

RAPD 방법을 이용한 고추나물의 유연관계분석

김선희* · 김응식** · 김성호** · 안준철*** · 황 백*†

*전남대학교 생물학과, **서남대학교 생명과학과

Analysis of Genetic Relationships in *Hypericum erectum* Thunb. by RAPD

Sun Hee Kim*, Eung Sik Kim**, Sung Ho Kim**, Jun Cheul Ahn***, and Baik Hwang*†

*Department of Biology, Chonnam National University, Gwanju 500-757, Korea.

**Department of Life Sciences, Seonam University, Namwon 590-170, Korea.

ABSTRACT : The genetic relationships of *Hypericum erectum*, *H. ascyron* and *H. perforatum* Thunb. by RAPD using total 46 primers were analysed 30 primers among primers tested showed the amplification band in all. The amplified DNA fragment ranged from 0.25 to 6.6 kb in size. The 411 bands (34.4%) among 1194 bands derived from 30 primers were polymorphic, and 13.7 bands per primer were observed. The phenograms for six analyzed individuals by RAPD markers were not matched well with those of the result by morphological characters. They were clustered monophyletic at the similarity coefficient value ranged from 0.24 to 0.96.

Key words : *Hypericum erectum* Thunb., RAPD, phenograms, morphological characters

서 언

고추나물 속 식물은 세계에 약 300종이 분포하고 있고, 우리나라에는 약 12종이 자라며 초본 또는 관목(灌木)으로 대부분이 북반구에 분포하는 것으로 알려져 있다 (Park *et al.*, 2000). 잎은 대생(對生)하고 대개 엽병(葉柄)이 없으며 가장 자리는 밋밋하고 선점이 있다는 특징이 있다 (김, 1999). 물레나물과 식물로는 물레나물 (*Hypericum ascyron*), 큰물레나물 (*H. ascyron* var. *longistylum*), 좁고추나물 (*H. laxum*), 진주 고추나물 (*H. oliganthum*), 애기고추나물 (*H. japonicum*), 채 고추나물 (*H. attenuatum*), 큰고추나물 (*H. confertissimum*) 등이 우리나라에 자생하고 있다. 고추나물 중에 키가 작고 잎이 선상 타원형이며 밑부분에서 총생(叢生)하는 것을 다복고추나물 (*H. caespitosum*)이라고 한다 (김, 1999). 고추나물과 유사한 종으로 서양에서는 St. John's wort (*H. perforatum* Thunb.)가 알려져 있다. 성 요한의 풀이라고도 불리는 St. John's wort는 고대부터 우울증을 포함한 여러 질병들을 치료하기 위한 약초로 쓰여 온 식물로 유럽, 아시아, 북부 아프리카, 북아메리카 등지에 널리 분포되어 있다 (Mulinacci *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 2002). 이 약용 식물은 연간 시장이 미국에서만 2억 1천만 달러, 그리고 전 세계적으로 5억 7천만

달러가 넘는 중요 식물 자원이다. 고추나물에 들어있는 hypericin, pseudohypericin, hyperforin 성분 등은 antidepression에 큰 효과가 있을 뿐만 아니라, 뇌질환, 신장질환, 항암, 항바이러스, 항박테리아 효과 등도 입증되고 있으며, 최근에는 체중감소를 위한 보조식품으로도 그 가능성이 시사되고 있다 (Park *et al.*, 2000). 또 에이즈에 대항할 수 있고, 화상과 자상도 제거하는 것으로 알려져 있다. 식물 유전 자원의 평가 및 분류에 있어서 최근에는 분자 유전학적인 방법이 각광을 받으면서 isozyme, RFLP, SSR, AFLP 마커들을 이용한 실험이 행해지고 있다. 그러나 이와 같은 방법들은 방법에 따라 다형성 정도가 떨어지거나, 동위원소를 사용하는 번거로움이 있거나, 복잡한 염기 서열과 관련된 보다 깊은 생화학적인 지식과 많은 시간이 요구되는 단점을 가지고 있다 (Lee *et al.*, 2003). 그러나 random primer를 사용한 random amplified polymorphic DNAs (RAPD) 분석은 다른 방법들에 비해 그 다지 효율성이 낮지 않으면서도 쉽게 이용할 수 있고, 소요시간이 짧으며, 적은 양의 DNA 시료로 분석이 가능하다는 장점이 있다 (Kim *et al.*, 2003). 그래서 RAPD 분석법은 이미 유전자원의 평가, 유용 유전 형질을 탐지할 수 있는 표지인자 개발, 유전자 연관지도 작성, 유연관계 비교 및 감별 등에 폭넓게 이용되고 있다 (Kim *et al.*, 2003).

†Corresponding authors: (Phone) +82-62-530-3392 (E-mail) bhwang@chonnam.ac.kr, jcahn@seonam.ac.kr
Received February 1, 2005 / Accepted July 31, 2005

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

No.	Cultivars	Sources
1	<i>Hypericum erectum</i>	Mt. Ji-li 500 m
2	<i>Hypericum erectum</i>	Mt. Ji-li 1000 m
3	<i>Hypericum erectum</i>	Mt. Ji-ri 1300 m
4	<i>Hypericum erectum</i>	Mt. Byoung-pung 200 m
5	<i>Hypericum ascyron</i>	<i>In vitro</i> culture
6	<i>Hypericum perforatum</i>	<i>In vitro</i> culture

Arnholdt-Schmitt (2000)는 이러한 RAPD 방법을 이용해 St. John's wort 개체들 간의 유전적 근연성을 조사한 실험을 수행하였다.

본 연구의 목적은 광주 근교인 지리산과 병풍산에 자생하며 hypericin을 다량 함유한 고추나물을 가지고 RAPD 분석을 함으로써 지리적 차이에 의한 유전적 차이 유무를 규명하고자 하였고, 또 동일 과 (科)에 속하는 물레나물, St. John's wort 와의 비교를 통해 유전적인 다양성과 계통간의 근연성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료

RAPD 분석에 사용된 실험재료는 지리산과 병풍산에 자생하고 있는 고추나물을 2003년 6월과 8월 사이에 채집하여 사용하였고, 고추나물과의 비교를 위한 St. John's wort와 물레나물은 기내 배양한 것을 사용하였다. 물레나물 종자는 2002년 병풍산에서 채집하여 70% ethanol에 수 초간 침지하고, 2% sodium hypochlorite 용액으로 3분간 표면 살균하여 멸균수로 3-4회 세척한 후, 기내에서 무균 발아시켜, MS 배지 (Murashige & Shoog, 1962)에서 광조건 $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 광주기 16/8 h, 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 배양 중인 식물체를 사용하였다. St. John's wort는 2002년 아시아 종묘사에서 종자를 수입하여 물레나물과 동일한 방법으로 표면 살균하여 무균 발아시킨 식물체를 사용하였다 (Table 1).

2. RAPD 분석

가. Genomic DNA 분리

DNA는 지리산에서 채집한 고추나물과 기내 배양 중인 병풍산 고추나물, 물레나물, St. John's wort에서 추출하였다. 각 샘플들의 잎 0.2 g을 채취하고 액체 질소를 막자사발에 넣은 다음 고운 분말이 될 때까지 갈았다. DNA 추출은 DNeasy plant Mini kit (Qiagen)를 이용하여 설명서에 따라 수행하였다 (Kim *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2002). 추출한 genomic DNA는 0.8% agarose gel에 6X loading dye (40% sucrose, 0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bromophenol blue)를 혼합하여 100 V에서 30분 정도 전기영동한 후 EtBr 존재 하에서 단일 밴드 생성여부를 확인하였다.

나. Primer 선발 및 PCR

RAPD 분석을 위한 primer는 Arnholdt-Schmitt (2000)의 paper를 참고하여 6개의 primer (001, 006, 020, 025, 026, 029)를 Jenotech에 주문·제작하였고 Operon Technologies Inc.의 20개 random primer (10 mer)와 Bioneer co.의 random primer 20개를 사용하여 총 46개의 primer로 PCR을 수행하였다 (Lee *et al.*, 2002). PCR은 GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems)을 사용하였고, RAPD를 위한 PCR 반응은 pre-denaturation 95°C 5분, 1 cycle 후, denaturation 95°C 1분, annealing 36°C 1분, extension 72°C 2분으로 총 45 cycle을 시행하였으며 post-extension은 72°C 에서 10분 동안 수행하였다. 증폭된 DNA는 EtBr 존재 하에 1.5% Agarose gel에서 전기영동 후 반응물은 UV광선 하에서 사진 촬영하여 분석에 사용하였다 (Yoo *et al.*, 2003).

다. 유연 관계 분석

RAPD 분석 결과 다형성을 나타내는 밴드의 유무에 따라 1 또는 0의 수치로 전환시킨 후 각각 하나의 운영 분류 단위 (OTU, operational taxonomic unit)로 하여 기초 자료 행렬 (data matrix)을 작성하였다. 유연관계 분석은 Jaccard coefficient 계산법에 따라 유사도 지수를 계산한 후 NTSYS-PC 프로그램을 사용하여 비가중 산술 결합법 (UPGMA, unweighted pair-group method using arithmetic average)으로 유집 분석하였다 (Yoo and Jang, 2003).

결과 및 고찰

1. 물레나물 속 식물의 유연관계 분석

고추나물에서 최적의 PCR 증폭 조건을 확립하기 위해서 template DNA, primer, dNTP 및 *Taq* DNA polymerase의 농도를 달리하여 증폭하였다. 그 결과, 고추나물의 최적 DNA 증폭은 template DNA 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, primer 500 nM, dNTP 0.25 mM 및 *Taq* DNA polymerase 0.5 unit에서 가장 안정적이고 재현성 있는 결과를 얻을 수 있는 것으로 나타났다 (Choi *et al.*, 2003; Arnholdt-Schmitt, 2000). 위의 조건으로 유연관계 분석에 사용할 임의 프라이머 선발을 위하여 Operon co.에 제작·주문한 프라이머 26개와 Bioneer co.의 random primer (10-mer) 20개를 스크리닝하여 증폭된 밴드의 수가 많고 선명한 프라이머 30개를 선발하였다 (Table 2).

선발한 30개의 프라이머를 이용해서 물레나물 속 식물 3종 6개체를 대상으로 RAPD 분석을 한 결과, 다형성을 보이는 밴드가 증폭되었다 (Table 3). 증폭된 random primer의 염기서열 중 guanine (G)과 cytosine (C)의 함량은 PCR 증폭에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데 (Fritsch *et al.*, 1993; Heo *et al.*, 2004), 본 연구에서도 분류군 전체에서 증폭이 일어난 30종류의 primer에서는 G와 C의 함량이 50% 이상 포

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

No.	Primer	Sequence (5'→3')	No.	Primer	Sequence (5'→3')
1	OP001	GGT GCG GGA A	16	OPA18	AGG TGA CCG T
2	OP006	CCC GTC AGC A	17	OPA19	CAA ACG TCG G
3	OP025	TGA GCG GAC A	18	R 01	CAG GCC CTT C
4	OP026	ACC TGA ACG G	19	R 02	CAA TCG CCG T
5	OPA02	TGC CGA GCT G	20	R 03	AGG GGT CTT G
6	OPA04	AAT CGG GCT G	21	R 08	TCC GCT CTG G
7	OPA05	AGG GGT CTT G	22	R 09	GGG TAA CGC C
8	OPA06	GGT CCC TGA C	23	R 11	GTG ATC GCA G
9	OPA07	GAA ACG GGT G	24	R 12	TAC AAC GAG G
10	OPA10	GTG ATC GCA G	25	R 13	GTT TCG CTC C
11	OPA11	CAA TCG CCG T	26	R 15	GGA CTG GAG T
12	OPA12	TCG GCG ATA G	27	R 16	TCG GTC ATA G
13	OPA13	CAG CAC CCA C	28	R 17	TGC TCT GCC C
14	OPA15	TTC CGA ACC C	29	R 19	GTC CAC ACG G
15	OPA16	AGC CAG CGA A	30	R 20	GAT CAT AGC G

OP001~026 : primer of produced in Jenotech OPA02~19 : primer of produced in Operon Technologies Inc R 01~20 : primer of produced in Bioneer.

Table 3. Number of bands and G + C contents based on RAPD products G + C content was showed more 50% in all primer

Primer number	Bands		G+C contents(%)
	Polymorphic	Total	
OP-001	10	27	70
OP-006	15	39	70
OP-025	7	31	60
OP-026	10	17	60
OPA-02	3	42	70
OPA-04	23	44	60
OPA-05	15	58	60
OPA-06	12	42	70
OPA-07	16	45	60
OPA-10	9	38	60
OPA-11	21	52	60
OPA-12	7	40	60
OPA-13	9	44	70
OPA-15	17	31	60
OPA-16	9	53	60
OPA-18	3	31	60
OPA-19	17	29	60
R-01	15	20	70
R-02	19	39	60
R-03	24	61	60
R-08	18	34	70
R-09	21	53	70
R-11	12	45	60
R-12	14	31	50
R-13	21	50	60
R-15	9	51	60
R-16	20	32	50
R-17	17	47	70
R-19	12	31	70
R-20	6	37	50

함되어 있었다 (Table 3).

증폭된 DNA 단편 크기는 0.25~6.6 kb까지 다양하게 나타났으며, 주로 0.5~4 kb 사이에 위치하였고, 샘플 간 동일하거나 서로 다른 밴드 양상을 보였다 (Fig. 1).

분류군 전체에서 반응이 일어난 30 종류의 primer로부터 총 1194개의 밴드가 관찰되었으며, 이 중 다형화 (polymorphism)를 보이는 밴드는 411개 (34.4%)로 primer당 평균 13.7개의 다형화 밴드를 보이는 것으로 나타났다. Primer별 밴드 수는 17개 (OP-026)에서 61개 (R-03)로 다양하였으며, 평균 밴드 수는 39.8개로 나타났다 (Table 3). 한편 R-01은 관찰된 20개 밴드 중 15 (75%)개가 다형화 현상을 보여 가장 높은 polymorphism을 보이는 반면, OPA-02 primer는 3개 (7%)로 가장 낮은 다형화 현상을 보였다.

30개의 primer를 이용하여 얻은 총 1194개 밴드를 이용한 유집분석 결과는 Fig. 2와 같다. Similarity 값에 의한 phenogram에서 물레나물과 식물에서의 유사도 값은 0.24~0.96의 범위에서 단계통군 (monophyly)을 형성하였다.

Distance를 계산하는 방식은 simple matching coefficient와 Jaccard's coefficient를 사용하였는데, simple matching coefficient를 사용하였을 때는 4개의 tree가 그려졌고, Jaccard's coefficient를 사용하였을 때는 1개의 tree가 그려졌다. 4개의 tree 중 Jaccard's coefficient와 가장 높은 상관계수를 가지는 tree는 r 값이 0.97770으로 나타났다 (date not shown).

물레나물과 St. John's wort는 다른 4개체와는 유사도 0.36 이하에서 유집되어 유연관계가 가장 멀게 나타났으며, 지리산 500 m 고지의 고추나물과 지리산 1300 m 고지의 고추나물은 유사도 0.85 이상에서 유집되어 유연관계가 가장 높게 나타났다 (Fig. 2).

지역별로는 지리산 지역에 분포하는 서로 다른 세 가지 고

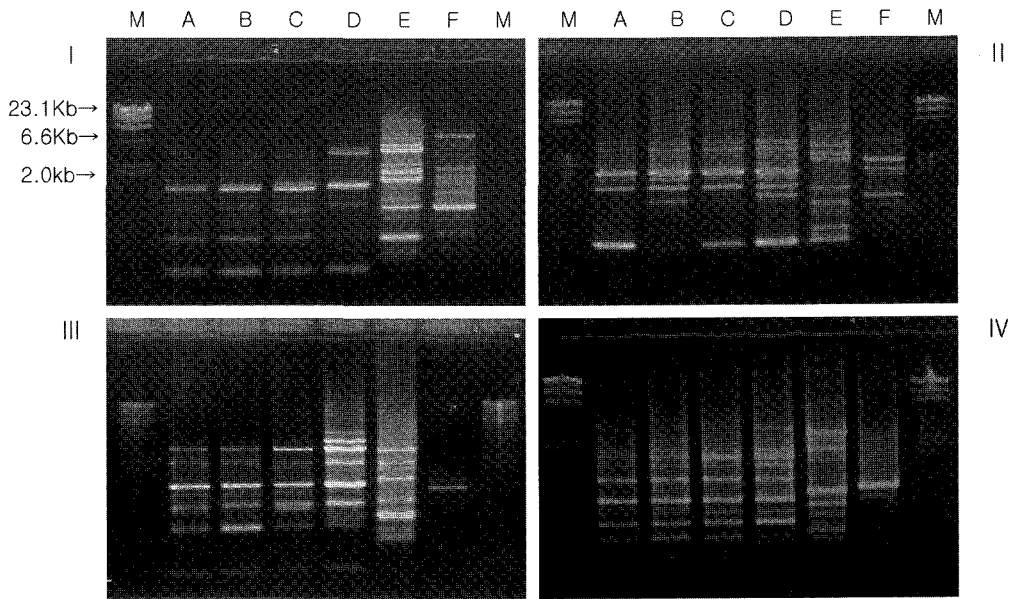


Fig. 1. Representative of electrophoretic separation of PCR products of *Hypericum* plants. Primer was used OP-006 (I) and OPA-07 (II), OPA-12(III) and R-09(IV). M : lamda *Hind* III marker, A : *H. erectum* at Mt. Ji-ri 500 m, B : *H. erectum* at Mt. Ji-ri 1000 m, C : *H. erectum* at Mt. Ji-ri 1300 m, D : *H. erectum* at Mt. Byoung-pung. E : *H. ascyron*, F : St. John's wort.

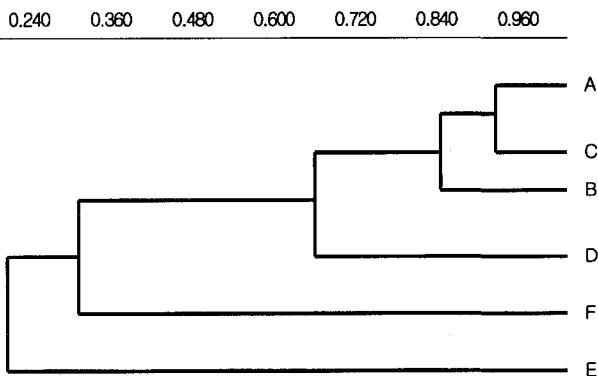


Fig. 2. Analysis of the genetic relationships among six species of *Hypericum* plants by UPGMA method incorporated in NTSYS. A : *H. erectum* at Mt. Ji-ri 500 m, B : *H. erectum* at Mt. Ji-ri 1000 m, C : *H. erectum* at Mt. Ji-ri 1300 m, D : *H. erectum* at Mt. Byoung-pung. E : *H. ascyron*, F : St. John's wort.

도 (500 m, 1000 m, 1300 m)에서의 고추나물은 모두 유사도 0.84 이상에서 유집되어 높은 유사도를 보이는 것으로 나타났고, 전남 담양의 병풍산에 자생하는 고추나물은 그보다 훨씬 낮은 0.677 정도의 유사도를 보이며 지리산 고추나물과는 유전적으로 다소 차이가 있음을 나타내었다. 그리고 물레나물보다는 St. John's wort가 고추나물과 유연관계가 더 가까운 것으로 나타났다 (Fig. 2).

적 요

Random amplified polymorphic DNAs (RAPD) 분석을 통

해 한국산 물레나물 속 (*Hypericum*) 식물에서의 유연관계를 분석한 결과, 병풍산 고추나물과 지리산 고추나물 사이에 상당한 유전적 차이가 있음을 확인할 수 있었고, 지리산의 500 m, 1000 m 그리고 1300 m 고도 차이에 따른 군락지별도 밴드 패턴의 차이가 확인되었다. 동일 과 (科)에 속한 물레나물보다는 서양고추나물이라고 불리는 St. John's wort가 고추나물과 유연관계가 더 가깝게 나타났다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오 그린 21 사업과 산업기술재단의 지역혁신인력양성사업의 일부 지원에 의하여 이루어 졌습니다. 아울러 생명공학연구소 정순천 박사님의 자료분석의 도움을 받아 이루어 졌으며 이에 감사 드립니다.

LITERATURE CITED

Arnholdt-Schmitt B (2000) RAPD analysis : a method to investigate aspects of the reproductive biology of *Hypericum perforatum* L. Theor Appl Genet. 100:906-911.
 Choi HS, Kim KT, Ahn YK, Kim DS, Woo JG, Lim YP (2003) Analysis of genetic relationships in Garlic Germplasm and Fertile Garlic by RAPD. Kor. J. Hort. Sci. 44:595-600.
 Frisch 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.
 Heo SJ, Kwon SB, Byeon HS, Seo JS, Yoo KO (2004) Intraspecific genetic relation of *Wasabia japonica* Matsum.

- based on RAPD analysis. Kor. J. medicinal Crop Sci. 12:31-35.
- Kim DH, Yang BK, Kim HK, Kim NY, Jeong SJ, Kim IS, Nam JS, Lee JH, Chung DS** (2003) Analysis of genetic variation of *Perilla* Germplasm using RAPD. Kor. J. Plant biotechnology 30:221-226.
- Kim JH, Yuk JA, Cha SK, Kim HH, Seong BJ, Kim SI, Choi JE** (2003) Genetic variation in pure lines of *Paanx ginseng* based on by RAPD analysis. korean J. Medicinal Crop Sci. 11:102-108.
- Kim JY, Park CY, Yoon JM** (2004) Genetic differences and DNA polymorphism in Oyster(*Crassostrea* spp.) analysed by RAPD-PCR. Korean J. Genetics 26:123-134.
- Lee SY, Yae BW, Kim KS** (2002) Indentification and analysis of genetic similarity in wild species and cultivars of carnation using RAPD. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 43:738-742.
- Lee SW, Kim ZH** (2003) Genetic relationship analysis of Melons (*Cucumis melo*) germplasm by RAPD method. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 44:307-313.
- Park HJ, Kwon SH, Yun SY, Lee KT** (2000) Isolation of steroids and flavonoids from the herbs of *Hypericum ascyron* L. Kor. J. Pharmacogn. 31:39-44.
- Song JH, Kom NS, Yi YS, Kim YJ, Song JM, Yi JS** (2002) Genetic variation of *Quercus variabilis* in Korea based on RAPD marker analysis. korean J. Genetics. 24:189-195.
- Yoo KO, Jang SW** (2003) Intraspecific relationship of *Lactuca sativa* var. *capitata* cultivars based on RAPD analysis. 2003. Kor. J. Hort. Sci. 21:273-278.
- Yoo KO, Lee WT, Kim NS, Kim JH, Lim HT** (1996) Comparative studies on the *Hanabusaya asiatica* and its allied groups based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Kor. J. Hort. Sci. 37:324-328.
- 김태정** (1999) 한국의 자원식물. 서울대학교 출판부 p.116-118.