

RAPD에 의한 천문동 수집종의 유연관계 분석

강찬호* · 박춘봉** · 최정식* · 최영근*

* 전북농업기술원, ** 진안속근약초시험장

Genetic Relationships Analysis of *Asparagus cochinchinensis* Lour Collections by Random Amplified Polymorphic DNA.

Chan Ho Kang*, Chun Bong Park**, Joung Sik Choi*, Yeong Geun Choi*

* Jeon-Buk Agricultural Research and Extension Service

** Jinan Perennial Herbs Experiment Station, J. B. ARES

ABSTRACT : To analyze the genetic relationships among 23 accessions of *Asparagus cochinchinensis* Lour, random amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis was performed using artificially synthesized 10 primers. The range of polymorphism was 42.9~91.7% with an average of 72.9% in 85 randomly and specifically amplified DNA fragments. On the basis of similarity coefficient analysis by unweighed pairgroup method, arithmetic average method(UPGMA), 23 accessions of *Asparagus cochinchinensis* Lour could be classified into 6 groups at the similarity coefficient value of 0.82. Group I contained 5 accessions, Group II contained 6 accessions, Group III contained 6 accessions, Group IV contained 2 accessions, Group V contained 2 accessions and Group VI contained 2 accessions. The range of total genetic similarity coefficient value of 23 accessions of *Asparagus cochinchinensis* Lour was 0.47~0.92 and average value was 0.76. To obtain more exact data from PCR, we also tried to develop enhanced RAPD techniques using Bovine Lacto Transfer Technique Optimizer(BLOTTO). In RAPD analysis of *Asparagus cochinchinensis* Lour, we could obtain better RAPD results by adding BLOTTO at a final concentration of 1%.

Key words : *Asparagus cochinchinensis* Lour, RAPD, BLOTTO, Genetic relationship.

서 언

천문동(*Asparagus cochinchinensis* Lour)은 백합과의 다년생 덩굴성 초본으로 맥문동과 함께 이문동(二門冬)으로 불리우며 이노, 각혈, 해수, 구갈 등에 효과가 있고 강장효과도 있어 한약원료는 물론 건강음료나 민속주의 부 원료로도 이용이 가능한 약재이다(박 등., 2000). 국내 수요량은 연간 약 100톤 정도이며 그동안 자연산의 무분별한 채취로 현재는 멸종위기에 처하여 수요량의 거의 전부를 중국에서 수입하고 있는 실정이다. 따라서 국

내자생지의 체계적인 보호와 보존을위해 2000~2001년에 걸쳐 자생 천문동을 수집하여 분시험의 유전자원으로 활용하였다. 유전육종 분야에 있어서 전통적으로 사용되어 오던 대표적 식물분류 방법은 표현형에 의존한 분석법과 동위효소 분석방법이 일반적으로 이용되고(Brown, 1990) 있으나 외부형태 특성 관찰에 의한 식물분류는 육안적 관찰 또는 판단으로 주관적 요인에 치우치기 쉽고 환경요인의 영향을 배제할 수 없어 복잡한 통계적 처리를 통한 보정을 거쳐야하기 때문에 어렵고 연구 결과에 대한 신뢰도도 낮을 수밖에 없다. 동위효소 분석법도

† Corresponding author (Phone) : 063-839-0462, E-mail : kangho88@intra.far.jeonbuk.kr

Received 5 October 2002 / Accepted 28 November 2002

또한 효소의 양 및 band pattern이 환경요인에 의해 발현 유무가 크게 좌우되고 시기 선택의 오류에 의해 잘못된 결과가 도출될 가능성도 상존하기 때문에 확실성 있고 좀더 적극적인 식물 분류 방식의 개발이 요구되어 왔다(Yang et al., 2001).

RAPD는 이러한 단점들을 극복하기 위해 개발된 분자생물학적 표지인자 이용법 중 하나로서 임의 염기서열의 짧은 oligonucleotide primer를 이용하여 핵 DNA를 PCR로 증폭하여 생성된 다양한 band를 비교하는 방법으로서 유전자 지도 작성(Mukai et al., 1995), 종의 분류와 유연관계(Kim et al., 1997), 유용형질을 탐색할 수 있는 표지인자 개발(Kwon et al., 2000), 집단 유전학의 양적형질 분석(Suh et al., 1999 ; Rim et al., 1995) 등에 많이 이용되고 있으며 RFLP 방법에 비하여 시간과 노력이 적게 들뿐만 아니라 간편하게 분석할 수 있어 활용빈도가 높은 기술이다(Williams et al., 1990). PCR을 통한 유전 유연관계의 분석은 그 신속성과 용이성으로 인하여 이용범위가 급격하게 확대되고 있다. 그러나 다양한 식물재료에서 추출된 DNA 내에는 PCR을 저해하는 다양한 종류의 물질이 존재하는 것으로 알려져 있는데 특히 polyphenol 화합물은 DNA에 결합하여 DNA를 분해하며(John, 1992), Mg^{2+} 와의 착염 형성을 통하여 PCR을 억제하는 것으로 알려지고 있다(De Boer et al., 1995).

따라서 PVPP(Polyvinyl poly pyrrolidone)(John, 1992 ; Pich & Schubert, 1993 ; Steiner et al., 1995)나 PVP(Polyvinyl pyrrolidone)(Kim et al., 1997)와 같이 polyphenol 화합물과 결합하는 물질이 추출과정에 사용되고 있으나 침전 및 정제과정 등 부가적 단계가 늘어나게 되고 이에 따라 DNA 순도유지 등에 어려움을 겪을 수 있어 좀더 간편한 방식인 특수 물질 첨가에 의해 PCR 억제작용을 경감시킬 수 있는 새로운 방법들이 개발되어 왔는데 BLOTTO 첨가 방법이 대표적으로 사용되고 있다(De Boer et al., 1995). 원래 Western이나 Southern 분석시 단백질이나 핵산이 전이막에 비특이적으로 결합하는 것을 방지하기 위해 사용하던 BLOTTO의 PCR 억제 경감효과는 이미 벼, 콩, 옥수수, 배추, 감자 등 초본식물에서도 확인된 바 있어(De Boer et al., 1995 ; Hwang & Kim, 2000) 국내 자생지에서 수집된 천문동의 유전적 동일성 여부를 확인하고 품종화를 위한 계통분석을 실시하기 위하여 수집 자생 천문동 21종과 도입 2종 등 23종을 대상으로 유전유연관계 분석을 RAPD를 통하여 실시하였으며 효율적 유연관계 분석을 위한 적정의 PCR 조건을 설정하기 위해 BLOTTO의 사용효과와 사용농도를 구명하였다.

재료 및 방법

1. 시험재료 및 DNA 추출

시험재료는 수집된 자생종 중 시험재료 채취가 가능한 것을 대상으로 선정하였는데 전남 여수 은적암, 경남 남해 이동, 전남 영광 송이도, 전남 진도 지산, 전남 여수 향일암, 전북 군산 오식도, 전북 부안 위도, 전북 부안 계화도, 충남 서천 서면, 충남 보령 남포, 전북 익산 금마, 전북 부안 하서, 경남 사천 실안, 전북 군산 선유도, 전북 군산 개야도, 전북 고창 아산종 그리고 일본종 1종(영남농업시험장 분양), 중국 도입종(호남성) 등이 포함되었으며 이중 전북 군산 선유도와 개야도, 전북 고창 아산 수집종들은 동일 지역 내에서도 특이 특성을 나타내는 개체들이 다시 분리되어 대표성을 띄는 특이군들을 다시 분리 총 23종을 선발(하여 시험재료로 사용하였다. 선발된 시험재료는 시험포장에서 출현한 30일 이내의 신선한 잎을 채취 4°C에서 72시간 보존하여 다당류를 제거한 다음 -70°C에 보관하면서 이를 RAPD분석 재료로 사용하였다.

2. DNA 추출

0.1g의 잎을 액체질소로 마쇄한 후 lysis buffer (50mM Tris-Cl pH 7.4, 50mM EDTA pH 7.2, 3% SDS, 1% 2-mercapto ethanol)를 첨가하여 68°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 4°C에서 12,000rpm으로 20분간 원심분리한 다음 상등액을 분리하여 새로운 tube로 옮기고 동량의 Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol(25 : 24 : 1, V/V/V) 용액을 첨가한 후 20분 동안 조심스럽게 흔들어주어 현탁액을 형성하게 하였다. 형성된 현탁액을 4°C, 12,000rpm에서 20분간 원심분리 한 후 층분리가 이루어진 반응물 중 상등액만을 새로운 tube에 옮기고 -72°C에 저장된 100% EtOH 2배량을 첨가하여 조심스럽게 흔들어주어 DNA를 침전시켰다. 이 용액을 12,000rpm으로 20분간 원심분리하여 상등액을 버리고 다시 4°C의 70% EtOH로 세척하여 원심분리 하였다. 최종적으로 얻어진 DNA pellet은 적당히 건조시킨 후 TE buffer로 잘 녹이고 RNase를 처리하여 RNA를 제거한 후 -20°C에 보관하면서 시료로 사용하였다.

3. Polymerase Chain Reaction

RAPD Primer는 10개의 10mer를 합성하여 사용하였다(Table 2). PCR 반응액은 PCR premixture를 Bioneer사 (AccuPower™ PCR Premix K-2016)로부터 구입하여 사용하였는데 반응액 20μl에 1unit의 Taq DNA polymerase와 dNTP 250μM, 10mM의 Tris-HCl(pH 9.

0), 40mM의 KCl 그리고 1.5mM의 MgCl₂를 함유한 용액으로 Template DNA 40ng과 Primer 농도를 20pM로 조정하여 PCR 반응용액을 조성하였으며 polyphenol에 의한 PCR 반응 억제 효과를 상쇄시키기 위하여 BLOTTO(10% skim milk powder + 0.2N sodium azide) 1%를 첨가하였다. PCR은 MJ research社의 PTC 200 Peltire Thermal cycler 기종에서 실시하였는데 94℃에서 5분동안 predenaturation 시킨후 다시 94℃에서 1분동안 denaturation, 34℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 2분간 extension 시키는 과정을 40 cycle 진행시킨 후 72℃에서 10분간 last extension을 실시하였다. PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 50V로 2시간 동안 전기영동한 후 EtBr로 10분간 염색 그리고 15분 동안 탈염색 시킨 다음 UV 조사장치에서 증폭된 DNA의 다형현상을 사진으로 기록하였다.

4. BLOTTO 사용효과 및 적정 사용농도 분석

BLOTTO의 PCR 반응억제 상쇄효과를 조사하기 위하여 BLOTTO를 제조하여 사용하였다. BLOTTO의 최적 사용농도를 결정하기 위하여 PCR 반응액 중 농도를 0,

1, 2, 3, 4, 6, 8, 10%로 조정하여 PCR을 실시하였는데 Primer는 P4(AGCGTCCTCC)를 사용하였으며 Primer별 Band 형성이 양호한 전남 영광 송이도 수집종과 전북 군산 개야도 수집 천문동의 DNA를 전기한 방법과 같이 추출하여 Template DNA로 사용하였다. PCR 기종과 반응액 조성 및 과정 그리고 전기영동 분석 등은 전기한 것과 동일하였다.

5. 유연관계 분석

PCR 산물의 분석은 밴드의 유. 무에 따라 유는 1, 무는 0으로 데이터화하였으며 NTSYS-PC system을 이용하여 UPGMA(unweighed pairgroup method, arithmetic average method) 분석방법으로 dendrogram을 작성하였다.

결 과

1. RAPD에 의한 유연관계 분석

수집된 천문동 중 시료를 취할 수 있는 23종(Table 1)에 대하여 RAPD분석을 실시하였다. 사용된 10개의 primer 모두에서 다형 현상이 관찰되었다(Table 2). 증

Table 1. The accessions of *Asparagus cochinchinensis* LOUR used for RAPD analysis

Code	Strain name	Locality	Stem colour	NO. of tuberous root(ea)
A	Boryung	Nampomyun Boryung C.N§1	Red	20~40
B	Seochun	Seomyun Seochun C.N	Red	5~20
C	Keumma	Keummamyun Iksan J.B§2	Red	4~10
D	Osikdo	Soryongmyun Kunsan J.B	Red	4~10
E	Kaeyado Blue	Okdomyun Kunsan J.B	Blue	20~40
F	Kaeyado Red	Okdomyun Kunsan J.B	Red	20~40
G	Sunyudo 1	Okdomyun Kunsan J.B	Red	5~30
H	Sunyudo 2	Okdomyun Kunsan J.B	Red	3~10
I	Sunyudo Red	Okdomyun Kunsan J.B	Red	10~50
J	Kaehwa	Kaehwamyun Buan J.B	Red	5~10
K	Haseo	Haseomyun Buan J.B	Red	3~40
L	WidoAsan 1	Widomyun Buan J.B	Red	5~20
M	Asan 2	Asanmyun Kochang J.B	Red	5~25
N	Asan 2	Asanmyun Kochang J.B	Red	5~10
O	Songido	Baeksumyun Youngkwang J.N§3	Red	5~10
P	Jisan	Jisanmyun Jindo J.N	Red	20~40
Q	Eunjukam	Dolsanmyun Yeosu J.N	Red	5~10
R	Hyangilam	Dolsanmyun Yeosu J.N	Red	10~30
S	Idong	Idongmyun Namhae K.N§4	Red	7~18
T	Sacheon	Silanmyun Sacheon K.N	Red	4~13
U	Youngsi(Japan)	Japan	Red	2~10
V	Chinese Blue	Chinese Honamseong	Blue	20~25
W	Chinese Red	Chinese Honamseong	Red	16~21

§1 : Chung-Nam province §2 : Jeon-Buk province §3 : Jeon-Nam province §4 : Kyung-Nam province

Table 2. The RAPD primer sequences and polymorphism of PCR products in *Asparagus cochinchinensis* LOUR

Primer	Sequence (5' to 3')	GC content (%)	[§] No. of PCR Products (Band)	No. of Polymorphic Products(Band)	Percentage of Polymorphism (%)
P1	TGCTGCAGGT	60	9(129)	8	88.9
P2	GAACCCTCCA	60	9(150)	6	66.7
P3	AGCGTGTCTG	60	12(140)	11	91.7
P4	AGCGTCCTCC	70	13(196)	7	53.8
P5	ACGACCGACA	60	7(114)	3	42.9
P6	GACGCCACAG	70	9(120)	8	88.9
P7	CTGCGGGTCA	70	7(95)	5	71.4
P8	TAGCAGCTTG	50	2(23)	2	50.0
P9	ACTGACCGGC	70	8(82)	6	75.0
P10	AGCACGGGCA	70	9(119)	7	77.8
Average		64	8.5(116.8)	6.2	72.9

[§]() : Total number of PCR products

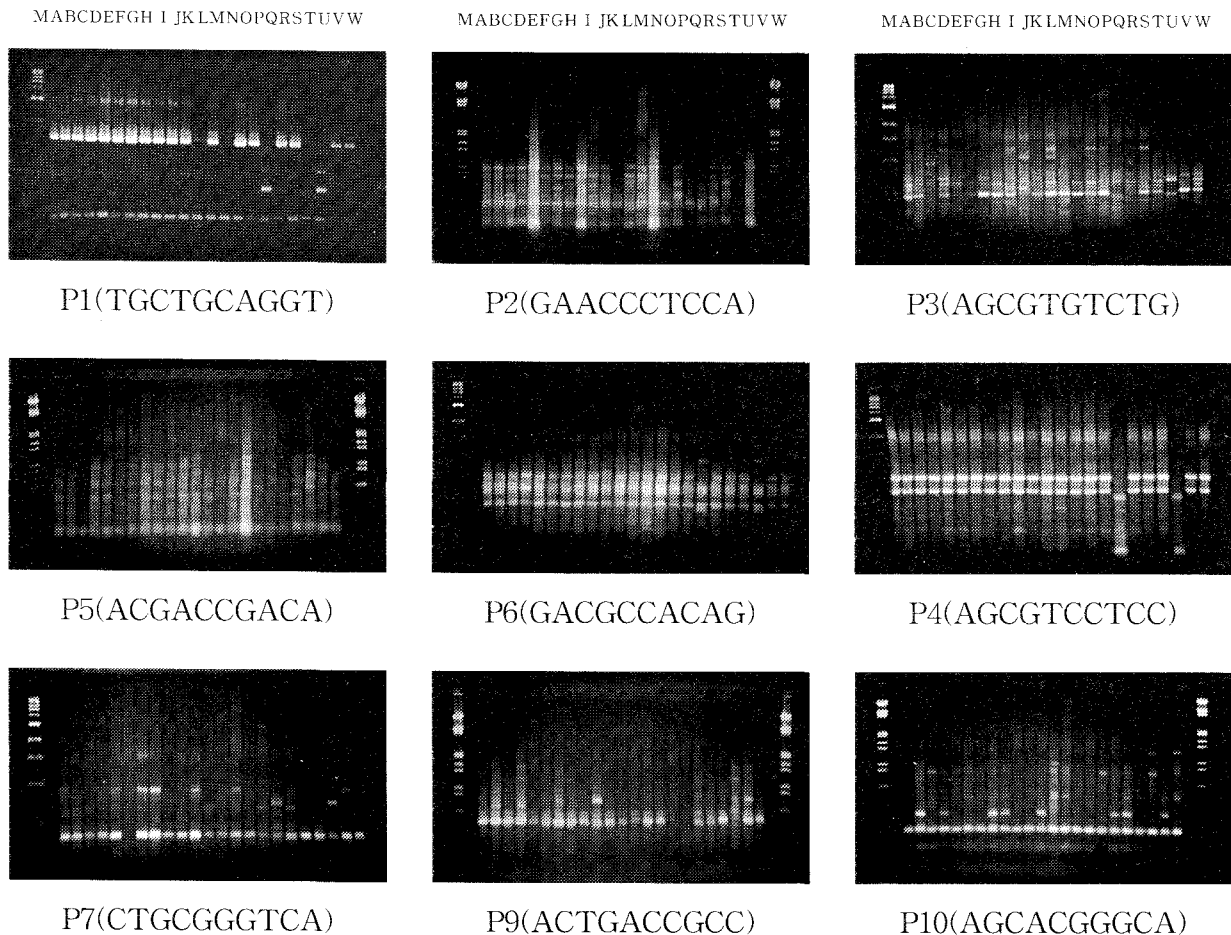


Photo. 1. Profiles of PCR products obtained from genomic DNA of 23 accessions of *Asparagus cochinchinensis* LOUR using primer P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P9, P10, respectively

M : Marker, A : Boryung, B : Seochun, C : Keumma, D : Osikdo, E : Kaeyado Blue F : Kaeyado Red, G : Sunyudo 1, H : Sunyudo Blue, I : Sunyudo Red, J : Kaehwa K : Haseo, L : Wido, M : Asan 1, N : Asan 2, O : Songido, P : Jisan, Q : Eunjukam R : Hyangilam, S : Idong, T : Sacheon, U : Youngsi(Japan), V : Chinese Blue, W : Chinese Red

폭된 PCR 산물은 2.3~0.3kb에서 나타났는데 10개의 primer에서 얻어진 산물이 총 1168개로서 23개 공시재료를 대상으로 primer당 116.8개의 산물이 형성되었다. 다형 현상을 판단할 수 있는 PCR 밴드의 수는 모두 85개가 얻어져 평균 8.5개로서(Table 2) 토마토의 RAPD 분석시 primer당 평균 band 수가 6.5개로 나타나 분석에 충분하였다는 보고(Foolad et al., 1993)와 비교해볼 때 적당한 것으로 판단되었다. Primer별로 얻어진 band의 범위를 보면 2~13개로 범위의 폭이 큰 편이었으나 거의 대부분의 primer가 7~9개의 범위 내에서 band가 형성되어 평균에서 크게 벗어나지는 않았다(Photo. 1).

얻어진 85개의 band를 대상으로 monomorphism과 polymorphism을 구분하여 분석한 결과 polymorphism을 보인 band의 수가 62개로서 전체 밴드의 72.9%를 차지

하여 가시오가피의 57.3%(Kim et al., 1998)지황의 54%(Kim et al., 2000), 용담의 53.7%(Lee et al., 1996)에 비해 월등히 높아 객관적 다형현상 분석이 가능하였다. Primer별 다형현상 정도는 42.9~91.7% 범위에서 형성되었으나 평균에서 크게 이탈하지 않는 안정된 정도를 유지하여 사용된 primer의 효용성이 한쪽으로 치우치지 않음을 알 수 있었다.

RAPD를 통하여 얻은 85개의 band를 code화 한 후 NTSYS-PC program에 의하여 상관계수를 산정하여 dendrogram을 작성하였다(Fig. 1). UPGMA 분석방법에 의하여 산정된 유전적 유사도를 살펴보면 천문동 전체 수집개체들의 유사도는 0.47~0.92로 나타났고 평균은 0.76이었다. 유사도 0.82를 기준으로 23개의 천문동 자생종을 구분해보면 6개의 group으로 분리되었는데 전남 여수의 은적암, 경남 남해 이동, 전북 부안 위도, 전남

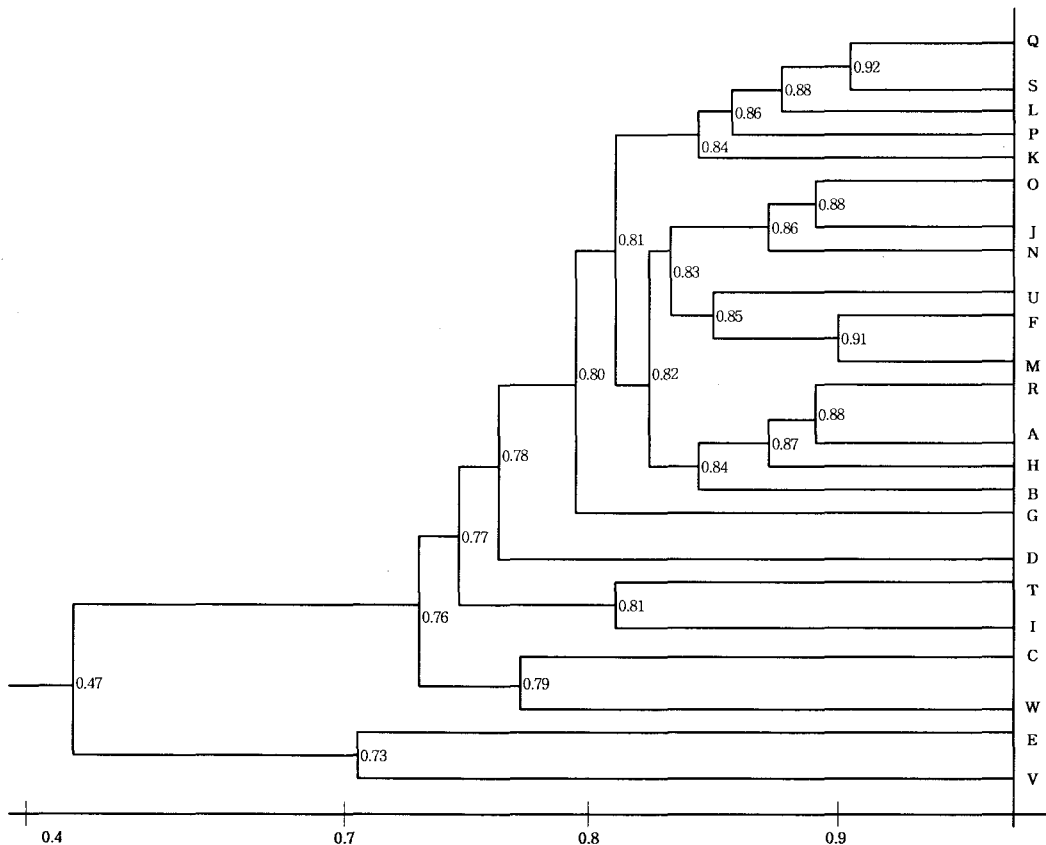


Fig. 1. Dendrogram obtained on the basis of similarity coefficient analysis by UPGMA. twenty three accessions of *Asparagus cochinchinensis* LOUR could be classified into 6 groups at the similarity coefficient value of 0.82 by using 85 RAPD bands.

A : Boryung, B : Seochun, C : Keumma, D : Osikdo, E : Kaeyado Blue, F : Kaeyado Red, G : Sunyudo 1, H : Sunyudo Blue, I : Sunyudo Red, J : Kaehwa, K : Haseo, L : Wido M : Asan 1, N : Asan 2, O : Songido, P : Jisan, Q : Eunjukam, R : Hyangilam, S : Idong T : Sacheon, U : Youngsi(Japan) V : Chinese Blue W : Chinese Red

진도 지산과 전북 부안의 하서종이 group I으로 분리되었으며 유사도는 0.84~0.92 였는데 서해안과 남해안에 걸쳐 골고루 분포하는 특성을 보였고 유전적 유사도는 남해안의 남해와 여수종이 서해안의 위도, 지산, 하서종과 분리되는 특성을 나타내었다.

Group II는 6개의 자생종 및 도입종이 포함되었는데 일본 지역 천문동인 영시 분양종을 제외하고는 제한된 지역인 전남, 북의 서해안 지대에 조밀하게 분포하는 특성을 나타내었다. 자생지역별로 살펴보면 전남 영광 송이도와 전북 부안 계화, 전북 고창 아산 2, 전북 군산 개야도(적경종), 전북 고창 아산 1 그리고 일본 자생 천문동으로 구분할 수 있는데 유전적 유사도는 개야도(적경종)과 아산 1종이 가장 가까웠으며 송이도, 계화, 아산 2종과 개야(적경종), 아산 2, 일본 자생종 등이 유전적 유사도 0.83~0.91의 범위 내에서 다시 분리될 수 있었다. 전남 여수의 향일암, 충남 보령 남포, 전북 군산 선유도 2, 전북 군산 오식도, 충남 서천 서면 등 5 자생종은 group III로 분리되었다. 유전적 유사도는 0.84~0.88로 큰 차이가 나지 않았다. Group IV는 경남 사천 실안 자생종과 전북 군산 옥도 선유도 2(적경종)으로 유전적 유사도는 0.81이었으며 기존 분리 group과는 0.77을 나타내었다. Group V는 전북 익산 금마 자생종과 중국 호남성의 적경종이 포함되었는데 상호 유전적 유사도는 0.79 이었고 기존 분리 group과는 0.76이었다. 이 group에 포함된 천문동 종들은 특이한 특성을 나타내었는데 전북 익산 자생 수집종은 23개의 수집종 중 유일하게 해안지대가 아닌 내륙지역에 분포하였고 바다에 가로막혀 지역적으로 분리되어 있는 중국종과 하나의 group을 형성하였다. Group VI도 또한 중국종(청경종)이 포함되었는데 전북 군산 개야도 자생종(청경종)과 하나의 group으로 나뉘어졌다. 두 종간 유전적 유사도는 0.73 이었으나 기존 group 들과는 0.47로서 유전적으로 완전히 분리된 특성을 나타내었다.

2. BLOTTO 사용효과와 적정 사용농도

천문동의 RAPD 분석시 BLOTTO 첨가효과와 적절한 사용농도 구명을 위하여 지역 자생종인 송이도종과 개야도종을 Template DNA로 하여 random primer를 사용, PCR을 통해 비특이적으로 증폭한 결과는 photo. 2와 같다. 송이도종을 Template DNA로하여 RAPD를 실시한 결과 BLOTTO 무첨가(lane 1)와 6%(lane 6), 8%(lane 7), 10%(lane 8) 첨가 처리에서는 DNA의 증폭이 이루어지지 않았으나 1%(lane 2), 2%(lane 3), 3%(lane 4), 4%(lane 5) 첨가 처리에서는 DNA 증폭현상을 관찰할 수 있었다. BLOTTO 2%와 4% 첨가 처리에서는 각

각 2개의 band가 형성됨을 관찰할 수 있었으나 선명도가 약하였고 3% 첨가 처리에서는 2개의 선명한 band와 하나의 약한 band의 형성을 관찰할 수 있었으나 4개 band 모두 선명한 1% 첨가 처리에 비해서는 선명도 및 band 수에서 떨어지는 결과를 나타내었다.

이러한 경향은 개야도 수집종에서 조금 더 뚜렷하게 나타났는데 BLOTTO 1% 첨가 처리에서 2% 첨가와 같은 6개의 band가 형성되었으나 선명도가 훨씬 강하였고 3% 처리에서는 band 수가 적고 선명도가 약하였으며 8, 10% 처리에서는 DNA의 증폭이 전혀 이루어지지 않았다. 이러한 결과로 보아 천문동 지역 수집종을 대상으로 한 RAPD 분석시 BLOTTO첨가에 의한 PCR 반응 억제 상쇄효과를 뚜렷이 관찰할 수 있었으며 적정처리 농도는 저농도인 1%가 가장 적당함을 확인할 수 있었다.

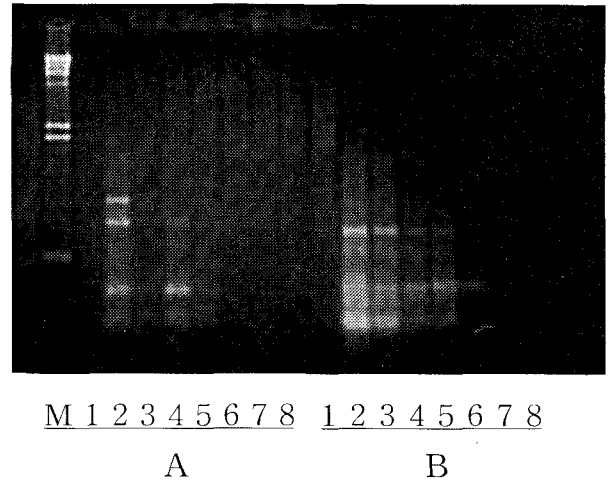


Photo. 2. Attenuation of PCR inhibition by addition of BLOTTO in PCR. BLOTTO was added to the PCR mixture containing a random primer (AGCGTCCTCC) and genomic DNA prepared from Jeonnam Youngkwang Songido(A) and Jeonbuk Kunsan Kaeyado(B).
 M : lamda /HindIII DNA ladder
 Lane 1 : No BLOTTO
 Lane 2~8 : 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10% BLOTTO

고 찰

난과식물인 *Cattleya*속에서 RAPD를 통하여 종의 분화와 형태 진화 및 분자 변화 과정이 구명될 수 있음이 보고(Benner et al., 1995) 된 바 있음에도 불구하고 식물의 도입기원을 유추하려는 시도는 너무 과장된 해석으로 비추어질 가능성이 크다. 자생천문동 21종 및 외국

도입 2종을 대상으로 실시한 RAPD분석 결과를 근거로 천문동의 도입기원 및 전파경로를 해석하려는 시도 역시 무리가 뒤따를 수 있겠으나 차후에 심도 있는 지속적인 연구를 통하여 오류를 수정할 수 있음을 전제로 천문동의 도입기원 및 전파경로에 관한 해석을 나름대로 해보았다. 우선 우리나라에 분포하는 천문동은 크게 두 줄기로 분리할 수 있을 것으로 보인다. 줄기 색이 파란색인 청경종과 붉은색인 적경종으로의 분리가 그것인데 분석종 중에서는 group VI이 청경종이며 이들을 제외한 나머지 group I~V가 적경종이다. Group VI는 중국 청경종과 전북 군산시 개야도 자생종이 포함되어 있는데 다른 group과의 유전적 유사도가 0.47로 원연이어서 자체 group내 유사도가 0.75 이상인 적경종 group들과는 명확하게 분리되는 특징을 보였다. 또 group V와 group VI이 국내 자생종들과 가장 원연인 것으로 보아 국내에서는 가장 먼저 분포하기 시작한 것으로 판단할 수 있고 두 group 모두에 중국종들이 포함되어 있는 것으로 보아 국내 자생 천문동의 기원은 중국으로 볼 수 있다. 따라서 국내 도입지는 중국종과 같은 group인 전북 군산 개야도 지역과 전북 익산 금마지역으로 볼 수 있는데 개야도 지역 자생종인 청경종들은 더 이상 분포지역이 확대되지 않고 일정지역 내에서만 서식하게 되어 유전적으로 고립되어 다른 group들과의 유전적 친밀도가 낮아지게 되었을 것으로 추정되며 적경종인 금마 수집종이 주를 이루어 점차 이동하여 전남·북과 충남의 서해안 일대로 분포지역이 확대되었고 바닷가 조류나 기타 운반수단에 의해 점차 남해안으로 이동한 것으로 추정된다. 또한 이러한 일련의 과정 중 일부가 일본으로까지 전파한 것으로 가정할 수 있다.

적 요

한약재 및 식품으로의 개발가능성이 높지만 현재 멸종 위험에까지 처해있는 천문동의 체계적 보호 및 보존을 위하여 수집된 유전자원의 유전 유연관계 분석을 실시한 결과는 다음과 같다.

1. 수집된 자생 천문동 23종에 대한 RAPD분석을 실시한 결과 primer 당 평균 8.5개의 PCR 밴드가 얻어졌으며 polymorphism 비율이 42.9~91.7% 이었으며 평균 72.9%를 나타내어 객관적 다형 현상 분석이 가능하였다.

2. 유사도 0.82를 기준으로 23개의 천문동 수집종을 구분한 결과 6개의 group으로 분리되었는데 group I은 전남 여수의 은적암, 경남 남해 이동, 전북 부안 위도, 전남 진도 지산과 전북 부안 하서종 이었고 Group II는 전남 영광 송이도와 전북 부안 계화, 전북 고창 아산 2,

전북 군산 개야도(적경종), 전북 고창 아산 1 그리고 일본 자생종 이었으며 group III는 전남 여수의 향일암, 충남 보령 남포, 전북 군산 선유도 1, 전북 군산 선유도 2, 전북 군산 오식도, 충남 서천 서면 자생종, Group IV는 경남 사천종과 전북 군산 선유도 2 적경종이었고 Group V는 전북 익산 금마 자생종과 중국 호남성의 적경종, Group VI는 중국종(청경종)과 군산 개야도 자생종(청경종)으로 각각 나뉘어졌다.

3. BLOTTO 사용에 의한 효율적 유연관계 분석에서는 BLOTTO를 사용할 경우 PCR 효율이 향상되어 band 획득수가 증가하고 좀더 선명한 PCR 산물의 획득이 가능하였으며 적절한 사용농도는 1% 이었다.

LITERATURE CITED

- Benner MS, Brannstein MD and Weisberg MV. 1995. Detection of DNA polymorphism within the genus *Cattelya*(Orchidaceae). *Plant Mol. Biol. Rep.* 13 : 147-155
- Brown AHD 1990. The role of isozyme studies in molecular systematics. *Aust. Syst. Bot.* 3 : 39-46
- De Boer SH, Ward LJ, Lix and Chittaranjan. 1995. Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of BLOTTO. *Nucleic Acids Res.* 23(13) : 2567-2568
- Foolad MR, Jones RA and Rodriguez RL. 1993. RAPD markers for constructing intraspecific tomato genetic maps. *Plant Cell Rep.* 12 : 293-297
- Hwang SK and Kim YM. 2000. A simple and reliable method for preparation of cross-contamination free plant genomic DNA for PCR-based detection of transgenes. *J. Biochem. Mol. Biol.* 33(6) : 537-546
- John ME. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Res.* 20(9) : 2381
- Kim CS, Lee CH, Shin JS, Chung YS and Yung NI. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic cDNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Res.* 25(5) : 1085-1086
- Kim JY, Choi SY, Choo BG, Ryo JH, Kwon TH and Oh DH. 2000. Intraspecific relationship of *Rehmania glutinosa* lines collected from Korea, Japan and China by RAPD analysis. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 8(3) : 266-273
- Kim S, Kim KY, Park MS, Choi SY and Yoon SJ. 1998. Intraspecific relationship of *Eleutherococcus senticosus* MAX. by RAPD markers : *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 6(3) : 165-169
- Kwon SJ, Ahn SN, Shu JP, Hong HC, Kim YK, Hwang HG, Moon HP and Choi HC. 2000. Genetic diversity of Korean native rice varieties. *Korean J. Breed* 32(2) : 186-193.
- Lee HK, Lee MK, Moon CS and Bang JW. 1996. Analysis genetic similarity of *genetiana Scabra* var. *buengeri* by randomly amplified polymorphic DNA. *Korean J. Medicinal*

- Crop Sci. 4(3) : 224-230
- Mukai Y, Suyama Y, Tsumura Y, Kawahara T, Yoshimaru H, Kond T, Tomaru N, Kuramoto N and Murai M. 1995. A linkage map for sugi(*Cryptomeria japonica*) based on RFLP, RAPD and isozyme loci. Theor. Appl. Genet. 90 : 835-840
- Pich V and Schubert I. 1993. Miniprep method for isolation of DNA from plants with a high content of polyphenolics. Nucleic Acids Res. 21(14) : 3328
- Rim YW, Hong BH, Nam JH, Park MW, Ha YW, Park KG and Shin JS. 1995. Detection of barley in Barley×wheat intergeneric hybrids using random amplified polymorphic DNA (RAPD). Korean J. Breed 27(4) : 417-422
- Steiner JJ, Poklemba CJ, Fjellstrom and Elliott LF. 1995. A rapid one tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analysis. Nucleic Acids Res. 23(13) : 2569-2570
- Suh JP, Ahn SN, Moon HP and Suh HS. 1999. QTL analysis of low temperature germinability in a weedy rice. Korean J. Breed 31(3) : 261-267
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA and Tingey SV. 1990. DNA polymorphism amplified arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18 : 6531-6535
- Yang DC, Choi SM, Kang TJ, Lee ME, Song NH and Min BH. 2001. Optimum condition of polymerase chain reaction techniques for randomly amplified polymorphic DNA of strawberry. Korean J. Plant Rws. 14(1) : 65-70
- 박종희, 이정규. 2000. 상용 약용식물 도감. 도서출판 신일상사. p426-427