

RAPD분석에 의한 잔대와 더덕의 유연관계 비교 및 감별

이미영* · 모숙연** · 김두환** · 오승은*** · 고병섭*

*한국한의학연구원, **건국대학교 원예학과, ***건국대학교 생명과학과

Discrimination and Genetic Relationship of *Adenophorae triphylla*(Thunb) A.DC. var. *japonica* Hara and *Codonopsis lanceolata* Trautv using RAPD analysis

Mi Young Lee*, Suk Yeon Mo**, Du Whan Kim**, Seong Eun Oh***, Byoung Seob Ko*

*Korea Institute of Oriental Medicine, Seoul, Korea

**Dept. of Horticulture, Kun-Kug University, Seoul, Korea

***Dept. of Life Science, Kun-Kug University, Seoul, Korea

ABSTRACT : Dried parts of the two species are difficult to distinguish morphologically, thus *Codonopsis radix* has been sold instead of *Adenophorae radix* in herbal medicine market. Therefore, this study was conducted to develop the genetic marker through the examination of the phylogenetic relationships between two *Adenophora triphylla*(Thunb.) A. DC. var. *japonica* Hara, two *Adenophora radiatifolia* Nakai, five *Codonopsis lanceolata*(Sieb. et Zucc)Trautv. using RAPD analysis. Fifty decamer oligonucleotide primers were screened for the RAPD analysis, and four primers generated distinct RAPD markers specific to *Adenophorae radix* and *Codonopsis radix*. Based on the RAPD patterns, the genetic relationships between three herbal medicine were analyzed by UPGMA method. As a result, *Adenophorae radix* and *Codonopsis radix* were classified into two major subgroups on the basis of the genetic similarity coefficient. The specific RAPD patterns generated by the selected primers were reproducible from dried materials. Furthermore, the specific RAPD patterns were produced from the mixture of dried roots of *A. triphylla* and *C. lanceolata*. These results prone the usefulness of the RAPD analysis for the discrimination of pure materials from the mixtures of *A. triphylla* and *C. lanceolata*.

Key words : *Adenophorae radix*, *Codonopsis radix*, RAPD marker, identification, dried root

서 언

서 언 사삼은 길경과(초롱꽃과 Campanulaceae)에 속하는 잔대 *Adenophora triphylla* var. *japonica*

Hara 및 동속근연식물의 뿌리를 말하는 것으로(본 초학, 1995) 현재 잔대의 동속근연식물은 전 세계적으로 약 70여종이 자생하고 있으며 유럽과 아시아의 온대지역 특히 동아시아에 널리 분포하고 있

† Corresponding author (Phone) : 02-3442, E-mail : bsko@kiom. re. kr
Received June 25, 2001

다. 우리나라에도 전국 각 지방에 자생하고 있는 것으로 알려져 있으나 환경특성에 의한 종내 변이가 매우 심하고 그 형태적, 유전적 분류가 거의 되어 있지 않으며 재배가 이루어지지 않아 자생종을 단순 수집 이용하고 있는 실정이다.

중국에서 일컫고 있는 사삼은 북사삼 (*Glehnia littoralis* Fr. Schmidt ex Miq) 과 남사삼 (윤엽사삼 *Adenophora tetraphylla* (Thunb.) Fisch. 과 행엽사삼 *Adenophora stricta* Miq.) 으로 구별되는데, 북사삼은 우리나라의 해변에 자생하는 갯방풍을 말하며 남사삼은 잔대의 동속식물을 말한다(難波恒雄, 1993, 吳家榮과 邱德文, 1993). 우리나라는 길경과 (초롱꽃과)에 속하는 잔대 뿌리를 사삼으로 규정하고 있으나 현재 약재시장에서는 그 성미와 귀경 그리고 효능이 사삼과 전혀 다른 초롱꽃과에 속하는 더덕 *Codonopsis lanceolata* Trautv (羊乳根 또는 山海)의 뿌리가 사삼으로 유통되고 있어 논란이 되고 있다. 사삼과 더덕은 육안으로 쉽게 구별이 되지만 건조약재의 경우 구별하기가 쉽지 않다. 최근 환경에 영향을 받지 않고 소량의 DNA만으로도 수행이 가능하며 실험과정이 빠르고 안전하여 대규모 집단의 screening에 효과적인 (Tragoonrung et al, 1992) RAPD polymorphism을 이용하여 특정 형질의 표지인자 개발 (Klein-Kankhorst et al, 1991; Martin et al, 1991) 이나 유전관계 분석 (Yamazaki et al, 1994) 에 이용하고 있다. 따라서 본 연구에서는 RAPD법을 이용하여 잔대와 더덕을 구별할 수 있는 DNA 표지인자를 알아보고 한약재 감별에 이용할 수 있도록 건조약재에서의 재현성확인, 한약재를 혼용시켰을때의 검출가능성을 통해 이를 감별에 활용할 수 있는지 확인하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에 사용한 잔대는 용문산, 칠갑산에서, 층층잔대는 제주임업시험장, 더덕은 검단산, 용문

산, 칠갑산, 예봉산, 명지산, 울릉도에서 각각 2000년에 채집하여 외부형태를 비교 조사하여 확인한 후 사용하였으며, 식물체는 한국한의학연구원 표본실에 일련번호를 부여하여 보관중이다. 건조약재는 경동시장에서 구입한 잔대 생뿌리를 실험실에서 건조시켜 준비하였으며 더덕은 경동시장에서 사삼으로 시판되고 있는 것을 구입하여 사용하였다.

DNA 추출 및 순도 분석

채집한 신선한 잎에서 Doyle와 Doyle (1987) 방법을 응용하여 다음과 같이 DNA를 추출하였다. 소량의 시료를 막자사발에 넣고 미세분말상태로 마쇄한 후, 분말 시료를 700 μ l의 CTAB buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.7 M NaCl, 50 mM EDTA (pH 8.0), 140 mM β -mercaptoethanol)와 혼합한 다음 60 $^{\circ}$ C 항온기에서 1시간 처리하여 phenol 350 μ l와 chloroform : isoamylalcohol (24 : 1) 350 μ l를 첨가하여 실온에서 3,500 \times g로 5분간 원심분리하였다. 상층액 600 μ l와 chloroform : isoamylalcohol (24 : 1) 600 μ l를 첨가하여 완전히 섞이도록 흔들어준 다음 3,500 \times g로 5분간 원심분리하여 상층액 500 μ l를 취하여 냉동고에 보관중인 500 μ l isopropanol을 넣고 -20 $^{\circ}$ C에서 30분간 정치시켜 DNA를 침전시켰다. 침전시킨 DNA를 3,500 \times g에서 15분간 원심분리하여 얻은 pellet을 70% EtOH로 세척하여 진공 혹은 자연건조시켰다. 건조시킨 DNA를 100 μ l TE buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA)에 용해하여 1 mg/ml의 RNase를 첨가하고 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 30분간, 47 $^{\circ}$ C에서 30분간 처리한 DNA를 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인한 후, UV/VIS spectrophotometer (Shimazu, Japan)로 280 nm와 260 nm에서 흡광도를 측정하여 DNA순도검정 및 정량을 실시하였다. 건조약재의 게놈 DNA는 NucleoSpin DNA extract kit (Macherey-Nagel, Germany)을 사용하여 추출하였다. 추출된 DNA는 순도와 농도를 측정 후 -4 $^{\circ}$ C에 보관하면서 사용하였다.

DNA 증폭

PCR (polymerase chain reaction) 증폭은 Williams (1990)의 방법을 수정하였다. PCR 반응용액은 멸균증류수에 $10 \times$ 반응 완충액, $200 \mu\text{M}$ dNTP, 1.5 mM MgCl_2 , 300 nM primer (UBC, The University of British Columbia), 1 U DNA polymerase, 50 ng DNA를 혼합하여 총 $20 \mu\text{l}$ 로 조성하였다. PCR (Perkin-elmer, USA)은 GeneAmp PCR system 2400을 이용하여 94°C 에서 5분간 pre-denaturation 후 94°C 에서 30초 denaturation, 37°C 에서 30초간 annealing, 72°C 에서 1분간 extension을 35회 수행하고 마지막으로 72°C 에서 10분간 반응시켰다. 증폭된 산물은 1.5% agarose gel에서 100 bp DNA ladder (GibcoBRL)와 함께 전기영동하여 EtBr로 염색한 후 Image master (Pharmacia biotech, USA)로 관찰하여 결과를 얻었다.

유연관계 분석

유연관계 분석은 DNA band를 분자량에 따라 band가 있을 경우를 1로 주고 없을 경우는 0으로 변환하여 NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) program의 UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic average) 분석방법 (Rohlf, 1989)을 이용하여 dendrogram을 작성하였다.

결과 및 고찰

잔대와 더덕 식물체의 형태적 특징은 쉽게 구별할 수 있지만 건조시켜 유통되고 있는 한약재는 대부분 절단되어 시판되고 있어 그 형태가 육안관찰로는 거의 비슷하여 섞어 놓거나 한, 두개 샘플만으로는 구별하기가 쉽지 않다. 이러한 특성 때문에 한약재의 오·혼용의 시비가 끊이지 않고 일어나고 있으므로 이에 대한 감별법을 확립시킬 필요가 있다.

본 연구에서는 50여개의 primer를 사용하여 잔대 (*Adenophora triphylla*)와 층층잔대 (*A. radiatifolia*)

Nakai), 더덕 (*Codonopsis lanceolata* Trautv)의 지역 간, 속간의 차이점을 분석하기 위해, 식물체의 신선한 잎에서 분리한 게놈 DNA를 이용하여 oligonucleotide primer 50여종을 스크린한 후 특이 밴드를 선정하여 건조약재와 비교하였다. 모든 primer로부터 $250 \text{ bp} \sim 1.2 \text{ kb}$ 크기의 다형 DNA가 나타났으나, 이중 primer 357, 361, 363, 393에서 증폭되는 band는 선명도와 재현성에서 잔대와 더덕을 동시에 구분할 수 있는 좋은 DNA 표지인자로 여겨졌으며 (Fig. 1), 이 primer를 이용하여 신선한 잎과 건조약재, 그리고 유통되는 약재를 비교하였을 때 잔대와 더덕의 major band가 같은 크기에서 뚜렷하게 반복적으로 나타났다 (Fig. 2). 잔대 (lane 1, 2)와 층층잔대 (lane 3, 4)는 차이점이 거의 없었으며, 노상에서 구입한 잔대는 채집한 잔대와 동일한 DNA 패턴을 보인 반면, 건조약재시장에서 사삼이라고 구입한 약재는 잔대가 아닌 더덕의 형태와 RAPD패턴 (Fig. 2)을 보여 더덕이 사삼으로 공공연하게 판매되고 있음을 증명해 주었다. 따라서 더덕이 사삼으로 유통되는 문제점에 대해 여러 기관에서 논의가 되었음에도 현실적으로 유통문제가 시정되지 않고 있으므로 더덕을 양유(羊乳)로 공정서에 표기하여 사삼과의 혼란을 막자는 의견을 제시하기도 하였다 (한국한의약연구원, 2000). RAPD분석에서 증폭된 polymorphic band를 이용해 dendrogram을 작성한 유연관계에서 잔대와 층층잔대는 0.731로 잔대 동속식물은 가까운 유연관계를 나타냈으며, 5개 장소에서 각각 채취한 더덕은 0.889로 유전적인 변이가 장소에 의해 크게 차이 나지 않음을 알 수 있었지만, 잔대와는 0.208의 거리로 상당한 차이가 있었다 (Fig. 3). DNA 표지인자를 이용한 한약재의 혼용여부의 판별가능성을 확인하기 위해 비율을 달리하여 한약재를 섞은 후 DNA를 추출하여 밴드여부를 확인하였다. 즉, 잔대와 더덕을 1:1, 5:1, 1:5로 혼합시켜 DNA를 추출한 다음, 잔대와 더덕을 구별하기 좋은 DNA 표지인자인 primer 393으로 증폭시켰을 경우 혼합시킨 lane에서

잔대 (1100bp)와 더덕 (650bp)의 뚜렷한 band가 나타나 혼용여부를 구별해낼 수 있는 가능성을 확인

하였다(Fig. 4). 따라서 primer 393은 RAPD분석을 통해 잔대와 더덕 한약재의 혼용여부 및 이와 관련

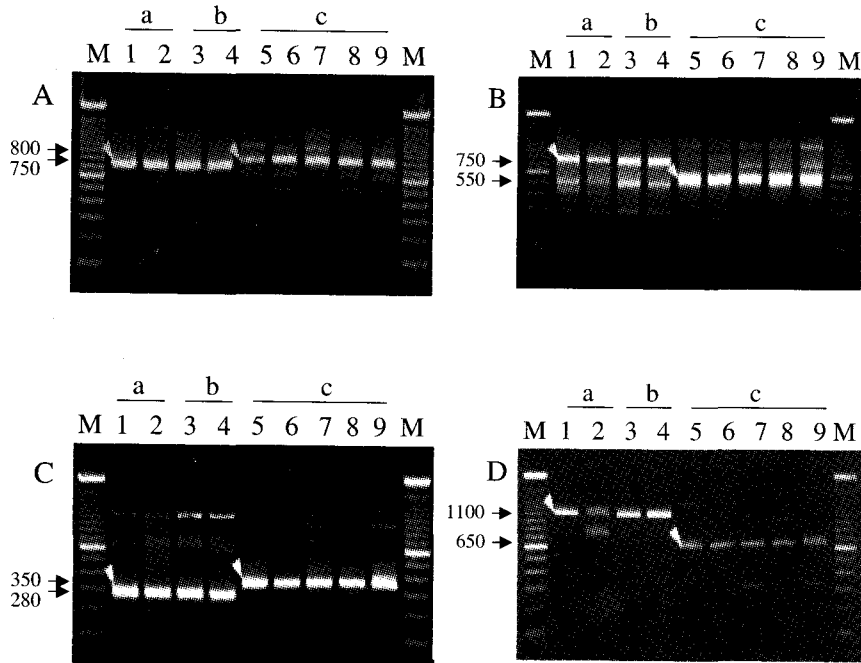


Fig. 1. Comparison of RAPD polymorphism of *Adenophorae Radix* and *Codonopsis Radix*. The primers were A, 357; B, 361; C,363; D, 393, respectively. Lane a, *Adenophora triphylla* A. DC. Var. *japonica* Hara(1, Yong-Mun Mt.; 2, Chil-Gap Mt.); b, *A. radiatifolia* Nakai(3, 4; Je-Ju Island); c, *Codonopsis lanceolata* Trautv(5, Gum-Dan Mt.; 6, Yong-Mun Mt.; 7, MOUNG-Ji Mt.; 8, Yei-Bong Mt.; 9, Yul-Reung Island). M, 100bp DNA ladder. Arrows indicate bands polymorphic between *Adenophora* and *Codonopsis*.

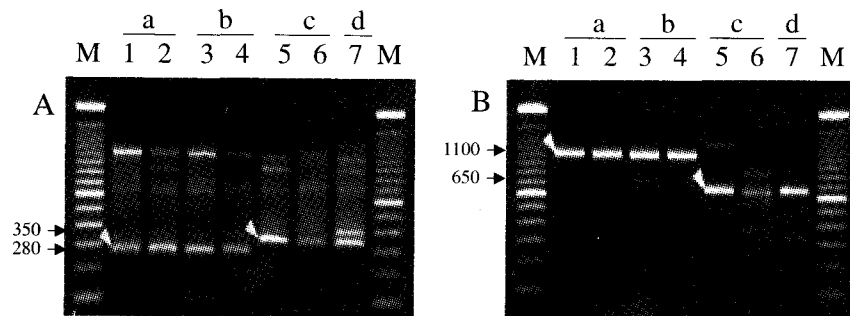


Fig. 2. Comparison of RAPD polymorphism of fresh leaf lanes (1,3,5), dry root lanes (2,4,6), commercial root (7) from *Adenophorae Radix* and *Codonopsis Radix*. The primers were A,363; B, 393. Lane a, *Adenophora triphylla* A. DC. Var. *japonica* Hara; b, *A. radiatifolia* Nakai; c, *Codonopsis lanceolata* Trautv.; d, Commercial root. M, 100bp DNA ladder. Arrows indicate bands polymorphic between *Adenophora* and *Codonopsis*.

RAPD분석에 의한 잔대와 더덕의 유연관계 비교 및 감별

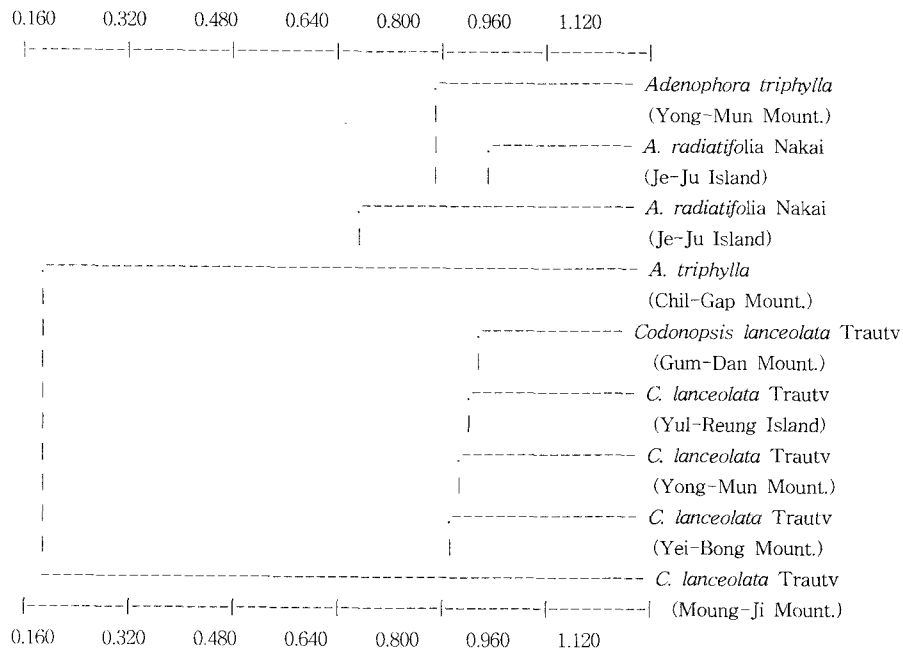


Fig. 3. Dendrogram showing the relationship between Adenophorae Radix and Codonopsis Radix based on UPGMA analysis of genetic distance measures.

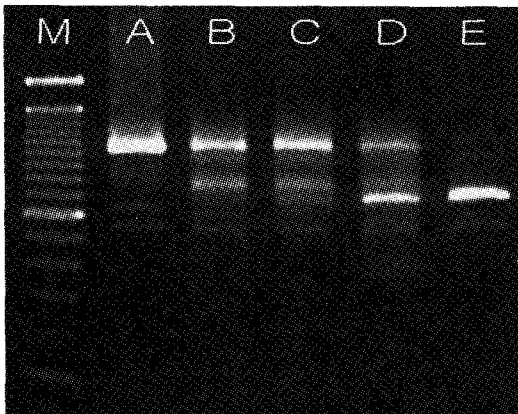


Fig. 4. RAPD fingerprints of the samples used in the study generated by primer 393. A, *Adenophora triphylla*; B, *A. triphylla* : *Codonopsis lanceolata* Trautv (5 : 1); C, *A. triphylla* : *C. lanceolata* Trautv (1 : 1); D, *A. triphylla* : *C. lanceolata* Trautv (1 : 5); E, *C. lanceolata* Trautv. M, 100bp DNA ladder.

된 분쟁의 해결에 필요한 증거 확보에 이용할 수 있

을것으로 사료된다. 또한 primer 393을 이용하여 증폭된 DNA의 cloning 및 염기서열 분석을 통해 잔대와 더덕의 식별이 가능한 유용한 marker의 추가적 개발이 가능할 것으로 생각된다.

적 요

50여개의 primer를 사용하여 잔대 *Adenophora triphylla*와 층층잔대 *A. radiatifolia* Nakai, 그리고 더덕 *Codonopsis lanceolata* Trautv의 지역간, 속간의 차이점과 감별여부를 RAPD법으로 시행한 결과, 잔대와 층층잔대의 차이점은 거의 없었으며, 더덕의 지역차이는 0.889의 유전적거리를 나타내었다. 두 종을 구별할 수 있는 특이 band로는 primer 357, 361, 363, 393 이었으며, 건조약재와 비교하였을 때 재현성이 확인되었고, 또한 잔대와 더덕의 건조약재를 각각 혼합시켰을 때 이를 구별할 수 있는 major band가 뚜렷이 나타나 혼용되어있는 건조약재에서의 감별이 가능함을 알 수 있었다.

LITERATURE CITED

- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19 : 11-15
- Klein-Kankhorst R. M., A. Vermunt, R. Weide, T. Liharska, P. Zabel. 1991. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.* 83 : 108-114
- Martin G. B., J. G. K. Willams, and S. D. Tanksley. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 : 2336-2340
- Roholf F. J. 1989. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exter, New York, USA.
- Tragoonrung, S., V. Kanazin, P. M. Hayes, and T. K. Blake. 1993. Sequence-tagged-site-facilitated PCR for barley genome mapping. *Theor. Appl. Genet.* 84 : 1002-1008
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18 : 6531-6535
- Yamazaki M., A. Sato, K. Shimomura, K. Saito, and I. Murakoshi. 1994. Genetic relationships among Glycyrriza plants determined by RAPD and RFLP analysis. *Biol. Pharm. Bull.* 17(11) : 1529-1531.
- 難波恒雄. 1993. 和漢藥百科 鑑〔I〕. 保育社. 75 ~76
- 吳家榮, 邱德文. 1993. 中國常用中草藥彩色圖譜. 貴州科技出版社. 64
- 全國韓醫科大學 本草學教室 共著. 1995. 本草學. 營林社. 587
- 한국한의학회. 2000. 한약재 표준품 개발 수집 및 활용방안 연구. 보건복지부. 354