

RAPD마커를 이용한 황기의 유전적 다양성 및 기원판별

방경환 · 허만규^{1*} · 조준형

농촌진흥청 작물과학원 인삼약초과, 1: 동의대학교 자연과학대학 분자생물학과

Genetic Diversity and Discrimination of *Astragalus Membranaceus* Bunge and *A. Membranaceus* var. *Mogholicus* Using RAPD Markers

Kyong Hwan Bang, Man Kyu Huh^{1*}, Jeon Hyeong Cho

Division of Ginseng & Medicinal Herbs, National Institute of Crop Science, RDA,
1: Department of Molecular Biology, Dongeui University

This study was carried out to differentiate the origins of *Astragalus membranaceus* Bunge and *A. membranaceus* Bunge var. *mogholicus* Nakai. To identify the variation of the RAPD patterns between domestic and foreign *Astragalus* species, 40 random primers were applied to ten accessions of *A. membranaceus* and six accessions of *A. membranaceus* var. *mogholicus* genomic DNA, respectively. Ten primers of 40 primers could be used to discriminate the origins and 33 polymorphisms among 44 scored DNA fragments (33 fragments are specific for *A. membranaceus* and *A. membranaceus* var. *mogholicus*) were generated using these primers, 75.0 % of which were polymorphic. Especially, three primers of ten primers, OPA17, OPA11 and OPB11, were useful to differentiate between domestic and foreign *Astragalus* species. RAPD data from the 10 primers were used for cluster analysis and cluster analysis of RAPD markers showed that the two groups are distinct genetically. Consequently, RAPD analysis was a useful method to discriminate between *A. membranaceus* and *A. membranaceus* var. *mogholicus*.

Key words : *Astragalus* species, discrimination, RAPD marker

서 론

황기(*Astragalus membranaceus* Bunge)는 콩과(Leguminosae), 황기속(*Astragalus*)에 속하는 식물로 중국, 일본 등에서 분포하며 우리나라는 울릉도와 강원도 이북 지방에 나며 또한 약용으로 재배되고 있다. 황기는 건조된 뿌리를 약으로 이용하며 뿌리에는 astragaloside I ~ VIII 등의 saponin, isoflavonoid류와 아미노산인 γ -aminobutyric acid 등이 함유되어 있고, 심장수축운동 및 강심 작용, 관상혈관, 신장혈관 및 전신 말초혈관을 확장시켜 혈압을 낮추고 이뇨, 진정작용 및 자궁수축작용을 하는 등의 약효가 있는 것으로 알려져 있다¹². 국내산 황기는 일본산과 중국산보다 약리 효능이 우수한 것으로 알려져 있으며¹², 최근에는 황기가 간질환 및 항암치료에도 탁월한 효과가 있는 것으로 보고되고 있다^{12,16}.

따라서 국내종인 *A. membranaceus*는 중국에 재배되어 국내로 수입되는 *A. membranaceus* var. *mogholicus*, *A. hoangchy*, *A. chinensis*, *A. adsurgens*, *A. complantatus*에 비해 고가에 거래되고 있고, 함유된 성분이나 효능에서 차이가 있으므로 이들 종간의 구별은 경제 및 약리적 측면에서 중요한 의미를 갖는다. Random amplified polymorphic DNA(RAPD)는 근연종간 유연관계 규명에 매우 유익한 분자적 마크로 알려져 있다^{9,15}. 국외에서는 internal transcribed spacer(ITS)와 ribosomal RNA(rRNA) 및 RAPD방법을 이용한 황기의 종간 분류 및 약재판별에 관한 연구가 이루어져 왔다⁴. Dong 등⁷은 *Astragalus*에 속하는 10종을 대상으로 5S rRNA spacer, ITS 및 18S rRNA를 이용하여 이들의 유연관계를 조사하였는데, 그 결과 *A. membranaceus*와 *A. membranaceus* var. *mogholicus*가 가장 가까운 염기서열 유사성을 보였다. 또한 Ma 등¹¹은 *Astragalus*속의 4종과 황기와 유사한 1종(*Hedysarum polybotrys*)을 대상으로 5S rRNA spacer domain의 염기서열을 밝혀 이들 종간의 차이를 보고하였다. 한편 Cheng 등⁵은 RAPD 방법을 이용하여 태국 한약재 시장에 유통

* 교신저자 : 허만규, 부산시 진구 업광로 995, 동의대학교 자연과학대학
· E-mail : mkhuh@dongeui.ac.kr, · Tel : 051-890-1529
· 접수 : 2004/03/16 · 수정 : 2004/04/21 · 채택 : 2004/05/21

되고 있는 *Astragalus membranaceus*와 그 유사종인 *Hedysarum polybotrys*의 판별을 시도하였는데 그 결과 3개의 random primers와 ITS-1 region에 관한 염기서열이 두 종을 구분하기에 유용하다고 보고하였다. 국내에서 분자생물학을 이용한 황기의 유전적 다양성 평가에 대한 연구는 미진한 실정이다.

본 연구는 국내 10대 약용작물 중 하나이며 새로운 소득 작물로 발굴할 가치가 있는 황기를 대상으로 RAPD 방법을 이용한 국내 황기 수집종과 중국산 황기 수집종의 유전적 다양성을 밝히고, 또한 황기 기원판별과 시중 건재약재 판별을 위한 분자마크를 선별하고자 하였다. 특히 국내 황기인 *A. membranaceus*는 중국에 재배되어 국내로 수입되는 *A. membranaceus* var. *mogholicus*와 형태상 매우 유사하여 외형상 식별이 어렵기 때문에 이 두 분류군에 대해 각각 두 집단을 선정하여 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료 및 DNA추출

황기 기원판별을 위한 재료로는 작물과학원 인삼약초과 약용작물시험포장에서 재배중인 황기 국내 수집종, *A. membranaceus*(집단계통명 K1-001 및 K2-001)과 중국 도입종, *A. membranaceus* var. *mogholicus*(집단계통명 C1-007 및 C2-011)을 대상으로 각 집단당 40개체씩 총 160 개체를 시료로 사용하였으며, 본엽이 4매 출현하였을 때 2매째 잎을 1.20 g 채취하여 Causse 등³⁾의 방법을 약간 변형하여 DNA를 추출하였다. DNA함량을 측정하기 위하여 λDNA를 *Hind*III로 처리한 DNA 단편을 기준으로 1.0 %의 아가로스 겔 상에서 전기영동 한 밴드의 강도를 비교하여 정량하였고, 각 DNA는 10 ng/μl로 희석하였으며, DNA의 농도는 3회 반복 측정하여 그 평균값으로 DNA의 양을 정하였다.

2. Polymerase Chain Reaction

RAPD primer는 Operon Technologies, Inc.(USA)에서 생산된 40개의 임의 primer를 사용하였다. PCR 반응은 PCR buffer(1 M Tris-HCl, pH 8.0, 1 M KCl, 1 M MgCl₂, 1 % gelatin), 2.5 mM MgCl₂, 4 μM의 Primer, DNA 10 ng, Taq polymerase 1 unit이 혼합된 20 μl의 반응혼합물에 동량의 mineral oil을 첨가한 후 DNA thermal cycler(Perkin-Elmer Cetus, USA)에서 94 °C에서 30초간 denaturation, 36 °C에서 30초간 annealing, 72 °C에서 1분간 extension의 과정을 총 35 cycle 수행하였다. PCR산물은 1.2 % 아가로스 겔에서 3시간 동안 전기영동 한 후, EtBr로 아가로스 겔을 10분 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.

3. 데이터 및 유연관계 분석

PCR산물의 분석은 밴드의 유·무에 따라 유는 1, 무는 0으

로 데이터화하였다. 품종 및 집단간 차이를 규명하기 위하여 관찰된 유전자수(observed number of allele, NA), 유효한 유전자수(effective number of allele, NE), 유전적 다양성(gene diversity, H), 샤논의 정보지수(Shannon's information index, I)는 POPGENE 프로그램을 사용하여 산출하였다. NTSYS-PC system을 이용하여 UPGMA(unweighted pair-group method, arithmetic average method) 분석방법으로 dendrogram을 작성하였다.

결 과

황기 국내 수집종과 중국 도입종의 기원판별을 위한 RAPD based primers를 선별하고자 PCR을 수행한 결과, 총 40개의 primer를 사용하여 명확하고 다형성 밴드가 관찰되는 10개의 primer를 선별하였다(Table 1). 증폭된 PCR 산물들은 0.5 Kb에서 3.2 Kb까지 다양하였으며, 총 44개의 증폭된 DNA 밴드를 얻었다. 각 primer에 의해 증폭된 밴드의 수는 3~7개이었으며 primer 한 개당 평균 4.4개의 DNA 밴드가 증폭되었다. 44개의 밴드 중 다형현상을 보이는 밴드 수는 33개(75.0 %)이었으며, 그렇지 않은 밴드(monomorphic band) 수는 11개(25.0 %)이었다.

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

Primer	Nucleotide sequence (5' to 3')	No. of polymorphic bands	No. of PCR products
OPA05	AGGGGCTTG	3	3
OPA11	CAATAGCCGT	5	5
OPA17	GACCGCTTGT	4	5
OPB7	GGTGACGCAG	1	3
OPB11	GTAGACCCGT	7	7
OPB18	CCACAGCAGT	3	4
OPC05	GATGACCGCC	3	5
OPC10	TGTCTGGTIG	2	4
OPC11	AAAGCTGCGG	2	3
OPC15	GACGGATCAG	3	4
Total		33	44

Fig. 1은 10 based primer인 OPA 17 primer를 이용한 PCR 결과를 나타낸 것이다. 약 1.2 kb 부근에서 중국 황기 특이 band가 나타났다. Fig. 2의 OPA 11을 이용한 PCR 결과에서는 0.7 kb 부근에 한국 황기와 중국 황기 특이적인 밴드가 각각 나타났고, 1.5 kb에서는 중국황기 특이적인 밴드가 관찰되었다. 또한 OPB 11 primer에서는 1.1 kb 부근에서 한국 황기와 중국 황기 특이적인 band pattern이 나타났다.

국내 황기인 *A. membranaceus*와 중국 황기인 *A. membranaceus* var. *mogholicus*의 집단간 다양성을 조사하였다(Table 2). 다형현상을 나타내는 정도는 한국 황기는 15.9 %로 같은 반면, 중국 두 집단은 13.6 %와 18.2 %로 차이가 있었다. 대립유전자좌위의 수(NA), 효과적인 대립유전자좌위의 수(NE), Nei의 유전적 다양도(H) 및 Shannon의 정보지수(I)에 있어서도 한국 황기와 중국 황기 집단은 유사한 경향을 띤다.

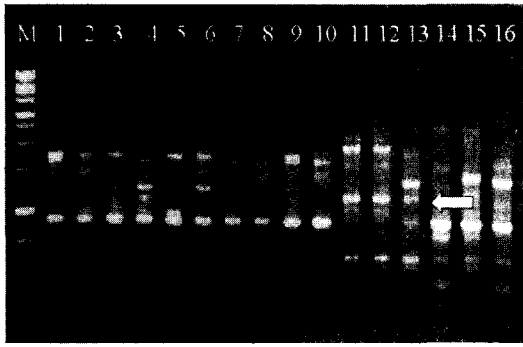


Fig. 1. Profiles of PCR products obtained from genomic DNA using the 10-based OPERON A17 primer. Lane M, 1 kb DNA ladder; Lane 1-10, *A. membranaceus*; Lane 11-16, *A. membranaceus* var. *mogholicus*.

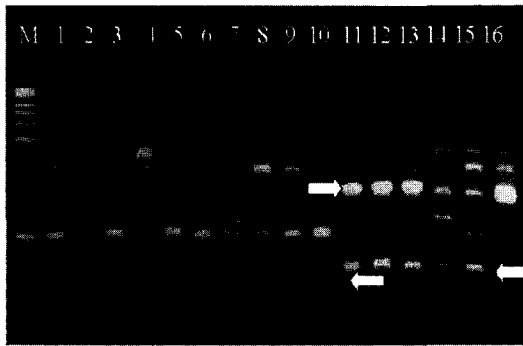


Fig. 2. Profiles of PCR products obtained from genomic DNA using the 10-based OPERON A11 primer. Lane M, 1 kb DNA ladder; Lane 1-10, *A. membranaceus*; Lane 11-16, *A. membranaceus* var. *mogholicus*.

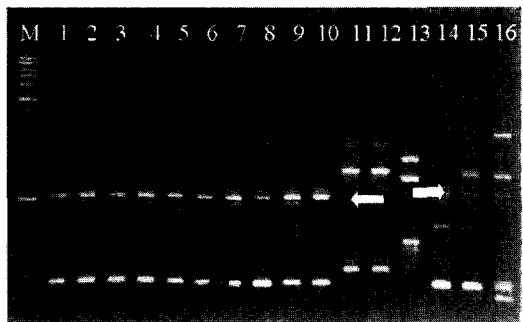


Fig. 3. Profiles of PCR products obtained from genomic DNA using the 10-based OPERON B11 primer. Lane M, 1 kb DNA ladder; Lane 1-10, *A. membranaceus*; Lane 11-16, *A. membranaceus* var. *mogholicus*.

한편 집단구조 분석의 결과 전체 유전적 다양도(Ht)에서는 0.366으로 높았으며 대신 집단내 다양도(Hs)는 0.148로 낮았다 (Table 3). 집단간 분화도(Gst)는 매우 높았다(Gst = 0.608). 세대 당 이주하는 개체수도 비교적 높게 나타났다(Nm = 0.311). 네 집단간 유전적 동질성과 유전적 거리를 산출한 결과 동질성은 한국의 두 집단간(0.984)은 높게 나타났으나 서로 다른 집단쌍은 낮았다(Table 4). 유전적 거리도 0.017-0.573으로 큰 차이를 나타내며 동일 종내 집단간에 비해 비교적 높았다.

Table 2. Summary of genetic variation statistics for all loci. The percentage of polymorphic loci (Pp), observed number of allele (NA), effective number of allele (NE), Nei's (1973) gene diversity (H), and Shannon's information index (I).

Locus	Pp	NA	NE	H	I
KOR-1	15.91	1.159	0.126	0.068	0.098
KOR-2	15.91	1.159	0.131	0.071	0.101
CHI-1	13.64	1.136	1.106	0.058	0.084
CHI-2	18.18	1.182	1.149	0.080	0.115
Mean	15.91	1.159	1.128	0.069	0.100

Table 3. Estimates of genetic diversity statistics and polymorphic loci in *Astragalus membranaceus* Bunge and *A. membranaceus* var. *mogholicus*. Total genetic diversity (Ht), genetic diversity within populations (Hs), and proportion of total genetic diversity partitioned among population (Gst), and gene flow (Nm)

Locus	Ht	Hs	Gst	Nm
A17	0.478	0.122	0.745	0.172
A05	0.450	0.116	0.742	0.174
A11	0.478	0.122	0.745	0.172
B07	0.189	0.122	0.354	0.911
B11	0.257	0.197	0.234	0.635
B18	0.499	0.247	0.504	0.492
C05	0.456	0.204	0.554	0.403
C10	0.189	0.122	0.354	0.911
C15	0.491	0.199	0.596	0.339
Mean	0.366	0.148	0.608	0.311

Table 4. Similarity matrix (above diagonal) of four populations based on RAPD and genetic distances (below diagonal)

Pop.	KOR-1	KOR-2	CHI-1	CHI-2
KOR-1	-	0.9837	0.5733	0.7474
KOR-2	0.0165	-	0.5640	0.7328
CHI-1	0.5488	0.5727	-	0.6320
CHI-2	0.2911	0.3109	0.4589	-

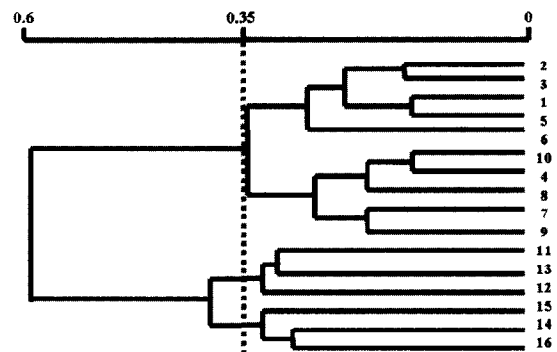


Fig. 4. Genetic relatedness dendrograms generated by UPGMA method on the basis of RAPD data. Population numbers are same as Figs. 1 and 2.

한국의 각 집단당 임의로 선정한 5계통(Fig. 4에서 1-10)과 중국의 3계통(Fig. 4에서 11-16)씩 총 16계통을 분석하였다. RAPD-PCR에 의해 얻어진 44개의 밴드를 가지고 유연관계를 분석한 결과, dendrogram에서 유연계수 0.35를 기준으로 공시된 3개의 소집단으로 구분할 수 있었으며, 유연계수 0.60을 기준으

로 할 때 2개의 집단으로 뚜렷하게 구분할 수 있었는데 이 결과로서 RAPD 방법이 한국 황기와 중국 황기의 기원판별을 위해 효율적인 방법으로 사용될 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 4).

고찰

Williams 등¹⁷⁾에 의해 개발된 RAPD 방법은 분석의 용이성 때문에 식물의 유연관계 분석^{9,13)}, 종 구분^{6,15)}, 집단의 유전적 다양성 평가^{8,9)} 등의 식물유전분석에 가장 보편적으로 이용되어왔으며, 최근에는 MAS(marker-assisted selection)를 이용한 작물 육종¹⁾과 약재 판별^{2,4)}에도 유용하게 이용되고 있다. 본 연구에서도 OPA 17 primer의 1.2 kb 부근에서 중국 황기 특이 band가 나타났다(Fig. 1). OPA 11 primer의 0.7 kb 부근에 한국 황기와 중국 황기 특이적인 밴드가 각각 나타났고, 1.5 kb에서는 중국황기 특이적인 밴드가 관찰되었다(Fig. 2). 또한 OPB 11 primer에서는 1.1 kb 부근에서 한국 황기와 중국 황기 특이적인 band pattern 이 나타났는데, 이들 OPA 17과 OPA 11 및 OPB 11 primer는 한국 황기와 중국 황기의 기원판별을 위한 선발 primer로 사용될 수 있을 것으로 생각되어진다. 국내 황기속은 6종이 있다. 이들은 대부분 지역적 분포에 따른 종동정이 된다. 예를 들면 강원도 정선지방에 분포하는 정선황기(*A. koraiensis* Y. Lee), 제주도 분포하는 제주황기(*A. nakaianus* Y. Lee)와 함경도에 분포하는 열주황기(*A. membranacens* var. *mandshuricus* Nakai)와 개황기(*A. uliginosus* L.) 등이 그 예이다. 그 외 자주땅비수리(*A. adsurgens* Pall)와 사료용 귀화종인 자운영(*A. sinicus* L.) 등도 황기속에 속하지만 황기와 형태가 매우 다르고 약용식물로 사용하지 않는다. 이런 지역적 분화는 본 연구에서도 유전적으로 다양하고(Ht = 0.366), 집단간 다양도에 비해 집단내 다양도가 낮고(Hs = 0.148), 집단간 분화가 매우 높은 것(Gst = 0.608)으로도 뒷받침된다. 따라서 한국과 중국은 종수준에서 크게 다를 수 있으며 약리작용도 황기속의 자주땅비수리, 자운영, 열주황기, 개황기는 약용으로 쓰이지 않으므로 같은 속내에서도 약리효과 차이가 크게 다를 수 있다. 따라서 올바른 종 동정이 필연적으로 선행되어야 한다. Bang²⁾은 백출의 기원판별을 위해 RAPD와 AFLP를 이용하여 특이 마커를 선발하여 선발된 특이 band들을 cloning과 sequencing을 통하여 새로운 SCAR(Sequenced Characterized Amplified Regions) marker로 전환하였는데 그 결과 백출의 기원 및 시중 유통약재 판별에 유용하였다고 보고하였다. 이러한 결과는 황기 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.

결론

RAPD 방법을 이용하여 국내 황기 수집종과 중국산 황기 도입종의 유전적 다양성을 밝히고, 기원 판별에 유용한 DNA

marker를 선발하고자 한 실험 결과는 다음과 같다. 총 40개의 primer로 RAPD 분석을 수행한 결과 재현성을 나타내는 10개의 primer를 선발하였고, 증폭된 PCR 산물들은 0.5 kb에서 3.2 kb의 크기에서 75.0 %의 다형성을 나타냈으며, primer당 평균 4.4개의 band가 관찰되었다. RAPD pattern의 다형성에 의한 유연관계 분석에서 공시된 16계통을 국내수집종과 중국 도입종 2개의 그룹으로 구분할 수 있었으며, 선발된 10개의 primers 중 3개의 primers는 황기 국내 수집종과 중국 수입종을 판별하기에 유용하였는데, 이러한 결과로서 RAPD 방법은 황기의 기원 및 건재 약재 판별에도 효율적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Ardiel, G.S., Grewal, T.S., Deberdt, P., Rossnagel, B.G., Scoles, G.J. Inheritance of resistance to covered smut in barley and development of a tightly linked SCAR marker. *Theor. Appl. Genet.* 104, 457-464, 2002.
2. Bang, K.H. Cytogenetic analysis and molecular marker development for discrimination of *Atractylodes japonica* and *A. macrocephala*. The thesis for degree of doctor of philosophy in Chungbuk Natl. Univ. pp. 34-55, 2003.
3. Causse, M.A., Fulton, T.M., Cho, Y.G., Ahn, S.N., Chunwongse, J., Wu, K.S. Xiao, J.H., Yu, Z.H., Ronald, P.C., Harrington, S.E., Second, G., McCouch, S.R., Tanksley, S.D. Saturated molecular map of the rice genome based on and interspecific backcross population. *Genetics* 138, 1251-1274, 1994.
4. 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 Pharmacol.* 22, 493-497, 2001.
5. 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.
6. Demeke, T., Adams, R.P., Chibbar, R. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in Brassica. *Theor. Appl. Genet.* 84, 990-994, 1992.
7. Dong, T.T., Ma, X.Q., Clarke, C., Song, Z.H., Ji, Z.N., Lo, C.K., Tsim, K.W. Phylogeny of *Astragalus* in China: molecular evidence from the DNA sequence of 5S rRNA spacer, ITS, and 18S rRNA. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6709-6714, 2003.
8. Harrison, R. E., Luby, J.J., Furnier, G.B, Hancock. J.F. Morphological and molecular variation among populations of octoploid *Fragaria virginiana* and *F. chiloensis* (Rosaceae) from North America. *Am. J. Bot.* 84, 612-620, 1997.
9. Huh, M.K., Ohnishi, O. Genetic diversity and relationships

- among natural and cultivated populations of radish in Korea revealed by RAPD. Korean J. Genetics 25, 119-125, 2003.
10. Li, C.X., Li, L., Lou, J., Yang, W.X., Lei, T.W., Li, Y.H., Liu, J., Cheng, M.L., Huang, L.H. The protective effects of traditional Chinese medicine prescription, han-dan-gan-le, on CCl₄-induced liver fibrosis in rats. Am. J. Chin. Med. 26, 325-332, 1998.
 11. Ma, X.Q., Duan, J.A., Zhu, D.Y., Dong, T.T., Tsim, K.W. Species identification of *Radix astragali* (Huangqi) by DNA sequence of its 5S-rRNA spacer domain. Phytochem. 54, 363-368, 2000.
 12. Masaki, A., Eiji, K., Yoshinobu, K., Takashi, Y. Chemical evaluation of *Astragali radix*. Natural Medicines 48, 244-252, 1994.
 13. 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.
 14. Park, J.S., Lee, B.C., Seong, C.G., Lee, K.W., Ra, S.W., Choi, K.J. Genetic similarity of boxthorn varieties (*Lycium chinense* Mill.) based on RAPD analysis. Korean J. Breed. 32, 117-121, 2000.
 15. 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.
 16. Rutao, C., Jinchun, H., Baoen, W., Fukui, Z., Guangyong, C., Shanshan, Y., Hong, S. Suppressive effect of *Astragalus membranaceus* Bunge on chemical hepatocarcinogenesis in rats. Cancer Chemother. Pharmacol. 51, 75-80, 2003.
 17. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18, 6531-6535, 1990.