

# RAPD 및 ITS 염기서열 분석을 이용한 곰취 속(*Ligularia*) 식물의 유연관계 분석

안순영<sup>1</sup> · 조광수<sup>1\*</sup> · 유기억<sup>2</sup> · 서종택<sup>1</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립식량과학원 고령지농업연구센터, <sup>2</sup>강원대학교 생명과학과

## Phylogenetic Relationship of *Ligularia* Species Based on RAPD and ITS Sequences Analyses

Soonyoung Ahn<sup>1</sup>, Kwang-Soo Cho<sup>1\*</sup>, Ki-Oug Yoo<sup>2</sup>, and Jong-Taek Suh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Highland Agriculture Research Center, National Institute of Crop Science,  
Rural Development Administration, Pyeongchang 232-955, Korea

<sup>2</sup>Department of Biological Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

**Abstract.** The genetic relationships in 5 species of *Ligularia* were investigated using RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) and ITS (Internal Transcribed Spacer) sequences analyses. In RAPD analysis, sixty three of 196 arbitrary primers showed polymorphism. The amplified fragments ranged from 0.2 to 1.6 kb in size. The dendrogram was constructed by the UPGMA clustering algorithm based on genetic similarity of RAPD markers. A total of 16 accessions were classified into 5 major groups corresponding each species at the similarity coefficient value of 0.77. In the ITS sequence analysis, the size of ITS 1 was varied from 248 to 256 bp, while ITS 2 was varied from 220 to 222 bp. The 5.8S coding region was 164 bp in lengths. Forty nine sites (10.2%) of the 478 nucleotides were variable, and the G+C content of ITS region ranged from 49.4 to 53.5%. In the ITS tree, five species of *Ligularia* were monophyletic, and *L. taquetii* was the first branching within the clade. *Ligularia intermedia* formed a clade with *L. fischeri* var. *spiciformis* (BS=79), and *L. stenocephala* and *L. fischeri* were also claded. Two data sets were congruent, except of the position of *L. fischeri* var. *spiciformis*.

**Additional key words:** cluster analysis, internal transcribed spacer, polymorphism

### 서 언

수집된 유전자원에 대한 평가는 다양한 육종 소재를 확보하고 유전적 변이에 대한 정보를 얻는데 있어 매우 중요하다. 이런 측면에서 최근 쌈 채소로 많이 이용되며 단백질, 칼슘, 비타민 A, C 등이 풍부하고, 그 추출물이 항산화 효과(Cho, 2002; Choi 등, 2007; Kwon 등, 2002; Na 등, 2006), 항돌연변이 및 유전독성 억제 효과(Ham 등, 1998) 등을 갖는 곰취 속(*Ligularia*) 식물의 경우, 수집 유전자원에 대한 평가나 연구가 미비한 실정이다. 현재까지 국내에 분포하는 곰취 속 식물은 화살곰취, 무산곰취, 갯취, 곤달비, 곰취, 개담배, 긴잎곰취, 어리곤달비 등 8종류가 자라며, 이 중 곰취,

곤달비, 갯취를 제외하면 북한지방에만 분포하는 것으로 알려져 있다(Kim, 2007). *Ligularia* 속 식물의 유전자원에 대한 평가연구는 거의 없으며, 곰취나 넘취(한대리곰취) 등의 약리활성 또는 기능성에 대한 연구 보고(Choi 등, 2007; Lee 등, 2002; Na 등, 2006; Park과 Choi, 2007)가 있을 뿐이다. 국외에서는 티벳 고원 지역의 *Ligularia* 속 식물의 핵형 분석에 관한 연구(Liu, 2004), *Ligularia*, *Crementhodium*과 *Parasenecio*의 복잡한 계통발생학적 연구(Liu 등, 2006)와 중국지역의 *Ligularia pleurocaulis*의 화학적 조성과 ITS 부분을 이용하여 화학적, 유전적 index로 구분한 연구(Nagano 등, 2006) 등이 있다. 국내에서는 RAPD 방법을 이용하여 5종의 취나물(청옥취, 개미취, 참취, 수리취, 곰취)의 유연관

\*Corresponding author: kscholove@korea.kr

※ Received 17 December 2009; Accepted 8 April 2010. 본 연구는 2008년도 농촌진흥청(국립식량과학원) 박사후 연수과정 지원사업에 의해 수행되었습니다.

계를 비교 분석한 Yoo 등(1996)의 보고가 있다.

외부형태적 특성을 이용한 유전자원의 평가는 재배 방법, 재배 환경, 식물의 생육 상태, 재배자의 경험과 주관성 등 여러 요인에 의해 영향을 받을 수 있는 반면, 분자표지를 이용한 유전자원 평가는 재배 환경, 식물의 발육 단계 등에 영향을 받지 않으므로 유연관계 분석에 있어 비교적 정확하고 직접적인 결과를 얻을 수 있다. 이러한 분자 유전학적 방법들은 여러 작물에서 유연관계를 분석하거나 유전적인 변이의 평가에서 그 효율성이 높게 평가되고 있으며, 원리, 응용성, 유형, 다형성 밴드 수, 비용, 시간 등에 따라 방법에는 약간의 차이가 있다(Russell 등, 1997; Tatineni 등, 1996). 유연관계 분석이나 종 및 품종 구분에 많이 이용되는 방법에는 RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA)를 비롯하여 AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR(Simple Sequence Repeat), RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) 등이 있으며, 이 방법들은 분자 유전학 수준에서의 분류군 동정, 계통발생 관계, 종 내 다양성 등을 밝히는 데 이용되고 있다(Kapteyn와 Simon, 2002). Random primer를 이용하는 RAPD 분석은 다른 방법들에 비하여 쉽게 이용할 수 있고 비교적 단시간에 적용할 수 있는 특성을 가지고 있다(Lee와 Kim, 2003).

최근 가장 광범위하게 쓰이는 분자 표지인자 중의 하나가 nrDNA(nuclear DNA)의 ITS 지역의 변이를 분석하는 것이

다(Álvarez와 Wendel, 2003). 특히 ITS 지역의 염기서열을 이용하여 유전적 변이 및 동질성을 확인하고 보다 정확한 유연관계 및 진화에 대한 연구도 많이 수행되고 있다(David와 Thien, 1997; In 등, 2006; Whang, 2006). ITS는 18S ribosomal DNA와 26S ribosomal DNA 사이의 영역으로 피자식물의 계통 발생학적 연구에 있어 유용한 특성으로 알려져 있다. ITS 영역은 식물 계놈상에 반복된 형태로 존재하며, 상이한 교차나 유전자 변환을 통해서 빠르게 진화가 이루어져 변이가 심하고 700bp이하의 작은 크기와 유전적 변이가 거의 없는 flanking sequence에 의해 증폭이 쉽다는 장점을 가지고 있다(Baldwin 등, 1995).

본 연구에서는 RAPD와 ITS 염기서열 분석을 통하여 곰취 속(*Ligularia*) 수집 종 간의 유연관계를 분석하고 이 결과를 곰취 육종연구를 위한 우수 교배친의 확보, 교배조합 작성 등을 위한 기초 자료로 활용하고자 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

실험에 사용된 재료는 *Ligularia* 속의 갯취(1개체), 어리곤달비(1개체) 곰취(6개체), 곤달비(3개체), 한대리곰취(3개체) 등 5종의 16개체를 사용하였다. 이 중 거제도과 백두산에서 수집된 곰취는 강원도농업기술원 특화작목시험장 평창분소의

**Table 1.** Accession lists of *Ligularia* species used in this study.

No.	Species	Collection Area	Accession No.
1	<i>Ligularia fischeri</i>	Daegwallyeong (GW <sup>z</sup> )	GU323280
2	<i>Ligularia fischeri</i>	Doonnae (GW)	
3	<i>Ligularia fischeri</i>	Yeongwol (GW)	
4	<i>Ligularia fischeri</i>	Jeongseon (GW)	
5	<i>Ligularia fischeri</i>	Mt. Taegi (GW)	
6	<i>Ligularia fischeri</i>	Geoje (GS <sup>y</sup> )	
7	<i>Ligularia fischeri</i>	Geochang (GS)	
8	<i>Ligularia fischeri</i>	Mt. Baekdu	
9	<i>Ligularia stenocephala</i>	Daegwallyeong (GW)	DQ272329
10	<i>Ligularia stenocephala</i>	Bongpyeong (GW)	
11	<i>Ligularia stenocephala</i>	Gapcheon (GW)	
12	<i>Ligularia fischeri</i> var. <i>spiciformis</i>	Daegwallyeong (GW)	GU323279
13	<i>Ligularia fischeri</i> var. <i>spiciformis</i>	Yongsan (GW)	
14	<i>Ligularia fischeri</i> var. <i>spiciformis</i>	Mt. Halla	
15	<i>Ligularia intermedia</i>	Hantaek botanical garden	GU323281
16	<i>Ligularia taquetii</i>	Hantaek botanical garden	GU323282

<sup>z</sup>Gangwon-do.

<sup>y</sup>Gyeongsangnam-do.

시험포에서 관리하고 있는 것을 분양 받아 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 개체의 수집지역은 Table 1에 나타내었다.

### RAPD 분석

실험에 사용할 DNA의 추출은 Murray와 Thompson(1980)의 방법을 따랐으며, 추출한 DNA는 ND-1000UV/VIS spectrophotometer(NanoDrop Technologies, USA)로 정량 한 후 10ng/ $\mu$ l로 희석하여 PCR을 위한 DNA로 사용하였다. PCR은 Williams 등(1990)의 방법을 따랐으며 DNA 증폭은 VertiTM 96-well DNA Thermal Cycler(Applied Biosystems, USA)로 수행하였다.

RAPD를 위한 primer는 Operon사의 random decamer 196 종류(OPB, OPF, OPI, OPN, OPO, OPP, OPQ, OPD 02-20, OPE 01-04, 08-20, OPG 08, OPV 01-08, OPW 01-11)를 사용하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분간 전처리 한 후, 94°C에서 45초, 36°C에서 45초, 72°C에서 45초를 cycle로 하여 35회 반복한 후 72°C에서 10분간 더 유지시켰다. 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel에 전기영동 한 후 UV하에서 Gel Documentation System(Alpha Digi Doc, USA)로 촬영하였다. 분자량 비교를 위한 marker로는 100bp DNA ladder(Bioneer Co., Korea)를 사용하였다.

유연관계 분석은 다형성을 나타내는 밴드의 유무에 따라서 1 또는 0으로 전환시킨 후 각각을 하나의 운영 분류 단위(OTU, operational taxonomic unit)로 하여 기초 자료 행렬(data matrix)을 작성하였다. 유집분석은 Jaccard coefficient 계산법에 따라 유사도 지수를 계산한 후, NTSYS-pc 프로그램을 이용하여 비가중산술법(UPGMA, Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Average)에 따라 유집하였다.

### ITS Sequence 분석

ITS sequence 분석은 RAPD분석에서와 동일한 DNA를

사용하였으며 곤달비를 제외한 4종에서 총 11개체의(곰취 6, 한대리곰취 3, 갯취 1, 어리곤달비 1개체) 핵 내 ITS(nr ITS) 및 rRNA지역의 증폭을 위하여 ITS-reverse primer(TCCTCCGCTTATTGATATGC)와 ITS-forward primer(TCCGTAGGTGAACCTGCGG)를 사용하였다. 곤달비(*L. stenocephala*)의 ITS는 유전자 은행(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 등록된 염기서열(DQ27232)을 이용하였다. PCR조건은 94°C에서 5분간 전처리 한 후, 94°C에서 1분, 50°C에서 1분, 72°C에서 2분을 cycle로 하여 35회 반복한 후 72°C에서 10분간 더 유지시켰다. 증폭된 DNA의 정제는 Wizard PCR Preps DNA Purification System(Promega, USA)을 사용하였으며, 염기서열 분석은 바이오니아(주)의 염기서열 분석 서비스를 이용하였다. 분석된 염기서열은 Sequence Scanner(Ver. 1.0, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였으며, CLC Main Workbench(Ver. 4.0, CLC Bio, Denmark)의 alignment 기능으로 정렬 후 최종 세부정렬은 수작업을 통해 수행하였다. 정렬된 염기서열은 PAUP 4.02b(Swofford, 1998)을 이용하여 parsimony analysis를 하였으며, 분석방법은 heuristic search를 이용하였고, 그에 따른 option으로는 ACCTRAN, MULPARS 그리고 TBR을 이용하였다. 또한 각 분계도의 지지 정도를 알아보기 위하여 bootstrap(Felsenstein, 1985)으로 1000회를 반복하여 분석하였으며, 이를 통한 계통수를 찾아내었다. 군외군(outgroup)은 국내에 분포하는 곰취 속과 가장 근연으로 알려진(Kim, 2007) 털머위 속(*Farfugium*)의 털머위(*F. japonicum*)를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### RAPD 방법에 의한 유연관계 분석

*Ligularia* 속 식물의 유연관계 분석을 위하여 Operon사의 총 196개의 random primer를 사용하여 16개의 수집종들에

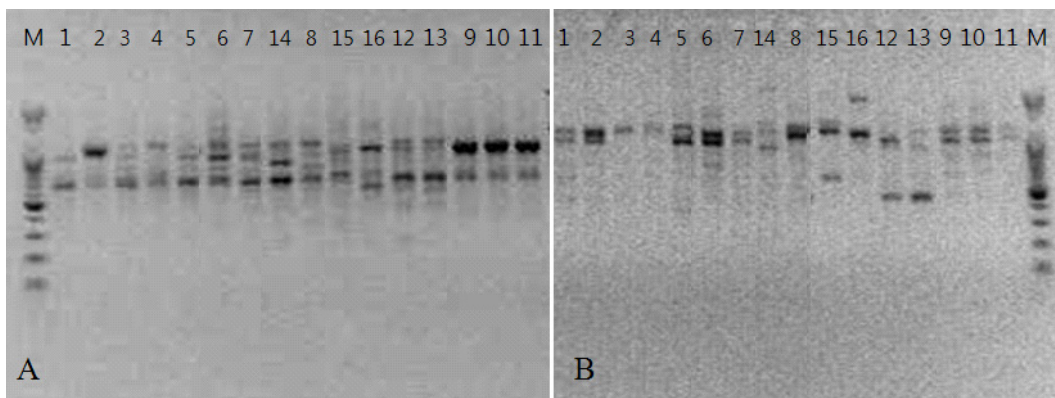


Fig. 1. RAPD profiles of *Ligularia* species generated using OPI 20 (A) and OPB 12 (B) primers. M; 100 bp ladder (Bioneer Co.). The numbers are shown in Table 1.

대해 RAPD를 실시하여 증폭된 밴드의 수가 많고 선명한 63개의 primer를 선발하였다(Table 2, Fig. 1). 증폭된 총 밴드 수는 444개였으며, 이 중 다형성(polymorphism)을 나타

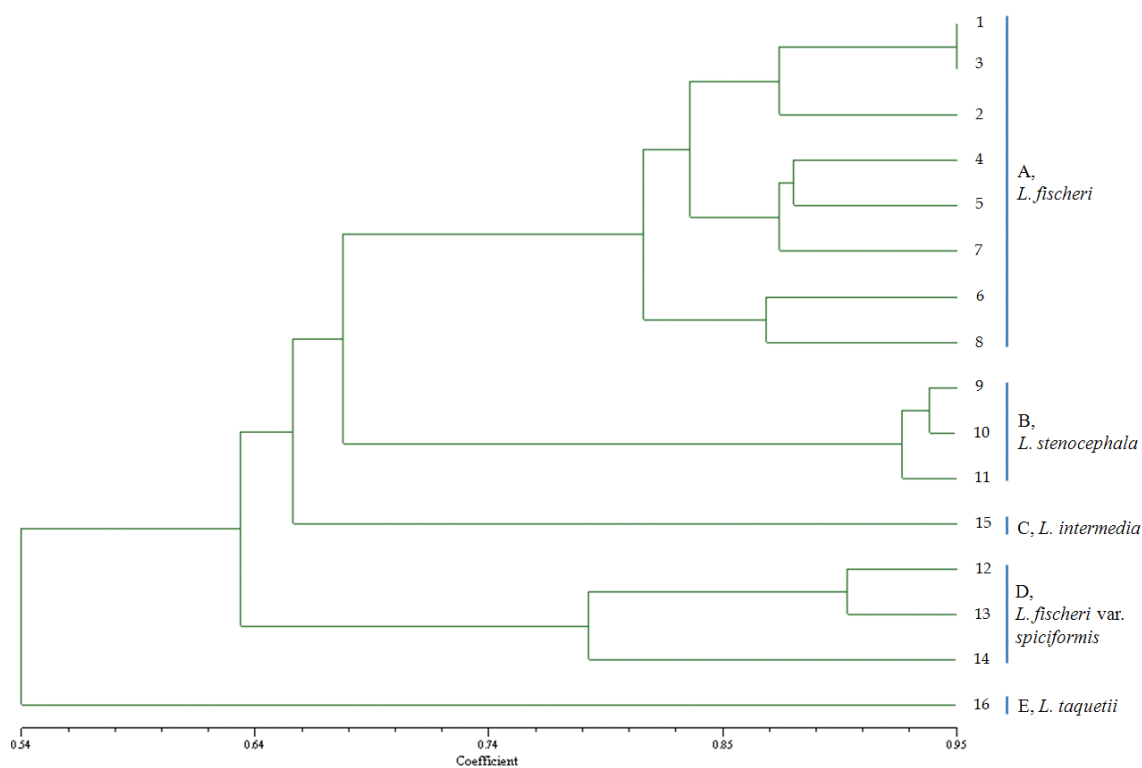
낸 밴드 수는 141개(31.8%) 였다. Primer 당 평균 2.2개의 다형성 밴드를 보였으며, 나머지 303개는 동일한 밴드 양상을 나타내었고, 증폭된 DNA 밴드는 그 크기가 0.2-1.6kb까

**Table 2.** Primers showing polymorphism in RAPD analysis of *Ligularia* species.

Primer	Sequence (5'-3')	No. of loci.		Polymorphism (%)
		total	polymorphism	
OPB 01	GTTTCGCTCC	4	2	50.0
OPB 10	TGCTGGGAC	10	4	40.0
OPB 11	GTAGACCCGT	7	5	71.4
OPB 12	CCTTGACGCA	5	4	80.0
OPB 13	TTCCCCCGCT	5	3	60.0
OPB 15	GGAGGGTGTT	5	3	60.0
OPD 02	GGACCCAACC	8	4	50.0
OPD 07	TTGGCACGGG	8	3	37.5
OPD 15	CATCCGTGCT	5	2	40.0
OPD 18	GAGAGCCAAC	7	4	57.1
OPE 12	TTATCGCCCC	4	1	25.0
OPE 14	TGCGGCTGAG	5	1	20.0
OPE 16	GGTGACTGTG	4	2	50.0
OPE 18	GGACTGCAGA	5	2	40.0
OPE 20	AACGGTGACC	6	2	33.3
OPF 01	ACGGATCCTG	5	2	40.0
OPF 03	CCTGATCACC	7	4	57.1
OPF 04	GGTGATCAGG	4	2	50.0
OPF 05	CCGAATTC	10	3	30.0
OPF 06	GGGAATTCGG	8	3	37.5
OPF 08	GGGATATCGG	9	1	11.1
OPF 20	GGTCTAGAGG	6	2	33.3
OPI 07	CAGCGACAAG	4	2	50.0
OPI 09	TGGAGAGCAG	6	1	16.7
OPI 12	AGAGGGCACA	7	1	14.3
OPI 13	CTGGGGCTGA	9	2	22.2
OPI 14	TGACGGCGGT	10	2	20.0
OPI 20	AAAGTGCGGG	6	2	33.3
OPN 01	CTCACGTTGG	8	5	62.5
OPN 02	ACCAGGGGCA	8	4	50.0
OPN 03	GGTACTCCCC	11	2	18.2
OPN 05	ACTGAACGCC	8	1	12.5
OPN 06	GAGACGCACA	7	1	14.3
OPN 09	TGCCGGCTTG	7	2	28.6
OPN 10	ACAACGGGG	8	4	50.0
OPN 11	TCGCCGCAAA	7	1	14.3
OPN 18	GGTGAGGTCA	8	1	12.5
OPO 05	CCCAGTCACT	7	2	28.6
OPO 16	TCGGCGGTTC	9	1	11.1
OPO 19	GGTGACGTT	9	2	22.2
OPO 20	ACACACGCTG	11	3	27.3

**Table 2.** Primers showing polymorphism in RAPD analysis of *Ligularia* species. (Continued)

Primer	Sequence (5'-3')	No. of loci.		Polymorphism (%)
		total	polymorphism	
OPP 05	CCCCGGTAAC	12	2	16.7
OPP 06	GTGGGCTGAC	8	2	25.0
OPP 08	ACATCGCCCA	6	2	33.3
OPP 09	GTGGTCCGCA	8	1	12.5
OPP 10	TCCCGCCTAC	10	2	20.0
OPP 12	AAGGGCGAGT	6	2	33.3
OPP 16	CCAAGCTGCC	6	2	33.3
OPP 17	TGACCCGCCT	6	1	16.7
OPQ 09	GGCTAACCGA	8	2	25.0
OPQ 11	TCTCCGAAC	8	1	12.5
OPQ 12	AGTAGGGCAC	9	1	11.1
OPQ 15	GGGTAACGTG	8	1	12.5
OPQ 16	AGTGCAGCCA	8	1	12.5
OPQ 17	GAAGCCCTTG	4	2	50.0
OPQ 18	AGGCTGGGTG	8	4	50.0
OPV 01	TGACGCATGG	3	1	33.3
OPV 02	AGTCACTCCC	6	4	66.7
OPV 03	CTCCCTGCAA	8	3	37.5
OPV 07	GAAGCCAGCC	7	5	71.4
OPW 01	CTCAGTGTCC	6	2	33.3
OPW 04	CAGAAGCGGA	5	1	20.0
OPW 09	GTGACCGAGT	7	1	14.3



**Fig. 2.** Dendrogram showing the genetic relationships of 16 *Ligularia* collections. The characters besides the bars indicate the cluster group, and the numbers are shown in Table 1.

지 다양하게 나타났다.

Fritsch 등(1993)은 primer에 구아닌(G)과 시토신(C)의 함량이 PCR 증폭에 많은 영향을 미친다고 보고 하였는데, 본 연구에서 증폭된 primer에서는 G와 C의 함량이 60%로 높았다. Random primer를 이용한 증폭방법은 중간 분류 또는 종내 분류에 있어서 적은 양의 DNA를 가지고도 많은 양의 증폭된 DNA를 얻어낼 수 있고, 경제적이라는 장점을 가지고 있지만 종 사이에서 보여지는 상동성과 실험의 재현성에 문제가 있는 것으로 알려져 있는데(Williams 등, 1993), 곰취 속 종류의 경우 196개의 primer를 사용했음에도 불구하고 뚜렷한 재현성을 보이는 primer는 63개(32.1%)로 비교적 낮게 나타났다.

다형성을 나타낸 63개 primer를 이용하여 증폭된 141개 밴드를 이용하여 유사도 값을 구하고 이를 근거로 UPGMA 법에 따라 유집 분석을 실시한 결과는 Fig. 2와 같다. 수집된 5종의 16개체의 유사도 값은 0.54-0.95의 범위였으며, 크게 5개의 그룹으로 유집되었다(Fig. 2). 우리나라의 제주도에서만 자라고 형태적으로도 꽃차례와 꽃줄기에 포(苞)가 없어 다른 종류와 뚜렷하게 구별되는 갯취는 나머지 4종류와는 가장 멀리 분계조를 형성하여 유전적으로 거리가 멀게 나타났으며, 곰취의 변종인 한대리곰취의 3개체도 독립된 군을 형성하였다. 어리곤달비는 곰취와 곤달비 군(clade)을 위한 자매군을 형성하였으며, 곰취 8개체와 곤달비 3개체도 잘 유집되어 RAPD에 의해서는 5종류 모두가 뚜렷하게 구별되는 경향을 보였다. 특히 곤달비의 경우는 3개체의 유사도가 0.92 정도로 매우 높게 나타나 개체변이가 가장 적은 종류로 나타났다. 곰취에 비해 꽃차례가 수상화서(穗狀花序)를 형성하며 잎 뒷면이 막질(膜質)이 아닌 특징을 가진 한대리곰취는 대관령이나 진부지역에서는 넘취라고 불리기도 하는데, 곰취에 비해 쓴맛이 강하므로 씹으로는 이용하지 못하고 주로 목나물로 사용된다. 곰취로 불리는 한라산 수집종은 형태적으로 한대리곰취와 매우 비슷하여 두 종류를 혼동하여 사용하기도 하는데, 본 실험 결과 이 수집종은 한대리곰취와 유집되었으며 두 종류는 뚜렷하게 독립적인 분계조를 형성하였고, 유사도 값도 모종인 곰취와는 차이가 있었다.

### ITS 염기서열 분석

곰취 속 식물 5종에 대한 ITS 지역의 염기서열 분석 및 alignment 결과는 Fig. 3과 4에 나타내었다. 곰취의 6종(대관령, 영월, 정선, 태기산, 거제, 거창, 백두산)과 한대리곰취의 3종(대관령, 용산, 한라산)에 대한 ITS 지역의 염기서열 분석 결과, 지역 수집 개체 내에서는 염기서열내의 변이가 없어(data 미제시) 곰취와 한대리곰취는 대관령 지역에서 수

집한 것을 ITS 지역 염기서열 분석에 이용하였다.

ITS 지역의 염기서열 분석 결과 ITS 1과 2는 각각 248-256 bp, 220-222bp의 범위로 ITS 1이 ITS 2보다 길게 나타났으며, 5.8S는 모두 164bp로 변이가 없었다(Table 3). 전체적으로는 한대리곰취, 어리곤달비와 곤달비가 642bp로 가장 길었으며, 곰취는 640bp, 그리고 갯취는 633bp로 가장 짧았다. Baldwin 등(1995)의 보고에 의하면, 여러 피자식물의 ITS 1 지역의 길이는 187-298bp, ITS 2 지역은 187-252bp 정도를 나타낸다고 하였으며, 본 실험 결과도 이 범위 안에 포함되었다. 또한 이러한 결과는 국화과의 다른 분류군에 의한 결과와도 일치하였다(Kim과 Jansen, 1994).

염기조성 중 G+C의 함량은 ITS 1과 2가 각각 평균 49.4%와 53.5%로 ITS 2가 약간 더 높았다(Table 3). Shin 등(2003)은 DNA 변성과 같은 상황에서 3중 수소결합인 구아닌(G)과 시토신(C) 비율이 높은 것은 환경변화에 비교적 안정도가 높을 것이라고 보고하였는데, 본 연구에서는 약 50% 정도로 나타나 중간 정도의 값을 가졌다(Table 3).

염기서열에서 관찰된 in/del은 모두 14곳 이었으며, 대부분은 1bp의 크기였으나 갯취는 ITS 1 지역에서 10bp의 deletion 부분이 확인되었다(Fig. 3). 염기서열의 변이는 군내군(ingroup)에서는 0.95-4.95%였으며, 군외군을 포함해서는 0.95-7.76%로 나타났다. 정렬된 총 646bp 중 581bp는 변화가 없고, 65bp에서 변화가 있었으며, 그 중 13bp는 계통학적으로 유용한 공유파생형질(synapomorphic change)이었다.

군외군을 포함한 ITS 염기서열의 최대절약분석 결과는 Fig. 5와 같다. 그 결과 5종류는 단계통을 형성하였으며, 갯취는 46개의 공유파생형질을 가지고 군외군으로부터 가장 먼저 분계조를 형성하였다. 나머지 4종류는 93%의 높은 bootstrap 지지도를 가지며 2개의 소그룹을 형성하였다. 즉, 한대리곰취와 어리곤달비는 8개의 공유파생형질과 79%의 지지율을 가지고 유집되었으며, 곰취와 곤달비도 8개의 공유파생형질을 가지고 유집되었지만 지지도는 52%로 낮았다(Fig. 5). 갯취는 RAPD분석에서 가장 기부에 분계조를 형성하였는데 ITS 분석에서도 군외군으로부터 가장 먼저 분기되어 일치하는 결과를 보였다. 어리곤달비는 본 연구에서 다른 나머지 종류와는 달리 잎이 삼각상 피침형(Kim, 2007)이어서 형태적으로도 구별되는데, ITS 결과에서는 한대리곰취와 분계조를 형성하여 곰취와 곤달비 군(clade)을 위한 자매군을 형성하였던 RAPD 분석 결과와는 차이가 있었다. 곰취는 곤달비에 비해 잎의 밑부분이 심장모양이고 총포(總苞)는 종형(鐘形)으로 크고 포린(苞鱗)이 8-9개 이다(Kim, 2007). 그러나 ITS분석에서는 두 종류가 함께 분계조를 형성하였고 RAPD 분석에서도 0.68정도의 유사도 값을 가지고 유집

되었다. 이상에서 RAPD와 ITS 분석 결과는 거의 일치하는 경향을 보였지만 한대리곰취의 분류학적 위치는 형태적으로 유사한 곰취와는 전혀 다르게 유집되는 차이를 보였다.

작물의 품종 개량을 위한 교배 양친 선발은 육종과정에서 제일 먼저 고려할 사항이다. 본 연구에서 곰취의 품종 개량

을 위해 수집된 곰취 속의 유연관계 분석 결과 지역별 차이는 크지 않았는데, 특히 대관령과 영월지역에서 수집된 곰취는 유전적으로 매우 유사하여 교배 양친으로 선발하기 어려웠다. 또한 한대리곰취는 강원도 지역에서 재배되고 묵나물로 많이 이용되는 산채자원으로서 본 시험결과 곤달비와

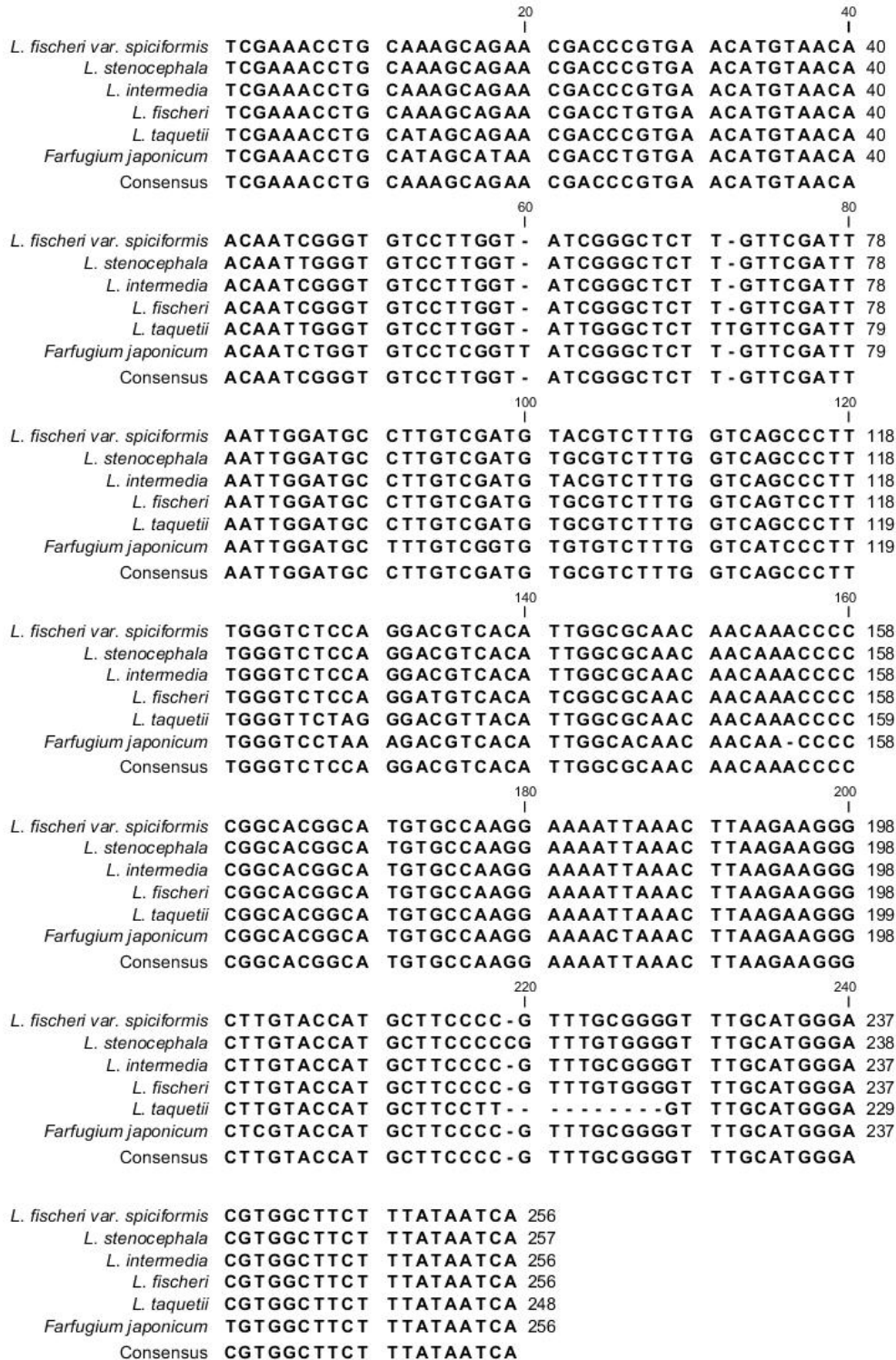


Fig. 3. DNA sequences of ITS1 regions of *Ligularia* species. *Farfugium japonicum* (AY176139) was used as outgroup.

20 | 40

*L. fischeri* var. *spiciformis* ATCGCGTCGC TCCCACCACG CCTCCTCGAC GGGG - ATGCT 39  
*L. stenocephala* ATCGCGTCGC TCCCACCACG CCTCCTCGAT GCGG - ATGCT 39  
*L. intermedia* ATCGCGTCGC TCCCACCATG CCTCCTCGAT GGGG - ATGCT 39  
*L. fischeri* ATCGCGTCGC TCCCACCACG CCTCCTCGAT GGGG - ATGCT 39  
*L. taquetii* ATCGCGTCGC TCCCACCACG CCTCTTCGAT GGGGGATGCT 40  
*Farfugium japonicum* ATCACGTCGT CCTCACCACG CCTCCTCGAT GGGG - ATGCT 39  
Consensus ATCGCGTCGC TCCCACCACG CCTCCTCGAT GGGG - ATGCT

60 | 80

*L. fischeri* var. *spiciformis* TGGATGTGGG CGGAGATTGG TCTCCCGTTC CCTATGGTGC 79  
*L. stenocephala* TGGATGTGGG CGGAGATTGG TCTCCCGTTC C - TATGGTGC 78  
*L. intermedia* TGGATGTGGG CGGAGATTGG TCTCCCGTTC CCTATGGTGC 79  
*L. fischeri* TGGATGTGGG CGGAGATTGG TCTCCCGTTC C - TATGGTGC 78  
*L. taquetii* TGGATGTGGG CGGATATTGG TCTCCCGTTC C - TATGGTGC 79  
*Farfugium japonicum* TGGATGCGGG CGGAGATTGG TCTCCCGTTC T - TATGGTGC 78  
Consensus TGGATGTGGG CGGAGATTGG TCTCCCGTTC C - TATGGTGC

100 | 120

*L. fischeri* var. *spiciformis* GGTTGGCTAA AATAGGAGTC CCCTTCGACG GACGCACGAT 119  
*L. stenocephala* GGTTGGCTAA AACAGGAGTC CCCTTCGACG GACGCACGAT 118  
*L. intermedia* GGTTGGCTAA AATTGGAGTC CCCTTCGACG GACGCACGAT 119  
*L. fischeri* GGTTGGCTAA AACAGGAG - C CCCTTCGACG GACGCATGAT 117  
*L. taquetii* GGTTGGCTAA AATAAGAGTC CCCTTCGACG GACGCATGAT 119  
*Farfugium japonicum* GGTTGGCTAA AACATGAGTC CCCTTCGACG GACGCATGAT 118  
Consensus GGTTGGCTAA AANAGGAGTC CCCTTCGACG GACGCANGAT

140 | 160

*L. fischeri* var. *spiciformis* TAGTGGTGGT TGACAAGACC CTCTTATCAA GTTGTGCGTT 159  
*L. stenocephala* TAGTGGTGGT TGACAAGACC CTCTTATCAA GTTGTGCGTT 158  
*L. intermedia* TAGTGGTGGT TGACAAGACC CTCTTATCAA GTTGTGCGTT 159  
*L. fischeri* TAGTGGTGGT TGACAAGACC CTCTTCTCAA GTTGTGCGTT 157  
*L. taquetii* TAGTGGTGGT TGACAA - ACC CTCTTATGAA GTTGTGCGTT 158  
*Farfugium japonicum* TAGTGGTGGT TGACAAGACC TTCTTATCAA GTTGTGCGTT 158  
Consensus TAGTGGTGGT TGACAAGACC CTCTTATCAA GTTGTGCGTT

180 | 200

*L. fischeri* var. *spiciformis* CTAAGGAGTA AGGAATATCT CTTCAATGAC CCCAATGTGT 199  
*L. stenocephala* CTAAGGAGTA AGGAATATCT CTTCAATGAC CCCAATGTGT 198  
*L. intermedia* CTAAGGAGTA AGGAAGATCT CTTCAATGAC CCCAATGTGT 199  
*L. fischeri* CTAAGGAGTA AGGAATATCT CTTCAATGAC CCCAATGTGT 197  
*L. taquetii* CTAAGGAGCA AGGAATATCT CTTAATGAC CCCAATGTGT 198  
*Farfugium japonicum* CTAAGGAGTA AGGAAGATCT CTTCAATTAC CCCAATGTGT 198  
Consensus CTAAGGAGTA AGGAATATCT CTTCAATGAC CCCAATGTGT

220

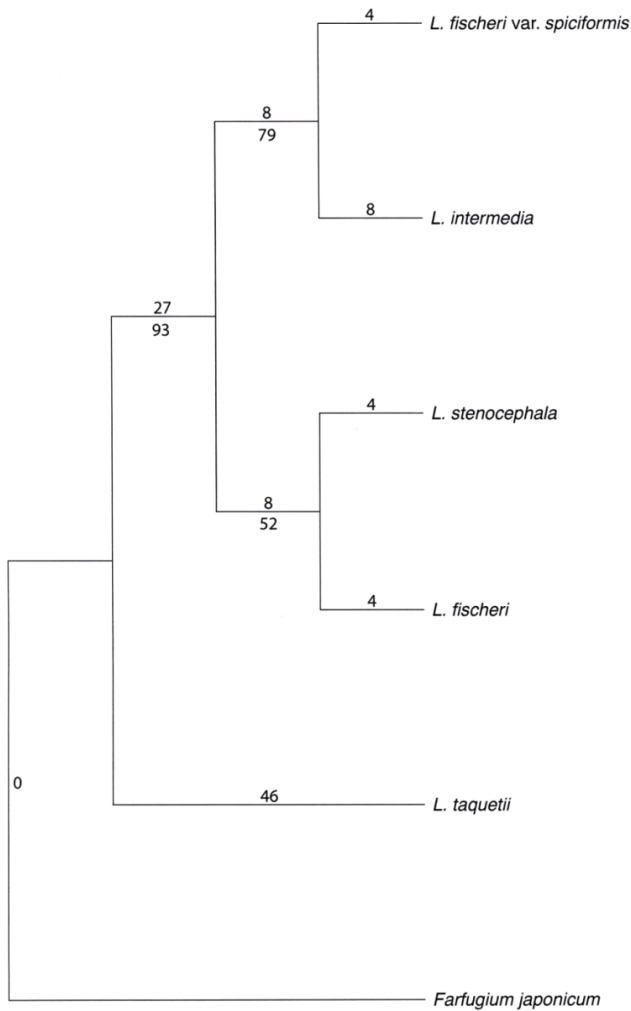
*L. fischeri* var. *spiciformis* CGTCCTGTGA CGATGCTTCG ACC 222  
*L. stenocephala* CGTCCTGTGA CGATGCTTCG ACC 221  
*L. intermedia* CGTCCTGTGA CGATGCTTCG ACC 222  
*L. fischeri* CGTCCTGTGA CGATGCTTCG ACC 220  
*L. taquetii* CGTCTTGTGA CGATGCTTCG ATC 221  
*Farfugium japonicum* CGTCTTGTGA CGATGTTTCG ACT 221  
Consensus CGTCCTGTGA CGATGCTTCG ACC

**Fig. 4.** DNA sequences of ITS2 regions of *Ligularia* species. *Farfugium japonicum* (AY176139) was used as outgroup.

**Table 3.** Sequence characteristics of ITS 1 and ITS 2 regions in *Ligularia* 5 species.

Species	ITS 1		5.8S	ITS 2	
	Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	Length (bp)	G+C (%)
<i>L. fischeri</i>	256	49.6	164	220	54.5
<i>L. stenocephala</i>	257	49.8	164	221	54.3
<i>L. fischeri</i> var. <i>spiciformis</i>	256	50.0	164	222	54.5
<i>L. intermedia</i>	256	50.0	164	222	53.6
<i>L. taquetii</i>	248	47.5	164	221	50.7





**Fig. 5.** Tree of *Ligularia* based on the ITS data set (71 steps, CI=0.930, RI=0.667). Branch lengths are shown above the lines, and the bootstrap values greater than 50% replicates are below the lines.

어리곤달비가 곰취와 유전적 유사도가 가까워 잎의 형태와 같은 양적형질의 개량에도 이용이 가능하겠으나 교배화합성, 염색체 관찰 등을 통하여 두 분류군의 관계를 명확히 할 필요가 있을 것으로 판단된다.

## 초 록

RAPD와 ITS 염기서열 분석을 통하여 *Ligularia* 속 식물 5종류의 유연관계를 밝혔다. RAPD 분석에서는 총 196개의 random primer를 사용하여 밴드수가 많고 선명한 63개의 primer를 선발하였다. 다형성을 나타낸 밴드는 141개(31.8%)이었으며, 증폭된 크기는 0.2-1.6kb로 다양하였다. 유집 분석 결과, 유사도 값은 0.54-0.95의 범위로 나타났고, 0.77을 기준으로 크게 5그룹으로 나누었다. ITS 영역의 염기서열 분석 결과, ITS 1과 ITS 2 지역은 각각 248-256bp와, 220-222bp

로 구성되어 있으며, 5.8S 부분은 164bp로 나타났다. ITS 1과 ITS 2 지역의 총 478개의 염기 중 49(10.2%)군데에서 변이가 있었으며, 구아닌(G)과 시토신(C)의 비율은 ITS 1 지역에서 49.4%, ITS 2에서는 53.5%로 나타났다. 염기서열 분석결과 5종류는 단계통을 형성하였으며, 갯취는 균외균으로 부터 가장 먼저 분계조를 형성하였다. 한대리곰취와 어리곤달비는 79%의 지지율을 가지고 유집되었으며, 곰취와 곤달비도 함께 유집되었지만 지지도는 52%로 낮았다. 이상의 결과에서 두 데이터는 일치하는 결과를 보였지만 한대리곰취의 분류학적 위치는 RAPD와 ITS 분석결과가 일치하지 않았다.

**추가 주요어 :** 유집분석, Internal Transcribed Spacer, 다형성

## 인용문헌

- Álvarez, I. and J.F. Wendel. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenetics Evol.* 29:417-434.
- Baldwin, B.G., M.J. Sanderson, J.M. Porter, M.F. Wojciechowski, C.S. Campbell, and M.J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Botanical Garden* 82:247-277.
- Cho, Y.O. 2002. Antioxidative activity of the Korean wild leafy vegetables: Aster scaber and *Ligularia fischeri*. *Nutraceuticals & Food*. 7:146-150.
- Choi, E.M., Y. Ding, H.T. Nguyen, S.H. Park, and Y.H. Kim. 2007. Antioxidant activity of Gomchi (*Ligularia fischeri*) leaves. *Food Sci. Biotechnol.* 16:710-714.
- David, V.J. and L.B. Thien. 1997. A conserved motif in the 5.8S ribosomal RNA (rRNA) gene is a useful diagnostic marker for plant internal transcribed spacer (ITS) sequences. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15:326-334.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:789-791.
- Fritsch, P., M.A. Hanson, C.D. Spore, and P.E. Pack. 1993. Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11:10-20.
- Ham, S.S., S.Y. Lee, D.H. Oh, S.W. Jung, S.H. Kim, C.K. Chung, and I.J. Kang. 1998. Antimutagenic and antigenotoxic effects of *Ligularia fischeri* extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 27:745-750.
- In, J.G., B.S. Lee, E.J. Kim, K.S. Choi, S.H. Han, C.W. Shin, and D.C. Yang. 2006. Analysis of the ITS (Internal Transcribed Spacer) region of *Opuntia ficus-indica*. *Kor. J. Plant Res.* 19:161-168.
- Kapteyn, J., and J.E. Simon. 2002. The use of RAPDs for assessment of identity, diversity, and quality of *Echinacea*. p. 509-513. In: Trends in new crops and new uses. J. Janick, and A. Whipkey (eds.). ASHS Press, Alexandria, VA.
- Kim, K.J. 2007. Tribe Senecioneae, In The genera of vascular plants of Korea. C. W. Park (eds.), Academy Publ. Co., Seoul.

- P. 1033-1034.
- Kim, J.K. and R.K. Jansen. 1994. Comparisons of phylogenetic hypotheses among different data sets in dwarf dandelions (*Krigia*): Additional information from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Pl. Syst. Evol.* 190:157-185.
- Kwon, Y.J., K.H. Kim, and H.K. Kim. 2002. Changes of total polyphenol content and activity of *Ligularia fischeri* extracts with different microwave-assisted extraction conditions. *Kor. J. Food Preserv.* 9:332-337.
- Lee, K.T., S.J. Koo, S.H. Jung, J. Cho, H.J. Jung, and H.J. Park. 2002. Structure of three new terpenoids, spiciformisins a and b, and monocycloqualene, isolated from the herbs of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* and cytotoxicity. *Arch. Pharm. Res.* 25:820-823.
- Lee, S.W. and J.H. Kim. 2003. Genetic relationship analysis of melons (*Cucumis melo*) germplasm by RAPD method. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 44:307-313.
- Liu, J.Q., Y. Wang, A. Wang, O. Hederik, and A. Richard. 2006. Radiation and diversification of *Ligularia-Cremanthodium-Parasenecio* triggered by uplifts of the Qinghai-Tibetan Plateau. *Molec. Phylogenetics Evol.* 38:31-49.
- Liu, J.Q. 2004. Uniformity of karyotypes of *Ligularia* (Asteraceae: Senecioneae), a highly diversified genus of the eastern Qinghai-Tibet Plateau highlands and adjacent areas. *Botanical J. Linnean Soc.* 144:329-342.
- Murray, M.G., and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8:4321-4325.
- Na, Y., J.H. Kim, K.S. Sim, B.C. Lee, and H.B. Pyo. 2006. Effects of antioxidation and inhibition of matrix metalloproteinase-1 from *Ligularia fischeri*. *J. Soc. Cosmet. Scientists Kor.* 32: 129-134.
- Nagano, H., Y. Iwazaki, X. Gong, Y. Shen, C. Kuroda, and R. Hanai. 2006. Chemical and genetic differentiation of *Ligularia pleurocaulis* in northwestern Yunnan and southwestern Sichuan provinces of China. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 79:300-304.
- Park, H.J. and M.Y. Choi. 2007. Antinociceptive effects of 3,4-Dicaffeoyl Quinic acid of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis*. *Kor. J. Plant Res.* 20:221-225.
- Russell, J.R., J.D. Fuller, M. Macaulay, B.G. Hatz, A. Jahoor, W. Powell, and R. Waugh. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* 95:714-722.
- Shin, S.K., J.S. Yun, T. Yun, and W.K. Sim. 2003. Taxonomic relationship of Lotus (*Nelumbo nucifera*) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 44:451-457.
- Swofford, D.L. 1998. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods. Version 4.02b Sinauer Asso. Inc., Massachusetts, USA.
- Tatineni, V., R.G. Cantrell, and D.D. Davis. 1996. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. *Crop Sci.* 36:186-192.
- Whang, S.S. 2006. Analysis of ITS DNA sequences of the *Viola albida* complex. *Kor. J. Plant Res.* 19:628-633.
- Williams, J.G.K., A.R.K. Kubelik, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Williams, J.G.K., M.K. Hanafey, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Meth. Enzymol.* 218:704-740.
- Yoo, K.O., S.D. Ahn, I.J. Chun, J.K. Hong, C.Y. Yoo, J.H. Kim, S.C. Kim, and H.T. Lim. 1996. Comparative studies of the five edible mountain vegetables by DNA marker fingerprinting. *Kor. J. Plant Res.* 9:305-310.