

우리나라 야생 차나무(*Camellia sinensis* L.)의 유전적 다양성

오찬진, 이 솔¹, 유한춘, 채정기², 한상섭^{1*}

전라남도 산림환경연구소

¹전북대학교 농업생명과학대학 산림자원학과

²전남대학교 농업생명과학대학 산림자원조경학부

Genetic Diversity of Wild Tea (*Camellia sinensis* L.) in Korea

Oh Chan Jin, Lee Sol¹, You Han Choon, Chae Jeong Gi² and Han Sang Sub^{1*}

Jeonnam Forest Environment Research Institute

¹Division of Forest Science, College of Agriculture & Life Science, Chonbuk National University

²Division of Forest Resources and Landscape Architecture, College of Agriculture & Life Science, Jeonnam National University

Abstract - Molecular relationship and genetic diversity of 21 wild tea collections which grown natural region in Korea were investigated based on PCR-RFLP analysis using DFR genes. Approximately 1.4kb fragment of the DFR gene from wild tea samples were successfully amplified use DFR 4+5 primer pair. On the bases of restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis using *Hpa* II and *Mse* I enzymes, three different band patterns shown from *Hpa* II enzyme and showed genetic diversity between same region wild tea group. Six kind of restriction enzyme profiles obtained from digested with restriction endonuclease *Mse* I and shown two kind of restriction enzyme profiles collected from same region wild tea at Ungpo. The results of RFLP analysis indicated that wild tea showed genetic diversity among different regions of tea groups, but also between same region wild tea.

Key words - Wild Tea (*Camellia sinensis* L.), PCR-RFLP, DFR

서 언

차나무(*Camellia sinensis* L.)는 차나무과(Theaceae)에 속하는 아열대성 상록식물로서 아시아, 아프리카, 남아메리카 등 50여 국가에서 중요한 경제작물로 재배되고 있다. 차나무는 크게 온대지방에서 자라는 소엽종(var. *sinensis*; 중국종)과 열대지방에서 자라는 대엽종(var. *assamica*; 앗삼종)의 두 변종으로 분류되고 있다(Wight, 1962; Banerjee, 1992).

차나무는 타가수정을 하기 때문에 종자를 이용하여 번식하게 되면 변이가 심하게 나타나게 되는 특성때문에 한 집단 안에서도 개체간 다양한 변이가 나타나게 되며, 우리나라의 경우에도 야생 차나무뿐만 아니라 재배 차나무에서도 집단간 변이가 출현하게 되어 계통간 품종을 구별하는데 어려움이 많다(김 등, 2000).

차나무의 분류는 주로 형태학적 특성 및 기능성 특성 연구가 이루어져 왔으나(송 등, 2005; 김 등, 2006; 박 등, 1997; 박 등,

2001), 최근에는 분자학적 방법을 도입한 유연관계 분석이 활발하게 진행되고 있다. 주로 차나무의 유연관계분석 방법으로는 RAPD방법을 이용하고 있으며(박 등, 2001; 오 등, 1995; Kaundun et al., 2000; Kaundun and park, 2002; Wachira et al., 1995), 오 등(1995)은 한국의 차나무를 19개 지역에서 35개 체에 대한 RAPD방법 분석 결과 크게 두 분류군으로 구분하였으며, 이를 다시 5개 분류군으로 세분화시켰다. Kaundun et al.(2000)은 한국종, 대만 및 일본종에 대한 RAPD분석 결과 한국종이 가장 많은 변이가 있었다고 보고하였으며, 우리나라에서 수집한 32계통에 대한 SSR법 및 AFLP법에 의한 분석에서도 다양한 유전적 특성을 보였다고 보고하였다(류 등, 2005; Paul et al., 1997). 그러나 RAPD법은 재현성과 정확성은 다른 분자학적 marker에 비하여 비교적 낮게 나타나지만 신속하고, 비용이 적게 든다는 이유로 많이 이용하고 있다. Kaundun and Matsumoto(2003a, b)는 차나무의 PAL(phenylalanine ammonia-lyase), CHS(chalcone synthase) 및 DFR(dihydroflavonol 4-reductase) 유전자에 대하여 PCR-RFLP 법을 이용하여 차나무간의 품종구분 및 개체변이구분을 위한

*교신저자(E-mail) : sshan@chonbuk.ac.kr

marker를 구분하였다.

차나무의 계통간 분류를 위하여 형태학적, 분자학적 방법이 많이 이용되고 있으며, 한국내에 생육하는 차나무는 개체간 또는 집단간의 변이가 나타나고 있다는 연구보고가 있지만, 차나무의 변이를 구분하기 위한 marker의 개발이 요구되며, 본 연구에서는 DFR유전자를 PCR-RFLP법을 사용하여 우리나라 야생 차나무에 대하여 유연관계를 분석하였다.

재료 및 방법

공시재료

본 조사에 사용된 공시재료는 우리나라 야생차나무의 대표적인 자생지인 전남·북 지방의 21개 지역에서 수집하였으며, 엽의 신초부위를 채취하여 시료로 사용하였다. 또한 한 지역내의 개체간 변이를 조사하기 위하여 별도로 응포 차나무집단에서 10개체를 선발하였다.

DNA 추출

Genomic DNA을 분리하기 위하여 야생 차나무지역에서 채취한 어린잎 시료 0.3g을 막사사발에 넣고 액체질소를 이용하여 얼린 다음 막자를 이용해서 아주 곱게 간 후, CTAB 추출용액(2.5 M NaCl, 0.25 M EDTA, 0.5 M Tris-HCl(pH8.0), 0.5% polyvinylpyrrolidone-10, 1% hexadecyl trimethyl

ammonium bromide) 3mℓ와 2-mecaptoethanol 6μl를 첨가하여 다시 간 다음, 혼탁액을 1.5mℓ tube에 넣어 65℃에서 45분간 반응시키고, 1,200×g에서 5분간 원심분리 시켰다. 원심분리하여 얻어진 상층액에 같은 양의 phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1)을 넣어 잘 섞고, 다시 1,200×g에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 상층액의 70%에 해당하는 양의 isopropanol을 넣어 -20℃에서 12시간 정도 침강시킨 후, 1,200×g에서 10분간 원심분리하여 얻어진 pellet에 70% ethanol 1mℓ를 넣어 1회 세척하고 충분히 건조시킨 다음 pellet을 멸균증류수 150μl에 녹여 DNA 농도를 측정하였다. 전체DNA는 -80℃에 보관 사용하였다.

프라이머 및 PCR

차나무의 DFR유전자를 증폭하기 위한 프라이머는 Kaundun and Matsumoto(2003 a, b)이 제작한 프라이머를 사용하였으며, 차나무의 DFR intron 4와 5를 포함하고 있으며, 약 1.4kb 정도의 크기이다(GeneBank Accession No. AB018685). 사용한 프라이머 배열은 Forward primer DFR-4(5'-AACATTCCCACCAAGCCTAATC-3')와 Reverse primer DFR-5(5'-ATGAGAACGACACAATGGCAA-3')를 사용하였다. PCR은 50~100ng/μl의 total DNA, 1×PCR buffer (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH8.3), 2.0mM MgCl₂, 0.5 mM forward primer, 0.5mM reverse primer, 각 200uM 씩

Table 1. Location of wild tea (*Camellia sinensis* L.) collections

No.	Location	Collection site
1	Boriam	Gyungnam, Namhae-gun, Sangju-myeon, Sangju-ri
2	Gambul	Jeonbuk, Buan-gun, Jinse-myeon, Gambu-ri
3	Geumsansa	Jeonbuk, Gimje-si, Geumsan-myeon, Geumsan-ri
4	Seonunsa	Jeonbuk, Gochang-gun, Asan-myeon, Samin-ri
5	Sunyang	Jeonbuk, Gochang-gun, Buan-myeon, Sunyang-ri
6	Gosa	Jeonbuk, Gunsan-si, Hoehyun-myeon, Gosa-ri
7	Ungpo	Jeonbuk, Iksan-si, Ungpo-myeon, Ungpo-ri
8	Sigidong	Jeonbuk, Jeongup-si, Sigi-dong
9	Serong	Jeonbuk, Sunchang-gun, Ingyue-myeon, Serong-ri
10	Dasanchodang	Jeonnam, Gangjin-gun, Doam-myeon, Mandek-ri
11	Taeansa	Jeonnam, Gokseong-gun, Jukgog-myeon, Wondal-ri
12	Choeunsa	Jeonnam, Gurye-gun, Gwangui-myeon, Banggwang-ri
13	Hwaeomsa	Jeonnam, Gurye-gun, Masan-myeon, Hwangjeon-ri
14	Yungoksa	Jeonnam, Gurye-gun, Toji-myeon, Nedong-ri
15	Chenkwansan	Jeonnam, Jangheung-gun, Gwansan-up, Nongan-ri
16	Borimsa	Jeonnam, Jangheung-gun, Yuchi-myeon, Dachen-ri
17	Heungdeok	Jeonbuk, Gochang-gun, Heungdeok-myeon, Heungdeok-ri
18	Yunheungsa	Jeonnam, Naju-si, Dado-myeon, Yunheung-ri
19	Seonamsa	Jeonnam, Suncheon-si, Seungju-up, Jughak-ri
20	Songgwangsa	Jeonnam, Suncheon-si, Songgwang-myeon, Bongsan-ri
21	Bulgabsa	Jeonnam, Yeonggwang-gun, Bulgab-myeon, Moag-ri

의 dNTPs, 1U AmpliTaq Gold DNA polymerase(Perkin-Elmer)를 넣고, 최종량을 멀균 증류수로 30 μ l가 되게 맞추었다.

반응 조건은 먼저 denaturation을 95°C에서 10분간 행한 후, denaturation을 94°C에서 1분, annealing은 60°C에서 1분, extention은 72°C에서 1분으로 하여 35회 반응시킨 후 마지막 extention은 10분간 하였다. 각 PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동을 하고, ethidium bromide로 염색한 후 UV transilluminator를 이용하여 DNA band를 확인하였다.

RFLP 분석

증폭된 PCR산물의 RFLP분석을 위하여 제한효소 *Hpa* II 및 *Mse* I를 이용하였다. 각각의 제한효소 5unit에 PCR산물 5 μ l를 혼합하여 최종 부피를 10 μ l로 한 다음 37°C 항온수조에서 2시간 반응한 후 8% polyacrylamide gel을 이용하여 150V에서 2시간 전기영동을 하고, ethidium bromide로 염색한 후 UV transilluminator를 이용하여 다형성을 조사하였다.

결과

PCR증폭

여러 지역에서 채집한 야생 차나무에 대하여 DFR유전자 증폭 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 공시한 시료 모두에서 약 1.4kb 정도의 PCR산물을 획득하였다(Fig. 1).

또한 웅포 지역의 야생 차나무에서 각각 10개체를 선발하여 PCR를 수행한 결과, 약 1.4kb 정도의 PCR산물을 획득하였다(Fig. 2).

RFLP분석

PCR에 의하여 증폭된 DFR 유전자를 제한효소 *Hpa* II 와

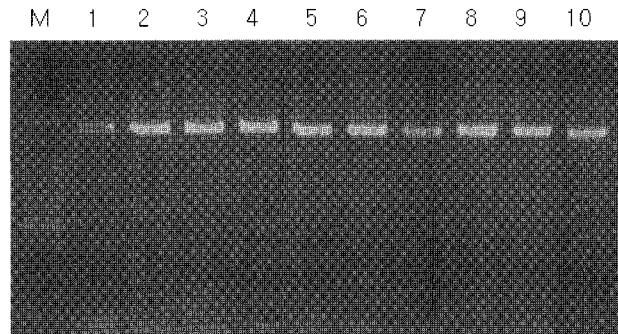


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR amplified DFR gene from total DNA samples using primer pair, DFR-4/DFR-5 (about 1.4 kb). Lane M; 100bp DNA ladder; Lane 1-10: Tea samples collected from Ungpo.

Mse I를 사용하여 PCR-RFLP분석하여 다양한 밴드패턴을 얻을 수 있었다. *Hpa* II 제한효소를 사용하여 RFLP분석결과에서는 사용한 모두에서 크게 3가지 형태의 RFLP 밴드패턴을 보였으며(Fig. 3, 4), 집단간 다양성을 보여 주었다. RFLP밴드 패턴 중 No. 2,3,8,15, 17집단은 A형태, 10,11집단은 B형태로 독립된 밴드패턴을 보였으며, A 및 B형태의 두 가지 밴드를 가지고 있는 C 형태를 나타내고 있는 집단은 No. 1,4,5,6,7,12,13,14,16, 18,19,20,21집단으로서 대부분이 C형태의 RFLP밴드패턴을 보였다(Fig. 3, 4). 그러나 특이하게 전북 순창 세룡지역의 집단에서는 C형태의 특이적인 밴드패턴을 보였다.

한편 웅포지역에서 개체별로 채집한 시료를 *Hpa* II를 사용하여 얻는 RFLP밴드패턴의 결과에서는 RFLP profile가 No. 5, 7,9,10번의 개체에서는 A형태, No. 1,2,3,4,6,8집단의 차나무 개체에서는 C형태의 밴드패턴을 보였으며, B형태의 밴드패턴은 나타나지 않았다(Fig. 5). 이상의 결과에서 *Hpa* II를 이용하여 RFLP분석의 경우 총 3가지의 형태로 차나무를 분류할 수 있었으며, 특히 한 집단내의 차나무에서도 서로 다른 밴드패턴을 나타내어 차나무의 변이가 집단내에서 다양하게 나타나는 것을

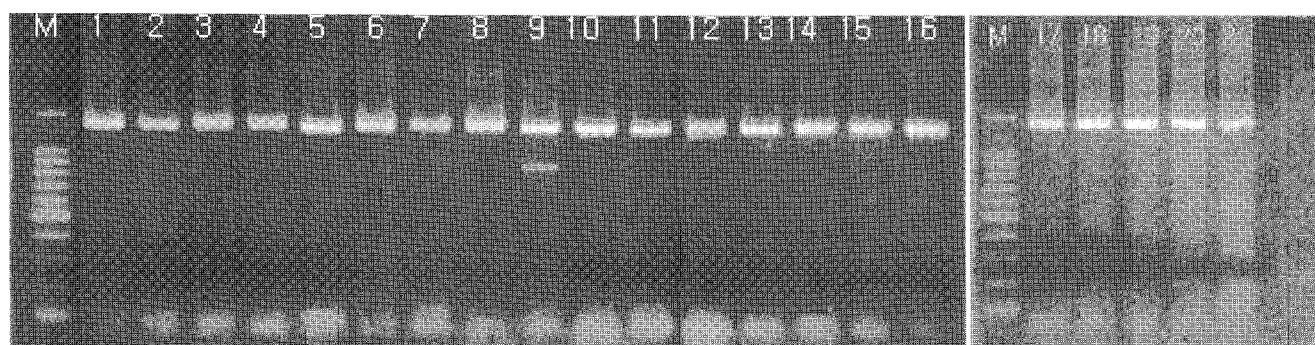


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR amplified DFR gene from total DNA samples using primer pair, DFR-4/DFR-5 (about 1.4 kb). Lane M; 100bp DNA ladder; The source of target DNA is given above each lane. Samples designations are as listed in Table 1.

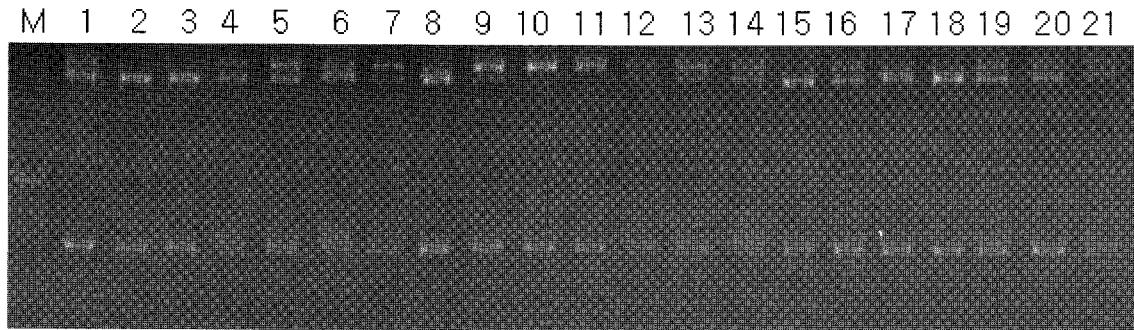


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of *Hpa* II digest of DFR gene amplified by PCR using a primer pair DFR4/5. M, 100 bp DNA marker. The source of target DNA is given above each lane. Samples designations are as listed in Table 1.

알 수 있었다.

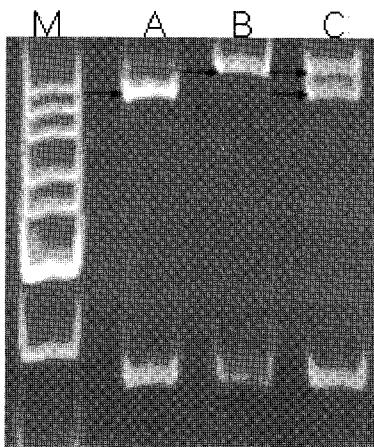


Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoresis of *Hpa* II I digest of DFR gene amplified by PCR using a primer pair DFR4/5. M, 100 bp DNA marker. A, B and C: the type of RFLP profiles.

Mse I 제한효소를 사용하여 RFLP분석결과에서는 사용한 모두에서 크게 6가지 형태의 RFLP 밴드패턴을 보였으며(Fig. 6, 7), 집단간 다양성을 보여주었다. RFLP밴드패턴 중 1,6,13집단은 A형태, No. 2,5,9,10,11,12,18집단은 B형태의 밴드패턴을 보

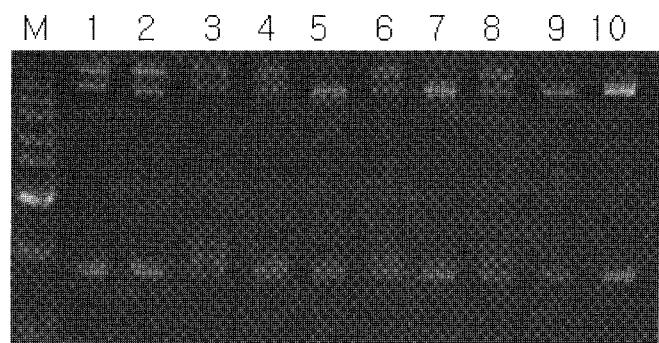


Fig. 5. 8% polyacrylamide gel electrophoresis of *Hpa* II digest of DFR gene amplified by PCR using a primer pair DFR4/5. M, 100 bp DNA marker.

The source of lane 1-10 is each tea tree collected from Ungpo.

였으며, C형태는 No. 3,4집단, B형태 및 C형태의 밴드를 모두 포함하고 있는 것은 No. 7,8,16,20,21집단으로 D형태의 밴드패턴을 보였다. 또한 E형태는 No. 14,15,17집단이며, F형태는 No. 19집단에서 특이적으로 나타났다(Fig. 6, 7). 이상의 결과에서 *Mse* I를 이용하여 RFLP분석을 할 경우 총 6가지의 형태로 차나무를 분류할 수 있었으며, 주로 A형태 및 D형태를 나타냈다.

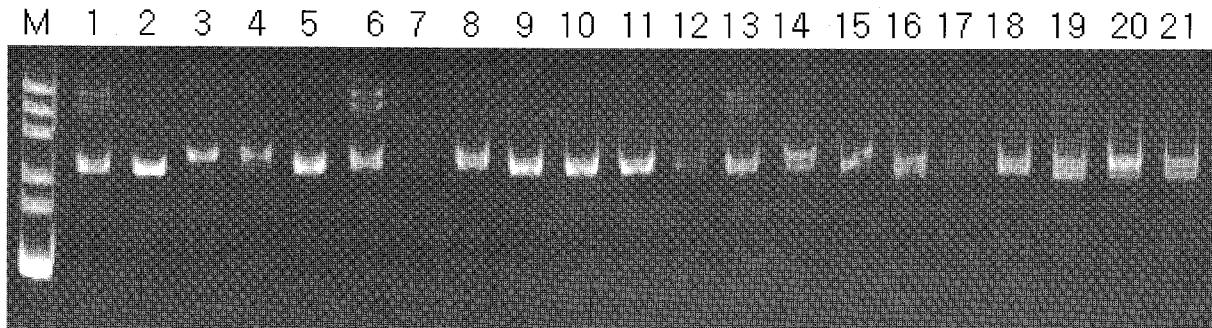


Fig. 6. Polyacrylamide gel electrophoresis of *Mse* I digest of DFR gene amplified by PCR using a primer pair DFR4/5. M, 100 bp DNA marker. The source of target DNA is given above each lane. Samples designations are as listed in Table 1.

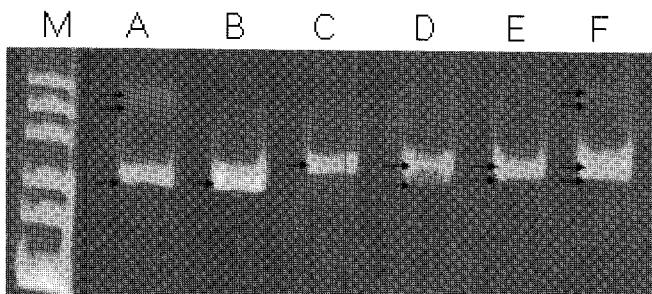


Fig. 7. Polyacrylamide gel electrophoresis of *Mse* I digest of DFR gene amplified by PCR using a primer pair DFR4/5. M, 100 bp DNA marker. A, B and C: the type of RFLP profiles.

한편 웅포지역에서 개체별로 채집한 시료를 *Mse* I을 사용하여 얻는 RFLP밴드패턴의 결과에서는 RFLP profile가 No. 1, 2, 3, 4, 6, 8집단의 개체에서는 D형태, No. 5, 7, 9, 10집단의 차나무 개체에서는 C형태의 밴드패턴을 보였으며 이외의 A, B, E, F형태의 밴드패턴은 나타나지 않았다 (Fig. 7, 8). 특히 한집단 내의 차나무에서도 서로 다른 밴드패턴을 나타내어 차나무의 변이가 집단내에서 다양하게 나타나며, 다른 지역의 차나무집단과 구별되어 있음을 알 수 있다.

고 찰

우리나라 야생 차나무 집단 21개 지역에 대하여 DFR intron 4와 DFR intron 5가 포함되어 있는 DFR 4+5프라이머를 이용하여 PCR한 결과 모두의 지역에서 약 1.4kb 크기의 PCR산물을 획득하였으며, 같은 집단내의 시료에서도 같은 크기의 PCR 산물을 획득하여 우리나라 차나무의 경우 DFR 유전자가 같은 크기를 나타내고 있었다. 차나무의 분류를 위하여 STS-RFLP 방법을 이용 차나무 품종간 분류연구의 경우 ammonia-lyase (PAL), chalcone synthase(CHS), dihydroflaconol 4-reductase(DFR) 부위의 유전자를 이용하여 분류체계를 시도하였으며, 이들의 유전자 부위에 대한 제한효소를 선발하여 품종

구분 체계를 시도하였다(Kaundun and Matsumoto, 2003 a, b).

본 연구의 결과에서도 PCR를 이용하여 *Hpa* II 와 *Mse* I 제한효소를 이용하여 PCR-RFLP분석 결과 우리나라 야생차나무 집단에 대한 품종 구분이 되었으며, 또한 같은 집단내 차나무에서도 변이가 나타남을 알 수 있었다. 특히 *Hpa* II 제한효소를 이용하여 RFLP분석결과에서는 3가지 형태의 밴드패턴을 나타냈으며, 야생차나무의 계통을 A형태와 B형태를 가지는 차나무가 여러 기간을 지나면서 A형태와 B형태를 모두 가지는 C형태를 나타내고 있는 것으로 추정된다. 특히 다산초당과 태안사의 야생 차나무의 경우에는 B형태만을 나타내고 있어 이들 지역에의 차나무 집단은 다른 지역의 차나무와 구별되는 것으로 추정된다 (Fig. 3).

같은 집단내의 차나무 유연관계 분석을 위한 RFLP분석에서는 웅포집단의 차나무의 경우 2가지의 유전형태를 취하고 있어 같은 집단내에서도 유전변이가 나타나지만 B형태의 유전형태는 나타내지 않았다.

Mse I 제한효소를 이용한 경우에는 모두 6가지 형태의 RFLP밴드형태를 보였으며, 유전적 다양성을 더욱 세분화 시킬 수 있었다. *Hpa* II 제한효소를 이용하여 특이한 밴드패턴을 보인 다산초당과 태안사 집단의 경우 *Mse* I 제한효소를 이용할 경우에는 다른 집단과 같은 형태를 보였으나, 선암사 차나무 집단에서 독립된 밴드패턴을 보여 다른 집단과 구별되었다. 그리고 C형태의 차나무 집단은 금산사와 선운사 집단에서만 보여 이들 집단의 경우 다른 집단과 구별되어 있음을 알 수 있었다. 웅포집단의 RFLP밴드패턴의 경우에도 C형태 및 D형태만을 나타내어 집단간 변이가 있음을 알 수 있으나, 전체 6가지의 밴드패턴과 비교하면 2가지 유전형질의 변이가 있었다는 것을 알 수 있었다. 본 연구의 결과는(Kaundun and Matsumoto, 2003b)에 의하여 보고된 차나무의 RFLP 밴드 패턴과 유사한 결과를 나타냈으며, 많은 제한효소들을 이용할 경우 더욱 근접한 집단간 또는 집단내의 유연관계를 알아 볼 수 있을 것으로 판단된다.

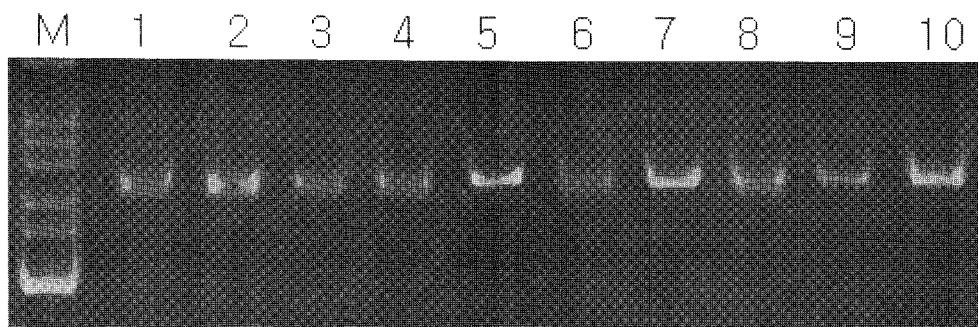


Fig. 8. Polyacrylamide gel electrophoresis of *Mse* I digest of DFR gene amplified by PCR using a primer pair DFR4/5. M, 100 bp DNA marker. The source of lane 1-10 is each tea tree collected from Ungpo.

또한 본 연구에서는 DFR 4 및 DFR 5유전자 부위에 대해서만 조사하였지만 PAL, CHS 유전자 부분 또는 ITS, 5S 유전자 부위에 대한 유연관계 분석이 정밀하게 이루어진다면 우리나라 야생차나무에 대한 계통분류가 정확하게 밝혀질 것으로 사료된다.

적 요

차나무의 분자학적 유연관계 및 유전적 다양성을 알아보기 위하여 한국에서 자생하는 차나무 집단 21개 지역 차나무에 대하여 DFR 유전자 부위를 이용하여 PCR-RFLP분석을 하였다. DFR 4+5 primer 쌍을 이용하여 증폭결과 DFR유전자의 크기는 약 1.4kb에서 PCR산물을 획득하였다. PCR산물에 제한효소 *Hpa* II 및 *Mse* I를 이용하여 RFLP분석 결과 차나무 집단간 또는 집단내 차나무간의 유전적 다양성을 보였다. *Hpa* II 제한효소를 이용한 RFLP 밴드패턴은 3가지 형태로 구분되었으며, 같은 차나무 집단내에서도 유전적 다양성이 나타났다. *Mse* I 제한효소를 이용한 밴드패턴은 6가지의 형태로 다양성을 보였으며, 웅포집단 차나무의 경우 집단 내 다양성이 2가지 형태로 나타나 같은 집단내에서의 유전적 변이는 적은 것으로 보인다. 본 연구에서 사용한 2가지의 제한효소의 결과 차나무의 집단간 또는 같은 집단내의 차나무간에서 유전적 다양성을 확인할 수 있었다.

인용문헌

- 김길자, 최정, 허길현, 류재일, 배창휴, 이선하, 김홍재. 2006. 차나무 유전자원의 화학적 성분에 의한 품종군의 분류. 한국차학회지 12(2): 209-216.
- 김정운, 곽수년, 최형국, 신기호, 김주희, 한재석. 2000. 한국 자생 차(*Camellia sinensis* L.)의 교잡 임성에 관한 연구. 한국차학회지 6(1): 75-83.
- 류재일, 이선하, 김길자, 박인진, 배창휴. 2005. SSR 표식에 의한 차나무 계통간 유전분석. 한국차학회지 11(2): 107-123.
- 박용구, 김주희, Ikeda Namiko, 신동일. 2001. 한국과 일본 야생차

- 나무의 도입경로와 기원에 관한 연구: 1. 형태적 및 유전적 변화를 중심으로. 한국차학회지 7(1): 143-161.
- 박인협, 김례화, 이선하. 1997. 야생차나무 집단의 생태 및 잎의 형태적 특성. 한국차학회지 3(2): 125-134.
- 송연상, 문윤호, 한선경, 정병춘, 방진기. 2005. 수집된 야생차나무 후대집단의 형태적 특성. 한국차학회지 11(2): 93-105.
- 오미정, 홍병희. 1995. 한국 자생 차나무의 RAPD-Marker에 의한 유연관계. 한국육종학회지 27(2): 140-147.
- Banerjee, B. 1992. Botanical classification of tea. In: Wilson KC, Clifford MN (eds) Tea: cultivation to consumption. Chapman and hall, London. pp. 25-51.
- Kaundun, S. S., Z. Alexander and Y. G. Park. 2000. Evaluation of the genetic diversity among elite tea(*Camellia sinensis* var. *sinensis*) accession using RAPD marker. Euphytica 115: 7-16.
- Kaundun, S. S. and Y. G. Park. 2002. Genetic structure of six Korean tea populations as revealed by RAPD marker. Crop Sci. 42: 594-601.
- Kaundun, S. S. and S. Matsumoto. 2003a. Development of CAPS markers based on three key genes of the phenylpropanoid pathway in the *Camellia sinensis* (L.) O. kuntze, and differentiation between assamica and sinensis varieties. Theor Appl. Genet. 106: 375-383.
- Kaundun, S. S. and S. Matsumoto. 2003b. Identification of processed Japanese tea based on polymorphism generated by STR-RFLP analysis. Agriculture and Food Chemistry 51: 1765-1771.
- Paul, S., F.N. Wachira, W. Powell and R. Waugh. 1997. Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] revealed by RFLP marker. Theor Appl. Genet. 94: 255-263.
- Wachira, F. N., R. Waugh, C. A. Hackett and W. Powell. 1995. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD marker. Genome 38: 201-210.
- Wight, W. 1962. Tea classification revised. Curr Sci. 31: 298-299.

(접수일 2007. 10. 30 ; 수락일 2007. 11. 21)