

RAPD 분석과 뿌리의 내부구조 비교를 통한 당귀류의 감별

이미영*·임성희*·주영승**·한경식**·정계진***·안덕균***·강헌철**·고병섭*

Discrimination of the three *Angelica* species using the RAPDs and Internal Root Structure

Mi Young Lee*, Sung Hee Im*, Young Seung Ju**, Keong Sik Han**,
Ge Jin Jeong***, Deok Gun An***, Heon Cheol Kang** and Byong Seob Ko*

ABSTRACT : Analysis of random amplified polymorphic DNAs(RAPDs) and internal morphological features were performed using three species of medicinal plants in the genus of *Angelica* (*A. gigas* Nakai, *A. sinensis*(Oliv.) Diels., *A. acutiloba* Kitagawa) to distinguish between these three species. Fifty decamer oligonucleotide primers were screened for the RAPDs of the herbal plant species. Five primers generated distinct RAPD markers specific to the species of *Angelica*. In analysis of the degree of similarity, *A. sinensis*(Oliv.) Diels is more closely related to *A. acutiloba* Kitagawa than to *A. gigas* Nakai. Furthermore, we proved the usefulness of RAPD analysis for the discrimination of the species using dry roots and commercial plant materials. In internal morphology of three species, *A. sinensis*(Oliv.) Diels seemed to be more specialized in systemic than *A. acutiloba* Kitagawa and *A. gigas* Nakai

Key words : RAPD, *Angelica* species, dry root, discrimination, internal morphology

서 언

최근 한약자원의 품질 향상과 품질의 균일화를 통해 품질평가를 향상시키고자 이화학 분석 및 내부형태관찰 등 여러가지 접근을 시

도하고 있으며, 특히 DNA 마커를 이용하여 품종간의 변이 분석 및 품종판별이 이루어지고 있다. RAPD 분석에 의한 식물 분류 방법은 식물의 육안적 관찰 또는 주관적인 판단에서 이루어지는 외부 형태학적, 생태학적인 방법보다 더 적극적인 방법 (Torres et al., 1993) 으

* 한국한의학연구원 (Korea Institute of Oriental Medicine, Seoul, Korea)

** 경희대학교 (Kyeong Hee University, Seoul, Korea)

*** 우석대학교 (Woosuk University, Chonju, Korea)

< 2000. 6. 27 접수 >

로 알려져 있고, 식물 분류 또는 유연관계 분석 등에 활발하게 이용되고 있다(Hu and Puiros 1991, Torres et al., 1993). 한약재의 품질평가와 우량계통 개발을 위해 *Panax japonicus*와 *Panax japonicus* var. *angustatus*에서 RAPD와 RFLP분석을 통해 동정하기도 하였으며(Hiroshi, 1996), 건조된 *Panax* 種에서의 DNA 추출법(Ozeki et al., 1996)과 4種의 *Glycyrrhiza*에서의 유전관계 분석(Yamazaki et al., 1994) 등 한약재를 이용한 유전자 분석이 활발히 진행되고 있고, 한약 처방에서의 약재 유무를 위해 RAPD법을 이용해 각각의 약재 판별을 시도하기도 하였다(Cheng et al., 1998).

그중 당귀는 참당귀 *Angelica gigas* Nakai, 중국당귀 *Angelica sinensis*(Oliv.) Diels, 일당귀 *Angelica acutiloba* Kitagawa로 분류되는데, 같은 屬식물이지만 한국, 중국, 일본 3國에서 다르게 이용하고 있고, 약효측면에서도 중국당귀와 일본당귀의 성분은 유사하지만 한국당귀는 전혀 다르므로 이에 대한 검토가 이루어져야 한다고 지적하고 있다(보건복지부, 1998). 우리나라에서 많이 재배되고 있는 품종은 참당귀와 일당귀로, 참당귀는 국내 한방에서 주로 소비되고, 일당귀는 수출량이 많아 수출을 목적으로 재배되고 있다. 중국당귀는 경희대학교 본초원과 강원도 평창 산채시험장에서 시험재배 중이다.

본 연구에서는 한약재감별의 객관적인 기준을 설정하기 위해 RAPD 분석을 통한 참당귀(*Angelica gigas* Nakai), 중국당귀(*Angelica sinensis*(Oliv.) Diels), 일당귀(*Angelica acutiloba* Kitagawa)의 유연관계를 알아보고, 생엽과 건조약재, 유통약재에서의 polymorphism을 함께 비교함으로써 건조약재에서의 한약재 감별의 가능성을 확인하고자 하였다. 또한 당귀류의 횡, 종단면의 내부구

조를 서로 비교하여 특징을 조사함으로써 유전자분석법과 함께 한약재감별에 이용하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에 사용한 참당귀(*Angelica gigas* Nakai)는 명지산과 경희대학교 본초원에서 수집하였고, 일당귀(*Angelica acutiloba* Kitagawa)와 중국당귀(*Angelica sinensis*(OLIV.) Diels.)는 경희대학교 본초원과 강원도 평창산채시험장에서 각각 수집하였다. 건조약재는 뿌리를 물로 씻은 후 50℃에서 2일간 건조시켜 실험에 사용하였다.

DNA 추출 및 순도 분석

채집한 신선한 잎은 급냉시켜 CTAB(Rogers and Bendich, 1988) 방법으로 추출하였고, 건조약재는 NucleoSpin DNA extract kit(MN, Germany)로 게놈 DNA를 추출하였다. DNA 순도는 분광광도계(Shimazu, Japan)를 이용하여 260nm에서의 흡수치로 측정하여 4℃에서 보관하며 사용하였다.

RAPD amplification

PCR(polymerase chain reaction) 반응용액은 멸균증류수에 10×반응 완충액, 200uM dNTP, 1.5mM MgCl₂, 300nM primer(UBC no. 300~400, The University of British Columbia), 1U *Taq* polymerase, 50ng DNA를 혼합하여 총 20ul로 조성하였다.

PCR(perkin-elmer, USA)은 GeneAmp PCR system 2400을 이용하여 94℃에서 5분간 pre-denaturation한 후 94℃에서 30초 denaturation, 37℃에서 30초간 annealing, 72℃에서 1분간 extension을 35회 수행하고 마

지막으로 72°C에서 10분간 반응시켰다. 증폭된 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 EtBr로 염색한 후 Image master (Pharmacia Biotech, USA)로 관찰하여 결과를 얻었다.

유연관계 분석

유연관계 분석은 NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) computer program의 UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic average) 분석방법 (Rohlf, 1992)을 이용하여 dendrogram을 작성하였다.

내부형태관찰

채집된 재료는 각각 5mm길이를 잘라 FAA 용액에서 약 1분동안 탈기 시킨 후 24시간 고정하였다. TBA와 파라플라스트를 1:1로 혼합한 용액에 재료를 넣고 60°C 건조기에서 점진적으로 침투시켰으며, 또한 TBA가 완전히 기화되면 순수한 파라플라스트로 옮겨 24시간동안 침투시켰다. 이와같이 파라핀침투가 끝난 재료는 paper boat의 용해된 파라핀에 적당한 간격으로 배열하여 균한 다음 마이크로 톨을 사용하여 10 μ m두께로 종단 및 횡단 방향으로 절단하였다. 절편리본을 적당한 크기로 잘라서 알부민을 바른 슬라이드그라스에 부착한 후 hematoxylin, safranin 및 light green으로 3원 염색하여 Canada balsam으로 봉입하였다 (Sass, 1971). 이상의 영구프레파라트를 광학현미경을 이용하여 해부학적 특징의 기재·측정 및 사진촬영을 하였다.

결과 및 고찰

당귀는 외부형태 비교에서 미나리과의 특징적인 복산형화서(復傘形花序)로 외관상 공

통점을 가지고 있지만 잎과 꽃에서 서로 다른 차이를 가지고 있어 자세히 관찰하지 않으면 구별하기 어렵다. 미나리과의 식물은 대부분 흰꽃이 피지만, 참당귀는 자주색 꽃이 피는 것이 특이하며, 줄기색이 참당귀는 암녹색, 일당귀는 적자색, 중국당귀는 자주색으로 서로를 구별할 수 있다(이우철, 1996; 중국본초도감, 1982). 그러나 외부형태에 의존하지 않고 PCR 기술을 이용한 RAPD 분석에 의한 분류와 내부형태 특징을 적용함으로써 당귀의 감별에 필요한 기초자료를 얻고자 하였다.

본 연구의 RAPD 분석을 위해 50여종의 decamer primer로 PCR을 수행한 결과, 참당귀, 중국당귀, 일당귀 각각을 한번에 구별할 수 있는 특이적인 band를 나타내는 primer는 5개였으며, 중국당귀와 일당귀를 구별할 수 있는 primer는 13개, 일당귀와 참당귀는 3개, 참당귀와 중국당귀는 4개 primer에서 특이적인 band를 나타냈다. 그 중 primer 322, 376, 386은 당귀를 구별할 수 있는 좋은 marker로 여겨진다.

PCR에 사용된 표본이 10년 이상 보관한 것과 현재 표본의 PCR 패턴을 비교했을 때 차이는 없었지만, 문제는 건조 표본의 경우 곰팡이 오염이 PCR 결과에 큰 영향을 미칠 수 있다고 하였다(김중현, 1998). 본 연구에서도 신선한 당귀류 잎에서의 선명하고 반복성 있는 특이적인 band를 선별한 후(Fig. 1), 당귀의 주사용부위인 건조시킨 뿌리와 비교하였을 때, 신선한 잎과 건조시킨 뿌리에서 동일한 패턴이 나타났으며 건조약재에서 재현성이 확인되었다. 뿐만아니라 시중에서 판매하고 있는 당귀의 PCR패턴 결과 역시 신선한 잎과 같은 결과를 나타냈다(Fig. 2). 따라서 RAPD 분석방법을 이용하여 건조약재에서 당귀 3종을 쉽게 구별할 수 있어 당귀 감별에 적절히 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

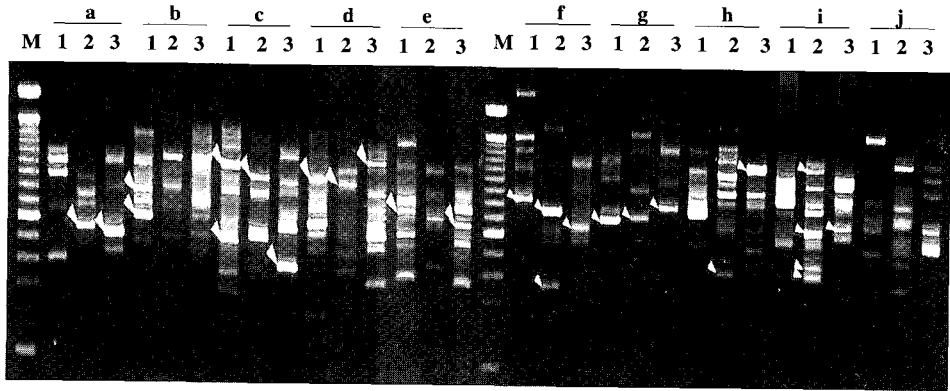


Fig. 1. Examples of DNA polymorphism detected in *Angelica* species. The primers were 352 (a), 353 (b), 354 (c), 355 (d), 357 (e), 386 (f), 387 (g), 389 (h), 391 (i) and 392 (j). Lane 1, *Angelica gigas*; 2, *A. sinensis*; 3, *A. acutiloba*. Arrows indicate polymorphic bands.

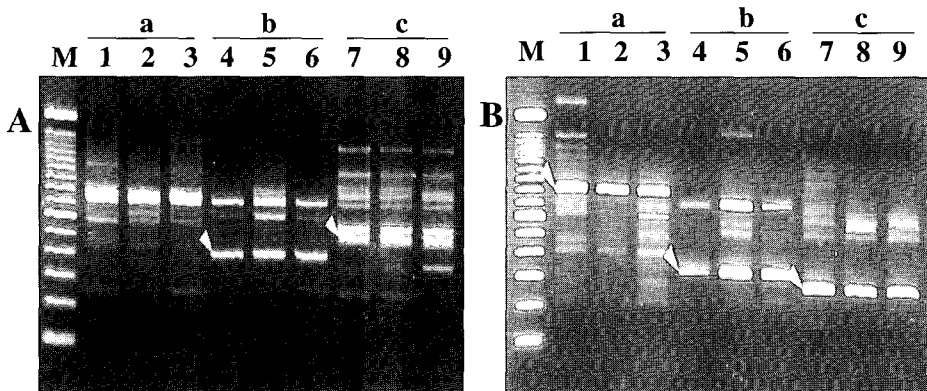


Fig. 2. Comparison of RAPD polymorphism of fresh leaf, dry root and commercial dry root in *Angelica* species. The primers were 376 (A) and 386 (B). Lane 1, 4, 5, fresh leaf; 2, 5, 8, dry root; 3, 6, 9, commercial root. a. *A. gigas*; b. *A. sinensis*; c. *A. acutiloba*. Arrows indicate polymorphic bands.

UPGMA방법으로 유연관계를 분석하여 Dendrogram을 작성하였을 때 중국당귀와 일당귀는 0.42, 참당귀는 0.5의 유전적거리로 참당귀는 중국당귀, 일당귀와 다른 그룹으로 분류되었고, 중국당귀와 일당귀가 참당귀보다 근연관계임을 알수 있었다(Fig. 3).

내부형태구조에 있어서 참당귀·중국당귀

및 일당귀의 뿌리는 일종의 저장 뿌리로서 당근·회향과 같이 정상적인 2기생장을 하나 2기목부와 사부에 유조직이 압도적인 면적을 점유한다. 그런데 저장뿌리의 비대생장방식은 식물에 따라 다양한 것으로 알려지고 있으며(Esau, 1977), 중국당귀에서도 피층과 유지도 주변에 일부 분열하는 세포가 산재하기

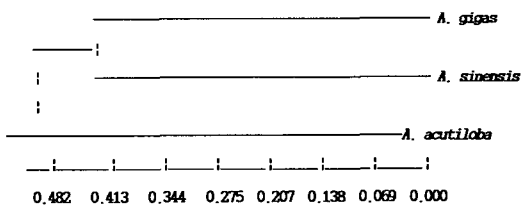


Fig. 3. Dendrogram showing the relationship between the *Angelica* species based on UPGMA analysis of genetic distance measures.

도 한다(Fig. 4, 5). 또한 형성층대의 세포층

수에 비추어 형성층의 분열활동은 참당귀에서 가장 활발하였으며 그 만큼 비대성장 속도도 빠른 것으로 사료된다.

한편 3종에서 도관절의 길이는 약 191.8~254.3 μ m으로 타 분류군에 비해 비교적 짧은 편으로 계통학적으로 상당히 발달된 양상이며, 특히 중국당귀의 도관절이 일당귀나 참당귀에 비해 더욱 분화된 것으로 여겨진다(Metcalfe and Chalk, 1950). 또한 2기사부와 피층에 속상의 후벽조직과 유지도가 산재하는데 참당귀의 경우 일당귀나 중국당귀에 비

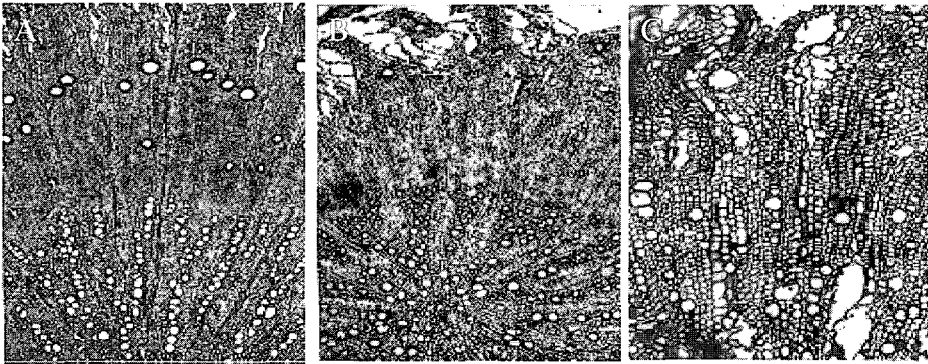


Fig. 4. Comparison of internal morphological features by cross section of the root. A, *A. gigas*; B, *A. sinensis*; C, *A. acutiloba*

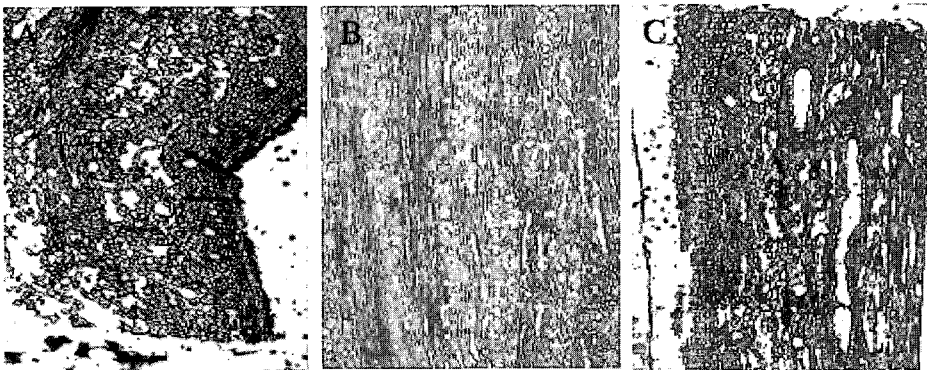


Fig. 5. Comparison of internal morphological features by longitudinal section of the root. A, *A. gigas*; B, *A. sinensis*; C, *A. acutiloba*

해 빈도가 상대적으로 높을 뿐만 아니라 횡단 면상에서 긴 관상의 유지도가 흔히 관찰되었고, 표면보호조직으로서 주피가 발달하였는데 이중 일당귀에서 현저하게 두꺼운 코르크층이 발달한 반면 참당귀의 코르크층 아래에는 5~7층의 후각세포가 환상으로 발달하여 다른 종과 뚜렷한 대조를 이루었다.

이상의 결과를 통해 당귀 3종의 내부형태 특징과 RAPD를 이용한 특이 marker에서의 건조약재 비교를 통해 당귀감별에 적절히 이용할 수 있을 것으로 여겨진다.

적 요

RAPD 분석을 통한 marker선별과 건조약재의 비교, 그리고 내부형태 특징을 통해 당귀 3종을 구별할 수 있는 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 50개의 primer중 5개의 primer에서 당귀류 3품종을 모두 구별할 수 있는 특이적인 band가 나타났다.

2. 유연관계 분석에서 중국당귀와 일당귀가 참당귀보다 더 근연관계임을 알 수 있었다.

3. 신선한 잎과 건조된 약재에서 RAPD 재현성이 확인되어 RAPD 분석법을 통해 당귀 감별에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

4. 뿌리 내부구조에서 중국당귀는 정상적인 2기사부와 2기목부에 덧붙여 일부 이상비대생장을 보였고, 일당귀나 참당귀의 도관절에 비하여 더 넓고 짧아 계통학적으로 훨씬 더 진화된 것으로 여겨진다.

5. 일당귀는 현저하게 두꺼운 코르크층이 발달한 반면 참당귀의 코르크층 아래에 5~7층의 후각세포층이 환상으로 발달하여 뚜렷한 대조를 이루었다.

사 사

본 연구는 2000년 보건복지부 정책과제의 일부으로 연구비지원에 깊은 감사를 드립니다.

LITERATURE CITED

- Cheng K. T., H. S. Tsay, C. F. Chen, and T. W. Chou. 1998. Determination of the components in a chinese prescription, Yu-Ping-Feng San, by RAPD analysis. *Planta Medica* 64 : 563-565.
- Esau, K. 1977. *Anatomy of Seed Plants* (2nd ed). Wiley New York. p. 108-110.
- Hiroshi K. 1996. Studies on plant resources of Kampo-medicines quality evaluation and development and propagation of selective strains. *Natural Medicines* 50(3) : 185-194.
- Hu, J. and C. F. Quiros. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars by RAPD markers. *The Cell Reports* 10 : 505-511.
- Metcalfe, C. R. and L. Chalk. 1950. *Anatomy of the Dicotyledons*. Vol. I. Oxford, Clarendon Press. p. 712-724.
- Ozeki Y., H. Wake, K. Yoshimatsu and K. Shimomura. 1996. A rapid method for genomic DNA preparation from dried materials of genus *Panax* for PCR Analysis. *Natural medicines* 50(1) : 24-27.
- Rogers SO, Bendich AJ. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual* 6 : 1-10.
- Rohlf SB. 1992. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.7. Applied Biostatistics Inc., New York. USA.
- Sass, J. E. 1971. *Botanical Microtechnique*

- (3rd ed.). The Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa. p. 131-148.
- Torres, A. M., T. Millan and J. I. Cubero. 1993. Identifying rose cultivars using random amplified polymorphic DNA markers. Hortscience 28(4) : 333-334.
- Yamazaki M., A. Sato, K. Shimomura, K. Saito, and I. Murakoshi. 1994. Genetic relationships among *Glycyrrhiza* plants determined by RAPD and RFLP analysis. Biol. Pharm. Bull. 17(11) : 1529-1531.
- 김중현. 1998. DNA 다형성 분석에 의한 한국산 불개미류의 유전적 변이와 계통분류학적 연구, 원광대학교 박사학위논문. p. 98.
- 보건복지부. 1998. 한약재 품질관리에 관한 조사연구. p. 66.
- 원색중국본초도감편집위원회. 1982. 원색중국본초도감. 인민위생출판사. p. 263.
- 이우철. 1996. 원색한국기준식물도감. 아카데미서적. p. 252-253.