

RAPD에 의한 마늘의 유연관계 분석

권순태[†] · 오세명

안동대학교 생명자원과학부

Genetic Relationship among Garlic Cultivars Based on RAPD Analysis

Soon-Tae Kwon[†] and Sei-Myoung Oh

Department of Applied Life Sciences, Andong Nat'l University, Kyungpook 760-749, Korea

Abstract

RAPD analysis using random primers were tried to evaluate the genetic variation and diversity of the nine garlic cultivars including two foreign varieties. Thirty-two primers out of 70 primers screened were used to amplify genomic DNA of garlic cultivars using polymerase chain reaction(PCR). Among a total of 151 bands amplified by 32 primers, 125 polymorphic bands were subjected to analysis for genetic relationship of garlic cultivars. The estimated size of amplified PCR products were in the range of 932 to 4,060 base pairs. Nine garlic cultivars were classified into two groups, such as group I corresponded to Changnyung and Hungary cultivars, and group II, Namdo, Sandong from China, Yecheon, Euseong, Youngweol, Danyang, Jeongsun cultivars, with the genetic distance value of 0.271. The major ecological types of garlics, so called southern and northern types, was grouped in the genetic distance value of 0.200. The results presented in this study suggest that RAPD analysis are likely to be useful for identification of cultivars and evaluation of genetic origin in garlics.

Key words – PCR, Polymorphic bands, Identification of cultivars

서 론

우리 나라에 마늘(*Allium sativum* L.)이 도입된 시기는 명확하지 않으나 단군신화에 언급되는 것으로 보아 수 천 년 전부터 재배되어 왔을 것으로 추정된다. 마늘은 오랜 기간동안 인편번식 되어 오면서 재배지역의 환경에 적응하거나 생육환경이 다른 지역으로 이동·전파되었을 것이다. 우리 나라에 재배되고 있는 마늘은 휴면성이나 맹아습성에 따라 크게 한지형과 난지형으로 구분되고 있으나 이

들 생태형 간의 전과경로의 차이나 유전적 변이에 관하여 알려진 바는 없다[6].

지금까지 마늘의 분류를 위한 시도는 형태적[7]방법 뿐만 아니라 생리·생태적[6,10], 세포학적[1,4] 및 동위효소에 의한 생화학적[3]인 방법 등 다양하게 시도되어 왔다. Hwang [6]은 마늘의 생리·생태 및 형태적 특성을 이용하여 국내·외 수집마늘 96종을 대상으로 다변량분석에 의한 분류를 시도한 결과 우리 나라 재래종은 48개의 품종군으로 나누어지며, 이들은 마늘의 지역적 분포와 높은 상관관계

[†] Corresponding author

를 보인다고 하였다. 마늘이 우리 나라에 도입된 후 수 천년간의 세대를 거치면서 새로운 유전적 변이체가 생성되었는지, 아니면 다양한 외국종들이 전파되어 섞여서 재배되고 있는지에 관하여는 명확히 알 수 없다. 그러나 우리나라의 마늘은 한지형과 난지형이 뚜렷이 구분되는 생태형이 존재하며, 일부 지역에서는 중간형이 존재하는 것으로 보아 재배종 마늘간에는 어느 정도의 유전적 다양성이 존재할 것으로 추정된다.

생물의 종에 따라 나타나는 다양한 형태적, 생리·생태적 차이는 그 종이 보유하고 있는 유전자의 DNA 염기서열의 차이와 밀접한 관련이 있으므로 RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA)법은 많은 식물을 대상으로 종간의 분류지표나 유연관계를 밝히는데 유용한 수단으로 이용되어 왔다[8,9,12,14,16].

본 실험은 우리 나라 재배종 7종과 외국 도입종 2종을 수집하여 RAPD 방법에 의한 종간의 차이를 살펴봄으로써 국내 재배마늘의 분류지표와 유연관계를 밝히기 위한 기초자료를 얻기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

본 실험에 사용된 마늘(*Allium sativum* L.)은 국내종인 예천, 의성, 단양, 영월, 정선, 남도, 창녕 등 7종과 외국종인 헝가리와 산동(중국) 등 2종으로 예천군 농업기술센터에서 수집한 것을 분양 받아 사용하였다. RAPD(Randomly amplified polymorphic DNA)분석을 위한 시료는 25℃에서 1주일간 맹아된 싹의 잎을 사용하였다.

식물의 잎으로부터 genomic DNA의 추출은 CTAB법(Rogers와 Bendich, 1994)에 준하여 추출하였다. PCR(polymerase chain reaction)을 위한 최적의 반응조건을 조사한 결과 template-DNA 5 ng, 10 mM dNTP 5 μ l, primer 50 nM 및 Taq polymerase 0.3 unit였으며, 총 반응액은 50 μ l로 PCR반응 buffer로 보정되었다. 임의 primer는 Operon社의 OPAA(20개), OPAB(20개), OPAC(20개) 및 기타(10개)로 총 70개를 사용하여 다형성밴드(polymorphic band)를 보이는 primer를 분석대상으로 하였다. DNA 증폭은 Minicycler TM(MJ Research 社)을 사용하였다. PCR증폭 조건은 94℃에 4분간 전처리 후 94℃에 1분(denaturation), 38℃에 1분(annealing), 72℃에 2분(elongation)간 반응을

45 cycle 반복한 다음 72℃에서 7분간 반응시켰다. 증폭된 DNA는 1.2% agarose gel로 150V에 30분간 전기영동하여 polaroid로 촬영하였다. PCR 후 밴드가 나타나지 않은 종이나 primer는 2회의 반복 실험을 실시하여 재확인하였다.

유연관계 분석을 위해 PCR 반응으로 증폭된 다형성 밴드를 각각 동일한 자격의 한 개 형질로 보아 밴드의 유무를 각각 1과 0으로 입력하였으며, cluster분석은 비가중산술방식(Unweighted pair-group method with arithmetic mean)을 통계방식으로 채택하였다[11]. 수집종간의 similarity coefficient는 Nie and Li[13]의 계산법 $\{2xw/(2xw+x+y)\}$ 을 기초로 하여 두 line간(A, B)에 모두 1인 것을 w, A만 1이고 B는 0인 것은 x, A는 0이고 B만 1인 것을 y로 하여 구하였다. 통계적 분석은 Australian National University에서 개발한 RAPD-104 프로그램을 사용하였다.

결과 및 고찰

마늘 9종의 genomic DNA를 주형(template)으로 하여 Operon社에서 구입한 총 70개의 primer로 PCR을 실시한 결과 38개의 primer에서는 어느 종에서도 증폭된 DNA밴드가 나타나지 않았고 32개의 primer에서는 다양한 크기의 DNA밴드가 확인되었다(Table 1). PCR에서 DNA의 증폭효율을 Primer의 염기서열 중 G, C구성 비율이 높을수록 좋다고 알려져 있는데[2,15], 본 실험에서 밴드를 보인 32개의 random primer는 모두 60%이상의 G, C 구성비를 보였다.

각각의 primer마다 증폭된 밴드의 수는 1개(OPA10)에서 10개(OPB17)까지 다양하게 나타났으며, 밴드가 나타난 32개의 primer 중 OPA01, 04, 10, 18 및 OPC06은 마늘 수집 종간에 동일한 DNA밴드 패턴을 보였으나, 27개 primer는 수집 종간에 다형성(polymorphism)을 보였다. 다형성을 보인 27개의 primer에서 나타난 총 DNA밴드 수는 151개였으며 그 중 125개(83.3%)의 DNA가 종간에 다형성을 보여 분석대상으로 하였다. PCR에 의해 증폭된 DNA의 크기는 932bp에서 4,060bp 까지 다양하게 나타났다(Table 1). 총 밴드 중 다형성을 보인 밴드는 83.3%로 참외와 멜론 52개 종에서 20%[12], 벼 13개 품종에서 80%[16], 밀 12개 품종에서 77%[5]라고 보고한 결과보다 높게 나타났다. 이러한 사실로 미루어 보아 마늘은 영양번식에 의해 재배

RAPD에 의한 마늘의 유연관계 분석

Table 1. The list of RAPD primers and corresponding band size detected with genomic DNA from garlics

Primers	Nucleotide sequence (5' to 3')	Estimated band size(bp) of PCR products ¹⁾
OPA01	AGACGGCTCC	2,583, 2,460, 1,968, 1,845, 1,353
OPA02	GAGACCAGAC	2,829*, 2,091*, 1,599, 1,476*, 1,354*, 1,107*, 984*
OPA03	TTAGCGCCC	2,090, 1,845*, 1,722*
OPA04	AGGACTGCTC	2,337, 1,845, 1,599, 1,353, 1,230, 1,107, 980
OPA10	TGGTCGGGTG	980
OPA14	AACGGGCCAA	2,091*, 1,590*, 1,353, 1,230*, 1,220*
OPA16	GGAAACCACA	2,706*, 1,968*, 1,599*, 1,476*, 1,353*
OPA17	GAGCCCGACT	2,706*, 2,214*, 1,845*, 1,595*, 1,476*, 1,353*, 1,108*, 1,021*, 932*
OPA18	TGGTCCAGCC	3,444, 1,968
OPB01	CCGTCGGTAG	3,445*, 3,198*, 2,706, 2,337*, 1,968*, 1,353, 1,230*
OPB02	GGAAACCCCT	1,848*, 1,840*
OPB05	CCCGAAGCGA	2,583*, 2,460*, 1,722*, 1,599*, 1,475*, 1,470*, 1,353*
OPB07	GTA AACCGCC	1,845*, 1,722, 1,476*, 1,350*, 1,230*, 1,100
OPB08	GTTACGGACC	2,214, 2,010*, 1,845*, 1,717*, 1,680*
OPB09	GGGCGACTAC	1,840, 1,595, 1,353*, 1,107, 861
OPB11	GTGCGCAATG	3,445*, 2,214*, 2,200*, 1,845*, 1,598*, 1,353*
OPB14	AAGTGGCACC	3,321*, 2,337*, 1,845*, 1,353*, 1,201*
OPB17	TCGCATCCAG	2,706*, 2,580*, 2,460*, 2,338*, 1,720*, 1,590*, 1,476*, 1,230*, 1,105*, 980*
OPB18	CTGGCGTGTC	2,465*, 1,599*, 1,210*, 1,110*, 974*
OPC02	GTCGTCGTCT	3,444*, 2,706*, 1,968*
OPC04	ACGGGACCTG	1,476*, 1,353, 1,229*
OPC05	GTTAGTGCGG	3,567*, 2,706*, 2,090*, 1,600*, 1,350*, 1,230*, 1,105*, 980*
OPC06	CCAGAACGGA	2,706, 1,845
OPC07	GTGGCCGATG	3,940, 3,198, 2,583, 2,504*, 1,570*, 1,476*, 1,356*, 1,229*
OPC10	AGCAGCGAGG	3,567*, 2,337*, 2,090, 1,720, 1,603*, 1,230*
OPC11	CCTGGGTGTC	1,968*, 1,353*, 984
OPC12	GGCGAGTGTG	3,321*, 1,968*, 1,845*, 1,722, 1,599*, 1,407*, 1,353*, 1,110, 986
OPC19	AGTCCCGCTG	2,214*, 1,350
OPH02	TCGGACGTGA	2,330*, 1,840*, 1,600*, 1,350*, 1,110*, 990*
OPK20	GTGTCGCGAG	4,060, 3,690*, 2,091*, 1,846, 1,599*
OPL03	CCAGCAGCTT	2,220*, 1,850*, 1,600, 1,350*, 1,105*
OPU20	ACAGCCCCCA	3,750*, 2,214*, 1,968*, 1,722*, 1,476*, 1,353*

¹⁾Bands showed polymorphism are marked with asterisk.

되는 식물임에도 불구하고 우리 나라와 세계적으로 재배되고 있는 마늘은 유전적으로 상당한 변이가 존재하고 있음을 추정할 수 있다.

Nei와 Li[13]의 방법에 따라 다형성 DNA밴드의 존재 유무로 존재하는 것은 1, 존재하지 않는 것은 0으로 표시하여 9종의 마늘간에 계산한 genetic distance(GD)는 평균 0.207로 나타났는데, 그 중 창녕종과 단양종 간에는 0.331의 GD값을 보여 가장 멀게 나타났고 정선종과 영월종을

0.080으로 가장 가깝게 나타났다. 종간에 나타난 GD값을 바탕으로 UPGMA(Unweighted pair-group method with arithmetic mean) 방법[11]에 의해 집단분석(cluster analysis)을 실시한 phenogram은 Fig. 1과 같다. 9개의 마늘 지방종은 GD값 0.271에서 크게 두 개의 group로 나누어 졌는데 group I은 창녕종과 외국종인 헝가리종이었고, group II는 남도, 산동, 예천, 의성, 당양, 정성 및 영월종으로 나타났다. 마늘의 주요 생태형인 한지형(단양, 예천,

의성, 정선, 영월종)과 난지형(창녕, 헝가리, 산동, 남도종)은 GD값이 0.200을 전후하여 나누어지는 것으로 나타났다. 재배상에서 휴면성이나 맹아습성이 뚜렷이 구분되는 한지형과 난지형 마늘은 RAPD방법에 의해 명확한 분류가 되지 않고 phenogram 상에서 남도종과 중국의 산동종과 같은 난지형 마늘이 오히려 한지형에 group되어 지는 결과를 보였다(Fig. 1). 그러나 이들 난지형(남도 및 산동종)은 한지형 마늘들과 비교하였을 경우 유연관계가 멀게 나타났다. 황[6]은 재배종 마늘의 생태형을 한지형, 난지형 및 중간형으로 분류하였는데, 재배지의 겨울 온도조건에 따라 난지 또는 한지형의 특성을 나타내는 중간형이 존재함을 보고한 바 있다. 이는 마늘의 맹아 습성이 한지형과 난지형의 극단적인 형태로 진화하여 온 것이 아니라 기후 특성상 중간형의 재배가 유리한 곳에는 양쪽의 형질을 공유하는 생태형이 존재하도록 적응해 온 것으로 추정된다. 마늘의 생태형을 유전적으로 분류하기 위한 시도로 동위효소법[3] 이나 핵형관찰법[4] 등이 수행되었으나, 이들의 결과도 한지형과 난지형 종들이 분류된 group내에 혼재하고 있어 명확한 구분이 어려운 것으로 나타났다. 본 실험은 마늘이 genome상에 보유하고 있는 DNA의 염기서열을 바탕으로 한 분석법으로 동위효소나 핵형 관찰법에 비해 분류방법이 객관적이고 특이성을 가지고 있다고 할 수 있다. 비록 우리 나라에서 크게 분류되는 난지형과 한지형 마늘 간에 완전한 group을 지을 수는 없었으나 이들 두 group

내에 존재하는 종들이 타 그룹보다 가까운 유연관계를 하고 있음을 알 수 있었고, 우리 나라에 재배되고 있는 마늘의 유전적 변이가 상당히 높은 것으로 나타났다.

Fig. 2는 각각의 primer를 이용하여 생성된 PCR산물을 사진으로 나타낸 것이다. 각 종마다 primer에 대하여 특이한 다형화 밴드를 보여 종의 구분이 가능할 수 있다. 그 예를 보면, OPA02 primer를 이용할 경우 984 basepairs(bp) DNA는 창녕과 헝가리종에만 공통으로 나타나며, 헝가리종에서는 동일한 OPA02 primer에서 2,829bp DNA를 단독으로 생성하며, 2,091bp DNA는 타 8종에서는 모두 나타났으나 헝가리 종에서는 존재하지 않았다. 그러므로 OPA02 primer는 분석된 9개의 마늘 지방종으로부터 창녕종 또는 헝가리종을 구분하는데 이용될 수 있을 것이다. 한편 OPA04 및 OPB18 primer의 의성종, OPA16 및 OPH02 primer의 창녕종에서는 몇 개체의 반복에서도 PCR 증폭이 전혀 일어나지 않아 다른 종들과 구분되는 특성을 보였다. 각각의 primer별로 구분이 가능한 종을 보면 OPA02로 창녕, 헝가리종, OPA03로 창녕종, OPA04로 의성종, OPA14로 창녕종, OPA16으로 단양, 창녕종, OPB08로 단양종, OPB17로 예천, 창녕, 헝가리종, OPB18로 의성, 창녕, 헝가리종, OPC05로 예천, 창녕, 헝가리종, OPC07로 단양종, OPC11로 영월, 창녕, 헝가리종, OPH02로 창녕, 헝가리종, OPL03으로 정선, 창녕, 남도, 헝가리종 등의 구분이 가능하였다 (Fig. 2).

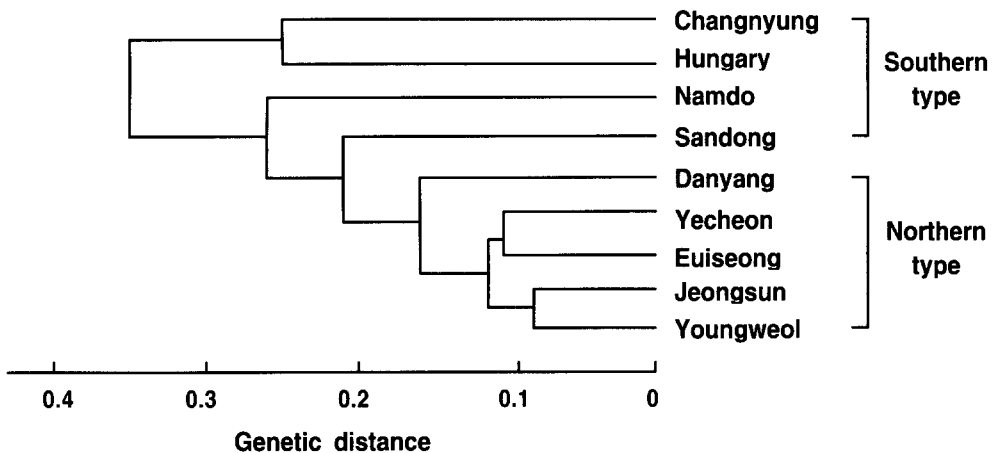


Fig. 1. Phenogram of 9 garlic cultivars based on UPGMA cluster analysis derived from RAPD bands

RAPD에 의한 마늘의 유연관계 분석

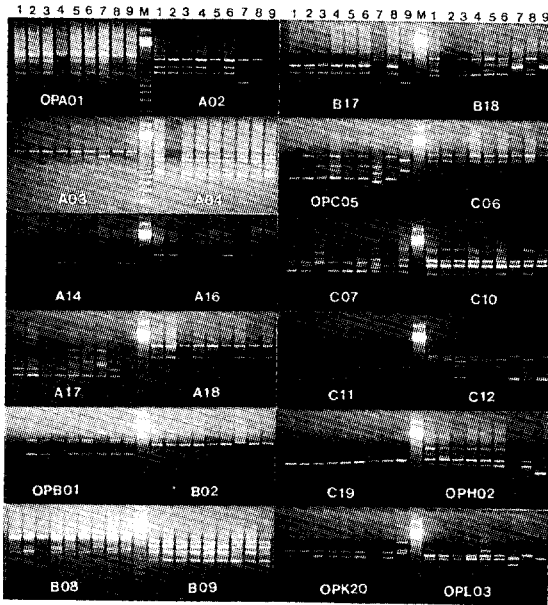


Fig. 2. RAPD profiles generated from the nine garlic cultivars using various random primers.
M; DNA ladder marker, Lane 1; Yecheon, 2; Euseong, 3; Danyang, 4; Yeongweol, 5; Jeongsun, 6; Sandong from China, 7; Changnyung, 8; Namdo and 9; Hungary cultivars.

본 실험의 결과로 보아 우리 나라에 재배되고 있는 마늘이 각 지역별로 다양한 유전적 변이를 보유하고 있음을 알 수 있으며, 수 천년동안 재배되어온 마늘이 동일한 유전적 기원을 가지지는 않을 것으로 사료된다. 특히 한지형과 난지형 마늘은 유전적으로 상당한 거리를 두고 있으며 동일한 생태형에서도 그 기원이 다양할 것으로 추정된다. 마늘은 유통과정에서 상당히 먼 거리까지 이동되며 재배하는 농민들이 인근지역으로부터 종자를 구입하여 재배하는 경향이 있고, 주아(bulbil) 재배나 조직배양에 의해 우량 씨마늘이 전국적으로 보급되고 있으므로, 우리 나라에 재배되는 마늘은 지역적으로 고립된 것이 아니라 상호 이동이 빈번하여 상당히 섞여있을 것으로 생각된다. 그러므로 본 실험에서 지방종을 수집한 특정지역에서 재배되는 마늘 모두가 동일한 PCR패턴을 보일 것으로 보이지는 않는다.

최근 농산물의 수입자유화로 외국종 마늘의 수입이 확대되고 있어 우리 나라 마늘과 외국마늘을 구분할 수 있

는 방법이 강구되어야 한다. RAPD 법은 종을 구분하는데 객관적인 자료를 제공할 수 있으므로 본 연구의 결과는 이 방법의 문제해결에 중요한 기초 자료를 제공한 것으로 사료된다. 본 연구에서 구명된 지방종 별로 특이적 primer를 이용하여 다양한 종과 개체간의 분석으로 마늘의 지방종을 구분하는 marker 유전자의 개발을 시도하고 있다.

요 약

국내에서 재배되는 7종의 마늘과 외국종인 헝가리종 및 중국 산동종을 수집하여 총 70종의 임의 primer를 이용하여 RAPD분석을 실시한 결과 32개의 primer에서 종간에 다형성(polymorphism)을 보이는 DNA밴드를 확인하였다. PCR에 의해 증폭된 DNA밴드 수는 151개였으며 그 중 125개의 밴드가 수집종 간에 다형성을 보였다. 다형성을 보인 밴드를 대상으로 집단분석을 실시한 결과 유전적 거리가 0.271인 값에서 9종의 수집마늘은 두 개의 group으로 나누어 졌는데, Group I은 창녕종과 헝가리종 이었고 Group II는 남도, 산동, 예천, 의성, 정선, 영월 및 단양종으로 분류되었다. 마늘의 주요 생태형인 난지형과 한지형은 유전적 거리가 0.200값을 전후하여 나누어 졌다. 각각의 primer로부터 나타난 밴드들은 지방종 간에 특이성을 보이는 것이 다수 존재하여 외국종과 국내종 마늘이나 국내종 간의 종을 구분하는 표식인자로 사용할 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 1997년도 안동대학교 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며, 마늘의 지방종 수집에 협조해 주신 경상북도 예천군 농업기술센터에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Cheshmedhiev, I. 1973. A cytotaxonomic investigation of the cultivated *Allium* species in Bulgaria. *Genetikai Selektsiya* 6, 283-294.
2. Devos, K. M. and M. D. Gale. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA marker in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 84, 567-572.

3. Etoh, T. and H. Ogura. 1981. Peroxidase isozymes in the leaves of various clones of garlic, *Allium sativum* L. *Mem. Fac. Agri. Kagoshima Univ.* **17**, 71-77.
4. Harn, C., D. Choung and B. Kim. 1966. Studies on the karyotypes of *Allium sativum*. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **2**, 58-67.
5. Hong, B. H. and C. S. Park. 1996. Phylogenetic analysis of wheat near-isogenic lines for culm length with RAPD marker. *Kor. J. Breeding* **28**(4), 420-428.
6. Hwang, J. M. 1993. Genetic divergence and classification of garlic cultivars by multivariate analysis. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **33**(4), 257-264.
7. Kollmann, F. and A. Shmida. 1977. *Allium* species of Mt. Hermon. I. Taxonomy. *Israel J. Botany* **26**, 128-148.
8. Kwon, S.T. and J. H. Jeong. 1999. Genetic relationship among *Sedum* species based on morphological characteristics and RAPD analysis. *Kor. J. Hort. Sci. & Tech.* **17**(4), 490-494.
9. Lee, G. P. and K. W. Park. 1998. Evaluation of genetic relationship among sweetpotato cultivars using randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis. *Kor. J. Hort. Sci. & Tech.* **16**(1), 18-20.
10. Lee, W. S. 1974. Studies on dormancy of Korean local garlicks. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **15**, 257-264.
11. Ludwig, J. A. and J. F. Reynolds. 1988. *Statistical Ecology*. pp.165-202, ed. John Wiley and Sons.
12. Mo, S. Y., S. H. Lee, G. D. Go, C. M. Ann, and D. H. Kim. 1998. RAPD analysis for genetic diversity of melon species. *Kor. J. Hort. Sci. & Tech.* **16**(1), 21-24.
13. Nie, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Soc. USA.* **76**, 5269-5273.
14. Viering, R. A., Z. Xiang, C.P. Joshi, M. L. Gilbert, and H. T. Nguyen. 1994. Genetic diversity among elite Sorghum lines revealed by restriction fragment length polymorphisms and random amplified polymorphic DNAs. *Theor. Appl. Genet.* **87**, 816-820.
15. Williams, J. G. K., R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers and useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6531-6535.
16. Yu, L. W. and H. T. Nguyen. 1994. Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars(*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* **87**, 668-672.