

RAMP를 이용한 황정과 위유의 유전적 분석

안선민*** · 육진아* · 김영화* · 채병찬* · 김홍준* · 김기훈*** · 강권규*** · 고병섭* · 이미영*†

*한국한의학연구원, **과학기술연합대학교대학원, ***한경대학교

Genetic Analysis of Polygonati Rhizoma and Polygonati odorati Rhizoma using Random Amplified Microsatellite Polymorphism

Sun Min An***, Jin Ah Ryuk*, Young Hwa Kim*, Byoung Chan Chae*, Hong Jun Kim*, Ki Hoon Kim***, Kwon Kyoo Kang***, Byong Seob Ko*, and Mi Young Lee*†

*Korea institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea.

**University of Science and Technology, Daejeon 305-333, Korea.

***Department of Horticulture, Hankyong National University, Ansung 456-749, Korea.

ABSTRACT : Two herbal medicines of the *Polygonatum* genus, namely *Polygonati Rhizoma* and *Polygonati Odorati Rhizoma*, are difficult to distinguish from each other through exterior morphologic aspects. Furthermore, because the standard components for physiochemical distinction have not yet been standardized, the identification of these medicines through botanic taxonomy is based on genetic methods of random amplified microsatellite polymorphism (RAMP). For the RAMP evaluation, we used five sets of UBC microsatellite primers 811, 818, 834, 836, 842 and random primer M1. Although no specific band that could clearly distinguish *Polygonati Rhizoma* from *Polygonati Odorati Rhizoma* was found, 11 *Polygonatum* plants could be divided into two groups by this method. *P. sibiricum* and *P. stenophyllum* were classified to group I and the others were to group II. As *P. sibiricum* and *P. stenophyllum* were very similar in genetic and morphologic perspective, the results suggest that *P. stenophyllum* belongs to the *Polygonati Rhizoma* family.

Key Words : Polygonati Rhizoma, Polygonati Odorati Rhizoma, RAMP

서 언

등굴레種 (*Polygonatum* species) 식물의 근경은 우리나라와 중국에서 주로 이용되고 있는 (Yun, 2002) 한약재로 신농본초경에 여루(女婁)라고 기재되어 있으며 명의별록에서 위유(萎蕤)와 황정(黃精)으로 분류하고 있다 (안, 1985).

한국에서는 층층갈고리등굴레 (*Polygonatum sibiricum* Red)와 진황정 (*P. falcatum* A. Gray)을 황정 (*Polygonati Rhizoma*)으로 규정하고 있으며 (식품의약품안전청, 2002a), 등굴레 (*P. odoratum*) 및 동속근연식물은 위유 (*Polygonati Odorati Rhizoma*)로 규정하고 있다 (식품의약품안전청, 2002b). 중국은 진황정 (*P. falcatum* A. Gray), 층층갈고리등굴레 (*P. sibiricum* Red) 및 다화황정 (*P. cyrtonea* Hua)을 황정으로 규정하고 있으며, 등굴레 (*P. odoratum*)를 옥죽으로 기재하고 있다 (중화인민공화국위생부약전위원회, 2005). 위유(萎蕤)는 다른 이름으로 옥죽(玉竹)이라고도 하는데, 황정과 같은 등굴레 동속식물

이지만 다른 약재로 쓰이며 형태적으로 구분하기가 쉽지 않다.

황정은 항균, 항진균 작용, 혈압을 낮추는 작용 (김 등, 1998) 및 혈당 강하작용 (Kim & Lee, 1980)을 가지고 있다. 지표 물질은 1-azetidine-2-carboxylic acid이며 (박, 1999), 그 밖의 주요 구성 성분으로는 polygona-quinone (Nakata *et al.*, 1964), steroid saponins (Li *et al.*, 1992) 및 benzoquinones (Huang, 1997) 등이 확인되었다. 지하경에는 과당인 fructose가 가장 많고 glucose와 arabinose가 약간 함유되어 있으며 이외에 점액질 및 소량의 alkaloid가 함유되어 있다 (박 등, 1995). 반면, 위유는 심장에 대한 작용, 혈관 수축, 혈압 강하, 혈청지질강하 작용 등에 효과가 있으며 (김, 2004), 주로 glutamic acid가 가장 많고 다음으로 aspartic acid가 높으며 이들로 구성된 조단백질 함량은 6.6%에 해당되는 것으로 알려져 있다 (Kwan *et al.*, 1997; Hwang *et al.*, 1998).

지금까지 등굴레속의 연구는 경, 엽, 엽병 및 과실 등 외부 형태에 의한 분류 (Jang *et al.*, 1998; Jang, 2001; Yun *et*

†Corresponding author: (Phone) +82-42-868-9504 (E-mail) mylee@kiom.re.kr
Received December 30, 2005 / Accepted Jun 29, 2006

Table 1. The *Polygonatum* plants used in RAMP experiment.

Medicine Name	Species	Locality, Nationality	Lane	
Polygonati Rhizoma	<i>P. sibiricum</i>	Suwon, Korea	1	
		Suwon, Korea	2	
	<i>P. stum cyrtonema</i> Hua	Nanning, China	3	
	<i>P. falcatum</i> A. Gray	Jeonju, Korea	4	
		Chuncheon, Korea	5	
		Jecheon, Korea	6	
Polygonati Odorati Rhizoma	<i>P. stenophyllum</i>	Suwon, Korea	7	
		Chuncheon, Korea	8	
		Suwon, Korea	9	
	<i>P. odoratum</i> var. <i>pluriflorum</i>	Uiseong, Korea	10	
		Keomdan Mt., Korea	11	
		Myeongji Mt., Korea	12	
		Pyeongchang, Korea	13	
		Bonghwa, Korea	14	
		Jeonju, Korea	15	
		Uiseong, Korea	16	
		Suwon, Korea	17	
		<i>P. odoratum</i> var. <i>pluriflorum</i> for <i>variegatum</i>	Suwon, Korea	18
		<i>P. thunbergii</i>	Suwon, Korea	19
<i>P. japonicum</i> Morren et Decaiene	Suwon, Korea	20		
<i>P. involucreatum</i> Max.	Yongmun Mt., Korea	21		
<i>P. humile</i> Fischer	Yongmun Mt., Korea	22		
<i>P. lasianthum</i> var. <i>coreanum</i> Nakai	Jeonju, Korea	23		

al., 2002; Shim et al., 2005a), 종자발아 (Kang et al., 1998), 염색체의 수와 핵형 등의 분석 (Han et al., 1998a; Han et al., 1998b; Kim & Kim, 1979) cluster 분석 (Shim et al., 2005b) 등 주로 분류 및 유연관계분석, 세포학적 분류가 연구되어 왔으며, 최근 RAPD (Lee et al., 2004; Jang et al., 2004) 분석을 통해 유연관계 분석으로 황정과 위유를 구별한 바 있다.

본 연구에 사용된 RAMP (random amplified microsatellite polymorphism)는 microsatellite와 random primer 두 개를 모두 이용하는 방법으로, RFLP (restriction fragment length polymorphism) 분석에 비해 품종 또는 개체간 다양성이 훨씬 높게 분석되며, PCR 반응에 기초하여 hybridization 절차가 없기 때문에 매우 신속하고 비용이 절감되는 분석방법으로 (Powell et al., 1996), 식물 간 유연관계를 밝히는 분석에 사용되고 있다 (Wu et al., 1994; Sanchez et al., 1996).

따라서 본 연구에서는, 11종의 등골레 속 식물을 RAMP 방법으로 분석함으로써 황정과 위유를 구분하고자 하며, 그에 속

하는 식물들의 유전적인 다양성과 계통간의 근연성을 조사하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용된 11종 23개체의 등골레 속 식물은 중국과 국내의 각 시험장과 식물원, 그리고 자생지에서 동속식물을 채집하여 전문가의 확인을 통해 시료를 동정한 후 사용하였으며, 이 시료들은 한국한의학연구원에 보관되어 있다 (Table 1).

2. DNA 분리

생체 앞에서 Doyle와 Doyle (1987) 방법을 응용하여 DNA를 추출하였다. 60~70 mg의 시료를 액체질소가 들어있는 막자사발에 넣고 미세분말상태로 마쇄한 후, 분말 시료를 700 μ l의 CTAB 완충용액 [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.7 M NaCl, 50 mM EDTA (pH 8.0), 140 mM β -mercaptoethanol]과 혼

합한 다음 60°C 항온기에서 1시간 처리하고 phenol 350 μ l와 chloroform : isoamylalcohol (24 : 1) 350 μ l를 첨가하여 실온에서 3,500 xg로 5분간 원심분리 하였다. 상층액 600 μ l에 chloroform : isoamylalcohol (24 : 1) 600 μ l를 첨가하여 완전히 섞이도록 흔들어진 다음 3,500 xg로 5분간 원심 분리하여 다시 상층액 500 μ l를 취하여 isopropanol 500 μ l을 넣고 -20°C에서 30분간 정치시켜 DNA를 침전시켰다. 그 후 3,500 xg에서 15분간 원심 분리하고 70% (v/v) EtOH로 세척하여 진공 혹은 자연 건조시켰다. 건조시킨 DNA를 100 μ l TE 완충용액 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA]에 용해하여 10 mg/ml의 RNase를 첨가하고 37°C 항온기에서 30분간, 47°C에서 30분간 처리한 다음 0.8% (w/v) agarose gel에서 전기영동하여 확인하고, DNA 순도검정 및 정량 (Nanodrop, USA)을 실시하였다.

3. RAMP (Random Amplified Microsatellite Polymorphism) 분석

가. 중합 효소 연쇄 반응 (PCR)

PCR 반응 조건은 DNA 100 ng을 10x PCR 완충용액 [750 mM Tris-HCl (pH 8.8), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% (v/v) Tween 20], 200 μ M dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 0.4 μ M microsatellite primer, 0.4 μ M M1 primer, 1 U Taq DNA polymerase와 3차 증류수를 혼합하여 총 20 μ l로 하였다. PCR 반응은 초기에 주형 DNA를 완전 변성시키기 위해 94°C에서 1분 30초간 반응시킨 후, 94°C에서 30초, annealing은 42°C에서 30초, extension은 72°C에서 1분간 40 cycle 반응을 수행시킨 다음, 72°C에서 10분간 더 진행시킨 후 4°C에서 보관하였다. 실험에 사용된 primer의 염기서열 (UBC primer)은 Table 2에 제시하였다.

나. 전기영동

최종 PCR 반응이 끝난 후 3 μ l의 PCR 산물과 7 μ l의 formamide loading dye (10 mM NaOH, 95% formamide, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanole FF)를 혼합하여 50 bp DNA 마커 (Promega, USA)와 함께 95°C에서 5분간 변성시켰다. 1x TBE 완충용액에 55°C로 미리 가열된

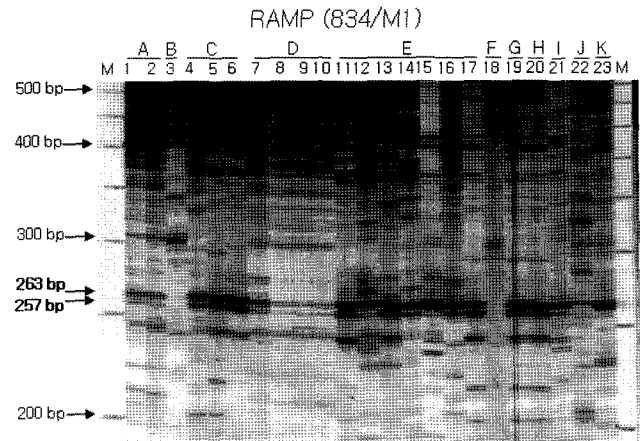


Fig. 1. RAMP polymorphism among *Polygonatum* plants detected by primer 834 and M1. A; *P. sibiricum*, B; *P. stum cyrtoneura* Hua, C; *P. falcatum* A. Gray, D; *P. stenophyllum*, E; *P. odoratum* var. *pluriflorum*, F; *P. odoratum* var. *pluriflorum variegatum*, G; *P. thunbergii*, H; *P. japonicum* Morren et Decaiene, I; *P. involucreatum*, J; *P. humile* Fischer, K; *P. lasianthum* var. *coreanum* Nakai. *Polygonatum* plants listed in Table 1. M, 50 bp ladder.

6% polyacrylamide gel (acrylamide:bisacrylamide (19 : 1), 7.5 M urea)에 이 산물들을 loading한 후 1,500 V에서 2시간 동안 전기영동하였다.

다. 염색 방법

전기영동이 끝난 후 젤이 부착되어있는 유리판을 Silver sequence™ staining reagents (Promega, USA)를 이용하여 염색하였다.

4. 유연관계 분석

유연관계 분석은 다형성을 나타내는 밴드의 유무에 따라 1 또는 0의 수치로 전환시킨 후 Jaccard coefficient 계산법에 따라 유사도 지수를 계산하여 NTSYS (Exeter software, USA)프로그램으로 유집 분석하였다.

결과 및 고찰

RAMP 분석으로 황정 3종류 층층갈고리둥굴레, 다화황정, 진황정과 위유 8종류 층층둥굴레, 둥굴레, 죽대, 옥죽, 산둥굴레, 편둥굴레, 용둥굴레, 각시둥굴레의 다형성을 비교해 보았다. UBC primer인 primer 811, 818, 834, 836, 842와 primer M1을 조합하여 분석한 결과, 황정과 위유의 두 약재를 뚜렷하게 구분할 수 있는 특이적인 밴드는 없었다 (Fig. 1, 2).

사용된 primer 811 (GA repeat sequence), 818 (CA repeat sequence), 834 (AG repeat sequence), 836 (AG repeat sequence), 842 (GA repeat sequence)와 M1 (AG repeat sequence)조합 모두에서 황정에 속하는 층층갈고리둥굴레 (lane

Table 2. RAMP primers used in this study.

UBC Primer	Sequences (5' - 3')
811	GAG AGA GAG AGA GAG AC
818	CAC ACA CAC ACA CAC AG
834	AGA GAG AGA GAG AGA G(CT)T
836	AGA GAG AGA GAG AGA G(CT)A
842	GAG AGA GAG AGA GAG A(CT)G
M1	CAA GAG AGA GAG A

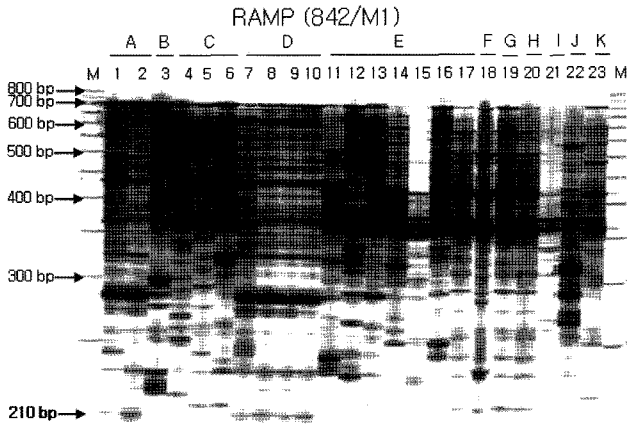


Fig. 2. RAMP polymorphism among *Polygonatum* plants detected by primer 842 and M1. A; *P. sibiricum*, B; *P. stum cyrtonema* Hua, C; *P. falcatum* A. Gray, D; *P. stenophyllum*, E; *P. odoratum* var. *pluriflorum*, F; *P. odoratum* var. *pluriflorum variegatum*, G; *P. thunbergii*, H; *P. japonicum* Morren et Decaiene, I; *P. involucreatum*, J; *P. humile* Fischer, K; *P. lasianthum* var. *coreanum* Nakai. *Polygonatum* plants listed in Table 1. M, 50 bp ladder.

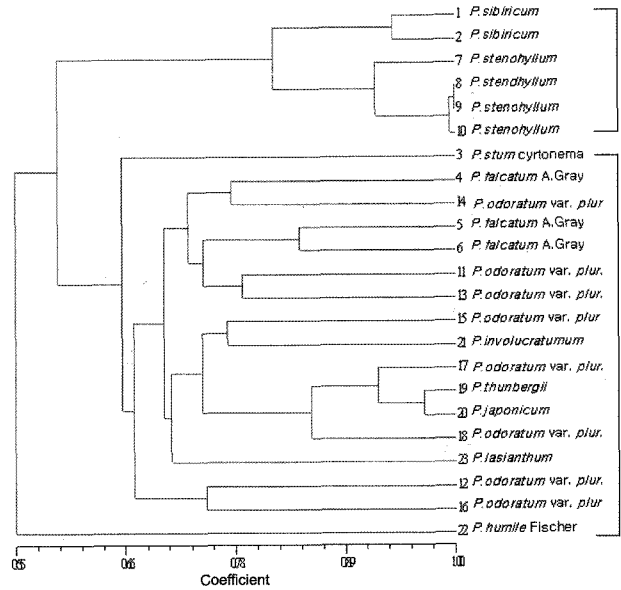


Fig. 3. Dendrogram analysis of *Polygonatum* species based on NTSYS. *Polygonatum* plants listed in Table 1.

1, 2)와 위유에 속하는 층층둥굴레 (lane 7~10)는 다형성 패턴이 거의 일치하였다. 그리고 무늬둥굴레 (lane 18)를 제외한 primer 834/M1의 257 bp, 263 bp에서 둥굴레 동속식물의 공통적인 밴드가 나타났고 (Fig. 1), primer 842/M1의 210 bp에서는 층층둥굴레와 층층갈고리둥굴레의 공통적인 특이밴드가 증폭되었다 (Fig. 2). 황정에 속하는 진황정의 경우, 황정보다는 위유에 속하는 둥굴레 동속식물들과 패턴양상이 비슷하게 나타났다. 둥굴레, 산둥굴레, 편둥굴레 (lane 17, 19, 20)는 모두 같은 패턴을 나타냈고, 다화황정 (lane 3)은 황정 약재나 위유 약재와는 다른 특이패턴을 나타냈다. 형태적으로도 앞에 줄무늬가 있어 다른 둥굴레 종과 형태적으로 뚜렷이 구별이 되는 무늬둥굴레 (lane 22)는 사용된 primer 중 818, 834, 842와 M1에서 다른 둥굴레 동속식물과 다형성 패턴에서 차이가 있었다.

RAMP 결과를 NTSYS 프로그램을 사용해서 분석한 결과, 크게 두 그룹으로 나뉘었으며, 55%의 유연관계를 나타냈다. 층층갈고리둥굴레와 층층둥굴레는 59.4%를 기준으로 그룹 I에 속하였으며, 다화황정, 용둥굴레, 둥굴레, 죽대, 옥죽, 산둥굴레, 편둥굴레, 각시둥굴레는 그룹 II에 포함되었다 (Fig. 3). 이들 중 층층갈고리둥굴레 (lane 1, 2)와 층층둥굴레 (lane 7~10)는 81.75%로 비교적 높은 유연관계를 보였다.

층층갈고리둥굴레와 층층둥굴레의 잎은 운생하지만 진황정을 포함한 다른 둥굴레 동속식물은 잎이 호생 (이, 1996)하므로 잎의 형태를 기준으로 하였을 때 둥굴레 계열과 층층둥굴레 계열 2개의 군으로 나눌 수 있다는 점에서 외부형태적인 특징과 본 연구결과가 일치한다는 것을 알 수 있었다.

또한, 엽선의 모양과 기본 염색체수를 기준으로 층층갈고리둥굴레 계열과 층층둥굴레 계열이 같은 계열수준으로 나누어지며 진황정은 *P. odoratum* 그룹과 유집된다는 결과 (Jang et al., 1998)가 본 연구 결과와 일치하였다. 그리고 RAPD 분석을 통한 층층갈고리둥굴레 계열과 층층둥굴레 계열이 같은 계열 수준으로 나누어졌다는 결과 (Lee et al., 2004)와도 일치하였다.

현재 한약재로 사용되는 황정과 위유의 구분은 근경의 형태를 기준으로 하여 구분하고 있지만, 둥굴레 동속식물에 해당하는 층층둥굴레는 황정의 약재인 층층갈고리둥굴레와 형태학적으로, 그리고 다형성패턴이 거의 일치하므로 황정의 약재에 속하는 것으로 사료된다. 또한 본 연구 결과에서 황정의 약재에 해당하는 진황정은 둥굴레 동속식물에 유집되므로 황정과 위유의 동속식물 구분에 대해 근경의 형태, 혹은 효능 등의 차이점에 대한 추후 연구가 필요한 것으로 여겨진다.

적 요

형태학적으로 구분이 어려운 황정과 위유의 범위를 구분하기 위해 황정에 속하는 층층갈고리둥굴레, 다화황정, 진황정 등 3종과 위유에 속하는 8종의 둥굴레 동속 식물 등 11종 23개체 시료로 RAMP분석한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 황정그룹과 위유그룹은 NTSYS를 통한 유연관계 분석에서 55%의 유연관계를 나타냈으며, 층층갈고리둥굴레와 층층둥굴레는 81.75%로 분석에 사용된 둥굴레 동속 식물 중 가장 높은 유연관계를 나타냈다.

2. 동굴레 동속식물에 해당하는 층층동굴레는 황정의 약제인 층층갈고리동굴레와 외부형태학적으로, 그리고 다형성패턴 결과가 매우 유사하므로 황정의 약제에 속하는 것으로 사료된다.

3. 진황정은 위유와 외부형태적으로 유사하며, 유연관계분석에서도 위유의 그룹에 속하므로 위유의 약제에 대한 구분을 새롭게 할 필요성이 있다.

LITERATURE CITED

- Doyle JJ, Doyle JL** (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.
- Han MK, Oh BU, Kim YS** (1998a) C-banded karyotes, of five taxa of genus *Polygonatum*. *Kor. J. Plant Tax.* 28(3):313-329.
- Han MK, Jang CG, Oh BU, Kim YS** (1998b) A cytotoxic study of genus *Polygonatum* in Korea. *Kor. J. Plant Tax* 28(2):187-208.
- Huang PL** (1997) Benzoquinones, a homoisoflavanone and other constituents from *Polygonatum altelobatum*. *Phytochemistry* 44(7):1369-1373.
- Hwang JB, Yang MO, Shin HK** (1998) Survey for amino acid of medicinal herbs. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 30(1):35-41.
- Jang KH** (2001) Ecological characteristics and relationship of Korean native *Polygonatum* species. Ph. D. dissertation Gyeong-sang Natl. Univ., Korea.
- Jang KH, Park JM, Kang JH, Lee ST** (1998) Growth and flowering characteristics of *Polygonatum* spp. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 6(2):142-148.
- Jang KH, Song GW, Chung JI, Kang JH** (2004) Analysis of genetic relationships of Korean native *Polygonatum* spp. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 12(3):214-218.
- Kang JH, Kim DI, Ryu YS, Bae KS, Han DS** (1998) Characteristics of seed structure and seedling development in *Polygonatum odoratum* Druce. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 6(2):102-107.
- Kim YS, Kim JH** (1979) A taxonomic study of the genus *Polygonatum* in Korea (I). *Kor. J. Plant Tax.* 9(1):27-41.
- Kim JK, Lee YJ** (1980) Pharmacognostical studies on the rhizome of *Polygonatum robustum* Nakai. *Kor. J. Pharmacog.* 11(2):69-74.
- Kwan JH, Ryu KC, Lee GD** (1997) Dynamic changes in browning reaction substrates of *Polygonatum odoratum* roots during roasting. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 26(4):654-661.
- Lee MY, Kim KH, Kim YH, Oh SE, Kang KK, Ko BS** (2004) A taxonomic examination of *Polygonatum Rhizoma* and *Polygonati Odorati Rhizoma* based on RAPD analysis. *Kor. J. Pharmacogn.* 35(4):265-270.
- Li XC, Yang CR, Ichikawa M, Matsuura H, Kasai R, Yamasaki K** (1992) Steroid saponins from *Polygonatum kingianum* *Phytochemistry* 31(10):3559-3563.
- Nakata H, Sasaki K, Morimoto I, Hirata Y** (1964) The structure of polygonoquinone. *Tetrahedron* 20:2319-2323.
- Powell W, Machray GC, Provan J** (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends. Genet.* 1(7):215-222.
- Sanchez MP, Davila JA, Loarce Y, Ferrer E** (1996) Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplifications to study genetic diversity in barley. *Genome* 39:112-117.
- Shim JS, Park JM, Jeon BS, Kang JH** (2005a) Classification by morphological characteristics and their correlation of *Polygonatum* species collected from Gyeongnam area. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 13(1):21-29.
- Shim JS, Park JM, Jeon BS, Kang JH** (2005b) Interspecific relationship of *Polygonatum* species collected from Gyeongnam area using cluster analysis. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 13(1):30-34.
- Wu KS, Jones R, Danneberger L, Scolnik A** (1994) Detection of microsatellite polymorphism without cloning. *Nucleic Acids Res.* 22:3257-3258.
- Yun JS, Son SY, Kim IH, Hong BY, Yun T, Jong SK, Park SI** (2002) Classification of *Polygonatum* spp. collections based on multivariate analysis. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 10(5):333-339.
- 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순** (1998) *완역 중약대사전 제 10권*. 도서출판 정담. 서울., p. 6550-6556.
- 김호철** (2004) *한약약리학*. 집문당., p. 478-479.
- 박정일** (1999) 황정의 품질 표준화에 관한 연구. 1999년도 생약·한약재 품질 표준화 연구보고서 (식품의약품안전청). 서울., p. 67-78.
- 박철호, 안상득, 장병호, 함승시** (1995) 산야초의 이해 (허브의 지식과 이용). 강원대학교 출판부., p. 135.
- 식품의약품안전청** (2002a) *대한약전 (제 8개정)*, p. 1586.
- 식품의약품안전청** (2002b) *대한약전외한약 (생약)규격집*, p. 293.
- 안덕균** (1985) 황정류의 본초학적 연구, *생약학회지* 16(2):105-113.
- 이우철** (1996) *원색한국기준식물도감*. 아카데미서적., p. 399-400.
- 中華人民共和國衛生部 藥典委員會 編** (2005) *中華人民共和國藥典 (中藥彩色 圖集)*, 廣東科技出版社., p. 215.