

석사학위 논문

황칠나무와 일본황칠나무에 관한 분자유전학적 연구



제주대학교 대학원 서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

생물 학과

한 상 현

1999年 12月

황칠나무와 일본황칠나무에 관한 분자유전학적 연구




지도교수 : 김 세 재

한 상 현

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

1999년 12월

제주대학교 중앙도서관
한상현의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 고 석 찬 
위 원 김 문 홍 
위 원 김 세 재 


제주대학교 대학원

1999년 12월

Molecular Genetic Studies between
Dendropanax morbifera Leveille
and *D. trifidus* Makino

Sang-Hyun Han

(Supervised by Professor Se-Jae Kim)

 제주대학교 중앙도서관
A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1999. 12

ABSTRACT

Dendropanax morbifera Leveille and *D. trifidus* Makino were known as Korean and Japanese endemic plant, respectively. However, it has been reported that there were so many variants in each taxon. Moreover, previous studies on the discriminating characters of two species, which were the color of sap and the shape of fruit of two species, revealed so many variations in these characters within each species. Thus, the open question of classification between two species was risen. In this study, the phylogenetic relationship between these two species was investigated by polymerase chain reaction-random amplified polymorphic DNA (PCR-RAPD), single stranded conformation polymorphism (SSCP), and heteroduplex analysis (HTA). The species-specific PCR products did not detected in PCR-RAPD analysis. Furthermore, two species could not be divided to different clusters on dendrogram based on distance coefficient as well. Also, the analyses of SSCP and HTA of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (nrDNA ITS) showed that there were at least three different types of ITS sequence respectively. Especially, the species-specific ITS sequence did not detected. Therefore, we suggest that the taxonomic revision on the classification of two species is required.

목 차

ABSTRACT	i
목 차	ii
LIST OF TABLES	iii
LIST OF FIGURES	iv
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	
1. 실험 재료	3
2. Total DNA 추출	3
3. PCR-RAPD analysis	3
4. Enzymatic amplification of ITS region	5
5. Single stranded conformation polymorphism analysis	5
6. Heteroduplex analysis	6
III. 결 과	
1. PCR-RAPD 분석에 의한 유연관계 분석	8
2. ITS region에 대한 SSCP와 HTA 분석	16
IV. 고 찰	24
요 약	26
인 용 문 헌	27

List of Tables

Table 1. List of <i>D. morbifera</i> and <i>D. trifidus</i> used in this study -----	4
Table 2. Nucleotide sequences of primers used for amplifications of nrDNA ITSII and ITS full region -----	7
Table 3. Nucleotide sequences of arbitrary 10-mer primers used for the PCR-RAPD analysis and numbers of polymorphic bands observed using each primer -----	12
Table 4. Binomial matrix based on the PCR-RAPD analysis -----	13
Table 5. Distance matrix obtained by PCR-RAPD analysis -----	14
Table 6. Electrophoretic band patterns of SSCP and HTA using ITSII and ITS full region -----	23

List of Figures

- Figure 1. PCR-RAPD patterns produced using 11 random primers
in *D. morbifera* and *D. trifidus* ----- 9
- Figure 2. Neighbor-joining tree based on the analysis of
PCR-RAPD fragments ----- 15
- Figure 3. Organization of the ITS region and nrDNA, and
PCR products of ITSII and ITS full region amplified
using PCR from 16 individuals ----- 18
- Figure 4. SSCP patterns of ITS II analyzed in 16 individuals
----- 20
- Figure 5. Heteroduplex patterns of ITS between inter- and
intra- species ----- 21

서 론

황칠나무속 (*Dendropanax*)은 두릅나무과 (Araliaceae)에 속하며 아메리카와 아시아의 열대와 아열대에 걸쳐 75종이 분포하고 있으며 (Bentham and Hooker, 1867; Krüssmann, 1976), 우리 나라에는 황칠나무 (*Dendropanax morbifera* Léveillé)만이 자생하고 있다. 황칠나무는 상록의 활엽교목으로 제주도, 완도, 보길도, 해남을 비롯한 남서 해안 및 도서지역에 분포하고 있으며 잎은 단엽이고 3~5갈래로 갈라진 형태를 취하기도 한다. 황칠나무는 잎에 윤택이 있고 수형이 아름다워 정원수로서의 가치가 높으며, 특히 수액이 투명하고 광택이 좋아 목가구의 칠 재료로 적당하다고 알려져 있다 (Kim *et al.*, 1994). 일본의 고유수종인 일본황칠나무 (*D. trifidus* Makino)는 황칠나무와 비슷한 위도 상에 분포하고 있으며, 황칠나무와 형태적으로 매우 유사하며 수액은 목가구의 칠재료로 이용되고 있다. 한국의 황칠나무는 과실이 타원형이고 수피에서 황색의 칠이 나오는 반면 일본황칠나무는 과실이 구형 또는 광타원형이고 무색의 수지가 나온다는 것만이 두 분류군 간의 식물형태학적인 구분형질로 알려져 있다.

Kim 등 (1994)은 제주도 5지역과 완도, 거문도, 해남, 보길도 등에서 선발된 황칠나무의 외부형태 비교연구에서 형질변이는 제주도 개체군과 완도, 해남, 보길도, 거문도의 개체군으로 구분되고, 여기서 다시 각각 4 cluster로 나누어진다고 보고하였다. Moon 등 (1999)은 황칠나무와 일본황칠나무를 대상으로 *Dendropanax*속의 16 가지의 식별형질을 비교분석하여 두 종간의 차이가 없다고 보고하였다. 특히, 현재까지 구분형질로 이용되는 수액의 색깔, 열매의 형태 변이도 매우 심하기 때문에 두 종의 식별형질로서 적합하지 못하다고 보고한 바 있다.

최근에는 DNA fingerprint (Jeffery *et al.*, 1985), restriction fragment length polymorphism (RFLP; Loftus *et al.*, 1988), random amplified polymorphic DNA (RAPD; Palmer *et al.*, 1988), DNA 염기서열 분석과 같은 기술들이 종의 진화와 계통의 유연관계를 추적하는 새로운 도구로써 이용되고 있다.

RAPD 분석법은 random oligonucleotide primers를 이용하여 증폭된 DNA를 서로 비교하여 유연관계 분석이나 동정을 위한 유전적 marker로 사용하는 방법이다 (Williams *et al.*, 1990; Paquet and Mouton 1997; Lohtander *et al.*, 1998;

Vidigal *et al.*, 1998). RAPD외에, single strand conformation polymorphism (SSCP; Thomas *et al.*, 1994), heteroduplex analysis (HTA: White *et al.*, 1992), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE; Gasser *et al.*, 1996) 등의 기법들도 유전자의 염기서열상에서 염기치환이나 삽입/결실에 의한 점돌연변이 (point mutation)의 검출, 종간의 fingerprint, gene mapping 등의 연구에 이용되고 있다 (Gross *et al.*, 1996; Martinelli *et al.*, 1996; Förnzler *et al.*, 1998).

리보솜 DNA상에서 internal transcribed spacer (ITS)는 피자식물에서 다수 사본으로 존재하며 (Rogers and Bendish, 1987; Baldwin *et al.*, 1995; Lee and Seo, 1997; Hosny *et al.*, 1999), 급속한 진화과정상에 있으며 (Brown *et al.*, 1972; Hillis *et al.*, 1991), 크기가 작고 (700 bp 이하) 고도로 보존된 rDNA 사이에 위치하고 있고, 증폭이 용이하다는 이유로 계통유전학적 분석에 가장 많이 이용되고 있다 (Kron and King, 1996; Schaal and Learn Jr., 1988).

America 자생종인 *D. aboreus* chloroplast DNA (cpDNA)의 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbcL*) gene (Plunkett *et al.*, 1996; Plunkett *et al.*, 1997), maturase (*matK*) gene (Plunkett *et al.*, 1997), RNA polymerase subunit C1 (*rpoC1*) gene의 intron (Downie *et al.*, 1998) ribosomal protein L16 (*rpl16*) gene의 intron (Downie *et al.*, 1999; GenBank Accession AF094464) 등의 염기서열을 분석하여 계통유전학적 연구가 보고된 바 있다.

본 연구에서는 형태적인 식별형질로는 구분이 모호한 황칠나무와 일본황칠나무를 대상으로 PCR-RAPD, ITS의 SSCP와 HTA 분석을 통해 두 종간의 분자유전학적 유연관계를 분석하였다.

재료 및 방법

실험 재료

황칠나무 (*Dendropanax morbifera* Leveille)는 한라산, 완도, 해남, 보길도에서, 일본 황칠나무 (*D. trifidus* Makino)는 Tokyo와 Tsushima, Nagasaki, Saga에서 어린잎을 채집하였다 (Table 1). 채집한 시료는 증류수로 세척하여 물기를 제거한 후 total DNA를 분리하거나, -72°C 저온 냉동기에 밀폐 보관하였다가 사용하였다.

Total DNA 추출

Genomic DNA는 어린 잎에서 Protein Precipitation Technique (Dellaporta *et al.*, 1983)을 이용하여 추출하였다. 황칠나무와 일본황칠나무의 신선한 잎 1 g에 액체질소를 가하여 마쇄하고, 일정량의 extraction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 500 mM NaCl; 2% SDS; 1% PVP; 0.1% β -mercaptoethanol)를 첨가하여 60°C 에서 30분 동안 반응시킨 후, 5 M potassium acetate (pH 6.5) 4 ml를 첨가하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 5,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA)에 용해시켰다. 이 용액을 원심분리하여 얻은 상정액에 3 M sodium acetate (pH 7.6) 100 μl 와 iso-propanol 1 ml를 첨가하고 -20°C 에서 2시간 동안 보관하여 DNA를 재침전시켰다. 재침전된 DNA는 TE buffer에 녹여, RNase A, Proteinase K (Sigma, USA)를 사용하여 남아있는 RNA와 protein을 분해하였다. 분해된 RNA와 protein들은 0.5M Tris (pH 8.0)로 포화시킨 phenol과 chloroform을 처리하여 제거하였다. 최종적으로 정제된 DNA는 ethanol 침전법으로 다시 회수하여 TE buffer에 용해시켰다. 분리된 DNA는 agarose (Sigma, USA) 전기영동과 UV/VIS spectrophotometer로 확인, 정량하였다.

PCR-RAPD Analysis

DNA 증폭에는 Canada의 British Columbia 대학교 Biotechnology Lab.으로부터 구입한 random primer 100 개 (Set #2, UBC 101~UBC 200)를 이용하였다. PCR 반

Table 1. List of *D. morbifera* and *D. trifidus* used in this study

Scientific name	Individuals (N=16)	Voucher ^a	Locality ^b
<i>D. trifidus</i> Makino	Tok* 1	K9752	Tokyo
	Tok 2	K9753	Tokyo
	Nag 1	J9785	Nagasaki
	Nag 2	J9786	Nagasaki
	Tsu 1	J9789	Tsushima
	Tsu 2	J9790	Tsushima
	Sag 1	J9787	Saga
	Sag 2	J9788	Saga
<i>D. morbifera</i> Léville	MHa 1	J9710	Mt. Halla
	MHa 2	J9711	Mt. Halla
	Wan 1	K9766	Wan-do
	Wan 2	K9768	Wan-do
	Pog 1	K9770	Pogil-do
	Pog 2	K9771	Pogil-do
	Hae 1	K9773	Haenam
	Hae 2	K9775	Haenam

^aM. H. Kim and Y. H. Jung in Cheju National University; ^b*D. trifidus* in Japan and *D. morbifera* in Korea; *Tok, Tokyo; Nag, Nagasaki; Tsu, Tsushima; Sag, Saga; MHa, Mt. Halla; Wan, Wan-do; Pog, Pogil-do; Hae, Haenam.

응은 template DNA 10 ng, primer 0.5 nM, dNTP (Promega, USA) 200 μ M, MgCl₂ 2.0 mM, 10 \times reaction buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 50 mM KCl; 0.1% Triton[®]X-100) 2.5 μ l, Taq DNA polymerase (Promega, USA) 2.0 unit에 멸균된 3차 증류수를 첨가하여 총 25 μ l 반응액으로 수행하였다. PCR반응은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 예열한 후, 94 $^{\circ}$ C 1분, 37 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 2분으로 이어지는 과정을 40회 반복 수행하였다. Cycle이 끝난 후 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 extension하였다 (Jung *et al.*, 1997). PCR 산물들은 TBE (Tris-Borate/ EDTA, pH 8.3) buffer를 사용하여 ethidium bromide (EtBr)가 첨가된 1.5% agarose gel 상에서 100 V, 150분간 전기영동을 실시하였고, UV transilluminator에서 확인한 후, polaroid camera로 촬영하였다. Polymorphic 밴드 양상을 나타내는 arbitrary primer를 이용한 PCR 산물들을 전기영동으로 확인한 후, 모든 개체에서 나타나는 밴드를 제외한 polymorphic 밴드만을 선정하여, 밴드의 유무에 따라 '1'과 '0'으로 표시하는 two-digital numbering system으로 binomial matrix code를 작성하였다. 이를 근거로 RAPDistance Ver. 1.04 program (Saitou and Nei, 1987) 내의 Sneath and Sokal (1973)의 방법을 이용하여 Phi coefficient에 기초한 거리지수를 산출하고 distance matrix를 작성하였다. 계통수는 작성된 distance matrix를 기초로 Neighbor-Joining 방법에 따라 작성하였다.

Enzymatic Amplification of ITS Region

SSCP와 HTA에 사용한 nrDNA ITS에 대한 증폭은 White *et al.* (1990)에 의해 고안된 universal primer (Table 2)를 사용하였다. PCR 반응은 template DNA 10 ng, primer 각각 0.5 nM, dNTP 50 μ M, MgCl₂ 1.8 mM, 10 \times reaction buffer 2.5 μ l, Taq DNA polymerase (Promega, USA) 2.0 unit에 3차 증류수를 첨가하여 총 25 μ l의 반응액으로 수행하였다. 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 예열한 후, 95 $^{\circ}$ C-1분, 55 $^{\circ}$ C-1분, 72 $^{\circ}$ C-45초로 이어지는 cycle을 30회 반복한 다음, 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 extension을 실시하였다. 증폭한 PCR 산물은 1.5% agarose (Sigma, USA) gel에서 100 V, 1시간 전기영동하고 EtBr로 염색한 후 UV transilluminator에서 polaroid camera로 촬영하였다.

Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

SSCP 분석은 PCR로 증폭한 ITSII 2 μ l를 denaturation solution (95%

formamide, 10 mM NaOH, 0.1% xylene cyanole FF, 0.1% bromophenol blue) 5 μ l와 희석하여 80°C에서 5분간 가열하여 변성시킨 후, 곧바로 ice-water bath로 2분간 방치하였다. 준비된 sample은 0.75×165×220mm polyacrylamide gel (10% acrylamide, 49:1 acrylamide:bis-acrylamide; 0.5×TBE; 5% glycerol)에서 30W, 18시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 silver staining (Allen *et al.*, 1989)하여 사진촬영하였다.

Heteroduplex Analysis (HTA)

중복한 ITS에 대한 HTA는 먼저, 황칠나무와 일본황칠나무 각각 1개체를 선정하여 같은 분류군의 개체들에 대한 HTA를 수행하였다. 이후 분류군 사이에서의 HTA는 SSCP 분석에서 type A, B, C로 구분된 개체의 PCR 산물을 기준시료로 하여 다른 개체의 PCR 산물과 duplex를 형성한 후 전기영동 하였다. 기준시료로 정한 개체의 PCR 산물 1 μ l에 다른 개체의 PCR 산물 1 μ l씩 첨가하고 10×reannealing buffer (Kshirsagar *et al.*, 1997; 1 M sodium chloride, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) 1 μ l와 증류수를 첨가하여 총 반응 용액량을 10 μ l가 되게 하였다. 준비된 시료들을 94°C에서 3분간 변성시킨 후 ice-water bath에서 1시간 동안 방치한 후, 1.0×165×140mm, polyacrylamide gel (8% acrylamide, 42:1 acrylamide:bis-acrylamide; 0.5×TBE)에서 30W, 4시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 EtBr로 염색하여 UV 하에서 사진촬영하였다.

Table 2. Nucleotide sequences of primers used for amplifications of nrDNA ITSII and ITS full region

Primer ^a	Sequence (5'→3')	Length (bp)
P1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	19
P3	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	20
P4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	20

^aAll primers were designed by White *et al.* (1990).



결 과

PCR-RAPD 분석에 의한 유연관계 분석

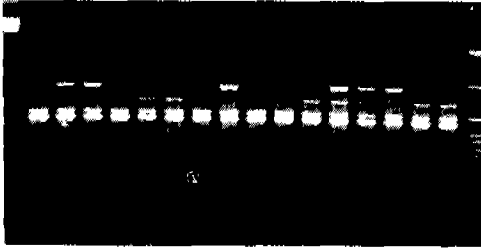
<G+C>비율이 50% 이상인 전체 100개의 arbitrary primer를 이용해서 PCR-RAPD를 실시한 결과, 78개 primer에서 PCR산물이 관찰되었다. 전체 분류군에서 증폭된 DNA 밴드 중 polymorphic한 밴드 양상을 나타내는 11개의 primer를 이용하여 총 113개의 밴드를 얻었다 (Fig. 1). 관찰된 밴드 중에서 모든 개체에서 동일하게 나타나는 것을 제외하면 78개의 밴드가 polymorphic하였다 (Table 3 and Table 4). 그러나 78개의 polymorphic 밴드 중에 황칠나무와 일본황칠나무 각각의 분류군에서만 한정되어 나타나는 밴드는 없었다. 관찰된 밴드 형태를 토대로 Sneath and Sokal (1973)의 방법에 의해 거리지수를 산출하였다 (Table 5). 산출된 거리지수를 사용하여 NJ (neighbor-joining) 방법으로 16개체에 대한 계통수를 작성하였다 (Fig. 2). 작성된 계통수는 두 분류군에서 선발된 16개체들이 두 개의 집단으로 구분되었다; cluster I - Tokyo 1, Tokyo 2, Saga 2, 완도 2, 보길도 2, 해남 1, 해남 2, 보길도 1; cluster II - Nagasaki 1, Nagasaki 2, Saga 1, 한라산 1, 한라산 2, Tsushima 1, Tsushima 2, 완도 1. Cluster I은 다시 Tokyo 1, Tokyo 2, 해남 1, 해남 2, Saga 2, 완도 2 개체들이 속하는 소그룹이 보길도 1과 분리되었다. Cluster II는 Nagasaki 1, Nagasaki 2, Saga 1, 한라산 1, 한라산 2, Tsushima 2들로 이루어진 소그룹과 완도 1, Tsushima 2로 이루어진 소그룹으로 나누어졌다. 동일한 locality에 해당하는 개체들 중 Tokyo, Nagasaki, 한라산, 해남의 개체끼리는 가장 가깝게 묶이는 반면, Tsushima, Saga, 완도, 보길도의 개체들은 서로 분산되어 나타났다 (Fig. 2).

Table 4에서 보여주는 바와 같이, 일본황칠나무 개체들 중 Tokyo 1-Tokyo 2의 거리지수가 0.061로 가장 낮았다. 서로 다른 자생지의 개체들 중에서는 Saga 1-Nagasaki 2 (0.173), Saga 1-Tsushima 2 (0.164), Saga 2-Tokyo 1 (0.173), Saga 2 -Tsushima 2 (0.175)의 거리지수가 Saga 1-Saga 2 (0.228)사이의 거리지수보다 낮았다. 황칠나무에서는 해남 1-해남 2 (0.026)가 조사된 16개체들 중 가장 낮은 거리지수를 나타내었다. 완도 1-완도 2 (0.164), 완도 1-해남 1 (0.164)의 거리

Figure 1. PCR-RAPD patterns produced using 11 random primers in *D. morbifera* and *D. trifidus*; A - UBC 112, B - UBC 115, C - UBC 116, D - UBC 119, E - UBC 120, F - UBC 126, G - UBC 129, H - UBC 133, I - UBC 147, J - UBC 162 and K - UBC 164. Lane 1 to 16 are *D. trifidus* and *D. morbifera* individual of Tokyo 1, Tokyo 2, Nagasaki 1, Nagasaki 2, Tsushima 1, Tsushima 2, Saga 1, Saga 2, Mt. Halla 1, Mt. Halla 2, Wan-do 1, Wan-do 2, Pogil-do 1, Pogil-do 2, Haenam 1 and Haenam 2. M, pGEM DNA markers; M1, λ DNA/*Hind* III markers.



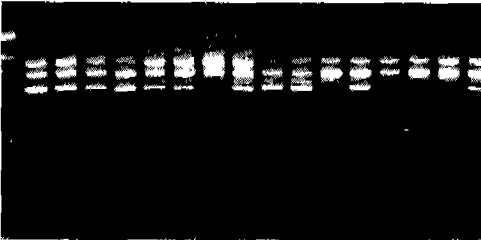
A M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 M



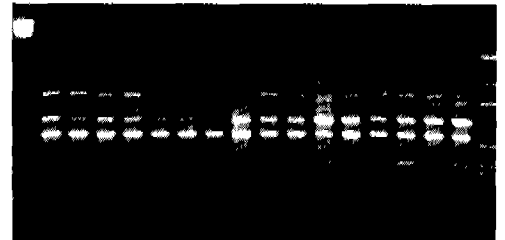
B M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



C M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



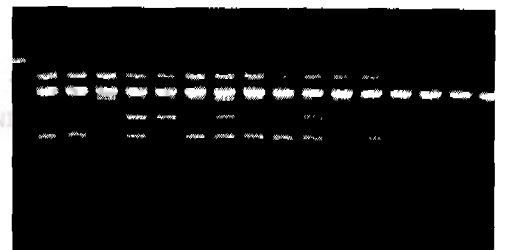
D M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 M



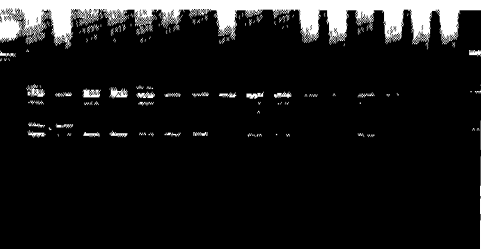
E M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



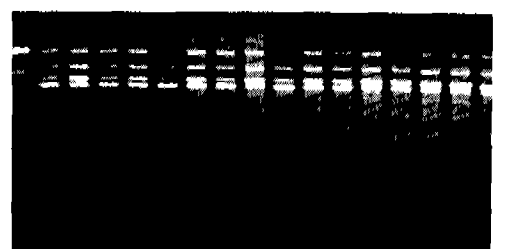
F M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



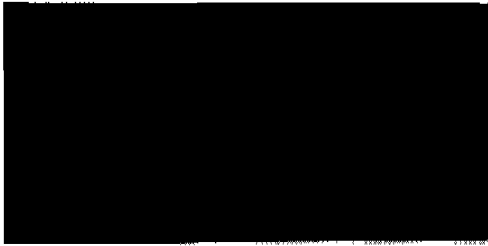
G M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 M



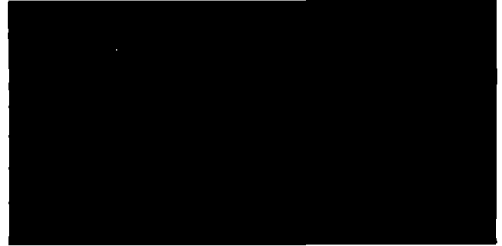
H M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



I M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



J M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



K M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

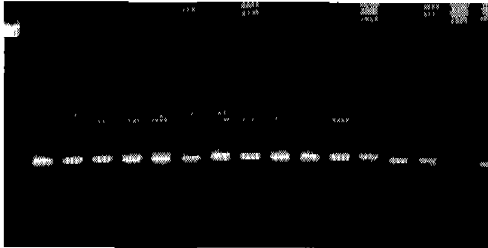


Table 3. Nucleotide sequences of arbitrary 10-mer primers used for the PCR-RAPD analysis and numbers of polymorphic bands observed in each primers

Primer ^a	Sequence (5'→3')	<G+C> content (%)	Number of Polymorphic Bands
UBC 112	GCT TGT GAA C	50	4
UBC 115	TTC CGC GGG C	80	11
UBC 116	TAC GAT GAC G	50	3
UBC 119	ATT GGG CGA T	50	9
UBC 120	GAA TTT CCC C	50	12
UBC 126	CTT TCG TGC T	50	4
UBC 129	GCG GTA TAG T	50	8
UBC 133	GGA AAC CTC T	50	4
UBC 147	GTG CGT CCT C	70	8
UBC 162	AAC TTA CCG C	50	12
UBC 164	CCA AGA TGC T	50	3

^a All primers were purchased from the University of British Columbia, Canada.

Table 4. Binomial matrix based on the PCR-RAPD analysis

Scientific name	Locality	No. of primer											
		U B C 1 1 2	U B C 1 1 5	U B C 1 1 6	U B C 1 1 9	U B C 1 2 0	U B C 1 2 6	U B C 1 2 9	U B C 1 3 3	U B C 1 4 7	U B C 1 6 2	U B C 1 6 4	
<i>Denropanax trifidus</i>	Tok 1	1110	00000000010	001	000100000	110000101101	0011	00010011	0101	00100100	011100101101	000	
	Tok 2	1110	00000010100	001	000100000	110011101101	0011	00010011	0100	00100100	000000111101	100	
	Nag 1	1110	01111100100	001	000101110	000101110110	1001	01010001	0100	00010100	010110111101	100	
	Nag 2	1000	11011100100	001	000101010	000010000011	1111	00010001	0100	01110001	010100100101	100	
	Tsu 1	1001	00001000101	111	000101000	000011000111	1110	11110001	0010	00100100	010100101101	100	
	Tsu 2	1001	01000000011	111	000100000	001011100111	1011	00000000	0100	00100100	011100111001	100	
	Sag 1	1100	01010101010	100	000100000	000000000111	1111	00001000	1100	10110100	000100101100	100	
	Sag 2	1110	01000010010	111	110000000	110011010110	1011	00000001	1100	10110101	011100110111	010	
<i>D. morbifera</i>	MHa 1	0000	01001001011	011	000100000	000001010111	1010	01010101	0100	10100000	000100101100	010	
	MHa 2	1000	01011001101	011	000100000	000011100111	1111	01000101	0100	10100101	000011010100	010	
	Wan 1	1001	00000000111	010	110111011	000011000111	1011	00000000	0100	10110100	011100111100	100	
	Wan 2	1011	01011010100	001	111100000	110011100110	1011	00000001	1100	00110101	011100111101	100	
	Pog 1	0011	01011010100	010	000100001	000011111110	1011	00010001	0100	00100110	010000111000	011	
	Pog 2	1110	00001010010	000	100100001	110011100110	1011	00000001	0110	00100111	011100111001	100	
	Hae 1	1001	01000011101	000	011110011	110011100110	0111	00000000	0110	00111111	111100101101	100	
	Hae 2	1001	00001011101	001	011110011	110011100110	0111	00000000	0110	00111111	111100101001	100	

All abbreviations of individuals described in Table 1.

Table 5. Distance matrix obtained by PCR-RAPD Analysis

	Tok 1	Tok 2	Nag 1	Nag 2	Tsu 1	Tsu 2	Sag 1	Sag 2	MHa 1	MHa 2	Wan 1	Wan 2	Pog 1	Pog 2	Hae 1	Hae2
Tok 1	-															
Tok 2	0.061	-														
Nag 1	0.228	0.200	-													
Nag 2	0.228	0.219	0.164	-												
Tsu 1	0.209	0.200	0.219	0.164	-											
Tsu 2	0.147	0.173	0.228	0.209	0.139	-										
Sag 1	0.219	0.228	0.228	0.173	0.228	0.164	-									
Sag 2	0.173	0.200	0.258	0.279	0.300	0.175	0.228	-								
MHa 1	0.209	0.238	0.238	0.219	0.164	0.173	0.173	0.238	-							
MHa 2	0.268	0.219	0.238	0.200	0.200	0.191	0.209	0.238	0.130	-						
Wan 1	0.219	0.228	0.248	0.209	0.173	0.114	0.182	0.209	0.209	0.228	-					
Wan 2	0.164	0.139	0.173	0.173	0.209	0.147	0.238	0.122	0.268	0.209	0.164	-				
Pog 1	0.173	0.200	0.238	0.279	0.219	0.139	0.268	0.182	0.164	0.238	0.173	0.173	-			
Pog 2	0.164	0.139	0.209	0.228	0.228	0.182	0.238	0.173	0.289	0.248	0.200	0.099	0.139	-		
Hae 1	0.238	0.228	0.311	0.248	0.248	0.200	0.258	0.248	0.333	0.289	0.164	0.130	0.248	0.147	-	
Hae 2	0.238	0.228	0.311	0.248	0.228	0.200	0.300	0.268	0.333	0.289	0.182	0.130	0.228	0.130	0.026	-

All abbreviations of individuals described in Table 1.

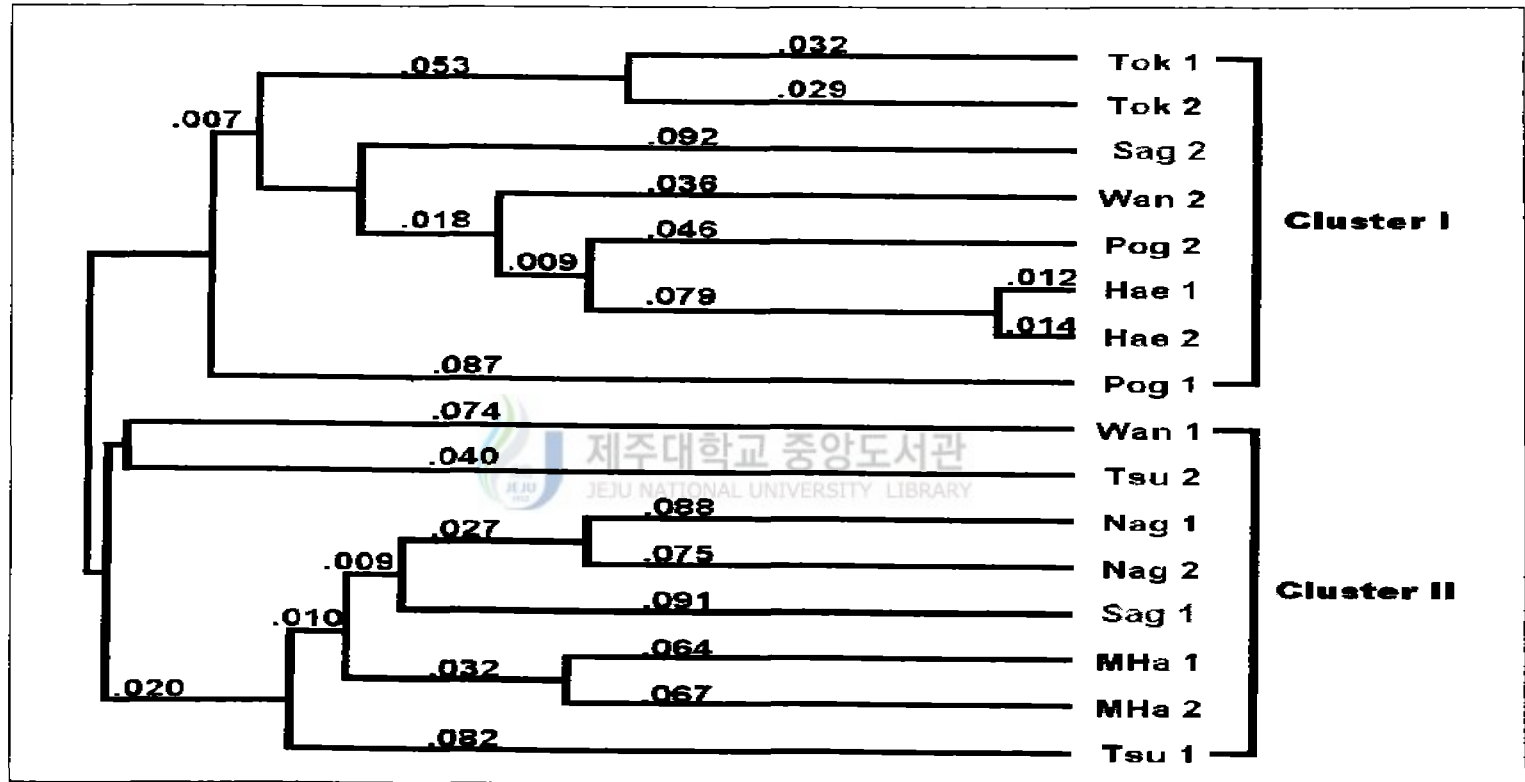


Figure 2. Neighbor-joining tree based on the analysis of PCR-RAPD fragments. All abbreviations of individuals described in Table 1.

지수는 서로 같게 나타났고, 완도 2는 보길도 1과 가장 가깝고 해남 1·2와의 유연관계가 같은 지역인 완도 1보다 훨씬 더 가까운 것으로 나타났다. 보길도 1은 보길도 2와 가장 가깝지만 보길도 2는 해남 2와 더 가까운 것으로 나타났다. 황칠나무와 일본황칠나무 두 종간의 거리지수를 비교해보면 완도 1-Tsushima 2가 0.114로 가장 가깝게 나타났고, Saga 2는 다른 종인 완도 2와의 거리지수는 0.122로 같은 종 내의 다른 개체들보다 낮았다. 각 분류군 내에서 거리지수가 가장 높은 개체는 Tsushima 1-Saga 1 (0.300)과 한라산 1-해남 1·2 (0.333) 사이에서 관찰되었고, 두 분류군 사이에서는 Nagasaki 1-해남 1·2 (0.311)사이에서 관찰되었다 (Table 5).

ITS에 대한 SSCP와 HTA 분석

황칠나무와 일본황칠나무에서 PCR로 증폭된 전체 ITS는 700 bp 크기였고 (Fig. 3B), 5.8S와 26S rDNA 사이에 위치하는 ITSⅡ는 400 bp의 크기로 (Fig. 3C), 피자식물에서 보고된 ITS의 크기와 유사하였다 (Baldwin *et al.*, 1995; Wen and Zimmer, 1996).

각 개체에서 증폭된 ITSⅡ를 시료로 하여 SSCP 분석 결과, 일본황칠나무 8개체와 황칠나무 8개체에서 세 가지 유형의 밴드양상이 관찰되었다 (Fig. 4). Type A에는 일본황칠나무의 Tokyo 1, Tokyo 2, Nagasaki 1, Saga1, Saga2와 황칠나무의 보길도 2, 해남 1, 해남 2등이 포함되며, type B에는 일본황칠나무 Nagasaki 2, Tsushima 2와 황칠나무 한라산 1, 한라산 2, 완도 2가 포함되었다. 두 type의 밴드가 모두 나타나는 type C에는 일본황칠나무 Tsushima 1과 황칠나무 완도 1, 보길도 1이 포함되었다 (Table 6, Fig. 4).

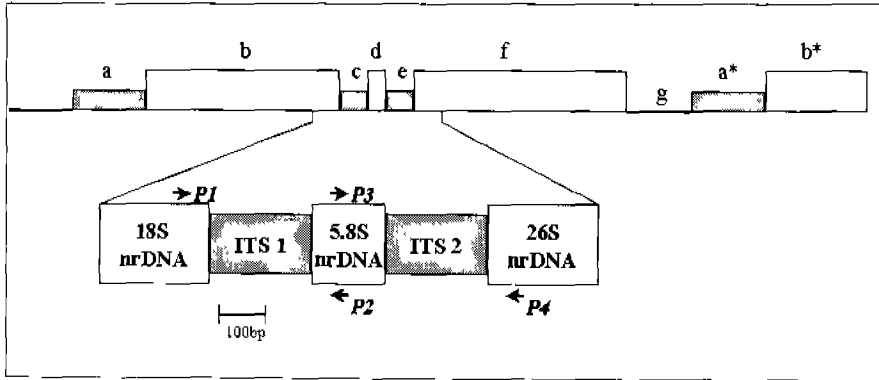
HTA 분석은 먼저, 각각 황칠나무와 일본황칠나무 종내 개체간 heteroduplex (HT)의 형성이 있는가를 조사하였고, SSCP 분석에서 나타난 type A, B, C에 해당하는 1 개체씩을 선정하여 종간 HT, HM (homoduplex) duplex 형성 여부를 관찰하였다. Non-denaturing PAGE 겔에서 전기영동한 결과 HM과 HT의 multiple 밴드들이 관찰되었다. 즉, HM보다 더 느린 속도로 이동한 두 개의 HT가 관찰되었다. 두 분류군에서 Tokyo 1과 한라산 1을 기준으로 각 개체에서 HTA 분석을 수행했을 때, 두 분류군 모두에서 HM와 HT분자가 형성되었다 (Fig. 5A). HT의 경우 두 개의 HM 단일밴드와 이보다 이동속도가 느린 두 개의 HT분자들이 관찰되었다. 더구나, 종간 개

체들 사이에서도 HM과 HT분자가 관찰되었다 (Fig. 5). 특히하게 완도 1의 경우는 모든 개체와 HT를 형성하였다 (Table 6, Fig. 5C).

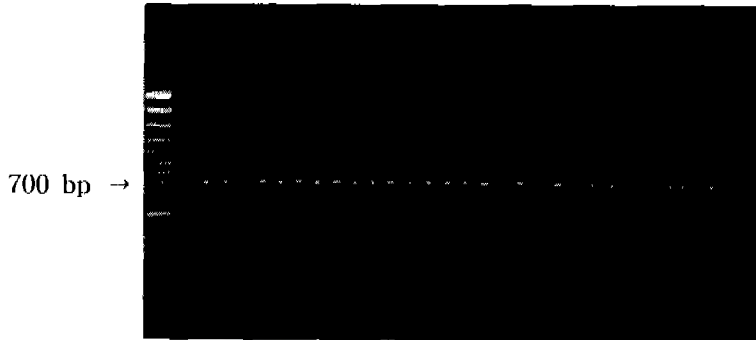


Figure 3. Organization of the ITS region and nrDNA repeat unit (A), ITS full region (B), and ITS II (C) amplified using PCR from 16 individuals. A, The line corresponds the nontranscribed spacer region, while boxes (gray or light gray) represent the portion of the gene. Light-gray boxes represent the coding regions for the 18S, 5.8S, and 26S rRNAs. Gray colored boxes symbolize the transcribed spacers, the external (ETS; a, a*) and internal (ITS1, ITS2; c, e). The repeating structure of these genes is represented by the adjacent ETS (a*) and 18S rDNA region (b*). *P1*, *P2*, *P3*, and *P4* are primers designed by White *et al.*(1990). Arrows indicate orientation and approximate position of primer sites; B, PCR products of ITS full region from 16 individuals. M, 100 bp DNA Ladder; C, PCR products of ITS II from 16 individuals. M, 50 bp DNA Ladder. Lane 1 to 16 indicate the each individuals.

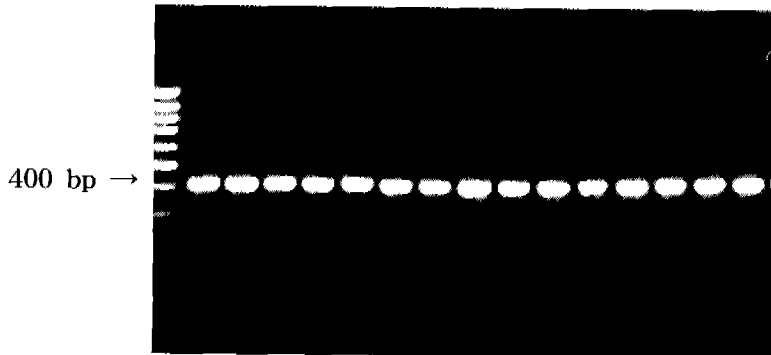
A



B M1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



C M2 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



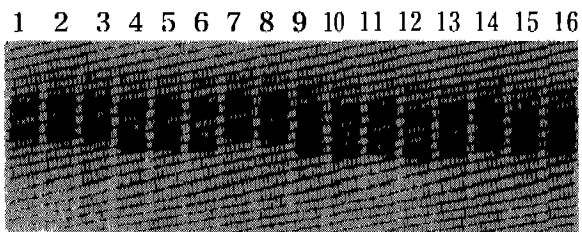
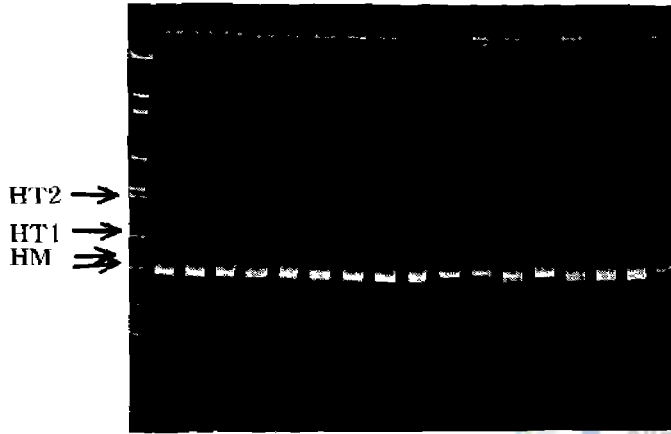


Figure 4. SSCP patterns of ITS II analyzed in from 16 individuals. Lane 1-8 are *D. trifidus* and lane 9-16 are *D. morbifera*.

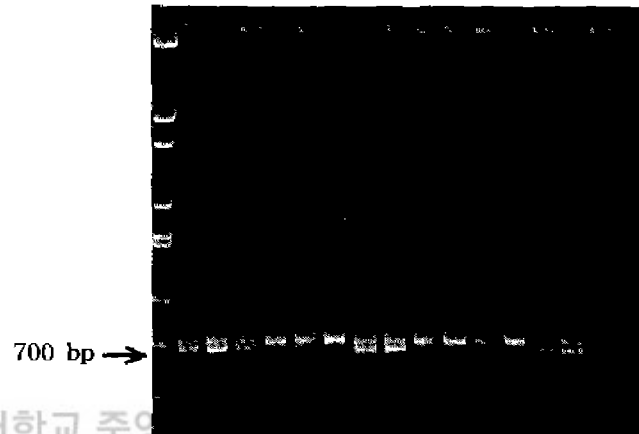
Figure 5. Heteroduplex patterns of ITS between inter- and intra- species. A, Lane 1 to lane 8 are Tok 1×individuals of *D. trifidus*. c, control (inter-species duplex formation as Tok 1×MHa 1). Lane 9 to lane 16 are MHa 1×individuals of *D. morbifera*; B, 1-16 lanes mixed with Nag 2; C, All lanes mix with Wan 1; D, all lanes mixed with Haenam 1, M, 100bp DNA Ladder.



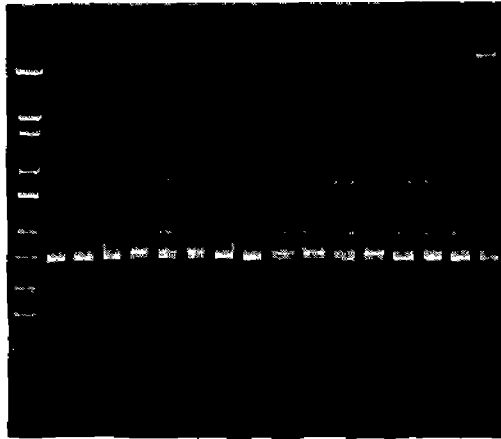
A M 1 2 3 4 5 6 7 8 c 9 10 11 12 13 14 15 16



B M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



C M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



D M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

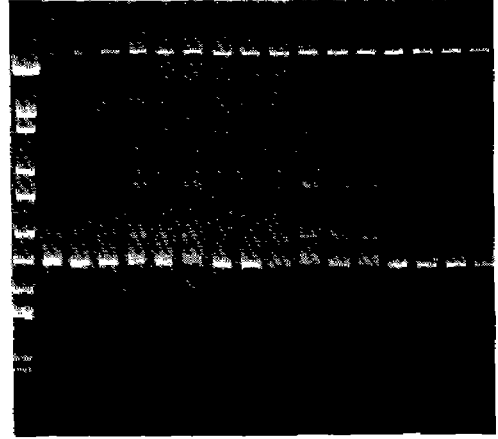


Table 6. Electrophoretic band patterns of SSCP in ITSII and HTA using ITS full region

Sample	SSCP patterns ^a	HTA patterns ^b				
	ITSII	Tok 1	Nag 2	MHa 1	Wan 1	Hae 1
Tok* 1	A	HM(S)	HT	-	HT	HM
Tok 2	A	HM	HT	-	HT	HM
Nag 1	A	HM	HT	-	HT	HM
Nag 2	B	HT	HM(S)	-	HT	HT
Tsu 1	C	HT	HT	-	HT	HT
Tsu 2	B	HT	HM	-	HT	HT
Sag 1	A	HM	HT	-	HT	HM
Sag 2	A	HM	HT	-	HT	HM
MHa 1	B	HT	HM	HM(S)	HT	HT
MHa 2	B	-	HM	HM	HT	HT
Wan 1	C	-	HT	HT	HT	HT
Wan 2	B	-	HM	HM	HT(S)	HT
Pog 1	C	-	HT	HT	HT	HM
Pog 2	A	-	HT	HT	HT	HM
Hae 1	A	-	HT	HT	HT	HM(S)
Hae 2	A	-	HT	HM	HT	HM

^aBand types observed in SSCP profiles. ^bPatterns of duplex molecules observed in each HTA; HM, homoduplex; HT, heteroduplex; (S); standard DNA used in each investigation. *Abbreviations of individuals described in Table 1.

고 찰

본 연구는 별개의 분류군으로 명명된 황칠나무 (*Dendropanax morbifera* Leveille)와 일본황칠나무 (*D. trifidus* Makino)의 16개체를 대상으로 분자유전학적 방법으로 두 종간의 유연관계를 추정하기 위해 수행하였다.

PCR-RAPD 분석에서 특이한 점은 황칠나무와 일본황칠나무에서만 국한되어 나타나는 종특이적인 밴드가 없다는 것과 황칠나무 분류군으로 구분되고 있는 한라산 1과 해남 1, 해남 2 사이의 거리지수 (0.333)가 16 개체 중 가장 멀다는 점이다. 이는 일본황칠나무 분류군에 속하면서 지리적으로 더 먼 Tokyo와 Nagasaki, Saga, Tsushima의 개체들과의 거리지수보다도 더 클 뿐 아니라 분류군간에서 가장 차이가 크게 나타난 Nagasaki 1과 해남 1, 해남 2 (0.311) 보다도 큰 값이다 (Table 5). 그리고, 서로 다른 분류군인 Tsushima 2와 완도 1 개체들이 하나의 아집단을 형성한다는 것도 특이하다고 할 수 있다 (Fig. 2). 이것은 이들 두 개체가 같은 자생지의 개체들보다 유전적 유사도가 높다는 것을 의미한다. 거리지수에 근거한 계통수에서, 일본황칠나무와 황칠나무 모두 각 분류군이 두 집단으로 구분되어 나타났다 (Fig. 2). 이중 황칠나무 분류군에서 나타나는 분지양상은 잎 형질에 의해 제주도과 다른지역으로 크게 구분되었던 Kim 등 (1994)의 보고와는 다른 결과를 보였다 (Fig. 2). 뿐만 아니라, 황칠나무와 일본황칠나무 두 분류군이 뒤섞여서 나타나기 때문에 두 종은 계통유전학적으로 명확하게 구분되지 않는다는 점을 시사해주고 있다. PCR-RAPD 방법은 종간, 종내의 개체군이나 개체간의 유연관계 규명에 유용하게 사용되고 있기 때문에 (Williams *et al.*, 1990; Karp *et al.*, 1996; Loo *et al.*, 1999), 본 연구결과는 PCR-RAPD 기법이 종간 계통유연관계 고찰에 부적합하다는 것보다는 황칠나무와 일본황칠나무를 각각의 종으로 구분하고 있는 현재의 분류체계에 문제점을 제기한다고 사료된다.

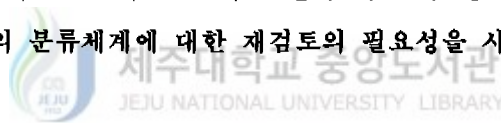
16개체에서 증폭된 ITS는 700 bp의 크기 (Fig. 3A)로 두릅나무과에서의 보고된 크기와 일치하고 있었다 (Mitchell and Wagastaff, 1997). 400 bp 크기로 나타난 ITSⅡ에 대한 SSCP 분석 결과, 16개체에서 두 가지의 주된 유형 (type A, type B)과 이들과 구분되는 또 다른 유형 (type C)을 관찰할 수 있었다 (Table 6). 이는 황칠

나무와 일본황칠나무가 각각 두 가지 이상의 ITS sequence를 가지고 있음을 암시한다. 그리고 전체 ITS에 대한 HTA 분석에서, 동일 분류군내의 개체들 사이에서 homoduplex (HM)와 heteroduplex (HT) 모두가 형성되었고, 분류군간 개체 사이에서도 HM과 HT 모두가 형성되었다 (Fig. 5). 이와 같은 결과는 두 종의 ITS가 재결합 후 loop를 형성하는 sequence와 HM을 형성하는 sequence를 모두 가진다고 할 수 있다. 이와 함께 ITS에 대한 SSCP와 HTA의 분석결과는 통해 서로 다른 두 가지 ITS sequence를 갖는 개체가 있음을 암시하고 있다. 특이한 점은, SSCP 겔 상에서 세 개의 밴드를 갖는 개체들 (type C; Table 6)이 관찰되었고, type C에 해당하는 완도 1를 기준으로 한 HTA에서 황칠나무와 일본황칠나무 모든 개체와 HT를 형성한다는 것이다. 이는 완도 1이 다른 모든 개체와 구분되는 또 다른 ITS sequence를 가지고 있음을 암시한다. 그리고 종내와 종간 HT의 형성이 두 가지의 ITS sequence를 나타내고 있기 때문에 전체적으로 16 개체가 가지는 ITS sequence의 유형은 적어도 3 가지 이상일 것으로 사료된다. 여기에 덧붙여, 종간 HM와 종내 HT의 형성은 황칠나무와 일본황칠나무 ITS가 종특이적이지 못함을 말해주고 있다.

황칠나무와 일본황칠나무에 대한 PCR-RAPD 계통수와, ITS에 대한 분석 결과는 두 분류군을 서로 다른 종으로 나눌만한 충분한 분자계통학적인 근거를 찾을 수 없었다. 이러한 결과는 Moon *et al.* (1999)에 의해서 밝혀진 두 분류군간 형태학적 구분형질에 대한 연구결과와 일치한다. 아울러 분류군 내에서의 변이가 다양하게 나타난다는 보고들 (Kim *et al.*, 1994; Moon *et al.*, 1999)과도 일치하고 있다. 이상과 같은 전지에서 볼 때, 황칠나무 (*Dendropanax morbifera* Leveille)와 일본황칠나무 (*D. trifidus* Makino) 두 종에 대한 외부형태적, 해부학적 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

우리나라와 일본의 특산식물로 알려져 있는 황칠나무 (*Dendropanax morbifera* Leveille)와 일본황칠나무 (*D. trifidus* Makino)는, 현재까지 수액의 색깔과 열매의 모양으로 황칠나무와 일본황칠나무를 구분하고 있다. 하지만, 각각의 분류군 내에서 폭넓은 변이들과, 심지어 구분형질에서도 많은 변이형이 보고되었다. 따라서, 이들 두 분류군을 식별하는 것에 대한 의문점이 제기되고 있다. 본 연구에서는, polymerase chain reaction-random amplified polymorphic DNA (PCR-RAPD), single stranded conformation polymorphism (SSCP), heteroduplex analysis (HTA) 등의 분자유전학적 기법들을 바탕으로 두 종간의 유연관계를 조사하였다. PCR-RAPD 분석 결과, 두 종에 대한 특이적인 PCR 산물은 발견되지 않았다. 또한 거리지수에 기초한 계통수에서도 두 종은 각각 다른 집단으로 구분되지 않았다. 이와 더불어 핵 리보솜 DNA의 internal transcribed spacer (nrDNA ITS)에 대한 SSCP와 HTA분석은, 두 종에서 존재하고 있는 ITS sequence가 각각 적어도 두 가지 이상이며, ITS 또한 종-특이적이지 못함을 암시하였다. 본 연구는 현재 완전히 다른 두 종으로 구분하고 있는, 황칠나무와 일본황칠나무의 분류체계에 대한 재검토의 필요성을 시사하고 있다.



인 용 문 헌

- Allen, R.C., G. Graves and B. Budowle, 1989. Polymerase chain reaction amplification products separated on rehydratable polyacrylamide gels and stained with silver. *BioTechniques* 7(7): 736-743.
- Baldwin, B.G., M.J. Sanderson, J.M. Porter, M.F. Wojciechowski, C.S. Campbell and M.J. Donoghue, 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277.
- Bentham, G. and J.D. Hooker, 1867. *Genera Plantarum I*, pt. 3. 943pp.
- Brown, D.D. P.C. Wensink and E. Jordan, 1972. A comparison of the ribosomal DNA's of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem genes. *Journal of Molecular Biology* 63: 57-73.
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks, 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Report* 1: 19-21.
- Downie, S.R., S. Ramanath, D.S. Katz-Downie and E. Llanas, 1998. Molecular systematics of Apiaceae subfamily Apioideae: phylogenetic analysis of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer and plastid *rpoC1* intron sequences. *American Journal of Botany* 85(4): 563-591.
- Förnizler, D., H. Her, E.W. Knapik, M. Clark, H. Lehrach, J.H. Postlethwait, L.I. Zon and D.R. Beier, 1998. Gene mapping in zebrafish using single-strand conformation polymorphism analysis. *Genomics* 51: 216-222.
- Gasser, R., P. Nansen and P. Guldberg, 1996. Fingerprinting sequence variation in ribosomal DNA of parasites by DGGE. *Molecular and Cellular Probes* 10: 99-105.
- Gatesy, J., G. Amato, E. Vrba, G. Schaller and R. DeSalle, 1997. A cladistic analysis of mitochondrial ribosomal DNA from the Bovidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7(3): 303-319.

- Gross, R.P. Schlee, H. Stein and O. Rottmann, 1996. Detection of allelic variation within the growth hormone gene in common bream using heteroduplex analysis. *Journal of Fish Biology* 48: 1283-1287.
- Hillis, D.M., C. Moritz, C.A. Porter, R.J. Baker, 1991. Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. *Science* 251: 308-310.
- Hosny, M., M., Hijri, E. Passerieux and H. Dulieu, 1999. rDNA units are highly polymorphic in *Scutellospora castanea* (Glomales, Zygomycetes). *Gene* 226: 61-71.
- Jeffery, S.A.J., V. Wilson and S.L. Thein, 1985. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73.
- Jung, Y.H., M.Y. Oh, M.H. Ko, G.O. Kim, Y.S. Oh, Y.C. Chung and M.H. Kim, 1997. Phylogenetic relationship among genus *Prunus* in Mt. Halla using RAPD analysis. *Korean Journal of Plant Taxonomy* 27: 415-428.
- Karp, A., O. Seberg and M. Buiatti, 1996. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Annals of Botany* 78: 143-149.
- Kim, S.H., C.S. Na, W.W. Kim, Y.J. Kim and C.H. Shin, 1994. Leaf variation of native *Dendropanax morbifera* populations in South Korea. *Research Report of Forest Genetics Research Institute of Korea* 30: 75-84.
- Kron, K.A. and J.M. King, 1996. Cladistic relationships of *Kalimia*, *Leiophyllum*, and *Loiseleuria* (Phyllodoceae, Ericaceae) based on *rbcL* and nrITS data. *Systematic Botany* 21(1): 17-29.
- Krüssmann, G., 1976. *Manual of Cultivated Broad-Leaved trees & Shurbs* vol. 1. Translation 1984. Timber Press, Beaverton, 427pp.
- Kshirsagar, S.G., M.S. Patole and Y.S. Shouche, 1997. Characterization of insect cell lines heteroduplex analysis employing a mitochondrial 16S ribosomal RNA gene fragment. *Annals of Biochemistry* 253: 65-69.
- Lee, S.H. and B.B. Seo, 1997. Chromosomal localization of 5S and 18S-26S rRNA genes using fluorescence *in situ* hybridization in *Allium wazakegi*.

- Korean Journal of Genetics* 19(1): 19-26.
- Loftus, M.G., D. Moore and T.J. Elliott, 1988. DNA polymorphisms in commercial and wild strains of the cultivated mushroom. *Agaricus bisporus*. *Theoretical Applied Genetics* 76: 712-718.
- Lohtander, K., M. Kallersjo and A. Tehler, 1998 Dispersal strategies in *Roccellina capensis* (Arthoniales). *Lichenologist* 30(4-5): 341-350.
- Loo, A.H.B., H.T.W. Tan, P.P. Kumar and L.G. Saw, 1999. Population analysis of *Licuala plabra* Griff. var. *glabra* (Palmae) using RAPD profiling. *Annals of Botany* 84: 421-427.
- Martinelli, G., E. Trabetti, P. Farabegoli, M. Buzzi, A. Zaccaria, N. Testoni, M. Amabile, A. Casartelli, A. de Vivo, P.F. Pignatti and S. Tura, 1996. 'Fingerprinting' of HLA-DQA by polymerase chain reaction and heteroduplex analysis. *Molecular and Cellular Probes* 10: 123-127.
- Mitchell, A.D. and S.J. Wagstaff, 1997. Phylogenetic relationships of *Pseudopanax* species (Araliaceae) inferred from parsimony analysis of rDNA sequence data and morphology. *Plant Systematics and Evolution* 208: 121-138.
- Moon, M.O., B.S. Ihm, Y.C. Chung, Y.J. Kang, C.S. Kim and M.H. Kim, 1999. Taxonomic appraisal of *Dendropanax morbifera* Leveille and *D. trifidus* (Thunberg) Makino based on morphological characters. *Korean Journal of Plant Taxonomy* 29(3): in press.
- Paquet, C. and C. Mouton, 1997. RAPD fingerprinting for the distinction of *Prevotella intermedia* sensu stricto from *Prevotella nigrescens*. *Anaerobe* 3: 271-278
- Palmer, J.D., R.K. Jansen, H.J. Michaels, M.W. Chase and J.R. Manhart, 1988. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 1180-1206.
- Plunkett, G.M., D.E. Soltis and P.S. Soltis, 1996. Higher level relationships of Apiales (Apiaceae and Araliaceae) based on phylogenetic analysis of *rbcl*

- sequences. *American Journal of Botany* 83(4): 499-515.
- Plunkett, G.M., D.E. Soltis and P.S. Soltis, 1997. Clarification of the relationship between Apiaceae and Araliaceae based on *matK* and *rbcL* sequence data. *American Journal of Botany* 84(4): 565-580.
- Rogers, S.O. and A.J. Bendich, 1987. Ribosomal DNA gene in plant: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Molecular Biology* 9: 509-520.
- Saitou, N. and M. Nei, 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetics trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Schaal, B.A. and G.H. Learn Jr., 1988. Ribosomal DNA variation within and among plant populations. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 1207-1216.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal, 1973. *Numerical Taxonomy : The Principles and Practice of Numerical Classification*. (Freeman, W. H., ed.). San Francisco.
- Thomas, A.W., R. Morgan, M. Sweeney, A. Rees and J. Alcolado, 1994. The detection of mitochondrial DNA mutations using single stranded conformation polymorphism (SSCP) analysis and heteroduplex analysis. *Human Genetics* 94: 621-623.
- Vidigal, T.H.D.A., L. Spatz, D.N. Nunes, A.J.G. Simpson, O.S. Carvalho and E.D. Neto, 1998. *Biomphalaria* spp: Identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer. *Experimental Parasitology* 89: 180-187.
- Wen, J. and E.A. Zimmer, 1996. Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (the ginseng genus, araliaceae): inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6: 167-177.
- White, M.B., M. Carvalho, D. Derse, S.J. O'Brien and M. Dean, 1992.

Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms.
Genomics 12: 301-306.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA gene for phylogenetics. *In PCR Protocols: A Guide to Methods and Application*. Innins, 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. *Nucleic Acid Research* 18: 6531-6535.

