

韓國과 日本에 自生하는 더덕의 Isozyme 變異에 關한 基礎學的 研究

金木 良三¹⁾, 朴相龍²⁾, 種村 淳²⁾, 李相來³⁾, 李良洙⁴⁾

1) 東京農業大學 作物學研究室

2) 東京農業大學 育種學研究室

3) 東洋資源植物研究所

4) 順天大學

Estimations of naturally *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. fil. polymorphic variations are zone in Korea and Japan

Yoshizo Kaneki¹⁾, Sang Yong Park²⁾, Jun Tanemura²⁾,
Sang Rea Lee³⁾, Yang Soo Lee⁴⁾

- 1) *Tokyo University of Agriculture*, 1-1-1 sakuraoka, Setagaya, tokyo, 156, Japan.
- 2) *Tokyo University of Agriculture, Lab. of Breed*, 1-1-1 sakuraoka, Setagaya, tokyo, 156, Japan.
- 3) *Institutue of Oriental Botanical Resources*, Bukgajwa-dong 307-33, Seodaemun-ku, Seoul Korea.
- 4) *Sunchun National University, Dept. of Agriculture Education*

Abstract

The present note describes that polymorphic isoelectrophoretic variation in leaves of the *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. fil. 4 enzymes

within variety of the zone in Korea and Japan.

1. Detected in common bands were NDH-2, Alp-4, -5, -7, -10 and Lap-2.
2. Detected only NDH-1, -3, Est-14, Alp-8 and -9 were area in Korea.
3. Detected only Est-3, -4, -8, -9, -11, -12, -16 and Alp-3 were zone in Japan.
4. The results 2 and 3 makes are clearly application to geographical characterlizations.

緒 言

Campanulacea 科에 屬하는 더덕 (*Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. fil.) 은 多年生 蔓性植物로서 주로 深山의 腐植質이 豊富한 砂質土壤에서 서식하며, 種子 繁殖을 하는 것으로 한반도 全域, 中國의 北部 및 日本地域에 分布되어 있다.⁹⁾ 藥用人參과 같이 主成分이 Saponin이며, 炭水化物·Vitamin B₁, B₂·蛋白質 等の 榮養成分이 多量 含有되어 있어, 藥用植物로서, 清熱解毒·祛痰排膿·養陰潤肺·抗癌 等の 藥理作用에 利用價値가 높이 評價되어 있다.

그러나, 더덕의 植物分類學上 品種群의 分類와 栽培·交配試驗에 關한 諸研究 및 生化學的 研究가 事實상 거의 報告되어 있지 않은 실정이다.

Isozyme 은 本來, 基質特異性을 같이 하는 酵素種의 分子多型을 意味하는 것으로, 現在, 國際酵素委員會 (Enzyme Committee, EC로 略稱)에 登錄되어 있는 酵素種은 約 3,000여종으로, 대부분이 動物 및 微生物에서 發見된 것으로, Zymogram

화된 Isozyme 은 全體적으로 130種을 넘지 않고, 植物에 있어서도 60種前後로 報告되어 있다.¹⁾ 더덕에 關한 Isozyme 研究는 尹등 (1988)⁸⁾에 의하여 韓國의 7自生種 및 日本의 3自生種의 報告가 있으나, 供試材料가 적은 이유로 地域間 變異分析에 이르지 못하는 못하였다.

本 研究는 韓國과 日本地域의 自生 더덕을 等電點電氣泳動法을 利用하여, Isozyme banding pattern을 檢討하여 더덕의 地域間 變異分析에 關한 基礎學的 研究를 目的으로, 若干의 知見을 얻었기에 報告한다.

材料 및 方法

東京農業大學 作物學研究室의 研究圃場에서 栽培試驗中의 韓國의 9自生種과 1個體의 栽培種 및 日本의 5自生種 (Table 1)의 잎을 供試하였다.

材料는 잎의 發生位置別로 採集하여 酵素蛋白質의 變異의 程度가 比較的 安定된 最上端의 新鮮한 잎을 使用하였다. 採集된 잎은 蒸留水로 2~3回 洗淨한 後, Homogenizer에 液體窒素 (-196°C)를 適

Table 1. Collection data for samples of *Codonopsis lanceolata* examined electrophoretically

| | | |
|-------|----------|-----------------------|
| KOREA | 茂 豊 | Mu Poong |
| | 白雲山 | Back Un San |
| | 茂 朱(自生種) | Mu Joo (Wild Type) |
| | 茂 朱(栽培種) | Mu Joo (Cultivar) |
| | 平 昌 | Pyung Chang |
| | 珍 島 | Chin Do |
| | 俗離山 | Sok Ri San |
| | 洪 川 | Hong Chun |
| | 智異山 | Chi Ri San |
| JAPAN | 德積島 | Duck Chuck Do |
| | 富 山 | Toyama |
| | 北海道 | Hokkaido |
| | 秋 田 | Akita |
| | 德 島 | Tokusima |
| | 筑 波 | Tsukuba |

量부어 破碎한 Sample을 Micro tube에 옮긴 다음 buffer(100 mM Mops, 0.05M EDTA(Na_2), 50mM β -Mercaptoethanol, 1% PVP(40))를 넣어(W/W), 시험관 Mixer로 完全混合하여 4 °C에서 15,000 rpm으로 30分間 遠心分離한 上清液을 2 × 8 mm의 濾過紙(Whatman No.2)에 抽出液을 吸收시켰다.4)5) 分畫酵素는 -20 °C에 各各 保存하였다.

電氣泳動法은 Saravis *et al*(1979)6)

의 報告에 準據한 平坂簿層 Agarose 等 電點電氣泳動法이며, 泳動用 Gel은 0.83% D-Sorbitol 및 0.05% Agarose-IEF(Pharmacia社)를 27 ml의 蒸留水에 完全溶解 後, 65 °C에서 兩性擔體(Ampholine, pH 3.5-10; LKB社)를 1 ml 混合하여 127 × 245 mm의 Gel Bond film 上에 展差시켜 4 °C에서 20分間 Gel 化시켰다.4) Power supply는 800V(5分間) 및 1,000V(60分間)에서 計 65分間 泳動하였으며, 電極液은 十極側에 0.85%의 H_3PO_4 를 포함한 30% Sucrose液을, 一極側에는 1%의 EDTA(Na_2)를 使用하였다.

染色液의 組成¹⁾²⁾⁷⁾은 Table 2와 같으며 檢出된 Zymogram의 pH로 各band의 位置를 確認한 後, 一部の 再現性이 없는 band를 分析에서 除外하고, 알칼리側에서부터 Zymogram No.를 命名하였다.

結果 및 考察

1. NDH

Fig.1에 表示하는 것과 같이 pH 5.0~6.0 사이에서 全部 3개의 band가 檢出되었다. NDH-1은 俗離山과 德積島에서, NDH-2는 band의 濃淡의 差는 있지만 全品種에서 보였으며, NDH-3은 白雲山, 珍島 및 洪川地域의 것에서 檢出되었다.

Table 2. Staining Recipes for four enzymes used.

| Enzymes | Recipe | |
|---|--|--------------------------------------|
| NDH (E.C.1.6.99) | Tris-HCl 0.1M , pH8.5 MTT NADH Phenolindo-2,6-dichlorophenol | 100ml 15mg 20mg 5ml |
| Incubate the gel at 25°C for 2 hours. | | |
| α -Est (E.C.3.1.1.1) | A: α -Naphthyl Acetate(in 0.5ml Acetone) Na Phosphate 0.1M , pH7.0 B: Fast Blue BB Salt Na Phosphate 0.1M , pH7.0 | 9mg 50ml 100mg 50ml |
| Incubate the gel in solution A at 37°C for 15 mins and adding solution B at room temperature for 1hour in the dark. | | |
| Alp (E.C.3.1.3.1) | Tris-HCl 50mM , pH8.5 MgCl ₂ 6H ₂ O 1M MnCl ₂ 1M Na β -Naphthyl phosphate 1%(in 50% Acetone) Fast Blue BB, Salt | 100ml 1ml 1ml 3ml 100mg |
| Incubate the gel at 25°C for 1 hour in the dark. | | |
| Lap (E.C.3.4.1.1) | A: L-Leucyl- β -Naphthylamide Hydrochloride Sodium Acetate 0.5M , pH5.0 Distilled Water B: Fast Black K, Salt Distilled Water | 88mg 25ml 25ml 20mg 50ml |
| Incubate the gel in solution A at 37°C for 10 mins and adding solution B for 3hour. | | |

Table 3. Polymorphic variants are revealed Agarose gel electrophoresis in C. lanceolata

| No. of Isozyme | No. of Isozyme | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|----------------|-------------|--------------------|-------------------|-------------|---------|------------|-----------|------------|---------------|--------|----------|-------|-----------|---------|
| | Mu Poong | Back Un San | Mu Joo (Wild Type) | Mu Joo (Cultivar) | Pyung Chang | Chin Do | Sok Ri San | Hong Chun | Chi Ri San | Duck Chuck Do | Toyama | Hokkaido | Akita | Tokushima | Isukuba |
| NDH | 1 | | | | | | + | | | + | | | | | |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 3 | | + | | | | | + | | | | | | | |
| α -Est | 1 | | | | | | + | | + | + | + | | + | + | |
| | 2 | | | | | | | | + | | | | + | + | |
| | 3 | | | | | | | | | | | | + | + | |
| | 4 | | | | | | | | | | | + | | | |
| | 5 | | | + | + | + | + | + | + | + | | + | | | |
| | 6 | | | + | | | | | + | | | + | + | | + |
| | 7 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | + | |
| | 8 | | | | | | | | | | + | + | | | |
| | 9 | | | | | | | | | | | + | + | | + |
| | 10 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| | 11 | | | | | | | | | | + | + | + | + | |
| | 12 | | | | | | | | | | | | | + | |
| | 13 | | | | | | | + | | + | + | + | | + | |
| | 14 | | | | | | + | + | | | | | | | |
| | 15 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | | | | |
| | 16 | | | | | | | | | | | | | + | + |
| | 17 | | + | + | + | | + | + | | + | + | + | + | | |
| Alp | 1 | + | + | + | + | + | + | + | | | | | + | | + |
| | 2 | + | | + | + | | + | | + | | | + | + | | + |
| | 3 | + | + | + | + | | + | | + | + | + | + | + | + | + |
| | 4 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 6 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 7 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 8 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 9 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 10 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Lap | 1 | | | | | | | | | + | | | | | + |
| | 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 3 | + | + | + | | + | + | | + | | + | | + | | |

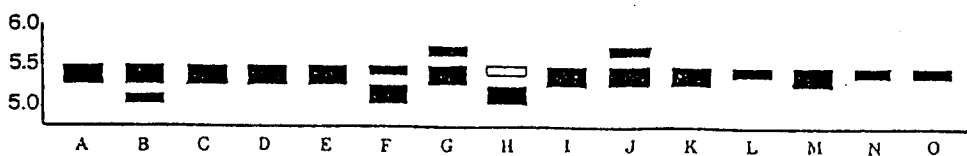


Fig 1. Electrophoretic patterns of NDH in C. lanceolata
 A.Mupoong B.Backunsan C.Mujoo(Wild tape) D.Mujoo(Cultivar)
 E.Pyungchang F.Chindo G.Sokrisan H.Hongchun I.Chirisan
 J.Duckchuckdo K.Toyama L.Hokkaido M.Akita N.Tokusima O.Tsukuba

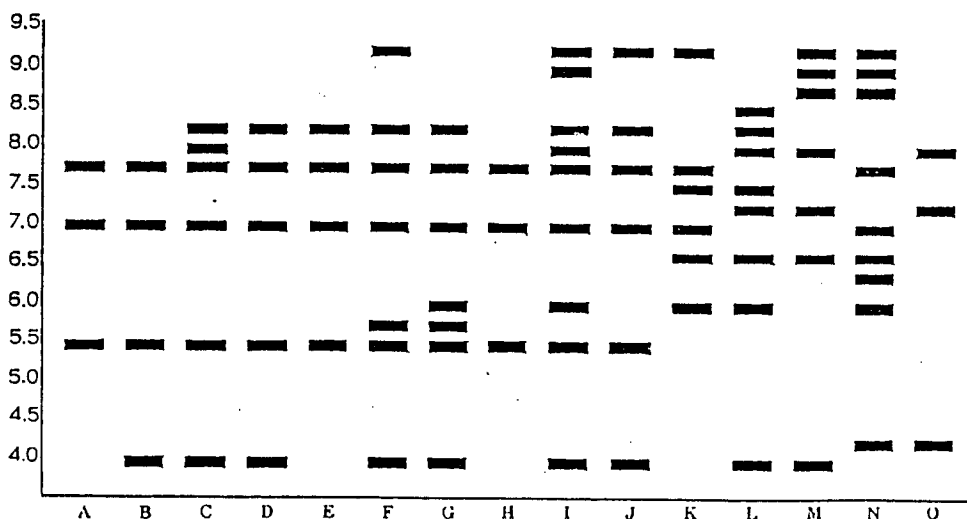


Fig 2. Electrophoretic patterns of α -Est in C. lanceolata
 A.Mupoong B.Backunsan C.Mujoo(Wild tape) D.Mujoo(Cultivar)
 E.Pyungchang F.Chindo G.Sokrisan H.Hongchun I.Chirisan
 J.Duckchuckdo K.Toyama L.Hokkaido M.Akita N.Tokusima O.Tsukuba

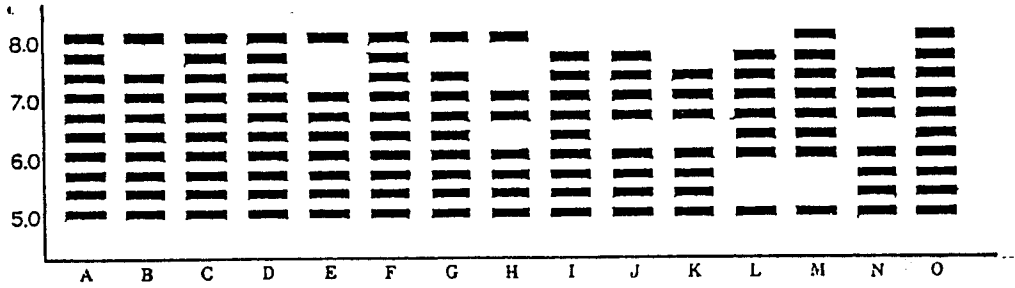


Fig 3. Electrophoretic patterns of β -Alp in *C. lanceolata*
 A.Mupoong B.Backunsan C.Mujoo(Wild tape) D.Mujoo(Cultivar)
 E.Pyungchang F.Chindo G.Sokrisan H.Hongchun I.Chirisan
 J.Duckchuckdo K.Toyama L.Hokkaido M.Akita N.Tokusima O.Tsukuba



Fig 4. Electrophoretic patterns of Lap in *C. lanceolata*
 A.Mupoong B.Backunsan C.Mujoo(Wild tape) D.Mujoo(Cultivar)
 E.Pyungchang F.Chindo G.Sokrisan H.Hongchun I.Chirisan
 J.Duckchuckdo K.Toyama L.Hokkaido M.Akita N.Tokusima O.Tsukuba

2. α -Est

pH 4.0 ~ 9.5 사이에 全部 17개의 band가 檢出되었다.(Fig.2)

韓國地域의 10種에 한하여 Est-7, -10 및 -15가 共通 band로 보여졌고, Est-14는 韓國地域의 것에서만, Est-3, -4, -8, -9, -11, -12 및 -16은 日本地域의 것에서 檢出되었으며, 以外の band는 各各 多型으로 보여졌다.

Est-7, -10 및 -15는 茂豊 및 洪川에서, Est-6 및 -9는 日本의 北海島・秋田 및 筑波가, Est-1, -2 및 -3은 徳積島 및 秋田가, Est-7 및 -10은 富山 및 徳島에서 共通되었다.

3. Alp

Fig.3에 表하는 것과 같이 pH 5.0 ~ 8.0 사이에 10개의 band가 檢出되었다.

Alp-4, -5, -7 및 -10의 band는 全品種에서 共通 band로 檢出되었고, Alp-8 및 -9는 韓國地域의 것에서만, Alp-3은 日本地域의 것에서만 共通 band로 檢出되었다. 茂豊·茂朱(自生種)·茂朱(栽培種)·珍島 및 筑波가 같은 band였고, 白雲山 및 俗離山이 같은 位置의 band로 檢出되었다.

4. Lap

Fig.4와 같이 pH 5.0~6.0사이에 3개의 band가 檢出되었다. Lap-1은 韓國의 德積島와 日本의 筑波에서, Lap-2는 全品種에서, Lap-3은 茂豊·白雲山·茂朱(野生種)·平昌·珍島·俗離山·智異山 및 日本의 富山에서 檢出되었다.

α -Est에서 尹등은 pH 3-9 사이의 14개의 band가 檢出된 것으로 報告하였으나, 本實驗의 結果, pH 4~9.5사이에 17개의 band가 檢出되었으며, 平昌·德積島 및 筑波의 경우에도 檢出된 band數가 달랐다. Alp에서는 平昌 및 筑波가 band의 位置가 달랐으며, Lap에서도 똑같은 差가 있었다. 이와같이 尹등의 報告와 本實驗의 差는, 植物의 器官 特異性에서 오는 것으로 判斷되었으며 1), α -Est와 같이 band數의 顯著한 差異는, Est가 一般的으로 幼組織에서 活性이 높은것으로 알려져 1) 尹등과의 band數의 差異가 說明된다.

以上の 結果를 Table 3을 通하여 分析해 볼때 NDH-2와 Alp-4, -5, -7 및

-10, Lap-2가 全供試材料에서 共通된 band로 檢出된 것은, 韓國과 日本地域에 自生하는 더덕의 認識 band로 생각되며, 韓國地域에서만 檢出된 NDH-1 및 -3, Est-14, Alp-8 및 -9와, 日本地域에서만 檢出된 Est-3, -4, -8, -9, -11, -12 및 -16과 Alp-3 등은 韓國과 日本地域에 自生하는 地域群의 特徵으로 여겨지며, 地域群의 判別에 活用할 수 있음이 시사된다. 今後 韓國과 日本地域에 分布되어 있는 더덕의 自生種을 多數 供試함으로서 本結果가 더욱 確實해 질것으로 생각된다.

要 約

本 研究는 韓國의 9自生種과 1個體의 栽培種 및 日本의 5自生種을 等電點電氣泳動法을 利用하여, 더덕의 地域間 多型分析에 關한 基礎學的 研究를 檢討한 것으로, 다음과 같은 知見을 얻었다.

1. NDH-2, Alp-4, -5, -7 및 -10, Lap-2는 全 供試材料에서 共通 band로 檢出되었다.
2. NDH-1 및 -3, Est-14, Alp-8 및-9가 韓國地域에서만 檢出되었다.
3. Est-3, -4, -8, -9, -11, -12 및 -16과 Alp-3은 日本地域에서만 檢出되었다.
4. 2와 3의 結果는 韓國과 日本地域에 自生하는 더덕의 地域群의 特徵으로 여겨졌으며, 地域群 判別에 活用할 수 있음이 시사되었다.

引用文獻

1. 青木幸一郎・永井 裕. 最新 電氣泳動法, 廣川書店.
2. GUNNAR NIELSEN and HANNE BAY JOHANSEN. Proposal for the identification of barley varieties based on the genotypes for 2 hordein and 39 isoenzyme loci of 47 reference varieties. *Euphytica* 35(1986) 717-728.
3. JINN LIH CHERN and TAIRA KATAYAMA. Genetic analysis and geographical distribution of acid phosphatase isozyme in cultivated rice, *Oryza sativa* L. *Jpn. J. Genet.*(1982) 57,143-153.
4. PARK, SANG YONG., K. IZUMI, C. TAKAGI, T. SOMEYA, Y. KIMIZUKA and M. YAMAMOTO. Genetic studies on the Isozyme Proteins in Radish. I. Detect of Isozyme. *Japan. J. Breed. Separate Vol* 39 (2), 1989.
5. PARK, SANG YONG., K. IZUMI, C. TAKAGI, T. SOMEYA, Y. KIMIZUKA and M. YAMAMOTO. Genetic studies on the Isozyme Proteins in Radish. II. Polymorphic in Isozyme. *Japan. J. Breed. Separate Vol* 39(2) 1989.
6. SARAVIS, C.A., M. O'BRIEN and N. ZAMCHECK, 1979. *J. of Immunol. Methods*, 29, 97-100.
7. TANKSLEY, S.D and T.J. ORTON. 1983. Isozyme, in *Plant Genetics and Breeding. Part A*, Elsevier Science Publishers, pp.469-516.
8. YOON, EUI SOO., SANG REA LEE, YANG SOO LEE. Estimation of Genetic Relationships and Characterization among *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. Fil. Geographical Variety by the Electrophoretic Patterns of Isozymes. *J. Oriental Bot. Res.* 1(1) 34-41(1988).
9. 中藥大辭典, 第2卷. 上海科學技術出版社 小學館編, 1985.