



## 모란과 작약의 구별을 위한 엽록체 기반 InDel 마커의 개발

이미선<sup>1</sup> · 정희정<sup>2</sup> · 박소현<sup>3</sup> · 정 희<sup>4</sup> · 정진태<sup>5,6</sup> · 김문교<sup>7,8</sup> · 길진수<sup>9</sup> · 이재복<sup>10</sup> · 김세림<sup>11</sup> · 윤기훈<sup>12</sup> · 이 이<sup>13†</sup>

### Development of a Chloroplast-based InDel Marker that Discriminates between *Paeonia suffruticosa* and *P. lactiflora*

Mi Sun Lee<sup>1</sup>, Hee Jeong Jeong<sup>2</sup>, So Hyeon Park<sup>3</sup>, Hee Chung<sup>4</sup>, Jin Tae Jeong<sup>5,6</sup>, Moon Kyo Kim<sup>7,8</sup>, Jin Su Gil<sup>9</sup>, Jae Bok Lee<sup>10</sup>, Se Rim Kim<sup>11</sup>, Ki Hoon Yun<sup>12</sup> and Yi Lee<sup>13†</sup>

#### ABSTRACT

Received: 2022 June 22  
1st Revised: 2022 July 20  
2nd Revised: 2022 September 19  
3rd Revised: 2022 October 31  
Accepted: 2022 October 31

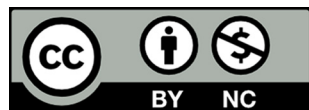
This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Background:** *Paeonia suffruticosa* Andrew and *P. lactiflora* Pallas are important medicinal plants that are difficult to differentiate due to their similar appearances. The development of molecular markers will aid in the discrimination of these two species.

**Methods and Results:** We found several chloroplast genomic loci that were polymorphic between *P. suffruticosa* and *P. lactiflora*. Among them, the insertion/deletion (InDel) marker PsPI-InDel-12 clearly discriminated 25 *P. suffruticosa* and *P. lactiflora* samples collected in the Republic of Korea. We were able to discriminate the two species in material of mixed status.

**Conclusions:** The marker developed in this study can be used to ensure *P. suffruticosa* and *P. lactiflora* quality and increase consumer confidence when purchasing medicinal products made from these species.

**Key Words:** *Paeonia lactiflora*, *Paeonia suffruticosa*, Chloroplast, Genotyping, Insertion/deletion Marker



#### 서 언

작약속 (*Paeonia* spp.)은 미나리아재비과 (*Ranunculaceae*)에 속하며 세계적으로 25 - 40 여 종이 존재하는 것으로 알려져 있다. 국내에는 모란 (*P. suffruticosa*), 백작약 (*P. japonica*), 산

작약 (*P. ovobata*), 작약 (*P. lactiflora*) 등이 자생하며 주요 재배종은 모란과 작약이다 (Stern, 1943). 영어권에서는 모란과 작약을 각각 tree peony와 peony라고 부르는데 꽃이 크고 아름답다며 꽃잎이 풍성하고 색이 다양하다는 공통점이 있다. 모란은 낙엽 관목으로 키가 2 m까지 자라고 작약은 여러해살이

†Corresponding author: (Phone) +82-43-261-3373 (E-mail) leeyi22@chungbuk.ac.kr

<sup>1</sup>충북대학교 특용식물학과 석사과정생 / Master's degree student, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.

<sup>2</sup>충북대학교 특용식물학과 석사수료 / Master's degree, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.

<sup>3</sup>충북대학교 특용식물학과 연구원 / Researcher, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.

<sup>4</sup>충북대학교 특용식물학과 연구원 / Researcher, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.

<sup>5</sup>충북대학교 특용식물학과 박사과정생 / Ph. D. student, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.

<sup>6</sup>농촌진흥청 국립원예특작과학원 연구사 / Researcher, Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 27709, Korea.

<sup>7</sup>충북대학교 특용식물학과 석사수료 / Master's degree, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.

<sup>8</sup>극지연구소 연구원 / Researcher, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Korea.

<sup>9</sup>충북대학교 특용식물학과 연구원 / Researcher, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.

<sup>10</sup>충북대학교 특용식물학과 연구원 / Researcher, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.

<sup>11</sup>충북대학교 특용식물학과 박사수료 / Ph. D. degree, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.

<sup>12</sup>㈜솔레온 대표 / CEO, Research Institute, Soleon Co., Ltd., Cheongju, 28644, Korea.

<sup>13</sup>충북대학교 특용식물학과 교수 / Professor, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.

플로 50 cm 에서 90 cm 까지 성장한다 (Lee, 2006).

모란과 작약의 지하부는 예로부터 한국, 중국, 일본 등 동아시아에서 심혈관 질환 등에 많이 쓰여왔으며, 대한민국 약전 (Korean Pharmacopoeia, KP)에 따르면 모란은 목단피로 불리는 뿌리껍질을 약으로 사용하고 작약은 뿌리 부위를 사용한다. 목단피는 진정제, 항염증제 및 다양한 여성 장애 치료제에 쓰이고 작약은 진통제 및 해열제로 사용된다 (WHO, 1999).

모란의 꽃에는 지표성분인 paeoniflorin 함량이 모란의 뿌리보다 높게 함유되어 있고 많은 종류의 flavonoid, monoterpenoid, 항산화 성분이 함유되어 있다 (Chen et al., 2003; Li et al., 2009; Han and Bhat, 2014; Wang et al., 2017, Yun et al., 2018). Yun 등 (2018)은 모란의 뿌리, 잎, 꽃에서 추출 용매별 유효성분의 함량 변화를 비교하였으며, Jung 등 (2010)은 작약꽃을 대상으로하여 polyphenol의 종류와 함량을 동정하고 지표성분인 paeoniflorin이 뿌리, 잎, 줄기 뿐만 아니라 꽃에서도 검출되는 사실을 확인하였다.

같은 *Paeonia* 속에 속해 있는 모란과 작약은 건강기능식품 및 기능성화장품 등으로 활용 가치가 높지만 꽃의 생김새가 비슷하고 주로 가공되어 운반되기 때문에 원산지 표기 문제나 종 혼용의 문제가 있다 (Moon et al., 2013). 대부분의 식물 분류 및 종에 대한 판별은 형태학적 특성에 따른 차이에 의존하고 있어 유사한 형태의 식물 종 사이에서의 구분에는 제한적이다.

형태적 특성을 이용한 구별의 한계를 해결하기 위해 식물 분류 및 종 판별 기술인 분자 마커가 제시되고 있는 바, Kim 등 (2014)은 백수오 (은조롱)와 하수오의 식물분류학적 위치와 유효성분이 다름에도 하수오라는 이름으로 혼용되는 상황을 극복하고, 백수오와 이엽우피소의 성숙기 열매와 종자가 박주가리의 것과 비슷하여 나타나는 혼동을 해결하기 위해서 국내에서 재배되는 백수오, 이엽우피소, 박주가리 및 하수오의 형태적 형질을 비교한 바 있다. 또한 Kim 등 (2015)은 백수오의 뿌리와 이엽우피소의 뿌리가 육안상 식별이 불가능한 점을 극복하기 위하여 하수오, 백수오 및 이엽우피소의 종 판별이 가능하도록 psbA-trnH 유전자를 대상으로 종 특이적 마커를 개발하기도 하였다.

분자 마커는 분자 수준에서 개체들을 구별할 수 있는 마커 시스템이며 random amplified polymorphic DNA (RAPD), inter-simple sequence repeat (ISSR), amplified fragment length polymorphism (AFLP), simple sequence repeat (SSR) 등이 널리 사용된다 (Huh, 2015). 또한 DNA 염기 서열 한 부위의 변이를 이용한 single nucleotide polymorphism (SNP)과 insertion (삽입) 또는 deletion (결실)된 부위를 이용하는 InDel을 대상으로 primer에 형광을 붙여 염기 서열간 차이를 실시간 분석하는 kompetitive allele specific PCR (KASP)과 high resolution melting (HRM)이 사용되기도 한다.

Bang 등 (2004)은 RAPD-SCAR 마커로 백출의 기원식물인 *Atractylodes japonica*와 *A. macrocephala*를 구별할 수 있음을 제시하였고 Sim 등 (2019)은 SNP 기반 HRM 마커를 개발해 *Sanguisorba officinalis* (오이풀), *S. longifolia* (긴오이풀), *S. tenuifolia* (흰오이풀)을 종 판별에 사용하였다.

현재까지 모란과 작약의 구분을 위해 작약 품종 구분을 위한 AFLP 마커와 SSR 마커 개발, 기원 판별 및 유연관계 분석이 이루어졌으나 (Wan et al., 2018; Xu et al., 2018; Wu et al., 2021) InDel 마커는 개발된 바 없다.

친자 확인 및 범죄현장의 용의자 추적에 주로 사용되는 Short Tandem Repeat (STR)과 DNA 염기 서열 한 부위의 변이를 이용한 SNP는 분석 시 고가의 장비가 필요하기 때문에 DNA 샘플 분석에 어려움이 있다 (Jobling and Gill, 2004; Kim et al., 2012; Schneider, 2012; Li et al., 2014). 이에 반해 InDel은 PCR 기반의 공유성 마커로서 앰플리콘의 길이 차이를 이용하여 agarose gel을 이용하여 실험실 수준에서 샘플을 쉽게 구별할 수 있다 (Pácurar et al., 2012). InDel은 SNP와 동일하게 식물을 포함한 다양한 종에서 게놈 전체에 걸쳐 매우 풍부하게 분포되어 있다 (Rafalski, 2002; Riahi et al., 2013). 또한 돌연변이율이 낮고 스테터 피크가 없으며, 지리적으로 멀리 떨어져 있는 모집단 사이의 대립유전자 빈도에서도 유의미한 차이를 나타내므로 ancestry informative marker (조상 정보 표지자)로 사용된다 (Pereira et al., 2009; Santos et al., 2015; Cortellini et al., 2020).

본 연구에서는 선행연구에서 완성된 총 길이 152,811 bp의 모란의 엽록체 유전체 (Park et al., 2019)와 총 길이 152,811 bp의 작약 엽록체 유전체 (Lee et al., 2019) 정보를 비교하고 형태적 특성으로 구분이 어려운 두 종의 구분을 위하여 InDel 마커를 개발하였다. 또한 개발된 마커가 모란과 작약의 다양한 개체에 적용되는지, 저농도의 DNA에도 구별 가능한지, 혼합 여부도 판단 가능한지 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료 및 DNA 추출

충북대학교 부설농장 (36°37'28.61"N, 127°27'18.36"E)에서 재배한 모란 17 개체와 작약 2 개체, 경기도 여주에서 수집한 모란 2 개체, 대전 광역시에서 수집한 작약 1 개체, 경북 영주에서 수집한 작약 3 개체를 대상으로 하였다 (Table 1). 총 25 개의 모란 (19 개체) 및 작약 (6 개체)을 수집하였고, 모란과 작약 각 수집 개체에 대해 어린 잎과 건조된 꽃의 상태로 샘플링하여 -70°C의 초저온 냉동고에 보관하였다.

각 모란과 작약의 수집 개체로부터 어린 잎을 약 20 mg 채취하여 동결 건조한 뒤 TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용해 30 Hz로 30 초간 분쇄하였으며, 건조된 꽃

**Table 1.** List of genetic resources used in this study.

No.	Sample name	Scientific name	Plant part	Collection site
1	Ps <sup>1</sup> -001	<i>P. suffruticosa</i>	Leaf	RGCBNU <sup>3</sup>
2	Ps-002	<i>P. suffruticosa</i>	Leaf	RGCBNU
3	Ps-003	<i>P. suffruticosa</i>	Leaf	RGCBNU
4	Ps-004	<i>P. suffruticosa</i>	Leaf	RGCBNU
5	Ps-005	<i>P. suffruticosa</i>	Leaf	RGCBNU
6	Ps-006	<i>P. suffruticosa</i>	Leaf	RGCBNU
7	Ps-007	<i>P. suffruticosa</i>	Leaf	RGCBNU
8	Ps-008	<i>P. suffruticosa</i>	Leaf	RGCBNU
9	Ps-009	<i>P. suffruticosa</i>	Leaf	RGCBNU
10	Ps-010	<i>P. suffruticosa</i>	Leaf	RGCBNU
11	Ps-011	<i>P. suffruticosa</i>	Leaf	RGCBNU
12	Ps-012	<i>P. suffruticosa</i>	Leaf	RGCBNU
13	Ps-013	<i>P. suffruticosa</i>	Leaf	RGCBNU
14	Ps-014	<i>P. suffruticosa</i>	Leaf	RGCBNU
15	Ps-015	<i>P. suffruticosa</i>	Flower	RGCBNU
16	Ps-016	<i>P. suffruticosa</i>	Flower	RGCBNU
17	Ps-017	<i>P. suffruticosa</i>	Flower	RGCBNU
18	Ps-018	<i>P. suffruticosa</i>	Leaf	Yeoju, Korea
19	Ps-019	<i>P. suffruticosa</i>	Leaf	Yeoju, Korea
20	Pl <sup>2</sup> -001	<i>P. lactiflora</i>	Leaf	RGCBNU
21	Pl-002	<i>P. lactiflora</i>	Flower	RGCBNU
22	Pl-003	<i>P. lactiflora</i>	Leaf	Daejeon, Korea
23	Pl-004	<i>P. lactiflora</i>	Leaf	Yeongju, Korea
24	Pl-005	<i>P. lactiflora</i>	Leaf	Yeongju, Korea
25	Pl-006	<i>P. lactiflora</i>	Leaf	Yeongju, Korea

<sup>1</sup>Ps; *P. suffruticosa*, <sup>2</sup>Pl; *P. lactiflora*. <sup>3</sup>RGCBNU; Research Garden in Chungbuk National University, Cheongju Korea.

은 막자사발을 이용해 분쇄하였다. 건조된 꽃의 genomic DNA (gDNA)는 건조 과정에서 파괴되었을 것으로 추정되나, 본 실험에 사용하기에 충분하다고 생각되어 어린 잎과 동일하게 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 방법으로 추출하였다 (Doyle and Doyle, 1987). 각 DNA는 DeNovix<sup>®</sup> DS-11+ Spectrophotometer (DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA)를 사용하여 농도 측정 후 10 ng · μl<sup>-1</sup>로 희석하였으며, 모두 -20°C에 보관하였다.

## 2. 염록체 전장유전체의 비교

InDel 구간의 탐색은 선행연구에서 완성한 모란 (NCBI 등록번호, MH793271)과 작약 (NCBI 등록번호, MK860971)의 염록체 유전체 비교를 통해 수행되었고 CLC Genomics Workbench Program (ver. 8.0, Qiagen, Aarhus, Denmark)을 이용하였다.

실험에 사용된 총 길이 152,811 bp의 모란은 long single copy (LSC) 부분이 84,466 bp, small single copy (SSC) 부분이 28,051 bp, 한 쌍의 inverted repeat (IR) 부분이 25,647 bp로 이루어진 것을 확인하였으며 (Park *et al.*, 2019), 작약은 총 길이 152,731 bp로 LSC 부분이 84,402 bp, SSC 부분이 16,969 bp, 한 쌍의 IR 부분이 25,680 bp로 이루어진 것을 확인하였다 (Lee *et al.*, 2019).

## 3. 유전체 기반 InDel 마커 선발

탐색한 InDel 구간을 포함하는 primer set를 CLC Genomics Workbench Program (ver. 8.0, Qiagen, Aarhus, Denmark)를 이용하여 제작하였다. Primer set 제작 조건은 증폭 산물의 길이가 100–450 bp, annealing 온도 47°C - 57°C, G+C 비율 0.4 이상으로 하였다.

4. Genotyping

PCR 반응액의 총 부피는 20  $\mu$ l 로서, 10 ng  $\cdot$   $\mu$ l<sup>-1</sup> 농도의 gDNA 2  $\mu$ l, 10  $\mu$ M의 forward primer와 reverse primer 각 1  $\mu$ l, 10x Taq DNA Polymerase (Takara Bio Inc., Otsu, Japan) 10  $\mu$ l, 증류수 6  $\mu$ l 로 구성하였다.

PCR 반응은 T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)를 이용하였으며, 95°C에서 3 분간 pre-denaturation한 후, 95°C에서 1 분간 denaturation, 50°C에서 1 분간 annealing, 72°C에서 1 분 30 초간 extension하여 총 35 cycles로 수행하였고, final extention 과정은 72°C에서 10 분간 실시하였다.

PCR 증폭 산물은 2% agarose gel에서 확인하였으며 EtBr (ethidium bromide)를 사용해 DNA 염색하였다. 각 밴드의 크기 비교를 위해 PCR 증폭 산물과 1 kb Ladder Plus (Dongshengbio Co., Guangdong, China)를 함께 분주하였다.

전기영동은 120 V로 30 분간 수행한 후, Gel Documentation System (Gel Doc™ XR + System, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)으로 Image Lab Program을 이용하여

UV light 하에서 PCR 증폭 산물을 확인하였다.

결 과

1. InDel 마커 개발

CLC Genomics Workbench Program (ver. 8.0, Qiagen, Aarhus, Denmark)를 이용해 모란 (MH793271)과 작약 (MK860971)의 엽록체 유전체 정보 비교하였고, *in silico* 상에서 다형성 구간 지역을 선발하였다. 선발한 다형성 구간에 대해서 41 개의 primer set를 제작 후 pretest한 결과, 모란과 작약 밴드의 사이즈 차이가 크고 선명해 뚜렷이 구별되었던 PsPI-InDel-12 마커를 중 관별 마커로 최종 선택하였다 (Table 2).

PsPI-InDel-12은 forward primer와 reverse primer 각각 18 bp로 모란 증폭 산물은 전체 388 bp의 길이를 가지며 작약 증폭 산물은 전체 280 bp의 길이를 갖는다 (Fig. 1). 또한, *trnD\_guc*와 *trnY\_gua*의 유전자간 영역 내에서 InDel 염기서열을 증폭하였다 (Table 2).

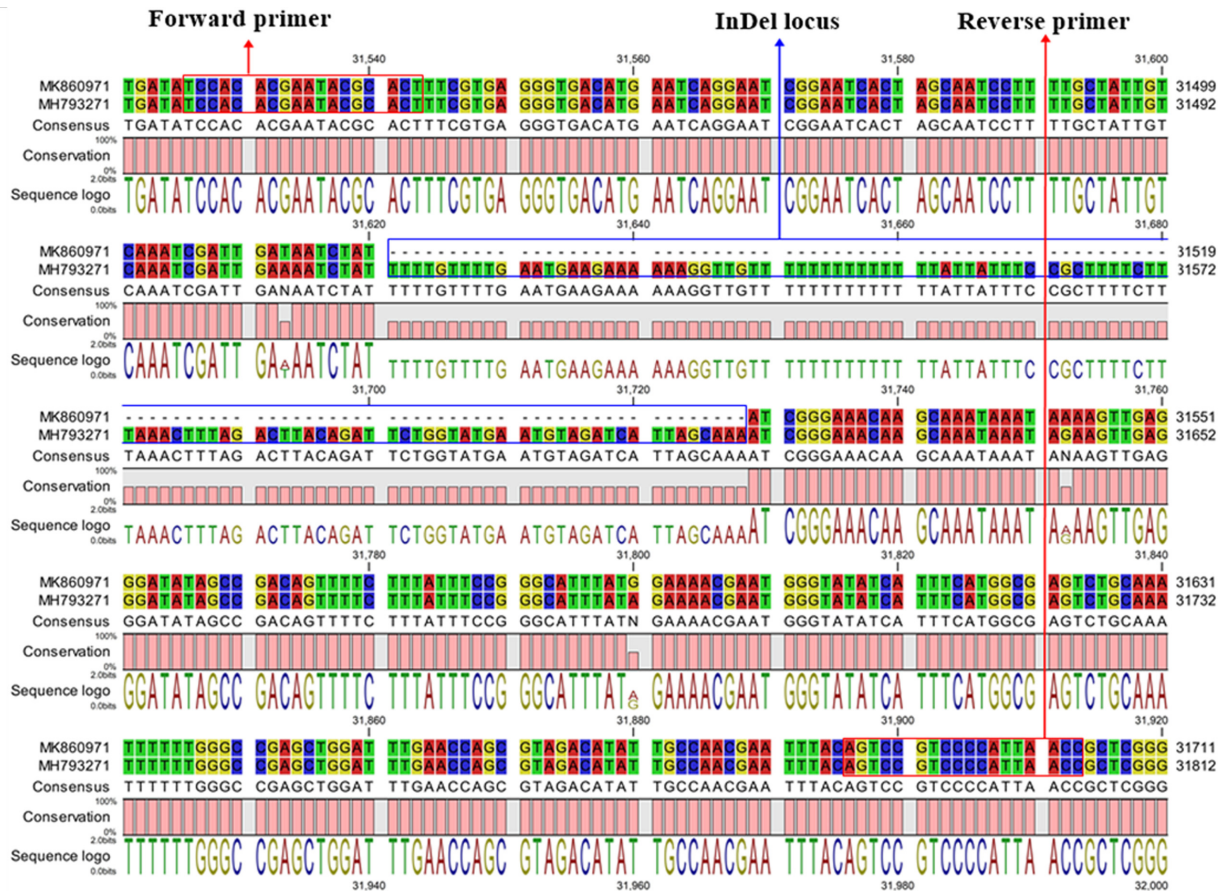


Fig. 1. InDel locus sequence of the PsPI-InDel-12. Comparison of the chloroplast genomic information of *P. suffruticosa* (MH793271) and *P. lactiflora* (MK860971) with CLC Genomics Workbench Program.

**Table 2.** InDel markers made by the chloroplast genome statue to distinguish *P. suffruticosa* and *P. lactiflora*.

Marker	Primer sequence (5' to 3')	Tm (°C)	Size <sup>3)</sup> (bp)	Region
PsPI-InDel-01	F <sup>1)</sup> : GAAACAAAAACCAAACCCG	51.0	191, 178	trnK_uuu - rps16
	R <sup>2)</sup> : CCAATCAACACAAGTCCCT	53.5		
PsPI-InDel-02	F : GAAACAAAAACCAAACCCG	51.0	234, 221	trnK_uuu - rps16
	R : ATTCCCTCATCTATACTCCT	49.1		
PsPI-InDel-03	F : ACCACTCGAAAATACTATCC	49.2	214, 223	trnK_uuu - rps16
	R : TTTTTTCTCTACCCCCCCC	55.6		
PsPI-InDel-04	F : CTTATCTACTCCCCAATTC	50.0	239, 246	rps16 - trnQ_uug
	R : CCCCATATTCCCAATTTCC	51.7		
PsPI-InDel-05	F : GCCATCTCTCCCAATTGAAA	53.3	206, 214	trnS_gcu - trnG_ucc
	R : GTGAGAATAAAAACGGCCCT	53.5		
PsPI-InDel-06	F : AATGGATAGGACAGAGTCT	52.6	201, 218	trnR_uuc - atpA
	R : AGGATCCCCCTTATTATCG	49.0		
PsPI-InDel-07	F : CCTATCCTCTTTTCTCTGTT	48.8	188, 180	atpF
	R : GCTGAATTTGATGACCTATG	48.9		
PsPI-InDel-08	F : GCCTATCCTCTTTTCTCTGTT	53.4	130, 122	atpF
	R : ACGAAACAACCTTGCTGACA	53.0		
PsPI-InDel-09	F : CCCGAATTGTTCCATAAACC	52.0	243, 236	atpH - atpI
	R : AAAAGGGGAAAGAGATCGAA	51.4		
PsPI-InDel-10	F : TACTTTGGAATTGACTGACC	49.9	159, 150	atpH - atpI
	R : AAAGATTACGGATATTGGGG	49.6		
PsPI-InDel-11	F : GTAGTGGAGTGAAGGGA	54.3	131, 110	trnC_gca - PetN
	R : CTTGCGAGTTTGATACA	50.1		
PsPI-InDel-12	F : TCCACACGAATACGCACT	54.6	388, 280	trnD_guc - trnY_gua GenBank accession number : ON638999
	R : GGTTAATGGGGACGGACT	55.3		
PsPI-InDel-13	F : GAGGGTGACATGAATCAG	50.6	447, 339	trnD_guc - trnE_uuc
	R : AGGGATACTACGAAAGGAA	49.8		
PsPI-InDel-14	F : CCGGACAACACATATAAAGA	49.7	235, 245	psaA - ycf3
	R : CACCCGATTGCACAAAAA	51.8		
PsPI-InDel-15	F : ATAAAGAGACCTGCCAAC	49.5	142, 152	psaA - ycf3
	R : TAGATCCGAACACTTGCC	52.5		
PsPI-InDel-16	F : TTTATATAACCATACCGCGGA	50.5	179, 169	ycf3
	R : TGAAGGTGGGAGAAAAGA	50.7		
PsPI-InDel-17	F : GCGCCCTGTTTTAGTTTTTA	51.5	195, 185	ycf3
	R : TGAAGGTGGGAGAAAAGA	50.7		
PsPI-InDel-18	F : ATCTCTAGCCAACCTTCC	51.7	188, 194	ycf3
	R : CAGCAAAAATCCATCTCGT	50.7		
PsPI-InDel-19	F : GGCTAGTGTTTTGCAAGA	51.0	236, 242	ycf3
	R : AGATTGGGACGAACAAGA	51.0		
PsPI-InDel-20	F : TGGTATTAGTGGAGTCGG	51.3	285, 296	ycf3
	R : TCAGGAGAAAAAGAGGCA	51.0		
PsPI-InDel-21	F : GGGATACACGACAGAAGG	53.3	175, 186	ycf3
	R : CAGGAGAAAAAGAGGCAT	49.8		

모란과 작약의 구별을 위한 InDel 마커

Table 2. Continued.

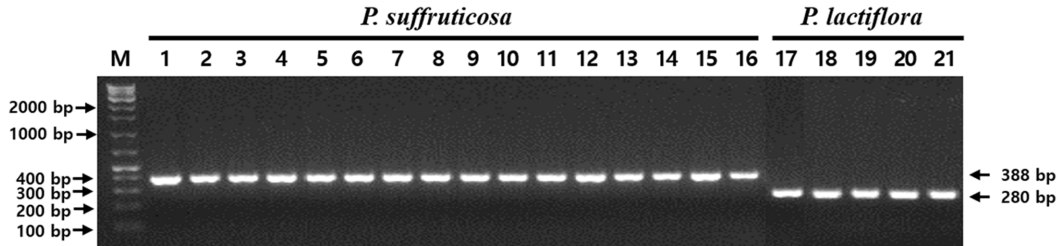
Marker	Primer sequence (5' to 3')	Tm (°C)	Size <sup>3)</sup> (bp)	Region
PsPI-InDel-22	F : CCGGACTCTCTTGATTCT R : GCTGGCTTTTCTCTATTTG	51.4 49.1	216, 237	rps4 - trnT_ugu
PsPI-InDel-23	F : GCAGAAACATAGACGCAC R : GGGACCACAGCAAACAAA	52.0 54.2	125, 118	ndhC - trnV_uac
PsPI-InDel-24	F : CGAGTGATAGTGGCAGTAA R : AATGATCAGAGTGGGGGT	52.0 53.7	240, 231	accD
PsPI-InDel-25	F : GGTGGAAGTAGAAGTAAAG R : ACTGTCCCCATTACTATC	47.3 48.0	162, 153	accD
PsPI-InDel-26	F : CCTTGTTTCCACTTTTCC R : CCTATCCAAGATTCTGCT	49.0 48.7	270, 282	cemA - petA
PsPI-InDel-27	F : TGTATCTCCGTCACCTTGT R : GGGGTTTTTCTAGTTTTGC	50.4 49.0	285, 297	cemA - petA
PsPI-InDel-28	F : CCGATCACAGGAATACCA R : AAGGACCCCATCTCATAA	52.0 50.0	149, 140	psbJ - psbL
PsPI-InDel-29	F : CAGTCGTATCGGCCATTT R : GTCTCTACTGGGGGTATT	53.2 51.2	210, 200	psbJ - psbL
PsPI-InDel-30	F : GCGCCGACTTGATATTTT R : CATGAGGAGGGACGTATTT	51.1 52.1	294, 304	petB, rps12
PsPI-InDel-31	F : CCGCATTTCGCACAAATAA R : CTCAAGCAGAAACACTCC	52.0 51.4	238, 248	petB, rps12
PsPI-InDel-32	F : TCCCTTCATTCTTCCTCT R : ACGAGTCGGTGTATTATTC	49.9 49.2	212, 202	rpl16, rps12
PsPI-InDel-33	F : GGCTCGCGTTTTTAATTT R : CGAGGAAGCCCTTATGAT	51.6 52.1	181, 170	rpl22, rps12
PsPI-InDel-34	F : TAGTTATGTGACAGATGGG R : TGATACTAGACCTCATGC	48.6 48.0	213, 202	rpl22, rps12
PsPI-InDel-35	F : CCAAGAGGATGAAGATGCCA R : GCACGGAGCCTTTGATTATA	55.4 53.0	200, 176	rps12, ycf1
PsPI-InDel-36	F : GATTCGTTCAAGAAAAGCCA R : GCACGGAGCCTTTGATTATA	51.2 53.0	167, 143	rps12, ycf1
PsPI-InDel-37	F : AGATCCGTCCTTCAATATCA R : GGATTCACTCTATTTCCGCA	50.4 52.7	227, 212	rps12, ycf1
PsPI-InDel-38	F : GATTATTTTGGAGTGGAGAG R : TTATTTTGAGCCATACGACC	48.0 50.5	191, 176	rps12, ycf1
PsPI-InDel-39	F : GAGCCGTTTCAGTATGAT R : CCTCCCCTTATCCTTTTTT	49.6 49.5	376, 328	rps12, ycf1
PsPI-InDel-40	F : CGCATCTCTTCTTATCTCTT R : CCTCTTGTGACTCTTCTTTT	49.2 49.8	149, 169	rps12, ndhF, ycf1
PsPI-InDel-41	F : GTTTTTTTTAGGAGAGGGG R : CCTCTTGTGACTCTTCTTTT	49.0 49.8	190, 210	rps12, ndhF, ycf1

<sup>1)</sup>F; forward primer, <sup>2)</sup>R; reverse primer, <sup>3)</sup>Size; The first number is *P. suffruticosa* size, the second number is *P. lactiflora* size.

2. Genotyping

PsPI-InDel-12가 지역에 관계없이 모란과 작약을 구분 가능한지 확인하기 위해 충북대학교 부설농장에서 재배한 모란 14

개체 (Ps-001, Ps-002, Ps-003, Ps-004, Ps-005, Ps-006, Ps-007, Ps-008, Ps-009, Ps-010, Ps-011, Ps-012, Ps-013, Ps-014)와 작약 1 개체 (PI-001), 국내 지역 3 곳 (경기도 여주, 대



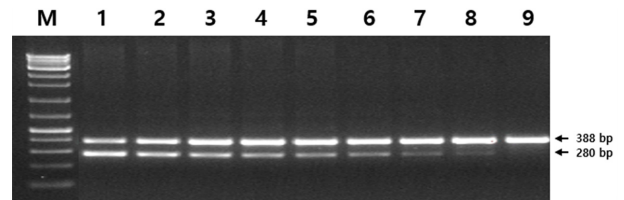
**Fig. 2.** The results of PCR analysis using the PsPI-InDel-12 marker on a total of 21 *P. suffruticosa* and *P. lactiflora* samples. M; 1 kb DNA ladder, Lane 1; Ps-001, Lane 2; Ps-002, Lane 3; Ps-003, Lane 4; Ps-004, Lane 5; Ps-005, Lane 6; Ps-006, Lane 7; Ps-007, Lane 8; Ps-008, Lane 9; Ps-009, Lane 10; Ps-010, Lane 11; Ps-011, Lane 12; Ps-012, Lane 13; Ps-013, Lane 14; Ps-014, Lane 15; Ps-018, Lane 16; Ps-019, Lane 17; Pl-001, Lane 18; Pl-003, Lane 19; Pl-004, Lane 20; Pl-005, Lane 21; Pl-006.

전광역시, 경북 영주)에서 수집한 모란 2 개체 (Ps-018, Ps-019)와 작약 4 개체 (Pl-003, Pl-004, Pl-005, Pl-006) 등 총 21 개체의 수집한 어린 잎 시료 대하여 genotyping을 수행하였다.

국내에서 수집한 총 21 개체에 PsPI-InDel-12 마커를 적용하여 PCR과 전기영동을 실시한 결과, 모란 16 개체는 388 bp로 윗줄에 밴드가 나타났고, 작약 5 개체는 280 bp로 아랫줄에 밴드가 나타나 모란과 작약을 뚜렷하게 구분할 수 있었다 (Fig. 2).

또한 모란과 작약이 각각 이용되었을 때, 저농도의 DNA에서도 PsPI-InDel-12 마커로 검출 가능한지 DNA 농도에 차이를 두어 모란과 작약에 대해 PCR 및 전기영동을 수행하였다. 그 결과 모란과 작약 모두  $10 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 의 농도까지 밴드가 뚜렷하게 나타나 육안으로 확인 가능하였다.  $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 의 농도까지도 밴드가 희미하게 관찰되었지만  $0.1 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 의 농도에서는 밴드가 전혀 확인되지 않았다 (Fig. 3).

혼합 여부 판단을 위한 정량분석은 건조된 모란 꽃 시료 (Ps-015, Ps-016, Ps-017의 동량 혼합물)와 작약 꽃 시료 (Pl-



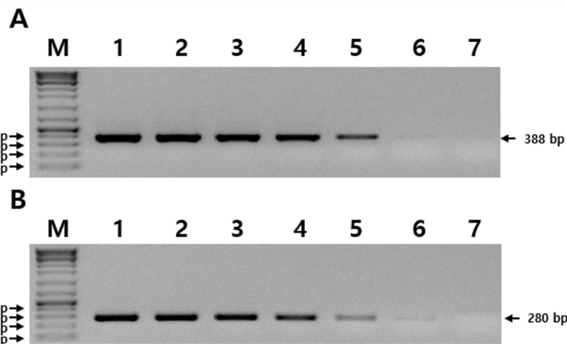
**Fig. 4.** PCR analysis using the PsPI-InDel-12 marker for the mixed samples of *P. suffruticosa* and *P. lactiflora*. Lane 1 - 9 differ in dry weight ratio (w/w) of mixed samples of *P. suffruticosa* Ps-015, Ps-016, and Ps-017 to *P. lactiflora* Pl-002 sample. Lane 1; 1:9, Lane 2; 2:8, Lane 3; 3:7, Lane 4; 4:6, Lane 5; 5:5, Lane 6; 6:4, Lane 7; 7:3, Lane 8; 8:2, Lane 9; 9:1, M; 1 kb DNA ladder.

002)를 이용하였다. 모란과 작약의 시료를 일정 비율로 혼합해 얻은 DNA에 PsPI-InDel-12 마커를 적용하여 PCR 및 전기영동을 수행한 결과, 모란과 작약의 특이적 밴드가 잘 증폭되어 두 밴드를 모두 검출할 수 있었다.

모란의 경우 9 개의 혼합 DNA에서 밴드가 윗줄에 모두 나타났지만 작약은 9:1로 혼합해 얻은 DNA에서 아랫줄의 밴드가 나타나지 않았다. 손상된 DNA에서도 판별이 가능할 것이라 예측했던 PsPI-InDel-12 마커는 모란 : 작약의 비율이 7:3인 경우에도 뚜렷하게 검출되었으며, 혼합비가 8:2인 경우에도 작약의 밴드가 희미하게 관찰되어 본 마커는 모란에 20%의 작약이 혼합되어도 충분히 혼합 여부를 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

## 고 찰

최근 합성 화합물의 독성과 부작용 사례가 증가함에 따라, 오랫동안 이용해오며 안전성이 확인된 천연자원에 대한 인기가 증가하고 있다 (Jo, 2012). 천연자원을 이용해 만든 건강기능식품 및 기능성화장품은 안전하면서도 복합적인 기능을 기대할 수 있는데 천연물 시장이 전 세계적으로 꾸준히 성장하고 있는 상황에서 원료로 사용될 천연물 소재 탐색 및 기능성 연구, 안전성 연구가 활발히 이루어지고 있다 (Cho *et al.*,



**Fig. 3.** PCR analysis results of the PsPI-InDel-12 marker used with various DNA concentrations. PCR amplification using PsPI-InDel-12 marker for *P. suffruticosa* Ps-001 sample (A) and *P. lactiflora* Pl-001 sample (B). Lane 1 - 7 differ in DNA concentration. Lane 1;  $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ , Lane 2;  $0.5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ , Lane 3;  $0.25 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ , Lane 4;  $0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ , Lane 5;  $10 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ , Lane 6;  $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ , Lane 7;  $0.1 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ , M; 1 kb DNA ladder.

2011; Lee *et al.*, 2020).

모란과 작약에는 약효성분인 paeoniflorin이 함유되어있기 때문에 향염과 진통에 효과가 있어 통풍이나 관절염 치료 등에 이용되어왔다. 모란과 작약은 꽃의 형태가 비슷할 뿐 아니라 약재 시장과 화장품 원료시장 등에서 가공된 상태로 거래되기 때문에 형태학적 특성에 의존하여 구분하는 데는 한계가 있다 (Park and Kim, 2009). 본 연구를 통해 개발된 PsPI-InDel-12은 국내에서 재배중인 모란 19 개체에서는 388 bp, 작약 6 개체에서는 280 bp의 앰플리콘이 증폭되어 명확히 구분할 수 있었다. 국내의 재배 모란과 작약에 대해 분자 수준의 종 구분에 활용할 수 있을 것이라 기대된다. 또한 PsPI-InDel-12은 InDel 마커로써 SNP 마커에 비해 최소한의 실험장비로 크기에 따라 쉽게 구별할 수 있어 활용 가치가 높을 것으로 사료된다.

그러나 genotyping에 사용된 작약 개체 수가 적고, 수집 자원이 국내 재배종에 국한되어 있기 때문에 실제 유통 시장에서 적용되기 위해서는 산작약 등 국내 희귀종을 포함한 국내외 *Paeonia*속 모란과 작약 종, 교배종 및 다양한 *Paeonia*속 원예용 재배 도입종 등에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

혼합 DNA의 분석은 법과학과 식품과학에서 주로 다루어지고 있으며, 식물보다 동물에서의 연구가 활발하다 (Montiel-Sosa *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2014; Eom *et al.*, 2018). Lee 등 (2017)은 돼지고기 위주로 제조된 소시지에 저가 원료인 닭고기의 혼합 여부를 판별하기 위해, 종 특이적 DNA 염기서열 차이를 이용한 real-time PCR로 돼지와 닭 DNA의 검출 한계가 각각 0.05 ng 이상임을 확인하고, DNA 혼합비가 5:5, 7:3, 9:1인 경우에도 정량분석 가능성을 확인하였다.

또한, Ujihara 등 (2005)은 단일 품종으로 구성되지 않고 혼합되어 판매되는 시중의 녹차를 구매하여, 제품 라벨지에 표기된 대로 Yabukita와 Meiryoku 품종이 실제 혼합되어 있음을 cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) 마커로 확인하고, DNA 혼합비가 5:1과 9:1인 경우에도 정량분석이 가능함을 확인하였다.

본 연구에서는  $10 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 의 농도까지도 모란과 작약의 밴드가 뚜렷하게 나타나고 혼합비가 7:3인 모란과 작약의 DNA에서도 두 밴드가 증폭되어 육안으로 확인 가능하였다. 특히  $10 \text{ pg} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 의 농도에서 작약에 비해 모란의 밴드가 더욱 선명했으며, 모란과 작약의 혼합 여부 판단 시 모란은 9 개의 혼합 DNA에서 밴드가 모두 나타났다. 따라서 PsPI-InDel-12은 모란의 판별에 더욱 유용할 것이라 판단된다.

소비자들의 신뢰 확보를 위한 과학적 판별 기술, 검증법이 필요한 시점에서 PsPI-InDel-12은 국내 모란과 작약의 잎과 꽃을 이용한 분석에서 종의 판별이 가능하였다. 또한, 모란과

작약의 원료 품질을 보증하고 소비자들의 원료에 대한 신뢰도 향상을 위해서, 향후 모란과 작약의 가공 제품에 대해 PsPI-InDel-12이 적용되는지 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 교육부와 한국연구재단의 재원으로 지원을 받아 수행된 사회맞춤형산학협력선도대학(LINC+) 육성사업과 농촌진흥청 바이오그린 연계 농생명 혁신기술개발사업(과제번호: PJ01588301)의 지원에 의하여 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Bang GH, Seong JS, Park CH, Kim DS, Park CG, Yu HS, Park HU and Seong NS. (2004). Discrimination of *Atractylodes* rhizome white using anatomical characteristics and SCAR markers. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 12:53-59.
- Chen LJ, Games DE and Jones J. (2003). Isolation and identification of four flavonoid constituents from the seeds of *Oroxylum indicum* by high-speed counter-current chromatography. Journal of Chromatography A. 988:95-105.
- Cho EA, Cho EH, Choi SJ, Park KH, Kim SY, Jeong YJ, Ku CS, Ha BJ, Jang DI and Chae HJ. (2011). Screening of anti-wrinkle resource from herbal medicinal extracts and stability test of its cosmetic products. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 19:126-135.
- Cortellini V, Brescia G, Carnevali E, Cerri N, Correa HSD, Nespeca P, Severini S, Tommolini F, Tozzo P, Verzeletti A and Caenazzo L. (2020). Genetic data and comparative study of 38 autosomal InDel markers in three Italian population groups. Forensic Science International: Genetics. 44.
- Doyle JJ and Doyle JL. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin. 19:11-15.
- Eom KY, Cho YJ, Kim HS, Moon SH, Hwang IK, Kang PW and Kim ES. (2018). ABO Genotyping analysis in mixed blood DNA and degraded DNA Samples. The Journal of Police Science. 18:165-187.
- Han CV and Bhat R. (2014). *In vitro* control of food-borne pathogenic bacteria by essential oils and solvent extracts of underutilized flower buds of *Paeonia suruticosa*(Andr.). Industrial Crops and Products. 54:203-208.
- Huh MK. (2015). An overview for molecular markers in plants. Journal of Life Science. 25:839-848.
- Jo HJ. (2012). Development of natural medicines and health functional foods using Korean natural resources. Food preservation and processing industry. 11:7-9.
- Jobling MA and Gill P. (2004). Encoded evidence: DNA in forensic analysis. Nature Reviews Genetics. 5:739-751.
- Jung YO, Park NB, Jung SJ, Kwak JS and Han JH. (2010). Effect of whitening, anti-aging on extract of *Paeonia lactiflora*



- flower. Journal of Physiology and Pathology in Korean Medicine. 24:452-456.
- Kim JS, Jang HW, Kim JS, Kim HJ and Kim JH.** (2012). Molecular identification of *Schisandra chinensis* and its allied species using multiplex PCR based on SNPs. Genes and Genomics. 34:283-290.
- Kim KH, Kim YS, Kim MR, Lee HY, Lee KH, Kim JH, Seong RS, Kang TS, Lee JH and Jang YM.** (2015). Development of primer sets for the detection of *Polygonum multiflorum*, *Cynanchum wifordii* and *C. auriculatum*. Journal of Food Hygiene and Safety. 30:289-294.
- Kim MJ, Kim IJ, Choi SY, Han DH, Kim YH, Lim SC, Kim TJ, Nam SY, Song BH, Oh BU and Park CG.** (2014). Comparison of *Cynanchum wifordii*, *C. auriculatum*, *Metaplexis japonica* and *Polygonum multiflorum* by morphological characters. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 22:113-120.
- Lee MJ, Park JH, Gil JS, Lee JH and Lee Y.** (2019). The complete chloroplast genome of *Paeonia lactiflora* Pall. (Paeoniaceae). Mitochondrial DNA Part B. 4:2715-2716.
- Lee NR, Joo JY and Yeo YH.** (2017). Use of real-time PCR and internal standard addition method for identifying mixed ratio of chicken meat in sausages. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 46:1097-1105.
- Lee TB, So YK, Kim SY and Hwang JY.** (2020). Biological activities of cosmetic material from ten kinds of flower ethanol extracts. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 28:260-275.
- Lee WH, Kim JY, Kim KS, Lee JM, Park MJ, Kim NY, Jung S, Hong SB, Ahn HJ, Park KW and Kim JJ.** (2014). Establishing the foundation of STR genotyping method using next generation sequencing. Korean Journal of Forensic Sciences. 15:36-42.
- Lee YN.** (2006). New flora of Korea. Kyohaksa. Seoul, Korea. p.394-396.
- Li C, Du H, Wang L, Shu Q, Zheng Y, Xu Y, Zhang J, Zhang J, Yang R and Ge Y.** (2009). Flavonoid composition and antioxidant activity of tree peony(*Paeonia* section *Moutan*) yellow flowers. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57:8496-8503.
- Li Y, Liu B, Reif JC, Liu Y, Li H, Chang R and Qiu LU.** (2014). Development of insertion and deletion markers based on biparental resequencing for fine mapping seed weight in soybean. The Plant Genome. 7:1-8.
- Montiel-Sosa JF, Ruiz-Pesini E, Montoya J, Roncalés P, López-Pérez MJ and Pérez-Martos A.** (2000). Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48:2829-2832.
- Moon BC, Lee YM, Choi G, Chun MJ and Kim HK.** (2013). Molecular authentication and phylogenetic analysis of plant species for Breeae and Cirsii Herba based on DNA barcodes. The Korea Journal of Herbology. 28:75-84.
- Păcurar DI, Păcurar ML, Street N, Bussell JD, Pop TI, Gutierrez L and Bellini C.** (2012). A collection of InDel markers for map-based cloning in seven *Arabidopsis* accessions. Journal of Experimental Botany. 63:2491-2501.
- Park JH and Kim KJ.** (2009). The effect of Moutan Cortex on pro-inflammatory cytokines through NF- $\kappa$ B and MAPKs pathway in HMC-I. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology and Otolaryngology and Dermatology. 22:1-18.
- Park JH, Chung H, Yoon KH, Park SH, Gil JS, Lee JH and Lee Y.** (2019). The complete chloroplast genome of *Paeonia suffruticosa* Andrew(Paeoniaceae). Mitochondrial DNA Part B. 4:1406-1407.
- Park JK, Shin KH, Shin SC, Chung KY and Chung ER.** (2007). Identification of meat species using species-specific PCR-RFLP fingerprint of mitochondrial 12S rRNA gene. Journal of Korean Society for Food Science of Animal Resources. 27:209-215.
- Pereira R, Phillips C, Alves C, Amorim A, Carracedo Á and Gusmão L.** (2009). Insertion/deletion polymorphisms: A multiplex assay and forensic applications. Forensic Science International: Genetics Supplement Series. 2:513-515.
- Rafalski A.** (2002). Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. Current Opinion in Plant Biology. 5:94-100.
- Riahi L, Zoghiami N, Fournier-Level A, Dereeper A, Le Cunff L, Laucou V, Mliki A and This P.** (2013). Characterization of single nucleotide polymorphism in Tunisian grapevine genome and their potential for population genetics and evolutionary studies. Genetic Resources and Crop Evolution. 60:1139-1151.
- Santos C, Fondevila M, Ballard D, Banemann R, Bento AM, Børsting C, Branicki W, Brisighelli F, Burrington M, Capal T Chaitanya L, Daniel R. Decroyer V, England R, Gettings KB, Gross TE, Haas C, Hartevel J, Hoff-Olsen P, Hoffmann A, Kayser M, Kohler P, Linacre A, Mayr-Eduardoff M, McGovern C, Morling N, O'Donnell G, Parson W, Pascali VL, Porto MJ, Roseth A, Schneider PM, Sijen T, Stenzl V, Court DS, Templeton JE, Turanska M, Vallone PM, van Oorschot RA, Zatkalikova L, Carracedo A and Phillips C.** (2015). Forensic ancestry analysis with two capillary electrophoresis ancestry informative marker(AIM) panels: Results of a collaborative EDNAP exercise. Forensic Science International: Genetics. 19:56-67.
- Schneider PM.** (2012). Beyond STRs: The role of diallelic markers in forensic genetics. Transfusion Medicine and Hemotherapy. 39:176-180.
- Sim MO, Jang JH, Jung HK, Hwang TY, Kim SY and Cho HW.** (2019). Development of HRM markers based on identification of SNPs from next-generation sequencing of *Sanguisorba officinalis*, *Sanguisorba tenuifolia* f. *alba*(Trautv. & Mey.) Kitam and *Sanguisorba tenuifolia* Fisch. ex Link. The Korea Journal of Herbology. 34:91-97.
- Stern FC.** (1943). Genus *Paeonia*. Journal of Royal Horticultural Society. 68:124-131.
- Ujihara T, Matsumoto S, Hayashi N and Kohata K.** (2005). Cultivar identification and analysis of the blended ratio of green tea production on the market using DNA markers. Journal of Food Science and Technology. 11:43-45.
- Wan YL, Zhang J, Liu AQ, Zhang KY and Liu Y.** (2018). Molecular identification of herbaceous peony cultivars based on SSR markers. Journal of Northwest A and F University-Natural Science Edition. 46:90-97.
- Wang Z, He C, Peng Y, Chen F and Xiao P.** (2017). Origins, phytochemistry, pharmacology, analytical methods and safety of

- Cortex Moutan(*Paeonia suffruticosa* Andrew): A systematic review. *Molecules*. 22:946. <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/6/946> (cited by 2022 June 20).
- World Health Organization(WHO)**. (1999). WHO monographs on selected medicinal plants(Vol. 2). World Health Organization. Geneva, Switzerland. p.195.
- Wu L, Nie L, Wang Q, Xu Z, Wang Y, He C, Song J and Yao H.** (2021). Comparative and phylogenetic analyses of the chloroplast genomes of species of *Paeoniaceae*. *Scientific Reports*. 11:14643. <https://www.nature.com/articles/s41598-021-94137-0> (cited by 2022 June 20).
- Xu JG, Dou X, Gao CR, Lu J and Yan LP.** (2018). Genetic diversity of 20 cut flower cultivars of *Paeonia lactiflora* with AFLP analysis. *Chinese Agricultural Science Bulletin*. 34:65-69.
- Yun KH, Chi YH, Lee DK, and Paik SH.** (2018). Quantitative analysis of paeoniflorin and paeonol in peony extracts and quality control standards. *Journal of the Korean Applied Science and Technology*. 35:235-246.