

Analysis of Genetic Variation of *Perilla frutescens* var. *crispa* Germplasm Using RAPD

Hyeun-Kyeong Kim¹, Young-Son Cho², Jae-Wan Yang, Young-Whan Choi, Jun-Soon Kang, Yong-Jae Lee and Beung-Gu Son*

Department of Horticulture Bioscience, Collage of Natural Resource & Life Science, Pusan National University, Milyang 627-706, Korea

¹Bioresources Development Institute, Pusan National University, Miryang 627-702, Korea

²Department of Crop Science & Biotechnology, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea

Received November 23, 2009 / Accepted December 12, 2009

Genetic variations of Chajogi (*Perilla frutescens* var. *crispa*) germplasms were investigated by using RAPD markers. Twenty-two *Perilla frutescens* var. *crispa* lines collected from various locations were subjected to RAPD analysis using 80 primers. Among them, only 22 primers showed polymorphic bands and these 22 primers provided a total of 224 bands consisting of 127 polymorphic and 97 monomorphic bands. The polymorphic bands were subjected to phylogenetic analysis using the UPGMA method. From UPGMA, similarity co-efficiency of 22 Chajogi lines ranged from 0.72 to 0.94. The dendrogram of 22 lines obtained through the UPGMA method resulted in two groups (one major group and one minor group). Although the two groups were roughly consistent with growth phenotypes (period of flowering, period of maturity, stem length, number of branches, number of nodes, number of flower clusters and number of ovaries) in detail, much inconsistency also was present.

Key words : *Perilla frutescens*, DNA marker, RAPD, genetic relationship, polymorphism

서 론

*Perilla*속의 종 분류는 분류학자에 따라 다소 차이는 있으나 Ito 등[4]은 4종 1변종으로 분류하였으며, 들깨(*Perilla frutescens* var. *frutescens*)와 차조기(*Perilla frutescens* var. *crispa*)는 서로 변종의 관계로서 염색체가 $2n=40$ 이며, 야생종으로 염색체가 $2n=20$ 인 *Perilla cirtridora*, *P. hirtella*, *P. setoyensis*로 구분하였다. 그러나 차조기의 형태적 특징은 다양하여 1종으로 단정하여 표현할 수 없으며, 차조기(*P. f.* Brit. var. *acutakudō*), 주름차조기(*P. f.* Brit. var. *crispa* Hand.-Mazz. f. *atopurpurea*), 앞푸른차조기(*P. f.* Brit. var. *japonica* Hara for. *discolor* Makino), 푸른차조기(*P. f.* Brit. var. *viridis* Makino), 푸른주름차조기(*P. f.* Brit. var. *crispa* Hand.-Mazz)의 5변종으로 구분하고 있다[5,6].

차조기는 중국 및 한국 등을 포함한 동북아시아가 원산지로서 예로부터 식용으로 또는 약용으로 재배되어 왔으며, 우리나라에서는 지금 전국 각지에서 소규모로 재배되고 있다. 차조기는 흥분성 발한, 진해, 건위, 이뇨 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 민간요법으로는 진통작용도 있어 뱀이나 개 등에 의해 상처를 입었을 때 독을 제거하는데 쓰였으며, 자실이 등숙 되기 전 자실을 건조하여 음식물의 방부제로 이

용되기도 하였다.

한편, 들깨는 쓰임새도 다양하여 식용기름, 등화용 이외에 기상재해로 소득작물의 재배가 어려울때 대파작물로 이용되어 왔으며, 최근에는 들깨기름의 우수성이 알려지면서 고혈압 등의 성인병 예방의 효과가 알려지면서 소비가 증가되어지고 있으며, 또한 신선 잎채소로 이용되어지는 등 새로운 소득작물로 자리를 잡아가고 있는 실정이다. 그러나 들깨의 재배국은 한국을 비롯한 동남아 몇 개 국가로 한정되어 있고, 재배면적도 많지 않아 타 작물에 비해 연구가 매우 부진한 실정이나, 최근 용도의 다양화와 재배면적의 증가에 의해 들깨에 관한 품종 육성을 포함한 여러 측면의 연구가 진행되어지고 있는 실정이다[3].

한편 *Perilla*속 내에서 변종관계인 들깨와 차조기 사이의 다른 형태적 특성에 따른 분류는 명확하지 않으나 줄기의 연모, 자엽색 향기 등의 차이로 구분할 수 있다[1,8]. 그러나 들깨와 차조기의 자연교잡에 의해 생성된 교잡종이 실제로 다양하게 존재하고 있으며 형태적으로는 anthocyanin과 정유성분을 분석하여 화학적 성과를 조사하였으나 그 성과는 미흡한 실정이다[1]. 한편, 차조기를 들깨와 구분하여 차조기만에 대한 연구는 거의 전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 국내에 분포하는 차조기를 수집하여 수집종의 형태적 특성과 RAPD법에 의한 유전적 변이를 비교하여 유연관계를 분석함으로써 차조기 유전자원의 평가와 선발을 위한 기초 자료를 얻고자 실시하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5521, Fax : +82-55-360-5529

E-mail : bgson@pusan.ac.kr

재료 및 방법

시험재료와 DNA의 추출 및 정제

본 연구에 사용된 차조기(*P. f. Brit. var. acutakudo*) 종자는 각 지방에서 수집된 22계통으로 이들 차조기의 생육특성은 Table 1에 나타내었다. 그리고 RAPD 분석을 위하여 어린잎을 채취하였으며, 이들 잎은 DNA 추출 시까지 -70°C에 보관하였다.

DNA의 추출을 위해 차조기의 어린잎 0.2 g을 액체질소로 급냉시킨 후 유발에 넣어 마쇄하였으며, DNA extraction buffer (100 mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 mM mercaptoethanol) 10 ml과 20% SDS 700 µl를 넣어 혼합한 다음 65°C에서 10분간 방치하였다. 여기에 5 M potassium acetate 4 ml를 넣고 0°C에서 20분간 둔 다음 원심분리(12,000 rpm, 20분, 4°C)한 후 상등액을 취하였다. 이 상등액에 isopropanol 10 ml를 넣고 -20°C에서 30분간 방치한 후 원심분리(12,000 rpm, 10분, 4°C)하여 상등액을 취하고 다시 50 mM Tris와 10 mM EDTA를 각각 0.7 ml 씩 넣고 10분간 10,000 rpm에서 원심분리 하였다. 원심분리후 상등액에 3 M sodium acetate 75 µl와 isopropanol 0.5 ml을 넣고 원심분리 (12,000 rpm, 10분, 4°C)하여 DNA를 회수하였다. 여기에 80% ethanol로 세척한후 TE buffer에 용해시켰다. 추출된 DNA는 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 genomic DNA를 관찰하였으며, 아울러 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 농

도 및 순도를 확인하였다.

Primer의 선별 및 PCR

Operon사로부터 각 20개의 random primer로 구성된 OPAE, OPAE, OPAG 및 OPAH 4종의 kit를 구입하여 총 80개의 primer를 사용하여 차조기 유전자원 22계통에 대한 RAPD 분석을 실시하였다. 이때 적용된 PCR의 조건은 Jeong 등[7]과 Kim 등[9]이 보고 한 조건으로 실시하였는데, 이는 50 ng의 template DNA, 2.5 mM의 dNTP, 0.6 unit의 *Taq* polymerase (Takara사), 5 µM primer에 2.5 µl의 10 buffer를 넣어 전체 반응용량은 25 µl가 되도록 하였다.

PCR의 반응은 GeneAmp PCR system 9600 (Perkin-Elmer, USA)를 사용하여 pre-heating time을 2분간 실시한 후, denaturation은 94°C에서 30초간, annealing은 40°C 30초간, extension은 72°C에서 60초간으로 총 40회 반복하여 실시하였다. 마지막 단계에서의 extension은 72°C에서 5분간 실시하였다. PCR 반응후 ethidium bromide가 첨가된 2.0%의 agarose gel 상에서 전기영동 한 후 UV 램프 위에서 DNA 증폭양상을 관찰하였다.

유전자원간 유연관계 분석

증폭된 DNA band의 존재 유무(유=1, 무=0)에 따라 data matrix를 작성한 후 유전자원간의 유전적 유사성(상이성) 및 유연관계를 분석하였다. 유연관계분석은 단순한 유전적 거리

Table 1. Agronomic characters in collected *Perilla frutescens var. crispa* germplasm

Code No.	Area of collection	Period of flowering	Period of maturity	Stem length (cm)	No. of branch	No. of node	No. of flower cluster	No. of ovary
1	Daegu	9.3	10.5	127	15	15	119	33
2	Gyeongbuk Pohang	9.17	10.11	89	11	6	48	38
3	Gyeongbuk Yeongdeok	8.25	9.17	80	10	16	156	38
4	Gangwon Taebawkl	9.6	10.3	109	13	20	185	34
5	Gangwon Samcheok	9.6	10.3	101	14	16	150	36
6	Gangwon Gangneung	8.31	9.22	75	12	7	260	30
7	Gyeongbuk Andong	9.6	10.3	99	13	14	187	41
8	Gangwon Hoengseong	8.31	9.25	84	12	7	86	51
9	Gyeongbuk Mungyeong	9.7	10.4	79	13	15	286	41
10	Gyeongnam Gimhae	9.8	10.5	106	15	15	165	47
11	Gangwon Hongcheon-1	8.25	9.17	78	18	14	255	45
12	Gyeongnam Milyang	9.8	10.5	133	15	16	187	36
13	Gangwon Inje	-	-	106	18	13	163	31
14	Gangwon Jeongseon	-	-	117	17	15	162	32
15	Gyeongbuk Ulleung	-	-	70	14	12	227	30
16	Gangwon Hongcheon-2	9.6	10.3	84	13	13	179	19
17	Gangwon Chuncheon	9.6	10.3	98	13	17	163	18
18	Gyeongbuk Sangju	9.10	10.8	181	15	15	252	44
19	Gyeongnam Geoje	9.20	10.14	82	13	15	126	36
20	Gyeongnam Masan	9.10	10.5	83	13	13	113	41
21	Gyeongnam Goseong	9.6	10.2	76	15	16	218	56
22	Gyeongbuk Yeongyang	-	-	81	13	12	185	46

(genetic distance=d)에 의한 유전적 유사성을 계산하는 un-weighted pair group method using arithmetic average (UPGMA)의 방법[10]에 의하여 수행하였다. 한편, UPGMA는 numerical taxonomy and multivariate analysis system (NTSYS ver 2.02) program을 이용하였으며, 이때 차조기 유전 자원간의 유사도계수(similarity coefficient)는 Sokal과 Sneath의 방법[12]에 따라 구하였다.

결과 및 고찰

형태적 및 생육적 특성에 따른 분류

수집된 22계통을 외형적 형태적 특성 및 정유성분 등에 따라 분류하였을 경우 차조기(*P. f. Brit. var. acutakud*)로 분류되어지는 경우가 12종으로 전체 수집종의 54.5%를 차지하였으며, 주름차조기(*P. f. Brit. var. crispa* Hand.-Mazz. *f. atopurpurea*)와 앞푸른차조기(*P. f. Brit. var. japonica* Hara for. *discolor* Makino)가 각각 3종으로 분류되었으며, 푸른차조기기는 1종으로 나타났다. 그리고 수집당시에는 푸른차조기(*P. f. Brit. var. viridis* Makino)로 분류하여 수집하였으나, 정유성분등의 분석에서 들깨로 분류된 것이 3종으로 나타났다. 그러나 푸른 주름차조기(*P. f. Brit. var. crispa* Hand.-Mazz)는 수집되어지지 않았다.

한편, 이들의 생육특성 중에서 개화기는 8월25일부터 9월20일까지로 나타났으며, 성숙기는 9월17일부터 10월14일로 나타났다. 수집종중에서 경북 포항(2)과 경남 고성에 수집한 주름차조기를 제외한 거의 대부분의 수집종은 현재 재배되어지고 있는 들깨의 경우와 개화기 및 성숙기가 비슷한 것으로 나타났다. 그리고 경장과 분지수, 마디수, 화방수 및 삭수는 수집종들 간에 변이의 폭이 큰 것으로 나타났다(Table 1)

DNA의 전기영동 분석

Operon사로부터 각 20개의 random primer로 구성된 OPAE, OPAF, OPAG 및 OPAH 4종의 kit를 구입하여 총 80개의 primer를 사용하였으며, 이 중에서 polymorphism을 나타내는 22개의 primer를 최종 선발하였다(Table 2). 그 결과 중 profile을 Fig. 1에 나타내었다. RAPD-PCR 결과, 약 300~3,500 bp의 범위에서 다양한 크기의 band가 확인되었다. 총 22개의 primer에서 224개의 band를 얻어 각 primer당 평균 10.2개의 band가 확인되었다. 이들 224개의 band 중에서 56.7%인 127개의 band가 유전자원간 polymorphism을 보인 band로 나타났다.

이는 들깨의 계통 및 품종을 대상으로 한 Kim 등[9]의 연구에서 보인 primer당 평균 12개의 band와 총 band중 polymorphism을 보인 band의 비율이 79.5%에 비해서는 다소 낮은 band수 및 polymorphism band 비율을 나타내었으나, 고추의 RAPD 분석과는 비슷한 band의 양상을 보였다[13]. 그리

Table 2. Selected random primers, which produced polymorphic DNA bands from *Perilla frutescens* var. *crispa* germplasm

PRIMER NAME	SEQUENCE
OPAF-03	GAAGGAGGCA
OPAF-04	TTGCGGCTGA
OPAF-05	CCCGATCAGA
OPAF-07	GGAAAGCGTC
OPAF-11	ACTGGGCCTC
OPAF-12	GACGCAGCTT
OPAF-13	CCGAGGTGAC
OPAF-14	GGTGCGCACT
OPAF-15	CACGAACCTC
OPAF-16	TCCCGGTGAG
OPAF-20	CTCCGCACAG
OPAG-02	CTGAGGTCTT
OPAG-06	GGTGCCAAG
OPAG-08	AAGAGCCCTC
OPAG-11	TTACGGTGGG
OPAG-12	CTCCAGGGT
OPAG-19	AGCCTCGGTT
OPAH-02	CACTTCCGCT
OPAH-03	GGTACTGCC
OPAH-04	CTCCCAGAC
OPAH-08	TTCCCGTGCC
OPAH-09	AGAACCAGG

고 원추리속[2] 및 구기자[11]의 RAPD 분석에 비해서는 다소 많은 band수 및 polymorphism band를 나타내었다. 이러한 결과는 각 식물의 분석에 사용되어진 primer의 차이에서 기인할 수 있으나, 타 식물에 비해 다소 많은 band 및 polymorphism band를 보인 것은 추후 차조기의 RAPD 분석을 통한 다형성 연구 및 유연관계, 그리고 각 유용형질과 관련된 유용한 마커의 선발 시 많은 다양한 primer의 screening이 필요함을 의미한다.

유사도 및 유연관계 분석

선발된 22개의 primer로부터 얻은 127개의 polymorphic band를 이용하여 NTSYS에 의한 유전자원간 유전적 유사도를 파악하였다(자료생략). 차조기 유전자원 22계통의 유사도계수는 0.72~0.94에 이르렀으며, 가장 낮은 유사도계수는 강원 인제(13) 수집종과 경남 마산(20) 수집종과의 비교에서, 그리고 가장 높은 유사도 계수는 경남 거제(19)와 경남 마산(20)수집종과의 비교에서 나타났다. 이상의 유사도계수 matrix를 이용하여 UPGMA법에 의한 차조기 유전자원 22계통의 계통수를 구한 결과 1개의 큰 그룹과 1개의 작은 그룹으로 나누어졌다(Fig. 2). 한편 차조기 유전자원의 형태적 특성을 기준으로 한 분류와 비교하여 볼 때 NTSYS를 이용한 유연관계분석의 본 연구 결과와는 다소 상이하게 나타나 이 후 더 많은 유전자원의 수집종 및 primer를 이용한 추가적인 연구가 진행된다면

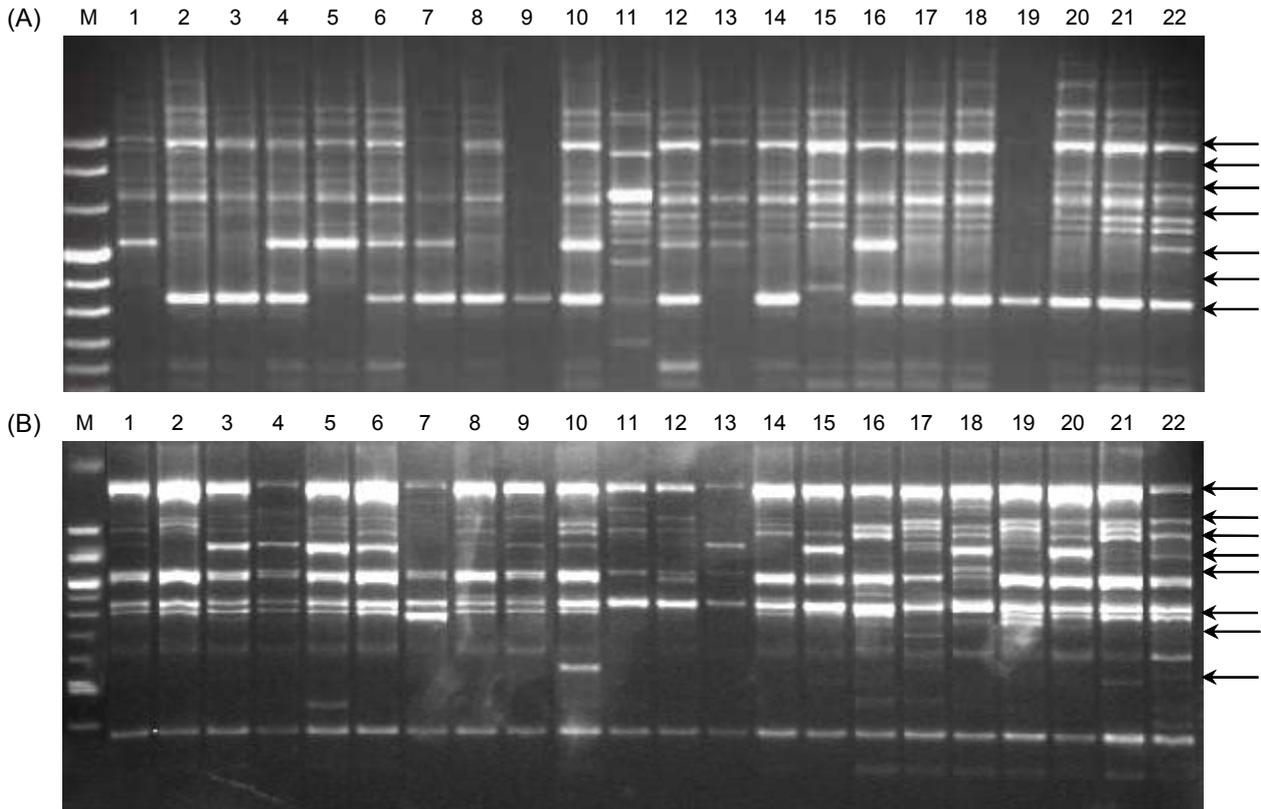


Fig. 1. RAPD profile obtained from 22 Chajogi (*P. f. Brit. var. acutakud*) germplasm using (A) OPAG11 and (B) OPAF20 primer. DNA molecular Weight marker VIII is presented in the lane M. The arrows indicate polymorphism bands utilized for UPGMA analyses.

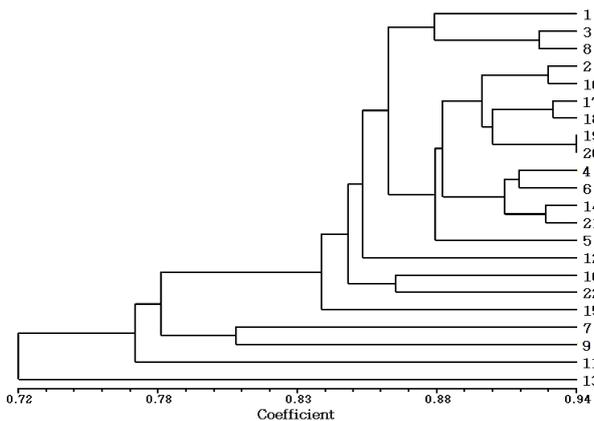


Fig. 2. Analysis of the genetic relation among 22 Chajogi (*P. f. Brit. var. acutakud*) by UPGMA method incorporated in NTSYS.

유전 및 육종 연구에 유용한 기초자료가 될 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

References

1. Choi, H. J. 1993. Analysis of molecular characteristics and genetic distance by using RFLP and RAPD techniques in *Perilla* spp. *Doctoral Dissertation. Kuungpook Natl. Univ. Korea.*
2. Han, H. N., U. H. Cho, and H. Y. Kim. 1998. Genetic variability in four daylily genus (*Hemerocallis*) taxa using RAPD. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **39**, 218-221.
3. Han, W. Y., C. S. Jung, Y. C. Kwon, B. J. Kim, H. K. Kim, H. S. Kim, Y. H. Kwack, and M. S. Ko. 2000. Genetic diversity among *Perilla* species using RAPD analysis. *Korean J. Breed* **32**, 6-11.
4. Ito, M. and G. Honda. 1996. A taxonomic study of Japanese wild perilla (Labiatae). *J. Phytogeogr. Taxon.* **44**, 43-52.
5. Ito, M., H. Kato, Y. Oka, and G. Honda. 1998. Phylogenetic analysis of Japanese *Perilla* species by using DNA polymorphism. *Natural Medicines* **52**, 248-252.
6. Ito, M., M. Toyoda, A. Yuba, and G. Honda. 1999. Genetic analysis of nothopioid formation in *Perilla frutescens*. *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 598-601.
7. Jeong, S. J., B. K. Yang, I. Kim, S. H. Park, J. K. Sun, J. S. Nam, H. K. Kim, and D. H. Kim. 2000. Optimization of RAPD-PCR conditions for onion (*Allium cepa* L.). *J. Life Sci.* **10**, 182-187.

8. Kwak, T. S. 1995. Growth characteristics and cross affinity among collected *Perilla*-related genus and species. *Korean J. Breed* **27**, 135-139.
9. Kim, D. H., B. K. Yang, H. K. Kim, N. Y. Kim, S. J. Jeong, I. S. Kim, J. S. Nam, J. H. Lee, and D. S. Chung. 2003. Analysis of genetic variation of *Perilla* germplasm using RAPD. *Korean J. Biotech* **30**, 221-226.
10. NTSYSpc Program version 2.02. 1998 Exeter software New York.
11. Park, S. Y., H. Kim, B. C. Lee., C. K. Sung, and Y. P. Lim. 1996. Identification and classification of *Lyclum chinense* Mill cultivars by RAPD analysis. *Korean J. Breed* **28**, 221-226.
- 12.okal R. R. and P. H. A. Sneath. 1963. Principles of numerical taxonomy, freeman. *San Francisco (on disk)*. 359.
13. Yang, T. J. and H. G. Park. 1998. Optimization of the random amplified polymorphic DNA analysis in *Capsicum annum* L. *Korean J. Breed* **30**, 204-211.

초록 : RAPD를 이용한 차조기(*Perilla frutescens* var. *crispa*) 유전자원의 유전적 변이 분석

김현경¹ · 조영손² · 양재완 · 최영환 · 강점순 · 이용재 · 손병구*

(부산대학교 원예생명과학과, ¹부산대학교 생명자원개발연구소, ²진주산업대학교 작물생명과학과)

본 연구는 차조기 유전자원의 유전적 특성 분석을 위해 차조기 유전자원의 유전적 변이를 DNA 수준에서 비교하고, 이들의 유전적 근연성 및 변이정도를 규명하여 유전 및 육종의 기초자료를 제공하기 위하여 수행한 연구의 결과로서, RAPD를 이용하여 국내에서 수집한 차조기 유전자원의 DNA polymorphism을 관찰한 결과 80개의 primer 중에서 22개의 변별력 있는 primer가 선발되었고 이들 22개의 primer는 총 224개의 band가 나타났으며, 이 중에서 polymorphic band는 127개 이었다. UPGMA에 의한 유사도 계수는 0.72~0.94 이었고, 유사도계수 matrix를 이용한 유연관계의 분석 결과 차조기 유전자원 22계통은 하나의 큰 그룹과 하나의 작은 그룹을 형성하였다. 그리고 NTSYS에 의한 유연관계 분석의 결과와 생육특성인 개화기, 성숙기, 경장, 분지수, 마디수와 화방군장 및 식수와의 밀접한 관련성은 확인하지 못하였다.