rDNA-ITS DNA 바코드 부위 분석을 통한 山椒 기원종 감별용 유전자 마커 개발

김옥진, 지윤의, 이영미, 강영민, 최고야, 문병철^{#,*}

한국한의학연구원 K-herb 연구단

Development of Molecular Markers for the authentication of *Zanthoxylum* Pericarpium by the analysis of rDNA-ITS DNA barcode regions

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

K-herb Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon, 305-811, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : Due to the morphological similarity of the pericarp and description of multi-species in National Pharmacopoeia of Korea and China, the *Zanthoxylum* Pericarpium is difficult to authenticate adulterant in species levels. Therefore, we introduced the sequence analysis of DNA barcode and identification of single nucleotide polymorphism(SNP) to establish a reliable tool for the distinction of *Zanthoxylum* Pericarpium from its adulterants.

Methods : To analyze DNA barcode region, genomic DNA was extracted from twenty-four specimens of authentic *Zanthoxylum* species and inauthentic adulterant and the individual internal transcribed spacer regions (rDNA-ITS and ITS2) of nuclear ribosomal RNA gene were amplified using ITS1, ITS2-S2F, and ITS4 primer. For identification of species-specific sequences, a comparative analysis was performed using entire DNA barcode sequences.

Results : In comparison of four *Zanthoxylum* ITS2 sequences, we identified 16, 4, 6, and 4 distinct species-specific nucleotides enough to distinguish *Z. schinifolium*, *Z. bungeanum*, *Z. piperitum*, and *Z. simulans*, respectively. The sequence differences were available genetic marker to discriminate four species. Furthermore, phylogenetic relationship revealed a clear classification between different *Zanthoxylum* species showing 4 different clusters. These results indicated that comparative analysis of ITS2 DNA barcode was an useful genetic marker to authenticate *Zanthoxylum* Pericarpium in species levels.

Conclusions : The marker nucleotides, enough to distinguish *Z. schinifolium*, *Z. piperitum*, *Z. bungeanum*, and *Z. simulans*, were obtained at 30 SNP marker nucleotides from ITS2 sequences. These differences could be used to authenticate official *Zanthoxylum* Pericarpium from its adulterants as well as discriminating each four species.

Key words : DNA barcode, *Zanthoxylum* species, *Zanthoxylum* Pericarpium, Internal Transcribed Spacer (ITS), Molecular Authentication

서론

산초나무(*Zanthoxylum schinifolium* Siebold et Zuccarini)는 운향과(芸香科, Rutaceae)에 속하는 낙엽성 관목으로 우리나라에 자생하는 운향과 식물은 10속 46종이 자라고 있으며,

굴나무속, 산초나무속, 황벽나무속 등으로 분류된다. 산초나무속(Genus of *Zanthoxylum*)에는 산초나무(*Z. schinifolium* Siebold et Zuccarini), 초피나무(*Z. piperitum* De Candolle), 왕초피나무(*Z. simulans* Hance = *Z. coreanum* Nakai) 등이 국내에 서식하고 있어 이들의 열매를 주로 식·약용으로 이용

^{*,#}Corresponding and First author : Byeong Cheol Moon, K-herb Research Center, 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
· Received : 13 April 2015 · Revised : 19 May 2015 · Accepted : 20 May 2015

되고 있다¹⁾. 한약재로 사용되는 山椒는 대한민국약전약전 제 11 개정(KP 11)에서 초피나무 *Z. piperitum* De Candolle, 산초나무 *Zanthoxylum schinifolium* Siebold et Zuccarini 또는 화초(花椒) *Z. bungeanum* Maximowicz의 잘 익은 열매껍질로 규정하고 있어, 중화인민공화국약전(Ch. P. 2010)이 규정하고 있는 산초나무와 화초(花椒), 그리고 일본약국방(JP 16)이 규정하고 있는 초피나무를 모두 포함하고 있다²⁾. 山椒는 신농본초경(神農本草經) 하품(下品)에 蜀椒와 秦椒라고 수재된 이래 川椒, 花椒, 巴椒 등으로 불리고 있다. 山椒는 온신(溫辛)의 성미를 가지고 있어, 임상에서는 온중산한(溫中散寒), 제습지통(除濕止痛), 살충(殺蟲), 해어성독(解魚醒毒)의 효능으로 주로 중초를 따뜻하게 하여 한사를 제거하고 습을 제거하여 통증을 그치게 하는 치료에 이용되고 온중(溫中)의 작용과 유독한 성질을 이용하여 회궤심복통(蛔厥心腹痛)의 구충제로 이용한다. 또한 민간에서는 생선독 등의 예방을 위한 식품첨가제로 활용되기도 한다³⁾.

기존의 보고에 의하면 산초나무속 식물인 초피나무와 산초나무의 잎에서 화학형과 주성분, 일반성분(수분, 조단백질, 총당, 조지방, 유리당 등)의 함량, 검출되는 monoterpenoid의 종류와 함량 등의 차이가 있는 것을 확인하였고⁴⁻⁸⁾, 초피나무와 산초나무의 잎, 종자, 열매껍질을 이용한 부위별 비교연구를 통해 총 페놀의 함량과 총 플라보노이드의 함량의 차이뿐만 아니라 항산화 활성 및 항암활성 등에서도 차이를 보이는 것을 확인하여 보고하였다¹⁾. 뿐만 아니라 산초나무의 열매껍질과 화초(花椒)의 열매껍질 효능에 관한 실험적으로 규명하고자 수행한 동물실험 결과, 산초나무 열매껍질과 화초(花椒) 열매껍질 모두 적출회장관 자동운동 억제효과, 항히스타민작용, 해독 및 항염증효과 등의 효과가 있지만 진통효과는 산초나무 열매껍질에서만 나타나는 것으로 보고하였다⁹⁾. 이러한 결과는 한약재로 사용되는 산초나무속 식물이 서로 다른 이화학적 특성을 가지고 있으며 생리활성 또한 다르다는 것을 설명하고 있다. 하지만 한의학에서는 초피나무, 산초나무, 화초(花椒)의 열매껍질을 모두 한약재 山椒로 이용하고 있어 이들의 효율적인 사용과 종별 성분과 효능의 차이를 고려한 세부적인 사용기준과 보다 상세한 비교·분석을 통해 구체적인 효능의 차이를 검토할 필요가 있으며, 이를 위해서는 약재 상태의 초피나무, 산초나무, 화초(花椒)의 열매껍질을 종단위에서 정확하게 구별함과 동시에 혼·오용 가능성이 있는 같은 속의 왕초피나무(*Z. simulans* = *Z. coreanum*) 열매껍질의 구별이 선행되어야 할 필요가 있다.

한약재는 전통적으로 형태학적 특징, 맛, 향기 등의 관능적 기준에 의해 감별되어왔으나, 약용부위의 수확시기, 보관방법, 유통을 위한 절단 방법 등에 따른 기준의 차이와 형태학적 특성이 유사한 종으로부터 기원종을 종단위에서 정확하게 구별하는 것은 어려움이 있다^{10,11)}. 이러한 전통적인 한약재 감별법은 1990년대 유전자 분석기술과 분자생물학의 발달로 생물종이 가지고 있는 고유의 유전자 정보를 이용하여 종 단위에서 객관적이고 정확하게 구별하기 위한 연구를 활발하게 진행되고 있다^{12,13)}. 이러한 연구는 핵의 리보솜 RNA 유전자(Nuclear Ribosomal RNA gene, rDNA)에 존재하는 internal transcribed spacer(ITS) 부위, *matK*, *rbcl*, *psbA-trnH* 유전자 등을 식물 종 판별을 위한 DNA 바코드 분석을 중심으로 진행되고 있으며¹⁴⁻¹⁷⁾, 국제적인 협력을 통해 전 세계

생물종에 대한 유전자 종 동정을 위해 국제생물바코드 컨소시엄을 설립하여 체계적인 연구를 수행하고 있다^{18,19)}. 종 감별에 이용되는 다양한 DNA 바코드 부위 중, 핵의 ribosomal RNA 유전자 internal transcribed spacer(rDNA-ITS) 부위는 다른 유전자의 코딩부위와 달리 빠르게 진화하고 일반성, 단순성, 재현성 등의 이점으로 인해 계통분류나 종간 유전변이 탐색 등을 위해 이용되는 염기서열로 알려져 있다²⁰⁾.

본 연구에서는 山椒의 약전기원품인 초피나무, 산초나무, 화초(花椒)와 국내에 자생하고 있어 혼·오용될 가능성이 있는 같은 속 왕초피나무를 국내·외 다양한 자생지에서 수집하여 rDNA-ITS 유전자 부위를 PCR 증폭하고 염기서열 정보 분석을 통해 종 단위에서 명확하게 감별할 수 있는 DNA marker nucleotide를 발굴하고 분자마커를 개발하여 山椒의 종 단위 구별과 혼·오용 방지를 위한 감별법으로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 이용된 기원식물 시료는 경상도, 전라도, 충청도, 제주도 등의 각각 다른 국내 자생지에서 수집하였고 국외의 경우 중국 사천성 아파현, 중경시 강진 등지의 다른 자생지와 재배지에서 수집하여 산초나무 6개, 화초(花椒) 5개, 초피나무 7개, 그리고 왕초피나무 6개의 시료를 분석에 이용하였다(Table 1). 수집한 시료는 본초학, 생약학, 식물분류학 등의 전문가로 구성된 분류·동정 자문회의 동정을 거쳐 그 종을 최종 확정지어 사용하였으며, 각 시료의 기원식물은 압착 표본을 제작하여 한약표준표본관(KIOM)에 표본번호를 부여하여 보관하였다.

Table 1. List and Information of Plant Materials Used in This Study.

Name		Source	Sample Name
Scientific plant	Herbal medicine		
<i>Zanthoxylum schinifolium</i> Siebold et Zuccarini	Zanthoxyli Pericarpium (Sancho, Huajiao)	Kangneung, Gangwon, Korea	ZS_KN
		Haenam, Jeonnam, Korea	ZS_HN
		Yangpyeong, Gyeonggi, Korea	ZS_YP
		Yuseong Daejeon, Korea	ZS_YS
		Sacheon, Gyeongnam, Korea	ZS_SC
		Seogwipo, Jeju, Korea	ZS_SGP
<i>Zanthoxylum bungeanum</i> Maximowicz	Zanthoxyli Pericarpium (Sancho, Huajiao)	Ngawa, Sichuan, China	ZB_SC1_Cn
		Ngawa, Sichuan, China	ZB_SC2_Cn
		Jiangjin, Chongqing, China	ZB_CQ1_Cn
		Jiangjin, Chongqing, China	ZB_CQ2_Cn
		Jiangjin, Chongqing, China	ZB_CQ3_Cn
		Hadong, Gyeongnam, Korea	ZP_HD
<i>Zanthoxylum piperitum</i> De Candolle	Zanthoxyli Pericarpium (Sancho, Huajiao)	Gongju, Chungnam, Korea	ZP_GJ
		Boeun, Chungbuk, Korea	ZP_BE
		Hamyang, Gyeongnam, Korea	ZP_HY
		Ulleung, Gyeongbuk, Korea	ZP_UL
		Dalseong, Daegu, Korea	ZP_DS
		Gwangyang, Jeonnam, Korea	ZP_GY
<i>Zanthoxylum simulans</i> Hance	—†	Wando, Jeonnam, Korea	ZSi_WD1
		Wando, Jeonnam, Korea	ZSi_WD2
		Wando, Jeonnam, Korea	ZSi_WD3
		Seogwipo, Jeju, Korea	ZSi_JJ1
		Seogwipo, Jeju, Korea	ZSi_JJ2
		Seogwipo, Jeju, Korea	ZSi_JJ3

†There is no appropriated official name.

2. DNA 추출

-70℃의 초저온 냉동고에 보관된 국내·외 자생지 또는 재배지에서 수집한 기원식물 생체시료 약 100mg을 Lysing matrix A™ tube(MP Biomedicals, USA)에 넣어 Precellys™ Grinder(Bertin Technologies, France)를 이용하여 마쇄한 후, DNasey Plant Mini Kit(QIAGEN, USA)을 이용하여 DNA를 추출·정제하였다. 정제된 DNA는 1.5% agarose gel 상에 전기영동 후, Ethidium Bromide(EtBr)로 염색하여 UV light에서 DNA의 양과 품질을 확인하였으며, UV spectrophotometer(Nanodrop ND-1000, DE, USA)를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 최종 정량 하였다.

3. DNA 바코드 부위 PCR 증폭 및 염기서열 분석

약 20 ng의 total DNA를 주형으로 각 20 pmole의 정방향, 역방향 primer(Table 2) 및 Solg™ 2 × PCR Smart Premix (Solgent, Korea)를 최종 50 µl의 반응용액에 첨가하여, DNA Engine Dyad Thermal Cycler(Biorad, USA)에서 95℃에서 5분간 predenaturation 한 후, 95℃에서 30초 denaturation, 55℃에서 30초 annealing, 72℃에서 1분 extension을 35회 수행하고 72℃에서 10분간 최종 extension 시켰다. 반응이 끝난 증폭산물은 1.5% agarose gel 상에서 증폭 여부를 확인하였고 단일 DNA 절편으로 확인된 증폭산물은 Gel Extraction kit(QIAGEN, USA)을 이용하여 정제 후 pGEM-Teasy vector(Promega, USA)에 삽입하였다. 삽입된 증폭 산물은 XL1-Blue MRF⁺ competent cell(Stratagene, USA)에 형질 전환하여 각 시료별 3개의 colony를 선발하였으며 T7과 SP6 primer 부위로부터 ABI3730 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems, CA, USA)를 이용하여 분석된 염기서열을 시료의 표준 염기서열로 선정하여 DNA 바코드 분석에 이용하였다.

Table 2. The Gene and Primer Sequence Information of DNA Barcodes Used in This Study.

Gene	Primer name	Sequence(5'→3')	Annealing temperature	Reference
rDNA-ITS	ITS1	TCGGTAGGTGAACCTGCGG	55℃	White <i>et al.</i> ⁽¹³⁾
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
ITS2	ITS2-S2F	ATGCGACTACTTGGTGTGAAT	55℃	Chen <i>et al.</i> ⁽¹⁹⁾
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		

4. 종 판별용 marker nucleotide 발굴 및 중간 유연관계 분석

최종 확증된 각 시료별 24개체의 rDNA-ITS와 ITS2 부위 유전자 염기서열을 DNA 바코드 종류별로 BioEdit program (Version 7.0.9, Tom Hall Ibis Biosciences, USA)의 ClustalW 방법으로 multiple alignment를 수행하여 종내 개체 및 종별 염기서열을 정렬하였다⁽²¹⁾. 정렬된 염기서열의 종내 개체별 비교와 종별 비교를 통해 종 특이성을 갖는 염기의 삽입(insertion), 결실(deletion) 및 치환(substitution)을 위치별로 분석하여 최종 종감별용 marker nucleotide로 정리

하였다. 분석시료로부터 확보한 24개 시료의 개체별 DNA 바코드 전체 염기서열을 CLC main workbench program (Insilicogen, Korea, ver. 6.0)를 이용하여 UPGMA 방법으로 Neighbor Joining Phylogenetic tree를 작성하고 군집의 형성유무와 군집간의 유전적 거리 등을 비교·분석하였다.

결 과

1. DNA 바코드 부위 증폭 및 염기서열 분석

山椒의 감별을 위하여 4종 24개의 시료로부터 추출한 게놈 유전자를 주형으로 rDNA-ITS와 ITS2 유전자 부위를 PCR 증폭하여 전기영동으로 확인한 결과, 전체 rDNA-ITS 부위를 증폭하는 ITS1과 ITS4 primer 쌍의 PCR 증폭산물은 일부 시료에서 크기가 다른 여러 개의 DNA 절편이 관찰되어 종 감별을 위한 DNA 바코드로 활용하기가 적합하지 않은 반면, ITS2 부위는 모든 시료에서 약 400 bp 크기의 단일 DNA 절편이 증폭되어 종 감별을 위한 DNA 바코드 부위로 활용하고자 염기서열을 분석하였다(Fig. 1). 24개의 시료로부터 얻은 ITS2 PCR 증폭산물을 pGEM-Teasy vector (Promega, USA)에 삽입한 뒤, 시료별로 3개 이상의 Plasmid DNA를 추출하여 삽입된 증폭산물의 염기서열을 해석하고 이들을 비교하여 실험과 분석과정에서 발생할 수 있는 오류 보정을 통해 각 시료의 최종 ITS2 부위 유전자 염기서열로 확정하였다. 확정된 각 시료의 ITS2 유전자 염기서열을 확인한 결과, 산초나무는 385 bp, 화초(花椒)는 388 bp, 초피나무는 383 bp, 그리고 왕초피나무는 386 bp의 염기로 구성되어 있었다.

Fig. 1. Schematic diagram and PCR amplification product of rDNA-ITS and ITS2 DNA barcode regions. A, Schematic diagram and primer information of nuclear ribosomal RAN gene ITS region. B, Electrophoresis of 24 *Zanthoxylum* PCR products.

2. DNA 바코드 염기서열 비교를 통한 종 감별용 marker nucleotide 발굴

1) ITS2 부위 marker nucleotide 발굴

4종의 山椒 기원식물과 동속종의 종내 유전적 변이와 종간 염기서열의 차이를 확인하기 위해 각 개체별 염기서열의 삽입/결실(indels)과 치환(substitutions)을 비교·분석하여 종별로 비교한 결과, 4종 모두에서 종내 지역별로 특이적인 염기서열 변이는 관찰되지 않았으며 종간 특이성을 갖는 염기서열의 삽입/결실(Indels)과 치환(Substitutions)은 다양한 위치에

서 관찰되었다(Fig. 2).

대한민국약전 기원종으로 수재되어있는 산초나무 ITS2 염기서열을 기준으로 산초나무, 초피나무, 화초(花楸), 왕초피나무의 중간 염기서열 비교를 통해 종 특이적인 염기의 삽입/결실과 치환을 확인한 결과, 분석한 ITS2 전체 염기서열에서 2개 위치의 종 특이적 염기삽입과 1개 위치의 결실, 그리고 26개 위치에서 27개 종 특이적 염기치환이 관찰되었다(Fig. 2, Table 3). 다른 종과 구별이 가능한 종 특이적 염기서열의 차이는 산초나무에서 16개 염기치환이 확인되었으며, 화초(花楸)에서 2개의 삽입과 2개 염기치환, 초피나무에서 1개의 염기결실과 5개의 염기치환, 그리고 왕초피나무에서 4개의 염기치환을 확인할 수 있었다. 종 단위에서 공통으로 확인되는 삽입/결실과 치환을 비교한 염기서열의 위치와 염기의 종류를 토대로 산초나무는 75번 위치의 C↔T, 80번 위치의 G↔A, 85번 위치의 G↔T, 95번 위치 C↔A, 102번 위치 T↔C, 109번 위치 G↔A/T, 111번과 113번 위치 A↔G, 125번 위치 C↔A, 132번 위치 T↔A, 134번 위치 T↔C, 188번 위치 G↔A, 240번 위치 T↔G, 242번 위치 G↔A, 249번 위치 A↔G, 그리고 270번 위치의 C↔T 염기치환이 종 감별용 marker nucleotide로 확인되었다. 또한 화초(花楸)는 71번과 120번 위치의 T 삽입 및 87번과 189번 위치의 A↔G 염기치환으로, 초피나무는 260번 위치의 G 결실과 105번 위치의 A↔T, 210번 위치 G↔T, 그리고 211번, 212번 및 258번 위치의 G↔A 염기치환을 통해, 왕초피나무는 109번 위치의 G/A↔T, 248번 위치 A↔G 및 257번과 343번 위치의 G↔T 염기치환을 통해 각각의 종 감별이 가능한 SNP(Single Nucleotide Polymorphism) marker nucleotide를 확인 할 수 있었다(Fig. 2, Table 3).

Fig. 2. Comparison of ITS2 region sequences for *Zanthoxylum* species. Dots (·) indicate the identical sequences with *Zanthoxylum schinifolium* and dashes (-) represents gaps introduced to maximize alignment.

Table 3. Summary of marker nucleotides from the comparison of ITS2 sequences among 24 samples of 4 species for *Zanthoxylum Pericarpium*.

Nucleotide Position	71	75	80	85	87	95	102	105	109	111	113	120	125	132	
<i>Z. schinifolium</i>	—	C	G	G	A	C	T	A	G	A	A	—	C	T	
<i>Z. bungeanum</i>	T	T	A	T	G	A	C	.	A	G	G	T	A	A	
<i>Z. pipetium</i>	—	T	A	T	.	A	C	T	A	G	G	—	A	A	
<i>Z. simulans</i>	—	T	A	T	.	A	C	.	T	G	G	—	A	A	
Nucleotide Position	134	188	189	210	211	212	240	242	248	249	257	258	260	270	343
<i>Z. schinifolium</i>	T	G	A	G	G	G	T	G	A	A	G	G	G	C	G
<i>Z. bungeanum</i>	C	A	G	.	.	.	G	A	.	G	.	.	G	T	.
<i>Z. pipetium</i>	C	A	.	T	A	A	G	A	.	G	.	A	—	T	.
<i>Z. simulans</i>	C	A	.	.	.	.	G	A	G	G	T	.	G	T	T

Hyphens (-) denote deletion of nucleotide for maximized alignment and dots (·) indicate sequence identity with *Zanthoxylum schinifolium* nucleotide positions indicate the aligned position starting from the 5' end of the ITS2 DNA barcode regions.

3. 중간 유연관계 분석

국내·외 지역별 수집을 통해 확보한 초피나무, 산초나무, 화초(花楸) 및 왕초피나무 4종 24개체 시료의 ITS2 DNA 바코드 부위 증폭산물 전체 염기서열 정보를 이용하여 중간 유연관계를 분석하였다. UPGMA 방법으로 neighbor joining phylogenetic tree 작성을 통한 중간 유연관계 분석 결과, *Zanthoxylum* 4종은 각 종별로 그룹을 형성하며 분류되었고 같은 그룹에 속한 시료의 수집지에 따른 지역별 연관성은 나타나지 않았다(Fig. 3). 하지만 종별로 분류된 초피나무, 화초(花楸), 왕초피나무는 유전적 거리가 가까워 하나의 큰 그룹을 형성하는 반면, 국내에서 많이 이용되고 있는 산초의 기원식물인 산초나무는 상대적으로 유전적 거리가 먼 것으로 나타나면서 별도의 그룹을 형성하는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합하면, 본 연구에서 확보한 산초의 기원 식물 및 관련 동속 종으로부터 확보한 ITS2 DNA 바코드 부위 유전자 염기서열을 기반으로 발굴된 종 판별용 marker nucleotide의 종별 비교와 유연관계 분석결과는 한약재 산초의 종 단위 감별은 물론 생산단계나 종자 상태의 종 구분에 활용되어 산초 기원식물이나 종자 동정과 한약재의 진위를 종 단위에서 감별할 수 있는 객관적이고 유용한 분자마커로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

Fig. 3. Neighbor joining phylogenetic tree of 4 *Zanthoxylum* species based on ITS2 DNA barcode sequences using UPGMA analysis.

고 찰

산초나무속(*Zanthoxylum*속) 식물은 운향과의 낙엽성 관목으로 전 세계적으로 250종이 난온대와 아열대 지역에 분포하는 것으로 알려져 있는 민속식물학적으로 식용, 약용 또는 화장품 원료로 사용되는 중요한 식물자원이다. 전통적으로 국가에 따라서 잎, 열매, 줄기, 뿌리, 과피, 수피 등을 복통, 치통, 당뇨, 콜레라, 열병, 암, 심혈관 질환, 피부병, 뱀독 해독, 구토 완화 등 다양한 질환에 대한 치료의 목적으로 종과 부위를 구별하여 사용하였으며, 향신료, 유지 등의 식품첨가물로 사용하기도 하였다²²⁾. 산초나무속은 식물형태의 유사성과 형태변이가 심하여 정확하게 그 종을 동정하기에는 어려움이 있는 속으로 알려져 있다. 따라서 산초나무속 식물에 대한 정확한 종 구별을 위해 RAPD, ISSR-PCR, rDNA-ITS 염기서열 분석법을 이용하여 종 구별법에 대한 연구를 진행하였다²³⁾. 특히 선 등은 ITS 염기서열 분석을 통해 산초나무와 초피나무의 구별법을 연구하여 보고하였지만, 한약재로 사용되는 약전 기원종인 화초(花椒)와 국내 자생종인 왕초피나무를 포함하지 않아 한약재 감별에 이용하기는 한계가 있었다^{24,25)}.

국내에 자생하는 산초나무속 식물로는 상록성 관목인 개산초(*Z. planispinum*)와 낙엽성 관목인 산초나무, 초피나무, 왕초피나무, 좁산초(*Z. schinifolium* var. *microphyllum*), 전주산초(*Z. schinifolium* var. *subinermis*), 민산초(*Z. schinifolium* var. *inermis*)가 분포하는 것으로 알려져 있으나 분류학적으로 좁산초, 전주산초 및 민산초는 형태 변이에 의해 나타나는 현상으로 분류학적 기준이 불명확하다²⁶⁾. 본 연구에서는 열매의 양이 적고 식용으로 사용량이 적을 뿐만 아니라 상록성 관목으로 구별이 쉬운 개산초와 분류학적 기준이 불명확한 좁산초, 전주산초, 민산초는 분석대상에서 제외하고 중국에서 수입되는 화초(花椒)의 열매껍질과 국내 식용으로 많이 이용되는 산초나무와 초피나무 그리고 우리나라 특산종인 왕초피나무를 대상으로 종 감별 연구를 수행하였다. 한약재의 정확한 감별은 한약의 약물동등성 확보와 표준화에 있어서 가장 기본이 되는 중요한 요소라고 할 수 있다. 한약재 감별법으로는 관능감별과 이화학 분석을 통한 감별, 그리고 유전자 분석을 통한 감별법이 일반적으로 사용되고 있다. 한약재를 감별하는 가장 일반적 방법인 관능감별법은 약재의 외부형태, 색상, 냄새 등에 의존하는 방법으로 다소 주관적인 방법으로 감별자에 따라 그 결과가 차이를 보이는 단점을 가지고 있다. 이화학적 분석을 통한 감별법은 품질관리와 직접적으로 연계하여 활용할 수 있는 장점이 있지만 재배기간, 재배지 또는 자생지의 환경, 채취시기 등 여러 가지 요소에 의해 정확한 기준을 설정하기가 어려운 단점을 지니고 있다^{10,12)}.

본 연구에서는 종과 부위에 따라 그 사용목적이 다르고 채취지역과 시기에 따라 이화학적 성분과 생리활성의 차이를 갖는 *Zanthoxylum*속의 기존 연구결과를 바탕으로 한약재로 사용되는 山椒를 유전자 분석을 통해 종 단위에서 정확한 감별법 개발이 요구되는 품목으로 판단되어 DNA 바코드 분석을 통한 감별법을 개발하고자 하였다^{1,23,27)}. 따라서 약전 수재 기원종인 산초나무, 초피나무, 화초(花椒)와 왕초피나무의 정확한 종 감별을 위해 rDNA-ITS와 ITS2 바코드 부위를 분석하여 종 특이적인 marker nucleotide를 발굴하고자 두 개의 primer set로 증폭하여 rDNA-ITS 부위는 동일한 크기의 단

일 DNA 절편이 증폭되지 않고 크기가 다른 다수의 절편이 증폭되어 山椒 감별을 위한 DNA 바코드 부위로 적합하지 않았으며, ITS2 부위만을 증폭한 결과에서는 단일 DNA 절편이 증폭되어 山椒 감별에 활용 가능한 유전자 부위임을 확인하였다. 단일 절편이 증폭된 ITS2 유전자 부위 염기서열의 종 특이적인 삽입/결실 및 치환을 확인한 결과에서 감별하고자 하는 *Zanthoxylum* 4종의 정확한 구별이 가능한 marker nucleotide를 확인할 수 있었으며, 종별 marker nucleotide의 수는 산초나무 16개, 화초(花椒) 4개, 초피나무 6개, 그리고 왕초피나무 4개 위치에서 확인되었다. 이중 109번째 염기는 산초나무와 왕초피나무 두 종을 각각 화초(花椒)와 초피나무로부터 구별 가능한 염기의 차이를 갖는 것으로 나타났다. 뿐만 아니라 왕초피나무의 경우에는 완도지역에서 수집한 시료와 제주도에서 수집한 시료가 지역별 염기서열의 차이를 보이는 것이 245번째 염기 위치에서 관찰되었으나 이는 하나의 위치에서만 관찰되고 하동에서 수집한 초피나무 시료에서도 나타나는 변이로 자생지 특이적인 marker nucleotide로 보기에는 무리가 있어 보다 세부적인 결과를 얻기 위해서는 추가 연구가 필요한 것으로 사료된다. 산초나무에서 가장 많은 수가 확인된 종 특이적인 marker nucleotide의 결과는 중간 유연관계분석에서도 산초나무가 독립적인 별도의 그룹을 형성하고 화초(花椒), 초피나무, 왕초피나무가 종별 독립적인 그룹을 형성하는 동시에 3종이 유전적으로 가까운 하나의 큰 그룹을 형성하는 점에서도 산초나무와는 유전적으로 거리가 먼 것으로 나타났다. 이러한 결과는 기존의 연구에서 산초나무와 초피나무의 잎과 열매 등이 일반성분이나 효능의 차이를 보인 것을 간접적으로 증명하는 결과로 판단할 수 있으며, 한약재 山椒의 이용에 있어 체계적인 종별 효능 비교연구를 통해 다른 그룹으로 구분되는 산초나무와 초피나무 및 화초(花椒)의 열매껍질을 약재로 사용하는데 있어서 세부적인 이용기준을 설정하는 것이 필요하다고 사료된다^{1,4-8)}.

본 연구에서는 山椒의 정확하고 객관적인 감별법 개발을 위해 범용성 rDNA-ITS 바코드 부위와 ITS2 부위 증폭 primer로 증폭하여 그 증폭 여부를 확인과 염기서열의 종별 특이성을 바탕으로 marker nucleotide를 발굴하여 山椒의 약전 수재 종인 산초나무, 화초(花椒), 초피나무와 국내에 자생하는 같은 속의 왕초피나무를 종단위에서 감별할 수 있는 분자생물학적인 감별법을 개발하였다. 이러한 결과는 山椒를 객관적으로 감별할 수 있는 분자 마커로 활용하여 한약의 기원확립과 약물동등성 확보를 위한 표준화 기법으로 충분한 가치가 있을 뿐만 아니라 한약재 생산단계나 유통현장에서 대용품이나 위품의 생산·유통을 방지할 수 있는 기술로 활용되어 한약에 대한 신뢰회복에 이바지 할 것으로 기대된다.

결 론

본 연구는 한약재 山椒의 약재 상태에서 종 단위를 정확하게 구별하고 유사한약재로 사용될 가능성이 있는 같은 속 왕초피나무 열매껍질의 혼·오용을 막기 위한 효과적 감별법 개발을 위하여 분자생물학적인 기법의 일환으로 rDNA-ITS와 ITS2 DNA 바코드 부위 유전자 염기서열 분석을 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 4종 *Zanthoxylum*속 식물의 rDNA-ITS 부위 증폭은 multi-copy DNA 절편이 증폭되어 DNA 바코드 부위로 활용하기 어려운 반면 ITS S2F와 ITS4 primer를 이용한 PCR 산물인 ITS2 부위는 단일 DNA 절편으로 증폭될 뿐만 아니라 종 감별이 가능한 종 특이적 염기서열 삽입/결실 및 치환을 확인함으로써 산초 감별에 활용 가능한 유전자 부위임을 알 수 있었다.
2. ITS2 DNA 바코드 염기서열 분석을 통해 대한민국약전 기원종과 동속의 유사종인 왕초피나무를 충분히 구별할 수 있을 뿐만 아니라 산초나무, 화초(花椒), 초피나무 및 왕초피나무를 종 단위로 구별할 수 있는 marker nucleotide를 각각 16개, 4개, 6개, 그리고 4개 위치에 서 발굴함으로써 산초의 기원검증과 혼·용 방지를 위한 유전자 감별법으로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 K-herb 사업의 일환으로 진행 중인 '한약자원 기원검증 체계 구축 및 육묘증식 기술 개발(K15421)'의 지원에 의해 수행되었으며, 일부는 '한의본초활용기반구축사업(K13020)'의 지원에 의해 수행되었습니다. 본 연구수행을 위한 기원식물 분류·동정에 도움을 주신 분류·동정 자문위원들에게 감사드립니다.

References

1. Choi HS. Different growth, genetic trait and biological activity in Korean *Zanthoxylum* genus accessions. The thesis of doctoral science, Sunchon National University, 2012.
2. Korea Institute of Oriental Medicine. Defining Dictionary for Medicinal Herbs [Korean], Retrieved March, 25, 2015, from <http://boncho.kiom.re.kr/codex/>.
3. Ju YS. Ungok Herbology. Jeonju : Woosuk Press. 2013 : 788-91.
4. Ko YS, Han HJ. Chemical constituents of Korean Chopi (*Zanthoxylum piperitum*) and Sancho (*Zanthoxylum schinifolium*). Korean J Food Sci Technol. 1996 ; 28 : 19-27.
5. Kim J, Jeong CH, Bae YI, Shim KH. Chemical components of *Zanthoxylum schinifolium* and *Zanthoxylum piperitum* Leaves. Korean J Postharvest Sci Technol. 2000 ; 7 : 189-94.
6. Cho MG, Chae YA, Song JS. Volatile components analysis using SPME in traditional aromatic plant resources, *Zanthoxylum schinifolium* Siebold et Zucc. and *Z. piperitum* DC. Korean J Mdicinal Crop Sci. 2001 ; 9 : 192-7.
7. Cho MG, Chae YA, Song JS. Identification of chemotypes in traditional aromatic plant resources *Z. schinifolium* Siebold et Zucc. and *Z. piperitum* DC. Korean J Breed. 2001 ; 33 : 126-32.
8. Cho MG, Chang JS, Chae YA. Variation of volatile composition in the leaf of *Zanthoxylum schinifolium* Siebold et Zucc. and *Zanthoxylum piperitum*, DC. Korean J Medicinal crop Sci. 2002 ; 10 : 162-6.
9. Oh HG, Won JH, Jeong GM. Experimental study on the effects of *Zanthoxyli Fructus* and *Fagarae mandshuricae Fructus*. J Korean Orient Pediatr. 1990 ; 4 : 1-17.
10. World Health Organization. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. Geneva : World Health Organization. 1998.
11. Klich MA. Identification of common *Aspergillus* species. Netherlands : Centraalbureau Voor Schimmelcultures. 2002.
12. Joshi K, Chavan P, Warude D, Patwardhan B. Molecular markers in herbal drug technology. Curr Sci. 2004 ; 87 : 159-65.
13. Shucher NJ, Carles MC. Genome-based approaches to the authentication of medicinal plants. Planta Med. 2008 ; 74 : 603-23.
14. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes or phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and amplifications. New York : Academic Press. 1990 : 315-22.
15. Kato H, Oginuma K, Gu Z, Hammel B, Tobe H. Phylogenetic relationships of Betulaceae based on matK sequences with particular reference at the positions of *Ostryopsis*. Acta Phytotax. Geobot. 1998 ; 49 : 89-97.
16. Olmstead RG, Reeves PA. Evidence for the polyphyly of the Scrophulariaceae based on chloroplast rbcL and ndhF sequences. Ann Missouri Bot Gard. 1995 ; 82 : 176-93.
17. Sang T, Crawford DN, Stuessy TF. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). Am J Bot. 1997 ; 84 : 1120-36.
18. Barcode of Life. Identifying species with DNA barcoding Retrieved March, 25, 2015, from <http://www.barcodeoflife.org>.
19. BOLDsystem. Databases and Identification. Retrieved March, 25, 2015, from <http://www.boldsystems.org>.
20. Kim YD, Park CW, Sun BY, Kim KJ, Lee EJ, Kim SH. ITS sequence variations in common ragweed and giant ragweed. Korean J Pl Taxon. 2005 ; 35 : 273-85.
21. Hall TA. BioEdit: an user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acid S. 1999 ; 41 : 95-8.

22. Medhi K, Deka M, Bhau BS. The genus *Zanthoxylum* - A stockpile of biological and ethnomedicinal properties. Sci. Rep. 2013 ; 2 : 697. doi:10.4172/scientificreports.697.
23. Medihi K, Sarmah Dk, Deka M, Bhau BS. High gene flow and genetic diversity in three economically important *Zanthoxylum spp.* of upper brahmaputra valley zone of NE india using molecular marker. Meta Gene. 2014 : 2 : 706-21.
24. Sun YL, Park WG, Kwon OW, Hong SK. Ribosomal DNA internal transcribed spacer 1 and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Zanthoxylum schinifolium*. Afr J Biotechnol. 2010 ; 9 : 4661-73.
25. Sun YL, Park WG, Kwon OW, Hong SK. The internal transcribed spacer rDNA specific markers for identification of *Zanthoxylum piperitum*. Afr J biotechnol. 2010 ; 9 : 6027-39.
26. Lee TB. Coloured Flora of Korea. Seoul : Hyang Moon Sa. 2006 : 657-8.
27. Negi JS, Bisht VK, Bhandari AK, Singh P, Sundriyal RC. Chemical constituents and biological activities of the genus *Zanthoxylum*: a review. Afr J Pure Appl Chem. 2011 ; 5 : 412-6.