

엽록체 DNA 변이에 기초한 가는기린초(*Sedum aizoon*)와 기린초(*S. kamtschaticum*)의 유전적 관계

AMARSANAA GANTSETSEG 석사과정¹, 조원범 박사후연구원², 한은경 박사과정¹,
이정현 부교수^{2*}

1. 전남대학교 자연과학대학 생물과학생명기술학과

2. 전남대학교 사범대학 생물교육과

Genetic relationship between *Sedum aizoon* and *S. kamtschaticum* based on Chloroplast DNA Variation

AMARSANAA GANTSETSEG¹, Won-Bum Cho², Eun-Kyeong Han¹, Jung-Hyun Lee^{2*}

1. Department of Biological sciences and Biotechnology, Chonnam National Univ.

2. Department of Biology Education, Chonnam National Univ.

Abstract

Sedum aizoon and *S. kamtschaticum* have been widely used as useful herbal medical plants, but the relatives have a taxonomic controversy due to their ambiguous morphological boundaries. Thus, at the genetic level, to clarify the taxonomic relationship between the two, we identified the chloroplast DNA haplotypes of 128 individuals from 6 populations in the Korean peninsula. Analyses were based on sequence data from the *trnL*^{UAA}-*trnF*^{GAA}, *psaI*-*accD*, *petN*-*psbM*, and *rpl32*-*trnL*^{UAG} regions. The *S. aizoon* has a total of two haplotypes, while the *S. kamtschaticum* has a total of five haplotypes. At the species level, *S. kamtschaticum* harbored relatively higher genetic variation. TCS analysis largely revealed two lineages formed according to each species. However, *S. kamtschaticum*'s haplotype K1 of the Mt. Jiri population was included in *S. aizoon* lineage. The haplotype K1 was discussed in two aspects: morphological and genetic criteria in the statistical parsimony network. In this regard, we conclude that *S. aizoon* specialized for the local environment (Mt. Jiri) was convergent with the morphology of the *S. kamtschaticum* by chance.

Correspondence: 이정현(Jung-Hyun Lee)

Department of Biology Education, Chonnam National Univ., Gwangju 61186, Rep. of Korea

Tel: +82-62-530-2503, E-mail: quercus@jnu.ac.kr

Received 2020-03-26, revised 2020-03-30, accepted 2020-03-31, available online 2020-04-01

doi:10.22674/KHMI-8-1-7



Keywords: *Sedum aizoon*, *Sedum kamschaticum*, Chloroplast DNA, Haplotype, Genetic diversity, Korean peninsula

서론

돌나물과(Crassulaceae) 식물인 가는기린초(*Sedum aizoon* L.; *Phedimus aizoon* (L.) 't Hart)와 기린초(*S. kamschaticum* Fisch.; *P. kamschaticus* (Fisch.) 't Hart)는 「대한민국약전의한약(생약)규격집」 등 국내 공정서에 수록되어 있는 한약재는 아니지만^{1,2)}, 민간에서 그 전초 또는 뿌리를 비채(費菜), 경천삼칠(景天三七), 토삼칠(土三七) 등으로 부르며 타박상 및 토혈 등의 치료에 사용한다³⁻⁵⁾. 한편 중국에서는 가는기린초를 비채(費菜), 기린초를 캄차키비채(堪察加費菜)로 부르고 있다⁶⁾. 한약재의 동속 근연종 범위와 혼용 가능성에 대한 여러 논의⁷⁾와 마찬가지로, 민간약재인 가는기린초와 기린초의 유전적 관계에 대해서 명확히 할 필요가 있다.



Sedum aizoon L.



S. kamschaticum Fisch. & Mey.

Fig. 1. Photographs of *Sedum aizoon* and *S. kamschaticum*

가는기린초와 기린초의 혼용은 명확한 한계가 없는 외부형태에서 기인한다(Fig. 1). 학자마다 두 종의 한계 설정에 이견이 따른다⁸⁻¹⁰⁾. 가는기린초는 넓은 분포역으로 인하여 다양한 형태 변이를 가지는데 학자에 따라 단일 종으로 취급하기도 하고¹¹⁾ 7 변종¹²⁾으로 구분되기도 한다. 그에 비해 좁은 분포역을 보이는 기린초는 가는기린초의 아종으로 취급되기도 한다¹³⁾. 가는기린초는 잎의 형태와 줄기의 분지 유무로 기린초와 구분되는 것으로 알려져 있다. 그러나 피침형의 가는기린초의 잎의 형태가 기린초에서도 나타나기도 한다. 또한 기존 두 종을 구분하는 뿌리의 발달 정도, 줄기의 분지 등의 형질은 이들을 뚜렷이 나눌 수 있는 형질이라 하기 어렵다. 줄기의 분지 유무의 경우 가는기린초는 1~2 개의 줄기를 가지는데 기린초는 총생하는 경향이 있어 두 종을 구분할 수 있지만 명확하지 않고 이들 분류군의 종 한계를 설정하는 데 어려움이 따르는 중간형으로 보이는 개체들도 나타난다⁸⁾. 따라서 본 연구에서는 가는기린초와 기린초 두 분류군간에 유전적 특성을 알아보고 관계를 규명하고자 한다. 이에 우리는

위에 기술한 형태학적 특징을 근거로 각각의 분류군을 특정하였고 한국산 가는기린초 3 개 집단 65 개 체와 기린초 3 개 집단 63 개체에 대하여 염색체 DNA non-coding 4 개 지역의 변이를 분석하였다.

본론

1. 재료 및 방법

1) 재료 수집

가는기린초와 기린초의 염색체 유전자 비교 분석을 위하여 본 연구에서는 2018 년 6~7 월까지 현지 조사를 통해 집단별 대표 증거표본과 잎 시료들을 수집하였다. 수집된 증거표본과 잎 시료들은 전남대 생물교육과 표본관(BEC)에 소장하였다. 서식처 환경에 따라 잎의 형태 변이가 심한 기린초는 해안지역, 중부, 남부지역을 대표하는 3 개 집단을 대상으로 63 개체를 수집하였고, 주로 백두대간을 따라 분포하는 것으로 알려진 가는기린초는 이들 지역을 중심으로 3 개 집단 65 개체를 수집하였다(Table 1). 가는기린초아속은 분류군간 또는 분류군 내에 외형적인 변이가 심하여 종의 한계 설정이 모호하다¹⁰⁾. 따라서 본 연구에서는 잎의 거치, 줄기의 분지 유무, 생육환경, 분포 등을 고려하여 가는기린초와 기린초를 인식하고 분석에 사용하였다. 잎의 염연에 거친 거치가 있고 줄기가 1~2 개 분지하는 분류군을 가는기린초로 취급하였고 염연에 둥근 거치가 있고 줄기가 여러 개로 분지하는 분류군을 기린초로 인식하였다. 수집된 잎 시료들은 각 집단을 대표하는 개체들을 대상으로 최소 3m 이상 이격하여 채집하였다.

Table 1. Details of *S. aizoon* and *S. kamtschaticum* samples collected from six population in Korea

Species	Geographical distribution	n	cpDNA Haplotypes	h	π
<i>Sedum aizoon</i>	Bonghwa-gun (BH)	22	A2(22)	0.0000	0.00000
	Pyeongchang-gun (PC)	26	A1(26)	0.0000	0.00000
	Samcheok-si (SC)	17	A1(9), A2(8)	0.5294	0.00132
	Total		A1, A2	0.5048	0.00126
<i>S. kamtschaticum</i>	Jeongseon-gun (JS)	22	K4(8), K5(14)	0.4848	0.00052
	Namwon-si (MB)	22	K1(22)	0.0000	0.00000
	Uljin-gun (WJ)	19	K2(8), K3(1), K4(10)	0.5731	0.00111
	Total		K1, K2, K3, K4, K5	0.7424	0.00235

n, number of individuals; h, haplotype diversity; π, nucleotide diversity

2) DNA 추출 및 PCR 증폭

각 채집된 잎 시료는 현장에서 즉시 실리카겔로 건조 한 후 -70°C deep freezer 에 보관하여 사용하였다. 건조된 잎은 Bead Blaster™ 24 Microtube Homogenizer (Benchmark Scientific, USA)를 사용하여 파쇄하였고 MGTM Plant SV Plant DNA Extraction mini kit (MGmed, Seoul, Korea)를 사용하여 각 개체에서 genomic DNA 를 추출하였다. 추출한 DNA 의 농도는 Micro-Spectrophotometer Nano-300 (allsheng, Hangzhou, China)을 사용하여 정량하고, 추출된 gDNA 의 농도가 15~20ng/μl 되도록 3 차 증류수로 희석하였다.

염색체 DNA 는 기린초와 근연분류군의 계통분석에 사용된 *trnL^{UAA}-trnF^{GAA}* 구간¹⁴⁾과 *psaI-accD* 구간



¹⁵⁾을 분석하였다. 또한 추가적으로 NCBI 에 등록된 기린초속의 엽록체 DNA 전체 염기서열을 비교하여 변이율이 높은 *peN-psbM* 지역과 *rpB2-trnL^{UAG}* 지역을 선정하여 이들 구간을 증폭할 primer 를 제작하였다(Table 2).

Table 2. The chloroplast DNA markers used in this study

Region	Primer	Sequencing (5'→3')	Origin
<i>trnL^{UAA}-trnF^{GAA}</i>	trnLc	CGAAATCGGTAGACGCTACG	Taberlet et al., 1991
	trnFf	ATTTGAACTGGTGACACGAG	
<i>psaI-accD</i>	accD	AATCGTACCACGTAATCCTTTAAA	Shaw et al., 2007
	psaI-75R	AGAAGCCATTGCCATTGCCGAAA	
<i>peN-psbM</i>	petNf	CTTGGGCTGCTTTAATGGTA	This study
	psbMr	ACTGCACTGTTTCATTCTAGT	
<i>rpB2-trnL^{UAG}</i>	rp132f	GCAAATCCCTTTCTACTGGT	This study
	trnLr	CTAAGAGCAGCGTGTCTAC	

4 개의 primer set 을 이용하여 Total genomic DNA 로부터 cpDNA 대상 유전자 부위를 증폭하였다. PCR 을 수행하기 위해 Qiagen[®] Top Taq polymerase (Qiagen, Seoul, Korea)을 이용하여 15~20ng/ μ l의 추출된 gDNA 2 μ l, 3 차 증류수 8.15 μ l, 10X Buffer 2 μ l, 5X Q Solution 4 μ l, dNTP(2.5mM of each) 1.6 μ l, Forward primer 1.0 μ l, Reverse primer 1.0 μ l, Top Taq polymerase 0.25 μ l를 포함하는 최종 부피 20 μ l의 mixture 를 만들었다. PCR 은 Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)로 수행하며, PCR 반응은 95°C에서 15 분간 초기 변성하고, 95°C에서 30 초, 52°C로 1 분 30 초, 72°C에서 1 분을 35 회 반복하며 증폭한 후 이어서 72°C에서 10 분간 수행하였다. 반응이 끝난 후 PCR product 는 Gel Red 에 염색한 1.0% agarose gels(100 V, 30 min)에 전기영동을 한 후 UV (Dual-intensity Transilluminator) 조명 아래에서 100bp ladder(TaKaRa)와 비교 확인하였다. Purification 은 PCR products 를 1% agarose gel 에서 분리하며, Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega)를 이용하여 gel 에서부터 DNA 를 추출하였다. DNA 염기서열은 TaKaRa Korea Biomedical Inc.에서 ABI PRISM (model 3700, version 3.6.1) automatic sequencer 에 의해 결정하였다.

3) 자료 분석

분석 결과 얻어진 염기서열은 Clustal W¹⁶⁾을 이용하여 정렬 후 가는기린초, 기린초의 haplotypes 을 결정하였다. 각 엽록체 DNA 구간의 haplotypes 은 종별로 GenBank 에 등록하였다(MT247014 ~ MT247036). DNASP 4.0¹⁷⁾을 이용하여 전체 haplotype 다양성(Hd), 집단내 haplotype 다양성(hs), 등 집단의 유전적 다양성 지수를 계산하였다. 또한 집단간 구조를 보기 위해 TCS 1.21¹⁸⁾을 이용하여 95% connection limit 로 haplotype parsimony network 를 작성하였다.



2. 결과 및 고찰

가는기린초(*S. aizoon*)와 기린초(*S. kamschaticum*)의 유전적 차이를 확인하기 위해 염록체 DNA 4 개 구간의 염기서열 분석을 수행하였다. 총 6 개 집단 128 개체를 분석한 결과, 염록체 DNA 4 개 구간의 염기서열은 총 2,820bp 의 서열로 정렬되었다. 4 개의 non-coding 지역 중 *trnL^{UAA}-trnF^{GAA}*, *psaI-accD*, *petN-psbM* 구간에서 구간별로 치환과 indel 을 포함한 8 개의 염기서열 변이가 확인되었으며 *rpB2-trnL^{UAG}* 구간에서는 7 개 변이가 확인되었다. 또한 *psaI-accD* 구간에 'ATATC', *petN-psbM* 구간에서 'ATTAA'의 큰 indel 이 확인되었다. 확인된 31 개의 다형성 지점을 기반으로 유합한 결과 가는기린초와 기린초 모든 개체는 총 7 개의 haplotypes 을 가지고 있는 것으로 나타났다 (Table 3). 가는기린초에서 평창 집단(PC)은 haplotype A1 로, 봉화 집단은 haplotype A2 로만 구성되어 있었으며 삼척 집단(SC)은 A1, A2 타입이 혼재되어 나타났다(Fig. 2). 기린초에서는 총 5 개 타입들이 확인되었으며 정선 집단과 울진 집단에 haplotype K4 가 공통적으로 분포하였으며 지리산 집단(MB)에서는 K1 타입으로만 구성되어 있었다. 기린초의 울진 집단(WJ)에서 3 개의 haplotypes 이 확인되었으며 채집된 집단 중 가장 유전적 다양성이 높은 지역으로 확인되었다(Fig. 2). 종 수준에서 다양성을 분석하였을 때, 가는기린초의 전체 유전적 다양성과 염기 치환율은 각각 $h_T=0.5048$, $\pi=0.00126$ 으로 나타났으며 기린초에서는 $h_T=0.7424$, $\pi=0.00235$ 로 확인되어 기린초가 더 유전적으로 다양하게 나타났다. 이러한 결과는 기린초가 가는기린초에 비해 적어도 한반도에서는 더 오랜 분포 역사를 가지고 있다는 사실을 시사한다.

Table 3. Variable sites of the aligned sequences of four cpDNA fragments in 7 haplotypes of *S. aizoon* and *S. kamschaticum*

		<i>trnL^{UAA}-trnF^{GAA}</i>	<i>psaI-accD</i>	<i>petN-psbM</i>	<i>rpB2-trnL^{UAG}</i>	
Taxon	T y p e		1 1 1 1 1 1 1	1 1 1 1 2 2 2 2 2	2 2 2 2 2 2 2 2	
			1 5 5 5 6	8 8 1 1 2 2 3 3	8 8 8 9 0 2 2 3	4 4 4 5 5 6 7
			3 5 9 3 3 8 8 8	8 9 5 7 0 4 0 0	4 4 5 1 1 0 9 0	8 8 8 0 3 2 0
			0 5 7 5 7 5 7 0	0 6 4 3 7 9 8 9	8 9 5 3 3 9 5 7	0 1 2 3 9 6 0
<i>S. aizoon</i>	A1	- C C A T A T T C T - G 1 A - - C T G - A A G - A - - T T G C				
	A2	A T . . . C . C . A - . - . - . . . A . . T - . A A . C C .				
<i>S. kamschaticum</i>	K1	- . T C . C G T . . A A 1 . - - . . A A . . T - . - - . C . T				
	K2	- . . . C C T . . - . 1 . - - . . . - . . T - - - - C . .				
	K3	- T . . . C . T . A - . 1 . A T . . . - C G T 2 - - - . C . .				
	K4	- T . . . C . T . A - . 1 - C G T 2 - - - . C . .				
	K5	- T . . . C . T A A - . 1 T . . T A . - C G T 2 - - - . C . .				

1 indicates ATATC, 2 indicates ATTAA, - indicates deletion



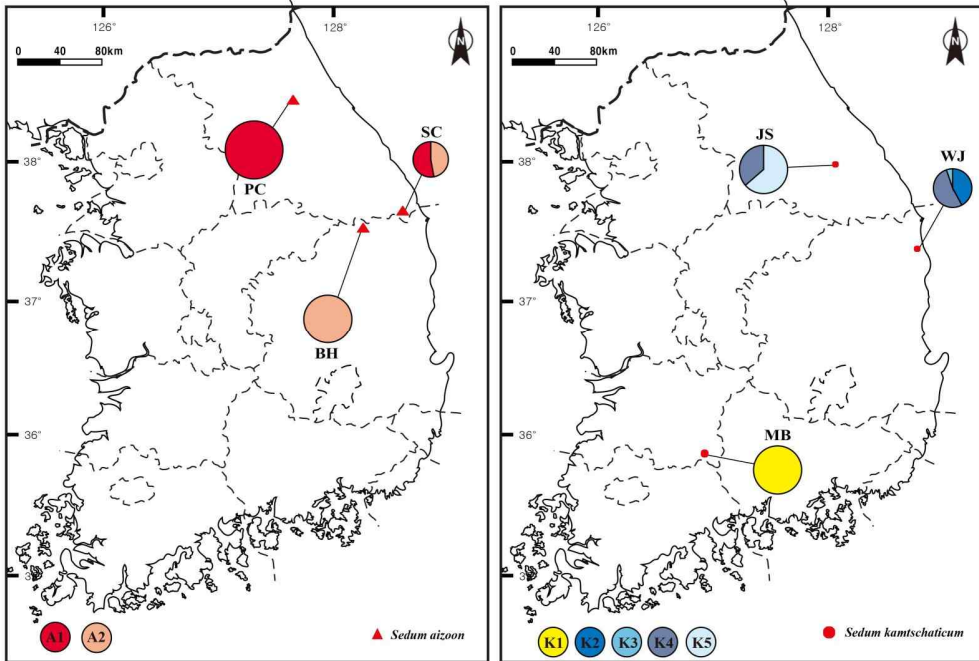
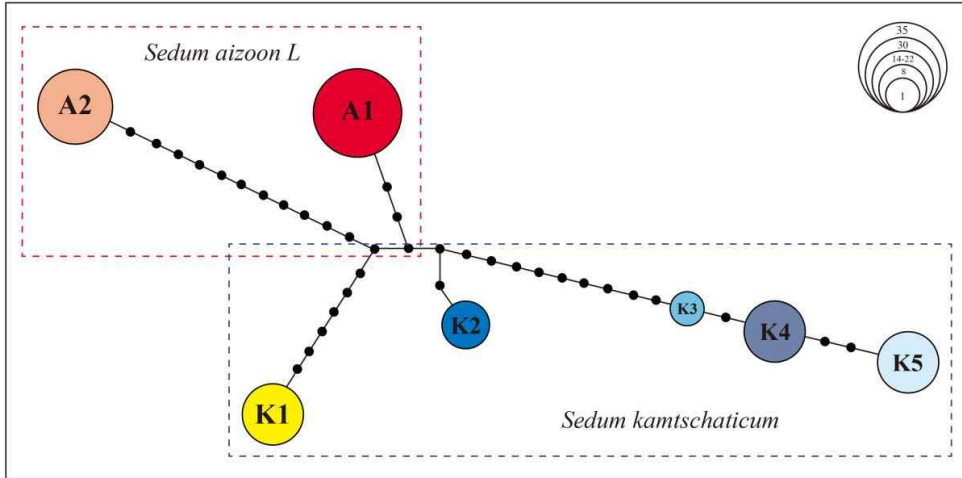


Fig 2. Geographical distribution of 7 cpDNA haplotypes detected in *S. aizoon* and *S. kamschaticum*

본 연구에서 가장 주목할 만한 결과는 두 분류군에서 확인된 haplotypes의 관계에 있다(Fig. 3). 두 분류군 모두 각각 단계통을 이루지 않고 있는데, 이는 두 분류군이 하나의 종으로, 외부형태의 차이는 환경적 차이에 의한 결과일 수도 있다는 가능성을 암시한다. 그러나 결과적으로 가는기린초와 기린초는 서로 간에 haplotypes을 공유하지 않고, 크게 두 개의 계통으로 나뉘어진다. 이는 두 종이 오래전 격리되어 종분화 후 서로 다른 역사를 가졌다는 것을 지지한다. 또한 우리가 간주한 기린초의 형태적 특징이 가는기린초에도 나타나는 것을 고려해 볼 때⁶⁾, 가장 합리적인 설명은 형태적으로 기린초로 간주된 지리산 집단 개체들이 가는기린초라는 것이다. 이러한 가정하에, TCS 네트워크 결과를 살펴 보면, 가는기린초와 기린초는 서로 다른 단계통으로 유집되는 것을 볼 수 있다(Fig. 3). 즉, 가는기린초의 상대적으로 남부에 위치한 지리산 개체들은 그 환경에 맞게 특수화되었고 형태적으로 기린초와 우연히 수렴되었다는 것이다. 즉, 형태학적 특징으로 두 분류군을 구분하는 것은 한계가 있을 수 있다. 다른 한편으로 지리산 기린초 개체들이 가는기린초와 잡종화가 이루어졌을 가능성도 있으나⁸⁾, 반성유전적 엽록체만을 이용해 이를 여기에서 논의하는 것은 무리가 있다. 추후 microsatellite 나 ITS와 같은 핵 DNA를 정보를 추가하여 가는기린초와 기린초의 유전적 관계에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 보인다.

A. Based on morphological criteria



B. Based on genetical criteria

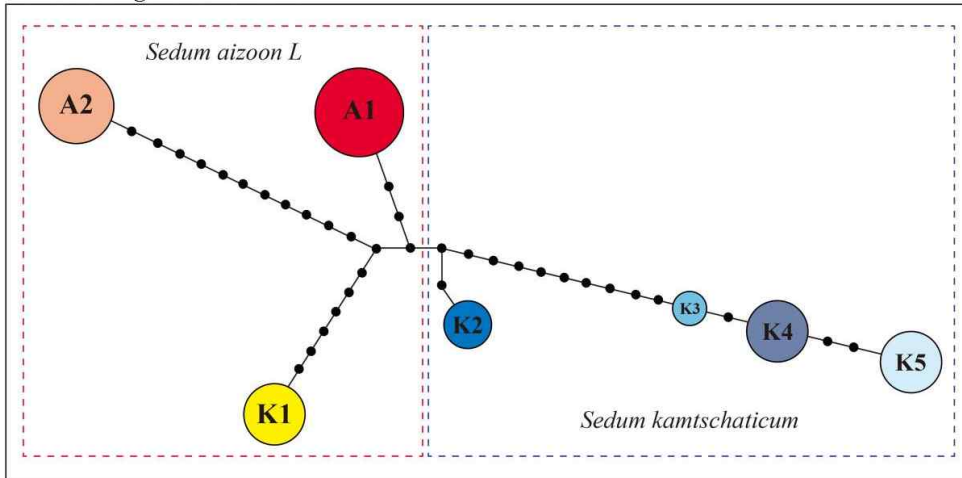


Fig. 3 Haplotype network of *S. aizoon* and *S. kamschaticum* constructed with TCS 1.21

결론

민간약재로 사용되지만 형태적 구분이 어려워 혼용될 소지가 있는 가는기린초와 기린초의 유전적 관계를 조사하였다. 유전적 분석은 염록체 DNA *trnL^{UAA}-trnF^{GAA}*, *psaI-accD*, *pepN-psbM* 및 *rpB2-trnL^{UAG}* 등 총 4 개 구간을 이용하였다. 그 중 *pepN-psbM* 및 *rpB2-trnL^{UAG}* 는 본 연구에서 새로이 마커를 제작하여 분석하였다. 결과적으로 가는기린초와 기린초는 크게 두 개의 계통으로 나뉘었으나, 형태적으로 기린초로 간주된 지리산 집단(haplotype K1)은 가는기린초와 단계통을 이루었다. 이는 두 분류군이 유전적으로 충분히 구분될 수 있다는 사실을 시사함과 동시에 상대적으로 남부에 위치한 지리산 개체들은 가는기린초로서 형태적으로 기린초와 우연히 수렴되었을 가능성을 제안한다.

감사의 글

본 연구는 2018년도 국립생물자원관의 연구개발비(NIBR201835201)로 수행되었으며 이에 감사드립니다. 원고 출판에 있어 아낌없는 조언을 주신 익명의 동료 검토위원분들께 또한 감사를 드립니다.

참고문헌

1. 식품의약품안전처. 대한민국약전외한약(생약)규격집. 식품의약품안전처 고시 제 2014-173 호. 2014. 4.
2. 박종철, 최고야. 대한민국약전 및 대한민국약전외한약 (생약) 규격집 수재 한약재 현황 검토. 한약정보연구회지. 2016;4(2):9-35.
3. Park, J. H., Geon, D. G., Kim, M. H. Pharmacognostical Studies on the Korean Folk Medicine 'Ki Rin Cho'. Korean Journal of Pharmacognosy. 2008;39(2):137-41.
4. Joo, J. S., Choi, C. H., Kim, J. S., Kim, C. H., Jeong, J. G. A Herbological study on the Plants of Crassulaceae in Korea. The Korea Journal of Herbology. 2010;25(3):139-47.
5. Roh, S. S., Seo, B. I., Park, J. H. A herbological study on the native plants of Dokdo island. The Korea Journal of Herbology. 2012;27(2):17-24.
6. Fu, K., Ohba, H., Gilbert, M. G. Crassulaceae Candolle. In: Flora of China, Vol.8. Beijing:Science Press and St. Louis:Missouri Botanical Garden Press. 2001.
7. 김옥진, 이영미, 지윤의, 강영민, 최고야, 김호경, 문병철. 천남성 (天南星) 유전자 감별을 위한 DNA 바코드 분석 및 Marker Nucleotide 발굴. 대한본초학회지. 2014;29(6):35-43.
8. 정영호, 김정희. 한국산 돌나물속 가는기린초절 식물의 분류학적 연구. 식물분류학회지. 1989;19(4):189-227.
9. 이계분, 유영기, 박기룡. 한국산 돌나물속 가는기린초아속 식물의 형태적 유연관계. 식물분류학회지. 2003;33(1):1-15.
10. Moon, A. R. 2018. A Phylogenetic Study of the Genus *Sedum* and *Phedimus* (Crassulaceae) in Korea. Kongju University.
11. Lee, T. B. Illustrated flora of Korea. Seoul:Hyang-mun Pub. Co. 1980.
12. Oh, S. Y. The phytogeographical studies of family Crassulaceae in Korea. 1985.
13. Fröderström, H. A. *Sedum*. Acta Horti Gothob. 1931;6:80.
14. Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant molecular biology. 1991;17(5):1105-9.
15. Shaw, J., Lickey, E. B., Schilling, E. E., Small, R. L. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. American journal of botany. 2007;94(3):275-88.
16. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Gibson, T. J., Higgins, D. G., Thompson, J. D. Clustal W and Clustal X version 2.0. bioinformatics. 2007;23(21):2947-8.



17. Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X., Rozas, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 2003;19(18):2496-7.
18. Clement, M., Posada, D. C. K. A., Crandall, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular ecology*. 2000;9(10):1657-9.

© The Author(s) 2020, khmi.or.kr

