

한국산 동굴레속 식물의 형태적 특성 및 엽록체 DNA 염기서열을 이용한 유연관계 분석

김정훈* · 서재완* · 변지희* · 안영섭** · 차선우** · 조준형*†

*동국대학교 바이오환경과학과, **농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부

Morphological Characteristics and Phylogenetic Analysis of *Polygonatum* Species Based on Chloroplast DNA Sequences

Jeong Hun Kim*, Jae Wan Seo*, Ji Hui Byeon*, Young Sup Ahn**, Seon Woo Cha** and Joon Hyeong Cho*†

*Department of Biological & Environmental Science, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea.

**Department of Herb Crop Resources, NIHHS, RDA, Eumseong 369-873, Korea.

ABSTRACT : *Polygonatum* is a genus placed in the family Liliaceae, distributed throughout the Northern Hemisphere and 16 of the species are grown naturally in Korea. In oriental medicine, the rhizomes of *Polygonatum* have been used as two different medicines, Okjuk (*Polygonati odorati* Rhizoma) and Hwangjeong (*Polygonati* Rhizoma). However, it is difficult to identify the morphological and chemical differences between the medicinal groups and thus easy to confuse the one with the other. Therefore, a clear classification standard needs to be established so as to be able to discriminate between them. In the study, the morphological characteristics of the plants, *Polygonatum* spp., were examined. Then, the differences in SNPs among the DNA sequences of 7 of the *Polygonatum* spp. and 1 of the *Disporum* spp. were analyzed by DNA barcoding with *rpoC1*, *rpoB2*, *matK*, and *psbA-trnH* of the cpDNA region. In the results, three regions, *rpoC1*, *rpoB2*, and *matK* were useful for discriminating the species, *P. stenophyllum* and *P. sibiricum*. Furthermore, it was possible to discriminate the individual germplasm within the species by using the combination of the results obtained from *rpoB2*, *rpoC1*, and *matK*.

Key Words : DNA Barcoding, *Polygonatum*, SNPs, *rpoC1*, *rpoB2*, *matK*, *psbA-trnH*

서 언

동굴레속 (*Polygonatum*)은 백합과 (Liliaceae)에 속하는 다년생 초본으로 북미, 유럽 등 전 세계적으로 40여종이 분포하며, 국내에는 16종이 자생하는 것으로 알려져 있다 (Jang and Kim, 1999). 동굴레는 동양의 전통 한의학에서 옥죽 (玉竹) 또는 위유 (萎蕤)와 황정(黃精)으로 명명되어 이용되어 왔다 (Ahn, 1985). 옥죽과 황정은 동굴레속 식물의 뿌리줄기로부터 기원된 한약재로서, 옥죽은 혈압강하, 혈관수축 (An *et al.*, 2006), 지질강하 (Seo *et al.*, 2011) 등에, 황정은 항균, 항진균, 혈압강하 등에 효과가 있다고 알려져 있다 (Kim *et al.*, 1998). 옥죽과 황정의 기원종에 대한 기준은 각 나라마다 다

르며, 그 기준 자체도 명확하지 않다. 대한민국약전에 따르면 국내에서는 동굴레 (*Polygonatum odoratum*)와 동속 근연종의 근경을 '옥죽 (위유), 층층갈고리동굴레 (*P. sibiricum*)와 진황정 (*P. falcatum*)의 근경을 '황정'으로 기재하고 있다. 옥죽과 황정의 적절한 이용을 위해서는 기원 식물 종을 명확히 확립할 필요가 있으나, 이처럼 분류 기준이 불분명하고, 찌거나 볶는 등의 가공과정을 거쳐 다양한 형태로 유통되기 때문에 한약재의 기원식물을 명확하게 판별하는 데에는 한계가 있다.

따라서 동굴레속 식물의 종판별을 위해 현재까지 형태학적 특성, 이화학적 성분, 분자생물학적 방법 등 많은 연구가 진행되어왔다. 형태학적 연구에 있어서 Jang (2002)은 엽서, 포, 줄기의 능각, 지하경, 염색체 수 등 형태적 특성을 기준으로

†Corresponding author: (Phone) +82-2-2260-3308 (E-mail) jhcho@dongguk.edu

Received 2014 October 24 / 1st Revised 2014 November 1 / 2nd Revised 2014 November 6 / 3rd Revised 2014 November 11 / Accepted 2014 November 12

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

국내산 둥굴레속 식물을 14종과 2변종, 총 16분류군으로 정리한 바 있다. 그러나 형태학적 특성은 동일종 내에서도 지역에 따라 다른 경우가 많으며 (Jang and Kim, 1999), 한약재 유통 시 절단 가공된 상태이므로 식물 원종의 명확한 판별에는 한계가 있다. 또한 Jang 등 (2002)의 둥굴레종 뿌리줄기 성분 분석 연구에서 각 종의 성분이 유사한 결과를 보였으며, 타 약용식물의 성분 또한 재배환경의 영향을 받을 수 있어 이화학적 판별 역시 한계가 있다 (An and Chung, 2014).

분자생물학적 방법은 형태적 및 이화학적 판별에서의 한계를 보완하고 종판별 결과의 신뢰도를 향상시켜 종 분류 및 계통분석에 관한 연구에 흔히 이용된다 (Williams *et al.*, 1990; Moon *et al.*, 2013). 둥굴레속 판별에는 현재까지 RAPD (Lee *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2004), RAMP (Ahn *et al.*, 2006), rDNA를 이용한 염기서열 분석 (Yun *et al.*, 2006) 등이 적용되었다. 식물 종판별을 위한 유전적 다양성분석을 위해 최근 DNA barcoding 기술이 제안되어 그 유용성이 인정되었다 (Hebert *et al.*, 2003; CBOL Plant Working Group, 2009). DNA barcoding은 각각 다른 생물 종 유전체에서 유래된 동일 유전자 부위의 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) 다형성 분석으로 생물 종을 식별하는 표준화된 방법이다. 동물 종판별에는 미토콘드리아 DNA의 CO1 (cytochrome c oxidase subunit 1) 분석이 유용하지만, 식물 종판별의 경우 표준화된 유전자 부위가 없어 엽록체 DNA의 coding region인 *matK*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*와 non-coding region인 *atpF-atpH*, *psbK-psbI*, *psbA-trnH* spacer 등의 이용이 제시되고 있다 (CBOL Plant Working Group, 2009). DNA barcoding 기술은 다량의 생물 종을 표준화된 유전자 부위로 동시에 분석할 수 있다. 또한 식물의 형태적 특성 및 유효성분 분석에 의한 식물 종판별이 불가능한 경우 이를 보완할 수 있으며, 종간차이는 물론 종내 변이 규명에도 이용이 가능하다 (Li *et al.*, 2011). 따라서 이 기술은 분류기준이 명확하지 않은 둥굴레속 식물자원의 종판별은 물론 이들의 가공 약재인 옥죽과 향정의 원재료 식물 판별에 유용할 것으로 판단된다.

본 연구는 둥굴레속 식물종간 외부 형태적 특성 비교는 물론, 엽록체 DNA 구간 내 바코드 후보 유전자인 *rpoC1*, *rpoB2*, *matK*, *psbA-trnH* 각 4개의 구간으로부터 발견된 SNPs 다형성을 분석함으로써 분자생물학적 측면에서의 둥굴레속 식물의 종 판별법을 모색하고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 공시재료

본 연구를 위해 일산 소재 동국대학교 실험농장에서 보유증식 중인 둥굴레 (*Polygonatum odoratum* var. *pluriflorum*), 무늬둥굴레 (*P. odoratum* var. *pluriflorum* f. *variegatum*)와

포항기청산식물원, 충북농업기술원, 농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부에서 분양받은 각시둥굴레 (*P. humile*), 용둥굴레 (*P. involucratum*), 층층둥굴레 (*P. stenophyllum*), 층층갈고리둥굴레 (*P. sibiricum*), 진황정 (*P. falcatum*) 등 총 7종 12점의 식물자원을 공시재료로 사용하였으며, 공시재료의 분류학적 구분은 농촌진흥청 농업유전자원센터에 의뢰하였다. 또한 둥굴레와 형태적으로 유사한 애기나리속 윤판나물 (*Disporum sessile*) 1점과 서울 경동시장에서 구입한 가공되지 않은 둥굴레속 한약재 옥죽 1점을 둥굴레 생체 시료들과 비교하고자 사용하였다 (Table 1).

2. 외부 형태적 분석

둥굴레속 식물체의 외부 형태적 분석을 위해 수집지역별로 3개체씩 선별하여 종간의 형태적 차이를 비교하였다. 이를 위하여 엽장 및 엽폭, 장폭비를 측정하였으며, 엽연 (葉緣), 엽선 (葉先), 엽맥 (葉脈), 근경 (根莖) 등 각 식물종의 형태적 특성을 비교하였다.

3. DNA 추출 및 PCR 분석

둥굴레속 식물체의 엽록체 DNA를 추출하기 위해 식물체의 잎으로부터 HiYield™ Genomic DNA Mini Kit (RBC, Inc., Taipei, Taiwan)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 처리하였다. 추출된 DNA는 Multiskan GO UV/Vis microplate spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 농도 및 순도를 확인하였으며 각각의 시료를 20 ng/μl로 정량하여 PCR 반응에 사용하였다. PCR 분석을 위해 엽록체 DNA 구간인 *rpoC1*, *rpoB2*, *matK*, *psbA-trnH*의 서열 내에서 primer를 제작하여 각각 사용하였으며, PCR 증폭은 40 ng genomic DNA와 forward 및 reverse primer 10 pmol, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 2.0 mM MgCl₂, 2 unit Taq-DNA polymerase와 함께 총 반응액을 40 μl로 하여 Thermo cycler (PTC-200 DNA Engine, Bio-Rad Co., Hercules, CA, USA)에서 각 primer 조건별로 수행하였다 (Table 2). PCR 증폭은 결과의 신뢰도를 높이기 위하여 각 시료 당 2회 씩 반복하였다.

4. 염기서열과 계통학적 유연관계 분석

증폭된 PCR 산물은 정제 후 (쥬제노텍 (Genotech Inc., Daejeon, Korea)에 의뢰하여 ABI Prism 3730xl DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA)로 염기서열을 분석하였다. 또한 본 연구에 사용된 둥굴레의 종간 염기서열 차이 비교를 위해 NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA)에 등록된 동일 종 또는 실험에 제외된 총 13종을 선정하여 적용하였다. 각 시료의 염기서열은 BioEdit version 7.2.5 프로그램 (<http://>

한국산 둥굴레속 (*Polygonatum*) 식물의 유연관계 분석

Table 1. List of the *Polygonatum* spp. used in this study.

No.	Testing materials	Collected region	Note
1	<i>Polygonatum odoratum</i> var. <i>pluriflorum</i>	Pohang	fresh leaf
2	<i>P. odoratum</i> var. <i>pluriflorum</i>	Ilisan	fresh leaf
3	<i>P. odoratum</i> var. <i>pluriflorum</i> f. <i>variegatum</i>	Pohang	fresh leaf
4	<i>P. odoratum</i> var. <i>pluriflorum</i> f. <i>variegatum</i>	Ilisan	fresh leaf
5	<i>P. odoratum</i> var. <i>pluriflorum</i> f. <i>variegatum</i>	Cheongju	fresh leaf
6	<i>P. stenophyllum</i>	Eumseong	fresh leaf
7	<i>P. stenophyllum</i>	Pohang	fresh leaf
8	<i>P. sibiricum</i>	Cheongju	fresh leaf
9	<i>P. falcatum</i>	Pohang	fresh leaf
10	<i>P. falcatum</i>	Cheongju	fresh leaf
11	<i>P. involucreatum</i>	Pohang	fresh leaf
12	<i>P. humile</i>	Pohang	fresh leaf
13	<i>Disporum sessile</i>	Ilisan	fresh leaf
14*	<i>P. odoratum</i>	NCBI Genbank	GQ435909
15	<i>P. odoratum</i>	NCBI Genbank	KC704705
16	<i>P. odoratum</i> var. <i>pluriflorum</i>	NCBI Genbank	KC704436
17	<i>P. robustum</i>	NCBI Genbank	KC704444
18	<i>P. robustum</i>	NCBI Genbank	KC704714
19	<i>P. lasianthum</i>	NCBI Genbank	JF972785
20	<i>P. lasianthum</i>	NCBI Genbank	KC704431
21	<i>P. lasianthum</i>	NCBI Genbank	KC704701
22	<i>P. involucreatum</i>	NCBI Genbank	JF972784
23	<i>P. humile</i>	NCBI Genbank	JF972782
24	<i>P. grandicaule</i>	NCBI Genbank	KC704416
25	<i>P. grandicaule</i>	NCBI Genbank	KC704686
26	<i>P. cryptanthum</i>	NCBI Genbank	JF972781
27	<i>D. cantonienase</i>	NCBI Genbank	GQ434915
28	<i>D. cantonienase</i>	NCBI Genbank	GQ435902
29	Okjuk	Kyeongdong medicinal market	dried

*The sequence informations of number 14 to 28 were recorded in NCBI Genbank database.

Table 2. PCR condition of primers from cpDNA region.

Region	Step						Reaction cycle
	Denaturation		Annealing		Extension		
	Temp. (°C)	Time (sec.)	Temp. (°C)	Time (sec.)	Temp. (°C)	Time (sec.)	
<i>rpoC1</i>		30	53	40		40	40
<i>rpoB2</i>	94	30	55	30	72	60	35
<i>matK</i>		30	52	20		50	35
<i>psbA-trnH</i>		30	57	30		40	40

bioedit.software.informer.com)의 ClustalW multiple alignment 로 정렬한 후 MEGA6 (molecular evolutionary genetics analysis version 6.0) (Tamura *et al.*, 2004)를 이용하여 Neighbor-Joining (NJ) 방법으로 (Saitou and Nei, 1987) 분

석하여 phylogenetic tree를 작성하였으며, 계통수에 대한 지지도는 Bootstrap 값을 1000회 반복하여 평가하였다 (Felsenstein, 1985).

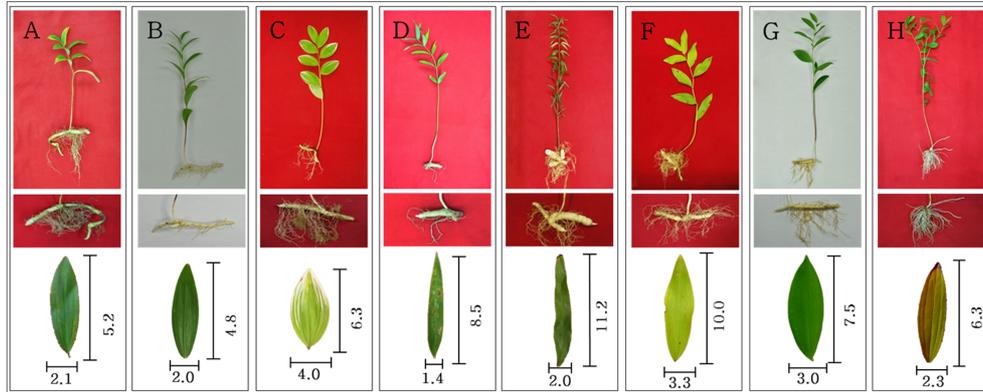


Fig. 1. Morphological characteristics of *Polygonatum* species. A; *P. odoratum* var. *pluriflorum*, B; *P. humile*, C; *P. odoratum* var. *pluriflorum* f. *variegatum*, D; *P. stenophyllum*, E; *P. sibiricum*, F; *P. falcatum*, G; *P. involucreatum*, H; *Disporum sessile*.

Table 3. Comparison of leaf characteristics of testing plants.

	<i>Polygonatum odoratum</i> var. <i>pluriflorum</i>	<i>P. humile</i>	<i>P. odoratum</i> var. <i>pluriflorum</i> f. <i>variegatum</i>	<i>P. stenophyllum</i>	<i>P. sibiricum</i>	<i>P. falcatum</i>	<i>P. Involucreatum</i>	<i>Disporum sessile</i>
length : width	2.5 : 1	2.4 : 1	1.6 : 1	6.1 : 1	5.6 : 1	3.0 : 1	2.5 : 1	2.7 : 1
Shape	Oblong	Oblong	Oval	Linear	Linear	Oblong	Oblong	Oblong
Margin	Entire	Entire	Entire	Entire	Entire	Entire	Entire	Entire
Venation	Parallel	Parallel	Parallel	Parallel	Parallel	Parallel	Parallel	Parallel
Arrangement	Alternate	Alternate	Alternate	Whorled	Whorled	Alternate	Alternate	Alternate
Apex	Acute	Acute	Acute	Acute	Acute	Acute	Apiculate	Acute

결 과

1. 외부 형태적 특성 비교

등굴레속 식물의 외부 형태적 특성을 비교한 결과는 Fig. 1 및 Table 3와 같다. 엽장은 층층갈고리등굴레가 다른 종들에 비해 길었으며 장폭비는 층층등굴레와 함께 약 6:1로 선형의 엽형인 것을 확인하였다 (Fig. 1D, E). 한편 진황정을 포함한 타 등굴레 속 식물체들의 엽형은 난형 (Fig. 1C) 또는 장타원형인 것으로 확인되어 (Fig. 1A, B, F, G), 층층등굴레 및 층층갈고리등굴레의 잎은 타 등굴레 식물 종들과 뚜렷하게 구별되었다. 엽연은 등굴레속 전체가 거치가 없이 밋밋하였으며, 엽맥은 평행맥이었다 (Table 3). 등굴레 속 식물체의 엽선은 전반적으로 뾰족한 형태이며, 층층갈고리등굴레의 경우 잎 끝이 말리는 것이 층층등굴레를 포함한 등굴레속 잎들의 뾰족한 말단과 구별되었다. 엽서는 층층등굴레와 층층갈고리등굴레의 경우, 3개에서 8개의 잎이 운생하며 이를 제외한 나머지 종은 호생하는 것으로 확인되었다. 뿌리줄기의 직경은 층층갈고리등굴레가 가장 굵었으며, 각시등굴레가 가장 가늘어 타종과 뚜렷한 차이를 보였다. 그러나 뿌리줄기가 한약재로서 시중에 유통될 때에는 다양한 형태로 가공되고 있으므로 외부 형태적 특성 비교에 따른 명확한 판별에는 한계가 있을 것으로 사료된다.

2. PCR 증폭 및 종간 염기서열 분석

7종의 등굴레속 식물의 엽록체 DNA로부터 *rpoC1*, *rpoB2*, *matK*, *psbA-trnH* 구간을 PCR 증폭한 결과, *rpoC1*에서는 약 550 ~ 600 bp, *rpoB2*에서는 약 550 ~ 600 bp, *matK*에서는 약 900 ~ 950 bp, *psbA-trnH*에서는 약 650 ~ 700 bp의 범위에서 PCR 산물이 확인되었다 (Fig. 2). 각 PCR 산물은 정제하여 염기서열분석 및 정렬 후, 각각 432 bp, 463 bp, 811 bp, 563 bp의 염기서열에 대한 SNP 분석을 수행하였다. 또한 phylogenetic tree 내에서 발생한 분기점에 대한 Bootstrap value를 참고하여 종간 차이를 분석하였다.

1) *rpoC1*

엽록체 DNA의 coding region인 *rpoC1* 구간에서 확인된 SNP는 총 25개로 각시등굴레에서 1개, 등굴레속과 동일한 백합과에 속하는 애기나리속인 윤판나물에서 23개의 SNP가 발견되었으며, 윤판나물과 대만윤판나물 (*D. cantoniense*, Genbank accession no. GQ435902) 사이에는 1개의 SNP 차이가 확인되었다 (data not shown). Bootstrap을 분석한 결과, 윤판나물과 등굴레속은 100%의 bootstrap value로 자매군 (Sister group)으로서 명확하게 분지되었다 (Fig. 3). 등굴레속 내에서는 층층등굴레와 층층갈고리등굴레가 하나의 집단으로

한국산 둥굴레속 (*Polygonatum*) 식물의 유연관계 분석

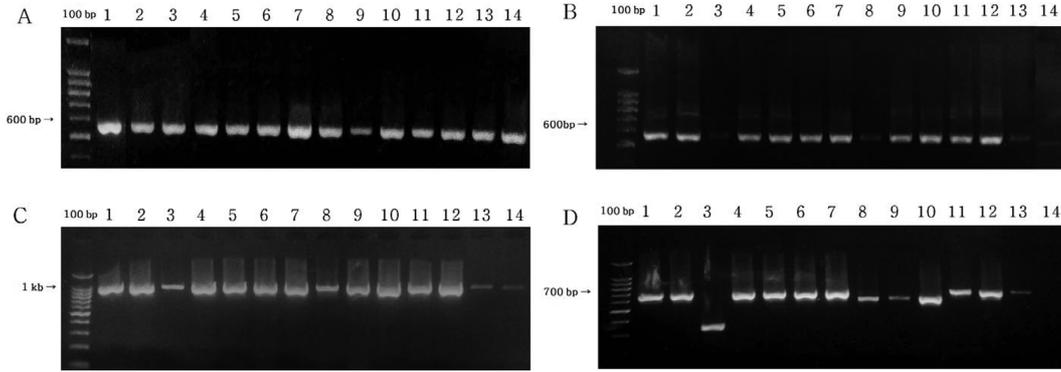


Fig. 2. PCR amplification products by using chloroplast DNAs. A; *rpoC1*, B; *rpoB2*, C; *matK*, D; *psbA-trnH*, 1; *Polygonatum odoratum* var. *pluriflorum* (Pohang), 2; *P. odoratum* var. *pluriflorum* (Ilsan), 3; *Disporum sessile*, 4; *P. odoratum* var. *pluriflorum* f. *variegatum* (Pohang), 5; *P. odoratum* var. *pluriflorum* f. *variegatum* (Ilsan), 6; *P. odoratum* var. *pluriflorum* f. *variegatum* (Cheongju), 7; *P. stenophyllum* (Eumseong), 8; *P. stenophyllum* (Pohang), 9; *P. sibiricum*, 10; *P. falcatum* (Pohang), 11; *P. falcatum* (Cheongju), 12; *P. involucreatum*, 13; *P. humile*, 14; Okjuk (dried).

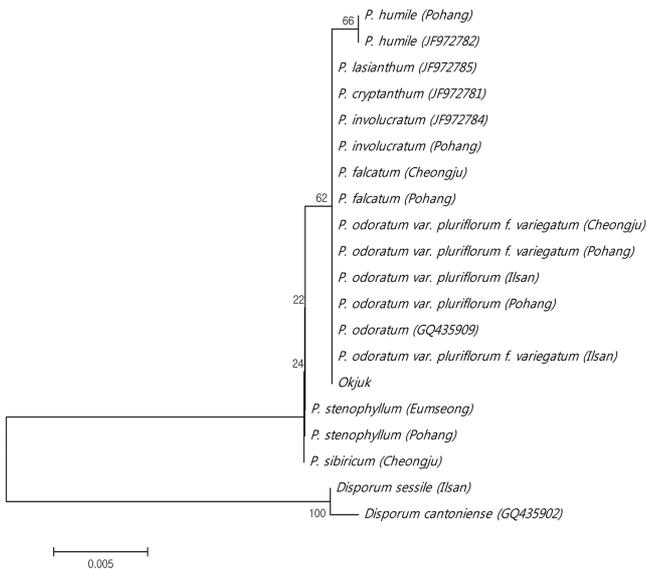


Fig. 3. The Neighbor-Joining tree of *rpoC1* sequences of species in *Polygonatum*.

구분되었으며, 이때의 bootstrap 값은 62%로 나타났다. 나머지 둥굴레속에서는 각시둥굴레가 66%의 bootstrap 지지도로 타종과 구분되었다. 한편, 한약재 옥죽의 경우 Neighbor-Joining tree 상에서 둥굴레 그룹 내에 속해있어 대한민국약전한약 (생약)규격집 10개정 (2012)에 기재된 옥죽에 대한 규정과 일치되는 결과를 보여주었다.

2) *rpoB2*

rpoB2 구간에서 뚜렷하게 확인된 SNP는 총 1개였다. 이 부위에 의하여 층층둥굴레와 층층갈고리둥굴레가 하나의 그룹으로 묶여 다른 둥굴레속 식물 종들과 구별되었으며, 이때의

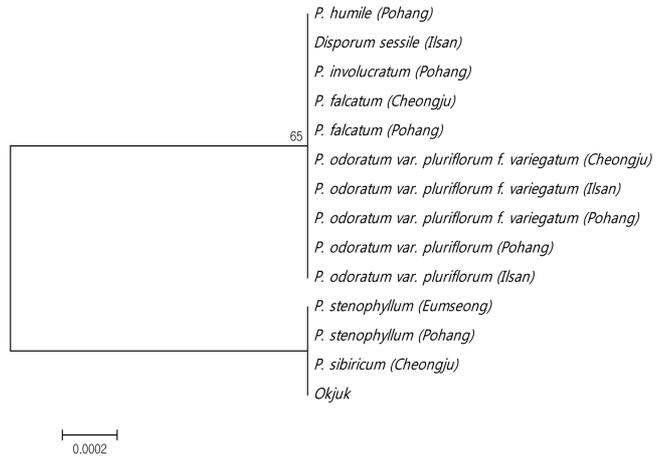


Fig. 4. The Neighbor-Joining tree of *rpoB2* sequences of species in *Polygonatum*.

bootstrap 지지도는 65%로 나타났다 (Fig. 4). 한편, 한약재 옥죽은 층층둥굴레 및 층층갈고리둥굴레와 같은 집단 내에 있어, 대한민국약전 기준에 따라 본 실험에 이용된 한약재가 황정이거나 혼용되었을 가능성이 있는 것으로 생각된다.

3) *matK*

matK 구간 내 염기서열에서는 7개의 SNP가 확인되었으며 (data not shown), 층층둥굴레와 층층갈고리둥굴레의 서열에는 3개의 SNP가 존재하여 동속타종과 구별되었다. 포항기청산식물원 둥굴레의 *matK* 구간 내 염기서열은 용둥굴레 (*P. involucreatum*)와 동일하였고, NCBI에 등록된 선둥굴레 (*P. grandicaule*), 왕둥굴레 (*P. robustum*), 죽대 (*P. lasianthum*)의 서열과도 동일하였다. 그러나 동일종인 일산 동국대학교실험농장 보유 개체의 서열은 NCBI에 등록된 둥굴레 (Genbank

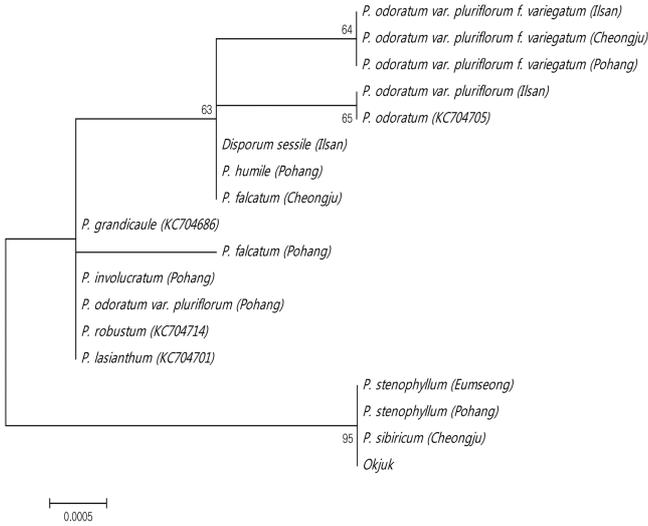


Fig. 5. The Neighbor-Joining tree of *matK* sequences of species in *Polygonatum*.

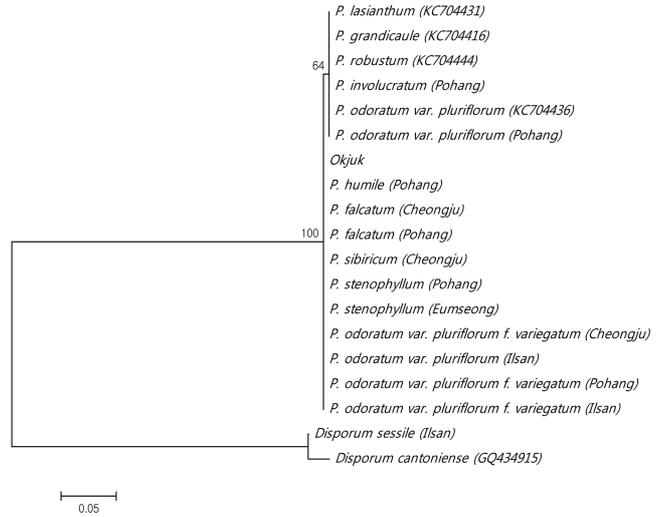


Fig. 6. The Neighbor-Joining tree of *psbA-trnH* sequences of species in *Polygonatum*.

accession no. KC704705)와 일치하였으며, 포항과 청주에서 분양받은 두 진황정 간에도 서로 다른 위치에서 SNP가 1개씩 확인되어 종내 SNP 차이를 확인하였다. Bootstrap 분석 결과, 층층둥굴레와 층층갈고리둥굴레가 95%의 높은 bootstrap 지지도로 동속타종과 구분되어 *matK* 구간이 층층둥굴레집단을 관별하는 기준이 될 가능성을 보여주었다. 또한 한약재 옥죽이 Neighbor-Joining tree 상에서 층층둥굴레 및 층층갈고리둥굴레 집단에 속하는 것이 확인됨에 따라 황정과와 혼용가능성을 보여주고 있다 (Fig. 5). 반면 동일한 분기군으로부터 분지된 다른 둥굴레속 자매군의 경우, 무늬둥굴레집단이 64%의 bootstrap 수치로 분지된 것을 제외하면 나머지 종들은 분지 경향이 동종 내에서도 변동이 심하였으며, 애기나리 속인 윤판나물 또한 이들과 구분되지 않았다.

는 둥굴레속의 종간 차이를 나타내는 2개의 SNP가 확인되었고, 층층둥굴레와 층층갈고리둥굴레 서열에서는 74개의 연속적 gap과 SNP 1개가 발견되었으며, 윤판나물의 서열에서는 각각 311개와 5개의 연속적 gap이 발견되어 둥굴레속 식물종과 확연히 구별되었다 (data not shown). 분지양상은 둥굴레속이 애기나리속인 윤판나물과 자매군으로서 100%의 bootstrap value로 분지되었고, 둥굴레속 내에서는 포항기청산식물원 분양 둥굴레가 용둥굴레, 왕둥굴레, 선둥굴레, 죽대와 동일 집단으로 분지되어 일산 동국대실험농장 보유 둥굴레 개체와 다른 집단으로 분류되었다 (Fig. 6). 한편, *rpoC1*, *rpoB2*, *matK* 세 구간에서 비교적 뚜렷하게 구분되었던 층층둥굴레와 층층갈고리둥굴레가 다른 종으로부터 구분되지 않아 이들을 위한 관별 마커로 이용하기는 어려울 것으로 사료된다.

4) *psbA-trnH*

엽록체 DNA의 non-coding region인 *psbA-trnH* spacer에서

5) *rpoB2*, *rpoC1* 및 *matK* 조합 분석

본 연구에서 상대적으로 종간 차이가 적었던 *rpoB2* 구간을

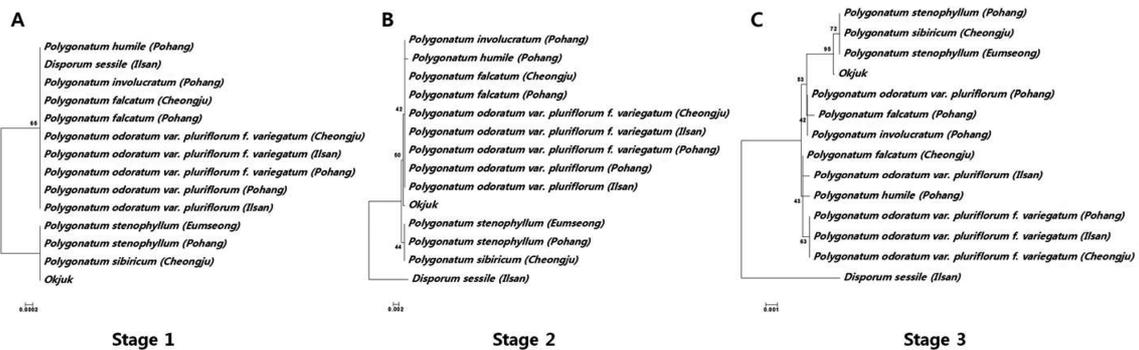


Fig. 7. The Neighbor-Joining trees showing combinations of *rpoB2*, *rpoC1* and *matK* sequences of species in *Polygonatum*. A; *rpoB2*, B; *rpoB2*, *rpoC1*, C; *rpoB2*, *rpoC1* and *matK*.

*rpoC1*과 조합한 결과, *rpoB2*에서 구별되지 않았던 각시둥굴레의 종간 구분이 확인되었으며 (Fig. 7A, B), 이에 *matK* 구간을 추가 조합한 결과를 바탕으로 작성된 phylogenetic tree에서는 *matK* 단독 이용 시 구별되지 않았던 각시둥굴레와 충북농업기술원 분양 진황정 사이의 종간 차이가 확인되었다 (Fig. 7C).

고 찰

둥굴레속 식물은 종에 따라 한약재 옥죽 또는 황정으로 구분되나, 형태적으로 종을 구분하기 어려우며, 약재 유통 시 절단 및 건조 등 가공과정을 거치므로 식물원종의 기원 판별이 어렵다. DNA barcoding 분석법은 표준화된 마커를 사용하여 DNA수준에서 생물 종간 또는 종내 SNP 차이를 비교분석하는 방법으로 형태적 분류동정법의 한계를 보완할 수 있을 뿐만 아니라 식물 분류 및 약재 원산지 판별에 용이하다.

본 연구의 공시재료인 둥굴레속 7종 식물자원은 농촌진흥청 농업유전자원센터 성정숙 박사의 도움으로 종간 형태적 비교를 수행하였다. 한약재 황정으로 사용되는 진황정 및 층층갈고리둥굴레의 경우 타종들과 육안으로 일부 구별이 가능하였다 (Fig. 1). 그러나 다양한 형태로 가공유통되는 뿌리줄기의 경우 판별에 어려움이 있어 보다 명확한 구분을 위해 cpDNA 구간의 염기서열분석을 수행하였다. 실험에 이용된 4개의 cpDNA 구간 중 *rpoC1*, *rpoB2*, *matK* 구간에서 공통적으로 층층둥굴레 및 층층갈고리둥굴레와 구별되는 SNP가 확인되었으며, Neighbor-Joining tree 에서도 이 그룹이 독립적으로 분지된 것으로 보아 계통적 분류가 선행된 형태학적 연구결과와 일치하는 것으로 확인되었다 (Table 3). 따라서 *rpoC1*, *rpoB2*, *matK* 구간이 둥굴레속으로부터 층층둥굴레 및 층층갈고리둥굴레를 판별하기 위한 바코드 유전자로 사용 가능할 것이라 사료된다. 또한 이들 구간에서 층층둥굴레와 층층갈고리둥굴레가 한 집단에 속함에 따라 층층둥굴레의 근경이 한약재 황정에 포함되는 것이 타당하다는 연구 결과를 뒷받침해준다 (An *et al.*, 2006). 한편, 한약재 옥죽의 경우 *rpoC1*에서는 둥굴레와 근연종으로 분류되고, *rpoB2*, *matK*에서는 층층둥굴레 및 층층갈고리둥굴레 그룹으로 분류되는 상반된 결과가 나와 옥죽의 유통과정에서 한약재 황정과 혼합되었을 가능성을 보여준다.

한편, *matK* 구간은 동일한 종간에도 서열에 차이가 발생하거나, 둥굴레와 속(屬)이 전혀 다른 윤관나물과 동일한 그룹으로 분류되는 결과가 나와 둥굴레계열에 대한 판별마커로 이용되기는 어려울 것으로 판단된다. 반면, 층층둥굴레 및 층층갈고리둥굴레 그룹의 경우 95%의 높은 bootstrap 지지도로 동속 타종과 명확히 구분되어, 황정 판별에 있어서는 *matK*가 유용할 것으로 사료된다 (Fig. 5).

psbA-trnH 결과에서 층층둥굴레 및 층층갈고리둥굴레의 경우, 서열에서 수십 개의 indel이 발견되었으며, 타 둥굴레 종들과 구분되는 SNP가 적어 phylogenetic tree 상에서도 분지양상이 명확하지 않았다 (Fig. 6). Ma 등 (2014)는 둥굴레와 동과 식물인 산자고 (*Tulipa edulis*) 판별 연구에서 *psbA-trnH*가 구간 내 insertion 및 deletion (indel)의 잦은 발생으로 판별마커로서 적합하지 않다고 하였으며, 본 연구의 결과가 이와 유사한 경향을 보인 바, 둥굴레속 판별에 *psbA-trnH*를 판별 마커로 이용하기에는 부적합한 것으로 사료된다.

한편, *psbA-trnH*를 제외한 나머지 세 개 구간을 조합한 결과에서 단일 primer 분석 시 차이를 보이지 않던 각시둥굴레가 두 구간 이상의 상호조합 시 타종과 구분되었으며, 특히 *rpoB2*, *rpoC1*, *matK* 세 구간을 조합한 경우에는 각시둥굴레와 충북농업기술원 분양 진황정의 종간 차이가 확인되었다 (Fig. 7).

본 연구결과에서 엽록체 DNA를 대상으로 한 barcoding 분석은 둥굴레속 식물체 판별에 유용하며, 특히 종판별에서의 primer 단독 이용의 한계점이 여러 primer의 조합으로 상호보완 됨으로써 비교적 정확한 결과가 도출되는 것을 확인하였다. 또한 본 연구 결과를 둥굴레속 기원 한약재 판별마커 개발뿐만 아니라 향후 기타 약용식물자원의 표준화와 이들을 원료로 하는 건강기능식품 및 한약재의 품질개선을 위한 기초자료로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2014년도 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ008567072014) 연구비 지원에 의해 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ahn DK. (1985). A herbal study on *Polygonatum* species. Korean Journal of Pharmacognosy. 16:105-113.
- An HJ and Chung KM. (2014). Analysis of index components in medicinal crops of Andong area cultivated at different altitude. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 22:91-97.
- An SM, Ryuk JA, Kim YH, Chae BC, Kim HJ, Kim KH, Kang KK, Ko BS and Lee MY. (2006). Genetic analysis of *Polygonati rhizoma* and *Polygonati odorati rhizoma* using random amplified microsatellite polymorphism. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 14:125-129.
- CBOL Plant Working Group. (2009). A DNA barcode for land plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 106:12794-12797.
- Felsenstein J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An approach using the bootstrap. Society for the study of Evolution. 39:783-791.

- Ha WY, Shaw PC, Liu J, Forrest CFY and Wang J.** (2002). Authentication of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* using amplified fragment length polymorphism(AFLP) and directed amplification of minisatellite region DNA(DAMD). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 27:1871-1875.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL and deWaard JR.** (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *The Royal Society*. 270:313-321.
- Jang CG and Kim YS.** (1998). Taxonomic relationships of the Korean *Polygonatum*(Liliaceae) using the RAPDs analysis. *Korean Journal of Plant Taxonomy*. 28:371-384.
- Jang CG.** (2002). A taxonomic review of Korean *Polygonatum* (Ruscaceae). *Korean Journal of Plant Taxonomy*. 32:417-447.
- Jang KH, Kang JH, Jeon BS, Song GW and Lee SD.** (2002). Major chemical components in rhizome of native *Polygonatum* species in Korea. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 10:185-193.
- Kim CM, Shin MK, Ahn DK and Lee KS.** (1998). Encyclopedia of chinese herbal medicine(Vol. 10). Jungdammedia. Seoul, Korea. p.6550-6556.
- Lee MY, Kim KH, Kim YH, Oh SE, Kang KK and Ko BS.** (2004). A taxonomic examination of *Polygonatum* rhizoma and *Polygonati odorati* rhizoma based on RAPD analysis. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 35:265-270.
- Li M, Cao H, But PPH, Shaw PC.** (2011). Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes. *Journal of Systematics and Evolution*. 49:271-283.
- Ma HL, Zhu ZB, Zhang XM, Miao YY and Guo QS.** (2014). Species identification of the medicinal plant *Tulipa edulis* (Liliaceae) by DNA barcode marker. *Biochemical Systematics and Ecology*. 55:362-368.
- Moon BC, Kim WJ, Ji Y, Lee YM and Kim HK.** (2013). Genetic diversity of *Curcuma* genus collected germplasm using analysis of AFLP. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 21:455-460.
- Saitou N and Nei M.** (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4:406-425.
- Seo YS, Park WH and Cha YY.** (2011). Effect of *Polygonatum odoratum* on lowering lipid and antioxidation. *Journal of Oriental Rehabilitation Medicine*. 21:49-62.
- Tamura K, Nei M and Kumar S.** (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:11030-11035.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA and Tingey SV.** (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18:6531-6535.
- Yun JS, Kim IH, Park JS, Lee CH, Hong EY, Yun T and Jong SK.** (2006). Characterization of 18S rDNA in *Polygonatum* spp. collections. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 14:178-182.