

RAPD 분석과 내부형태에 의한 獨活(*Aralia continentalis*)의 감별에 관한 연구

이미영 · 주영승* · 김홍준 · 고병섭

한국한의학연구원, * 우석대학교

Abstract

Discrimination of *Aralia continentalis* Root by the Random Amplified Polymorphic DNA Analysis and Morphological Characteristics

Mi Young Lee, Young Seung Ju*, Hong Jun Kim, Byoung Seob Ko

Korea Institute of Oriental Medicine, Seoul, Korea

* Woosuk University, Chonju, Korea

Dried parts of the herb medicines are difficult to distinguish morphologically. *Heracleum moellendorffii cordata* has often been sold instead of *Aralia cordata* in herbal medicine markets. Therefore, this study was conducted to develop the key for discrimination between them using the RAPD analysis and morphological characteristics. Thirty decamer oligonucleotide primers were screened for the RAPD analysis, and four primers generated distinct RAPD markers specific to *Aralia cordata*, *Angelica pubescens maxim f. biserrata*, and *Heracleum moellendorffii*. The specific RAPD patterns generated by the selected primers were reproducible from dried materials. In comparison of morphological characteristics, *Aralia cordata* seems to be entirely developed in xylem fiber, but not developed in pith.

Key words : *Heracleum moellendorffii cordata*, *Aralia cordata*, *Angelica pubescens maxim f. biserrata*, morphological characteristics, RAPD markers

I. 서론

獨活은 예로부터 강활과 구별하는 것이 어려웠던 한 약제로 性味が 溫 · 無毒, 辛苦한 약재(全國韓醫科大學,

1995)로 기재되어 있으며 한국, 중국이 서로 다른 약재를 기원식물로 하고 있다. 중국의 독활은 香獨活인 重齒毛當歸(*Angelica pubescens Maxim. f. biserrata* Shan et Yun)가 중국약전에 표준약재로 수록되어 있으며(張

貴君主編, 1993), 한약(생약)규격집에는 오갈피나무과(Araliaceae)의 獨活(*Aralia continentalis* Kitagawa)로 기재되어 있다(한국의약품수출입협회, 2000). 그리고, 현재 獨活의 대용으로 유통되고 있는 어수리(*Heracleum moellendorffii* Hance)는 중국의 사천에서 주산하고 있는 牛尾獨活 (*Heracleum hemsleyanum* Michx.)와 동속인 미나리과로 옛부터 어린잎은 식용되어져 왔다. 따라서 獨活은 식물명이 *Aralia continentalis* Kitagawa로 규정되어 있지만 重齒毛當歸를 사용해야 한다는 지적도 있으며 현재 어수리를 獨活의 대용으로 쓰고 있어 이에 대한 감별이 필요한 사항이다. 한약재 특성상 시중약재는 건조시킨 상태로 유통되므로 건조약재에서의 분석이 원활히 이루어져야 한다. 감별을 위한 유전분석 방법중 RAPD법은 벼과나 콩류, 감자, 옥수수, 토마토 등의 품종분류와 식별에 관해 연구가 활발히 이루어졌으며(Weeden 등, 1992; Waugh와 Powell, 1992), 한약처방의 구성을 판별하는 방법(Kur-Ta 등, 1998)으로도 이용되고 있다. 한편, 그 이용범위가 넓어 식물의 genomic DNA를 간편하게 빨리 분리, 정제할 수 있는 방법(Edwards 등, 1991)과 건조시킨 식물뿌리에서의 적절한 DNA 분리방법(Rong-Zhao, 1998), PCR 결과 확인을 신속히 할 수 있는 기법(Kaluz와 Reid, 1991) 등 RAPD에 관련된 기술도 개선되고 있는 실정이고 보다 쉬운 방법으로 변이종 및 품종간 차이를 확인할 수 있을 뿐 아니라 유전병이나 미생물의 진단, 성감별(Nakahori 등, 1986), 법의학, DNA 클로닝 등 식물 분자생물학 전반에 걸쳐 널리 이용되고 있는 실정이다(Rajapakse 등, 1995).

지금까지 genome 분석을 통해 동·식물의 개체, 계통 및 품종 수준의 단계에서 유전적 변이 및 품종 고유의 특이적 marker를 찾기 위한 분석은 많이 이루어졌으나 한약재 판별을 대상으로 한 내부형태적인 판별이나 유전적 표지인자 검출방법에 관한 연구는 많이 보고되어 있지 않다. 본 연구에서는 RAPD 법과 내부형태를

이용하여 獨活의 감별을 위한 기초연구를 하고자 하는데 목적을 두고 있다.

II. 재료 및 방법

1. 식물시료 채취 및 보관

본 실험에 사용한 식물재료는 獨活 *Aralia cordata*, 重齒毛當歸 *Angelica pubescens* f. *biserrata*, 어수리 *Heracleum moellendorffii*를 사용하였으며 生葉(fresh leaf)은 채취장소에서 즉시 dry ice로 급냉시킨 후 -70°C 에 냉동보관하여 total DNA를 분리하였으며, 건조약재중 重齒毛當歸는 중국중의학대학에서 구입하였으며 유통한약재는 경동시장에서 구입하여 한국한의학연구원 표본실에 일련번호를 부여하여 보관중이다.

2. Total DNA 분리 및 정제

채집한 신선한 잎에서 Doyle과 Doyle(1987)방법을 응용하여 다음과 같이 DNA를 추출하였다. 소량의 시료를 막자사발에 넣고 미세분말상태로 마쇄한 후, 분말 시료를 $700\mu\text{l}$ 의 CTAB buffer [50mM Tris-HCl(pH 8.0), 0.7M NaCl, 50mM EDTA(pH 8.0), 140mM β -mercaptoethanol]와 혼합한 다음 60°C 항온기에서 1시간 처리하여 phenol $350\mu\text{l}$ 와 chloroform:isoamylalcohol(24:1) $350\mu\text{l}$ 를 첨가하여 실온에서 $3,500\times\text{g}$ 로 5분간 원심분리하였다. 상층액 $600\mu\text{l}$ 와 chloroform:isoamylalcohol(24:1) $600\mu\text{l}$ 를 첨가하여 완전히 섞이도록 흔들어준 다음 $3,500\times\text{g}$ 로 5분간 원심분리하여 상층액 $500\mu\text{l}$ 를 취하여 냉동고에 보관 중인 $500\mu\text{l}$ isopropanol을 넣고 -20°C 에서 30분간 정치시켜 DNA를 침전시켰다. 침전시킨 DNA를 $3,500\times\text{g}$ 에서 15분간 원심분리하여 얻은 pellet을 70% EtOH로 세척하여 진공 혹은 자연건조시켰다. 건조시킨 DNA를

100 μ l TE buffer[10mM Tris-HCl(pH 8.0), 1mM 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 280nm와 260nm에서 흡광도를 측정하여 DNA 순도검정 및 정량을 실시하였다. 건조약재의 게놈 DNA는 NucleoSpin DNA extract kit(Macherey-Nagel, Germany)을 사용하여 추출하였다. 추출된 DNA는 순도와 농도를 측정한 후 -4 $^{\circ}$ C에 보관하면서 사용하였다.

3. RAPD 조건

PCR(polymerase chain reaction) 증폭은 Williams(1990)의 방법을 수정하였다. PCR 반응용액은 멸균증류수에 10x buffer(750mM Tris-HCl, pH 8.8, 200mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% (v/v) Tween 20), 200 μ M dNTP, 1.5mM MgCl₂, 300nM primer(UBC, University of British Columbia), 1 U DNA polymerase, 50ng DNA를 혼합하여 총 20 μ l로 조성하였다. PCR(PerkinElmer, USA)은 GeneAmp PCR system 2400을 이용하여 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 pre-denature한 후 94 $^{\circ}$ C에서 30초 denaturation, 37 $^{\circ}$ C에서 30초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension을 35회 수행하고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다. 증폭된 산물은 1.5% agarose gel에서 100bp DNA ladder(GibcoBRL)와 함께 전기영동하여 EtBr로 염색한 후 Image master(Pharmacia biotech, USA)로 관찰하여 결과를 얻었다.

4. 내부형태 특성조사

시료 조직을 5mm x 5mm 크기로 부위별로 자른 후, FAA 용액(Formalin 5mL, Glacial acetic acid 5mL, 50% Ethyl alcohol 90 mL)에 24시간 이상 고정시켰고, 고정

액의 침투를 촉진하기 위해 진공펌프를 이용하여 조직 내부의 기포가 조직액 상면에 나타나는 상태까지 탈기시켰다. 탈수는 Lang's butanol series의 2단계에서 부터 진행시켰으며 각 단계에서 탈수시간은 8시간으로 하였으며, 8단계가 끝난 후 다시 100% butanol로 2번 탈수하였다. Butanol과 soft paraffin(1 : 1)을 재료가 담겨있는 용기에 넣고 incubator에서 58~60 $^{\circ}$ C를 유지하면서 butanol을 5일동안 완전히 기화시켰다. 여기에 동량의 hard paraffin을 넣어 incubator에서 60~70 $^{\circ}$ C로 1~3일 동안 유지시켰다. 규정의 cake case에 넣어 포매(embedding)시킨 다음 1~2일 실온에 방치하였다. 칼날각도를 5도로 하고 두께를 5~10 μ m로 하여 절단한 후 albumin을 도포한 slide glass에 검체를 올려 놓고, slide warmer에서 1~2일동안 overnight하였다. Heidenhain's hematoxylin, safranin 및 light green을 사용하여 삼원염색을 하고, Canada balsam으로 봉입하고 건조기에서 24시간 동안 건조한 후, 광학현미경 하에서 조직의 특성을 관찰 및 측정하고 사진을 촬영하였다.

5. 결과 및 고찰

중국의 독활은 미나리과(Umbelliferae)로 香獨活인 重齒毛當歸(*Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata*)로 수록되어 있지만 실제 유통에 있어서는 川獨活인 *Angelica megaphlla* Diels, 혹은 *Angelica laxiflora* Diels.도 동일 약재로서 시판되고 있다. 이들의 공통점은 *Angelica*에 속하는 동속식물인 점이다. 식물명 독활은 향약집성방에 수록되어 있는 향약으로 조선시대 이전부터 사용되어진 것으로 추측되고 있고, 어수리의 사용은 구황식물로서 식용하여 왔지만 본초서에 약용으로 기재되어 있지 않다. 따라서 현재 우리가 사용하고 있는 독활은 향약으로 땃두릅이라고 하는 고유한 향약명이 있지만 본초서에 기재되어 있는 香獨活과 같은 성

미를 가지고 있는가는 금후 연구가 되어야 할 것이며 본 연구에서는 해부학적 특징과 유전자분석을 종합적으로 검토하여 어수리와 독활 그리고 중치모당귀의 식별에 관해 알아보았다.

6. 내부형태

중치모당귀 *Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata*는 3~8층의 형성층대가 環狀으로 배열되어 있으며 안쪽의 목부는 뿌리의 1/4 정도를 차지하며 木化細胞가 많이 있고, 목부의 박벽세포는 아직 木化가 진행되어있지 않은 편이며, 코르크층은 10여열의 세포로 구성되어 있으며 납작한 직사각형모양이고 코르크 안쪽층은 좁고

油室 및 石細胞가 흩어져 있다(Fig 1, A).

Fig 1, B는 독활 *Aralia cordata* Thunb의 횡단면과 종단면을 나타낸 것으로 중치모당귀와 달리 저장뿌리로서 모두 정상적인 위치에 발달된 3~7층의 원통형 형성층에 의한 2기생장을 한다. 이러한 형성층으로부터 분화되는 2기유관속 조직은 일반적인 경우에 비해 훨씬 더 풍부한 유조직을 가지며, 다량의 유조직에 의해 2기목부와 2기사부가 서로 격리되어 있다. 광범위하게 발달된 유조직은 상당 부분이 통기 유조직으로 분화되며, 유세포는 다량의 전분립을 함유한다. 또한 유조직에 다수의 유지도가 산재한다. 또다른 특징은 목부섬유가 상당히 발달되었지만 수는 발달하지 않았다.

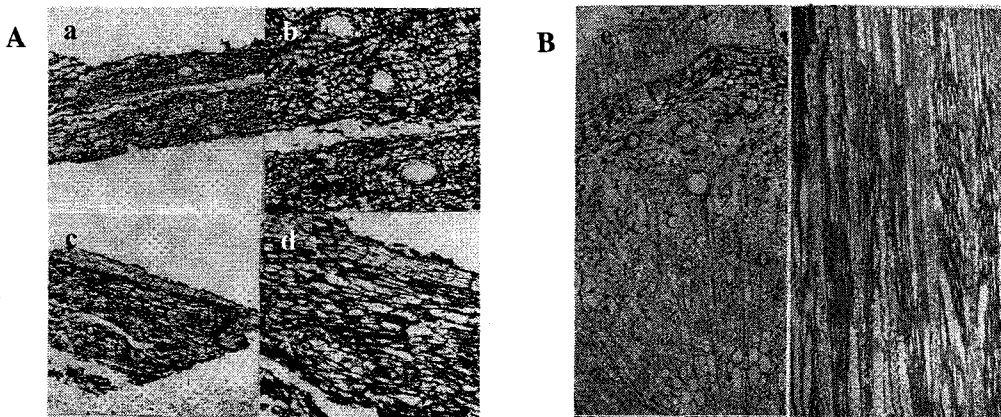


Fig. 1. Internal morphological features of *Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* (A) and *Aralia continentalis*(B). Phloem and leptom 100X(a), laticifer 200X(b), Phellem and sclereid 100X(c), sclereid 200X(d), Cross section 60X (e), longitudinal section 60X (f).

어수리 *Heracleum moellendorffii*의 뿌리는 저장뿌리로서 정상적인 위치에 발달한 5~7층의 형성층대의 활동에 의해 안쪽에 각각 2기 사부가 분화되어있다(Fig 2, A, B). 다만 일반적인 2기 생장에 비해 많은 유조직이

2기 유관속조직에 분화됨으로써 2기 목부와 사부가 유조직에 의해 멀리 분리되어있다. 형성층의 안쪽에 위치한 2기 목부는 도관, 목부섬유와 후벽세포 및 유조직으로 구성되어 있다. 횡단면상에서 목부방사조직은 주

로 단열이나 2열로 방사방향으로 배열되며 다량의 전분립을 함유하고 있다(Fig 2, a). 주피는 코르크 피층, 코르크형성층 및 코르크가 뚜렷한 방사열을 이루는 2기 보호조직으로 6~7층의 장방형으로 된 두꺼운 세포벽으로 구성되어 있다(Fig 2, c).

횡단면상에서 노두부분의 도관은 도관절로 구성되

며, 각 도관절의 직경은 $40.8 \pm 5.2 \mu\text{m}$, 길이 $196.6 \pm 16.3 \mu\text{m}$ 정도이며(Fig 2, d) 목부방사조직은 5~11 세포열로 매우 넓고 높이도 매우 높아 점유율이 높은 것으로 나타났다. 주피는 안쪽으로부터 코르크피층, 코르크형성층 및 코르크 조직으로 이루어지며 조직이 뚜렷한 방사배열로 내측의 피층과 구별되어 있다(Fig 2, c, f).

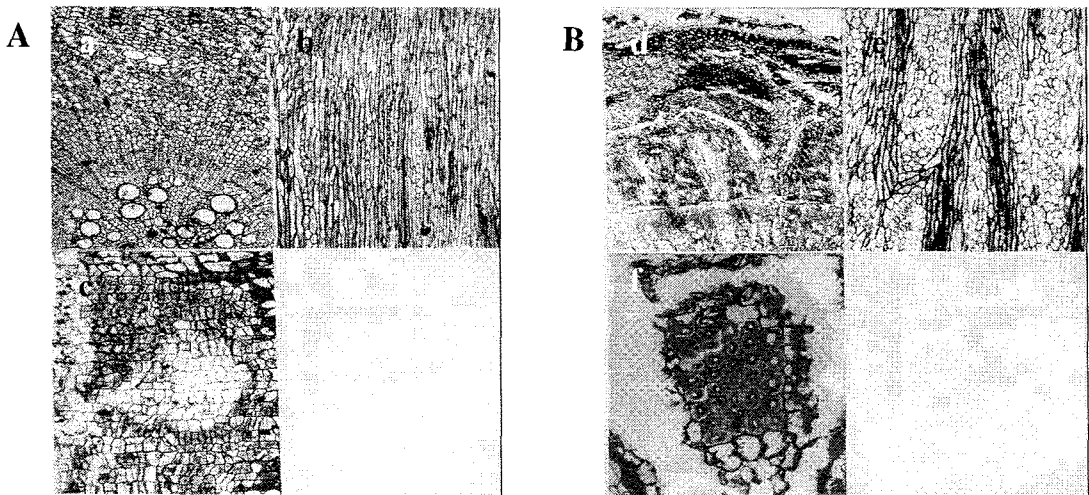


Fig. 2. Internal morphological features of *Heracleum moellendorffii* A, Root ; B, Rhizome. Cross section 60X (a, d), longitudinal section 60X (b, e), cork 100X (c, f).

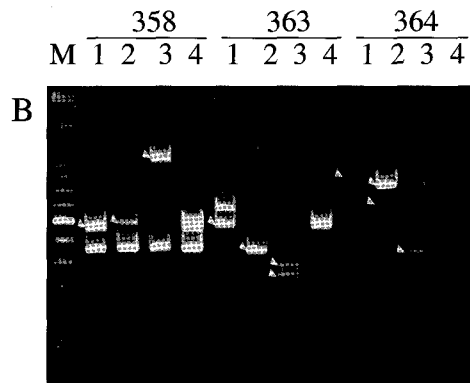
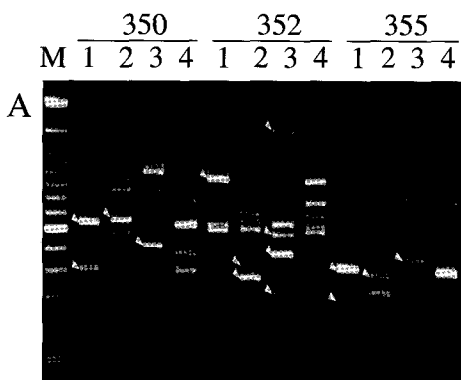
7. 유전자분석

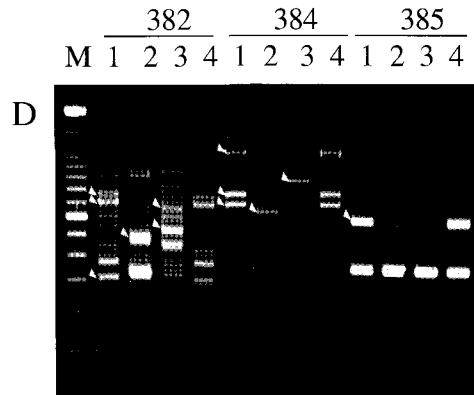
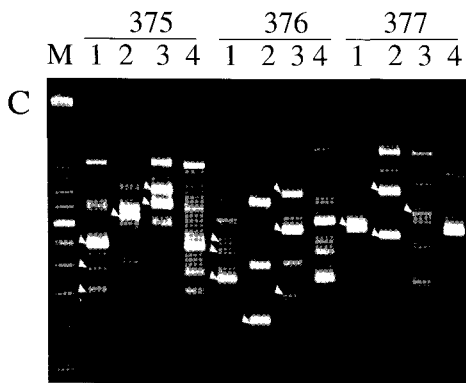
30 개의 primer를 이용하여 RAPD 방법으로 중치모 당귀, 독활과 어수리를 대상으로 분석하였다. 직접 채집한 기원식물의 신선한 잎과 건조상태의 polymorphism이 같은 패턴을 나타내는지 확인한 후, 세 품종의 건조 약재로 분석하였다. 獨活, 重齒毛當歸, 어수리의 건조 약재와 유통되고 있는 獨活을 비교한 결과, 300 bp ~ 1.5kb 사이의 polymorphic band를 보였으며, 채집한 독

활(*Aralia continentalis* Kitagawa)과 유통되고 있는 독활의 polymorphism이 동일하게 나타났다. 따라서 현재 시중에 유통되고 있는 약재는 독활(*Aralia continentalis* Kitagawa)임을 확인하였다. Table 1은 세 품종에 특이적인 밴드를 요약한 것으로 각각 3種에 공통적으로 나타나는 band는 primer 358(430bp), 385(350bp)인 것으로 나타났으며 독활만을 구별하기에는 primer 355, 365가 좋았고, 3種을 한번에 구별하기에는 primer 376을 이용하면 좋을 것으로 여겨진다.

Table 1. A summary of the RAPD markers(bp) from of *Araliae Continentalis Radix*

Primer No.	marker(bp)		
	<i>Aralia continentalis</i>	<i>Angelica pubescens</i>	<i>Heracleum moellendorffii</i>
350	400,650	700	500
352	1000	400,450	300,500,600,1700
353	350,420	400	500
358	580	600	1100
363	580	600	1100
364	600	420	350,400
365	950	700,800	450
366	900,1100	600,850,1000	500,550
370			950,1150
372	1050	650	250,900
373	300,400,600,1000	450	
374			500
375	300,400,500	650	700,850
376	350,480,520	200	300,600,800
377	600	550,800	700
378		800,100	280,390,580,620
380	320,400		
381	150,800	300,400,720	350,420
382	300,700,780	480	550,680
384	700,800,1200	650	900
385	620		





3. RAPD polymorphism of *Aralia continentalis*. The used primer was 350, 352, 355, 358, 363, 364, 375, 376, 377, 382, 382, 385. Lane 1, *Aralia continentalis* Kitagawa(dry root); 2, *Angelica pubescens*(dry root); 3, *Heracleum moellendorffii*(dry root); 4, *Aralia continentalis*(commercial dry root). M, 100bp DNA ladder. Arrow heads indicate polymorphic bands

III. 적 요

본 연구에서는 독활의 유통품을 외부 형태적 특징으로만 식별하기 어려운 문제를 해결하고자 내부형태 특성조사와 유전분석법 중 RAPD 등을 이용하여 감별을 위한 기초자료로 이용하고자 한다.

1. 중치모당귀는 형성층대가 環狀으로 배열되어 있고 목부의 박벽세포는 아직 木化가 진행되어있지 않았다.
2. 독활은 중치모당귀와 달리 저장뿌리로서 원통형 형성층에 의한 2기생장을 하며 풍부한 유조직을 가지고 목부섬유가 상당히 발달되었지만 수는 발달하지 않았다.
3. 어수리는 2기목부내에 석세포가 11-26 개씩 무리지어 산재하는 반면, 독활은 주피를 이루는 코르크 세포내에 3-5층의 후벽세포가 띠처럼 분포하였다.

4. 건조약재에서 30 개의 primer를 대상으로 RAPD polymorphism 을 조사해 본 결과 300bp ~ 1.5kb 사이의 polymorphic band를 보였으며 독활만을 구별하기에는 primer 355, 365가 좋았고, 중치모당귀, 독활, 어수리 3種을 한번에 구별하기에는 primer 366을 이용하면 좋을 것으로 여겨진다.

IV. 감사의 글

본 연구는 보건복지부 용역과제에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

〈색인어〉 어수리, 독활, 중치모당귀, 형태특징, RAPD 마커

참 고 문 헌

- 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
- Edwards, K., C. Johnstone, and C. Thompson. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nuci. Aci. Res.* 19(6): 1349
- Kaluz, S. and K. B. M. Reid. 1991. A novel rapid method for detection of PCR products. *Nuci. Aci. Res.* 19: 4012
- Kur-Ta C., H. S. Tsay, C. F. Chen, and T. W. Chou. 1998. Determination of the components in a chinese prescription, yu-ping-feng san, by RAPD analysis. *Planta Medica*: 64: 563-565
- Nakahori, Y., K. Mitani, M. Yamada, and Y. Nakagome. 1986. A human Y-chromosome specific repeated DNA family(DYZ1) consists of a tandem array of pentanucleotides. *Nuci. Aci. Res.* 14: 7569-7576
- Rajakpse, S., L. E. Belthoff, G. He, A. E. Estager, R. Scorza, I. Verde, R. E. Ballard, W. V. Baird, A. Callahan, R. Monet, and A. G. Abbott. 1995. Genetic linkage mapping in peach using morphological, RFLP and RAPD markers. *Thor. Appl. Genet.* 90: 503-510
- Rong-Zhao F., J. Wang, Y. R. Sun and P. C. Shaw. 1998. Extraction of genomic DNA suitable for PCR analysis from dried plant rhizomes/roots. *Biotechniques* 25: 796-801
- Waug. R., and W. Powell. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends in Biotechnology* 10: 186-191
- Weeden. N. F., G. M. Timmerman, M. Hemmat, B. E. Kneen and M. A. Lodhi. 1992. Identification and reliability of RAPD markers. In applications of RAPD technology to plant breeding. *Joint Plant Breeding Symposium. Minnesota.* 12-17
- 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
- 張貴君主編. 1993. 常用中藥鑑定大典, 黑龍江科學技術出版社 上海 630
- 全國韓醫科大學 本草學教室 共著. 1995. 本草學. 營林社. 260
- 韓國的약품수출입협회, 韓國的약품시험연구소. 2000. 한약 (생약)규격집. 대명기획. 123