

RAPD를 이용한 자란(*Bletilla striata*)의 유전적 다형성 분석

경윤정 · 윤미정 · 박천호*

고려대학교 원예과학과

Identification of the Genetic Polymorphism of *Bletilla striata* Using RAPD

Yun Jeong Kyung, Mi Jeong Yoon, Chun Ho Pak*

Department of Horticultural Science, Korea University, Seoul 136-701, Korea

*corresponding author

ABSTRACT The genetic relationship of *Bletilla striata* native to Korea and Japan was investigated using random amplified polymorphic DNA (RAPD). The 156 reproducible DNA bands, consisted of 58 polymorphic and 98 monomorphic bands, were obtained by polymerase chain reaction (PCR) with selected 10 random primers. The 8 *Bletilla* lines have been classified into three groups according to the similarity coefficient obtained by RAPD analysis. The dendrogram showed overall correlation between similarity coefficient of 0.48 and 0.84. The first group included A (*Bletilla striata* native to Korea), B (*Bletilla striata* variegated and native to Korea in Mokpo), C (*Bletilla striata* variegated and native to Korea), D and E (*Bletilla striata* native to Japan). In this group, it was showed that B and C had the most similar genetic relationship. The similarity coefficient between D and E was 0.77. D and E had a very close resemblance in plant height and flower color with A native to Korea, respectively. The second group included only G (dwarf *Bletilla* native to Japan) and had a different morphological character compared to other cultivars. The last group included F and H (dwarf and variegated *Bletilla* native to Japan) and they had a similarity of variegation.

Additional key words: dwarfed, PCR, phylogenetic study, variegated

서 언

자란은 한국, 일본, 중국에서 자생하고 있는 난과 식물(orchidaceae)로 우리나라에서는 남해안과 도서지방에 주로 분포하며 *Bletilla striata*와 변종이 있다. 개화기는 5~6월로 잎 사이에서 화경이 나와 3~7개의 홍자색 꽃이 총상으로 달린다. 노지 종자에 의한 번식은 거의 불가능하나 무균배양법으로 쉽게 대량생산이 가능하다(이창복, 1993).

자란은 꽃이 아름답고 노지재배가 가능하여 분화와 조경용 지피 소재로서의 가능성이 매우 높아 개발 가치가 크며, 일본에서는 다양한 품종이 육성되어 폭넓게 이용되고 있다. 우리나라에서도 최근 자란의 이용은 점차 증가하고 있으나, 대부분 산채하여 이용하는 수준이어서 품종의 육종은 생각하기도 어려운 실정이다. 그러나 자란은 속간교잡이 비교적 쉬워 RAPD를 이용한 교배친화성과 근연관계에 대한 기초적인 연구만 이루어지면 새로운 품종의 육성은 가능하다.

식물 육종과 유전적인 분류를 위해서 polymerase chain reaction (PCR)을 이용한 random amplified polymorphic DNA(RAPD)

방법을 많이 이용하는데 이는 유전자 지도 작성에 매우 유용할 뿐만 아니라 유전적 특징과 분자분류학 연구에도 널리 이용되고 있다. PCR 증폭에 의해 만들어진 DNA 단편은 길이에 따라 다형화 현상을 나타내기 때문에 주로 작물의 종내 분류군 또는, 종간 분류군들을 비교분석 하는데 이용되어 왔다(Williams 등, 1990).

RAPD 방법은 간단하고 비용이 적게 들며 위험성이 적다는 장점이 있다. 그리고 10개의 염기로 된 임의의 primer를 이용하여 분석을 위한 다량의 marker를 제공할 수 있다. 따라서 식물의 연구에 RAPD 방법을 이용한 이후 RAPD는 유전자 지도 작성을 위한 계통발생학적 연구에 광범위하게 이용되어 왔다(Paran 등, 1991).

육종을 위한 유전적인 연구를 위해서는 양친선택이 중요하며 유전적으로 원원인 모본을 이용하는 것이 바람직하다. 따라서 본 연구에서는 RAPD를 이용하여 국내 자란과 일본에서 재배하고 있는 5품종의 유전적인 변이를 비교 분석하여 자란 육종의 기초자료로 이용하고자 하였다.

재료 및 방법

1) 공시재료

본 실험에 사용된 공시재료는 1년생 자란으로 1종의 국내 자생 일반종과 2종의 국내 자생 무늬종, 그리고 5종의 일본자생 자란을 이용하였다. 일본종 D는 국내 일반종과 잎의 형태나 꽃색이 유사하고 E는 꽃색이 백색인 품종이다. 그리고 F와 H는 왜성이고 잎에 무늬가 있는 품종이며, G는 같은 왜성종이나 잎에 무늬가 없고 백색의 꽃이 피는 품종이다.

2) DNA 추출

DNA는 CTAB법을 이용하여 추출하였다(Rogers와 Bendich, 1985). 500mg의 잎을 액체질소를 이용하여 마쇄하고, 150 μ L의 추출액(50mM Tris-HCl, 25mM EDTA, 0.35M Sorbitol)과 소량의 β -mercaptoethanol을 넣은 후 1mL의 추출액을 더 첨가하여 부드럽게 섞은 뒤 250 μ L의 5% sarcosyl 용액을 넣었다. 잘 섞은 후 실온에 5분간 처리하고 220 μ L의 5M NaCl과 180 μ L의 8.6% CTAB을 넣은 뒤 65 $^{\circ}$ C에 15분간 처리하였다. 그 후 1/2배의 phenol과 1/2배의 chloroform-isoamylalcohol을 넣고 원심분리하였다. 상정액에 1/2배의 7.5 M NH_4OAc 와 총 부피의 2배의 95% EtOH을 첨가하여 혼합후 -20 $^{\circ}$ C 저온고에 1시간 동안 처리하였다. 처리후 15,000rpm에서 15분간 원심분리 후 상정액은 버리고 DNA를 건조하였다. DNA는 다시 TE buffer에 녹여 lambda DNA로 정량하였으며, RAPD분석을 위해 1ng/ μ L로 희석하였다.

3) RAPD 조건설정

최적의 RAPD 조건 설정을 위해 template DNA의 농도, enzyme의 선별, primer 선별 실험을 하였다. Template DNA의 농도는 1, 2, 5, 10 ng을, enzyme 선별을 위해서는 ex-Taq, r-Taq을 사용하였다. Primer는 Canada의 British Columbia 대학에서 구입한 인위적으로 합성된 ten-mer(10 nucleotide) 중에서 예비실험을 통하여 다양한 polymorphism을 보인 10개를 선발하였다(Table 1).

Table 1. The list of 10 random primers and their sequences used in RAPD for classification of *Bletilla striata*.

Primer No.	Sequences	GC contents (%)
UBC 3	5'-CCTGGGCTTA-3'	60
UBC 4	5'-CCTGGGCTGG-3'	70
UBC 5	5'-CCTGGGTTC-3'	70
UBC 53	5'-CTCCCTGAGC-3'	70
UBC 227	5'-CTAGAGGTCC-3'	60
UBC 243	5'-GGGTGAACCG-3'	70
UBC 253	5'-CCGTGCAGTA-3'	60
UBC 262	5'-CGCCCCAGT-3'	80
UBC 270	5'-TGAGCGCGGG-3'	80
UBC 275	5'-CCGGGCAAGC-3'	80

4) RAPD 분석

추출한 DNA를 이용한 PCR 분석을 위해 polymorphism이 나타나는 10개의 primer를 선발하였다. PCR 반응은 0.27 μ M의 primer, 1ng의 genomic DNA, 1.5mM의 MgCl_2 , 200 μ M의 dNTP mix, 그리고 0.5unit의 r-Taq polymerase를 함유하는 14 μ L의 반응액에 동량의 mineral oil을 첨가하여 실시하였다(Table 2). 증폭을 위한 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 변성 후, 94 $^{\circ}$ C에서 45초, 39 $^{\circ}$ C에서 60초, 72 $^{\circ}$ C에서 90초로 45회 반복하고, 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응하였다. 증폭된 반응액은 1.0% agarose gel 상에서 100V로 전기영동하여 확인하였다. 전기영동 후 gel은 ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator상에서 band 차이를 관찰하고 촬영하였다.

RAPD 분석은 PCR을 통한 65개의 polymorphic band를 이용하였으며 band가 특정 base pair에 나타나면 1로, 나타나지 않으면 0으로 코드화한 것으로 시행하였다. 8종류의 난들에 대한 유연관계 분석은 computer 통계 프로그램인 NTSYS program을 이용해 수행하였으며 Sneath와 Sokal(1973)에 의해 개발된 비가중산술법(UPGMA; unweighted pair group method with arithmetic averages)을 사용하였다.

결과 및 고찰

3종류의 국내자생 자란과 5종류의 일본자생 자란이 본 실험의 계통발생 연구에 이용되었다. 국내자생 자란은 일반종이 1종이며 이는 자주색 꽃이 피고 잎에 무늬가 없다. 그리고 국내자생 무늬종은 2종류인데 이는 자생지가 서로 상이하며 잎에 아름다운 무늬가 있다. 일본자생 자란의 경우 모두 5가지가 있는데 국내 일반종과 꽃색이나 형태적으로 유사한 것이 2종류 있고, 잎에 무늬가 있는 것이 2종류 있으며 왜성종이 1종류 있다(Table 3).

종간, 품종간 교잡에 의한 잡종식물체는 다양한 형질변이를 나타내는데 최근 식물의 품종분류나 계통발생학적 연구에 PCR을 이용한 genomic DNA의 RAPD법을 많이 이용해왔다. PCR을 이용한 RAPD 분석은 소량의 DNA로 많은 수의 marker를 얻을 수 있으

Table 2. Concentrations and condition of RAPD reaction mixture.

Reaction Mix.	Final concentration
Component	
Primer	0.27 μ M
Template DNA	1 ng
DEPC-D.W.	
10 X PCR buffer	1 X
dATP (2 mM)	200 μ M
dCTP (2 mM)	200 μ M
dGTP (2 mM)	200 μ M
dTTP (2 mM)	200 μ M
MgCl_2 (10 mM)	1.5 mM
ex-Taq polymerase (2U/ μ L)	0.5 U

며 시간이 적게 들고 경제적이란 장점이 있다.

8개 품종의 자란에서 얻은 genomic DNA를 10개의 염기서열로 구성된 서로 다른 random oligonucleotide primer 40개를 이용하여 primer 선별실험 결과 다형성을 보여주는 10개의 primer를 분석에 이용하였다. 사용된 10개의 primer를 이용한 PCR 결과 156개의 재현성을 보이는 중 58개의 band가 다형성을 보였으며 98개는 단일성을 나타냈다. Primer당 polymorphism을 보여주는 band수는 3~9개이며 크기는 300~2,000 base pair 사이의 것이다(Fig. 1).

일반적으로 RAPD-PCR 증폭결과는 온도와 시간 그리고 primer의 GC 함량에 의해 차이가 나며 GC 함량이 높을수록 고온에 안정되어 증폭이 잘 일어난다고 보고되었다. 본 연구에서도 반응이 잘 일어난 12개의 primer의 GC 함량이 전체 염기의 60% 이상으로 비교적 높았다(Table 1).

자란 품종간의 유사도는 크게 3 group으로 나타났으며, 분류군의 전체 유사도는 0.48~0.84로 비교적 높게 나타났다(Fig. 2). Group 1은 국내 자생일반종과 일본품종 D와 E 그리고 국내 일반 무늬종과 목포산 무늬종이고, group 2는 일본산 G만이 분류되며, group 3은 일본산 무늬종인 F와 H가 속했다. Group 1의 경우 국내 무늬종 2종류가 유사도 0.806으로 가장 높게 나타나 유전적인 거리가 매우 가깝거나 동일한 품종인 것으로 사료된다. 그리고 일

본산 자란 중에서는 D와 E가 유사도 0.778로 가장 근연인 종류로 나타났다. 이들은 국내산 일반종과 유연관계가 가장 높게 나타났는데 초장과 꽃색이 자색인 점에서 형태적으로 유사한 결과를 나타냈다. Group 2의 일본산 G는 왜성품종으로 다른 자란종과 형태적인 면에서 차이를 나타냈다. Group 3인 일본산 F와 H는 0.58의 유사도를 나타냈는데 이들은 형태적으로 무늬종이라는 점이 유사하다.

초 록

RAPD 방법을 이용하여 국내자생 자란과 일본자생 자란의 유전적 다형성을 연구하였다. PCR 결과 156개의 재현성을 보이는 band를 얻었으며 그 중 58개가 다형성을 보였고 98개는 단일성을 나타냈다. 유연관계 분석 결과 자란은 세가지의 그룹으로 분류되었다. 첫 번째 그룹은 국내 A(자생일반종), B(목포산 자생 반엽종), C(자생 반엽종) 그리고 일본품종 D와 E(일본자생 일반종)가 속한다. 국내 무늬종 B와 C의 유사도 0.806, 일본품종 D와 E는 0.778로 매우 높게 나타났다. 두 번째 그룹은 일본품종 G(일본자생 왜성종)만이 분류되었다. 그리고 세 번째 그룹은 일본자생 무늬종인 F와 H(일본자생 무늬종)가 포함되었다.

추가 주요어 : 왜성종, 계통발생 연구, 반입, PCR

Table 3. Morphological differences of some genus of *Bletilla*.

	A	B	C	D	E	F	G	H
Type	Common	Variogated	Variogated	Common	Common	Dwarf variegated	Dwarf	Dwarf variegated
Leaf length (cm)	60 - 70	60 - 70	60 - 70	60 - 70	about 60	40 - 50	about 45	about 45
Flower color	Purple	Unknown	Purple	Purple	White	White	White	White

A: *Bletilla striata* native to Korea, B: *Bletilla striata* variegated native to Korea in Mokpo,

C: *Bletilla striata* variegated native to Korea, D to H: *Bletilla striata* native to Japan

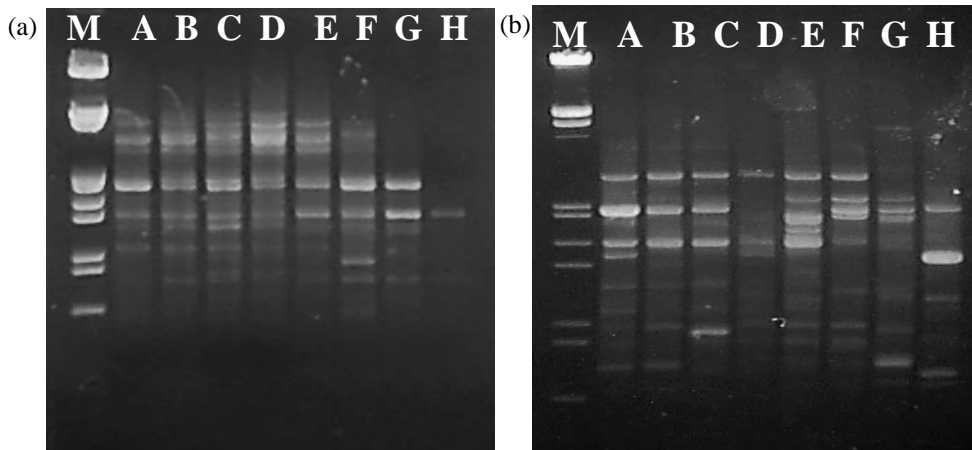


Fig. 1. DNA profiles generated from 8 *Bletilla striata* cultivars with UBC primer # 3(a) and #253(b).

M: size marker

A: *Bletilla striata* native to Korea, B: *Bletilla striata* variegated native to Korea in Mokpo,

C: *Bletilla striata* variegated native to Korea, D to H: *Bletilla striata* native to Japan

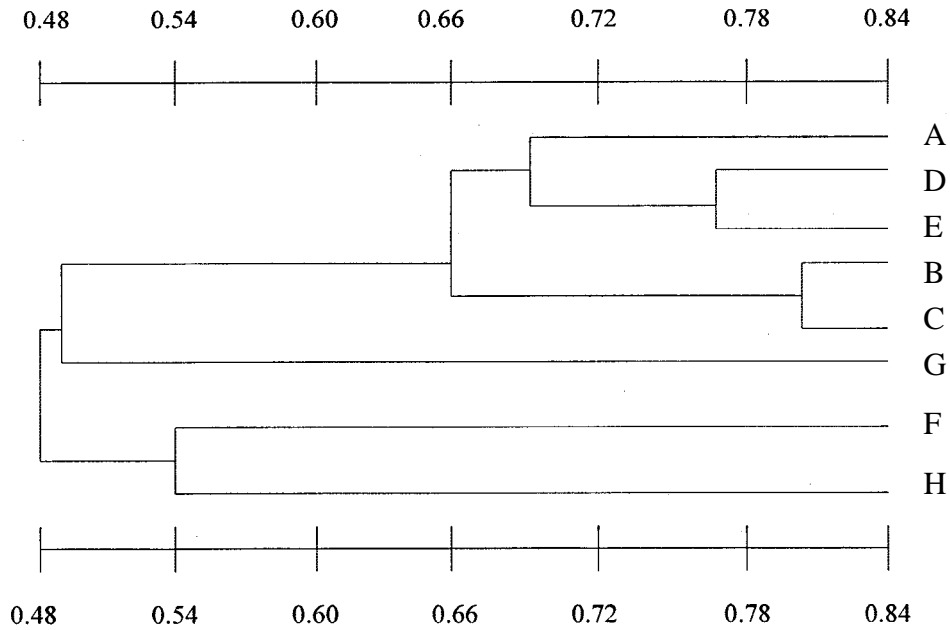


Fig. 2. Dendrogram of 8 *Bletilla striata* cultivars generated by UPGMA cluster analysis based on the similarity coefficient.

A: *Bletilla striata* native to Korea, B: *Bletilla striata* variegated native to Korea in Mokpo, C: *Bletilla striata* variegated native to Korea, D to H: *Bletilla striata* native to Japan

인용문헌

- Chaparro, J.X., D.J. Werner, D. O'Malley, and R.R. Sederoff. 1994. Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme and RAPD markers in peach. *Theor. Appl. Genet.* 87:805-815.
- Federici, C.T., D.Q. Fang, R.W. Scora, and M.L. Roose. 1998. Phylogenetic relationships within the genus citrus (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 96:812-822.
- 이창복. 1993. *대한식물도감*. p.246. 향문사, 서울
- Lee S.J., J.S. Shin, K.W. Park, and Y.P. Hong. 1996. Detection of genetic diversity using RAPD-PCR and sugar analysis in watermelon (*Citrullus lanatus*) germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 92:719-725.
- Paran, I., R. Kesseli, and R. Michelmore. 1991. Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. *Genome* 34:1021-1027.
- Rogers, S.O. and A.J. Bendich. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissue. *Plant Mol. Biol.* 5:69-76
- Sneath, P.H.A. and H.R. Sokal. 1973. *Numerical taxonomy*. Freeman, San Francisco.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.