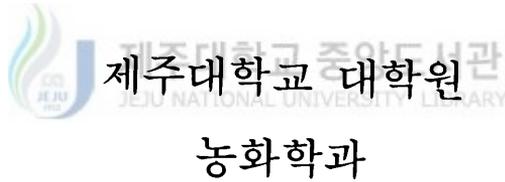


석사학위논문

참취(*Aster scaber* Thunb.) 총영
로제트의 발달과정과 DNA 다형성



이 도 승

110.397

2000년 12월

참취(*Aster scaber* Thunb.) 총영 로제트의 발달과정과 DNA 다형성

지도교수 류 기 중

이 도 승

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함



이도승의 농학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	_____	인
위 원	_____	인
위 원	_____	인

제주대학교 대학원

2000년 12월

Developmental Process and DNA
Polymorphism of Rosette Gall in
Aster scaber Thunb.

Do-Seung Lee
(Supervised by Professor Key-Zung Riu)



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF AGRICULTURAL CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

December 2000

목 차

그림목차

Summary

I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 참취식물재료	4
2. 방 법	4
2.1. 실험실내에서의 충영로제트 유기	4
2.2. 충영로제트의 형태 해부학적 관찰	5
2.3. 충영로제트의 DNA 다형성 조사	5
2.3.1. Genomic DNA 분리 및 정제	5
2.3.2. RAPD를 위한 PCR 조건	6
2.3.3. RNA의 분리	7
2.3.4. cDNA의 합성	9
2.3.5. cDNA의 PCR 조건	10
III. 결과 및 고찰	11
1. 참취 충영의 형태 및 발생부위	11
2. 충영로제트의 발달과정	15
3. 충영로제트의 DNA 다형성	27
IV. 요 약	34
V. 참고문헌	36

그림 목차

- Figure 1. A daughter plant on the leaf of mother plant ?
- Figure 2. Whole plants of *Aster scaber*.
- Figure 3. Locations of the rosette gall formation in *A. scaber*.
- Figure 4. *Dasineura* laying eggs, appearance of oviposition and shape of the eggs on the surface of a leaf.
- Figure 5. Growth of the early rosettes on the same leaf.
- Figure 6. Flowers of normal plant and rosette gall.
- Figure 7. A larva in the center of rosette gall in flowering stage.
- Figure 8. Longitudinal section of rosette gall with larvae.
- Figure 9. Preparation of a larva by peeling off the main parts of the gall chamber. Mouth of the larva directed towards the basis of the chamber.
- Figure 10. A larva collected from the rosette gall.
- Figure 11. RAPD analysis of normal leaf and rosette gall of *A. scaber*. with random primers.
- Figure 12. Agarose gel electrophoresis of total RNAs extract from normal leaf & rosette gall of *A. scaber*.
- Figure 13. RT-PCR for mRNAs extracted from the tissues of normal leaf and rosette gall of *A. scaber*.

summary

The developmental process and DNA polymorphism of rosette like insect galls (rosette galls) in *Aster scaber* Thunb. were investigated.

1. Naturally occurring rosette galls were found at any aerial part of Aster plant including leaf, petiole, node and stem. Most frequently, however, rosette galls were observed on the upper or lower surface of leaves.

2. Rosette galls were successfully reproduced in a laboratory. When Aster plants with rosette galls collected from fields in autumn were transplanted into a pot, covered with nylon mesh and kept it outside during winter, rosette galls were developed at the newly emerged aerial parts of plants in next spring.

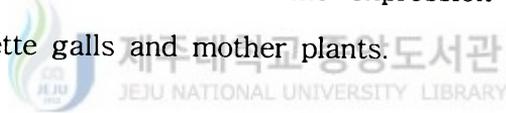
3. In early May, we observed very small unidentified insects laying eggs on the leaf surface of newly emerged Aster plant in the pot. Later, gall formations were initiated from the oviposited leaf parts.

4. The young small galls at the oviposited leaf parts developed

gradually into rosette like plantlets and finally one or more of pseudoflowers were formed in the middle of rosettes in autumn. In each pseudoflower there were a larval chamber containing a lava with its head toward inside of the rosette.

5. The results of RAPD analysis showed that there was a difference in genomic DNA polymorphism between rosette galls and mother plants.

6. The data of RT-PCR analysis for total RNA indicated that there was a difference also in the expression of several genes between rosette galls and mother plants.



I. 서 론

식물체에 흔히 발견되는 혹 모양의 이상조직 즉 영류(gall)는 다른 생물과 식물의 상호작용에 의하여 생기는 것으로서 우리나라, 중국, 인도 및 유럽 등지에서는 오래 전부터 의약 및 식품으로 널리 이용되어 왔다(Mani 1992). 식물의 영류는 영류형성자(gall maker, gall inducer)에 의해 분비되는 어떤 자극에 의해 식물체 일부의 세포가 비정상적인 증식을 하거나, 무핵 또는 거대핵, 다핵 등 핵에 이상이 생기거나, 조직의 분화과정에 이상이 생겨서 만들어지는 것으로 알려져 있다. 식물병리학적으로 볼 때 영류는 식물의 비정상 조직 또는 기관(Mani, 1964)이며, 식물의 조직이 비대해진 것뿐만 아니라 축소된 것도 포함한다(Meyer, 1987).

식물의 영류를 형성시키는 생물로는 바이러스, 마이코플라즈마, 박테리아, 곰팡이, 곤충, 응애, 선충 등이 있는데 이중 곤충에 의해 생기는 영류를 충영(insect gall)이라 부른다(Meyer, 1987). 충영을 형성하는 곤충은 약 13,000종 정도가 알려져 있는데(Bani, 1992), 총채벌레목(Thysanoptera)의 Thripidae, aphididae, 노린제목(Hemiptera), Tingidae, Beesoniidae, 딱정벌레목(Coleoptera)의 Buprestidae, Moredllidae, 벌목(Hymenoptera)의 Tenthredinidae, cynipidae, 파리목(Diptera)의 Cecidomyiidae, Chloropidae, 그리고 나비목(Lepidoptera)의 Tortricidae, Sesiidae 등이 알려져 있다(Yukawa 와 Masuda 1996).

충영이 형성되는 식물로는 소나무과(Pinaceae)의 소나무(*Pinus*

densiflora), 가문비나무(*Picea jezoensis*), 삼나무과(Taxodiaceae)의 삼나무(*Cryptomeria japonica*), 주목(*Taxus cuspidata*), 버드나무과(Salicaceae), 왕버들(*Salix chaenomeloides*), 개키버들(*Salix integra*), 국화과(Compositae)의 참취(*Aster scaber*), 미역취(*Solidago virgaurea* var. *asiatica*), 참나무과(Fagaceae)의 굴참나무(*Quercus variabilis*), 종가시나무(*Quercus glauca*), 장미과(Rosaceae)의 매실나무(*Prunus mune*), 윤노리나무(*Pourthiaea villosa* var. *laevis*) 그리고 콩과(Leguminosae)의 콩(*Glycine max*), 아카시아나무(*Robinia pseudoacacia*)등이 있다.

충영을 형성하는 곤충은 대부분 기주식물에 대해 고도의 특이성을 나타낸다(Dredge-Jauffret 와 Shorthouse, 1992). 즉 기주식물의 생리기능, 화학적 성질, 성장 그리고 주변 기후 등의 작은 차이를 감지하기 때문에 충영 형성자들은 숙주식물들의 종간 차이를 구별할 수 있다(Floate 등, 1996). 충영 형성자 중에서 특히 *Rhabdophaga asteriae*, *Lasioptera astericoli*, *Lasioptera gibaushi*, *Dasineura astericoli*, *Dasineura asteriae*의 곤충들은 참취(*Aster scaber*; Shinji, 1938, 1939, 1944)에 충영을 형성하는 원인곤충으로 알려져 있다.

충영은 식물의 여러 조직에서 형성될 수 있는데 식물의 특정조직에서만 형성되는 것을 조직충영(Histioid gall)이라 하고, 기관전체가 충영이 되는 것을 기관충영(Oganoid gall)이라 한다(Küster, 1911; Yukawa 와 Masuda, 1996). 물론 조직과 기관이 전부 충영이 되어 명확히 구별할 수 없는 경우도 많다. 기주식물과 충영 형성 곤충사이의 특이성 때문에 곤충은 특정 기주식물에만 충영을 형성(Cornell, 1983; Abrahamson 와 Weis, 1987)할 뿐만 아니라, 형성되는

충영의 형태도 원추모양(conical), 공모양(spherical), 원통모양(cylindrical), 꽃모양(flower or rosette like), 복합모양(fusiform) 등 다양하다(Floate 등, 1996; Weis 등, 1988).

꽃모양의 충영(rosette gall)을 형성하는 곤충으로는 *Asphondalia*, *Bayeria*, *Dasineura*, *Gallacoccus*, *Marcolabis*, *Rhopalomyia*, *Thilak* 등이 알려져 있는데, 이들은 각각 *Baccharis*, *Euphoria*, *Aster*, *Shorea*, *Populus*, *Solidago*, *Acacia*, *Rosa* 에 충영을 형성시킨다(Gagne 와 Boldt, 1995; Solinus 와 Pecoa, 1984; Shinji, 1944; Anthony, 1977; Skuharavý 등, 1997; Raman 와 Abrahamson, 1995; Raman 와 Anathakrishnan, 1983; Amrine 와 Hindal, 1988). 이 중에서 특히 Diptera(Cecidomyiidae)의 *Dasineura asteriae* Shinji는 참취의 충영로제트(rosette gall)를 발생시키는 원인 곤충으로 추정되고 있다(Shinji, 1944).

참취(*Aster scaber* Thunb.) 식물체에 로제트 모양의 충영이 형성된다는 것은 이미 오래 전에 알려졌다(Shinji, 1944). 그러나 현재까지 참취충영의 형성원인 곤충도 정확하게 동정되지 않았을 뿐만 아니라 충영의 분화과정이나 충영으로부터 분화된 로제트 식물체와 모식물의 유전적 동질성에 관한 연구 등 기초연구도 거의 이루어지지 않았다. 본 연구는 참취 충영 로제트 식물체에 관한 기초연구로서 참취의 충영을 실험실내에서 유지시키는 방법을 확립하고, 이들 충영이 유지되는 정확한 원인과 충영이 로제트로 발달해 가는 과정을 조사하고 DNA 다형성 분석을 통해 정상적인 모식물과 충영으로부터 분화되는 로제트 식물체 간의 유전적 동질성을 비교검토 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 참취 식물 재료

충영(rosette gall)이 형성된 참취 식물체 및 충영이 없는 정상적인 참취 식물체는 제주도 북제주군 애월읍 소길리 소재 산 16번지 일대(해발 약 500m) 참나무 숲에 자생하는 것을 채집하여 사용하거나, 자생지에서 충영이 형성된 식물체를 제주대학교 방사능이용연구소 뒷편에 이식하여 재배하면서 사용하였다.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2. 방 법

2.1. 실험실내에서 충영의 유기

실험실내에서 충영을 유기시키고 충영의 분화과정을 관찰하기 위해 포트에 살균된 흙을 넣고 충영이 형성된 참취식물체를 심은 다음 망으로 포트를 씌우고 겨울동안 야외 음지에 보관하였다. 포트는 직경 25 cm, 높이 43cm의 25 L용량의 플라스틱 제품(대구공업사)을 사용하였다. 망으로는 구멍의 크기가 0.5 mm인 흰색 나일론 천을 사용하였다. 토양은 1999년 11월 1일 충영이 발견되는 참취 자생지에서 채취하여 15 psi, 20분간 토양을 멸균하였다. 먼저 망을 2 겹으로 포트의 하부에 깔고, 멸균된 토양을 높이 10 cm가 되도록 넣어 총 4개의 포트를 준비하였다. 충영 로제트가 형성된 참취식물

(15-40cm 크기로 생육상태가 양호한 것)을 자생지에서 1999년 11월 2일 채취하여 흐르는 물로 깨끗하게 씻은 후 풋트 당 식물체 18개를 재식하였다. 풋트당 로제트의 수는 약 70개가 되도록 하였다. 식물체를 심은 후 풋트의 상부를 2겹의 망으로 덮어 다른 곤충의 출입할 수 없도록 막았다. 이후 풋트는 방사능이용연구소 건물 뒤편의 그늘진 곳에 보관하며 관찰하였다.

2.2. 충영 로제트의 형태 해부학적 관찰

충영 로제트의 형태적 특징 조사에는 육안 및 카메라(Anam Nikon F-801s, Nikon AF MICRO NIKKOR 105mm 1:2.8D)를 사용하였다. 충영 로제트의 내부와 유충을 관찰하기 위해서는 Vibratome Series 1000(USA)를 이용하여 식물조직을 70 μ m 두께로 잘라 실체현미경(OLYMPUS BX 60-F3, JAPAN) 또는 해부현미경(OLYMPUS SZX-ILLB100, JAPAN)하에서 관찰하였다. 사진 필름은 ASA 100을 사용하였다.

2.3. 충영 로제트의 DNA 다형성 조사

2.3.1. Genomic DNA의 분리 및 정제

Genomic DNA 분리는 Chee 등(1991)의 방법을 이용하였다. 식물조직 0.5 g을 채취하여 막자사발에 넣은 후 액체질소를 가하여 곱

계 마쇄 한 후, 여기에 500 ml CTAB 추출 완충용액 [H₂O 703 ml, Tris-HCl (pH 7.5) 100 ml, 5 M NaCl 140 ml, 0.5M EDTA (pH8.0) 20 ml, CTAB 10 g, β -mercaptoethanol 10 ml]를 넣고 65°C에서 30분간 반응시켰다. 여기에 동일량의 chloroform-isoamyl alcohol (24:1)을 첨가한 후 원심분리(4°C, 12,000 rpm, 10 min)하여 상층액을 얻어냈고, 1배의 isopropanol을 넣어 -20°C에 30분간 두어 DNA를 침전시킨 후 원심분리(4°C, 12,000 rpm, 15 min) 하여 상층액을 제거하고, 진공상태에서 건조하였다. 건조된 DNA를 450 μ l 증류수로 잘 현탁시킨 후 5 μ l RNase A(1 mg / ml)를 첨가하여 37°C에서 30분간 방치하였다. 색소 및 RNase를 제거하기 위하여 동일량의 phenol-chloroform을 가하여 원심분리(4°C, 12,000 rpm, 15 min)후 상층액을 새로운 튜브에 옮겨 1배의 isopropanol과 1/10배의 3 M sodium acetate를 넣고 -20 °C에 10분간 두어 DNA를 침전시킨 후 원심분리(4 °C, 12,000 rpm, 10 min)하였다. 상층액을 제거 후 침전된 DNA는 70 % ethanol로 2회 세척한 후 TE buffer에 녹였다.

2.3.2. RAPD를 위한 PCR 조건

RAPD에 사용된 primer는 Operon사에서 제작된 10개의 염기서열로 구성된 random primer이며 다음과 같은 염기서열을 갖는다.

OPN07 : 5'-CAGCCCAGAG-3'

OPN14 : 5'-TCGTGCGGGT-3'

OPN20 : 5'-GGTGCTCCGT-3'

OPQ10 : 5'-TGTGCCCCAA-3'

OPQ11 : 5'-TCTCCGCAAC-3'

Reaction mixture(10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.001 % gelatin, 각각 2.5 mM의 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP, 1 μM primer, 0.5 μg의 genomic DNA, 5 unit의 Taq polymerase)의 final volume은 25 μl이었고 반응은 94 °C에서 1분, 36 °C에서 30초, 72 °C에서 1분간 45회 반복하였다.

2.3.3. RNA의 분리



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Total RNA 추출은 Puissant 와 Houdebine (1990)의 guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform 방법을 사용하였다. 참취 정상식물의 잎 조직과 rosette gall부분에서 유충을 제거한 조직을 이용하였다. 식물조직 200 mg을 취하여 막자사발에서 액체질소를 가하여 마쇄한 후 원심분리관에 옮기고 denaturing 용액에 넣었다. 여기에 chloroform 0.2 mL를 첨가하여 20초 동안 강하게 흔들여 섞은 후 5분간 얼음 위에서 방치하고 12,000 rpm(4 °C, 20분)로 원심 분리 하였다. 상층 수용액을 조심스럽게 1.5 mL 튜브에 옮기고 isopropanol 동량을 첨가하여 다시 얼음 위에서 15분간 방치하였다. 이를 4 °C에서 15분간 12,000 rpm으로 원심분리하고 상층액을 조심스럽게 제거한 후 75 % ethanol 1 ml 첨가하여 교반기로 잘 섞었

다. 다시 4 °C에서 10분간 12,000 rpm으로 RNA 펠렛을 침전시킨 후 상층액을 조심스럽게 제거하고 남은 액은 진공에서 잔액을 건조시켰다.

Genomic DNA의 제거는 위에서 얻은 RNA 펠렛을 diethylpyrocarbonate(DEPC)처리 증류수 25 μ l에 녹인 후 DNAase를 첨가하여 37 °C에서 20분간 반응시켰다. RNA reprecipitation은 DNAase를 처리한 튜브에 DEPC 처리된 증류수 40 μ l, Tris-EDTA saturated phenol/chloroform(1:1)을 100 μ l 첨가하여 잘 혼합한 후 원심분리 하여 상층 액을 취했다. 상층 액에 3 M sodium acetate를 15 μ l 와 냉각시킨 ethanol를 225 μ l 첨가하고 얼음 위에서 30분간 방치한 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 조심스럽게 제거하고 다시 75 % ethanol을 넣고 침전물을 세척하고 다시 원심분리하여 상층액을 조심스럽게 제거하고 침전물을 상온에서 10분간 건조시켰다. RNA의 농도 측정은 20 μ l DEPC 처리된 증류수를 넣어 RNA 침전물을 녹인 후 농도는 A_{260}/A_{280} 이 1.7이상인 것을 사용하였다. 분리한 RNA 1 μ g가 되게 하였다. 분리한 RNA 1 μ g을 ethidium bromide를 포함하는 1 % agarose gel에 전기영동 하여 rRNA인 28S, 18S의 밴드를 확인하고 사용할 때까지 -70 °C에서 보관하였다.

mRNA 추출은 OligotexTM mRNA Mini Kit을 구입하여 사용하였다. 추출한 total RNA에 250 μ l의 RNase-free water를 가한 후 250 μ l OBB buffer 와 37 °C에서 데운 Oligotex suspension 15 μ l을 가하여 pipet으로 잘 혼합하였다. 그리고 70 °C에서 3 분간 방치한 후 실온에서 10 분간 방치하였다. 12,000 rpm으로 원심분리한 후 상층액을 제거한 후 400 μ l OW2 buffer를 가하여 잘 혼합하였다.

혼합된 액을 small spin column 으로 옮긴 후 12,000 rpm 으로 1분간 원심분리 하였다. small spin column을 새로운 RNase-free 1.5 ml microcentrifuge tube로 옮긴 후 400 μ l OW2 buffer를 가하여 12,000 rpm 으로 1분간 원심분리 하였다. 그리고 small spin column 을 새로운 RNase-free 1.5 ml microcentrifuge tube로 옮긴 후 70 $^{\circ}$ C에서 데운 OEB buffer 50 μ l를 가하여 잘 혼합하여 12,000 rpm 으로 1분간 원심분리 하였고 위 과정을 1회 반복하여 mRNA를 추출하였다.

2.3.4. cDNA의 합성

cDNA 합성은 random hexamer(25 μ M) 3.0 μ l, mRNA 300 ng(3 μ l), DEPC D.W. 7 μ l를 넣고 70 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열한 후 바로 얼음 위에서 냉각하였다. 준비된 튜브에 반응액(5 \times first strand cDNA synthesis buffer 4 μ l, 10 mM dNTP mix 2 μ l)에 reverse transcriptase M-MLV(20 unit / μ l)를 1 μ l 넣고 25 $^{\circ}$ C에서 10분, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 후 다시 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하여 reverse transcription 반응을 중지시켰다. 반응이 끝나면 바로 얼음 위에서 냉각시킨 후 튜브 벽에 있는 반응액을 원심분리 하여 모은 후 사용 전까지 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

2.3.5. cDNA의 PCR 조건

PCR은 RAPD에 사용한 primer를 사용하였다. Reaction mixture(10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.001 % gelatin, 각각 2.5 mM의 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP, 1 μM primer, 0.5 μg의 cDNA, 5 unit의 Taq polymerase)의 final volume은 25 μl이었고 반응은 94 °C에서 45초, 36 °C에서 1분, 72°C에서 2분간 40회 반복하였다.



Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 참취 충영의 형태 및 발생부위

충영은 식물에 따라 다양한 모양을 나타낸다. *Contarinia matusintome* Haraguti & Monzen(1995) (= *Contarinia tonensis* Uchida & Inouye)에 의해 적송, 흑송의 눈(bud)에 형성되는 충영은 높이가 10 mm 내외이고, 직경이 5 mm로 원추형이며 적갈색의 인편이 덮여져 있다. 호프벌의 일종인 *Pontania* sp. A에 의해 형성되는 충영은 왕버들 잎의 주맥에 부착되어 형성되는데 직경이 6~8 mm이며 원반상이다. 표면은 부드럽고 담녹색에서 나중에는 황녹색으로 변화하는데 가끔 홍색의 띠가 생기기도 한다. 옆표면에 형성되는 것은 극히 일부분이고 주로 옆 뒷면에 반구형으로 돌출된다. 그리고 진드기에 의해 잎에 형성되는 손형의 주머니 모양의 충영은 잎 표면에 거의 구형에 가까운 모양으로 붙어있으며, 직경은 0.5 ~ 1.5 mm, 높이는 0.5 ~ 1.2 mm로 표면은 평활하고, 황녹색, 홍색, 갈색도 있다. 잎의 뒷면에는 약간 오목하게 들어간 중앙부가 돌출되어 이 돌출이된 부분에 구멍을 만든다(Yukawa 와 Masuda 1996).

Fig. 1은 참취에서 발견되는 충영의 모양이다. 다른 식물에서 발견되는 충영과 달리 참취의 충영은 발생초기의 작은 흑으로부터 장미꽃 모양의 작은 식물체(rosette like plantlet)로 분화되는데 줄기가 발달하지 않고 잎이 작다는 점을 제외하고는 모식물과 매우 유사하다. 참취 충영이 특히 흥미를 끄는 것은 잎, 줄기 등 분화된 모식물의 조직으로부터 또 다른 자식물체(?)가 재분화된다는 점이다. 여러

식물이 조직배양계에서 분화된 조직으로부터 완전한 식물체로 재분화되는 경우는 많이 알려져 있으나 자연상태에서 분화된 조직으로부터 식물체가 재분화되는 예는 흔하지 않다. 그러므로 참취 총영은 식물재분화연구의 좋은 모델이 될 수 있다.

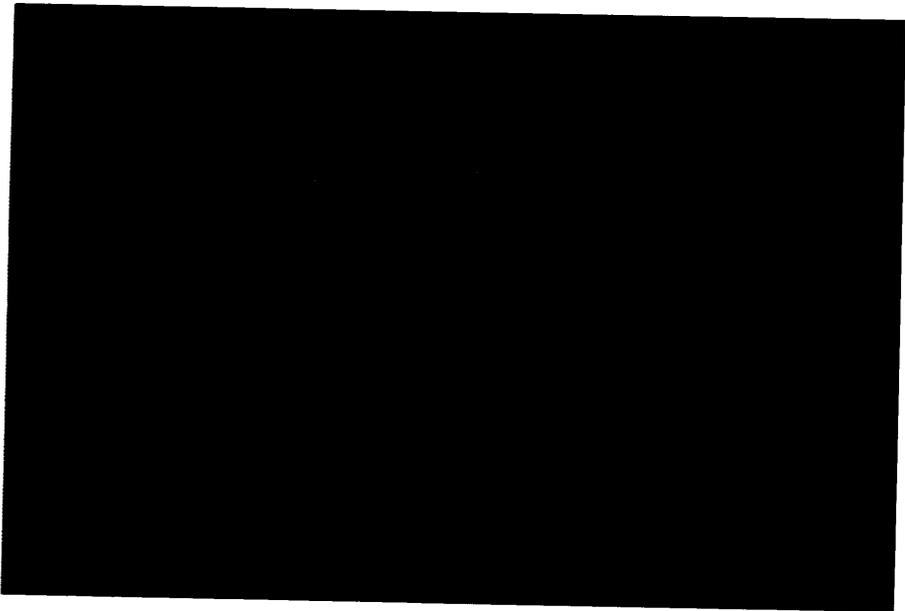


Fig. 1. A daughter plant on the leaf of mother plant ?

제주도에는 어느 지역에서나 참취가 쉽게 발견되지만 현재 총영이 발견되는 것은 해발 500m의 중산간 지역으로 서북부 지역에 국한되어 있다. 현재 총영이 발견되는 지역으로는 서부산업도로변인 북제주군 애월읍 소길리 산 16번지 일대, 관음사 지역, 천왕사 지역, 삼의약 인근지역 등 4개 지역인데 이 중에서 서부산업도로변 지역에서 총영이 가장 많이 발견된다.

자생지에서 총영은 모든 참취식물개체에 곁고루 형성되는 것이

아니고 특정개체에 집중적으로 형성되는 경향이 있다. Fig.2는 2000년 7월 10일에 촬영한 참취 식물체인데 (A)는 충영이 없는 건전한 식물체이고 (B)는 충영이 형성된 식물체(B)이다. 이 두 식물체는 약 10cm 거리에 인접하여 자란 것임에도 불구하고 (A)의 식물체에는 충영이 전혀 없는 반면 (B)에는 5개 이상의 충영이 형성되어 있다.

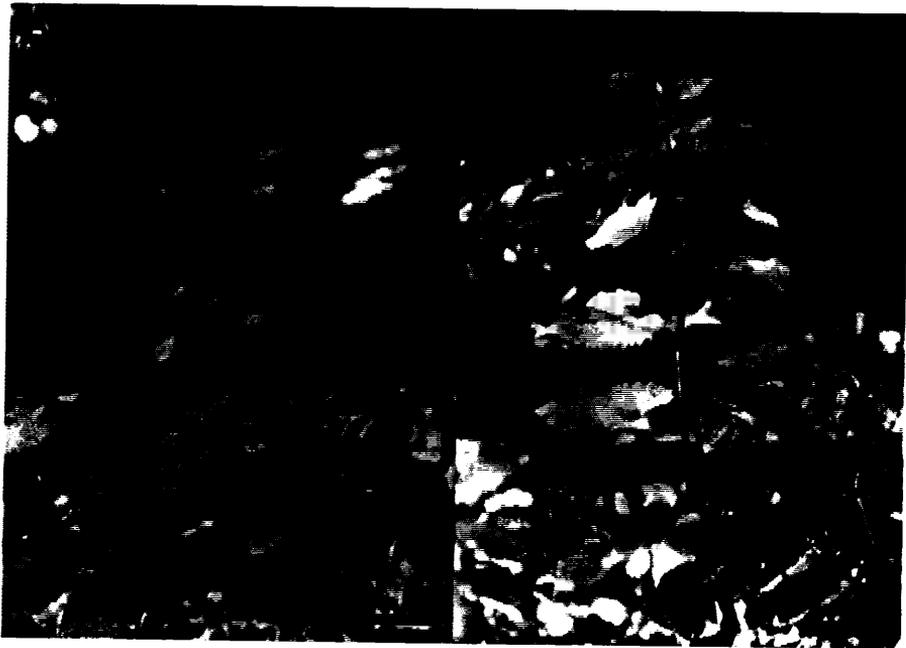


Fig. 2. Whole plants of *Aster scaber*.

A: A normal plant without rosette gall, B: A plant with rosette gall (Photographed on 10 July, 2000; Scale bar = 10 cm)

참취에서 충영은 Fig.3에서 보는 바와 같이 잎의 앞과 뒷면, 엽병, 마디 그리고 줄기 등 식물체 지상부 모든 조직에서 발견된다. 이 중에서 잎의 앞면이나 뒷면에 가장 많이 형성되고, 그 다음이 잎자루

와 마디부위이며 줄기에서의 발생빈도가 가장 낮다. 그리고 동일한 식물체 내에서도 충영은 분산되어 발생되기보다 특정부위에 집중적으로 형성되는 경향이 있다.

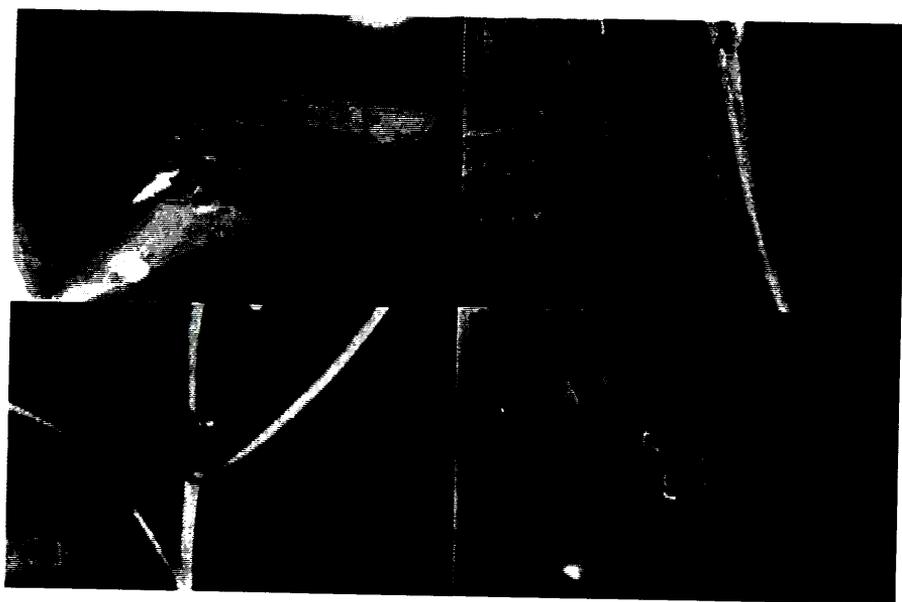


Fig. 3. Locations of the rosette gall formation in *A. scaber*.
A: Leaf surface; B: Petiole; C: Node; D: Stem. (Photographed on
7 July, 2000; Scale bar = 1 cm)

2. 충영 로제트의 발달과정

제주지역에서 참취 충영이 발견되는 지역은 중산간지대로서 골프장건설 또는 목장조성이 진행되고 있어서 참취 충영 자생지가 급속도로 훼손되고 있다. 실험재료의 확보를 위해 충영이 형성된 참취식물체를 제주대학교 방사능이용연구소 인근지역(해발 약 300m)에 이식하였으나 해마다 충영발생빈도가 감소하는 경향을 보여 문제가 되었다. 그래서 실험재료를 확보하고 충영의 발생과정을 정밀관찰하기 위해 실험실내에서 충영형성을 재현하고자 시도하였다.

다른 충영과 마찬가지로(김, 1992) 참취의 경우에도 곤충의 성충이 식물조직에 산란하여 충영이 형성될 것으로 추정되므로, 성숙된 충영을 밀폐된 포트에 기주식물과 함께 넣어 자생지의 환경과 유사하게 유지하면 충영을 포트내에서 형성시킬수 있을 것으로 생각되었다. 그래서 재료 및 방법에서 기술한 바와 같이 충영 로제트가 형성된 참취 식물체를 11월에 자생지에서 채취하여, 살균된 토양을 미리 넣은 포트에 이식하고, 촉촉한 천을 씌워 겨울동안 실외의 음지에서 보관하면서 주기적으로 관찰하였다.

이듬해 봄 5월 초 포트내에서 4-5mm 크기의 *Dasineura*로 추정되는 곤충의 성충들이 발견되었다. 그리고 이들 성충들이 꼬리 부분으로 교미하는 장면이 관찰되었는데 암컷으로 보이는 성충의 꼬리 부분은 적색을 띠고 비대하였다. 한편 이 성충들 중 일부가 새로 출아한 참취식물의 잎표면에 산란하는 장면이 목격되었다(Fig.4-A). 특히 꼬리 부분이 적색인 성충들 만이 산란하는 것으로 관찰되었다.

관찰된 성충이 산란하는 부위는 주로 잎의 엽맥이었고, 나중에 충영들 또한 잎의 엽맥 부분에서 많이 발생되었다. 이러한 성충들이

산란시 꼬리부분을 잎 조직에 내려 산란을 하는데 한 곳에만 집중적으로 산란을 하기도 하고, 잎 표면을 기어다니면서 산란을 하기도 하였다. 성충의 산란 시간은 짧게는 수초에서 길게는 1시간 이상 걸렸다. 1시간 이상 산란한 성충은 산란을 끝마친 후에 지상으로 떨어졌다.

산란된 알들은 식물체의 표면에 부착되어 있었고 색깔은 주황색이었으며, 많은 알이 밀집된 부위는 육안으로도 식별이 가능하였다 (Fig.4-B). 현미경하에서 관찰했을 때 그 알들은 열은 주황색을 띠었고 몸체에 적색의 띠가 둘러져 있었으며, 그 크기는 약 37 μm 이었다(Fig.4-C). 성충이 산란한 알들은 어린 조직 표면에 어떤 물리적인 힘에 의해 붙어있는 것으로 보였고 바람이나 비에 쉽게 날려가거나 씻겨 내려가지 않았다.

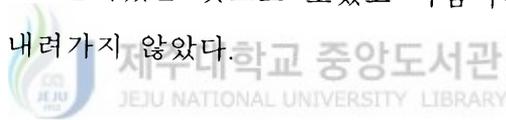




Fig. 4. *Dasineura* laying eggs, apperance of oviposition and shape of the eggs on the surface of a leaf.

Photographed on 3 May, 2000. Scale bar; A & B = 1 cm, C = 5 μ m.

산란후 4일정도까지는 산란부위의 식별이 가능하였으나 그 후로는 그 알들의 점들이 점차 사라져 1주일 정도가 경과되면 식별이 되지 않았다. 어린 식물조직에 산란된 부위에서는 솜털같은 돌기가 형성이 되었고, 성숙한 조직에 산란된 알들의 경우는 시간이 경과함에 따라 말라가면서 이들이 있는 조직부위는 점차 농갈색을 나타냈다.

산란부위중 잎표면은 5월 초순에서 중순사이에 직경이 0.5 - 1 mm 이하의 작은 점모가 뭉쳐져서 둥근 형태의 점모 돌기형태가 된다. 잎자루 조직에서는 잎에서 관찰이 되는 것과 유사한 형태로 충영이 발달되는데 잎자루의 조직일부분이 돌출한 형태를 하고있다. 그리고 줄기 부분에 발생한 충영은 줄기의 조직이 일부 부풀어 오르는 형태가 된다. 발생초기에 충영은 참취의 어린 잎에 많이 발생하는 것을 관찰할 수 있으며, 대부분의 충영은 초기에는 옅은 녹색을 띠지만, 일부의 충영에서는 옅은 분홍색 또는 짙은 분홍색을 띠기도 한다. 그리고 충영의 중앙부분은 옅은 녹색을 띠고 그 둘레는 분홍색을 띠고 한다. 이 시기에 곤충의 알들은 잎의 표면이나 그 점모에 둘러 싸여져 있었다.

충영의 발생초기에서 보름정도가 경과하면 잎 및 각 기관의 성장과 함께 충영도 성장을 하는데 그 크기가 5 mm 이상 성장을 하고 잎의 뭉쳐진 점모부위와 잎자루의 돌출된 부분 그리고 줄기에 발생한 작은 충영 부위에서는 작은 어린 잎(leaflet)형태가 발달하면서 장미꽃 모양의 작은 식물체 형태를 갖추어간다. 그리고 잎과 잎자루 부위에서 형성되는 충영은 잎의 앞면에서는 꽃잎 같은 형태를 갖추면서 발달하고, 뒷면은 녹색의 혹(gall)이 생긴다. 잎자루에서도 잎에서와 동일한 양상으로 충영이 발달한다.

이러한 충영이 다시 2주 정도가 경과하면 작은 어린 잎의 수가 많아지고 완전한 꽃잎 같은 형태를 갖추면서 성장을 하며 발생초기에 나타났던 옅은 분홍색들은 나타나지 않는다. 그리고 그 크기가 8 mm 이상 성장을 한다. 이러한 참취에 발생한 충영이 다시 한 달이 경과하면 장미꽃 모양의 기관으로 충영 로제트를 완전하게 갖추며 그 크기가 1cm 이상 발달한다. 이 시기에 충영 로제트의 내부에는 각각 애벌레가 서식하는 집(larva chamber)이 있고 그 모양은 타원형의 모습을 갖추고 있으며, 충영 로제트의 소엽(leaflet)이 그 유충이 서식하는 집을 덮고 있으며 하부는 영양조직들이 뭉쳐져 있다.

곤충의 산란부위에서 형성된 흑모양의 충영은 시간이 지남에 따라 소엽의 크기가 커지고 수가 증가하여 점차 장미꽃 형태(rosette)로 발달되었는데, 로제트 소엽의 분화는 충영 로제트 중심부위인 생장점을 중심으로 진행되는 것으로 관찰되었다(Fig. 5). 성숙단계로 가면서 가을에는 충영 로제트내에 꽃으로 보이는 기관(pseudoflower)이 한 개 이상 형성되었으며 연분홍 또는 연보라 빛의 봉오리가 형성되었다(Fig. 6). 이 꽃봉오리에서 꽃받침과 꽃잎으로 추정되는 기관을 확인할 수 있었고, 정상적인 참취 꽃이 잎보다 먼저 시들어 죽는 것처럼 로제트의 꽃은 로제트의 소엽보다 먼저 시들어 죽어갔다. 그러나 정상적인 참취식물체의 꽃이 종자를 만드는데 비해 충영 로제트의 꽃은 종자를 만들지 않았다.

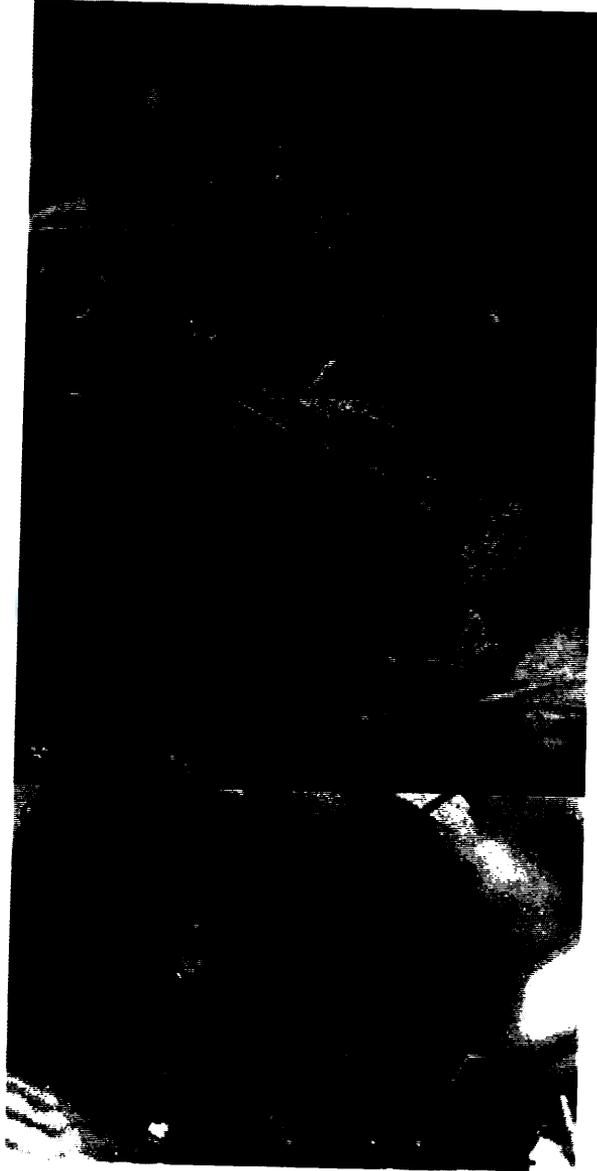


Fig. 5. Growth of the early rosettes on the same leaf.
Photographed in 2000; A: 16 May, B: 15 June, C: 7 July. Scale
bar = 1 cm.

앞에서 언급한 바와 같이 참취 충영의 로제트에는 애벌레집(larva chamber)들이 있는데, 각각의 애벌레집은 꽃모양의 기관(pseudoflower)으로 발달하였다(Fig. 7). 충영 로제트를 종단으로 절단해서 관찰한 결과 애벌레 집에는 각각 한 마리의 애벌레가 서식하는 것이 관찰되었다(Fig. 8). 또한 애벌레집 내에서 애벌레는 머리 부분이 내부로 향해 있었는데(Fig. 9, 10). 이는 애벌레가 성장을 위해 식물체로부터 필요한 양분을 섭취하는 방법과 관련이 있는 것으로 생각된다.

곤충이 산란한 부위에 충영을 형성하는 것은 산란된 알을 보호하고 유충의 성장에 필요한 영양분을 얻기 위한 수단이라고 생각된다(Solinas 와 Pecora, 1984). 그러나 이들 충영을 형성하는 곤충이 식물에 미치는 영향은 병원균의 경우와는 다르다. 병원균이 양분을 얻기 위해서는 각피나 세포벽 등의 장벽을 파괴하여 식물체내로 침입하여야 하고, 식물이 생산하는 물질을 유용한 형태로 전환시켜야 한다. 이를 위해서 병원균은 기주식물의 특정 성분이나 대사에 영향을 미치는 화학물질을 분비하게 되고 그 결과 곤충에 의한 충영과 유사한 식물의 혹(gall), 종양(tumor), 빗자루모양(witches bloom), 위축(dwarfing)등의 현상을 일으킬 수 있다(황, 1985). 그러나 곤충에 의해 생기는 충영은 주로 식물생장조절물질의 대사에 영향을 주어 생기는 것으로 알려져 있다. 그러므로 참취 충영로제트의 경우 곤충과 식물의 상호작용에 식물생장조절물질이 어떻게 관여되어 있는지 또 어떤 유전자가 관여되어 있는지를 규명하는데 매우 유용한 모델이 될 수 있다.



Fig. 6. Flowers of normal plant and rosette gall.

A: Flowers of normal plant. Photographed on 12 Aug, 2000. Scale bar = 3 cm. B: Early stage of flowering in Rosette gall. Photographed on 15 Sep., '98. Scale bar = 1 cm. C: Late flowering stage of Rosette gall. Photographed on 28 Oct, 2000. Scale bar = 1 cm

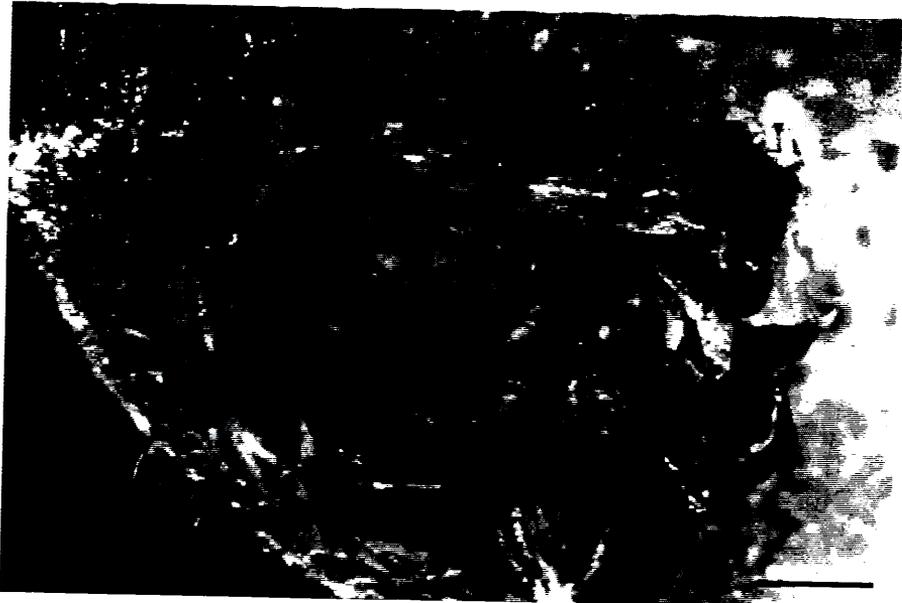


Fig. 7. A larva in the center of rosette gall in flowering stage.

Sample collection and photographing: 28 October 2000. Scale bar = 1 mm.



Fig. 8. Longitudinal section of rosette gall with larvae.

Fresh section. Sample collection and photographing: 28 October, 2000.

Scale bar = 1 mm.

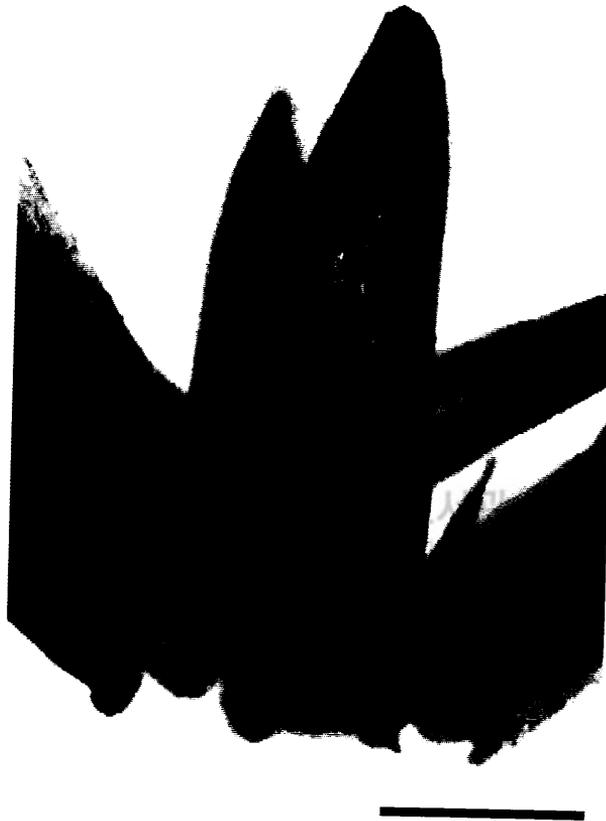


Fig. 9. Preparation of a larva by peeling off the main parts of the gall chamber. Mouth of the larva directed towards the basis of the chamber.

Fresh section. Sample collection and photographing: 15 November 1999. Scale bar = 1 mm



Fig. 10. A larva collected from the rosette gall.

Sample collection: 5 June 1998, 70 μm Vibratome section. Scale bar = 150 μm

3. 충영 로제트의 DNA 다형성

과거의 식물분류는 대부분 식물표현형을 중심으로 한 세포학적, 형태학적 분류에 주된 관점을 두었으나, 이러한 분류방법은 시간과 노동력이 많이 필요하고, 유연관계가 가까운 식물 종간에는 그 구별이 어려운 단점을 갖고 있는데 특히 개체수준의 동정이 불가능하다. 그러나 근래 개발된 분자생물학적 방법은 개체, 계통 및 품종 수준의 단계에서도 식별이 가능하게 되었다. 예를 들어 RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic) 및 DNA-fingerprinting 방법은 식물 종의 계통 및 품종간의 유연관계를 분석하는데 유용하며, germ plasm 보존을 위한 marker 탐색에도 적극 활용되고 있다. 그 중에서도 RAPD 분석은 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 불특정 DNA를 증폭시킴으로써 원핵생물, 진핵생물 내에 폭 넓게 존재하는 DNA 단편의 다형성을 손쉽게 확인 할 수 있다. 또한 증폭된 단편을 Southern hybridization 과정을 거치지 않고 전기영동만으로 DNA를 분획하여 개체 및 품종을 식별할 수 있다(Beyerman 등, 1992; Waugh 와 Powell, 1992).

참취에서 형성되는 충영은 다른 식물의 충영과 달리 비교적 균일한 소엽을 가지고 있고 이들 소엽은 장미꽃 모양의 정돈된 형태를 취하고 있으며 꽃모양의 기관도 형성된다. 비록 잎의 크기와 수에 차이가 있고 줄기의 신장이 없어 작으며 종자가 결실되지 않는다는 점을 제외하면 모식물과 매우 유사하기 때문에 모식물체 (mother plant)의 분화된 조직으로부터 재분화된 하나의 자식물체 (daughter plant)로 볼 수 있다. 그러므로 여기서는 충영로제트의 식

물체 조직이 모식물의 조직과 유전적으로 동질한 것인지를 genomic DNA의 RAPD 분석에 의해 확인하고자 하였다.

Fig.11은 충영 로제트의 조직과 로제트가 없는 정상적인 참취 잎 조직으로부터 genomic DNA를 분리하고 random primer로 증폭한 다음 증폭된 DNA를 전기영동한 결과이다. 시도된 5개의 primer 중 4가지에서는 충영 로제트와 정상식물의 DNA 다형성이 유사하여 차이가 없었다. 그러나 primer OPN07을 사용했을 때는 정상식물체의 앞에서는 거의 나타나지 않은 3개의 DNA band가 로제트 조직에서는 나타났고 반대로 정상적인 식물체에서 나타난 DNA band가 로제트에는 거의 보이지 않아, 모두 6개의 DNA band에서 차이가 있었다.

충영 로제트와 모식물이 genomic DNA의 다형성에서 차이가 있다는 이 결과는 예상 밖이다. 왜냐하면 아직까지 곤충에 의해 식물의 유전자가 변형된다는 증거는 없기 때문이다. 그러므로 이 결과는 사용된 식물의 조직이 다른 유기체에 의해 오염되어 나타난 결과일 가능성이 크다. 물론 참취 충영 로제트의 형성에 바이러스나 미생물이 개입되어 실제로 식물의 유전자가 변형되었을 가능성도 배제할 수는 없다. 그리고 식물에서 꽃과 같은 특정 기관이 분화될 때 모양이나 위치가 변경되는 homeotic mutation(Bateson, 1984; 한, 1997)이 존재하기 때문에 로제트 발생시 유사한 변이가 일어날 가능성도 있다. 그러므로 이들 가능성을 확인하기 위해서는 보다 많은 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

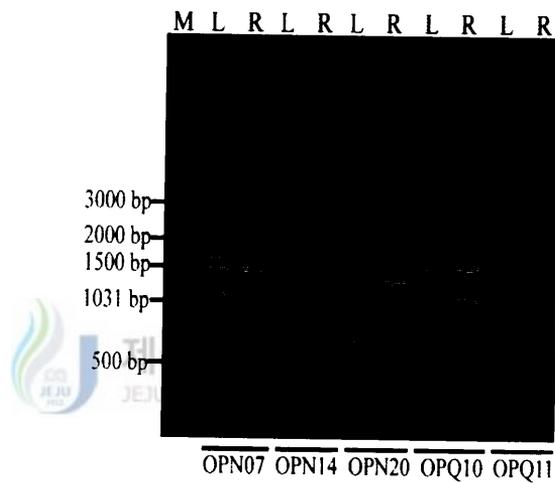


Fig. 11. RAPD analysis of normal leaf and rosette gall of *A. scaber*. with random primers.

OPN07, OPN14, OPN20, OPQ10 & OPQ11: random primers M: GeneRulerTM DNA ladder mix(MBI), L: normal leaf, R: rosette gall.

비록 곤충에 의해 형성되는 충영 로제트와 모식물이 genomic DNA 수준에서 차이가 있을 가능성은 작지만 특정 유전자의 발현에는 차이가 있을 가능성이 크다. 그래서 충영 로제트의 식물조직과 정상식물의 조직간의 유전자발현의 차이를 조사하였다. 참취의 정상 식물체의 잎조직, 로제트에 서식하는 애벌레, 애벌레를 포함한 충영 로제트 전체, 애벌레를 제거한 로제트 조직, 로제트의 잎조직, 충영 로제트의 혹(gall) 부분과 로제트가 형성된 참취의 잎조직으로부터 total RNA를 추출하고 cDNA를 만든 다음 RT-PCR을 수행하였다.

Fig. 12는 total RNA를 추출하여 1.2% agarose gel에 전기영동을 실시한 결과이다. 28S 와 18S ribosomal RNA가 확인되어 total RNA가 추출된 것을 알 수 있었다(Farrel, 1993). 이 total RNA로부터 Oligotex™ mRNA Mini-Kit을 이용하여 단일가단 cDNA를 합성하였다. 단일가닥 cDNA 합성 시에는 random hexamer를 이용하였으며(Sokolov 등 1994, Jefferies 등, 1998), 합성된 cDNA 0.5 μ g과 5 μ M의 primer(OPN14), 5 unit의 Taq polymerase를 넣어 94°C에서 45초, 36°C에서 1분, 72°C에서 2분간의 조건으로 40회를 진행한 뒤 PCR 산물을 얻고 3% agarose gel에 전기영동을 하였다.

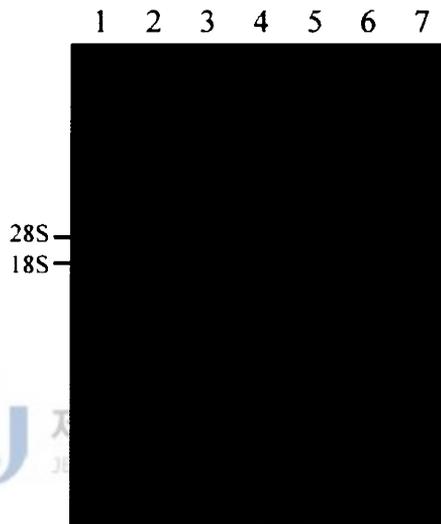


Fig. 12. Agarose gel electrophoresis of total RNAs extract from normal leaf & rosette gall of *A. scaber*.

Lane; 1: normal leaf, 2: larva, 3: rosette gall, 4: rosette gall(remove larva), 5: leaflet of rosette gall, 6: gall of rosette gall, 7: leaf on rosette gall.

cDNA를 random primer(OPN14)로 증폭한 결과 정상식물의 잎 조직에서는 거의 보이지 않는 약 1kb의 DNA band가 유충을 제거한 충영 로제트 조직에서 현저하게 많이 증폭되었다. 또 충영 로제트의 잎조직에서는 3kb 보다 큰 하나의 DNA band가 그리고 충영 로제트의 혹조직(gall)에서는 약 2.5kb의 DNA band가 특징적으로 나타났다(Fig. 13).

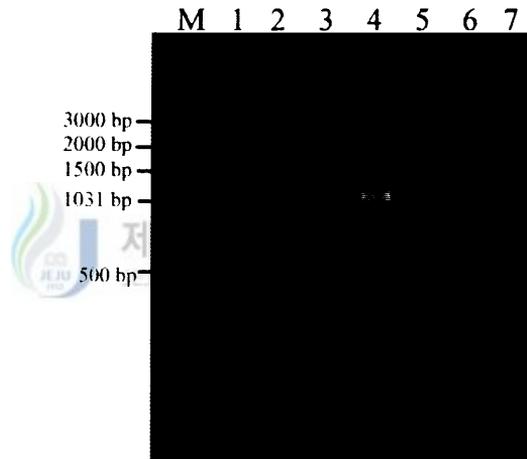


Fig. 13. RT PCR for mRNAs extracted from the tissues of normal leaf and rosette gall of *A. scaber*.

Lane; M: GeneRuler™ DNA ladder mix(MBI), 1: normal leaf, 2: larva, 3: rosette gall, 4: rosette gall(remove larva), 5: leaflet of rosette gall, 6: gall of rosette gall, 7: leaf on rosette gall.

충영 로제트 조직과 모식물의 잎조직의 cDNA를 random primer로 증폭했을 때 DNA band가 차이가 있다는 상기 결과는 충영조직과 모식물이 유전자발현에서 차이가 있음을 시사한다. 충영 로제트 조직의 세포들은 meristemic cell들이 많고 줄기의 신장이 거의 없는 점으로 미루어보면 이들 특정 유전자는 식물호르몬계에 관련된 유전자일 가능성이 있다(강, 1991). 또 충영 로제트의 꽃기관에서는 종자가 결실되지 않는 점으로 미루어 볼 때 생식기관의 발달 또는 수정에 관련된 유전자일 가능성이 있다. 그러나 본 실험의 결과만으로는 이들 유전자가 어떤 유전자인지 알 수 없다. 더욱이 mRNA의 발현은 분화단계나 생육조건에 따라서도 차이가 있기 때문에 보다 구체적인 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.



IV. 요약

제주지역에 자생하는 참취(*Aster scaber* Thunb.)에서 발견되는 장미꽃모양의 작은 식물체인 충영 로제트(rosette gall)를 실험실내에서 유기시키고, 이들 로제트가 생기는 원인과 로제트의 발달과정 및 DNA 다형성을 조사하였다.

1. 자생지의 참취에서 로제트는 잎, 잎자루, 마디, 줄기 등 식물체 지상부 어느 부위에서도 발견되는데, 로제트가 가장 많이 발견되는 부위는 잎의 상하표면이다.
2. 로제트가 형성된 참취식물체를 가을에 채취하여 포트에 이식하고 촉촉한 천을 씌워 실외에 보관하는 방법으로 다음해 봄 새로 출아하는 식물체 지상부에 로제트를 형성시킬 수 있었다.
3. 로제트가 형성된 참취식물체를 이식한 포트내에서 다음해 봄에 미동정 곤충의 성충들이 발견되었으며, 이 곤충이 식물체 잎표면에 산란하는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 곤충이 산란한 잎 부위에서 작은 흑모양의 충영(gall)이 형성되는 것을 확인할 수 있었다.
4. 곤충의 산란부위에서 형성된 흑모양의 충영은 점차 장미꽃

형태의 로제트로 분화되며 가을에는 로제트내에 꽃으로 보이는 기관(pseudoflower)이 한 개 이상 형성되는 것을 관찰하였다. 로제트의 꽃기관내에는 애벌레집(larva chamber)이 있으며, 한 개의 애벌레집에는 한 마리의 애벌레가 서식하는 것이 확인되었다. 애벌레집 내에서 애벌레는 머리부분이 식물체 내부로 향해 있었다.

5. 로제트로부터 분리한 게놈 DNA의 RAPD 분석결과 로제트가 없는 정상식물체의 앞에서는 거의 나타나지 않는 3개의 DNA band가 관찰되었고, 정상식물체의 DNA band 중 3개는 로제트에서는 거의 나타나지 않았다.

6. 로제트의 total RNA로부터 cDNA를 합성하여 random primer로 증폭시킨 결과 정상식물에서는 거의 보이지 않는 4개의 band가 관찰되었다.

V. 참고문헌

Abrahamson, W. G., Weis, A. E. (1987) "Nutritional ecology arthropod gall makers", *In* Slansky, F., Rodriquez, J. G.; [eds.], "Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates", John Wiley & Sons, New York, NY. pp.235-258.

Amrine and Hindal (1988) "Rose rosette: a fatal disease of multiflora rose", Available from west Virginia University, Agricultural and Forestry Experiment Station, circular 147.

Bateson, W. (1984) "Materials for the Study of variation", London: Macmillan.

Beyermann, B., Numberg, P., Weihe, A., Mexier, M., Epplen, J. T. (1992) "Fingerprinting plant genomes with oligonucleotide probes specific for simple repetitive DNA sequence", *Theor Appl Genet*, 83, pp.691-5694.

Chee, P. P., Drong, R. F., Slightom., J. L. (1991) "Using polymerase chain reaction to identify transgenic plants", *Plant Molecular Biology Manual C3*, pp.1-28.

Cornell, H. V., (1983) "The secondary chemistry and complex morphology of galls formed by the Cynipidae (Hymenoptera): why and how?", American Midland Naturalist, 110, pp.225-232.

Farrel, R. E. (1993) "RNA Methodologies", Academic Press, pp.126-155

Floate, K. D., Fernandes, G. W., Nilsson, J. A. (1996) "Distinguishing intrapopulational categories of plants by their insect faunas: galls on rabbitbush", Oecologia, 105, pp.221-229.

Gagne, R., Boldt, P. (1995) "The gall midges (Diptera: Cecidomyiidae) of *Baccharis* spp.(Asteraceae) in the United States", Proc. Entomol. Soc. Wash., 97(4), pp.767-778.

Jefferies, D., Botman, M., Farquharson, C., Lester, D., Whitehead, C. C., Thorp, B. H., Houston, B. (1998) "Cloning differentially regulated genes from chondrocytes using agarose gel differential display", Biochim. Biophys. Acta, 1396, pp.237-241.

Küster, E. (1911) "Die gallen der Pflanzen" S. Hirezel (Leipzig), pp.437.

Mani, M. S. (1964) "Ecology of plant galls", Dr. W. Junk(The Hague), pp.434.

Mani, M. S. (1992) "Introduction to cecidology", *In* Shorthouse, J. D., Rohfritsch, O. "Biology of insect-induced galls", Oxford university press. New York. pp.3-7.

Raman, A., Ananthkrishnan, T. (1983) "On the developmental morphology of rosette galls of *Acacia leucophloea* Wild., (Mimosaceae) induced by *Thilakothrips bablu* Ramk(Thysanoptera: Insecta)." *Proc. Indian Acad. Sci.*, 92(5), pp.343-350.

Raman, A., Abrahamson, W. (1995) "Morphometric relationships and energy allocation in the apical rosette gall of *Solidago altissima*(Asteraceae) induced by *Rhopalomyia solidaginis*(Diptera: Cecidomyiidae)", *Environmental Entomology*, 24(3), pp.635-639.

Sokolov, B. P., Prockop, D. J. (1994) "A rapid and simple PCR-based method for isolation of cDNAs from differentially expressed genes", *Nucleic Acids Res.*, 22, pp.4009-4015.

Solinas, M., Pecora, P. (1984) "The midge complex(Diptera: Cecidomyiidae) on *Euphorbia* spp. I.", *Entomologica Bari*, 19, pp.167-213.

Weis, A., Walton, R., Crego, C. (1988) "Reactive plant tissue site and the population biology of gall makers", *Ann. Rev. Entomol.* 33, pp.467-486.

Wilde, J., Waugh, R., Powell, W. (1992) "Genetic fingerprinting of Theobroma clones using randomly amplified polymorphic DNA makers" Theor Appl Genet, 83, pp.871-877.

Yukawa, J., Masuda, H. (1996) "Insect and Mite Galls of Japan in Colors", Zenkoku Noson, Kyoiku Kyokai, Tokyo, pp.347-427, 795-782.

강홍규, 남홍길 (1991) "*Arabidopsis thaliana* : 식물분자 유전학 연구의 새로운 모형", 생화학 총설집, 제Ⅲ권, pp.213-225

김홍용 (1992) "식물생태학", 효일문화사, 서울, pp.269-270.

이우철 (1996) "한국 식물 명고", 아카데미서적, 서울, pp.1101-1102

한창열 (1997) "조직·기관의 분화와 유전적 발현의 조절, 최근의 진보", 식물조직배양학회지, Vol. 24, pp. 1-35

황병국 (1985) "식물의학", 탐구당, 서울, pp.38-91.

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 세심한 학문적 배려와 시종 성심껏 지도를 해주신 류기중 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 바쁘신 가운데서도 불구하고 시간을 내어 많은 조언과 비평을 주신 현해남 교수님과 김찬식 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

또한 평소 많은 지도와 충고를 주신 김형욱 교수님, 강순선 교수님, 유장걸 교수님, 고정삼 교수님, 그리고 이옥영 박사님과 Stadelmann 교수님, Mary 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

본 논문이 이루어지도록 많은 격려와 귀중한 조언을 아끼지 않으신 송성준 박사님, 홍경애 박사님, 양철신 선배님, 송정흡 선배님, 윤수현 선배님, 이창훈 선배님, 양윤호 선배님, 이종욱 선배님, 채현병 선배님, 진성범 선배님, 부경환 선배님과 김진환 후배에게 심심한 감사를 드립니다. 그리고 김양록 선배님, 오병권 선생님, 전경용 형과 대학원 동기 여러 선배님들, 학과 조교선생님과 후배들에게도 고마움의 뜻을 전합니다.

끝으로 오늘이 있기까지 저를 사랑과 염려로 키워주신 부모님과 항상 저를 걱정해준 동생에게 이 작은 논문을 드립니다.