

RAPD 표지인자를 이용한 흑오미자의 자웅동주 및 자웅이주 식물의 동정

이효연 · 한호심¹ · 이갑연² · 한상섭³ · 정재성^{1*}
순천대학교 농과대학, ¹순천대학교 자연과학대학,
²삼림청 임목육종연구소 남부육종장, ³강원대학교 농업생명과학대학

Identification of Monoecious and Dioecious Plants of *Schisandra nigra* Using the RAPD Markers

LEE, Hyo-Yeon · HAN, Hyo-Sim¹ · LEE, Gab-Yeon² ·
HAN, Sang-Sop³ · JUNG, Jae-Sung^{1*}

College of Agriculture and ¹College of Natural Science, Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Korea:
²Southern Breeding Station, Forest Genetics Research Institute, Forestry Administration, Seogwipo, 697-060, Korea: and
³College of Forest Sciences, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea.*Corresponding author.

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analysis was conducted to *Schisandra nigra* plants in order to select the specific markers for monoecious and dioecious individuals. RAPD results using eighty random 10-mer primers revealed that *S. nigra* had a different banding pattern from *S. chinensis* and *Kadsura japonica*. When DNA isolated from leaves of monoecious and dioecious plants were used as PCR template, only five primers, OPA-17, OPA-19, OPB-03, OPB-09 and OPB-16, showed polymorphic band patterns. No variation in banding profiles within male or female individuals was observed when these five primers were used whereas three monoecious plants (No 1, No 2 and No 3) showed different banding patterns one another. A 750 bp segment was amplified by primer OPB-3 from male individuals. On the other hand, two segments, 950 bp and 1690 bp, with OPA-19 and 700 bp of segment with OPB-3 were amplified in female individuals. These results indicate that the specific bands of male and female *S. nigra* could be used as genetic markers for the early discrimination of male and female individuals.

Key words : *Schisandra nigra*, RAPD, monoecious, dioecious, genetic marker

식물의 육종 및 재배에 있어서 가장 중요한 과제중의 하나는 현재 재배되고 있는 품종을 정확히 분류하여 유용형질을 이용하는 것이다. 최근 생물다양성 보존협약이 체결되어 자국의 품종들을 적극적으로 조사 개발하여 자생 수종중에서 세계적인 희귀성과 함께 고품질의 식품으로 개발 가능성이 높은 유용 식물자원을 탐색하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 과거의 식물분류는 대부분 식물 표현형을 중심으로한 세포학적·형태학적 분류에 주된 관점을 두었으나, 이러한 분류의 경우에는 시간과 노동력이 많이 필요하고, 개체 수준의 동정이 불가능하며, 또한 유연관계가 가까운 식물 종간에는 그 구별이 어려운 단점을 갖고 있다.

최근 분자생물학의 발달로 식물 육종사업에도 분자생물학적 방법이 도입되어 개체, 계통 및 품종 수준의 단계에서도 식별이 가능하게 되었다. 예를 들어 RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD(random amplified polymorphic) 및 DNA-fingerprinting 방법은 식물종의 계통 및 품종간의 유연관계를 분석하는데 유용하며, 생식질 보존을 위한 marker 탐색에도 적극적으로 활용되고 있다. 그 중에서도 RAPD 분석은 PCR (polymerase chain reaction)을 이용하여 불특정DNA를 증폭시킴으로써 원핵생물, 진핵생물 내에 폭 넓게 존재하는 DNA 단편 장다형 현상을 손쉽게 확인 할 수 있다. 또한 증폭된 단편은 Southern

hybridization 과정을 거치지 않고 전기영동만으로 DNA를 분획하여 개체 및 품종을 식별 할 수 있다 (Beyermann et al., 1992; Waugh and Powell, 1992). 지금까지 목본식물의 경우 이러한 방법을 이용하여 코코아 (Wilde et al., 1992), 사과 (Koller et al., 1993), 파파야 (Stiles et al., 1993), 소나무 (Kim et al., 1995; Lee et al., 1997) 등의 식물에서 종내 분류군 또는 중간 분류군들을 비교 분석하는데 이용되어 왔다.

본 연구에 이용되는 흑오미자(*Schisandra nigra*)는 남부지방에서 재배되고 있는 오미자(*Schisandra chinensis*)와는 달리 국내의 경우 제주도의 일부지역에서만 자생하는 특산 식물로써 식용가치 및 약용효과가 탁월한 식물로 인정받고 있다. 그러나 무계획적인 열매 채취로 산림자원의 훼손과 더불어 많은 양의 우량 유전자원이 고갈되어 가고 있는 상태이다. 따라서 품질 향상과 품질의 균일화를 통한 농산물의 소득증대를 위해서는 우량한 자원의 확보가 시급히 필요한 실정이다. 그러므로 RAPD법을 이용하여 먼저 흑오미자와 오미자 및 나무오미자와의 중간 및 종내 구별이 가능할 수 있는 genetic markers를 조사함과 동시에 흑오미자 종내 개체간의 암그루, 숫그루 및 자웅동주 식물체간의 genetic marker를 선별하여 흑오미자의 품종보존과 재배상의 효율성을 높이기 위한 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에 사용한 재료는 제주도 남부 육종연구소에서 채취한 자웅동주 黑五味子 3개체 (*Schisandra nigra* 1, 2, 3), 黑五味子 숫그루 3개체 (*S. nigra* 42, 52, 53), 黑五味子 암그루 3개체 (*S. nigra* 46, 54, 55) 五味子 (*Schisandra chinensis*) 1개체 및 南五味子 (*Kadsura japonica*) 1개체의 잎을 사용하였다.

Genomic DNA의 분리 및 정제

액체질소로 분쇄시킨 엽육조직에 시료의 10배량의 isolation buffer (10% polyethylene glycol 6000, 0.35 M sorbitol, 0.1 M Tris (pH 8.0), 0.5% spermidine, 0.5% spermine, 0.5% β -mercaptoethanol)를 넣고 잘 교반한 후, 원심분리 (4°C, 15,000 rpm, 10min)하여 침전물을 얻었다. 이 침전물에 5배량의 lysis buffer (0.35 M sorbitol, 0.1 M Tris (pH 8.0), 0.5% spermidine, 0.5% spermine, 0.5% β -mercaptoethanol)와 1/10배량의 10% sarcosine을 첨가하고, 실온에서 10분간 반응시킨 후, 2배량의 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 용액을 넣고, 65°C에서 10분간 반응시켰다. 여기에 동량의 chloroform 용액 (chloroform: isoamylalcohol=24:1)을 첨가한 후 원심분리

(25°C, 15,000rpm, 10min)하여 상층액을 얻어냈고, isopropanol 과 ethanol 처리 과정을 거쳐서 DNA를 추출 하였다. 건조시킨 DNA는 TE buffer 녹일 경우 EDTA가 PCR buffer의 Mg²⁺의 농도에 영향을 미칠 수 있으므로 적당량의 증류수에 녹였다. DNA 양은 Hoefer사의 DNA fluorometer (TKO-100)을 이용하여 측정하였다.

Random primers

PCR에 사용된 primer는 Operon사로부터 구입한 random primer OPA kit (20 primers), OPB kit (20 primers), OPC kit (20 primers), OPD kit (20 primers)의 총 80개의 primer를 사용하였다.

PCR 조건

PCR반응은 20 ng의 template DNA, 25 pmole의 primer, 200 μ M의 deoxyribonucleic acid, 1.5 mM의 MgCl₂, 10 × PCR buffer (100 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl₂, 500 mM KCl (pH 8.3)), 1.25 unit의 Taq DNA polymerase (Takara)를 포함하는 25 μ L의 반응액을 PCR에 사용하였다. 먼저 DNA를 100°C에서 5분간 boiling한 후 바로 얼음에 방치하여 DNA를 denature시킨 후 PCR을 수행하였다. PCR은 Perkin Elmer사의 GeneAmp PCR system 2400 모델을 이용하였으며, 94°C에서 5분간 초기 denaturation을 행한 뒤, 94°C에서 30초간 denaturation, 37°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension과정을 45회 반복하였다. 마지막으로 72°C에서 5분동안 반응을 시켰다. 얻어진 PCR 산물은 1.4% agarose gel에서 전기영동 한 후 ethidium bromide로 염색하여 결과를 얻었다.

결과 및 고찰

Genomic DNA의 추출

상기의 CTAB(cetyltrimethylammonium bromide)와 spermine-spermidine을 이용하여 식물체로부터 genomic DNA 추출한 결과 엽육조직 1 g에서 평균 1600 μ g의 genomic DNA를 분리 하였다. 이 방법은 일반적으로 많이 사용하고 있는 CTAB 방법(Rogers and Bendish, 1988)과 비교하여 genomic DNA의 추출양이 많았고, 또한 어린 싹에서 뿐만 아니라 성숙한 잎에서도 DNA의 추출이 용이하였다. 이러한 결과는 엽육조직이 두꺼운 목본식물의 성엽에서도 genomic DNA의 추출이 가능하다는 것을 보여주었다.

흑오미자, 오미자, 남오미자의 RAPD 다형성 조사

10-mer로 구성된 Operon사의 4 종류의 random primer kit (OPA, OPB, OPC, OPD)의 primer를 이용하여 2종의 오미자속 식물과 1종의 남오미자를 RAPD 분석한 결과는 다음과 같다. Figure 1의 경우 80개의 primer중에서 9개의 primer에 대한 결과만 제시하였으나 80개의 모든 primer에 대해서 흑오미자, 오미자, 남오미자의 3종의 식물은 서로 다른 band pattern을 보여 주었다. 예를 들면 OPD-15 primer에서 자웅동주 흑오미자는 800bp, 오미자는 2500bp, 남오미자는 1900bp에서 서로 다른 특이적인 band가 검출되었다. 또한 상기의 9개의 primer의 경우 식별 가능한 band가 모두 128개 검출되었으며, 1종의 식물당 평균 10개의 band pattern을 보여 주었다. 대부분의 band pattern은 150-3000bp 사이에 존재하였다. 이상의 결과를 살펴보면 국내에서 자생 또는 재배하고 있는 흑오미자, 오미자, 남오미자는 외형적으로는 비슷하지만 유전적인 유연관계는 다소 먼 것으로 생각할 수 있었다.

흑오미자의 자웅동주 및 자웅이주의 특이적 표지인자 탐색

흑오미자의 자웅동주, 암그루, 수그루의 3품종을 상기와 동일하게 80개의 primer를 사용하여 RAPD를 분석한 결과, 75개의 primer (73개의 primer에 대한 결과는 미제시)는 자웅동주, 암그루, 수그루에서 primer 종류에 따라 전부 동일

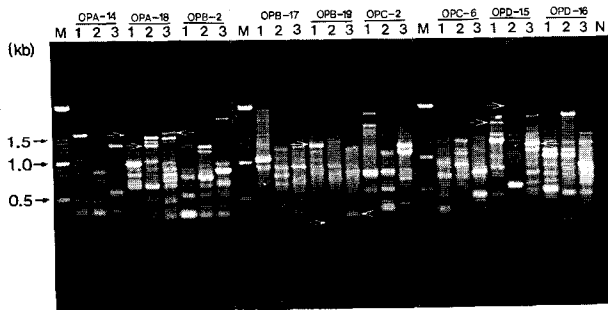


Figure 1. Amplified DNA band profiles of the analyzed plants by using primer OPA-14, OPA-18, OPB-2, OPB-17, OPB-19, OPC-02, OPC-06, OPD-15, OPD-16. M: size marker 100 bp-ladder: 1: *Schisandra nigra* 2: *Schisandra chinensis*: 3: *Kadsura japonica*: N: negative control. The arrows indicate distinctive bands among three species.

Table 1. Synthetic deoxyribonucleotides used as primers for RAPD

Primer number	Nucleotide sequence (5' to 3')	GC content (%)
OPA-17	GACCGTTGT	60
OPA-19	CAAACGTCGG	60
OPB-03	CATCCCCCTG	70
OPB-09	TGGGGGACTC	70
OPB-16	TITGCCCGGA	60

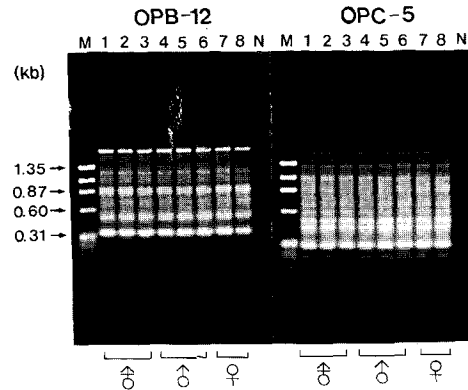


Figure 2. Amplified DNA band profiles of the analyzed plants by using primer OPB-12 and OPC-05. M: size marker Φ X174 DNA digested with *HaeIII*. Lane 1-3: Monoecious plants of *Schisandra nigra* (1, 2, 3): Lane 4-6: Male plants of *Schisandra nigra* 42, 52, 53: Lane 7-8: Female plants of *Schisandra nigra* 46, 54: N: negative control. (♂): monoecious plant, (♂): male plant, (♀): female plant

한 형태의 band pattern을 보여 주었다(Figure 2). 그러나 5 종류의 random primer(Table 1)에 대해서는 각 품종에 대한 특이적인 band가 검출되었다(Figure 3). 먼저 수그루, 암그루 식물과는 다르게 자웅동주 식물은 3개체(1호, 2호, 3호) 간에도 서로다른 band pattern을 보이는 특징을 갖고 있다. 수그루, 암그루와 비교하여 자웅동주 1호는 OPB-16 primer의 경우 1480bp와 1730bp에서 특이적인 band가 검출되었다. 자웅동주 2호는 OPA-17 primer의 경우 650bp, 770bp, 자웅동주 3호는 330bp에서 특이적인 band가 검출되었다. 또한 OPB-9 primer에서 자웅동주 3호는 190bp, 880bp, 1620bp에서 특이적인 band가 검출되었다. 수그루 특이적인 band pattern은 OPB-3 primer을 이용할 경우 750bp에서 검출되었고, 암그루는 OPA-19 primer에서 950bp, 1690bp와 OPB-3 primer의 경우 700bp에서 자웅동주 및 수그루에서 나타나지 않는 band가 검출되었다. 상기의 5개의 primer에 대해 모두 72개의 식별 가능한 band가 증폭되었으며, 한 개의 primer당 평균 14.4개의 band가 검출되었다. 대부분의 band는 200-2000bp 사이에 존재 하였다. 이상의 결과를 살펴보면 자웅동주 식물체가 수그루, 암그루와는 다르게 개체간에서 서로 다른 band pattern을 보이는 것은 수그루 또는 암그루로부터 어떠한 원인에 의해 변이가 발생 되었다고 생각된다. 왜냐하면 자웅동주 1호는 OPA-17 primer의 경우 680bp에서 암그루에 없는 수그루 특이적인 band를 갖고 있으며, 자웅동주 2호는 OPA-19 primer에서 수그루에 없고 암그루에만 있는 2개의 band pattern(1200bp, 1350bp)을 갖고 있다. 또한 자웅동주 3호를 제외하고 1호, 2호는 수그루, 암그루의 대부분의 band를 포함하고 있기 때문에 진화적인 관점으로 볼 때 수그루 또는 암그루에 비해서 나중에 분화된 변이 개체

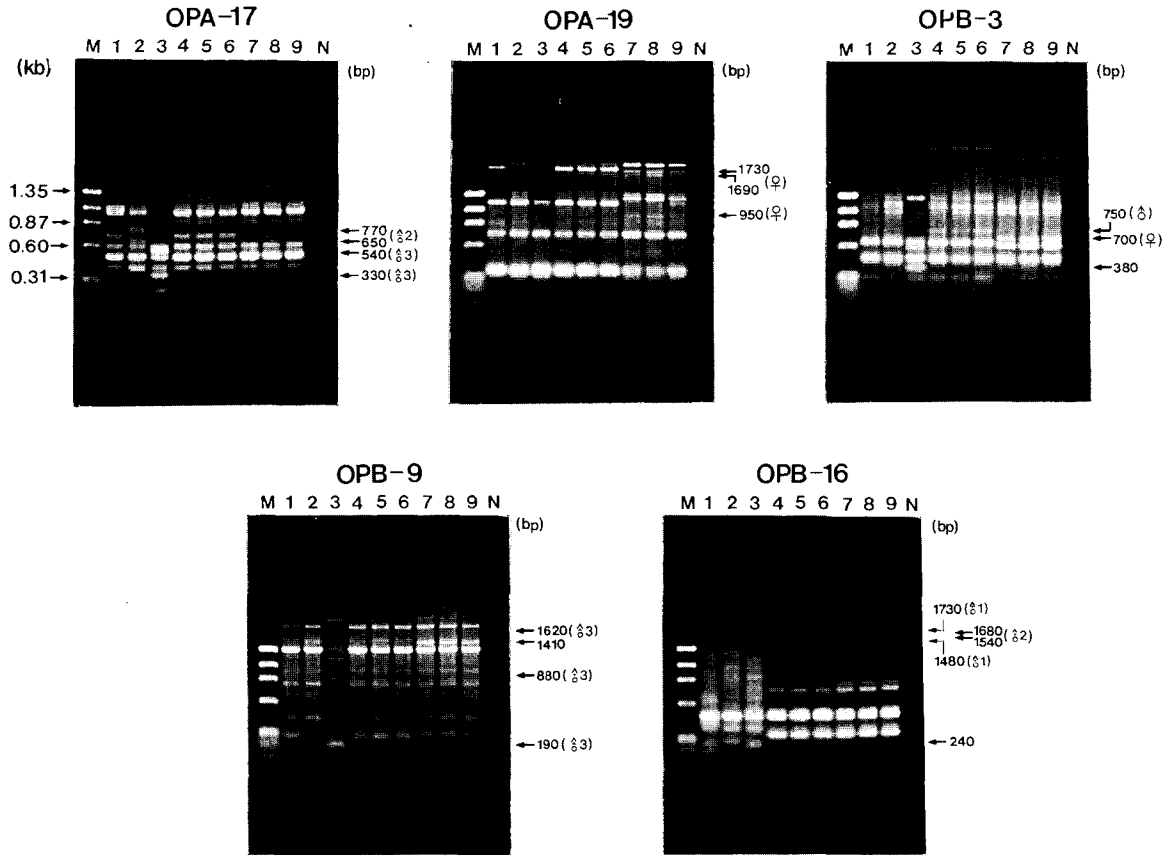


Figure 3. Amplified DNA band profiles of the analyzed plants by using primer OPA-17, OPA-19, OPB-03, OPB-09, and OPB-16. M: size marker ϕ X174 DNA digested with *Hae*III. Lane 1-3: Monoecious plants of *Schisandra nigra* (1, 2, 3); Lane 4-6: Male plants of *Schisandra nigra* 42, 52, 53; Lane 7-9: Female plants of *Schisandra nigra* (46, 54, 55); N: Negative control. (♂): Monoecious plant, (♂): Male plant, (♀): Female plant

라 생각되나 앞으로 보다 많은 검토가 필요하다고 생각된다.

현재까지 흑오미자의 경우 국내에서는 한라산에서만 자생하는 것으로 알려졌고, 그중에도 자용동주 흑오미자는 최근에 3개체만이 발견되었기 때문에 이 식물체의 유전적 변이에 관한 연구는 거의 진행되지 않은 실정이다. 그러나 자용동주 흑오미자(Figure 4A)는 암그루(Figure 4B)에 비하여 1주당 열매(Figure 4D)의 생산량이 1.5배 정도 높은 것으로 보고 되었기(Lee, 1988) 때문에 재배 또는 육종적인 측면에서 매우 흥미 있는 유전 형질이라고 생각된다. 숫그루(Figure 4C)나 암그루는 상기의 PCR 결과에서도 보았듯이 개체간에 유전적 변이가 없이 안정된 상태를 유지하고 있기 때문에 숫그루 및 암그루에서 나타난 특이적인 band는 암·수 개체를 유묘시기에 조기에 구별하는 genetic marker로 사용할 수 있으리라 기대된다.

대부분의 피자식물은 양성화를 가지고 있지만 오이나 옥수수 등은 자용동주 식물로 한 개체내에 암꽃과 숫꽃을 함께 가지고 있다. 반면에 *Asparagus*, *Rumex*, *Humulus*, *Silene* 및 *Cannabis* 등은 한 개체에 암꽃 또는 숫꽃중 어느



Figure 4. Flower and fruits of *Schisandra nigra*. A: Monoecious flower: B: Male flower: C: Female flower: D: Fruits

한 종류만을 가지고 있는 자웅이주 식물이다. 이중 *Canabis*, *Rumex*, *Silene*은 X와 Y의 성염색체를 가지고 있음이 밝혀졌다 (Chattopadhyay and Sharma, 1991; Sakamoto et al., 1995). 최근 생식기관의 결정에 관여하는 유전자에 대한 연구가 진행되어 성의 분화가 homeotic 유전자 발현의 차이에 기인하는 것이 아니라 어느 한쪽 생식기관의 발달이 억제되기 때문인 것으로 알려지고 있다 (Ma, 1994). 몇몇 종에서 이러한 현상은 호르몬이나 호르몬 대사에 관여하는 유전자에 의함이 보고된 바 있다 (Lebel-Hardenack and Grant, 1997). 그러나 흑오미자의 경우 암·수 특이적인 band가 성분화에 관련된 직접적인 유전자라고는 이 연구의 결과로는 확신할 수 없기 때문에 앞으로 자웅동주, 숫그루, 암그루의 특이적 band만을 분리하여 분자생물학적 수준에서 보다 많은 연구가 진행되어야 한다고 생각한다. 또한 이러한 방법으로 품종 특이적인 유전적 marker를 개발한다면 개체 또는 품종에 유전적 marker를 붙이지 않아도 육종적인 측면에 있어서 이용할 수 있고, 유전자의 구성 등에 관한 정보도 얻을 수 있을 것이며, 더욱이 유전적 변이관계를 연구함에 있어서도 좋은 지표가 되리라 생각된다.

적 요

본 연구는 국내의 경우 제주도의 일부지역에서만 자생하는 흑오미자(*Schisandra nigra*)를 RAPD법을 이용하여 자웅동주 및 자웅이주 식물의 특이적 Marker를 탐색하고자 실시 하였다. 10-mer로 구성된 80종류의 random primer를 사용하여 흑오미자를 분석한 결과 기존의 재배되고 있는 오미자(*Schisandra chinensis*) 또는 남오미자(*Kadsura japonica*)와는 다른 band pattern을 보여 주었다. 흑오미자의 자웅동주, 암그루, 숫그루의 3품종을 상기와 동일하게 80개의 primer를 사용하여 RAPD를 분석한 결과, 5종류의 random primer(OPA-17, OPA-19, OPB-3, OPB-9, OPB-16)에 대해서는 각 품종에 대한 특이적인 band가 검출 되었다. 숫그루, 암그루 식물과는 다르게 자웅동주 식물은 3개체(1호, 2호, 3호)간에도 서로 다른 band pattern을 보이는 특징을 갖고 있다. 숫그루 특이적인 band pattern은 OPB-3 primer을 이용할 경우 750bp에서 검출 되었고, 암그루는 OPA-19 primer에서 950bp, 1690bp와 OPB-3 primer의 경우 700bp에서 자웅동주 및 숫그루에서 나타나지 않는 band가 검출 되었다. 이러한 결과는 흑오미자의 숫그루 및 암그루에서 나타나는 특이적인 band가 유묘시기에 암·수 개체를 조기에 구별하는 genetic marker로 사용할 수 있으리라 기대된다.

시사 - 본 연구는 농림수산 특정연구 과제(196057-3)의 연구결과이다. 본 연구사업에 지원을 해준 농수산부와 제주도 정우식품에 깊은 감사를 드립니다.

인 용 문 헌

- Beyermann B, Nurnberg P, Weihe A, Mexier M, Epplen JT (1992) Fingerprinting plant genomes with oligonucleotide probes specific for simple repetitive DNA sequence. *Theor Appl Genet* 83:691-694
- Chattopadhyay D, and Sharma AK (1991) Sex determination in dioecious species of plants. *Feddes Repert* 102:29-55
- Kim YY, Hyun JO, Hong KN, Choi TB, Kim KS (1995) Genetic variation of natural populations of *Pinus densiflora* in Korea based on RAPD marker analysis. *Kor J Breed* 27:23-48
- Koller B, Lehmann A, McDormott JM, Gessler C (1993) Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor Appl Genet* 85:901-904
- Lebel-Hardenack S, Grant SR (1997) Genetics of sex determination in flowering plants. *Trends Plant Sci* 2:130-136
- Lee KB (1992) The ecophysiological characteristics propagation and genetic variation of *Schisandra nigra* Max pp 1-126
- Lee SW, Kim YY, Hyun JO, Kim ZS (1997) Comparison of genetic variation in *Pinus densiflora* natural populations by Allozyme and RAPD markers. *Kor J Breed* 29:72-83
- Ma H (1994) The unfolding drama of flower development: recent results from genetic and molecular analysis. *Genes Dev* 8:745-756
- Rogers SO, Bendich AJ (1988) Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual* 6:1-10
- Sakamoto K, Shimomura K, Komeda Y, Kamada H, Satoh S (1995) A male-associated DNA sequence in a dioecious plant, *Cannabis sativa* L. *Plant Cell Physiol* 36:1549-1554
- Stiles JL, Lemme C, Sondur S, Morshidi MB, Manshardt R (1993) Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. *Theor Appl Genet* 85:697-701
- Waugh R, Powell W (1992) Using RAPD markers for crop improvement. *TIBTECH* 10:186-191
- Wilde J, Waugh R, Powell W (1992) Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor Appl Genet* 83:871-877

(1998년 3월 25일 접수)