

엽록체 DNA 염기서열을 이용한 한약재 지모의 기원 확인 및 유연관계 분석

김명겸 · 베갈마 · 손화 · 노종훈 · 김세영 · 양덕춘[†]
경희대학교 고려인삼명품화사업단 및 인삼유전자원소재은행

Phylogenetic Analysis of Ji-Mo (*Anemarrhena asphodeloides*) on the Basis of Chloroplast DNA Sequences

Myung Kyum Kim, Baigalmaa Jigden, Sun Hua, Jong Hun Noh, Se Young Kim, and Deok Chun Yang[†]

Korea Ginseng Center for Most Valuable Products & Ginseng Genetic Resource Bank
1 Seocheon-dong, Giheung-gu Yongin-si, Gyeonggi-do 449-701, Korea

ABSTRACT : *Anemarrhena asphodeloides* (Korean name "Ji-Mo") has been used for oriental medicinal purposes in Korea, China and Japan. In this study, 29 *A. asphodeloides* samples were collected including 3 certified *A. asphodeloides* plants and many commercially marketed *A. asphodeloides* products. Chloroplast *trnL-F* regions of the "Ji-Mo" samples were sequenced and used to identify whether the samples were genuine *A. asphodeloides* or not. As the result, the *trnL-F* sequences of all the "Ji-Mo" samples were shown to be identical and it was proven that commercially available medicinal products "Ji-Mo" are genuine *A. asphodeloides*. Phylogenetic tree of *A. asphodeloides* using the *trnL-F* sequences was constructed and compared with phylogenetic tree using rubisco large subunit (*rbcL*) gene sequences. In these tree, *A. asphodeloides* was affiliated in the family *Agavaceae* in the order *Asparagales*. It is proven that *trnL-F* phylogenetic tree is useful to study taxonomic position of *A. asphodeloides*.

Key Words : Ji-Mo (*Anemarrhena asphodeloides*), Phylogenetic Analysis, *rbcL*, *trnL-F*

서 론

지모 (知母, *Anemarrhena asphodeloides* Bunge)는 한약재로 널리 사용되는 약초로서 *Anemarrhena* 속 (genus)에는 아직 하나 *A. asphodeloides* 종 (species)만 보고되어 있다. 현재 *A. asphodeloides* 종은 한국, 일본, 중국에서 동일하게 '지모' 한약재의 기원식물로서 승인되어 한의약품 원료로 유통되고 있다. 중국에서는 치무 (zhimu)라고 하고 일본에서는 치모 (chimo)라고 한다.

지모는 중국이 원산지인 다년초로서 산과 들에서 자란다. 지모는 현재 우리나라 전국에서 재배되고 있으며 황해도에서 많이 난다. 중국에서는 하북 (河北), 산서 (山西) 및 동북 (東北) 등지에서 주로 재배되고 몽골에서도 분포한다고 알려져 있다. 가을에 캐어 싹과 수염뿌리를 제거하고 벌에 말린 것을 지모 (毛知母)라고 하고 외피를 벗겨서 벌에 말린 것을 지모육 (知母肉)이라 한다.

지모 (知母)는 한방에서는 뿌리줄기를 약재로 쓰는데 성질이 차며 (寒) 맛이 쓰고 (苦) 독이 없다. 뿌리줄기는 굵고 옆

으로 뻗는데 약간 특이한 냄새와 단맛이 나고 점액성이 있다. 약으로 쓸 때는 탕으로 하거나 환제로 하여 사용하며 꼭 고아서 죽처럼 먹기도 한다. 지모는 사기 (邪氣)-병을 일으키는 기운을 몰아내고 허한 것을 보하고 기를 더하는 한약재로 알려져 있다. 일명 지삼 (地參)이라고도 불리며 골증노열 (骨蒸勞熱)을 치료하고 (해열작용) 허손된 신기 (腎氣)를 치료하는데 주로 쓰인다. 금기로는 변을 묽게 보거나 설사를 할 때는 쓰지 못하는데 지모를 다량 복용하면 설사가 나기 때문이다 (Bae, 2000).

지모의 주된 작용은 해열로써 여름철 장기간의 지속적인 발열과 만성·소모성 질환으로 인한 발열의 해열효과가 뛰어나다. 심 (心), 폐 (肺), 위 (胃), 방광, 콩팥 (腎)의 화 (火)를 제거하고, 열 (熱)이 극심해서 생기는 두통, 설사, 요통을 치료하고 마음을 안정시켜 놀라는 것을 그치게 한다. 지모의 두 번째 대표적인 효과는 진정작용으로 성신경의 흥분을 저하시킨다. 성신경의 흥분상태로 인한 인후통 (咽喉痛), 인건 (咽乾)과 아울러 목구멍에서 냄새가 나는 것을 치료한다. 허리와 무릎이 시리고 저리며 연약한 증상과 유정 (遺精), 몽정에 사용

[†]Corresponding author: (Phone) +82-31-201-2688 (E-mail) dcyang@khu.ac.kr
Received November 28, 2007 / Accepted January 18, 2008

한다. 비노기계의 감염증으로 오는 만성 신우염에서 소변에 백혈구가 다수 보이고 항생제를 쓸 수 없는 경우에도 적용되고 마른기침을 하며 목이 쉬며 가래가 조금씩 있고 식은땀이 나올 때에 사용된다. 구내염, 구강궤양, 인후염 등에 현삼과 생지황과 같이 쓰고, 입이 마르고 번조증상이 있는 당뇨병에도 활용된다. 대표적으로 성신경의 흥분을 제거하는데 쓰이는 지백팔미환(知栢八味丸)이 있다.

최근에 지모를 대상으로 연구가 활발히 이루어지면서 지모 뿌리줄기에 있는 약리성분들의 효능이 과학적으로 밝혀지고 있다. 지모의 스테로이드계 사포닌인 timosaponin은 혈소판의 응고방지 효능이 있어서 심근경색증 치료가 가능하고 (Zhang *et al.*, 1999a), 면역세포인 neutrophil의 superoxide 분비활성을 조절하며 (Zhang *et al.*, 1999b), 근육과 혈관의 긴장을 이완시키는 기능이 있고 (Wang *et al.*, 2002), 기억을 향상시키는 기능이 있다 (Li *et al.*, 2007). 지모의 sarsapogenin은 간암세포에 대해 항암효과를 나타내었고 (Bao *et al.*, 2007), 기억을 향상시키는 활성이 있었다 (Hu *et al.*, 2005). 지모에서 분리된 항생제 niasol은 식물병원성 곰팡이의 mycelium 형성을 강력히 억제하였다 (Park *et al.*, 2003). 지모에서 추출된 mangiferin은 신경쇠약을 완화하고, 항산화, 항당뇨 (Miura *et al.*, 2001), 항-HIV, 항암효과가 있는 것으로 나타났다 (Lai *et al.*, 2003). 그 외 지모의 뿌리줄기에는 아스포닌, 말코게닌, 치모닌 (chimonin), 프로코카테치산 (Prococathechic acid) 성분이 함유되어 있다.

지모 추출물의 항산화효과는 그다지 높지 않았으나 (Pan *et al.*, 2004), 지모 추출물은 항암효과를 보였고 (Shoemaker *et al.*, 2005), 인슐린 분비를 촉진하여 항당뇨 작용을 보였고 (Hoa *et al.*, 2004), 천식을 완화시켰다 (Yeum *et al.*, 2007). 지모, 감초, 인삼, 석고, 쌀 5가지 한약재가 주성분인 중국의 전통처방 “Byakko-ka-ninjin-to”가 당뇨병에 걸린 마우스의 혈당을 완화시키는 것이 확인되었고 (Kimura *et al.*, 1999), 가려움증과 아토피 피부염을 완화시켰다 (Tohda *et al.*, 2000). 홍미롭게도 홍콩에서 판매되는 수면제의 일부 성분으로 지모가 포함되어 있었다 (Chung *et al.*, 2002).

유전자의 염기서열을 이용하여 친자를 감별하고 한우감별, 녹용감별이 가능하듯 한약재의 감별이 가능하다 (An *et al.*, 2006; Yun *et al.*, 2006). DNA 염기서열을 이용하여 식물을 감별할 때, 식물에만 특징적으로 존재하는 기관인 엽록체 DNA를 이용하는데 그중에서 *trnL-F* 영역을 많이 이용한다 (Lang *et al.*, 2006). *trnL-F* 영역은 leucine-tRNA를 coding하는 *trnL* 유전자 (tRNA^{Leu} UAA (*trnL*) intron sequences)와 phenylalanine을 coding하는 *trnF* 유전자 사이의 영역을 말하는데, 세 가지 영역 즉, *trnL* intron, *trnL* 3'exon, *trnL-trnF* 사이의 intergenic non-coding 영역으로 구성된다 (Fig. 1). *TrnL-F* 영역을 이용하는 장점으로 첫째, *trnL-F* 영역은

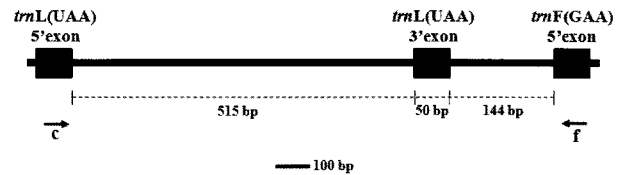


Fig. 1. Schematic diagram for *trnL-F* region of *A. asphodeloides*. The sizes of *trnL* intron, *trnL* 3'exon, *trnL-trnF* intergenic region were shown. Positions and directions of two universal primers for *trnL-F* were also shown.

NCBI에 방대한 양의 데이터가 축적되어 있어서, 감별하고자 하는 시료의 염기서열을 결정 후 NCBI Blast를 통해 데이터베이스의 염기서열과 비교하여 결론을 내릴 수가 있다. 둘째, *trnL-F* 영역을 구성하는 염기의 개수가 작기 때문에 건조 과정에서 손상된 한약재 DNA로부터 PCR 증폭 산물을 얻는데 어렵지 않다. 예를 들어, *trnL-F* 영역은 *rbcL* 유전자나 *matK* 유전자보다 염기의 개수가 적다. *rbcL* 유전자나 *matK* 유전자는 1,500 bp 이상의 크기인 반면 *trnL-F* 영역은 900 bp 크기밖에 안 된다. 셋째, *trnL-F* 영역은 size가 작기 때문에 sequencing할 때 Big-Dye PCR 반응을 forward와 reverse 반응 한번씩 만으로 염기서열을 결정할 수 있다. 넷째, *trnL-F* 영역은 intron과 intergenic 영역 (두개의 coding 유전자 사이의 non-coding 영역)이기 때문에 *rbcL* 유전자와 같은 다른 엽록체 유전자들보다 염기서열 변이가 커서 종 (species)간, 변종 (variety)간 또는 품종 (cultivar) 구별에도 사용이 가능하다.

본 연구에서는 식품의약품안전청에서 추진하는 한약재과학 화사업의 일환으로 지삼(地參)이라고 불리는 지모의 감별 연구를 추진하였다. 지모 DNA의 *trnL-F* 영역 염기서열을 결정하고, 이 염기서열을 이용하여 지모의 기원식물을 확인하고, 시중에서 유통되고 있는 한약재 지모가 *A. asphodeloides* 종 (species) 진품이 맞는지 확인하였다. 더 나아가, *trnL-F* 계통수를 구축하여 그 동안 백합과 (Liliaceae)로 분류되었던 지모의 계통학적 유연관계를 살펴보았다.

재료 및 방법

연구에 사용된 지모샘플을 Table 1에 나타내었다. 기존에 형태학적으로 분류가 이루어져서 기원이 확인된 지모 식물 2개를 농촌진흥청 작물과학원과 식약청 육천약초시험장에서 각각 수집하였다. 마찬가지로 경희대학교, 이화여자대학교, 동국대학교에서 형태학적 분류가 끝나서 효능연구가 진행되고 있는 지모 샘플을 16개 확보하였다. 시중에 유통되고 있는 한약재 샘플은 한국과 중국의 한약재 유통 시장에서 11개를 구매하여, 총 29개의 지모 샘플을 확보하였다. 지모 샘플은 액체질소로 얼린 후 유발에서 마쇄하고 Plant DNA isolation kit (GeneALL)을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. Agarose

Table 1. List of "Ji-Mo" samples used in this study

No.	Sample Name	Place	Area	Nation
1	jimo01	National Institute of Crop Science	Su-Won	Korea
2	jimo02	localmarket	Seoul	China
3	jimo03	Kyung-Hee University	Su-Won	Korea
4	jimo04	National Institute of Crop Science	Ok-Cheon	Korea
5	jimo05	Ih-Wha University	Seoul	Korea
6	jimo06	Ih-Wha University	Seoul	Korea
7	jimo07	Ih-Wha University	Seoul	Korea
8	jimo08	Ih-Wha University	Seoul	Korea
9	jimo09	Ih-Wha University	Seoul	Korea
10	jimo10	Ih-Wha University	Seoul	Korea
11	jimo11	Ih-Wha University	Seoul	China
12	jimo12	Kyung-Dong market	Seoul	China
13	jimo13	Kyung-Dong market	Seoul	China
14	jimo14	Kyung-Dong market	Seoul	China
15	jimo15	local market	An-Kook	Korea
16	jimo16	local market	An-Kook	Korea
17	jimo17	local market	Yun-Tae	China
18	jimo18	local market	Gil-Lim	China
19	jimo19	local market	Gil-Lim	China
20	jimo20	local market	Gil-Lim	China
21	jimo21	Dong-Kook University	Kyung-Buk	Korea
22	jimo22	Dong-Kook University	Kyung-Buk	Korea
23	jimo23	Dong-Kook University	Kyung-Buk	Korea
24	jimo24	Dong-Kook University	Kyung-Buk	Korea
25	jimo25	Dong-Kook University	Kyung-Buk	Korea
26	jimo26	localmarket	Ha-Buk	China
27	jimo27	Ih-Wha University	Seoul	Korea
28	jimo28	Ih-Wha University	Seoul	Korea
29	jimo29	Ih-Wha University	Seoul	Korea

gel과 UV spectrophotometer를 사용하여 분리된 DNA를 정량하였다.

TrnL-F 염기서열을 결정하기 위해, *trnL-F* 영역의 universal primer인 c와 f 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 프라이머의 염기서열은 c (5'-CGA AAT CGG TAG ACG CTA-3')와 f (5'-ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG-3')이었으며 (Taberlet *et al.*, 1991), PCR condition은 pre-denaturation 94°C, 1 min; denaturation 94°C, 60 sec; annealing 56°C, 30 sec; extension 72°C, 120 sec; 34 cycles 이었다. 증폭된 PCR 산물을 정제하여 (주)제노텍에 염기서열 결정을 의뢰하였다.

얻어진 지모의 염기서열은 NCBI에서 Blast를 수행하였다. 계통수를 그리기 위하여 Bioedit 프로그램으로 식물체의 염기서열들을 편집하였고, ClustalX 프로그램으로 염기서열을 정렬하였다. r계통수는 MEGA3 프로그램을 사용하여 구축되었다.

결과 및 고찰

1. 지모 *trnL-F* 염기서열의 결정 및 Blast

수집된 모든 지모 샘플에서 DNA를 분리하고 *trnL-F* 영역을 PCR 증폭한 후 염기서열을 분석하였다. 먼저, 기원이 분명한 지모 기원식물 2개의 *trnL-F* 염기서열을 서로 비교한 결과, 동일한 것으로 확인되었다 (100% 일치). 이것으로 두 기원식물들이 서로 동일한 것임을 확인할 수 있었다. 다음으로 한국과 중국에서 유통되는 한약재 샘플들 27개의 *trnL-F* 염기서열을 두 기원식물의 염기서열과 비교한 결과 모두 동일한 것으로 확인되었다 (100% 일치). 이것으로 한국과 중국의 한약재 시장에서 유통되는 한국산 지모와 중국산 지모 약재들이 모두 기원식물인 *A. asphodeloides* 종이라는 것을 확인할 수 있었다. 이것으로 지모의 형태학적인 분류 (Han *et al.*, 1997; Bae, 2000; Kim *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004)와 DNA 염기서열에 기반을 둔 분자유전학적인 분류가 동일한 결과를 보인다는 것을 확인할 수 있었다.

지모의 *trnL-F* 영역은 *trnL* 유전자의 intron 크기가 515 bp, *trnL* 유전자의 3'exon의 크기가 50 bp, *trnL* 유전자와 *trnF* exon 사이의 intergenic non-coding 영역이 144 bp이어서 모두 709 bp 크기를 가지고 있었다 (Fig. 1). *TrnL* 유전자 intron의 G+C content는 34.8%, *trnL* 유전자의 3' exon이 46.0%, *trnL* 유전자와 *trnF* exon 사이의 intergenic 영역이 27.8%, 전체 *trnL-F* 영역은 34.13% 이었다.

지모의 *trnL-F* 염기서열을 NCBI에서 Blast하였다. 그 결과, 지모의 *trnL-F* 염기서열이 NCBI에 등록되어 있지 않음을 확인하였고 본 연구에서 얻어진 지모 *trnL-F* 염기서열을 NCBI에 등록하였다 (accession number EU180056). 지모의 *trnL-F* 염기서열은 *Hosta ventricosa trnL-F* (AF508512, identities = 606/634 (95%)), *Hesperocallis undulata trnL-F* (AY561253, identities = 595/623 (95%))와 가장 유사한 것으로 나타났다. 그 외 *Massonia* sp., *Camassia quacumash* 외 여러 종의 *trnL-F* 염기서열이 92% 정도의 유사성을 보였다. 지모는 백합과 (*Liliaceae*)로 분류되어 왔으나 최근 NCBI Taxonomy browser (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Taxonomy>)에 따르면 지모 (*A. asphodeloides*)는 *Liliopsida*강 (class), *Asparagales*목 (order), 용설란과 (*Agavaceae*)로 분류되고 있다. 지모의 *trnL-F* 염기서열의 Blast 결과로는 지모가 백합과 (*Liliaceae*)보다는 용설란과 (*Agavaceae*)에 속하는 것으로 추측되었고 이에 지모의 재분류가 필요하다고 여겨졌다.

2. 염기서열의 정렬

NCBI에서 용설란과 (*Agavaceae*)로 분류된 22개 속 (genus)의 *trnL-F* 염기서열을 다운받았다. 이 염기서열들은 *trnL* 3'exon이나 *trnL* 유전자와 *trnF* exon 사이의 intergenic 영역

Table 2. Nucleotide divergences of *trnL*-F regions

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. <i>Anemarrhena asphodeloides</i> EU180056	-	0.951	0.951	0.951	0.948	0.94	0.94	0.938	0.929	0.922	0.743
2. <i>Hosta fortunei</i> AJ232446	26	-	0.995	0.986	0.979	0.973	0.973	0.975	0.964	0.952	0.749
3. <i>Hosta ventri</i> AF508512	26	3	-	0.986	0.979	0.973	0.973	0.975	0.964	0.952	0.751
4. <i>Hesperoyucca whipplei</i> DQ500912	26	7	7	-	0.988	0.975	0.979	0.982	0.973	0.959	0.753
5. <i>Hesperaloe funifera</i> DQ500913	28	11	11	6	-	0.986	0.975	0.977	0.966	0.952	0.752
6. <i>Hesperocallis undulata</i> AY56125	32	14	14	13	7	-	0.968	0.97	0.952	0.946	0.752
7. <i>Chlorogalum pomeridianum</i> AJ232449	32	14	14	11	13	17	-	0.997	0.957	0.946	0.743
8. <i>Chlorogalum palmatum</i> AJ232448	33	13	13	10	12	16	2	-	0.959	0.946	0.746
9. <i>Yucca queretaroensis</i> DQ500915	38	19	19	14	18	26	23	22	-	0.943	0.737
10. <i>Yucca rigida</i> DQ500916	41	26	26	22	26	29	29	29	30	-	0.749
11. <i>Panax ginseng</i> AF366930	137	134	132	131	132	132	137	135	140	134	-

보다는 주로 *trnL* intron의 염기서열이었다. 또한, 용설란과 (*Agavaceae*)가 속해 있는 *Asparagales*목 (order)의 여러 과 (family)를 대표하는 속 (genus)들의 *trnL*-F 염기서열을 다운받았다. ClustalX 프로그램을 이용하여 다운받은 염기서열들을 정렬하였고 정렬된 염기서열의 개수는 outgroup으로 넣은 인삼 (*Panax ginseng*)의 염기서열까지 54개였다. 정렬된 전체 염기서열의 크기는 532 bp이었고, 지모의 경우 정렬에 포함된 염기서열은 443 bp이었다.

Anemarrhena 속에는 종 (species)이 지모 하나뿐이어서 종 간의 divergence를 분석할 수 없었다. *TrnL*-F 염기서열 분석 결과 지모와 가장 가까운 종은 *Hosta fortunei*와 *Hosta ventri*이었고, nucleotide divergence가 4.9%, 염기 차이는 26 bp이었다 (Table 2). 다음으로 지모와 가까운 종들은 모두 NCBI Taxonomy browser에서 용설란과 (*Agavaceae*)의 속 (genus)들이었다.

3. 계통수 분석

계통학적 분석은 Neighbor-Joining method로 수행되었고 인삼 (*Panax ginseng*)을 외군 (outgroup)으로 사용하였는데 계통수에는 용설란과 (*Agavaceae*)의 여러 속 (genus)들과 용설란과 (*Agavaceae*)가 속해있는 *Asparagales*목 (order)의 여러 과 (family)를 대표하는 두 개 이상의 속 (genus)들로 구성되었다 (Fig. 2). Bootstrap 분석 결과, 12~100%의 bootstrap value가 나타나 계통수가 전체적으로 안정적이지 않았다. 이 계통수에서 지모 (*A. asphodeloides*)는 *Hosta* 속과 다른 용설란과 (*Agavaceae*) clade에서 sister group (자매군)으로 분지해 나왔고 이 때 bootstrap value는 55%에 불과했다. 이것은 지모가 용설란과 (*Agavaceae*)에 속하는지 아니면 독자적인 과 (family)를 형성하는지 결정하기 위해 용설란과 (*Agavaceae*)를 중심으로 더 많은 다양한 속 (genus)의 *trnL*-F 염기서열이 밝혀져야 함을 의미하고 그래서 bootstrap value가 높아진 계통수를 얻어야 함을 의미한다.

이 계통수에서 재분류의 여지가 남아있는 속 (genus)들을 살펴 보았다. 용설란과 (*Agavaceae*) clade에 있으면서 지모 다음으로 용설란과 (*Agavaceae*)에서 분지해 나온 속이 *Hosta*속인데, *Hosta*속은 수선화과 (*Hyacinthaceae*)라고 알려져 있기 때문에 *Hosta*속의 분류에 더 많은 연구가 필요함을 알 수 있었다. 그 다음으로 분지해 나온 *Yucca*속을 비롯한 다른 속 (genus)들은 모두 NCBI에서 용설란과 (*Agavaceae*)로 분류된 속 (genus)이었다. 지모 (*A. asphodeloides*) 밑에 위치한 *Anthericum*속은 용설란과 (*Agavaceae*)로 분류되어 있으나 이 계통수에서는 *Ruscaceae*과 clade에 위치하여 분류 연구가 더 필요함을 알 수 있었다.

4. *RbcL* 계통수 분석

TrnL-F 계통수의 유용성을 확인하기 위하여 *rbcL* 유전자 염기서열을 이용하여 계통수를 그리고, *trnL*-F 계통수와 비교해 보았다. *RbcL* 유전자 염기서열 분석 결과 지모와 가장 가까운 종은 *Hesperocallis undulata*이었고, nucleotide divergence가 2.4%, 염기 차이는 30 bp이었다 (Table 3). 다음으로 지모와 가까운 종은 모두 NCBI Taxonomy browser에서 용설란과 (*Agavaceae*)로 분류된 속 (genus)이었다. *TrnL*-F 염기서열에서 지모와 가장 가까웠던 *Hosta*속은 *rbcL* 유전자 염기서열에서 다소 차이를 보였지만, 지모와 가장 가까운 *Hesperocallis undulata*와 *Hosta*속의 *rbcL* 염기서열과의 차이가 크지 않았다.

RbcL 계통수에서 (Fig. 3) 지모는 용설란과 (*Agavaceae*)와 sister group임을 나타내는 clade로 분지되었는데 이때 bootstrap value가 37%로서 낮았다. *RbcL* 계통수 역시 지모가 용설란과 (*Agavaceae*)로 분류되는 결정적인 증거를 제시하지 못하고 있다. *Hosta*속은 *rbcL* 계통수에서도 용설란과 (*Agavaceae*) clade에 위치하여 재분류가 필요함을 다시 확인하였다.

두 계통수 (*trnL*-F 계통수와 *rbcL* 계통수)에서 아스파라거스과 (*Asparagaceae*), 수선화과 (*Hyacinthaceae*), 붓꽃과 (*Iridaceae*) 등은 아스파라거스목 (*Asparagales*) 내에서 높은

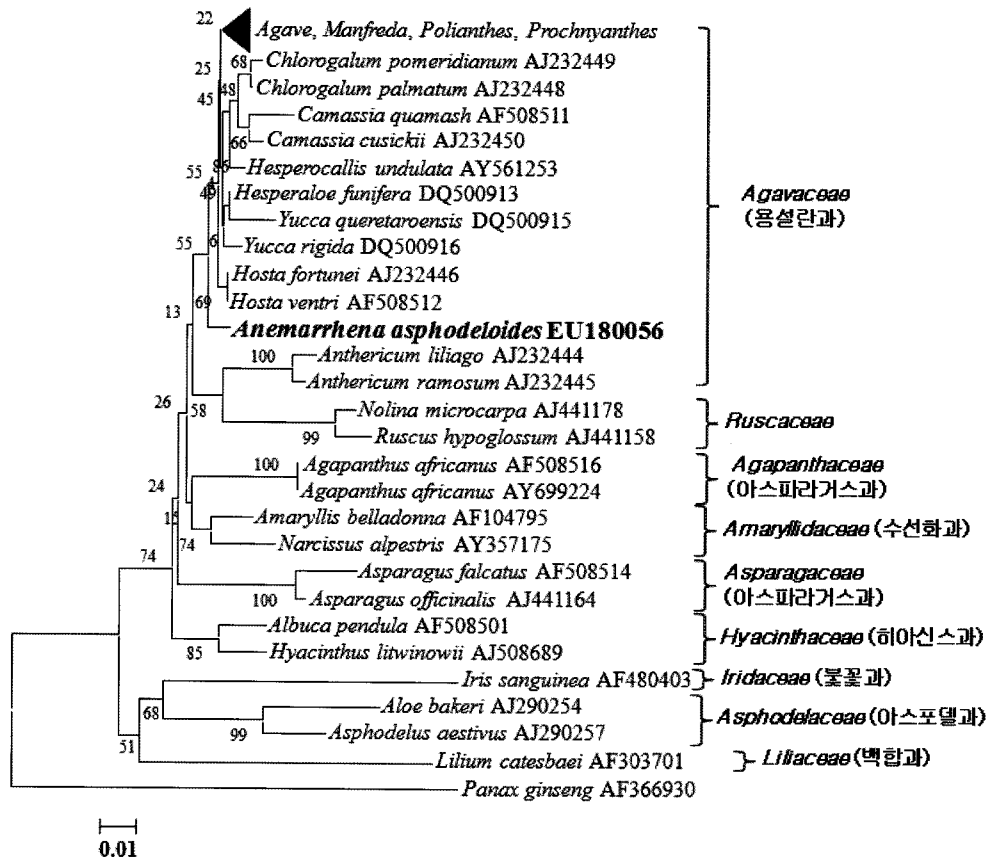


Fig. 2. The Neighbor-joining tree of *trnL-F* sequences of species belonging to various families in *Asparagales* order.

Table 3. Nucleotide divergences of *rbcl* genes

Taxa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. <i>Anemarrhena asphodeloides</i> Z77251	—	0.976	0.975	0.974	0.974	0.974	0.972	0.972	0.972	0.971	0.970	0.970	0.970	0.969	0.913
2. <i>Hesperocallis undulata</i> AY56125	30	—	0.996	0.968	0.971	0.986	0.988	0.972	0.968	0.992	0.966	0.984	0.968	0.990	0.909
3. <i>Chlorogalum pomeridianum</i> Z69228	31	5	—	0.967	0.970	0.987	0.988	0.971	0.966	0.992	0.965	0.984	0.966	0.989	0.908
4. <i>Asparagus capensis</i> AM234843	33	40	41	—	0.968	0.965	0.964	0.968	0.968	0.964	0.966	0.960	0.968	0.966	0.909
5. <i>Polygonatum cirrhi</i> AB029827	33	36	38	40	—	0.970	0.967	0.973	0.977	0.966	0.971	0.965	0.972	0.967	0.909
6. <i>Behnia reticulata</i> Z69226	33	18	16	44	38	—	0.982	0.968	0.966	0.983	0.966	0.978	0.965	0.981	0.905
7. <i>Herreria montevidense</i> Z69230	35	15	15	45	41	23	—	0.970	0.964	0.984	0.964	0.980	0.963	0.981	0.906
8. <i>Amaryllis belladonna</i> Z69219	35	35	36	40	34	40	38	—	0.971	0.967	0.980	0.964	0.973	0.965	0.909
9. <i>Iri sensata</i> D28332	35	40	43	40	29	43	45	36	—	0.963	0.965	0.960	0.969	0.962	0.912
10. <i>Camassia leichtlinii</i> Z69238	36	10	10	45	43	21	20	41	46	—	0.963	0.980	0.964	0.987	0.910
11. <i>Narcissus elegans</i> AF116972	38	43	44	43	36	43	45	25	44	46	—	0.960	0.971	0.961	0.907
12. <i>Anthericum liliago</i> Z69225	38	20	20	50	44	28	25	45	50	25	50	—	0.967	0.980	0.904
13. <i>Albuca shawii</i> Z69223	38	40	43	40	35	44	46	34	39	45	36	41	—	0.965	0.909
14. <i>Hosta rectifolia</i> L10253	39	13	14	43	41	24	24	44	48	16	49	25	44	—	0.906
15. <i>Panax ginseng</i> NC006290	109	114	115	114	114	119	118	114	110	113	117	120	114	118	—

bootstrap value들을 가지는 안정된 clade를 형성하고 있어서 분류가 잘 되어진 것을 알 수 있었다. NCBI Taxonomy browser에서 백합속 (*Lilium*)은 백합과 (*Liliaceae*), 백합목

(*Liliales*)으로 등록되어 있다. 실제로 백합과 (*Liliaceae*)는 두 계통수에서 모두 아스파라거스목 (*Asparagales*)의 바깥에 위치하고 있으며 outgroup (*P. ginseng*) 바로 인쪽에 위치하여서,

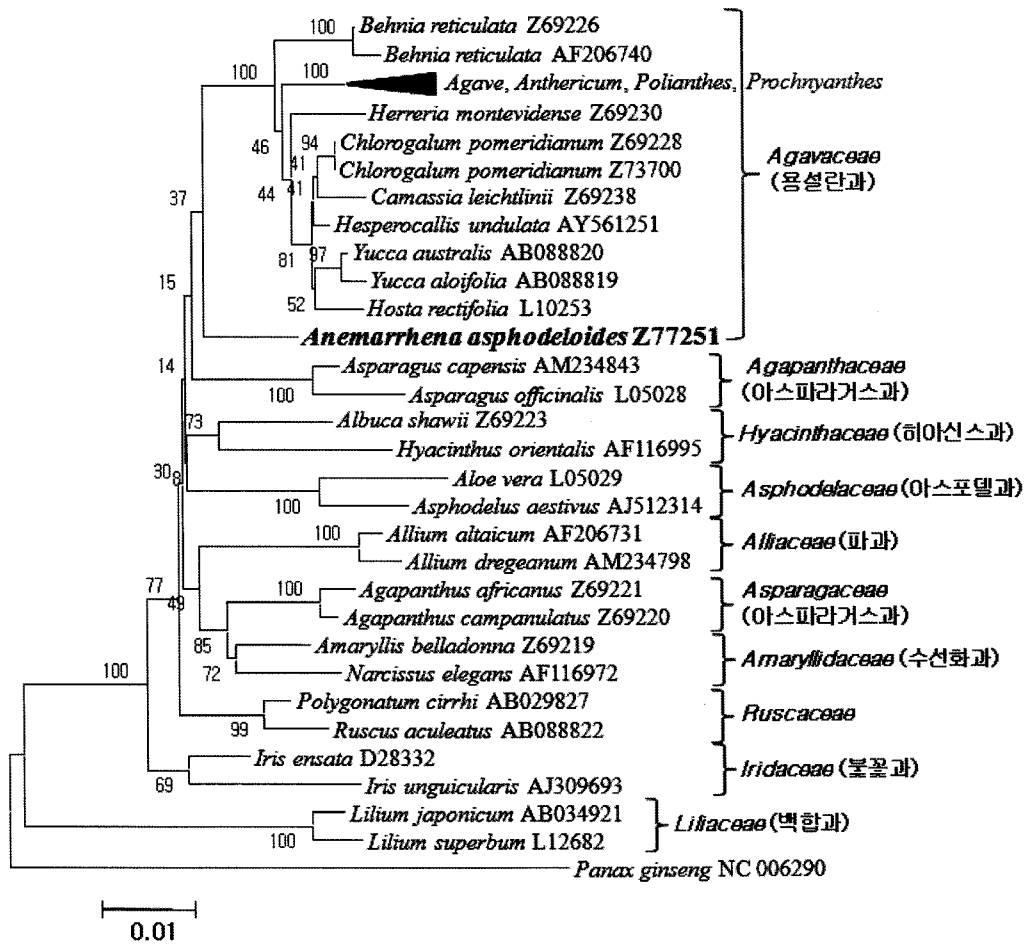


Fig. 3. The Neighbor-joining tree of *rbcL* gene sequences of species belonging to various families in Asparagales order.

지모가 분류되어 있는 아스파라거스목 (*Asparagales*)에서 상당한 차이가 있음을 확인하였다.

지금까지 지모는 백합과 (*Liliaceae*-lily family)로 알려져 왔으나 최근 NCBI Taxonomy browser에서 지모는 아스파라거스목 (*Asparagales*) 용설란과 (*Agavaceae*)로 분류되어 있다. 백합과 (*Liliaceae*)는 백합목 (*Liliales*)에 속하며 아스파라거스목 (*Asparagales*)하고는 완전히 다른 목 (order)이다. 본 연구에서 지모의 *trnL-F* 계통수와 *rbcL* 계통수 결과가 유사한 결론을 도출하였는데 이것은 NCBI Taxonomy browser의 분류와 일치하고 있었다. 이 두 계통수는 기존에 발표된 *Asparagales*목의 계통수와 유사함을 또한 확인하였다 (Chase et al., 2000).

적 요

지모 (*Anemarrhena asphodeloides*)는 탁월한 해열작용과 진정작용을 갖는 한약재로 한국, 중국, 일본에서 널리 이용되어

왔다. 본 연구에서는 먼저 국내 연구소에서 형태학적 분류 결과 지모로 확인된 3종의 식물체를 수집하여 염색체 DNA의 *trnL-F* 염기서열을 분석하였다. 분석 결과, 국내 연구기관에서 보관중인 지모 식물체들이 모두 동일한 *trnL-F*의 염기서열을 보여서, 형태학적 분류와 계통유전학적 분류가 동일함을 확인하였다. 최초로 얻어진 지모 *trnL-F* 염기서열은 NCBI database에 등록하였다. 다음으로 국내 한약재 시장과 중국 한약재 시장에서 유통 중인 지모 한약재를 다량 구입하여 *trnL-F*의 염기서열을 분석하였다. 그 결과, 유통 중인 지모 한약재들이 모두 기원식물과 동일한 *TrnL-F*의 염기서열을 보여서 지모 약재의 경우 진품이 유통되고 있음을 알 수 있었다. *TrnL-F*의 염기서열로 계통수를 작성한 결과 지모는 아스파라거스목 (*Asparagales*), 용설란과 (*Agavaceae*)에 속한 것으로 보였다. 염색체 *rbcL* 유전자 염기서열로 얻은 계통수와 비교한 결과 *trnL-F* 계통수와 *rbcL* 계통수가 비슷한 결과를 보여주어서 분자유전학적 분류에 두 유전자가 상호보완적으로 이용될 수 있음을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 2007년도 식품의약품안전청 용역연구개발사업의 연구비지원 (07092한약재335)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다. 지모의 형태학적인 분류와 시료 확보로 도와주신 농촌진흥청 작물과학원과 식약청 육천약초시험장 성락선 과장님, 이화여자대학교 서은경 교수님, 그리고 동국대학교 이제현 교수님께 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- An SM, Ryuk JA, Kim YH, Chae BC, Kim HJ, Kim KH, Kang KK, Ko BS, Lee MY** (2006) Genetic analysis of polygonati rhizoma and polygonati odorati rhizoma using random amplified microsatellite polymorphism. *Korean J Medicinal Crop Sci.* 14:125-129.
- Bao W, Pan H, Lu M, Ni Y, Zhang R, Gong X** (2007) The apoptotic effect of sarsasapogenin from *Anemarrhena asphodeloides* on HepG2 human hepatoma cells. *Cell Biol Int.* 31:887-892.
- Bae KH** (2000) The medicinal plants of Korea. Kyohaksa. Seoul. Korea. p. 546.
- Chase MW, De Bruijn AY, Cox AV, Reeves G, Rudall PJ, Johnson MAT, Eguiarte LE** (2000) Phylogenetics of *Asphodelaceae* (*Asparagales*): An analysis of plastid *rbcL* and *trnL-F* DNA sequences. *Ann Bot-London.* 86:935-951.
- Chung KF** (2002) Over-the-counter sleeping pills: a survey of use in Hong Kong and a review of their constituents. *Gen Hosp Psychiat.* 24:430-435.
- Han SH, Park SI** (1997) Classification of Korean native *Anemarrhena asphodeloides* Bunge by cluster analysis. *Korean J Medicinal Crop Sci.* 5:266-275.
- Hoa NK, Phan DV, Thuan ND, Ostenson CG** (2004) Insulin secretion is stimulated by ethanol extract of *Anemarrhena asphodeloides* in isolated islet of healthy Wistar and diabetic Goto-Kakizaki rats. *Exp Clin Endocr Diab.* 112:520-525.
- Hu Y, Xia Z, Sun Q, Orsi A, Ree D** (2005) A new approach to the pharmacological regulation of memory: sarsasapogenin improves memory by elevating the low muscarinic acetylcholine receptor density in brains of memory-deficit rat models. *Brain Res.* 1060:26-39.
- Kimura I, Sugihara N, Nakashima Y, Chen FJ, Kimura M** (1999) The anti-hyperglycaemic blend effect of traditional Chinese medicine Byakko-ka-ninjin-to on alloxan and diabetic KK-Cay mice. *Phytother Res.* 13:484-488.
- Kim SY, Choi HW, Bang JW** (2004) Physical mapping of rDNAs using McFISH in *Anemarrhena asphodeloides* Bunge. *Korean J Medicinal Crop Sci.* 12:515-518.
- Kim SY, Koo DH, Bang JW** (2002) Karyotype analysis of *Anemarrhena asphodeloides* Bunge. *Korean J Medicinal Crop Sci.* 10:144-146.
- Lai L, Lin LC, Lin JH, Tsai TH** (2003) Pharmacokinetic study of free mangiferin in rats by microdialysis coupled with microbore high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 987:367-374.
- Lang P, Dane F, Kubisiak TL** (2006) Phylogeny of *Castanea* (Fagaceae) based on chloroplast *trnT-L-F* sequence data. *Tree Genetics & Genomes.* 2:132-139.
- Li TJ, Qiu Y, Yang PY, Rui YC, Chen WS** (2007) Timosaponin B-II improves memory and learning dysfunction induced by cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett.* 421:147-151.
- Miura T, Ichiki H, Iwamoto N, Kato M, Kubo M, Sasaki H, et al** (2001) Anti-diabetic activity of the rhizoma of *Anemarrhena asphodeloides* and active components, mangiferin and its glucoside. *Biol Pharm Bull.* 24:1009-1011.
- Pan Y, Liang Y, Wang H, Liang M** (2004) Antioxidant activities of several Chinese medicine herbs. *Food Chem.* 88:347-350.
- Park HJ, Lee JY, Moon SS, Hwang BK** (2003) Isolation and anti-oomycete activity of niasol from *Anemarrhena asphodeloides* rhizomes. *Phytochemistry.* 64:997-1001.
- Shoemaker M, Hamilton B, Dairkee SH, Cohen I, Campbell MJ** (2005) In vitro anticancer activity of twelve Chinese medicinal herbs. *Phytother Res.* 19:649-651.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J** (1991) Universal primers for amplification of three non-coding region of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol.* 17:1105-1109.
- Tohda C, Sugahara H, Kuraishi Y, Komatsu K** (2000) Inhibitory effect of Byakko-ka-ninjin-to on itch in a mouse model of atopic dermatitis. *Phytother Res.* 14:192-194.
- Wang GJ, Lin LC, Chen CF, Cheng JS, Lo YK, Chou KJ, Lee KC, Liu CP, Wu YY, Su W, Chen WC, Jan CR** (2002) Effect of timosaponin A-III, from *Anemarrhena asphodeloides* Bunge (Liliaceae), on calcium mobilization in vascular endothelial and smooth muscle cells and on vascular tension. *Life Sci.* 71: 1081-1090.
- Yeum HS, Lee YC, Kim SH, Roh SS, Lee JC, Seo YB** (2007) *Fritillaria cirrhosa*, *Anemarrhena asphodeloides*, Lee-Mo-Tang and cyclosporine A inhibit ovalbumin-induced eosinophil accumulation and Th2-mediated bronchial hyper-responsiveness in a murine model of asthma. *Journal compilation.* 100:205-213.
- Yun JS, Kim IH, Park JS, Lee CH, Hong EY, Yun T, Jong SK** (2006) Characterization of 18S rDNA in *Polygonatum* sp. collections. *Korean J Medicinal Crop Sci.* 14:178-182.
- Zhang J, Meng Z, Zhang M, Ma D, Xu S, Kodama H** (1999) Effect of six steroidal saponins isolated from *Anemarrhena* rhizoma on platelet aggregation and hemolysis in human blood. *Clin Chim Acta.* 289:79-88.
- Zhang J, Zhang M, Sugahara K, Sagara Y, Meng Z, Xu S, Kodama H** (1999) Effect of steroidal saponins of *Anemarrhena* rhizoma on superoxide generation in human neutrophils. *Biochem Bioph Res Co.* 259:636-639.