

nrDNA-ITS 분자마커를 이용한 오미자(五味子) 종 감별 및 기원분석 -ITS 염기서열을 이용한 오미자(五味子) 감별-

문병철, 지윤의, 서형석, 이아영, 천진미, 김호경*

한국한의학연구원 한약자원연구센터

Molecular Authentication of Schisandrae Fructus and Analysis of Phylogenetic Relationship based on nrDNA-ITS sequences

Byeong-Cheol Moon, Yunui Ji, Hyeong-Seok Seo, A-Young Lee, Jin-Mi Chun
and Ho-Kyoung Kim*

Center of Herbal Resources Research, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon, 305-811, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : The original plant species of Schisandrae Fructus (*O-mi-ja*) is prescribed as *Schisandra chinensis* BAILL., in Korea, but *S. chinensis* BAILL. and *S. sphenanthera* REHD. et WILS. in China. Moreover, fruit of several other species in genus *Schisandra* also have been used as the same herbal medicines. To develop a reliable method for correct identification of Schisandrae Fructus and to evaluate the phylogenetic relationship of *S. chinensis* and its related species, we analyzed internal transcribed spacer (ITS) sequences of nuclear ribosomal DNA (nrDNA).

Methods : Twenty-four plant samples of three *Schisandra* species and one *Kadsura* species, *S. chinensis* BAILL., *S. sphenanthera* REHD. et WILS., *S. nigra* MAX. and *Kadsura japonica* DUNAL were collected from each different native habitate and farm in Korea and China. The nrDNA-ITS region of each samples were amplified using ITS1 and ITS4 primer and nucleotide sequences were determined after sub-cloning into the pGEM-Teasy vector. Authentic marker nucleotides were estimated by the analysis of ClustalW based on the entire nrDNA-ITS sequence.

Results : In comparative analysis of the nrDNA-ITS sequences, we found specific nucleotide sequences including indels (insertions and deletions) and substitutions to distinguish *C. chinensis*, *S. sphenanthera*, *S. nigra*, and *K. japonica*. These sequence differences at corresponding positions are available nucleotide markers to determine the botanical origin of *O-mi-ja*. Moreover, we evaluated the phylogenetic relationship of four plant species by the analysis of nrDNA-ITS sequences.

Conclusions : These marker nucleotides would be useful to identify the official herbal medicines by the providing of definitive information that can identify each plant species and distinguish it from unauthentic adulterants for *O-mi-ja*.

Key words : Molecular marker, Schisandrae Fructus, nrDNA-ITS, Molecular authentication

서론

오미자(五味子)는 오미자과(Schisandraceae)의 식물인 오미자(*S. chinensis* BAILL.)의 잘 익은 열매를 말려서 이용하는 것

으로 단맛, 신맛, 매운맛, 쓴맛, 짠맛의 다섯 가지 맛이 난다
고 해서 그 명칭이 유래된 한약재로¹⁾, 한의학에서 거담제, 자양제, 강장제, 수렴제 및 진해제로 사용되어 왔으며, 진정, 진해, 해열 등의 중추 억제 작용과 간 보호 및 혈압강하, 알콜

*교신저자 : 김호경. 305-811, 대전시 유성구 엑스포로 483 한국한의학연구원 한약자원연구센터.
· Tel : 042-868-9502, · Fax : 042-863-9434, · E-mail : hkkim@kiom.re.kr.
· 접수 : 2010년 11월 15일 · 수정 : 2010년 12월 4일 · 채택 : 2010년 12월 15일

해독작용이 있는 것으로 알려져 있다²⁻⁴). 오미자과 식물은 전 세계적으로 2속 60 종이 분포하며, 북미와 열대 및 아열대 아시아, 우리나라를 포함한 동아시아지역으로 광범위하게 분포하고 있는 것으로 알려져 있다⁵). 우리나라의 오미자과 식물은 2속 3종으로 오미자속(*Schisandra*)의 오미자(*S. chinensis* BAILL.) 및 흑오미자(*S. nigra* MAX.)와 남오미자속(*Kadsura*)의 남오미자나무(*Kadsura japonica* DUNAL)가 자생하고 있다⁶). 낙엽활엽성 덩굴식물로 전국에 분포하고 있으며 널리 재배되고 있는 오미자(*S. chinensis*)와 제주도 특산종인 흑오미자(*S. nigra*)는 주로 식약용으로 이용되고 있으며⁷, 남해안 일대와 남부 섬지역에 분포하는 상록활엽성 덩굴식물인 남오미자나무(*K. japonica*) 또한 그 열매의 형태가 오미자(五味子)와 유사하여 오미자(*S. chinensis*)나 흑오미자(*S. nigra*) 열매로 이용될 가능성이 높다. 중국은 오미자(五味子)를 크게 남오미자(南五味子)와 북오미자(北五味子)로 분류하고 있는데 남오미자(南五味子)는 중국의 서남지역에서 생산되고 있고 북오미자(北五味子)는 주로 동북지역에서 생산되고 있다⁸). 우리나라 대한약전에서 오미자(五味子)는 중국의 북오미자(北五味子)에 해당하는 오미자(*S. chinensis*)의 잘 익은 열매로 규정하고 있는 반면, 중국약전에서의 오미자(五味子)는 오미자(*S. chinensis*)와 남오미자(南五味子)인 화중오미자(*S. sphenanthera*)의 잘 익은 열매로 그 기원을 다르게 규정하고⁹) 있어 외국산 한약재의 수입이 증가하는 우리나라는 이들의 혼오용이 우려된다. 뿐만 아니라, 제주 특산종인 흑오미자(*S. nigra*)가 새로운 소득 작물로 관심이 높아져 그 재배기술이 개발되고 있고, 남오미자속(*Kadsura*속)의 남오미자나무(*K. japonica*) 열매의 이용에 대한 관심도 점점 높아지고 있다. 하지만 우리나라의 오미자과 식물의 연구는 재배량이 많은 오미자(*S. chinensis*)의 효능을 중심으로 진행되었으며⁹⁻¹¹), 종 특유의 형태적 특성이나 생리적 특성에 대한 연구와 이들의 중간 유연관계를 규명하는 분류학적 연구는 미미한 실정이다¹²).

근래에 들어 분자생물학의 발달과 염기서열 분석의 자동화로 핵 리보솜 RNA 유전자(Nuclear Ribosomal RNA gene, nrDNA)의 internal transcribed spacer(ITS) 부위¹³), 18S rRNA 유전자 부위 및 *matK* 유전자 부위^{14,15}), *rbcl* 유전자 부위¹⁶), *trnL-F* 유전자 부위¹⁷) 등을 이용한 객관적인 식물분류체계 확립이나 한약재의 감별을 위한 연구가 진행되고 있다¹⁸). 특히 계능상에 존재하는 nrDNA-ITS 부위는 다른 유전자의 코딩부위보다 빠르게 진화하고 일반성, 단순성, 재현성 등의 이점으로 인해 계통분류나 중간 유전변이 탐색 등을 위해 이용되는 염기서열로 알려져 있다¹⁹). nrDNA-ITS 부위의 염기서열 변이 분석은 시호(柴胡)의 감별 및 분류^{13,20}), 당귀류 한약재의 감별²¹), 천궁의 기원 감별²²) 등의 중간 비교를 통한 종 감별은 물론, 인삼의 재배품종 식별을 위한 감별마커 개발하여 보고 하였다²³).

오미자(五味子)의 기원식물인 오미자과 식물의 분류학적 측면에서의 연구는 Ao⁵)는 오미자과 2속 23종의 잎 표면과 기관의 특성을 현미경으로 분석하여 *Schisandra*속이 *Kadsura*속에 비해 더 진화한 것으로 보고하였으며, Sun 등과²⁴) Yan 등은²⁵) 각각 *S. chinensis*와 *S. sphenanthera*의 microsatellite의 위치와 다형성을 분석하여 이들 개체군의 특성과 보존에 대한 기초정보를 보고하였다. 특히, Gao 등은²⁶) 화중오미자(*S. sphenanthera*)와 녹엽오미자(*S. viridis*)의

ITS 염기서열 비교-분석을 통해 녹엽오미자(*S. viridis*) 열매와 남오미자(南五味子) 감별법을 제안하였으나 국내 자생종과의 연관성은 부족하였다. 또한, 김 등이¹²) 국내에 분포하는 2속 3종에 대한 잎 형질과 광합성 특성의 비교하여 보고하였으나, 구체적인 분류체계 확립과 건조 상태의 오미자(五味子) 종 감별을 통한 혼오용 방지와 분초화적인 측면에서의 기원식물 식별을 위한 충분한 정보를 제공하지 못하였다.

본 연구에서는 대한약전과 중국약전을 기준으로 분초화적 측면에서 오미자(五味子) 기원종을 대상으로 객관성 높은 분자생물학적인 감별법을 모색하고 이들과 우리나라에 자생하는 오미자과 식물인 흑오미자(*S. nigra*)와 남오미자나무(*K. japonica*)의 분자계통학적 유연관계를 분석하고자 하였다. 따라서 대한약전에 오미자(五味子) 기원식물로 규정된 오미자(*S. chinensis*)는 물론 중국약전의 남오미자(南五味子)의 기원식물로 규정된 화중오미자(*S. sphenanthera*)와 국내에 자생하고 있는 흑오미자(*S. nigra*)와 남오미자나무(*K. japonica*)의 잎으로부터 분리한 계능유전자의 nrDNA-ITS 염기서열을 분석을 통해 중간 유연관계를 분석하고, 염기서열 비교를 통해 오미자(五味子) 기원식물의 종 감별에 활용 가능한 marker nucleotide를 선별하여 혼오용 방지 및 분자마커로 활용하기 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

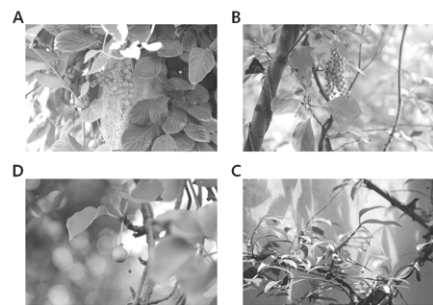


Fig. 1. A photograph of original plants. A: *Schisandra chinensis*, B: *Schisandra sphenanthera*, C: *Schisandra nigra*, D: *Kadsura japonica*.

재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용한 오미자(五味子) 기원식물은 Table 1에서 나타낸바와 같이 오미자(*S. chinensis*)는 국내의 경우 전북 장수 지역의 재배지와 강원도 평창, 춘천 등의 자생지에서 수집하였으며, 국외의 경우는 중국 요령성과 길림성의 재배지와 자생지에서 각각 수집하였다. 중국 기원종인 화중오미자(*S. sphenanthera*)는 중국 하남성 산문협시 일대의 자생지에서 수집하였으며, 국내 특산종인 흑오미자(*S. nigra*)는 제주도 난대산림연구소와 한라수목원 그리고 제주도 지역의 3대 자생지 시료를 암그루와 솟그루를 구분하여 수집하였다. 남오미자나무(*K. japonica*)는 전남 해남과 완도지역의 자생지와 제주도의 자생지로부터 2009년부터 2010년에 걸쳐 수집하였다. 수집한 시료는 분초학, 생약학, 식물분류학 등의 전문가로 구성된 분류-동정 자문회의의 동정을 거쳐 그 종을 확정지어 사용하였으며, 각 시료의 기원식물은 표본을 제작하여 한국한의약연구원 표본관에 보관하였다(Table 1).

Table 1. List of Plant Materials and Information

Medicinal Name	Scientific Name	Source	Sample Name
Schisandrae Fructus	<i>Schisandra chinensis</i> BAILL.	Jangsu Chunbuk, Korea	CCJ1
			CCJ5
		Pyeonchang Gangwon, Korea	CCP
		Chuncheon Gangwon, Korea	CCC
		Shenyang Liaoning, China	CCS
		Tilei Jilin, China	CCT
		Yanbian Jilin, China	CCY1
		Yanbian Jilin, China	CCY2
Fructus Schisandrae Sphenantherae	<i>Schisandra sphenanthera</i> REHD, et WILS.	Xanmenxia Henan, China	CSX1
		Xanmenxia Henan, China	CSX2
		Xanmenxia Henan, China	CSX3
		Xanmenxia Henan, China	CSX4
- ^a	<i>Schisandra nigra</i> MAX.	Kwanumsa Jeju, Korea	CNK
		Halla Arboretum, Jeju, Korea	CNH
		Yeongsil Jeju, Korea	CNY
		Donnaeco Jeju, Korea	CND
		Korea Forest Research Institute Jeju, Korea	CNKF1
			CNKF2
<i>Kadsura japonica</i> DUNAL		Haenam Chunnam, Korea	KJH
		Yando Chunnam, Korea	KJY
		Halla Arboretum, Jeju, Korea	KJHA
		Seogwipo Jeju, Korea	KJS
			CNKM1
	CNKM2		

^aThere is no official herbal name.

2. DNA 추출

국내의 자생지 또는 재배지에서 수집하여 -70℃에 보관중인 기원식물 생체시료 및 약재 시료를 액체질소로 급냉시켜 막자사발을 이용하여 분말상태가 되도록 마쇄한 후, DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN, Germany)을 이용하여 제작자가 제공한 protocol에 따라 추출정제하였다. 정제된 DNA의 순도와 질을 확인하기 위하여 1.5% agarose gel을 이용하여 전기영동 후, EtBr (Ethidium Bromide)로 염색하여 UV light 상에서 DNA band를 확인하였으며, UV spectrophotometer를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량 하였다.

3. nrDNA-ITS 부위 PCR 증폭

약 5~20 ng의 genomic DNA와 각 20 pmole의 ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')과 ITS4 (5'-TCC TCC GCT GAT TGA TAT GC-3') primer²⁷⁾, 그리고 1 unit의 DNA polymerase를 50 µl의 1×반응용액 (75 mM Tris-HCL (pH 8.8), 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% (v/v) Tween 20, 20 µM dNTP, 200 µM MgCl₂)에 각각 첨가하여 DNA Engine Dyad Thermal Cycler (MJ Research, USA)를 이용하여 증폭하였다. 반응조건은 95℃에서 5분간 pre-denaturation한 후 95℃에서 30초 denaturation, 51℃에서 40초 annealing, 72℃에서 1분 extension을 35회 수행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 extension 시켜 증폭하였다.

4. 염기서열 분석

nrDNA-ITS부위 증폭산물의 DNA 염기서열 분석을 위하여 total 증폭산물을 1.5% agarose gel상에서 100bp DNA ladder (Solgent, Korea)와 함께 전기영동하고 EtBr로 염색하여 관찰한 후, 정확하게 증폭된 nrDNA-ITS 증폭산물을 agarose gel로부터 회수하여 Gel Extraction Kit(QIAGEN, Germany)를 이용하여 정제한 뒤 pGEM-Teasy Vector Systems (Promega, USA)에 삽입하였다. 삽입된 증폭산물은 XL1-Blue MRF' competent cell (Stratagene, USA)에 형질 전환한 뒤 ampicillin과 X-gal/IPTG가 첨가된 LB agar 배지

에 도말하여 약 20시간 배양하였다. 각 시료별로 선별된 3개의 white colony를 액체배양하고 Plasmid mini preparation kit (SolGent, Korea)를 이용하여 plasmid DNA를 분리한 후, T7과 SP6 primer를 이용하여 ABI3730 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems, USA)에서 염기서열을 분석하고 각 시료의 nrDNA-ITS 부위 염기서열을 확정하였다.

5. 중간 유연관계 및 marker nucleotide 분석

각 시료로부터 얻은 총 24 개체의 nrDNA-ITS 염기서열을 BioEdit program(Version 7.0.9.)의 ClustalW 방법으로 multiple alignment를 수행하여 종내 개체 및 종별 염기서열을 정렬하였다. 정렬된 nrDNA-ITS 염기서열과 GenBank에 등록된 염기서열을 비교하여 ITS1, 5.8S 및 ITS2 영역을 결정하였으며, 종 특이성을 갖는 염기의 삽입(insertion), 결실(deletion) 및 치환(substitution)을 위치별로 분석하여 정리하였다. 종별 유연관계 분석은 24 개체의 nrDNA-ITS 전체 염기서열을 DNASTAR의 MegAlign program을 이용하여 ClustalW 방법으로 Phylogenetic tree를 작성하고 종별 유전적 근연관계를 비교하였다.

결과 및 고찰

1. nrDNA-ITS 염기서열 분석

국내·외 각기 다른 자생지와 재배지로부터 수집한 오미자 (*S. chinensis*) 8개 시료, 화중오미자(*S. sphenanthera*) 4개 시료, 흑오미자(*S. nigra*) 8개 시료 및 남오미자나무(*K. japonica*) 4개 시료의 잎으로부터 추출한 게놈 유전자를 주형으로 하여 nrDNA와 ITS 부위를 ITS1과 ITS4 primer²⁷⁾로 PCR 증폭하여 약 750bp의 증폭산물을 확보하였으며, 이를 nrDNA-ITS라 정의하였다(Fig. 1). 24개 시료로부터 확보한 nrDNA-ITS 증폭산물을 pGEM-Teasy vector에 삽입한 뒤, 각 시료별 3개 이상의 염기서열을 해석하고 이들을 비교하여 각 시료의 최종 nrDNA-ITS 염기서열을 확정하였다. 확정된 각 시료의 염기서열을 분석하여 중간 염기서열을 비교한 결과, ITS1과 ITS4 primer에 의해 증폭된 전체 nrDNA-ITS의 크기는 오미자(*S. chinensis*)는 759-760bp, 화중오미자

(*S. sphenanthera*)는 760bp, 흑오미자(*S. nigra*)는 759bp 그리고 남오미자나무(*K. japonica*)는 760-762bp로 구성되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 1, Table 2). 코딩부위보다 진화가 빠른 것으로 알려진¹⁹⁾ ITS1과 ITS2 부위의 염기서열을 중별 비교·분석한 결과, ITS1 부위는 오미자(*S. chinensis*) 281-282bp, 화중오미자(*S. sphenanthera*)와 흑오미자(*S. nigra*) 282bp, 남오미자나무(*K. japonica*) 282-284bp로 나타났으며, ITS2 부위는 오미자(*S. chinensis*), 화중오미자(*S. sphenanthera*) 및 남오미자나무(*K. japonica*)가 226bp, 흑오미자(*S. nigra*)는 225bp로 구성되어 있음을 알 수 있었다. nrDNA-ITS 부위의 전체 G+C의 염기조성은 4종의 오미자(*S. chinensis*)가 55.13-55.79%로 나타나 중간 DNA의 구조와 물리적 특성은 큰 차이를 보이지 않고 비슷한 것으로 나타났다. 반면 ITS1과 ITS2 각각 부위의 G+C 염기조성은 ITS1 부위가 50.71-51.77%, ITS2 부위가 59.29-60.89%로 앞서 보고된 시호²⁰⁾와 천궁²²⁾ 등, 다른 식물에 비해 ITS1 부위는 비교적 낮게 나타난 반면, ITS2 부위는 비교적 높게 나타났다(Table 2). 중별 삽입/결실 및 치환을 분석한 결과, 변이 또한 ITS1 부위와 ITS2 부위가 각각 21개 위치와 16개 위치로 ITS1에서 많이 일어남을 알 수 있었다(Fig. 3-4).



Fig. 2. Schematic diagram of the PCR amplified nrDNA-ITS region of *Schisandra* and *Kadsura* species.

식물은 기후, 토양, 주변환경 등 생태적 요인에 따라 유전적 변이를 통해 적응하고 진화한다. 4종의 오미자과 식물의 환경적 요인에 의한 변이의 정도를 알아보기 위해 국내·외 서로 다른 자생지나 재배지에서 수집한 개체별 변이를 nrDNA-ITS 염기서열 분석을 통해 조사한 결과, 4종 모두 ribosomal RNA 유전자 부위에서는 변이가 관찰되지 않았고 ITS1과 ITS2 부위에서는 종내 변이가 관찰되었으나 미미한 수준임을 알 수 있었다(Fig. 3-4). 4종의 오미자과 식물을 중별로 비교한 결과에서는 화중오미자(*S. sphenanthera*)와 남오미자나무(*K. japonica*)가 다른 종에 비해 변이의 빈도가 높게 나타났으며, 남오미자나무(*K. japonica*)의 경우에는 한라

수목원에서 수집한 시료(KJHA)에서 높게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 3-4). 국내·외 다양한 지역의 서식지나 재배지에서 수집한 시료로부터 확보한 이러한 결과는 오미자과 식물은 종내 변이가 적고 안정적인 유전특성을 가지는 식물종임을 간접적으로 확인할 수 있었으며, nrDNA-ITS 부위 염기서열을 통한 원산지 판별에 활용 가능한 SNPs(Single Nucleotide Polymorphi)는 확인할 수 없었다(Fig. 3-4).

2. ITS 부위 염기변이를 이용한 종 감별용 marker nucleotide 분석

우리나라와 중국의 오미자(五味子) 기원식물의 차이에서 비롯되는 오미자(五味子)와 남오미자(南五味子)의 혼·오용 방지와 국내 자생 오미자과 식물인 흑오미자(*S. sphenanthera*)와 남오미자나무(*K. japonica*)의 식별을 위해 *matK* 유전자와 18S 유전자 분석을 통한 대황류 감별¹⁵⁾이나 ITS 염기서열 분석을 통한 시호류²⁰⁾와 천궁류 감별용 marker nucleotide를 개발하여 보고한 결과²²⁾를 토대로 오미자과 식물 4종 24개 시료의 nrDNA-ITS 부위 염기서열의 삽입/결실이나 치환을 중별로 분석하였다(Fig. 3-4). 종내 변이를 제외한 종 특이적 삽입/결실 및 치환을 토대로 marker nucleotide를 분석한 결과, 오미자(*S. chinensis*)는 148번 염기(ITS1 118번 염기, C↔T), 259번 염기(ITS1 229번 염기, C↔T), 그리고 485번 염기(ITS2 6번 염기, A↔T) 3개 위치에서 화중오미자(*S. sphenanthera*), 흑오미자(*S. nigra*) 및 남오미자나무(*K. japonica*)와 다른 염기로 치환되어 차이를 보임을 알 수 있었다(Fig. 3-4, Table 3). 화중오미자(*S. sphenanthera*)의 경우는 514번(ITS2 35번 염기, G↔T)과 700번 염기(ITS2 221번 염기, T↔A) 2개의 위치에서, 흑오미자(*S. nigra*)는 183번(ITS1 153번, A↔T), 190번(ITS1 160번, G↔A), 238번(ITS1 208번, C↔T), 307번(ITS1 227번, T↔C), 528번(ITS2 49번, T↔결실), 532번(ITS2 53번, A↔G) 및 667번(ITS2 188번, T↔C) 7개 위치에서 각각의 종 감별이 가능한 종특이 marker nucleotide를 확인할 수 있었다(Fig. 3-4, Table 3). 또한 남오미자나무(*K. japonica*)는 3개의 삽입 및 1개의 결실과 14개 염기의 치환을 포함하여 총 17개의 위치에서 다른 3종과 구별 가능한 종 특이 marker nucleotide를 확인하였다(Fig. 3-4, Table 3).

Table 2. Sequence Characteristics of the nrDNA-ITS Region from Plant Samples of *Schisandrae* Fructus.

Species	Sample	nrDNA-ITS		ITS 1		ITS2	
		Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)
<i>S. chinensis</i>	CCJ1	760	55.66	282	51.77	226	59.73
	CCJ5	760	55.66	282	51.77	226	59.73
	CCP	760	55.66	282	51.77	226	59.73
	CCC	759	55.60	281	51.60	226	59.73
	CCS	760	55.66	282	51.77	226	59.73
	CCT	760	55.66	282	51.77	226	59.73
	CCY1	760	55.66	282	51.77	226	59.73
	CCY2	760	55.66	282	51.77	226	59.73
<i>S. sphenanthera</i>	CSX1	760	55.13	282	50.71	226	59.29
	CSX2	760	55.13	282	50.71	226	59.29
	CSX3	760	55.26	282	50.71	226	59.73
	CSX4	760	55.26	282	50.71	226	59.73
<i>S. nigra</i>	CNK	759	55.60	282	50.71	225	60.89
	CNH	759	55.60	282	50.71	225	60.89
	CNY	759	55.60	282	50.71	225	60.89
	CND	759	55.60	282	50.71	225	60.89
	CNKF1	759	55.60	282	50.71	225	60.89
	CNKF2	759	55.60	282	50.71	225	60.89
	CNKM1	759	55.60	282	50.71	225	60.89
	CNKM2	759	55.60	282	50.71	225	60.89
<i>K. japonica</i>	KJH	762	55.64	284	51.41	226	60.18
	KJY	762	55.64	284	51.41	226	60.18
	KJHA	760	55.79	282	51.77	226	60.62
	KJS	762	55.64	284	51.41	226	60.18

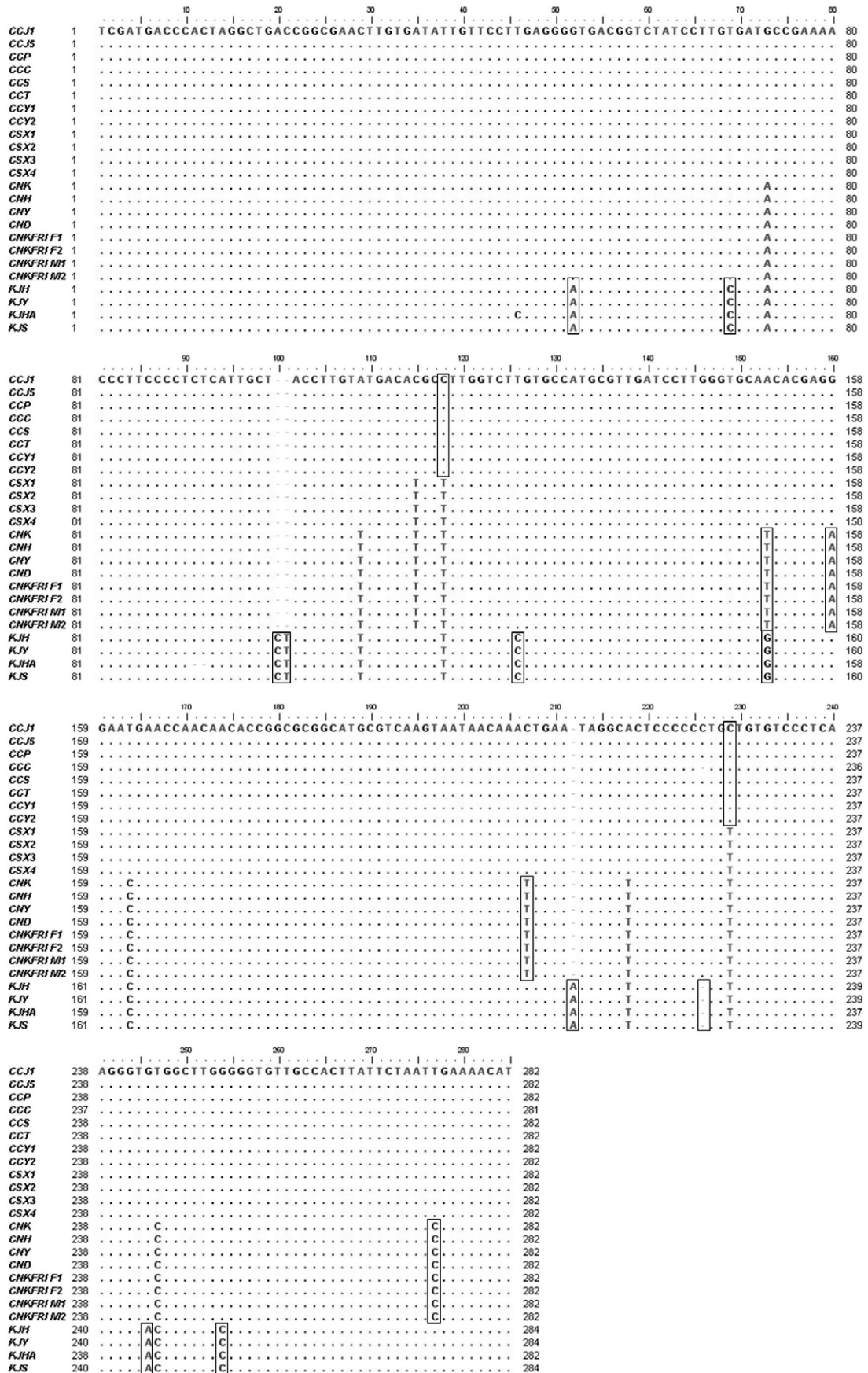


Fig. 3. Comparison of ITS1 sequences. Dots (·) indicate the identical sequences with *S. chinensis* and dashes (–) represent gaps that were introduced to maximize alignment. The boxes indicate species-specific nucleotide sequences.

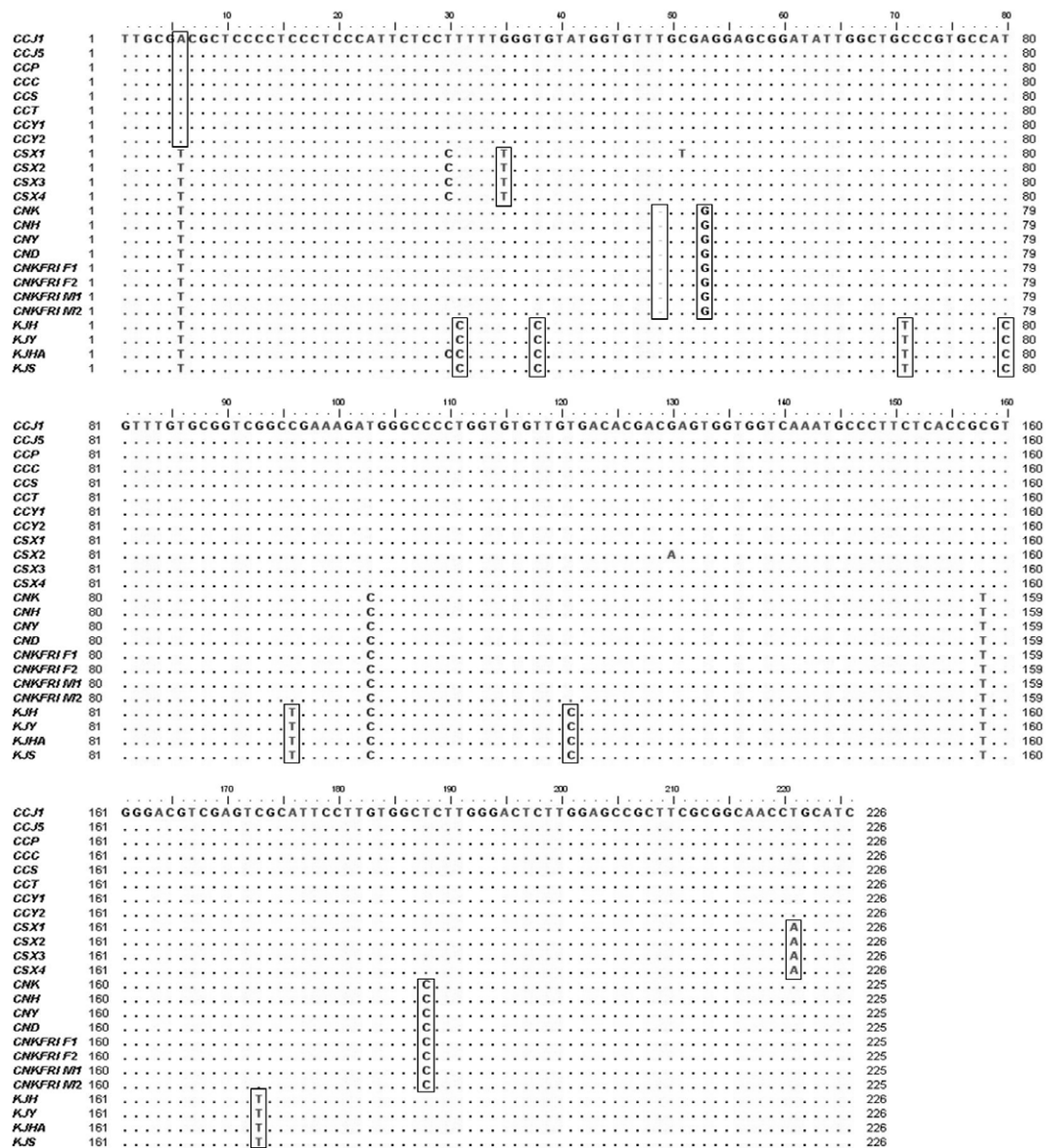


Fig. 4. Comparison of ITS2 sequences. Dots (·) indicate the identical sequences with *S. chinensis* and dashes (-) represent gaps that were introduced to maximize alignment. The boxes indicate species-specific nucleotide sequences.

따라서 오미자(五味子)의 감별은 Yang 등¹⁵⁾이 제시한 대황류 중 감별용 *matK* 유전자와 18S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 개발한 유전자 마커, Kim 등²³⁾이 제시한 ITS 염기서열 분석을 통한 인삼의 품종 감별용 유전자 마커, 그리고 문 등²⁰⁾과 안 등²²⁾이 ITS 염기서열 분석을 통해 제시한 시호류와 천궁류 감별을 위한 유전자 마커처럼 우리나라와 그 기원종이 다른 화중오미자(*S. sphenanthera*)는

물론 국내에 자생하는 오미자과 식물의 동정이나 한약재의 진위를 감별을 위한 유전자 마커로 유용하게 활용이 가능할 것으로 판단된다. 하지만 중국에만 약 30여종의 *Schisandra* 속과 *Kadsura*속의 오미자과 식물이 자생하는 것으로 알려져 있어, 보다 체계적이고 폭넓은 연구를 통한 이들의 계통 분류와 혼-오용 방지를 위한 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

Table 3. Summary of Marker Nucleotides from Comparison of the nrDNA-ITS Sequences among 24 Samples for *Schisandrae Fructus*.

Seq. No.	nrDNA-ITS	82	99	130	131	148	156	183	190	238	242	256	259	276	284	307
	ITS1	52	69	100	101	118	126	153	160	208	121	226	229	246	254	277
<i>S. chinensis</i>		C	T	-	-	C	T	A	G	C	-	C	C	G	G	T
<i>S. sphenanthera</i>		·	·	-	-	T	·	·	·	·	-	·	T	·	·	·
<i>S. nigra</i>		·	·	-	-	T	·	T	A	T	-	·	T	·	·	C
<i>K. japonica</i>		A	C	C	T	T	C	G	·	·	A	-	T	A	C	·
Seq. No.	nrDNA-ITS	485	510	514	517	528	532	550	559	575	600	652	667	700		
	ITS2	6	31	35	38	49	53	71	80	96	121	173	188	221		
<i>S. chinensis</i>		A	T	G	T	T	A	C	T	C	T	C	T	T		
<i>S. sphenanthera</i>		T	·	T	·	·	·	·	·	·	·	·	·	A		
<i>S. nigra</i>		T	·	·	·	-	G	·	·	·	·	·	C	·		
<i>K. japonica</i>		T	C	·	C	·	·	T	C	T	C	T	·	·		

3. 종간 유연관계 분석

우리나라 약전 및 중국 약전에서 규정하고 있는 오미자(五味子) 기원종인 오미자(*S. chinensis*) 및 화중오미자(*S. sphenanthera*)와 국내 자생종인 흑오미자(*S. nigra*)와 *Kadsura*속 남오미자나무(*K. japonica*)의 국내·외 자생지와 재배지에서 수집하여 이들의 유전다양성과 종간 유연관계 분석을 위하여 전체 nrDNA-ITS 염기서열을 이용하여 DNASTAR의 MegAlign 프로그램을 이용하여 ClustalW 분석 및 phylogenetic tree를 작성하였다. ClustalW 분석을 기반으로 4종 24 개체의 유연관계를 분석한 결과, 4종 모두 종별 유집을 형성하는 것을 확인할 수 있었으며, 우리나라 오미자(五味子) 기원종인 오미자(*S. chinensis*)와 중국 남오미자(南五味子) 기원종인 화중오미자(*S. sphenanthera*)와 유전적 거리가 가까운 것으로 나타났다(Fig. 5). 또한 *Schisandra*속의 한국 특산종인 흑오미자(*S. nigra*)는 오미자(*S. chinensis*)나 화중오미자(*S. sphenanthera*)와의 유전적 거리가 *Kadsura*속의 남오미자나무(*K. japonica*)에 비해 더 가까운 것으로 나타났다(Fig. 5). 이상의 결과로부터 오미자와 식물을 *Schisandra*속과 *Kadsura*속으로 나누는 기존의 분류 체계에 대한 분자생물학적 접근을 통한 자료를 제공할 수 있었으며, 보다 정확한 분류체계 확립과 계통학적 측면에서의 연구는 Ao⁵⁾가 보고한 2속 23종의 오미자와 식물과 국내 특산종인 흑오미자(*S. nigra*)와 남오미자나무(*K. japonica*)를 추가하여 보다 다양한 종을 대상으로 하여 체계적인 연구를 통해 확인할 필요가 있음을 알 수 있었다.

본 연구에서는 오미자와 식물 전체의 분류학적 연구보다 우리나라와 중국이 그 기원종을 달리하고 있고 국내에도 형태적으로 유사한 종이 자생하고 있어 우리나라 약전이 규정하지 않는 다른 종류의 오미자와 식물의 열매가 수입 또는 생산되어 오미자(五味子)로 혼·오용되는 것을 방지하고 이를 식별할 수 있는 감별법의 개발에 중점을 두고 진행하였다. 현재 대한약전에 의하면 오미자(五味子)는 쉬잔드린(C24H32O7, 432.51), 고미신 A(C23H28O7, 416.46) 및 고미신 N(C23H28O6, 400.47)의 함이 0.7% 이상 함유되어야 한다고 규정하고 있다. 이러한 이화학적 품질규격에 앞서 ITS 부위의 염기서열 분석을 통해 종 수준에서 정품과 위품을 감별하고, 확인된 정품은 쉬잔드린과 고미신으로 오미자(五味子)의 품질을 관리한다면 보다 안정된 한약의 품질확보에 이바지 할 것이다. 따라서 본 연구에서 제시하는 4종의 오미자와 식물의 열매를 객관적으로 감별에 활용할 수 있는 marker nucleotide는 대한약전이 규정하고 있는 정품 오미자(五味子)의 감별을 통해 한약표준화에 기여할 것으로 판단된다.

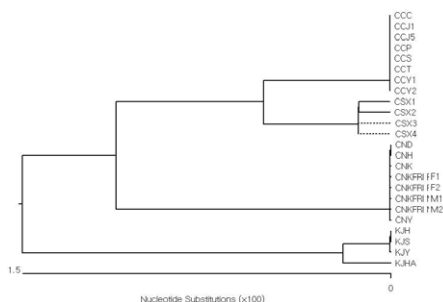


Fig. 5. Phylogenetic tree assembled by the ClustalW method of *Schisandra* and *Kadsura* species.

결론

본 연구는 오미자(五味子)로 수입되거나 생산되어 혼·오용될 수 있는 화중오미자(*S. sphenanthera*), 흑오미자(*S. nigra*) 및 남오미자나무(*K. japonica*)로부터 정품의 오미자(五味子)를 분자수준에서 감별할 수 있는 객관적 방법을 개발하기 위하여 nrDNA-ITS 염기서열 분석을 통하여 다음과 같은 유의적인 결과를 얻을 수 있었다.

1. 국내·외 다양한 자생지에서 수집한 오미자와 식물의 nrDNA-ITS 염기서열을 분석으로 오미자(*S. chinensis*), 화중오미자(*S. sphenanthera*), 흑오미자(*S. nigra*) 및 남오미자나무(*K. japonica*)는 종내 변이가 적고 종간 변이의 폭이 크지 않은 것으로 보아 유전적으로 매우 안정적임을 알 수 있었으며, ITS1의 길이가 다른 식물 종에 비하여 길고 ITS2의 G+C 염기조성이 약 60%로 다른 식물 종에 비해 높게 나타났다.
2. 오미자와 식물의 종별 nrDNA-ITS 부위 염기서열을 비교하여 3개 염기의 위치와 종류를 통해 대한약전에 규정된 오미자(五味子)를 다른 3종의 오미자와 식물의 열매로부터 감별할 수 있었으며, 화중오미자(*S. sphenanthera*)는 2개, 흑오미자(*S. nigra*)는 7개, 그리고 남오미자나무(*K. japonica*)는 17개 위치에서 염기서열의 삽입/결실 및 치환을 확인으로 종을 구별할 수 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 ‘한의본초활용기반구축사업(K10020)’의 지원에 의해 수행되었으며, 기원식물 수집과 분류·동정에 도움을 주신 분류·동정자문위원님들께 감사드립니다.

참고문헌

1. Lee JS, Lee MG, Lee SW. A study on the general components and minerals in parts of Omija (*Schisandra chinensis* Baillon). Korean J. Dietary Culture. 1989;4:173-176.
2. 육창수. 아세아 생약도감. 서울:도서출판 경원. 1997; 172.
3. 안덕균. 원색 한국본초도감. 서울:교학사. 1998;740.
4. 배기환. 한국의 약용식물. 서울:교학사. 2001;654.
5. Ao CQ. Morphological characters of leaf epidermis in *Schisandraceae* and their systematic significance. Journal of Plant Biology. 2006;49;80-87.
6. 이창복. 원색대한식물도감 상권. 서울:향문사. 2003;914.
7. Kim KS, Park CG, Bang JK. Varietal and yearly differences of Lignan contents in fruits of collected lines of *Schisandra chinensis* Baillon. Korean J. Medicinal Crop Sci. 2003;11:71-75.
8. 우석대학교 한의과대학 본초방제학교실. 운곡 한약재의 기

- 원 및 산지 총람. 파주:한국학술정보(주). 2009:307-308.
9. 류일환, 권태오, 이강수, 윤용갑. 오미자 효소 가수분해물에 의한 장내 세균총 개선 및 장관 염증 억제 효과의 효소학적 평가. 생약학회지. 2007;38:363-371.
 10. 김순임, 심기현, 주신윤, 한영실. 추출 조건에 따른 오미자 추출물의 항산화 및 혈당 강하에 관한 연구. 한국식품영양학회지. 2009;22:41-47.
 11. 조영재, 주인식, 김병철, 이우식, 김미자, 이병구, 안봉전, 김정환, 권오준. 오미자(*Schisandra chinensis* Baillon) 추출물의 생리활성. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 2007;50:198-203.
 12. Kim PG, Lee KY, Kim SH, Han SS. Foliar characteristics and photosynthetic efficiency of three species of *Schisandraceae* trees distributed in Korea. Korean J. Agricultural and Forest Meteorology. 1999;:1:90-96.
 13. Veves SS, Watson MK. Phylogenetic relationship in *Bupleurum* (Apiaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequence data. Annals of Botany. 2004;93:1-20.
 14. Yan P, Pang QH, Jiao XW, Zhao X, Shen YJ, Zhao SJ. Genetic variation and identification of cultivated *Fallopia multiflora* and its wild relatives by using chloroplast *matK* and 18S rRNA gene sequences. Planta Med. 2008;74:1504-1509.
 15. Yang DY, Fushimi H, Cai SQ, Komatsu K. Molecular analysis of Rheum species used as Rhei Rhizoma based on the chloroplast *matK* gene sequence and its application for identification. Biol. Pharm. Bull. 2004;27:375-383.
 16. Zhao ZL, Leng CH, Wang ZT. Identification of *Dryopteris crassirhizoma* and the adulterant species based on cpDNA *rbcl* and translated amino acid sequences. Planta Med. 2007;73:1230-1233.
 17. Jigden B, Wang H, Kim YJ, Samdan N, In JG, Yang DC. Molecular identification of oriental medicinal plant *Schizonepeta tenuifolia* bunge (Hyung-Gae) by multiplex PCR. Plant Biotechnol Rep. 2010;4:223-228.
 18. Sucher NJ, Carles MC. Genome-based approaches to the authentication of Medicinal Plants. Planta Med. 2008;74:603-623.
 19. 김영동, 박종욱, 선병윤, 김기중, 이은주, 김성희. 돼지풀 및 단풍잎돼지풀의 ITS 염기서열 변이. 한국식물분류학회지. 2005;35:273-285.
 20. 문병철, 추병길, 지윤의, 윤태숙, 이아영, 전명숙, 김보배, 김호경. rDNA-ITS 염기서열 분석을 통한 시호 종 감별용 유전자 마커 개발 및 유연관계 분석. 대한본초학회. 2009;24:59-68.
 21. Choi HY, Choi YJ, Lee JH, Ham I. Sequencing analysis on the ITS region and AFLP analysis to identify dried medicinal *Angelica* species. Kor. J. Herbology. 2004;19:91-99.
 22. 송임근, 안보람, 서부일, 박선주. 천궁의 기원과 식별을 위한 분자마커. 대한본초학회지. 2009;24:1-8.
 23. Kim OT, Bang KH, In DS, Lee JW, Kim YC, Shin YS, Hyun DY, Lee SS, Cha SW, Seong NS. Molecular authentication of ginseng cultivars by comparison of internal transcribed spacer and 5.8S rDNA sequences. Plant Biotechnol Rep. 2007;1:163-167.
 24. Sun Y, Liu YF, Huang HW. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Schisandraceae). Conservation Genet Resour. 2009; :119-121.
 25. Yan B, Wang J, Chen G, Wang T. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in a traditional Chinese medicinal plant, *Schisandra sphenanthera*. Conserv Genet. 2009; 10:615-617.
 26. Gao JP, Wang YH, Qiao CF, Chen DF. Ribosomal DNA ITS sequences analysis of the Chinese crude drug fructus schisandrae sphenantherae and fruits of Shisandra viridis. Zhonghuo Zhong Yao Za Zhi. 2003;28:706-710.
 27. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocol: A guide to method and applications. New York : Academic Press. 315-322.