

국내외 수집 삼지구엽초의 형태적 특성 및 유연관계 분석

임정대¹·성은수¹·최강준²·김승경²·정일민³·허권¹·유창연^{1*}

Morphological characteristics and RAPD analysis of *Epimedium* spp.

Jung Dae Lim¹, Eun Soo Seong¹, Kwang Joon Choi², Seung Kyung Kim²
Ill Min Chung³, Kweon Heo¹, and Chang Yeon Yu^{1*}

ABSTRACT : Morphological characteristics of nine *Epimedium* spp was analyzed on the basis of six morphological characters. To analyse the genetic relationship among *Epimedium* spp., polymerase chain reaction (PCR) was performed with total genomic DNA of 17 *Epimedium* spp. by using random 8 primers. The genetic diversity and genetic distance among nine Korean collections, seven Japanese and one China collection were used to generate a dendrogram showing phylogenic relationship. Seventeen *Epimedium* spp were classified into two groups of group I and II, since they were divided into two major groups at the similarity coefficients value of 0.65. In addition, one of the two group, group I was divided into three sub-groups including *Epimedium koreanum*, Chul-won collections 1, 2, and 3, Yanggu, Hongchon, Hwachun, Chunchon, China, Maehwa (Japanese), *E. diphyllum* and *E. violaceum* (Japanese), while group II included Chulwon collection 4 and 5 and Japanese collection. The samples collected at Chulwon district showed close similarity with Japanese collection. Similarity indexes between collection and genetic relationship were related at the levels ranging from 0.6 to 0.9

Key words : *Epimedium* spp., RAPD, Genetic similarity

서 언

삼지구엽초는 매자나무과 *Berberidaceae*에 속하며 음양곽(淫羊藿) 등으로 불리며 강장, 항바이러스, 혈압강하, 이뇨, 건망증, 창종 등에 쓰이는데 주요성분은 Icarin, des-o-Methylcariin,

Magnoflorin이다. 식생활과 건강에 대한 중요성이 강조되면서 인체에 유익한 산채류 및 약용작물에 대한 관심이 증가하는 추세이며, 전초를 차 또는 한약재로 사용하며 요즘은 인삼, 오미자, 산약 등의 생약성분들을 가미해 건강식품으로 개발되기도 하여 소비량이 해마다 늘어나고 있는 실정이다. 야생 유용자원들의 무분별한 남획으로 말미암아 개체수

¹강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부 (Division of Applied Plant Science, College of Agriculture & Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea)

²철원특작시험장 (Cheolwon Industrial Crop Experiment Station)

³건국대학교 농업생명과학부 (College of Agriculture & Life Sciences, Konkuk University, Seoul, Korea)

* Corresponding author Tel : 0361-250-6474, Fax : 0361-242-6497 E-mail : cyyu@cc.kangwon.ac.kr

< 2000. 2. 10 접수 >

와 분포지가 줄어들고 있다. 옛부터 강장 및 강정제로 알려진 삼지구엽초는 환경부에 의해서 종의 보존 측면에서 보호해야 할 희귀 식물로 지정되기에 이르렀다(환경부, 1995). 삼지구엽초에 대한 연구로는 잎과 생육 특성을 비교한 것(경기도 농촌진흥원, 1995), 일부 지역에서의 자생지 식생 및 환경 특성 조사(Park et al., 1997; Park et al., 1998) 등이 있으며 일부 생약성분의 구명(Shin et al., 1996)과 몇 가지 재배기술 등 매우 미흡한 실정이며 자생지마다 많은 번이가 알려져 있음에도 불구하고 유연관계에 대한 분석도 국내 수집종만을 대상으로 수행되었다(Yoo et al., 1997). 식물의 유전자 분석에 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 이용한 RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA) 분석이 많이 사용되고 있으며 이것은 염기서열에 대한 정보 없이도 DNA의 다형 현상을 조사할 수 있으며(McGarvey & Karper 1991) 인위적으로 제조한 random-primer를 이용한 DNA 다형현상의 분석을 통해 유전적 marker를 쉽게 탐색할 수 있을 뿐 아니라(Williams et al 1990) 유전자 지도작성(Mukai et al., 1995), 종의 분류와 유연관계(Karihaloo et al., 1995; Cho et al., 1994; Badenes et al., 1995) 및 집단유전학의 양적 유전형질 분석(Homberg & Bchmann 1995) 외래 유전자 도입 확인 등 널리 사용되어지고 있다. 따라서 본 연구는 삼지구엽초의 형태적 특성을 다른 종들과 조사, 비교하고 국내 수집종과 중국 및 일본종 사이의 유연관계를 밝힘으로써 유용자원식물로 개발하기 위한 기초자료로 활용하고자 실시되었다.

재료 및 방법

본 연구에서 사용되어진 삼지구엽초 재료는 국내에 자생하는 삼지구엽초(춘천, 양구, 화천, 홍천 및 철원)에서 수집한 수집종과 철원특작시험장에서 분양 받은 '매화' '루부라부' '도끼와' 등의 일본종과 중국종, *E. diphyllum*, *E. violaceum*(일본) 등 총 17종의 삼지구엽초를 사용하였다.

1. 형태적 특성조사

형태적 특성 조사시에는 지역적으로 춘천, 양구

및 철원의 3개 지역으로부터 채집한 표본을 사용하였으며 *E. diphyllum*, *E. grandiflorum*, *E. macranthum*, *E. sagittatum*, *E. sempervirens* 등과 비교하였다. 형태적인 특징들을 조사하기 위하여 가변적 형질은 채집지에서 동일한 수준의 개체 40개를 각각 조사하여 평균을 구하였으며 고유 형질들은 표본을 작성하여 이를 실내조사 및 전자현미경 관찰에 이용하였다. 본래의 유전적 특성이 아닌 환경에 영향을 많이 받는 가변적 형질은 분류나 종의 특성을 구명하기 위한 근거로 설정하지 않은 것이 바람직하므로(Martin et al., 1991; Sneath & Sokal, 1973) 수량이나 경장 등속기 등의 형질은 제외하였으며 엽면적, 엽서, 거(距), 화색, 기공, 종자형태 등을 조사하였다.

2. Genomic DNA 분리

삼지구엽초 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 넣는다. 시료와 CTAB용액이 잘 섞이도록 흔들어 준 후에 60℃에서 1시간 동안 배양한다. Chloroform : isoamylalcohol(49 : 1) 용액을 CTAB 용액과 동일 양을 넣어준 후 흔들어 주고 5000rpm에서 15분간 원심분리를 수행하였다. DNA 상층액을 분리하여 새로운 튜브에 옮긴 후 isopropanol을 넣고 흔들어준다. 10,000rpm 15분 동안 원심분리를 한다. 침전된 부분을 남기고 따라버린 후에 dH₂O를 넣어 침전물을 녹인 후에 다시 chloroform을 넣고 원심분리한다. 상층액을 분리하여 다시 새 튜브에 옮기고 100% ethanol처리한 후에 10,000 rpm, 15분간 원심분리를 수행하고 여기서 생긴 침전물을 건조시킨다. dH₂O나 TE buffer를 넣어 침전물을 녹여준 후에 RNase를 첨가하여 37℃에서 1시간 배양한 후 0.8% agarose gel상에서 DNA band를 확인하였다. 추출한 DNA의 농도를 알아보기 위하여 Hitach U-2001 Spectrophotometer를 사용, 정량분석을 실시하여 최종농도가 5ng/ μ l가 되도록 희석한다.

3. DNA 증폭

Primer 합성은 oligonucleotide primer (10-mer) bioneer primer 40개를 각각 사용하였다. PCR 기기는 TOUCHDOWN™ (HYBRID) 을 사용하였으며 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel 상에서 전기영동한 후 EtBr (ethidium bromide) 로 염색하여 UV를 통해 DNA band를 확인하였다.

4. 유연관계분석

Primer screen 작업을 실시하여 그 중 band가 형성되지 않은 것과 재현성의 문제가 되는 부분을 제외시켰으며 8개의 primer를 선정하여 유연관계를 분석하였다. 각 각의 실험은 2반복으로 실시하였다. 증폭조건은 94℃ 1분, 35℃ 1분, 72℃ 2분으로 45회 반복한 후, 72℃에서 5분간 반응하여 PCR을 통한 RAPD 분석을 하였다. 8개의 primer를 이용하여 증폭된 bands를 가지고 binominal matrix code (0, 1) 을 작성하고 dendrogram을 나타내는 NTSYS-PC에서 UPGMA program을 이용하여 clustering analysis를 수행하였다.

결과 및 고찰

1. 형태적 특성조사

삼지구엽초 (*E. koreanum*) 의 외부 형태적 특성을 살펴보고자 다른 종들과 엽면적, 엽서, 거, 화

색, 기공, 종자형태 등을 비교한 결과는 표 1과 같다. 삼지구엽초 (*E. koreanum*) 의 엽면적은 평균 38-39cm² 이었으며, 이것은 중국종 *E. sagittatum*의 평균엽면적 42cm²보다는 약간 작았으나, 일본 자생의 *E. grandiflorum* 보다는 넓게 나타났으며 같은 일본종인 *E. sempervirens*, *E. macranthum*, *E. diphyllum*은 엽면적이 10cm² 전후로 작게 나타나 유의적 차이를 보였다. 엽장에 있어서도 *E. macranthum*와 *E. diphyllum*에서는 초장이 약 4 cm² 이하로 *E. koreanum*와 유전적 거리가 있음이 예상되어지며 *E. sempervirens*와 같은 경우에는 엽장이 50 cm² 이상으로 가장 높다른 종들과 유의적 차이가 크게 나타났다. 엽서는 2회 3출엽으로 소엽이 9엽인 것이 일반적이고, 종에 따라 2회 2출엽종, 3회 3출엽종이 있다. 국내 자생지 조사에서는 2회 3출엽의 변이종으로 생각되는 (소엽수 15-17엽) 개체가 조사되었다.

삼지구엽초 (*E. koreanum*) 의 화색은 보통 황백색의 꽃을 피우지만, 종에 따라 흰색, 담자색, 황색, 홍자색 등이 있으며 거 (距, spur) 는 대부분의 종에서 잘 발달한 것으로 나타났지만 *E. diphyllum*에서 이러한 거는 발달되지 않아 距가 잘 발달해 있는 삼지구엽초 (*E. koreanum*) 와 유전적 거리가 가장 멀 것이라고 예상되어진다. 종 별로 잎표면의 기공특징을 관찰한 결과 모든 종에서 기공형태는 불규칙형 (anomocytic type) 이었으며, 잎의 뒷면 (abaxial) 에는 약 24개/mm²이었으며 다세

Table 1. Morphological characteristics of *Epimedium* spp.

Accession	Leaf area (cm ²)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Phyllotaxis	Flower color	Stoma type	Spur*
<i>E. diphyllum</i>	4.7	2.8	1.9	bigeminate	white	Irregular	×
<i>E. grandiflorum</i>	32.4	8.2	5.2	triternate	red	Irregular	○
<i>E. koreanum</i> (C hun-chon)	38.0	9.8	5.8	triternate	white-yellow	Irregular	○
<i>E. koreanum</i> (Yang-gu)	37.4	9.5	5.7	triternate	white-yellow	Irregular	○
<i>E. koreanum</i> (Chul-won)	40.2	10.3	6.0	triternate	white-yellow	Irregular	○
<i>E. macranthum</i>	9.1	4.8	3.2	triternate	light violet	Irregular	○
<i>E. sagittatum</i>	42.2	12.8	5.7	triternate	white	Irregular	○
<i>E. sempervirens</i>	10.6	50.7	3.1	triternate	white	Irregular	○

* ○ : Existing, × : No existing

포성의 모용 (trichome) 체가 엽맥을 따라 분포하였고, 잎의 앞면 (adaxial) 에는 기공이 존재하지 않았다 (그림 1).

*E. koreanum*의 꽃은 원줄기의 끝부분에 총상화서로 달리며 꽃잎에 부착된 거 (spur) 가 있으며 꽃잎은 황백색이며 수술의 열개형태는 병개하는 형태이다. 수분은 주로 벌 등에 의해 행해지고 5월 중순이 되면 성숙하여 서서히 지면에 떨어져 산포된다. 종자의 형태는 얇은 막으로 형성된 종의 (Aril) 를 갖고 있으며 종자 하나의 크기는 길이 5-6mm,

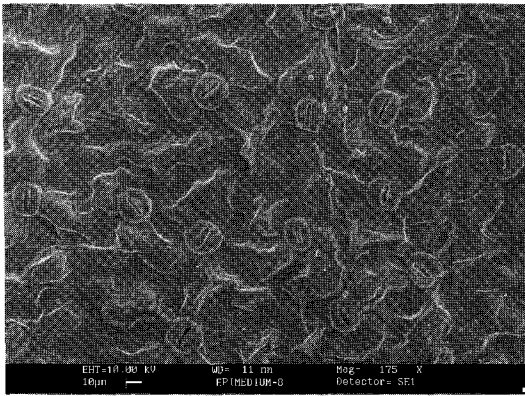


Fig. 1. Morphological characteristic of stoma in *Epimedium koreanum*

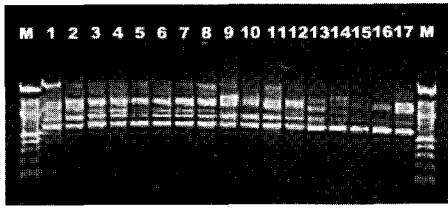
지름 3mm 정도이며 한 개의 골돌안에 4-6개의 종자가 들어있다. 종피는 외종피 외층형 (exotestal type) 으로 외종피의 외층이 탄닌화하여 잘 발달되어 있다.

2. RAPD 분석을 이용한 유연관계분석

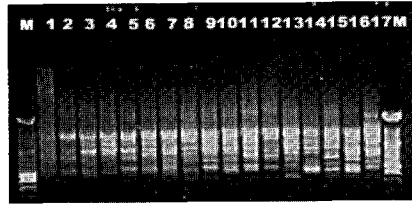
일본, 중국, 우리나라에 자생하고 있는 삼지구엽초 17 개체에서 추출한 genomic DNA를 10개의 염기서열로 구성된 oligonucleotide primer 40종으로 screening 하여 그 중 band의 재연성과 선명도가 높은 primer를 선발한 결과 전체에서 모두 증폭이 일어난 primer는 8개였다. (그림 2) 증폭된 DNA 단편들은 지역적에 따라 개체간에 동일하거나 서로 다른 밴드 양상을 보였으며 8개의 primer를 사용하여 얻을 수 있는 총 밴드 수는 88개였으며 이 중 monomorphic한 밴드는 25%에 해당하는 22개였으며 나머지 66개는 polymorphic한 것으로 나타났다. 17개체 모두에서 증폭이 일어난 8개의 primer는 G+C의 수가 DNA 증폭에 영향을 준다는 보고 (Fitsch et al., 1993) 와 같이 G+C의 수가 모두 50% 이상이었다 (표 2). Primer N8001과 같은 경우 지역적인 수집종들 사이에 커다란 차이가 나타나지 않은 반면 나머지 7개의 primer에서는 개체간에 뚜렷한 밴드상의 차이를 보여 삼지구엽초의 지역 수집종간 유연관계를 밝히는 데 유용하게 사용될 수 있다고 사료되어진다.

Table 2. Nucleotide sequence and G+C contents of selected primers that generated polymorphism and reproducible band profiles and number of detectable polymorphic bands

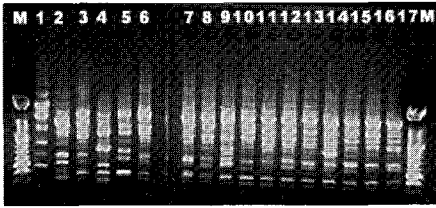
Primer No.	Sequence (5' to 3')	G+C content (%)	No. of band (No. of polymorphic band)	Polymorphism (%)
N-8001	CAGGCCCTTC	70	8 (4)	50.0
N-8002	CAATCGCCGT	60	9 (6)	66.6
N-8003	AGGGGTCTTG	60	11 (6)	54.6
N-8004	TCGGCGATAG	60	12 (12)	100.0
N-8006	AGCCAGCGAA	60	13 (8)	61.5
N-8010	CTGAGACGGA	60	6 (5)	60
N-8012	TACAACGAGG	50	14 (13)	83.3
N-8014	TGGATTGGTC	50	7 (6)	85.7
Total 10			88 (66)	



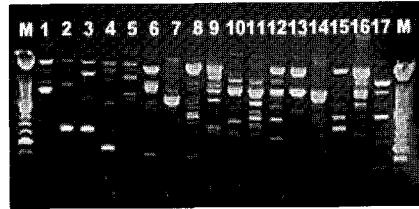
N-8001



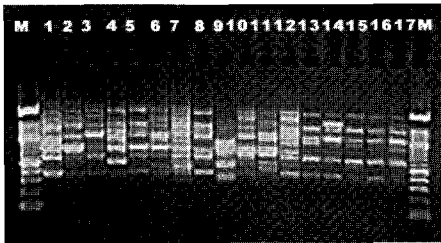
N-8002



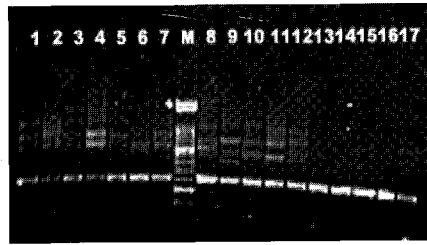
N-8003



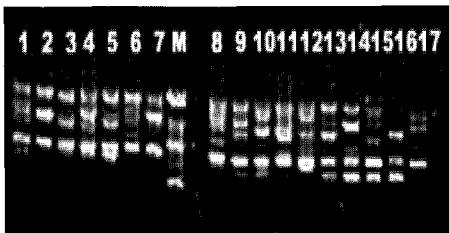
N-8004



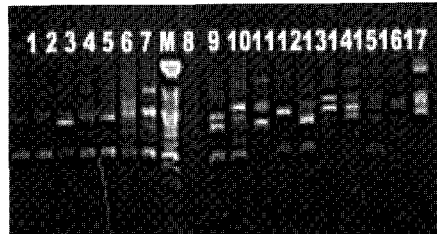
N-8006



N-8010



N-8012



N-8014

Fig. 2. Randomly amplified polymorphic DNAs band profile of the analyzed plants from the 17 isolates of *Epimedium* spp.

M : Size marker, 1-3 : *Epimedium koreanum* (Chul-won 1, 2, 3), 4 : *E. koreanum* (Hwa-chun), 5 : Hong-chun, 6 : *E. koreanum* (Yang-gu), 7 : *E. diphyllum*, 8 : *E. violaceum* (Japanese), 9 : China collection, 10 : *E. koreanum* (Chun-chon), 11 : mae-hwa (Japanese), 12 : lubulau (Japanese), 13-14 : *E. koreanum* (Chul-won 4, 5), 15 : hwang-hwa (Japanese), 16 : dokiwa (Japanese), 17 : mu-myung (Japanese).

3. 유사도 분석

8개의 primer를 사용하여 얻은 88개의 밴드를 각각 하나의 형질 (character)로 보아 이를 유연관계를 분석한 결과 (그림 3) 크게는 2개의 group, 즉 철원의 일부 수집종 (철원 4, 5)과 일본종을 포함하

는 군 (Group II)과 국내종과 중국종, 그리고 일부 일본종을 포함하는 군 (Group I)으로 나뉘어지고 국내종과 중국종, 그리고 일부 일본종을 포함하는 군 (Group I)은 다시 3개의 subgroup으로 나뉘어졌다. 철원지역 (1, 2, 3)에서 수집된 삼지구엽초의 경우 크게는 다른 지역의 국내종과 같은 군

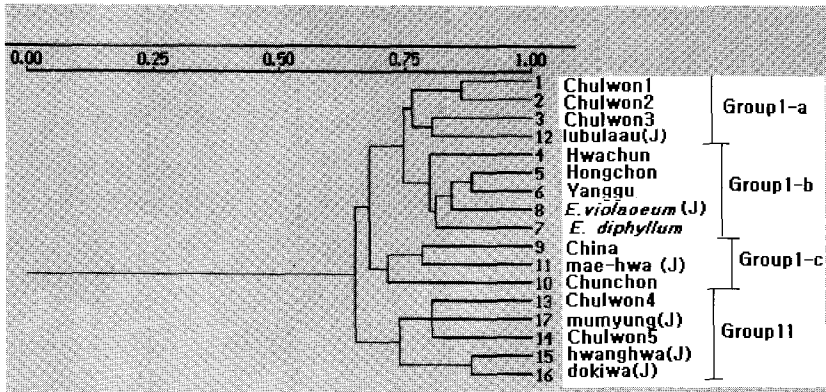


Fig. 3. Phylogenetic tree of *Epimedium* spp. based on DNA polymorphism derived from amplification of genomic DNAs using 8 decamer

1-3 : *Epimedium koreanum* (Chul-won 1, 2, 3), 4 : *E. koreanum* (Hwa-chun), 5 : Hong-chun, 6 : *E. koreanum* (Yang-gu), 7 : *E. diphyllum*, 8 : *E. violaceum* (Japanese), 9 China collection, 10 : *E. koreanum* (Chun-chon), 11 : mae-hwa (Japanese), 12 : lubulaa (Japanese), 13-14 : *E. koreanum* (Chul-won 4, 5), 15 : hwang-hwa (Japanese), 16 : dokiwa (Japanese), 17 : mu-myung (Japanese).

(Group I) 내에 속하였지만 작게는 일본산(루부라 무)와 같은 군(Group I-a)에 속하는 것으로 나타났다. 이러한 결과로부터 철원의 수집종이 일본 수집종들과는 유전적으로 매우 높은 상동성을 보이는 반면 중국종이나 국내의 다른 지역의 수집종과 유전적 거리를 보이는 것으로 나타났는데 이러한 것은 삼지구엽초의 철원 수집종과 중국 수집종의 icarrin 함량 차이가 크게 나타났다는 보고와 연관하여 식물체내 특정성분의 함량이 유전적인 차이에 기인할 수도 있다고 추측할 수 있으며 이러한 유전적인 유사성을 근거로 하여 특정성분의 함량을 비교하는 연구가 진행되어야 할 것이다. 또한 화천, 홍천, 양구지역에서 수집된 국내종 삼지구엽초는 같은 군에 속하고 일본산 *E. violaceum*와도 같은 군에 속하였다. 이와 같이 국내종과 일본종의 일부가 같은 군에 속하기도 하고 화색의 변이에 있어서 일본산은 자색 또는 담자색이고 한국산은 황백색으로 피어 국내종을 일본산의 아종으로 구분하는 견해도 있지만 전체적으로는 큰 group으로 나누어지고 있고(유사도 : 0.6) 분포지도 한국에서는 중부이북에만 자라는 지역적인 특성을 고려하여 볼 때 일본종들과는 유전적 거리가 길고 국내산이 일본종의 아종이라기 보다는 *Epimedium*

spp.의 종내변이라고 인식하여야 할 것이다. 전체 17개체에 유사도는 0.6~0.9의 상동성을 보여 높게 나타났으며 각각의 subgroup은 0.75부근에서 분포되어 있으며 같은 subgroup내에서는 0.8~0.9의 상동성을 나타내었다. 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 사용한 분석과 동위효소 분석 등과 같은 좀더 세밀한 분자생물학적 접근 방법이 수행되어져야 할 것이다.

적 요

삼지구엽초(*E. koreanum*)의 엽면적, 엽장, 엽서, 화색, 거(距, spur)의 조사를 통하여 국내종과 국외종 사이의 유전적 거리 있음을 알 수 있었으며 기공형태와 모용, 종자 등의 형태적 특성이 조사되었다. 삼지구엽초 수집종 17 개체에서 추출한 genomic DNA를 사용하여 RAPD를 위한 primer를 선발 한 결과 8개의 primer가 선발되었으며 이들 8개의 primer는 G+C의 수가 모두 50% 이상이었다. 삼지구엽초 수집종의 유연관계를 분석한 결과 크

계는 2개의 group으로 나누어졌으며 큰 group의 유사도는 0.65로 나타났다. 철원의 일부 수집종(철원 4, 5)과 일본종을 포함하는 군(group II)과 국내종과 중국종, 그리고 일부 일본종을 포함하는 군(group I)으로 나뉘어지고 국내종과 중국종, 그리고 일부 일본종을 포함하는 군(group I)은 다시 3개의 subgroup으로 나뉘어졌다. 전체 17개체에 유사도는 0.6~0.9의 상동성을 보여 높게 나타났으며 각각의 subgroup은 0.75부근에서 분포되어 있으며 같은 subgroup내에서는 0.8-0.9의 상동성을 나타내었다.

LITERATURE CITED

- Bardenes, M. L. and D. E. Parfitt. 1995. Phylogenetic relationships fo cultivaated *Prunus species* from an analysis of chloroplast DNA variation Theor Appl Genet. 90 : 1035-1041
- Cho, Y. C., T. Y. Chung, Y. H. Park and H. S. Suh. 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
- Fitsch, P., M. A. Hanson, C. D. Spore, P. E. Pack, and L. H. Reisberg. 1993. Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related of flowering plants. Plant Molecular Biology 11 : 10-20
- Karihaloo, J. L., S. Brauner, and L. D. Gottlieb. 1995. Randomly amplified polymorphic DNA variation in eggplant *Solanum melongena* L. (*Solanaceae*) Theor. Appl. Geent. 90 : 767-770
- Martin, J. M., T. K. Blake and G. Hockett. 1991. Diversity among north American spring barely cultivars based on coefficients of percentage. Crop Sci. 31 : 1131-1137
- McGarvey, P. and J. M. Kaper 1991. A simple and rapid method for screening transgenic plant nusing the PVR. Biotechniques 11 : 428-432
- Mukai, Y., Y. Suyyama, Y. Tsumura, T. Kawahara, H. Yoshimuraru, T. Kond, N. Tomura, N. Kuramoto and M. Murai. 1995. A linkage map for sugi (*Cryptomeria japonica*) based on RFLP, RAPD and isozyme loci. Theor. Appl Genet 90 : 835-840
- Park, B. J., S. Y. Choi, K. J. Chang, D. H. Cho, K. Heo and C. H. Park. 1997. Vegetation and environment in nature habit of *Aster scaber* and *Epimedium koreanum* around Chunchon Korean J. Plant Res. 10(4) 422-428
- Park, K. Y., B. R. Choi, E. S. Yi, S. J. Kim and C. H. Park. 1998. Habit environment of *Epimedium koreanum* Nakai Korean J. Medicinal. Crop Sci. 6(1) : 51-56
- Shin, K. H., S. S. Lim, S. D. Ahn, S. K. Kim and K. Y. Park. 1996. Difference in components of *Epimedium koreanum* in compliance with seasons and places of collection Korean J. Medicinal. Crop Sci. 4(4) : 321-328
- Sneath, P. H. A. and P. R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy p. 216 W. H. Freeman & Co., San Francisco, USA.
- Williams, J. G. K., A. R. Kublelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers Nuc. Acids. Res. 18 : 6531-6535
- Yoo, K. O., S. D. Ahn, C. Y. Yu, K. Y. Park and H. T. Lim. 1997. Ineraspecific variation of *Epimedium koreanum* by Randomly and Specifically Amplified Polymorphic DNA marker J. Kor. Sci. Hort Sci. 38(2) 183-187
- 경기도 농촌진흥원. 1995. 1995 시험연구보고서 p. 350
- 환경부. 1995. 한국통계연감. 일지사. p405