

우리 나라 자생 등굴레속 식물의 유연관계 분석

장계현* · 송근우* · 정종일** · 강진호**†

*경남농업기술원, **경상대학교 생명과학연구소

Analysis of Genetic Relationships of Korean Native *Polygonatum* spp.

Kye Hyun Jang*, Geun Woo Song*, Jong Il Chung**, and Jin Ho Kang**†

*Gyeongnam Agricultural Research and Extension Services, Jinju 660-370, Korea.

**Research Institute of Life Sci., Gyeongsang Natl. University, Jinju 660-701, Korea.

ABSTRACT : Germplasms having valuable characters are increasingly important for modern breeding programs. This study was conducted to obtain the basic data for effective use of genetic resources of *Polygonatum*. The relationship of seven *Polygonatum* species collected widely in Korea was analyzed by RAPD markers. Total number of alleles amplified by nineteen random primers were 114 to 157, and variation in number of alleles was also diverse among seven species examined. The seven species were divided into two groups; one was of *Polygonatum stenophyllum* and *Polygonatum humile*, the other was of *Polygonatum inflatum*, *Polygonatum lasianthum*, *Polygonatum odoratum* var. *pluriflorum* (1), (2), and for *variegatum*.

Key words : *Polygonatum* species, RAPD, genetic relationships

서 언

소득수준이 향상됨에 따라 전통차의 소비가 꾸준히 증가하고 있다. 최근까지 등굴레차는 소비량이 꾸준히 증가하여 대량유통이 이루어져 상품으로 정착된 전통차종의 하나이다. 등굴레차는 등굴레속 식물의 지하경을 원료로 이용하고 있다. 등굴레속 (*Polygonatum* Mill.) 식물은 식물학적으로 백합과 (*Liliaceae*) 등굴레족 (*Polygonateae*)에 속하며 북반구에만 약 40여종이 분포하며 (Tang, 1978; Jeffrey, 1980), 이 중 16종이 한국에 자생하고 있는 것으로 알려져 있다 (Jang, 1998). 따라서 상품으로 개발되고 있는 등굴레차의 가공원료인 등굴레속 식물은 면적이 협소한 우리 나라에 상대적으로 많은 종이 분포하고 있다고 할 수 있다.

등굴레속 식물은 기원지가 두 곳인 것으로 알려졌는데, 하나는 아열대 지역인 중국 남서부의 운남성이 중심지인

남방계이고, 다른 하나는 중일구 (Sino-Japanese region)를 중심으로 한 북방계이다 (Jeffrey, 1980). 이 중에 남방계는 기원지에서 동남아시아, 인도를 거쳐 중앙아시아, 서남아시아 및 유럽으로 전파되었으며, 북방계는 만주 및 시베리아에서 한반도를 거쳐 일본열도에 이르는 경로와 알래스카를 거쳐 북미로 전파된 것으로 알려져 있다 (Jeffrey, 1980). 이러한 과정을 통하여 전파되었기 때문에 북반구에 분포하고 있는 등굴레속 식물들은 그 연이서로 가까운 것으로 추정할 수 있다.

등굴레속 식물의 이와 같이 넓은 지역에 다양한 종이 분포하고 있고 그 경제적 가치가 점진적으로 증대하고 있기 때문에 이들의 분류에 대한 기초연구가 필요하다 (Yun *et al.*, 2002). 지금까지 등굴레속의 분류 및 유연관계 분석은 경, 엽, 엽병 및 과실 등 외부형태에 의한 분류 (Jang *et al.*, 1998; Jang, 2001; Yun *et al.*, 2002), 염색체의 수와 핵형 등의 분석 (Han *et al.*, 1998a; Han *et al.*, 1998b;

† Corresponding author: (Phone) +82-55-751-5427 (E-mail) jhkang@nongae.gsnu.ac.kr

Received January 29, 2004 / Accepted April 19, 2004

Kim & Kim, 1979)에 의한 세포학적 분류가 있고, 최근에는 花粉學的 방법 (Jang & Kim, 1999a)이나 RAPD (Jang & Kim, 1999b) 등 최신의 기법을 활용한 분리·동정이 이루어지고 있다.

현재 둥굴레차의 원료로는 층층둥굴레 (*Polygonatum stenophyllum* Maxim.)가 주로 사용되고 있다. 그러나 전래적인 둥굴레차, 즉 옥죽차의 원료는 둥굴레 (*Polygonatum odoratum* var. *pluriflorum* Ohwi)로서 이들 모두 둥굴레속에 속한다고 하나 형태, 생장, 약효가 완전히 다른 것으로 알려져 있다. 소비량이 꾸준히 증가하고 있는 둥굴레차의 우량 가공원료를 확보함과 아울러 우리 나라의 산야에 다양하게 분포하고 있는 둥굴레속 식물을 자원화할 수 있

도록 이들의 유연관계를 체계적으로 분석할 필요가 제기되고 있다. 본 연구는 이러한 목적을 달성하기 위한 일환으로 국내에 자생하고 있는 둥굴레속 식물을 수집하여 이들의 유연관계를 분석하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 식물체 수집

연구에 이용된 둥굴레속 식물은 우리 나라에 자생하는 종을 1994년부터 1997년까지 4개년에 걸쳐 수집·선발한 종 중 표 1에서 보는 바와 같이 7개종을 공시재료로 이용하여 시험을 수행하였다.

Table 1. Collection place of seven *Polygonatum* species used in this study.

Species	Collection places
<i>Polygonatum odoratum</i> var. <i>pluriflorum</i> (1) [†]	Hamyang-gun
<i>Polygonatum odoratum</i> var. <i>pluriflorum</i> (2)	Gukmangsan
<i>Polygonatum stenophyllum</i> Maxim.	Chongju city
<i>Polygonatum odoratum</i> var. <i>pluriflorum</i> for <i>variegatum</i>	Cheju-do
<i>Polygonatum inflatum</i> Kom.	Jinyang
<i>Polygonatum lasianthum</i> var. <i>coreanum</i> Nakai	Hamyang-gun
<i>Polygonatum humile</i> Fisch.	Hapcheon-gun

[†] Selected species among the collected ones.

2. Genomic DNA 추출

PCR-based RAPD marker를 얻기 위한 genomic DNA는 CTAB (Saghai-Marouf *et al.*, 1984) 방법으로 추출하였다. 어린잎 2~3장을 막자사발에 넣고 -270°C의 액화질소를 부어 급속 냉동시킨 후 미세분말로 마쇄하여 15 ml polypropylene tube에 200~250 mg을 넣고 5 ml의 CATB extraction buffer [1 M Tris HCl (pH 5), 1% alkyltrimethyl ammonium (CTAB), 5 M NaCl, 0.5 M EDTA, 1% β-mercaptoethanol]를 넣어 60°C 항온수조에 1시간 동안 담가두었다가 이를 꺼내어 추가로 같은 량의 Chloroform-octanol (24:1)을 넣어 천천히 섞은 뒤 3200 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 분리된 액의 상층부를 피펫으로 새로운 tube에 옮겨 넣고 같은 량의 cold isopropyl alcohol을 넣어 DNA를 침전시켰다. DNA를 피펫 끝으로 깨끗한 micro tube에 옮겨 담고 1 ml의 76% EtOH 0.2 M NaOAc에 20여분 동안, 76% EtOH 10 mM [TrisHCl (pH 7.5) containing 1 mM EDTA]에 넣어 보관하였다. Stock DNA는 UV-VIS Spectrophotometer (V-2001, Hitachi Co.)를 이용하여 stock DNA의 농도를 측정하고 5 ml TE 용액을 첨가 20 ng/μl으로 희석하였다.

PCR 반응은 Operon Technologies Inc. (Alameda, California)에서 제조한 10-mer Oligonucleotide Random Primer (4 uM/2 μl) 19개를 사용하였으며 (Williams *et al.*, 1990), primer 명과 sequence는 표 2와 같다.

Table 2. Primers and their sequences used to detect genetic diversity of *Polygonatum* species.

Primers	sequences (5'-3')	Primers	sequences (5'-3')
OPA02	TGCCGAGCTC	OPB04	GGACTGGAGT
OPA03	AGTCAGCCAC	OPB05	TGCGCCCTTC
OPA05	AGGGGTCTTG	OPB06	TGCTCTGCCC
OPA13	CAGCACCCAC	OPB07	GGTGACGCAG
OPA14	TCTGTGCTGG	OPB08	GTCCACACGG
OPA15	TTCCGAACCC	OPB09	TGGGGGACTC
OPA16	AGCCAGCGAA	OPB10	CTGCTGGGAC
OPA19	CAAACGTCGG	OPB11	GTAGACCCGT
OPA20	GTTGCGATCC	OPB15	GGAGGGTGTT
OPB01	GTTTCGCTCC		

PCR 증폭용액을 gel에 loading하고 60 V의 전압으로 3 시간 동안 전기영동 하였다. 분리된 band들은 형광물질 EtBr에 20분 동안 염색한 후 Image Analyzer System (TEP-M/W, Viber Inc.)을 이용하여 band를 촬영하였다.

3. 유연관계 분석

유연관계 분석을 위한 RAPD marker 획득은 PCR 후 촬영된 gel상에 존재하는 band는 1, 존재하지 않는 band는 0으로 구분하여 band data를 얻고 이 data에 근거하여 genetic similarity를 계산하여 cluster 분석을 실시하였다 (Nei & Li, 1979).

결과 및 고찰

1. 증폭된 band pattern

등굴레속 식물은 외부 형태적 형질에서는 환경적 변이가 심하여 이를 이용한 분류에는 어려움이 많아 DNA 염기서열의 변이에 기초로 등굴레속 식물의 7種을 대상으로 유연관계 분석하고자 19개의 10-mer random sequence primer를 이용하여 RAPD marker를 얻었다. 이용된 OPA20, OPB01, OPA15, OPA16 primer에 의해 증폭된 band의 양상은 그림 1 및 2와 같다. 증폭된 DNA의 band pattern을 비교해 보면 절편의 크기는 300~3,000 bp이었고, 중간 band의 양상이 뚜렷한 차이를 보여 DNA level에서 종들간에 유전적으로 분명한 차이가 있음을 알 수 있다. 증폭된 band의 수와 전체 band의 수는 표 3과 같다. Primer별로 볼 때 1~16개의 다양한 band를 나타내었으며, 평균 band의 수는 7개였다. 이는 Jang & Kim

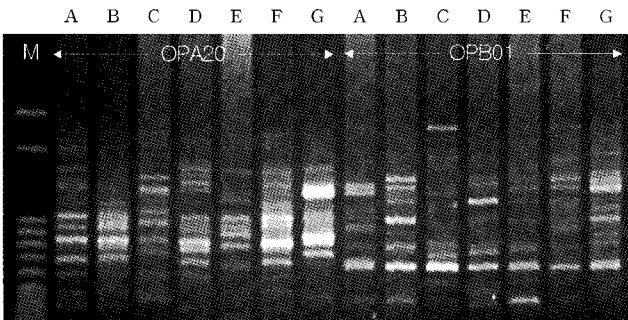


Fig. 1. DNA amplification patterns obtained with Operon primer OPA20 and OPB01. M indicates molecular weight. Abbreviations on the top mean A, *P. inflatum*; B, *P. odoratum* var. *pluriflorum* (1); C, *P. humile*; D, *P. lasianthum* var. *coreanum*; E, *P. odoratum* var. *pluriflorum* (2); F, *P. odoratum* var. *pluriflorum* for. *variegatum*, and G, *P. stenophyllum*.

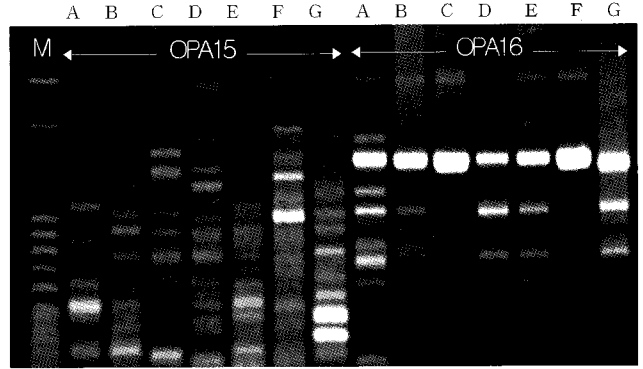


Fig. 2. DNA amplification patterns obtained with Operon primer OPA15 and OPA16. M indicates molecular weight. Abbreviations on the top mean A, *P. inflatum*; B, *P. odoratum* var. *pluriflorum* (1); C, *P. humile*; D, *P. lasianthum* var. *coreanum*; E, *P. odoratum* var. *pluriflorum* (2); F, *P. odoratum* var. *pluriflorum* for. *variegatum*, and G, *P. stenophyllum*

(1999a)이 보고한 결과와 유사하며 전체 band의 수는 114~157개의 범위였다. 이는 단지 19개의 primer만을 사용한 것으로 primer별 평균 6~8개의 allele이 탐색되었으며, 19개 primer에서 43개의 allele 차이를 보여 유전적으로 상당한 변이가 있음을 의미한다. 현재로서는 이러한 band의 차이가 어느 형질의 변이와 연관이 있는지 알 수 없으며 이에 대한 지속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

2. 유연관계

RAPD marker에 의한 유연관계 분석을 위해 계산된 similarity matrix는 표 4와 같으며, 이를 기준으로 유연관계를 분석한 결과는 그림 3과 같다. 통등굴레와 등굴레2가 유전적 거리지수 0.660 이내에서 우선적으로 유집되었다. 순차적으로 등굴레1, 무늬등굴레와 묶였으며, 이들 4종이 하나의 group을 형성하는 양상이었고, 상당한 유전적 거리 차이로 다시 죽대와 유집되었으며, 마지막으로 0.885의 유전적 거리로 각시등굴레와 층층등굴레가 유집되었다.

이러한 결과로 보아 먼저 유집된 통등굴레, 등굴레2, 등굴레1 및 무늬등굴레와 죽대는 상당히 원연관계인 것으로 보이며, 각시등굴레와 층층등굴레 2종간에는 더욱 먼 관계를 나타내었다. 통등굴레와 등굴레2는 유전적 거리지수가 가장 적은 수치에서 유집됨으로서 유연관계가 가까운 것으로 되었다. 한편 각시등굴레와 층층등굴레는 유전적 거리지수가 다소 높더라도 같은 군으로 유집되어 유연관계가 가까운 것으로 판단되었는데 이들 2종은 외부 형태적으로 줄기가 직립하고 화분학적 연구결과 이들의 크기

Table 3. Number of bands obtained from each primer in seven *Polygonatum* species.

Primer \ Species	PO1 [†]	PO2	PS	POF	PI	PL	PH
OPA02	6	7	10	10	7	8	6
OPA03	6	5	7	6	5	5	4
OPA05	3	6	4	3	4	5	3
OPA13	4	2	6	4	4	4	5
OPA14	4	8	13	5	5	7	5
OPA15	12	10	11	10	6	12	7
OPA16	6	6	8	3	9	4	2
OPA19	9	6	12	12	12	7	7
OPA20	8	8	10	13	14	13	13
OPB01	13	12	14	11	12	11	13
OPB04	10	1	3	1	7	7	5
OPB05	10	9	16	8	5	9	8
OPB06	2	2	6	2	4	4	8
OPB07	9	8	4	5	7	10	11
OPB08	4	3	6	4	6	4	5
OPB09	4	2	2	5	1	1	1
OPB10	9	11	10	11	10	6	9
OPB11	6	6	6	8	6	4	3
OPB15	4	2	9	4	7	6	3
Total	129	114	157	125	131	127	118

[†] PO1, *P. odoratum* var. *pluriflorum* (1); PO2, *P. odoratum* var. *pluriflorum* (2); PS, *P. stenophyllum*; POF, *P. odoratum* var. *pluriflorum* for. *variegatum*; PI, *P. inflatum*; PL, *P. lasianthum* var. *coreanum*, and PH, *P. humile*.

Table 4. Similarity matrix of seven *Polygonatum* species by RAPD markers.

Species	PO1 [†]	PO2	PS	POF	PI	PL	PH
PO1	1.00	0.27	0.00	0.27	0.29	0.24	0.11
PO2		1.00	0.09	0.24	0.33	0.13	0.12
PS			1.00	0.04	0.00	0.02	0.12
POF				1.00	0.29	0.23	0.10
PI					1.00	0.15	0.17
PL						1.00	0.08
PH							1.00

[†] PO1, *P. odoratum* var. *pluriflorum* (1); PO2, *P. odoratum* var. *pluriflorum* (2); PS, *P. stenophyllum*; POF, *P. odoratum* var. *pluriflorum* for. *variegatum*; PI, *P. inflatum*; PL, *P. lasianthum* var. *coreanum*, and PH, *P. humile*.

도 비교적 작은 공통성이 있을 (Jang & Kim, 1999a; Jang & Kim, 1999b) 뿐만 아니라 본 연구의 RAPD 분석 결과에서도 유연관계가 높은 것으로 분석되었다. 따라서

우리 나라 전역에서 수집한 7개종들은 크게 2개군으로 분류되었는데, 각시동굴레와 층층동굴레가 1개군으로, 이들과 달리 여타 5개종들이 1개군으로 분류되었다.

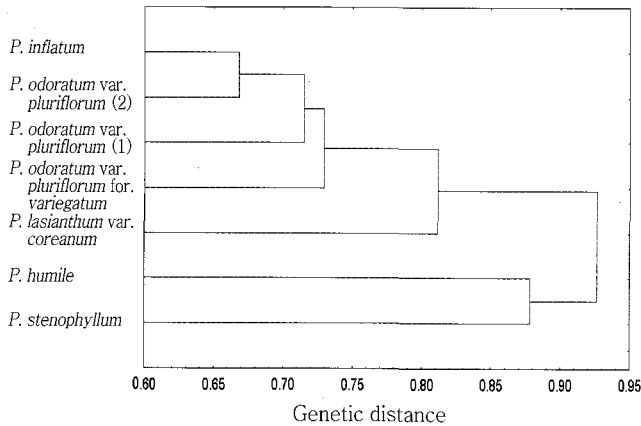


Fig. 3. Relationships among seven *Polygonatum* species obtained as cluster analysis by Nei and Li's formula. The distances were computed from RAPD data.

적 요

우리 나라 전역에서 수집한 7종의 자생 등굴레로부터 genomic DNA을 추출한 후 Operon random primer (10-mer)를 이용하여 PCR을 수행하여 재현성이 있으면서 polymorphism을 보이는 19개의 primer를 선발하였다. 선발한 primer로부터 PCR에 의해 증폭된 DNA의 크기는 3000~300 bp이었고, 19개의 random primer에서 복제된 전체 band의 수는 114개에서 157개로 공시종간에 많은 차이를 보였으며, band의 유무에 근거한 유연관계 분석에서 7개의 공시종은 각시등굴레와 층층등굴레가 1개군으로, 여타 종들을 1개군으로 크게 2개군으로 분리되어 유전적으로 상당한 차이가 있는 것으로 나타났다.

LITERATURE CITED

Han MK, Oh BU, Kim YS (1998a) C-banded karyotype of five taxa of genus *Polygonatum*. Korean J. Plant Tax, 28(3):313-

329.
 Han MK, Jang CG, Oh BU, Kim YS (1998b) A cytotoxic study of genus *Polygonatum* in Korea. Korean J. Plant Tax, 28(2):187-208.
 Jeffrey C (1980) The genus *Polygonatum* (Liliaceae) in eastern Asia. Kew Bull. 34:435-471.
 Jang CG (1998) A systematic study of the genus *Polygonatum* (Liliaceae) : with a special reference to Korean species. PhD dissertation, Korea Univ, Seoul.
 Jang CG, Kim YS (1999a) The palynological study on the Korean *Polygonatum* (Liliaceae). Korean J. Plant Tax, 29(1):1-17.
 Jang CG, Kim YS (1999b) Morphological evolution and relationships of Korean *Polygonatum*. Korean J. Plant Tax, 29(2):135-149.
 Jang KH, Park JM, Kang JH, Lee ST (1998) Growth and flowering characteristics of *Polygonatum* spp. Korean J. Medicinal Crop Sci, 6(2):142-148.
 Jang KH (2001) Ecological characteristics and relationship of Korean native *Polygonatum* species. PhD dissertation, Gyeongsang Natl. Univ., Korea.
 Kim YS, Kim JH (1979) A taxonomic study of the genus *Polygonatum* in Korea (I). Korean J. Plant Tax, 9(1):27-41.
 Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5269-5273.
 Saghai-Maroo MA, Soliman KA, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley : Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci, 81:8014-8018.
 Tang YC (1978) *Polygonatum* Mill. In Wang, F.T. and T. Tang (eds.). Flora Reipublicae Popularis Sinicae, V. 15, p. 52-81. 250. Science Press, Beijing (in Chinese).
 Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafaski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.
 Yun JS, Son SY, Kim IH, Hong EY, Yun T, Jong SK, Park SI (2002) Classification of *Polygonatum* spp. collections based on multivariate analysis. Korean J. Medicinal Crop Sci, 10(5):333-339.