

RAPD와 핵 리보솜 DNA ITS2 염기서열에 의한 한국산 전나무속 식물의 유전적 변이 및 계통유전학적 분석

정용환 · 한상현 · 오유성 · 고미희 · 고석찬 · 김문홍 · 오분유*

제주대학교 생물학과

Genetic Variation and Phylogenetic Analysis of Genus *Abies* Distributed in Korea Based on RAPD and Nuclear rDNA ITS2 Sequences

Yong-Hwan Jung, Sang-Hyun Han, You-Sung Oh, Mi-Hee Ko,
Suck-Chan Koh, Moon-Hong Kim and Moon-You Oh*

Department of Biology, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

ABSTRACT

We analyzed the genetic variation and phylogenetic relationship among fourteen taxa of Genus *Abies* distributed in Korea using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and internal transcribed spacer (ITS) 2 sequences of the nuclear ribosomal DNA (rDNA). RAPDs were used for identification of selected taxa by amplification using single 10-mer primers of arbitrary sequence. Fourteen taxa were clearly classified with 10 arbitrary primers, which generated 102 useful polymorphic bands that were evaluated according to the presence or absence of the fragments of equal size. The genetic distance between *A. koreana* for. *chlorocarpa* and *A. koreana* for. *rubrocarpa* was 0.127, showing the closest among any other pairs. By comparing the base sequences in the ITS2 region of the nuclear rDNA, genetic relationship was assessed among selected taxa. It showed twenty six sites of point mutation (base substitution) in 243 base pairs (bp) of ITS2 region. The G + C contents of ITS2 region were ranged from 58.3% to 61.7%. The value of nucleotide divergence among selected taxa was ranged from 0.4% to 9.8%. These results showed that RAPD and ITS2 sequence analysis was a useful tool for elucidating phylogenetic relationship and selection of specific marker in *Abies* species.

Key words: *Abies*, ITS, phylogenetic, RAPD, rDNA, relationship, variation.

Received : Jul. 11, 2000. Revised : Oct. 9, 2000. Accepted : Oct. 20, 2000.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail : mike@cheju.cheju.ac.kr. 본 연구는 1998년 한국학술진흥재단의 학술연구비 (1998-015-D00222)에 의하여 지원되었음.

서 론

한반도에 자생하는 전나무속 (Genus *Abies*) 식물은 구상나무 (*A. koreana* Wilson), 분비나무 (*A. nephrolepis* Maxim), 전나무 (*A. holophylla* Maxim)의 3종으로 분류되어 있다. 전 세계적으로 미국과 유럽의 북반구에 널리 분포하고 있는 전나무속 식물은 지역적으로 분화된 다양한 종들이 분포하고 있다 (Palmer and Parker, 1991). 전나무속 식물 중 북미산 몇몇 종은 외부형태에 대한 분류학적 연구 (Parker and Maze, 1984; Robson *et al.*, 1993)와 flavonoids에 관한 연구 (Parker *et al.*, 1984) 등 분류학적 실체에 대해 잘 알려져 있으며, 국내의 전나무속에 관한 연구는 구상나무의 형태적 변이에 대한 연구 (이와 김, 1982)와 terpenoids 화학성분 분석 (전, 1988) 등이 있다. 특히, 구상나무는 소나무과 (Pinaceae)에 속하는, 전 세계에서 우리 나라에만 자생하는 한국 특산수종으로 한라산을 비롯하여 지리산, 덕유산, 가야산 등의 남부지역의 아고산 지대에 분포하며 분비나무와 함께 한반도 아고산대의 극상수종 (이와 조, 1993)으로, 1915년 Wilson에 의해 새로운 종으로 확인된 후 분류학적 연구 (Lee, 1970)와 동위효소를 이용한 유전학적인 연구가 (정과 이, 1985) 수행되어 왔다. 유럽과 미국 등지에서는 산림쇠퇴에 따른 고산수목의 유전자원을 보전하기 위한 유전변이 연구가 활발하게 진행되고 있으나, 우리 나라에서는 기후변화와 각종 환경오염으로 인한 한라산 자생 구상나무의 부분적인 쇠퇴현상이 보고되어 있지만 (김, 1994), 구상나무를 포함하는 전나무속 식물에 대한 유전자원 보전에 관한 연구가 매우 미흡한 실정이다.

한라산에 자생하는 구상나무에 대한 분류학적 연구는 단지 구과 (strobile)와 포 (bract)에 대한 색깔을 바탕으로 구상나무 (*A. koreana*), 푸른구상나무 (*A. koreana* for. *chlorocarpa*), 검구상나무 (*A. koreana* for. *nigrocarpa*), 붉은구상나무 (*A. koreana* for. *rubrocarpa*)의 4 품종으로 구분 지어 놓았지만 (Lee, 1970), 이들이 시간이 흐름에 따라 연속변이를 나타내고 있어 아직까지도 각 품종에 대한 뚜렷한 형질을 제시하지 못하고 있다. 또한, 구상나무와 분비나무는 유사 종으로서 외부 형태적인 형질에서 그 차이를 확연히 찾아볼 수 없어 같은 종으로 분류할 것인지 다른 종으로 분류할 것인지에 대한 논의가 분분한 실정으로 그간에 외부 형태적인 형질에 의한 연구와 flavonoid, terpenoid 및 동위효소를 이용한 종 분류 연구가 수행되었으나 명확한 결론을 내리지 못한 바 있다 (Chang *et al.*, 1997).

생물 다양성 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. 지금까지 유전변이 연구는 주로 동위효소를 위주로 이루어져 왔으며, 최근에는 DNA marker를 이용한 유전변이 및 유연관계 분석이 널리 이루어지고 있다 (Williams *et al.*, 1990; Williams, 1992). 특히 특정 DNA 부분을 빠른 시간 내에 증폭할 수 있는 PCR 기술과 random primer를 이용한 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 기술이 개발되어 (Hadrys *et al.*, 1992; Tingey and Tufo, 1993) 종내 분류군 또는 종간 분류군 비교 및 계통유전학적 연구 등에 폭넓게 이용되고 있으며, RAPD marker로 알려진 증폭된 DNA fragment는 종의 분류와 유전자지도 작성에 많이 이용되고 있다 (Nelson *et al.*, 1994; Brickner *et al.*, 1996). 이러한 DNA 분석은 종의 진화 과정을 가장 직접적으로 추론할 수 있는 중요한 방법론의 하나로 인식되고 있으며 (Parlmer *et al.*, 1988; Hamby and Zimmer, 1992), 종내 분류군 또는 종간의 분류군 비교에도 효과적으로 이용되고 있다 (Klein-Lankhorst *et al.*, 1991; Shimada *et al.*, 1994; Brickner *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1996). 특히 핵 리보솜 DNA 중 18S, 5.8S, 26S, ITS (internal transcribed spacer) 부위와 엽록체의 *rbcL*, *matK* 유전자의 염기서열을 비교하여 피자식물 (angiosperms) 및 나자식물 (gymnosperms)의 종속 단위의 분류군 비교에 자주 이용되고 있다 (Baldwin, 1992; Kron and Chase, 1994; Kim and Jansen, 1994; Manhart, 1994; Quijada *et al.*, 1998; Gernandt and Liston, 1999).

따라서 본 연구는 한라산 자생 구상나무 및 분비나무, 전나무 등 *Abies* 속 식물 각 종들에 대하여 RAPD 표지인자를 식별하고, 핵 리보솜 DNA의 ITS2 부분에 대한 염기서열을 비교함으로써, *Abies*속 식물의 유전적 분석 및 유연관계를 규명하여 점차 소멸되어 가는 한라산 자생 구상나무의

유전자원을 보존하고자 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 DNA 추출

본 연구에 사용한 전나무속 (*Abies*) 식물들은 Lee (1970)가 보고한 바를 기준으로 한라산 자생 구상나무 4품종과 경기도 포천 국립수목원에 식재된 구상나무, 분비나무, 전나무 각 종당 2개체를 채집하여 실험재료로 사용하였으며 (Table 1), 잎과 구과가 달린 가지를 채집하고 구과의 절편을 따서 증류수로 세척한 후 물기를 제거한 즉시 total DNA 분리에 사용하거나, 저온 냉동기(-72℃)에 보관하였다가 DNA를 추출하였다. DNA 추출은 protein precipitation technique (Dellaporta *et al.*, 1983)을 변형하여 실행하였고, CsCl/ethidium bromide 농도경사에 의한 초고속 원심분리 방법에 따라 DNA를 추출·정제하였다 (Sambrook *et al.*, 1989).

RAPD 분석

RAPD 분석을 위한 DNA 절편을 얻기 위하여 사용한 arbitrary primer는 British Columbia 대학의 Biotechnology Lab. (Canada)으로부터 구입하여 사용하였다. PCR 반응 혼합액 및 반응조건과 전기영동은 Jung *et al.* (1997)의 방법에 따라 3회 반복하여 수행하였다.

핵 리보솜 DNA의 ITS2 부위 증폭

핵 리보솜 DNA의 ITS 부위의 증폭은 White *et al.* (1990)의 'ITS 3 (5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3')'과 Nickrent *et al.* (1994)의 '26S-25R (5'-TAT GCT TAA ACT CAG CGG GT-3')' primer를 사용하였으며, PCR 반응 및 전기영동 조건 등은 Jung *et al.* (1998)의 방법을 수정 없이 사용하였다.

RAPD 표지인자 선발 및 유전적 거리지수 산출

PCR 수행결과 얻어진 절편들을 이용하여 각각의 arbitrary primer에 특이한 종간 표지인자를 확인하고 DNA size marker와 비교하여 각 종에 대한 표지인자를 나타내었다. *Abies* 속 식물 14개체의 유연관계 분석을 위하여 얻어진 PCR-product를 크기에 따라 일련번호를 매겼으며, 각 종에 대하여 밴드의 존재유무에 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 (Saito and Nei, 1987)의 NJTREE program을 이용하여 Phi coefficient에 기초한 거리지수를 산출하였다 (Sokal and Sneath, 1973).

Cloning과 Plasmid 분리

PCR에 의해 증폭된 ITS 부위는 2% agarose gel 상에서 100V, 1시간 전기영동하여 확인하였으며, 확인된 PCR-product는 pT-Adv vector (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA)를 사용하여 cloning 하였다. 먼저 pT-Adv vector에 ligation은 준비된 insert DNA 1 μ l (50 ng), vector 2 μ l (25 ng/ μ l), 10 \times ligation buffer 1 μ l, T4 DNA ligase 1 μ l (4.0 Weiss units)에 최종 10 μ l가 되게 한 후 14℃에서 overnight 반응시켰다.

형질전환은 Top 10F' competent cell를 사용하여 ligation된 DNA 5 μ l를 넣고 혼합하여 얼음에서 30분 동안 보관한 후 42℃에서 30초 동안 열충격을 주어 실시하였다. 그리고 얼음에서 3분 정도 식힌 후에 SOC medium (2% bacto-trypton, 0.5% bacto-yeast extract, 0.05% NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 20 mM glucose) 250 μ l를 넣고 37℃에서 1시간 배양한 후 ampicillin이 포함된 LB-plate (50 μ g/LB ml)에 150 μ l의 cell을 도말하여 16시간 배양한 후에 형질전환된 white colony를 선발하였다. 형질전환된 세포를 petri-dish에 뿌리기 전에 LB-plate에 미리 X-Gal

Table 1
Sample Collection Localities and Date of Genus *Abies* Used for the RAPD Analysis

Species	Individuals	Localities ^a	Date
<i>A. koreana</i>	AK1	CJ : Mt. Halla	1998. 9. 28
	AK2	CJ : Mt. Halla	1998. 9. 28
	AK3	KG : National Arboretum	1998. 10. 4
	AK4	KG : National Arboretum	1998. 10. 4
<i>A. koreana</i> for. <i>chlorocarpa</i>	AC1	CJ : Mt. Halla	1998. 9. 28
	AC2	CJ : Mt. Halla	1998. 9. 28
<i>A. koreana</i> for. <i>rubrocarpa</i>	AR1	CJ : Mt. Halla	1998. 9. 28
	AR2	CJ : Mt. Halla	1998. 9. 28
<i>A. koreana</i> for. <i>nigrocarpa</i>	AN1	CJ : Mt. Halla	1998. 9. 28
	AN2	CJ : Mt. Halla	1998. 9. 28
<i>A. nephrolepis</i>	AS1	KG : National Arboretum	1998. 10. 4
	AS2	KG : National Arboretum	1998. 10. 4
<i>A. holophylla</i>	AH1	KG : National Arboretum	1998. 10. 4
	AH2	KG : National Arboretum	1998. 10. 4

^a CJ, Cheju-do; KG, Kyonggi-do.

40 μ l (50 mg/ml), IPTG 40 μ l (0.2 M)를 처리하였다.

선별한 white colony를 ampicillin이 들어있는 LB-broth (50 μ g/ml) 배지에 8시간 동안 배양한 후 Minipreps DNA Purification System (Promega, USA)을 사용하여 plasmid DNA를 분리하였다. Plasmid DNA는 2% agarose gel에서 전기영동으로 확인하였다.

Sequencing

Abies 속 식물의 ITS2 부위의 sequencing은 Cy5™ AutoCycle™ Sequencing Kit (Pharmacia Biotech, USA)을 사용하여 실시하였으며, 모든 처리과정은 공급자의 manual (Protocols for Cy5™ AutoCycle™ Sequencing Kit: Pharmacia, Biotech, USA)에 따라 수행하였다. Cyclic sequencing을 위하여 Cy5가 표지된 vector inner primer인 M13-40 primer와 M13 reverse primer (Pharmacia Biotech, USA)를 사용하여 94℃ 30초, 55℃ 30초 72℃ 40초를 30회 실시한 다음 가닥 신장을 위하여 72℃에서 10분간을 더 유지시켰으며 stop solution을 첨가하기 전까지 4℃에 보관하였다. 전기영동은 7 M urea, 6% acrylamide gel상에서, buffer는 0.6×TBE buffer (1 M Tris, 0.83 M boric acid, 10 mM EDTA)를 사용하였으며, AlFexpress DNA sequencer (Pharmacia Biotech, USA)를 사용하여 1000 V에서 700분간 실시하였다.

염기서열 분석

ITS2 부위의 염기서열 결정은 기존에 발표된 염기서열 (Gernandt and Liston, 1999)과 비교하여 결정하였으며, Clustal V program (Higgins et al., 1992)을 이용하여 염기정렬을 일차 수행한 후, 최종적으로 육안에 의해 정렬 상태를 검토하여 필요시 수정하였다. 염기 변이율을 확인하기 위한 분지분석에서 gap은 missing character로 처리하였다. 또한 염기변이 산출은 PHYLIP (version 3.5; Felsenstein, 1993)의 DNADIST program에서 transition : transversion을 2 : 1로 가정하여 two-parameter 방법 (Kimura, 1980)으로 계산하였고, 그 결과를 기초로 Neighbor program

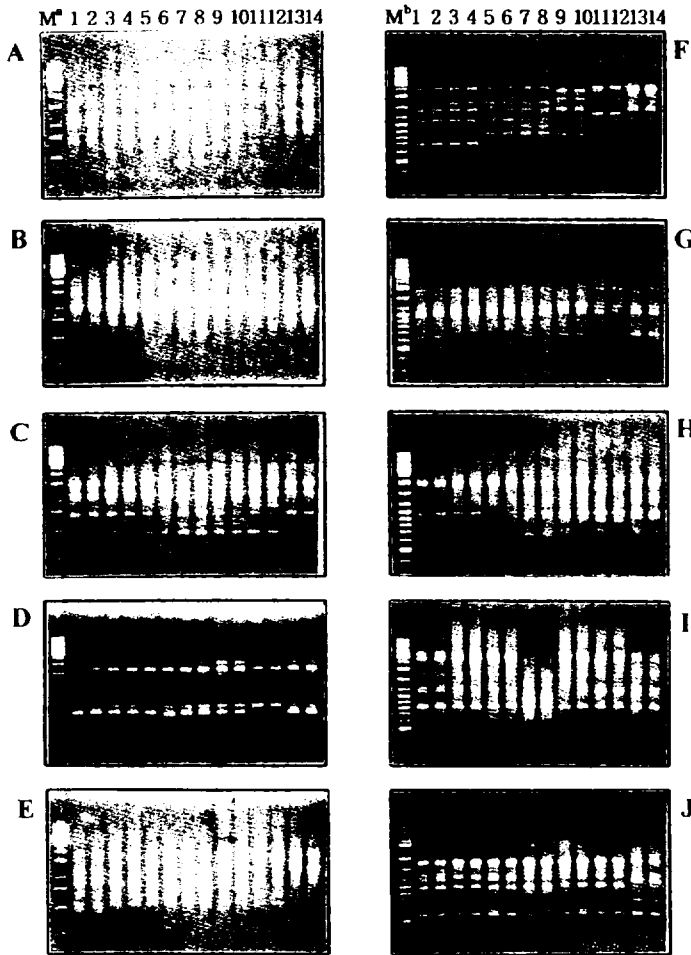


Figure 1. Polymorphic band patterns of DNA in *Abies* species, using 10 arbitrary primers; A-U109, B-U111, C-U485, D-498, E-500, F-U112, G-U410, H-U455, I-U460 and J-U482. Lane 1 to 14 are AC1, AC2, AK1, AK2, AR1, AR2, AN1, AN2, AK3, AK4, AS1, AS2, AH1 and AH2. Species abbreviations are given in Table 1. M^a and M^b are DNA size marker, GeneRuler 1 kp DNA Ladder and GeneRuler DNA Ladder Mix (MBI, Fermentas).

(Saitou and Nei, 1987)을 이용하여 neighbor-joining tree를 작성하였다. 또한, 계통수의 branch에 대한 신뢰도를 얻기 위한 bootstrap (100회 반복)은 parsimony analysis에서 나온 결과를 모두 채택하여 consensus tree를 작성하였다.

결 과

한라산 자생 구상나무를 포함한 전나무속 (Genus *Abies*) 14 분류군 (Table 1)에 관하여 각종에 대한 표지인자 선발 및 한반도 전나무속 식물의 유전적 변이 및 계통유전학적 유연관계 분석을 위하여 PCR-RAPD 방법 및 핵 리보솜 DNA의 ITS2 부위의 염기서열을 비교 분석하였다.

전나무속 식물에 대한 RAPD 표지인자를 선발하기 위한 PCR-RAPD 분석에서는 전체 200개의 10-mer arbitrary primer에서 PCR 산물을 생성한 arbitrary primer는 112개였으나, 그 중 증폭산물이 뚜렷하고 전체 14 개체에 대하여 다형현상을 보이며 각 개체에 대한 특이 표지인자를 나타내는 10개의 primer (U109, U111, U112, U410, U455, U460, U482, U485, U498, U500)를 선발하여 PCR-RAPD를 3회 반복 수행한 결과 총 102개의 polymorphic band를 얻었으며 (Fig. 1), 사용된 각각의 arbitrary primer와 염기서열은 Table 2에 나타내었다. 총 102개의 band 중 구상나무 4 개체 (AK1, AK2, AK3, AK4), 푸른구상나무 2개체 (AC1, AC2), 검구상나무 2개체 (AN1,

Table 2
List of Arbitrary 10-mer Primers Used for the RAPD Analysis

Primer	Sequence (5' → 3')	G+C (%)
U109	TGTACGTGAG	50
U111	AGTAGACGGG	60
U112	GCTTGTTAAC	50
U410	CGTCACAGAG	60
U455	AGCAAGCCGG	70
U460	ACTGACCGGC	70
U482	CTATAGGCCG	60
U485	AGAATAGGGC	50
U498	GACAGTCCTG	60
U500	TTGCGTCATG	50

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

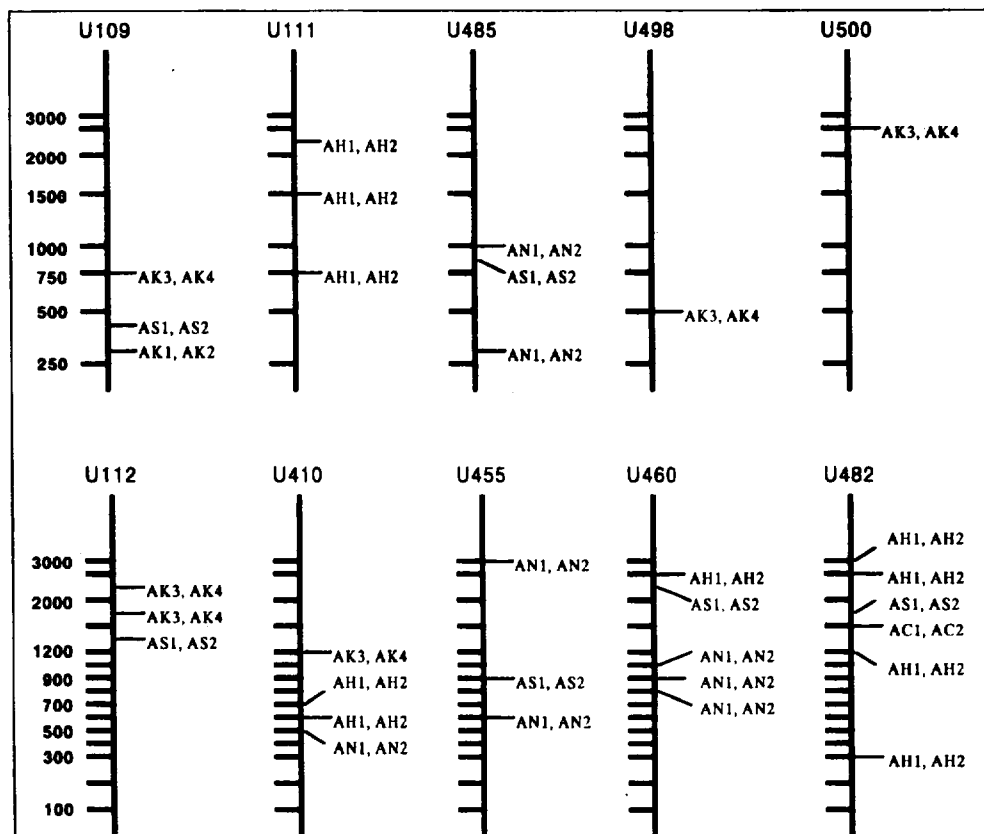


Figure 2. Position of the species specific RAPD markers in the gel. Marker sites of each species shown on the right were identified by the PCR-product. The left numbers are the DNA size marker. Numbers above the marker maps denote the name of primer.

AN2), 분비나무 2개체 (AS1, AS2), 그리고 전나무 2개체 (AH1, AH2)에서 각각 1, 6, 1, 8, 6, 10개의 표지인자들을 확인하였으나 붉은구상나무에서는 종 특이적 표지인자가 나타나지 않았다 (Fig. 2). 유연관계 분석을 위하여 Binomial matrix code 작성은 DNA size marker와 비교하여

Table 3
Binomial Matrix Code Based on the RAPD Analysis

Species*	Name of Primer												
	U109	U111	U112	U410	U455	U460	U482	U485	U498	U500			
AC1	0010110010100	0101010	1100111010101	01000100100	01110100	100100110001	00011101110	0010000100	010	001100001010011			
AC2	0010110010100	0101010	1100111010101	01000100100	01110100	100100110001	00011101110	0010000100	010	001100001010011			
AK1	1001101010101	0101011	1000111010101	11010110000	01110000	100111100000	00001001010	111110000000	010	100011101011110			
AK2	1001101011101	0101011	1000111010101	11010110000	01110000	100111100000	00001001010	111110000000	010	100011101011110			
AR1	1111110001000	0101000	1100111010101	01000100000	01110000	100100110001	00001101010	10100001000	010	000101111111110			
AR2	1111110001000	0101000	1100111010101	01000100000	01110000	100100110001	00001101010	10100001000	010	000101111111110			
AN1	1000100011010	0100011	1000111001111	10000110101	1010101	100011001111	00000001010	0011100111	010	001000001101110			
AN2	1000100011010	0100011	1000111001111	10000110101	1010101	100011001111	00000001010	0011100111	010	001000001101110			
AK3	1010100111100	0101011	0011111011011	10111000100	01110100	100111100001	00001000110	1111001100	001	011110100111110			
AK4	1010100111100	0101011	0011111011011	10111000100	01110100	100111100001	00001000110	1111001100	001	011110100111110			
AS1	1001000011100	0001001	1100000101000	01000100000	00111010	101011110000	00101001000	1110010000	100	100101001010110			
AS2	1001000011100	0001001	1100000101000	01000100000	00111010	101011110000	00101001000	1110010000	100	100101001010110			
AH1	11111101000100	1111111	0100001000000	01100001110	0101100	010000100001	11001010101	1000000010	100	101110010000001			
AH2	11111101000100	1111111	0100001000000	01100001110	0101100	010000100001	11001010101	1000000010	100	101110010000001			

*For species abbreviations, see Table 1.

Table 4
Distance Matrix Using Sokal and Sneath Algorithm
from 14 Individuals of Genus *Abies*

	AC1	AC2	AK1	AK2	AR1	AR2	AN1	AN2	AK3	AK4	AS1	AS2	AH1	AH2
AC1	-													
AC2	0.000	-												
AK1	0.193	0.193	-											
AK2	0.200	0.200	0.005	-										
AR1	0.127	0.127	0.146	0.140	-									
AR2	0.127	0.127	0.146	0.140	0.000	-								
AN1	0.252	0.252	0.229	0.222	0.275	0.275	-							
AN2	0.252	0.252	0.229	0.222	0.275	0.275	0.000	-						
AK3	0.222	0.222	0.186	0.179	0.229	0.229	0.244	0.244	-					
AK4	0.222	0.222	0.186	0.179	0.229	0.229	0.244	0.244	0.000	-				
AS1	0.267	0.267	0.200	0.193	0.229	0.229	0.342	0.342	0.291	0.291	-			
AS2	0.267	0.267	0.200	0.193	0.229	0.229	0.342	0.342	0.291	0.291	0.000	-		
AH1	0.291	0.291	0.369	0.378	0.333	0.333	0.489	0.489	0.388	0.388	0.333	0.333	-	
AH2	0.291	0.291	0.369	0.378	0.333	0.333	0.489	0.489	0.388	0.388	0.333	0.333	0.000	-

Species abbreviations are given in table 1.

Table 5
Sequence Characteristics of ITS2 Regions Among 14 Individuals of Genus *Abies*

	ITS 2	
	Length (bp)	G+C (%)
AC1	243	61.7
AC2	243	61.7
AK1	243	60.8
AK2	243	60.8
AR1	243	61.7
AR2	243	61.7
AN1	243	61.3
AN2	243	61.3
AK3	243	60.0
AK4	243	60.0
AS1	243	60.0
AS2	243	60.0
AH1	243	58.3
AH2	243	58.3

Species abbreviations are given in table 1.

10 ng/ μ l 이상인 것들을 사용하여 band의 유무에 따라 '1'과 '0'으로 표기하였다 (Table 3). Phi coefficient에 기초한 거리지수를 산출하고 Sokal and Sneath algorithm (Sokal and Sneath, 1973)을 이용 distance matrix를 작성하였으며, 그 결과 한라산 자생 구상나무 2개체에서 0.005의 거리지수를 나타내었으며, 한라산 자생 구상나무를 제외하고는 동일종인 서로 다른 개체에서 거리지수가 0.000으로서 동일한 결과를 나타내고 있다 (Table 4). 한편, 푸른구상나무와 붉은구상나무가 0.127로서 가장 높은 유연관계를 나타내고 있는 반면, 검구상나무와 전나무가 거리지수 0.489로

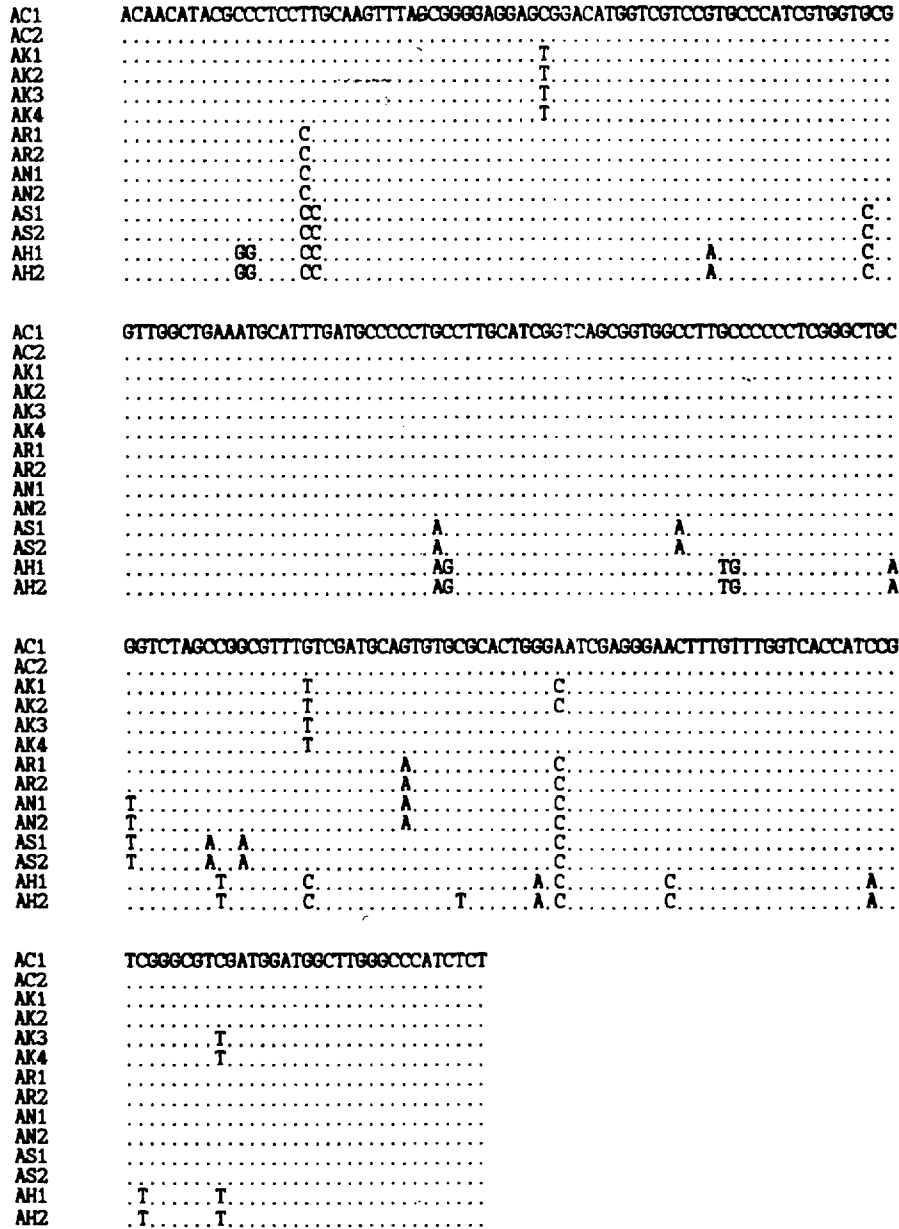


Figure 3. Sequence alignment of ITS2 complete sequences of nuclear ribosomal DNA among 14 individuals of Genus *Abies*. Nucleotide sequences were displayed from 5' to 3'. Dots indicate nucleotides identical to those in the sequence.

유연관계가 가장 낮게 나타났다 (Table 4).

ITS2 부위의 염기서열 분석결과 모든 개체에서 243 bp로 동일한 크기를 나타내었으며, 26 부분에서 염기치환이 나타나 한국산 전나무속 식물 14 분류군 전체적으로 염기치환율 10.7% (26/243)을 보였다 (Fig. 3). 또한, $\langle G+C \rangle$의 함량은 전나무 2개체가 58.3%로 가장 낮은 함량을 나타냈으며, 푸른구상나무 2개체와 붉은구상나무 2개체가 61.7%로 가장 높은 함량을 나타내면서 전나무속 전체에서 3.4%의 차이를 나타냈다 (Table 5).

Table 6
Sequences Divergences for ITS2 Sequences Among Selected Species of *Abies*

	AC1	AC2	AK1	AK2	AR1	AR2	AN1	AN2	AK3	AK4	AS1	AS2	AH1	AH2
AC1	-													
AC2	0.000	-												
AK1	0.017	0.017	-											
AK2	0.017	0.017	0.000	-										
AR1	0.017	0.017	0.017	0.017	-									
AR2	0.017	0.017	0.017	0.017	0.000	-								
AN1	0.021	0.021	0.021	0.021	0.004	0.004	-							
AN2	0.021	0.021	0.021	0.021	0.004	0.004	0.000	-						
AK3	0.017	0.017	0.008	0.008	0.025	0.025	0.030	0.030	-					
AK4	0.017	0.017	0.008	0.008	0.025	0.025	0.030	0.030	0.000	-				
AS1	0.052	0.052	0.052	0.052	0.043	0.043	0.038	0.038	0.061	0.061	-			
AS2	0.052	0.052	0.052	0.052	0.043	0.043	0.038	0.038	0.061	0.061	0.000	-		
AH1	0.098	0.098	0.093	0.093	0.089	0.089	0.094	0.094	0.093	0.093	0.089	0.089	-	
AH2	0.098	0.098	0.093	0.093	0.089	0.089	0.094	0.094	0.093	0.093	0.089	0.089	0.000	-

Sequences divergences corrected for multiple substitution using two-parameter method (Kimura, 1980) are given below the diagonal.

Species abbreviations are given in table 1.

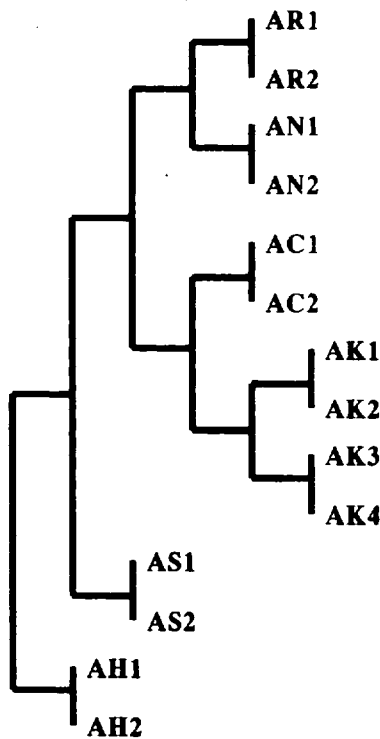


Figure 4. Phylogenetic trees from 14 individuals of Genus *Abies* using Neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987). Species abbreviations are given in Table 1.

실험에서 관찰한 ITS2 부위 전체 243 bp의 염기 변이율을 분석한 결과 *Abies*속 식물들 사이에서 붉은구상나무와 검구상나무가 0.4%로 가장 낮은 염기변이율을 나타내었으며, 푸른구상나무와 전

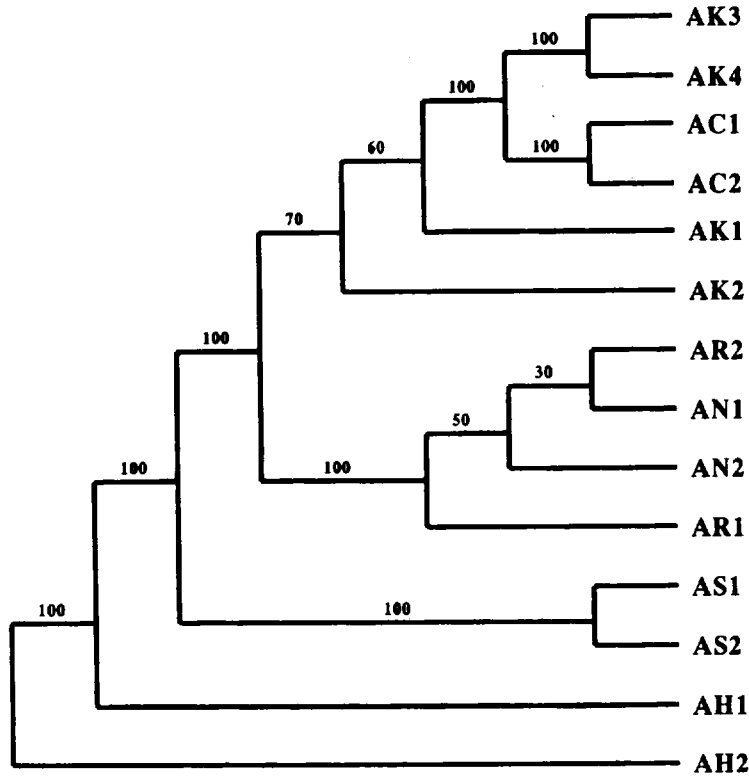


Figure 5. Single most parsimonious tree found in a branch-and-bound search of nrDNA nucleotide sequence data. Indels were treated as missing data in this analysis. Numbers above the lines indicate bootstrap values based upon 100 replicates. Generic abbreviations are listed in Table 1.

나무 사이에서 9.8%로 가장 높은 염기변이율을 나타내면서 전체적으로 9.4%의 염기변이율 차이를 나타내었다 (Table 6). 염기변이율을 바탕으로 작성한 neighbor-joining tree는 크게 붉은구상나무와 검구상나무, 구상나무와 푸른구상나무, 분비나무와 전나무 집단으로 나누어졌다 (Fig. 4). Neighbor-joining tree의 각각의 branch에 대한 신뢰도를 얻기 위하여 parsimony 분석에 의한 bootstrap (100회 반복) 결과로 작성한 consensus tree는 50~100%에 가까운 값을 나타내면서 neighbor-joining tree와 마찬가지로 크게 세 그룹으로 나누어졌다 (Fig. 5).

고 찰

PCR-RAPD 분석에 의한 표지인자 선발과 핵 리보솜 ITS2 부위의 염기서열에 의한 유전적 변이 및 계통유전학적 유연관계 분석실험에서 본 연구진은 동일 종이면서도 한라산 자생 구상나무와 국립수목원 구상나무 사이에 서로 다른 위치에서 특징적인 표지인자를 찾아냄으로써 종내의 유전적 변이를 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 즉, 한라산 자생 구상나무 (AK1, AK2)가 1개의 표지인자를 나타낸 반면 국립수목원 구상나무 (AK3, AK4)는 다른 분류군에서 확인되지 않는 6개의 표지인자들을 나타내었다 (Fig. 2). 또한 RAPD 분석에서 분류군간에 서로 다르게 나타나는 102개의 polymorphic band를 기초로 한 거리지수 산출에서 구상나무 4품종, 분비나무 및 전나무 개체들은 다른 종과의 거리지수가 각각 0.005~0.275, 0.193~0.342 및 0.291~0.489를 나타냄으로써 분류군간의 커다란 차이를 나타내고 있는데 (Table 4), 이것은 각각의 분류군에 대한 주목할 만한 계통유전학적 유연관계의 차이를 나타내고 있다고 할 수 있다. 이러한 결과들은 본 실험에서 밝혀진 ITS2 부위에서 확인된 염기치환 (Fig. 3)과 더불어 전나무속 식물의 종간 잡종 가능성을 제기한 Hunt와 Rudloff (1979)의 연구 보고와는 다른 것으로 사료된다. 다시 말해서, 제주도는 본토와 멀리 떨어져

저 있어서 조사된 분류군 간에 최근 혹은 가까운 과거에 잡종화가 일어났을 가능성이 매우 낮은 반면, 북미대륙의 전나무속 식물에서와 같이 (Parker *et al.*, 1981; Palmer and Parker, 1991) 과거 빙하기 동안에 같은 피난처 (refugia)에 함께 자라면서 일부 종의 유전자 이입과 더불어 종간에 잡종이 이루어졌을 가능성이 높다고 판단한 Chang 등 (1997)의 보고와 일치하는 것으로 보인다.

또한, PCR-RAPD 분석에서 가장 많은 10개의 특이인자를 보이며 핵 리보솜 DNA의 ITS2 염기서열 비교에서 가장 낮은 <G+C> 함량 (58.3%)을 나타내면서 다른 분류군 즉, 분비나무 및 구상나무 분류군들과 비교하여 전나무가 확연한 차이를 보이고 있는 것은 아시아에 분포하는 28종의 전나무속 (Genus *Abies*) 식물중 전나무는 *Pitcha* 절 (Section *Pitcha*)에 속하며, 분비나무 및 구상나무는 *Momi* 절 (Section *Momi*)에 속한다는 보고 (Cheng and Fu, 1978) 와 일치되는 것으로 판단된다. 이러한 결과들은 핵 리보솜 ITS2 부위의 염기서열 분석결과에서도 동일하게 나타나고 있다. 각각의 분류군에서 확인된 염기서열 (Fig. 3)을 바탕으로 Kimura (1980)의 two-parameter 방법에 의한 염기변이율을 계산한 결과 전나무 (8.3%~9.8%)는 구상나무 4품종 (0.4%~3.0%)과 분비나무 (3.8%~6.1%)에 비해 높은 염기변이율을 나타냄을 확인할 수 있었다 (Table 6). 또한 염기변이율을 기초로 계통수를 작성한 결과 구상나무 4품종, 분비나무 및 전나무가 각각의 군집 (cluster)을 형성하고 있으며 (Fig. 5), 계통수에 대한 신뢰도를 얻기 위한 bootstrap (100회 반복)에서도 크게 세 개의 군집을 형성하면서 구상나무, 분비나무 및 전나무 분류군들의 뚜렷한 차이점을 제시하고 있다 (Fig. 6).

Chang 등 (1997)에 따르면, 구상나무와 분비나무 사이의 동위효소 분석실험에서 10개의 효소 중 대부분의 효소에서 monomorphic 하여 유전적인 차이점을 찾아내지 못하였고, 다만 GOT (glutamate-oxaloacetate transaminase), 6-PGD (6-phosphogluconic dehydrogenase), PER (peroxidase), 등의 효소에서 다형현상을 보임으로써, 이를 근거로 구상나무와 분비나무의 차이점을 보고한 바 있다. 선행 연구결과와 같이 본 연구에서도 구상나무 4 품종 및 분비나무 각각에 대한 RAPD 분석 및 ITS2 염기서열을 기초로 한 분석실험을 통하여 이 두 집단간에 유전적으로 상이함을 제시할 수 있었다. 특히, 지금까지 단지 구과 (strobile)와 포 (bract)의 색깔 등 외부형태에만 의존했던 분류체계에서 한 걸음 더 나아간 PCR-RAPD 분석 및 nrDNA의 ITS2 부위의 염기서열 분석결과 각 구상나무 품종들 간에 뚜렷한 유전적 차이점을 밝혀낼 수 있었다. 이는 선행연구 (이와 김, 1982)에서 두 종간의 뚜렷한 차이점이 제시되지 못 했던 것에 반해, 본 연구에서는 뚜렷한 식별인자를 제시할 수 있었다는데서 그 의의를 찾을 수 있으며, 구상나무는 분비나무나 전나무와는 확연히 다른 것이라는 종 분류상의 근거를 제시할 수 있었다. 이러한 사실들은 현재 연속변이를 나타내고 있는 한라산 자생 구상나무 4 품종간에 뚜렷한 형태분류학적 열쇠(key)가 되는 형질을 제시하지 못하고 있는 분류체계에 대한 재검토를 요구하는 중요한 자료들이라고 할 수 있을 것이다.

개체의 표현형질은 개체가 물려받은 유전적인 요소들만이 작용하는 것이 아니라 (Park *et al.*, 1996) 선천적으로 물려받은 유전자의 발현이 개체가 처한 환경의 영향을 받아 다른 종 또는 같은 종이라 할지라도 형질발현의 정도에 따라 형태적으로 다양한 변이가 나타날 수 있는 것이다. 유전자가 개체발생의 초기 단계에서 개체의 유전형질을 결정한다고 하면, 개체가 처한 생육 환경은 그 개체의 표현형질을 결정하는 요소들이라고 할 수 있다 (Yadav *et al.*, 1997).

결론적으로, 한라산 구상나무를 포함한 한반도 전나무속 식물에 대한 본 연구 결과, PCR-RAPD 분석 및 nrDNA ITS2 부위의 염기서열분석을 통한 각 종들에 대한 식별인자 선발 및 계통유전학적 유연관계 분석 결과 형태학적 분석법과 동위효소를 이용한 분석법에 의한 선행 연구결과에 비해 더 명확한 종 분류 및 종간, 개체간 계통유전학적 유연관계를 구분할 수 있다고 하겠다. 이러한 연구결과와 더불어 전나무속 식물에 대한 더 많은 개체와 다양한 지역의 재료를 채집하여 빠르게 진화하는 특정 유전자를 대상으로 RFLP (restriction fragment length polymorphism)와 DNA 지문지법 (fingerprinting) 등의 방법을 이용하여 식물지리학적 연구 및 격리에 의한 진화와 각 집단의 유전자 이입 문제로 인한 다형성에 대한 집중적인 연구를 통해 한라산 자생 구상나무의 실체를 확실히 밝히는 것이 생물 유전자원 보존 및 그 유전자원이 무기가 되리라는 21세기의 생물자원 확보에 일익을 담당하게 될 것으로 사료되어 앞으로 이 분야에 대한 심도 있는 연구가 요청된다.

사 사

본 실험을 수행하기 위한 재료 채집에 많은 도움을 주신 한라산 국립공원 관리사무소와 경기도 포천 국립수목원 관계자들에게 감사를 표합니다.

인용문헌

- 김은식. 1994. 환경변화와 고산지대 수목생장 쇠퇴현상과의 상관성 해석. *한국과학재단보고서*. pp. 89.
- 이강연, 김현권. 1982. 구상나무 천연집단의 침엽형질 변이. *한국임학회지* 57: 39-44.
- 이창석, 조현재. 1993. 가야산 구상나무 군락의 구조 및 동태. *한국생태학회지* 16: 75-91.
- 전승훈. 1988. Monoterpene 성분에 의한 분비나무와 구상나무의 분류학적 연구. *서울대학교 석사학위논문*. pp. 27.
- 정현관, 이석구. 1985. *Abies koreana* 9개 천연집단의 동위효소실험에 의한 유전분석. *임목연보* 21: 89-95.
- Baldwin, B.G., 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the Compositae. *Molec. Phylogene. Evol.* 1: 3-16.
- Brickner J.H., T.J. Lynch, D. Zeilinger and E. Orias, 1996. Identification, mapping and linkage analysis of randomly amplified DNA polymorphisms in *Tetrahymena thermophila*. *Genetics* 143: 811-821.
- Chang, C.S., J.I. Jeon and J.O. Hyun, 1997. An analysis of morphological variation in *Abies koreana* Wilson and *A. nephrolepis* Maxim of Korea (Pinaceae) and their phylogenetic problems. *Jour. Korea For. Soc.* 86: 378-390.
- Cheung, W.C. and L.K. Fu, 1978. *Flora reipublicae popularis Sinicae*. Vol. 7. Academiae Sinicae. Peking.
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks, 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Rep.* 1: 19-21.
- 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.
- 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 *Molecular Systematics of Plants*, E.E. Soltis, P.S. Soltis and J.J. Doyle, eds., Chapman and Hall, New York, pp. 50-91.
- Higgins, D.G., A.J. Bleasby and R. Fuchs, 1992. Clustal V: Improved softword for multiple sequence alignment. *Computer Applic. Biosci.* 8: 189-191.
- Hunt, R.S. and E. von Rudloff, 1979. Chemosystematic studies in the Genus *Abies*. IV. Introgression in *Abies lasiocarpa* and *Abies bifolia*. *Taxon* 28: 297-305.
- Jung, Y.H., M.H. Ko, Y.S. Oh, G.O. Kim, Y.C. Chung, M.H. Kim and M.Y. Oh, 1997. Phylogenetic relationship among selected taxa of *Prunus* in Mt. Halla and cultivated *Prunus yedoensis* by the RAPD analysis. *Kor. J. Plant Tax.* 27: 415-428.
- Jung, Y.H., M.H. Ko, Y.S. Oh, S.H. Han, M.H. Kim, S.C. Koh and M.Y. Oh, 1998. Relationship of *Prunus yedoensis*, native and cultivar, based on internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA. *Korean J. Genetics* 20: 109-116.
- 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. Molec. Evol.* 16: 111-120.
- Klein-Lankhorst, R.M., A. Vermunt, R. Weide, T. Iiharska and P. Zabel, 1991. Isolation of molecular markers for tomato (*Lycopersicon esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.* 83: 108-114.

- Kron, K.A. and M.W. Chase, 1994. Systematics of the ericaceae, empetraceae, epacridaceae and related taxa based upon *rbcl* sequences data. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **80**: 735-741.
- Lee, T.B., 1970. *Abies koreana* and its new forms discovered. *Jour. Korean For. Soc.* **10**: 5-6.
- Lu, Z.X., G.L. Reighard and W.V. Baird, 1996. Identification of peach rootstock cultivars by RAPD markers. *HortScience* **31**: 127-129.
- Manhart, J.R., 1994. Phylogenetic analysis of green plant *rbcl* sequences. *Molec. Phylogene. Evol.* **3**: 114-127.
- 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.
- Nickrent, D.L., K.P. Schuette and E.M. Starr, 1994. A molecular phylogeny of *Arceuthobium* (Viscaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Amer. J. Bot.* **81**: 1149-1160.
- Palmer, C.L. and W.H. Parker, 1991. Phenotypic variation in Yukon populations of subalpine fir. *Canadian Journal of Botany* **69**: 1491-1500.
- Palmer, J.D., 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, 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.
- Parker, W.H. and J. Maze, 1984. Intraspecific variation in *Abies lasiocarpa* from British Columbia and Washington. *Amer. J. Bot.* **71**: 1051-1059.
- Parker, W.H., J. Maze and G.E. Bradfield, 1981. Implications of morphological and anatomical variation in *Abies balsamea* and *A. lasiocarpa* (Pinaceae) from western Canada. *Amer. J. Bot.* **68**: 843-854.
- Parker, W.H., J. Maze, F.E. Bennett, T.A. Cleveland and D.G. McLachlan, 1984. Needle flavonoid variation in *Abies balsamea* and *A. lasiocarpa* from western Canada. *Taxon* **33**: 1-12.
- Quijada, A., A. Liston, P. Delgado, A. Vazquez-Lobo, E.R. Alvarez-Buylla, 1998. Variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) region of *Pinus rzedowskii* revealed by PCR-RFLP. *Theor. Appl. Genet.* **96**: 539-544.
- Robson, K.A., J. Maze, R.K. Scagel and S. Banerjee, 1993. Ontogeny, phylogeny and intraspecific variation in North America *Abies* Mill. (Pinaceae): an empirical approach to organization and evolution. *Taxon* **42**: 17-34.
- Saitou, N. and M. Nei, 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetics trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, p. 15, 109.
- 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.
- Tingey, S.F. and J.P. del Tufo, 1993. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Physiol.* **101**: 349-352.
- 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.
- 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.
- Williams, M.N.V., 1992. RFLP analysis of polymerase chain reaction products amplified from mapped loci of rice (*Oryza sativa* L.) genomic DNA. *Theor. Appl. Genet.* **82**: 489-497.
- 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.