

## DNA 바코드 분석을 통한 패장 기원종 감별용 분자 마커 개발

김욱진, 지윤의, 이영미, 강영민, 최고야, 김호경, 문병철<sup>#,\*</sup>

한국한의학연구원 한약자원그룹

### Development of Molecular Marker for the authentication of *Patriniae Radix* by the analysis of DNA barcodes.

Wook Jin Kim, Yunui Ji, Young Mi Lee, Young Min Kang  
Goya Choi, Ho Kyoung Kim, Byeong Cheol Moon<sup>#,\*</sup>

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

#### ABSTRACT

**Objectives** : Due to the morphological similarity of in the roots of herbal medicine, the official herbal medicine is very difficult to authenticate between the original plants of *Patriniae Radix* and two adulterant *Patrinia* species. Therefore, we introduced DNA barcode analysis to establish a powerful tool for the authentication of *Patriniae Radix* from its adulterants.

**Methods** : To analyze DNA barcode regions, genomic DNA was extracted from twenty-nine specimens of *Patrinia scabiosaefolia*, *Patrinia villosa*, *Patrinia saniculifolia*, and *Patrinia rupestris*, and internal transcribed spacer 2(ITS2), *matK* and *rbcl* genes were amplified. For identification of species specific sequences, a comparative analysis was performed by the ClustalW based on entire sequences of ITS2, *matK* and *rbcl* genes, respectively.

**Results** : In comparison of three DNA barcode sequences, we identified 22, 22, and 12 species-specific nucleotides enough to distinguish each four species from ITS2, *matK* and *rbcl* gene, respectively. The sequence differences at the corresponding positions were available genetic marker nucleotides to discriminate the correct species among analyzed four species. These results indicated that comparative analysis of ITS2, *matK* and *rbcl* genes were useful genetic markers to authenticate *Patriniae Radix*.

**Conclusions** : The marker nucleotides enough to distinguish *P. scabiosaefolia*, *P. villosa*, *P. saniculifolia*, and *P. rupestris*, were obtained at 22 SNP marker nucleotides from ITS2 and *matK* DNA barcode sequences, but they were confirmed at 12 SNP marker nucleotides from *rbcl*. These differences could be used to authenticate *Patriniae Radix* from its adulterants as well as discriminating each four species.

**Key words** : DNA barcode, *Patriniae Radix*, internal transcribed spacer 2 (ITS2), *matK* gene, *rbcl* gene, molecular authentication

#### 서론

한의학에서 패장은 성미가 寒苦辛하여, 소종배농(消腫排膿), 청열해독(淸熱解毒)의 효능으로 폐옹(肺癰), 폐농양(肺膿瘍), 간농양(肝膿瘍), 자궁내막염(子宮內膜炎), 자궁부속기염(子宮附屬器炎), 난소낭종(卵巢囊腫) 등의 염증성 질환에 양호한 치료효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 우리나라에 자생하

고 있는 같은 과(Family)의 동속(Genus) 식물로는 돌마타리(*Patrinia rupestris*)와 금마타리(*Patrinia saniculifolia*)가 자생하고 있으며, 예부터 마타리과 식물의 뿌리, 잎은 정신병 질환, 신경쇠약증, 불면증, 진정 등을 치료하는 민간약으로 이용되었다<sup>2)</sup>. 패장(敗醬)은 대한민국약전의 한약(생약)규격집에 마타리과(Valerianaceae)의 똑갈 *Patrinia villosa* Jussieu 또는 마타리 *Patrinia scabiosaefolia* Fischer ex Link의 뿌

<sup>\*,#</sup>Correspondence and First Author. Byeong Cheol Moon, Herbal Medicine Resources Group, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon 305-811, Republic of Korea.

· Tel : +82-42-868-9530 · FAX : +82-42-868-9541 · E-mail : bcmoon@kiom.re.kr

· Received : 13 October 2014 · Revised : 10 November 2014 · Accepted : 11 November 2014

리로 그 기원을 규정하고 있으며<sup>3)</sup>, 중화인민공화국약전 부록에서는 마타리와 똑갈의 전초를 패장초로 규정하고 있다<sup>3)</sup>. 하지만 패장은 황화패장과 백화패장으로 구분되어 황화패장인 마타리는 급성췌장염 억제효과, 궤양성 대장염 억제효과, 골수암 세포주에서 항암효과 등이 알려져 있고 백화패장인 똑갈은 항염효과, 정유성분의 항산화효과, 항암효과 등이 알려져 있어 각각은 염증억제에 대한 효능이 주류를 이루고 있음을 알 수 있으나 세부적인 효능을 비교하면 차이를 보인다<sup>4)</sup>. 따라서 황화패장과 백화패장의 개별 효능은 보다 상세한 비교·분석을 통해 구체적인 효능의 차이를 검토할 필요가 있으며, 약재 상태에서의 황화패장과 백화패장의 정확한 구별과 더불어 혼·오용 가능성이 높은 같은 속의 돌마타리나 금마타리와 구별이 필요한 실정이다.

최근 분자생물학의 발전과 염기서열 분석기술의 발달로 유전자 분석을 통한 식물 분류 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 국제생물바코드 컨소시엄(CBOL, Consortium of Barcoding of Life)에서 식물의 특정 유전자 부위의 염기서열정보로 이루어진 DNA 바코드를 이용하여 종의 판별 및 분자계통학적 연구가 가능한 것을 보고하고 있다<sup>5)</sup>. DNA 바코드로 이용되는 대표적인 유전자 부위로 핵의 리보솜 RNA 유전자(Nuclear Ribosomal RNA gene, rDNA)에 존재하는 internal transcribed spacer(ITS) 부위, *matK*, *rbcl*, *psbA-trnH* 유전자 등이 식물 종 판별을 위한 유전자 후보로 제시하고 있으며, 이들 유전자를 이용한 객관적인 식물 분류체계 확립 및 종간 유연관계 분석을 위한 분자계통학적 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>6,7)</sup>. 특히 계통상에 존재하는 ITS 부위는 다른 유전자의 코딩 부위보다 빠르게 진화하고 일반성, 단순성, 재현성 등의 이점으로 인해 계통분류나 종간 유전변이 탐색 등을 위해 이용되는 염기서열로 알려져 있다<sup>8)</sup>. 또한, *matK* 및 *rbcl* 유전자 부위는 대부분의 식물 종에서 잘 보존되어있는 염기서열로 CBOL에서 식물 DNA 바코드 후보로 활발하게 연구를 진행하여 DB화 하고 있다<sup>9,10)</sup>. 이러한 DNA 바코드 분석기술은 혼·오용 한약재인 반하<sup>11)</sup>, 천궁<sup>12)</sup>, 시호<sup>13)</sup>, 오미자<sup>14)</sup> 등의 다양하게 품목의 적용되어 한약재의 객관적 감별법 개발에 응용되고 있다.

본 연구에서는 황화패장인 마타리와 백화패장인 똑갈, 그리고 이들과 뿌리와 약재 가공시 형태가 유사하여 혼·오용될 가능성이 있는 돌마타리와 금마타리를 국내·외 다양한 자생지에서 수집하여 대표적으로 이용되고 있는 DNA 바코드 부위인 ITS2, *matK*, *rbcl* 유전자의 염기서열 정보 분석을 통해 종 단위에서 명확하게 감별할 수 있는 DNA marker nucleotide를 발굴하고 분자마커를 개발하여 패장의 구별과 혼·오용 방지를 위한 감별법으로 활용하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

본 실험에 이용된 기원식물 시료는 경상도, 전라도, 충청도 등의 각각 다른 국내 자생지에서 수집하였고 국외의 경우 중국 길림성 연길시, 화룡시, 장백현 등지의 다른 자생지와 재배지에서 수집하여 마타리 8개, 똑갈 5개, 돌마타리 4개, 그

리고 금마타리 12개의 시료를 분석에 이용하였다(Table 1). 수집한 시료는 본초학, 생약학, 식물분류학 등의 전문가로 구성된 분류·동정 자문회의 동정을 거쳐 그 종을 최종 확정지어 사용하였으며, 각 시료의 기원식물은 압착 표본을 제작하여 한국한의학연구원 한약표준표본관(KHSHR)에 표본번호를 부여하여 보관하였다.

Table 1. List and Information of Plant Materials Used in This Study.

Name		Source	Sample Name
Scientific plant	Herbal medicine		
<i>Patrinia scabiosaefolia</i> Fischer ex Link	Patriniae Radix (BaiJiang, PaeJang)	Jangsu, Jeonbuk, Korea	JS
		Cheonan, Chungnam, Korea	CA
		Gapyeong, Gyeonggi, Korea	GP
		Geochang, Gyeongnam, Korea	GC
		Yeongdong, Chungbuk, Korea	YD
		Gangneung, Gangwon, Korea	KR
		Yanji, Jilin, China	Cn_YK
Wangqing, Jilin, China	Cn_WC		
<i>Patrinia villosa</i> Jussieu	Patriniae Radix (BaiJiang, PaeJang)	Jangsu, Jeonbuk, Korea	JS
		Cheonan, Chungnam, Korea	MC
		Gapyeong, Gyeonggi, Korea	GP
		Yeongdong, Chungnam, Korea	YD
		Gangneung, Gangwon, Korea	HY
<i>Patrinia rupestris</i> (Pall.) Juss.	-†	Yanji, Jilin, China	Cn_YK
		Helong, Jilin, China	Cn_HR
		Changbai, Jilin, China	Cn_JB
		Wangqing, Jilin, China	Cn_WC
<i>Patrinia saniculifolia</i> Hemsl.	-†	Pyeongchang, Gangwon, Korea	PC#1
		Pyeongchang, Gangwon, Korea	PC#2
		Seongju, Gyeongbuk, Korea	SJ#1
		Seongju, Gyeongbuk, Korea	SJ#2
		Seongju, Gyeongbuk, Korea	SJ#3
		Seongju, Gyeongbuk, Korea	SJ#4
		Seongju, Gyeongbuk, Korea	SJ#5
		Gapyeong, Gyeonggi, Korea	GP#1
		Gapyeong, Gyeonggi, Korea	GP#2
		Gapyeong, Gyeonggi, Korea	GP#3
		Gapyeong, Gyeonggi, Korea	GP#4
		Gapyeong, Gyeonggi, Korea	GP#5

†There is no appropriated name.

### 2. DNA 추출

-70℃의 초저온 냉동고에 보관된 국내·외 자생지 또는 재배지에서 수집한 기원식물 생체시료는 액체질소로 급냉시켜 막자와 사발을 이용하여 분말상태로 마쇄한 후, DNasey Plant Mini Kit(QIAGEN, CA, USA)을 이용하여 DNA를 추출·정제하였다. 정제된 DNA는 1.5% agarose gel 상에 전기영동 후, Ethidium Bromide(EtBr)로 염색하여 UV light에서 DNA 절편을 확인하였으며, UV spectrophotometer(Nanodrop ND-1000, DE, USA)를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량 하였다.

### 3. DNA 바코드 부위 PCR 증폭 및 염기서열 분석

약 20 ng의 total DNA를 주형으로 각 10 pmole의 정량향, 역방향 primer(Table 2) 및 2×PCR pre-mix(Solgent,

Daejeon, Korea)를 최종 30  $\mu$ l의 반응용액에 첨가하여, DNA Engine Dyad Thermal Cycler(Bio-rad, CA, USA)에서 95°C에서 5분간 pre-denaturation 한 후, 95°C에서 30초 denaturation, 55°C에서 30초 annealing, 72°C에서 1분 extension을 35회 수행하고 72°C에서 10분간 extension 시켰다. 반응이 끝난 증폭산물은 1.5% agarose gel 상에서 증폭 여부를 확인하였고 단일 DNA 절편으로 확인된 증폭산물은 Gel extraction kit(QIAGEN, CA, USA)을 이용하여 정제 후 pGEM-Teasy vector(Promega, WI, USA)에 삽입하였다. 삽입된 증폭 산물은 XL1-Blue MRF' competent cell (Stratagene, CA, USA)에 형질 전환하여 각 시료별 3개의 colony를 선별하였으며 T7과 SP6 primer 부위로부터 ABI3730 automatic DNA sequencer(Applied Biosystems, CA, USA)를 이용하여 분석된 염기서열을 시료의 표준 염기서열로 선정하여 DNA 바코드 분석에 이용하였다.

#### 4. 종 판별용 marker nucleotide 발굴

최종 확증된 각 시료별 29개체의 ITS2, *matK*, *rbcl* 유전자 염기서열을 DNA 바코드 종류별로 BioEdit program(Version 7.0.9, Tom Hall Ibis Biosciences, CA, USA)의 ClustalW 방법으로 multiple alignment를 수행하여 종내 개체 및 종별 염기서열을 정렬하였다<sup>15)</sup>. 정렬된 ITS2, *matK* 및 *rbcl* 염기서열의 종내 개체별 비교와 종별 비교를 통해 종 특이성을 갖는 염기의 삽입(insertion), 결실(deletion) 및 치환(substitution)을 위치별로 분석하여 정리하였다(Table 2).

Table 2. The Gene and Primer Sequence Information of DNA Barcodes Used in This Study.

gene	primer name	Sequence(5'→3')	annealing temperature	reference
ITS2	ITS2-S2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	55°C	White <i>et al.</i> <sup>16)</sup> Chen <i>et al.</i> <sup>17)</sup>
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
<i>matK</i>	<i>matK</i> -AF	CTATATCCACITATCTTTCAGGAGT	55°C	Kato <i>et al.</i> <sup>18)</sup>
	<i>matK</i> -8R	AAAGTTCTAGCACAAAGAAAGTCGA		
<i>rbcl</i>	<i>rbcl</i> -F	ATGTCACCCAAACAGAACTAAAGC	55°C	Mansion <i>et al.</i> <sup>19)</sup>
	<i>rbcl</i> -R	TCCTTTTAGTAAAAGATTGGGCCGAG		

## 결 과

### 1. DNA 바코드 부위 증폭 및 염기서열 분석

패장의 감별을 위하여 4종 29개의 시료로부터 추출한 게놈 유전자를 주형으로 ITS2, *matK*, *rbcl* 유전자 부위를 PCR 증폭하여 전기영동으로 확인한 결과, 4종 29개 시료에서 모

두 단일 DNA 절편이 증폭되었고 ITS2 유전자 부위는 약 400bp, *matK* 유전자 부위는 약 1,250bp, 그리고 *rbcl* 유전자부위는 약 1,450bp 크기의 DNA 증폭산물을 확보하여 이를 각 시료의 ITS2, *matK* 및 *rbcl* 바코드 부위로 정의하였다. 각 시료로부터 얻은 DNA 바코드 PCR 증폭산물을 pGEM-Teasy vector (Promega, USA)에 삽입한 뒤, 각 시료별로 3개 이상의 Plasmid DNA를 추출하여 삽입된 증폭산물의 염기서열을 해석하고 이들을 비교하여 각 시료의 최종 유전자 염기서열로 확정하였다. 확정된 각 시료의 유전자 염기서열을 분석한 결과, ITS2 부위는 똑갈, 마타리 및 돌마타리는 389 bp의 염기로 구성되어 있었고 금마타리는 392bp의 염기로 구성되어 있었으며, *matK* 부위는 똑갈은 1,261bp의 염기로 마타리, 돌마타리 및 금마타리는 1,262bp의 염기로 구성되어 있었으며, *rbcl* 부위는 4종 모두 1,497bp의 염기로 구성되어 있었다(Fig. 1-2).

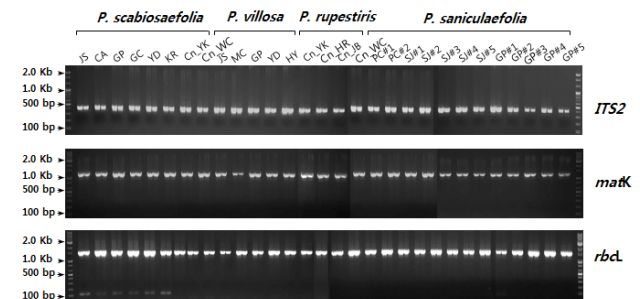
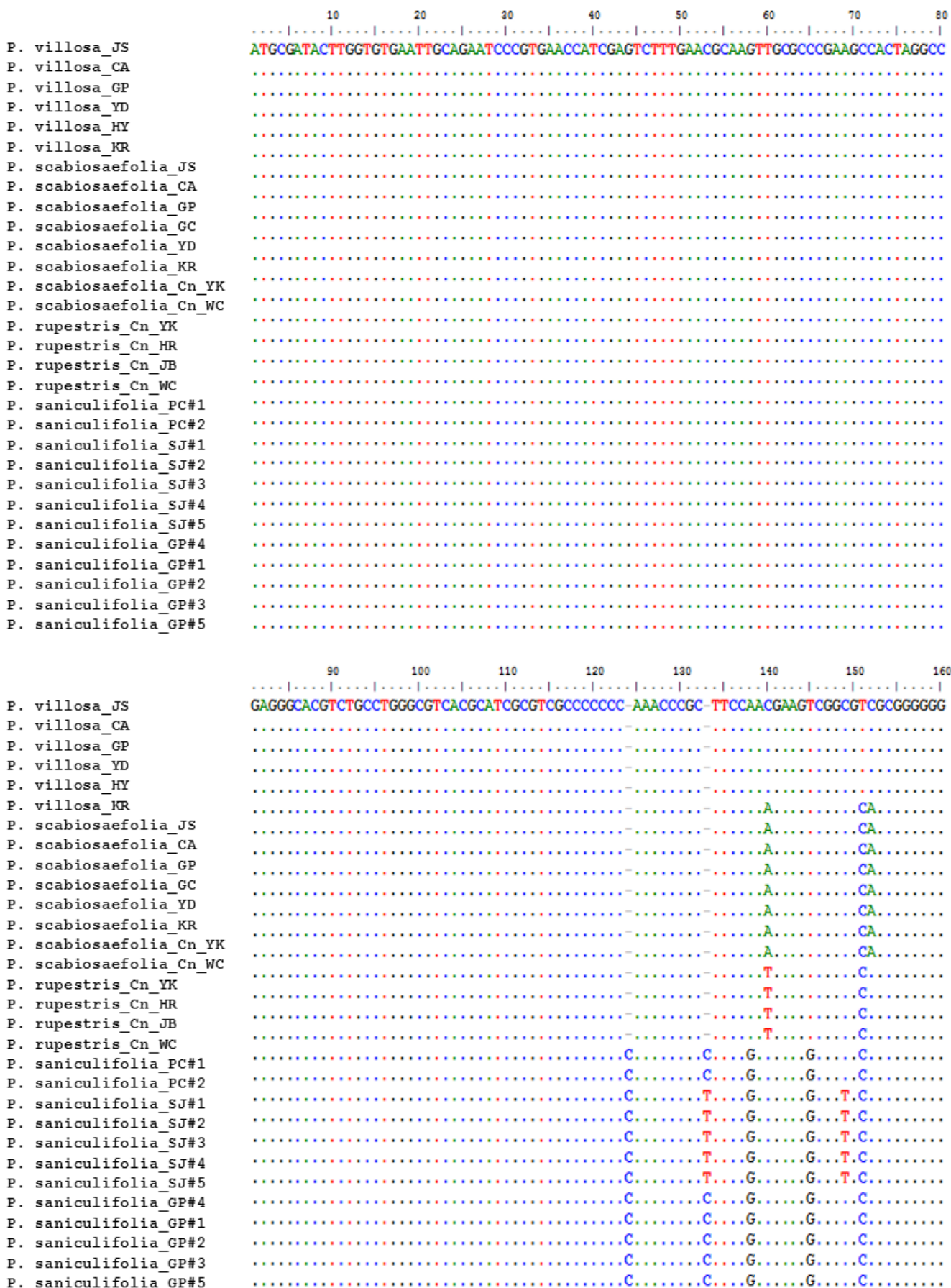


Fig. 1. PCR amplification of DNA barcode regions.

### 2. DNA 바코드 염기서열 비교를 통한 종 감별용 marker nucleotide 발굴

#### 1) ITS2 부위 marker nucleotide 발굴

패장 기원식물 및 관련 동속종의 환경적 요인에 의한 유전적 변이 정도를 알아보기 위해 시료 개체별 염기의 삽입/결실(indel)과 치환(substitution)을 비교·분석한 결과, 똑갈, 마타리, 돌마타리 3종은 자생지 특이적인 변이가 관찰되지 않았지만 금마타리의 경우는 지역 특이적 유전변이 뿐만 아니라 자생지별 염기서열 변이도 관찰되었다(Fig. 2). 이러한 변이는 수집한 종내 개체 간에서 발생하는 것이 아니고 자생지별로 특이성을 갖는 변이형태를 보였다. 본 연구는 패장의 정확한 기원확립을 위해 종단위의 기원식물 판별에 이용 가능한 종별 특이 염기서열 발굴이 주목적으로 하고 있어 이러한 지역별 변이나 자생지별 변이를 제외한 종 단위의 특이성을 갖는 염기의 삽입/결실과 치환을 조사하여 정리 하였다.



see the next page for the figure legend.



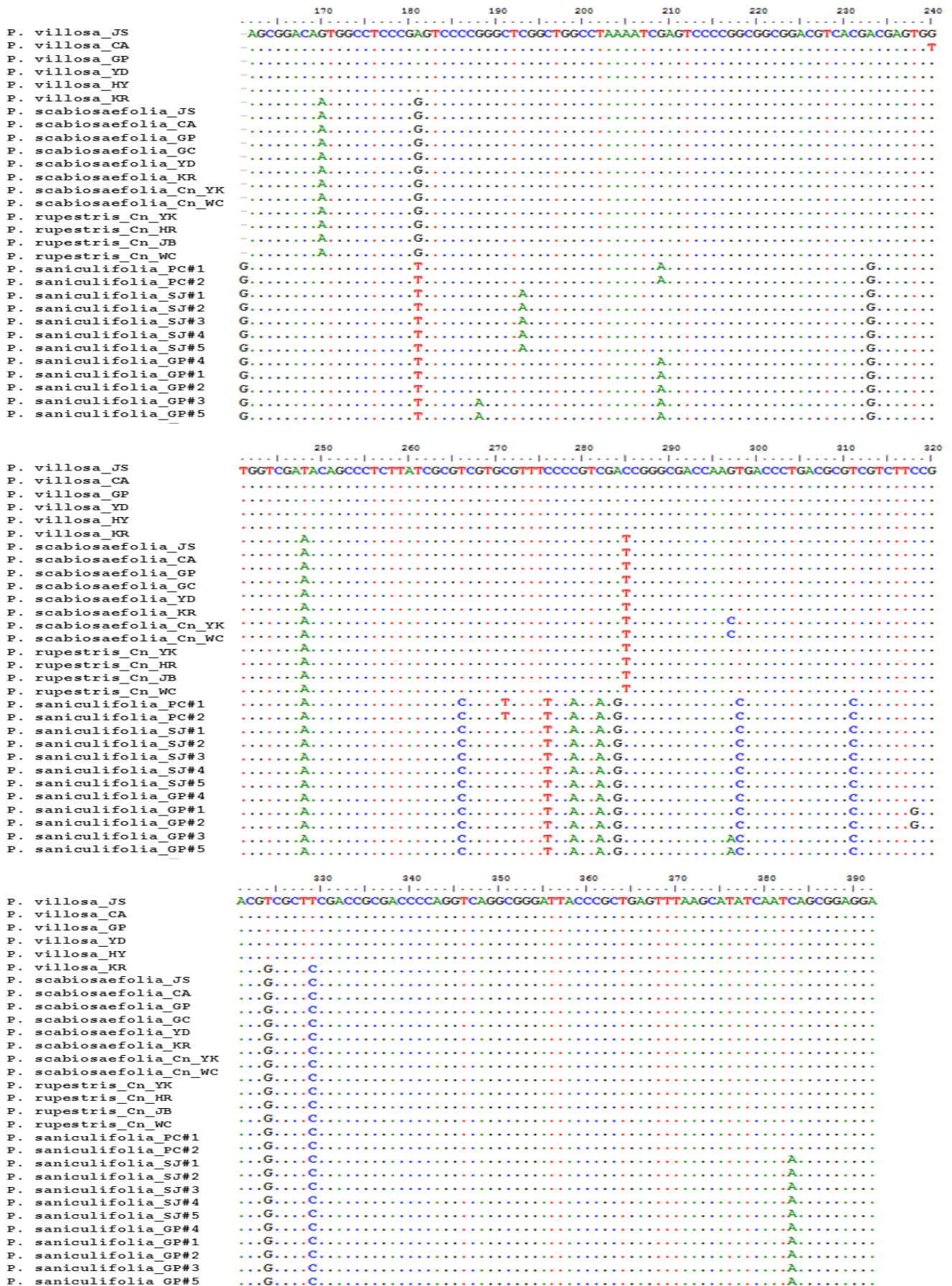


Fig. 2. Comparison of ITS2 region sequences for *Patrinia* species. Dots (·) indicate the identical sequences with *Patrinia villosa* and dashes(-) represents gaps introduced to maximize alignment.

패장의 기원식물중 백화패장인 똑갈의 ITS2 염기서열을 기준으로 중간 염기서열 비교를 통해 확인된 종 특이적인 염기의 삽입/결실 및 치환을 분석한 결과, 총 3개의 삽입과 17개 위치에서 19개의 종 특이적 염기치환이 관찰되었다. 다른 종과 구별이 가능한 종 특이적 염기치환은 똑갈에서 5개 위치에서 확인되었으며, 마타리는 2개의 위치, 돌마타리는 1개의 위치, 그리고 금마타리의 경우는 11개의 위치에서 염기치환이 일어났음을 확인할 수 있었다. 종내 변이를 제외한 종별로 공통으로 확인된 종 특이적 삽입/결실 및 치환을 토대로 marker nucleotide를 분석한 결과, 삽입의 경우는 금마타리에서 124번 C, 133번 C/T, 그리고 161번 G의 삽입이 확인

되었으며, 치환의 경우는 똑갈이 5개 위치의 염기치환으로 (151번 T↔C; 181번 A↔G/T; 248번 T↔A; 324번 T↔G; 329번 A↔G) 다른 3종의 *Patrinia*속 식물과 종 단위 구별이 가능하였다. 마타리는 2개 위치의 염기치환으로 (140번 C↔A 및 152번 C↔A), 돌마타리는 1개 위치의 염기치환으로 (140번 C/A↔T), 그리고 금마타리는 11개 위치의 염기치환으로 (138번 A↔G; 145번 T↔G; 181번 A/G↔T; 233번 A↔G; 266번 T↔C; 276번 C↔T; 279번 및 282번 C↔A; 284번 A↔G; 298번 및 311번 T↔C) 각각의 종 판별이 가능한 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) marker nucleotide를 확인할 수 있었다(Fig. 2, Table 3).

Table 3. Summary of marker nucleotides from the comparison of the ITS2 sequences among 29 samples of 4 species for *Patriniae Radix*.

Nucleotide Position	124	133	138	140	145	151	152	161	181	233	248	266	276	279	282	284	298	311	324	329	
<i>P. villosa</i>	-	-	A	C	T	T	C	-	A	A	T	T	C	C	C	A	T	T	T	T	
<i>P. scabiosaefolia</i>	-	-	.	A	.	C	A	-	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	G	C
<i>P. rupestris</i>	-	-	.	T	.	C	.	-	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	G	C
<i>P. saniculifolia</i>	C	C/T	G	.	G	C	.	G	T	G	A	C	T	A	A	G	C	C	G	C	

Hyphens (-) denote deletion of nucleotide for maximized alignment and dots (·) indicate sequence identity with *P. villosa*. Nucleotide positions indicate the aligned position starting from the 5' end of the ITS2 gene.

2) *matK* 부위 marker nucleotide 발굴

4종 28개 시료의 종내 개체간 삽입/결실과 치환을 확인한 결과, 종내 시료간 염기의 변이는 미미하게 관찰되었으며, ITS2에서 얻은 결과와 같이 금마타리 경북 성주 시료에서 지역 특이적인 염기치환이 관찰되었다 (data not shown). 금마타리에서 관찰된 지역 특이적 염기 변이를 제외하고 중간 염기서열 비교를 통해 종 판별에 활용 가능한 염기의 삽입/결실과 치환을 확인한 결과, 4종에서 똑갈을 기준으로 마타리, 돌마타리 및 금마타리에서 1개의 염기삽입과 21개 위치에서 21개의 종 특이적 염기치환을 확인할 수 있었다. 종내 변이를 제외한 종 특이적 삽입/결실 및 치환을 토대로 종 판별용 marker nucleotide를 분석한 결과, 똑갈의 구별이 가능한 1,107번

위치에서 C의 결실이 확인되었다. 종 특이적 염기치환에 의한 종 판별용 marker nucleotide는 똑갈은 2개의 위치 (1,106번 T↔A 및 1,111번 C↔T), 마타리는 6개 위치 (198번 T↔C; 255번 G↔A; 266번 C↔A; 464번 C↔T; 728번 A↔C; 732번 G↔A), 돌마타리는 2개 위치 (69번 G↔A 및 961번 C↔T), 그리고 금마타리는 지역 특이적 염기 치환을 제외한 11개 위치 (74번 A↔G; 185번 T↔G; 244번 A↔C; 336번 및 364번 T↔G; 420번 및 513번 A↔G; 730번 A↔C; 738번 C↔A; 903번 T↔C; 948번 C↔A)에서 다른 3종의 *Patrinia*속 식물과 각각의 종 단위 구별이 가능한 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) marker nucleotide를 확인할 수 있었다 (Table 4).

Table 4. Summary of marker nucleotides from the comparison of the *matK* sequences among 28 samples of 4 species for *Patriniae Radix*.

Nucleotide Position	69	74	185	198	244	255	266	336	364	420	464	513	728	730	732	738	903	948	961	1,106	1,111		
<i>P. villosa</i>	G	A	T	T	A	G	C	T	T	A	C	A	A	A	G	C	T	C	C	A	-	C	
<i>P. scabiosaefolia</i>	.	.	.	C	.	A	A	.	.	.	T	.	C	.	A	.	.	.	.	.	TC	T	
<i>P. rupestris</i>	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	TC	T
<i>P. saniculifolia</i>	.	G	G	.	C	.	.	G	G	G	.	G	.	C	.	A	C	A	.	TC	T		

Hyphens (-) denote deletion of nucleotide for maximized alignment and dots (·) indicate sequence identity with *P. villosa*. Nucleotide positions indicate the aligned position starting from the 5' end of the *matK* gene.

3) *rbcl* 부위 marker nucleotide 발굴

4종 28개 시료의 종내 개체 간 삽입/결실과 치환을 확인한 결과, 종내 시료 간 염기의 변이는 미미하게 관찰되었으며, ITS2와 *matK*에서 얻은 결과에서와 마찬가지로 금마타리 경북 성주 시료에서 하나의 지역 특이적인 염기치환이 관찰되었다 (data not shown). 금마타리에서 관찰된 지역 특이적 염기 변이를 제외하고 중간 염기서열 비교를 통해 종판별에 활용 가능한 염기의 삽입/결실과 치환을 확인한 결과, 4종에서 염기의 삽입/결실은 확인되지 않았으나 10개 위치에서 12개의 종 특이 염기치환을 확인할 수 있었다. 종별 염기치환은 앞서 분석한 ITS2와 *matK* 유전자 부위에서와 같이 지역변이

를 보인 금마타리에서 6개 위치가 관찰되어 가장 많은 변이가 일어났음을 알 수 있었다. 금마타리를 제외한 나머지 3종에서는 똑갈이 2개 위치, 마타리가 3개 위치, 그리고 돌마타리에서 1개 위치의 종 단위 구별이 가능한 염기 치환이 확인되었다. 종내 변이를 제외한 종 특이적 삽입/결실 및 치환을 토대로 종 판별용 marker nucleotide를 분석한 결과, 종 특이적 염기치환에 의한 종 판별용 marker nucleotide는 똑갈은 2개의 위치 (509번 A↔T/G 및 970번 T↔G), 마타리는 3개 위치 (509번 A/G↔T; 534번 C↔T; 1,207번 A↔D), 돌마타리는 1개 위치 (510번 CA↔T), 그리고 금마타리는 지역 특이적 염기 치환을 제외한 6개 위치 (152번 G↔C; 153번 C

↔A; 253번 A↔G; 285번 C↔G; 415번 G↔A; 510번 C/T  
↔A)에서 다른 3종의 *Patrinia*속 식물과 각각의 종 단위 구별이

가능한 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) marker  
nucleotide를 확인할 수 있었다(Table 5).

Table 5. Summary of marker nucleotides from the comparison of the *rbcl* sequences among 28 samples of 4 species for *Patriniae* Radix.

Nucleotide Position	152	153	253	285	415	509	510	534	970	1,207
<i>P. villosa</i>	G	C	A	C	G	A	C	C	T	A
<i>P. scabiosaefolia</i>	.	.	.	.	.	T	.	T	G	G
<i>P. rupestris</i>	.	.	.	.	.	G	T	.	G	.
<i>P. saniculifolia</i>	C	A	G	G	A	G	A	.	G	.

Dots (·) indicate sequence identity with *P. villosa*. Nucleotide positions indicate the aligned position, starting from the 5' end of the *rbcl* gene.

이상의 결과를 종합하면, 본 연구에서 확보한 패장 기원식물과 관련 동속 종으로부터 확보한 DNA 바코드 부위인 ITS2, *matK*, 그리고 *rbcl* 유전자 염기서열을 기반으로 발굴된 종 판별용 marker nucleotide는 한약재 패장의 종 감별은 물론 생산단계나 종자 상태의 종 구분에 활용되어 패장의 기원식물이나 종자 동정은 물론 한약재의 진위를 종 단위에서 감별할 수 있는 객관적이고 유용한 분자마커로 활용 할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 금마타리의 경우는 다양한 지역에서 추가 수집을 통해 DNA 바코드에 대한 지역 특이적 변이와의 연관성을 추가 분석하여 향후 금마타리의 자생지 정보 관리나 원산지 판별 등에 활용 가능할 것으로 판단된다. 하지만 이러한 지역 특이적 변이는 RAPD, AFLP 등의 유전자 지문분석과 같은 방법으로 계층 수준에서 보다 구체적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 고찰

한약재의 정확한 감별은 한약의 약물동등성 확보와 표준화에 있어서 가장 기본이 되면서 중요한 요소라고 할 수 있다. 한약재 감별법으로는 관능감별과 이화학 분석을 통한 감별, 그리고 유전자 분석을 통한 감별법이 일반적으로 사용되고 있다. 한약재를 감별하는 가장 일반적 방법인 관능감별법은 약재의 외부형태, 색상, 냄새 등에 의존하는 방법으로 다소 주관적인 방법으로 감별자에 따라 그 결과가 차이를 보이는 단점을 가지고 있다. 이화학적 분석을 통한 감별법은 품질관리와 직접적으로 연계하여 활용할 수 있는 장점이 있지만 재배기간, 재배지 또는 자생지의 환경 등 여러 가지 요소에 의해 정확한 기준을 설정하기가 어려운 단점을 지니고 있다<sup>20,21</sup>. 이러한 단점을 보완하기 위해 최근 유전자 분석을 통한 한약재 감별법이 활발하게 연구되고 있다. 특히, DNA 바코드 분석을 통한 한약재 종 감별 연구는 형태적 감별이 어려운 혼·오용 한약재 품목을 중심으로 종 단위의 정확한 감별법 개발이 국·내외에서 진행되고 있으며<sup>22</sup>, 국제생물바코드 컨소시엄을 구성하여 전 세계 생물종에 대한 종 판별을 위한 체계적인 연구를 진행하고 있는 실정이다<sup>10-11</sup>.

한약재 패장의 기원종인 마타리와 똑갈은 두 종 모두 주로 항염증 효능을 나타내는 것으로 보고되었지만 항천식 효능 종 비교 연구에서는 똑갈이 마타리보다 효능이 우수하고 그 작용기작도 차이를 보일뿐만 아니라<sup>4</sup> 마타리, 똑갈, 돌마타리 및 금마타리의 구성성분 비교연구에서 똑갈이 다른 *Patrinia*속과는 성분구성의 차이를 보인다는 연구결과<sup>23</sup>를 바탕으로 종 감별 연구를 통해 이들의 정확한 구별법 개발을 수행하였다. 따라서, 황화패장과 백화패장을 구별하고 혼·오용될 가능성이

있는 같은 속의 식물인 돌마타리와 금마타리를 정확하게 감별하기 위해 rDNA-ITS, ITS2, *matK*, *rbcl* 바코드 부위를 분석하여 이들의 종 감별에 활용 가능한 marker nucleotide를 발굴하고자 하였다. 각 DNA 바코드 부위의 증폭한 결과로부터 rDNA-ITS 부위는 동일한 크기의 단일 DNA 절편이 증폭되지 않고 크기가 다른 다수의 절편이 증폭되어 패장 감별을 위한 DNA 바코드로는 적합하지 않았으며(data not shown), 나머지 3개 부위는 단일 DNA 절편이 증폭되어 패장 감별에 활용 가능한 유전자 부위임을 확인하였다. 단일 절편이 증폭된 3개 유전자 부위 염기서열의 종 특이적인 삽입/결실 및 치환을 확인한 결과에서 감별하고자 하는 *Patrinia*속 4종의 정확한 구별이 가능한 marker nucleotide를 확인할 수 있었으며, 바코드별로는 ITS2와 *matK*가 22개로 많았고 *rbcl*은 12개로 적은 편이었다. 이러한 결과는 *rbcl* 유전자 부위의 변이의 속도가 느려 종 단위 이하의 동정이나 계통학적 유연관계 분석에 적합하지 못하다는 이전의 연구결과와 일치하는 경향을 *Patrinia*속에서도 확인 할 수 있었다<sup>24</sup>. 4종에 대한 변이의 정도를 종별로 나누어 보면 금마타리가 31개 위치로 가장 많았으며 마타리 11개 위치, 똑갈 10개 위치, 그리고 돌마타리 4개 위치의 순으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 분석한 3개 DNA 바코드 부위를 이용하여 패장의 종 감별을 위해서는 바코드 부위 3개 전체 염기서열을 분석하지 않고 각각의 바코드 부위 분석을 통해서 종 단위 감별이 가능하며, 보다 정확한 감별이 요구될 경우에는 두 개 이상의 바코드 부위 염기서열 분석을 통해 감별의 신뢰성을 높일 수 있을 것으로 판단된다. 각 DNA 바코드 부위 유전자 염기서열을 종내 개체 또는 지역별 비교를 통해 확인한 결과, 마타리, 똑갈, 그리고 돌마타리에서는 특이성을 가지는 염기서열이 확인되지 않은 반면에 금마타리의 경우에는 경기도, 강원도, 경상북도에서 수집한 시료에서 지역별로 공통된 특이성을 갖는 염기서열의 치환이 확인되었을 뿐만 아니라 경기도 시료의 경우에는 자생지별 특이성을 갖는 염기서열의 치환도 확인되었다. 이러한 결과는 같은 *Patrinia*속 식물이지만 금마타리는 서식환경이 해발 600m 이상의 고지대에서 자생하고 있는 생육특성으로 인하여 자생지별로 격리되어 서식하고 있어 이러한 환경적 요인은 자생지별 독립적인 유전변이에 의해 나타나는 현상이거나 금마타리가 *Patrinia*속 식물중에서 다른 종과는 달리 종 분화가 진행되고 있는 식물이기 때문에 나타나는 현상으로 판단된다. 금마타리의 이러한 자생지 및 지역별 염기서열 변이는 비슷한 서식환경에서 자생하는 식물 종의 지역별 수집을 통해 정확한 원인을 추가 분석하여 검증하는 것은 향후 유전자 분석을 통한 한약재의 정확한 종 감별뿐만 아니라 원산지 판별 등에 활용 가능한 중요한 정보를 제공할 수 있을

것으로 기대된다. 하지만 DNA 바코드 기법을 이용하여 실제 검사기관에서 유통되는 한약재 감별과정에서 정확한 종의 판별과 유사종의 혼입여부를 판별하기 위해서는 분자생물학적 지식이 요구되고 분석량이 많아 보다 경제적인 감별법 개발을 위해서는 종별 특이 DNA 바코드 염기서열을 이용하여 직접적인 판별이 가능한 SCAR 마커나 나아가 multiplex SCAR 마커의 개발을 통해 그 활용도와 적용성을 제고할 필요가 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 폐장의 정확하고 객관적인 감별법 개발을 위해 다양한 DNA 바코드 부위 염기서열을 분석하고 ITS2, *matK*, *rbcL* 유전자 부위 염기서열의 종별 특이성을 바탕으로 marker nucleotide를 발굴하여 폐장의 약전 수재 종인 마타리, 똑갈과 혼·오용 가능성이 있는 돌마타리와 금마타리를 종단위로 감별할 수 있는 분자생물학적인 감별법을 개발하였다. 이러한 결과는 폐장을 신속하고 명확하게 감별할 수 있는 분자 마커로 활용하여 한약의 기원확립과 약물동등성 확보를 위한 표준화 기법으로 충분한 가치가 있을 뿐만 아니라 한약재 생산단계나 유통현장에서 대용품이나 위품의 생산·유통을 방지할 수 있는 기술로 활용되어 한약에 대한 신뢰회복에 이바지 할 것으로 기대된다.

## 결론

본 연구는 한약재 폐장을 약재 상태에서 종단위로 정확하게 구별하고 유사한약재로 사용될 가능성이 있는 같은 속 식물인 돌마타리와 금마타리의 혼·오용을 막기 위한 효과적 감별법 개발을 위하여 분자생물학적인 기법의 일환으로 ITS2, *matK* 및 *rbcL* DNA 바코드 부위 유전자 염기서열 분석을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 4종 *Patrinia*속 식물의 DNA 바코드 염기서열 분석을 통해 ITS2와 *matK* 유전자는 삽입/결실이 관찰되어 각각 389–392bp와 1,261–1,262bp로 구성되어 있었고 *rbcL* 유전자는 삽입/결실 없이 1,497bp로 구성되어 있었으며, 이들 바코드 부위는 각각 22, 22, 12개의 종 감별이 가능한 marker nucleotide를 포함하고 있었다.
2. ITS2, *matK* 및 *rbcL* 세개의 유전자 염기서열 분석을 통해 각 DNA 바코드 부위의 marker nucleotide 수, 염기의 삽입/결실 및 치환 수, 활용성 등을 비교한 결과, *matK*와 *rbcL* 유전자 부위에 비해 ITS2 유전자 부위가 길이가 짧고 4종을 모두 감별 할 수 있어 폐장의 감별에 가장 유용한 DNA 바코드로 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 '한의본초활용기반구축사업(K12020)'과 한약자원 국내 생산 기반기술 개발과제(K14417)의 지원에 의해 수행되었으며, 기원식물 분류·동정에 도움을 주신 분류·동정 자문위원님들께 감사드립니다.

## References

1. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine School, Korean Herbology(Boncho-hak). Seoul : Younglimsa, 2010 : 255–6.
2. Chang WH, Park SW, Chang SY, Yook CS, The studies on chemical components of Valerianaceae, Bull K H Pharma Sci, 2001 ; 29 : 1–9.
3. Korea Institute of Oriental Medicine, Defining Dictionary for Medicinal Herbs [Korean], Retrieved Oct, 06, 2014, from <http://boncho.kiom.re.kr/codex/>.
4. Cha JT, Lee JC, Lee YC, Comparative study on anti-asthmatic activities of *Patrinia scabiosaefolia* Fischer ex link and *Patrinia villosa* Jussieu in a mouse model of asthma, Kor J Herboogy, 2012 ; 27(3) : 75–82.
5. Guo YL, Ge S, Molecular phylogeny of Oryzaeae (Poaceae) based on DNA sequences from chloroplast, mitochondrial, and nuclear genomes, Am J Bot, 2005 ; 92(9) : 1548–58.
6. Cabrera LI, Salazar GA, Chase MW, Mayo SJ, Bogner J, Davila P, Phylogenetic relationships of Aroids and Duckweeds (Araceae) inferred from coding and noncoding plastid DNA, Am J Bot, 2008 ; 95(9) : 1153–65.
7. Foster PG, Bergo ES, Bourke BP, Oliveira TM, Nagaki SS, Snatana DC, Sallum MA, Phylogenetic analysis and DNA-based species confirmation in *Anopheles* (Nyssorhynchus), PLoS ONE, 2013 ; 8(2) : e54063.
8. Kim YD, Park CW, Sun BY, Kim KJ, Lee EJ, Kim SH, ITS sequence variations in common ragweed and giant ragweed, Korean J Plant Taxon, 2005 ; 35(4) : 273–85.
9. Barcode of Life, Identifying species with DNA barcoding Retrieved Oct, 06, 2014, from <http://www.barcodeoflife.org>.
10. BOLDsystem, Databases and Identification Request Retrieved Oct, 06, 2014, from <http://www.boldsystems.org>.
11. Lee YM, Moon BC, Ji Y, Kim WJ, Kim HK, Molecular Authentication of Pinelliae Tuber from its adulterants by the analysis of DNA barcodes, *matK* and *rbcL* genes, Kor J Herboogy, 2013 ; 28(3) : 75–84.
12. Song IG, An BR, Seo BI, Park SJ, Molecular marker to identify and origin of Cnidii Rhizoma from Korea and China, Kor J Herbology, 2009 ; 24(4) : 1–8.
13. Moon BC, Choo BK, Ji Y, Yoon T, Lee AY, Cheon MS, Kim BB, Kim HK, Molecular authentication and phylogenetic relationship of *Bupleurum* species by the rDNA-ITS sequences, Kor J Herbology, 2009 ; 24(3) : 59–68.
14. Kim JS, Jang HW, Kim JS, Kim JH, Kim JH, Molecular identification of *Schisandra chinensis* and



- its allied species using multiplex PCR based on SNPs. *Genes Genomics*. 2012 ; 34 : 283–90.
15. Hall TA, BioEdit: an user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid S*. 1999 ; 41 : 95–8.
  16. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes or phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and amplifications*. New York : Academic Press, 1990 : 315–22.
  17. Kato H, Oginuma K, Gu Z, Hammel B, Tobe H. Phylogenetic relationships of Betulaceae based on *matK* sequences with particular reference at the positions of *Ostryopsis*. *Acta phytotax Geobot*. 1998 ; 49(2) : 89–97.
  18. Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, Zhu Y, Ma X, Gao T, Pang X, Luo K, Li Y, Li X, Jia X, Lin T, Leon C. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*. 2010 ; 5(1) : e8613.
  19. Mansion G, Rosenbaum G, Schoenenberger N, Bacchetta G, Rosselló JA, Conti E. Phylogenetic analysis informed by geological history supports multiple, sequential invasions of the Mediterranean Basin by the angiosperm family Araceae. *Syst Biol*. 2008 ; 57(2) : 269–85.
  20. Joshi K, Chavan P, Warude D, Patwardhan B. Molecular markers in herbal drug technology. *Curr Sci*. 2004 ; 87(2) : 159–65.
  21. Choo BK, Moon BC, Ji Y, Kim BB, Choi G, Yoon T, Kim HK. Development of SCAR markers for the discrimination of three species of medicinal plants, *Angelica decursiva* (*Peucedanum decursivum*), *Peucedanum praeruptorum* and *Anthriscus sylvestris*, based on the internal transcribed spacer (ITS) sequence and random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Biol Pharm Bull*. 2009 ; 32(1) : 24–30.
  22. Shucher NJ, Carles MC. Genome-based approaches to the authentication of medicinal plants. *Planta Med*. 2008 ; 74(6) : 603–23.
  23. Kim JS, Kang SS. Chemical constituents of plants from the genus *Patrinia*. *Nat Prod Sci*. 2013 ; 19(2) : 77–119.
  24. Olmstead RG, Reeves PA. Evidence for the polyphyly of the Scrophulariaceae based on chloroplast *rbcl* and *ndhF* sequences. *Ann Missouri Bot Gard*. 1995 ; 82(2) : 176–93.