

## 등굴레속 식물의 18S rDNA 염기서열의 특성

윤종선\*<sup>†</sup> · 김익환\* · 박재성\* · 이철희\* · 홍의연\* · 윤 태\* · 정승근\*\*

\*충북농업기술원 시험연구부, \*\*충북대학교 식물자원학과

### Characterization of 18S rDNA in *Polygonatum spp.* Collections

Jong Sun Yun\*<sup>†</sup>, Ik Hwan Kim\*, Jae Seong Park\*, Cheol Hee Lee\*, Eui Yon Hong\*,  
Tae Yun\*, and Seung Keun Jong\*\*

\*Experiment & Research Department, Chungbuk Agricultural Research and Extension Service,  
Cheongwon 363-883, Korea.

\*\*Dept. of Plant Resources, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea.

**ABSTRACT :** This study was conducted to investigate the variation in sequence, the base composition and the sequence similarity of 18S rDNA (18S ribosomal RNA coding region) in the 10 *Polygonatum spp.* collections. The entire 18S rDNA region of 10 *Polygonatum spp.* collections ranged from 913 bp to 914 bp. There were 8 variable sites in the entire 18S region, and they were attributable to nucleotide substitution and deletion. T → C transition happened in 4 sites, and A → G transition happened in 1 site. C → A transversion happened in 1 site, and deletion happened in 2 sites. Transition rates were five times that of transversion. Base compositions of 18S rDNA were 23.09~23.33% in adenine, 23.33~23.52% in guanine, 25.60~25.85% in thymine and 27.38~27.79% in cytosine. The A + T content of 18S rDNA of 10 *Polygonatum spp.* collections averages 48.99%, ranging from 48.80% to 49.18%, and the G + C content averages 51.01%, ranging from 50.82% to 51.20%. Pairwise sequence comparisons indicated that 18S rDNA sequence similarity ranged from 99.7% to 100%.

**Key words :** 18S rDNA, nucleotide sequence, *Polygonatum*

## 서 언

등굴레의 지하경인 근경을 한약재명으로는 황정이라고 하며, 항균 작용, 항진균 작용 및 혈압을 낮추는 작용 (김 등, 1998) 뿐만 아니라 혈당 강하작용 (Kim & Lee, 1980)이 있어 한약재로 많이 이용되어 왔고, 근경 건물중 100 g 당 단백질 16.5 g, 지방 0.9 g, 탄수화물 67.7 g을 함유하고 있으며 열량은 247 kcal 이고, 각종 무기물과 vitamin류 함유하고 있어 (농촌진흥청, 1996; Jang *et al.*, 2002) 식품 영양학적으로 가치가 높기 때문에 최근에는 등굴레차로 가공되어 소비가 증가되는 추세에 있다.

등굴레속 (*Polygonatum*) 식물은 백합과의 다년생 식물로 우리나라에는 등굴레, 각시등굴레, 죽대, 진황정 등 14종이 자생하며 (Lee, 2003), 이 속의 분류를 위하여 형태적 특성 (Shim *et al.*, 2005), 군집 분석 (Shim *et al.*, 2005), 다변량 분석 (Yun *et al.*, 2002) 그리고 RAPD 분석 (Jang *et al.*, 2004) 등이 이용된 바 있다.

모든 식물은 단백질 합성에 있어 필수 구성성분인

ribosomal RNA (rRNA)를 암호화하는 DNA 염기서열 즉 ribosomal DNA (rDNA)를 가지고 있으며, 이는 핵, 미토콘드리아 및 엽록체 genome에서 발견된다. rRNA는 18S, 5.8S 및 26S 세 종류가 하나의 단위로 전사되며, 앞뒤로 다수 반복되어 배열되어 있다. 또한 세 종류의 rRNA 중에서 18S와 5.8S 및 5.8S와 26S 사이를 각각 ITS 1 (internal transcribed spacer 1)과 ITS 2 (internal transcribed spacer 2)라 하며 (Hamby & Zimmer, 1992; Rogers & Benedich, 1987), ribosomal DNA의 18S 영역과 ITS 영역의 염기서열 분석 자료를 생물의 계통 분류에 이용하여 왔다 (Baldwin & Markos, 1998; Bhagwat *et al.*, 2001; Borisjuk *et al.*, 1997; Dubouzet & Shinoda, 1999; Lee *et al.*, 2004).

본 연구는 ITS 영역에 비하여 유전자의 진화속도가 느리기 때문에 유전정보의 보존 정도가 높은 영역인 18S rDNA 영역을 이용하여 등굴레속 식물 10종의 염기서열을 결정하고, 염기서열의 특성과 종간의 차이를 구명하여 등굴레속 식물의 유연관계에 관한 기초적인 자료를 얻고자 수행되었다.

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-43-219-2659 (E-mail) jsyun135@cbares.net  
Received May 20, 2006 / Accepted Jun 29, 2006

재료 및 방법

식물재료로는 층층갈고리등골레 (*Polygonatum. sibiricum* DELAR.), 등골레 (*P. odoratum* (Miller) Druce var. *pluriflorum* O<sub>HWI</sub>), 큰등골레 (*P. odoratum* (Miller) Druce var. *maximowiczii* K<sub>OIDZ.</sub>), 산등골레 (*P. odoratum* (Miller) Druce var. *thunbergii* H<sub>ARA</sub>), 죽대 (*P. lasianthum* M<sub>AXIM.</sub>), 용등골레 (*P. involucratum* M<sub>AXIM.</sub>), 안면용등골레 (*P. desoulavyi* K<sub>OMAROV</sub>), 각시등골레 (*P. humile* Fischer ex. M<sub>AXIM.</sub>), 통등골레 (*P. inflatum* K<sub>OMAROV</sub>) 및 진황정 (*P. falcatum* A. GRAY) 등 8종 2변종 등 총 10종을 수집하여 재배하고 잎을 채취하여 시료로 사용하였다.

DNA는 Promega의 Genomic DNA 추출 Kit를 사용하여 추출하였다. PCR 반응액은 PCR premix (Bioneer사 Cat. No. K-2012)에 DNA 2 µl (20 ng), primer로 18S Forward 2 µl (20 pmoles)와 18S Reverse 2 µl (20 pmoles) 그리고 멸균수 14 µl를 첨가하여 총 20 µl로 하였다. 18S rDNA 증폭을 위해 18S forward primer (5'-GACTGTGAACTGCG AATGG-3')와 18S reverse primer (5'-TAAGTTTCAGCCTT GCGACC-3')를 사용하였다.

PCR 반응은 Tgradient thermocycler (Biometra사)를 사용하여 95°C에서 5분간 예비 변성시킨 후 94°C 30초 (변성), 55°C 1분 (primer 부착) 및 72°C 2분 30초 (증폭)의 반응을 35회 반복하였으며, 72°C에 10분간 유지시켜 증폭이 잘 되도록 하였다.

PCR 반응으로 증폭된 18S rDNA를 전기영동 후 gel에서 정제하고, pGEM-T vector에 삽입한 다음 JM109 (Promega 사) 균주를 사용하여 cloning하였으며, 100 µg/mL의 ampicillin, 100 µM의 IPTG 및 50 µg/mL의 X-gal이 첨가된 agar 선별 배지 위에 도말한 후 37°C에서 배양하였다. 청색 colony와 백색 colony 중에서 백색 colony 만을 채취하여 다시 증식시킨 후 Qiazen Kit (Qiazen사)로 plasmid 만을 추출하였고, 18S rDNA는 EcoR I 제한효소로 절단한 후 확인하였다.

염기서열의 결정은 Bioneer사의 automatic sequencer를 사용하였으며, 염기서열의 분석은 DNASTar사의 Lasergene (Version 5.0)을 이용하였다.

결과 및 고찰

등골레속 8종 2변종 총 10종의 18S rRNA의 coding region인 18S rDNA를 PCR 반응으로 증폭하고, 염기서열을 결정한 후 ClustalW 프로그램으로 다중 정렬하고 염기서열을 비교하였다.

18S rDNA의 전체 길이는 913~914 bp였으며 (Table 1), 염기의 돌연변이나 결실이 발생하지 않은 층층갈고리등골레 등 5종의 염기서열은 Fig. 1과 같다. 377 bp에서 염기의 결실이 발생한 안면용등골레와 각시등골레 그리고 380 bp에서 염기의

Table 1. Matrix of 18S rDNA nucleotide positions with potential phylogenetic information from 10 *Polygonatum* spp. collections.

No.†	Total (bp)	Nucleotide sites							
		22	139	155	342	377	380	699	881
1	914	C	T	T	A	C	G	T	T
2	913	C	T	T	A	C	-	T	C
3	914	C	T	T	G	C	G	T	T
4	914	C	T	T	A	C	G	T	T
5	914	C	T	C	A	C	G	C	T
6	914	C	T	T	A	C	G	T	T
7	913	C	C	T	A	-	G	T	T
8	913	A	T	T	A	-	G	T	T
9	914	C	T	T	A	C	G	T	T
10	914	C	T	T	A	C	G	T	T

†1. *Polygonatum. sibiricum* DELAR., 2. *P. odoratum* (Miller) Druce var. *pluriflorum* O<sub>HWI</sub>, 3. *P. odoratum* (Miller) Druce var. *maximowiczii* K<sub>OIDZ.</sub>, 4. *P. odoratum* (Miller) Druce var. *thunbergii* H<sub>ARA</sub>, 5. *P. lasianthum* M<sub>AXIM.</sub>, 6. *P. involucratum* M<sub>AXIM.</sub>, 7. *P. desoulavyi* K<sub>OMAROV</sub>, 8. *P. humile* Fischer ex. M<sub>AXIM.</sub>, 9. *P. inflatum* K<sub>OMAROV</sub>, 10. *P. falcatum* A. GRAY.

결실이 발생한 등골레는 길이가 913 bp였고, 기타는 914 bp로 종에 따른 염기서열의 길이의 변이는 매우 적었다 (Table 1).

각시등골레 등 일부 종에서는 DNA 염기서열 내에서 하나의 nucleotide가 바뀌는 염기의 치환은 총 6개 지점에서 발생하였고, 결실은 2개 지점에서 발생하여 총 8개 지점에서 변이가 발생하였으며 (Table 1), 이러한 변이는 종의 진화 또는 분류에 유용한 정보를 갖고 있을 것으로 판단된다.

등골레는 881 bp에서 T → C로, 큰등골레는 342 bp에서 A → G, 죽대는 155 bp와 699 bp에서 T → C로 염기가 치환되었다. 그리고 안면용등골레는 139 bp 위치에서 T → C, 각시등골레는 22 bp 위치에서 C → A로 염기가 치환되었다. 그 중에서 한 purine이 다른 purine으로 대체되거나 한 pyrimidine이 다른 pyrimidine으로 대체되는 전위 (transition)는 T → C 전위가 4개 지점에서 발생하였고, A → G 전위가 1개 지점에서 발생하였다. 이에 비해 한 purine이 pyrimidine으로 대체되거나 또는 한 pyrimidine이 purine으로 대체되는 전좌 (transversion)는 각시등골레의 C → A 전좌가 유일하여 전위가 전좌에 비해 5배 발생하였다. 이러한 결과는 10종의 목초류 ITS 염기서열에서 전위가 전좌보다 더 많이 발생한 결과 (Hsiao et al., 1994)와 비, 콩 등 6개 분류군에 대하여 18S 염기서열의 분석결과 C-T 전위가 A-G 전위의 2배였고, 전위가 전좌보다 5배 많았다는 결과 (Hershkovitz & Lewis, 1996)와 유사하였다.

염기의 결실은 안면용등골레와 각시등골레에서 377 bp 및 등골레에서 380 bp에서 발생하였으며, 이러한 염기의 결실은

```

1 AAAAGCAACATCCGCGGATCCCTGGTCCGGCATCGTTTATG 40
41 GTTGAGACTAGGACGGTATCTGATCGTCTTCGAGCCCCCA 80
81 ACTTTCGTTCTTGATTAATGAAAACATCCTTGGCAAATGC 120
121 TTTCCGAGTTGTTTCGTCTTTCATAAATCCAAGAATTTTAC 160
161 CTCTGACTATGAAATACGAATGCCCCCGACTGTCCCTCTT 200
201 AATCATTACTCCGATCCCGAAGGCCAACACAATAGGACCG 240
241 AAATCCTGTGATGTTATCCCATGCTAATGTATACAGAGCG 280
281 TAGGCTTGCTTTGAGCACTCTAATTTCTTCAAAGTAACGG 320
321 CGCCGGAGGCACGACCCGGCCAGTTAAGGCCAGGAGCGCA 360
361 TCGCCGGCAGAAAGGGACGGGACGGCCGGTGCACACCGGTT 400
401 GCGCGACCGGCCGGCCAGCCCAAGGTCCAACACTACGAGCT 440
441 TTTTAACTGCAACAACCTTAAATATACGCTATTGGAGCTGG 480
481 AATTACCGCGGGCTGCTGGCACCCAGACTTGCCCTCCAATGG 520
521 ATCCTCGTTAAGGGATTAGATTGTAATTCATTCCAATTAC 560
561 CAGACTCGTTTGAGCCCGGTATTGTTATTTATTGTCACTA 600
601 CCTCCCCGTGTCAGGATTGGGTAATTTGCGCGCCTGCTGC 640
641 CTTCCCTTGGATGTGGTAGCCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCC 680
681 GGAATCGAACCCCTAATTCCTCCGTCACCCGTCACCACCATG 720
721 GTAGGCCTCTATCCTACCATCGAAAGTTGATAGGGCAGAA 760
761 ATTTGAATGATGCGTCGCCGGCACGAGGGCCGTGCGATCC 800
801 GTCGAGTTATCATGAATCATCAGAGCACCGGGCAGAGCCC 840
841 GCGTCGGCCTTTTATCTAATAAATGCATCCCTTCCGGAAG 880
881 TCGGGTTTTGTTGCACGTATTAGCTCTAGAATTA 914
    
```

Fig. 1. Nucleotide sequence of majority in 18S rDNA of the 10 *Polygonatum* spp. collections.

mRNA 분자내 해독 틀이 변화되어 비 기능적 단백질이 생산 될 수 있을것으로 추정된다.

등굴레 18S rDNA의 염기 조성을 살펴보면 purine계의 adenine은 23.09~23.33%로 평균 23.21%였고, guanine은 23.33~23.52%로 평균 23.42%였다. 한편 pyrimidine계의 thymine은 25.60~25.82%로 평균 25.79%였고, cytosine은 27.38~27.79%로 평균 27.59%였으며, purine계의 46.63%보다 pyrimidine계가 6.75% 높았다 (Table 2).

A+T 함량은 48.80~49.18%로 평균 48.99%였고, G+C 함량은 50.82~51.20%로 평균 51.01%로서, 대부분의 동식물에서 G+C 함량이 48~52% 범위에 있고 종간에 차이가 적다는 Freifelder (1985)의 결과와 같은 경향을 보였다.

ClustalW 방법으로 18S rDNA 염기서열의 유사성을 분석한 결과 99.7~100% 일치하여 등굴레속 내에서 종간에 유전적으로 매우 가까운 것으로 나타났다 (Table 3).

충충갈고리등굴레, 산등굴레, 용등굴레, 텃등굴레 및 진황정은 염기서열이 100% 일치하였고, 등굴레는 죽대, 안면용등굴

Table 2. Base composition of 18S rDNA sequences in 10 *Polygonatum* spp. collections.

No. <sup>†</sup>	Total bp	----- % -----					
		A	G	T	C	A+T	G+C
1	914	23.20	23.41	25.82	27.57	49.02	50.98
2	913	23.22	23.33	25.74	27.71	48.96	51.04
3	914	23.09	23.52	25.82	27.57	48.91	51.09
4	914	23.20	23.41	25.82	27.57	49.02	50.98
5	914	23.19	23.41	25.60	27.79	48.80	51.20
6	914	23.20	23.41	25.82	27.57	49.02	50.98
7	913	23.22	23.44	25.74	27.60	48.96	51.04
8	913	23.33	23.44	25.85	27.38	49.18	50.82
9	914	23.20	23.41	25.82	27.57	49.02	50.98
10	914	23.20	23.41	25.82	27.57	49.02	50.98
Average	913.7	23.21	23.42	25.79	27.59	48.99	51.01

<sup>†</sup>Numbers correspond to those in Table 1.

**Table 3.** Sequence similarity of 18S rDNA among 10 *Polygonatum* spp. collections.

No.	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	99.9	99.9	100.0	99.8	100.0	99.9	99.9	100.0	100.0
2	-	99.8	99.9	99.7	99.9	99.7	99.7	99.9	99.9
3	-	-	99.9	99.7	99.9	99.8	99.8	99.9	99.9
4	-	-	-	99.8	100.0	99.9	99.9	100.0	100.0
5	-	-	-	-	99.8	99.7	99.7	99.8	99.8
6	-	-	-	-	-	99.9	99.9	100.0	100.0
7	-	-	-	-	-	-	99.8	99.8	99.9
8	-	-	-	-	-	-	-	99.8	99.9
9	-	-	-	-	-	-	-	-	100.0

<sup>†</sup>Numbers correspond to those in Table 1.

레 및 각시등골레와 0.3%의 차이가 있었으며, 큰등골레는 죽대와 0.3%, 그리고 죽대는 안면용등골레 및 각시등골레와 0.3%의 차이가 있었다.

동양배에서는 18S rDNA 염기서열이 0.1~0.8%의 차이를 보였으며 (Kim *et al.*, 2000), 포도에서 0.0~1.9%의 차이를 보인 것 (Lee *et al.*, 2001)과 비교할 때 유사한 경향이어서, 종의 수준에서는 18S rDNA 염기서열의 변이 정도가 매우 적은 것을 알 수 있었다.

5.8S를 포함한 ITS 영역은 길이가 목초류 작물이 603 bp (Dubouzet & Shinoda, 1999), 백합이 632 bp (Hsiao *et al.*, 1994), 윗나무속 식물 (5.8S 제외) 이 480~492 bp (Lee *et al.*, 2004) 로 18S rDNA에 비해 짧지만 염기서열에서 큰 변이를 보이는데 비하여 (Dubouzet & Shinoda, 1999; Hsiao *et al.*, 1994), 등골레속 식물에서 종간에 18S rDNA의 염기서열이 매우 유사한 것은 이 영역이 ITS 영역에 비하여 진화속도가 느리고 보존 정도가 높은 암호화 영역이기 때문이라고 (Riccardo *et al.*, 1998; Rogers & Benedich, 1987) 판단된다.

이상의 결과에서 볼 때, 등골레속 식물의 종간에 있어서 18S rDNA 염기서열에 큰 차이를 보이지 않아 유연관계를 비교하기에는 불충분하였다. 18S rDNA 외에 5.8S를 포함한 ITS 1과 ITS 2 및 26S rDNA의 염기서열을 모두 분석한다면 등골레속 식물의 유연관계를 구명하는데 필요한 더 많은 정보를 얻을 수 있을 것이다.

### 적 요

등골레 유전자원의 유연관계를 위한 기초 자료를 얻고자 등골레속 식물 수집종 10종에서 18S ribosomal RNA를 암호화하는 18S rDNA 영역의 염기서열을 결정하고 그 특성을 분석한 결과를 요약하면 다음과 같다. 등골레속 10종의 18S rDNA 영역 전체의 길이는 913~914 bp로 비슷하였으나, 총 8

개 지점에서 염기의 치환 및 결실에 의한 변이가 발생하였다. 전위는 T → C 전위가 4개 지점에서 발생하였고, A → G 전위가 1개 지점에서 발생하였으며, 전좌는 C → A 전좌가 1개 지점에서 발생하여 전위가 전좌보다 5배 만큼 발생하였다. 결실은 2개 지점에서 발생하였다. 18S rDNA의 염기의 조성은 adenine 23.09~23.33%, guanine 23.33~23.52%, thymine 25.60~25.85%, cytosine 27.38~27.79%로 pyrimidine계가 purine계보다 많았다. 18S rDNA의 A + T 함량은 48.80~49.18%로 평균 48.99%였고, G + C 함량은 50.82~51.20%로 평균 51.01%였다. 다중 정렬에 의해 염기서열을 비교한 결과 99.7~100% 일치하여 종간에 차이가 적었다.

### LITERATURE CITED

- Baldwin BG, Markos S** (1998) Phylogenetic utility of the external transcribed spacer of 18S-26S rDNA: congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia*(Compositae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10(3):449-463.
- Bhagwat AS, Krishna TG, Jawali N, Mitra RK** (2001) Cloning and characterisation of a ribosomal RNA gene repeat unit from groundnut. *Plant Cell Reports* 20:193-197.
- Borisjuk NV, Davidjuk YM, Kostishin SS, Miroshnichenco GP, Velasco R, Hemleben V, Volkov RV** (1997) Structural analysis of rDNA in the genus *Nicotiana*. *Plant Molecular Biology* 35:655-660.
- Dubouzet JG, Shinoda K** (1999) Phylogenetic analysis of the internal transcribed spacer region of Japanese *Lilium* species. *Theor. Appl. Genet.* 98:954-960.
- Freifelder D** (1985) *Essentials of Molecular Biology, Part III: Nucleic Acids.* p. 27-46. Jones and Bartlett Publishers, Inc. Portola Valley, CA.
- Hamby RK, Zimmer EA** (1992) Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. *Molecular systematics of plants.* p. 50-91. Chapman & Hall, N.Y.
- Hershkovitz MA, Lewis LA** (1996) Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region. *Mol. Biol. Evol.* 13(9):1276-1295.
- Hsiao C, Chatterton NJ, Asay KH, Jensen KB** (1994) Phylogenetic relationships of 10 grass species: an assessment of phylogenetic utility of the internal transcribed spacer region in nuclear ribosomal DNA in monocots. *Genome* 37:112-120.
- Jang KH, Kang JH, Jeon BS, Song GW, Lee SD** (2002) Major chemical components in rhizome of native *Polygonatum* species in Korea. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 10(3):185-193.
- Jang KH, Song GW, Chung JI, Kang JH** (2004) Analysis of genetic relationships of Korean native *Polygonatum* spp. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 12(3):214-218.
- Kim CS, Lee GP, Han DH, Ryu KH, Lee CH** (2000) Molecular phylogeny of *Pyrus pyrifolia* based on the 18S rDNA sequences. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 41(2):129-134.
- Kim JK, Lee YJ** (1980) Pharmacognostical studies on the rhizome of *Polygonum robustum* Nakai. *Korea J. Pharmacog.* 11(2):69-74.
- Lee CH, Lee DW, Kim CS, Ryu KH, Lee GP** (2001) Classification of grape rootstocks by using 18S rDNA sequence

- analysis. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 42(6):712-716.
- Lee TB** (2003) Colored Flora of Korea. p. 676-679. Hyangmoonsa. Korea.
- Lee WK, Kim MJ, Heo K** (2004) Phylogeny of Korean *Rhus* spp. based on ITS and *rbcL* sequences. Korean J. Medicinal Crop Sci. 12(1):60-66.
- Riccardo P, Aurelio T, Alessandra Z, Simone O** (1998) Molecular phylogeny of truffles derived from nuclear rDNA sequence analysis. Mol. Phyl. and Evol. 13:169-180.
- Rogers SO, Benedich AJ** (1987) Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy numbers and in the intergenic spacer. Plant Mol. Biol. 9:509-520.
- Shim JS, Park JM, Jeon BS, Kang JH** (2005) Classification of morphological characteristics and their correlation of *Polygonatum* species collected from Gyeongnam area. Korean J. Medicinal Crop Sci. 13(1):21-29.
- Shim JS, Park JM, Jeon BS, Kang JH** (2005) Interspecific relationship of *Polygonatum* species collected from Gyeongnam area using cluster analysis. Korean J. Medicinal Crop Sci. 13(1):30-34.
- Yun JS, Son SY, Kim IH, Hong EY, Yun T, Lee CH, Jong SK, Park SI** (2002) Classification of *Polygonatum* spp. collections based on multivariate analysis. Korean J. Medicinal Crop Sci. 10(5):333-339.
- 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순** (1998) 완역 중약대사전 제 10권. 도서출판 정담. 서울. p. 6550-6556.
- 농촌진흥청** (1996) 식품성분표 (제 5개정판). p. 96-97.