

RAPD를 이용한 용담의 유전적 유사도 분석

이혜경*·이미경*·문창식**·방재욱*

Analysis Genetic Similarity of *Gentiana scabra* var. *buengeri* by Randomly Amplified Polymorphic DNA

Hae Kyung Lee*, Mi Kyung Lee*, Chang Sik Moon** and Jae Wook Bang*

ABSTRACT : Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was applied to detect the molecular polymorphisms in *Gentiana scabra* var. *buengeri*. A high level of molecular variability was found among wild plants and cultivars. In genetic analysis, eight of twenty primers were selected and 54 amplification products ranged 2.2 to 0.2 kb were compared. Twenty - nine amplified products showed polymorphic, while five were monomorphic. Twenty of line specific bands were found. In genetic similarity and cluster analysis using PCR products, three wild plants collected from Naejangsan, Daedunsan and Keojedo and one cultivar Seo-chunjaerae were grouped into one cluster, while cultivar Jinbujaerae and Japanese line separated into another clusters, respectively. The identification of DNA polymorphisms by the RAPD technique will facilitate the selection of the lines from different origin.

Key words : *Gentiana scabra* var. *buengeri*, Genetic similarity, Monomorphic, Polymorphic, PCR, RAPD

생약의 중요성이 재인식되면서 약용 작물의 수요는 증가 추세에 있으며, 농업에서 유망 작물로 부각되고 있다. 그러나, 약용 작물은 생육 지역에 따라 형태, 생리 및 생태적 특성 등에서 차이를 보이기 때문에 지역에 따른 유전적 계통의 분석이 필요할 뿐만 아니라, 국내 약용 식물 자원의 보호 차원에서라도 무분별하게 반입되고 있는 중국산 약재와의 구분을 위한 계통 확립에 관한 연구가 요구되고 있다⁹⁾. 용담 (*Gentiana scabra* var. *buengeri*)의 경우 생육 지역에 따라 gentiopicroside의 함량이 차이를 나타내는 것으로 보고 되었으나⁸⁾, 분자적 수준에서의 계통에 따른 유전적 분석은 이루어진

바 없다.

최근 종간 또는 종내 계통 분석에 핵형, 동위효소, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 및 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) 등의 유전적 분석이 널리 이용되고 있다^{2,7,11)}. PCR (Polymerase Chain Reaction) 을 이용한 RAPD 분석은 1980년 후반에 개발되어 생물 재료를 대상으로 유전적 동질성의 확인에 적용되고 있으며¹²⁾, RAPD 분석에서는 primer의 염기가 하나만 바뀌어도 band 양상이 다르게 나타날 수 있기 때문에 10 - mer oligonucleotide가 DNA 증폭을 통한 다형현상의 검정에 이용될 수 있다³⁰⁾.

* 嶺南農業試驗場 (National Yeongnam Agricultural Experiment Station, RDA, Milyang 627 - 130, Korea)

약용 작물의 계통 분석에 관한 연구로는 타식성 작물로 극심한 혼계를 이루고 있어 육종상 어려움이 있는 시호 (*Bupleurum falcatum* L.)에서 재래종을 육성하여 지역 적응 시험이 보고되었으며¹⁵⁾, 한국 재배종 시호의 체세포 염색체와 종자의 저장단백질의 SDS-PAGE 양상이 분석된 바 있다³⁾. 분자유전적 계통 확립에 대한 연구로는 primer 선발 및 변종에 따른 비교 연구가 인삼 (*Panax ginseng*)을 대상으로 이루어진 바 있다¹⁰⁾. 그러나, 용담에 관한 연구는 체세포 염색체 수의 연구와¹⁶⁾ 조직배양을 통한 식물체의 재분화에 관한 연구^{1, 14, 13)}가 있을 뿐 계통과 지역에 따른 분자유전적 연구는 이루어진 바가 없다.

본 연구는 야생과 재배 용담을 재료로 PCR을 이용한 RAPD 분석을 통해 지역과 계통에 따른 유전적 유사도를 분자유전적 수준에서 탐색하고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 식물 재료

재료 식물은 내장산, 대둔산 및 거제도에서 수집한 야생종과 충남농촌진흥원에 식재되어 있는 서천재래종, 진부재래종 및 일본 도입종 용담을 사용하였다.

2. 게놈 DNA

추출 게놈 DNA의 추출에는 Fang 등⁴⁾의 방법을 변용하여 사용하였다. 식물 재료 1g을 액체 질소에서 갈은 후 10 μ l의 β -mercaptoethanol을 혼합한 10ml의 CTAB 추출 용액 (50mM Tris, pH 8.0; 0.7M NaCl; 50mM EDTA; 1% CTAB)에서 1시간 (60 $^{\circ}$ C) 중탕하였다. 추출액에 chloroform/isoamylalcohol (24 : 1)을 가한 후, 원심분리하여 상등액을 취한 다음 isopropanol (0.6)을 넣고, DNA를 침전시켰다. 침전물을 건조시킨 다음, TE (10mM Tris, pH 8.0; 1mM EDTA)를 가하여 10 μ l의 RNase A (10mg/ml)를 가한 다음 30분 (37 $^{\circ}$ C)간 항온시켰다. 동량의 phenol-

chloroform-isoamylalcohol (25 : 24 : 1)을 가하고, 원심분리 후 상등액을 취하였다. NaCl을 가하여 2M로 만든 후, 에탄올을 이용해 DNA를 침전시켰다. 원심분리하여 얻은 DNA를 70% 에탄올로 수세하고 진공 건조 후, 1ml의 TE에 녹여 냉장고 (4 $^{\circ}$ C)에 보관하면서 시료로 사용하였다.

3. DNA의 증폭을 위한 PCR

PCR은 반응 혼합물 ($\times 10$ 반응 완충액, 120M dNTPs, 5pM primer, 0.75U Taq polymerase, 100ng 주형 DNA)에 mineral oil을 가한 후, thermocycler (Hybaid Co.)에서 수행하였다. 중합 반응은 94 $^{\circ}$ C (5분)에서 pre-denaturation 시킨 후, 94 $^{\circ}$ C (30초) - 36 $^{\circ}$ C (30초) - 72 $^{\circ}$ C (120초)로 2 cycles, 94 $^{\circ}$ C (20초) - 36 $^{\circ}$ C (15초) - 45 $^{\circ}$ C (15초) - 72 $^{\circ}$ C (90초)로 20 cycles, 94 $^{\circ}$ C (20초) - 36 $^{\circ}$ C (15초) - 45 $^{\circ}$ C (15초) - 72 $^{\circ}$ C (120초)로 19 cycles, 마지막 cycle은 DNA의 충분한 증폭을 위하여 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 가온하였다. PCR은 2회 이상 반복하여 실험 오차를 최소화하였다.

4. 전기 영동과 유사도 분석

반응 생성물 10 μ l와 loading dye 2 μ l ($\times 6$)를 TBE ($\times 0.5$) 완충 용액과 ethidium bromide (50 μ g/100ml)가 첨가된 1.2% agarose gel에 loading하였다. 50V로 약 1시간 전기영동한 후, DNA를 UV하에서 확인하고, 촬영하였다. PCR산물의 분석은 band의 유·무에 따라 유는 1, 무는 0으로 처리하였고, Cluster 분석에는 NTSYS의 UPGMA 프로그램을 사용하였다.

5. 시 약

Taq DNA polymerase는 한국생공, primer (10-mer) kit는 Operon Technologies, dNTP는 BM으로부터 구입하여 사용하였다. 전기영동에 사용되는 Seakem LE agarose는 FMC, 1kb DNA ladders는 GIBCO-BRL, 그밖의 시약은 Sigma Co.로부터 구입하여 사용하였다.

결과 및 고찰

집단 내에서 개체 사이의 PCR 산물의 다형현상 유무를 조사한 결과 Fig. 1에서와 같이 동일 집단의 개체들은 같은 band 양상을 보였다. 이러한 결과를 토대로 RAPD 분석에 20가지의 10-mer primer를 적용한 결과 8가지에서 다형현상을 관찰할 수 있었다 (Table 1). 증폭된 PCR 산물은 2.2-0.2kb에서 나타났으며, 모두 54개의 band들이 확

인되었다. 각 primer에 의해 증폭된 band의 수는 5-9개로 다양하게 나타났으며, 평균 6.6개였다. 토마토의 재배종과 야생종 간의 RAPD 분석 결과 DNA 절편의 크기가 2.5~0.2kb였으며, primer 당 평균 band 수가 6.5개로 나타나 분석에 효과적이었다는 보고⁵⁾와 비교해 볼 때 본 실험도 적절한 조건으로 수행되었음을 간접적으로 확인할 수 있었다. 또한 송백류의 RAPD 표지 선발시 200개의 primer 중 26개가 유효하여 전체 primer 중 분석에 유용한 primer의 비율이 13%였으며¹⁸⁾, 인삼의 경

Table 1. The sequences of arbitrary primers and polymorphism of PCR products

Primer No.	Primer sequences (5' to 3')	No. of PCR products	No. of polymorphic products (%)	No. of monomorphic products	No. of specific products (%)
A01	CAGGCCCTTC	9	7 (77.8)	1	1 (11.1)
A02	TGCCGAGCTG	6	4 (66.7)	-	2 (33.3)
A03	AGTCAGCCAC	6	5 (83.3)	-	1 (16.7)
A04	AATCGGGCTG	5	1 (20.0)	1	3 (60.0)
A07	GAAACGGGTG	8	3 (37.5)	1	4 (50.0)
A08	GTGACGTAGG	7	3 (42.9)	1	3 (42.9)
A09	GGGTAACGCC	5	3 (60.0)	-	2 (40.0)
A11	CAATCGCCGT	8	3 (37.5)	1	4 (50.0)
Total		54	29 (53.7)	5	20 (37.0)

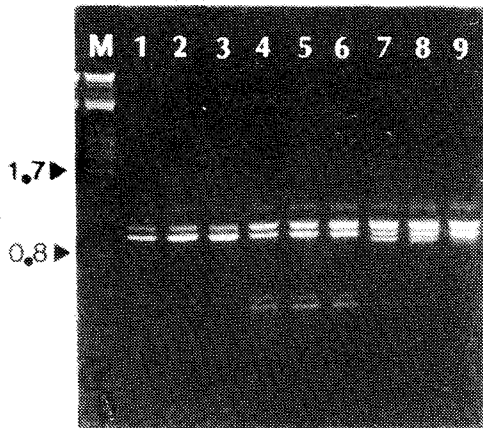


Fig. 1. Profiles of PCR products obtained from genomic DNA of 3 different lines of *G. scabra* var. *buengeri*. Lane 1-3, Keojedo line; Lane 4-6, Seochunjaerae; Lane 7-9, Naejangsan line. Lane M, 1kb ladder.

우 적용한 10개의 primer 중 4개가 유효하여 40%였는데¹⁰⁾, 본 연구에서는 20개 중에 8개가 선발되어 40%로 나타났다. 장미의 경우 8개의 primer를 사용하여 5개의 품종이 식별된 바 있는데¹⁷⁾, 용담의 경우는 8개 primer로 6가지 계통의 구분이 가능하여 유사한 결과를 나타냈다.

따라서 식물에 따른 적당한 primer의 선발은 RAPD 분석에 매우 중요하게 작용한다고 사료된다^{6, 10)}. 비교된 54개의 band 중 53.7%에 해당하는 29개의 band들이 다형현상을 보였으며, 9.3%에 해당하는 5개의 band들은 모든 식물에서 공통적으로 출현하였고, 37.0%인 20개의 band들은 계통에 따른 특이성을 보였다. 다형현상은 적용한 primer에 따라 20.0%에서 83.3%까지 다양한 변이성을 보였다 (Table 1). 계통에 따른 공통 band는

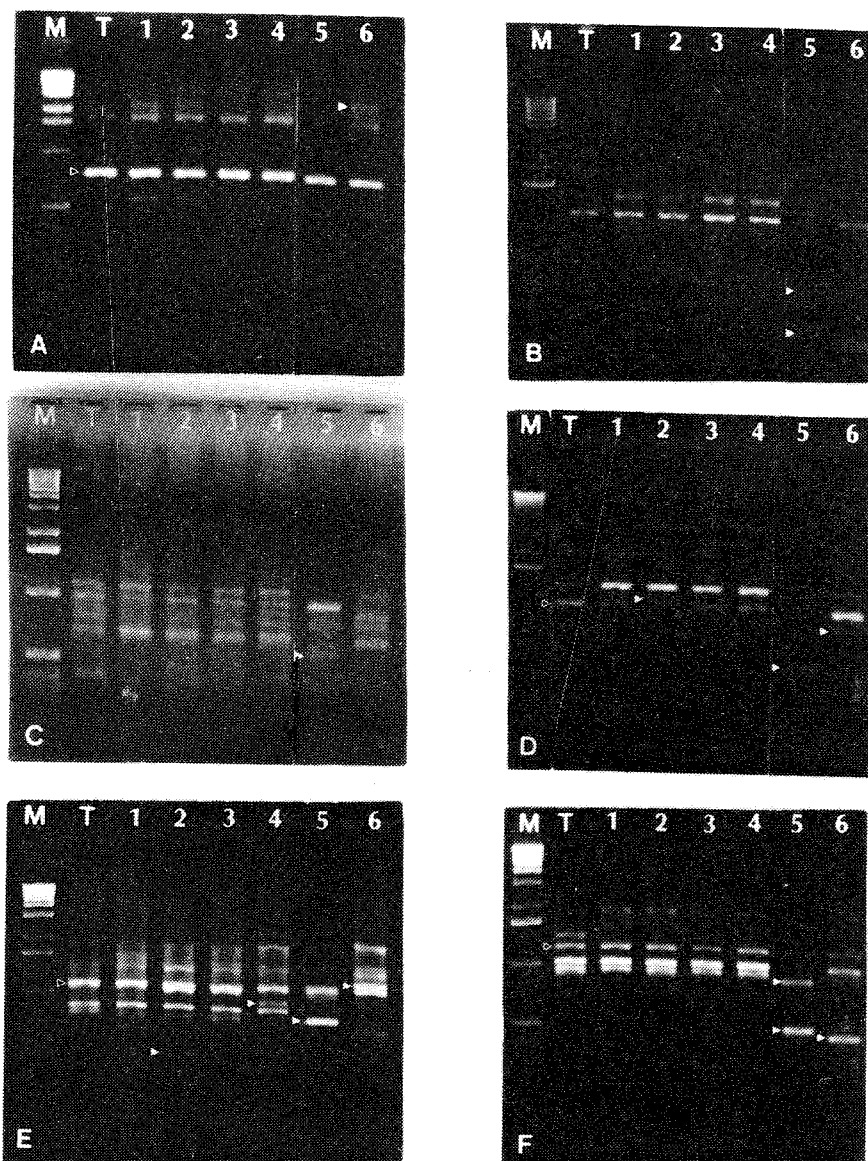


Fig. 2. Profiles of PCR products obtained from genomic DNA of lines of *G. scabra* var. *buergeri* using primer A01 (A), A02 (B), A03 (C), A04 (D), A07 (E) and A08 (F). Lane numbers are the same as in Table 2. Lane M, 1kb ladder; Lane T, bulked DNA of line 1 to 6. Open (▷) and closed arrows (▶) indicate monomorphic and specific bands, respectively.

8가지의 primer 중 5가지에서 각각 1개씩만 나타나는 계통 분석에 RAPD 분석이 유용하게 이용될 수 있음을 보여 주었으며, DNA 절편의 크기도 primer에 따라 0.8kb부터 1.3kb까지 다양하게 나타났다(Fig. 2, 3). A-01 primer에 의한 증폭 산

물에서는 0.8kb의 band가 모든 계통에서 공통적으로 나타났으며, 일본 도입종에서 2.2kb의 특이 band가 관찰되었다. 진부재래종에서는 band가 하나만 나타나 특징을 보였다. A-02에서는 모든 계통에 공통적인 band는 볼 수 없었으며, 진부재래

종에서 0.5kb와 0.3kb 부근에서 각각 특이 band가 나타났다.

일본 재래종에서는 다른 계통에 비해 band 수가 적게 나타나는 특징이 관찰되었다. A-03의 경우에는 공통 band가 나타나지 않았으며, 진부재래종에서 0.5kb의 특이 band 하나가 관찰되었다. A-04에서는 0.9kb 근처의 공통 band가 하나 나타났으며, 내장산 수집종에서 1.0kb, 진부재래종에서는 0.5kb, 일본도입종에서는 0.8kb의 특이 band

가 각각 관찰되었다. A-07의 경우에는 1.1kb의 공통 band 하나와 함께 4개의 특이 band가 관찰되었다. 4개의 특이 band들은 내장산 수집종에서 0.5kb, 거제도 수집종에서 0.9kb, 진부재래종에서는 0.8kb, 일본 도입종에서는 1.1kb 부근의 band들이었다. A-08에 의한 증폭 산물에서는 1.3kb의 공통 band가 관찰되었으며, 진부재래종에서 1.5kb와 0.5kb, 일본 도입종에서 0.4kb 부근에서의 특이 band가 출현하였다.

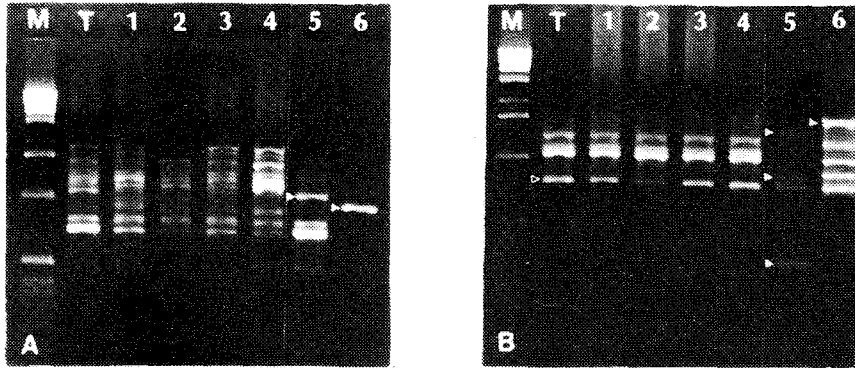


Fig. 3. Profiles of PCR products obtained from genomic DNA of lines of *G. scabra* var. *buergeri* using primer A09(A) and A11(B). Lane numbers are the same as in Table 2. Lane M, 1kb ladder ; Lane T, bulked DNA of line 1 to 6. Open (▷) and closed arrows (▶) indicate monomorphic and specific bands, respectively.

Table 2. Genetic similarity values calculated using 54 PCR products in *G. scabra* var. *buergeri*. 1, Seochunjaerae ; 2, Naejangsan line ; 3, Daedunsan line ; 4, Keojedo line ; 5, Jinbujaerae ; 6, Japanese line

Genetic lines	1	2	3	4	5	6
1	1.00					
2	0.76	1.00				
3	0.81	0.87	1.00			
4	0.76	0.76	0.87	1.00		
5	0.31	0.31	0.33	0.34	1.00	
6	0.26	0.23	0.24	0.23	0.41	1.00

A-09에서는 공통 band가 관찰되지 않았으며, 진부재래종과 일본 도입종에서 각각 1.1kb와 1.0kb 부근에서 특이 band가 나타나는 특징을 보였다. A-011에서는 0.8kb 근처의 공통 band와 함께 4개의 특이 band들이 나타났는데, 그 중 1.4kb, 0.8kb 및 0.2kb의 3개는 진부재래종에서, 일본 도입종에서는 0.1kb의 특이 band 하나가 관찰되었다. 진부재래종과 일본 도입종은 다른 계통과 현저한 차이를 보였으며, 특이 band의 수도 특이성을 보이는 20개 중 각각 11개와 6개로 높게 나타남을 알 수 있었다. RAPD 기법이 사과에서의 품종 구분²¹⁾이나 난과 식물인 *Cattleya*속 식물종에서 종의 분화, 형태적 진화 및 분자적인 변화 과정의 구명에 이용될 수 있음이 보고²⁾된 바 있는데, 용담에서도 지역이나 계통에 따

인 용 문 헌

른 다형현상의 분석에 RAPD가 유용하게 이용될 수 있음이 본 연구를 통하여 확인되었다. PCR 산물에서 비교한 54개의 band들의 유사도는 0.23~0.87로 나타났다(Table 2).

이들 유사도를 근거로 지역 및 계통에 따른 차이를 비교한 결과 서천재래종, 내장산 수집종, 대둔산 수집종, 거제도 수집종 사이의 유사도가 0.76-0.87로 한 집단으로 구분되었다. 이 집단과 진부재래종 및 일본 도입종 사이의 유사도는 0.23-0.34로 나타나 서로 구분되었으며, 진부재래종과 일본 도입종 사이의 유사도도 0.41로 나타나 서로 다른 집단으로 구분할 수 있었다. 이들 결과를 종합해 볼 때 RAPD를 이용한 증폭 산물의 다형 현상은 용담의 유전적 변이를 밝히는데 유용하게 이용될 수 있는 것으로 여겨진다²⁾. RAPD 기법은 국내에서 재배되고 있는 약용 작물의 계통 확립에 유용하게 이용될 수 있으며, 본 연구 결과는 용담의 유전 자원의 확보를 위한 주요 기본 자료이다.

적 요

서천재래종, 내장산 수집종, 대둔산 수집종, 거제도 수집종, 진부재래종 및 일본 도입종 등 6계통의 용담을 대상으로 RAPD 분석을 통한 유사도 분석을 수행한 결과 적용한 20가지의 10-mer primer 중 8가지에서 54개의 증폭된 DNA 절편을 얻었다. 그 중 53.7%에 해당하는 29개의 band가 다형현상을 보였으며, 9.3%에 해당하는 5개의 band는 모든 계통에서 공통적으로 나타났고, 37.0%인 20개의 band가 특이성을 보였다. 특이성을 보이는 band들은 내장산 수집종에서 2개, 거제도 수집종에서 1개, 진부재래종에서 11개, 일본 도입종에서 6개가 관찰되었다. 유전적 유사도의 분석 결과 서천재래종, 내장산 수집종, 대둔산 수집종 및 거제도 수집종이 0.76-0.87의 유사도를 보여 한 집단으로 구분되었으며, 이 집단과 진부재래종 및 일본 도입종 사이의 유사도는 0.23-0.34로 각각 다른 집단으로 구별되었다. 또한 진부재래종과 일본 도입종 사이의 유사도는 0.41로 나타나 서로 구분되었다.

1. Bang, J.W., M.K. Lee and S.H. Chung. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration in leaf explant cultures of *Gentiana scabra* var. *buergeri*. Korean J. Plant Tissue Culture 21 : 233-237.
2. Benner, M.S., M.D. Braunstein and M.U. Weisberg. 1995. Detection of DNA polymorphisms within the genus *Cattleya* (Orchidaceae). Plant Mol. Biol. Rep. 13 : 147-155.
3. Chung, S.H., J.W. Bang and H.W. Choi. 1995. Cytogenetic analysis of *Bupleurum falcatum* L. cultivated in Korea. Korean J. Medicinal Crop Sci. 3 : 61-65.
4. Fang, G., S. Hammar and R. Grumet. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. Biotechniques 13 : 52-55.
5. Foolad, M.R., R.A. Jones and R.L. Rodriguez. 1993. RAPD markers for constructing intraspecific tomato genetic maps. Plant Cell Rep. 12 : 293-297.
6. Fritsch, P., M.A. Hanson, C.D. Spore, P. E. Pack and L. H. Rieseberg. 1993. Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plants. Plant Mol. Biol. Rep. 11 : 10-20.
7. Hamrick, J.L. and R.W. Allard. 1975. Correlations between quantitative characters and enzymes genotypes in *Avena bartata*. Evolution 29 : 438-442.
8. Hayashi, T. 1976. Studies on crude drugs originated from Gentianaceous plants I. Determination of gentiopicroside, the bitter principle of *Gentiana radix* and *Gentiana scabrae Radix*. Yakugaku Zasshi 96 : 356-361.

9. Lee, S.T., J.I. Lee, N.S. Seong and R.K. Park. 1993. Status and future measure on production of medicinal crops in the major cultivation area. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 1 : 74 – 80.
10. Lim, Y.P., C.S. Shin, S.J. Lee, Y.N. Youn and J.S. Jo. 1993. Survey of proper primers and genetic analysis of Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) variants using the RAPD technique. *Korean J. Ginseng Sci.* 17 : 153 – 158.
11. Rani, V., A. Parida and S.N. Raina. 1995. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. *Plant Cell Reports* 14 : 459 – 462.
12. Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn and H.A. Erlich. 1985. Primer – detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 : 487 – 491.
13. Seong, N.S., C.H. Park, K.S. Kim, S.T. Lee and Y.H. Chang. 1995. In vitro variant induction and its content of gentiopicroside of *Gentiana scabra* BUNGE. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 3 : 40 – 44.
14. Seong, N.S., C.H. Park, S.T. Lee and S.M. Kim. 1993. Plant regeneration and multiplication of *Gentiana scabra* Bunge through leaf and stem culture. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 1 : 129 – 136.
15. Seong, N.S., K.S. Kim, E.H. Soh and Y.A. Chae. 1994. Effects of soil textures on growth and saikosaponins content in *Bupleurum falcatum* L. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 2 : 193 – 197.
16. Suzuka, O. 1950. Chromosome numbers in pharmaceutical plants I. Rep. Kihara Inst. Biol. Res. 4 : 57 – 58.
17. Torres, A.M., T. Millan and J.I. Cubero. 1993. Identifying rose cultivars using randomly amplified polymorphic DNA markers. *HortScience* 28 : 333 – 334.
18. Tulsieran, L.K., J.C. Glaubitz, G. Kiss and J.E. Carlson. 1992. Single tree linkage mapping in conifers using haploid DNA from megagametophytes. *Bio/Tech* 40 : 686 – 690.
19. Wilde, J., R. Waugh and W. Powell. 1992. Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 83 : 871 – 877.
20. Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18 : 6531 – 6535.
21. Yae, B.Y. 1994. Classification of *Malus domestica* cultivars by random amplified polymorphic DNA and selection of markers for cultivar identification. Ph.D. Thesis, Seoul National University, pp 1 – 109.