

Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD)를 이용한 나리(*Lilium*)의 품종구분

최혜선* · 김경수 · 최장경 · 이경국¹ · 홍대기¹ · 강원희² · 이운수
 강원대학교 농생대 식물응용과학부, ¹강원도 농업기술원, ²강원대농업과학연구소

Classification of *Lilium* Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Choi, Hae-Sun · Kim, Kyung-Su · Choi, Jang-Kyung · Lee, Kyung-Kook¹ · Hong, Dae-Ki¹ · Kang, Won-Hee² · Lee, Youn-Su

Div. of Applied Plant Sciences, Kangwon National University
¹Kangwon Provincial Agricultural Technology Administration
²Institute of Agricultural Sciences, Kangwon National University
 *corresponding author

ABSTRACT RAPD technique was employed for the genetic analysis of major *Lilium* cultivars and horticultural hybrids. As a result of RAPD with 10-mer random primers, total 107 bands were observed within 300bp and 2kb range, and the same band patterns were observed within the same cultivar for different primers. However, Casa Blanca in Orientals and Adelina in Asiatics showed different band patterns with others in the same. Cultivars within *L. longiflorum* showed different band patterns. RAPD markers produced with random primers OPA- 02, 03, 04, 14, 16 and 17 can be used for the classification of *Lilium* cultivars.

Additional key words: DNA marker

서 언

나리는 다른 화훼류와는 달리 자생원종 그 자체가 관상용으로 폭넓게 재배되어 왔지만 최근 품종 개량이 왕성히 이루어져 많은 중간 잡종이 육성되고 있기 때문에 원종과 원예종으로 분류가 요구되어졌다(허 등, 1994).

각 종의 화형, 지리적 분포, 구근의 모양, 잎의 부착 모양, 발아 습성, 발육 과정 등을 고려하여 원종을 분류하며, 최근에는 원종간의 교잡이 집행되어 다수의 품종이 육성되었고, 이로 말미암아 원예학적으로 정확한 종간의 분류가 요구되어 지고 있다(김 등, 1992). 또한 품종만 해도 4,000여 종이 넘기 때문에 이들을 구별하기 위한 계통명과 품종명도 요구되어진다(허 등, 1994).

나리의 주요 계통으로는 나팔나리, 아시아계통, 동양계통이 있다(Okazaki 등, 1994). 나팔나리 계통은 꽃 모양이 나팔모양으로 생겼다해서 붙여진 이름으로 꽃은 보통 통상이며, 주로 잎을 향해 피고 화색은 순백이다. 나팔나리는 많은 중간 잡종에서 육성된 아시아 계통이나 동양계통의 나리와는 달리 주로 나팔나리의 종내에서 선발 육성된 것이다(홍 등, 1990). 아시아 계통의 나리는 꽃잎의 기부가 붙어 있지 않고 서로 떨어져 있다해서 우리나라에서는 튼나리라고 한다. 최근에는 많은 원예 품종이 육성됨에 따라 스카시 나리보다는 아시아틱 하이브리드로 표기하고 있다. 동양 계통의 나리는 점박이 나리, 신나리, 각시 나리 등 동양에 자생하고 있는 종을 기본으로 하여 육성된 교잡종이다.

이 계통은 근년에 들어서 재배가 증가하고 있으며, 카사블랑카, 스타게이저, 르네보로로 대표되는 3 품종이 주력 품종으로 많이 알려져 있다(최 등, 1994).

나리의 교잡종이나 원예종의 분류로 형태학적 특징이나 isozyme marker가 많이 이용되지만, 형태학적 특징은 환경의 영향 때문에 불안정 하고, isozyme marker의 이용은 정보화된 marker의 숫자가 제한되기 때문에 분류에 이용하기는 어렵다. 그러나 Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP)나 Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD)의

이용은 종간의 분리에 매우 적합한 방법으로 이용되어진다(Reed와 Mann, 1985, Williams 등, 1993, Yamagishi, 1995). 따라서 본 실험에서는 RAPD marker를 이용하여 종과 종간의 교잡종에 대한 분류를 실시하였다.

재료 및 방법

식물재료: 공시 재료로는 동양 계통 6종, 아시아 계통 10종, 나팔나리 4종 을 사용하였다 (Table 1).

DNA 추출: Rogers와 Bendisch(1998)에 준하여 아래와 같은 방법으로 각각의 식물체 잎으로부터 DNA를 추출하였다. 멸균된 1.5mL centrifuge tube에 tissue 1g을 넣고 액체질소를 부은 후 갈아 분말로 만들고 750mL의 extraction buffer(500mL NaCl, 100mM Tris-HCl, pH 8.0, 50mM EDTA, 1.25% SDS)를 넣고 잘 혼합한 후 동량의 phenol : chloroform : isoamylalcohol = 25 : 24 : 1)을 첨가한 후 65°C water bath에서 10분간 incubation 하였다. Incubation한 tube를 13,000rpm에서 10분동안 원심 분리하여 분리된 층에서 상층액을 취한후 동량의 isopropanol을 첨가하여 genomic DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 70% EtOH로 세척 과정을 거친 뒤 실온에서 약 1시간 건조하였다. 건조된 DNA에 RNase A를 첨가하고 37°C의 water bath에서 1시간 동안 incubation한 다음 0.8% agarose gel에 전기 영동하여 농도를 측정하였다.

PCR 반응: PCR증폭은 genomic DNA 10ng에 20mM dNTP, 0.5µM의 random primer(Operan Tech., Inc. USA), 1 unit의 Taq polymerase(Dynazyme™)를 혼합한 뒤 최종 20µL의 용량으로 MJ Research, Inc.의 유전자 증폭기 PTC-100™을 이용하여 수행하였다. 반응 조건은 95°C에서 5분간 preheating 시킨 후, 94°C에서 1분, 35°C에서 1분, 72°C에서 2분간 45 cycle 실행시키고, 마지막 extension은 72°C에서 10분 동안 반응시켰다(Willi-

Table 1. *Lilium* species used in this study.

Code No.	Classification	Name of species or hybrids	
1 ^z	Oriental	Con Amor(hybrid)	
2		Casa Blanca(hybrid)	
3		Marco Polo(hybrid)	
4		Acapulco(hybrid)	
5		Siberia(hybrid)	
6		Star Gazer(hybrid)	
7	Asiatic	Adelina(hybrid)	
8		Avignon(hybrid)	
9		Minstrel(hybrid)	
10		Gran Paradiso(hybrid)	
11		Nepal(hybrid)	
12		Nove Cento(hybrid)	
13		Toscane(hybrid)	
14		Connecticut King(hybrid)	
15		Shiraz(hybrid)	
16		London(hybrid)	
17		<i>L. longiflorum</i>	<i>L. longiflorum</i> cv. Gelria
18			<i>L. longiflorum</i> cv. White America
19			<i>L. longiflorum</i> cv. Almata
20			<i>L. longiflorum</i> cv. Nathelina

^zThe numbers indicate the order of each *Lilium* in Fig. 1 and 2.

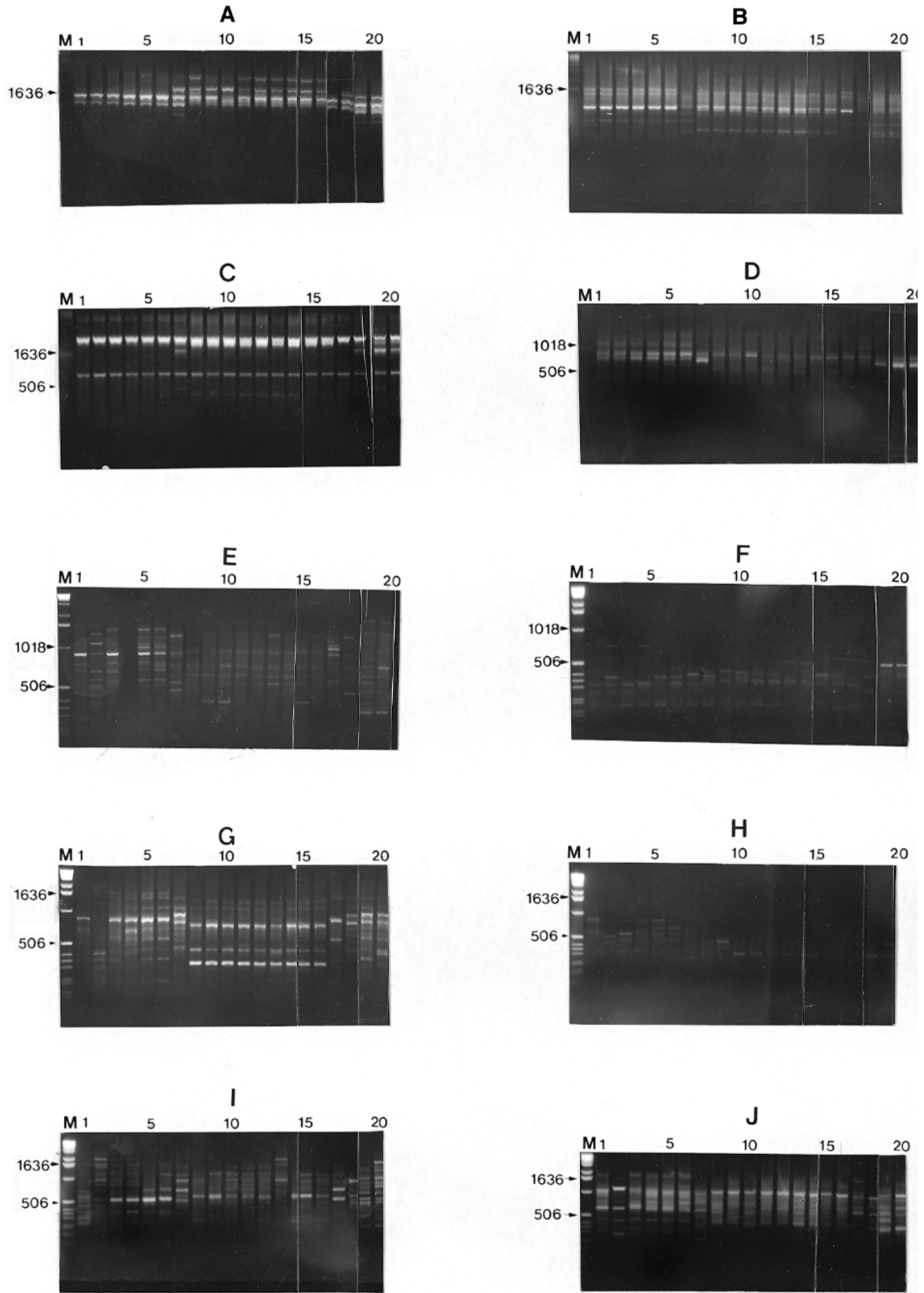


Fig. 1. PCR amplified DNA fragments using primers listed in Table 2 in lily cultivars and hybrids. Letters A through J on top of the lane indicate primers OPA-01, 02, 03, 04, 08, 10, 14, 15, 16, and 17, respectively. The numbers on top of the lane indicate code number of *Lilium* species in Table 1. M denotes kilobase ladder size marker.

ams 등, 1990). 증폭된 PCR 산물은 0.5×TBE buffer를 사용하여 1.5% agarose gel에서 2시간 동안 전기 영동한 후 UV transilluminator 상에서 전개된 band양상을 관찰하였다(Welsh 등, 1991).

Data 분석: 유연 관계를 분석하기 위하여 NTSYS-pc 프로그램(Version 1.61)을 이용하여 수행하였다(Rohlf, 1993). 전기 영동 결과, band가 있으면 1, 없으면 0으로 하여 data화하였다. 그리고 품종간 유사도 지수를 구한 후

UPGMA 분석을 통해 유연관계를 밝혔다(Williams 등, 1990).

결과 및 고찰

동양계통 6종, 아시아 계통 10종, 나팔나리 4

종을 가지고 genomic DNA를 추출하여 RAPD를 실시하였다. 10개의 random primer를 사용하여 실험한 결과 genomic DNA로부터 300bp~2kb 사이의 총 107개 band가 형성되었고 그 중 46개의 polymorphic한 band를 얻었다(Table 2).

동양계통 6종은 OPA-01, 02, 03 primers에서 동일한 band 형태를 나타냈고, 나머지 primers에서도 유사한 band 형태를 나타냈다. Casa Blanca는 OPA-08, 14, 16, 17 primers에서 나머지 종들과 다른 band 양상을 보였다. 아시아계통 10종은 OPA-02, 03, 04, 14, 16, 17 primers에서 동일한 band 형태를 나타냈는데, Adelina는 아시아 계통 중에서 각 primer에서 다른 형태로 나타났다. 나팔나리 계통도 각 primer에서 거의 비슷한 band 형태를 나타냈지만 아시아, 동양계통에서처럼 계통의 동일한 band는 나타나지 않았다. OPA-02, 03에서는 동양, 아시아, 나팔나리 3종 모두 균일한 band를 가졌다. OPA-02, 03, 04, 14, 16, 17에서 나타난 band 형태처럼 계통간의 동일한 band 형태로 보아 각 계통의 분류에 marker로 이용할 수 있을 것으로 본다.

NTSYS-pc를 이용한 결과, 3가지의 계통간에 유사도는 최저 0.333에서 최고 0.952를 보였으며, 동양 계통끼리는 0.690~0.880 정도의 유사성을 나타냈으며, 아시아 계통간에는 0.547~

0.952 사이의 유사성을 보였고, 나팔나리 계통은 0.547~0.833의 유사관계를 보였다. 또한 동양 계통에서는 5번인 Siberia와 6번, Star Gazer가 88%로 가장 높은 유사성을 보였으며 가장 낮은 유사성을 보인 것은 1번, Con Amor와 4번인 Acapulco로 69%를 보였다. 아시아 계통에서는 8번인, Arignon와 11번, Nepal이 7번, Adelina와 54.7%로 낮은 유사성을 보였으며 12번과 16번의 경우는 92.2%로 가장 높은 유사성을 보였다. 나팔나리 계통에서는 17번과 19번이 54.7%를 보인 반면에, 19번과 20번의 isolates는 83.3%를 보였다(Fig. 2).

Fig. 2에 나타난 dendrogram에서 약 50%에서 크게 2개의 groups으로 나뉘었고, 72% 정도에서는 총 4개의 groups으로 분류할 수 있었다. 4개의 그룹 중 17번을 포함한 동양계통이 한 그룹을 형성했으며, 7번과 18번이 한 그룹, 19번과 20번이 한 그룹을 이루었고, 마지막으로 7번을 제외한 아시아 계통이 한 그룹을 형성했다. 계통간 grouping에선 아시아 계통이 약 80% 이상에서 형성됐으며, 나팔나리의 경우는 약 60%에서 17번을 제외한 3개의 isolates, 18, 19, 20번이 grouping됨을 알 수 있었다.

Random primer를 이용한 PCR 결과 계통간의 polymorphic marker가 나타났고, 각 계통간의 polymorphic marker는 나리의 유전적 다양성과 계통간의 분류에 이용하기에 적합하

다고 사료된다. 본 실험에서는 각 계통간에 한 품종이 추가되거나 삭제되어 grouping이 형성됐으며, 이는 DNA 추출 과정 중에 다른 것에 의해 오염됐거나 자료 분석에서는 오차 등으로 사료된다. 또한 이런 오차는 반복 실험을 통해서 보완될 수 있을 것으로 사료된다.

초 록

백합과 화훼작물의 품종구분을 위하여 RAPD 방법이 사용되어졌다. Operon사에서 구입한 10개의 10-mer random primer를 이용한 RAPD 실험결과 모두 107개의 밴드가 관찰되었고, 관찰된 밴드는 300bp 에서 2kb의 범위에 속했으며, 같은 계통 내에서는 동일한 밴드양상을 나타내었다. 그러나 Casa Blanca와 Adelina는 동일계통 내 다른 품종들과 다른 밴드 양상을 보였다. *L. longiflorum*내의 품종들은 서로 다른 밴드 양상을 나타내었다. Random primers, OPA-02, 03, 04, 14, 16 그리고 17로 형성된 DNA 밴드들은 *Lilium*의 서로 다른 cultivar와 hybrid를 구분하는 marker로도 이용이 가능하리라 생각된다.

인용문헌

- 최택용, 홍계완, 류범열, 우인식. 1994. 백합우량품종 도입선발. 한국원예학회 논문발표요지 12(1):278-279.
- 홍영표, 김광권, 최산태, 정임경, 고대영, 김영진, 김재영, 한인송, 허건양, 신학기, 임진희, 김종호. 1990. 자생나리의 종간교잡방법에 관한 연구. 과학기술처보고서. p.50.
- 허복구, 한용희, 이순봉, 김삼근. 1994. 나리(백합)재배의 이론과 실제. 중앙화훼 기술총서. pp63-64.
- 김영진, 김신광, 최주건, 조해룡, 임진희. 1992. 나리류 교잡종 유성. 시험연구 보고서. 농촌진흥청 원예시험장. pp.200-208.
- Okazaki, K., Y. Asano, and K. Oasawa. 1994. Interspecific hybrids between *Lilium* 'Oriental' hybrid and *L. Asiatic* produced by embryo culture with revised media. Breed Sci. 44:59-64.
- Reed, K. C. and D. A. Mann. 1985. Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. Nucleic Acids Res. 13:7207-7221.
- Rogers, S. O. and A. J. Bendisch. 1998. Extraction of DNA from plant tissues. In: Gelvin S. B., R. A. Schilperoort., and D. S. Verma. Eds. Plant molecular biology manual, set A/6. Kluwer Academic Pub., Dordrecht, pp. 1-10.
- Rohlf, F. J. 1993. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. (Version 1.80), Computer program distributed by Exeter Software, Setauket, NY.

Table 2. List of primers(10-mer) and their base sequences used for RAPD.

Primer code	Base sequences(5' to 3')	No. of bands
OPA-01	CAG GCC CTT C	9 (4) ^z
OPA-02	TGC CGA GCT G	11 (5)
OPA-03	AGT CAG CCA C	7 (2)
OPA-04	AGG GGT CTT G	6 (2)
OPA-08	GTG ACG TAG G	16 (4)
OPA-10	GTG ATC GCA G	11 (5)
OPA-14	TCT GTG CTG G	17 (9)
OPA-15	TTC CGA ACC C	8 (6)
OPA-16	AGC CAG CGA A	12 (5)
OPA-17	GAC CGC TTG T	10 (4)
Total		107 (46)

^zThe number in the parentheses is the number of polymorphic bands.

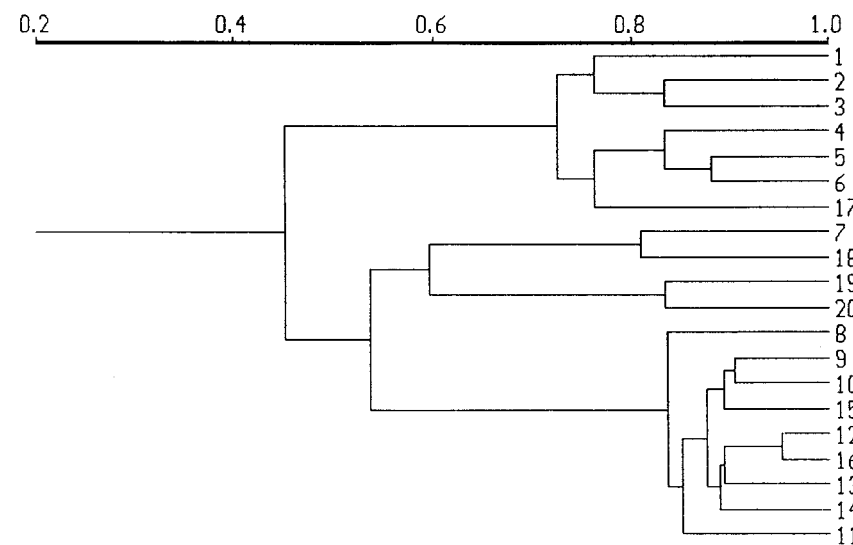


Fig. 2. UPGMA dendrogram showing the relationship among the 20 cultivars based on the polymorphic bands obtained from RAPD analysis.

- Welsh, J., R. J. Honeycutt, M. McClelland, and B. W. S. Sobral. 1991. Parentage determination in maize hybrid using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theor. Appl. Genet.* 82: 473-476.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalsky, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
- Williams, J. G. K., M. K. Hanafey, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Meth. Enzymol.* 218:704-740.
- Yamagishi, M. 1995. Detection of section-specific random amplified polymorphic DNA(RAPD) markers in *Lilium*. *Theor Appl. Genet.* 91:80-835.