

Development of Specific SNP Molecular Marker from *Thistle* in the DNA Sequences of Chloroplast *TrnL-F* and *Matk* Region Using HRM Analysis

Shin-Woo Lee¹, Soo Jin Lee¹ and Yun-Hee Kim^{2*}

¹Department of Agronomy & Medicinal Plant Resources, Gyeongnam National University of Science & Technology, Jinju 52725, Korea

²Department of Biology Education, College of Education, IALS, Gyeongsang National University, Jinju, Jinju 52828, Korea

Received March 8, 2019 / Revised April 29, 2019 / Accepted May 8, 2019

Medicinal plants resources are becoming important assets since their usages have been expanded to the development of functional foods for human health, cosmetics and pharmaceutical industries. However, their phylogenetic origins and names are different from each country and quite often they are mixed each other resulting in the confusion for consumers. Particularly when they are very similar based on their morphological characteristics and distributed, it is extremely difficult to differentiate their origins even by specialists. Therefore, identification of each plant species is important for standardizing herbal medicine. Thistle is a medicinal and perennial plant. Obtaining information about the genetic diversity of plant populations is highly important for conservation and germplasm utilization. Although thistle is an important medicinal plant species registered in South Korea, no molecular markers are currently available to distinguish from other similar species from different countries. In this study, we developed single nucleotide polymorphism (SNP) markers derived from chloroplast genomic sequences to identify distinct Korean-specific thistle species via high resolution melting (HRM) curve analyses. We performed molecular authentication of four different kinds of thistle species from different regions using DNA sequences in the *trnL-F* and *matK* chloroplast intergenic region. The SNP markers developed in this study are useful for rapidly identifying specific thistle species from different country.

Key words : Chloroplast genome, HRM curve analysis, nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer regions, single nucleotide polymorphisms, thistle

서 론

엉겅퀴는 국화과(Asteraceae 또는 Compositae)에 속하는 약용식물로서, 일반적으로 *Cirsium japonicum* 종에 속하는 식물들을 정의한다[11]. 현재까지 보고된 국내자생 엉겅퀴 종들은 *Cirsium* 속에 속하는 엉겅퀴(*Cirsium japonicum*), 고려엉겅퀴(*C. setidens*), 도깨비엉겅퀴(*C. schantarense*), 마늘엉겅퀴(*C. rhinoceros*), 버들잎엉겅퀴(*C. lineare*), 물엉겅퀴(*C. nipponicum*), 큰엉겅퀴(*C. pendulum*), 흰잎엉겅퀴(*C. vlassovianum*) 등 8종이 있으나[8, 11], 국내에서도 지역마다 사용하는 일반명에 차이가 있고, 국가마다 생태종에 따른 차이 및 종의 기원에 대한 구체적인 정보가 없어서 오용 및 혼용의 가능성이 매우 높은 편이다.

약용식물로서 엉겅퀴는 많은 생리활성물질의 특성에 대한

연구가 진행 중에 있다. 국내자생 엉겅퀴(*C. japonicum*)의 종자 껍질 추출물에서 확인된 항염증 물질인 apigenin은 관절염의 염증 및 통증을 유발하는 물질인 prostaglandin E2의 형성을 억제하여 통증을 덜어준다는 결과가 확인된 바 있으며, 국내 자생 엉겅퀴와 속이 다른 유럽의 엉겅퀴 종인 *Silybum marianum*에서 생산되는 silymarin이라는 물질이 간질환 치료에 효과가 있음이 또한 증명된 바 있다[10]. 이와 같이 중요한 생리활성 물질을 생성하는 대표적인 약용식물인 엉겅퀴는 국내에 자생하는 *Cirsium* 속의 식물이 보고된 8종 이외에도 더 있을 것으로 예상되며, 전 세계적으로는 200여종 이상의 있을 것으로 보고되어 있으므로, 이들 식물 시료 및 추출물을 이용한 가공식품, 약품 및 약제의 개발 및 사용시 오용 및 혼용을 방지할 수 있는 각각의 종들을 판별할 수 있는 과학적인 기술의 개발과 보급이 매우 중요하다고 할 수 있다[2, 11]. 그러나 이들 식물종들은 유전적, 생태적 및 형태적으로도 매우 유사한 종들이므로 중간 교잡종도 많을 것으로 예상되기 때문에, 이들을 형태학적 또는 생화학적 지표성분 등으로 분류하기는 거의 불가능한 것으로 보고되어 있다.

최근 NGS (Next generation sequencing) 기술 등의 발달로 특정 생물종이 갖는 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)의 차이에 근거한 특정 종을 판별하는 bar-

*Corresponding author

Tel : +82-55-772-2237, Fax : +82-55-772-2239

E-mail : cefle@gnu.ac.kr

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.

coding 기술이 빠르게 발전되고 있다. 이와 같이 최근 신속히 발전하고 있는 분자생물학적 염기서열 분석기술을 이용하여 국내자생 엉겅퀴 종들의 상호 유전적 근연성을 분석하거나 종의 기원을 조사하는 연구결과가 일부 보고 되고 있다. 국내 자생 엉겅퀴 종들 중 엉겅퀴, 물엉겅퀴, 큰엉겅퀴, 고려엉겅퀴, 도깨비엉겅퀴 등 5종에 대하여 ITS 영역의 염기서열의 분석을 통한 유전적 연관성이 확인된 바 있으며[1], 고려엉겅퀴와 큰 엉겅퀴의 유전적 연관성이 분석되어 보고된 바 있다[11]. Moon et al. [4]은 6종의 엉겅퀴 및 엉겅퀴 유사종들을 대상으로 ITS, MatK, RbcL 유전자 염기서열을 DNA barcode 종류별로 비교 분석하여 한약재로 사용 중인 약용식물들의 기원에 대한 차이를 보고하였다. 그 외에도 해외에서 자생 중인 지역별로 수집하여 *Cirsium* 속에 속하는 캐나다 엉겅퀴(*C. arvense* (L.) Scop.)를 대상으로 microsatellite를 이용한 유연관계를 분석 하였으며[5], ITS 유전자단편의 염기서열을 이용하여 유연관계를 분석한 연구결과들이 또한 보고된 바 있다[6, 8].

선행연구의 결과로서, 국내 토종 및 해외 유래 엉겅퀴 종의 기원을 판별하기 위해 핵의 리보솜에 존재하는 ITS 유전자 단편에서 각 종들의 판별을 위해 ARMS-PCR 및 HRM 분석기술을 이용하여 SNP 유래의 판별 마커를 개발하였다[3]. 또한, 국내 중 특이적 프라이머들을 이용한 정량적 PCR 분석방법을 이용해 두 가지 종의 genomic DNA의 혼합 여부를 판별하는 연구를 진행한 바 있다. 그러므로, 본 연구에서는 한국산 국내 토종 및 해외 계통의 엉겅퀴의 기원을 판별하기 위한 보다 다양한 판별마커 개발방법으로서, 엽록체에 존재하는 *TrnL-F*와 *MatK* 유전자 단편에서 SNP를 이용한 판별 프라이머를 확보하였으며, 이를 보완하여 보다 신속하게 판별하기 위하여 HRM 분석기술을 이용한 판별마커와 그 조건을 확립하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에서 사용한 엉겅퀴 계통은 국내 자생하는 엉겅퀴(*Cirsium japonicum*), 국내 자생 물엉겅퀴(*C. nipponicum*), 유럽 엉겅퀴(*Silybum marianum*) 및 캐나다엉겅퀴(*C. arvense*)를 대상으로 조사하였다(Table 1).

DNA 분리

수집된 계통별로 일정량의 뿌리, 종자, 잎 등을 액체질소에 급속 냉동시킨 후 곱게 갈아서 얻은 분말을 이용하여 GeneAll 사의 Exgene™ Plant SV 키트를 이용하여 회사에서 제공한 실험방법에 따라 염색체 DNA를 분리하였다. 정제된 DNA는 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 DNA의 분리과정에서의 분해정도를 확인한 후 Micro-spectrometer (BioPrince, SD-2000, Gangwon, South Korea)를 이용하여 234 nm, 260 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 A260/A280 값이 1.8-2.2 범위 그리고 A234/A260 값이 0.5-0.8 범위 내 포함 여부를 조사하여 RNA 및 단백질 등의 오염 정도를 확인하여 순수한 DNA를 확인하였다.

*TrnL-F*와 *MatK*의 증폭 및 염기서열 분석

엽록체 유전자인 *TrnL-F*와 *MatK* 유전자 단편을 증폭하기 위하여 Genbank에서 각각의 염기서열정보를 비교 분석하여 프라이머를 제작하여 Table 2에 제시하였다. *MatK* 유전자의 염기서열정보는 *C. japonicum* (HM 989744), *C. nipponicum* (KC 590016), *C. arvense* (HQ 593238), *S. marianum* (AY 013551), 그리고 *TrnL-F* 유전자 단편의 염기서열정보는 *C. japonicum* (MF 034025), *C. nipponicum* (KC 590049), *C. arvense* (KC

Table 1. List of plant materials used in this study

Identification code	Scientific name	Origin	Specimen material
2014-28	<i>Cirsium japonicum</i>	South Korea	Root
2014-29	<i>Silybum marianum</i>	Europe	Leaf
2016-37	<i>Cirsium arvense</i>	Canada	Leaf
2016-38	<i>Cirsium arvense</i>	Canada	Leaf
2016-43	<i>Cirsium japonicum</i>	South Korea	Leaf
2016-44	<i>Cirsium nipponicum</i>	South Korea	Leaf
2016-45	<i>Cirsium japonicum</i>	South Korea	Leaf
2016-46	<i>Silybum marianum</i>	Europe	Leaf

Table 2. Primer sequences for amplification of the *MatK* and *TrnL-F* fragments

Gene	Primers	Sequences (5'-3')	Tm (°C)	Size (bp)
<i>MatK</i>	<i>MatK</i> forward	ATTGCGTTTTTTCTTCACGACT	57.8	988
	<i>MatK</i> reverse	ATGATTGACCAGATCGTTGATGC	57.4	
<i>TrnL-F</i>	<i>TrnL-F</i> forward	GATATGGCGAAATCGGTAGACG	57.2	1047
	<i>TrnL-F</i> reverse	TGCCAGGAACCAGATTTGAACT	57.2	

969583), *S. marianum* (AY 914869)를 각각 사용하였다. 유전자의 증폭은 iNtRON 회사(Gyeonggi Province, South Korea)에서 제공하는 PCR 반응용 완충용액 및 i-pfu DNA polymerase를 사용하여 증합반응과정에서 야기 될 수 있는 돌연변이를 최소화 하였다. 제조사에서 제공하는 실험방법에 따라 순수 분리한 DNA 50 ng과 프라이머를 각각 10 pmole을 혼합 한 후 94°C에서 5분간 DNA를 변성 시킨 후 94°C에서 30초, 60°C에서 10초, 72°C에서 30초를 1 cycle로 하여 35 cycle 반복 후 72°C에서 5분간 연장반응을 시킨 후 4°C에서 반응을 종료하고 증폭된 DNA밴드는 2.0% agarose gel을 이용하여 전기영동하여 그 결과를 확인하였다. 증폭 되어진 각 유전자 단편의 클로닝 과정에서 돌연변이가 일어날 수도 있으므로 클로닝을 하지 않고 증폭된 DNA단편을 ExpinTM PCR SV (GeneAll, Seoul, South Korea) Kit를 사용하여 순수 정제한 후 직접 염기서열분석을 의뢰하였다. 또한 최종적으로 확인된 SNP는 최소

5만복 이상 수행하여 검정하였다.

유연관계 분석

확인된 *TrnL-F*와 *MatK* 유전자의 유연관계 분석은 Mega 6.0 프로그램을 이용해 진행하였다. 비교군들 간의 유전적 거리의 계산은 Tamura-Nei distance 방법을 이용하였으며, neighbor-joining 방법을 이용해 유연관계를 분석하였다[9].

HRM 분석

Table 2에서 제시된 프라이머를 이용하여 증폭된 각 유전자 단편의 염기서열정보를 alignment하여 SNP를 확인하여 상호 간에 판별이 가능한 SNP가 가장 많이 분포하는 지역을 중심으로 하여 약 200 bp 크기의 단편이 증폭 될 수 있도록 하여 HRM (High Resolution Melting) curve 패턴을 분석하기 위한 프라이머를 제작하여 Table 3에 제시하였다. 먼저 제작한 프라

Table 3. Primer sequences for HRM analysis of the *MatK* and *TrnL-F* fragments

Gene	Primers	Sequences (5'-3')	Tm (°C)	Size (bp)
<i>MatK</i>	<i>MatK</i> forward	GTTTCGATACTCTTGTGCCAA	57.4	205
	<i>MatK</i> reverse	TCTAGCACAAAGACAGTCGAAGT	57.5	
<i>TrnL-F</i>	<i>TrnL-F</i> forward	GGGCAATCCTGAGCCAAATCA	61.3	253
	<i>TrnL-F</i> reverse	TATGGAGTGAATTGTTGATC	53.5	

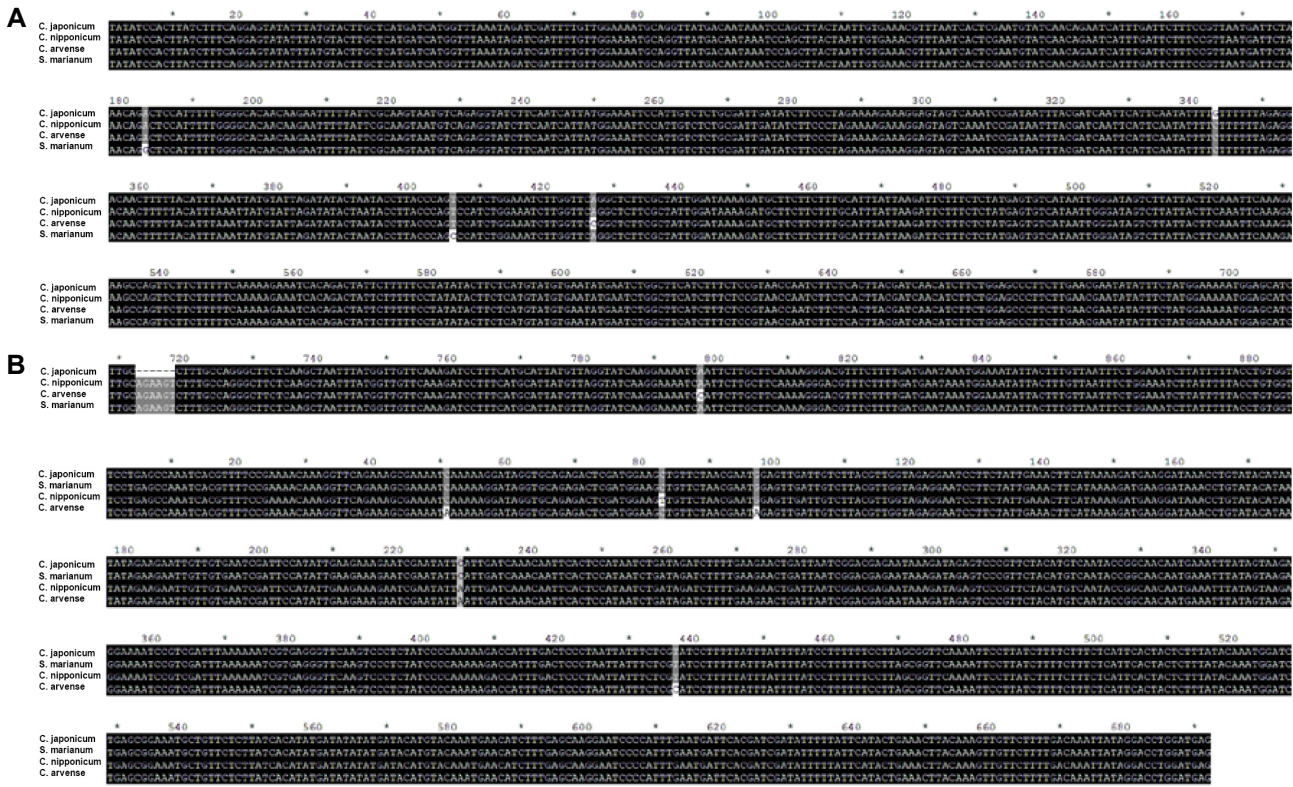


Fig. 1. Sequence alignment of the *MatK* and *TrnL-F* chloroplast intergenic region in 4 kinds of thistle species. Korean species (*C. japonicum* and *C. nipponicum*), Canadian species (*C. arvensis*) and European species *S. marianum*).

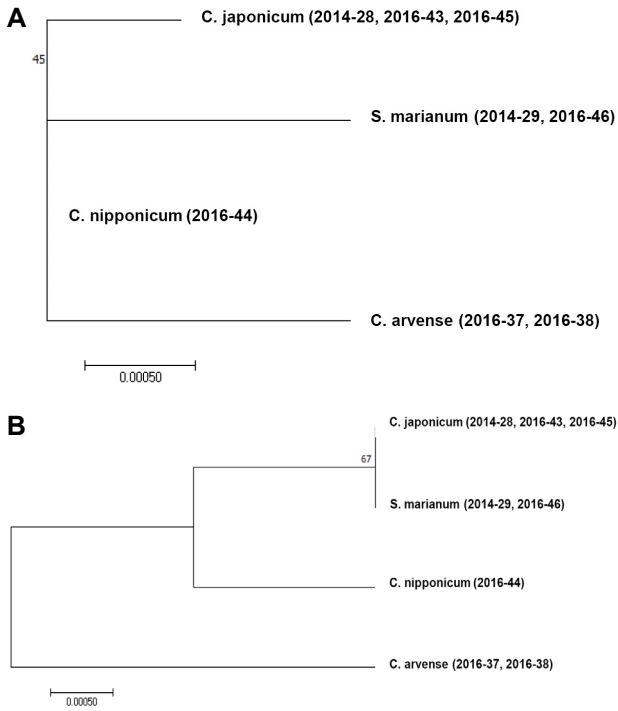


Fig. 2. Phylogenetic tree showing the genetic diversity of 8 plants of 4 kinds of thistle species. (A) *MatK* plastid intergenic regions, (B) *TrnL-F* plastid intergenic regions. The tree was produced using the neighbor-joining method based on intergenic sequences of the plastid intragenic regions of *MatK* and *TrnL-F*.

이머가 목표 유전자단편을 정확하게 증폭 하는지의 여부를 조사하기 위하여 각각의 프라이머 조합을 이용하여 각 엉겅퀴

시료들에서 분리한 DNA를 주형으로 PCR로 증폭시켜 전기영동을 통해 확인하였다. 또한 확인된 밴드들을 순수 정제하여 염기서열분석을 한 결과 각각의 종에서 확인된 *TrnL-F*와 *MatK* 유전자와 100% 일치하는 것을 확인한 후 HRM curve 패턴 분석을 실시하였다. 각 엉겅퀴 시료에서 분리한 DNA를 각각 10 ng씩 넣고, 프라이머를 각각 5 pmol 넣고 10 μ l의 SsoFast™ EvaGreen Supermix BIO-RAD, 172-5200 premixture를 넣고 전체 반응액을 20 μ l로 맞춘 후 Mx3005P QPCR Systems (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)을 사용하여 HRM curve 분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

엽록체 유전자단편을 이용한 유연관계 분석

국내 토종 엉겅퀴 [엉겅퀴(*C. japonicum*), 물엉겅퀴(*C. nipponicum*)]와 해외 엉겅퀴 [유럽엉겅퀴(*S. marianum*), 캐나다엉겅퀴(*C. arvense*)] 시료들의 *TrnL-F*와 *MatK* 유전자 단편을 염기서열 분석을 한 결과, 같은 출처의 계통(엉겅퀴: 2014-28, 2016-43, 2016-45; 유럽엉겅퀴: 2014-29, 2016-46; 캐나다엉겅퀴: 2016-37, 2016-38)들은 모두 같은 염기서열을 보였다(Table 1). 유전적 유연관계 분석을 통해 엽록체의 *TrnL-F*와 *MatK* 유전자의 경우, 국내 토종 엉겅퀴들(엉겅퀴, 물엉겅퀴)은 유럽엉겅퀴와 유연관계가 높음을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이와 같은 결과는 선행연구결과에서 국내 토종 엉겅퀴들이 유럽 엉겅퀴와 ITS 유전자 영역의 유사도가 높게 확인된 연구내용과 일치하는 것을 알 수 있다[3].

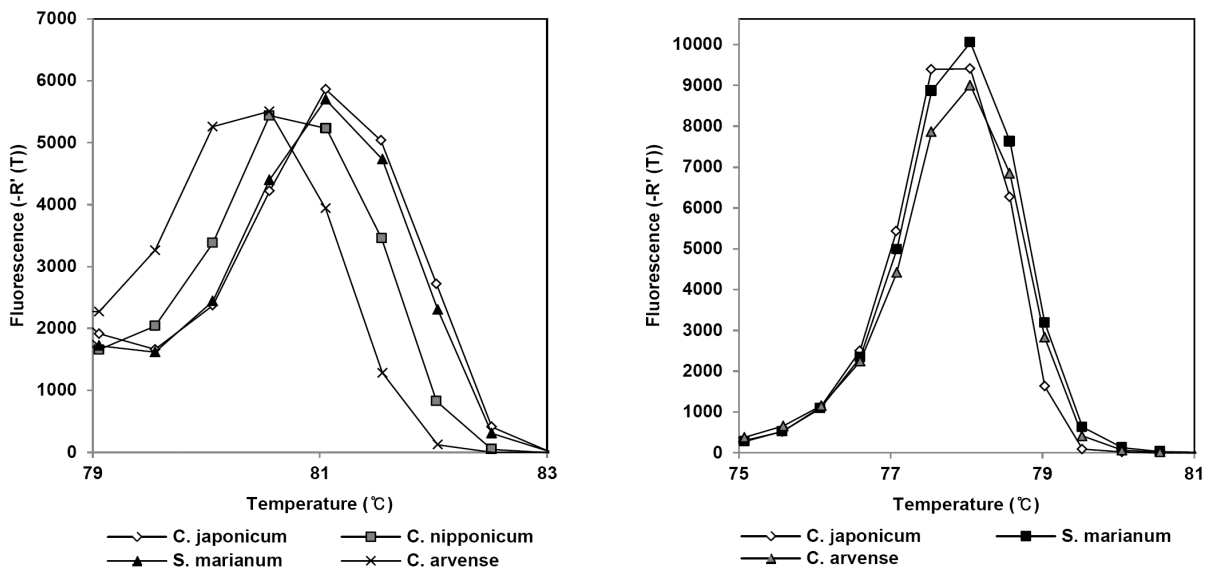


Fig. 3. Primer sets and HRM curve analysis using the plastid intragenic regions of *MatK* and *TrnL-F* in the 4 kinds of thistle species. (A) *MatK* melting curves of sample from each thistle species. (B) *TrnL-F* and melting curves of sample from each thistle species.

엽록체 유전자 단편에 대한 HRM 분석을 통한 시료의 혼용 확인

정확한 판별마커들의 확인을 위해, 각 계통들의 *TmL-F*와 *MatK* 유전자 영역의 염기서열을 비교하여 SNP 패턴을 근거로 하여 HRM (High Resolution Melting) curve 분석용 프라이머를 제작 하였다(Table 2). 각 엉겅퀴 계통들의 HRM curve 패턴을 분석한 결과, *MatK*의 경우, 유전자 단편이 4가지 종 모두에 대해 서로 다른 HRM curve 패턴을 보여 종의 판별이 가능한 것으로 확인 되었다(Fig. 3A). 유연관계가 높은 국내 엉겅퀴와 유럽 엉겅퀴는 HRM curve 패턴이 매우 유사한 특성을 보였다. 반면에 *TmL-F*는 4가지 종 모두 매우 유사한 HRM curve 패턴을 보였으며, 특히 국내 토종 엉겅퀴들은 판별이 되지 않고 같은 HRM curve 패턴을 보였다(Fig. 3B). 그러므로, 엽록체 유전자 단편을 이용한 각 엉겅퀴 시료의 판별을 위해서는 *MatK* 유전자 단편을 판별마커로 활용하는 것이 효율적인 방법인 것으로 생각된다.

본 연구의 결과들을 종합하여 보면, 국내 및 해외에서 그 기원을 달리하는 다양한 엉겅퀴 및 엉겅퀴 유사 종들의 정확한 기원 판별을 위하여서는 생육 조건이나, 형태적 변이 등에 따라 크게 영향을 받지 않는 DNA 단편을 이용한 분자생물학적 판별 마커의 개발이 매우 필요한 실정이다. 그러나 현재까지 국내를 중심으로 한 엽록체 유전자인 *TmL-F*와 *MatK* 영역 등에 대한 특정 유전자 단편 내에 존재하는 SNP의 확인 등에 관한 연구에 한정되어 있어, 실제적인 실용화를 위해서는 많은 연구들이 추가로 필요한 것으로 생각된다.

본 연구의 결과에서처럼, 최근 SNP의 차이를 보이는 염기서열 부분들을 이용한 DNA barcodes의 개발 및 이를 이용한 약용작물의 기원 분석에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 선행 연구의 ITS 유전자 영역 및 본 연구의 엽록체 유전자 영역의 결과들을 통해 향후 다양한 국내자생 엉겅퀴 종들 및 해외에서 수집된 엉겅퀴 및 엉겅퀴 유사 종들에 대한 핵 및 엽록체 단편의 유전자 서열의 계통간 차이가 나는 SNP를 근거로 하여 염기서열분석을 통한 분자마커를 이용하여 국가별 및 기원을 달리하는 국내 자생 엉겅퀴종들을 정확하게 판별할 수 있을 것으로 기대되는 바이다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 농생명산업기술개발사업(과제 번호: 314021-3-1-SB050) 지원에 의하여 연구되었습니다.

References

- Bae, Y. M. 2010. Identification of a *Carduus* spp. showing anti-mycobacterial activity by DNA sequence analysis of its ITS1, 5.8S rRNA and ITS2. *J. Life Sci.* **20**, 578-583.
- Haffner, E. and Hellwig, F. H. 1999. Phylogeny of the tribe *Cardueae* (*Compositae*) with emphasis on the subtribe *Carduinae*: an analysis based on ITS sequence data. *Willdenowia* **29**, 27-39.
- Lee, S. W., Lee, S. J. and Kim, Y. H. 2018. Development of specific SNP molecular marker from *Thistle* using DNA sequences of ITS region. *J. Plant Biotechnol.* **42**, 102-109.
- Moon, B. C., Lee, Y. M., Ji, Y., Choi, G., Chun, J. M. and Kim, H. K. 2013. Molecular authentication and phylogenetic analysis of plant species for *Breeae* and *Cirsii* herba based on DNA barcodes. *Kor. J. Herbol.* **28**, 75-84.
- Slotta, T. A. B., Foley, M. E., Chao, S., Hufbauer, R. A. and Horvath, D. P. 2010. Assessing genetic diversity of Canada thistle (*Cirsium arvense*) in North America with microsatellites. *Weed Sci.* **58**, 387-394.
- Slotta, T. A. B., Horvath, D. P. and Foley, M. E. 2012. Phylogeny of *Cirsium* spp. in North America: host specificity does not follow phylogeny. *Plants* **1**, 61-73.
- Slotta, T. A. B., Rothhouse, J. M., Horvath, D. P. and Foley, M. E. 2006. Genetic diversity of Canada thistle (*Cirsium arvense*) in North Dakota. *Weed Sci.* **54**, 1080-1085.
- Song, M. J. and Kim, H. 2007. Taxonomic study on *Cirsium Miller* (*Asteraceae*) in Korea based on external morphology. *Kor. J. Plant Taxon.* **37**, 17-40.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725-2729.
- Thao, N. T. P., Cuong, T. D., Hung, T. M., Lee, J. H., Na, M. K., Son, J. K., Jung, H. J., Fang, Z., Woo, M. H., Choi, J. S. and Min, B. S. 2011. Simultaneous determination of bioactive flavonoids in some selected Korean thistles by high-performance liquid chromatography. *Arch. Pharm. Res.* **34**, 455-461.
- Yoo, S. K. and Bae, Y. M. 2012. Phylogenetic and chemical analyses of *Cirsium pendulum* and *Cirsium setidens* inhabiting. *J. Life Sci.* **22**, 1120-1125.

초록 : 엉겅퀴의 엽록체 *TrnL-F*와 *Matk* 영역 염기서열의 HRM 분석을 통한 특이적 SNP 분자마커의 개발

이신우¹ · 이수진¹ · 김윤희^{2*}

(¹국립경남과학기술대학교 생명과학대학 농학 · 한약자원학부, ²국립경상대학교 사범대학 생물교육과(농업생명과학연구원))

엉겅퀴는 대표적인 다년생의 약용식물이다. 최근 국제적 추세에 따라 자국의 유전자원의 발굴, 보존 등이 강화됨에 따라 인접국가와 국내 자생 엉겅퀴 계통을 판별 할 수 있는 기준 설정에 관한 연구의 필요성이 대두되고 있지만, 분자생물학적 판별 기술의 개발은 아직 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 국내 토종과 해외 유래 엉겅퀴 종의 기원을 판별하기 위해 엽록체에 존재하는 *trnL-trnF*와 *MatK* 유전자단편에서 SNP를 이용한 판별 프라이머를 확보하였으며 이를 보완하여 보다 신속하게 판별하기 위하여 HRM 분석 기술을 이용한 판별 마커와 그 조건을 확립하였다. 그러므로, 본 연구에서 개발된 SNP 마커는 다양한 지역 또는 국가에서 서식하는 엉겅퀴 종들의 신속한 확인을 위해 매우 유용하게 이용될 것으로 생각된다.