범용성 DNA 바코드(*matK*, *rbcL*) 분석을 통한 독활(獨活) 유전자 감별용 Marker Nucleotide 발굴

김옥진[#], 양선규, 최고야, 문병철^{*}

한국한의학연구원 K-herb연구단

Identification of Marker Nucleotides for the Molecular Authentication of *Araliae Continentalis Radix* Based on the Analysis of Universal DNA Barcode, *matK* and *rbcL*, Sequences

Wook Jin Kim[#], Sungyu Yang, Goya Choi and Byeong Cheol Moon^{*}

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

ABSTRACT

Objectives : *Araliae Continentalis Radix* and *Angelicae Pubescentis Radix* have been used as the same medicinal name Korean and Chinese traditional medicines, respectively. The authentic *Araliae Continentalis Radix* is described only the root of *Aralia continentalis* in the Korean Pharmacopoeia. However, the dried root of *Angelica biserrata*, *Levisticum officinale*, or *Heracleum moellendorffii* also has been distributed adulterants of *Araliae Continentalis Radix*. To develop a reliable method for identifying *Araliae Continentalis Radix* from adulterants, we carried out the analyses of universal DNA barcode sequences.

Methods : Four plants species were collected from different habitate and nucleotide sequences of *matK* and *rbcL* were analyzed. The species-specific sequences and phylogenetic relationship were estimated using entire sequences of two DNA barcodes, respectively.

Results : In comparative analysis of *matK* sequences, we were identified 104 positions of marker nucleotide for *Ar. continentalis*, 3 for *An. biserrata*, 4 for *L. officinale* and 8 for *H. moellendorffii* enough to distinguish individual species, respectively. Furthermore, we obtained marker nucleotides in *rbcL* at 42 positions for *Ar. continentalis*, 5 for *An. biserrata* and 2 for *H. moellendorffii*, but not for *L. officinale*. The phylogenetic tree of *matK* and *rbcL* were showed that all samples were clustered into four groups constituting homogeneous clades within the species.

Conclusions : We confirmed that species-specific marker nucleotides of *matK* sequence provides distinct genetic information enough to identify four species. Therefore, we suggest that *matK* gene is useful DNA barcode for discriminating authentic *Araliae Continentalis Radix* from inauthentic adulterants.

Key words : *Araliae Continentalis Radix*, *Aralia continentalis*, Marker nucleotide, *matK*, *rbcL*

I. 서 론

독활(獨活)은 거풍습약(祛風濕藥)으로서 한방기관에서의 활용도가 매우 높은 한약재로, 민간에서 예로부터 식물 독활

*Corresponding author : Dr. 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 : +82-42-863-9421 · E-mail : bcmoon@kiom.re.kr

#First author : Wook Jin Kim, K-herb Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon 305-811, Republic of Korea.

· Tel : +82-42-868-9372 · Fax : +82-42-863-9421 · E-mail : ukgene@kiom.re.kr

· Received : 10 August 2016 · Revised : 2 September 2016 · Accepted : 20 September 2016

의 뿌리를 기침, 염증, 신경쇠약, 신장병 치료 등에 사용해 왔다¹⁻²⁾. 중국에서는 해열, 두통 및 근육통 치료제로 독활(獨活)을 사용하고 있으나, 동북아시아 국가별 약전에 수재되어 있는 기원 종(種)에는 차이가 있다³⁻⁵⁾. 대한민국과 북한에서는 독활(*Aralia continentalis* Kitagawa = *Aralia cordata* var. *continentalis* (Kitag.) Y.C.Chu)을 독활(獨活, 생약명: *Araliae Continentalis Radix*)으로, 일본에서는 땅두릅(*Aralia cordata* Thunb.)를 독활(獨活, 생약명: *Araliae Cordatae Rhizoma*)의 기원식물로 규정하고 있지만, 중국과 대만에서는 중치모당귀(*Angelica biserrata* (R.H.Shan & C.Q.Yuan) C.Q.Yuan & R.H.Shan = *Angelica pubescens* f. *biserrata* R.H.Shan & C.Q.Yuan)를 독활(獨活, 생약명: *Angelicae Pubescentis Radix*)의 기원식물로 정의하고 있어서 기원의 차이에서 오는 효능의 차이와 중치모당귀의 수입으로 유통상에서 혼란을 야기할 수 있는 문제점을 가지고 있다¹⁾. 뿐만 아니라 한국과 중국의 약재시장에서는 독활(獨活)의 위품으로 알려진 유럽당귀(*Levisticum officinale* W.D.J.Koch, 구당귀)의 뿌리가 독활 또는 중치모당귀의 뿌리로 유통되고 있어 사용에 주의가 필요한 실정이다⁶⁾. 또한, 중화본초와 중약대사전에서는 어수리(*Heracleum moellendorffii* Hance) 뿌리를 우미독활(牛尾獨活)로 규정하고 있어 이들의 뿌리가 독활(獨活)로 혼·오용 될 수 있는 가능성도 배제할 수 없다¹⁾.

최근 분자생물학에 기반한 유전자 분석 방법은 정확한 종 동정 및 감별을 가능하게 하는 장점이 있어 많은 한약재 기원 검증 연구에 활용되고 있다⁷⁻⁹⁾. 종 동정 및 감별법 개발에 이용되는 다양한 유전자 분석법 중에서 가장 널리 이용되고 있는 방법이 DNA 바코드 분석법이다¹⁰⁾. DNA 바코드 분석은 모든 생물에 공통적으로 존재하는 nuclear ribosomal RNA gene internal transcribed spacer (rDNA-ITS), 진핵생물에 존재하는 미토콘드리아 유전자 cytochrome c oxidase 1 (COI1), 그리고 식물계 특이적으로 존재하는 엽록체 계놈의 *matK* 및 *rbcL* 등이 생물종에 따라 적용 가능한 범용성 유전자 구간으로 이용되고 있으며, 이를 통해 종을 동정하고 계통분류학적 근연관계를 분석하는 것이 가능하다¹¹⁻¹³⁾. 또한, 이렇게 전 세계적으로 진행되고 있는 DNA 바코드 연구결과를 국제생물바코드 컨소시엄(CBOL, Consortium for Barcode of Life)에서 DB화하여 실시간 모니터링이 가능하기 때문에 종 동정 및 감별에 가장 적합한 DNA 바코드 구간 및 primer 정보를 활용할 수 있다. CBOL에서 권장하는 식물 DNA 바코드 구간으로는 엽록체에 존재하는 *matK*와 *rbcL* 두 유전자가 있다¹¹⁾. 이외에도 식물 종에 따라서는 *trnL*-F, *psbA*-*trnH*, *trnL* intron 그리고 *rps16* 등의 DNA 바코드 구간이 종 동정 및 식물계통분류연구에 이용되고 있으나, 이들 바코드 구간은 식물 종에 따라서는 적용이 불가능하거나 단백질질을 암호화하지 않는 유전자 구간의 특성상 변이의 속도가 빠르게 일어남으로서 개체 또는 서식 지역에 따라라도 변이가 발생한다는 연구결과가 보고된 바 있다¹⁴⁻¹⁵⁾. 반면, CBOL에서 권장하는 *matK*와 *rbcL* 바코드 구간은 식물계에 범용적으로 적용 가능할 뿐만 아니라 단백질을 암호화하는 이들 유전자 구간의 특성상 진화에 따른 변이가 심하지 않다는 장점으로 인해 식물

종 동정 및 식물계통분류를 위한 DNA 바코드 분석에 많이 이용되고 있다^{8,9,11,14)}.

따라서 본 논문에서는 국가별로 독활(獨活) 기원종의 차이에서 발생하는 혼·오용을 방지를 위해 독활, 중치모당귀, 유럽당귀 및 어수리 4종을 대상으로 *matK*와 *rbcL* 두 개의 범용성 DNA 바코드 구간의 염기서열 정보 분석을 통해 종을 동정할 수 있는 marker nucleotide 발굴하고 유전자 마커로 활용 가능한 정보를 제공하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

유전자 분석에 사용된 독활, 중치모당귀, 유럽당귀 및 어수리 4종의 각 4개체씩 총 16개체 시료는 2008년부터 2013년까지 국내·외의 서로 다른 자생지와 재배지에서 수집하였으며, 수집한 분석용 시료는 장기보관을 위한 처리과정으로 증류수를 이용하여 2~3회 수세한 후 병반부위가 포함되지 않은 부위만 액체질소에 급냉시켜 -75℃ 초저온 냉동고에 보관하여 이용하였다(Table 1). 또한, 수집한 시료는 본초학, 식물분류학, 식물생태학 등의 전문가로 구성된 분류·동정 자문회의의 동정을 거쳐 그 종을 최종 확정하였으며, 각 시료의 기원식물은 압착석엽표본을 제작하여 한국한의학연구원 한약표준표본관(IH 표본관 코드 KIOM)에 표본번호를 부여하여 증거표본으로 보관하였다.

2. DNA 추출

DNA 바코드 분석을 위해 -75℃에 보관 중인 각각의 시료는 약 100 mg을 Lysing matrix A™ tube (MP biomedical, USA)에 담아 Precellys™ Grinder (Bertin technologies, France)를 이용하여 5,500 rpm으로 30초간 곁게 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, Ecodye (Biofact, Korea)로 염색하여 UV light 상에서 DNA band를 확인하였으며, UV spectrophotometer (Nanodrop, USA)를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

3. DNA 바코드 구간 PCR 증폭

약 15 ng의 genomic DNA와 각 20 pmole의 정방향과 역방향 primer (Table 2)를 Solg™ 2×Taq PCR Smart-MixI (Solgent, Korea)를 혼합하여 DNA Engine Dyad Thermal Cycler (MJ Research, USA)를 이용하여 증폭하였다. 반응 조건은 95℃에서 2분간 pre-denaturation한 후 95℃에서 60초 denaturation, 53℃에서 40초 annealing, 72℃에서 2분 extension을 총 35회 반복 수행하고 마지막으로 72℃에서 5분간 final-extension시켜 증폭하였다.

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

Name		Information of sample habitate	Voucher number	Sample name
Scientific name	Herbal name			
<i>Aralia continentalis</i> Kitag.	Araliae Continentalis Radix	Jusan, Boryeong, Chungnam, Korea	KIOM201301006224	<i>Ar. continentalis</i> _JS
		Janggye, Jangsu, Jeonbuk, Korea	KIOM201201004852	<i>Ar. continentalis</i> _JG
		Antu County, Jilin province, China	KIOM201201005561	<i>Ar. continentalis</i> _AT
		Ulleung, Gyeongbuk, Korea	KIOM2013KR05-36	<i>Ar. continentalis</i> _UL
<i>Angelica biserrata</i> C.Q. Yuan & R.H. Shan	Angelicae Pubescentis Radix	Badong, Enshi, Hubei, China	KIOM200801001319	<i>An. biserrata</i> _BD1
		Badong, Enshi, Hubei, China	KIOM200801001320	<i>An. biserrata</i> _BD2
		Badong, Enshi, Hubei, China	KIOM200801001321	<i>An. biserrata</i> _BD3
		Badong, Enshi, Hubei, China	KIOM200801001483	<i>An. biserrata</i> _BD4
<i>Levisticum officinale</i> W.D.J. Koch	—†	Lanzhou, Gansu, China	KIOM2011CN02-19	<i>L. officinale</i> _LZ1
		Lanzhou, Gansu, China	KIOM2011CN02-20	<i>L. officinale</i> _LZ2
		Lanzhou, Gansu, China	KIOM2011CN02-21	<i>L. officinale</i> _LZ3
		Lanzhou, Gansu, China	KIOM2011CN02-22	<i>L. officinale</i> _LZ4
<i>Heracleum moellendorffii</i> Hance	—†	Punggi Yeongju, Gyeongbuk, Korea	KIOM201101003889	<i>H. moellendorffii</i> _PG
		Seolcheon, Muju, Jeonbuk, Korea	KIOM200901002079	<i>H. moellendorffii</i> _SC
		Mupung, Muju, Jeonbuk, Korea	KIOM200801001576	<i>H. moellendorffii</i> _MP
		Jeoksang, Muju, Jeonbuk, Korea	KIOM200801001227	<i>H. moellendorffii</i> _JS

† There is no appropriate official name.

4. 염기서열 분석

DNA 바코드 구간 증폭산물의 DNA 염기서열 분석을 위하여 각 시료당 전체 40 µl 증폭산물을 1.5% agarose gel상에서 100 bp DNA ladder (Solgent, Korea)와 함께 전기영동하고 Ecodey로 염색하여 관찰한 후, 정확하게 증폭된 PCR 증폭산물을 agarose gel로부터 회수하여 Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA)를 이용하여 정제한 뒤 pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, USA)에 삽입하였다. 삽입된 증폭산물은 JM109 competent cell (RBC, USA)에 형질전환한 뒤 100 µg/ml ampicillin, 40 µg/ml X-gal 그리고 0.5 mM IPTG가 첨가된 LB agar 배지에 도말하여 약 18시간 배양하였다. 각 시료별로 선별된 white colony를 이용하여 colony PCR 분석을 통해 예상된 크기로 증폭된 clone 4개씩을 solgent (Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 염기서열 분석은 pGEM-T Easy Vector 내부에 존재하는 T7과 SP6 primer를 이용하여 증폭산물 전체의 염기서열을 확보하였으며 4개의 clone으로부터 얻은 각각의 염기서열 정보를 비교분석하여 각 시료의 matK 및 rbcL 바코드 염기서열을 최종 확정하였다.

5. 종 판별용 marker nucleotide 탐색 및 중간 유연관계

16개체의 시료로부터 확보한 matK와 rbcL 유전자 최종 염기서열을 DNA 바코드 종류별로 다중서열정렬을 위해 BioEdit program (Version 7.0.9)의 ClustalW (command line interface)을 수행하였다. 정렬된 matK와 rbcL 염기서열의 종내 개체별 비교와 종별 비교를 통해 종 특이성을 갖는

염기의 삽입(insertions), 결실(deletions) 및 치환(substitutions)을 정렬된 위치별로 분석하여 정리하였다. 전체 분석대상 시료의 유연관계 분석은 16 개체의 각 DNA 바코드 구간 전체 염기서열과 GenBank에 등록된 *Vauquelinia californica*의 염기서열 정보를(matK, AF288129; rbcL, JQ391403) outgroup으로 하여 계통유전학적 거리 측정을 위해 MEGA6 program의 neighbor-joining (NJ) 방법으로 phylogenetic tree를 작성하고 군집의 형성 유·무와 군집간의 유연관계를 비교·분석하였다.

Ⅲ. 결 과

1. DNA barcode 구간 증폭 및 종내간 변이율 분석

CBOL에서 권장하는 universal primer를 이용하여 독활, 중치모당귀, 유럽당귀 및 어수리 4종 16개체의 matK와 rbcL 유전자를 증폭한 결과, 모든 시료에서 각각 예상된 크기의 1.3 kb와 1.5 kb의 DNA 절편이 증폭되었음을 agarose 겔 전기영동을 통해 확인하였으며, 두 DNA 바코드의 PCR 효율은 모두 100%였다. 각 시료당 4개 clone에 대한 염기서열 분석을 통해 PCR 에러를 확인하고 최종 확정된 matK 유전자 증폭산물 크기는 중치모당귀, 유럽당귀 및 어수리에서 1,268 bp로 동일하였으며, 독활은 1,259 bp로 다른 종들에 비해 9 bp가 짧음을 확인하였다(Table 3). matK 유전자의 염기서열 삽입/결실 구간의 정확한 위치정보를 확인하기 위해 최종 확정된 4종 16개체의 염기서열을 ClustalW 방법으로 multiple alignment하여 비교 분석한 결과, 독활의 97-99번 위치에서 'GAC' 염기삽입이 존재하였으며, 150-155번과 710-715번 두 위치에서 각각 'GTCTGA'와 'GACCTG' 염기결실이 확인

되었다(Table 4). *rbcL* 유전자 증폭산물의 크기는 중모치당귀, 유럽당귀 및 어수리는 1,503 bp로 동일한 반면 독활은 1,497 bp로 확인되었다(Table 3). 이들 염기서열을 multiple alignment하여 비교한 결과, 중치모당귀, 유럽당귀 및 어수리와는 달리 독활의 1433–1438번 위치에서 'CTAATT' 염기결실이 존재함을 확인되었다(Table 5).

각 바코드 구간의 염기서열 분석에서 구아닌과 시토신 염기의 비율 [G+C(%)]을 분석한 결과, *matK* 유전자는 유럽당귀가 34.23%로 가장 높았으며, 어수리 33.91%, 중치모당귀 33.87%, 독활 33.72%의 순서였다(Table 3). *rbcL* 유전자의 G+C(%) 비율에서는 중치모당귀가 44.28%로 가장 높았으며, 그 다음으로 어수리 43.91%, 독활 43.89%, 유럽당귀 43.78%의 순서였다(Table 3). *matK* 유전자 염기서열의 종내 변이율은 중치모당귀가 0.12%로 가장 높았으며, 독활 0.07%로 그 다음이었으며 유럽당귀와 어수리는 0.00%로 종내 변이가 확인되지 않았다. *rbcL* 유전자 염기서열의 종내 변

이율도 중치모당귀가 0.07%로 가장 높았으며, 나머지 3종의 종내 변이는 확인되지 않았다(Table 3). *matK*와 *rbcL* 두 유전자 모두 중치모당귀에서 종내 변이율이 가장 높게 나타났는데, 이는 분석시료 4개 중에서 *An. biserrata* BD1~BD3은 바코드 분석 구간의 염기서열에서 종내 변이가 확인되지 않았으나, *An. biserrata* BD4에서 다수의 종내 변이가 발생되었기 때문이다. 또한, 독활 *matK* 유전자에서의 종내 변이율이 0.07%로 나타난 이유는 *Ar. continentalis* JG와 *Ar. continentalis* AT에서 염기변이가 발생되었기 때문으로 확인되었다. 종간 변이율(inter-species variability)을 확인한 결과에서도 *matK* 유전자는 독활이 9.23%로 가장 높았으며, 그 다음으로 어수리 3.87%, 중치모당귀 3.72% 그리고 유럽당귀 3.68% 순서였다(Table 3). *rbcL* 종간 변이율에서도 독활이 3.20%로 가장 높았으며, 그 다음으로는 중치모당귀 1.56%, 어수리 1.41% 그리고 유럽당귀 1.32% 순서였다(Table 3).

Table 2. Primers Information Used for the DNA Barcode Analysis.

DNA barcode region	Primer name	Primer sequences (5' → 3')	Reference
<i>matK</i>	<i>matK</i> -AF	CTA TAT CCA CTT ATC TTT CAG GAG	Järvinen et al., 2004 ¹⁶⁾
	<i>matK</i> -8R	AAA GTT CTA GCA CAA GAA AGT CGA	
<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i> -F	ATG TCA CCA CAA ACA GAA ACT AAA GC	Olmstead and Reeves, 1995 ¹⁷⁾
	<i>rbcL</i> -R	TCC TTT TAG TAA AAG ATT GGG CCG AG	

Table 3. Sequence Characteristics of *matK* and *rbcL* DNA Barcode Regions.

DNA barcode region	Species	Amplicon length (bp)	G+C (%) ratio	Intra-species variability (%)	Inter-species variability (%)	Number of Species-specific marker nucleotide	
						Indels	Substitutions
<i>matK</i>	<i>Ar. continentalis</i>	1,259	33.72	0.07 ± 0.05	9.23 ± 0.18	3	101
	<i>An. biserrata</i>	1,268	33.87	0.12 ± 0.13	3.72 ± 3.81	0	3
	<i>L. officinale</i>	1,268	34.23	0.00 ± 0.00	3.68 ± 3.94	0	4
	<i>H. moellendorffii</i>	1,268	33.91	0.00 ± 0.00	3.87 ± 3.99	0	8
<i>rbcL</i>	<i>Ar. continentalis</i>	1,497	43.89	0.00 ± 0.00	3.20 ± 0.11	1	41
	<i>An. biserrata</i>	1,503	44.28	0.07 ± 0.07	1.56 ± 1.26	0	5
	<i>L. officinale</i>	1,503	43.78	0.00 ± 0.00	1.32 ± 1.26	0	0
	<i>H. moellendorffii</i>	1,503	43.91	0.00 ± 0.00	1.41 ± 1.31	0	2

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

DNA barcode 분석에 이용된 4종 16개체 시료의 multiple alignment를 통해 염기서열이 정렬된 결과를 토대로 종내 염기치환 또는 삽입/결실을 제외한 종 특이적으로 존재하는 염기치환 또는 삽입/결실을 종 동정 및 감별용 유전자 마커로 활용할 수 있어 이들의 위치와 염기서열을 marker nucleotide (MN)라 명명하였다. *matK* 유전자의 MN 분석 결과, 독활에서는 101개 위치의 염기치환 및 3개 위치의 삽입/결실을 포함하여 총 104곳의 MN이 확인되었고, 중치모당귀, 유럽당귀 및 어수리에서의 염기치환은 각각 3개 위치, 4개 위치, 그리

고 7개 위치가 각각의 종에서 확인되었으나 삽입/결실은 3종 모두 확인되지 않았다 (Table 4). 즉 독활 감별에 활용 가능한 종 특이적 MN은 정렬된 염기의 73번 위치에서 발생한 G→A 염기치환이 *matK* 유전자 전체에서 17개 위치에서 확인되었으며, 그 외에도 G→C 염기치환 4개 위치, G→T 염기치환 6개 위치, C→A 염기치환 9개 위치, C→T 염기치환 13개 위치, C→G 염기치환 1개 위치, A→T 염기치환 2개 위치, A→G 염기치환 11개 위치, A→C 염기치환 12개 위치, T→A 염기치환 6개 위치, T→G 염기치환 5개 위치 그리고 T→C 염기치환 15개 위치 등 총 101개 위치에서 확인되었다(Table 4). 독활 특이적인 삽입/결실에 의해 확인되는 MN은 97–99번 위치의 'GAC' 염기삽입 위치 1곳, 150–155번 'GTATGA'와

710–715번 ‘GACTTG’ 위치에서 나타난 염기결실 2곳이었다. 중치모당귀 종 특이적인 염기치환 MN은 219번과 435번 위치(G→A) 그리고 801번 위치(A→C) 3곳에서 확인되었고, 유럽당귀는 26번 위치(A→T), 771번 위치(C→G), 810번과 1207번 위치(T→A) 4곳에서 확인되었다. 또한, 어수리의 MN은 76번 위치(T→G), 262번 위치(G→C), 630번 위치(C→G), 721번과 732번 위치(G→A), 938번 위치(A/C→T), 973번 위치(C→T) 그리고 1221번 위치(G→T) 8곳에서 확인되었다.(Table 4)

rbcl 구간의 분석 결과, 독활에서만 확인되는 종 특이적 염기치환 41개 위치와 1개 위치의 삽입/결실을 포함하여 총 42개 위치에서 MN가 확인되었고, 중치모당귀와 어수리에서는 염기치환의 MN이 각각 5개 위치와 2개 위치에서 확인되었다(Table 5). 그러나, 유럽당귀에서는 종 특이 MN이 단 한

곳도 존재하지 않음을 확인함으로써 *rbcl* 구간만을 이용한 독활(獨活) 및 혼·오용 유사종 3종을 포함한 4종을 명확하게 종단위에서 감별하는 것이 불가능함을 확인하였다. *rbcl* 구간에 위치하는 독활 종 특이적 염기치환 MN은 정렬된 염기의 28번 위치(G→A)를 시작으로 4 위치에 존재하고 있었으며, G→T 2개 위치, G→C 2개 위치, C→T 10개 위치, C→A 4개 위치, A→T 1개 위치, A→C 5개 위치, A→G 5개 위치, T→A 1개 위치, T→C 6개 위치 및 T→G 1개 위치의 형태로 존재하였고, 삽입/결실 MN은 1433–1438번 위치의 ‘CTAATT’ 염기결실 1개가 존재하였다. 중치모당귀는 495번 위치(T→C), 982번 위치(T→G), 1315번 위치(A→C), 1320번 위치(A→G), 1408번 위치(C→G) 등 모두 5개 위치에서 염기치환 MN이 존재하였고, 어수리는 1356번 위치(C→T)와 1439번 위치(A→C) 2개 위치에서 염기치환 MN이 존재하였다(Table 5).

Table 4. Summary of Marker Nucleotide from the Comparison of *matK* Sequences among Four Species.

Nucleotide Position	26	73	76	90	95	97–99	105	111	130	131	137	138	150–155	176	178	188	191	199	200	201	207	208	219	225	226	230	246	249			
<i>Ar. continentalis</i>	A	A	T	G	A	GAC	A	T	T	T	C	T	-----	C	A	C	A	C	T	A	G	A	G	G	T	C	G	G			
<i>An. biserrata</i>	.	G	.	A	C	---	G	C	G	C	A	G	GTATGA	T	G	T	C	A	C	C	T	G	A	T	A	T	A	A			
<i>L. officinale</i>	T	G	.	A	C	---	G	C	G	C	A	G	GTATGA	T	G	T	C	A	C	C	T	G	.	T	A	T	A	A			
<i>H. moellendorffii</i>	.	G	G	A	C	---	G	C	G	C	A	G	GTATGA	T	G	T	C	A	C	C	T	G	.	T	A	T	A	A			
Nucleotide Position	262	264	278	282	284	289	290	297	306	312	318	354	373	393	432	435	450	465	477	487	508	512	535	542	564	565	567	574	616	624	630
<i>Ar. continentalis</i>	G	G	C	A	A	A	A	C	C	G	C	T	C	T	C	G	G	T	G	C	T	A	G	C	A	C	A	T	A	C	C
<i>An. biserrata</i>	.	A	A	C	G	T	T	G	G	A	T	C	T	G	A	A	C	C	A	A	C	T	A	G	G	T	T	G	G	T	.
<i>L. officinale</i>	.	A	A	C	G	T	T	G	G	A	T	C	T	G	A	.	C	C	A	A	C	T	A	G	G	T	T	G	G	T	.
<i>H. moellendorffii</i>	C	A	A	C	G	T	T	G	G	A	T	C	T	G	A	.	C	C	A	A	C	T	A	G	G	T	T	G	G	T	G
Nucleotide Position	631	646	654	681	683	687	697	699	703	710–715	718	721	722	723	728	732	735	741	743	752	759	765	771	781	786	801	810	826			
<i>Ar. continentalis</i>	C	C	A	A	A	C	A	C	T	-----	A	G	T	C	T	G	T	A	T	T	G	T	C	G	G	A	T	T			
<i>An. biserrata</i>	A	T	G	C	T	A	C	A	C	GACTTG	G	.	C	T	C	.	C	G	A	G	T	C	.	A	T	C	.	C			
<i>L. officinale</i>	A	T	G	C	T	A	C	A	C	GACTTG	G	.	C	T	C	.	C	G	A	G	T	C	G	A	T	.	A	C			
<i>H. moellendorffii</i>	A	T	G	C	T	A	C	A	C	GACTTG	G	A	C	T	C	A	C	G	A	G	T	C	.	A	T	.	.	C			
Nucleotide Position	828	852	858	868	885	894	924	936	938	939	966	973	988	1006	1012	1024	1045	1057	1065	1083	1088	1104	1110	1134	1156	1160	1176	1186	1198	1207	1221
<i>Ar. continentalis</i>	G	C	T	C	G	A	C	C	A	C	G	C	G	T	C	G	A	A	G	A	A	A	T	C	A	A	A	C	C	T	G
<i>An. biserrata</i>	T	T	C	A	A	G	T	A	C	T	A	.	A	G	A	C	C	G	A	G	G	G	C	T	G	T	C	A	T	.	.
<i>L. officinale</i>	T	T	C	A	A	G	T	A	C	T	A	.	A	G	A	C	C	G	A	G	G	G	C	T	G	T	C	A	T	A	.
<i>H. moellendorffii</i>	T	T	C	A	A	G	T	A	T	T	A	T	A	G	A	C	C	G	A	G	G	G	C	T	G	T	C	A	T	.	T

Dots (·) indicate nucleotides identical to those of *Ar. continentalis*, and hyphens(–) means deletion of nucleotide. Bold characters represent species-specific substitutions (marker nucleotides).

Table 5. Summary of Marker Nucleotide from the Comparison of *rbcL* Sequences among Four Species.

Nucleotide Position	28	48	68	90	91	107	159	201	249	251	284	294	393	423	450	495	543	582	615	648	677	696	741	747	763	825	836
<i>Ar. continentalis</i>	A	T	A	C	C	C	A	A	A	A	C	T	T	T	C	T	T	T	C	C	T	A	C	C	G	C	C
<i>An. biserrata</i>	G	G	C	A	A	T	G	C	C	G	A	C	C	C	A	C	C	C	T	T	A	T	T	A	A	T	G
<i>L. officinale</i>	G	G	C	A	A	T	G	C	C	G	A	C	C	C	A	.	C	C	T	T	A	T	T	A	A	T	G
<i>H. moellendorffii</i>	G	G	C	A	A	T	G	C	C	G	A	C	C	C	A	.	C	C	T	T	A	T	T	A	A	T	G
Nucleotide Position	840	843	885	933	982	1027	1038	1060	1125	1131	1302	1315	1320	1323	1327	1356	1359	1380	1408	1433-1438					1439	1447	
<i>Ar. continentalis</i>	G	T	A	T	T	T	T	G	G	G	A	A	A	T	C	C	T	G	C	-----					A	C	
<i>An. biserrata</i>	A	C	C	C	G	C	C	A	A	T	G	C	G	G	G	.	C	A	G	CTAATT					.	T	
<i>L. officinale</i>	A	C	C	C	.	C	C	A	A	T	G	.	.	G	G	.	C	A	.	CTAATT					.	T	
<i>H. moellendorffii</i>	A	C	C	C	.	C	C	A	A	T	G	.	.	G	G	T	C	A	.	CTAATT					C	T	

Dots (·) indicate nucleotides identical to those of *Ar. continentalis*, and hyphens(–) means deletion of nucleotide. Bold characters represent species-specific substitutions (marker nucleotides).

3. 중간 유연관계 분석

독활, 중치모당귀, 유럽당귀 및 어수리 4종 16개체의 *matK*, *rbcL* 각 DNA 바코드 구간 염기서열과 과(family)가 다른 *V. californica*를 outgroup으로 중간 유연관계를 분석한 결과, *matK* 유전자는 독활, 중치모당귀, 유럽당귀 및 어수리가 bootstrap value 97 이상에서 각각의 종단위로 clade를 형성하며 유집되는 것을 확인하였다(Figure 1). 또한, 중치모당귀, 유럽당귀 및 어수리 3종이 유전적으로 가깝게 유집되어 독활과 독립된 하나의 분계조를 형성하였다. *rbcL* 유전자의 유연관계 분석결과, *matK* 유전자와 마찬가지로 4종이 bootstrap value 95 이상에서 각각의 종단위로 clade를 형성하며 유집이 되었는데, 이는 미나리과(Apiaceae)에 속하는 중치모당귀, 유럽당귀 및 어수리와 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 독활이 각각 독립된 분계조를 형성하였다(Figure 2). 따라서 4종간의 유연관계 분석은 두 DNA 바코드 구간 모두 종단위 clade 형성으로 종 감별을 위한 방법으로 활용이 가능할 수 있으나, 중간 유전적 거리에서 보다 명확하게 차이를 보인 *matK*를 이용하는 것이 *rbcL*보다 유리하다는 것을 보여준다.

IV. 고 찰

한약재 및 민간요법에서 자주 사용되는 독활(獨活)은 우리나라와 중국의 약전에 수재된 기원종에 있어서 차이가 있을 뿐만 아니라, 독활, 중치모당귀 및 어수리가 본초학적 사용에 있어 다르게 처방되어야 함에도 불구하고 동명이물(同名異物)의 관계로 인해 유통상의 혼란을 야기하고 있다¹⁾. 그 외에도 한국과 중국에서 판매되고 있는 약재들 가운데 유럽당귀가 독활 또는 중치모당귀로 혼·오용 되어 유통되고 있음을 보여주는

Figure 1. Phylogenetic tree among sixteen samples of four species by the neighbor joining statistics with 1,000 bootstrap replicated based on the *matK* sequences.

Figure 2. Phylogenetic tree among sixteen samples of four species by the neighbor joining statistics with 1,000 bootstrap replicated based on the *rbcL* sequences.

유전자 분석 결과도 최근 보고된 바 있다⁶⁾. 또한, 최근 들어 전통적으로 사용되고 있는 한약재의 효능을 과학적으로 평가하는 연구가 진행되고 있음에도 불구하고, 중국에서 기원식물로 사용되고 있는 중치모당귀가 류마티즘, 항염증, 진통제, 구충제 및 항암 등의 치료제로 효과가 있다는 연구 보고와 한국의 기원식물인 독활이 요통, 두통 및 류마티즘에 효과적이라는 연구 보고에 반해, 유럽당귀 및 어수리에 대한 효능 특성 평가 연구는 아직 보고된 바 없어 이들 4종의 약리적 효과를 비교하는 것은 아직까진 불가능하여 이들 2종을 독활(獨活)의 대체품으로 이용하기에는 무리가 있다¹⁸⁻²²⁾. 그러므로 약재시장에서 독활(獨活)로 유통될 수 있지만 약효 동등성이 확인되지 않은 이들 4종간의 종 단위 감별을 위한 유전자 분석 연구는 필요하다.

분자생물학적 유전자분석 기법 가운데 DNA 바코드 분석은 생물체 내에 공통적으로 존재하는 유전자 구간의 염기서열을 이용하므로 많은 식물에 적용 가능하다는 장점이 있어 종 동정 및 계통분류학에서 뿐만 아니라 한약자원 기원 검증 연구에도 널리 적용되고 있다^{14,23-25)}. 특히 한약재 종 감별에 있어서 기원 식물의 원물은 건조되고 절단되는 등 변형된 형태로 가공되어 유통되기 때문에 내·외부 형태특징 중심의 분류기를 이용하는 형태감별법의 한계 극복과 지표물질 분석시료의 생육상태나 환경조건에서 기인되는 시료간 구성성분의 차이에서 발생하는 문제와 고가의 장비가 마련되어야 하는 화학분석법의 단점을 극복할 수 있는 유전자 분석을 통한 감별법 개발이 효율적인 것으로 알려져 활발하게 연구되고 있다²⁶⁻²⁷⁾. 최근 보고된 독활(獨活) 기원종 및 혼·오용 가능 식물 4종을 대상으로 한 rDNA-ITS 염기서열 분석을 통해 개발된 multiplex-SCAR 마커는 신속·간편하게 독활(獨活)의 종 감별이 가능함을 제시하였다⁶⁾. 또한 대계(大薊)와 소계(小薊)로 이용될 가능성이 있는 *Breia* 2종과 *Cirsium* 4종을 대상으로 한 rDNA-ITS, matK 및 rbcL의 DNA 바코드 분석을 통해 6종의 정확한 유전자 감별이 가능함을 보고하였다⁶⁾.

DNA 바코드 분석에 적용되고 있는 다양한 구간들 중에서 rDNA-ITS는 식물 종에 따라서는 수십~수천개의 동일한 유전자가 존재한다는 점과 양친유전을 하는 rDNA-ITS 구간의 특징으로 인해 종 동정에 적용할 수 있는 대표 염기서열을 확보하는 것이 쉽지 않지만, 염록체의 DNA 바코드 구간으로 이용되고 있는 유전자는 모계유전이 되는 염록체 게놈에 single copy로 존재하기 때문에 종을 대표하는 염기서열 확보가 용이하며, 식물계에 범용적으로 적용 가능한 universal primer가 공개되어 있어 것이 장점이다^{11,14)}. 본 연구에서 사용한 matK와 rbcL 구간은 CBOL에서 권장하는 DNA 바코드로 독활, 중치모당귀, 유럽당귀 및 어수리 4종 모두에서 적용 가능하였으며, 확보된 염기서열의 분석을 통해 rbcL이 matK 보다 G+C(%) 함량이 10% 이상 높음을 확인한 결과는 조구등(釣鉤藤)으로 이용되는 *Uncaria* 동속 5종을 대상으로 한 분석에서 나타난 결과나 파두(巴豆) 기원종인 *Croton tiglium* L.과 동속근연종인 11종의 분석결과와 유사하였다²⁷⁻²⁸⁾. 이러한 연구보고는 유전자를 이루는 염기구성에서 G+C(%) 함량의 차이가 염기치환 및 삽입/결실과 같은 변이율 차이에 영향을 주는 것과의 상관관계를 보여주며²⁷⁻²⁸⁾, 본 연구결과에서 확인된 MN은 rbcL에서 49곳으로 matK의 119곳과 비교

하면 41%에 불과했다(Table 4-5). 즉, 두 DNA 바코드 유전자 염기서열에서 나타난 G+C(%) 함량차이는 종간 변이율에 영향을 미친 것으로 보이며, 독활에서는 matK가 rbcL 보다 3배 가까이 높았으며 중치모당귀, 유럽당귀 및 어수리도 2배 이상 높은 수치로 나타났다. 결과적으로 염기서열 분석을 통해 나타난 DNA 바코드 구간 matK와 rbcL, 그리고 독활(獨活) 및 혼·오용 가능성이 있는 식물 4종간의 G+C(%) 함량 값, 종간 변이율과 MN 개수 차이는 유연관계 분석을 통한 유전적 거리를 확인한 결과에서 더욱 명확하게 나타났으며, *Tulipa edulis* (Miq.) Baker 및 이와 동속근연종인 5종간의 DNA 바코드 분석을 통해 나타난 결과와 유사한 경향성을 보였다²⁹⁾. 또한, 4종간의 유연관계는 matK 보다 rbcL에서 유전적 거리가 가까운 것을 확인할 수 있었고 두릅나무과에 속하는 독활은 미나리과에 속하는 중치모당귀, 유럽당귀 및 어수리가 이루는 분계와 달리 독립된 분계를 이루고 있으면서 명확하게 종단위로 유집하였다. 이는 독활, 중치모당귀, 유럽당귀 및 어수리를 대상으로 한 rDNA-ITS 구간의 종간변이율, MN 및 유연관계를 보고한 김 등⁶⁾의 연구결과와 유사한 결과이지만, 핵 내에 위치하는 rDNA-ITS 구간과 달리 엽록체에 위치한 matK와 rbcL의 염기서열을 기반으로 보고된 연구결과와는 전무하기 때문에 기 보고된 sequence characterized amplified region (SCAR) 마커 또는 multiplex-SCAR 마커 개발과 함께 독활(獨活) 및 독활(獨活) 혼·오용 종들의 엽록체 게놈을 이용한 종 단위로 감별 할 수 있는 자료로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

V. 결 론

본 연구는 대한민국약전에 독활(獨活) 기원식물로 수재되어 있는 독활(*Ar. continentalis*)과 독활(獨活)의 위품으로 혼·오용되고 있거나 가능성이 있는 중치모당귀(*An. biserrata*), 유럽당귀(*L. officinale*) 및 어수리(*H. moellendorffii*)를 감별할 수 있는 marker nucleotide (MN)를 탐색하기 위해 4종을 대상으로 2종류의 범용성 DNA 바코드인 matK와 rbcL 유전자의 염기서열 비교분석을 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 4종 16개체의 DNA 바코드 구간 염기서열을 해독하고 구조를 분석한 결과 matK와 rbcL 유전자는 독활은 1,259 bp와 1,497 bp의 염기로, 독활을 제외한 3종(중치모당귀, 유럽당귀 및 구당귀)은 1,268 bp와 1,503 bp 염기의 동일한 길이로 구성되어 있었으며, 종간 변이율에서도 두릅나무과에 속한 독활이 미나리과에 속한 중치모당귀, 유럽당귀 및 어수리에 비해 2배 이상 높은 값을 보였다.
2. 종 단위 감별이 가능한 MN을 확인하기 위해 matK와 rbcL 유전자의 염기서열을 비교·분석한 결과, 염기의 삽입/결실에 의한 MN은 독활에서만 확인되었으며, 염기치환에 의한 MN은 독활, 어수리, 중치모당귀 그리고 유럽당귀 순으로 확인되었다.

3. MN을 기준으로 *matK*는 4종을 명확하게 감별 가능한 DNA 바코드 구간으로 확인된 것에 비해 *rbcl*은 유럽 당귀를 제외한 3종의 감별이 가능하였으며, 유연관계분석을 통한 결과는 *matK*와 *rbcl* 모두 종 단위 감별이 가능함을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원의 '기원검증 체계 구축을 통한 한약자원 국내생산 기반기술 개발(K16403)'과제의 지원에 의해 수행되었으며, 한약자원식물 시료를 제공한 한국한의학연구원 한약표준표보관(표본관 코드 KIOM) 및 기원식물 분류·동정에 도움을 주신 분류·동정자문위원님께 감사드립니다.

참고문헌

1. Korea Institute of Oriental Medicine. Defining Dictionary for Medicinal Herbs 'Hanyak Giwon Sajeon'. Retrived July 28, 2016, from <http://boncho.kiom.re.kr/codex>.
2. Lee SG, Jo DJ, Chang HJ, Kang H. Anthioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extracts from *Aralia continentalis* Kitagawa. *Journal of naturopathy*. 2015 ; 4(1&2) : 10-4.
3. Zaugg J, Eickmeier E, Rueda DC, Hering S, Hamburger M. HPLC-based activity profiling of *Angelica pubescens* roots for new positive GABA_A receptor modulators in *Xenopus* oocytes. *Fitoterapia*. 2011 ; 82 : 434-40.
4. Cheng GJS, Li GK, Xiao XH. Microwave-assisted extraction coupled with counter-current chromatography and preparative liquid chromatography for the preparation of six furocoumarins from *Angelica Pubescentis* Radix. *SEP PURIF TECHNOL*. 2015 ; 141 : 143-9.
5. Zhang L, Yan R, Su R, Yang C, Liu S, Yu X, Chang X, Zhang S, Liu C, Xu M, Zeng W, Chen Y, Wang Q. Bioavailability enhancement of osthole after oral administration of Bushen Yizhi prescription extract to rats followed by *Cnidium monnieri* (L.) Cusson fruits extract in comparison to pure osthole at different doses. *J Ethnopharmacol*. 2014 ; 152 : 266-71.
6. Kim WJ, Moon BC, Yang S, Han KS, Choi G, Lee AY. Rapid authentication of the herbal medicine plant species *Aralia continentalis* Kitag. and *Angelica biserrata* C.Q. Yuan and R.H. Shan using ITS2 sequences and multiplex-SCAR markers. *Molecules*. 2016 ; 21 : 270. doi:10.3390/molecules21030270.
7. Lee YM, Ji Y, Kang YM, Kim WJ, Choi G, Moon BC. Molecular authentication of Pinelliae Tuber and its common adulterants using RAPD-derived multiplex sequence characterized amplified region (multiplex-SCAR) markers. *Int J Clin Exp Med*. 2016 ; 9(1) : 40-50.
8. Moon BC, Lee YM, Ji Y, Choi G, Chun JM, Kim HK. Molecular authentication and phylogenetic analysis of plant species for Breeae and Cirsii Herba based on DNA barcodes. *Kor J Herbol*. 2013 ; 28(3) : 75-84.
9. Moon BC, Kim WJ, Ji Y, Lee YM, Kang YM, Choi G. Molecular identification of the traditional herbal medicines, Arisaematis Rhizoma and Pinelliae Tuber, and common adulterants via universal DNA barcode sequences. *Genet Mol Res*. 2016 ; 15(1) : gmr.15017064. doi: 10.4238/gmr.15017064.
10. Gustavo CA, Peter MG. DNA markers: protocols, applications, and overviews. Weinheim : Wiley-VCH. 1996 : 364.
11. Barcode of Life. Identifying Species with DNA barcoding. Retrieved July 27, 2016, from <http://www.barcodeoflife.org>.
12. Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP. Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE*. 2011 ; 6(5) : e19254. doi:10.1371/journal.pone.0019254.
13. 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. doi:10.1371/journal.pone.0057125.
14. Ganie SH, Upadhyay P, Das S, Sharma MP. Authentication of medicinal plants by DNA markers. *Plant Gene*. 2015 ; 4 : 83-99.
15. Kim W, Ji Y, Moon B. Identification of marker nucleotides for the molecular authentication of *Paeoniae Radix* based on the analysis of *psbA-trnH* Sequences. *Korean Herb Med Inf*. 2015 ; 3(2) : 73-80.
16. Järvinen P, Palmé A, Morales LO, Lännenpää M, Keinänen M, Sopanen T, Lascoux M. Phylogenetic relationships of *Betula* species (Betulaceae) based on nuclear adh and chloroplast *matK* sequences. *Am J Bot*. 2004 ; 91(11) : 1834-45.
17. Olmstead RG, Reeves PA. Evidence for the polyphyly of the Scrophulariaceae based on chloroplast *rbcl* and *ndhF* sequences. *Ann Mo Bot Gard*. 1995 ; 82(2) : 176-93.
18. Wei F, Zou S, Young A, Dubner R, Ren K. Effects of four herbal extracts on adjuvant-induced inflammation and hyperalgesia in rats. *J Altern Complement Med*. 1999 ; 5(5) : 429-36.

19. Chen YF, Tsai HY, Wu TS. Anti-inflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*. *Planta Med*. 1995 ; 61(1) : 2-8.
20. Wang KY, Yao L, Du YH, Xie JB, Huang JL, Yin ZQ. Anthelmintic activity of the crude extracts, fractions, and osthole from *Radix angelicae pubescentis* against *Dactylogyrus intermedius* in goldfish (*Carassius auratus*) in vivo. *Parasitol Res*. 2011 ; 108(1) : 195-200.
21. Li J, Zhang QH, He J, Liu EW, Gao XM, Chang YX. An improved LC-MS/MS method for simultaneous determination of the eleven bioactive constituents for quality control of *Radix angelicae pubescentis* and its related preparations. *Sci World J*. 2015 ; 2015 : 365093. doi:10.1155/2015/365093.
22. Lim H, Jung HA, Choi JS, Kim YS, Kang SS, Kim HP. Anti-inflammatory activity of the constituents of the roots of *Aralia continentalis*. *Arch Pharm Res*. 2009 ; 32(9) : 1237-43.
23. 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 Herbol*. 2013 ; 28(6) : 53-8.
24. 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 Herbol*. 2010 ; 25(4) : 47-54.
25. Kim WJ, Lee YM, Ji Y, Kang YM, Choi G, Kim HK, Moon BC. Identification of marker nucleotides for the molecular authentication of *Arisaematis Rhizoma* based on the DNA barcode sequences. *Kor J Herbol*. 2014 ; 29(6) : 35-43.
26. Joshi K, Chavan P, Warude D, Patwardhan B. Molecular markers in herbal drug technology. *Curr Sci*. 2004 ; 87(2) : 159-65.
27. Jiang C, Cao L, Yuan Y, Chen M, Jin Y, Huang L. Barcoding melting curve analysis for rapid, sensitive, and discriminating authentication of *Saffron* (*Crocus sativus* L.) from its adulterants. *Biomed Res Int*. 2014 ; 2014 : 809037. doi:10.1155/2014/809037.
28. Osathanunkul M, Suwannapoom C, Ounjai S, Rora JA, Madesis P, Boer HD. Refining DNA barcoding coupled high resolution melting for discrimination of 12 closely related *Croton* species. *PLoS ONE*. 2015 ; 10(9) : e0138888. doi:10.1371/journal.pone.0138888.
29. Ma HL, Zhu ZB, Zhang XM, Miao YY, Guo QS. Species identification of the medicinal plant *Tulipa edulis* (Liliaceae) by DNA barcode marker. *Biochem Syst Ecol*. 2014 ; 55 : 362-8.