

韓國產 참나무屬 植物의 花粉蛋白質分析에 依한 分類學的 研究

李 惟 性 · 趙 武 衍*

(忠北大學校 自然科學大學 生物學科, *林業試驗場)

Taxonomic Studies on Korean Oaks-*Quercus*- by Pollen Protein Analysis

Lee, Yoo Sung and Muyun Cho*

(Department of Biology, Chungbuk National University, Chongju and
*Forest Research Institute, Seoul)

ABSTRACT

This research was conducted to determine if the obtained serological data would reveal: (1) grouping among basic *Quercus* species, (2) the degree of correspondence within and among any detected grouping, and (3) the comparative value of new serological technique, "rocket immunoelectrophoresis". Overall quantitative and qualitative data indicate the genus *Quercus* is distantly separated from the *Fagus*. Within the *Quercus*, the subgenus *Cyclobalanopsis* is separable from the *Lepidobalanus*. But the elevation of the *Cyclobalanopsis* to the rank of a separate genus is not warranted. Antisera produced to the species belonging to *Lepidobalanus* gave strong reactions with other experimental species in the same subgenus. Particularly, *Q. aliena*, *Q. donarium*, and *Q. serrata* are tied up each other in terms of serological similarity. Rocket immunoelectrophoresis used in this systematic research proved to be a valuable new technique for systematic serology. To obtain the degree of protein similarity (serological correspondence) this technique was used in plant systematic research and determined by sum of total rocket heights. The rocket immunoelectrophoresis illustrated the measurement of individual immunoprecipitin systems identical or partly identical to those in the reference-reaction as quantitation of all available rocket heights.

緒 論

Quercus 屬(참나무屬: 참나무科 Fagaceae)은 地球의 北半球 溫帶地域에 分布하는 被子植物의 代表的인 屬으로서, 現在 250~300種이 된다고 하나 實際로는 많은 種이 polytypic 種本 研究는 產學協同財團에서 支給한 1980年度 學術研究費로 이루어진 것임.

을 포함하는 亞種에 該當할 것으로 생각된다(Stebbins, 1950). 細胞學的으로 *Quercus* 屬에 屬하는 모든 種은 染色體數가 $n=11, 12, 13$ 등이며, 染色體의 크기나 形態도 別로 差異가 없다. 種間雜種이 自然的으로 잘 일어나는데 細胞學的으로나 遺傳學的으로 大部分은 種間에도 稔性으로 나타난다. 美國產으로 東部の *Q. borealis* 나 西部의 *Q. agrifolia*, *Q. dumosa*, *Q. wislizenii* 는 polytypic 으로 잘 알려진 것이지만, 여러 地域의 植物相을 다룰 때 種의 境遇 대개 亞種이나 變種으로 記載하지 않고 있는 傾向을 알 수 있다.

Schwarz(1936)는 *Macrobalanus* 亞屬(*Lepidobalanus* 亞屬: 큰 열매의 흰 참나무)과 *Erythrobalanus* 亞屬(붉은 참나무)을 屬水準으로 昇格하고, *Lepidobalanus* 亞屬은 남은 種들을 포함하여 *Quercus* 屬의 亞屬으로 取扱하였다. Oersted(1871)는 꽃과 열매의 形態에 따라서 *Quercus* 屬을 *Erythrobalanus* 亞屬, *Lepidobalanus* 亞屬, *Macrobalanus* 亞屬으로 나누었다. Tillson and Muller(1942)는 木部 內部構造를 解剖學的으로 比較하여 美國產 *Quercus* 屬의 分離 妥當性을 否定하였다. 節(section)까지 分離하여 取扱함은 흔치 않으며, 現在도 Trelease(1924)가 만든 節이 자주 引用되고 있다. Turker(1961)는 美國產 *Q. undulata* 複合體를 觀察 分析하여 雜種과 그들의 父系種과 母系種을 밝혔으며, Rushton(1977)은 花粉粒 크기를 統計處理하고, Olsson(1975)은 表現型 分析으로 *Q. robur* 와 *Q. petraea* 의 雜種關係를 推定하였다. Brophy and Parnell(1975)도 常綠참나무인 *Q. agrifolia* 와 *Q. wislizenii* 의 雜種現象을 밝혔다.

韓國產 *Quercus* 屬은 1859年 英國사람 Wilford 가 巨文島 및 對馬島에서 *Q. serrata*, *Q. variabilis*, *Q. dentata*, *Q. acuta*를 採集한 以來 여러 西洋人 (Oldham, Webster, James, Skan, Komarov 等)들에 依해 採集 發表된 記錄이 남아 있다(Lee, 1961). Nakai(1952)는 韓國產 *Quercus* 屬을 두루 採集하였으며, *Q. donarium*(속수리나무), *Q. major*(갈참나무) 등을 命名하였고 *Q. mongolica* 는 var. *typica*, var. *liaotungensis*, var. *manchurica* 등으로 나누어서 變種을 命名하였다. Uyeki(1936)는 韓國產 *Quercus* 屬에 對하여 다음과 같은 7가지 基本種을 定하였으며, 이들과의 推定的 雜種系統을 形態的 表現型으로 基礎를 세웠다: *Q. acutissima*, *Q. variabilis*, *Q. mongolica*, *Q. crispula*, *Q. serrata*, *Q. aliena*, *Q. dentata*. 比較的 最新 研究로는 Hyun(1949)의 血清學的 類緣關係와 Lee(1961)의 基本種과 그의 雜種에 關한 形態的 分析을 代表的으로 들 수 있는데 現代系統學의 方法에 依한 再照明이 기다리고 있는 形便에 있다.

本 研究는 다음과 같은 事項을 檢討하기 爲하여 實驗 結果를 얻었다: (1) *Quercus* 屬 基本種間의 grouping 確認; (2) 어떤 grouping 이 이루어진다면 그의 類似度 決定; (3) 既存 情報과 血清學的 資料와의 比較檢討와 既存 *Quercus* 屬 分類에의 反映; (4) 花粉의 系統學의 研究 材料로서의 適合性; (5) Rocket immunoelectrophoresis 의 技術的 價値와 系統學的 價値.

材料 및 方法

植物 材料. 花粉蛋白質을 抽出하기 爲하여 *Quercus* 屬의 2 亞屬(*Cyclobalanopsis*, *Lepidobalanus*)에 屬하는 9 種의 花粉을 主로 서울, 京畿道, 釜山에서 採集하였으며, 美國產 花粉

은 New Jersey 州立大學校 植物學科의 Dr. D. E. Fairbrothers 實驗室에서 運搬하였다 (Table 1). Table 1에 記載된 韓國產 *Quercus* 屬 植物들의 成熟한 雄性葉莖花序(male ament)를 1980~1981年 春季(4月 中旬~5月 中旬)에 採集하여 室溫 陰地에서 乾燥시키고 花粉만을 分離시켰다. 花粉은 粉碎機(Microbroyeur Quantitatif Dongoumau)로 2~3분간 부수고 petroleum ether (200 ml/50 g, 30 min, 室溫)로 두차례 脫脂한 다음, acetone 으로 다시 脫脂하여 4°C에 貯藏하였다.

Table 1. *Quercus* species tested in this study

Scientific name and common name	Abbr.	Subgenus	Area collected
<i>Q. acuta</i> Thunberg(붉가시나무)	AC	<i>Cyclobalanopsis</i> Prantl.	Busan, Korea
<i>Q. acutissima</i> Carruters(상수리나무)	CT	<i>Lepidobalanus</i> Endl.	Busan, Korea
<i>Q. aliena</i> Bl.(갈참나무)	AM	<i>Lepidobalanus</i> Endl.	Gyeonggi, Korea
<i>Q. dentata</i> Thunberg(떡갈나무)	DN	<i>Lepidobalanus</i> Endl.	Seoul, Korea
<i>Q. mongolica</i> Fischer ex Turczaninow(신갈나무)	MN	<i>Lepidobalanus</i> Endl.	Seoul, Korea
<i>Q. donarium</i> Nakai(속수리나무)	DO	<i>Lepidobalanus</i> Endl.	Seoul, Korea
<i>Q. serrata</i> Thunberg(졸참나무)	SR	<i>Lepidobalanus</i> Endl.	Gyeonggi, Korea
<i>Q. acutissima</i> × <i>variabilis</i> (정능참나무)	VA	<i>Lepidobalanus</i> Endl.	Gyeonggi, Korea
<i>Q. glauca</i> Thunberg(종가시나무)	GL	<i>Cyclobalanopsis</i> Prantl.	Busan, Korea
<i>Q. alba</i> L.(white oak)	AB	<i>Lepidobalanus</i> Endl.	New Jersey, USA
<i>Q. ilicifolia</i> Wangh.(bear oak)	IL	<i>Erythrobalanus</i> Spach	New Jersey, USA
<i>Q. palustris</i> Muenchh.(swamp oak)	PA	<i>Erythrobalanus</i> Spach	New Jersey, USA
<i>Q. phellos</i> L.(willow oak)	PH	<i>Erythrobalanus</i> Spach	New Jersey, USA
<i>Q. rubra</i> L.(red oak)	RB	<i>Erythrobalanus</i> Spach	New Jersey, USA
<i>Fagus grandifolia</i> (American beech)	FGR	—	New Jersey, USA

蛋白質 抽出. 蛋白質抗原物質(Ag: antigenic material)은 上記와 같이 얻은 脫脂된 花粉가루를 0.068 M sodium-potassium phosphate buffer, 2.5% saline, pH 7.0(KH₂PO₄ 1.90 g, Na₂HPO₄ 7.46 g, NaCl 250.00 g, NaN₃ 1.00 g, QS to 10 l)에 담가서 抽出하였다. 即 花粉가루 1 g을 緩衝液 10 ml(0.1 g/ml)에 섞은 후, 하루밤을 4°C에 放置하여 緩衝液에 溶解되는 蛋白質을 얻었으며, 이렇게 얻은 全體 蛋白質은 ≈3,000 μg/ml인 것이 Bio-Rad protein assay 로 測定되었다.

免疫血清(抗體)의 生産. 抗原物質을 토끼(品種, New Zealand White)에 注入하여 免疫血清에 包含된 抗體(Ab: antibody)를 얻었다. 抗原物質을 처음 注射할 때에는 Freund's complete adjuvant를 混合하여(1 ml씩 1:1) intramuscular injection으로 이루어졌으며(Crowle, 1973), 週當 1회씩 4週를 繼續한 後에는 抗體形成에 큰 刺戟을 주기 爲하여 booster series를 導入하였다(Lee, 1977; Lee and Fairbrothers, 1978). 마지막 booster series의 注入日字로부터 7日 後에 ear puncture로 採血된 免疫血清은 標準過程(Clausen, 1969)에 依하여 分離되고 -10°C에 冷凍시켰다. 抗體生産을 爲하여 使用했던 抗原物質은 다음 種에서 얻었다: *Q. acutissima*, *Q. aliena*, *Q. dentata*, *Q. donarium*, *Q. glauca*, *Q.*

phellos.

Ouchterlony method (Double immunodiffusion). Immunoprecipitin system(IPS)을 분석하기 위한 gel immunodiffusion 技術은 이미 出版되어 確立된 方法(Garvey *et al.*, 1977; Ouchterlony and Nilsson, 1978)을 採擇하였다. Ouchterlony plate 를 만들기 爲하여 使用한 agarose gel 은 barbital-glycine/tris 緩衝液, pH 8.8 (Axelsen *et al.*, 1975)에 溶解 시켜서 만들었다.

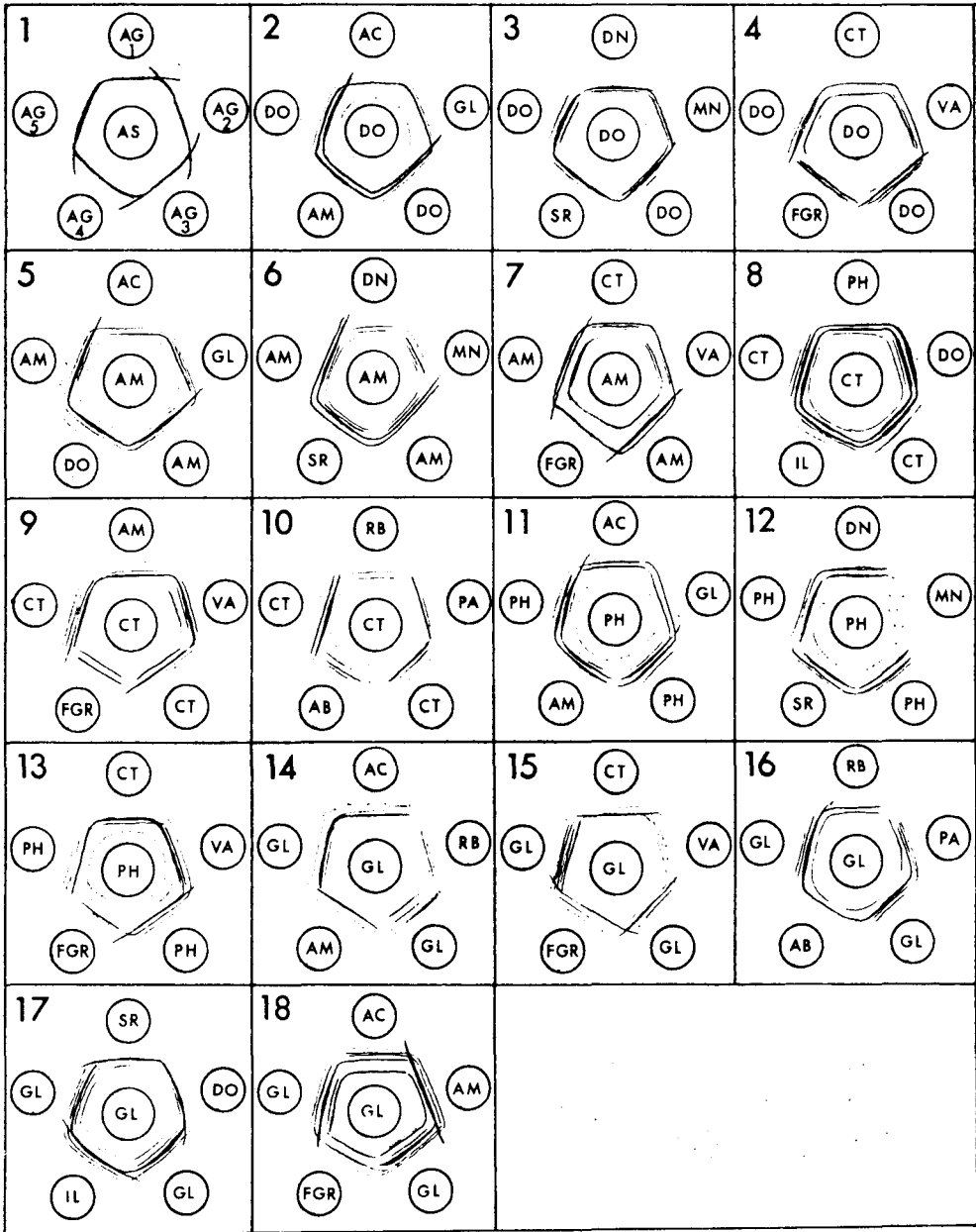
溶解된 agarose(1.5% w/v)는 petri dish(直徑 6 cm)에 부어서 굳히고, 굳은 gel 면에 6 well-pattern 을 만드는데 中央의 well 은 免疫血清으로 채워지고, 周圍의 5 well 은 抗原物質로 채워졌다. Ouchterlony plate 가 채워지면 室溫에 貯藏되고(相對濕度 100%), Ag-Ab 反應으로 形成되는 precipitin band 를 7日間 觀察 스퀷치했다.

Immuno-electrophoresis (IE). IE에 依한 分析은, (1) Grabar-William 方法(Arquembourg, 1975; Weier, 1978)과 (2) rocket immunoelectrophoresis (RIE) (Axelsen *et al.*, 1975)로 LKB 模造品을 利用했다. (1)方法은 agarose 溶液은 immunodiffusion 에서와 같은 緩衝液을 利用하여 만들고, 水平된 immuno-plate (8.4×9.4 cm)에 17 ml 의 agarose 溶液을 부어서 굳혔다. 굳은 後에 蛋白質抽出液(抗原物質)을 채울 well 은 LKB template 과 LKB puncher (直徑 2.5 cm)로 만들고 well 兩則의 trough 는 LKB template 대로 칼로 금을 그어서 만들었다. 抗原物質을 채우고 電氣泳動(100 V, 120~130 mA, 4°C, 2 hr)한 다음, trough 에 免疫血清을 채우고 室溫에 貯藏하고, Ag-Ab 反應으로 形成되는 precipitin arc 를 5日間 觀察 스퀷치하고 寫眞찍었다. (1)方法은 conventional IE(CIE)라고도 하며, (2)方法은 advanced IE 의 한 가지로 rocket 모양의 precipitin band 가 形成되는 데서 비롯한 名稱을 쓰고 있다. CIE 에서 使用한 immuno-plate 에 agarose 3: antiserum 1 의 比率로 섞어서 굳힌 다음 抗原物質을 채울 well 을 一列로 直接 Ab-containing agarose gel 에 만들었다. 約 7 μ l 의 抗原物質을 채우고 電氣泳動(100 V, 120 mA, 4°C, 2 hr)을 하면 Ag-Ab 反應이 電氣泳動과 同時에 일어나며 rocket 모양 precipitin band 를 5日間 觀察 스퀷치하고 寫眞찍었다. Precipitin arc 나 band 가 가장 뚜렷하게 滿發하였을 때에 dark-lighting 을 利用하여 close-up lens 를 附着한 camera 로 촬영하였다.

結果 및 解釋

Ouchterlony method. 이 方法은 比較하려는 *Quercus* 屬의 種들로부터 얻은 抗原物質(蛋白質抽出液)과 免疫血清의 抗體와의 사이에 일어나는 Ag-Ab 反應의 結果로 얻어지는 沈澱을 agarose gel 속에 precipitin band 로 나타나게 함으로써 定性的 分析과 部分的 定量的 分析을 爲하여 이루어졌다. Ouchterlony method 에 依한 實驗 結果 Ouchterlony (Ouchterlony and Nilsson, 1978)가 命名한 4 가지 type pattern 이 觀察되었다.

Figs. 1~18은 免疫血清을 Ouchterlony plate 의 center well 에 채우고 抗原物質로는 reference-Ag(免疫血清속의 抗體를 生産하기 爲하여 使用했던 抗原物質)과 cross-Ag (reference-Ag 以外에 比較하려는 모든 抗原物質)을 使用했는데, center well 의 周圍에 만들어진 5 개의 well 에 나누어 채웠다. Fig. 1 은 보기로 AG3, AG5 는 reference-Ag 이고, 나머지 AG1, AG2, AG4 는 cross-Ag 을 채웠다. Precipitin band 의 觀察에 있어서 Type



Figs. 1~18. Illustration of immunoprecipitin systems obtained on Ouchterlony plates. Center well of each plate received antiserum and surrounding wells antigenic materials. AG=antigenic materials; AS=antiserum. See Table 1 for other abbreviations.

I pattern 은 AG1 과 AG5 사이에서 보여 주고, Type II pattern 은 AG1 과 AG2, 또는 AG2 와 AG3 사이에서 보여 준다. Type III pattern 은 AG3 와 AG4, 또는 AG4 와 AG5 사이에서 보여 주고 있다.

Figs. 2~4 는 *Q. donarium* 免疫血清을 使用하였는데, Fig. 2 에서는 *Q. donarium* 과 *Q. aliena* 의 major immunoprecipitin band 와 附加的인 faint band 들도 모두 Type I pattern 으로 나타나서 높은 血清學的 類似度(serological similarity)를 나타냈다. 그러나 *Q. donarium* 과 *Q. acuta*, 또는 *Q. aliena* 와의 各各 Ag-Ab 反應에 있어서는 *Q. donarium* 의 reference-reaction 에서 나타난 major immunoprecipitin band 가 不連續線으로 끊어지므로 *Q. acuta* 또는 *Q. glauca* 는 그 immunoprecipitin system(IPS)을 共通的으로 갖지 않고 있음이 分明하다. 이 IPS 는 Figs. 3~4 에서 보는 바와 같이 *Q. dentata*, *Q. serrata*, *Q. acutissima* 等은 共有하고 있는 것으로 나타났다.

이는 *Q. acuta* 와 *Q. glauca* 를 包含하는 *Cyclobalanopsis* 亞屬은 위에 말한 其他 種을 包含하는 *Lepidobalanus* 와의 分離現象을 立證하는 證據라고 볼 수 있겠다. *Q. donarium* 과 *Q. mongolica* 와의 反應에서 생긴 band 는 *Lepidobalanus* 亞屬에 屬하는 다른 種들보다 比較的 弱하였고, major band 의 Type III (또는 Type IV) pattern 이 나타났다(Fig. 3). *Q. donarium* 과 *Fagus grandifolia* 와의 反應에서 생긴 2 개의 강한 band 는 *Q. donarium* 의 reference-reaction 에 나타난 band 와는 전혀 합쳐지지 않는 Type II pattern 이 나타났는데 이는 같은 Fagaceae 에 屬하나, 다른 屬과의 反應이므로 蛋白質의 異質現象을 나타낸 것으로 解釋된다(Fig. 4).

Figs. 5~7 은 *Q. aliena* 免疫血清을 使用하였는데, Fig. 5 에서는 Fig. 2 와 비슷한 結果를 얻었다. 즉, *Q. aliena* 와 *Q. donarium* 의 反應은 reciprocal reaction 으로 두 種間의 血清學的 類似도가 높게 나타났으며(Type I pattern), *Q. aliena* 와 *Q. acuta* 또는 *Q. glauca* 와는 比較的 弱한(또는 낮은) 血清學的 類似도를 나타냈다(Type II pattern). *Q. aliena* 와 *Q. serrata* 는 2 개의 major band 를 包含한 모든 IPS 는 거의 Type I pattern 으로 높은 血清學的 類似도를 보이고 있는데, *Q. aliena* 와 *Q. dentata* 또는 *Q. mongolica* 와는 *Q. serrata* 와의 血清學的 類似도보다 훨씬 떨어졌다(Fig. 6). *Q. aliena* 와 *Q. serrata* 가 共有하는 major band 1 개가 *Q. acutissima* 또는 *Q. acutissima* × *variabilis* 에는 없으므로, *Q. mongolica* 와의 類似도보다 좀 높게 나타났다. *Q. aliena* 와 *Fagus grandifolia* 와는 1 개의 major band 가 Type I pattern 現象으로 共有하고 있음을 보여주고 있다(Fig. 7).

Figs. 8~10 은 *Q. acutissima* 免疫血清을 使用하였는데, Figs. 8~9 에서는 *Q. donarium*, *Q. phellos*, *Q. ilicifolia*, *Q. aliena*, *Q. acutissima* × *variabilis* 와의 反應에서 Type I pattern 으로 높은 類似도를 나타냈으며, *Q. acutissima* 와 *Q. alba*, *Q. palustris*, *Q. rubra* 等과의 反應에서는 훨씬 낮은 類似도를 나타냈다(Fig. 10).

Fagus grandifolia 와의 反應에서는 위에서 다른 免疫血清과의 反應에서와 같이 가장 弱하게 2 band 만이 Type II 로 나타났다(Fig. 9).

Figs. 11~13 은 *Q. phellos* 免疫血清을 使用하였는데, Fig. 11에서 *Q. phellos* 와 *Q. acuta* 의 major IPS 는 Type I 와 III pattern 으로 강한 反應으로 나타났으며, 이는 다른 種(*Q. dentata*, *Q. acutissima*, *Q. serrata* 等)과 함께 Type I pattern 으로 强하게 나타났다. *Q. phellos* 와 *Fagus grandifolia* 와의 反應에서 나타난 major band 와는 Type II pattern 으로

同一성은 아니었다(Fig. 13).

Figs. 14~18 은 *Q. glauca* 免疫血清을 使用하였는데, Fig. 14에서 *Q. glauca* 와 *Q. acuta* 는 거의 完全하게 Type I pattern 으로 合致되는 band 로 나타났고, *Q. aliena* 와의 反應에서는 強했으나 reference-reaction 에서 볼 수 없는 1 major band 가 나타났으며, *Q. rubra* 의 反應은 아주 弱했다. *Q. glauca* 는 다른 種, 特히 *Q. acutissima*, *Q. ilicifolia* 등과 強하게 反應하면서 附加的인 1 major band (Type II 또는 III pattern) 가 나타났다. 그리고 *Q. serrata*, *Q. donarium* 과는 比較的 弱한 反應으로, *Q. alba*, *Q. rubra*, *Fagus grandifolia* 와는 아주 弱한 反應으로 나타났다.

Conventional immunoelectrophoresis(CIE). CIE pattern 은 各種의 抗原物質 사이에 생긴 血清學的 差異를 arc 의 數와 位置로 나타냈다. Figs. 19~25 는 *Q. aliena* 免疫血清을 使用하여 6 種의 *Quercus* (Figs. 19~21, 23~25) 와 1 種의 *Fagus* (Fig. 22) 와의 反應으로 形成된 CIE pattern 을 記錄하였다. *Q. aliena* 의 reference-reaction 에서 10개 程度의 IPS 가 分離되었고, *Q. serrata* 나 *Q. donarium* 은 아주 비슷한 CIE pattern 을 보였으며, major IPS 인 m_1 , m_2 를 共有하였다. *Fagus grandifolia* 는 m_1 에 該當하는 것으로 보이는 弱한 arc 가 나타나고 m_2 는 보이지 않았다. *Q. acutissima*, *Q. acutissima* × *variabilis* 나 *Q. glauca* 와의 反應에 있어서도 m_1 만이 뚜렷하고 *Q. glauca* 는 다른 *Quercus* 屬의 種에 比하여 약간 다른 electrophoretic mobility 를 나타냈다. Major IPS 인 m_1 , m_2 외에 附加的인 IPS 는 重複되어서 識別이 어려웠으므로 더 나은 分離法으로 보이는 rocket immunoelectrophoresis 가 試圖되었다.

Rocket immunoelectrophoresis (RIE). 普通 臨床學이나 生化學的 研究에 終前に 利用되었던 RIE 에서는 monovalent antiserum 을 썼으나, 本 研究에서는 polyvalent antiserum 을 利用하여 multiple IPS 의 spectrum 이 그 濃度에 따라 여러 rocket 모양의 pattern 으로 나타났다.

이 pattern 들은 *Quercus* 屬의 各種으로부터 얻은 抗原物質 사이에 생긴 血清學的 差異를 rocket height 와 serological correspondence(SC, Table 2 題目 參照)로 測定되었다. Double immunodiffusion plate 에서 觀察된 multi-band 는 RIE pattern 으로 充分히 分離되었으며, 1 major band 는 RIE 에서 2개의 強한 IPS(rocket)으로 出現하였다. RIE 는 蛋白質 混合 抽出液속에 包含된 各 蛋白質의 量的 測定을 爲하여 使用되었고, 이는 各種의 抗原物質 特性을 밝혀낼 수 있었다.

Q. donarium 免疫血清을 섞은 agarose gel 속에서 電氣泳動되며 Ag-Ab 反應을 일으킨 *Quercus* 屬의 7 種의 各 rocket height 가 Table 2 에 記載되었다. *Q. donarium* 의 reference-reaction 에서 10 rocket, *Lepidobalanus* 亞屬에 屬하는 4 種(*Q. aliena*, *Q. acutissima*, *Q. dentata*, *Q. serrata*) 은 9~13 rocket, *Cyclobalanopsis* 亞屬에 屬하는 2 種(*Q. acuta*, *Q. glauca*) 은 8 rocket 로서 觀察되었으며, SC 는 *Q. acuta* 와 *Q. glauca* 는 다른 種이 SC=91~117에 比하여 훨씬 낮은 SC=51~74로 나타났다. 理論적으로 reference-reaction 에서 나타나는 rocket 數와 rocket height 總 合計도 가장 높을 것이나, 實際 觀察에서는 *Q. dentata*, *Q. aliena* 와의 反應에서 약간 높았다. 아마도 rocket 의 一部는 겹쳤거나 faint rocket 이 觀察에서 漏落되었을 可能性도 있다.

Q. acutissima 免疫血清을 包含한 agarose gel 속에서 形成된 rocket (Table 3) 에 있어서는

Table 2. Quantitation of rocket heights (in mm) in the different species of *Quercus* obtained by rocket immunoelectrophoresis. The agarose gel was charged with *Q. donarium* antiserum. SC=serological correspondence, the percentage value of total rocket heights in the reference reaction (cross reaction/reference reaction $\times 100$). Underlined number is the rocket height of major immunoprecipitin system.

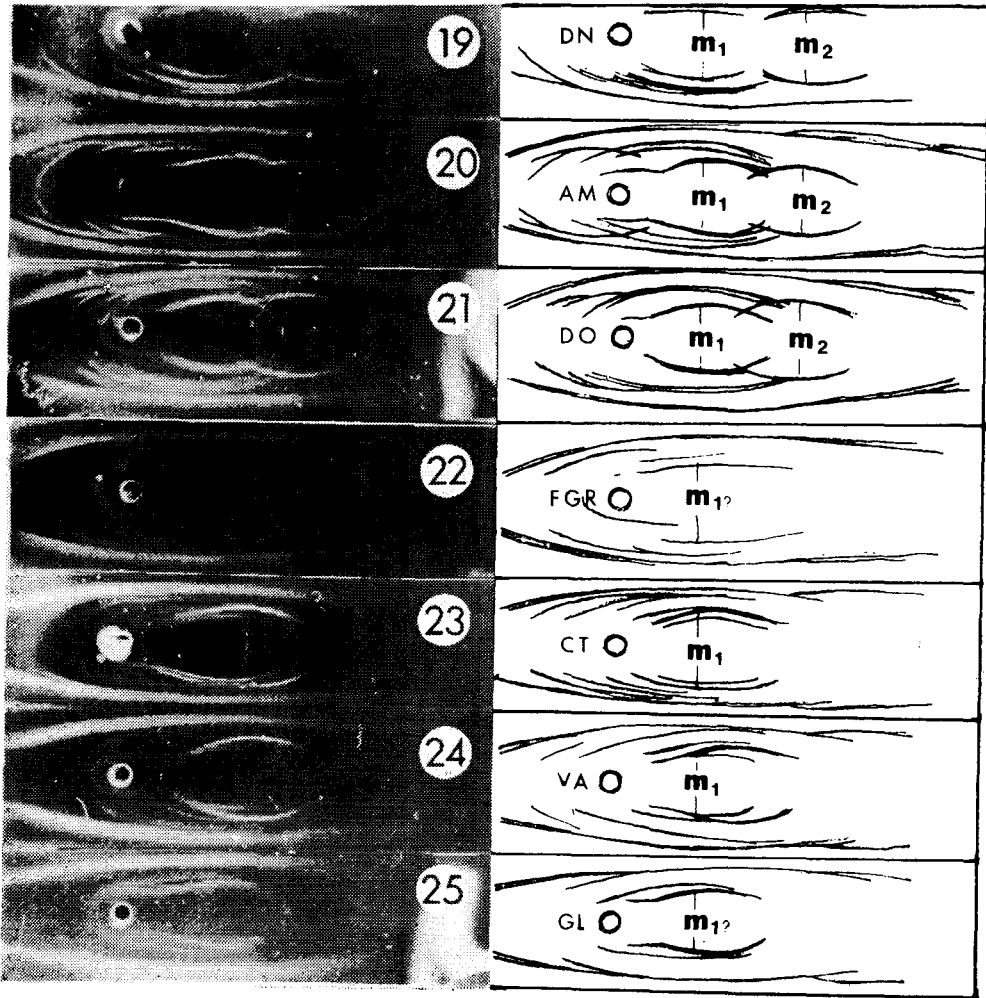
Scientific name	Rocket height	Number of rockets	Total rocket heights	SC(%)
<i>Q. denata</i>	3, 5, 6, <u>7</u> , 8.5, 9, 10, 11, 12, 13, 14.5, 15, 23	13	137.5	117
<i>Q. aliena</i>	2, 7, <u>8</u> , 8.5, 9.5, 10, 10.5, 11, 12.5, 13, 14, 15	12	121.0	101
<i>Q. serrata</i>	1, 3, <u>8</u> , <u>9</u> , 11, 12, 12.5, 14, 18, 20	10	108.5	91
<i>Q. donarium</i>	1, <u>7.5</u> , <u>8</u> , 9, 10, 12, 14, 15, 21, 22	10	119.5	100
<i>Q. glauca</i>	3.5, 6, <u>7</u> , 8, 12, 13, 19, 19.5	8	88.0	74
<i>Q. acuta</i>	1, 3, <u>3.5</u> , 6, 7, 8, 12.5, 20	8	61.5	51
<i>Q. acutissima</i>	1, <u>8</u> , 9, 10, 11, 14, 15, 20, 21	9	109.0	91

Table 3. Quantitation of rocket heights (in mm) in the different species of *Quercus* obtained by rocket immunoelectrophoresis. The agarose gel was charged with *Q. acutissima* antiserum. See Table 1 for abbreviation.

Scientific name	Rocket height	Number of rockets	Total rocket heights	SC(%)
<i>Q. dentata</i>	0.5, 1, 3, <u>4</u> , 5.5, 6, 8, 9.5, 10, 12, 14, 17	12	90.5	143
<i>Q. aliena</i>	2.5, 5, <u>5.5</u> , 8.5, 11.5, 12, 15	7	60.0	94
<i>Q. serrata</i>	0.5, 1.5, 2, <u>7</u> , 8, 9, 11.5, 13	9	64.0	101
<i>Q. donarium</i>	1, 4, <u>5</u> , 6, 7, 8, 9.5, 10, 11, 12	10	73.5	115
<i>Q. glauca</i>	0.5, 2, 3, 6.5, 7, 9.5, 11, 12	8	51.5	81
<i>Q. acuta</i>	1, 3, 5, 6, 7, 8, 11	8	45.0	70
<i>Q. acutissima</i>	1.5, 2, 6, <u>6.5</u> , 7, 8, 10, 10.5, 12	9	63.5	100

그 수와 SC에서 多樣性을 보여 주었다. Rocket 數는 7~12로서 *Q. serrata*, *Q. donarium*, *Q. dentata*는 reference-reaction과 같거나 약간 높았다. *Q. acuta*, *Q. glauca*, *Q. aliena*는 약간 낮았으며 SC에 있어서도 다른 種에 比하여 낮은 값으로 나타났다. 이는 *Cyclobalanopsis* 亞屬에 屬하는 種이 *Lepidobalanus* 亞屬과 약간 떨어짐을 뒷받침한다.

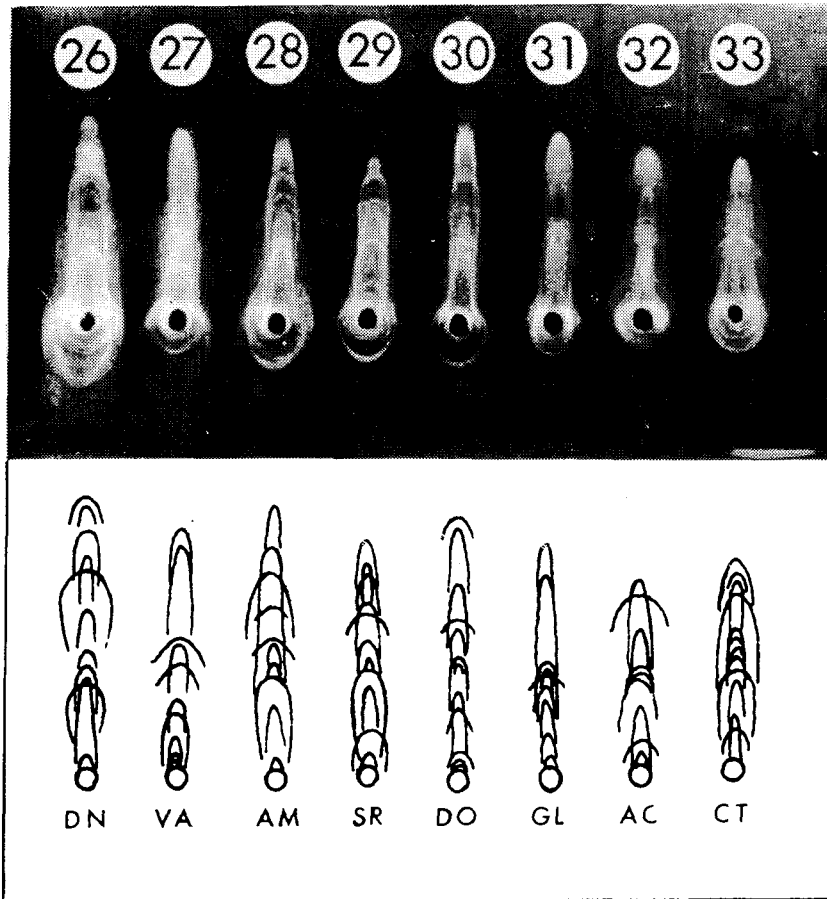
Q. acutissima reference-reaction에서 뚜렷하게 나타난 major IPS가 다른 *Quercus* 屬의 種에는 모두 觀察되었으나, *Q. acuta*, *Q. glauca*에서는 分明하지 않았다. *Q. dentata*는



Figs. 19~25. Left: Separation and identification of major immunoprecipitin arcs of *Quercus* and *Fagus* by conventional immunoelectrophoresis. The trough was charged with *Q. aliena* antiserum. The plate was photographed on a dark background (unstained) with direct light (pictures taken the second day of incubation). Right: Sketches of the arcs from photograph. Antigens: (19) *Q. dentata*; (20) *Q. aliena*; (21) *Q. donarium*; (22) *Fagus grandifolia*; (23) *Q. acutissima*; (24) *Q. acutissima* × *variabilis*; (25) *Q. glauca*.

rocket 數와 rocket height 에 있어서 높은 값을 보였다(Table 2, 3).

Q. dentata 免疫血清을 包含한 agarose gel 속에서 rocket 에서는 *Q. aliena*, 나 *Q. donarium* 이 reference-reaction 과 가장 비슷했으며, *Q. acuta* 나 *Q. glauca* 가 가장 덜 비슷한 rocket 數와 SC 를 나타냈다((Figs. 26~33, Table 4).



Figs. 26~33. Above: Rocket immunoelectrophoretic patterns. The agarose gel was charged with *Q. aliena* antiserum. The plate was photographed on a dark back ground with direct light. Below: Sketches of the rockets from photograph. Antigens: (26) *Q. dentata*; (27) *Q. acutissima* × *variabilis*; (28) *Q. aliena*; (29) *Q. serrata*; (30) *Q. donarium*; (31) *Q. glauca*; (32) *Q. acuta*; (33) *Q. acutissima*.

Q. alina 免疫血清을 利用하여 各種의 抗原物質과의 反應 結果로 形成된 rocket에서는 (Table 5) 沈澱濃度가 높고, rocket 數가 높고 고르게 나타난 것으로 보아 상당히 넓은 antiderminant가 생긴 免疫血清임을 알 수 있다.

이 血清을 生産하기 爲하여 注射에 使用한 花粉은 여러 植物의 것을 使用했다. *Q. aliena*의 形態的 多樣性은 極大化해서 重複的으로 이루어진 雜種現象으로 他 種으로부터 온 gene의 役割이 加味되었을 것으로 推測된다. SC는 *Q. acuta*와 *Q. glauca*가 其他 *Quercus*屬의 種에 比하여 가장 낮게 나타났으며, 이 2種은 他 種에서 뚜렷하게 나타난 2 major IPS가 分明하지 않았다.

위에서 RIE에 使用했던 免疫血清은 *Lepidobalanus*에 屬하는 種의 抗原物質을 注射하

Table 4. Quantitation of rocket heights (in mm) in the different species of *Quercus* obtained by rocket immunoelectrophoresis. The agarose gel was charged with *Q. dentata* anti-serum. See Table 1 for abbreviation.

Scientific name	Rocket height	Number of rockets	Total rocket heights	SC(%)
<i>Q. dentata</i>	1, 2, <u>4.5</u> , 6, 6.5, 8, 8.5, 10, <u>13</u> , 15, 18	11	92.5	100
<i>Q. acutissima</i> × <i>variabilis</i>	1, 2, <u>4</u> , <u>7</u> , 7.5, 12, 15	7	48.5	52
<i>Q. aliena</i>	1, 3, 5, <u>4</u> , 5, 8, 9, 12, 14, 17	9	73.5	79
<i>Q. serrata</i>	1, <u>4</u> , 5, 8, 9, <u>11</u> , 12, 15	8	65.5	70
<i>Q. donarium</i>	1, 2, <u>3.5</u> , 5.5, 9, 10, <u>11.5</u> , 13, 15, 17	11	92.5	99
<i>Q. glauca</i>	1.5, 5.5, 9, 11.5, 14	5	41.5	45
<i>Q. acuta</i>	1, <u>3.5</u> , 12, 13	4	29.5	32
<i>Q. acutissima</i>	1, <u>5</u> , 5.5, 8, 9, 9.5, <u>13</u> , 14.5	8	65.5	71

Table 5. Quantitation of rocket heights (in mm) in the different species of *Quercus* obtained by rocket immunoelectrophoresis. The agarose gel was charged with *Q. aliena* antiserum. See Table 1 for abbreviation.

Scientific name	Rocket height	Number of rockets	Total rocket heights	SC(%)
<i>Q. dentata</i>	1, <u>5</u> , 5.5, 6.5, 8, 10.5, <u>12.5</u> , 14.5, 18, 19	11	115.0	123
<i>Q. acutissima</i> × <i>variabilis</i>	0.5, 1.5, 4, 5, 7, 9.5, 10, 15, 16.5	10	72.0	77
<i>Q. aliena</i>	1, 1.5, 3, <u>5</u> , 7, 9, 10, 11, <u>13</u> , 15, 18	11	93.5	100
<i>Q. serrata</i>	1.5, 4.5, <u>6.5</u> , 7, 8.5, 9.5, 11, <u>12.5</u> , 14, 15, 16.5	11	109.5	117
<i>Q. donarium</i>	0.5, 1, 1.5, 4, <u>5.5</u> , 8.5, 9, 9.5, 13, 17, 19	11	88.5	95
<i>Q. glauca</i>	3, 4, 6, 7, 8, 9, 14, 17	8	68.0	73
<i>Q. acuta</i>	1, 2, 2.5, 3.5, 5, 6, 7, 8, 11, 15	10	61.0	66
<i>Q. acutissima</i>	3, 3.5, 5, <u>6</u> , 6.5, 7, 8, 9.5, 12, 13.5, 14.5, 16	12	104.5	112

여 생산된 것이다. *Q. glauca* (*Cyclobalanopsis* 亞屬) 免疫血清을 포함한 agarose gel 속에서 形成된 rocket 數와 SC는 Table 6에 表示하였다. *Q. glauca* 과 다른 *Quercus* 屬의 種과의 反應으로 생긴 rocket 數는 7~10으로 波狀的인 差異를 보였으나 *Fagus* 와의 反應에서 생긴 낮은 數(4)로 나타났다.

Q. phellos 와 *Q. ilicifolca* 는 *Erythrobalanus* 亞屬에 屬하는 美國産 種으로, 韓國産인

Table 6. Quantitation of rocket heights (in mm) in the different species of *Quercus* obtained by rocket immunoelectrophoresis. The agarose gel was charged with *Q. glauca* antiserum. See Table 1 for abbreviation.

Scientific name	Rocket height†	Number of rockets	Total rocket heights	SC(%)
<i>Q. serrata</i>	2, 5.5, 6.5, 7.5, 9, 10, 11, 13	8	64.5	83
<i>Q. donarium</i>	0.5, 1, 1.5, 2.5, 3.5, 8, 9.5, 10, 13	9	49.5	64
<i>Q. mongolica</i>	1, 1.5, 3.5, 4.5, 5, 6.5, 7.5, 9, 10.5	9	49.0	63
<i>Q. phellos</i>	3, 5, 6, 7, 10.5, 14, 18.5	7	64.0	64
<i>Q. ilicifolia</i>	3, 3.5, 7, 9.5, 11.5, 11.5, 14, 20	7	68.5	88
<i>Q. glauca</i>	0.5, 4.5, 5.5, 6, 7.5, 8, 8.5, 10, 13, 14	10	77.5	100
<i>Q. acuta</i>	3, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 8, 11, 13	8	55.0	71
<i>Fagus grandifolia</i>	1, 4, 6.5, 12	4	23.5	30

Table 7. Quantitation of rocket heights (in mm) in the different species of *Quercus* obtained by rocket immunoelectrophoresis. The agarose gel was charged with *Q. phellos* antiserum. See Table 1 for abbreviation.

Scientific name	Rocket height	Number of rockets	Total rocket heights	SC(%)
<i>Q. phellos</i>	4.5, 4.5, 6.5, 7.5, 9, 12, 13, 16	8	73.0	100
<i>Q. ilicifolia</i>	3.5, 5, 8, 9, 17	5	42.5	58
<i>Q. palustris</i>	8, 9.5, 10, 11, 11.5, 14, 18	7	82.0	112
<i>Q. alba</i>	3, 5, 5, 9, 13, 18	5	48.5	66
<i>Fagus grandifolia</i>	6, 9, 9.5	3	24.5	34

Lepidobalanus 亞屬에 屬하는 種에서 보다 낮은 便이나, SC에 있어서는 뚜렷한 差異를 나타내지 않았다. 그러나 *Q. glauca* 와 *Fagus* 와의 反應으로 생긴 SC는 確實한 分離現象을 나타내는 情報를 뒷받침하는 資料로 보여 주었다.

Q. phellos 免疫血清과의 反應으로 생긴 rocket data에 依하면 (Table 7), SC의 差異가 많아서 *Q. ilicifolia* 또는 *Q. alba* 와의 反應에서는 낮게, 그리고 *Fagus grandifolia* 와의 反應에서는 아주 낮게 나타났다. 그러나 더 많은 種과의 反應으로 SC의 傾向을 把握해야 할 것 같다.

論 議

Quercus 屬 花粉이 系統學的 研究 材料로서 適合한 것이 다음과 같은 理由로 證明되었다.

(1) *Quercus* 屬은 風媒花群에 屬하는 顯花植物로서 豊富한 花粉量을 採集 確保할 수 있고, (2) 蛋白質은 比較的 容易하게 抽出할 수 있으며, (3) 花粉의 成熟度도 쉽게 肉眼으로 確認할 수 있고, (4) 普通 흔히 使用해 온 種子蛋白質 못지 않게 抗原物質로서의 蛋白質量이 豊富하다는 點이다.

本 研究에서 使用된 技術이 다르면 種의 比較的인 分類學的 位置가 약간 달라진 結果도 있었다. 이는 血清學的으로 아주 類似하나 技術의 感度에 따라 한 가지 技術이 探知하는 IPS를 다른 技術은 探知하지 못하는 수도 있고, 또 다른 것은 약간 다른 것을 쥔 수도 있 기 때문이다. 그러나 本 研究에서와 같이 3가지 다른 技術의 結果를 綜合할 때는 適切한 分類學的 位置의 解決이 可能하였다.

Rocket height에 依한 SC 값이 모든 cross-reaction에 있어서는 30% 이상이였으므로, 各種의 血清學的 類似度는 中間程度 內至 높은 便이었다. 特히 *Lepidobalanus* 亞屬에 屬하는 種들이 rocket 數는 reference-reaction의 60%(平均 77%) 以上이었으며, *Lepidobalanus* 亞屬과 *Cyclobalanopsis* 亞屬의 사이에는 40%(平均 70%) 以上이었다. 全體的인 定量的, 그리고 定性的인 資料로 보아 *Quercus* 屬이 *Fagus* 屬과는 멀리 分離되고, *Quercus* 屬內 에서는 *Cyclobalanopsis* 亞屬이 *Lepidobalanus* 亞屬으로부터 뚜렷하게 分離된다. 그러나 *Cyclobalanopsis* 亞屬이 獨立된 屬階級까지의 昇格은 保證되지 못한다. 위에서 利用된 3가지 다른 技術로 얻은 資料는 Hyun(1949)이 얻은 資料와 매우 一致한다. 그의 data는 *Quercus* 屬內에 亞屬으로 남겨 두는 것을 支持하였으며, 이는 Hjelmquist(1948)가 反對 意見を 主張하였다.

Erythrobalanus 亞屬 亦是 *Lepidobalanus* 亞屬으로부터 分離될 것 같았으며 *Lepidobalanus* 亞屬과 *Cyclobalanopsis* 亞屬에 對한 *Erythrobalanus* 亞屬의 類緣關係는 더욱 研究하여 밝혀내야 할 것이다. *Lepidobalanus* 亞屬에 屬하는 種들로 生産된 免疫血清은 같은 亞屬內의 種들과의 反應에서 強하게 나타났다. 特히 *Q. aliena*, *Q. donarium*, *Q. serrata*는 血清學的 類似度에 있어서 相互一束으로 나타났다. Lee(1961)는 葉毛, 包麟, 葉底, 花序毛, 花被 等の 形態學的 分析을 通하여 *Q. aliena*와 *Q. serrata*와의 높은 類似度를 報告하였다.

*Q. donarium*은 形態學的, 血清學的 類似度에 依하면 *Q. aliena*를 祖上으로 하여 直接 起因된 것으로 推測된다. *Q. acutissima*는 上記한 種들로부터 약간 떨어진 것 같고, 雜種인 *Q. acutissima* × *variabilis*와는 거의 同一性을 나타냈다. Lee(1961)는 *Q. mongolica*의 位置를 *Q. denata*와 *Q. aliena*사이에 있을 것을 指摘하였다. 本 研究에서의 資料는 *Q. dentata*가 *Q. aliena*에 더욱 가까우며, 오히려 *Q. mongolica*가 덜 가까운 것으로 나타났다. 이 3가지 種을 包含하는 群의 類緣關係를 確認하기 爲하여 좀 더 많은 資料를 蓄積해야 할 것으로 본다.

本 系統學的 研究에 利用된 RIE는 系統學的 血清學을 爲한 새로운 技術로서 價値가 있음이 證明되었다. 蛋白質 類似性의 程度를 얻기 爲하여 이 技術이 植物系統學的 研究에 利用되었는데, 모든 rocket height의 總 合計로 決定되었다. Rocket height에 依한 SC를 다른 단 하나의 다른 報告書는 *Coffea* 3種(Lee, 1977)에 關한 研究가 있다(Fairbrothers, 1980). Cronquist(1973)는 蛋白質의 量的 決定을 血清學的 方法으로 할 때, 우리는 實質的으로 무엇을 測定했는지 모른다고 말한 적이 있다. 우리는 아직까지도 모르지만(例를 들면

amino 酸의 配列 等), RIE 는 모든 rocket height 의 量으로, reference-reaction 속에 個個의 IPS 에 同一하거나 部分的으로 同一한 IPS 를 cross-reaction 에서 測定할 수 있었다.

摘 要

本 研究는 花粉蛋白質을 對象으로 *Quercus* 屬 基本種間의 grouping 確認과 那들간의 類似度를 血清學의 方法으로 決定하고, rocket immunoelectrophoresis 의 技術의 價値와 系統分類學의 價値를 論議하였다. 全般的인 定量的, 定性的 data 로 보아 *Quercus* 屬이 *Fagus* 屬과는 멀리 分離되고, *Quercus* 屬內에서는 *Cyclobalanopsis* 亞屬이 *Lepidobalanus* 亞屬으로부터 뚜렷하게 分離된다. 그러나 *Cyclobalanopsis* 亞屬이 獨立된 屬階級까지의 昇格은 保證되지 못한다. *Lepidobalanus* 亞屬에 屬하는 種들로 生産된 免疫血清은 같은 亞屬內의 種들과의 反應에서 強하게 나타났다. 特히 *Q. aliena*, *Q. donarium*, *Q. serrata* 는 血清學的 類似度에 있어서 相互一束으로 나타났다. *Q. acutissima* 는 上記한 種들로부터 若干 멀어진 것 같고, 雜種인 *Q. acutissima* × *variabilis* 와는 거의 同一性을 나타냈다. 本 系統分類學의 研究에 利用된 rocket immunoelectrophoresis 는 새로운 技術로서 그 價値가 證明되었다. 蛋白質 類似性의 程度를 얻기 爲하여 이 技術이 應用되었는데, 모든 rocket height 의 總合計로 決定되었다.

參 考 文 獻

- Arquembourg, P. C. 1975. Immunoelectrophoresis. 2nd Ed. S. Karger, Basel.
- Axelsen, N. H., J. Kroll and B. Weeke. 1975. A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis. Ed., Oslo.
- Brophy, W. W. and D. R. Parnell. 1975. Hybridization between *Quercus agrifolia* and *Q. wislizenii* (Fagaceae). *Madroño* 22 : 290~302.
- Clausen, J. 1969. Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules. American Elsevier Pub. Co., New York.
- Cronquist, A. 1973. Chemical plant taxonomy: A generalist's view of a promising specialty. In G. Bendz and J. Stantesson (Ed.) Nobel Symposium 25. Nobel Foundation, Stockholm.
- Crowle, A. J. 1973. Immunodiffusion. Acad. Press, New York.
- Fairbrothers, D. E. 1980. The systematic position of *Aralidium* Miq. — A multidisciplinary study. 6. Comparative serological investigation. *Taxon* 79 : 412~416.
- Garvey, J. S., N. E. Cremer and D. H. Sussdorf. 1977. Methods in Immunology, 3rd Ed., W. A. Benjamin Inc., Reading, Mass.
- Hjelmquist, H. 1948. Studies on the floral morphology and phylogeny of the Amentiferae. *Bot. Not. Suppl.* 2 : 1~171.
- Hyun, S. 1949. Serodiagnostic investigation on the affinities of different species of genus *Quercus* and *Castanea*. *Bull. Kishyu Univ. Forest* 17 : 1~87.
- Lee, Y. S. 1977. An immunoelectrophoretic comparison of three species of *Coffea*. *System. Bot.* 2 : 169~179.
- and D. E. Fairbrothers. 1978. Serological approaches to the systematics of the Rubiaceae and related families. *Taxon* 27 : 159~185.
- . 1981. Serological investigations in *Ambrosia* (Compositae-Ambrosieae) and relatives.

- System. Bot.* **6** : 113~125.
- Lee, T. B. 1961. Phylogenetic study of the subgenus *Lepidobalanus* of the genus *Quercus* in Korea. *Res. Bull. Kor. Agr. Soc.* **7** : 87~108.
- Oersted, A. S. 1871. Bidrag til Kundskab on Egefamilien Nutid og Fortid. K. Danske Vidensk. *Selak. Skrift.* **9** : 334~370.
- Olsson, U. 1975. On the size and microstructure of pollen grains of *Quercus robur* and *Q. petraea* (Fagaceae). *Bot. Not.* **128** : 256~264.
- Ouchterlony, O. and L. A. Nilsson, 1978. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In D. M. Weir, Handbook of Experimental Immunology. Vol. 1. Immunochemistry. Blackwell Scientific Pub., London.
- Nakai, T. 1952. A synoptical sketch of Korean flora. *Bull. Nat. Sci. Mus.*, Japan.
- Rushton, B. S. 1977. Pollen grain size of *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. *Watsonia* **11** : 137~140.
- Schwarz, O. 1936. Entwurf zu einem naturlichen System der Cupuliferen und der Gattung *Quercus* L. *Notizbl. Bot. Gart. Mus. Berlin. Dahlem* **13** : 1~22.
- Stebbins, G. L., Jr. 1950. Variation and Evolution in Plants. Columbia Univ. Press, New York.
- Tillson, A. H. and C. H. Muller. 1942. Anatomical and taxonomic approaches to subgeneric segregation in American *Quercus*. *Amer. J. Bot.* **21** : 523~529.
- Trelease, W. 1924. The American oak. *Mem. Nat. Acad. Sci.* **20** : 1~255.
- Tucker, J. M. 1961. Studies in the *Quercus undulata* complex. I. A preliminary statement. *Amer. J. Bot.* **48** : 202~208.
- Uyeki, H. 1936. On the genus *Quercus* in Korea. *J. Jap. Forests.* **18** : 473~478.
- Weier, D. M. 1978. Handbook of Experimental Immunology. 2nd Ed. Blackwell, Oxford and Edinburgh.

(1981. 10. 14. 接受)