

RAPD기술에 의한 강냉이제꽃가루받이계통들의 유전적류연관계분석

김강, 박경미

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시었다.

《농업부문에서는 종자문제를 중요한 고리로 틀어쥐고 종자문제해결에 선차적인 주목을 돌려야 합니다.》

수확고가 높은 새로운 강냉이1대잡종품종을 육성하는데서 나서는 중요한 문제는 제꽃가루받이계통들사이의 유전적다형성을 정확히 평가한데 기초하여 계통들사이의 유전거리를 계산하고 무리를 정확히 구분하는것이다. 형질표식자와 검정자에 의한 무리구분과 잡종쌍선택에서는 적지 않은 문제들이 제기된다.[1-6]

분자표식자를 리용하여 강냉이제꽃가루받이계통들사이의 유전거리를 계산하고 무리를 구분하는 연구자료는 여러건 제기되었으나 리용한 강냉이제꽃가루받이계통이 다르고 프라이머선택에서 연구자마다 일정한 차이가 존재한다.[7]

이로부터 우리는 RAPD기술을 리용하여 현재 우리 나라에서 리용하거나 앞으로 리용 전망이 있는 강냉이제꽃가루받이계통들사이의 유전거리를 계산하고 무리를 구분하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

재료로는 현재 우리 나라에서 강냉이(*Zea mays* L.) 1대잡종육성에서 검정자로 되고있는 계통들과 새로 개발한 제꽃가루받이계통 40개를 리용하였다.

게놈DNA분리 게놈DNA분리는 CTAB법으로 진행하였다. DNA순도와 농도는 분광광도계(《Nanodrop2000》)를 리용하여 260nm와 280nm에서 측정하고 1% 아가로즈겔전기영동으로 확인하였다.

다형성프라이머선택발 RAPD프라이머종합키트(READY To Go™ RAPD Analysis Beads Kits)에서 30개의 프라이머를 다형성프라이머선택발에 리용하였다.

PCR 주형DNA 1μL(50~100ng), 프라이머 0.4μL, PCR Mix(3mmol/L MgCl₂, 0.2mol/L dNTP, 5U/μL *Taq* DNA폴리메라제, 10×PCR완충액포함) 5μL, ddH₂O 13.6μL, 총체적 20μL 되게 맞추었다. PCR조건은 94℃ 예비변성 5min→45회전의 94℃ 변성 30s, 36℃ 아닐링 1min, 72℃ 사슬연장 90s→최종사슬연장 72℃ 10min이다.

PCR는 PCR장치(C1000Touch™ Thermal Cycler; 《BIORAD》)에서 위의 프로그램에 따라 진행하였다.

겔전기영동 다형성프라이머선택발에서는 증폭산물들을 1% 아가로즈겔에서, 다형성프라이머에 의한 PCR산물들은 8% 폴리아크릴아미드겔전기영동장치(《BIORAD》 Mini-Protein® Tetra System)에서 영동하여 겔화상입력장치(《Geldoc-It™》)에서 관찰하고 총띠수와 다형성띠수, 다형률을 평가하였다.

유전적류연관계분석 유전적다양성해석프로그램 NTSYS_{PC} 2.11a를 리용하여 강냉이제꽃가

루받이계통들사이의 유사성행렬을 작성하고 그에 기초하여 유전거리를 계산하여 류연관계를 분석하였다.

결과 및 논의

강냉이계통들에서 게놈DNA분리 및 확인 강냉이의 씨눈을 채취하여 DNA를 분리하였다. 모든 시료들에서 분리한 DNA의 농도가 10~100ng/mL범위이고 A_{260}/A_{280} 값이 1.8~2.0사이에 있으므로 분리한 DNA가 비교적 순수하게 분리되었다고 볼수 있다. 분리한 게놈DNA에 대하여 1% 아가로스겔전기영동을 진행하였다. 모든 개체로부터 분리한 DNA는 아가로스겔 전기영동상에서 단일띠로 나타났으므로 PCR에 리용할수 있다.

강냉이에서 유전적다형성이 높은 프라이머선발 RAPD프라이머종합키트에 서 지금까지 강냉이품종들에서 연구된 다형률이 높은 프라이머 30개를 선택하고 3개 계통의 시료DNA를 주형으로 하여 PCR를 진행한 다음 다형률을 평가하였다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 리용한 RAPD프라이머의 PCR증폭띠수는 프라이머당 차이가 심한데 증폭산물은 1~14개이며 그 크기는 100~3 000bp 사이에 있다.

강냉이계통들에서 유전적다형성이 높은 30개의 프라이머를 리용하였을 때 나타나는 전기영동띠수와 다형률은 표와 같다.

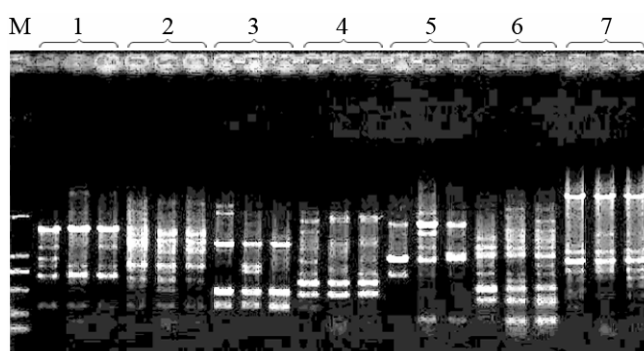


그림 1. RAPD프라이머 1-7(OPR1, OPR2, OPR3, OPR4, OPR5, OPR6, OPR7)을 리용한 3개 시료 (<441>, <81-4>, <황-C>)계통PCR산물의 1% 아가로스겔전기영동상

M은 분자크기표식자(DL2 000: 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100bp), 기타 프라이머의 영동자료는 제시하지 않음

표. 30개의 프라이머를 리용한 전기영동띠수와 다형률

No.	프라이머 이름	프라이머 염기배열	총띠수 /개	다형성 띠수/개	다형률 %	No.	프라이머 이름	프라이머 염기배열	총띠수 /개	다형성 띠수/개	다형률 %
1	OPR1	TgCgggTCCT	6	3	50.0	16	OPT2	ggAgAgACTC	6	3	50.0
2	OPR2	CACAgCTgCC	11	3	27.3	17	OPT3	TCCACTCCTg	3	1	33.3
3	OPR3	ACACAgAggg	8	4	50.0	18	OPT4	gggTTTggCA	6	2	33.3
4	OPR4	CCCgTAGCAC	11	7	63.4	19	OPT6	CAAgggCagA	6	1	16.7
5	OPR6	gTCTACggCA	8	5	62.5	20	OPN6	gAgACgCACA	12	7	58.3
6	OPR7	ACTgGCCTgA	13	7	53.8	21	OPT11	TTCCCCgCgA	1	1	0
7	OPR8	CCCgTTgCCT	9	4	44.4	22	OPT12	gggTgTgTAg	8	4	50.0
8	OPR9	TgAgCACgAg	11	10	90.9	23	OPT13	AggACTgCCA	9	4	44.4
9	OPR10	CCATTCCCCA	11	3	27.3	24	OPT14	AATgCCgCag	9	5	55.6
10	OPR11	gTAgCCgTCT	6	1	16.7	25	OPT15	ggATgCCACT	6	5	83.3
11	OPR12	ACAggTgCgT	9	3	33.3	26	OPT16	ggTgAACgCT	14	8	57.1
12	OPR14	CAGgATTCCC	1	1	0	27	OPT17	CCAACgTCgT	12	10	83.3
13	OPR15	ggACAACgAg	7	4	57.1	28	OPT18	gATgCCAgAC	7	3	42.9
14	OPR20	ACggCAAggA	7	4	57.1	29	OPT20	gACCAATgCC	9	5	55.6
15	OPT1	gggCCACTCA	2	2	0	30	OPF5	CCgAATTCCC	9	5	55.6

표에서 보는바와 같이 리용한 프라이머 30개중 다형률이 50%이상인 프라이머는 17개(OPR1, OPR3, OPR4, OPR6, OPR7, OPR9, OPR15, OPR20, OPN6, OPT2, OPT12, OPT14, OPT15, OPT16, OPT17, OPT20, OPF5)로서 56.7%이다. 특히 OPR9(90.9%), OPT15(83.3%), OPT17(83.3%)은 다형률이 80%이상으로서 매우 높다. 선행연구[3]에 의하면 20종의 강냉이에 대하여 20개의 프라이머를 리용하였을 때 총증폭띠수 291개중 169개의 다형성띠가 나타났으며 프라이머당 평균다형성띠수는 8.5개로서 우리의 연구결과와 일정한 차이가 나지만 그것은 리용한 프라이머와 강냉이종의 차이에 그 원인이 있다고 볼수 있다.

강냉이제꽃가루받이계통들에서 RAPD분석 40개의 강냉이제꽃가루받이계통들에서 유전적 다형률이 50%이상인 프라이머 OPR1, OPR3, OPR4, OPR6, OPR20, OPT4, OPF5를 리용하여 PCR를 진행하고 전기영동분석을 한 결과는 그림 2—8과 같다.

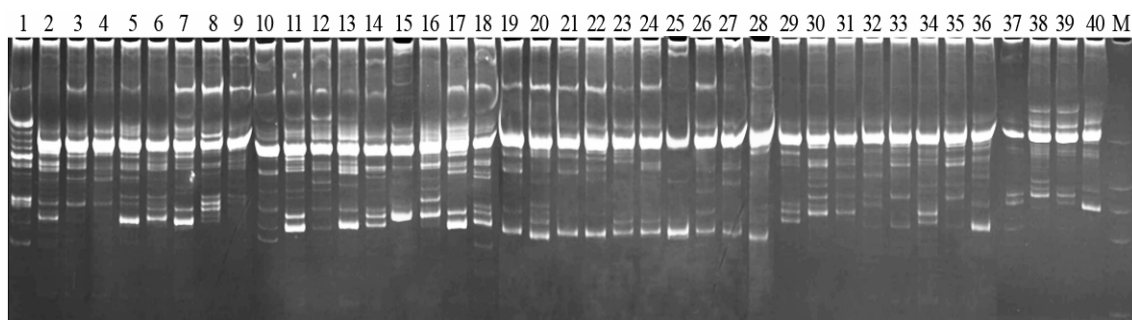


그림 2. OPR1을 리용한 PCR산물의 8% 폴아겔전기영동상
M은 분자크기표식자(DL2000), 1—40은 강냉이제꽃가루받이계통들의 번호

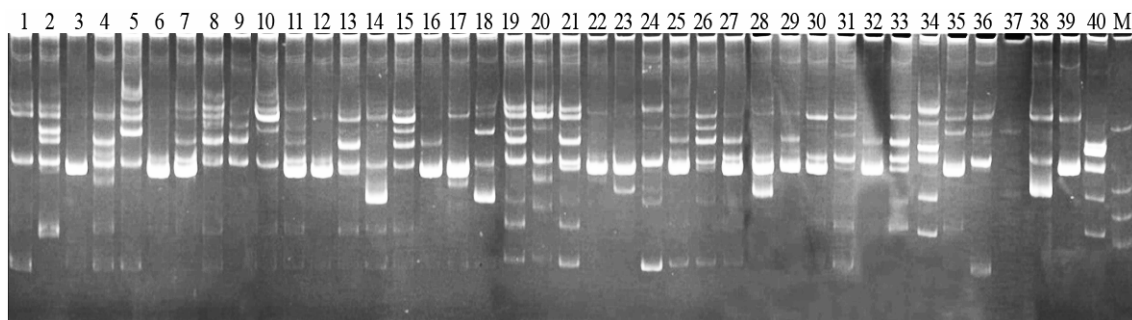


그림 3. OPR3을 리용한 PCR산물의 8% 폴아겔전기영동상
M은 분자크기표식자(DL2000), 1—40은 강냉이제꽃가루받이계통들의 번호

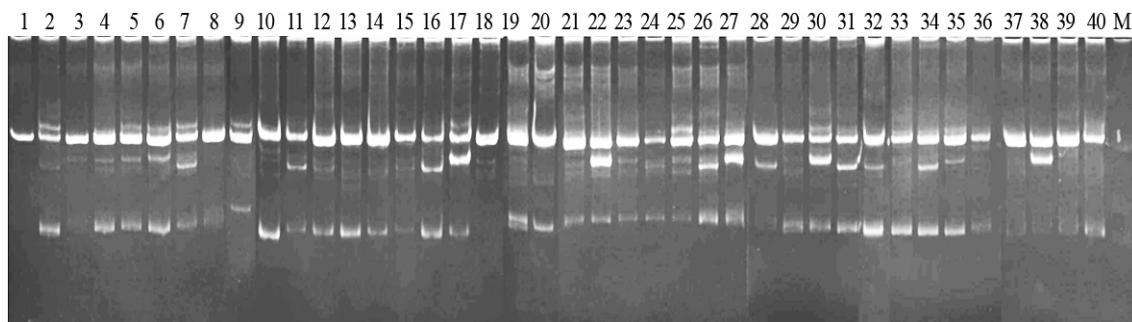


그림 4. OPR4를 리용한 PCR산물의 8% 폴아겔전기영동상
M은 분자크기표식자(DL2000), 1—40은 강냉이제꽃가루받이계통들의 번호

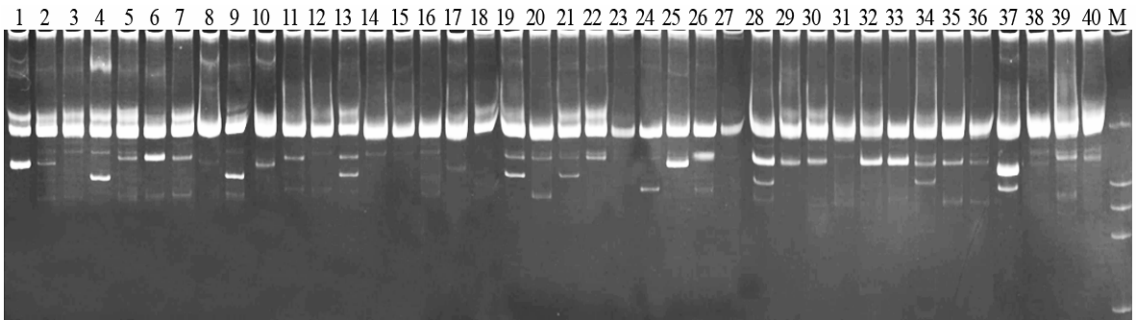


그림 5. OPR6을 리용한 PCR산물의 8% 폴아겔전기영동상
M은 분자크기표식자(DL2000), 1—40은 강냉이제꽃가루받이계통들의 번호

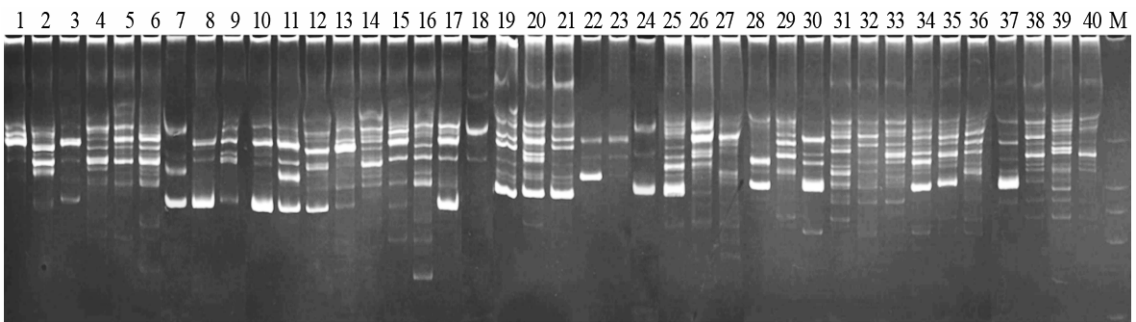


그림 6. OPR20을 리용한 PCR산물의 8% 폴아겔전기영동상
M은 분자크기표식자(DL2000), 1—40은 강냉이제꽃가루받이계통들의 번호

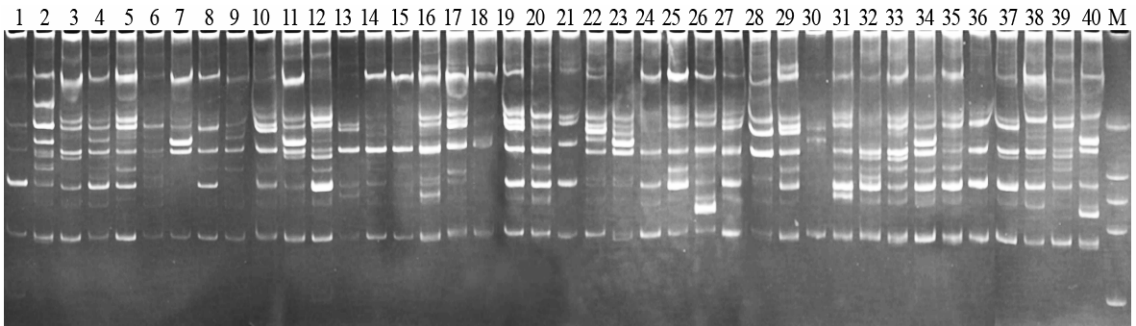


그림 7. OPT4를 리용한 PCR산물의 8% 폴아겔전기영동상
M은 분자크기표식자(DL2000), 1—40은 강냉이제꽃가루받이계통들의 번호

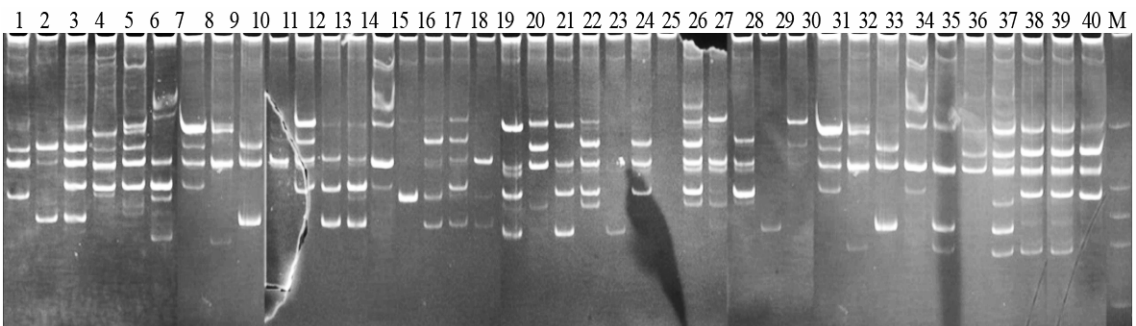


그림 8. OPF5를 리용한 PCR산물의 8% 폴아겔전기영동상
M은 분자크기표식자(DL2000), 1—40은 강냉이제꽃가루받이계통들의 번호

그림 2-8에서 보는바와 같이 OPR1, OPT4의 증폭범위는 200~3 000bp, OPR3, OPF5의 증폭범위는 150~2 400bp, OPR4의 증폭범위는 200~2 000bp, OPR6의 증폭범위는 500~2 200bp, OPR20의 증폭범위는 100~3 000bp이다.

증폭피수는 프라이머당 6~13개이며 7개의 프라이머에서 총피수는 91개, 다형성피수는 52개로서 전체적인 유전적다형률은 57.1%이다. PCR산물의 크기는 100~3 000bp정도이다.

유전적다양성해석프로그램 NTSYS_{PC} 2.11a를 리용한 유전적류연관계분석 전기영동분석결과에 기초하여 40개의 강냉이제꽃가루받이계통들사이의 유전적류연관계를 유전적다양성해석프로그램 NTSYS_{PC} 2.11a를 리용하여 분석하고 그에 기초하여 계통수를 작성하였다.(그림 9)

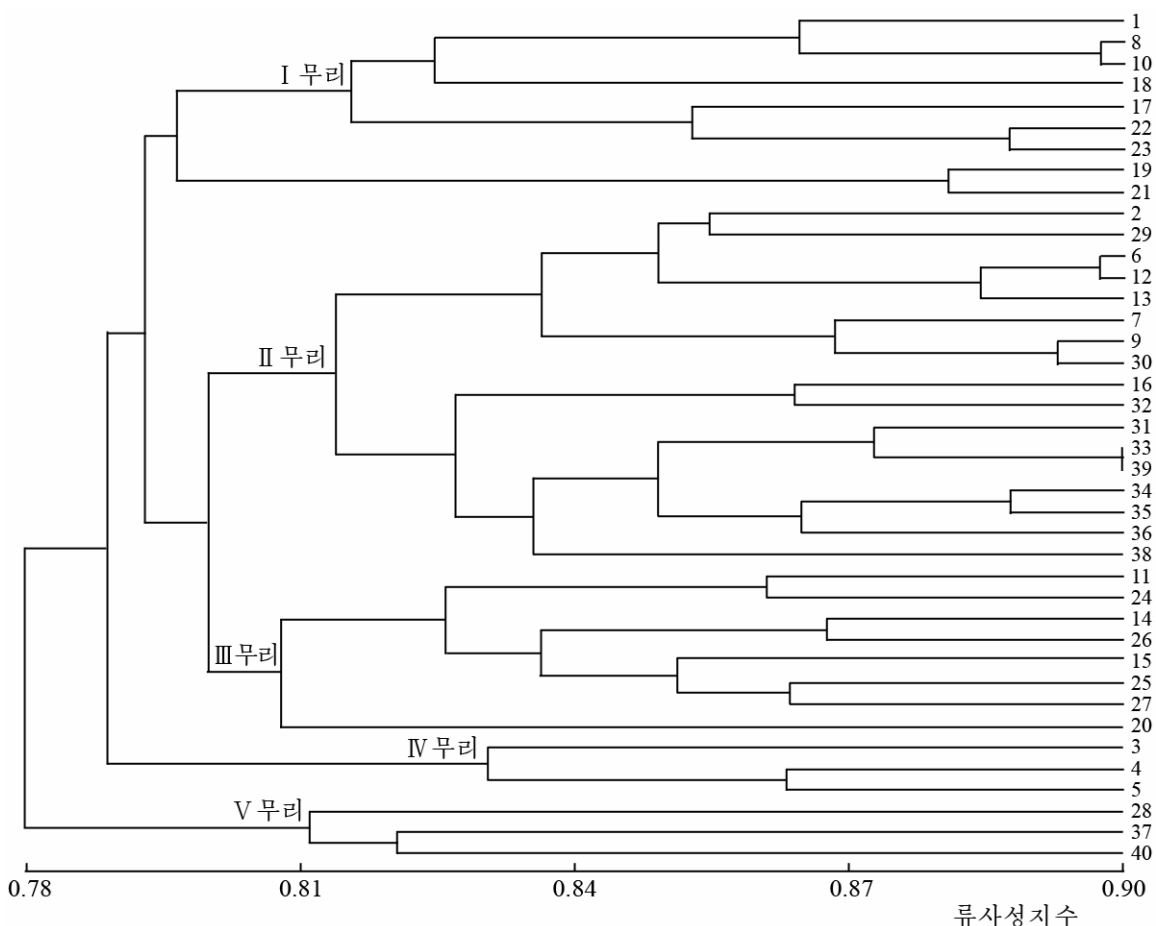


그림 9. 40개의 강냉이제꽃가루받이계통들의 계통수

그림 9에서 보는바와 같이 7개의 RAPD표식자들을 리용하여 40개의 강냉이제꽃가루받이계통들사이의 유전적류연관계를 분석하였을 때 크게 5개의 무리로 구분된다. 즉 I 무리에 9개, II 무리에 17개, III 무리에 8개, IV 무리에 3개, V 무리에 3개 계통이 속한다.

한편 RAPD분석결과에 의하여 구분된 무리에 속하는 계통들사이의 류사성지수를 보면 I 무리 0.82~0.90, II 무리 0.81~0.90, III 무리 0.81~0.89, IV 무리 0.83~0.88, V 무리 0.82~0.88로서 5개의 무리들사이의 류사성지수가 0.79~0.90사이에서 변하였다.

선행연구에서는 RAPD표식자 OPO-9, OPO-11, OPA-16, OPB-11, OPZ-7을 리용하여 강냉이 3개 아종 *Zea mays* ssp. *Mays*, *Z. mays* ssp. *Mexicana*, *Z. mays* ssp. *Parviglumis*사이의

유전적다양성을 평가하였는데 류사성지수가 0.76~0.86범위에 있었다.[1] 한편 22개의 RAPD 표식자를 리용하여 16개의 강냉이제꽃가루받이계통들사이의 유전적다양성을 평가하였는데 류사성지수가 0.59~0.83사이에 있었다.[5] 우리의 연구결과는 류사성지수가 0.79~0.90범위로서 유전적류연관계에서 선행한 연구와 류사한 분포범위에 있다고 볼수 있다.

맺 는 말

1) 강냉이제꽃가루받이계통들에서 리용한 프라이머 30개중 프라이머당 평균증폭띠수는 7.2개, 평균다형성띠수는 4.0개이며 다형률이 50%이상인 프라이머는 17개로서 56.7%, 80% 이상인 프라이머는 3개(OPR9 90.9%, OPT15 83.3%, OPT17 83.3%)이다.

2) RAPD표식자들을 리용하여 분석한 우리 나라에서 개발리용되고있는 40개의 강냉이제꽃가루받이계통들사이의 유전적류연관계무리는 크게 5개로서 I 무리에 9개, II 무리에 17개, III 무리에 8개, IV 무리에 3개, V 무리에 3개 계통이 속하며 무리들사이의 류사성지수는 0.79~0.90이다.

참 고 문 헌

- [1] A. I. Abuali et al.; African Journal of Biotechnology, 10, 42, 8245, 2011.
- [2] Georgi Bonchev et al.; Plant Genetic Resources, 16, 1, 50, 2018.
- [3] Nidhal Abdul Hussein Al-Badeiry et al.; Journal of Life Sciences, 7, 12, 1260, 2013.
- [4] G. Osman et al.; African Journal of Biotechnology, 12, 27, 4269, 2013.
- [5] Silvia Graciele Hulse de Souza et al.; An International Journal, 51, 1, 183, 2008.
- [6] L. Solla et al.; Plant Pathology, 57, 33, 2008.
- [7] Tereza Cholastova et al.; African Journal of Biotechnology, 10, 24, 4794, 2011.

주제109(2020)년 1월 5일 원고접수

The Genetic Relationship Analysis between Maize Self-Pollination Lines by RAPD Markers

Kim Kang, Pak Kyong Mi

We have done the genetic relationship analysis between 40 lines of maize self-pollination by RAPD markers.

Among the 30 primers used in maize self-pollination by RAPD markers the numbers of average amplified fragment bands and polymorphic band per primer are 7.2 and 4.0 respectively. 16 primers shows polymorphic rate of more than 50%. The primers of more than 80% in polymorphic rate are 3 namely OPR9(90.9%), OPT15(83.3%) and OPT17(83.3%).

The genetic relationship groups among 40 lines of maize self-pollination used in our country are divided into 5 groups, 9 in I group, 17 in II group, 8 in III group, 3 in IV group and 3 in V group and the similarity between groups is 0.79~0.90.

Keywords: RAPD, molecular marker, maize self-pollination line, genetic relationship