

핵 리보솜 DNA ITS1 염기서열에 기초한 한국산 사철란속 식물의 계통유전학적 유연관계

김재환, 정용환, 한상현, 오문유

제주대학교 생물학과

Phylogenetic Relationships of Korean *Goodyera* Based on nrDNA ITS1 Sequences

Jae Hwan Kim, Yong Hwan Jung, Sang Hyun Han, and Moon You Oh
Department of Biology, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

ABSTRACT

Phylogenetic relationships of Korean *Goodyera* (*G. schlechtendaliana*, *G. macrantha*, *G. maximowicziana* and *G. velutina*) were analyzed by comparing the nucleotide sequences of the internal transcribed spacer 1 (ITS1) region of the nuclear ribosomal DNA (nrDNA). The ITS1 region of the nrDNA was amplified with the universal ITS primers (ITS1-F and ITS1-R) by polymerase chain reaction (PCR). The length of the nrDNA ITS1 regions identically represented 238 base pairs (bp) among selected taxa. The G+C contents of the nrDNA ITS1 region ranged from 45.3 (*G. maximowicziana* and *G. macrantha*) to 45.7% (*G. schlechtendaliana* and *G. velutina*). Comparing the nucleotide sequences among selected taxa, twenty one sites of point mutation (base substitution) were found. The pairwise distance between *G. macrantha* and *G. maximowicziana* was 0.0043 showing the lowest value among any other pairs. These results showed that ITS1 sequences analysis in Korean *Goodyera* is a useful tool for elucidating phylogenetic relationship.

Key words: *Goodyera*, ITS, PCR, phylogenetic, relationship, ribosomal

서 론

사철란속 (*Goodyera*) 식물은 난초과 (Orchidaceae)에 속하는 상록성 다년생 식물로서 전세계적으로 아프리카를 제외한 북반구의 온대 및 열대지역에서 약 40여 종이 분포한다고 보고되어 있다 (Satake *et al.*, 1982). 한국에서 보고된 사철란속 식물은 사철란 (*G. schlechtendaliana*), 붉은사철란 (*G. macrantha*), 섬사철란 (*G. maximowicziana*), 털사철란 (*G. velutina*), 애기사철란 (*G. repens*) 등 5종이 있으며, 주로 남부지방, 울릉도 및 제주도에 분포하고 있다 (Lee, 1989). 사철란속 식물들의 모든 종은 개체의 크기가 5~20 cm 정도로서, 종에 따라 1~3개 또는 최고 15개의 꽃이 피며 잎의 무늬가 독특하여 관상용으로서의 가치가 높다 (Lee, 1989).

사철란속에 대한 연구는 도감수준의 기재 내용으로 하는 형태학적 연구 (Kitagawa, 1939; Kitamura *et al.*, 1980; Makino, 1983)와 화분피의 형태 및 화분립 형성 과정에 대한 화학적 연구 (Konta and Tsuji, 1982), 그리고 대부분이 세포학적 연구에 치중되어 있다 (Vij and Gupta, 1975; Löve and Löve, 1981; Averyanov, 1984). 특히 세포학적 연구에서는 염색체의 수를 밝히고 핵형을 분석하였으며 이를 근거로 하여 종간 혹은 종내 집단간의 종분화 과정을 추정하였다 (Averyanov, 1984). 한편, 사철란속에 관한 국내연구는 형태적 및 생태적으로 다르나, 조직학적으로는 종간 차이를 규명할 수 없는 제주도 자생 사철란속 식물에 대하여 단백질 전기영동을 이용한 유전적 유연관계와 종간 차이를 규명한 바 있으며 (Oh *et al.*, 1989), Tae 등 (1999a)에 의해서 형태학적 형질, 세포학적 형질 및 유집분석을 바탕으로 속내 분류군을 정리하여 종간 계통 및 유연관계를 논의한 바 있다. 또한 최근 들어 random primer를 이용한 PCR-RAPDs를 사용하여 사철란속 내의 종들을 대상으로 한 연구

가 수행되었다 (Tae *et al.* 1999b).

생물다양성 협약이 발표된 이후로 모든 생물은 유전자원으로 인식되고 있으며, 이러한 경향은 식물의 경우도 마찬가지여서 천연집단의 유전변이 분석의 의미가 점차 증대되고 있는 실정이다. 이는 유전변이 분석자료를 바탕으로 차후의 유전자원 보전계획 수립이 가능하기 때문이다. 최근 분자생물학적 기법의 발달로 특정 DNA 부분을 빠른 시간 내에 증폭할 수 있는 중합연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR) 기술이 개발되어 종내 분류군 또는 종간 분류군 비교 및 계통유전학적 연구 등에 폭넓게 이용되고 있다 (Williams *et al.*, 1990). 특히 핵 리보솜 DNA 중 18S, 5.8S, 26S, ITS (internal transcribed spacer) 부위와 엽록체의 *rbcL*, *matK* 및 *psbA* 유전자들의 염기서열을 비교하여 피자식물 (angiosperms) 및 나자식물 (gymnosperms)의 종·속 단위의 분류군 비교에 자주 이용되고 있다 (Baldwin, 1992; Kim and Jansen, 1994; Baldwin *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 1998, 2000; Gernandt and Liston, 1999; Han *et al.*, 2000).

따라서 본 연구는 제주도에 자생하는 사철란속 식물 중 애기사철란을 제외한 4종에 대하여 유전자의 길이가 짧고, 증폭이 용이한 핵 리보솜 DNA의 ITS1 부위에 대한 염기서열을 분석함으로써 제주도 자생 사철란속 식물의 유전적 분석 및 계통유전학적 유연관계를 규명하고, 형태학적·세포학적 선행연구 결과들과 비교하고자 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 DNA 추출

본 연구에 사용한 사철란속 (*Goodyera*) 식물들은 한라산을 중심으로 남쪽의 수악교, 선돌 그리고 동쪽의 교래리 부근에서 채집하였으며, 채집된 재료를 증류수로 세척한 후 물기를 제거하고 즉시 total DNA를 분리하였다. DNA 추출은

protein precipitation technique (Dellaporta *et al.*, 1983)을 변형하여 실행하였다. 채집된 사철란속 식물 각각 1 g에 액체질소를 가하여 마쇄한 후, 10 ml의 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 넣고 60°C에서 20 분 동안 반응시킨 후, 5 M potassium acetate (pH 6.5) 4 ml를 첨가하여 얼음에서 10분 동안 침전시켰다. 원심분리 후 상징액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 2시간 동안 보관한 후 DNA를 침전시킨 후 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA) 1 ml을 첨가하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 RNase A, proteinase K (Sigma, USA)를 사용하여 정제하였으며, 1% agarose (Sigma, USA) gel 상에서 전기영동하여 확인하였다.

유전자 증폭

ITS1 부위의 증폭에 사용된 primer는 White 등 (1990)에 의해 고안된 ITS 1-F (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')와 ITS 1-R (5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3') primer를 사용하였으며(Fig. 1), template DNA 10 ng과 primer 0.5 μ M, dNTP 200 μ M, MgCl₂ 2.5 mM, 10 \times reaction buffer 5 μ l, Taq polymerase (Promega, USA) 2 unit에 멸균된 3차 증류수를 첨가하여 총 반응액을 25 μ l가 되게 하였다. PCR 반응은 GeneAmp PCR System 9600 Thermal Cycler (Perkin-Elmer, Foster city, USA)를 사용하였으며, 반응조건은 94°C에서 2분간 pre-denaturation 시킨 후 94°C, 55°C, 72°C에서 각각 45초를 1 cycle로 하여 30회 반복하였다. 그 후 72°C에서 10분간 가닥신장 (extension)시켰다. PCR 산물은 1% agarose gel 상에서 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr)로 염색한 후 UV transilluminator에서 확인하였다.

유전자 클로닝

PCR로 증폭한 ITS1 부위는 AdvanTage™ PCR Cloning Kit (Clontech Laboratories, USA)를 사용하여 클로닝하였다. 먼저 준비된 insert DNA 1.2 μ l (50 ng), vector 0.8 μ l (25 ng/ μ l), 10 \times ligation buffer 0.5 μ l, T4 DNA ligase 0.5 μ l (4.0 Weiss units)에 증류수를 첨가하여 최종 5 μ l가 되게 한 후 14°C에서 overnight 시켰다. 형질전환은 Top 10F' competent cell 25 μ l에 ligation된 DNA 2 μ l를 혼합하여 얼음에서 30 분 동안 보관한 후 42°C에서 30초 동안 열충격을 주어 수행하였다. 그 다음 얼음에서 약 2분 정도 보관 후 SOC medium (2% bacto-trypton, 0.5% bacto-yeast extract, 0.05% NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 20 mM glucose) 200 μ l를 넣고 37°C에서 1시간 배양하였다. Ampicillin이 미리 처리된 LB-plate에 X-Gal 20 μ l (50 mg/ml), IPTG 20 μ l (0.2 M)를 처리하고 형질전환된 세포 80 μ l를 도말하여 16시간 배양 후에 white colony를 선별하였다. 이를 ampicillin이 들어있는 LB-broth (50 μ g/ml) 배지에서 8시간 동안 배양한 후 Minipreps DNA Purification System (Promega, USA)을 사용하여 plasmid DNA를 분리하였다.

염기서열 분석

사철란속 식물의 ITS1 부위의 염기서열 분석은 Cy5™ AutoCycle™ Sequencing Kit (Pharmacia Biotech, USA)를 사용하여 manual (Protocols for Cy5™ AutoCycle™ Sequencing Kit; Pharmacia Biotech, USA)에 의해 수행하였다. Cy5가 표지된 vector inner primer인 M13-40 forward primer와 M13-20 reverse primer (Pharmacia Biotech, USA)를 사용하여 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 40초를 1회로 하여 25회 실시한 다음 가닥신장 (extension)을 위하여 72°C에서 10분간 유지시

켰으며, 4°C에서 stop solution을 첨가하였다. 전기영동은 7 M urea, 6% acrylamide gel 상에서 수행하였으며, ALFexpress DNA sequencer (Pharmacia Biotech, USA)를 사용하여 1500V에서 700분간 실시하였다.

계통유전학적 분석

Sequencing에서 얻어진 ITS1 염기서열들은 CLUSTAL W program을 사용하여 염기정렬을 수행하였다. 염기변이율 산출은 PHYLIP (Felsenstein, 1993: ver. 3.5)의 DNADIST program에서 transition : transversion을 2 : 1로 가정하여 two-parameter method (Kimura, 1980)로 염기변이율 (nucleotide divergence)을 계산하였고, 그 결과를 기초로 NEIGHBOR program (Saitou and Nei, 1987)을 이용하여

복)은 parsimony analysis에서 나온 결과를 모두 채택하여 consensus tree를 작성하였다.

결과 및 고찰

제주도에 자생하는 사철란속 (*Goodyera*) 식물 4종간의 계통유전학적 유연관계를 분석하기 위하여 핵 리보솜 DNA ITS1 부위의 염기서열을 비교·분석하였다. ITS 1-F와 ITS 1-R primer를 사용하여 증폭한 결과 320 bp 정도에서 band가 형성되었으며 (Fig. 1B), 이를 바탕으로 분석된 염기서열은 기존에 보고된 난과 (Orchidaceae)식물의 ITS1 영역의 서열과 비교하여 결정하였다 (Whitten *et al.*, 2000). 사철란속 식물들 간의 염기서열 분석 결과 모든

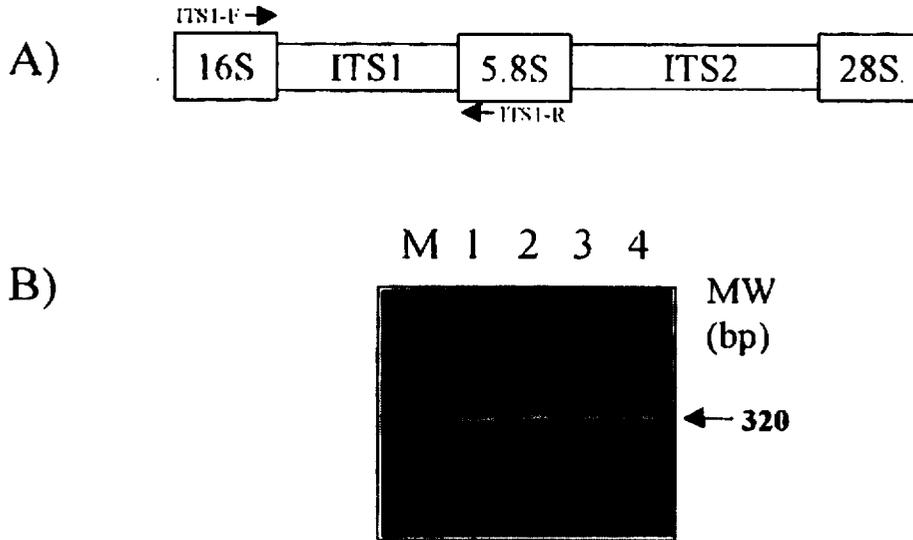


Figure 1.

- A) Schematic organization of the nuclear ribosomal DNA ITS regions. Arrows denote orientation and approximate position of primer sites.
- B) Agarose gel electrophoresis band patterns of ITS1 region amplified by PCR. M is DNA size marker, GeneRuler™ DNA Ladder Mix. Lane 1 to 4 are *G. macrantha*, *G. maximowicziana*, *G. velutina*, and *G. schlechtendaliana*.

분지도를 작성하였다. 또한 계통수의 branch에 대한 신뢰도를 얻기 위한 bootstrap (1000회 반

개체에서 238 bp로 동일한 크기를 나타내었으며, <G+C> 함량은 붉은사철란과 섬사철란이

45.3%. 털사철란과 사철란이 45.7%로 거의 유사함을 보였는데 (Table 1), 이러한 결과들은 기존에 보고된 난과식물의 <G+C> 함량들과 거의 유사한 양상을 보이고 있다.

Table 1

Comparison of ITS1 regions among <i>Goodyera</i> spp				
	Species ^a			
	MAC	MAX	VEL	SCH
Length (bp)	238	238	238	238
G+C (%)	45.3	45.3	45.7	45.7

^aMAC, *G. macrantha*; MAX, *G. maximowicziana*;
VEL, *G. velutina*; SCH, *G. schlechtendalliana*

또한 사철란속 4종의 염기서열을 비교한 결과 21개의 염기에서 염기치환이 나타나 전체적으로 8.8% (21/238)의 염기치환율을 나타내었으며, 염기의 삽입 (addition)이나 결실 (deletion)은 나타나지 않았다 (Fig. 2).

며, 사철란과 털사철란 사이에서 8.15%로 가장 높은 염기변이율을 나타내었다 (Table 2).

Table 2

Sequence divergences of ITS1 region among *Goodyera* spp
The abbreviations are given in Table 1

	SCH	MAC	MAX	VEL
SCH	-	0.0668	0.0716	0.0815
MAC		-	0.0043	0.0530
MAX			-	0.0533
VEL				-

산출된 염기변이율을 근거로 PHYLIP의 NEIGHBOR program을 이용하여 작성한 UPGMA tree는 붉은사철란과 섬사철란이 가장 가깝게 나타났으며, 털사철란, 사철란 순으로 멀게 나타났다 (Fig. 3). 또한 분지도 각각의 branch에 대한 신뢰도를 얻기 위하여 parsimony 분석에 의한 bootstrap (1000회) 결과 작성한 consensus tree 상에서는 bootstrap value가 모두 100%의 값을 나타내면서 결과의 신뢰도를

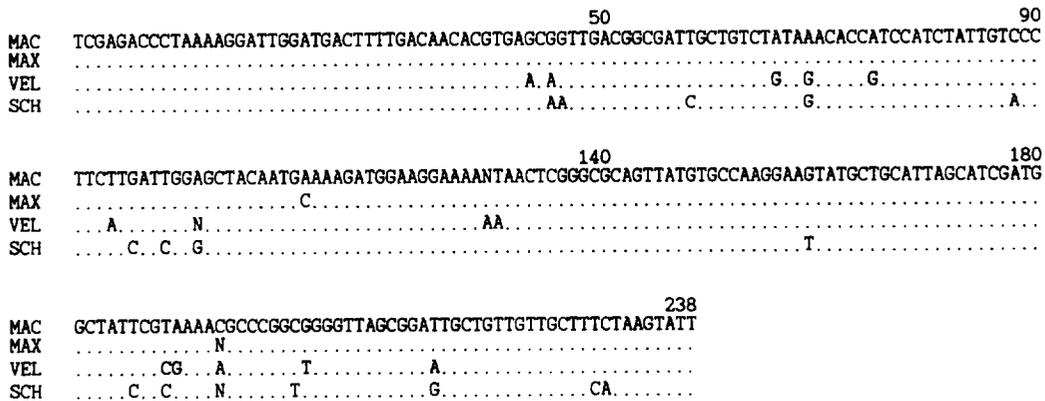


Figure 2. Sequence alignments of ITS1 complete sequences of nuclear ribosomal DNA among *Goodyera* spp. Nucleotide sequences were displayed from 5' to 3'. Dots indicate that the base is identical to that of MAC. The abbreviations are given in Table 1.

실험에서 관찰한 ITS1 부위 전체 238 bp의 염기변이율을 분석한 결과 붉은사철란과 섬사철란이 0.43%로 가장 낮은 염기변이율을 나타냈

으며, UPGMA tree에서의 유연관계 분석 결과와 동일하게 나타나고 있다 (Fig. 3). Oh 등 (1989)은 애기사철란을 제외한 사철란속

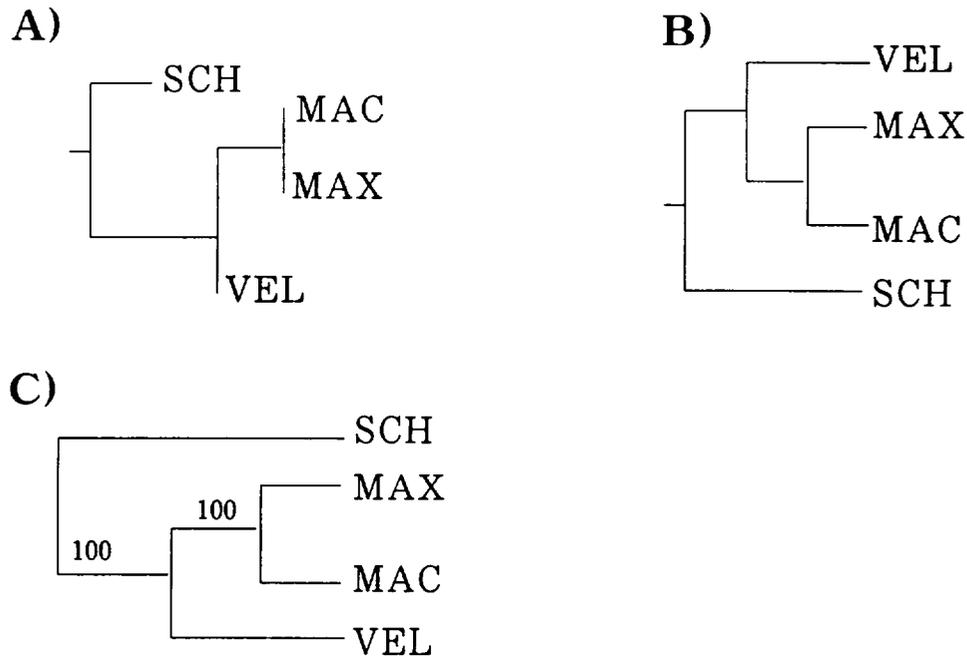


Figure 3. Phylogenetic trees based on entire ITS1 nucleotide sequence data from genus *Goodyera*. (A) UPGMA tree based on nucleotide divergency from the Kimura two-parameter method. (B) Parsimonious trees gained after bootstrapping. (C) Majority-rule and strict consensus tree. Numbers above the lines denote the percentage of bootstrap value. The abbreviations are given in Table 1.

4종을 대상으로 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis)와 2-DGE (two-dimensional gel electrophoresis)에 의한 단백질 전기영동상에서 나타나는 banding patterns의 차이를 분석한 결과 섬사철란과 사철란이 유전적 거리지수 0.5773을 나타내면서 가장 가까운 유연관계를 나타낸다고 보고하였다. 한편, Tae 등 (1999b)에 의해 수행된 사철란속 식물들의 유집분석 및 PCR-RAPDs를 이용한 연구에서는 공통적으로 사철란이 타종에 비해서 유전적 거리가 가장 멀게 나타나고, 붉은사철란, 털사철란 그리고 섬사철란 3종이 가깝지만 털사철란과 섬사철란이 조금 더 가깝다고 보고한 바 있다. 그러나, 본 실험의 결과는 단백질 분석을 통한 Oh 등 (1989)의 결과보다는 PCR-RAPDs 분석을 통한 Tae 등 (1999b)의

연구결과와 유사하게 나타났다. 또한, 사철란이 타종에 비해서 상대적으로 가장 먼 거리지수를 나타낸다는 것은 Tae 등 (1999b)의 연구결과와 동일하지만, 섬사철란이 털사철란보다 붉은사철란과 더 가까운 유전적 거리지수를 나타낸다는 사실은 선행 연구결과와는 다른 양상을 보이고 있다. 그러나, Tae 등 (1999b)은 RAPD 분석 결과로 작성한 Neighbor-joining법에 의한 분지도에서 섬사철란을 붉은사철란과 유연관계가 가장 가까운 종이라고 나타내면서도 섬사철란을 털사철란과 가장 유사한 종이라고 표현하고 있다. 개체의 표현 형질은 개체가 물려받은 유전적인 요소들만이 개입하는 것은 아니다 (Park *et al.*, 1996). 선천적으로 물려받은 유전자의 발현이 개체가 처한 환경의 영향을 받음으로써 같은 종이라고 할지라도 형질발현의 정도에 따라 형태상

다양한 변이가 있을 수 있다. 유전자가 개체발생의 초기 단계에서의 개체의 형태를 결정한다고 하면, 개체가 처한 생육환경은 그 개체의 획득형질을 결정하는 요소들이라고 할 수 있다 (Yadav *et al.*, 1997). 결과적으로, 핵 리보솜 DNA ITS1 염기서열을 이용한 본 연구는 선행결과와 전체적으로 유사하게 나타났지만, 털사철란, 섬사철란 그리고 붉은사철란의 계통은 상이하게 나타났다. 이들의 명확한 계통을 분석하기 위해서는 광범위한 지역에 분포하는 사철란속 식물들의 재료채집과 어느 한 분야에서만이 아니라 형태학적, 세포학적 및 유전적인 분야에서 포괄적인 분석이 필요할 것으로 보이며, 사철란속 식물 중 본 연구에서 제외된 애기사철란 (*G.repens*)을 포함시킴으로써 한국산 사철란속 식물들에 대한 유전적 분화 및 유연관계에 대한 명확한 결론을 내릴 수 있을 것으로 사료된다.

인 용 문 헌

- Averyanov, L.V., 1984. Chromosome numbers of some species of Orchidaceae family from the north-western part of U.S.S.R. *Bot. Zurn.* 64: 863-877.
- Baldwin, B.G., 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. *Mol. Phylogene. Evol.* 1: 3-16.
- 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 of angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82: 247-277.
- Dellaporta, S.L., J. Woodland, and J.B. Hicks, 1983. A plant DNA miniprep: preparation II. *Plant Mol. Rep.* 1:v19-21.
- Felsenstein, J., 1993. PHYLIP (*Phylogeny Inference Package*), version 3.5. Computer program distributed by the author, University of Washington, Seattle.
- Gernandt, D.S. and A. Liston, 1999. Internal transcribed spacer region evolution in *Larix* and *Pseudotsuga* (Pinaceae). *Amer. J. Bot.* 86: 711-723.
- Han, S.H., Y.H. Jung, M.H. Ko, Y.S. Oh, S.C. Koh, M.H. Kim, and M.Y. Oh, 2000. Phylogenetic relationship between *Dendropanax morbifera* Leveille and *D. trifidus* Makino (Araliaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequences. *Korean J. Genetics* 22: 257-264.
- Jung, Y.H., M.H. Ko, Y.S. Oh, S.H. Han, M.H. Kim, S.C. Koh, and M.Y. Oh, 1998. Genetic relationship of *Prunus yedoensis*, native and cultivar, based on internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA. *Korean J. Genetics* 20: 109-116.
- Jung, Y.H., S.H. Han, Y.S. Oh, M.H. Ko, S.C. Koh, M.H. Kim, and M.Y. Oh, 2000. Genetic variation and phylogenetic analysis of genus *Abies* distributed in Korea based on RAPD and nuclear rDNA ITS2 sequences. *Korean J. Genetics* 22: 341-354.
- Kim, K.J. and R.K. Jansen, 1994. Comparisons of phylogenetic hypotheses among different data sets in dwarf dandelions (*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 substitutions through comparable studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Kitagawa, M., 1939. Lineamenta Florae Manshuricae. *Inst. Sci. Res. Manchoukuo, Taiwan.* 2: 485.
- Kitamura, S., G. Murata, and T. Koyama, 1980. Colored Illustrations of Herbaceous plants of Japan (Monocotyledoneae). Hoikusa Pub. Co., Ltd., Tokyo.
- Konta, F. and M. Tsuji, 1982. The types of pollen tetrads and their formations observed in some species in the orchidaceae in Japan. *Acta Phytotax. Geobot.* 33: 206-217.
- Lee, C.B., 1989. Illustrated Flora of Korea. Hyang Moon Sa. Seoul. pp.243-244.
- Löve, A. and D. Löve, 1981. In chromosome number reports LXX III. *Taxon* 30: 845-851.
- Makino, T., 1983. Makino's New Illustrated Flora of Japan. Kokuryukan Co., Ltd. Tokyo. pp. 892-894.
- Oh, M.Y., S.H. Song, and S.J. Kim, 1989. Genetic relationships among 4 species of *Goodyera* in Cheju Island by the electrophoresis patterns of proteins. *Cheju App. Rad. Res. Inst. Ann. Report* 4: 61-72.
- Park, Y.E., K.S. Kim, S.R. Cheong, Y.S. Yoo, Y.N. Song, and H.T. Lim, 1996. Identification and genetic relationship of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars and breeding lines via protein, isozyme, and RAPD analysis. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 37: 386-391.
- Saitou, N. and M. Nei, 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetics trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Satake, Y., J. Ohwi, S. Kitamura, S. Watari and T. Tominari, 1982. Wild flowers of Japan. Monoco. [1]. Heibonsha, Tokyo. pp. 211-213.
- Tae, K.H. and S.C. Ko, 1999a. Interspecific relationship of the genus *Goodyera* in Korea using cluster analysis. *Korean J. Plant Tax.* 29: 63-73.
- Tae, K.H., D.S. In, H.Y. Bae, and S.C. Ko, 1999b. Relationship of Korean *Goodyera* (Orchidaceae) using amplified polymorphic DNAs analysis. *Korean J. Plant Tax.* 29: 169-181.
- Tae, K.H., E.H. Lee, and S.C. Ko, 1997. A systematic study of the genus *Goodyera* in Korea by morphological and cytological characters. *Korean J. Plant Tax.* 27: 89-116.
- Vij, S.P. and G.C. Gupta, 1975. Cytological investigations into W. Himalayan orchidaceae I. Chromosome numbers and karyotypes of taxa from Kashmir. *Cytologia* 40: 613-621.
- White, T.J., T. Bruns, 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*. M. Innis, S. Gelfand, J. Sninsky and T. White, eds., Academic Press, San Diego, CA, pp. 315-322.
- Whitten, M., N.H. Williams, and M.W. Chase, 2000. Subtribal and generic relationships of Maxillarieae (Orchidaceae) with emphasis on Stanhopeinae: Combined molecular evidence. *Amer. J. Bot.* 87: 1842-1856.

Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafaski, and S.V. Tingey, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.

Yadav, R.R., A. Bhattacharyya, and W.K. Park. 1997. Climate and growth relationship in blue pine (*Pinus wallichiana*) from the Western Himalaya, India. *Korean J. Ecol.* 20: 95-102.