

## RAPD분자마커를 이용한 칩(콩과) 및 근연분류군의 유전적 변이 및 유연관계

김동갑, 장대식<sup>1</sup>, 김진숙<sup>1\*\*</sup>, 김주환<sup>\*</sup>

경원대학교 생명과학과, <sup>1</sup>한국한의약연구원 한의융합연구본부 당뇨합병증연구센터

## Genetic Variations and Phylogenetic Relationship of and *Pueraria lobata* Ohwi (Fabaceae) and Related Taxa by RAPD Makers

Dong-Kap Kim, Dae Sik Jang<sup>1</sup>, Jin Sook Kim<sup>1\*\*</sup> and Joo-Hwan Kim<sup>\*</sup>

Department of Life Science, Kyungwon University, Gyeonggi-do 461-701, Korea

<sup>1</sup>Diabetic Complications Research Center, Division of Traditional Korean Medicine (TKM) Integrated Research,  
Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea

**Abstract** - RAPD analyses were performed to investigate genetic relationships and useful molecular maker for 3 species and their 17 regional populations of the *Pueraria lobata* and related taxa. The length of amplified DNA fragments ranged from 200 to 2,800 bp. Two hundred and eight scorable polymorphic makers and three scorable monomorphic makers were found from the PCR reactions with 15 random oligo primers, and those were analyzed by Nei's genetic distance coefficient. Based on the UPGMA phenogram from RAPD analyses, two major groups (9 populations from Korea; 3 populations from foreign countries) were recognized. And it showed distinct genetic differences from related taxa. The RAPD results was very useful to define the samples by geographical distribution and to discuss the relationships among the populations and their related taxa of the *Pueraria lobata*.

**Key words** - Molecular markers, Genetic relationship, *Pueraria lobata*, Geographical distribution, medicinal plant

### 서 언

칩(*Pueraria lobata* Ohwi)은 콩과에 속하는 덩굴성 다년식물로서 *Pueraria*속내 근연종에 약 17종이 분포하며, 중국에 약 11종이 분포하는 것으로 알려져 있다. 특히 칩은 한국, 중국, 만주, 대만, 극동러시아, 일본 등을 포함한 극동아시아의 온대영역에 폭넓게 분포한다. 예로부터 칩은 한국, 중국, 일본 등지에서 중요한 약용식물로 사용되어왔고, 한약명으로는 사용부위에 따라 갈근, 갈화라고 한다. 우선 갈근(*Puerariae Radix*)은 껍질을 제거한 뿌리를 절편으로 건조한 것을 이용하며 해열, 발한 등의 감기약으로 사용하거나, 편두통, 진정작용, 편도선염 등에 광범위하게 사용되고 있고, 꽃은 갈화(*Puerariae Flos*)라 하여 주독치료에 사용된다(Yuk, 1989). 개보본초에는 칩의 생즙을 먹

으면 소아의 열병을 다스리며, 명의별록에 의하면 칩잎은 금상과 지혈에 유용하다 기록된 것으로도 보고되어있다(Ministry of health and social affairs, 1987; Society for the research of pharmacognosy, 1998). 또한, 뿌리의 전분으로 갈분을 만들어 식용하기도 하며, 덩굴의 속껍질은 청을치라 하여 갈포의 원료로 쓰인다(Sim, 1983).

칩의 성분에 대한 연구로는 칩뿌리에 몇 가지의 flavonoids가 함유되어 있다고 보고되어 있으며(Koichi *et al.*, 1982), 약리작용에 관한 연구에서는 antivirus, 항혈액응고 및 급성간염억제, 고혈압 및 당뇨병성 백내장 등의 예방, 혈압강화작용 등의 결과가 보고되어 있다(Junei *et al.*, 1987; Takashi *et al.*, 1992). 이외에도 칩잎의 단백질 분해성질에 관한 연구, 칩뿌리의  $\beta$ -amylase의 분리와 정제에 관한 연구 등이 있다(Lee *et al.*, 1985; Kim and Yoon, 1988).

칩의 대표적 성분으로는 isoflavonoid와 triperpenoids, polysaccharide 등이 있고, 갈근에 함유된 유효한 성분은

\*교신저자(E-mail) : kimjh2009@kyungwon.ac.kr

\*\*공동교신저자(E-mail) : jskim@kiom.re.kr

isoflavonoid 계열의 daidzein, daidzin, puerarin, puerarin-7-xyloside 등으로 보고되어 있으며, 갈화에는 kakkatin 1, kakkalide, irisolidone, daidzein 등의 성분이 포함되어 있다고 알려져 있다(Yang and Ko, 1994; 장상문 등, 1999). 또한, 이 성분들은 기원식물, 산지, 기후, 채취시기, 부위 및 조제방법에 따라 성분함량에 큰 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 그럼에도 불구하고 칩에 대한 연구는 역사적 문헌고찰과 생약성분 연구에만 치중되어있을 뿐 기원 및 원산지에 대한 연구는 전무한 실정이다. 갈근의 경우 유효성분 중 puerarin이 다른 성분에 비하여 다량함유되어 있어 갈근의 품질평가 및 제제시험에도 함량이 높은 puerarin을 지표성분으로 하는 것이 타당하다고 보고되어 있으며, 특히 한국산 갈근의 puerarin 함량이 daidzein 및 daidzin에 비하여 월등히 높은 것으로 알려져 있다(Chang *et al.*, 1999).

현재 우리나라는 자유무역 및 수입개방화에 따라 한약재의 수입대체현상이 심각할 정도로 진행되고 있지만, 식물체의 일부분이 거의 대부분 건재 또는 추출물의 형태로 유통되는 한약재의 경우 기원의 불명확성, 유사약재의 부작용 미확인 등 많은 문제점을 가지고 있다. 전통적으로 한약재의 감별은 현재까지 약전이나 도제식 전수과정을 통하여 주로 형태적인 특징 및 이화학적 분석에 의존하고 있다. 그러나 식물체의 일부분이 약용으로 사용되는 한약재의 경우 일부 특정부위만을 대상으로 생물종을 구별하는 것은 거의 불가능한 경우가 많다. 또한, 이화학적인 분석방법의 대상이 되는 식물체의 2차대사 산물은 식물체의 생육환경에 따라 차이를 나타내기 때문에 객관적인 판단의 척도가 되기 어려운 경우도 있다(Kang *et al.*, 2002). 반면에, 식물체의 유전적 고유성은 환경변이에 쉽게 변하지 않고, 유전물질이 되는 DNA의 분석은 식물체의 확인 또는 종간 구별에 매우 중요한 도구로 활용되고 있다. 따라서 약용식물의 원산지판별 및 근연종 감별에 대하여 분류학적으로 명확하게 확인하기 위해 여러 가지 감별방법에 대하여 연구되고 있는 실정이다. 그러나 갈화 및 갈근과 같이 약재로 사용되는 칩에 대해 간편하게 감별할 수 있는 분자유전학적 연구는 아직 이루어지지 않고 있는 실정이다.

식물의 종·속간 및 종내 분류군간의 유연관계나 계통 분류를 위해 형태적 형질분석, 단백질유형 분석, 동위효소 분석 등이 이용되어 왔으나, 최근에는 분자생물학적 표지인을 이용하는 방법으로 RFLP와 RAPD가 널리 이용되고

있다(Stiles *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1998; Fu *et al.*, 2003). RAPD는 일반적으로 두 생물체가 계통 유전학적으로 얼마나 유사성이 있는가를 판별할 때 쓰이는데, primer의 염기가 하나만 바뀌어도 밴드 양상이 다르게 나타날 수 있기 때문에 이러한 primer가 DNA 증폭을 통한 다형현상의 검정에 이용될 수 있다(Williams *et al.*, 1990). 따라서 주로 생물의 종간 분류군 또는 지리적으로 격리 분포하고 있는 종내 분류군들의 집단간 종내 개체의 유전적 유사성을 밝힐 수 있는 방법으로 종내 분류군들의 변이정도를 파악하는데 매우 유용한 방법으로 알려져 있다(Nybohm, 1993). 더욱이, RAPD 방법은 동위효소(isozyme)나 RFLP(restriction fragment length polymorphism)분석방법과 비교하여 볼 때, 비용이 저렴하고 적은 양의 시료로도 이용이 가능하다는 이점이 있다. 최근 우리나라에서도 RAPD maker를 이용하여 멸종위기종 풍란의 유전변이와 유연관계 연구(Lee *et al.*, 2005), RAPD에 의한 한국산 개나리족의 유연관계 연구(Tae *et al.*, 2005), RAPD maker에 의한 한국산 반하속 식물의 유연관계 분석(Tae *et al.*, 2005) 등의 분류학적 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

따라서 본 연구에서는 동아시아에 분포하는 칩 및 근연분류군간의 유연관계를 확인하기 위하여 RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA)를 분자마커로 활용하는 연구를 수행하고자 하였다.

## 재료 및 방법

상기한 바와 같이 칩 및 근연분류군에 대하여 종내, 종간의 개체군 사이의 유전적 다양성을 파악하고 종내, 종간의 분자유전학적 유연관계 및 분자마커를 조사하기 위해 칩과 근연분류군에 대하여 국내외 지역별 개체군을 대상으로 채집하여 본 연구에 사용하였다. 칩은 한국에서 채집·확보된 9개 자연집단과 베트남과 중국에서 직접 채집한 2개 집단을 이용하였으며, 시중에서 한약재(갈화)로 유통 중인 국내산(PSPK)과 중국산(PSPC01)을 확보하여 원산지의 진위여부 판별에 이용하였다. 근연분류군의 경우 베트남과 중국에서 2종 4개 집단을 확보하여 총 17개 집단을 본 실험에 이용하였다. 확보된 시료 중 시중에서 구입하여 동정이 불가능한 개체는 PSPK(한국산)과 PSPC01(중국산)으로 처리하여 취급하였다(Table 1). 본 연구에 사용된 재료의 증거표본은 경원대학교 생명과학과 자원식물표본실(KWU)에

Table 1. Materials and collection data of *Pueraria* which were used in RAPD analysis

Taxa	Locality	Symb.
<i>Pueraria lobata</i>	Muju, Jeonbuk, Korea	PLOK01
	Hamyang, Gyeongnam, Korea	PLOK02
	Taeon, Chungnam, Korea	PLOK03
	Okcheon I, Chungbuk, Korea	PLOK04
	Cheonan, Chungnam, Korea	PLOK05
	Daejeon, Korea	PLOK06
	Dangjin, Chungnam, Korea	PLOK07
	Okcheon II, Chungbuk, Korea	PLOK08
	Jeongeup, Jeonbuk, Korea	PLOK09
	Sapa, Vietnam	PLOV
	Kunming, China	PLOC
<i>Pueraria sp.</i>	Korea, KIOM	PSPK
	China, KIOM	PSPC01
	Hangzeou, China	PSPC02
<i>Pueraria peduncularis</i>	Sapa, Vietnam	PPEV
	Kunming, China	PPEC
<i>Pueraria phaseoloides</i>	Kunming, China	PPHC

보관하였다.

### DNA 추출

DNA 추출을 위한 재료는 주로 어린잎을 Silica gel을 이용하여 건조시켜 사용하였으며, 잎을 액체질소에 넣은 후 막자사발로 분쇄하였고, CTAB 방법(Doyle and Doyle, 1987)을 변형한 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 약 1.0 g의 분말을 0.5% 2- $\beta$ -mercaptoentanol이 첨가된 15 mL의 extraction buffer(2% CTAB; 100 mM Tris, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 500 mM NaCl)에 넣은 후 65°C에서 1시간 incubation하였고, 조직 내 phenol 화합물 및 탄닌 등의 불순물을 제거하기 위하여 extraction buffer에 2% PVP-40을 첨가하였다. 또한 SEVAC용액(chloroform: isoamyl alcohol=24:1) 7.5 mL을 첨가하여 3,200 rpm에서 1시간 원심분리시켜 상등액을 취하고 2/3에 해당하는 부피의 isopropanol을 첨가한 후 -20°C에서 12시간 이상 보관 후 15,000 rpm로 1시간 원심분리하여 DNA를 분리하였다. DNA pellet은 70% ethanol로 세척 후 TE buffer(1 M Tris, 0.5 M EDTA, pH 8.0)에 녹였고, GeneClean kit (Bio 101 Inc., CA, USA)를 이용하여 DNA를 정제한 후, 0.7%

agarose gel에 전기영동 시킨 후 1% EtBr로 염색하여 추출 여부를 확인하였으며, 정확한 DNA의 농도는 GeneQuant pro(Amersham Pharmacia Biotech, Inc. USA)를 이용하여 결정된 후 PCR 반응에 사용하였다.

### PCR 및 DNA 증폭

추출된 DNA로부터 RAPD절편의 증폭반응은 Perkin Elmer 9700 thermal cycler에서 수행되었다. PCR 반응액의 총 부피는 25  $\mu$ L로서, 10-50 ng DNA, 1 unit Taq DNA polymerase, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatin, 0.5  $\mu$ M primer 그리고 dATP, dCTP, dGTP, dTTP 각 200 M을 포함시켰다. Primer는 NAPS (University of British Columbia)에서 제작된 No.1에서 No.200까지의 10-mer oligoprimer를 이용하여 94°C에서 4분간 pre-denaturation 한 후, 94°C에서 30초, 45°C에서 30초, 72°C에서 1분으로 구성된 amplifying을 40cycle로 수행하고, 마지막 단계인 final extention 과정은 72°C에서 7분간 진행시켰다. 이때 각각의 primer에 대한 상기의 PCR 과정을 통한 screening을 실시하여 선택된 primer는 3회 이상의 반복실험을 통해 재현

Table 2. The code and sequences of primers, total number of bands and fragment size which were used in *Pueraria lobata* and related taxa

Primer code	Sequence (5'→3')	Total no. of bands			Fragment size range (bp)
		Polymorphic	Monomorphic	Total	
NAPS-017	CCT GGG CCT C	17	0	17	400-2,800
NAPS-023	CCC GCC TTC C	13	1	14	300-2,000
NAPS-063	TTC CCC GCC C	14	0	14	400-2,000
NAPS-073	GGG CAC GCG A	14	0	14	400,2,000
NAPS-083	GGG CTC GTG G	16	0	16	350-1,600
NAPS-101	GCG GCT GGA G	15	1	16	250-2,800
NAPS-102	GGT GGG GAC T	7	0	7	200-2,500
NAPS-105	CTC GGG TGG G	15	1	16	300-2,000
NAPS-125	GCG GTT GAG G	10	0	10	300-2,000
NAPS-147	GTG CGT CCT C	12	0	12	400-2,300
NAPS-149	AGC AGC GTG G	17	0	17	300-2,000
NAPS-152	CGC ACC GCA C	16	0	16	250-2,200
NAPS-155	CTG GCG GCT G	12	0	12	300-2,000
NAPS-157	CGT GGG CAG G	16	0	16	300-2,000
NAPS-194	AGG ACG TGC C	14	0	14	250-2,000
Total	-	208	3	211	-
Mean/Primer	-			12.4	-

성이 뚜렷한 것만을 사용하였다(Table 2). 증폭된 DNA product는 1.5% agarose gel상에서 전기영동한 후 1% EtBr로 염색하여 UV-illuminator상에서 band를 확인한 후 사진촬영을 하고 ideogram을 작성하여 정확한 분자마커의 위치를 표시하였다(Fig. 1, 2).

### 자료분석

PCR 결과에 의해 증폭된 DNA 절편으로부터 나타난 각 band를 하나의 형질로 취급하여 band의 유무에 따라 각각 1과 0으로 표시하고, 전체 OTU에 대한 자료행렬을 작성하였다.

NTSYS(Applied Biostatistics, 2000, v2.1)을 이용하여 Nei(1972)의 유전적 거리지수에 근거한 비유사도지수행렬을 도출하였다(Table 3). 도출된 자료행렬에 근거하여 UPGMA(비가중산술법, Unweighted pair group method with arithmetic mean)방법(Rohlf, 1989)에 의한 phenogram을 작성하여 각 OTU간의 유전적 유사성을 검토하였다.

### 결 과

콩과에 속하는 칩 1종에 대한 13개 집단과 근연분류군 2종의 4개 집단 등 총 17개 국내의 지역별개체군에 대하여 유전적 유연관계 및 분자마커를 알아보기 위해 RAPD 분석을 실시하였다. 본 실험에 사용된 200개의 random primer를 대상으로 screening을 실시한 결과, 뚜렷한 RAPD 절편형성의 재현성을 나타내는 primer는 15개로 나타났다(Table 2). RAPD 절편들은 대부분 300-2,000 bp에서 총 211개로 확인되었고, 종간에 서로 차이를 나타냈다. 종내 개체군간에 동일하거나 서로 다른 band pattern이 관찰되었으며, polymorphic bands는 208개였고, monomorphic bands는 3개에 불과하여 칩과 근연분류군의 매우 높은 유전적 다양성을 나타내고 있다(Fig. 1, 2).

RAPD결과 도출된 비유사도지수행렬에 의하면 칩 개체군간의 유전적 거리는 0.159에서 0.512(평균 0.316)로 나타나 유전적 다양성이 비교적 높은 것으로 나타났으며, 칩 개체군과 근연분류군간에는 0.340에서 1.23(평균 0.661)

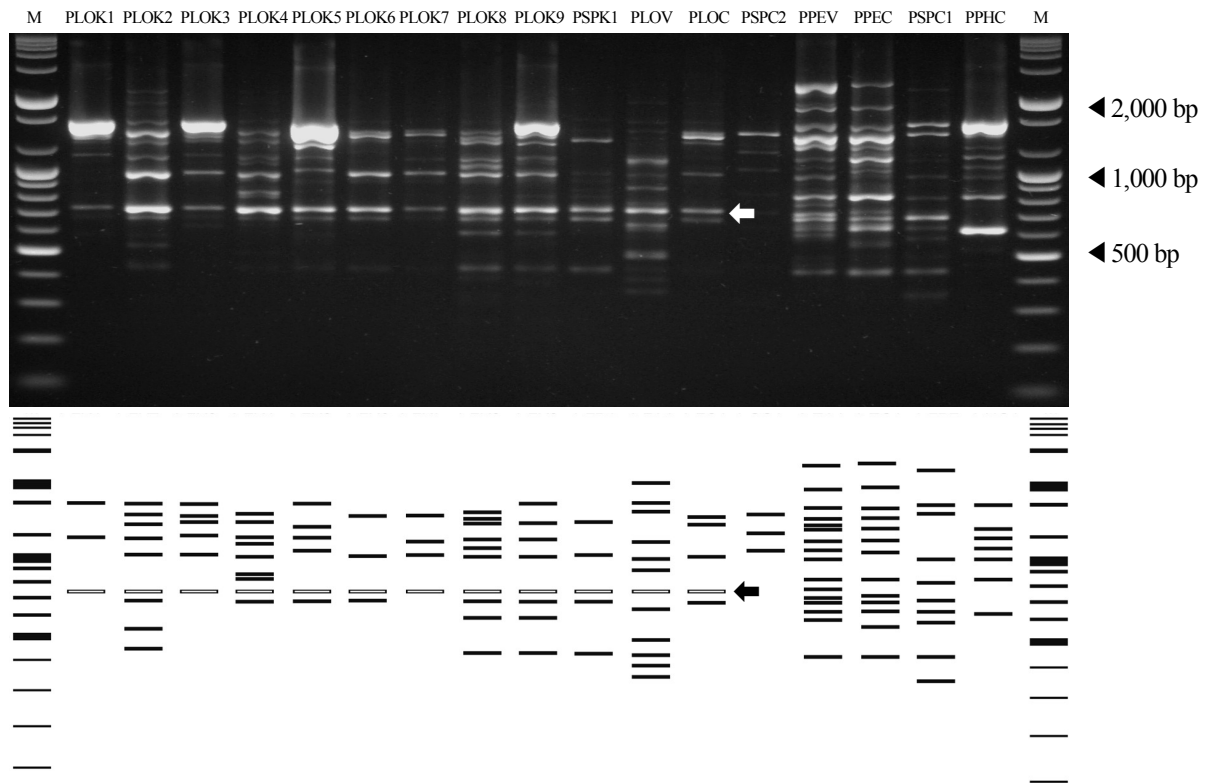


Fig. 1. RAPD electrophoresis profile and diagram for *Pueraria lobata* with primer no. NAPS-017.

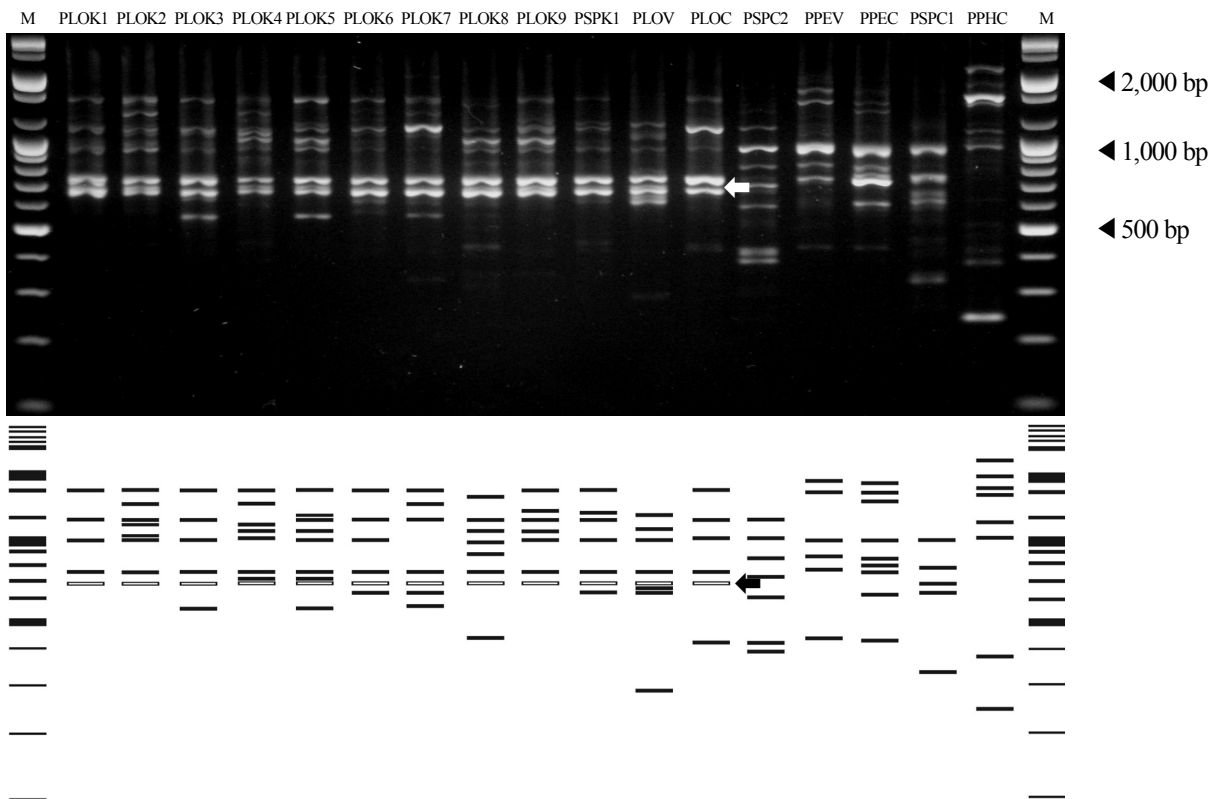


Fig. 2. RAPD electrophoresis profile and diagram for *Pueraria lobata* with primer no. NAPS-101.

로 확인되어 유전적 불연속성이 확인되었다. 또한, 한국산 칩 개체군 내에서는 0.159에서 0.431(평균 0.288)의 유전적 거리를 나타내는 반면, 한국산 칩 개체군과 국외산 칩 개체군간에는 0.251에서 0.512(평균 0.374)로 상대적으로

높게 관찰되었다. 시중에 한국산 칩으로 유통 중인 PSPK와 직접 채집한 한국산 칩 개체군간의 유전적 거리는 0.245에서 0.594(평균 0.435)로 비교적 높은 값을 나타냈으나, 외국산 칩 개체군과는 0.345에서 0.346으로 상대적으로

Table 3. Genetic dissimilarity matrix calculated by Nei's (1972) genetic coefficient based on RAPD analysis of *Pueraria lobata* and related taxa

	PLOK01	PLOK02	PLOK03	PLOK04	PLOK05	PLOK06	PLOK07	PLOK08	PLOK09	PLOV	PLOC	PSPK	PSPC01	PSPC02	PPEV	PPEC	PPHC
PLOK01	-																
PLOK02	0.209	-															
PLOK03	0.236	0.291	-														
PLOK04	0.257	0.159	0.234	-													
PLOK05	0.280	0.212	0.317	0.265	-												
PLOK06	0.244	0.239	0.343	0.270	0.223	-											
PLOK07	0.319	0.328	0.348	0.336	0.287	0.238	-										
PLOK08	0.385	0.331	0.387	0.332	0.198	0.303	0.330	-									
PLOK09	0.316	0.257	0.322	0.342	0.243	0.298	0.431	0.241	-								
PLOV	0.449	0.364	0.378	0.416	0.421	0.439	0.512	0.384	0.265	-							
PLOC	0.309	0.294	0.293	0.381	0.400	0.335	0.422	0.410	0.251	0.336	-						
PSPK	0.451	0.420	0.478	0.465	0.411	0.494	0.594	0.355	0.245	0.346	0.345	-					
PSPC01	0.706	0.577	0.652	0.635	0.583	0.628	0.651	0.479	0.549	0.572	0.731	0.476	-				
PSPC02	0.861	0.76	0.758	0.703	0.727	0.735	0.844	0.682	0.704	0.696	0.815	0.742	0.686	-			
PPEV	0.541	0.505	0.555	0.510	0.455	0.498	0.644	0.422	0.389	0.453	0.531	0.560	0.447	0.724	-		
PPEC	0.538	0.422	0.499	0.44	0.404	0.493	0.560	0.372	0.340	0.358	0.509	0.557	0.362	0.626	0.199	-	
PPHC	1.234	0.972	1.002	1.008	0.939	1.045	1.136	1.071	0.944	1.062	0.960	1.344	1.216	1.474	0.936	0.941	-

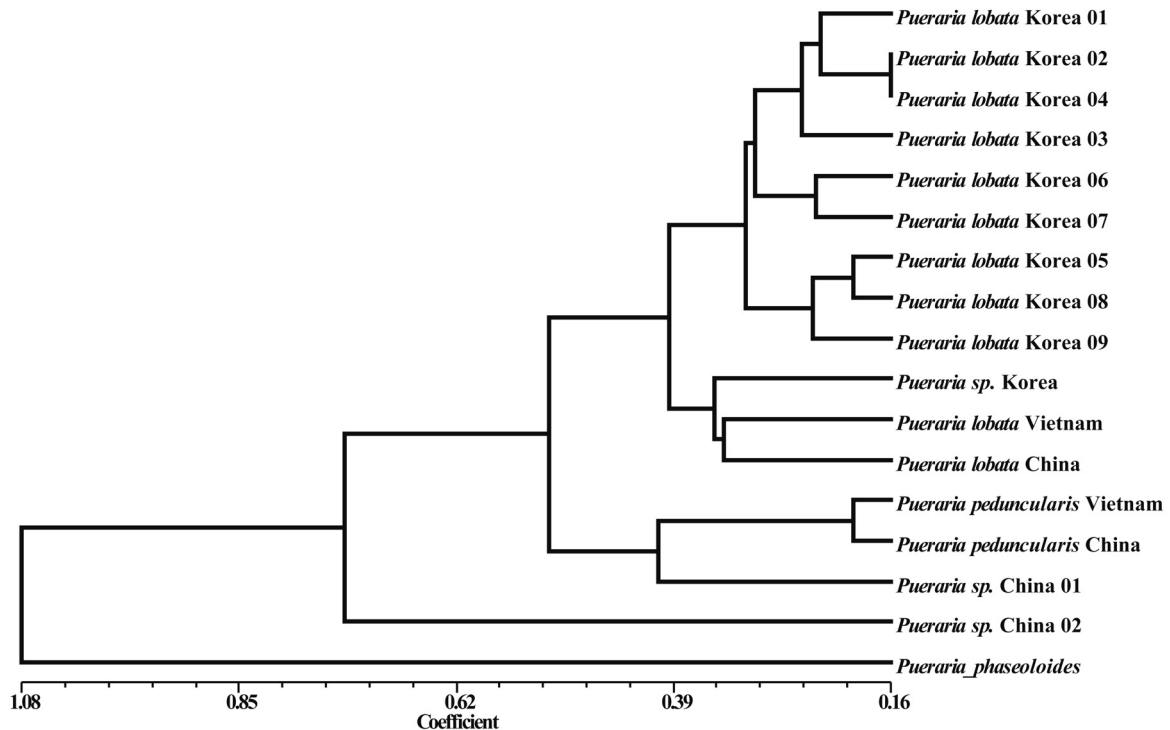


Fig. 3. UPGMA phenogram of 17 populations of *Pueraria lobata* and related taxa based on RAPD analysis.

낮은 값이 관찰되었다. 특히, 시중에서 중국산 칩으로 유통 중인 PSC01과 칩 개체군간에는 0.476에서 0.706(평균 0.607)의 매우 높은 값을 나타내어 뚜렷한 유전적 불연속성이 관찰된다. 한편, 칩의 근연분류군 중에서는 *Pueraria peduncularis*가 칩 개체군과 가장 가까운 유전적 거리(평균 0.474)를 갖는 것으로 나타난다(Table 3).

유집분석결과 도출된 UPGMA phenogram에서는 칩 개체군이 칩 근연분류군의 유집군으로부터 명확하게 구분되어 독립적인 유집군을 형성하며, 다시 한국산 칩 유집군과 외국산 칩 유집군으로 구분된다. 한국산 칩 유집군은 무주-함양-옥천-태안, 대전-당진, 천안-옥천II-정읍 등의 3개 소그룹으로 구성되지만 지역적 분포와는 전혀 무관하게 유집되는 경향을 나타내어 칩 개체군들이 매우 높은 유전적 다양성을 나타내는 것으로 생각된다. 또한, 시중에서 구입한 칩 개체군 중 한국산 칩은 외국산 칩 개체군들과 함께 유집되었으며, 중국산 칩 개체군은 칩의 근연분류군인 *Pueraria peduncularis*와 함께 유집되었다(Fig. 3).

## 고 찰

RAPD 분자마커를 이용한 본 연구에서 15개의 oligo primer로부터 형성된 211개의 RAPD절편 중 polymorphic bands는 208개로 나타나 칩 개체군들이 유전적으로 매우 다양한 것으로 생각되며, 이러한 결과는 비유사도지수에서 칩 개체군간의 유전적거리가 비교적 높고, 유집분석결과 UPGMA phenogram에서도 지역별 유집성이 없는 것으로 지지된다. 한편, 칩과 근연분류군을 식별가능하게 하는 분자마커는 15개의 primer에서 4개가 관찰되어 별도의 RAPD 절편 자료분석을 수행하지 않아도 근연종을 쉽게 구별할 수 있었으며, 총 3회의 반복실험에도 동일한 재현성을 나타내어 종구별에 매우 유용한 분자마커로 생각된다. 비유사도 지수행렬에서는 칩 개체군내의 유전적 거리는 평균 0.334이었으며, 근연분류군과는 0.676의 명확한 불연속적 유전적 거리지수를 나타내 종구별이 매우 용이한 것으로 나타났으며, 이는 칩은 탁엽이 엽병에 부착되는 형태가 저작(basifixed)인 반면 근연분류군들인 *P. phaseoloides*와 *P. peduncularis*는 측착(dorsifixed)하여 구분되는 것과도 일치한다. 또한, 한국산 칩 개체군간의 유전적 거리지수가 평균 0.288로 비교적 낮은 반면에 국외산 칩 개체군과는 평균 0.374로 상대적으로 높게 나타나 추가적인 primer

screening을 실시한다면 칩의 원산지 판별에도 유용한 분자마커를 탐색할 수 있을 것으로 기대된다. 한편, 시중에서 유통 중인 한국산 칩은 한국산 칩 개체군과의 유전적 거리(평균 0.435)에 비해 외국산 칩과 보다 가까운 유전적 거리 지수(평균 0.345)를 나타내었으며, 특히, 칩으로 유통 중인 중국산과 칩 개체군과는 평균 0.607의 매우 높은 유전적 거리를 나타내는 것으로 볼 때 칩이 아닌 근연분류군중 하나로 생각된다. 이러한 결과는 유집분석에서도 동일하게 나타나 한국산 칩은 국외산과 중국산 칩은 근연분류군들과 함께 유집되는 것을 관찰할 수 있다.

한약재는 식물체의 다양한 부위가 이용되는 만큼 절단된 상태로 이를 건조시켰을 경우 효능 및 품질이 떨어지는 위 품을 진품과 구별하는 것은 매우 주관적일 뿐 아니라 어려운 일이다. 따라서 사용빈도가 높거나 오용될 소지가 있는 한약재들을 대상으로 분자생물학적인 표지인자를 구축해 나간다면 향후 보다 객관적으로 검증된 한약재의 유통을 유도할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 RAPD 분자마커를 이용한 연구 방법은 현재 뚜렷한 정보 없이 무분별하게 수입되어 사용되고 있는 칩과 칩의 근연분류군을 정확하고 객관적으로 식별하는 방법으로서 매우 유용하다고 생각되며, 향후 지속적인 분자마커 탐색을 실시한다면 칩의 원산지 판별에도 매우 유용한 방법으로 판단되어진다.

## 적 요

동아시아에 분포하는 콩과에 속하는 칩 1종의 13집단과 근연분류군 2종의 4집단 등 총 17개의 개체군에 대하여 유전적 유연관계 및 종간 특이적인 분류학적으로 유용한 분자마커를 알아보기 위해 RAPD 분석을 실시하였다. 15개의 oligo primer를 이용한 효소중합반응을 통해 증폭된 RAPD 절편들은 200 bp에서 2,800 bp 사이의 구간에서 관찰되었다. 이중 유효한 polymorphic band makers는 총 208개, monomorphic bands는 3개를 확인하였으며, 칩의 종 특이적 분자마커는 4개로 확인되었다. 이러한 자료에 근거하여 칩속의 17개 개체군 집단에 대한 UPGMA 분석을 실시하였다. 도출된 UPGMA phenogram에서 한국산 칩 9개체군과 국외산 칩 3개체군이 각각 독립적인 두 개의 작은 유집군을 형성하였으며, 이후 두 유집군이 하나로 크게 유집되어 다른 칩 근연분류군과는 뚜렷하게 구분되었다. 따라서 RAPD 분석은 칩과 근연분류군간의 유연관계 분석 및

한국산과 국외산 집단의 원산지판별에 매우 유용한 분자마커로 생각된다.

## 사 사

본 연구는 한국한의학연구원 일반사업비(L08010)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Chang, S.-M., S.-H. Noh and S.D. Park. 1999. Herbal resources plant. Hakmunsa. Seoul. (in Korean)
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation methods for small quantities of fresh tissues. *Phytochemical Bulletin*. 17: 144-163.
- Fu, C., Y. Qiu and H. Kong. 2003. RAPD analysis for genetic diversity in *Changium smyrnioides* (Apiaceae), an endangered plant. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 44: 13-18
- Junei, K., F. Juncihi, B. Junko, T. Takashi and Y. Masaki. 1987. Studies on the constituents of *Pueraria lobata*. III. *Chem. Pharm. Bull.* 35: 4846-4850.
- Kang, I.H., J.H. Cho, D.H. Kim, Y.H. Shin, E.K. Kim, J.W. Kim, W.K. Hwang and H.Y. Choi. 2002. Monitoring on Endocrine Disruptors in Natural Medicines-Studies on Pesticide Residues in Natural Medicines. *Kor. J. Herbology* 17: 175-182. (in Korean)
- Kim, B.M. and S.H. Yoon. 1988. Separation and Properties of crude  $\beta$ -amylase from *Pueraria thunbergiana* Benth. *Chung-ang Journal of Natural Science* 2: 43-51. (in Korean)
- Koichi, T. and I. Hideji. 1982. Isoflavonoids and the other constituents in callus tissues of *Pueraria lobata*. *Chem. pharm. Bull.* 30: 1496-1499.
- Lee, K.S., K.Y. Yim, W.Y. Choi and M.J. Oh. 1985. Isolation and characterization of arrowroot leaf proteins. *Korean J. Food & Nutr.* 14: 345-352. (in Korean)
- Lee, S.W., D.K. Kim, H.C. Shin and J.H. Kim. 2005. Genetic variations and relationships of *Neofinetia falcata* (Thunb.) Hu (Orchidaceae), a rare and endangered species in Korea. The 60<sup>th</sup> Annual Meeting of the Korean Association of Biological Sciences, vol. 9 Supplement.
- Ministry of health and social affairs. 1987. The Korea Pharmacopoeia 5 edit. Korea Medical Index. Seoul. (in Korean)
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Amer. Natur.* 106: 283-292.
- Nybom, H. 1993. Applications of DNA fingerprinting in plant population studies in DNA fingerprinting: State of the Science, Burke, Dolf, T.G., A.J. Jeffreys and R. Wolff, Eds., Birkh user, Basal. pp. 293-309.
- Rohlf, F.J. 1989. NTSys-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.50. Exeter pubi. New York.
- Sim, S.Y. 1983. Medicinal natural food. Changjosa. Seoul. (in Korean)
- Society for the research of pharmacognosy. 1998. Modern pharmacognosy. Hakchangsa. Seoul. (in Korean)
- Stiles, J.I., C. Lemme, S. Sondur, M.B. Morshildi and R. Manshardt. 1993. Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 85: 697-701.
- Tae, K.H., D.K. Kim and J.H. Kim. 2005. Analysis of phylogenetic relationship among Korean *Pinellia Tenore* (Araceae) using RAPD markers. *Kor. J. Plant Tax.* 35: 161-174. (in Korean)
- Tae, K.H., D.K. Kim and J.H. Kim. 2005. Genetic Variations and Phylogenetic Relationships of Tribe Forsythieae (Oleaceae) Based on RAPD Analysis. *Korean J. Plant Res.* 8: 135-144.
- Takashi, S., Akihiko K., Akira T., Yoshio T. and Tatsuzo F. 1992. Mechanism of antioxidant action of *Pueraria* glycoside (PG)-1 (an isoflavonoids) and mangiferin (a Xanthonoid). *Chem. Pharm. Bull.* 40: 721-724.
- Williams, J.G.K, A.R. Kubelik, K.J. Livark, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic makers. *Nucl. Acids. Res.* 18: 6531-6535.
- Yang, S.K. and Y.S. Ko. 1994. Constituent of *Pueraria mirifica* root juice and *Pueraria mirifica* root extract. *The Journal of Korean living science research.* 12: 25-45. (in Korean)
- Yang, Y.W., W.H.J. Kuo and T.H. Wong. 1998. Genetic polymorphism of seven populations of *Capsella bursapastoris* based on RAPD markers. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39: 17-21.
- Yuk, C.S. 1989. Coloured medicinal plants of Korea. Academy-book. Seoul. (in Korean)

(접수일 2009.3.26; 수락일 2009.6.18)