

營實과 그 위품의 유전자 감별

도의정^{1,2#}, 신상문¹, 이금산^{1,2*}

1 : 원광대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 원광대학교 전통의학연구소

DNA barcoding analysis of Rosae Multiflorae Fructus and its adulterants

Eui jeong Doh^{1,2#}, Sangmun Shin¹, Guemsan Lee^{1,2*}

1 : Dept. of Herbology, College of Korean Medicine, Wonkwang Univ
2 : Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang Univ

ABSTRACT

Objectives : Rosae Multiflorae Fructus is a traditional medicine derived from the fruit of *Rosa multiflora* Thunb, a member of the Rosaceae family. Even though it has a single origin, the possibility of adulterants has always existed. In fact, we had discovered suspicious commercial samples of Rosae Multiflorae Fructus, imported from China.

Methods : To define the taxonomic origin of Rosae Multiflorae Fructus and its adulterants, DNA barcode analysis of the internal transcribed spacer, *trnL-F* intergenic spacer, and *psbA-trnH* sequences was carried out. These DNA barcode sequences from the correct origin of Rosae Multiflorae Fructus were analyzed and compared with those of other samples from genus *Rosa* used as medicinal herbs.

Results : The analyses of the three DNA barcode sequences efficiently distinguished Rosae Multiflorae Fructus from six other species in genus *Rosa* and also separated each species used in this study. According to the DNA barcoding results, none of the suspicious commercial samples were Rosae Multiflorae Fructus, RMF09 was identified as *Rosa acicularis*, whereas RMF10 and RMF11 were identified as *Rosa davurica* and *Rosa rugosa*, respectively. These results corroborated the existence of adulterants of Rosae Multiflorae Fructus.

Conclusions : Our research provides useful information that could be used as a criterion for distinguishing between Rosae Multiflorae Fructus and its adulterants. These results will help in the prevention of adulteration and also suggest effective methods for verifying the origin of commercial herbal medicines derived from genus *Rosa*.

Key words : authentication, DNA barcoding, Rosae Multiflorae Fructus, Rosaceae, ITS

I. 서 론

營實은 《東醫寶鑑》¹⁾에 ‘달위여름’이라는 이름으로 ‘性은溫(一云微寒)하며味는酸(一云苦)하고無毒하다.癰疽惡瘡敗瘡陰蝕不瘳頭瘡白禿에 쓴다’고 하였으며野薔薇의 열매라 기록된 약물이다. 《대한민국약전의한약(생약)규격집》²⁾(이하 KHP IV)과 《日本藥局方》³⁾(이하 JP 17)에는 장미과(Rosaceae)에 딸린 찔레꽃 *Rosa multiflora* Thunb.의 열매로 규정되어

있다. 《조선인민민주주의공화국약전》⁴⁾(이하 DP VII)에는 찔레꽃 *R. multiflora*와 더불어 용가시나무 *R. maximowicziana* Regel도 기원식물에 기재되어 있다. 중화인민공화국이나 중화민국의 공정서에는 수재되지 않았으나, 《中華本草》⁵⁾에서는 찔레꽃을 기원 식물로 기재하고 清熱解毒, 祛風活血, 利水消腫의 효능과 瘡癰腫毒, 風濕痹痛, 關節不利, 月經不調, 水腫, 小便不利를 主治로 제시하고 있다. 한편, 陶弘景의 저서 《本草經集注》⁶⁾ 草木中品에는 ‘營實即是薔薇子 以白花者爲良’이라

*Corresponding author : Guemsan Lee, Department of Herbology, College of Korean Medicine, Wonkwang Univ., Iksan-si, Jeollabuk-do, 54538, South Korea.

· Tel : +82-63-850-6985 · Fax : +82-63-850-6985 · E-mail : rasfin@wku.ac.kr

#First author : Eui jeong Doh, Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang Univ., Iksan-si, Jeollabuk-do, 54538, South Korea.

· Tel : +82-63-850-6985 · Fax : +82-63-850-6985 · E-mail : bluemoon-lion@daum.net

· Received : 13 May 2019 · Revised : 02 July 2019 · Accepted : 25 Jul 2019

한 것처럼 기원의 서술이 약간 다른 것도 있다. 그러나 당시의 *Rosa*속 식물 중 문헌상의 묘사에 적합하면서 흰 꽃이 피는 대표적 식물이 찔레꽃이었고, 동 서적에 기재된 이명 ‘牛棘’과 ‘牛勒’이 찔레꽃을 지칭하였으므로 현대의 薔實과 그리 큰 차이가 있지는 않았던 것으로 간주할 수 있다.

이와 같이 古代로부터 2019년 현재에 이르기까지 대부분의 국가에서 薔實을 찔레꽃의 열매로 인정하는 추세임에도 불구하고 실제로는 *Rosa*속에 속하는 다양한 식물의 열매가 섞여 유통되고 있다. 그러나 *Rosa*속에 속하는 식물의 열매는 형상이 유사한 것이 많고 채취 시기나 건조 방식에 따라 색깔이 달라질 수 있어, 섞이거나 가루로 유통될 경우 관능검사만으로 배제하기 어려운 측면이 있다. 게다가 과거 국산 薔實이 유통품의 대부분을 차지하였을 때와는 달리, 건강기능식품, 한방 화장품원료 등의 수요에 비해 생산량이 따라가지 못해 수입품이 늘어남과 동시에 다양한 동속근연식물의 과실이 유입되고 있다. 이를 배제하기 위한 감별법 중에는 이⁷⁾가 응용한 조직학적 판별법, 문⁸⁾이 응용한 유전자분석법, 김⁹⁾이 응용한 이화학적판별법 등이 있을 수 있다. 薔實의 경우 한약재뿐만 아니라 건강기능식품 등의 재료로 추출의 용이성을 위해 분말 상태로도 유통되는 만큼, 앞서 언급한 다양한 감별법을 확립할 필요가 있다.

본 연구는 한방 관련 제품을 연구 개발하는 연구팀에서 감

별의뢰를 받은 薔實 중 공정서 기준에 적합하지 않은 약물이 있음을 발견하고 다양한 감별을 시도한 후 薔實과 그 혼·위품의 유전자감별이 유효하다고 판단하여 그 결과를 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용된 薔實의 기원 종 및 유사 비교 대상 식물 시료는 국내 자생지에서 수집하였으며 및 국내 분포하지 않는 식물 종이나 수집이 어려운 종의 경우 한국한의학연구원 한약 표준표본관으로부터 시료를 분양받아 사용하였다. 유통 시료는 국내외 약재 시장 등을 통해 수집하였다.

본 연구에서는 薔實과 그 혼·위품 뿐만 아니라 약재로 사용하는 *Rosa*속 식물도 동시에 분석함으로써 향후 薔實 이외에도 *Rosa*속 한약재 감별에 사용할 수 있는 DNA barcode 데이터 또한 확보하고자 하였다.

분석에 이용한 시료는 Table 1과 같으며, 수집 후 저자의 관능검사를 통해 1차 검증을 완료한 후 분석에 사용하였으며 사용한 시료의 일부분은 원광대학교 본초표본실에 보관하고 있다.

Table 1. The information of collected samples used in this study

Accession code	Scientific name	Voucher No.	Country of collection	Sample condition
RMF01		WKURMF01	China	F
RMF02		WKURMF02	Korea	F
RMF03		WKURMF03	Korea	F
RMF04		WKURMF04	Korea	F
RMF05		WKURMF05	Korea	F
RMF06	<i>Rosa multiflora</i> Thunb.	WKURMF06	Korea	D
RMF07		WKURMF07	Korea	D
RMF08		WKURMF08	Korea	D
RMF09		WKURMF09	China	D
RMF10		WKURMF10	China	D
RMF11		WKURMF11	China	D
RLF01		WKURLF01	Korea	D
RLF02		WKURLF02	China	F
RLF03		WKURLF03	China	F
RLF04	<i>Rosa laevigata</i> Michx.	WKURLF04	China	F
RLF05		WKURLF05	China	D
RLF06		WKURLF06	Korea	D
RLF07		WKURLF07	Korea	D
RRF101		WKURRF101	China	F
RRF102		WKURRF102	China	F
RRF103	<i>Rosa rugosa</i> Thunb.	WKURRF103	China	D
RRF104		WKURRF104	Korea	D

Accession code	Scientific name	Voucher No.	Country of collection	Sample condition
FRa01	<i>Rosa acicularis</i> Lindl.	WKUFR03	China	F
FRa02		WKUFR04	China	F
Rw01	<i>Rosa luciae</i> Franch. & Rochebr. = <i>R. wichuraiana</i> Crép. ex Déségl.	WKURMF12	Korea	F
Rw02		WKURMF13	Korea	F
FRd01	<i>Rosa davurica</i> Pall.	WKUFR05	Korea	F
FRd02		WKUAL06	Korea	F
RCF01	<i>Rosa chinensis</i> Jacq.	WKUSP01	China	D
RCF02		WKUSP02	China	D
RCF03		WKUSP03	China	D

*F : indicated the official plant species voucher

*D : indicated the medicinal herbs

2. DNA 추출

유전자 분석용 식물 시료와 유통 약재 100–200 mg을 파쇄한 후, NucleoSpin® Plant II kit (Macherey–Nagel, Dueren, Germany)을 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 genomic DNA 시료 중 유통 약재 (특히 약용 부위가 과실인 경우)의 경우, 0.7M NaCl 첨가 10% cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) 시약을 활용한 2차적 정제 과정을 통해 추가적 다당류 제거 과정을 수행하였다. 정제 완료된 DNA는 Biodrop (Biochrom, UK) 측정을 통해 최종 정량하였다.

3. DNA barcode 부위 증폭

ITS 부위 증폭을 위해 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTG CGG-3') / ITS4 (5'-TCCTCCG CTTATTGATATGC-3')¹⁰⁾ primer를 사용하였다. cpDNA 부위인 *trnL-F* intergenic sapcer와 *psbA-trnH* 증폭을 위해 *trnL-e* (5'-GGTTCAA GTCCCTCTTATCCC -3') / *trnL-f* (5'-ATTTGAACTGGT GACACGAG-3')¹¹⁾ primer 쌍과 *psbAF* (5'-GTTATGCAT GAACGTAA TGCTC-3') / *trnH2* (5'-CGCGCATGGTGG ATTACAAA ATCC-3')¹²⁾ primer를 사용하였다. PCR 반응은 30 ng의 total gDNA를 주형으로 20pmole primer AccuPower® GoldHotStart *Taq* PCR PreMix (Bioneer, Korea)를 이용하여 최종 20 μ l의 반응 용액으로 진행하였다. Safe-view™ (abm, Canada)가 첨가된 1.5% agarose gel 상에서 증폭 여부를 확인하였으며 증폭 산물은 Gel extraction을 통해 정제 후 TOPcloner™ TA Kit (Enzynomics, Korea)를 활용하여 PCR cloning을 진행하였다. 선별된 시료를 대상으로 염기서열 분석을 진행하였으며 (Bioneer, Korea), 최종 확정된 염기서열은 Bioedit program (ver. 7.0.9)의 ClustalW 방법을 사용하여 전체 염기서열을 비교하였다.

4. DNA barcode 염기서열 기반 유연관계 분석

營實의 기원 1종 및 유사 동속 근연 6 종 30개체의 유전적

유연관계 분석을 위해 각 시료로부터 확보한 DNA barcode 3 부위 (ITS, *trnL-F* intergenic sapcer, *psbA-trnH*) 염기서열을 ClustalW multiple sequence alignment (Bioedit, v7.0.9; available from <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>)를 활용한 정렬 후 DNADist의 neighbor-joining (NJ) (Bioedit)를 이용하여 유연관계를 비교 분석하였다. 군외군(outgroup)으로는 *Brassica napus* (KM975581.1, FJ490775.1, KM892606.1), *Morus alba* (MH187221.1, HM747180.1, KC584956.1), *Morus mongolica* (MH357905.1, HM747189.1, KM491711.2), *Geum laciniatum* (MK355981.1), *Geum virginianum* (MK355982.1), *Sieversia pentapetala* (AJ302359.1, AB219665.1), *Sieversia pusilla* (AJ302360.1)의 염기서열 정보를 NCBI GenBank에서 내려 받아 사용하였다.

III. 결 과

1. ITS 유전자 부위 염기서열 특성 분석

약전에 명시된 營實의 기원종 및 근연종 감별을 위해 ITS1/ITS4 primer 쌍을 이용한 ITS 부위 증폭 결과 종에 따라 Table 2에 명시된 바와 같이 712–714 bp 증폭 산물을 형성하였다. 營實의 기원 종 식물 *R. multiflora* 표본 시료인 RMF01–05는 713bp 증폭 산물을 형성하였다. 6종의 동속근연종 표본시료의 염기서열 비교 분석 결과 *R. laevigata*, *R. acicularis*, *R. luciae*는 713 bp, *R. davurica*, *R. rugosa*에서는 714 bp, *R. chinensis*는 712 bp의 증폭 산물을 각각 형성하였다. 분석이 진행된 *Rosa*속 7 종 간 ITS 부위는 증폭 산물의 크기뿐만 아니라 transition 12 부위, transversion 2부위, insertion/deletion 1부위 포함 총 15 부위에서 뚜렷한 염기서열 차이를 보여 줌으로써 營實 및 *Rosa*속 한약재 감별을 위한 DNA barcode 부위로 사용할 수 있음을 확인하였다(Fig. 1). 분석에 사용된 7 종 모두 종내 변이는 관찰되지 않았다. 營實의 유통 시료 중 정품 시료인

RMF06-08과 달리 의심 시료 군 (RMF09-11)에서 영실 표본 시료와는 다른 염기서열 정보를 보였다. RMF09 시료는 5 부위 염기서열이 영실 표본 시료와는 차이를 보이며, *R. acicularis* 표본 시료와 일치하였다. RMF10 과 RMF11 시료는 각각 9 부위와 10 부위에서 營實 표본 시료와 염기서열 차이를

보여주었으며, 각각 *R. davurica* 와 *R. rugosa* 표본 시료의 염기서열과 일치하였다. 이와 같은 ITS 염기서열 분석 결과는, RMF09-11 시료는 공정서 기준에 적합하지 않은 *Rosa*속의 다른 종에서 유래한 과실임을 확인시켜주었다.

Table 2. Size and G+C% of ITS, *trnL-F* intergenic spacer, *psbA-trnH* among the sample in table 1.

Taxon	ITS		<i>trnL-F</i> intergenic spacer		<i>psbA-trnH</i>	
	length (bp)	G+C %	length (bp)	G+C %	length (bp)	G+C %
RMF01	713	56.4	418	30.8	414	26.1
RMF02	713	56.4	418	30.8	414	26.1
RMF03	713	56.4	418	30.8	414	26.1
RMF04	713	56.4	418	30.8	414	26.1
RMF05	713	56.4	418	30.8	414	26.1
RMF06	713	56.4	418	30.8	414	26.1
RMF07	713	56.4	418	30.8	414	26.1
RMF08	713	56.4	418	30.8	414	26.1
RMF09	713	56.2	414	31.3	441	26.7
RMF10	714	57.2	413	30.8	464	26.3
RMF11	714	57.1	413	30.5	464	26.3
RLF01	713	56.3	418	31.2	415	25.9
RLF02	713	56.3	418	31.2	415	25.9
RLF03	713	56.3	418	31.2	415	25.9
RLF04	713	56.3	418	31.2	415	25.9
RLF05	713	56.3	418	31.2	415	25.9
RLF06	713	56.3	418	31.2	415	25.9
RLF07	713	56.3	418	31.2	415	25.9
RRF101	714	57.1	413	30.5	470	26.3
RRF102	714	57.1	413	30.5	464	26.3
RRF103	714	57.1	413	30.5	464	26.3
RRF104	714	57.1	413	30.5	464	26.3
FRa01	713	56.2	414	31.3	441	26.7
FRa02	713	56.2	414	31.3	441	26.7
Rw01	713	56.4	418	30.8	414	25.9
Rw02	713	56.4	418	30.8	414	25.9
FRd01	714	57.2	413	30.8	464	26.3
FRd02	714	57.2	413	30.8	464	26.3
RCF01	712	56.6	419	30.8	414	25.7
RCF02	712	56.6	419	30.8	414	25.7
RCF03	712	56.6	419	30.8	414	25.7

2. Chloroplast DNA 부위 염기서열 특성 분석

chloroplast DNA *trnL-F* intergenic spacer 부위 염기서열 분석을 위해 *trnL-e/trnL-f* primer 쌍이 사용되었으며, 413-419bp의 증폭산물이 형성되었다(Table 2). 營實의 기원 식물인 *R. multiflora* 표본 시료 RMF01-05에서는 418bp 증폭산물이 형성되었다. 동속 근연 6종 표본 시료의 염기서열 분석 결과 *R. laevigata*와 *R. luciae*는 418bp, *R. rugosa*와 *R. davurica*는 413bp, *R. acicularis*는 414bp, *R. chinensis*에서는 419bp 증폭산물을 각각 형성하였다. ITS 부위 분석 결과와 같이 *trnL-F* intergenic spacer 부위 염기서열도 *Rosa*속 7 종간에 증폭 산물의 크기뿐만 아니라 3 transition, 8 transversion 그리고 5 insertion/ deletion 포함 총 16 부위에서 염기서열 차이가 있음을 확인하였다(Fig. 1). 이러한

염기서열 차이를 바탕으로 營實과 동속근연종 시료 사이에 감별을 시도 할 수 있으며 이는 ITS 부위와 마찬가지로 *trnL-F* intergenic spacer 부위도 감별을 위한 DNA Barcode 로 활용할 수 있음을 의미한다. 다만, ITS와는 달리 *trnL-F* intergenic spacer 부위의 경우, 營實의 기원 종 식물과 동속 근연 5 종은 구분이 가능하였으나 *R. luciae* 사이에는 염기서열 차이를 보여 주지 않아 구분이 되지 않았다. 의심 시료군 (RMF09-11)를 제외한 유통시료 분석 결과는 각 기원식물 분석 결과와 일치하였다. RMF09 시료는 營實 표본 시료와 8 부위의 염기서열 차이를 보이며 *R. acicularis* 표본 시료와 일치하는 결과를 보여주었다. RMF10 과 RMF11 시료는 營實 표본 시료와 각각 10 부위와 11부위 염기서열 차이를 나타내며 *R. davurica* 와 *R. rugosa* 로 확인되었고, 이는 ITS 염기서열 분석 결과와 일치하였다.

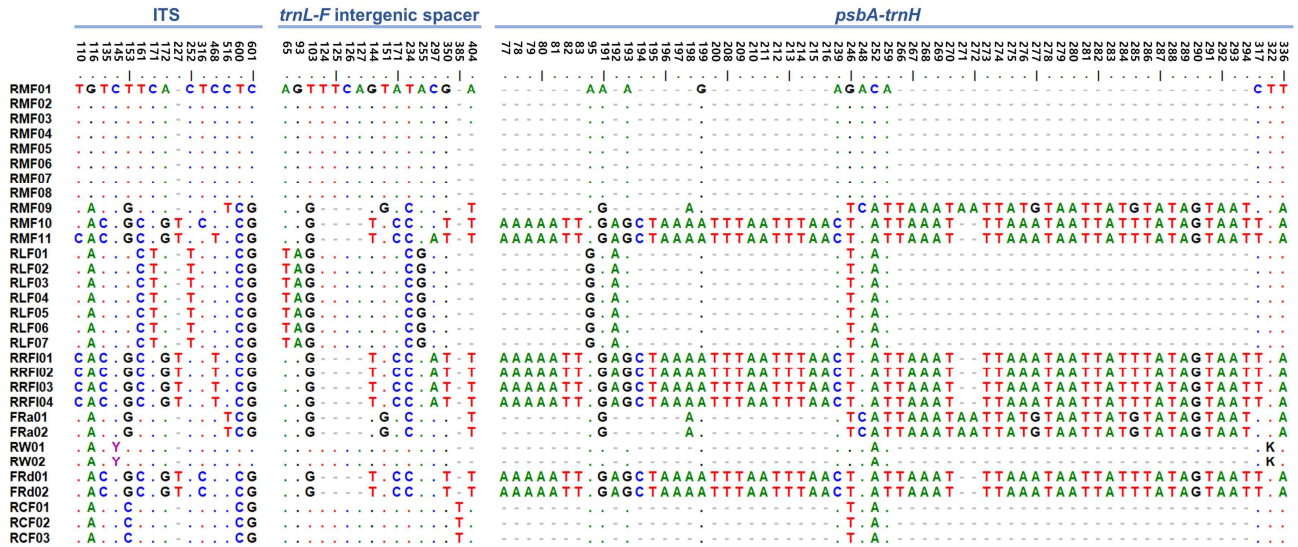


Fig. 1. Multiple alignments of the nucleotide sequences of the three DNA barcodes regions(ITS, *trnL-F* intergenic spacer, *psbA-trnH*). Numbers above the bases indicate the position of SNPs. Dots (·) represent identical nucleotide sequence to RMF01 sequence. Dashes (–) means gaps to maximized alignment.

psbA-trnH 분석을 위해 *psbAF / trnH2* primer 쌍이 사용되었으며, 414-470 bp의 증폭 산물이 형성되었다(Table 2). 영실의 기원식물 표본 시료와 *R. luciae*, *R. chinensis* 시료는 414bp 염기서열이 분석되었으며, *R. laevigata*는 415bp 염기서열을 확인하였다. 반면에 *R. acicularis*는 441bp, *R. davurica* 464bp 그리고 *R. rugosa*에서는 470bp와 464bp 염기서열이 분석되었다. 동속근연종 식물임에도 불구하고 증폭 길이 차가 큰 것은 다양한 크기로 존재하는 indel과 insertion/deletion 염기서열 때문이다. Figure 1에서 제시한 바와 같이, *R. rugosa*, *R. acicularis*, *R. davurica* 종은 다양한 크기의 indel 및 insertion/deletion 이 존재한다. indel 유무와 관계없이 營實의 기원종의 *psbA-trnH* 부위 염기서열은 동속근연종 6종과 차이를 보이며 구분이 가능함을 확인하였다. 그러나, *R. rugosa* 와 *R. davurica* 간에는 *R. rugosa* 일부 시료에서 indel 서열이 좀 더 길게 존재하지만 동일 종 내에서도 일정하게 나타나지 않기 때문에 구분에 어려움이 있다. 의심 시료군(RMF09-11)의 염기서열 분석 결과, RMF09 시료는 *R. acicularis* 로 확인

되었으며, 이는 ITS 및 *trnL-F* intergenic spacer 부위 분석 결과와 일치하였다. RMF10과 RMF11 시료의 경우, 동일한 염기서열을 지니고 있으며 이는 *R. davurica* 와 *R. rugosa* 서열과 일치하여 두 종 중 하나의 가능성을 보여주었다. 비록 *psbA-trnH* 부위 분석을 통해 *R. davurica* 와 *R. rugosa*를 명확하게 구분 할 수 없어 의심 시료 RMF10과 RMF11을 정확히 확정할 수는 없으나 의심 시료군 RMF 09-11은 營實이 아님을 확인하였다.

3. 분자계통학적 유연관계 분석

다양하게 수집된 營實의 공정서 기준의 기원종과 동속근연종 6종 포함 31개체 시료의 ITS, *trnL-F* intergenic spacer, *psbA-trnH* 유전자 증폭 산물 염기서열 분석 정보를 바탕으로 이들의 분자계통학적 유연관계를 분석하였다. ClustalW 방법으로 분석된 세 부위 염기서열 정보를 결합하여 alignment 하고 Neighbor phylogenetic tree를 작성한 결과, 모든 시료는

종 단위로 명확하게 분류되었다(Fig. 2). *R. luciae* 와 *R. chinensis* 시료가 분석에 사용된 7 종 *Rosa*속 식물 중 영실의 기원 종 식물과 가장 가까운 유연관계를 보여주었다. 유통 시료 중 의심 대상 시료(RMF09-11)의 경우, 찹쌀의 기원종과 완

연히 구분되는 타 종 식물인 *R. acicularis*, *R. davurica*, *R. rugosa* 표본시료와 각각 그룹화 되었다. 이는 의심 시료군의 경우 찹쌀의 정품 시료가 아닌 위품 시료라는 것을 확인 시켜 주는 결과라 할 수 있다.

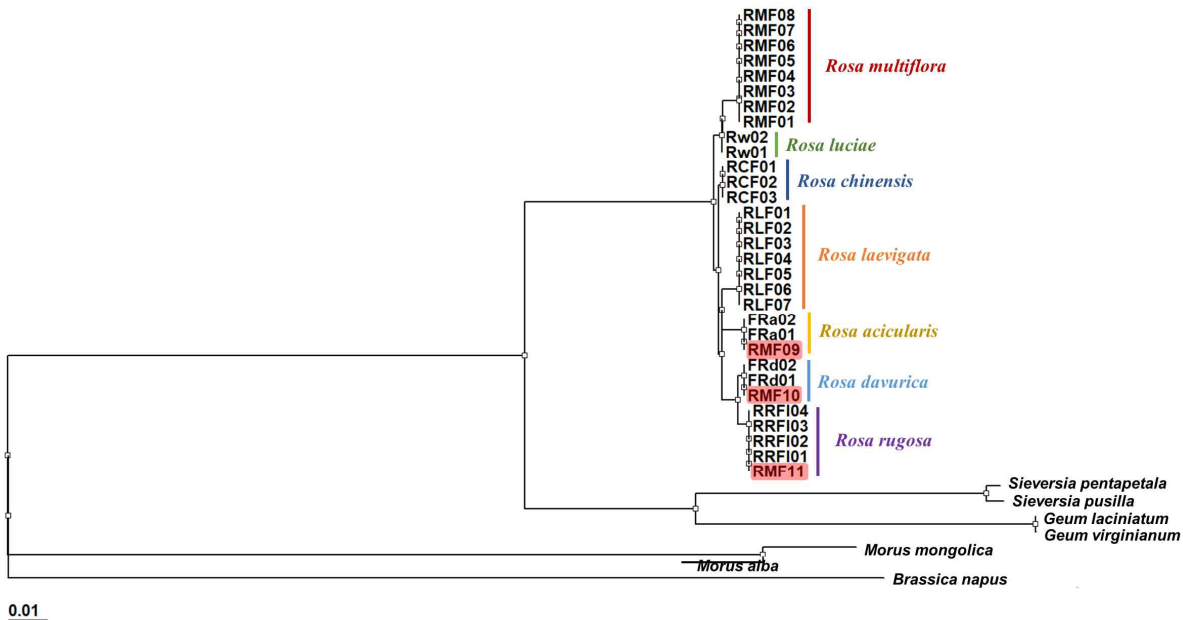


Fig. 2. Phylogenetic relationships of genus *Rosa* samples listed in table 1 based on the combined analysis of three DNA barcode nucleotide sequences.

IV. 고 찰

장미속 (genus *Rosa*)은 약 150-200 종으로 구성되어 있으며 북반구의 온대, 아열대 전반에 걸쳐 넓게 분포하고 있다^{13,14}. *Rosa*속에 딸린 종은 대부분 관상식물, 절화, 향수, 화장품, 의약품 연구 모델 식물 등 다양한 경제적 부가가치를 지니고 있다¹⁵⁻¹⁸. 그러나 다양한 산업적 가치를 위해 재배 및 개발하는 품종이 많아지면서 형태학적 감별에 어려움이 생기는 역설적인 상황도 발생하였다¹⁹. 이를 해결하기 위한 방안 중 하나로 유전자를 바탕으로 *Rosa*속 식물 종들의 계통 발생학적 관계를 분석하고자 하는 다양한 시도가 진행되어 왔다. 초기 RAPD (rapidly amplified polymorphic DNA)²⁰⁻²², microsatellite analyses²³, AFLP (amplified fragment length polymorphism)²⁴ 등 과 같은 분석이 다양하게 시도 되었으나 제한된 분석 범위, 낮은 재현성 등 여러 가지 문제 점이 있었다. 이를 보완하기 위해 핵의 ITS (internal transcribed spacer)와 다양한 chloroplast DNA 부위 (*trnL* intron, *trnL-F*, *psbA-trnH*, *rbcL*, *matK* 등)의 염기서열 비교 분석을 통한 감별 선행연구가 수행되었다^{19,25-27}. 이러한 다양한 선행 연구 분석을 통해 본 연구에서는 찹쌀을 감별하기 위해 ITS 와 *trnL-F* intergenic spacer, *psbA-trnH* 부위를 선택하였다.

결정된 ITS 염기서열 다중서열정렬(multiple sequence alignment) 분석 결과, 본 연구에서 사용된 *Rosa*속 7 종간에 15 부위의 염기서열 차이를 확인 할 수 있었으며, 찹쌀을 기

준으로 종 간 2 ~ 10 부위 염기서열 차이를 보이며 찹쌀과 동속근연종을 구분할 수 있음을 보여주었다. 의심 시료군인 RMF 09-11 시료의 경우 찹쌀의 표본 시료 염기서열과 일치 하지 않았을 뿐만 아니라 의심 시료군 간에도 염기서열 차이를 보여주었다. RMF09 시료는 영실을 기준으로 비교 시 3개의 transition ($G \rightarrow A$, $C \rightarrow T$, $T \rightarrow C$) 과 2개 transversion ($T \rightarrow G$, $C \rightarrow G$) 포함 총 5 부위에서 염기서열 차이를 보여 영실이 아님을 확인하였다. RMF10은 6개의 transition (2개 $A \leftrightarrow G$, 4개 $T \rightarrow C$)과 2개의 transversion($T \rightarrow C$, $C \rightarrow G$), 1개의 insertion을 포함 총 9 부위에서 찹쌀과 염기서열 차이를 보였다. RMF11 시료는 7개의 transition (5개 $T \leftrightarrow C$, 2개 $G \leftrightarrow A$), 2개의 transversion ($T \rightarrow G$, $C \rightarrow G$), 1개의 insertion 포함 총 10 부위에서 찹쌀과 염기서열 차이를 보였다. 이와 같이 찹쌀과 뚜렷한 염기서열 차이를 보이며 위품으로 확인된 RMF09-11 시료의 종을 확인하기 위해 이미 결정된 동속근연종 염기서열 데이터 분석 결과 RMF09는 *R. acicularis*, RMF10는 *R. davurica*, RMF11는 *R. rugosa*와 일치하였다.

이러한 의심 시료군과 찹쌀 표본시료간의 염기서열 불일치는 *trnL-F* intergenic spacer와 *psbA-trnH* 부위 염기서열 분석에서도 동일하게 관찰되었다. *trnL-F* intergenic spacer 부위 염기서열 분석에서는 영실과 의심시료군 사이에 RMF09는 4개의 deletion과 1개의 transition ($T \rightarrow C$), 3개의 transversion (2개 $T \rightarrow G$, 1개 $A \rightarrow T$) 포함 총 8부위 염기서열 차이가 관찰되었다. RMF10은 4개의 deletion과 1개 transition ($T \rightarrow C$), 5개 transversion (3개 $T \leftrightarrow G$, $A \rightarrow C$,

A → T) 포함 총 10 부위 염기서열 차이를 보여주었으며 RMF11은 4개의 deletion과 1개 transition (T → C), 6개 transversion (3개 T ↔ G, 2개 A ↔ C, A → T) 포함 총 11 부위에서 營實과 염기서열 차이가 있음을 확인하였다. 의심 시료군의 기원 확인을 위한 동속근연종과의 염기서열 비교 분석 결과, RMF09는 *R. acicularis*, RMF10 과 RMF11 시료는 각각 *R. davurica* 와 *R. rugosa*로 확인되었으며 이는 ITS 염기서열 분석 결과와 일치하였다.

psbA-trnH 부위는 *R. davurica* 와 *R. rugosa*을 제외한 나머지 *Rosa*속 종 들을 구분할 수 있었으며 특히 營實을 동속 근연종으로부터 명확히 구분해 낼 수는 있었다. 의심시료군 RMF09-11 시료는 營實에는 없는 다양한 길이의 indel 서열과 insertion/deletion 서열이 존재하고 있어 명확하게 營實과 다른 종으로 구분되었다. 기원 확인을 위한 동속근연종과의 염기서열 비교 분석 결과, RMF09는 *R. acicularis* 로 확인되었다. RMF10과 RMF11의 경우 ITS와 *trnL-F* intergenic spacer 부위에서와 달리 두 시료에서 염기서열 차이가 나타나지 않았다. RMF10과 RMF11 시료 염기서열이 *R. davurica* 와 *R. rugosa* 의 서열과 일치하는 결과를 보여주며 이 두 시료도 營實이 아님을 확인시켜주었다. 비록 *psbA-trnH* 부위로 RMF10과 RMF11의 종을 명확히 확정 지을 수 없었으나, 염기서열이 일치하는 종이 *R. davurica* 와 *R. rugosa* 로 앞서 분석된 두 유전자 부위의 결과와 일치한다.

DNA Barcode를 활용한 식물 종 분류에 관한 많은 선행 연구들은 하나의 바코드 부위 분석의 한계를 보완하기 위해 다양한 부위를 분석할 것을 권고한다. 따라서 본 연구에서도 분석된 세 가지 바코드 부위의 결과를 결합하여 분자계통학적 유연관계를 분석하고 유통 시료의 기원종의 위치를 확인하고자 하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이 營實은 다른 동속근연종과 명확히 분리되었으며, 각 약재의 유통시료도 기원종에 맞게 위치한 것을 확인하였다. 의심시료군의 경우 예상했던 바와 같이 RMF09는 *R. acicularis* 로 RMF10은 *R. davurica*, RMF11 시료는 *R. rugosa* 로 최종 감별되어 營實의 위품임을 확인하였다.

본 연구결과를 통해 분석된 ITS, *trnL-F* intergenic spacer, *psbA-trnH* 유전자부위 염기서열 데이터는 營實의 감별 기준으로 사용할 수 있을 뿐만 아니라 동속근연종 기원 한약재를 감별할 수 있는 기준으로도 활용 가능할 것이다.

V. 결 론

본 연구는 영실(營實)의 표본과 규격품, 위품을 염기서열 분석을 통해 감별하여 다음과 같이 보고하는 바이다.

1. ITS 및 Chloroplast DNA 부위인 *trnL-F* intergenic spacer와 *psbA-trnH* 부위 분석을 통해 營實을 여타 동속근연종으로부터 유래한 위품을 명확히 구분해 낼 수 있었다.
2. 시료 중 RMF09는 *R. acicularis*, RMF10과 RMF11은 각각 *R. davurica*와 *R. rugosa*로 營實의 위품으로 판명

되었다.

3. 본 연구에서 사용한 ITS, *trnL-F* intergenic spacer, *psbA-trnH* 부위는 다양한 營實의 혼·위품을 감별하기에 적합한 DNA barcode 부위라 판단된다.

감사의 글

이 연구는 2018학년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 수행되었기에 이에 감사드립니다.

References

1. Heo J (許浚, 1546-1615). Principles and Practice of Eastern Medicine [東醫寶鑑]. New Translation of Dongui Bogam, Seoul : Bubin Publishers Co., 2012 : 2013.
2. The Korean Herbal Pharmacopoeia 4th edition, 2012, 1st supplement, 2013. Partial amendment, 2016, 2017 : 284-5.
3. The Japanese Pharmacopoeia 17th edition, 2016 : 1742.
4. The Pharmacopoeia of Democratic People's Republic of Korea 7th edition, 2011 : 527-8.
5. State Administration of Traditional Chinese Medicine of the People's Republic of China, Chinese Materia Medica [中華本草], vol 4, Shanghai : Shanghai Science and Technology Publishing Company, 1999 : 231-2.
6. Tao HJ (陶弘景, 456-536). Bencaojing Jizhu [本草經集注]. Chang ZJ, Chang YS, eds. Bencaojing Jizhu (jijiao ben). Beijing : People's Medical Publishing House, 1994 : 309-10.
7. Lee GS. The anatomical identification-key of Dipasci Asperi Radix, Phlomoidis Radix and Dipsaci Japonici Radix. Kor. J. Herbol, 2018 ; 33(4) : 27-33.
8. Moon BC, Kim WJ, Yang SG, Park IK, Yeo SM, Noh PR. Molecular authentication of Lepidii seu Descurainiae Semen by the development of matK amplification primers and analysis of sequence. Kor. J. Herbol, 2018 ; 33(3) : 25-35 .
9. Kim JH, Lee GS, Choi GY, Hwang SY, Kim HJ, Jeong SI, Ju YS. A study on external·internal morphology and pattern analysis of Atractylodes Rhizomes. Kor. J. Herbol, 2009 ; 24(2) : 77-85.
10. White TJ, Bruns T, Lee SJ, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protoc, 1990 ; 18 : 315-322.
11. Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. Universal primers for amplification of three non-coding

- regions of the chloroplast DNA. *Plant Mo. Bio.* 1991 ; 17 : 1105–1109.
12. Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF. Chloroplast DNA phylogeny reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Am. J. Bot.* 1997 ; 84 : 1120– 1136. PMID:21708667
 13. Rehder A. Manual of cultivated trees and shrubs hardy in North America, ed. 2. New York : Macmillan, 1940.
 14. Gu C, Robertson KR. *Rosa* L. In: Team FoCe, ed. *Flora of China* St. Louis, Mo : Missouri Botanical Garden Press. 2003.
 15. Cutler RR. Medicinal and pharmaceutical uses. *Encycloepedia of rose science*. In : Roberts A, Denbener T, Gudin S, eds. Amsterdam : Elsevier, 2003. 716–726
 16. Jager AK, Eldeen IMS, van Staden J. COX-1 and-2 activity of rose hip. *Phytother. Res.*. 2007 ; 21 : 1251–1252.
 17. Yi OS, Jovel EM, Towers GHN, Wahbe TR, Cho D.W. Antioxidant and antimicrobial activities of native *Rosa* sp. from British Columbia, Canada. *Int. J. Food Sci. Nutr.*. 2007 ; 58 : 178–189.
 18. Guimaraes R, Barros L, Carvalho AM, Ferreira ICFR. Studies on chemical constituents and activity of *Rosa micrantha*: an alternative antioxidant source for food, pharmaceutical, or cosmetic application. *J. Agric. Food Chem.* 2010 ; 58 : 6277–6284.
 19. Fougere-Danezan M, Joly S, Bruneau A, Gao XF, Zhang LB. Phylogeny and biogeography of wild roses with specific attention to polyploids. *Ann. Bot.* 2015 ; 115 : 275–291.
 20. Debener T, Bartels C, Mattiesch L. RAPD analysis of genetic variation between a group of rose cultivars and selected wild rose species. *Mol. Breed.* 1996 ; 2 : 321–327.
 21. Milan T, Osuna F, Cobos S, Torres A, Cubero J. Using RAPDs to study phylogenetic relationships in *Rosa*. *Theor. Appl. Genet.* 1996 ; 92 : 273–277.
 22. Jan CH, Byrne DH, Manhart J, Wilson H. Rose germplasm anaysis with RAPD markers. *Hortscience.* 1999 ; 34 : 341–345.
 23. Scariot V, Akkak A, Botta R. Characterization and genetic relationships of wild species and old garden roses based on microsatellite analysis. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 2006 ; 131 : 66–73.
 24. Koopman WJI, Wissemann V, De Cock K. AFLP markers as a tool to reconstruct complex relationships: a case study in *Rosa* (Rosaceae). *Am. J. Bot.* 2008 ; 95 : 353–366.
 25. Bruneau A, Starr JR, Joly S. Phylogenetic relationships in the genus *Rosa*: new evidence from chloroplast DNA sequences and an appraisal of current knowledge. *Syst. Bot.* 2007 ; 32 : 366–378.
 26. Qiu XQ, Zhang H, Wang QG. Phylogenetic relationships of wild rose in China based on nrDNA and matK data. *Sci. Hortic.* 2012 ; 140 : 45–51.
 27. Wissemann V, Ritz CM. The genus *Rosa* (Rosoideae, Rosaceae) revisited: moleclar anaysis of nrITS-1 and atpB-rbcL intergenic spacer (IGS) versus conventional taxonomy. *Bot. J. Linn. Soc.* 2005 ; 147 : 275–290.