

ISSR 표지에 의한 천마의 유전 다양성분석 및 기능성 물질분석

김현태 · 김지아 · 박응준[†]
국립산림과학원 산림생명공학과

Genetic Diversity and Metabolite Analysis of *Gastrodia elata* by Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) Markers

Hyun Tae Kim, Ji Ah Kim and Eung Jun Park[†]

Division of Forest Biotechnology, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-847, Korea.

ABSTRACT : *Gastrodia elata*, an achlorophyllous orchid plant, is rare medicinal plant. We investigated the genetic diversity in *G. elata* from 4 locations by using Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) markers. Shannon's information Index (S.I.) indicating genetic diversity ranged from 0.255 (Pocheon) to 0.322 (Muju) with the mean of 0.29. The level of genetic diversity was lower than other plant and most genetic diversity was allocated among individuals within populations (26.81%). The UPGMA dendrogram based on genetic distance failed in showing decisive geographic relationship. In the case of gastrodin (GA), the major components in *G. elata*, Sangju was highest. The ergothionine (ERG) was detected a lot of contents in Muju and Pocheon. In conclusion, our results is very important information for explaining relationship of genetic variation and functional substances without the effects of environment factors and developing genetic marker by ISSR in *G. elata*, which may be responsible for the development of breeds with a lot of functional substance in *G. elata*.

Key Words : *Gastrodia elata*, Genetic Diversity, ISSR, Gastrodin, Ergothionine

서 언

천마 (*Gastrodia elata*)는 한국, 일본, 중국 등에 주로 분포하는 고등식물의 다년생 난과 식물이지만 잎과 뿌리가 퇴화되어 독립적인 생육이 불가능한 식물이다. 광합성을 통한 탄소동화 작용이 불가능하고 담자균류인 뽕나무 버섯균과 공생하여 영양을 공급 받아 성장하는 기생식물이다. 해발고가 700 m 이상의 고산지대 계곡의 숲속이나 부식질이 많고 경사면이 있는 참나무 군락에 자생한다. 생리적인 특성으로 종자 발아 시 담자류인 *Mycena species*, 생장에는 *Amillaria species*와 공생하는 것으로 알려져 있다 (Lee, 1982). 전 세계적으로 약 50여종이 분포하나 우리나라에는 꽃대의 색에 따라 홍천마, 청천마, 황천마 등 3종이 분포한다.

천마에 함유되어 있는 성분은 당을 중심으로 대부분 페놀화합물로서 gastrodin, 페놀성 배당체, 유허 함유 페놀화합물이며 이외에 유기산, 비타민류, B-sitosterol, cholesterol, p-hydroxylbenzyl alcohol과 바닐린 (vanillin) 등의 성분이 알려져 있다 (Taguchi *et al.*, 1981; Noda *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2002). Gastrodin은 새로운 phenolic glycoside인데 천마의

주요 생리활성물질이며, ergothionine은 버섯에 주된 항산화 물질로 천마에 상당량 함유되어 있음이 밝혀져 있으며 천마를 어떻게 가공하는가에 따라서는 성분함량의 차이가 있음이 보고된 바 있다 (Choi *et al.*, 2011). 천마의 임상적 효능으로는 주로 고혈압, 두통, 마비, 신경성질환, 당뇨병 등의 성인병과 스트레스, 피로 등의 증상에 효능이 있는 것으로 보고되어 있으며, 이러한 효능의 기원은 대부분이 천마에 포함되어 있는 항산화 물질과 관련되어 있는 것으로 추정 된다 (Niu *et al.*, 2004).

천마의 생산은 우리나라뿐만 아니라 중국에서도 60년대까지는 대개 자연산 채굴 방법으로 수요를 충족시키는 정도였으나, 1970년대 이후 인공재배법이 개발됨으로써 재배천마가 일반화되기 시작하였다. 한국은 1980년대 천마와 뽕나무 버섯속균과의 관계 구명을 시작으로 1990년대 들어서면서 천마 재배에 적합한 뽕나무 버섯균의 선발 생육 환경 등 생리 생태적인 특성을 구명되면서 천마의 대량인공재배가 가능하게 되었다. 그러나 야생천마에서 채취한 괴경을 이용한 무성번식에 의한 인공재배 방식은 종마의 노화 또는 퇴화를 촉진 시켰으며, 자마의 수확 저장 시 곰팡이와 세균에 의한 오염으로 인해 생산량이 현저히 감소하는 현상을 보이고 있다.

[†]Corresponding author: (Phone) +82-31-290-1167 (E-mail) pahkej@forest.go.kr

Received 2012 September 21 / 1st Revised 2012 October 9 / 2nd Revised 2012 November 5 / 3rd Revised November 9 / Accepted 2012 November 16

DNA를 이용한 집단 및 개체들 간의 유전적 다양성 연구에는 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat), SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism), 변이율이 높은 특정 DNA 구간의 염기서열 분석 등 여러 분석 기법들이 이용되고 있다. 진핵세포 생물의 유전체에는 2~4 bp 크기로 반복적으로 존재하는 부분이 있는데, 이러한 영역을 SSR (Simple Sequence Repeats)라고 한다. ISSR 마커는 반복 염기서열의 4~10회 반복적으로 genome상의 SSR이 상보적으로 증폭되어 다형성을 나타내고, 반복서열이 게놈에 위치하여 종이나 집단에 특이적으로 판별이 가능하여 집단유전 연구 및 유연관계가 근연한 종의 유전적 다양성 연구에 유용하다 (Ryu and Bae, 2011). 또한 ISSR 분석은 RAPD 분석의 낮은 재현성, AFLP 분석의 고비용, SSR 분석의 maker 제작에 복잡함을 보완할 수 있다 (Camacho and Liston, 2001; Xiao *et al.*, 2004, 2006; Ge *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2006).

지금까지 천마에 대한 연구는 중국의 경우 8개의 지역에 대한 유전적인 변이 분석과 천마의 주요물질인 *gatrodin*과의 관계에 대한 연구가 보고되어있다 (Tao *et al.*, 2009). 그러나 국내의 경우 유전학적인 연구는 전무한 수준이다. 천마의 퇴화 현상을 극복하기 위하여 지역적으로 천마의 유전적 다양성이 어떻게 분포되어있는지 검토해야할 필요가 있으며, 유전형질에 따른 천마의 물질적인 차이에 관한 연구 또한 필요한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 약용으로 활용가치가 높은 천마를 대상으로 ISSR 기법을 이용하여 지역적 유전변이를 분석하였고, HPLC를 이용하여 지역별 기능성 물질의 함량이 어떻게 차이가 나는지를 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용한 시료는 국내 천마 (*Gastrodia elata*) 생산지 중 임의적으로 4개 지역 (무주, 상주, 영양, 포천)을 선택하여 가을에 수확한 천마 중 20개체씩을 무작위로 선발하여 각각의 실험에 사용하였다 (Fig. 1, Table 1).

2. DNA 분리 및 ISSR PCR

천마의 꽃눈을 피경에서 분리하여 세척 후 액체질소를 이용하여 막자사발로 분쇄하였으며, Plant Genomic DNA Extraction Mini kit (FAVORGEN)를 이용하여 DNA를 분리하였다. DNA의 양은 spectrophotometer를 이용하여 260 nm에서 비색 정량하고 최종 농도가 2 ng/ μ l 가 되도록 희석하였다. ISSR PCR 반응용액 20 μ l 당 10 ng template DNA, 0.6 μ M ISSR

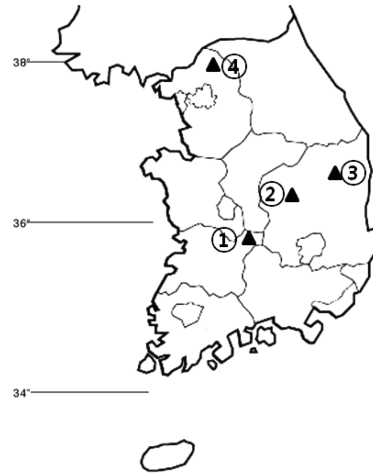


Fig. 1. Geographical distribution of locations of *Gastrodia elata*. (①; Muju-gun, ②; Sangju-si, ③; Yeongyang-gun, ④; Pocheon-si)

Table 1. Locality information of locations of *Gastrodia elata*.

Locations	Latitude (N)	Longitude (E)	No. of plant
Muju	36° 00′	127° 39′	20
Sangju	36° 27′	128° 12′	20
Yeongyang	36° 65′	129° 11′	19
Pocheon	37° 09′	127° 20′	20

Table 2. Primers, sequences and their annealing temperatures.

ISSR primers	Sequences (5' - 3')	Annealing temperature (°C)
809	(AG) ₈ G	52
810	(GA) ₈ T	50
811	(GA) ₈ C	52
813	(CT) ₈ T	50
823	(TC) ₈ C	52

primer, 0.6 Unit Thermostable DNA polymerase (Advanced Biotechnologies Ltd.), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 75 mM Tris·HCl (pH 8.8), 1.5 mM MgCl₂, 100 μ M dNTPs, 0.0025% BSA (Bovine Serum Albumine)가 포함되도록 하였으며, 40개의 ISSR primer screening을 통해서 재현성이 우수하고 다형성을 보이며 증폭산물이 선명하게 구분이 되는 5개의 primer (#809, #810, #811, #813, #823)를 분석에 사용하였다 (Table 2). PCR 조건으로는 94°C에서 5분의 전처리 후 94°C에서 30초, 50°C 또는 52°C에서 30초, 72°C에서 60초의 DNA 합성 과정을 45회 반복한 후 72°C에서 10분간 증폭하여 완료시켰다. PCR 증폭산물 (ISSR bands)은 2% agarose gel에서 90분 전기영동 시킨 후 UV trans-illuminator상에서 촬영한 뒤 증폭산물의 크기를 확인 하였으며, 동일한 크기의 특정 bp에서 증폭산물의 유무에 따라 '1' 과 '0'으로 데이터를 입력하여 분석하였다.

3. 자료의 분석

POPGENE ver. 3.2 program을 이용하여 Shannon's information Index (Shannon, 1948)를 계산하여 지역별 유전다양성을 구하였으며, Arlequin ver. 2.0 program을 이용하여 계산된 유전적 거리 (Euclidean distance)를 기초로 AMOVA (Analysis of MOlecular VAriance) 분석을 실시하여 지역 간 유전적 분화의 정도를 계산하였다 (Excoffier *et al.*, 1992). 분석된 지역 간의 유전적 유연관계를 구명하기 위해서 RAPDDIST ver. 1.0 (Hong *et al.*, 2004)을 이용하여 Manhattan distance (Wright, 1978)를 계산하였다. UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) tree와 NJT (Neighbor Joining Tree)를 재구성하여 각 지역 간 유집분석을 실행하였다 (Page, 1996). 통계 프로그램 [SPSS V.12 (SPSS Inc. USA)]를 이용하여 Duncan's test를 실시하였다.

4. 기능성 물질분석

1) Gastrodin 함량측정

동결 건조된 천마 50 mg 시료를 50% Methanol 2.5 ml 첨가하여 10분 동안 상온에 정치한 후 5분 동안 sonication 한 후 상온에 하루를 정치한 후, 4500 rpm에 20분 동안 원심분리를 하였다. 상등액을 filtering 한 후 HPLC를 이용하여 분석하였다. Mobile phase로는 0.5% formic acid water와 0.5% formic acid methanol 두 가지 용매를 사용하였으며, 유속은 0.7 ml/min, 흡광도는 270 nm이며, HPLC column은 Luna C₁₈ (250 × 21.2 mm, 5 μM)를 사용하였다 (Liu *et al.*, 2005; Ong *et al.*, 2007).

2) Ergothionine 함량측정

동결 건조된 천마 0.2 g에 10 ml cold ethanolic extraction buffer (10 mM DTT, 100 μM betain, 100 μM MMI in 70% ethanol)를 첨가 후 vortex한 후 3분 동안 sonication하고 1% ethanolic solution 2 ml을 첨가 후 1분 동안 상온에 정치한 후 4500 rpm에 20분 동안 원심분리를 하였다. 상등액 3 ml을 유리관에 담아 농축하여 HPLC 분석 용액 (50 mM sodium phosphate, 3% acetonitrile)에 녹여서 분석하였다. Mobile phase로 50 mM sodium phosphate에 3% acetonitrile를 첨가하여 0.1% triethylamine를 이용하여 pH를 7.3으로 조절하여 사용하였으며, 유속은 1 ml/min이며, 흡광도는 254 nm를 이용하였다. HPLC column은 Ecomosphere C18 colum (4.6 × 250 mm, 5 μm)를 사용하였다 (Lee *et al.*, 2009).

3) Amino acid 함량측정

동결 건조된 천마 50 mg 시료를 1 ml 5% PCA (Perchloric acid)용액을 넣고 vortex하고 3분 동안 sonication한 후 -20°C에 서서히 얼리기를 3회 한 후 하루 동안 정치 후 4°C

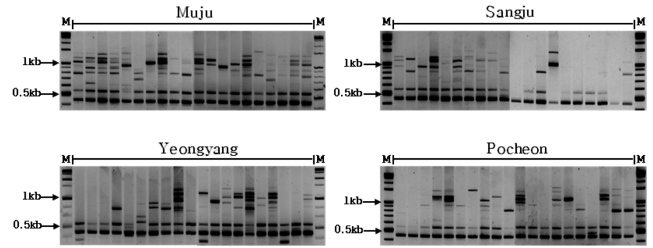


Fig. 2. Example of ISSR amplicon profiles. ISSR PCR was performed with UBC primer #811, "M" denotes DNA size marker.

13000 rpm에 10분 동안 원심분리 하였다. 상등액 30 μl에 40 mM NIE (Norleucin)를 첨가하여 농축 후 재건조 시약 20 μl을 첨가 후 sonication 한 후 농축하고, PITC 20 μl를 첨가 후 sonication 한 후 농축하고 Methanol 20 μl 첨가하여 농축 후 Pico-Tag 200 μl 첨가 후 용해시킨 다음 원심 분리 후 상등액으로 HPLC를 사용하여 분석하였다. 유속은 0.8 ml/min, 흡광도는 254 nm이며, HPLC column으로 Pico-Tag (3.9 × 150 mm) 사용하였다 (Cohen *et al.*, 1988).

결과 및 고찰

1. 유전적 다양성

총 98개의 증폭 산물 중 다형성 유전자좌의 비율 (percentage of polymorphic loci)은 상주지역 (76.53%)와 무주지역 (70.41%)로 비교적 높게 계산되었으며 영양지역 (64.29%)이 가장 낮게 계산되었다 (Fig. 2, Table 3). Shannon의 유전다양성지수 (S.I.: Shannon's information Index)를 계산해 본 결과 가장 높은 값을 보인 지역은 무주지역 (0.322)이었으며, 가장 적은 값을 보인 집단은 포천 지역 (0.255)이었다 (Table 3). 지역별 평균 유전 다양성 지수는 0.290으로 나타났다. 초본 식물이나 약용식물의 경우 유전다양성 지수 분석이 많이 되어있지 않은 상태이다. 천연집단의 비자나무 (*S.I.* = 0.395), 주목 (*S.I.* = 0.478), 철쭉나무 (*S.I.* = 0.395), 소나무 (*S.I.* = 0.453), 은행나무 (*S.I.* = 0.379) 등과 같은 목본들의 유전다양성 지수와 비교해 봤을 때 천마의 유전다양성지수는 비교적 낮은 것으로 밝혀졌다 (Hong *et al.*, 2000, 2003; Kwon *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). 집단유전학 분야연구에서 많이 활용되고 있는 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) marker 등 자연선택의 직접적인 대상이 아닌 DNA 표지자에서 관찰된 유전변이의 양과 분포는 식물종의 생태적·생활사적 특성과 깊은 상관관계가 있는 것으로 보고되고 있다 (Nyblom and Bartish, 2000). 천마의 생태적·생활사적 측면을 살펴보면 천마의 꽃은 꽃대 끝이 이삭화서로 꽃 주둥이가 오그라든 단지 모양으로 되어 있으며 꽃이 화려하거나 향이 좋은 편이 아니어서 곤충과 같은 매개체가 없는 경우 자연 상태에서 수분이 잘 안 되므로 종자 형성이 매우

Table 3. Comparison of genetic variation among four locations of *Gastrodia elata*.

Locations	The number of polymorphic loci	The percentage of polymorphic loci	h^{\dagger}	i^{\ddagger}
Muju	69	70.41%	0.212	0.322
Sangju	75	76.53%	0.196	0.310
Yeongyang	63	64.29%	0.175	0.274
Pocheon	66	67.35%	0.159	0.255
Mean	68.25	69.64%	0.186	0.290

† = Nei's (1973) gene diversity;

‡ = Shannon's information Index [Lewontin (1972)].

Table 4. Analysis of Molecular Variance(AMOVA) based on 98 ISSR markers for the four locations of *Gastrodia elata*.

Sources of variation	DF	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation (%)
Among populations	3	268.10	3.99	26.81
Within population	75	816.80	10.89	73.19

어렵다. 종자가 형성되어서 땅에 떨어진다고 하더라도 발아에 관여하는 공생균인 환애주름 버섯균이 없을 경우 발아가 어려우므로 종자로 번식이 매우 어렵다. 이러한 천마의 생태적 생활사로 보았을 때 천마의 유전적 다양성 지수가 높기에는 매우 어렵다고 추측한다. 재배지와 천연 집단 유전 다양성 지수를 직접적으로 비교하는 것을 무리가 있으나 천마의 생태적 특징을 고려해볼 때 천마의 유전적 다양성 지수가 낮은 것이 어느 정도 설명이 된다고 볼 수 있다. 차나무 재배지에 대한 유전변이 분석의 경우 층매에 의한 타가 수정을 하는 식물로 알려져 있지만 재배 집단이 기원집단에서 일부의 개체로 이루어졌기 때문에 차나무의 유전변이가 국내 천연적으로 분포하는 다른 수종들에 비해 낮은 유전변이를 나타내는 것으로 보고되었다 (Yang *et al.*, 2010). 그러나 확실한 결론을 얻기 위해서는 보다 많은 자료를 가지고 심도 있는 분석이 이루어져야 할 것이다.

2. 집단의 유전적 분화

조사된 4개의 집단에 대한 AMOVA를 이용한 분산요소의 비교에서 전체 유전변이 중 26.81%가 집단 간에서 기인하는 것으로 나타났고, 나머지 73.19%는 집단내 개체간의 차이에서 기인한 것으로 나타났다 (Table 4). 아직까지 재배되고 있는 약용식물에서 유전 변이를 분석한 경우가 극히 드물어 비교대상을 찾기가 매우 어려우나 비교적 유전변이 분석이 많이 되어있는 관목류와 비교해 볼 때 가시오갈피 (63.8%), 들쭉나무 (33.5%), *Lonicera perichlymenum* (18.6%) 철쭉 (11.6%), *Tetraena mongolica* (15.2%), 줄댕강나무 (18.7%) 등과 같은 집단 간의 유전 변이를 보이고 있으며, 버섯류인 송이버섯 ($F_{st}=0.13$)이나 *Pteridium aquilinum* ($F_{st}=0.37$) 연구결과와 Higberg의

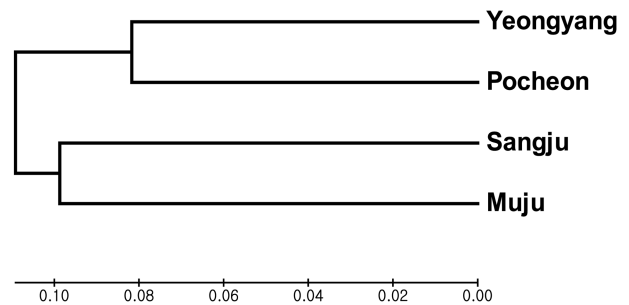


Fig. 3. UPGMA tree based on ISSR data for four locations of *Gastrodia elata*.

Fomitopsis pinicola Karst 자료를 비교할 때 천마의 재배기간의 유전적 분화는 큰 것이 아니라고 생각한다 (Kim *et al.*, 2009). 이러한 집단 간 차이는 일반적으로 지리적으로 광범위하게 분포하고, 타가수정하며 장수하는 식물이 그렇지 않은 식물에 비해서 집단 내 유전 변이량은 많고 집단 간 유전적 분화의 정도는 적은 것으로 알려져 있다 (Hamrick *et al.*, 1992). 더 정확한 해석을 위해서는 더 많은 지역 집단의 분석을 통하여 천마의 모양이나 표현형적 차이가 유전적인 요인지 지역적 환경에의 영향인지를 검토해 볼 필요가 있다 (Korpelainen, 1995; Cho *et al.*, 2000).

3. 유사성 분석

유전적 거리를 이용하여 UPGMA법 (Michener and Sokal, 1957)에 의한 유집분석을 실시한 결과 포천과 영양이 유전적 거리가 가장 가까웠으며 무주와 영양집단과의 거리가 가장 먼 것으로 나타났다 (Fig. 3). 이 결과로 봤을 때 지리적 거리와 유전적 거리와는 일정한 양상을 보이지 않는 것으로 나타났다. 일반적으로 유전적 거리와 지역적 거리 간에 일정한 양상을 보이지 않는 이유를 두 가지로 볼 수 있다. 첫 번째, 일반적인 집단 유전학적 측면에서 유전변이는 유전적 교류에 의해 점진적인 유전변이 양상을 띠게 되므로 유전적 거리와 지리적 거리 간에 높은 상관관계를 나타내는 것이 이제까지의 연구 결과이다. 그러나 이러한 자료는 동위효소 분석이나 기타 표현형적 분석 자료에 의거한 것이고, 최근 DNA분석 자료를 보면 유전적 거리와 지리적 거리 간에 전혀 관계가 없는 것으로 보고되고 있다 (Hong *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2010). 집단 유전학적 측면에서도 이러한 경향이 DNA marker 자체에 속성에 의해 기인된다고 보고 있는데, DNA marker는 selection에 대한 다른 genetic marker 보다 환경적인 인자에 영향을 받지 않으므로, 그 분석 결과는 지역적으로 점진적인 유전변이 분포 양상을 보이지 않는다는 것이다 (Cho *et al.*, 2000). 그리고 고등식물의 경우 조사된 유전적 거리와 지리적 거리간의 상관관계는 다른 연구에서도 통계적으로 인정되지 않는다는 보고가 있다 (Son *et al.*, 1989; Kim and Lee

1992; Kim *et al.*, 1993). 따라서 본 연구결과에서 유전적 거리와 지리적 거리간의 일정한 양상을 보이지 않은 것이 DNA marker의 속성 때문으로 볼 수 있을 것이다. 두 번째로 인간의 인위적인 유전적 교란으로 인하여 나타난 결과로 해석할 수 있다. 야생에서 채취되어 오던 약용식물이 사람에게 유용하게 이용되기 시작하면서 사람에 의해서 종자나 유묘형태로 이동되어 식재, 재배 및 확산됨으로서 여러 형태의 유전형이 섞여서 식재되는 경우가 있다. 대표적인 예로 차나무를 들 수 있는데 차나무 자생지들의 유전적 그룹 간 및 그룹 내 집단 간 유연관계가 지리적 경향이 나타내지 않음을 보고 하였는데, 그 이유로 승려들이나 신도들에 의해서 종자가 파종되어 지고 재배됨에 따른 사람의 인위적 유전자 교란을 받아 형성되었을 가능성이 높다는 보고가 있다 (Yang *et al.*, 2010). 천마의 생산의 경우 종자를 파종하여 번식하기보다 무성 생식에 의한 자마를 구입하여 생산하는 경우가 대부분이다. 대부분의 생산자가 생산지 주변에서 자마를 구입하여 생산을 하지만 생산지의 확장이나 생산자의 생산지 이동에 따라서 생산지와 먼 지역의 자마가 유입되거나 유출될 가능성을 배제할 수 없다. 이런 식으로 오랜 기간 반복적으로 생산되다 보니 자마들이 서로 섞여 혼식이 이루어졌으며 결과적으로 유전적 유연관계와 지리적 경향이 일치하지 않는 것으로 추측할 수 있다.

Table 5. Contents of two major pharmacological components in mature rhizomes of *Gastrodia elata* collected from four different locations.

Locations	Content(ug/g DW)	
	Gastrodin	Ergothionine
Muju	3372.92±24.81 ^a	378.7±283.83 ^{*a***}
Sangju	4779.23±764.33 ^b	229.22±47.38 ^b
Yeongyang	3960.77±809.69 ^{ab}	258.83±89.96 ^b
Pocheon	3742.37±809.41 ^a	394.97±81.63 ^a

*The data represents mean value ± SD.

**The same superscript letters indicate the corresponding components that do not differ statistically(P<0.05; Duncan's test).

4. 기능성 물질 분석

천마의 주요물질인 gastrodin (GA)과 ergothionine (ERG)은 알츠하이머병이나 신경 질환 기억력 강화 및 간질에 매우 효과적인 것으로 알려져 있다 (Ong *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2001; Hsieh *et al.*, 1997, 2000). 천마의 GA의 함량은 재배지의 환경과 시기에 따라 그 함량이 매우 다양하며, ERG은 곰팡이에서만 생합성되며 항산화제로서의 역할이 두드러진다고 알려져 있다. 천마의 경우 천마의 생장 균인 뽕나무 버섯균의 균사를 통하여 ERG이 전달될 것으로 추측하며 지역적인 영향도 있지만 균사속에 축적된 ERG의 양이 많을수록 천마의 피경에 축적되는 ERG의 양 또한 많아짐이 보고된바 있다 (Park *et al.*, 2010). 본 연구에서 상주지역의 경우 GA의 함량 매우 많은데 반하여 ERG의 경우 함량이 작은 것으로 나타났으며 포천과 무주의 경우 ERG의 함량은 많으나 상대적으로 GA함량이 적은 것으로 나타났다 (Table 5). 대부분 GA의 함량이 ERG의 함량이 10배 정도의 차이를 보이고 있으며, 상주의 경우 20배 이상의 차이를 보이고 있다. 천마는 탄수화물 89.8%, 조 단백질 6.2%로 다른 식물에 비하여 단백질 함량이 높은 편이며 아미노산의 조성은 필수 아미노산, arginine, histidine이 골고루 존재한다고 알려져 있다. 상주 지역 천마의 경우 glutamine, arginine, alanine, valine, lysine 등이 다른 지역보다 함량이 많았으며 영양의 지역 천마의 경우 tyrosine, isoleucine의 함량이 많으며, 포천의 경우 serine, glycine, histidine, proline, methionine의 함량이 다른 지역 보다 많은 것으로 확인이 되었다 (Table 6).

천마의 주요 성분인 GA와 ERG의 함량이 지역별로 서로 상이하게 축적되어있음을 볼 수 있으며 지역별 함량의 차이를 유전적인 영향과 결부시키기에는 매우 어렵다고 볼 수 있다. 지역의 환경적인 영향을 배제한 상태의 천마를 이용하여 천마의 유전형질과 기능성 물질의 함량과의 관계를 밝히는 연구가 필요할 것으로 생각한다.

본 연구를 통하여서 천마의 지역별 유전적 다양성은 종자로 번식이 매우 어려우며 다른 공생균이 없이는 발아가 어려운

Table 6. Contents of amino acid components in mature rhizomes of *Gastrodia elata* collected from four different cultivation areas.

Locations	Content (nM/mg DW)															
	Glu	Ser	Gly	His	Arg	Thr	Ala	Pro	Tyr	Val	Met	Cys	Ile	Leu	Phe	Lys*
Muju	1.33±0.51 ^{ab}	3.33±2.72 ^a	2.98±2.75 ^a	3.26±2.53 ^a	0.69±0.95 ^a	0.74±0.62 ^{ab}	0.38±0.32 ^a	1.26±1.11 ^a	0.25±0.46 ^a	0.61±0.53 ^a	0.79±0.64 ^a	0.22±0.22 ^a	0.04±0.03 ^a	0.06±0.07 ^a	0.34±0.29 ^a	0.21±0.19 ^{***a}
Sangju	3.55±0.69 ^b	3.30±1.13 ^b	3.77±1.21 ^b	0.47±0.14 ^b	1.01±0.31 ^a	0.29±0.09 ^b	1.68±0.53 ^b	0.09±0.05 ^b	0.18±0.06 ^a	2.23±0.4 ^b	0.6±0.13 ^b	0.11±0.03 ^b	0.49±0.11 ^b	0.13±0.07 ^{bc}	0.18±0.05 ^b	1.21±0.31 ^b
Yeongyang	2.12±0.68 ^a	2.29±1.57 ^b	2.81±1.58 ^b	0.48±0.16 ^b	0.69±0.3 ^a	0.4±0.16 ^a	1.05±0.56 ^a	0.15±0.19 ^b	0.86±0.28 ^b	1.77±0.5c	0.47±0.17 ^b	0.02±0.01 ^b	0.56±0.11 ^b	0.18±0.08 ^c	0.41±0.14 ^c	0.8±0.34 ^c
Pocheon	3.12±0.74 ^b	5.55±1.27 ^b	4.06±1.97 ^a	4.93±1.55 ^b	0.93±0.75 ^a	1.07±0.56 ^b	0.61±0.16 ^a	1.85±0.79 ^a	0.34±0.31 ^a	0.92±0.29 ^a	1.29±0.33 ^a	0.36±0.2 ^a	0.05±0.02 ^a	0.07±0.01 ^{ab}	0.58±0.15 ^a	0.32±0.18 ^a

*Glu; glutamine, Ser; serine, Gly; glycine, His; histidine, Arg; arginine, Thr; threonine, Ala; alanine, Pro; proline, Tyr; tyrosine, Val; valine, Met; methionine, Cys; cysteine, Ile; isoleucine, Leu; leucine, Phe; phenylalanine, Lys; lysine,

**The data represents mean value ± SD.

***The same superscript letters indicate the corresponding components that do not differ statistically(P < 0.05; Duncan's test)

형태로서 무성생식으로 번식이 되었을 가능성이 매우 높다. 또한 천마의 생태적 생활사적인 측면으로 살펴보았을 때 유전적 다양성 지수가 낮을 수밖에 없음을 추측할 수 있었으며, 그로 인해 지역별 유전자 분화 또한 높지 않은 것으로 판단된다. 천마의 생산이 종자에 의해서 번식되기보다 자마의 유통에 의해서 생산되는 것이 대부분으로 사람에 의한 인위적인 간섭이 천마의 유전형에 지대한 영향을 미치므로 지역적 거리와 유전자의 거리가 일치 하지 않는 것으로 추측할 수 있다. 각 지역별 천마의 기능성물질 GA의 함량이 ERG의 함량보다 10~20배까지 많음이 확인되었으며 생산지별 기능성 물질과 아미노산의 함량의 차이는 미세한 것으로 확인되었다. 본 연구는 천마의 생산지의 환경적인 영향을 배제한 연구를 통하여 천마의 유전형질과 기능성 물질과의 관계를 파악하고, ISSR을 이용하여 천마 개체간의 유전적인 마커를 개발하여 기능성 물질이 많이 함유된 천마의 품종을 개발하는데 중요한 자료가 될 것으로 생각한다.

LITERATURE CITED

- Camacho FJ and Liston A.** (2001). Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola*(Ophioglossaceae) based on inter-simple sequence repeats(ISSR). *American Journal of Botany*. 88:1065-70.
- Choi SR, Kim CS, You DH, Kim JY, Kim YH, Ahn YS, Kim JM, Kim YS and Seo KW.** (2011). Changes of components and quality in *gastrodiae* rhizoma by different dry methods. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 19:354-361.
- Cho DH, Lee KJ and Han SH.** (2000). A study on the genetic variation of *Tricholoma matsutake* collected from eleven sites of Korea using I-SSR PCR. *Korean Journal of Mycology*. 28:32-37.
- Chung JM, Lee BC, Kim JS, Park CW, Chung MY and Chung MG.** (2006). Fine-scale genetic structure among genetic individuals of the clone-forming monotypic genus *Echinosophora koreensis*(Fabaceae). *Annals of Botany*. 98:165-173.
- Cohen SA, Meys M and Tarvin TL.** (1988). The pico-tag method: A manual of advanced techniques for amino acid analysis. Millipore Corp. Milford. Massachusetts, USA. p.11-52.
- Excoffier L, Smouse PE and Quattro JM.** (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131:479-491.
- Ge XJ, Yu Y, Yuan YM, Hyang HW and Yan C.** (2005). Genetic diversity and geographic differentiation in endangered *Ammopiptanthus*(Leguminosae) populations in desert regions of northwest China as revealed by ISSR analysis. *Annals of Botany*. 95:843-851.
- Hamrick JL, Godt MJW and Sherman-Broyles S.** (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*. 6:95-124.
- Hong PY, Ahn JY, Kim YM, Yang BH and Song JH.** (2011). Genetic variation of nSSR markers in natural populations of *Abies koreana* and *Abies nephrolepis* in south Korea. *Journal of Korean Forest Society*. 100:577-584.
- Hong YP, Cho KJ, Kim YY, Shin EM and Pyo SK.** (2000). Diversity of I-SSR variants in the populations of *Torreya nucifera*. *Journal of Korean Forest Society*. 89:167-172.
- Hong YP, Kwon HY, Kim YY, Kim CS and Han SD.** (2003). Distribution of I-SSR variants in natural populations of smile rosebay(*Rhododendron schlippenbachii* Maxim.) in Korea. *Journal of Korean Forest Society*. 92:497-503.
- Hong YP, Kwon HY, Yang BH, Lee SW, Kim CS and Han SD.** (2004). Genetic status of an isolated relict population of dwarf stone pine in Mt. Seorak. *Journal of Korean Forest Society*. 93:393-400.
- Hsieh CL, Chang CH, Chiang SY, Li TC, Tang NY, Pon CZ, Hsieh CT and Lin JG.** (2000). Anticonvulsive and free radical scavenging activities of vanillyl alcohol in ferric chloride-induced epileptic seizures in sprague-dawley rats. *Life Sciences*. 67:1185-1195.
- Hsieh MT, Wu CR and Chen CF.** (1997). Gastrodine and-hydroxybenzyl alcohol facilitate memory consolidation and retrieval, but not acquisition on the passive avoidance task in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 56:45-54.
- Kim HJ, Moon KD, Oh SY, Kim SP and Lee SR.** (2001). Ether fraction of methanol extracts of *Gastrodia elata*, a traditional medicinal herb, protects against kainic acid-induced neuronal damage in the mouse hippocampus. *Neuroscience Letters*. 314:65-68.
- Kim JS and Lee SW.** (1992). Genetic structure of natural populations of *Pinus densiflora* in Kangwon - Kyungbuk region. *Korean Journal of Breeding*. 24:48-60.
- Kim JS, Lee SW, Hwang JW and Kwon KW.** (1993). *Pinus densiflora* for erecta - Can it be treated genetically as a distinct group? - Reconsideration based on allozyme data. *Journal of Korean Forest Society*. 82:166-175.
- Kim SY, Kim YD, Kim JS, Yang BH, Kim SH and Lee BC.** (2009). Genetic diversity of *Forsythia ovata* Nakai(Oleaceae) based on inter-simple sequence repeats(ISSR). *Korean Journal of Plant Taxonomy*. 39:48-54.
- Korpelainen H.** (1995). Mating system and distribution of enzyme genetic variation in bracken(*Pteridium aquilinum*). *Canadian Journal of Botany*. 73:1611-1617.
- Kwon HY and Kim ZS.** (2002). ISSR variation within and among korean populations in *Taxus cuspidata*. *Journal of Korean Forest Society*. 91:654-660.
- Lee JY.** (1982). The propagation of *Gastrodia elata* by using rhizomorphs of *Armillariella mella*. Seoul Women's University. Rural Development Research Service. 7:39-45.
- Lee SW, Kim YM, Kim WW and Chung JM.** (2002). Genetic variation of I-SSR markers in the natural populations of rare and endangered tree species, *Oplopanax elatus* in Korea. *Journal of Korean Forest Society*. 91: 565-573.
- Lee WY, Park EJ and Ahn JK.** (2009). Supplementation of methionine enhanced the ergothioneine accumulation in the *Ganoderma neojaponicum* Mycelia. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 158:213-221.
- Liu XQ, Baek WS, Kyun AD, Choi HY and Yook CS.** (2002). The constituents of the aerial part of *Gastrodia elata* Blume.

- Natural Product Sciences. 8:137-140.
- Liu ZH, Hu HT, Feng GF, Zhao ZY and Mao NY.** (2005). Protective effects of gastrodine on the cellular model of Alzheimer's disease induced by Abeta 25-35. *Sichuan Da Xue Xue Bao*. 36:537-540.
- Michener CD and Sokal RR.** (1957). A quantitative approach to a problem of classification. *Evolution*. 11:490-499.
- Niu Q, Niu P and He S.** (2004). Effect of *Gastrodia elata* on learning and memory impairment induced by aluminum in rats. *Journal of Hygiene Research*. 33:45-48.
- Noda N, Kobayashi Y, Miyahara K and Fukahori S.** (1995). 2, 4-Bis(4-hydroxybenzyl) phenol from *Gastrodia elata*. *Phytochemistry*. 39:1247-1248.
- Nybom H and Bartish IV.** (2000). Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Prospectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. 3:99-114.
- Ong ES, Heng MY, Tan SN, Yong JWH, Koh H, Teo CC and Hew CS.** (2007). Determination of gastrodin and vanillyl alcohol in *Gastrodia elata* Blume by pressurized liquid extraction at room temperature. *Journal of Separation Science*. 30:2130-2137.
- Page RDM.** (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*. 12:357-358
- Park EJ, Lee WY, Kim ST, Ahn JK and Bae EK.** (2010). Ergothioneine accumulation in a medicinal plant *Gastrodia elata*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4:1141-1147.
- Ryu HJ and Bae CH.** (2011). Genetic diversity and relationship analysis of *Taraxacum officinale* Weber and *Taraxacum coreanum* Nakai accessions based on Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) markers. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 19:149-156.
- Shannon CE.** (1948). A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal*. 27:379-656.
- Son DS, Hong SC and Yeo JK.** (1989). Genetic variation of isozymes in populations of *Pinus densiflora* and *Pinus thunbergii* naturally distributed in Kyungpook province. *Journal of Korean Forest Society*. 78:345-359.
- Taguchi H, Yosioka I, Yamasaki K and Kim IH.** (1981). Studies on the constituents of *Gastrodia elata* Blume. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 29:55-62.
- Tao J, Luo ZY, Msangi CI, Shu XS, Wen L, Liu SP, Zhou CQ, Liu RX and Hu WX.** (2009). Relationships among genetic makeup, active ingredient content, and place of origin of the medicinal plant *Gastrodia* tuber. *Biochemical Genetics*. 47:8-18.
- Wright S.** (1978). *Evolution and the genetics of population*(Vol. 4). Variability within and among natural populations. University of Chicago Press. Chicago. Illinois, USA. p.580.
- Xiao LQ, Ge XJ, Gong X, Hao G and Zheng SX.** (2004). ISSR variation in the endemic and endangered plant *Cycas guizhouensis*(Cycadaceae). *Annals of Botany*. 94:133-138.
- Xiao MQ, Li L, Wang L, Guo J, Li L, Tang and Chen F.** (2006). ISSR analysis of the genetic diversity of the endangered species *Sinopodophyllum hexandrum*(Royle) Ying from western Sichuan province, China. *Journal of Integrative Plant Biology*. 48:1140-1146.
- Yang BH, Hong YP, Lee KY, Jeong BC and Park YG.** (2010). Genetic diversity of Korean wild tea revealed by ISSR markers. *Journal of the Korean Tea Society*. 16:119-126.