원예과학기술지 17(2):141-143. 1999

동위효소와 RAPD 법을 이용한 제주 자생 새우란, 금새우란, 왕새우란의 근연관계 분석

현명력 · 최지용 · 서정남 · 소인섭* · 이종석[1]
제주대학교 원예학과, [1]서울여자대학교 원예과학과

Isozyme and Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis for Genetic Relationship among *Calanthe discolor*, *C. sieboldii*, and *C. bicolor* Native to Cheju Island

Hyun, Myung-Ryuk · Choi, Ji-Yong · Suh, Jung-Nam · So, In-Sup* · Lee, Jong-Suk[1]
Dept. of Horticulture, Cheju Nat'l Univ., Cheju 690-756, Korea
[1]Dept. of Hort. Sci., Seoul Women's Univ., Seoul 139-744, Korea
*corresponding author

ABSTRACT Genetic relationship of *Calanthe discolor*, *C. sieboldii*, and *C. bicolor* for elucidating the classification was investigated. Electrophoretic zymograms for either peroxidase or esterase isozymes indicated that bands of *C. bicolor* appear in the zone where those of *C. discolor* and *C. sieboldii* are located. Genetic relationship among the three *Calanthe* species using RAPD analysis showed that *C. discolor* and *C. sieboldii* are more distant each other than *C. bicolor*, demonstrating the genetic position of *C. bicolor* between the other two. It was assumed that *C. bicolor* is a natural hybrid between *C. discolor* and *C. sieboldii*.

Additional key words: esterase, natural hybrid, orchid, peroxidase

서 언

제주도에는 새우란(*Calanthe discolor*), 금새우란(*C. sieboldii*), 왕새우란(*C. bicolor*), 섬새우란(*C. coreana*), 여름새우란(*C. reflexa*) 등 5종류가 자생하고 있다(Lee와 Kwack, 1983). 그 중 왕새우란은 새우란과 금새우란이 동시에 자생하고 있는 지역에 분포하고 있으며, 그 외형적인 형태가 두 종의 중간적인 형태를 나타내고 있다.

본 연구는 지금까지 새우난초에 대한 연구가 매우 적어 이들 중 주종을 이루고 있는 새우란(*Calanthe discolor*)과 금새우란(*C. sieboldii*) 및 이들간의 자연 교잡종으로 추정되는 왕새우란(*C. bicolor*)을 대상으로 동위효소 분석과 RAPD 분석을 실시하여 지금까지의 추정으로만 알려진 이들 3종 식물의 근연관계를 구명하고, 이를 새우난초의 분류와 품종명명에 기준이 되는 자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

동위효소 분석

새우란, 왕새우란, 금새우란 각각의 건전한 잎 1g 당 효소추출 buffer (0.6M sucrose, 0.5M sodium ascorbate, pH 7.0) 2mL를 넣어 4℃에서 마쇄한 후 12,000 g로 30분간 원심분리한 상등액을 전기영동시료로 사용하였다.

7.5% polyacrylamide gel을 이용하여 0.02 M Tris-glycine buffer에서 4℃, 2.5㎃ 전류로 8시간 동안 전기영동하였다.

Peroxidase(PX) 염색은 May(1991) 방법을 약간 변형하여 이용하였다. 3-amino-9-ethylcarbazole 20㎎을 N,N-dimethyl formide 3mL에 녹인 다음 0.1M Na-acetate buffer (pH 5.0) 25mL, 0.1M calcium chloride 2mL, 그리고 3% H_2O_2 1mL을 첨가한 염색액으로 30℃ 암조건에서 발색시켰다.

Esterase(EST) 염색은 aceton 1 mL에 α-, β-napthyl acetate를 각각 50㎎씩 녹인 후 0.2M phosphate buffer (pH 7.0) 100mL, 그리고 fast blue RR salt 85㎎을 첨가하여 37℃ 암조건에서 발색시킨 후 밴드양상을 조사하였다.

RAPD 분석

새우란(*Calanthe discolor*), 금새우란(*C. sieboldii*), 왕새우란(*C. bicolor*)의 어린 잎을 서로 다른 세 개체에서 각각 채취하여 Chee 등(1991)의 방법을 변형하여 total DNA를 분리, 정제하였다(Fig. 1)

최종적으로 얻어진 total DNA는 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 단일밴드로 나타나는 것을 확인하고, UV/VIS Spectrophotometer로 280nm와 260nm에서 흡광도를 측정하여 DNA 순도검정 및 정량을 하였다. Reaction buffer는 10ng template DNA, 0.4nM primer, 2.0mM $MgCl_2$, 200μM dNTP mix(dATP, dTTP, dGTP, dCTP, Promega, USA), 1.5unit Taq polymerase(Promega, USA), 10X reaction buffer 2.5μL를 첨가하였고, 나머지는 멸균수로 보충하여 총 25μL 용액으로 처리하였다. Primer는 Canada의 British Columbia 대학에서 구입한 인위적으로 합성된 ten-mer (10 nucleotides) 중에서 예비실험을 통하여 다양한 polymorphism을 보인 8개를 선발하여 사용하였다(Table 1).

PCR 반응은 Perkin Elmer사의 hot start PCR amplification 방식인 Gene Amp PCR System 9600을 이용하여 94℃에서 120초간 예열한 다음, 94℃(denaturation) 45초, 38℃(annealing) 60초, 72℃(extension) 120초를 1 cycle로 하여 총 45 cycle을 수행한 후, 마지막으로 72℃에서 5분을 더 유지시켰다. PCR 산물은 1.5% agarose gel 상에서 전기영동하여 밴드양상을 조사하였다. 유연관계 분석은 개인용 computer 통계 package인 NTSYS (Ver. 1.9)를 이용하여 수행하였으며, 분석조건은 Sneath와 Sokal(1973)에 의해 개발된 비가중산술법

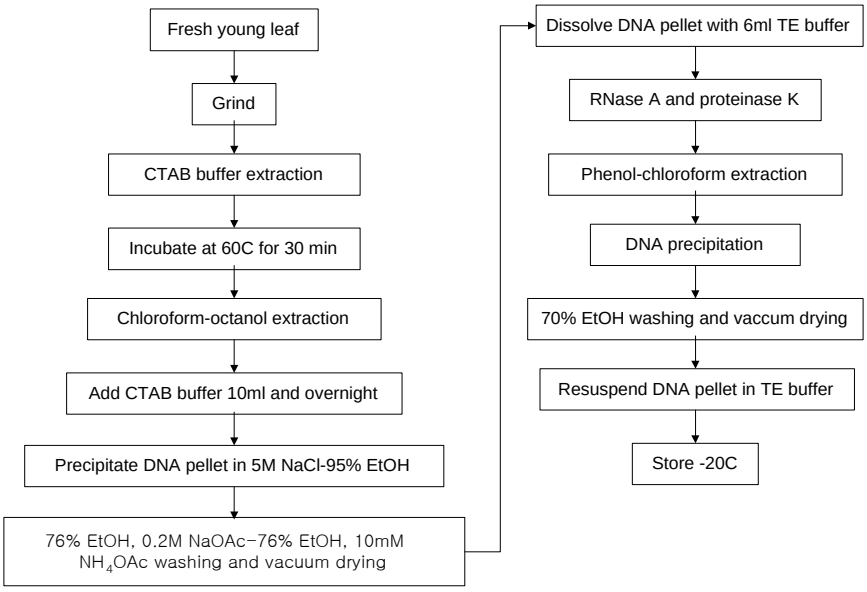

Fig. 4. Procedure to prepare total DNA from *Calanthe* species leaves.

※ 본 연구는 대한민국 교육부 학술연구비 지원으로 수행되었음.

Table 1. Primer sequence and GC contents used in the present *Calanthe* RAPD procedures.

Primer No.[z]	Sequences	GC contents (%)
UBC 154	5'-TCCATGCCGT-3'	60
UBC 203	5'-CACGGCGAGT-3'	70
UBC 717	5'-CCCACACCCA-3'	70
UBC 726	5'-GGTGTGGGTG-3'	70
UBC 734	5'-GGAGAGGGAG-3'	70
UBC 744	5'-CCACCCACCA-3'	70
UBC 761	5'-GAGAGGAAGG-3'	60
UBC 798	5'-GAGAGGAAGG-3'	60

[z]Accession number of UBC (The University of British Columbia) primer set.

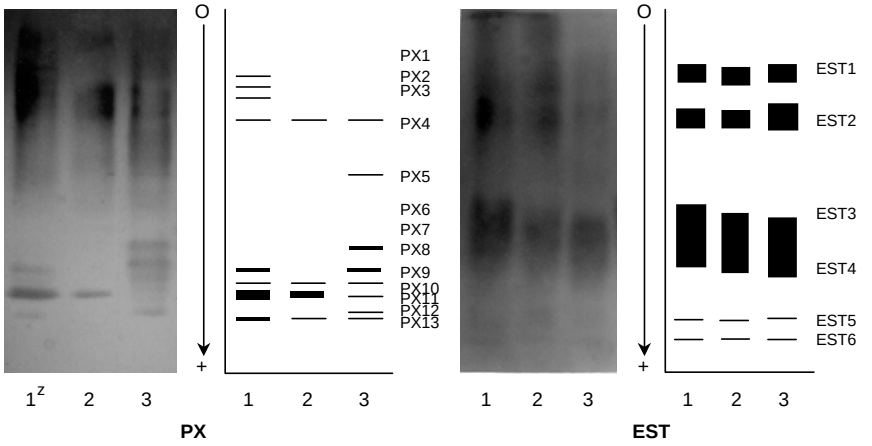

Fig. 5. Zymograms and their schematic illustrations for peroxidase (PX) and esterase (EST) on 7.5% native polyacrylamide gel (O = origin, arrow forward the anode).
[z]1. *Calanthe sieboldii* 2. *C. bicolor* 3. *C. discolor*

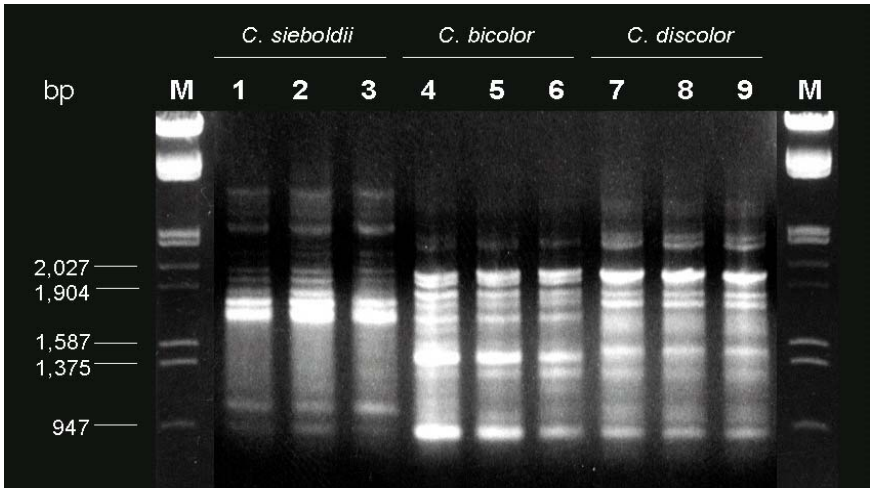

Fig. 6. RAPD profiles obtained from the three different *Calanthe* species using primer UBC726. Lane No. 1, 2, 3 are *Calanthe sieboldii*, No. 4, 5, 6 are *C. bicolor*, No. 7, 8, 9 are *C. discolor*. Lane M is DNA molecular weight marker (Lambda DNA/*Eco*R I + *Hind* III).

(UPGMA: unweighted pair group method with arithmetic mean)을 사용하였다.

결과 및 고찰

제주 자생 새우난초 3종을 동위효소분석 한 결과, peroxidase는 양극 쪽으로 밴드의 이동속도가 빠른 순으로 PX-1부터 PX-13까지 일련의 부호를 표현형으로 부여하였다. PX-1에서 PX-5까지는 종간 구별이 힘든 밴드양상을 보였으나 PX-6에서 PX-13까지는 분석이 가능한 선명한 밴드들이 나타났다. 왕새우란의 밴드 양상은 새우란과 금새우란이 동시에 나타나는 밴드에서만 나타나는 특이성을 보여주었다(Fig. 2).

Esterase는 양극쪽으로 이동속도가 빠른순으로 EST-1부터 EST-6까지 일련의 부호를 표현형으로 부여하였다. Esterase 밴드의 활성이 미약하여 정확한 밴드양상을 파악할 수 없었으나 peroxidase와 마찬가지로 대체적으로 왕새우란의 밴드 양상은 새우란과 금새우란이 동시에 나타나는 밴드에서만 나타났다.

동위효소 분석은 대립인자가 공우성으로 작용하기 때문에 이형접합상태인 개체와 동형접합 상태인 개체 구별이 가능하며 후대검정에 용이하다(Esen과 Scora, 1977; Esen과 Soost, 1976; Torres, 1983). 제주도에 자생하고 있는 새우란과 금새우란, 그리고 이들의 자연교잡종으로 추정되는 왕새우란 등 3종을 동위효소분석에 의해 그 형질을 비교해본 결과 peroxidase와 esterase에 의한 표현형에서 왕새우란은 새우란과 금새우란에서 동시에 나타나는 곳에서만 나타나는 특이한 밴드양상을 보였다. Kim(1994)은 제주한란을 자가수분시켜 그 종자에서 얻어진 F_1 개체와 모계의 밴드양상은 동일하였고, 타가수분의 경우는 양친의 밴드양상을 공유하였으며, 한란을 모계로 춘란, 죽백란, 관음소심 등을 교잡시킨 결과 그 F_1의 밴드양상은 모계나 부계의 밴드양상과 같거나 양친의 중간형을 나타내는 경향이었다고 보고하였다. 이와 같은 보고와 본 실험의 결과로부터 왕새우란은 새우란과 금새우란의 종간잡종이라고 생각된다.

그러나 동위효소는 유전자 표현의 산물이고, 환경 조건에 의해 영향을 받을 수 있기 때문에 최근 개발된 RAPD(random amplified polymorphic DNA)법을 이용하여 보다 더욱 정확하게 유전적인 차이를 확인하였다. RAPD법은 RFLP(restriction fragment length polymorphism) 법에 비해 기술적으로 간단하고 비용이 적게 든다. 또한 RAPD법은 유전적 다양성 혹은 유연관계를 구분하고자 할 때 주로 이용하는 방법으로 RAPD법에 의한 polymorphism은 한 품종에서 나타나더라도 다른 품종에서는 안 나타날 수 있으며 특히 게놈이 달라지면 더욱 그러하다(Eun, 1995). RAPD법을 이용하여 주로 품종간의 근연관계나 품종의 분류 등에 많이 이용되어 왔다(Fabbri 등, 1995; Kim, 1996; Kobayashi 등, 1995; Nienhuis 등, 1995; Shimada 등, 1994). 공시재료로 사용한 새우란, 왕새우란, 금새우란의 각각 3개체씩을 분석한 결과 총 80개의 밴드 중 30개의 polymorphism이 인정되었다(Fig. 3). 공시한 種의 種內 유전적 거리는 전체 거리 1.000을 기준으로 했을 때, 금새우란은 0.009, 왕새우란은 0.000, 새우란은 0.015로 種內에서의 유전적인 차를 나타낼 수 있는 수치상의 차는 거의 없는 것으로 나타났다(Table 2). 그러나 이들 3種 식물의 상대적인 유전적인 근연관계를 보면, 새우란과 왕새우란의 두 종간의 유전적인 거리는 0.097로 한 그룹으로 나타났고, 금새우란은 이들 그룹과 0.129 정도의 유전적인 거리 차이를 나타내었다(Fig 4). 또한 왕새우란은 새우란과 금새우란의 중간적인 위치를 나타내었으며 새우란과 금새우란 사이에 왕새우란이 존재하는 것으로 확인되었다. Choi 등(1998)은 춘란을 모본으로 한 교배친화성에 대한 RAPD 분석에서 교배친화성을 보인 건란, 한란, 보세란 등의 *Cymbidium* 속의 종들은 춘란과 0.268의 유전적 거리 내에서 나타난 반면, 교배친화성을 보이지 않은 다른

Table 2. Matrix for genetic dissimilarity among the three different *Calanthe* species genotypes.

No.	Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	*C. sieboldii*	0.000								
2		0.000	0.000							
3		0.009	0.009	0.000						
4	*C. bicolor*	0.103	0.103	0.094	0.000					
5		0.103	0.103	0.094	0.000	0.000				
6		0.103	0.103	0.094	0.000	0.000	0.000			
7	*C. discolor*	0.156	0.156	0.164	0.099	0.099	0.099	0.000		
8		0.148	0.148	0.156	0.091	0.091	0.091	0.010	0.000	
9		0.159	0.159	0.167	0.101	0.101	0.101	0.020	0.010	0.000

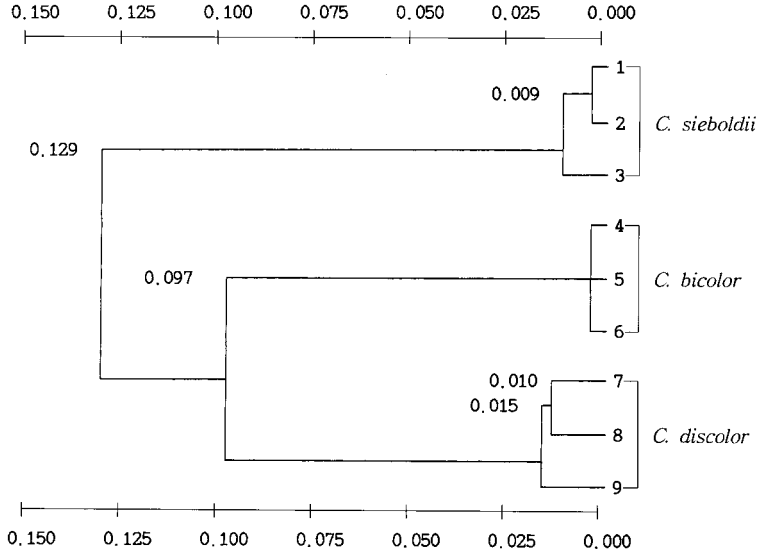

Fig. 4. Dendrogram of the three different *Calanthe* species genotypes as based on UPGMA analysis system. Values on the base line indicate the average genetic distance between two lines.

Cymbidium 속의 종들은 0.300 이상의 유전적 거리를 나타냈으며, *Phalaenopsis*는 0.400, *Dendrobium chrysotoxum*은 0.806으로 상당히 먼 유전적 거리를 나타내었다. 이는 같은 속 내에서도 유전적으로 가까운 종들이 있음을 의미하는데, 본 연구 결과에서도 왕새우란이 상대적으로 금새우란보다는 새우란과 조금 더 가까운 유전적 위치를 나타내고 있었다. 이는 왕새우란이 화색이나 크기 등 여러 가지 형태적인 면에서 금새우란보다는 새우란과 좀더 유사한 성질을 가지고 있다는 사실과 일치한다고 생각된다. 따라서 왕새우란이 유전적인 근연관계에서 새우란과 금새우란의 중간적 위치에 있다는 결과로 보아 새우란과 금새우란의 자연적인 종간 교잡종임을 나타내는 것으로 생각된다.

적 요

제주 자생 새우란, 금새우란, 왕새우란의 분류를 위한 동위효소 분석과 RAPD법을 이용한 유전적 근연관계 조사 결과, peroxidase와 esterase의 동위효소(isozyme)분석에서 왕새우란의 밴드양상은 새우란과 금새우란이 동시에 나타나는 밴드에서만 밴드가 나타났다. RAPD를 이용한 유전적인 근연관계에서 왕새우란은 새우란과 금새우란 모두와 비교적 가까웠지만 새우란과 금새우란의 상호간 근연관계는 가장 멀었다. 즉, 왕새우란은 유전적인 근연관계에서 새우란과 금새우란의 중간적인 위치를 나타내었다. 따라서, 왕새우란은 새우란과 금새우란의 자연적인 교잡으로 출현된 새로운 종으로 사료된다.

추가 주요어 : 자연교잡종, 난, esterase, peroxidase

인용문헌

Chee, P.P., R.F. Drong, and J.L. Slightom. 1991. Using polymerase chain reaction to identify transgenic plant. Plant Molecular Biology Manual C3:1-28.

Choi, J.Y., I.S. So, C.H. Pak, and B.H. Kwack. 1998. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis on compatibility of Korean native *Cymbidium goeringii* with other *Cymbidium* species. Kor. J. Hort. Sci & Tech. 16:361-363.

Esen, A. and R.K. Soost. 1976. Peroxidase polymorphism in *Citrus*. J. Heredity 67: 199-203.

Esen, A. and R.W. Scora. 1977. Amylase polymorphism in *Citrus* and some related genera. Amer. J. Bot. 64:305-309.

Eun, M.Y. 1995. Genome mapping technology and its application in plant breeding. pp. 57-85, The 9th Plant Biotechnology Symposium: Plant Breeding and Molecular Biology, Suwon, Korea, July 7-8, 1995.

Fabbri, A., J.I. Hormaza, and V.S. Polito. 1995. Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120: 538-542.

Kim, C.S. 1996. Application of RAPD and DNA fingerprints for classification and identification of grape (*Vitis* spp.) cultivars. Master Diss., Korea Univ., Seoul.

Kim, K.H. 1994. Studies on asymbiotic germination, plantlet growth and isozyme variations in Cheju *Cymbidium kanran*. Doctor Diss., Cheju National University, Cheju.

Kobayashi, N., R. Takeuchi, T. Handa, and K. Takayanagi. 1995. Cultivar identification of evergreen azalea with RAPD method. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64:611-616.

Lee, J.S. and B.H. Kwack. 1983. Classification of horticultural cultivars on cultivated *Calanthe striata* R. Br. in Korea. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 24:62-67.

May, B. 1991. Stain recipes for specific enzymes. In: Hoelzel, A.R. (ed.). Molecular genetic analysis of populations. pp. 271-278. Oxford Univ. Press, New York.

Nienhuis, J., J. Tivang, and P. Skroch. 1995. Genetic relationships among cultivars and landraces of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120: 300-306.

Shimada, T., T. Haji, M. Yamaguchi, and T. Takeda. 1994. Classification of mume (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) by RAPD assay. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 63:543-551.

Sneath, P.H.A and R.R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy. W.H. Freeman & Co., San Francisco.

Torres, A.M. 1983. Fruit trees. In: Tanksley, S.D. and T.J. Orton (eds.). Isozyme in plant genetics and breeding, part B. pp. 401-404. Elsevier, Amsterdam.