원예과학기술지 17(3):352-354. 1999

꽃도라지(*Eustoma grandiflorum* Shinn.) 조직배양시 발생한 변이체의 RAPD 분석

정창호 · 유기원 · 백기엽*
충북대학교 첨단원예기술개발센터

Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis of the Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Shinn.) Variants Obtained during Tissue Culture

Cheong, Chang Ho · Yu, Kee Won · Paek, Kee Yoeup*
Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea
*corresponding author

ABSTRACT Randomly and specifically amplified polymorphic DNA band patterns based on polymerase chain reaction (PCR) analysis were used to assess genetic variation of somaclonal variants obtained from tissue culture of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). Five different types of variant were classified by morphological characters such as leaflet number, leaf shape, caulicle length, plant height, and leaf area. Five primers out of 20 primers (10 mer) resulted in 34 random amplified DNA fragments with polymorphisms (64.7%) in all tested plants. The dissimilarity coefficient was from 0.71 to 0.91 by UPGMA cluster analysis. Based on the presence of polymorphic bands, normal plant and five somaclonal variants were divided into two groups at the similarity coefficient value of 0.79.

Additional key words: genetic variation, morphological character, PCR, polymorphisms

서 언

꽃도라지(*Eustoma grandiflorum* Shinn.)는 용담과 식물로 원산지는 미국 중. 남부의 대초원과 멕시코이며 원래 다년초지만 원예적으로는 1년초로 취급되고 있다(Roh와 Lawson, 1984). 꽃이 화려하고 흑심이 있는 자주색, 분홍색, 백색 등이 있으며 매년 품종개량으로 최근에는 겹꽃 품종과 꽃잎 끝에 복눈이 있는 계통도 육성되었다. 번식은 주로 종자번식과 삽목 번식을 이용하는데 종자번식은 일시에 많은 양의 묘를 얻을 수 있으나 유전적으로 형질분리에 의한 개화기, 초장, 착화수 등 변이가 많아 균일한 상품을 생산하는 데 어려움이 있다(Roh와 Lawson, 1988). 꽃도라지는 종자로부터 우량변이가 발생되었을 때 기존 품종보다 화형이나 화색 등 우수한 형질을 가진 개체의 발생빈도가 타 화훼류에 비해 높기 때문에 이를 선발하여 대량 번식을 한다면 새로운 품종으로 육성도 가능하다(Evans, 1985).

최근 들어 polymerase chain reaction(PCR)을 이용한 ramdomly amplified polymorphic DNAs(RAPDs) 기술은 유전자지도 작성시 매우 유용할 뿐만 아니라 유전적 특징과 분자분류학 연구에도 널리 이용되고 있다(Welsh와 McClelland, 1990). 또한 PCR 증폭에 의해 만들어진 DNA 단편은 길이에 따라 변화현상을 나타내기 때문에 주로 작물의 종내 분류군 또는 종간 분류 군들을 비교분석하는 데 이용되어 왔다(Klein-Lankhorst 등, 1991; Williams 등, 1993).

본 연구에서는 RAPD 분석법을 이용하여 꽃도라지의 캘러스 및 정단배양에서 선발된 형태적인 변이체를 RAPD 분석법으로 유전적인 변이 유무를 확인하기 위해 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 재료는 꽃도라지 'Murasakinomine'(자색의 조생종) 배양시 발생된 5종의 변이체를 재료로 사용하였다(Fig. 1). 변이체는 기내에서 잎절편과 정단배양으로부터 형성된 캘러스를 MS 배지에 2.4-D가 1.0mg/L 첨가된 배지에서 증식시킨 다음 kinetin이 1.0mg/L 첨가된 신초재생 배지에 옮겨 배양했을 때 증식된 개체중 형태적 변이를 나타내는 개체를 선발하여 저온냉동기(-20℃)에 보관하면서 실험에 사용하였다.

실험기기중 PCR 기기는 ERICOMP Co.의 Power Black System을 사용하였다. PCR primer는 Operon Technologies사의 Operon 키트(10 mer-oligonucleotide)를 구입 사용하였고, *Taq* polymerase, dNTP 염색시약은 Bionia(주)의 혼합된 PremixTM-Top을 사용하였다.

Genomic DNA 분리 및 정제

순수한 genomic DNA를 분리하기 위하여 초자기구 및 용액 등은 살균하여 사용하였다. 기내 정상 및 변이 잎 조직을 분쇄기를 사용하여 마쇄한 후 DNA 추출용액(0.2M Tris-Cl(pH 7.5), 0.25M NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS)을 첨가하여 vortex mixer로 혼합하여 4분간 원심분리하여 상징액만을 분리하였다. 상징액에 동량의 phenol: chloroform: isoamylalcohol (25: 24: 1)을 넣어 실온에서 inverting으로 혼합 후 14,000×g에서 4분간 원심분리로 상징액을 연속 2회 분리하였다. 상징액에 0.6mL의 isopropanol를 첨가하여 -20℃에서 30분간 안정시킨 후 14,000×g에서 4분간 원심분리하여 상징액을 제거한 후 침전물을 채취하였다. 채취한 침전물에 70% 에탄올을 첨가한 후 2~3회 inverting으로 수세하여 14,000×g에서 4분간 원심분리하였다. 상징액은 제거하고 진공건조기로 건조시켜 TE buffer(10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH 8.0)에 녹여 -20℃에 보관 사용하였다.

DNA 증폭: PreMixTM-Top(0.5mL)에 10개의 염기서열로 구성된 random primer (Operon Primer Kit, AF) 1μL(50nM), genomic DNA 1μL(50nM), 멸균수를 첨가하여 최종량을 20μL로 한 후 증발을 방지하기 위해 20μL의 미네랄 오일을 첨가하였다.

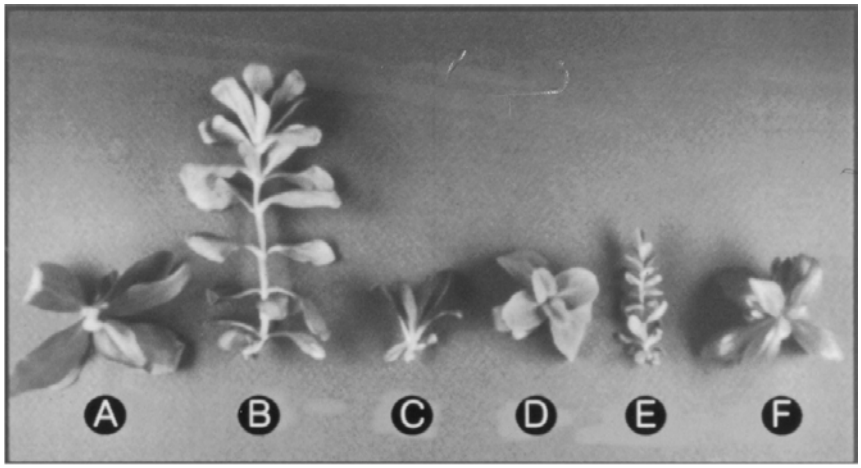

Fig. 1. Normal (A) and variant (B to F) plants obtained from in vitro culture of *Eustoma grandiflorum* used for PCR analysis.

Table 1. List of arbitrary 10-mer primers used for the RAPD analysis.

Primers	Sequence (5' to 3')	GC content (%)
B(OPAF-06)	CCGCAGTCTG	70
C(OPAF-09)	CCCCTCAGAA	60
D(OPAF-11)	ACTGGGCCTC	70
E(OPAF-14)	GGTGCGCATC	70
F(OPAF-16)	TCCCGGTGAG	70

Table 2. The representative of bands made by PCR-DNAs shown on the column 1 to 8 were reacted with the OPAF 6; 9 to 17 with OPAF 9; 18 to 26 with OPAF 11; 27 to 30 with OPAF 14; 31 to 34 with OPAF 16.

Marked	The band of PCR-DNA of the lisianthus isolates amplified with the different primer of OPAF[z]							Source
	1	5	10	15	20	25	30	
A	1111	11010	11110	10001	11111	11100	01000	Janobong
B	1111	11110	01010	10000	01000	00100	01100	Variant
C	1111	11010	01111	10000	01011	11111	11101	Variant
D	1111	11010	01111	10000	01011	11100	01001	Variant
E	0111	11111	01111	11000	01011	11100	01010	Variant
F	1111	11011	11111	11111	11011	11110	11101	Variant

[z]OPAF primer was purchased(Operon Technologys Ins).

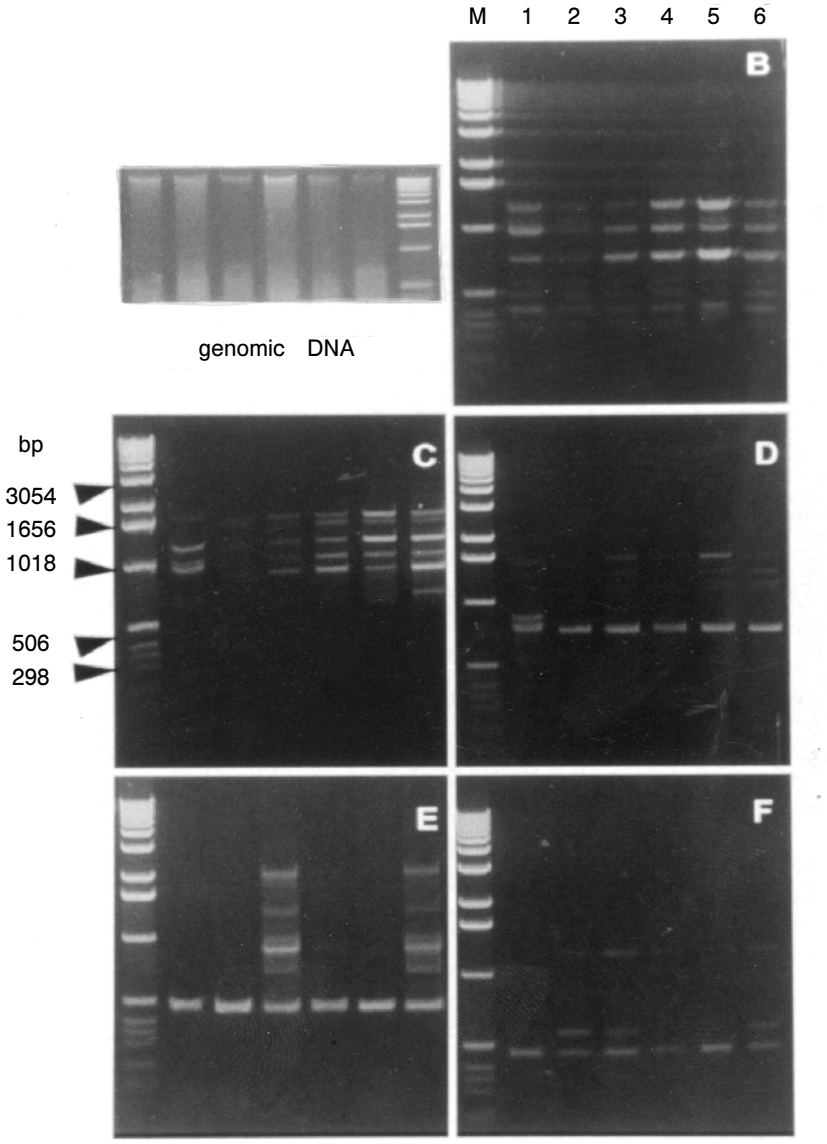

Fig. 2. Randomly and specifically amplified polymorphic DNAs band profiles of analyzed plants. The sequences of each primers in OPAF-6(B), OPAF-(C), OPAF-11(D), OPAF-14(E), OPAF-16(F) is shown in Table 1. M=1kb DNA ladder. Lane 1-6=A to F in Fig. 1.

PCR 반응 조건은 94℃에서 5분간 전변성시킨 후, 94℃에서 30초, 37℃에서 30초, 72℃에서 1분간 반응시킨 것을 1 사이클로 하여 총 35 사이클을 반복한 후 72℃에서 7분간 안정화한 다음 4℃에서 유지시켰다.

겔 전기영동은 1X TAE buffer(40mM Tris-Cl, 20mM acetic acid, 10mM EDTA)를 사용하여 1.2% agarose gel을 만들고 80V에서 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 UV-transilluminator를 사용하여 DNA 밴드 양상을 관찰한 후 폴라로이드 사진기로 촬영을 하였다. 증폭되어 분리된 밴드의 분자량은 1kb DNA ladder(GIBCO BRL Co.)를 사용하여 추정 비교하였다.

형태적으로 차이가 있는 꽃도라지 6개체에서 얻어진 genomic DNA를 10개의 염기서열로 구성된 서로 다른 random primer 20개를 이용하여 실험한 결과 증폭이 일어난 primer는 18개이었으며 이중 전체 분류군에서 증폭이 일어난 5개의 primer 염기서열은 Table 1과 같다.

5개의 primer를 사용하여 얻을 수 있는 총 밴드의 수는 34개이었고, 증폭된 DNA 단편은 전기영동상에서 2가지의 특성을 나타냈는데 밴드가 있으면 1, 없으면 0으로 코드화하여 기초자료행렬을 작성하였다. 이를 근거로 NTSYS-PC program(Exeter Software)을 이용하여 유사도 값을 구하고, unweighted pair-group method with arithmatic average(UPGMA; 비가중평균결합)분석방법을 이용하여 dendrogram을 작성하여 비교하였다.

결과 및 고찰

변이체의 발생은 정단이나 엽편배양을 통해서 얻은 캘러스 조직에서 식물체를 분화시킬 때 발생되었는데 정상적인 식물(Fig. 1A)에 비해 절간이 신장되면서 비교적 큰 잎이 착생되는 것(Fig. 1B)은 5% 정도, 엽장이 길고 엽폭은 짧은 로제트화 식물체(Fig. 1C)는 12% 정도, 외관상 정상적인 식물체처럼 보이나 잎이 뒤틀리고 생장이 매우 불량한 식물체는(Fig. 1D) 3% 정도, 절간이 신장되면서 매우 작은 잎들이 착생되는 식물체(Fig. 1E)는 5% 정도, 정상적인 식물체와 같이 생장하나 기부 액아가 생장하여 잎이 전개되는 식물체(Fig. 1F)는 3% 정도 발생되었으며 나머지는 전부 정상적인 형태를 나타내었다. 이들 변이체는 뿌리형성이 억제되는 경향을 나타내었으며 포장에 재식하였을 때 생장이 극히 억제되고 개화가 잘 되지 않았다. 개화된 식물체의 화색을 보면 키메라가 분리되어 다양한 화색을 나타내었으며 꽃의 형태에 있어서도 정상과 비정상적인 것이 관찰되었다. 따라서 꽃도라지의 조직배양시 재생된 식물체는 유전적으로 다양한 변이가 발생할 수 있어 캘러스 배양을 통한 식물체 재생은 현실적으로 대량번식 수단으로 이용할 수 없다고 생각되었다.

이들 변이체에서 게놈 DNA를 분리하여 증폭시켜 본 결과 DNA 단편들의 크기는 300-2300bp 범위로 나타났으며 종내 개체간 동일

Table 3. Similiarity matrix for lisianthus and it's variant group.

Marked	LF	B	C	D	E	F
LF	1.000					
B	0.684	1.000				
C	0.783	0.750	1.000			
D	0.857	0.778	0.909	1.000		
E	0.837	0.703	0.800	0.878	1.000	
F	0.808	0.652	0.852	0.800	0.745	1.000

LF: Normal lisianthus. B to F: different types of variants shown in Fig. 1.

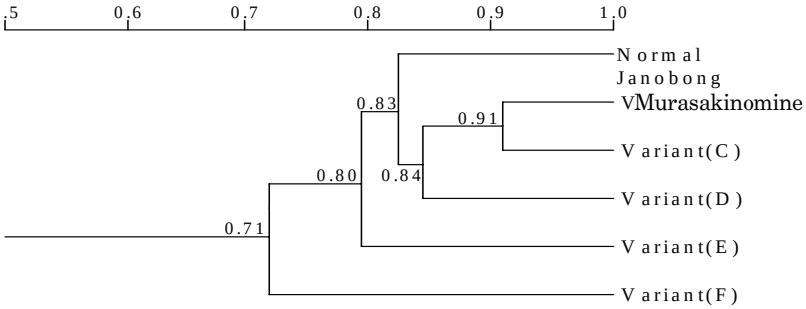

Fig. 3. Phenogram of *Eustoma grandiflorum* based on UPGA analysis system derived from amplication of genomic DNAs using several primer. Refrence B to F as in Fig 1.

Fig. 3. Phenogram of *Eustoma grandiflorum* based on UPGA analysis system derived from amplification of genomic DNAs using several primers. B to F indicate different variants shown in Fig. 1.

하거나 서로 다른 밴드 양상을 보였다(Fig. 2). 또한 5개의 primer를 사용하여 얻은 총 34개의 밴드중 monomorphic한 밴드는 35.3%에 해당하는 12개이었으며 나머지 22개 밴드는 polymorphic 밴드로 나타나 기내배양시 발생하는 변이체간에는 polymorphism이 대단히 높게 나타남을 알 수 있었다.

일반적으로 primer의 구성염기는 DNA증폭에 영향을 미치며(Williams 등, 1990), 특히 G·C 농도가 높을수록 DNA증폭이 매우 유리하게 일어난다고 알려져 있다(Fritsch 등, 1993). 본 연구결과에서도 6개체 모두에서 증폭이 일어난 5개의 primer는 G+C의 빈도가 60% 이상으로 높았다.

5개의 primer를 사용하여 얻은 34개 밴드 각각을 하나의 형질로 보아 기초자료행렬을 작성하고(Table 2) 이를 근거로 유사도를 구한 값은 Table 3과 같으며 이 결과를 UPGMA(비가중평균결합)방법으로 denogram을 작성하면 Fig. 3과 같다.

그 결과 Fig. 3에서 보여지는 것처럼 1개의 군으로 나타났는데 5개체의 유사도는 0.72~0.92로 나타났으며 이군은 0.72에서 2군으로 구분할 수 있었다. 이는 캘러스 및 정단배양에서 얻은 형태적 특성을 달리한 식물체가 유전적인 변이체이었음을 확인할 수 있었다.

PCR 증폭에 의해 만들어진 DNA단편들은 길이에 따라 genomic DNA의 차이를 나타내기 때문에 재배 작물의 근연관계 및 종내 또는 종간 유연관계를 밝히는 데 주로 사용되어 왔다. 實際로 PCR 분석을 통해 한국특산종인 금강초롱이 근연분류군들과 잘 구별되어 특산 속으로 구별됨을 밝힌 바 있고(Yoo 등, 1996) 삼지구엽초(Yoo 등, 1997)와 산마늘(Kim 등, 1997)의 종내 변이를 밝힌 바도 있다. 본 연구 결과 PCR방법이 꽃도라지 변이체의 유전적인 변이를 밝히는 데 유용한 실험방법으로 가치가 인정되었다.

그러나 정확한 품종내 변이 양상을 밝히기 위해서는 specific probe를 이용한 RFLP, gene sequencing과 같은 좀더 세밀한 분자생물학적 접근방법이 수행되어야 가능하리라 생각된다.

초 록

꽃도라지(*Eustoma grandiflorum*) 조직배양시 발생한 5개의 변이체와 모본을 이용하여 PCR 반응으로 나타난 RAPDs 밴드 형태로 유전적인 변이 유무를 확인하려고 하였다. 6개의 분류군은 엽수, 엽모양, 줄기직경, 초장 그리고 엽면적과 같은 형태적인 특징이 달랐다. 실험한 20개의 임의 primers 중에서 모본과 변이체에서 모두 밴드를 나타낸 5개 PCR 반응에서 증폭밴드는 총 34개였으며 64.7%의 다형성을 나타냈다. 밴드의 유무를 코드화하여 NTSYS-PC (ver. 1.5)분석으로 나타난 변이체들의 유전적인 거리값의 차이가 변이체인 5개체와 정상 식물체간 비유사성 계수는 0.72에서 0.91로 밀접한 유사성을 나타냈으며 거리값이 0.79에서 두 그룹으로 나뉘어졌기 때문에 변이체의 형태적인 차이와 거의 일치되는 유전적인 차이를 나타냈다.

추가 주요어 : 유전적 변이, 형태적 특성, 다형성, PCR

인용문헌

Evans, D.A. 1985. Phenotypic and genotypic stability of tissue cultured plants, p. 73-94. In: R.H. Zimmerman, R.J. Griesbach, F.A. Hammerschlag, and R.H. Lawson (eds.). Tissue culture as plant production system for horticultural crop. Martinus Nijhoff Publishers.

Fritsch, P.M., C.D. Hanson, and L.H. Reiseberg. 1993. Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plant. Plant Molecular Biology 11: 10-20.

Kim, W.B., K.O. Yoo, S.Y. Ryu, J.T. Seo, Y.H. Om, and H.T. Lim. 1997. Intraspecific variations of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* by polymerase chain reaction. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 38(2): 129-132.

Klein-Lankhorst, R.M., A. Vermunt, R. Weide, T. Liharska, and P. Zabel. 1991. Isolation of molecular markers for tomato using random amplified polymorphic DNA(RAPD). Theor. Appl. Genet. 83: 104-144.

Roh, S.M. and R.H. Lawson. 1984. The lure of lisianthus. Greenhouse Manager 2: 103-121.

Roh, S.M. and R.H. Lawson. 1988. Tissue culture in the improvement of *Eustoma*. HortScience. 23: 658.

Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitray primers. Nucleic Acid Res. 18: 7213-7218.

Williams, J.G.K., K.J. Kubelik, J.A. Rafalski, and S.V. Tnigey. 1990. DNA polymorphics amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid 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.

Yoo, K.O., W.T. Lee, N.S. Kim, J.H. Kim, and H.T. Lim. 1996. Comparative studies on the *Hanabusaya asiatica* and its allied groups based on randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 37(2): 324-328.

Yoo, K.O., S.D. Ahn, C.Y. Yu, K.Y. Park, and H.T. Lim. 1997. Intraspecific variations of the *Euimedium koreanum* by randomly and specifically amplified polymorphic DNA markers. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 38(2): 183-187.