

국내 유통 중인 더덕의 Internal Transcribed Sequence 분석을 통한 종다양성 분석
(주)바이오피아 생명공학연구소, ¹⁾경희대학교 한방재료가공학과
인준교, 이범수, 김종학, 손화¹⁾ 양덕춘^{1)*}

Species Diversity Analysis by Internal Transcribed Spacer Region in Taproots of *Codonopsis lanceolata* Selling in Market

Research Institute of Biotechnology, BioPia Co., Ltd., ¹⁾Dept. of Oriental Medicinal
Material and Processing, Kyung Hee University
Jun-Gyo In, Bum-Soo Lee, Hua Sun¹⁾, Deok-Chun Yang^{1)*}

실험목적

오래 전부터 식용 및 약용으로 사용하여 온 더덕은 현재 대부분 밭에서 재배한 더덕이 주로 소비되고 있다. 재배 더덕은 포장에서 3년 이상 재배하면 질병 발생율이 높아 대부분 수확을 하는데 비하여, 산에서 키우는 산더덕은 6년 이상 재배하여도 병충해 발생이 낮다. 산더덕은 재배더덕에 비하여 가격이 고가임에도 불구하고 그 소비가 꾸준히 증가하고 있는 추세이다. 그러나 산더덕의 경우 그 유전적인 다양성에 대한 연구가 전혀 없고 수입산 중국더덕과 외형적인 비교를 통하여 구분하고 있어 명확한 구별방법이 없는 실정이다. 본 연구는 ITS분석을 통해서 현재 재배되고 시장에서 유통되고 있는 더덕의 유전적인 다양성 조사하고자 실시하였다.

재료 및 방법

- 실험재료 : 산더덕은 경기도 용문산에서 재배되고 있는 산더덕을 모양에 따라서 5개 그룹으로 분리하여 30개체를 선발하였고, 재배더덕은 충남 논산, 제주, 강원도 정선에서 재배한 더덕을 구입한 논산 8개체, 제주와 정선은 7개체씩 선발하였다(Fig. 1). 중국산 더덕은 수입되어 판매되고 있는 중국산 더덕을 시장에서 구입한 후 7개체를 선발하였고 액체질소로 얼린 후 -80℃에 보관하면서 genomi DNA 추출에 사용하였다
- 더덕 genomic DNA 추출 : 산더덕, 재배더덕, 중국산 더덕의 뿌리를 막자사발에 넣고 액체질소를 첨가하여 완전히 마쇄한 후 GENE/ALLTM SV column (Generalbiosystem, Korea)으로 정제하였고, DNA는 spectrophotometer (Amersham Biosciences, USA)를 사용하여 정량한 후 0.8% agarose gel에 전기영동하여 DNA의 quality를 확인하였다. 추출한 genomic DNA는 멸균증류수를 사용하여 50 ng/ul로 희석한 후 1.5 ml tube에 분주하여 -20℃ 냉동고에 보관하면서 ITS rDNA의 증폭에 사용하였다.
- ITS cloning 및 염기서열분석 : 식물의 18S와 26S rDNA 영역에서 primer (rev-TCCTCCGCTTAT TGATATGC, for-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG G)를 디자인한 후 PCR증폭 (95℃ 30sec, 55℃ 30sec, 72℃ 1min)을 35회 실시하여 ITS 영역을 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 0.7% agarose gel에 전기영동한 후 gel purification kit(Bioneer, Korea)을 사용하여 정제한 후 pGEM-T easy vector (Promega, USA)에 cloning하여 sequencing분석을 실시하였다. DNASIS 프로그램 (Hitachi)을 사용하여 벡터영역을 제거한 후 blast algorithm에 따라서 상동성 검색을 실시하였으며, Clustal W (1.82)로 종다양성을 분석하였다.

*주저자 연락처(Corresponding author) : 양덕춘 E-mail : dcyang@khu.ac.kr Tel : 031-201-2688

실험결과

선발한 국내산 용문산 산더덕과 재배더덕(논산, 정선, 제주도), 외국산 중국 더덕의 뿌리로부터 genomic DNA를 추출한 후 18S와 26S 영역의 primer를 사용하여 PCR 증폭을 실시하여 ITS 영역을 클로닝 하였다. 그 결과 더덕의 ITS 영역은 총 768 bp로 이중 ITS1 영역은 55~312 bp, ITS2 영역은 475~708bp에 위치하여 비교적 다른 식물체에 비하여 길었다.

산더덕, 재배더덕 및 중국산 더덕의 종 다양성 분석을 위해서 DNASIS 프로그램 (Hitachi)을 사용하여 벡터영역을 제거한 후 blast algorithm에 따라서 상동성 검색을 실시하였으며, Clustal W (1.82)로 종 다양성을 분석하였다. 더덕 rDNA영역은 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 26S rRNA 의 coding gene이 직렬적인 배열로 연결되어 있다(Fig. 2). 18S rRNA의 길이는 54 bp로서 3'말단의 partial sequence이고 162 bp의 5S rRNA, 26S rRNA는 57 bp로서 5'부분의 partial sequence로 구성되어 있으며, 이들 사이에 스페이서 영역인 258 bp의 ITS1과 236 bp의 ITS2로 구성되어 있었다. ClustalW(Ver. 1.32)프로그램을 사용하여 분석된 30개의 산더덕 ITS sequence를 비교·분석하여 상동성(homology)과 유연관계를 분석한 결과 100% 일치하는 산더덕 개체가 21개 나왔는데, 이들은 다시 8개의 그룹으로 나누어졌으며 산더덕의 형태적인 분류와의 상관관계는 없는 것으로 나타났다. 재배더덕인 논산, 정선, 제주산 재배더덕도 상호간에 98~100%로 매우 높은 유연관계를 나타내었다. 또한 시중에서 유통되고 있는 중국산 더덕도 국내산 재배더덕과 99~100%로 전혀 국내산 재배더덕 및 산더덕과 뚜렷한 차이 없이 매우 높은 유사도를 나타내었다. 더덕의 ITS rDNA영역을 바탕으로 종 다양성을 분석한 결과 산에서 재배되고 있는 더덕은 물론 밭에서 재배되고 있는 재배더덕의 경우도 품종 표준화 없이 다양한 종이 혼합되어 재배되고 있는 것으로 나타났다. rDNA sequence를 바탕으로 계통수 분석을 한 결과 더덕의 종 다양성을 보다 명확히 볼 수 있다(Fig. 3). 또한 수입산 중국더덕의 경우 뿌리외형과 미각적인 측면에서는 많은 차이를 보였으나, rDNA 영역 분석결과로 보면 국내산 더덕과 매우 높은 연관성을 보여 금후 시중에서 유통되고 있는 다양한 중국산 더덕을 구입하여 보다 명확히 국내산과 구별할 필요성이 있다.

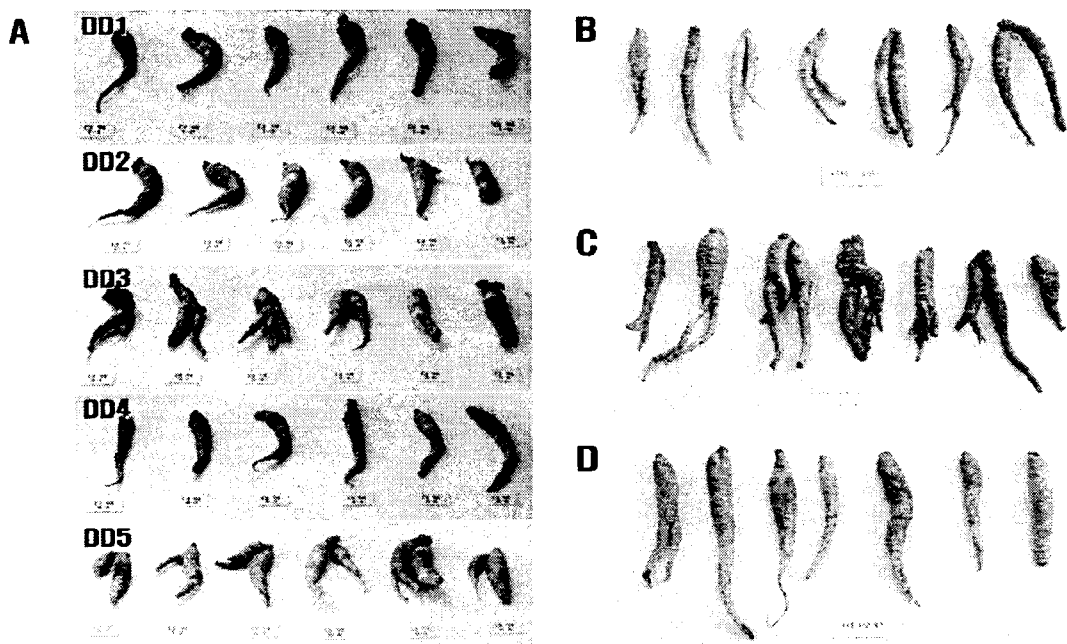


Fig. 1. Taproots of *C. lanceolata* selling in market. A, Yongmun mountain at Kangwondo; B, Jungsun; C, Jejudo; D, China products selling in Korean market.

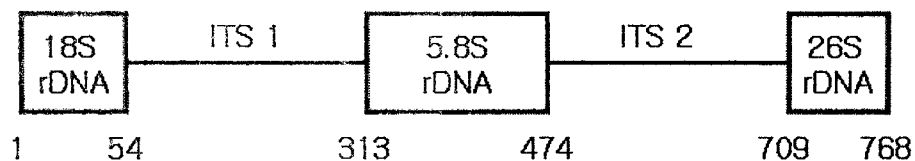


Fig. 2. Schematic diagram of rDNA region in *C. lanceolata*.

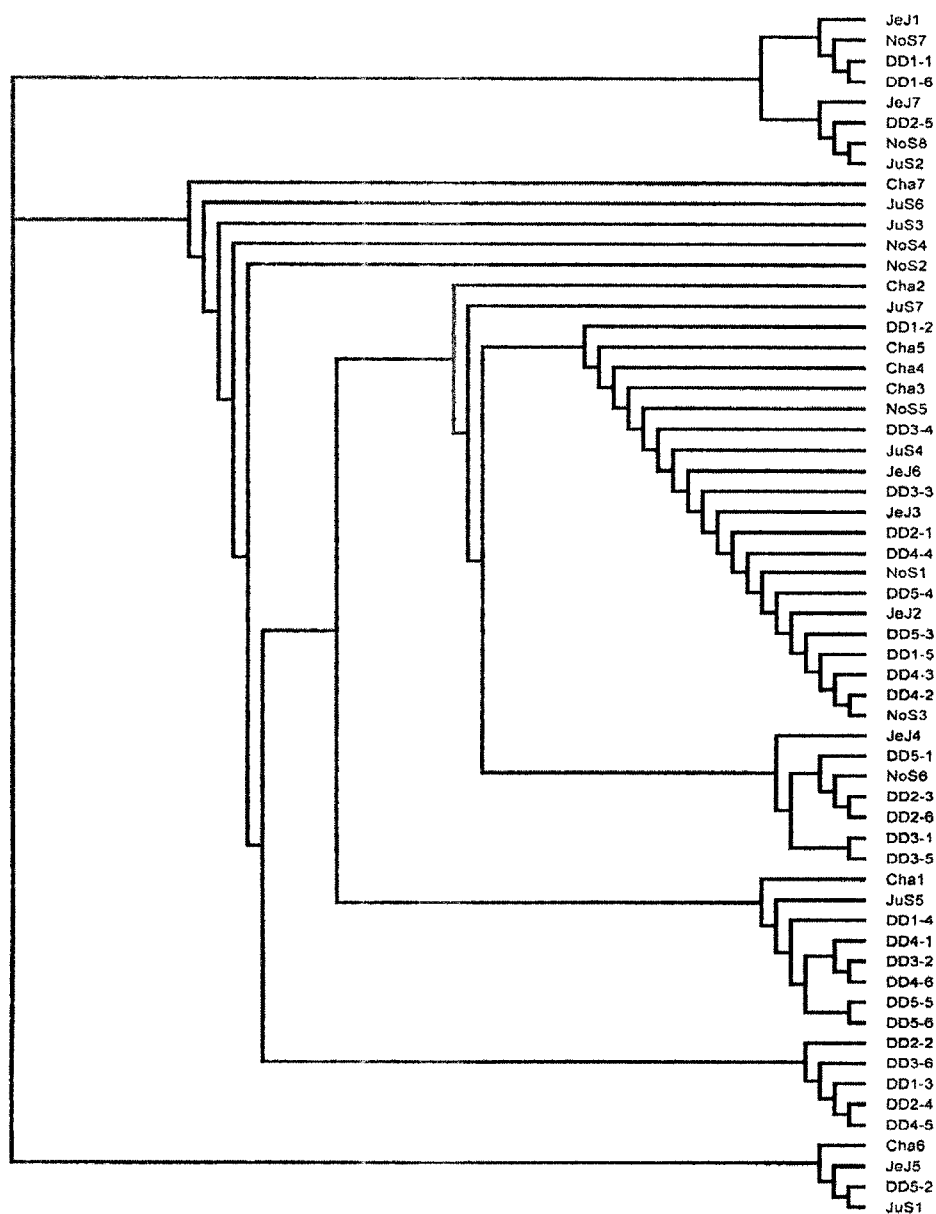


Fig. 3. Phylogenetic analysis of *Codonopsis* rDNA based on the nucleotide sequence. The branch lengths are proportional to divergence with the scale of 0.1 representing 10% change. Cha, from China; DD, from Yongmun mountain at Kangwondo; JeJ, from Jeju; JuS, from Jungsun; NoS, from Nonsan