

RAPD 標識者 分析에 의한 사시나무屬 *Leuce*節 포풀러의 類緣關係^{1*}

洪廣洛^{2,3} · 玄正悟² · 洪鎔杓³

Genetic Relationships among the Poplars of Section *Leuce*(Genus *Populus*) revealed by RAPD Marker Analysis^{1*}

Kyung-nak Hong^{2,3}, Jung Oh Hyun² and Yong Pyo Hong³

要 約

사시나무屬(Genus *Populus*) *Leuce*절 수종중 우리나라에 식재되어 있는 사시나무, 수원사시나무, 은백양, 은사시나무와 인공교배종 수개 클론에 대한 분자유전학적 유연관계를 RAPD PCR 방법을 이용하여 구명하였다.

88개의 arbitrary primer중 재현성과 다형성을 기준으로 선발하고, 유연관계분석을 위하여 22개의 primer에서 181개의 RAPD marker를 이용하였다. 유연관계를 위한 조사는 5개 수종, 14개 클론 및 천연집단의 개체목에 대하여 181개의 다형성 RAPD marker를 가지고, UPGMA와 Neighbor-joining 방법으로 유연관계도를 구했다. 방법을 달리하여 그린 유연관계도에서 각각의 분지에서의 차이는 현 사시 클론간에 미미한 위치변화만 있을 뿐 전체적인 계통수에는 변화가 없었다. 유연관계도에서 수원사시나무는 은백양과 같은 분지군을 형성하였고, 주성분분석에서는 사시나무와 같은 계열을 이루고 있어서 수원사시나무는 이 들 두 종의 1대 교잡종으로 추정되며, 은사시나무는 자연교잡종과 인공교배종이 동일한 유전적 배경을 갖는 것으로 나타났다.

ABSTRACT

Genetic relationships of some poplars in the section *Leuce*, including 5 species and 11 clones of *Populus alba* × *glandulosa*, were investigated on the basis of RAPD marker analysis. Twenty-two of the 88 arbitrary 10-mer primers, showed reproducible amplification in the preliminary experiment with 6 samples, were used for PCR and generated a total of 181 RAPD markers. Genetic relationships among the analyzed samples were tested by two phenetic methods of the UPGMA and the neighbor-joining, which revealed the close genetic relationship between *P. glandulosa* and *P. alba*. And the close genetic relationship between *P. glandulosa* and *P. davidiana* was ascertained by the principal component analysis. Based on the observation of the close genetic relationship between them, it was deduced that *P. glandulosa* might be originated by the saltational speciation caused by the hybridization between *P. alba* and *P. davidiana* in nature.

Key words : *Populus*, genetic relationship, RAPD PCR, Principal Component Analysis

¹ 接受 1997年 11月 10日 Received on November 10, 1997.

² 서울대학교 산림자원학과 Department of Forest Resources, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea.

³ 임목육종연구소 유전생리과 Forest Genetics Research Institute, Suwon 441-350, Korea.

* 본 연구는 1995년도 한국과학재단 특정연구과제(과제번호 : 94-0402-06-01-2) 연구비 지원에 의하여 이루어진 것임.

緒 論

포플러類는 미국, 캐나다, 멕시코, 유럽, 아프리카 북부 및 아시아 여러 지역에 넓게 분포하는 데(FAO, 1980), 교배가 쉽고, 全形成能力이 높으며, 물질생산력이 뛰어나고, genome 구조도 비교적 간단한 수종이라서 오래 전부터 임목육종과 유전공학에서 주요 대상으로 취급되고 있다(Bradshaw와 Stettler, 1995). 우리나라에서는 포플러류에 관한 다양한 육종학적 연구가 시행되었으나, 그 유전적 배경이 되는 種間의 유연관계 확립이나 在來種의 遺傳子 紹源(gene pool)에 대한 조사는 미흡한 실정이다(노의래, 1989)

사시나무屬(Genus *Populus*)은 대개 6節(Section)로 분류되고, 6節 중에서 2節은 灌木性이며, 나머지 4개 節은 林業과 造景에 관계가 있는 林木이다(FAO, 1980). 우리나라에서 자라고 있는 *Leuce*節 포플러는 사시나무(*Populus davidiana* Dode), 은백양(*P. alba* Linn.), 수원사시나무(*P. glandulosa* Uyeki), 은사시나무(*P. tomentiglandulosa* T. Lee) 등이 있는데, 은사시나무는 1954년 이창복에 의해 처음 보고되었으며(이창복, 1955), 이창복(1987)은 은사시나무의 雜種分離形을 수원사시나무로 추정하였다. 1960년대에 현신규는 수원사시나무와 은백양을 인공교배하여 은수원사시나무 혹은 혼사시나무(*P. alba* × *glandulosa*)라 불렀다. 한편 中國에는 생장이 빠르고 내성이 강한 *Leuce*절의 *P. tomentosa* Carr.의 母樹의 기원에 대하여 은백양과 사시나무 혹은 *P. adenopoda*나 *P. hopeiensis* 등으로 분분한 의견이 있는데(Zhang 등, 1995), 이러한 유연관계의 異見은 포플러類가 다른 수종에 비하여 雜種現象이 쉽게 나타나기 때문일 것이다(Willing과 Pryor, 1976; Ellstrand 등, 1996).

*Leuce*절 포플러는 種間은 물론 節間 교배도 매우 용이하여, 1954년부터 導入 및 交雜育種이 본격화되었다(노의래와 김영모, 1980; 손두식, 1982). 김정석과 정상배(1974)는 isoperoxidase를 분석하여 우리나라에 퍼져있는 은백양과 수원사시나무가 각각 4개의 클론이라고 했지만, 이러한 결과는 Bhattacharya 등(1975)이 *P. nigra*의 isoperoxidase 연구에서 발생단계에 따른 band 양상의 변이를 보인다는 보고 등으로 미루어 실험계획상 오류로 생각된다(Scandalios, 1974). 더구나 손

두식과 주성현(1985)는 GOT, MDH, ADH, ACP의 4가지 동위효소분석에서 수원사시나무와 은백양(토착종 및 도입종)의 클론간 차이를 관찰할 수 없었으며, 단지 토착종과 도입종 은백양간에서만 ACP의 변이를 발견하였다. 따라서 우리나라에 존재하는 수원사시나무와 은백양(토착종)은 각기 한 개체 또는 동일 클론에서 번식한 것으로 추정하였으며, 교배에 의한 次代의 형질특성에서도 교배조합간 차이가 없어서 혼사시나무 클론들이 동일한 유전형질을 갖고 있는 것으로 판단하였다(현신규 등, 1967). 한편 사시나무屬 수종과 클론들에 대한 분석에서는 Hyun과 Hyun(1985)이 國內外에 분포하는 *Leuce*절에 속하는 49개 종에 대하여 품종구별과 命名을 위한 80개의 外形基準을 보고하였으며, 김정석과 김삼식(1979)은 현사시 1호의 15개 클론에 대한 유관속 배열에 따라서 5가지 型으로 나누었다. 또한 Hyun과 Hyun(1993)은 119개 포플러 클론에 대하여 4가지 동위효소로 분석한 결과 115개 클론을 분별하고, MDH의 발생단계별 변이를 보고하였다. 그러나 위와 같은 연구에도 불구하고 수원사시나무의 起源 및 천연교잡종과 인공교배종에 대한 분류학적 관계는 여전히 논란거리로 남아있다(이창복, 1987; 김삼식 등, 1981).

Williams 등(1990)과 Welsh와 McClelland(1990)가 입의의 짧은 primer를 이용하여 종간의 구별을 할 수 있는 RAPD(randomly amplified polymorphic DNA 혹은 arbitrarily primed PCR; AP-PCR)를 동시에 발표한 以來, RAPD는 거의 무한대의 nearly-neutral marker를 생산하는 방법으로 種間 유연관계분석에 유용한 도구가 되었다(Hoey 등, 1996; Millan 등, 1996). 강낭콩(*Lens*; Abo-elwafa 등, 1995)이나 *Allium sativum*(Maaβ 와 Klass, 1995)의 종내 변이를 추정한 결과, 동위효소가 전세계의 광범위한 지역에서 대량적인 품종 구별만을 할 수 있는 반면에 RAPD 결과는 국소지역의 변이도 확인할 수 있었고, Yamagishi(1995)는 백합科의 節間 구별에 RAPD를 성공적으로 이용하였다. 이러한 개체간 변이와 개체내 변이, 즉 체세포변이(somatic variation)의 확인까지 RAPD로 가능하다고 보고하여(Jacobson 등, 1993; Ionov 등, 1993; Taylor 등, 1995), RAPD가 세분화된 분류에 유용한 방법론임을 증명하였다.

임목에 있어서 RAPD PCR 방법의 이용은 아

라비아地方에서 향나무屬의 전파경로를 밝히는데 사용되었고(Adams 等, 1993), European white birch(*Betula pendula*)의 次代를 pooling하여 家系를 구분할 수 있었다(Akerman 等, 1995). Perron 等(1995)은 가문비나무屬 교잡종의 유연 관계를 실시하였으며, *Ribes nigrum*의 21개 품종을 대상으로 한 연구에서는 54개 RAPD marker를 이용하여 품종 구분이 이루어졌다(Lanham 等, 1995).

본 연구는 기존의 형태적 특성을 이용한 분류나 동위효소를 이용한 분류에서 종간 식별이 어렵고, 그 분류체계에 있어서 분분한 논란이 있어 온 사시나무속 *Leuce*절의 5개 수종 및 현사시나무 11개 클론에 대하여 RAPD marker를 이용하여 분자유전학적 유연관계를 정립하는데 있다.

材料 및 方法

1. 공시재료

사시나무속 *Leuce*절의 유연관계 구명을 위하여 19개의 개체목을 선정하여, 잎을 채취하였다. Ingroup으로 은백양, 수원사시나무, 은백양과 사

시나무의 천연교잡종으로 알려진 은사시나무를 각 1개체목, 인공교배종 현사시나무 11개 클론 및 계방산, 가리왕산, 월악산 지역의 사시나무를 각 1개체목씩, 중국 북경에 식재되어있는 *Populus tomentosa* 1개체를 선정하였다. 대상 개체목의 선정은 검색표를 이용하여 형태적으로 뚜렷한 特성을 나타내는 개체를 선별하였으며(이창복, 1987), 은사시나무의 경우는 현사시나무와 형태적으로 구별할 수가 없어서, 명명자(이창복)가 지정한 type species의 자손묘로 식재 사실이 확실한 서울대 수원캠퍼스 수의대본관 앞의 개체를 선정하였다. Outgroup은 같은 버드나무속에 속하는 버드나무屬의 능수버드나무(*Salix pseudolasioxyne* Linn.)를 선정하였다. 각 共試木에 대한 정보는 Table 1과 같다

2. RAPD(Randomly amplified polymorphic DNAs) PCR 분석

Edwards 等(1991)의 total DNA 추출방법을 일부 변경하여 total DNA를 분리하였다. 채집된 잎을 표면세척하고, 연마제(alumina desiccant)와 액체질소를 넣어 곱게 마쇄하였다. 시료분말을

Table 1. The information of nineteen samples for this analysis

Genus(Section)	Species name	Clone(or ID) number	Location
<i>Populus</i> (<i>Leuce</i>)	<i>P. alba</i> Linn.		Coll. of Agri. Seoul Natl' Univ., Suwon
	<i>P. glandulosa</i> Uyeki		
	<i>P. tomentiglandulosa</i> T.Lee		
	<i>P. davidiana</i> Dode	(1)	Kariwangsan
		(2)	Keibangsan
		(3)	Woraksan
	<i>P. tomentosa</i> Carr.		Beijing, China
	<i>P. alba</i> × <i>glandulosa</i>	64-6-44	Scion Garden for Poplars, Forest Genetics Research Institute, Suwon
		65-22-11	
		66-25-5	
		67-6-3	
		72-4	
		72-12	
		72-23	
		(3) Pochun30	
		72-16	
		72-30	
		72-31	
<i>Salix</i>	<i>S. pseudolasioxyne</i> Linn.		Coll. of Agri. Seoul Natl' Univ., Suwon

1.5ml Eppendorf tube에 넣고, DNA extraction buffer(100mM Tris-HCl, pH7.5, 100mM NaCl, 50mM EDTA, 1% SDS, 10mM mercaptoethanol, 0.1% PVP(MW360,000))와 5mM potassium acetate를 첨가하여 65°C에서 30분간 중탕한 후에 4°C에서 10분간 정적하였다. 15,000xg(한일과학社 Mega 17R)에서 원심분리후 상등액을 분리하고, 1.2배의 chloroform : isoamylalcohol (24 : 1 v/v)용액을 첨가하여 잘 섞어준 다음에 15,000xg에서 원심분리하였다. 상등액에 10M ammonium acetate와 cold isopropanol을 첨가하여 냉동 정적했다. 원심분리하여 DNA pellet을 얻은 후 RNAase 처리하고 chloroform 추출과정과 isopropanol의 pelleting을 실시하였다. 멸균 수에 녹여 260nm 파장에서 농도를 계산했다.

RAPD PCR은 25μl의 반응용액에 1Unit *Taq* DNA polymerase, 1.5mM MgCl₂, 200μM dNTPs, 40ng primer, 50ng template DNA, 0.025% BSA(bovin serum albumin), 50mM KCl, 10mM Tris · HCl(pH 8.3)에서 실시하였다(김용율, 1995). 사용된 PCR thermal cycler(대한메디칼社 FTC2000)는 glass-capillary tube를 이용하는 air-flower 방식으로, PCR cycle은 36°C/60초, 72°C/70초, 93°C/5초의 과정을 45회 반복 후 72°C/5분간 최종 extension 시켰다(ramp time은 1°C/0.2초). 2% agarose gel에서 육안으로 확인되는 RAPD marker가 존재하는 경우를 "1", 나타나지 않는 경우를 "0"으로 표시하였다. Primer screen에 사용된 arbitrary primer는 캐나다 UBC Biotechnology Laboratory의 Oligonucleotide Set #6(UBC601-UBC700)중 63개와 서울대 기초과학교육연구공동기기원에 주문 제작한 25개의 FOR series(FOR1-FOR25) primer를 사용하였다(부록 1). primer에 대한 재현성은 primer당 동일한 template DNA를 이용하여 3반복 씩 실험을 하였다. RAPD PCR 방법은 크기가 작은 band의 종족에서는 종종 재현성이 나빠짐으로(Yu와 Pauls, 1993), RAPD band의 scoring은 500bp 이상에서 증폭된 band만을 분석에 포함시켰다.

3. 資料의 分析

사시나무속 *Leuce*절 19개 시료에 대한 RAPD 자료의 분석은 Czekanowski(Czekanowski, 1913)와 simple matching(Apostol 等, 1993), Jaccard

(1901)의 유사도를 구하고, Nei(Nei와 Li, 1979)의 유전적 거리(genetic distance)로 바꾸었다. PHYLIP(ver 3.5c ; Felsenstein, 1993)과 REST-SITE(ver 1.2 ; Miller, 1994) package를 이용하여 Neighbor-Joining Tree와 UPGMA(unweighted pair-group method using arithmetic average)로 유연관계도를 작성하고, SAS/STAT program을 이용하여 주성분분석을 수행하였다.

結果 및 考察

1. 사시나무屬 *Leuce*節의 分자유전학적 유연 관계

유연관계 분석을 위한 UPGMA와 NJT 작성에는 simple matching 방법에 의해 계산된 유전적 거리(genetic distance)를 이용하였다. Jaccard 방법이나 Czekanowski distance 방법을 사용한 결과의 유연관계도는 simple matching 방법에 근거해서 재구성된 유연관계도와 유사한 分枝 양상을 보였으며, 이들 방법간에 유의한 차이는 없었다(홍경낙, 1997). RAPD 자료에 근거한 유연관계 결과 사시나무속 *Leuce*절에서 은사시나무는 인공교배종인 현사시나무와 같은 分枝群(clade)을 형성하여(bootstrap 신뢰도 97%) 이들이 동일한 조상으로부터 유래되었음을 추정할 수 있었으며, 母樹 은백양과 花粉樹 수원사시나무의 자연 교잡종으로 추정할 수 있었다(Fig. 1). NJT에서도 두 양친수의 중간정도의 유전적 분화를 보여주고 있다(Fig. 2). 이창복(1987)은 사시나무와 은백양의 자연교잡으로 은사시나무가 나오고, 수원사시나무는 은사시나무의 近緣分離種으로 취급하였으나, RAPD 결과에 의해 작성된 UPGMA 유연관계도에서는 수원사시나무와 은백양과 각각 다른 분지군에 속하고 있는 것을 확인할 수 있었으며, NJT 유연관계도에서는 은사시나무보다 수원사시나무의 유전적 분화정도가 더 심한 것으로 나타났다.

따라서 유연관계도 해석과 造林地에서의 既存 관찰(이창복, 1987)을 감안하면 사시나무와 은백양의 교잡으로 수원사시나무가 생성되고, 은백양과 수원사시나무의 戻交雜(backcross)으로 은사시나무가 나온 것으로 추정된다. 이러한 假定은 은백양이 1910年代에 도입되었다는 것과 은사시나무의 成木이 1954년에 보고되었다는 점, 그리고 사시나무속의 평균성숙기간이 10~20년이면 충분

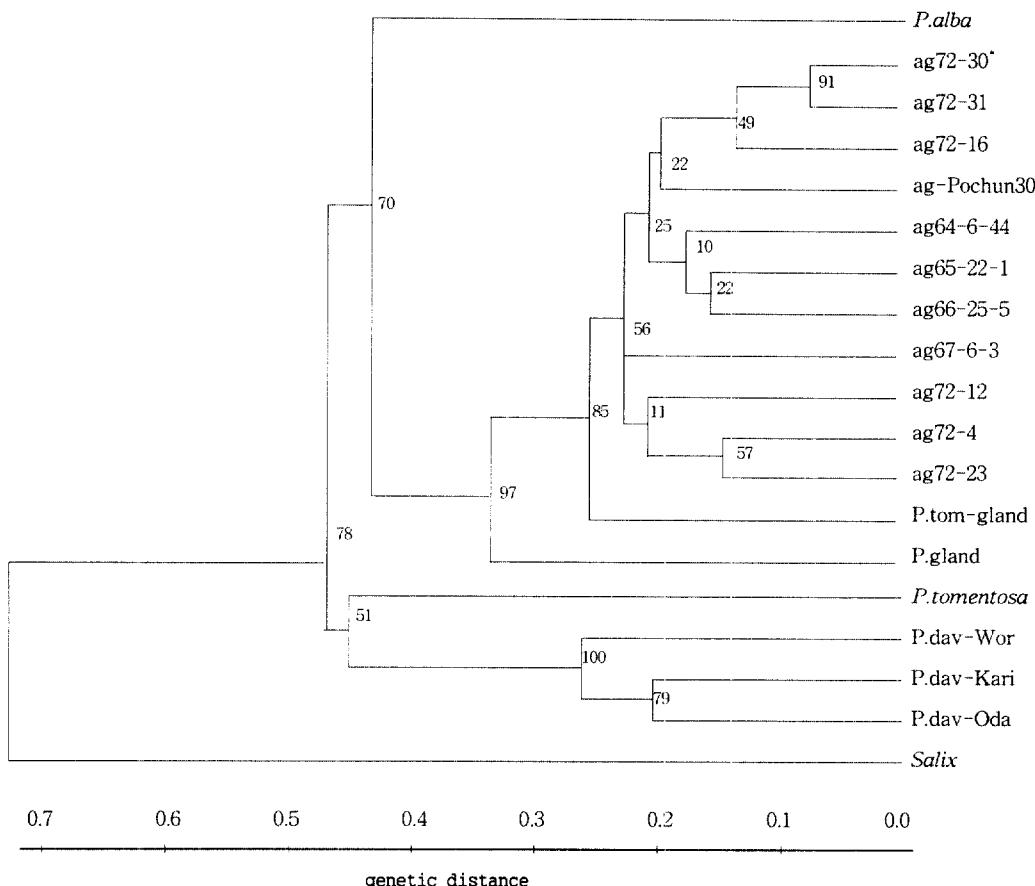


Fig. 1. UPGMA tree of section *Leuce* based on simple-matching distance.

The values, the bootstrap confidence interval, on the nodes are the results of bootstrap search (the percentage of 100 replications).

* ag- and the numerics : *Populus alba* × *glandulosa* and its clone number

P.tom-gland : *P. tomentiglandulosa*

P.gland : *P. glandulosa*

P.dav- and followed characters : *P. davidiana* and its ID number

Salix : *Salix pseudolasioxyne*

하다는 점으로 미루어 타당한 추정이라 생각된다. 卽 초기에 우리나라에 들어온 은백양이 成木이 되어 自生 사시나무와 교잡하여 수원사시나무를 만들고, 이 교잡종 수원사시나무가 다시 성장하여 은백양과 여교잡을 하고 은사시나무를 만들었다는 추정이다. 또한 이러한 추정은 '(현사시나무의) 造林地 근방에서는 은사시나무, 수원사시나무, 사시나무 등이 같이 자라고… 사시나무 같지만 夏茅枝에서 소위 수원사시나무 같은 형태가 많이 나타난다(이창복, 1987)'는 記述에도 부합된다.

中國산 *Populus tomentosa*는 은백양類와 사시

나무間의 자연교잡종으로 여겨지고 있는데(Zhang 等, 1995), UPGMA에서는 사시나무와 밀접한 유연관계를 보였으며(Fig. 1), NJT에서는 사시나무와 은백양의 중간정도에 해당하는 유전적 분화상태를 보여주었다(Fig. 2). 그러나 은사시나무나 인공교배종인 현사시나무가 모수인 은백양의 영향을 많이 받는 것으로 나타난데 비하여, *P. tomentosa*는 이들보다 화분수인 사시나무의 영향이 많은 것으로 나타났다.

이것은 은사시나무와 *P. tomentosa*의 양친수로 추정되는 은백양이나 사시나무의 금원이 다른

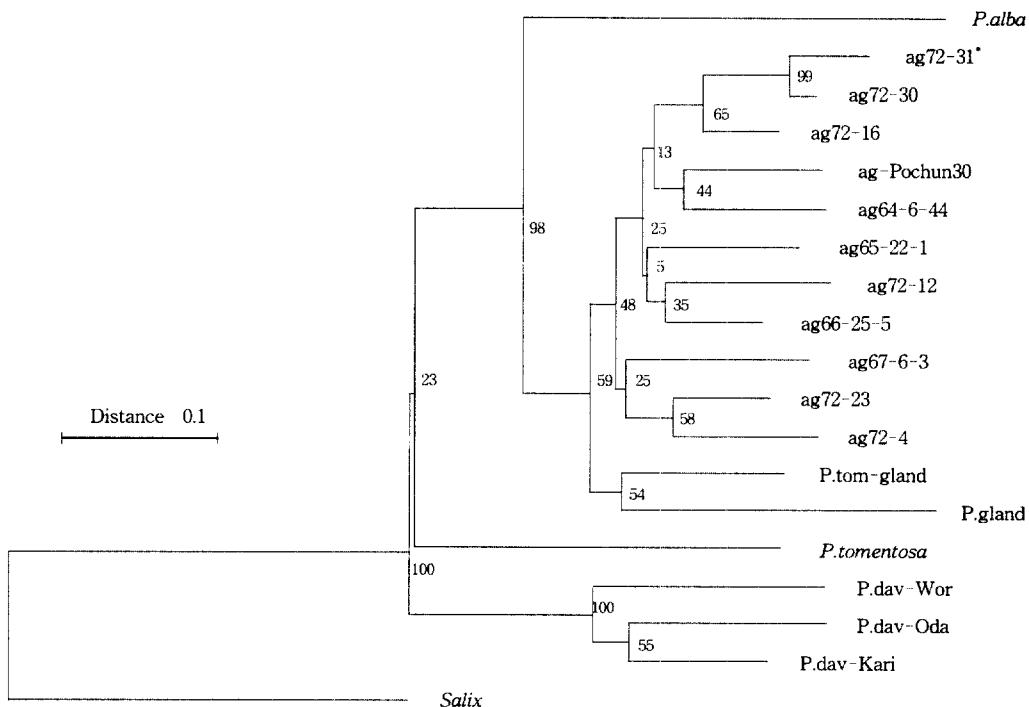


Fig. 2. Neighbor-joining tree of section *Leuce* based on simple-matching distance. The values, the bootstrap confidence interval, on the nodes are the results of bootstrap search(the percentage of 100 replications).

* The characters are as described in Fig. 1.

Table 2. Eigenvalues of the correlation matrix from principal component analysis using 19 samples with 181 RAPD markers (PRIN : Principal component)

PRIN*	Eigenvalue	Difference	Proportion	Cumulative
PRIN1	10.5751	8.53595	0.556584	0.556584
PRIN2	2.0391	1.00294	0.107323	0.663907
PRIN3	1.0362	0.14501	0.054537	0.718444
PRIN4	0.8912	0.21524	0.046905	0.765349
PRIN5	0.6760	.	0.035577	0.800925

유전적 배경을 갖고 있으며, 특히 *P. tomentosa*의 母樹의 起源에 대해서는 은백양(*P. alba*; Zhang 等, 1995)으로 추정하는 이외에도 은백양에 *P. adenopoda*(Bialobok, 1964; Bai와 Ma, 1990) 혹은 *P. hopeiensis*(Zhao, 1987) 등의 유전 인자가 섞인 잡종 은백양 또는 新疆楊(*P. alba* L. var. *pyramidalis*; Zhang 等, 1995) 등의 異見이 있을 정도로 은백양의 유전자 금원이 다양하기 때문일 것이다.

2. 主成分分析(principal component analysis)

사시나무속 *Leuce*절에서 22개 primer 181개

RAPD marker를 대상으로 유연관계 결정에 영향을 미치는 primer 및 RAPD marker를 구분하고, 각 수종 및 클론간의 유사성을 판단하는 기준을 마련하기 위하여 주성분분석(principal component analysis)을 실시하였다(Broschat, 1979).

토플리류 19개의 자료(樹種 및 클론)에 대한 주성분분석에서 제1주성분과 제2주성분이 種 구분에서 66.4%의 설명력을 가졌으며, 상위 5개의 주성분이 전체 변이의 80% 이상을 설명하였다(Table 2). 제1주성분과 제2주성분의 座標(plotting)에서 수원사시나무가 제1사면에 *P. tomentosa*와 사시나무 等과 함께 분포하여 사시나무의

영향을 받고 있음을 보여주었으며, 은사시나무와 인공교배종 혼사시나무 클론들은 群生하고 있어서 분포양상이 유연관계도와 일치한다(Fig. 3). 그러나 19개의 자료(樹種 및 클론)중에 비슷한 RAPD marker 양상을 보이는 11개의 인공교배종(혼사시나무 클론)이 분석자료에 포함되어 있어서 제1주성분과 제2주성분의 결과에서는 혼사시나무 클론간의 구분이 어려웠고, 제3주성분과 제4주성분에서 혼사시 클론 간의 구분이 비교적 용이했다.

181개의 RAPD marker중 종간 구분의 정보 기여도가 높은 band를 선별하기 위하여 181개 자료(RAPD marker)에 대한 요인분석(factor analy-

sis)을 실시하였다. RAPD marker에 관한 주성분의 설명력은 상위 5개까지 74.7%의 설명력을 가졌으나, 11개 혼사시나무 클론의 기여에 의하여 제1주성분과 제2주성분의 설명력은 비교적 낮게 나타났다(Table 3). 그러나 분포양상은 각 사면에 고르게 분포하고 있으므로(Fig. 4), 몇 개의 RAPD marker를 추려서 수종에 관한 주성분분석을 다시 실시한다면 정보량의 큰 손실없이 기여도가 높은 RAPD marker를 선별할 수 있을 것이다. 본 연구에서 RAPD 결과는 나타나는 band(present = "1")를 기준으로 자료를 정리한 것이므로 eigenvector가 陽數로 커질수록 정보량이 많은 primer나 RAPD marker의 선발에 유의한 것이 될 수 있기 때문에(Iezzoni와 Pratts 1991), 181개 band중에서 제1주성분과 제2주성분에서 각각 상위 10%(18위)에 해당하는 eigenvector 값을 갖는 RAPD marker를 선별해서, 37개의 RAPD marker를 구하여 다시 분석을 실시하였다.

선별된 37개의 RAPD marker는 18개 primer에 대하여 분포를 나타내고 있었는데(Table 4),

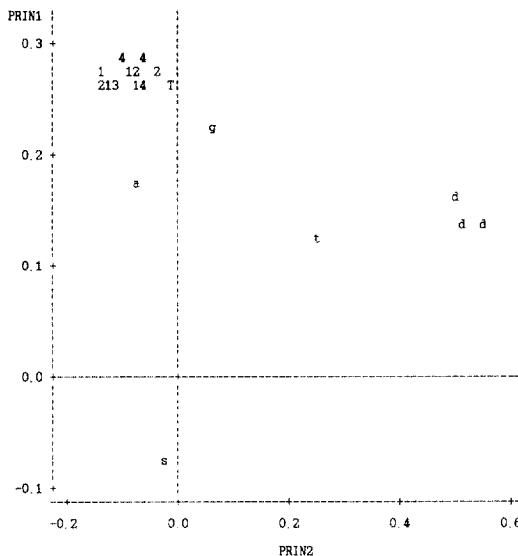


Fig. 3. Scatter diagram of 19 samples with 181 RAPD markers based on principal component 1(PRIN1) and 2(PRIN2).

(s : *Salix pseudolasioigyne*, t : *Populus tomentosa*, d : *P. davidiana*, a : *P. alba*, T : *P. tomentiglandulosa*, g : *P. glandulosa*. numeric as 1,2,3 and 4 : clone number of hybrid poplars)

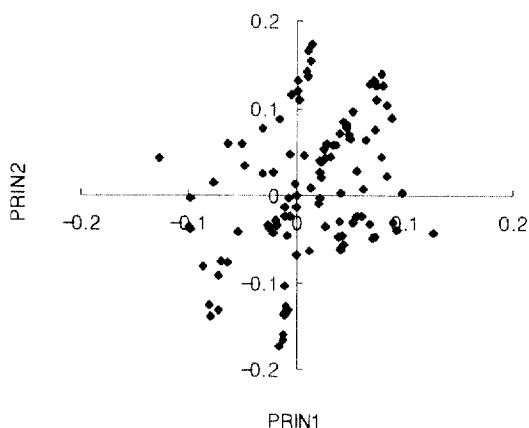


Fig. 4. Scatter diagram of 19 samples with 181 RAPD bands based on principal component 1(PRIN1) and 2(PRIN2).

Table 3. Eigenvalues of the Correlation Matrix from principal component analysis using 181 RAPD markers of 19 samples

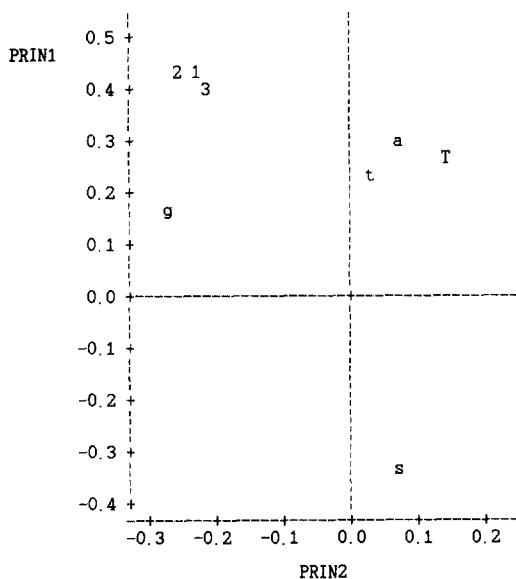
PRIN*	Eigenvalue	Difference	Proportion	Cumulative
PRIN1	57.6962	27.2073	0.345486	0.345486
PRIN2	30.4889	14.4133	0.182568	0.528054
PRIN3	16.0755	3.0835	0.096261	0.624315
PRIN4	12.9920	5.3216	0.077797	0.702112
PRIN5	7.6704	.	0.045931	0.748042

Table 4. The selected primers and its RAPD marker number based on the PCA with 181 RAPD markers of 19 samples

primer ID	RAPD marker ID			primer ID	RAPD marker ID		
FOR02	f02.05	f02.08		FOR19	f19.01	f19.07	
FOR04	f04.02	f04.06	f04.10	UBC613	613.02	613.05	
FOR05	f05.03	f05.07		UBC625	625.01	625.03	
FOR06	f06.01	f06.02	f06.08	UBC632	632.02		
FOR07	f07.05			UBC648	648.06	648.07	
FOR09	f09.04	f09.05		UBC654	654.01	654.11	
FOR13	f13.07			UBC668	668.03	668.07	
FOR14	f14.02			UBC669	669.06	669.07	669.08
FOR16	f16.01	f16.06		UBC680	680.02	680.03	668.04 668.05

Table 5. Eigenvalues of the correlation matrix from principal component analysis using 19 samples with selected 37 RAPD markers

PRIN*	Eigenvalue	Difference	Proportion	Cumulative
PRIN1	4.40460	2.45760	0.440460	0.440460
PRIN2	1.94700	0.67261	0.194700	0.635160
PRIN3	1.27439	0.33979	0.127439	0.762600
PRIN4	0.93460		0.093460	0.856060

**Fig. 5.** Scatter diagram of 8 samples with 37 RAPD markers based on principal component 1(PRIN1) and 2(PRIN2).

(s : *Salix pseudolasigyne*, t : *Populus tomentosa*, a : *P. alba*, T : *P. tomentiglandulosa*, g : *P. glandulosa*, numerics as 1, 2 and 3 : *P. davidiana*)

이 자료를 갖고 19개 수종에 대하여 주성분분석 결과 상위 4개의 요인이 전체 변이의 85.6%를 설명하고 있었다(Table 5).

제1주성분과 제2주성분에 의한 종간의 구분은 181개의 RAPD marker를 모두 사용한 결과와 크게 차이가 나지 않는 63.5%의 설명력을 갖고 있었으나, 11개 인공교배종의 클론에 대한 설명은 할 수 없었다. 현사시 클론을 제외한 8개 수종에 대한 좌표(Fig. 5)에서 은백양과 은사시나무, *P. tomentosa*가 제1사면에 존재하고, 수원사시나무와 사시나무가 제2사면에 존재했다. 이 좌표가 전체 181개 RAPD marker를 사용했을 때의 결과(Table 3)와 *P. tomentosa*의 위치에서 변화가 있는 것은 정보량이 줄어든 까닭이외에도 37개 RAPD marker가 은백양과 사시나무 계열을 주로 구분할 수 있는 것으로써, *P. tomentosa*가 두 수종사이의 교접이라는 간접적 증거가 될 수 있다. 전체 변이의 85% 이상을 설명하는 제4주성분까지 포함시켜도 인공교배종에 대한 구분이 확연하지 못한 까닭은 클론간의 구별을 위한 RAPD marker가 *Leuce*절 전체를 대상으로 했을 때 설명력이 매우 낮은 것으로, 특히 클론구별에서는 한 두개로 구분되는 것이 아니라 몇 개가 조합을 이루어야 가능함을 간접적으로 의미한다.

結論

사시나무속 *Leuce*절의 5개 수종 14개 클론들에 관한 분자유전학적 유연관계 구명을 위하여 총 88개의 arbitrary primer의 RAPD 결과에서 다형성과 재현성 검증을 통하여 22개 primer를 선정하고 181개의 다형성 RAPD marker를 얻었다. 이들 RAPD marker를 이용한 UPGMA와 Neighbor-joining 방법에 의한 유집분석 결과 수원사시나무는 사시나무와 은백양의 1대 잡종이고, 은사시나무는 은백양과 수원사시나무의 천연교잡종으로 인공교배종인 현사시나무와 공통의兩親樹種을 갖는 것으로 추정할 수 있었다. 또한 주성분분석에서도 수원사시나무와 은사시나무에 대한 양친수의起源에 관한 추정을 확인할 수 있었으며, 각 RAPD marker들의 기여도를 제1주성분과 제2주성분에서 선별하여 종간구별에 유용한 37개의 RAPD marker를 선발할 수 있었으며, 제3주성분과 제4주성분을 이용하면 현사시 클론의 구별도 가능했다. 많은 수의 RAPD marker를 유연관계에 이용하면 설명력 높은 유연관계도를 얻을 수 있지만, 모든 marker를 종간 혹은 품종 수준에서의 판단기준이 되는 marker를 선발하는데 이용하는 것은 오히려 혼란의 요인이 될 수도 있다(Coppenolle 等 1993). 따라서 RAPD marker의 유연관계 분석과 주성분분석을 동시에 실시함으로써 손쉬운 종간, 종내 수종 식별(또는同定)의 판단기준을 마련할 수 있었다.

引用文獻

- 金三植·金鼎錫·野田昭三. 1981. *Populus tomentiglandulosa*와 *P. glandulosa*의 分類學的研究. 韓林誌 51 : 1-21.
- 김용율. 1995. RAPD 분석에 의한 소나무 10개 천연집단의 유전변이 연구. 서울대학교 박사학위 논문. 115p.
- 김정석·김삼식. 1979. *Populus alba* *glandulosa*와 그의兩親의葉柄의維管束配列狀態에 관하여. 韓林誌 43 : 1-5.
- 김정석·정상배. 1974. *Populus*屬의 isoperoxidase 變異: I. *Populus alba*, *P. glandulosa* 및 *P. euramericana*類에 대한 isoperoxidase의 變異. 林育研報 11 : 53-59.
- 노의래·金永模. 1980. 한국에 있어서의 포플러類의種間 및種內交配. 林育研報 16 : 3-19.
- 노의래. 1989. Longterm strategies for aspen(*Populus davidiana* Dode) breeding in Korea. 林育研報 32 : 8-15.
- 孫斗植·朱城賢. 1985. *Populus alba* × *P. glandulosa*의 4가지 isozyme(GOT, ACP, MDH, ADH)의遺傳. 韓林誌 71 : 90-98.
- 손두식. 1982. *Populus alba* × *P. glandulosa*交配兩親樹의生長에 대한遺傳變異推定. 韓林誌 58 : 27-33.
- 李昌福. 1955. 枝芽의特徵에의한한국산*Populus*屬의識別. 서울大論文集自然科學 2 : 75-80.
- 이창복. 1987. 新稿樹木學. 鄉文社 331p.
- 현신규·손두식·조이명. 1967. *Populus alba* × *P. glandulosa* F₁의生長에관한연구. 林育研報 5 : 53-60.
- 홍경낙. 1997. RAPD Marker分析에의한사시나무屬*Leuce*節系統分類 및 사시나무天然集團의遺傳變異. 서울大學校博士學位論文. 87p.
- Abo-elwafa, A., K. Murai, and T. Shimada. 1995. Intra- and inter-specific variations in *Lens* revealed by RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 90 : 335-340.
- Adams, R., T. Demeke, and H. Abulfatih. 1993. RAPD DNA fingerprints and terpenoids: clues to past migrations of *Juniperus* in Arabia and east Africa. Theor. Appl. Genet. 87 : 22-26.
- Akerman, S., J. Tammisola, S. Lapinjoki, H. Soderlund, V. Kauppinen, et al. 1995. RAPD markers in parentage confirmation of a valuable breeding progeny of European white birch. Can. J. For. Res. 25 : 1070-1076.
- Apostol, B., Black, W., B. Miller, P. Reiter, and B. Beaty. 1993. Extimation of the number of full sibling families at an oviposition site using RAPD-PCR markers: applications to the mosquito *Aedes aegypti*. Theor. Appl. Genet. 86 : 991-1000.
- Bai, Y. and C. Ma. 1990. Breeding of new

- Chinese white poplar. Forest Science and Technology 12 : 19.
18. Bhattacharya, N., N. Kaur, and K. Nanda. 1975. Transients in isoperoxidases during rooting of etiolated stem segments of *Populus nigra*. Biophysiol. Pflanzen. 167 : 159-164.
 19. Bialobox, S. 1964. Studies on *Populus tremuloides* Carr. Arboretum Konickie IX : 1-35.
 20. Bradshaw, H. and R. Stettler. 1995. Molecular genetics of growth and development in *Populus*: IV. mapping QTLs with large effects on growth, form and phenology traits in a forest tree. Genetics 139 : 963-973.
 21. Broschat, T. 1979. Principal component analysis in horticultural research. Hort Science 14 : 114-117.
 22. Coppenolle, B., I. Watanabe, C. Hove and S. Mccouch. 1993. Genetic diversity and phylogeny analysis of *Azolla* based on DNA amplification by arbitrary primers. Genome 36 : 686-693.
 23. Czekanowski, J. 1913. Zarys metod statystycznych w zastosowaniu do antropologii. Travaux de la Societe des Sciences de Varsovie III. Classes des sciences mathematiques et naturelles. No. 5.
 24. Edwards, K., C. Johnston, and C. Thompson. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucl. Acids Res. 19 : 1349.
 25. Ellstrand, N., R. Whitkus, and L. Riesenberg. 1996. Distribution of spontaneous plant hybrids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(10) : 5090-5093.
 26. FAO. 1980. Poplar and Willows in Wood Production and Land Use. FAO Forestry Series No. 10. 328p.
 27. Felsenstein, J. 1993. PHYLIP(Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Dept of Genetics, Univ. Washington, Seattle.
 28. Hoey, B., K. Crowe, V. Jones, and N. Polans. 1996. A phylogenetic analysis of *Pisum* based on morphological characters, and allozyme and RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 92 : 92-100.
 29. Hyun, J.O. and S.K. Hyun. 1993. An investigation on applicability of isozyme band patterns for identification of poplar clones. Kor. J. Breeding 25(1) : 20-27.
 30. Iezzoni, A. and M. Pritts. 1991. Applications of principal component analysis to horticultural research. HortScience 26(4) : 334-338.
 31. Ionov, Y., M. Peinado, and S. Malkhosyan. 1993. Uniquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. Nature 363 : 558-561.
 32. Jaccard, P. 1901. Etude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat. 37 : 547-579.
 33. Jacobson, K., O. Miller, Jr., and B. Turner. 1993. RAPD markers are superior to somatic incompatibility tests for discriminating genotypes in natural populations of the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 9159-9163.
 34. Lanham, P., R. Brennan, C. Hackett., and R. McNicol. 1995. RAPD fingerprinting of blackcurrant(*Ribes nigrum* L.) cultivars. Theor. Appl. Genet. 90 : 166-172.
 35. Maaß, H. and M. Klaas. 1995. Interspecific differentiation of garlic(*Allium sativum* L.) by isozyme and RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 91 : 89-97.
 36. Millan, T., F. Osuna, S. Cobos, A. Torres, and J. Cubero. 1996. Using RAPDs to study phylogenetic relationship in *Rosa*. Theor. Appl. Genet. 92 : 273-277.
 37. Miller, J. 1994. RESTSITE version 1.2. Distributed by the author. (Miller, J. 1991. RESTSITE : a phylogenetic program that sorts raw restriction data. J. Heredity 82 : 262-263.)
 38. Nei, M. and W. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl.

- Acad. Sci. USA 76 : 5269-5273.
39. Perron, M., A. Gordon., and J. Bousquet. 1995. Species-specific RAPD fingerprints for the closely related *Picea mariana* and *P. rubens*. Theor. Appl. Genet. 91 : 142-149.
40. Scandalios, J. 1974. Isozymes in development and differentiation. Ann. Rev. Plant Physiol. 25 : 225-228.
41. Taylor, P., J. Geijskes, T. Fraser, R. Henry, and R. Birch. 1995. Sensitivity of RAPD analysis to detect genetic change in sugarcane during tissue culture. Theor. Appl. Genet. 90 : 1169-1173.
42. Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl. Acids Res. 18 : 7213-7218.
43. Williams, J., A. Kubelik, K. Livak, J. Rafalski, and S. Tingey. 1990. DNA6 polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18 : 6531-6535.
44. Willing, R. and L. Pryor. 1976. Interspecific hybridization in poplar. Theor. Appl. Genet. 47 : 141-151.
45. Yamagishi, M. 1995. Detection of section-specific RAPD markers in *Lilium*. Theor. Appl. Genet. 91 : 830-835.
46. Yu, K. and K. Pauls. 1993. Segregation of RAPD markers and strategies for molecular mapping in tetraploid alfalfa. Genome 36 : 844-851.
47. Zhang, T., D. Copes, S. Zhao, and M. Qui. 1995. Genetic analysis on the hybrid origin of *Populus tomentosa* Carr. Silvae Genetica 44(4) : 165-173.
48. Zhao, T. 1987. Preliminary studies on origin and taxonomy of Chinese white poplar. Forest Science 2 : 20-41.

附 錄

Appendix 1. Primer sequence list(25 arbitrary 10-mers of FOR series)

Primer name	Sequence(5' to 3')	%GC
FOR01	CAC GGC GAG T	70
FOR02	GCA CCG AGA G	70
FOR03	GCG CAT TAG A	50
FOR04	CCA CTC ACC G	70
FOR05	GGC TAG GGC G	80
FOR06	CAG CCA ACC G	70
FOR07	GGT TCC AGC T	60
FOR08	GGG CGC CTA G	80
FOR09	CGC GTT CCT G	70
FOR10	TGC AGT CGA A	50
FOR11	CCG TAC GGA C	70
FOR12	AGG GAG TTC C	60
FOR13	CCG GCC TTA C	70
FOR14	CCG GCC TTC C	80
FOR15	GAG GGC GTG A	70
FOR16	ACG ACG TAG G	80
FOR17	GGG CTC GTG G	50
FOR18	TAC GAT GAC G	50
FOR19	ATT GGG CGA T	60
FOR20	ACG ACG TAG G	60
FOR21	GAT GAC CGC C	70
FOR22	GTC CCG ACG A	70
FOR23	CCA GAT GCA C	60
FOR24	GGG AAT TCG G	60
FOR25	GGA CAC CAC T	60