

## 무엽란에서 RAPD 분석 기법을 이용한 자가수분 습성 연구

강윤숙<sup>1</sup>, 소인섭<sup>1</sup>, 김인중<sup>2</sup>, 강 훈<sup>1</sup>

<sup>1</sup>제주대학교 생명자원과학대학 생물산업학부 원예환경전공

<sup>2</sup>제주대학교 아열대농업생명과학연구소

### A Study for Self-Pollination Habitat of *Cymbidium nipponicum* by Using RAPD Analytical Technique

Yoon-Sook Kang<sup>1</sup>, In-Sup So<sup>1</sup>, In-Jung Kim<sup>2</sup>, Hun Kang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Industry of Biology, College of Applied Life Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

<sup>2</sup>Research Institute for Subtropical Agriculture and Biotechnology, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

#### ABSTRACT

This study aimed at investigating the pollination process of *Cymbidium nipponicum* after it being flowered and its genetic relationship within individuals and between regions by using RAPD technique.

In *Cymbidium nipponicum*, self-pollination occurred a week after it being flowered, and embryos were formed sufficiently 5 months after it being flowered.

It was identified from RAPD analysis that there was no genetic relationship in terms of within individuals and between regions.

In conclusion, *Cymbidium nipponicum* is characterized as a unique self-pollination in the same genus.

도서 지방과 일부 남부지방 등지에서 소수가 자생하고 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 무엽란이라는 이름대로 지상부에 어떠한 잎도 없이 부생상태의 근경이 성장하면서 개화하는 특이종이기 때문에 무분별한 남획에 의하여 멸종 위기에 처해있는 실정이다.

한편 춘란, 한란, 소심란, 날세란 등과 같은 대표적인 *Cymbidium*속 난류들은 모두가 타가수분을 원칙으로 수분생리패턴을 가지고 있으며 대부분의 난과식물 또한 진화의 본능에 따라 타가수분 하는 것으로 알려져 있다.(한, 1982). 그러나 무엽란은 지하근경 생장기를 거쳐 잎의 출현 없이 꽃대만 출현하여 개화하는 습성을 가지고 있다.

RAPD(random amplified polymorphic DNA)법은 유전적인 차이를 확인할 수 있으며 이러한 분자적인 지표(molecular marker)들은 형태적이거나 생화학적인 지표들보다 더욱 정확하게 유전적인 관계를 측정할 수 있다. 왜냐하면 첫째 잠재적으로 수적인 면에서 제한이 없고, 둘째, 환경에 영향을 받지 않으며, 셋째 연관지도(linkage map)로 조직화 할 수 있기 때문이다.(Soller와 Beckmann, 1983; Helentjaris 등, 1986). RAPD법은 RELP

#### 서 론

무엽란은 우리나라의 제주도를 비롯한 남해안

(restriction fragment length polymorphism)법에 비해 기술적으로 간단하고 비용이 적게 들지만 반응조성물의 농도나 PCR 증폭조건 등에 의해 밴드패턴의 재현성이 영향을 받을 수 있다.(Weeden 등, 1992) 그럼에도 불구하고 분자적 지표에 관한 연구에서 유전자형의 유전적 근연관계를 추정할 때 RAPD법과 RELP법을 비교한 결과 유사한 결과가 나타났다.(dos santos 등, 1994). RAPD법을 이용하여 주로 품종간의 근연관계나 품종의 분류 등에 많이 이용되어 왔는데, 난과식물에서는 춘란, 한란 등의 동양계 *Cymbidium*과 양란 *Cymbidium*, 열대 원종인 *Cymbidium aloifolium*, *Dendrobium*, *Phalaenopsis* 등 14종과 춘란과의 교배친화성을 RAPD법을 이용하여 분석한 보고가 있었다.(최, 1996)

따라서 본 연구에서는 무엽란의 수분생리를 관찰하고, Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)법을 이용하여 일반 난과식물의 습성인 타가수정보다는, 자가수분에 의하여 후대를 계승하는 특이한 성질이 있으므로 자생지별에 다른 개체간의 근연관계를 조사하였다.

또한 기내에서 개화하여 자가수정 되어 형성된 종자와 기외에서 자연 개화하여 얻은 종자와의 발아력도 비교 조사하였다.

## 재료 및 방법

공시재료로는 제주도 한라산의 영실 일대, 성읍리 일대 그리고 서광리 일대에서 자생하고 있는 무엽란의 근경을 채취하였고 제주도 외 지역으로는 전남 해남의 대홍사일원에서 동, 서, 남부 지역을 설정하여 자생하고 있는 3개체를 채취하여 사용하였다. 채취된 근경은 대체로 5~10 cm 길이, 2~3 mm 두께의 것을 선별하여 난식재용 플라스틱화분(직경 15 cm)을 사용하였고 식재재료는 바크를 이용하였으며 화분 당 4개씩의 근경을 심어 재배 후의 결과를 관찰하였다. 식재 2개월 후 개화가 시작되는 화분은 여타의 수분매개체를 차단하기 위하여 망실에 옮겨 개화과정에 따라 시간별로 주두의 변화를 관찰하였고, 자방의 길이와 두께의 변화를 측정하였다.

자가 수분은 유전적인 다양성을 감소시킬 것으로 생각되어 RAPD법을 이용하여 근연관계를 분석하였다. RAPD분석을 위한 genomic DNA는 PVP와 SDS로 정하고 클로로포름추출방법을 사용하여 순수 분리하였다(Dellaporta 등, 1983). 무엽란 근경을 5  $\mu$ L(한 방울)의 1%(v/v) 2-mercaptoethanol을 넣고 잘 마쇄한 후 300  $\mu$ L extraction buffer [250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% sodium dodecyl sulfate(SDS), 200 mM Tris/HCl(pH 8.0)]를 넣고 잘 섞어 실온에서 30분간 방치하였다. 여기에 10% polyvinylpyrrolidone (soluble PVP, Sigma, MW 10000) 90  $\mu$ L를 첨가하여 잘 섞은 후 1/2 vol.의 7.5 M ammonium acetate(NH<sub>4</sub> OAc)를 넣고 4°C에서 30분간 반응시켰다가 chloroform/isoamylalcohol을 1 vol. 넣고 2~3분 동안 반응시킨 후 10분 동안 원심분리(10,000g, 4°C)하여 상등액을 분리하여 1 vol.의 isopropanol을 넣고 -20°C에서 30분 동안 침전시켰다. Isopropanol 혼합물은 침전 후 4°C에서 10분간 원심분리(10,000g)하여 상등액을 따라 버리고 펠렛을 말린 후 500  $\mu$ L TE buffer [10mM Tris/HCl(pH8.0), 0.1 mM EDTA(pH 8.0)]에 녹여 RNase 2  $\mu$ L를 넣고 37°C에서 15분간 반응시켜 RNA를 분리하고 다시 chloroform/isoamylalcohol을 1 vol.넣고 반응시킨 후 원심분리하여 상등액을 취하고, 이것을 다시 isopropanol로 침전시킨 후 펠렛을 얻어 30  $\mu$ L의 3차 증류수로 녹여 DNA를 얻었다. DNA의 양은 Lamada DNA를 일련의 농도로 구매하여 agarose gel에서 비교하거나 EtBr(ethidium bromide) 직접 염색하여 비교하는 방법과, spectrophotometer로 측정하는 방법을 모두 사용하여 측정하였다.(Sambrook 등, 1989).

유연관계분석을 위한 primer는 Canada의 British Columbia 대학에서 구입하여 인위 합성된 10-mer(10 nucleotides)들 중에서 예비실험을 통하여 다양한 polymorphism이 인정된 19개의 primer를 사용하였다(Table 1.). DNA 증폭 반응을 위한 첨가요소의 기준량은 0.27  $\mu$ M primer와 1~5ng genomic DNA 용액에 1X buffer(10mM Tris-HCl, pH8.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, FINNZYNES Oy, Finland), 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTP mix(dATP, dTTP, dGTP,

dCTP, FINNZYNES Oy, Finland)와 0.5U의 Dynazyme(Thermus brockianus, FINNZYNES Oy, Finland)을 첨가하여 총 14 ul로 하고, 동일량의 mimeral oil을 첨가액에 overlay한 것을 기준으로 하였다. 증폭조건은 PTC-100 PCR 증폭기(MJ Research Inc.)로 94 °C(denaturation) 15초, 37 °C(annealing) 30초, 72 °C(extension) 1분으로 총 45cycles을 수행하였으며 cycle 전 초기 denaturation을 95 °C에서 5분 동안 시켰고, 마지막 extension은 72 °C에서 5분간하였다. 증폭된 DNA는 1.4% agarose gel로 전기영동한 다음 EtBr(ethidium bromide)로 염색시킨 후 UV light에서 비교 관찰하였다.

Table 1. Primer seunce used on the *Cymbidium nipponicum* RAPD

Primer NO. <sup>1)</sup>	Sequences
UBC 701	5'-CCCACAACCC-3'
UBC 705	5'-GGAGGAAGGA-3'
UBC 707	5'-CCCAACACCC-3'
UBC 711	5'-CCCACACCCA-3'
UBC 717	5'-CCCACACCCA-3'
UBC 720	5'-GGGAGGGAGA-3'
UBC 723	5'-CCCTCTCCTC-3'
UBC 731	5'-CCCACACCAC-3'
UBC 735	5'-GGGAGAGGAG-3'
UBC 748	5'-CCTTTCTCCC-3'
UBC 749	5'-GGGAGGAGAG-3'
UBC 753	5'-GGGAGGAGGA-3'
UBC 756	5'-CCCTCCTCCT-3'
UBC 760	5'-CCTTCCCTCC-3'
UBC 767	5'-ACCCACCACC-3'
UBC 779	5'-CCTTTCTCCC-3'
UBC 784	5'-GTGGGTGTTG-3'
UBC 789	5'-GGAAGGGAGA-3'
UBC 796	5'-AGAGGGAGGA-3'

<sup>1)</sup> Primer accession number of University of British Columbia in Canada

모든 다형화 밴드(polymorphic)는 증폭된 DNA 조각의 존재유무에 따라 밴드가 나타난 것은 1, 밴드가 나타나지 않는 것은 0으로 하여 Neidissimilarity(genetic distance) index를 사용하

여 분석하였으며, 그 식은 다음과 같다.

$$\text{Dissimilarity} = 1 - 2N_{XY} / (N_X + N_Y)$$

$N_{XY}$  = 유전자형 X와 Y사이에서 같은 분자량의 증폭된 DNA 조각의 수,

$N_X$  = 유전자형 X에서 증폭된 DNA 조각의 수,

$N_Y$  = 유전자형 Y에서 증폭된 DNA 조각의 수.

난 품종 혹은 계통간의 유전 특성에 따른 변이도 작성을 위하여 NTSYS program(Exeter Software, Setauket, N. Y.)을 사용하였으며, Sneath와 Sokal에 의해 개발된 비가중산술방식(UPGMA; unweighted pair group method with arithmetic averages)을 통계방식으로 채택하였다.

재현성 있는 결과를 위하여 순수분리한 DNA polymerase는 Dynazyme 한 가지만을, PCP tube는 Perkin Elmer사의 Thin wall만을 사용하였다.

### 결과 및 고찰

만개한 무엽란(*Cymbidium nipponicum*)에 다른 수분매개체가 접근하지 못하도록 한 후, 시간별로 주두의 변화를 관찰한 결과 개화 후 일주일 이후부터 주두가 팽창하면서 anther cap이 달려있는 채로 주두가 폐쇄되었고, 이후 자방이 비대하였으며, 약 5개월 이후 배가 있는 종자가 형성되었다(Fig.1). 만개한 무엽란의 자방은 길이가 19 mm, 두께가 2 mm이었고, 만개 후 35일에는 각각 46 mm, 52 mm로 증가하였다.

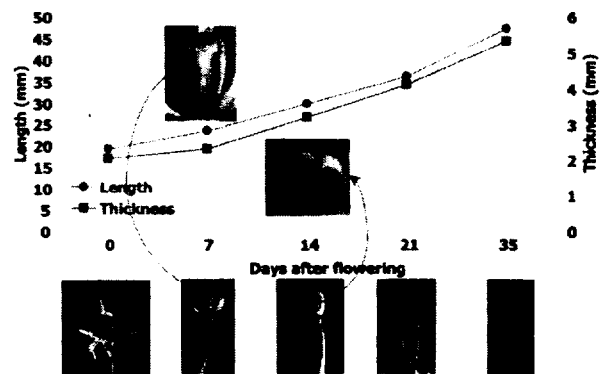


Fig. 1 Changes in ovary size of autogamous *Cymbidium nipponicum*

郭(1994)은 난과식물은 다른 식물과는 달리 종속간에 교잡이 비교적 쉽게 일어나지만 자가불화합성을 가진다고 하였다. 난은 수분 후 주두가 팽창하면서 주두가 폐쇄되고, 그 과정에서 에틸렌이 합성되어 발생하게 되어 타종의 화분이 2차로 수분되지 못하도록 하는 기작을 갖는 것이 일반적인 사실이다(Avadhani 등, 1994). 그 후 자방이 비대하기 시작하여 완전히 자방이 비대한 후 수정이 시작되는데 이것은 수정 후 자방이 비대한다는 일반식물과 비교할 때 특이한 현상이다. 수정 후 종자가 형성되면서 배가 발달하게 되고 이로써 난과 식물이 갖는 특이성 즉 무배유 종자로서의 완전한 배 발육이 촉진되어 성숙하고 발아력을 갖춘 종자가 완성된다.(Arditte와 Flick, 1976). 일반적으로 난과 식물은 단자엽 중에서 가장 진화한 식물로 알려져 있는데 이러한 근거로는 난과 식물에 속하는 800여속, 30,000여종의 식물들 대부분이 타가수정에 의존하여 종을 유지하기보다는 진화를 지향하는 습성을 갖기 때문인 것으로 결론 지을 수 있다.(한, 1982). 그러므로 화색이 다양하고, 흑색이 없으며 청색이 드문 등 수많은 난과 식물들은 자생하는 지역의 특성에 따라 수분매개의 곤충을 유인하기 위한 수단에 따라 색깔, 향기 등을 다양하게 갖는 생태적 의의를 갖는다(Arditti, 1992).

그러나 본 연구의 공시 식물은 부생란이며 일정기간이라 할지라도 광합성에 의한 자가영양 충족 기능이 없으므로 한 종의 유지번식을 위한 자구책을 기능적으로 가져야만 하고 그렇기 때문에 개화단계에서도 자가화합할 수밖에 없는 필연적인 수분수정 수단을 습성화했다고 사료된다.

무엽란을 RAPD법을 이용하여 근연관계를 분석한 실험에서는 Fig.2에서 보듯이 19개의 10mer primer로 분석한 결과, 전체 218개의 band가 나타났다. 또한 NTSTS program으로 UPGMA clustering 분석 결과(Fig.3) 제주에서 자생하고 있는 무엽란 3계통의 계통간 UPGMA clustering 수준은 0.061로부터 0.102 그리고 전남 해남에서 채취한 3계통의 수준은 0.101로부터 0.144의 수치를 가지고 있어 동일 지역내 그리고 타지역간의 유전적 차이 분석에 유의성이 없는 것으로 해석된다.

RAPD법은 유전적 다양성 혹은 유연관계를 구분하고자 할 때 주로 이용하는 방법으로 RAPD법에 의한 polymorphism은 한 품종에서 나타나더라도 다른 품종에서는 안 나타날 수도 있으며 특히 계놈이 달라지면 더욱 그렇다(Eun, 1995).

따라서 *Cymbidium*속에 속하는 난 중에서 유일하게 자가수분하는 무엽란은 유전적인 다양성은 개체 혹은 자생 지역간의 유전적 변이가 거의 없다는 사실이 본 RAPD분석법에 의하여 밝혔다.

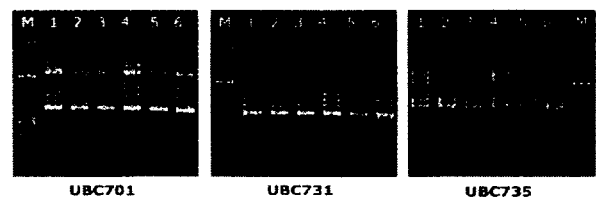


Fig. 2. RAPD profiles obtained from the *Cymbidium nipponicum* plants collected from 6 different location with the primer UBC701, 731, 735. M: Molecular size marker (1kb ladder, GIBCO BRL.) 1, 2, 3: Native to Cheju Island 4, 5, 6: Native to Haenam, Cheollanamdo

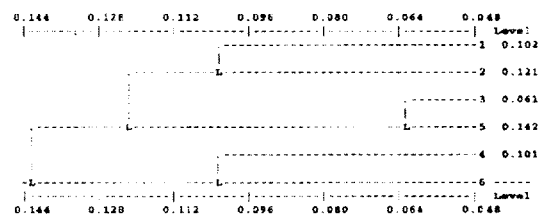


Fig. 3. Dendrogram of the *Cymbidium nipponicum* plants collected from 6 different locations based on UPGMA analysis system. 1, 2, 3: Native to Cheju Island 4, 5, 6: Native to Haenam, Cheollanamdo. Values on the base line indicate the average genetic distance between two lines.

이상의 결과를 단적으로 증명할 수 있는 증거를 Fig. 4에서 볼 수 있는데, 야생상태에서 얻어진 종자를 채취하여(A, B단계), 인공배지에 파종하여 얻은 근경을 배양하여 기내개화를 유도하고(C, D단계), 기내에서 자가수분된 꼬투리를 3~4개월 성숙시켜 성숙된 종자를 얻은(E, F단계) 후 이 종자의 활력을 TTC검정법으로 검정하고 한편으로는 기내에 무균적으로 파종하여 종자 발아시킴으로서 발아된 근경을 얻을 수 있었다(G, H단계). 무엽란은 다른 *Cymbidium*속 난들이 간혹 기내배양하여 개화 후 꼬투리가 형성되었다 하여도 이들 대부분이 위 수정되어 배발생이 없이 꼬투

리만 비대하는 경우(Avadhani et. al, 1994)와 비교될 수 있는 특이하며 흥미로운 난의 습성을 가지고 있음이 밝혀졌다 하겠다.

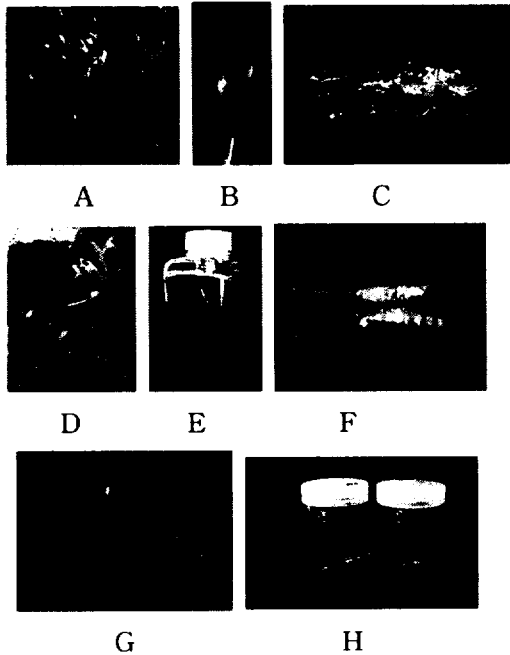


Fig. 4. Diagram of life cycle from seed to flowering stage on the *Cymbidium nipponicum*. A : Flowering status in native stage, B : Seed pod in nature, C : Seed germination in vitro, D : Flower induction in the culture vessel, E : Seed pods ripened by self-pollination, F : Seeds in the pod, G : vitality test of embryos by TTC solution, H : Germination of autogamous seeds.

따라서 본 연구의 결과를 총괄적으로 정리한다면 부생란으로 알려진 무엽란은 온대원산 *Cymbidium* 속에 속하는 특이한 난으로서 속내의 식물 중 유일하게 자가수분, 수정하는 종이라는 사실과, 이를 뒷받침하는 근거로는 RAPD 검정에 의해서도 존재하고 있는 종내의 식물 중 변이성을 판별할 수 없을 정도로 순계임이 확인 되었다. 또한 자연에서의 개화습성을 관찰한 결과에서도 지하부로부터 돌출하는 화경이 이미 anther cap의 탈리 없이도 수분이 이루어져 개화 되는 시점부터 이미 주두가 비대함을 확인 할 수 있었으며, 보다 확실한 근거로는 기내에서 개화한 무엽란이 여타의

매개체가 없이 자가수분되어 꼬투리를 형성하고 성숙하여 종자를 많이 생산한 점과, 이들 종자를 TTC로 활성 검정한 결과와 종자의 기내발아처리 시 발아력이 자연에서 채취된 종자와 같은 발아양상을 보였다는 사실이다. 따라서 무엽란은 *Cymbidium*속 난들 중에 유일한 부생란이며 그러한 습성을 보충 보완하기 위해서 자가수분하는 특성을 가지고 있다는 사실을 확인 증명하였다.

## 적 요

본 연구는 *Cymbidium nipponicum*의 개화 후 수분과정을 관찰하고 RAPD법을 이용하여 지역간, 개체간의 근연관계를 조사하였다. 또한 *Cymbidium* 속에서 유일하게 자가수분하는 무엽란의 기내종자 파종으로 개화까지의 생산단계를 확립하였다.

개화 후 타가수분이 이루어지지 못하도록 인위적으로 차단한 상태에서 개화 후 일주일 이후부터 주두가 팽창하면서 약모의 탈립없이 주두가 폐쇄되었고, 이후 자방이 비대하였으며, 약 5개월 이후 배가 충실히 형성되었다.

RAPD법에 따른 유전분석에서는 *Cymbidium nipponicum*은 개체간이나 지역간의 유전적 변이가 거의 없었다.

## 사 사

본 연구는 제주대학교 생명대부설연구실습센터와 아열대농업생명과학연구소의 지원을 받고, 시설을 이용하여 수행한 연구임.

## 참 고 문 헌

1. Arditti, J. 1992. Pollination. In: Fundamentals of Orchid Biology. pp.453-482. John Wiley & Sons. N. W.
2. Arditti, J. and B. H. Flick. 1976. Post-pollination phenomena in orchid flowers. VI. Excised floral segments of *Cymbidium*,

- Amer. J. Bot. 63:201-211.
3. Avadhani, P. N., H. Nair, J. Arditti and C. S. Hew. 1994. Physiology of orchid flowers. In: Arditti, J. (ed.). Orchid biology: Reviews and perspectives, VI. John Wiley & Sons, New York.
  4. 崔至鎔. 1996. 韓國春蘭과 다른 Cymbidium과의 交配親和성에 관하여. 高麗大學校 大學院 碩士學位論文.
  5. dos Santos, J. B., J. Nienhuis, P. Skroch, J. Tivang, and M. K. Slocum. 1994. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. Theoretical Applied Genet. 87:909-915.
  6. Eun, M. T. 1995. Genome mapping technology and its application in plant breeding. pp. 57-85, The 9th Plant biotechnology symposium : Plant breeding and molecular biology, Suwon, Korea, July 7-8, 1995.
  7. 한창열. 1982. 식물조직배양학. pp. 68-104. 일조각, 서울.
  8. Helentjaris, T., M. Slocum, S. Wright, A. Schaefer and J. Nienhuis. 1986. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphism. Theoretical Applied Genet. 72:761-769.
  9. Soller, M. and J. S. Beckmann. 1983. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. Theoretical Applied Genet. 67:25-33.
  10. Weeden, N. F., G. M. Timmerman, M. Hemmat, B. E. Kneen, and M. A. Lodhi. 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers, pp. 12-17. In: Applications of RAPD technology to plant breeding. Crop Sci. Soc. Amer., Madison, Wis.