

DNA marker 지문법에 의한 취나물 5종 (청옥취, 개미취, 참취, 수리취, 곰취)의 비교연구

¹유기억, ¹안상득, ¹전익조, ²홍정기, ¹유창연, ¹김종화, ¹김시창, ¹임학태*
¹강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부, ²산채시험장

Comparative studies of the five edible mountain vegetables by DNA marker fingerprinting

¹Yoo, Ki Oug, ¹Ahn, Sang Deuk, ¹Chun, Ik Jo, ²Hong, Jeong Ki, ¹Yoo, Chang Yeon, ¹Kim, Jong Hwa,
¹Kim, Shi Chang and ¹Lim, Hak Tae*

¹Division of Applied Plant Science, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701

²Mountain Vegetables Experimental Station, RDA, South Korea

*Corresponding author

ABSTRACT

Five edible mountain vegetables (*Saussurea* sp., *Aster tataricus*, *A. scaber*, *Synurus deltooides*, *Ligularia fischeri*) were investigated on the basis of amplified DNA polymorphisms resulted from PCR (polymerase chain reaction) analysis. The sampled plants consisted of 38 individuals in 5 taxa. Only 10 primers out of 62 primers (60 random [10-mer] primers, two 15-mer [M13 core sequence, and (GGAT)_n sequence]) tested gave rise to polymorphisms in all of the tested plants, producing 176 DNA fragments amplified. Intraspecific polymorphisms found in each taxa showed intraspecies constancy (31.1-61.1%) in the banding patterns of individual plants; *Saussurea* sp., 31.1%, 15 bands, *Aster tataricus*, 40.9%, 18 bands, *A. scaber*, 38.5%, 15 bands, *Synurus deltooides*, 34.7%, 17 bands, and *Ligularia fischeri*, 61.1%, 22 bands, respectively. All five species were well classified from each other at the 0.93 level of similarity index value. Intraspecific and interspecific variations were appeared at the levels ranging from 0.62 to 0.99. Based on these results, our PCR analyses support the previous data derived from external morphology of the 5 edible mountain vegetables, but very low levels of intraspecific variations were detected in all of these taxa.

Key words : PCR, M13 core sequence, (GGAT)_n sequence, DNA polymorphism

서 론

식생활 및 외식산업의 발달과 더불어 인체에 유용한 산채류에 대한 수요가 급증하고 있다. 이에 따라 산채류의 재배면적도 증가하고 있어 1994년에는

4,739ha로 1990년에 비해 약 1.6배가 증가되었으며 2000년에는 6,000ha 이상으로 증가될 것으로 추정된다. 그러나 UR등에 따른 수입개방화로 인하여 가격경쟁력에서는 외국산에 비해 떨어지고 있는 실정이다. 국내의 산채류는 야생종에 국한되어 있고 재배품목도 취나물등 일부 산채에 한정된 20여종류로 매우 단순

본 연구는 1995년도 교육부 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

하며 가공이용 기술도 초보적인 단계에 있어 이들에 대한 연구가 필요하다 (강원도, 1995). 본 연구에서 다들 5종류의 취나물은 우리나라 산채류 중에서 비교적 선호도가 높은 것들로 모두 국화과에 속한다. 청옥취는 삼척을 위주한 동해안 지역에서 주로 이용하는 나물로 '자옥'이라 불리기도 하며 아직까지 정확히 명명 되지 않은 종이다. *Aster*속에 속하는 개미취와 참취는 어린순이나 잎을 나물로하며 개미취는 전체를 거담제로 사용하고 참취는 두통이나 현기증의 치료등 약용으로 사용되기도 한다. 수리취는 잎 뒷면에 거미줄 같은 털이 밀생하는 특징을 가지고 있으며 연한 잎을 떡에 섞어서 이용하므로 '떡취'라고도하고 성숙한 잎은 말려서 부싷깃으로 이용한다. 곰취는 심산지역의 습지에서 주로 자라며 잎은 심장형이고 얇은 거치가 있다. 어린 잎을 식용으로하며 독특한 향이 있어 씹이나 묵나물로 이용한다(이, 1982). 이러한 선호도가 높은 종류들은 원활한 공급을 위해 재배면적이 급속히 늘어나고 있지만 재배농가에서는 정확한 종의 구분없이 유사종류를 재배함으로써 생산량을 떨어뜨리는 문제점을 안고 있다. 따라서 종의 변이정도를 설정하고 정확한 구별점을 찾는 것이 필요한 실정이다.

최근들어 polymerase chain reaction (PCR)을 이용한 RAPD(Randomly amplified polymorphic DNA) 방법

이 개발되었다. RAPD기술은 유전자지도 작성시 매우 유용할 뿐만 아니라 유전적 특징과 분자분류학 연구에도 널리 이용되고 있다 (Welsh et al., 1990). PCR 증폭에 의해 만들어진 DNA 단편들은 길이에 따라 변화현상을 나타내기 때문에 주로 작물의 종내 분류군 또는 종간 분류군들을 비교 분석하는데 이용되어 왔다 (Klein-Lankhorst et al., 1991). 실제로 Yoo 등(1996)은 RAPD방법을 통해 금강초롱꽃이 근연분류군들과 구별되어 금강초롱꽃이 우리나라 특산속으로 지지됨을 보고한 바 있고, Lin 등(1994)은 잔디종류의 생태형들을 RAPD marker로 지역간 변이정도를 확인하였다. 또한 Bellamy 등(1996)은 국화과에 속하는 치커리 교잡품종을 대상으로 RAPD marker를 이용해 동정 및 순도 검정을 실시하기도 하였다. 이러한 RAPD 방법 이외에 M13, poly(GT) probe와 같은 specific primer를 이용하여 종내변이를 논하는 방법도 개발되어 이용되고 있다 (Nybom, 1993).

본 연구에서는 취나물 5종을 대상으로 PCR을 이용한 DNA 다변성을 통해 종간 및 종내 구별이 가능한가를 알아보고, 유용자원의 효율적 이용을 위한 기초자료로 활용하게 하고자 수행하였다.

재료 및 방법

Table 1. Collection data of 5 edible mountain herbs used for PCR analysis

Scientific name	Korean name	Collecting sites*	No. of individuals
<i>Saussurea</i> sp.	청옥취	KW : Dutasan	5
<i>Aster tataricus</i>	개미취	KW : Heongsung Keumbyungsan	5 5
<i>A. scaber</i>	참취	KW : Heongsung Pyongchang Anmasan	6 1 1
<i>Synurus deltooides</i>	수리취	KW : Chungoksan	5
<i>Ligularia fischeri</i>	곰취	KW : Dutasan Jungsun Hwangbyungsan Kariwangsan GK : Yongmunsan CB : Jinchun	5 1 1 1 1 1 1

* : KW:Kangwondo, GK:Kyungkido, CB:Chungcheongbukdo

재 료 : 본 실험에 사용한 재료는 5종 38개체를 대상으로 하였으며, 시료는 1996년 5월에서 7월까지 자생지에서 채집한 개체와 강원도 농촌진흥원 평창산채시험장에서 분양 받은 재료를 강원대학교 야외포장과 온실에 이식, 재배한 생체 재료에서 잎을 적출하여 저온냉동기(-80℃)에 보관한 것을 사용하였다. 실험에 사용된 재료와 채집지는 Table 1과 같다.

DNA 추출 : 취나물 5종류 38 개체의 잎 절편 0.5g을 액체질소를 이용하여 마쇄한 후 DNA 추출용액 (0.2M Tris-HCl, 0.05M EDTA, pH 8.0, 0.5 M NaCl, 0.5% SDS)을 첨가하여 잘 섞어 65°C에서 1시간 배양한 후, 4°C에서 13,000rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 상층액에 동량의 chloroform : isoamylalcohol (24 : 1)을 넣어 20분간 실온에서 혼합시킨 후, 4°C에서 13,000rpm으로 5분간 원심분리하여 상등액만을 취했다. 상등액의 2배에 해당하는 ethanol을 첨가하여 잘 섞은 다음 -20°C에서 1시간 동안 두었다가, 4°C에서 13,000rpm으로 7분간 원심분리했다. 상등액은 제거하고 남은 pellet을 건조시킨 후, 1xTE buffer를 넣어 용해한 다음 RNase(10μg/ml)를 첨가하여 37°C에서 20분간 처리하였다. 최종량의 1/10에 해당하는 3M sodium acetate와 2배의 ethanol을 넣고 섞은 후 -20°C에서 1시간 동안 두었다가, 15,000rpm에서 7분간 원심분리한 후 상등액을 새로운 tube에 옮겨 100% ethanol을 첨가한 후, -20°C에서 약 1시간 정도 두었다가 13,000rpm으로 4°C에서 7분간 원심분리하여 상등액을 제거하고, 70% ethanol을 넣어 혼합한 후 4°C에서 2분간 원심분리하였다. Pellet은 실온에서 건조시킨 후 TE buffer에 녹여 4°C에 보관하여 사용하였다.

DNA 증폭과 분리 : 0.5ml tube에 1 x KCl buffer, 4mM dNTPs, 10개의 염기서열로 구성된 random primer, 50ng genomic DNA와 0.8unit Taq DNA Polymerase, 그리고 증류수를 혼합하여 최종량을 25μl로 한 후, 20μl의 mineral oil을 첨가하였다. Primer는 Random primer 60개와 core sequence인 M13, (GGAT)_n, 총 62개를 선발하였다. 혼합액이 들어있는 tube는 DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus 9600)에 옮겨 94°C에서 1분, 35°C에서 1분, 72°C에서 2분을 한 cycle로 하여 45 cycle을 반복한 다음 72°C에서 10분 더

유지시켜 주었다 [M13 core sequence와 (GGAT)_n sequence의 경우는 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분을 한 cycle로 하여 45 cycle]. Mineral oil을 제거하고 증폭된 DNA에 5μl의 6x DNA tracking dye solution을 첨가 후, 15μl를 취하여 1.5% agarose gel을 이용하여 전기영동한 다음 ethidium bromide(EtBr)로 염색하고 UV transilluminator를 사용하여 밴드를 확인한 후 Polaroid 사진기로 촬영하였다. 증폭되어 분리된 밴드의 분자량은 HindIII 로 절단된 Lambda DNA와 double digested lambda markers를 사용하여 추정하였다.

Band양상에 따른 비교 분석 : 촬영된 사진을 근거로 분자량에 따른 밴드의 유무를 확인하고 기초자료 행렬을 작성한 후 이를 근거로 NTSYS program (Exeter Software)을 이용하여 유사도 값을 구하고, UPGMA(Unweighted pair-group method with arithmetic mean, 비가중산술법) 방법으로 phenogram을 작성하여 비교 검토하였다.

결과 및 고찰

전기영동 분석 : 취나물 5종류 38개체에서 얻어진 genomic DNA를 10개의 염기서열로 구성된 서로 다른 random primer 60가지와 M13 core, (GGAT)_n sequence primer (15-mer), 총 62종류를 이용하여 primer 선발실험 결과 반응이 일어난 primer는 14개였으며 이중 전체 분류군에서 반응이 일어난 primer는 10개였다. 이러한 primer의 염기 서열에는 G+C의 수가 60% 이상으로 많은 비중을 차지하고 있어 primer의 구성 염기는 DNA 증폭에 영향을 미치며, 특히 G+C의 수에 따라 DNA 증폭이 영향을 받는다는 기존 결과 (Williams *et al.*, 1990, 1993; Fritsch *et al.*, 1993)와 일치하였다. 38개체 모두에서 반응이 일어난 10개의 염기서열은 Table 2와 같다.

증폭된 DNA 단편들의 크기는 300-2300bp 사이의 범위에서 나타났으며, 종간 구별이 가능하였고 종내에서도 같거나 서로 다른 band양상을 보였다 (Fig. 1). 전체 분류군에서 반응이 일어난 10개의 primer를 사용하여 얻을 수 있는 총 band의 수는 176개였고 이중 5종류 모두에서 나타나는 monomorphic한 band는 없었다. 종내 개체간 비교에서는 청옥취의 경우 총 47개의 중 31.1%에 해당하는 15개 band가 polymorphic

Table 2. List of arbitrary 10-mer primers, M13 core and (GGAT)₄ sequences used in this study.

Primers	Sequence (5' → 3')
I (OPA-01)	CAG GCC CTT C
II (OPA-05)	AGG GGT GTT G
III (OPA-08)	TCA CCA CGG T
IV (OPA-09)	GGG TAA CGC C
V (OPB-18)	CCA CAG TGG T
VI (OPE-01)	CCC AAG GTC C
VII (OPE-04)	GTG ACA TCC C
VIII (OPE-10)	TGC CGA GGC T
IX (M13)	GAG GGT GGN GGN TCT
X (GGAT) ₄	GGA TGG ATG GAT GGA

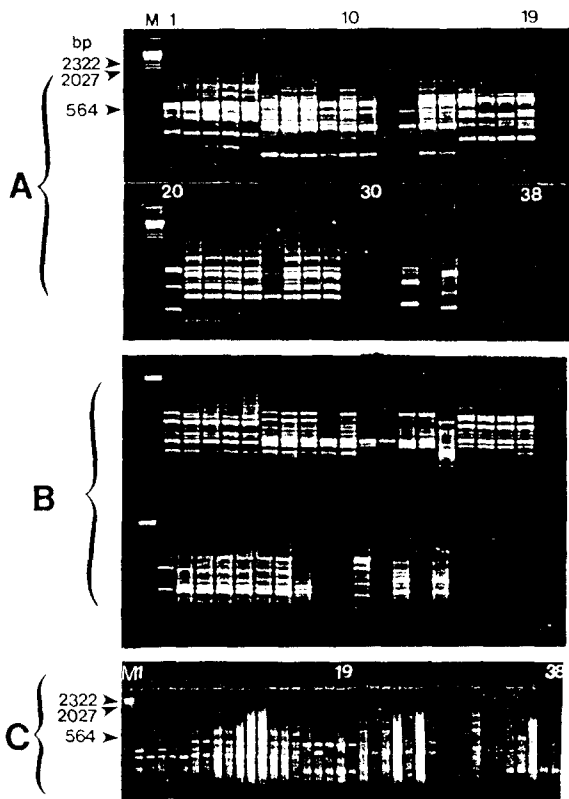


Fig. 1. Amplified DNA band profiles of the analyzed plants. The sequences of each primer in A(primer I), B(primer VII), C(primer IX) are shown in Table 2. M= Lambda DNA marker digested with HindIII. Lane 1-5 : *Saussurea* sp., 6-15 : *Aster tataricus*, 16-20 : *Synurus deltooides*, 21-28 : *Aster scaber*, 29-38 : *Ligularia fischeri*

하게 나타났고, 개미취는 44개 중 18개(40.9%), 수리취는 49개 중 17개(34.7%), 참취는 39개 중 15개(38.5%), 곰취는 36개 중 22개(61.1%)로 청옥취의 종내변이는 가장 낮았으며 곰취가 가장 높았다. 이러한 결과는 청옥취는 강원도 삼척 이북에서만 자생하는 종으로 분포가 한정되어 있는데 비하여 나머지 4종류는 전국에 고루 분포하고 특히 곰취는 6개 지역의 개체를 비교하여 변이폭이 심한 것으로 사료된다.

Random primer 이외의 특이 primer로 사용된 M13 core sequence와 (GGAT)₄ sequence는 종내 또는 종 이하의 분류 개체를 동정하는데 유용한 probe로 알려져 있으며(Wersing *et al.*, 1995), 이 방법은 지리적으로 격리분포되어 있는 종내 분류군들의 집단이나 종의 유전적 유사성을 밝힐 수 있는 것으로 알려져 있다(Nyholm, 1993). 본 연구에서는 뚜렷한 종내 변이가 관찰되지 않았고 36.4%에 해당하는 14개만이 polymorphic하게 나타났다. 따라서 외부형태에 의한 변이는 생육지나 환경요인과 관계가 있어서 (Clausen *et al.*, 1940) 잎의 크기, 줄기의 높이와 색깔 등은 자생지 환경에 적응한 형태로 판단된다

Band 양상에 따른 비교 분석 : 10개의 primer를 사용하여 얻은 176개의 band 각각을 하나의 형질(character)로 보아 기초자료행렬을 작성하고 이를 근거로 유사도를 구한 다음, 이 결과를 UPGMA(비가중평균결합)방법으로 phenogram을 작성하면 Fig. 2와 같다.

그 결과 Fig. 2에서 보여지는것 처럼 크게 청옥취

가 포함된 1개의 군, 개미취와 수리취가 포함된 1군, 그리고 곰취와 참취가 포함된 1군으로 구별이 가능하였다. 38개체의 유사도는 0.62-0.99로 나타났으며 세계의 군은 0.70에서 구별되었다.

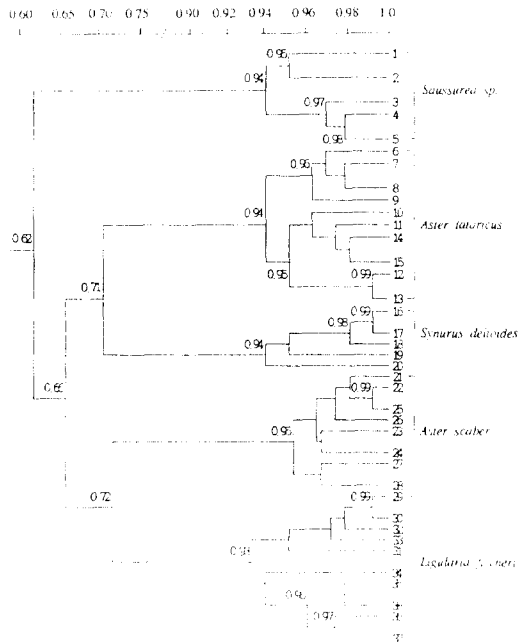


Fig 2. Phenogram for 5 edible mountain vegetables based on DNA polymorphisms.

취나물 5가지 분류군의 종간 비교에 있어서는 유사도 0.93에서 5종의 구분이 가능하였으며 종내 개체간 변이 역시 0.94이상으로 유사도가 높게 나타나 종내 변이는 매우 낮은 것으로 나타났다. 종간비교에 있어서 청옥취, 수리취, 곰취는 잘 구별되었지만 같은 속에 속하는 참취와 개미취는 서로 다른 양상을 보여 이들에 대한 재검토가 요구된다.

RAPD에 의한 분석은 주로 종간 또는 종내 품종간의 낮은 분류단위를 구별하기 위해 사용되는 방법으로 알려져 있다. RAPD에 비해 단백질 분석이나 동위효소 분석은 실험재료의 균일성이 요구되고, 조직부위에 따라 결과가 다르며, polymorphism을 일으킬 수 있는 수가 제한적이다. 그러나 RAPD 방법은 종간 또는 종내 분류에 있어서 각각의 종에서 보여지는 상동성(homology)과 재현성에 관한 문제점을 가지고는 있지만 적은 양의 DNA를 가지고도 많은 양의 증폭된 DNA를 얻어낼 수 있고 시간이 적게 들

며 경제적이라는 장점을 가지고 있다(Demeke *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1990). 위의 결과에서 DNA marker를 이용한 PCR 방법이 취나물류의 종간 비교를 위한 실험방법으로 가치가 인정되었지만 종내변이를 밝히는 데는 유의성이 적은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 실험재료로 사용한 개체수가 적고 분류학적으로 계통간 거리가 먼 개체를 대상으로 하였다는 점 등이 인정되며 앞으로 분류군간 종내변이를 정확히 밝히기 위해서는 종내 분류군들의 집단간, 종내 유전적 유사성을 밝힐 수 있는 RFLP나 AFLP 또는 gene sequencing과 같은 방법이 수행되어야 가능할 것으로 판단된다.

적 요

유용 취나물 5종류의 종간 유사도 및 종내 변이를 파악하기 위하여 38개체를 대상으로 PCR 방법을 이용하여 비교분석하였다. 사용된 62가지 primer 중에서 38개체 전체에서 band를 보여준 것은 10가지였고, 이를 통해 얻어진 총 band의 수는 176개로 나타났다. 종내 변이는 청옥취가 31.1%에 해당하는 15개의 polymorphic band를 가져 변이가 가장 낮았으며 곰취는 61.1%로 가장 높게 나타났다. 군집분석 결과 조사된 38개체는 유사도 0.93에서 5종의 구분이 가능하였으며 38개체 각각은 유사도 0.62-0.99의 유사성을 갖는 것으로 나타났고 종내 변이는 0.93이상으로 높게 나타나 변이가 적은 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 PCR방법을 이용한 결과가 취나물 5종류를 구분하는데 유용하게 사용되었으며 군집분석 결과 종내 변이가 매우 낮은 것으로 나타났다.

인용문헌

1. Bellamy, A. F. Vedel and H. Bannerot. 1996. Varietal identification in *Cichorium intybus* L. and determination to genetic purity of F₁ hybrid seed samples based on RAPD markers. *Plant breeding* 115:128-132.
2. Clausen, D., D. Neck and W.M. Heisey. 1940. Experimental studies on the Native of species I. Effect of varied environments on Western North America Plants. Carnegie Inst. Washington Pub. p520.

3. Demeke, T., L.M. Kawchuk, and D.R. Lynch. 1993. Identification of potato cultivars and clonal variants by random amplified polymorphic DNA analysis. *Amer. J. Potato* 70:561-569.
 4. Fritsch, P., M.A. Hanson, C.D. Spore, P.E. Pack and L.H. Reisberg. 1993. Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related of flowering plants. *Plant Molecular Biology* 11 : 10-20.
 5. Klein-Lankhorst, R.M., A. Vermunt, R. Weide, T. Liharska, and P. Zabel. 1991. Isolation of molecular markers for potato using RAPD. *Theor. Appl. Genet.* 83:108-114.
 6. Lin, Z.W., R.L. Jarret., R.R Duncan, and S. Kresovich. 1994. Genetic relationships and variation among ecotypes of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum*) determined by RAPD markers. *Genome* 37:1011-1017.
 7. Nybom, H. 1993. Applications of DNA fingerprinting in plant population studies in DNA fingerprinting : State of the Science, Burke, T., Dolf, G., Jeffrey, A. J., and Wolff, R., Eds., Birkh user, Basal. 293-309.
 8. Weising K, H. Nybom, K. Wolff and W. Meyer. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC press. p180.
 9. Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213-7218.
 10. 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.
 11. Williams, J.G.K., M.K. Hanafey, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Meth. Enzymol.* 218:704-740.
 12. Yoo, K.O., Lee, W.T., Kim, N.S., Kim, J.H. and Lim, H.T. 1996. Comparative studies on the *Hanabusaya asiatica* and its allied groups based on RAPD analysis. *Kor. J. Soc. Hort. Sci.* 37(2):324-328.
 13. 강원도. 1995. WTO체제에 대응한 강원도 농정의 기본방향에 관한 연구. p189-191.
 14. 이창복. 1982. 대한식물도감. 향문사. pp726-780
- (접수일 : 1996년 11월 2일)