白首烏와 耳葉牛皮消의 내부형태 감별기준

도의정^{1,4#}, 김정훈², 최고야³, 이승호³, 송호준⁴, 주영승⁵, 이금산^{4*}

1 : 원광대학교 대사기능제어연구센터, 2 : 부산대학교 한의학전문대학원 약물의학부,
3 : 한국한의학연구원, 4 : 원광대학교 한의과대학 본초학교실, 5 : 우석대학교 한의과대학 본초학교실

Microscopic Identification—keys for *Cynanchi Wilfordii* Radix and *Cynanchi Auriculati* Radix

Eui-Jeong Doh^{1,4#}, Jung-Hoon Kim², Goya Choi³, Seung-Ho Lee³,
Ho-Joon Song⁴, Young-Sung Ju⁵, Guem-San Lee^{4*}

1 : Center for Metabolic Function Regulation, Wonkwang Univ., 2 : School of Korean Medicine, Pusan National Univ.,
3 : Korea Institute of Oriental Medicine, 4 : College of Korean Medicine, Wonkwang Univ.,
5 : College of Korean Medicine, Woosuk Univ.

ABSTRACT

Objectives : The root of *Cynanchum wilfordii* (CW) had been used as herbal medicine, 'Baeksuo', in Korea. However, the root of *Cynanchum auriculatum* (CA) had also been mis-used as 'Baeksuo' in herbal markets, due to its morphological similarity with CW. This study aimed to compare discriminative features and establish the identification—keys between two herbal medicines using microscopic methods.

Methods : Microscopic preparations including fixation, rapid dehydration, paraffin infiltration, paraffin embedding, sectioning, mounting, and staining, were performed and the microscopic features between CW and CA samples were compared.

Results : The starch grain of parenchymal cells, the amounts of calcium oxalate crystals, cell sizes, and the shape of phloem were not different between CW and CA samples. However, the clusters of stone cells which were conglomerated at outer cortex were apparently observed in CA sample (4~8 layers of stone cells), but not in CW sample (2~4 layers of stone cells, or not). Xylem of CW consisted of several vessels and fiber bundles which were formed as linear shapes and discontinuous radial lines, while that of CA, in which radial lines was not observed, were shaped as a wedge and scattered near cambium with comparatively few fiber bundles enclosed vessels. Especially, in the xylem of CA, fiber bundles located towards cambium were relatively more developed than those located outward cambium.

Conclusions : The identification—keys established in this study would be helpful to discriminate microscopic features between CW and CA.

Key words : *Cynanchum wilfordii*, *Cynanchum auriculatum*, identification, authentication, microscopy

서론

白首烏 또는 白何首烏는 宋代의 《開寶本草》¹⁾와 《圖經本草》²⁾에 何首烏는 赤白의 2가지가 있다는 기록 이후로 何首

烏의 일종으로 사용되었던 약물이다. 사용 연원이 비교적 오래되었음에도 불구하고 明代의 《本草綱目》²⁾에 이르러서도 《圖經本草》의 내용을 인용하여 언급하였을 뿐 두 약물간의 정확한 감별요점이 제시되어 있지 않다. 중국과는 달리 한반

*Corresponding author : Guem-San Lee, Department of Herbolology, College of Korean Medicine, Wonkwang University, 460 Iksandae-ro, Iksan, Jeonbuk, Korea

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

#First author : Eui-Jeong Doh, Department of Herbolology, College of Korean Medicine, Wonkwang University, 460 Iksandae-ro, Iksan, Jeonbuk, Korea

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

· Received : 22 June 2015 · Revised : 2 July 2015 · Accepted : 8 July 2015

도에서는 《東醫寶鑑》³⁾에 기원식물로 은조롱을 제시하였음을 근거로 은조롱 *Cynanchum wilfordii* (Maxim.) Hemsl.의 뿌리를 白首烏로 사용하여 왔다.

한편 《대한민국약전의한약(생약)규격집》⁴⁾과 《조선민주주의인민공화국약전》⁵⁾에만 각각 '白首烏' '은조롱뿌리'로 수재하고 있으며 중국이나 일본, 대만 등의 타국의 공정서에는 미수재된 품목이다. 다만, 중국의 경우 《中華人民共和國藥典》⁶⁾ 1977년판에 잠시 白首烏의 기원식물로 '白首烏 *Cynanchum bungei* Decne.'를 수재하였다가 그 다음판인 1985년판에서 삭제된 뒤로 현재까지 미수재 품목이다. 이와 같이 현대에 이르러서도 각 나라별로 白首烏의 기원식물에 대한 인식차이가 있는 것 또한 사용상의 혼란을 부추기는 한 원인이 되고 있다.

한약재감별법 중 내부형태감별은 비용에 비해 높은 효율을 보이는 한약재 감별법으로, 공정서⁴⁾에도 성상 부분에 현미경상의 특징이 기재되어 일선 현장에서 활용되고 있으나, 偽品과의 감별에는 용이하지 않은 측면이 존재한다. 기존 연구에서 김 등⁷⁾은 한약재감별도감에서 내부형태특징을 간략하게 제시하고 있으나 耳葉牛皮消와의 감별점은 제시하지 않아 이에 대한 보충연구가 필요하며, 이⁸⁾가 제시한 내부형태검색표는 구체화하여야 할 필요가 있다.

이에 본 연구는 관련분야 전문가가 아닌 경우 정확한 감별이 어려운 飲片의 외부형태감별과 시간과 비용의 소모가 비교적 많은 유전자감별 이외에 현장에서 비교적 쉽게 적용할 수 있는 내부형태감별을 위한 기준을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

한국한의학연구원 한약표준표본관(이하 표본관)에서 기존의 연구^{8,9)}에 따라 1차 동정을 완료한 白首烏 (CW)와 耳葉牛皮消 (CA) 시료를 분양받아 우석대학교 한의과대학 본초학교실에서 제시한 외부형태감별기준⁹⁾으로 검색표 고안자가 직접 2차 동정하였다. 또한 이 연구가 종료된 후 한국한의학연구원에서 자체 개발한 유전자마커를 통해 검증하였음을 표본관측으로부터 확인받았다. 당 연구에 사용한 시료는 현재 한국한의학연구원과 원광대학교 한의과대학 본초학교실에서 표본으로 보관 중이다(Table 1).

Table 1. Informations of samples

No.	Herb name	Scientific name of original plant	Site	Specimen No. of KIOM*
CW	白首烏	<i>Cynanchum wilfordii</i> (Maxim.) Hemsl.	Jeju	2-14-0046
CA	耳葉牛皮消	<i>Cynanchum auriculatum</i> Royle ex Wight	Jecheon	2-14-0010

* Korean Herbarium of Standard Herbal Resources, Korea Institute of Oriental Medicine

Safranin O, Hematoxylin, FastGreen FCF, Paraffin 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서 구입하였다. 탈수는 항온항습기 (Jeiotech IB-05G, Korea)에서, 포매는 진공오븐 (Jeiotech OV-12, Korea)에서 진행하였으며 마이크로톰(Leica 2125 RTS, German)을 이용하여 절삭하였다. 삼원염색에 사용된 염색시약 중 Haemalum은 Hematoxylin을 Abs. EtOH에 10% w/v이 되도록 녹인 후 3개월 이상 충분히 산화시킨 것을 사용하였다.

2. 방법

각 시료에서 무작위로 5개의 飲片을 취하여 물에 충분히 불린 후 Formalin-acetic acid-alcohol로 고정하고 Rapid dehydration法으로 탈수한 것을 Paraffin/TBA method에 따라 포매하고 절삭한 후 Safranin O, Haemalum, FastGreen FCF가 포함된 Ju's triple staining method로 염색하였다. 프리파레트를 현미경관찰 후 촬영(Olympus CX31 with Discovery C15, Japan)하였다. 이상 기술된 고정부터 염색까지의 전 과정은 주 등¹⁰⁾이 기술한 방법으로 진행하였다. 결과에 제시된 도해는 각 시료의 특징을 잘 나타내는 프리파레트를 1개씩 취하여 Adobe photoshop CS6 및 photoscape로 밝기와 명암만 조정한 후 조합하여 편집하였다.

결 과

1. CW (*Cynanchi Wilfordii Radix*)

木栓層의 木栓皮는 대부분 제거되어 있으나 제거되지 않은 부분은 7~18개의 木栓細胞로 층을 이루고 있으며 木栓形成層은 비교적 명확하다. 木栓細胞의 크기는 약 50~90 μm 이며 長方形이다. 木栓層과 皮層의 사이에는 간혹 石細胞가 2~4列로 群集되어 있으나 대체적으로 群集간의 거리가 떨어져 있어 한 시야에서 관찰되지 않기도 하였다(Fig. 1A, B).

皮層의 대부분은 柔組織으로 구성되어 있으며 韌皮部는 발달하지 않았다. 篩部는 柔組織으로 둘러싸여 대체적으로 梭形을 이루나 그 경계는 불명확하였다. 皮層의 柔細胞는 10~50 μm 不定形이었다(Fig. 1B, C).

形成層은 波狀의 環形으로 비교적 뚜렷하였다. 維管束의 양쪽 옆으로 長方形의 柔細胞가 커져서 밀집되어 구성된 髓線이 있으나 形成層을 지나서 皮層으로 진입됨과 동시에 髓線의 형태를 유지하지 못하는 경향을 보였다. 前形成層의 木部는 原生木部와 後生木部가 관찰되나 纖維束의 발달은 미비하였다(Fig. 1C).

中心柱 안쪽의 木部는 原生木部와 後生木部, 纖維束으로 이루어져 있으나 纖維束이 적고 導管이 줄지어 있는 탓에 대체적으로 線形이었다. 전체적으로 放射狀으로 배열되어 射線의 형태를 띠나 불연속적이다. 木部는 導管 7~20개와 각 導管을 纖維細胞가 束을 이루어 둘러싸고 있었다. 木部는 不定形の 柔細胞로 둘러싸여 있는데 이 柔細胞는 규칙적으로 皮層 방향으로 일정한 髓線을 이루고 있었다(Fig. 1C, D).

導管은 직경 약 40~100 μm 로 階紋 또는 螺線, 孔紋導管이 동시에 관찰되었다(Fig. 1E, F).

髓部に 있는 木部는 原生木部와 後生木部가 발달하였는데 그 발달 정도가 中心柱 안쪽의 다른 木部와 비슷하였다. 다만 導管을 둘러싼 纖維束이 다른 木部에 비해 발달하였다. 간혹 髓部가 柔組織만 관찰되는 것도 있었다. 髓部에서부터 뻗어나간 多角形的 柔細胞로 이루어진 髓線은 광활하며 1次에서 3次 髓線까지 관찰되었다(Fig. 1A, D).

柔細胞는 澱粉粒을 함유하고 있으며 간혹 草酸鈣晶이 관찰되기도 하였다(Fig. 1G).

Fig. 1. CW (*Cynanchi Wifordii Radix*). Cross section (A), cortex (B), vascular bundle (C), central cylinder (D), xylem (E), vessel (F), parenchyma cell (G).
Abbreviations: c, cambium ; fb, fiber bundle ; kl, cork layer ; mrs, secondary medullary ray ; mrp, primary medullary ray ; pc, parenchyma cell ; ph, phloem ; sta, starch grain ; v, vessel ; xm, metaxylem ; xp, protoxylem ; xy, xylem.

2. CA (*Cynanchi Auriculati Radix*)

木栓層의 木栓皮는 대부분 제거되어 있으나 제거되지 않은 부분은 6~20 여개의 木栓細胞로 층을 이루고 있다. 木栓細胞는 長方形으로 크기는 약 50~90 µm이었다. 木栓層과 皮層의 사이에 石細胞 10~20여개가 4~8列로 群集을 이루고 있으며 群集간의 거리가 가까워 밀집된 형태를 띠고 있으며 서로 붙어 있는 것도 다수 관찰되었다(Fig. 2A, B).

皮層의 대부분은 柔組織으로 구성되어 있으며 韌皮部는 발달하지 않았다. 篩部는 柔組織으로 둘러싸여 대체적으로 稜形을 이루고 있다. 皮層의 柔細胞는 10~60 µm로 不定形이었다(Fig. 2B, C).

形成層은 波狀의 環形으로 비교적 뚜렷하였다. 形成層 주위의 維管束은 束간 거리가 維管束의 두께만큼의 비교적 가까운 것이 관찰되었다. 多角形의 柔細胞로 이루어진 柔組織이 維管束 양 옆을 지나고 있으나 篩部를 둘러싼 직후 髓線의 형태가 유지되지 못하는 경향을 보였다. 前形成層의 木部는 原生木部와 後生木部가 관찰되며 비교적 纖維束이 발달하였음이 관찰되었다(Fig. 2C).

木部가 주로 髓部 또는 形成層 인근에 형성된 탓에 中心柱 중간쯤에는 木部가 드물게 관찰되었다. 木部는 導管 10~20 여개를 纖維細胞가 둘러싸고 있는데, 둘러싼 纖維束이 皮層쪽이 상대적으로 더 발달되어 전체적으로 楔形을 이룬다. 木部는 대체적으로 불규칙한 放射狀으로 배열되어 있기는 하나 射

線이라 할 만큼의 연속성을 보이지 않는다. 木部는 多角形의 柔細胞가 밀집된 柔組織으로 둘러싸여 있었다(Fig. 2C, D). 導管은 직경 약 40~100 µm로 階紋 또는 環紋, 孔紋導管이 동시에 관찰되었다(Fig. 2E, F). 髓部에 있는 木部는 原生木部와 後生木部가 발달하였으며 간혹 柔組織으로만 이루어진 경우도 있었다. 다만 導管을 둘러싼 纖維束이 다른 木部에 비해 발달이 더딘 것이 관찰되었다(Fig. 2A, D). 柔細胞는 대부분 澱粉粒을 함유하고 있으며 간혹 草酸鈣晶이 관찰되기도 하였다. 石細胞의 너비는 약 20~50 µm이며 群集을 이루고 있다(Fig. 2G).

Fig. 2. CA (*Cynanchi Auriculati Radix*). Cross section (A), cortex (B), vascular bundle (C), central cylinder (D), xylem (E), vessel (F), parenchyma cell (G).
Abbreviations: c, cambium ; fb, fiber bundle ; kl, cork layer ; mrs, secondary medullary ray ; mrp, primary medullary ray ; pc, parenchyma cell ; ph, phloem ; st, stone cell ; v, vessel ; xm, metaxylem ; xp, protoxylem ; xy, xylem.

고 찰

식품의약품안전처에서 유통사용상의 혼란을 개선하고자 국내 공정서를 기준으로 2010년 초에 가짜 하수오 단속을 시행¹¹⁾하였고 한국한의학연구원의 주도로 임상한의사에게 지속적인 감별정보를 제공⁹⁾하는 등의 적극적 대처로 인해 의약품으로 유입되는 耳葉牛皮消는 점차 자취를 감추게 되었음은 주지의 사실이다. 그러나 최근 건강기능식품의 재료에 혼입된 耳葉牛皮消가 사회문제로 대두되었는데, 이는 비전문가가 외부형태감별을 수행하기 어려운 탓에 생산지에서 1차 검증이 이루어지지 않은 상태에서 납품받은 업체가 검수감별을 외면하면서 발생한 것으로 알려졌다. 사회문제로 대두되며 그간의

다양한 감별법이 재조명되기도 하였는데 Li 등¹²⁾이 HPCL-UV 분석을 통해 두 약물 중 白首烏에만 함유된 conductitol F를 지표물질로 제시한 것, 문 등^{13,14)}과 고 등¹⁵⁾이 multiplex-PCR 또는 RT-PCR을 이용하여 마커로 사용될 유전자부위를 제시한 것 등이 그것이다. 그러나 기존의 감별법은 시간과 비용의 소요가 많아 1차 검증의 수단으로 용이하지 않는 단점이 있다. 이러한 정황을 고려할 때 비교적 단시간 저비용의 내부형태감별법과 같은 1차 검증법이 보급된다면 유통사용상의 혼란을 배제하기에 용이하겠다는 판단으로 본 연구를 수행하였다.

연구결과 연구대상인 白首烏(CW)와 耳葉牛皮消(CA)의 내부형태는 柔細胞의 澱粉粒이나 草酸鈣晶의 함유, 각 細胞의 크기, 篩部의 형태적 특징 등에서 형태상의 차이는 없는 것으로 사료된다.

그러나 두 약물의 기원식물의 생장 방식에 따른 차이는 지지역할을 하는 木部組織의 형태상의 차이로 나타났다.

木栓層과 皮層의 사이에 존재하는 石細胞 群集의 양상이 그 하나으로써, CW의 경우 현미경 한 시야에서 관찰되지 않는 경우도 있을 만큼 드물거나 관찰되어도 2~4 층의 배열로 드문드문 있을 따름이다. 반면에 CA의 경우 石細胞 群集이 확연하게 발달되어 있으며 4~8 층의 배열로 밀집되거나 잇달아 형성되어 있음이 관찰되었다. 다만, 두 약물 모두 去皮하여 유통되는 것이 대부분이므로 群集의 양상만으로 眞僞判別을 행하는 것은 다소 무리가 있을 것으로 판단된다.

또 다른 형태적 감별점으로 木部의 발달 형태의 차이를 들 수 있다. 즉, CW는 導管이 放射狀으로 줄지어 배열되며 이를 纖維束을 둘러싸고 있으나 纖維束이 CA에 비하여 상대적으로 미발달되어 木部가 대체적으로 線形의 형태를 이루고 있다. 이 線形의 木部가 발달된 탓에 中心柱에서 불연속적인 木部射線이 관찰된다. 반면에 CA는 木部가 形成層 인근과 髓部에 집중되어 발달하였고 中心柱의 중간쯤에는 그 발달이 더디어 木部射線이라고 규정할 만큼의 형태를 보이지 않는다. 또한 形成層 인근에 발달된 木部는 인접한 維管束의 木部와 대체적으로 木部の 너비만큼 근접하여 있다. 또한 1~2개의 後生木部가 잇달아 배열된 것은 CW와 유사하나 그 주위를 둘러싼 纖維束의 발달이 확연하다. 특히, 한 木部에서 皮層에 가까운 부분일수록 纖維束이 더욱 발달되어 전체적으로 각 木部는 楔形을 이룬다.

이러한 지지조직의 형태적 차이는 두 기원식물의 생장 방식으로부터 유래한 것으로 보인다. 白首烏의 기원식물인 은조롱 *Cynanchum wilfordii* (Maxim.) Hemsl.은 주로 길이생장을 위주로 하며, 耳葉牛皮消의 기원식물인 牛皮消 *C. auriculatum* Royle ex Wight는 주로 비대생장을 위주로 하여 단위면적당 생산량에서 후자가 월등함은 익히 알려진 사실이다. 즉, CW의 경우 흙의 압축력보다는 인장력에 더 대응하는 방식으로, CA는 인장력보다는 압축력에 대응하기 용이하게 발달되어 지지조직형태의 차이를 초래하였다 사료된다. 그러므로 이러한 형태적 차이는 기원식물의 변이가 발생하지 않는 이상 생장 연수와는 별다른 연관이 없을 것으로 추정한다.

이상의 내용을 종합하여 白首烏와 耳葉牛皮消의 내부형태 감별 검색표를 작성하면 아래와 같다. 또한, 이 검색표를 기존의 기원식물 및 외부형태 감별기준^{8,9)}과 병용한다면 두 약물의 판별에 더욱 용이하리라 사료된다.

〈白首烏와 耳葉牛皮消의 내부형태감별 검색표〉

1. 木栓層 아래쪽의 石細胞는 드물거나 2~4개의 群集을 이루나 서로의 간격이 넓고, 木部는 線形으로 纖維束이 상대적으로 발달되지 않았으며 대체적으로 불연속적인 射線을 이룬다. 白首烏 *Cynanchum wilfordii*
1. 木栓層 아래의 石細胞는 4~8개의 群集을 이루어 서로 밀집되어 있으며, 木部는 두터운 楔形으로 纖維束이 상대적으로 발달하였으며 中心柱 외곽에 불규칙하게 흩어져 있어 射線을 이루지 않는다. 耳葉牛皮消 *C. auriculatum*

결론

白首烏와 耳葉牛皮消의 내부형태를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 白首烏는 石細胞群의 발달이 뚜렷하지 않은 반면, 耳葉牛皮消는 그 발달이 뚜렷하였다.
2. 白首烏의 木部는 대체적으로 線形이며 纖維束이 상대적으로 미발달되었으며, 耳葉牛皮消는 楔形이고 纖維束이 상대적으로 발달하였다.
3. 白首烏의 木部는 불규칙한 木部射線을 이루는 반면, 耳葉牛皮消는 이루지 않았다.

이상의 감별요점은 일선 현장에서 白首烏와 耳葉牛皮消를 판별하는데 활용할 수 있을 것으로 사료되며 추후 戟葉牛皮消 등에 대한 추가연구가 이루어져야 한다고 생각한다.

감사의 글

본 연구는 2014년 한국한의학연구원 K-herb연구단의 위탁과제 '내부형태 기반 약재 품질 정보 확보'의 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다. 또한 사진 정리 및 편집에 도움을 준 전신희(원광대 한의대 한의학과), 신상문(원광대 약학대 한약학과)학생에게도 깊이 감사드리는 바입니다.

References

1. Liu H, Ma Z (974, Song period). Gaeboboncho[開寶本草]. In : Tang SW (宋, 1082, Song period). Jungsujeonghwagyeongsajeungnyubigeupboncho[重修政和經史證類備急本草], photographic ed., Beijing : People's Medical Publishing House, 1996 : 262.
2. Su S (1062, Beisong period). Dogyeongboncho[圖經本草]. In : Li SZ (1590, Ming period). Bonchogangmok [本草綱目], revised ed., Beijing : People's Medical Publishing House, 1996 : 1288.
3. Heo J (1596, Joseon period). Donguibogam[東醫寶鑑]

- 鑑]. In : Sinjeungbo Daeyeok Donguibogam[New Enlarged Translation of Donguibogam], translated ed., Seoul : Bubin publishers, 2012 : 2067-8.
4. Korea Food & Drug Administration, The Korean Herbal Pharmacopoeia, The KFDA Notification No, 2014-173, 2014 Oct 17th.
5. Pharmacopoeia Committee of the DPRK, Pharmacopoeia of Democratic People's Republic of Korea, 7th ed, Pyeongyang : Medicine and Science Press, 2011 : 552.
6. Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of China, Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 1977 ed., Beijing : China Medical Science and Technology Press, 1977 : 178-9.
7. Kim CM *et al*. Coloured Illustrations for Discrimination of Herbal Medicine : Internal Morphology. Seoul : Academybook, 2014 : 78.
8. Lee GS. A study on the key of discrimination in Heshouw Radix kinds. Woosuk University, 2009.
9. Ju YS. Abstain from use Cynanchi Auriculati Radix as Baiheshouw. Akomnews, 2012 ; 1872 : 30.
10. Ju YS *et al*. Gaejeong UnGok Boncho-hak Silseup -seo [New Practice in Ungok Herbology]. Jeonju : HakYe-sa, 2009 : 33-53. Korean.
11. Akomnews, KFDA start cracking down fake Heshouw. Akomnews [serial online] 2010 Mar 8 [cited 2015 June 15].. Available from : URL : <http://www.akomnews.com/?p=263569>
12. Li Y, Piao D, Zhang H, Woo MH, Lee JH, Moon DC, Lee SH, Chang HW, Son JK. Quality assessment and discrimination of the roots of *Cynanchum auriculatum* and *Cynanchum wilfordii* by HPLC-UV analysis. Arch Pharm Res. 2013 ; 36(3) : 335-44.
13. Moon BC, Choo BK, Cheon MS, Yoon T, Ji Y, Kim BB, Lee AY, Kim HK. Rapid molecular authentication of three medicinal plant species, *Cynanchum wilfordii*, *Cynanchum auriculatum*, and *Polygonum multiflorum* (*Fallopia multiflorum*), by the development of RAPD-derived SCAR markers and multiplex-PCR. Plant Biotechnol Rep. 2010 ; 4(1) : 1-7.
14. Moon BC, Kim HK. Authentication of Cultivated and Commercial Herbal Materials of Cynanchi Wilfordii Radix Using Molecular Discrimination Methods. Korean herb Med Inf. 2014 ; 2(1) : 53-59.
15. Ryuk JA, Lee HW, Ju YS, Ko BS. Monitoring and identification of *Cynanchum wilfordii* and *Cynanchum auriculatum* by using molecular markers and real-time polymerase chain reaction. J Korean Soc Appl Biol Chem. 2014 ; 57(2) : 245-51.