RAPD마커를 이용한 가시오갈피의 기원판별 및 유전적 다양성

허만규* · 최영현[1] · 최병태[1] · 김경철[1]

동의대학교 자연과학대학 분자생물학과, 1 : 동의대학교 한의과대학 한의학과

Discrimination and Genetic Diversity of *Acanthopanax senticosus* Using RAPD Markers

Man Kyu Huh*, Yung Hyun Choi[1], Byung Tae Choi[1], Gyeong Cheol Kim[1]

Department of Molecular Biology, Dongeui University, 1 : College of Oriental Medicine, Dongeui University

Acanthopanax senticosus (Araliaceae) is a long-lived woody species primarily distributed throughout East Asia. This species is regarded as medically and ecologically important woody plants in Korea. To identify the variation of the RAPD patterns between domestic and foreign *A. senticosus* species, 22 random primers were applied to Korean *A. senticosus* and *A. senticosus* for. *inermis*, Chinese and Russian *A. senticosus*. Six primers of them could be used to discriminate the origins and 58 polymorphisms among 92 scored DNA fragments. Six bands are specific for Korean *A. senticosus* and *A. senticosus* for. *inermis*. Especially, three primers, OPD04, OPD11 and OPE10, were useful to differentiate between domestic and foreign *Acanthopanax* species. RAPD analysis was a useful method to discriminate among *A. senticosus* populations or accessions and Korean accessions are distinct genetically.

Key words : *Acanthopanax* species, discrimination, RAPD

서 론

가시오갈피(*Acanthopanax senticosus*)는 오갈피속(*Acanthopanax* 또는 *Eleutherococcus*)에 속하는 낙엽 관목으로 중국, 일본, 러시아 등에서 분포하며 약용으로 재배되고 있다. 약리 작용면에서 가시오갈피는 생체 기관의 전반적인 기능을 증대시켜주는 촉진작용, 동맥 혈압을 정상화 시키는 작용, 증가된 혈당치를 감소시키는 작용, 생체 기관의 방어력을 강화, 자극에 대한 인내력 촉진시키는 Adaptogenic작용 등이 알려져 있다[1,2,3]. 최근 들어 가시오갈피는 Ether, 포수크로랄, Medinal 등에 대한 항마취효과를 발현하며 항알콜독성작용이 있다[4]. 항암제에 의한 독성을 저하시킨다는 연구 등이 진행되고 있다[5].

국내산 가시오갈피는 일본산과 중국산보다 약리 효능이 우수한 것으로 알려져 있으며[6], 따라서 국내종인 가시오갈피는 중국산과 러시아산에 비해 고가에 거래되고 있고, 함유된 성분이나 효능에서 차이가 있으므로 이들 종간의 구별은 경제 및 약리적 측면에서 중요한 의미를 갖는다[7].

* 교신저자 : 허만규, 부산시 진구 엄광로 995, 동의대학교 자여과학대학
· E-mail : mkhuh@deu.ac.kr, · Tel : 051-890-1529

· 접수 : 2005/05/19 · 수정 : 2005/06/21 · 채택 : 2005/07/25

Random amplified polymorphic DNA(RAPD)는 근연종간 유연관계 규명에 매우 유익한 분자적 마크로 알려져 있다[6,8]. Huh 등[9]은 오갈피속에 속하는 8종을 대상으로 RAPD, AFLP, ISSR를 이용하여 이들의 유연관계를 조사하였는데, 그 결과 분자마크로도 종간 차이를 발견할 수 있었다.

한편 Cheng 등[10]은 RAPD 방법을 이용하여 태국 한약재 시장에 유통되고 있는 황기(*Astragalus membranaceus*)와 그 유사종인 *Hedysarum polybotrys*의 판별을 시도하였는데 그 결과 3개의 random primers에 관한 두 종을 구분하기에 유용하다고 보고하였다. 국내에서 분자생물학을 이용한 가시오갈피의 유전적 다양성 평가에 대한 연구는 미진한 실정이다.

본 연구는 국내 주요 약용작물 중 하나이며 새로운 소득작물로 발굴할 가치가 있는 가시오갈피를 대상으로 RAPD 방법을 이용한 국내 가시오갈피 수집종과 중국산 및 러시아산 가시오갈피 수집종의 유전적 다양성을 밝히고, 또한 가시오갈피 기원판별과 시중 건재약재 판별을 위한 분자마크를 선발하고자 하였다.

특히 국내 가시오갈피와 중국에 재배되어 국내로 수입되는 가시오갈피는 형태상 매우 유사하여 외형상 식별이 어렵기 때문에 이 두 분류군에 대해 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 DNA추출

가시오갈피 기원판별을 위한 재료로는 작물과학원 약용작물 시험포장에서 재배중인 국내 수집종 가시오갈피(*A. senticosus*)와 유사 계통인 민가시오갈피(*A. senticosus for. inermis*), 중국과 러시아에 분포하는 가시오갈피를 대상으로 동일 모체에서 삽목한 개체를 배제한 각 집단당 20개체씩(민가시오갈피는 개체가 적어 12개체) 총 72개체를 시료로 사용하였다. 5년생 개체에서 잎 0.2 g 채취하여 NucleoSpin Plant(Macherey-Nagel Inc., Valencienner, Germany)로 DNA를 추출하였다. DNA함량을 측정하여 각 DNA는 20 ng/μl로 희석하였다.

2. Polymerase Chain Reaction

RAPD primer는 Operon Technologies, Inc.(USA)에서 생산된 OPC01-20, OPD01-20, OPE01-20의 총 60개 primer를 사용하였다. PCR 반응은 PCR buffer(1 M Tris-HCl, pH 8.0, 1 M KCl, 1 M $MgCl_2$, 1% gelatin), 2.5 mM $MgCl_2$, 4 μM의 Primer, DNA 10 ng, Taq polymerase 1 unit이 혼합된 반응혼합물을 DNA thermal cycler에서 94℃에서 30초간 denaturation, 36℃에서 30초간 annealing, 72℃에서 1분간 extension의 과정을 총 32 cycle 수행하였다.

PCR산물은 1.2% 아가로스 젤에서 30분간 동안 전기영동 한 후, EtBr로 젤을 20분 동안 염색시켰다. 자외선 조사장치 위에서 증폭된 DNA의 다형 현상을 사진으로 기록하였다. RAPD는 재현성 문제가 야기될 수 있어 주의하여 증폭하였고, 2번 반복실험으로 같은 결과만 얻은 primer만 본 분석에 사용하였다.

또한 OPE10 primer상 한국에서만 관찰되는 종 특이밴드를 아가로스 젤에서 절제하여 gel extraction kit(Qiagen, Cat 28706)로 DNA를 추출한 다음 sequencing을 의뢰한 다음(제노택, 한국), 그 서열중 5′-AGTCGCGAACCCCAGGTCGTCGG-3′와 5′-CCGCGAACACGTTACCTACCG-3′의 두 primer를 제작한 다음 한국, 중국, 러시아 게놈 DNA에 다시 PCR로 증폭한 다음 밴드를 확인하였다.

3. 데이터 및 유연관계 분석

RAPD는 우성마크이므로 PCR산물의 분석은 밴드의 유·무에 따라 각각 1, 0으로 데이터화하였다. 종내 및 종간 차이를 규명하기 위하여 관찰된 유전자수(observed number of allele, NA), 유효한 유전자 수(effective number of allele, NE), 유전적 다양성(gene diversity, H), 샤논의 정보지수(Shannon's information index, I), Nei의 유전적 동질성과 유전적 거리, 집단간 다양도(Ht), 집단내 다양도(Hs), 집단간 분화정도(Gst), 세대간 이주자수(Nm) 등은 POPGENE 프로그램을 사용하여 산출하였다[11,12].

결 과

가시오갈피 국내 수집종과 중국 도입종의 기원판별을 위한 60개 primers로 RAPD분석 결과, 22개의 primer에서 재현성 높은 92개의 밴드를 얻었다(Table 1). 각 primer에 의해 증폭된 밴드의 수는 1~11개이었다. 92개의 밴드 중 다형현상을 보이는 밴드 수는 58개(63.0%)이었다.

Table 1. The sequences of primers and number of polymorphic bands.

Primer	Nucleotide sequence(5' to 3')	No. of polymorphic bands
OPC01	TTCGAGCCAG	4
OPC07	GTCCCGACGA	6
OPD01	ACCGCGAACG	2
OPD02	CGACCCAACC	6
OPD03	GTCGCCGTCA	11
OPD04	TCTGGTGAGG	5
OPD05	TGAGCGGACA	1
OPD06	ACCTGAACGG	3
OPD07	TTGGCACGGG	1
OPD09	CTCTGGAGAC	1
OPD10	GGTCTACACC	8
OPD11	AGCGCCATTG	4
OPD12	CACCGTATCC	2
OPD13	GGGGTGACGA	3
OPD14	CTTCCCCAAG	1
OPD16	AGGGCGTAAG	5
OPD20	ACCCGGTCAC	6
OPE01	CCCAAGGTCC	5
OPE05	TCAGGGAGGT	3
OPE08	TCACCACGGT	6
OPE10	CACCAGGTGA	2
OPE12	TTATCGCCCC	7
Total		92

Fig. 1은 10 based primer인 OPD04 primer를 이용한 결과를 나타낸 것이다. 약 650 kb 부근에서 러시아 가시오갈피에 결여된 한국과 중국 가시오갈피 특이 밴드가 나타났다. OPD11 primer에서는 700 kb와 800 kb 부근에 러시아 가시오갈피 특이적인 두 밴드가 나타났다. OPE10 primer에서는 200-500 kb 부근에서 한국 가시오갈피에 특이적인 밴드가 많이 나타났다. 따라서 OPE10 primer상에서 나타난 밴드를 절제하여 서열을 규명한 다음 다시 한국, 중국, 러시아 게놈 DNA에 적용한 결과 한국종에 대해서만 명확한 결과를 얻었다(Fig. 2).

국내 가시오갈피와 중국 가시오갈피의 집단간 다양성을 조사하였다(Table 2). 다형현상을 나타내는 정도는 한국 가시오갈피는 50.0%로 가장 높은 반면, 중국산은 48.3%로 유사한 반면 러시아산은 35.6%로 유의한 차이가 있었다($p<0.05$). 대립유전자좌위의 수(NA), 유효한대립유전자좌위의 수(NE), Nei의 유전적 다양도(H) 및 Shannon의 정보지수(I)에 있어서도 한국 가시오갈피와 중국 가시오갈피 집단은 유사한 반면 러시아산과는 유의한 차이를 나타내었다.

집단구조 분석의 결과 전체 유전적 다양도(Ht)에서는 0.234

로 나타났으며, 집단내 다양도(Hs)는 0.134로 나타났다(Table 3). 집단간 분화도(Gst)는 매우 높았다(Gst = 0.425). 세대당 이주하는 개체수도 비교적 낮게 나타났다(Nm = 0.677).

네 그룹간 유전적 동질성과 유전적 거리를 산출한 결과 동질성은 한국의 두 집단간은 0.795였고, 한국과 중국집단, 한국과 러시아, 중국과 러시아는 0.674-0.770으로 나타났다. 유전적 거리도 0.230-0.261로 나타났다.

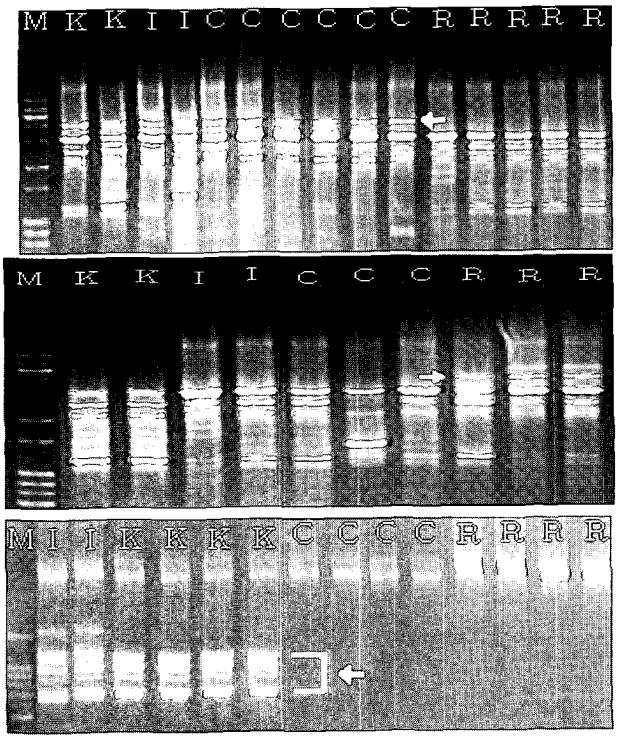

Fig. 1. Representative RAPD fingerprintings of different *A. senticosus* accessions generated with primer OPD04(above), OPD11(middle), and OPE10(below). M: Standard markers, K: Korean *A. senticosus*, I: *A. senticosus* for. *inermis*, C: Chinese *A. senticosus*, R: Russian *A. senticosus*.

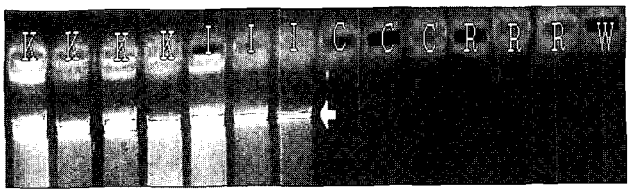

Fig. 2. Specific band of Korean *A. senticosus*. Abberations of K, I, C, and R are the same as Fig. 1. W is a control as water instead of genomic DNA and other contents are the same as K.

Table 2. Summary of genetic variation statistics for all loci.

Locality	Pp	NA	NE	H	I
Korea(*A. senticosus*)	50.0	1.500	1.272	0.169	0.257
Korea(for. *inermis*)	40.2	1.402	1.204	0.127	0.196
China	48.3	1.483	1.263	0.164	0.250
Russia	35.6	1.356	1.165	0.106	0.166

The percentage of polymorphic loci (Pp), observed number of allele (NA), effective number of allele (NE), Nei's gene diversity (H), and Shannon's information index (I).

Table 3. Estimates of genetic diversity statistics in *A. senticosus*.

Ht	Hs	Gst	Nm
0.234	0.135	0.425	0.677

Total genetic diversity (Ht), genetic diversity within populations (Hs), and proportion of total genetic diversity partitioned among populations (Gst), and gene flow (Nm).

고 찰

Williams 등[13]에 의해 개발된 RAPD 방법은 분석의 용이성 때문에 식물의 유연관계 분석, 종 구분, 집단의 유전적 다양성 평가 등의 식물 유전분석에 가장 보편적으로 이용되어왔으며, 최근에는 작물육종과 약재 판별에도 유용하게 이용되고 있다[10,14,15]. 본 연구에서도 OPD04, OPD11, OPE10 primers에서 동아시아 지역간 가시오갈피 특이 밴드가 나타났다(Fig. 1). 그 외 OPD03 primer의 *OPD03-06* locus, *OPD20* primer의 *OPD05-06* locus, OPE12 primer의 OPD03-05 locus 등에서 지역 특이 밴드가 나타났다. 따라서 이들 primer나 locus로 한국 가시오갈피와 중국 및 러시아 가시오갈피의 기원판별을 위한 선발 분자 마크로 사용되어질 수 있을 것으로 판단된다. 또한 OPE10의 결과로 얻어진 서열에서 새로 제작된 primer도 역시 한국산 가시오갈피의 특이 서열의 일부로 판별기원에 적용될 수 있다. 국내 가시오갈피속은 8종과 여러 변종이 있다. 이들은 대부분 지역적 분포에 따른 종 동정에 도움이 된다. 예를 들면 제주도에 분포하는 섬오갈피(*A. koreanum*), 지리산에 분포하는 지리산오갈피(*A. chiisanensis*)와 경기도와 서울에 분포하는 서울오갈피(*A. seoulense*) 등이 그 예이다. 특히 섬오갈피, 지리오갈피, 서울오갈피는 우리나라 특산으로 감안하면 오갈피는 지역에 따라 종분화가 발생할 정도로 종의 가변성내지 유연성이 있음을 시사한다. 따라서 국내보다 훨씬 먼 중국과 러시아 지역과는 동종일지라도 종간 차이가 나는 것은 크게 놀랄 일은 아니다. 그 외 털오갈피(*A. rufinerve*)와 왕가시오갈피(*A. senticosus* var. *subinervis*), 오갈피나무(*A. sessiliflorus*) 등도 가시오갈피속에 속하지만 털오갈피는 가시오갈피와 형태가 매우 다르고, 왕가시오갈피는 평안도 숲에 나며, 오갈피나무는 약용으로 거의 쓰이지 않음으로 본 종과 구별된다.

이런 지역적 분화는 본 연구에서도 집단간 유전적 다양성(Ht = 0.234)중 상당 부분이 집단내 다양도(Hs = 0.134)에 기인하며(Hs/Ht=0.575), 집단간 분화가 42.5%나 되어 매우 높은 것(Gst = 0.425)으로도 뒷받침된다. 한국과 중국은 종수준에서 크게 다를 수 있으며 같은 속내에서도 약리효과 차이가 크게 다를 수 있다. 결국 올바른 종 동정이 필연적으로 선결되어야 한다.

본 연구 결과는 가시오갈피 기원 및 건재약재 판별에도 효율적으로 적용될 수 있을 것으로 사료된다. 많은 분자 마크 중 RAPD에서 특이밴드는 cloning과 서열분석에 쓰일 수 있어 형태에 의한 종간 또는 품종간 구별이 모호할 경우 RAPD 분석법이 간편하고 신속하게 분석할 수 있는 수단으로 사용될 수 있다.

결 론

RAPD 방법을 이용하여 국내 가시오갈피종과 중국산, 러시

아산 가시오갈피종의 유전적 다양성을 밝히고, 기원 판별에 유용한 DNA marker를 선발하고자 한 실험 결과는 다음과 같다. 총 60개 primer로 RAPD 분석을 수행한 결과 재현성을 나타내는 22개의 primer를 선발하였고, 증폭된 PCR 산물들은 지역간 많은 다형성을 나타냈다. 한국, 중국, 러시아의 지역 특이 밴드가 각각 동정되는데 이는 유전적 변이가 지역간 42.5%나 되는 것에 근거한다. 이러한 결과로서 RAPD 방법은 가시오갈피의 기원 및 건재약재 판별에도 효율적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Foster, S. Siberian Ginseng-Eleutherococcus senticosus aqueous extract against L1210 leukemia cells. J. Pharm. Sci. 73, 270-272.
2. Kim, Y.H., Rhy, J.H., Chung, B.S. Diterpene glycoside from Acanthopanax koreanum. Korean J. Pharm. 21, 49-51, 1990.
3. Lee, Y.S., Lee E.B., Kim, Y.H. Some pharmacological activities of acanthoic acid isolated from Acanthopanax koreanum root bark. J. Appl. Pharm. 9, 176-182, 2001.
4. Bohn, B., Nebe, C., Birr, C. Flow-cytometric *Eleutherococcus senticosus* extract as an immunomodulatory agent. Arzneimforsch 37, 1193-1196, 1987.
5. Jiao, S.D. Ten Lectures of the Use of Medicinals. Paradigm Publications, Massachusetts, USA. 2003.
6. Quires, C.F., Hu, J., This, P., Chevre, A.M., Delseny, M. Development and chromosomal localization of genome-specific markers by polymerase chain reaction in Brassica. Theor. Appl. Genet. 82, 627-632, 1991.
7. Yeh F.C., Yang, R.C., Boyle, T. POPGENE version 1.31, Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis, 1999.
8. Nicese, F.P., Hormaza, J.I. McGranahan, G.H. Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers. Euphytica 101, 199-206, 1998.
9. Huh, M.K., Choi, J.S., Lee, B.K., Huh, H.W. The classification of genus *Acanthopanax* and detection of specific band of species using AFLP markers. The 59th Ann. Meeting of the Kor. Ass. Biol. Sci.. Seoul Natl. Univ., Seoul, 2004.
10. Cheng, K.T., Su, B., Chen, C.T., Lin, C.C. RAPD analysis of *Astragalus* medicines marketed in Taiwan. Am. J. Chin. Med. 28, 273-278, 2000.
11. Nei, M., Li, W.H. Mathematical model for studying genetical variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5267-5273, 1979.
12. Wangner, H, Hikino, H., Farnsworth N.R. Economic and Medicinal Plant Research. London, Orlando, Fl. Academic Press, pp 155-215, 1985.
13. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18, 6531-6535, 1990.
14. Bang, K.H. Cytogenetic analysis and molecular marker development for discrimination of *Atractylodes japonica* and *A. macrocephala*. The thesis for Ph. D. in Chungbuk Natl Univ., 2003.
15. Chen, K.T., Su, Y.C., Lin, J.G., Hsin, L.H., Su, Y.P., Su, C.H., Li, S.Y., Cheng, J.H., Mao, S.J. Identification of *Atractylodes* plants in Chinese herbs and formulations by random amplified polymorphic DNA. Acta Pharm. 22, 493-497, 2001.