

호랑가시나무(*Ilex cornuta*) 개체군의 ITS 염기서열 변이 분석

손성원 · 김주환¹ · 김용식² · 박선주*

영남대학교 생물학과 · ¹대전대학교 생명과학과 · ²영남대학교 조경학과

한국과 중국에 분포하는 호랑가시나무의 개체군 및 개체간의 유전적 차이점을 파악하기 위해 10개체군 65개체를 대상으로 nuclear ribosomal DNA 중 ITS 지역의 염기서열을 분석하였다. 그 결과 호랑가시나무의 ITS1의 길이는 253 - 259bp, 5.8S는 159 bp, ITS2는 231bp로 관찰되었다. 또한 65개체의 호랑가시나무로부터 총 8개의 서로 다른 ITS 유형[Single Nucleotide Polymorphism (SNP) haplotype]이 발견되었으며 유형 간에는 1bp에서 6bp까지 차이를 보였다. ITS 지역의 SNP는 총 9개 위치에서 나타났다. 지역별로 보면 남제주군 대정읍에서 채집된 4개의 개체들은 모두 다른 유형으로 관찰되었으며, 전라남도 나주시와 전라남도 무안군에서 채집된 개체들은 모두 같은 유형으로 나타나 ITS 지역의 다양성은 제주도 개체군이 육지 개체군보다 높게 나타났다. 이와 같이 호랑가시나무 개체 및 개체군에 대한 ITS 염기서열 분석 결과 다양한 ITS 유형이 나타났으며 이는 호랑가시나무의 유전적 다양성 연구에 유용한 정보를 제공할 뿐만 아니라 파괴되어 가고 있는 호랑가시나무 서식지 보전의 기초적 자료가 될 것으로 사료된다.

주요어: 서식지 보전, 유전적 차이, ITS 유형, SNP haplotype

호랑가시나무(*Ilex cornuta* Lindley et Paxton)는 감탕나무과(Aquifoliaceae) 감탕나무속(*Ilex*)의 상록활엽 소교목으로 한국의 전북 변산 이남 온대남부지방의 바닷가에 제한적으로 자라며, 중국의 양쯔 강 이남지역의 낮은 구릉지, 향주, 소주, 난징지역과 서부의 이창과 창사 지방까지 분포한다(Galle, 1997). 호랑가시나무의 잎은 호생하고 일반적으로 타원상 6각형이지만 변이가 아주 심하여 모서리의 수가 다양하다. 열매는 일반적으로 붉은색으로 구형이며 밝은 노란색의 꽃은 엽액에서 나와 총생하며 2년생 이상의 개체에서 개화한다(Hume, 1953). 유럽 및 미국에서는 관상수목으로 예로부터 매우 주요한 소재로 연구대상이 되었으며(Lee, 1983) 또한 수피, 잎, 열매는 강장제로서 한방약으로 사용되며, 조경용도로 재배품종중 50종 이상이 조경소재로 인기를 끌고 있다(Galle, 1997). 하지만 식물지리학적 특성으로 인

*교신저자: 전화 053-810-2377, 전송 053-810-4618, sjpark01@ynu.ac.kr

하여 한반도의 제주도, 전라남도의 서해안을 따라 제한적으로 야생군집이 분포하며 이들 또한 조경소재를 위한 지나친 남획과 지역주민의 관심 소홀로 인하여 보호가 제대로 이루어지지 못하고 있는 실정이다.

호랑가시나무에 대한 연구로는 Yim (1979)의 *Ilex*속의 유전변이의 분석과 조경학적 이용가치의 조사 연구와 Lee (1983)에 의해 호랑가시나무의 천연분포와 군락생태에 관한 연구가 이루어졌으며, Park *et al.* (2000)에 의해 변산반도내 호랑가시나무군락의 서식환경 및 생육실태에 관한 연구가 이루어졌다. 또한 Miller and Kim (2002)은 호랑가시나무와 감탕나무(*I. intergra* Thunb.)의 자연교잡종인 완도호랑가시나무(*Ilex* × *wandoensis* C. F. Miller & M. Kim)를 발표한 적이 있으며 Koh *et al.* (2005)에 의해 호랑가시나무의 잎의 형태적 특성에 관하여 연구가 이루어졌다. 하지만 이들 연구는 주로 호랑가시나무의 천연분포나 군락생태, 외부형태학적 변이 등에 관한 연구였으며 호랑가시나무 개체군 및 개체의 대한 유전학적 및 진화적 연구는 아직까지 이루어지지 못한 상태이다.

생물 다양성 협약 이후 모든 생물은 유전자원으로 인식되고 있으며, 이러한 경향은 식물의 경우도 마찬가지여서 천연집단의 유전변이 분석의 의미가 점차 증대되고 있는 실정이다(Jung *et al.*, 2000). 이는 일반적으로 유전자원 보존림은 유전변이 연구를 통해서 얻어진 자료를 바탕으로 유전변이가 많이 존재하는 집단과 유전적으로 분화가 많이 되어 여타의 집단과는 유전적인 조성이 상이한 집단을 선정하게 되기 때문이다(NRC, 1991). 지금까지 식물 개체군의 유전변이 연구는 주로 동위호소 수준에서 이루어져 왔으며, 최근에는 DNA 마커를 이용한 유전변이 및 유연관계 분석이 널리 이루어지고 있다(Williams *et al.*, 1990; Williams, 1992). 최근 몇 년간의 연구결과에서 염기서열의 변이율에 대한 분석은 속 이상의 포괄적인 유연관계 추적뿐만 아니라, 종간 심지어 종내 개체, 또는 개체군간의 비교에도 효과적으로 이용되고 있다. 특히 핵 리보솜 RNA 유전자의 5.8S 양쪽에 위치하고 있는 internal transcribed spacer (ITS)는 코딩지역보다 더 빠르게 진화하고 종의 유연관계와 진화경향성(Baldwin, 1992; Kim and Jansen, 1994; Alvarez and Wendel, 2003) 및 유전적 변이양상(Kim *et al.*, 2005)을 파악하는데 유용한 정보를 제공하여 분자계통학적 연구 및 집단 유전학적 분석에 널리 이용되고 있다.

따라서 본 연구는 한국과 중국에 자생하고 있는 호랑가시나무를 대상으로 ITS 구간의 염기서열을 분석하고 염기변이를 파악하여 호랑가시나무의 개체군 및 개체간의 유전적 차이점을 밝히고자 한다.

재 료 및 방 법

재료

연구에 사용된 개체들은 2005년 6월부터 2006년 9월에 걸쳐 채집하여 사용하였고, 국내에서 채집된 일부 개체들은 유리온실에 이식·재배하여 지속적으로 사용하였다. 국내의 자생하

Table 1. Geographical location and the number of individuals of *Ilex cornuta* populations.

Population	Location	No. of individuals	Abbreviation
Docheong-ri, Byeonsan-myeon, Buan-gun, Jeollabuk-do	35° 35' N, 126° 29' E	6	BD
Gyema-ri, Hongnong-eup, Yeonggwang-gun, Jeollanam-do	35° 24' N, 126° 25' E	3	YH
Anchang-dong, Naju-si, Jeollanam-do	35° 00' N, 126° 42' E	11	NA
Sangma-ri, Cheonggye-myeon, Muan-gun, Jeollanam-do	34° 55' N, 126° 25' E	12	MS
Yongban-ri, Busan-myeon, Jangheung-gun, Jeollanam-do	34° 44' N, 126° 54' E	11	JY
HyeopJae-ri, Hallim-eup, Bukjeju-gun, Jeju-do	33° 23' N, 126° 15' E	5	HH
Yongsu-ri, Hangeyeong-myeon, Bukjeju-gun, Jeju-do	33° 19' N, 126° 10' E	7	HY
Dongil-ri, Daejeong-eup, Namjeju-gun, Jeju-do	33° 12' N, 126° 10' E	4	DD
Mt. Socheon Shanghai China	31° 04' N, 121° 10' E	3	CS
Province of Kunming Yunan China	-	3	CK

는 호랑가시나무는 8개 집단 59개체를 채집하여 분석의 자료로 삼았고 또한 중국에 자생하는 호랑가시나무는 상해지역에서 채집된 3개체와 운남성 지역의 3개체를 포함하여 총 65개체를 대상으로 연구를 수행하였다(Table 1).

DNA 추출, PCR 및 염기서열 결정

야외에서 직접 채집한 생체는 실험실로 운반하여 즉시 잎을 채취하여 엽병과 주맥을 제거 시킨 후 -70°C 에서 냉동 보관하였다. 액체 질소를 이용하여 막자사발로 분쇄시킨 후 Saghai-Marooof *et al.* (1984)의 방법을 수정한 Dolye and Doyle (1987)의 CTAB 방법에 따라 추출하였다. 추출된 DNA는 cesium chloride/ethidium bromide 구배법(Sambrook and Russell, 2001)에 의해 정제하였고 중국에서 채집된 개체들은 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation)에 의해 정제하였다. ITS 지역의 증폭을 위한 PCR 반응용액의 조성은 다음과 같다. 주형 DNA 20-50ng, 5X *Taq* polymerase reaction buffer 10 μl , 25mM의 MgCl_2 4 μl , 각 10mM의 dNTPs 4 μl , 25pmol의 primers 각각 0.5 μl , 1.25 unit의 *Taq* polymerase (Promega)에 total volume이 총 50 μl 이 되도록 증류수를 조절하여 첨가하였다. 이러한 반응액을 95°C 에서 2분 동안 initial denaturation한 후 denaturation 95°C 1분, annealing 54°C 1분, extension 72°C 1분으로 구성된 반응을 30회 반복한 후 최종적으로 72°C 에서 10분간 extension하여 수행하였다. PCR 반응액은 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation)으로 정제하였다. PCR과 염기서열 결정에는 White *et al.* (1990)에 의해 제작된 프라이머 ITS 1, ITS 4를 사용하였고 automatic sequencer (ABI PRISM 3730xl)을 이용하여 염기서열을 결정하였다.

Table 2. Sequence characteristics of the ITS1, 5.8S and ITS2 regions in 10 populations of *Ilex cornuta*.

	ITS1		5.8S		ITS2		ITS1+5.8S+ITS2	
	Length (bp)	(G+C)%	Length (bp)	(G+C)%	Length (bp)	(G+C)%	Length (bp)	(G+C)%
BD	254-256	60.5-61.1	159	53.5	231	58.4-58.7	644-646	58.1-58.3
YH	254-259	60.2-61.1	159	53.5	231	58.4-58.7	644-649	58.1-58.3
NA	253-257	60.7-61.3	159	53.5	231	58.7-58.9	643-647	58.3-58.5
MS	253-257	60.5-61.3	159	53.5	231	58.9	643-647	58.2-58.5
JY	253-255	60.8-61.3	159	53.5	231	58.7-58.9	643-645	58.2-58.6
HH	255-257	60.7-60.9	159	53.5	231	58.4-58.7	645-647	58.1-58.3
HY	254-255	60.1-60.8	159	53.5	231	58.1-58.9	644-645	58.0-58.3
DD	255-257	59.2-61.2	159	53.5	231	58.7-58.9	645-647	57.6-58.4
CS	255-256	60.8-60.9	159	53.5	231	58.4-58.7	645-646	58.2-58.3
CK	254-255	60.8-61.1	159	53.5	231	58.4-58.9	644-645	58.2-58.4

Data 분석

10개 지역의 65개체로부터 얻어진 65개의 ITS 염기서열들은 Sequencher 프로그램(Gene Code, USA)으로 조합하여 MacClade 4.0 (Sinauer Associates, Inc.)을 사용하여 저장한 후 Clustal X (Thompson *et al.*, 1997)로 정렬하였으며, 다시 MacClade를 이용한 수작업을 거쳐 최종 정렬 하였다. ITS영역에 대한 염기서열은 기존에 보고된 염기서열(Jackson *et al.*, GenBank Acession AF174625)과 비교하여 ITS1과 ITS2, 5.8S sequence를 결정하였다. 각 ITS 유형간의 염기서열 분석은 PAUP ver. 4.0b (Swofford, 2002)를 사용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

한국 및 중국의 호랑가시나무 10개 개체군에 대해 ITS 염기서열을 분석한 결과 나타난 호랑가시나무의 ITS지역의 염기서열 길이는 ITS1이 253 - 259bp로 나타났으며 5.8S는 159bp, ITS2는 231bp로 나타났다. 전체적으로 ITS1 지역이 ITS2지역에 비해 더 길었으며 ITS 구간의 개체 간의 길이 차이는 ITS1 지역의 길이 차이에 기인했다(Table 2). ITS 염기서열 길이는 조사한 전체 개체들 중 전라남도 영광의 개체가 가장 길게 나타났으며 전라남도 나주와 무안, 장흥 개체가 가장 짧게 나타났다. 또한 DNA의 구조 및 물리적 특성을 결정하는 G+C의 염기조성은 ITS1이 59.2% - 61.3%, 5.8S와 ITS2가 각각 53.5%, 58.1 - 58.9%로 나타났다 (Table 2).

본 연구에서는 한국 및 중국의 호랑가시나무의 각 개체 간에 차이를 보이는 여러 개의

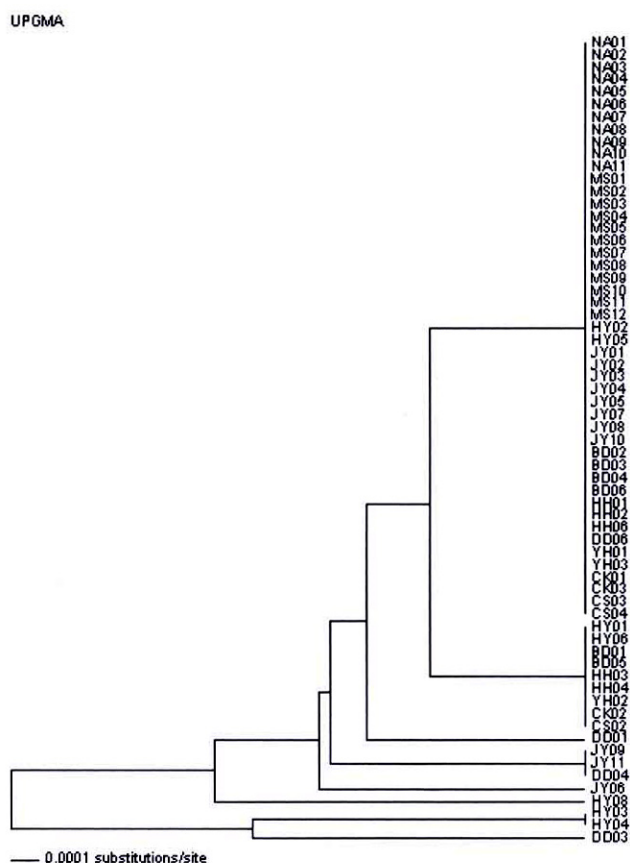


Fig 1. A phylogenetic tree by UPGMA clustering method on *Ilex cornuta* based on ITS sequences of 65 individuals.

ITS유형이 존재한다는 것이 확인되었다(Table 3). 조사된 호랑가시나무의 ITS유형은 8개로 크게 구분할 수 있었으며 ITS 구간의 SNP는 총 9개 위치에서 발견되었으며 각각의 위치는 13번, 106번, 140번, 151번, 209번, 427번, 453번, 650번이다.

관찰된 8개의 ITS 유형은 1bp에서 6bp까지 차이를 나타냈으며 type7과 type8에서 가장 큰 차이를 보였다(Table 4). Kimura (1980)의 two-parameter method를 이용한 유전적 거리지수는 type1과 type2, 5, 6 그리고 type2와 type5, 7이 0.155%으로 가장 낮게 나타났으며 type7과 type8이 0.942%로 가장 높게 관찰되었다(Table 4).

호랑가시나무에서 발견된 8개의 ITS 유형은 2개 이상의 개체를 포함하는 4개의 주요 유형과 1개의 개체에서만 나타나는 기타 소수 유형으로 세분되었다(Table 5). 주요 유형으로는

Table 3. Haplotypes of SNPs in ITS regions (9 SNPs/653 bp).

TYPE	SNP Haplotype	Observations in 65 individuals	GenBank accession
Type 1	ATCCCCCCC	47/65 (72.3%)	EF690539
Type 2	ATCCCCCTC	9/65 (13.8%)	EF690540
Type 3	ACCCCCCCC	3/65 (4.6%)	EF690541
Type 4	ATCCTYCCC	2/65 (3.0%)	EF690542
Type 5	GTCCCCCYC	1/65 (1.5%)	EF690543
Type 6	ATCCCCCG	1/65 (1.5%)	EF690544
Type 7	ATCCCCTTC	1/65 (1.5%)	EF690545
Type 8	ATTTTCCC	1/65 (1.5%)	EF690546

Table 4. Pairwise sequence distance among 8 types observed for *Ilex cornuta*. Absolute difference is shown below the diagonal, and sequence divergence value ($\times 100$) by Kimura's two parameter method is above diagonal.

	Type 1	Type 2	Type 3	Type 4	Type 5	Type 6	Type 7	Type 8
Type 1	-	0.155	0.156	0.156	0.155	0.155	0.311	0.627
Type 2	1	-	0.311	0.312	0.155	0.311	0.155	0.785
Type 3	1	2	-	0.313	0.311	0.311	0.467	0.785
Type 4	1	2	2	-	0.312	0.312	0.468	0.315
Type 5	1	1	2	2	-	0.311	0.312	0.785
Type 6	1	2	2	2	2	-	0.467	0.784
Type 7	2	1	3	3	2	3	-	0.942
Type 8	4	5	5	2	5	5	6	-

type1이 47개 개체(72.3%)로 가장 많이 나타났으며 조사된 전 지역에서 나타났고, type2는 9개의 개체(13.8%)에서 발견되었으며 전북 부안, 전남 영광, 북제주 한림읍, 북제주 한경면, 중국 상해, 중국 운남성 등의 지역에서 나타났다. 또한 type3이 2개 지역에서 3개의 개체(4.6%)를 포함했으며, type4가 1개 지역에서 2개체(3.0%)로 나타났다. 기타 소수유형으로는 type5, 6, 7, 8이 각각 1개체(1.5%)에서 조사되었다. 또한 중국 상해와 운남성에서 채집된 6개의 개체 중에서 4개체는 type1에 속하고 나머지 2개체는 type2에 속했으며 이들은 모두 2개체 이상을 포함하는 주요 유형에 포함되는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 비추어 볼 때 호랑가시나무의 ITS 염기서열 변이는 외래종인 돼지풀 및 단풍잎돼지풀의 ITS 염기서열의 변이(Kim *et al.*, 2005)등을 조사한 선행연구와 비교했을 때 높은 염기 변이 다양성을 가지고 있다고 생각

Table 5. ITS types of *Ilex cornuta*.

Abbreviation	Type	Abbreviation	Type	Abbreviation	Type	Abbreviation	Type
BD 01	2	NA 09	1	JY 03	1	HY 04	4
BD 02	1	NA 10	1	JY 04	1	HY 05	1
BD 03	1	NA 11	1	JY 05	1	HY 06	2
BD 04	1	MS 01	1	JY 06	6	HY 08	7
BD 05	2	MS 02	1	JY 07	1	DD 01	5
BD 06	1	MS 03	1	JY 08	1	DD 03	8
YH 01	1	MS 04	1	JY 09	3	DD 04	3
YH 02	2	MS 05	1	JY 10	1	DD 06	1
YH 03	1	MS 06	1	JY 11	3	CS 02	2
NA 01	1	MS 07	1	HH 01	1	CS 03	1
NA 02	1	MS 08	1	HH 02	1	CS 04	1
NA 03	1	MS 09	1	HH 03	2	CK 01	1
NA 04	1	MS 10	1	HH 04	2	CK 02	2
NA 05	1	MS 11	1	HH 06	1	CK 03	1
NA 06	1	MS 12	1	HY 01	2		
NA 07	1	JY 01	1	HY 02	1		
NA 08	1	JY 02	1	HY 03	4		

된다.

산출된 염기변이에 기초한 UPGMA 방법의 유집분석을 수행한 결과 호랑가시나무의 지역 개체군 집단 간에는 일정한 유전적 불연속성을 나타내지는 않았다(Fig. 1). 하지만 호랑가시나무의 각각의 type 간에는 일정한 유전적 거리를 나타냄으로서 유전적인 개별성을 보여주었다.

지역별로 각 유형들의 분포를 살펴보면 전라북도 무안은 type1, 2가 나타났고 전라남도 영광은 type1, 2, 나주, 무안은 각각 type1만 나타났다. 또한 장흥은 type 1, 3, 6이 나타났다. 이에 반해 제주도에서 채집된 개체들은 type6을 제외한 모든 유형들이 나타났다. 특히 남제주군 대정읍에서 채집된 4개의 개체들은 모두 다른 유형(type1, 3, 5, 8)이 나타남으로서 다른 지역에 비해 상대적으로 ITS 구간에서 가장 다양한 유전적 다양성을 보여주었다. 이에 비해 전라남도 나주와 무안에서 채집된 23개 개체들은 모두 type1 유형만 나타내서 ITS 구간에서는 다른 지역의 개체들에 비해 상대적으로 낮은 다양성을 보여주었다. 이처럼 제주도 지역이 온대남부지방의 바닷가 지역보다 다양성이 높게 나타남으로써 유전적 다양성이 더 높을 수 있음을 암시한다. 일반적으로 종의 지리적 분포에 있어서 기원집단의 유전적 다양성이 가장 높으며, 파생된 집단은 상대적으로 유전적 다양성이 낮은 것으로 알려져 있다(Frankham *et al.*, 2004). 따라서 ITS구간의 다양성을 기초로 한국에 자생하는 호랑가시나무는 제주도에서

육지로 파생되었을 가능성이 있다고 볼 수 있다.

호랑가시나무와 같이 조경용으로 널리 이용되고 있는 식물 종들은 그 서식지의 파괴와 최소한의 개체 육종으로 인해 유전변이 감소가 지속적으로 이루어지고 있다. 일반적으로 종의 감소나 멸종이 가시적인 것이라고 한다면 종내의 유전변이 감소는 눈에 보이지는 않지만 진화과정에 있어서 종을 유지하는데 필수적인 유전자 변이 폭이 좁아지기 때문에 매우 심각한 문제이다(Park, 1994). 또한 유전변이의 손실은 환경적 조건의 변화에 대한 개체군의 적응능력을 감소시키는 결과를 초래한다(Arft and Ranker, 1998; Frankham *et al.*, 2004). 따라서 이런 식물 종들에 대한 자생지의 보존은 유전적 다양성이 가장 높은 지역부터 우선적으로 선정하여 이루어져야 할 것이다. 남제주군 대정읍에서 채집된 개체군은 조사된 개체군들 중에 가장 다양한 ITS 유형들이 존재하고 있다. 하지만 이들 서식지들은 대부분 인근 주민들의 밭으로 개간된 지역에 간헐적으로 존재하고 있어서 자생지의 파괴가 심각하게 이루어지고 있다. 따라서 이 지역에 대한 자생지 보존이 절실히 요구된다.

본 연구에서는 중국의 자생지에 대한 충분한 조사가 이루어지지 않아 중국과 한국에 자생하는 호랑가시나무의 비교 및 기원지를 파악하기에는 어려울 것으로 보인다. 따라서 앞으로 중국에 자생하고 있는 호랑가시나무 개체군에 대해 더 많은 조사와 국내의 분포지로 알려져 있는 완도 및 해남 개체군의 추가적인 조사가 필요할 것이다. 또한 ITS 구간 이외의 적절한 분자 마커를 선정해서 분자유전학적 연구를 함께 수행하여 호랑가시나무 개체군에 대한 유전적 다양성을 충분히 조사할 경우 현재 조경소재로 과도한 남획 및 서식지의 단편화로 인해 급격한 유전적 다양성 감소가 예상되고 개체군이 급격히 파괴되어 가고 있는 호랑가시나무의 종 보존 대책의 기초 자료를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2005년도 정부(과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 205-B-000-039)

인 용 문 헌

- Alvarez, I. and J. F. Wendel. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogen. Evol.* 29: 417-434.
- Arft A. M. and T. A. Ranker. 1998. Allopolyploid origin and population genetics of the rare orchid *Spranthes dilvialis*. *Am. J. Bot.* 85: 110-122.
- Baldwin, B. G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. *Mol. Phylogen. Evol.* 1: 3-16.
- Doyle, J. J. and J. A. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure of small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer.* 19: 11-15.
- Frankham, R., J. D. Ballou, and D. A. Briscoe. 2004. A primer of conservation genetics. Cambridge University Press. Cambridge. Pp. 12-30.
- Galle, F. C. 1997. Hollies. Timber Press. Portland. Pp. 312-323.
- Hume, H. H. 1953. Hollies. The Macmillan Company. New York. Pp. 80-102.
- Jackson, R. B., L. A. Moore, W. A. Hoffmann, W. T. Pockman, and C. R. Linder. 1999. Ecosystem rooting depth determined with caves and DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 11387-11392.
- Jung, Y. H., S. H. Han, Y. S. Oh, M. H. Ko, S. C. Koh, M. H. Kim, M. Y. Oh. 2000. Genetic variation and phylogenetic analysis of genus *Abies* distribution in Korea based on RAPD and nuclear rDNA ITS2 sequences. *Kor. J. Genetics* 22: 341-354.
- Kim, Y. D., J. W. Park, B. Y. Sun, K. J. Kim, E. J. Lee, and S. H. Kim. 2005. ITS sequence variations in common ragweed and giant ragweed. *Korean J. Pl. Taxon.* 35: 273-285. (in Korean)
- Kim, K. J. and R. K. Jansen. 1994. Comparisons of phylogenetic hypotheses among the different data sets in dwarf dadelion (*Krigia*, Asteraceae): Additional information from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Pl. Syst. Evol.* 190: 157-185.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Koh, M. H., Y. S. Kim, and H. K. Oh. 2005. Morphological Characteristics of Chinese Holly (*Ilex cornuta*) Leaves in Korea. *Kor. J. Env. Eco.* 19: 348-357. (in Korean)
- Lee, J. S. 1983. Studies on the natural distribution and ecology of *Ilex cornuta* Lindley et Pax. *Jour. Korean For. Soc.* 62: 24-42. (in Korean)

- Miller, C. F. and M. Y. Kim. 2002. *Ilex* × *wandoensis* C. F. Miller & M. Kim, a new hybrid species of *Ilex* (Aquifoliaceae) from Korea. Korean J. Pl. Taxon. 32: 293-300.
- NRC. 1991. Managing Global Genetic Resources. National Academy Press, WA. USA. Pp. 228.
- Park, C. M., B. S. Seo, K. H. Kim, J. M. Park, and S. J. Lim. 2000. Inhabitation Enviroments and Growth Conditions of *Ilex cornuta* Community in Pyonsanbando. Kor. Insti. Traditional Landscape Arch. 18: 100-115. (in Korean)
- Park, Y. G. 1994. Strategy for Bio-Diversity and genetic conservation of forest resources in Korea. Jour. Korean For. Soc. 83: 191-204. (in Korean)
- Saghai-marroof, M. A., K. M. Soliman, R. A. Jorgensen, and R. W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chorosomal location, and population dynamic. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 8014-8018.
- Sambrook J. and D. W. Russell. 2001. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Ed 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Swofford D. L. 2002. PAUP : Phylogenetic analysis using parsimony and other methods (ver. 4.0), Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- 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 tool. Nuc. Acids Res. 25: 4876-4882.
- White, T. J., T. Birms, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols : A guide to methods and applications, Innis, M., D. Gelfand, J. Sninsky and T. White (eds), Academic Press, San Diego Pp. 315-322
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nuc. Acids Res. 18: 6531-6535
- Williams, M. N. V., 1992. RFLP analysis of polymerase chain reaction products amplified from mapped loci of rice (*Oryza sativa* L.) genomic DNA. *Theor. Appl. Genet.* 82: 489-497
- Yim, K. B. 1979. Variation of genus *Ilex* in Korea and their ornamental values. J. Kor. For. Soc. 42: 1-38 (in Korean)

ITS Sequence Variations in Populations of *Ilex cornuta* (Aquifoliaceae)

Sung-won Son, Joo-Hwan Kim¹, Yong-Shik Kim² and Seon-Joo Park*

Department of Biology, Yeungnam University, Gyeonsan 712-749; ¹Department of Life Science, Daejeon University, Daejeon 300-716; ²Faculty of Natural Resources, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

Genetic variation of *Ilex cornuta* Lindley et Paxton was examined by sequence analyses of ITS for 65 individuals from Korea and China. The length of ITS 1 ranged from 253 to 259 bp. The 5.8S was 159 bp and ITS2 was observed to be 231 bp. A total of 8 different ITS types (Single Nucleotide Polymorphism haplotypes), which showed the difference of 1 - 6 bp, were detected from 65 individuals. The sequence polymorphisms of ITS appeared at 9 different sites. All of four individuals collected at Daejeong-eup in Jeju-do exhibited different types, but all individuals from Naju-si and Muan-gun in Jeollanam-do were identical. The variation of ITS was higher in Jeju-do population than in inland population. Since *I. cornuta* contains various types of ITS sequences, ITS analyses will provide important information on genetic diversity and conservation of this species.

Key words: genetic variation, habitat conservation, ITS types, SNP Haplotype

*Corresponding author: Phone 053-810-2377, Fax 053-810-4618, sjpark01@ynu.ac.kr