



nrDNA ITS 및 엽록체 DNA 염기서열 분석에 의한 유통 한약재 오갈피 판별

김정훈* · 변지희* · 박효섭* · 이정훈** · 이상원** · 차선우** · 조준형*†

*동국대학교 바이오환경과학과, **농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부

Authentication of Traded Traditional Medicine Ogapi Based on Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers and Chloroplast DNA Sequences

Jeong Hun Kim*, Ji Hui Byeon*, Hyo Seop Park*, Jeong Hoon Lee**,
Sang Won Lee**, Sun Woo Cha** and Joon Hyeong Cho*†

*Department of Biological and Environmental Science, Dongguk University, Seoul 10326, Korea.

**Department of Herb Crop Resources, NIHHS, RDA, Eumseong 27709, Korea.

ABSTRACT

Background : Plants belonging to 5 species of the genus *Eleutherococcus* are currently distributed in the Korean peninsula. The traditional medicine ‘Ogapi’, derived from *Eleutherococcus sessiliflorus* and other related species, and ‘Gasiogapi’, derived from *Eleutherococcus senticosus*, are frequently mixed up and marketed. Therefore, accurated identification of their origins in urgently required.

Methods and Results : Candidate genes from nuclear ribosomal DNA (nrDNA) and chloroplast DNA (cpDNA) of *Eleutherococcus* plants were analyzed. Whereas the nrDNA-internal transcribed spacer (ITS) regions were useful in elucidating the phylogenetic relationships among the plants, the cpDNA regions were not as effective. Therefore, a combined analysis with nrDNA-ITS was performed. Various combinations of nrDNA and *matK* were effective for discriminating among the plants. However, the *matK* and *rpoC1* combination was ineffective for discriminating among some species. Based on these results, it was found that OG1, OG4, OG5, OG7, GS1, GS2, and GS3 were derived from *E. sessiliflorus*. In particular, it was confirmed that GS1, GS2, and GS3 were not derived from *E. senticosus*. However, more samples need to be analyzed because identification of the origins of OG2, OG3, OG6 and GS4 was not possible.

Conclusion : The ITS2, ITS5a, and *matK* combination was the most effective in identifying the phylogenetic relationship among *Eleutherococcus* plants and traditional medicines based on *Eleutherococcus*.

Key Words : *Eleutherococcus*, Chloroplast DNA, DNA Barcoding, Internal Transcribed Spacers, Nuclear Ribosomal DNA

서 언

두릅나무과 (Araliaceae) 다년생 낙엽관목인 오갈피속 (*Eleutherococcus*) 식물은 한국을 비롯한 중국 동북지역, 러시아 우수리강 유역, 일본 북해도 등 동북아시아에 약 35종이 분포하며, 국내에는 오갈피나무 (*Eleutherococcus sessiliflorus*), 가시오갈피 (*E. senticosus*), 털오갈피 (*E. divaricatus*), 지리산 오갈피 (*E. divaricatus* var. *chiisanensis*), 섬오갈피나무 (*E. gracilistylus*) 총 5종이 자생하는 것으로 알려져 있다.

오갈피속 식물의 뿌리 및 줄기는 강장작용, 피로회복 및 인체 저항력 증진 등의 약리효과가 있어 예로부터 민간약으로 이용되어 왔다 (Kim, 1997). 이들의 약리효과는 면역조절 (Kim *et al.*, 2004), 항피로, 항우울 및 항스트레스 (Deyama *et al.*, 2001)뿐만 아니라 최근 항산화 (Heo *et al.*, 2011), 혈당강하 및 항당뇨 (Lim *et al.*, 2010)에 이르기까지 다양하게 보고되어 있다.

국내 약재시장에서 오갈피나무는 ‘오갈피 (五加皮)’로, 가시오갈피는 ‘가시오갈피’로 유통되고 있다. 대한민국약전 제 10

†Corresponding author: (Phone) +82-31-961-5124 (E-mail) jhcho@dongguk.edu

Received 2015 October 1 / 1st Revised 2015 October 8 / 2nd Revised 2015 October 21 / 3rd Revised 2015 November 5 / Accepted 2015 November 5
This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

개정 (MFDS, 2015)에서 오가피 (五加皮)는 오갈피나무 또는 기타 동속식물의 뿌리껍질 및 줄기껍질로 정의된다. 또한 가시오가피는 대한민국약전외한약(생약)규격집 (MFDS, 2013)에서 ‘자오가 (刺五加)’로 기재되어 있으며, 가시오갈피의 뿌리 및 뿌리줄기로 정의된다. 이렇듯 대한약전에 오가피와 가시오가피가 구분 기재되어 있음에도 혼용 유통되는 사례가 많아 (Kim *et al.*, 1997) 오갈피속 식물종을 포함한 약재 간에 명확한 기원정립이 요구된다.

현재까지 오가피 기원정립을 위해 형태적 판별 연구 (Kim *et al.*, 1997, 2008), 이화학적 성분 분석 (Kim *et al.*, 2009), 분자유전학적 계통변이 분석 (Huh *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 2000) 등 많은 연구가 진행되어 왔다. 오갈피속 식물은 형태적 특성 분석을 통해 감별 가능하나 (Kim *et al.*, 2008), 1년생과 2년생 이상 가지의 가지밀생도 및 색상차이 등 동일 개체 내 변이가 큰 것으로 보고되었으며 (Kim *et al.*, 1997), 재배지역 및 시기, 부위 등에 따라 성분차이가 있어 (Kim *et al.*, 1996) 형태 및 이화학적 분석은 오갈피 종판별에 한계가 있다.

DNA 마커를 이용한 분자유전학적 판별 기법은 재배환경조건에 영향을 받지 않아 다양한 약용식물 기원정립의 대안으로 제시되고 있다 (Li *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014). 오갈피속 식물을 대상으로 한 분자유전학적 판별에는 RAPD (Huh *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 1998), ISSR 표지자 분석 (Hong *et al.*, 2000) 등의 연구가 수행되었으나 이들보다 재현성이 높고 특이적 마커 선발이 가능한 분석법의 확립이 필요하다. Consortium for the Barcode of Life (CBOL)가 제안한 DNA barcoding 기술은 nrDNA (nuclear ribosomal DNA) 및 cpDNA (chloroplast DNA)의 후보유전자 구간으로부터 탐색된 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 차이를 통해 식물 종을 판별하는 방법으로 신속성, 정확성, 보편성 측면에서 식물 종간 변이 분석에 유용하다 (CBOL Plant Working Group, 2009). 이와 관련하여 Lim 등 (2012)은 감초종 및 약재 판별연구에 DNA barcoding을 적용하였으며, Kim 등 (2014)은 이를 동굴레속 식물 종간 유연관계에 적용한 바 있다. 오갈피속 식물을 대상으로 ITS (internal transcribed spacer) 염기서열을 이용한 유연관계 분석 (Han *et al.*, 2006) 등이 수행된 바 있으나 이외의 DNA barcoding 기술을 이용한 기원정립 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 nrDNA 및 cpDNA 구간 염기서열 분석을 통하여 오갈피속 식물 종간 유연관계 분석을 수행하였으며, 이를 시중 유통 오가피 한약재 판별에 적용함으로써 한약재 유통 질서 확립과 품질 향상에 기여하고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 공시재료

본 연구를 위해 국립농업유전자원센터에 등록된 가시오갈피 (*Eleutherococcus senticosus*, IT239073, IT239084, IT239239, IT239040, IT239279) 5점과 오갈피나무 (*Eleutherococcus sessiliflorus*), 지리산오갈피 (*Eleutherococcus divaricatus* var. *chiisanensis*), 섬오갈피나무 (*Eleutherococcus gracilistylus*) 각각 1점씩 총 4종의 자생종을 비롯하여, 중국 원산 재배종으로 알려진 오가나무 (*Eleutherococcus sieboldianus*) 1점을 강원도 농업기술원 인삼약초연구소로부터 분양받아 공시재료로 이용하였다. 또한, NCBI (National Center for Biotechnology Information) Genbank에 등록된 12점의 염기서열 정보를 본 연구에 사용한 오갈피속 식물 5종과 비교하였다. 한편, 국내 유통 오가피 한약재 판별을 위해 서울약령시장, 금산약재시장, 대구약령시장으로부터 다양한 명칭으로 유통 중인 국내산 오가피 10점과 중국산 1점, 총 11점을 수집하여 약재 판별에 이용하였다 (Table 1).

2. 외부 형태적 분석

오갈피속 식물체 5종에 대한 형태적 분석을 위해 원색대안 식물도감 (Lee, 2006)을 참고하여 잎과 줄기의 형태를 비교하였다. 잎의 경우, 엽형, 엽색을 비롯하여 엽장 및 엽폭, 장폭비를 측정하였으며, 줄기는 수피의 색상 및 가시의 유무 및 형태를 바탕으로 특성을 비교하였다.

3. DNA 추출 및 PCR 분석

오갈피속 식물의 nrDNA 및 cpDNA를 추출하기 위해 식물체의 잎으로부터 HiYield™ Genomic DNA Mini Kit (RBC Bioscience Co., Taipei, Taiwan)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 처리하였다. 추출된 DNA는 Multiskan GO UV/Vis microplate spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 농도 및 순도를 확인하였으며, 각각의 시료를 20 ng/μl로 정량하여 PCR 반응에 이용하였다. PCR 분석을 위해 nrDNA 구간인 internal transcribed spacers (ITS2 및 ITS5a), 그리고 cpDNA 구간인 Maturase K (*matK*), RuBisCO large subunit (*rbcL*), RNA polymerase subunit (*rpoB2* 및 *rpoC1*)의 서열 내에서 primer를 제작하여 사용하였으며, PCR 증폭은 40 ng genomic DNA와 forward 및 reverse primer 10 pmol, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 1.25 unit Taq-DNA polymerase와 함께 총 반응액을 50 μl로 하여 PTC-200 DNA Engine thermo cycler (Bio-Rad Co., Waltham, MA, USA)에서 각 primer 조건별로 수행하였다 (Table 2). PCR 증폭은 결과의 신

Table 1. *Eleutherococcus* accessions used in this research.

No.	Code ¹⁾	Origin	Collected region	Voucher	Note
1	ESS	<i>Eleutherococcus sessiliflorus</i>	Cherwon	–	fresh
2	ECS	<i>E. divaricatus</i> var. <i>chiisanensis</i>	Cherwon	–	fresh
3	EGR	<i>E. gracilistylus</i>	Cherwon	–	fresh
4	ESB	<i>E. sieboldianus</i>	Cherwon	–	fresh
5	ESC1	<i>E. senticosus</i>	Cherwon	IT239073	fresh
6	ESC2	<i>E. senticosus</i>	Cherwon	IT239084	fresh
7	ESC3	<i>E. senticosus</i>	Cherwon	IT239239	fresh
8	ESC4	<i>E. senticosus</i>	Cherwon	IT239040	fresh
9	ESC5	<i>E. senticosus</i>	Cherwon	IT239279	fresh
10	OG1	Ogapi	Geumsan Medicinal Market		dried
11	OG2	Ogapi	Geumsan Medicinal Market		dried
12	OG3	Ogapi(China)	Seoul Medicinal Market		dried
13	OG4	Ogamok	Geumsan Medicinal Market		dried
14	OG5	Ogamok	Daegu Medicinal Market		dried
15	OG6	Ogalpinamu	Daegu Medicinal Market		dried
16	OG7	Jinogapi	Daegu Medicinal Market		dried
17	GS1	Gasiogapi	Daegu Medicinal Market		dried
18	GS2	Gasiogapi	Seoul Medicinal Market		dried
19	GS3	Gasiogapi	Seoul Medicinal Market		dried
20	GS4	Gasiogapi	Geumsan Medicinal Market		dried
21	I-ESS	<i>E. sessiliflorus</i>	NCBI Genbank	FJ980421	gene
22	I-ESC	<i>E. senticosus</i>	NCBI Genbank	AJ786230	gene
23	I-EGR	<i>E. gracilistylus</i>	NCBI Genbank	KJ170232	gene
24	I-ESB	<i>E. sieboldianus</i>	NCBI Genbank	KJ170230	gene
25	M-ESS	<i>E. sessiliflorus</i>	NCBI Genbank	DQ133782	gene
26	M-ESC1	<i>E. senticosus</i>	NCBI Genbank	AB080246	gene
27	M-ESC2	<i>E. senticosus</i>	NCBI Genbank	AB571641	gene
28	L-ESS	<i>E. sessiliflorus</i>	NCBI Genbank	DQ133796	gene
29	L-ESC	<i>E. senticosus</i>	NCBI Genbank	GQ436704	gene
30	L-EGR	<i>E. gracilistylus</i>	NCBI Genbank	GQ436710	gene
31	B-ESC	<i>E. senticosus</i>	NCBI Genbank	KF412447	gene
32	B-EGR	<i>E. gracilistylus</i>	NCBI Genbank	KF412457	gene

¹⁾I; ITS, M; matK, L; rbcL, B; rpoB2.

Table 2. Primer sequences and PCR conditions of candidate genes.

Region		Sequence (5' → 3')	Annealing	Reaction Cycle
nrDNA	ITS2	(F)GACGCTTCTCCAGACTACAA (R)ATGCCGATACTTGGTGTGAAT	57°C	40
	ITS5a	(F)CCCTTATCATTAGAGGAAGGA (R)TCCTCCGCTTATTGATATGC	56°C	40
cpDNA	<i>rbcL</i>	(F)ATGTCACCACAAACAGAAAC (R)TCGCATGTACCTGCAGTAGC	55°C	35
	<i>matK</i>	(F)CGATCTATTCAATATTTT (R)TCTAGCACACGAAAGTCAAGT	52°C	35
	<i>rpoB2</i>	(F)ATGCAACGTC AAGCAGTTCC (R)GATCCCAGCATCACAATTCC	55°C	35
	<i>rpoC1</i>	(F)TGAGAAAACATAAAGTAAACG (R)GTGGATACACTTCTTGATAA	53°C	40

되도를 높이기 위하여 각 식물시료 당 2회씩 반복하였다.

4. 염기서열 및 분자계통학적 유연관계 분석

증폭된 PCR 산물은 정제 후 (주)제노텍 (Genotech Inc., Daejeon, Korea)에 의뢰하여 ABI Prism 3730xl DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)로 염기서열을 분석하였다. 각 시료의 염기서열은 BioEdit version 7.2.5 프로그램 (<http://bioedit.software.informer.com/>)의 ClustalW multiple alignment로 정렬한 후 MEGA6 (molecular evolutionary genetics analysis version 6.0) (Tamura *et al.*,

2004)의 Kimura 2-parameter method로 유전적 거리를 계산하여 neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) 방법으로 phylogenetic tree를 작성하였다. 계통수에 대한 지지도는 bootstrap 값을 1000회 반복하여 평가하였다 (Felsenstein, 1985).

결과 및 고찰

1. 외부 형태적 특성 비교

오갈피속 식물 잎의 형태적 특성은 모두 5출엽인 장상복엽

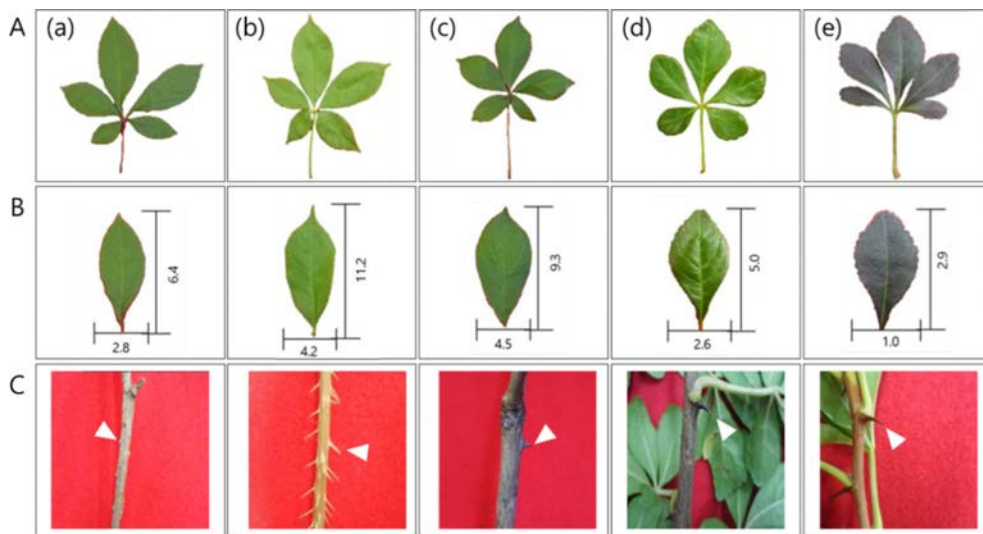


Fig. 1. Morphological characteristics of leaves, leaflets and branches of *Eleutherococcus* species. (a); *E. sessiliflorus*, (b); *E. senticosus*, (c); *E. divaricatus* var. *chiisanensis*, (d); *E. gracilistylus*, (e); *E. sieboldianus*.

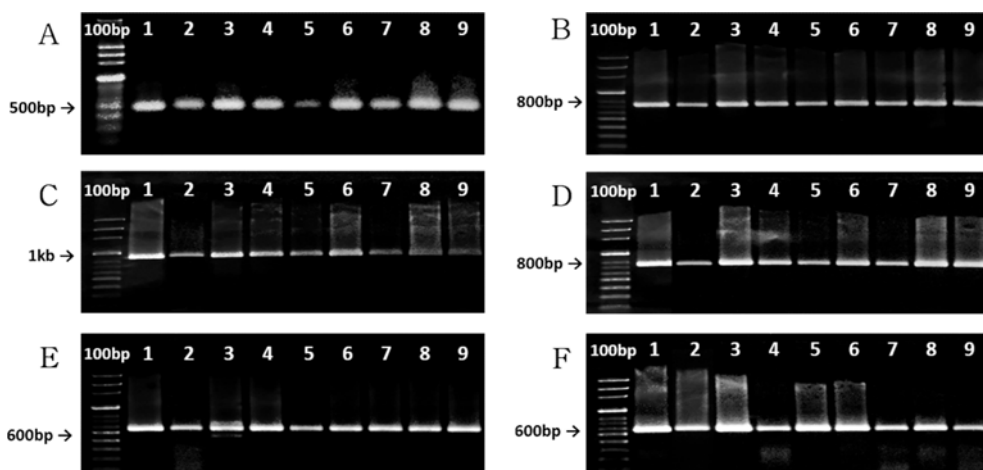


Fig. 2. PCR products of *Eleutherococcus* spp. A; nrDNA ITS2, B; nrDNA ITS5a, C; cpDNA *matK*, D; cpDNA *rbcL*, E; cpDNA *rpoB2*, F; cpDNA *rpoC1*, 1; *E. sessiliflorus*, 2; *E. divaricatus* var. *chiisanensis*, 3; *E. gracilistylus*, 4; *E. sieboldianus*, 5; *E. senticosus* (Yangpyeong-Yongmunsa), 6; *E. senticosus* (Bukhaedo), 7; *E. senticosus* (Cheorwon-Daeseongsan), 8; *E. senticosus* (Baekjeoksan), 9; *E. senticosus* (China).

으로, 오갈피나무의 소엽은 잎의 장폭비가 약 1:2.3인 도란상 타원형, 가시오갈피와 지리산오갈피는 각각 1:2.7과 1:2.2 비율의 타원상 도란형, 섬오갈피나무 및 오가나무는 각각 1:1.9와 1:2.9 비율의 도피침형이었다. 가지의 형태에 있어서 오갈피나무, 지리산오갈피, 섬오갈피나무는 회갈색, 그리고 가시오갈피와 오가나무는 회백색을 보였으며, 가지 경침 형태 또한 다양하였다. 오갈피나무의 가지에는 경침 흔적만이 확인된 반면, 지리산오갈피와 섬오갈피나무의 경우 경침이 짧았고, 가시오갈피와 오가나무에서는 다소 긴 경침이 관찰되었다. 관찰된 가시오갈피의 형태는 회갈색으로 기재된 원색대한식물도감 (Lee, 2006)의 내용과 상이하였으며, 엽색의 경우 광택이 있는 섬오갈피나무 및 진녹색의 오가나무와는 쉽게 구분되었으나 오갈피나무 및 지리산오갈피와는 구분이 어려웠다 (Fig. 1). 한편 Kim 등 (1997)은 가시오갈피가 동일 개체 내에서도 변이가 크다고 보고하였는데, 섬오갈피나무에서도 생육단계에 따라 어린 가지와 과년지 (過年枝)에서 경침의 발달에 차이를 보이므로 형태적 특성에 의한 오갈피속 식물 종판별은 어려울 것으로 생각된다.

2. DNA barcoding에 의한 오갈피속 5종의 계통 분류

오갈피속 식물 5종에 대하여 nrDNA 구간인 ITS2, ITS5a와 cpDNA 구간인 *matK*, *rbcL*, *rpoB2*, *rpoC1*을 증폭한 결과, ITS2는 450 - 500 bp, ITS5a에서는 700 - 800 bp 범위에서 증폭 밴드가 확인되었고, *matK*와 *rbcL*에서는 각각 900 bp - 1 kb와 700 - 800 bp, *rpoB2*와 *rpoC1*은 500 - 600 bp 범위에서 확인되었다 (Fig. 2). DNA barcoding은 이종 식물 간 동일 유전자 구간의 SNP 차이에 의해 식물 종을 구분하는 방법으로, 분석대상이 되는 이종 식물의 동일 유전자 구간의 크기는 통상적으로 유사하다 (Hollingsworth *et al.*, 2011). 오갈피속 식물을 대상으로 한 각 유전자 구간의 PCR 결과는 감초 (Lim *et al.*, 2012), 방풍 (Lim *et al.*, 2013), 둥굴레 (Kim

et al., 2014) 등 타과 식물 대상 연구로부터 얻어진 밴드의 크기와 유사한 것으로 확인되어 Hollingsworth 등 (2011)의 보고와 일치하였다. 증폭된 PCR 산물은 염기서열분석을 진행하였으며 ITS2와 ITS5a는 각각 423 bp, 615 bp, *matK*, *rbcL*, *rpoB2*, *rpoC1*에서는 각각 752 bp, 675 bp, 415 bp, 487 bp 구간을 대상으로 SNP 및 phylogeny 분석을 통해 종간 유연관계를 확인하였다.

1) Nuclear ribosomal DNA (nrDNA) ITS 구간 계통 분석

ITS2 구간에서 발견된 SNP는 총 20개로 (Table 3), 오갈피나무 (*E. sessiliflorus*: ESS), 지리산오갈피 (*E. divaricatus* var. *chiisanensis*: ECS), 섬오갈피나무 (*E. gracilistylus*: EGR), 오가나무 (*E. sieboldianus*: ESB), 가시오갈피 (*E. senticosus*: ESC) 총 5종의 오갈피속 식물 모두 phylogenetic tree 상에서 각각 다른 집단으로 분지되었다. 가시오갈피 집단의 경우, ESC5를 제외한 나머지 4개의 개체들이 한 집단으로 유집되었으며, ESC5의 경우, 다른 가시오갈피 종들과 근접한 분지양상이 나타나 종내 변이의 가능성을 보여주었다. 이는 가시오갈피 군락 간 유전변이 발생도가 타종보다 높으며 (Hong *et al.*, 2000), 군락이 위치한 지역 환경에 따른 유전변이에 기인한 것으로 사료된다.

ITS5a 구간에서는 총 29개의 SNP가 확인되었으며 (Table 4), 이를 바탕으로 phylogenetic tree로 나타낸 결과, ITS2와 마찬가지로 오갈피속 식물 5종이 각각의 집단으로 분지되었다. 한편 5개체의 가시오갈피가 97%의 높은 지지도로 하나의 집단으로 유집되어, ESC5가 독립적으로 분지되었던 ITS2의 결과와 차이를 보였다 (Fig. 3). 이러한 차이는 ITS2 구간에서 가시오갈피 종내 개체 간 차이를 보이는 SNP가 발견된 것에 기인하며, ESC5의 ITS2 구간 염기서열 결과는 가시오갈피 종내 변이 연구에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

Table 3. SNPs of 5 *Eleutherococcus* species by using the primers of nrDNA (ITS2).

Origin	Code	ITS2																			
		4	7	17	64	71	72	77	88	108	124	154	158	196	206	210	211	217	218	221	409
<i>E. sessiliflorus</i>	ESS	G	G	T	C	C	C	T	G	C	T	G	A	C	T	A	C	G	T	G	C
<i>E. divaricatus</i> var. <i>chiisanensis</i>	ECS	G	G	T	C	C	C	T	A	C	T	A	A	C	T	A	C	G	T	G	C
<i>E. gracilistylus</i>	EGR	G	G	T	A	T	T	C	A	C	C	A	G	C	G	G	A	G	C	G	T
<i>E. sieboldianus</i>	ESB	A	G	C	C	C	C	T	A	T	C	A	A	T	G	G	C	A	C	A	C
<i>E. senticosus</i>	ESC1	G	G	C	C	C	C	T	A	C	T	A	A	C	G	G	C	G	C	G	C
<i>E. senticosus</i>	ESC2	G	G	C	C	C	C	T	A	C	T	A	A	C	G	G	C	G	C	G	C
<i>E. senticosus</i>	ESC3	G	G	C	C	C	C	T	A	C	T	A	A	C	G	G	C	G	C	G	C
<i>E. senticosus</i>	ESC4	G	G	C	C	C	C	T	A	C	T	A	A	C	G	G	C	G	C	G	C
<i>E. senticosus</i>	ESC5	G	C	C	C	C	C	G	A	C	T	A	A	C	G	G	C	G	C	G	C

Table 4. SNPs of 5 *Eleutherococcus* species by using the primers of nrDNA (ITS5a).

Origin	Code	ITS5a														
		12	29	45	47	55	74	75	125	134	166	171	307	320	367	374
<i>E. sessiliflorus</i>	ESS	T	G	G	A	G	T	T	T	C	A	T	G	T	C	C
<i>E. divaricatus</i> var. <i>chiisanensis</i>	ECS	T	A	G	G	G	G	T	C	C	A	T	G	C	A	T
<i>E. gracilistylus</i>	EGR	T	A	G	G	G	G	T	C	C	A	C	G	T	A	T
<i>E. sieboldianus</i>	ESB	C	G	T	G	G	G	T	C	A	A	T	A	C	C	C
<i>E. senticosus</i>	ESC1	C	G	G	G	T	G	C	C	C	G	T	G	C	C	C
<i>E. senticosus</i>	ESC2	C	G	G	G	T	G	C	C	C	G	T	G	C	C	C
<i>E. senticosus</i>	ESC3	C	G	G	G	T	G	C	C	C	G	T	G	C	C	C
<i>E. senticosus</i>	ESC4	C	G	G	G	T	G	C	C	C	G	T	G	C	C	C
<i>E. senticosus</i>	ESC5	C	G	G	G	T	G	C	C	C	G	T	G	C	C	C

Origin	Code	ITS5a													
		375	380	391	411	427	457	461	499	509	513	514	520	521	524
<i>E. sessiliflorus</i>	ESS	C	T	G	C	T	G	A	C	T	A	C	G	T	G
<i>E. divaricatus</i> var. <i>chiisanensis</i>	ECS	T	C	A	C	C	A	G	C	G	G	A	G	C	G
<i>E. gracilistylus</i>	EGR	T	C	A	C	C	A	G	C	G	G	A	G	C	G
<i>E. sieboldianus</i>	ESB	C	T	A	T	C	A	A	T	G	G	C	A	C	A
<i>E. senticosus</i>	ESC1	C	T	A	C	T	A	A	C	G	G	C	G	C	G
<i>E. senticosus</i>	ESC2	C	T	A	C	T	A	A	C	G	G	C	G	C	G
<i>E. senticosus</i>	ESC3	C	T	A	C	T	A	A	C	G	G	C	G	C	G
<i>E. senticosus</i>	ESC4	C	T	A	C	T	A	A	C	G	G	C	G	C	G
<i>E. senticosus</i>	ESC5	C	T	A	C	T	A	A	C	G	G	C	G	C	G

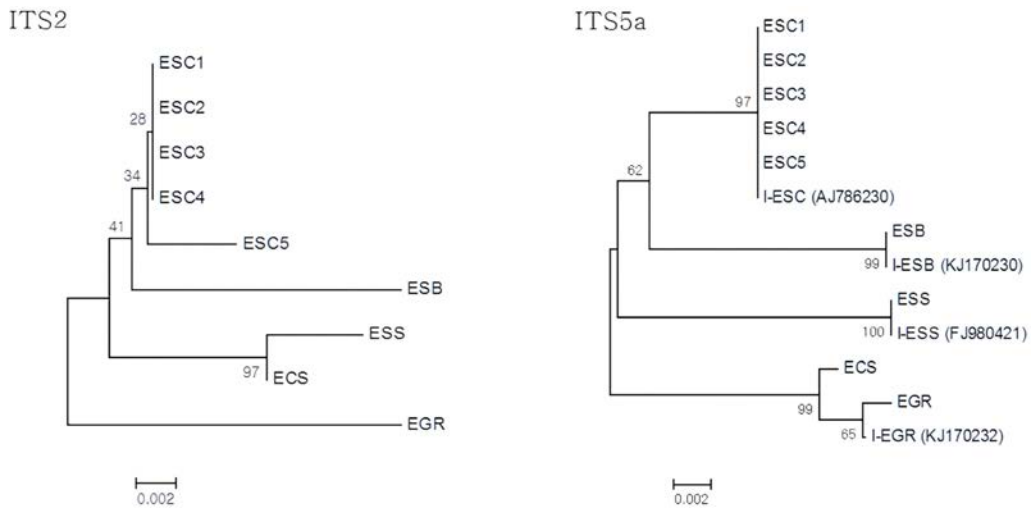


Fig. 3. Neighbor-joining trees of nrDNA sequences of *Eleutherococcus* species. ESS; *E. sessiliflorus*, ECS; *E. divaricatus* var. *chiisanensis*, EGR; *E. gracilistylus*, ESB; *E. sieboldianus*, ESC; *E. senticosus*.

2) Chloroplast DNA (cpDNA) 구간 계통 분석
matK 구간에서 확인된 SNP는 총 8개로 (Table 5), 이에 대한 phylogenetic tree 분석 결과 오갈피나무와 지리산오갈피가 타종들과 구분되었으며, 섬오갈피나무, 오가나무, 가시오갈

피는 하나의 집단으로 유집되어 서로 구분되지 않았다. 한편, ESC2의 경우 나머지 가시오갈피 개체들과 상대적으로 큰 유전적 차이로 분지되었으며, NCBI에 등록된 가시오갈피 M-ESC1은 다른 가시오갈피 종들과 독립된 분지양상을 보여, 이

Table 5. SNPs of 5 *Eleutherococcus* species by using the primers of cpDNA (*matK*, *rbcl*, *rpoB2* and *rpoC1*).

Origin	Code	<i>matK</i>								<i>rbcl</i>		<i>rpoB2</i>	<i>rpoC1</i>	
		42	248	322	461	495	512	619	742	622	625	38	208	388
<i>E. sessiliflorus</i>	ESS	C	T	T	C	T	C	G	G	A	A	A	A	A
<i>E. divaricatus</i> var. <i>chiisanensis</i>	ECS	T	G	C	G	C	C	C	G	C	T	G	G	G
<i>E. gracilistylus</i>	EGR	T	G	C	G	T	T	G	A	C	T	G	A	A
<i>E. sieboldianus</i>	ESB	T	G	C	G	T	T	G	A	C	T	G	G	G
<i>E. senticosus</i>	ESC1	T	G	C	G	T	T	G	A	C	T	G	A	A
<i>E. senticosus</i>	ESC2	T	G	C	G	T	C	G	G	C	T	G	A	A
<i>E. senticosus</i>	ESC3	T	G	C	G	T	T	G	A	C	T	G	A	A
<i>E. senticosus</i>	ESC4	T	G	C	G	T	T	G	A	C	T	G	A	A
<i>E. senticosus</i>	ESC5	T	G	C	G	T	T	G	A	C	T	G	A	A

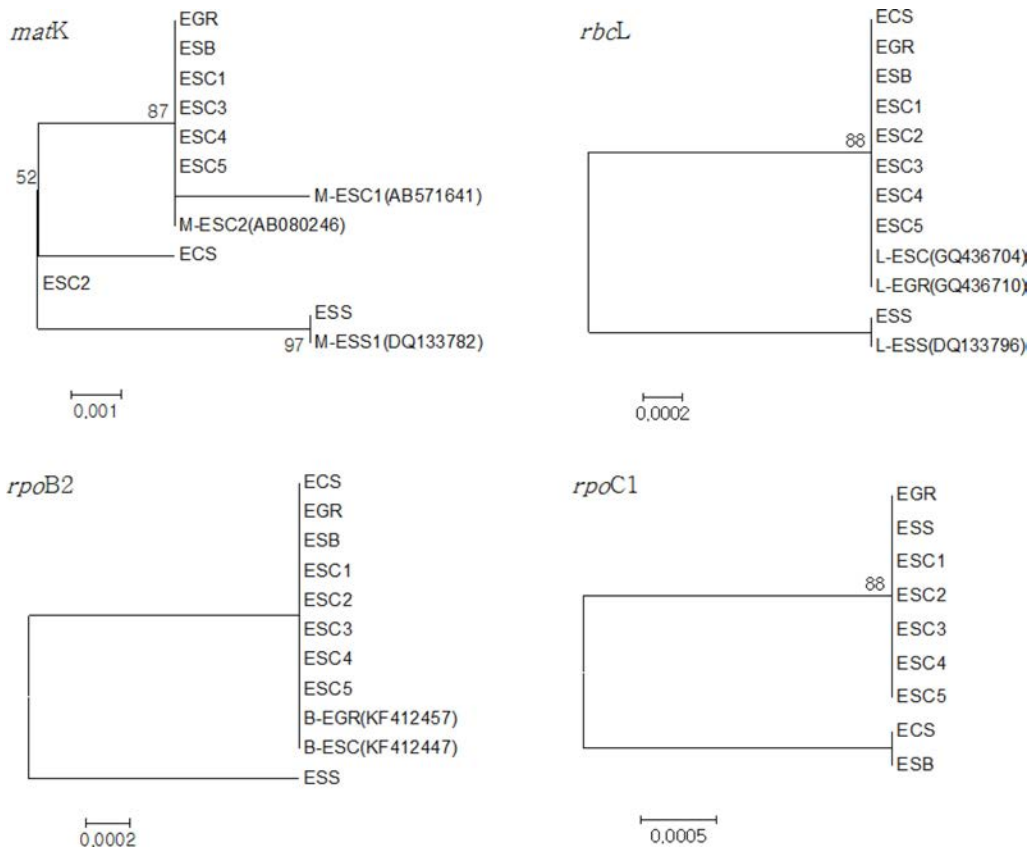


Fig. 4. Neighbor-joining trees of cpDNA sequences of *Eleutherococcus* spp. ESS; *E. sessiliflorus*, ECS; *E. divaricatus* var. *chiisanensis*, EGR; *E. gracilistylus*, ESB; *E. sieboldianus*, ESC; *E. senticosus*.

들 개체에서 종내 변이가 발생하였을 것으로 사료된다. 오갈피속 식물 종의 *rbcl* 구간 내 SNP는 2개, *rpoB2* 구간 내의 경우 1개로 (Table 5), 이에 대한 phylogenetic tree 분석 결과 오갈피나무만 구분되고 나머지 종은 한 집단으로 유집되는 양상을 보였다. 한편, *rpoC1* 구간의 경우 총 2개의 SNP가 발견되었다 (Table 5). Phylogenetic tree 상에서 오갈

피나무와 가시오갈피 및 섬오갈피나무가 하나의 집단으로, 그리고 지리산오갈피와 오가나무가 동일 집단으로 유집되어 전반적으로 *rpoC1* 구간 내에서는 오갈피속 식물 종이 구분되지 않았다 (Fig. 4). 본 연구 결과와 관련하여, *rbcl*은 거의 모든 식물에 적용가능하나 진화속도가 느려 식별력이 떨어진다는 보고가 있으며 (CBOL Plant Working Group, 2009; Little,

2014), *rpoB2* 및 *rpoC1*의 경우, 적은 SNP로 Kim 등 (2014)의 연구 결과와 유사한 경향을 보인 바, 근연 종간 판별력이 낮은 것으로 사료된다.

3) nrDNA 및 cpDNA 구간 조합 분석

본 연구에서 nrDNA ITS2 및 ITS5a 단독 이용만으로 오갈피속 5종에 대한 구분이 가능하였다. 그러나 cpDNA 구간은 단독 primer 만으로는 종간 구분에 한계를 보여 Kim 등 (2014)의 연구결과와 일치하였으며, cpDNA 구간의 판별능에 대한 한계를 보완하기 위해 nrDNA와 cpDNA 구간의 조합 분석을 수행하였다. cpDNA 구간 중 *rbcL*과 *rpoB2*는 오갈피나무를 제외한 나머지 종에 대한 판별 유용성이 크지 않아 조합 대상 구간에서 제외하였다. ITS2와 *matK* 구간을 조합한 결과, ITS2에 의한 분석결과와 달리 ESC2가 추가적으로 분리되었다 (Fig. 5A). ITS5a와 *matK* 구간 조합 결과, *matK* 단독 이용 시 구분되지 않았던 오가나무와 섬오갈피나무가 분리되어 구분이 용이하였으며, ITS5a 단독 적용시 가시오갈피 집단에 속해있던 ESC2가 *matK*의 영향으로 분리되었다 (Fig. 5B). 이에 ITS2를 추가 조합한 결과, ITS5a 및 *matK* 조합에

서 가시오갈피 집단에 유집되어 있던 ESC5가 다른 가시오갈피로부터 구분되었다 (Fig. 5C). 한편 cpDNA *matK*와 *rpoC1* 조합 결과, *rpoC1*에서 구분되지 않았던 가시오갈피, 오가나무, 오갈피나무, 그리고 *matK*에서 구분되지 않았던 오가나무가 두 유전자 구간의 상호보완으로 용이하게 구분되었다. 한편 섬오갈피나무의 경우 여전히 가시오갈피 집단과 유집되어, *matK* 및 *rpoC1* 두 cpDNA 구간 조합에 의한 구분에 한계를 보였다 (Fig. 5D).

본 연구에서 수행된 4가지 조합 중 ITS2, ITS5a 및 *matK* 조합에서는 오갈피속 식물 5종이 구분된 것은 물론, 가시오갈피 종내 ESC2와 ESC5가 독립적으로 분리됨으로써 본 연구에서 수행된 조합 중 판별능이 가장 우수하였다. 따라서 ITS2+ITS5a+*matK* 세 구간의 조합이 오갈피속 식물 종간 유연관계분석에 있어 최적의 조합인 것으로 사료된다.

4) 한약재 오가피 판별

시중 유통 오가피는 다양한 형태로 줄기가 종단 또는 횡단으로 절단되거나 수피가 박피된 형태였고, ‘오가피’, ‘오가목’, ‘오갈피나무’, ‘진오가피’, ‘가시오가피’ 등의 명칭으로 유통되

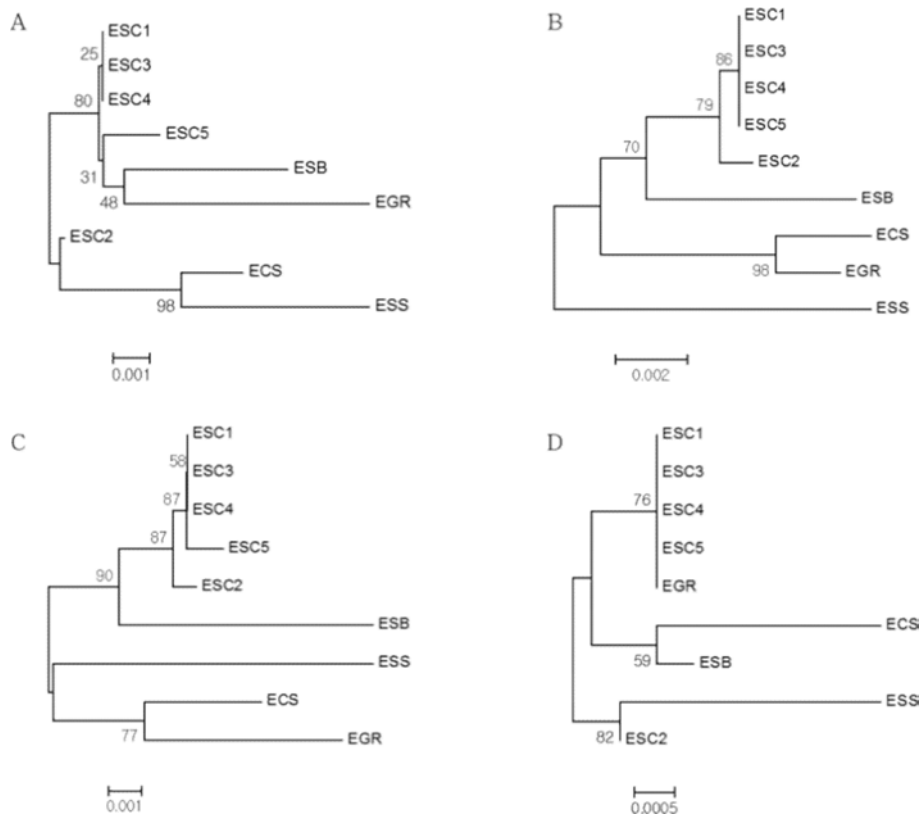


Fig. 5. Combinations of neighbor-joining trees of nrDNA and cpDNA of *Eleutherococcus* spp. A; ITS2 + *matK*, B; ITS5a + *matK*, C; ITS2 + ITS5a + *matK*, D; *matK* + *rpoC1*, ESS; *E. sessiliflorus*, ECS; *E. divaricatus* var. *chiisanensis*, EGR; *E. gracilistylus*, ESB; *E. sieboldianus*, ESC; *E. senticosus*.



Fig. 6. Processed traditional medicine of *Eleutherococcus* spp.

며, 유통 명칭이 동일하더라도 가공된 형태가 달라 이들 약재 간 육안 구분이 어려웠다 (Fig. 6). 이와 관련하여 Kim 등 (2008)은 오가피가 뿌리 및 줄기껍질이 약재로 이용되어 다양한 형태로 유통되므로 이들의 정확한 형태적 판별의 중요성을 보고하였으며, Kim 등 (1997)은 동일 개체 내에서 큰 형태적 변이의 문제를 언급하였다. 따라서 본 연구에서는 이러한 문제점들을 보완할 수 있는 분자생물학적 분석법의 확립을 위해 시중 유통 오가피 약재를 대상으로 원 식물종과의 염기서열 차이를 비교하여 약재 판별을 수행하고자 하였다.

시중 유통 오가피 한약재 판별을 위해 nrDNA ITS 및 cpDNA 구간 분석을 바탕으로 오갈피속 식물의 유연관계를 분석한 후, 오가피 약재 판별에 적용하였다. 대상 유전자의 단독 구간 분석에 있어서 nrDNA의 ITS2 및 ITS5a 구간이 오갈피속 식물 판별에 유용하였으나, 가시오갈피, 지리산오갈피, 섬오갈피나무의 유집형태가 다소 다른 결과를 보였고 (Fig. 3), cpDNA의 *matK* 구간에 있어서는 섬오갈피나무와 오가나무의 구분이 어려웠다 (Fig. 4). 이에 nrDNA의 ITS2와 ITS5a 및 cpDNA *matK* 구간의 조합분석을 수행한 결과 구분이 불분명했던 중간중내 판별력이 향상되어 (Fig. 5C) 이를 한약재 판별에 적용하였다.

오갈피속 식물체 구분에 최적 조합으로 판단되는 ITS2 + ITS5a + *matK* 조합을 이용하여 시중 유통 오가피 한약재 11점의 판별에 적용한 결과, OG1, OG4, OG5, OG7, GS1, GS2, GS3가 오갈피나무와 동일한 집단으로 유집되어 오갈피나무로부터 유래된 약재인 것으로 확인되었다 (Fig. 7). 특히

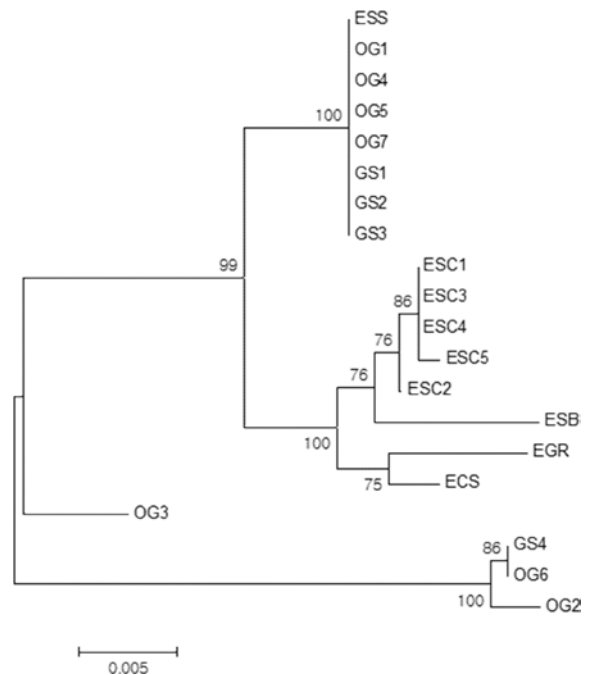


Fig. 7. Neighbor-joining tree combining *matK*, ITS5a, and ITS2 sequences of plants and dried medicinal materials of *Eleutherococcus* spp. ESS; *E. sessiliflorus*, ECS; *E. divaricatus* var. *chiisanensis*, EGR; *E. gracilistylus*, ESB; *E. sieboldianus*, ESC; *E. senticosus*, OG1; Ogapi, OG2; Ogapi, OG3; Ogapi (China), OG4; Ogamok, OG5; Ogamok, OG6; Ogalpinamu, OG7; Jinogapi, GS1; Gasiogapi, GS2; Gasiogapi, GS3; Gasiogapi, GS4; Gasiogapi.

GS1, GS2, GS3의 경우 시중에서 가시오가피라는 명칭으로 유통된 한약재로서, 실제로는 가시오갈피 (*E. senticosus*)로부터 유래된 약재가 아닌 것으로 사료된다. 이러한 결과는 Kim 등 (1997)이 국내 가시오가피 시중품 대부분은 지리산오갈피 및 오갈피나무의 수피인 것으로 보고한 것과 연관성이 있다. 한편 OG2, OG3, OG6, GS4는 본 연구에 이용된 오갈피속 5종과는 별개의 집단으로 분지되어 이들 한약재의 기원 종판별이 가능하지 않았다. 따라서 다양한 종의 오갈피속 식물체 수집 및 추가연구가 필요할 것으로 사료된다.

CBOL Plant Working Group (2009)은 비록 cpDNA의 *matK*, *rbcL*, *rpoB2*, *rpoC1* 등 다양한 유전자 구간이 식물의 종 구분에 유용하지만, 이들 구간의 단독 이용보다는 유전자 조합에 의한 분석에서 더 높은 신뢰도를 갖는다고 하였으며, Li 등 (2011)은 ITS 구간은 변이가 많아 높은 종 판별력을 가질 뿐만 아니라, 기술적으로 유전자 구간의 증폭이 용이하여 식물 계통분석은 물론 약재 판별에 자주 이용된다고 하였다. 현재 국내에서 DNA barcoding을 이용한 시중 유통 한약재 판별 연구는 감초 (Lim *et al.*, 2012)와 방풍 (Lim *et al.*, 2013) 등 제한적인 식물 종을 대상으로 nrDNA ITS2 또는 cpDNA의 *matK* 및 *psbA-trnH* 구간을 단독으로 이용한 사례에 머물러 있을 뿐 다양한 유전자 조합을 통한 유통 한약재 판별연구는 미흡한 실정이다.

본 연구에서 시중 유통 오가피 한약재 판별을 위해 nrDNA의 ITS2 및 ITS5a 각각을 이용한 결과가 ITS2+ITS5a+*matK* 조합을 이용한 약재 판별 결과와 동일하였으나 (data not shown), nrDNA 및 cpDNA 조합 시 오갈피속 식물체에 대한 판별력이 향상되었기 때문에 이 조합을 바탕으로 한 오가피 한약재 판별이 신뢰성이 높을 것으로 판단된다.

향후 추가적인 오갈피속 식물 종 수집 및 약재 판별 연구가 필요하나, nrDNA와 cpDNA 유전자 구간의 조합을 이용한 본 연구결과는 오가피 한약재뿐만 아니라 오·혼용 가능성이 높은 약용식물 기원정립, 판별기술을 활용한 한약재 유통질서 확립, 원료표준화에 의한 한약재 품질향상에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(과제번호: PJ008567072015)의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

CBOL Plant Working Group. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 106:12794-12797.
 Deyama T, Nishibe S and Nakazawa Y. (2001). Constituents and

pharmacological effects of *Eucommia* and siberian ginseng. *Acta Pharmacologica Sinica*. 22:1057-1070.
 Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39:783-791.
 Han HS, Kim DY, Lee KY, Park WG, Cho IK and Jung JS. (2006). Comparative analysis of *Acanthopanax senticosus* Harms from Korea, China and Russia based on the ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Korean Journal of Plant Resources*. 19:54-58.
 Heo SJ, Ahn HY, Kang MJ, Lee JH, Cha JY and Cho YS. (2011). Antioxidative activity and chemical characteristics of leaves, roots, stems and fruits extracts from *Acanthopanax senticosus*. *Journal of Life Science*. 21:1052-1059.
 Hollingsworth PM, Graham SW and Little DP. (2011). Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE*. 6:e19254.
 Hong KN, Cho KJ, Park YH, Hur SD, Hong YP and Kang BY. (2000). Genetic variation of some patches of *Eleutherococcus senticosus*(Rupr. and Maxim.) Maxim. in Korea. *Journal of Korean Forestry Society*. 89:645-654.
 Huh MK, Choi YH, Choi BT and Kim GC. (2005). Discrimination and genetic diversity of *Acanthopanax senticosus* using RAPD markers. *Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology*. 19:1046-1049.
 Kim CH. (1997). Systematics of *Eleutherococcus* and related genera(Araliaceae). Ph. D. Thesis. Chonbuk National University. p.1-263.
 Kim HS, Han HS and Lee YJ. (2008). A study on a morphological identification of *Acanthopanax cortex*. *Korea Journal of Herbology*. 23:41-49.
 Kim JH, Seo JW, Byeon JH, Ahn YS, Cha SW and Cho JH. (2014). Morphological characteristics and phylogenetic analysis of *Polygonatum* species based on chloroplast DNA sequences. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 22:489-496.
 Kim MS, Sung CK, Kim HC, Gal SW and Lee SW. (2009). Physicochemical composition of the *Acanthopanax chilsanensis*. *Journal of Life Science*. 19:1815-1820.
 Kim NS, Kwon J, Koh HY, Choi DS and Oh CH. (2004). Immunoregulatory action of Ogapi. *Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology*. 18:1337-1342.
 Kim S, Kim KY, Park MS, Choi SY and Yun SJ. (1998). Intraspecific relationship of *Eleutherococcus senticosus* Max. by RAPD markers. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 6:165-169.
 Kim YJ, Park MS, Park HK, Kim S and Sung CK. (1996). Eleutheroside E content in *Eleutherococcus* spp. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 4:333-339.
 Kim YJ, Park HK, Park MS, Kim S and Choi KG. (1997). Morphological and anatomical characteristics of five *Eleutherococcus* species. *Korean Journal of Breeding Science*. 29:56-63.
 Lee CB. (2006). *Coloured Flora of Korea I*. Hyangmunsa. Seoul, Korea. p.811-813.
 Li M, Cao H, But PPH and Shaw PC. (2011). Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes. *Journal of Systematics and Evolution*. 49:271-283.
 Lim JD, Seong ES, Choi KJ, Kim SK, Kim MJ and Yu CY.

- (2000). Intraspecific relationship analysis of *Eleutherococcus senticosus* Max. by RAPD markers. Korean Journal of Plant Resources. 13:104-110.
- Lim JM, Ahn YS, Park CG, Park CB and Cho JH.** (2012). Authentication of traded medicinal herb, *Glycyrrhiza* spp. (Licorice), based on nrDNA-ITS2 sequence analysis. Journal of the Korean Society of International Agriculture. 24:435-443.
- Lim JM, Kim MS, Byeon JH, Park HS, Ahn YS, Park CG and Cho JH.** (2013). Classification and discrimination of geographical origin of Bang-Poong [*Saposhnikovia divaricata* (Turcz) Schischkin] medicinal plant and related species by using DNA sequence analysis. Journal of the Korean Society of International Agriculture. 25:395-405.
- Lim SH, Park YH, Kwon CJ, Ham HJ, Jeong HN, Kim KH and Ahn YS.** (2010). Anti-diabetic and hypoglycemic effect of *Eleutherococcus* spp. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 39:1761-1768.
- Little DP.** (2014). A DNA mini-barcode for land plants. Molecular Ecology Resources. 14:437-446.
- Ma HL, Zhu ZB, Zhang XM, Miao YY and Guo QS.** (2014). Species identification of the medicinal plant *Tulipa edulis* (Liliaceae) by DNA barcode marker. Biochemical Systematics and Ecology. 55:362-368.
- Ministry of Food and Drug Safety(MFDS).** (2013). The Korean herbal pharmacopoeia(4th ed.). Ministry of Food and Drug Safety. Seoul, Korea. p.157-158.
- Ministry of Food and Drug Safety(MFDS).** (2015). The Korean pharmacopoeia(10th ed.). Ministry of Food and Drug Safety. Seoul, Korea. p.1839.
- Saitou N and Nei M.** (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. 4:406-425.
- Tamura K, Nei M and Kumar S.** (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 101:11030-11035.