

Multiplex PCR을 이용한 독활 류 식물로부터 *Aralia continentalis* 감별

이권진* · 도의정* · 고병섭** · 이미영** · 오승은*†

*건국대학교 생명과학과 **한국한의학연구원

Discrimination of *Aralia continentalis* from other Herbs Identified as 'Angelicae Pubescentis Radix' by Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR)

Gwon Jin Lee*, Eui Jeong Doh*, Byong Seob Ko**, Mi Young Lee** and Seung Eun Oh*†

*Department of Biological Sciences, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea.

**Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea.

ABSTRACT : 'Angelicae Pubescentis Radix' (APR) is an important oriental medical preparation. In Korea, *Aralia continentalis* has been recognized as the source plant of APR. *Aralia cordata*, which is difficult to distinguish from *A. continentalis*, and *Heracleum moellendorffii*, which is frequently used in lieu of *A. continentalis*, are traded in Korean herbal markets. In contrast, in China, *Angelica pubescens* is recognized as the source plant of APR. In this study, we devised a method not only to discriminate *A. continentalis* from *A. cordata*, but also to discriminate both *A. continentalis* and *A. cordata* from *H. moellendorffii* and *A. pubescens*. Based on the discrepancy in the sequences of specific regions of ITS, we designed a Cont F/ Cont R primer set to amplify a 173 bp PCR band that appears only in *A. continentalis*. Additionally, we designed an Ara F/ Ara R primer set to amplify a 278 bp PCR band that appears in both *A. continentalis* and *A. cordata*. Using these primer sets and the ST R primer to confirm the PCR amplification results, we developed a simple multiplex PCR method for differentiating *A. continentalis* from *A. cordata* and to concurrently differentiate both *A. continentalis* and *A. cordata* from other APR herbs.

Key Words : Angelicae Pubescentis Radix (APR), *A. continentalis*, *A. cordata*, *A. pubescens*, *H. moellendorffii*, ITS (internal transcribed sequences) multiplex PCR

서 언

우리나라에서 전통적으로 사용되고 있는 한약재인 독활 (Angelicae Pubescentis Radix)은 류마티즘, 관절통, 신경통, 요통 등에 치료 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Kim and Kang, 1998; Moon, 1999). 그 외에 독활은 해열 (Moon, 1999)과 항염증 효과 (Han et al., 1983)도 있는 것으로 알려져 있다. 대한약전 (2007)에 의하면, 우리나라에서는 독활의 기원식물을 두릅나무과 (Araliaceae)의 *Aralia continentalis* Kitagawa로 하고, 그의 뿌리를 독활로 규정하고 있다. 반면에, 중국에서는 우리나라에서 '중치모당귀'라 불리는 산형과 (미나리과, Umbelliferae)의 *Angelica pubescens*를 독활의 기원식물로 규정하고 있다 (Zhang, 1993). 일본에서는 *A. continentalis*와 동속 근연식물인 *Aralia cordata*를 화강활 (和光活)이라 하고, *A. pubescens*를 당독활 (唐獨活)이라 하여 사용하고 있다 (Ministry of Health, Labour and Welfare, 1989).

일부 문헌에는 *A. cordata*와 *A. continentalis*가 동일한 종으로 기재되어 있다 (Lee, 1996; Kim et al., 2006). 그러나 두 식물은 이미 다른 종으로 구분되었고 (Kitagawa, 1935), ITS (Internal Transcribed Spacer) 염기서열의 비교 (Artyukova et al., 2005)와 RAPD 분석 (Zhuraavlev et al., 2003)을 통해 두 식물이 서로 다른 종이 확인되었다. 또한 두 식물은 성숙한 약 (葯, anther)과 화분 (花粉, pollen)의 형태적 특징으로도 구분할 수 있다 (Reunov et al., 2007). 하지만 *A. cordata*와 *A. continentalis*의 외부형태로만으로는 서로 구분하기가 대단히 어려워 우리나라에서는 *A. cordata*가 *A. continentalis*와 구분 없이 혼용되고 있는 실정이다 (Korea Institute of Oriental Medicine, 2005). 또한, 우리나라에서는 오래전부터 '어수리'라 불리는 미나리과의 *Heracleum moellendorffii*가 독활 대용으로 유통되고 있다 (Lee et al., 2001).

이들 독활 류 식물을 감별하기 위하여 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)를 이용한 지표물질 함량분

†Corresponding author: (Phone) +82-2-450-3428 (E-mail) seunoh@konkuk.ac.kr

Received 2010 June 28 / 1st Revised 2010 October 8 / 2nd Revised 2010 October 14 / Accepted 2010 October 15

석과 같은 이화학적 연구가 수행되었으며 (Kim *et al.*, 2006) 입체경과 현미경을 이용한 약용식물의 내, 외부 형태구분법이 연구되었다 (Kim *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2001). 그러나, 독활 류 약용식물은 건조된 뿌리가 잘게 잘려져 유통되기 때문에 약재의 외부 형태 혹은, 내부의 미세구조의 차이로 감별하기가 어렵다 (Lee *et al.*, 2008). 그리고, 약용식물에 존재하는 대사물질과 각 물질의 농도는 계절에 따라, 생육된 장소에 따라, 수확시기에 따라 그리고 시료에 따라 상당히 변화되는 것으로 알려져 있다 (Lee *et al.*, 2008; Vesela *et al.*, 1999)는 단점이 있다.

이를 극복하기 위해 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)와 같은 분자생물학적 기법도 독활 류 약용식물들의 감별을 위해 사용되었다 (Lee *et al.*, 2001).

본 연구에서는 RAPD 기법의 재현성 문제를 보완하고 정확성과 효율성을 높이기 위해, 식물의 분류와 감별에 이용되고 있는 ITS의 염기서열의 차이를 이용하여 *A. continentalis*를 다른 독활 류 식물로부터 효율적으로 감별 할 수 있는 multiplex PCR (Polymerase Chain Reaction) 방법을 개발하고자 하였다. 이를 위하여 두릅나무과의 *A. continentalis*와 *A. cordata* 모두를 다른 독활 류 약용식물로부터 감별할 수 있는 DNA 마커와 *A. continentalis*를 *A. cordata*로부터 감별 할 수 있는 DNA 마커를 개발하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

본 연구에 사용된 32 개의 독활 류 약용식물 시료들을 Table 1에 제시하였다. 이들 시료는 한국한의학연구원에 의해서 수집되었고 일부 *A. pubescens* 시료는 중국으로부터 구입하였다.

2. 게놈 DNA 준비

게놈 DNA 추출을 위해, 생체시료는 잎과 줄기 부분이 주로 사용되었으며, 건조시료로는 독활로 유통되는 건조된 뿌리 절편을 사용하였다. 각 시료의 게놈 DNA는 PureGene DNA purification kit (Gentra, U.S.A.)의 매뉴얼에 따라서 추출하였다. DNA의 순도를 높이기 위해 10% cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)와 0.7 M NaCl를 사용하여 페놀화합물과 다당류를 제거하였다.

3. PCR 증폭

ITS 증폭을 위한 PCR은 T-personal cycler (Biometra, Germany)를 사용하여 White 등(1990)의 방법으로 수행하였다. 600 nM의 ITS1 (5'-TCCGTA-GGTGAACCTGCGG-3')과 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 프라이머, 1U의 *Taq*

polymerase (ABgene, U.S.A.) 그리고 각 시료로부터 추출한 50 ng의 게놈 DNA를 PCR 증폭에 사용하였다. 95°C에서 5 분간 게놈 DNA를 전 변성 시킨 후 변성과정 (denaturation)은 95°C에서 30 초, 결합과정 (annealing)은 50°C에서 30 초, 신장과정 (extension)은 72°C에서 40 초로한 PCR 과정을 25 회 반복하였다. 최종 신장 과정은 72°C에서 7 분간 수행하였다. 독활 류 약용식물의 감별을 위한 PCR은 250 nM의 프라이머들을 사용하였다. 그리고 ITS 증폭 때와 동일하게 50 ng의 게놈 DNA와 1 U의 *Taq* polymerase를 사용하였으며 95°C에서 5 분간 게놈 DNA를 전 변성시켰다. 변성과정은 95°C에서 30 초, 결합과정은 *A. continentalis*를 감별하기 위해서는 53.5°C에서, *A. continentalis*와 *A. cordata*를 동시에 감별하기 위해서는 53°C에서 각각 30 초간 수행하였다. 신장과정은 *A. continentalis*를 감별하기 위해서는 72°C에서 20 초간, *A. continentalis*와 *A. cordata*를 동시에 감별하기 위해서는 72°C에서 25 초로한 PCR 과정을 24 회 반복하였다. 최종 신장 과정은 72°C에서 7 분간 수행하였다. Multiplex PCR은 400 nM의 Cont F, 200 nM의 Cont R, 100 nM의 Ara F, 450 nM의 Ara R, 150 nM의 ST R 프라이머를 사용하였다. 95°C에서 5 분간 전 변성 후 95°C에서 30 초간, 54°C에서 30 초간 그리고, 72°C에서 21 초의 과정을 23 회 반복하였다. 최종 신장 과정은 72°C에서 7 분간 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose 겔을 사용하여 전기영동 한 후에, EtBr (Sigma, U.S.A.)로 염색하였으며, MyImage (Seoulin Biotechnology, Korea)를 사용하여 증폭산물들을 분석하였다.

4. PCR 산물의 염기서열 결정

Agarose 겔로부터 분리한 PCR 산물은 pGEM T-easy vector I (Promega, U.S.A.)를 사용하여 클로닝 하였다. 클로닝 된 PCR 산물의 염기서열은 MacroGen (Korea)에 의뢰하여 결정하였다.

5. 염기서열 분석 및 dendrogram 제작

DNA 염기서열은 Bioedit v7.0.9 (<http://mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>)의 ClustalW Multiple sequence alignment 이용하여 분석하였다. Dendrogram의 작성은 Bioedit의 DNADist를 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 시료의 ITS 염기서열 결정 및 분석

본 연구에서는 독활 류 약용식물로부터 *A. continentalis*를 감별을 위해서 ITS 염기서열에서의 차이를 이용한 분자생물학적 감별방법을 개발하려하였다. ITS 염기서열은 속 (genus) 이하 단위에서의 계통분류 분석과 감별에 효율적으로 이용되고

있다 (Baldwin *et al.*, 1995). ITS 염기서열은 옷나무속 (*Rhus*)의 자원식물들 (Lee *et al.*, 2004)과 *Rubus* 재배종 (Eu *et al.*, 2009)의 계통분류 연구에 이용되었으며 *Atractylodes* 속 (Shiba *et al.*, 2006), *Bupleurum* 속 (Xie *et al.*, 2009), *Phyllanthus* 속 (Lee *et al.*, 2006) 약용식물의 감별에도 효율적으로 이용되었다. 또한, NCBI의 GenBank에 연구의 대상인 *A. continentalis* (NCBI accession no. AJ786232), *A. cordata* (NCBI accession no. AJ786236), *H. moellendorffii* (NCBI accession no. AY548226)와 *Angelica pubescens* (NCBI accession no. DQ263567) 등 4 종 식물의 ITS 염기서열이 등재되어있어, 이를 수집된 시료를 동정 (identification)하고 동일 종 내에서의 염기서열 변이를 분석하는데 이용하였다. Table 1에 제시한 시료를 대상으로 ITS1, 5.8s rRNA 암호

부위 그리고, ITS2의 지역이 포함된 599 bp - 610 bp의 PCR 증폭산물의 염기서열을 결정하였다 (Fig. 1). 결정된 각 시료의 ITS 염기서열을 NCBI의 GenBank에 수록되어 있는 ITS 염기서열 정보를 기준으로 비교하여 각 시료를 동정하였다. 32 개의 시료 중 2 개가 *A. continentalis*, 18 개가 *A. cordata* 로 확인되었으며 4 개의 시료가 *H. moellendorffii* 그리고 8 개의 시료가 *A. pubescens*임을 확인하였다 (Table 1).

*A. continentalis*의 ITS 염기서열을 *A. cordata*의 ITS 염기서열과 비교한 결과, 결정된 610 bp의 염기서열 중 ITS1 지역에서 3 곳, ITS2 지역에서 5 곳에서 일관된 염기의 치환이 있음을 확인하였다 (Fig. 1). 일반적으로 염기치환의 원인이 되는 transition은 transversion과 거의 비슷하거나 경우에 따라 transversion보다 높게 일어나는 것으로 알려져 있다 (Gibson

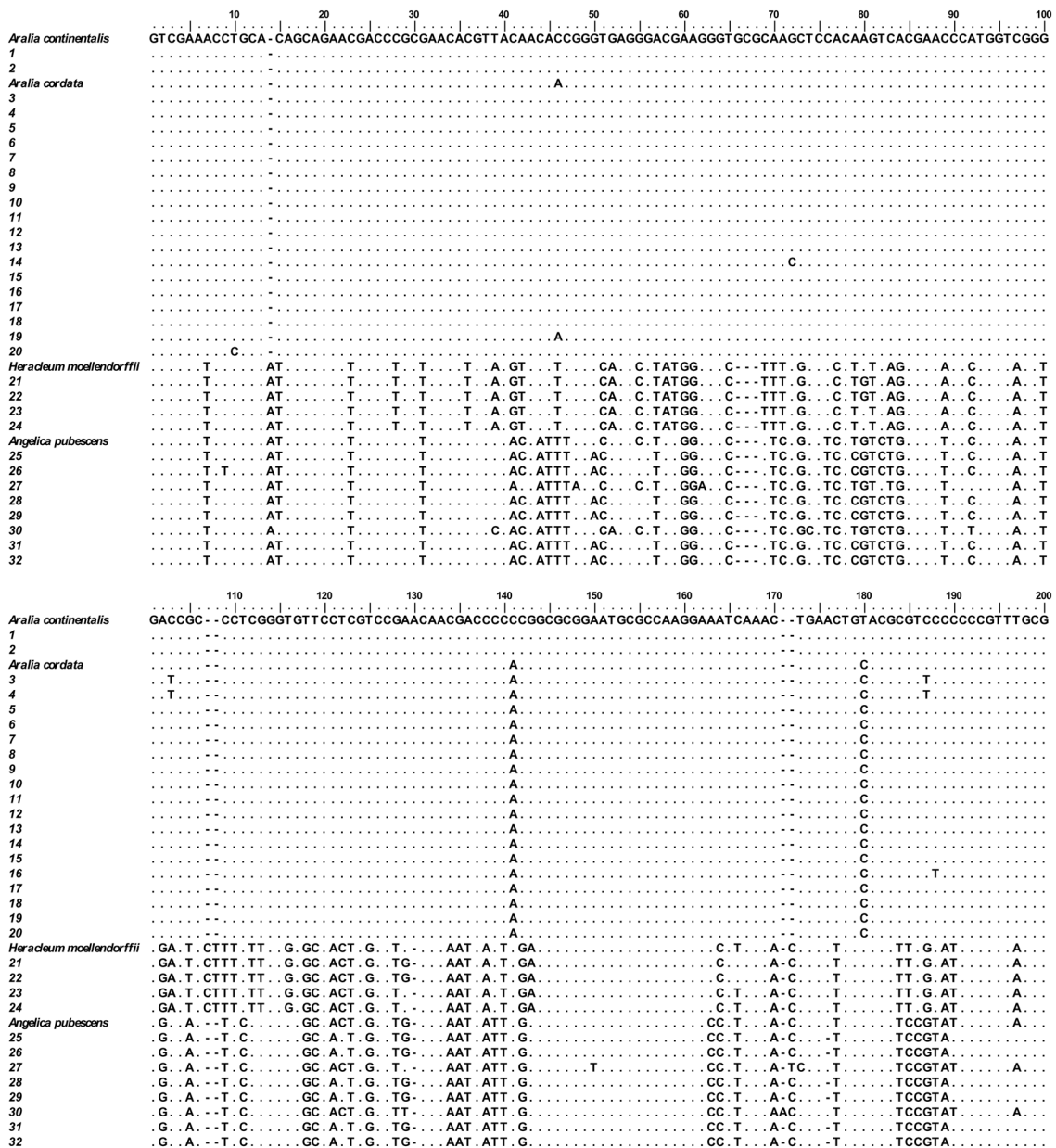
Table 1. List of Angelicae Pubescentis Radix used for the ITS sequencing in this study.

Scientific name	Locality	Nationality	Date of collection	Lane
<i>Aralia continentalis</i>	Myeongjisan (Mt)	Korea	99.10.06	1
	Imsil	Korea	08.06.30	2
<i>Aralia cordata</i>	Ullungdo	Korea	99.10.23	3
	Ullungdo	Korea	99.10.23	4
	Seongnam	Korea	07.06.13	5
	Suwon	Korea	07.07.18	6
	Hamyang	Korea	07.07.12	7
	Imsil	Korea	07.08.30	8
	Imsil	Korea	07.09.05	9
	Imsil	Korea	99.10.23	10
	Muju	Korea	07.06.13	11
	Imsil	Korea	99.09.20	12
	Imsil	Korea	04.06.25	13
	Imsil	Korea	07.07.12	14
	Imsil	Korea	07.07.23	15
	Imsil	Korea	06.05.10	16
	Andong	Korea	07.05.09	17
	Uiseong	Korea	07.08.30	18
	Imsil	Korea	07.08.30	19
	Imsil	Korea	07.09.05	20
<i>Heracleum moellendorffii</i>	Geomdansan (Mt)	Korea	99.09.08	21
	Geomdansan (Mt)	Korea	99.09.08	22
	Geomdansan (Mt)	Korea	99.09.15	23
	Taegisan (Mt)	Korea	99.09.20	24
<i>Angelica pubescens</i>	Sichuan	China	06.05.10	25
	Sichuan	China	07.08.30	26
	Jinan	Korea	99.10.06	27
	Hubei	China	99.09.08	28
	Jinan	Korea	99.09.20	29
	Jeonju	Korea	04.06.25	30
	Qinghai	China	07.07.25	31
Sichuan	China	08.06.30	32	

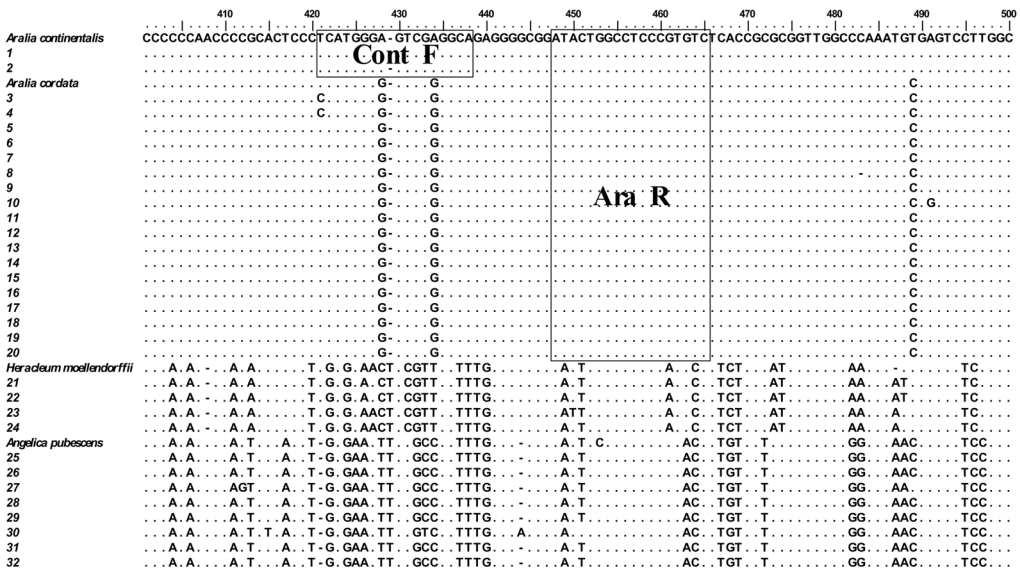
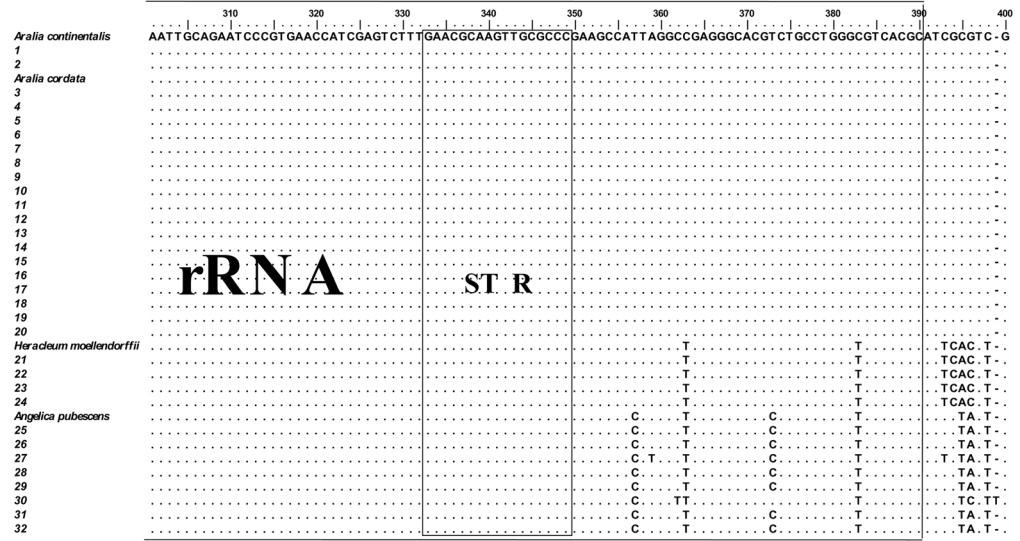
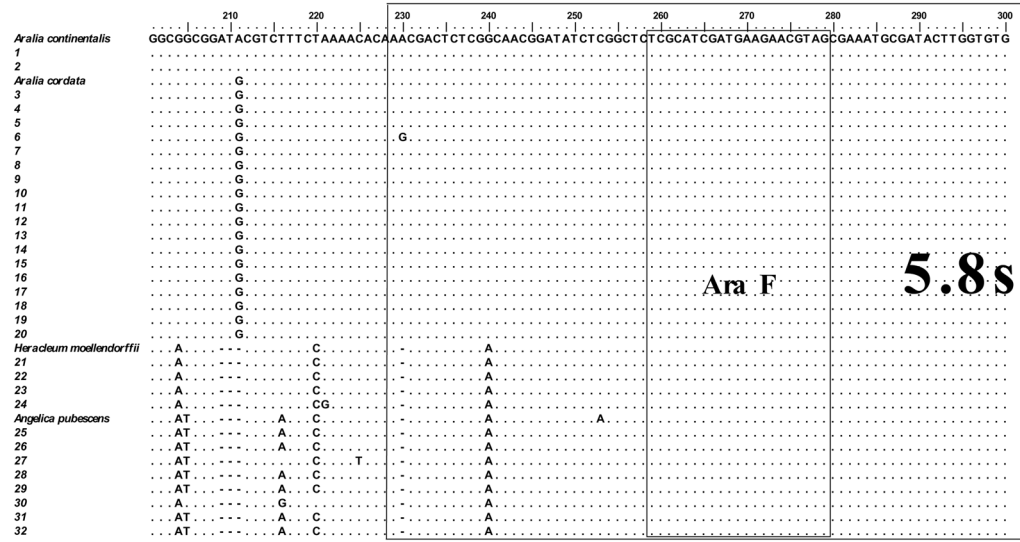
and Muse, 2009). *A. continentalis*와 *A. cordata*의 경우, ITS1 지역에서는 2 곳에 transition과 1 곳에 transversion이 그리고 ITS2 지역에서는 3 곳에 transition이, 2 곳에 transversion이 일어남을 알 수 있다.

수집된 각 독활 류 약용식물의 종 내 염기변이를 확인한 결과, *A. continentalis*의 경우 610 bp 크기의 ITS 염기서열 중 1 곳에서만 염기변이가 있었고 610 bp의 *A. cordata*의 경우 9 곳에, 601 bp의 *H. moellendorffii*의 경우 7 곳에 그리고 599 bp의 *A. pubescens*의 경우 49 곳에 염기변이가 있었다. 각 약용식물 시료의 개수가 서로 달라 식물간의 종 내 염기의 변이

정도를 비교하기는 어렵지만 *A. pubescens*는 다른 독활 류 약용식물보다 종 내의 염기변이가 심하게 일어남을 확인하였다. ITS 염기서열에서의 차이로 종 간 즉, 4 종의 독활 류 약용식물을 구분 할 수 있는지 그리고, ITS에서 관찰된 종 내 염기변이가 ITS 염기서열을 이용한 약용식물의 구분에 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 ITS 염기서열을 이용하여 dendrogram을 작성하였다 (Fig. 2). 작성된 phenogram에 의하면, 두릅나무과의 *A. continentalis*와 *A. cordata* 시료들로 형성된 두 개의 그룹은 산형과의 *H. moellendorffii*와 *A. pubescens* 시료들로 형성된 두 개의 그룹과 확연히 구분되었다. 또한 두



Multiplex PCR을 이용한 독활 류 식물로부터 *Aralia continentalis* 감별



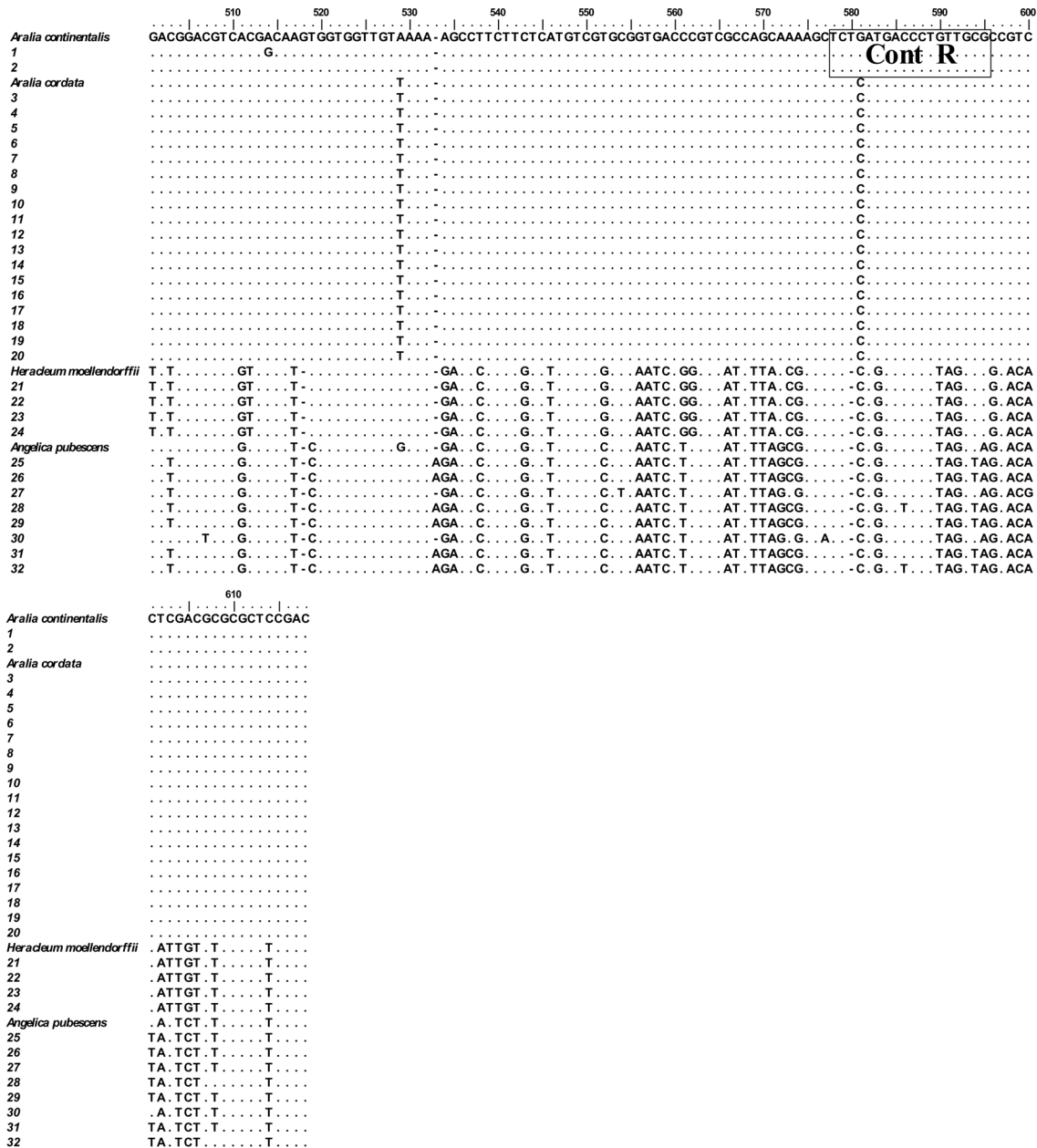


Fig. 1. Multiple alignment of the nucleotide sequences of ITS of samples listed in Table 1. The dots indicate the consensus nucleotide, and the dashes represent the gaps. The names of species represent the nucleotide sequences of the ITS deposited in the NCBI Genbank database. The 5.8S rRNA nucleotide sequence is presented in the bold box. Relative to the bold box, the left shows the nucleotide sequences of ITS1 and the right shows the nucleotide sequences of ITS2. Other bold boxes with letters are primer sequences represented in Fig. 3. Cont F and Con R are primers for the amplification of *A. continentalis*. The Ara F and Ara R primers are used for the amplification of both *A. continentalis* and *A. cordata*. The ST R primer is used for the amplification of internal standards.

릅나무과의 *A. continentalis*와 *A. cordata* 시료들로 형성된 그룹들도 서로 명확히 구분되었다. Fig. 2의 결과로, ITS 염기서열의 차이로 4 종의 독활 류 약용식물을 서로 구분할 수 있음을 확인하였다.

2. *A. continentalis* 감별 마커 개발

*A. continentalis*와 *A. cordata* 간의 염기서열 차이가 ITS1 보다 ITS2 지역에서 현저히 나타나기 때문에 (Fig. 1), ITS2 지역에 위치하고 있는 173 bp 크기의 *A. continentalis* 특이

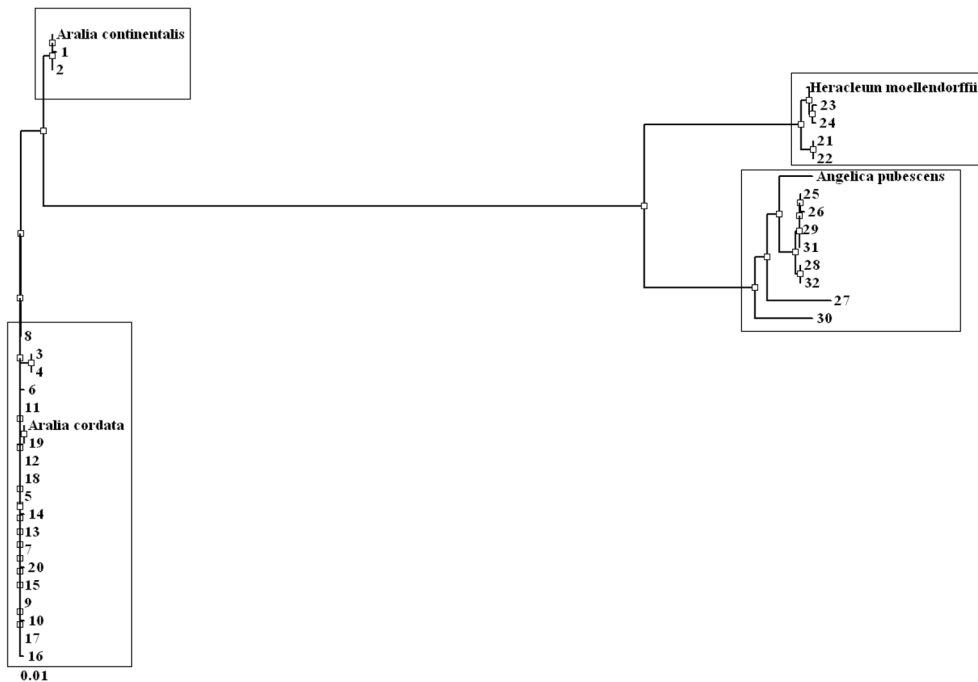


Fig. 2. Dendrogram constructed on the basis of ITS sequences shown in Fig 1.

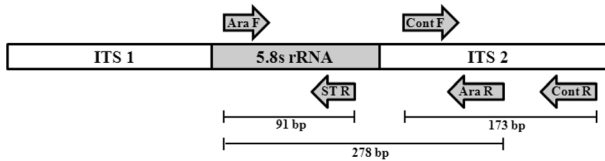


Fig. 3. Primer sets designed in this work and the expected base pair (bp) of PCR products amplified by these primers. Cont F and Con R primers are used for the amplification of *A. continentalis*. Ara F and Ara R are primers for the amplification of both *A. continentalis* and *A. cordata*. The ST R primer is used to amplify the internal standard. The nucleotide sequence of each primer is shown in the bold box in Fig. 1.

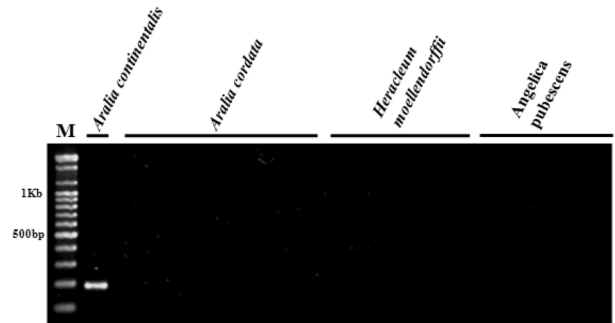


Fig. 4. PCR product amplified by primer set (Cont F/ Cont R) to discriminate *Aralia continentalis* from other plants. M, 100 bp ladder.

마커 (Fig. 3)를 증폭할 수 있는 ContF (5'-TCATGGGAGTC GAGCA-3')와 Cont R (5'-CGCAACAGGGTCATCAGA-3') 프라이머를 고안하였다 (Fig. 1과 Fig. 3). 제작된 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 결과, *A. continentalis* 시료에서만 예상했던 173 bp의 크기의 특이적 PCR 증폭산물이 생성되었으며 *A. cordata*와 *H. moellendorffii*, *A. pubescens* 시료에는 어떠한 증폭산물도 생성되지 않았다 (Fig. 4).

3. *A. continentalis*와 *A. cordata*의 감별을 위한 multiplex 기법

개발된 173 bp 크기의 *A. continentalis* 감별마커를 이용해,

일회의 PCR 과정을 수행함으로써 *A. continentalis*와 *A. cordata*를 *H. moellendorffii*와 *A. pubescens*로부터 구별하고 동시에 *A. continentalis*와 *A. cordata*를 서로 구분 할 수 있는 multiplex 기법을 개발하였다. 먼저 *A. continentalis*와 *A. cordata* 시료를 *H. moellendorffii*와 *A. pubescens* 시료로부터 동시에 구분 할 수 있는 278 bp 크기의 *A. continentalis*와 *A. cordata* 공동 마커를 증폭하기 위하여 (Fig. 3) Ara F (5'-CTCGCATCGATGAAGAACGTA-3')와 Ara R (5'-GACACGGAGGCCAGTAT-3')를 고안하였다 (Fig. 1과 Fig. 3). 각 시료의 PCR 증폭여부를 확인하기 위한 internal standard는 4종의 독활 류 약용식물의 염기서열이 동일한 5.8s rRNA 암호

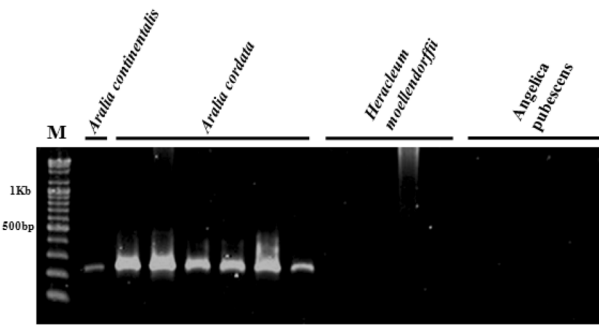


Fig. 5. PCR product amplified by primer set (Ara F/ Ara R) to discriminate both *Aralia continentalis* and *Aralia cordata* from *Heracleum moellendorffii* and *Angelica pubescens*. M, 100 bp ladder.

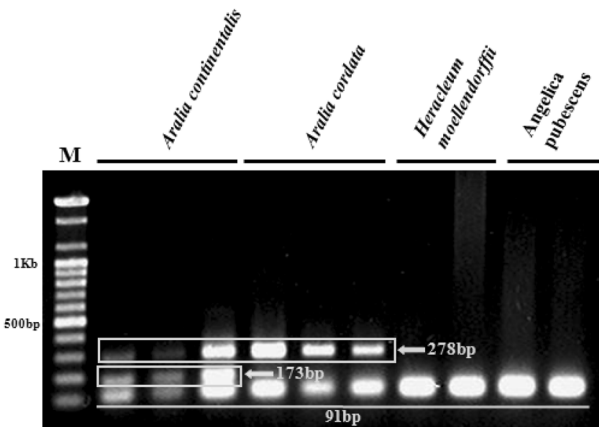


Fig. 6. Multiplex PCR products amplified by primer sets (Cont F/ Cont R/Ara F/Ara R/ST R). M, 100 bp ladder.

지역의 91 bp 크기의 단편으로 하였다 (Fig. 1과 Fig. 3). 이 단편을 특이적으로 증폭할 수 있는 Ara F와 ST R (5'-GGCGCAACTTGC GTTCA-3') 프라이머 (Fig. 1)를 고안하였다. 이상의 5 개의 프라이머 (Cont F, Cont R, Ara F, Ara R, ST R)를 동시에 사용하여 multiplex PCR를 수행한 결과, *A. continentalis* 시료에는 173 bp와 278 bp의 두 개의 증폭산물이 동시에 증폭되었으며 *A. cordata* 시료에는 278 bp의 증폭산물만이 증폭되었다. 반면에 *H. moellendorffii*와 *A. pubescens* 시료에는 어떠한 증폭산물도 증폭되지 않았다 (Fig. 5). 이상의 결과로 본 연구에서 개발된 multiplex 방법은 *A. continentalis*를 *A. cordata*, *H. moellendorffii* 그리고 *A. pubescens*로부터 효율적으로 감별할 수 있음을 확인하였다. 이러한 효율적인 multiplex PCR 방법은 PCR 과정 중, 기술적인 문제로 증폭산물이 증폭되지 않는, false negative 발생 여부를 확인할 수 있고, primer 한 쌍만을 사용하는 각각의 uniplex PCR 보다 경제적이며, 실험과정의 시간을 단축 할 수

있는 장점도 갖고 있다 (Edward and Gibbs, 1994).

감사의 글

본 연구는 2007년도 식품의약품안전청 용역연구개발과제의 연구개발비 지원 (08172 KFDA263)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

- Artyukova EV, Gontcharov AA, Kozyrenko MM, Reunova GD and Zhuravlev YN. (2005). Phylogenetic relationships of the far eastern Araliaceae inferred from ITS Sequences of nuclear rDNA. *Russian Journal of Genetics*. 41:649-658.
- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS and Donoghue MJ. (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 82:247-277.
- Edwards MC and Gibbs RA. (1994). Multiplex PCR: Advantages, development, and applications. *PCR Methods and Applications*. 3:S65-66.
- Eu GS, Park MR and Yun SJ. (2009). Internal transcribed spacer (ITS) regions reveals phylogenetic relationships of *Rubus* species cultivated in Korea. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 17:165-172.
- Gibson G and Muse SV. (2009). A primer of genome science. 3rd Edition. Sinauer Associates Inc. Sunderland, England. p. 134.
- Han B, Han Y, Han K, Park M and Lee E. (1983). Studies on the anti-inflammatory activity of *Aralia continentalis* (I). *Archives of Pharmacal Research*. 6:17-23.
- Kim H, Kim JY, Choi G, Jeong S and Ju Y. (2006). A study on internal-external morphology and pattern analysis in *Angelica pubescens* Radix. *Korean Journal of Oriental Medicine*. 12: 101-115.
- Kim J and Kang S. (1998). Saponins from the aerial parts of *Aralia continentalis*. *Natural Product Sciences*. 4:45-50.
- Kitagawa M. (1935). *Contributio ad cognitionem florae Manshuricae* (VI), Vol 49. *Botanical Magazine*. Tokyo, Japan. p. 222-234.
- Korean Food and Drug Administration. (2007). *The Korean Pharmacopoeia 9th Edition*. Korean Food and Drug Administration. Seoul, Korea. p. 921, 985-986.
- Korea Institute of Oriental Medicine. (2005). *Development of Standard Oriental Medicine*. Korea Institute of Oriental Medicine. Seoul, Korea. p. 69.
- Lee HC, Lee BC, Kim SD, Paik SW, Lee SS, Lee KS and Kim SM. (2008). Changes in composition of Gugija (*Lycii fructus*) species according to harvest time. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 16:306-312.
- Lee MY, Doh EJ, Kim ES, Kim YW, Ko BS and Oh SE. (2008). Application of the multiplex PCR method for discrimination of *Artemisia iwayomogi* from other *Artemisia* Herbs. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 31:685-690.
- 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. Korean Journal of Oriental Medicine. 7:145-152.
- Lee SKY, Li PT, Lau DTW, Yung PP, Kong RYC and Fong WF.** (2006). Phylogeny of medicinal Phyllanthus species in China based on nuclear ITS and chloroplast *atpB-rbcL* sequences and multiplex PCR detection assay analysis. *Planta Medica*. 72:721-726.
- Lee WK, Kim MJ and Heo K.** (2004). Phylogeny of Korean Rhus spp. based on ITS and *rbcL* sequences. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 12:60-66.
- Lee WT.** (1996). Lineamenta Florae Koreae. Academybook. Seoul, Korea. p. 771.
- Ministry of Health, Labour and Welfare.** (1989.) Japanese Herbal Pharmacopoeia. Pharmacists Daily. Tokyo, Japan. p. 23, p. 64.
- Moon GS.** (1999). Compound use of Medicinal Plants. Ilwalseogak. Seoul, Korea. p. 493-494, 657-658.
- Reunov AA, Reunova GD and Zhuravlev YN.** (2007). Morphological study of pollen grains in mature anthers of *Aralia elata*, *A. continentalis*, and *A. cordata* (Araliaceae). Doklady Biological Sciences. 417:465-468.
- Shiba M, Kondo K, Miki E, Yamaji H, Morota T, Terabayashi S, Takeda S, Sasaki H, Miyamoto K and Aburada M.** (2006). Identification of medicinal Atractylodes based on ITS sequences of nrDNA. Biological & Pharmaceutical Bulletin. 29: 315-320.
- Vesela D, Saman D, Valterova I and Vanek T.** (1999). Seasonal variations in the content of taxanes in the bark of *Taxus baccata* L. Phytochemical Analysis. 10:319-321.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J.** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, (Eds.). PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, America. p. 315-322.
- Xie H, Huo K, Chao Z and Pan S.** (2009). Identification of crude drugs from Chinese medicinal plants of the genus Bupleurum using ribosomal DNA ITS sequences. *Planta Medica*. 75:89-93.
- Zhang GJ.** (1993) Collection of great classics of commonly used traditional Chinese medicine. Heilongjiang Science and Technology Publishing Press. Shanghai, China. p. 630 No. 507.
- Zhuravlev YN, Artyukova EV, Kozyrenko MM and Reunova GD.** (2003). Genetic relationships among far eastern species of the family Araliaceae inferred by RAPD analysis. Russian Journal of Genetics. 39:46-51.