

## PCR-RAPD와 ITS 서열 분석에 의한 두릅나무과 (Araliaceae) 의 유연관계 분석

김남희, 양덕춘<sup>1)</sup>, 엄안흠<sup>2)</sup>

한국교원대학교 생물교육과, 경희대학교 한방재료가공학과<sup>1)</sup>, 한국교원대학교 자연과학연구소<sup>2)</sup>

### A Phylogenetic Relationships of Araliaceae Based on PCR-RAPD and ITS Sequences

Nam-Hee Kim, Deok-Chun Yang<sup>1)</sup>, and Ahn-Heum Eom<sup>2)</sup>

Department of Biology Education, and <sup>2)</sup>Institute of Natural Science,  
Korea National University of Education, Chungbuk 363-791, Korea.

<sup>1)</sup>College of Life Science & Center for Oriental Medicinal Materials and Processing,  
Kyung Hee Univ., Suwon 449-701, Korea.

#### ABSTRACT

Phylogenetic relationships among species in Araliaceae were analyzed using PCR-RAPD and sequence of ITS region of nuclear ribosomal DNA based on samples collected in Korea. RAPD analysis showed various polymorphic bands which were able to differentiate species and genus, and specific bands showing variations among individuals within species. Cluster analysis using gel images revealed high molecular variability within species of *Aralia eleta*. No significant variation was found among cultivated species of *Panax ginseng*, but they showed high genetic differences with wild type of the species. In ITS analysis, specific sequences for each genus and species were observed and these were allowed to differentiate species and genus. Phylogenetic analysis using ITS sequences showed that *Acanthopanax* and *Kalopanax* had a close relationship, and *Aralia* and *Panax* are monophyletic, but genus *Hedera* is different species from other species in family Araliaceae in this study. The results showing close relationship between genera *Aralia* and *Panax* were also observed in RAPD analysis. Contrary to the results of RAPD analysis of *Panax ginseng*, sequence analysis of ITS showed no significant difference between wild mountain ginseng and cultivated species of *P. ginseng*. Also, both RAPD and ITS analysis of *P. ginseng* showed no significant genetic variability among cultivation sites. Results indicate that *P. ginseng* cultivating in Korea is monophyletic. The molecular analysis used in this study agreed on classification using morphological feature. These results suggest that molecular techniques used in this study could be useful for phylogenetic analysis of Araliaceae.

**Key words :** ITS, RAPD-PCR, ribosomal DNA, Araliaceae, *Panax ginseng*

---

\*교신저자 : E-mail : eomah@knue.ac.kr

## 서언

두릅나무과(Araliaceae, 두릅나무과)에는 약 80개의 속에 900여 종의 식물이 속하며, 형태적 특징은 상록, 낙엽관목 또는 드물게 초본이거나 덩굴성이고 줄기는 흔히 가시가 있으며, 잎은 단엽, 장상 및 우상 복엽으로 호생한다. 꽃은 산형화서, 두상화서, 총상 및 수상화서를 형성하고, 꽃받침은 가장자리가 밋밋하거나 갈라져 있으며 꽃잎은 5-10장이다. 두릅나무과 식물은 주로 열대 속(genus)으로서 인도, 말레이 군도 및 미주의 열대에 집중 분포하며 의약자원으로 중요한 식물이며 국내에는 총 8속 14종 5변종 1품종이 분포한다. 두릅나무과에 속하는 대부분의 식물은 뿌리 또는 수피를 약용으로 이용하는데, 특히 오갈피(*Acanthopanax sessiliflorus*)와 가시오갈피(*A. senticosus*), 인삼(*Panax ginseng*)은 국내의 중요한 약용식물들이다. 인삼은 우리나라를 비롯한 동북아에 자생하며, 중국, 한국, 일본 등의 동아시아에서는 2000년 이상을 강장제, 피로 회복제로 이용하여왔다(Wen *et al.*, 1996). 인삼은 자연적으로 자란 야생종(산삼)과 인공적으로 기른 재배종이 있는데, 약효면에서는 야생종이 월등하다고 알려져 있다. 오갈피 또한 예부터 우리나라를 비롯한 동양에서는 귀중한 약재의 하나로 이용해왔으며, Brekhman (1960)과 Ovodov 등(1967), Elyakova 등 (1972)의 가시오갈피에 대한 연구 결과가 발표되면서 오갈피의 효능이 전세계적으로 알려지게 되었으며, 탁월한 약리효과가 인정되어 약제 및 건강음료로 상품화되어 수요가 급증하는 추세에 있다(황 등, 1996).

형태적 특징을 이용한 두릅나무과의 연구는 넓은 범위에서 분류학적으로 유용하다. 특히 화서에 관한 연구는 많은 영역에서 두릅나무과의 종을 확인하는데 도움을 주고 있다. 최근에는 엽록체 유전자의 DNA 염기서열 연구들로 두릅나무과의 진화와 계통에 대한 중요한 정보가 제공되고 있다(Plunkett *et al.*, 1996; 1997). 많은 외국학자들이 한국산 두릅나무과 식물들을 연구하였고, 특히 Nakai(1939)는, 가장 활발한 연구를 하여 여러 신종을 발표하였고, 두릅나무과의 종들에 대한 분류사, 기술검색표, 이명,

분포 등의 종합적이고도 체계적인 연구를 하였다. 이와 안(1965)은 두릅나무과 10속 16종 7변종을, 이창복 (1985)은 9속 14종 5변종 1품종을 기술했고, 이우철(1979)은 한국산 오갈피속의 8종에 대한 검색표와 분포에 대하여 보고하였다. 또한 이영노(1996), 김태정(1996)은 한국산 두릅나무과 8속 14종 5변종 1품종을 기록하고 특징을 기술하였다. 한국산 두릅나무과는 연구자에 따라 9속 또는 8속으로 나뉘는데, 이는 오갈피속(*Acanthopanax*)과 가시오갈피속(*Eleutherococcus*)의 통합, 분리의 문제 때문이다(박우철, 1989). 두 속의 분리는 Maximowicz (1859)에 의하여 이루어졌고 Nakai(1914)도 이를 따랐다. 이후 대부분 이 체계를 따랐으나, 최근에는 이 두 속을 통합시키는 경향이 있으며, *Acanthopanax*로 하여야 한다는 견해(이우철, 1979)와 *Eleutherococcus*로 하여야 한다는 견해(김철환, 1989)가 있다. 그러나 박 등(1989)은 두릅나무과 식물의 화분형태를 관찰하여 가시오갈피의 화분은 오갈피속과 상이하하며, 오갈피속 화분의 표면무늬와 발아구 특징이 음나무(*Kalopanax pictus*)와 더 비슷하다고 보고함으로써, 가시오갈피속을 오갈피속에 통합시키고 음나무속을 다른 속으로 인정하는 현재의 분류체계에 이의를 제기하였다. 따라서 두릅나무과에 대한 분류학적 검토의 필요성이 제기되고 있다.

식물의 계통분류에는 형태적, 해부학적 특징 이외에 단백질, 동위효소 분석 등이 이용되어 왔으며, 최근에는 분자생물학적 방법을 이용한 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism) 등의 방법을 이용하고 있다. 두릅나무과에 있어서는 분자적 방법을 이용한 분류는 일부 속 또는 일부 종에서 제한적으로 이루어지고 있다. 따라서 기존의 형태적 분류를 재확인하고, 분류학상의 위치가 불분명한 분류군의 위치를 확인하기 위해 유전자 분석을 통한 연구의 중요성이 크게 부각되고 있다. 그 중 PCR-RAPD는 절차가 단순하여 품종 분류 및 종내 변이 분석, 유연관계 비교 등에 널리 이용되고 있다. 최근 식물 분류학에서 계통분류에 사용되는 유

전자는 rRNA 유전자이다 (Hibbett *et al.*, 1995; Baldwin and Sanderson, 1995). 이들 유전자는 매우 보존적이며 PCR을 통하여 손쉽게 증폭할 수 있다는 점과 분자시계로서 갖추어야 할 여러 특성들을 지니고 있으므로 생물의 진화를 추론할 수 있는 여러 가지 장점을 지니고 있다. 특히 rRNA 유전자의 ITS(Internal transcribed spacer) 부위는 SSU 유전자부위와 달리 종 내에서도 변이가 존재하여 종내, 종간 거리 분석에 유용하다. ITS 부위는 전체 게놈상에서 반복되는 부위가 많아 추출하기 수월하고, 600bp 정도로 작아서 손쉽게 효과적인 분석이 가능하다. 따라서 ITS 부위를 이용한 식물의 유연관계분석 연구가 증가하는 추세이다(Baldwin, 1992, 1995). ITS 부위를 이용한 계통발생학적 분석은 두릅나무과와 다른 많은 식물들에서 속, 종의 분류학적 문제를 성공적으로 해결해 왔다 (Wen and Zimmer, 1996; Katx-

Kownie *et al.*, 1999). 또한 ITS 부위를 이용해 작성한 계통도는 다수의 분류학적으로 중요한 꽃잎 수, 잎의 형태, 심피수 등과 같은 형태적 특징들에 의한 기존의 분류를 재평가 할 수 있게 한다 (Wen *et al.*, 2001). 따라서 본 연구에서는 두릅나무과의 다양한 식물들을 이용한 PCR-RAPD방법과 ITS부위의 염기서열분석을 통하여 두릅나무과의 형태적 분류체계를 확인하고, 분자적 방법에 의해 두릅나무과의 속간 및 종간 유연관계를 파악해 보고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 실험 재료

한반도에 분포하는 두릅나무과의 8속 14종 5변종 1품종 중에서 오갈피속과 두릅나무속 그리고 인삼

Table 1. Collection sites for plants in Araliaceae used in this study

specimen	Species	Collection sites
1	<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	Cheonwon, Chungbuk
2	<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	Asan, Chungnam
3	<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	Asan, Chungnam
4	<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	Asan, Chungnam
5	<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	Asan, Chungnam
6	<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	Cheongwon, Chungbuk
7	<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	Cheongju, Chungbuk
8	<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	Cheongju, Chungbuk
9	<i>Panax ginseng</i>	Mungyeong, Gyeongbuk
10	<i>Panax ginseng</i>	Chungbuk boeun
11	<i>Panax ginseng</i>	Chungnam geumsan
12	<i>Panax ginseng</i>	Chungbuk eungpyeong
13	<i>Panax ginseng</i>	Chungbuk yeongdong
14	<i>Panax ginseng</i>	Gyeonggi anseong
15	<i>Panax ginseng</i>	Gyeongbuk punggi
16	<i>Panax ginseng</i>	Gangwon hongcheon
17	<i>Panax ginseng</i>	Gangwon inje
18	<i>Panax ginseng</i>	Gangwon yanggu
19	<i>Panax ginseng</i>	Gangwon hongcheon
20	<i>Aralia eleta</i>	Cheongwon, Chungbuk
21	<i>Aralia eleta</i>	Asan, Chungnam
22	<i>Aralia eleta</i>	Asan, Chungnam
23	<i>Aralia eleta</i>	Yesan, Chungnam
24	<i>Aralia eleta</i>	Asan, Chungnam
25	<i>Aralia eleta</i>	Goesan, Chungbuk

\*For specimens 7-16, 18 and 19, tissue cultured plants were used in this study. Specimens 17, 18, 19 were obtained from wild mountain ginseng (sansam) and specimen 16 were obtained from mountain ginseng (Jangnoesam).

속의 3개 속을 실험대상으로 하였다. 오갈피속에서는 오갈피와 가시오갈피, 두릅나무속에서는 두릅나무(*Aralia elata*)과 독활(*A. cordata*), 그리고 인삼속에서는 인삼(*P. ginseng*)을 채집지역, 야생종, 재배종 등에 차이를 두어 각 종별로 1~5개 개체를 채집하였다 (Table 1). 자연 상태에서 직접 채집한 잎과 페트리디쉬 상에서 순수 무균 조직 배양한 배양체를 이용하였다. 잎을 이용하여 DNA를 추출할 때는 오염이나 균의 감염을 고려해 되도록 잎이 출현하여 전개하기 전의 신엽을 채취하여 사용하였다. 오갈피 5개체, 가시오갈피 1개체, 두릅나무 5개체는 2002년 4월 충남 아산과 예산 지역, 본 연구실의 온실에서 잎이 완전히 전개하기 전의 신엽을 채집하였고, 독활 1개체는 2002년 8월 충북에서 채취한 완전 전개엽을 이용하였다. 가시오갈피 3개체 중 2개체는 조직 배양한 배양체를 사용하였다. 인삼은 페트리디쉬 상에서 순수 무균 배양되고 있는 배양체 6개체와 2002년 5월 조령산에서 채집한 전개엽 1개체를 이용하였고, 산삼은 산삼 채집자에게서 구한 전개엽 1개체와 조직배양한 배양체 2개체를 사용하였다. 장뇌삼 역시 조직배양한 배양체 1개체를 이용하였다. 채집한 재료는 멸균수를 이용하여 세척한 후 바로 건조시켜 DNA를 추출하거나 또는 추출 전까지 -70℃로 냉동 보관 하였다가 DNA를 추출하였다.

### DNA 추출

모든 시료는 그늘에서 완전히 건조시킨 후 액체 질소를 첨가하여 충분히 갈아 분말 형태로 만든 후 분말 20mg을 취하여 1.8ml Eppendorf tube 넣은 후 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Inc., USA)을 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 Spectrophotometer (SPECYRONIC 1001; Milton roy Co., USA)로 260nm와 280nm에서 OD(Optical Density)를 측정하여 농도와 순도를 확인하고, 각각의 농도를 20ng/ $\mu$ l로 맞춘 후 PCR 반응에 사용하였다. 남은 DNA는 -70℃ 냉동실에 보관하여 필요할 때마다 사용하였다.

### PCR-RAPD

DNA 증폭에 사용된 프라이머는 Operon (USA)의 OPA-11 (5' CAATCGCCGT3')와 OPA-12 (5' TCCGGCGATAG3'), 그리고 Bioner (Korea)의 #28 (5' CCCGCCGTTG3')이 사용되었으며, PCR 반응액은 2.5U Taq DNA polymerase, 250 $\mu$ M dNTP, 10 $\mu$ M Tris-HCl(pH 9.0), 40 $\mu$ M KCl, 1.5 $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>을 모두 혼합하여 동결 건조한 AccuPower<sup>®</sup> PCR PreMix (RAPD-A) (Bioneer co., Korea)를 사용하였다. PCR 반응은 PreMix에 primer 1 $\mu$ l(10pmol), template DNA 1 $\mu$ l(20ng), ddH<sub>2</sub>O 18 $\mu$ l를 넣어 전체 부피를 20 $\mu$ l로 하여 반응을 진행하였다. 반응 조건은 94℃에서 5분간 predenaturation 후, 94℃에서 1분, 37℃에서 30초, 72℃에서 1분의 3단계를 1 cycle로 하여 총 35 cycle을 진행하였으며, 최종적으로 72℃에서 8분간 안정화시킨 다음, 전기영동을 하거나 4℃로 보관하였다가 전기영동 하였다. PCR 조건은 primer 종류에 관계없이 동일한 조건을 주었고, 반응은 PTC-100(MJ Research, Inc., USA)에서 수행하였다. 각각의 PCR 산물은 1x TAE buffer(40mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH8.0)를 사용하여 1.8% agarose gel에서 50V의 전압으로 45분 동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 gel을 EtBr(Ethidium Bromide)로 15분간 염색한 후, 다시 흐르는 수돗물에서 15분간 탈색하여 밴드를 확인하였고 Digital camera (Kodac PC120)를 사용하여 촬영하였다. 밴드는 1-D main(Bioneer, Korea)을 이용하여 1과 0으로 코드화하였고, SPSSWIN program을 이용하여 군집 분석(cluster analysis; Yu et al., 1986) 한 후, dendrogram을 작성하였다.

### 염기서열의 분석

PCR 반응에 사용된 primer들은 사용 전에 모두 10pmol의 일정 농도로 맞추어 이용되었다. ITS지역을 증폭하기 위한 PCR반응은 0.2ml thin wall PCR 튜브에 PCR master mix (500unit/ml Taq DNA polymerase, 250 $\mu$ M dNTP, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, pH8.5; Promega Co., USA) 32 $\mu$ l, 진행생물 universal primer인 ITS1(5' CAATCGCCGT)와 ITS4(5' CCCGCCGTTG3')를 각각 2 $\mu$ l, 추출된 주형 DNA 2

μ(20ng)를 넣고 nuclease free water 32μ를 넣어 도합 70μ 반응액을 만들어, 95℃에서 2분간 denaturation 시킨 후, 94℃ 1분, 51℃ 30초, 72℃ 1분 반응을 35 cycles 시킨 후 72℃에서 7분간 안정화시켰으며, 반응은 MYGENIE 32 THERMINAL BLOCK(Bioneer Co., Korea)를 이용하여 수행하였다. PCR 반응물은 1% agarose gel에서 전기영동하여 EtBr로 15분간 염색하고 흐르는 물에서 15분간 탈색한 다음 약 700bp 밴드를 확인하였다. 확인된 DNA는 gel과 함께 오려내어 gel purification kit (Bioneer co., Korea)를 이용하여 정제 과정을 거친 후 유진택에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다. 인삼의 5.8S/26S 유전자 부위는 primer 5.8SR (5' TCGATGAAGAACGCAGCG3' )와 LR3 (5' CCGTGTTTCAAGACGGG3' )을 이용하여 ITS 지역의 증폭과 동일한 방법으로 수행하였고 염기서열을 결정하였다. 결정된 24개의 염기서열과 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 받은 7개의 서열을 Clustal X를 이용하여 alignment 하였다. 분석

된 염기서열들은 NCBI의 염기 서열과 비교하여 ITS 영역 및 5.8S/28S의 염기 서열을 결정하였고, njplotwin95와 treeview를 이용하여 계통수로 나타내었다. 분석된 염기서열간의 유사도를 통해 계통을 추론하였으며, 이를 통하여 두릅나무과의 유연 관계를 분석하였다. 두릅나무과와 같은 산형화목의 산형과(Apiaceae) 식물 중 *Hydrocotyle vulgaris* 을 outgroup으로 선택하여 계통도를 작성하였다.

## 결과

### PCR-RAPD

오갈피과 식물의 속, 종간의 유연관계를 살피고, 이들의 종내 변이를 보고자 우리나라의 여러 지역에서 수집한 오갈피과의 여러 식물들에 대하여 RAPD-PCR을 수행하였다. 세가지 Primer #28, OPA-11, OPA-12 에서 다양한 밴드가 형성되었다 (Fig 3). RAPD 결과 나타난 primer별 밴드들의 주요 증폭 범

Table 2. Matrix of similarity coefficients of 25 specimens in Araliaceae collected in Korea

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
2	.80																								
3	.67	.55																							
4	.73	.91	.50																						
5	.73	.91	.50	1.0																					
6	.31	.36	.33	.33	.33																				
7	.10	.14	.11	.19	.19	.44																			
8	.11	.15	.11	.20	.20	.47	.93																		
9	.05	.04	.05	.04	.04	.00	.00	.00																	
10	.04	.04	.04	.04	.04	.04	.07	.07	.82																
11	.05	.04	.05	.04	.04	.00	.04	.04	.93	.88															
12	.05	.04	.05	.04	.04	.00	.04	.04	.93	.88	1.0														
13	.05	.04	.05	.04	.04	.00	.04	.04	.93	.88	1.0	1.0													
14	.05	.04	.05	.04	.04	.00	.04	.04	.87	.82	.93	.93	.93												
15	.04	.04	.05	.04	.04	.00	.04	.04	.88	.94	.94	.94	.94	.88											
16	.05	.05	.06	.05	.05	.00	.04	.04	.73	.71	.80	.80	.80	.86	.75										
17	.13	.11	.13	.11	.11	.06	.00	.00	.60	.50	.56	.56	.56	.60	.53	.69									
18	.05	.05	.06	.05	.05	.00	.04	.04	.73	.71	.80	.80	.80	.86	.75	1.0	.69								
19	.08	.07	.08	.07	.07	.04	.07	.07	.57	.71	.62	.62	.62	.57	.67	.63	.45	.63							
20	.13	.12	.18	.11	.11	.04	.07	.03	.14	.13	.13	.13	.13	.14	.13	.15	.12	.15	.15						
21	.13	.12	.18	.11	.11	.04	.07	.03	.14	.13	.13	.13	.13	.14	.13	.15	.12	.15	.15	.81					
22	.08	.11	.13	.11	.11	.00	.03	.00	.13	.12	.13	.13	.13	.13	.13	.14	.11	.14	.15	.77	.70				
23	.05	.04	.10	.04	.04	.04	.07	.04	.12	.10	.11	.11	.11	.12	.11	.13	.14	.13	.99	.62	.62	.46			
24	.13	.12	.18	.11	.11	.04	.06	.03	.14	.13	.13	.13	.13	.14	.13	.15	.12	.15	.152	.90	.81	.70	.62		
25	.08	.07	.09	.07	.07	.00	.00	.00	.12	.10	.11	.11	.11	.12	.11	.13	.15	.13	.091	.14	.14	.14	.18	.14	

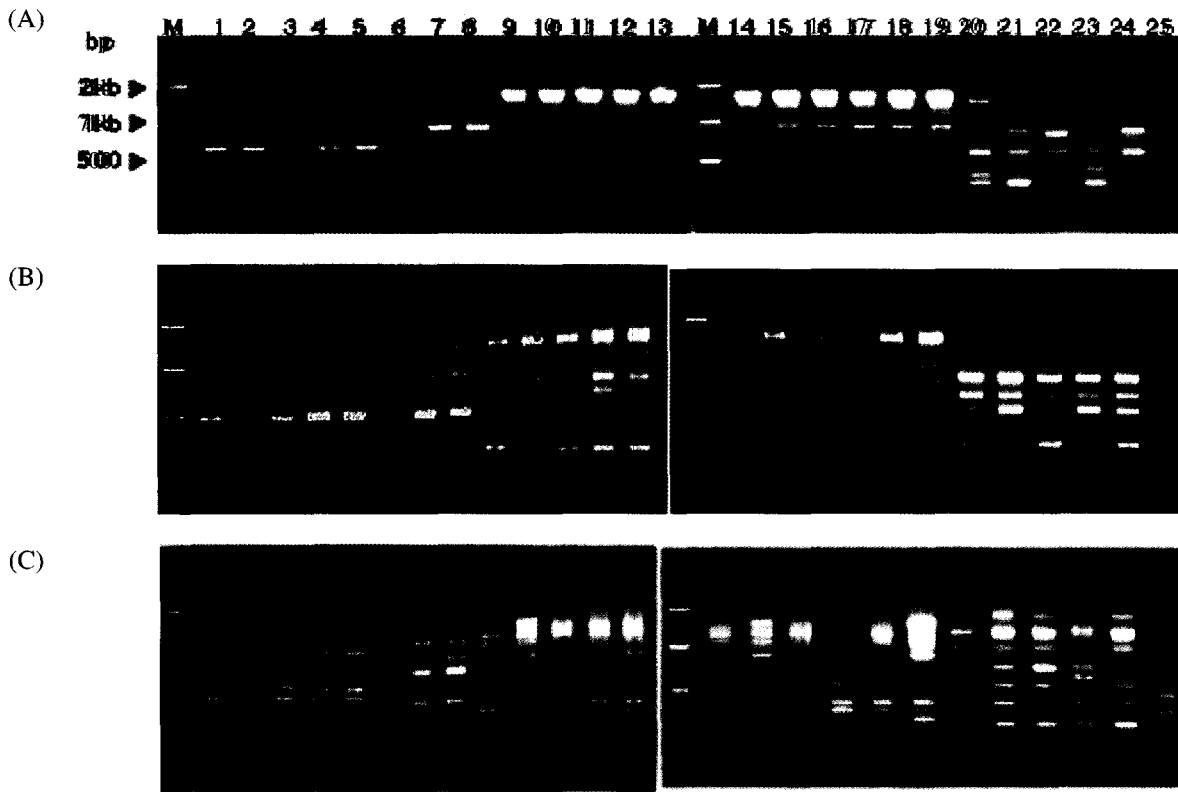


Fig. 1. Polymorphism of PCR-RAPD reacted to three primers; (A) primer OPA-11, (B) primer OPA-12, (C) primer #28. The lanes indicated the ladder DNA (Marker, M) and *Acanthopanax sessiliflorus* (1, 2, 3, 4, 5), *A. senticosus* (6, 7, 8), *Panax ginseng* (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19), *Aralia eleta* (20, 21, 22, 23, 24), *Aralia cordata* (25). See Table 1 for details.

위는 #28에서는 1800-200bp, OPA-11은 3500-300bp, OPA-12에서는 2700-200bp이었다. OPA-11에서는 총 17개, OPA-12에서는 총 13개의 밴드가 증폭되었고, #28에서는 총 24개의 밴드를 얻었다. RAPD 결과 얻어진 밴드를 이용하여 유연관계를 분석한 결과, 한 지역 내에서 채취한 개체라 하더라도 밴드의 양상이 동일하지는 않았다. 오갈피의 유사도를 살펴보면 같은 지역에서 채취한 3개체(2, 4, 5) 간의 유사도 지수가 최대 1.00서 최소 0.91로 나타나 서로 매우 유사함을 보였으나, 같은 지역에서 채집한 3번 개체와 2, 4, 5번 개체 사이는 평균 유사도 지수 0.52를 보여 같은 지역의 개체라든 개체간에 유전적 다양성이 존재함을 관찰 할 수 있었다 (Table 2). 가시오갈피는 7과 8 사이의 유사도가 0.93로 매우 가깝게 나타났으나, 6과 7, 8 사이는 평균 유사도가 0.45으로 낮게 나타났

다. 인삼의 경우 OPA-11에서는 모든 개체에서 동일 밴드가 나타났으나, #28과 OPA-12에서는 재배종 인삼과 야생종 인삼 사이에 다양한 polymorphic 밴드를 관찰할 수 있었다. Dendrogram을 통해 재배종과 야생종의 유사도를 살펴보면, 재배종들간의 유사도 지수는 최대 1.00에서 최소 0.82로 나타나 매우 유사함을 확인할 수 있었고, 야생종인 17은 재배종과 0.53-0.60의 유사도를, 19는 0.57-0.71의 유사도를 보여 재배종과의 유사도가 낮게 나타났다(Fig. 2). 야생종인 18과 16은 서로 1.00의 유사도를 보였다.

#### 염기서열 분석

인삼 9개체로부터 5.8S/26S 유전자 일부에 대한 염기서열을 얻었고 이들 염기서열을 NCBI에서 얻은 인삼의 염기서열과 비교 분석한 결과 각 부위에

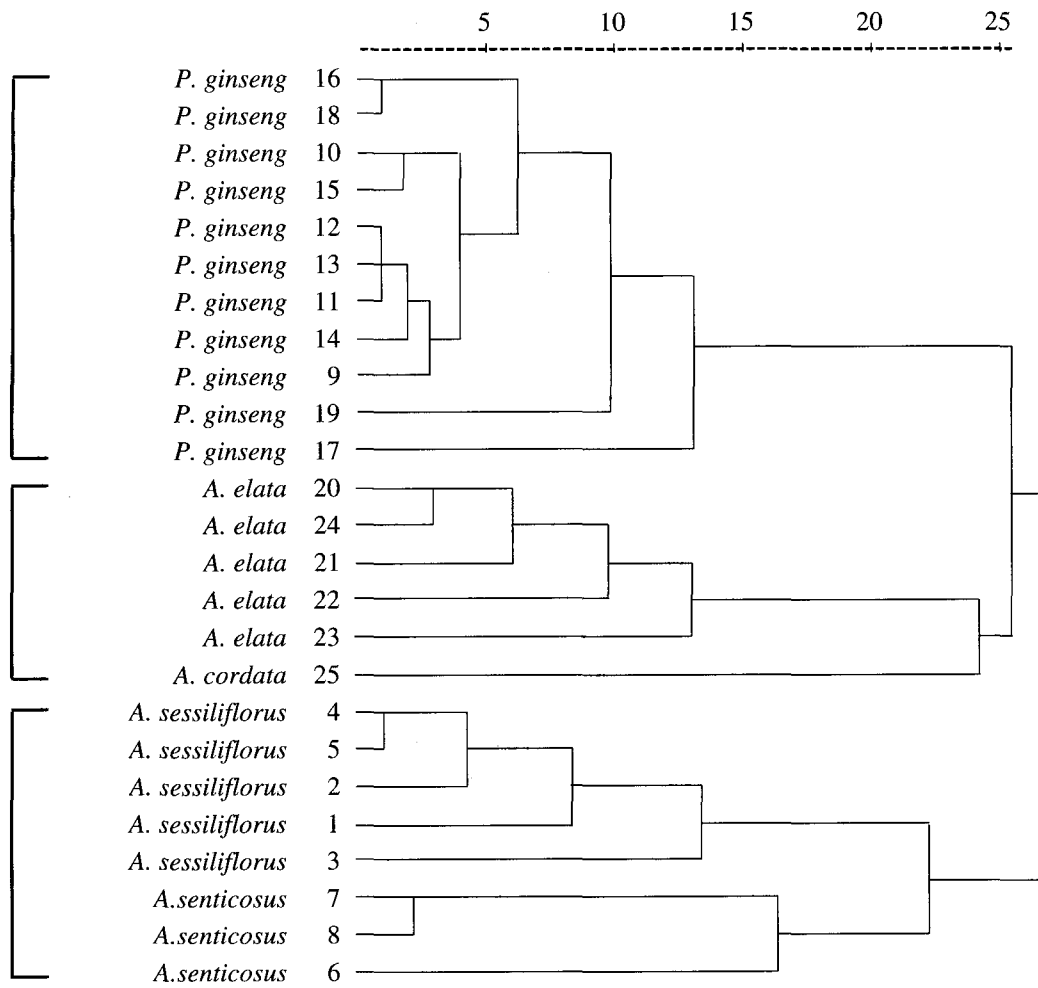


Fig. 2. Cluster analysis of 25 specimens in Araliaceae based on DNA polymorphism by RCR-RAPD analysis. Numbers after name of each species indicates specimen number in Table 1.

서 개체간 염기서열의 차이를 발견할 수 없었고, 모든 개체에서 동일한 염기서열을 보였다. 또한 오갈피과의 속, 종 수준의 유연관계 분석을 위해 ITS부위의 염기서열을 분석하였다 (Table 3). 오갈피과 식물에서 분석된 서열과 NCBI에서 받은 서열을 이용하여 분석한 결과, 5.8S 유전자 부위에서는 전체 서열 중 일부의 염기차이를 제외하고는 오갈피과의 모든 종에서 동일한 염기서열을 보였으나, ITS1과 ITS2 부위에서는 속과 종 수준을 구분할 수 있는 변이가 나타났다. ITS1에서는 ITS2에 비해 더 많은 변이를 확인할 수 있었는데, 특히 ITS1에서는 각 속과 종만이 지니는 특이 염기 서열이 다양하게 나타나 ITS1

을 이용해 속과 종 구분이 가능함을 확인할 수 있었다. ITS염기서열을 이용하여 작성한 계통수에서 두릅나무과는 덩굴성의 송악속을 포함하는 Group1과 음나무속-오갈피속-팔손이속을 포함하는 Group2, 두릅나무속-인삼속이 속하는 Group3으로 크게 3개의 group으로 나뉜다(Fig. 3). 음나무속을 제외하고는 형태 분류에 의한 속 분류와 일치하게 나타났다. Clade2는 오갈피와 가시오갈피로 분리되고, Clade4는 다시 두릅나무와 독활로 분리되어 표현형에 의한 종래의 분류와 거의 유사함을 볼 수 있었다. 계통수를 통해 오갈피과 내의 유연관계를 살펴보면 음나무속과 오갈피속이 가장 가깝게 나타나고, 팔손이속도

Table 3. Comparison of BLAST results of NCBI with the analyzed ITS sequence

Specimen Number	Morphological identification Species	BLAST results of NCBI	
		Accession NO.	Sequence Similarity(%)
1	<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	U13185	584/588(99%)
2	<i>Acanthopanax sessilifloru.</i>	U63185	571/598(95%)
3	<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	U63185	585/588(99%)
4	<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	U63185	590/596(98%)
5	<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	U63185	581/584(99%)
6	<i>Acanthopanax senticosus</i>	AF077885	589/612(96%)
7	<i>Acanthopanax senticosus</i>	U63185	604/620(97%)
8	<i>Acanthopanax senticosus</i>	U63185	604/620(97%)
9	<i>Panax ginseng</i>	AF274534	609/616(98%)
10	<i>Panax ginseng</i>	AB043872	514/543(94%)
11	<i>Panax ginseng</i>	AB043872	611/619(98%)
12	<i>Panax ginseng</i>	AB043872	611/619(98%)
13	<i>Panax ginseng</i>	AB043872	550/562(97%)
14	<i>Panax ginseng</i>	AF043872	587/605(97%)
15	<i>Panax ginseng</i>	AF274532	609/616(98%)
16	<i>Panax ginseng</i>	AF274532	518/545(95%)
17	<i>Panax ginseng</i>	AB043872	612/619(98%)
18	<i>Panax ginseng</i>	AF274532	601/616(97%)
19	<i>Panax ginseng</i>	AF274532	610/619(98%)
21	<i>Aralia eleta</i>	AF273527	586/609(96%)
22	<i>Aralia eleta</i>	AF273527	598/617(96%)
23	<i>Aralia eleta</i>	AF273527	586/609(96%)
24	<i>Aralia eleta</i>	AF273527	604/618(97%)
25	<i>Aralia cordata</i>	U66923	578/590(97%)

이 둘과 가깝게 나타난다. 두릅속은 인삼속과 가깝게 나타났으며, 송악속은 이 두 Group과는 다르게 묶여 유연관계가 가장 멀게 나타났다. ITS 부위의 염기서열 비교 결과 인삼속 내에서는 지역별 차이와 야생종, 재배종 간의 차이를 구분할 수 있는 염기서열의 차이는 나타나지 않았다.

### 고찰

두릅나무과는 분류학적으로 산형화목에 속하며 대부분의 식물이 약용 또는 관상용 식물로 유용하게 이용되고 있어 실생활과 밀접하게 연관되어 있다.

그러나 이러한 중요성에도 불구하고 몇몇 분류군의 단편적인 연구를 제외하고는 국내산 오갈피과의 종합적이고 체계적인 계통연구가 미흡하고, 이로 인해 일부 형태적 분류에 있어서 혼돈이 있다. 본 논문에서는 오갈피과 식물의 형태적 분류 체계를 확인하고 계통 관계를 추론하기 위하여 분자유전학적 자료에 기초하여 유연관계 분석을 실시하였다. 지금까지의 오갈피과 분류는 주로 형태적 특징을 이용한 분류였으나, 분자 생물학의 발전과 더불어 오갈피과 분류에도 RAPD 기법이 적용되기 시작하였다(Williams *et al.*, 1990). 김 등(1998), 차 등(2002)은 오갈피과 식물의 분류에 PCR-RAPD 방법을 적용하여 종 및 종내 변이를 확인하여 이 방법이 적절한 방법임을 연



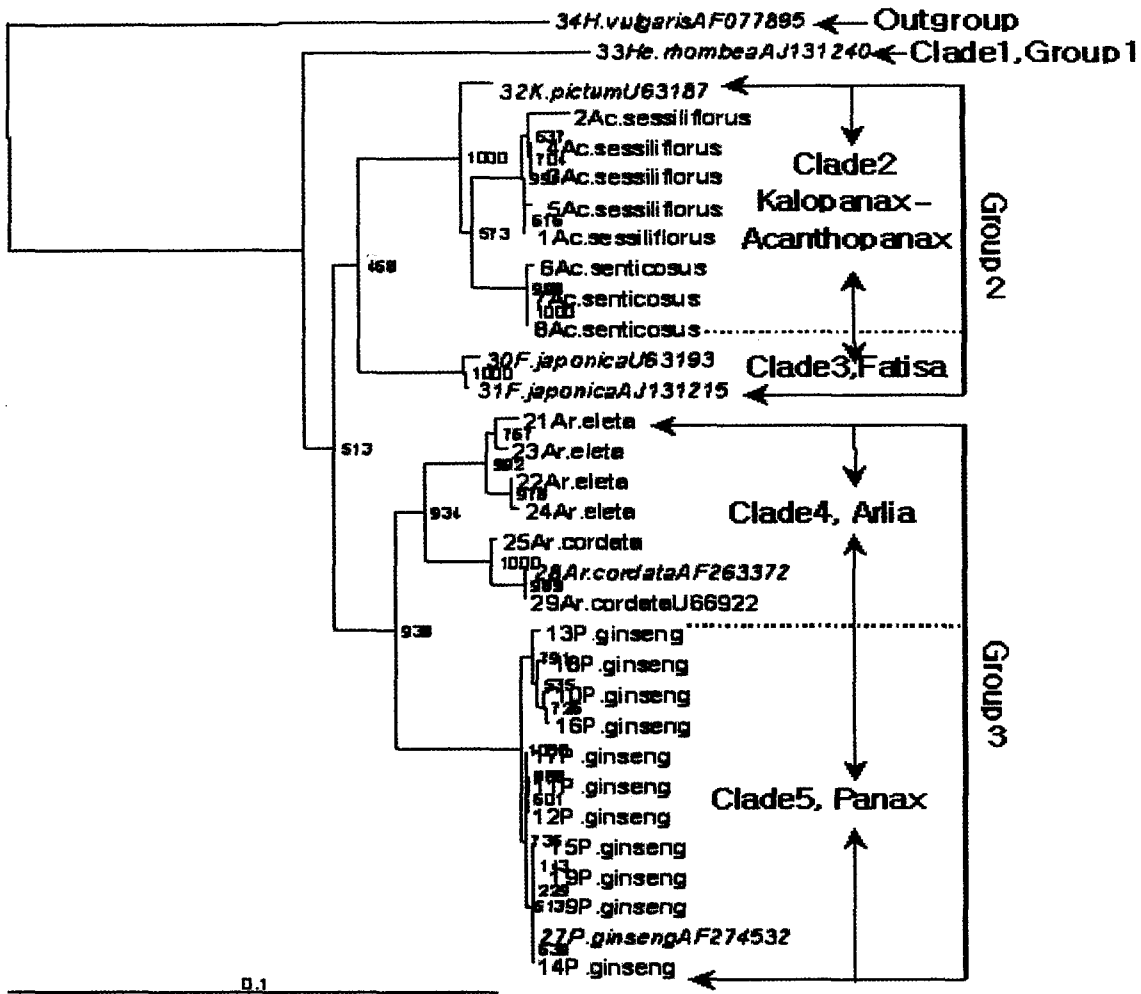


Fig. 3. The neighbor-joining tree based on ITS sequences of 25 specimens (numbers 1 through 25) and sequences obtained NCBI database (numbers 26-36) in Araliaceae. Numbers on branches indicates frequencies of statistical occurrence out of 1,000 bootstrap replicates.

구 보고하였으며, 본 연구자도 PCR-RAPD 방법으로 오갈피과 식물의 유연결과를 알아본 결과 종 및 속 내에서 동질성의 정도를 확인할 수 있었고, 형태 분류와도 일치함을 확인할 수 있었다. 본 실험에서는 3 개의 primer를 사용하여 polymorphic 밴드를 조사한 결과 오갈피속 내의 공통 밴드 2개, 두릅속 내의 공통 밴드 2개를 육안으로 확인할 수 있었고, 종 내에서는 각 종만의 특이 밴드도 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Williams et al.(1990), Karp et al.(1996) 그리고 Loo et al.(1999)에 의해 보고된 바와 같이 RAPD가 종간 및 종내 개체군이나 개체간의 유연관

계 규명에 효과적인 방법임을 재확인 할 수 있었다. RAPD 결과로부터 실험에 이용한 두릅나무 개체군 내에서 다양한 종내 변이가 있음을 확인할 수 있었고, 오갈피는 같은 지역에서 채취한 개체들 사이에 유연관계가 멀게 나타나 동일 지역 내에서도 개체간에 유전적 다양성이 존재함을 알 수 있었다. 특히 인삼에서는 재배종 내의 개체 변이는 관찰되지 않았으나, 야생종들은 재배종과 유연관계가 멀게 나타나 재배종과 야생종간에 유전적 차이가 존재함을 확인할 수 있었다. 이는 인위적 품종 개량으로 인한 유전자의 손실 또는 유입 때문에 재배종 인삼과 야생종

인삼의 유전적 차이가 발생한 것으로 여겨진다. 속간 유연관계 분석에서는 두릅속과 인삼속이 크게 하나의 그룹으로 묶여 인삼속과 오갈피속보다 인삼속과 두릅속의 유연관계가 더 가까운 것으로 나타났다. 이는 ITS 분석 결과와도 일치함을 보였다. PCR-RAPD 방법은 증폭된 DNA 단편들의 polymorphism 때문에 종간 및 종내 개체군이나 개체간의 유연관계 규명에 유용하게 사용되고 있다(Williams *et al.*, 1990; Karp *et al.*, 1996; Loo *et al.*, 1999). 오갈피과 식물의 유연관계를 분석한 본 연구결과에서도 PCR-RAPD 기법이 속, 종간 및 종내 계통유연관계 고찰에 적합함을 재확인할 수 있었다.

오갈피과의 속, 종의 유연관계 분석을 위해 염기서열을 비교한 결과 5.8S 유전자는 변이가 관찰되지 않아 속, 종 수준의 분류에 사용하기엔 적합하지 않았으며, ITS 부위는 각각의 속과 종만이 지니는 특이 염기 서열이 나타나 이 부위를 이용한 속과 종 분류가 가능함을 확인할 수 있었다. ITS 지역의 염기서열을 이용하여 작성한 계통수에서 오갈피과는 크게 3개의 그룹으로 나뉘어 각 속간의 유연관계를 파악할 수 있었다. 오갈피속은 음나무속과 근연임을 확인할 수 있었고, 두릅속과 인삼속이 하나의 계통이며, 송악은 다른 속과 명료하게 구분됨을 확인할 수 있었다. 이는 두릅나무과에서 두릅나무속, 인삼속, 이 단계통이라는 Wen *et al.*(2001)의 보고와 일치한다. 또 화분형태 연구를 통해 두릅나무속과 인삼속은 서로 근연관계이고, 송악은 다른 속과 명료하게 구분되며, 음나무속과 오갈피속이 근연관계임을 보고한 박과 이(1989)의 연구 보고와도 일치한다. 인삼은 RAPD 분석 결과 재배종과 야생종 사이에 변이가 존재함을 확인할 수 있었으나, ITS 염기서열분석에서는 인삼의 종내 변이를 관찰할 수 있는 결과가 나타나지 않았다. 차 등(2002)의 보고에 의하면 국내 재배종 인삼의 변이 폭이 상당히 크다고 보고하였으나, 본 연구 결과와는 일치하지 않았다. RAPD 분석 결과 야생종과 재배종 인삼간에 변이는 확인 가능하였으나, 재배종 내의 유사도지수는 매우 높게 나타났고, ITS 분석결과 역시 재배종 인삼 내에 염기서열간의 차이가 크지 않음을 확인할 수 있었다. 또한

RAPD와 ITS 분석 결과 모두 지역에 따른 재배종 인삼의 유전적 차이도 관찰되지 않았다. 이를 통해 국내에서 재배중인 인삼이 단계통임을 예상할 수 있었다.

오갈피과 식물을 이용하여 PCR-RAPD와 ITS 분석을 수행한 결과 형태적 특징을 이용한 기존의 형태 분류와 거의 일치함을 확인하였다. RAPD 분석에서는 오갈피과의 속 및 종 분류가 가능하였고, 종내 개체 변이를 확인할 수 있었다. 특히 인삼에서는 재배종과 야생종 사이의 유전적 차이를 확인하였다. ITS 부위 분석에서는 속과 종 수준의 분류가 가능한 특이 염기 서열들이 확인되었으며 인삼속과 두릅속이 단계통임을 확인하였고, 음나무와 오갈피가 근연임을 재확인할 수 있었다. 결과적으로 RAPD와 ITS 분석을 통한 분자생물학적 시도가 식물의 계통분석과 형태 분류에 대한 보조자료로서 유용함을 확인하였다.

## 적요

국내에 자생하는 두릅나무과 식물의 형태적 분류를 재확인하고, 분자적 방법에 의해 속 및 종간 유연관계를 파악해 보고자 PCR-RAPD 와 ITS sequence 분석을 실시하였다. 채집된 오갈피과 식물을 이용하여 PCR-RAPD를 실시한 결과 속과 종을 구분할 수 있는 다양한 polymorphic 밴드를 관찰할 수 있었다. 또한 실험에 이용한 두릅나무 개체군 내에서 다양한 ;꺄 변이가 있음을 확인할 수 있었고, 인삼에서는 재배종내의 변이는 관찰되지 않았으나 야생종과 재배종간의 유전적 차이가 존재함을 확인할 수 있는 밴드들이 나타났다. ITS 분석에서는 각각의 속과 종만이 지니는 특이 염기 서열이 나타나 ITS를 이용한 속과 종 분류가 가능하였다. ITS 염기서열로 작성한 계통수를 분석한 결과 오갈피속은 음나무속과 근연임을 알 수 있었고, 두릅속과 인삼속이 하나의 계통이며 송악은 다른 속과 명료하게 구분됨을 확인하였다. 두릅속과 인삼속이 근연관계임은 RAPD 결과에서도 확인되었다. 인삼은 RAPD 분석 결과 재배종과

야생종 사이에 변이가 존재함이 관찰되었으나, ITS 분석 결과에서는 야생종과 재배종 간의 변이를 관찰할 수 있는 결과가 나타나지 않았다. 또한 RAPD와 ITS 분석 결과 모두 지역에 따른 재배종 인삼의 유전적 차이도 관찰되지 않았다. 이를 통해 국내에서 재배중인 인삼이 단계통임을 알 수 있었다. ITS 분석에서는 속과 종 수준의 분류가 가능한 특이 염기 서열들이 관찰되었다.

## 사사

본 연구는 2003년도부터 수행된 농림기술 개발과제(주요 신품종의 유전적 마커확인을 위한 SNP primer의 활용기술개발) 연구비로 일부 수행된 연구 결과입니다.

## 인용문헌

- Baldwin, B. G. 1992. Phylogenetic utility of the ITS of nr DNA in plants: An example from the Compositae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1:3-16.
- Baldwin, B. G., and M. J. Sanderson. 1995. The ITS Region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82:247-277.
- Brekhman, I. I. 1960. A new medicinal plant of the family Araliaceae the spiny *Eleutherococcus*. *Izvsibirrotel. Akad. Nauk, U.S.S.R.* 9:113-120.
- Elyakova, L. A., A. K. Kzisenko, U. V. Sova, and G. B. Elyakov. 1972. *Eleutherococcus glycosides* on inclusion of labeled phosphorus in m-RNA. *Veprosy Med.* 17:267.
- Hibbett, D. S., and M. J. Donoghue. 1995. Progress toward a phylogenetic classification of the Polyporaceae through parsimony analysis of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Can. J. Bot.* 73:S853-S861.
- Karp, A., O. Sebergand, M. Buiatti. 1996. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Annals of Botany* 78:143-149.
- Katz-Dowine, D. S., C. M. Valiejo-Romano, E. I. Tetentieva, A. V. Troitsky, M. G. Pimenov, B. Lee, and S. R. Dowine. 1999. Towards a molecular phylogeny of Apiaceae subfamily Apioideae: additional information from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *Plant Systematics and Evolution* 216:167-195.
- Loo, A. H. B., H.T.W. Tan, P. Kumar, and L. G. Saw. 1999. Population analysis of *Licuala plabra* Griff. var. *glabra* (Palmae) using RAPD profiling. *Annals of Botany* 84:421-427.
- Maximowicz, C.J. 1859. Araliaceae, in *Primitives Florae Amurensie*. pp. 131-134.
- Nakai, T. 1939. *Flora sylvatica Korean*. Vol. VI For. Exp. Sta. Goven, Chosen, Seoul.
- Ovodov, Y. S., G. M. Frolova, M. Y. Nefedovaand, G. B. Elyakov. 1967. The glycosides of *Eleutherococcus senticosus* II. The structure of *Eleutheroside* A, B, C and D. *Khim Pirodn Soedin* 3:46.
- Plunkett, G. M., D. E. Soltis, and P. S Soltis. 1996. Higher level relationship of Apiales (Apiaceae and Araliaceae) based on phylogenetic analysis of rbcL sequences. *American Journal of Botany* 83:499-515.
- Plunkett, G. M., D. E. Soltis, and P. S Soltis. 1997. Clarification of the relationship between Apiaceae and Araliaceae based on matK and rbcL sequence data. *American Journal of Botany* 84:565-580.
- Wen, J., and E. A. Zimmer. 1996. Phylogeny and Biology of *Panax* L.: Inference from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Mol. Phylogenetic and Evolution* 6:167-177.
- Wen, J., and E. A. Zimmer. 1998. Phylogeny and biogeography of *Aralia* sect. *Aralia*(Araliaceae). *American Journal of Botany* 85:866-875.
- Wen, J., A. D. Mitchell, and S. J. Wagstaff. 2001. The

- evolution of Araliaceae: A phylogenetic analysis based on ITS sequence of nuclear ribosomal DNA. *Systematic Botany* 26:144-167.
- Williams, J., K. J. Kubelik, Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 19:6531-6535.
- 김선, 김기영, 박문수. 1998. 가시오갈피 수집 종의 RAPD 변이분석. *의약화학지* 6:165-169.
- 김철환. 1989. 한국산 두릅나무과 식물의 분류학적 연구. 전북대학교 생물학과 석사학위 청구논문.
- 김태정. 1996. 한국의 자원식물. 서울대학교출판부.
- 박우철, 이상태. 1989. 한국산 두릅나무과의 화분분류학적 연구. *한국식물분류학회지* 19:103-121.
- 이영노. 1996. *원색한국식물도감*. 교학사.
- 이우철. 1979. 한국산 오갈피나무속식물의 분포에 관하여. *생약학회지* 10:103-107.
- 이창복. 1985. *대한식물도감*. 향문사.
- 이춘영. 안학수. 1965. *한국식물명감*. 범학사.
- 차선경, 최재을. 2002. RAPD를 이용한 고려인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 유전적 다양성 분석. *충남대학교 농학과 석사학위 청구논문*.
- 황완균, 최수부, 김일혁. 1996. 가시오갈피 및 두충 혼합엑스의 생리활성. *생약학회지* 27:65-74.
- (접수일 2004. 3. 13)  
(수락일 2004. 6. 2)