

## RAPD분석에 의한 가시오갈피의 유연관계 분석

임정대, 성은수, 최강준<sup>1)</sup>, 김승경<sup>1)</sup>, 김명조, 유창연  
강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부, <sup>1)</sup>철원특작시험장

### Intraspecific Relationship Analysis of *Eleutherococcus senticosus* Max. by RAPD Markers

Eun-Soo Seong, Jung-Dae Lim, Kang-Joon Choi<sup>1)</sup>, Seung-Kyung Kim<sup>1)</sup>, Myong-Jo Kim, and Chang-Yeon Yu  
Division of Applied Plant Science, College of Agriculture & Life Sciences,  
Kangwon National University, Chuchon 200-701, Korea  
<sup>1)</sup>Cheolwon industrial Crop Experiment Station

#### ABSTRACT

To analyse the genetic relationship and intraspecific variations among the *Eleutherococcus senticosus* population, the polymerase chain reaction(PCR) was performed total genomic DNAs of 10 *E. senticosus* collections by random 10 primers. The genetic diversity and genetic distance among 10 collections of *Eleutherococcus* spp. were used to describe the dendrogram showing phylogenetic relationship. Ten collections were classified into two group(group I, II) at the similarity coefficient value of 0.50. Group I included *E. senticosus* of Bukhado(Japanese), youngwal(Korea), *E. seoulense*, and *E. chiisanensis* while group II included several internal and Russia collection. The range of polymorphism was from 66.7 to 90.9% in 87 amplified DNA fragments. The similarity value of all collections ranged from 0.41 to 0.92. The average of genetic distance was 0.61.

**Key words** : polymerase chain reaction(PCR), genetic similarity

#### 서 언

가시오갈피는 두릅나무과 오갈피속에 속하는 활엽성 낙엽관목으로 동북아시아 지역인 러시아의 우수리강 유역과 사할린, 중국의 흑룡강성 유역과 동북 산간지역 및 일본의 북해도 지역에 분포되어 있고(中國 藥用植物 栽培學, 1991). 우리 나라에는 백

두산 일원과 태백산맥을 따라 설악산, 오대산, 덕유산 등의 지역에 분포한다(韓德龍, 1983). 가시오갈피의 외부 형태는 절간에 길이 1cm 내외의 피침이 밀생하고, 잎은 장상복엽인데 소엽의 크기는 길이가 7~12cm, 폭이 4~5cm내외이며, 꽃은 산형화서로서 1개의 화축에 60~90개의 꽃이 착생하고, 자방은 5개의 심피로 구성되어있다. 개화시기는 6월 상, 중순이며 결실시기는 9월 상순경인데 우리나라에 자생하

Corresponding author: 유 창 연, 우.200-701, 강원도 춘천시 효자 2동 192-1, 강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부, 자원식물학과; E-mail: cyyu@cc.kangwon.ac.kr

는 가시오갈피는 극히 일부의 나무에서만 성숙된 자방이 관찰된다.

가시오갈피속에 대한 분류학적 연구로는 Nakai(1927), Kim 등(1997)이 심피의 수, 엽의형태, 화주의 유합여부 등을 기준으로 각자의 견해에 따라 다르게 분류하였다. 그 후 Kim 등(1996)은 가시오갈피 종내에도 화기내 화사의 형태에 따라 화사의 길이가 0.5cm 내외인 장화사 형과 0.2cm 내외인 단화사 형의 꽃이 피는 나무로 분류되며, 단화사형의 약은 퇴화되어 수정능력이 없음을 밝혔다. 또한 Kim 등(1997)은 지역 수집종의 교배실험에서 결실이 잘 되는 개체와 안되는 개체가 있음을 조사하여 가시오갈피 종내 변이와 개체간의 유전적 다양성에 대한 검토가 필요함을 제시하였다. 식물의 유전자 분석에 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 이용한 RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA) 분석이 많이 사용되고 있으며(Baird 등, 1992) 이것은 염기서열에 대한 정보 없이도 DNA의 다형 현상을 조사할 수 있으며(McGarvey 과 Karper, 1991) 인위적으로 제조한 random-primer를 이용한 DNA 다형현상의 분석을 통해 유전적 marker를 쉽게 탐색할 수 있을 뿐 아니라(Williams 등, 1990) 유전자 지도작성(Mukai 등, 1995), 종의 분류와 유연관계(Karihaloo 등, 1995; Cho 등, 1994; Badenes 등, 1995) 및 집단유전학의 양적 유전형질 분석(Homberg과 Bchmann, 1995) 외래 유전자 도입 확인 등 널리 사용되어지고 있다.

따라서 본 연구는 RAPD 분석을 통한 DNA 다형 현상을 이용하여 가시오갈피의 자생 지역에 따른 변이 정도와 가시오갈피와 오갈피의 변이 정도를 검토하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

실험재료는 1990년부터 1996년에 가시오갈피의 국가별(일본, 러시아, 중국), 지역별 수집종(태기산, 잠곡, 오대산, 춘천, 영월)과 2 개의 오갈피 종(*E. seoulense*, *E. chiisanensis*)을 수집하여 총 10종을 대상

으로 하였다.

### DNA 추출 및 전기영동

가시오갈피 모집종간의 유연관계를 분석하기 위한 RAPD 분석에서 DNA의 추출은 CTAB(cetyltrimethyl ammonium bromide)방법을 사용하였다. 각각의 모집종의 잎을 2~3매 채취하여 액체질소가 들어있는 막자사발에 넣고 갈아서 CTAB 용액이 들어있는 튜브에 넣고 시료와 CTAB 용액이 잘 섞이도록 흔들어 준 후에 60℃에서 1시간동안 처리한다. 동량의 Chloroform : isoamylalcohol(49:1)용액을 첨가한후 5000rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 새로운 centrifuge tube에 넣은후 동량의 isopropanol을 넣고 DNA를 침전시켰고 이를 10,000rpm에서 15분 동안 원심분리를 하였다. 이어서 pellet을 70% EtOH로 세척과정을 거친후 실온에서 약 1시간 정도 건조시키고 이에 다시 TE buffer(10mM Tris-HCl, 2mM EDTA pH 8.0) 150 $\mu$ l로 pellet을 녹인후 RNase A를 첨가하고 37℃의 water bath에서 1시간동안 incubation한 다음 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 추출된 DNA를 확인하였다. 추출한 DNA의 농도를 알아보기 위하여 Hitach U-2001 Spectrophotometer를 사용, 정량분석을 실시하여 최종농도가 5ng/ $\mu$ l가 되도록 희석하였다.

### DNA 증폭

본 실험에서 사용한 10 base oligonucleotide primer는 Operon Technologies Inc. USA에서 구입하여서 사용하였다(Table 1). DNA 증폭은 Williams 등(1990)의 방법을 수정하여 수행하였다. DNA 증폭은 0.5ml의 effendorf tube를 사용하여서 총 25 $\mu$ l의 반응혼합물(template DNA 10ng, 0.5mM primer, 200 $\mu$ M dNTP, 10 $\times$ buffer with MgCl<sub>2</sub>, 1unit Taq polymerase)을 조성하여 TOUCHDOWNTM(HYBRID)을 이용하여 45회의 증폭을 수행하였다.

PCR 증폭은 초기 denaturing 단계를 95℃에서 5분간 실행했고 최종 신장단계는 72℃에서 10분간 지속시키고 종결하였으며, 증폭은 94℃에서 1분간 denaturing과정과 45℃에서 1분간 annealing, 그리고

72℃에서 2분간 extending과정을 1회로 하여 45회 증폭을 수행하였다. 전기영동에 사용된 gel은 1.5% agarose gel로 하였고 120V에서 1.5시간동안 진행시킨 후 EtBr(ethidium bromide)로 염색하여 UV를 통해 DNA band를 확인하였고 Polaroid film을 사용하여 사진으로 기록하였다.

### 유연관계 분석

유연관계 분석은 NTSYS(Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) computer program의 UPGMA(Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic average) 분석 방법(Rohlf, 1989)을 이용하여 dendrogram을 작성하였다.

## 결과 및 고찰

### RAPD 양상

가시오갈피 및 오갈피의 수집종 내 유연관계를 분석하기 위하여 지리적으로 원거리에 있는 일본 북해도, 러시아, 중국에 자생하는 가시오갈피와 국내에서는 춘천, 태기산, 잠곡, 오대산 등 8개 지역에서 수집한 8개체와 오갈피 속의 서울오갈피와 지리오갈피에서 추출한 genomic DNA를 10개의 염기서열로 구성된 Oligonucleotide primer 60종으로 screening

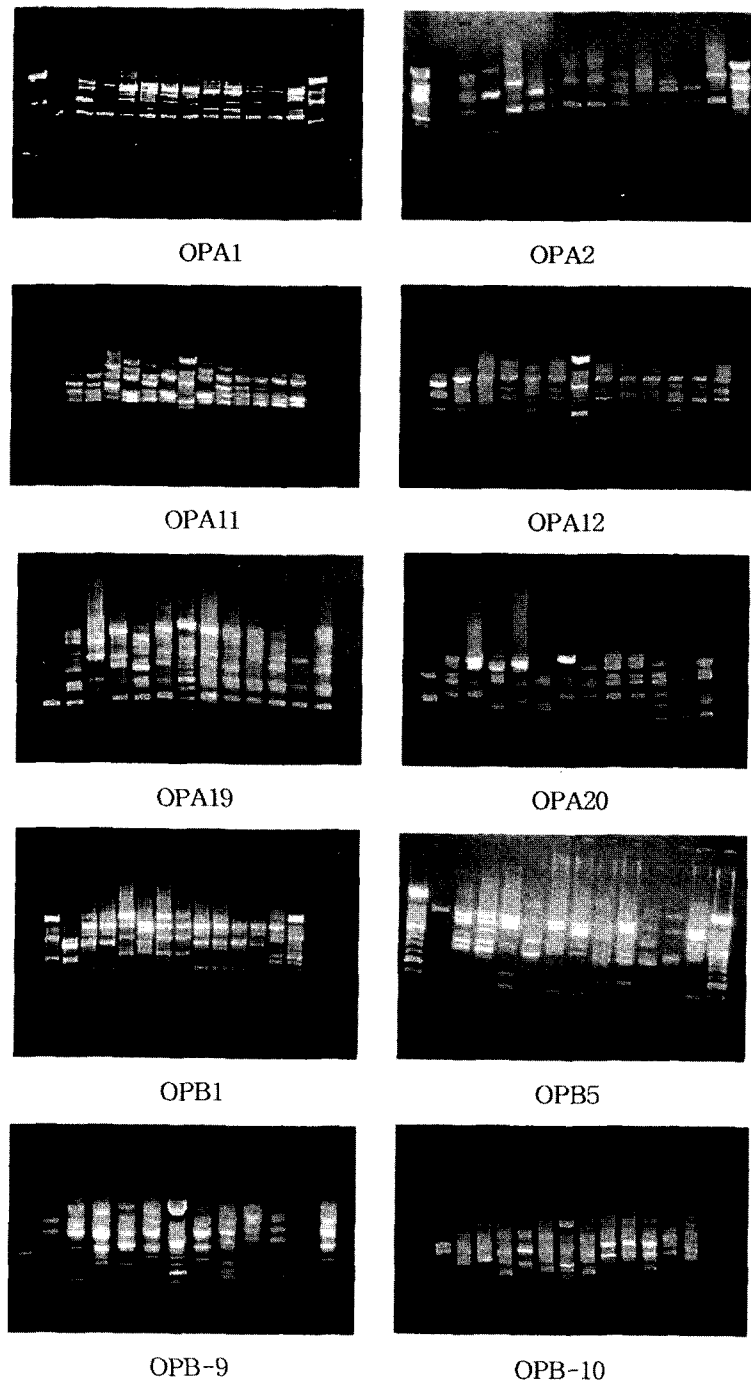
하여 그 중 band의 재연성과 선명도가 높은 10개의 primer를 선발하였다(Fig. 1). 증폭된 DNA 단편들은 지역에 따라 개체간에 동일하거나 서로 다른 밴드 양상을 보였으며 10개의 primer를 사용하여 얻을 수 있는 총 밴드 수는 106개 였으며 이중 monomorphic한 밴드는 17.9%에 해당하는 19개였으며 나머지 87개는 polymorphic한 것으로 나타났다. 10개체 모두에서 증폭이 일어난 10개의 primer는 G+C의 수가 DNA 증폭에 영향을 준다는 보고(Fitsch 등, 1993)와 같이 G+C의 수가 모두 60%이상이었다(Table 1). Primer OPA-1와 같은 경우 지역적인 수집종들 사이에 커다란 차이가 나타나지 않은 반면 나머지 9개의 primer에서는 개체간에 뚜렷한 밴드상의 차이를 보여 가시오갈피의 국가별 지역별 수집종간 유연관계를 밝히는 데 유용하게 사용되어질 수 있다고 사료되어진다.

### 유사도 분석

10개의 primer를 사용하여 얻은 106개의 밴드를 각각 하나의 형질(character)로 보아 이를 유연관계를 분석한 결과(Fig. 2) 크게는 2개의 group, 즉 영월수집종과 일본종 및 지리산 오갈피와 서울오갈피를 포함하는 군(Group I)과 국내종과 러시아종, 중국종을 포함하는 군(Group II)으로 나뉘어졌다. 가시

**Table 1.** Nucleotide sequence and G+C contents of selected primers that generated polymorphism and reproducible band profiles and number of detectable polymorphic bands

Primer No.	Sequence(5' to 3')	G+C content (%)	No. of band (No. of polymorphic band)	polymorphism(%)
OPA-1	CAGGCCCTTC	70	8(7)	87.5
OPA-2	TGCCGAGCTG	70	11(10)	90.9
OPA-11	CAATCGCCTG	60	9(6)	66.7
OPA-12	TCGGCGATAG	60	12(8)	66.7
OPA-19	CAAACGTCGG	60	11(9)	81.8
OPA-20	GTTGCGATCC60	11(10)	90.9	
OPB-1	GTTTCGCTCC	60	10(9)	90.0
OPB-5	TGCGCCCTTC	70	13(10)	76.92
OPB-9	TGGGGGACTC	70	13(12)	92.3
OPB-10	CTGCTGGGAC	70	8(6)	75.0
Total			106(87)	82.1



**Fig. 1.** Randomly and specifically amplified polymorphic DNAs of the analyzed plants. The sequences of each primer in OPA(#1, 2, 11, 12, 19, 20) and OPB(#1, 5, 9, 10) are shown in Table 1.

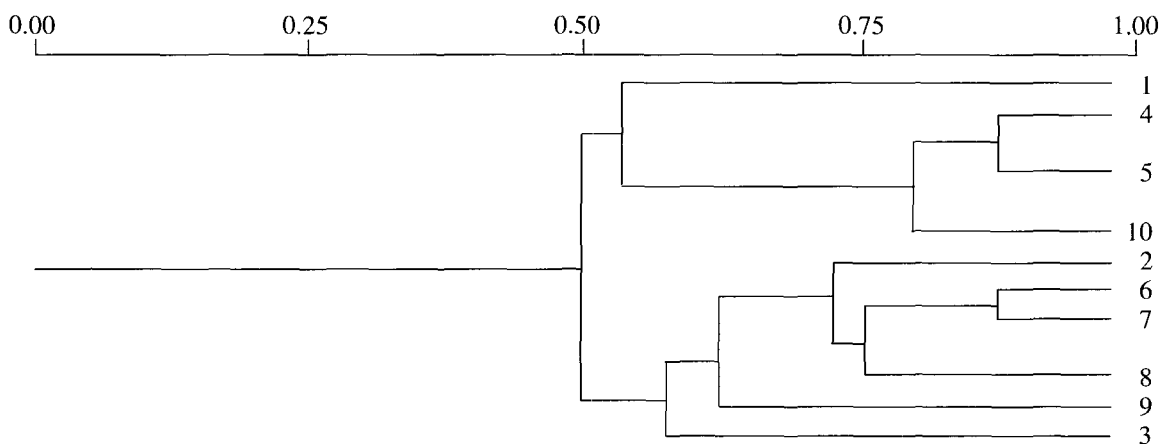
오갈피와 오갈피의 전체 수집 개체들의 유사도는 0.41에서부터 0.92로 나타났고, genetic distance 값의 평균은 0.61이었다(Table 2). 유사도를 기준으로 수집 개체사이의 원연관계를 분류했을 때 0.50을 기준으로 2군으로 분류되었으며, 1군으로 분류된 북해도 가시오갈피는 국내의 각 수집지역의 가시오갈피나 러시아 가시오갈피와 원연의 관계인 것으로 나타났으며 1군으로 분류된 지리산 오갈피나 서울오갈피와 0.52~0.61의 유사도를 나타내어 이들 오갈피종들이 국내산이나 러시아, 중국 가시오갈피와 원연의

관계를 나타내었다. 한편 2군으로 분류된 개체들의 유사도는 0.56~0.92의 분포를 나타냈다. 2군에 포함된 수집 지역종 간의 원연 관계 중 춘천 수집종은 국내의 다른 지역인 잠곡이나 태기산 오대산 등과 비교하여 러시아 산이나 중국산에 대하여 더 근연의 관계에 있다고 볼 수 있다.

본 연구 결과 국내종과 함께 인접국가와 분포지별 수집종을 대상으로 하였기 때문에 보다 정확한 종내변이와 유연관계를 파악할 수 있다고 사료되며 보다 정확한 결과를 얻기 위하여 specific primer를 사

**Table 2.** Similarity coefficient matrix of 10 collections of *Eleutherococcus* spp.

	p1	p2	p3	p4	p5	p6	p7	p8	p9	p10
p1	1.0000000									
p2	0.5000000	1.0000000								
p3	0.5000000	0.5625000	1.0000000							
p4	0.5833333	0.5625000	0.4375000	1.0000000						
p5	0.6041667	0.5000000	0.4166667	0.9166667	1.0000000					
p6	0.5208333	0.7500000	0.7083333	0.5000000	0.4791667	1.0000000				
p7	0.5416667	0.7291667	0.6458333	0.5208333	0.5000000	0.9166667	1.0000000			
p8	0.5833333	0.7291667	0.6041667	0.5208333	0.4583333	0.7500000	0.7708333	1.0000000		
p9	0.6041667	0.5833333	0.5833333	0.5833333	0.5625000	0.6458333	0.7083333	0.7500000	1.0000000	
p10	0.5208333	0.5833333	0.4583333	0.7916667	0.8125000	0.5625000	0.5833333	0.5416667	0.5208333	1.0000000



**Fig. 2.** A dendrogram to 10 collections of *Eleutherococcus senticosus* Max. based on DNA polymorphism by PCR analysis

1. *E. senticosus* Bukhado, Japan; 2. *E. senticosus* Russia; 3. *E. senticosus* Mulnori, Chuncheon, Korea; 4. *E. seoulense*; 5. *E. chiisanensis*; 6. *E. senticosus* Tagisan, Korea; 7. *E. senticosus* Jangok, Korea; 8. *E. senticosus* Odaesan, Korea; 9. *E. senticosus* China; 10. *Eleutherococcus* youngwal, Korea.

용한 분석과 동위효소 분석 등과 같은 좀더 세밀한 분자생물학적 접근방법이 수행되어져야 할 것이다.

## 적 요

가시오갈피 및 오갈피의 수집종 간의 유연관계를 구명하기 위하여 RAPD 분석을 한 결과 10개의 primer를 선발하였으며 G+C의 수가 모두 60%이상이었다. 10개의 primer를 사용하여 얻을 수 있는 총 밴드 수는 106개 였으며 이중 monomorphic한 밴드는 17.9%에 해당하는 19개였으며 나머지 87개는 polymorphic한 것으로 나타났다. 10개의 primer를 사용하여 얻은 106개의 밴드를 각각 하나의 형질(character)로 보아 이를 유연관계를 분석한 결과 영월 수집종과 일본종 및 지리산 오갈피와 서울오갈피를 포함하는 군(Group I)과 국내종과 러시아종, 중국종을 포함하는 군(Group II)으로 나누어졌으며 genetic distance 값의 평균은 0.61이었다. Group I으로 분류된 북해도 가시오갈피는 국내의 각 수집지역의 가시오갈피나 러시아 가시오갈피와 원연의 관계인 것으로 나타났으며 2군에 포함된 수집 지역종 간의 원연 관계 중 춘천 수집종은 국내의 다른 지역인 잠곡이나 태기산 오대산 등과 비교하여 러시아 산이나 중국산에 대하여 더 근연의 관계를 나타내었다.

## 인 용 문 헌

- Baird E., Cooper-Bland S., Wangh R., De Maine M., Powell W. 1992. Mol. Gen. Genet. 233: 469-475
- Doyle J. J. and Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical bulletin.19(1): 11~15.
- Bardenes M. L. and Parfitt D. E. 1995. Phylogenetic relationships of cultivated *Prunus species* from an analysis of chloroplast DNA variation Theor. Appl. Genet. 90: 1035-1041
- Cho Y. C., Chung T. Y., Park Y. H., Suh HS, 1994. Genetic polymorphisms and phylogenic relationship of Korean rice(Weedy rice in *Oryza sativa* L.) based on randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) markers. Korea J. Breed. 27(1): 86-93
- Innis, M. A., Gelf. D. H., Suinsky J., White T. S. 1990. Optimization of PCRs. In: PCR protocols, A Guide to Methods and Applications(Innis, M. A. et. al., eds), pp.3~12. Academic Press Inc. San Diego.
- Ishikawa S., Kato S., Lmakawa S., Mikami T., Moto Y. S. 1992. Organelle DNA polymorphism in apple cultivars and rootstocks. Theor. Appl. Genet. 83: 963~967.
- Karihaloo J. L., Brauner S., Gottlieb L. D. 1995. Randomly amplified polymorphic DNA variation in eggplant *Solanum melongena* L.(*Solanaceae*) Theor. Appl. Geent. 90: 767-770
- Kim C. H. 1997. Systematic of *Eleutherococcus* and related genera(*Araliaceae*). PH Dissertation at Chunbuk National Univ. pp. 1~82.
- Kim K. Y., Hun D. Y., Kim S., Park H. K. 1996. Studies on gathering Seeds of *Eleutherococcus Senticosus* Max. Korean J. Breed 28(2): 120~121.
- McGarvey P., Kaper J. M. 1991. A simple and rapid method for screening transgenic plant nusing the PVR. Biotechniques 11: 428-432
- Mukai Y., Suyyama Y., Tsumura Y., Kawahara T., Yoshimuraru H., Kond T., Tomura N., Kuramoto N., Murai M. 1995. A linkage map for sugi(*Cryptomeria japonica*) based on RFLP, RAPD and isozyme loci. Theor. Appl. Genet 90: 835-840
- Nakai T. 1927. *Araliaceae Flora sylvatica* Koreana. For. Exp. Sta. Govern., Seoul. 16: 1~50.
- Rohlf F. J. 1989. Ntsys-PC Numerical taxonomy and multivalent analysis system, version 1 . 50. Exeter Pubi. New York.
- Tragoonrung S., Kanazin V., Hayes P. M., Blake T. K. 1992. Sequence tagged site facilitated PCR for barley genome mapping. Theor. Appl. Genet. 84: 1002~1008.
- Williams J. G. K., Kublelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers Nuc. Acids. Res. 18: 6531-6535
- Welsh J., Honeycutt R. J., Mcclell M., Sobal B. W. S. 1991. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction(AP-PCR). Theor. Appl. Genet. 82: 473~476.

韓德龍. 1983. 국산 오가피(五加皮)류의 자원화. 동양의학연구소 논문집. pp 1-79.  
中國醫學科學院 藥用植物 資源開發研究所. 1991. 中國藥用植物栽培學. 農業出版社 pp.607~609.  
金先, 朴文洙. 1997. 가시오갈피採種에 관한基礎研究. 湖南農業試驗場 試驗研究報告書. pp 406~407.

(접수일 2000. 3. 20)

(수리일 2000. 6. 20)