

RAPD를 이용한 뽕나무속 식물의 유전적 유연관계 분석

성규병 · 남학우 · 구태원
농업과학기술원 잠사곤충부

Phylogenetic Relationships of *Morus* Species on the Basis of RAPD

Gyoo-Byung Sung, Hack-Woo Nam and Tae-Won Goo
Department of Sericulture and Entomology, NIAST, RDA, Suwon 441-100, Korea

ABSTRACT

Phylogenetic relationships among mulberry varieties (*Morus* species) were analyzed on the basis of RAPD in order to identify the possibility of classification for the species. Polymorphisms under RAPD method were compared among 41 mulberry varieties. From the results of RAPD for 41 mulberry varieties by use of 30 different primers, 151 polymorphic bands were formed out of 201 ones. Under the dendrogram based on cluster analysis with the polymorphic bands, the varieties were classified into 7 groups including two large and five small ones on 0.747 value of genetic similarity coefficient. In the large groups 19 and 16 varieties were belong to group I and III, respectively. On the other hand, relatively high genetic similarity was shown among the varieties belonging to the group I, II and III. While, relatively low similarity were done between them in the group IV-VI and the other groups, and Mohusang in the group VII showed the lowest phylogenetic relationship with the other varieties.

Key words : mulberry, RAPD, phylogenetic relationship

서 론

뽕나무는 누에의 유일한 사료이며, 오디 및 잎에 기능성 물질이 많이 포함되어 있는 작물로서 현재 수많은 품종이 전 세계에서 재배되고 있다.

뽕 육종이나 유전적 연구에 있어서 뽕나무의 유전적 특성을 판별하고 분류하는 일은 극히 중요하나, 뽕나무 품종 및 계통의 분리와 동정은 잎이나 新梢의 형태적 또는 생리적 특성에 많이 의존하여 왔다(金, 1982; 堀田, 1951). 그러나 외부 형태적 특성은 재배조건 및 환경에 의해 변할 수 있으며, 또한 관찰자의 경험에 의하여 판단되므로 지속적인 객관성 있는 결과를 얻기 어렵다.

분류의 객관성을 유지하기 위하여 平野(1976, 1980)는 뽕나무 동위효소의 패턴에 종속간의 차이가 있음을 보고하였으나, 동위효소의 패턴은 일반적으로 환경조건에 따라 차이를 나타내지는 않지만 발육단계나 추출에 이용된 조직의 차이에 따라 영향을 받을 수 있는 한계점이 있다.

그러므로 계통간 유연관계를 추론하기 위해서는 형태적 형질에 의한 분류체계를 보완 할 수 있는 객관적인 새로운 기준이 요구된다.

DNA는 재배환경 또는 발육단계나 조직에 따른 영향을 받지 않기 때문에 염기서열이나 다형현상의 분석에 의한 유연관계 해석은 객관성을 유지할 수 있어서 더 많은 신뢰성을 줄 수 있다. 또한 이와 같은 분자생물학적 방법에 기초를 둔 해석은 유전적 유연관계를 나타내는 것으로서 중간 또는 종내 변이정도와 근연관계를 구명하는 데 있어서 매우 중요한 방법인 동시에 유전육종의 기초연구에 효과적으로 활용 할 수 있다.

본 연구는 기존의 형태학적 분류방법을 보완하는 것은 물론, RAPD 분석을 통해 뽕나무 품종 동정의 기준을 확립하고, 품종간의 유전적 유연관계를 분석함으로써 금후 육종의 효율성을 높일 수 있을 것으로 기대하여 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험재료는 농업과학기술원 잠사곤충부(수원시 서둔동 61 소재) 유전자원 보존포에 보존되어 있는 41종의 뽕나무 (*Morus* spp.)를 사용하였으며, 형태적 분류방법에 따라 분

Table 1. List of *Morus* species used for RAPD analysis

Variety	AN*	Variety	AN
<i>Morus alba</i> L.		<i>Morus bombycis</i> K.	
Backasipmunja	23	Hoijinshipdo	1
Buguisang	8	Jajosaeng	20
Bulance	10	Julgogjosaeng	2
Buyungsang	6	Milsungppong	37
Chungilppong	38	Orangchijosaeng	11
Josaenghongpisang	14	Shinkwangppong	29
Juckasipmunja	21	Ssarigol II	41
Kaeryangppong	40	Subongppong	33
Mujeonsipmunja	13	<i>Morus Lhou</i> (SER) K.	
Sangilppong	35	Busangwhan	19
Shinilppong	39	Dearyukppong	32
Sugyeppong	30	Hyungsang	3
Suwonppong	31	Jungyasang	22
Yungchijosaeng	18	Kugsang No. 14	17
<i>Morus bombycis</i> K.		Kugsang No. 15	
Amroidaeyup	12	Kugsang No. 16	7
Bulkusang	25	Kugsang No. 20	16
Busangkeum	4	Kugsang No.21	34
Chungeunsipmunja	28	Yulbon	26
Chungolppong	36	<i>Morus tiliaefolia</i>	
Daejosaeng	24	MAKINO	
Huihag	5	Mohusang	27

*AN means accession number.

류되고 있는 종명을 표 1에 나타내었다.

2. Genomic DNA 분리

잎을 채취하여 유발에 넣고 액체질소로 급속 냉동시킨 상태에서 미세한 분말로 마쇄한 다음, Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit를 이용하여 분리하였다.

3. Random primer

Random arbitrary 10-mer primer는 Bioneer사의 primer 1-83까지를 screening하여 band 발현양상이 양호한 30개를 선발 이용하였는데, 각 primer들의 번호와 sequence는 표 2와 같다.

4. DNA 분리, PCR 반응의 기본조건

RAPD 반응용액은 template DNA 30 ng, primer는 30 pmoles 10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 40mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 250 μM dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 및 1.0 unit Taq DNA polymerase를 넣었으며 총 반응용액량을 20 μl로 하였다.

TaKaRa PCR Thermal cycler MP를 이용하여 처음 DNA 변성을 위해 95°C에서 5분간, 그 후 cycle에서 DNA 변성은 95°C에서 90초, annealing은 35°C에서 60초 및 DNA 합성은 72°C에서 90초로 45 cycle을 실행하였으며 최종 DNA 합성은 72°C에서 300초로 하였다.

Table 2. Nucleotide sequences and GC contents of random primers selected for RAPD analysis of *Morus* species

Primers	Nucleotide sequences	GC content (%)
Bioneer #02	5' CAA TCG CCG T 3'	60
#03	5' AGG GGT CTT G 3'	60
#04	5' TCG GCG ATA G 3'	60
#05	5' GAA ACG GGT G 3'	60
#09	5' GGG TAA CGC C 3'	70
#11	5' GTG ATC GCA C 3'	60
#12	5' TAC AAC GAG G 3'	50
#13	5' GTT TCG CTC C 3'	60
#14	5' TGG ATT GGT C 3'	50
#18	5' TAC CTA AGC G 3'	50
#19	5' GTC CAC ACG G 3'	70
#20	5' GAT CAT AGC G 3'	50
#22	5' GGT ACT CCA C 3'	60
#24	5' TGA CGC GCT C 3'	70
#25	5' CTG GCG GCT G 3'	70
#38	5' GGT CCC TGA C 3'	70
#39	5' ATA CGG CGT C 3'	60
#45	5' CAA ACG TCG G 3'	60
#46	5' TTC CCG GAG C 3'	70
#53	5' GGA AGC AGC T 3'	60
#57	5' GAG CTA TGG C 3'	60
#60	5' CAC AGT GAG C 3'	60
#61	5' GAC CGC TTG T 3'	60
#64	5' CCA CTC ACC G 3'	70
#65	5' ACC GCC TGC T 3'	70
#67	5' GTA GAC CCG T 3'	60
#70	5' GCC ACT CGA A 3'	60
#71	5' AGG GTT CGG T 3'	60
#72	5' CTT AGG GCA C 3'	60
#74	5' CCT CTG ACT G 3'	60

5. 전기영동

각 primer 별로 PCR 반응이 끝난 후 1.2% agarose gel 에서 100 V로 25분간 실시하였다. 전기영동 buffer는 0.5× TAE buffer를 이용하여 1.2% agarose gel에서 100 V로 25 분간 전기영동하였다.

전기영동이 끝난 후 gel은 EtBr(0.5 μg/ml)로 5분간 염색한 후 증류수로 탈색하여 DNA band 양상을 분석하였다.

6. 계통간의 유연관계 분석

계통간의 유연관계 분석은 Gel 상에서 나타난 band를 binary system으로 code화하여 band가 있으면 1, 없으면 0 으로 하였다. 유연관계분석은 NTSYS(Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System)computer Program의 UPGMA(Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic average) clustering 분석방법(Rohlf, 1989)으로 실시하였으며, 그 결과를 토대로 dendrogram을 작성하였다.

결과 및 고찰

1. 뽕나무 품종간 유연관계 분석

가. 유사도 계수에 의한 유연관계

뽕나무 유전변이와 유연관계를 RAPD 방법으로 분석하기 위하여 선발한 30개의 primer를 이용하여, 41 품종에서 분리, 정제한 genomic DNA를 primer종류별로 각각 동일 조건하에서 PCR하여 얻어진 RAPD band 양상의 차이를 품종별로 비교하였다(그림 1).

증폭된 단편은 대부분 그 크기가 200 bp부터 1,000bp의 범위에 있었으나 일부는 2,000bp에 위치하는 것으로 나타났다.

증폭된 band는 201개였으며, 이중 151개에서 다형성 DNA 단편을 얻어 이를 대상으로 band의 유무에 따라 1 또는 0을 대입하여 수치화 하였다. 이렇게 얻어진 결과를 NTSYS 프로그램으로 계통상호간의 유연관계를 나타내는 유사도 계수(Similarity coefficient)를 산출하였으며, 이 값은 개체간의 분자생물학적 유사도로서 그 값이 1에 가까울

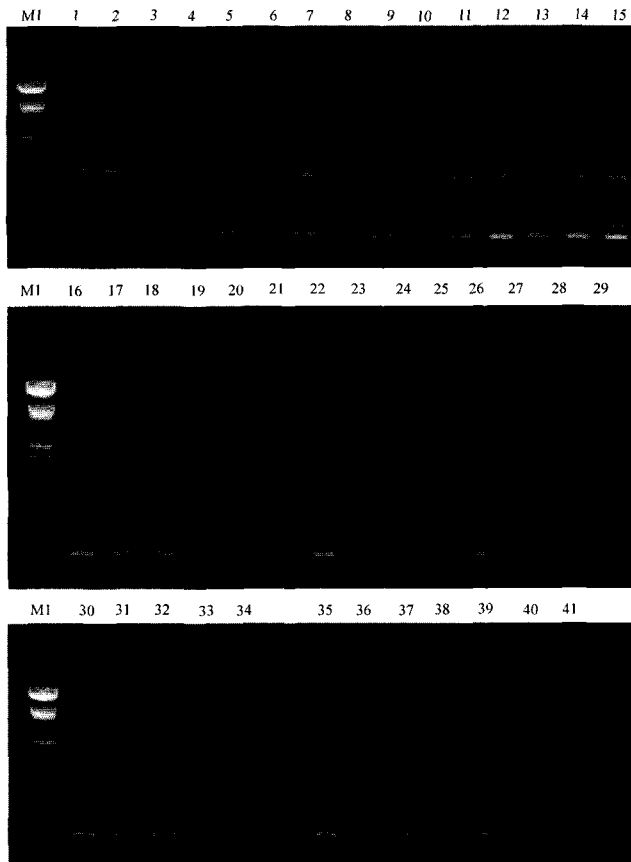


Fig. 1. RAPD profiles generated by primer Bioneer #46 with forty one mulberry varieties. Refer to table 2 for accession number. M1: λ DNA/EcoR I+HindIII marker.

수록 유전적으로 近緣인 관계를 나타내고 반대로 그 수치가 낮아질수록 거리가 먼 것을 나타낸다.

41품종의 유사도 계수 범위는 0.583에서 0.874이었고, 이들 중에서 절곡조생과 부영상 그리고 절곡조생과 불란서간에 가장 높은 0.874로서 나타내어 근연관계를 나타내었으며, 반면, 가장 유사도 계수가 낮은 것은 모후상과 신평뽕 그리고 모후상과 수봉뽕사이에 0.583을 나타내어 유연관계가 가장 먼 것으로 확인되었다. 한편, 수량성, 엽질 등 실용적인 형질이 비슷한 것으로 알려져 있는 청일뽕과 개량뽕에 있어서는 비교적 높은 0.815를 나타내어 유전적으로도 근연관계가 있을 것으로 추정된다.

기존의 분류체계(小泉, 1917)와 비교하면 모후상과 신평뽕 및 수봉뽕이 각각 毛桑系와 山桑系로 다른 군으로 분류한 것과 같이 모상계가 타 품종들과 유연관계가 매우 낮은 것을 확인할 수 있었다. 그러나 가장 가까운 것으로 나타난 절곡조생과 부영상 및 불란서는 각각 山桑系와 白桑系로 다른 군으로 분류한 것과는 일치하지 않고 있다. 이는 모상계 이외의 계통들 간에는 교잡친화성이 높아 자연교잡으로 인하여 유전적으로 균일화가 이루어져 근연관계가 되었을 것으로 추측되어, 외부형태적 성상에 의한 기존 분류방법의 한계성을 암시한다고 볼 수 있으며, 따라서 RAPD 분석에 의한 품종간 유연관계를 새로이 밝혀 보완 수정할 필요가 있다고 본다.

한편 교잡모본과 교잡개체간의 관계를 보면, 신평뽕은 청일뽕과 국상21호의 교잡실생에서 선발한 개체(朴 등, 1983)로서, 신평뽕은 청일뽕과 유사도가 0.788, 그리고 국상21호와는 0.768을 나타내었으며, 같은 모본에서 선발 육성된 상일뽕(朴 등, 1996)은 국상21호와 0.874 그리고 청일뽕과는 0.815를 나타내어 花粉親 및 母樹와 교배개체간에는 유연관계가 비교적 높았으나 신평뽕은 母樹와 더 높은 관계를 나타내어 사과 교배종의 경우 花粉親보다 母樹에 유전적으로 더 가깝다는 보고(예, 1995)와 같은 경향을 나타내었으나 상일뽕은 母樹보다 花粉親과 더 높은 유연관계를 나타낸 것은 상반되는 경향을 보이고 있다. 그러나 유사도 계수는 상호 큰 차이를 나타내지 않아 근연관계일 것으로 추측되며, 이와 같은 교배모본과 개체간의 유전관계는 보다 많은 실험 재료를 분석 검토함으로써 유전성의 변화를 해명할 수 있을 것이다.

나. 집괴분석에 의한 유연관계

유사도 계수를 기초로 NTSYS의 UPGMA(Unweighed Pair-Group Method with Arithmetic Average) 방법으로 집괴분석하여 系統樹를 작성하여 본 결과, 공식 품종들간의 유사도가 큰 차이를 보이지 않았으나, 유사도 0.747에서 19개 품종과 16개 품종이 각각 속해있는 2개의 대분류군과 2 품종이 속하는 1개의 분류군 및 1품종씩 속하는 4개의

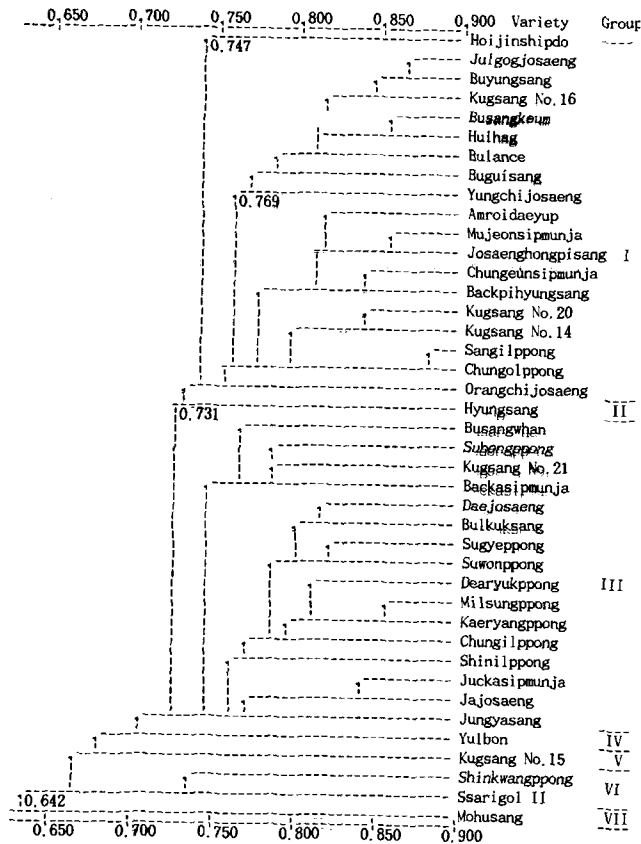


Fig. 2. Dendrogram of phylogenetic relationships based on cluster analysis with polymorphic bands among forty one mulberry varieties. The numbers are phylogenetic similarity coefficients.

소분류군등 모두 7군으로 나눌 수 있었다(그림 2). 이들 품종군중 IV-VII群에 속하는 품종들은 다른 品種群들과 유연관계가 비교적 낮았으며, 특히 단독으로 하나의 군을 형성(VII群)하는 모후상은 유연관계가 매우 낮았다. 한편 I群, II群 및 III群에 속하는 품종들은 유전적 상동성이 비교적 높은 것이 확인되었다.

이와 같은 결과는 peroxidase 등위효소, α -amylase 및 단백질의 주성분분석에 의해 얻어진 band의 cluster 분석결과(平野, 1980)에서 국상21호와 모후상을 제외한 11종의 공시품종들이 비교적 높은 상동성을 나타낸 것과 일치하고 있으나 이 실험의 RAPD 분석결과에서는 국상21호가 다른 분류군들과 유연관계가 비교적 가까운 것으로 나타나 다른 결과를 보였다.

현재의 種分類學에서 種은 서로 교잡하여 얻어진 자연집단으로(Mayer, 1963) 다른 집단으로부터 生殖面에서 격리되어 있는 것이라고 말할 수 있다. 그러나 위에 언급한 뽕나무 계통은 교잡친화성이 높고, 잡종의 稔性도 높은 것으로 알려져 있어(堀田, 1951) 유전적 배경이 매우 좁아 유연관

계가 매우 가까운 상태라고 말할 수 있다. 이와 달리 모후상은 6배체로(平野, 1980) 자연상태에서의 교잡이 어려워 유연관계가 먼 것으로 판단되며, 본 연구에서 RAPD 방법으로 분석하여 품종을 분류하면 계통간이나 모후상 및 일부 품종을 제외한 대부분 품종간에 근연관계가 있는 결과를 나타내고 있다.

유사계수에 의한 품종 분류에 있어서 사과의 경우 유사계수 0.68에서 40개의 품종을 6개의 그룹으로 나눌 수 있다고 하였으며(예 등, 1995), 고추 43계통을 대상으로 한 경우 5개 그룹으로(Kang et al., 1997), 그리고 무궁화의 48품종을 0.5 이상에서 6개의 그룹으로 나눌 수 있다고 하였다. 이와 같이 이 실험결과에서도 RAPD 분석에 의하여 공시한 품종들을 유사도 계수 0.747에서 7그룹으로 구분할 수 있어서 RAPD 분석에 의하여 뽕나무 품종간 유연관계를 밝힐 수 있으며, 분류에 이용될 수 있는 기법인 것으로 판단된다.

摘 要

본 연구에서는 형태적인 특성에 의해 분류가 이루어져, 객관성이 부족한 뽕나무를 대상으로 분자생물학적인 기법을 활용하여 유연관계를 분석하여 뽕나무 품종분류의 기초자료를 얻기 위하여 본 실험을 수행하였다.

30개의 primer를 이용하여 41개의 뽕나무품종에 대하여 RAPD를 수행한 결과 201개의 band를 얻었으며, 이중 151개의 polymorphic band를 집괴분석하여 dendrogram을 작성하였다. 이 계통수에서 유사도 0.747을 기준으로 41개의 공시 계통을 19개 품종과 16품종이 각각 속해있는 2개의 대분류군과 2품종이 속하는 1개의 군 그리고 1품종씩 속하는 4개의 군으로 모두 7개의 분류군으로 나눌 수 있었다.

분류군별 관계를 보면 I군, II군, III군에 속하는 품종들은 유전적 상동성이 비교적 높았으나, IV-VII군에 속하는 품종들은 다른 품종군들과 유연관계가 비교적 낮았으며, 특히 단독으로 하나의 군을 형성(VII群)하는 모후상은 다른 품종군들과의 유연관계가 매우 낮았다.

인용문헌

- 平野 久(1980) クワのタンパク質變異に關する育種學的研究. 蠶試報. 28: 67-186.
- 平野 久, 中島建次(1976) クワ科植物におけるパーオキシダ-ゼアインザイムパターンの種屬間差異. 蠶絲研究. 98: 19-24.
- 堀田 吉(1951) 農學大系作物部門 桑編. 養賢堂, pp. 24-44.
- Kang, B. C., K. T. Kim, D. S. Kim, and D. G. Oh (1997) Random Amplified Polymorphic DNA analysis of Capsicum germ-

RAPD를 이용한 뽕나무속 식물의 유전적 유연관계 분석

- plasm, J. Kor. Horti. Sci. **38**(1): 39-42.
- 金文浹(1982) 栽桑學. 鄉文社, PP 64-67.
- 小泉源一(1917) 桑屬植物考. 蠶試報. **3**: 1-62.
- 朴光駿, 趙將鎬, 李相郁, 南鶴祐(1996) 뽕나무오갈병에 강한 뽕품종 “常一뽕”의 栽培學의 特性. 農業論文集. **38**(2): 793-800.
- 朴光駿, 南鶴祐, 金浩樂, 梁盛烈, 李相郁, 鄭台岩, 金漢俊, 李鍾澤 (1983) 耐倒伏 多收性 뽕 新品種 “新—뽕”. 農試報告(農機·農經·蠶業). **25**: 87-94.
- Rohlf F. J. (1989) NTSYS-pc Numerical Taxnomy and Multivariate Analysis System. Version 1.50 Exter Publ. New York.
- 예병우, 고광출(1995) RAPD 표지를 이용한 사과품종의 분류. 韓園誌. **36**(6): 824-828.