

RAPD를 이용한 고추냉이의 유연관계 분석

허수정* · 권순배* · 변학수* · 서정식* · 유기억**†

*강원도 농업기술원, **강원대학교 자연과학대학 생명과학부

Intraspecific Genetic Relation of *Wasabia japonica* Matsum. Based on RAPD Analysis

Su Jeong Heo*, Soon Bae Kwon*, Hak Soo Byeon*, Jeong Sik Seo*, and Ki Oug Yoo**†

*Gangwon Provincial Agricultural Research & Extension Services, Chuncheon 200-939, Korea.

**Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

ABSTRACT : The genetic variation and intraspecific relationships between 10 individuals of seven cultivars and one Ulleungdo native of *Wasabia japonica* were investigated using RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) analysis. The 21 primers out of 50 random primers were amplified for all tested plants. The 68 (47.2%) among 144 bands derived from 21 primers showed polymorphism, and 3.2 bands per primer were observed. Number of bands per primer was ranged from 2 to 13, and average numbers were 6.8. The phenograms for 11 analyzed individuals by RAPD markers were not matched well with those of the result by morphological characters since they were clustered monophyletic at the similarity coefficient value ranged from 0.81 to 0.96. The Ulleungdo native individual was clustered sister to Daruma, Simanesairai, Sawa, and Hujidaruma cultivars. The RAPD markers were not useful to evaluate the intraspecific variations in *Wasabia japonica* cultivars, therefore need to more specific molecular phylogenetic characters such as AFLP technology and gene sequence of nuclear and chloroplast DNA.

Key words : RAPD, DNA polymorphism, cultivar, phenogram, random primer

서 론

고추냉이 (*Wasabia japonica* Matsum.)는 일본이 원산지이며 십자화과에 속하는 다년생 초본식물이다 (이, 1996). 고추냉이 (와사비)는 풍미 (風味), 신미 (辛味), 향미 (香味)를 가지고 있는 고급향신료 작물로, 재배 환경 조건에 따라 물와사비와 발와사비로 구분하며 물와사비는 근경을 이용하고 발와사비는 주로 와사비지 (漬)의 가공 원료로 이용되고 있다 (大塚, 1988). 고추냉이는 근경과 식물체 전체에 독특한 매운 성분을 함유하고 있어 향신료로서 사용될 뿐만 아니라 비타민 C의 산화억제작용, 베타

아밀라제의 활성촉진, 식욕증진, 비타민 B₁ 합성증강, 항균성 등의 효과가 있어 건강식품으로도 각광 받고 있으며, 국내에서도 생선 요리의 섭취에 따른 소비가 급증하고 있고 (Park *et al.*, 1996), 이에 따른 재배면적도 증가하고 있다. 국내에서 발재배 와사비는 주로 전북, 충북, 경북지역을 중심으로, 물재배 와사비는 주로 강원도를 중심으로 재배되고 있으며 (Eun *et al.*, 1996), 가격도 8만원/kg 정도로 높아 고소득작물로 인정받고 있다.

고추냉이에 대한 국내연구는 주로 식물체 재분화 및 대량증식 (Lee *et al.*, 1994; Eun *et al.*, 1995, 1996, 1997, 1998), 변이체 유도 (Park *et al.*, 1996), 재배조건 (Lee

† Corresponding author: (Phone) +82-33-250-8531 (E-mail) yooko@kangwon.ac.kr

Received October 8, 2003 / Accepted January 28, 2004

et al., 1995; 문과 김, 1996), 생육특성 (Choi & Lee, 1995; Lee et al., 1998; Byeon et al., 2002), 광합성과 호흡 (Choi et al., 1995)에 대한 연구가 수행되었으며 품종간 유연관계 분석에 대한 연구는 미비한 실정이다.

고추냉이는 타가수정을 원칙으로 하나 자가수정도 가능한 작물로 수정양식이 복잡한데, 이 때문에 품종명은 원산지인 일본에서도 각각의 산지명을 따라 명명되거나 재배과정 중에서 발견된 것이 많기 때문에 육성과정이 불확실한 것이 많다. 따라서 형태적으로 다른 것이 동일한 품종이 되기도 하고, 형태적으로 같은 것이 다른 품종이 되기도 하여 품종간 유연관계 분석에 대한 연구가 절실히 요구된다 (Byeon et al., 2002). 한편 고추냉이는 반음지성 식물로서 기상환경에 대한 생육반응이 민감하여 재배적지의 선정이 어려워 (이, 1993), 국내 환경에 알맞은 신품종육성이 필요한 것으로 보고되어 있다 (이 등, 1996).

본 연구에서는 국내에 도입되어 재배되거나 국내외에서 육성된 고추냉이 7품종과 울릉도에 자생하는 개체를 포함한 총 11개체를 대상으로 RAPD분석을 실시하여 품종간 유연관계를 밝히고 이 방법이 품종구별에 유용한지를 알아보고, 나아가서는 우리 나라 환경에 맞는 품종육성을 위한 기초자료로 활용하게 하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용한 재료는 국내에 도입되거나 품종으로 육성되어 재배되고 있는 고추냉이 7품종 10개체 (Daruma 품종 4개체, Himenisiki, Hujidaruma, Sayatori, Simanesairai, Simane 3 go, Sawa 품종 각각 1개체)와 울릉도에 자생하는 1개체 등 총 11개체를 대상으로 하였다 (Table 1).

Table 1. Accession list of *Wasabia japonica* cultivars used in this study.

No.	Cultivars	Abbreviation	Sources
1	<i>Wasabia japonica</i> cv. Daruma	DRU	Nagano
2	Daruma (A)	DMA	Geonbuk ARES
3	Daruma (B)	DMB	Geonbuk ARES
4	Daruma (C)	DMC	Geonbuk ARES
5	Himenisiki	HIM	Shizuoka
6	Hujidaruma	HUJ	Nagano
7	Sayatori	SAY	Nagano
8	Simanesairai	SIM	Nagano
9	Simane 3 go	SIM3	Nagano
10	Ulleungdo	ULL	Ulleungdo
11	Sawa	SAW	Shizuoka

2. 방법

가. DNA 추출 및 PCR

DNA 추출은 Doyle & Doyle (1987)법을 따랐으며, 추출한 DNA는 Beckman spectrophotometer로 정량한 후 5 ng/μl로 희석하여 사용하였다. PCR은 Williams et al. (1990)의 방법을 따랐으며 DNA 증폭은 DNA Thermal Cycler (Biometra, Whatman Co.)로 수행하였다. PCR 조건은 94℃에서 1분, 35℃에서 1분, 72℃에서 2분을 하나의 cycle로 하여 45회 반복한 후 72℃에서 10분간 더 유지시켜 주었다. Primer는 Operon사의 random decamer 50종류를 사용하였으며 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel에 전기영동한 후 UV하에서 polaroid camera로 촬영하였다. 분자량 비교를 위한 marker로는 100 bp DNA ladder를 사용하였다.

나. 유연관계분석

촬영된 gel 사진을 근거로 증폭된 밴드를 각각 하나의 운영분류단위 (OTU, operational taxonomic unit)로 보아 data matrix를 작성하였다. 유연관계 분석을 위한 유사도 지수는 Nei & Li (1979)의 방법을 따랐으며, 유집분석은 NTSYS-pc (version 2.02j, Applied Biostatistics, Setauket, New York, USA)를 이용하였고, 비가중산술법 (UPGMA, unweighted pair-group method using arithmetic average)으로 유집하였다.

결과 및 고찰

1. Primer선발 및 전기영동 분석

고추냉이의 유연관계 분석을 위해서 Operon사의

Table 2. List of primers used for the RAPDs analysis by PCR.

No.	Primer	Sequence (5' → 3')	No.	Primer	Sequence (5' → 3')
1	OPA-01	CAG GCC CTT C	12	OPC-15	GAC GGA TCA G
2	OPA-02	TGC CGA GCT G	13	OPC-20	ACT TCG CCA C
3	OPA-03	AGT CAG CCA C	14	OPD-02	GGA CCC AAC C
4	OPA-04	AAT GGG CCT G	15	OPD-03	GTC GCC GTC A
5	OPA-10	GTG ATC GCA G	16	OPD-05	TGA GCG GAC A
6	OPA-13	CAG CAC CCA G	17	OPD-07	TTG GCA CGG G
7	OPA-16	AGC CCA GCG A	18	OPD-08	GTG TGC CCC A
8	OPA-17	GAC CGC TTG T	19	OPD-10	GGT CTA CAC C
9	OPC-05	GAT GAC CGC C	20	OPD-15	CAT CCG TGC T
10	OPC-06	GAA CGG ACT C	21	OPD-18	GAG AGC CAA C
11	OPC-07	GTC CCG ACG A			

random primer (10-mer) 50종류를 이용한 스크린 결과 30종류에서 DNA 증폭 반응을 보였으며, 이중 21 primer 만이 조사된 11개체 전체에서 증폭되었다 (Table 2).

증폭된 random primer의 염기서열 중 guanine (G)과 cytosine (C)의 함량은 PCR 증폭에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데 (Fritsch *et al.*, 1993), 본 연구에서도 분류군 전체에서 증폭이 일어난 21종류의 primer에는 G와 C의 함량이 60% 이상 포함되어 있었다.

증폭된 DNA 단편 크기는 0.1~3.0 kb까지 다양하게 나타났으며 주로 0.5~1.0 kb 사이에 위치하였고, 품종간 동일하거나 서로 다른 밴드 양상을 보였다 (Fig. 1).

분류군 전체에서 반응이 일어난 21 종류의 primer로부터 총 144개의 밴드가 관찰되었으며, 이 중 다형화 (polymorphism)를 보이는 밴드는 68개 (47.2%)로 primer당 평균 3.2개의 다형화 밴드를 보이는 것으로 나타났으며, 나머지 76개 (52.8%)는 동일한 밴드패턴을 보였다. Primer별 밴드 수는 2개 (OPA-16과 OPD-15)에서 13개 (OPC-20과 OPD-03)로 다양하였으며 평균 밴드의 수는 6.8개로 나타났다 (Table 3). 한편 OPD-3은 관찰된 13개 밴드 중 12개 (92.3%)가 다형화 현상을 보여 가장 높은 polymorphism을 보이는 반면, OPA-4, OPD-2, 10, 15, 18 등 5개 primer는 11품종 모두가 monomorphic하게 나타났다.

2. 유연관계분석

21개의 primer를 이용하여 얻은 총 144개 밴드를 이용한 유집분석 결과는 그림 2와 같다. Similarity 값에 의한 11개체의 유사도 값은 0.81~0.96의 범위로 높은 유연관계를 보였다. 유사도값을 이용한 phenogram 작성 결과 본 연구에서 사용한 고추냉이 11종류는 단계통군 (monophyly)

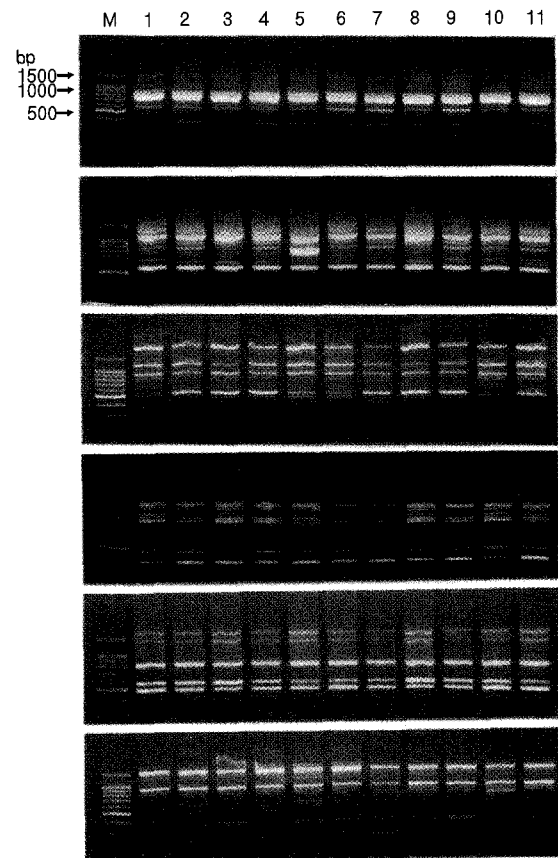


Fig. 1. RAPD profiles of the analyzed plants. The sequence of each primer in OPA-03, OPA-13, OPC-06, OPC-20, OPD-02 and OPD-07 is shown in Table 2. M : DNA marker, 1 : Daruma, 2 : Daruma A, 3 : Daruma B, 4 : Daruma C, 5 : Himenisiki, 6 : Hujidaruma, 7 : Sayatori, 8 : Simanesairai, 9 : Simane 3 go, 10 : Ulleungdo, 11 : Sawa.

Table 3. Number of bands based on RAPD products.

Primer number	bands		Total
	Monomorphic	Polymorphic (%)	
OPA-01	5	2 (28.6)	7
OPA-02	2	3 (60.0)	5
OPA-03	3	0 (0)	3
OPA-04	2	3 (60.0)	5
OPA-10	6	5 (45.5)	11
OPA-13	6	3 (33.3)	9
OPA-16	1	1 (50.0)	2
OPA-17	2	5 (71.4)	7
OPC-05	5	5 (50.0)	10
OPC-06	3	6 (66.7)	9
OPC-07	7	2 (22.2)	9
OPC-15	3	2 (40.0)	5
OPC-20	7	6 (46.2)	13
OPD-02	5	0 (0)	5
OPD-03	1	12 (92.3)	13
OPD-05	2	3 (60.0)	5
OPD-07	2	8 (80.0)	10
OPD-08	2	2 (50.0)	4
OPD-10	4	0 (0)	4
OPD-15	2	0 (0)	2
OPD-18	6	0 (0)	6
Total	76	68 (47.3)	144

으로 나타났다. 달마 (DRU)와 시마네재래 (SIM)는 조사된 11분류군 중 유사도 0.96에서 유집되어 유연관계가 가장 높게 나타났다. 일본에서 재배되고 있는 사야토리 (SAY)와 히메니시키 (HIM)는 다른 9개체와는 유사도 0.83이하에서 유집되어 유연관계가 가장 멀게 나타났으며, 사와 (SAW) 품종은 시마네재래 (SIM)와 달마 (DRU)와 함께 유집되어 나타났다. 국내에서 선발된 달마 계통의 재배종들은 서로 유집되지 않고 오히려 다른 품종들과 유집되는 경향을 보였으며 일본에서 재배되는 후지 달마 (HUJ) 역시 달마 품종의 4개체, 시마네재래 (SIM), 시마네3호 (SIM3), 사와 (SAW) 품종들을 위한 자매군으로 유집되었다. 달마 계통들은 일본에서 약 40여년간 재배된 대표적인 고추냉이로 1967년경부터는 급속히 퇴화되어 현재에는 원종에 가까운 계통들도 거의 없어진 종류로 현재에는 일부 품종의 계통으로 추측되는 개체들이 많이 알려져 있는데 (이와 안, 1995) 본 연구에서 사용한 4개체들도 품종내 유연관계가 명확하지 않았다. 시마네재래 (SIM)는 영양번식용 품종으로 일본의 시마네현 (島根縣)에서 주로 재배되던 종류이며 신미와 점도가 강하고 특히

단맛이 강한 품종으로 알려져 있으며, 시마네3호 (SIM3)는 시마네재래 (SIM)와 반원 (半原)의 자연교배로 생긴 실생고추냉이에서 선발 육성된 품종으로 영양번식 뿐만 아니라 실생번식용으로도 재배되는 품종으로 근경의 색깔이나 맛 등은 시마네재래 (SIM)와 비슷한 특징을 가지고 있으나 (이와 안, 1995) RAPD에 의한 유집결과는 두 품종이 각각 달마A (DMA)와 달마 (DRU)에 유집되어 나타났다. 울릉도의 계곡 습지에 군락을 이루고 있는 국내 자생종은 1920년대에 일본인에 의해 시험재배 되었다가 해방과 더불어 재배가 중단된 후 자연상태로 방치되어 현재의 군락을 이루고 있다고 인정되고 있는데, 본 연구에서 울릉도에 자생하는 개체와는 뚜렷하게 유집되는 품종 없이 사야토리 (SAY)와 히메니시키 (HIM)를 제외한 나머지 8개체들을 위한 자매군 (sister group)을 형성하였다. 따라서 울릉도 개체는 국내에 재배되고 있는 근연 품종들과 형태적으로도 차이가 없고 RAPD에 의한 결과에서도 뚜렷하게 유집되는 품종이 없어 예전부터 재배되던 종류의 일부가 현재까지 남아있는 것으로 추측된다.

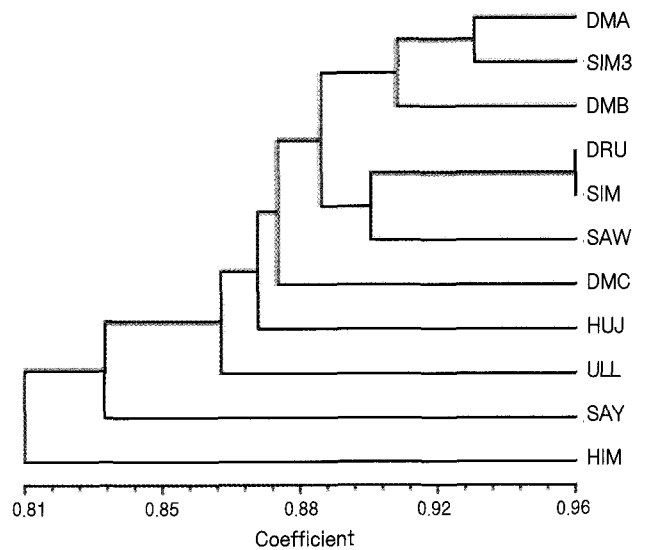


Fig. 2. Phenogram for 11 *Wasabia japonica* accessions based on analysis of PCR amplified fragments produced by 21 arbitrary 10-mer RAPD primers. (Notes) DRU (Daruma), DMA (Daruma A), DMB (Daruma B), DMC (Daruma C), HIM (Himenesiki), HUJ (Hujidaruma), SAY (Sayatori), SIM (Simanesairai), SIM3 (Simane 3 go), ULL (Ulleungdo), SAW (Sawa).

이상의 결과에서 고추냉이 11종류는 단계통군 (monophyly)을 형성하는 것으로 보아 유전적으로는 매우 가깝게 나타

났지만 품종간/내 형태적으로 유사한 종류들은 서로 유집되지 않는 것으로 나타났다. 일반적으로 고추냉이는 잡종성이 강하여 채종한 후 실생묘를 육성하면 여러 가지 형질이 다른 변이체가 나타나므로 교잡종의 우량한 성질을 유지할 수 없는 것으로 알려져 있는데 (Nakamura & Sathiyamoorthy, 1990), 본 연구에 사용된 재료 역시 재배기간 동안 많은 교잡과정이 있었던 것으로 추측된다. 또한 형태적으로는 근경이나 잎의 특징에 의해 품종간 구별이 명확하나 DNA분석에 의해서는 뚜렷한 경향을 찾을 수가 없어 RAPD법은 고추냉이의 품종 유연관계분석을 위한 방법으로 유용하지 않은 것으로 나타났다. 따라서 보다 정확한 품종별 계통유연관계 분석을 위해서는 AFLP분석이나 진화속도가 빠르고 계통분석에 용이한 유전자로 알려져 있는 핵DNA의 ITS region이나 엽록체 DNA의 *ndhF*, *matK* coding gene의 sequence를 비교하는 등 보다 정밀한 분자계통학적 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

적 요

국내에서 육성 또는 외국에서 도입되어 재배되고 있는 고추냉이 (*Wasabia japonica* Matsum.) 7품종의 10개체와 울릉도 자생 1개체, 총 11개체에 대한 유연관계 분석을 위하여 RAPD분석을 실시하였다. RAPD분석에 사용한 random primer는 총 50종류였으며 screen 결과 21종류만이 11품종 전체에서 반응을 보였다. 21종류의 primer로부터 관찰된 밴드는 총 144개였으며 이중 다형화 (polymorphism)를 보이는 밴드는 68개 (47.2%)로 primer 한 개당 평균 3.2개의 다형화 밴드를 보였다. Primer별 밴드의 수는 2~13개로 다양하게 나타났고 평균 밴드의 수는 6.8개였다. 유집분석 결과 phenogram은 유사도지수 0.81~0.96의 높은 범위 내에서 11개체들이 단계통군으로 유집되었으나 품종내 개체간에는 뚜렷하게 유집되지 않았다. 울릉도에 자생하는 개체의 경우는 Sayatori와 Himenisiki 품종을 제외한 나머지 8개체를 위한 자매군으로 유집되었다. 이러한 결과는 neighbor-joining 분석에서도 같은 경향을 보였다. 따라서 고추냉이의 종내 유연관계 분석을 위한 방법으로 RAPD법은 유용하지 않은 것으로 나타났으며 좀더 정확한 유연관계분석을 위해서는 AFLP방법이나 계통분류에 널리 이용되는 핵, 엽록체 DNA의 유전자 염기서열 비교와 같은 정밀한 분자계통학적 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

LITERATURE CITED

- Byeon HS, Heo SJ, Lim SJ, Seo JS (2002) Variation of growth and allylthiocyanate contents of *Wasabia japonica* Matsum. cultivar. Korean J. Medicinal Crop Sci. 10(3):181-184.
- Choi SY, Lee KS (1995) Effect of plant growth regulators on the germination and seedling growth of *Wasabia japonica* Matsum. seeds. Korean J. Medicinal Crop Sci. 3(2):111-115.
- Choi SY, Lee KS, Eun JS (1995) Effect of temperature, light intensity and CO₂ concentration on photosynthesis and respiration of *Wasabia japonica* Matsum. Korean J. Medicinal Crop Sci. 3(2):181-186.
- Doyle JJ, Doyle JS (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19:11-15.
- Eun JS, Ko JA, Kim YS, Kim MJ (1995) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryo culture of *Wasabia japonica* Matsum. Korean J. Plant Culture 22(4):207-211.
- Eun JS, Ko JA, Kim YS (1996) Propagation by means of somatic embryogenesis from immature embryo of *Wasabia japonica*. Korean J. Breed. 28(1):21-28.
- Eun JS, Ko JA, Kim YS, Kim MJ (1997) Micropropagation by apical meristem culture of *Wasabia japonica* Matsum. Korean J. Plant Culture 24(1):43-48.
- Eun JS, Ko JA, Kim YS (1998) Mass propagation of *Wasabia japonica* by apical meristem culture. J. Korean Soc. Hort. Sci. 39(3):278-282.
- Fritsch P, Hanson MA, Spore CD, Pack PE, Reisberg LH (1993) Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related of flowering plants. Plant Mol. Bio. 11:10-20.
- Lee SW, Lee BH, Lee JI, Kim YH (1994) Multiplication by *in vitro* culture of axillary bud in *Wasabia japonica* Matsum. RDA J. Agri. Sci. 36(1):186-190.
- Lee SW, Kang CH, Lee JI, Hur HS, Lee BH, Choi IS (1995) Rhizome yield and growth characteristics of *Wasabia japonica* Matsum. by culturing condition. RDA J. Agri. Sci. 37(1):110-116.
- Lee SW, Park CH, Kim SD, Choi KG (1998) Flowering characteristics and optimal harvest time in *Wasabia japonica* Matsum. Korean J. Medicinal Crop Sci. 6(3):227-231.
- Nakamura S, Sathiyamoorthy P (1990) Germination of *Wasabia japonica* Matsum. seeds. J. Japan Soc. Hort. Sci. 59:573-577.
- Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76:5269-5273.
- Park KI, Yoon MJ, Kwon SW, Choi SY, Lee KS (1996) Effects of colchicine and EMS on induction of variants in *Wasabia japonica* Matsum. Korean J. Medicinal Crop Sci. 4(1):12-18.
- Williams JGK, Kubelik ARK, Livak J, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18:6531-6535.
- 문정섭, 김동원 (1996) 고추냉이 재배기술 확립연구. 전북농촌진흥원 시험연구보고서 p. 123-130.
- 이봉호 (1993) 향신료작물 고추냉이의 특성과 재배기술. 연구와 지도. 34(2):50-55.
- 이성우, 안병욱 (1995) 고추냉이(와사비)재배법-일본의 고추냉이 재배법과 국내 연구 결과 소개. 사단법인 농진회.
- 이성우, 김석동, 박장환 (1996) 특수용도작물 품종개량 및 재배기술 개발연구. 작물시험장 시험연구보고서. p. 234-239.
- 이우철 (1996) 원색한국기준식물도감. 아카데미서적. p. 142.
- 大塚壽夫 (1988) ワサビの増殖法. 農業および園藝. 63:185-189.