

가시오갈피 수집종의 RAPD 변이분석

김 선* · 김기영* · 박문수* · 최선영** · 윤성중**

Intraspecific Relationship of *Eleutherococcus senticosus* Max. by RAPD Markers

Sun Kim*, Ki Young Kim*, Mun Su Park*, Sun Young Choi** and Song Joong Yun**

ABSTRACT : To evaluate the intraspecific variations among the Kasiogalpi (*Eleutherococcus senticosus* Max.) collections, randomly amplified DNA polymorphisms were examined. Twenty primers from 90 primers applied were selected. The range of polymorphism was 7.1~90.9% in 113 randomly and specifically amplified DNA fragments. Collections were divided into two major groups at the similarity coefficient value of 0.65. A considerable degree of genetic diversity was also detected among plants within the same collections. Deokyu (1, 2, 3, 4, 6), Bukhaedo (7, 8) and Odae (9, 10) collections showed higher degree of genetic similarity with a value of 0.65~0.86, while Deokyu 5 showed much lower genetic similarity than other collections.

Key words : *Eleutherococcus senticosus* Max., Genetic similarity.

緒 言

가시오갈피는 두릅나무과 오갈피속에 속하는 활엽성 낙엽관목으로 동북아시아 지역인 러시아의 우수리강 유역과 사할린, 중국의 흑룡강성 유역과 동북 산간지역 및 일본의 북해도 지역에 분포되어 있고 (中國 藥用植物 栽培學, 1991), 우리나라에는 백두산 일원과 태백산맥을 따라 설악산, 오대산, 덕유산 등의 지역에 분포한다 (韓德龍, 1983).

가시오갈피의 외부 형태는 절간에 길이 1cm 내외의 피침이 밀생하고, 잎은 장상복엽인데 소엽의 크기는 길이가 7~12cm, 폭이 4~5cm 내외이며,

꽃은 산형화서로서 1개의 화축에 60~90개의 꽃이 착생하고, 자방은 5개의 심피로 구성되어 있다. 개화시기는 6월 상순이며 결실시기는 9월 상순경인데 우리나라에 자생하는 가시오갈피는 극히 일부의 나무에서만 성숙된 자방이 관찰된다.

가시오갈피속에 대한 분류학적 연구로는 Harms (1918), Nakai (1927), Kim (1997) 등이 심피의 수, 엽의 형태, 화주의 유합여부 등을 기준으로 각자의 견해에 따라 다르게 분류하였다. 그 후 Kim 등 (1996)은 가시오갈피 종내에도 화기내 화사의 형태에 따라 화사의 길이가 0.5cm 내외인 장화사 형과 0.2cm 내외인 단화사 형의 꽃이 피는 나무로 분류되며, 단화사형의 약은 퇴화되어 수정능력

* 호남농업시험장 (Honam National Agricultural Experiment Station, RDA, Iksan 570-080, Korea)

** 전북대학교 농학과 (Dept. of Agri, Chonbuk Nat. Univ., Chonju 560-756, Korea)

〈 '98. 6. 19 接受 〉

이 없음을 밝혔다. 또한 Kim (1997) 등은 지역 수집종의 교배실험에서 결실이 잘되는 개체와 안되는 개체가 있음을 조사하여 가시오갈피 종내 변이와 개체간의 유전적 다양성에 대한 검토가 필요함을 제시하였다.

따라서 본 연구는 RAPD 분석을 통한 DNA 다형현상을 이용하여 가시오갈피의 화기의 형태적 특성에 따른 유전학적 차이점과 자생 지역에 따른 변이 정도를 검토하고자 수행하였다.

材料 및 方法

실험재료

공시 재료는 1990년부터 1996년에 가시오갈피 지역 수집종(덕유산, 오대산, 북해도)을 호남 농업 시험장 포장에 재배하면서 실험 재료로 이용하였다(Table 1).

DNA 추출 및 전기영동

잎이 출현하여 전개하기 전의 신엽을 채취하여 동결시킨 후 냉동 건조기에서 3일간 동결건조시켜 CTAB방법(Doyle & Doyle, 1987)으로 DNA를

추출하였다.

PCR (polymerase chain reaction) 반응용액은 1X PCR buffer (10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂), template DNA 50ng, dNTP 100μM(Takara Co.), primer 100nM (UBC), Taq DNA polymerase (TakaRa Co.) 1.0unit를 혼합하여 25μl로 조성하였고, UBC (The University of British Columbia)의 primer 201-290까지를 공시하여 pre-denaturation을 94℃에서 5분간 시행한 다음, denaturation (94℃, 1.5분간)과 annealing (36℃, 1분간), extension (72℃, 2분간) 과정을 1 cycle로 하여 총 45 cycles을 수행하고 마지막 extension (72℃, 5분간) 과정을 수행한 후, 발현된 band를 UV상에서 촬영하여 DNA band 양상을 분석하였다.

유연관계 분석

유연관계 분석은 NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) computer program의 UPGMA(Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic average) 분석방법 (Rohlf, 1989)을 이용하여 dendrogram을 작성하였다.

Table 1. Origin and morphological characteristics of *Eleutherococcus senticosus* Max. .

Code	Origin	Leaf shape	Thorn shape	Thorn		Date of flowering	Anther shape ²⁾
				Number of thorns/node	Angle of thorn ¹⁾		
1	Mt. Deokyu	Elliptical	Needle	240	B	June	LF, WY
2	"	"	"	186	B	"	"
3	"	"	"	120	B	"	"
4	"	"	"	95	B	"	SF, SB
5	"	"	"	240	A	"	"
6	"	"	"	170	B	"	"
7	Bukhaedo (Japan)	"	"	172	B	"	"
8	"	"	"	48	B	"	"
9	Mt. Odae	"	"	236	B	"	"
10	"	"	"	174	B	"	"

¹⁾ A : an acute angle (~90°), B : an obtuse angle (90° ~).

²⁾ LF (long filament), SF (short filament), WY (white yellow), SB (semi - brown).

結果 및 考察

RAPD 양상

가시오갈피 수집종내 변이 동정을 위하여 지리적으로 원거리에 있는 덕유산, 오대산과 일본의 북해도 등 3개 지역에서 수집한 10개체에서 추출한 genomic DNA를 10개의 염기서열로 구성된 UBC Oligonucleotide primer 90종으로 screening하여 그 중 band의 재현성과 선명도가 높은 20개의 primer를 선발하였다. 전기영동에 의해 증폭된 DNA의 단편들은 400~2,000 bp에서 나타났으며 20개의 primer에서 나타난 band의 수는 197개로 나타났고, polymorphic band수는 113개 (57.3%)로 높은 다형을 나타냈으나 primer 종류에 따라 다형의 비율이 크게 달라, primer # 232의 경우 92.3%의 높은 polymorphism을 보였으나 primer # 250의 경우 7.1%로 다형율이 낮았다 (Table 2).

Table 2. The oligonucleotide primers selected for RAPD analysis of *Eleutherococcus senticosus* Max. .

Primer No. ¹⁾	Sequence (5' → 3')	GC content (%)	Product ²⁾		Polymorphism (%)
			AP	PP	
208	ACG GCC GAC G	80	8	5	62.5
211	GAA GCG CGA T	60	6	2	30.0
212	GCT GCG TGA C	70	5	3	60.0
218	CTC AGC CCA G	70	9	7	77.0
222	AAG CCT CCC C	70	6	3	50.0
225	CGA CTC ACA G	60	9	7	77.8
226	GGG CCT CTA T	60	12	4	33.3
227	CTA GAG GTC C	60	8	5	62.5
230	CGT CGC CCA T	70	10	6	60.0
232	CGG TGA CAT C	60	11	10	90.9
239	CTG AAG CGG A	60	10	7	70.0
241	GCC CGA CGC G	90	9	4	44.4
243	GGG TGA ACC G	70	10	6	60.0
244	CAG CCA ACC G	70	10	6	60.0
250	CGA CAG TCC C	70	14	1	7.1
254	CGC CCC CAT T	70	7	4	57.1
261	CTG GCG TGA C	70	11	8	72.7
262	CGC CCC CAG T	80	16	8	50.0
266	CCA CTC ACC G	70	15	8	53.3
268	AGG CCG CTT A	60	11	9	81.8
Total			197	113	57.3

¹⁾ UBC primer

²⁾ AP : No. of amplified products, PP : No. of polymorphic products

한편 template DNA내 G+C 함량의 높을수록 DNA중폭이 잘 일어난다고 보고 (Williams et. al., 1990; Yang et. al., 1993) 되었으나, 본 실험에서는 primer별 G+C 함량의 비율이 60% 이상에서는 차이가 없는 것으로 나타났다.

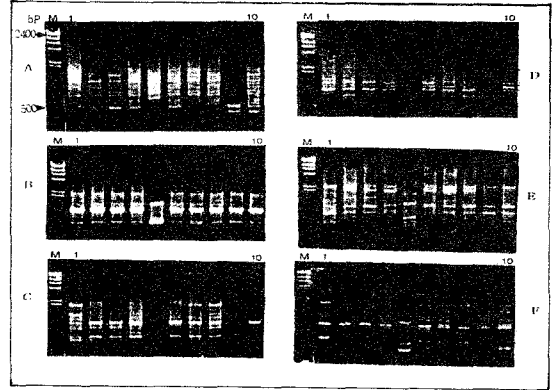


Fig. 1. Randomly and specifically amplified polymorphic DNAs of the analyzed plants. The sequences of each primer in #232 (A), #241 (B), #244 (C), #261 (D), #266 (E), #268 (F) are shown in Table 2. M=Lambda DNA marker digested with hind III. Lane 1-6 (Mountain Deokyu), 7-8 (Bukhaedo), 9-10 (Mountain Odae).

유연관계 분석

가시오갈피 수집종 내의 유연관계 분석을 위해 RAPD에 의해 나타난 band를 조사하여 code화한 후, dendrogram (NTSYS-PC program)을 작성하였을 때 나타나는 수집지역 및 개체간의 변이정도와 유연관계는 Fig. 2와 같다.

가시오갈피 전체 수집 개체들의 유사도는 0.27~0.86으로 나타났고, Genetic distance 값의 평균은 0.73이었다. 유사도 0.65를 기준으로 2군으로 분류되었으며, 2군으로 분류된 덕유산 5번 개체가 다른 개체들과 원연의 관계인 것으로 나타났다. 이 개체가 나머지 개체들과 구별되는 표현형은 질간에 착생하는 가시오갈피로 다른 개체들은 둔각인 반면, 5번 개체는 예각과 둔각이 혼재하는 특성을 나타내었다. 그러나 이 개체가 원연의 관계로 나타

난 것이 가시각을 나타내는 유전자의 표현 인가를 확인하기 위해서는 이와 유사한 개체들에 대한 유효 성분 함량이나 단백질 구조의 변화 등에 대한 추가적인 검토가 요구되었다. 한편 1군으로 분류된 개체들의 유사도는 0.65~0.86의 분포를 나타냈는데, 1군에 포함된 수집 지역중 간의 원연 관계는 북해도 수집종인 7, 8번 개체는 근연인 것으로 나타났으나, 동일지역 수집종인 오대산 수집종 10번 개체는 9번 개체 보다는 다른 지역 수집종과 근연인 것으로 나타났다.

한편 외부 형태 중 장화사형을 나타냈던 개체들에서는 2번과 3번 개체는 동일 group으로 분류되었으나, 1번 개체는 다시 분리되는 것으로 나타났는데 그 원인은 약 길이에 대한 표현형을 지배하는 marker가 발현되지 않았던 때문으로 생각된다.

이상의 결과를 종합하였을 때 가시오갈피는 일정지역에 분포 자생하고 있을지라도 자생지 환경에 따른 유전적 변이보다는 개체간에 나타난 유사도의 차이가 크게 나타나는데, 이는 이 식물의 환경변이에 적응할 수 있는 유전자가 고착된 상태에서 자생지역의 환경에 따른 변이가 일어나지 않았던 것으로 추정되며, 번식이 실생으로 이루어질 경우 수정양식이 주로 타가수정에 의해 이루어졌기 때문에 개체간의 유사도가 크게 나타난 것으로 생각된다.

따라서 RAPD방법이 가시오갈피의 종내 변이를 밝히는데 유용한 실험방법으로 인정되었으나 외부 형태 중 뚜렷이 나타났던 화사형에 따른 구분에서 명확한 결과를 얻지 못해, 정확한 결과를 얻기 위해서는 Specific probe를 이용한 RFLP, gene sequencing과 같은 세밀한 접근방법이 수행되어야 할 것으로 생각된다.

摘 要

가시오갈피의 지역 수집 종간 변이의 정도와 유연 관계를 검토하고자 덕유산, 오대산, 북해도 수집종을 공시하여 RAPD를 실시한 결과 가시오갈피 유연관계 분석에 적합한 Primer로 UBC Primer #200~300에서 #208 등 20개의 primer를 선발하였고, 다형화율은 7.1~90.9%를 나타냈으며, 총 증

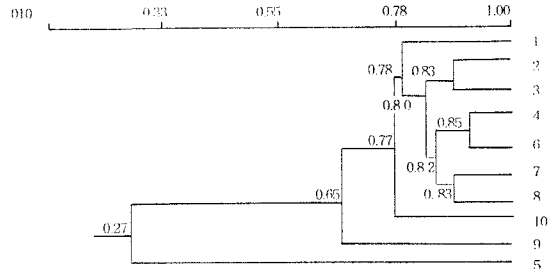


Fig. 2. Dendrogram acquired with 10 collections of *Eleutherococcus senticosus* Max. based on DNA polymorphism by PCR analysis.

폭된 band 197개중 113개의 다형 band를 얻을 수 있었다. 가시오갈피 수집종은 2그룹으로 분류되었으며, 1 그룹으로 분류된 덕유산 1, 2, 3, 4, 6, 북해도 7, 8, 오대산 9, 10번 개체내의 유사도는 0.65~0.86으로 나타났으나, 변종으로 추정되는 덕유산 수집종 5번 개체는 다른 수집종들과의 유사도는 0.27로 극히 낮았다. 또한 동일지역 수집종간에 유사도는 다른 지역에서 수집된 개체들과 차이가 없었고, 화사길이에 따른 차이도 구분되지 않았다.

LITERATURE CITED

- Doyle, J. J and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*. 19(1) : 11~15.
- Innis, M. A. and D. H. Gelf. J. Suinsky, and T. S. White. 1990. Optimization of PCRs. In : *PCR protocols, A Guide to Methods and Applications* (Innis, M. A. et. al., eds), pp.3~12. Academic Press Inc. San Diego.
- Ishikawa, S., S Kato, S Imakawa, T Mikami, and Y. S. Moto. 1992. Organelle DNA polymorphism in apple cultivars and rootstocks. *Theor. Appl. Genet.* 83 : 963~967.
- Kim, C. H. 1997. Systematic of *Eleutherococcus* and related genera (Araliaceae). Ph. Dissertation at Chonbuk National Univ. pp. 1~82.

- Kim K. Y, D. Y. Hun, S. Kim, H. K. Park. 1996. Studies on gathering Seeds of *Eleutherococcus Senticosus* Max. Korean J. Breed 28 (2) : 120~121.
- Nakai T. 1927. Araliaceae Flora sylvatica Koreana. For. Exp. Sta. Govern., Seoul. 16 : 1~50.
- Rohlf F. J. 1989 Ntsys-PC Numerical taxonomy and multivalent analysis system, version 1 . 50. Exeter Pubi. New York.
- Tragoonrung, S., V. Kanazin, P. M. Hayes, and T. K. Blake. 1992. Sequence -tagged-site-facilitated PCR for barley genome mapping. Theor. Appl. Genet. 84 : 1002~1008.
- 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 makers. Nucl. Acids Res. 18 : 6531~6535.
- Welsh, J., R. J. Honeycutt, M. McClell and B. W. S. Sobal. 1991. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). Theor. Appl. Genet. 82 : 473~476.
- 金 先, 朴文洙. 1997. 가시오갈피 採種에 관한 基礎研究. 湖南農業試驗場 試驗研究報告書. pp 406~407.
- 中國醫學 科學院 藥用植物 資源開發研究所. 1991. 中國 藥用植物 栽培學. 農業 出版社 pp.607~609.
- 韓德龍. 1983. 국산 오가피 (五加皮)류의 자원화. 동양의학연구소 논문집. pp 1-79.