

백두산지역과 국내 더덕 수집종의 RAPD에 의한 유연관계 분석

두홍수* · 류점호**† · 이강수** · 이호림*** · 유현호***

*호남농업시험장, **전북대학교 생물자원과학부(농업과학기술연구소), ***연변대학 농학원

Analysis of Genetic Relationship by RAPD Technique for *Codonopsis lanceolata* Trauty Collected from the Baekdoo Mountain and Korea

Doo Hong Soo*, Ryu Jeom Ho**†, Lee Kang Soo**, Li Hu Lin***, Liu Xian Hu***

* National Honam Agricultural Experiment Station, Iksna 570-080, Korea

** Faculty of Biological Resources Science (The Institute of Agricultural Science & Technology), Jeonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

*** Faculty of Agriculture, Yanbian University, Long Jing 133400, China

ABSTRACT : Extracted genomic DNA from 16 accessions of *Codonopsis lanceolata* collected from South Korea and the Baekdoo Mt. areas of China were analyzed for their genetic relationships by RAPD. Twenty 10-mer-oligonucleotide primers having reproductive polymorphism were selected for the RAPD analysis. The size of amplified DNA was almost between 125 bp and 2.0 kbp. Sixteen collected *Codonopsis lanceolata* were analyzed with 20 primers which generated 73(49.3%) polymorphic bands among 148 PCR products. The mean number of polymorphic bands were 7.4 and varied 1~9 per primer. It was, thus, demonstrated that RAPD was useful for detecting polymorphism in *Codonopsis lanceolata*. The range of 1-F value(genetic similarity) was from 0.682 to 0.959. These results indicate variable genetic similarities. By UPGMA (Unweighted Pair Group Method using an Arithmetic average) cluster analysis based on 1-F value, genetic distance among the 16 collected *Codonopsis lanceolata* was 0.133~0.400. It was certainly classified into two groups between collected accessions from Korea and China, and the genetic distance was about 0.281. Both accessions collected from Korea and China showed minor differences, while the genetic relationships of Tonghua Xian and Liuhe Xian from China was farthest with other accessions collected.

Key words : *Codonopsis lanceolata*, Baekdoo mountain, Korea, Genetic relationship, RAPD

서 언

더덕(*Codonopsis lanceolata* Trauty)은 초롱꽃과에 속하는 숙근성 다년생 식물로써 백삼, 사삼, 행엽, 가덕, 지취 등 여러 가지 이름으로 불리워지고 있으며(이, 1984) 중국, 한국 및 일본의 산간지역에 분포하고 있다. 방추형의 뿌리에는 saponin, pentosane, inulin, Vitamin B

1과 B2, 탄수화물, 단백질, 식물정유(植物精油) 등의 성분이 함유되어 있어(이, 1981) 약용으로 이용하기도 하는데, 특히 강장(強壯), 배농(排膿), 거담(祛痰), 해독(解毒), 해수(咳嗽) 등에 약리작용이 뛰어나 인삼의 대용생약으로 이용되고 있다(김과 정, 1974; 이, 1980). 또한 맛과 향이 독특하여 식품으로 널리 애용되고 있어 그 수요가 점차 증가될 전망이다.

† Corresponding author (Phone) : Jeom Ho Ryu., 063-270-2513, E-mail : jeomho@moak.chonbuk.ac.kr

Received 18 July 2002 / Accepted 22 August 2002

중국에서 일컫는 사삼이 국내에 유입되어 더덕으로 유통되고 있어 Lee *et al.*(2001)은 잔대와 더덕의 유연관계를 RAPD법으로 비교한 결과 잔대와 층층잔대의 차이점은 거의 없었으며, 더덕의 지역차이는 0.889의 유전적 거리를 나타내었다. Yoo *et al.*(1989)은 한국산 더덕속 식물을 외부형태, 식생조사, 해부학적 형질, 염색체 관찰 및 화학적 형질에 따라서 유연관계를 조사한 결과 각 종은 유의한 차이가 있었다. 그러나 각 지방에 자생하고 있는 더덕은 환경특성에 의한 종내 변이가 심하다.

최근에 식물의 유연관계를 분류하는 데에는 분자생물학적인 표지인자를 얻는 방법으로 RAPD의 분자생물학적인 방법이 많이 이용되고 있다. RAPD 방법은 PCR에 의해 열저항성 DNA 중합효소를 처리하고 DNA의 denaturation, primer의 annealing과 polymerization의 과정을 반복하여 유전자나 DNA의 특정부위에서 증폭된 다형 DNA 단편들을 이용하기 때문에 근친계통간에도 유연관계를 확실하게 구명할수 있으며, 시간과 노력이 RFLP에 비하여 적게 소요되어 최근에 다양한 분야에서 활용되고 있다(Innis *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1990). 따라서 최근에는 RAPD 분석에 의하여 식물 분류 또는 유연관계 분석 등이 목본식물과 초본식물의 구분 없이 활발하게 이루어지고 있다(Hu & Quiros, 1991; Lee *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996; Park *et al.* 1996; 박, 1995)

본 연구는 약용 및 식용으로 사용하는 더덕의 유연관계를 밝히기 위하여 중국의 북동부지역 백두산과 국내의 자생종을 수집하여 PCR을 이용한 RAPD 분석을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 식물체 수집

더덕은 국내 9 지역과 백두산을 중심으로 중국 북동부의 7 지역에서(Table 1) 2~3년근을 2000년부터 2년간 수집하여 전북대학교 농과대학 전자포장에 식재하였으며, 70% 차광비닐을 설치하였다.

2. Genomic DNA 추출

잎이 출현한 후 초기의 유엽을 채취하여 -70 °C의 deep freezer에서 급속 냉동시킨 후 Shure *et al.*(1983)의 방법을 변형하여 genomic DNA를 추출하였다. 1g의 잎과 액체질소를 첨가하여 미세하게 마쇄한 다음 50 ml centrifuge tube에 넣고 DNA extraction buffer (7 M urea, 1.83 g NaCl, 50 mM Tris/pH 8.0, 20 mM EDTA, 1% N-Lauroylsarcosine, 0.6% SDS) 5 ml를 첨가하고 65°C의 water bath에서 30분간 방치한 후 10분

Table 1. *Codonopsis lanceolata* accessions used in this study

No.	Accessions	Origin
1	Yeongwol #1	Korea
2	Yeongwol #2	Korea
3	Chunchon	Korea
4	Cheorwon	Korea
5	Jinan	Korea
6	Geumsan #1	Korea
7	Geumsan #2	Korea
8	Hongcheon #1	Korea
9	Hongcheon #2	Korea
10	Wangqing Xian	China
11	Linjiang Shi	China
12	Hunchun Shi	China
13	Meihokou Shi	China
14	Changbai Xian	China
15	Tonghua Xian	China
16	Liuhe Xian	China

간격으로 흔들어 주었다. 5 ml의 TE-phenol을 가하여 10분간 shaker에서 부드럽게 흔든 다음 5 ml의 chloroform을 첨가하여 10분간 shaker에서 흔들어 주었다. 5분간 원심분리(4°C, 10,000 rpm)하여 상정액을 새로운 tube로 옮긴 다음 각각 5 ml의 TE-phenol과 chloroform 처리 후 2.5 ml의 TE-phenol 및 chloroform 처리를 반복하였다. 1/10 volume의 3 M sodium acetate(pH 5.2)와 2 volume의 ethyl alcohol을 가하여 응집한 DNA만을 건져내어 70% ethyl alcohol에 세척한 후 공기 중에 약 1시간 동안 방치하여 건조시켰다. DNA를 1.5 ml tube에 옮겨 750 µl TE buffer로 DNA pellet을 녹인 후 동량의 TE-phenol과 chloroform을 처리하고 각각 10,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상정액을 취하였다. RNase의 최종농도를 10 µg/ml이 되도록 혼합하여 60°C에서 30분간 처리하고 TE-phenol과 chloroform 추출 및 3 M sodium acetate와 ethyl alcohol 처리를 반복한 후 DNA만을 건져내어 70% ethyl alcohol에 세척하여 공기 중에서 약 1시간 동안 건조시켰다. 건조시킨 DNA pellet은 200 µl TE buffer로 녹여 260 nm에서 정량한 후 -20°C에 보관하여 사용하였다.

3. Polymerase Chain Reaction

더덕의 genomic DNA polymerase chain reaction (PCR)을 위한 반응액은 Template DNA 20 ng, Primer

10 pmol, Taq DNA polymerase 1 unit, dNTP 250 M, Tris-HCl(pH 9.0) 10 mM, KCl 40 mM 및 MgCl₂ 1.5 mM로 전체 반응액은 20 μ l로 하였다. Primer는 Bioneer사의 Random primer 49종을 사용하였고, PCR기는 Perkin-Elmer사의 Peltier Thermal Cycler(PTC-200)를 사용하여 DNA fragment를 증폭하였는데, pre-denaturation은 94°C에서 5분간 수행한 후 denaturation은 94°C에서 1분, annealing은 36°C에서 1분 extension은 72°C에서 1분 30초로 하여 총 40 cycle을 반복한 후 last extension을 72°C에서 10분간 수행하였다.

PCR 반응이 끝난 후 TAE buffer(0.5)를 이용한 1.0 % agarose gel 상에서 50V의 전압으로 전기영동 후, Ethidium-bromide 수용액에 staining한 다음 증류수로 destaining하여 UV transilluminator상에서 polaroid 카메라로 촬영 및 분석하였다. 이상의 실험은 각각 3번 이상의 PCR을 수행하여 재현성을 확인하였다.

4. 유연관계 분석

PCR에 의해 증폭된 DNA band의 존재 유무에 따라서

band가 있을 경우에는 1, 없을 경우에는 0의 값으로 code화 하여 NTSYS(Numerical Taxonomy and Multi Analysis System) computer program의 UPGMA (Unweighted Pari-group Method with Arithmetic Average) 분석방법(Rohlf, 1989)으로 dendrogram을 작성하였다.

결과 및 고찰

더덕의 genomic DNA와 Bioneer사로부터 구입한 random primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR을 이용한 RAPD 분석은 생물재료를 대상으로 유전적 동질성의 확인에 적용되고 있으며, 10-mer primer의 염기 중 하나만 바뀌어도 band 양상이 다르게 나타날 수 있어 10-mer-oligonucleotide가 DNA 증폭을 통한 다형현상의 검증에 이용될 수 있다(Lee *et al.*, 1997). 본 연구에서 사용한 10-mer primer는 미세한 차이를 보임에도 불구하고 총 49종의 primer를 스크린 한 결과 재현성이 있으면서 polymorphism을 보이는 20개의 primer를 선발하였다(Table 2).

Table 2. The selected primers, sequence and the number of polymorphic bands produced from RAPD analysis of *Codonopsis lanceolata*

Primer ¹	Nucleotide sequence (5' to 3')	GC content (%)	No. of PCR products(a)	No. of polymorphic products(b)	Polymorphism (b/a × 100)
N-8002	5' CAA TCG CCG T 3'	60	8	6	75.0
N-8003	5' AGG GGT CTT G 3'	60	7	1	14.3
N-8005	5' GAA ACG GGT G 3'	60	9	4	66.7
N-8007	5' GTG ACG TAG G 3'	60	12	9	75.0
N-8008	5' TCC GCT CTG G 3'	70	5	4	80.0
N-8009	5' GGG TAA CGC C 3'	70	6	4	66.7
N-8011	5' GTG ATC GCA G 3'	60	6	2	33.3
N-8013	5' GTT TCG CTC C 3'	60	8	3	37.5
N-8015	5' GGA CTG GAG T 3'	60	8	2	25.0
N-8019	5' GTC CAC ACG G 3'	60	8	5	62.5
N-8024	5' TGA CGC GCT C 3'	70	10	4	40.0
N-8026	5' TGG GCT CGC T 3'	70	5	2	40.0
N-8027	5' TGC GCC GCG G 3'	90	6	1	16.7
N-8028	5' CCC GCC GTT G 3'	80	6	4	66.7
N-8033	5' ACA TCC TGC G 3'	60	6	2	33.3
N-8038	5' GGT CCC TGA C 3'	60	4	2	50.0
N-8040	5' GTT GCG ATC C 3'	60	7	2	28.6
N-8043	5' ATC TGC GAG C 3'	60	7	3	42.9
N-8045	5' CAA ACG TCG G 3'	60	10	7	70.0
N-8046	5' TTC CCG GAG C 3'	70	10	6	60.0
Total			148	73	(49.2) ²

¹ The primers were from Bioneer Co., ² Mean.

선발한 primer로부터 PCR에 의해 증폭된 DNA의 크기는 125 bp에서 2.0 kb 내외였는데(Fig. 1), 증폭된 DNA의 크기가 100 bp에서 1,500 bp 사이라는 주장과 (Rothuizen & Van Wolferen, 1994) 유사하였다. PCR 반응에 사용된 20개의 primer에서 총 148개의 band가 관찰되었는데, 각각의 primer별로 4~12개의 다양한 band를 나타내었으며, 평균 band 수는 7.4개였다. 총 148개의 band 중에서 polymorphism을 보이는 band의 수는 73개이었으며(49.3%), 그렇지 않은 밴드의 수는 75개(50.7%)이었다. Polymorphism은 각 primer별로 1~9개로써 다양하였는데, 이는 다른 약용작물인 홍화의 polymorphism 75.7%(Bang *et al.*, 2001)보다는 낮았으나 구기자의 29.1%(Park *et al.*, 2000)보다 높은 유전적 다형성을 보였다. 유전자 유연관계를 설명하기 위해서는 최소 10개의 primer로부터 100 개 이상의 band를 형성해야 하는데, 본 실험에서의 결과를 이용하여 더덕의 수집종에 대한 분류 및 동정이 가능하다고 판단된다.

증폭된 DNA band의 유무에 따라 1과 0으로 기호화한 후 통계분석에 이용하여 수집종간의 유사계수를 비교하였던 바(Table 3), 16개 수집종의 유사계수 범위는 0.682에서 0.959로써 유전적 유연정도는 크지 않은 것으로

판단된다. UPGMA 분석에 의한 수집종들의 유연관계를 dendrogram으로 나타낸 바(Fig. 2), 수집종들간의 유전적 거리는 0.133~0.400이었다. 국내 수집종과 중국 수집종간에는 확실하게 두 그룹으로 분류되었으며, 유전적 거리는 약 0.281이었다.

국내 수집종 간에는 강원도 지역의 '영월', '춘천' 및 '철원' 수집종과 전북의 '진안' 수집종, 강원도의 '홍천' 및 충남의 '금산' 수집종 등으로 각각 grouping 되어 지역적인 차이를 보였다. 중국 수집종 간에는 '梅河口市', '琿春市', '臨江市' 및 '汪清縣' 수집종이 한 그룹, '長白縣' 수집종이 한 그룹 그리고 '通化縣'과 '柳河縣' 수집종이 한 그룹으로 각각 grouping 되었는데, 이들 역시 국내 수집종과 마찬가지로 유전적 거리는 지역적인 차이를 보였다. 한편, '通化縣'과 '柳河縣' 수집종은 중국내 수집종 뿐만이 아니라 국내 수집종과도 유전적 거리가 크게 나타난 것이 특이하였다.

우리 나라 각 지방에 분포하고 있는 더덕과 중국 북동부지역에 있는 더덕 역시 외부적인 형태로서의 구분은 매우 힘든데, 국내산은 대체로 가늘고 매끈하며 연한 갈색이면서 향기가 많지만 수입산은 대체로 굵고 울퉁불퉁하며 검은색이면서 향기가 적다(이 등, 1996). 그러나

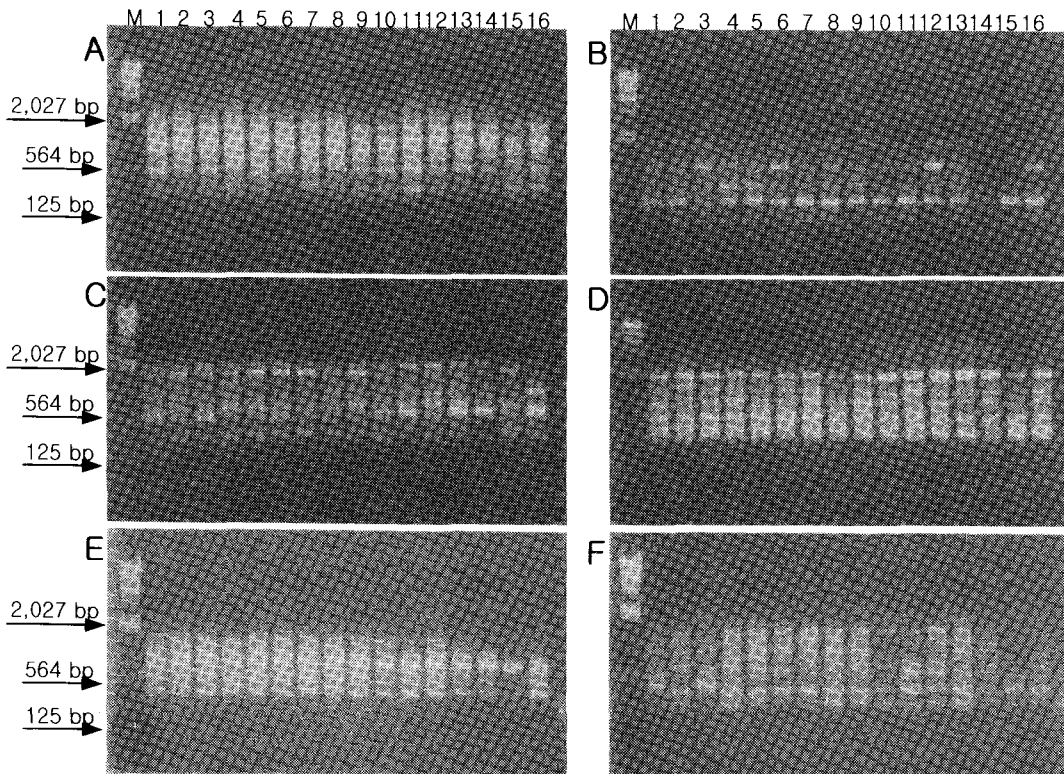


Fig. 1. RAPD polymorphisms of 16 accessions in *Codonopsis lanceolata* using primer N-8002(A), 05(B), 08(C), 28(D), 40(E), 46(F). M : DNA site marker(λ /Hind III). Abbreviations are in Table 1.

Table 3. Jaccard coefficients matrix(a/n - d) of 16 accessions of *Codonopsis lanceolata* based on 73 RAPD markers

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	-															
2	0.851	-														
3	0.892	0.905	-													
4	0.804	0.831	0.831	-												
5	0.831	0.858	0.858	0.892	-											
6	0.838	0.865	0.851	0.845	0.845	-										
7	0.885	0.899	0.899	0.865	0.892	0.899	-									
8	0.878	0.838	0.838	0.845	0.831	0.824	0.885	-								
9	0.845	0.845	0.831	0.865	0.824	0.831	0.865	0.885	-							
10	0.784	0.824	0.784	0.818	0.818	0.797	0.804	0.797	0.845	-						
11	0.750	0.804	0.764	0.784	0.770	0.804	0.811	0.791	0.811	0.899	-					
12	0.804	0.858	0.845	0.838	0.811	0.885	0.865	0.831	0.865	0.885	0.905	-				
13	0.818	0.858	0.818	0.851	0.824	0.885	0.865	0.818	0.878	0.885	0.892	0.959	-			
14	0.824	0.824	0.784	0.791	0.750	0.797	0.791	0.811	0.858	0.838	0.858	0.872	0.885	-		
15	0.750	0.709	0.696	0.703	0.703	0.682	0.689	0.723	0.730	0.818	0.770	0.743	0.770	0.791	-	
16	0.804	0.777	0.764	0.784	0.770	0.764	0.770	0.818	0.797	0.831	0.824	0.797	0.811	0.872	0.878	-

Abbreviations are in Table 1.

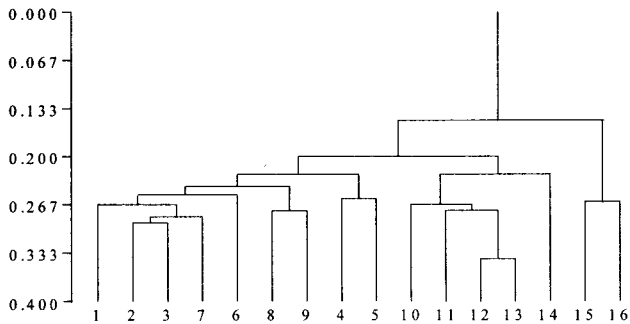


Fig. 2. Dendrogram obtained from UPGMA cluster analysis based on Jaccard and Nei coefficients by using 73 RAPD bands of 16 accessions in *Codonopsis lanceolata*.

1; Yeongwol #1, 2; Yeongwol #2, 3; Chunchon, 4; Cheorwon, 5; Jinan, 6; Geumsan #1, 7; Geumsan #2, 8; Hongcheon #1, 9; Hongcheon #2, 10; Wangqing Xian, 11; Linjiang Shi, 12; Hunchun Shi, 13; Meihekou Shi, 14; Changbai Xian, 15; Tonghua Xian, and 16; Liuhe Xian.

중국산에서도 굵고 검은색이지만 매끈한 더덕도 있기 때문에 크기 면에서 소비자의 기호도에 맞아 국내에 유통될 가능성이 매우 높다.

적 요

한국과 중국 동북부 지역에서 수집한 16종의 더덕으로 부터 genomic DNA를 추출한 후, Bioneer사로부터 구입한 random primer(10-mer)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 총 49종의 primer를 스크린 한 결과 재현성이 있으면서 polymorphism을 보이는 20개의 primer를 선발하였다. 선발한 primer로부터 PCR에 의해 증폭된 DNA의 크기는 125 bp에서 2.0 kb 내외였으며, 총 148개의 band가 관찰되어 평균 band 수는 7.4개였다. 이들 중에서 polymorphism을 보이는 band의 수는 73개이었으며 (49.3%), polymorphism은 각 primer별로 1~9개로써 다양하였다. 16개 수집종의 유사계수 범위는 0.682에서 0.959로써 유전적 유연정도는 크지 않았다. UPGMA 분석에 의한 수집종들의 유연관계를 dendrogram으로 나타낸 바, 수집종들간의 유전적 거리는 0.133~0.400이었으며, 국내 수집종과 중국 수집종간에는 확실하게 두 그룹으로 분류되었고, 유전적 거리는 약 0.281이었으며, 이들은 모두 지역적인 차이를 보였다. 한편, 중국의 通化縣과 柳河縣 수집종이 다른 지역의 수집종보다 유전적 거리가 가장 크게 나타났다.

사 사

이 논문은 2000년도 전북대학교의 지원 연구비에 의

하여 연구되었음.

LITERATURE CITED

- Bang KH, Kim YG, Park HW, Seong NS, Cho JH, Kim HS, Cho YG** (2001) Classification of safflower(*Carthamus tinctorius* L.) collections by RAPD analysis. *Kor J Medicinal Crop Sci* 9(3) : 225-231.
- Hu J, Quiros CF** (1991) Identification of broccoli and cauliflower cultivars by RAPD markers. *The Cell Reports* 10 : 505-511.
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky J, White TS** (1990) Optimization of PCRs. In : PCR protocols, a guide to methods and applications (Innis, M. A. *et al.*, ed.). Academic Press Inc. San Diego pp. 3-12.
- Lee MY, Mo SY, Kim DW, Oh SE, Ko BS** (2001) Discrimination and genetic relationship of *Adenophorae triphylla* (Thunb) A. DC. var. japonica Hara and *Codonopsis lanceolata* Trautv using RAPD analysis. *Kor J Medicinal Crop Sci* 9(3) : 205-210.
- Lee SH, Kim CH, Song WS, Nou IS** (1996) Phylogenetic relationship and genetic variation among varieties of *Hibiscus syriacus* based on RAPD analysis. *Kor J Breed* 28(4) : 445-456.
- Lee YK, Yoon YH, Chung IS, Lee JS, Lim SJ, Song IG, Kim DU** (1996) Analysis of genetic relationship by RAPD technique in *Allium sativum* L. *Kor J Breed* 28(3) : 332-341.
- Lee JK, Hong SK, Kim NS** (1997) Utilization of molecular markers in plant genetics and breeding. *Kor J Plant Res* 10(2) : 200-210.
- Park SY, Kim H, Lee BC, Sung CK, Lim YP** (1996) Identification and classification of *Lycium chinense* Mill. cultivars by RAPD analysis. *Kor J Breed* 28(3) : 221-226.
- Park JS, Lee BC, Seong CG, Lee KW, Ra SW, Choi KJ** (2000) Genetic similarity of boxthorn varieties(*Lycium chinense* Mill.) based on RAPD analysis. *Kor J Breed* 32(2) : 117-121.
- Rohlf FJ** (1989) NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system. version 1.50 Exter Publ. New York. USA.
- Rothuizen J, Van Wolferen M** (1994) Randomly amplified DNA polymorphisms in dogs are reproducible and display mendelian transmission. *Animal Genetics* 25 : 13-18.
- Shure M, Wessler S, Federoff N** (1983) Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. *Cell* 35 : 225-233.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV** (1990) DNA polymorphism amplified by arbitray primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18 : 6531-6535.
- Yoo KY, Lee WT** (1989) A taxonomic study of the genus *Codonopsis* in Korea. *Kor J Plant Tax* 19(2) : 81-102.
- 김종현, 정명현 (1974) 더덕의 생약학적 연구. *생약학회지* 6(1) : 43
- 박숙경 (1995) RAPD를 이용한 버드나무류 중 중요한 4가지 종들의 유전적 변이에 관한 연구. 영남대학교 석사학위 논문
- 이덕봉 (1984) 韓國 動植物圖鑑 植物篇(有用植物). 三化出版社. 서울. 15卷 pp. 264, 419.
- 이상인 (1981) 本草學. 진서원. 서울. p. 129
- 이재석, 김순동, 노홍균 (1996) 우리농산물과 수입농산물의 식별도감. 농업특정연구완결보고서. 효성가톨릭대학교 식품과학연구소 pp. 83-84
- 이창복 (1980) 한국식물도감. 향문사. 서울. p. 724