세발당귀(*Angelica gigas* Jiri)의 판별을 위한 ARMS-PCR용 분자표지 개발

이신우 · 이수진 · 한은희 · 신용욱 · 김윤희

Development of molecular markers for the differentiation of *Angelica gigas* Jiri line by using ARMS-PCR analysis

Shin-Woo Lee · Soo Jin Lee · Eun-Hee Han · Yong-Wook Shin · Yun-Hee Kim

Received: 4 February 2021 / Revised: 6 March 2021 / Accepted: 23 March 2021

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract *Angelica* is a widely used medicinal and perennial plant. Information on the genetic diversity of *Angelica* populations is essential for their conservation and germ plasmic utilization. Although *Angelica* is an important medicinal plant species registered in South Korea, no molecular markers are currently available to distinguish it from other similar species from different countries. This developed single nucleotide polymorphism (SNP) markers derived from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer regions genomic sequences to identify distinct Korean-specific *Angelica* species via amplification refractory mutation system (ARMS)-PCR curve analyses. We performed molecular authentication of different kinds of Korean-specific *Angelica* species such as *A. gigas* Nakai and *A. gigas* Jiri using DNA sequences in the ITS intergenic region. The SNP markers developed in this study are useful for rapidly identifying specific *Angelica* species from different countr.

Keywords *Angelica*, ARMS-PCR, Nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer regions, Single nucleotide polymorphisms

서 언

당귀는 중국, 일본, 한국 등의 지역에서 자생하는 식물로 국가 별로 그 기원을 달리하며, 우리나라의 경우 참당귀(*Angelica gigas* Nakai), 중국은 중국당귀(*Angelica sinensis* Oliv. Diels), 일본은 일당귀(*Angelica acutiloba* Kitag) 등으로 알려져 있다(Yu et al. 2004). 당귀는 coumarine계의 umbelliferon, β -sitosterol, decursin, nodakenetin, 등의 성분이 함유된 것으로 알려져 있으며 (Kim et al. 2007), 약용 성분 및 식용 가치 측면에서 다양한 영양소 및 유용물질을 함유하고 있어 기능성 고부가가치 식품으로서의 개발 가치가 높은 편이다(Kim and Joung 2006). 특히, 우리나라의 지리산 권역인 산청군의 금서면, 삼장면과 같은 고산지대에서 자생하는 것으로 알려진 자연산 토종 당귀인 세발당귀(*Angelica gigas* Jiri)는 일반 노지에서 재배가 까다로운 것으로 알려져 농가에서 대량으로 재배하기 위한 단지화가 어렵다. 세발당귀와 참당귀 식물체의 형태학적 특성은 아주 유사하여 구분이 어려우나 세발당귀의 뿌리가 참당귀에 비하여 가늘다는 것이 특징으로 한자어의 가늘세(細)자를 사용하여 세발당귀로 명명되었다. 최근에는 세발당귀에 대한 기능성 물질 및 산업화에 관한 연구 결과도 보고된 바 있으며(Kim 2013), 임상 효능에 관한 보고로 지질대사 개선효과가 있는 데커신 및 데커시놀안젤레이트를 유효 성분으로 하는 참당귀 및 세발당귀 추출물과 그 추출방법에 대한 특허도 출원된 바 있고(Kang et al. 2008), 데커신 및 데커시놀안젤레이트를 포함하는 당뇨 치료제에 대한 연구 결과도 보고되었다(Oh et al. 2011). 그러나 현재까지는 형태학적

S.-W. Lee · S.-J. Lee · E. H. Han · Y.-W. Shin · Y.-H. Kim
경상국립대학교 생명과학대학 항노화신소재학과
(Department of Plant & Biomaterials Science, Chilam Campus,
Gyeongsang National University, Jinju, Korea)

E.-H. Han
경상남도 농업기술원 약용자원연구소
(Gyeongsangnam-do Agricultural Research and Extension Services,
Jinju 52733, Korea)

Y.-H. Kim (✉)
경상국립대학교 사범대학 생물교육과(농업생명과학연구원)
(Department of Biology Education, College of Education, IALS,
Gyeongsang National University, Jinju, Korea)
e-mail: cefle@gnu.ac.kr

특성이 아주 유사한 세발당귀와 참당귀를 정확하게 판별할 수 있는 방법이 알려진 바가 없다.

최근 NGS (Next generation sequencing) 기술 등의 발달로 특정 생물종이 갖는 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)의 차이에 근거한 특정 종을 판별하는 barcoding 기술 등이 빠르게 발전되고 있다. 그러나 한약재로 이용되는 약용작물의 혼용 및 혼재 등의 확인을 위하여 시중에 유통되는 수많은 시료에 대하여 NGS 기술로 판별하기에는 아직까지 비용과 노력 면에서 실용화하기가 어려운 실정이다. 따라서 현장에서 채취한 수많은 시료에 대하여 신속 간편하게 판별이 가능한 기술의 개발이 시급한 실정이다.

Amplification Refractory Mutation System (ARMS)-PCR 기술은 점돌연변이(point mutation)가 일어난 특정 대립유전자(allele)를 확인하는 기술로 allele-specific (AS)-PCR이라고도 한다. 일반적으로 3'-말단에 단 하나의 mismatching염기를 사용하여 제작한 프라이머 조합으로 PCR 증폭 실험을 수행할 경우, 특이성이 약하여 allele-specific DNA밴드를 확인하기가 어려운 경우가 많다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 Newton et al. (1989)은 3'-말단에 인접한 2, 3, 4번째 염기를 임의로 다른 염기로 변이를 시킨 결과 판별효과를 증대시킬 수 있었다고 하였다. ARMS-PCR기술은 염기서열이 아주 유사하여 SNP의 수가 너무 적어 종 또는 계통간 판별용 프라이머의 제작이 어려운 경우에 효과적으로 이용이 가능하다는 장점이 있다. Yang과 Wang (2012)은 인삼의 금품종과 청선종에만 유일하게 나타나는 SNP를 3'-말단에 위치하게 하고 인접한 2, 3, 4번째의 염기를 임의로 다른 염기로 변경시킨 ARMS-PCR용 프라이머를 사용하여 다른 인삼 품종들과 판별이 가능하다는 결과를 보고하였다. 본 연구팀의 선행연구에서도 하수오(*Polygonum multiflorum*), 백수오(*Cynanchum wilfordii*), 이엽우피소(*Cynanchum auriculatum*)의 특이적 판별을 위한 ARMS-PCR용 프라이머의 개발 연구결과를 보고한 바 있으며(Han et al. 2016), 구지뽕(*Panax ginseng* C. A. Meyer.) 및 엉겅퀴(*Platycodon grandiflorum* Jacq. A. DC.)에서 유전적 다양성, 유연관계 및 유전적 마커 개발에 관한 결과를 보고한 바 있다(Lee et al. 2017; 2018; 2019).

당귀 속 식물에서는 현재까지 RAPD 및 SSR 분자마커 등을 사용한 종 식별에 대한 연구 사례들이 보고된 바 있으나(Lee

et al. 2001; Liao et al. 2013; Mei et al. 2015; Jeong et al. 2019), ARMS-PCR기술을 적용한 연구결과는 아직 없다. 본 연구에서는 한국산 국내 토종 및 해외 계통의 당귀의 기원을 판별하기 위해 핵내 리보솜 RNA를 암호 하는 유전자단편 내 Internal Transcribed Spacer (ITS) 영역의 염기서열을 비교하여 SNP를 확인하고 이를 이용한 ARMS-PCR 기술을 적용하여 염기서열이 아주 유사한 국내 자생종인 참당귀와 세발당귀의 판별은 물론 해외에서 수집된 중국당귀, 일당귀 및 구당귀와의 판별마커를 확보하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

실험에서 사용한 당귀 계통은 국내 자생하는 참당귀(*Angelica gigas Nakai*) 및 세발당귀(*A. gigas Jiri*), 그리고 일당귀(*A. acutiloba*), 중국당귀(*A. sinensis*), 및 구당귀(*Levisticum officinale*)의 식물체 또는 종자를 수집하여 조사 하였다(Table 1). 각각의 구입 경로를 살펴보면 참당귀는 국립원예특작과학원(인삼특작부), 경남농업기술원(안의), 경북농업기술원(봉화) 및 경남생약농업협동조합에서 수집하였다. 세발당귀는 경남농업기술원(안의) 그리고 일당귀는 충북농업기술원(오창), 경남농업기술원(안의)에서, 중국당귀는 (주)현진제약사의 수입품 또는 현지에서 입수한 한약재상태로 수집하였다. 구당귀는 충북대학교, 특용작물학과 이이교수님 연구실에서 분양 받았으며 이의 원구입처는 미국, Horizon Herbs (Williams, OR)에서 구입한 것이며, 또한 경남 산청군에 소재하는 한약재 수입회사인 (주)자연애제약으로부터 수집하였다.

DNA 분리

수집된 계통별로 일정량의 식물체, 종자 및 한약재 재료 등을 액체질소에 급속 냉동시킨 후 곱게 갈아서 얻은 분말을 이용하여 GeneAll사의 Exgene™ Plant SV 키트를 이용하여 회사에서 제공한 실험방법에 따라 염색체 DNA를 분리하였다. 정제된 DNA는 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하여

Table 1 List of plant materials used in this study

Identification code	Scientific name	Origin	Specimen material
2014-40	<i>Angelica gigas</i> Jiri	Sancheong, South Korea	Plant
2014-13, 17, 27	<i>Angelica gigas</i> Nakai	Anui, Eumseong, Bonghwa, South Korea	Plant, seed
2014-07, 18	<i>Angelica acutiloba</i>	Ochang, Anui, South Korea	Plant, seed
2016-28	<i>Angelica sinensis</i>	China	Leaf
2016-48	<i>Levisticum officinale</i>	Williams, OR, USA	Seed(DNA)

DNA의 분리 과정에서의 분해 정도를 확인한 후 Microspectrometer (BioPrince, SD-2000, Gangwon, South Korea)를 이용하여 234 nm, 260 nm, 280 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 A_{260}/A_{280} 값이 1.8-2.2 범위 그리고 A_{234}/A_{260} 값이 0.5-0.8 범위 내 포함 여부를 조사하여 RNA 및 단백질 등의 오염 정도를 확인하여 순수한 DNA를 확인하였다.

ITS의 증폭 및 염기서열 분석

ITS 유전자 내의 SNP를 확인하고자 유전자 단편의 증폭을 위하여 Table 2에 표시된 유전자의 염기서열정보를 사용하여 각각의 프라이머를 제작하였다. 유전자의 증폭은 iNtRON 회사(Gyeonggi Province, South Korea)에서 제공하는 PCR 반응용 완충 용액 및 i-pfu DNA polymerase를 사용하여 중합반응과정에서 야기될 수 있는 돌연변이를 최소화하였다. 제조사에서 제공하는 실험방법에 따라 순수 분리한 DNA 50 ng과 프라이머를 각각 10 pmole을 혼합한 후 94°C에서 5분간 DNA를 변성시킨 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 전기영동 하여 그 결과를 확인하였다. 증폭되어진 각 유전자 단편의 클로닝 과정에서 돌연변이가 일어날 수도 있으므로 클로닝을 하지 않고 증폭된 DNA단편을 Expin™ PCR SV (GeneAll, Seoul, South Korea) Kit를 사용하여 순수 정제한 후 직접 염기서열분석을 의뢰하였다. 또한 최종적으로 확인된 SNP는 최소 5반복 이상 수행하여 검정하였다.

유연관계 분석

확인된 ITS 유전자의 유연관계 분석은 Mega 6.0 프로그램을 이용해 진행하였다. 비교 군들간의 유전적 거리의 계산은 Tamura-Nei distance 방법을 이용하였으며, neighbor-joining 방법을 이용해 유연관계를 분석하였다(Tamura et al. 2013).

ARMS-PCR

공시된 종들에 대한 ITS 유전자 단편을 PCR로 증폭하여 확인한 염기서열분석을 바탕으로 SNP를 확인한 다음 참당귀 및 세발당귀를 판별하기 위하여 ARMS-PCR을 수행하였다. 종 특이 프라이머는 ITS 유전자의 SNP를 나타내는 염기를 3'-말단에 위치하게 하고, 5'-말단 쪽으로 세 번째의 염기를 각각 다른 3개의 염기로 치환 시킨 primer를 제작하였다. PCR 증폭실험에 사용된 forward 및 reverse primer는 각각 동일한 염기로 치환된 프라이머들을 한 조합으로 하여 각 종에 대한 판별 특이성을 조사하였다(Table 2). PCR 증폭 조건은 94°C에서 5분간 DNA를 변성 시킨 후 94°C에서 30초, 각 프라이머

조합별 Tm 값으로부터 계산한 온도에서 10초, 72°C에서 30초를 1 cycle로 하여 25 cycle 반복 후 72°C에서 5분간 연장반응을 시킨 후 4°C에서 반응을 종료하고 증폭된 DNA밴드는 2.0% agarose gel을 이용하여 전기영동 하여 그 결과를 확인하였다.

결과 및 고찰

ITS 유전자 단편을 이용한 유연관계 분석

국내외의 다양한 경로를 통하여 수집한 각각의 시료들에 대하여 DNA를 분리하여 ITS 특이 프라이머를 사용하여 증폭한 다음 염기서열을 분석하여 NCBI에 등록된 정보와 비교하여 각각의 수집 개체에 대한 해당 종의 진위 여부를 확인하였다. 아직 NCBI에 등록이 되어 있지 않은 세발당귀는 참당귀와 비교하여 차이가 나는 단일염기다형성을 3회 이상 시료를 달리한 반복 실험을 통하여 확인하였다.

국내 토종 당귀[참당귀(*A. gigas* Nakai) 및 세발당귀(*A. gigas* Jiri)]와 해외에서 수집된 [일당귀(*A. acutiloba*), 중국당귀(*A. sinensis*), 구당귀(*Levisticum officinale*)] 시료들의 ITS 유전자 단편의 염기서열 분석을 한 결과(Table 1, Table 2A), 동일한 *Angelica*속이라도 국내에서 자생하는 참당귀(*A. gigas*, Nakai) 및 세발당귀(*A. gigas* Jiri)와 종이 다른 일당귀(*A. acutiloba*), 중국당귀(*A. sinensis*), 구당귀(*Levisticum officinale*) 사이에는 많은 수의 SNP를 확인할 수 있었다. 반면에 참당귀와 세발당귀는 단 2개의 SNP가 확인되었다. 이들 염기서열을 상호 비교한 유전적 유연관계 분석을 통해 국내 토종 당귀들(참당귀, 세발당귀)은 해외에서 수집된 당귀들 중 일당귀와 보다 높은 유연관계를 확인할 수 있었다(Fig. 1).

ITS 유전자 단편에 대한 자생 계통 판별용 마커 개발

먼저 국내 토종당귀(참당귀 및 세발당귀)와 해외에서 수입되는 다른 당귀계통들에 대한 판별용 마커를 개발하고자 ITS 유전자 단편의 염기서열을 상호 비교하여 확인된 SNP를 바탕으로 국내 토종인 세발당귀 및 참당귀는 동일하고 다른 중국당귀, 일당귀, 구당귀와는 차이를 보이는 SNP를 근거로 하여(Fig. 1) 국내 자생 특이적 프라이머를 제작하였으며(Table 2B, Fig. 2A), 이를 사용하여 Table 1에서 표시한 연구 재료로부터 분리한 염색체 DNA를 주형으로 하여 각 계통별 유전자의 증폭을 수행하였다. 그 결과, 국내 자생 당귀종인 세발당귀와 참당귀는 예상한 크기인 514 bp 크기에서 선명하게 밴드가 확인되었으나, 중국당귀, 일당귀, 구당귀의 밴드는 확인되지 않아 용이하게 판별이 가능하다는 것을 알 수 있었다(Fig. 2B).

Fig. 1 Phylogenetic tree showing the genetic diversity of 5 kinds of *Angelica* species using the *ITS* nuclear intergenic regions. The tree was produced using the neighbor-joining method based on intergenic sequences of the *ITS*

Fig. 2 Sequence alignment and products of Korean species-specific ARMS-PCR using the *ITS* nuclear intergenic regions in 5 kinds of *Angelica* species. (A) Sequence alignment of the *ITS* nuclear intergenic region in each species. The gray box indicates the same sequences in two or three species, while the black box indicates the same sequence in all species. Arrows indicate the positions of the *ITS* primers developed in this study. (B) PCR results using Korean species (*A. gigas Nakai* and *A. gigas Jiri*)-specific primers. The samples *A. gigas Nakai* and *A. gigas Jiri* are Korean species. The samples *A. acutiloba*, *A. sinensis*, and *Levisticum officinale* originated from other countries

세발당귀 및 참당귀의 구분을 위한 판별 마커의 제작

국내 토종 당귀인 참당귀와 세발당귀를 각각 판별할 수 있는 분자 마커를 개발하고자 두 종에 대한 염기서열을 비교한 결과 단 두 개의 SNP를 확인할 수 있었다. 이에 근거하여 먼저 세발당귀에만 특이하게 적용되는 정방향 프라이머를 제작하였다(Table 2C, Fig. 3A). 제작된 프라이머는 참당귀를 포함하여 다른 해외 당귀종과 유일하게 차이가 나는 염기서열 T를 3'-말단에 위치하도록 하여 24-mer를 제작하였으며, 이 영역에 대한 다른 4종의 염기서열과 비교하면 참당귀와는 1

개, 일당귀와는 2개, 중국당귀 및 구당귀와는 7개의 염기가 mismatching 하였다. 역방향 프라이머는 참당귀와 유일하게 차이가 나는 A를 3'-말단에 위치하도록 하여 18-mer를 제작하였다. 이 프라이머의 염기서열을 다른 4종의 당귀와 비교한 결과 참당귀와 일당귀와는 3'-말단에 단 1개, 중국 및 구당귀와는 3'-말단은 차이가 없지만 내부에 C 대신 G가 mismatching 되는 다른 1개의 차이를 보였다. 이렇게 제작된 세발당귀 판별용 특이 프라이머를 사용하여 PCR 증폭 실험을 한 결과, 4종의 당귀 계통에서 밴드를 형성하여 상호 구분이 불가능하였다(Fig. 3B). 따라서 정방향 및 역방향 프라이머

Fig. 3 Primer sets and each Korean species *A. gigas* Nakai and *A. gigas* Jiri specific ARMS-PCR using the *ITS* nuclear intergenic regions in 5 kinds of *Angelica* species. (A) Sequence alignment and specific primer positions of the *ITS* nuclear intergenic region in each species. The gray box indicates the same sequences in two or three species, while the black box indicates the same sequence in all species. Arrows indicate the positions of the *ITS* primers developed in this study. (B) PCR results using each Korean species *A. gigas* Jiri-specific primers. (C) PCR results using each Korean species *A. gigas* Nakai-specific primers. The samples *A. gigas* Nakai and *A. gigas* Jiri are Korean species. The samples *A. acutiloba*, *A. sinensis*, and *Levisticum officinale* originated from other countries. All experiments were repeated at least 3 times with different sets of collected samples

Table 2 Primer sequences used in this study**A. SNP analysis**

Gene	Primers	Sequences (5'-3')	Tm (°C)	Size (bp)
ITS	Forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	55.4	800
	Reverse	GCCGTTACTAGGGGAATCCTTG	61.2	

B. Domestic *Angelica* specific PCR analysis

Target species	Primers	Sequences (5'-3')	Tm (°C)	Size (bp)
<i>Angelica gigas</i>	ITS forward	ATGACCCGCTAACACGTT	53.9	514
Jiri & Nakai	ITS reverse	CAAGACAAGAGGGTCTTTC	55.2	

C. ARMS-PCR analysis

Target species	Primers	Sequences (5'-3')	Tm (°C)	Size (bp)
<i>Angelica gigas</i> Jiri	ITS forward-ARMS	CGGTCTCCTGTCTGCGAATCCT	63.1	406
	ITS reverse-ARMS	TTTTCCGCCAACCGCACA	60.2	
	ITS forward-ARMS-A	CTCGGTCTCCTGTCTGCGAATACT	60.3	
	ITS reverse-ARMS	TTTTCCGCCAACCGCACA	60.2	
	ITS forward-ARMS-T	CTCGGTCTCCTGTCTGCGAATTCT	60.9	
	ITS reverse-ARMS-T	TTTTCCGCCAACCGCTCA	59.8	
	ITS forward-ARMS-G	CTCGGTCTCCTGTCTGCGAATGCT	63.7	
	ITS reverse-ARMS-G	TTTTCCGCCAACCGCGCA	63.7	
	ITS forward-ARMS	CTCGGTCTCCTGTCTGCGAATCCT	63.1	
	ITS reverse-ARMS-C	TTTTCCGCCAACCGCCCA	63.2	
<i>Angelica gigas</i> Nakai	ITS forward-ARMS	CCTGGTAGGTGGCCACTCT	64.7	387
	ITS reverse-ARMS	TTTTTCCGCCAACCGCACG	65.0	
	TS forward-ARMS-A	CCTGGTAGGTGGCCACACT	61.2	
	ITS reverse-ARMS	TTTTTCCGCCAACCGCACG	65.0	
	ITS forward-ARMS	CCTGGTAGGTGGCCACTCT	64.7	
	ITS reverse-ARMS-T	TTTTTCCGCCAACCGCTCG	61.3	
	ITS forward-ARMS-G	CCTGGTAGGTGGCCACGCT	64.7	
	ITS reverse-ARMS-G	TTTTTCCGCCAACCGCGCG	65.0	
	ITS forward-ARMS-C	CCTGGTAGGTGGCCACCCT	64.2	
	ITS reverse-ARMS-C	TTTTTCCGCCAACCGCCCG	64.5	

의 3'-말단에 인접한 세 번째 염기를 다른 3종의 염기로 임의로 변경하여 정방향 및 역방향에 각각 동일한 염기가 변경된 4조합(Table 2C)을 사용하여 ARMS-PCR 실험을 수행한 결과 정방향 및 역방향 프라이머의 3'-말단에 인접한 세 번째 염기를 T 또는 G로 변경한 경우에 세발당귀에만 선명하게 밴드가 나타나고 다른 시료에는 모든 밴드가 사라진 것을 확인하였다. 그러나 A 또는 C로 변경한 프라이머 조합에는 ARMS-PCR의 효과가 없는 것으로 조사되었다.

참당귀 판별용 프라이머를 제작하기 위하여 정방향 프라이머는 유일하게 일당귀와 차이가 나는 C를 3'-말단에 위치하게 하여 19-mer를 제작하였으며 역방향 프라이머는 세발당귀 판별용 프라이머와 동일한 위치에서 제작하였으나 5'-말단에 T 염기를 하나 더 추가한 19-mer를 제작하였다(Table 2C, Fig. 3A). 정방향 프라이머의 3'-말단은 일당귀와 차이가 나며, 역방향 프라이머의 3'-말단은 세발당귀, 중국당귀 그리

고 구당귀와 차이가 나도록 제작하였다. 정방향 프라이머의 전체 염기서열을 상호 비교하여 보면 중국당귀와 구당귀와 각각 1개 및 2개의 mismatching을 보였다. 역방향 프라이머는 세발당귀 판별용 역방향 프라이머와 동일한 것으로 3'-말단은 일당귀와는 동일하나 세발당귀, 중국 및 구당귀와는 차이가 나도록 하였으며, 추가적으로 프라이머의 내부 염기서열에 중국당귀와 구당귀는 각각 2개의 mismatching을 보였다. 이렇게 제작된 프라이머를 사용하여 PCR 증폭실험을 수행한 결과 중국당귀와 구당귀에는 밴드가 나타나지 않았으나, 세발당귀 및 일당귀에도 동일한 위치에서 밴드가 확인되었다. 이러한 결과는 세발당귀의 경우에는 역방향 프라이머 그리고 일당귀와는 정방향 및 역방향 프라이머의 3'-말단에 단 하나의 mismatch만 존재하는 프라이머 조합이기 때문에 대립 유전자(allele)의 구분이 어려울 것이라고 이미 예견되었다. 따라서 3'-말단에 인접한 세 번째 염기를 다른 3종의 염기로

치환하여 만든 3종류의 프라이머들을 사용하여 세발당귀의 경우와 동일하게 정방향 및 역방향 프라이머를 각각 동일한 염기로 치환된 조합을 사용하여 ARMS-PCR 분석을 진행하였다(Table 2C). 그 결과 정방향 및 역방향 프라이머의 3'-말단에서 3번째 염기를 G로 변경한 프라이머 세트를 이용한 경우에만 참당귀 시료에서 유일하게 특이적인 밴드를 형성하여 역시 ARMS-PCR기술의 효율을 확인할 수 있었다. 그러나 A 또는 T로 변경한 프라이머 조합에서는 치환하지 않은 프라이머를 사용하였을 때와 동일하게 세발당귀 및 일당귀에 강한 밴드를 확인하였으며 C로 변경한 프라이머 조합의 경우에는 오히려 모든 시료에서 밴드가 사라지는 것을 확인하여 판별 마커로는 부적절한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3C).

이상의 연구결과를 보면, 국내 자생 당귀인 참당귀와 세발당귀는 굳이 ARMS-PCR 기술을 사용하지 않고 관행적인 일반 PCR을 사용하여 확실하게 판별이 가능하였다. 따라서 지금까지의 연구결과를 현장에 실용화하기 위한 방법은 먼저 국내자생용 당귀 판별용 프라이머 조합(Table 2B)을 사용하여 외국종과 분리한 다음 세발당귀 또는 참당귀의 여부는 ARMS-PCR용으로 세발당귀 특이 프라이머 조합(Table 2C)을 사용하면 쉽게 판별이 가능할 것으로 사료된다. 그 이유는 본 연구에서 제작한 참당귀 특이 판별 마커를 이용한 ARMS-PCR 실험결과 단지 3'-말단에 인접한 염기서열 "C"를 "G"로 치환한 경우에만 유일한 밴드를 확인하여 판별이 가능하다고 할 수 있으나 밴드의 강도가 상대적으로 많이 약화된 것이 단점이었기 때문이다.

본 연구에 사용된 국내 토종인 세발당귀의 경우 ITS 유전자 단편내 확인된 단 2개의 SNP를 사용하여 다양한 ARMS-PCR용 프라이머 조합을 사용한 경우 참당귀 뿐만 아니라 다른 해외 당귀 계통과도 확실하게 판별이 가능한 우수한 결과를 얻을 수 있었다. 또한 참당귀의 경우에도 일당귀와 염기서열이 아주 유사하였으나 유일하게 일당귀와만 차이가 나는 염기 하나를 3'-말단에 위치하게 하여 정방향 특이 프라이머로 사용하고 역방향 프라이머는 세발당귀에 사용된 프라이머를 그대로 사용하여 ARMS-PCR기술을 적용한 결과 밴드가 약화된 것이 단점이긴 하나 중국당귀와 구당귀는 물론 세발당귀 및 일당귀와도 판별에 대한 가능성은 확인하였다. 이러한 연구결과는 정방향 및 역방향 프라이머의 3'-말단에 인접한 3번째 염기를 각각 동일한 염기로 변경한 조합만을 조사한 연구결과로, 향후 3'-말단에 인접한 2번째 및 4번째 염기를 변경한 프라이머와 서로 다른 염기로 변경한 조합 등 적어도 50조합 이상의 다양한 프라이머 조합에 대한 조사를 수행하면 밴드의 강도가 약화되지 않는 보다 개선된 프라이머 조합의 탐색이 가능할 것으로 조사되었다.

뿐만 아니라, annealing 온도에 따라 극도로 민감하므로 현장에서 적용이 가능한 실용화를 위하여 온도 변화에 따른 결과의 변동성, 실험하는 실험자에 따른 유사 밴드의 출현을 최소화할 수 있는 조건의 확립 등에 관한 보완 연구 또한 필

요하다고 사료된다. 또한, 최근 급속하게 발전하고 있는 NGS기술과 병행하여 보다 다양한 SNP를 보이는 유전자 단편을 확보하여 제2, 제3의 분자마커를 사용한 교차 분석시스템을 이용하거나 SNP를 보이는 특정 DNA 단편(약 200 bp)을 대상으로 High resolution melting 곡선 패턴을 비교하는 기술을 적용하여 상호 비교하는 시스템을 확립하면 현장에서 적용할 수 있는 실용화를 조기에 확립할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서 확인된 분자표지는 당귀 이외에 국내 및 해외에서 그 기원을 달리하는 다양한 당귀 및 유사 종들의 정확한 기원판별을 위하여 실용화가 가능할 것으로 사료된다. 생육 조건이나, 형태적 변이 등에 따라 크게 영향을 받지 않는 DNA 단편을 이용한 기술로 향후 국내외 유통시장에서 혼용되는 사례들을 적발하기 위한 실용화에 관한 추가 연구의 필요성을 제시하였다. 뿐만 아니라 건재 또는 탕재 등으로 가공된 시료를 대상으로 한 추가 연구도 수행되어야 실용화가 가능할 것이다.

적 요

당귀는 일반적으로 이용되는 대표적인 다년생의 약용식물이다. 최근 국제적 추세에 따라 자국의 유전자원의 발굴, 보존 등이 강화됨에 따라 인접국가와 국내 자생 당귀 계통을 판별할 수 있는 기준 설정에 관한 연구의 필요성이 대두되고 있지만, 분자생물학적 판별 기술의 개발은 아직 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 국내 토종 당귀인 참당귀와 세발당귀, 그리고 해외 유래 당귀 종의 기원을 판별하기 위해 핵의 리보솜에 존재하는 ITS 유전자단편에서 SNP를 이용한 판별 프라이머를 확보하였으며, 이를 보완하여 보다 신속하게 판별하기 위하여 ARMS-PCR 기술을 이용한 판별 마커와 그 조건을 확립하였다. 그러므로, 본 연구에서 개발된 SNP 마커는 다양한 지역 또는 국가에서 서식하는 당귀 종들의 신속한 확인을 위해 매우 유용하게 이용될 것으로 생각된다.

사 사

이 논문은 2020~2021년도 경남과학기술대학교 대학회계 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

References

- Han EH, Cho KM, Goo YM, Kim MB, Shin YW, Kim YH, Lee SW (2016) Development of molecular markers, based on chloroplast and ribosomal DNA regions, to discriminate three popular medicinal plant species, *Cynanchum wilfordii*, *Cynanchum*

- auriculatum*, and *Polygonum multiflorum*. Mol Biol Rep 43:323–332
- Jeong DH, Park YM, Kim KY, Park HW, Jeon KS, Kim MJ, Gil JS, Lee Y, Um Y (2019) Genetic diversity of *Angelica gigas* Nakai collected in Korea using genome-wide SSR markers. Kor J Med Crop Sci 27:376–382
- Kang JS, Hwang SW, Lee JY, Kim KM, Kim CK, Hong YK, Choi KJ, Lee SK (2008) Extracts of chaff and cucumber angelica extracts using decusin and decusinol angelate as effective ingredients to improve lipid metabolism. KR patent 1009 95891B1, 10-2009-0078267, 10-2008-0004122
- Kim HS and Jeong SW (2006) Effective components and nitrite scavenging ability of root and leaves of *Angelica gigas* Nakai. Kor J Food Cook Sci 22:957–965
- Kim JY, Yoon YD, Ahn JM, Kang JS, Park SK, Lee K, Song KB, Kim HM and Han SB (2007) Angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai induces dendritic cell maturation through toll-like receptor 4. Int Immunopharmacol 7:78–87
- Kim JY (2013) Development and industrialization of functional bioactive material from the medicinal Plant. Food Ind Nut 18:1–6
- Lee MY, Ju YS, Kim HJ and Ko BS. (2001). Discrimination of *Aralia continentalis* root by the random amplified polymorphic DNA analysis and morphological characteristics. Kor J Ori Med 7:145–152
- Lee SJ, Shin YW, Kim YH, Lee SW (2017) Identification of specific SNP molecular marker from *Cudrania tricuspidata* using DNA sequences of chloroplast TrnL-F region. J Plant Biotechnol 44: 135–141
- Lee SW, Lee SJ, Kim YH (2018) Development of specific SNP molecular marker from Thistle using DNA sequences of ITS region. J Plant Biotechnol 45:102–109
- Lee SW, Lee SJ, Kim YH (2019) Development of specific SNP molecular marker from Thistle in the DNA sequences of chloroplast ITS region. J Life Sci 29:524–529
- Liao C, Downie SR, Li Q, Yu Y, He X and Zhou B. (2013) New insights into the phylogeny of *Angelica* and its allies (Apiaceae) with emphasis on east Asian species, inferred from nrDNA, cpDNA, and morphological evidence. Sys Bot 38: 266–281
- Mei Z, Zhang C, Khan A, Zhu Y, Tania M, Luo P and Fu J. (2015). Efficiency of improved RAPD and ISSR markers in assessing genetic diversity and relationships in *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels varieties of China. Electronic J Biotechnol 18:96–102
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE (1989) Analysis of point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucl Acids Res 17:2503–2516
- Ok S, Lee JH, Kim IH, Kang JS (2011) Glucose transporters and AMP-activated protein kinase modulation effects of decursin and decursinol angelate on diabetic rats. Yakhak Hoeji 55: 301–308
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30:2725–2729
- Yang DC, Wang HD (2012) SNP primers for Gumpoong and Chungsun selection of Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. meyer) and method for Gumpoong and Chungsun distinction using the same. KR patent 10-2012-0106414
- Yu HS, Park CH, Park CG, Kim YG, Park HW, Seong NS (2004) Growth characteristics and yield of the three species of genus *Angelica*. Kor J Med Crop Sci 12:43–46