

불멸의 꽃 김일성화에서 몇가지 유전적변이성검증을 위한 RAPD표식자기술의 개발

한경선, 김춘상, 박학성

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《김일성화는 나라의 국보이며 수령님의 존함으로 빛나는 불멸의 꽃을 가지고있는것은 우리 인민에게 있어서 크나큰 자랑이며 영광입니다. 우리는 김일성화를 잘 키워 대대손손 길이 전하며 김일성화가 우리 나라의 그 어디에서나 만발하도록 하여야 합니다.》(《김정일선집》증보판 제22권 295페이지)

불멸의 꽃 김일성화의 원종적특성을 유지하고 표준형만을 재배보급하는것은 매우 중요한 문제로 나선다.

임의의 증폭다형DNA(Random Amplified Polymorphic DNA: RAPD)기술은 생물종과 품종들사이에 유전적다형성을 밝히는데 리용되는데 이 기술을 리용하여 표준형과 차이나는 변이형을 갈라볼수 있다.[1-3]

우리는 김일성화의 품종적특성을 보존하고 표준형만을 재배보급하기 위하여 순화모단계에서 식물체의 형태와 꽃핀 단계에서 꽃의 형태적특징이 표준형과 다른 변이형들을 선발하고 그것의 유전적변이성을 밝히기 위한 RAPD표식자기술을 개발하였다.

재료 및 방법

1) 재료

재료로는 6개월 자란 김일성화 순화모와 5~6년생 꽃핀 개체를 재료로 리용하였다.

2) RAPD분석방법

게놈DNA분리 표준형과 변이형개체들의 두번째 잎을 취하여 CTAB법으로 게놈DNA를 분리하였다. DNA순도는 A_{260}/A_{280} 값을 리용하여 판정하고 1.2% 아가로즈겔전기영동으로 확인하였다. RAPD표식자기술을 리용하여 *Dendrobium*속의 종들에서 유전적다형성을 연구한 선행연구자료[1, 2]에서 리용한 프라이머들과 보충한 프라이머들을 포함하여 24개의 프라이머를 리용하였다.

PCR증폭 주형DNA 1 μ L(50~100ng), 프라이머 2 μ L, PCR Mix(3mmol/L MgCl₂, 0.2mol/L dNTP, 0.1U/ μ L Taq DNA폴리메라제, 2 \times PCR완충액포함) 12.5 μ L, dH₂O 9.5 μ L 총체적 25 μ L 되게 맞추었다. PCR조건은 예비변성 94 $^{\circ}$ C 5min→변성 94 $^{\circ}$ C 30s, 아닐링 36 $^{\circ}$ C 1min, 사슬연장 72 $^{\circ}$ C 90s, 45회전→최종사슬연장 72 $^{\circ}$ C 10min이다. PCR는 PCR장치(《C1000TouchTM Termal Cycler; BIORAD》)에서 우의 프로그램에 따라 진행하였다.

아가로즈겔전기영동 증폭산물들을 1.2% 아가로즈겔에서 전기영동하고 에티디움브로미드로 염색한 다음 겔화상입력장치(《Geldoc-ItTM》)에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

1) 김일성화에서 게놈DNA분리 및 확인

순화모(표준형과 Dentay류사형), 꽃핀 개체(표준형과 Denbig류사형), 기타형에서 3개 개체씩, 꽃핀 개체(Denpha류사형)에서 5개 개체, 순화모(Denpha류사형)와 꽃핀 개체(Dentay류사형)에서 1개체씩 임의로 선발하여 그것들의 잎으로부터 DNA를 분리하였다.

모든 개체들의 잎에서 분리한 DNA의 농도가 10~100ng/mL범위에 들어가고 A_{260}/A_{280} 값이 1.8~2.0사이에 있으므로 DNA가 비교적 순수하게 분리되었다고 보고 다음분석을 진행하였다.

분리한 DNA들에 대한 1.2% 아가로스겔전기영동결과는 그림 1과 같다.

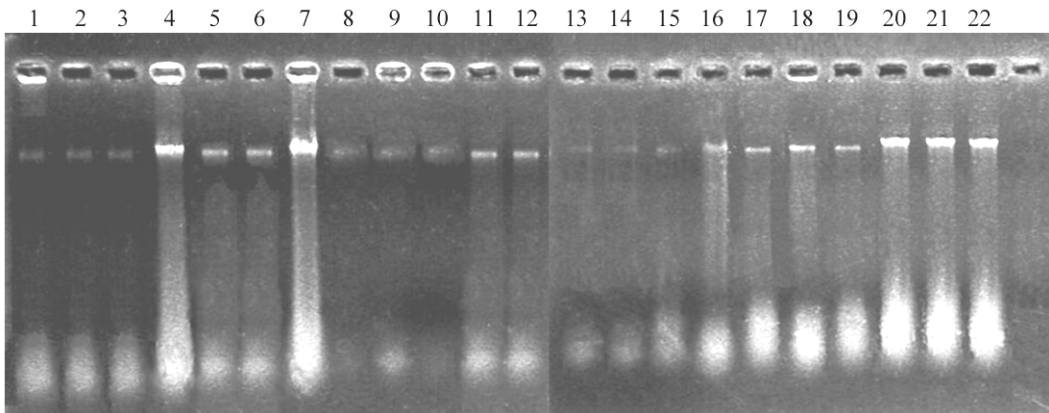


그림 1. 22개 시료DNA의 1.2% 아가로스겔전기영동상

1-3은 표준형(순화모), 4-6은 Dentay류사형(순화모), 7-Dentay류사형(꽃핀 개체),
8-10은 기타형, 11, 12는 Denpha류사형 1, 13-15는 Denpha류사형 2,
16-Denpha류사형(순화모), 17-19는 Denbig류사형, 20-22는
표준형(꽃핀 개체)

그림 1에서 보는바와 같이 모든 개체들로부터 분리한 DNA는 아가로스겔전기영동상에 단일띠로 나타났으므로 PCR에 리용할수 있다.

2) 김일성화에서 유전적다형성이 높은 프라이머선발

분리한 김일성화표준형과 분리형들의 DNA들을 주형으로 하고 *Dendrobium*의 종들에서 다형성이 높다고 선발된 프라이머들[1-3]을 포함하여 24개의 프라이머들을 가지고 PCR를 진행하고 증폭산물들에 대한 1.2% 아가로스겔전기영동을 진행하였다.

김일성화에서 유전적다형성이 높은 24개의 프라이머를 리용하였을 때 나타나는 전기영동띠수와 다형률은 표 1과 같다.

표 1에서 보는바와 같이 유전적다형률이 50%이상인 프라이머는 A02, C11, G19, N06이며 유전적다형률이 40%이상인 프라이머는 C20, H18이다. 우리가 선발한 프라이머들은 다형률이 45~50%정도로써 앞으로 김일성화에서 RAPD분자표식자를 리용한 유전적류연관계 분석에 리용할수 있다.

표 1. 김일성화표준형과 분리형들에서 24개의 프라이머를 리용한 전기영동띠수와 다형률

프라이머 이름	프라이머 염기배열	띠 수/개				총띠 수 /개	차이띠 수/개	다형률 /%
		표준형	Dentay 류사형	Denbig 류사형	Denpha 류사형			
A02	TGCCGAGCTG	7	8	5	8	8	4	50.0*
A09	GGGTAACGCC	6	6	6	6	6	0	0
A18	AGGTGACCGT	5	5	4	4	6	1	16.7
B04	GGACTGGAGT	3	4	2	4	5	2	40.0
B05	TGCGCCCTTC	5	8	3	7	8	3	37.5
B07	GGTGACGCAG	5	6	4	4	7	2	28.6
C02	GTGAGGCGTC	6	3	4	5	6	1	16.7
C03	GGGGGTCTTT	5	4	4	4	5	1	20.0
C07	GTCCCGACGA	7	6	8	8	8	1	12.5
C11	AAAGCTGCGG	8	9	7	6	10	5	50.0*
C20	ACTTCGCCAC	8	7	6	8	9	4	44.4
D03	GTCGCGAAGG	3	4	5	5	5	1	20.0
G05	CTGAGACGGA	6	7	4	7	8	2	25.0
G17	ACGACCGACA	6	5	5	4	6	1	16.7
G19	GTCAGGGCAA	6	3	4	6	6	3	50.0*
H01	GGTCGGAGAA	5	5	6	4	6	1	16.7
H03	AGACGTCCAC	7	7	6	6	7	1	14.3
H04	GGAAGTCGCC	6	7	7	7	7	1	14.3
H07	CTGCATCGTG	5	5	5	6	6	1	16.7
H18	GAATCGGCCA	6	8	5	11	11	5	45.5
I14	TGACGGCGGT	7	7	7	9	9	2	22.2
N06	GAGACGCACA	7	8	4	7	8	4	50.0*
P02	TCGGCACGCA	5	4	4	3	5	2	40.0
P08	ACATCGCCCA	4	3	3	3	4	1	25.0
계		138	141	118	136	163	49	

3) 김일성화에서 유전적류연관계분석

김일성화의 표준형과 여러가지 분리형들에서 유전적다형률이 40%이상인 프라이머 A02, C11, C20, G19, H18, N06을 리용하여 PCR를 진행하고 전기영동을 하였다. 결과는 그림 2—7과 같다.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

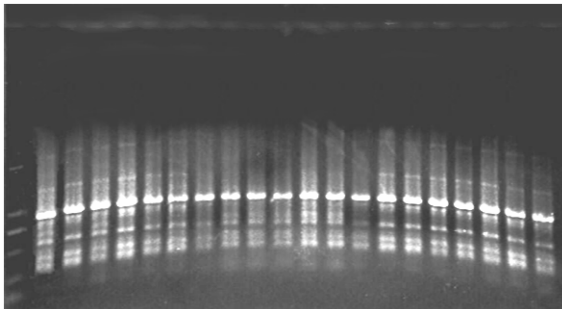


그림 2. 김일성화에서 프라이머 A02를 리용한 PCR증폭산물의 1.2% 아가로스겔전기영동상
M은 분자량표식자(DL2000), 1—3은 표준형(순화모), 4, 5는 Dentay류사형(순화모), 6—Dentay류사형(꽃핀 개체), 7—Denpha류사형(순화모), 8—10은 기타형, 11—14는 Denpha류사형(꽃핀 개체), 15—17은 Denbig류사형, 18—20은 표준형(꽃핀 개체)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M

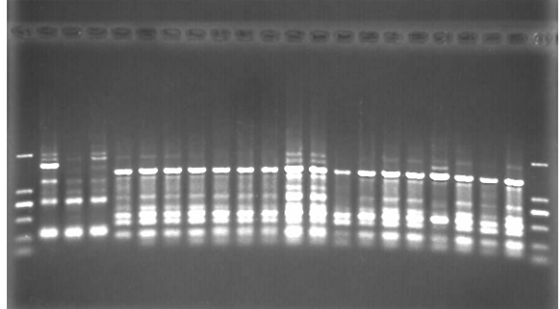


그림 3. 김일성화에서 프라이머 C11을 리용한 PCR증폭산물의 1.2% 아가로스겔전기영동상
M은 분자량표식자(DL2000), 1—3은 표준형(순화모), 4, 5는 Dentay류사형(순화모), 6—Dentay류사형(꽃핀 개체), 7—Denpha류사형(순화모), 8—10은 기타형, 11—14는 Denpha류사형(꽃핀 개체), 15—17은 Denbig류사형, 18—20은 표준형(꽃핀 개체)

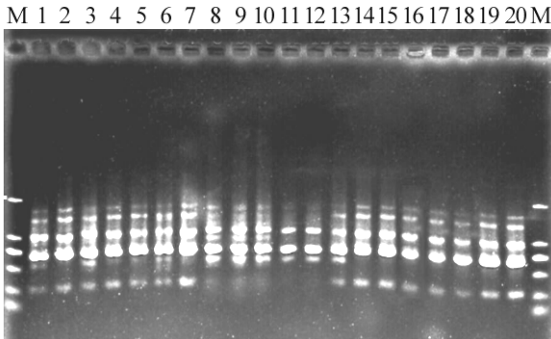


그림 4. 김일성화에서 프라이머 C20을 리용한 PCR증폭산물의 1.2% 아가로스겔전기영동상
M은 분자량표식자(DL2000), 1-3은 표준형(순화모), 4, 5는 Dentay류사형(순화모), 6-Dentay류사형(꽃핀 개체), 7-Denpha류사형(순화모), 8-10은 기타형, 11-14는 Denpha류사형(꽃핀 개체), 15-17은 Denbig류사형, 18-20은 표준형(꽃핀 개체)

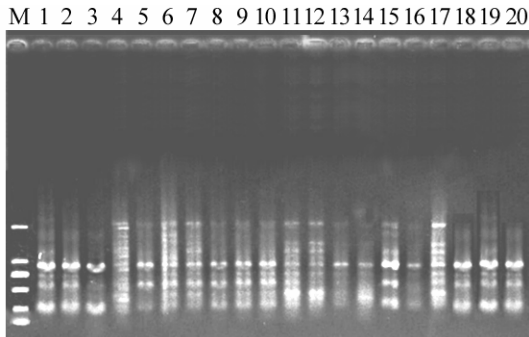


그림 6. 김일성화에서 프라이머 G19를 리용한 PCR증폭산물의 1.2% 아가로스겔전기영동상
M은 분자량표식자(DL2000), 1-3은 표준형(순화모), 4, 5는 Dentay류사형(순화모), 6-Dentay류사형(꽃핀 개체), 7-Denpha류사형(순화모), 8-10은 기타형, 11-14는 Denpha류사형(꽃핀 개체), 15-17은 Denbig류사형, 18-20은 표준형(꽃핀 개체)

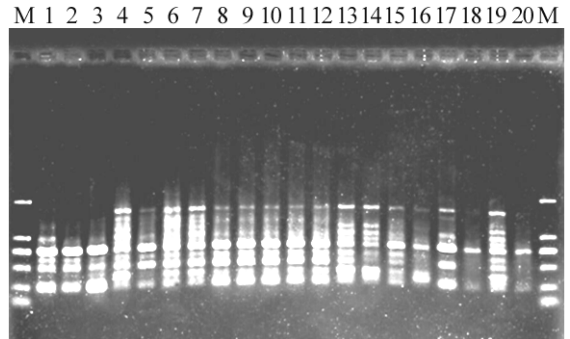


그림 5. 김일성화에서 프라이머 N06을 리용한 PCR증폭산물의 1.2% 아가로스겔전기영동상
M은 분자량표식자(DL2000), 1-3은 표준형(순화모), 4, 5는 Dentay류사형(순화모), 6-Dentay류사형(꽃핀 개체), 7-Denpha류사형(순화모), 8-10은 기타형, 11-14는 Denpha류사형(꽃핀 개체), 15-17은 Denbig류사형, 18-20은 표준형(꽃핀 개체)

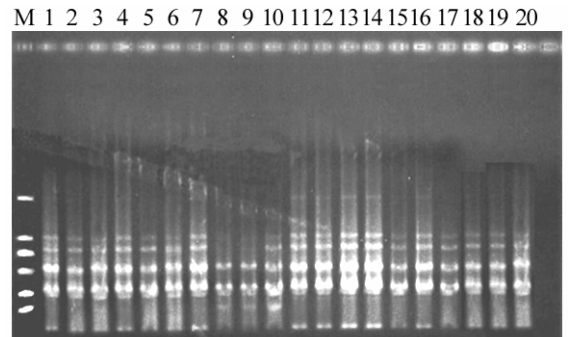


그림 7. 김일성화에서 프라이머 H18을 리용한 PCR증폭산물의 1% 아가로스겔전기영동상
M은 분자량표식자(DL2000), 1-3은 표준형(순화모), 4, 5는 Dentay류사형(순화모), 6-Dentay류사형(꽃핀 개체), 7-Denpha류사형(순화모), 8-10은 기타형, 11-14는 Denpha류사형(꽃핀 개체), 15-17은 Denbig류사형, 18-20은 표준형(꽃핀 개체)

그림 2-7에서 보는바와 같이 A02과 C11, B07, C20, N06의 증폭범위는 250~2 000bp, G19의 증폭범위는 250~2 500bp, H18의 증폭범위는 100~2 000bp이다.

프라이머종류에 따라 영동띠의 수와 위치에서 차이가 있으며 같은 프라이머에서 시료에 따라 차이가 명백하게 나타났다.

증폭띠수는 시료당 7~11개이다. 6개의 프라이머에서 총띠수는 57개이며 다형성띠수는 21개로서 전체적인 유전적다형률은 36.8%이다. PCR산물의 크기는 0.1~2.5kb정도로써 증폭산물들의 분자량범위가 넓었다.

4) RAPD표식자분석프로그램 SLT_NTsys_2.10e를 리용한 유전적류연관계분석

전기영동분석결과에 기초하여 분리형들사이의 유전적류연관계를 RAPD분석프로그램 SLT_NTsys_2.10e를 리용하여 분석하였다. 전기영동상들에서 매 증폭띠들의 유무에 기초하여 김일성화표준형과 분리형 20개 개체들사이의 유전거리값(표 2)을 구하고 계통수(그림

8)를 작성하였다.

표 2. 김일성 화에서 개체들사이의 유전거리값

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	0.000 0																			
2	0.000 0	0.000 0																		
3	0.000 0	0.000 0	0.000 0																	
4	0.204 3	0.204 3	0.204 3	0.000 0																
5	0.204 3	0.204 3	0.204 3	0.000 0	0.000 0															
6	0.186 8	0.186 8	0.186 8	0.009 9	0.009 9	0.000 0														
7	0.260 3	0.260 3	0.260 3	0.030 9	0.030 9	0.040 8	0.000 0													
8	0.173 3	0.173 3	0.173 3	0.143 4	0.143 4	0.129 8	0.136 6	0.000 0												
9	0.173 3	0.173 3	0.173 3	0.143 4	0.143 4	0.129 8	0.136 6	0.000 0	0.000 0											
10	0.179 8	0.179 8	0.179 8	0.170 5	0.170 5	0.155 7	0.164 8	0.021 7	0.021 7	0.000 0										
11	0.173 3	0.173 3	0.173 3	0.119 9	0.119 9	0.106 8	0.161 3	0.136 6	0.136 6	0.164 8	0.000 0									
12	0.173 3	0.173 3	0.173 3	0.119 9	0.119 9	0.106 8	0.161 3	0.136 6	0.136 6	0.164 8	0.000 0	0.000 0								
13	0.149 9	0.149 9	0.149 9	0.136 9	0.136 9	0.146 8	0.158 6	0.186 0	0.186 0	0.221 4	0.186 0	0.186 0	0.000 0							
14	0.154 1	0.154 1	0.154 1	0.163 9	0.163 9	0.173 8	0.188 5	0.217 5	0.217 5	0.195 8	0.217 5	0.217 5	0.025 6	0.000 0						
15	0.151 6	0.151 6	0.151 6	0.075 2	0.075 2	0.085 1	0.114 8	0.114 8	0.114 8	0.143 1	0.090 7	0.090 7	0.110 2	0.138 6	0.000 0					
16	0.151 6	0.151 6	0.151 6	0.075 2	0.075 2	0.085 1	0.114 8	0.114 8	0.114 8	0.143 1	0.090 7	0.090 7	0.110 2	0.138 6	0.000 0	0.000 0				
17	0.151 6	0.151 6	0.151 6	0.075 2	0.075 2	0.085 1	0.114 8	0.114 8	0.114 8	0.143 1	0.090 7	0.090 7	0.110 2	0.138 6	0.000 0	0.000 0	0.000 0			
18	0.051 0	0.051 0	0.051 0	0.149 2	0.149 2	0.133 8	0.198 3	0.144 3	0.144 3	0.176 6	0.144 3	0.144 3	0.090 3	0.120 2	0.096 6	0.096 6	0.096 6	0.000 0		
19	0.051 0	0.051 0	0.051 0	0.149 2	0.149 2	0.133 8	0.198 3	0.144 3	0.144 3	0.176 6	0.144 3	0.144 3	0.090 3	0.120 2	0.096 6	0.096 6	0.096 6	0.000 0	0.000 0	
20	0.051 0	0.051 0	0.051 0	0.149 2	0.149 2	0.133 8	0.198 3	0.144 3	0.144 3	0.176 6	0.144 3	0.144 3	0.090 3	0.120 2	0.096 6	0.096 6	0.096 6	0.000 0	0.000 0	0.000 0

1-3은 표준형(순화모), 4, 5는 Dentay류사형(순화모), 6-Dentay류사형(꽃핀 개체), 7-Denpha류사형(순화모), 8-10은 기라형, 11-14는 Denpha류사형(꽃핀 개체), 15-17은 Denbig류사형, 18-20은 표준형(꽃핀 개체)

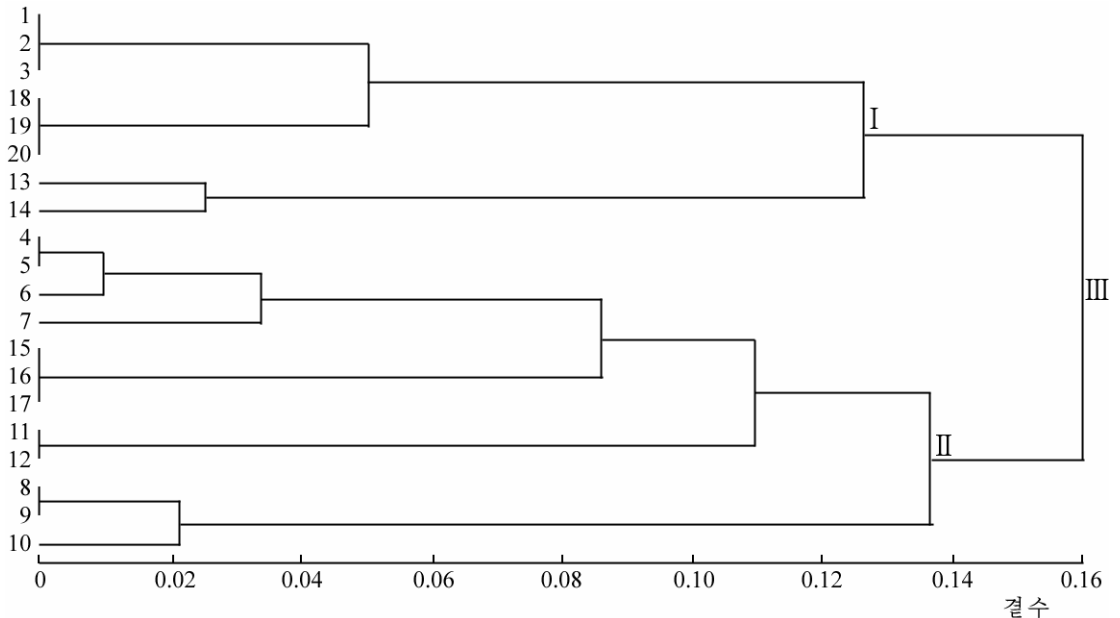


그림 8. 김일성화에서 개체들사이의 유전적류연관계를 보여주는 계통수
 1-3은 표준형(순화모), 4, 5는 Dentay류사형(순화모), 6-Dentay류사형(꽃핀 개체),
 7-Denpha류사형(순화모), 8-10은 기타형, 11-14는 Denpha류사형(꽃핀 개체),
 15-17은 Denbig류사형, 18-20은 표준형(꽃핀 개체)

그림 8에서 보는바와 같이 RAPD표식자기술을 리용하여 김일성화표준형과 분리형들을 분석할 때 순화모(표준형 1-3)와 꽃핀 개체(표준형 18-20)가 유전거리 0.05정도에서 한 무리를 이루며 이것은 유전거리 0.13정도에서 Denpha류사형(꽃핀 개체 13-14)과 한무리(I)로 합쳐진다. 그외 나머지분리형들은 제각기 무리를 이루다가 유전거리 0.14정도에서 한무리(II)로 합쳐진다. 순화모(표준형)와 꽃핀 개체(표준형)는 개체간 차이로 하여 유전거리 0.05정도에서 한무리로 합쳐진다고 볼수 있다. 그림 8을 통하여 김일성화표준형과 분리형들은 꽃 모양과 색 등 형태적특징에서뿐만아니라 유전자수준에서 차이가 있다는것을 알수 있다.

김일성화재배과정에 나타나는 변이형들은 환경요인에 의한 일시적인 변이가 아니라 표준형과 유전적으로 차이나는것이기때문에 원종적특성을 갖춘 표준형만을 선발하여 재배보급하는것이 중요하다.

맺 는 말

1) 불멸의 꽃 김일성화재배과정에 나타나는 여러가지 분리형들과 표준형사이의 유전적류연관계를 분석하기 위한 RAPD표식자기술적용에서 유전적다형률이 50%이상인 프라이머는 A02, C11, G19, N06이며 유전적다형률이 40%이상인 프라이머는 C20, H18이다.

2) 김일성화표준형과 분리형들사이의 차이는 환경요인에 의한 일시적인 변이가 아니라 유전적인 차이이다.

참 고 문 헌

- [1] Dawei Xue et al.; Journal of Genetics and Genomics, 37, 197, 2010.
- [2] Xueqiang Zha et al.; African Journal of Biotechnology, 8, 10, 2064, 2009.
- [3] 李吴 等; 药物生物技术, 20, 4, 361, 2013.

주체107(2018)년 4월 5일 원고접수

Development of RAPD Markers Technique for the Identification of Some Genetic Variability in Immortal Flower Kimilsungia

Han Kyong Son, Kim Chun Sang and Pak Hak Song

To conserve the features of variety of Kimilsungia and cultivate and propagate only normal type, the RAPD markers technique for the selection of the deviation types which were different from normal type in young sapling and flowered stage, and for figuring out the genetic variability of the deviation types was developed.

In the application of the RAPD markers technique, the primers of which genetic polymorphic rate are more than 50% are A02, C11, G19 and N06. And the primers of which genetic polymorphic rate are more than 40% are C20 and H18.

The difference between normal type and deviation type of Kimilsungia is not temporary mutation caused by environmental factor, but the genetic difference.

Key words: genetic relationship, orchid, RAPD, *Dendrobium*