

목단피의 감별을 위한 ITS-PCR 분석

이재웅*** · 김영화* · 고병섭* · 육진아* · 오승은** · 박상언*** · 이미영*†

*한국한의학연구원, **건국대학교 이과대학 생명과학과, ***충남대학교 농업생명과학대학 농학과

ITS-PCR Analysis for the Discrimination of Moutan Cortex

Jae Woong Lee***, Young Hwa Kim*, Byoung Seob Ko*, Jin Ah Ryuk*,
Seung Eun Oh**, Sang Un Park*** and Mi Young Lee*†

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

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

***Department of Agriculture, Chungnam National University, Daejeon 305-754, Korea.

ABSTRACT : The application of PCR analysis on the herbal medicine Moutan Cortex (*Paeonia suffruticosa* Andrews) was evaluated by the comparison of the genetic relationship based on the DNA sequence with *Paeoniae Radix* (*Paeonia lactiflora* Pallas) following development of specific primers. Moutan Cortex and *Paeoniae Radix* were distinguished through the PCR analysis based on the internal transcribed spacer (ITS-PCR) from nuclear ribosomal DNA region. The 294 bp PCR products both of Moutan Cortex and *Paeoniae Radix* was amplified by MIF1 and MIR1. And a Moutan Cortex specific 225 bp PCR amplification product was amplified by MIF2 and MIR1 primers. The 225 bp sequence could be successfully amplified from Moutan Cortex of dried herbal preparations. PCR analysis based on ITS (ITS-PCR) may be an efficient tool for the discrimination of Moutan Cortex.

Key Words : ITS-PCR Analysis, Nuclear DNA, Moutan Cortex, *Paeoniae Radix*

서 언

*Paeonia*속 식물은 현재 세계적으로 35종이 알려져 있는데, 우리나라에서 자생하는 *Paeonia*속 식물 중 작약은 *Paeonia japonica*, *Paeonia lactiflora*, *Paeonia obovata*이며 목단류로는 *Paeonia suffruticosa*가 보고되고 있다 (Lee, 1976). 그리고 약용으로 재배되고 있는 작약의 대부분 *Paeonia lactiflora* 계통인 것으로 분류되어 있다 (Kim et al., 1997).

목단피 Moutan Cortex는 작약과의 목단 *Paeonia suffruticosa* Andrews의 뿌리껍질로 paeonol, paeonoside, paeonolide, paeoniflorin, oxypaeoniflorin, benzoylpaeoniflorin 등이 포함되어 있다 (Li, 1988). 목단피는 통풍·류마티즘 관절염의 진통, 피부발진에 대한 항염증 효과가 있으며 (Wang et al., 1994), 실험적 동맥경화 억제효과 (Dai et al., 1999), 혈소판 응집억제효과 (Lin et al., 1999), 폐혈증 억제효과 (Li et al., 2004), carrageenan 유발 염증에 대한 억제효과 및 진통효과 (Chou, 2003), 비만세포로부터 히스타민 유리억제효과 및 TNF- α 생성저해효과 (Kim et al., 2004) 등이 보고되어 있다.

작약 *Paeoniae Radix* (*Paeonia lactiflora* Pallas)은 작약과의 다년생 초본으로 주된 약재성분으로는 paeonol, paeoniflorin 등이 있다 (Aimi et al., 1969; Akata et al., 1980). 작약은 자양보혈, 지경지통, 강압작용, 제산작용 등의 효능이 있어 부인병 치료에 주로 이용되어 왔다 (Kim et al., 2002).

이들 두 약재는 모두 *Paeonia*속 식물로 목단은 목본식물, 작약은 초본식물이므로 분류 기준은 외형적 특성에 따르고 있으나, 정확한 기원의 약재사용에 대한 필요성이 제기되어 있어 쉽고 명확한 판별법이 요구되어지고 있다. 따라서, 분자생물학적 방법인 PCR 분석으로 약재를 구별하기 위한 노력이 진행되고 있으며, Lee 등 (2008)은 *Artemisiae* 약재로부터 *Artemisia iwayomogi*를 동시에 구별할 수 있는 multiplex PCR 방법을 보고하였고, Chung 등 (2009)은 SSR 마커를 이용하여 품종판별을 시도하였고, An 등 (2006)은 황정과 위유의 분류를 위해 RAMP (Random Amplified Microsatellite Polymorphism) 방법으로 유전적인 분류를 시도하였다.

지금까지 목단과 작약에 대해 연구된 분야는 주로 접목 등과 관련된 재배방법이나 (Kim et al., 2002) 성분분석과 추출

†Corresponding author: (Phone) +82-42-868-9504 (E-mail) mylee@kiom.re.kr

Received 2010 January 8 / 1st Revised 2010 February 3 / 2nd Revised 2010 February 10 / Accepted 2010 February 11

물 등에 대한 연구가 대부분이었고 (Choi and Park, 2005; Kim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2004; You *et al.*, 2009) 그 외의 유전학적 연구로는 ITS (Internal Transcribed Spacer) 부위의 분석을 통해 작약류의 종을 구분하고 유연관계 분석을 통해 작약류를 비교한 바 있으며 (Kim *et al.*, 1997; Sang *et al.*, 1995), GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase) 유전자의 이용을 통해 작약류의 유연관계를 분석한 연구가 있다 (Tank and Sang, 2001). 또한 ITS 영역의 염기서열분석은 무화과의 계통분석 (Ghada *et al.*, 2009)과 황기의 구별 (Lu *et al.*, 2009) 자생 밀의 계통분석 (Gulbitti-Onarici *et al.*, 2009), 형개의 기원 및 유연관계 분석 (Baigalmaa *et al.*, 2009) 등 주로 계통간의 차이를 찾고자 할 때 이용되고 있다.

본 연구에서는 nuclear ribosomal DNA의 ITS 부위의 염기서열을 기초로 하여 *Paeonia* 계통의 *Paeonia suffruticosa*와 *Paeonia lactiflora*의 염기서열상의 차이를 비교하고, *Paeonia* 속 (species)에서 *Paeonia suffruticosa*만을 구별할 수 있는 ITS-PCR 방법을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에서 목단과 작약의 ITS 부위 염기서열을 결정하기 위해 목단은 국내외에서 수집한 생체시료 5개와 유통건조 약재 23개를 포함한 28개 시료를, 작약은 국내산 유통건조 약재 4개와 중국산 유통건조 약재 6개를 포함한 10개 시료, 총 38개 시료를 대상으로 하여 실험에 이용하였다 (Table 1).

2. DNA 추출

약 100 mg의 시료를 막자사발에 넣고 액체질소를 사용하여 미세분말 상태로 마쇄한 후 Nucleospin® Plant kit (Macherey-Nagel, Germany)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 0.8% agarose gel에서 전기 영동하여 확인한 후, ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Tech, USA)로 DNA 순도검정 및 정량을 실시하였다.

3. ITS 부위 증폭 및 염기서열 분석

분리된 genomic DNA로부터 ITS 부위를 증폭하기 위해 White 등 (1990)이 보고한 primer ITS1과 ITS4를 이용하여 PCR 증폭을 실시하였다 (Table 2). PTC-200 (MJ Research, USA)을 이용하여 PCR을 실시하였고 PCR 조성은 Smart 2X PCR Pre-mix (Solgent, Korea) 15 ul, DNA 5 ng/ul, 10 pmole/ul primer 각 1 ul를 넣고 DW를 12 ul를 넣어 최종 30 ul로 하였다. PCR 조건은 95°C에서 4분간 pre-denaturation 한 후 95°C에서 30초 denaturation, 55°C에서 40초간

Table 1. List of *P. suffruticosa* and *P. lactiflora* sample used in this study.

Sample Number	Collected Place	Scientific Name
MOUTAN 1	Yongin, Korea	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 2	Qinghai, China	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 3	Fresh Jinan, Korea	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 4	Beijing, China	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 5	Shandong, China	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 6	Uiseong, Korea	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 7	Boseong, Korea	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 8	Yongin, Korea	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 9	Qinghai, China	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 10	China	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 11	China	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 12	China	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 13	China	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 14	China	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 15	China	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 16	China	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 17	Dry China	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 18	China	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 19	China	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 20	China	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 21	China	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 22	China	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 23	China	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 24	China	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 25	China	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 26	China	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 27	China	<i>P. suffruticosa</i>
MOUTAN 28	China	<i>P. suffruticosa</i>
PEONY 1	Imsil, Korea	<i>P. lactiflora</i>
PEONY 2	China	<i>P. lactiflora</i>
PEONY 3	Jangsu, Korea	<i>P. lactiflora</i>
PEONY 4	Imsil, Korea	<i>P. lactiflora</i>
PEONY 5	Dry Korea	<i>P. lactiflora</i>
PEONY 6	Korea	<i>P. lactiflora</i>
PEONY 7	Korea	<i>P. lactiflora</i>
PEONY 8	Korea	<i>P. lactiflora</i>
PEONY 9	Sangju, Korea	<i>P. lactiflora</i>
PEONY 10	China	<i>P. lactiflora</i>

Table 2. PCR primers used in this study.

Primer	Sequence
ITS1	5' - TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3'
ITS4	5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3'
MIF1	5' - TCG AAC CTG CCT AGC AGA AC - 3'
MIF2	5' - CTC CTT CAT CCC ACG TCC GA - 3'
MIR1	5' - GAG ATA TCC GTT GCC GAG AG - 3'

annealing, 72°C에서 1분간 extension을 35회 수행하고 마지막으로 72°C에서 5분간 반응시켰다. 증폭한 산물은 1.5% agarose gel에서 30분간 전기 영동하여 EtBr로 염색한 뒤 관찰하였고, Wizard SV gel and PCR cleanup system (Promega, USA)를 이용하여 정제하였다.

정제된 유전자 증폭 산물을 pGEM T-easy vector (Promega, USA)에 넣고 상온에서 2~3시간 동안 ligation 수행 후, 형질 전환 (transformation) 하였다. LB agar plate에 일정량을 분주하고 37°C 배양기에서 12~16시간 동안 배양하여 white colony만을 선별하고 24시간 배양하였다. 그 후 LB 액체배지로 다시 24시간 배양한 후, 배양액을 원심 분리하여 Plasmid mini-prep Kit (Solgent, Korea)를 이용하여 plasmid만을 분리, 정제하였다.

염기서열의 비교 분석은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 염기서열을 확인한 후 Bioedit (Tom Hall, USA)로 정렬하였고 DNASTAR® Lasergene® 7.2 (DNASTAR, USA)를 이용하여 phylogenetic analysis를 실시하였다.

4. 특이염기서열을 이용한 ITS-PCR 분석

목단의 감별을 위한 ITS-PCR 분석에 이용하기 위해 특이 염기서열을 이용하여 primer 8개를 제작한 후, 그 중 가장 효율이 좋은 primer MIF1, MIF2, MIR1을 선별하였다 (Table 2). PCR 조성은 Smart 2X PCR Pre-mix (Solgent, Korea) 15 ul, DNA 5 ng/ul, MIF1 0.5 ul, MIF2 1 ul 그리고 MIR1 1 ul를 넣고 DW를 12.5 ul로 하여 최종 30 ul로 하였다. PCR

조건은 95°C에서 4분간 predenaturation 한 후 95°C에서 30초 denaturation, 59°C에서 40초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 26회 수행하고 마지막으로 72°C에서 5분간 반응시켰다. 증폭한 산물은 1.5% agarose gel에서 30분간 전기 영동하여 EtBr로 염색한 뒤 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. ITS 부위 염기서열분석을 통한 목단과 작약 비교

목단과 작약의 기원을 확인하기 위해 대상 시료로 부터 DNA를 추출한 후 ITS 부위의 염기서열을 분석하기 위해 PCR 증폭을 실시한 결과, 5.8S RNA를 포함한 ITS 영역의 PCR 증폭 부위는 750 bp 크기의 염기서열을 나타냈다. ITS 부위의 분석된 염기서열을 바탕으로 목단과 작약의 유연관계를 확인한 결과, 목단과 작약이 각각 다른 집단으로 나뉘어져 Group 1과 Group 2로 구분되었으며 (Fig. 1), 이 결과는 Kim 등 (1997)이 발표한 목단과 작약의 RAPD에 의한 유연관계 분석 과도 같은 결과를 보임을 확인할 수 있었다. 목단의 ITS 부위는 268 bp 부터 431 bp까지 163 bp의 5.8S rDNA를 포함한 652 bp의 염기서열을 가지고 있었다. 이 염기서열을 NCBI Blast를 통해 확인한 결과 목단 (*Paeonia suffruticosa*, U27692, identities = 652/653 (99%))과 가장 일치하는 것으로 나타났다. 그 외에 목단과 유사한 식물로는 *Paeonia lutea* (AY328312, identities = 647/653 (99%)), *Paeonia delavayi* (U27679 identities = 646/654 (98%)) 등이 있었다. 본 실험 대



Fig. 1. Phylogenetic analysis of *P. suffruticosa* and *P. lactiflora* based on sequence data from ITS region.

목단피 감별을 위한 ITS-PCR 분석

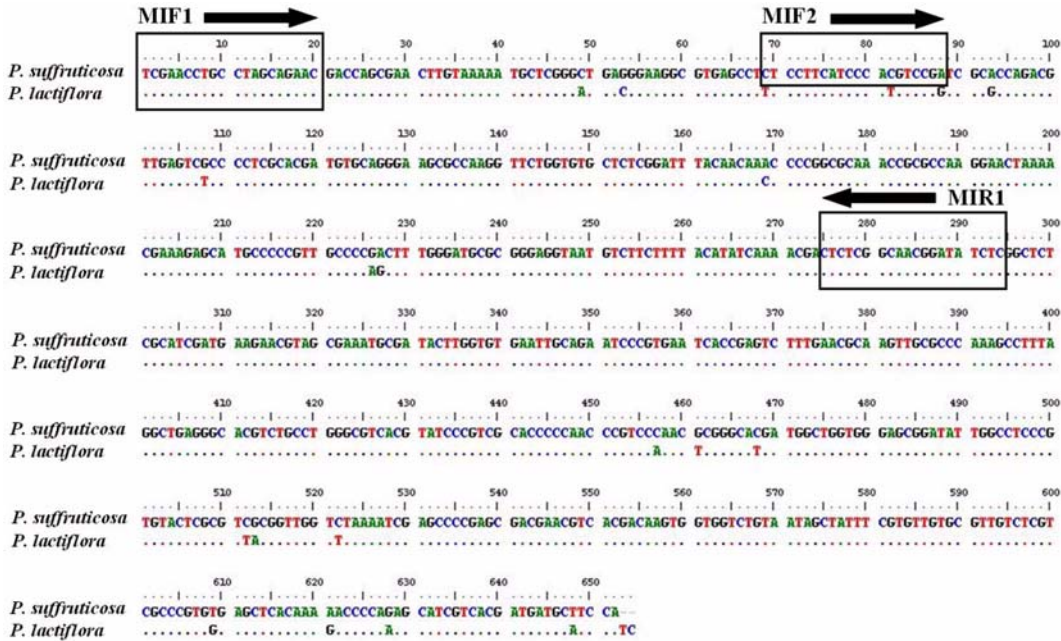


Fig. 2. Comparison of the nucleotide sequence of PCR products of *P. suffruticosa* and *P. lactiflora* amplified using ITS1/ITS4 primer. In the boxes nucleotides indicate a designed primer set for the discrimination of *P. suffruticosa* and *P. lactiflora*.

상 시료인 목단의 염기서열들은 NCBI GenBank의 목단 (*Paeonia suffruticosa*, U27692)과 1 bp 또는 4 bp 차이로 99% 일치함을 나타내었는데 그 중 22개 시료는 공통적으로 448 bp에서 NCBI에 등록되어 있는 목단 (U27692)과는 달리 C 염기가 deletion되는 차이점을 보였다.

본 연구결과에서 100% 동일한 대상 시료의 염기서열인 17개의 목단 염기서열을 새로운 목단의 염기서열로 NCBI GenBank에 등록하였다 (*Paeonia suffruticosa*, EU224272). 작약은 ITS 부위 염기서열 PCR 증폭 결과 268 bp부터 431 bp 까지 163 bp의 5.8S rDNA를 포함한 654 bp의 염기서열로 목단보다 2 bp 더 긴 염기서열을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 작약 염기서열들을 NCBI Blast로 분석을 실시한 결과 8개의 시료는 NCBI에 등록되어 있는 작약 (*Paeonia lactiflora*, FJ514403)과 염기서열이 100% 일치함을 알 수 있었고, Peony-4는 2 bp, Peony-10은 7 bp의 차이를 보임을 알 수 있었다.

목단과 작약의 염기서열을 비교해본 결과, 총 654 bp에서 634 bp가 일치하여 96%의 일치율을 보였다. 작약과 목단의 ITS 부위 염기서열의 크기는 작약이 목단보다 2 bp 더 길었으며, 염기서열 배열의 차이에 있어서는 20 bp 차이가 있었다. 따라서 목단과 차이를 보이는 작약 염기서열은 총 22 bp였으며, A + T와 G + C의 함량으로 서로 비교해 보았을 때 목단의 경우에는 7:13으로 G+C의 함량이 더 높았으나 작약의 경우 14:8로 A+T의 함량이 더 높은 것을 확인할 수 있었다.

목단에서는 17개 시료들의 염기서열이 100% 일치하는 것

으로 나타났으며, 나머지 11개의 시료들은 1~5 bp의 차이가 나타났다. Moutan-6은 91 bp에서 G가 T로 치환되어 1 bp의 차이를 보여 가장 적은 차이를 보인 것을 알 수 있었고 Moutan-21은 공통적인 염기서열을 갖는 17개 시료의 목단들과 비교했을 때 5 bp의 차이를 보여 가장 많은 차이를 보였다. ITS 부위의 91 bp에서는 공통적으로 Moutan-4, 6, 7, 8, 10, 11의 6개 시료들이 G 염기가 T 염기로 치환된 것을 확인할 수 있었고 629 bp에서는 Moutan-4, 7, 8, 10, 15의 5개 시료들은 A 염기가 T 염기로 치환된 것을 알 수 있었다. 작약은 총 10개 시료들 중 7개 시료들의 염기서열이 100% 일치함을 알 수 있었고, Peony-4는 457 bp에서 A 염기가 C 염기로 치환되어 1 bp의 차이를 보이는 것을 알 수 있었으며 Peony-10은 457 bp에서 A 염기가 C 염기로 치환되었음을 알 수 있었다.

2. 특이염기서열을 이용한 목단 구별 ITS-PCR 분석

목단과 작약의 ITS 부위 염기서열 분석을 실시한 결과, 두 시료는 전체 654 bp 크기에서 22 bp의 염기서열 차이를 보였으며 (Fig. 2), 목단과 작약을 구별할 수 있는 ITS-PCR 분석을 위해 이 염기서열 차이를 이용하였다. 총 8개의 primer를 제작하여 특이 염기서열의 차이를 확인한 후, 가장 효율적인 MIF1, MIF2, MIR1을 선별하였으며 목단과 작약에서의 구별 primer 부위는 Fig. 2에 제시하였다. 이 primer를 이용하였을 경우, MIF2와 MIR1 primer에서는 목단과 작약 중 목단만을 감별할 수 있는 225 bp의 특이 band가 형성되도록 하였으며,

감사의 글

본 연구는 2007년도 식품의약품안전청 용역연구개발과제의 연구개발비 지원 (08172한약재264)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

LITERATURE CITED

Aimi N, Inaba M, Watanabe M and Shibata S. (1969). Chemical studies on the oriental plant drugs-XXIII: Paeoniflorin, a glucoside of Chinese peony root. *Tetrahedron*. 25:1825-1838.

Akata Y, Kawano S and Tanase Y. (1980). High-speed liquid chromatographic analysis of drugs XII. Determination of paeoniflorin in pharmaceutical preparations including peony root. *Yakugaku Zasshi*. 100:958-961.

An SM, Ryuk JA, Kim YH, Chae BC, Kim HJ, Kim KH, Kang KK, Ko BS and Lee MY. (2006). Genetic analysis of Polygonati Rhizoma and Polygonati Odorati Rhizoma using random amplified microsatellite polymorphism. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 14:125-129.

Baigalmaa J, Kim MK, Noh JH, Sun H and Yang DC. (2009). Phylogenetic analysis of Schizonepeta Spike on the basis of DNA sequences. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 17:46-53.

Baldwin BG and Markos S. (1998). Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) of 18S-26S rDNA: congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 10:449-463.

Choi MY and Park HJ. (2005). *In vitro* antiinflammatory activity of paeonol from the essential oil and its derivative methylpaeonol. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 36:116-120.

Chou TC. (2003). Anti-inflammatory and analgesic effects of paeonol in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia. *British Journal of Pharmacology*. 139:1146-1152.

Chung JW, Lee GA, Lee SS, Bang KH, Park CB and Park YJ. (2009). Cultivar discrimination of Korean and Chinese Boxthorn (*Lycium chinense* Mill. and *Lycium barbarum* L.) using SSR markers. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 17:445-451.

Dai M, Zhi X, Peng D and Liu Q. (1999). Inhibitory effect of paeonol on experimental atherosclerosis in quails. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 24:488-490.

Ghada B, Olfa S, Khaled C, Messaoud M, Mohamed M, Mokhtar T and Amel SH. (2009). Sequence analysis of the internal transcribed spacers (ITSs) region of the nuclear ribosomal DNA (nrDNA) in fig cultivars (*Ficus carica* L.). *Scientia Horticulturae*. 120:34-40.

Gulbitti-Onarici S, Sancak C, Sumer S and Ozcan S. (2009). Phylogenetic relationships of some wild wheat species based on the internal transcribed spacer sequences of nrDNA. *Current Science*. 96:794-800.

Kim HK, Chang KW, Choi KJ and Ko SR. (2002). Comparison of quality and ecological properties Radix and Moutan Cortex, which were Paeonia Radix grafted with Moutan stem. *Journal of the Korean Society Agricultural Chemistry and*

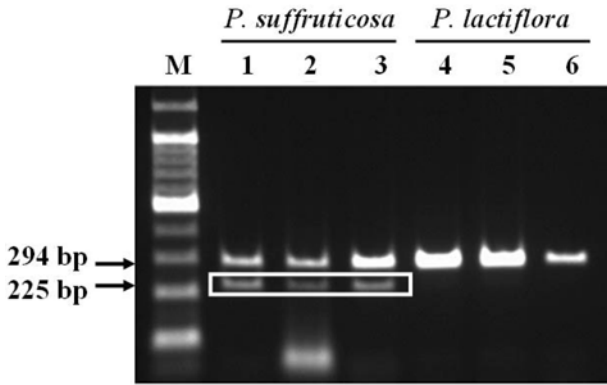


Fig. 3. PCR product with designed primers MIF1, MIF2 and MIR1 from *P. suffruticosa* and *P. lactiflora*. Lane 1 to 3 are *P. suffruticosa* and lane 4 to 6 are *P. lactiflora*. In the Box PCR products indicate that 225 bp PCR product amplified only *P. suffruticosa*.

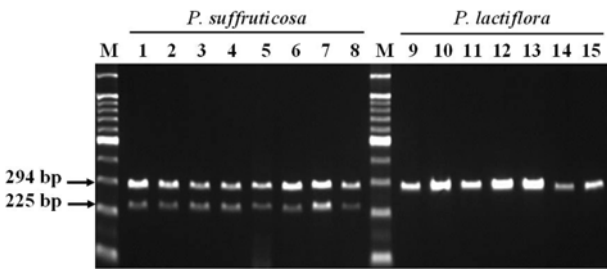


Fig. 4. Application of PCR product with designed primers MIF1, MIF2 and MIR1 from collected in herbal market. Lane 1 to 8 are *P. suffruticosa* and lane 9 to 15 are *P. lactiflora*.

MIF1과 MIR1 primer에서는 목단과 작약 두 시료에 공통적으로 증폭되는 294 bp의 band가 형성되도록 하였다 (Fig. 3). 제작된 primer의 적용성을 확인하기 위해 유통 중인 건조 약재에 대해 PCR 증폭을 실시한 결과, 목단과 작약에서 공통적으로 증폭되는 internal band가 294 bp에서 뚜렷이 증폭되었고, 목단에서만 증폭되는 목단 특이 band는 225 bp에서 증폭되었다 (Fig. 4). 따라서 한약재를 구별할 수 있는 방법으로 ITS-PCR 방법을 효율적으로 이용할 수 있으며, 목단을 간편하게 구별할 수 있는 방법으로 적용할 수 있을 것으로 보인다

rDNA의 ITS 영역을 포함한 18S 영역부터 28S 영역까지의 염기서열 분석은 식물의 계통분류에 많이 이용되고 있고 (Baldwin and Markos, 1998; Gulbitti-Onarici *et al.*, 2009), 작약류 또한 RAPD와 ITS 부위 분석을 통해 계통분류를 실시하였다 (Kim *et al.*, 1997; Sang *et al.*, 1995).

본 연구에서는 ITS 영역을 이용한 염기서열의 비교를 통해 간단하게 목단을 구별할 수 있는 ITS-PCR 방법을 개발하였으며, 이를 응용하여 형태적 구분이 어렵고 불분명한 한약재들의 종 감별 분석에 효율적으로 이용할 수 있을 것이다.

- Biotechnology. 45:173-178.
- Kim JH, Sohn UI, Lee HC, Kim JC and Park SD.** (1997). Phylogenetic analysis of herbaceous peony using ribosomal DNA partial sequencing and RAPDs. Korean Journal of Breeding. 29:349-358.
- Kim JS, Kim YJ, Lee SY and Kang SS.** (2008). Phytochemical studies on *Paeoniae Radix* (3) : Triterpenoids. Korean Journal of Pharmacognosy. 39:37-42.
- Kim SH, Kim SA, Park MK, Kim SH, Park YD, Na HJ, Kim HM, Shin MK and Ahn KS.** (2004). Paeonol inhibits anaphylactic reaction by regulating histamine and TNF- α . International Immunopharmacology. 4:279-287.
- Kim SJ, Park JH, Choi SY, Son KH and Kim KU.** (2007). Isolated and identification of biological activity compounds from leaves and stem of *Paeonia lactiflora* Pallas. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 15:6-11.
- Lee MS.** (1976). Studies on the breeding of new variety of cultivated *Paeonia*. WonKwang University. 10:481-502.
- 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 and Pharmaceutical Bulletin. 31:685-690.
- Li G, Seo CS, Lee KS, Kim HJ, Chang HW, Jung JS, Song DK and Son JK.** (2004). Protective constituents against sepsis in mice from the root cortex of *Paeonia suffruticosa*. Archives of Pharmacial Research. 27:1123-1126.
- Li Q.** (1988). Advances in the pharmacology of the root bark of *Paeonia suffruticosa*. Chinese Traditional and Herbal Drugs. 19:276-278.
- Lin HC, Ding HY, Ko FN, Teng CM and Wu YC.** (1999). Aggregation inhibitory activity of minor acetophenones from *Paeonia* species. Planta Medica. 65:595-599.
- Lu KT, Lee HC, Liu FS, Lo CF and Lin JH.** (2009). Discriminating *Astragali Radix* from *Hedysarum Radix* in Chinese medicine preparations using nested PCR and DNA sequencing methods. Journal of Food and Drug Analysis. 17:380-385.
- Park SM, Jun DW, Park CH, Jang JS, Park SK, Ko BS, Kim BJ and Choi SB.** (2004). Hypoglycemic effects of crude extracts of Moutan Radicis Cortex. Korean Journal of Food Science and Technology. 36:472-477.
- Sang T, Crawford DJ and Stuessy TF.** (1995). Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences. 92:6813-6817.
- Tank DC and Sang T.** (2001). Phylogenetic utility of the glycerol-3-phosphate acyltransferase gene : Evolution and implications in *Paeonia* (Paeoniaceae). Molecular Phylogenetics and Evolution. 19:421-429.
- Wang B, Pang Z and Zhang Q.** (1994). Chemiluminescence in the study of paeonol. Chinese Pharmaceutical Journal. 29:35-38.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J.** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocol: A guide to method and applications. 315-322. Academic Press. San Diego, USA.
- You JK, Chung MJ, Kim DJ, Seo DJ, Park JH, Kim TW and Choe M.** (2009). Antioxidant and tyrosinase inhibitory effects of *Paeonia suffruticosa* water extract. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 38:292-296.