

당귀 내추대성 품종 및 건재약재 판별을 위한 RAPD marker 선발

방경환*† · 유홍섭* · 구달희** · 조준형* · 박희운* · 성낙술* · 박상일*** · 김홍식***

*작물시험장 특용작물과, **충남대학교 생물학과, ***충북대학교 식물자원학과

Selection of RAPD marker to discriminate the bolting-resistant varieties and commercial dried medicinal materials of *Angelica* species

Kyong-Hwan Bang*†, Hong-Seob Yu*, Dal-Hoe Koo**, Joon-Hyeong Cho*
Hee-Woon Park*, Nak-Sul Seong*, Sang-Il Park*** and Hong-Sig Kim***

*Industrial Crop Div., Nat'l Crop Exp. Station, RDA, Suwon 441-100, Korea

**Dept. of Biology, Chungnam Nat'l Univ., Daejeon, 305-764, Korea

***Dept. of Plant Resources, Chungbuk Nat'l Univ., Cheonju, 360-763, Korea

ABSTRACT : In DNA level, genetic study of *Angelica* species was firstly conducted to discriminate the bolting-resistant or low bolting variety, so called as Manchu, from other Korea collected lines and also this technuque was applied to identify the origin of commercial dried materials obtained from current oriental medicinal market. By RAPD analysis with 72 primers including sixty of 10-mers and twelve of 20-mers, respectively, three primers, which were related to the bolting resistant traits of *Angelica gigas*, were identified. Comparing the RAPD bands, URP04 primer showed the 1.7 kb specific band, which seemed to be related to delaying bolting traits, since it was observed only in Jinbu elite lines but not in others. On the other hand, since 1.2 kb band amplified by OPD11 was observed in other collected lines but not in Manchu var. and Jinbu line, this primer also could be considered as a selection marker for identifying bolting resistant or delaying bolting traits. In the same manner, since OPP09 did not show 1 kb major band but produced 0.8 kb and 1.2 kb bands in Manchu var., these three bands amplified by the primer could be considered one of the important key specifying Manchu var. related with the trait of *Angelica gigas*. OPC02 primer showed the same band patterns in all Korean collected lines, but not in other foreign introduced lines, such as *A. sinensis* from China, and *A. acutiloba* from Japan. Since these four RAPD primers, OPD11, OPP09, URP04, and OPC02 showed the specific polymorphisms in *Angelica* species, thus, these were useful to discriminate the three *Angelica* species, *A. gigas*, *A. sinensis*, and *A. acutiloba*.

Key words : *Angelica* species, Manchu variety, discrimination, RAPD marker

서 언

한 국가가 가진 자원식물의 분류 및 유전자원으로의

보존을 위해서는 외부형질이나 분자생물학적인 특징에 따른 연구가 필요하다. 당귀는 역대 유효 상용한방 처방에 사용된 한약재 중 사용빈도가 높은 한약재로 수요가

† Corresponding author (Phone) : 031-290-6777, E-mail : bang31@hanmail.net

Received 28 January 2002 / Accepted 8 March 2002

늘어나고 있으나, 타식성 작물로 순계의 유지가 어렵고 대부분이 혼계집단으로 당귀 종 및 품종 구분이 어려워 체계적인 육종방법의 확립이 시급한 실정이다.

또한 당귀는 우리나라에서는 참당귀 (*A. gigas* NAKAI), 중국에서는 중국당귀 (*A. sinensis* DILES), 일본에서는 일당귀 (*A. aucutiloba* KITAGAWA)를 정품으로 사용하고 있어 기원식물이 서로 다른 것을 이용하고 있으나 (曳野 등, 1962), 이들 수입약재와 국산약재를 건재로 혼용하여 사용하였을때 기원 식물을 감정할 수 있는 방법이 없는 실정이므로 이 문제를 해결하기 위해서 가장 정확하고, 신속하게 기원을 판별할 수 있는 유전자 수준에서의 연구가 필요하다.

현재까지는 당귀에 대한 연구는 형태학적 연구 (陸, 1965)와 세포분류학적인 기초 연구 (都, 1970, 1971) 및 육종에 대한 기초 연구 (Park *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1998) 등이 있을 뿐이고, 실제 육종에 적용할 수 있는 분자생물학적인 연구결과는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 당귀의 품종과 수집종의 구분을 위한 유용한 방법으로 활용하고자 RAPD based primer를 탐색하였고, 당귀 재배에 있어 수량성과 품질을 결정하는 가장 중요한 요인으로 알려진 추대에 관련하여, 추대가 지연되는 품종 육성을 위한 선발 marker로 이용하고자 수행하였으며, 또한 시중 건재약재 판별과 기원 정립을 위한 marker를 선발하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료 및 DNA추출

당귀 품종과 수집종의 구분을 위한 재료로는 만추당귀와 진부재래종 및 농가수집종을 포함한 내추대성 2집단과 추대성 2집단 등 총 4집단에서 4반복씩 총 16 sample을 사용하였으며, DNA는 생육 중순경의 잎을 채취하여 Causse *et al.*, (1994) 방법을 변형하여 추출하였다.

건재약재 판별을 위한 재료로는 공시된 4집단에서 1 sample씩과 중국당귀, 일당귀 각각 1 sample씩 총 6 sample을 사용하였는데, 중국당귀는 시중에서 구입한 것을 사용하였고, 일당귀는 작물시험장 유전자원포에서 채취하여 건조한 것을 DNA extraction kit (Amersham Co.)로 추출하였다.

DNA 함량을 측정하기 위하여 λ DNA를 *Hind*III로 처리한 DNA 단편을 기준으로 1.5%의 아가로스 겔 상에서 전기영동한 밴드의 강도를 비교하여 정량하였고, 각 DNA는 10 ng/ μ l로 희석하였으며, DNA의 농도는 3회 반복 측정하여 그 평균값으로 DNA의 양을 정하였다.

2. Polymerase Chain Reaction

RAPD primer는 Operon Technologies, Inc. (USA)에서 생산된 60개와 Seoulin사 (Korea)에서 URP primer 12개를 포함한 총 72개의 임의 primer를 사용하였다.

PCR 반응은 PCR buffer (1 M Tris-HCl, pH 8.0, 1 M KCl, 1 M MgCl₂, 1% gelatin), 2.5 mM MgCl₂, 4 μ M의 Primer, DNA 10 ng, *Taq* polymerase 1 Unit이 혼합된 15 μ l의 반응혼합물에 동량의 mineral oil을 첨가한 후 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus, USA)에서 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 35~56 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 extension의 과정을 총 35 cycle 수행하였다.

PCR산물은 1.2%의 아가로스 겔에서 85 V에서 3시간 동안 전기영동 한 후, EtBr로 아가로스 겔을 10분 동안 staining 시키고, 10분간 destaining 시킨 다음 자외선 조사장치 위에서 증폭된 DNA의 다형 현상을 사진으로 기록하였다.

결과 및 고찰

당귀는 추대가 되면 뿌리가 목질화되어 수량이 감소되는 문제가 있어, 1998년 작물시험장에서는 참당귀의 조기추대 문제를 해결하기 위해 추대가 덜되는 품종 "만추당귀"를 육성하였는데(Yu *et al.*, 1998), 외형적으로 지역수집종과 구분하기가 어려워 만추당귀 종자가 농가에 보급될 경우 종자사과의 위험이 있어, 만추당귀를 선발할 수 있는 분자마커 탐색 등의 실용적인 방법이 필요하지만 아직까지는 이에 대한 해결방안이 없는 실정이다.

이에 당귀의 품종과 수집종의 구분 수단으로 내추대성과 추대성 당귀의 구분을 위해 RAPD based primer를 선발하고자 PCR을 수행한 결과 총 72개의 primer를 사용하여 3개의 내추대성 특이적인 primer를 선발하였다.

그림1은 20 based primer인 URP04 primer를 이용한 PCR 결과를 나타낸 것으로 1.7 kb 부근에서 내추대성 특이적인 band가 나타났고, 10 based primer인 OPD 11를 이용한 PCR 결과에서는 1.2 kb 부근에 band가 없는 것이 내추대성으로 나타났다. 또한 OPP09 primer에서는 1 kb 부근의 major band가 없고 1.2 kb와 0.8 kb부근에 band가 있는 만추당귀 특이적인 band pattern이 나타났는데, 이들 URP04와 OPD11 및 OPP09 primer는 실제 만추당귀 집단개량에 선발 primer로 사용되어질 수 있을 것으로 생각되어진다.

그리고 이러한 primer에서 관찰된 다형성을 나타내는 특이 band들은 cloning과 sequencing을 통하여 새로운 SCARs(Sequenced Characterized Amplified Regions)

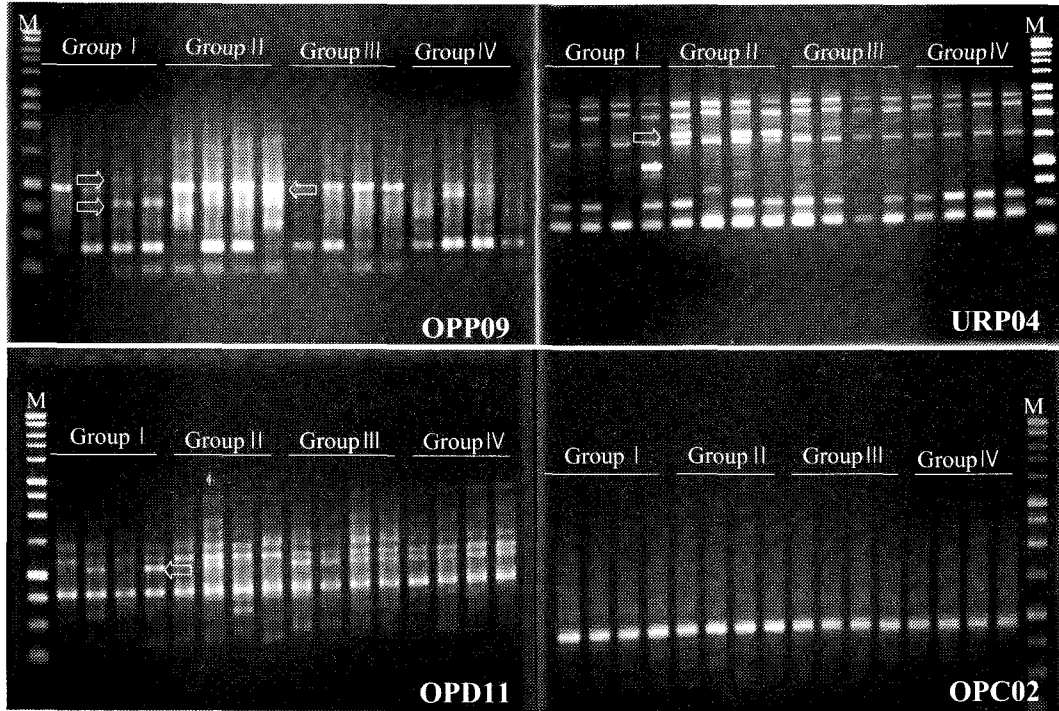


Fig. 1. Profile of PCR products obtained from genomic DNA using the primer OPC02, OPD11, OPP09, URP04 to differentiate the voltin-resistant varieties of *Angelica gigas* from other collected lines. Group I, Manchu variety; Group II, Jinbu elite line; Group III, Jinbu local collection(farm land); Group IV, Jinbu local collection(wild field).

marker로의 전환이 가능하고, 이것은 만추당귀를 선발 육종을 하는데 효율적으로 이용될 수 있을 것으로 사료되며, 세포유전학적 분석방법인 FISH(Fluorescence in Situ Hybridization)를 이용하면(Mukai *et al.*, 1993; Iqbal *et al.*, 2000) 염색체 상에서 marker를 확인 할 수 있을 것으로 생각되어진다.

한편 수입 약재와 국산 약재를 건재로 혼용하여 사용하였을때 기원 식물을 감정할 수 있는 방법이 거의 없는 실정이므로 이 문제를 해결하기 위한 연구가 필요하지만, 아직까지는 RAPD를 이용한 당귀 종간의 유연관계 분석(Lee *et al.*, 2000) 및 ITS (Internal Transcribed Spacer)를 이용한 *Angelica*속의 분자 마커 탐색에 대한 연구결과가 일부 있을 뿐이다(Lee and Rasmussen, 2000).

그림2는 참당귀 종내에서 찾아진 RAPD based primer를 이용하여 참당귀와 중국당귀 및 일당귀를 판별할 수 있는 primer를 사진으로 나타낸 것으로, OPC02 primer는 그림1에서 보는 것처럼 내추대성과 추대성 4집단 모든 sample에서 똑 같은 band pattern을 보였는데 이것을 약재 판별에 적용하였을 경우 4집단의 참당귀는

중국당귀와 일당귀와 뚜렷하게 구별할 수 있어 약재 판별 primer로 사용할 수 있을 것으로 기대된다. OPD11과 OPP09 및 URP04 primer는 참당귀내의 내추대성과 추대성을 구분하기 위한 선발 primer들로써 이들 primer는 또한 중국당귀와 일당귀를 판별하기 위해서도 적합할 것으로 여겨진다.

결론적으로 당귀와 같은 타식성 약용식물의 분자마커 관련 연구를 위해서는 우선 같은 속내에서의 각각의 종들에 대해 다양한 수집종들을 확보하여 가능한 많은 대조군을 대상으로 마커를 탐색하고, 선발하여 그 식물의 기원을 정립해 나가는 것이 선결 과제이며, 이를 바탕으로 약용식물 고유의 마커를 개발하고, 약재판별 등의 연구에 활용한다면 더욱 효율적인 연구 성과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

당귀의 품종과 수집종의 구분 수단으로 내추대성과 추대성 당귀의 구분과 수입 약재와 국산 약재를 건재로 혼용하여 사용하였을 때 기원 식물을 판별하기 위해

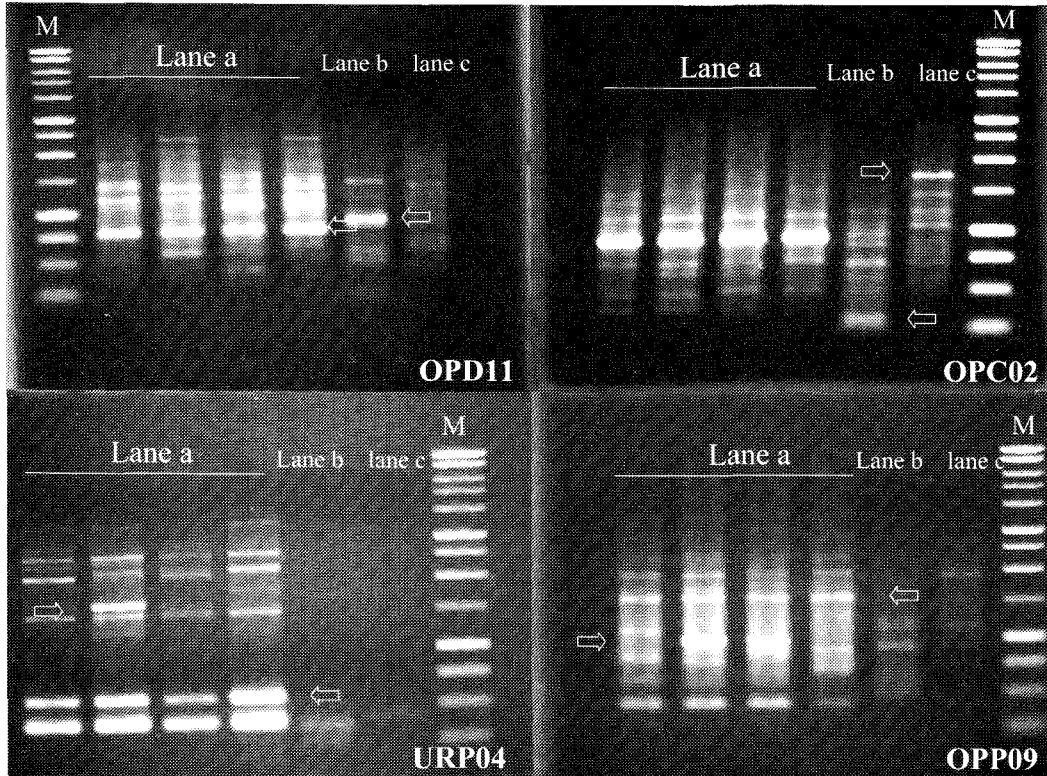


Fig. 2. Profile of PCR products obtained from genomic DNA using the primer OPC02, OPD11, OPP09, URP04 to discriminate the commercial dried medicinal herb materials among *Angelica* species. Lane a, *Angelica gigas*; Lane b, *Angelica siensis*; Lane c, *Angelica acutiloba*.

RAPD based primer를 선발하고자 PCR을 수행한 결과는 다음과 같다.

임의의 10-mer primer와 20-mer primer 등 총 72개의 primer를 사용하여 3개의 내추대성 특이적인 primer를 찾았는데, URP04 primer에서는 1.7 kb 부근에서 내추대성 특이적인 band가 나타났고, OPD11 primer에서는 1.2 kb 부근에 band가 없는 것이 내추대성으로 나타났으며, OPP09 primer에서는 1 kb 부근의 major band가 없고 1.2 kb와 0.8 kb 부근에 band가 있는 만추당귀 특이적인 band pattern이 나타났다.

한편 OPC02 primer는 참당귀내에서 내추대성과 추대성 4집단 모든 sample에서 똑같은 band pattern을 보였던 primer로써, 이 primer를 사용하여 국내산 참당귀를 중국당귀, 일당귀와 판별할 수 있었고, OPD11과 OPP09 및 URP04 primer는 참당귀내에서 내추대성과 추대성을 구분 할 수 있었던 primer들로써 이들 primer로도 참당귀를 중국당귀, 일당귀와 판별할 수 있었다.

LITERATURE CITED

- Causse, M. A., T. M. Fulton, Y. G. Cho, S. N. Ahn, J. Chunwongse, K. S. Wu, J. H. Xiao, Z. H. Yu, P. C. Ronald, S. E. Harrington, G. Second, S. R. McCouch and S. D. Tanksley. 1994. Saturated molecular map of the rice genome based on and interspecific backcross population. *Genetics* 138 : 1251~1274.
- Iqbal, N., S. M. Reader, P. D. S. Caligari, T. E. Miller. 2000. Characterization of *Aegilops uniaristata* chromosomes by comparative DNA marker analysis and repetitive DNA sequence in situ hybridization. *Theoretical and Applied Genetics* 101(8) : 1173~1179.
- Lee, M. Y., S. H. Lim, Y. S. Ju, K. S. Han, G. J. Jeong, D. G. An, H. C. Kang and B. S. Ko. 2000. Discrimination of the three *Angelica* species using the RAPDs and Internal Root Structure. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 8(3) : 243~249.
- Lee, S. B and S. K. Rasmussen. 2000. Molecular markers in some medicinal plants of the Apiaceae family. *Euphytica* 114(2) : 87~91.
- Mukai Y, Nagahara Y, Yamamoto M. 1993. Simultaneous

- discrimination of three genomes in hexaploid wheat by multicolor fluorescence in situ hybridization using total genomic and highly repeated DNA probes. *Genome* 35 : 489~495.
- Park, C. H., N. S. Seong, H. S. Yu and Peter Pauls.** 1997. Characterization of Cultured *Angelica gigas* Microspores by Flow Cytometry. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 5(3) : 196~201.
- Yu, H. S., N. S. Seong, J. K. Bang, Y. G. Kim, B. H. Lee, S. B. Bang and O. H. Kwon.** 1998. A New Bolting-Resistant and High-Yielding Danggui(*Angelica gigas*) Cultivar "Manchu". *Korean J. Breed.* 30(4) : 405.
- 曳野靖子, 田林之及, 高橋眞太郎. 1962. 唐當歸の成分. *生藥學會誌.* 16 : 12~15.
- 都貞愛. 1970. 미나리科 植物의 細胞分類學的 研究. *Angelica屬 植物에 關하여.* *生藥學會誌.* 1(1) : 19~24.
- 都貞愛. 1971. 미나리科 植物의 細胞分類學的 研究. *Angelica屬 및 Cynidiu屬 植物의 染色體數와 花粉 結實度.* *生藥學會誌.* 2(1) : 29~34.
- 陸昌洙. 1965. *Angelica屬 植物의 剖見.* *藥學會誌.* 3 : 5~12.