

RAPD 분석에 의한 홍화의 품종군 분류

방경환* · 김영국* · 박희운* · 성낙술* · 조준형* · 김홍식** · 조용구**

*작물시험장 특용작물과, **충북대학교 농학과

Classification of Safflower(*Carthamus tinctorious* L.) Collections by RAPD Analysis

Kyong Hwan Bang*, Young Guk Kim*, Hee Woon Park*, Nak Sul Seong*,
Joon Hyeong Cho*, Hong Sig Kim** and Yong Gu Cho**

*Industrial Crop Div., Nat,1 Crop Exp. Station, RDA, Suwon 441-100, Korea

**Dept. of Agronomy, Chungbuk Nat,1 Univ., Cheonju, 360-763. Korea

ABSTRACT : This studies were conducted to provide the basic information on safflower collections and to identify the variations which could be utilized in safflower breeding programs. The RAPDs was used to clarify the genetic relationships among safflower collections and to classify them into distint genetic groups. Among 30 of 10 mer primers in RAPD analysis, twenty were selected as the appropriate primers for identification of the genetic characters in safflower collections. Amplified PCR showed the highly reproducible bands at 3.0~0.2kb. The number of bands amplified with the each primer showed the variations ranged from 2 to 11, with the average of 5.6. Total of 111 bands were identified among 20 selected primers used in PCR reaction and 84 bands (75.7%) showed polymorphism. Based on the similarity value of 0.14 in dendrogram derived from the cluster analysis using RAPD-PCR, the 30 safflower collections were classified into 11 groups. The two main groups, VII and VIII included 7 collections (23%) and 8 collections (27%), respectively. Most of the collections in group VII were the Korean collections (85%).

Key words ; *Carthamus tinctorious*L. , polymorphism , random amplified polymorphic DNA, cluster analysis.

서 언

과거에는 식물의 종·속간 및 품종간 특성이나 계통을 분류하는데 형태적 특성에 의한 식물학적 분류 방법 이외에 단백질, 동위효소 등이 이용되어

왔다(Brown, 1990). 최근에는 분자생물학적 표지 인자를 이용하는 방법으로 RFLP (restriction fragment length polymorphism)와 RAPD (random amplifield polymorphic DNA), SSR (simplifield sequence repeats), AFLP (amplified fragment

† Corresponding author (Phone) : 031-290-6716

Received July 13, 2001

length polymorphisms) 등의 분석 방법이 널리 이용되고 있다(Park *et al.*, 2000).

PCR (polymerase chain reaction) 분석기술을 이용하는 RAPD방법은 RFLP 방법에 비하여 시간과 노력이 적게들 뿐만 아니라 간편하게 분석할 수 있어 많이 이용되고 있다(Williams *et al.*, 1990). RAPD 방법은 임의 염기서열의 짧은 oligonucleotide primer를 이용하여 핵 DNA를 PCR로 증폭하여 생성된 다양한 DNA밴드를 비교하는 방법으로서 유전자지도 작성 (Mukai *et al.*, 1995), 종의 분류와 유연관계 (Kim, 1997), 유용형질을 탐색할 수 있는 표지인자 개발(Kwon *et al.*, 2000), 집단유전학의 양적유전형질 분석(Suh *et al.*, 1999; Rim *et al.*, 1995) 등에 많이 이용되고 있다.

또한 RAPD 분석법을 이용한 식물의 분류학적 연구는 Demeke *et al.* (1992)이 *Brassica*속 식물을 대상으로, Wilkie *et al.* (1993)이 다섯 종류의 *Allium* 속을 중심으로 유전학적인 분석을 하였다. 국내에서는 Shin *et al.* (1995)이 한국 재래종 및 도입종 수박 39계통간의 DNA 다형성을 관찰하여 소집단화하였고, Lee *et al.* (1996)이 무궁화 84품종간의 유연관계를 분석하였으며, Park *et al.* (2000)은 방사선 돌연변이체인 청양구기자의 변이 유발 후 DNA 고정여부와 재래종 및 외국종들간의 유연관계를 밝힌 바 있다.

작물육종에 있어 유전자원의 다형성에 대한 정보는 매우 중요하며, 종이나 집단의 유전적 연관성에 대한 평가는 새로운 유전자 조합을 위한 유전자 도입의 선택에 큰 역할을 제공한다(Thormann and Osborn 1992).

최근에는 국내에서도 홍화 종자를 약용으로 이용하면서 급속히 재배 면적이 늘어나고 있으나 가격 경쟁의 취약성으로 해마다 수입이 증가되고 있으며, 국내 재배 여건에 알맞는 품종을 육성하고 재배 기술에 대한 연구 개발이 필요한 실정이다.

지금까지 홍화에 대한 연구는 재배법, 성분 분석 및 형태적 특성에 관한 연구가 수행되었으나 체계적

인 재배법과 육종에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구는 국내·외 홍화 수집종을 대상으로 RAPD 분석을 이용한 주요 수집종들의 유전적 변이를 DNA 수준에서 비교하여, 그들의 유전적 다양성 및 유연관계를 밝혀, 체계적인 홍화 품종육성 연구의 기초 자료로 이용코자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료 및 DNA추출

공시재료는 국내종 9종과 국외종 21종 및 도합 30종이었으며 1999년 5월 7일 온실의 포트에 파종하였다. DNA는 파종 14일 후의 어린잎을 채취하여 Causse *et al.* (1994) 방법을 변형하여 추출하였다.

홍화 잎 약 0.2g을 채취한 즉시 액체 질소를 이용하여 얼렸다. 이 시료를 1.5ml 원심분리 튜브에 넣고 곱게 마쇄 한 후, 시료량의 2배 부피의 CTAB buffer와 혼합하여 65℃ water bath 에서 5~10분 간격으로 천천히 흔들며 주면서 1시간 동안 처리하였다.

Chloroform : Isoamyl alcohol (24 : 1, v/v) 을 가하여 천천히 흔들며 주어 현탁액을 형성하게 하였으며 12,000 rpm으로 15분간 원심분리 한 후 상등액을 새 튜브에 옮기고, 그 2배에 해당하는 95% 에탄올을 첨가하여 천천히 섞은 후 DNA를 침전시켰다. 이 용액을 12,000rpm으로 15분간 원심분리하여 상등액은 버리고 4℃의 70% 에탄올로 세척하여 원심분리하였다. 처리된 DNA를 건조 후 TE buffer로 잘 녹여 RNase를 처리하여 RNA를 제거한 후 4℃에 보관하면서 시료로 사용하였다.

DNA함량을 측정하기 위하여 λ DNA를 *Hind*III로 처리한 DNA 단편을 기준으로 1.5%의 아가로스 겔 상에서 전기영동한 밴드의 강도를 비교하여 정량하였고, 각 DNA는 5 ng/ μ l로 희석하였으며, DNA의 농도는 3회 반복 측정하여 그 평균값으로 DNA의 양을 정하였다.

2. Polymerase Chain Reaction

RAPD primer는 Operon Technologies, Inc. (USA)에서 생산된 20개와 Bioneer사(Korea)에서 10개를 구하여 총 30개의 임의 primer를 사용하였는데, 이 중에서 DNA의 다형성을 보인 20개의 primer를 분석에 이용하였다(표 1). PCR 반응은 PCR buffer (1 M Tris-HCl, pH 8.0, 1 M KCl, 1 M MgCl₂, 1% gelatin), 2.5 mM MgCl₂, 4 μM의 Primer, DNA 10 ng, Taq polymerase 1 Unit이 혼합된 15 μl의 반응혼합물에 동량의 mineral oil을 첨가한 후 DNA thermal cycler(Perkin-Elmer Cetus, USA)에서 94℃에서 1분간 denaturation, 35℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 2분간 extension의 과정을 총 45 cycle 수행하였다.

PCR산물은 1.5%의 아가로스 겔에서 85V에서 4시간 동안 전기영동 한 후, EtBr로 아가로스 겔을 10분 동안 staining 시키고, 10분간 destaining 시킨 다음 자외선 조사장치 위에서 증폭된 DNA의 다형 현상을 사진으로 기록하였다.

3. 유연관계 분석

PCR산물의 분석은 밴드의 유·무에 따라 유는 1, 무는 0으로 데이터화하였으며 NTSYS-PC system을 이용하여 UPGMA(unweighted pair-group method, arithmetic average method) 분석방법으로 dendrogram을 작성하였다.

결과 및 고찰

RAPD 분석을 수행함에 있어 가장 기초적으로 수행되어야 할 것은 DNA의 농도를 정확히 알고 각 시료의 DNA를 동일한 양을 사용해야 하는데 이를 위해서 DNA의 농도를 3회 반복하여 실험한 결과, 10-100 ng/μl의 원액 DNA을 얻었고 이중 10 ng을 사용하여 분석하였다. 홍화의 최적 PCR 반응조건을 탐색한 결과, 10 ng의 DNA와 4 μM의 10-mer primer 그리고 1 unit의 Taq polymerase를 이용하여

35℃의 annealing temperature로 반응시켰을 때 가장 양호한 증폭된 DNA band의 형성을 나타냄을 알 수 있었다.

홍화 30 수집종을 대상으로 30개의 primer를 사용하여 재현성이 있으면서 다형성이 높은 primer를 탐색한 결과는 표 1과 같다.

Table 1. The sequences of primers and number of PCR products

Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')	No. of PCR products	No. of polymorphic products
OPB14	TCCGCTCTGG	4	3
OPP2	TCGGCACGCA	4	3
OPP4	GTGTCTCAGG	9	7
OPP8	ACATCGCCCA	5	3
OPP12	AAGGGCGAGT	5	3
OPP14	CCAGCCGAAC	5	2
OPP15	GGAAGCCAAC	5	2
OPP16	CCAAGCTGCC	6	4
OPP17	TGACCCGCT	9	9
OPQ7	CCCCGATGGT	4	3
OPQ15	GGGTAACGTG	8	7
OPQ20	TCGCCAGTC	11	9
BIO2	CAATCGCCGT	3	2
BIO10	CTGAGACGGA	5	3
BIO12	TACAACGAGG	7	6
BIO13	GTTTCGCTCC	2	1
BIO15	GGAAGCGAGT	3	3
BIO17	TGCTCTGCTC	4	4
BIO24	TGACGCGCTC	4	3
BIO28	CCCGCCGTTG	8	7
Total		111	84

♣ OPB, OPP, OPQ : The primers of Operon Technologies, Inc

♣ BIO : The primers of Bioneer Co.

30개의 primer중에서 밴드가 분명하고 다형성이 높은 20개의 primer들이 선발되었는데 증폭된 PCR산물들은 0.2 Kb에서 3.0 Kb까지 다양하였으며, 총 111개의 증폭된 DNA 밴드를 얻었다. 각 primer에 의해 증폭된 밴드의 수는 2~11개로 다양

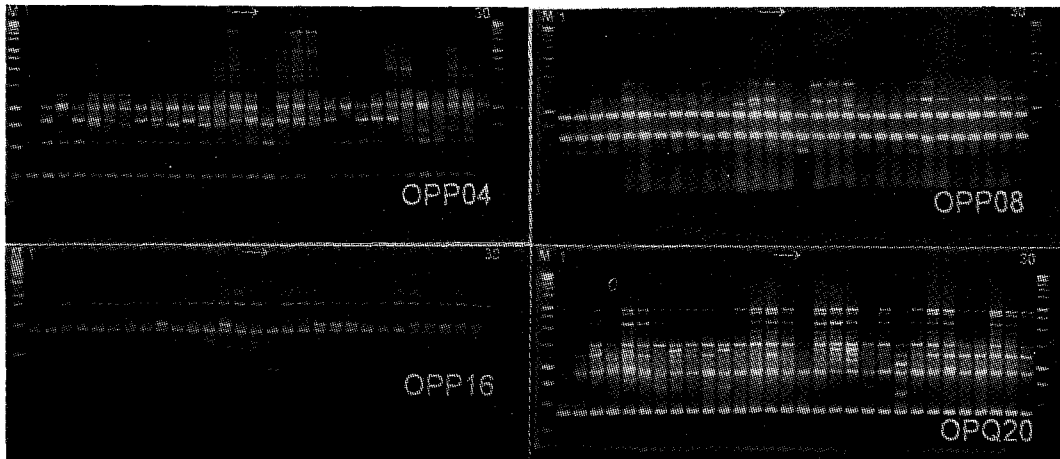


Fig. 1. Profiles of PCR products obtained from genomic DNA using the primers OPP04, 08, 16 and OPQ 20 in 30 safflower collections.

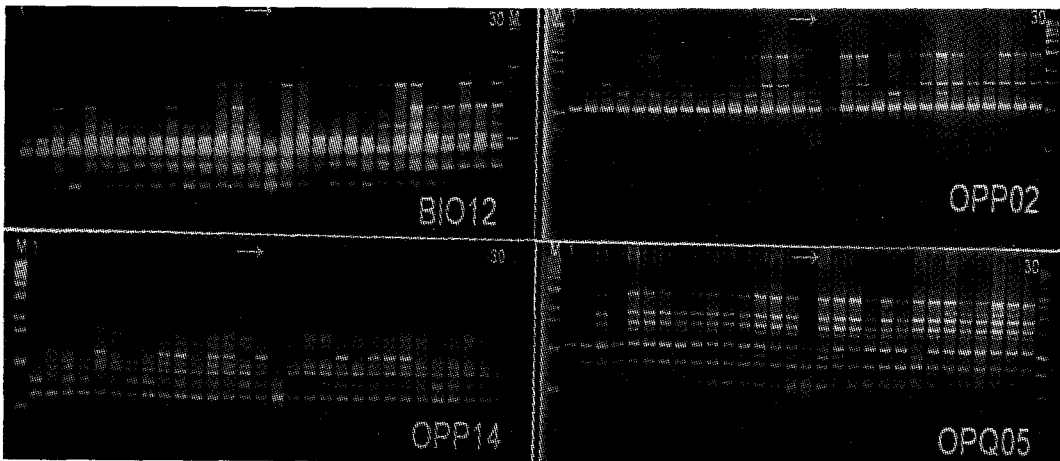


Fig. 2. Profiles of PCR products obtained from genomic DNA using the primers OPP02, 05, 14 and BIO12 in 30 safflower collections.

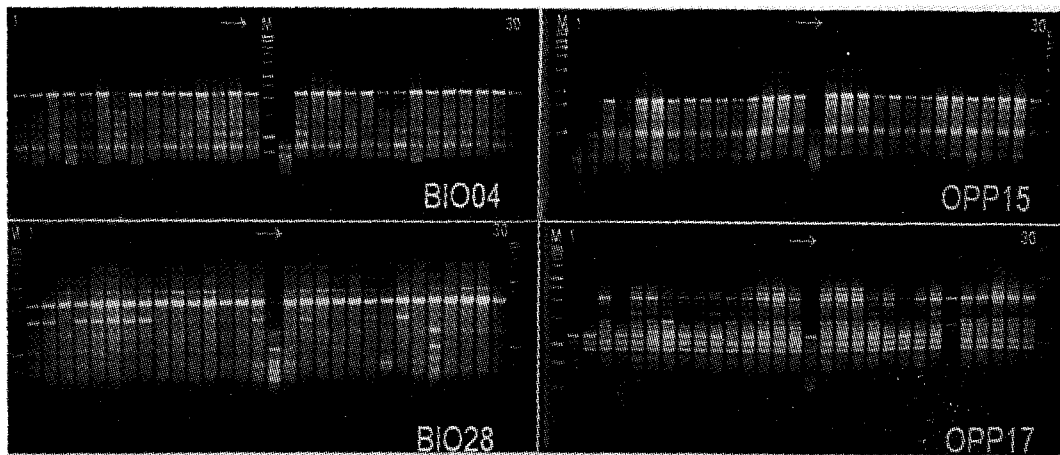


Fig. 3. Profiles of PCR products obtained from genomic DNA using the primers OPP15, OPP17, BIO04 and BIO28 in 30 safflower collections.

하였으며 primer 한 개당 평균 5.6개의 DNA 밴드가 증폭되었다.

총 111개의 밴드중 다형성을 보이는 밴드의 수는 84개 (75.7%)이었으며, 그렇지 않은 밴드의 수는 27개 (24.3%)이었다. 다형현상은 각 primer에 따라

40~100%로 나타났는데, 이는 다른 약용작물인 구기자의 다형성 밴드 29.1%와 각 primer에 따른 다형현상 11.1~62.5% 보다 높은 유전적 다형성을 보였다 (Park *et al.*, 2000).

국내 수집종들 사이의 유전적 거리는 0.019~0.

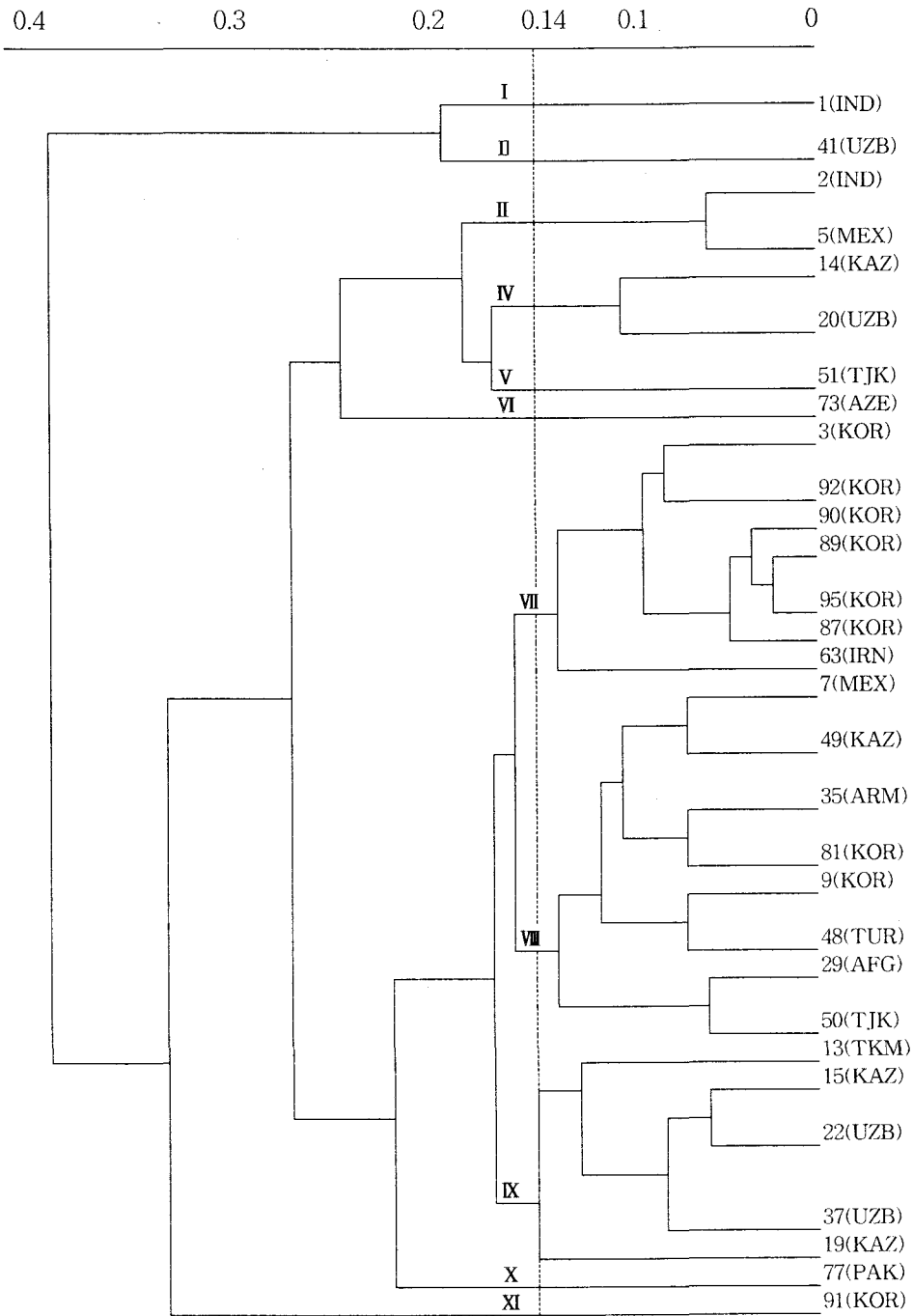


Fig. 4. Dendrogram analyzed by unweighted pair grouping method in 30 safflower collections.

045로 근연인 특성을 나타냈으며, 국내 수집종들과 외국 수집종들 사이의 유전적 거리는 0.450~0.486으로 원연인 특성을 보였다.

RAPD-PCR에 의해 얻어진 111개의 밴드를 가지고 유연관계를 분석한 결과, dendrogram에서 유연계수 0.14를 기준으로 30개 공시 품종을 11개의 군으로 분류되었는데, 특히 제Ⅶ군은 대부분이 국내종(85%)들이었다(그림 4).

Bang(2001)의 홍화의 작물학적인 특성에 의한 품종군 분류에서는 최대거리 1.2를 기준으로 11개의 군으로 분류되었는데, Ⅲ군의 14종 모두가 국내종이었다. 또한 RAPD 분석에 의한 분류에서 Ⅶ군의 대부분이 국내종(85%)들이었다. 이는 국내종들 간에는 작물학적 특성이나 RAPD 분석에 의한 유연관계가 근연이기 때문인 것으로 생각된다. 작물학적 특성에 의한 분류 결과, 우량품종 육성을 위한 유용 유전자원으로 활용할 수 있을 것이라 생각된 수집종들은 Ⅵ군의 티지크스탄종(IT202723)과 X군의 우즈베키스탄종(IT202728)이었다. 이들 유망 수집종들은 RAPD 분석에 의한 분류에서는 티지크스탄종(IT202723)은 Ⅷ군에, 우즈베키스탄종(IT202728)은 Ⅸ군에 속하였다.

분류학적인 측면에서 볼 때 작물학적인 특성에 의한 분류보다는 분자생물학적 기법을 이용한 RAPD, AFLP 및 SSR 등의 방법에 의한 분류가 더 정확할 것으로 생각되어지나 그 유효성은 보다 많은 DNA를 전체 염색체에 걸쳐서 분석할 때 높을 것이다.

적 요

RAPD 분석을 통하여 홍화 수집종들의 유전적 다양성 및 유연관계를 밝히고, 품종군을 분류하여 품종육성의 기초자료로 이용코자 시험한 결과를 요약하면 다음과 같다.

RAPD 분석에 적용한 30개의 10mer primer 중 20개의 적정 primer를 선발하였고, 증폭된 PCR 산

물은 3.0~0.2Kb에서 재현성 있는 밴드를 보였으며, 각 primer에 의해 증폭된 밴드의 수는 2~11개로 다양하였으며 평균 5.6개이었다. PCR 반응에 사용된 20개의 selected primer에서 111개의 밴드가 관찰되었으며, 다형성을 보이는 밴드 수는 84개(75.7%)이었고, RAPD-PCR에 의해 얻어진 dendrogram에서 유연계수 0.14를 기준으로 11개의 군으로 분류되었고, Ⅶ군은 7종(23%), Ⅷ군은 8종(27%)이 속하는 큰 군이였으며, 7군은 대부분이 국내종(85%)이었다.

LITERATURE CITED

- Bang, K. H. 2001. Classification of Safflower (*Carthamus tinctorious* L.) Collection by Agronomic Characteristics and RAPD Analysis. Department of Agronomy, Graduate School Chungbuk National University, Cheongju, Korea.
- Brown, A. H. D. 1990. The role of isozyme studies in molecular systematics. *Aust. Syst. Bot.* 3 : 39~46.
- Causse, M. A., T. M. Fulton, Y. G. Cho, S. N. Ahn, J. Chunwongse, K. S. Wu, J. H. Xiao, Z. H. Yu, P. C. Ronald, S. E. Harrington, G. Second, S. R. McCouch and S. D. Tanksley. 1994. Saturated molecular map of the rice genome based on and interspecific backcross population. *Genetics* 138 : 1251~12.
- Demeke T, R. P. Adama, and R. Chibbar. 1992. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) : a case study in Brassica. *Theor. Appl. Genet.* 84 : 990~994.
- Kim, K. M. 1997. Analyses of Genetic Distance Using RAPDs in Rice. *Korean J. Breed.* 29(3) : 327~332.
- Kwon, S. J, S. N. Ahn, J. P. Shu, H. C. Hong, Y. K. Kim, H. G. Hwang, H. P. Moon, and H. C. Choi. 2000. Genetic Diversity of Korean Native Rice Varieties. *Korean J. Breed.* 32(2) : 186~193.
- Lee, S. H, C. H. Kim, W. S. Song, and I. S. Nou. 1996. Phylogenetic Relationship and Genetic Variation among Varieties of *Hibiscus syriacus* based on RAPD Analysis. *Korean J. Breed.* 28(4) :

- 445~456.
- Mukai, Y., Y. Suyama, Y. Tsumura, T. Kawahara, H. Yoshimaru, T. Kond, N. Tomaru, N. Kuramoto, and M. Murai. 1995. A linkage map for sugi (*Cryptomeria japonica*) based on RFLP, RAPD and isozyme loci. *Theor. Appl Genet.* 90 : 835~840.
- Park, J. S., B. C. Lee, C. G. Seong, K. W. Lee, S. W. Ra, and K. J. Choi. 2000. Genetic Similarity of Boxthorn Varieties (*Lycium chinense* Mill.) based on RAPD analysis. *Korean J. Breed.* 32(2) : 117~121.
- Rim, Y. W, B. H. Hong, J. H. Nam, M. W. Park, Y. W. Ha, K. G. Park, and J. S. Shin. 1995. Detection of Barley in Barley×Wheat Intergeneric Hybrids Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Korean J. Breed.* 27(4) : 417~422.
- Shin, J. S, S. J. Lee, and K. W. Park. 1995. Genetic Diversity in Watermelon (*Citrullus vulgaris* L.) Germplasm through RAPD Analysis. *Korean J. Breed.* 27(1) : 94~107.
- Suh, J. P, S. N. Ahn, H. P. Moon, and H. S. Suh. 1999. QTL Analysis of Low Temperature Germinability in a Weedy Rice. *Korean J. Breed.* 31(3) : 261~267.
- Thorman, C. E. and T. C. Osborn. 1992. Use of RAPD and RFLP markers for germplasm evaluation. In : Applications of RAPD technology to plant breeding, CSSA, ASHS, AGA. pp 9~11.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18 : 6531~6535.
- Wilkie, S. E., P. G. Issac, and R. G. Slater. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor. Appl. Genet.* 86 : 497~504.