천남성(天南星) 유전자 감별을 위한 DNA 바코드 분석 및 Marker Nucleotide 발굴

김옥진[#], 이영미, 지윤의, 강영민, 최고야, 김호경, 문병철^{*}

한국한의학연구원 한약자원그룹

Identification of Marker Nucleotides for the Molecular Authentication of *Arisaematis Rhizoma* Based on the DNA Barcode Sequences

Wook Jin Kim[#], Young Mi Lee, Yunui Ji, Young Min Kang,
Goya Choi, Ho Kyoung Kim, Byeong Cheol Moon^{*}

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

ABSTRACT

Objectives : Official *Arisaematis Rhizoma* is described only three species, *Arisaema amurense*, *Arisaema erubescens*, and *Arisaema heterophyllum*, in national Pharmacopoeia. However, other *Arisaema* species, *Arisaema ringens*, *Arisaema takesimensense* and *Arisaema serratum*, also have been distributed as an inauthentic *Arisaematis Rhizoma* in the herbal market. To develop a reliable molecular authentication method for *Arisaematis Rhizoma* in species level, we analyzed DNA barcode regions using six *Arisaema species*.

Methods : Thirty-eight samples of six *Arisaema* plants species (*A. amurense*, *A. amurense f. serratum*, *A. heterophyllum*, *A. takesimensense*, and *A. serratum*) were collected from different habitat and nucleotide sequences of DNA barcode regions (*rDNA-ITS*, *matK*, and *rbcL* gene) were analyzed after PCR amplification. The species-specific sequences and phylogenetic relations were estimated using entire sequences of three DNA barcodes based on the analysis of ClustalW and UPGMA, respectively.

Results : The comparative analysis of DNA barcode sequences were revealed inter-species specific nucleotides to distinguish the medicinal plant of *Arisaema Rhizoma* in species levels excluding between *A. amurense* and its subspecies (*A. amurense f. serratum*) and *A. takesimensense* and *A. serratum*, respectively. However, we obtained sequence differences enough to discriminate authentic and inauthentic *Arisaematis Rhizoma*. Therefore, we suggest that these SNP type molecular genetic markers were an reliable method available to identify official herbal medicines.

Conclusions : These marker nucleotides could be useful to identify the official herbal medicines by providing definitive information that can identify original medicinal plant and distinguish from inauthentic adulterants and substitutes.

Key words : *Arisaema* species, *Arisaematis Rhizoma*, DNA barcode, Marker Nucleotide, Molecular Authentication

서론

천남성과(Araceae)에 속하는 다년생 초본식물인 천남성은 주로 열대지방에 분포하여 전 세계적으로 115속 2,000종이

*Corresponding 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 : +82-42-863-9434 · E-mail : bcmoon@kiom.re.kr

#First author : Wook Jin Kim, Herbal Medicine Resources Group, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon 305-811, Republic of Korea,

· Tel : +82-42-868-9372 · FAX : +82-42-863-9434 · E-mail : ukgene@kiom.re.kr

· Received : 13 October 2014 · Revised : 14 November 2014 · Accepted : 14 November 2014

서식하며, 우리나라에는 천남성속(*Arisaema*), 반하속(*Pinellia*), 창포속(*Acorus*), 앉은부채속(*Symplocarpus*) 등 7속 13종이 전국적으로 분포하고 있는 것으로 보고된 바 있다¹⁾. 천남성(天南星; *Arisaematis Rhizoma*)은 《신농본초경(神農本草經)》에 호장(虎掌)이라는 이름으로 하품(下品)에 실린 이후, 장엽 반하(掌葉半夏) 또는 호장남성(虎掌南星) 등의 이름으로도 불렸으며, 여름과 가을에 채취하여 외피를 벗겨 건조한 것을 이용해 왔다²⁾. 대한민국약전 제 10개정(약전10)에서는 천남성(天南星)을 둥근잎천남성 *Arisaema amurense* Maximowicz, 천남성(天南星) *Arisaema erubescens* Schott 또는 두루미천남성 *Arisaema heterophyllum* Blume의 덩이뿌리로서 주피를 완전히 제거한 것으로 규정하고 있다³⁾. 천남성(天南星)의 성미는 고(苦)·신(辛)하며, 온(溫)하고 유독(有毒)한 특성이 있으며, 폐(肺)·간(肝)·비경(脾經)에서 작용하여 주로 조습화담(燥濕化痰), 거풍지경(祛風止癢), 소종산결(消腫散結) 및 항암작용(抗癌作用) 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다^{2,3)}. 그러나, 대한민국약전 제 10개정(약전10) 기준에서는 천남성(天南星)의 기원종으로 포함되지 않지만 국내 서식하는 큰천남성(*Arisaema ringens* (Thunb.) Schott), 점박이천남성(*Arisaema serratum* (Thunb.) Schott) 및 섬남성(*Arisaema takesimensense* Nakai) 등이 채취되어 천남성으로 혼·오용 될 수 있으며, 중국으로부터 다양한 천남성의 동속 근연종이 국내로 유입되어 천남성(天南星)으로 사용될 가능성이 있으므로 체계적인 분류법을 마련하여 정확하게 종을 동정하는 방법이 개발되어야 한다.

최근 들어 분자생물학의 발전으로 염기서열분석의 자동화 및 대량화가 가능해짐에 따라 지구상에 존재하는 모든 생물종을 대상으로 DNA 바코드 부위를 탐색하여 종을 동정하고 계통분류학적인 유연관계를 분석하는 연구가 활발히 진행되고 있다^{4,5)}. 국제생물바코드 컨소시엄(CBOL, Consortium for Barcode of Life)에서는 전 세계에서 보고되는 DNA 바코드 연구결과를 모니터링 할 수 있도록 정보를 DB화하고 있으며, 2015년까지 50만종의 DNA barcode library 구축을 목표로 하고 있다⁴⁾. 식물계에서 보편적으로 이용되고 있는 DNA 바코드 부위로는 염색체에 존재하는 *rDNA-ITS* 부위, 그리고 색소체에 존재하는 *rbcL*, *matK*와 *psbA-trnH* 등이 있으며⁶⁻⁸⁾, 이를 이용한 식물 종 단위 분류체계 확립이나 한약재 감별을 위한 marker nucleotide 개발 연구 사례가 다수 보고되고 있다⁹⁻¹²⁾. 그동안 천남성(天南星) 기원식물을 이용한 분류체계 연구사례로는 천남성속 16종을 대상으로 한 형태적 특성조사¹⁾, 식물 해부학 및 화분학적 형질을 이용한 천남성속 8종의 세부분류학적 연구¹⁴⁾와 2종의 천남성을 이용한 약재 상태에서의 내·외부형태에 관한 연구 등이 있으나²⁾, 이들 분류체계는 그 결과 값이 환경적 요인에 의해 영향을 받을 수 있다는 점과 제한된 정보만을 제공하는 등 한계가 있다¹⁵⁻¹⁶⁾. 그 외에도 random amplified polymorphic DNA (RAPD)를 이용한 천남성속 식물간의 유연관계를 분석한 연구도 있었으나¹⁾, 유전적 다양성 평가를 통한 계통분류학적 정보만을 제공하기 때문에 종 단위 감별을 위한 정보를 제공할 수 있는 marker nucleotide의 확보 및 분자마커의 개발이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 대한민국약전 제 10개정(약전10)에서 규정한 천남성(天南星) 정품에 속하는 둥근잎천남성 *Arisaema amurense* Maximowicz, 두루미천남성 *Arisaema heterophyllum*

Blume 및 천남성 *Arisaema amurense* f. *serratum* Nakai 과 천남성(天南星)의 위품으로 혼·오용 될 가능성이 있는 큰천남성, 점박이천남성 그리고 섬남성을 대상으로 식물 DNA 바코드 부위 *rDNA-ITS*, *matK*, *rbcL*의 염기서열을 확보하여 종별 유연관계를 분석하고, 염기서열 비교분석을 통해 천남성(天南星) 기원식물의 종 감별에 활용 가능한 marker nucleotide를 발굴을 통해 혼·오용 방지를 위한 객관적 감별법으로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

유전자 분석에 사용한 둥근잎천남성 7개체, 천남성 6개체, 두루미천남성 6개체, 큰천남성 6개체, 점박이천남성 7개체 및 섬남성 6개체 총 38개체의 시료는 2011년부터 2012년 까지 국내·외 서로 다른 자생지에서 수집하여 액체질소에 급냉시켜 -70℃ 초저온 냉동고에 보관하여 이용하였다(Table 1). 수집한 시료는 분초화, 생약학, 식물분류학 등의 전문가로 구성된 분류·동정 자문회의의 동정을 거쳐 그 종을 최종 확정하였으며, 각 시료의 기원식물은 압착석엽표본을 제작하여 한 국한의약연구원 한약표준표본관(KHSHR)에 표본번호를 부여하여 증거표본으로 보관하였다.

Table 1. List and Information of Medicinal Plant Species for *Arisaematis Rhizoma* and Closely Related Plant Species Used in This Study.

Name Origins		Information of Collection Habitate	Sample Name
Scientific Name	Herbal Name		
<i>Arisaema amurense</i> Maxim.	<i>Arisaemae Rhizoma</i>	Ongyong, Gwangyang, Jeollanam-do	<i>A. amurense</i> KY
		Habuk, Yangsan, Gyeongsangnam-do	<i>A. amurense</i> YS
		Chuja, Jeju, Jeju-do	<i>A. amurense</i> JJ
		Yokji, Tongyeong, Gyeongsangnam-do	<i>A. amurense</i> TY
		Buk-myeon, Inje, Gangwon-do	<i>A. amurense</i> IJ
<i>Arisaema amurense</i> f. <i>serratum</i> Nakai	<i>Arisaemae Rhizoma</i>	Jangsu, Jangsu, Jeollabuk-do	<i>A. amurense</i> JS
		Buk-dong, Danwon, Ansan, Gyeonggi-do	<i>A. amurense</i> AS
		Gwirae, Wonju, Gangwon-do	<i>A. amurense</i> f. <i>serratum</i> WJ
		Jochon, Jeju, Jeju-do	<i>A. amurense</i> f. <i>serratum</i> JJ
		Yokji, Tongyeong, Gyeongsangnam-do	<i>A. amurense</i> f. <i>serratum</i> TY
<i>Arisaema heterophyllum</i> Blume	<i>Arisaemae Rhizoma</i>	Hwabuk, Yeongcheon, Gyeongsangbuk-do	<i>A. amurense</i> f. <i>serratum</i> YC
		Pampo, Gongju, Chungcheongnam-do	<i>A. amurense</i> f. <i>serratum</i> GJ
		Buk-dong, Danwon, Ansan, Gyeonggi-do	<i>A. amurense</i> f. <i>serratum</i> AS
		Danseong, Sancheong, Gyeongsangnam-do	<i>A. heterophyllum</i> SC
		Daan, Gwangyang, Jeollanam-do	<i>A. heterophyllum</i> KY
<i>Arisaema takesimensense</i> Nakai	-	Yokji, Tongyeong, Gyeongsangnam-do	<i>A. heterophyllum</i> TY
		Daechi, Cheongyang, Chungcheongnam-do	<i>A. heterophyllum</i> CY
		Buk-dong, Danwon, Ansan, Gyeonggi-do	<i>A. heterophyllum</i> AS
		Seorak, Gapyeong, Gyeonggi-do	<i>A. heterophyllum</i> GP
		Nam-myeon, Ulleung, Gyeongsangbuk-do	<i>A. takesimensense</i> BR1
<i>Arisaema serratum</i> (Thunb.) Schott	-	Nam-myeon, Ulleung, Gyeongsangbuk-do	<i>A. takesimensense</i> BR2
		Na-ri, Buk-myeon, Ulleung, Gyeongsangbuk-do	<i>A. takesimensense</i> NR1
		Na-ri, Buk-myeon, Ulleung, Gyeongsangbuk-do	<i>A. takesimensense</i> NR2
		Naesujeon, Buk-myeon, Ulleung, Gyeongsangbuk-do	<i>A. takesimensense</i> NSJ1
		Naesujeon, Buk-myeon, Ulleung, Gyeongsangbuk-do	<i>A. takesimensense</i> NSJ2
<i>Arisaema ringens</i> (Thunb.) Schott	-	Ongyong, Gwangyang, Jeollanam-do	<i>A. serratum</i> KY
		Jangsu, Jangsu, Jeollabuk-do	<i>A. serratum</i> JS
		Nam-myeon, Geoje, Gyeongsangnam-do	<i>A. serratum</i> GJ
		Guwa, Jeju, Jeju-do	<i>A. serratum</i> JJ
		Buk-myeon, Inje, Gangwon-do	<i>A. serratum</i> IJ
<i>Arisaema ringens</i> (Thunb.) Schott	-	Nam-myeon, Ulleung, Gyeongsangbuk-do	<i>A. serratum</i> UR
		Antu, Yanbian, Jilin, China	<i>A. serratum</i> Ch JL
		Nam-myeon, Geoje, Gyeongsangnam-do	<i>A. ringens</i> GJ
		Yokji, Tongyeong, Gyeongsangnam-do	<i>A. ringens</i> TY
		Guwa, Jeju, Jeju-do	<i>A. ringens</i> JJ GJ
<i>Arisaema ringens</i> (Thunb.) Schott	-	Jochon, Jeju, Jeju-do	<i>A. ringens</i> JJ JC
		Namwon, Seogwipo, Jeju-do	<i>A. ringens</i> JJ SGP
		Chuja, Jeju, Jeju-do	<i>A. ringens</i> JJ CJ

[†]There is no appropriate official name.

2. DNA 추출

국내 · 외 자생지에서 수집하여 -70°C 에 보관한 기원식물 생체시료의 약 100mg을 Lysing matrix ATM tube(MP biomedical, USA)에 담아 PrecellysTM Grinder(Bertin technologies, France)를 이용하여 곱게 마쇄한 후, DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN, USA)을 이용하여 제작자가 제공한 protocol에 따라 추출 · 정제하였다. 정제된 DNA의 순도와 질을 확인하기 위하여 0.8% agarose gel을 이용하여 전기영동 후, Ethidium Bromide(EtBr)로 염색하여 UV light 상에서 DNA band를 확인하였으며, UV spectrophotometer(Nanodrop, USA)를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

3. DNA 바코드 부위 PCR 증폭

약 15 ng의 genomic DNA와 각 20 pmole의 정방향과 역방향 primer(Table 2)와 SolgTM 2 × Taq PCR Smart-MixI (Solgent, Korea)를 혼합하여 DNA Engine Dyad Thermal Cycler(MJ Research, USA)를 이용하여 증폭하였다. 반응조건은 95°C 에서 5분간 pre-denaturation한 후 95°C 에서 30초 denaturation, 53°C 에서 40초 annealing, 72°C 에서 1분 extension을 총 35회 반복 수행하고 마지막으로 72°C 에서 5분간 final-extension시켜 증폭하였다.

Table 2. The Information of the Primer Sequences for Plant DNA Barcodes Used in This Work.

Barcode Gene	Primer Name	Prime Sequences(5' - 3')	Reference
<i>rDNA-ITS</i>	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> , 1990 ¹⁷⁾
	ITS4	TCCTCCGCTGATTGATATGC	
<i>matK</i>	<i>matK</i> AF	CTATATCCACTTATCTTTCAGGAG	Chase <i>et al.</i> , 2007 ¹⁸⁾
	<i>matK</i> 8R	AAAGTTCTAGCACAAGAAAGTGA	
<i>rbcl</i>	<i>rbcl</i> F	ATGTCACCAACAACAGAACTAAAGC	Cuenoud <i>et al.</i> , 2002 ¹⁹⁾
	<i>rbcl</i> R	TCCCTTTTAGTAAAAGATTGGGCGGAG	

4. 염기서열 분석

DNA 바코드 부위 증폭산물의 DNA 염기서열 분석을 위하여 각각의 total 증폭산물을 1.5% agarose gel상에서 100 bp DNA ladder(Solgent, Korea)와 함께 전기영동하고 EtBr로 염색하여 관찰한 후, 정확하게 증폭된 *rDNA-ITS*, *matK*, *rbcl* 유전자 PCR 증폭산물을 agarose gel로부터 회수하여 Gel Extraction Kit(QIAGEN, CA, USA)를 이용하여 정제한 뒤 pGEM-T easy Vector Systems(Promega, USA)에 삽입하였다. 삽입된 증폭산물은 XL1-Blue MRF' competent cell (Stratagene, USA)에 형질전환한 뒤 ampicillin과 X-gal / IPTG가 첨가된 LB agar 배지에 도말하여 약 20시간 배양하였다. 각 시료별로 선별된 3개의 white colony를 액체배양하고 Plasmid mini preparation kit(SolGent, Korea)를 이용하여 plasmid DNA를 분리한 후, T7과 SP6 primer를 이용하여 ABI3730 automatic DNA sequencer(Applied Biosystems, USA)에서 염기서열을 분석하고 각 시료별로 분석된 3개 colony의 염기서열을 비교하여 최종 확정하였다.

5. 종 판별용 marker nucleotide 탐색 및 종간 유연관계

최종 확정된 각 시료별 38개체의 *rDNA-ITS*, *matK*, *rbcl* 유전자 염기서열을 DNA 바코드 종류별로 BioEdit program (Version 7.0.9.)의 ClustalW 방법으로 multiple alignment를 수행하여 종내 개체 및 종별 염기서열을 정렬하였다. 정렬된 *rDNA-ITS*, *matK* 및 *rbcl* 염기서열의 종내 개체별 비교와 종별 비교를 통해 종 특이성을 갖는 염기의 삽입(insertions), 결실(deletions) 및 치환(substitutions)을 위치별로 분석하여 정리하였다. 전체 분석대상 시료의 유연관계 분석은 38 개체의 DNA 바코드 부위 전체 염기서열을 각각 CLC main workbench ver. 6.0 program(Insilicogen, Korea)을 이용하여 UPGMA 방법으로 Phylogenetic tree를 작성하고 군집의 형성 유 · 무와 군집간의 유연관계를 비교 · 분석하였다.

결 과

1. DNA barcode 부위 증폭 및 염기서열 분석

천남성(天南星)의 기원식물로 이용되는 등근잎천남성 7개 시료, 천남성 6개 시료, 두루미천남성 6개 시료 및 천남성(天南星)의 위품으로 이용될 수 있는 큰천남성 6개 시료, 점박이천남성 7개 시료 및 섬남성 6개 시료의 잎으로부터 추출한 게놈 유전자를 주형으로 DNA 바코드 부위를 PCR 증폭하였다. *rDNA-ITS* 부위는 약 750 bp의 증폭산물을 확보하였으며, *matK*와 *rbcl* 부위에서는 약 1,250 bp와 1,500 bp의 DNA 증폭산물을 각각 확보하여 이를 각각 *rDNA-ITS*, *matK* 및 *rbcl* 바코드 부위로 정의하였다. 38개 시료로부터 확보한 DNA 바코드 부위 증폭산물 전체 염기서열을 확인하기 위해 pGEM-T easy vector에 삽입한 뒤, 각 시료별로 최소 3개 이상의 삽입 유전자 염기서열을 확보 · 분석하고 이들을 비교하여 DNA 바코드 부위 염기서열을 확정하였다. 확정된 각 시료의 염기서열을 종간 비교한 결과, *rDNA-ITS* 부위는 종간의 유전자크기 차이는 있었으나 종내 지역별 수집개체간의 유전자크기 차이는 관찰되지 않았다. *rDNA-ITS*에서 등근잎천남성과 천남성은 771 bp의 크기로 확인되었으며, 큰천남성은 769 bp, 두루미천남성은 762 bp, 그리고 점박이천남성과 섬남성은 765 bp의 염기로 구성되어 있음을 확인하였다(Table 3). 또한, *matK*와 *rbcl*은 각각 1,286 bp와 1,517 bp로 6종간 염기서열 길이의 차이가 없었다(Table 3).

Table 3. Sequence Length of *rDNA-ITS*, *matK* and *rbcl* Gene Region Amplified from Six *Arisaema* Species.

Scientific plant	<i>rDNA-ITS</i> (bp)	<i>matK</i> (bp)	<i>rbcl</i> (bp)
<i>A. amurense</i>	771	1,286	1,517
<i>A. amurense</i> f. <i>serratum</i>	771	1,286	1,517
<i>A. heterophyllum</i>	762	1,286	1,517
<i>A. takesimensense</i>	767	1,286	1,517
<i>A. serratum</i>	767	1,286	1,517
<i>A. ringens</i>	771	1,286	1,517

천남성(天南星) 및 천남성(天南星) 위품으로 사용되는 6종 38개체간의 *rDNA-ITS* 염기서열 비교를 통해 종내 유전변이와 종간 유전자 염기서열의 삽입/결실(indels)과 치환(substitutions)을 분석한 결과, 천남성은 둥근잎천남성과 동일한 염기서열을 가지며, 점박이천남성은 섬남성과 동일한 염기서열을 가지는 것으로 확인되었다. 둥근잎천남성을 기준으로 6종간의 염기서열 삽입/결실을 분석한 결과, 두루미천남성은 1 bp 결실이 3개 위치(89번, 682번, 701번 위치), 2 bp 결실이 2개 위치(92-93번, 171-172번 위치), 3 bp 결실이 1개 위치(507~509번 위치) 그리고 1 bp 삽입이 1개 위치(496번 위치)에서 존재하였다(Table 4). 둥근잎천남성을 기준으로 섬남성과 점박이천남성의 삽입/결실을 확인한 결과는 두 종 모두 동일한 1 bp(119번 위치), 2 bp(92-93번 위치) 및 3 bp(170~

172번 위치) 결실만 각 1개 위치에서 존재하였으며, 큰천남성과의 비교에서는 1 bp 결실이 1개 위치(682번 위치), 2 bp 결실이 2개 위치(92-93번, 171-172번 위치), 1 bp 삽입이 1개 위치(496번 위치) 그리고 2 bp 삽입이 1개 위치(510-511번 위치)에 존재함을 확인하였다(Table 4). 또한 둥근잎천남성을 기준으로 염기치환을 분석한 결과에서는 두루미천남성이 79개 위치, 섬남성과 점박이천남성이 각각 24개 위치, 그리고 큰천남성이 44개 위치에 염기서열의 차이가 있음을 확인하였다(Table 4). 이 외에 종 단위 구별이 가능한 single nucleotide sequence (SNP)가 두루미천남성은 63개 위치에 존재하였으며, 큰천남성은 26개 위치에 존재함을 확인하였다(Table 4).

Table 4. Summary of Marker Nucleotides from Comparative Analysis of the *rDNA-ITS* Sequences Among Six *Arisaema* Species.

Alignmented Nucleotide Position	34	35	39	48	49	55	61	73	79	82	89	92-93	95	103	110	111	117	119	136	138	148	151	154	166-173	178	
<i>A. amurense</i>	C	A	T	G	C	C	C	A	T	G	G	GG	A	T	T	C	C	-	T	C	A	C	C	TCCTTCTA	T	
<i>A. amurense</i> f. <i>serratum</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	TCCTTCTA	.	
<i>A. heterophyllum</i>	T	G	.	A	.	T	T	G	C	A	-	--	G	C	C	.	T	-	.	.	G	T	.	CTCTC--G	C	
<i>A. takesimense</i>	T	.	.	A	G	.	.	.	.	.	.	--	.	C	.	.	.	-	C	.	.	.	.	TCCT---A	.	
<i>A. serratum</i>	T	.	.	A	G	.	.	.	.	.	.	--	.	C	.	.	.	-	C	.	.	.	.	TCCT---A	.	
<i>A. ringens</i>	T	.	C	A	G	.	.	G	.	.	.	--	.	C	.	T	.	C	.	T	G	.	G	TCCCT--A	.	
Alignmented Nucleotide Position	180	181	183	184	193	199	202	203	206-207	210	223	225	236	237	244	249	257	261	266	268	272	279	284	286-287	293	
<i>A. amurense</i>	G	G	C	T	G	C	T	G	TC	T	C	C	G	G	A	C	C	C	C	G	T	T	T	TG	C	
<i>A. amurense</i> f. <i>serratum</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
<i>A. heterophyllum</i>	A	.	.	C	.	T	.	A	CA	.	T	.	.	A	.	.	G	.	T	A	A	.	C	CA	G	
<i>A. takesimense</i>	.	.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	
<i>A. serratum</i>	.	.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	
<i>A. ringens</i>	.	A	.	.	A	.	.	.	.	C	.	T	A	.	T	T	.	T	.	.	.	.	C	C	..	T
Alignmented Nucleotide Position	298	308	310	313	319	431	444	469	471	475-476	487	496	498	500	506-514	538	546	550	554	558	569-570	580	594			
<i>A. amurense</i>	C	T	A	T	C	C	C	A	G	CG	T	-	C	G	GGTG--GGG	C	G	G	C	C	AG	C	C			
<i>A. amurense</i> f. <i>serratum</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	.	GGTG--GGG	.	.	.	.	.	.	.	.			
<i>A. heterophyllum</i>	T	C	G	C	T	T	T	G	A	A	.	C	.	A	G-----CGG	T	A	A	T	.	G	T	T			
<i>A. takesimense</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	-	.	.	GGGG--TGG	.	.	.	.	.	.	.	.			
<i>A. serratum</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	-	.	.	GGGG--TGG	.	.	.	.	.	.	.	.			
<i>A. ringens</i>	.	.	.	.	.	.	T	.	.	TA	.	C	T	.	GGGGGGTGT	.	.	.	.	.	T	GA	.			
Alignmented Nucleotide Position	606	608	619	620	621	624	626	631	636	640	646	655	661	662	675	681-687	689	692-693	698-704	715	719	749	752			
<i>A. amurense</i>	A	T	G	C	C	A	T	G	T	C	T	C	G	-	G	CCCTGCT	A	TC	GG-ATAG	C	C	C	A			
<i>A. amurense</i> f. <i>serratum</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	CCCTGCT	.	.	GG-ATAG	.	.	.	.			
<i>A. heterophyllum</i>	G	C	A	.	T	G	C	C	.	C	.	A	-	A	A-ACGAC	.	CT	AA--TGA	T	T	T	G				
<i>A. takesimense</i>	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	ACACGCT	.	.	AATGGGG	.	.	.	.			
<i>A. serratum</i>	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.	ACACGCT	.	.	AATGGGG	.	.	.	.			
<i>A. ringens</i>	G	.	.	.	.	.	.	C	T	.	T	.	G	.	A-ACGAT	G	.	AG-ATAG	T	.	.	.				

Dots (·) indicate the identical sequences with *A. amurense* and dashes(-) represents gaps introduced to maximize alignment.

*matK*와 *rbcL* 두 유전자 부위 염기서열을 비교·분석한 결과에서도 둥근잎천남성과 천남성, 그리고 섬남성과 점박이천남성이 동일한 염기서열을 가지는 것을 확인하였다. 천남성 속 6종 모두 *matK*와 *rbcL* 유전자 부위에서는 삽입/결실 부위가 존재하지 않았으며, 염기치환 부위만 존재하였다. *matK*의 경우 둥근잎천남성을 기준으로 두루미천남성 21개 위치, 섬남성과 점박이천남성이 각 10개 위치 그리고 큰천남성 12개 위치에서 염기치환이 존재함을 확인하였다(Table 5). *rbcL*에서

도 둥근잎천남성을 기준으로 염기서열을 비교하였을 때, 두루미천남성에서 10개 위치, 섬남성과 점박이천남성에서 각각 5개 위치 그리고 큰천남성에서 6개 위치의 염기치환을 확인하였다(Table 6). 그 외에도 각각의 *matK*와 *rbcL* 유전자 부위에 존재하는 종 단위 특이 염기서열인 SNP가 두루미천남성이 12개 위치와 8개 위치, 그리고 큰천남성 3개 위치와 4개 위치에서 각각 확인되었다(Table 5, 6).

Table 5. Summary of Marker Nucleotides from Comparative Analysis of the *matK* Sequences Among Six *Arisaema* Species.

Aligned Nucleotide Position	81	92-93	120	201	246	379	381	397	445	451	512	546	709	762	801	836	939	942	960	981-982	1,005	1,052	1,140
<i>A. amurense</i>	C	AG	T	C	G	C	G	A	C	A	T	A	A	C	A	C	G	T	A	GC	T	G	T
<i>A. amurense</i> f. <i>serratum</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>A. heterophyllum</i>	T	GA	C	.	A	T	A	G	A	C	A	.	G	A	T	A	A	.	G	AA	.	T	A
<i>A. takesimensis</i>	T	GA	.	.	.	T	A	.	.	.	.	G	G	.	.	.	A	.	G	.	.	.	G
<i>A. serratum</i>	T	GA	.	.	.	T	A	.	.	.	.	G	G	.	.	.	A	.	G	.	.	.	G
<i>A. ringens</i>	T	GA	.	T	.	T	A	.	.	.	.	.	G	.	.	.	A	C	G	.	C	.	A

Dots (·) indicate the identical sequences with *A. amurense*.Table 6. Summary of Marker Nucleotides from Comparative Analysis of the *rbcl* Sequences Among Six *Arisaema* Species.

Aligned Nucleotide Position	32	243	264-265	423	585	639	655	672	673	688	1,095	1,137	1,261	1,381	1,416	1,459
<i>A. amurense</i>	C	A	AG	T	T	T	T	T	C	T	T	A	C	A	A	A
<i>A. amurense</i> f. <i>serratum</i>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<i>A. heterophyllum</i>	T	.	CC	.	G	.	G	A	A	G	.	.	.	G	.	T
<i>A. takesimensis</i>	.	.	.	C	.	.	.	A	.	.	C	C	.	.	.	T
<i>A. serratum</i>	.	.	.	C	.	.	.	A	.	.	C	C	.	.	.	T
<i>A. ringens</i>	.	G	.	.	.	C	.	A	.	.	.	.	A	.	G	T

Dots (·) indicate the identical sequences with *A. amurense*.

2. DNA 바코드 부위 염기서열을 이용한 종 감별용 marker nucleotide 발굴

천남성(天南星)으로 이용되는 3종과 천남성(天南星)의 위품

으로 혼·오용 될 수 있는 3종을 구별하기 위한 marker nucleotide 발굴을 위해 6종 38개체 시료의 *rDNA-ITS*, *matK* 그리고 *rbcl* 유전자 염기서열의 각 위치별 삽입/결실과 치환을 종별로 비교·분석하였다(Fig. 1, Table 4-6).

Fig. 1. Screening of marker nucleotides from comparative analysis of DNA barcodes. Dots (·) indicate the identical sequences with *A. amurense* KY and dashes (—) represents gaps introduced to maximize alignment. Boxes indicate available sequence regions as a specific marker nucleotide. A: comparison of *rDNA-ITS* sequence among six *Arisaema* species, B: comparison of *matK* sequence among six *Arisaema* species, C: comparison of *rbcl* sequence among six *Arisaema* species.

*rDNA-ITS*에서의 종특이적 삽입/결실과 치환을 토대로 marker nucleotide를 분석한 결과, 두루미천남성과 다른 5종 간의 염기치환 부위가 A→G 5개 위치(35번, 95번, 173번, 469번, 624번 위치), C→T 16개 위치(55번, 61번, 117번, 151번, 167번, 199번, 223번, 266번, 298번, 319번, 431번, 538번, 554번, 580번, 594번, 693번 위치), T→C 13개 위치(79번, 110번, 166번, 178번, 184번, 206번, 286번, 308번, 313번, 608번, 626번, 646번, 687번 위치), G→A 13개 위치(82번, 180번, 203번, 237번, 268번, 287번, 471번, 500번, 546번, 550번, 619번, 661번, 675번 위치), C→T 3개 위치(621번, 719번, 749번 위치), C→A 1개

위치(207번 위치), C→G 1개 위치(257번 위치), T→A 1개 위치(272번 위치), A→G 2개 위치(310번, 752번 위치), G→C 1개 위치(631번 위치), T/결실→C 1개 위치(170번 위치) 그리고 G/T→C 1개 위치(512번 위치)로 모두 58개 위치에서 존재하였으며, 염기결실 부위는 G→결실 3개 위치(89번, 507번, 509번 위치), T/G→결실 1개 위치(508번 위치) 및 A/G→결실 1개 위치(701번 위치)로 모두 5개 위치에 존재하는 등 총 63개 위치에서 확인되었다(Fig. 1A, Table 4). 큰천남성을 다른 5종과 비교하였을 때는 총 26개 위치에서 marker nucleotide부위가 존재하였으며, T→C 3개 위치(39번, 210번, 636번 위치), C→T 10개 위치(111번, 138번, 225번,

249번, 261번, 475번, 498번, 558번, 640번, 655번 위치), C→G 1개 위치(154번 위치), G→A 4개 위치(181번, 193번, 236번, 570번 위치), G→T 1개 위치(514번 위치), A→G 1개 위치(689번 위치), A/G→T 1개 위치(244번 위치) 그리고 C/G→T 1개 위치(293번 위치)의 염기치환이 22개 위치하였고, 결실→C 1개 위치(119번 위치)와 결실→G 3개 위치(510번, 511번, 662번 위치)의 염기삽입 부위가 4개 위치에서 존재함을 확인하였다. 둥근잎천남성과 천남성간의 *rDNA-ITS* 유전자부위를 비교분석한 결과는 2종간의 염기서열이 완전히 일치하여 종 단위 특이 marker nucleotide를 발굴할 수는 없었으나, 다른 4종과 비교하였을 때 T→C 1개 위치(34번 위치), A→G 2개 위치(48번, 698번 위치), C→T 2개 위치(103번, 684번 위치), T/C→G 1개 위치(512번 위치), A→C 1개 위치(681번 위치), G/결실→T 1개 위치(508번 위치), 결실→C 1개 위치(171번 위치) 그리고 결실→T 1개 위치(172번)의 총 10개 위치에서 염기 삽입/결실 또는 치환부위가 존재함을 확인하였다. 또한, 섬남성과 점박이천남성간의 *rDNA-ITS* 유전자부위도 2종간의 염기서열이 완전히 일치함으로 인해 종 단위 특이 marker nucleotide를 확인할 수는 없었으나, 이들 2종을 다른 4종과 비교하였을 때 T→C 3개 위치(136번, 202번, 487번 위치), C→T 2개 위치(183번, 620번 위치), T→G 1개 위치(702번 위치), T/C→결실 1개 위치(170번 위치), A/T→G 1개 위치(244번 위치), 결실→T 1개 위치(700번 위치) 및 A/결실→G 1개 위치(701번 위치)에서 총 10개의 염기차이가 있음을 확인하였다.

matK 1,286 bp의 염기정보를 바탕으로 두루미천남성과 다른 5종간의 염기서열을 비교한 결과는 C→A 4개 위치(445번, 762번, 836번, 982번 위치), G→A 2개 위치(246번, 939번 위치)로 치환된 것 외에 T→C(120번 위치), A→G(397번 위치), A→C(451번 위치), T→A(512번 위치), A→T(801번 위치) 그리고 G→T(1,052번 위치)로 각 1개 위치씩 총 12개 위치에서 치환부위가 존재하였고, 큰천남성을 기준으로 비교하였을 때에는 C→T 1개 위치(201번 위치)와 T→C 2개 위치(942번, 1,005번 위치)로 총 3개 위치에서 염기치환이 존재하여 종 특이성을 갖는 marker nucleotide를 확인할 수 있었다(Fig. 1B, Table 5). *rDNA-ITS*부위와 동일하게 *matK*에서도 염기서열이 완전히 일치하는 것으로 밝혀진 둥근잎천남성과 천남성을 기준으로 다른 4종과 비교한 결과에서는 T→C 2개 위치(81번, 379번 위치), G→A 3개 위치(92번, 709번, 960번 위치), A→G 3개 위치(93번, 381번, 939번 위치) 그리고 A/G→T 1개 위치(1,140번 위치)로 총 9개 위치에서 염기치환이 존재하였으며, 마찬가지로 동일한 *matK* 염기정보를 가지는 섬남성과 점박이천남성을 기준으로 A→G 1개 위치(546번 위치)와 T/A→G 1개 위치(1,140번 위치)로 총 2개 위치에서 염기 치환을 확인할 수 있었다.

본 연구의 분석에 이용된 천남성속 6종의 *rbcl* 유전자 1,517 bp의 염기정보를 비교·분석하였을 때, 두루미천남성과 다른 5종간에 염기치환이 일어난 위치는 총 8개로 T→G가 3개 위치(585번, 655번, 688번 위치), C→T(32번 위치), A→C(264번 위치), G→C(265번 위치), C→A(673번 위치) 그리고 A→G(1,381번 위치)는 각 1개 위치씩 존재하였으며, 큰천남성을 기준으로 A→G 2개 위치(243번, 1,416번 위치), T→C(639번 위치)와 C→A(1,261번 위치)는 각 1개 위

치씩 총 4개 위치에서 염기치환이 존재함을 확인하였다(Fig. 1C, Table 6). *rbcl* 유전자 부위에서도 염기정보가 완전히 일치하는 것으로 밝혀진 둥근잎천남성과 천남성을 기준으로 A→T(672번 위치)와 T→A(1,459번 위치)각 총 2개 위치에서, 그리고 섬남성과 점박이천남성을 기준으로 T→C 2개 위치(423번, 1,095번 위치)와 A→C 1개 위치(1,137번 위치)는 총 3개 위치에서 염기치환이 확인되었다.

3. 종간 유연관계 분석

국·내외 지역별 수집을 통해 확보된 둥근잎천남성, 천남성, 두루미천남성, 섬남성, 점박이천남성 및 큰천남성 6종 38개체 시료를 이용하여 *rDNA-ITS*, *matK* 그리고 *rbcl* DNA 바코드 부위를 증폭하였고, 이들 증폭 부위 전체의 염기서열 정보를 바탕으로 유연관계를 분석하였다(Fig. 2). *rDNA-ITS* 유전자 부위의 유연관계 분석결과 4개의 그룹으로 나뉘음을 확인하였고, I그룹에는 둥근잎천남성과 천남성이 종별 수집 지역별 구분 없이 특정한 경향 없이 분포하고 있었다(Fig. 2A).

Fig. 2. Phylogenetic tree of six *Arisaema* species based on DNA barcode sequences using UPGMA analysis in CLC main workbench ver. 6.0. program. A: phylogenetic tree of *rDNA-ITS*, B: phylogenetic tree of *matK*, C: phylogenetic tree of *rbcl*.

섬남성과 점박이천남성도 종별 수집 지역별 구분 없이 II그룹에 속하였고, 가장 많은 염기치환 및 삽입/결실이 존재했던

큰천남성과 두루미천남성은 I-II그룹과 가장 유전적으로 멀리 떨어져 각각 III그룹과 IV그룹으로 분계함을 확인하였다.

*matK*의 염기서열 정보를 바탕으로 한 유연관계 분석에서도 *rDNA-ITS*와 동일하게 I-IV그룹으로 나뉜 결과를 확인하였다(Fig. 2B). I그룹에 속한 둥근잎천남성과 천남성은 종별 및 수집 지역별 구분 없이 혼재하여 분포하고 있었으며, II그룹에 속한 섬남성과 점박이천남성은 유전적 유연관계는 유사하여 하나의 그룹으로 유집되었으나, 수집 지역보다는 종단위의 영향을 받은 결과로 나타났다. 또한, III그룹에 속한 큰천남성은 I그룹의 둥근잎천남성과 천남성 그리고 IV그룹의 두루미천남성과 비교하여 II그룹의 섬남성 및 점박이천남성과 비교적 유전적 거리가 가까웠으며, IV그룹의 두루미천남성은 가장 I-III그룹과 유전적 거리가 멀리 떨어져 위치하였다. *rbcL* 염기서열을 이용한 유연관계분석 결과의 특징은 *rDNA-ITS*와 *matK*의 유집결과와 비교하여 가장 수집지역의 영향을 받지 않고 명확하게 종 단위로 그룹형성이 이루어졌다는 점이다(Fig. 2C). 둥근잎천남성과 천남성이 I그룹에서 가장 유전적으로 유사한 것으로 유집되었으며, 점박이천남성과 섬남성은 II그룹을 이루고 있었고, 큰천남성과 두루미천남성은 각각 III그룹과 IV그룹으로 분계하여 유전적으로 I-II그룹과 유전적으로 차이가 있음을 확인하였다.

고찰

대한민국약전 제 10개정(약전10)에서 규정한 천남성(天南星) 기원식물로는 둥근잎천남성, 일파산남성 및 두루미천남성이 있으며, 이의 위품으로 혼·오용될 수 있는 천남성속 식물로는 큰천남성, 섬남성 및 점박이천남성 등이 있다³⁾. 천남성(天南星) 기원식물을 감별하는 방법으로 형태학적 감별 또는 이화학적 감별 등이 이용될 수 있으나, 형태학적 감별은 약재의 원형이 유지되거나 분류기로 이용할 수 있는 체계적인 분류법과 전문적 경험이 있어야 하며, 이화학적 감별은 정품에 대한 지표물질이 밝혀져 있어야 하는 한계점이 있다²⁾. 그 외에도 기원식물이 가지는 고유의 유전정보를 이용한 유전자 감별법이 있는데²⁰⁾, *rDNA-ITS*, *matK* 및 *rbcL* 등의 식물 DNA 바코드 부위에 대한 유전자 염기서열 비교분석을 통해 marker nucleotide를 발굴 한다면 종 단위 수준에서까지 정확하게 감별이 가능하다는 장점이 있어 본 연구에 적용하였다.

따라서 본 연구에서는 국내·외 다양한 천남성 서식지에서 수집한 천남성속 6종 38개체 시료를 대상으로 *rDNA-ITS*, *matK* 및 *rbcL* 유전자의 염기서열을 비교·분석 하였고, 그 결과로 PCR 증폭된 DNA 바코드 부위의 유전자 크기는 *rDNA-ITS*의 경우 762~771 bp로 분포하여 762 bp의 두루미천남성이 가장 짧았고 둥근잎천남성과 천남성 2종이 771 bp로 가장 길어 동속 간에도 길이 차이가 있었다. 이는 Table 4.에서 보듯이 둥근잎천남성 염기서열을 기준으로 비교·분석하였을 때, 두루미천남성에서 가장 빈번하게 염기의 삽입/결실 부위가 위치하고 있기 때문이다. 그 외에 두루미천남성보다는 삽입/결실 부위가 적은 빈도였지만, 큰천남성, 섬남성 및 점박이천남성에서 나타남에 따라 다양한 크기의 *rDNA-ITS*를 확인하였다. 이러한 결과는, 기 보고된 759~762 bp 범위의 오미자 연구¹¹⁾ 및 732~736 bp 범위의 대계/소계(大薊/小薊)

/小薊)¹³⁾ 연구의 결과와도 유사하며 종간 또는 종내 지역별 개체 간에 존재하는 유전적 변이로 인한 차이로 생각 된다. 반면 *matK*에서는 염기서열 정보가 보고된 바 있는 1,286~1,292 bp 범위의 반하(半夏)¹⁰⁾ 연구와 1,262~1,268 bp 범위의 대계/소계(大薊/小薊)¹³⁾ 연구 등의 결과와 달리 본 연구 결과의 6종 38개체는 모두 종내 또는 종간의 변이가 존재하지 않고 1,286 bp로 동일함을 확인하였다. 이전 연구결과에서 *Pinellia* 속에 속한 반하류 3종은 1,286 bp 크기로 동일하고 수반하(*Typhonium flagelliforme*)만 1,296 bp 크기로 차이가 다른 이유가 속의 차이로 인한 것으로 볼 수도 있으나¹⁰⁾, 대계/소계(大薊/小薊) 연구¹³⁾에서 조뱅이(*Breua segeta*), 큰조뱅이(*Breua setosa*)와 지느러미영경귀(*Cirsium crispus*)가 속이 다름에도 불구하고 동일하게 1,268 bp 크기를 가진 결과로 유추 할 때, *matK* 유전자 부위에 존재하는 종간 유전적 변이로 볼 수 있다.

앞서 언급된 *rDNA-ITS*와 *matK*가 염기삽입/결실로 인해 종에 따라 다양한 크기의 DNA 바코드 부위가 존재하는 반면, *rbcL*은 반하(半夏)¹⁰⁾와 대계/소계(大薊/小薊)연구¹³⁾에서 분석된 증폭 부위의 크기가 모두 동일한 것으로 밝혀져 이용되고 있는 식물 DNA 바코드 부위 중에서 가장 유전변이가 적음을 보여주었는데, 본 연구에서도 동일한 양상으로 6종 38개체 시료 모두 1,517 bp 크기의 염기서열을 확인하였다. 이상의 결과로, 3종의 DNA 바코드 부위의 증폭을 통해 확보된 염기서열을 비교·분석하면 *rDNA-ITS*가 가장 빈번하게 유전변이가 일어남으로 인해 다양한 크기로 식물체의 핵 내에서 위치하고 있음을 확인할 수 있었으며^{9,11,12,13,21)}, 색소체에 존재하는 *matK*와 *rbcL*은 모계유전을 통해 보다 안정적으로 유전형질을 보존함으로써 *rDNA-ITS*와 비교하여 유전변이가 일어나는 빈도가 덜함을 확인할 수 있었다.

이러한 결과는 대계/소계(大薊/小薊) 연구¹³⁾와 유사하게 본 연구에서도 천남성속 6종의 종 단위 감별을 위한 marker nucleotide가 *rDNA-ITS*, *matK* 그리고 *rbcL* 유전자 순서로 많이 존재함을 보여주었으며, 종 단위로는 두루미천남성에서 가장 많이 발굴되었고, 그 다음으로 큰천남성에서 존재하였으나, 하수오 산지 구분에 대한 가능성을 보인 연구 결과²¹⁾와 같은 지역 특이성을 가지는 변이가 관찰되지 않았으며, 일부 개체에서는 염기치환 변이가 확인됐으나 경향성 없이 존재하는 비 특이적인 형태였다. 유연관계 분석에서도 두루미천남성과 큰천남성은 독립된 분계를 이루어 다른 4종들과 가장 유전적으로 먼 거리에서 위치하였는데, 이는 대계/소계(大薊/小薊) 기원식물의 *rDNA-ITS* 유연관계에서 많은 marker nucleotide가 발굴되었던 지느러미영경귀가 분석에 이용된 다른 종들과 가장 유전적 거리가 멀었던 결과¹³⁾와도 유사하다. 두루미천남성과 큰천남성 같이 다수의 종 단위 감별 marker nucleotide가 발굴된 경우에 비해, 둥근잎천남성과 천남성은 일부 개체에서 경향성 없이 존재하는 변이를 제외하고는 3가지의 DNA 바코드 부위에서 염기서열이 동일한 것으로 나타났다. 유연관계에서도 두 종이 같은 그룹을 형성하는 것으로 분석되었다. 현재 식물분류체계상 천남성은 둥근잎천남성의 품종으로 분류가 되고 있는데, 이는 두 종 모두 3~5개 소엽(leaflet)으로 이루어진 손바닥형(palmate type) 잎을 가지며, 염색체수가 2n=56으로 동일하기 때문이다^{14,22,23)}. 그러나, 두 종을 형태적으로 구분 할 수 있는 분류키는 앞에 존재

하는 거치의 유·무 이외엔 없으며, 서식지에 따라서 거치의 유·무를 판단 할 수 있는 경계가 애매모호 한 경우가 많았다. 이점은 형질이 발현되는데 있어서 유전형질 외에 환경적 요인에 의해서도 영향을 받기 때문에 천남성이 둥근잎천남성의 환경적 요인에 의한 단순변이일 가능성이 있는데 본 연구에서 유전학적으로는 두 종이 동일함을 바코드 부위 결과로 보여주고 있다고 본다. 또한, 섬남성과 점박이천남성에서도 3종의 DNA 바코드 부위에 일부 존재하는 개체 특이적인 변이를 제외하고는 염기서열이 동일함에 따라 유연관계 분석 결과에서도 하나의 그룹으로 유집되는 경향으로 나타났다. 이들 두 종은 6개의 소엽(leaflet)이 조족형(pedate type)을 이루는 잎과 염색체수가 $2n=28$ 인 특징을 가지고 있어서 식물분류체계상 점박이천남성계열에 속하여 각각의 종으로 분류되고 있지만²³⁾, 형태적으로 점박이천남성과 섬남성을 비교하였을 때의 차이는 줄기에 점무늬가 나타난다는 점 이외엔 없는데, 이 또한 수집된 개체에 따라 점무늬의 발현 정도 차이가 환경적 요인에 의해 영향을 받아 나타난 단순변이일 가능성이 있다고 본다. 따라서, RAPD, amplified fragment length polymorphism (AFLP) 또는 simple sequence repeat (SSR)과 같은 다양한 분자유전학적 기법²⁴⁾을 활용한 다각적 분석을 통해 형태적 구분이 불명확하여 기후 또는 식생의 차이에 따른 환경적 요인에 의해 형질의 발현이 다양하게 나타나는 둥근잎천남성과 천남성 그리고 섬남성과 점박이천남성 간의 분류학적 재검토를 확인해 볼 필요가 있다. 또한, 최근의 분자유전학적 분석 기법의 발달로 SNP부위를 인지할 수 있는 probe를 이용한 real-time PCR분석이나 SNP-SCAR marker를 DNA 바코드 분석을 통해 발굴된 marker nucleotide와 점목한다면 작은 크기의 DNA 절편만으로도 종단위의 검정이 가능하며 장기간 보관된 제약화 상태에서도 적용이 가능할 것이므로 본 연구결과를 토대로 DNA marker 개발에 대한 후속연구가 진행될 필요성이 있다.

결과적으로는 본 연구를 통하여 이용된 천남성속 6종은 천남성(天南星)과 천남성(天南星)의 위품을 기준으로 기원 식물을 정확하게 감별할 수 있는 marker nucleotide를 발굴 할 수 있었으며, DNA 바코드 부위로 활용 가능성이 높은 것은 *rDNA-ITS*, *matK* 그리고 *rbcl* 순서였으며, 본 연구에서는 국내에서 자생하지 않아 분석에 이용되지 못한 천남성 기원식물인 일파산남성에 대한 중국 지역별 시료 수집을 통해 추가 실험이 필요할 것으로 사료된다.

결론

본 연구는 천남성(天南星)과 천남성(天南星) 위품을 감별할 수 있는 marker nucleotide를 탐색하기 위해 천남성(天南星) 기원식물인 둥근잎천남성, 천남성 및 두루미천남성 3종과 위품으로 혼·오용 가능성이 있는 섬남성, 점박이천남성 및 큰천남성 3종 총 6종을 대상으로 *rDNA-ITS*, *matK* 그리고 *rbcl* 3종류의 DNA 바코드 부위의 염기서열 비교분석을 비교하였으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 천남성속 6종 38개체의 DNA 바코드 염기서열을 비교·분석한 결과, *rDNA-ITS*, *matK* 그리고 *rbcl* 부위는

각각 765~771 bp, 1,286 bp, 1,517 bp 길이로 구성 되어 있었으며, 삽입/결실 또는 치환의 변이는 종의 구분 없이 *rDNA-ITS*에서 가장 빈번하게 발생함을 확인 하였고, 그 다음으로 *matK*, *rbcl* 순서였다.

2. 3종류의 DNA 바코드 염기서열을 비교·분석한 결과, 두루미천남성과 큰천남성에서 많은 수의 종 단위 감별이 가능한 marker nucleotide가 발굴됨을 확인하였다.
3. 3종류의 DNA 바코드 염기서열이 동일한 것으로 밝혀진 둥근잎천남성과 천남성에서도 다수의 marker nucleotide가 존재함으로 천남성(天南星) 기원 정립 및 판별에 활용 가능하다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 '한의본초활용기반구축사업(K13020)' 및 '한약자원 국내생산 기반 기술 개발(K14417)'의 지원에 의해 수행되었으며, 기원식물 분류·동정에 도움을 주신 분류·동정전문위원님께 감사드립니다.

References

1. Lee JS, Kim BM. Analysis of genetic relationship among *Arisaema* species using RAPD. Kor J Hort Sci Technol. 2005 ; 23(4) : 459-64.
2. Kang JH, Yun JB, Ju YS. The external and internal morphological standard of original plants and herbal states in 2 kinds of *Arisaematis Rhizoma*. Korean J Orient Med Prescription. 2003 ; 11(2) : 213-32.
3. 식품의약품안전처. 대한민국약전 의약품각조 제2부. 제10 개정. 청원군 : 식품의약품안전처. 2014 : 106.
4. Barcode of Life. Identifying Species with DNA barcoding Retrieved Oct. 6, 2014, from <http://www.barcodeoflife.org>.
5. Boldsystem, The Barcode of Life Database Retrieved Oct. 6, 2014, from <http://www.boldsystems.org>.
6. Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP. Choosing and using a plant DNA barcode. PLoS ONE. 2011 ; 6(5) : e19254.
7. Zhang W, Fan X, Zhu S, Zhao H, Fu L. Species-specific identification from incomplete sampling: Applying DNA barcodes to monitoring invasive *Solanum* Plants. PLoS ONE. 2013 ; 8(2) : e55927.
8. Shen YY, Chen X, Murphy RW. Assessing DNA barcoding as a tool for species identification and data quality control. PLoS ONE. 2013 ; 8(2) : e57125.
9. 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.
10. 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 Herbology, 2013 ; 28(6) : 53-8.
 11. Moon BC, Ji Y, Seo HS, Lee AY, Chun JM, Kim HK. Molecular authentication of Schisandrae Fructus and analysis of phylogenetic relationship based on *nrDNA-ITS* sequences, Kor J Herbology, 2010 ; 25(4) : 47-54.
 12. Moon BC, Choo BK, Ji Y, Choi GY, Yoon TS, Lee AY, Kim HK. Geographical variation and evolutionary relationship of *Asparagus cochinchinensis* Lour. based on *rDNA-ITS* sequences and random amplified polymorphic DNA(RAPD), Korean J Orient Med, 2008 ; 14(1) : 129-35.
 13. Moon BC, Lee YM, Ji Y, Choi GY, Chun JM, Kim HK. Molecular authentication and phylogenetic analysis of plant species for Breeae and Cirsii herba based on DNA barcodes, Kor J Herbology, 2013 ; 28(3) : 75-84.
 14. Oh BU, Ko SC, Hong WP, Kim YS. A phylogenetic consideration of *Arisaema* by anatomical and palynological characters II, -Palynological characters, Kor J Plant Tax, 1990 ; 20(1) : 37-52.
 15. Kim WJ, Moon BC, Ji Y, Lee YM, Kim HK. Genetic Diversity of the Original Plant for Taraxaci Herba, *Taraxacum* spp. by the Analysis of AFLP, Korean J Medicinal Crop Sci, 2013 ; 21(4) : 247-54.
 16. Kim WJ, Kim DS, Kim SH, Kim JB, Goh EJ, Kang SY. Analysis of genetic similarity detected by AFLP and PCoA among genotypes of Kenaf(*Hibiscus cannabinus* L.), J Crop Sci Biotech, 2010;13:243-9.
 17. White TJ, Bruns T, Lee S, Tayler J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocol: A guide to method and applications, New York : Academic press, 1990 : 315-22.
 18. Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM, van den Berg C, Madrinan S, Peterson G, Seberg O, Jorgensen T, Cameron KM, Carine M, Pedersen N, Hedderson TAJ, Conrad F, Salazar GA, Richardson JE, Hollingsworth ML, Barraclough TG, Kelly L, Wilkinson M. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants, Taxon, 2007 ; 56(2) : 295-9.
 19. Cuenoud P, Savolainen V, Chatrou LW, Powell M, Gryer RJ, Chase MW. Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcl*, *atpB*, and *matK* DNA sequences, Am J Bot, 2002 ; 89(1) : 132-44.
 20. de Feo V, Bruno M, Tahiri B, Napolitano F, Senatore F. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Thymus spinulosus* Ten. (Lamiaceae), J Agric Food Chem, 2003 ; 51(13) : 3849-53.
 21. Yan P, Pang QH, Jiao XW, Zhao X, Shen YJ, Zhao SJ. Genetic variation and identification of cultivated *Fallopia multiflora* and its wild relatives by using chloroplast *matK* and 18S rRNA gene sequences, Planta Med, 2008 ; 74(12) : 1504-9.
 22. Ko SC, Oh BU, Lee HS, Kim YS. A phylogenetic study of *Arisaema* by anatomical and palynological characters I, -Anatomical characters, Kor J Plant Tax, 1990 ; 20(1) : 9-35.
 23. Ko SC, Kim YS. A taxonomic study on genus *Arisaema* in Korea, Kor J Plant Tax, 1985 ; 15(2) : 67-109.
 24. Gustavo CA, Peter MG. DNA markers: protocols, applications, and overviews, Weinheim : Wiley-VCH, 1996 : 75-83, 115-31, 173-85.