

진보된 DNA barcoding 기술을 이용한 당귀(*Angelica*)속 식물의 기원 판별 기술에 관한 연구 동향

이신우 · 신용욱 · 김윤희

Trends in the development of discriminating between *Angelica* L. species using advanced DNA barcoding techniques

Shin-Woo Lee · Yong-Wook Shin · Yun-Hee Kim

Received: 18 August 2021 / Revised: 31 August 2021 / Accepted: 31 August 2021

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract We reviewed current research trends for discriminating between species of the *Angelica* genus, a group of important medicinal plants registered in South Korea, China, and Japan. Since the registered species for medicinal purposes differ by country, they are often adulterated as well as mixed in commercial markets. Several DNA technologies have been applied to distinguish between species. However, one of the restrictions is insufficient single-nucleotide polymorphisms (SNPs) within the target DNA fragments; in particular, among closely-related species. Recently, amplification refractory mutation system (ARMS)-PCR and high-resolution melting (HRM) curve analysis techniques have been developed to solve such a problem. We applied both technologies, and found they were able to discriminate several lines of *Angelica* genus, including *A. gigas* Nakai, *A. gigas* Jiri, *A. sinensis*, *A. acutiloba* Kitag, and *Levisticum officinale*. Furthermore, although the ITS region differs only by one SNP between *A. gigas* Nakai and *A. gigas* Jiri, both HRM and ARMS-PCR techniques were powerful enough to discriminate between them. Since both *A. gigas* Nakai and *A. gigas* Jiri are native species to South Korea and are very closely related, they are difficult to discriminate by their

morphological characteristics. For practical applications of these technologies, further research is necessary with various materials, such as dried or processed materials (jam, jelly, juice, medicinal decoctions, etc.) in commercial markets.

Keywords *Angelica* genus, DNA barcoding, ARMS-PCR, HRM curve

서론

대한민국의 약전에서는 참당귀(*Angelica. gigas* Nakai)와 일당귀(*Angelica. acutiloba* (Siebold & Zucc.) Kitag)를 당귀의 기원식물로 지정하고 있으나 중국과 일본에서는 중국당귀(*Angelica. sinensis*)와 일당귀를 지정하고 있다. 국내에 자생하거나 한약재로 유통되는 *Angelica* 속 식물은 18종으로 참당귀(*A. gigas* Nakai)와 일당귀[*A. acutiloba* (Siebold & Zucc.) Kitag]가 대표적이다(Gil et al. 2016). 중국당귀(*A. sinensis*)는 우리나라 기후환경에 맞지 않기 때문에 재배가 되지 않은 것으로 보고된 바 있으나(Yu et al. 2004), 국내의 한약재 시장에서 중국당귀, 일당귀 및 참당귀의 혼용사례가 많아 위품을 판별하기 위한 첨단기술의 개발이 시급한 실정이다.

최근에는 유럽에서 향신료로 사용되고 있는 구당귀(歐當歸, *Levisticum officinale* W. D. J. Koch) 또한 당귀와 마찬가지로 Phthalides 성분을 함유하는 생약으로서 소염, 중추신경 보호 작용 등이 보고되고 있어 국내에서 유통되고 있는 중국당귀, 일당귀 및 참당귀와 혼용될 가능성이 높아 이에 대한 분자생물학적 판별 기술 또한 요구되고 있는 실정이다(Blank et al. 1993; Han et al. 2018; Long et al. 2018; Ma and Bai

S.-W. Lee, Y.-W. Shin
경상국립대학교 생명과학대학 향노화신소재과학과
(Department of Plant & Biomaterials Science, Chilam Campus,
Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea)

Y.-H. Kim (✉)
경상국립대학교 사범대학 생물교육과 (농업생명과학연구원)
(Department of Biology Education, College of Education, IALS,
Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea)
e-mail: cefle@gnu.ac.kr

2012; 2013). 구당귀는 유럽에서 전통적으로 요로 감염증 개선에 차로 응용 되어 왔으며(EMA 2012), 이노, 구풍, 진경작용 등이 보고된 바 있다(Bylaite et al. 1998).

실제로, 구당귀는 중국산 독활의 기원식물인 중치모당귀(*Angelica biserrata*)의 위품으로 유통되어 중치당귀라는 이름으로, 또는 중국당귀라는 이름으로 유통되는 사례가 적발된 바 있다(Kim et al. 2016). 이러한 사례는 중국에서도 발생하여 안휘성 보주 약재시장에서 구당귀가 독활의 위품으로 유통된다고 보고된 바 있다(Han et al. 2016a). 한편 국내에서 구당귀 뿌리는 러비지(lovage)라는 이름으로 식품에 사용할 수 있는 원료로 식품공전에 등재되어 있다(Foodcode 2015). 중치모당귀(*Angelica biserrata*)는 독활[*Aralia continentalis* Kitagawa (Araliaceae)]과 또 다른 당귀속에 속하는 *Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan과 혼용되고 있다. 또한, 전술한 바와 같이 중치모당귀는 구당귀(*L. officinale*)와 어수리(*Heracleum moellendorffii*) 등과도 혼용되어 동일한 약재로 유통이 되고 있는 실정이며 이들 4종의 뿌리는 형태학적으로 아주 유사하여 전문가도 구분이 어렵게 현실이다. 나아가 건재상에서 건조한 뿌리는 물론 일부 가공한 분말 등은 전혀 구분이 불가능하여, 자주 혼용되어 우리나라와 중국 등의 시장을 교란하고 있는 실정이다(Kim et al. 2016; Mei et al. 2015; Yuan et al. 2015).

우리나라에서 ‘전호’라고 불리우는 한약재는 당귀속에 속하는 식물인 바디나물로서 “*Angelica decursiva* (= *Peucedanum decursivum*)와 *Peucedanum praeruptorum*의 뿌리”라고 대한약전에 정의하고 있다. 반면에 중국에서는 ‘Qianhu’라고 불리우며 “*Umbelliferae*과에 속하는 *Peucedanum praeruptorum*의 건조된 뿌리”로 기술되어 있다. 뿐만아니라 전호는 ‘토전호’라고 불리우는 *Anthriscus sylvestris*와 이름도 유사하며 형태학적으로도 유사하여 구분하기가 매우 어려워 혼용 또는 위품으로 유통될 가능성이 아주 높은 실정이다(Choo et al. 2009).

이러한 문제점을 해결하기 위하여 Sung 등 (2004)은 형태학적으로 피층에 유실 세포가 없으면 일당귀, 코르크층 아래 후각 세포층이 잘 발달하면 참당귀, 후각 세포층이 발달하지 않으면 중국 당귀로 판별이 가능하다고 보고한 바 있으며, Kim 등(2011)은 지표성분의 분석 연구를 통하여 참당귀는 coumarin으로서 decursin과 그의 이성질체인 decursinol angelate, 중국당귀와 일당귀는 정유 성분으로서 z-ligustilide, n-butyridenephtalide, 유기산으로 ferulic acid가 주된 성분이라는 연구 결과를 발표한 바 있다. Lee 등(2000)은 참당귀, 중국당귀 및 일당귀에 대하여 뿌리 단면의 내부구조를 비교함과 동시에 RAPD 마커들을 개발하여 이들 3종을 판별하기 위한 연구 결과를 발표한 바 있다.

DNA finger printing 기술을 이용한 당귀속 식물의 판별 기술 개발

당귀속 식물의 기원 분석에 관한 초창기 연구는 Restriction

Fragment Length Polymorphism (RFLP), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) 마커, Microsatellite 마커, Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) 마커, Simple Sequence Repeat (SSR) 등의 기술을 적용한 DNA finger printing의 차이를 이용하는 연구가 주로 발표되었다. 이들의 연구 결과들을 Table 1에 요약하였다.

당귀속 식물의 기원을 밝히기 위한 분자생물학적 연구 결과를 최초로 보고한 그룹은 Mizukami 등(1997)이었다. 일본의 여러 지역에서 자생하고 있는 일당귀로 *A. acutiloba*, var. *iwatensis*, Miyama-toki, *A. acutiloba* var. *acutiloba* (Toki), *A. acutiloba* (Yamato-toki), *A. acuiloha* (Hokkai-toki)등에 대하여 5S-rDNA의 intergenic spacer 영역을 PCR 증폭한 후 염기서열 분석을 한 결과 모든 계통이 완벽하게 일치하여 동일 종이라는 사실을 발표하였다. 이후 중국당귀(*A. sinensis*)와 일당귀(*A. acutiloba*)의 5S rDNA의 spacer 영역을 암호 하는 DNA 단편을 PCR로 증폭하여 염기서열을 비교하여 SNP의 차이로 상호구분이 가능한 연구 결과가 보고되었다(Zhao et al. 2003). 한편, Zhang 등(2003)은 중국당귀(*A. sinensis*)와 *Rheum palmatum*의 종자로부터 DNA를 분리하여 핵내 ribosomal DNA에 존재하는 Internal Transcribed Spacer (ITS)영역을 PCR로 증폭한 다음 염기서열을 비교하여 다양한 SNP를 확인하여 마커로 사용할 수 있는 가능성을 발표하였다. Choi 등(2004)도 참당귀, 일당귀, 중국당귀에 대하여 rDNA의 ITS 영역을 PCR로 증폭한 후 제한효소로 절단하여 얻은 AFLP 패턴을 비교하여 3종에 대하여 구분이 가능한 종 특이적 패턴을 확보하였다.

Mei 등(2015)과 Zhang 등(2015)은 중국의 다양한 지역에서 수집된 당귀 재배종(중국당귀)을 일당귀 및 구당귀와의 상호구분이 가능한 RAPD, ISSR, SCAR 마커를 보고 하였으며, Lu 등(2015)은 중국의 다양한 지역에서 수집한 당귀를 대상으로 계통들의 그룹이 가능한 microsatellite 마커에 관한 결과를 보고하였다. Noh 등(2018)은 SCAR 마커 분석을 통하여 한국 및 중국 약재시장에서 수집한 구릿대(*A. dahurica*)의 계통 비교분석과 함께 개구릿대(*A. anomala*), 갯강활(*A. japonica*) 등과의 기원 판별이 가능하였다고 보고하였다. Liu 등(2020a)도 구릿대(*A. dahurica*)와 전호(바디나물, *A. decursiva*)의 상호 구분이 가능한 microsatellite 마커를 개발하였다고 하였으며, Chen 등(2019)과 Liu 등(2020b)은 중국 내 다양한 지역에서 수집된 다양한 *A. dahurica* 또는 *A. biserrata* 계통들의 구분이 가능한 SSR 마커를 각각 개발하였다고 하였다. 그러나 이러한 다양한 분자생물학적 기술을 이용한 기원 판별용 마커의 단점은 실험의 조건, 실험 수행자, 시료의 상태 등 다양한 요인에 의하여 결과의 신뢰성이 다소 떨어진다는 단점들이 알려졌다.

Table 1 List of DNA fingerprinting technology applied to discriminate between *Angelica* L. species

Species	Applied techniques	Major results	Reference
<i>A. sinensis</i> , <i>Rheum palmatum</i>	Nucleotide sequence of ITS region	Identified SNPs within ITS region.	Zhang et al. 2003
<i>A. sinensis</i> , <i>A. acutiloba</i> , <i>A. gigas</i>	Nucleotide sequence of 5S-rRNA spacer region	Identified SNPs within 5S-rRNA spacer region.	Zhao et al. 2003
<i>A. gigas</i> , <i>A. acutiloba</i> , <i>A. sinensis</i>	PCR-mediated fingerprinting, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)	Identified the Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) among species.	Choi et al. 2004
<i>A. sinensis</i> , <i>A. acutiloba</i> , <i>L. officinale</i>	Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), inter-simple sequence repeat (ISSR) marker	Differentiated <i>A. sinensis</i> cultivars collected in China from <i>A. acutiloba</i> and <i>L. officinale</i> .	Mei et al. 2015
<i>A. sinensis</i> , <i>A. acutiloba</i> , <i>L. officinale</i>	Sequence-characterized amplified region (SCAR), RAPD	Identified typical SCAR and RAPD patterns of <i>A. sinensis</i> , <i>A. acutiloba</i> , and <i>L. officinale</i> .	Zhang et al. 2015
<i>A. sinensis</i> (<i>Apiaceae</i>)	Microsatellite marker	Analyzed microsatellite markers of 120 samples of <i>Angelica</i> L. species collected in China.	Lu et al. 2015
<i>A. dahurica</i>	SCAR marker	Identified a typical SCAR marker for <i>A. dahurica</i> , <i>A. anomala</i> , and <i>A. japonica</i> collected from markets in South Korea and China.	Noh et al. 2018
<i>A. dahurica</i>	Simple sequence repeat (SSR) marker	Identified a typical SSR marker for 56 samples of <i>A. dahurica</i> collected in China.	Chen et al. 2019
<i>A. dahurica</i> , <i>A. decursiva</i> cultivar (cv) Hangbaizhi	Microsatellite marker	Identified a typical microsatellite marker (Locus AD7) for the discrimination of <i>A. dahurica</i> and <i>A. decursiva</i> .	Liu et al. 2020a
<i>A. biserrata</i>	SSR marker	Analyzed SSR markers using transcriptome with 208 samples of <i>Angelica</i> L. species collected in China.	Liu et al. 2020b

DNA barcoding 기술을 이용한 당귀 속 식물의 기원 판별에 관한 연구

DNA barcoding 기술은 DNA fingerprinting 기술의 단점을 보완하기 위하여 개발된 것으로 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)를 이용하여 제작한 PCR용 판별 마커를 개발하는 기술이다. 동 기술을 적용하여 한약재로 사용되는 당귀 속 식물들로서 우리나라와 중국, 일본 등에서 가장 흔하게 적발되는 혼용 사례에 대비하기 위한 연구 결과들을 요약하여 Table 2에 제시하였다.

Choo 등(2009)은 전호(*A. decursiva*)(=*Peucedanum decursivum*)와 중국의 ‘Qianhu’(*Peucedanum praeruptorum*)와 우리나라에서 ‘토전호’에 해당하는 *Anthriscus sylvestris*가 서로 혼용되는 사례가 많아 이에 대한 기원 판별 마커를 개발하고자 핵내 ITS 영역을 이용하여 SCAR 마커를 개발할 수 있었다고 보고하였다. Feng 등(2010)은 중국당귀(*A. sinensis*) 및 *A. apaensis*, *A. fargesii*, *A. laxifoliata*, *A. megaphylla*, *A. nitida*, *A. pseudo-selinum* 등 6종에 대한 ITS 단편의 염기서열을 비교하여 얻은

SNP를 사용하여 중국당귀 특이 판별용 프라이머를 제작하여 PCR 증폭 실험을 수행하여 중국당귀에만 특이하게 증폭되는 밴드를 확인할 수 있었다고 하였다. 실제 현장 적용을 위한 실용화 연구로 동 판별 마커를 이용하여 시중에서 중국당귀로 유통되고 있는 8 계통의 시료들을 대상으로 실험을 수행한 결과 절반에 해당하는 4개 시료에서 중국 특이 DNA 밴드가 증폭이 되지 않아 위품으로 확인되었다고 보고하였다.

He 등(2012)은 형태학적으로 유사할 뿐만 아니라 이름도 비슷하여 중국 내에서도 혼용 사례가 빈번한 것으로 알려진 개구릿대(*A. anomala*)와 구릿대(*A. dahurica*)의 기원을 판별하기 위하여 엽록체 내 유전자에 해당하는 *mat K*, *rbcL*, *psbA-trnH*, 그리고 핵내 유전자에 해당하는 *ITS1*과 *ITS2* 유전자 단편에서 확인된 SNP를 근거로 하여 제작한 프라이머를 사용하여 조사한 결과, *ITS1*과 *ITS2* 유전자 단편 내 SNP를 이용하여 제작한 프라이머는 상호구분이 가능하여 barcoding 화가 가능하였으나 엽록체 내에 존재하는 3종의 유전자 단편은 SNP가 충분하지 않아 barcoding으로서 부적격한 것으

Table 2 List of DNA barcoding technology applied to discriminate between *Angelica* L. species

Species	Markers	Major results	Reference
<i>A. decursiva</i> , <i>Peucedanum decursivum</i> , <i>P. praeruptorum</i> , <i>Anthriscus sylvestris</i>	SCAR marker in <i>ITS</i> region	<i>ITS</i> and SCAR marker for the discrimination between the four listed species of <i>Angelica</i> L. plants.	Choo et al. 2009
<i>Angelica sinensis</i>	<i>ITS</i> marker	<i>ITS</i> marker for the authentication of <i>A. sinensis</i> samples collected from markets.	Feng et al. 2010
<i>A. anomala</i> , <i>A. dahurica</i>	<i>matK</i> , <i>ITS1</i> , <i>ITS2</i> , <i>rbcL</i> , <i>psbA-trnH</i>	Identified several SNPs within <i>ITS1</i> and <i>ITS2</i> regions for PCR amplification. No SNPs were identified within <i>matK</i> , <i>rbcL</i> , or <i>psbA-trnH</i> fragments.	He et al. 2012
<i>A. sinensis</i>	<i>rbcL</i> , <i>matK</i> , <i>trnH-psbA</i> , <i>ITS</i>	Identified powerful SNP markers within <i>ITS</i> region of 46 samples of <i>A. sinensis</i> collected in China. Of particular note, this method was able to differentiate using DNA purified from decoction samples.	Yuan et al. 2015
<i>A. biserrata</i>	<i>ITS2</i> , multiplex-SCAR marker	Discriminated <i>Aralia continentalis</i> Kitag from <i>Angelica biserrata</i> C.Q. Yuan and R.H. Shan.	Kim et al. 2016
<i>A. decursiva</i>	<i>ITS</i> marker	Discriminated the adulterant of Qianhu (<i>Peucedanum praeruptorum</i>) in <i>Angelica decursiva</i> samples collected from markets. These plants are often misidentified or mixed.	Han et al. 2017
<i>A. polymorpha</i>	LYCE indel marker	Developed an indel marker that is able to discriminate <i>A. polymorpha</i> from <i>L. officinale</i> using whole genome analyses of chloroplast.	Park et al. 2019

로 확인되었다고 보고하였다. Yuan 등(2015)도 중국 내에서 수집된 중국당귀(*A. sinensis*), 구당귀 (*Levisticum officinale*), *A. biserrata*, 구릿대(전호, *A. dahurica*) 등의 계통에 대하여 He 등(2012)이 사용한 3종의 엽록체 유전자 단편과 *ITS* 유전자 단편에 대하여 SNP를 사용한 barcoding 기술을 적용하여 본 결과 역시 *ITS*가 가장 우수한 결과를 보였으며 엽록체 유전자 단편은 barcoding화 하기에 부적합한 것으로 보고하였다. 동 연구에서 특이할만한 사실은 탕재로 부터 추출한 DNA를 대상으로 PCR 증폭 실험을 수행한 결과 증폭된 DNA 밴드의 강도가 약하기는 하나 상호 판별은 가능하였다고 하였다. 이는 DNA가 탕재화 하는 과정에서 일부 파괴되기는 하지만 증폭되는데 필요한 약 500 bp의 짧은 단편만 보존되어 있으면 가능하기 때문이라고 주장하였다. 따라서 많은 한약재의 경우 탕재로 유통되고 있는 점을 고려한다면 이 결과는 향후 실용화를 위한 보다 심도 있는 연구가 필요하다고 하겠다.

Kim 등(2016)은 독활(*Aralia continentalis* Kitagawa), 중치모당귀 (*Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan) (*Angelica biserrata*도 독활이라는 이름으로 불리어짐), 구당귀(*L. officinale*), 어수리 (*Heracleum moellendorffii*) 등 4 계통에 대하여 *ITS2* 영역에서 확인된 SNP에 근거하여 제작한 각각의 특이 판별용 프라이머를 사용하여 한국 및 중국에서 수집된 상기 4종의 한약재를 대상으로 순수분리된 DNA와 4종의 특이 판별용 프라이머를 하나의 시험관에 혼합하여 PCR 증폭 실험(multiplex assay)을 수행한 결과 공시한 4종을 정확

하게 판별할 수 있었다고 보고하였다. 특히, 이 결과는 시중에 유통되는 4종의 한약재 중 위품이 확인된 결과로 본 실험에 사용한 4종의 한약재가 빈번하게 혼용되어 유통된다는 사실을 실제로 확인하였으며, 향후 실용화가 가능하다는 것을 시사하였다.

Han 등(2017)은 중국에서 오래전부터 전통중의약재(Traditional Chinese Medicine)로 사용되어온 전호(*A. decursiva*)(중국어, ‘Zihuaqianhu’)(=*Peucedanum decursivum*), *Peucedanum praeruptorum*(중국어, ‘Qianhu’)에 대한 기원 판별 마커를 개발하고자 *ITS*영역 내 염기서열을 비교하여 확인한 SNP를 기본으로 하여, 이들을 각각 판별할 수 있는 특이적 프라이머를 제작할 수 있었다. 무작위로 시중에서 채집한 시료들을 대상으로 PCR증폭 실험을 수행한 결과 위품을 확인할 수 있었다고 보고하였다. 서론에서 언급한 바와 같이 우리나라의 대한약전과 중국의 약전에서 정의한 전호의 기원 식물 종이 각각 다르며 게다가 우리나라에서 이름이 유사하게 불리우는 토전호(*Anthriscus sylvestris*)와 형태학적으로도 아주 유사하여 이들이 혼재되어 유통되고 있는 현실이다. 따라서 우리나라에서는 이들 연구 결과를 활용하여 전호와 토전호(*Anthriscus sylvestris*)를 판별할 수 있는 DNA barcode의 개발이 필요하며, 현장 적용을 위한 실용화연구의 필요성이 제기되었다.

Park 등(2019)은 궁궁이(*A. polymorpha*)와 자주 혼용되어 시장을 교란하고 있는 구당귀(*Ligusticum officinale*)(GenBank accession no. NC039760)에 대한 분자생물학적 판별 마커를

개발하기 위하여 엽록체의 유전체 분석을 수행하였다. 그 결과, *ycf4-cemA* 유전자간 영역에서 궁궁이(*A. polymorpha*)는 구당귀(*L. officinale*)에 비하여 418 bp가 삭제된 사실을 확인하였다. 따라서 이 영역을 사용하여 궁궁이와 구당귀를 판별할 수 있는 indel 마커(LYCE)를 성공적으로 개발할 수 있었다고 하였다. 실지로 국내에서 수집된 21 계통의 시료에 대하여 PCR 증폭실험으로 조사를 수행한 결과 예상한 대로 정확하게 판별이 가능하였다. 즉 구당귀와 궁궁이 계통들은 정확하게 예상한 540과 122 bp에 해당하는 크기의 밴드를 확인할 수 있었다. 이 또한 향후 현장적용이 가능한 실용화 연구가 후속적으로 필요하며, 당귀속에 속하는 보다 많은 종에 대한 판별 마커개발을 위한 연구가 추진되어야 할 것으로 사료된다.

Amplification Refractory Mutation System (ARMS)-PCR 기술을 이용한 DNA barcode 개발

ARMS-PCR은 바이러스 또는 세균의 유전체 서열 내 점돌연변이가 일어난 대립유전자(allele)를 효율적으로 확인하기 위하여 개발된 기술이다(Newton et al. 1989). 일반적으로 단 하나의 점돌연변이가 일어난 대립유전자를 확인하고자 점돌연변이가 일어난 염기서열을 3말단에 위치하게 하여 프라이머를 제작하여 PCR 증폭 실험을 수행하는 경우, 기질 특이성이 낮아 다양한 유사 밴드가 나타나 allele-specific 밴드만 판별하기가 어려운 경우가 많아 allele-specific 바코드를 개발하는데 가장 큰 걸림돌이 되어 왔다. 따라서, allele-specific (AS)-PCR이라고도 명명된 ARMS-PCR 기술은 단 하나의 점돌연변이가 일어난 3말단 염기에 인접한 2, 3, 4번째 염기를 임의로 다른 염기로 변이를 시켜, 점돌연변이가 일어난 allele의 경우 1개의 mistching이지만 야생형 allele의 경우 2개의 mismatching이 되도록 하여 그만큼 기질 특이성을 향상시켜 판별력을 높일 수 있도록 고안한 기술이다. 또한, 피리미딘과 퓨린염기 중 어떤 염기로 변이를 유도하느냐에 따라 allele-specific 밴드의 판별력에 변이가 크므로 수많은 조합의 프라이머를 제작하여 실험을 수행하여 가장 적합한 조합을 찾아야 한다.

따라서, Han 등(2016b)도 시장에서 혼·오용으로 문제가 대두되고 있는 대표적인 약용작물로 하수오(*Polygonum multiflorum*), 백수오(*Cynanchum wilfordii*), 이엽우피소(*Cynanchum auriculatum*)의 엽록체 유전자인 *TrnL-F*와 핵내 ITS 영역의 SNP를 파악하여 이들을 판별할 수 있는 ARMS-PCR용 바코드를 개발하여 국내의 다양한 지역에서 수집된 시료들에 대하여 진위여부를 조사한 결과를 발표하였다. 국내의 지역별 및 중국에서 수집된 구지뽕(*Cudrania tricuspidata* Bureau)에 대하여 엽록체 유전자인 *TrnL-F*에서 확인된 단일염기다형성을 대상으로 제작한 ARMS-PCR용 프라이머를 제작하여 확인한 결과 국내 토종과 중국과의 판별이 가능하였다(Lee

et al. 2017). 또한, 국내외에서 수집한 엉겅퀴를 대상으로 ITS 영역 내 단일염기다형성을 확인하여 ARMS-PCR용 마커를 개발하여 국내 토종 엉겅퀴(*Cirsium japonicum*)를 판별할 수 있었다(Lee et al. 2018).

이러한 선행연구 경험을 이용하여 저자들은 국내·외에서 수집한 당귀 계통에 대한 ARMS-PCR용 판별 마커를 개발할 수 있었다. 국내 자생종인 참당귀(*A. gigas* Nakai)와 지리산 권역의 고산지대(산청군 금서면, 심장면 일대)의 고산지대에서 자생하는 자연산 토종인 세발당귀(*A. gigas* Jiri), 그리고 중국당귀(*A. sinensis*), 일당귀(*A. acutiloba*), 구당귀(*L. officinale*)를 대상으로 ITS 영역의 염기서열을 비교한 결과, 예상한 바와 같이 종명이 다른 일당귀, 중국당귀 및 속명이 다른 구당귀와는 다양한 단일염기다형성이 확인되었으나 국내 토종인 참당귀와 세발당귀 사이에는 유일하게 단 하나의 단일염기다형성만 확인할 수 있었다. 이 염기서열은 일당귀, 중국당귀, 구당귀와 비교하여도 유일하게 차이가 나는 것으로 조사되었다. 따라서 이 염기서열을 3'-말단 염기에 위치하게 하여 제작한 프라이머와 다른 방향의 프라이머는 임의로 종 특이적 프라이머를 제작하여 먼저 일반 PCR로 증폭을 수행한 결과 역시 예상한 바와 같이 종명 또는 속명이 다른 외국 종과는 쉽게 판별이 가능한 종 특이 밴드를 확인할 수 있었으나, 국내 토종인 참당귀와 세발당귀는 예상한 대로 다양한 유사 밴드가 확인되거나 아예 밴드가 확인이 되지 않아 판별이 불가능하였다. 그러나 3말단 염기에 인접한 3번째 염기를 다른 3가지의 염기로 변경하여 조사한 결과 "G"로 변경한 경우에 판별이 가능하여 ARMS-PCR의 효능을 확인할 수 있었다(Lee et al. 2021a).

High Resolution Melting (HRM) curve 패턴 비교 분석을 이용한 당귀속 식물의 혼재 여부 확인

HRM curve 패턴 분석기술은 온도에 따라 DNA가 보유하고 있는 고유의 녹는점(melting temperature, T_m)을 이용하여 온도에 따른 melting curve 패턴을 상호 비교하여 판별하는 기술로 post-PCR melting curve 분석 기술이라고도 한다(Han et al. 2015; Kim et al. 2018). 판별하고자 하는 종의 특정 유전자 단편 내 단일염기다형성을 확인한 다음 가장 많은 단일염기다형성을 포함하도록 하여 약 200 bp가 증폭될 수 있는 범용 프라이머를 제작하여 분석하고자 하는 계통들의 염색체 DNA를 주형으로 하여 먼저 목표 DNA를 증폭한다. 이때 PCR 반응용액에 형광염색물질(C Green PLUS, Eva green, SYTO9, ResoLight 등)을 넣고 초당 0.01 ~ 0.2°C씩 서서히 온도를 올리면서 나타나는 발색 정도를 조사한 melting curve 패턴을 상호 비교하면 단 하나의 단일염기다형성을 갖고 있는 DNA 단편의 판별도 가능하다.

HRM curve 패턴 분석기술을 이용하여 하수오(*Polygonum multiflorum*), 백수오(*Cynanchum wilfordii*), 이엽우피소(*Cynanchum*

auriculatum)의 엽록체 유전자인 *TrnL-F*와 핵내 *ITS* 영역의 SNP를 파악하여 범용 프라이머를 제작한 다음 melting curve 패턴을 조사하여 상호 비교한 결과 이들을 손쉽게 구분이 가능하였다(Han et al. 2016b). 또한, 국내의 지역별 및 중국에서 수집된 구지뽕, 엉겅퀴를 대상으로 수행한 경우에도 동일한 결과를 확인하였다(Lee et al. 2017; 2018).

이러한 선행연구 경험을 이용하여 이 등(2021b)은 국내·외에서 수집한 당귀 계통에 대하여 역시 *ITS* 영역의 단일염기다형성을 확인한 후 이를 포함하는 약 200 bp 단편을 대상으로 HRM curve 패턴을 비교한 결과 국내 자생종을 포함하여 중국당귀, 일당귀 및 구당귀의 판별이 가능하였다. 특히 국내 자생종인 참당귀와 세발당귀는 단 하나의 단일염기다형성을 포함하였으나 확연하게 다른 패턴을 나타내어 동 기술의 민감도와 정확도를 확인할 수 있었다. 나아가 수집된 각각의 시료들로부터 분리한 DNA를 대상으로 농도별로 HRM curve 패턴을 비교 조사한 결과 미지의 시료에 대한 농도를 예측할 수 있는 표준곡선의 개발이 가능한 것으로 조사되었다. 뿐만 아니라, 참당귀의 DNA에 중국당귀, 일당귀, 구당귀 등의 DNA를 동일한 비율로 혼합한 시료와 일정 농도의 다른 당귀 계통을 혼합한 시료를 대상으로 조사한 결과, melting curve 패턴이 참당귀의 단일 DNA를 사용한 경우에 비하여 상대적으로 낮아지는 현상도 확인하였다. 이러한 패턴을 참당귀의 농도별 표준곡선과 비교하면 다른 계통의 혼재 여부와 혼입 농도의 확인도 가능할 것으로 조사되었다.

이상의 연구 결과들을 종합하여 보면 당귀 속에 속하는 참당귀(*A. gigas*), 중국당귀(*A. sinensis*), 일당귀(*A. acutiloba*), 구당귀(*L. officinale*) 등은 종 또는 속명이 다르므로 *ITS* 유전자 단편 내에 다양한 SNP들이 확인되었으며, 이들을 이용한 기존의 DNA barcoding 기술로 쉽게 판별할 수 있었다. 그러나, 국내에서 자생하는 토종인 세발당귀(*A. gigas* Jiri)는 참당귀와 비교하였을 때 단 하나의 SNP가 확인되어 ARMS-PCR 기술의 적용이 필요한 것으로 조사되었다. 따라서 종내(interspecies)의 변종 또는 아종의 판별과 종간(intraspecies)에 있어서도 근연관계가 아주 가까워 목표로 하는 DNA 단편 내에 충분한 SNP가 없는 경우에는 ARMS-PCR 기술을 도입하면 가능한 것으로 조사되었다. 한편, HRM curve 패턴 분석기술은 당귀 속 계통들의 혼재 여부를 신속하게 확인할 수 있을 뿐만 아니라 혼입 비율 등의 판별도 가능한 것으로 확인되어 향후 유통 현장에 실용화를 위한 추가 연구가 필요한 것으로 조사되었다.

적 요

본 리뷰에서는 우리나라, 중국, 일본 등에서 각각 그 기원식물을 달리하는 당귀 속 식물 계통의 기원 계통을 판별하기 위한 DNA barcoding 기술의 발전현황에 관하여 조사하였다.

약용작물들에 대한 종의 기원을 판별하기 위하여 단일염기다형성을 이용한 DNA 바코드의 개발에 관한 연구가 활발하게 진행되어왔다. 그러나 가까운 근연종간에는 단일염기다형성을 보이는 염기의 수가 많지 않아 어려움이 있었다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 ARMS-PCR 및 HRM curve 패턴 비교 분석기술 등이 개발되었다. 이들 기술을 적용하여 국내 자생종 및 국외에서 수집된 당귀 계통들에 대하여 이들의 기원을 판별 할 수 있는 조건이 확립되었다. 특히 단 하나의 단일염기다형성을 보이는 국내 자생종인 참당귀와 세발당귀의 판별이 가능하여 향후 현장에 적용이 가능한 실용화 연구가 필요한 것으로 조사되었다. 그러나 이들 연구 결과는 그 기원이 확인된 계통의 시료들을 대상으로 분리한 순수 DNA를 대상으로 조사한 결과로, 현장에서 실용화하기에는 아직 보다 많은 연구가 필요하다. 실제로 일정한 비율로 혼합한 계통들을 대상으로 분리한 DNA를 대상으로 한 후속 연구가 필요하다. 또한, 수확 후 가공 및 처리 방법에 따른 시료들에 대한 후속 연구도 필요하다. 당귀와 같은 약용작물은 건조한 시료, 다양한 가공제품(잼, 젤리, 주스 등), 약탕(탕재) 등으로 유통이 되기 때문에 이들에 대한 시료별 적용 가능성에 대한 연구도 필요한 것으로 조사되었다.

References

- Blank I, Schieberle P (1993) Analysis of the seasoning-like flavour substances of a commercial lovage extract (*Levisticum officinale* Koch.). *Flavour Fragr J* 8:191-195
- Bylaite E, Venskutonis RP, Roozen JP (1998) Influence of harvesting time on the composition of volatile components in different anatomical parts of lovage (*Levisticum officinale* Koch.). *J Agric Food Chem* 46:3735-3740
- Chen C, Chen Y, Huang W, Jiang Y, Zhang H, Wu W (2019) Mining of simple sequence repeats (SSRs) loci and development of novel transferability-across EST-SSR markers from de novo transcriptome assembly of *Angelica dahurica*. *PLoS ONE* 14:e0221040
- Choi HY, Choi YJ, Lee JH, Ham IH (2004) Sequencing analysis on the *ITS* region and AFLP analysis to identify dried medicinal *Angelica* species. *Kor J Herbol* 19:91-99
- Choo BK, Moon BC, i Y, Kim BB, Choi G, Yoon TS, Kim HK (2009) 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* 32:24-30
- EMA, European Medicines Agency. Community Herbal Monograph on *Levisticum officinale* Koch, Radix; EMA, European Medicines Agency: Amsterdam, The Netherlands, 2012; Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-mono-graph/draft-community-herbal-mono-graph-levisticum-offici>

- nale-koch-radix_en.pdf (accessed on 15 January 2020)
- Feng T, Liu S, He XJ (2010) Molecular authentication of the traditional Chinese medicinal plant *Angelica sinensis* based on internal transcribed spacer of nrDNA. *Electron J Biotechnol* 13:DOI: 10.2225. <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol13/issue1/full/13/>
- Foodcode (2015) 식품의 기준 및 규격 https://members.wto.org/crnattachments/2015/SPS/KOR/15_4289_00_x.pdf
- Gil JS, Park SI, Lee Y, Kim HB, Kim SC, Kim OT, Cha SW, Jung CS, Um YR (2016) Current status and prospects of the authentication of *Angelica* species. *J Plant Biotechnol* 43: 151-156
- Han EH, Kim YH, Lee SW (2015) Development of molecular biological techniques for the differentiation of medicinal plant species. *J Plant Biotechnol* 42:6-12
- Han JP, Pang XH, Liao BS, Yao H, Song JY, Chen SI (2016a) An authenticity survey of herbal medicines from markets in China using DNA barcoding. *Sci Rep* 18723:1-6
- Han EH, Cho KM, Goo YM, Kim MB, Shin YW, Kim YH, Lee SW (2016b) Development of molecular markers, based on chloroplast and ribosomal DNA regions, to discriminate three popular medicinal plant species, *Cynanchum wilfordii*, *Cynanchum auriculatum*, and *Polygonum multiflorum*. *Mol Biol Rep* 43:323-332
- Han B-X, Yuan Y, Huang LQ, Zhao Q, Tan L-L, Song X-W, He X-M, Xu T, Liu F, Wang J (2017) Specific PCR identification between *Peucedanum praeruptorum* and *Angelica decursiva* and identification between them and adulterant using DNA barcode. *Pharmacognosy Magazine* 13:38-45
- Han L, Liu DL, Zeng QK, Shi MQ, Zhao LX, He Q, Kuang X, Du JR. (2018) The neuroprotective effects and probable mechanisms of Ligustilide and its degradative products on intracerebral hemorrhage in mice. *Int Immunopharmacol* 63:43-57
- He Y, Hou, Fan G, Song Z, Arain S, Shu H, Tang C, Yue Q, Zhang Y (2012) Authentication of *Angelica anomala* Avé-Lall cultivars through DNA barcodes. *Mitochondrial DNA* 23:100-105
- Kim SA, Oh HK, Kim JY, Hong JW, Cho SI (2011) A Review of Pharmacological Effects of *Angelica gigas*, *Angelica sinensis*, *Angelica acutiloba* and their Bioactive Compounds. *J Kor Ori Med* 32:1-24
- Kim WJ, Moon BC, Yang S, Han KS, Choi G, Lee AY. (2016) Rapid authentication of the herbal medicine plant species *Aralia continentalis* Kitag. and *Angelica biserrata* C.Q. Yuan and R.H. Shan using ITS2 sequences and multiplex-SCAR markers. *Molecules* 21:270-276
- Kim YH, Shin YW, Lee SW (2018) Practical application of the Bar-HRM technology for utilization with the differentiation of the origin of specific medicinal plant species. *J Plant Biotechnol* 45:9-16
- Korea Food & Drug Administration, “The Korean Herbal Pharmacopoeia,” Korea Food & Drug Administration, Seoul, 2006
- Lee MY, Li SH, Ju S, Han KS, Jeong GJ, An DG, Kang HC, Ko BS (2000) Discrimination of the three *Angelica* species using the RAPDs and Internal Root Structure. *Kor J Med Crop Sci* 8:243-249
- Lee SJ, Shin YW, Kim YH, Lee SW (2017) Identification of specific SNP molecular marker from *Cudrania tricuspidata* using DNA sequences of chloroplast TrnL-F region. *J Plant Biotechnol* 44:135-141
- Lee SW, Lee SJ, Kim YH (2018) Development of specific SNP molecular marker from Thistle using DNA sequences of ITS region. *J Plant Biotechnol* 45:102-109
- Lee SW, Lee SJ, Han EH, Shin YW, Kim YH (2021a) Development of molecular markers for the differentiation of *Angelica gigas* Jiri line by using ARMS-PCR analysis. *J Plant Biotechnol* 48:26-33
- Lee SW, Lee SJ, Han EH, Shin YW, Kim YH (2021b) Development of specific polymorphism molecular markers for *Angelica gigas* Nakai. *J Plant Biotechnol* 48:71-76
- Liu Q, Lu Z, He W, Li F, Chen W, Li C, Chao Z, Tian E (2020a) Development and characterization of 16 novel microsatellite markers by transcriptome sequencing for *Angelica dahurica* and test for cross-species amplification. *BMC Plant Biol* 20:152-160
- Liu M, Hu X, Wang X, Zhang J, Peng X, Hu Z and Liu Y (2020b) Constructing a core collection of the medicinal plant *Angelica biserrata* using genetic and metabolic data. *Front Plant Sci* 11:600249
- Long FY, Shi MQ, Zhou HJ, Liu DL, Sang N, Du JR. (2018) Klotho upregulation contributes to the neuroprotection of ligustilide against cerebral ischemic injury in mice. *Eur J Pharmacol* 820:198-205
- Lu Y, Cheng T, Zhu T, Jiang D, Zhou S, Jin L, Yuan Q, Luqi Huang L (2015) Isolation and characterization of 18 polymorphic microsatellite markers for the “Female Ginseng” *angelica sinensis* (Apiaceae) and cross-species amplification. *Biochem Sys Ecol* 61:488-492
- Ma Z, Bai, L. (2012) The anti-inflammatory effect of Z-Ligustilide in experimental ovariectomized osteopenic rats. *Inflammation* 35:1793-1797
- Ma Z, Bai L (2013) Anti-inflammatory Effects of Z-Ligustilide Nanoemulsion. *Inflammation* 36:294-299
- Mei Z, Zhang C, Khan MA, Zhu Y, Tania M, Luo P, Fu J (2015) Efficiency of improved RAPD and ISSR markers in assessing genetic diversity and relationships in *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels varieties of China. *Electron J Biotechnol* 18:96-102
- Mizukami H, Hao BS, Tanaka T (1997) Nucleotide sequence of 5S-rDNA intergenic spacer region on *Angelica acutiloba*. *Nat Med* 51:376-378
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE (1989) Analysis of point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucl Acids Res* 17:2503-2516
- Noh P, Kim WJ, Yang S, Park I, Moon BC (2018) Authentication of the herbal medicine *Angelicae Dahuricae* Radix using an ITS sequence-based multiplex SCAR assay. *Molecules* 23:2134-2146
- Park IK, Yang S, Kim WJ, Song JH, Lee HS, Lee HO, Lee JH, Ahn SN, Moon BC (2019) Sequencing and comparative analysis of the chloroplast genome of *Angelica polymorpha* and the development of a novel indel marker for species. *Molecules*

- 24:1038-1052
- Sung JS, Bang KW, Park CH, Park CG, Yu HS, Park HW, Seong NS (2004) Discrimination of *Angelicae Radix* Based on Anatomical Characters. *Kor J Med Crop Sci* 12:67-72
- Yu HS, Park CH, Park CG, Kim YG, Park HW, Seong NS (2004) Growth characteristics and yield of the three species of genus *Angelica*. *Kor J Med Crop Sci* 12:43-46
- Yuan QJ, Zhang B, Jiang D, Zhang WJ, Lin TY, Wang NH, Chiou SJ, Huang LQ (2015) Identification of species and materia medica within *Angelica L.* (*Umbelliferae*) based on phylogeny inferred from DNA barcodes. *Mol Ecol Resour* 15:358-371
- Zhang X, Ji K, Li Y, Chen C, Li X, Liu L (2003) Studies on establishing rRNA gene map of *Angelica sinensis* and *Rheum palmatum* from Gansu by DNA sequencing. *J Chi Med Mat* 26:481-4
- Zhang C, Mei Z, Cheng J, He Y, Khan MA, Luo P, Imani S, Fu J (2015) Development of SCAR markers based on improved RAPD amplification fragments and molecular cloning for authentication of herbal medicines *Angelica sinensis*, *Angelica acutiloba* and *Levisticum officinale*. *Nat Prod Com* 10: 1743-1747
- Zhao KJ, Dong TTX, Tu PF, Song ZH, Lo CK, Tsim KWK (2003) Molecular genetic and chemical assessment of radix *Angelica* (*Danggui*) in China. *J Agr Food Chem* 51:2576-25