ISSR을 이용한 고추나물 집단의 유전적 다양성과 계통학적 연구

허홍욱* · 허만규[1] · 강동호[1]

부산대학교 사범대학 과학교육과 생물교육 전공

Received April 5, 2007 / Accepted May 22, 2007

Genetic diversity and Phenetics of *Hypericum erectum* Populations Using inter-simple sequence repeat Markers. Hong Wook Huh, Man Kyu Huh[1] and Dong Ho Kang[1]. *Biological Education, Pusan National University,* [1]*Division of Molecular Biology, Dongeui University* – Inter simple sequence repeat (ISSR) markers were performed in order to analyse the phylogenetic relationships of eight *Hypericum erectum* populations in Korea. The six primers were produced 37 reproducible ISSR bands. Analysis of ISSR from individual plants of Korean *H. erectum* resulted in 22 polymorphic bands with 59.5%. Across populations, the mean number of alleles per locus was 1.348 and Shannon's information index was 0.203. Population Mt. Gyeryong had the highest expected genetic diversity (0.175) among all populations. When species were grouped by eight populations, within group diversity was 0.140 (H_S), while among group diversity was 0.472 (G_{ST}) on a per locus basis. The estimated gene flow (Nm) for *H. erectum* was very low (0.561). It is suggested that reproductive isolation by the isolation of geographical distance among *H. erectum* populations and genetic drift may have played roles in shaping the population structure of this species. In phenetic tree, all populations were well separated from each other. Thus, ISSR markers are very effective in classifying natural population levels of genus *Hypericum* in Korea.

Key words – *Hypericum erectum*, ISSR markers, phylogenetic relationships

서 론

식물 집단의 구조에는 여러 요인이 영향을 줄 수 있는 중요한 요인으로 교배체계(inbreeding system), 종자분산기작(seed dispersal mechanism), 작은 서식 집단에서 자연도태(natural selection) 등이 있다[10]. 이런 요인들을 간접적으로 측정하거나 집단간 또는 집단내 변이를 측정하거나 계통분류를 조사하기 위해 allozyme marker가 널리 사용되어져 왔다.[4,5,11] 진화적 과정을 연구하는 유전적 지표로서 allozyme 분석이 중요한 역할을 수행하고 있으나 allozyme 발현이 일부 제한적이거나 일부 allozyme은 모계 유전을 따르기 때문에, allozyme 다형이 도태적으로 중립적인가 하는 의문이 제기되고 있다[15].

한편, 그러한 생화학적 한계를 극복할 수 있는 새로운 분자 마커가 제시되고 있다. 특히 RAPD (random amplified polymorphic DNA), SSR (simple sequence repeats)이나 ISSR (inter simple sequence repeats)과 같은 PCR에 기초한 분자 마커가 유전적 다양성과 집단 유전 구조 연구에 널리 이용되고 있다[2,12,21]. ISSR 마커는 단순한 반복 서열에 의한 분자 마커로 이들 밴드들은 그 기능은 알 수 없지만 반복 서열이 게놈내에 위치하여 종이나 집단에 특이적으로 판정하는데 좋은 분류형질에 도움이 되며, SSR 마커와는 달리 목표로 하는 사전 서열의 지식이 필요치 않아 사용하기에 매우 편리하고[7,26], AFLP (amplified fragment length polymorphism)보다 간단하다[27].

ISSR은 RAPD보다는 primer 당 다형성 파편의 수가 더 많아 효과적이라는 보고가 있다[12]. ISSR은 ISSR primer들의 높은 결합 온도와 더 긴 서열 때문에 RAPD와 보다 정확하고 재생 가능한 밴드들이 생성된다고 지적하고 있다[6]. ISSR이 목표로 하는 반복 서열은 진핵 게놈 전체에 걸쳐 풍부하지만, 빠르게 진화하는 것으로 알려져 있다. 따라서, ISSR은 집단유전 연구, 특히 유연관계가 근연한 종이나 집단의 유전적 다양성과 유전자 지문의 검출에서 그 유용성이 입증되고 있다[9,27].

한국의 고추나물속(*Hypericum*) 식물에는 고추나물(*Hypericum erectum* Thunb.)과 물레나물(*Hypericum ascyron* Linne)을 포함하여 11종이 우리나라 각처에 자생한다[18]. 이 속의 집단들은 전형적으로 작으며 패치(patchy) 구조를 형성한다. 한국산 고추나물은 일부 산지의 양지바른 해발고도 200~1,200 m 습지에서 흔히 발견된다[18].

한방에서는 6-8월에 고추나물 식물 전체를 채취하여 말린 것을 소연교(小蓮翹)라고 하며, 지혈 작용이 있어서 토혈, 코피, 혈변, 월경 불순, 외상 출혈, 타박상, 종기 등에 처방한다. 전초 추출액은 신경계통 질병, 청각장애, 류마티스, 근염, 관절염, 허리병, 두통, 고열, 만성피로, 만성통증, 신석증과 신염 등을 치료하기 위해 먹거나 피부에 바르기도 한다[13]. 또한, 활혈, 지혈, 조경, 통유, 소종, 지통, 토혈, 장궁출혈, 유즙불통

*Corresponding author
Tel : +82-51-510-2698, Fax : +82-51-510-2698
E-mail : hwhuh@pusan.ac.kr

치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있다[19].

서양고추나물(*Hypericum perforatum*)은 서양에서는 『성 요한의 풀(St. John's wort)』이라고도 불리우고 있으며, 고대부터 우울증을 포함한 여러 질병들을 치료하기 위한 약초로 쓰여 온 식물로 유럽·아시아·북부 아프리카·북아메리카 등지에 널리 분포되어 있다[1]. 서양고추나물에는 여러 가지 화학물질들이 포함되어 있다[23]. 이 중 하이퍼리신(Hypericin)과 하이퍼포린(Hyperforin)이 중요한 성분으로 서양고추나물은 수백 년 동안 서양에서 우울증을 포함한 여러 질병들을 치료하기 위한 약초로 쓰여 온 식물이다[1,23]. 이러한 성분들이 몸에서 어떻게 작용하는지는 아직 명확하게 규명되지 않았지만 서양고추나물이 뇌에서 신경전달물질인 세로토닌(serotonin)의 재흡수를 방해하거나 몸의 면역체계에서 어떤 역할을 하는 특별한 단백질의 농도를 낮춤으로써 작용할 것이라는 추측을 하고 있다[1]. 그러나 우리나라에는 서양고추나물은 자생하지 않으나 같은 고추나물속(*Hypericum*)이 있다. 특히 고추나물은 서양고추나물 못지않게 하이퍼리신 성분이 많은 것으로 보고되고 있다[14].

현재 많은 국내 식물종 사이의 분류학적, 계통발생학적 유연관계를 규명하기 위하여 집단유전학적 접근이 이루어지고 있으나, 고추나물속 식물에 대한 연구는 매우 빈약하다[14]. 그래서 본 연구의 목적은 한국산 고추나물에서 유전적 다양성의 수준을 추정하고, ISSR maker를 이용하여 이들 집단간 분화의 양상을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

재료

한국에 자생하는 고추나물(*H. erectum*) 8개 집단으로부터 2005년 6월에서 2006년 9월까지 잎을 채집하였다(Fig. 1). 각 집단에서 동일 모계의 것을 배제하기 위하여 1 m 이상 이격하여 16개체 이상을 채집하였다. 한 개체 당 1~2개의 신선한 잎을 사용하여 DNA 추출에 이용하였다. 같은 고추나물속의 물레나물(*H. ascyron*)을 대조군으로 사용하였다.

Genomic DNA 추출과 ISSR 분석

각 식물체로부터 DNA를 추출하기 위하여 Plant DNA Zol Reagent (Life Technologies Inc., Grand Island, New York, USA)를 사용하였는데 제조사의 지침서에 의거하여 추출하였다. 신선한 고추나물 잎 약 1.2g을 계량한 다음 액체질소에 넣고 잘 마쇄하였다. DNA Zol을 튜브에 넣고 조직용해를 위해 교반시켰다. Isoamyl alcohol과 chloform의 혼합 용액을 넣고 세게 흔들어 섞고 원심분리를 실시하여 DNA를 침전시켰다. 이후 DNA 침전반응, 세척과정, 용해 반응 등을 거친 후 건조하여 TE 100 μl에 용해하였다. 3일간 냉장보관한 후 DNA를 정량하였다.

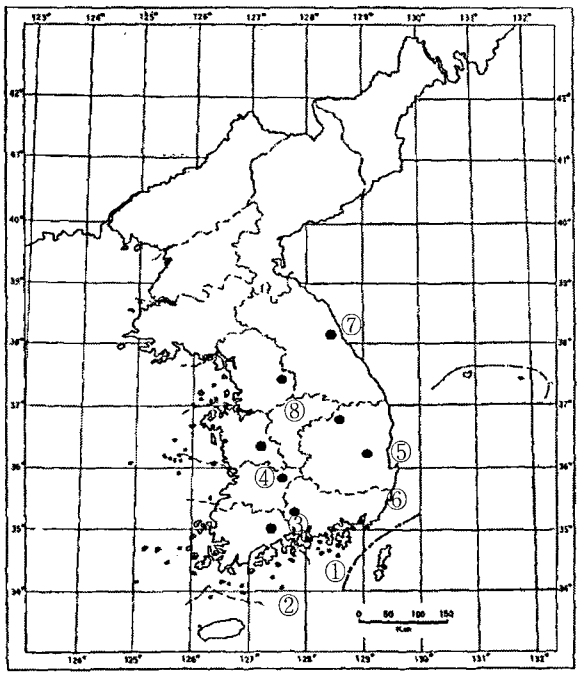

Fig. 1. Population locations of *Hypericum erectum* for ISSR analysis. ① GIR: Mt. Giri, Gyeongsangnam-do, ② JEO: Mt. Jeokae, Cheonlanam-do, ③ DEO: Mt. Deogyu, Cheonlabuk-do, ④ GYE: Mt. Gyeryong, Chungcheongnam-do, ⑤ SOB: Mt. Soback, Gyeongsangbuk-do, ⑥ JUW: Mt. Juwang, Gyeongsangbuk-do, ⑦ SEO: Mt. Seorak, Gangwon-do, ⑧ YON: Mt. Yongmun, Gyeonggi-do.

각 개체에서 DNA를 분석하기 위하여, 11개의 primers를 사용하였다. 그 중 예비 실험을 통해 ISSR band가 잘 나타나는 6개 ISSR primers를 선정하여 본 실험에 적용하였다(Table 1). ISSR primers는 바이오니아사(Bioneer Technologies Inc.)로부터 주문 제작하여 구입하였다.

ISSR 분석은 다음과 같이 실시하였다. PCR 반응을 위해 게놈 DNA (1 ng/μl) 5 μl, primer (5 μM) 2 μl, dNTPs (250 μM total) 2 μl, Taq-polymerase (5 U/μl) 0.2 μl, 10 × buffer 2.5 μl, distilled water 13.3 μl 등 총 25 μl 반응물을 혼합하였다. 증폭반응은 DNA Thermal Cycler (BIOMETRA)에서 초

Table 1. List of decamer oligonucleotide utilized as primers, their sequences, and associated fragments

No	Sequence (5′ to 3′)	No. of fragments
ISSR-04-01	-AGAGAGAGAGAGAGAGG-	8
ISSR-04-02	-CTCTCTCTCTCTCTCTG-	9
ISSR-04-03	-CACACACACACACACAG-	5
ISSR-04-05	-GGAGAGGAGAGGAGA-	5
ISSR-04-08	-GAGAGAGAGAGAGAGATC-	6
ISSR-04-09	-GCGAACACACACACACACAC-	4
Total		37

기 온도 94℃에 2분, 이어서 35사이클로 94℃에 30초, 50℃ 30초, 72℃ 60초, 그리고 마지막 신장과정은 72℃에서 5분간 실시하였다. 재현성을 위해 모든 실험은 2회에 걸쳐 실시하여 일치된 결과만 분석에 사용하였다. 증폭된 DNA 산물을 1.5% 아가로스 젤에서 전기영동을 실시한 후, ethidium bromide로 염색하고, Alpha Image TM (Alpha Innotech Co., U.S.A)으로 UV하에서 밴드 양상을 분석하였다.

데이터 분석

육안으로 식별되는 모든 단형성(monomorphic)과 다형성(polymorphic)을 나타내는 ISSR 밴드를 분류하여 명백하게 분류된 밴드들만 본 연구의 분석에 이용하였다. 각 다형성 ISSR 밴드의 유무에 따라 존재시 1, 부재시 0으로 이진법 처리하였다.

여러 유전학적 표준 척도는 컴퓨터 프로그램 POPGENE (ver. 1.31)과 AMOVA를 사용하여 추정하였다[29]. 다형현상을 나타내는 유전자좌위(polymorphic loci)의 퍼센트(*Pp*), 유전자좌위당 대립유전자의 수(*A*), 유전자좌위당 유효한 대립유전자의 수(A_E), 유전자 다양성(*H*), 샤논의 정보지수(Shannon's *I*) 등을 POPGENE으로 산출하였다[17].

각 집단에 대한 다형성 정도는 표현형 다양성으로 산출하였다[3].

$$Ho = - \sum p_i \log p_i$$

여기서 p_i는 특정한 표현형 i의 빈도이다. H_O를 이용하여 집단들의 차이를 계산하고 비교하였다[20].

$$H_{POP} = 1/n \sum H_O$$

n 개의 다른 집단들 사이의 다양성 평균을 계산하였다.

$$H_{SP} = - \sum p \log p$$

모든 집단들을 함께 고려한 표현형 빈도 p로부터 종의 다양성이 계산되었다. 집단내 존재하는 다양성 비율은 H_{pop}/H_{sp}, 집단들 사이의 다양성 비율은 $(H_{sp} - H_{pop})/H_{sp}$ 로 비교한다.

유전자형 사이의 유전자 유사성(GS)의 평가는 한 개체로부터 증폭된 단편이 다른 개체에 역시 존재하는 밴드의 빈도에 기반하여 다음과 같이 산출하였다.

$$GS = \frac{2 \times \text{Number of shared fragment between A and B}}{\text{(Number of fragment in A + Number of fragment in B)}}$$

이 GS값은 유전적 거리를 산출하기 위해 1-GS로 전환하여 사용하였다.

집단들내 그리고 집단들 사이 유전적 다양성의 분포 값을 계산하기 위해 Nei's 유전자 다양성 공식(H_T, H_S, G_{ST})을 사용하였다. 특히 G_{ST}는 집단들 사이에 유전적 분화의 정도를 측정하는데 사용하였다. 집단들 사이에 세대당 이주하는 개체수(Nm)는 G_{ST} 값으로부터 $Nm = 0.5(1/G_{ST} -1)$로 계산하였다[16].

집단간 분화는 이웃연결법(neighbor-joining: NJ)으로 실시하였다[22]. 이를 위해 앞서 분석한 유전적 거리로 통계프로그램, NEIGHBOR program (PHYLIP version 3.57)을 사용하였다[8].

결 과

ISSR 분석을 통해 사용된 6종류의 primer에서 고추나물에 특징적이면서도 다형성을 나타내는 밴드들이 많이 나타났다 (Table 1). ISSR-04-09 primer가 가장 적은 4개 밴드를 나타내었으며 ISSR-04-02 primer가 가장 많은 9개 밴드를 나타내었다. 전체적으로는 37개의 단편이 나타났다. 이 중에서 22개 밴드(59.5%)는 8개 집단에 대해 다형성을 나타내었다.

집단내 변이의 단순한 산출 값으로 다형성을 나타내는 백분율은 강원도 설악산이 가장 낮은 27.0%였으며 경상북도 주왕산과 경기도 용문산 집단이 29.7%로 30%이하의 다형성을 나타내었다(Table 2). 반면에 충청남도 계룡산 집단(43.2%)이 가장 높게 나타났다. 평균은 34.8%였다.

유전자좌위당 대립유전자의 수(*A*)는 평균(1.348)이며, 설악산 집단(1.270)이 가장 낮고, 계룡산 집단(1.432)이 가장 높았다. 유전자좌위당 유효한 대립유전자의 수(A_E)는 평균 1.251이며, Nei의 집단내 유전자 다양성(*H*) 평균값은 0.139이고, Shannon의 정보지수(*I*)는 0.203로 나타났다. 그러나 Wilcoxin's signed-rank 테스트에 따르면 이들 매개변수($p > 0.05$) 값에는 유의한 차이가 없었다.

각 band의 표현형 빈도를 계산하고 집단내 유전적 다양도 평가에 이용하였다. 고추나물의 전체 유전적 다양도(H_T)는 0.264로 높고(Table 3), 집단내 유전적 다양도(H_S)는 0.140로

Table 2. Measurements of genetic variation for *Hypericum erectum*

Pop.	*Np*	*Pp*	*A*	A_E	*H*	*I*
GIR	14	37.8	1.378	1.279	0.153	0.221
JEO	13	35.1	1.351	1.245	0.139	0.203
DEO	14	37.8	1.378	1.302	0.163	0.234
GYE	16	43.2	1.432	1.321	0.175	0.254
SOB	14	37.8	1.378	1.268	0.151	0.221
JUW	11	29.7	1.297	1.212	0.119	0.174
SEO	10	27.0	1.270	1.178	0.101	0.150
YON	11	29.7	1.297	1.201	0.114	0.167
Mean	12.9	34.8	1.348	1.251	0.139	0.203

The number of polymorphic loci (*Np*), percentage of polymorphism (*Pp*), mean number of alleles per locus (*A*), effective number of alleles per locus (A_E), gene diversity (*H*), and Shannon's information index (*I*).

Table 3. Estimates of genetic diversity of *H. erectum*

Taxa	H_T	H_S	G_{ST}	*Nm*
H. erectum	0.264	0.140	0.472	0.561
S.D.	0.045	0.025	-	-

Total genetic diversity (H_T), genetic diversity within populations (H_S) proportion of total genetic diversity partitioned among populations (G_{ST}), and gene flow (*Nm*).

낮으며, 세대당 집단간 이주하는 평균 개체수($N-$)는 0.561로 매우 낮게 나타났다. 따라서 집단간 분화(G_{ST})는 0.472로 매우 높게 나타나 변이의 약 47%는 집단 간에 있음을 시사한다.

집단간 유전적 거리는 주왕산 집단과 설악산 집단이 0.038로 가장 근연관계에 있고 반면에 주왕산 집단과 조계산 집단이 0.296으로 가장 멀 것으로 나타났다(Table 4). 따라서 집단간 유전적 유사도는 가장 낮은 집단간 유사도가 0.744에서 가장 높은 유사도가 0.963으로 나타났다.

유전적 거리에 의한 계통수 분석에서 한국의 고추나물 집단은 조계산, 계룡산, 덕유산, 지리산이 한 그룹을 이루고, 주왕산, 설악산, 용문산, 소백산이 역시 한 그룹을 형성하여 전체 8개 집단이 크게 두 그룹으로 나뉜다(Fig. 2). 이 두 그룹은 지리적으로 볼 때 용문산을 제외하면 동서 지역으로 나누어진다.

고 찰

집단들 사이의 유전적 분화는 꽃가루와 씨의 분산을 매개로 하는 자연 선택, 유전자 이동, 유전자 교류가 중요한 개념이다[11,24]. 본 연구 결과의 가장 현저한 특징은 집단들 사이에 기록된 유전자 분화의 정도는 다른 다년생 종들에서 얻는 결과들과 비교할 때 비교적 높은 수준이었다. 예를 들어, 알로자임 분석에 기초를 둔 결과이지만 유전적 변이의 고찰에 따르면 타가수분이 현저한 다년생 식물 종에서 유전적 분화는 집단간 사이에 평균 10% 이하로 나타났다[10]. 그런데, 다

Table 4. Genetic identity (above diagonal) of eight *H. erectum* populations based on ISSR and genetic distances (below diagonal)

Pop.	GIR	JEO	DEO	GYE	SOB	JUW	SEO	YON
GIR	****	0.929	0.874	0.924	0.787	0.746	0.746	0.772
JEO	0.074	****	0.925	0.942	0.811	0.744	0.748	0.813
DEO	0.134	0.078	****	0.911	0.782	0.758	0.768	0.747
GYE	0.079	0.060	0.093	****	0.845	0.766	0.750	0.804
SOB	0.239	0.210	0.246	0.168	****	0.898	0.889	0.906
JUW	0.294	0.296	0.277	0.267	0.107	****	0.963	0.910
SEO	0.293	0.291	0.265	0.287	0.117	0.038	****	0.920
YON	0.259	0.207	0.291	0.219	0.099	0.094	0.084	****

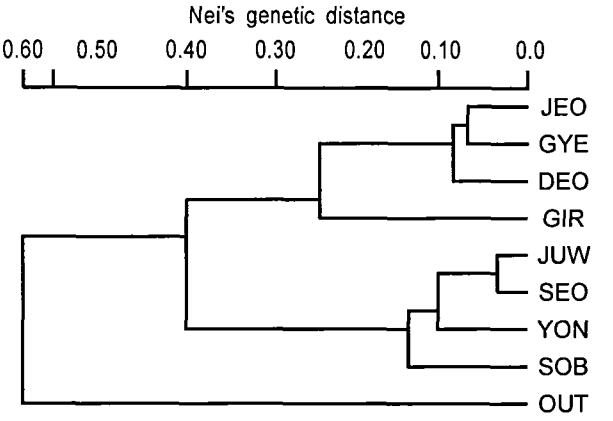

Fig. 2. A phenogram showing the relationships among eight populations of *H. erectum*, based on data of genetic distance obtained by ISSR. OUT: outgroup (*H. ascyron*).

년생 식물인 고추나물은 전체 변이의 약 47.2%가 집단 사이의 차이에 기인한다(G_{ST} = 0.472). 이는 집단의 크기가 작아 대군락을 이루는 곳이 전혀 없었고 한국내 고추나물 집단이 서로 격리되어 있는 것이 그 원인의 하나로 사료된다. 유전적 분화의 높은 정도는 집단 사이의 유전자 이동이 낮다는 것을 암시한다. 유전자 이동과 지리적인 거리 사이의 상호관계는 *Hypericum*속에서는 상대적으로 낮다(*Nm* = 0.561, Table 3). 고추나물의 유전자 교류는 역시 씨와 꽃가루의 분산에 관한 정보에 의해 식물 안에서 설명될 수 있다. 예를 들면, 고추나물의 열매 성숙의 기간은 늦은 10월에서 이른 11월이고, 성숙된 열매는 곤충과 바람에 의해 수송될 것이다. 이때에는 곤충들이 차가운 기후나 겨울잠으로 인해 거의 사라진다. 따라서 적어도 수분은 곤충보다는 바람에 의존할 것으로 판단되므로 집단이 격리되어 있어 효율적인 수분이 기대되지 않을 것으로 판단된다. 대신에 종자는 작고 가벼워 바람에 의해 장거리 이동이 가능할 것으로 판단된다. *Nm*값이 1.0이하이면 유전적 부동 효과가 전반적으로 크게 작용하는 것으로 알려져 있다[24,28]. 따라서 본 연구 결과 0.561은 유전적 부동을 상쇄시키기에 매우 부족한 값이다. 따라서 한국내 고추나물 집단은 유전적 부동이 크게 작용하는 것으로 볼 수 있다. 이는 앞서 기술한 집단의 크기가 작은 것이 그 원인으로 들 수 있다.

또한 실험 집단 사이에 서식지 고도에서도 차이가 있어 수직으로 이동하는 곤충류들에게는 수분을 기대하기 어려울 것으로 보인다(Table 1). 그런 까닭에 대부분의 집단이 같은 큰 지역내에서 작은 분집단이 거의 없지만 있다고 할지라도 분집단들간 고립이 발생할 것으로 사료된다. 유전자 이동은 집단들 사이에 낮기 때문에, 유전적 분화는 지역적 선택의 결과일 수도 있다. 유전자 변이와 지역적 선택은 집단들 사이에 유전 변이의 분포를 식별 가능하게 하는 요인이다.

비록 지역별 집단의 세분화가 더 이상 분석되지 않았지만,

고추나물 집단 내에 주로 존재하는 ISSR 변이는 중립적인 대립 유전자의 무작위적인 변이에 의해서든 대립 유전자의 적응을 위한 미세한 환경적 선택이든 patchily한 분포를 한 부분적인 집단이나 demes내에서 유지된다고 추측할 수 있다.

ISSR 마커에 기초한 계통수 내에는 집단들의 위치와 지리적인 위치가 한국의 집단과 거의 완전하게 일치하지 않지만 동서 구배가 일부 발견되었다(Fig. 2). 그 이유는 명확하지 않지만 태백산맥이 남북방향으로 형성되어 지리적 장벽이 그 한 원인일 수 있으나 그 가설은 검증이 필요할 것이다. 한편 분석한 8개 집단은 사용한 6개 primer로 모두 잘 구분되었다. 따라서 ISSR 마커는 한국 내 고추나물 야생 집단들을 구분하기에 매우 효과적이라고 볼 수 있다.

한국의 고추나물과 서양고추나물을 RAPD로 분석하였을 때 한국 고추나물의 다양도가 더 높았다[미발표]. 물론 한국의 고추나물과 서양고추나물의 하이퍼리신 서열을 분석하였을 때 99.9%가 일치하였지만 RAPD primer중에서는 하이퍼리신 서열이 포함되어 있지 않아 하이퍼리신 함량과 다양도와의 관계는 더 연구가 필요할 것이다. 그렇지만 하이퍼리신 함량이 더 높은 고추나물도 우울증으로 인한 자살률이 높은 우리나라 사람들의 치료용으로 널리 쓰일 것으로 기대된다. 따라서 본 연구 자료에 기초한 높은 변이를 가지는 몇몇 집단들은 특히 보존될 필요성이 대두될 때 기초 자료로 쓰일 수 있다[25]. 즉, 이들 높은 변이를 지닌 집단들은 유전적으로 중요한 자원으로 판명되어 종 복원을 위한 유전적 다양성의 근원으로 사용될 수 있다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음

참 고 문 헌

1. Bais, H., R. Vepachedu, C. Lawrence, F. Stermitz and J. Vivanco. 2003. Molecular and biochemical characterization of an enzyme responsible for the formation of *Hypericin* in St. John's Wort. *The Journal of Biological Chemistry* **34**, 32413-32422.
2. Barrett, S. C. H., C.G. Eckert and B. C. Husband. 1993. Evolutionary processes in aquatic plant populations. *Aquatic Botany* **44**, 105-145.
3. Bowman, K. D., K. Hutcheson, E. P. Odum and L. R. Shenton. 1971. Comments on the distribution of indices of diversity. *Stat. Ecol.* **3**, 315-359.
4. Brown, A. H. D. 1979. Enzyme polymorphism in plant populations. *Theor. Pop. Biol.* **15**, 1-42.
5. Ennos, R. A. and M. T. Clegg. 1982. Effects of population substructuring on estimates of outcrossing rate in plant populations. *Heredity* **48**, 283-292.
6. Esselman, E., J. L. Jiangquiang, D. J. Crawford, J. L. Winduss and A. D. Wolfe. 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrosis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and their simple sequence repeat (ISSR) markers. *Mol. Ecol.* **8**, 443-451.
7. Fang, D. Q. and M. L. Roose. 1997. Identification of closely related citris cultivars with inter-simple sequence markers. *Theor. Appl. Genet.* **95**, 408-417.
8. Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Plyogeny Inference Package) ver. 3.5s. Distributed by the author. Univ. Washington, Seattle, USA. http:// evolution.genetics.washington.edu/ phylip.
9. Godwin, I. D., E. A. B. Aiken and L. W. Smith. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* **18**, 1524-1528.
10. Hamrick, J. L. and M. J. W. Godt. 1989. Allozyme Diversity in Plant Species, pp. 304-319, In Brown, A. H. D., M. T. Clegg, A. L. Kahler and B. S. Weir (eds.), *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*, Sinauer Associates, Sunderland, MA.
11. Hamrick, J. L., M. J. W. Godt and S. L. Sherman-Broyles. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* **6**, 95-124.
12. Iruela, M., J. Rubio, J. I. Cubero, J. Gil and T. Mill. 2002. Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.* **104**, 643-651.
13. Jiao, S. D. 2003. *Ten Lectures of the Use of Medicinals*. pp. 711. Paradigm Publications, MA, USA.
14. Kim, S. H., Y. J. Jung, J. C. Ahn and B. Hwang. 2005. Hypercin contents of *Hypericum erecvtum* Thunberg. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* **13**, 101-104.
15. Kreitman, M. E. and H. Akashi. 1995. Molecular evidence for natural selection. *Ann. Rev. Ecol. System.* **26**, 403-422.
16. McDermott, J. M. and B. A. McDonald. 1993. Gene flow in plant pathosystems. *Ann. Rev. Phytopathy.* **31I**, 353-373.
17. Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **70I**, 3321-3323.
18. Oh, S. Y. 1982. An enumerative and phytogeographical studies of family *Hypericaceae* in Korea. *Research Review Kyungpook of National Univ.* **34**, 201-250.
19. Park, J. H., D. H. Kim, G. P. Chol, L. H. Ryu, K. Y. Lee and H. Y. Lee. 2004. Immune activities in *Hypericum perforatum* L. *Korean J. Medical Crop Sci.* **12**, 304-308.
20. Paul, S. P., F. N. Wachira, W. Powell and R. Waugh. 1997. Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) revealed by AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* **94I**, 255-263.
21. Qian, W., S. Ge and D. Y. Hong. 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.* **102**, 440-449.
22. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees.

Mol. Biol. Evol. **4I**, 406-425.

23. Samanani, N. S., D. K. Liscombe and P. J. Facchini. 2004. Molecular cloning and characterization of norcoclaurine synthase, and enzyme catalyzing the first committed step in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. *The Plant J.* **40**, 302-313.
24. Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* **236**, 787-792.
25. Templeton, A. R., K. Shaw, E. Routman and S. K. Davies. 1990. The genetic consequences of habitat fragmentation. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **771**, 13-27.
26. Tsumura, Y., K. Ohba and S. H. Strauss. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptonmeria japonica*). *Theor. Appl. Genet.* **92**, 40-45.
27. Russel, T. R., J. D. Fuller, M. Macaulay, B. G. Hatz, A. Jahoor, W. P. Powell and R. Waugh. 1997. Direct comparison of level of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* **95**, 714-722.
28. Wright, S. 1951. The genetic structure of populations. Ann. Eugen. 15: 313-354.
29. Yeh, F. C., R. C. Yang and T. Boyle. 1999. POPGENE version 1.31, Microsoft windows-based freeware for population genetic analysis, Edmonton, Canada.