA cloning에 의해 sequencing을 하며 이 결과는 다시 SPCR 프라이머 제작에 사용하고 500 bp SPCR로 다시 sequencing해 결과로 사용하였다.

## (4) 염기서열 재검정

일단 약 4~6X의 염기서열분석을 마치면 ORF, 20여개의 인트론 2차 구조분석, tRNA의 2차 구조분석, rRNA 분석, 5'UTR 및 3' UTR 분석, IGS의 SSR 분석 및 미 보고된 pseudo-tRNA 유전자 검색 후 새로운 프라이머를 디자인해 L-PCR로 구조를 재확인하고, 의심구간은 다시 염기 서열을 검정한다. 이 단계에서 6~10X의 염기 서열 분석을 하게 된다. 이 분석을 위하여 GCG package를 사용하였다.

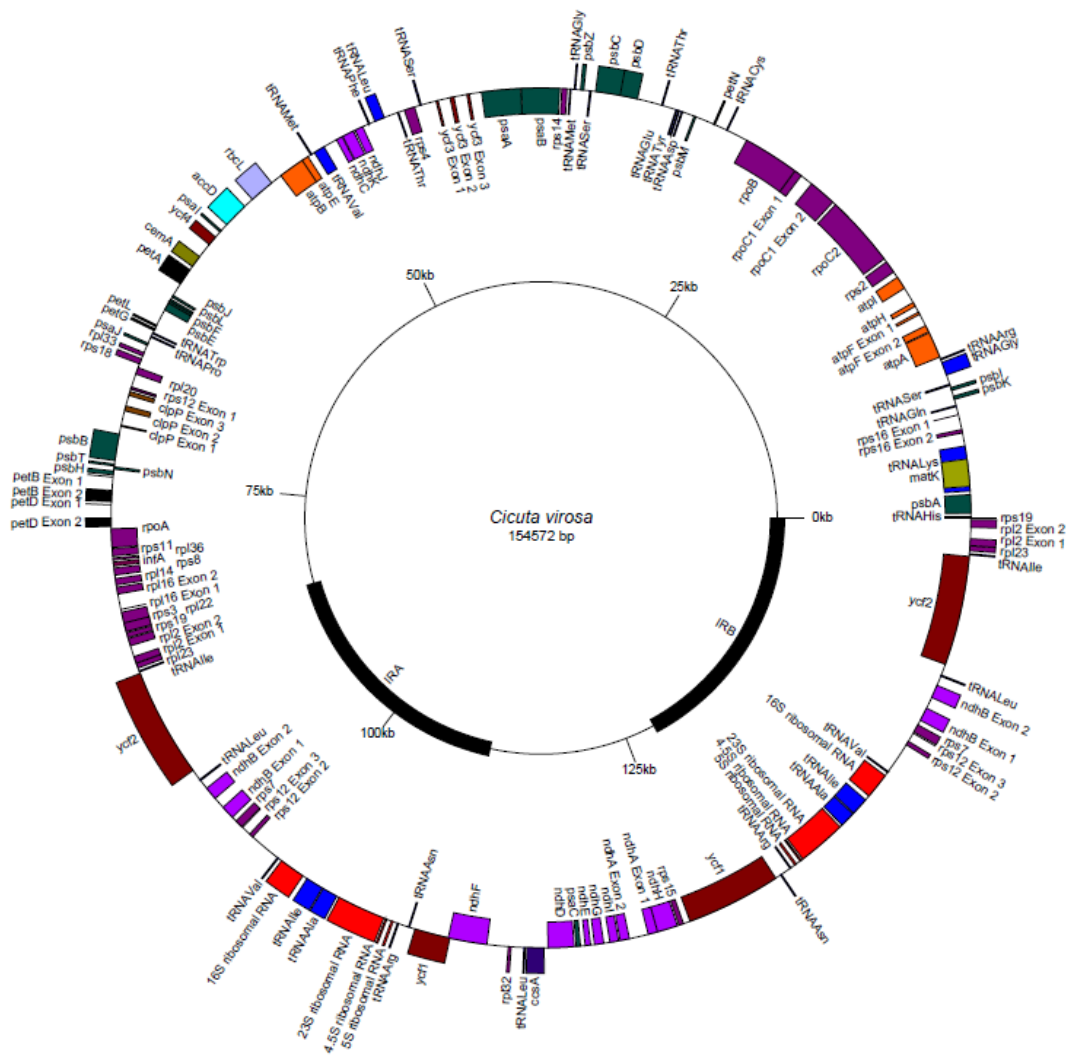
## (5) Annotation

유전체 구조 및 유전자의 기존 유전체 정보와 비교하여 파악하며, 이들 구간의 annotation은 Sequin에서 수행하였고, 유전체 비교는 mVISTA, 유전자 2차구조는 GCG package의 mFOLD를 사용하였으며, 유전자비교를 위하여 Seal과 McClade를 사용하였다.

## 다. 결과 및 고찰

### (1) 엽록체 유전체 지도와 구조

독미나리(*Cicuta virosa*, 22E08)의 엽록체 유전체는 154,572 bp로 당근의 155,911 bp보다 1kb 정도 작은 것으로 나타났으며, IR 구간은 26,408 bp, SSC 구간 17,579 bp, LSC구간은 84,177 bp로 나타났다. 당근의 LSC구간(84,242 bp)과 IR구간(27,050 bp)과 크기가 유사하고, SSC구간은 당근(17,579 bp)과 동일하였다 <그림 6>.



<그림 6> 독미나리의 엽록체 유전체 지도.

## (2) 엽록체 유전자 조성과 구조적 특징

독미나리는 당근과 같이 4개의 rRNA 유전자, 30개의 tRNA 유전자, 75개의 단백질 coding 유전자와 4개의 conserved open reading frame을 가지고 있어 유전자 조성에는 차이를 보이지 않았다(표 9-10 참조). 본 연구를 포함한 알려진 5종의 산형목 식물의 IR 구간은  $\Psi rps19\sim\Psi\text{-}ycf1$ 로 그 유전자 조성은 같으나, 5' end의  $\Psi rps19$ 와 3' end의  $\Psi\text{-}ycf1$ 의 크기에 차이를 보인다. 산형목 식물의 IR 구간의 유전자 조성은 <표 11>에 나타내었다.

<표 9> 독미나리 엽록체 유전체의 단백질 유전자 조성

유전자 종류	유전자명					
Genetic system genes						
Conserved orf	ycf1	ycf2	ycf3	ycf4		
maturase K	matK					
RNA polymerase	rpoA	rpoB	rpoC1	rpoC2		
Ribosomal protein						
Large subunits	rpl2	rpl14	rpl16	rpl20	rpl22	rpl23
	rpl32	rpl33	rpl36			
Small subunits	rps2	rps3	rps4	rps7	rps8	rps11
	rps12	rps14	rps15	rps16	rps18	rps19
Photosynthesis genes						
Acetyl-CoA carboxylase	accD					
ATP-dependent Clp protease	clpP					
ATP synthase	atpA	atpB	atpE	atpF	atpH	atpI
Cytochrome b	petB					
Cytochrome b/f	petD	petG	petL	petN		
Cytochrome f	petA					
Cytochrome C biogenesis	ccsA					
Membrane protein	cemA					
NADH dehydrogenase	ndhA	ndhB	ndhC	ndhD	ndhE	ndhF
	ndhG	ndhH	ndhI	ndhJ	ndhK	
Photosystem I	psaA	psaB	psaJ	psaC	psaI	
Photosystem II	psbA	psbB	psbC	psbD	psbE	psbF
	psbH	psbI	psbJ	psbK	psbL	psbM
	psbN	psbT	psbZ			
Rubisco	rbcL					
Translation initiation factor 1	infA					
Pseudo gene	$\Psi\text{-}rps19$	$\Psi\text{-}ycf1$				

<표 10> 독미나리 엽록체 유전체의 rRNA 및 tRNA 유전자 조성

유전자 종류	유전자명					
RNA genes						
Ribosomal RNA	rrn16S	rrn23S	rrn4.5S	rrn5S		
Transfer RNA	trnA_UGC	trnC_GCA	trnD_GUC	trnE_UUC	trnF_GAA	trnM_CAU
	trnG_GCC	trnG_UCC	trnH_GUG	trnI_CAU	trnI_GAU	trnK_UUU
	trnL_CAA	trnL_UAA	trnL_UAG	trnM_CAU	trnN_GUU	trnP_UGG
	trnQ_UUG	trnR_ACG	trnR_UCU	trnS_GCU	trnS_GGA	trnS_UGA
	trnT_GGU	trnT_UGU	trnV_GAC	trnV_UAC	trnW_CCA	trnY_GUA

<표 11> 독미나리 엽록체 유전체의 inverted repeat region 유전자

유전자명	Apiaceae			Araliaceae	
	<i>C. virosa</i>	<i>A. cerefolium</i>	<i>D. carota</i>	<i>E. senticosus</i>	<i>P. ginseng</i>
rps19	△	△	△	△	△
rpl2	○	○	○	○	○
rpl23	○	○	○	○	○
trnI_cau	○	○	○	○	○
ycf2	○	○	○	○	○
trnL_caa	○	○	○	○	○
ndhB	○	○	○	○	○
rps7	○	○	○	○	○
rps12_Exon3	○	○	○	○	○
rps12_Exon2	○	○	○	○	○
trnV-GAC	○	○	○	○	○
16S rRNA	○	○	○	○	○
trnI_gau	○	○	○	○	○
trnA_ugc	○	○	○	○	○
23S rRNA	○	○	○	○	○
4.5S	○	○	○	○	○
5S	○	○	○	○	○
trnR_acg	○	○	○	○	○
trnN_guu	○	○	○	○	○
ycf1	△	△	△	△	△

△ : 일부 구간, pseudo gene

### (3) 엽록체 유전자의 크기와 구조적 특성

<표 12>에 산형목에 알려진 엽록체 유전체의 단백질 유전자의 크기를 비교하였다. 단백질 유전자의 경우, 두릅나무과와 산형과에서 특이적으로 고정된 유전자 크기를 보면 *atpF*(산형과: 546 bp, 두릅나무과: 555 bp), *clpP*(산형과: 594 bp, 두릅나무과: 591 bp), *psbE*(산형과: 438 bp, 두릅나무과: 252 bp)의 3 유전자가 synapomorphic character로서 구별된다. 이 밖에 *rpoC2*의 경우, 두릅나무과와 달리 산형과에서 4,173 bp로, *rbcL*의 경우 1,449 bp로 고정되어 있다. 독미나리에서 특이하게 나타나는 현상으로는 *psbI*의 경우 일반적으로 111 bp이나 독미나리는 168 bp로 상당히 긴 유전자를 갖는다. 이와 비슷하게 최근에 Genbank에 보고된 산형과 *Anthriscus cerefolium*의 경우 171 bp로 산형과에서 이 유전자의 크기 변이가 높은 것으로 판단된다. 이외에 *rpoA*와 *rpoB*에서 다른 산형목 식물에 유전자가 길게 나타났다. 이러한 유전자의 크기변이는 유독 독미나리에서 많이 나타난다.

<표 13>에 산형목 5종의 rRNA와 tRNA의 유전자 크기를 비교하여 보았다. 16S 유전자의 경우 1,491 bp로 일정하였고, 23S 유전자의 경우 loop에서 base의 INDEL이 존재한 차이를 보이며, *Anthriscus cerefolium*와 독미나리에서 2,815 bp로 *psbI*와 같은 현상이 나타났다. Streptophyta에서만 나타나는 4.5S 유전자의 경우 99 bp로 산형목에서 일정하였고, 5S 유전자의 경우 121 bp로 일정하였다. tRNA 유전자의 크기변이를 보면, *trnC-GCA*의 경우 독미나리를 포함한 4종에서 71 bp인 반면 인삼(*Panax ginseng*)의 경우에서 72 bp로 달랐으며, *trnS-UGA*의 경우 독미나리를 포함한 4종에서 93 bp인 반면 인삼(*Panax ginseng*)의 경우에서 92 bp로 달랐다. *trnL-CAA*의 경우 독미나리에서 82 bp로 다른 4종의 81 bp로 타 4종과 구별된다. 이 *trnL-CAA*는 미나리에서 연구한 결과 82 bp로 동일한 염기 서열을 확인하였다, 이들 tRNA 유전자의 염기서열을 분석한 결과는 <그림 7>에 명시하였다.

<표 14>에 산형목 5종의 intron의 유전자 크기를 비교하여 보았다. Group II intron인 *ndhB.i*은 682 bp, *rpl2.i*는 651 bp로 산형과에서 일정한 크기를 갖고 있으며, *rpl2.i*는 두릅나무과에서 660 bp로 고정되어 있는 반면, 타 인트론의 경우 중간 변이를 보이는 것으로 나타났다. 산형과의 2개의 인트론의 균일성에 비교해서, 두릅나무과에서는 *rpl2.i*를 포함한 5개 인트론의 크기가 일정한 것으로 나타나, 과내의 변이율이 상당히 낮은 것으로 판단된다.

<표 12> 산형목에서 알려진 엽록체 유전체 유전자의 크기 비교표

유전자명	Apiaceae			Araliaceae	
	<i>D. carota</i>	<i>A. cerefolium</i>	<i>C. virosa</i>	<i>E. senticosus</i>	<i>P. ginseng</i>
accD	1476	1458	1470	1,530	1,515
atpA	1524	1524	1524	1,524	1,524
atpB	1497	1497	1497	1,497	1,497
atpE	402	402	402	423	423
atpF	<b>546*</b>	<b>546*</b>	<b>546*</b>	<b>555*</b>	<b>555*</b>
atpH	246	246	246	246	246
atpI	744	744	744	744	744
ccsA	975	975	975	966	963
cemA	690	690	690	690	690
clpP	<b>594*</b>	<b>594*</b>	<b>594*</b>	<b>591*</b>	<b>591*</b>
infA	234	234	234	234	234
matK	1545	1539	1572	1,518	1,512
ndhA	1092	1092	1092	1,092	1,092
ndhB	1533	1533	1533	1,533	1,533
ndhC	363	363	363	363	363
ndhD	1503	1503	1503	1,503	1,503
ndhE	306	306	306	306	306
ndhF	2226	2241	2241	2,226	2,226
ndhG	531	531	531	531	531
ndhH	1182	1182	1182	1,182	1,182
ndhI	495	504	504	504	504
ndhJ	477	477	477	477	477
ndhK	678	678	678	678	678
petA	963	963	963	963	963
petB	648	648	648	648	676
petD	483	483	483	483	483
petG	114	114	114	114	114
petL	96	96	96	96	96
petN	90	90	90	90	90
psaA	2253	2253	2253	2,253	2,253
psaB	2205	2205	2205	2,205	2,205
psaC	246	246	246	246	246
psaI	111	111	111	111	111
psaJ	129	129	129	129	129
psbA	1062	1062	1062	1,062	1,062
psbB	1527	1527	1527	1,527	1,527
psbC	1422	1422	1422	1,422	1,422
psbD	1062	1062	1062	1,062	1,062
psbE	<b>438*</b>	<b>438*</b>	<b>438*</b>	<b>252*</b>	<b>252*</b>
psbF	120	120	120	120	120

<표 12> 계속

유전자명	Apiaceae			Araliaceae	
	<i>D. carota</i>	<i>A. cerefolium</i>	<i>C. virosa</i>	<i>E. senticosus</i>	<i>P. ginseng</i>
psbH	240	240	222	222	222
psbI	111	<b>171*</b>	<b>168*</b>	111	111
psbJ	123	123	123	123	123
psbK	186	186	186	186	186
psbL	117	117	117	117	117
psbM	117	117	117	108	111
psbN	132	132	132	132	132
psbT	102	102	108	108	102
psbZ	189	189	189	189	189
rbcL	1449	1449	1449	1,428	1,437
rpl2	825	825	825	825	825
rpl14	369	369	369	369	369
rpl16	408	408	408	408	408
rpl20	387	387	387	387	387
rpl22	498	495	495	483	483
rpl23	282	282	282	282	282
rpl32	168	165	165	165	165
rpl33	201	201	201	201	201
rpl36	114	114	114	114	114
rpoA	1062	1017	<b>1074*</b>	1,062	1,062
rpoB	3213	3213	<b>3267*</b>	3,213	3,216
rpoC1	2055	2058	2058	2,058	2,058
rpoC2	<b>4173*</b>	<b>4173*</b>	<b>4173*</b>	4,164	4,152
rps2	711	711	711	711	711
rps3	657*	657*	657*	660	660
rps4	606	606	606	606	606
rps7	468	468	468	468	468
rps8	405	405	405	405	405
rps11	417	417	417	417	417
rps12	372	372	372	372	372
rps14	303	303	303	303	303
rps15	273	273	273	273	273
rps16	237	237	237	237	237
rps18	306	306	306	327	306
rps19	279	279	279	279	279
ycf1	5423	5382	5349	5,628	5,760
ycf2	6449	6309	6336	6,366	6,333
ycf3	507	507	507	507	507
ycf4	555	555	555	555	555
Total	68317	68148	68283	68570	68335

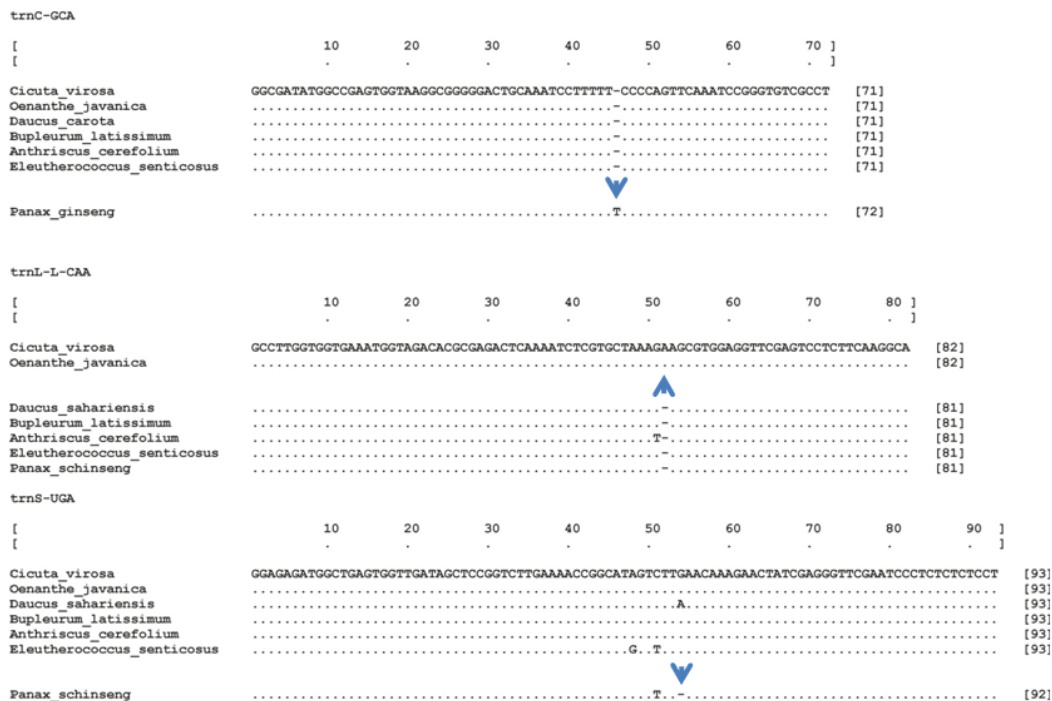
<표 13> 산형목에서 알려진 엽록체 rRNA와 tRNA 유전자 크기 비교표

유전자명	Apiaceae			Araliaceae	
	<i>D. carota</i>	<i>A. cerefolium</i>	<i>C. virosa</i>	<i>E. senticosus</i>	<i>P. ginseng</i>
16S rRNA	1,491	1,491	1,491	1,491	1,491
23S rRNA	2,806	2,815	2,815	2,809	2,809
4.5S rRNA	99	99	99	99	99
5S rRNA	121	121	121	121	121
trnA-UGC	73	73	73	73	73
trnC-GCA	71	71	71	71	72*
trnD-GUC	74	74	74	74	74
trnE-UUC	73	73	73	73	73
trnF-GAA	73	73	73	73	73
trnM-CAU	74	74	74	74	74
trnG-GCC	71	71	71	71	71
trnG-UCC	72	72	72	72	72
trnH-GUG	78	78	78	78	78
trnI-CAU	74	74	74	74	74
trnI-GAU	72	72	72	72	72
trnK-UUU	72	72	72	72	72
trnL-CAA	81	81	82*	81	81
trnL-UAA	84	84	84	84	84
trnL-UAG	80	80	80	80	80
trnM-CAU	73	73	73	73	73
trnN-GUU	72	72	72	72	72
trnP-UGG	74	74	74	74	74
trnQ-UUG	72	72	72	72	72
trnR-ACG	74	74	74	74	74
trnR-UCU	72	72	72	72	72
trnS-GCU	88	88	88	88	88
trnS-GGA	87	87	87	87	87
trnS-UGA	93	93	93	93	92*
trnT-GGU	72	72	72	72	72
trnT-UGU	73	73	73	73	73
trnV-GAC	72	72	72	72	72
trnV-UAC	74	74	74	74	74
trnW-CCA	74	74	74	74	74
trnY-GUA	84	84	84	84	84
Total	6784	6793	6794	6787	6787

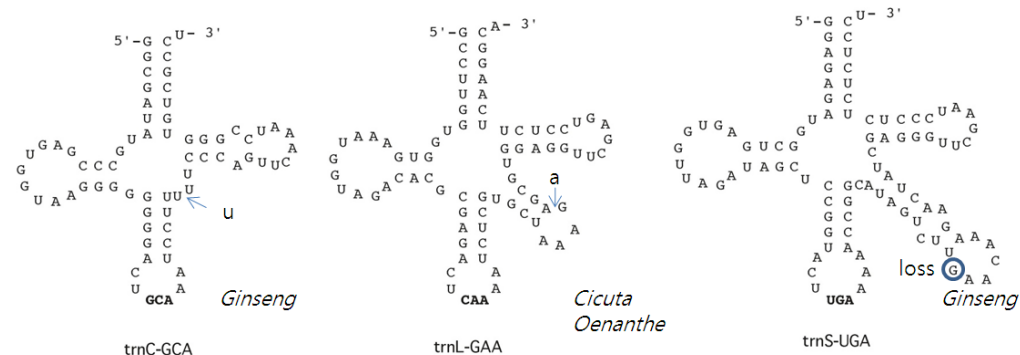
<표 14> 산형목에서 알려진 엽록체 유전체 인트론의 크기 비교표

유전자명	Apiaceae			Araliaceae	
	<i>D. carota</i>	<i>A. cerefolium</i>	<i>C. virosa</i>	<i>E. senticosus</i>	<i>P. ginseng</i>
<b>Group I</b>					
trnL-UAA.i	503	497	497	<b>507</b>	<b>507</b>
<b>Group II</b>					
atpF.i	733	729	743	724	730
clpP.i1	850	844	847	768	771
clpP.i2	628	625	601	648	632
ndhA.i	1,096	1109	1101	1,071	1,023
ndhB.i	<b>682</b>	<b>682</b>	<b>682</b>	679	678
petB.i	773	758	758	791	783
petD.i	750	762	764	754	751
rpl16.i	875	892	903	953	944
rpl2.i	<b>651</b>	<b>651</b>	<b>651</b>	<b>660</b>	<b>660</b>
rpoC1.i	742	749	744	762	756
rps12.i	536	536	536	<b>536</b>	<b>536</b>
rps16.i	916	865	864	891	887
ycf3.i1	719	698	699	<b>716</b>	<b>716</b>
ycf3.i2	783	751	739	748	758
trnA-UGC.i	814	812	812	810	808
trnG_UCC.i	701	685	690	698	697
trnI-GAU.i	952	949	947	<b>945</b>	<b>945</b>
trnK-UUU.i	2478	2527	2529	2,515	2,524
trnV-UAC.i	567	568	572	590	578
Total	16749	16689	16679	16766	16684

A.



B.



<그림 7> 산형목 7종의 *trnC-GCA*, *trnL-CAA*, *trnS-UGA* 유전자 염기서열 및 2차구조 비교. A. 염기서열 비교. B. 2차구조에 있어 염기 삽입과 소실 부위의 상대적 위치- 인삼의 T 첨가, 독미나리와 미나리의 A 삽입, 인삼의 G 소실. 산형과: 독미나리(*Cicuta*, 본 연구), 미나리(*Oenanthe*, 녹색식물연구소 DB), 당근(*Daucus*, Ruhlman et al. 2006), 섬시호(*Bupleurum*, 녹색식물연구소 DB), 전호류(*Anthriscus* Genbank); 두릅나무과: 가시오갈피(*Eleutherococcus*, Yi et al. 2012), 인삼(*Panax*, Kim et al. 2004).

<표 15>는 산형목 5종의 엽록체 overlapping gene의 크기를 나타낸 것이며, *psbDC*, *atpBD* 오페론, *rpl22-rps3*의 중복 구간은 5종 공히 각각 53 bp, 4 bp, 16 bp로 나타난 반면, 역방향으로 중복되는  $\psi$ -*ycf1*과 *ndhF*는 두릅나무과에서는 없었다. 산형과의 2종에서 9 bp 중복되었고, 독미나리에서는 특이하게 98 bp 중복서열이 발견되었다.

<표 15>. 산형목에서 알려진 엽록체 유전체의 overlapping gene 크기 비교

유전자명	Apiaceae			Araliaceae	
	<i>C. virosa</i>	<i>A. cerefolium</i>	<i>D. carota</i>	<i>E. senticosus</i>	<i>P. ginseng</i>
psbD ~ psbC	53	53	53	53	53
atpB ~ atpE	4	4	4	4	4
rpl22 ~ rps3	16	16	16	16	16
$\psi$ - <i>ycf1</i> ~( <i>ndhF</i> )	98	9	9	-	-

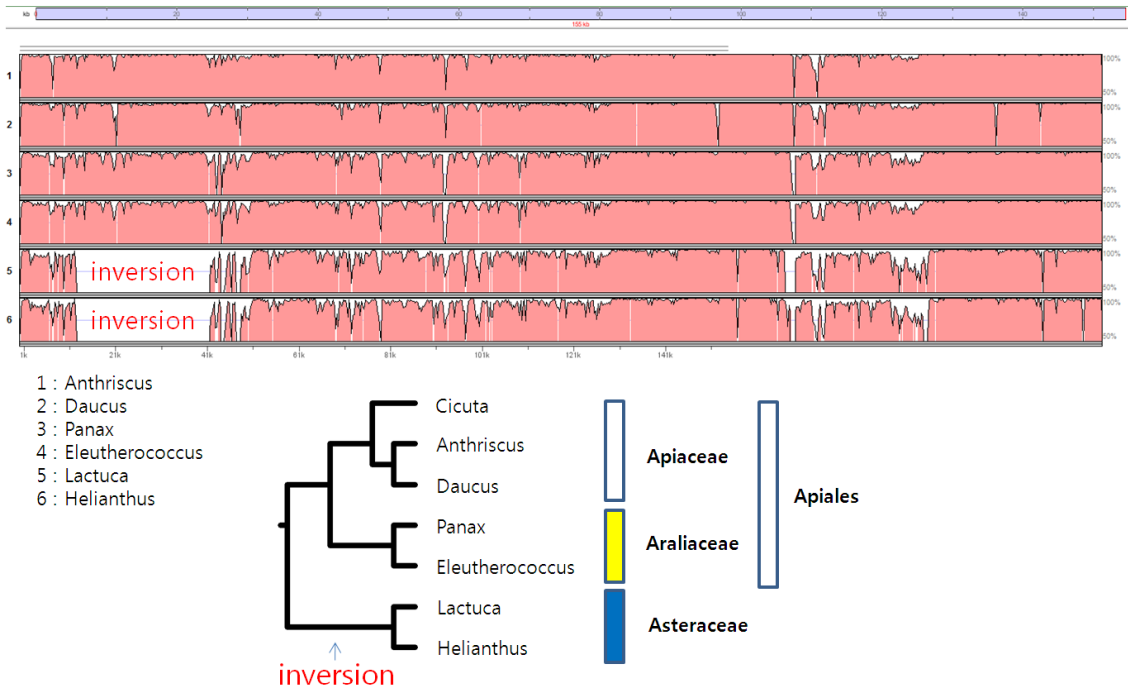
<표 16>는 산형목 5종에서 pseudo-gene 크기를 비교하였다.  $\psi$ *rps19*와  $\psi$ *ycf1*의 크기는 종간에 차이를 보였고,  $\psi$ *ycf1*는 독미나리에서 가장 큰 것으로 나타났다.

<표 16> 산형목에서 알려진 엽록체 유전체의 pseudo-gene 크기 비교표

유전자명	Apiaceae			Araliaceae	
	<i>C. virosa</i>	<i>A. cerefolium</i>	<i>D. carota</i>	<i>E. senticosus</i>	<i>P. ginseng</i>
$\psi$ <i>rps19</i>	78	120	207	60	72
$\psi$ <i>ycf1</i>	2064	1677	1686	1505	1752



Apiales와 Asterales는 근연목으로, 산형목의 산형과 당근, 두릅과의 인삼, 가시오갈피, 국화목 국화과의 상추와 해바라기의 엽록체 염기서열을 독미나리를 기준으로 분석한 결과, 국화목의 국화과에서 LSC의 20kb inversion을 보인다. 해바라기 고유 inversion은 SSC 구간으로 유전체분석 시 B type을 그려서 나타나는 것으로 판단되어, A type으로 분석하였다 <그림 9>.



<그림 9> 독미나리기준으로 근연목인 Apiales와 Asterales의 염기서열의 mVISTA분석.

## (5) 독미나리 유전체 정보와 보존 복원

독미나리(*Cicuta virosa*)에 대한 유전 정보는 nrITS, cp-*matK*, cp-*rbcl*, cp-*psbI~rps16*, cp-*rpoC1* intron, *trnL-UAA* intron에 대한 정보가 알려져 있다. 산형과 전문가인 Downie 연구실에서 보고된 *trnL-UAA*(녹색식물연구소 2009)과 cp-*psbI~rps16* 염기서열은 본 연구에서 밝혀진 엽록체 유전체의 염기서열과 동일한 것으로 나타나 국내의 독미나리는 *Cicuta virosa*로 판정하였다. 그 외의 *Cicuta virosa*에 대한 연구 결과의 경우 그 결과를 재분석한 결과, 오동정에 의한 연구결과이거나, 그 변이가 높을 가능성을 배제할 수 없다. 산형목에 알려진 엽록체 유전체를 분석한 결과, 유전자의 크기변이는 유독 독미나리에서 많이 나타난다. 특이한 것으로 *atpF*, *clpP*, *psbE*, *rpoC2*, *psbI*의 단백질 유전자와 *trnL-CAA*를 들 수 있다.

국내 독미나리(*Cicuta virosa*)에 군집간 유전변이는 엽록체의 한 IGS구간에서 강원도 군집과 군산군집이 유별되는 것으로 알려져 있다(녹색식물연구소 2009). 그 외의 변이가 존재하는 지 알 수는 없다. 따라서, 독미나리의 서식지 보존기관인 신구대학에서는 강원도 군집과 군산 군집의 유전자원을 분리해서 계대유지를 하고 있다. 독미나리의 자연 군집의 보존 복원에 대한 보다 많은 정보를 수집이 필요하다고 판단하여, 유전다양성 분석을 본 연구에서 수행하였다.

## 2. 유전적 다양성 분석

### 가. 독미나리(*Cicuta virosa* L., 산형과) 유전적 다양성 분석

#### (1) 서론

철학자 소크라테스는 Hemlock(*Conium* or *Cicuta*)의즙액으로 만들어 진 독배를 마시고 죽은 것으로 알려질 만큼, 독미나리(Water hemlock)의 뿌리진액에 신경독성을 가진 맹독성 Cicutoxin을 함유하고 있다. 이 성분은 1876년 Boehm에 의해 분리되었고, 1949년 Clarke에 의해 결정화 되었다. 그 구조식은  $\text{HOCH}_2(\text{CH}_2)_2(\text{C}=\text{C})_2(\text{CH}=\text{CH})_3\text{CHOHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 로 밝혀져 있으며, 이 neurotoxin에 기인하여 어린 가축을 죽이거나, 인명에게도 피해를 보이는 극독식물이다.

독미나리는 2005년 3월 멸종위기야생동식물 보호법의 개정으로 멸종위기야생식물에 추가된 식물이다. 최초 자생지로 알려진 강원도 강릉시 왕산면 대기리에는 도로확대 포장 공사가 진행되고, 다른 자생군락지에서는 산업단지 조성공사 때문에 자생지가 훼손되고 있어 종합적인 서식지외 보전 대책이 필요한 종이다. 2009년 서식지보존기관으로 선정된 신구대학에서 독미나리의 증식을 수행하고 있다. 독미나리(*Cicuta virosa*)는 유독식물로, 약용식물, 건강보조식품으로 알려져 있는 다년생 초본 습지 식물이다. 한국·중국·유럽·북아메리카 등에 널리 분포하는 유독식물로서 한국에서는 대관령 북쪽 습지에서 자라며 심은 것은 남부지방에서도 잘 자라는 것으로 알려져 있다. 식물체는 높이가 1 m에 달하고 전체에 털이 없다. 지하경은 굵으며 녹색이고 마디가 있으며 마디사이는 속이 비어 있고 지하경 끝에서 속이 빈 지상경이 자라며 가지가 갈라진다. 근생엽과 밑부분의 잎은 엽병이 길고 삼각상 난형이며 길이 30~50 cm로서 2회 우상으로 갈라지고 최종엽편은 선상 피침형 또는 넓은 피침형이며 끝이 뾰족하고 길이 3~8 cm, 너비 7~20 mm로서 가장자리에 뾰족한 톱니가 있으며 위로 올라가면서 잎이 작아지고 엽병이 없어진다. 대산경 끝에는 20개 정도의 산변이 있으며 총포편은 없고 소산경은 길이 3~7 cm로서 10여 개의 꽃이 달리며 선상의 소총포편이 있고 6~8월에 백색 꽃이 핀다. 소화경은 길이 8~10 mm이며 꽃잎과 수술은 각각 5개이고 자방은 하립이다. 열매는 난상 구형이며 길이 2.5 mm로서 녹색이고 굽은 능선이 있으며 능선 사이에 1개의

유관이 있다. 염색체는 n=11이다.

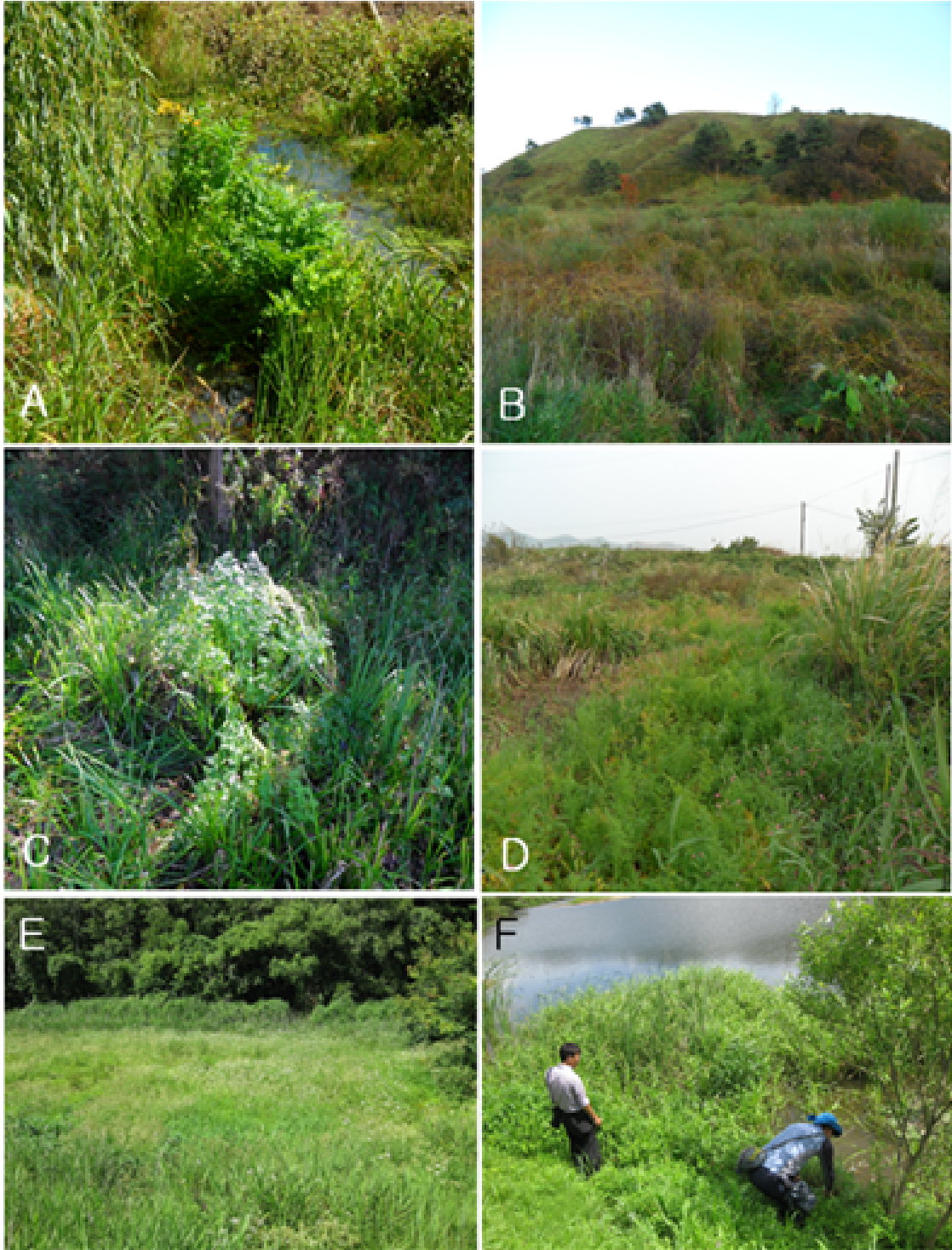
## (2) 재료 및 방법

### (가) 연구재료

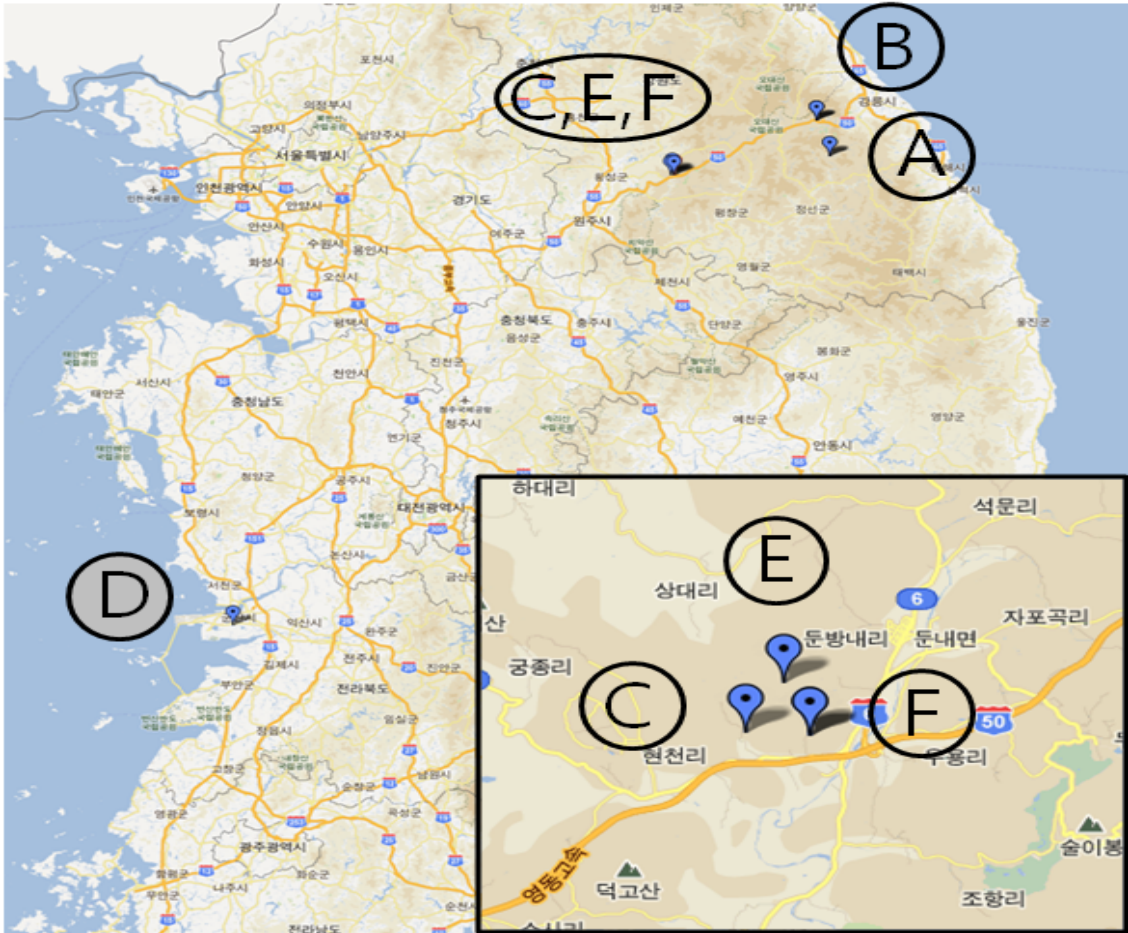
독미나리의 유전다양성을 조사하기 위해 강원도 5곳의 일대와 전라북도 군산에서 발견한 집단을 대상으로 시료를 채취하였다. 총 6곳의 아개체군으로 구분을 짓고 독미나리의 DNA 채취용 및 표본 시료를 확보하였다. 본 연구에 이용된 강원도 평창, 강릉, 횡성 현천리, 둔방내리, 횡계리 및 전라북도 군산에서 서식하고 있는 독미나리를 채집하여 총 6개 집단 96개의 개체를 선발하여 분석에 이용하였다(표 17; 그림 10). 분석에 이용된 DNA 추출은 'DNeasy Plant Mini Kit' (QIAGEN)을 사용하였다.

<표 17> 본 연구에 이용된 강원 및 전북의 독미나리 4군집 정보

군 집	개 체 수	채 집 지	Voucher #	GPI DNA #
군집 A	12	강원도 강릉시	이재선 사진(그림 10)	GPI2010_22A1~10, 12, 14
군집 B	21	강원도 평창시	이재선 사진(그림 10)	GPI2010_22B1, 2, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 13~25
군집 C	31	강원도 횡성군	이재선 사진(그림 10)	GPI2010_22C1~7, 9~33
군집 D	17	전라북도 군산시	이재선 사진(그림 10)	GPI2010_22D1, 4, 7~20
군집 E	10	강원도 횡성군	이정호 사진(그림 10)	GPI2012_22E1~10
군집 F	5	강원도 횡성군	이정호 사진(그림 10)	GPI2012_22F1~3, 5, 7
	96			



<그림 10> 독미나리 4개 군집 전경. A: 강원도 강릉시 B: 강원도 평창군  
 C: 강원도 횡성군 D: 전북 군산시 E: 강원도 횡성군 (버려진 논) F: 강원도  
 횡성군 (저수지).



<그림 11> 독미나리의 연구대상 6 군집의 위치.

## (나) 연구방법

### ① AFLP 방법 및 분석

AFLP 분석은 Gaudeul *et al.*(2000)의 방법을 약간 변형시켜 수행하였다. 독미나리의 유전적다양성을 가장 잘 나타낼 수 있는 primer 조합은 독미나리와 같은 산형과에 속하는 *Eryngium alpinum* L.에 대한 유전적 다양성 비교 실험에 사용되었던 AFLP Marker를 최종적으로 선발하였다. (Gaudeul *et al.*, 2004)

### ② 제한효소 절단 및 Adapter ligation

각 집단별 추출된 genomic DNA (50 ng) 는 제한효소인 *EcoRI*(NEB) 와 *MseI* (NEB)를 사용하여 37°C에서 3시간 처리를 하여 절단하였다. 제한효소로 절단된 DNA에 10unit의 T4 ligase(promega) 와 10pMol의 *EcoRI* Adapter 와 *MseI* Adapter <표 18> 를 첨가한 후 37°C에서 3시간 동안 ligation을 수행하였다.

<표 18> AFLP 분석에 사용된 adapters와 primers

Adapters/primers	Sequences (5'-3')
Adapters	
<i>EcoR</i> I adapter	CTCGTAGACTGCGTACC AATTGGTACGCAGTCTAC
<i>Mse</i> I adapter	GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT
Pre-amplification primers	
<i>EcoR</i> I +A	GACTGCGTACCAATTCA
<i>Mse</i> I +C	GATGAGTCCTGAGTAAC
Selective-amplification primers	
<i>EcoRI</i> +AGA_HEX	GACTGCGTACCAATTCAGA
<i>EcoRI</i> +ATC_FAM	GACTGCGTACCAATTCATC
<i>MseI</i> +CAGG	GATGAGTCCTGAGTAACAGG
<i>MseI</i> +CTCT	GATGAGTCCTGAGTAACTCT

### ③ Pre-amplification

Ligation된 DNA를 주형으로 하였으며, *EcoR* I +A 와 *Mse* I +C primer 를 사용하여 PCR증폭을 수행하였다.<표 18> PCR 조건은 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient를 이용하여 94°C/1분, 56°C/1분, 72°C/1분 1cycle을 최종 26회 반복하고 반응을 종료하였다.

#### ④ Selective-amplification

Pre-amplification에서 1차 증폭된 PCR 산물을 주형으로 하여 같은 산형과에 대하여 분석한 문헌에서 사용되었던 *EcoRI* 과 *MseI* primer조합들 중 다양성을 가장 잘 나타낼 수 있는 Marker를 최종 선발하여 selective-amplification PCR을 수행하였다 <표 18>.

PCR 조건은 최초 94℃에서 30초, 65℃에서 30초, 72℃에서 1분을 13cycle 반복한 후 마지막으로 94℃에서 30초, 56℃에서 30초, 72℃에서 1분을 첫 cycle로 시작하여 다음 cycle부터는 annealing 온도를 1℃씩 감소시키면서 25cycle을 반복한 후 반응을 종료하였다.

증폭된 산물은 ABI 3730 automated sequencer (Perkin-Elmer)를 이용하여 GeneMapper® Software로 분석하였다. <그림 12>

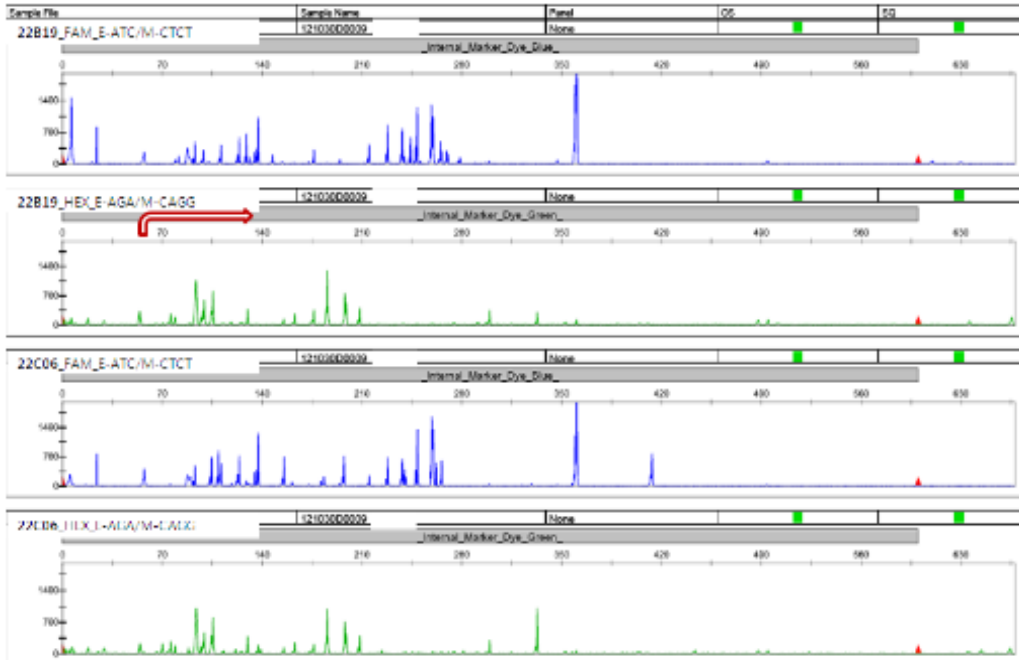
#### ⑤ Data 분석

국내 총 6지역에서 채집된 독미나리 96개체에 대한 유전적 다양성 분석을 위해서 선발된 AFLP marker 조합들 중 증폭된 DNA 단편들은 증폭여부에 따라 유(1) 또는 무(0)로 표시하여 분석에 이용하였다.

유전적 다양성 (phenotype diversity) 분석은 Shannon's information index를 이용하여 수행하였고, 증폭된 단편들에 대한 유전적 유사성 (genetic similarity) 와 계통 유연관계는 GeneAEx 6.5 프로그램을 이용하여 UPGMA방법에 따라 dendrogram ( SHAN-clustering) 을 작성하였다.

#### ⑥ 엽록체 유전구간 분석

선행연구에서 알려진 엽록체 구간(녹색식물연구소 2010)에 대해서, 총 6지역에서 채집된 독미나리 96개체 중, 새로이 추가된 군집 E와 F의 15개체에 대하여 SSR 구간 연구를 하였고, 추가적으로 엽록체 유전체 연구가 완료된 강원 군집의 22E08에 비교하기 위하여, 군산 군집의 22D10에 대해 구간을 중심으로 한 일부 구간을 분석하였다.



<그림 12> Chromatogram of Selective-amplification PCR product.

### (3) 유전적 다양성 분석 결과

#### (가) AFLP 분석

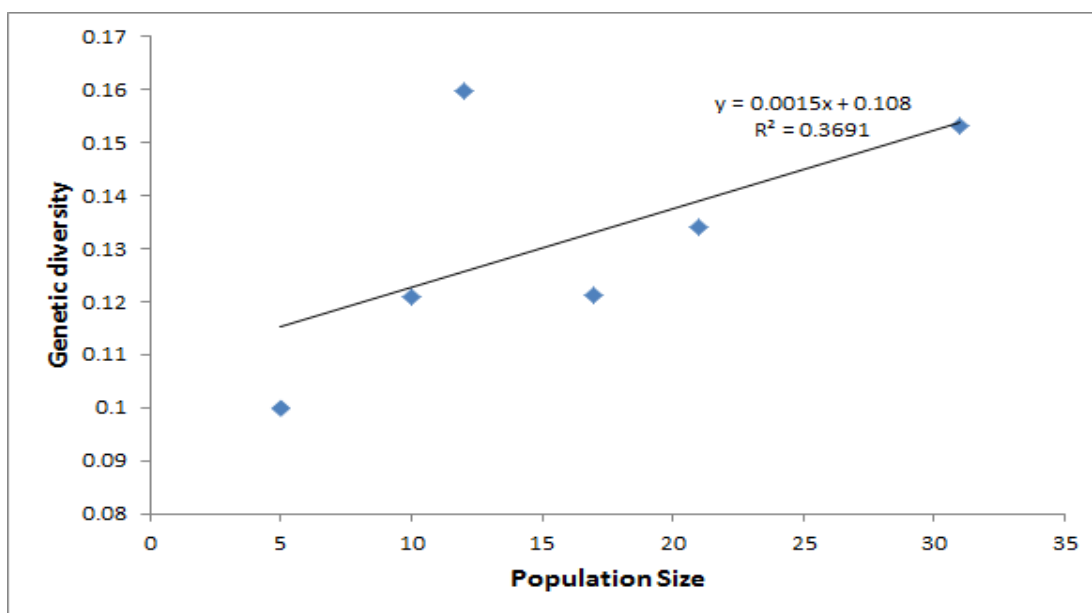
AFLP Polymorphic band의 수는 강원도 횡성에서 채집한 집단 A에서 280개 (Total band 수의 65.56%) 로 가장 많았고, 강원도 횡성군 둔내면 현천리와 둔방내리 지역에서 채집한 E 집단 (42.18%)과 F집단 (30.52%)에서 가장 적었다<표 19>.

Nei's Gene diversity는 집단A(강릉)과 집단C(횡성)에서 각각 0.1599, 0.1531로 높았으며, 집단E(횡성군 둔방내리)와 집단F(횡성군 현천리)에서 각각 0.1209, 0.0999로 가장 낮았다.

AFLP 분석에 이용된 6집단의 독미나리의 유전다양성과 개체군 사이의 결정계수는  $R^2 = 0.3691$ 로서 유의한 양성 상관관계가 있었다<그림 13>. 즉, 독미나리의 개체수가 많은 집단에서 크기가 작은 집단보다 유전다양성이 높은 경향을 보였다.

<표 19> 독미나리 6개체군의 유전다양성

Population	Polymorphic bands		Number of Private bands	Shannon's Information Index	Nei's Gene Diversity
	Number	Percentage of Polymorphic bands (%)			
A (강릉)	214	53.10	9	0.2445	0.1599
B (평창)	266	57.07	35	0.2123	0.1342
C (횡성)	280	65.56	24	0.2408	0.1531
D (군산)	245	50.37	18	0.1935	0.1213
E (횡성)	203	42.18	10	0.1867	0.1209
F (횡성)	169	30.52	16	0.1523	0.0999



<그림 13> 독미나리 개체군의 유전다양성과 개체군의 크기 사이의 관계를 나타내는 회귀직선.

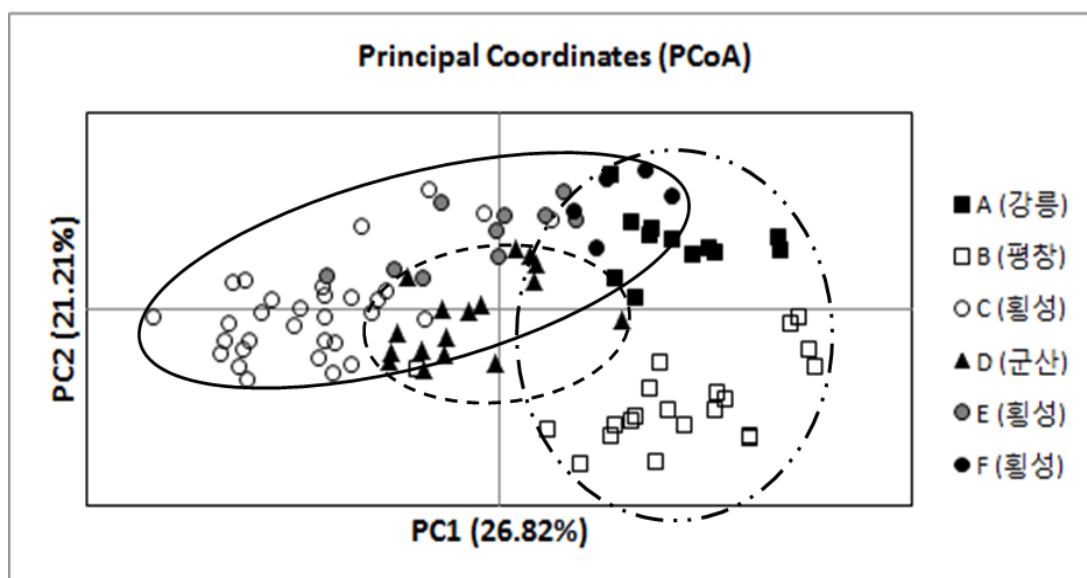
분자 변이 분석 (AMOVA)에 의하면 강원도 5지역에 서식하고 있는 개체군과 전라도 군산에 서식하고 있는 독미나리 개체군 사이의 분자 변이는 25%로 낮았다.

그러나, 각 아개체군 내에서의 분자변이도는 75%로 높은 양상을 보였다 <표 20>. 이 같은 결과는, 유전적 변이정도가 아개체군간에는 뚜렷하게 나타나는 유전적인 차이는 없으나, 개체군 내의 유전적 변이는 비교적 높다는 것을 의미한다.

<표 20> 독미나리 개체군의 분자변이분석 (AMOVA) 결과

	df	SS	MS	Est. Var.	%	PhiPT
Among Populations	5	934.09	186.82	10.34	25	0.253
Within Populations	90	2747.08	30.52	30.52	75	
Total	95	3681.17		40.86	100	

독미나리의 AFLP 자료를 이용하여 PCoA 분석을 한 결과 1축과 2축에 의하여 전체변이의 49.8%를 설명하였고, 3축까지 포함하여 66.3%를 설명하였다 <그림 14>. 강원도 5곳에 서식하는 독미나리 집단의 경우, 아개체군이 각 축에 분포하는 양상을 보였다. 집단 B(평창)은 주로 1축의 음의값을 가지고, 전라북도 군산에 서식하는 집단 D의 경우는 주로 2축에 음의 값을 나타내었다. 지리적 근연 집단인 강릉(A)과 평창(B)는 실선으로 표시하였고, 군산 군은 점선으로, 3개의 횡성 군집을 따로 분리하여 표시하였다.



<그림 14> 독미나리 개체군의 AFLP 자료를 이용한 PCO (principal coordination) 분석 결과.

독미나리의 집단간 유전적 거리는 집단(D)와 집단(E)가 0.041로 가장 가까운 것으로 나타났고, 개체군 D와 F가 0.081로 먼 것으로 나타났다<표 21>.

<표 21> 독미나리 개체군의 각 집단 간 Nei's unbiased genetic distance

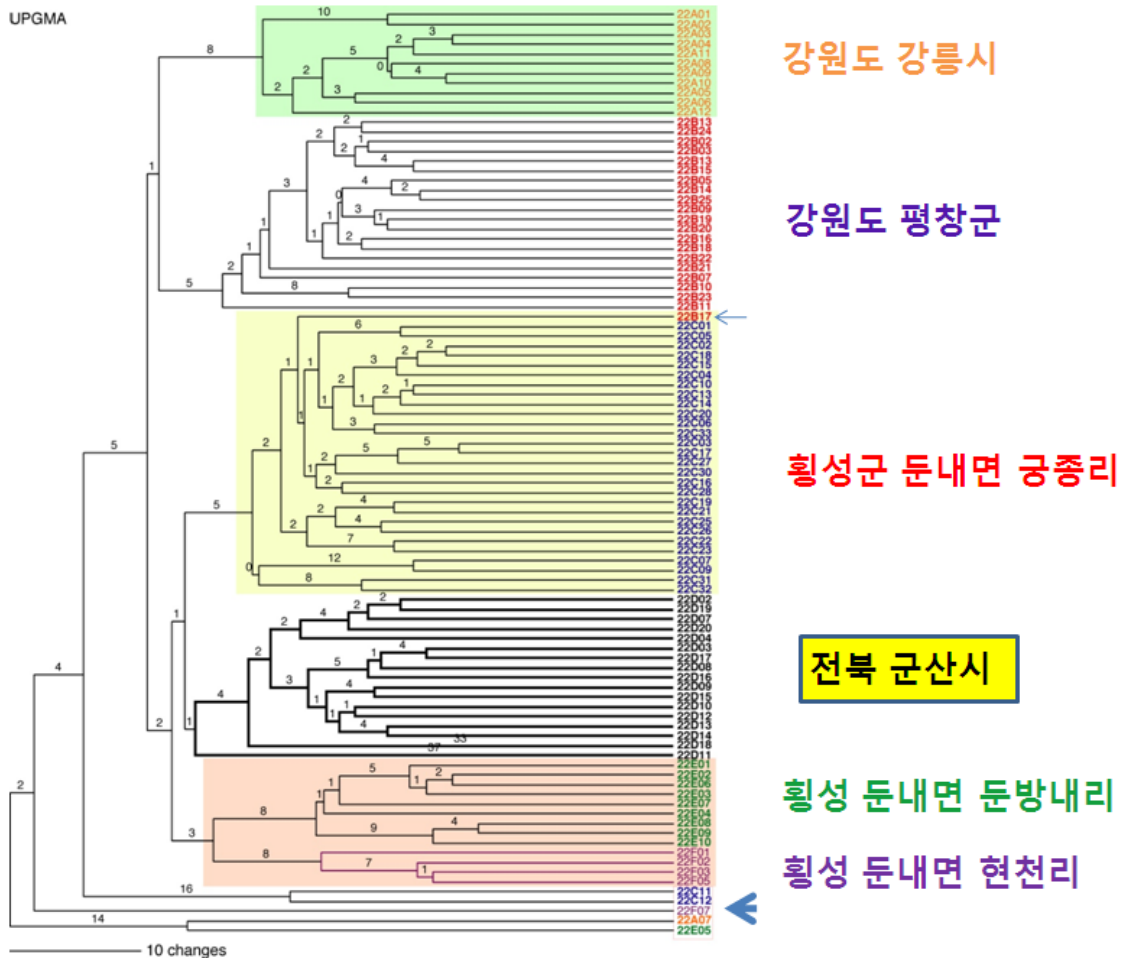
Population	A (강릉)	B (평창)	C (횡성)	D (군산)	E (횡성)	F (횡성)
A (강릉)	-					
B (평창)	0.043	-				
C (횡성)	0.043	0.048	-			
D (군산)	0.046	0.043	0.043	-		
E (횡성)	0.050	0.056	0.043	0.041	-	
F (횡성)	0.051	0.070	0.059	0.081	0.050	-

아개체군간 유전 거리와 지리적 거리 <표 21>사이의 관계를 알아보기 위하여, Mantel test를 실시하였다. 강원도 지역의 5집단과 전라북도 군산에 서식하는 독미나리 집단 (D)가 지리적으로 거리차이가 있으나,  $R^2 = 0.0224$   $p = 0.020$ 으로서 Nei's 비편차 유전적 거리에 대한 유의한 관계는 없는 것으로 분석되었다.

<표 22> 독미나리 개체군의 각 집단 간 지리적 거리 (Km)

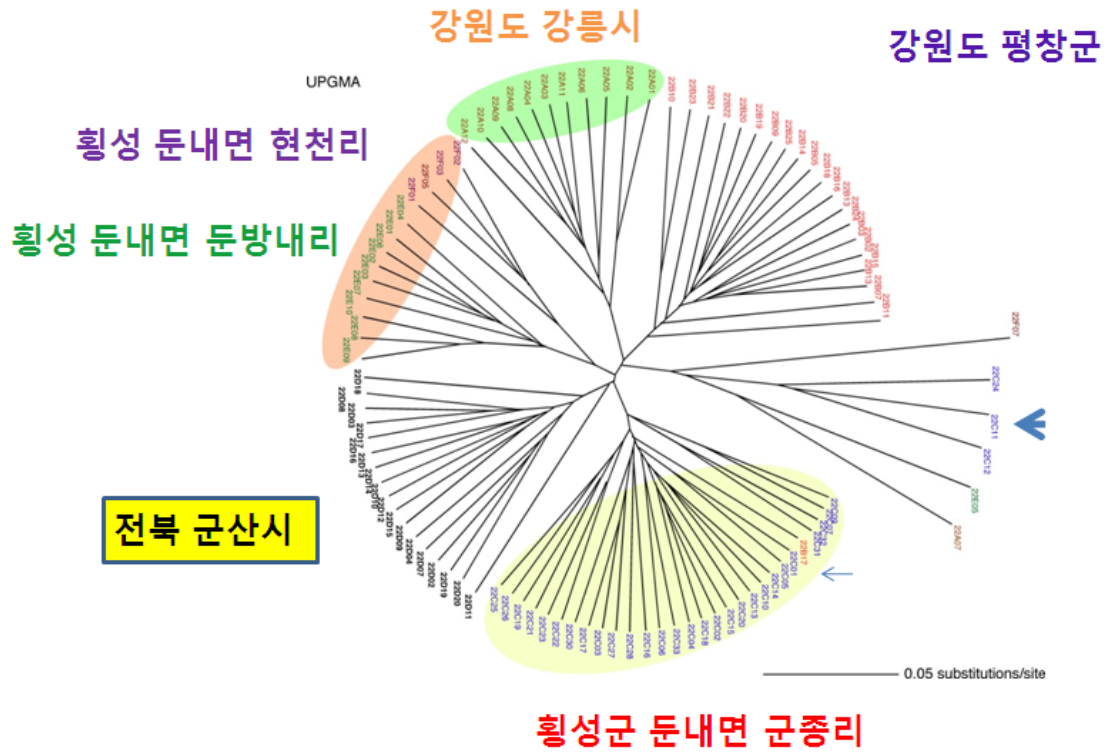
Population	A (강릉)	B (평창)	C (횡성)	D (군산)	E (횡성)	F (횡성)
A (강릉)	-					
B (평창)	14.31	-				
C (횡성)	47.33	47.8	-			
D (군산)	253.2	260.6	216.9	-		
E (횡성)	46.65	46.9	1.06	218	-	
F (횡성)	46.42	46.99	0.93	217.5	1.03	-

(나) 유연관계 및 엽록체 구간분석

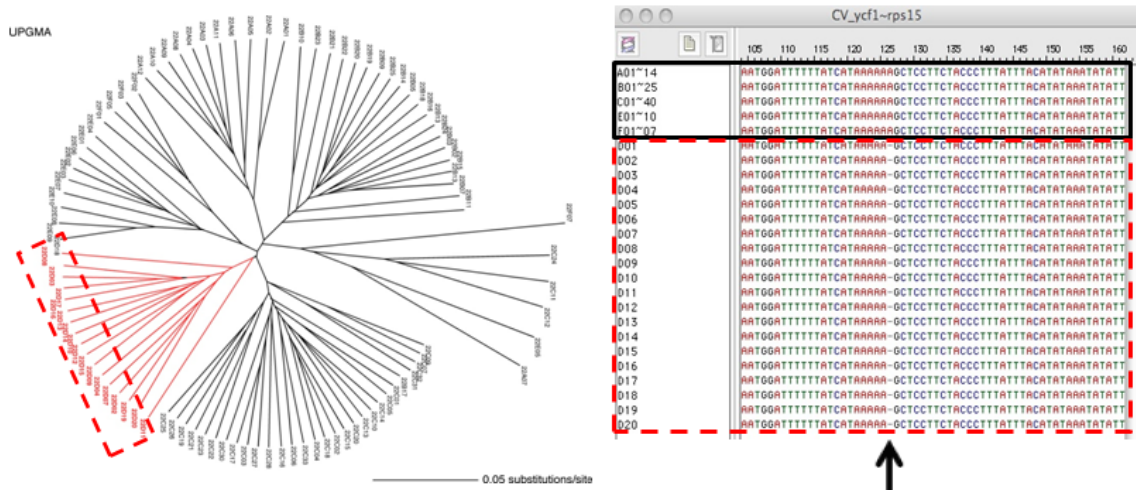


<그림 15> AFLP 결과를 분석한 UMGMA clustering (rooted).

<그림 15>에서 보이듯이, UMGMA clustering를 통한 분석에 의하면, 6개의 군집은 각각 독립적으로 clustering이 되는 것을 볼 수 있다. 예외의 경우로는 22B17(평창)이 횡성 궁종리(군집 C)에 같이 묶이는 현상과 군집 A, B, C, E와 F의 모든 강원군집 변이체(화살표)가 한데 모이는 현상을 보인다. 단지 D 군집인 전북 군산 개체들은 다른 개체군과 섞이지 않는 특성을 보인다. 이러한 현상은 <그림 16>에서 보다 쉽게 볼 수 있으며, 6개의 군집은 잘 clustering 된 것을 볼 수 있다.



<그림 16> AFLP 결과를 분석한 UMGMA clustering (unrooted).



<그림 17> 군집 D(군산 군집)와 강원 군집간의 염록체 SSR 차이.

#### (다) 독미나리 엽록체의 변이

강원의 변이체들(화살표)은 하나로 cluster되는 것을 볼 수 있다. 이들 변이체의 유전적 특성은 엽록체 SSR-1 마커로 구별한 결과 강원 개체와 군산 개체는 유별되었다<그림 17>. 이러한 관점에서 크게 강릉 군집과 군산 군집의 두 유전 pool이 형성된 것으로 보아야 할 것이나, 본 AFLP 분석에서는 그 유별성을 나타내지 못하였다. 추가적으로 엽록체 유전체 연구가 완료된 강원 군집의 22E08에 비교하기 위하여, 군산 군집의 22D10에 대해 일부 구간을 분석하였다.

추가적으로 SSR-2 구간에서 22E08에서는 [A]<sup>21</sup>, 22D10에서는 [A]<sup>20</sup>이었고, SSR-3 구간에서 22E08에서는 [A]<sup>20</sup>, 22D10에서는 [A]<sup>22</sup>으로 SSR 변이를 확인할 수 있었고, 추가적인 SSR을 개발 검정 중에 있다. 흥미로운 것은 유전자 구간에서 3개의 SNP 마커구간을 갖는 유전자를 찾았으며<그림 18>, 이들 구간의 연구가 진행 중에 있다.

```
22E08      TTATTTTA~GGGGACTTA~TCTGGGTCG.  
22D10      ...C.....~.....T.....~.....A.....
```

<그림 18> 군산 군집(D)과 강원 군집(E)의 엽록체 유전자구간의 SNP 마커.

#### (라) 독미나리 복원에 대한 견해

AFLP 결과에 근거한 독미나리의 유전적 다양성을 요약하면, ① 독미나리의 군집내 변이가 군집간 변이보다 높으며, ② 강원 내 아군집 별로 유별성을 보여 gene flow가 낮은 것으로 판단되며 이는 beetle pollination에 의해 제한되는 것으로 판단된다. ③ 강원 내의 변이체는 하나의 cluster를 이루

고 전북 군집과 유별되는 것으로 보아 강원 군집은 하나의 군집으로 그 변이 정도가 유사한 것으로 보이며, 이는 수생식물로 습지나 저수지의 제한된 분포에도 그 원인이 있다고 판단된다. ④ 가장 큰 강원군집은 군집 C로 많은 수계가 연결되어 있는 군집이어서 이곳의 AFLP를 이용한 연구가 보충된다면, 독미나리의 유전적 다양성을 보다 면밀히 볼 수 있다고 판단된다. ⑤ 강원 군집 E와 F는 유전적 다양도가 낮아 최근에 형성된 군집으로 판단된다.

국내 독미나리(*Cicuta virosa*)에 군집간 유전변이는 엽록체의 한 IGS구간에서 강원도 군집과 군산군집이 유별되는 것으로 알려져 있다(녹색식물연구소 2009). 이 엽록체 마커 cp-SSR-1에 근거해 강원군집과 전북 군집은 유별되는 것을 재확인하였다. 2 개체의 유전적 변이를 추적한 결과 강원도의 개체와 군산의 개체는 3개의 SSR에 의해 구별되고, 유전자구간에서 3 SNP가 존재함을 확인하였다. 본 연구결과에 근거하여, ① 강원군집과 군산 군집은 유전적으로 다르므로 복원 시 혼제하는 일이 없어야 하겠다. ② 일단 한 장소에 정착하면, 개체군의 다양도는 높아질 것으로 판단되나, 본 연구에서는 그 소요 기간에 대한 판단은 유보된다. ③ 흐르는 물에서 자라는 군집 C에 대한 연구는 독미나리 복원 보전에 대한 많은 정보를 줄 것으로 판단된다.

## 나. 비자나무(*Torreya nucifera* Siebold & Zucc., Taxaceae) 유전다양성 분석

### (1) 서론

주목과의 비자나무는 상록 침엽교목으로 수고 25 m, 흉고직경 2 m에 달하며 가지가 사방으로 퍼지고 수피는 회갈색이다. 침형의 잎은 선형에 침두로서 뒤쪽 주맥의 양측에 황백색의 기공조선이 있어 개비자나무와 구별된다. 음지와 해풍에 강하나 생장은 매우 느린 편이다. 염색체 수  $n = 11$ (Terasaka, 1982)인 자웅이주이며 개화기는 4월이고 풍매로 수분한다. 웅성구화수는 10개 내외의 갈색 포(苞)가 있고 난상원형이며 길이 10 mm로서, 한 줄기에 10여개의 구화수가 달린다. 자성구화수는 한 군데에 2-3개씩 달리고 녹색 포로 싸인 불규칙한 난형으로서 길이 6 mm정도이다. 가종피에 싸인 종자는 가을에 열리는데 두 해를 거쳐 완전히 성숙한다(이창복 2003). 예로부터 목재는 재질이 치밀하고 독특한 향과 광택이 있어 선박재, 가구재 등으로 이용되었고, 종자는 구충제와 약재로 이용되었으며 기름을 짜기도 하였다.

자웅이주이며 제3기 유존종인 비자나무(*T. nucifera*)는 전 세계적으로 우리나라와 일본에 제한적으로 분포한다. 우리나라에는 북위 35° 10' 이남에 분포하며, 단목 및 집단림 8곳이 천연기념물로 지정되어있다(그림 19A, 전남 강진 삼인리 비자나무 제39호; 전남 진도 상만리 비자나무 제111호; 전남 장성 백양사 비자나무숲 제153호; 전남 고흥 금탑사 비자나무숲 제239호; 전남 해남 녹우단 비자나무숲 제241호; 경남 사천 성내리 비자나무 제 287호; 제주 평대리 비자나무숲 제 374호; 화순 개천사 비자나무숲 제 483호). 이 중 가장 큰 집단이 제주도 평대리의 비자나무숲이다: 총 44.8 ha에 이르는 용암성 암석지대로서 매우 이질적인 꽃자왈 지대(송시태 2000, 송시태 등 2007)에 대부분 수령 200-400년, 평균수령 316년, 최고수령 ~880년에 이르는 2800여 개체가 순림을 이루고 있다(그림 19B, 이상길 2009).

이런 생물적, 지질적, 기념물적 중요성에도 불구하고 비자나무숲은 다음과 같은 보전 상의 문제점을 가지고 있다. 1) 보전을 위한 생태적 정보가 미비하다. 많은 자웅이주 식물의 성비는 번식적 성공에 중요하며

암수식물간 번식자원 분배의 상이성으로 인해 공간적으로 분리되는 경향이 있다(Bawa and Opler 1977, Thomas and LaFrankie 1993, Kang and Bawa 2003, Nuñez et al. 2008, but see Nicotra 1998, Queenborough et al. 2007, Schmidt 2008, Forero-Montana et al. 2010). 그러나 타가수정의 근간이 되는 성비와 공간분포의 양상, 이 양상과 관련된 환경적, 생태적 요인이 분석된 바 없다. 2) 보전을 위한 유전적 정보가 미비하다(Kang 1993, Hong et al. 2000). 목본의 경우 세대가 길어 유전적 위해요인의 발현이 비교적 느리지만 현재의 유전다양성에 대한 이해조차 없을 경우 환경 조건의 격변 시 어떤 회복도 기대하기 어렵다. 또한 비자나무숲은 노령림으로서 중하층부 유목과 치수가 존재하지 않고 이는 개체군 쇠퇴현상으로 보고되고 있다(이상길 2009, 신현철 등 2010). 치수부재를 해소하기 위해 임의의 치수를, 임의의 장소에 식재하고 있으나 식재목의 유전적 배경이 자연목과 다르다면 이는 자연림의 유전적 다양성을 변화시킬 수 있는 요인이 될 수 있다(Savolainen and Karkkainen 1992). 3) 침엽수는 현화식물에 비해 기후변화에 대한 적응력이 낮기 때문에 기후변화 시 매우 취약하다. 더욱이 자웅이주성 식물은 계통적으로 종수가 적고 위기종 비율이 높은 분류군이며(Vamosi and Vamosi 2005) 제주도는 우리나라에서 현저한 기후변화를 겪고 있는 대표적 지역이다. 이러한 심각한 조건 하에 처해있는 비자나무숲을 보전하기 위해서는 이들 위험요인을 고려한 대책이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 제주도 평대리의 비자나무 군락지에 서식하는 개체를 대상으로 유전적 다양성과 함께 유전적 다양성의 근간이 되는 생태적 특성 - 성비, 개체군통계, 공간분포 - 등을 종합적으로 분석하고자 하였다.



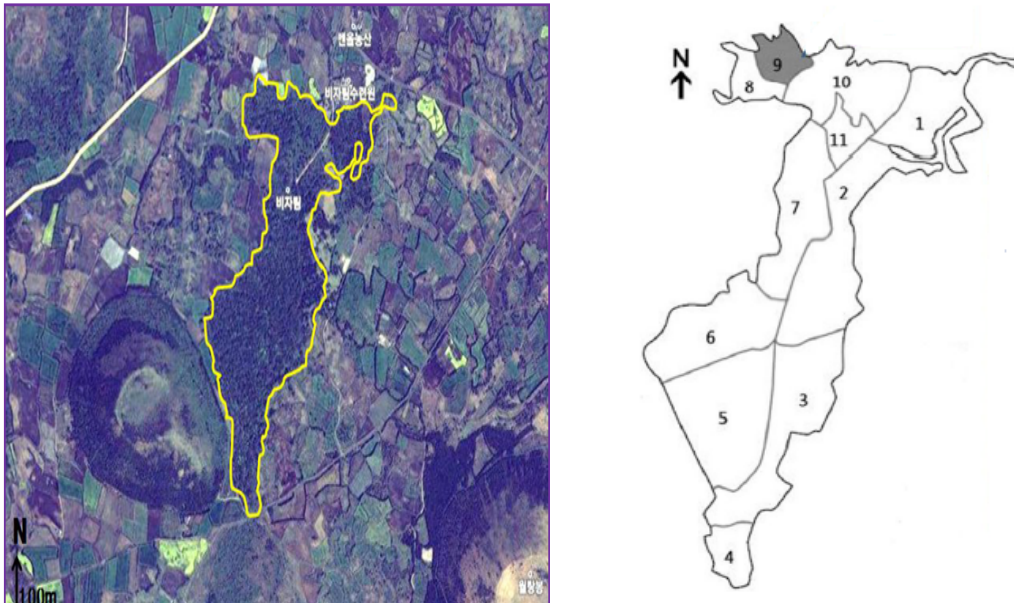
<그림 19> (A) 우리나라 비자나무 단목과 개체군 분포지. (B) 제주도 비자나무숲(*Torreya nucifera* S. et Z.; 이상길 2009, <http://www.cha.go.kr/>).

## (2) 재료 및 방법

### (가) 연구 재료

#### 1) 개체군생태 DB

본 연구는 제주도 제주시 구좌읍 평대리에 위치한 천연기념물 제 374호 비자나무숲(33° 29' N, 126° 48' E)에서 수행되었다(그림 20A, B). 비자나무숲은 남북방향(길이 1.4 km, 폭 0.6 km)으로 길게 형성된 평균해발고도 143 m의 평지림이다. 선행 연구된 개체 현황 분석자료(한국수목보호연구회 1999, 이상길 2009, 신수경 2012)를 참고하여 관리번호가 부여된 비자나무를 대상으로 dbh(수령), 수고, 성, 서식위치 등에 대한 DB를 구축하였다.



<그림 20> (A) 제주도 평대리 비자나무숲의 위치. (B) 비자나무숲의 관리 구역(구역 9는 인위적 관리에서 제외된 대조구이다.).

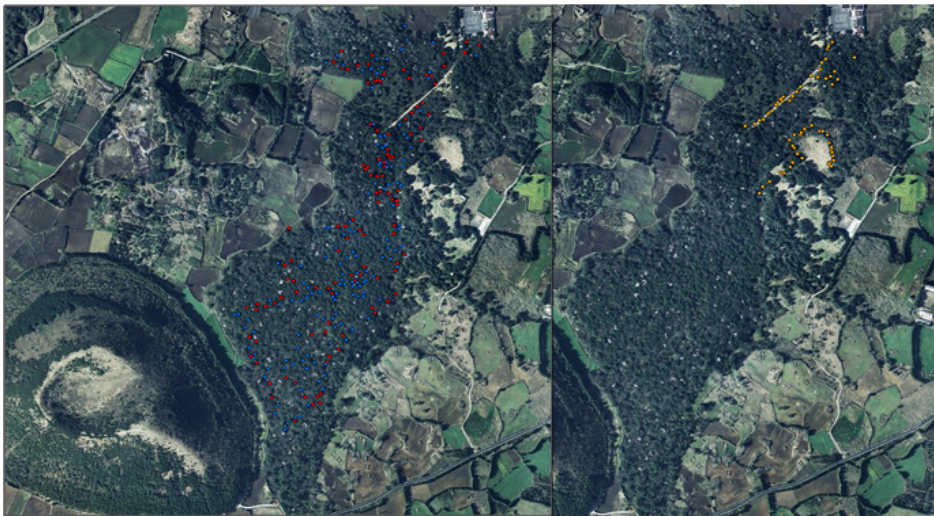
## 2) 유전다양성 시료

비자나무숲의 남북 길이에 걸쳐 고도구배와 수령구배가 있기 때문에 이런 구배를 반영할 수 있도록 전 구역에 걸쳐 채집활동을 수행하였으며, 최소 20 m 이상의 개체 간 거리를 유지해 혈연적으로 근연관계에 있는 개체가 선발되지 않도록 하였다. 비자나무가 천연기념물임을 고려하여 실험을 위한 최소한의 양만을 채집하고자 하였으며, 전 개체의 약 10%에 해당하는 300여 개체로부터 샘플을 확보하였으며(표 22, 그림 21), 이중 148개체를 대상으로 microsatellite을 이용한 유전다양성 분석을 수행하였다(자연집단 128개체, 식재집단 20개체). 자연목의 위치정보 및 생태정보는 생태 DB에 근거하였고 식재목은 현장에서 직접 위치정보 및 생태특성을 조사하였다. 천연기념물인 비자나무의 샘플링을 위해 해당 관리청에서 채취 및 보관허가를 획득하였다.

<표 23> 비자나무 시료 확보 현황

분석 대상종	지역	면적(ha)	샘플 수	평균 dbh(cm)	
비자나무	자연집단	I	15.0	92	67.8
		II	16.8	122	55.9
		III	10.5	39	54.7
식재집단			59	11.2	
			312		

채집지역 I = 구역 3, 4, 5; II = 구역 2, 6, 7; III = 구역 1, 8, 9, 10.



(A) 자연집단

(B) 식재집단

<그림 21> 비자나무 자연목과 식재목의 위치.

## (나) 연구 방법

### 1) 개체군생태 조사

비자나무숲은 11개의 구역으로 나뉘어 관리되고 있으나 한 구역(구역 11)에는 해송과 활엽수 외 비자나무가 없기 때문에 본 연구에서는 구역 1-10(면적 42.3 ha)만을 고려하였다<그림 20>. 고도와 크기 구배를 고려하여 뜻오름과 근거리인 지역 I(구역 3, 4, 5: 평균고도 149.0 m), 원거리인 지역 III(구역 1, 8, 9, 10: 평균고도 141.7 m), 지역 I과 III 사이의 지역 II(구역 2, 6, 7: 평균고도 129.5 m)로 서식위치를 재설정하였다. 생태 DB에서 dbh 및 지역별, 구역별 성비를 (수나무 총 본수/비자나무 총 본수)를 구하였고 dbh 및 지역별(10개 구역과 3개 지역) 성비의 1:1 평형을 검증하였다.

비자나무숲에 대해 전수조사한 측량지도를 획득하여 ArcGIS Ver. 9.3. (ESRI 2008)을 이용해 모든 개체들의 GPS 좌표값(Garmin GPSmap 60CSx)을 지도화하고 이어 공간분석을 수행하였다. Ripley's  $K$  지수를 적용하기 위해서는 1차적으로 전수의 비자나무숲을 포인트 좌표화하는 작업을 수행하였다. 종이로 된 분포도를 고해상도 스캐닝과정을 통해서 이미지 파일로 저장한 후에 각 모서리 지점에 좌표를 지정하여 warping을 수행하였으며, 모든 비자나무의 위치를 디지털라이징을 통하여 위치좌표를 확보하였으며, 1999년과 2009년에 조사된 암수 및 속성정보의 값을 매칭하여 수치지도화 작업을 완성하였다.

본 지수는 거리 증가에 따른 공간분포의 패턴을 달리 확인할 수 있는 지수이다. 아래의 공식은 포인트 자료의 공간분포가 서로 다른 거리의 차원에서 집중/분산되었는지를 반영한다. 가까운 거리에서는 집중되어 있을지라도 더 큰 크기의 거리에서는 분산 또는 임의의 결과를 보여줄 수도 있으므로  $L(d)$ 값을 거리에 따른 값으로 표현한다. 특히 임의의 점을 선택하지 않고 바로 동등하게 처리하는 경우와 9개 또는 99개 정도의 점의 수를 기준으로 하여 반복 계산을 할 경우에는 신뢰도가 높아져 의미있는 통계값을 구할 수 있다.

$$L(d) = \sqrt{\frac{A \sum_{i=1}^n \sum_{j=1, j \neq i}^n k(i, j)}{\pi n(n-1)}}$$

여기서  $d$  = 거리,  $n$  = 총 대상 나무의 수,  $A$  = 분석지역의 면적,  $K_{ij} = i, j$ 에 대한 가중치를 나타낸다. 위의 식을 적용한 ArcGIS Ver. 9.3. (ESRI 2008)의 공간분석 메뉴를 이용하여 구역별 특성을 살펴보았다. 구역별로 포인트의 갯수가 상이하고 분포 크기가 서로 다르므로 모두 표현하는 디폴트값을 사용해서는 상호비교가 어렵다. 따라서 시작점의 거리와 거리간의 급간을 각각 10과 5로 정하여 상호비교가 가능하도록 하였다.

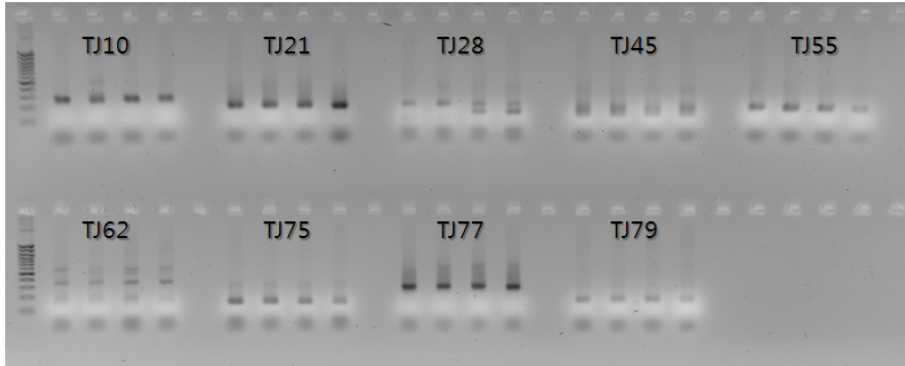
## 2) 집단유전학적 분석

### ① DNA 추출 및 Microsatellite 분석

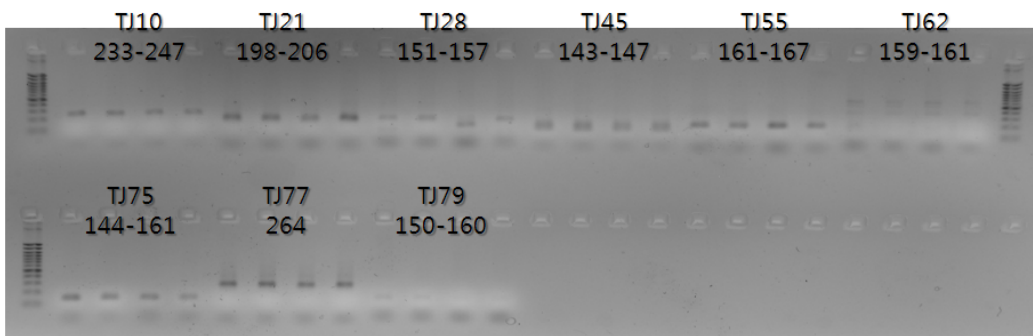
QIAGEN DNeasy Plant kit (QIAGEN Inc.)를 사용하여 비자나무의 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 Agarose gel 전기영동 및 Nanodrop Spectrophotometer를 통해 DNA 유무와 양질을 확인하였다.

*Torreya jackii* (Li et al. 2011)에 대해 개발된 9개의 microsatellite marker를 *T. nucifera*에 적용하여 Schuelke(2010)의 방법에 따라 증폭하였다<그림 22>. 그 결과 증폭에 일관성이 없는 TJ28, TJ45, TJ62 등을 제외한 6개 marker에 대해 형광 dye를 부착해 분석한 결과, TJ21, TJ55, TJ75, TJ77, TJ79 등이 모두 monomorphic한 것으로 확인되었다. **TJ10**의 경우 동일 marker에서 총 4개 유전좌위의 확인이 가능하였으며, 이들이 독립적인 유전좌위로 식별 가능하여, 각각을 microsatellite marker로 coding하였다 <그림 23>. 총 148개체(자연목 128개체, 식재목 20개체) 중 증폭에 실패한 11개체를 제외한 137개체(자연목 117개체, 식재목 20개체)에 대해 microsatellite 대립유전자를 codominant marker로 coding하였으며, 별도로 각각의 대립유전자의 존재 유무를 0/1로 coding하여 fingerprinting marker로 coding하였다.

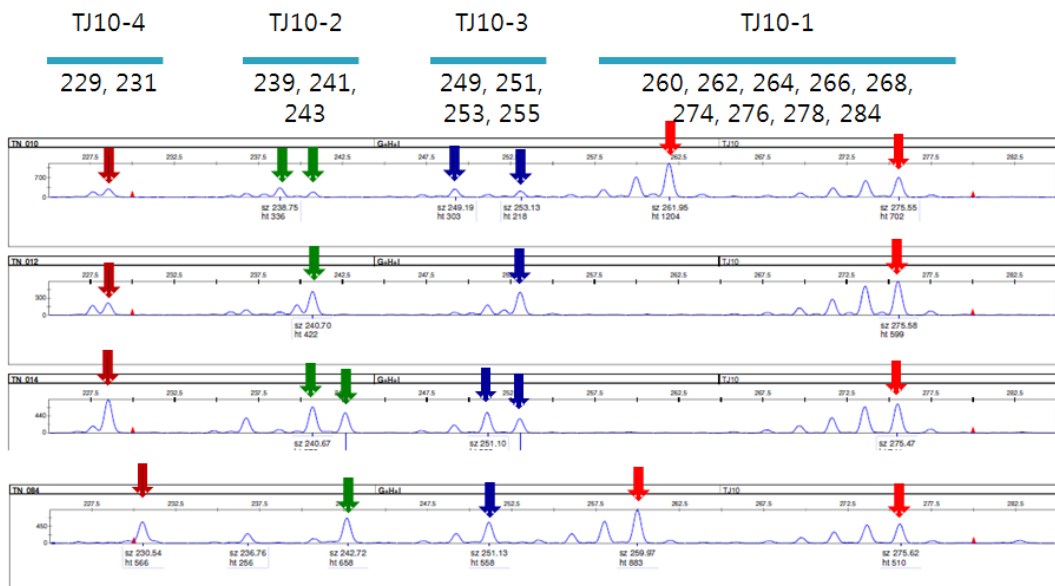
A



B



<그림 22> *Torreya jackii*에서 개발된 microsatellite marker를 *T. nucifera*에 적용한 결과. (A) 4개의 식재목에 대한 증폭 결과. (B) 4개의 자연목에 대한 증폭 결과. 왼쪽은 100 bp DNA ladder이다.



<그림 23> 비자나무에서 증폭된 TJ10 microsatellite marker의 coding.

## ② 자료분석

비자나무 자연집단과 식재집단 및 수령 유전변이를 추정하기 위해 관측된 이형접합치( $H_0$ ), 기대된 이형접합치( $H_E$ : Nei 1987), Fixation index ( $F_{IS} = 1 - H_0/H_E$ ) 등을 산출하였다. 자연집단은 dbh (40 cm 미만, 40 cm 이상 80 cm 미만, 80 cm 이상), 서식위치(지역 I, 지역 II, 지역 III)에 따라 세 등급으로 구분하였다. 집단 간 분화정도는 AMOVA (Analysis of molecular variance)로 분석하였다. 유전다양성 및 집단 분화 분석에는 GenAlex 6.41 program (Peakall and Smouse 2006)을 사용하였다. 공간적 유전구조를 규명하기 위해 Gregorius(1978)의 유전적 거리( $D_G$ ) 산출 방식에 근거한 distogram과 Moran' I ( $I_q$ )에 근거한 correlogram을 작성했다. 거리등급은 0.1 km 간격으로 12개 구간으로 나뉘었으며, 각 구간에서 1000회의 permutation 분석에 의해 95% 신뢰구간을 산출했다. 이 분석에는 SGS version 1.0d program (Degen et al. 2001)을 이용하였다. 비자나무 집단의 최적군집 수는 STRUCTURE version 2.2 program (Pritchard et al. 2000)을 이용해 분석을 하였다.

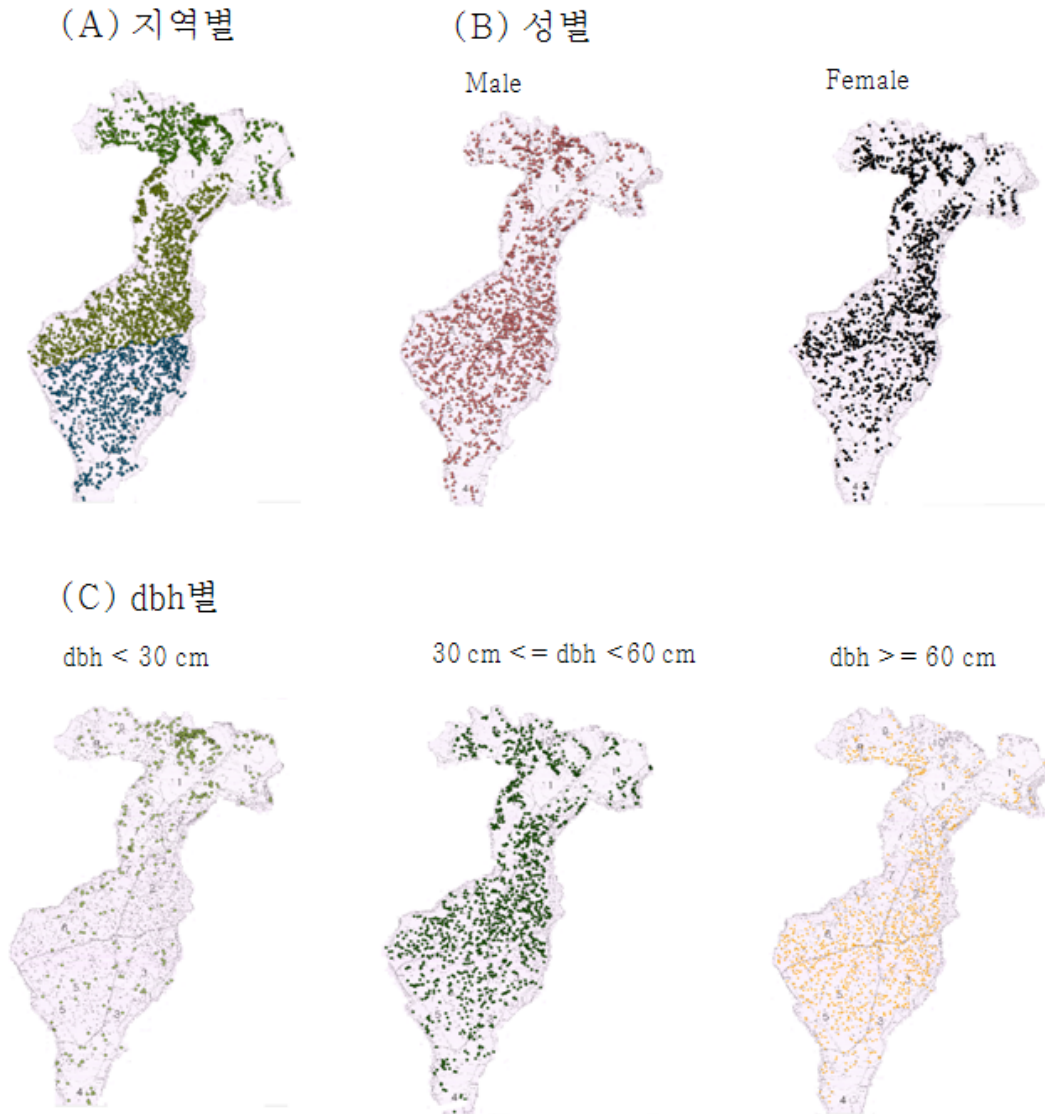
## (3) 결과

### (가) 개체군생태학

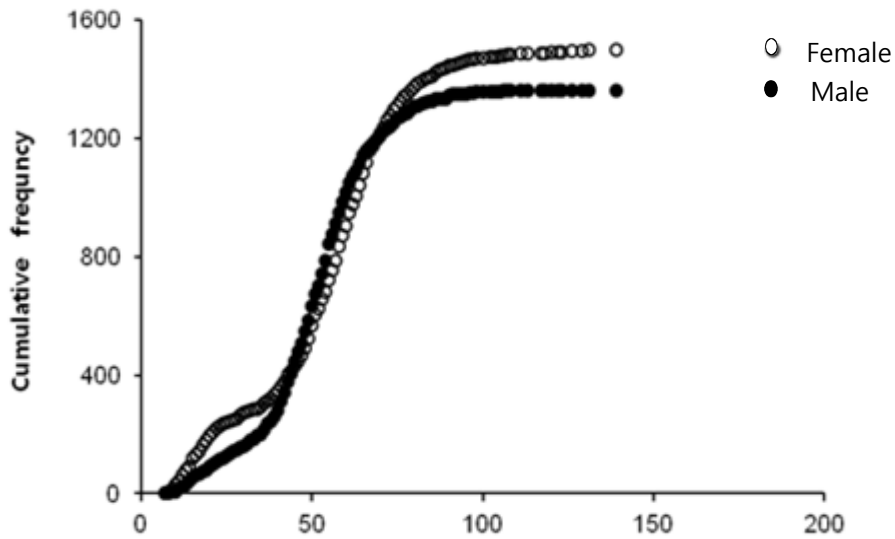
#### 1) 성비

비자나무숲에는 총 2861본의 비자나무(평균 수고  $10.4 \text{ m} \pm 2.20\text{m}$ , 평균 dbh  $52.4 \text{ cm} \pm 20.11 \text{ cm}$ )가 서식한다. <그림 24>은 지역 별, dbh 별, 성별에 따른 개체들의 분포를 보여준다. dbh를 세 등급으로 나누었을 때 dbh 등급에 따라 성비가 다른 방향으로 편향되는 경향이 있었다. 즉 소경목(dbh < 30 cm)에서는 수나무, 중경목( $30 \text{ cm} \leq \text{dbh} < 60 \text{ cm}$ )에서는 암나무, 대경목(dbh  $\geq 60 \text{ cm}$ ) 무리에서는 다시 수나무가 많았다<그림 25>. 특히 dbh 100 cm 이상에서는 수나무가 암나무에 비해 5.6배 많았다. 구역별

성비의 양상과 더불어 돛오름 근거리인 지역 I은 수나무로, 원거리인 지역 III은 암나무로 편향되었고, 중간인 지역 II는 1:1 성비를 보였다<표 24>.



<그림 24> 비자나무숲 내 (A) 지역별, (B) 성별, (C) dbh 등급별에 따른 비자나무의 공간 분포.



<그림 25> dbh에 따른 비자나무의 암수 개체 누적빈도.

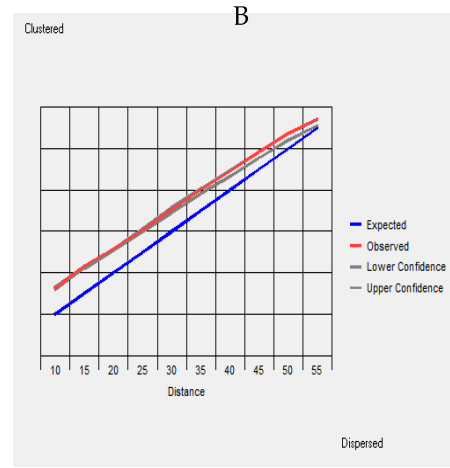
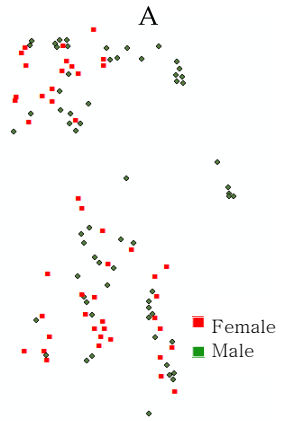
<표 24> 지역별, 구역별 암수 개체 수와 성비

관리구역	개체 수		성비	X <sup>2</sup>	P
	수	암			
지역 I					
3	235	167	0.58	11.50	0.0007
4	16	11	0.59	0.93	0.3359
5	268	165	0.62	24.50	<0.0001
총	519	343	0.60	35.94	<0.0001
지역 II					
2	304	293	0.51	0.20	0.6526
6	194	200	0.49	0.09	0.7624
7	165	160	0.51	0.08	0.7815
총	663	653	0.50	0.08	0.7878
지역 III					
1	64	47	0.58	2.60	0.1066
8	23	64	0.26	19.32	<0.0001
9	18	21	0.46	0.23	0.6310
10	211	235	0.47	1.29	0.2558
총	316	367	0.46	3.81	0.0510

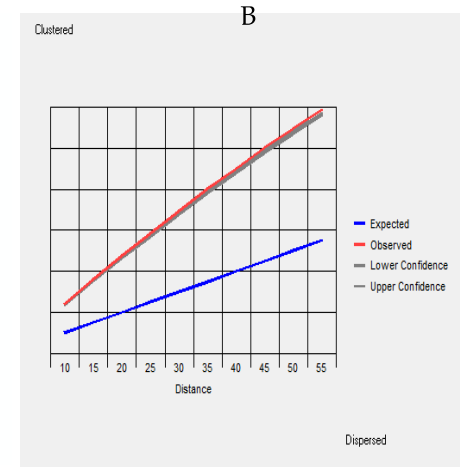
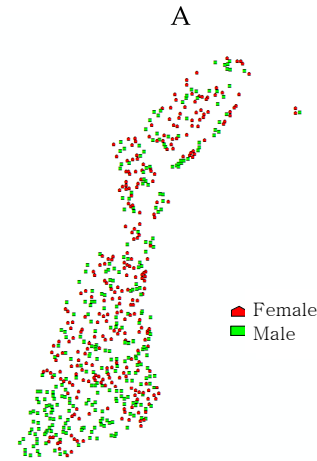
## 2) 공간분포

<그림 26>는 각 구역에서의 암수개체들의 집중, 임의, 분산의 공간분포를 검증하는 Ripley's  $K$ 의 결과와 암수개체들의 분포를 보여준다. 구역 1은 거리에 따른 집중/분산의 경향성을 보이지 않고 있으나 임의라기보다는 다소 집중되는 경향을 보여준다. 구역 2의 경우 임의분포의 예측값에 비해 매우 유의하게 집중되었고 거리가 클수록 더욱 집중되는 경향이 있다. 구역 3과 구역 4는 대조적이었다. 구역 3은 거리에 따른 효과 없이 집중된 모습을 보인다: 구역 4는 가까운 곳에서는 임의적인 모습을 보이나 20 m를 넘어서는 점차 분산되어 35 m 이상의 거리에서는 통계적으로 유의한, 강한 분산 경향이 나타났다. 구역 5, 6, 7은 구역 3과 유사하게 집중 경향이 있지만 크게 유의하지 않아 임의분포에 가까웠다. 이와 달리 구역 8은 임의 양상을 나타내고 40 m 이상의 거리에서는 분산된 모습을 보여주었다. 구역 9는 구역 8보다 훨씬 더 유의하게 분산된 모습을 보여주며, 거리 증가에 따라 분산정도가 더 커졌다. 구역 10에서는 집중도가 더 크게 나타났다. 결국 암수식물의 공간분포 양상은 구역간 일치하지 않았다.

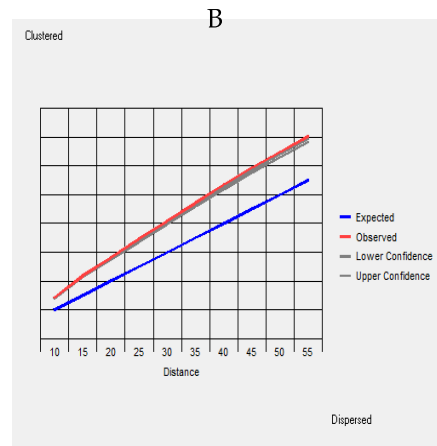
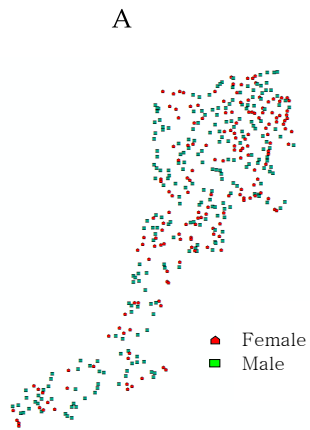
구역 1



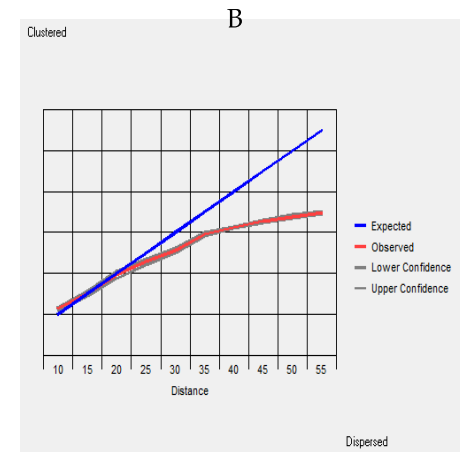
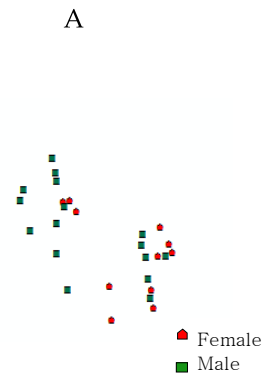
구역 2



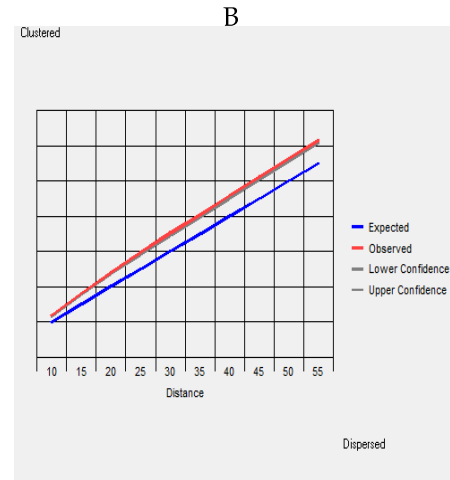
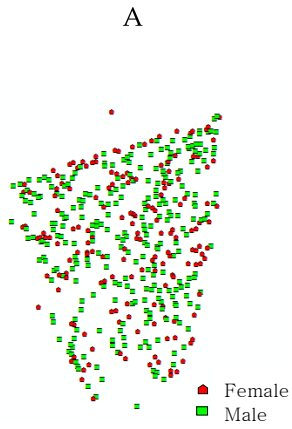
구역 3



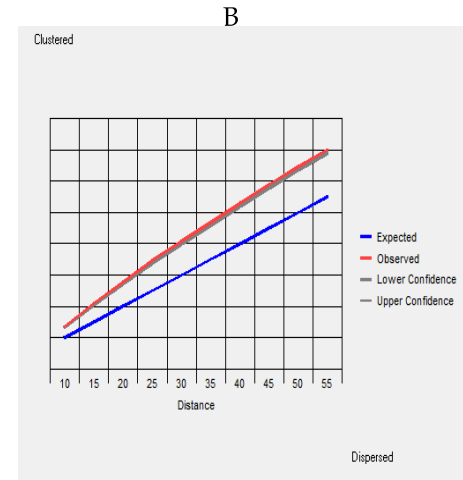
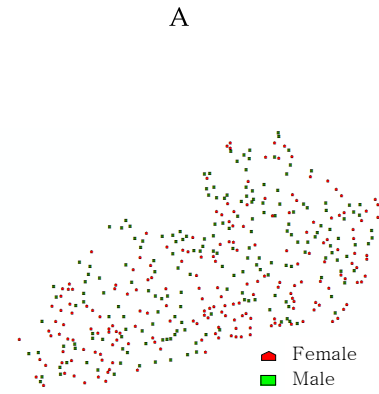
구역 4



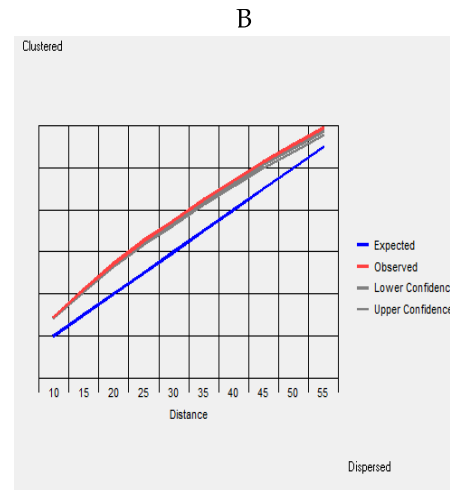
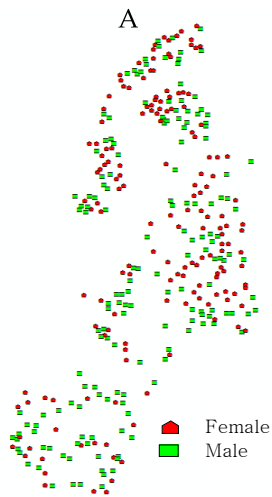
구역 5



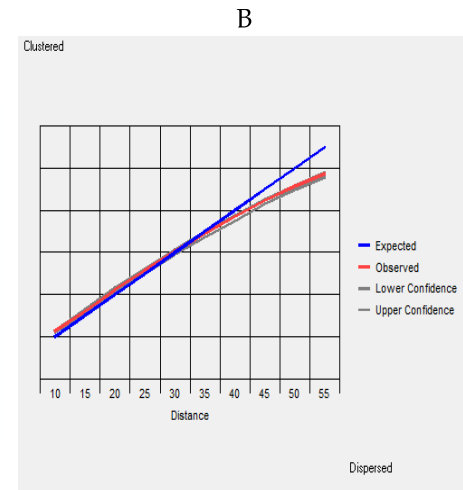
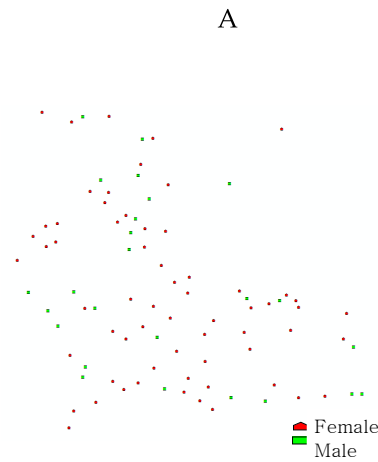
구역 6



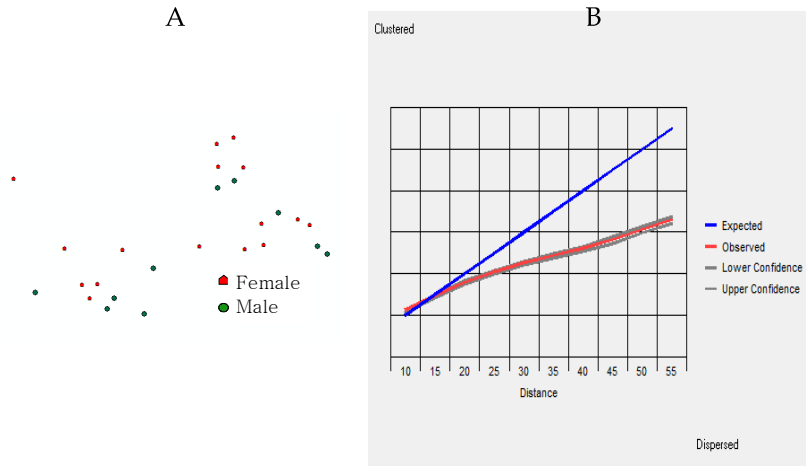
구역 7



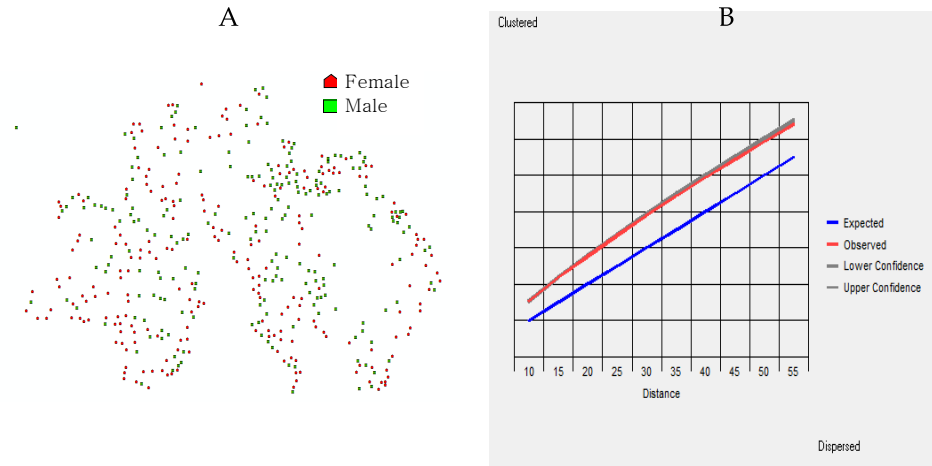
구역 8



구역 9



구역 10



<그림 26> 비자나무숲 각 구역에서의 (A) 지도화된 암수 개체의 분포. (B) 공간분포를 확인하기 위한 Ripley's  $K$ 의 결과.

(나) 집단유전학적 분석

1) 유전다양성

제주도 비자나무 자연집단에서 이형접합도의 관측치( $H_o$ )는 0.543, 기대치( $H_e$ )는 0.624로 나타났다<표 25>. 근연종으로 중국에 서식하는 *T. jackii* 집단(Li et al. 2011)의 microsatellite 분석 결과( $H_e$ : 0.185 - 0.796)와 비교했을 때, 제주도 집단은 비교적 평균 이상의 유전변이를 보유하고 있는 것으로 판단된다. 자연집단 내에서 dbh가 증가할수록 이형접합도의 관측치( $H_o$ )가 증가했으며, 기대치( $H_e$ )는 유사한 경향이 나타났다. dbh가 높은 노령목 그룹은 근친교배가 없는 안정된 그룹으로 나타났다( $F_{IS} < 0$ ). 식재집단의 이형접합도 관측치( $H_o$ )는 자연집단에 비해 낮았다. 서식위치를 고려하였을 때 지역 간 유전변이의 차이가 있었다<표 25>. 비자나무 암수성비가 1:1로 평형을 이루고 있는 지역 II에서 유전변이가 가장 높았으며, 암나무가 고밀도로 분포하는 지역 III에서 가장 낮았다.

이석우 등(1999)에 의하면 공우성 표지자인 동위효소 분석을 통해 국내 비자나무 집단(전북 장성, 전남 해남 및 고흥, 경남 남해, 제주도)의 유전다양성( $H_o = 0.024$ ,  $H_e = 0.055$ )이 매우 낮았다. 또한 동일 집단을 우성 표지자인 I-SSR로 분석한 Shannon의 다양성 지수( $J$ )가 0.353(Hong et al. 2000)으로 보고된 바 있다.

<표 25> 비자나무 자연집단과 식재집단의 유전다양성

집단	dbh	개체수	Shannon index ( $J$ )	$H_o$	$H_e$	Fixation index ( $F_{IS}$ )
자연집단	< 40	15	1.111	0.467	0.624	0.277
	40 - 80	85	1.083	0.539	0.624	0.109
	≥ 80	17	1.087	0.625	0.623	-0.001
	총	117	1.094	0.543	0.624	0.128
식재집단		20	1.003	0.486	0.564	0.080
총		137	1.050	0.514	0.596	0.099

<표 26> 서식위치(지역 I, 지역 II, 지역 III)에 따른 비자나무 자연집단의 유전다양성

서식위치	개체수	Shannon index ( <i>I</i> )	<i>H<sub>o</sub></i>	<i>H<sub>e</sub></i>	Fixation index ( <i>F<sub>IS</sub></i> )
지역 I	15	1.035	0.540	0.586	0.060
지역 II	85	1.089	0.567	0.630	0.092
지역 III	17	0.987	0.478	0.567	0.112
총	117	1.037	0.528	0.594	0.088

## 2) 유전적 분화

자연집단과 식재집단에 대한 AMOVA 분석에 의하면 전체 유전변이량 중 1.0% 만이 집단 간에서, 99.0% 는 집단 내 개체 간에서 기인하였다<표 27>.

자연집단의 dbh 등급(수령)별 분석에서, 등급 간 차이는 0%로 수령에 따른 집단 간 분화는 없는 것으로 보인다. 반면 자연집단을 서식위치(지역 I, 지역 II, 지역 III)에 따라 AMOVA 분석을 실시한 결과, 총 변이의 8.0%가 지역 간 발생하였다<표 28>.

<표 27> 비자나무 자연집단과 식재집단의 AMOVA 분석

	df	SS	MS	Variance component	Percentage variation (%)	<i>P</i>
개체군 간	1	3.50	3.50	0.017	1.0	0.006
개체군 내	135	394.10	2.92	2.919	99.0	
총	136	397.60		2.936	100.0	

df, degree of freedom; SS, sum of squares; MS, expected mean squares

**<표 28>** 서식위치(지역)에 따른 비자나무 자연집단의 AMOVA 분석

	df	SS	MS	Variance component	Percentage variation (%)	<i>P</i>
지역 간	2	23.69	11.84	0.249	8.0	0.000
지역 내	114	316.51	2.78	2.776	92.0	
총	116	340.20		3.025	100.0	

### 3) 비자나무숲의 공간적 유전구조

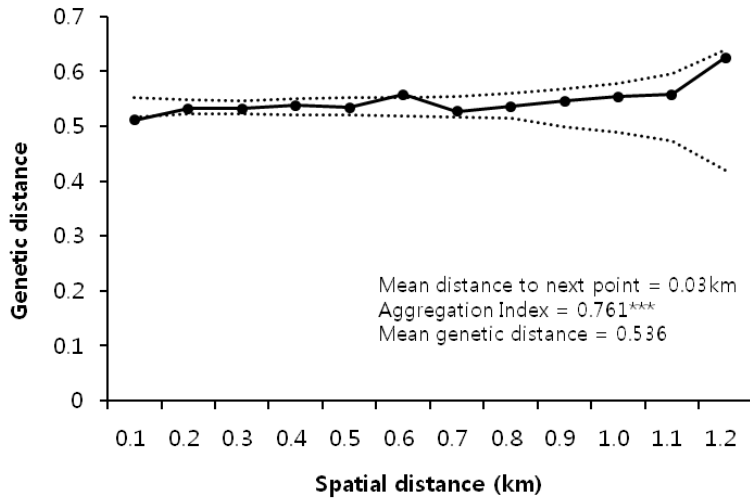
#### - 공간자기상관 분석(Spatial autocorrelation analysis)

공간적 자기상관성 분석에 의하면, 0.1 km 이하의 거리에 있는 개체 간에는 유전적 유사성이 나타나 자기상관성이 인정되었다<그림 27A>. 이후 0.1 - 0.5 km 사이에는 임의분포 하였고, 0.5 - 0.6 km 구간에 있는 개체 간에는 유전적 이질성을 나타냈다. 0.6 km 이상 떨어진 개체들 간에는 다시 임의분포를 나타냈다. Moran's  $I(I_q)$ 에 의한 correlogram에 의해서도 이와 같은 경향이 있었다<그림 27B>. 유전자원 확보의 측면에서 채종 등 활동을 한다면 최소 0.1 km 이상의 거리를 두어야 할 것으로 보인다.

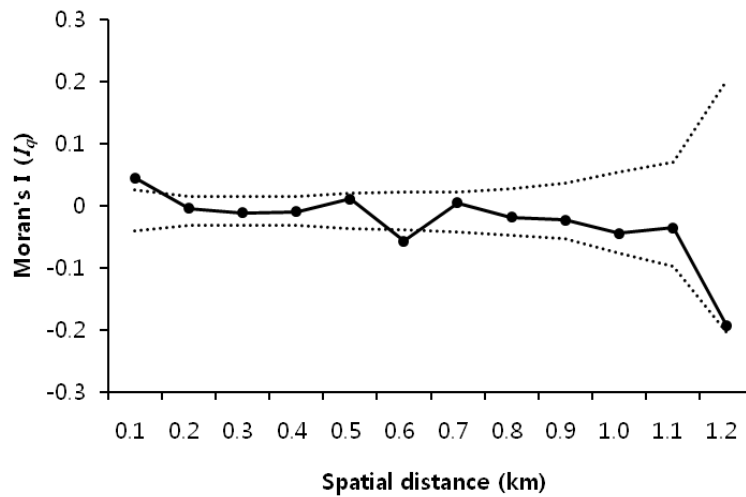
#### - 베이지 군집분석(Bayesian clustering analysis)

Evanno et al. (2005)을 이용한 베이지 군집분석의 최적군집 수는 2개로 계산되었다. 각 개체는 bar로 나타내어지며, 그 구성은  $K$  값에 따라 두 가지 색으로 표현된다. 이를 토대로 개체의 유전적 구성과 형상을 분석한 결과, 자연집단과 식재집단 간 개체의 차이는 나타나지 않았다<그림 28A>. 자연집단 역시 서식위치에 따라 개체 간 유사한 유전적 구성을 나타냈다<그림 28B>.

(A)

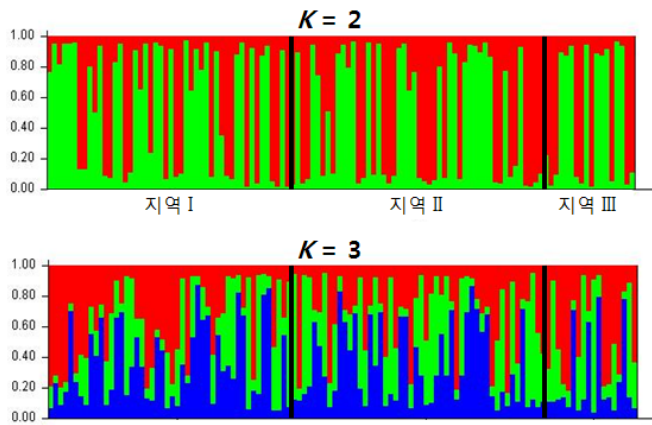


(B)

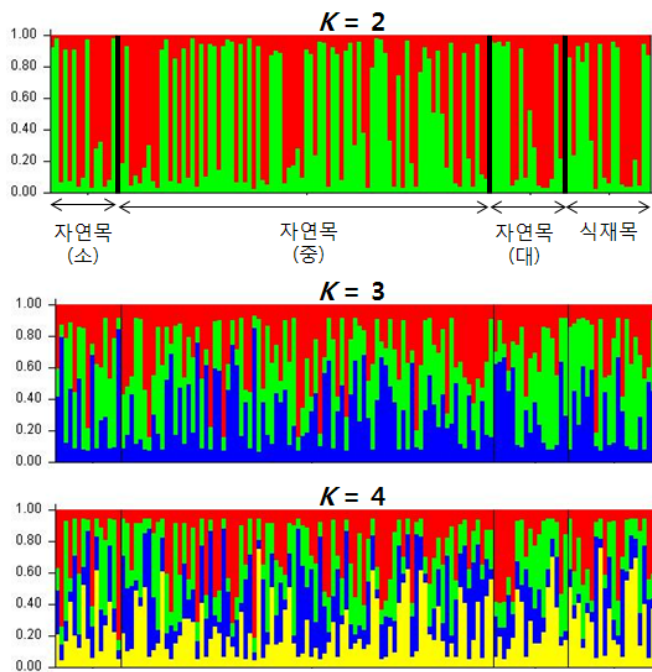


<그림 27> 비자나무숲 조사지의 공간적 유전구조(실선: 자기상관곡선, 점선: 95% 신뢰구간). (A) Gregorius(1978)의 유전적 거리( $D_G$ ) 산출 방식에 근거한 distogram. (B) Moran'  $I(I_q)$ 에 근거한 correlogram.

(A)



(B)



<그림 28> 비자나무 집단의 STRUCTURE 분석결과, 집단별 개체의 유전적 구성 및 형상. (A) 자연집단 내 서식위치. (B) 자연집단(dbh 별)과 식재집단. 각 bar는 개체를 나타내며, 각 색은 특이 유전자풀을 나타낸다.

#### (4) 결론 및 연구 활용 방안

##### (가) 비자나무숲의 개체군생태학

성비가 1:1이라는 선행보고(한국수목보호연구회 1999, 이상길 2009)들과는 달리 비자나무숲의 성비는 수나무로 유의한 편향을 보였다. 비자나무 크기와 성비 변이의 동조현상이 관찰되었다. 비자나무숲이 대체로 자연림(이상길 2009, 신현철 등 2010)이고 대부분 수령 200 - 400년, 최고 수령이 880년에 이르는 노령림이라면 dbh와 동반한 지역간 성비의 전환은 번식비용과/또는 성장률에 따른 선택의 결과로 해석될 수 있다. 그러나 밀도와 평균 dbh는 지역 내 구역간에서 다소 또는 상당한 차이가 있었다. 이런 차이는 대체로 고도가 낮으며 전답에 둘러싸인 남단지역(북단의 구역 4 포함)에서 현저하였다. 구역별 Ripley's  $K$  결과는 임의분포, 집중분포, 분산분포까지 구역별 다양한 양상을 보여주고 있다. 구역별 dbh, 성비, 밀도의 변이와 함께, 공간분포의 변이는 비자나무숲 구역들의 단편화 역사와 인간 활동의 역사를 반영할 가능성이 있다. 제주도는 오랜 방목의 역사, 경작, 전란의 역사를 가지고 있다. 각 구역별 세밀한 유전변이 조사를 병합하여 지도화한다면 구역별 차이를 가져온 역사적 사건에 대한 가설이 제기될 수 있을 것이다.

##### (나) 비자나무숲의 집단유전학

비자나무 노령목들이 다른 수령의 나무들에 비해 유전변이가 다소 높았고 이런 경향은 여러 수종에서 밝혀진 바와 유사하다. 자연집단은 식재집단에 비해 유전변이가 약간 높았다( $H_0$  0.543 vs. 0.486). 따라서 식재목 종자가 자연집단에서 유래했을지라도 채종된 암나무들은 다양하지 않았을 가능성이 있다. 유전변이량의 차이에 불구하고 두 집단 간 분화도는 낮고(1%) 개체들의 유전적 형상과 구조는 집단 간 차이가 없었다. 이는 본 연구에서는 성별 구분이 가능한 (dbh 6 cm 이상) 식재목 중 소수만을 분석한 결과일 수 있으므로 현재 널리 식재되고 있는 작은 비자나무들의 유전다양성을 검증할 필요가 있다. 공간자기상관 분석에 의하면 0.1 km 구간 이내에서는 비자나무가 유전적으로 동질하였으나 0.5 - 0.6 km에서는 이질성이 있었다.

그렇다면 현지 내·외 보전을 위한 채종시 최소 0.1 km, 0.5 - 0.6 km 거리까지 모수간격을 확보한다면 유전적 다양성을 높일 수 있을 것이다. 그러나 천연기념물의 역사성이 유전적 역사를 포함한다면 식재에 앞서 식재활동의 생물적 영향에 대한 논의가 선행되어야 한다. 유전 분석과 논의는 현재 비교적 관리정도가 덜한 전라도 일원 비자림의 보전에도 시급하다.

집단의 유전변이 감소는 일반적으로 환경변화에 따른 적응력의 감소를 초래한다(Savolainen and Karkkainen 1992, Vergeer et al. 2003, Hensen et al. 2005). 그러나 중립 마커의 변이가 환경변화에 대한 적응력을 반영하지 못한다면, 적응력에 관련된 일련의 유전자를 다루는 계량유전학 연구가 필요할 것으로 보인다(Kramer and Havens 2009). 1000년 숲 비자나무숲에 대한 다양한 유전적 정보는 전라도 일원 잔존 비자림에도 적용가능하다. 뿐만 아니라 유사한 위기종, 희귀종, 유존종들의 보전 및 관리 방안 설정에 기여할 것이다.

#### (다) 비자나무숲의 보전방안

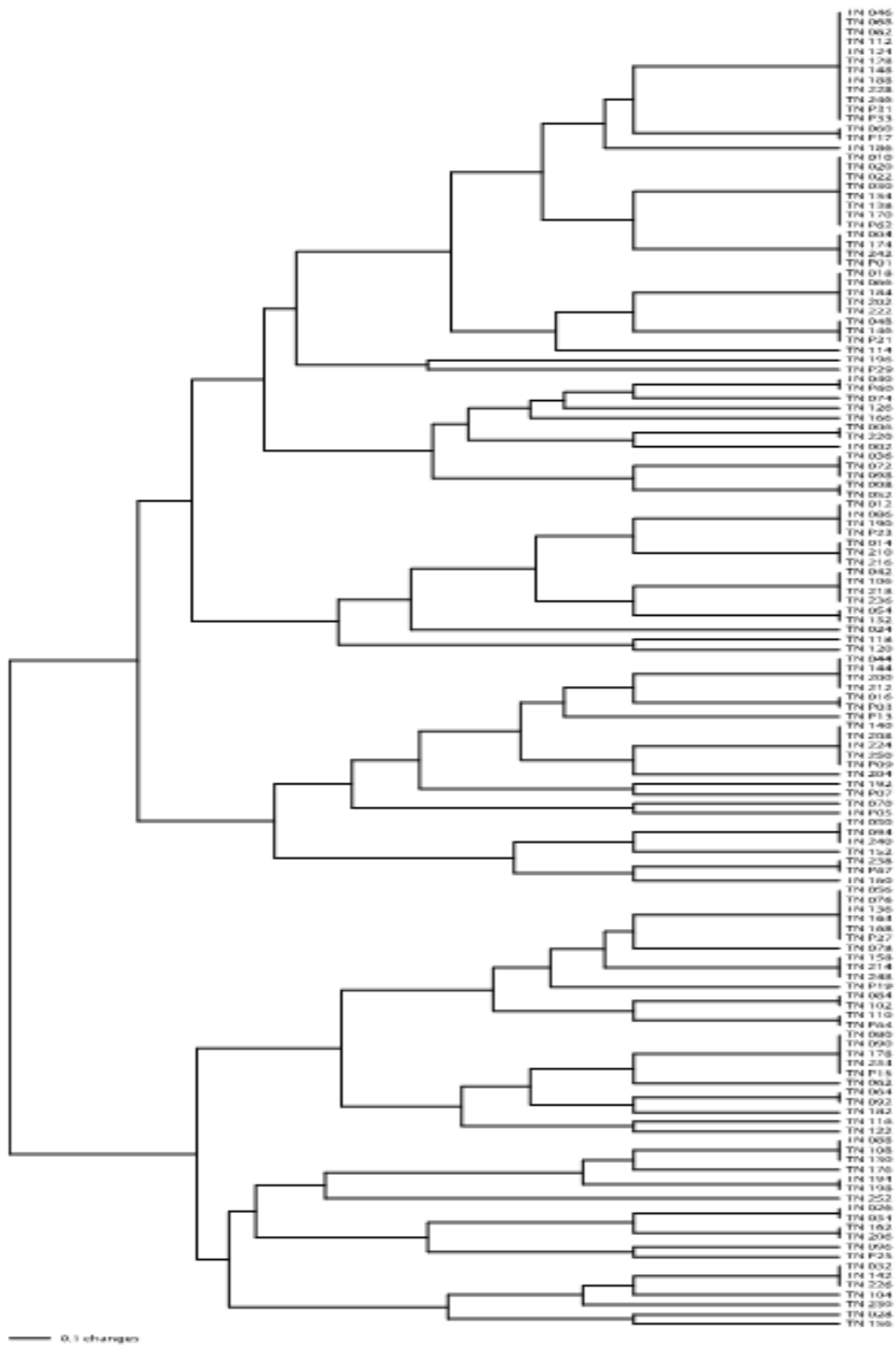
서식지 크기와 경관은 생물종들의 생태적, 유전적 특성의 변화를 초래하여 궁극적으로 종과 개체군의 번식과 생존에 결정적인 영향을 미친다. 현재의 비자나무숲은 긴 장방향으로서 거의 모든 서식지가 가장자리효과에 처할 수 있을 정도로 작은 편이다. 서식지를 확보하기 위해 가장자리효과의 범위와 그 영향에 대한 분석이 필요하며 그 결과에 따라 가장자리효과를 상쇄할 수 있는 적절한 조치가 있어야 할 것이다.

우리나라 위기종 목록은 위기종 설정 기준과 계통상의 측면에서 IUCN의 적색목록과 큰 차이를 보이고 있다. 예를 들어, IUCN(2012)에 의하면 겉씨식물이 식물분류군 중 가장 위협도가 높으며 비자나무가 속한 주목과 종의 55%가 위기종이다. 이에 반해 우리나라에는 70 여 종의 겉씨식물이 있고 이중 4종이 고유종임에도 불구하고 단 한 종도 위기종으로 지정되어 있지 않다(Kang et al. 2010). 비자나무는 절멸위협도가 높은 자용이주식물이며, 기후변화에 취약한 침엽수이고, 세계적으로 분포가 제한되고, 국내에서도 분포역이 제한되고, 계통적으로 작을 뿐만 아니라 경제적으로 유용하므로 극히 취약한 수종이다. 이러한 다중의 위협요인들은

비자나무가 '위기종'으로 지정되지 않은 '잠재적 위기종'임을 말해준다. 비자나무와 그 밖의 잠재적 위기종들을 보전하기 위한 연구, 정책, 관리, 평가의 전략을 제고할 시점이다.

#### (라) Microsatellite를 활용한 fingerprinting

본 연구에서 *T. jackii*에서 개발된 microsatellite marker중 TJ10이 비자나무에서 활용가능한 것이 확인되었으며, 이를 통한 비자나무의 fingerprinting과 개체 선별에 활용이 가능한 것으로 판단된다. TJ10으로부터 총 18개의 대립유전자가 확인되었으며, 이의 존재 유무를 통해 분석된 137개체가 96개의 유전형으로 식별되었다 <그림29>. 이처럼 개체 수준에서 식별가능한 marker를 활용, 후계목 선정, 개체 식별 등에 활용이 가능할 것으로 판단된다.



<그림 29> 비자나무 집단의 microsatellite를 이용한 fingerprinting. 137개체로부터 총 96개의 genotype이 식별됨.

## 다. 자주솜대(*Maianthemum bicolor* (Nakai) Cubey ≡ *Smilacina bicolor* Nakai, Asparagaceae) 유전다양성 분석

### (1) 서론

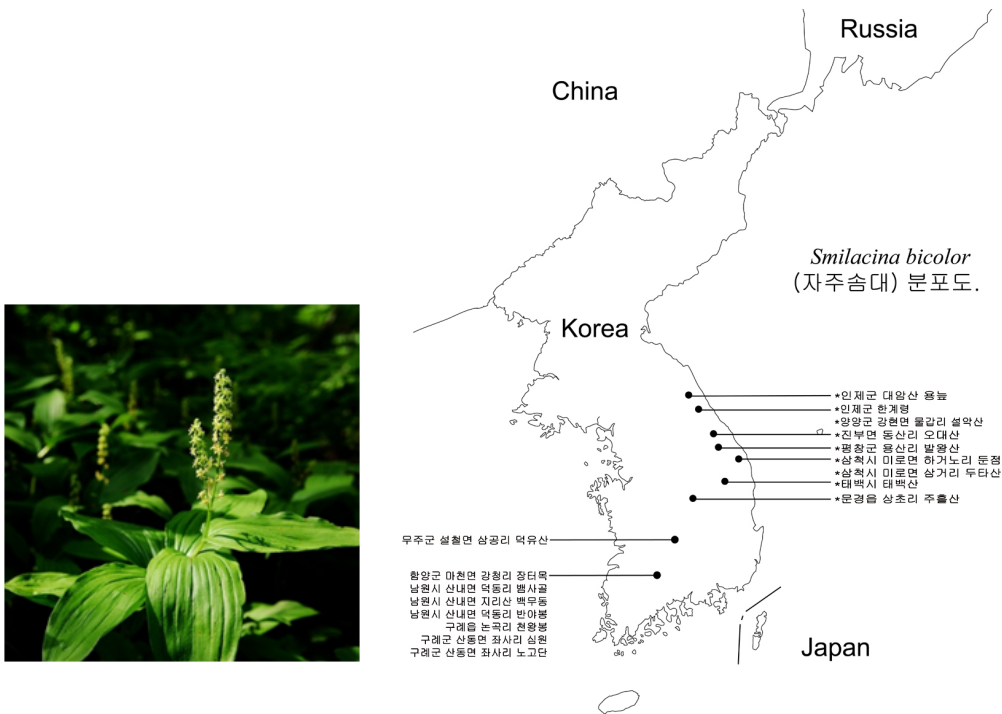
*Smilacina*(풀솜대속)속은 비짜루목(Asparagales) 비짜루과(Asparagaceae)에 속하며, 1986년 LaFrankie에 의해 이 속의 분류군들이 모두 *Maianthemum*(두루미꽃속)속으로 이전되었다. 현재 우리나라에는 과거 풀솜대속으로 취급되는 분류군을 포함해 *M. bifolium* (L.) F.W. Schmidt(두루미꽃), *M. dilatatum* (Alph. Wood) A. Nelson & J. F. Macbr.(큰두루미꽃), *M. dahuricum* (Trucz. ex Fisch. & C. A. Mey.) LaFrankie(≡ *S. dahurica*, 민솜대), *M. japonicum* (A. Gray) LaFrankie(≡ *S. japonica*, 풀솜대), *S. japonica* var. *manshurica* Maxim.(왕솜대), *M. trifolium* (L.) Sloboda(≡ *S. trifolia* (L.) Desf., 세잎솜대), *M. bicolor* (Nakai) Cubey(≡ *S. bicolor* Nakai, 자주솜대) 등이 분포하고 있다. 한편, 김(1997), Kim and Lee(1998)는 풀솜대속에 대한 분류학적 연구를 통해 그동안 한국에서 민솜대로 인식되어 오던 개체들이 자주솜대와 마찬가지로 줄기, 잎, 소화경 등에 모양이 존재하지 않으면서, 꽃의 형질에서만 차이가 나타나는 특징을 들어 중국의 *S. dahurica*와 구별되는 것으로 보고 *S. bicolor* var. *flavovirens* N. S. Lee et J. Y. Kim(연두솜대)로 명명한 바 있다. *Smilacina bicolor* var. *flavovirens*(연두솜대)는 화피의 끝이 둥글며, 연두색이고, 수술대는 흰색, 자방 및 주두는 연두색이며, 주두가 얇게 갈라지는 점에 있어 자주솜대와 구분되는 것으로 보고되었다. 한편, Kim and Lee(1998)은 제주도에 *S. robusta* Makino & Honda(큰솜대)가 분포하는 것을 보고하였으며, Lee(1993)는 풀솜대 중 열매가 노란색인 것을 *S. japonica* var. *lutecarpa* Y. N. Lee(황금지장보살)로 보고하였다.

자주솜대는 1914년 Takenoshin Nakai에 의해 지리산 반야봉에서 채취된 개체를 기준으로 기재된 한국 특산종이다. 자주솜대는 키 30-45 cm의 다년생 초본으로, 지하경이 한쪽 방향으로 길게 가로로 뻗는다. 줄기에는 털이 없으며, 잎은 타원형, 또는 난형으로 호생하며 길이 6-11 cm, 폭 2.5-5 cm이다. 잎의 가장자리에는 작은 돌기가 나 있으며, 잎 상, 하면 표피에 털이 없고, 엽맥 위에 돌기가 분포한다. 화서는 총상화서로 간혹 1개정도 가지가 갈라지며, 마디에서 소화경이 있는 꽃이 1개씩 달리며, 소화경 표면에 돌기가 분포한다. 꽃은 6-7월에 피며, 외화피와 내화피가 크기나 형태에 뚜렷한 차이가

없다. 화피는 좁은 타원형으로 끝이 뾰족하며, 개화 초기에는 연두색이었다가 만개하면서 자주색 얼룩이 생긴다. 수술대 역시 개화 초기에는 미색이 되는 흰색이다가 만개하면서 검은색에 가까운 짙은 자주색이 된다. 꽃밥의 길이는 평균 0.3 mm로 다른 종이 평균 0.8 mm인 것에 비해 짧다. 자방은 구형으로 개화 초기에는 노란 빛이 돌다가 만개하면 주황색 또는 짙은 자주색으로 변화며, 주두는 깊게 갈라지면서 뒤로 젖혀진다. 주두 역시 자방과 마찬가지로 개화초기에는 노란 빛이 돌다가 만개하면서 짙은 자주색이 된다. 자주솜대는 강원(설악산, 태백산, 오대산, 발왕산, 두타산), 충북(소백산), 전북(덕유산), 전남 및 경남(지리산) 등지 등 백두대간의 주요 산지와 그 주변부의 능선부 숲 하부에 분포하는 것으로 알려져 있다<그림 30>.

두루미꽃속 및 풀솜대속 분류군에 대한 기존의 계통학적 연구는 Kim and Lee(1998)에 의한 형태학적 연구, Kim and Lee(2007)에 의한 cp *matK* 유전자 및 *trnK* intron 염기서열 분석 연구, Meng et al.(2008)에 의한 *Maianthemum*속의 계통과 생물지리학적 연구에서 엽록체 *trnL-F*, *rps16*, *rpl16*, *psbA-trnH*, *rbcL*, *ndhF*, *trnK* 구간 염기서열과 핵 nrITS 염기서열을 분석한 결과 등이 있다. 그러나, 자주솜대에 대한 유전다양성 분석은 수행된 바 없으며, 이 등(2007)에 의해 소백산 및 태백산 자주솜대 자생지에 대한 개체군 모니터링 연구 보고가 존재한다. 해외의 경우 Wilson et al.(2005)이 *M. dilatatum*에 대해 AFLP 마커로 유전적 구조를 분석한 경우가 보고된 바 있으며, Arens et al.(2005)는 *M. bifolium*을 대상으로 AFLP 분석을 수행한 바 있다.

자주솜대는 멸종위기 II급으로 분류되어 왔으나, 2012년 5월 멸종위기종에서 해제되었다. 자주솜대가 능선주변에 주로 분포하기에 등산객에 의한 간섭 및 훼손이 우려되었으나, 비교적 높은 개체수를 갖고 있는 것으로 나타나 멸종위기종에서 해제되었다. 자주솜대는 지하경을 통해 clone을 형성하는 특성이 나타난다.



<그림 30> 자주솨대(한반도 생물자원포털)와 분포 현황.

## (2) 자주솨대 샘플 확보 및 유전다양성 분석 방법

### (가) 자주솨대 샘플 확보

자주솨대의 경우 지하경을 통해 영양번식을 하는 점을 고려하여, 우선적으로 지역별 분포 양상, 국지적 집단들의 분포 양상을 파악한 다음, 충분한 거리를 두고 개체를 선별하여 시료를 채취하고자 하였다. 2012년 6월초 지리산 및 덕유산 조사 과정 중 자주솨대에는 기능적 수꽃만이 피는 수 개체와 기능적 암꽃만이 피는 암 개체가 별도로 존재하는 자웅 이주인 것을 확인하였으며, 이는 기존 보고에서 언급된 바 없었다. 기능적 자웅이주인 경우 수 개체와 암 개체에 모두 수술과 암술이 달리나, 수 개체의 경우 암술이, 암 개체의 수술이 정상적인 기능을 하지 못한다. 자주솨대 수 개체의 꽃은(수꽃) 암술에서 암술대가 발달하지 않고 자방 상부에서 암술머리가 얇게 흔적처럼 3개로 갈라지며, 열매가 형성되지 않고 꽃이 모두 조락한다. 자주솨대 암 개체의 꽃은(암꽃) 암술대가 길게 3개로 뚜렷하게 갈라지는 반면, 수술의 약은 흔적만 있고 꽃가루가 형성되지 않는다. 표본관에 소장된 표본 관찰에서도

암꽃의 수술에서는 꽃밥이 흔적만 있는 반면, 수꽃의 꽃밥에서는 꽃가루가 방출되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 꽃의 이형성(dimorphism)은 기존에 보고된 바 없으며, 김(1997)이 도판 상에 자주솜대 자방의 두가지 유형을 표시는 하였으나 이중 암술대가 발달하지 않은 자방은 개화초기의 발생단계에서 나타나는 것으로 인식하여 별다른 설명을 하지 않았다. 한편, 김(1997), Kim and Lee(1998)는 자주솜대와 마찬가지로 줄기에 전체적으로 털이 없고, 엽맥, 엽연 및 화서 표면에 털이 없으면서, 화피가 연두색이고, 주두가 거의 발달하지 않는 개체를 화피가 개화 후 자주색으로 변하면서 주두가 3갈래로 깊게 갈라지면서 뒤로 젖혀지는 특징을 갖는 자주솜대와 구분하여 연두솜대(*S. bicolor* var. *flavovirens*)라 명명하였다. 본 연구를 위한 조사 결과, 김(1997), Kim and Lee(1998)가 연두솜대라 인식한 개체는 자주솜대의 수개체와 형태적 특징이 일치하며, 수꽃(수 개체)의 경우 화피와 자방이 연두색인 상태로 유지되다 꽃이 떨어지는 반면, 암꽃(암 개체)의 경우 화피와 자방이 자주색으로 변하며 자방이 수정 후 비후하는 것으로 관찰되었다. 따라서, 김(1997), Kim and Lee(1998)가 연두솜대로 인식한 개체는 자주솜대의 수개체로 판단된다.

6월 1-2일 지리산 집단 조사에서 지리산 개체가 개화기 초기이거나 봉오리 상태였던 반면, 6월 6일 덕유산 조사의 경우 대부분 개화가 많이 진행되었거나 이미 결실기인 것으로 나타나 덕유산 집단이 지리산 집단에 비해 개화 및 결실이 빨랐다. 이는 지리산 집단(1600-1800 m)에 비해 덕유산 집단(<1550 m)의 분포 고도가 낮아 평균 기온이 높기 때문인 것으로 추정된다. 수 개체에서는 개화 후 꽃이 탈락되는 반면, 암 개체에서는 수정 후 자방이 비후되는 것을 확인할 수 있었다 <그림 31>. 자주솜대 동일 집단에 있어 모든 개체들이 개화를 하는 것은 아니었으며, 일부 개체에서는 화서가 형성되지 않는 경우도 나타났다. 자주솜대의 분포 양상은 지리산과 덕유산의 경우 20-50개체가 직경 1-2 m 내외의 작은 patch를 형성하는 경우가 주로 나타났으며, 이 경우 patch가 동일 성으로 구성된 경우가 대부분이었다. 200여개체 이상으로 구성된 큰 집단은 지리산의 경우 반야봉 북사면, 천왕봉 칠선계곡 상부, 덕유산은 향적봉-백련사 능선 북사면 등에서만 제한적으로 나타나며, 오대산 및 설악산의 경우 비교적 큰 규모의 집단이 보다 많이 나타나고 있었다. 이러한 분포 양상을 고려하여 유전다양성 분석을 위한 DNA 샘플의 채취는 장축의 길이가 30 m 이상이며 개체수가 500여 개체 이상인 큰 집단을 대상으로 하였으며, 가능하면 성을 확인할 수 있는 개화된 개체를 대상으로 성을 확인하면서 1 m 간격으로 30개체로부터 잎 1장씩을 채취하였으며, 동

시에 집단별로 확증표본을 채집하였다. 또한, 지리적 분포 및 거리에 따른 유전적 변이의 폭을 확인하기 위해서 강원도 설악산, 오대산, 태백산, 전북 덕유산 및 전남(경남) 지리산 등 5개 지역에 대해 동일 지역에서 최소한 2개 집단을 선정하여(태백산 및 덕유산 제외) 집단 유전다양성 분석을 위한 시료를 채취하였다 <표 29>. 한편, 유연 분류군인 풀솜대, 왕솜대, 민솜대 등도 채집하였으며, 계통분석에 포함하였다.



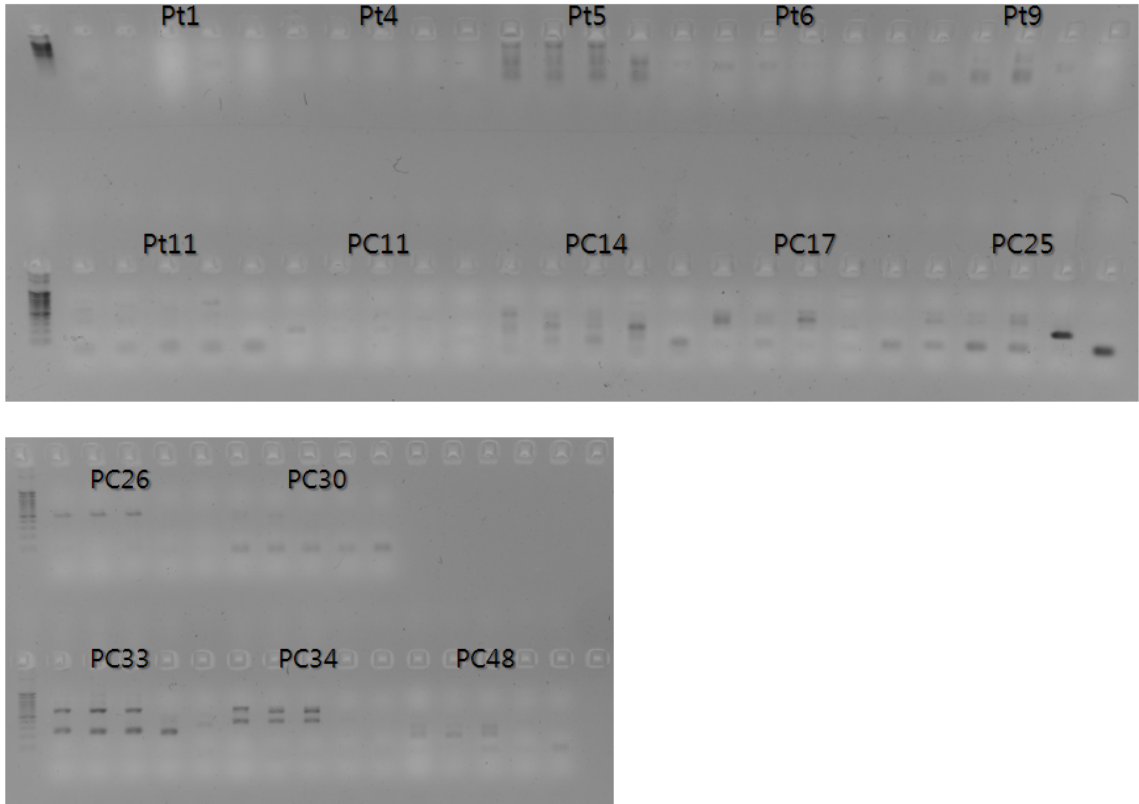
<그림 31> 자주솜대의 성적 이형성. 기능적 암꽃을 가진 암 개체와 기능적 수꽃을 가지는 수 개체가 따로 나타남.

#### (나) 자주솜대 유전다양성 분석

**Microsatellite 테스트:** 유연 속인 등골레속의 *Polygonatum filipes* (Liu et al. 2010)과 *P. cyrtomma* (Cheng et al., 2010)에 대해 개발된 microsatellite marker 15개를 테스트한 결과 일부 marker에서는 증폭이 일어나지 않거나, 약하게 일어나며, 일부 marker에서는 fragment가 500-600 bp 이상이어서 microsatellite로 적용하기에는 부적합 것으로 판단된다. 그러나, 일부 marker는 자주솜대와 왕솜대를 뚜렷이 구분해주고 있어(PC26, PC33, PC34 등), 종 식별의 marker로는 활용이 가능할 것으로 판단되었다 <그림 32>.

<표 29> 자주습대 유전다양성 시료 채취 현황

일련 번호	Voucher Name	채집번호	채집장소, GPS 좌표	개체수	분석 여부
1	SB01BY	Won7448 Line	지리산 반야봉	32	○
			N 35° 19' 09.9" E 127° 34' 04.1"		
2	SB02CS	Won7467 Line	지리산 칠선폭포	36	○
			N 35° 20' 19.7" E 127° 43' 39.9"		
3	SB03DY	Won7475 Line	덕유산 백련사	29	○
			N 35° 51' 35.0" E 127° 45' 09.7"		
4	SB04TB	Lim58	태백산 장군봉	25	○
			N 37° 06' 12.1" E 128° 55' 27.1"		
5	SB05D1	KBGOD1	오대산	29	○
			N37° 46' 52.9" E128° 32' 49.5"		
6	SB05D2	KBGOD2	오대산	18	○
			N37° 48' 36.3" E128° 34' 18.0"		
7	SB07D3	KBGOD3	오대산	29	○
			N37° 48' 48.0" E128° 34' 25.8"		
8	SB08SR1	Lim78	설악산 대승령	30	-
			N 38° 08' 06.6" E 128° 21' 24.2"		
9	SB09SR2	Lim79	설악산 대승령	33	-
			N 38° 08' 07.0" E 128° 21' 20.3"		
소계			분석 개체: 7집단 192개체		
			확보 개체: 9집단 261개체		



<그림 32> 등굴레속에서 개발된 microsatellite marker를 자주솜대에 적용한 결과. 자주솜대 3개체, 왕솜대 1개체 및 negative control을 대상으로 15개의 microsatellite marker의 증폭 여부를 확인하였다.

**AFLP 분석:** AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 분석은 Vos et al. (1995)와 Chun et al. (2009)의 방법을 변형하여 수행하였다.

- 자주솜대의 유연 분류군인 *M. dilatatum*과 *M. dilatatum*에 대해 각각 Wilson et al.(2005)과 Arens et al.(2005)이 AFLP 마커를 적용해 유전적 구조를 분석한 바 있으며, 이들의 연구를 참조하여 AFLP 분석을 수행하였다.

#### 1) 시료 채취 및 DNA 추출

- DNA의 추출은 생체로부터 곧바로 DNA를 추출하거나, 야외에서 실리카젤을 이용해 건조한 다음 건조된 시료로부터 추출하였으며, DNeasy Plant Mini

Kit (Qiagen, USA)을 사용하였다.

- 자주솜대의 유전다양성을 가장 잘 나타낼 수 있는 primer 조합을 선정하기 위하여, 집단별로 1개체씩 총 8개의 시료를 선택하여 예비실험에 사용하였다

## 2) 제한효소 절단 및 adapter ligation

- 추출된 0.1~0.5 ug의 DNA를 2.5 unit의 *EcoRI*과 2.5 unit의 *Tru9I*(*MseI*의 isomer)제한효소로 37°C에서 3시간 동안 절단하였다.
- 절단된 DNA는 agarose gel 전기영동으로 절단 여부를 확인하였다.
- 제한효소로 절단된 DNA에 *EcoRI* adapter와 *MseI* adapter를 넣고 T4 DNA ligase를 이용하여 16°C에서 12시간동안 ligation을 수행하였다 <표 30>.

<표 30> AFLP 분석에 사용된 adapters와 primers

Adapters/primers	Sequences (5'-3')
Adapters	
<i>EcoRI</i> adapter	CTCGTAGACTGCGTACC AATTGGTACGCAGTCTAC
<i>MseI</i> adapter	GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT
Pre-amplification primers	
<i>EcoRI</i> +A	GACTGCGTACCAATTCA
<i>MseI</i> +CC	GATGAGTCCTGAGTAACC
Selective amplification primers (test)	
FAM- <i>EcoRI</i> +AGG	GACTGCGTACCAATT <b>CCCCA</b>
VIC- <i>EcoRI</i> +AGA	GACTGCGTACCAATT <b>CCCCT</b>
PET- <i>EcoRI</i> +AGC	GACTGCGTACCAATT <b>CCCG</b>
FAM- <i>EcoRI</i> +ATC	GACTGCGTACCAATT <b>CCCC</b>
VIC- <i>EcoRI</i> +AAG	GACTGCGTACCAATT <b>CCAG</b>
PET- <i>EcoRI</i> +ACA	GACTGCGTACCAATT <b>CCGG</b>
Selective amplification primers (final)	
FAM- <i>EcoRI</i> +AGG	GACTGCGTACCAATT <b>CCCCT</b>
VIC- <i>EcoRI</i> +AGA	GACTGCGTACCAATT <b>CCCCT</b>
PET- <i>EcoRI</i> +AGC	GACTGCGTACCAATT <b>CCCCT</b>

### 3) Pre-amplification

- Wilson et al.(2005)과 Arens et al.(2005)의 연구와 동일하게 *EcoRI*+A와 *MseI*+CC를 primer로 하여 PCR 증폭을 수행하였다 <표 30>.

### 4) Selective amplification

- Pre-amplification을 거쳐 증폭된 DNA를 주형으로 <표 30>의 *EcoRI* 2 set x *MseI* 6개의 multiplexing을 통해 증폭을 한 다음, 얻어진 결과로부터 전체 band, polymorphic band 와 monomorphic band의 수를 분석하여 유전다양성을 잘 파악할 수 있는 3개의 primer 조합을 선정하였다 <표 30>.
- 확보된 primer 조합을 전체 9개 집단 261개체를 대상으로 증폭하였다. 그러나, 오대산 일부 개체 및 설악산 집단의 경우 selective amplification에 이상 현상(500 bp 이상의 대형 fragment가 증폭되는 현상)이 나타나 분석에서 제외하고 7개 집단 192개체를 대상으로 분석을 진행하였다.

### 5) 전기영동 및 밴드 분석

- Selective-amplification 이후의 과정은 (주)바이오메딕에 의뢰하여 ABI 3730XL (Applied Biosystems, CA, USA)를 이용하여 전기영동을 통해 AFLP 밴드를 분석하였다. 각 AFLP 밴드의 peak threshold가 300 이상인 band만 분석에 이용하였다.

### 6) AFLP 자료 분석

- AFLP 결과로 얻어진 band는 존재 유무에 따라 존재 (1)와 부재 (0)로 코딩하여 2진수 행렬로 작성하였다. AFLP 분석에서 같은 크기의 밴드가 같은 유전자 좌위 (locus)에 해당하고 각 밴드가 독립적인 것으로 가정하여 수행하였다. 작성된 자료로부터 GenAlEx 6.4 프로그램 (Peakall and Smouse 2006)을 이용하여 polymorphic bands의 비율과 private bands 수, Shannon's index (Lewontin 1972), Nei's gene diversity (Nei 1973) 및 genetic distance를 구하였다. 또한 유전적 거리와 지리적 거리의 상관관계를 알아보기 위하여 Mantel 검정 (Mantel 1967)을 실시하였다. 또한

아개체군 사이의 관계를 알아보기 위하여 principal coordinate analysis (PCO)를 이용하였고, 지역적 집단 간의 유전적 변이 양상을 파악하기 위해 2개 지역 집단으로 구분하여 analysis of molecular variance (AMOVA) 분석을 수행하였다.

#### (다) 자주솜대 계통적 유연관계 연구

자주솜대의 실체를 파악하기 위해 자주솜대 및 유연분류군을 대상으로 엽록체 *rbcL* 및 *matK* 유전자 구간의 염기서열을 분석하였다. 염기서열은 Kim and Lee (2007), Meng et al. (2008), China Plant BOL Group (2011) 등의 결과와 GenBank에 수록된 염기서열을 활용하였으며, 본 연구 과정 중 채집된 자주솜대, 풀솜대, 민솜대에 대해서는 새로이 염기서열을 확보하였다. 분석에 사용된 엽록체 *rbcL* 및 *matK* 유전자 구간 염기서열 정보는 <표 31>에 표시하였다.

<표 31> 자주솜대의 분류학적 실체 파악을 위해 분석된 엽록체 *rbcL* 및 *matK* 염기서열 정보

Taxon	Voucher	Accession numbers		Reference/Location
		<i>rbcL</i>	<i>matK</i>	
<i>Polygonatum</i>				
<i>P. lasianthum</i> var. <i>coreanum</i>				
	DK Kim 04-046 (TUT)	HM640458	HM640572-	Kim et al. (2012)
<i>Maianthemum</i>				
<i>M. bifolium</i>				
	DK Kim 04-182 (TUT)	HM640453	HM640567	Kim et al. (2012)
	Meng 211	EU850094	EU850266	Meng et al. (2008)
	Wen 8530	EU850093	EU850265	Meng et al. (2008)
	Zhangsr0570	JF942498	JF954591	China Plant BOL(2011)
	MengY-n280	JF942499	JF954592	China Plant BOL(2011)
	Zhangsr0603	JF942497	JF954590	China Plant BOL(2011)
	NS Lee Korea-1	-	EF133712	Kim & Lee (2007)
	NS Lee Korea-2	-	EF133713	Kim & Lee (2007)
	MengY_n228	-	JF954593	China Plant BOL(2011)
<i>M. dilatatum</i>				
	DK Kim 04-165 (TUT)	HM640454	HM640568	Kim et al. (2012)
	Washington	-	EF133725	Kim & Lee (2007)
	S Kephart, Oregon-1	-	EF133723	Kim & Lee (2007)
	S Kephart, Oregon-2	-	EF133726	Kim & Lee (2007)

	S Kephart, Oregon-3	-	EF133727	Kim & Lee (2007)
	S Kephart, Oregon-4	-	EF133728	Kim & Lee (2007)
	T Yahara, Japan-1	-	EF133721	Kim & Lee (2007)
	T Yahara, Japan-2	-	EF133722	Kim & Lee (2007)
	Chase 497	-	EF133724	Kim & Lee (2007)
	NS Lee, Korea-1	-	EF133718	Kim & Lee (2007)
	NS Lee, Korea-2	-	EF133719	Kim & Lee (2007)
	NS Lee, Korea-3	-	EF133720	Kim & Lee (2007)
	Yamashita & Tamura	-	AB029770	Yamashita & Tamura (2000)
<i>M. bicolor</i>	DK Kim 04-077 (TUT)	HM640460	HM640574	Kim et al. (2012)
	<b>Lim58-1 (DGU)</b>			<b>Korea. Mt. Taebaek</b>
	<b>Lim78-1 (DGU)</b>			<b>Korea. Mt. Seorak</b>
	<b>Kim s.n. (DGU)</b>			<b>Korea. Mt. Odae</b>
	<b>Won 7448-1 (DGU)</b>			<b>Korea. Mt. Jiri</b>
	<b>Won 7467-1 (DGU)</b>			<b>Korea. Mt. Jiri</b>
	<b>Won 7475 (DGU)</b>			<b>Korea. Mt. Dukyoo</b>
<i>M. dahuricum</i>	DK Kim 04-082 (TUT)	HM640461	HM640575	Kim et al. (2012)
	Zhangsr0602	JF942500	-	China Plant BOL(2011)
	Meng 224	EU850092	EU850026	Meng et al. (2008)
	<b>Won 7508 (DGU)</b>			<b>China. Mt. Changbai</b>
<i>M. japonicum</i>	DK Kim 04-039	HM640462	HM640576	Kim et al. (2012)
	Murata s.n.	EU850098	EU850271	Meng et al. (2008)
	Meng 223	EU850090	EU850263	Meng et al. (2008)
	Meng 213	EU850091	-	Meng et al. (2008)
	MengY-n207	JF942516	JF954608	China Plant BOL(2011)
	MengY-n314	JF942514	JF954607	China Plant BOL(2011)
	Zhangsr0259	JF942512	JF954605	China Plant BOL(2011)
	MengY-n281	JF942515	-	China Plant BOL(2011)
	Zhangsr0258	JF942513	JF954606	China Plant BOL(2011)
	Zhangsr0261	JF942511	JF954604	China Plant BOL(2011)
	Yamashita & Tamura	-	AB029768	Yamashita & Tamura (2000)
	T Yahara, Japan	-	EF133704	Kim & Lee (2007)
	NS Lee, Korea	-	EF1337-3	Kim & Lee (2007)
	<b>Won 7342 (DGU)</b>			<b>Korea. Jeju</b>
	<b>Won 7479 (DGU)</b>			<b>Korea. Mt. Dukyoo</b>
	<b>YC Kim s.n.</b>			<b>Korea. Mt. Odae</b>
<i>var. mandshuricum</i>	<b>YC Kim s.n.</b>			<b>Korea. Mt. Odae</b>
<i>M. canadense</i>	AP043	HQ590172	-	Burgess et al.
	SC Kim, Ohio-1	-	EF133714	Kim & Lee (2007)
	SC Kim, Ohio-2	-	EF133715	Kim & Lee (2007)
	SC Kim, Ohio-3	-	EF133716	Kim & Lee (2007)
	Sanders AC23510	-	EF133717	Kim & Lee (2007)
	JAG 0876	-	HQ593355	Burgess et al.

	Nie & Meng 525	-	EU850267	Meng et al. (2008)
<i>M. robustum</i>	Yamashita & Tamura	-	AB029769	Yamashita & Tamura (2000)
<i>M. nanchuanense</i>	Nie & Meng 201	EU850089	EU850262	Meng et al. (2008)
<i>M. henryi</i>	Wen 9017	Eu850079	EU850249	Meng et al. (2008)
	Nie & Meng 311	EU850083	EU850256	Meng et al. (2008)
	Meng 244	EU850075	-	Meng et al. (2008)
	MengY-z1	JF942508	JF954601	China Plant BOL(2011)
	MengY-z2	JF942506	JF954599	China Plant BOL(2011)
	MengY-z8	JF942504	JF954597	China Plant BOL(2011)
	MengY-z7	JF942505	JF954598	China Plant BOL(2011)
	MengY-z9	JF942503	JF954596	China Plant BOL(2011)
	MengY-z10	JF942507	JF954600	China Plant BOL(2011)
	MengY-n034	JF942510		China Plant BOL(2011)
	MengY-n231		JF954603	China Plant BOL(2011)
	MengY-n398	JF942509	JF954602	China Plant BOL(2011)
<i>M. oleraceum</i>	Nie & Meng 307	EU850078	EU850216	Meng et al. (2008)
<i>M. tatsienense</i>	Zhangsr0263	JF942530	JF954621	China Plant BOL(2011)
	Zhangsr0516	JF942528	JF954619	China Plant BOL(2011)
	MengY-z4	JF942426	JF964617	China Plant BOL(2011)
	Zhangsr0262	JF942531	JF954622	China Plant BOL(2011)
	Zhangsr0515	JF942529	JF954620	China Plant BOL(2011)
	MengY-n266	JF942527	JF954618	China Plant BOL(2011)
	Nie & Meng 313	EU850087	EU850260	Meng et al. (2008)
	Chase 3642	-	EU133702	Kim & Lee (2007)
<i>M. stellatum</i>	Nie s.n.	EU850097	EU850270	Meng et al. (2008)
	McCormac JS725	-	EF133707	Kim & Lee (2007)
	McCormac JS5587	-	EF133706	Kim & Lee (2007)
	Plant Delights Nursery	JQ273928	JQ276423	Steele et al.
<i>M. racemosum</i>	Nie & Meng 524	EU850096	EU850269	Meng et al. (2008)
	Wen 8562	EU850095	EU850268	Meng et al. (2008)
	MengY-n369	JF942524	JF954615	China Plant BOL(2011)
	MengY-n311	JF942525	JF954616	China Plant BOL(2011)
	AP066	HQ590173	HQ593357	Burgess et al.
	w/o voucher	AY149376	-	McPherson et al.
	Chase 488	-	EF133705	Kim & Lee (2007)
	subsp. <i>amplexicaule</i>			
	Sanders & Lawlor 7228		EF133709	Kim & Lee (2007)
	Helmkamp & Helmkamp 5943		EF133708	Kim & Lee (2007)
<i>M. paniculatum</i>	Martinez 39110	EU850100	-	Meng et al. (2008)
	Martinez 39109	EU850101	-	Meng et al. (2008)
<i>M. gigas</i>	Martinez 39002	EU850099	EU850272	Meng et al. (2008)
	MengY-n394	JF942501	JF954594	China Plant BOL(2011)
<i>M. stenolobum</i>	Nie & Meng 418	EU850088	EU850261	Meng et al. (2008)

## (라) 자주솜대의 분포 양상 분석

자주솜대의 분포 경향이 고도와 이에 따른 기온에 의해 결정되는 지그 경향성을 파악하기 위해, 백두대간의 주요 산지에 대한 위도, 고도 및 자주솜대의 분포 정보를 종합적으로 분석하였다. 이를 위해 <표 32>와 같이 주요 산지의 최고 고도, 자주솜대의 최저 분포 고도를 위도에 따라 표에 표시하였으며, 위도와 자주솜대의 최저 분포 고도와의 상관관계를 추정하였다. 자주솜대의 최저 분포 고도는 본 연구 기간 동안 직접 확인한 분포 자료와 기존 연구 보고서 등에서 확인된 자료를 활용하였다.

<표 32> 자주솜대의 분포 경향성 파악을 위한 자주솜대 최저 분포 고도와 분포 지역의 좌표 정보

산	최고 고도 (m)	자주솜대 최저 분포 고도 (m)	최고봉의 좌표	
			위도	경도
지리산	1915	1465	35:20:16	127:43:60
덕유산	1614	1410	35:51:38	127:44:47
민주지산	1242	-	36:02:24	127:50:57
속리산	1058	-	36:32:38	127:52:15
주흘산	1106	-	36:47:19	128:06:02
월악산	1161	-	36:53:21	128:05:27
소백산	1440	1300	36:57:36	128:29:05
태백산	1567	1350	37:05:45	128:54:55
치악산	1288	-	37:22:18	128:03:02
가리왕산	1561	N/D*	37:27:41	128:33:48
오대산	1563	1231	37:47:53	128:32:35
방태산	1444	N/D*	37:53:41	128:21:20
설악산	1708	1265	38:07:10	128:27:56
대암산	1316	1183	38:12:56	128:07:25

\*N/D: 자주솜대가 분포하나 최저 분포고도에 대한 자료가 없음

### (3) 결과

#### (가) 자주솥대 유전다양성 분석 결과

자주솥대 7집단 192개체를 대상으로 한 AFLP 분석결과, 다형 밴드의 비율은 태백산 집단이 가장 높았으며, 오대산1 집단에서 가장 낮았다. 평균 이형접합성의 경우, 태백산 집단이 가장 높았으며, 지리산 반야봉 집단이 가장 낮은 것으로 나타났다 <표 33>. 집단간의 Nei의 비편차 유전거리와 지리적 거리를 파악하였으며 <표 34>, 이를 이용하여 PCO 분석을 수행하였다 <그림 33>. 그 결과, 분석에 포함된 7개 집단은 크게 남부와 중부 집단으로 유집되었다. 남부 집단에는 지리산 반야봉, 천왕봉 집단과 덕유산 집단이 포함되었으며, 중부 집단에는 오대산 및 태백산 집단이 포함되었다. 이들 지역 집단 사이의 지리적 거리는 최소 170 km이상 격리되어 있으며, 유전적 거리와 지리적 거리사이의 상관관계를 알아보기 위해 수행한 Mantel test 결과  $R^2 = 0.9078$ 로 높은 상관관계가 있어 isolation-by-distance가 일어났음을 확인하였다<그림 34>. 즉, 지리적 거리에 따라 유전적인 격리가 존재함을 확인하였다.

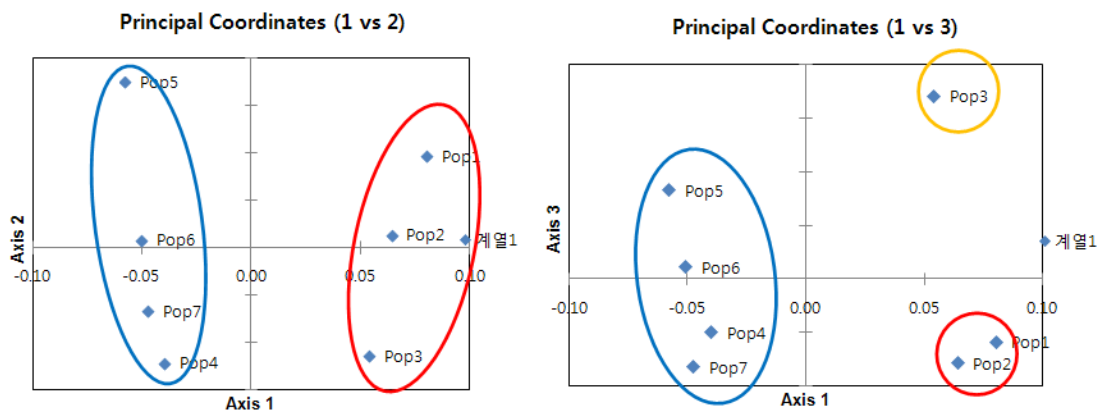
한편, 집단의 분자 변이를 파악하기 위해 수행한 AMOVA 분석 결과 지역 집단 (남부 vs. 중부)사이의 유전적 변이가 전체 변이의 42%를 대변하고 있으며( $P < 0.001$ ; 표 35), 지역 내의 집단 간의 유전적 변이는 크지 않은 것으로 나타났다.

<표 33> 자주솥대 집단의 유전다양성.

집단	밴드수	빈도 5%이상 밴드수	고유 밴드수	다형밴드%	Shanon 's Information Index	Mean He	Mean uHe
지리 반야봉	158	139	8	17.3%	0.065±0.006	0.041±0.004	0.042±0.004
지리 천왕봉	170	121	17	22.6%	0.076±0.006	0.047±0.004	0.048±0.004
덕유산	178	139	14	23.6%	0.090±0.007	0.057±0.005	0.058±0.005
태백산	191	153	43	25.4%	0.091±0.007	0.057±0.005	0.058±0.005
오대산1	127	115	4	13.7%	0.057±0.006	0.037±0.004	0.038±0.004
오대산2	127	127	1	16.9%	0.076±0.007	0.049±0.005	0.051±0.005
오대산3	159	104	20	20.6%	0.070±0.006	0.044±0.004	0.045±0.004

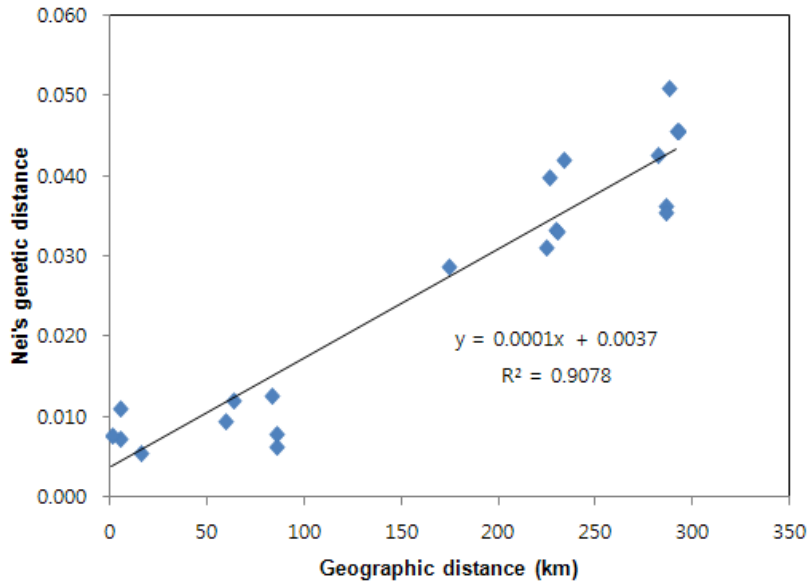
<표 34> 자주솜대 집단간의 Nei의 비편차 유전거리와 지리적 거리 (km).

	Pop1	Pop2	Pop3	Pop4	Pop5	Pop6	Pop7
Pop1 (SB01BY)	-	14.7	62.4	232.7	287.4	291.1	291.5
Pop2 (SB02CS)	0.005	-	58.0	223.7	281.3	285.0	285.4
Pop3 (SB03DY)	0.011	0.009	-	173.5	225.0	228.8	229.2
Pop4 (SB04TB)	0.041	0.030	0.028	-	82.4	84.5	84.8
Pop5 (SB05OD1)	0.050	0.042	0.039	0.012	-	3.9	4.3
Pop6 (SB06OD2)	0.045	0.035	0.032	0.005	0.006	-	0.4
Pop7 (SB07OD3)	0.045	0.035	0.032	0.007	0.010	0.006	-



Axis	1	2	3
%	72.87	9.09	6.92
Cum %	72.87	81.96	88.89

<그림 33> 자주솜대 집단의 AFLP 자료를 이용한 PCO(principal coordiantion) 분석 결과와 주성분의 누적 지수.



SSx	SSy	SPxy	Rxy	P(rxy-rand >= rxy-data)	#permutation
252322.912	0.005	34.307	0.953	0.001	9999

<그림 34> 자주솜대 집단들의 isolation-by-distance를 확인하기 위한 Mantel test 결과. 집단 간의 Nei's genetic distance와 지리적 거리를 상관 분석하였으며, 9999번의 permutation을 통해 신뢰도를 조사하였다.

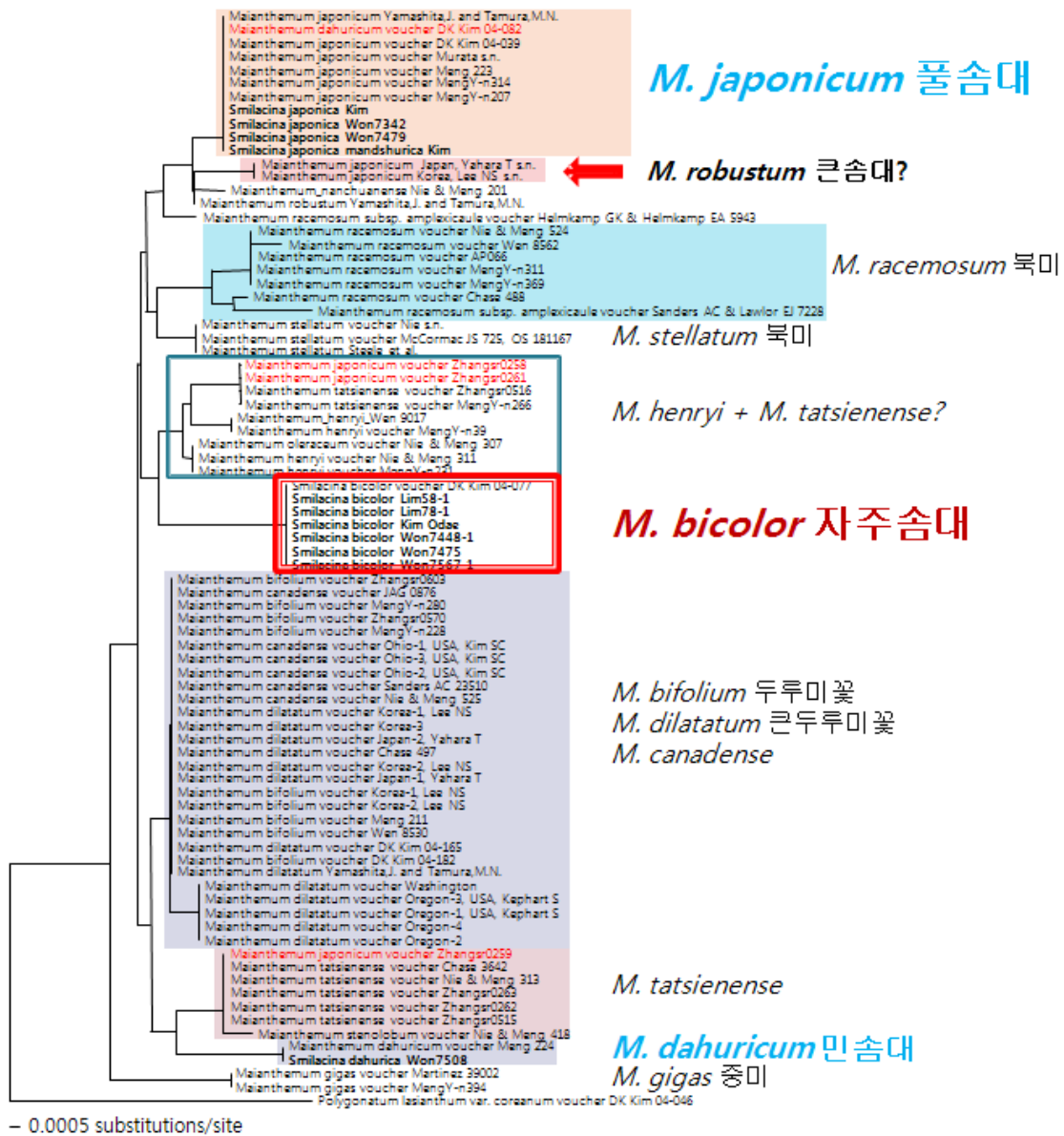
<표 35> 자주솜대 집단의 분자변이 분석(AMOVA) 결과

	df	SS	MS	추정 분산	변이비율	통계량	P
지역간	1	1707.746	1707.746	16.431	42%	$\Phi_{RT}=0.419$	0.001
집단간	5	624.365	124.873	3.926	10%	$\Phi_{PR}=0.172$	0.001
집단내	185	3493.087	18.882	18.882	48%	$\Phi_{PT}=0.519$	0.001
Total	191	5825.198		39.238	100%		

## (나) 자주솜대 계통적 유연관계 분석 결과

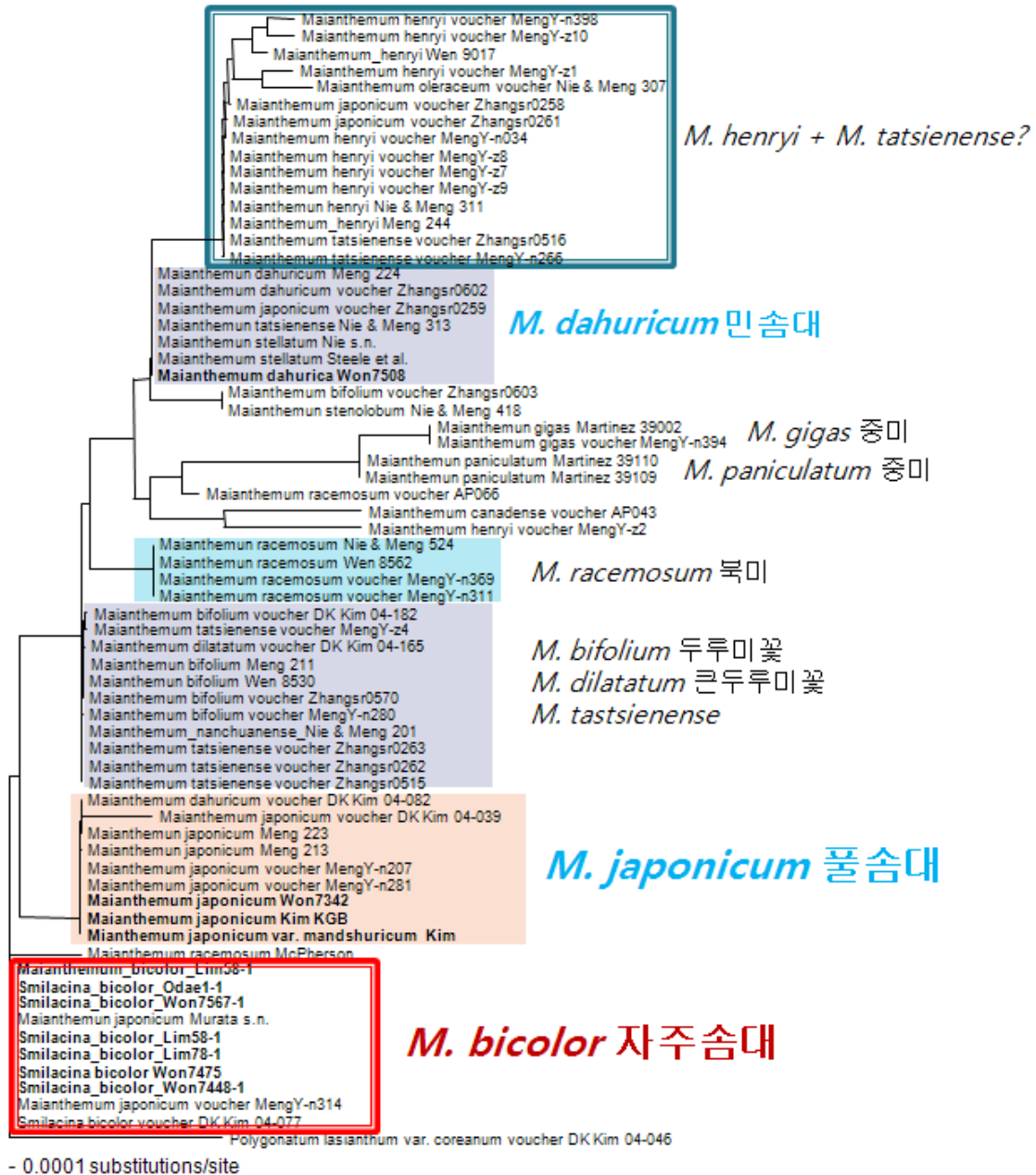
자주솜대의 분류학적 실체를 파악하기 위해 본 연구 기간 동안 추가적으로 자주솜대 6개체, 풀솜대 4개체 및 민솜대 1개체로부터 엽록체 *rbcL* 및 *matK* 유전자 구간 염기서열을 확보하였으며, 이를 기존 자료와 유입하여 분석하였다 <표 31>. *matK* 구간의 경우 645 bp 구간을 대상으로 하였으며, *rbcL* 구간의 경우 628 bp 구간을 대상으로 각각 Kimura 2-parameter model을 적용한 neighbor-joining tree를 확보하였다. 그 결과 확보된 *matK* 유전자 NJ tree는 <그림 35>에, *rbcL* 유전자 NJ tree는 <그림 36>에 각각 표시하였다.

분석 결과, 자주솜대는 두루미꽃속(*Maianthemum*)에 속하는 다른 분류군과 뚜렷이 구분되는 독립적인 분류군이며, 풀솜대, 민솜대 및 중국에 분포하는 동속 분류군과 분명히 구분되었다. 확보된 *matK* 및 *rbcL* 염기서열에서 자주솜대 종 내 염기변이는 관찰할 수 없었다. 풀솜대의 경우, 중국 및 일본에서 풀솜대로 동정되어 분석된 개체 들 중에는 일부 변이가 나타나며, 이는 오동정에 기인하거나 추가적인 분류학적 연구가 필요한 것으로 판단된다. 특히, 큰솜대(*S. robusta*)의 경우, Kim and Lee (1998)에 의해 그 분포가 제주도에서 보고된 바 있으며, *matK* 유전자 염기서열 분석에서도 일본 개체와 함께 독립된 분계를 형성하고 있어, 이들에 대한 추가 조사가 필요할 것으로 판단된다. GenBank에 소장된 염기서열 중 자주솜대에 대한 염기서열은 국내 연구자에 의한 염기서열 (Kim et al., 2012)외에는 없으며, 이를 통해 추정할 때, 자주솜대는 우리나라에만 분포하는 특산 종인 것으로 다시 확인되었다. 한편, 민솜대의 경우 한반도 중부에도 분포하는 것으로 일부 연구자들이 보고한 바 있으나, 이는 풀솜대 중 털이 적게 분포하는 개체들이 태백산 및 오대산 일대에 분포하고 있으며, 이를 오인하여 민솜대로 인식한 때문으로 판단된다. 본 연구 중 백두산 일대에서 확보된 민솜대는 그 생육형, 잎의 형태, 화서 및 꽃의 형태 등에 있어 풀솜대 및 자주솜대와 뚜렷이 구분되며, 이는 Kim (1997) 및 Kim and Lee(1998)의 연구 결과와 일치한다. 유전자 분석 결과 민솜대는 풀솜대 및 자주솜대와 독립된 분계를 형성하고 있으며, 분석된 개체는 모두 백두산 일대에서 채취된 개체이다.



<그림 35> 자주솜대 및 유연분류군 cp *matK* 유전자 염기서열 분석 결과 얻어진 neighbor-joining tree (Kimura 2-parameter model).

NJ

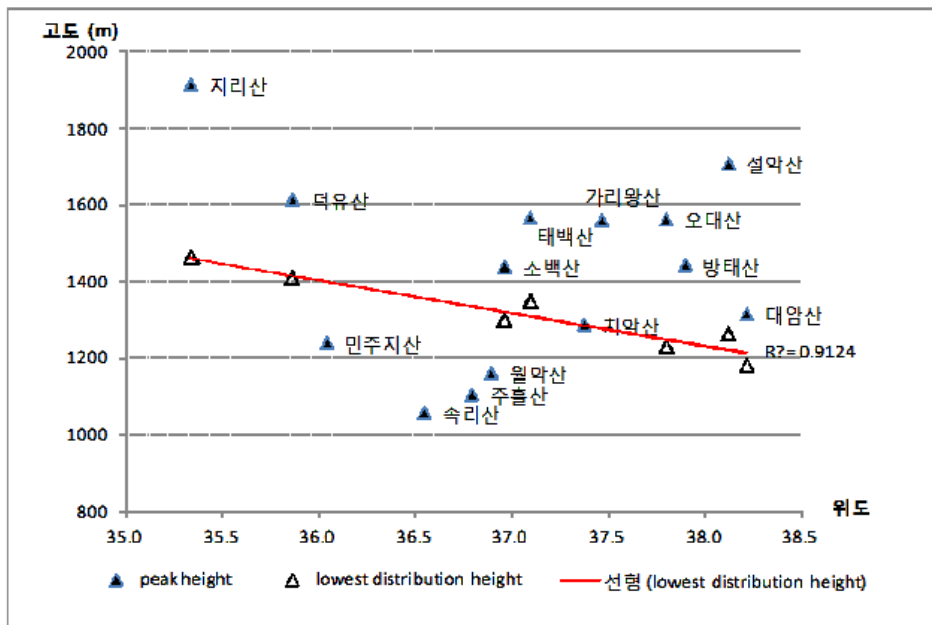


<그림 36> 자주솜대 및 유연분류군 cp *rbcl* 유전자 염기서열 분석 결과 얻어진 neighbor-joining tree (Kimura 2-parameter model).

### (다) 자주솜대의 분포 경향 분석 결과

자주솜대의 최저 분포 고도를 분석한 결과 <그림 37>와 같은 분포 경향을 파악할 수 있었다. 최저 분포고도와 위도 사이에는  $R^2=0.9124$ 로 높은 상관관계를 보였으며, 위도가 높아질수록 최저 분포고도는 낮아지며, 반대로 위도가 낮아질수록 분포고도가 높아지는 경향이 나타났다. 이는 고도가 높을수록, 그리고 위도가 높을수록 평균 기온이 낮아지는 것과 일치하며, 자주솜대가 생육하기 위해서는 적절한 평균기온을 필요로 하기 때문인 것으로 판단된다. 즉, 자주솜대는 비교적 서늘한 기후에 적응한 식물로 평균기온이 증가하면 생육에 제한을 받아 소멸될 가능성이 높은 것으로 판단된다. 실제로 민주지산, 속리산, 주흘산, 월악산 등 충남/북에 분포하는 산악 지역의 경우 최고 고도가 자주솜대의 최저 분포 고도에 미치지 못하고 있으며, 이들 지역에서 자주솜대의 분포가 보고된 바 없는 것과 일치하고 있다. 일부 보고에서 주흘산에서 자주솜대가 분포하는 것으로 보고한 바 있으나, 본 추정으로 볼 때 그 분포 가능성은 희박하거나 동정상의 오류일 것으로 추정된다.

이러한 결과로 볼 때, 우리나라의 자주솜대 분포는 기온과 관련이 큰 고도에 의해 제한되고 있으며, 이로 인해 남부(지리산 및 덕유산)와 중부 집단(소백산과 강원도 집단)이 지리적으로 격리되는 양상이 나타나고 있다.



<그림 37> 자주솜대의 분포 경향성 파악

### (3) 결론

본 연구 결과에서 얻어진 자주솜대의 생육상태, 서식 상황, 형태적 특성, 계통 유연관계 및 유전다양성 분석 결과로 볼 때, 자주솜대는 풀솜대 및 민솜대 등 유연 분류군과 뚜렷이 구분되는 한국 특산종으로 계속된 보호와 관심이 필요하다. 특히, 자주솜대는 분포 영역과 개체 수가 충분히 크다는 이유로 2012년 5월부터 멸종위기종에서 해제되었으나, 자주솜대는 서식지가 능선 및 능선부 경사면, 특히 북사면 내지 서북사면의 서늘한 지역에만 분포하는 특성이 있어, 그 분포가 제한되어 있어 쉽게 교란될 가능성이 높은 것으로 판단된다. 또한, 지구온난화에 대해 취약하여 장기적으로 그 분포범위가 축소될 가능성이 높아, 이를 대비하기 위해 주요 서식지, 특히 분포지가 고도 1600 m 이상으로 제한되어 있는 지리산과 덕유산 (1400 m 이상에 제한되어 분포) 집단에 대한 장기적인 개체군 동태 파악 및 모니터링이 필요할 것으로 판단된다. 특히, 이들 남부 집단은 중부 집단과 지리적으로 격리가 되어 있으며, 또한 유전적으로도 격리가 되어 있는 것으로 파악되었다. 이들 지역적 집단 사이에는 아직까지 보고된 자연 서식처가 존재하지 않으며, 지구 온난화의 영향을 먼저 받게 될 덕유산과 지리산 집단의 경우, 집단의 축소, 유전적 다양성의 감소 및 소멸의 가능성이 높아, 이들 지역에 대한 우선적인 장기 모니터링이 필요할 것으로 판단된다. 현재 결과로 볼 때, 지리산의 반야봉 및 천왕봉 집단은 크게 분화가 되지 않은 것으로 보이나, 덕유산 집단과는 분화가 되어 있으며, 이는 거리에 따른 유전자 흐름이 제한되기 때문이며, 가까운 거리에서는 비교적 유전자 흐름이 빈번히 일어나는 것으로 파악된다.

한편, 본 연구기간 동안 멧돼지에 의한 능선부 식생의 파괴가 크게 일어나고 있는 것을 다수 목격할 수 있었으며, 이러한 현상은 덕유산, 방태산, 오대산 등 대부분의 조사지역에서 빈번히 나타나고 있었다. 멧돼지에 의해 식생 교란이 일어나는 지역이 자주솜대 서식지와 많은 경우 일치하고 있으나, 그 영향에 대해서는 아직까지 보고된 바 없으며, 앞으로 추가적으로 연구가 필요할 것으로 판단된다.

## 라. 노랑만병초(*Rhododendron aureum* Georgi) 및 만병초(*R. brachycarpum* D. Don, Ericaceae)

### (1) 서론

노랑만병초와 만병초는 철쭉과(Ericaceae) 철쭉속(*Rhododendron*) Subg. *Hymenanthes* Subsect. *Pontica*에 속하며, *R. caucasicum*과 함께 단일 분계군을 형성하는 것으로 알려져 있다 (Minle, 2004). Subsect. *Pontica*에 속하는 분류군 중에서 흑해 연안 산악지역에 분포하는 *R. caucasicum*과 달리 동북아시아에는 일본 남부에 분포하는 *R. degronianum*과 함께 노랑만병초와 만병초만이 분포한다. 철쭉속(*Rhododendron*)에 대한 분자 계통학적 연구로는 Kurashige et al.(2001)이 엽록체 *matK* 유전자와 *trnK* intron 염기서열을 이용한 분석을 수행한 바 있으며, Goetsch et al.(2005)이 핵 *RPB2* 유전자 염기서열 분석을 통해 철쭉속의 아속 및 절간 분류체계를 새로이 제시한 바 있다. Goetsch et al.(2005)의 연구에서 노랑만병초, 만병초, 철쭉 등이 포함되었으며, 노랑만병초와 만병초는 subg. *Hymenanthes*에 포함되는 것이 확인되었다. Minle(2004)는 철쭉속 subg. *Hymenanthes* subsection *Pontica*에 속하는 분류군을 대상으로 엽록체 *matK* 유전자와 *trnL-F* 구간 염기서열 분석을 통해 신생대 제3기 빙하기 잔존 분류군의 계통과 생물지리 연구를 수행하였다. Minle(2004)의 연구에서 동북아에 분포하는 subsection *Pontica* 분류군은 노랑만병초와 만병초로 한국, 중국, 일본, 러시아 등지에 분포하며 흑해 연안 산악지역에 분포하는 *R. caucasicum*과 유연관계가 높은 것으로 나타났다.

노랑만병초에 대한 유전적 다양성 분석은 Li et al.(2011)이 백두산 일대 노랑만병초 3개 집단 52개체를 대상으로 microsatellite marker 19개를 개발한 바 있으며, 이를 유연 분류군인 만병초 1개체와 *R. dauricum* 1개체군 20개체에 대해 시험해 본 바 있다. Liu et al.(2012)는 백두산에 분포하는 노랑만병초 집단에 대해 고도별로 집단 간의 유전적 변이양상을 ISSR과 RAPD marker를 이용하여 분석하였으며, 그 결과 고도가 높아질수록 유전적 다양성이 증가하는 경향이 나타났으며, 대부분의 유전적 변이는 집단 내의 변이에 기인하는 것으로 나타났다. Hirao et al.(2006)은 *R. metternichii*에 대해 개발된 microsatellite를 노랑만병초에 적용하여 유성 생식의 양상을 분석하였다. 한편, Lee et al.(2002)은 한국산 만병초 6개 집단(설악산, 흥천, 가리왕산, 함백산, 지리산, 울릉도) 200개체를 대상으로 allozyme 분석을 수행하였으며,

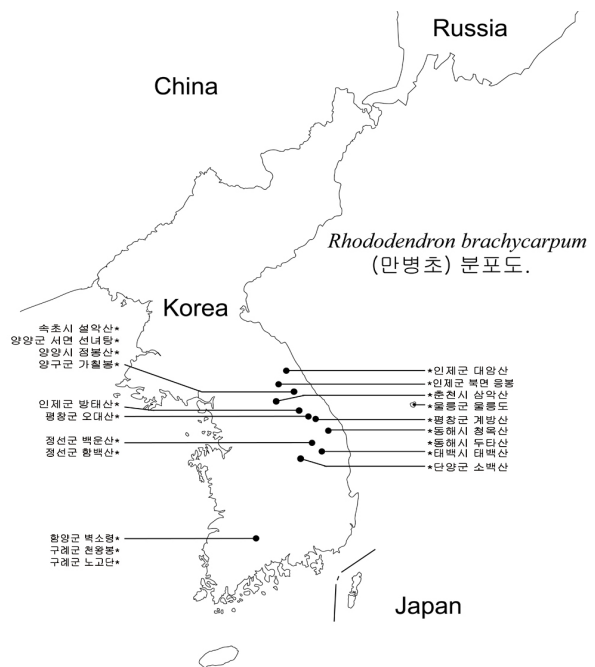
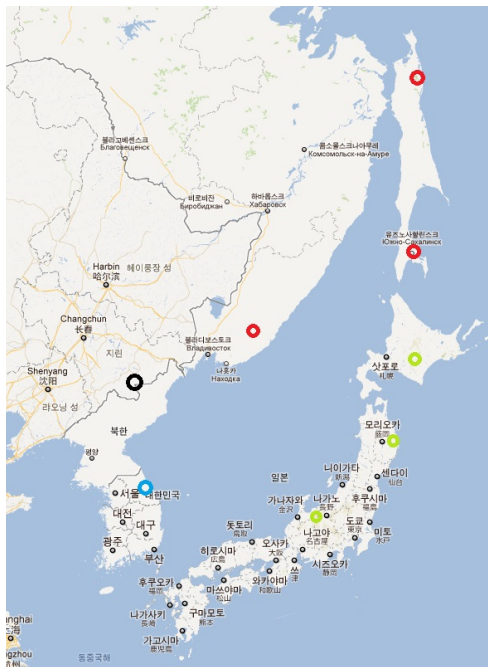
그 결과 낮은 유전적 다양성( $H_e = 0.075$ )이 나타나는 것을 보고한 바 있다. 분석된 6개 집단 중 울릉도 집단이 다른 집단과 가장 변이가 크게 나타나는 것으로 확인되었다. 한편, 이와 심(2011)은 만병초 자생지의 환경 생태학적 특성을 조사하였으며, 그 결과 26년동안 만병초의 식생고도가 약 500 m 정도 올라갔으며, 자생지는 모두 북사면에 위치하는 것으로 나타났다. 만병초의 자생지 위협요인으로는 등산로 개설에 의한 훼손, 산채와 같은 인위적 간섭, 주변 식물로부터의 피압 등이며, 병해충 피해와 건조해 등이 확인되었다.

노랑만병초의 화분 산포와 종자 산포 등에 대한 연구는 Hirao et al.(2006)에 의해 수행된 바 있으며, 일본 홋카이도의 Taisetsu산의 Hisago호 수 주변의 2개 plot을 대상으로 연구되었다. 2개 plot은 각각 6월 중순에 개화하는 집단과 7월말에 개화하는 집단으로 구분되며, 화분매개자, 종자 결실율, 타가수분율 등에 있어 차이가 있는 것으로 확인되었다. Hirao et al.(2006)의 연구에서 노랑만병초는 주로 타가수분(0.71-0.89)을 하는 것으로 나타났다.

노랑만병초는 상록관목으로, 높이가 1 m에 달하고, 소지에 잔털이 있으나 곧 없어진다. 잎은 호생하며 혁질이고, 타원형, 난상 피침형 또는 긴 타원상 도란형이며, 원두 도는 둔두, 예저이며, 길이 3-8 cm, 폭 1.5-2.5 cm로 양면에 털이 없고, 가장자리가 약간 뒤로 젖혀지며, 전연이다. 엽병은 1-1.5 cm로 털이 없다. 꽃은 5-6월에 피며, 가지 끝에 5-8개의 꽃이 산형 또는 취산상으로 달리고, 기부가 인편으로 싸여 있다. 소화경은 2.5-3.5 cm로 갈색 털이 있다. 꽃받침잎은 작고 둔두로서 털이 있으며, 화관은 깔대기모양이고, 지름 2.5-3.5 cm로 연한 황색이다. 수술은 10개로 수술대 기부에 털이 있다. 자방에는 갈색 털이 있고, 암술대는 길이 1.5-2 cm로 수술보다 길며, 털이 없다. 삭과는 좁고 긴 타원형이며, 길이 1-1.5 cm로 9월에 익는다 <그림 38>. 우리나라의 경우 노랑만병초는 설악산에서만 1개 집단이 보고되어 있으며, 중국의 경우 백두산 일대의 1000 m 이상 고지대에 분포하고, 일본의 경우 토야마현의 2500 m 넘는 고산지대, 이와테현의 1500 m 고산지대 및 홋카이도의 1600 m 이상의 고산지대, 러시아의 경우 극동 지역과 사할린 및 캄차카 지역의 고산 지대 등 격리된 분포를 보이고 있다 (표 36, 그림 39).



<그림 38> 노랑만병초와 만병초(동북아식물연구소).



<그림 39> 노랑만병초 및 만병초 분포도.

<표 36> 노랑만병초 분포지역

국가	지역	좌표	고도(m)
한국	설악산 중청봉-소청봉 능선		1,600
일본	홋카이도 히가시 카와초우 대설산*	43:40:04N, 142:50:10E	1,675
	이와테현	39:33:30N, 141:29:20E	1,459
	토야마현 오야마쵸 아리미네 “구름의 평”	36:45:31N, 137:45:31E	2,932
러시아	사할린 롱니강 유역	54:01:18N, 142:57:01E	
	사할린 섬 남부, 유주노 사할린스크 주변	46:59:26N, 132:50:16E	740
	Partizansky 지구, Alexeyevka의 강변 Monakino 마을 26.6 km, Olkhovaya 산의 정상	43.34N, 133.66E	1,600
중국	백두산 분화구 일대	43, 128	2,300
	백두산 인근 Laobai*	44:06:04N, 128:01:55E	1,540
	백두산 인근 Taiyuan*	42:03:05N, 128:03:32E	1,750
	백두산 인근 Pubu*	42:10:44N, 128:08:20E	1,150

\*Hirao et al. (2006); Kudo et al. (2011); Li et al. (2011).

만병초는 상록관목으로 높이가 4 m에 달하며, 어린 가지에 회색 털이 밀생하나 곧 없어지고 갈색으로 변한다. 잎은 호생하지만 가지끝에서는 5-7개가 총생하고, 타원형 또는 타원상 피침형이며, 둔두 예저로, 길이 8-20 cm, 폭 2-5 cm로, 윗면은 짙은 녹색이며 주름이 진 것 같고, 아랫면은 회갈색 또는 연한 갈색 털이 밀생하며, 가장자리는 뒤로 말리며 전연이다. 엽병은 길이 1-3 cm로 회색 털이 밀생하지만 곧 없어진다. 꽃은 7월에 피며, 10-20개가 가지 끝에 달리고, 화경이 털이 있으며, 꽃받침은 짧고 5개로 갈라지며, 화관은 깔대기모양이고 백색 또는 연한 황색이며, 안쪽 윗면에 녹색 반점이 있다. 수술은 10개로서 길이가 서로 다르고, 수술대 기부에 털이 있다. 자방에 갈색 털이 밀생하며, 암술대에는 털이 없다. 짙은 홍색 꽃이 피는 것을 홍만병초라 *var. roseum* Koidz. 부르기도 한다. 만병초의 경우 중국, 일본에 모두 분포하며, 우리나라의 경우 백두대간을 따라 대암산, 설악산, 점봉산, 가칠봉, 계방산, 오대산, 방태산, 개인산, 청옥산, 태백산, 소백산, 지리산 등 해발고도 1,200m 이상의 고지대에 분포하는 것으로 알려져 있으며, 울릉도에 분포하는 개체는 붉은색 꽃을 피우는 홍만병초로 알려져 있다<그림 39>.

## (2) 노랑만병초 및 만병초 샘플 확보 및 계통분석

### (가) 노랑만병초 및 만병초 샘플 확보

노랑만병초와 만병초는 타가수분을 하며, 노랑만병초의 경우 지상을 기면서 자라기 때문에, 개체 사이에 최소한 3-4 m 이상의 거리를 띄고 DNA 시료를 채취하였다.

노랑만병초의 경우 한국, 중국, 일본, 러시아 등 4개국 6개 지역 13집단으로부터 총 337개체의 DNA 시료를 확보하였다 <표 37>. 중국 조사는 6월 15-21일간 백두산 소천지-장백폭포 일대에 대한 조사를 통해 3개 집단 90개체의 DNA 시료와 20여개체의 노랑만병초 생체를 확보하였으며, 일부 생체는 한국자생식물원에 의뢰하여 재배 중에 있다. 조사지역인 백두산 소천지-장백폭포 일대의 경우 조사기간에 1700 m 일대에는 이미 개화가 완료된 상태인 반면, 1900 m 이상 지대는 개화가 일부 진행되었거나 시작되는 상태였다. 러시아 사할린 지역의 경우 9월 15-16일에 2개 지역 3개 집단으로부터 생체를 확보하였고, 일부 생체를 한국자생식물원에 의뢰하여 식재하여 관리 중에 있다. 일본 Gifu현 타카야마의 경우 10월 13-14일에 4개 집단으로부터 확보하였으며, 홋카이도 샘플의 경우 홋카이도 대학의 Kudo 교수로부터 2개 집단의 샘플을 제공받았다. 설악산 집단의 경우 설악산국립공원과 협조하여 2012년 9월 21일 시료를 채취하였다.

만병초의 경우 지리산, 태백산, 오대산, 설악산, 방태산 및 울릉도와 일본 Gifu현 등 총 13집단에서 352개체의 DNA 시료를 확보하였다 <표 38>.

추가적으로, 계통분석을 위해 노랑만병초와 만병초 외의 한국산 철쭉과 식물의 DNA 시료를 확보하였다.

<표 37> 노랑만병초 시료 확보 현황

국가	Voucher	Locality, GPS info.	개체수
China	Won7595 (소천지)	China. Jilin, Mt. Changbai N42° 03' 28.6" E128° 03' 23.3"	35
	Won7596 (소천지-온천)	China. Jilin, Mt. Changbai N42° 03' 19.4" E128° 03' 31.8"	30
	Won7597 (온천-장백폭포)	China. Jilin, Mt. Changbai N42° 02' 33.9" E128° 03' 20.9"	30
Russia	Won8038	Russia. Sachaline, Mt. Chekoba N46° 59' 26.5" E142° 50' 16.0"	30
	Won8045	Russia. Sachaline, Mt. Chekoba N47° 00' 19.4" E142° 50' 25.2"	30
	Won8067	Russia. Sachaline, Mt. Zhdankos N48° 05' 45.1" E142° 31' 50.8"	30
Korea	Lim86	Korea. Mt. Seorak NP (1637m) N38° 07' 21.5" E128° 27' 26.9"	30
Japan	MC677	Japan. Gifu, Takayama, Sugoroku-dake	30
		N36° 22' 19.1" E137° 35' 13.7"	
	MC679	Japan. Gifu, Takayama, Sugoroku-dake	30
		N36° 23' 05.4" E137° 35' 13.2"	
	MC682	Japan. Gifu, Takayama, Mitsumata-renge-dake	30
		N36° 23' 23.6" E137° 35' 15.5"	
	MC683	Japan. Gifu, Takayama, Mitsumata-renge-dake	12
		N36° 23' 01.3" E137° 35' 32.1"	
Kudo Pop1	Japan. Hokkaido, Daisetsuzan NP	10	
	N43° 33' 33" E142° 51' 40"		
Kudo Pop2	Japan. Hokkaido, Daisetsuzan NP	10	
	N43° 42' 50" E142° 52' 30"		
<b>Total Population : 13</b>		<b>Total individual : 337</b>	

<표 38> 만병초 시료 확보 현황

Voucher	Locality, GPS info	개체수
Won7465-1	지리산 천왕봉 칠선폭포 주변	13
	N35° 20' 24.5" E127° 43' 32.9"	
Lim53	태백산 장군봉 주변	30
	N37° 06' 00.2" E128° 54' 59.4"	
Won7826	오대산 적멸보궁 주변	30
	N37° 47' 27.7" E 128° 33' 18.3"	
Won7829	오대산 소황병산 늪	33
	N 37° 46' 21.0" E 128° 40' 40.5"	
MC614	울릉도	25
	N 37° 46' 21.0" E 128° 40' 40.5"	
MC617-1	울릉도	33
	N 37° 29' 43.6" E 130° 51' 58.0"	
MC617-2	울릉도	23
	N37° 29' 42.96" E 130° 51' 38.0"	
MC617-3	울릉도	30
	N37° 29' 42.74"E 130° 51' 51.89"	
MC617-4	울릉도	20
	N37° 29' 42.63"E130° 51' 54.73"	
Lim87	설악산 중청봉 주변 (1649M)	30
	N38° 07' 21.4" E128° 27' 27.6"	
Lim88	설악산 대청봉 주변 (1649M)	30
	N38° 07' 03.0" E128° 27' 51.3"	
Won8133	방태산	32
	N37° 53' 17.4" E128° 23' 25.2"	
MC671	Japan. Gifu, Takayama, Sugoroku-dake	23
	N36° 21' 05.0" E137° 35' 49.8"	
Total Populations : 15	Total individual : 352	

(나) 계통분석

계통적 유연관계 파악: 철쭉과 식물을 대상으로 한 계통적 유연관계 분석에는 엽록체 *matK* 유전자, *trnK* intron 구간, *trnL-F* IGS 구간, 핵 low-copy marker인 *xch* 유전자와 nrITS 구간 등의 염기서열 분석이 적용되어 왔으며, 본

연구에서도 노랑만병초, 만병초, 및 한국에 자생하는 철쭉과 식물을 대상으로 엽록체 *rbcL* 유전자와 핵 *xdh* 유전자 염기서열 분석을 통해 계통학적 유연관계 분석을 수행하였다. 분석에 포함된 철쭉과 식물은 <표 39>에 표시하였다.

<표 39> 한국산 철쭉과 식물의 계통분석에 사용된 샘플 목록

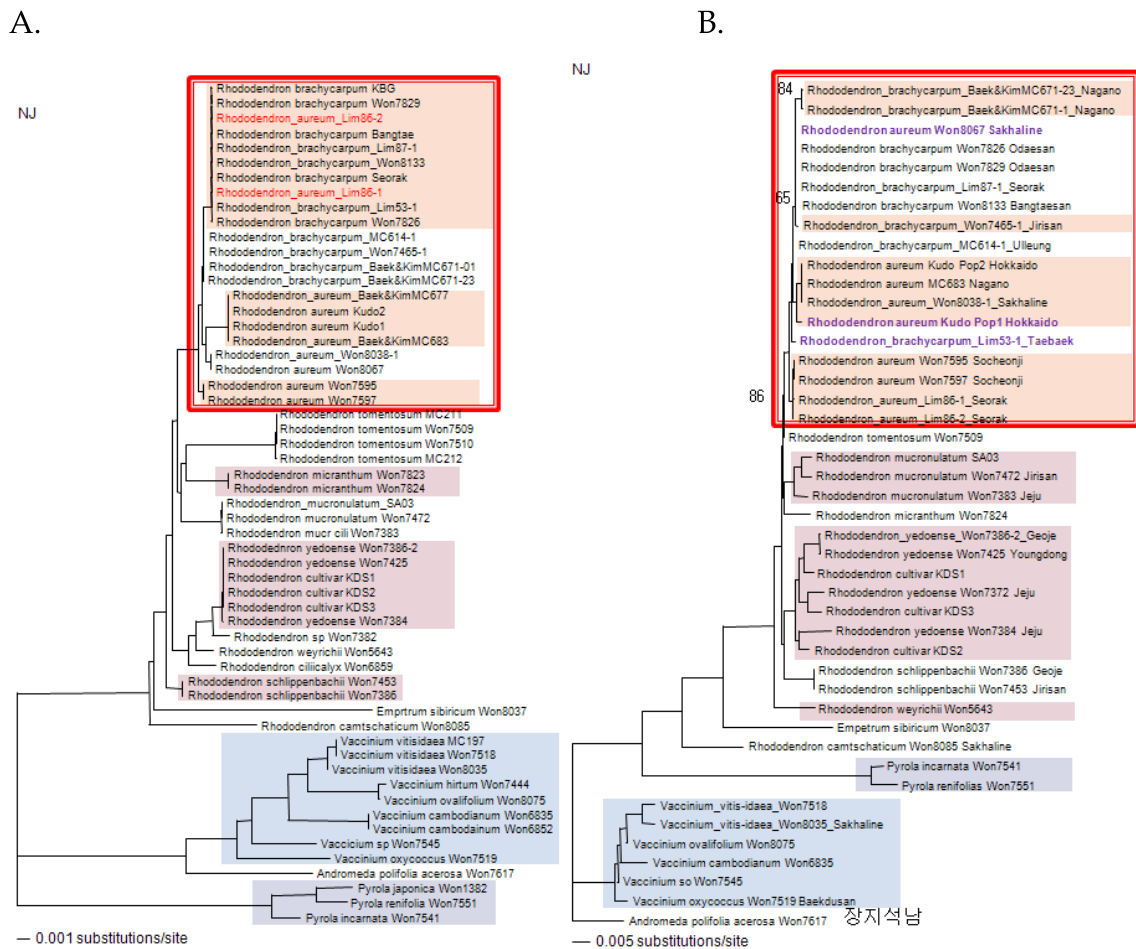
Sci. Name	Voucher	Locality
<i>Andromeda</i>		
<i>A. polifolia</i> var. <i>acerosa</i>	장지석남 Won7617(DGU)	China. Jilin, Mt. Changbai
<i>Empetrum</i>		
<i>E. sibiricum</i>	시로미 Won8037(DGU)	Russia. Sakhaline
<i>Pyrola</i>		
<i>P. incarnata</i> (DC.)	fisch. Ex Kom 분홍노루발 Won7541(DGU)	China. Jilin, Mt. Changbai
<i>P. renifolia</i> Maxim	콩팥노루발 Won7551(DGU)	China. Jilin, Mt. Changbai
<i>Rhododendron</i> 진달래속		
<i>R. aureum</i> Georgi	노랑만병초	
	Lim86-1(DGU)	Korea. Gangwon, Mt. Seorak
	MC677 (DGU)	Japan. Gifu, Takayama
	MC683 (DGU)	Japan. Gifu, Takayama
	Kudo Pop#1	Japan. Hokkaido
	Kudo Pop#2	Japan. Hokkaido
	Won7595(DGU)	China. Jilin, Mt. Changbai
	Won7597(DGU)	China. Jilin, Mt. Changbai
	Won8038-1(DGU)	Russia. Sakhaline, Mt. Chekoba
	Won8067 (DGU)	Russia. Sakhaline, Zhdankos
<i>R. brachycarpum</i> D.Don ex G.Don	만병초	
	Won7465-1(DGU)	Korea. Gyungnam, Mt. Jiri
	Won7826(DGU)	Korea. Gangwon, Mt. Odae
	Won7829(DGU)	Korea. Gangwon, Mt. Odae
	Won8133(DGU)	Korea. Gangwon, Mt. Bangtae
	Lim53-1(DGU)	Korea. Gangwon, Mt. Taebaek
	Lim87-1(DGU)	Korea. Gangwon, Mt. Seorak
	MC671-1(DGU)	Japan. Gifu, Takayama

	MC671-23(DGU)	Japan. Gifu, Takayama
<i>R. tomentosum</i> (Stokes) Harmaja	백산차	
	MC211(DGU)	China. Jilin, Mt. Changbai
	MC212(DGU)	China. Jilin, Mt. Changbai
	Won7509(DGU)	China. Jilin, Mt. Changbai
	Won7510(DGU)	China. Jilin, Mt. Changbai
<i>R. cantschaticum</i>	Won8085(DGU)	Russia. Sakhaline, Mt. Chekoba
<i>R. ciliicalyx</i>	Won6859(DGU)	Cambodia. Kampot, Bokor
<i>R. micranthum</i> Turcz.	꼬리진달래	
	Won7823(DGU)	Korea. Gangwon, KBG
	Won7824(DGU)	Korea. Gangwon, KBG
<i>R. mucronulatum</i> Turcz.	진달래	
	Won7472(DGU)	Korea. Jeonnam, Mt. Jiri
	SA03(DGU)	Korea. Incheon, Isl. Jamjin
var. <i>ciliatum</i> Nakai.	털진달래	
	Won7383(DGU)	Korea. Jeju
<i>R. schlippenbachii</i> Maxim.	철쭉	
	Won7386(DGU)	Korea. Gyungnam, Geoje
	Won7453(DGU)	Korea. Jeonnam, Mt. Jiri
<i>R. weyrichii</i> Maxim.	참꽃나무	
	Won5643(DGU)	Korea. Jeju
<i>R. yedoense</i> Maxim. ex Regel f. <i>poukhanense</i> (H. Lév.) Sugimoto	산철쭉	
	Won7384(DGU)	Korea. Jeju
	Won7386-2(DGU)	Korea. Gyungnam, Geoje
	Won7425(DGU)	Korea. Chungbuk, Youngdong
<i>R. sp.</i>		
	Won7382(DGU)	Korea. Jeju
<i>R. cultivar</i>	KDS1(DGU)	Korea. Gyungbuk, Deagu Univ.
	KDS2(DGU)	Korea. Gyungbuk, Deagu Univ.
	KDS3(DGU)	Korea. Gyungbuk, Deagu Univ.
<i>Vaccinium</i>		
<i>V. hirtum</i> var. <i>koreanum</i> (Nakai) Kitam	산앵도나무	
	Won7444(DGU)	Korea. Jeonnam, Mt. Jiri
<i>V. ovalifolium</i>	Won8075(DGU)	Russia. Sakhaline
<i>V. vitis-idaea</i> L.	월귤	
	Won7518(DGU)	China. Jilin, Mt. Changbai
	MC197(DGU)	China. Jilin, Mt. Changbai
	Won8035(DGU)	Russia. Sakhaline, Mt. Chekhoba
<i>V. sp.</i>	Won7545(DGU)	China. Jilin, Mt. Changbai

-----  
Total

47  
=====

본 연구기간 동안 확보된 노랑만병초 및 만병초 집단 샘플과 한국산 철쭉과 식물에 대한 엽록체 *rbcL* 염기서열 및 핵 *xdh* 유전자 염기서열에 대한 계통 분석 결과 <그림 40>과 같은 유전자 계통수를 확보하였다. 두 계통수에서 모두 노랑만병초와 만병초가 단일 분계군을 형성하였으며, 다른 철쭉과 식물들과 뚜렷이 구분되었다. 그러나, 노랑만병초와 만병초 간에는 서로 공유되는 유전자형이 존재하며, 이러한 양상이 엽록체 유전자와 핵 유전자에서 서로 상이한 양상이 나타나기도 하였다.

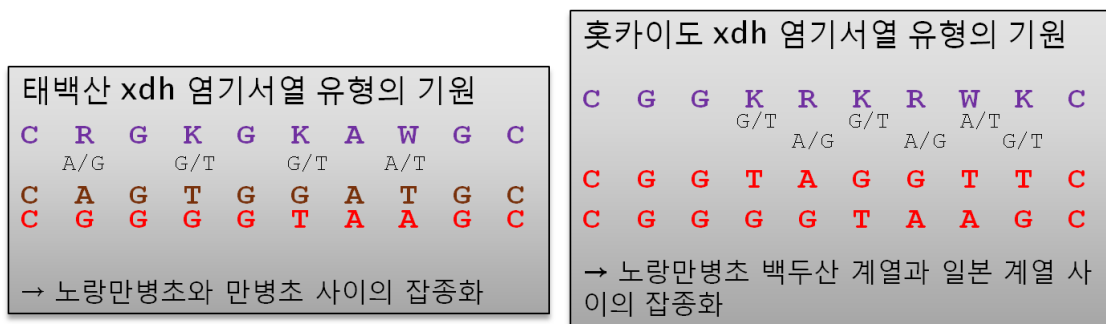


<그림 40> 한국산 철쭉과 식물의 계통적 유연관계 분석. (A) 엽록체 *rbcL* 유전자 분석 결과 얻어진 neighbor-joining tree. (B) 핵 *xdh* 유전자 분석 결과 얻어진 neighbor-joining tree.

엽록체 *rbcL* 유전자 분석 결과 총 5개의 유전자형이 노랑만병초와 만병초에서 확인되었으며, 이중 노랑만병초에서 4개 유형이, 만병초에서 2개 유형이 나타났다. 노랑만병초 설악산 집단의 경우 만병초와 동일한 유형인 것으로 나타났으며, 나머지 노랑만병초는 일본나가노와 홋카이도 집단이 동일 유형을, 사할린 유형과 백두산 유형으로 구분되어졌다. 만병초의 경우, 설악산, 오대산, 방태산, 태백산 등 중부지방 집단이 1개의 유형을, 그리고 지리산, 울릉도 일본 Gifu현 집단이 다른 1개의 유형을 가지고 있어 지역적으로 중부와 남부 유형으로 구분되었다 <그림 40>.

핵 *xhd* 유전자 분석 결과, 총 8개 유형이 확인되었다. 노랑만병초의 경우 총 3개 유형의 염기서열이 확인되었으며, 이는 각각 일본 유형(Gifu현, 홋카이도, 사할린)과 백두산 유형(백두산, 설악산)으로 크게 양분되었다. 한편, 사할린 집단 중 단코스산 집단은 한국 중부지방 만병초와 동일한 유전자형인 것으로 나타났다. 만병초의 경우 총 5개 유형이 확인되었는데, 이는 일본 Gifu현 유형, 한국 중부 유형(설악산, 오대산, 방태산), 지리산 유형, 울릉도 유형, 그리고 태백산 유형 등으로 구분되었다.

한편, 핵 *xdh* 유전자의 polymorphic site를 분석한 결과 2개의 잠재적인 잡종 유형이 발견되었다. 이는 만병초 태백산 집단과 일본 홋카이도의 노랑만병초 집단에서 각각 발견되었는데, 만병초 태백산 집단의 경우 노랑만병초와 중부지방 만병초 사이의 잡종에 의해, 홋카이도 노랑만병초의 경우 노랑만병초 백두산 유형과 일본 유형 사이의 잡종에 의해 기원한 것으로 추정된다 <그림 41>. 또한, 노랑만병초 설악산 집단의 경우, 핵 *xdh* 유전자는 백두산 노랑만병초 집단과 동일하나, 엽록체 *rbcL* 유전자 유형이 만병초 중부 집단과 동일한 것으로 볼 때, chloroplast capture에 의해 기원한 것으로 추정된다.



<그림 41> 노랑만병초와 만병초 핵 *xdh* 유전자 잡종 유형의 기원에 대한 가설.

이와 같이 동북아시아의 노랑만병초와 만병초 집단에 있어서는 복잡한 양상의 잡종화와 진화가 일어났을 가능성이 있으며, 집단별 분석 샘플을 추가하여 이에 대한 확인 작업과 함께, 이들의 계통지리학적 연구를 보다 심도있게 수행해야할 필요성이 있다. 특히, 이들 분류군을 대상으로 한 유전 다양성 분석에 앞서 계통지리학적 분석 및 실체 확인이 선행되어야 할 것으로 판단된다.

### 3. Genomics 기반 연구 분야

#### 가. 후보종 선정 대상

계놈 프로젝트를 수행하기 위한 후보종은 2012년 환경부에서 지정한 멸종위기 후보대상종, 신규지정검토종, 해제검토종, 해제대상종 등을 포함한 96종 <표 4>을 대상으로 문헌조사, 정량적 및 정성적 평가 등을 통해 선정하였다.

#### 나. 후보종 선정 방법

후보종 선정은 배수성 검증, 계놈 크기 추정, 생태적 특징, 수정양상 및 수분매개체 분석, 실질적 시료 확보 가능량, 경제적 가치 및 생물산업계 등의 활용도 분석, 인공증식 방법 조사, 근연관계가 높은 종의 국내외 연구현황 파악, Genomics 연구 후 파급효과 등을 <표 40>의 평가 양식에 따라 정성적 및 정량적으로 평가하여 선정하였다. 계놈 크기의 경우 대부분의 경우 해당 종에 대한 자료가 없는 경우가 많아 기존에 C-value가 보고된 유사분류군(동일 속 또는 과)의 자료를 기준으로 평가하였으며, Bennett and Leitch(2010)의 자료를 활용하였다. 계놈 프로젝트가 수행되었거나 수행 중인 분류군의 정보는 NCBI GenBank의 자료와 BGI 1000 Plant and Animal Reference Genomes Project (<http://ldl.genomics.org.cn/page/pa-research.jsp>)로부터 정보를 확보하였다. 염색체 수 및 배수성의 경우 Tropicos(<http://www.tropicos.org>)에서 확인하였다. 선정된 후보종 5종에 대해서는 배수성(염색체 수 계수) 확인 및 C-value 측정을 수행하였다.

**배수성 측정:** 염색체 수 계수는 Kim et al. (2000)의 방법을 적용하여 수행하였다. 즉, 오전 10시 전후로 식물체의 뿌리 정단을 채취한 다음, 2 mM 8-hydroxyquinoline 수용액에서 4°C 20-24시간 동안 전처리한 다음, glacial acetic acid:ethanol 3:1 (v/v) 용액으로 고정하고, 1 N HCl 수용액에서 60°C 10분간 조식을 연화시킨 다음, 2% acetic orcein 용액으로 염색한 다음 압착해서 염색체를 관찰하고 염색체 수를 계수하였다.

**C-value 측정:** 유전체의 C-value 추정은 flow-cytometry를 이용하여 수행하며, 네덜란드의 Naturalis의 Dr. B.J.M. Zonneveld에 의뢰하여 수행하였다. C-value 측정은 최근에 나온 어린 잎이나 종자에서 발아된 신선한 조직

1 cm<sup>2</sup>을 잘게 자른 다음 DAPI로 형광염색하여 수행하였다. 유전체의 DNA 양은 유전체 크기의 standard인 *Pisum sativum* L. 'Citrad'를 분석 대상 시료와 함께 형광량을 측정한 다음 9.09 pg의 표준 유전체량과 비교하여 산정하였다. 분석에 사용된 개체는 한국자생식물원에서 확보하여 증식, 관리하고 있는 개체를 대상으로 하였으며, 이들 계놈 프로젝트 후보종은 서식지의 보전기관에서 최소 2년간 유지 관리되도록 하며, 개체의 발아, 증식, DNA 시료 확보 등이 가능하도록 하였다. 또한 생육상태, 개화상태, 결실상태 등을 사진으로 기록하였다 (그림 42).

<표 40> 계놈 분석 후보종 평가 기준표

항목	배점	예시
시료 확보 가능량(생체량/개체)	3	교/관목: 3 보통: 2 소형 초본: 1
시료 확보의 용이성	3	
증식, 관리의 용이성	3	발아율, 영양번식 가능성 등
서식지의 보존기관 기 확보 여부	3	
배수성 여부	2	다배체 1; 2배체 2
염색체수	3	≤20: 3 20 < 2n ≤40: 2 >40: 1
계놈 크기	3	C-value ≤ 10: 3 10 < C ≤ 20: 2 >20: 1
생태/환경적 가치 (생태적 기능)	2	기후 변화 관련, 생태적 기능 등 고려, 지표종 등
경제적 가치 (유용성분, 약용 등 여부)	3	원예 1, 식용 2, 약용 및 유용성분 3
정책적 가치 (고유종/국외반출승인대상종 여부)	2	지정시 2
근연 분류군의 유전체 연구	2	동일 속에 대한 유전체 연구 여부
유전체 연구 활용 효과 - 생물산업계의 활용도 (작물개량, 원예, 품종화 여부 등), 근연 분류군의 활용도 (품종 개량 등에 활용)		정성적 평가
소계	29	

## 다. 후보종 선정 결과

계놈 프로젝트를 수행하기 위한 후보종의 평가 결과는 <표 41>에 제시하였으며, 유전체 계놈 크기와 염색체 수 정보가 있는 경우 총점 21점 이상, 해당 정보가 누락된 경우 총점 17점 이상인 종을 대상으로 21종을 후보종으로 선정하였다 (표 42). 이들 21종은 대부분 원예종 개발 및 약용 식물로 활용이 가능한 종들로, 계놈 프로젝트를 통해 우리나라 자생 및 고유 식물의 유전자 활용에 크게 도움일 될 것으로 판단된다. 이들 21종 중 활용가능성 및 샘플 확보가 용이한 6종을 한국자생식물원으로부터 확보하여 이들의 C-value 추정 및 염색체수 측정을 시도하였다. 그러나, 채집시기가 늦어 샘플들의 뿌리의 발육이 좋지 않아 염색체 수 측정에 성공하지 못하였으며, 이는 기존의 결과로 대처하였다. C-value 측정의 경우 네덜란드의 Naturalis의 Dr. B.J.M. Zonneveld에 의뢰하여 가시오갈피를 제외한 5종의 C-value 측정을 완료하였다. Ploidy level을 고려할 경우, 제비동자꽃의 C-value는 동속의 *L. coronaria*에서 얻어진 6.30 pg에 비해 2배정도 되며, 제비붓꽃의 경우 동속에서 얻어진 8.0 ~ 56.4 pg의 범주에 포함되는 것으로 확인되었다. 솔붓꽃은 제비붓꽃에 비해 계놈이 1/2 이하인 것으로 (14.25 vs. 5.16 pg) 확인되었다. 한편, 각시수련의 경우 동속인 수련(*N. odorata*)이 4.60 pg, *N. alba*가 3.98 pg인 것에 비해 작으나, 수련속 식물이 1.10 ~ 4.60 pg로 나타나는 것으로 보아서는 속 내에서는 비교적 계놈이 큰 편인 것으로 판단된다. 큰바늘꽃의 경우 0.87 pg으로 Dr. Zonneveld가 네덜란드에서 자생하는 샘플에서 측정한 값과 동일한 것으로 확인되었다. 이러한 결과로 볼 때, 계놈 분석 대상으로 선정된 6종 중 큰바늘꽃이 가장 계놈 크기가 작으며, 제비붓꽃이 가장 큰 계놈을 가진 것으로 파악되었다.

<표 41> 계놈 프로젝트 후보종 평가 결과

국명	등급	확보 가능량	확보 용이성	증식, 관리 용이성	기확보 여부	배수성 여부	염색체 수	계놈 크기	생태적 기능	경제적 가치	정책적 가치	근연종 유전체 연구	활용 가능성	합계	비고
		3	3	3	3	2	3	3	2	3	2	2	정성적		
서울개발나물	II	1	1	2	1			3	1	1	1	1		12	2012 신규지정
한라솜다리	II	1	1	1	1			3	1	1	2	1		12	2012 신규지정
제비동자꽃	II	2	2	3	3	2	2	3	1	1	2	1	원예종 개량	22	2012 신규지정
분홍장구채	II	2	2	2	2			3	1	1	2	1	원예종 개량	16	2012 신규지정
대성쓴풀	II	1	1	1	1			3	1	1	2	1		12	2012 신규지정
닷꽃	II	1	1	2	2	2	2	3	1	1	2	1		18	2012 신규지정
제비붓꽃	II	3	2	3	3	1	2	2	2	1	2	1	붓꽃 개량	22	2012 신규지정
솔붓꽃	II	1	1	3	2	2	2	2	1	1	2	1	붓꽃 개량	18	2012 신규지정
날개하늘나리	II	1	1	2	1	1	2	1	1	1	2	1	백합과 개량	14	2012 신규지정
초령목	II	1	1	2	1	1	2	3	1	1	2	1		16	2012 신규지정
칠보치마	II	1	1	1	1	1	3	3	1	1	2	1		16	2012 신규지정
각시수련	II	2	2	2	3			3	1	1	2	2	수련 개량	18	2012 신규지정
큰바늘꽃	II	2	2	3	3	1	2	3	2	1	2	1		22	2012 신규지정
콩짜개난	II	1	1	1	1	2	2	3	1	1	2	1		16	2012 신규지정
복주머니란	II	1	2	1	1			1	1	1	1	1		10	2012 신규지정

<표 41> 계속

국명	등급	확보 가능량	확보 용이성	증식, 관리 용이성	기확보 여부	배수성 여부	염색체 수	개놈 크기	생태적 기능	경제적 가치	정책적 가치	근연종 유전체 연구	활용 가능성	합계	비고
		3	3	3	3	2	3	3	2	3	2	2	정성적	29	
석곡	II	1	1	1	1	2	2	3	1	1	2	1		16	2012 신규지정
금자란	II	1	1	1	1			3	1	1	2	1		12	2012 신규지정
탐라란	II	1	1	1	1			3	1	1	2	1		12	2012 신규지정
구름병아리난초	II	1	1	1	1	2	1	3	1	1	2	1		15	2012 신규지정
해오라기난초	II	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1		12	2012 신규지정
차결이난	II	1	1	1	1	2	2	3	1	1	2	1		16	2012 신규지정
비자란	II	1	1	1	1			3	1	1	2	1		12	2012 신규지정
백양더부살이	II	1	1	1	1			3	1	1	2	1		12	2012 신규지정
물고사리	II	1	1	1	1	1	1	3	1	1	2	1		14	2012 신규지정
갯봄맞이	II	1	2	1	1	2	2	3	1	1	1	1		16	2012 신규지정
전주물꼬리풀	II	1	2	1	1	2	2	3	1	1	2	1		17	2012 신규지정
한라송이풀	II	1	1	1	1			3	1	1	2	1		12	2012 신규지정
애기송이풀	II	1	2	1	1			3	1	1	2	1		13	2012 신규지정
넓은잎제비꽃	II	1	2	2	2	2	3	3	1	1	2	1		20	2012 신규지정
참골담초		3	2	2	2			3	1	1	2	1		17	2011 지정후보

<표 41> 계속

국명	등급	확보 가능량	확보 용이성	증식, 관리 용이성	기확보 여부	배수성 여부	염색체 수	개놈 크기	생태적 기능	경제적 가치	정책적 가치	근연종 유전체 연구	활용 가능성	합계	비고
		3	3	3	3	2	3	3	2	3	2	2	정성적	29	
참물부추		1	1	1	1			3	1	1	2	2		13	2011 지정후보
섬국수나무		3	2	2	2			3	1	1	2	1		17	2011 지정후보
층층등굴레	II	2	3	2	2	1	2	2	1	1	1	1		18	2011 해제검토
자주솨대	II	2	3	1	1			2	1	1	1	1		13	2012 해제
솨다리	II	1	1	2	1			3	1	1	2	1		13	2012 해제
한계령풀	II	2	2	2	2			3	1	1	1	1		15	2012 해제
깁깁이풀	II	2	2	2	2			3	1	1	1	1		15	2012 해제
등근잎뿔의비름	II	1	2	2	2			3	1	1	1	1		14	2012 해제
황기	II	2	2	2	2	2	3	3	1	3	1	1		22	2012 해제
개느삼	II	3	2	3	2	2	2	3	1	1	1	1		21	2012 해제
애기등	II	3	2	2	1			3	2	1	1	1		16	2012 해제
개가시나무	II	3	3	2	1			3	2	1	1	2		18	2011 해제검토
히어리	II	3	3	3	3			3	2	1	1	1		20	2012 해제
노랑무늬붓꽃	II	2	2	2	3			2	1	1	2	1	붓꽃 개량	16	2012 해제
물부추	II	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	2		14	2012 해제

<표 41> 계속

국명	등급	확보 가능량	확보 용이성	증식, 관리 용이성	기확보 여부	배수성 여부	염색체 수	개놈 크기	생태적 기능	경제적 가치	정책적 가치	근연종 유전체 연구	활용 가능성	합계	비고
		3	3	3	3	2	3	3	2	3	2	2	정성적	29	
솔나리	II	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	백합과 개량	15	2012 해제
큰연령초	II	1	2	2	2	2	3	1	1	1	1	1		17	2012 해제
박달목서	II	3	2	2	2			3	1	1	1	1		16	2012 해제
매화마름	II	2	2	2	2			3	1	1	1	1		15	2011 해제검토
망개나무	II	3	2	2	2			3	1	1	1	1		16	2012 해제
갯대추나무	II	3	2	2	2			3	1	1	1	1		16	2012 해제
끈끈이귀개	II	1	1	1	1			3	1	1	1	1		11	2011 해제후보
자주땅귀개	II	1	1	1	1	2	3	3	1	1	1	1		16	2011 해제후보
황근	II	3	3	3	3			3	1	3	1	2		22	2011 해제후보
가시연꽃	II	3	3	3	3	2	1	2	1	3	1	1	수련 개량	23	2011 해제후보
미선나무	II	3	2	3	3	2	2	3	1	1	2	1		23	2011 해제후보
털복주머니란	II	1	1	1	1	2	3	1	1	1	1	1		14	2012 II→I
암매	I	1	1	1	1	2	3		1	1	1	1		13	
만년콩	I	2	1	1	1			3	1	1	1	1		12	
한란	I	1	1	1	2	1	1	3	1	1	1	1		14	

<표 41> 계속

국명	등급	확보 가능량	확보 용이성	증식, 관리 용이성	기확보 여부	배수성 여부	염색체 수	개념 크기	생태적 기능	경제적 가치	정책적 가치	근연종 유전체 연구	활용 가능성	합계	비고
		3	3	3	3	2	3	3	2	3	2	2	정성적	29	
죽백란	I	1	1	1	2	1	2	3	1	1	1	1		15	
광릉요강꽃	I	1	1	1	2	2	3	1	1	1	1	1		15	
풍란	I	1	1	1	1	2	2	3	1	1	1	1		15	
나도풍란	I	1	1	1	2	2	2	3	1	1	1	1		16	
섬개야광나무	I	3	1	2	2			3	1	1	2	1		16	
진노랑상사화	II	2	2	2	2	2	3	1	1	1	2	1		19	
섬시호	II	2	2	2	2	2	3	3	1	1	2	1		21	
독미나리	II	3	2	3	3	2	2	3	1	3	1	1		24	
가시오갈피나무	II	3	2	3	3	2	1	3	1	3	1	1	약용 개발	23	
파초일엽	II	1	1	2	1			3	1	1	1	1		12	
단양쑥부쟁이	II	2	3	3	3			3	2	1	1	1		19	
순채	II	2	2	2	3	1	1	3	1	2	1	2		20	
죽절초	II	1	2	2	2	2	2	3	1	1	1	1		18	
홍월굴	II	1	3	1	1	2	2	3	1	1	1	1		17	
노랑만병초	II	2	2	1	1	1	1	3	1	1	1	1		15	

<표 41> 계속

국명	등급	확보 가능량	확보 용이성	증식, 관리 용이성	기확보 여부	배수성 여부	염색체 수	개놈 크기	생태적 기능	경제적 가치	정책적 가치	근연종 유전체 연구	활용 가능성	합계	비고
		3	3	3	3	2	3	3	2	3	2	2	정성적	29	
나도승마	II	2	2	2	2	2	1		1	1	1	1		15	
대청부채	II	2	3	3	3	2	2	2	1	1	1	1	붓꽃 개량	21	
노랑붓꽃	II	2	2	3	3			2	1	1	2	1	붓꽃 개량	17	
조름나물	II	1	1	2	2	1	1	3	1	1	1	1		15	
제주고사리삼	II	1	1	1	2			1	1	1	1	1		10	
지네발란	II	1	1	1	2			3	1	1	1	1		12	
대홍란	II	1	1	1	1			3	1	1	1	1	원예종 개량	11	
으름난초	II	1	1	1	2			3	1	1	1	1		12	
백운란	II	1	1	1	1	2	2	3	1	1	1	1		15	
산작약	II	2	2	2	2	1	3	2	1	3	1	1		20	
기생꽃	II	1	2	1	2			3	1	1	1	1		13	
솔잎란	II	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1		13	
세뿔투구꽃	II	1	2	2	2			3	1	3	1	1		16	
백부자	II	1	2	2	2	1	2	3	1	3	1	1		19	
연잎평의다리	II	1	2	2	2	2	3	3	1	1	1	1		19	
무주나무	II	3	1	2	2			3	1	1	1	1		15	

<표 41> 계속

국명	등급	확보 가능량	확보 용이성	증식, 관리 용이성	기확보 여부	배수성 여부	염색체 수	개놈 크기	생태적 기능	경제적 가치	정책적 가치	근연종 유전체 연구	활용 가능성	합계	비고
		3	3	3	3	2	3	3	2	3	2	2	정성적	29	
삼백초	II	2	2	3	2	2	2	3	1	3	1	1	약용활용	22	
개병풍	II	2	2	2	3	2	1	3	1	1	1	1		19	
섬현삼	II	2	2	2	2			3	1	1	2	1		16	
선제비꽃	II	1	2	2	2	2	2	3	1	1	1	1		18	
왕제비꽃	II	1	2	2	2			3	1	1	1	1		14	

<표 42> 선정된 계놈 프로젝트 후보종 (21종)

국명	과	습성	염색체수 (2n)	C-value (동속, 과 기준)
섬시호	Apiaceae 미나리과	다년생 초본	16	2.49
독미나리		다년생 초본	22	2.35
가시오갈피나무	Araliaceae 두릅나무과	다년생 목본	48	2.25
단양쭉부쟁이	Asteraceae 국화과	2년생 초본	-	4.32
순채	Cabombaceae 순채과	다년생 초본	72, 80	1.25
제비동자꽃	Caryophyllaceae 석죽과	다년생 초본	24	1.52
황기	Fabaceae 콩과	다년생 초본	16	2.15
개느삼		다년생 목본	22	1.36
개가시나무	Fagaceae 너도밤나무과	다년생 목본	-	0.88
히어리	Hamamelidaceae 조록나무과	다년생 목본	-	0.59
제비붓꽃	Iridaceae 붓꽃과	다년생 초본	28, 32, 34	11.03
대청부채		다년생 초본	32	11.03
노랑붓꽃		다년생 초본	-	11.03
솔붓꽃		다년생 초본	40	11.03
황근	Malvaceae 아욱과	다년생 목본	-	1.53
각시수련	Nymphaeaceae 수련과	다년생 초본	-	1.83
가시연꽃		1년생 초본	58	4.62
미선나무	Oleaceae 물푸레나무과	다년생 목본	28	1.46
큰바늘꽃	Onagraceae 바늘꽃과	다년생 초본	36, 38	0.30
섬국수나무	Rosaceae 장미과	다년생 목본	-	0.22
삼백초	Saururaceae 삼백초과	다년생 초본	22	0.53

<표 43> 최종 선정된 계놈 프로젝트 후보종의 C-value 및 염색체수 추정

국명	과	습성	염색체수 (2n)	2C-value (pg)
가시오갈피나무	Araliaceae 두릅나무과	다년생 목본	48	4.50
제비동자꽃	Caryophyllaceae 석죽과	다년생 초본	24	<b>11.79*</b>
제비붓꽃	Iridaceae 붓꽃과	다년생 초본	28, 32, 34	<b>14.25*</b>
솔붓꽃		다년생 초본	40	<b>5.16*</b>
각시수련	Nymphaeaceae 수련과	다년생 초본	-	<b>3.59*</b>
큰바늘꽃	Onagraceae 바늘꽃과	다년생 초본	36, 38	<b>0.87*</b>

\*Dr. B.J.M. Zonneveld의 측정값 (2012. 12)



<그림 42> 확보된 유전체 연구 후보종. 각시수련, 큰바늘꽃, 솔붓꽃, 제비동자꽃, 제비붓꽃, 가시오갈피.

## IV. 활용 방안

### 1. 독미나리 엽록체 유전체 연구

- 미나리과와 두릅나무과 엽록체 유전체와 비교 연구를 통해 마커 개발 및 엽록체 비교 유전체학 논문 투고
- 집단 식별 마커 개발에 활용

### 2. 유전다양성 분석

- 독미나리의 경우 증식, 복원, 관리에 활용
  - 군산 집단은 강원도 집단과 구분하여 관리
  - 집단내 유전다양성이 비교적 높음
  - 집단 사이의 유전자 흐름은 제한되는 것으로 보임
- 비자나무
  - 제주도 비자림의 경우 유전적 다양성이 비교적 높음
  - 후계목 선정 및 타 집단 분석시 microsatellite genotyping 활용 가능
- 자주솨대
  - 2012년 5월 집단수와 개체수가 충분한 이유로 멸종위기종에서 해제됨.
  - 한국 특산종으로 속내에서 유일하게 자웅이주임
  - 조사 결과 중부 지방에 집단과 개체수가 많아 개체수 감소 및 멸종위협은 적은 것으로 판단됨.
  - 유전다양성 분석 결과 거리에 따라 유전자 흐름이 제약되며, 남부 집단과 중부 집단 사이에 유전적 격리가 존재
  - 유전적 격리 양상을 볼 때 집단의 크기와 분포가 제한된 남부 집단에 대해서는 장기 모니터링이 필요하며, 특히 지구 온난화 지표종으로 활용가능
  - 원예종으로 개발하여 수출 가능성
- 노랑만병초와 만병초
  - 전통적으로 약용식물, 차, 원예 등으로 활용해 옴
  - 계통분석을 통해, 복원 대상 및 방안에 대해 guideline 제시
  - 추가적인 계통지리학적 연구가 유전다양성 분석에 선행되어야 함

- 계통지리학적 연구 논문 투고

### 3. 유전체 분석 후보종 확보

- 약용/원예종으로 개발 가능한 유전체 예비 후보종 21종 선정 및 6종에 대한 게놈 크기 측정 및 배수성 확인
- 유전체 연구를 통해 자원화 및 산업화를 위한 정보 제공 가능

### 4. 주요 성과물

- 확보된 독미나리 유전체 염기서열은 GenBank 포맷으로 정리하여 제출
- 확증표본, 유전자 샘플, 생체 등은 모두 자원관 생물자원 입력시스템에 등록하도록 하며, 자원관에 제출
  - 확증표본 5분류군 총 20점 (독미나리 1점, 자주솜대 9점, 비자나무 2점, 노랑만병초 3점, 만병초 5점 등)
  - DNA 시료 5분류군 총 701점 (독미나리 1점, 자주솜대 9점, 비자나무 2점, 노랑만병초 9집단 337개체 시료, 만병초 9집단 352개체 시료 등)
  - 확보된 자주솜대, 풀솜대 및 민솜대 엽록체 *matK* 및 *rbcL* 유전자 염기서열, 철쭉과 엽록체 *rbcL* 및 핵 *xdh* 유전자 염기서열은 GenBank 포맷으로 정리하여 제출
- 유전체 후보종 6종 시료: 분류군당 생체 5 gram 확보 및 제출
- 노랑만병초 생체: 백두산 및 러시아 집단에서 확보한 개체 (한국자생식물원 식재 관리 중)

## V. 참고 문헌

- 국립공원관리공단. 2005. 멸종위기종 증식·복원에 관한 연구
- 국립생물자원관. 2006. 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 I.
- 국립생물자원관. 2007. 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 II
- 국립생물자원관. 2007. 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 II.
- 국립생물자원관. 2008. 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 III.
- 국립생물자원관. 2009. 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 IV.
- 국립생물자원관. 2010. 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 V.
- 국립생물자원관. 2011. 주요 생물자원의 유전자 분석·연구 VI.
- 국립수산과학원 해조류연구센터. 2008. UPOV 대비 해조류 품종보호제도 기 반연구
- 국립수산과학원 해조류연구센터. 2009. UPOV 대비 해조류 품종보호제도 기 반연구
- 국토해양부. 2008. 국립해양생물자원관 표본 확보방안 연구보고서
- 김지영. 1997. 한국산 풀솜대속(*Smilacina* Desf.) 식물의 형태분류학적 연구. 석사학위논문. 이화여자대학교 대학원.
- 녹색식물연구소. 2010. 독미나리 및 나도승마 유전다양성 분석. 신구대학 식물원(연구용역 보고서).
- 송시대, 김효철, 김대신, 류성필, 좌승훈. 2007. 제주의 꽃자왈. 국립민속박물관, 서울, 100-107쪽.
- 송시대. 2000. 제주도 암괴상 아이용암류의 분포 및 암질에 관한 연구. 박사학위논문. 부산대학교, 부산.
- 신수경. 2012. 제주도 평대리 비자나무의 성체체를 고려한 보전방안. 석사학위논문. 성신여자대학교 대학원.
- 신현철, 이광수, 박남창, 정수영. 2010. 한반도 비자나무림의 식생구조. 한국임학회지 99: 312-322.
- 이기의, 홍혜옥. 1982. 韓國産 自生萬病草에 關한 研究(I). 韓國園藝學會誌 23: 64-69.
- 이병철, 김완순, 서지현. 2010. 희귀식물 만병초의 자생지 분포현황 및 식생조사. 원예과학기술지 (Kor. J. Hort. Sci. Technol. 28 (Suppl. II)): 354.
- 이병철, 심이성. 2011. 만병초 자생지의 환경생태학적 특성. 한국환경과학회지 20: 1319-1328.
- 이상길. 2004. 구좌읍 비자나무 天然集團의 遺傳資源 保全戰略에 關한 研究. 석사학위 논문. 상지대학교 대학원.

- 이상길. 2009. 제주도 구좌읍 비자림의 생물상, 성장특성, 무육강도에 따른 식생변화 및 보전 방안에 관한 연구. 박사학위논문. 상지대학교, 강원도.
- 이석우, 이현신, 조경진, 최완용. 1999. 비자나무 자생집단의 유전변이. 한국임학회 99년 하계 총회 및 학술연구발표회 140.
- 이창복. 2003. 원색대한식물도감 상. 향문사, 서울, 128쪽.
- 이철호, 신창호, 김규식. 2007. 자주솨대 집단의 개체군 동태 및 보전을 위한 모니터링. 한국 자원식물학회 학술심포지엄 2007: 131-132.
- 이현우, 정홍락, 노태호, 권영환, 김철환, 현진오, 장인수. 2005. 보호대상 식물종에 대한 환경 영향평가기법 개선방안 연구. 한국환경정책·평가연구원.
- 한국수목보호연구회. 1999. 구좌읍의 비자림지대 보존 및 정비대책 보고서. 북제주군.
- 홍예옥, 이기의, 유근창. 1984. 韓國産 自生萬病草에 關한 研究(III). 韓國園藝學會誌 25: 50-55.
- 홍혜옥, 이기의, 유근창. 1983. 韓國産 自生萬病草에 關한 研究(II). 韓國園藝學會誌 24: 57-61.
- 환경부. 2006. 2006~2015 멸종위기야생동·식물 증식·복원 종합계획.
- 환경부. 2011. 멸종위기 야생동식물 지정관리 기준 마련 및 적색목록집 발간 보고서. Pp. 217.
- 환경부·서식지외보전기관협의회. 2010. 2010 멸종위기 야생동·식물보전. 환경부·서식지외보전 기관협의회.
- 환경부·교육과학기술부·외교통상부·농수산식품부·지식경제부·보건복지가족부·국토해양부·농촌진흥청·산림청·특허청. 2009. 생물유전자원의 접근 및 이익공유 (ABS) 인식제고 세미나 자료집
- Bawa KS, Opler PA. 1977. Spatial relationships between staminate and pistillate plants of dioecious tropical forest trees. *Evolution* 31: 64-68.
- Bendich, A.J. et al. 2004. Circular chloroplast chromosome: The grand illusion. *The Plant Cell* 16:1661-1666.
- Bennett MD, Leitch IJ. 2010. Angiosperm DNA C-values database (release 7.0, Dec. 2010) <http://www.kew.org/cvalues/>
- Bremer, K., 1994. Bremer support and tree stability. *Cladistics*, 10:295-304.
- Cavagnaro *et al.* 2011. Microsatellite isolation and marker development in carrot - genomic distribution, linkage mapping, genetic diversity analysis and marker transferability across Apiaceae. *BMC genomics* 2011,12:386.
- Cheng, W.-J., T.-T. Liu, H.-L. Wu, S.-B. Zhou, S.-Q. Zuan, and G.-P. Zhu. 2010. Isolation and characterization of twelve polymorphic microsatellite loci in *Polygonatum vrytonema* and cross-species amplification. *Conservation Genet. Resour.* 2: 105-107.

- China Plant BOL Group et al. 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 19641-19646.
- Degen B, Petit R, Kremer A. 2001. SGS - Spatial genetic software: A computer program for analysis of spatial genetic and phenotypic structures of individuals and populations. *Journal of Heredity* 92: 447-448.
- Environmental Systems Research Institute. 2008. Arc/Info User's Guide. Ver. 9.3. Environmental Systems Research Institute, Redlands, CA, USA.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Excoffier, L., G. Laval, S. Schneider. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*. 1: 47-50.
- Farris, J., V. Albert., M. Kallersjo, D. Lipscomb and A. Kluge, 1996. Parsimony Jackknifing outperforms Neighbor-joining. *Cladistics*, 12:99-124.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies : an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 789-791.
- Fitch, W. M., 1971. Toward defining the course of evolution: minimal change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* 20:406-416.
- Forero-Montana J, Zimmerman JK, Thompson J. 2010. Population structure, growth rates and spatial distribution of two dioecious tree species in a wet forest in Puerto Rico. *Journal of Tropical Ecology* 26: 433-443.
- Frankham R, Ballou J. D., and Briscoe D. A., 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Gao P, Kang M, Wang J, Ye Q, Huang H. 2009. Neither biased sex ratio nor spatial segregation of the sexes in the subtropical dioecious tree *Eurycorymbus cavaleriei* (Sapindaceae). *J Int Plant Biol* 51:604-613.
- Gaudeul M, Till-Bottraud I, Barrjon F, and Manel S. 2004. Genetic diversity and differentiation in *Erygium alpinum* L. (Apiaceae): Comparison of AFLP and microsatellite markers. *Heredity* 92: 508-518.
- Gibson, T. D. Higgins and J. Thompson, 1994. Clustal X program. EMBL, Heidelberg, Germany
- Goetsch, L., A. J. Eckert, and B. D. Hall. 2005. The molecular systematics of *Rhododendron* (Ericaceae): a phylogeny based upon RPB2 gene sequences. *Syst. Bot.* 30: 616-626.

- Gregorius HR. 1978. The concept of genetic diversity and its formal relationship to heterozygosity and genetic distance. *Mathematical Biosciences* 41: 253-271.
- 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.:281-304.
- Hansen, D.R. et al. 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.
- Hensen I, Oberprieler C, Wesche K. 2005. Genetic structure, population size, and seed production of *Pulsatilla vulgaris* Mill. (Ranunculaceae) in Central Germany. *Flora* 200: 3-14.
- Higgins, D., J. Thompson., T. Gibson., J. D. Thompson., D. G. Higgins., and T. J. Gibson, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- Hill B. E., Lythgoe B., Mirvish S., and Trippett S. 1955. Oenanthotoxin and cicutoxin. Part II. The synthesis of cicutoxin and oennantheol. *J. Chem.. Soc.* 1770-1775.
- Hirao, A. S., Y. Kameyama, M. Ohara, Y. Isagi, and G. Kudo. 2006. Seasonal changes in pollinator activity influence pollen dispersal and seed production of the alpine shrub *Rhododendron aureum* (Ericaceae). *Mol. Ecol.* 15: 1165-1173.
- Hong, Y. P., K.-J. Cho, Y.-Y. Kim, E.-M. Shin, and S.-K. Pyo. 2000. Diversity of I-SSR variants in the populations of *Torreya nucifera*. *J. Korean For. Soc.* 89: 167-172.
- Huelsenbeck, J. P., and F. Ronquist, 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny *Bioinformatics*, 17:754-755.
- Kang H, Bawa KS. 2003. Effects of successional status, habit, sexual systems, and pollinators on flowering patterns in tropical rain forest trees. *American Journal of Botany* 90: 865-876.
- Kang H. 1993. Genetic effects on seed and seedling traits of nutmeg (*Torreya nucifera* S.) in Cheju Island. I. Variation in seed weight. *Bulletin of Korean Association of Conservation of Nature Ser* 12: 51-60.
- Kim, J. Y. and N. S. Lee. 1998. A taxonomic study of Korean *Smilacina*. *J. Plant Biol.* 41: 50-58.

- Kim, K.-J., and H.-L. Lee, 2004. Complete chloroplast genome sequences from Korean ginseng (*Panax schinseng* Nees) and comparative analysis of sequence evolution among 17 vascular plants. *DNA Research*, 11:247 - 261.
- Kim, M.-H., J. H. Park, H. Won, and C.-W. Park. 2000. Flavonoid chemistry and chromosome numbers of *Fallopia* section *Pleuropterus* (Polygonaceae). *Can. J. Bot.* 78: 1136-1143.
- Kim, S.-C. and N. S. Lee. 2007. Generic delimitation and biogeography of *Maianthemum* and *Smilacina* (Ruscaceae sensu lato): preliminary results based on partial 3' *matK* gene and *trnK* 3' intron sequences of cpDNA. *Pl. Syst. Evol.* 265: 1-12.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of the base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. of Mol. Evol.* 16:111-120.
- Knutsen O. H. and Paszkowski P. 1984. New aspects in the treatment of water hemlock poisoning. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 22:157-166.
- Kondo K, Tarabayashi S, Okada M, Yuan C, He S. 1996. Phylogenetic relationship of medicinally important *Cnidium officinale* and Japanese Apiaceae based on *rbcl* sequence. *J Plant Res* 109:21-27
- Kron, K. A. 1997. Phylogenetic relationships of *Rhododendroideae* (Ericaceae). *Amer. J. Bot.* 84: 973-980.
- Kudo, G., A. S. Hirao, and Y. Kawai. 2011. Pollination efficiency of bumblebee queens and workers in the alpine shrub *Rhododendron aureum*. *Int. J. Plant Sci.* 172: 70-77.
- Kurashige, Y., J.-I. Etoh, T. Handa, K. Takayanagi, and T. Yukawa. 2001. Sectional relationships in the genus *Rhododendron* (Ericaceae) evidence from *matK* and *trnK* intron sequences. *Pl. Syst. Evol.* 228: 1-14.
- LaFrankie, J. V. Jr. 1986. Transfer of the species of *Smilacina* to *Maianthemum* (Liliaceae). *Taxon* 35: 584-589.
- Le Clerc V, Briard M, Revollon P. 2002. Influence of number and map distribution of AFLP markers on similarity estimates in carrot. *Theor Appl Genet* 106:157-162
- Le Clerc V, Suel A, Briard M. 2005. Identification of duplicates for the optimization of carrot collection management. *Biodiversity and conservation* 14:1211-1223
- Lee C-S, Downie SR. 2006. Phylogenetic relationships within *Cicuta* (Apiaceae tribe Oenantheae) inferred from nuclear rRNA ITS and cpDNA sequence data. *Can J Bot* 84:453-468
- Lee, J and J.R. Manhart. 2001. Transition from aquatic algae to land plants - phylogenomic evidence. Contributed talk will be given at Botany 2001,

Albuquerque, New Mexico, USA.

- 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. 2000. Phylogeny of Charophytes - evidence from the chloroplast genome. Invited talk given at Deep Green - College Park, University of Maryland, USA.
- 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. and J.R. Manhart. 2002a. Four embryophyte introns and psbB operon explains *Chlorokybus* as a basal lineage of streptophytes. *Algae* 17:53-58.
- Lee, J. and J.R. Manhart. 2002b. The Chloroplast rpl23 gene cluster of *Spirogyra maxima*(Charophyceae) shares many similarities with the angiosperm rpl23operon. *Algae* 17:59-68.
- Lee, J. and J.R. Manhart. 2003. Three orf-containing group I introns in chloroplast SSU of *Caulerpa sertularioides* (Ulvophyceae) and their evolutionary implications. *Algae* 18:183-190.
- Lee, S. W., Y. M. Kim, W. W. Kim, S. S. Jang, and J. M. Chung. 2002. Genetic variation and structure of *Rhododendron brachycarpum* D. Don, a rare and endangered tree species in Korea. *Silvae Genetica* 51: 215-219.
- Lee, S.-T. and E. J. Park, 1982a. A Cladistic analysis of the Korean Oleaceae. *Korean J. Bot*, 25:57-64.
- Lee, Y. N. 1993. New Taxa on Korean Flora(5). *Kor. J. Plant Tax.* 23: 263-268.
- Lee, Y. S., J. Oh, Y. U. Kim, N. Kim, S. Yang, and U. W. Hwang, 2007. Mitome: dynamic and interactive database for comparative mitochondrial genomics in metazoan animals. *Nucleic Acid Research*, 36: D938-D942.
- Li, J., Y. S. Choi, I. Kim, H. D. Sohn, and B. R. Jin, 2004. Genetic analysis of the diamondback moth, *Plutella xylostella*, collected from China using mitochondrial COI gene sequence. *Int. J. Indust. Entomol*, 9:137-144.
- Li, J.-H., J. Jiao, K. Jiang, and Y.-Y. Li. 2011. Development and characterization of microsatellites in *Torreya jackii* (Taxaceae), and endangered species in China. *Amer. J. Bot.* e349-351. (doi:10.3732/ajb.1100179)
- Li, Jianhong, Y. S. Choi, I. Kim, H. D. Sohn, and B. R. Jin. 2006. Genetic variation of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) in China inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Eur. J. Entomol.* 103: 605-611.

- Li, L.-F., D.-X. Yin, N. Song, E.-H. Tang, and H.-X. Xiao. 2011. Genomic and EST microsatellites for *Rhododendron aureum* (Ericaceae) and cross-amplification in other congeneric species. Amer. J. Bot. (<http://www.amjbot.org/cgi/doi/10.3732/ajb.1100153>)
- Librado, P., J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics. 25: 1451-1452.
- Liu, T.-T., W.-J. Cheng, S.-B. Zhou, J.-W. Shao, H.-L. Wu, and G.-P. Zhu. 2010. Eleven polymorphic microsatellite loci in *Polygonatum filipes* and cross-amplification in other congeneric species. Conservation Genet. Resour. 2: 77-79.
- Liu, Y-F., M. Xing, W. Zhao, R-J Fan, S. Luo, and X. Chen. 2012. Genetic diversity analysis of *Rhododendron aureum* Georgi (Ericaceae) located on Changbai Mountain using ISSR and RAPD markers. Pl. Syst. Evol. 298: 921-930.
- Lowe, T. M., and S. R. Eddy, 1997. tRNA-scan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. Nucleic Acids Res, 25:955-964.
- Manhart, J.R. and J. Palmer. 1990. The gain of two chloroplast tRNA introns marks the green algal ancestors of land plants. Nature 345:268-270.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook, 1982. Molecular Cloning. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Meng, Y., J. Wen, Z.-L. Nie, H. Sun, Y.-P. Yang. 2008. Phylogeny and biogeographic diversification of *Maianthemum* (Ruscaceae: Polygonatae). Mol. Phylogenet. Evol. 49: 424-434.
- Milligan, B. G., J. Leebens-Mack and A. E. Strand, 1994. Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. Molecular Ecology 12:844-855.
- Minle, R. I. 2004. Phylogeny and biogeography of *Rhododendron* subsection *Pontica*, a group with a tertiary relict distribution. Mol. Phylogenet. Evol. 33: 389-401.
- Moritz, C. 1994. Defining 'evolutionary significant unit' for conservation. Trends Ecol. Evol, 9:373-375.
- Nei, M., 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
- Nicotra A. 1998. Sex ratio variation and spatial distribution of *Siparuna grandiflora*, a tropical dioecious shrub. Oecologia 115: 102-113.
- North D. S. and Nelson R. B. 1985. Anticholinergic agents in cicutoxin poisoning. West J. Med. 143:250.
- Nuñez CI, Nuñez MA, Kitzberger T. 2008. Sex-related spatial segregation and growth in a dioecious conifer along environmental gradients in northwestern Patagonia. Ecoscience 15: 73-80.

- O'Brien SJ. A role for molecular genetics in biological conservation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. 91:5748-5755.
- O'Brien SJ., 1994. Genetic and phylogenetic analyses of endangered species. Annu. Rev. Genet, 28:467-489.
- Panter K. E., Gardner D. R., Stegelmeier B. L., Welch K. D., and Holstege D. 2011. Water hemlock poisoning in cattle: Ingestion of immature *Cicuta maculata* seed as the probable cause. Toxicon. 57: 157-161.
- Panter K. E., Keeler R. F., and Baker D. C. 1988. Toxicoses in livestock from the hemlock (*Conium* and *Cicuta* spp.). J. Anim. Sci. 66: 2407-2413.
- Panter K. E., Keeler R. F., and Buck W. B. 1985. Induction of cleft palate in newborn pigs by maternal ingestion of poison hemlock (*Conium maculatum*). Amer. J Vet Res. 46: 1368-1371.
- Park C-W(ed.). 2007. The genera of vascular plants of Korea. Academy publishing co., Seoul
- Peakall R, Smouse PE. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6: 288-295.
- Powell W, Morgante M, McDevitt R, Venderamin GG, Rafalski JA. 1995. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: application to the population genetics of pines. PNAS 92:7759-7763.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945-959.
- Queenborough SA, Burslem DFRP, Garwood NC, Valencia R. 2007. Determinants of biased sex ratios and inter-sex costs of reproduction in dioecious tropical forest trees. Am J Bot 94: 67-78.
- Rozas, J. and R. Rozas. (1995). DnaSP, DNA sequence polymorphism: an interactive program for estimating Population Genetics parameters from DNA sequence data. Comput. Applic. Biosci. 11: 621-625.
- Ruhlman T, et al. 2006. Complete plastid genome sequence of *Daucus carota*. Implications for biotechnology and phylogeny of angiosperms. *BMC Genomics* 7:222-234
- Rumpho, M.E., J.M. Worful, J. Lee, K. Kannan, M. Tyler, D. Bhattacharya, A. Moustafa, and J.R. Manhart. 2008. Horizontal gene transfer of the algal nuclear gene psbO to the photosynthetic sea slug *Elysia chlorotica*. Proc Natl Acad Sci USA 105:17867-17871.
- Saitou, N, and M. Nei, 1987. The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol, 4:406-425.
- SAS. 2008. SAS/STAT software. Ver. 9.2, SAS Institute, Cary, NC, USA.

- Savolainen, O.; Karkkainen, K. 1992. Effect of forest management on gene pools. *New Forest* 6:329-345.
- Schmidt JP. 2008. Sex ratio and spatial pattern of males and females in the dioecious sandhill shrub, *Ceratiolaericoides* (Empetraceae) Michx. *Plant Ecology* 196: 281-288.
- Starreveld E and Hpoë E. 1975. Cicutoxin poisoning (water hemlock). *Neurology* 25:730.
- Strauss U, Wittstock U, Schubert R, Teuscher E, Jung S, and Mix E. Cicutoxin from *Cicuta virosa*--a new and potent potassium channel blocker in T lymphocytes. *Biochem Biophysics Res Commun.* 219: 332-336.
- Swofford D.L. 2002. PAUP\* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\* and Other Methods) Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taberlet. P. and J. Bouvet, 1994. Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear *Urus arctos* in Europe. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 255:195-200.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599
- Terasaka O. 1982. Nuclear differentiation of male gametophytes in gymnosperms. *Cytologia* 47: 27-46.
- Thomas SC, LaFrankie JV. 1993. Sex, size, and interyear variation in flowering among dioecious trees of the Malayan rain forest. *Ecology* 74: 529-537.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24: 173-216.
- Vamosi JC, Vamoni SM. 2005. Present day risk of extinction may exacerbate the lower species richness of dioecious clades. *Diversity and Distribution* 11: 25-32.
- Vergeer P, Rengelink R, Copal A, Ouborg NJ. 2003. The interacting effects of genetic variation, habitat quality and population size on performance of *Succisa pratensis*. *Journal of Ecology* 91: 18-26.
- Vergeer P, Rengelink R, Copal A, Ouborg NJ. 2003. The interacting effects of genetic variation, habitat quality and population size in performance of *Succisa pratensis*. *Journal of Ecology* 91: 18-26.
- Weir, B. S., and C. C. Cockerham, 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Wiegand T, Moloney KA. 2004. Rings, circles, and null-models for point pattern analysis in ecology. *Oikos* 104: 209-229.

- Wiegand T. 2010. Programita, a software to perform point pattern analysis with Ripley's L and O-ring statistic. Dept. of Ecological Modelling, UFZ-Centre for Environmental Research, Leipzig, Germany.
- Wilson, A. S. G., B. J. van der Kamo, and C. Ritland. 2005. Spatial genetic and clonal structure in *Maianthemum dilatatum* as defined by AFLP markers. *Can. J. Bot.* 83: 1126-1132.
- Yeh FC, Yang R, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular biology and biotechnology centre. University of Alberta, Canada.
- Yi, D.-K., H.-L. Lee, B.-Y. Sun, M. Y. Chung, and K.-J. Kim. 2012. The complete chloroplast DNA sequence of *Eleutherococcus senticosus* (Araliaceae); comparative evolutionary analyses with other three asterids. *Mol. Cells.* 33: 497-508.

## VI. 부록

세계가 찾는 제주, 세계로 가는 제주,



### 제주특별자치도

수신자 세계자연 유산관리단장

(경유)

제목 국가지정(등록)문화재 현상변경 허가신청 허가(비자림 강혜순)

#### 『공정한 사회로 더 큰 희망, 활기찬 제주』

1. 세계자연유산관리단-4355(2012.04.18)호의 관련입니다.
2. 천연기념물 제374호 제주 평대리 비자나무숲 내 비자나무 잎 채집과 관련하여 동물, 식물, 광물 오리 포획 채취 반출 허가신청건에 대하여 아래와 같이 허가하오니 동 사항이 충실히 이행될 수 있도록 지도, 감독에 만전을 기하여 주시기 바랍니다.  
가. 허가받는 사람 : 성신여자대학교 강혜순  
나. 허가내용 및 허가조건 : 붙임 참조

붙임 : 국가지정(등록)문화재 현상변경 등의 허가서 1부. 끝.」

- \* 부당한 행정처리, 공무원의 비리가 있을 경우에는 신고하여 주시기 바랍니다.
- \* 신고자는 어떠한 불이익도 받지 않도록 신분에 대하여 비밀을 철저히 보장합니다.
- \* 신고처 : 공직자비리신고센터 (<http://www.jeu.go.kr> : 감사위원회 064-710-6167)  
감찰팀 직통전화 064-710-3650  
- 정렬한 제주, 무죄 ZERO 실천에 적극 노력하겠습니다. -

문화정책

주무관 **고봉연** 문화재보수담당 **김승자** 문화정책과장 **이규봉** 0420

협조자

시행 문화정책과-5668 (2012. 04. 23.) 접수 세계자연유산관리단-4598 (2012. 04. 24.)  
우 690-700 제주도 연동 제주도 문연로1 / [www.jeu.go.kr](http://www.jeu.go.kr)  
전화 710-8428 전송 710-8419 / [kobone@korea.kr](mailto:kobone@korea.kr) / 대한민국 공가

내리는 물 안전하게, 흐르는 물 깨끗하게



## 원주지방환경청



수신 원효식 귀하  
(경유)

제목 멸종위기야생식물 채취 등 허가 알림

1. 귀하가 신청한 멸종위기야생식물(노랑만병초 등) 채취·보관과 관련하여 야생동·식물보호법 제14조제1항 및 같은 법 시행규칙 제13조제2항에 따라 불임과 같이 허가하오니, 허가조건을 철저히 이행하여 주시고,
2. 채취 후 5일 이내에 채취 개체수 및 장소 등을 기재한 신고내역서를 우리 청으로 제출하여 주시기 바랍니다.

불임 허가증(2012-15호) 1부. 끝.

원주지방환경청장



주무관 장경호 과장 전결 2012. 6. 25.  
최재윤


협조자

시행 자연환경과-1274 (2012. 6. 25.) 접수  
우 220-040 강원 원주시 명륜동 원주지방환경청 / http://wonju.me.go.kr  
전화번호 033-760-6010 팩스번호 033-765-1326 / jjh4054@me.go.kr / 비공개(5)

Me First, 녹색은 생활이다 !

[별지 제9호서식]

(앞 쪽)

허가번호 제2012-15호	멸종위기 야생동·식물	<input type="checkbox"/> 포획 <input checked="" type="checkbox"/> 채취 <input type="checkbox"/> 방사 <input type="checkbox"/> 이식 <input type="checkbox"/> 가공 <input type="checkbox"/> 유통 <input checked="" type="checkbox"/> 보관 <input type="checkbox"/> 수출 <input type="checkbox"/> 수입 <input type="checkbox"/> 반출 <input type="checkbox"/> 허가증 <input type="checkbox"/> 반입 <input type="checkbox"/> 훼손 <input type="checkbox"/> 고사	
성명(대표자)	원효식	생년월일	700310-*****
상호(명칭)	대구대학교	전화	053-850-6451, 010-3609-6451
주소	경북 경산시 진량읍 내리리 15 대구대학교 자연대 생명과학과		
허가사항	대상지역	불임 참조	
	대상종명	독미나리, 노랑만병초	
	수량	불임 참조	허가기간 채취: 허가일~12.10.31. 보관: 영구
	목적·용도	학술연구용	
허가조건	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 허가 목적 이외 타 용도로의 사용 및 분양·양도가 불가함</li> <li>· 채취로 인해 자생지 종 보전에 지장을 초래하거나 생존에 위협을 주는 행위를 하여서는 아니 됨.</li> <li>· 노랑만병초의 경우 개체군의 현황을 조사하여 종자 수량은 10g 이하로, 삽수는 10개 이하로 채취 수량 조정이 필요하며, 채취 시 설악산국립공원사무소 직원, 전문가와 동행하여야 함</li> <li>· 노랑만병초에 대한 학술연구 관련 국립공원관리공단 자원보존부-1285호(2012. 5. 9)의 승인조건을 준수하여야 함</li> <li>· 상기 허가조건 및 야생동·식물보호법, 자연환경보전법 등 환경 관련법규를 위반할 경우 본 허가를 취소할 수 있음</li> </ul>		
<p>「야생동·식물보호법」 제14조제1항 및 동법 시행규칙 제13조제2항의 규정에 의하여 멸종위기야생동·식물의 <input type="checkbox"/>포획 <input checked="" type="checkbox"/>채취 <input type="checkbox"/>방사 <input type="checkbox"/>이식 <input type="checkbox"/>가공 <input type="checkbox"/>유통 <input checked="" type="checkbox"/>보관 <input type="checkbox"/>수출 <input type="checkbox"/>수입 <input type="checkbox"/>반출 <input type="checkbox"/>반입 <input type="checkbox"/>훼손 <input type="checkbox"/>고사를 허가합니다.</p> <p style="text-align: center;">2012년 6월 25일</p> <p style="text-align: center;"><b>원주지방환경청장</b> </p> <p style="text-align: center;">유의사항</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 멸종위기야생동·식물의 포획·채취등을 하는 때에는 허가증을 휴대하여야 합니다.</li> <li>2. 포획·채취 등을 한 멸종위기야생동·식물은 5일 이내에 원주지방환경청장에게 신고하여야 합니다.</li> <li>3. 화약류·땃·울무·그물·함정을 설치하거나 유독물·농약 등을 살포 또는 주입하는 방법으로 멸종위기야생동·식물을 포획하지 못합니다.</li> <li>4. 허가증이 그 효력을 상실한 경우에는 30일 이내에 원주지방환경청장에게 반납하여야 합니다.</li> </ol>			

<붙임>

### <채취 등 허가 내역>

분류	허가종	대상지역	신청수량	허가내역 (지역, 수량)
식물	독미나리	- 황성군 둔내면 현천리 일대 - 강릉시 왕산면 대기리 일대 - 평창군 대관령면 차항리 일대	- 잎 30개 - 전초 2개체	- 신청내용과 동일
	노랑만병초	- 설악산 일원	- 가지 2개 - 잎 30개 - 종자 100g - 삼목 10개	- 가지 2개 - 잎 30개 - 종자 10g 이하 - 삼목 10개 미만