

ITS 염기서열 기반 방기 신속 감별용 SCAR marker 개발

김육진[#], 노수민, 최고야, 문병철^{*}

한국한의학연구원 한약자원연구센터

Development SCAR marker for the rapid authenticaton of Sinomeni Caulis et Rhizoma based on ITS Sequences

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

Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine

ABSTRACT

Objectives : In the Korean Pharmacopoeia 12th edition (KP 12) and the Korean Herbal Pharmacopoeia (KHP), two authentic herbal medicines are described, namely *Bang-gi* (*Cheong-pung-deung*) and *Mok-bang-gi*, respectively. In China, *Bun-bang-gi* is also used as herbal medicine. This study was conducted to develop a molecular authentication tool for distinguishing the three herbal medicine used as *Bang-gi*, which are Sinomeni Caulis et Rhizoma (Rhizome of *Sinomenium acutum*), Stephaniae Tetrandrae Radix (Root of *Stephania terandra*), and Cocculi Radix (Root of *Cocculus trilobus*).

Methods : Twelve samples of three species (four samples of *S. acutum*, five samples of *S. tetrandra*, and three samples of *C. trilobus*) were collected from different habitats. The sequences of internal transcribed spacer (ITS) regions were obtained and comparatively analyzed to design the species-specific sequence characterized amplified region (SCAR) primers. The specificity of each pair of SCAR primers that amplified species-specific amplicon was evaluated for establishing the singleplex and multiplex PCR assay tools.

Results : The singleplex SCAR markers show discriminability in *C. acutum*, *S. tetrandra*, and *C. trilobus*. These SCAR markers were also efficiently authenticated three species in the multiplex SCAR amplification using single PCR reaction. Furthermore, these PCR assay methods were applicable to authenticate dried herbal medicines distributed in the markets.

Conclusions : The SCAR markers and PCR assay tools help discriminate the three herbal medicines used as *Bang-gi* at the species levels and provide a reliable genetic method to prevent the inauthentic distribution of these herbal medicines.

Key words : *Sinomenium acutum*, Sinomeni Caulis et Rhizoma, ITS, SCAR marker

*Corresponding author : Dr. Byeong Cheol Moon, Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Naju 58245, Republic of Korea.

· Tel : +82-61-338-7100

· Fax : +82-61-338-7135

· E-mail : bccmoon@kiom.re.kr

#First author : Wook Jin Kim, Herbal Medicine Resources Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Naju 58245, Republic of Korea.

· Tel : +82-61-338-7115

· Fax : +82-61-338-7135

· E-mail : ukgene@kiom.re.kr

· Received : 02 May 2022

· Revised : 08 July 2022

· Accepted : 25 July 2022

I. 서론

防己 *Sinomeni Caulis et Rhizoma*는 祛風濕藥에 효능이 있는 한약재로 한의학에서 다빈도로 이용되며, 한국에 유통되는 防己의 대부분은 중국 절강성, 안휘성 및 호북성에서 생산된 것을 수입하여 사용하고 있는데, 《대한민국약전》(이하 'KP 12')과 《중화인민공화국약전》(이하 'ChP 2015')에서 수재하고 있는 기원종에 차이가 있어 사용시 주의가 요구된다¹⁾. KP12는 防己의 기원종을 '새모래덩굴과(Menispermaceae) 식물인 방기 *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehder & E.H.Wilson의 덩굴성줄기 및 뿌리줄기(이하 '靑風藤')'로 규정하는 반면, ChP 2015는 '粉防己 *Stephania tetrandra* S.Moore의 뿌리(이하 '粉防己')'를 防己의 기원종으로 규정하고 있어 한국과 차이가 있다. 더불어 '방기 *S. acutum*의 덩굴성 줄기와 뿌리줄기'를 약용 부위로 규정한 KP 12와 《일본약국방》(이하 'JP 17')과는 달리 ChP 2015는 덩굴줄기만을 인정하는 등의 다소 차이가 있다 (Figure 1). 또한, 《대한민국약전외한약(생약)규격집》(이하 'KHP')에서는 새모래덩굴과에 속한 '맹맹이덩굴 *Cocculus trilobus* (Thunb.) DC.의 뿌리(이하 '木防己')'을 한약재 木防己 *Cocculi Radix*로 수재하고 있다¹⁾. 무엇보다 이들 防己, 靑風藤, 木防己를 防己類라는 범주에서 동일한 약재로 사용한 기록이 신농본초경에도 남아있어 이들 한약재 간의 혼·오용은 오래전부터 이뤄졌음을 직·간접적으로 예상할 수 있으나, 현재는 이들 한약재를 한국과 중국에서 수재하는 생약명과 기원종에 차이가 있으므로 처방하는데 있어 구분되어 사용되어야 할 것이다²⁾.

최근 들어 DNA 바코드 구간을 이용한 종 동정 및 한약재 감별 연구가 매우 활발하게 이뤄지고 있다^{3,4)}. 본초로 이용하는 한약재의 대부분은 식물 유래 한약자원이 많은데, 식물 종 동정은 internal transcribed spacer (ITS), *matK*, *rbcl*, *psbA-trnH* 그리고 *trnL-F*와 같은 DNA 바코드 구간이 주로 이용된다^{5,6)}. 그러나, DNA 바코드 구간의 염기서열 정보 확보를 위해서는 PCR 증폭, 전기영동 및 증폭 산물의 회수, 염기서열 해독 및 비교분석 등의 검정 시간이 다소 소요되며 그 과정이 번거롭다는 단점이 있다^{2,4)}. 또한, 유통되는 한약재의 특성상 건조되고 절단된 형태가 많아 DNA 바코드 구간 분석시 DNA가 파괴되었을 가능성이 높고 바코드 분석 구간의 크기(700 ~ 1600 bp)가 다소 크다는 점도 유전자 분석을 저해하는 요인이며, 여러 종이 혼입되어 유통되었을 때를 대비하여 유통품의 표본 추출 시료를 여러 개로 분석해야 한다^{3,7)}. 이러한 DNA 바코드 분석의 단점을 보완하고 동등한 분석 결과를 얻기 위해 최근에는 종 특이적인 primer를 이용한 sequence characterized amplified region (SCAR) marker 개발 연구가 여러 한약자원에서 보고되고 있다^{8,9)}. 더불어 대상종 각각의 종 특이적인 primer를 한 tube 내에서 반응시켜 한번의 PCR 증폭으로 여러 종의 동시 감별이 가능한 multiplex SCAR

marker는 분석 시간과 비용면에서 singleplex SCAR marker 보다 훨씬 효율적이다^{10,11)}.

따라서 본 연구에서는 防己類의 기원종으로 이용되는 靑風藤, 木防己 및 粉防己 3종에 대한 ITS 바코드 구간 염기서열을 확보하여 비교분석하고, 이를 바탕으로 신속정확한 종 감별이 가능한 multiplex SCAR marker를 개발하여 한약재 防己類 감별에 활용하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 靑風藤 4개, 木防己 5개 및 粉防己 3개 총 12개 시료는 대한민국과 중국의 서로 다른 지역에서 수집된 것으로 각각의 시료는 본초학, 식물분류학 및 식물생태학 등의 전문가로 구성된 분류·동정 위원회의를 거쳐 그 종을 최종적으로 확정하였으며, 각 시료의 기원식물은 압착 석엽 표본을 제작하여 한국한의학연구원 한약표준표본관(IH 표본관 코드 KIOM)에 표본번호를 부여하여 보관하였다(Figure 2, Table 1).

2. DNA 추출

Genomic DNA 추출은 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, USA)에서 제공하는 protocol에 따라 약 100 mg의 시료를 이용하여 진행하였고, 정량은 UV spectrophotometer (Nanodrop, USA)를 이용하여 260 nm 흡광도 측정값으로 계산하였다.

3. ITS 바코드 구간 PCR 증폭 및 염기서열 분석

ITS 바코드 구간의 분석을 위해 약 15 ng의 genomic DNA와 각 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 의 정방향과 역방향 primer (Table 2)를 SolgTM 2 \times Taq PCR Smart-MixI (Solgent, Daejeon, Korea)와 혼합하여 반응물이 전체 40 μL 되도록 제조하였다. PCR 장비는 ProFlexTM PCR System (Applied Biosystems, USA)를 이용하였으며, 증폭 조건은 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분간 초기 변성시킨 후 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60초, 53 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60초, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 90초 반응을 총 35회 반복한 후 마지막으로 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 합성하는 것으로 반응시켰다. 각 시료의 증폭산물을 이용한 전기영동, 증폭산물 회수, T-vector 삽입 및 *E. coli* 형질전환 그리고 염기서열 분석은 김 등이 보고한 조건과 동일하게 수행하였다¹³⁾.

Table 2. Primers used for the ITS sequence analysis.

DNA barcode region	Primer name	Primer sequences (5'→3')	Reference
ITS	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	White et al., 1990 ¹⁴⁾
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	

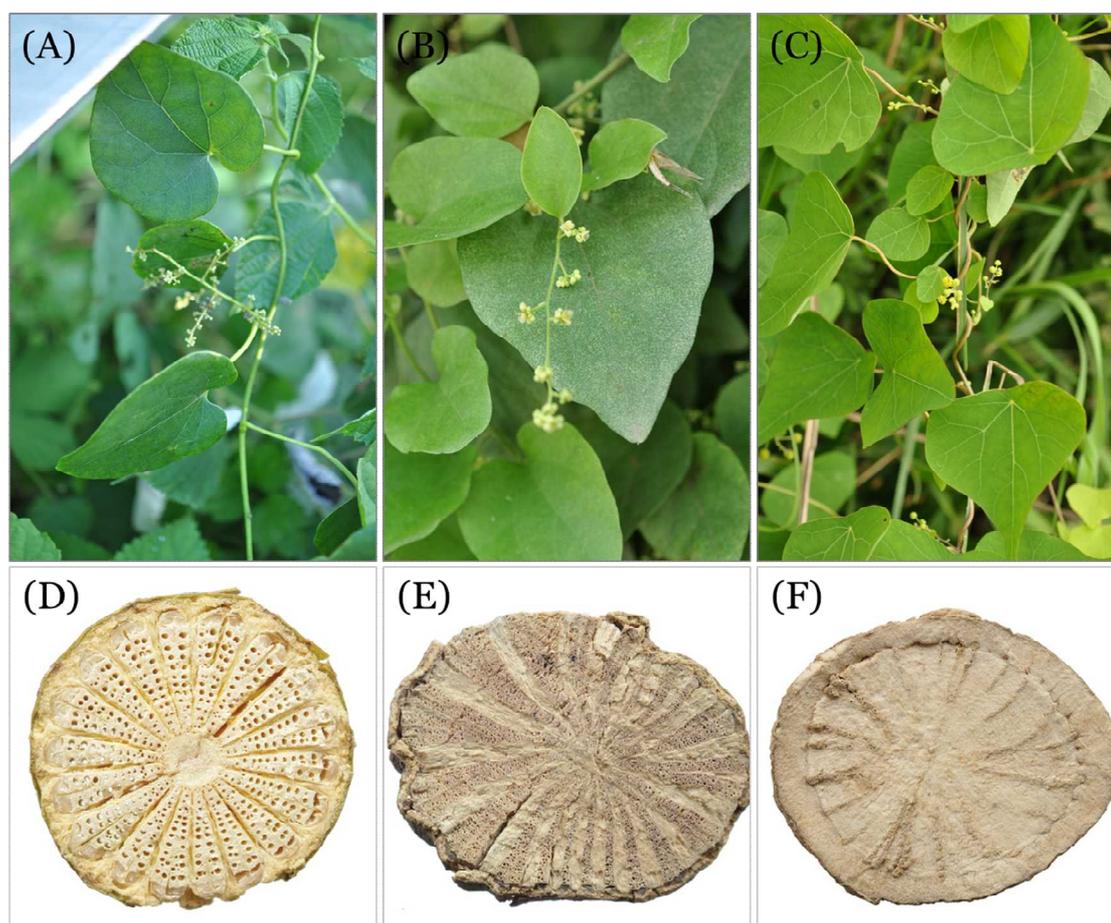


Figure 1. Plant and herbal medicine of *Sinomenium acutum* (A, D), *Cocculus trilobus* (B, E) and *Stephania tetrandra* (C, F). A picture of herbal medicine (D, E and F) was adapted from Korean Medicinal Materials¹²⁾.

Table 1. List and information of plant materials used in this study.

Herbal name	Scientific name	Information of sample habitate	Voucher number	Abbreviation
Sinomeni Caulis et Rhizoma	<i>Sinomenium acutum</i> (Thunb.) Rehder & E.H.Wilson	Aewol-eup, Jeju-si	2011-KR-1-30	SA1
		Yokji-myeon, Tongyeong-si	2011-KR-2-05	SA2
		Heuksan-myeon, Sinan-gun	2011-KR-2-47	SA3
		Heuksan-myeon, Sinan-gun	2011-KR-3-13	SA4
Cocculi Radix	<i>Cocculus trilobus</i> (Thunb.) DC.	Seongsan-eup, Seogwipo-si	2011-KR-1-02	CT1
		Gujwa-eup, Jeju-si	2011-KR-1-04	CT2
		Yuseong-gu, Daejeon	2011-KR-1-13	CT3
		Gahoe-myeon, Hapcheon-gun	2011-KR-1-18	CT4
		Gonyang-myeon, Sacheon-si	2011-KR-1-21	CT5
Stephaniae Tetrandrae Radix	<i>Stephania tetrandra</i> S.Moore	Anhui, China	2011-CN-1-27	ST1
		Jiangsu, China	2011-CN-2-49	ST2
		Jiangsu, China	2011-CN-2-50	ST3

4. 종 특이적 SCAR primer 제작 및 검증

확보된 약 700 bp 크기의 ITS 염기서열은 BioEdit(버전 7.0.5.3) 프로그램을 이용하여 편집하였고, 확정된 염기서열은 양말단에 위치한 ITS1 및 ITS4 primer 부위를 기준으로 ClustalW Multiple Alignment를 통해 정렬시켰다. 또한, 종 특이적 SCAR marker 제작을 위해 3종간 염기서열 비교·분석에서 확인된 종 특이 염기서열 치환 및 삽입·결실 부위를 포함하는 구간을 SCAR primer 부위로 선정하였다. 제작한 SCAR primer의 종 특이성 검증은 3종 12개 시료를 대상으로 다음과 같은 조건으로 수행하였다. 약 15 ng의 genomic DNA와 각 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 의 정방향과 역방향 primer를 Solg™ 2×Taq PCR Smart-MixI (Solgent, Daejeon, Korea)와 혼합하여 반응물이 전체 20 μL 가 되도록 제조하였으며, ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 증폭시켰다. PCR 조건은 95℃에서 2분간 변성시킨 후 95℃에서 20초, 65℃에서 30초, 72℃에서 20초 반응을 총 35회 반복 수행하고 마지막으로 72℃에서 5분간 합성하는 것으로 반응시켰다.

5. Multiplex SCAR 분석 및 유통품 모니터링

Multiplex SCAR 분석은 종 특이성이 검증된 primer 4개를 한 개의 tube에서 섞어 반응시켜 확인하였으며, PCR 반응물

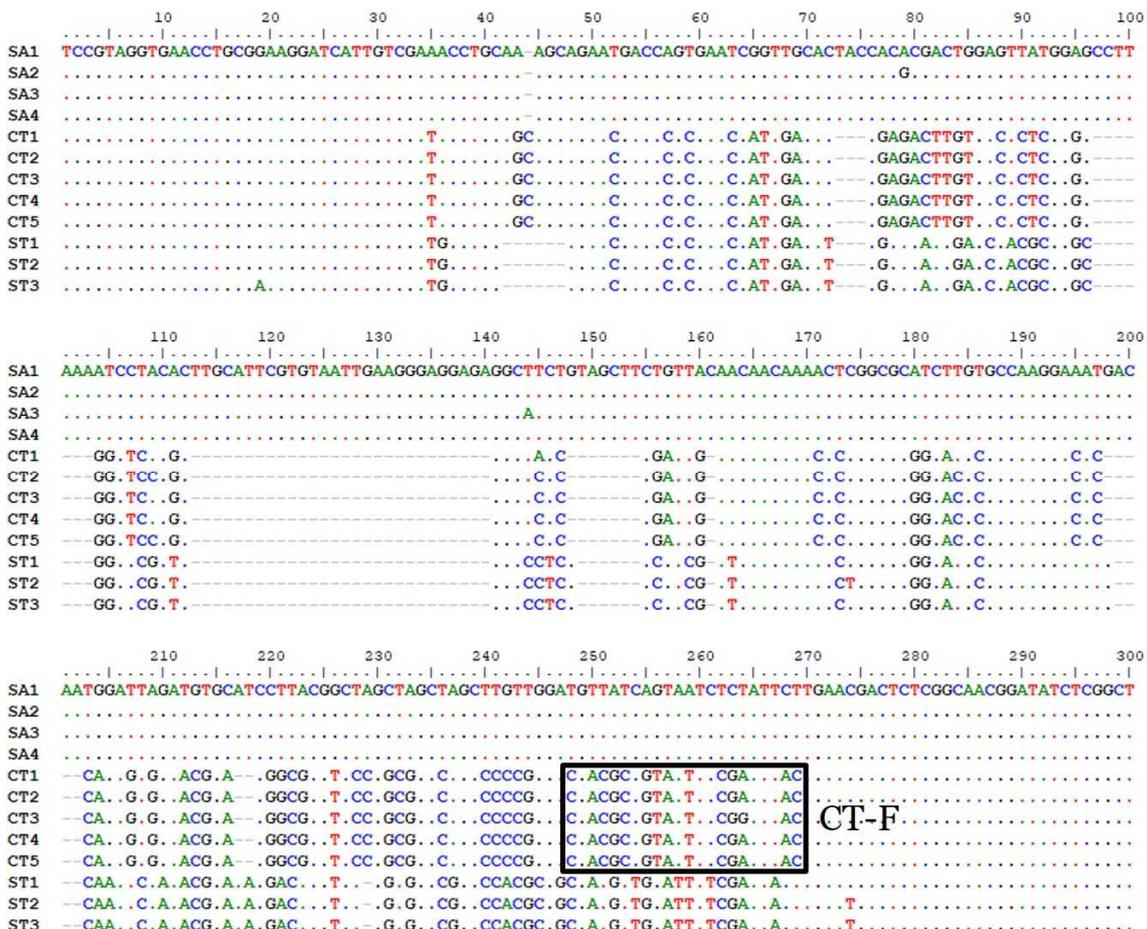
제조 및 조건은 위에 기술한 SCAR primer 종 특이성 검증과 동일한 방법으로 수행하였다. 또한 구축된 multiplex SCAR marker를 이용한 모니터링은 한국과 중국에서 구입 가능한 防己 9개와 木防己 5개의 유통 약재를 대상으로 하였다. 분석 방법은 시료 약 50g의 건조 약재를 분쇄하고 균질화한 가루를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. PCR 반응물 제조 및 조건은 위에 기술한 SCAR primer 종 특이성 검증과 동일한 방법으로 수행하였다.

III. 결 과

1. ITS 바코드 구간 증폭 및 염기서열 분석

White가 보고한 특이 primer를 이용하여 靑風藤 4개체, 木防己 5개체 및 粉防己 3개체에서 ITS 유전자 크기로 예상된 약 700 bp 증폭 산물은 전기영동을 통해 확인하였다¹⁴⁾. 각 시료의 정확한 염기서열 정보 확보를 위해 증폭 산물은 *E. coli*에 형질전환하여 3개의 colony를 분석하였으며, 확보된 각 시료에 대한 염기서열 정보는 BioEdit을 이용한 비교·분석을 통해 확정하였다(Figure 2).

그 결과 3종 12개체로부터 확보한 ITS 부위의 염기서열은 靑風藤 689개 염기(nt), 木防己 615-616 nt 그리고 粉防己 624 nt로 구성되어 있었다(Figure 2).



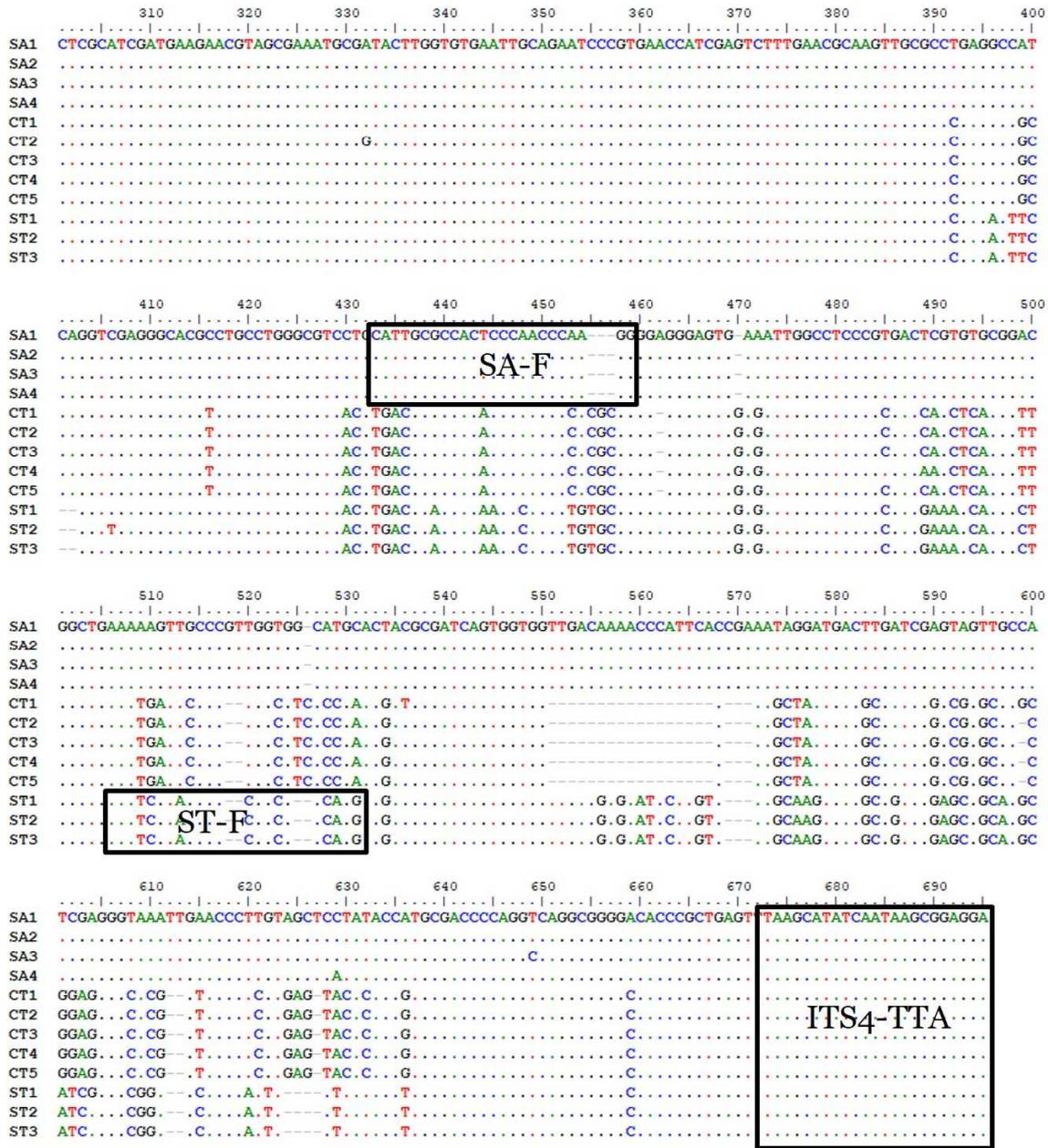


Figure 2. The ClustalW Multiple Alignment using the amplified ITS sequences in three species related with *Sinomeni Caulis et Rhizoma*. The boxes indicate the SCAR primer regions used in this assay.

2. ITS 염기서열 기반 종 특이 감별용 SCAR marker 개발

다중염기서열로 정렬된 3종 12개체의 ITS 염기서열을 토대로 종 특이 primer 부위를 선정하였다(Figure 2, Table 3). SCAR primer는 22~24개의 염기서열로 설계하였고, PCR을 통한 유전자 증폭 산물의 예상 크기는 靑風藤 258 bp, 木防己 422 bp 그리고 粉防己 177 bp 였다(Table 3). 3종 각각의 종 특이성은 SCAR primer를 이용한 PCR 검정을 통해 확인하였다(Figure 3). 靑風藤의 경우 SA-F와 ITS4-TTA primer를

이용하여 PCR 검정을 한 결과, 12개 시료 중에서 靑風藤 4개 시료에서만 특이적으로 258 bp 크기의 증폭 산물이 전기영동을 통해 확인되었다(Figure 3. A). 또한, 木防己 특이 primer (CT-F와 ITS4-TTA)와 粉防己 특이 primer(ST-F와 ITS4-TTA)를 각각 이용한 PCR 검정에서도 木防己(422 bp)과 粉防己(177 bp)에서 종 특이적으로 증폭 산물이 확인되었다(Figure 3. B, C).

Table 3. List of SCAR primers used for the species-specific assay.

Primer name	Sequence (5' →3')	Specificity	Amplicon (bp)
SA-F	CAT TGC GCC ACT CCC AAC CCA CGG	<i>Sinomenium acutum</i>	258
CT-F	CGA CGC CGT AAT TCC GAA CTA C	<i>Cocculus trilobus</i>	422
ST-F	AAA TCG TAG CCC CGG CGC CAG G	<i>Stephania tetrandra</i>	177
ITS4-TTA	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GCT TA	All samples	-

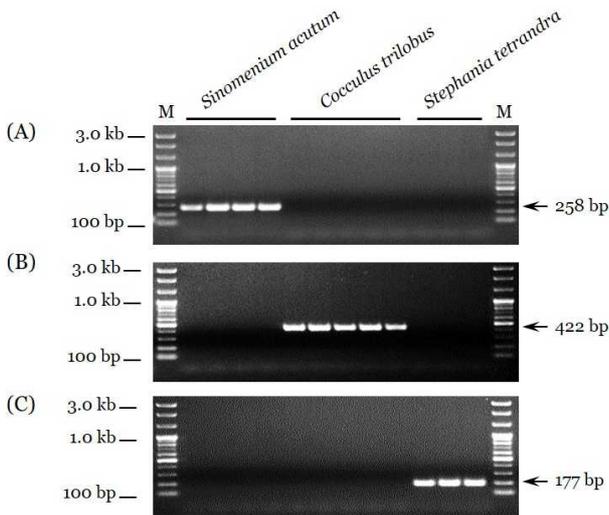


Figure 3. Verification of six species-specific SCAR primers using the conventional PCR assays. (A) Species-specific amplicon in *Sinomenium acutum* using SA-F/ITS4-TTA primers. (B) Species-specific amplicon in *Cocculus trilobus* using CT-F/ITS4-TTA primers. (C) Species-specific amplicon in *Stephania tetrandra* using ST-F/ITS4-TTA primers.

3. Multiplex PCR 분석법 구축 및 유통품 모니터링

종 특이성이 확인된 SCAR primer 4개를 이용하여 한 번의 PCR 증폭으로 3종의 防己類를 동시에 감별할 수 있는 multiplex 분석을 수행한 결과, 3종 모두 예상된 크기의 증폭 산물이 종 특이적으로 전기영동을 통해 확인되었다(Figure 4). 구축된 multiplex PCR 분석법을 이용하여 유통품 防己 9개와 粉防己 5개를 검정한 결과, 각각 정품 기원종인 靑風藤와 粉防己로 확인되었으며 異種의 혼입은 확인되지 않았다(Figure 5).

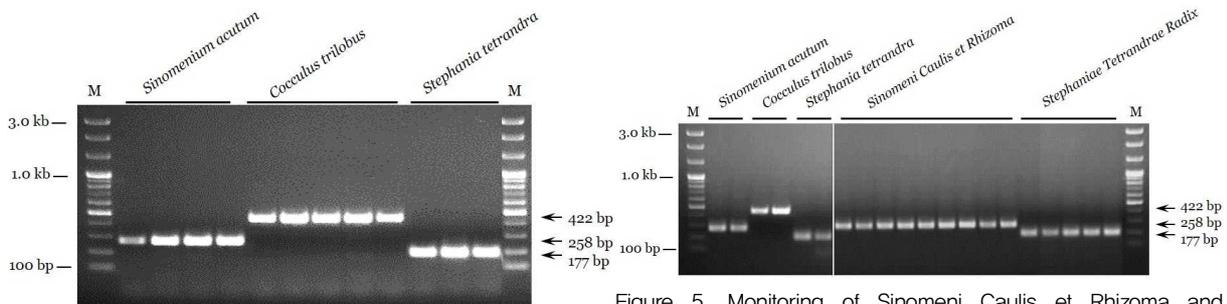


Figure 4. Verification of species specificity of multiplex using the conventional PCR assays. Figure 5. Monitoring of *Sinomeni Caulis et Rhizoma* and *Stephaniae Tetrandrae Radix* distributing on the herbal medicinal market using the multiplex SCAR markers.

IV. 고찰

우리나라에서 높은 처방 빈도수를 갖는 한약재 防己는 국가별로 약전에서 수재하고 있는 기원식물의 종류가 다양하고 차이가 있어 유통되는 한약재 防己의 종을 명확하게 밝혀 종에 따라 발생할 수 있는 효능 차이를 정리하는 것이 표준화된 한약재 이용에 중요한 요소이다^{15,16}. 防己類 범주로 오랫동안 사용되었으나 한국과 중국약전에 수재된 防己 기원종과 약재 명의 차이로 구분되어 사용되는 防己, 靑風藤, 粉防己 및 木

防己, 그리고 현재는 독성 문제로 사용이 금지된 廣防己를 포함하는 형태 감별 연구가 보고되고 있으나, 유전자 수준에서의 감별 연구가 보고된 사례는 전무하다^{15,16}.

최근 들어 유통 한약재의 종 감별을 위한 유전자 분석 연구로 DNA barcoding, PCR 기반 분석법, Next generation sequencing (NGS) 등이 활용되고 있다^{4,7}. 유전자 감별법의 방법론적 측면에서 DNA barcoding이나 NGS를 이용하여 중

을 구별하는 것은 종 특이적인 염기서열 정보를 이용하기 때문에 연구 결과의 정확성 및 신뢰성이 높지만, 현재로서는 분석 비용 및 시간적 측면에서 효율성이 떨어진다고 볼 수 있다. 특히, DNA barcoding을 이용하여 한약재 종 감별 분석을 적용하는 경우, 유통되는 한약재의 특성상 절단 및 건조된 것이 대부분이라서 그 값이 낮은 DNA 추출률 및 순도에 영향을 주고 PCR 증폭을 저해하여 정확한 염기서열 정보 확보가 어렵다²⁾. 따라서 이러한 단점을 보완하고 동등한 검정 결과를 얻기에 가장 효율적으로 접근할 수 있는 분석법은 DNA 추출률 및 순도가 낮은 상태에서도 유전자 분석이 가능한 PCR 기반 DNA marker라고 할 수 있다¹⁷⁾. DNA marker는 DNA barcoding에 이용되는 구간의 종 특이적인 염기서열 정보를 바탕으로 primer를 제작하고 PCR 증폭 과정을 거치고 그 중 동정 결과를 겔 전기영동에서 밴드의 유무로 확인하기 때문에, DNA barcoding 분석을 위해 필요로 하는 염기서열 분석 과정의 생략으로 신속한 검정 결과를 얻을 수 있다는 장점 외에도 PCR 증폭 과정에 이용되는 primer가 종 특이적으로 제작되어 DNA barcoding보다 상대적으로 작은 PCR 증폭 산물과 저수율·저순도의 DNA에서도 분석이 가능한 장점이 있다. 그러므로, DNA marker를 이용한 종 동정 분석이 DNA barcoding이나 NGS 분석보다 현재로서는 검정 결과의 동등성 및 분석 비용, 시간적 측면에서 효율적이라고 할 수 있다^{2,18)}.

PCR 기법을 적용한 종 감별용 DNA marker 개발을 위한 염기서열 정보 확보는 DNA barcoding에 다빈도로 이용되는 ITS 부위를 이용하였다. ITS 부위(internal transcribed spacer)는 18s RNA-ITS1-5.8s RNA-ITS2-26s RNA 구조로 배열되어있는 ribosomal RNA (rRNA) 유전자 구간에 존재하는 non-coding 부위로 ITS1과 ITS2에는 다양한 염기서열 변이가 존재하는데, 본 연구 결과에서도 靑風藤, 木防己 및 粉防己에서 염기서열 크기 및 정보에서 차이가 있어서 3종을 명확하게 구분할 수 있었다²⁾. 일부 시료에서 확인된 종 내에 존재하는 염기서열의 차이는 non-coding 부위인 ITS 구간 특성상 종내 변이로 판단된다^{19,20)}. 3종의 다중염기서열 분석 결과를 종합적으로 판단했을 때, ITS 구간의 염기서열을 바탕으로 신속 감별용 SCAR marker로 전환하기에 적합하다고 판단되어, 靑風藤, 木防己 및 粉防己 각각의 종 특이적인 PCR 증폭 산물이 생성되도록 SCAR primer로 설계하였다. 설계된 SCAR primer를 이용한 PCR 검정을 통해 예상된 크기의 종 특이적인 증폭 산물이 확인되어 종 감별능 및 특이성을 확인하였다. 또한, 이들 각각의 singleplex SCAR marker는 한 번의 PCR 반응으로 3종을 동시에 감별할 수 있는 multiplex SCAR marker로 이용하기 위해 각각의 primer 부위는 서로 다르게 설계되었는데, PCR 검정을 통해 종 특이성 및 예상된 크기의 증폭 산물로 확인되어 multiplex SCAR marker로 이용 가능하다.

또한, 개발된 multiplex SCAR marker 및 최적의 PCR 분석법은 시중에서 유통되고 있는 防己 및 粉防己 한약재에서의 종 감별능도 확인되어, 향후 防己類 유통품 모니터링에 효율적으로 활용 가능할 것으로 판단된다.

V. 결 론

본 연구는 防己 기원종으로 수재하고 있는 종의 차이(KP 12: 靑風藤, ChP 2015: 粉防己)와 한약명의 유사성(木防己)으로 혼·오용이 우려되는 靑風藤, 粉防己 및 木防己 3종을 대상으로 ITS 바코드 구간 염기서열을 비교·분석하였고, 중간 염기서열 차이가 있는 보이는 구간을 PCR 분석용 primer로 설계·제작하여 종 특이성을 PCR 검증을 통해 확인하였으며, 유통 약재에서 보다 신속하고 간편하게 防己類를 감별할 수 있는 multiplex SCAR marker 분석법을 개발하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 3종 12개체의 ITS 바코드 염기서열을 해독하고 유전자 정보를 분석한 결과, 防己類 3종(靑風藤, 粉防己 그리고 木防己) 염기서열 정보에 차이가 있어 SCAR marker로 활용 가능함을 확인하였다.
2. 분석한 ITS 바코드 구간 종 특이 염기서열을 바탕으로 SCAR primer 설계하였고, 이를 이용한 multiplex PCR 분석법이 개발되어 防己類 3종에 대한 신속·정확한 종 동정이 가능함을 확인하였다. 개발된 multiplex PCR 분석법은 한약재 防己類 위품의 혼·오용 방지를 위한 유전자 감별법으로 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원의 ‘지속가능한 한약표준자원 활용기술 개발’ 과제(KSN2021320)의 지원으로 수행되었으며, 한국한의학연구원 한약표준표본관 그리고 시료의 분류·동정에 도움을 주신 분류·동정자문위원님께 감사드립니다.

References

1. Korea Institute of Oriental Medicine, Defining Dictionary for Medicinal Herbs ‘Hanyak Giwon Sajeon’ 021; Published on the Internet; <https://oasis.kiom.e.kr/erlib/hminfo/hbmcod/hbmcodList.do> (accessed 2021-12-28).
2. 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* CQ Yuan and RH Shan using ITS2 sequences and multiplex-SCAR markers. *Molecules*. 2016 ; 21(3) : 270.
3. Parveen I, Gafner S, Techen N, Murch SJ, Khan IA. DNA barcoding for the identification of botanicals in herbal medicine and dietary supplements: strengths

- and limitations. *Planta Medica*. 2016 ; 82(14) : 1225–1235.
4. Gesto-Borroto R, Medina-Jiménez K, Lorence A, Villarreal ML. Application of DNA barcoding for quality control of herbal drugs and their phytopharmaceuticals. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2021 ; 31 : 1–15.
 5. 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.
 6. Liu J, Mu W, Shi M, Zhao Q, Kong W, Xie H, Shi L. The species identification in traditional herbal patent medicine, Wuhu San, based on shotgun metabarcoding. *Frontiers in pharmacology*. 2021 ; 12 : 152.
 7. Raclariu AC, Heinrich M, Ichim MC, de Boer H. Benefits and limitations of DNA barcoding and metabarcoding in herbal product authentication. *Phytochemical Analysis*. 2018 ; 29(2) : 123–8.
 8. Noh P, Kim WJ, Park I, Yang S, Choi G, Moon BC. Development of ITS sequence based SCAR marker and multiplex-SCAR assay for the rapid authentication of *Tetrapanax Medulla* and *Akebiae Caulis*. *The Korea Journal of Herbology*. 2021 ; 36(1) : 9–17.
 9. Noh P, Kim WJ, Yang S, Choi G, Moon BC. PCR-ased rapid diagnostic tools for the authentication of medicinal mistletoe species. *Phytomedicine*. 2021 ; 91 : 153667.
 10. Yanaso S, Phrutivorapongkul A, Hongwiset D, Piyamongkol S, Intharuksa A. Verification of Thai ethnobotanical medicine “Kamlang Suea Khrong” driven by multiplex PCR and powerful TLC techniques. *PloS one*. 2021 ; 16(9) : e0257243.
 11. Noh P, Kim WJ, Yang S, Park I, Moon BC. Authentication of the herbal medicine *Angelicae Dahuricae Radix* using an ITS sequence-based multiplex SCAR assay. *Molecules*. 2018 ; 23(9) : 2134.
 12. Korea Institute of Oriental Medicin. *Korean Medicinal Materials*. Daejeon : Korea Institute of Oriental Medicine. 2014 ; 1 : 125, 127, 129.
 13. Kim WJ, Yang S, Choi G, Park I, Noh P, Lee AY, Kim HS, Moon BC. Establishment of conventional PCR and real-time PCR assays for accurate, rapid and quantitative authentication of four mistletoe species. *Phytochemistry*. 2020 ; 176 : 112400.
 14. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. *PCR protocols: a guide to methods and amplifications*. New York : Academic Press. 1990 : 315–322.
 15. Jo KI, Yoon JH, Kim YS, Ju YS. A study on the identification key of medicinal herbs used as bangki. *The Korea Journal of Herbology*. 2017 ; 32(6) : 49–54.
 16. Cho YD, Han HS, Lee YJ. A study on a morphological identification of *Sinomenium acutum*, *Cocculus trilobus* and *Aristolochia fangchi*. *The Korea Journal of Herbology*. 2007 ; 22(2) : 109–14.
 17. Kim WJ, Yang S, Choi G, Park I, Noh P, Kim MJ, Moon BC. Accurate and rapid identification of Longan Arillus and Litchi Semen by a multiplex PCR assay. *Plants*. 2020 ; 9(8) : 948.
 18. Park I, Song JH, Yang S, Moon BC. Comparative analysis of *Actaea* chloroplast genomes and molecular marker development for the identification of authentic *Cimicifugae Rhizoma*. *Plants*. 2020 ; 9(2) : 157.
 19. Kim WJ, Yang S, Choi G, Moon BC. Peptide nucleic acid based molecular authentication for identification of four medicinal *Paeonia* species using melting array analysis of the internal transcribed spacer 2 region. *Molecules*. 2017 ; 22(11) : 1922.
 20. Zhao LL, Feng SJ, Tian JY, Wei AZ, Yang TX. Internal transcribed spacer 2 (ITS 2) barcodes: A useful tool for identifying Chinese *Zanthoxylum*. *Applications in plant sciences*. 2018 ; 6(6) : e01157.