

홍화 수집종의 RAPD에 의한 유연관계 분석

김세종*, 김재철, 최성용, 신동현¹
경상북도농업기술원 신물질연구소, ¹경북대학교

Intraspecific Relationship Analysis of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Lines Collected by RAPD Markers

Se Jong Kim*, Jae Chul Kim, Seong Yong Choi and Dong Hyun Shin¹

Research Institute of Natural Product Kyungbuk Agriculture Technology Administration,
Uisung 769-803, Korea

¹College of Agriculture and Life Science, Kyungpook National University Daegu 702-701, Korea

Abstract - This study was conducted to provide the genetic diversity on Safflower collections and to identify the variations which could be utilized in Safflower breeding. The RAPDs analysis was used to clarify the genetic relationships among 32 Safflower collections. Among 37 primers applied in RAPD analysis, 25 primers that generated appropriate PCR products for identification of the genetic characters in safflower collections were used. Amplified PCR showed the highly reproducible bands at 0.1~4.0 kb. The number of bands amplified in each primer showed the variations ranging from 1 to 9, with the average of 5.6. A total of 25 bands were identified among twenty-five selected primers and 23 bands (19.2%) showed polymorphism. Based on the similarity value of 0.042 in dendrogram derived from the cluster analysis, the 32 Safflower collections were classified into 6 groups. The two main groups, II and III included 12 collections (38%) and 12 collections (38%), respectively.

Key words - *Carthamus tinctorius* L., RAPD, Polymorphism

서 언

홍화(*Carthamus tinctorius* L.)는 국화과에 속하는 초본성 식물로 25종이 있는 것으로 알려져 있으며 스페인, 인도 등지에 분포하고 자중해 연안에서 많이 자생하고 있다(Knowles, 1988). 홍화는 약용, 염료, 기름용 등 다양하게 이용하고 있는데 우리나라에서는 주로 약용 혹은 건강 보조식품으로 재배되고 있으나 인도, 미국 등지에서는 대부분 기름용으로 재배되고 있다. 최근 홍화의 소비가 급증되면서 국내산 뿐만 아니라 외국에서도 수입이 많이 되며, 재배되고 있는 계통 또한 매우 다양한 실정이다.

이러한 각 계통들 간에 유전적인 다양성의 평가는 매우 중요한데 작물 육종에 있어서 유전자원의 종속간이나 각 계통들간에 유전적인 연관성에 대한 평가를 과거에는 품종간 특성이나 계통을 분류하는데 형태적 특성에 의한 식물학적 분류 방법이나 단백질, 동위효소 등이 이용되어 왔으나(Brown, 1990), 최근에는 RAPD(random amplified polymorphic DNA), RFLP(restric-

tion fragment length polymorphisms) 등의 분석방법이 이용되고 특히 RAPD분석은 RFLP에 비하여 시간이 적게 들고 비용이 저렴하며(Willams *et al.*, 1990), 유전적 거리 측정, 품종의 다양성 검토, 유전질동정 및 분류를 하는데 매우 유용한 방법임이 증명되었다(Echt *et al.*, 1992; Yu and Pauls, 1993). 본 연구는 국내외에서 수집한 홍화 32계통에 대하여 DNA를 이용한 계통간의 유전적 다양성 및 유연관계를 밝혀 홍화 품종 육성의 기초자료로 활용코자 수행하였다.

재료 및 방법

공시재료 및 DNA 추출

공시재료는 32계통으로 국내에서 수집한 6종과 국외에서 수집한 26종을 의성약초시험장 시험포장에 식재 후 RAPD 분석을 위한 시료로 사용하였다. 공시계통의 식물학적 특징은 계통당 20주씩 3반복으로 조사하였으며 table 1에 나타내었다. DNA 추출은 줄기에서 나온 어린 잎 약 0.5g을 채취한 즉시 액체 질소를 이용하

*교신저자(E-mail) : kimsejong@hanmail.net

Table 1. Growth characteristics of Safflower(*Cartamus tinctorius* L.) lines collection

No.	Collection no. ¹⁾	Stem length (cm)	Stem diameter (mm)	No. of branch (/Plant)	No. of flower heads (/Plant)	Flower head diameter (cm)	Thorn	Serrulate of leaves
1	4	93	8.9	12.8	12.8	2.5	×	○
2	5	90	9.0	12.7	12.7	2.4	○	○
3	6	88	12.3	14.0	14.0	1.9	×	○
4	7	84	8.7	10.7	10.7	3.1	○	○
5	8	80	7.3	15.0	15.0	2.4	○	○
6	9	81	8.7	14.0	14.0	2.5	○	○
7	11	79	7.7	15.6	15.6	2.3	×	○
8	13	120	12.3	48.3	48.3	2.1	×	×
9	15	97	8.7	15.7	14.8	2.5	○	○
10	16	110	10.8	23.3	23.3	2.9	×	○
11	17	110	10.5	16.7	16.7	2.7	×	○
12	19	86	8.0	16.7	16.7	2.5	×	○
13	20	95	9.7	17.1	17.1	3.0	○	○
14	21	90	10.1	21.4	21.4	2.2	×	○
15	22	75	7.8	13.1	13.1	2.5	○	○
16	23	86	9.9	31.2	31.2	2.2	○	○
17	26	100	10.7	21.9	21.9	2.7	○	○
18	27	69	8.6	28.3	28.3	2.1	○	○
19	28	123	11.5	26.8	26.8	2.8	○	○
20	29	100	9.5	14.3	14.3	2.5	×	○
21	30	92	10.0	30.7	30.7	2.3	○	○
22	Chungsu	78	7.7	8.1	8.1	2.8	×	○
23	US 14	80	8.4	12.1	12.1	2.6	○	○
24	US 16	73	7.7	9.7	9.7	2.6	×	○
25	US 19	71	10.2	24.0	24.0	2.5	×	○
26	US 21	73	13.2	42.7	42.7	2.3	○	○
27	US 22	86	10.3	14.0	14.0	2.4	○	○
28	US 25	87	8.1	14.8	14.6	2.5	○	○
29	US 27	92	9.4	20.4	20.4	2.7	○	○
30	US 28	86	9.2	10.6	10.6	3.0	○	○
31	US 30	106	9.9	17.1	17.3	2.4	×	○
32	US 31	84	10.4	25.0	25.0	2.8	○	○

¹⁾Name of collection nation : 4(Tajikistan) 5(Uzbekistan) 6(Kazakhstan) 7(Uzbekistan) 8(Uzbekistan) 9(Uzbekistan) 11(Azerbaijan) 13(Iran) 15(Armenia) 16(Azerbaijan) 17(Afghanistan) 19(Iran) 20(Iran) 21(Uzbekistan) 22(Uzbekistan) 23(Iran) 26(Uzbekistan) 27(Mexico) 28(Iran) 29(Azerbaijan) 30(Korea) Chungsu(Korea) US14(Korea) US16(Korea) US19(India) US21(China) US22(Korea) US25(Mexico) US27(Turkey) US28(Korea) US30(Korea) US31(Iran)

여 급속 동결후 mortar를 이용하여 곱게 마쇄하였다. 마쇄한 시료에 1 ml Extraction buffer [100 mM Tris-HCl(pH 8.0), 50 mM EDTA(pH 8.0), 500 mM NaCl, 10 mM 2-Mercaptoethanol]를 가한후 1.5ml E-tube에 넣고 20% SDS 33 μ 을 다시 넣고 vortexing한 후 65°C water bath에 10분 가량 반응 시켰다. 5 M potassium acetate 150 μ 를 넣고 vortexing한 후 얼음에 꽂아 0°C에 20분 저장시키고 12,000rpm으로 10분 원심분리한 후 상등액만 가제를 이용하여 걸러내고 300 μ 의

isopropanol을 넣고 섞은 후 영하 20°C에 30분 저장하였다. 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 형성된 DNA pellet를 TE buffer(50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) 500 μ 에 녹인후 동일한 양의 phenol로 5분간 원심분리하여 찌꺼기를 걸러내었다. 이 과정은 3회 정도 반복하고 상등액만을 모아 새로운 1.5 ml E-tube에 옮긴후 2배량의 100% EtOH를 넣고 원심분리하여 세척하였다. 상등액은 따라내고 다시 70% EtOH 500 μ 로 원심분리하여 세척하였다. 처리된 DNA를 건조 후 TE buffer 20 μ +

Table 2. The sequences of primer and number of PCR products in Safflower.

Primer No.	Nucleotide sequence (5' to 3')	No. of PCR bands	No. of polymorphic bands	Polymorphism (%)
OPG-04	AGCGTGTCTG	4	0	0
OPG-05	CTGAGACGGA	5	0	0
OPG-06	GTGCCTAACC	3	1	33
OPG-07	GAACCTGCGG	3	3	100
OPG-08	TCACGTCCAC	6	0	0
OPG-09	CTGACGTCAC	4	1	25
OPG-10	AGGGCCGTCT	9	2	22
OPG-11	TGCCCCGTCGT	6	2	33
OPG-12	CAGCTCAGGA	6	1	17
OPG-13	CTCTCCGCCA	5	1	20
OPG-15	ACTGGGACTC	3	0	0
OPG-17	ACGACCGACA	3	0	0
OPG-18	GGCTCATGTG	4	3	75
OPG-19	GTCAGGGCAA	7	0	0
OPH-01	GGTCGGAGAA	1	1	100
OPH-03	AGACCTCCAC	5	4	80
OPH-04	GGAAGTCGCC	5	0	0
OPH-05	AGTCGTCCCC	6	2	33
OPH-06	ACGCATCGCA	4	0	0
OPH-08	GAAACACCCC	4	0	0
OPH-09	TGTAGCTGGG	3	0	0
OPH-10	CCTACGTCAG	4	1	25
OPH-11	CTTCCGCAGT	6	1	17
OPH-12	ACGCGCATGT	9	0	0
OPH-13	GACGCCACAC	5	0	0
Total 25		120	23	19.2

RNase 1 μ를 처리하여 잘 녹이고 이 시료는 영하 20°C에 보관하였다.

Polymerase Chain Reaction

RAPD primer는 Bioneer사에서 생산된 random primer 37개를 사용하였는데, 이 중에서 DNA의 다형성을 보인 25개의 primer를 분석에 이용하였다. PCR 반응은 10X PCR buffer(100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 0.1% gelatin) 5 μ, 25 mM MgCl₂ 4 μ, dNTP 4 μ, primer 1 μ, DNA 1 μ, Taq DNA polyme rase 1 μ를 넣은후 나머지를 ddH₂O로 채워 50 μ를 만들었다.

PCR cycle은 94°C에서 1분 denaturation, 37°C에서 2분간 annealing, 72°C 에서 3분간 extention의 과정을 총 45 cycle을 수행하였다.

PCR산물은 1.2% agarose gel에서 50 V로 40분간 전기영동한 후, UV장치를 통해 EtBr에 의해 표시된 밴드를 polaroid film으로 촬영하였다.

유연관계분석

PCR산물의 분석은 밴드의 유,무에 따라 유는 1, 무는 0으로 데이터화하였고 분석 프로그램은 NTSYS-PC system(ver. 2.02)을 이용하여 UPGMA 분석 방법으로 dendrogram을 작성하였다

결과 및 고찰

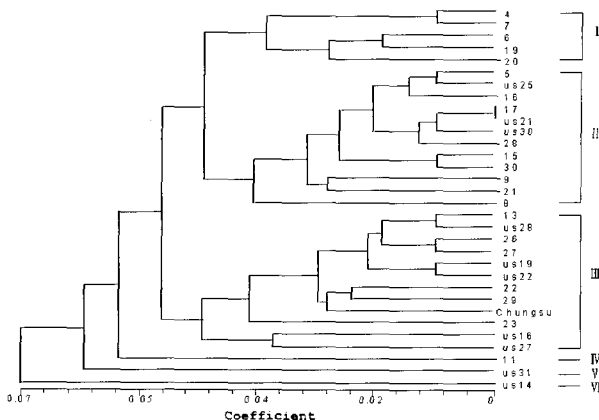
RAPD 양상

수집한 홍화 32계통에 대하여 전체 DNA를 추출 정제하여 RAPD 분석을 하였다. 10개의 염기서열로 구성된 37개의 random primer 중 밴드가 분명하고 다형성이 높은 25개의 primer를 선발(OPG 14 개, OPH 11개)하여 분석한 결과(Table 2) 총 120개의 증폭된 밴드를 얻었는데 각 primer에 의해 증폭된 밴드의 수는 1~9개로 다양하게 나타났으며 primer 한 개당 평균 4.8개의 DNA밴드가 증폭되었다.

총 120개의 밴드중 다형성을 보이는 밴드의 수는 23개(19.2%)로 매우 낮은 다형성을 나타내었고 그렇지 않은 밴드의 수는 97개(80.8%)였으며 primer 종류에 따라 다형성의 비율이 0~100%로 크게 달랐다. 이는 Kim *et al.*(1998)의 가시오가피의 다형성 밴드 57%와 Kim *et al.*(2000)의 지황 54%보다는 크게 낮은 유전적 다형성을 보였다.

유연관계 분석

홍화 수집종내의 유연관계 분석을 위해 RAPD에 의해 나타난 band를 조사하여 code화 한후 dendrogram(NTSYS-PC program)을 작성하였을 때 나타나는 수집지역과 개체간의 변이 정도와 유연관계는 Fig. 1과 같다. 홍화 수집종 개체들 간의 유전적 거리는 0.0083~0.1158사이로 나타났으며 국내 수집종간의 유전적 거리는 0.0331~0.0992로 근연인 특성을 나타내었고 외국 수집종과 국내 수집종간에는 0.0166~0.1158로 다소 원연인 특성을 나타내었다. RAPD-PCR에 의해 얻어진 120개의 밴드를 가지고 유연관계를 분석한 결과 dendrogram에서 유연계수 0.042를 기준으로 하였을 때 32개 수집종을 6개의 군으로 분류되었는데 II군과 III군은 각각 12종씩 각각 38%가 속하는 큰 군으로 나타났으며 IV군, V군, VI군은 각각 1종씩 분류되었다. 1군에 속하는 5종중 가시 없는 수집종이 3종(60%)이나 속하였으며 특히 이들의 수집지역은 우즈베키스탄, 카자흐스탄, 이란 등 지역적으로 매우 가까운 곳에 위치하였음을 알수 있었다. 또한 한국에서 수집한 종이라도 자생지역 및 환경에 따라 유전적 변이가 일어나지 않았나 추정된다. Bang *et al.*(2001)은 홍화의 작물학적 특성에 의한 품종 군 분류에서 군집간의 최대거리 1.2를 기준으로 하여 101개 수집종을 11개 군으로 분류하였는데 제 III군은 모두 국내 재래종이었다고 하였다.



적 요

홍화 수집종의 RAPD 분석을 통한 유전적 다양성 및 유연관계를 밝히고 품종군을 분류하여 품종육성의 기초자료로 활용코자 시험한 결과는 아래와 같다. RAPD 분석에 적용한 37개의 Primer 중 25개의 적정 primer를 선발하였고, 증폭된 PCR산물은 0.1~4.0 kb에서 재현성있는 band를 보였으며 각 primer에 의해 증폭된 band의 수는 1~9개로 다양하였고 평균 4.8개였다. PCR 반응에 사용된 25개의 primer에서 120개의 band가 관찰되었으며 다형성을 보이는 band의 수는 23개(19.2%)였다. RAPD-PCR에 의해 얻어진 dendrogram에서 유연계수 0.042를 기준으로 했을 때 6개 군으로 분류되었고 II군과 III군은 각각 12종(38%)씩 속하였다.

인용문헌

Bang, K. H., Kim, Y. K., Park, H. W., Seong, N. S., Cho, J. H., Kim, H. S. and Cho Y. G. 2001. Classification of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Collections by Agronomic Characteristics. Korean J. Medicinal Crop Sci. 9(4): 301-309.

Brown, A. H. D. 1990. The role of isozyme studies in molecular systematics, Aust. Syst. Bot. 3: 39-46.

Echt, C.S, Erdhal and L.A, McCoy. 1992. Genetic Segregation of Random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. Genome. 35: 84-87.

Kim, J. S., Choi, S. Y., Choo, B. G., Ryu, J. H., Kwon, T. H. and Oh, D. H. 2000. Intra-specific Relationship of *Rehmannia glutinosa* Lines Medicinal Collected from Korea, Japan and China by RAPD Analysis. Korean J. Crop Sci. 8(3): 266-273.

Kim, S., Kim, K. Y., Park, M. S., Choi, S. Y. and Yun, S. J. 1998. Intraspecific Relationship of *Eleutherococcus senticosus* Max. by RAPD Markers. Korean J. Medicinal Crop Sci. 6(3): 165-169.

Knowles, P. F. 1989. Safflower in Oil Crops of the World. McGraw-Hill, New York. pp. 363-374.

Williams, J. G. K, A. R. Kubelik, K. H. Livak. J. A. Rafalski and S. V. Fingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18: 6531-6535.

Yu K, Pauls KP. 1993. Rapid estimation of genetic relatedness among heterogenous population of affalfa by random amplification of bulked genomic DNA samples. Theor. Appl. Genet. 86: 788-794.

(접수일 2006.3.8 ; 수락일 2006.4.6)

Fig. 1. Dendrogram acquired with 32 collections of in Safflower based on DNA polymorphism by PCR analysis.