

RAPD 방법을 이용한 국내외 수집 地黃의 유연 관계 분석

김종엽*·최선영**·추병길**·류점호**·권태호***·오동훈*

Intrapecific Relationship of *Rehmannia glutinosa* Lines Collected from Korea, Japan and China by RAPD Analysis

Jong Yeob Kim*, Sun Young Choi**, Beng Gil Choo**, Jeom Ho Ryu**
Tae Ho Kwon*** and Dong Hun Oh*

ABSTRACT : The optimal conditions of PCR components for the random amplification of genomic DNA were 20 ng/20 μ l in template DNAs, 250 mM in dNTP, 10 pM in primer 1.0unit/20 μ l in Taq DNA polymerase respectively with the annealing temperature at 36 $^{\circ}$ C, respectively. Twelve local lines were divided into 3 groups by the coefficients of 107 polymorphic bands by Jaccard and Nei. The coefficients value of group I including Chongup # 1, Seochon # 1, Andong # 1, Chinan # 1, and Danyang # 1 ranged from 0.27 to 0.05 and those of group II including Suwon # 2, Chunchon # 1, Japan # 3, Danyang # 2 and F₁ (Variety Jihwang 1 \times Seohchon) ranged from 0.29 to 0.11. While, Jihwang 1 originated from China and Japan # 1 in group III showed a distant genetic relationship to Korean local lines.

Key words : *Rehmannia glutinosa*, RAPD analysis, polymorphic band

緒 言

地黃 (*Rehmannia glutinosa*) 은 玄蔘科 (Scrophulariaceae) 에 屬하는 宿根性 植物로

서, 중국이 原產地이고 우리 나라, 일본, 베트남 등에 分布하고 있다 (北川等, 1971). 栽培種으로는 *Rehmannia glutinosa* Libosch, *R. glutinosa* var. *purpurea* Makino 및 *R. glutinosa* var. *hueichingnsis* (Chao et al

* 진안속근약초시험장 Chinan Medicinal Herbs Exp. Sta. Chinan 567-807

** 전북대학교 농과대학 College of Agriculture, Chonbuk National University, Chonju 561-756

*** 전북대학교 유전공학연구소 The Institute of Genetic Engineer Research, Chonbuk National University < 2000. 7. 18 접수 >

Schih) Hsiao 등이 있다 (안 등, 1990).

잎은 叢生하며 藥用으로 이용되는 뿌리는 용도에 따라 生地黃, 乾地黃, 熟地黃으로 쓰이고 있다 (박, 1969). 主要成分으로는 Catapol, Rehmanin, β -sitosterol, 5-HMF, vitamin A와 특히 glucose, manintol 등의 糖分이 많아 肉質이 柔軟하고 粘性이 있다.

박 (1969)은 우리 나라 栽培地黃의 葉形, 葉幅, 草形, 根莖의 굵기 및 生育時期 등을 調査하고 早生系와 晚生系로 나누었다. 정 등 (1968)은 국내 지방在來種을 수집하여 營養系를 분리하여 잎이 좁은 것 (강릉, 청송, 안동종), 잎이 넓은 것 (삼척, 곡성, 진주종)으로 나누고, 수량성이 높은 진주-6 (425 kg), 삼척-5 (340 kg/10a)를 分離한 바 있다. 1993년에는 中國種 (IT No. 93-135)을 導入하여 1996년 “지황1호”를 育成하였다 (박, 1998). 그러나 지금까지의 地黃 品種 育成은 外部 形態의 生態學的인 傳統 分類方法으로

이루어져와 일정한 한계점이 있어, RAPD 분석 기법을 통한 遺傳學的 類緣關係를 밝히기 위하여 연구를 수행하였다.

材料 및 方法

實驗材料

본 연구에서는 국내외에서 수집한 12 系統의 *Rehmannia glutinosa*를 실험재료로 이용하였다 (Table 1).

DNA 分離 및 精製

地黃의 新葉을 採取하여 -70℃에 냉동 밀폐 보관한 것을 실험실에서 genomic DNA를 Rogers와 Bendich (1988)의 방법을 참고로 지황新葉 마쇄, Phenol chloroform 용액첨가, 상등액 Ethnoal 첨가, 침전 DNA 정선, 상등액 용해, UV/VIS spectrophotometer로 DNA 정

Table 1. Date and locality of sample collection in *Rehmannia glutinosa*

| Code No. | Name of Strains | Collection date | Locality |
|----------|-----------------------|-----------------|----------|
| A | Chongup (# 1) | Dec. 1995 | Chonbuk |
| B | Seochon (# 1) | " | Chungnam |
| C | Andong (# 1) | " | Kyungbuk |
| D | Chinan (# 1) | " | Chunbuk |
| E | Danyang (# 1) | " | Chungbuk |
| F | Danyang (# 2) | Feb. 1996 | Kyonggi |
| G | Suwon (# 2) | " | " |
| H | Chunchon (# 1) | " | Kangwon |
| I | Japan (# 1) | " | Japan |
| J | Japan (# 3) | Dec. 1995 | " |
| K | Jihwang 1. (# 3) | Jan. 1996 | China |
| L | F1 of Jihwang 1 (# 3) | Oct. 1997 | Chunbuk |

1 : Local lines, # 2 : Lines from tissue culture, # 3 : Lines from breeding

량, 순도 1.8 이상인 것만 재료로 사용하기 위해 분리 정제하였다.

RAPD에 의한 類緣關係 分析

본 연구에서는 분자생물학 수준의 시약 (Sigma Chemical co.)을, random primer는 OPB random primer Technology (OPB co.) B Kit 1~20까지 20종을, PCR (Polymerase Chain Reaction) 반응 용액은 10×PCR buffer (100mM Tris-HCl, pH: 8.3, 500mM KCl, 15mM MgCl₂)를 사용하였다. 사용된 PCR 기종은 Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research Co.)이었다.

Template DNA 농도는 10, 20, 30, 50, 100 ng의 5 수준으로, dNTP 농도는 Takara사의 150 200 250 300 mM의 4 수준으로, Primer 농도는 OPB사의 5 10 20 30 50 pM의 5 수준으로, Taq DNA polymerase 농도를 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 unit의 4 수준으로, PCR하여 DNA band 양상을 비교하고, PCR 과정의 annealing temperature를 34, 36, 38 및 40℃의 4 수준으로 구별하여 반응시킨 후, DNA band 양상을 비교하였다. PCR 과정은 pre-denaturation을 94℃에서 2분간, denaturation은 94℃에서 30초간, 36℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 1분 30초간, extension을 1 cycle로 하여 35 cycle를 완료하여 72℃에서 5분간 마지막 extension 한 뒤 4℃에 보관하였다.

PCR 반응이 끝난 후 TAE buffer(×1)를 이용하여 1% agarose gel상에서 전기영동 후, 염색 세척한 다음 UV transilluminator상에서 polaroid 필름으로 촬영 분석하였다 (Sambrook 등, 1989).

계통간의 유연관계분석은 NTSYS (Numerical Taxonomy and Multi Analysis System) computer program의 UPGMA (Unweighted Pair-group Method with

Arithmetic average) 분석 방법 (Rohlf, 1989)으로 Jaccard와 Nei의 상관계수를 이용하여 Dendrogram을 작성하였다. 이 때 사용된 통계 program은 Applid Biostatistics Inc. NTSYS-pc (Version 1.70)이었다.

結果 및 考察

RAPD 最適條件 究明

PCR 증폭에서 총 반응 용액 20 μ l 중에 포함되는 template DNA의 농도는 Fig. 1에서와 같이 20 ng에서 최대의 band 수를 나타냈고, 再現性和 鮮明度가 가장 높았다. 이는 김 (1997)의 작약에서 30ng, 유 등 (1997)의 토란에서 30 ng 보다는 낮았다 (Table 2).

dNTP 농도는 그 중에서 250 mM에서 선명하고 再現性이 있는 band가 많았다. 이는 여러 연구에서 RAPD반응에 적합한 dNTP는 100~200 mM 이라고 보고한 Kazen *et al.* (1993) 및 Koller *et al.* (1993)의 결과와 유사하였다. Primer 농도는 10 pM을 사용했을 때 band가 선명하여 더이상 Primer의 농도를 높이지 않아도 될 것으로 판단되었다. Taq DNA polymerase 농도는 1.0 unit에서 양호하였다. 이는 유 (1997)의 토란에서 1.0~2.0 unit에서 선명한 농도를 나타내는 것과 비슷하였고 김 등 (1997)이 보고한 작약 2.0 unit 보다는 낮았다.

PCR 과정에서 annealing 온도가 높아질수록 불특정한 band의 수가 감소하고 주 band의 선명도가 높아지는 경향을 보여 불특정한 band가 감소함을 보여주는 36℃가 annealing의 최적온도인 것으로 판단되었다. 이는 권 등 (1995)이 딸기에서 보고한 34℃ 보다는 높고, 남 등 (1998)이 고추에서 보고한 42℃ 보다는 낮은 온도이었다.

Table 2. The optimum condition for RAPD analysis in *Rehmannia Glutinosa*

| Variable | Concentration in 20 μ l | | Optimum |
|-----------------------|-----------------------------|--|-----------------|
| | Evaluated | | |
| Template DNA | 10, 20, 30, 50, 100 ng | | 20 ng |
| dNTP | 150, 200, 250, 300 mM | | 250 mM |
| Primer | 5, 10, 20, 30, 50 pM | | 10 pM |
| TaqDNA polymerase | 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 unit | | 1.0 unit |
| Annealing temperature | 34, 36, 38, 40 $^{\circ}$ C | | 36 $^{\circ}$ C |
| Pre-denaturation | 94 $^{\circ}$ C | | 2.0 Min. |
| Denaturation | 94 $^{\circ}$ C | | 0.5 Min. |
| Annealing | 36 $^{\circ}$ C | | 1.0 Min. |
| Extention | 72 $^{\circ}$ C | | 1.5 Min. |
| Last-extention | 72 $^{\circ}$ C | | 5.0 Min. |

Primer band 樣相

지황의 蒐集系統에 대한 종내 변이 동정을 위해 추출한 genomic DNA를 OPB primer 20종으로 Table 2와 같이 screening하여 그 중에서 band의 再現性和 선명도가 높은 17개의 primer를 선발하였다.

Fig. 1에서 보는 것처럼 GC함량에 의한

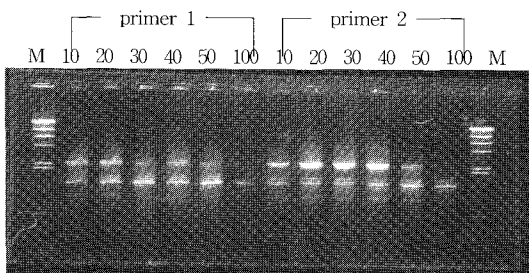


Fig. 1. RAPD patterns of *Rehmannia glutinosa* in different concentrations of template DNA in line Chongup #1. M, DNA size mark (λ Hind III); The numbers on top are showing the concentration of template in ng.

DNA 증폭은 큰 有意差가 없는 것으로 나타났다. 이는 template DNA내 GC 함량이 높을수록 DNA 증폭에 의해 생성되는 band의 수 (Ozaki *et al.*, 1995)나 밝기 (Yoo *et al.*, 1996)가 증가한다는 연구 결과와 相異하여 지황 PCR의 GC 함량은 더 검토하여야 할 것으로 생각된다.

RAPD에 의한 系統의 分類

選定된 17종의 primer에서 107 개의 재현성이 있으며, 수집 계통 분류에 이용이 가능한 多形性 band가 primer 종류 별로 1~10개의 다양한 band가 나타났으며, primer 당 평균 band수는 6.1개이었다 (Fig. 2). 이는 이 등 (1996)의 무궁화 87%, 김 등 (1998)의 가시오가피의 57% 보다는 낮았지만, 평균 54%로 높은 편에 속하였다. (Table 3) PCR 결과 增幅된 DNA 절편은 400~3,200 bp의 범위에 존재하여 이 등 (1997)이 보고한 구기자 2,000 bp 이하, Hu 등 (1991)이 보고한 broccolic cauliflower 품종들의 300~2,600 bp보다 넓은 범위였다.

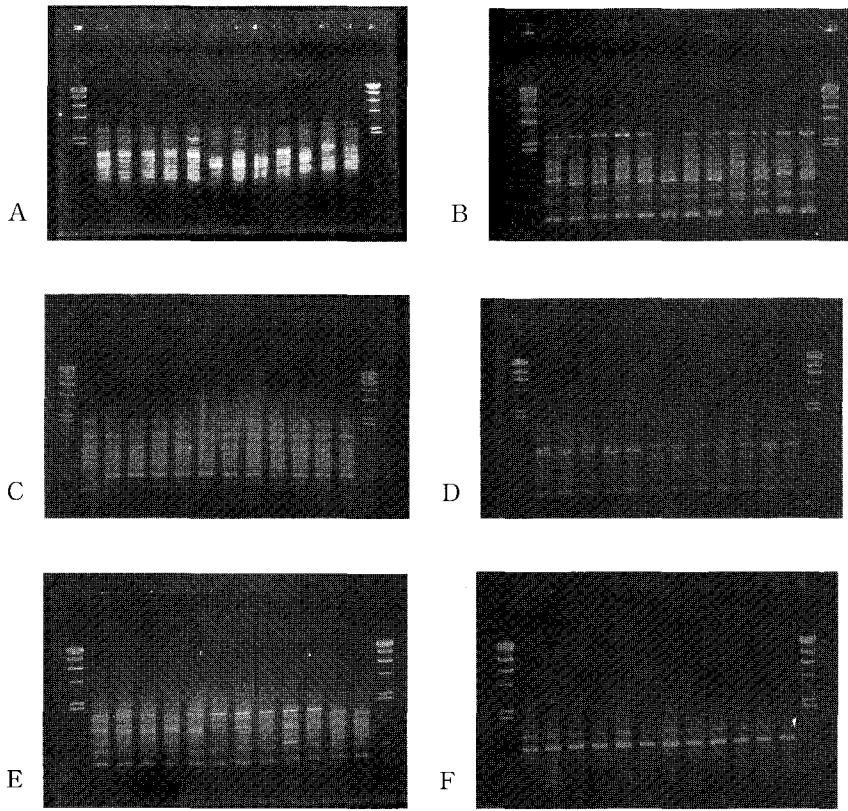


Fig. 2. RAPD polymorphisms of 12 lines in *Rehmannia glutinosa* using primer OPB- 02 (A), 04 (B), 11 (C), 12 (D), 04 (E), 18 (F), 19

M : DNA site marker (λ HindIII) : the numbers on top represent the lines showed in Table 1.

Table 3. List of primers and number of their amplified products using genomic DNAs in *Rehmannia glutinosa* lines

| A | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| B | 8.5 | 6.9 | 7.7 | 5.5 | 6.9 | 5.2 | 7.0 | 9.2 | 8.3 | 8.3 | 3.1 | 5.3 | 10.2 | 3.5 | 2.0 | 6.3 | 6.3 | 8.3 | 4.5 | 6.2 |

A : Primer code B : Number of amplified bands

RAPD를 통하여 얻은 107개의 band를 code화 한 후, NTSYS-PC program에 의하여 상관계수를 산정 (Table 4) 하여 dendrogram을 작성 (Fig. 3) 하였다.

Fig. 3 에서처럼 Jaccard와 Nei의 상관 계수

를 이용하여 분석한 결과 정읍, 서천, 진안, 안동 및 단양재래계통이 제 1군에 속하였고, 이는 박 등 (1999)의 지황 국내 재래종 서천재래와 단양재래와 유연관계가 가까웠다는 것과 일치한 결과였다.

Table 4. Jaccard Coefficients matrix (a/n-d) of 12 lines of *Rehmannia glutinosa* based on 107 RAPD markers

| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L |
|---|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| A | 0.00000 | | | | | | | | | | | |
| B | 0.13345 | 0.00000 | | | | | | | | | | |
| C | 0.15607 | 0.04559 | 0.00000 | | | | | | | | | |
| D | 0.14784 | 0.12905 | 0.08641 | 0.00000 | | | | | | | | |
| E | 0.12611 | 0.06097 | 0.06750 | 0.08694 | 0.00000 | | | | | | | |
| F | 0.17667 | 0.16417 | 0.20581 | 0.22871 | 0.18163 | 0.00000 | | | | | | |
| G | 0.14773 | 0.10783 | 0.12886 | 0.14922 | 0.10342 | 0.13140 | 0.00000 | | | | | |
| H | 0.18355 | 0.14163 | 0.16468 | 0.18608 | 0.14730 | 0.13959 | 0.06148 | 0.00000 | | | | |
| I | 0.17494 | 0.22307 | 0.24844 | 0.23881 | 0.19607 | 0.31021 | 0.23474 | 0.24510 | 0.00000 | | | |
| J | 0.14995 | 0.16603 | 0.17426 | 0.15164 | 0.13087 | 0.17935 | 0.11185 | 0.11596 | 0.25375 | 0.00000 | | |
| K | 0.19229 | 0.19506 | 0.18869 | 0.14994 | 0.18357 | 0.28001 | 0.17779 | 0.20135 | 0.22307 | 0.21048 | 0.00000 | |
| L | 0.18714 | 0.16004 | 0.15367 | 0.16004 | 0.13831 | 0.18887 | 0.13253 | 0.12377 | 0.27951 | 0.13437 | 0.14565 | 0.00000 |

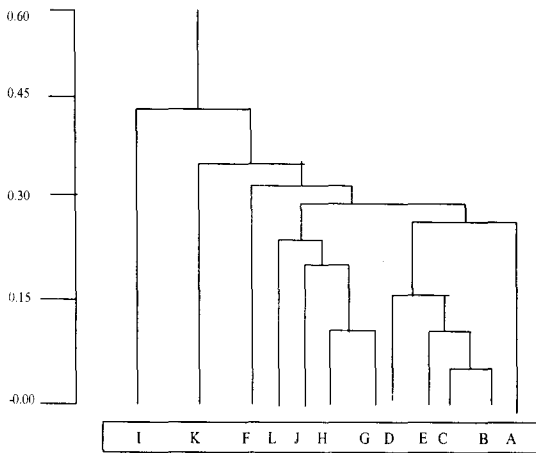


Fig. 3. Dendrogram obtained from UPGMA cluster analysis based on Jaccard and Nei coefficients by using 107 RAPD bands of 12 lines of *Rehmannia glutinosa*.

A : Chongup # 1 B : Seochon # 1
 C : Andong # 1 D : Chinan # 1
 E : Danyang # 1 F : Danyang # 2
 G : Suwon # 2 H : Chunchon # 1
 I : Japan # 1 J : Japan # 3
 K : Jihwang1 # 3 L : F1 of Jihwang #

춘천재래계통을 위시한 수원 조직배양계통, 일본개량계통, 지황1호의 F₁계통, 단양조직배양계통이 제 2군으로 구분되었다. 지황1호는 상관계수가 0.35, 일본재래계통은 0.43으로, 우리나라 재래계통과는 類緣類似도가 멀었다. 이러한 결과에 의해 현재 우리나라에 남아 있거나 재배되고 있는 정읍, 서천, 안동, 진안 및 단양 등 우리나라 재배지황의 대부분은 유연 관계가 가까운 군에 속해 있음을 알 수 있었다.

우리나라 중북부 지방인 춘천을 중심으로 한 제 2군에서, 수원과 춘천은 지리상으로 가까운 지황 종근들의 교류가 있었던 것으로 여겨진다. 그러나 일본 개량계통과 단양 조직배양계통, 지황1호를 母本으로 서천재래계통을 父本으로 交配 생산한 F₁이 2군에 속한 것은 다소 의외의 결과였다.

지황1호와 일본 재래계통은 우리나라 재래계통들과는 遠緣關係의 독립성을 보였는데 따라서 이들은 우리나라 재래계통들과는 다른 품종이 아닌가 생각되었다. 이는 박 등

(1999)의 일본종, 중국종, 베트남종은 유연 관계가 먼 다른 집단으로 분류된 것과 같은 결과를 나타내었다.

이를 더 명확히 하기 위해서는 많은 primer를 사용하거나, 보다 긴 염기서열의 primer를 이용하거나 더욱 細密하고 綜合的인 研究를 並行한다면 더 정확한 결과를 기대할 수 있을 것으로 생각되었다.

摘 要

지황 新品種 育成의 기초 자료를 마련하고자 RAPD 기법을 이용하여 國內外에서 蒐集된 지황 12계통의 系統間 類緣關係를 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

PCR 증폭의 최적 조건은 總 反應溶液 20 μ l 중 template DNA 20 ng, dNTP 250 mM, primer 10 pM, Taq DNA polymerase 1.0 unit, annealing 온도는 36 $^{\circ}$ C 이었다. 20가지의 OPB random primer를 PCR한 結果 17개의 primer를 選拔하였으며 다형을 보이는 band 수는 107개였다. 선정된 17개의 primer 에 의해 증폭된 DNA 斷片들은 400~3,200 bp 범위에 속하였으며, primer 당 나타난 band 수는 1~10 개 까지였고 평균 6.1개 이었다. Jaccard 와 Nei 상관계수에 따라 지황의 12계통은 가운데에서 나타난 群은 크게 3개 群으로 구분되었는데, 우리나라 지황 蒐集 系統 중 정읍, 서천, 진안, 안동 및 단양 재래계통은 系統間 類緣關係가 0.27~0.05로 가깝게 나타났다. (제 1群). 수원 組織培養 系統과 춘천 在來 系統은 0.29~0.11로 유연관계가 가깝게 나타났으며, F₁ (지황1호 \times 서천 재래계통)과 단양 組織培養 系統, 日本改良 계통도 이들과 系統間 類緣關係가 가까운 群에 屬하였다(제 2群). 지황1호와 日本 在來 系統의 유연관계는 각각 0.35와 0.43으로 우리나라 在來種과

遠緣關係인 것으로 밝혀졌다.

LITERATURE CITED

- Hu J, Quiros C.F 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD Markers. Plant Cell Rep. 10 : 505-511.
- Kazan K., J. M. Manners and D. F. Cameron. 1993. Genetic variation in agronomically important species of *stylsanthes* determined using random amplified polymorphic DNA markers. Theor. Appl. Genet. 85 : 882-888
- Koller B., Lehmann A., Mcpermott J. M., Gesser C. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 85 : 901-904
- Ling, J. T., R. S. Auye, . 1997. Identification of poinsettia cultivars using RAPD markers, Hortscience 32(1) : 122-124
- Lee, B. C., Kwak, T. S., Park, J. S., Yu, K. W., 1997. Variation of agronomic characters and RAPD in induced boxthorn (*Lycium chinense*) mutants . Korean journal of breeding Vol. 29(4) pp. 453-460; 1997
- Nam, S. H., Choi, G. W., and Yoo, I. W., 1998. classification of capsicum annuum using Random Amplified polymorphic DNA. KOR. J. HORT. SCI. & TECH. 16(4), 503-507
- Park, C. H. 1998. Evaluation of cytogenetic Characters and In Vitro Micropropagation on chinese foxglove. Department of Horticulture Graduate school, chungbuk National university, cheonju, KOREA
- Rogers, S. O. and A. J. Bendich. 1988 Extraction of DNA from plant tissues. In; Plant Molecular Biology Manual (ed by Gelibien et al). pp. A6 - H10.

- Rohlf, F. J. 1989 Ntsys-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system. version 1.50. Exeter publ. New York.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch. 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Lab. press.
- Yu, N. H. 1997. A study on phylogenetic Relationship Analysis and Selection of Genetic Resources suitable for the low input sustainable Agricultures (LISA) in colocasia antiquorum schott. Department of Agronomy, Graduate school, Chonbuk National University, Chonju, korea. 1-110.
- Yoo, .K. O., W. T. Lee, N. S. Kim, J. H. Kim, and H. T. Lim. 1996. Comparative studies on the Hanabusaya asiatica and polymorphic DNA (RAPD) analysis. J, Kor , Hort. Sci. 37 : 324-328.
- Kim, S. , Kim, K. Y., Park, M. S., Choi, S. Y., and Yun, S. J., 1998. Intraspecific Relationship of Eleutherococcus senticosus Max. by RAPD Markers 한국약잡지 6(3) : 195-169
- 농림통계연보 1988~1999 Ozaki, J. shimada, T. Nakanish, J. Yamamoto, and M. Yoshida. 1995. RADP analysis for parentage determination in prunus mume Sieb. et Zuec. J. Japan. soc. Hort. sci. 64(2) : 235-242
- 안학수, 이춘영, 박수현. 1990. 한국농산물 자원도감. pp. 199
- 정규용, 이은섭, 오성근. 1968. 지황영양계 분리육성 시험. 작물시험장 시험연구 보고서 (특작편) : 731-740
- 北川勳, 由寸正, 古村安見子. 1971. 日藥誌 : p 593
- 김영미. 1996. PCR을 이용한 포도 품종분류. 충북원예 06-27 : 566-570
- 김정혜. 1997. 핵산지분법을 이용한 작약 유전 자원분류 기술 확립. 농사시험 연구 보고서. 경북도원 pp. 886-888
- 박상일 . 1969. 한국재래종 지황에 관한 연구. 충북대논문집. 9편 : 179-205