

왕벚의 起源에 關한 研究

1. 漢拏山自生울벚, 栽培왕벚 및 산벚의 電氣泳動型 比較

韓昶烈·金英眞·梁瑞榮*·鄭熙埈**

(韓國原子力研究所·美國칼리포니아大學校*·濟州大學**)

Studies on the Origin of *Prunus yedoensis* Matsumura

1. A Comparative Electrophoretic Study on Wild *P. subhirtella* in Mt. Hanla, Cultivated *P. yedoensis* and *P. donarium*.

Harn, Changyawl, Yung J. Kim, Suh Y. Yang* and Hee J. Chung**

(Korea Atomic Energy Research Institute, Seoul, University of California,* Berkeley, Calif., and Jeju University,** Jeju)

ABSTRACT

Horizontal starch gel electrophoresis in three buffers was used to compare the electrophoretic patterns in three cherry species, wild *Prunus subhirtella*, cultivated *P. yedoensis* and *P. donarium*. Electrophoretic patterns of glutamate oxaloacetate, transaminase-2(GOT-2), malate dehydrogenase-2(MDH-2), and phosphoglucose isomerase(PGI) in three species showed strong evidence that *P. yedoensis* might be originated by hybridization between *P. subhirtella* and *P. donarium*.

緒 論

왕벚(*Prunus yedoensis* Matsumura)은 旺盛한 生育, 多花性, 華麗한 開花習性 등이 受賞의 對象이 되어 韓國, 日本을 爲始하여 여러 나라에서 栽植되고 있으나 그 起源이나 原產地에 關하여는 아직 論難이 많다.

1908년 Taquet에 의하여 처음으로 우리나라 濟州島 漢拏山에 왕벚이 自生하고 있음이 報告되었고 Koehne(1912)은 이를 *P. yedoensis* var. *nudiflora* Koehne라 命名하였다. 그후 中井(1916)도 漢拏山에 왕벚이 自生함을 報告하였고 小泉(1932)은 왕벚의 原產地는 濟州島 漢拏山이라고 結論지은바 있다. 竹中(1934)은 小泉가 濟州島 漢拏山에서 發見한 왕벚은 지금까지 日本에서 栽培하여 오던 왕벚과는 서로 다른 點이 있다고 主張하였고 그는 계속 왕벚의 起源을 研究하여(1959, 1962, 1963) 왕벚은 雜種에 의해 생겨났고 原產地는 日本의 伊豆일지도 示唆한바 있다.

한편 朴萬奎는 1950年代以來 數회에 걸쳐 漢拏山을

踏査하여 山中腹 數個處에서 왕벚이 自生함을 發見하였고 韓(1934, 1965)은 漢拏山 自生の 벚나무屬의 分布를 調査한 結果 山麓에서 中腹인 海拔 700~800m 附近까지에는 울벚(*P. subhirtella*)이 多數 自生해있고 山中腹에서 1,200m 附近까지에는 산벚(*P. donarium*)을 主로한 산벚系가 많고, 中腹에는 數個處에 왕벚이 點在해 있는 것을 發見하여 이 3種의 形態, 生態, 및 分布를 調査함으로써 왕벚은 울벚과 산벚系와의 種間 交雜에 의해 생겨났을 것이라 하였다.

近來에 이르러 生物의 進化나 遺傳學의 研究 또는 種 屬間 比較에 있어서 組織化學染色法과 더불어 澱粉-겔 電氣泳動法(Hunter and Markert, 1957)이 많이 利用되고 있다.

著者들은 이러한 電氣泳動法을 利用, 濟州島 漢拏山의 울벚, 왕벚, 산벚系의 種間 差異, 왕벚의 산벚과 울벚과의 雜種 眞否 등을 究明하고자 몇 가지 實驗을 하였던 바 그 結果의 一部를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1976年 4月 12日부터 4月 16日에 걸쳐 漢拿山에서 울벚, 왕벚 및 산벚의 花蕾와 葉芽를 採取하여 乾燥하지 않도록 비닐 주머니에 넣어 航空便으로 實驗室로 運搬하였다. 한편 서울 近郊에서도 栽培왕벚과 漢拿山 산벚계의 變種인 栽培산벚의 花蕾 및 葉芽를 採取, 漢拿山의 것 과 같이 實驗에 使用할 때까지 -40°C 에 保管하였다.

電氣泳動에 앞서 -40°C 로 얼은 材料를 녹인 다음 花蕾와 葉芽를 마르 眼科用 가위로 잘게 자른 후 glass grinder에 넣고 材料와 증류수의 비가 2:1로 증류수를 가하여 電氣 모터를 利用, glass grinder를 얼음 속에 유지하면서 1分정도 grind한 후 0°C 로 유지된 遠心分離機를 利用 13,000g 조건에서 30分間 遠心하였다. 遠心이 끝난 후 上澄液만을 採取하여 곧 電氣泳動 材料로 使用하거나 使用할 때까지 -40°C 에 보관하였다. 電氣泳動은 水平澱粉 겔 電氣泳動方法(horizontal gel electrophoresis)을 利用하였고 電氣泳動에 使用한 buffer의 種類나 酵素檢出에 使用된 染色方法은 Appendix에 表記하였다. 澱粉은 Lot 371(Otto Hiller, Madison, Wisconsin, U.S.A.)을 使用하였고 澱粉의 농도는 12.5% 하였다.

結 果

빛나무의 酵素作用은 部位와 時期에 따라서 큰 差異가 있다. 즉 葉芽에서는 3種에서 모두 酵素作用을 거의 찾아볼 수 없었고 花蕾에서는 酵素作用이 있었으나 開花直前의 것이 가장 強하였고, 完全히 開花된 것은 弱하고 어린 花蕾는 葉芽의 境遇와 같이 酵素作用이 검출되지 않았다.

漢拿山에 自生하는 벚꽃은 種에 따라 開花期가 各各 다른데 울벚이 제일 먼저 開花하고 다음이 왕벚이며 산벚계는 가장 늦게 開花한다. 採取한 材料中 울벚의 花蕾는 開花直前의 것이어서 여러가지 酵素作用을 찾아볼 수 있었으나 왕벚과 산벚은 花蕾가 너무 어려서 酵素作用을 볼 수 없었다. 한편 서울 近郊에서 採取한 栽培되고 있는 園藝品種인 왕벚과 산벚은 모두 開花直前의 適期의 것이어서 強한 酵素作用을 나타냈다. 이러한 理由로 本實驗에서는 結局 漢拿山의 울벚과 栽培되고 있는 왕벚과 산벚의 酵素를 比較하게 되었으며 漢拿山 自生의 왕벚과 산벚계의 酵素比較는 다음 機會로 미루는 수 밖에 없었다.

1. Esterase(ES)

LiOH 겔에서 陽極으로 移動하는 두개의 esterase

system(ES-1, ES-2)을 관찰할 수 있었다. ES-2는 울벚, 왕벚, 산벚, 全部에 있었고 移動度도 같았으나 ES-1은 栽培種인 왕벚에서만 관찰되었다.

2. Malate dehydrogenase(MDH)

Tris citrate겔에서 陽極으로 移動하는 두개의 MDH system(MDH-1, MDH-2)을 관찰할 수 있었다. MDH-1은 산벚에서만 관찰되었고 왕벚이나 울벚에서는 관찰되지 않았다. MDH-2는 울벚, 왕벚, 산벚 全部에서 관찰되었는데 그들의 移動度는 各各 달랐다. 즉 산벚은 移動度가 가장 느렸고 울벚은 이와 反對로 가장 빨랐으며 왕벚은 이 兩種의 雜種과 비슷한 形態를 나타내었다(Fig. 1-A).

3. Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT)

LiOH겔에서 GOT를 관찰하였으며 陽極으로 移動하는 두개의 GOT system(GOT-1, GOT-2) 중 GOT-1은 울벚, 왕벚, 산벚의 세 種에서 모두 同一한 移動度를 보여 주었으나 GOT-2에 있어서는 산벚에서 그 移動度가 가장 빨랐고 울벚이 가장 느렸으며 왕벚은 두種의 雜種 形態로 3개의 band를 보여 주었다(Fig.1-B).

4. Phosphoglucose isomerase(PGI)

Poulik겔에서 陽極으로 移動하는 한개의 PGI system을 관찰할 수 있었다. PGI의 移動度는 울벚에서 가장 빨랐고 산벚은 울벚보다 약간 느렸다. 그리고 왕벚은 單一 band가 아닌 세개의 band로 나타나고 있어 산벚과 울벚의 雜種과 비슷한 形態를 보여 주었다(Fig. 2-A).

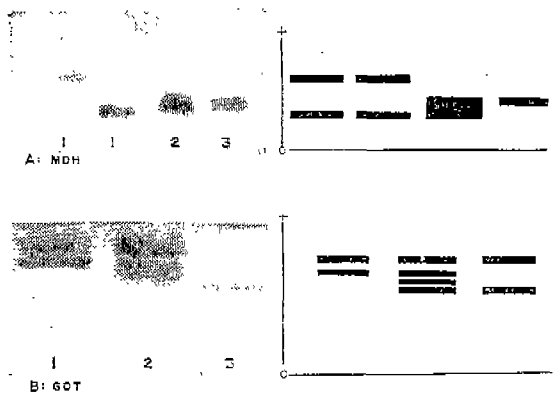


Fig. 1. Starch gel electrophoretic patterns(left) and diagrams(right) of MDH and GOT. 1, 2, and 3 indicate *P. donarium*, *P. yedoensis* and *P. subhirtella*, respectively. A: MDH-1(top) and MDH-2(bottom). B: GOT-1 (top) and GOT-2(bottom).

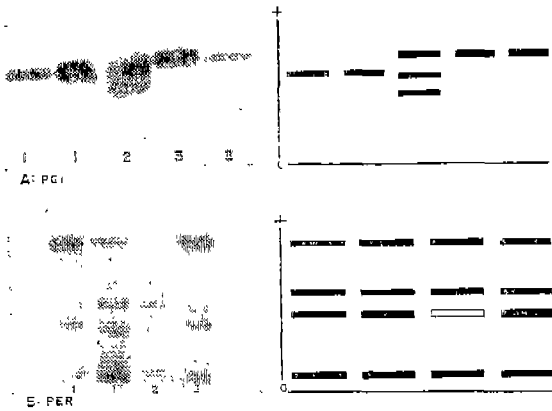


Fig. 2. Starch gel electrophoretic patterns(left) and diagrams(right) of PGI and PER. 1, 2, and 3 indicate *P. donarium*, *P. yedoensis* and *P. subhirtella*, respectively.

5. Peroxidase(PER)

Poulik겔에서 陽極으로 移動하는 네개의 system (PER-1, PER-2, PER-3, PER-4)을 관찰할 수 있었다. PER-1, PER-2, PER-4의 세 system은 울벳, 왕벳, 산벳에서 모두 同一하였고 PER-3은 산벳과 울벳에서만 있었고 왕벳에서는 나타나지 않았다 (Fig. 2-B).

6. Tetrazolium oxidase(TO)

Poulik겔에서 陽極으로 移動하는 한개의 TO system을 관찰할 수 있었으며 울벳, 왕벳, 산벳, 全部가 同一한 移動도를 가지고 있었다.

考 察

一般적으로 植物의 酵素作用은 動物에서 보다 弱하기 때문에 많은 種類의 酵素를 檢出하기 困難하다. 그러나 本 實驗에서 밝혀진 ES, MDH, PGI, GOT, PER 외에 PGM, IDH 等の 酵素蛋白質의 檢出이 可能한 點으로 보아 植物의 경우도 動物에서와 같이 蛋白質의 電気泳動方法을 利用하여 種間比較 또는 種의 起源을 追究할 수 있다 고 본다.

여러 種類의 酵素중 ES는 가장 복잡한 酵素의 하나로서 *Peromyscus*인 경우는 7個의 system이 있음이 報告되었으며 (Selander *et al.*, 1971) 도마뱀 種類에서는 3個의 system (Gorman and Kim, 1975; Kim *et al.*, 1976)이 報告된 바 있고 植物에서는 Schwartz (1962)가 보리의 ES를 研究한 바 있다. ES의 分子構成은 大部分이 monomer이나 dimer인 경우도 있다. 本 實驗에 使用된 벳 나무는 그 전부가 ES를 支配하는 遺

傳因子가 同型이었으며 따라서 單一 band만을 관찰할 수 있었다. 울벳과 산벳은 한개의 ES system을 가지고 있었으나 왕벳은 2개의 system을 가지고 있었다 그러나 本 實驗에서 관찰된 ES는 染色도가 극히 낮기 때문에 왕벳만이 2 system을 가지고 있으며, 울벳과 산벳은 한개의 system만을 가지고 있는지 또는 2개의 ES system을 가지고 있으나 染色도가 낮아 관찰되지 않았는지는 더 調査하여야 된다고 본다.

MDH는 GOT에서와 같이 細胞液에 溶解되어 있는 상태 (MDH-1)와 mitochondria에 附着되어 있는 상태 (MDH-2)의 두 種類가 있으며 (Christie and Judah, 1953) 이들 酵素에 遺傳的 差異가 있음은 사람의 赤血球에서 처음 報告되었다 (Davidson and Cortner, 1967). 벳나무의 MDH는 산벳에서만 MDH-1, MDH-2, 둘 다 관찰되었고 왕벳과 울벳에서는 MDH-2만이 관찰되었다. 왕벳과 울벳에서 MDH-1이 관찰되지 않은 것은 開花時期의 差異에 따른 酵素의 活性濃度 差異에서 起因하는 것이라 思料되며 遺傳的 差異는 아니라고 생각된다.

電氣泳動像에서 MDH-2의 移動도는 울벳이 가장 빨랐고 산벳이 가장 느렸다. 한편 왕벳은 이들의 中間位置에 자리 잡으며 GOT-2에서와 같이 왕벳이 울벳과 산벳의 雜種임을 보여 주었다.

GOT는 Boyd (1961)에 의하여 動物組織에서 報告되었으며 두개의 서브 분리된 형태 존재한다. 즉 하나는 細胞液속에 溶解되어 있는 상태 (GOT-1)로 있고 다른 것은 mitochondria에 附着되어 있는 상태 (GOT-2)로 있다. 이들 酵素는 動物이나 植物에 널리 分布되어 있으며 分子構成은 dimer이다. 따라서 GOT를 支配하는 因子가 同型인 경우는 한개의 band로 나타나지만 異型因子일 때는 3개의 band로 나타난다 (DeLorenzo and Ruddle, 1970).

벳나무에서도 動物에서와 같이 GOT-1, GOT-2를 모두 관찰할 수 있었으며 GOT-1은 울벳, 왕벳, 산벳, 모두가 單一 band로 同一한 移動도를 나타내어 서로 共通因子임을 알 수 있었다. 한편 GOT-2는 울벳 왕벳, 산벳이 각각 서로 다른 移動도를 보여 주었는데 즉 GOT-2의 移動도는 산벳에서 가장 빨랐으며 울벳에서 가장 느렸고 왕벳은 산벳과 울벳의 中間位置를 차지하고 있었으며 3개의 band로 구성되어 있었다. 이러한 事實은 왕벳이 산벳과 울벳의 雜種임을 證明하는 것이라 思料되지만 本 實驗에서는 漢拿山에 自生하는 산벳과 울벳에서는 酵素를 관찰하지 못하여 좀더 研究되어야 한다고 생각된다.

Phosphohexose isomerase (PHI)로서도 알려진 PGI

는 사람의 血色素에서 처음 관찰되었으며 다른 酵素에서와 마찬가지로 遺傳的 變異가 있음이 報告되었다 (Detter et al., 1968). PGI의 分子構成은 dimer로서 역시 同型因子인 경우는 한개의 band로 나타나게 되지만 異型因子가 서로 만날 때는 3개의 band로 나타난다. 넋나무에 있어서는 한개의 PGI system이 관찰되었으며 울벚이 電氣泳動의 移動도가 가장 빨랐고 산벚은 울벚보다 약간 느린 移動도를 보여 주었으며 왕벚은 大體로 이들 두 PGI band의 中間 位置에 속하며 3개의 band를 보여 주었으나 3개의 band 중 제일 아랫 부위에 속하는 것이 그 移動도가 제일 느린 산벚의 band와 일치하지는 않았는데 이는 울벚과 산벚에서 PGI를 支配하는 因子가 合하여질때 생기는 PGI의 특이성이라 생각되나 더욱 追究하여야 된다고 본다.

한편 PER인 경우 PER-1, PER-2, PER-3, PER-4, 4개의 system이 관찰되었으나 울벚, 왕벚 산벚 사이에 種間 差異는 없었다. 단지 왕벚에서는 PER-3이 관찰되지 않은 점이 다르다 하겠다. 그러나 왕벚에서는 PER-1도 弱하게 染色된 것으로 보아 PER-3이 관찰되지 않은 것은 遺傳的인 것이 아니라 酵素의 活性이 弱하기 때문이라 생각된다.

Indophenol oxidase (IPO)라고도 불리워지고 있는 TO는 動物에서나 植物 모두에서 흔히 관찰되는 酵素이며 Brewer(1967)에 의하여 처음으로 遺傳的인 研究가 이루어졌다. 韓 등(1975)은 남해 種類에서 5개의 TO system을 관찰 報告한바 있는데 넋나무에서는 한개의 TO system만을 관찰할 수 있었고 種間 差異는 없었다.

지금까지 論議한 바와같이 ES, GOT, MDH, PGI, PER, TO 등의 酵素性 蛋白質을 支配하는 12개의 因子座중 9개의 因子座가 울벚, 왕벚, 산벚 사이에 共通이었으며 3개의 因子座는 세 種間에 뚜렷한 差異가 있었다. 따라서 이들 세 種間的 遺傳的 類似性은 大體로 75%라 할 수 있다. 무엇보다도 重要한 事實은 왕벚에서 관찰된 MDH-2, GOT-2, PGI 등의 酵素가 울벚과 산벚의 雜種型이라는 점이다. 이러한 여러가지 事實로 미루어보아 왕벚은 울벚과 산벚 사이에서 생긴 種間雜種이라 할 수 있겠으나, 開花期의 差異로 因해 直接 漢拿山自生の 왕벚과 산벚을 材料로 檢討하지 못한 것이 遺憾스럽다. 今後 漢拿山自生の 울벚, 왕벚, 산벚 및 栽培왕벚의 酵素를 比較함으로써 栽培왕벚의 起源과 由來가 容易하게 究明될 수도 있으리라 고 기대한다.

摘 要

세가지 種類的 buffer를 使用한 電氣泳動方法을 利用하여 野生の 울벚(*P. subhirtella*)과 栽培品種인 왕벚(*P. yedoensis*) 및 산벚(*P. donarium*)의 電氣泳動型을 서로 比較하였는데 마 Glutamate oxaloacetate transaminase-2(GOT-2), Malate dehydrogenase-2(MDH-2), Phosphoglucose isomerase(PGI) 등은 왕벚이 울벚과 산벚 사이에서 만들어진 種間雜種임을 强하게 暗示하였다.

參 考 文 獻

- Boyd, J. W. 1961. The intracellular distribution, latency and electrophoretic mobility of L-glutamate oxaloacetate transaminase from rat liver. *Biochem. J.* 81: 434.
- Brewer, G. J. 1967. Achromatic regions of the tetrazolium stained starch gels: inherited electrophoretic variation. *Am. J. Hum. Genet.* 19: 674.
- Christie, G. S. and J. D. Judah. 1953. Intracellular distribution of enzymes. *Proc. R. Soc. Biol.* 141: 420.
- Davidson, R. G. and J. A. Cortner. 1976. Mitochondrial malate dehydrogenase: A new genetic polymorphism in man. *Science* 157: 1569.
- DeLorenzo, R. J. and F. H. Ruddle. 1970. Glutamate oxalate transaminase(GOT) genetics in *Mus musculus*, polymorphism, and phenotypes of the GOT-2 and GOT-1 loci. *Biochem Genet.* 4: 259-274.
- Detter, J. C., P. O. Ways, E. R. Giblett, M. A. Baughan, D. A. Hopkinson, S. Povey, and H. Harris. 1968. Inherited variations in human phosphohexose isomerase. *Ann. Hum. Genet., Lond.* 31: 329-338.
- Gorman, G. C. and Y. J. Kim. 1975. Genetic variation and genetic distance among populations of *Anolis* lizards on two lesser Antillean island banks. *Syst. Zool.* 24: 369-373.
- Harn, C. 1964. *Prunus yedoensis* and its putative parent in Mt. Hanla. *Kor. J. Bot.* 7(2): 14-16.
- _____. 1965. Wild *Prunus yedoensis* and its putative parent in Mt. Hanla(II). *Ibid.* 7(1-2): 11-18.
- _____, C.Y. Sohn, and Y. J. Kim. 1975. Studies on the electrophoretic variation in tetrazolium oxidase isozyme of *Nicotiana* species. *Ibid.* 18: 150-154.
- Hunter, R. L. and C. L. Markert. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125: 1294-1295.
- Kim, Y. J., G. C. Gorman, T. Papenfuss, and A. K. Boychoudhury. 1976. Genetic relationships and genetic variation in the amphibaenian genus *Bipes*. *Copeia* 1: 120-124.
- 中井 猛之進. 1916. 朝鮮森林植物 第5輯.
- 朴萬奎. 1950: Personal communication.
- Selander, R. K., M. H. Smith, S. Y. Yang, W. E. Johnson, and J. B. Gentry. 1971. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. 1. Variation in the old-field mouse (*Peromyscus polionotus*). *Studies*

in Genetics IV. p. 49-90.

竹中要. 1959. 梁井吉野の起源, 遺傳 12(4): 47.

_____. 1962. サクラの研究. 植物學雜誌 75: 278-287.

Takenaka, Y. 1963. The origin of the Yoshino cherry tree. *Jour. Hered.* 54: 207.

(1976년 11월 23일 접수)

APPENDIX

Electrophoretic Buffer Systems

1. Lithium hydroxide

Electrode: Stock solution A

Gel : 1 : 9 mixture of stock solution A and B. Stock solution A : 0.03 M lithium hydroxide -0.19M boric acid, pH 8.1 (=1.20g monohydrate lithium hydroxide and 11.89g boric acid dilute to 1 l H₂O) Stock solution B : 0.05M tris-0.008M citric acid, pH 8.4 (6.2g tris and 1.6g monohydrate citric acid dilute to 1 l H₂O). Potential : 350 V for 3hrs or until borate buffer line reaches anodal sponge.

2. Discontinuous tris-citrate (Poulik)

Electrode : 0.3M borate, pH 8.2 (=18.55g boric acid and 2.40g sodium hydroxide to 1 l H₂O).

Gel : 0.076M tris-0.005M citric acid, pH 8.7 (=9.21g tris and 1.05g monohydrate citric acid dilute to 1 l H₂O). Potential : 250V for 3hrs or until borate buffer line reaches anodal sponge.

3. Continuous tris-citrate

Electrode : 0.687 M tris -0.157M citric acid, pH 8.0 (=83.2g tris and 30.3g monohydrate citric acid dilute 1 l H₂O).

Gel : 22.89mM tris-5.22M citric acid pH 8.0 (=2.77g tris and 1.10g monohydrate citric acid dilute to 1 l H₂O). Potential : 100V for 4hrs.

Protein Stains

Proteins demonstrated with the following stains migrate anodally except as noted. The following

abbreviations are used in descriptions of stains: NAD= β -diphosphopyridine; nucleotide; NADP= α -diphosphopyridine nucleotide; NBT=nitro blue tetrazolium; and PMS=phenazine methosulfate. During staining, slices of gel are incubated at 37°C, unless otherwise noted. Following staining, gel slices are fixed in a 1 : 5 : 5 mixture of acetic acid, methanol, and water.

1. Esterase (ES) : 4ml sodium phosphate buffer (stock solution : 1 : 1 mixture of 0.1M monobasic sodium phosphate, pH 4.4, and 0.1M dibasic sodium phosphate, pH 8.7, 1ml of a solution of 1g α -naphthyl propionate or a β -naphthyl butyrate in 100ml acetone, 25mg Fast Blue RR salt, and 45ml of water. Stain solution should be prepared immediately before using. Incubate 2 to 10 min at room temperature.

2. Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) : 50ml 0.2M tris-hydrochloric acid buffer (pH 8.0), 0.5mg pyridoxal-5'-phosphate, 200mg L-aspartic acid, 100mg α -ketoglutaric, and 150mg Fast Blue BB. Prepare stain just before using. Incubate for 10 to 15 min

3. Malate dehydrogenase (MDH) : 30ml 0.2M tris-hydrochloric acid buffer (pH 8.0), 5ml 2.0M malate, 10mg NAD, 20mg NBT, and 5mg PMS. Incubate for 20 to 30 min.

4. Phosphoglucose isomerase (PGI) : 30ml 0.2M tris hydrochloric acid buffer (pH 8.0), 10ml of 0.1M magnesium chloride, 4ml 0.018M disodium D-fructose-6-phosphate, 2ml glucose-6-phosphate dehydrogenase (10units/ml water), 10mg NADP, 20mg MTT, and 10mg PMS. Incubate 5 to 10 min.

5. Peroxidase (Per) : 50ml water, 2.5ml 0.05M Na-acetate (pH 5.0), 25mg 3-amino-9-ethylcarbazole. 1.3ml dimethyl formamide, 1ml 0.1M CaCl₂, and 0.3ml 3% H₂O₂. Incubate for 10 to 30min.