

RAPD marker로 추적한 천연기념물로 지정된 느티나무의 유연관계

강 경 홍* · 정 영 재¹ · 김 홍 남²

(*전주대학교 생명과학부, ¹전주대학교 대학원 생물학과, ²전주대학교 자연과학연구소)

적 요 - 천연기념물로 지정된 14개체의 느티나무의 유연관계 및 개체간의 다양성을 RAPD 마커를 이용하여 조사하였다. 일반적으로 각 개체간의 유사성의 정도는 낮았고 강원도의 두 개체(KWH와 KWS)간에서 78%로 가장 높은 유사성을 보였다. Neighbour-joining tree에서 보여진 유연관계는 강원도와 전남의 일부 개체를 제외하고는 지리적 분포와 일치하지 않았다. 이는 생물학적 요인이라기보다는 이 종의 인위적인 이동에 의한 결과로 사료된다. 또한 개체간의 유전적 polymorphism의 정도는 매우 높아 polymorphic band수의 퍼센트는 77.8%에서 100%였다. 이는 각 개체가 장기간 격리 분화된 조상형에서 유래되었던 결과로 추측되었다.

서 론

느릅나무과(Ulmaceae)에 속하는 느티나무(*Zelkova serrata* Makino)는 한국, 일본, 대만 및 중국에만 국지적으로 분포한다(Krussmann 1986; 임 1993). 이 종은 재목으로서의 가치 뿐 아니라(Todzia 1993) 바람에 대한 저항성이 강하며 장수하는 식물로 노거수와 정자목으로서 이용되고 있다(임 1993).

Williams (1990) 등에 의해 Random primer로 증폭된 DNA polymorphism이 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 마커로 명명된 이래 식물에서도 유전관계의 분석(Heun and Helentjaris 1993; Tinker *et al.* 1993; Dweikat *et al.* 1993), 재배종의 동정(Koller *et al.* 1993; Fukuoka *et al.* 1992), 유전자형의 분석(Vierling & Nguyen 1992), 연관지도의 작성(Kiss *et al.* 1993) 및 자연집단구조의 분석(Chalmers *et al.* 1992)에 이용되고 있다. 이 방법은 신속하고 적은 비용으로 계통전체의 변이를 추적할 수 있다는 장점을 지닌다.

느티나무는 국내에서 천연기념물로 지정된 나무중에서 가장 많은 수를 차지하고 있다(임 1993). 적어도 400년 이상이 된 이 천연기념물들은 경북 북부이외의 경상도 지역에는 거의 존재하지 않고 충남북 지역에는 전혀 존재하지 않는다. 이러한 노거수가 왜 국지적으로 존재하는지는 명확하지 않다. 따라서 본 연구에서는 이러한 분

포를 결정하는 요인과 이 천연기념물들이 지리적 분포와 유사한 유연관계를 갖는가를 추적하기 위하여 RAPD 마커를 이용하여 전국에서 채집된 14개체의 느티나무 천연기념물의 유연관계 및 개체간의 다양성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

실험재료는 국내에 산재하여 있는 천연기념물 14개체로부터 채집하였다(Fig. 1, Table 1).

또한 outgroup으로는 팽나무 1개체를 사용하였다. 다른 생물의 오염을 방지하기 위하여 새로 나온 잎만을 선별하여 채집하였다. 채집된 잎은 비닐봉지에 넣어 실험실로 옮겨졌다. 재료는 수돗물과 증류수로 세척하였고 다른 생물의 부착여부를 해부현미경으로 확인하였다. 깨끗이 세척된 재료는 -70°C에 보관하여 DNA 추출을 위해 사용하였다.

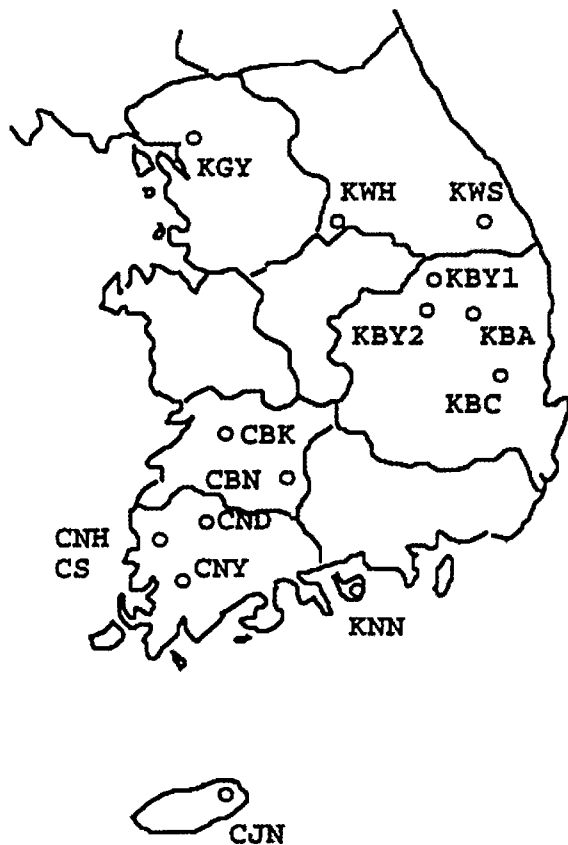
2. DNA 추출, Primer, PCR 반응 및 전기영동

-70°C에 보관된 재료를 액체질소를 주입하여 마쇄하였고 DNA는 Doly & Doly (1987) 방법으로 추출하였다. 추출한 DNA를 0.8% agarose gel로 전기영동하여 양과 질을 확인하였다.

* 교신저자 : E-mail, kkh@www.jeonju.ac.kr

Table 1. The list of samples used in this study, their abbreviations (Abbr.), locations and registration number

Species	Location		Abbr.	Registration No. of Natural monument	
<i>Zelkova serrata</i>	Kangwŏn-do	Samch'ŏck-gun	KWS	95	
	Kangwŏn-do	Hoengsŏng-gun	KWH	279	
	Kyŏnggi-do	Yangju-gun	KGY	278	
	Chŏllabuk-do	Kimje-gun	CBK	280	
	Chŏllabuk-do	Namwon-gun	CBN	281	
	Chŏllanam-do	Yŏngam-gun	CNY	283	
	Chŏllanam-do	Damyang-gun	CND	284	
	Chŏllanam-do	Hamp'yŏng-gun	CNH	108	
	Kyŏngsangbuk-do	Ch'ŏngsong-gun	KBC	192	
	Kyŏngsangbuk-do	Yŏngpŭng-gun	KBY1	273	
	Kyŏngsangbuk-do	Yŏngpŭng-gun	KBY2	274	
	Kyŏngsangbuk-do	Andong-gun	KBA	275	
	Kyŏngsangnam-do	Namhae-gun	KNN	276	
	Cheju-do	Namjeju-gun	CJN	161	
	<i>Celtis sinensis</i>	Chŏllanam-do	Hamp'yŏng-gun	CS	108

**Fig. 1.** The locations of natural monuments used in this study.

RAPD primer는 Operon사로부터 구입한 OPE 세트를 사용하였다. PCR 반응액은 200 ng gDNA, 1X reaction buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM

KCl), 0.2 mM dNTP, 0.5 uM primer, 2.5 Units *Taq* DNA polymerase (Takara)로 total volume 50 μ l로 조제하였다. 이 반응액의 PCR을 thermal cycler (GeneAmp PCR system 2400, *Perkin Elmer*)로 다음 조건에서 수행하였다. 초기 denaturation조건으로 94°C에서 3분, 이어서 denaturation을 위해서 94°C에서 1분, annealing 조건으로 36°C에서 1분, extension을 위해서 72°C에서 2분으로 반응 조건을 설정하고 이를 45 cycle 수행하였다.

증폭된 DNA는 PCR산물의 적량을 0.8% agarose gel로 영동하여 확인하였다. 이어서 data의 해석을 위해서 20 μ l PCR산물을 1.2% agarose gel로 영동한 후 EtBr (0.5 μ g/ml)로 염색하고 UV를 조사하여 polaroid 667 film으로 촬영하였다. 또한 재현성을 확인하기 위하여 동일 조건에서 PCR 증폭을 반복 수행하였다.

3. Data의 해석

10개의 primer가 사용되었으나 모든 재료에서 DNA 단편을 증폭시키지 않은 primer는 제외하고 6개의 primer를 이용한 증폭산물만을 해석하였다. 관찰된 DNA band로부터 data matrix를 band의 유무에 따라 1과 0으로 하여 작성하였다. Similarity index는 data matrix를 기초로 Lynch (1990)의 방법으로 계산되었다. 개체간의 유연관계를 확인하기 위하여 Neighbor-Joining (N-J) tree (Saitou & Nei 1987)를 만들었다. outgroup으로는 *Celtis sinensis*를 사용하였다. 이를 위해 data matrix의 1와 0은 각각 a와 t로 설정을 하였고 clustalW (Thompson *et al.* 1994)로 multi-alignment한 후, 1000번의 bootstrap을 행하였고 TreeView PPC를 이용하여 만들었다.

Table 2. The primers used in this study, GC contents, number of DNA fragment and polymorphic fragment detected from them, and percentage of polymorphic fragments

Primer No.	Primer Sequence (5' to 3')	G+C Content	No. of amplified fragments	No. of Polymorphic fragments	Percentage of Polymorphic fragments
OPE 15	ACGCACAACC	60%	12 (15)	11 (15)	91.7 (100)
OPE 16	GGTGA CTGTG	60%	16 (16)	14 (16)	87.5 (100)
OPE 17	CTACTGCCGT	60%	9 (12)	7 (11)	77.8 (91.7)
OPE 18	GGACTGCAGA	60%	16 (16)	15 (16)	93.8 (100)
OPE 19	ACGGCGTATG	60%	14 (15)	14 (15)	100 (100)
OPE 20	AACGGTGACC	60%	19 (19)	19 (19)	100 (100)
Total			86 (93)	80 (92)	93.0 (98.9)

* The values in parentheses were counted with DNA bands amplified from *Celtis sinensis*.

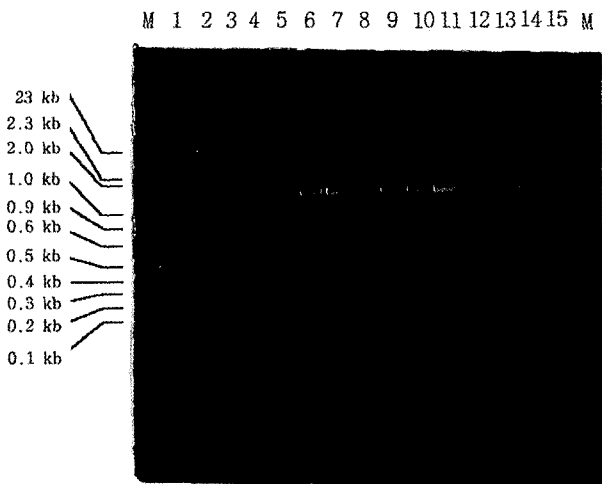


Fig. 2. Electrophoretic patterns of DNA fragments amplified using RAPD primer, OPE 18 in 15 samples studied. Size markers mixed by pUCBM 21/Hpa II, Dra I and Hind III, and λ Hind III are on left and right side. 1 to 15 are KWH, KWS, KGY, CBK, CBN, CNY, CND, CNH, KBC, KBY1, KBY2, KBA, KNN, CJN and CS, respectively. The abbreviations of each sample are indicated on Table 1.

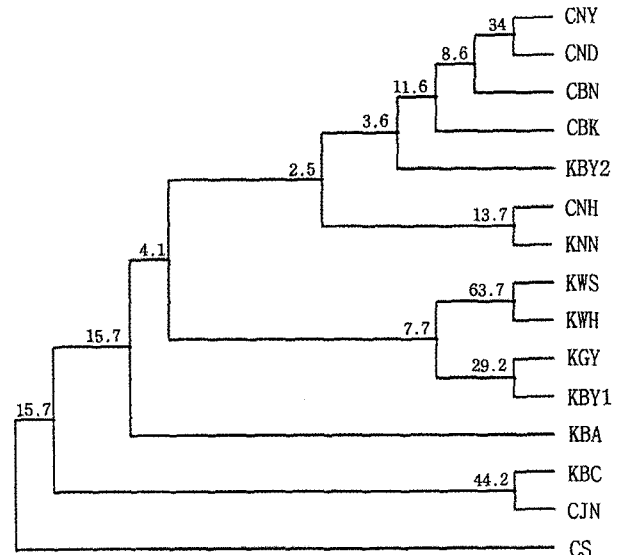


Fig. 3. N-J tree constructed on the basis of data matrix. Support for branches was evaluated by 1000 bootstrap replicates analysis. Numbers on the branches are the percentages of bootstrap confidence values.

결과 및 고찰

천연기념물로 지정된 14개체의 느티나무의 유연관계를 6개의 RAPD 마커로 분석하였다. outgroup으로는 팽나무를 사용하였다. 일반적으로 사용된 각 primer에서 매우 polymorphic함을 알 수 있었다(Fig. 2, Table 2).

각 느티나무에서 증폭된 DNA 밴드수는 primer OPE 20을 사용했을 때가 가장 많이 증폭하여 19개를 보였고 가장 적은 수는 OPE 17에서였다(Table 2). Polymorphic band 수는 7에서 19개였고 그 퍼센트는 77.8%에서 100%였다. 증폭된 DNA 밴드의 유무에 따라 data matrix를 작성하였고(Table 3) 이를 기초로 각 개체간의 유사성의

정도를 계산하였다(Table 4).

일반적으로 유사성의 정도는 낮았고 강원도의 두 개체(KWH와 KWS)간에서 78.4%로 가장 높은 유사성을 나타내었다. 이외에는 대체로 50% 내외 수준의 유사성을 보였다. 각 개체간의 유연관계를 관찰하기 위하여 Table 3의 data matrix를 기초로 N-J tree를 작성하였다(Fig. 3).

각 branch를 지지하는 bootstrap 확률은 매우 낮은 경향을 나타내었고 강원도 삼척군(KWS)과 횡성군(KWH)의 개체는 63.7%였다. Bootstrap 확률은 낮지만 지리적으로 비교적 가까운 전남 영암군(CNY)과 담양군(CND) 및 강원 삼척군(KWS)과 횡성군(KWH)의 개체가 각각

Table 3. Matrix of DNA fragments detected by RAPD primers from 15 OTUs of *Zelkova serrata* and *Celtis sinensis*

Abbr./Primer No.	OPE15	OPE16	OPE17	OPE18	OPE19	OPE20
	1111111223	111111222	11111	11111122	1111223	111111112
size	668990125678031	4566778124778018	344678913456	4456789913456803	455667780147385	2334556789012456780
(bp)	190085150055000	0059481150055050	658064015785	0552630910004100	205094655115570	8278089630015024550
	020000400000000	4102000400000000	009000040000	4500000040000000	510020500400000	0059102040040050000
KWS	010100100100000	1001000110110011	111010100000	0000001010011000	000010000010000	0100000000010010000
KWH	010001100100000	1001000110010011	111100100000	0000000010011010	000010000010000	0000000001010001000
KGY	010000111100100	1010100010000111	111100100001	0000000101111010	000001000010000	1000000010010010000
CBK	010000100000000	1001100100100001	111100000000	0000011000011000	000101000101000	0000000010000011000
CBN	010000010000000	1001000110110001	101100000000	0000001000011001	001000000010000	0000101110011011101
CNY	010000000010110	1001000110101011	111100100000	1100011000001101	000010000010000	0000000010000011010
CND	010000010000000	1001000100111001	111100100000	1000000011001000	000001001010000	0000000010000011000
CNH	010001100000000	1011000101001111	111100100000	0101001000011000	000000010010001	0000000000100001000
KBC	010000000000000	1100001101001111	111110000000	0010011011001010	000011000010000	1011101001110100000
KBY1	010001111110000	1000011110110101	111100100000	0000000000001010	100011000010011	0000000011001011001
KBY2	010001101000000	1001101000100001	111100100100	0000101001001001	000000100010000	0000000000010011000
KBA	011000100000000	1000101100110011	101100100010	0011000000001000	010000000010010	0001010010110011000
KNN	010001100000000	1001110010001001	111110000000	0100101010011010	000000000010000	0000010010001011000
CJN	010010101000000	1001110110001011	111110000000	0000000010001010	000000000010000	0001100001010111001
CS	101100011111001	0000000100001010	100101011000	0010001100000001	000000000010100	0000010000000100000

Table 4. Similarity index among 15 samples used in this study. These values were counted on the basis of data matrix on the Table 3

	KWH	KGY	CBK	CBN	CNY	CND	CNH	KBC	KBY1	KBY2	KBA	KNN	CJN	CS
KWS	0.784	0.525	0.571	0.593	0.607	0.600	0.566	0.500	0.557	0.577	0.555	0.593	0.607	0.275
KWH		0.607	0.542	0.566	0.582	0.612	0.654	0.542	0.667	0.588	0.556	0.642	0.691	0.240
KGY			0.519	0.475	0.492	0.545	0.517	0.492	0.606	0.561	0.500	0.542	0.557	0.286
CBK				0.588	0.604	0.638	0.560	0.421	0.517	0.612	0.538	0.627	0.528	0.167
CBN					0.586	0.615	0.473	0.419	0.571	0.556	0.526	0.571	0.552	0.264
CNY						0.667	0.596	0.469	0.554	0.571	0.508	0.586	0.533	0.327
CND							0.549	0.483	0.610	0.600	0.566	0.577	0.556	0.245
CNH								0.525	0.516	0.566	0.536	0.618	0.526	0.269
KBC									0.464	0.433	0.476	0.452	0.625	0.305
KBY1										0.557	0.531	0.571	0.585	0.267
KBY2											0.582	0.630	0.571	0.235
KBA												0.491	0.542	0.259
KNN													0.690	0.226
CJN														0.291

clustering하였다. 이외에는 지리적으로 먼 개체간에서 grouping하거나 독립적으로 분기하는 경향을 보였다. 동일 지역인 경북 영풍군(KBY1와 KBY2)의 개체는 clustering하지 않았다.

본 연구의 결과에서 사용된 마커는 매우 polymorphic 하였다. 28개의 RAPD 마커로 23개의 셀러리 재배종을 분석한 결과는 9.3%만이 polymorphic 밴드였다(Yang & Quiros 1993). 또한 *Brassica carinata*의 개체간의 RAPD 분석에서 polymorphic 밴드 퍼센트는 8.3%이었다(Demeke et al. 1992). 22개의 primer로 *Stylosanthes* 종간 및 종내 개체를 RAPD 분석한 결과에서 종간에서는

46% 이상으로 높은 polymorphism을 보였고 종내 개체간에서는 0~2%로 매우 낮았다(Kazan et al. 1993). 이러한 결과에 비하면 본 연구에서 14개 개체에서 추적된 94.1%의 polymorphic band의 비율은 매우 높은 것이다. 그러나 전세계의 여러 집단에서 채집된 *Gliricidia sepium*의 집단간 및 집단내의 변이를 RAPD로 분석한 결과는 집단과 마커에 따라 다양하여 집단내에서는 0~75%의 polymorphism을 보였다. 전 집단의 polymorphic band의 비율은 더욱 높아 22~100%였다(Chalmers et al. 1992). 본 연구의 결과는 *Gliricidia sepium*의 집단내의 변이와 비교될 수 있다. 이에 비하면 본 연구의 결과

는 약간 높은 polymorphism을 보이고 있다. 이러한 연구 결과는 아마도 사용된 마커에 따라 다르게 나타나는 것으로도 생각된다. 이 종에서 polymorphism을 유지하는 결정요인이 무엇인지를 명백히 한다는 것은 대단히 어렵다. 본 연구에서 분석된 느티나무는 수령이 450년에서 1000년 정도이다(임 1993). 이는 생물학적으로는 매우 짧은 시간이다. 따라서 각 개체간에서 높게 나타난 polymorphism은 각 개체의 조상형이 아마도 오랫동안 유전적 교환이 없이 격리되어 분화가 이루어 졌던 집단에서 각각 독립적으로 유래되었을 것으로 사료된다.

본 연구의 결과에서 14개의 천연기념물 느티나무의 개체간의 유연관계가 대체적으로 지리적 위치와 일치하지 않는다. 한국의 *Ceramium kondoi*의 자연집단이 크게 두 그룹으로 나누어지는 것(Kim *et al.* 1997)과는 대조적이다. 이는 이 종의 역사적 유래에서 추적할 수 있을 것이다. 본 연구에서 조사된 천연기념물 느티나무는 바람에 의한 종자의 전달에 의해서 이동되었을 가능성은 거의 없다. 인위적인 이식으로 성장하여 현존하는 것으로 생각된다. 그 이유로는 이 천연 기념물들은 오래전에 형성된 마을의 입구에서 발견되기 때문이다. 예로부터 사람들은 나무를 갖고 이동하였다. 특히 이 종은 정자수로서 가치이외에도 민간신앙의 대상으로 마을의 풍요와 건강을 기원하는 당산제를 행하던 나무로서 신성시되었다(김과 장 1994). 즉 이러한 배경속에서 느티나무는 민족의 이동과 밀접한 관련을 가졌던 것으로 생각된다. 이는 일본에서도 동일하다(personal comm. from Dr. Yamazaki, T. Kyushu Uni. Japan). 이러한 사실이 생물학적으로 기대되는 결과와는 다른 유연관계를 나타내는 원인이 되었던 것으로 사료된다. 이는 역으로 이종의 유연관계를 조사하므로써 한민족의 이동을 추측할 수 있음을 시사한다. 더욱이 이 종은 한국, 일본, 중국 및 대만등 동아시아에만 국지적으로 분포한다(임 1993). 장래에는 이들 국가의 천연기념물과 함께 DNA 마커를 이용하여 조사하므로써 역사적 사실을 추측할 수 있을 것이다. 또한 이러한 유연관계는 이 종의 자연집단 구조와 천연기념물이 아닌 자연집단 개체의 유연관계를 분석하므로써 더욱 명백해질 것이다. 앞으로 DNA 염기서열과 같은 data를 이용하여 보다 명백히 해석되어야 할 것이다.

사 사

이 논문은 1998학년도 전주대학교 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

- 김학범, 장동수(1994) 한국기층문화의 탐구-6, 마을 숲-한국 전통부락의 당숲과 수구막이. pp. 44-84.
- 임경빈(1993) 천연기념물. 대원사. pp. 398-413.
- Chalmers KJ, R Waugh, JI Sprent, AJ Simons & W Powell (1992) Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity* **69** : 465-472.
- Demeke T, RP Adams & R Chibbar(1992) Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in Brassica. *Theor. Appl. Genet.* **84** : 990-994.
- Doyle JJ & JL Doyle (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12** : 13-15.
- Dweikat I, S Mackenzie, M Levy & H Ohm (1993) Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species. *Theor. Appl. Genet.* **85** : 497-505.
- Fukuoka S, K Hosaka & O Kamijima (1992) Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions. *Jpn. J. Genet.* **67** : 243-252.
- Heun M & T Helentjaris (1993) Inheritance of RAPDs in F₁ hybrids of corn. *Theor. Appl. Genet.* **85** : 961-968.
- Kazan K, JM Manners & DF Cameron (1993) Genetic variation in agronomically important species of *Stylosanthes* determined using random amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* **85** : 882-888.
- Kim Sun Ran, Su Yoon Hwan, Min Boo Sung & Gi Paik Sang (1997) Morphological and random amplified polymorphic DNA features in populations of *Ceramium kondoi* (Rhodophyta). *J. Plant Biol.* **40** : 27-32.
- Kiss GB, G Csanadi, K Kalman, P Kalo & L Okresz (1993) Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers. *Mol. Gen. Genet.* **238** : 129-137.
- Koller B, A Lehmann, JM McDermott & C Gessler (1993) Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* **85** : 901-904.
- Krussmann G (1986) Cultivated broad-leaved trees and shrubs. Timber Press, pp. 464-467.
- Lynch M (1990) The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol. Biol. Evol.* **7**(5) : 478-484.
- Saitou N & M Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4** : 406-425.
- Tinker NA, MG Fortin & DE Mather (1993) Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. *Theor. Appl. Genet.* **85** : 976-984.
- Todzia CA (1993) Ulmaceae in The Families and Genera of Vascular Plants. II. Flowering Plants, Dicotyledous,

- edited by K. Kubitzki, Springer-Verlag, pp. 603-611.
- Thompson JD, DG Higgins & TJ Gibson (1994) Multiple alignment program, European Molecular Biology Laboratory Meyerhofstrasse 1 D 69117 Heidelberg, Germany.
- Vierling RA & HT Nguyen (1992) Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid, wheat genotypes. *Theor. Appl. Genet.* **84** : 835-838.
- Williams GKJ, RA Kubelik, JK Livak, JA Rafalski & SV Tingey (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**(22) : 6531-6535.
- Yang X & C Quiros (1993) Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* **86** : 205-212.

The Genetic Relationship of *Zelkova Serrata* Registered as the Natural Monument Using RAPD Markers

Kyung Hong Kang*, Young Jae Chong¹ and Hong Nam Kim²

(*School of Life Science, ¹Graduated School, ²Institute of Natural Science, Jeonju University, 560-759, Chonju, Korea)

Abstract - The genetic polymorphism and relationship among 14 *Zelkova serrata* registered as the natural monument in Korea were investigated using RAPD markers. N-J tree indicated that individuals in Kangwŏn-do were clustered and those in Yŏngam-gun and Damyang-gun of Chŏllanam-do were done closely. However, all the others were not agreed with the geographical distribution. Maybe this discordance was resulted from their movement by human being than any biological factors. The polymorphic percentages among individuals were from 77.8 to 100. From the high polymorphism, it was supposed that existing natural monuments were independently originated in the ancestors of long differentiated populations. [*Zelkova serrata*, RAPD marker, DNA polymorphism, natural monument].