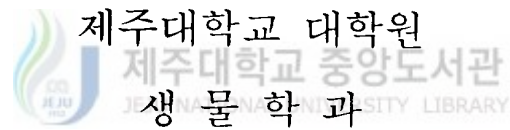

석사학위논문

RAPD 분석에 의한 한라산 벚나무속
식물의 계통유전학적 유연관계



정 용 환

1998년 2월

RAPD 분석에 의한 한라산 벚나무속 식물의 계통유전학적 유연관계

지도교수 : 오 문 유




정 용 환

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

1998년 2월

정용환의 이학 석사학위 논문을 인준함

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

심사위원장	金世宰	
위 원	金文洪	
위 원	吳文儒	

제주대학교 대학원

1998년 2월

Phylogenetic Relationship among
Genus *Prunus* in Mt. Halla Using
RAPD Analysis

Yong-Hwan Jung

(Supervised by Professor Moon-You Oh)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULLFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1998. 2

ABSTRACT

The phylogenetic relationship among eight taxa (*P. pendula* for. *ascendens* 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 one cultivated taxon, *P. yedoensis* Matsumura was studied by random amplified polymorphic DNA (RAPD). RAPDs were identified in nine taxa by amplification using single 10-mer primers of arbitrary sequence (UBC 401~UBC 500, Univ. of British Columbia, Canada).

Nine taxa were clearly classified with 8 arbitrary random primers, UBC 446, UBC 455, UBC 456, UBC 460, UBC 482, UBC 485, UBC 498 and UBC 500, which generated 76 polymorphic amplified DNAs or RAPDs. The phylogenetic tree was constructed from the RAPD fragments patterns by neighbor-joining method.

Nine taxa were divided into two large groups. *P. buergeriana* Miquel formed subgenus *Padus*. *P. pendula* for. *ascendens* Ohwi, *P. yedoensis* Matsumura, *P. sargentii* Rehder, *P. serrulata* var. *quelpaertensis* Uyeki, *P. maximowiczii* Rupr., *P. serrulata* var. *pubescens* Nakai, *P. serrulata* var. *spontanea* Wils. and *P. yedoensis* Matsumura-Cultivar formed subgenus *Pseupcerasus*. The genetic distance between *P. sargentii* Rehder and *P. serrulata* var. *quelpaertensis* Uyeki was 0.3036 showing the lowest value among any other pairs, but the genetic distance between *P. yedoensis* Matsumura and *P. yedoensis* Matsumura-Cultivar was 0.4297. The numbers of identical bands in two species were 16 / 26 in *P. yedoensis* and 16 / 30 in *P. yedoensis*-Cultivar, respectively.

목 차

ABSTRACT	i
목 차	ii
LIST OF TABLES	iii
LIST OF FIGURES	iv
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	
1. 재료 채취 및 보관	4
2. Total DNA 추출, 정제 및 정량	5
3. Random primer의 예비검정	6
4. PCR-RAPD 분석	6
5. 유연관계 분석	7
III. 결 과	
1. Random primer의 예비검정	8
2. PCR-RAPD 분석	9
3. 유연관계 분석	16
IV. 고 찰	21
요 약	24
참고문헌	26

LIST OF TABLES

Table 1. List of <i>Prunus</i> species used for RAPD analysis in this study	4
Table 2. List of arbitrary 10-mer primers used for the RAPD analysis by PCR.....	8
Table 3. Binomial matrix from RAPD analysis	17
Table 4. Distance matrix for 9 species of genus <i>Prunus</i>	19



LIST OF FIGURES

Figure 1. Polymorphic band patterns of DNA in <i>Prunus</i> species by primer UBC 446.....	10
Figure 2. Polymorphic band patterns of DNA in <i>Prunus</i> species by primer UBC 455.....	10
Figure 3. Polymorphic band patterns of DNA in <i>Prunus</i> species by primer UBC 456.....	11
Figure 4. Polymorphic band patterns of DNA in <i>Prunus</i> species by primer UBC 460.....	12
Figure 5. Polymorphic band patterns of DNA in <i>Prunus</i> species by primer UBC 482.....	12
Figure 6. Polymorphic band patterns of DNA in <i>Prunus</i> species by primer UBC 485.....	13
Figure 7. Polymorphic band patterns of DNA in <i>Prunus</i> species by primer UBC 498.....	14
Figure 8. Polymorphic band patterns of DNA in <i>Prunus</i> species by primer UBC 500.....	15
Figure 9. Neighbor-joining tree based on analysis of RAPD fragment.....	20

I. 서 론

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 분류군이 있으며 (이, 1980), 제주도 한라산에는 올벚나무 (*P. pendula* for. *ascendens* Ohwi), 왕벚나무 (*P. yedoensis* Matsumura), 산벚나무 (*P. sargentii* Rehder), 사육 (*P. serrulata* var. *quelpaertensis* Uyeki), 산개벚나무 (*P. maximowiczii* Rupr.), 섬개벚나무 (*P. buergeriana* Miquel), 잔털벚나무 (*P. serrulata* var. *pubescens* Nakai), 개벚나무 (*P. leveilleana* Koehne), 벚나무 (*P. serrulata* var. *spontanea* Wils.), 털벚나무 (*P. serrulata* var. *tomentella* Nakai), 제주벚나무 (*P. yedoensis* for. *nudiflora* Rehder) 등 10여 분류군의 벚나무속 식물이 자생·분포한다고 보고되어 있다 (김, 1992). 그러나 이러한 보고는 학자에 따라 약간의 차이를 보이고 있어 (Nakai, 1914; Kitamura and Murata, 1979) 종분류에 대한 문제점으로 지적되고 있다. 또한 개화시기가 비슷한 벚나무속 식물들은 그 형태적 변이가 다양하며 자생 왕벚나무인 경우 그 기원에 대하여 많은 논란이 따르고 있다.

한라산 자생 벚나무류에 대한 연구는 몇 종의 벚나무속에 관한 isozyme 분석 (Harn *et al.*, 1977), 영양아를 이용한 한라산 자생 왕벚나무의 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 왕벚나무의 기원에 관한 연구들이 대부분이다 (Takenaka, 1963; Kaneko *et al.*, 1986; Kaneko, 1992; Innan *et al.*, 1995). Innan *et al.* (1995)은 벚나무속 식물의 DNA fingerprint 연구 보고에서 일본 전역에 식재되어 있는 재배 왕벚나무 (*P. yedoensis*-Cultivar)는 모두 유전자 지문이 동일하여 한 개체에서 분화되어 나온 것으로 결론

을 내리면서 *P. lannesiana*와 *P. pendula*의 형질을 90 % 갖고 있는 두종간의 교잡종이라고 보고한 바 있다. 그러나 제주도 및 국내에서는 지금까지 *P. lannesiana*가 발견되지 않아 제주 자생 왕벚나무에 대한 견해는 Innan *et al.* (1995)의 결과와는 무관하며, 그 기원에 관해서는 아직도 구명되지 않은 실정이다. 또한 Harn *et al.* (1977)은 한라산에 자생하는 울벚나무, 산벚나무, 그리고 재배 왕벚나무에서 수종의 isoenzyme 분석을 통하여 재배 왕벚나무가 울벚나무와 산벚나무 사이에서 만들어진 중간잡종이라고 보고하였다.

계통유전학 연구에 있어서 당면하게 되는 가장 어려운 문제는 연구 대상의 분류군이 보여주는 형질의 유사성이 공통의 조상에서 유래된 것인지 혹은 같은 유전적 기원을 갖지 아니하고 단지 수렴 진화에 의한 것인지를 분간해 내는 것이다 (Cain, 1982). 더욱이 식물의 형태적 형질은 주위 환경 요인에 따라 변이가 형성되기도 하며, 때때로 상호 비교분석이 매우 어려울 정도로 다양한 형태적 변화를 보여주기도 한다. 따라서 보다 확실한 식별 형질을 찾기에 노력하여 왔으며 급기야는 유전물질 본체인 DNA의 직접적인 비교 분석에 까지 이르게 되었다.

80년대 후반에 들어서면서 급증하고 있는 DNA를 이용한 식물 계통학 연구들은 DNA가 계통학 연구에 있어서 매우 중요한 도구로 사용될 수 있는 커다란 잠재력과 실용성을 입증해 주었으며 (Sytsma and Schaal, 1985; Sytsma and Gottlieb, 1986; Jansen and Palmer, 1988; Zimmer *et al.*, 1989; Hamby and Zimmer, 1992), 이미 활발히 전개되고 있는 DNA 계통학의 추세에 따라 여러 연구 논문들이 보고되었다 (Palmer, 1985, 1986a, 1986b, 1987; Palmer *et al.*, 1988; Clegg *et al.*, 1991). 또한 분자생물학적 연구기법의 발전과 더불어 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP, Loftus *et al.*, 1988; Furnier *et al.*, 1990), DNA fingerprint (Jeffrey *et al.*, 1985; Innan *et al.*, 1995) 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 random amplified polymorphic DNA (RAPD) 기술

이 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 유전자 지도를 작성할 때 매우 유용할 뿐만 아니라, 분자량에 따라 다양한 band가 나타나므로, 주로 종내 분류군 또는 종간의 분류군 비교에 효과적으로 이용되며 (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).

한라산에는 10여 종의 벚나무들이 자생하고 있지만, 이들 종간의 계통유전학적 연구는 아직 행해진 바가 없다. 특히, 자생 왕벚나무와 재배 왕벚나무의 분류학적 위치는 동일한 것으로 통용되고 있다. 따라서 본 연구는 PCR-RAPD 방법으로 한라산에 자생하는 벚나무속 8종과 재배 왕벚나무간의 계통유전학적 유연관계를 분석하여 자생 왕벚나무의 분류학적 위치와 그 기원을 구명하고자 실시하였다.



II. 재료 및 방법

1. 재료 채취 및 보관

본 실험에 재료로 사용된 어린 잎은 1996년 3월부터 6월까지 각 분류군당 10 개체에서 채집하였다. 채집된 잎은 증류수로 세척한 후 즉시 total DNA 분리에 사용하거나, 저온 냉동고 (-72 °C)에 보관하였다. 채집된 재료의 일부는 압착 건조하여 건조표본을 만든 후 표본실에 보관하였다 (Table 1).

Table 1. List of *Prunus* species used for RAPD analysis in this study

Scientific name	Korean name	Collection date	Locality
<i>P. pendula</i> for. <i>asendens</i> Ohwi	올벚나무	1996. 4. 19	^a CJ: Kwanumsa
<i>P. yedoensis</i> Matsumura	왕벚나무	1996. 4. 29	CJ: Bonggae-Dong
<i>P. sargentii</i> Rehder	산벚나무	1996. 4. 27	CJ: Kwanumsa
<i>P. serrulata</i> var. <i>quelpaertensis</i> Uyeki	사 옥	1996. 4. 30	CJ: Tamrakyo
<i>P. maximowiczii</i> Rupr.	산개벚 나무	1996. 5. 7	CJ: Erimok
<i>P. yedoensis</i> Matsumura-Cultivar	재배왕벚나무	1996. 4. 29	CJ: Bonggae-Dong
<i>P. serrulata</i> var. <i>pubescens</i> Nakai	잔털벚나무	1996. 5. 5	CJ: Kwanumsa
<i>P. buergeriana</i> Miquel	섬개벚나무	1996. 5. 4	CJ: Chonwangsa
<i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i> Wils.	벚나무	1996. 4. 30	CJ: Kwanumsa

^aCJ: Cheju-do

2. Total DNA 추출, 정제 및 정량

한라산 벚나무속 9종의 total DNA는 Murray and Thompson (1980)의 방법을 변형한 protein precipitation technique (Dellaporta *et al.*, 1983)으로 추출하였다.

한라산 벚나무속 식물의 신선한 어린 잎 1 g에 액체질소를 가하여 분말로 만든 후, 15 ml의 extraction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 500 mM NaCl; 1 % PVP; 2 % SDS; 0.1 % 2-mercaptoethanol)을 넣고 60 °C에서 30분 동안 incubation 후 5 M potassium acetate (pH 6.5) 4 ml를 첨가하여 얼음에서 10 분간 방치하였다. 5,000 rpm (Mega 17R)에서 20 분간 원심분리시킨 다음 침전된 DNA pellet을 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA) 1 ml를 첨가하여 DNA pellet을 용해시켰다. 그리고 한번 더 원심분리하여 상정액에 3 M sodium acetate (pH 7.6) 100 μ l와 ice cold isopropanol 1 ml를 첨가한 후 -20 °C에 보관하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 다시 TE buffer 1 ml를 첨가하여 용해 시킨 후 RNase A (10 mg / ml; Sigma, USA) 2 μ l, Proteinase K (10 mg / ml; Sigma, USA) 5 μ l를 첨가하여 37 °C에서 각각 1시간과 30분씩 incubation 시켰다. 여기에 동량의 phenol 용액, phenol과 chloroform이 1:1로 섞인 용액을 각각 첨가하여 정제시킨 다음 상정액에 두배의 ethanol를 첨가한 후 -72 °C에 30분간 보관하였다. 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 DNA pellet을 얻은 후 70 % ethanol로 세척 하였다. DNA pellet을 65 °C에서 건조 시킨 후 2 ml의 TE buffer를 첨가하여 37 °C에서 30분간 용해시켰다. 분리된 DNA는 1.5 % agarose gel 상에서 100V, 90분간 전기영동을 실시하여 single band로 나타나는 것을 확인하였다. 분리된 DNA는 UV / VIS spectrophotometer로 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량을 하였다.

3. Random primer의 예비검정

벚나무속 (*Prunus* L.) 식물들의 RAPD에 적합한 primer를 선발하고자 Univ. of British Columbia Biotechnology Lab. (Canada)로부터 구입한 random primer 100개 (Set #5, UBC 401 ~ UBC 500)를 대상으로 하여, 자생 왕벚나무의 total DNA를 template DNA로 하고 동일한 PCR 반응용액 조건하에서 PCR를 수행하였다. PCR 반응용액은 template DNA 10 ng, 각각의 primer 400 nM, dNTP 200 μ M, MgCl₂ 1.8 mM, 10 \times reaction buffer 2.5 μ l, *Taq* DNA polymerase 2 units에 멸균된 3차 증류수를 첨가하여 총 반응 용액량을 25 μ l로 하였다. DNA 증폭은 94 $^{\circ}$ C에서 2 분간 predenature 시킨 후 94 $^{\circ}$ C에서 denature 1 분, 36 $^{\circ}$ C에서 45 초 동안 annealing 시켰으며 extension은 72 $^{\circ}$ C에서 2 분간 실시하여 총 45 회 PCR 반응을 실시하였다. 모든 DNA 증폭은 GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Cetus, USA)을 사용하여 실시하였다.

4. PCR-RAPD 분석



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

예비검정을 통해 선발된 primer를 이용하여 한라산 벚나무속 (*Prunus* L.) 9종 각각에 대한 PCR를 수행한 후 PCR-products는 1 \times TBE buffer (100 mM Tris-borate; 2 mM EDTA, pH 8.0)를 사용하여 ethidium bromide (EtBr, 1 μ g / μ l)가 첨가된 1.5 % agarose gel 상에서 100 V로 100 분간 전기영동하였다. 벚나무속 9종에 대한 primer 각각의 band patterns은 UV transilluminator에서 확인하여 Polaroid Camera로 사진촬영 하였다.

5. 유연관계 분석

Random primer 예비검정 시험에서 선발된 8개의 primer (UBC 446, UBC 455, UBC 456, UBC 460, UBC 482, UBC 485, UBC 498 및 UBC 500)를 이용하여 PCR를 실시한 후 PCR-products의 분자량의 크기에 따라 일련번호를 부여하였다. 각 종에 대하여 밴드의 존재 유무에 따라 각각 '1'과 '0'으로 표시하는 two-digital numbering system을 이용하여 binomial matrix code를 작성하였다. 얻어진 밴드의 유무를 확인하고 기초자료행렬을 작성한 다음 이를 근거로 RAPDistance Ver. 1.04 (Saitou and Nei, 1987)의 NJTREE program을 이용하여 Phi coefficient에 기초한 거리지수를 산출하고 (Sokal and Sneath, 1973) distance matrix를 작성하였다. 이를 토대로 NJ (Neighbor-Joining) 방법에 따라 dendrogram (Nei and Li, 1979; Nei and Gojobori, 1986; Saitou and Nei, 1987; Nei, 1991; Nei and Hughes, 1992)을 작성하여 한라산 뱀나무속 9종의 계통유전학적 유연관계를 분석하였다.



III. 결 과

1. Random primer의 예비검정

한라산 자생 뱀나무속 9종의 RAPD를 수행하기 전에 미리 뱀나무속 식물에 적합한 primer를 선발하고자, 50% 이상의 <G+C> 함량을 가지는 UBC 10-mer random primer의 100개를 이용하여 자생 왕뱀나무의 total DNA를 template DNA로 하고 동일한 조건하에서 PCR를 수행하였다. PCR를 수행한 결과 전 종에서 반응이 일어난 primer는 14개였다. 그 중에서 polymorphic band 빈도수가 많아 본 실험을 수행할 수 있다고 판단되는 8개의 primer를 선발하였으며 각각의 primer와 염기 서열은 Table 2와 같다.

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

Primer ^a No.	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 TAT 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.

2. PCR-RAPD 분석

예비검정을 통해 선발된 8개의 primer로 PCR-RAPD를 수행한 결과 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 선발하였으며 각 band의 선발은 DNA molecule marker와 비교하여 10 ng 이상인 band만 선발하였다 (Fig. 1~8).

UBC 446 primer를 이용한 PCR 반응에서는 300~5,000 bp에 이르는 15개의 band가 보였다. 특히 섬개벚나무에서 다른 종과는 다른 특이한 5.0 kb, 2.1 kb, 1.9 kb와 0.4 kb의 band가 나타났고, 한라산 자생 왕벚나무와 올벚나무가 동일한 경향을 보였으며 산개벚나무에서는 850 bp 이하의 band는 보이지 않았다 (Fig. 1).

UBC 455 primer에서는 PCR-product들이 500~3,400 bp 사이에서 13개의 band가 보였으며 섬개벚나무에서 특이하게 1.3 kb, 1.15 kb와 0.8 kb의 밴드가 나타났다. 한라산 자생 왕벚나무에서 3.4 kb의 band가 나타났으며, 산벚나무와 함께 단 2개의 band만을 나타내고 있다. 전체적으로 자생 왕벚나무, 산벚나무, 사옥이 유사한 경향을 보였으며, 올벚나무, 산개벚나무, 재배왕벚나무, 잔털벚나무, 섬개벚나무 및 벚나무가 유사한 형태를 보이고 있다 (Fig. 2).

UBC 456 primer를 사용하여 한라산 벚나무속 식물들의 RAPD 양상을 살펴본 실험에서는 700~5,300 bp 사이에서 polymorphic 양상을 띤 band는 5개 뿐이었다. 전 종에서 3.4 kb와 0.8 kb의 동일한 크기의 밴드가 나타났으며, 재배 왕벚나무와 잔털벚나무에서는 동일한 밴드를 제외하고는 각각 5.3 kb, 2.0 kb의 밴드 하나씩 나타났다. 전체적으로 비슷한 양상을 보이고 있으며, 자생 왕벚나무, 산벚나무 그리고 사옥에서는 5.3 kb와 0.7 kb band를 똑같이 나타내고 있다 (Fig. 3).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

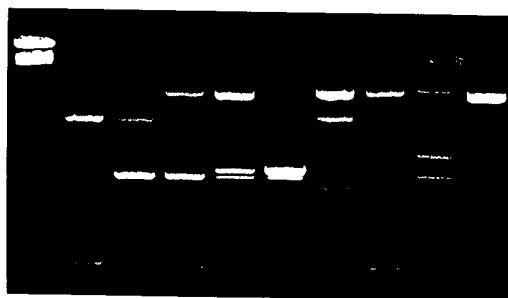


Figure 1. Polymorphic band patterns of DNA in *Prunus* species by primer UBC 446. Lane 1 to 9 were *P. pendula* for. *ascendens*, *P. yedoensis*, *P. sargentii*, *P. serrulata* var. *quelpaetensis*, *P. maximowiczii*, *P. yedoensis*-Cultivar, *P. serrulata* var. *pubescens*, *P. buergeriana*, *P. serrulata* var. *spontanea*. M is molecular marker, Lambda DNA/*EcoR* I +*Hind* III digested.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

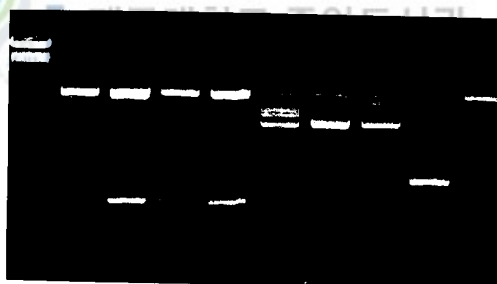


Figure 2. Polymorphic band patterns of DNA in *Prunus* species by primer UBC 455. Lane 1 to 9 were *P. pendula* for. *ascendens*, *P. yedoensis*, *P. sargentii*, *P. serrulata* var. *quelpaetensis*, *P. maximowiczii*, *P. yedoensis*-Cultivar, *P. serrulata* var. *pubescens*, *P. buergeriana*, *P. serrulata* var. *spontanea*. M is molecular marker, Lambda DNA/*EcoR* I +*Hind* III digested.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

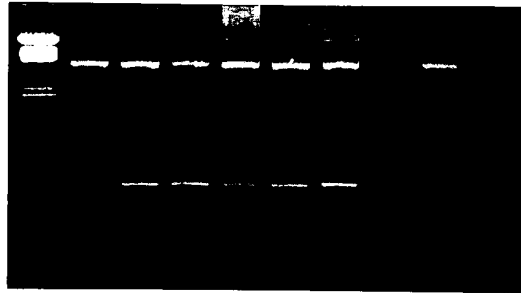


Figure 3. Polymorphic band patterns of DNA in *Prunus* species by primer UBC 456. Lane 1 to 9 were *P. pendula* for. *ascendens*, *P. yedoensis*, *P. sargentii*, *P. serrulata* var. *quelpaetensis*, *P. maximowiczii*, *P. yedoensis*-Cultivar, *P. serrulata* var. *pubescens*, *P. buergeriana*, *P. serrulata* var. *spontanea*. M is molecular marker, Lambda DNA/*EcoR* I +*Hind*III digested.

UBC 460 primer에서는 300~1,700 bp 사이에서 7개의 band가 보였으며 전 종에서 거의 유사한 형태를 보였으나 섬개벚나무에서 1.7 kb, 1.3 kb, 0.65 kb와 0.55 kb band가 특이하게 나타났다. 울벚나무, 자생 왕벚나무, 산벚나무, 사옥에서 0.6 kb와 0.3 kb 두 개의 band만이 나타나 동일한 경향을 보였으며, 산개벚나무, 재배 왕벚나무, 잔털벚나무, 섬개벚나무 및 벚나무에서는 1.2 kb band를 추가하여 3개의 band들이 나타났다 (Fig. 4).

UBC 482 primer에서는 600~3,000 bp 사이에서 8개의 polymorphic한 band가 나타났다. 2.3 kb는 벚나무를 제외한 모든 종에서 나타났고, 0.7 kb band는 섬개벚나무를 제외한 모든 종에서 관찰되었다. 특히 벚나무에서는 0.7 kb의 band 한 개만 polymorphic band를 이루고 있다 (Fig. 5).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

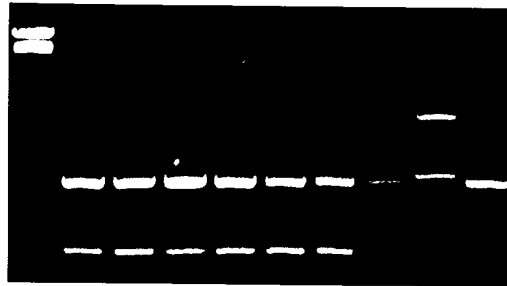


Figure 4. Polymorphic band patterns of DNA in *Prunus* species by primer UBC 460. Lane 1 to 9 were *P. pendula* for. *ascendens*, *P. yedoensis*, *P. sargentii*, *P. serrulata* var. *quelpaetensis*, *P. maximowiczii*, *P. yedoensis*-Cultivar, *P. serrulata* var. *pubescens*, *P. buergeriana*, *P. serrulata* var. *spontanea*. M is molecular marker, Lambda DNA/*EcoR* I +*Hind*III digested.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

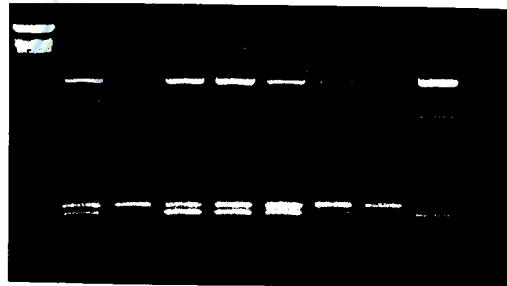


Figure 5. Polymorphic band patterns of DNA in *Prunus* species by primer UBC 482. Lane 1 to 9 were *P. pendula* for. *ascendens*, *P. yedoensis*, *P. sargentii*, *P. serrulata* var. *quelpaetensis*, *P. maximowiczii*, *P. yedoensis*-Cultivar, *P. serrulata* var. *pubescens*, *P. buergeriana*, *P. serrulata* var. *spontanea*. M is molecular marker, Lambda DNA/*EcoR* I +*Hind*III digested.

UBC 485 primer에서는 300~3,500 bp 사이에서 본 실험에서 가장 많은 polymorphic band 15개가 나타났다. 그 중에서 특이한 점은 다른 종에 비해 올벚나무에서 0.5 kb와 0.3 kb 두 개의 band만이 뚜렷하게 관찰되었다. 잔털벚나무와 벗나무는 1.8 kb의 band를 제외하고 아주 유사한 band patterns을 나타내고 있다 (Fig. 6).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

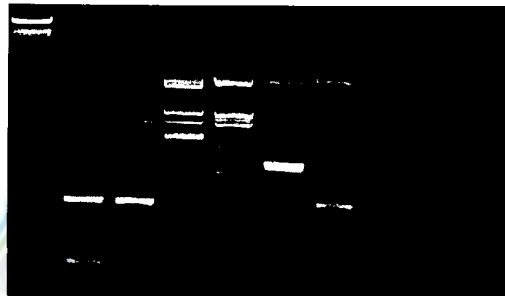


Figure 6. Polymorphic band patterns of DNA in *Prunus* species by primer UBC 485. Lane 1 to 9 were *P. pendula* for. *ascendens*, *P. yedoensis*, *P. sargentii*, *P. serrulata* var. *quepaetensis*, *P. maximowiczii*, *P. yedoensis*-Cultivar, *P. serrulata* var. *pubescens*, *P. buergeriana*, *P. serrulata* var. *spontanea*. M is molecular marker, Lambda DNA/*EcoR* I +*Hind*III digested.

UBC 498 primer에서는 0.8, 1.7, 1.9, 2.5 kb의 polymorphic band 4개만 나타났다. 산벚나무에서는 4개의 밴드 모두가 나타났으나, 잔털벚나무와 벚나무에서는 전종에서 동일하게 보이는 0.3 kb와 0.7 kb band를 제외하고는 한 개의 polymorphic band도 나타나고 있지 않았다. 특이한 점은 잔털벚나무, 벚나무와 동일종내의 변종인 사육은 2.5, 1.9 kb band 두 개가 나타나고 있다. 산벚나무와 산개벚나무에서 0.8 kb band가 나타난 것도 특징적이다 (Fig. 7).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

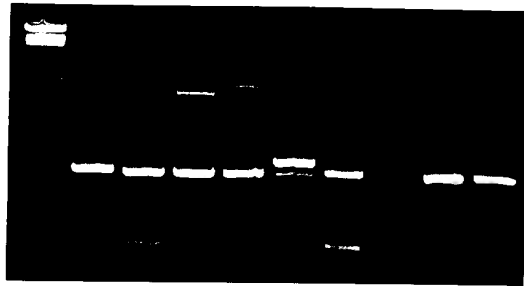


Figure 7. Polymorphic band patterns of DNA in *Prunus* species by primer UBC 498. Lane 1 to 9 were *P. pendula* for. *ascendens*, *P. yedoensis*, *P. sargentii*, *P. serrulata* var. *quelpaetensis*, *P. maximowiczii*, *P. yedoensis*-Cultivar, *P. serrulata* var. *pubescens*, *P. buergeriana*, *P. serrulata* var. *spontanea*. M is molecular marker, Lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* III digested.

UBC 500 primer에서는 PCR-product들이 0.55~3 kb 사이에서 9개의 band가 나타났다. 0.7 kb band 만이 전 종에서 동일하게 나타났고 그 중 특이한 점은 잔털벚나무에서 polymorphic band가 전혀 나타나지 않은 것과 자생왕벚에서 1.3, 1.0, 0.9 kb band가 연속적으로 나타난 것이다 (Fig. 8).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Figure 8. Polymorphic band patterns of DNA in *Prunus* species by primer UBC 500. 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.

3. 유연관계 분석

한라산에 자생하는 벚나무속 (*Prunus* L.) 9 분류군 (*P. pendula* for. *ascendens* Ohwi, *P. yedoensis* Matsumura, *P. sargentii* Rehder, *P. serrulata* var. *quelpaertensis* Uyeki, *P. maximowiczii* Rupr., *P. yedoensis* Matsumura-Cultivar, *P. serrulata* var. *pubescens* Nakai, *P. buergeriana* Miquel, *P. serrulata* var. *spontanea* Wils.)의 계통유전학적 유연관계를 밝히기 위하여 9 분류군 각각의 10 개체에서 종내 개체군에는 동일하나 종간에 polymorphic band 빈도수가 많은 8개의 10-mer random primer를 사용하여 얻은 76개의 밴드 각각을 하나의 형질로 보아 기초자료행렬을 작성하였으며 자료행렬은 band의 유무에 따라 “1”과 “0”으로 표시하는 two-digital numbering system을 이용하여 binomial matrix code를 작성한 결과 Table 3과 같다.

이를 근거로 RAPDistance Ver. 1.04 (Saito and Nei, 1987)의 NJTREE program을 이용하여 Phi coefficient에 기초한 거리지수를 산출하여 (Sokal and Sneath, 1963) distance matrix를 작성하였으며 (Table 4), 이 결과를 NJ (Neighbor-joining) 방법에 의거한 dendrogram (Nei and Li, 1979; Nei and Gojobori, 1986; Saito and Nei, 1987; Nei, 1991; Nei and Hughes, 1992)을 작성하였다 (Fig. 9). 산벚나무와 사옥이 거리지수 0.3036으로 가장 유연관계가 높게 나타났으며, 그 다음으로 잔털벚나무와 사옥이 거리지수 0.3286을 나타내었다. 한라산 자생 왕벚나무의 경우 사옥과 거리지수 0.3863으로 가장 높은 유연관계를 나타내었고, 울벚나무·산벚나무와 각각 0.4190으로 동일한 거리지수를 나타내면서 사옥과의 거리지수 0.3863보다 낮게 나타났다. 동일밴드의 수에서도 한라산 자생 왕벚나무는 울벚나무와 13개, 산벚나무와는 16개로, 사옥과의 동일밴드 16개 보다 적게 나타났다. 한편 자생 왕벚나무와 재배 왕벚나무간에는 16개의 동일 밴드가 관찰되었다.

Table 3. Binomial matrix from RAPD analysis

Species	UBC 446 ^a	UBC 455	UBC 456	UBC 460
	5 2 2 2 1 1 1 1 1 1 ^b	3 1 1 1 1 1 1 1 1 1	5 2 1 1	1 1 1
	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 5 0 0 0 5 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
<i>P. pendula</i> for. <i>aspidens</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 1 1	1 0 1 1 0	0 0 0 0 1 0 1
<i>P. yedoensis</i>	0 0 0 0 0 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
<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 0 1 0	1 0 0 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 0 1 0 1 0	1 0 0 0 1	0 0 0 0 1 0 1
<i>P. maximowiczii</i>	0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 0 0 0 0	0 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 1 0	1 0 1 0 1	0 0 1 0 1 0 1
<i>P. yedensis</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
<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
<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
<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 0 1	1 0 0 1 0	0 0 1 0 1 0 1

(Continued)

Table 3. (Continued)

Species	UBC 482 ^a		UBC 485		UBC 498		UBC 500	
	3211111	3311111 ^b	549832198765433	3311111 ^b	211	311111	086530985	311111
<i>P. pendula</i> for. <i>ascendens</i>	01100111	00000000001001	0100	00100000	0100	00100000	00000000	00100000
<i>P. yedoensis</i>	01011010	001001100011001	1100	00101100	1100	00101100	00101100	00101100
<i>P. sargentii</i>	01000011	001101110010000	1111	110010001	1111	110010001	110010001	110010001
<i>P. serrulata</i> var. <i>quelpaetensis</i>	01001011	001001101010100	1100	01000001	1100	01000001	01000001	01000001
<i>P. maximowiczii</i>	01101011	001000001100000	0001	011100001	0001	011100001	011100001	011100001
<i>P. yedoensis</i> -Cultivar	01110011	001011100001000	0100	011010001	0100	011010001	011010001	011010001
<i>P. serrulata</i> var. <i>pubescens</i>	01101010	011001000010000	0000	00000000	0000	00000000	00000000	00000000
<i>P. buergeriana</i>	11111001	110101010000010	0100	110010010	0100	110010010	110010010	110010010
<i>P. serrulata</i> var. <i>spontanea</i>	00000010	011101000010000	0000	00000100	0000	00000100	00000100	00000100

^aRandom primer series^bBand size (base pairs)

Table 4. Distance matrix for 9 species of 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*.

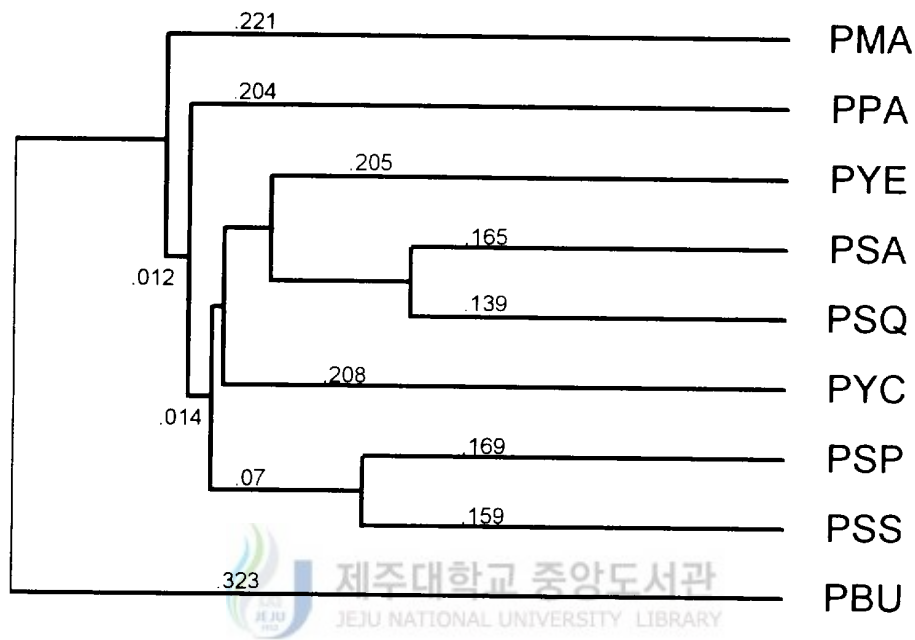


Figure 9. Neighbor-joining tree based on analysis of RAPD fragment. PMA = *P. maximowiczii*, PPA = *P. pendula* for. *ascendens*, PYE = *P. yedoensis*, PSA = *P. sargentii*, PSQ = *P. serrulata* var. *quelpaetensis*, PYC = *P. yedoensis*-Cultivar, PSP = *P. serrulata* var. *pubescens*, PSS = *P. serrulata* var. *spontanea*, PBU = *P. buergeriana*.

IV. 고찰

한라산에 자생하는 9종의 벚나무속 (*Prunus* L.) 식물들에 대한 계통유전학적 유연관계를 구명하기 위하여 먼저 9종의 벚나무에서 PCR-RAPD의 적정조건을 결정하였다. PCR의 적정조건을 확인한 후 random primer의 선발에서는 모두 100개의 random primer를 (Set #5, Univ. of British Columbia, Canada) 사용하였다. 전체종에서 반응이 일어난 primer는 모두 14개 였으나 그 중 밴드가 굵고 깨끗하며 전종에서 다양하게 나타나서 본 실험에 적용 가능하다고 판단된 8개의 primer를 이용하여 실험을 수행하였다 (Table 2). 일반적으로 primer의 염기구성은 DNA 증폭 길이에 많은 영향을 미치며 (Williams *et al.*, 1990), 특히 primer에 <G+C>의 함량이 높을수록 DNA 증폭이 매우 유리하게 일어난다고 알려져 있는데 (Fritsch *et al.*, 1993), 본 실험에 사용한 primer의 <G+C>의 함량이 60 % 이상이어서 동일한 결과를 나타내었다.

8개의 primer를 사용하여 얻은 polymorphic band pattern을 two-digital numbering system을 이용한 binomial matrix를 근거로 거리지수를 계산하여 distance matrix를 작성한 결과 산벚나무와 사옥이 거리지수 0.3036으로 가장 유연관계가 높게 나타났으며, 그 다음으로 잔털벚나무와 벚나무가 거리지수 0.3285를 나타내었다. 잔털벚나무와 섬개벚나무는 거리지수 0.6729로 한라산 자생 벚나무속 식물중 가장 낮은 유연관계를 나타내었다. 한라산 자생 왕벚나무의 경우 사옥과 거리지수 0.3863으로 가장 높은 유연관계를 나타내었는데, 이는 화분학적 연구에서 왕벚나무의 화분크기나 표면무늬에 있어서 사옥과 가장 가깝다는 연구 보고 (Park *et al.*, 1984)와 일치한다. 한편, 한라산 자생 왕벚나무와 재배 왕벚나무와의 거리지수는 0.4297로 나타나 이는 산벚나무 및 사옥과의 거리지수보다 낮았다. 이는 한라산 자생 왕벚나무가 산벚나무와 울벚나무의 종간 교잡종일 것이라는 선행 연구보

고 (Kaneko, 1992)와 차이는 있지만, 본 연구 결과만으로 Kaneko (1992)의 보고를 전면 부정할 수는 없다. Innan *et al.*, (1995)이 보고한 왕벚나무의 기원에 관한 연구결과를 보면 일본 전 지역에 식재·분포된 왕벚나무는 모두 같은 clone이라고 보고한 바 있으며 지금까지 한라산 자생 왕벚나무와 재배 왕벚나무는 동일 분류군으로 취급되고 있다. 그러나, 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 간주되고 있는 한라산 자생 왕벚나무와 재배왕벚나무가 다른 분류군일 가능성을 시사해주고 있다. 따라서 특정한 유전자의 연구를 병행하는 복합적인 연구를 통해 이를 명확히 할 필요가 있다고 사료된다.

NJ 방법에 의한 분지도에서 크게 2개의 분류군으로 나누어졌는데 subgenus *Padus*와 subgenus *Pseupcerasus*로 나누어졌다. Subgenus *Padus* 그룹에는 십개벚나무, subgenus *Pseupcerasus* 그룹에는 산개벚지나무, 올벚나무, 왕벚나무, 산벚나무, 사옥, 재배왕벚나무, 잔털벚나무, 벚나무가 속한다 (Fig. 9). Subgenus *Pseupcerasus* 내에서는 더 이상의 구분이 되지 않았다. 본 실험결과 또 하나의 주목할 점은 동일종에 속하는 변종들 중 사옥이 벚나무, 잔털벚나무와 다른 유연관계를 나타내고 있다. 이러한 결과는 사옥이 기존의 벚나무 또는 잔털벚나무와 기원이 다른것에 대한 더 신중한 분류학적인 재검토가 요구된다.

본 연구에서는 전체 *Prunus*속에 관한 전반적인 계통유전학적 유연관계를 수립하지는 못하였으나 PCR-RAPD band pattern에 기초한 한라산에 자생하는 벚나무속 식물 8종과 재배왕벚나무에 관한 계통유전학적 연구가 형태적 특징(김, 1990) 및 화분학적 연구(Park *et al.*, 1984)에 근거하여 추정하여 오던 종내의 계통유연 분석과는 부분적으로 다른 양상을 나타내고 있어서 현 단계에서는 성급하게 어떤

결론을 내리기는 어렵다. 그러나 식물의 형태적 형질은 주위 환경 요인에 따라 변이가 형성되기도 하며, 때때로 상호 비교분석이 매우 어려울 정도로 다양한 형태적 변화를 보여주기도 한다. 따라서 재현성 등에 매우 안정이 되어 있는 유전물질 본체인 DNA를 이용한 RAPD 방법은 한라산 뱀나무속 식물들의 직접적인 계통유전학적 비교 분석에 매우 유용한 접근 방법으로 보인다. 본 연구결과와 더불어 뱀나무속들의 분류군을 확대시켜 전체 뱀나무 속의 유전적 유연관계 분석을 통하여 유전적 배경을 밝혀주고 더 나아가 빠르게 진화하는 특정 유전자를 선택하여 DNA fingerprint, DNA sequence를 수행한다면 한라산 자생 왕뱀나무와 재배왕뱀나무 및 뱀나무속 식물들의 정확한 계통유연관계를 밝힐수 있다고 사료된다. 이러한 연구는 한라산 자생 왕뱀나무의 기원을 구명하고, 사라져가는 한라산 희귀종인 왕뱀나무의 유전자원 보전에 매우 필요하다고 사료된다.

요 약

본 연구는 한라산에 자생하는 올벚나무 (*P. pendula* for. *ascendens* 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. *pubescens* Nakai), 벚나무 (*P. serrulata* var. *spontanea* Wils.)와 제주도 전역에 식재된 재배 왕벚나무 (*P. yedoensis* Matsumura-Cultivar) 등 벚나무속 (*Prunus* L.) 9종 간의 계통유전학적 유연관계를 Random amplified polymorphic DNA (RAPD) 분석에 의해 추정하였다. RAPDs는 10-mer arbitrary sequence를 갖는 100개의 random primer를 이용한 DNA 증폭에 의하여 9종에서 관찰되었다 (UBC 401 - UBC 500, Univ. of British Columbia, Canada).

한라산 벚나무속 식물에서 <G+C> 함량이 50% 이상인 8개의 10 bp - random primer (UBC 446, UBC 455, UBC 456, UBC 460, UBC 482, UBC 485, UBC 498, UBC 500)를 사용하여 RAPD를 수행한 결과, 전체 76개의 polymorphic band들이 관찰되었다. RAPD 단편들을 이용한 계통수 작성은 neighbor-joining 방법을 이용하였다. 계통수에서 9종의 벚나무속 식물은 크게 2 그룹으로 나누어 졌는데, 섬개벚나무가 subgenus *Padus*에 속하며 섬개벚나무를 제외한 8종 즉, 올벚나무, 자생 왕벚나무, 산벚나무, 사옥, 재배 왕벚나무, 산개벚나무, 잔털벚나무, 벚나무가 subgenus *Pseupcerasus*를 형성하였다.

RAPD fragment pattern에 근거한 neighbor-joining tree에서 산벚나무 (*Prunus sargentii* Rehder)와 사옥 (*P. serrulata* var. *quelpaertensis* Uyeki)이 거리지수 0.3036으로 다른 근연종들보다 가장 유사함을 보였다. 그러나 한라산 자생 왕벚나무 (*P. yedoensis* Matsumura)와 지금까지 동일 종으로 분류되어왔던 재배 왕벚나무 (*P. yedoensis* Matsumura - Cultivar)의 거리지수는 0.4297로 나타

났다. 또한 자생왕벚나무와 재배왕벚나무 사이의 동일 band의 수는 16개 (자생 왕벚나무, 16 / 26), (재배 왕벚나무, 16 / 30)로 나타났다.



VI. 참고 문헌

- 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.
- Cain, A. J. 1982. On homology and convergence. In problems of phylogenetic reconstruction. K. A. Joesey and A. E. Friday (eds.). pp. 1-19. Academic Press. New York.
- Clegg, M. T., G. H. Learn, and E. M. Golenberg. 1991. Molecular evolution of chloroplast DNA. In R. K. Selander, A. G. Clark and T. S. Whittman (eds.), *Evolution at Molecular Level*. Hall, New. 135-149. Sinauer Associates, Sunderland.
- Dellaporta, S. L., J. Wood, and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: 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.
- Hamby, R. K., and E. A. Zimmer. 1992. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. In E. E. Soltis, P. S. Soltis and J. J. Doyle (eds.). *Molecular Systematics of Plants*. Hall, New. 50-91. Chapman and Hall, New York.
- Harn, C. Y., Y. J. Kim, S. Y. Yang, and 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.
- Jansen, R. K., and J. D. Palmer. 1988. Phylogenetic implications of chloroplast DNA restriction site variation in the Mutisieae (Asteraceae). *Amer. J. Bot.* 75: 751-764.
- Jeffrey, S. A. J., V. Wilson, and S. L. Thein. 1985. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73.
- Kaneko, T., T. Toru, and T. Koichiro. 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, and 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 W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nuc. Acid. Res.* 8: 4321-4325.

-
- Nakai, T. 1914. Flora of quepart 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 Histocopatibility 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.
- Palmer, J. D. 1985. Comparative organization of chloroplast genomes. *Ann. Rev. Genet.* 19: 325-354.
- . 1986a. Chloroplast DNA and phylogenetic relationships. In S. K. Dutta (ed.). *DNA Systematics, Vol. 2. Plants*. Hall, New. 63-80. CRC Press, Boca Raton.

-
- . 1986b. Isolation and structural analysis of chloroplast DNA. *Meth. Enzymol.* 118: 167-186.
- . 1987. Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. *Am. Nat.* 130: S6-29.
- , R. K. Jansen, H. J. Michaels, M. W. Chase, and J. R. Manhart. 1988. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 75: 1180-1206.
- Park, S. H., M. H. Kim, and S. T. Lee. 1984. A palynological study on the several cherry trees in Mt. Halla. *Kor. J. Plant Tax.* 14: 153-158.
- Roland, J., and H. K. Wain. 1984. The nomenclature of cultivated Japanese flowering cherries (*Prunus*). The Satozakura group.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic 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. *Numerical Taxonomy* (Freeman, W. H., ed.). San Francisco.
- Sytsma, K. J., and L. D. Gottlieb. 1986. Chloroplast DNA evidence for the origin of the genus *Heterogaura* from a species of *Clarkia* (Onagraceae). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 5554-5557.

- , and B. A. Schaal. 1985. Phylogenetics of the *Lisianthus skinneri* (Gentianaceae) species complex in Panama utilizing DNA restriction fragment analysis. *Evolution* 39: 594-608.
- 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. pp. 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.
- Zimmer, E. A., R. K. Hamby, M. L. Arnold, D. A. Leblanc and E. C. Theriot. 1989. Ribosomal RNA phylogenies and flowering plant evolution. In B. Fernholm, K. Bremer and H. Jornvall (eds.). *The Hierarchy of Life.* pp. 205-214. Elsevier Science Publishers,

Amsterdam.

김문홍. 1992. 제주도 자생식물목록. 제주식물도감. 제주도. pp. 616-618.

김우길. 1990. 한국산 *Prunus*속 식물의 계통분류학적 연구. 제주대학교 석사학위
논문. pp.1-29

이창복. 1980. 대한식물도감. 향문사. pp. 450-456.

정태현. 1958. 한국식물도감(상). 신지사. pp. 206-211.



감사의 글

본 연구를 수행하고 논문이 완성되기까지 부족한 저를 끊임없이 지도와 사랑으로 보살피 주시며 학문에 임하는 자세를 일깨워 주신 오문유 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 늘 격려와 사랑으로 바쁘신 중에도 기꺼이 심사를 맡아 미흡한 논문을 다듬어 주신 김문홍, 김세재 교수님들께도 깊은 감사를 드립니다. 그리고 평소에 생물학에 관한 많은 가르침을 주신 허인옥, 오덕철, 이용필, 김원택, 이화자, 고석찬 교수님들께도 더불어 감사의 뜻을 전합니다.

미래를 향한 힘찬 전진을 하는 유전학 실험실 가족들에게 고마움을 전하며, 특히 엄하고 날카로운 충고를 아낌없이 해주시는 김기옥, 고미희, 오유성 선배님들께 남다른 애정과 감사의 마음을 전합니다. 대학원 생활의 또 하나의 결실이라 생각되는 소중한 나의 친구 김연주에게도 고마움을 전합니다.

저를 낳아 주시고 길러 주시고 무한한 사랑으로 밀어 주시는 부모님과 어려울 때 힘이 되어준 가족들과 관심으로 지켜봐 주신 친지분들께도 깊은 감사를 드리며 미흡하나마 이 논문을 바칩니다.

1997년 12월

정용환 드림