

Chloroplast Gene Marker를 이용한 현사시나무 選拔 Clone間 Restriction Fragment Length Polymorphism 分析

洪庚洛 · 金龍律 · 玄正悟

(서울大學校 農科大學 林學科)

Restriction Length Polymorphism Analysis of *Populus alba* x *P. glandulosa* F1 clones using Chloroplast Gene Markers

Kyoung Nak Hong, Yong Yul Kim, Jung Oh Hyun

(Dept. Forestry, Seoul Nat'l Univ.)

Summary

The total DNA samples, isolated from 4 clones of *P. alba* x *P. glandulosa* were digested with 6 restriction enzymes and hybridized with ³²P-labeled gene probe from pCB16, pCB19 and pCB35 containing 2-4 kb of Chloroplast DNA. When DNA samples were digested with ClaI, EcoRI and BamHI and hybridized with the probes from pCB16 and pCB29, we found the same band pattern clone 1 and 3 and also between clone 2 and 4. However, restriction site variation was found between clone 1 and 2 and also between clone 3 and 4. This result is in good agreement with the fact that the pollen parent is common for all 4 clones while clone 1 and 3 share the same seed parent and clone 2 and 4 share another same seed parent. This indicate that the inheritance of chloroplastal DNA in *Populus* may be maternal and that the 'RFLP' method used in our study can be useful for identification of aspen clones.

緒 論

既存의 林木育種學 이론과 새로운 분자생물학적 기법의 接木方法으로써 DNA marker를 이용한 RELP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 分析은 個體 또는 집단 의 유전 變異量과 變異幅에 대한 정확한 정보를 제공하여 育種 選拔世代의 단축과 개량 방향 등을 제시하여 줄 수 있다. 林木을 대상으로 하는 기존의 유전변이 연구방법은 엽의 모양이나 樹脂 특성 등 개체의 외부형태 즉, 표현형에 대하여 통계적으로 검정하여 변이를 추정하여 왔는데 (Hyun and Hyun, 1985; Kim and Kim, 1981) 이러한 방법으로는 種間 구별은 가능하지만, 雜種現象이나 同一種의 個體木간 유전변이를 정확히 究明하기에는 부족하다. 한편 생화학적 접근方法으로 근래 수년간 연구되어온 同位酵素 分析은 유전자의 2차 산물인 protein을 분석하는 것인데 (Kim and Kim, 1977; Kim and Lee, 1983; Lee and Kim, 1985; Son, 1982) 고등식물체의 유전자의 발현과 조절이 立地, 기후 등 외부 환경적요인에 영향을 받으면서 각 발

달 및 분화단계에 따라 수행되기 때문에 개체의 유전적 변이와 환경적변이를 동시에 포함하므로 정확한 유전적 변이의 추정이 힘들며, 또한 무엇보다도 특정 동위효소의 발현에 관련된, 뚜렷히 구별할 수 있는 대립 유전자의 수가 적다는 것이 커다란 문제점으로 지적될 수 있다.

모든 고등생명체의 유전양식이 DNA와 RNA에 의해 이루어진다고 할 때, 결국 식물체의 유전변이 분석은 核酸(DNA와 RAN)을 다루는 것이 가장 정확한 方法이며, 실지로 최근 비약적 발전을 이루고 있는 分子生物學의 연구는 核酸 수준에서 種間, 種內 個體間 분류와 유전변이를 확인할 수 있는 여러 방법을 제시해 주고 있다.

이중 'RFLP' 분석은 核酸鹽基序列上的 自然的 突然 變異 현상을 이용하는 것으로, 4-8 Base pair를 인지하여 절단할 수 있는 제한효소(Restriction enzyme)를 처리한 후 크기와 길이 등이 서로 다른 여러 DNA 斷片들을 얻은 다음, 이들을 상호 비교하여 각 개체의 유전자간에 유전적특성을 比較, 分析하는 方法이다 (Birley and Croft, 1986; Birky, 1978; Boyton et al, 1987). 이

방법으로는 제한효소 切斷 部位에 있는 DNA sequence가 Deletion, Insertion 및 Point mutation 등에 의해 단 하나의 염기서열의 변화가 발생하더라도 사용된 임의의 제한효소에 의해 인지 및 절단되는 정도의 차이가 매우 크게 나타나기 때문에 정밀한 유전변이를 識別할 수 있는 것이다. 흔히 RFLP 분석에는 純粹分離가 비교적 용이한 total DNA를 利用하는데, 그 대부분을 차지하는 核 DNA는 Mendel의 유전법칙에 따라 交配兩親樹 모두에서 유전정보를 입수하며 양친의 유전력 차이에 따른 유전 정보량의 변화 때문에 次代檢定을 실시해야만 정확한 유전양식의 究明이 가능하다(Castor, 1980; Douglas, 1981; Kriebel, 1985). 반면 chloroplast나 mitochondria의 DNA는 非멘델性인 細胞質유전을, 특히 林木이나 기타 고등식물에서는 母性遺傳을 많이 하기 때문에 當代에서 유전변이의 측정과 母樹選抜이 가능하지만(Govindaraju et al, 1988; Hatfield et al, 1985; Hosaka, 1986; Kung, 1982) 이들 Organelle DNA의 순수분리가 어렵다는 기술적인 단점이 있으나, 최근 Palmer(1982)와 Hanson(1986) 등에 의해 고등식물체에서 이러한 Organelle DNA의 순수분리 방법이 확립됨에 따라 이러한 DNA를 이용하려는 경향이 많은 실정이다.

本 研究에서는 total DNA를 분리한 後 chloroplast gene marker를 이용한 Southern hybridization 방법으로 우리나라 주요 Biomass 및 조림장려 수종인 현사시 나무의 선발 clone(현사시 1, 2, 3, 4호) 간에 존재하는 chloroplast 遺傳 變異량을 측정, 각 clone간의 유전변이 究明하고 Genus *Populus*에서의 Chloroplast genome의 母系 遺傳 양상을 확인하였다.

材料 및 方法

1. 供試樹種

본 연구에서 사용한 현사시 시료(葉)은 임목육종연구소 內 현사시나무 Clone 保存林에서 현사시 1, 2, 3, 4호 각 號 當 각 Clone 內에서 채취하였고, 잎은 1년생 가지에서 채취하여 사용하였다.

2. 현사시 Total DNA 분리

DNA의 분리 및 Southern hybridization을 위한 일련의 실험과정은 Ausubel등(1987), Maniatis(1982), Hauswirth등(1987)과 농업기술연구소(1987) 등의 방법

에 준하여 수행하였다. 사용된 buffer의 조성표는 <附表 1>에 나타낸 바와 같다.

1) Total DNA 추출

현사시 Clone 當 10 g의 葉을 마쇄한 후 시료 g當 2-4 ml 정도의 extraction buffer를 첨가하고 여기에 10% Sarkosyl 용액을 더한 다음, 6,000 rpm(7,500 Xg)에서 15분간 低温(4°C)상태의 遠心分離를 실시하여 crude DNA pellet을 얻었다.

2) Total DNA 순수분리

DNA pellet을 9 ml의 TE buffer에 녹이고, 고체 CsCl를 9.7g 넣어 鎔解시켜 8,000 rpm에서 10분간 低温(4°C) 원심분리하였다. 10 mg/ml 농도의 Ethidium bromide 0.5 ml를 첨가하여 얼음 속에 두었다가 원심분리한 후 沈澱物을 제거하였다. 상층액을 하루동안 超高速 遠心分離(60,000 rpm, 20°C) 시킨 다음, Isopropanol를 첨가하면서 잔존 EtBr를 제거시키고 Ethanol precipitation방법에 따라 DNA pellet을 얻었다. 얻어진 DNA pellet을 TE buffer에 다시 녹인 後 1/10 vol의 3M sodium acetate와 2 vol의 ethanol로 최종적으로 不純物을 제거하고, 원심분리하여 다시 DNA pellet을 얻은 다음, TE buffer에 재용해시켜 회석하고 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 아래 식을 사용 DNA 含量을 決定하였다.

$$\text{DNA 含量}(\mu\text{g/ml}) = \text{흡광도값} \times \text{회석배수} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

3. 제한효소 처리 및 Southern blotting

본 연구에서 사용된 제한효소의 일반적 명세표는 <표 1, 2>와 같다. 2 μg/ml의 DNA에 대략 2-3 units/μg의 제한효소와 효소반응을 돕기 위하여 0.4 mM의 고농도 Spermidine 용액을 첨가하여 37°C에서 하루동안 반응시킨 후 EDTA-indicator 용액을 넣어 효소반응을 終結시켰으며 처리가 끝난 DNA 용액을 냉장고에(4°C) 保管하였다가 Agarose gel electrophoresis를 실시한 후 Maniatis(1982) 등의 방법에 준하여 Nylon membrane filter에 blotting시켰다.

4. 염색체 Gene Probe의 준비

Southern hybridization을 위해 사용된 gene probe는 葉綠體 gene series中 pCB16, pCB29, pCB35에 cloning된 DNA로 Pst I의 recognition site를 지니고 있고,

Table 1. Information for restriction enzymes

Enzyme name	Salt conc.	Incubation temperature	Recognition sequence	Claved end situation
HamHI	med.	37°C	G ↓ GATCC	ladder end
Clal		37°C	AT ↓ CGAT	ladder end
DdeI	med.	37°C	C ↓ TNAG	ladder end
EcoRI		37°C	AAA ↓ TTT or GGA	blunt end
PstI	med.	21-37°C	↓ TCC	ladder end
XhoI	high	37°C	CTGCA ↓ G C ↓ TCGAG	ladder end

Table 2. Buffers for restriction endonuclease digestion

Buffer	NaCl	Tris. Cl (pH 7.5)	MgCl ₂	Dithiothreitol
Medium	50 mM	10 mM	10 mM	1 mM
High	50 mM	50 mM	10 mM	1 mM

核 DNA 또는 mitochondrial DNA와 sequence homology가 없으며, 그 크기는 2-4 kb 정도이다.

1) E. coli에서의 Plasmid 순수분리

LB 液體배지에서 增殖된 대장균을 원심분리하여 침전시킨 후 LiCl buffer에 녹이고 50 μ l의 Lysozyme용액을 첨가했다. 100°C에서 3분, 얼음에서 5분간 처리하고 10,000 rpm으로 원심분리(10분)하여 상등액을 취하였다. 2 vol의 95% cold ethanol을 첨가하여 -80°C에서 15분간 定置하고 원심분리(10,000 rpm, 15분)하여 얻어진 pellet을 70% ethanol로 세척하고 다시 원심분리, 氣乾시킨 後, 100 μ l의 TE buffer에 용해시킨다음 원심분리(10,000 rpm, 5분)하여 얻어진 상등액의 DNA 함량을 측정했다. 여기에 Pst I을 위 과정 3과 같이 처리하고 전기영동하여 probe로 사용될 엽록체 DNA를 분리하였다.

2) 엽록체 DNA의 放射能 標識

위의 과정에서 분리한 100 ng의 DNA Probe에 3 unit의 Klenow fragment DNA polymerase와 [α -³²P] dCTP를 첨가하여 Random Primer 방식에 따라 end-labeling 시키고 Scintillation Counter로 放射能 濃度를 測定하였다.

5. Total DNA의 3' Single-stranded Extension

제한효소 XhoI로 처리한 상태의 total DNA에 [α

-³²P]dCTP와 Klenow fragment polymerase를 넣어 반응시킨 後 방사능 標識이 된 DNA들을 분리하였다.

6. Southern Hybridization¹

1) Prehybridization

hybridization buffer를 65°C에서 중탕시키고 동시에 Salmon sperm DNA를 멸균수에 넣어 가열한 후 얼음속에서 급냉시켰다. Southern blotting된 nylon membrane filter와 hybridization buffer 및 salmon sperm DNA를 hybridization box에 함께 넣고 밀봉하여 65°C에서 4시간 이상 incubation하여 salmon sperm DNA가 nylon membrane에 binding되도록 prehybridization시켰다.

2) Southern Hybridization

90°C에서 10분간 가열하여 labeling된 probe를 denaturation시킨 후, hybridization box에 이를 주입하여 65°C에서 하루동안 incubation하였다. filter를 box에서 꺼낸다음 65°C의 2 × SSC - 0.1% SDS 세척액에 filter를 옮겨 진탕한 다음, 다시 1 × SSC 1/ 세척액과 0.5 × SSC 용액에서 filter를 세척하였다.

3) Autoradiography

Wrap으로 감싼 filter와 KODAK Safty X-ray film를 Screening cassettes에 넣은 후 4°C의 암실에서 24시간 동안 감광시킨 다음 꺼내어 현상하였다.

7. 자료분석

Nei와 Li(1979)의 公式에 의해 鹽基置換率을 계산하고, Clone간의 유연關係圖를 作成하였다.

結果 및 考察

1. Autoradiography 및 RELP analysis

엽록체 DNA를 probe로 이용하여 4개 현사시 clone간의 엽록체 유전변이를 조사한 RFLP 결과는 사진 1과 같다. 제한효소 EcoRI으로 자른 4개 현사시 clone의 DNA fragment를, pCB16에 cloning되어 있던 엽록체 DNA의 probe에 southern hybridization시킨 경우에 있어서는 1호와 3호간에는 7개, 2호와 4호간에는 5개의 뚜렷한 공유 Band를 나타냈으나, 4개의 clone이 동일하게 공유하는 band pattern은 보이지 않았다. 또한 BamHI을 처리한 DNA에 pCB16의 probe를 hybridization시킨 경우에 있어서도 1호는 3호와 2호는 4호간에 band pattern이 일치하였고, 전체적으로 4개의 clone이 모두 공유하고 있는 1개의 band가 있어 이를 Nei의 염기치환율 산출 방식에 준하여 계산해 본 결과 1호-3호 집락과 2호-4호 집락간에 18.6%의 염기치환율이 있음을 알 수 있었다. ClaI 처리와 pCB16의 probe 실험에서는 1호와 3호간에 동일한 band pattern을 보였지만, 2호와 4호간에는 2호에 존재하지 않는 band 1개가 4호에 나타났는데 이것은 현사시 2호의 엽록체 genome상에 sequence 결실이 생겨 band가 나타나지 않았거나 혹은, 4호에서 중복이 생겨 band가 잘 보이는 band size variation에 의한 결과로 생각된다(Palmer, 1982; Schaffer and Sederoff, 1981). 한편, DdeI 처리와 pCB35의 probe를 이용한 실험에서는 현사시 1호의 DNA loading과 감광시에 오염이 심하여 lane 1에서의 정확한 band數의 구별이 어렵지만, 1호와 3호간에 그리고 2호와 4호간에 각각 1개씩의 fragment size 차이에 따른 band의 위치 변화가 관찰되었는데 이러한 현상은 제한효소의 염기 認識부위에서 base 변이가 생기거나, 혹은 다른 genome상에 point mutation이 발생하여 새로운 restriction site가 생성되는 것으로, 이를 restriction site variation이라고 하며 대규모 gene의 이동이 필요한 site variation보다는 빈번히 발생하고 유전자 斷片多樣性의 주요 원인이 된다(Walbot and Cullis, 1985; Wallace, 1982). EcoRI

처리와 pCB29의 probe를 이용한 실험에서는 1호와 3호간에 2개 위치의, 2호와 4호간에는 1곳에서의 restriction site variation에 의한 band 변화가 나타났다. Neal 등(1986)도 美松의 chloroplast DNA 분석에서 次代에서 兩親樹와는 다른 band가 중복 또는 결실에 의해 생성된다고 보고하였는데, 이때의 band들도 이동거리만 차이가나고 총 band수는 동일한 size variation이었다.

Total DNA를 XhoI으로 절단하고 3'single-stranded extension한 실험은 blotting된 band의 구별이 모호하여, 식별이 가능한 한도내에서 염기치환율의 계산을 실시하였는데 현사시 1호에서는 13개, 3호에서는 12개, 2호에서는 11개, 4호에서 9개의 band를 구별해 낼 수 있었으며, 1, 2, 3, 4호가 공유하고 있는 band도 2개가 있었다. 또한 total DNA의 경우에도 엽록체 DNA의 probe를 이용한 실험에서와 같이 1호와 3호가, 2호와 4호가 비슷한 유전변이 양상을 보이고 있었다.

2. 염기치환율 계산에 의한 유전변이

본 연구의 autoradiograph 분석에 사용된 Nei와 Li(1979)의 염기치환율 계산식(표 3)은 원래 특정 제한효소의 절단처리에 따른 총 band에 적용되는 식이지만, 본 실험에서와 같이 probe를 이용한 경우에도 결과 해석상에 약간의 차이만 있을 뿐 적용가능하리라고 생각된다. 일반적으로 DNA간의 Hybridization에서는 probe가 80%의 homology만 갖고 있어도 임의의 DNA 결합을 유지할 수 있기 때문에, 최대 200-300 bp의 sequence 차이가 생길 수 있으며 이런 수치는 제한효소가 염기를 인식함에 있어 流動性을 나타내는 원인이 되지만, 새로운 band의 생성을 유도할 정도로 중요하지는 않다. 반면 특정 제한효소(type II)의 사용은 4-9 base를 정확히 인식하여 DNA 절편의 크기를 달리할 수 있기 때문에 본 실험에서와 같이 probe를 사용한 실험에서도 Nei와 Li의 공식을 적용하여 restriction site의 염기변화를 알 수 있는 것이다.

본 연구의 Nei와 Li(1979)의 공식에 따른 염기치환율은 표 3과 같다. 엽록체 DNA의 변이량(염기치환율)은 현사시 1호와 3호간의 경우에는 아주 없거나 10% 정도였으며, 2호와 4호간에서도 ClaI 처리(23.37%)를 제외하고는 10% 정도로 나타났다. 3'single-stranded extension이나 ClaI 처리 결과에서 1호와 3호 집락과 2호와 4호 집락의 염기치환율은 각 clone간의 평균 염기치환율을 사용해서 구했는데, 현사시 1호와 3호의 집락과 2호

와 4호의 집락간 변이는 30% 정도에서 결정되나, 4개 clone의 공유 band가 없을 경우에는 변이량을 규정할 수 없었다. 이러한 비규정관계는 엽록체 sequence가 clone간 완전히 다르기 때문이 아니라 엽록체 DNA의 probe의 특성상 homology 부분을 갖는 부위가 적을 수 있고 그에 따라 약간의 제한효소 인식부위의 차이라도 큰 변이율을 나타내기 때문이다.

각각의 제한 효소 인식부위의 염기치환율을 기본으로

작성한 현사시 clone별 유연관계도는 그림 2에서 그림 7에 나타내었다. 전체적으로 1호와 3호간, 2호와 4호간의 band pattern이 동일한 양상을 보여, 이들의 양친수 혹은 편친의 근원이 동일함을 반영하고 있다.

Uyeki(1926)가 현사시나무의 화분수인 수원사시나무가 수원 여기산에서 자생함을 최초로 보고한 사실과 孫과 朱(1985)가 수원사시나무의 개체간에는 동위효소에 변이는 없는 것으로 미루어 봐서 수원사시나무들은 단

Table 3. RFLP phylogentic values of *P. alba* × *glandulosa*

$S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ N_x & N_y : total # of bands in each samples N_{xy} : total # of shared bands in two samples $P(\%) = -(3/2) \text{LN}(4 * S * (1/2r) - 1) / 3 * 100$ P: base substitution ratio					
EcoRI (6)	pCB 16				
	Populus	N_{xy}	$N_x + N_y$	S	P
	1-3	7.00	14.00	1.00	0.00
	2-4	5.00	10.00	1.00	0.00
	others	0.00	11.00	0.00	infi.
BamHI (6)	pCB 16				
	Populus	N_{xy}	$N_x + N_y$	S	P
	1-3	3.00	6.00	1.00	0.00
	2-4	3.00	6.00	1.00	0.00
	others	1.00	6.00	0.17	18.60
ClaI (4)	pCB 16				
	Populus	N_{xy}	$N_x + N_y$	S	P
	1-3	6.00	12.00	1.00	0.00
	2-4	1.00	5.00	0.40	23.37
	others	0.00	8 / 9	0.00	infi.
DdeI (4)	pCB 35				
	Populus	N_{xy}	$N_x + N_y$	S	P
	1-3	2.00	6.00	0.33	10.22
	2-4	2.00	6.00	0.67	10.22
	others	0.00	6.00	0.00	infi.
EcoRI (6)	pCB 29				
	Populus	N_{xy}	$N_x + N_y$	S	P
	1-3	5.00	14.00	0.71	5.74
	2-4	3.00	8.00	0.38	4.81
	others	1.00	11.00	0.09	29.32
XhoI (6) 3'labling	Populus	N_{xy}	$N_x + N_y$	S	P
	1-3	10.00	25.00	0.80	3.73
	2-4	8.00	20.00	0.80	3.73
	1-2	2.00	24.00	0.17	30.67
	1-4	2.00	22.00	0.18	29.14
	2-3	2.00	23.00	0.17	30.67
	3-4	2.00	21.00	0.19	28.32
	1 / 3-2 / 4				29.70

일 clone에서 번식한 것이라는 주장과 현사시 1호의 모수인 은백양(*Populus alba*)과 현사시 2호의 모수가 된 은백양(*P. alba* × *alba*) 간에 동위효소 ACP band에서 변이를 확인한 보고등을 종합해 보면(Son, 1987, Son and Kim, 1986; Son and Joo, 1985), 본 연구에서 확인된 현사시 1호와 3호간, 2호와 4호간 엽록체 DNA의 probe 실험 및 total DNA의 3'-single stranded extension 실험에서 나타난 확연한 band pattern 차이는 현사시나무의 모수인 은백양의 차이에 유래하는 것으로 볼 수 있다. 또한 본 연구에서 사용된 엽록체 DNA의 probe는 핵이나 mitochondria의 DNA와는 hybridization을 이룰 만큼 큰 homology는 지니지 않는 엽록체 고유의 sequence를 갖는 DNA 단편들로서, 이들의 band pattern이 곧 현사시나무의 엽록체의 유전형식이나 엽록체내의 유전변이를 나타낸다고 할 수 있다.

결국 현사시나무의 변이원은 모수인 은백양에 영향을 받고, 본 연구에서의 엽록체 DNA의 probe이용은 엽록체 유전형상을 대변할 수 있다는 사실에서, 현사시나무의 엽록체는 모계의 유전방식을 다르고 있음을 추정할 수 있었다. 이러한 사실은 임목에서 활엽수 같은 피자식물의 엽록체는 모계유전을 하고 있다는 여러 연구보고들과도 잘 부합되는 실험결과라고 생각된다. 한편, Neal과 Sederoff(1988)는 미송과 red wood에서 분리한 chloroplast DNA는 부계와 유사한 band pattern을 갖고 있음을 보고 하였고, Strauss등(1989)도 Pinus속 17개 수종의 유연관계 연구에서 chloroplast DNA가 부계 유전형상을 보임을 보고한 바 있으나 이러한 연구의 재료가 모두 침엽수에 해당하는 것으로 볼 때 침엽수와 활엽수에서 엽록체 유전이 각기 독특한 양상을 보인다는 것은 흥미로운 사실로 보다 더 많은 수종에 대한 RFLP analysis연구가 요구된다고 하겠다.

이상의 실험결과에서 나타난 바와 같이 현사시나무에 있어 엽록체 DNA를 이용한 RFLP 분석은 모계를 추정할 수 있는 수단으로, 그리고 고유의 Genome량이 적기 때문에 band pattern에 의해 손쉽게 세포질 유전변이량을 밝힐 수 있는 방법으로 매우 유용하다고 할때, 임목육종에 있어 당대에 모수의 유전적 구조와 계통간의 유전적 유연관계를 규명하는 것은 기존의 임목육종에서 근간을 이루어 왔던 선발육종방법에서 매우 중요한 의미를 지닌다고 할 수 있으며, 또한 표현형에 의존하던 식물분류학적 연구가 점차 정확한 유전적 배경을 요구하고 있는 시점에서, 엽록체 DNA를 이용한 RFLP 분

석은 이러한 요구를 수용하는 새로운 방법론이라고 생각된다.

結 論

本 研究는 현사시나무 1, 2, 3, 4호에서 채취한 葉의 Total DNA를 對象으로 chloroplast gene marker를 이용한 Southern hybridization 실험과 RFLP 分析을 통하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

식물 葉綠體 DNA 上에만 존재하는 수개의 gene들을 probe로 사용하여 Southern hybridization을 실시하였는데, total DNA를 *Clal* 制限酵素로 처리하고 pCB16에 cloning되어 있던 엽록체 DNA를 probe로 이용한 경우에는 현사시 2호와 4호간에 size variation이 確認되었다. 그리고 *EcoRI* 처리와 pCB29에서 분리한 엽록체 DNA를 probe로한 결과에서는 1호와 3호간, 2호와 4호간에 restriction site variation에 의한 band들이 나타났다. 엽록체 DNA를 이용한 Southern hybridization이나 total DNA의 3'-single-stranded extension 실험에서 전체적으로 현사시 1호는 3호와, 그리고 2호는 4호와 유사한 band pattern을 나타내어, 이들 두 集落의 交配母樹가 각기 區別됨을 반영하였다.

本 研究의 結果 현사시나무에 존재하는 1호, 3호와 2호, 4호간 엽록체 DNA의 確然한 구분은 母樹인 은백양의 차이로 인한 것이고, 따라서 현사시나무에서 엽록체 DNA는 母系로 遺傳된다고 하겠다.

引用文獻

- Abusubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl (ed). 1987. current Protocols In Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., 10. 16. 10.
- Birley, A. J. and J. H. Croft. 1986. Mitochondrial DNAs and phylogenetic relationships. p. 107-137. In S. K. Dutta (ed.). DNAs Systematics Vol. 1: Evolution. CRC Press, Inc., Florida. p. 229.
- Birky, C. W., Jr. 1978. Transmission genetics of mitochondria and chloroplasts. Ann. Rev. Genet. 12: 471-512.
- Boyton, J. E., E. H. Harris, B. D. Burkhardt, P. M.

- Lamerson and N. W. Gilham. 1987. Transmission of mitochondrial and chloroplast genome in crosses of (*Chlamidomonas*). PNAS USA 84: 2391-2395.
- Castor, F. J., N. Arnheim and M. V. Simpson. 1980. Mitochondrial DNA Polymorphism: evidence that variants detected by restriction enzymes differ in nucleotide sequence rather than in methylation. PNAS USA 77(11): 6415-6419.
- Douglas, G. C., L. R. Wetter, W. A. Keller and G. Setterfield. 1981. Somatic hybridization between (*Nicotiana rustica*) and (*N. tabacum*): IV. analysis of nuclear and chloroplast genome expression in somatic hybrids. Can. J. Bot. 59: 1509-1513.
- Engels, W. R. 1981. Estimating genic divergence and genetic variability with restriction endonucleases. PNAS USA 78(10): 6329-6333.
- Govindaraju, D. R., D. B. Wagne, G. P. Smith and D. B. Dancik. 1988. Chloroplast DNA variation within individual trees of (*Pinus banksiana*-*P. contorta*) sympatric region. Can. J. For. Res. 18: 1347-1350.
- Hanson, M. R., et al. 1986. Isolation of mitochondria and mitochondrial DNA. In Methods in enzymology, S. P. Colowick and N. O. Kaplan eds, 437pp.
- Hatfield, P. M., R. C. Shoemaker and R. G. Palmer. 1985. Maternal inheritance of chloroplast DNA within the genus (*Glycine*), subgenus (*soja*). J. Heredity 76: 373-374.
- Hauswirth, W. W., L. O. Lim, B. Dujon and G. Turner. 1987. Methods for studying the genetics of mitochondria. pp. 171-224. In V. M. Darley-Usmar (ed.). Mitochondria; A Practical Approach. IRL Press Ltd., Oxford. p. 244.
- Hyun, S. K. and J. O. Hyun. 1985. A study of the standard characteristics for nomenclature and registration for poplars of the Section (*Leuce*). p. 139-187. J. Natl. Acad. Sci. Korea Natu. Sci. Series Vol. XXIV.
- Kim, C. S. and S. S. Kim. 1977. Variation in the patterns of isoperoxidase in Genus (*Populus*)(II). J. Kor. For. Soc. 36: 1-4.
- Kim, C. S. and S. S. Kim. 1979. Vascular bundle system of petiol in the hybrid (*Populus alba* X *glandulosa*) and parents. J. Kor. For. Soc. 43: 1-5.
- Kim, G. T. and D. K. Lee. 1983. A Technique for selecting (*populus alba* XP. *glandulosa*) F1 clone with some physiological characters. J. Kor. For. Soc. 59: 15-30.
- Kim, S. S., C. S. Kim and Shozo Noda. 1981. Studies on the taxonomical characters in (*Populus tomentiglandulosa*) and (*P. glandulosa*). J. Kor. For. Soc. 51: 1-21.
- Kriebel, H. B. 1985. DNA sequence components of the (*Pinus strobus*) nuclear genome. Can. J. for. Res. 15: 1-4.
- Kung, S. D. 1977. Expression of the chloroplast genomes in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 28: 401-437.
- Kung, S. D., Y. S. Zhu and G. F. Shen. 1982. (*Nicotiana*) chloroplast genome III. chloroplast DNA evolution. Theor. Appl. Genet. 61: 73-79.
- Lee, D. K., G. T. Kim. and K. J. Lee. 1985. Variations in peroxidase and nitrate reductase activities and growth of (*Populus alba* X *P. glandulosa*) F1 clones. J. Kor. For. Soc. 70: 63-71.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. CSH Lab. Pub., NY.. pp. 545.
- Neal, D. B. and R. R. Sederoff. 1988. Inheritance and evolution of conifer organelle genomes. p. 251-264. In J. W. Hanover (ed.). Genetic Manipulation of Woody Plants. Plenum Press, NY. pp. 519.
- Neale, D. B., N. C. Wheeler and R. W. Allard. 1988. Paternal inheritance of chloroplast DNA in Douglas-fir. Can. J. For. Res. 16: 1152-1154.
- Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. PNAS. USA. 76: 5269-5373
- Netwon, K. J. 1988. Plant mitochondrial genomes: organization, expression and variation. Ann. Rev. Plant Physiol. 39: 503-532.

- Palmer, J. D. 1982. Physical and gene mapping of chloroplast DNA from (*Atriplex triangularis*) and (*Cucumis sativa*). *Nucle. Acids Res.* 10(5): 1593-1605.
- Palmer, J. D. 1986. Chloroplast DNA and phylogenetic relationships. pp. 63-80. In S. K. Dutta (ed.). *DNA Systematics Vol. II: Plants*. CRC Press, Inc., Florida. 203pp.
- Schaffer, H. E. and R. R. Sederoff. 1981. Improved estimation of DNA fragment lengths from agarose gels. *Anal. Biochem.* 115: 113-122.
- Son, D. S. 1982. Estimates of genetic variation in the high growth of the parents of (*Populus alba* X *Populus glandulosa*). *J. Kor. For. Soc.* 58: 27-33.
- Son, D. S. 1987. A study on genetic characteristics and growth of (*Populus alba* X *Populus glandulosa*) F1 and their parents. pp. 69. *Seoul Natl. Univ. Ph.D. paper.*
- Son, D. S. and K. S. Kim. 1986. Variation and heredity of stomatal frequency, stomatal size and transpiration in (*Populus alba* X *Populus glandulosa*) and its parents. *J. Kor. For. Soc.* 75: 51-54.
- Son, D. S. and S. H. Joo. 1985. Inheritance of four isoenzymes (GOT, ACP, MDH, and ADH) in (*Populus alba* X *Populus glandulosa*) F1 hybrids. *J. Kor. For. Soc.* 71: 90-98.
- Strauss, S. H., D. B. Neale and D. B. Wagner. 1989. Genetics of the chloroplast in conifers: biotechnology research reveals some surprises. *J. Forestry* Aug.: 11-17.
- Uyeki, H. 1925. Some new varieties of Korean ligneous plants and their value from the standpoint of arboriculture. *Bulletin of Agr. and For. College, Korea.* 1: 6-7.
- Walbot, V. and C. A. Cullis. 1985. rapid genomic change in higher plant. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36: 367-369.
- Wallace, D. C. 1982. Structure and evolution of organelle genomes. *Microbiological Rev.* 46(2): 208-240.
- 농업기술연구소 유전공학과. 1989. RFLP 기술의 농업 이용. *식물유전공학 Workshop.* pp. 50.

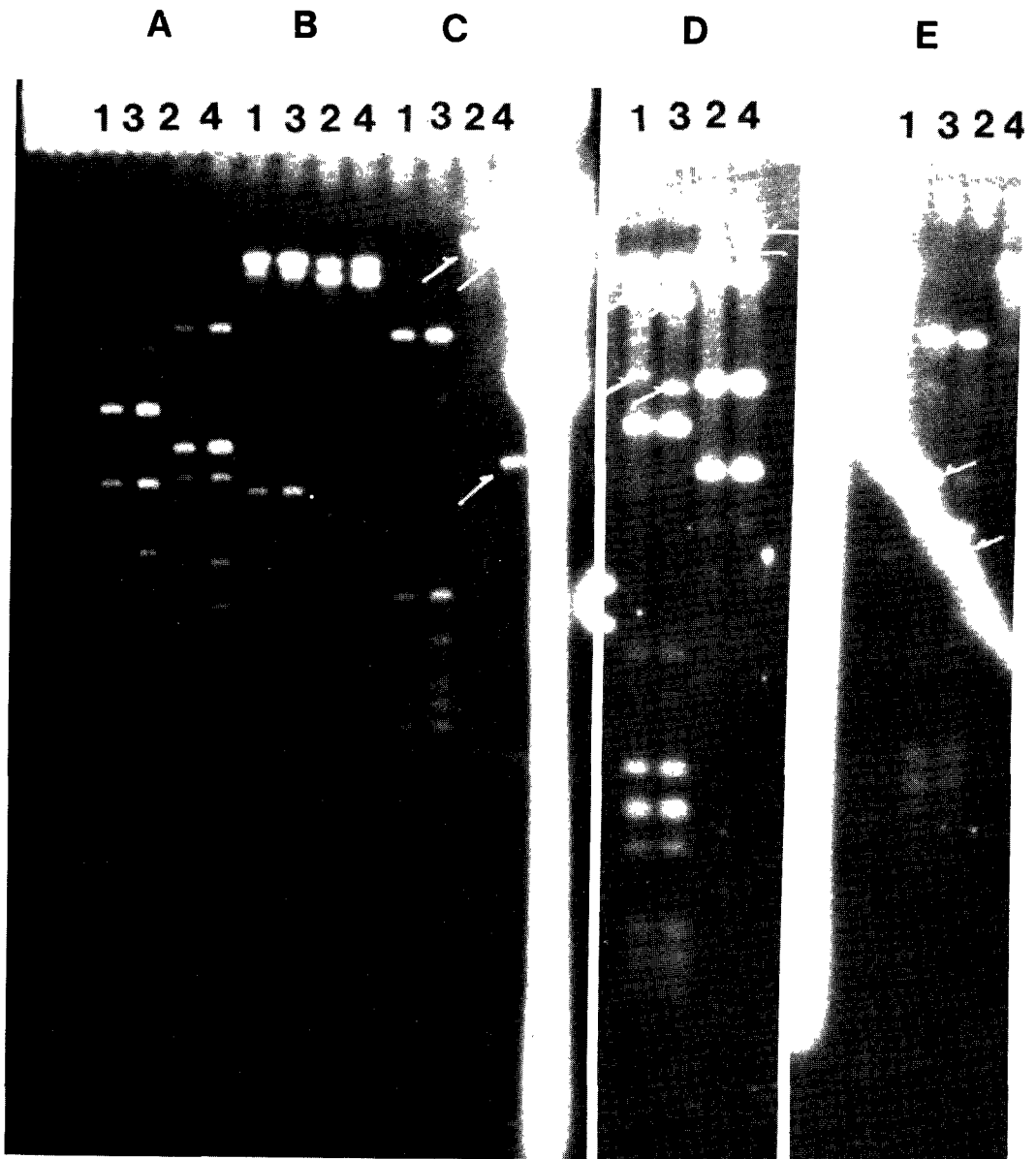


Fig. 1. The band patterns of *Populus alba x glandulosa* ctDNA using various restriction enzymes and chloroplast gene markers
 A: using *EcoRI* digestion and probe from pCB16
 B: using *BamHI* digestion and probe from pCB16
 C: using *Clal* digestion and probe from pCB16
 D: using *EcoRI* digestion and probe from pCB29
 E: using *DdeI* digestion and probe from pCB35
 1, 2, 3, and 4: clone number

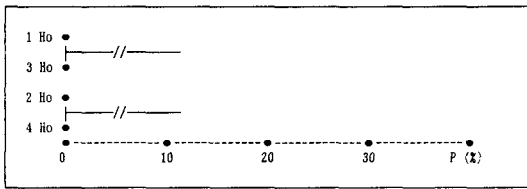


Fig. 2. The dendrogram of *Populus alba x glandulosa* derived by the UPGMA method from the base substitution ratio using *EcoRI* and chloroplast gene marker which was derived from pCB16.

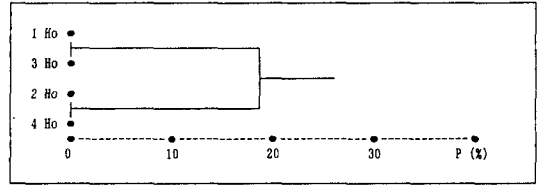


Fig. 3. The dendrogram of *Populus alba x glandulosa* derived by the UPGMA method from the base substitution ratio using *BamHI* and chloroplast gene marker which was derived from pCB16.

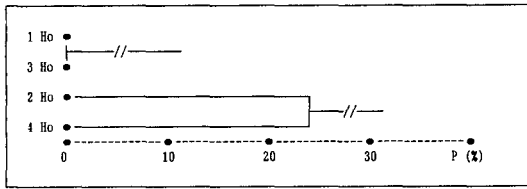


Fig. 4. The dendrogram of *Populus alba x glandulosa* derived by the UPGMA method from the base substitution ratio using *ClaI* and chloroplast gene marker which was derived from pCB16.

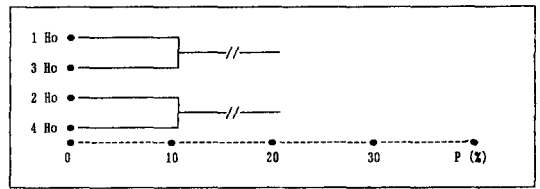


Fig. 5. The dendrogram of *Populus alba x glandulosa* derived by the UPGMA method from the base substitution ratio using *DdaI* and chloroplast gene marker which was derived from pCB35.

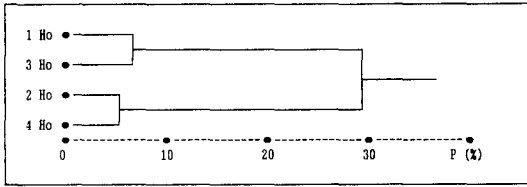


Fig. 6. The dendrogram of *Populus alba x glandulosa* derived by the UPGMA method from the base substitution ratio using *EcoRI* and chloroplast gene marker which was derived from pCB29.

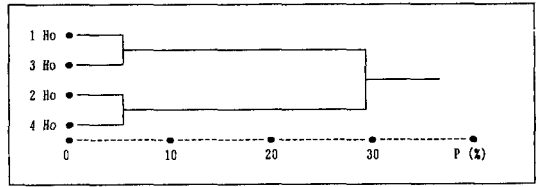


Fig. 7. The dendrogram of *Populus alba x glandulosa* derived by the UPGMA method from the base substitution ratio using *EcoRI* and 3' single-stranded extension.

<부표 1> Buffer 용액의 조성

1. Extraction buffer: 100 mM Tris, Cl, pH 8
100 mM EDTA
250 mM NaCl
100 μ g / ml Proteinase K
2. TE buffer, pH 8: 10 mM Tris, Cl, pH 8
1 mM EDTA, pH 8
3. EDTA-indicator 용액: 350 ml Glycerol
25 ml 10 \times NE buffer
40 ml 0.25 M EDTA
5 ml 20% SDS
30 ml 10% Bromophenol
50 ml 멸균수
4. 10 \times Neutral electrophoresis (NE) buffer: 121 g / l Tris base
3.36 g / l EDTA
17 g / l Na-Acetate
5. LiCl buffer: 50 mM Tris
62.5 mM EDTA
0.4% Triton X-100
2.5 M LiCl
멸균수로 1L 조정
6. EDTA-SDS 용액: 10% SDS
125 mM EDTA
200 mg / 50 ml Blue Dextran
0.1 mg / ml Bromophenol blue
7. 20 \times SSC: 3 M NaCl
0.5 M Na₃-citrate dihydrate
8. Hybridization buffer: 100 ml 20 \times SSC
20 ml 1M Sodium phosphate
20 ml Denhardt's solution
4 ml 0.25 M EDTA
40 ml 50% Dextran sulfate
204 ml 멸균수