

Phylogenetic Analysis of the Former Members of Scrophulariaceae

Young-Min Bae*

Department of Microbiology, Changwon University, Changwon, Kyungnam 641-773, Korea

Received November 4, 2010 / Accepted December 14, 2010

Plants which had been classified to the Scrophulariaceae of the Lamiales were recently reclassified. Many of them were moved to the other families of Lamiales according to the DNA sequences of the plastid DNA. Among those, *Melampyrum roseum*, *Phtheirospermum japonicum*, *Pseudolysimachion undulata*, *Lindernia crustacea* and *Mazus pumilus* were chosen for phylogenetic analyses. DNA sequences of 18S rRNA gene and ITS1 of those plants were determined and deposited into GenBank (accession numbers GU359046, GU359047, GU359048, GU359049, GU359050, respectively). Analyses of those DNA sequences confirmed the current classification done on the basis of the plastid DNA sequences of *Melampyrum roseum*, *Phtheirospermum japonicum* and *Pseudolysimachion undulata*. However, it was not possible to classify *Mazus pumilus* and *Lindernia crustacea* due to discrepancies of analyses data.

Key words : Lamiales, Scrophulariaceae, *Lindernia crustacea*, *Pseudolysimachion undulata*, *Mazus pumilus*, *Melampyrum roseum*, *Phtheirospermum japonicum*

서 론

현삼과(Scrophulariaceae)는 19세기부터 존재하던 분류군으로서 꿀풀목(Lamiales)에 속하며, 전세계에 걸쳐 널리 분포하는 식물들을 포함하고 있다[4,10]. 그러나 현삼과를 정의하는 명확한 특징이 없었기 때문에 이 분류군에 속하는 식물들 간의 상관관계에 대해 오래전부터 의문이 제기되어 왔다[10]. 이 분류군에 속하는 식물들의 엽록체 유전자들(*rtcl*, *ndhF* 및 *rps2*)의 염기서열을 비교하여 분자유전학적으로 분석하려는 시도가 1990년대에 시작되었는데, 그 결과 종래에 현삼과로 분류되어왔던 식물들을 여러 개의 서로 다른 과로 다시 분류해야 한다는 의견들이 제시되어서 수용되었다[3,9,10]. 이 중에서 국내에 널리 분포되어있는 꽃머느리밥풀(*Melampyrum roseum*)과 나도송이풀(*Phtheirospermum japonicum*)은 열당과(Orobanchaceae)로 옮겨졌고, 물칭개나물(*Pseudolysimachion undulata*)은 질경이과(Plantaginaceae)로 옮겨졌으며, 주름잎(*Mazus pumilus*)은 파리풀과(Phrymaceae)로 재분류되었고, 외풀(*Lindernia crustacea*)은 외풀과(Linderniaceae)로 재분류되었으며[13], 지황은 현재 속하는 과(family)가 모호한 상태이다. 그러나 주름잎을 파리풀과로 분류하는 것과 외풀을 외풀과로 분류하는 것에 대해서 나중에 의문이 제기되어 있는 상태이기 때문에 종래에 현삼과로 분류되었던 꿀풀목 식물들의 분류는 아직도 진행형이라고 볼 수 있다[12].

생명체들의 진화적 차이 및 서로간의 상관관계를 비교하기 위해서는 현재 원핵생물들은 16S rRNA의 염기서열, 그리고

진핵생물의 경우에는 18S rRNA의 염기서열을 많이 비교하고 있다[2,11]. 또한 종 단위 또는 그 이하의 세분류를 위해서는 ITS1과 ITS2의 염기서열을 사용하기도 한다[7,8]. 그리고 엽록체 DNA의 염기서열을 사용하기도 하는데, 이 경우는 ITS 염기서열보다는 더 큰 단위의 분류에 사용 된다[8]. 현재 현삼과 또는 연관된 과의 식물들 중에서 18S rRNA의 염기서열이 알려져 있는 것들은 소수에 불과하다. 본 연구자가 2009년 12월 초에 GenBank에서 조사를 해 본 결과, 꿀풀목에 속하는 식물들 중에서 18S rRNA의 염기서열이 완전히 또는 거의 완전히 밝혀져 있는 식물들은 겨우 62종에 불과했다. 이는 현재까지 알려져 있는 꿀풀목 식물들 11,000여 종의 1%에도 훨씬 못 미치는 수치이다. 따라서 본 연구에서는 아직까지 18S rRNA의 염기서열이 알려져 있지 않고, 우리나라에서 흔하게 발견되는 자생식물들 중에서 종래에는 현삼과에 속했으나 현재에는 여러 개의 다른 과로 재분류된 꽃머느리밥풀(*Melampyrum roseum*), 나도송이풀(*Phtheirospermum japonicum*), 물칭개나물(*Pseudolysimachion undulata*), 외풀(*Lindernia crustacea*) 그리고 주름잎(*Mazus pumilus*)을 확보하여 그 genomic DNA를 추출하고, 18S rRNA 유전자 및 ITS1의 염기서열을 밝혀서 이를 GenBank에 등록하였다(accession numbers GU359046, GU359047, GU359048, GU359049, GU359050, respectively). 이렇게 얻어진 염기서열들을 서로 비교해서 엽록체 DNA의 염기서열에 의한 분류체계와 비교해 보았다.

재료 및 방법

식물재료

본 연구에 사용된 식물들은 충북 제천의山野에서 채집하였

*Corresponding author

Tel : +82-55-213-3483, Fax : +82-55-213-3480

E-mail : yominbae@changwon.ac.kr

다. 정확한 분류를 위하여 식물도감을 참고하고, 또한 전문가들의 조언도 받았다. 乾地黃은 국내의 한의원에 한약재를 납품하는 제약사를 통해서 구입하였다.

DNA 추출

나도송이풀, 물청개나물, 외풀 및 주름잎의 genomic DNA는 막자사발을 이용하여 건조된 식물체를 분쇄한 후, Qiagen의 DNeasy Plant Mini Kit를 사용하여 분리하였다. 꽃머느리밥풀의 genomic DNA는 Cota-Sanchez et al.의 방법을 사용하여 분리하였다[6]. 간단히 설명하면, 막자사발을 이용하여 건조된 식물체를 미세하게 분쇄하고, 분말 0.5 g을 15 ml 용량의 polypropylene tube에 넣고, 여기에 2X CTAB buffer 4 ml를 첨가하여 잘 섞은 후, 65°C에서 4시간 동안 유지시켰다. 여기에 chloroform · isoamyl alcohol (24:1) 혼합물 4 ml를 첨가하여 vortex한 후, tabletop centrifuge를 사용하여 3,500 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 상등액에 isopropanol을 첨가하여 DNA를 침전시킨 후에, TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)에 녹이고, RNase A를 첨가하여 37°C에서 overnight 동안 유지시켰다. 이것을 Promega의 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System으로 정제하였다.

PCR Amplification

PCR 반응을 위해서는 DNA template 100 ng, forward primer 2.5 pmol, reverse primer 2.5 pmol, dNTPs mixture 2 µl (10 nM each) 그리고 *Pfu* DNA polymerase 1 µl (3 U)를 포함하는 100 µl의 반응액에서 반응을 진행하였다. PCR 반응에 사용된 forward primer (5'-TTTAGATCTGGTTGATCCTGCCAGT-3') 및 reverse primer (5'-TTTAAGCTTCCAAGTATCGCATTTTCGCT-3')의 위치는 Fig. 1A에 표시하였다. 반응 조건은 94°C에서 2분간 한 cycle, 그리고 94°C에서 1분, 58°C에서 1분, 72°C에서 3분씩 30 cycle을 진행시킨 후, 최종적으로 72°C에서 10분간 유지시켰다. 이때에 사용된 forward primer는 18S rRNA gene들의 5'-ends의 conserved region을 target으로 하여 제조되었다[14]. 이때에 현삼과 식물들의 18S rRNA genes에서 존재하지 않는 제한효소 *Bgl*II의 인식부위를 forward primer의 5'-말단에 첨가하여서 cloning시에 사용할 수 있도록 하였다. Reverse primer는 5.8S rRNA의 중간부위를 target으로 하여 제조하는데, 역시 cloning시에 사용하기 위하여 현삼과 식물들의 18S rRNA gene, 5.8S rRNA gene 그리고 사이의 intergenic transcribed spacer에 존재하지 않는 *Hind*III의 인식부위를 첨가하였다. PCR에는 error가 많이 발생하는 *Taq* DNA polymerase 대신에 error가 훨씬 적게 발생하는 *Pfu* DNA polymerase를 사용함으로써 반응 중에 DNA sequence가 변경되는 것을 최소화하였다[5].

Cloning and DNA sequencing

PCR 산물은 agarose gel electrophoresis로 분석하여 예상

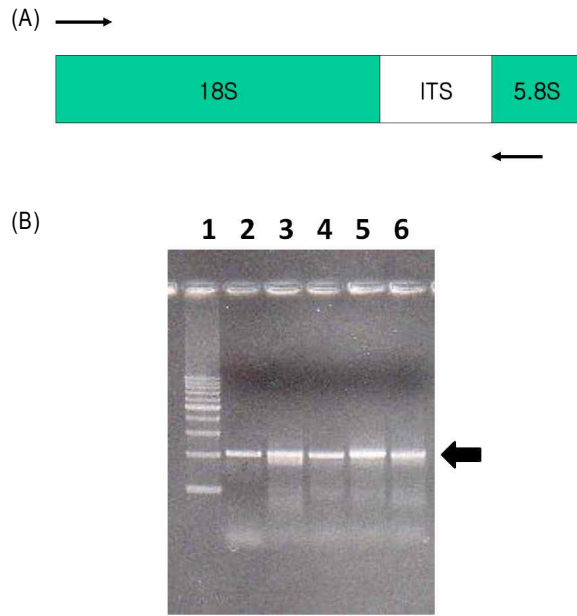


Fig. 1. (A) The locations of the two primers used for amplification of the 18S rRNA gene. The forward primer is shown above and the reverse primer shown below. Abbreviations are 18S for 18S rRNA gene, ITS for internal transcribed spacer, and 5.8S for 5.8S rRNA gene. (B) Agarose gel electrophoresis of the PCR products. Lane 1 shows 1-kb ladder. Each band from the bottom represents 1.0 kb, 2.0 kb, 3.0 kb, etc. PCR products from the genomic DNA of the plants used in this study were analyzed on the lanes 2 to 6. Lane 2, PCR product of *Melampyrum roseum*, Lane 3, *Phtheirospermum japonicum*, Lane 4, *Pseudolysimachion undulata*, Lane 5, *Lindernia crustacea*, Lane 6. *Mazus pumilus*. The arrow on the right indicates the PCR products.

되는 크기의 산물이 생성된 것을 확인한 후에 Promega의 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System으로 정제하였다. 이렇게 정제된 DNA는 *Sma*I로 절단된 pBluescript SK II plasmid 0.1 µl과 섞어서 ligation 반응을 진행시킨 후, *Escherichia coli* competent cell (DH5a)을 transformation 시키는 데에 사용하고, transformed cells는 ampicillin (10 µg/ml)을 함유하는 MacConkey agar plate에 도말하였다. 흰색의 colony들로부터 plasmid DNA를 추출하고, agarose gel electrophoresis를 통해서 예상되는 크기의 insert DNA가 포함되어 있는 것을 확인한 후, 염기서열 분석을 수행하였다. 염기서열 분석은 (주)바이오닉스(서울특별시 구로구 구로3동 235번지)에 의뢰하였다.

Phylogenetic analysis of the DNA sequences

얻어진 염기서열은 BLAST program 및 ClustalW 1.83 program을 이용하여 분석하였다[1].

결과 및 고찰

건조된 식물체들의 잎과 줄기로부터 얻어진 genomic DNA를 template로 사용하여 PCR을 수행하고, 그 산물을 agarose gel electrophoresis를 통하여 분석한 결과, 예상한 대로 약 2.1-kb의 DNA가 관찰되었다(Fig. 1B). 이 DNA들을 pBluescript II SK- plasmid에 cloning하여서 염기서열을 분석하였다.

본 연구에서는 종래에는 모두 현삼과로 분류되었으나 현재에는 다른 과로 분류되고 있는 식물들 중에서 18S rRNA 염기서열이 아직까지 알려져 있지 않으며 우리 주위에서 흔하게 발견되는 국내 자생식물 5종의 18S rRNA 유전자 및 ITS1의 염기서열을 밝혀서 이들 식물들의 분류에 도움이 되는 단서를 발견하고자 하였다. 또한 이렇게 얻어진 결과를 엽록체 DNA의 염기서열에 의한 분류체계와 비교해 보았다. 그러므로 새로운 분류체계에 따라서 현재에는 열당과(Orobanchaceae)에 속하는 꽃머느리밥풀(*Melampyrum roseum*) 및 나도송이풀(*Phtheirospermum japonicum*), 질경이과(Plantaginaceae)에 속하는 물청개나물(*Pseudolysimachion undulata*), 파리풀과(Phrymaceae)에 속하는 주름잎(*Mazus pumilus*) 그리고 외풀과(Linderniaceae)에 속하는 외풀(*Lindernia crustacea*)의 18S rRNA 유전자 및 ITS1의 염기서열을 밝혀내어서 GenBank에 등록하였다(accession numbers GU359046, GU359047, GU359048, GU359049, GU359050, respectively).

본 연구자가 조사해 본 바로는 꿀풀목 식물들 중에서는 2009년 12월 현재 62종이 GenBank에 등록되어있는 것으로 밝혀졌다. 따라서 본 연구자는 이 62종의 식물들 모두의 18S rRNA 유전자의 염기서열을 확보하였다. 그러나 일부의 염기서열은 너무 짧아서 phylogenetic comparison을 수행하기에 부적합하다고 판단이 되었다. 따라서 이 중에서 염기서열의 길이가 phylogenetic comparison을 수행하기에 충분한 52종과 본 연구에서 추가로 밝혀진 5종의 식물들의 염기서열을 포함하여 서로간의 상관관계를 ClustalW 1.83을 사용하여 비교해 보았다(Fig. 2). 그 결과, 쥐꼬리망초과(Acanthaceae, Fig. 2, lines 5 to 9 from the top), 돌담배과(Gesneriaceae, Fig. 2, lines 29 to 35 from the top), 질경이과(Plantaginaceae, Fig. 2, lines 36 to 40 from the top), 그리고 열당과(Orobanchaceae, Fig. 2, lines 41 to 56 from the top)에 속하는 식물들 대부분은 같은 속의 식물들끼리 cluster를 형성함으로써 엽록체 DNA에 의한 분류체계와 일치하고 있는 것을 볼 수 있었다. 그러나 돌담배과가 두 그룹(lines 29-31, lines 32-35)으로 나뉘어 있고, 열당과의 경우는 대부분이 한 cluster에 포함이 되어있으나, *Harveya speciosa* 및 *Hyobache atropurpurea* (lines 60-61)는 다른 그룹으로 나뉘어 있는 것을 알 수 있다. 또한 질경이과 역시 *Antirrhinum majus*와 *Lineria vulgaris*는 별도의 분류군을 형성하고 있다. 이러한 점에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다

고 여겨진다.

본 연구에서 분석한 식물들의 경우에는 18S rRNA 염기서열을 GenBank의 BLAST로 search도 해서 ClustalW1.83에 의한 분석과 비교해 보았다. 우선 Fig. 2에 의하면 꽃머느리밥풀과 나도송이풀은 열당과로 분류되는 것이 옳은 것으로 나타나고 있다. 또한 BLAST search 결과, 꽃머느리밥풀과 나도송이풀은 모두 열당과에 속하는 *Pedicularis racemosa*와 가장 유사한 것으로 나타났다(data not shown). 또한 현재 엽록체 DNA의 염기서열에 의한 분류체계에서도 이 두 식물들은 모두 열당과로 분류되고 있기 때문에 모든 결과가 서로 잘 일치하고 있다고 볼 수 있다. 물청개나물은 Fig. 2의 결과에 의하면 질경이과로 분류되고, 또한 엽록체 DNA 염기서열에 의한 분류에서도 질경이과로 분류되고 있다. 또한 BLAST search 결과도 질경이과에 속하는 *Veronica anagallis-aquatica*와 가장 유사한 것으로 나타나기 때문에, 이 결과도 서로 잘 일치하고 있다고 볼 수 있다(data not shown). 주름잎의 경우는 Olmstead 등[10]에 의해서 파리풀과로 분류가 되었으나 Oxelman 등[12]에 의해서 나중에 의문이 제기 되었다. Fig. 2의 결과에서는 주름잎은 열당과와 유사한 것으로 나타나고 있으며, BLAST search 결과로는 현삼과에 속하는 *Verbascum thapsus*와 가장 가까운 것으로 나타나고 있다(data not shown). 따라서 주름잎의 경우에는 본 연구에서도 결론을 내리기가 어렵게 되었기 때문에 당분간 분류가 모호한 상태로 남아있을 가능성이 높아지게 되었다. 외풀도 Olmstead 등[10]에 의해서 외풀과로 분류가 되었으나 나중에 Oxelman 등[12]에 의해서 의문이 제기 되었다. 외풀의 경우는 Fig. 2에 의하면 열당과에 속하는 *Harveya speciosa* 및 *Hyobache atropurpurea*와 가까운 것으로 나타나고 있고, BLAST search 결과에 의하면 참깨과의 참깨(*Sesamum indicum*)와 유사한 것으로 나타나고 있다(data not shown). 따라서 외풀도 본 연구에서 결론을 내리기가 어렵게 되었다. 따라서 외풀의 분류도 당분간 결론이 나지 않을 가능성이 높다고 본다.

Fig. 2에서 분류상으로 문제가 과가 몇 가지 있는데, 그 중의 하나가 꿀풀과(Lamiaceae)와 마편초과(Verbenaceae)이다. 꿀풀과에 속하는 *Lamium amplexicaule*와 *Pogostemon cablin*는 cluster를 형성하고 있으나, *Clerodendrum chinense*와 *Callicarpa dichotoma*는 다른 분류군에 흩어져 있고, 마편초과의 *Verbena bracteata*와 *Chionophila jamesii*도 분류에 문제가 있는 것으로 나타났다. 이 식물들의 정확한 분류는 엽록체 DNA 염기서열이든 18S rRNA 염기서열이든 간에 더 많은 자료가 확보되어 좀 더 체계적인 연구가 진행될 때까지 기다려야 할 것으로 생각된다. 또한 그 결과에 따라서 이러한 식물들을 포함하는 분류군에서 또 한 차례의 대규모 지각변동이 일어날 가능성도 배제할 수는 없다.

Fig. 2의 식물들 중에서 ITS1의 염기서열이 알려져 있는 식



Fig. 2. Dendrogram drawn on the basis of ClustalW1.83 comparison of 18S rRNA genes of Lamiales.

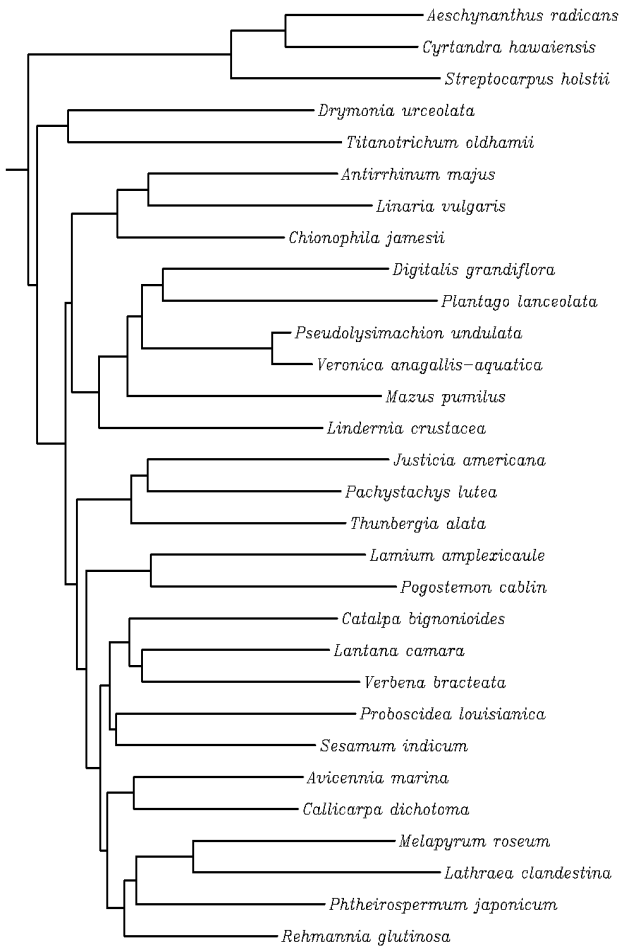


Fig. 3. Dendrogram drawn on the basis of ClustalW1.83 comparison of ITS1 sequences of the plants of the upper branches of the Fig. 2 (lines 1 to 40).

물들의 ITS1의 염기서열을 찾으려 시도하였다. 그 결과, 열당과의 식물들 중에서는 ITS1의 염기서열이 알려져 있는 것들이 본 연구에서 밝혀진 것들을 제외하고는 거의 없었다. 따라서 열당과의 식물들을 제외한 식물들(lines 1 to 40 of Fig. 2)의 ITS1의 염기서열을 비교해 보았다(Fig. 3). 그 결과, 돌담배과(lines 1 to 5), 질경이과(lines 6 to 12), 쥐꼬리망초과(lines 13-15)의 식물들은 서로 cluster를 형성하고 있는 것을 관찰할 수 있었으나, 나머지 식물들은 여전히 뚜렷한 패턴을 보이지 않고 있었다(Fig. 3).

감사의 글

이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(KRF-2008-521-E00173).

References

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Bae, Y. M. 2009. DNA sequencing and phylogenetic analysis of the 18s rRNA gene of *Atractyloides japonica* Koidz and analysis of atractylon. *Korean J. Med Crop Sci.* **17**, 26-32.
- Beardsley, P. M. and R. G. Olmstead. 2002. Redefining Phrymaceae: the placement of *Mimulus*, tribe Mimuleae, and *Phryma*. *Am. J. Bot.* **89**, 1093-1102.
- Bentham, G. 1846. Ordo CXLII Scrophulariaceae. In de Candolle, A. (ed.), *Prodrromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis*, Vol. 10, Victoris Masson, Paris.
- Cline, J., J. C. Braman, and H. H. Hogrefe. 1996. PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3546-3551.
- Cota-Sanchez, J. H., K. Remarchuk, and K. Ubayasena. 2006. Ready-to-use DNA extracted with a CTAB method adapted for herbarium specimens and mucilaginous plant tissue. *Plant Mol. Biol. Rep.* **24**, 161-167.
- Eu, G. S., M. R. Park, and S. J. Yun. 2009. Internal transcribed spacer (ITS) regions reveals phylogenetic relationships of *Rubus* species cultivated in Korea. *Korean J. Med Crop Sci.* **17**, 165-172.
- Jigden, B., M. K. Kim, J. H. Noh, S. Hua, and D. C. Yang. 2009. Phylogenetic analysis of *Schizonepeta* Spike on the basis of DNA sequences. *Korean J. Med Crop Sci.* **17**, 46-53.
- National Genetic Resources Program. 2003. Germplasm Resources Information Network. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. URL: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/family.pl>
- Olmstead, R. G., C. W. DePamphilis, A. D. Wolfe, N. D. Young, W. J. Elisons, and P. A. Reeves. 2001. Disintegration of the Scrophulariaceae. *Am. J. Bot.* **88**, 348-361.
- Olsen, G. J. and C. R. Woese. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J.* **7**, 113-123.
- Oxelman, B., P. Kornhall, R. G. Olmstead, and B. Bremer. 2005. Further disintegration of Scrophulariaceae. *Taxon* **54**, 411-425.
- Rahmanzadeh, R., K. Müller, E. Fischer, D. Bartels, and T. Borsch. 2005. The Linderniaceae and Gratiolaceae are further lineages distinct from the Scrophulariaceae (Lamiales). *Plant Biol. (Stuttgart)*. **7**, 67-78.
- Wada, H. and N. Satoh. 1994. Details of the evolutionary history from invertebrates to vertebrates, as deduced from the sequences of 18S rRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 1801-1804.

초록 : 현삼과에서 재분류된 식물들의 계통분류학적 고찰

배영민*

(창원대학교 미생물학과)

꿀풀목 현삼과에 속하는 식물들의 재분류가 최근에 이루어졌는데, 엽록체 DNA의 염기서열에 따라 많은 수의 식물들이 꿀풀목의 다른 과로 옮겨졌다. 이들 중에서 국내의 산야에서 쉽게 발견할 수 있는 꽃머느리밥풀, 나도송이풀, 물칭개나물, 외풀, 주름잎의 계통분류를 시도해 보았다. 우선, 이 식물들의 18S rRNA 및 ITS1의 염기서열을 결정하여 GenBank에 등록하였다(각각, accession numbers GU359046, GU359047, GU359048, GU359049, GU359050). 꽃머느리밥풀, 나도송이풀 및 물칭개나물의 경우에는 엽록체 DNA의 염기서열에 기초를 둔 현재의 분류체계와 본 연구에서 분석한 결과가 잘 일치하였다. 그러나 주름잎과 외풀의 경우에는 분석 결과에 있어서의 차이가 커서 결론에 도달할 수가 없었다.