pISSN 1229-1153 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 30, No. 3, pp. 289~294 (2015)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2015.30.3.289

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

유전자 마커를 이용한 하수오, 백수오 및 이엽우피소 종 판별법 개발

김규헌† · 김용상† · 김미라 · 이호연 · 이규하[1] · 김종환[1] · 성락선[1] · 강태선* · 이진하 · 장영미
식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 신종유해물질팀, [1]식품의약품안전평가원 생약연구과

Development of Primer Sets for the Detection of *Polygonum multiflorum*, *Cynanchum wilfordii* and *C. auriculatum*

Kyu-Heon Kim†, Yong-Sang Kim†, Mi-Ra Kim, Ho-Yeon Lee, Kyu Ha Lee[1], Jong Hwan Kim[1], Rack Seon Seong[1], Tae Sun Kang*, Jin-Ha Lee, and Young-Mi Jang
New Hazardous Substance Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, [1]Herbal Medicine Research Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation
(Received April 6, 2015/Revised June 10, 2015/Accepted July 24, 2015)

ABSTRACT - The aim of this study was to develop rapid screening method for the identification of Chinese herbal medicine species with similar appearance, *Polygonum multiflorum*, *Cynanchum wilfordii* and *C. auriculatum,* by using genetic markers. As a genetic marker, *psbA-trnH* gene in chloroplast was selected due to differences in sequence among the three species. Species-specific primers were designed based on the sequences of the marker gene of *P. multiflorum*, *C. wilfordii*, and *C. auriculatum*, and the expected size of PCR products was 160, 147, and 119 bp, respectively. Under the developed conditions, cross-reaction was not detected among these three plant species. To confirm the efficiency of our species-specific primers, the optimized method was applied to a variety of processed products composed of mostly *P. multiflorum* and *C. wilfordii*, demonstrating that our method was a rapid and easy screening assay. Our findings suggest this screening method can be utilized to prevent the distribution of economically motivated adulteration food and to improve consumer's right.

Key words : species-specific primer, PCR (polymerase chain reaction), adulterated food

중국의 중약대사전과 중약지(中藥志)에는 백수오 기원식물(起源植物)로 은조롱 (격산소, *Cynanchum wilfordii* hemsley), 이엽우피소(耳葉牛皮消, *C. auriculatum* Royle ex Wight) 및 대근우피소(*C. bungei* Dence)가 수재되어 있으나[9,13,14], 우리나라의 「대한민국약전외한약(생약)규격집」에는 기원식물로 은조롱만이 규정되어 있다. 우리나라에서 백수오로 널리 재배된 은조롱은 지주설치 비용과 노동력이 많이 소요될 뿐만 아니라 생산성이 낮아 농가에서 재배를 기피하여 왔는데[13,14], 1990년대 초반에 수량성이 높은 이엽우피소가 중국으로부터 도입되면서 대부분의 농가에서 은조롱 대신 이엽우피소가 재배되고 있는 실정이다. 한국, 중국, 일본 및 북한의 약전 혹은 규격집에 수재된 하수오는 *Polygonum multiflorum*를 기원식물로 하며, 백수오는 한국과 북한의 약전 혹은 규격집에 *C. wilfordii*를 기원식물로 수록하고, 중국과 일본에서는 수재하고 있지 않다. 이렇게 규정과 현실이 일치되지 않는 문제가 있어 이를 해결하기 위한 연구가 절실히 요구되고 있다[3,14]. 또한 백수오는 하수오(*P. multiflorum* Thunberg)와 식물분류학적 위치와 유효성분이 서로 다름에도 불구하고 우리나라의 생약시장, 민간요법 및 임상에서 하수오라는 이름으로 혼용됨으로써 큰 혼란이 야기되는 생약이다. 뿐만 아니라 백수오(은조롱)와 이엽우피소는 박주가리(*Metaplexis japonica* Makino)와 성숙기의 열매와 종자가 매우 유사하여 생약에 관심을 갖는 이들에게 혼동을 야기시키므로 이들을 정확히 구분할 수 있는 식별방법(識別方法) 개발이 필요하다. 백수오의 이명을 백하수오라 하여 하수오로 오용되기도 했으나 백수오와 하수오는 기원과 함유 성분이 전혀 다르므로 혼동해서는 안 된다. 국내에 재배되고 있는 동속식물 이엽우피소가 백수오로 혼입되어 유통되고 있으므로

†These authors contribute equally to this work
*Correspondence to: Tae Sun Kang, New Hazardous Substance Team, Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, 187 Osongsaengmyeong2-ro, Osong-eup, Heungdeok-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do 363-700, Korea
Tel: 82-43-719-4454, Fax: 82-43-719-4450
E-mail: missa1976@gmail.com

주의해야 한다. 이엽우피소는 긴 원기둥 모양 혹은 방추형이며 조금 구부러져 있는 것이 백수오와 형태가 매우 비슷하나[12,14,21], 기원・성상 부적합에 따른 식품원료 불가 품목이며, 임신 중인 돼지가 이엽우피소 섭취 시 유산을 야기한다는 보고가 있어 U.S. FDA는 이엽우피소를 독성 식물로 분류하였다[5](FDA Poisonous Plant Database; http://www.accessdata.fda. gov/scripts /Plantox /Detail.CFM?ID=11513). 건강식품 및 보조제의 원료로 사용되는 하수오 및 백수오는 대근을 사용하므로 일반인이 이엽우피소와 구분하기가 어려우며, 특히 분말이나 추출물 형태로 가공되기 때문에 혼입여부를 판별하는 것이 극히 어렵다. 식물의 종을 정확하고 신속하게 판별하기 위해 외부 요소에 영향을 받지 않는 DNA 마커를 활용한 방법이 최근 주요 작물을 대상으로 활발히 연구되고 있다. DNA 마커를 이용한 방법은 식물체의 모양과 크기 등 형태적 특성과 달리 외부 환경의 영향을 받지 않고 식물의 종을 구분할 수 있으며, 사용할 수 있는 마커 수의 제한이 없어 정확한 판별이 가능하다[9-11,14].

분자생물학 및 유전자 분석 기술의 발달로 Polymerase Chain Reaction (PCR)을 통해 DNA 염기서열 차이를 이용한 종 판별이 가능하게 되었다. 특히, 종 특이 프라이머를 이용한 PCR법은 종간 판별은 물론 동종 내에서의 판별이 가능한 방법으로 식품원료 진위 판별에 주로 이용되고 있다[16,23-25]. 유전자는 모든 동・식물의 조직 내에 존재하며 식품 제조・공정 중 처리되는 압력, 고열 등에 대한 안정성이 단백질 보다 비교적 높은 장점이 있다. 유전자를 이용하는 방법 중 일반 프라이머를 이용하여 특정 유전자 영역을 증폭한 후 염기서열 분석을 통해 정확한 종 판별하는 것이 가장 일반적인 방법이지만, 염기서열 분석 시간이 비교적 길고, 유전자은행과 같은 데이터베이스에 염기서열 정보가 등록되어 있지 않으면 정확한 시료 동정이 어렵다. 또한 비교적 긴 주형 DNA를 요구하기 때문에 열로 인해 DNA 손상 가능성이 있는 열처리 가공식품에서의 식품원료 종 판별에 한계가 있다. 최근 종 특이 프라이머를 이용한 종 판별법에 대한 관심이 높아지고 있는데, 특정 유전자 염기서열에만 반응하여 증폭시키는 프라이머를 개발하여 식품 중 식물성 원료의 진위 여부를 판단하는데 이용된다[1,17,19,20,26,27].

본 연구에서는 하수오, 백수오 및 이엽우피소의 종 판별을 위하여 엽록체 내 *psbA-trnH* 유전자를 대상으로 종 특이적 프라이머를 개발하였고 최적의 PCR 조건을 확립하였다. 또한, 개발된 판별법을 다양한 형태로 가공된 하수오, 백수오 원료 및 제품에 적용하여 그 효율성을 확인하였다.

Materials and Methods

시료 확보 및 전처리

본 연구에서 사용된 하수오(*P. multiflorum*), 백수오(*C. wilfordii*) 및 이엽우피소(*C. auriculatum*) 3종은 식품의약품안전평가원 생약연구과에서 제공받아 표준시료로 사용하였으며, 프라이머의 적용 실험에 사용된 하수오 제품(4종), 백수오 제품(5종)은 제품 형태별 무작위 선별 후 구입하여 이용하였다. 표준시료를 이용하여 혼합 시 결과를 확인하기 위해 가루 형태의 백수오에 이엽우피소를 0%, 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 50% 비율(w/w)로 혼합하여 각각의 유전자를 추출하였고, 제품 중 즙 형태의 경우 20,000 × g에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 침전물만을 건조하여 시료로 사용하였다.

유전자 추출

유전자 추출은 DNeasy Plant mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 사용하였고, 추출 방법은 제조사에서 제공하는 방법에 따라 추출하였다.

유전자 단순 증폭

시중에 판매되고 있는 백수오 및 하수오 제품을 대상으로 본 연구에서 개발한 진위 판별법을 적용하기 위하여 유전자를 추출하였다. 하지만 가공 공정에 따른 가열 및 강압으로 DNA가 파괴 및 손실 됨에 따라 추출된 DNA양이 0.1 ng/μl 이하로 PCR이 불가능 하였다. 따라서, PCR로 증폭이 가능한 DNA 단편들의 양을 증가시키고, PCR 반응을 저해 할 수 있는 물질들의 비율을 감소시키기 위해 유전자의 단순 증폭 실험을 추가 진행 하였다. 본 실

Table 1. Information of species-specific primer used in this study

Species	Name	Primer sequence (5'-3')	PCR product size (bp)	Target gene
Polygonum multiflorum	PM-F	AAGTTTTCCTTACCTTACCCATTA	160	*psbA- trnH*
	PM-R	AACCAAAACACCAAAGAGGCC		
Cynanchum wilfordii	CW-F	ATATTATATTCTAAAATTAGAT	147	
	CW-R	CTCTATTTCTATTTCTAT		
C. auriculatum	CA-F	AATTGAATTTAAAAATTCAATACA	119	
	CA-R	GTTCTATTTCTATTTATTTTTAT		

험에서는 유전자의 단순 증폭을 하기 위하여 Whole Genome Amplification kit (WGA, Sigma, USA)를 사용하였다. 실험 방법은 제조사에서 제공하는 방법에 따라 증폭을 수행하였고, 최종 증폭된 산물은 AccuPrep® PCR Purification Kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 정제한 후 종 특이 프라이머를 이용한 진위 판별 PCR실험에 사용하였다.

종 특이 프라이머 설계

종 특이 프라이머 설계를 위해 미국 국립보건원에서 운영하는 유전자 은행에 등록되어 있는 하수오, 백수오 및 이엽우피소에 대한 엽록체와 핵 내 유전 정보를 확인하였다. 유전자 은행에 유전 정보가 없는 백수오의 ITS유전자, 이엽우피소의 *trnH-psbA*유전자의 경우 일반 프라이머(universal primer)를 이용하여 유전자를 증폭한 후 염기서열을 결정하고 그 결과를 비교하여 종 특이 프라이머를 설계하였다. 설계한 프라이머는 바이오니아(Bioneer, Korea)에 의뢰하여 합성하였다(Table 1).

PCR 반응 및 결과 확인

PCR을 위한 반응액의 조성은 추출한 주형 DNA 20~100 ng/μl, dNTPs 200 μM, $MgCl_2$ 2.0 mM 그리고 0.5 μM 의 정방향 및 역방향 프라이머 각각 1 μl를 혼합하였으며, 최종 용량은 20 μl가 되도록 증류수를 첨가하였다. 유전자 증폭을 위해 *Taq.* DNA polymerase 및 dNTPs, $MgCl_2$은 Takara사(Japan)에서 구매하였고, PCR 장비는 C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-RAD Laboratories, Inc. USA)을 사용하였다. 본 연구에서 개발된 종 특이 프라이머의 염기서열 및 검출을 위한 최적의 PCR 반응조건은 Table 2에 나타내었다. 또한 이엽우피소의 검출 한계를 확인 하기 위하여 이엽우피소 DNA 20 ng/μl 를 10배 단위로 희석하여 PCR실험을 진행하였다. 최종 산물의 확인은 반응액 5 μl를 취하여 EtBr이 첨가된(1 μl/ml) 아가로즈 젤로 100 V, 30분간 전기영동 하였다. PCR 산물의 크기 확인은 100 bp DNA ladder (Bioneer, Korea)를 사용하였으며, 전기영동 완료 후 UV 투영기를 이용하여 결과를 확인하였다.

Table 2. Information of PCR condition used in this study

Item	Step	Temperature	Time	Cycles
Polygonum multiflorum	Initial denaturation	94ºC	5 min	1
	Denaturation	94ºC	30 sec	40
	Annealing	62ºC	5 sec	
	Extention	72ºC	20 sec	
	Elongation	72ºC	7 min	1
Cynanchum wilfordii	Initial denaturation	94ºC	5 min	1
	Denaturation	94ºC	30 sec	40
	Annealing	42ºC	30 sec	
	Extention	72ºC	1 min	
	Elongation	72ºC	7 min	1
C. auriculatum	Initial denaturation	94ºC	5 min	1
	Denaturation	94ºC	20 sec	45
	Annealing	38ºC	1 mim	
	Extention	72ºC	30 sec	
	Elongation	72ºC	7 min	1

Results

종 특이 프라이머 설계

하수오, 백수오 및 이엽우피소의 종 특이 프라이머를 설계하기 위하여 식물의 분자계통분류학적 연구에 유전자 마커로 주로 이용되고 있는 *rbcL*, *psbA-trnH* 그리고 ITS 등의 유전자 염기서열을 비교 하였다. 하지만 유전자 내 변이가 적은 *rbcL*, ITS의 경우 하수오와 백수오의 종간 구분은 가능했지만, 백수오 및 이엽우피소와 같은 근연종의 경우 염기서열 차이가 적어 종 특이 프라이머 설계에 적용하기가 어려웠다. 본 연구에서는 엽록체 유전자 중 종간 염기서열 차이가 분명하여 하수오, 백수오 및 이엽우피소의 구별이 가능한 *psbA-trnH*를 마커 유전자로 선택하고 종 특이 프라이머를 설계하였다[2,18,22,26]. 또한 건강기능식품 등과 같은 가공식품의 경우 고온, 강압 등의 단계를 거쳐 제조・가공되므로 가공 시 발생하는 DNA 절단 및 파괴 등의 손상을 고려하여 PCR 산물의 크기는 200 bp 내외가 되도록 프라이머를 설계하였고, 이를 이용하여 PCR 조건을 최적화 하였다(Table 1).

PCR 조건 최적화 및 확인

각각의 종 특이 프라이머를 사용하여 최적화 된 조건으로 PCR을 수행한 결과, 하수오(*P. multiflorum*), 백수오(*C. wilfordii*), 이엽우피소(*C. auriculatum*)에서 각각 160, 147, 119 bp의 예상된 크기의 증폭 산물을 확인 할 수 있었고, 각각의 대상 종 이외의 비교 종에서 비 특이적 밴드는 생성되지 않았다(Fig. 1). 또한, 백수오와 이엽우피소 혼합 실험에서는 2% 이상의 이엽우피소가 혼합 되었을 때 개발된 종 특이 PCR방법으로 이엽우피소 유전자를 검출할 수 있었으며(Fig. 2), 최적화된 PCR 조건하에서 이엽우피소의 검출 한계는 0.2 ng/μl 이었다.

가공식품에 대한 적용

하수오, 백수오 및 이엽우피소 종 특이 판별법의 가공식품 적용성을 확인하기 위해 시중에 판매중인 가공식품 9건(하수오 제품 4건, 백수오 제품 5건)을 무작위 선별 후 구매하여 분석하였다. 제조공정 중 발생할 수 있는 고온 및 고압으로 인하여 소량의 유전자가 추출 되었으며(0.1 ng/ul 이하), 추출된 DNA 양은 제품의 유형(즙, 분말 등)

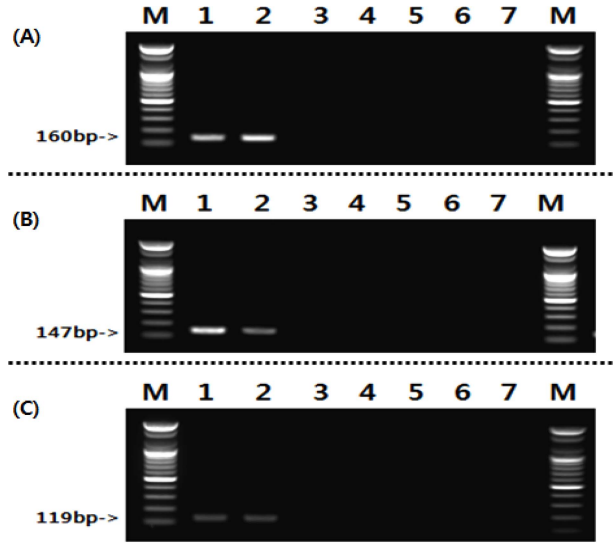

Fig. 1. PCR results from various standard samples by PCR using *Polygonum multiflorum*, *Cynanchum wilfordii* and *C. auriculatum* specific primers. (A) Lane 1,2; *P. multiflorum,* Lane 3,4; *C. wilfordii,* Lane 5,6; *C. auriculatum.* (B) Lane 1,2; *C. wilfordii,* Lane 3,4; *P. multiflorum,* Lane 5,6; *C. auriculatum.* (C) Lane 1,2; *C. auriculatum,* Lane 3,4; *P. multiflorum,* Lane 5,6; *C. wilfordii,* Lane 7; Negative Control. M: Size marker.

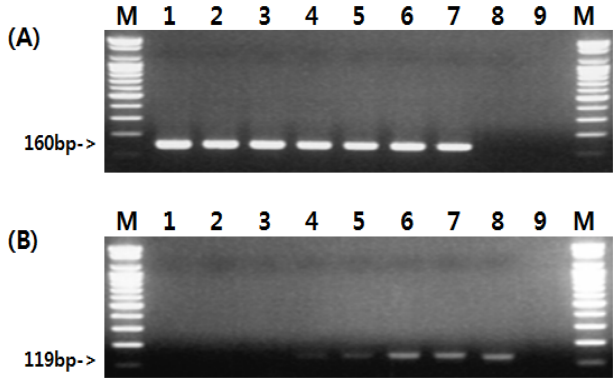

Fig. 2. The PCR detection of *C. auriculatum* adulteration into *C. wilfordii* presented in ratio of 0%, 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 50% and 100% (A) *C. wilfordii* specific primer, (B) *C. auriculatum* specific primer(*C. auriculatum* adulterattion ratio 0% (Lane 1), 0.5% (Lane 2), 1% (Lane 3), 2% (Lane 4), 5% (Lane 5), 10% (Lane 6), 50% (Lane 7), 100% (Lane 8), Negative Control (Lane 9), Size marker (M).

에 따라 차이가 있었다. 때문에 WGA kit를 이용하여 추출된 DNA를 단순 증폭 후 종 특이 PCR실험에 사용하였으며 결과를 Table 3에 정리하였다. 하수오 제품의 경우 즙 형태 및 분말형태에서 모두 하수오의 유전자가 확인되었는데, 2개의 제품에서 백수오 유전자도 확인이 되었다. 또한, 모든 백수오 제품에서 백수오 유전자가 확인 되었으며 1개의 즙 형태 제품에서 하수오 유전자가 확인 되었다. 반면, 모든 하수오 및 백수오 제품에서 이엽우피소 유전자는 확인되지 않았다. 본 연구를 통하여 개발된 종 특이 프라이머는 하수오, 백수오 및 이엽우피소의 원료 및 가공품을 대상으로 향상된 종 판별법을 보였으나, 정성분석법의 한계상 일부 백수오 및 하수오 가공품에서 보여진 교차 확인 사례의 원인은 동일한 생산라인의 사용으로 인한 비의도적 혼입인지 또는 단가를 절감하기 위한 의도적 혼합인지는 판단 할 수 없었다.

Table 3. The type of classified health functional food of purchased samples in markets and PCR results using *Polygonum multiflorum, Cynanchum wilfordii, C. auriculatum* specific primers

Type of health functional food		PM[1)]	CW[2)]	CA[3)]
Polygonum multiflorum	A, juice type	+	-	-
	B, juice type	+	+	-
	C, powder type	+	-	-
	D, powder type	+	+	-
Cynanchum wilfordii	E, pill type	-	+	-
	F, juice type	-	+	-
	G, juice type	+	+	-
	H, juice type	-	+	-
	I, powder type	-	+	-

[1)]*Polygonum multiflorum,* [2)]*Cynanchum wilfordii,* [3)]*C. auriculatum* specific primer.

Discussion

언론을 통해 하수오 및 백수오의 효능이 소개되고 기능성 생약으로서 관심이 높아지면서 하수오 및 백수오와 가짜 백수오로 알려진 이엽우피소를 판별하기 위한 다양한 분석법이 개발 중에 있다. 유전자를 이용한 분자생물학적 종 판별 연구는 대표적인 분석방법으로, 선행 연구에서 하수오, 백수오 및 이엽우피소의 종 판별을 위해 *trnL* (tRNA-Leu)유전자를 마커로 한 multiplex-PCR기반의 분석법을 보고한 바 있다[15]. Multiplex-PCR을 이용한 판별법은 생약원물의 경우 손쉽게 하수오, 백수오 및 이엽우피소를 동시에 검출할 수 있지만, 하수오, 백수오 및 이엽우피소 외의 다양한 식품원료가 포함된 가공식품의 경우 정확한 종 판별이 어렵다는 한계가 있다. 종 특이 프라이머를 이용한 분석법은 multiplex-PCR 기반의 방법이 가지고 있는 한계를 극복할 수 있는 하나의 대안이어서, 특정 유전자 염기서열에만 반응하여 증폭시키는 프라이머를 개발하여 식품 중 식물성 원료의 진위 여부를 판단하는데 이용되고 있다[24,25].

본 연구에서 개발된 하수오, 백수오 및 이엽우피소에 대한 종 특이 프라이머는 육안으로 사용원료의 확인이 어려운 가공식품 등을 대상으로 간단하고 정확하게 특정 사용원료의 진위 여부를 확인할 수 있다. 또한 식품의 가공 중

발생 할 수 있는 유전자 손상을 고려하여, 최종 증폭 산물의 크기를 200 bp 내외가 되도록 프라이머를 설계하였으며, 이는 일반 프라이머가 가지고 있는 가공식품 적용 한계를 극복할 수 있을 것이라 판단된다. 하지만 본 연구에서 개발한 유전자 분석법은 의도적/비의도적 혼입에 대한 정확한 판단이 어렵다는 한계가 있어, 추후 종 특이 프라이머를 이용한 정량분석법 개발 등의 보안이 필요하다. 따라서 이러한 사항이 보안되어 개발된 판별법을 활용한다면, 건전한 식품제조업체를 보호하고 정확한 표시사항 준수를 통한 소비자 보호와 불량식품 근절에 적극 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 식품의약품안전평가원 2015년도 연구개발사업지원비(15161불량식073)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구에서는 건강기능성 식품원료로서 이용 빈도가 증가하고 있는 하수오, 백수오 및 이엽우피소에 대한 종 특이 프라이머를 개발하였다. 개발된 종 특이 프라이머는 하수오, 백수오 및 이엽우피소에 대해 원물뿐만 아니라 육안 확인이 어려운 가공식품 등을 대상으로 사용원료의 진위여부를 빠르고 정확하게 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 개발한 종 특이 PCR방법은 기존의 일반 프라이머를 사용하는 방법이 가지고 있는 식품 적용 한계를 극복할 수 있을 것이라고 판단하였다.

References

1. Chase M.W., Cowan R.S., Holling sworth P.M., Van den Berg C. and Madrinan S.: A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon*, **56**, 295-299 (2007).
2. Chen S., Yao H., Han J., Liu C., Song J., Shi L., Zhu Y., Ma X., Gao T., Pang X., Luo K., Li Y., Li X., Jia X., Lin Y. and Leon C.: Validation of the ITS2 region as a Novel DNA barcode for identifying medicinal plant species., *PLoS One*, **5**, e8613 (2010).
3. Choi H.S., Zhu M.F., Kim C.S. and Lee J.H.: Studies of name and herbal origins of Ha-Soo-Oh. *Korean Journal of Oriental Medicine*, **9**, 81-91 (2003).
4. Focke F., Haase I. and Fischer M.: DNA-Based identification of Spices: DNA Isolation, Whole Genome Amplification, and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 513-520 (2011).
5. Han J., Luan D.H.: Sow abortion caused by feeding *Cynanchum auriculatum*. *Anim Husb Vet Med Xumu yu Shouyi*, **16**(6), 266 (1984).
6. Harmer J.E., Farrall L., Ortach M.J., Valent B. and Chunmley F.G.: Host species-specific conservation of a family of repeated sequence in the genomic of a fungal plant pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 9981-9985 (1989).
7. Hebert P.D.N., Cywinska A., Shelley L.B. and Jeremy R.: Biological identifications through DNA Barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, **270**, 313-321 (2003).
8. Herbert P.D.N., Retnasingham S., and DeWaard J.R.: Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species., *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, **270**, 96-99 (2003).
9. Hwang T.Y., Seo M.J., Lee S.K., Park H.M., Jeong K.H., Lee Y.Y., Kim S.L., Yuu H.T., Lee J.E. and Kim D.W.: Discrimination of 110 Korean soybean cultivars by sequence tagged sites(STS)-CAPS markers. *Korean Journal of Breeding Science*, **3**, 258-272 (2012).
10. Innocenzo M., Massimiliano P. and Enzo P.: Detection of DNA in virgin olive oils extracted from destoned fruits. *European Food Research and Technology*, **224**, 469-475 (2007).
11. Jo I.H., Bang K.H., Kim Y.C., Kim J.U., Shin M.R., Moon J.Y., Noh B.S., Hyun D.Y., Kim D.H., Cha S.W. and Kim H.S.: Analysis of mitochondrial DNA sequence and molecular marker development for identification of *Panax* species. *Korean Journal of Medicinal Crop Sciences*, **21**, 91-96 (2013).
12. Kim H.K., Kim Y.A., Lee A.Y. and Ko B.S.: Pattern analysis of *Cynanchi wilfordi* Radix and *Polygoni multiflori* Radix. *Korea Journal of Pharmacognosy,* **34**(4), 278-281 (2003).
13. Kim M.J., Song B.H., Nam S.Y, Kim I.J., Lee C.H. and Yun T.: Effects of non-supporting methods on growth and yield of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight. *Korean Journal of Medicinal Crop Sciences*, **13**, 268-272 (2005).
14. Kim M.J., Kim I.J., Choi S.Y., Han D.H., Kim Y.H., Lim S.C., Kim T.J., Nam S.Y., Song B.H., Oh B.U. and Park C.G.: Comparison of *Cynanchum wilfordii*, C. *auriculatum*, *Metaplexis japonica* and *Polygonum multiflorum* by morphological characters. *Korean Journal of Medicinal Crop Sciences*, **22**, 113-120 (2014).
15. Kim M.K., Wang H., Kim Y.j., Sathiyamoorthy S., Kwon W.S. and Yang D.C.: Molecular authentication by multiplex-PCR of three similar medicinal plant species:*Cynanchum wilfordii*, *Cynanchum auriculatum* and *Polygonum multiflorum* (*Fallopia multiflorum*). *Journal of Medicinal Plants Research,* **7**(35), 2584 -2589 (2013).
16. Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A., Edwards S.V., Paabo S. and Vellablanca F.X.: Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 6196-6200 (1989).
17. Kress W.J., Wurdack K.J., Zimmer E.A., Weigt L.A. and Janzen D.H.: Use of DNA barcodes to identify flowering plants.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **102**, 8369-8374 (2005).
18. Kress W.J. and Erickson D.L.: A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding rbcL gene complements the non-coding trnH-psbA spacer region. *PLoS One*, **2**, e508 (2007).
19. Kress W.J. and Erickson D.L.: DNA barcodes : genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 2761-2762 (2008).
20. Lahaye R., Van der Bank M., Bogarin D., Warner J. and Pupulin F.: DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* **105**, 2923-2928 (2008).
21. Moon B.C. and Choo B.G.: Gene marker for classification of *Polygonum multiflorum* Thungerg, *Cynanchum wilforid* Max. Hemsl and *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight. *KR,* 10-2009-0123113 (2009).
22. Olmstead R.G., Reeves P.A.: Evidence for the polyphyly of the Scropulariaceae based in chloroplast *rbcL* and *ndhF* sequence. Ann. Missouri Bot. Gard., **82**, 176-193 (1995).
23. Park Y.C., Jin S.O., Kim M.R., Kim K.H., Lee J.H., Cho T.Y., Lee H.J. and Han S.B.: Detection Method for Identification of *Pueraria mirifica* (Thai kudzu) in Processed Foods. *Journal of Food Hygiene and Safety*, **27**, 466-472 (2012).
24. Park Y.C., Jin S.O., Lim J.Y., Kim K.H., Lee J.H., Cho T.Y., Lee H.J., Han S.B., Lee S.J., Lee K.H. and Yoon H.S.: Application for identification of food raw materials by PCR using universal primer. *Journal of Food Hygiene and Safety*, **27**, 317-324 (2012).
25. Park Y.C., Lim J.Y., Kim M.R., Park Y.E., Lim J.D., Hwang C.R., Kim K.H., Lee J.H., Cho T.Y., Lee H.J., Lee S.J. and Han S.B.: Identification of faulty red pepper powder containing seasoned red-pepper sauce. *Journal of Food Hygiene and Safety,* **27**, 182-187 (2012).
26. Tomoaki M., Atsushi A., Takuma T., Sumitaka Y., Yutaka O. and Yoshida M.: Identification of animal species using the partial sequences in the mitochondrial 16S rRNA Gene. *Legal Medicine*, **11**, 449-450 (2009).
27. White J.J., Bruns J., Lee S. and Taylor J.: Amplification and direct sequencing of fungus ribosomal RNA genes for phylogenics. A guide to methods and application. *Academic press*, 315-322 (1990).