

RAPD 분석에 의한 한라산 자생 벚나무속 식물 및 재배 왕벚나무의 계통유전학적 유연관계

정용환 · 고미희 · 오유성 · 김기욱 · 정영철 · 김문홍 · 오문유*

(제주대학교 자연과학대학 생물학과, 1순천대학교 자연과학대학 생물학과)

Random amplified polymorphic DNA(RAPD) 분석에 의한 유사거리지수를 바탕으로 한라산 자생 왕벚나무를 포함한 벚나무속(*Prunus* L.) 9분류군의 계통유전학적 유연관계를 추정하였다. (G+C) 비율이 50% 이상인 8개의 10 bp primer에서 전체 76개의 polymorphic band들이 관찰되었다. RAPD fragment pattern에 근거한 neighbor-joining tree에서 산벚나무(*Prunus sargentii* Rehder)와 사옥(*P. serrulata* var. *quelpaertensis* Uyeki)이 거리지수 0.3036으로 가장 유사함을 보였고, 한라산 자생 왕벚나무(*P. yedoensis* Matsumura)는 지금까지 동일 종으로 혼용하여왔던 재배 왕벚나무(*P. yedoensis* Matsumura-Cultivar)와 거리지수 0.4297로 나타났다. RAPD에 기초한 계통수는 형태적, 화학적 및 동위효소 분석에 근거하여 추정되어 오던 기존의 계통 유연관계와는 부분적으로 다른 양상을 보이고 있으나, 재현성 등에 매우 안정이 되어 있어 RAPD 분석방법은 풍부한 분자생물학적 식별 형질을 제공함으로써 한라산 벚나무속의 계통유전학적 유연관계를 연구하는데 유용한 접근 방법인 것으로 사료된다.

주요어 : RAPD, 벚나무속, 계통수, 유연관계

벚나무속(*Prunus* L.)은 장미과(Rosaceae) 앵도나무아과(Prunoideae)에 속하는 식물로 북반구 온대지역에서 자라며, 관목이나 교목으로서 산지 조림수, 조경수 및 과수 등 그 경제적 가치로 인해 전 세계에 걸쳐 약 400여 종 이상이 식재·분포하고 있다(Roland and Wain, 1984). 우리나라에도 전국 산지에 20여 종이 있으며(이, 1980), 제주도 한라산에는 울벚나무(*P. pendula* for. *asendens* Ohwi), 왕벚나무(*P. yedoensis* Matsumura), 산벚나무(*P. sargentii* Rehder), 사옥(*P. serrulata* var. *quelpaertensis* Uyeki), 산개벚나무(*P. maximowiczii* Rupr.), 섬개벚나무(*P. buergeriana* Miquel), 잔털벚나무(*P. serrulata* var.

*교신저자 : 064) 54-3521 전송 064) 56-3541

pubescens Nakai), 개벗나무(*P. leveilleana* Koehne), 벗나무(*P. serrulata* var. *spontanea* Wilson.), 털벗나무(*P. serrulata* var. *tomentella* Nakai), 제주벗나무(*P. yedoensis* for. *nudiflora* Rehder) 등 10여 분류군의 벗나무속 식물이 자생·분포하는 것으로 보고되어 있으나(김, 1992), 학자에 따라 약간의 차이를 보이고 있어(Nakai, 1914; Kitamura and Murata, 1979) 종분류에 문제점이 있다.

이들 한라산 자생 벗나무류에 대한 연구는 몇 종의 벗나무속에 관한 isozyme 분석(Harn *et al.*, 1977), 영양아를 이용한 한라산 자생 왕벗나무의 대량 증식에 관한 연구(Kim *et al.*, 1993)와 식물상 조사나 도감적 기재(정 1958; 이 1980)를 제외하면 국내 및 일본 등지에 관상용으로 널리 재배되는 왕벗나무의 기원에 관한 연구들이 대부분이다(Takenaka, 1963; Kaneko *et al.*, 1986; Kaneko, 1992; Innan *et al.*, 1995).

Harn *et al.*(1977)은 한라산에 자생하는 울벗나무, 산벗나무, 그리고 재배왕벗나무에서 몇 가지 isozyme 분석을 통하여 울벗나무 및 산벗나무, 재배품종인 왕벗나무의 전기영동형을 비교 분석한 결과 재배 왕벗나무가 울벗나무와 산벗나무 사이에서 만들어진 종간잡종임을 강하게 암시하고 있다. 그러나 한라산에는 3종의 벗나무 외에도 비록 그 개체수는 적으나 앞에서 언급한 수종의 벗나무들이 자생하고 있지만, 이들 종간의 계통유전학적 연구는 아직 행해진 바가 없다.

분자생물학적 연구기법의 발전과 더불어 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP, Loftus *et al.*, 1988; Furnier *et al.*, 1990), DNA fingerprint(Jeffrey *et al.*, 1985) 등을 이용한 종간 및 종내 개체간의 유전변이를 확인하는 새로운 방법이 도입되었다. 최근, 특정 DNA 부분을 빠른 시간내에 증폭할 수 있는 PCR 기술과 random primer를 이용하는 RAPD 기술이 개발되어(Hadrys *et al.*, 1992; Tingey *et al.*, 1992; Weeden *et al.*, 1992) 종의 분류와 유전자지도 작성에 많이 이용되고 있다(Williams *et al.*, 1990; Nelson *et al.*, 1994). RAPD의 marker로 알려진 증폭된 DNA fragment는 유전자지도를 작성할 때 매우 유용할 뿐 만 아니라, 길이에 따라 다양한 band가 나타나므로, 주로 종내 분류군 또는 종간의 분류군 비교에 효과적으로 이용되어(Klein-Lankhorst *et al.*, 1991; Shimada *et al.*, 1994; Brickner *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1996), 최근에는 분류학적 및 계통발생학적 연구에 폭넓게 이용되고 있다(Fukuoka *et al.*, 1992; Vierling and Nguyen, 1992; Mori *et al.*, 1993).

따라서 본 연구는 한라산에 자생하는 벗나무속 8분류군과 재배 왕벗나무에 대하여 유연관계를 밝히기 위해 RAPD 분석법으로 DNA polymorphism을 조사하고, 종들간의 유전적 거리를 산출하여, 이를 토대로 한라산 벗나무속의 계통유전학적 유연관계를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료: 본 실험에 사용한 재료는 1996년 3월부터 1997년 4월까지 각 분류군 당 10개 체에서 잎이 달린 가지를 채집하고 잎을 따서 증류수로 세척한 후 물기를 제거한 즉시 total genomic DNA를 분리하거나, 저온 냉동기(-72℃)에 보관한 것을 사용하였으며, 실험에 사용된 재료의 증거 표본은 제주대학교 생물학과 표본실에 보관하였다(Table 1).

Table 1. List of *Prunus* species used for DNA analysis. Vouchers are at CNU

Scientific name	Korean name	Voucher ^a	Locality ^b
<i>P. pendula</i> for. <i>asendens</i> Ohwi	올벚나무	YHJ 9602	CJ: Kwanumsa
<i>P. yedoensis</i> Matsumura	왕벚나무	YHJ 9641	CJ: Bonggae-Dong
<i>P. sargentii</i> Rehder	산벚나무	YHJ 9701	CJ: Kwanumsa
<i>P. serrulata</i> var. <i>quelpaertensis</i> Uyeki	사옥	MHK 9611	CJ: Tamrakyo
<i>P. maximowiczii</i> Rupr.	산개벚지나무	MHK 9621	CJ: Erimok
<i>P. yedoensis</i> Matsumura-Cultivar	재배 왕벚나무	YHJ 9716	CJ: Bonggae-Dong
<i>P. serrulata</i> var. <i>pubescens</i> Nakai	잔털벚나무	MHK 9631	CJ: Kwanumsa
<i>P. buergeriana</i> Miquel	섬개벚나무	MHK 9732	CJ: Chonwangsa valley
<i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i> Wils.	벚나무	MHK 9672	CJ: Kwanumsa

^aYHJ, Y. H. Jung; MHK, M. H. Kim

^bCJ, Cheju-do

DNA 추출: Total genomic DNA는 Murray and Thompson(1980)의 방법을 변형하여 cellular proteins 및 polysaccharides 제거에 알맞은 protein precipitation technique (Dellaporta *et al.*, 1983)으로 추출했다. 즉 한라산 벚나무속 식물의 신선한 잎 1g에 액체질소를 가하여 분말로 만든 후, 15ml의 extraction buffer(100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 500 mM NaCl; 2% SDS; 1% 2-mercaptoethanol)을 넣고 60℃에서 1시간 동안 incubation을 실시한 후 5 M potassium acetate (pH 6.5) 4ml를 첨가하여 얼음에서 10분간 incubation 하였다. 20,000×g에서 20분간 원심분리시킨 다음 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA) 1 ml를 첨가하여 DNA pellet을 용해한 후에 한번 더 원심분리하여 상침액에 3 M sodium acetate (pH 7.6) 100 μl와 ice cold isopropanol 1 ml를 첨가한 후 -20℃에서 보관하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 다시 TE buffer 1ml를 첨가하여 용해 시킨 후 RNase A(10 mg/ml) 2 μl, Proteinase K(10mg/ml; Sigma, USA) 5 μl를 첨가하여 PCR를 수행할 수 있도록 DNA를 정제시킨 후에 1.0% agarose gel 상에서 전기영동하여 single band로 나타나는 것을 확인한 후 확인된 DNA는

UV/VIS spectrophotometer로 측정하여 순도가 1.8 정도인 것만 사용하였다.

DNA 증폭: PCR은 Williams *et al.*(1990)의 방법을 변형하여 실시하였다. PCR 반응 혼합액은 최종농도가 template DNA 20 ng, 각각의 primer(Univ. of British Columbia) 400 nM, dNTP(Promega, USA) 200 μ M, MgCl₂ 1.8 mM, 10 × reaction buffer(10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl and 0.1% Triton X-100) 2.5 μ l, Taq DNA polymerase(Promega, USA) 2 units에 멸균된 3차 증류수를 첨가하여 총 반응 용액량을 25 μ l로 하였다. PCR 반응은 GeneAmp PCR system 9600 thermal cycler(Perkin-Elmer Cetus, USA)에서 94°C 2분간 예열한 후 94°C에서 45초, 36°C 1분, 72°C 2분으로 이루어지는 cycle을 45회 반복한 다음 72°C에서 5분을 더 유지시켰으며 모든 반응은 2회 이상 반복하여 수행하였다.

전기영동: PCR 수행 후 PCR-product들은 1×TBE buffer를 사용하여 1.5% agarose gel 상에서 100V로 100분간 전기영동하여 ethidium bromide(EtBr)로 염색 후 UV transilluminator에서 결과를 확인하여 Polaroid Camera로 사진촬영 하였다.

유연관계 분석: 9종 뱃나무의 유연관계 분석을 위하여 얻어진 PCR-product를 크기에 따라 일련번호를 매겼다. 각 종에 대하여 밴드의 존재유무에 따라 각각 '1'과 '0'으로 표시하는 two-digital numbering system을 이용하여 binomial matrix code를 작성하였다. 얻어진밴드의 유무를 확인하고 기초자료행렬을 작성한 다음 이를 근거로 RAPDistance Ver. 1.04(Saito and Nei, 1987)의 NJTREE program을 이용하여 Phi coefficient에 기초한 거리지수를 산출하고(Sokal and Sneath, 1973), NJ(Neighbor-Joining) 방법에 의거한 dendrogram(Nei and Li, 1979; Nei and Gojobori, 1986; Saitou and Nei, 1987; Nei, 1991; Nei and Hughes, 1992)을 작성하였다.

결 과

PCR반응은 GeneAmp PCR system 9600 thermal cycler(Perkin-Elmer Cetus, USA)에서 DNA를 50% 이상의 <G+C> 함량을 가지는 100개의 10-mer random primer(UBC 401 ~UBC 500, Univ. of British Columbia)를 이용하여 PCR를 수행한 결과 반응이 일어난 primer는 UBC 405, UBC 406, UBC 419, UBC 435, UBC 446, UBC 452, UBC 455, UBC 456, UBC 460, UBC 468, UBC 482, UBC 485, UBC 498, UBC 500으로 14개였다. 그 중에서 9종 각각의 10개체에서 종내 개체군에는 동일하나 종간에 polymorphic band 빈도수가 많은 8개의 primer를 사용하여 76개의 서로 다른 band를 얻어냈다(Fig. 1). 일반적으로 primer의 염기구성은 DNA 증폭 길이에 많은 영향을 미치며(Williams *et al.*, 1990) 특히 primer에 <G+C>의 수가 많을수록 DNA 증폭이 매우 유리하게 일어난다고 알려져 있다(Fritsch *et al.*, 1993). 본 연구에서도 뱃나무속 9분류군 전체에서 종간 특이한 반응이 일어난 8개의 random primer에는 대부분 <G+C>의 수가 전체 염기의 60% 이상이며 염기

Table 2. List of arbitrary 10-mer primers used for the RAPD analysis by PCR

Primer ^a	Sequence (5' → 3')
UBC 446	GCC AGC GTT C
UBC 455	AGC AAG CCG G
UBC 456	GCG GAG GTC C
UBC 460	ACT GAC CGG C
UBC 482	CTA TAG GCC G
UBC 485	AGA ATA GGG C
UBC 498	GAC AGT CCT G
UBC 500	TTG CGT CAT G

^aAll primers were purchased from the University of British Columbia, Canada

서열은 Table 2와 같다.

각각의 primer에서 나타난 *polymorphic band* 수는 UBC 446 primer에서 15개, UBC 455 primer에서 13개, UBC 456 primer에서 5개, UBC 460 primer에서 7개, UBC 482 primer에서 8개, UBC 485 primer에서 15개, UBC 498 primer에서 4개 그리고 UBC 500 primer에서 9개 등 종간에 명확한 차이를 보이는 총 76개의 밴드를 선별하였다(Fig. 1). 특히 UBC 446 primer를 이용한 실험에서는 섬개뽕나무에서 다른 종과는 다른 특이한 5.0kb, 2.1kb, 1.9kb와 0.4kb의 band가 나타났으며 한라산 자생 왕뽕나무와 울뽕나무가 거의 동일한 경향을 보였다(Fig. 1 A). 그리고 UBC 455 primer를 이용한 실험에서는 섬개뽕나무에서 특이하게 1.3kb, 1.15kb와 0.8kb의 밴드가 나타났으며 한라산 자생 왕뽕나무에서 3.4kb의 band가 나타났다(Fig. 1 B). UBC 456 primer를 이용한 실험에서는 전 종에서 3.4kb와 0.8kb의 밴드가 나타났으며 잔털뽕나무에서는 2.0kb의 밴드가 나타났다(Fig. 1 C). UBC 460 primer를 이용한 실험에서는 전종에서 거의 유사한 형태를 보였으나 섬개뽕나무에서 1.7kb, 1.3kb, 0.65kb와 0.55kb band가 특이하게 나타났으며(Fig. 1 D), UBC 482 primer를 이용한 실험에서는 2.3kb와 0.7kb band가 뽕나무를 제외한 거의 모든 종에서 관찰되었으며(Fig. 1 E), UBC 485 primer를 이용한 실험에서는 *polymorphic band* 15개 중에서 다른 종에 비해 울뽕나무에서 특이하게 0.5kb와 0.3kb등 두 개의 band만이 관찰되었다(Fig. 1 F). UBC 498 primer를 이용한 실험에서는 산뽕나무와 산개뽕나무에서 0.8kb band가 나타난 것이 특징적이다(Fig. 1 G). UBC 500 primer를 이용한 실험에서는 0.7kb band 만이 monomorphic하고 그 중 특이한 점은 잔털뽕나무에서 *polymorphic band*가 전혀 없는 것이다(Fig. 1 H).

Figure 1. Polymorphic band patterns of DNA in *Prunus* species, using 8 primers. Lane 1 to 9 were *P. pendula* for. *ascendens*, *P. yedoensis*, *P. sargentii*, *P. serrulata* var. *quelpaetensis*, *P. maximowiczii*, *P. yedoensis*-Cultivar, *P. serrulata* var. *pubescens*, *P. buergeriana*, *P. serrulata* var. *spontanea*. M is molecular marker, Lambda DNA/*EcoR*I + *Hind*III digested. Used primers are A;UBC 446, B;UBC 455, C;UBC 456, D;UBC 460, E;UBC 482, F;UBC 485, G;UBC 498, and H;UBC 500.

Figure 1.

Table 3. Binomial matrix from RAPD analysis

	UBC 446 ^b	UBC 455	UBC 456	UBC 460
	5 2 2 2 1 1 1 1 1 ^c	3 1 1 1 1 1 1 1 1	5 2 1 1	1 1 1
Species	0 3 1 0 9 8 5 3 2 9 8 8 7 4 3	4 8 6 5 4 3 2 1 0 9 8 6 5	3 0 8 3 7 7 3 2 6 6 5 3	0 0 0 0 0 0 0 0 5 0 0 0 0
	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 5 0 0 0 0	0 0 0 5 0 0 0 5 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 5 0 5 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
<i>P. pendula</i> for. <i>asendens</i>	0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 0 0 1	0 0 1 0 0 0 1 0 1 0 1 0 1 1 1	1 0 1 1 0 0 0 0 0 1 0 1	0 0 0 0 1 0 1
<i>P. yedoensis</i>	0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 1 0 0 0 1	1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0	1 0 0 0 1 0 0 0 0 1 0 1	0 0 0 0 1 0 1
<i>P. sargentii</i>	0 0 0 1 0 1 0 1 0 0 1 0 1 0 1	0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0	1 0 0 0 1 0 0 0 0 1 0 1	0 0 0 0 1 0 1
<i>P. serrulata</i> var. <i>quelpaetensis</i>	0 0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 1 0 1	0 0 1 0 0 0 0 0 0 1 0 1 0	1 0 0 0 1 0 0 0 0 1 0 1	0 0 0 0 1 0 1
<i>P. maximowiczii</i>	0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0	0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 1 0	1 0 1 0 1 0 0 1 0 1 0 1	0 0 1 0 1 0 1
<i>P. yedoensis</i> -Cultivar	0 0 0 1 0 0 1 0 0 1 0 1 1 0 1	0 1 0 0 1 0 1 0 1 0 0 1 0	1 0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 1	0 0 1 0 1 0 1
<i>P. serrulata</i> var. <i>pubescens</i>	0 1 0 1 0 0 1 0 0 1 0 0 0 0 1	0 1 0 1 1 0 1 0 0 1 0 1 1	0 1 0 0 0 0 0 1 0 1 0 1	0 0 1 0 1 0 1
<i>P. buergeriana</i>	1 0 1 0 1 1 0 0 1 1 1 0 0 1 0	0 0 1 0 0 1 0 1 0 0 1 0 0	1 0 1 1 0 1 1 0 1 0 1 0	1 1 0 1 0 1 0
<i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i>	0 1 0 1 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 1	0 0 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1	1 0 0 1 0 0 0 1 0 1 0 1	0 0 1 0 1 0 1

Table 3. (Continued)

	UBC 482 ^b	UBC 485	UBC 498	UBC 500
	3 2 1 1 1 1	3 3 1 1 1 1 1 1 ^c	2 1 1	3 1 1 1 1 1
Species	0 3 8 6 5 4 7 6	5 4 9 8 3 2 1 9 8 7 6 5 4 3 3	5 9 7 8	0 8 6 5 3 0 9 8 5
	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 5 5 0 0 0 0 5 0	0 0 0 0	0 5 0 0 0 0 0 0 5
	0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0
<i>P. pendula</i> for. <i>asendens</i>	0 1 1 0 0 1 1 1	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1	0 1 0 0	0 0 1 0 0 0 0 0 0
<i>P. yedoensis</i>	0 1 0 1 1 0 1 0	0 0 1 0 0 1 1 0 0 0 1 1 0 0 1	1 1 0 0	0 0 1 0 1 1 1 0 0
<i>P. sargentii</i>	0 1 0 0 0 0 1 1	0 0 1 1 0 1 1 1 0 0 1 0 0 0 0	1 1 1 1	1 1 0 0 1 0 0 0 1
<i>P. serrulata</i> var. <i>quelpaetensis</i>	0 1 0 0 1 0 1 1	0 0 1 0 0 1 1 0 1 0 1 0 1 0 0	1 1 0 0	0 1 0 0 0 0 0 0 1
<i>P. maximowiczii</i>	0 1 1 0 1 0 1 1	0 0 1 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0 0	0 0 0 1	0 1 1 1 0 0 0 0 1
<i>P. yedoensis</i> -Cultivar	0 1 1 1 0 0 1 1	0 0 1 0 1 1 1 0 0 0 0 1 0 0 0	0 1 0 0	0 1 1 0 1 0 0 0 1
<i>P. serrulata</i> var. <i>pubescens</i>	0 1 1 0 1 0 1 0	0 1 1 0 0 1 0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0
<i>P. buergeriana</i>	1 1 1 1 1 0 0 1	1 1 0 1 0 1 0 1 0 0 0 0 0 1 0	0 1 0 0	1 1 0 0 1 0 0 1 0
<i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i>	0 0 0 0 0 0 1 0	0 1 1 1 0 1 0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0

^bRandom primer series^cBand size (base pairs)

8개의 arbitrary primer를 사용하여 얻은 76개의 밴드 각각을 하나의 형질로 보아 기초 자료 행렬을 작성하고(Table 3), 이를 근거로 distance matrix를 작성하였으며(Table 4), 이

결과를 Neighbor-joining method(Nei and Li, 1979; Nei and Gojobori, 1986; Saitou and Nei, 1987; Nei, 1991; Nei and Hughes, 1992)로 dendrogram을 작성하였다(Fig. 2). 그 결과 산뱀나무와 사옥이 0.3036으로 가장 유사하게 나타났으며, 그 다음으로 잔털뱀나무와 뱀나무가 거리지수 0.3285를 보이면서 유사하게 나타났다. 지금까지 동일종으로 혼용하여 오던 한라산 자생 왕뱀나무와 재배 왕뱀나무의 거리지수는 0.4297로 나타났다. 섬개뱀나무가 가장 유사성이 낮았으며 그 다음으로 산개뱀지나무가 낮게 나타났다.

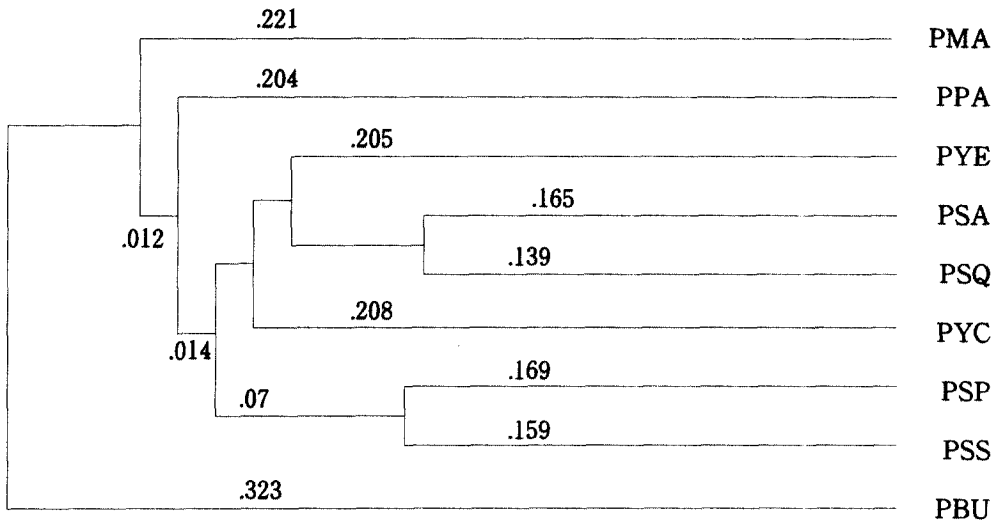


Figure 2. Neighbor-joining tree based on analysis of RAPD fragment.

PMA=*P. maximowiczii*, PPA=*P. pendula* for. *ascendens*, PYE=*P. yedoensis*, PSA=*P. sargentii*, PSQ=*P. serrulata* var. *quelpaetensis*, PYC=*P. yedoensis*-Cultivar, PSP=*P. serrulata* var. *pubescens*, PSS=*P. serrulata* var. *spontanea*, PBU=*P. buergeriana*.

고 찰

한라산 뱀나무속 9 분류군의 PCR-RAPD 방법을 이용한 계통유전학적 연구에서 전체 종에서 polymorphic band pattern을 보인 8개의 primer를 가지고 분석한 결과 산뱀나무와 사옥이 거리지수 0.3036으로 가장 유연관계가 높게 나타났으며, 그 다음으로 잔털뱀나무와 뱀나무가 거리지수 0.3286을 나타내었다(Table 4). 한라산 자생 왕뱀나무의 경우 사옥과 거리지수 0.3863으로 가장 높은 유연관계를 나타내었는데, 이는 화분학적연구에서 왕뱀나무의 화분크기나 표면무늬에 있어서 사옥과 가장 가깝다는 연구 보고(박, 1984)와 동일한 결과를 나타내고 있다. 한편, 한라산 자생 왕뱀나무는 올뱀나무·산뱀나무와 각각

Table 4. Distance matrix for 9 species Genus *Prunus*

	PPA	PYE	PSA	PSQ	PMA	PYC	PSP	PBU	PSS
PPA	—								
PYE	0.4190	—							
PSA	0.4919	0.4190	—						
PSQ	0.4611	0.3863	0.3036	—					
PMA	0.4507	0.4817	0.4507	0.4190	—				
PYC	0.4190	0.4297	0.4402	0.4082	0.4611	—			
PSP	0.4611	0.4714	0.5222	0.4297	0.4611	0.4082	—		
PBU	0.5823	0.6325	0.5823	0.6124	0.6024	0.6526	0.6729	—	
PSS	0.4507	0.4611	0.4507	0.4190	0.4919	0.4817	0.3285	0.6024	—

PPA=*P. pendula* for. *ascendens*, PYE=*P. yedoensis*, PSA=*P. sargentii*, PSQ=*P. serrulata* var. *quelpaetensis*, PMA=*P. maximowiczii*, PYC=*P. yedoensis*-Cultivar, PSP=*P. serrulata* var. *pubescens*, PBU=*P. buergeriana*, PSS=*P. serrulata* var. *spontanea*.

0.4190으로 동일한 거리지수를 나타내면서 사육과의 거리지수 0.3863보다 낮게 나타났다. 동일밴드 수에서도 한라산 자생 왕벚나무는 울벚나무와 13개, 산벚나무와는 16개로, 사육과의 동일밴드 16개 보다 적음을 알 수 있었다. 이는 한라산 자생 왕벚나무가 산벚나무와 울벚나무의 중간교잡종일 것이라는 선행 연구보고 (Kaneko, 1990)와 차이는 있지만, 본 연구 결과만으로 Kaneko(1990)의 보고를 전면 부정할 수는 없다. Innan *et al.*(1995)이 보고한 왕벚나무의 기원에 관한 연구결과에서 보면 일본 전 지역에 식재분포된 왕벚나무는 모두 같은 clone이라고 보고한 바 있으나, 본 연구 결과 제주도 한라산에 자생인 왕벚나무는 재배왕벚나무와는 다른 종임을 나타내고 있다. 따라서 지금까지 한라산 자생 왕벚나무와 재배왕벚나무가 같은 학명을 사용하면서 종분류에 문제점을 제시하고 있는데 본 연구 결과 한라산 자생 왕벚나무에서 관찰된 전체 밴드 수는 26개이며, 재배왕벚나무의 밴드 수는 30개이다. 그러나 그 중에서 동일 밴드 수는 16개 뿐으로 한라산 자생 왕벚나무의 경우 61.5% (16/26), 재배왕벚나무의 경우는 53.3% (16/30) 수준에서 동일성을 보이고 있을 뿐이다. 이는 지금까지 같은 종으로 혼용하여 왔던 한라산 자생 왕벚나무와 재배왕벚나무가 다른 분류군일 가능성을 시사하는 것으로 보여져 앞으로 DNA 수준의 연구와 더불어 제주도 자생 왕벚나무의 분리·교잡 실험등이 병행되어야 할 것으로 보인다. NJ 방법에 의한 수지도에서 크게 2개의 분류군으로 나누어졌는데 subgenus *Padus*와 subgenus *Pseupcerasus*로 나누어졌다. Subgenus *Padus*에는 섬개벚나무, subgenus *Pseupcerasus*에는 산개벚나무, 울벚나무, 왕벚나무, 산벚나무, 사육, 재배 왕벚나무, 잔털벚나무, 벚나무가 속한다(Fig. 2). Subgenus *Pseupcerasus* 내에서는 더 이상의 구분이 되지 않았으며 동일종

에 속하는 변종들 중 사육이 뱀나무, 잔털뱀나무와 다른 그룹에 위치한 것(Fig. 2)에 대하여 사육이 기존의 뱀나무 또는 잔털뱀나무와 기원이 다른것에 대한 분류학적인 재검토가 요구된다.

본 연구에서는 RAPD band pattern에 기초한 한라산 자생 뱀나무속 식물 8분류군과 재배왕뱀나무에 관한 계통유전학적 연구가 형태적 특징 및 화분학적 연구 등에 근거하여 추정하여 오던 종내의 계통유연분석과는 부분적으로 다른 양상을 나타내고 있어서 현 단계에서는 성급하게 어떤 결론을 내리기는 어렵다. 그러나 재현성 등에 매우 안정이 되어 있는 RAPD를 이용한 계통유전학적 연구가 한라산 뱀나무속 식물들에 대해 매우 유용한 접근 방법으로 사료된다.

사 사

본 연구는 1996년도 교육부 기초과학연구소 학술연구조성비 지원(BSRI-96-4446)에 의한 연구결과의 일부임.

인 용 문 헌

- Brickner, J. H., T. J. Lynck, D. Zeiling and E. Orias. 1996. Identification, mapping and linkage analysis of Randomly amplified DNA polymorphisms in *Tetrahymena thermophila*. *Genetics* 143:811-821.
- Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol. Rep.* 1:19-21.
- Fritsch, P., M. A. Hanson, C. D. Spore, P. E. Pack, and L. H. Reiseberg. 1993. Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plants. *Plant Mol. Biol.* 11:10-20.
- Fukuoka, S., H. Kazuyoshi., and K. Osamu. 1992. Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions. *Jpn. J. Genet.* 67:243-252.
- Furnier, G. R., M. P. Cummings and M. T. Clegg. 1990. Evolution of the avocados as revealed by DNA restriction fragment variation. *J. Hered.* 81:183-188.
- Hadrys, H., M. Balick, and B. Schierwater. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* 1:55-63.
- Harn, C. Y., Y. J. Kim, S. Y. Yang, H. J. Chung. 1977. Studies on the origin of *Prunus yedoensis* Matsumura. I. A comparative electrophoretic study on wild *P. subhirtella* in Mt. Halla, cultivated *P. yedoensis* and *P. domarium*. *Kor. J. Bot.* 20:1-5.
- Innan, H., T. Ryohei, T. M. Naohiko, and T. Koichiro. 1995. DNA fingerprinting study

- on the intraspecific variation and the origin of *Prunus yedoensis* (Someiyoshino). Jpn. J. Genet. 70:185–196.
- Jeffrey, S. A. J., V. Wilson, and S. L. Thein. 1985. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. Nature 314:67–73.
- Kaneko, T., Toru T. and Koichiro T. 1986. Studies on the origin of crop species by restriction endonuclease analysis of organellar DNA. II. Restriction analysis of ctDNA of 11 *Prunus* species. Jpn. J. Genet. 61:157–168.
- Kaneko, T. 1992. The origin of *Prunus yedoensis* (Someiyoshino). Planta 20:21–24.
- Kim, C. S., J. G. Koh, and R. M. Cho. 1993. Effects of media, growth regulators and dark treatment on *in vitro* propagation using vegetative buds of *Prunus yedoensis* Matsumura. Korean J. Plant Tissue Culture 20:213–219.
- Kitamura, S. and G. Murata. 1979. Coloured illustrations of wood plants of Japan vol. II. Hoikusha publishing Co. Ltd. pp. 2–17.
- Klein-Lankhorst, R. M., A. Vermunt, R. Weide, T. Liharska, P. Zabel. 1991. Isolation of molecular markers for tomato (*Lycopersicon esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). Theor. Appl. Genet. 83:108–114.
- Loftus, M. G., D. Moore and T. J. Elliott. 1988. DNA polymorphisms in commercial and wild strains of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. Theor. Appl. Genet. 76:712–718.
- Lu, Z. X., G. L. Reighard and W. V. Baird. 1996. Identification of peach rootstock cultivars by RAPD markers. HortScience 31:127–129.
- Mori, M., H. Kazuyoshi, U. Yoshiki and K. Chukichi. 1993. Rapid identification of Japanese potato cultivars by RAPDs. Jpn. J. Genet. 68:167–174.
- Murray, M. G. and Thompson W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8:4321–4325.
- Nakai T. 1914. Flora of Quelpart and Wangto island. Govern. Chosen. pp. 1–156.
- Nei, M., 1991. Relative efficiencies of different tree making method for molecular date. Phylogenetic Analysis of DNA sequences. Oxford Univ. NY. pp. 90–128.
- _____ and A. L. Hughes. 1992. Balanced polymorphism and evolution by the birth and death process in the MHC loci. Proceedings of the 11th Histocompatibility workshop and conference. 2:27–38.
- _____ and T. Gojobori. 1986. Simple method for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. Mol. Bio. Evol. 3:418–426.
- _____ and W. L. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:5269–5273.

- Nelson, C. D., T. L. Kubisiak, M. Stine, and W. L. Nance. 1994. A genetic linkage map of longleaf pine (*Pinus palustris* Mill.) based on random amplified polymorphic DNAs. *J. Hered.* 85:433–439.
- Roland, J. and H. K. Wain. 1984. The nomenclature of cultivated Japanese flowering cherris (*Prunus*). The Satozakura group.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetics trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406–425.
- Shimada, T., T. Haji, M. Yamaguchi and T. Takeda. 1994. Classification of Mume (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) by RAPD assay. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 63:543–551.
- Sokal, R. R. and P. H. A. Sneath. 1973. Principles of numerical taxonomy. Freeman. p. 134.
- Takenaka, Y., 1963. The origin of the Yoshino cherry tree. *J. Hered.* 54:207.
- Tingey, S. V., J. A. Rafalski, and J. G. K. Williams. 1992. Genetic analysis of RAPD markers, p.3–8. *In* Applications of RAPD technology to plant breeding. Joint Plant Breeding Sym. Ser., Minneapolis Crop Sci. Soc. Amer./Amer. Soc. Hort. Sci./Amer. Genetic Assn.
- Vierling, R. A., and H. T. Nguyen. 1992. Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid wheat genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 84:835–838.
- Weeden, N. F., G. M. Timmerman, M. Hemmat, B. E. Kneen, and M. A. Lodhi. 1992. Identification and reliability of RAPD markers. *In* Applications of RAPD technology to plant breeding. pp 12–17. Joint Plant Breeding Symposia Series. Minneapolis. Crop Sci. Soc. Amer./Amer. Soc. Hort. Sci./Amer. Genetic Assn.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuc. Acid. Res.* 18:6531–6535.
- 김문홍. 1992. 제주도 자생식물목록. 제주식물도감. 제주도. pp. 616–618.
- 박선홍. 1984. 한라산에 자생하는 수종 뱀나무의 화분학적 연구. 제주대학교 석사학위 논문. pp. 1–27.
- 이창복. 1980. 대한식물도감. 향문사, 서울. pp. 450–456.
- 정태현. 1958. 한국식물도감(상). 신지사, 서울. pp. 206–211.

**Phylogenetic Relationship Among Selected Taxa of
Prunus in Mt. Halla and Cultivated *Prunus yedoensis*
by the RAPD Analysis**

**Jung, Yong-Hwan, Mi-Hee Ko, You-Sung Oh, Gi-Ok Kim,
Young-Cheul Chung¹, Moon-Hong Kim and Moon-You Oh***

(Department of Biology, College of Natural Sciences,
Cheju National University, Cheju 690-756,

¹Department of Biology, College of Natural Sciences,
Sunchon National University, Suncheon 540-742, Korea)

We analyzed the phylogenetic relationship among eight taxa (*P. pendula* for. *asendens* Ohwi, *P. yedoensis* Matsumura, *P. sargentii* Rehder, *P. serrulata* var. *quelpaertensis* Uyeki, *P. maximowiczii* Rupr., *P. serrulata* var. *pubescens* Nakai, *P. buergeriana* Miquel, *P. serrulata* var. *spontanea* Wils.) of genus *Prunus* in Mt. Halla and a cultivated taxon, *P. yedoensis* Matsumura using random amplified polymorphic DNA(RAPD). RAPDs were used for identification on nine taxa by amplification using single 10-mer primers of arbitrary sequence. Nine taxa were clearly classified with eight arbitrary random primers which generated 76 polymorphic amplified DNAs or RAPDs. The phylogenetic tree was constructed from the RAPD fragment patterns by the neighbor-joining method. The genetic distance between *Prunus sargentii* Rehder and *P. serrulata* var. *quelpaertensis* Uyeki was 0.3036 and was the lowest among any other pairs. On the other hand, the genetic distance between *P. yedoensis* Matsumura and *P. yedoensis* cultivar was 0.4297. The molecular phylogeny based on RAPD analysis was considerably different from others based on morphology, palynology and isoenzymes. These results showed that RAPD analysis was a powerful tool for elucidating phylogenetic relationship among nine taxa of cherry.

Key words: RAPD, *Prunus*, phylogenetic tree, relationship

*Corresponding author phone +82-64-54-3521 FAX +82-64-56-3541