

## RAPD Marker에 의한 호박의 품종간 유연 관계 분석

김창훈 · 이승인 · 유병천 · 송인호 · 권용삼\*

농림부 국립종자관리소 재배시험과

## Assessment of Genetic Relationship among *Curcubitaceae* Cultivars Revealed by RAPD Marker

Chang-Hoon Kim, Seung-In Yi, Byung-Cheon Yu, In-Ho Song and Yong-Sham Kwon\*

Department of Variety Testing, National Seed Management Office, MAF, Suwon, 442-400, Korea

### Abstract

The objective of this study was to assess of genetic variation within and between pumpkin species including *Cucurbita maxima*, *C. moschata*, *C. pepo* and *C. maxima* × *C. moschata* using RAPD markers. The 16 primers showed the amplification of 136 scorable fragments ranging from about 100 bp to 2300 bp. A total of 94 DNA fragments were polymorphic with an average 5.9 polymorphic bands per primer. A species (*C. maxima* × *C. moschata*) has the highest number of polymorphic loci. Based on obtained data, UPGMA cluster analysis was conducted. Twenty pumpkin cultivars were classified into three large categories and identified genetic distance of cluster ranging from 0.38 and 1.00. Clustering was in accordance with the division of *Curcubitaceae* into four species, *C. maxima*, *C. moschata*, *C. pepo* and *C. maxima* × *C. moschata*. Therefore, RAPD method may be essential tool for enabling discrimination of pumpkin cultivars.

**Key words** – *Cucurbitaceae*, Genetic similarity, RAPD, Cluster analysis

### 서 론

호박(*Cucurbita*)의 원산지는 중, 남아메리카이며, 식물학적으로 동양계(*Cucurbita moschata*), 서양계(*C. maxima*), 페포계(*C. pepo*), 믹스타(*C. mixta*) 및 흑종호박(*C. ficifolia*)으로 분류할 수 있으며, 동양계, 서양계, 페포계가 주로 식용으로 이용되어 오고 있다. 채소로서의 가치면에서 볼 때 호박은 그 특성이 서로 유사하기 때문에 일반인에게는 오래 전부터 같은 종으로 취급을 받아온 것이 사실이다. 우리나라

의 경우 동양계와 페포계 호박이 많이 재배되고 있으며, 서양계 호박은 80년대 후반부터 제주도를 비롯한 남부 해안 지방에서 재배하여 일본에 수출하거나, 최근 건강식으로의 가치가 높다는 것이 알려지면서 재배면적은 증가 추세에 있다. 호박의 품종개량은 잡종강세 육종법을 이용하기 때문에 우수한 농업 형질을 가진 양친의 확보가 무엇보다 중요하다. 같은 속이라도 교배친화성이 낮아 한정된 유전자원을 품종 육성에 이용하기 때문에 유전적 근연 관계가 아주 가까운 것으로 알려져 있다[1].

분자생물학의 발달과 더불어 다양한 형태의 DNA marker가 개발되면서 이를 품종의 유연관계 분석에 적극 활용하고 있는데, 호박의 경우, 국외에서는 이미 Random ampli-

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : 031-273-4147, Fax : 031-203-7431  
E-mail : yskwon@seed.go.kr

fied polymorphic DNA (RAPD), Inter simple sequence repeat (ISSR), Amplified fragment length polymorphism (AFLP) marker를 이용하여 다양한 유전자원의 유전적 근연 관계를 구명하였으며[3,7,9], 국내에서도 민간업체서 육성된 호박 품종에 대한 RAPD 분석을 실시한 바 있다[6]. 최근에는 몇몇 선진국에서 품종의 육성자 권리를 보호하는 품종보호 요건인 구별성(distinctness), 균일성(uniformity), 안정성(stability) 등의 판단(DUS-test)에 DNA marker를 활용하는 방안도 논의되고 있다[4]. 실제로 스페인과 영국에서는 밀, 오이, 유채를 대상으로 RAPD와 Simple sequence repeat (SSR) marker를 이용한 DUS test의 적용 가능성을 제시하고 있다[2,8,11].

따라서 본 연구에서는 분자표지인자를 활용하여 국내에서 육성된 호박품종의 유사성 정도를 구명하는데 기초자료를 얻고자, 호박 20품종과 RAPD markers와의 관계를 분석하고 품종간 유전적 유연관계를 분석하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 DNA 분리

본 연구에서는 국내 종묘회사에서 육성된 동양계(*Cucurbita moschata*) 3품종, 서양계(*C. maxima*) 2품종, 페포계(*C. pepo*) 11품종, 토좌류(*C. maxima* × *C. moschata*) 4품종 등 20종의 호박을 대상으로(Table 1), 대상품종의 종자를 50공 플러그 육묘판에 파종하여 20일 정도 육묘한 다음 어린잎을 채취하였다. 공시품종의 어린잎을 액체질소를 이용하여 마쇄하고, Nucleospion® Plant Kit (Cat no. 740.270.540.)의 방법에 준하여 DNA를 분리하였다. 추출된 DNA는  $\mu\text{g}$ 당 40 ng 수준으로 농도를 맞추고 PCR에 이용하였다.

### RAPD 분석

PCR 증폭을 위하여 호박 genomic DNA 40 ng을 template DNA로 이용하였으며, *Taq* DNA polymerase reaction buffer (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 1.5 mM

Table 1. *Cucurbita* cultivars used in this study

Cultivars	Source
Geumtojoa ( <i>C. maxima</i> × <i>C. moschata</i> )	Seminis Korea
Ilmiaehobak ( <i>Cucurbita pepo</i> )	Nongwoo Bio
Danbamhobak ( <i>Cucurbita maxima</i> )	Nongwoo Bio
Jeililjinzucchini ( <i>Cucurbita pepo</i> )	Jeil seed & agricultural products
Hansol ( <i>Cucurbita pepo</i> )	Syngenta
Taegeukae ( <i>Cucurbita moschata</i> )	Hyundae seed & agricultural products
Jangsutojoa ( <i>C. maxima</i> × <i>C. moschata</i> )	Nongwoo Bio
Superggotojoa ( <i>C. maxima</i> × <i>C. moschata</i> )	Nongwoo Bio
Sachulzucchini ( <i>Cucurbita pepo</i> )	Dongbu Hanong Chemicals
Myungaput ( <i>Cucurbita pepo</i> )	Syngenta.
Jeilyeunzucchini ( <i>Cucurbita pepo</i> )	Jeil seed & agricultural products
Saematzucchini ( <i>Cucurbita pepo</i> )	Pyeonghwa seed & agricultural products
Matmulzucchini ( <i>Cucurbita pepo</i> )	Pyeonghwa seed & agricultural products
Meotjin ( <i>Cucurbita pepo</i> )	Seminis Korea
Yeoeuibongzucchini ( <i>Cucurbita pepo</i> )	Syngenta
Shintojoa ( <i>C. maxima</i> × <i>C. moschata</i> )	Dongbu Hanong Chemicals
Jeilae ( <i>Cucurbita moschata</i> )	Jeil seed & agricultural products
Jinsangput ( <i>Cucurbita pepo</i> )	Nongwoo Bio
Aehobak ( <i>Cucurbita moschata</i> )	Seminis Korea
Bamhobak ( <i>Cucurbita maxima</i> )	Seminis Korea

MgCl<sub>2</sub>; 0.01% gelatin; 0.1% Triton X-100)에 0.2 mM의 dNTP mix, 100 pmol의 primer, 그리고 2 units의 Taq DNA polymerase를 첨가하여 실시하였다. 본 연구에서 총 100개의 Operon primer중 다형성을 보이는 16개의 primer를 선발하였으며, primer의 sequence는 Table 2와 같다. PCR은 UNO II Thermocycler (Biometra, Germany)에서 45 cycle을 실시하였으며, denaturation은 94°C에서 30초, annealing은 35°C에서 45초, 그리고 extension을 72°C에서 1분간으로 하여 수행하였다. PCR이 완료된 후 5 µl의 증폭산물을 1 mg/ml 농도의 ethidium bromide가 첨가된 1.5% agarose gel에 150 V에서 30분간 전기영동한 후 UV illuminator에서 polymorphism 여부를 확인하였다.

유연관계 분석

RAPD 분석을 통하여 재현성이 높은 band를 선발하여 다형성 밴드의 유무(dominant marker scoring : present = 1, absent = 0)를 확인한 다음 NTSYS software에 입력하고 simple matching 방법에 의해 유전적 유사도 값을 계산하고 이 값을 기초로 하여 UPGMA[10] 법으로 집괴분석하여 dendrogram을 작성하였다.

Table 2. Primer sequences used for RAPD analysis

Primer name	Sequence(5'-3')	GC content (%)	Tm (°C)
OPB-01	GTTTCGCTCC	60	17.39
OPK-07	AGCGAGCAAG	60	18.84
OPK-10	GTGCAACGTG	60	13.52
OPK-12	TGGCCCTCAC	70	22.06
OPK-16	GAGCGTCGAA	60	18.65
OPK-19	CACAGGCGGA	70	24.23
OPL-03	CCAGCAGCTT	60	18.29
OPL-05	ACGCAGGCAC	70	23.23
OPL-07	AGGCGGGAAT	70	26.45
OPL-08	AGCAGGTGGA	60	16.21
OPL-11	ACGATGAGCC	60	16.11
OPL-14	GTGACAGGCT	60	9.01
OPL-15	AAGAGAGGGG	60	14.61
OPL-16	AGGTTGCAGG	60	17.17
OPL-17	AGCCTGAGCC	70	21.09
OPL-18	ACCACCCACC	70	19.90

결과 및 고찰

RAPD 분석

국내에서 육성된 호박 20품종의 genomic DNA와 random primer를 이용하여 PCR을 수행한 바(Table 3), 다형성이 확실하게 나타난 primer는 16개 였으며 총 136개의 밴드가 관찰되었다. 다형성을 보이는 band는 94개로 나타났고, primer당 5.9개의 밴드를 나타내었다. 그리고 증폭된 DNA 단편의 크기는 0.1~2.3 kb 사이에 위치하였다.

본 연구에서 다형성을 보이는 밴드의 비율이 69.1%로 높았고 primer당 밴드 수도 많이 나타났는데 이는 PCR 분석에 이용된 품종의 유전적 특성이 다양하고 primer의 G+C의 비율이 높기 때문에 나타난 결과라고 사료된다. 또한 Decker-Walters 등[3]은 폐포계 호박을 대상으로 RAPD 분석하였을 때 증폭 size의 크기는 100~2200 bp로 나타난다고 하였는데 본 연구에서도 이와 유사한 경향을 나타내었다.

선발된 16개의 primer와 4개의 호박 품종군(폐포계 11품종, 동양계 3품종, 서양계 2품종, 잡종계 4품종)에 대한 다형성 정도를 조사한 바(Table 4), 폐포계는 24.5%, 동양계 27%,

Table 3. Percent of polymorphic loci in Cucurbita species

Primer	Total number of fragments	Polymorphic bands	
		number	percent
OPB-01	14	11	78.6
OPK-07	10	8	80.0
OPK-10	12	10	83.3
OPK-12	11	7	63.6
OPK-16	5	4	80.0
OPK-19	7	6	85.7
OPL-03	8	6	75.0
OPL-05	5	3	60.0
OPL-07	10	6	60.0
OPL-08	11	6	54.5
OPL-11	9	5	55.6
OPL-14	8	5	62.5
OPL-15	10	5	50.0
OPL-16	4	4	100.0
OPL-17	6	4	66.7
OPL-18	6	4	66.7
Total	136	94	69.1
Average	8.5	5.9	

Table 4. Number of evaluated and polymorphic loci in four *Cucurbita* species

	<i>Cucurbita</i> species			
	<i>C. pepo</i>	<i>C. maxima</i>	<i>C. moschata</i>	<i>C. maxima</i> × <i>C. moschata</i>
Evaluated loci	95	90	100	100
polymorphic loci	23	11	27	35
% of polymorphic loci	24.2	12.2	27.0	35.0

서양계가 12.2%, 잡종계가 35%의 다형성을 나타내었다.

RAPD marker를 이용한 호박의 유연관계 분석에서, Baranek 등[1]은 페포계, 서양계 및 동양계 호박 18 수집종에 대한 RAPD 다형성 정도는 각각 42.5%, 55.9%, 64.1%를 나타내며 품종군에 따라 다형성 정도가 다르다고 하였으며, Ferriol 등[5]은 서양계 호박 8개의 유전자원에 대하여 11개의 primer를 이용하여 PCR 반응시켰을 때 74%의 다형성을 나타낸다고 하였다. 본 연구에서 이용된 품종군의 RAPD 다형성 정도는 12~35%를 나타내어, 호박 품종군에 따라 다형성 정도가 다르게 측면에서 Baranek 등[1]의 연구 결과를 동일한 양상을 보였다. 그러나 Baranek 등[1]과 Ferriol 등[5]의 연구보다 RAPD 다형성 정도가 낮은 양상을 보인 원인은 국내 민간 육종회사에서 육성된 호박 품종

들은 유전적으로 서로 근연 관계인 유전자원을 육종에 활용하고 있기 때문에 나타난 결과라고 생각된다.

유사도 분석

재현성이 나타난 밴드를 대상으로 증폭되는 밴드가 있는 것을 1, 증폭되지 않은 밴드를 0으로 NTSYS 프로그램에 입력하여 호박의 품종간 유사도 정도를 분석한 바(Fig. 1), 20품종의 전체 유사도 지수는 0.38~1.00의 범위로 나타났으며, 유전적 유사도 값 0.70을 기준으로 할 때 총 20개 품종을 3개 군으로 분류할 수 있었다. 제 I 군의 경우 서양계 및 잡종계 호박 6개 품종이 속하였으며, 제 II군은 페포계 호박 11품종이 속하였고, 이들 품종중에서 '말뭍쭈키니'와 '여의봉쭈키니'의 유사도 지수가 1.00으로 두 품종간에 구

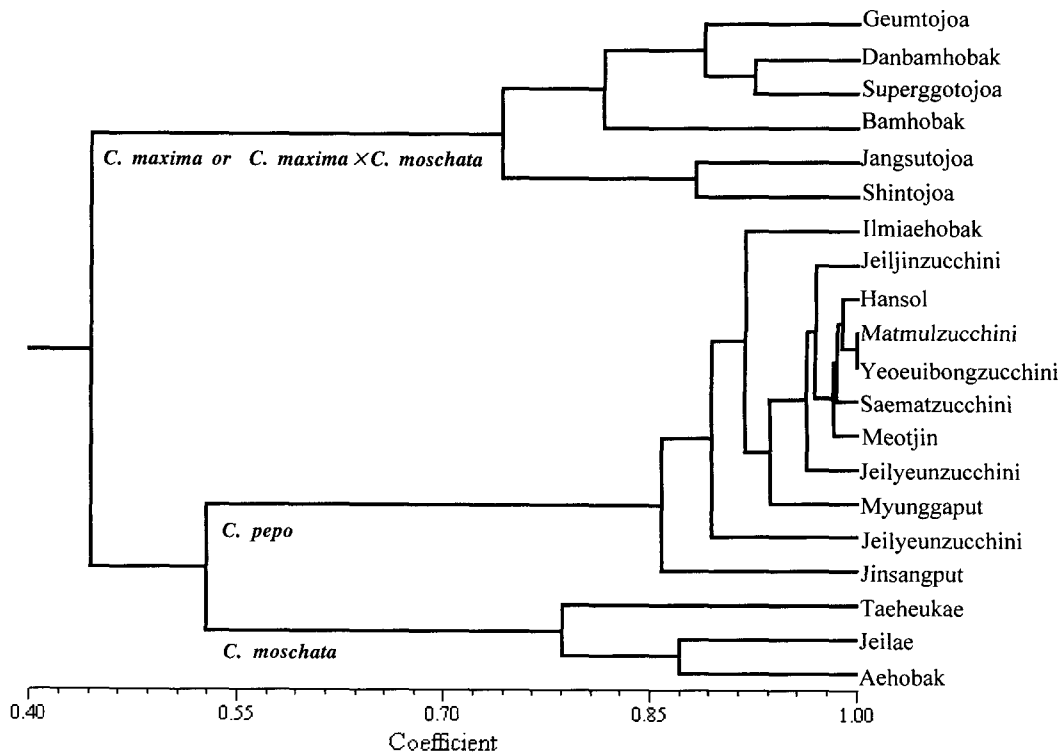


Fig. 1. Dendrogram of 20 cultivars by cluster analysis based on the RAPD markers.

분이 되지 않았으며, '제일진쭈키니', '한솔', '새맛쭈키니', '멋진', '제일연쭈키니'의 유사도가 0.95이상으로 높게 나타났다. 제 III군은 동양계 호박 3품종이 속하였는데 이들 품종간에는 유사도 지수가 0.77~0.87로 나타나, 유전적 거리가 비교적 먼 것으로 분석되었다.

본 연구에서 잡종계 호박의 경우 서양계와 동양계가 교배된 F<sub>1</sub>으로 알려져 있으나 서양계 호박과 같은 군으로 분류되어(Fig. 1), 서양계 호박의 유전형질이 더 많이 포함되어 있는 것으로 추정되었다. 그리고 페포계 호박 10품종 중 '진상풋'을 제외한 나머지 품종들의 유전적 유사도는 0.90 이상으로 나타나 국내에서 육성된 페포계 호박의 육성에는 서로 유사한 유전자원을 이용하고 있음을 추정할 수 있었다.

일반적으로 품종의 유전적 근연관계를 판단하는데는 형태적 특성이나 RAPD, AFLP, SSR 등 다양한 DNA marker를 이용하는데 호박의 경우 식물체 형태에 대한 제반형질을 조사하기 어렵기 때문에, 과형이나 과색 및 종자의 특성만 조사하여 품종을 분류하여 왔기 때문에 이 방법은 품종의 근연관계 분석에 적합하지 않은 것으로 알려져 왔다 [12]. 이러한 방법을 보완하기 위하여 DNA marker가 주로 이용되는데 AFLP나 SSR marker는 co-dominant를 나타내기 때문에 heterozygous 상태를 알 수 있어 호박과 같이 잡종강세 육종법에 의해 육성되는 품종의 유연관계 분석에 효율적일 것으로 알려져 있으나 [9], RAPD의 경우 분석 과정에 소요되는 시간과 경비를 고려할 때 좀더 현실적 방법이라고 사료된다. 앞으로 본 연구에서 선발된 primer를 이용하여 대상품종 수를 확대하고 이들 품종에 대한 형태적 특성조사가 접목된다면 품종간 유사성 정도는 좀더 구체적으로 밝혀질 수 있을 것이며, AFLP나 SSR marker를 이용하여 품종간 유전적 유사도를 분석하여 본 연구의 결과와 비교 검토가 있어야 될 것으로 생각된다.

## 결 론

RAPD markers를 이용하여 호박 20품종간의 유전적 변이 정도를 분석하여 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다. 호박 20품종의 genomic DNA와 primer는 16개를 PCR 반응시킨 결과 총 136개의 밴드 중 94개가 다형성을 보이는 것으로 나타났고, 증폭된 DNA 단편의 크기는 0.1~2.3 kb

사이에 위치하였다. 재현성이 나타난 밴드를 대상으로 증폭되는 밴드가 있는 것을 1, 증폭되지 않은 밴드를 0으로 NTSYS 프로그램에 입력하여 호박의 품종간 유사도 정도는 유사도 지수는 0.38~1.00의 범위로 나타났으며, 유전적 유사도 값 0.70을 기준으로 할 때 총 20개 품종을 3개 군으로 분류할 수 있었다. 이들 3개 군은 호박의 초형, 과실의 형태적 특성과 유사하게 구분됨을 확인할 수 있었다

## 참 고 문 헌

1. Barnek, M., G. Stift, J. Vollmann and T. Lelley. 2000. Genetic diversity within and between the species *Cucurbita pepo*, *C. moschata* and *C. maxima* as revealed by RAPD markers. *Cucurbit Genetics Coop. Rpt.* **23**, 73-77.
2. Bernet, G. P., S. Bramardi, D. Calvache, E. A. Carbonell and M. J. Asins. 2003. Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. *Plant Breeding* **112**, 146-152.
3. Decker-Walters, D. S., J. E. Staub, S. M. Chung, E. Nakata and H. D. Quemada. 2002. Diversity in free-living populations of *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*) as assessed by random amplified polymorphic DNA. *Systematic Botany* **27**, 19-28.
4. Donini, P., R. J. Cooke and J. C. Reeves. 2000. Molecular markers in variety and seed testing. pp. 27-34, In Arenciba, A. D. (ed), *Plant Genetic Engineering : towards the third millennium*, Elsevier Science B. V., Biotechnology, Havana City, Cuba.
5. Ferriol, M., B. Pico and F. Nuez. 2001. Genetic variability in pumpkin (*Cucurbita maxima*) using RAPD markers. *Cucurbit Genetics Coop. Rpt.* **24**, 94-96.
6. Jeon, H. J., C. G. Been, K. H. Hong, Y. H. Om and B. D. Kim. 1994. Identification of *Cucurbitaceae* cultivars by using RAPD markers. *J Kor Soc Hort Sci* **35**, 449-456.
7. Katzir, N., Y. Tadmor, G. Tzuri, E. Leshzeshen, N. Mozes-Daube, Y. Danin-Poleg and H. S. Paris. 2000. Further ISSR and preliminary SSR analysis of relationships among accessions of *Cucurbita pepo*. *Acta Hort* **510**, 433-439.
8. Law, J. R., P. Donini, R. M. D. Koebner, J. C. Reeves and R. J. Cooke. 1998. DNA profiling and plant variety registration. III: The statistical assessment of distinctness in wheat using amplified fragment length

- polymorphisms. *Euphytica* **102**, 335-342.
9. Paris, H. S., N. Yonash, V. Portnoy, N. Mozes-Daube, G. Tzuri and N. Katzir. 2003. Assessment of genetic relationships in *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*) using DNA markers. *Theor Appl Genet* **106**, 971-978.
10. Sneath, P. H. A and R. R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy. San Francisco: W. H. Freeman and Company.
11. Tommasini L., J. Batley, G. M. Arnold, R. J. Cooke, P. Donini, D. Lee, J. R. Law, C. Lowe, C. Moule, M. Trick and K. J. Edwards. 2003. The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theor Appl Genet* **106**, 1091-1101.
12. Wilson, H. D. 1989. Discordant patterns of allozyme and morphological variation in Mexican *Cucurbita*. *Systematic Botany* **14**, 612-623.

(Received May 27, 2003; Accepted September 29, 2003)