



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

교육학 석사학위논문

한국산 멸종위기종
죽절초(*Sarcandra glabra*)의 유전적
다양성 평가 및 엽록체 유전체 분석

전남대학교 대학원

과학교육학과

한 은 경

2018년 8월

한국산 멸종위기종
죽절초(*Sarcandra glabra*)의 유전적
다양성 평가 및 엽록체 유전체 분석

이 논문을 과학교육학과 석사학위 논문으로 제출함

전남대학교 대학원
과학교육학과
한 은 경
지도교수 이 정 현

한은경의 과학교육학과 석사의 학위논문을 인준함

심 사 위 원 장 유 형 빈



심 사 위 원 임 형 탁



심 사 위 원 이 정 현



2018년 8월

목 차

국문초록	v
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 연구 재료 수집	5
2. 죽절초의 microsatellite 마커 개발	7
가. DNA 추출 및 유전체 염기서열 분석	8
나. microsatellite 유전자위 선별	9
다. primer 제작	10
라. 유용성 검증 및 microsatellite 마커 선정	11
3. 죽절초 집단의 유전적 다양성 평가	12
가. 선별된 microsatellite 마커 적용	12
나. 죽절초 집단의 유전적 다양성 분석	12
4. 죽절초의 엽록체 유전체 분석	13
III. 결과	16
1. 죽절초 전수조사 결과	16
2. 죽절초의 microsatellite 마커 개발 결과	19
가. primer 제작 결과	19

나. 유용성 검정 결과 및 선정된 microsatellite 마커	19
3. 죽절초 집단의 유전적 다양성 평가 결과	24
4. 죽절초의 엽록체 유전체 분석 결과	29
IV. 고찰	35
인 용 문 헌	38
영 문 초 록	43

그림차례

그림 1. 죽절초 제주 집단 조사지역	6
그림 2. microsatellite 마커 개발 흐름도	7
그림 3. primer 제작	10
그림 4. 죽절초의 제주 분포지역	17
그림 5. 죽절초의 제주 전수조사 결과	18
그림 6. 개발된 죽절초 microsatellite 마커의 다형성	20
그림 7. 죽절초 집단의 Structure 분석 결과	28
그림 8. 죽절초의 염색체 유전체 지도	32
그림 9. 죽절초 및 근연종의 공통된 74개의 protein coding genes로 작성된 계통수	34

표 차 례

표 1. SSR_pipeline을 통해 확보된 죽절초의 library	9
표 2. 죽절초의 계통 분석에 이용된 분류군 및 GenBank accession numbers	14
표 3. 죽절초의 계통 분석에 이용된 74개의 protein coding genes	15
표 4. 죽절초의 제주 전수조사 지역 및 개체 수	16
표 5. 죽절초에서 개발된 33개의 microsatellite 마커	21
표 6. 개발된 죽절초의 microsatellite 마커의 특징	25
표 7. 죽절초 집단별 유전적 다양성 통계치	27
표 8. 죽절초 집단의 AMOVA 분석 결과	27
표 9. 죽절초의 엽록체 유전체 구조 정보	29
표 10. 죽절초 엽록체 유전체 상의 유전자 목록	30

한국산 멸종위기종 죽절초(*Sarcandra glabra*)의 유전적 다양성 평가 및 엽록체 유전체 분석

한 은 경

전남대학교대학원
과학교육학과
(지도교수 : 이정현)

(국문초록)

홀아비꽃대과(Chloranthaceae)의 죽절초(*Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai)는 상록활엽관목 식물로, 아시아의 아열대 지역에 넓게 분포하는 종이다. 한반도에서는 제주의 일부 지역에 국한되어 자라는데, 이 지역은 죽절초의 분포북한계 지로서 매우 중요한 의미를 갖는다. 그러나 최근 남획, 자생지 훼손 등 인위적 간섭으로 인해 제주의 개체 수는 급감하고 있어 이들 개체군의 안정적 성장을 위한 효과적 보전전략 마련이 절실히 필요하다. 따라서 본 연구에서는 첫째, 개체군의 쇠퇴 및 성장을 가늠할 수 있는 지표 마련을 위해 제주산 죽절초의 총 개체 수를 파악하고자 하였다. 둘째, 유전적 데이터를 기초로 효과적 보전전략을 제시하기 위해, 제주 및 국외 개체군의 유전적 다양성을 평가 비교 분석하였다. 마지막으로 속씨식물 내의 죽절초의 계통학적 위치를 확인하기 위해 엽록체 유전체 지도를 완성하여, 죽절초를 포함한 총 13종의 엽록체 유전체를 비교 분석하였다.

조사 결과 제주 내에는 서귀포시 상효동 등지에 총 132개체가 자생하고 있는 것으로 확인되었다. 복원집단의 경우 여미지식물원에서 기존 자생지인 제9산록교 부근에 복원한 것으로 63개체가 확인되었고, 국립산림과학원 난대아열대산림

연구소에서 기존 자생지가 아닌 상호교 부근에 복원한 것으로 28개체가 확인되었다.

유전적 다양성 분석은 본 연구에서 개발된 25개의 마이크로새틀라이트 마커를 이용하여 제주 4개 집단(자생 2, 자생지 내 복원 1, 자생지 외 복원 1)과 국외(일본) 1개 집단에 적용하였다. 분석 결과 제주 집단($H_E = 0.121$, $I = 0.198$)이 일본 집단($H_E = 0.397$, $I = 0.713$)에 비해 다양성이 매우 낮게 나타났다. 한편 제주 집단의 경우 자생지 내 복원집단($H_E = 0.283$, $I = 0.490$)이 자생집단($H_E = 0.070$, $I = 0.110$)과 자생지 외 복원집단($H_E = 0.060$, $I = 0.083$)에 비해 상대적으로 높은 유전적 다양성을 나타냈다. Structure 프로그램을 이용한 유전적 구조 분석 결과 제주 자생집단과 자생지 외 복원집단이 하나의 분기군을 형성하였고, 자생지 내 복원집단 그리고 일본 집단이 각각 서로 다른 분기군을 형성하여 총 3개의 분기군이 나타났다.

죽절초의 엽록체 유전체는 158,881 bp이고, 39.2%의 GC 함량을 가졌다. LSC 영역은 88,169 bp, SSC 영역은 18,446 bp, IR 두 영역은 각 26,133 bp으로 확인되었다. 죽절초 엽록체 상의 유전자는 총 130개로, protein coding genes 85개, transfer RNA 37개, ribosomal RNA 8개를 포함하였다. ML 분석 결과는 죽절초가 홀아비꽃대속(*Chloranthus*)과 함께 단계통을 형성하고 목련군(Magnoliids)과 자매군을 형성하면서 속씨식물의 진화에서 초기에 분기된 계통임을 지지하였다.

본 연구에서는 이상의 결과를 통해 제주산 죽절초 개체군 동태를 파악하기 위한 기초자료를 마련하였으며 유전적 측면을 고려하여 보전전략을 논의하였다. 제주 집단의 유전적 다양성과 구조를 종합하여 볼 때, 제주 집단의 국외 집단과의 유전적 이질성은 제주지역 환경에 맞춰 독특하게 진화한 결과라 볼 수 있다. 그러나 제주의 자생지 내 복원집단이 자생집단과 유전적 이질성을 보이는 것은 매우 의미하는 바가 크다. 북한계지역 집단의 경우 유전적 독특성이 종의 분포확장 및 종의 생존에 직결되는 유전적 원천이라 할 수 있다. 따라서 제주산 죽절초의 안정적 성장을 위해 우선 선행되어야 할 효과적 보전전략은 자생집단과 유사한 구조를 갖도록 자생지 내 복원집단의 유전적 동질화를 이루는 것이라 할 수 있다.

I. 서론

죽절초(*Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai)는 홀아비꽃대과(Chloranthaceae) 죽절초속(*Sarcandra*)에 속하는 상록활엽관목 식물이다. 죽절초는 툰베르그(C. P. Thunberg)에 의해 진달래과 자금우속 식물인 *Bladhia glabra* Thunb.로 1794년 처음 기록되었고, 1912년 마키노(T. Makino)가 홀아비꽃대과 홀아비꽃대속 식물인 *Chloranthus glaber* (Thunb.) Makino로 정정 기재하였다. 이후 1930년 나카이(T. Nakai)가 홀아비꽃대과 죽절초속으로 분류하면서 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai라는 학명을 제시하였다. 죽절초(竹節草)는 꽃잎과 꽃받침이 없고 관다발 목질부가 물관 대신 헛물관으로 구성되어 있는 특징으로(Takahashi, 1988) APG IV 분류 체계에서 원시적인 속씨식물로 분류된다.

죽절초(*S. glabra*)는 일본, 중국 남부, 베트남, 인도, 캄보디아, 필리핀 등의 아열대 지역에 널리 분포하는 식물이다(Xia and Jérémie, 1999). 식물구계학적 으로 한반도는 8개의 아구계로 나뉘는데(Lee and Im, 2002), 이 중 아열대 지역과 가장 유사한 지역은 난온대 상록활엽수림이 발달한 남해안아구계, 제주아구계 그리고 울릉아구계 등으로, 이들 지역에 죽절초의 분포가 예상된다. 그러나 현재까지 보고된 바에 의하면 죽절초는 제주의 일부 지역에 국한되어 자라는 것으로 알려져 있다. 이 지역은 죽절초의 분포북한계지로서 매우 중요한 의미를 갖는다. 한편 최근 전라남도 신안군 가거도에 죽절초가 분포하는 것으로 보고된 바 있다(Kim et al., 2012). 한반도의 경우 이 종은 주로 저지대의 계곡사면이나 능선의 상록수림 하에 서식하는 것으로 알려져 있다(Song et al., 2012).

죽절초는 잎 위로 올라온 붉은 열매가 겨울동안에 붙어 있어 관상 가치가 높아 우리나라에서는 관상 및 조경 식물로 알려져 있으며(Kil et al., 2012), 일본에서는 정월초 집안에 장식하는 풍습에 따라 장식용 식물로 많이 이용된다(Krussmann, 1984). 또한 중국에서는 죽절초를 오래전부터 한약재로 사용하여 왔으며, 죽절초 추출물의 약리성분에 관한 활발한 연구를 통해 죽절초의 성분이 항산화 효과와 암 치료, 고지혈증 치료, 염증 치료에 효과적이라는 것을 입증하였다(Chinese Pharmacopoeia Commission, 2010; He et al., 2009; Zhou et

al., 2013). 이처럼 죽절초는 열매가 아름다운 식물로서 관상 가치가 높고, 다양한 효능으로 약용 가치가 높아 활용 가능성이 큰 식물자원이다. 그러나 국내에서 죽절초가 조경 식물로의 인식이 증가되면서 한정적인 서식지 내에서 무분별한 채취가 일어나 자생지가 파괴되고 개체 수가 현저히 줄어들게 되어 멸종될 우려가 높아졌으며, 현재 죽절초는 멸종위기 야생생물 II급 및 국가적색목록 위기(Endangered; EN)종으로 지정되어 보호되고 있다(Ministry of the Environment of Korea, 2012). 최근에는 죽절초의 개체 수가 급감함에 따라 죽절초를 보전하기 위한 자생지 복원사업이 진행되고 있다.

분포의 경계에 있는 집단의 경우 보전과 관련하여 논쟁이 있다. 일반적으로, 경계 집단의 경우 크기가 작고 유전적 다양성이 낮아 쉽게 자연적으로 절멸이 예상되어 중요성이 낮게 평가되어 왔다(Hoffman and Blows, 1994; Lesica and Allendorf, 1995). 그러나 최근 분포의 경계 집단의 보전과 관련하여 그 중요성이 점차적으로 부각되고 있다(Cassel-Lundhagen et al., 2009; Zigouris et al., 2012). 경계 집단의 보전 가치는 분포의 중심 집단과 유전적으로 분기 되었을 때 가치를 가지게 된다(Lesica and Allendorf, 1995). 경계 집단의 유전적 독특성은 그 지역특유의 환경에 맞게 유전적 변이가 축적된 결과라 할 수 있으며, 이러한 유전적 결과물은 종의 분포확장을 가능케 하고, 급격한 환경변화에 대응할 수 있도록 한다(Zigouris et al., 2012). 그러나 한반도에서 진행되는 멸종위기종 복원사업의 경우 종의 유전적 특성에 대한 고려 없이, 개체 수 확장에 치중한 멸종위기종의 복원이 이루어지고 있으며, 이러한 복원은 오히려 생물의 생존에 악영향을 끼칠 수 있다. 한 해외 사례의 경우 멸종위기종인 Catalina mahogany (*Cercocarpus traskiae* Eastw.)의 보전을 위해 충분한 유전정보 없이 복원한 결과 Catalina mahogany와 Mountain mahogany (*C. betuloides* Nutt.)의 hybrids가 포함되었으며, hybrids는 종의 특정 경계를 흐리게 만들어 경우에 따라 종 보전에 중대한 위협을 제기할 수 있다(Rieseberg and Swensen, 1996; Ellestrand et al., 1999). 이러한 사례는 종의 효과적인 보전을 위해서 유전적 특성에 대한 정보가 반드시 필요함을 분명히 보여준다. 따라서 종의 보전을 위해서는 종의 유전적 특성을 이해하고 유전적 다양성을 평가하는 것이 필수적으로 선행되어야 한다.

생물 종의 유전적 특성을 분석하기 위해 allozyme, ISSR, RAPD, SNP, microsatellite 등과 같은 DNA 마커가 개발되어 사용되고 있다. Microsatellite는 1~6개의 짧은 반복 배열 구조를 가지는 SSR (Simple Sequence Repeat) 염기서열로서, microsatellite 부위의 반복수가 집단, 종간 및 개체에서도 다양한 차이를 보여 매우 유용한 분자 식별마커이다. microsatellite는 대부분의 진핵생물 genom 전반에 풍부하게 존재하며, 유전자 전체에 걸쳐(약 90%) non-coding 지역에 나타나기 때문에 고도의 다형성을 가지며 실험적 재현성이 뛰어나 유전적 구조 결정과 종내 집단 간 다양성 비교가 가능하다(Selkoe and Toonen, 2006). 최근에는 차세대 염기서열 분석(Next Generation Sequencing, NGS)를 이용한 microsatellite 마커 개발이 활발히 진행되고 있다. NGS는 단시간에 대용량의 염기서열 정보를 획득할 수 있는 sequencing 기술로, NGS를 이용한 microsatellite 마커 개발은 비용 효과적이며 대량의 염기서열 정보를 통해 대량의 microsatellite 부위를 선별할 수 있다(Yun et al., 2011). 국내뿐만 아니라 해외에서도 멸종위기종의 유전자 이동 변화 및 집단구조 분석, 유전적 다양성 평가에서 NGS를 이용한 microsatellite 마커가 많이 활용되고 있다(Csencsics et al., 2010; Lee et al., 2017).

죽절초의 유전적 다양성에 대한 연구는 중국에서 진행된 바 있다. 중국 내 죽절초 개체 수가 급격히 감소함에 따라 집단의 보전을 위해 10개의 ISSR 마커를 사용하여 중국 집단의 유전적 다양성을 분석하였으며(Ni et al., 2008), 죽절초의 microsatellite 마커 42개를 개발하여 Jiangxi 지역의 33개체에 적용한 결과 10개의 마커에서 다형성이 확인된 바 있다(Xu et al., 2015). 그러나 우리나라에서는 죽절초의 생육에 관한 연구가 진행된 적 있으나(Kil et al., 2012; Lee et al., 2018), 집단 분석이나 유전적 다양성 평가에 대한 연구가 아직 수행된 바 없다.

엽록체 유전체는 120~180 Kb 정도의 circular DNA로, LSC (large single copy)와 SSC (small single copy), 한 쌍의 역방향반복배열인 IR (inverted repeat) 영역으로 구성된다. 엽록체 유전체에는 ATPase계, 광화학계(I, II), 전자전달계, 리보솜 단백질, RNA 중합효소 등의 유전자가 포함되어 있다. 엽록체 유전체의 유전정보는 변칙성 없이 잘 보존된 것이 일반적으로 종간 변이가 거의 없다. 이와 같은 특징으로 엽록체 염기서열과 유전적 정보조사 연구를 통해 종내

유전자원의 특성을 파악할 수 있고 종간의 특성을 비교하여 유연관계 및 계통학적 위치를 밝힐 수 있다. 죽절초가 속한 홀아비꽃대목(Chloranthales)은 기저 속씨식물로서 다른 원시적인 속씨식물과의 연관성이 다소 불분명하여 계통학적 위치가 계속 논의되어 왔다(Hansen et al., 2007). 죽절초의 엽록체 유전체에 대한 연구가 홀아비꽃대목(Chloranthales)의 계통학적 위치와 기저 속씨식물의 연관성을 이해하는 데 기초 자료로 활용될 수 있다.

이에 따라 본 연구에서는 죽절초의 자생지 개체 전수조사를 통해 제주에 분포하는 개체수를 파악하고 개체군의 정보를 획득하고자 한다. 또한 microsatellite 마커를 개발하여 죽절초 집단의 유전적 다양성 평가를 수행하고, 그 결과를 토대로 지속가능한 보전 및 복원 방안을 제시하고자 한다. 더 나아가 죽절초의 엽록체 유전체 지도를 완성하고 근연종과의 계통분석을 통해 종의 계통학적 위치를 확인하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 연구 재료 수집

죽절초의 국내 분포를 확인하기 위해 문헌 및 표본 자료를 조사한 결과 죽절초는 제주 서귀포시 상호동 등지에 낮은 지대 하천을 따라 매우 드물게 존재하는 것으로 확인되었다(그림 1). 본 연구종은 환경부 멸종위기 야생생물 II급(2005년)으로 지정되어 멸종위기 야생생물 채취 허가를 취득한 후 전수조사를 실시하였다.

현지조사는 표본 및 문헌 자료를 토대로 조사된 자생지에 대하여 2017년 12월부터 2018년 5월까지 제주 돈내코 주변 및 상호동 일대의 곳자왓 지역에서 자생지 전수조사를 실시하였다. 전수조사는 약 30cm 이하의 어린 개체를 제외한 생식기관이 발달한 성체만을 대상으로 하였으며, GPSMAP 64st (Garmin, USA) 장비를 이용하여 각 개체의 좌표 및 공간 정보를 획득하였다. 멸종위기종인 연구종의 피해를 최소화하기 위해 각 개체로부터 DNA 분석을 위한 잎 시료만을 절단 수집하여 연구에 사용하였다. 또한 최근 죽절초 자생지 복원 사업으로 제주 서귀포시 일부 지역에 개체를 복원함에 따라 자생집단 내, 복원집단 내, 자생집단과 복원집단 간의 유전적 다양성을 비교하기 위해 복원지역의 개체를 조사대상에 포함시켰다. 죽절초의 자생집단 및 복원집단에서 수집된 총 223개체의 잎 시료는 실리카겔(silicagel)에 넣어 건조 보관시킨 후 전남대학교 생물교육과 식물분류학실험실의 표본실(BEC)에 보관하였다.

죽절초 국외 집단과의 유전적 다양성 비교는 기존 한국한의학연구원 연구진에 의해 일본 류큐(沖繩島) 지역(Benoki, Kunigami-son, Kunigami-gun, Okinawa-ken, Japan)에서 수집된 30개체의 잎 시료를 이용하였으며, 증거 표본은 한국한의학연구원의 한약표준표본관(KIOM: YSG_KIOM-2015-61)에 보관되어 있다.

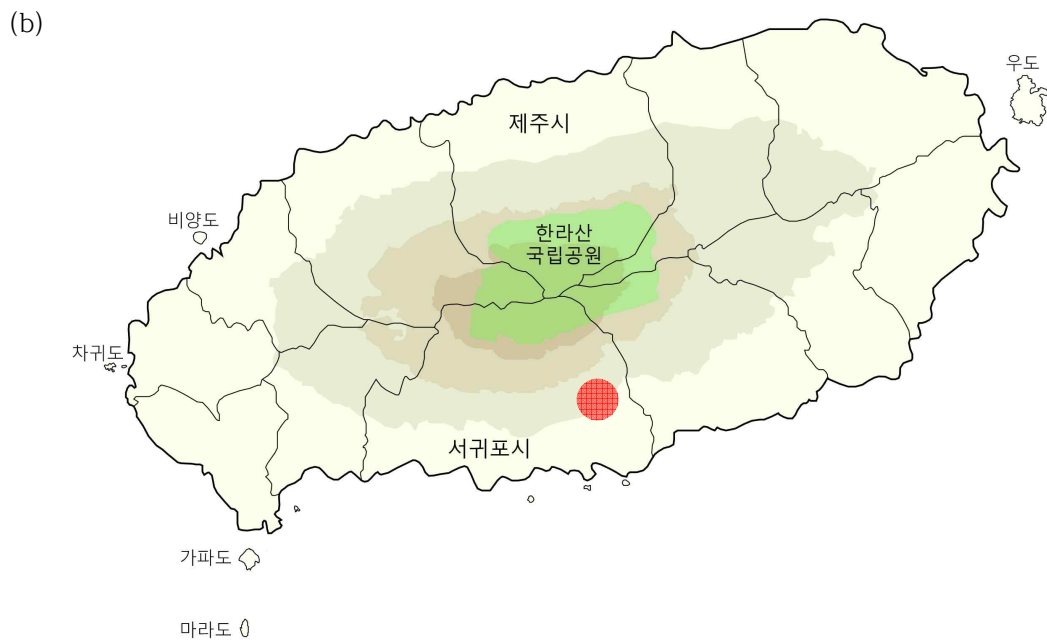
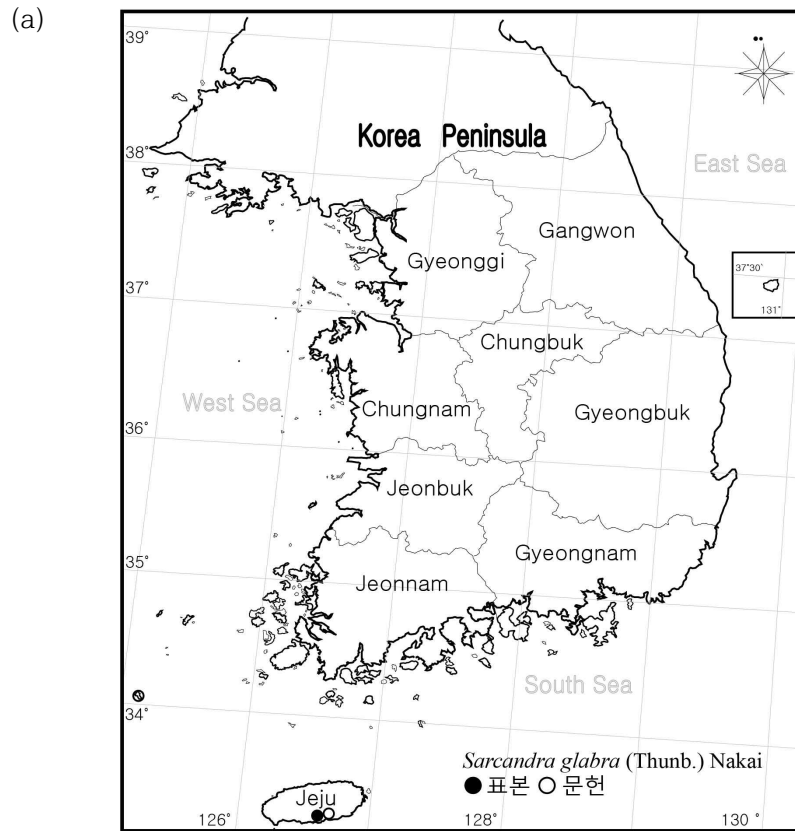


그림 1. 죽절초 제주 집단 조사지역 (a) 표본 및 문헌조사 결과 (b) 자생지역

2. 죽절초의 microsatellite 마커 개발

죽절초 집단의 유전적 다양성을 비교하기 위해 차세대 염기서열 분석(NGS) 통해 얻어진 유전체 염기서열 데이터를 기초로 하여 microsatellite 마커를 개발하였다. DNA 추출, NGS 데이터 분석, microsatellite 유전자위 선별, primer 제작, microsatellite 유용성 검증 과정을 거쳐 microsatellite 마커를 개발하였다 (그림 2).

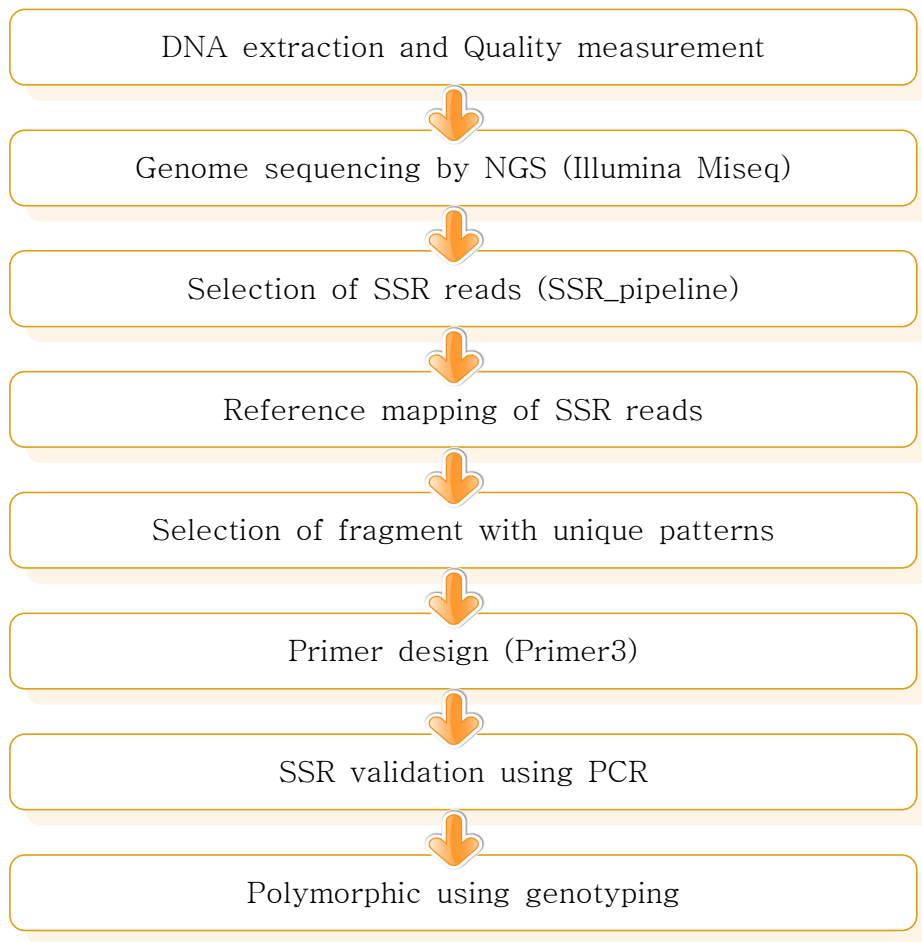


그림 2. microsatellite 마커 개발 흐름도

가. DNA 추출 및 유전체 염기서열 분석

죽절초의 NGS library 확보 및 개발된 microsatellite의 유용성 검정 과정에 사용하기 위해 죽절초의 잎 시료에서 DNA를 추출하였다. 채집 직후 실리카겔로 건조 보관되어 있던 제주 집단 223개체의 잎 시료와 일본 집단 30개체의 잎 시료에서 DNA를 추출하였다. Bead Blaster™ 24 Microtube Homogenizer (Benchmark Scientific, USA)로 각 개체의 잎을 파쇄 한 다음, MG™ Plant SV (MGmed, Seoul, Korea)를 사용하여 해당 protocol에 따라 각 개체에서 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 DNA의 농도는 Micro-Spectrophotometer Nano-300 (Allsheng, Hangzhou, China)을 사용하여 정량하였으며, 이후 추출된 genomic DNA의 농도가 15~20ng/μl 되도록 3차 증류수로 희석하였다.

죽절초의 NGS 분석에 사용할 DNA는 일본 류큐 지역에서 채집된 개체의 잎 시료에서 추출하였다. 추출된 genomic DNA의 농도를 극미량 분광광도계 (Micro-Spectrophotometer)를 이용하여 측정하였으며, 13.54ng/μL, A260/280 = 1.57, A260/230 = 0.88로 확인되었다. 추출된 DNA는 NGS 방법을 적용한 분석 장비인 Illumina사의 MiSeq platform (LAS, Seoul, Korea)을 사용하여 sequencing이 수행되었고, 그 결과 paired-end된 12,611,114 (2 X 300 bp)개의 read가 산출되었다.

나. microsatellite 유전자위 선별

SSR_pipeline v.0951 (Miller et al., 2013)을 이용하여 NGS를 통해 산출된 read들 중에서 microsatellite 부위를 가지는 read를 선별하였다. 선별 조건은 di-, tri-, tetra-의 반복염기서열이 최소 10, 6, 4번 이상 반복되며, 최소 100 bp보다 더 큰 양 옆 보전적인 부위를 갖는 염기서열로 설정하였다. 이 선별 검사로부터 반복염기서열을 가지는 43,080개의 read를 얻었다(표 1).

얻어진 염기서열은 약 100개 단위로 그룹화 한 후, Geneious R11.0.5 (Kearse et al., 2012)의 reference-guide mapping을 이용하여 total NGS 데이터와 assembly되었다. reference-map된 결과에서 반복 부위에 길이 변이를 보이며, primer가 부착될 부위와 microsatellite 부위에 치환이 없고, 인접 부위에 추가적인 단일 뉴클레오타이드 다형성이 없는 read를 최종적으로 선택했다.

표 1. SSR_pipeline을 통해 확보된 죽절초의 library

Repeat motif length	Minimum number of repeat units	Length of flanking sequences	Reads
2-mer	10 repeat	100	14,771
3-mer	6 repeat	100	16,175
4-mer	4 repeat	100	12,134
Total			43,080

다. primer 제작

최종 선택된 read를 바탕으로 Primer3 version 0.4.0 software (Rozen and Skaletsky, 2000)을 이용하여 primer를 제작하였다. 효과적인 primer 제작을 위해 primer size는 18~22 bp, T_m (Melting Temperature)는 53~60°C, GC 함량은 35~65%로 조건을 설정하였다. fragment size는 100~200 bp가 되도록 microsatellite의 양 보전적인 부위에 primer를 제작하였다(그림 3). 각 primer의 길이와 형광 염료별 Multi-plex PCR을 실시하기 위해 제작된 forward primer의 5' 위치에 3종류의 M13 tag sequence (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3', 5'-TGTGGAATTGTGAGCGG-3', 5'-CTATAGGGCACGCGTGGT-3')을 붙여 합성하였다.

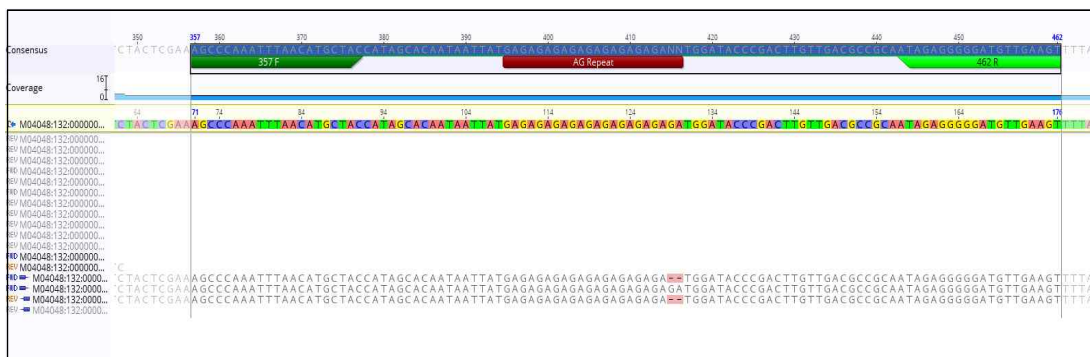


그림 3. primer 제작(예 SaG007_GA 11번 반복)

라. 유용성 검증 및 microsatellite 마커 선정

제작된 microsatellite 마커의 유용성을 알아보기 위해 일본 집단 30개체에 대해 PCR 증폭을 실행하였다. PCR은 QIAGEN Multiplex PCR kit (Qiagen, Seoul, Korea)의 Multiplex PCR Master Mix를 사용하여 진행하였고, Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에서 수행되었다. PCR 반응물의 최종 부피는 $5\mu\text{l}$ 로 제작하였으며, $15\sim 20\text{ng}/\mu\text{l}$ 의 추출된 gDNA $1\mu\text{l}$, Multiplex PCR Master Mix $2.5\mu\text{l}$, forward primer $0.05\mu\text{l}$, reverse primer $0.10\mu\text{l}$, M13 Fluorescent dye primer (6-FAM, VIC, NED) 각 $0.05\mu\text{l}$ 씩 총 $0.15\mu\text{l}$ 가 포함되었다. PCR 조건은 1단계로 95°C 에서 15분간 초기 변성하고, 2단계로 95°C 에서 30초간 denaturation, 56°C 로 1분30초간 annealing, 72°C 에서 1분간 extension 하였다. 2단계는 35 cycle 반복되었으며 그 후 3단계로 72°C 에서 10분간 유지하였다.

PCR 반응을 통해 증폭된 microsatellite 구간의 길이를 측정하기 위해 PCR 결과물에 GeneScanTM-500LIZTM Size Standard (Applied Biosystems)로 기준 설정하고, ABI 3730XL sequencer (Applied Biosystems)에서 fragment size를 분석하였다. Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems)를 이용하여 유전자 좌위(loci)별 peak를 선별한 후 대립유전자 크기를 선정하고 각 마커별 염기서열의 길이 변화를 조사하였다. 조사된 결과를 토대로 염기서열 길이에 다형성을 보이는 마커를 선정하였다.

3. 죽절초 집단의 유전적 다양성 평가

가. 선별된 microsatellite 마커 적용

죽절초 제주 집단의 유전적 다양성을 평가하기 위해 앞서 유용한 마커로 선정된 microsatellite 마커에서 반응 효율이 좋은 마커를 선별한 후, 제주 집단의 총 223개체(자생집단 132개체, 자생지 내 복원집단 63개체, 자생지 외 복원집단 28개체)에 대해 PCR 증폭을 수행하였다. PCR 반응물과 PCR 조건은 상기의 방법과 동일하게 처리하여 PCR을 진행하였으며, ABI 3730XL sequencer (Applied Biosystems)를 이용하여 PCR 반응을 통해 증폭된 microsatellite 구간의 fragment size를 분석하였다.

나. 죽절초 집단의 유전적 다양성 분석

Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems)를 이용하여 각 microsatellite 좌위(loci)별 peak를 선별하고 대립유전자 크기를 선정한 후, 각 마커별 염기서열의 길이 변이를 조사하였다. 그 결과를 기초로 GenAlEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2006)를 이용하여 대립유전자 수(N_A), 관찰 이형접합률 (Observed heterozygosity, H_O), 기대 이형접합률(Expected heterozygosity, H_E), 근친교배계수(F_{IS}) 등을 산출하였다. 또한 AMOVA 분석을 통해 개체 내·간 유전적 다양성을 추산하였고, Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000)을 사용하여 개체군간 유전적 구조를 파악하였으며, 최적의 유전적 그룹의 수(K)를 결정하기 위해 Structure harvester (Earl, 2012)를 이용하였다.

4. 죽절초의 엽록체 유전체 분석

죽절초의 엽록체 유전체의 구조와 염기서열을 분석하기 위해 Geneious R11.0.5 (Kearse et al., 2012)를 이용하여 죽절초와 같은 과인 홀아비꽃대속 (*Chloranthus*)의 *C. spicatus* (Genbank accession EF380352)와 *C. japonicus* (Genbank accession KP256024)의 엽록체 서열을 reference로 하여 죽절초의 NGS 데이터를 mapping시켰다. 죽절초의 전체 게놈 서열의 read들 중 엽록체 유전체 관련 read들이 reference에 mapping 되었으며, 엽록체 관련 read를 추출하여 *de novo* assembly를 진행하였다. assembly 결과 생성된 contig를 연결하여 alignment를 형성하였고, 이 alignment들을 reference로 하여 NGS 데이터를 100회 mapping 반복 후 죽절초의 엽록체 유전체의 서열을 얻었다.

DOGMA (Wyman et al., 2004)를 사용하여 완성된 엽록체 유전체 서열에서 유전자 영역을 예측한 후 근연종인 *C. spicatus*와 *C. japonicus*의 엽록체의 구조와 비교하여 annotation 하였다. tRNA의 경우 tRNAscan-SE (Schattner et al., 2005)를 이용하여 확인하였다. 완성된 죽절초의 엽록체 유전체 서열은 OGDRAW (Lohse et al., 2007)을 이용하여 전체 엽록체 유전체 지도가 완성되었으며 Genbank에 등록하였다(accession number: MH071744).

죽절초의 계통학적 위치를 결정하기 위해 현재 Genbank에 보고된 근연분류군 12종의 complete chloroplast genom과 비교하였다(표 2). 죽절초를 포함한 총 13종의 엽록체 유전체에서 공통으로 가지는 74개의 protein coding genes을 선별하고 ClustalW (Thompson et al., 1994)를 이용하여 alignment한 후 RAxML v8.2.11 (Stamatakis, 2014)를 이용하여 1000 bootstrap replicates로 Maximum likelihood (ML) 분석하였다(표 3).

표 2. 죽절초의 계통 분석에 이용된 분류군 및 GenBank accession numbers

Order	Species	Sequence length	Genbank accession No.
Amborellales	<i>Amborella trichopoda</i>	162,686	NC_005086
Ceratophyllales	<i>Ceratophyllum demersum</i>	156,252	EF614270
Chloranthales	<i>Chloranthus spicatus</i>	157,772	EF380352
	<i>C. japonicus</i>	158,640	KP256024
Magnoliids	<i>Drimys granadensis</i>	160,604	DQ887676
	<i>Litsea glutinosa</i>	152,618	KU382356
	<i>Magnolia laevifolia</i>	160,120	MF583748
	<i>Piper kadsura</i>	161,486	NC_027941
Monocots	<i>Acorus americanus</i>	153,819	EU273602
	<i>Elodea canadensis</i>	156,700	JQ310743
Eudicots	<i>Berberis bealei</i>	164,792	KF176554
	<i>Lactuca sativa</i>	152,765	AP007232

표 3. 죽절초의 계통 분석에 이용된 74개의 protein coding genes

Gene type	Gene products	No.
ATP synthase	<i>atpA, atpB, atpE, atpF, atpH, atpI</i>	6
NADH dehydrogenase	<i>ndhA, ndhB, ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK</i>	11
Cytochrome b/f complex	<i>petA, petB, petD, petG, petL, petN</i>	6
Photosystem I	<i>psaA, psaB, psaC, psaI, psaJ</i>	5
Photosystem II	<i>psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN, psbT</i>	14
Large subunit ribosomal proteins	<i>rpl2, rpl14, rpl16, rpl20, rpl23, rpl32, rpl33, rpl36</i>	8
Small subunit ribosomal proteins	<i>rps2, rps3, rps4, rps7, rps8, rps11, rps12, rps14, rps15, rps16, rps18, rps19</i>	12
RNA polymerase	<i>rpoB, rpoC1, rpoC2</i>	3
Conserved open reading frames	<i>ycf2, ycf3, ycf4</i>	3
C-type cytochrome synthesis gene	<i>ccsA</i>	1
Chloroplast envelope membrane protein	<i>cemA</i>	1
Protease	<i>clpP</i>	1
Translational initiation factor	<i>infA</i>	1
Maturase	<i>matK</i>	1
Large subunit of rubisco	<i>rbcL</i>	1
Total		74

III. 결과

1. 죽절초 전수조사 결과

죽절초의 전수조사를 실시한 결과 제주 서귀포시의 자생집단(JW①, JW②)에서 132개체, 자생지 내 복원집단(JWC)에서 63개체, 자생지 외 복원집단(JC)에서 28개체로 총 223개체가 조사되었으며, 죽절초 각 개체의 위치 정보를 획득하였다(표 4, 그림 4~5). 죽절초는 제주 서귀포시 상호동의 제9산록교와 영주교 사이의 상록활엽수림에서 저지대 계곡 주변을 중심으로 분포하였으며 그늘지고 습도가 높은 계곡 사면이나 능선에서 자생하였다. 죽절초 자생지의 식생구조를 살펴본 결과 구실잣밤나무, 종가시나무, 동백나무, 참식나무, 백량금, 호자나무, 콩짜개덩굴 등이 우점하고 있다. 한편 JWC 집단은 죽절초 자생지 복원사업으로 자생지에 증식된 개체를 복원함에 따라 자생개체와 복원개체가 동존하고 있는 지역이었으며, JC 집단의 경우는 자생지 외 지역에 증식된 개체를 복원한 지역이었다.

표 4. 죽절초의 제주 전수조사 지역 및 개체 수

ID	Locality, GPS	Number of individuals	Remarks
JWC	제주특별자치도 서귀포시 상호동 제9산록교, 33°18'50.80"N 126°35'29.62"E	63개체	자생지 내 복원집단
JW①	제주특별자치도 서귀포시 상호동 산61, 33°18'38.06"N 126°35'42.41"E	85개체	자생집단
JW②	제주특별자치도 서귀포시 상호동 1182-7, 33°18'19.54"N 126°35'56.90"E	47개체	자생집단
JC	제주특별자치도 서귀포시 상호동 1616, 33°17'42.3"N 126°35'41.9"E	28개체	자생지 외 복원집단
Total		총 223개체	



그림 4. 죽절초의 제주 분포지역

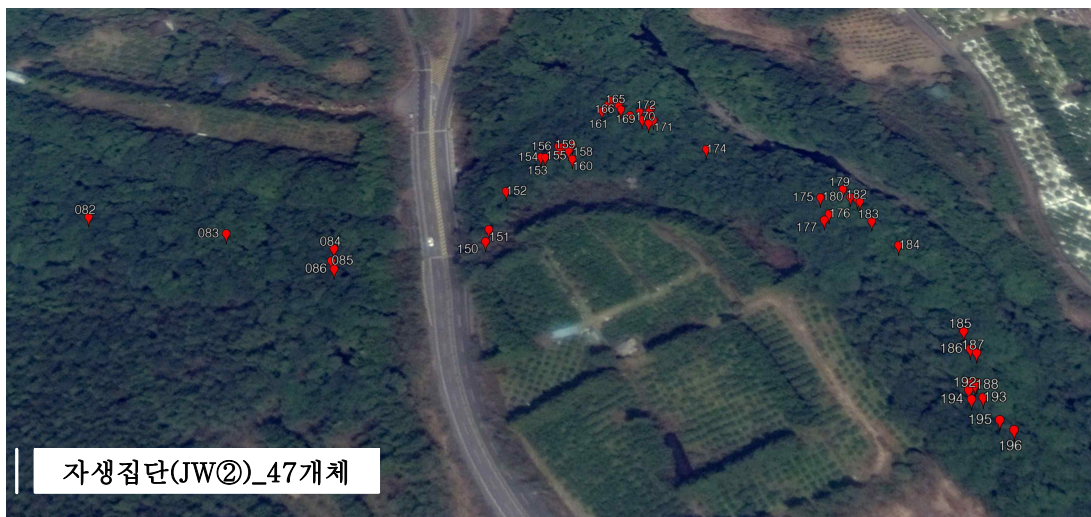
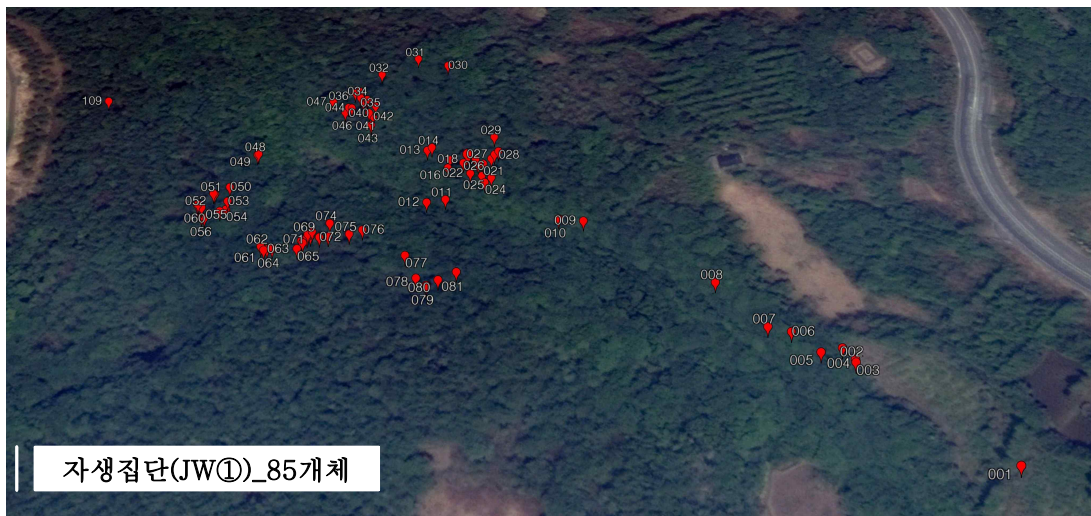


그림 5. 죽절초의 제주 전수조사 결과

2. 죽절초의 microsatellite 마커 개발 결과

가. primer 제작 결과

일본 류큐 지역에서 채집한 잎 시료로부터 추출한 DNA에 대해 NGS 분석한 결과 죽절초의 전체 염색체 서열에 대한 paired-end된 12,611,114 (2 X 300 bp)개의 read를 얻었다. 이후 SSR_pipeline를 통해 NGS 데이터에서 microsatellite 부위를 가지는 총 43,080개(2-mer는 14,771개, 3-mer는 16,175개, 4-mer는 12,134개)의 read가 선별되었다. 이와 같이 얻어진 microsatellite 부위를 가진 read를 죽절초 NGS 데이터에 mapping하여 다형성을 나타내는 read만을 선별한 후, Primer3 version 0.40. software를 이용하여 primer를 제작한 결과 총 54쌍의 primer가 제작되었다. 각 primer 쌍은 forward primer와 reverse primer로 구성되며, 하나의 microsatellite 좌위(loci)를 가진다. 54쌍의 primer 중 38쌍의 primer는 2-mer의 microsatellite 부위를 포함하는 read에서 제작되었고, 16쌍의 primer는 3-mer의 microsatellite 부위를 포함하는 read에서 제작되었다.

나. 유용성 검정 결과 및 선정된 microsatellite 마커

제작된 총 54개 microsatellite 마커의 유용성을 검정하기 위해 일본 집단 30개체에 대해 PCR 증폭을 수행하였으며, PCR 반응을 통해 증폭된 microsatellite 구간의 fragment size를 분석하여 microsatellite 좌위(loci)별 증폭 여부 및 대립유전자 크기를 선정하였다. 그 결과 총 54개의 microsatellite 마커 중 51개의 마커가 증폭되었고, 이 중 33개 마커에서 대립유전자에 다형성을 보였다(그림 6). 다형성을 보인 33개의 마커를 유전적 다양성 평가에 유용하게 사용될 수 있는 microsatellite 마커로 선정하였다. 개발된 33개의 microsatellite 마커에서 대립유전자의 수는 2~14개로 확인되었으며, 평균 3.2개의 대립유전자를 가지고 있는 것으로 확인되었다. 33개의 microsatellite 마커에 대한 forward 및 reverse primer sequences, repeat motif, GenBank accession number 등을 표 5에 기록하였다.

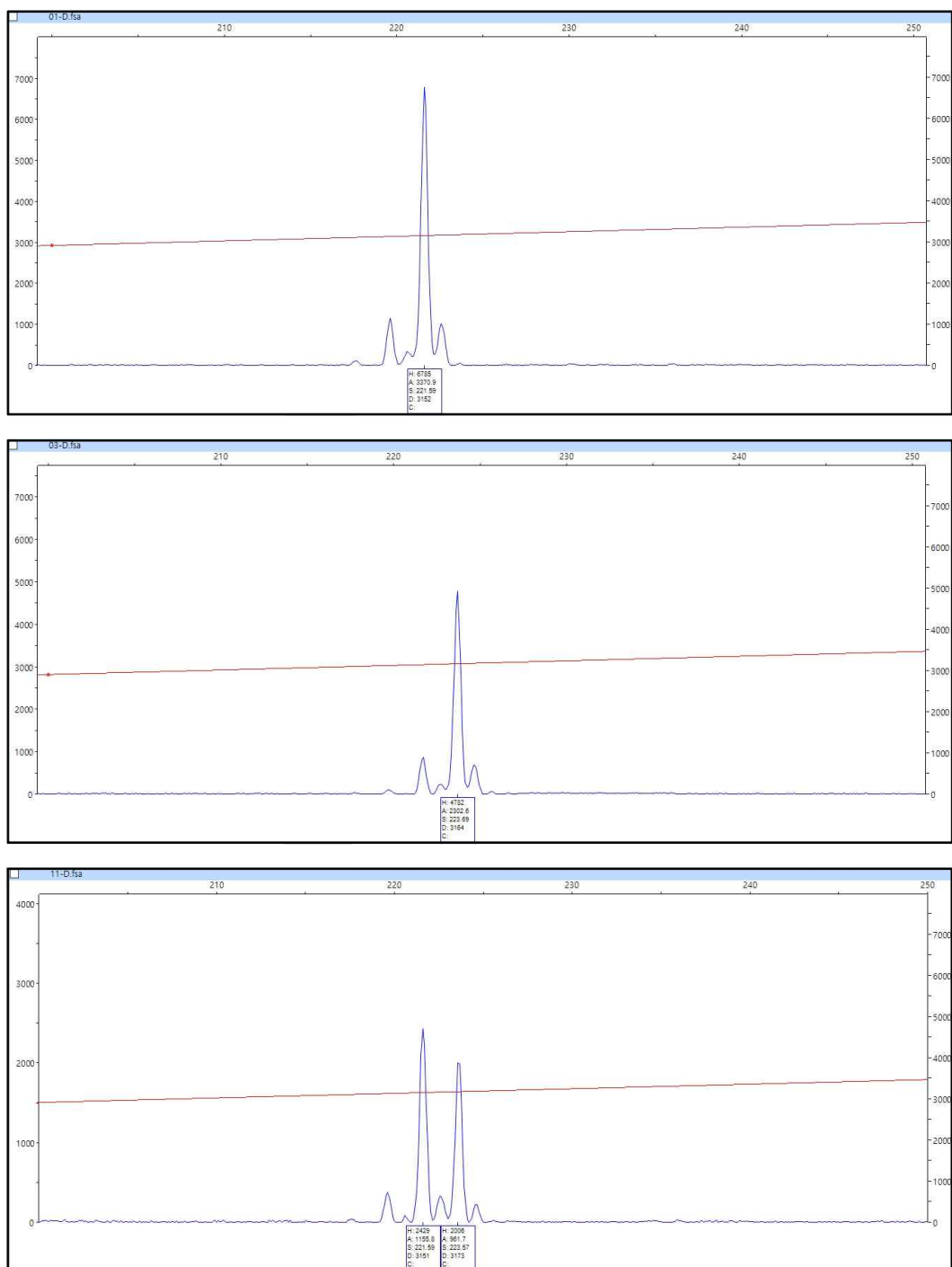


그림 6. 개발된 죽절초 microsatellite 마커의 다형성(예 SaG003)

표 5. 죽절초에서 개발된 33개의 microsatellite 마커

Locus	Primer sequence (5'-3')	Repeat motif	<i>A</i>	Size range (bp)	Fluorescent label	Genbank accession No.
SaG001	F: CTGATATCTATCATCTGAGAGC R: CGTCTAATTTAAAGGAAGCCA	(AG) ₁₁	3	112-116	6-FAM	MH010404
SaG002	F: AGGATGAGCAATAACTGGTG R: TCTAGAGTCCACACGGCA	(GA) ₁₁	3	154-158	6-FAM	MH010405
SaG003	F: ACAAAAGGGGAATGTTTTGG R: GATTTTCATTTCCATGATTTGCA	(CT) ₁₂	14	220-264	6-FAM	MH010406
SaG004	F: TAGCGACTTTTGTTAGCACT R: CAGGTATGCATGGATTTCTG	(TC) ₁₈	2	108-110	VIC	MH010407
SaG005	F: ACACAAGTGTTTTCTTCTAAAC R: TCCTTAGTCCAAAAATGGGT	(TGA) ₈	2	154-160	VIC	MH010408
SaG006	F: CAGGGCCCTTGTCTGTTT R: GAGAGGCTGATACGTACGTA	(TGA) ₈	2	209-212	VIC	MH010409
SaG007	F: AGCCCAAATTTAACATGCTAC R: ACTTCAACATCCCCCTCTAT	(GA) ₁₁	2	122-124	NED	MH010410
SaG008	F: TGGTCCTTCCTTCTACATTC R: AACTCTACATAGACCTCGGA	(TTA) ₈	2	162-165	NED	MH010411
SaG010	F: ATGGACCGCCTCTCTATC R: AAAAACCCGAGAGCAAAATC	(CT) ₂₀	4	119-127	6-FAM	MH010412
SaG011	F: GAGGAACTAGGCCCAATTAA R: TACAACCACATGGACACTTT	(GA) ₁₄	2	154-164	6-FAM	MH010413
SaG013	F: TGATAAAGAGCGACTAGTGT R: GGCTGCAGAAAAGAATCCTA	(GA) ₁₄	2	120-122	VIC	MH010414
SaG014	F: CTGGTCCTTAGTACTAGGCT R: AATTGAGACCCCTACAGAGT	(AG) ₁₃	3	157-165	VIC	MH010415
SaG017	F: ACCATGTTGGATTGGATCTA R: CCTTGTAATCGTTCTCCAT	(CA) ₁₈	4	164-170	NED	MH010416
SaG018	F: CCCATTTAGACCCAACCTA R: TGAACCGATTTTAAAATCTTGA	(TGA) ₉	3	207-219	NED	MH010417
SaG020	F: TGTTTAAACATAGTCAAAGGCC R: ACACAAAGAGAAAGGGACAA	(CT) ₁₉	2	169-173	6-FAM	MH010418

Table 5. Continued.

Locus	Primer sequence (5'-3')	Repeat motif	A	Size range (bp)	Fluorescent label	Genbank Accession No.
SaG024	F: CCTTTGGTTTGTGAATGAT R: GCTCAACCCTAAGATGTGAG	(TC) ₁₂	4	228-234	VIC	MH010419
SaG026	F: GAGGATCTAGCCCATTTAGAC R: TTCTCAAACATTAATCATGCAA	(GA) ₁₉	2	143-149	NED	MH010420
SaG028	F: AACCAAAAAGCTTGCAGAAAT R: GGATTTCTCATTTCCGACTT	(TG) ₁₃	2	131-141	6-FAM	MH010421
SaG029	F: ACCCAAGGTAGAATTGATGAG R: CTCCCATTATATTTGGACGGA	(TC) ₁₈	4	172-180	6-FAM	MH010422
SaG030	F: GGGCTGGGAAAGACAAAAA R: TGTAATGGACCATGTTGTTCT	(CT) ₁₂	4	222-230	6-FAM	MH010423
SaG032	F: CCCTAATGCACGGTCTATC R: GCACCTTAACTTTAGAGGCA	(GA) ₁₁	2	171-176	VIC	MH010424
SaG035	F: TGACTGCACTGTTATCAAGT R: AGTTACATTGGAGATTCATAGA	(GA) ₁₇	3	177-183	NED	MH010425
SaG037	F: AATGCATTGGGATGAGTGAA R: TACATGAAAGTCTTGTGGCA	(TC) ₁₃	2	127-129	6-FAM	MH010426
SaG039	F: AGAGTTAAATACGTAGGATTCA R: CTAAACGCGAATCTGCTCT	(AG) ₁₉	5	226-250	6-FAM	MH010427
SaG040	F: TACTTGTTGTTTGTAGCGTCT R: TGTGATAGGGTTGAGAGAGA	(AGA) ₈	2	124-127	VIC	MH010428
SaG041	F: AGGATGATGGTCTAATCTCT R: AAATAGGCGAAACACGGG	(ATT) ₇	2	183-186	VIC	MH010429
SaG043	F: CTCGGTTTTTGCCCTAGATG R: CGGATTAGGAAAGGAGGACT	(AG) ₁₆	4	125-137	NED	MH010430
SaG046	F: GCTTTAGATAGCAGCAGTGA R: TTCTCCAAACCCTAAGTCAT	(GA) ₁₃	3	141-158	6-FAM	MH010431
SaG048	F: TGGCAACTTTGGTGACTC R: CGAAAGCGTAAGTCTCTC	(AG) ₁₈	7	242-264	6-FAM	MH010432
SaG050	F: AATCATGAGGCTCCAGTTTT R: CAAATTCTGCATCAGTCTGC	(TAA) ₁₄	3	180-189	VIC	MH010433

⌘ 5. Continued.

Locus	Primer sequence (5′–3′)	Repeat motif	A	Size range (bp)	Fluorescent label	Genbank Accession No.
SaG051	F: TTTATTGAGCTTGACACCCT R: GATAGAGAATGGGCTCAAGG	(GA) ₂₁	2	238–240	VIC	MH010434
SaG052	F: GTTTTGCAAAGACCTTTCTT R: GTACTATTACAAAACGGAAG	(TC) ₁₆	4	136–152	NED	MH010435
SaG054	F: ATCCGACCGTTGAAATTTGA R: CGCTTCTCCTCTTCTGTATT	(GAA) ₇	2	264–273	NED	MH010436

A , number of alleles.

3. 죽절초 집단의 유전적 다양성 평가 결과

죽절초 집단의 유전적 다양성을 평가하기 위해 유용한 마커로 선정된 33개의 microsatellite 마커 중 효율이 좋은 25개의 microsatellite 마커를 선별한 후 제주 4집단의 총 223개체에 대해 PCR 증폭을 수행하였고, 그 결과 각 microsatellite 좌위(loci)별 염기서열의 길이 변이가 확인되었다. 일본 집단 및 제주 집단에 25개의 죽절초 microsatellite 마커를 적용한 결과 확인된 대립유전자의 길이 변이를 토대로 죽절초 집단의 유전적 다양성이 분석되었다.

죽절초 집단에 적용된 25개의 microsatellite 마커별 대립유전자 수(N_A), 관측 이형접합률(H_0), 기대 이형접합률(H_E)가 표 6에 제시되었다. 마커별 대립유전자 수는 2~14개로 평균 4.92개이며, 일본 집단(OKI)은 2~13개, 국내 자생집단(JW①과 JW②)은 1~3개, 자생지 내 복원집단(JWC)은 1~5개, 자생지 외 복원집단(JC)은 1~2개로 나타났다. 마커별 기대 이형접합률(H_E)은 0.000~0.890으로, 일본 집단(OKI)은 0.064~0.890, 국내 자생집단 JW①은 0.000~0.538, JW②은 0.000~0.590, 자생지 내 복원집단(JWC)은 0.000~0.635, 자생지 외 복원집단(JC)은 0.000~0.050로 나타났다. 마커 중 SaG005, SaG008, SaG013, SaG048, SaG051, SaG052의 경우 일본 집단과 제주 집단에서 각각 고유 대립유전자 길이를 가져 일본 집단과 제주 집단을 구별할 수 있는 유용한 마커로서 확인되었다.

죽절초의 각 집단별 대립유전자 수(N_A), 대립유전자 풍부도(I), 관측 이형접합률(H_0), 기대 이형접합률(H_E) 등은 표 7에 제시되었다. 집단별로 대립유전자의 평균수는 1.88개이며, 일본 집단(OKI)이 3.24개로 가장 높게 나타났고, 제주 자생지 외 복원집단(JC)이 1.12개로 가장 낮게 나타났다. 집단별 기대 이형접합률(H_E)는 평균 0.176으로 일본 집단(OKI)이 0.397로 가장 높게 나타났고, 제주 자생집단 JW①이 0.054로 가장 낮게 나타났다. 집단별 유전적 다양성을 비교한 결과 일본 집단($H_E = 0.397$, $I = 0.713$)이 다양성이 가장 높은 것으로 분석되었고, 제주 집단은 상대적으로 상당히 낮은 다양성을 보였다. 한편 제주 집단 중에서 자생지 내 복원집단($H_E = 0.283$, $I = 0.490$)이 다른 제주 집단들에 비해 상대적으로 높은 유전적 다양성을 보였다.

표 6. 개발된 죽절초의 microsatellite 마커의 특징

Locus	All	OKI ^z (N = 30)			JW① ^z (N = 85)			JW② ^z (N = 47)			JW③ ^z (N = 47)	
	N_A	N_A	H_E	H_O	N_A	H_E	H_O	N_A	H_E	H_O	N_A	H_E
SaG001	7	3	0.572	0.033	2	0.023	0.000	2	0.156	0.000	3	0.000
SaG002	3	2	0.180	0.000	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000	2	0.000
SaG003	14	13	0.890	0.100	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000	2	0.000
SaG004	5	2	0.206	0.033	2	0.171	0.000	2	0.359	0.000	4	0.000
SaG005	3	2	0.499	0.033	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000	1	0.000
SaG006	2	2	0.124	0.000	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000	1	0.000
SaG007	3	2	0.231	0.000	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000	3	0.000
SaG008	3	2	0.464	0.000	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000	1	0.000
SaG010	10	4	0.576	0.100	1	0.000	0.000	3	0.042	0.043	5	0.000
SaG011	2	2	0.124	0.000	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000	1	0.000
SaG013	5	2	0.339	0.033	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000	3	0.000
SaG014	6	3	0.515	0.967	2	0.500	1.000	2	0.500	1.000	4	0.000
SaG017	5	4	0.214	0.033	1	0.000	0.000	2	0.042	0.000	3	0.000
SaG018	4	3	0.625	1.000	3	0.538	1.000	3	0.590	1.000	3	0.000
SaG024	7	4	0.296	0.000	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000	4	0.000

⚭ 6. Continued.

Locus	All	OKI ^z (N = 30)			JW① ^z (N = 85)			JW② ^z (N = 47)			JW③ ^z (N = 10)	
	N_A	N_A	H_E	H_O	N_A	H_E	H_O	N_A	H_E	H_O	N_A	H_E
SaG029	6	4	0.548	0.033	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000	2	0.3
SaG035	3	3	0.371	0.000	2	0.023	0.000	1	0.000	0.000	2	0.3
SaG037	3	2	0.433	0.433	2	0.090	0.094	2	0.467	0.745	2	0.0
SaG040	2	2	0.064	0.000	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000	1	0.0
SaG041	2	2	0.064	0.067	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000	1	0.0
SaG043	5	4	0.642	0.033	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000	2	0.3
SaG048	9	6	0.738	0.033	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000	3	0.3
SaG051	5	2	0.391	0.000	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000	3	0.3
SaG052	7	4	0.346	0.033	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000	3	0.4
SaG054	2	2	0.480	0.067	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000	1	0.0
Total	4.92	3.24	0.397	0.121	1.28	0.054	0.084	1.36	0.086	0.111	2.4	0.2

^zPopulation symbols are the same as those used in parentheses for Table 4. N, number of individuals for each locus; N_A , number of alleles; H_E , expected heterozygosity; H_O , observed heterozygosity.

표 7. 죽절초 집단별 유전적 다양성 통계치

Pop	N	N_A	N_E	I	H_O (SE)	H_E (SE)	F_{IS}
Korea							
JW①	85	1.280	1.101	0.086	0.084 (0.055)	0.054 (0.029)	0.182
JW②	47	1.360	1.166	0.135	0.111 (0.061)	0.086 (0.036)	0.099
JWC	63	2.400	1.539	0.490	0.057 (0.040)	0.283 (0.044)	0.786
JC	28	1.120	1.120	0.083	0.120 (0.066)	0.060 (0.033)	-1.000
Japan							
OKI	30	3.240	2.082	0.713	0.121 (0.055)	0.397 (0.043)	0.731
Total	-	1.880	1.401	0.301	0.099 (0.025)	0.176 (0.021)	0.529

N, number of individuals from each population; N_A , observed allele number; N_E , number of effective alleles; I , Shannon's Information Index; H_O , observed heterozygosity; H_E , expected heterozygosity; SE, standard error; F_{IS} , Wright's inbreeding coefficient.

죽절초의 집단 간 유전적 구조를 보기 위해 AMOVA 분석을 실시한 결과, 죽절초에서 유전적 변이는 집단 간 66%, 개체 간 15%, 개체 내 19%에서 기인한 것으로 분석되었다(표 8). Structure harvester 분석 결과 K값 1~10(분석된 집단의 수)의 범위에서 델타 ΔK 값이 $K = 3$ 일 때 가장 높게 나타나 세 개의 유전적 클러스터가 가장 적합한 모델임을 나타낸다. $K = 3$ 으로 그룹을 나눴을 때 일본 집단(OKI), 제주 자생집단(JW①, JW②) 및 자생지 외 복원집단(JC), 제주 자생지 내 복원집단(JWC)이 세 개의 유전적 클러스터로 분리되는 것을 볼 수 있으며, $K = 2 \sim 5$ 일 때 집단 구조는 다음과 같다(그림 7).

표 8. 죽절초 집단의 AMOVA 분석 결과

Source	df	SS	MS	Est. Var.	%
Among Populations	4	1540.945	385.236	3.955	66%
Among Individuals	248	714.632	2.882	0.875	15%
Within Individuals	253	286.500	1.132	1.132	19%
Total	505	2542.077		5.962	100%

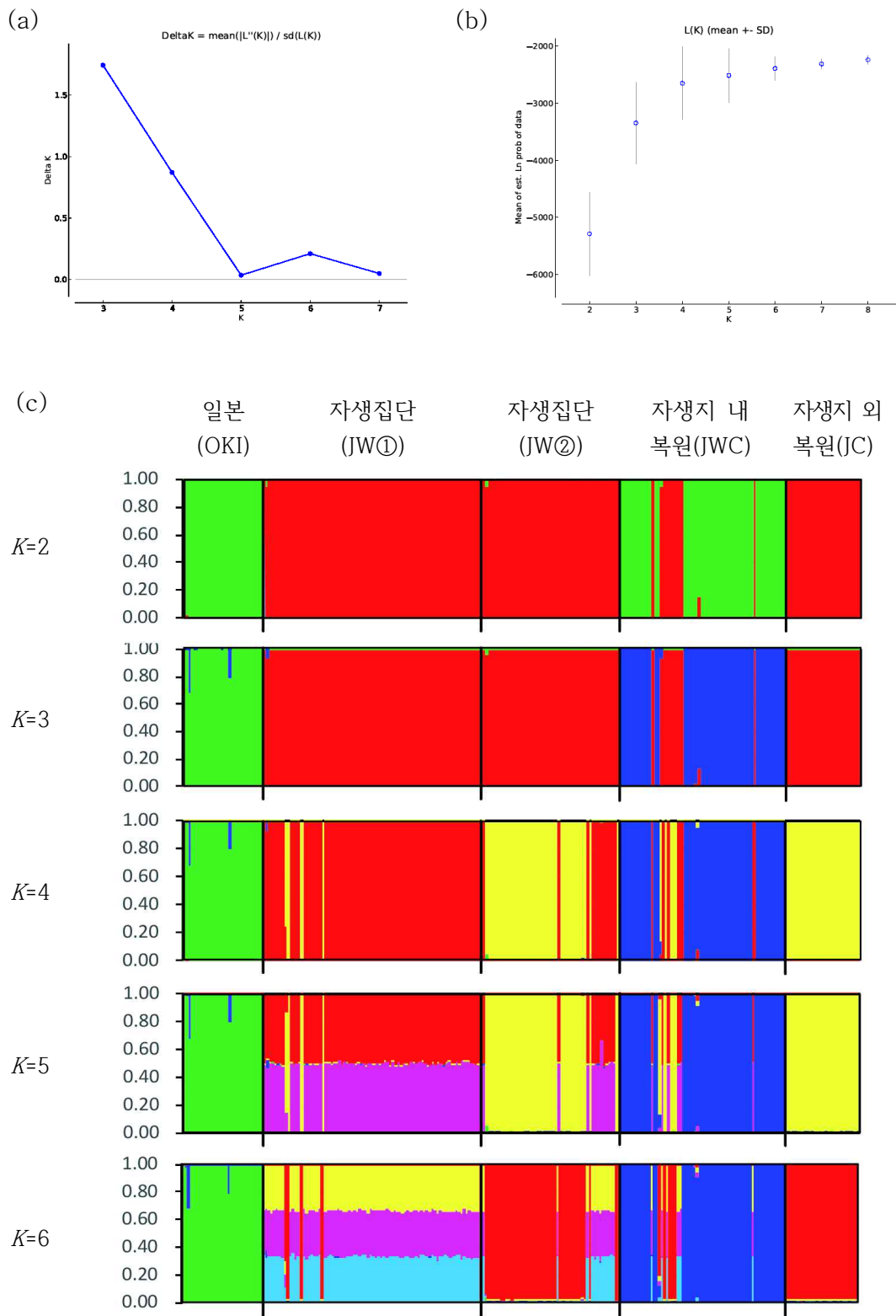


그림 7. 죽절초 집단의 Structure 분석 결과 (a) ΔK 값 (b) Bayesian 추정별 $\text{LnP}(K)$ 값의 평균과 표준편차 (c) K 클러스터링별 Structure bar plot

4. 죽절초의 엽록체 유전체 분석 결과

NCBI에 등록된 죽절초와 같은 홀아비꽃대과 (Chloranthaceae)인 홀아비꽃대속(*Chloranthus*)의 *C. spicatus* (Genbank accession EF380352)와 *C. japonica* (Genbank accession KP256024)의 엽록체 서열을 reference로 사용하여 죽절초 전체 게놈 sequencing 데이터를 mapping한 결과 엽록체와 관련된 129,849개 read가 선별되었다. 선별된 엽록체 관련 read들을 추출하여 *de novo* assembly를 진행하고 assembled contig를 연결해 죽절초의 엽록체 게놈 sequence를 완성하였다. 완성된 죽절초 엽록체 유전체 서열 길이는 158,881 bp이며, GC 함량은 39.2%로 확인된다. 그 중 LSC 지역은 88,169 bp, SSC 지역은 18,446 bp, IR 지역은 각각 26,133 bp으로 확인된다(표 9).

표 9. 죽절초의 엽록체 유전체 구조 정보

Structure	Length (bp)	GC (%)	AT (%)	Start	End
LSC (Large Single Copy)	88,169	37.8	62.2	1	88,169
IRA (Inverted Repeat A)	26,133	43.3	56.7	88,170	114,302
SSC (Small Single Copy)	18,446	34.6	65.4	114,303	132,748
IRB (Inverted Repeat B)	26,133	43.3	56.7	132,749	158,881
Total	158,881	39.2	60.8		

결정된 죽절초 엽록체의 염기서열을 근연종인 *C. spicatus*와 *C. japonica*의 엽록체 유전자 구조와 비교하여 annotation을 완료한 결과 죽절초 엽록체 상의 유전자는 총 130개로 그 중 단백질 발현 유전자(protein coding genes)는 85개로 확인되었으며, RNA 구성은 운반 RNA (transfer RNA) 37개, 리보솜 RNA (ribosomal RNA)는 8개로 확인되었다(표 10). 작성된 죽절초의 유전체 지도는 그림 8과 같다.

표 10. 죽절초 엽록체 유전체 상의 유전자 목록

Gene types	Gene products	No.
Ribosomal RNAs	<i>rrn4.5(x2), rrn5(x2), rrn16(x2), rrn23(x2)</i>	8
Transfer RNAs	<i>trnA</i> -UGC(x2) ^a , <i>trnC</i> -GCA, <i>trnD</i> -GUC, <i>trnE</i> -UUC, <i>trnF</i> -GAA, <i>trnI</i> ^M -CAU, <i>trnG</i> -GCC, <i>trnG</i> -UCC ^a , <i>trnH</i> -GUG, <i>trnI</i> -CAU(x2), <i>trnI</i> -GAU(x2) ^a , <i>trnK</i> -UUU ^a , <i>trnL</i> -CAA(x2), <i>trnL</i> -UAA ^a , <i>trnL</i> -UAG, <i>trnM</i> -CAU, <i>trnN</i> -GUU(x2), <i>trnP</i> -UGG, <i>trnQ</i> -UUG, <i>trnR</i> -ACG(x2), <i>trnR</i> -UCU, <i>trnS</i> -GCU, <i>trnS</i> -GGA, <i>trnS</i> -UGA, <i>trnT</i> -GGU, <i>trnT</i> -UGU, <i>trnV</i> -GAC(x2), <i>trnV</i> -UAC ^a , <i>trnW</i> -CCA, <i>trnY</i> -GUA	37
Photosystem I	<i>psaA, psaB, psaC, psaI, psaJ</i>	5
Photosystem II	<i>psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN, psbT, psbZ</i>	15
Cytochrome b/f complex	<i>petA, petB</i> ^a , <i>petD</i> ^a , <i>petG, petL, petN</i>	6
ATP synthase	<i>atpA, atpB, atpE, atpF</i> ^a , <i>atpH, atpI</i>	6
Large subunit of rubisco	<i>rbcL</i>	1
NADH dehydrogenease	<i>ndhA</i> ^a , <i>ndhB</i> ^a (x2), <i>ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK</i>	12
Chloroplast envelope membrane protein	<i>cemA</i>	1
Large subunit ribosomal proteins	<i>rpl2(x2)</i> ^a , <i>rpl14, rpl16</i> ^a , <i>rpl20, rpl22, rpl23(x2), rpl32, rpl33, rpl36</i>	11
Small subunit ribosomal proteins	<i>rps2, rps3, rps4, rps7(x2), rps8, rps11, rps12(x2)</i> ^a , <i>rps14, rps15, rps16</i> ^a , <i>rps18, rps19</i>	14
RNA polymerase	<i>rpoA, rpoB, rpoC1</i> ^a , <i>rpoC2</i>	4
Translational initiation factor	<i>infA</i>	1

⌘ 10. Continued.

Gene types		Gene products	No.
Subunit of Acetyl-CoA carboxylase	<i>accD</i>		1
C-type cytochrome synthesis gene	<i>ccsA</i>		1
Maturase	<i>matK</i>		1
Protease	<i>clpP</i>		1
Conserved open reading frames	<i>ycf1</i> , <i>ycf2</i> (x2), <i>ycf3</i> ^a , <i>ycf4</i>		5
Total			130

*x2, duplicated genes; ^agenes with introns.

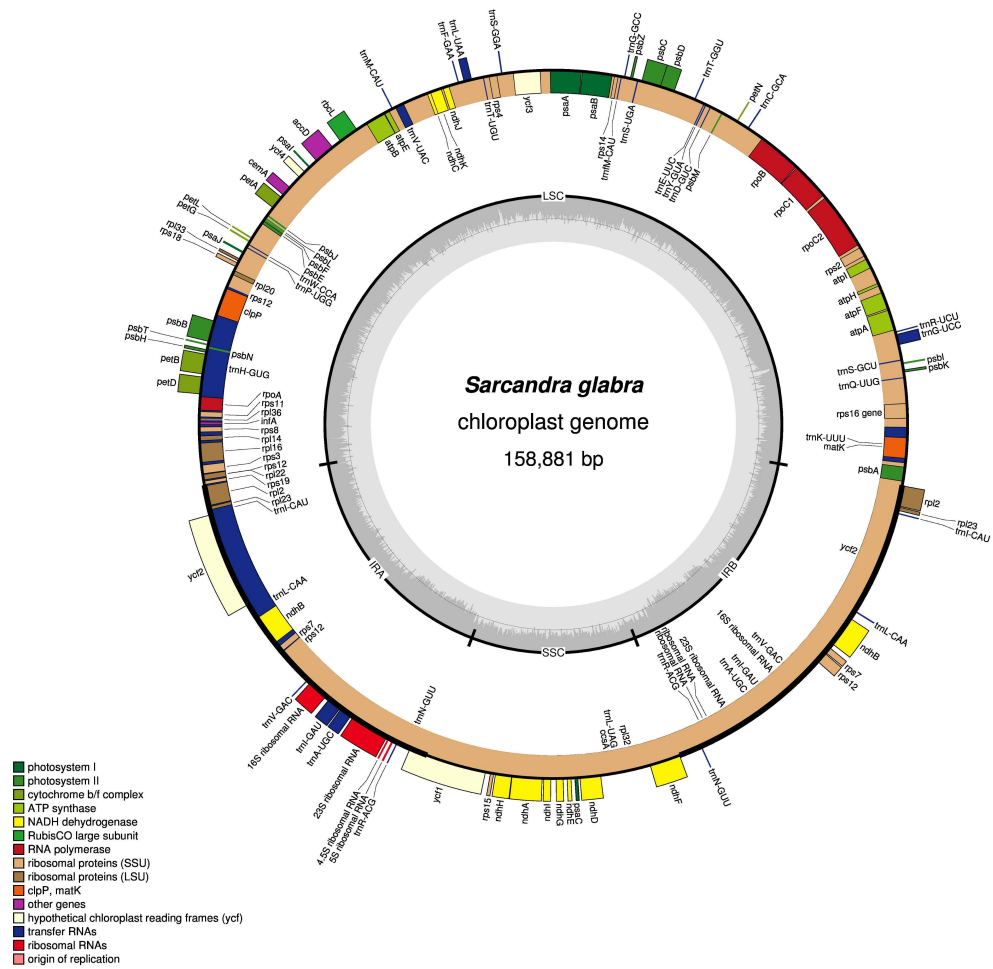


그림 8. 죽절초의 엽록체 유전체 지도

죽절초의 계통학적 위치를 결정하기 위해 죽절초를 포함한 총 13종의 엽록체 유전체에서 공통으로 가지는 74개의 protein coding genes의 유사도를 비교한 결과, 전체 유합된 염기서열의 길이는 62,273 bp이고 pairwise % identity는 90.0%, GC 함량은 39.4%였다. 죽절초의 경우 홀아비꽃대속(*Chloranthus*)인 *C. spicatus*와 *C. japonicus*와 함께 홀아비꽃대목(Chloranthales)에 속하는데 세 엽록체 유전체 구조가 유사하게 나와 계통학적으로 홀아비꽃대목(Chloranthales) 엽록체 유전체 구조가 보존되어 있는 것으로 판단된다.

죽절초와 12종의 엽록체 유전체의 공통된 74개의 protein coding genes을 alignment하여 ML 분석한 결과 생성된 Phylogenetic tree는 그림 9와 같다. 죽절초는 홀아비꽃대속(*Chloranthus*)인 *C. spicatus*와 *C. japonicus*와 함께 단계통을 형성하며, 목련군(Magnoliids)과는 자매군을 형성하였다. 죽절초가 속한 홀아비꽃대과(Chloranthaceae)와 목련군은(Magnoliids)은 기저 속씨식물로서 단자엽식물과 쌍자엽식물이 속한 clade의 자매군을 형성하였다.

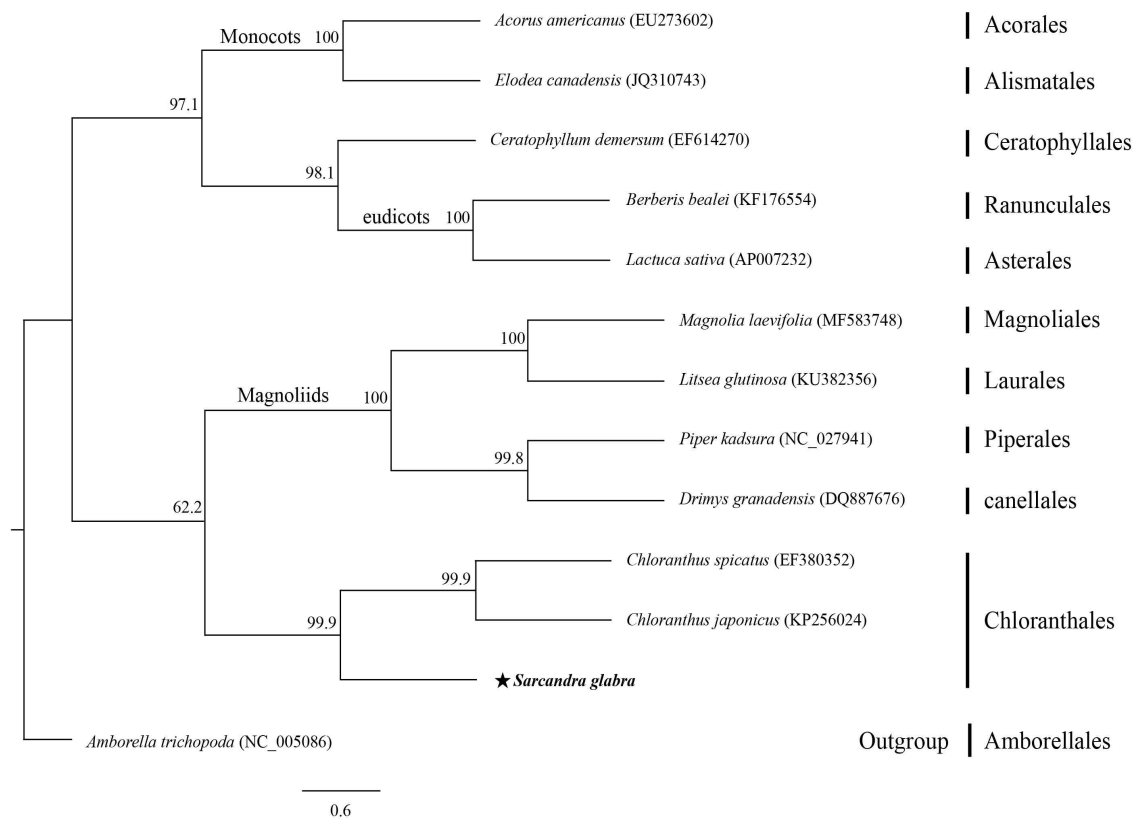


그림 9. 죽절초 및 근연종의 공통된 74개의 protein coding genes로 작성된 계통수

IV. 고찰

본 연구에서 죽절초의 자생지 전수조사와 죽절초의 microsatellite 마커가 개발되었고, 이를 통해 집단 간 유전적 구조와 다양성을 분석하였다. 또한 엽록체 유전체 지도를 작성하고 근연종과의 계통분석을 통해 종의 계통학적 위치를 확인하였다.

전수조사 결과 죽절초는 제주 서귀포시 상효동 등지의 그늘지고 습윤한 계곡 사면과 능선에서 자생하였으며, 자생집단(JW①, JW②) 132개체, 자생지 내 복원집단(JWC) 63개체, 자생지 외 복원집단(JC) 28개체가 확인되었다. 본 조사는 지금까지 문헌과 표본 자료로 알려진 자생지역에서 수행되었기 때문에 조사된 결과가 죽절초의 전체 자생 개체 수를 파악한 것이라 하긴 다소 무리가 있다. 최근 보고된 가거도 뿐만 아니라 제주의 돈내코 및 남서교 지역 등의 추가 조사가 필요할 것으로 보인다. 다만 조사된 개체 이외의 자생 개체가 많지 않을 것으로 추정되며 본 조사 결과가 자생 개체 수를 충분히 대표할 수 있을 것으로 판단된다.

죽절초 집단의 유전적 다양성을 비교한 결과 제주 집단($H_E = 0.121$, $I = 0.198$)이 일본 집단($H_E = 0.397$, $I = 0.713$)에 비해 상대적으로 상당히 낮은 다양성을 보였다. 제주 집단에서는 자생집단인 JW① ($H_E = 0.054$, $I = 0.086$), JW② ($H_E = 0.086$, $I = 0.135$)과 자생지 외 복원집단인 JC ($H_E = 0.060$, $I = 0.083$)의 유전적 다양성이 매우 낮게 나타났다. 한편 자생지 내 복원집단인 JWC ($H_E = 0.283$, $I = 0.490$)는 다른 제주 집단에 비해 상대적으로 높은 유전적 다양성을 나타냈다. 특히 25개의 microsatellite 마커로 genotyping 한 결과 자생지 외 복원집단(JC)의 경우 28개체 모두가 동일한 유전자형을 갖는 것으로 보아 단일개체의 영양번식을 통해 복원되었음을 알 수 있다. 자생지 내 복원집단(JWC)의 경우에는 63개체 중 29개체가 서로 다른 유전자형을 가지고 있었으며, 이는 복원 당시 종자로 증식된 개체를 식재한 것으로 보인다.

죽절초의 유전적 집단구조를 분석한 결과, 일본 집단(OKI), 제주 자생집단(JW①, JW②) 및 자생지 외 복원집단(JC), 제주 자생지 내 복원집단(JWC)으로

3개의 공간적 구조를 갖는 것으로 나타났다. 죽절초 제주 집단 유전적 집단구조를 살펴볼 때 자생집단(JW①, JW②)과 자생지 외 복원집단(JC)은 유전적 단일 분기군을 형성하였으나, 자생지 내 복원집단(JWC)은 자생집단과의 이질적인 유전적 구조를 형성하였다. 이는 자생지 외 복원집단(JC)의 경우 자생집단(JW①, JW②)의 개체를 이용하여 복원된 것을 보여주며, 자생지 내 복원집단(JWC)의 경우 제주 자생지 개체와 이질적인 유전적 구조를 가지는 개체를 이용해 복원된 것을 알 수 있다. 죽절초 분포의 경계에 있는 제주 집단의 경우 지역의 독특한 유전적 조성 유지가 매우 중요하다. 이를 위해서는 제주 집단에서 이질적인 유전적 구조를 가지는 자생지 내 복원집단(JWC)에 대해서는 자생집단과의 유전적 동질화를 위한 후속조치가 수행되어야 하며, 추후 복원시 제주 집단의 고유성 유지를 위해 영양번식을 통한 복원이 이루어질 필요가 있다. 또한 현재 수행되는 자생지 복원사업의 경우 수량 중심의 복원에서 더 나아가 반드시 개체군의 유전적 다양성 평가 결과를 기반으로 유전적 다양성 및 고유성을 고려한 체계적인 복원이 수행되어야 한다. 그리고 한정된 특정 지역에서만 자생하는 죽절초의 경우 효율적인 종 보전을 위해서는 자생지의 생태적 특성 연구 및 자생지인 서귀포 지역의 계곡 주변 상록활엽수림 보전이 함께 수행되어야 한다.

죽절초의 엽록체 유전체의 분석 결과 엽록체 유전체 서열 길이는 158,881 bp이고, GC 함량은 39.2%로 확인되었다. LSC 지역은 88,169 bp, SSC 지역은 18,446 bp, IR 지역은 각각 26,133 bp으로 확인되었다. 죽절초 엽록체 상의 유전자는 총 130개로 그 중 단백질 발현 유전자(protein coding genes)는 85개로 확인되었으며, RNA 구성은 transfer RNA 37개, ribosomal RNA는 8개로 확인되었다. 근연종인 홀아비꽃대속(*Chloranthus*)의 *C. spicatus*와 *C. japonica* 엽록체 유전체와 비교하였을 때 유전자 구조 및 배열이 동일하게 나와 계통학적으로 엽록체 유전체 구조가 보존되어 있는 것으로 판단된다. 죽절초의 계통학적 위치 분석 결과 죽절초는 홀아비꽃대속(*Chloranthus*)인 *C. spicatus*와 *C. japonicus*와 함께 단계통을 형성하며, 기저 속씨식물로서 목련군과는 자매군을 형성하였다.

본 연구를 통해 파악된 제주산 죽절초의 개체 수는 추후 개체군의 쇠퇴 및 성장을 가늠할 수 있는 객관적인 지표로 사용될 수 있을 것이며, 유전적 다양성 평가 결과는 멸종위기인 죽절초의 효과적인 보전 및 복원 전략을 수립하는 데

필요한 유전적 정보를 제공할 것으로 기대된다. 또한 본 연구에서 개발한 죽절초의 엽록체 유전체 정보는 추후 속씨식물의 기원 및 진화를 파악하는 데 중요한 자료로 활용될 것으로 기대된다.

인 용 문 헌

- Cassel-Lundhagen A, Tammaru T, Windig JJ, Ryrholm N, Nylin S. 2009. Are peripheral populations special? Congruent patterns in two butterfly species. *Ecography*, 32: 591–600.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. 2010. Pharmacopoeia of People's Republic of China. China Medical Science Press, Beijing, China. pp. 207.
- Csencsics D, Brodbeck S, Holderegger R. 2010. Cost-effective, species-specific microsatellite development for the endangered dwarf bulrush (*Typha minima*) using next-generation sequencing technology. *Journal of Heredity*, 101: 789–793.
- Earl DA. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4: 359–361.
- Ellestrand NC, Prentice HC, Hancock JF. 1999. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 30: 539–563.
- Hansen DR, Dastidar SG, Cai Z, Penaflor C, Kuehl JV, Boore JL, Jansen R K. 2007. Phylogenetic and evolutionary implications of complete chloroplast genome sequences of four early-diverging angiosperms: *Buxus* (Buxaceae), *Chloranthus* (Chloranthaceae), *Dioscorea* (Dioscoreaceae), and *Illicium* (Schisandraceae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 45: 547–563.
- He RR, Yao XS, Li HY, Dai Y, Duan YH, Li YF, Kurihara H. 2009. The anti-stress effects of *Sarcandra glabra* extract on restraint-evoked immunocompromise. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32: 247–252.

- Hoffmann AA, Blows MW. 1994. Species borders: ecological and evolutionary perspectives. *Trends in Ecology & Evolution*, 9: 223–227.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, *et al.* 2012. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28: 1647–1649.
- Kil MJ, Choi SY, Kwon YS. 2012. Dwarfing Effect by Different Temperature Treatment in *Chloranthus glaber*. *Journal of Bio-Environment Control*, 21: 343–347.
- Kim JH, Nam GH, Kim JS. 2012. The vascular plants in Is. Gageo (Jeollanam-do). *Journal of Environmental Science International*, 21: 437–450.
- Krussmann G. 1984. Manual of cultivated broad-leaved trees and shrubs. Timber press. Portland.
- Lee JH, Cho WB, Yang SG, Han EK, Lyu ES, Kim WJ, Moon BC, Choi GY. 2017. Development and characterization of 21 microsatellite markers in *Daphne kiusiana*, an evergreen broad-leaved shrub endemic to Korea and Japan. *Korean Journal of Plant Taxonomy*, 47: 6–10.
- Lee SY, Lee YP, Jung YH, Kim UJ, Lee JG, Lee SY, Park JH, Lee SH, Yu YH. 2018. Study of Ecological Response of Endangered *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai according to Moisture and Nutrient under Condition of Climate Change for Propagation and Restoration. *Korean Society of Environment and Ecology*, 32: 30–38.
- Lee WT, Yim YJ. 2002. Plant Geography. Kangwon University Press. Kangwon, Republic of Korea.

- Lesica P, Allendorf FW. 1995. When are peripheral populations valuable for conservation?. *Conservation biology*, 9: 753–760.
- Lohse M, Drechsel O, Bock R. 2007. OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW): a tool for the easy generation of high-quality custom graphical maps of plastid and mitochondrial genomes. *Current genetics*, 52: 267–274.
- Makino T. 1912. Observation on the Flora of Japan. *In*: The botanical magazine. Vol. 26. Tokyo Botanical Society; Tokyo, Japan. pp. 386.
- Miller MP, Knaus BJ, Mullins TD, Haig SM. 2013. SSR_pipeline: A bioinformatics infrastructure for identifying microsatellites from paired-end Illumina high-throughput DNA sequencing data. *Journal of Heredity*, 104: 881–885.
- Ministry of the Environment of Korea. 2012. Korean Red List of Threatened Species. National Institute of Biological Resources, Incheon, Republic of Korea.
- Nakai T. 1930. Chloranthaceae. *In*: Flora Sylvatica Koreana. Vol. 18. The Forest Experiment Station, Government General of Chosen, Keijyo, Japan. pp. 17.
- Ni KC, Min F, Guo WD, Si JP, Zhang ZZ, Li HJ. 2008. Analysis on genetic diversity of *Sarcandra glabra* collected from eight provenance based on ISSR markers. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 39: 1392–1396.
- Peakall R, Smouse PE. 2006. GenALEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288–295.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155: 945–959.

- Rieseberg LH, Swensen SM. 1996. Conservation genetics of endangered island plants. *In*: Avise JC, Hamrick JL (eds) Conservation genetics: case histories from nature. Chapman and Hall, New York. 305–334.
- Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *In*: Bioinformatics methods and protocols Humana Press, Totowa, New Jersey. 365–386.
- Schattner P, Brooks AN, Lowe TM. 2005. The tRNAscan-SE, snoscan and snoGPS web servers for the detection of tRNAs and snoRNAs. *Nucleic Acids Res.* 33: 686–689.
- Selkoe KA, Toonen RJ. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters*, 9: 615–629.
- Song GP, Jang CG, Kang SH. 2012. Conservation and vegetation structure of *Euchresta japonica* (Leguminosae) in Jeju Island. *Korean Journal of Plant Resources*, 25: 89–95.
- Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30: 1312–1313.
- Takahashi A. 1988. Morphology and ontogeny of stem xylem elements in *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai (Chloranthaceae): Additional evidence for the occurrence of vessels. *The Botanical Magazine*, Tokyo, Japan. 101: 387–395.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673–4680.
- Thunberg CP. 1794. Botanical Observations on the Flora Japonica. *In*: Transactions of the Linnean Society of London. Vol. 2. The

- Society, London. pp. 331.
- Wyman SK, Jansen RK, Boore JL. 2004. Automatic annotation of organellar genomes with DOGMA. *Bioinformatics*, 20: 3252–3255.
- Xia N, Jérémie J. 1999. Chloranthaceae. *In*: Flora of China. Editorial Committee, eds. Vol. 4. Science Press, Beijing, China. 132–138.
- Xu Y, Wei GY, Zhou Y, Huang XF, Xu YQ. 2015. A set of novel microsatellite markers developed for a traditional Chinese medicinal plant, *Sarcandra glabra* (Chloranthaceae). *Journal of Genetics*, 94: 86–88.
- Yun YE, Yu JN, Lee BY, Kwak MH. 2011. An introduction to microsatellite development and analysis. *Korean Journal of Plant Taxonomy*, 41: 299–314.
- Zhou H, Liang J, Lv D, Hu Y, Zhu Y, Si J, Wu S. 2013. Characterization of phenolics of *Sarcandra glabra* by non-targeted high-performance liquid chromatography fingerprinting and following targeted electrospray ionisation tandem mass spectrometry/time-of-flight mass spectrometry analyses. *Food chemistry*, 138: 2390–2398.
- Zigouris J, Dawson FN, Bowman J, Gillett RM, Schaefer JA, Kyle CJ. 2012. Genetic isolation of wolverine (*Gulo gulo*) populations at the eastern periphery of their North American distribution. *Conservation genetics*, 13: 1543–1559.

Genetic Diversity and Chloroplast Genome Analysis of an Endangered Species, *Sarcandra glabra* in Korea

Eun-Kyeong Han

Department of Science Education
Graduate School Chonnam National University
(Directed by Professor Jung-Hyun Lee)

(Abstract)

Sarcandra glabra (Thunb.) Nakai is an evergreen shrub belonging to Chloranthaceae, and widely distributed in subtropical vegetation zone of Asia. However, the plants are extremely rare on Jeju Island in Korea, where is of great concern for the species' long-term survival, as they are at the northern limit of the species. Jeju populations are rapidly declining, due to habitat destruction such as urbanization and over-collection of desirable plants. Thus, it is urgently needed to develop an effective conservation strategy for stable growth of the populations. The study goals were to: (1) investigate the total number of individuals on Jeju populations, in order to prepare an indicator for population decline and growth, (2) suggest an effective conservation strategy at the genetic level through comparison analysis of Jeju and Japanese populations, (3) examine phylogenetic position of *S. glabra* within angiosperm.

As a result of the survey, a total of 132 individuals were found in Sanghyo-dong, Seogwipo-si, Jeju island, Korea. 63 and 28 individuals for populations restored *in situ* and *ex situ* were found, respectively.

Genetic analysis was conducted in four populations (2 natural populations, 1 population restored in situ and 1 population restored ex situ using the 25 microsatellite markers developed in this study. The results indicated that genetic diversity of Jeju populations ($H_E = 0.121$, $I = 0.198$) are lower than that of the Japanese population ($H_E = 0.397$, $I = 0.713$). Within the Jeju populations, population restored in situ showed relatively higher genetic diversity than natural populations ($H_E = 0.070$, $I = 0.110$) and ex situ restoration population ($H_E = 0.060$, $I = 0.083$). Meanwhile, structure analysis revealed a spatial genetic structure that was clearly partitioned by 3 clusters, i.e., the Japanese population, in situ restoration population, and the others.

The complete chloroplast genome sequence for *S. glabra* is 158,881 bp long, with 39.2% GC content. It includes a large single copy (LSC) region of 88,169 bp that is separated from the 18,446 bp small single copy (SSC) region by two inverted repeat regions (26,133 bp each). This genome contains 130 genes, including 85 protein coding genes, 37 tRNA, and eight tRNA. To determine the phylogenetic position of *S. glabra*, we compared the similarity of 74 Protein coding genes common in a total of 13 different chloroplast genes, including *S. glabra*. Maximum likelihood analysis showed that *S. glabra* formed a monophyletic group with Chloranthus, and those was sister of Magnoliids. This supported that *S. glabra* was an early branching line in the evolution of angiosperm.

This study provided a criteria as an indicator for population decline and growth, and an effective conservation strategy at the genetic level. Given the spatial genetic structure, forming a strong cluster of Jeju populations is the result of its evolution to adapt the unique environment

of Jeju Island. However, it is significant that the population restored in situ is showing different genetic structure. The genetic uniqueness are clearly critical because they represent the northern edge of the distribution range, possibly providing potential for further expansion of the species. Therefore, the first effective conservation strategy that should take place in order to ensure stable growth of *S. glabra* on Jeju Island is to achieve a genetic homogeneity of the in situ restoration population to make it similar structure with natural populations.