

RAPD markers에 의한 한국산 때죽나무과(Styracaceae) 식물의 유연관계

김 혁 진 · 태 경 환 · 김 주 환*

대전대학교 생명과학과

한국산 때죽나무과 식물 2속 4분류군(때죽나무, 쪽동백나무, 쯤쪽동백나무, 나래쪽동백)에 대한 속간, 종간 및 종내 지역별 개체군간의 유연관계를 조사하기 위하여 RAPD 분석을 수행하였다. 반응을 보인 15개의 random primer에서 238개의 유전자 표지밴드가 나타났으며, 이를 근거로 UPGMA phenogram을 작성하였다. 4종의 개체군들은 3개의 유집군으로 묶이는 결과를 보였다. 첫 번째 유집군은 때죽나무 개체군, 두 번째 유집군은 쪽동백나무 개체군-쯤쪽나무 개체군이 묶였고, 세 번째 유집군은 나래쪽동백 개체군으로 유집되었다. 취급된 분류군들 중 두 번째 유집군에 속하는 쪽동백나무-쯤쪽동백나무가 가장 밀접한 유연관계를 갖는 것으로 밝혀졌다. 따라서 RAPD 분석으로 속과 종을 분류할 수 있었다.

주요어: 나래쪽동백속, 때죽나무과, 때죽나무속, 유연관계, RAPD

감나무목(Ebenales)에 속하는 때죽나무과(Styracaceae Dum.)는 11속 160여 분류군으로 구성되어(Cronquist, 1981), 동아시아와 아메리카 서부의 환태평양과 접하는 지역 및 지중해의 온대에서 열대지역까지 광범위하게 분포하는 것으로 알려져 있다(Fritsch, 2001). 이중 과내의 가장 큰 속인 때죽나무속(*Styrax* L.)은 약 120여 분류군이 동아시아, 아메리카 및 지중해 지역에까지 광범위한 분포역을 보이고 있으나 실제 생육지는 국소적으로 한정되어 있다. 중국의 때죽나무과 식물은 10속 54 분류군이 분포하는 것으로 알려져 있고(Hwang and Grimes, 1996), 국내에는 때죽나무속 4 분류군과 나래쪽동백속(*Pterostyrax* S. & Z.) 1 분류군이 보고되어 있다(Lee, 1986).

때죽나무과의 분류학적 위치에 대해서는 Bentham and Hooker (1873) 이후 학자들 간에 많은 논란이 있어 왔으나(Perkins, 1907, 1928; Engler and Gilg, 1924; Willis, 1937; Hutchinson, 1967, 1973; Baas, 1972; White, 1981; Heywood, 1985), 현재 때죽나무과는 감나무목에 속해 있다

*교신저자: 전화 042-280-2434, 전송 042-285-2434, kimjh@dju.ac.kr

(Cronquist 1981; Thorne 1992; Takhtajan 1997). 또한 때죽나무속은 sect. *Styrax*(북부-온대의 낙엽성질)와 sect. *Valvatae*(열대의 상록성질)로 구분되며, sect. *Styrax*에는 잎에 부분적으로 거치가 있는 ser. *Cyrta*와 잎 전체에 거치가 있는 ser. *Styrax*가 포함되는데(Fritsch, 2001), 한국산 때죽나무속 분류군들은 ser. *Cyrta*에 포함된다.

국내에 분포하는 때죽나무과 식물에 대해서는 최초로 Hemsley and Forbes(1889)에 의해 인천에서 채집된 식물표본을 근거로 한반도 내 때죽나무(*Styrax japonicus* Sieb. & Zucc.)의 분포를 처음 보고한 후, Palibin (1900), Nakai (1911) 및 Mori (1921)는 국내에 때죽나무와 쪽동백나무 2종에 대한 분포를 기재한 바 있다. 또한 Nakai (1938)는 좁쪽동백나무(*Styrax shiraianus* Makino)가 전남 지리산에 분포함을 보고한 바 있으며, 아울러 Daigen이 1908년 지리산에서 채집된 표본의 개체 중 잎의 이면에 백색의 모용이 밀생하는 개체를 좁쪽동백나무의 변종인 흰좁쪽동백나무(*S. shiraianus* var. *discolor*)로 처리하여 신변종으로 발표한 바 있으나 이후 상기한 2분류군에 대해서는 현재까지 채집된 기록이 전무한 상황으로 동경대 표본실의 정기준표본에 대한 조사가 필요한 실정이다.

때죽나무과(Styracaceae)에 대한 분류학적 연구는 주로 형태학적 연구가 대부분이었으며, 때죽나무속을 포함한 근연속의 화부 구조에 대한 해부학적 연구(Copeland, 1938), 잎의 해부학적 연구(Schadel and Dickison, 1979) 및 목부의 해부학적 연구(Dickinson and Phend, 1985)등이 진행된 바 있다. Morton and Dickinson (1992)는 때죽나무과의 화분과 화관의 형태 및 수술의 모양을 근거로 차나무과(Theaceae)와 유사함을 밝힌 바 있으며, Steenis and Brink (1967)는 종자의 외부형질 중 주름진 종자와 단단한 외종피가 존재하는 대형의 종자는 때죽나무과에 있어 중요한 형질임을 보고 한 바 있다. 또한, 때죽나무과는 발생학적으로 불안전하지만, 자방에 꽃받침이 착생하는 형태와 배유세포의 형태, 암술모양 등이 진달래목과 유사한 특징을 보인다(Palser, 1961; Dickinson, 1993). 최근에 들어 Fritsch (2001)는 형태형질과 핵리보솜 DNA의 ITS 염기서열 및 cpDNA, *trnL* 및 *rbcL*의 염기서열을 기초로 한 때죽나무속 분류군들에 대하여 절(sect.) 및 열(ser.)에 포함되는 분류군들의 유연관계에 대한 분석을 시도하였으며, 이를 통해 식물지리학적 및 계통분류학적 입장에서 논의한 바 있다.

따라서 본 연구는 때죽나무과에 포함되는 분류군을 대상으로 RAPD marker를 이용한 수리분류학적 분석을 수행하여 현재까지 국내산을 대상으로 분석된 바 없는 때죽나무과의 속간, 종간 및 종내 지역 개체군 간의 유전적 다양성을 파악하고 분류군의 유연관계를 검토하고자 하였다.

재 료 및 방 법

재료

본 실험에 사용된 재료는 국내에 분포하는 분류군들을 대상으로 하여 국내자생지와 성균관

Table 1. Materials and collection data of Styracaceae which were used in RAPD analysis.

Taxa	Localities (date) & Sources	Abbr.
<i>Styrax japonicus</i> Sieb. & Zucc. (때죽나무)	Jindong-myeon Masan-si Gyeongsangbuk-do (Aug. 27. 2003)	SJA1
	Donneko Seogwipo-si Jeju-do (Jun. 5. 2003)	SJA2
	Wando-gun Jeollanam-do (May 16. 2003)	SJA3
	Gubongsan Seo-gu Daejeon (May 10. 2003)	SJA4
	Anmyeondo Taean-gun Chungcheongnam-do (Jul. 3. 2003)	SJA5
	Jiphyeonsan Jinju-si Gyeongsangnam-do (May 8. 2002)	SJA6
	Chunghwa-myeon Buyeo-gun Chungcheongnam-do (May 18. 2003)	SJA7
	Jirisan Sancheong-gun Gyeongsangnam-do (Jun. 6. 2002)	SJA8
	Japan, Honshu pref. Osaka (K) (Jun. 2. 1963)	SJA9
<i>Styrax obassia</i> Sieb. & Zucc. (쪽동백나무)	Tonggosan Ujin-gun Gyeongsangbuk-do (May 18. 2003)	SOB1
	Gyeryongsan Gongju-si Chungcheongnam-do (May 19. 2002)	SOB2
	Jirisan Sancheong-gun Gyeongsangnam-do (May 18. 2003)	SOB3
	Odaesan Pyeongchang-gun Gangwon-do (Jul. 12. 2003)	SOB4
	Anmyeondo Taean-gun Chungcheongnam-do (May 15. 2003)	SOB5
	Gayasan Hapcheon-gun Gyeongsangnam-do (May 28. 2003)	SOB6
	Naebyeonsan Buan-gun Jeollabuk-do (May 15. 2003)	SOB7
	Donneko Seogwipo-si Jeju-do (Jun. 5. 2003)	SOB8
	Japan, Niigata pref. Hondo (W) (Sep. 24. 1964)	SOB9
<i>Styrax shiraianus</i> Makino (좁쪽동백나무)	Japan, Honshu pref. Nagano (K) (Jun. 9. 1968)	SSH1
	Japan, Nikko Tochigi pref. (M) (Jun. 10. 1995)	SSH2
<i>Pterostyrax hispidus</i> Sieb. & Zucc. (나래쪽동백)	Sungkyunkwan Univ. Suwon-si Gyenggi-do (May 31. 2002)	PHI1
	Japan, Honshu Tokyo pref. (K) (May 25. 1982)	PHI2

대학교 수목원에서 지역 개체군 22집단을 채집하여 사용하였다(Table 1). 일부 채집하지 못한 분류군은 Royal Botanic Gardens, Kew (K), Botanische Staatssammlung München (M) 및 Naturhistorisches Museum Wien (W) 등 국외 표본관에 소장된 석엽표본들을 대여 받아 일부 실험에 사용하였으며, 본 실험에 사용된 재료의 증거표본은 대전대학교 생명과학과 식물 표본실(TUT)에 보관하였다.

DNA 추출

잎을 액체질소를 사용하여 동결시킨 뒤에 넣어 막자사발로 파쇄하였고, CTAB method (Doyle and Doyle, 1987)를 변형한 아래의 방법으로 실시하였다. 약 1.0g의 분말을 0.5% 2- β -mercaptoethanol이 첨가된 15ml의 extraction buffer(2% CTAB; 100mM Tris, pH 8.0; 50mM EDTA, pH 8.0; 500mM NaCl)에 넣은 후 65°C에서 20분간 incubation하며, 조직내 phenol 화합물, 탄닌 등의 불순물을 제거하기 위하여, extraction buffer에 2% PVP-40을 첨가하였다. Incubation후 SEVAC용액(chloroform:Isoamyl alcohol =24: 1) 7.5 ml를 첨가하여, 3,200rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하고 이 부피의 2/3이 되는 양의 isopropanol을 첨가한 후, -20°C에서 12시간 이상 보관하였다가 15,000rpm으로 50분간 원심분리하여 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA pellet은 70% ethanol로 세척한 후 TE buffer(1 M Tris, 0.5 M EDTA, pH 8.0)에 용해하였으며, GeneClean kit(Bio 101 Inc., CA, USA)를 이용하여 DNA를 정제하였다.

PCR 과정

PCR반응은 전체 25 μ l 부피로 행하며, 10-50ng DNA, 1 unit *Taq* DNA Polymerase (Bioneer), 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 0.5 μ M primer 및 200 μ M의 각 dATP, dCTP, dGTP, dTTP 등이 포함되어 있다. Primer는 NAPS (University of British Columbia)에서 제작된 No. 1-100의 10-mer oligo primer를 이용하였다.

94°C에서 2분간 pre-denaturation, 94°C에서 1분간, 44°C에서 2분간, 72°C에서 2분으로 구성된 amplifying cycle을 35회 반복하였고, 마지막으로 72°C에서 7분 동안 extension으로 구성된 3단계의 PCR과정을 거쳐 DNA product를 만들어 냈다. 이때 각각의 primer에 대한 상기의 PCR 과정을 통한 screening을 실시, 선택된 primer별로 3회 이상의 반복실험을 수행하여 재현성이 뚜렷한 것만을 primer로 결정하였다. PCR을 통하여 합성된 DNA product는 1 EtBr이 포함된 1.5% agarose gel로 전기영동하여 UV-illuminator상에서 band의 존재유무를 확인하고 이를 촬영하였다.

자료분석 및 유전학적 유연관계 분석

RAPD 결과는 필름상에 나타난 각 band를 하나의 형질로 취급하여 유, 무에 따라 각기 1과

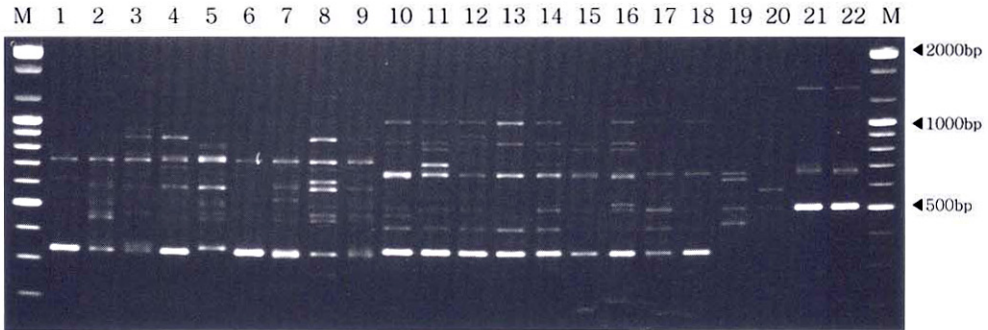


Fig. 1. Electrophoretic photograph of RAPD with the primer No. 29. M: Molecular Marker

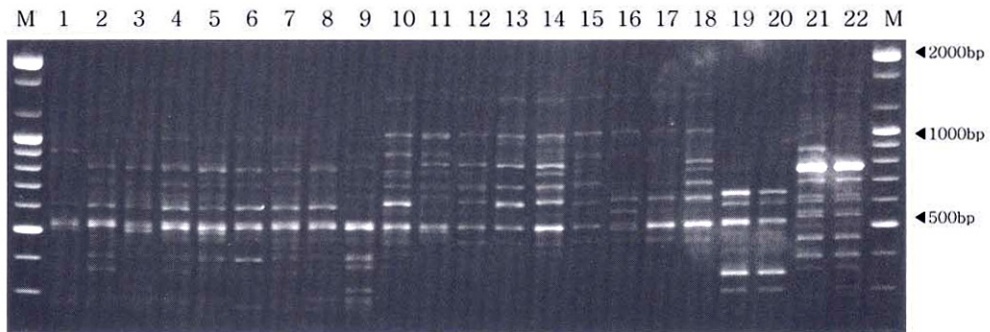


Fig. 2. Electrophoretic photograph of RAPD with the primer No. 34. M: Molecular Marker

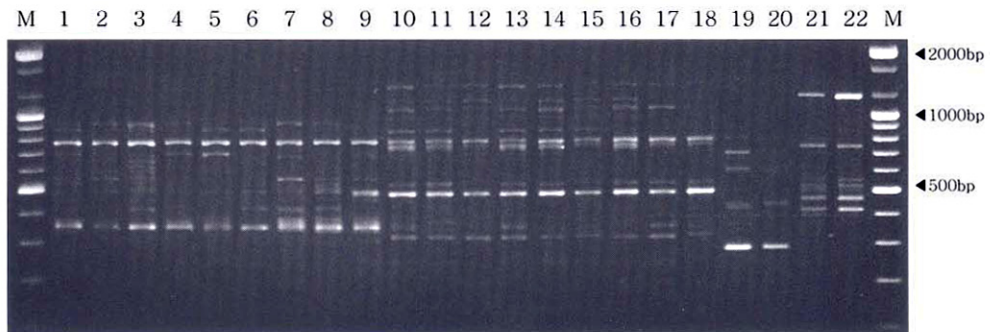


Fig. 3. Electrophoretic photograph of RAPD with the primer No. 71. M: Molecular Marker

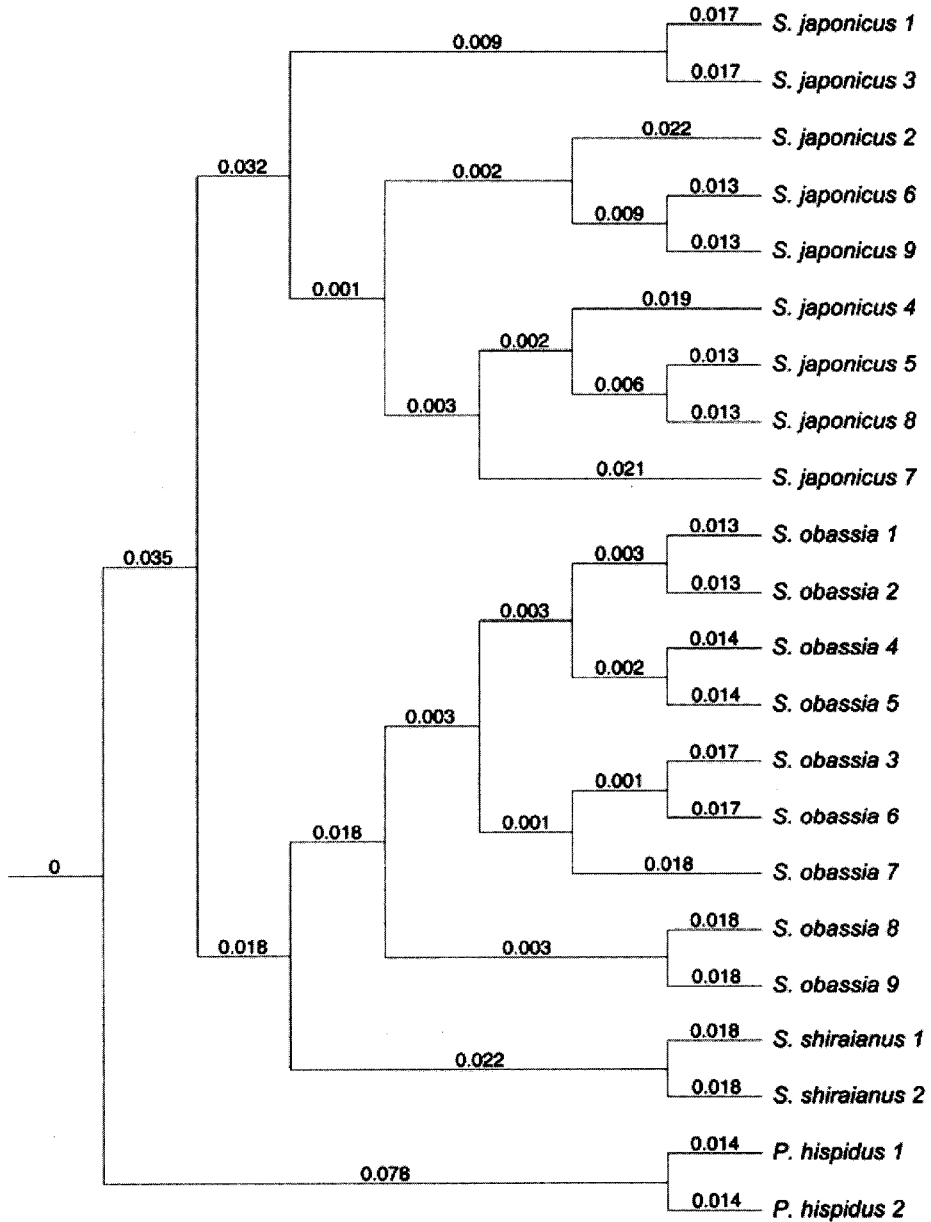


Fig. 4. A phenogram by UPGMA clustering method on Korean Styracaceae based on RAPD analysis. The branching point is positioned at a genetic distance of Nei and Li (1979).

0으로 표시하고, 전체 OTU에 대한 자료행렬을 작성하였으며, PAUP*4.0 (Swofford, 2001, version 4.08b)을 이용하여 Nei (1972)의 유전적 거리지수를 다소 변형한 Nei-Li (1979)의 거리지수를 이용하여 비유사도(상사도)지수행렬을 도출하였고, 도출된 자료행렬을 근거하여 UPGMA방법에 의한 phenogram를 작성하였다(Fig. 4).

결 과 및 고 찰

때죽나무속 식물중 쪽동백나무의 경우 한국산의 실체가 파악되지 않고 있어 일본산을 재료로 사용하였다(Table 1). 때죽나무과 22개 집단에 대한 15개 primer에 의한 RAPD 분석결과 총 238개의 유전적 표식밴드를 확인할 수 있었고, 이중 0.02%에 달하는 5개의 밴드는 전 분류군에서 공통적으로 나타났다. PCR과정을 통하여 증폭된 RAPD 절편들은 200bp에서 1,800bp 사이의 구간에서 관찰되었으며, RAPD 절편들은 종간에 서로 차이를 보이거나, 종내 개체군간에는 동일한 서로 다른 band pattern이 관찰되었다. 지역 개체군을 각각 하나의 OTU로 취급하여 기초자료행렬을 작성, 이를 근거로 Nei and Li(1979)의 유전적 거리지수를 사용하여 비유사도(상사도) 지수행렬을 도출하였고, 이를 통한 UPGMA phenogram (Fig. 4)을 작성하여 종간 및 종내 지역별개체군간의 유연관계를 분석하였다. RAPD 분석에 의한 때죽나무과 집단의 유전적 비유사도 지수행렬에 의하면, 때죽나무 집단은 비유사도 지수행렬 0.026-0.066, 쪽동백나무 집단은 0.026-0.051, 쪽동백나무 집단은 0.035, 나래쪽동백 집단은 0.028의 매우 낮은 값을 나타내어 속간 및 속내 종 집단 간에 높은 유연관계를 보인다.

UPGMA에 의한 유집분석을 수행한 결과(Fig. 4) 때죽나무의 지역별 개체군이 하나의 유집군을 형성하고, 쪽동백나무-쪽동백나무 개체군이 묶여 또 하나의 유집군을 형성하며 이 둘 유집군이 함께 묶여 최종적으로 나래쪽동백과 유집되는 형태를 보였다. 따라서 나래쪽동백속의 나래쪽동백은 군외군의 역할을 함과 동시에 속간의 유전적 거리지수를 보여주었다. 이러한 결과는 Fritsch (2001)가 DNA의 ITS 염기서열, cpDNA, *trnL* 및 *rbcL*의 염기서열을 기초로 때죽나무속 식물을 정리한 결과 *Styrax*절내의 *Cyrta*열에 때죽나무, 쪽동백나무, 쪽동백나무 3분류군이 함께 포함되나, 때죽나무가 외국의 다른 종들과 함께 하나의 유집군을 형성하고, 쪽동백나무와 쪽동백나무가 함께 또 하나의 유집군에 포함되었던 패턴과 동일한 결과를 보여주는 것이다. 또한 때죽나무 개체군은 남부지역 개체군(*S. japonicus* 2, 6)과 일본 개체군(*S. japonicus* 9)이 유집되고, 이들은 중부와 북부지역의 개체군(*S. japonicus* 4, 5, 7, 8)과 유집된 후 남부지역 완도, 마산의 개체군(*S. japonicus* 1, 3)과 최종적으로 묶였다. 한국산 때죽나무의 개체군(*S. japonicus* 1~8)과 일본산 때죽나무의 개체군(*S. japonicus* 9) 사이에서 동일한 유전적 거리지수에서 유집되는 것으로 나타났다. 쪽동백나무의 개체군은 남부지역 개체군(*S. obassia* 3, 6, 7)과 중부와 북부지역 개체군(*S. obassia* 1, 2, 4, 5)이 유집을 형성하였고, 제주도 집단(*S. obassia* 8)과 일본지역 개체군(*S. obassia* 9)이 묶인 후 최종적으로 좀

쪽동백나무와 유집됨으로서 취급된 분류군들 중 쪽동백나무와 좁쪽동백나무와의 밀접한 중간 유연관계를 밝혀주는 결과를 보였다. 한국산 쪽동백나무의 개체군(*S. obassia* 1-8)과 일본산 쪽동백나무의 개체군(*S. obassia* 9) 사이에서도 낮은 수준의 유전적 거리지수에서 유집되는 것으로 보아 한국산 개체군과 일본산 개체군간에 높은 유전적 관계를 보여주었다. 향후 Nakai (1938)에 의해 발표된 바 있는 한국산 좁쪽동백나무와 흰좁쪽동백나무의 실체가 파악되어 때죽나무과의 형질분석에 이용될 수 있도록 정밀한 실체조사가 이루어져야 할 것이다.

이상의 결과를 종합해 보면 RAPD markers에 의한 분석방법은 한국산 때죽나무과의 분류에 있어서 속간 및 중간 유연관계 그리고 종내 개체군간의 유연관계를 설명하는데 매우 유용한 방법으로 판단된다.

사 사

본 연구는 환경부 차세대핵심환경기술개발사업(과제번호 052-041-026) 및 과학기술부 프론티어연구개발사업인 자생식물이용기술개발사업단의 일부지원(PF0300201-00)에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

- Baas, P. 1972. Anatomical contributions to plant taxonomy. 2. The affinities of *Hua* Pierre and *Afrostryax* Perkins *et* Gilg. *Blumea* 20: 161-192.
- Bentham, G. and J. D. Hooker. 1873. *Genera Plantarum*. Vol 2. Lovell Reeve, London. 1279 pp.
- Copeland, H. F. 1938. The *Styrax* of northern California and the relationships of the *Styracaceae*. *Amer. J. Bot.* 25: 771-780.
- Cronquist, A. 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press, New York.
- Dickinson, W. C. 1993. Floral anatomy of the *Styracaceae*, including observations on intra-ovarian trichomes. *Bot J Linn Soc.* 112: 223-255.
- _____ and K. D. Phend 1985. Wood anatomy of the *Styracaceae*: evolutionary and ecological considerations. *International Association of Wood Anatomists Bulletin.* 6: 3-22.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation methods for small quantities of fresh tissues. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15
- Engler, A. and E. Gilg. 1924. *Syllabus der Pflanzenfamilien*. Borntraeger, Berlin.
- Fritsch, P. W. 2001. Phylogeny and biogeography of the flowering plant genus *Styrax* (*Styracaceae*) based on chloroplast DNA restriction sites and DNA sequences of the internal transcribed spacer region. *Mol. Phylogenet. Evol.* 19: 387-408.
- Hemsley, W. B. and F. B. Forbes. 1889. *Styracaceae*. *Bot. J. Linn. Soc.* 26: 75-77.
- Heywood, V. H. 1985. *Flowering Plants of the World*. Prentice Hall, Englewood Cliffs.
- Hutchinson, J. 1967. *The Genera of Flowering*. Vol 2. Clarendon, Oxford.
- _____. 1973. *The Families of Flowering Plants Arranged according to a New System Based on Their Probable Phylogeny*. 3d ed. Clarendon, Oxford.
- Hwang, S. and J. Grimes. 1996. *Flora of China*. 15: 253-271.
- Lee, T. B. 1986. *Illustrated Flora of Korea*. Hyangmoonsa, Seoul (in Korean).
- Mori, T. 1921. *Enumeration of Plants* (in Japanese).
- Morton, C. M. and W. C. Dickinson. 1992. Comparative pollen morphology of the *Styracaceae*. *Grana* 31: 1-15.
- Nakai, T. 1911. *Flora of Koreana*. *Journ. Coll. Sci. Univ. Tokyo* 31: 85 (in Japanese).
- _____. 1938. *Notulæ ad Plantas Asiæ Orientalis* (V). *J. Jap. Bot.* 14: 2-3.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Amer. Nat.* 106: 283-292.
- _____ and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in

- terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
- Palibin, J. W. 1900. *Styracaceae Crataegoides. Conspectus Florae Koreae*. Vol. 2.
- Palser, B. F. 1961. Some aspects of embryology in the Ericales. *In* *Recent Advances in Botany*. Vol. 1: 685-689. University of Toronto Press, Toronto.
- Perkins, J. 1907. *Styracaceae*. *In* A. Engler, ed. *Pflanzenreich IV*, 241 (Heft 30). Engelmann, Leipzig.
- _____. 1928. *Ubersicht uber die gattungen der Styracaceae*. Engelmann, Leipzig. p 36.
- Schadel, W. E. and W. C. Dickison 1979. Leaf anatomy and venation patterns of the *Styracaceae*. *J. Arnold Arbor.* 60: 8-37.
- Steenis, C. G. G. J. and R. C. B. van der Brink. 1967. *Miscellaneous botanical notes XVI*. *Bot. Jahrb. Syst.* 86: 385-401.
- Swofford, D. L. 2001. *PAUP-Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods)*. ver. 4.0b8. Academic Press, Sunderland, MA.
- Takhtajan, A. 1997. *Diversity and Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press, New York.
- Thorne, R. F. 1992. An updated phylogenetic classification of the flowering plants. *Aliso* 13: 365-389.
- White, F. 1981. *Lissocarpaceae*. *In* Maguire, B. ed. *The Botany of the Guayana Highland*, pt 11. *Mem. New York Bot. Gard.* 32: 329-330.
- Willis, J. C. 1937. *A Dictionary of the Flowering Plants and Ferns*. 8th ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Analysis of Relationship of the Korean Styracaceae by RAPD Markers

Hyuk-Jin Kim, Kyoung-Hwan Tae and Joo-Hwan Kim*

Department of Life Science, Daejeon University, Daejeon 305-716

In order to estimate the relationships among four taxa (*Styrax japonicus*, *Styrax obassia*, *Styrax shiraianus* and *Pterostyrax hispidus*) of two genus in the Styracaceae and their regional populations, RAPDs analysis was performed. Fifteen random primers generating 238 RAPD bands were enough to reveal differences in genotype bands. They were clustered into three groups by the UPGMA phenogram. The first group was *Styrax japonicus* populations, the second group was consisted of *Styrax obassia* populations and *S. shiraianus* populations, and third group was *Pterostyrax hispidus* population. The UPGMA phenogram based on RAPD analyses showed that *Styrax obassia* and *S. shiraianus* had the closest relationship among four taxa. Species as well as genera of the Korean Styracaceae were well discriminated by the RAPD analyses.

Key words: *Pterostyrax*, RAPD, relationship, *Styrax*, Styracaceae,

*Corresponding author: Phone +82-42-280-2434, Fax: +82-42-285-2434, kimjh@dju.ac.kr