

최 종
연구보고서

주요 신품종의 유전적 마커확인을 위한
SNP primer의 활용기술개발

Development of a Molecular Technique
using SNP Primers for Genetic Marker
Identification

경 희 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “주요 신품종의 유전적 마커확인을 위한 SNP primer의 활용기술개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 7 월 13일

주 관 연구 기 관 명 :

경희대학교

총괄연구책임자 :

교 수 : 양덕춘

책임연구원 : 김무성

연구 원 : 이은경

연구 원 : 박종산

연구 원 : 김도완

연구 원 : 성락금

연구 보조원: 손 화

연구 보조원: 김학범

연구 보조원: 장현숙

연구 보조원: 김목경

협동연구기관명 :

강원대학교

협동연구책임자 :

교 수 : 임 학 태

연구 보조원: 김태주

연구 보조원: 강창원

요 약 문

I. 제 목

주요 신품종의 유전적 마커확인을 위한 SNP primer의 활용기술개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

인삼의 약리성분은 1854년 미국산 인삼 (*Panax quinquefolium*)뿌리에서 일종의 사포닌 혼합물인 무정형 물질을 분리하면서 인삼의 유효 성분 에 대한 과학적 연구가 시작되었고 인삼의 화학적 활성 성분 연구가 본격적으로 시작된 것은 1957년 소련의 Brekhman에 의해 사포닌 배당체 (glycoside)가 인삼의 약효 성분임을 강조함으로써 사포닌에 대한 집중적인 연구가 이루어져 1960년대에 이르러 생화학적 분야에서 많은 연구가 활발히 수행되었다. 현재 National Center for Biotechnology Information(NCBI)에는 오가과(五加科, *Araliaceae*) 인삼속(*Panax*)에 속하는 15 종의 *Panax* species에 대한 유전정보가 등록되어 있다. 이들 중 상업화되어 재배되고 있는 것으로는 한국의 고려인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer), 중국의 전칠삼 (*Panax notoginseng* F.H. Chen), 일본의 죽절삼 (*Panax japonicus* C.A. Meyer) 그리고 미국 및 캐나다의 화기삼 (*Panax quinquefolium* L.)등이 있다 (Kwak *et al.*, 2003). 국내에서 고려인삼 재배현황을 보면 품종 개량 전 재래 혼계종인 자경종이 주로 재배되어 왔다. 자경종은 일부 타가수정을 하기 때문에 개체마다 지상부 주요형질인 줄기와 잎의 유전형질이 다른 특성을 가지고 있고, 이러한 특성은 출아, 전엽, 개화 및 결실과 같은 생육에서 다른 양상을 나타내 균일한 생육이 되지 못했다(Kwon *et al.*, 1998). 따라서 순도율이 높고 안정한 인삼의 육종을 위하여 1965년부터 김포, 강화 및 포천 등을 중심으로 개체선발에 의한 품종육성이 시도되었으며 선발된 개체를 계통육성하고, 이들 계통 중 품질이나 수량성이 높은 계통을 2

세대 및 3세대 증식과정을 거쳐 생산력 검정시험에 공시하여 우수 품종 가능성이 높은 유망계통을 선발하였다. 선발된 계통은 지역적응시험을 실시하고 최종적으로 농가에서 실증재배 시험을 수행하여 생산성을 검증하였다. 이러한 과정을 거쳐 1998년에 국내에서는 최초로 인삼 신품종 천풍과 연풍이 등록되었으며 2000년부터 고품, 금풍, 선풍 등 신품종이 계속적으로 등록되었다 (Kwon *et al.*, 1998; Kwon *et al.*, 2000). 그 중 천풍은 다른 신품종과 비교하여 생장이 우수하고 균일성이 높아 천삼제조에 가장 적합하여 최근 재배농민들로부터 선호도가 가장 높은 인삼 품종이다. 그러나 순도율이 67%로 낮아 신품종 종자관리 대책이 필요하다는 보고가 제시된바 있다 (Lee *et al.*, 2005). 또한 형태학적 구별방법에 의해서 등록되어 있고 유전적인 마커가 없기에 외부종자 혼입에 의한 순도율 저하를 막기가 어렵다. 그러므로 천풍을 판별할 수 있는 유전적인 분자 마커의 개발이 절실히 요구되고 있는 상황이다. 현재 인삼 품종구별을 위해서 사용되고 있는 분자생물학적 방법은 주로 random amplified polymorphic DNA (RAPD), polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), multiplex PCR, inter simple sequence repeat (ISSR) 등이 있다. 그러나 이들 방법은 품종 특이적인 마커 선발의 어려움과 재현성있는 결과를 얻기 어려워 유연관계가 근접한 인삼 품종간의 구별이 쉽지 않는 상황이다. 본 연구에서는 인삼의 품종구별을 위한 분자마커 개발을 위해서 최근 인간의 질병진단 및 신약개발 분야에서 많이 이용되는 single nucleotide polymorphism (SNP) 방법을 이용하였다. SNP는 유전적 변이의 원인으로 알려진 단일 염기변이를 말하는 것으로, 사람의 경우 1,200~1,500 bp의 염기에 하나 비율로 나타나고 있다. 하지만 인삼처럼 혼계종으로 단기간에 순계분리를 통하여 육성된 유사한 품종을 구별할 수 있는 SNP를 찾기는 쉽지 않다. 따라서 4년근 천풍의 뿌리로부터 cDNA library를 제작하여 분석한 EST 정보를 다른 인삼 품종의 EST와 비교·분석하여 천풍을 구별할 수 있는 분자마커 탐색을 실시하고자 후보 유전자를 선발하였고 다른 품종과 염기서열을 비교하여 SNP를 탐색하였다. 그리고 탐색한 SNP 부위를 이용하여 primer를 제작하고 PCR 분석을 통하여 신품종인 천풍과 기존에 재배되고 있는 인삼 품종을 구별하고자 본 연구를 실시하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

가. 인삼에서 SNP탐색 및 분석시스템의 개발

- 1) 인삼으로부터 마커(marker) 유전자의 선발 및 염기서열분석을 통한 SNP 탐색
 - (1) 인삼으로부터 marker 유전자의 선발 및 염기서열분석을 통한 SNP 탐색
 - (2) 효율적인 SNP primer 제작기술개발
 - (3) 최적의 SNP primer의 적용을 위한 PCR조건의 개발
 - (4) 선발된 marker 유전자를 통한 SNP primer 제작
 - (5) 개발된 SNP primer를 이용하여 간편하고 신속한 분석법의 개발
 - (6) SNP primer를 이용한 One-step 분석의 시제품개발
- 2) D/B검색을 통한 인삼의 SNP의 탐색
- 3) 신품종 재배인삼의 유전적 정체성 확인 연구
 - (1) 분자계통학적 기술을 이용한 분자유전학적 표지인자 기술확보연구
 - (2) 신품종 재배인삼과 비교군(지역별 전통 재배인삼, 수입인삼 등)간의 분자유전학적 유연관계 분석 연구

나. 인삼 및 감자의 SNP primer의 활용기술개발

- 1) 국내산 인삼 신품종 천풍에서 SNP primer의 활용
- 2) 신품종 감자에서 SNP primer의 적용가능성

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

가. 연구개발 결과

- 1) 인삼으로부터 마커(marker) 유전자의 선발 및 염기서열분석을 통한 SNP 탐색
 - (1) 인삼의 종 및 변종간의 유전적 다양성을 식물의 분류학적 연구에 이용하여 품종육성을 위한 기초자료로 활용하고자 인삼 조직의 DNA를 사

용하여 RAPD primer를 선정하고 RAPD양상을 조사하고자 수행되었다. 인삼의 RAPD를 수행함에 있어서 DNA분리에 이용되는 조직의 차이가 PCR이후 DNA band 양상에 어떠한 영향을 미치는 지를 조사하고자 포장에서 정상적으로 생육하고 있는 자경종에서 조직별로 시료를 채취한 후 primer를 사용하여 PCR을 수행하여 나타난 band의 양상은 모든 조직에서 동일한 band를 형성하였다. 50개의 서로 다른 10-mer random primer를 이용하여 band가 확실히 나타나는 18개의 primer를 선발하여 자경종, 풍기황숙, 중국삼, 미국삼의 DNA를 사용하여 PCR 증폭을 하였다. 그러한 PCR product를 1.2%의 Agarose gel에 전기영동하여 banding pattern에 따라 분석하였다. 이러한 RAPD 결과를 Cluster analysis 방법을 사용하여 similarity index(SI)로서 원연관계를 조사한 결과 자경종과 풍기황숙이 근연관계를 가졌고 중국삼은 자경종과 약간의 차이를 가졌으며 또한 자경종, 풍기황숙, 중국삼은 미국삼과 변이의 차이를 나타냈다.

- (2) DNA수준에서 인삼의 종내 및 종간 개체간의 유전변이를 확인할 수 있는 새로운 방법인 PCR-aided RFLP를 사용하여 품종육성의 기초자료로 삼고자 수행하였다. 인삼의 엽록체 DNA중 *psbA* gene과 *rbcL* gene을 제한효소처리하여 그 band 양상을 조사하였다. Chloroplast DNA중 *psbA* gene과 *rbcL* gene을 분리하기 위하여 각각 *psbA*-N, *psbA*-C primer 및 *rbcL*-N, PX-1 primer를 사용한 결과 적정 분자량인 *psbA* gene은 1,008bp에서, *rbcL* gene은 1,336bp에서 band가 나타났다. 또한 *atpB* gene, *rpoB* gene, *trn* gene을 분리하기 위한 primer를 사용한 결과 역시 예상대로 1,366bp, 900bp, 1,500bp, 1,008bp에서 band가 나타났다. PCR에 의하여 분리한 *psbA* gene과 *rbcL* gene을 *Sau3A*, *TaqI*, *AluI*, *HaeIII* 등의 제한효소로 절단하여 RFLP 양상을 조사한 결과 모든 인삼에서 *TaqI* 제한효소 처리구에서 KG Line 과 종 및 변종간 모두 절단이 되었으며 800bp에서 band가 위치하고 있다. *Alu I*의 제한효소 처리구에서도 KG Line과 유전자원에서 800bp의 동일한 band를 보였다. 제한효소 *HaeIII*에서는 KG Line의

경우 500bp의 위치에서 희미하게 band를 동일하게 보였다. 그러나 유전자원에 있어 *Hae*III 제한효소처리구에서는 band가 관찰되지 않아 KG Line과 차이를 보였다. 모든 chloroplast gene은 PCR 증폭에 의하여 밴드를 형성하였으나 제한효소 처리후 각 인삼종내 또는 종간 식별이 용이하지 않아서 좀 더 많은 제한효소를 사용하거나 증폭된 DNA를 염기서열을 분석하여 비교하는 방법이 고려 되어야 할 것으로 사료된다.

- (3) 인삼에서는 변이를 가지는 ITS영역을 탐색하여 유전적 변이를 가지는 SNP를 탐색하였다. SNP 부분을 이용하여 primer를 제작하여 PCR로 확인한 결과, 고려인삼과 외국삼에서 공통으로 나타나는 대조구 DNA 밴드(579bp)와 고려인삼에서만 나타나는 DNA 밴드(254bp), 외국삼에서 특이적으로 나타나는 DNA 밴드(325bp)가 나타나 고려인삼과 외국삼을 판별할 수 있었다(그림 4). SNP primer을 이용하면 고려인삼과 화기삼, 중국삼 등의 외국삼으로부터 소량의 시료를 채취하여 genomic DNA를 추출한 후 특수하게 제작된 SNP primer로 단시간에 재현성 있는 결과를 얻을 수 있으므로 국내에서 불법적으로 수입되어 판매되고 있는 외국삼을 판별함으로써 국내 인삼시장의 유통질서를 보다 명확하고 투명하게 하는데 크게 기여할 것이다.
- (4) 인삼근중 순계분리에 의하여 선발된 천풍과, 사포닌의 함량이 많은 연풍뿌리를 대상으로하여 UBC primer 중 실험결과 선발한 91종의 primer중 우선 36종을 대상으로 하여 RAPD분석을 하였던 바, 36종의 primer중에서 모두 band를 나타낸 것은 28종이었으며, 이중 6번(CCTGGGCCTA), 29번(CCGGCCTTAC), 33번(CCGGCTGGAA), 105번(CTCGGGTGGG), 125번(GCGGTTGAGG), 149번(AGCAGCGTGG), 157번(CGTGGGCAGG), 159번(GAGCCCGTAG), 174번(AACGGGCAGC), 177번(TCAGGCAGTC), 181번(ATGACGACGG)에서 천풍 및 연풍 계통간에 차이를 보였다. 181(ATGACGACGG), 218(CTCAGCCCAG), 220(GTCGATGTCG), 250 (CGACAGTCCC)번은 천풍에서 band를 형성하였고,

211(GAAGCGC GAT), 225(CGACTCACAG), 239(CTGAAG-CGGA), 248(GAGTAAG CGG) 에서는 연풍에서 band가 형성되었고 270(TGCGCGCGGG)번에서는 연풍에서 매우 진한 band가 형성되었으나 재현성이 매우 떨어졌다.

2) D/B검색을 통한 인삼의 SNP의 탐색

- (1) 5개의 cDNA library로부터 분석된 EST data를 BioEdit 프로그램을 이용하여 Local Blast 분석을 실시한 결과 연풍과 천풍의 EST 중에서 SNP로 추정되는 유전자의 염기서열들을 다수 확보하였으며, 그 중 DC03과 DC05에서 단염기 C와 T에서 차이 났고 기타 품종에서도 차이났다. DC03의 염기서열이 어떤 유전자에 속하는 지를 확인 하기 위하여 NCBI에서 Blast를 한 결과 이미 알고 있는 기타 식물들과 상동성이 많이 떨어졌으므로 어떤 유전자인지 확인하기 어려웠다. 영역에 존재하는 SNP의 명확성을 확인하기 위해서 이들 클론을 5'과 3' 영역에서 sequencing primer를 이용하여 full sequence를 확보하였다.
- (2) 인삼의 바이오마커를 찾기 위해서 고려인삼의 품종들에서 EST (expressed sequence tag)분석을 통하여 대량으로 확보한 cDNA sequence data에 대하여 BioEdit 프로그램을 사용하여 99% 상동성 있는 sequence data만을 수집한 후 그 중에서 SNP로 추정되는 sequence를 NCBI의 Blast 검색을 통하여 인삼 SNP를 탐색하였다.
- (3) 인삼 신품종간 SNP를 찾기는 매우 어려웠으나 인삼의 EST 20,000여 개를 bioinformatics에 의하여 SNP를 확인한 결과 천풍과 연풍, 고풍, 자경종, 황숙종에서 차이가 나는 염기서열을 확인하여 천풍 specific SNP를 확인하였다. 그러나 차이가 나는 EST는 unknown 유전자이었다. 반면에 연풍의 경우에도 다른 품종과 차이가 나는 연풍 specific primer를 확인하였는데, 이 유전자는 ADP-ribosylation factor gene으로 확인되었으며, 천풍의 경우에는 major latex protein homolog 유전자로 나타났다.

3) 신품종 재배인삼의 유전적 정체성 확인

- (1) 염기서열분석이 수행된 엽록체 DNA *trnL-F* region과 핵리보솜 DNA ITS region, ETS region의 영역은 기존에 발표된 sequence들과 비교하여 결정하였으며, ClustalX program, Autoassembly, Sequencer 등을 이용하여 일단 염기서열의 정확도와 sequence alignment를 실행 및 확인한 후, 최종적으로 육안에 의하여 결과를 검토하였으며, 각 분류군에 대한 색소체 DNA *trnL-F* region과 핵리보솜 DNA ITS region, ETS region의 유전정보를 요약하여 제시하였다.
- (2) 염기서열분석결과 얻어진 유전정보의 분석은 PHYLIP(Phylogenetic Inference Package, ver. 3.5c)내의 DNADIST program의 Kimura's two parameter에 의한 genetic distance matrix를 작성하였으며, PAUP*(Phylogenetic Analysis Using Parsimony) program을 이용하여 molecular phylogenetic tree를 작성하고, Jackknife analysis 및 bootstrap analysis를 수행하였다.
- (3) 본 연구의 주재료와 비교군으로 확정된 23분류군(국외산 4분류군 포함) 인삼에 대한 색소체 DNA *trnL-F* region과 핵리보솜 DNA ITS region 그리고 ETS region의 염기서열분석을 수행한 결과 총 1490개의 정렬된 염기서열자료가 확보되었고, 그 중에서 3개의 염기만이 한국산 인삼의 19개 strains을 구분할 수 있는 유용한 계통학적 정보를 갖는 것으로 확인되었다. 계통학적 분석을 통하여 대상 유전자별 및 결합정보를 이용한 최단거리의 계통도가 도출되었다. 색소체 DNA *trnL-F* region과 핵리보솜 DNA ITS region 그리고 ETS region의 염기서열에 기초한 최단거리계통도에 의하면, 비교군인 *P. quinquefolius*, *P. japonicum*, *P. pseudoginseng* 및 *P. notoginseng* 으로부터 주재료인 *P. ginseng* group이 94%의 높은 bootstrap value를 보이며 명확히 구분되는 것으로 나타났다. 그러나, *P. ginseng* group에 포함되는 분류군들 사이에는 연풍2, 천풍3, 금풍2, 선풍을 제외한 모든 group간에 모두 동일한 염기서열을 갖는 것으로 관찰되었으나, 1

개씩의 염기차이를 나타내는 4집단(연풍2, 천풍3, 금풍2, 선풍) 조차도 각각의 품종내에서도 일정한 분자유전학적 불연속성을 나타내지는 못하였다.

4) 신품종 인삼 및 감자의 SNP primer의 활용기술개발

- (1) 새로운 신품종인 인삼 (*Panax ginseng* C.A.Meyer) 천풍구별을 위한 분자마커를 개발할 목적으로 인삼 신품종 4년근 천풍과 14년근 자경종의 뿌리조직 EST 분석을 통하여 천풍 특이적인 negative 분자마커를 개발하고자 하였다. 천풍을 자경과 구별하기 위한 분자마커의 개발을 목적으로 4년근 천풍 뿌리와 14년근 자경뿌리에서 분석된 6천여개의 EST 자료를 분석하였다. 마커 선발을 위한 후보 유전자 선발위해서 천풍과 자경종의 뿌리에서 다발현되는 유전자를 각각 선발하여 비교하였다. 그 결과 천풍에서는 major latex protein homolog가 41개와 major latex-like protein이 12개로 가장 많이 검출되었고 ribonuclease2가 36개, metallothionein 2가 35, ribonuclease 1이 21개 등의 유전자가 발견되었다. 이중 major latex protein homolog 유전자를 대상으로 천풍을 구별할 수 있는 천풍 특이적 SNP를 발견할 수 있는 가능성이 높다고 판단되어 이 유전자를 선발하였다.
- (2) 천풍의 분자마커 확인 실험은 SNP에 근거하여 3'-end에서 mismatching을 주는 방법을 사용하여 SNP primer를 디자인 하고 PCR, multiplex PCR 등 방법으로 확인해 보았다. 여러 SNP primer를 사용하면서 실험하는 중에 primer 5와 primer 8을 사용하였을 때 자경종에서만 증폭되었다. 특이한 것은 sequencing하여 얻은 이 영역에 원 sense로 사용된 primer 5와 anti-sense로 사용된 primer 8의 순서가 완전 바뀌어 진 것이다. 이 한쌍의 primer를 총 30개의 천풍과 자경종 샘플에 실험해보았을 때 높은 재현성과 정확성을 보였다. 하지만 이것은 nevigative marker이므로 인삼 모두에서 증폭될 수 있는 control primer가 필요하다. 이 문제를 해결하기 위하여 primer 8와 primer 11를 사용하여 control primer가 나타나게 하여 보완하였다.

- (3) 개발된 negative marker를 이용하여 천풍과 다른 인삼품종간의 구별이 가능한지를 알아보기 위하여 6년근 신품종 천풍, 연풍, 금풍, 자경종, 황숙종을 대상으로 하여 이중 맹검법으로 실험을 실시한 결과 천풍을 다른 인삼품종과 명확히 구별할 수 있었다. 본 연구 결과는 순계율이 낮은 천풍 순수율을 100%로 높일 수 있는 분명한 기준을 제시하였다. 이 방법을 이용할 경우 농가에서 일반품종 (자경종)을 신품종 (천풍)으로 둔갑시켜 고가로 판매하는 것을 방지할 수 있다. 나아가, 앞으로 개발되는 신품종의 육종기간을 대폭 감소시킬 수 있을 것으로 기대한다.
- (4) 강원대학교 육성 유망 대상으로 UPOV의 특성조사항목에 의거하여 과정에 대한 특성조사를 실시하였으며 특성조사는 감자 품종 V-1, V-2, V-4, V-5, V-8, V-9, V-13, V-16 V-42, V-47를 하였다.
- (5) 상기 감자 품종의 구별을 위하여 genomic DNA를 추출하여 ITS5F primer와 ITS4R primer를 이용하여 ITS 영역을 PCR 증폭을 실시하였다. 증폭된 ITS PCR 산물을 direct sequencing을 하여 염기서열을 분석하였으며, NCBI의 BLAST program을 이용하여 유전자 은행에 등록되어 있는 기존 감자 품종들의 ITS영역의 염기서열을 비교한 결과 신품종(V-4, V13)과 기존 감자 품종을 구별할 수 있는 여러 곳의 SNP를 찾아낼 수 있었고, 이들 SNP 부분에 대하여 분자마커로서의 유용성을 검토하였다.

나. 활용에 대한 건의

- 1) 인삼으로부터 marker 유전자의 선발 및 염기서열분석을 통한 SNP 탐색을 통하여 선발된 marker 유전자를 통한 SNP primer 제작하고 이를 특허출원하여 국내에서 재배되는 작물들의 유전자원에 대한 재산권을 확보가 가능할 것이다.
- 나 국내에서 확보된 선발마커유전자를 활용하여 외국산과 구별할 수 있는 시스템을 개발하여 국내 농가의 권익을 보호하는데 활용할 수 있을 것이다.

- 다. 개발된 SNP primer를 이용하여 간편하고 신속한 분석법을 개발하고 이를 제품화(kit)하여 일반에 공급함으로써 그 활용성을 높일수 있을것이다.
- 라. SNP primer 및 적용기술이 개발되면 외국에서 밀려오는 모든 농산물을 값싸고 쉽게 구별이 가능하여 자국의 농업을 보호할 수 있을 것이다.
- 마. 특히 인삼 신품종 천풍의 marker가 확인되었으며 이중맹검법에 의하여 완벽하게 test가 되었기 때문에 바로 농가에 적용함으로써 일반 자경종이 천풍으로 둔갑하여 고가로 판매되는 것을 막을 수 있어 유통질서체계를 순기능적으로 확립할 수 있으며, 현재 중국등으로 유출되어 대량으로 재배되고 있는 천풍이 국내에 무단으로 반입될것 경우 사전 방지가 가능할 것이다.

SUMMARY

I. Title of the Study

Development of a molecular technique using SNP primers for genetic marker identification

II. Objectives of the Study

The pharmaceutical component of ginseng was first found in American ginseng (*Panax quinquefolium*) roots in 1854. In 1957 a Russian scientist Brekhman have found that spaponin glycoside is the major active compound. At present, in the National Center for Biotechnology Information (NCBI), genetic information of 15 species of *Panax* genus are enrolled. Among the species, only a few are commercially used, for example, Korean ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer), chinese ginseng (*Panax notoginseng* F.H. Chen), Japanese ginseng (*Panax japonicus* C.A. Meyer) and American ginseng (*Panax quinquefolium* L.).

From 1965, breeding of ginseng was started at Kimpo, Kangwha and Pochun in south Korea. After many series of test for breeding, new cultivar "Chun-Poong" and "Yun-Poong" were developed in 1998. In 2000, "Ko-Poong", "Kum-Poong" and "Sun-Poong" were enrolled. Among the new denveloped cultivars, "Chun-Poong" showed the highest growth, best property for manufacturing for "Chun-Sam", so was favored by the farming population. But, the purity of the cultivar is so low (67%) and could be identified by only morphological method. Because there is no genetic marker for the cultivar "Chun-Poong", exogeneous seed mixing can

decrease the cultivar purity.

There are various techniques for molecular markers, for example, random amplified polymorphic DNA (RAPD), polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), multiplex PCR, inter simple sequence repeat (ISSR). But, SNP molecular marker is the best one. SNP (Single nucleotide polymorphism) is the single nucleotide change in ginseng DNA. In the case of human, one nucleotide in 1,200~1,500 bp showd variation.

Because there was no genome sequencing project at ginseng plant, no available DNA sequence could be gained from ginseng. So, we constructed cDNA library from 4 year-old ginseng roots and obtained many gene sequences from which SNP can be found. After finding SNP that can discriminate the "Chun-Poong" cultivar, we developed PCR system using cultivar-specific primers.

III. The Scope of the Study

1. Development of SNP-searching and SNP-analyzing system from ginseng
 - 1) Selection of marker gene from ginseng
 - (1) searching marker gene and SNP
 - (2) development of SNP primer technique
 - (3) development of PCR conditions
 - (4) development of SNP primer
 - (5) development of rapid analysis method using SNP primer
 - (6) one-step kit development
 - 2) SNP searching in Database
 - 3) Checking of genetic identity of newly developed ginseng cultivar
 - (1) development of molecular marker using phylogenetics

- (2) Phylogenetic relatedness study of new cultivar (by each cultivar and region)

2. Application of SNP primer in ginseng and potato

- 1) Application of SNP primer to "Chun-Poong"
- 2) Application to new potato cultivar

IV. Results and Possible Application of the Study

A. Results

1) Selection of marker gene from ginseng and SNP searching

- (1) Using ginseng DNA, RAPD primer was designed and RAPD was analyzed. fifty different random primers (10-mer) were used to amplify DNA bands and 18 primers were selected to amplify DNA bands. Cluster analysis of RAPD bands showed that "Ja-Kyung" was close to "Poong-gi Whang-Sook" and that American ginseng showed distance from other ginseng varieties.
- (2) Genes in chloroplast DNA of ginseng, *psbA* gene and *rbcL* gene were cut by restriction enzyme and the DNA bands were analyzed. *psbA*-N, *psbA*-C primer and *rbcL*-N, PX-1 primer was used and 1,008bp of *psbA* gene and 1,336bp of *rbcL* gene were obtained. *atpB* gene, *rpoB* gene and *trn* gene were amplified to 1,366bp, 900bp, 1,500bp, 1,008bp DNA bands. *Sau3A*, *Taq1*, *Alu1*, *HaeIII* were used to cut PCR-amplified DNA but no specific DNA bands were found. So more enzyme must be tested.
- (3) ITS region was amplified and SNP primer was used. As the results, All the ginseng showed common DNA band (579bp). And Korean ginseng specific DNA band (254bp), Foreign ginseng

specific DNA band (325bp) were amplified. So, Korean ginseng could be discriminated from foreign ginsengs so illegal foreign ginseng disguising as Korean ginseng can be detected using this SNP method.

- (4) 36 UBC primers were tested for RAPD and 28 primers showed PCR-amplified DNA bands. 6 (CCTGGGCCTA), 29 (CCGGCCTTAC), 33 (CCGGCTGGAA), 105 (CTCGGGTGGG), 125 (GCGGTTGAGG), 149 (AGCAGCGTGG), 157 (CGTGGGCAGG), 159 (GAGCCCGTAG), 174 (AACGGGCAGC), 177 (TCAGGCAGTC), 181 (ATGACGACGG) showed difference between "Chun-Poong" and "Yun-Poong". 181 (ATGACGACGG), 218 (CTCAGCCCAG), 220 (GTCGATGTCG), 250 (CGACAGTCCC) showed band in "Chun-Poong", 211 (GAAGCGCGAT), 225 (CGACTCACAG), 239 (CTGAAGCGGA), 248 (GAGTAAGCGG) showed band in "Yun-Poong" and 270 (TGCGCGCGGG) showed strong band in "Yun-Poong".

2) SNP searching in Database

- (1) Many SNP candidate DNA bases were found in five cDNA libraries by using local Blast. Single nucleotide difference of C and T were found in DC03 and DC05 cDNA libraries. NCBI Blast could not identify the genes.
- (2) ESTs (expressed sequence tags) were searched using whole cDNA library sequences and NCBI Blast results..
- (3) From almost 20,000 ESTs, SNPs specific for each varieties and cultivars were found. The genes containing SNP were mostly unknown. The "Yun-Poong" specific SNP-containing gene was ADP-ribosylation factor and "Chun-Poong" specific SNP-containing gene was major latex protein.

- 3) Identification of genetic properties of new cultivar
 - (1) Sequences of chloroplast DNA *trnL*-F region and ITS region, ETS region were compared in NCBI database.
 - (2) Genetic distance matrix using Kimura's two parameter were constructed by PHYLIP(Phylogenetic Inference Package, ver. 3.5c) DNADIST program. Molecular phylogenetic tree was constructed by PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) program.
 - (3) As the analysis results of 23 ginseng samples using chloroplast *trnL*-F region, nuclear ITS region and ETS region, 1490 bp-sequences were aligned, three bases were selected for 19 Korean ginseng strains.

- 4) SNP primer application for new cultivar of ginseng and potato
 - (1) 6,000 ESTs were analyzed that were constructed from 4 years old "Chun-Poong" and 14 years old "Ja-Kyung" to get "Chun-Poong"-specific molecular marker. Major latex protein gene was selected for SNP searching.
 - (2) SNP primers were designed using 3'-end mismatching and multiplex PCR was performed. Primer 5 and primer 8 amplified "Ja-Kyung"-specific DNA band. Analysis of 30 samples mixed with "Ja-Kyung" and "Chun-Poong" showed high reproducibility and accuracy. Primer 8 and primer 11 were used as control primers.
 - (3) The negative marker was used to identify "Chun-Poong" from double blinded sample mixed with 5 different ginseng cultivars or varieties. "Chun-Poong" could be discriminated with the negative marker so this could be used as a criterion for identification of pure "Chun-Poong" line.
 - (4) Potato cultivars V-1, V-2, V-4, V-5, V-8, V-9, V-13, V-16 V-42, V-47 was analyzed.

- (5) Genomic DNA of potato was extracted and ITS region was amplified using ITS5F and ITS4R primers. After sequencing many SNPs were found and analyzed for use as molecular markers.

B. Recombination for application

- 1) The molecular marker developed based on SNP in major latex protein gene can be applied for a patent.
- 2) Korean ginseng can be discriminated from other foreign ginseng by the molecular marker. So, our marker can be used to protect the domestic farmer's right.
- 3) Simple SNP identification kit can be manufactured and be used for rapid detection of Korean ginseng.
- 4) SNP primer technique can be applied to all the agricultural products so protect domestic products from foreign ones.
- 5) The molecular marker system can prohibit illegal marketing of cheap common ginseng as expensive "Chun-Poong" cultivar. Import of "Chun-Poong" cultivar from China can be prohibited using the system.

CONTENTS

Chapter 1. Synopsis of this study

Chapter 2. State of the art

Chapter 3. Experimental schemes and the results of this study

3-1. Development of SNP-searching and SNP-analyzing system from ginseng

3-1-1. Selection of marker gene from ginseng

3-1-2. SNP searching in Database

3-1-3. Checking of genetic identity of newly developed ginseng cultivar

3-2. Application of SNP primer in ginseng and potato

3-3-1. Application of SNP primer to "Chun-Poong"

3-2-2. Application to new potato cultivar

Chapter 4. Achievement of the goals and contribution

Chapter 5. Plans for application of the results

Chapter 6. Information gathered during this study

Chapter 7. References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

제 2 절 연구개발의 필요성

제 3 절 연구개발의 범위

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내기술의 현황

제 2 절 외국기술의 현황

제 3 절 앞으로 전망

제 4 절 기술도입의 타당성

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구추진전략

제 2 절 연구개발 내용

제 3 절 연구수행 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

제 2 절 관련분야에 기여도

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

List of Tables and Figures

Table 1. PCR primers for the detection of specific molecular marker in *Panax ginseng* new cultivar Chunpoong

Table 2. PCR conditions for the selection of optimum amplification in *Panax ginseng* new cultivar Chunpoong

Table 3. Primer sequences of ITS 5F, ITS 4R used in this study

Table 4. The sequence and RAPD of tandom from UBC primers

Table 5. Bands of ginseng DNA amplified by PCR using UBC primers

Table 6. Oligonucleotide primer used for chloroplast DNA analysis

Table 7. Characteristics of banding pattern on KG101 and KG103 according to selected primer

Table 8. List of CAB I registered in other plants.

Table 9. List of rbcS registered in other plants

Table 10. Categorization of 349 Energy related genes

Table 11. Most abundant mRNA in energy-related cDNA library

Table 12. Arrangement ESTs by gene function

Table 13. Analysis of Yunpoong specific SNP compared with various ginseng cultivar based on ADP-ribosylation factor gene

Table 14. Analysis of Chunpoong specific SNP compared with various ginseng cultivar

Table 15. Materials and collection data

Table 16. Sequence characteristics of plastid DNA *trnL-F* region and

nrDNA ITS region, ETS region for taxa

Table 17. Sequence comparison with previous nrDNA ITS region data from GeneBank

Table 18. Materials and collection data for investigated taxa.

Table 19. Alligned sequence data matrix of chloroplast DNA 3'-end half *trnL*-F region of *Panax ginseng* and investigated taxa.

Table 20. Most abundant ESTs expressed in 4-year root of *Panax ginseng* new cultivar Chunpoong

Table 21. Most abundant ESTs expressed in 14-year root of *Panax ginseng* Jakyung cDNA library

Fig. 1. Diagram and position of PCR/sequencing primers for plastid DNA *trnL*-F gene.

Fig. 2. Diagram and position of PCR/sequencing primers for nuclear ribosomal DNA ITS region.

Fig. 3. Diagram and position of PCR/sequencing primers for nuclear ribosomal DNA ETS gene.

Fig. 4. Photographs of *Panax ginseng* roots used for distinction of ginseng cultivars. A-Chunpoong, B-Jakyung 1, C-Jakyung 2.

Fig. 5. RAPD banding pattern of genomic DNA from various tissues of *P. ginseng* C. A. Meyer using UBC-50 primer. M, molecular marker; 1, 2, 3, Leaf; 4, 5, 6, Root; 7, 8, 9, Stem.

Fig. 6. PCR amplification of DNA from 4 species (*Panax ginseng*) using primer; A: Jakyungjong, B: Punggi Hwangsuk, C: China, D: *Panax quinquefolium*. M, Molecular marker(1Kb DNA ladder).

Fig. 7. Phenogram of clustering pattern for 4 species and strain of ginseng.

Fig. 8. PCR product of *Panax ginseng* using primer for *psbA* gene and *rbcL* gene. A: KG101, B: KG102, C: KG103, D: KG104, E: KG105, F: KG106, G: KG107, H: KG108, I: KG109, 1: *Panax quenquifolium*.

2: USSR, 3 : China, 4: Mimaki, 5: *Panax japonicum*, 6: Hwangasukjong, 7: Chungkyungjong, 8: Sanyang 9: Jakyungjong ; M, Molecular marker(1Kb DNA ladder).

Fig. 9. PCR product of ginseng using primers for *atpB* gene, *rpoB* gene, *trnL* gene. A: *Panax ginseng*. B: *Panax quenquifolium*., C: *Panax japonicum* ; M, Molecular marker(1Kb DNA ladder).

Fig. 10. Restriction fragment patterns of PCR products obtained from *psbA* gene in chloroplast of *Panax ginsengs* using Taq 1, Alu1 and Hae III restriction enzyme. A: KG101, B: KG102, C: KG103, D: KG104, E: KG105, F: KG106, G: KG107, H: KG108, I: KG109, 1: *Panax quenquifolium*., 2: USSR, 3 : *Panax notoginseng*, 4: Mimaki, 5: *Panax japonicum*, 6: Hwangasukjong, 7: Chungkyungjong, 8: Sanyang, 9: Jakyungjong; M: Molecular marker(1Kb DNA ladder).

Fig. 11. RAPD banding pattern of ginseng roots containing normal(KG101; 1*) or high level(KG103; 3*) of ginsenoside according to different primers. A: UBC-1, 2, 3, 4, 6, B: UBC-12, 13, 17, 23, 25, C: UBC-29, 30, 33, 34, 63, D: UBC-77, 82, 83, 89, 100, 102, E: UBC-193, 105, 106, 125, 127, F: UBC-137, 147, 149, 150, 155, G: UBC-157, 159, 174, 177.

Fig. 12. RAPD banding pattern of ginseng roots containing normal(KG101; 1*) or high level(KG103; 3*) of ginsenoside according to different primers. A: UBC-181, 184, 190, 198, 199, 203, 204, 208, B: 211, 213, 218, 219, 220, 222, 225, 226, C: 228, 230, 231, 232, 234, 237, 239, D: 240, 241, 243, 244, 245, 246, 248, E: UBC-249, 250, 251, 253, 254, 262, 264, 266, F: UBC-270, 273, 275, 276, 280, 282, 283, 285.

Fig. 13. SNP of ginseng species.

Fig. 14. Phenogram of clustering pattern for ginseng species.

Fig. 15. Confirm of SNP of inter- and intra- species.

Fig. 16. Design of specific SNP primer to distinguish Yunpoon of *Panax*

ginseng C.A. Meyer from other ginseng cultivar, variety and species.

- Fig. 17. PCR products with various concentrations of SNP primer.
- Fig. 18. Selection of various concentrations of SNP primer
- Fig. 19. 5.8S ITS rDNA amplified PCR in *Panax ginseng*.
- Fig. 20. PCR condition for SNP marker of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*.
- Fig. 21. Application of SNP marker for distinguish of hybride of ginseng species.
- Fig. 22. Nucleotide sequence alignment for the SNP discovery between Chunpoong(DC03) and Yunpoong(DC05). The red square is a SNP (C/T).
- Fig. 23. Comparing a SNP with other new ginseng variety. In the result of the SNP cleared up separate from other new ginseng variety. DC03 is Chunpoong.
- Fig. 24. Comparing a SNP with other new ginseng variety. In the result of the SNP cleared up separate from other new ginseng variety. DC03 is Chunpoong.
- Fig. 25. Nucleotide sequence alignment for the SNP discovery between Yunpoong and Chunpoong. Red square is a SNP (G/A).
- Fig. 26. The nucleotide and predicted amino acid sequence of the *Panax ginseng* C.A. Meyer CAB I gene.
- Fig. 27. Alignments of predicted amino acid sequence of ginseng CAB I with other selected plant chlorophyll a/b binding protein. Amino acid were aligned with the aid of the CLUSTAL W program. *Petunia x hybrida* (CAA28639); *Prunus persica* (AAC34983); *Nicotiana tabacum* (CAA41188); *Solanum tuberosum* (Z35160).
- Fig. 28. Phylogenetic relationship of the CAB I to other plants CAB I . Phylogenetic analysis is based on the deduced amino acid

sequences of CAB I from various species. The tree was generated by Clustal W (version 1.4) and phylogenetic tree (BioEdit version 5.0.9). The cDNA sequences used for amino acid translation was retrieved from GenBank.

Fig. 29. The nucleic acid and predicted protein sequence of the *Panax ginseng* C.A. Meyer rbcS gene.

Fig. 30. Alignments of predicted amino acid sequence of rbcS along with other selected plant ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small Subunit. Sequences were aligned with the aid of the CLUSTAL W program. *Lactuca sativa*(BAA03103) rbcS; *Malus domestica* x *Pyrus communis*(AAA33866) rbcS; *Flaveria pringlei*(AAB67847) rbcS; *Arabidopsis thaliana*(RKMUA1) rbcS; *Brassica napus*(CAA39402) rbcS; *Helianthus annuus*(CAA68490) rbcS; *Glycine max*(AAA81328) rbcS; *Spinacia oleracea*(CAA66201) rbcS.

Fig. 31. Phylogenetic relationship of the rbcS to other plants rbcS. Phylogenetic analysis is based on the deduced amino acid sequences of rbcS from various species. The tree was generated by Clustal W (version 1.4) and phylogenetic tree(BioEdit version 5.0.9).The cDNA sequences used for amino acid translation was retrieved from GenBank. The respective accession number is described next to plant name.

Fig. 32. Functional classification of *Panax ginseng* C.A. Meyer ESTs. The ESTs that had sequence similarity to known genes were classified based on energy related functions.

Fig. 33. PCR products with various concentration of SNP primer and reaction time for PCR.

Fig. 34. PCR product of Yunpoon and jakyungchong by concentration of G>A Yunpoon specific primer.

- Fig. 35. One of the most parsimonious tree of genus *Panax* based on the combined plastid DNA *trnL* gene, nuclear ribosomal DNA ITS region, and ETS region (CI=0.968, RI=0.957, tree length=31). The numbers above the line indicate bootstrap values from 1000 replicates.
- Fig. 36. Electrophoresis photograph of extracted DNA of *Panax ginseng* and investigated taxa. M : Molecular Marker (100bp ladder).
- Fig. 37. Electrophoresis photograph of amplified chloroplast DNA 3'-end half *trnL*-F region of *Panax ginseng* and investigated taxa. M : Molecular Marker (100bp ladder).
- Fig. 38. Sequence alignment (A) and phylogenetic analysis (B) of the major latex protein homolog gene in *Panax ginseng* new cultivar Chunpoong.
- Fig. 39. Putatively identified major latex protein homolog using blastx program in NCBI database (A) and phylogenetic analysis (B) of the major latex protein homolog gene of in *Panax ginseng* new cultivar Chunpoong's EST and genomic clone (clone DNA) with GenBank's Data of *Mesembryanthemum crystallinum* (AAC14179), *Beta vulgaris* (CAC43292), *Prunus persica* (AF239177).
- Fig. 40. Sequence alignment of major latex protein homolog between Chunpoong and Jakyung ESTs for the detection of *Panax ginseng* new cultivar Chunpoong specific SNP.
- Fig. 41. Schematic representation of PCR-amplification for distinction of *Panax ginseng* new cultivar Chunpoong from other cultivars of Korean ginseng. A: Standard primers, B: C specific primer (Chunpoong), C: T specific primer (others).
- Fig. 42. PCR amplification in *Panax ginseng* Chunpoong(1), Jakyung1(2), Jakyung2(3), using SNP primers to be designed for the distinction according to PCR conditions. [A] a (primer1: primer2: primer3:

primer4- 5 M: 5 M: 15 M: 10 M) and b (primer1: primer2: primer3: primer4- 5 M: 5 M: 5 M: 5 M) using PCR program A; [B] a (primer1: primer2: primer5: primer6- 5 M: 5 M: 20 M: 15 M); using PCR program C; [C] a (primer1: primer2: primer5: primer6- 10 M: 10 M: 5 M: 5 M); using PCR program C; [D] a, b,c, d, e (primer1: primer2: primer3: primer4- 10 M: 10 M: 2 M: 10 M) using PCR program B; AT- a) 55°C/b) 58°C/c) 60°C/d) 62°C/e) 66°C Appropriate 0.5 U DNA polymerase (SolGent Co., LTD.). PCR products were electrophoresis by 2 % gel electrophoresis. Size marker(M) was used with 2 ul of 100 bp DNA ladder (Bioneer Co., LTD).

Fig. 43. Reproducibility confirmation of 900 bp band from using primer 5 and primer 8 with PCR program C in *Panax ginseng* Chunpoong(1), Jakyung1(2), Jakyung2(3). [A] First test. [B] Try 5 times to show reproducibility.

Fig. 44. PCR amplification of 900 bp band from using primer 5 and primer 8 with PCR program D in *Panax ginseng* Chunpoong(1), Jakyung1(2), Jakyung2(3). Annealing temperature (a) -55°C, and (b)- 58°C.

Fig. 45. Nucleotide sequence of amplified DNA fragment predicted with 900 bp band. The sequences of Jakyung 1 and 2 were all the same in 780bp, and position of sense and antisense were exchanged.

Fig. 46. Schematic diagram of primer positions. A was designed primer position, B was field of sequencing result, C was field of supposition. Primer F was primer5 , and R was primer8.

Fig. 47. Check out the negative marker by twenty samples of 1-year-old ginseng. [A] PCR result that the primer(primer9+primer10) designed from 780 bp sequences. Using PCR program D and AT was 58°C. M-1kb DNA ladder. [B] Using PCR program E, primer9 and primer10. a-Chunpoong, b-Jakyung1, c-Jakyung2. Taq

concentration 1 unit, M=100bp DNA ladder.

Fig. 49. Finding the best PCR condition of Chunpoong negative marker.

PCR program E in *Panax ginseng* Chunpoong(1), Jakyung1(2), Jakyung2(3). Taq concentration 1 unit. a-primer11 and primer8, AT=50°C b- primer12 and primer8, AT=55°C.

Fig. 50. Result of double blind test using the negative marker in *Panax*

ginseng cultivars. The PCR reaction was conducted with primer 11 and primer 8 using PCR program E under the annealing temperature at 50°C. Chunpoong (4, 8, 11, 14), Yunpoong (1, 5, 16, 18), Gumpoong (3, 7, 10, 17), Jakyung (2, 12, 19, 20), HwangSook (6, 9, 13, 15).

Fig. 51. Tubers and flowers of Atlantic and Superior.

Fig. 52. Tubers and flowers of V-1.

Fig. 53. Tubers and flowers of V-2.

Fig. 54. Tubers and flowers of V-5.

Fig. 55. Tubers and flowers of V-9.

Fig. 56. Tubers and flowers of V-16.

Fig. 57. Alligned sequence data matrix of nuclear DNA ITS region of various potatoes.

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

약용식물로서 옛부터 한방에서 중요한 약재로 사용되어온 인삼은 혼계형으로 현재 자경을 비롯하여 황숙, 천풍, 청경, 연풍, 고풍 등 여러 신품종이 재배되고 있으나 이들은 순계분리를 통하여 우수한 형질의 것을 선발·고정한 것이다. 현재 재배되고 있는 인삼 품종들의 구별은 외부 형태적인 특징으로 구별할 뿐 이들을 정확히 구별할 수 있는 분자마커 (molecular marker)가 없는 실정이다. 따라서 인삼의 품종육종을 위한 기간 단축과 뿌리삼의 유통과정에서 품종을 명확히 구별하기 위한 품종별 분자마커의 개발이 절실히 요구되고 있다. 본 연구는 새로운 신품종인 인삼 (*Panax ginseng* C.A.Meyer) 천풍구별을 위한 분자마커를 개발할 목적으로 인삼 신품종 4년근 천풍과 14년근 자경종의 뿌리조직 EST 분석을 통하여 천풍 특이적인 negative 분자마커를 개발하고자 하였다. 천풍을 자경과 구별하기 위한 분자마커의 개발을 목적으로 4년근 천풍 뿌리와 14년근 자경뿌리에서 분석된 6천여개의 EST 자료를 분석하였다. 마커 선별을 위한 후보 유전자 선별위해서 천풍과 자경종의 뿌리에서 다발현되는 유전자를 각각 선별하여 비교하였다. 그 결과 천풍에서는 major latex protein homolog가 41개와 major latex-like protein이 12개로 가장 많이 검출되었고 ribonuclease2가 36개, metallothionein 2가 35개, ribonuclease 1이 21개 등의 유전자가 발견되었다. 이중 major latex protein homolog 유전자를 대상으로 천풍을 구별할 수 있는 천풍 특이적 SNP를 발견할 수 있는 가능성이 높다고 판단되어 이 유전자를 선별하였다. 천풍의 분자마커 확인 실험은 SNP에 근거하여 3'-end에서 mismatching을 주는 방법을 사용하여 SNP primer를 디자인하고 PCR, multiplex PCR 등 방법으로 확인해 보았다. 여러 SNP primer를 사용하면서 실험하는 중에 primer 5와 primer 8을 사용하였을 때 자경종에서만 증폭되었다(Table 1). 특이한 것은 sequencing하여 얻은 이 영역에 원sense로 사용된 primer 5와 anti-sense로 사용된 primer 8의 순서가 완전 바뀌어 진 것

이다. 이 한쌍의 primer를 총 30개의 천풍과 자경종 샘플에 실험해보았을 때 높은 재현성과 정확성을 보였다. 하지만 이것은 nevigative marker이므로 인삼 모두에서 증폭될 수 있는 control primer가 필요하다. 이 문제를 해결하기 위하여 primer 8와 primer 11를 사용하여 control primer가 나타나게 하여 보완하였다. 개발된 negative marker를 이용하여 천풍과 다른 인삼 품종간의 구별이 가능한지를 알아보기 위하여 6년근 신품종 천풍, 연풍, 금풍, 자경종, 황숙종을 대상으로 하여 이중 맹검법으로 실험을 실시한 결과 천풍을 다른 인삼 품종과 명확히 구별할 수 있었다. 본 연구 결과는 순도율이 낮은 천풍 순도율을 100%로 높일 수 있는 분명한 기준을 제시하였다. 이 방법을 이용할 경우 농가에서 일반품종 (자경종)을 신품종 (천풍)으로 둔갑시켜 고가로 판매하는 것을 방지할 수 있다. 나아가, 앞으로 개발되는 신품종의 육종기간을 대폭 감소시킬 수 있을 것으로 기대한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

SNP marker는 고비율로 존재하기 때문에 높은 정확도 및 해상도로 개놈의 개체간의 차이를 해독하는데 매우 유용하다. SNP marker는 각 개체간의 염기배열의 차이를 직접 비교하는 것으로 이를 동정하기 위해서는, 인간의 경우에 10명 이상의 샘플로부터 개놈 DNA를 추출한 후 라이브러리화하여, 대규모로 염기배열을 결정하고 표준 샘플에서 얻은 염기배열과 비교함으로써 염기배열의 다양성 정보를 알 수 있다. SNP의 비교연구는 종간의 진화나 계통연구에 새로운 돌파구를 제시하고 있으며, 또한 SNP들은 질병저항성의 차이도 유발하는 것으로 보고 있다. 비슷한 여건의 사람들 중 어떤 사람은 다른 사람에 비해 질병에 걸릴 확률이 높는데 이는 SNP들에 의해 특징지워지는 유전적 소양의 차이에 의한 것이라고 한다. 이러한 SNP의 유용성을 활용하면 근연관계에 있는 식물체들의 유연관계를 규명할 수 있고 또한 특정한 식물체의 종간 및 아종, 품종간의 구별도 가능할 것으로 보이며 이를 특정품종의 선발 marker로서 활용할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 아직 SNP primer를 효율적으로 제작하는 방법이 알려져 있지 않고 작물에 따라서 많은 차이가 있다. 그 이유

는 primer의 경우 보통 70-80%만 유사하더라도 모본 DNA와 hybridization이 될 가능성이 높기 때문 1개의 염기서열이 다른 SNP primer의 제작과 활용은 그만큼 어려움이 있다.

한편 한국인삼의 전통적인 명성과 약효에 자극되어 세계 여러 곳에서 인삼이 활발히 재배되고 있으며 인삼을 상업적으로 재배, 생산하는 나라는 우리나라를 비롯한 중국, 일본, 미국, 캐나다, 유럽 일부 지역이다. 앞으로 세계의 주요한 인삼 생산국은 한국과 중국 그리고 북미, 3자 경쟁체제를 보일 것으로 예상된다. 중국의 경우 매년 재배 면적이 급속히 증가하고 있으며 대규모 재배를 무기로 하여 싼 값에 많은 양의 인삼을 동양의 인삼 시장으로 수출하고 있다. 이런 상황에서 한국이 인삼 중주국으로 자리를 유지하기 위하여는 한국인삼의 독보적인 효능을 홍보하면서 타 지역 인삼과의 차별화에 힘을 기울여야 한다. 인삼은 보통 4년 1회 종자를 채취하는 것을 원칙으로 하기 때문에 육종기간이 매우 길어 신품종의 육성이 어렵다. 그 동안 한국담배인삼공사의 권우생박사팀에서는 신품종 천풍, 연풍, 고풍을 개발하였으며, 이미 중국과 일본등지에 퍼져 있는 상태이며, 조만간에 이런 신품종이 오히려 중국에서 한국으로 밀려올 상황에 있다. 또한 한국인삼을 외국삼으로부터 차별화 판매하려면, 한국인삼을 외국삼으로부터 쉽고 빠르게 구별하고 확인할 수 있는 기술 개발이 필요하다. 외국삼이 뿌리의 원래 형태 그대로 유통되고 매매될 때는 전문가가 육안으로 식별할 수 있지만 식품첨가물이나 분말의 형태로 유통될 때는 품종을 확인할 수 있는 방법이 전무한 상태이다. 실제로 인삼 시장에서 한국인삼과 외국삼을 육안으로 구별할 수 있는 사람은 얼마되지 않는다. 더군다나, 최근 외국삼이 한국의 산삼으로 둔갑하여 유통되는 사례가 발생하면서 한국인삼과 외국삼을 구별 할 수 있는 기술이 시급하다.

최근에 분자생물학적인 방법을 이용하여 인삼을 구별하려는 연구가 일본에서 시도되었고, 기본적인 체계를 이루어 가고 있다. 분자생물학적인 방법이 적용되면 외국삼이 어떠한 상품형태로 유통되었는지 확인이 가능하다. 아직 한국에서는 이러한 기술 개발이 시도되지 않았다.

SNP의 기본적인 성격은 marker 이므로 활용도 역시 기타 marker들과 크게 다를 바가 없으나 다만 기존의 marker들에 비해 보다 촘촘하고 안정한 map을 작성할 수 있다는 점과 새로운 기술, 특히 DNA chip을 포함하는

high-throughput technology에 보다 적합한 특성, 즉 탐색에서 분석에 이르는 전 과정이 robot과 컴퓨터에 의해 고속으로 자동화될 수 있다는 점이 SNP의 차별화된 특성이라고 할 수 있다. 이러한 특성은 최근 구미의 대형 제약업체들이 속속 진출하고 있는 “pharmacogenomics”분야에 매우 유망한 소재로서 부각되고 있다. 현재 우리의 식단에 오르는 대부분의 식품이 저가의 중국산에 의하여 거의 점령당하고 있다고 해도 과언이 아니다. 저가의 물량공세로 인하여 가격 경쟁력에서 뒤떨어지는 우리나라의 자영농들은 경제적으로 막심한 피해를 보고 있는 실정이다. 뿐만아니라 중국산이 국내산으로 둔갑하여 대량으로 유통되고 있어 그 피해가 더욱 극심하다. 그래서 현재 이러한 중국산과 국내산을 구별할수 있는 간편하고도 신속한 기술개발의 필요성이 절실히 요구되고 있다. 이러한 기술을 개발하기 위해서는 우선 국내에서 재배되고 있는 다양한 작물들에 대한 유전적인 특성이 우선적으로 규명이 되어야 하며, 이러한 결과를 바탕으로 SNP를 이용한 국내산과 외국산을 구별할 수 있는 시스템을 개발한다면 다른 다양한 작물에도 응용되어져 국내산의 시장경쟁력을 높이는데 크게 기여할 것이다. 또한 국내재배품종들의 SNP primer를 개발하여 특허화함으로써 국내의 유전자원을 확보함으로써 국제경쟁력의 제고에도 크게 기여할 것으로 사료된다.

SNP의 연구는 현재 의료계에 엄청난 과급효과를 가져오고 있다. SNP의 분석에 의해서 개개인의 질병에 대한 민감성 차이의 원인이 규명되어질 수 있기 때문에 유전질환의 진단·예후·치료·예방에 이용이 기대된다. 또한 SNP는 개개인의 동일 약물에 대해 상이한 반응·효과·부작용·독성을 나타내는 원인으로 개개인의 유전적 배경에 근거한 맞춤형 약물의 주문, 처방으로 이어질 수 있다. 또한 개인의 다양한 생리작용과 체질의 변화, 발병가능성을 조기에 진단·예측하는 데 이용될 수 있다. 이러한 SNP의 정보는 의료계뿐만이 아니라 식물에서도 병충해내성, 종자개량, 품종의 식별 등 다양한 방면에서 이용가능성이 매우 클 것으로 보고 있다. 현재 SNP 발굴을 위한 학계와 산업계의 경쟁은 전쟁을 방불케하고 있는 실정으로 국내의 경우 재배작물을 대상으로 하는 SNP의 연구는 전무한 실정으로 유전자원의 확보가 시급히 요구되고 있다. 또한 WTO 가입 및 수입개방화시대에 있어서 우수한 한국산 인삼의 계속적인 경쟁력확보가 요구되며, 고령화, 지식정보화, 경쟁사회인 21세기사회에

서 질환예방, 건강유지 및 회복 등을 목표로 하는 대표적인 건강기능식품인 인삼의 수요는 의약품의 그것을 상회할 것으로 예측되며, 각국이 이에 대한 법령 및 제도를 정비, 도입하고 있기에 한국인삼의 생물학적 정체성과 이에 관련된 기초연구가 시급히 요구된다.

인삼의 약리작용이 처음으로 기재된 것은 <신농본초경(神農本草經)>(서기 196년경)으로 ‘主補五臟, 安精神, 定魂魄, 止驚悸, 除邪氣, 明目, 開心益智, 久服輕身延年’ 등의 약효가 있다고 하였다 (한국인삼사 편찬위원회, 2002). 인삼의 약리성분은 1854년 미국산 인삼 (*Panax quinquefolium*) 뿌리에서 일종의 사포닌 혼합물인 무정형 물질을 분리하면서 인삼의 유효 성분 에 대한 과학적 연구가 시작되었고 인삼의 화학적 활성 성분 연구가 본격적으로 시작된 것은 1957년 소련의 Brekhman에 의해 사포닌 배당체 (glycoside)가 인삼의 약효 성분임을 강조함으로써 사포닌에 대한 집중적인 연구가 이루어져 1960년대에 이르러 생화학적 분야에서 많은 연구가 활발히 수행되었다. 현재 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에는 오가과 (五加科, *Araliaceae*) 인삼속 (*Panax*)에 속하는 15 종의 *Panax* species에 대한 유전정보가 등록되어 있다. 이들 중 상업화되어 재배되고 있는 것으로는 한국의 고려인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer), 중국의 전칠삼 (*Panax notoginseng* F.H. Chen), 일본의 죽절삼 (*Panax japonicus* C.A. Meyer) 그리고 미국 및 캐나다의 화기삼 (*Panax quinquefolium* L.) 등이 있다 (Kwak *et al.*, 2003). 국내에서 고려인삼 재배현황을 보면 품종 개량 전 재래 혼계종인 자경종이 주로 재배되어 왔다. 자경종은 일부 타가수정을 하기 때문에 개체마다 지상부 주요형질인 줄기와 잎의 유전형질이 다른 특성을 가지고 있고, 이러한 특성은 출아, 전엽, 개화 및 결실과 같은 생육에서 다른 양상을 나타내 균일한 생육이 되지 못했다 (Kwon *et al.*, 1998). 따라서 순도율이 높고 안정한 인삼의 육종을 위하여 1965년부터 김포, 강화 및 포천 등을 중심으로 개체선발에 의한 품종육성이 시도되었으며 선발된 개체를 계통육성하고, 이들 계통 중 품질이나 수량성이 높은 계통을 2세대 및 3세대 증식과정을 거쳐 생산력 검정시험에 공시하여 우수 품종 가능성이 높은 유망계통을 선발하였다. 선발된 계통은 지역적응시험을 실시하고 최종적으로 농가에서 실증재배 시험을 수행하여 생산성을 검증하였다. 이러한 과정을 거쳐 1998년에 국내에서는 최초로 인삼 신품종 천풍과 연풍이 등록되었

으며 2000년부터 고풍, 금풍, 선풍 등 신품종이 계속적으로 등록 되었다 (Kwon *et al.*, 1998; Kwon *et al.*, 2000). 그 중 천풍은 다른 신품종과 비교하여 생장이 우수하고 균일성이 높아 천삼제조에 가장 적합하여 최근 재배농민 들로부터 선호도가 가장 높은 인삼 품종이다. 그러나 순도율이 67%로 낮아 신품종 종자관리 대책이 필요하다는 보고가 제시된바 있다 (Lee *et al.*, 2005). 또한 형태학적 구별방법에 의해서 등록되어 있고 유전적인 마커가 없기에 외부종자 혼입에 의한 순도율 저하를 막기가 어렵다. 그러므로 천풍을 관별할 수 있는 유전적인 분자 마커의 개발이 절실히 요구되고 있는 상황이다. 현재 인삼 품종구별을 위해서 사용되고 있는 분자생물학적 방법은 주로 random amplified polymorphic DNA (RAPD), polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), multiplex PCR, inter simple sequence repeat (ISSR) 등이 있다. 그러나 이들 방법은 품종 특이적인 마커 선발의 어려움과 재현성있는 결과를 얻기 어려워 유연관계가 근접한 인삼 품종간의 구별이 쉽지 않는 상황이다. 본 연구에서는 인삼의 품종구별을 위한 분자마커 개발을 위해서 최근 인간의 질병진단 및 신약개발 분야에서 많이 이용되는 single nucleotide polymorphism (SNP) 방법을 이용하였다. SNP는 유전적 변이의 원인으로 알려진 단일 염기변이를 말하는 것으로, 사람의 경우 1,200~1,500 bp의 염기에 하나 비율로 나타나고 있다. 하지만 인삼처럼 혼계종으로 단기간에 순계분리를 통하여 육성된 유사한 품종을 구별할 수 있는 SNP를 찾기는 쉽지 않다. 따라서 4년근 천풍의 뿌리로부터 cDNA library를 제작하여 분석한 EST 정보를 다른 인삼 품종의 EST와 비교·분석하여 천풍을 구별할 수 있는 분자마커 탐색을 실시하고자 후보 유전자로서 major latex protein homolog 유전자를 선발하였고 다른 품종과 염기서열을 비교하여 SNP를 탐색하였다. 그리고 탐색한 SNP 부위를 이용하여 primer를 제작하고 PCR 분석을 통하여 신품종인 천풍과 기존에 재배되고 있는 인삼 품종을 구별하고자 본 연구를 실시하였다.

또한 본기술이 개발되면 타 작물에도 적용하기 위하여 우선 감자를 대상으로 응용할 필요가 있다. 감자는 세계 4대 주요 주식작물로서 각종 영양분을 골고루 함유하고 있는 주요한 알카리성 식품으로 전세계적으로 그 수요가 날로 증가하고 있다. 그러나 국내에서는 좁은 경지면적과 안정적으로 우수한 씨감자

의 보급이 원활치 못해 다소 그 생산면에서 다른 나라에 비해 떨어지고 있는 실정이다. 그러나 최근에 강원대학교 임학태 교수팀은 많은 신품종을 개발하여, 이 역시 인삼과 같이 외국에 많이 퍼져있는 상태이며 상품화 될 가능성이 매우 높다. 따라서 SNP primer에 의한 marker의 개발로 특허권등을 인정받을 수 있을것으로 생각된다.

제 3 절 연구개발의 범위

가. 인삼에서 SNP탐색 및 분석시스템의 개발

1) 인삼으로부터 마커(marker) 유전자의 선발 및 염기서열분석을 통한 SNP 탐색

(1) 인삼으로부터 marker 유전자의 선발 및 염기서열분석을 통한 SNP 탐색

(2) 효율적인 SNP primer 제작기술개발

(3) 최적의 SNP primer의 적용을 위한 PCR조건의 개발

(4) 선발된 marker 유전자를 통한 SNP primer 제작

(5) 개발된 SNP primer를 이용하여 간편하고 신속한 분석법의 개발

(6) SNP primer를 이용한 One-step 분석의 시제품개발

2) D/B검색을 통한 인삼의 SNP의 탐색

3) 신품종 재배인삼의 유전적 정체성 확인 연구

(1) 분자계통학적 기술을 이용한 분자유전학적 표지인자 기술확보연구

(2) 신품종 재배인삼과 비교군(지역별 전통 재배인삼, 수입인삼 등)간의 분자유전학적 유연관계 분석 연구

나. 인삼 및 감자의 SNP primer의 활용기술개발

1) 국내산 인삼 신품종 천풍에서 SNP primer의 활용

2) 신품종 감자에서 SNP primer의 적용가능성

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내기술의 현황

- 1960년대 초반부터 한국에서는 식물학의 입장에서 인삼에 대한 연구가 시작되었고 1962년부터 1964년 사이에 인삼의 생육에 대한 생리, 생태학적 연구와 인삼 생육에 대한 광 환경 등이 발표되었고, 1970년대에 식물학적 연구는 차원을 높여 인삼식물의 여러 기관을 전자현미경을 사용하여 미세 구조와 세포화학적 연구가 수행되었다(한국인삼사 편찬위원회, 2002). 같은 해에 인삼을 전문적으로 연구하는 고려인삼연구소의 설립으로 한국인삼에 대한 재배연구 뿐만 아니라 신품종 개발이 본격적으로 진행되었다 (Kwon *et al.*, 1998). 이러한 지속적인 연구 결과로서 고려인삼의 품종화가 진행되었고 최근 신품종으로서 천풍 (Kwon *et al.*, 1998), 연풍 (Kwon *et al.*, 2000), 금풍, 선풍, 고풍 (Kwon *et al.*, 2003) 등이 개발되었다.
- 분자생물학적 측면에서 인삼 구별을 위한 연구를 살펴보면 Ahn (1985년) 등이 인삼, 사삼 및 도라지 등의 단백질 패턴과 분자량에 비교를 인삼 특이적인 단백질 band를 찾은 것이 그 시초이다. 1988년 Taq DNA polymerase가 개발됨으로써 PCR 장치가 활용되어 (전문진 등 2003년), DNA 차이를 이용한 인삼의 종간 (inter species), 종내 (intra species) 간의 구별을 위한 다양한 기술적인 진보가 이루어지게 되었다. 분자생물학적 기술을 이용한 가장 간단하고 경제적으로 DNA의 다양성 확인에 널리 이용되고 있는 RAPD법은 무작위로 합성한 oligo nucleotide 10-mer를 이용하는 것으로, 이 primer는 410가지 즉 약 100만 가지의 염기배열 조합을 가질 수 있고 이 primer 중에서 몇 가지를 이용하여도 기존의 RFLP 기술에 의해서 나타날 수 있는 DNA변이 보다도 월등히 많은 polymorphism을 찾을 수 있다 (Lim *et al.*, 1993). 인삼의 구별에 이용된 예를 보면 고려인삼 변종과 품종별 비교 (Lim *et al.*, 1993 Kim *et al.*, 2003), 미국삼과 고려인삼의 구별 (Boehm *et al.*, 1999 Artyukova *et al.*, 2004), *Panax*속 간의 다양성 (Mathur *et al.*, 2003;

In *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2006), 지역별로 고려인삼의 다양성 (Um *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2003), 중국삼과 기타 인삼의 구별 (Cui *et al.*, 2003) 등이 있다. 그리고 식물체 DNA의 특정부위를 인식하는 제한효소를 사용하여 종간 및 종내 개체간의 유전변이를 확인하는 RFLP (Corell and Zoll, 1988)법의 가장 큰 문제점으로 지적된 시간과 노력이 많이 드는 문제를 개선하여 개발된 PCR-RFLP를 이용하여 고려인삼의 변종 및 품종의 다양성을 조사한 것도 있다 (Yang and Kim, 2003).

- Amplified fragment length polymorphism (AFLP)는 RFLP의 기법을 변형하여 DNA를 제한효소로 처리한 후 설계된 primer를 이용하여 PCR를 수행하는 방법 (Thomas *et al.*, 1995)으로써 인삼에서는 고려인삼과 미국삼의 구별을 위한 마커개발에 사용한 예가 있다 (Luo *et al.*, 2000; Ha *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005). 이외에 inter simple sequence repeats (ISSR)를 이용한 고려인삼 품종간 구별 (Bang *et al.*, 2004), internal transcribed spacers (ITS)를 이용한 *Panax*속 유연관계분석 (Wen and Elizabeth, 1996), 고려인삼 변종과 품종간의 관계분석 (Mihalov *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001)와 미국삼과의 구별 (Leem *et al.*, 2005), 18S와 rbcL에 의한 인삼구별 및 유연관계분석 (Komatsu *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2003)과 single nucleotide polymorphism (SNP)를 이용한 고려인삼과 외국삼의 구별 (Park *et al.*, 2006) 등이 있다.
- 국내의 경우 인간의 SNP연구는 3개의 벤처회사정도가 SNP를 주력사업으로 하여 사업이 진행되고 있으나 이는 주로 인간과 동물에 국한되어서 진행되고 있는 실정으로 식물(작물)에 대한 연구는 거의 전무한 실정이다.
- 본 연구팀은 SNP를 이용하여 외국삼과 국내인삼을 구별하는 시스템을 개발하였으며, 이를 활용하여 국내야생산삼과 재배인삼 및 외국삼을 간편하게 단시간에 구별하는 SNP 시스템을 개발하였다. 또한 본 시스템을 활용하여 국내재배인삼과 미국삼의 잡종을 간편하고 신속하게 구별할 수 있는 것도 실험을 통하여 확인한 바 있다.

제 2 절 외국기술의 현황

- 현재 농업 바이오테크 분야는 제약산업 분야에 비하여 유전체 및 생물정보학 등의 기술 적용이 느린 편이나 향후 그 속도는 더욱 빠르게 증가할 것으로 예상된다. 잡초, 병충, 병원균 등으로부터 작물을 보호하는 기술을 개발함으로써 궁극적으로 작물의 생산성 및 품질향상, 환경보전 등을 도모하기 위해 생물정보학을 비롯한 각종 정보기술이 농업관련 바이오테크에 응용되고 있다.
- 우선 애기장대, 벼, 밀, 옥수수, 대두 등의 식물에 대한 유전체 연구가 이미 진행되고 있으며, 이중 애기장대 지놈프로젝트와 벼 지놈프로젝트가 대표적인데, 이는 이들 지놈의 크기가 보리, 옥수수, 밀, 콩 등 다른 작물에 비하여 현저히 작아 병충과 환경변화에 대한 반응 연구의 모델로서 적합하기 때문이다. 농업관련기업등은 밀, 옥수수, 대두 등의 작물에 대한 지노믹스에 이미 투자를 하고 있으며, 미농무성은 작물관련 데이터베이스 구축과 생물정보학의 분야에서 새로운 유전정보를 얻는데 해마다 350만 달러를 투자하고 있다.
- 생물체로부터 대량으로 유전자 정보를 획득하는데 있어서 강력한 방법 중의 하나가 ESTs (expressed sequence tags) 분석법이다. 최초의 ESTs 분석은 Adams 등(1991)이 인간의 뇌로부터 만들어진 cDNA library 으로부터 무작위로 선별한 609개의 cDNA를 ESTs로 명명함으로써 그 기원이 시작되었다. 비록 대부분의 ESTs가 인간 유전자로부터 얻어진 것이긴 하지만 NCBI의 ESTs databse (dbEST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>)는 현재 250종이 넘는 생명체에 대한 정보가 등록되어 있다 (Wolfsberg *et al.*, 2001).
- 식물에서는 모델식물인 애기장대에서 2,000년도에 게놈 DNA의 염기서열 분석이 완료되어 110,000개 이상의 ESTs를 확보하였고 (Hofte *et al.*, 1993), 아시아의 주요 식량자원인 벼는 한국, 일본, 중국 등이 컨소시움을 구성하여 유전체 분석을 진행하고 있으며 (Mayer and Mewes, 2001), 현재 가장 많은

dbESTs를 보유하고 있다. 애기장대와 벼는 각각 쌍자엽과 단자엽을 대표하는 식물로서 이 두 식물체의 게놈크기(genome size)가 다른 식물에 비해 상대적으로 작는데 애기장대는 125 Mb (Heiko and Wojciech, 2003), 벼는 대략 460 Mb (Mayer and Mewes, 2001)이다. 애기장대와 벼 이외에도 옥수수, 유채, 배추 등에서 분리된 EST가 유전자 database에 등록되어 있다.

- 또한 목본류인 *Pinus taeda* (loblolly pine), 포플러, 감귤의 ESTs 정보가 NCBI의 dbEST에 등록되어 있으며, 계속적으로 새로운 EST 들이 등록되고 있으며, 이러한 유전정보들은 식물의 기능유전체학 (functional genomics), 대사공학 metabolomics), 새로운 품종의 육성 및 품종구별 등에 다양하게 활용되고 있다.
- 계통분류학은 분류군들이 격어온 진화 역사를 반영하는 분류체계를 건설하고, 이를 기초로 분류군간의 진화적 상호유연관계를 규명하려는데 근본 목적이 있다(Donoghue, 1989). 과거의 형태학적 형질에 기초한 식물의 계통학적 분류체계는 다소 이해하기 어려운 문제점들로 인하여 학자간에 심한 논란의 대상이 되기도 하였다(Cronquist, 1988). 최근 1980년대 후반에 이르러서 분자생물학적 연구방법의 발달과 함께 유전자의 변이에 기초한 계통학적 연구가 활발히 진행되고 있다(Moritz and Hillis, 1990). 유전자에 관한 연구는 외부형태에 기초한 전통적 연구에서의 문제점을 보완하여 주고, 특정 유전자의 특성에 기초한 식물의 분자유전학적 정체성, 계통체계 및 진화 과정을 밝혀 주고 있다(Doyle et al., 1992).
- 오늘날에는 진핵 생물의 경우, protein의 expression에 필수적인 ribosome의 rRNA를 coding하는 DNA (Internal Transcribed Sequences)의 nucleotide sequence를 분석하여 분류를 실시하는 분자생물학적 연구가 활발히 전개되고 있다. 실제로 SNP (Single Nucleotide Polymorphism)이나 다른 nucleotide sequences의 차이를 이용하여 식물 구별하기 위해서는 거의 모든 essential gene들이 대상이 될 수 있다. 그러나, 그 중에서도 ribosome의 rRNA를 coding하는 nucleotide sequence는 개체에 상관없이 일정하게 유지되어 있고, 오늘날 모든 생물체의 계통분류 연구에 필수적인 sequence가 되어 있다. 분자생물학적인 방법으로 생물체를 계통분류하기 위하여는 꼭 이

rDNA region을 sequencing해야 한다.

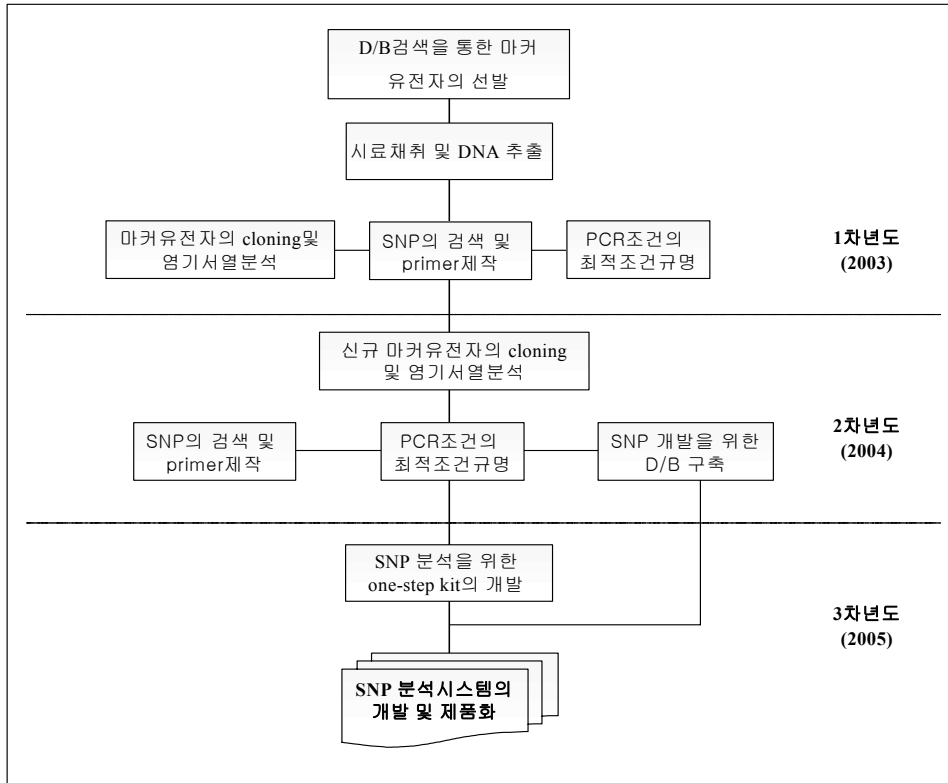
- rDNA region중에서 서로 연관이 먼 생물체의 분류를 위해서는 rDNA 중에서 18S rRNA나 28S rRNA를 coding하는 sequence의 차이를 기준으로 삼는다. 그러나, 인삼과 같이 연관이 가까운 생물체의 분류를 위해서는 coding region의 사이사이에 존재하는 ITS1,ITS2 region의 sequence 차이를 분류의 기준으로 삼는다. 이것은 ITS region이 rRNA coding region보다 mutation 되기 쉽기 때문이다.

제 3 절 앞으로 전망

분자생물학은 21세기에 접어들면서 기초생명과학 뿐만 아니라 의 약학, 농·수산, 식품 분야 등 광범위한 분야에서 강력한 파급 효과를 내고 있으며 또한 암, 에이즈 등과 같은 난치병, 유전병, 환경오염, 식량 및 에너지 문제 등 인류가 당면한 난제들에 대하여 분자생물학은 제 3의 산업혁명을 이룰 핵심 첨단 기초학문으로 평가받고 있어 분자생물학을 기초로 한 인삼연구는 추후 더욱 다양하게 진행 될 것이라고 판단된다.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 연구추진전략



제 2 절 연구개발 수행내용

가. 인삼에서 SNP탐색 및 분석시스템의 개발

- 1) 인삼으로부터 마커(marker) 유전자의 선발 및 염기서열분석을 통한 SNP 탐색

가) 인삼으로부터 SNP의 분석

- 단일염기다형성(SNP, single nucleotide polymorphism)은 DNA 특정사슬에 있어서 어떤 개체는 A를 가지고 있고, 어떤 개체는 C를 가지고 있는 경우 이러한 염기간의 차이를 말한다. 가장 흔한 형태의 DNA 변이인 단일염기다형성(SNP · single nucleotide polymorphism)의 경우 500-1,000 염기당 1 개꼴로 나타난다고 한다.
- SNP marker는 고비율로 존재하기 때문에 높은 정확도 및 해상도로 개놈의 개체간의 차이를 해독하는데 매우 유용하다. SNP marker는 각 개체간의 염기배열의 차이를 직접 비교하는 것으로 이를 동정하기 위해서는, 인간의 경우에 10명 이상의 샘플로부터 개놈 DNA를 추출한 후 라이브러리화하여, 대규모로 염기배열을 결정하고 표준 샘플에서 얻은 염기배열과 비교함으로써 염기배열의 다양성 정보를 알 수 있다.
- SNP의 비교연구는 종간의 진화나 계통연구에 새로운 돌파구를 제시하고 있으며, 또한 SNP들은 질병저항성의 차이도 유발하는 것으로 보고 있다. 비슷한 여건의 사람들 중 어떤 사람은 다른 사람에 비해 질병에 걸릴 확률이 높는데 이는 SNP들에 의해 특징지워지는 유전적 소양의 차이에 의한 것이라고 한다.

나) 인삼으로부터 SNP의 primer작성

- 이러한 SNP의 유용성을 활용하면 근연관계에 있는 식물체들의 유연관계를 규명할 수 있고 또한 특정한 식물체의 종간 및 아종, 품종간의 구별도 가능할 것으로 보이며 이를 특정품종의 선발 marker로서 활용할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 아직 SNP primer를 효율적으로 제작하는 방법이 알려져 있지 않고 작물에 따라서 많은 차이가 있다. 그 이유는 primer의 경우 보통 70-80%만 유사하더라도 모본 DNA와 hybridization이 될 가능성이 높기 때문 1개의 염기서열이 다른 SNP primer의 제작과 활용은 그만큼 어려움이 있다.

- SNP의 기본적인 성격은 marker 이므로 활용도 역시 여타 marker들과 크게 다를 바가 없으나 다만 기존의 marker들에 비해 보다 촘촘하고 안정한 map을 작성할 수 있다는 점과 새로운 기술, 특히 DNA chip을 포함하는 high-throughput technology에 보다 적합한 특성, 즉 탐색에서 분석에 이르는 전 과정이 robot과 컴퓨터에 의해 고속으로 자동화될 수 있다는 점이 SNP의 차별화된 특성이라고 할 수 있다. 이러한 특성은 최근 구미의 대형 제약업체들이 속속 진출하고 있는 “pharmacogenomics” 분야에 매우 유망한 소재로서 부각되고 있다.
- 오늘날에는 진핵 생물의 경우, protein의 expression에 필수적인 ribosome의 rRNA를 coding하는 DNA (Internal Transcribed Sequences)의 nucleotide sequence를 분석하여 분류를 실시하는 분자생물학적 연구가 활발히 전개되고 있다. 실제로 SNP (Single Nucleotide Polymorphism)이나 다른 nucleotide sequences의 차이를 이용하여 식물 구별하기 위해서는 거의 모든 essential gene들이 대상이 될 수 있다. 그러나, 그 중에서도 ribosome의 rRNA를 coding하는 nucleotide sequence는 개체에 상관없이 일정하게 유지되어 있고, 오늘날 모든 생물체의 계통분류 연구에 필수적인 sequence가 되어 있다. 분자생물학적인 방법으로 생물체를 계통분류하기 위하여는 꼭 이 rDNA region을 sequencing해야 한다.
- rDNA region중에서 서로 연관이 먼 생물체의 분류를 위해서는 rDNA 중에서 18S rRNA나 28S rRNA를 coding하는 sequence의 차이를 기준으로 삼는다. 그러나, 인삼과 같이 연관이 가까운 생물체의 분류를 위해서는 coding region의 사이사이에 존재하는 ITS1, ITS2 region의 sequence 차이를 분류의 기준으로 삼는다. 이것은 ITS region이 rRNA coding region보다 mutation되기 쉽기 때문이다.
- 본 연구에 사용한 재료는 현재까지 순계분리된 신품종 재배인삼 2계열의 8집단(품종별 4집단)에서 수 개체를 임의로 선택하여 주재료로 사용하였으며, 유전적 유연관계를 검토하기 위하여 국내재배인삼 및 수입인삼 6집단을 비교군으로 사용하고자 한다. 실험에 사용된 재료는 개화기와 결실기의 성체를 석엽표본으로 제작하여 증거표본으로써 확보하였다. DNA 추출을 위하여 채집된 식물의 잎은 얼음과 함께 ice box를 이용하여 실

험실로 운반하거나, silica gel로 건조하여 밀폐된 비닐주머니에 넣어 실험실로 운반하였다. 채집된 잎은 액체질소를 넣어 막자사발로 분말로 파쇄하여 -70°C 의 deep freezer에 보관하였다.

- DNA추출은 CTAB method(Doyle et Doyle, 1987)를 다소변형한 아래의 방법으로 실시하였다. 우선 냉동보관된 약 1.0g의 분말조직을 0.5% 2-β-mercaptoethanol이 첨가된 15 ml의 extraction buffer(2% CTAB; 100 mM Tris, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 500 mM NaCl)에 넣은 후 65°C 에서 20분간 incubation하며, 조직내 phenol 화합물, 타닌등의 불순물을 제거하기 위하여, extraction buffer에 2% PVP-40을 첨가한다. Incubation후 SEVAC 용액(chloroform:Isoamyl alcohol=24:1) 7.5 ml를 첨가하여, 8000 g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하고 이 부피의 2/3이 되는 양의 isopropanol을 첨가한 후 -20°C 에서 12시간 이상 보관하였다가 8000 g로 30분간 원심분리하여 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA pellet은 70% ethanol로 세척한 후 TE buffer(1 M Tris, 0.5 M EDTA, pH 8.0)에 용해하였으며, 그 후 필요에 따라 7.5 M ammonium acetate, 2.5 M sodium acetate 등을 이용한 정제과정을 거쳤다. 추출된 DNA 용액에 RNA를 제거하기 위하여 RNase(2 unit/ml, 37°C , 1 hour; Berhinger Mannheim)을 처리하며, Geneclean kit(Bio 101 Inc., CA, USA)와 Chelex 100(Bio-Rad Lab., CA, USA)를 이용하여 DNA를 순수 정제하였다. 정제된 DNA는 0.7% Agarose gel로 전기영동한 후 1% EtBr로 염색하여 UV illuminator상에서 marker와의 밝기정도를 비교하는 spot-test를 실시하거나, spectrophotometer를 이용하여 그 농도를 계산하였다.
- 추출된 DNA로부터 절편의 증폭반응은 Perkin-Elmer 9600 thermal cycler에서 수행된다. PCR 반응은 전체 50μl 부피로 행하며, 10-50ng DNA, 1.5unit Taq DNA Polymerase(Perkin & Elmer, Cetus), 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 0.5-1.0μM primer 및 200μM의 각 dATP, dCTP, dGTP, dTTP 등이 포함되어 있다. RAPD PCR에 사용되는 primer는 UBC, NAPS(University of British Columbia)에서 제작된 random primer set 및 No. 1 - No. 200의

10-mer oligo primer를 이용하며, 다음의 PCR반응에 사용하였다. ① 94°C에서 2분간 pre-denaturation, ② 94°C에서 1분간, 42°C에서 2분간, 72°C에서 2분으로 구성된 amplifying cycle을 35회 반복, 마지막으로 ③ 72°C에서 7분동안의 final extension으로 구성된 3단계의 PCR과정을 거쳐 DNA product를 만들어 낸다. 이때 각각의 primer에 대한 상기의 PCR 과정을 통한 screening을 실시하여, 선택된 primer별로 2회 이상의 반복실험을 수행하여 유용한 표식인자를 제공하는 primer를 결정하였다. PCR을 통하여 합성된 DNA product는 1.5% Agarose gel로 전기영동하여 marker를 선별하고 이를 Polaroid film(Kodak 667)으로 촬영하였다.

- **PCR에 의한 ITS region의 증폭** : 추출된 DNA로부터 ITS region의 증폭은 다음의 PCR(polymerase chain reaction) 반응을 이용하여 실시한다. PCR 반응은 전체 100 μ l 부피로 행하며, 10-50ng DNA, 1.5unit Taq DNA Polymerase, 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 0.5-1.0 μ M primer 및 200 μ M의 각 dATP, dCTP, dGTP, dTTP 등이 포함되어 있다. 우선 ITS region의 증폭을 위하여는 ITS4 primer와 ITS5 primer를 각각 이용하여, ① 94°C에서 3분간 pre-denaturation, ② 94°C에서 1분간, 52°C에서 2분간, 72°C에서 4분으로 구성된 amplifying cycle을 30회 반복, 마지막으로 ③ 72°C에서 7분동안의 final extension으로 구성된 3단계의 PCR과정을 거쳐 dsDNA template를 만들어 냈다.
- **Gene Cloning 및 Sequencing** : PCR과정을 통하여 핵DNA ITS gene의 합성이 성공한 분류군을 제외하고 유전자 증폭상의 문제가 있는 분류군들의 template dsDNA의 정확하고 용이한 Sequencing을 수행하기 위하여, TA Cloning kit(IN VITRO GENE)을 사용하여 공급자의 Manual에 따라 Gene cloning을 실시하였다. PCR과 Cloning과정을 통하여 대량 분리된 ITS region은 공급자의 manual에 따라서 dye labelled dideoxy termination method를 이용하여 Automated sequencer(Perkin Elmer Ltd., ABI 3700)로 염기서열분석을 수행하였다.

2) D/B검색을 통한 인삼의 SNP의 탐색

- SNP(single nucleotide polymorphism)의 비교연구는 종간의 진화나 계통연구에 새로운 돌파구를 제시하고 있으며, 또한 SNP는 질병저항성에 대한 다양성의 원인으로도 작용한다는 것이 알려져 있다. 이러한 SNP의 유용성을 활용하면 근연관계에 있는 식물체들의 유연관계를 규명할 수 있고 또한 특정한 식물체의 종간 및 품종간의 구별에도 활용할 수 있다. 인삼은 보통 4년에 1회 채종을 원칙으로 하고 있기 때문에 타작물에 비해 육종기간이 매우 길다. 현재 고려인삼 신품종은 순계분리에 의하여 천풍, 연풍, 고풍 등이 등록되었으며 상품화되고 있는 실정이지만 중국등 외국으로 종자가 이미 반출되어 그곳에서 재배되어 비싸게 국내로 다시 반입될 가능성이 매우 높다. 따라서 이런 신품종과 기존의 인삼과 구별하기 위해서는 바이오 마커가 절대로 필요한 상황이다. 본 연구에서는 바이오마커를 찾기 위해서 고려인삼의 품종들에서 EST(expressed sequence tag)분석을 통하여 대량으로 확보한 cDNA sequence data에 대하여 BioEdit 프로그램을 사용하여 99% 상동성 있는 sequence data만을 수집한 후 그 중에서 SNP로 추정되는 sequence를 NCBI의 Blast 검색을 통하여 인삼 SNP를 탐색하는 것을 목적으로 하고 있다.
- **EST data** : 인삼 5개의 cDNA library에서 분석된 2만여개 EST
모상근자경종(DCO1), 14년근 자경종인삼(DC02), 4년근 천풍(DC03), 자경종(DC04), 4년경 연풍 잎(DC05)
- **시험방법** : 2만개의 인삼 EST data를 BioEdit 프로그램으로 Blast 검색을 하여 400~700 bp에서 99% 상동성을 가지는 것들을 수집하였다. 그리고 SNP인지를 확인하기 위하여 GeneBank에서 그에 대응한 기타 염기서열들을 찾아 web ClustalW를 이용하여 상동성과 SNP임을 확인하였다.
- **고려인삼 신품종 천풍과 타 품종간의 SNP 분석**: EST는 mRNA를 역전사 효소를 이용해 cDNA로 만듦으로써 가능했으며 이러한 짧은 cDNA들은 PCR을 통해 증폭되어 클론되었다. 그렇기 때문에 EST는 mRNA가 유래한 세포에서 실제로 발현되는 유전자라 할 수 있다. 이 방법은 유전자의 아주

작은 부분만은 증폭하기 때문에 하나의 유전자에서 다수의 서로 다른 EST가 만들어질 수 있다. 이러한 중복을 최소화하기 위해 P. Deloukas는 지도 작성을 위한 EST는 각 유전자의 3'말단에 있는 비번역지역로 제한하였다. 이러한 방법은 단일방향으로만 시퀀스하므로 신속하고 경제적이며 무작위로 염기들을 뽑을 수 있으므로 지금 널리 응용되고 있다.

3) 신품종 재배인삼의 유전적 정체성 확인

- 본 연구에 사용된 재료는 현재까지 순계분리된 신품종 재배인삼 2계열(연풍, 천풍)의 4집단에서 소수의 개체를 임의로 선택하여 주재료로 사용하였다. 또한, 이들의 유전적 유연관계를 검토하기 위하여 기존의 국내외 재배인삼 4계열(자경종, 황숙종, 중국산, 러시아산), 주재료외의 신품종인삼 3계열(금풍, 고풍, 선풍) 및 야생형의 산삼 4계열(백두산, 평창군, 소백산, 철원)을 비교분석하였고, 인삼의 분자유전학적 분석을 위하여 외국산 근연종 5집단을 비교군으로 사용하였다(Table 1). 실험에 사용된 재료는 결실기의 성체를 석엽표본으로 제작한 후, 증거표본으로써 확보하여 보관하였다. DNA 추출을 위하여 채집된 식물의 잎은 얼음과 함께 ice box를 이용하여 실험실로 운반하거나, silica gel로 건조하여 밀폐된 비닐주머니에 넣어 실험실로 운반하였다. 채집된 잎은 액체질소를 넣어 막자사발로 분말로 파쇄하여 -70°C의 deep freezer에 보관하였다.
- DNA추출은 CTAB method(Doyle et Doyle, 1987)를 다소변형한 아래의 방법으로 실시하였다. 우선 냉동보관된 약 1.0g의 분말조직을 0.5% 2-β-mercaptoethanol이 첨가된 15 ml의 extraction buffer(2% CTAB; 100 mM Tris, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 500 mM NaCl)에 넣은 후 65°C에서 20분간 incubation하며, 조직내 phenol 화합물, 탄닌등의 불순물을 제거하기 위하여, extraction buffer에 2% PVP-40을 첨가한다. Incubation후 SEVAC 용액(chloroform:Isoamyl alcohol=24:1) 7.5 ml를 첨가하여, 8000 g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하고 이 부피의 2/3

이 되는 양의 isopropanol을 첨가한 후 -20°C 에서 12시간 이상 보관하였다가 8000 g로 30분간 원심분리하여 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA pellet은 70% ethanol로 세척한 후 TE buffer(1 M Tris, 0.5 M EDTA, pH 8.0)에 용해하였으며, 그 후 필요에 따라 7.5 M ammonium acetate, 2.5 M sodium acetate 등을 이용한 정제과정을 거쳤다. 추출된 DNA 용액에 RNA를 제거하기 위하여 RNase(2 unit/ml, 37°C , 1 hour; Berhinger Mannheim)을 처리하며, Geneclean kit(Bio 101 Inc., CA, USA)와 Chelex 100(Bio-Rad Lab., CA, USA)를 이용하여 DNA를 순수정제하였다. 정제된 DNA는 0.7% Agarose gel로 전기영동한 후 1% EtBr로 염색하여 UV illuminator상에서 marker와의 밝기정도를 비교하는 spot-test를 실시하거나, spectrophotometer를 이용하여 그 농도를 계산하였다.

- PCR에 의한 엽록체 DNA의 *trnL-F* region과 핵리보솜 DNA의 ITS region, ETS region의 증폭 : 추출된 DNA로부터 *trnL-F* region과 ITS region 그리고 ETS region의 증폭은 다음의 PCR(polymerase chain reaction) 반응을 이용하여 실시였다. PCR 반응은 전체 100 μl 부피로 행하였고, 10-50ng DNA, 1.5unit Taq DNA Polymerase, 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 0.5-1.0 μM primer 및 200 μM 의 각 dATP, dCTP, dGTP, dTTP 등이 포함되어 있다. 우선 *trnL-F* region의 증폭을 위하여는 T1 primer와 T6 primer(Fig. 1), ITS region의 증폭을 위하여는 ITS4 primer와 ITS5 primer(Fig. 2), ETS region의 증폭을 위해서는 ETS 1F primer와 18S-R primer(Fig. 3)를 각각 이용하였다. PCR cycle은 다음과 같이 ① 94°C 에서 2분간 pre-denaturation, ② 94°C 에서 1분간, 52°C 에서 2분간, 72°C 에서 4분으로 구성된 amplifying cycle을 30회 반복, 마지막으로 ③ 72°C 에서 7분동안의 final extension으로 구성된 3단계의 PCR과정을 거쳐 dsDNA template를 만들어 내었다.

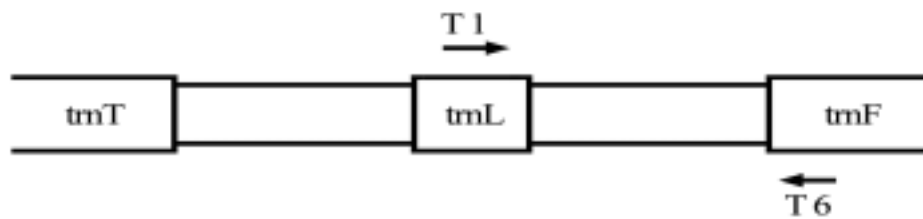


Fig. 1. Diagram and position of PCR/sequencing primers for plastid DNA *trnL-F* gene

T1 : CGAAATCGGTAGACGCTACG

T6 : ATTTGAACTGGTGACACGAG

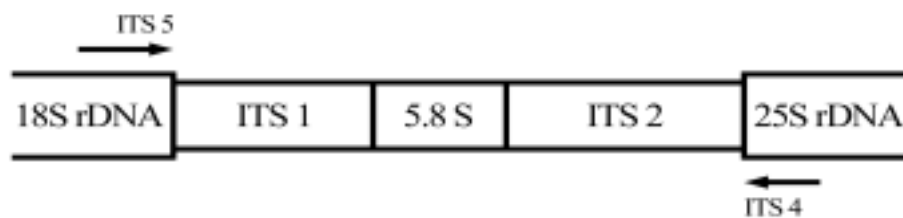


Fig. 2. Diagram and position of PCR/sequencing primers for nuclear ribosomal DNA ITS region

ITS5 : GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG

ITS4 : TCCTCCGCTTATTGATATGC

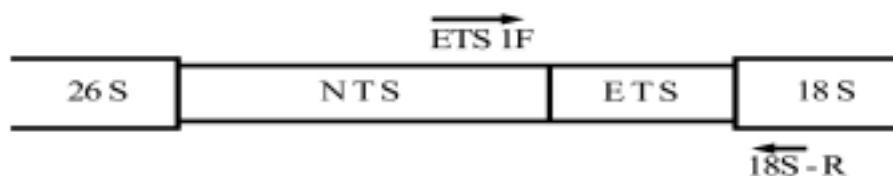


Fig. 3. Diagram and position of PCR/sequencing primers for nuclear ribosomal DNA ETS gene

ETS 1F : CTGTGGCGTCGCATGAGTTG

18S-R : AGACAAGCATATGACTACTGGCAGG

- **Gene Cloning 및 Sequencing** : PCR과정을 통하여 엽록체 DNA *trnL-F* region과 핵리보솜 DNA ITS region, ETS region의 합성이 성공한 분류군을 제외하고 유전자 증폭상의 문제가 있는 분류군들의 template dsDNA의 정확하고 용이한 Sequencing을 수행하기 위하여, TA Cloning kit(In Vitro Gene)을 사용하여 공급자의 Manual에 따라 Gene cloning을 실시하였다. PCR과 Cloning과정을 통하여 대량증폭된 엽록체 DNA *trnL-F* region은 공급자의 manual에 따라서 dye labelled dideoxy termination method를 이용하여 Automated sequencer(Perkin Elmer Ltd., ABI 3700)로 염기서열분석을 수행하였다.

- **Sequence alignment와 phylogenetic analysis**: 염기서열분석이 수행된 엽록체 DNA *trnL-F* region과 핵리보솜 DNA ITS region, ETS region의 영역은 기존에 발표된 sequence 들과 비교하여 결정하였으며, ClustalX program, Autoassembly, Sequencer 등을 이용하여 일단 염기서열의 정확도와 sequence alignment를 실행 및 확인한 후, 최종적으로 육안에 의하여 결과를 검토였다(Appendices 1, 2, 3). 또한, 각 분류군에 대한 색소체 DNA *trnL-F* region과 핵리보솜 DNA ITS region, ETS region의 유전정보를 요약하여 제시하였으며(Table 5), 기존에 발표된 동일한 분류군의 sequence와 비교할 수 있도록 제시하였다(Table 6).

- 염기서열분석결과 얻어진 유전정보의 분석은 PHYLIP(Phylogenetic Inference Package, ver. 3.5c)내의 DNADIST program의 Kimura's two parameter에 의한 genetic distance matrix를 작성하였다(Table 8, 9, 10, 11). 또한 PAUP*(Phylogenetic Analysis Using Parsimony) program을 이용하여 molecular phylogenetic tree를 작성하고, 계통도의 신뢰도와 정확성을 구축하기 위하여, Jackknife analysis 및 bootstrap analysis를 수행하였다.

나. 인삼 및 감자에서 최적조건의 SNP primer의 활용

1) 신품종 재배인삼에서 SNP의 활용

가) 인삼 신품종 수집

- 본 실험에서 사용된 인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)는 KT&G (전 한국인삼연초연구원)에서 직접 육성한 신품종 묘삼인 친풍 (10개체)과, 기존에 재배되고 있는 혼계 자경종 그룹 1 (10개체), 자경종 그룹 2 (10개체)을 사용하였다 (Fig. 4). 또한 최종적으로 품종확인을 위하여 KT&G에서 임의로 선발된 5종의 6년근 친풍 (4개체), 연풍 (4개체), 금풍 (4개체), 자경종 (4개체)과 황숙종 (4개체)의 잎을 채취하여 이중 맹검법에 의하여 친풍의 구별을 위한 시료로 사용하였다. 묘삼은 동체와 뿌리를 사용하였고 잎은 필요한 양을 사용하여 DNA를 추출하고 나머지 시료는 액체질소로 얼린 후 deep freezer (-80℃)에 보관하였다.



Fig. 4. Photographs of *Panax ginseng* roots used for distinction of ginseng cultivars. A-Chunpoong, B-Jakyung 1, C-Jakyung 2.

나) 묘삼으로부터 genomic DNA의 추출

- 토양에서 채취한 묘삼은 흐르는 수도물로 표면의 흙을 제거하고 paper towel을 이용하여 수분을 제거한 후 막자사발에 넣고 액체질소를 부어 완전히 마쇄한 후, 분말 100 mg 정도를 멸균된 1.5 ml Eppendorf tube에 넣고, 녹기전에 추출 buffer를 넣어 genomic DNA를 분리·정제하였다(QIAGEN Dneasy plant mini kit, USA; Gene AllTM Plant SV Kit, Korea). 추출된 genomic DNA는 1.5% agrose gel에서 전기영동하여 상태를 확인한 후, UV/VIS spectrophotometer(Amersham bioscience, USA)의 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 DNA 순도검정 및 정량을 실시하였다.

다) 이중 맹검법에 의한 천풍인삼 판별을 위한 DNA추출 및 PCR

- 선발된 인삼 잎 20 mg을 멸균된 1.5 ml Eppendorf tube에 넣고 액체질소를 넣어 멸균된 페슬로 빠르게 5초 동안 마쇄한 후 200 l의 0.5 M NaOH를 넣고 vortexing하여 혼합하고 5 l를 취하여 100 M Tris (pH 8.0) 495 l 들어 있는 tube에 넣고 vortexing한 후 1 l를 PCR template로 사용하였다 (Wang *et al.*, 1993).
- **PCR 증폭 및 검증** : PCR 증폭은 Williams (1990)의 방법을 변형하여 사용하였다. PCR 반응 용액은 멸균 증류수에 10×buffer 2.5 l, 10 mM dNTP 0.5l, 0.5 U DNA polymerase, 50 ng DNA 1 l, primer를 혼합하여 총 20 l로 맞추어 후 PCR 반응을 실시하였다 (Tables 1, 2).
- **PCR product의 검증 및 데이터 분석** : 증폭된 산물은 1.5% agrose gel에서 1 kb와 100 bp DNA ladder (Bioneer, Korea)와 함께 전기영동하여 확인하고 electrophoresis를 한 agarose gel 상의 band는 자외선 조명장치상에서 디지털 카메라를 이용하여 촬영한 후 데이터로 저장하였다. 데이터의 분석은 photoshop를 이용하여 밴드의 color와 선명도를 조절한 후 분석에 사용하였다.
- **Plasmid DNA 추출 및 sequence 분석** : 선발된 clone들은 sequencing 분

석을 위해서 pGEM T easy vector (Promega, USA)에 cloning하였다. Sequencing 분석을 위한 plasmid 분리는 알칼리 용해방법 (Bimboim *et al.*, 1979)을 사용하여 분리하였다. 박테리아를 4 ml의 LB 배지에 12~16시간 배양한 후 배양액을 1.5 ml Eppendorf 원심분리 튜브로 옮겨 박테리아를 수확하였다. 박테리아는 100 μ l의 GTE buffer (50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl, pH8.0; 10 mM EDTA)에 현탁한 후 200 μ l의 알칼리 sodium dodecyl sulfate (SDS) 용액 (0.2 N NaOH, 1% SDS)를 가하여 혼합하고 5분간 얼음에 보관하였다. 여기에 150 μ l의 3 M potassium acetate (pH 4.8) 용액을 가하여 얼음에 보관한 후 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액은 동량의 phenol/chloroform (1:1)을 첨가하여 12,000 \times g에서 10분간 원심분리하여 상등액에 2배의 에탄올을 첨가하여 -70 $^{\circ}$ C에서 30분간 두었다.

Table 1. PCR primers for the detection of specific molecular marker in *Panax ginseng* new cultivar Chunpoong

Primer Name	Length (mer)		Sequence
Primer1 (s88)	30	Left	5'-ATA TGC CAA ACA GGA ATC AAG TCA GAC GGG-3'
Primer2 (A554)	30	Right	5'-CGC CCT TAT GAT GAG CCT CAA TAT CTC TGG-3'
Primer3 (CS448)	28	Left	5'-ATG GAC CAT CAA CTA TGA GAA GCC CGA C-3'
Primer4 (YA502)	28	Right	5'-ATA CGC CGT CGG ATC CTT CAC ACT CCC A-3'
Primer5 (sF)	28	Left	5'-ATG GAC CAT CGA CTA TGA GAA GCT CCT C-3'
Primer6 (sR)	28	Right	5'- ATA CGA CGT CGG ATC CTT GAC GCT CGA A-3'
Primer7 (majorFor)	25	Left	5'-ATA TTA ATG GGT TTA ACT GGT AAG T-3'
Primer8 (majorRev)	21	Right	5'-ATG ATG AGC CTC AAT ATC TCT-3'
Primer9 (majorF)	21	Left	5'-AGA GAT ATT GAG GCT CAT CAT-3'
Primer10 (sR2)	28	Right	5'-GAG GAG CTT CTC ATA GTC GAT GGT CCA T-3'
Primer11 (sF_21)	21	Left	5'-ATG GAC CAT CGA CTA TGA GAA-3'
Primer12 (sF_24)	24	Left	5'-ATG GAC CAT CGA CTA TGA GAA GCT-3'

Table 2. PCR conditions for the selection of optimum amplification in *Panax ginseng* new cultivar Chunpoong

	Pre-dena- turation	Denaturation	Annealing temperature (AT)	Extension	Cycle no.	Final- Extension
Program A	94°C, 10 min	94°C, 30 s	66°C, 30 s	72°C, 30 s	30	72°C, 10 min
Program B	96°C, 5 min	96°C, 30 s	55°C-66°C, 30 s	72°C, 30 s	30	72°C, 10 min
Program C	96°C, 5 min	96°C, 30 s	60°C, 30 s	72°C, 40 s	35	72°C, 10 min
Program D	96°C, 5 min	96°C, 30 s	55°C/58°C, 30 s	72°C, 40 s	36	72°C, 10 min
Program E	94°C, 5 min	94°C, 30 s	52°C, 30 s	72°C, 1 min	36	72°C, 10 min

- 플라스미드 DNA는 4°C에서 10분간 원심분리 하여 80% 에탄올로 씻은 후 말려 50 μ l의 RNase를 포함한 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA)에 녹여 사용하였다. 이중 염기서열분석을 위해 선별된 플라스미드 DNA는 350 μ l TE buffer를 더한 후 400 μ l의 PEG 용액 (13% PEG, 2.5 M NaCl)을 처리하여 얼음에 10분간 두었다. 플라스미드 DNA는 4°C, 12,000 \times g에서 10분간 원심분리한 후 70% 에탄올로 씻은 다음 말려 400 μ l의 TE buffer에 녹였다. 이 용액에 동량의 phenol/chloroform (1:1)을 가하여 12,000 \times g 10분간 원심분리한 후 상등액에 2배의 에탄올과 1/4배의 10 M ammonium acetate를 첨가한 후 plasmid를 침전시키기 위해서 -70°C에서 30분간 처리하였다. 침전시킨 플라스미드 DNA는 4°C에서 10분간 원심분리 하여 얻고 70% 에탄올로 씻은 후 자연 건조시키고 10 μ l의 멸균수에 녹인 뒤 정량하여 염기서열분석을 위한 반응에 사용하였다.
- Sequencing 분석은 automatic DNA sequencer (ABI prism 3700)를 이용하여 5'방향의 T7 promoter (5'-ATT ATGCT GAGTG ATATC CC-3')와 3' 방향의 SP6 promoter (5'-ATTT GTGGA ACACT ATAGA AT-3')를

이용하여 전체의 염기서열 분석을 실시하여 major latex protein homolog여부를 확인하였다.

- **Sequence alignment와 계통분석** : 본 실험에 사용한 인삼 ESTs의 상동성과 SNP분석을 위하여 SeqManII의 assemble분석 방법을 사용하여 분석하였고 또한 기존 NCBI의 GenBank에 있는 ESTs Data와 어떤 상동성이 있는지를 확인하기 위하여 NCBI에서 blastx를 사용하였다. 다형성 유연관계는 MEGA3를 이용하여 Neighbor Joining방법으로 개체간의 유연관계를 조사하였다.

2) 신품종 감자에서 최적조건의 SNP primer의 활용

가) 감자 DNA 추출 및 PCR

- **감자 DNA 추출** : DNA추출은 CTAB method(Doyle et Doyle, 1987)를 다소 변형한 아래의 방법으로 실시하였다. 우선 냉동보관된 약 1.0g의 분말조직을 0.5% 2- β -mercaptoethanol이 첨가된 15 ml의 extraction buffer(2% CTAB; 100 mM Tris, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 500 mM NaCl)에 넣은 후 65°C에서 20분간 incubation하며, 조직내 phenol 화합물, 탄닌등의 불순물을 제거하기 위하여, extraction buffer에 2% PVP-40을 첨가하였다. Incubation후 SEVAC 용액(chloroform:Isoamyl alcohol=24:1) 7.5 ml를 첨가하여, 8000g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하고 이 부피의 2/3이 되는 양의 isopropanol을 첨가한 후 -20°C에서 12시간 이상 보관하였다가 8000 g로 30분간 원심분리하여 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA pellet은 70% ethanol로 세척한 후 TE buffer(1 M Tris, 0.5 M EDTA, pH 8.0)에 용해하였으며, 그 후 필요에 따라 7.5 M ammonium acetate, 2.5 M sodium acetate 등을 이용한 정제과정을 거쳤다. 추출된 DNA 용액에 RNA를 제거하기 위하여 RNase(2 unit/ml, 37°C, 1 hour; Borhinger Mannheim)을 처리하였다. 정제된 DNA는 0.7% Agarose gel로 전기영동

한 후 1% EtBr로 염색하여 UV illuminator상에서 marker와의 밝기정도를 비교하는 spot-test 방법과 spectrophotometer를 이용하여 그 농도를 계산하였다.

나) PCR에 의한 ITS(Internal Transcribed Spacer) region의 증폭

- **PCR 실시** : 추출된 DNA로부터 ITS region의 증폭은 다음의 PCR 반응을 이용하여 실시하였다. PCR 반응은 전체 40 μ l 부피로 행하였으며, 100ng DNA, 1.5unit Taq DNA Polymerase, 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 각각 0.5-1.0 μ M primer 및 200 μ M의 각 dATP, dCTP, dGTP, dTTP 등이 포함되어 있다. ITS region의 증폭을 위하여 ITS5F primer와 ITS4R primer(Table 3)를 이용하여, ① 96°C에서 2분간 pre-denaturation, ② 96°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 1분으로 구성된 amplifying cycle을 30회 반복, 마지막으로 ③ 72°C에서 10분동안의 final extension으로 구성된 3단계의 PCR과정을 거쳤다.

Table 3. Primer sequences of ITS 5F, ITS 4R used in this study

Primer	Sequence(5'-3')
ITS 5F (Forward)	5' - GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG - 3'
ITS 4R (Reverse)	5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'

- **Gene cloning 및 Sequencing** : PCR과정을 통하여 DNA ITS 합성이 성공한 PCR 산물들의 정확하고 용이한 sequencing을 수행하기 위하여, pGEM - T Easy Vector System I (In Promega Corporation)을 사용하여 공급자의 manual에 따라 gene cloning을 실시한 후 PCR과 Cloning과정을 통하여 대량 분리된 ITS region은 automated sequencer(Perkin Elmer Ltd., ABI 3700)로 염기서열분석을 수행하였다.

제 3 절 연구수행 결과

가. 인삼에서 SNP탐색 및 분석시스템의 개발

1) 인삼으로부터 마커(marker) 유전자의 선발 및 염기서열분석을 통한 SNP 탐색

가) RAPD를 이용한 표지인자 검토

- 인삼은 오가피과(Araliaceae)의 인삼속(*Panax* genus)에 속하며, 식물분포상 북위 30도에서 48도의 아시아의 극동 지방과 북미에서 주로 재배되는 고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)과 중국의 운남성에서 재배되는 전칠삼(*Panax notoginseng*), 그리고 미국, 캐나다의 북부지역에서 재배되는 미국삼(*Panax quinquefolium*)등이 3대 권역으로 나누어 분포하고 있다(최, 1996). 현재까지 *Panax*속 식물인 인삼의 종은 연구자에 따라 변종을 포함하여 7-10 종으로 분류하고 있으며(최, 1996), 일반적으로 인삼은 종의 형태에 따라 고려인삼(*Panax ginseng* C.A.Meyer), 죽절삼(*Panax japonicum* C.A.Meyer), 전칠삼(*Panax notoginseng* Burkill), 가인삼(*Panax pseudo-ginseng* Wall.), 미국삼(*Panax quinquefolium* Linne)과 삼엽삼(*Panax trifolius* Linne)등이 있다. 그 중 우리나라 인삼은 해외에서 고려인삼이라는 별칭으로 국제인삼 시장에서 가장 고품질의 인삼으로서 인정받고 있으며 우리나라 최고의 수출농산물이기도 하다.
- 인삼은 품종 육종연구에 있어서 열매와 줄기의 색소변화에 따른 변종으로만 분리되어 사용되고 있을 뿐으로서 아직까지 품종으로서 확립되지 않고 있는 실정이며, 현재까지 인삼의 표지인자와 경색발현, 조.만기 출아, 다소엽발생 등의 계통간 차이점이 있다는 사실등으로 인삼의 기초적인 유전적 현상 구명이 이루어지고 있으나 특별한 표지인자가 없어 육종적인 측면에서 어려움이 많다(최, 1994). 동위원소에 의한 인삼의 분류는 같은 종이라도 시기별

로 또는 생육상태에 따라 band 양상이 달라질 수 있는 등의 제약점이 있으나(Schulz, 1994), 분자 표지의 일종인 restriction amplified polymorphic DNA(RAPD) 방법은 기술이 매우 용이하고 신속하며 소량의 DNA만이 있어도 측정이 가능할 뿐만 아니라 restriction fragment length polymorphism(RFLP) 기술보다도 상대적으로 위험성이 적어 식물의 종 및 품종간의 DNA 양상과 유전자지도 작성등에 더 많이 사용되고 있으며(Joao, 1994; Kim, 1996), 인삼(임, 1990), 사과(예, 1994), 벼(안, 1996), 감자(박, 1996)등의 품종 분류를 위한 RAPD marker선발에 성공적이었다고 보고한 바 있다.

- 그러나 RAPD방법은 추출된 DNA의 상태에 따라서 재현성이 매우 다르고, primer의 선정 및 PCR조건등 실험조건에 따라 다소의 차이가 있어 이에 대한 보완책이 시급히 요구되고 있는 실정이다. 따라서 본 연구는 인삼의 RAPD를 위한 인삼의 DNA 분석 가능성을 진단하고자, PCR의 적정조건을 설정하고 자경종, 풍기황숙 그리고 중국삼과 미국삼의 증폭된 DNA band pattern을 조사하여 그 유연관계를 알아보하고자 하였다.
- 본 연구에 사용된 재료는 구 한국인삼연구소연구원의 고려인삼(*Panax ginseng*. C.A. Meyer)의 변종인 자경종과 황숙종, 그리고 중국에서 재배된 고려인삼속인 중국삼(*Panax ginseng*. C.A. Meyer), 그리고 미국삼(*Panax quinquefolium*. C.A.Meyer)의 잎, 뿌리, 엽병을 채취하여 종 및 변종 분류에 사용하였다.
- Total DNA 분리 및 정제 : 포장에서 채취한 인삼 엽조직 0.3g의 시료를 채취하여 1.5mL의 eppendorf tube에 넣고 600 μ L의PCR extraction buffer(1.0M Tris-HCl pH 7.5, 10M NaCl, 0.5M EDTA pH 8.0, 10% SDS)를 첨가하여 완전히 마쇄한 후 30초간 vortex하였다. 이 추출액을 12,000 rpm에서 3분간 원심분리 한 후 상등액 500 μ L를 취하여 새로운 tube에 넣고 phenol:chloroform:isoamylalcohol(25:24:1) 500 μ L를 첨가하였다. 이 용액을 다시 30초간 vortex한 후 3분간 12,000rpm으로 원심분리하여 상등액 300 μ L 취하여 새로운 tube로 옮긴 후 200 μ L의 isopropanol을 첨가하여 2분간 실온에서 방치한 후 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 12,000rpm으로 원심분리하였다. 원심분리후 상등액

은 버리고 70% ethanol용액으로 세척후 건조하였다. 건조가 끝난 DNA pellet은 100 μ l의 TE buffer를 넣고 현탁한 후 RNase 처리한 후 10 μ l의 3M sodium acetate와 220 μ l의 cold ethanol을 첨가한 후 -80 $^{\circ}$ C에서 30분간 보관한 후 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고, 70% ethaol을 이용하여 세척한 다음 건조하였다. 건조된 DNA pellet을 100 μ l의 TE buffer에 용해시켰다.

- RAPD를 위한 primer : 인삼의 DNA를 이용하여 RAPD분석을 하기 위해서 사용된 primer는 The University of British Columbia(UBC)의 Nucleic Acid-Protein Service Unit(Dr. J.B. Hobbs, Director)에서 제작된 UBC No. 1 - 50을 사용하였으며, 그 sequence는 Table 4과 같다.

Table 4. The sequence and RAPD of tandom from UBC primers

Primer No. (UBC)	Sequence	Primer No. (UBC)	Sequence	Primer No. (UBC)	Sequence
UBC-1	CCTGGGCTTC	UBC-18	GGGCCGTTTA	UBC-35	CCGGGGTTAA
UBC-2	CCTGGGCTTG	UBC-19	GCCCGGTTTA	UBC-36	CCGGGGTTAG
UBC-3	CCTGGGCTTA	UBC-20	TCCGGGTTTG	UBC-37	CCGGGGTTTT
UBC-4	CCTGGGCTGG	UBC-21	ACCGGGTTTC	UBC-38	CCGGGGAAAA
UBC-5	CCTGGGTTCC	UBC-22	CCCTTGGGGG	UBC-39	TTAACCGGGC
UBC-6	CCTGGGCCTA	UBC-23	CCCGCCTTCC	UBC-40	TTAACCGGGG
UBC-7	CCTGGGGGTT	UBC-24	ACAGGGGTGA	UBC-41	TTAACCGGGG
UBC-8	CCTGGCGGTA	UBC-25	ACAGGGCTCA	UBC-42	TTAACCCGGC
UBC-9	CCTGCGCTTA	UBC-26	TTTGGGCCCA	UBC-43	AAAACCGGGC
UBC-10	GGGGGGATTA	UBC-27	TTTGGGGGGA	UBC-44	TTACCCCGGC
UBC-11	CCCCCCTTTA	UBC-28	CCGGCCTTAA	UBC-45	TTAACCCCGG
UBC-12	CCTGGGTCCA	UBC-29	CCGGCCTTAA	UBC-46	TTAACCCCGG
UBC-13	CCTGGGTGGA	UBC-30	CCGGCCTTAG	UBC-47	TTCCCAAGC
UBC-14	CCTGGGTTTG	UBC-31	CCGGCCTTCC	UBC-48	TTAACGGGGA
UBC-15	CCTGGGTTTG	UBC-32	GGGGCCTTAA	UBC-49	TTCCCGAGC
UBC-16	GGTGGCGGGA	UBC-33	CCGGCCCCAA	UBC-50	TTCCCGCGC
UBC-17	CCTGGGCCTC	UBC-34	CCGGCCCCAA		

- **인삼의 RAPD분석** : 인삼의 종간 및 변종간의 유연관계를 확인하기 위해 먼저 고려인삼인 자경종을 사용하여 Table 4에서 나타낸 UBC No. 1-50의 primer를 이용하여 RAPD분석을 실시하였으며, 그 중 band의 구분이 확실

한 primer를 선발하고 이를 이용하여 자경종, 풍기황숙, 중국삼, 미국삼의 중간 분류를 위해 사용하였다. 또한 조직별 DNA의 차이가 PCR이후 DNA band의 양상에 어떠한 영향을 미치는 지를 검토하고자 포장에서 정상적으로 생육하고 있는 자경종에서 잎, 뿌리, 엽병의 시료를 채취하여 시험하였다.

- RAPD를 행함에 있어서는 template DNA, Taq DNA polymerase, dNTP, primer등이 반응액을 구성하는 필수 요소이며 이들 요소가 적절한 조건하에서 일정 횟수 이상의 반복된 PCR과정을 거쳐야만 특정 DNA의 amplification이 이루어질 수 있다. 본 실험에서는 이러한 요소들이 구비되어 있는 PremixTM(바이오니아)에 template DNA 50ng, Primer 10pmol, 멸균수를 첨가하여 총 반응액을 20 μ l로 맞추고, mineral oil을 첨가하였다. PCR반응조건은 predenaturation을 96 $^{\circ}$ C에서 2분 반응 후 denaturation 94 $^{\circ}$ C, 1분, annealing 37 $^{\circ}$ C, 1분, extension 72 $^{\circ}$ C, 2분간의 반응을 DNA amplification을 위해 45 cycle로 고정하였으며 post extension을 72 $^{\circ}$ C에서 15분간한 후 반응을 4 $^{\circ}$ C에서 종료시켰다. PCR이 끝난 후에는 PCR반응액 10 μ l를 1.2% agarose gel에 전기영동한 후 DNA 양상을 조사하였다.
- **인삼의 RAPD분석결과** : 인삼의 부위별로 RAPD banding pattern에 차이가 있는 지를 조사한 결과는 Fig. 5과 같다. 잎, 뿌리 및 엽병조직으로 부터 분리한 DNA를 UBC-50 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 약 1.2 Kb에서 동일한 1개의 band가 출현되었다. 예 등(1994)은 사과 품종에서 template DNA를 분리해낸 조직의 차이가 RAPD banding pattern에 미치는 영향을 보고자 후지의 잎, 수피, 꽃잎 및 화분으로부터 분리한 DNA를 각각 이용하여 PCR을 한 결과 모든 조직에서 동일한 band가 출현되었다고 보고하였고, 동일한 식물체에서는 채취부위와 상관없이 모든 조직에서 DNA를 분리하여도 아무런 문제가 없었다고 보고하여 본 실험의 결과와도 유사하였다. 또한 사과나무의 RAPD표지를 탐색함에 있어서 PCR에 관여하는 주요 요소들인 template DNA는 10ng, dNTP primer는 2unit, Taq polymerase는 50 μ M, primer 10ng을 각각 첨가하는 것이 가장 적합한 조건이었으며 PCR 횟수는 50회로 하는 것이 가장 적당하다고 하였다(예, 1994).

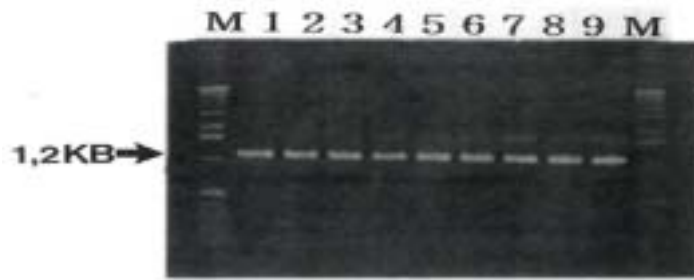


Fig. 5. RAPD banding pattern of genomic DNA from various tissues of *P. ginseng* C. A. Meyer using UBC-50 primer. M, molecular marker; 1, 2, 3, Leaf; 4, 5, 6, Root; 7, 8, 9, Stem.

- 인삼의 종간 유연관계를 확인하기 위해 먼저 고려인삼인 자경종을 사용하여 Table 4에서 나타낸 50개의 UBC primer를 이용하여 RAPD분석을 실시하였으며 그 중 band의 구분이 확실한 primer를 선발하고 이를 이용하여 자경종, 풍기황숙, 중국삼, 미국삼의 종분류를 위해 사용하였다. 인삼종간의 RAPD분석을 실시하기전에 고려인삼인 자경종을 사용하여 적합한 primer를 선발하고자 50개의 UBC primer를 이용하였다(Table 4). 이중 band가 확실한 18개의 primer를 선발할 수 있었으며, 그 결과는 Table 5에 나타내었다. 선발된 18개의 primer는 자경종, 풍기황숙, 중국삼, 미국삼의 genomic DNA를 대상으로 동일한 조건에서 PCR반응을 실시하였다. 각 개체간 동일 조건에서도 primer종류에 따라서 다양한 band양상을 보였는데 이는 인삼의 종 및 변종간의 차이가 있음을 시사하는 결과라 하겠다. 특히 미국삼의 경우 UBC-6은 1.7Kb, 23은 1.7Kb, 700bp, 29는 800bp, 34는 600bp, 43은 800bp, 50에서는 1.3Kb 등에서 다른 3종과는 구별되는 band양상을 보였으며, 중국삼의 경우 UBC-6은 1.9Kb, 16은 2.1Kb, 31은 1.5Kb 등에서 특이적 band양상이 관찰되었다. 또한 자경종의 경우 UBC-1은 1.6Kb, 2.2Kb에서 25는 1.2Kb, 26은 1.5Kb 등에서 풍기황숙의 경우 UBC-19에서 1.3Kb, 25는 1.5Kb, 31은 1.5Kb에서 다른 종과 구별되는 band를 보였다. 그 결과는 Fig. 6와 Table 5와 같다.



Fig. 6. PCR amplification of DNA from 4 species (*Panax ginseng*) using primer; A: Jakyungjong, B: Punggi Hwangsuk, C: China, D: *Panax quinquefolium*. M, Molecular marker(1Kb DNA ladder).

Table 5. Bands of ginseng DNA amplified by PCR using UBC primers

UBC Primer No.	Band Size Formed															
	<0.5 Kb				0.5-1.0 Kb				1.0-1.5 Kb				1.5 Kb>			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1									1	1	1					
4					1	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	3
6								1				1			1	
12									3	1	1		1	2	2	2
13									1	1				1	1	1
16					1	1			2	2	1		1	1	2	
17									1	1			1	1	1	
19									1							
23								1	1	1	1	3	3	3	3	2
25									1	2						
26									1							
29							1	2	1	1	2	1	2	2	2	1
30	1	1	1	1												
31					2	2	2	1		1	1		1	1	1	2
33							1		2	2	2	1	1	1	1	
34								1	1	1	1	1	2	2	2	4
43					2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2
50		1			1	1	1	1	1	1	1		5	4	2	

- 이에 따른 RAPD 분석결과는 계통분석용 프로그램인 Cluster analysis 방법 중 Similarity Index를 구하여 3개의 종과 1개의 고려인삼 변종의 원연관계를 보고자한 결과 자경종과 풍기황숙은 0.816의 SI를 가져 근연관계를 가졌

고 중국삼은 1.034 SI로서 자경종과 약간의 차이를 가졌으며 자경종과 미국삼과는 상당한 변이의 차이를 보임으로 중간 구별이 용이하였다(Fig. 7). 임(1993)은 RAPD를 이용한 인삼의 변종간 분석 및 변종내 육종계통의 분류를 실시하여 육종계통을 조기선발을 위한 marker를 개발하여 외국으로부터 밀수입되는 중국인삼과 고려인삼의 감별법을 개발하고자 인삼에의 RAPD 이용가능성을 타진하고 동시에 적절한 primer를 선발하고 이를 이용하여 고려인삼의 변종 및 일부 외국 변종의 유전적 차이를 보고하였으며, 이미 인삼이외에도 사과(예, 1994) 벼(안, 1996), 감자(박, 1996)등의 품종 분류를 위한 RAPD marker선발에 성공적이었다고 보고하였다.

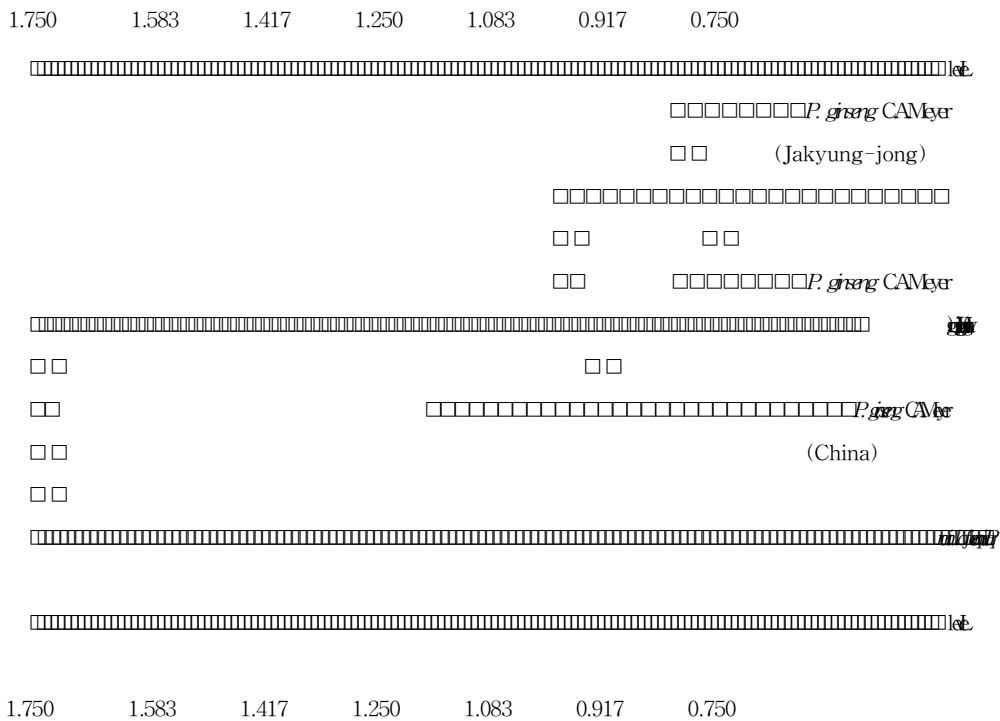


Fig. 7. Phenogram of clustering pattern for 4 species and strain of ginseng.

- 결론적으로 본 연구 결과 인삼의 종 및 변종간의 유전적 다양성을 식물의 분류학적 연구에 이용하여 품종육성을 위한 기초자료로 활용하고자 인삼 조직의 DNA를 사용하여 RAPD primer를 선정하고 RAPD양상을 조사하고자

수행되었다. 인삼의 RAPD를 수행함에 있어서 DNA분리에 이용되는 조직의 차이가 PCR이후 DNA band 양상에 어떠한 영향을 미치는 지를 조사하고자 포장에서 정상적으로 생육하고 있는 자경종에서 조직별로 시료를 채취한후 primer를 사용하여 PCR을 수행하여 나타난 band의 양상은 모든 조직에서 동일한 band를 형성하였다. 50개의 서로다른 10-mer random primer를 이용하여 band가 확실히 나타나는 18개의 primer를 선발하여 자경종, 풍기황숙, 중국삼, 미국삼의 DNA를 사용하여 PCR 증폭을 하였다. 그러한 PCR product를 1.2%의 Agarose gel에 전기영동하여 banding pattern에 따라 분석하였다. 이러한 RAPD 결과를 Cluster analysis 방법을 사용하여 similarity index(SI)로서 원연관계를 조사한 결과 자경종과 풍기황숙이 근연관계를 가졌고 중국삼은 자경종과 약간의 차이를 가졌으며 또한 자경종, 풍기황숙, 중국삼은 미국삼과 변이의 차이를 나타냈다.

나) PCR-aided RFLP방법을 통한 인삼의 마커유전자 개발

- 80년대까지 전 세계 인삼 생산량의 46%를 유지하던 우리나라는 90년대에 39%로 국제시장 점유율이 감소한 반면 미국삼과 중국삼의 수출이 90년대 50%이상 신장하여 연평균 7.2% 이상의 높은 생산증가율을 나타내어 UR로 인한 시장개방과 더불어 우리나라 인삼산업이 커다란 위협을 받고 있다. 또한 인삼은 뿌리부분만이 주로 사용되기 때문에 이 부분을 마쇄하거나 그 외 방법으로 가공처리한다면 형태적, 조직학적특성으로 구분하는 종래의 방법으로는 국내삼인지 타국삼인지 혹은 불량한 삼인지를 구별할 수 없다. 따라서 이러한 여건의 변화속에서 지역의 특성에 따른 고려인삼의 고품질화와 차별화와 더불어 식물의 종 및 품종간 구별을 확인할 수 있는 방법의 보완책과 시장특성에 맞는 경쟁력을 갖추어야 한다.
- 그러나 문제점은 인삼은 환경에 민감하여 그 유전적 조성이 다양하며, 또한 현재 일반농가에서 재배되고 있는 인삼은 품종이나 계통의 구분없이 오래전 부터 재배되어 왔기 때문에 뿌리를 자세히 관찰하여 보면 여러 가지 모양의 많은 유전자형을 가지고 있는 혼계상태로서 개체간의 형질변이가 대단히 심

하다는 것을 알 수 있다. 이러한 특성으로 인하여 유전 형질의 현상구명에도 상당한 시간이 필요하며 품종육성을 목적으로 한 교배 및 선발의 효율을 높이는 데도 많은 어려움이 따른다. 이러한 난점들로 인하여 종 및 품종육성에 상당한 시일이 지연되었으며, 인삼의 제반형질의 유전현상 구명과 유전자원의 수집, 분류 및 평가의 중요성이 대두되었고, 품종육성을 위한 중요형질의 선발 기술에 대한 사항도 주요 관심사항으로 떠오르게 되었다.

- 분류의 객관성과 정확성을 기하기 위하여 다수의 연구자들이 이 분야의 새로운 방법을 개발, 이용하고자 하였고 특히, 잎, 과실, 뿌리의 형태적, 조직학적 형질¹⁾과 양적형질을 수리화한 동위효소분석 등이 인삼의 종간의 유연관계 해석에 적용되었다. 그러나 동위효소의 경우 시기별로 또는 같은 종이라도 생육상태에 따라 band양상이 달라질 수 있는 등 방법상의 제약이 많고 종 구분이나 특수 유전형질의 유무에 따른 개체간의 구분에는 그 적용성이 높지 못한 결점이 있다.
- 근래에, 분자생물학의 발전과 더불어 DNA수준에서 식물체간의 유전분석연구로서 Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP) 기술이 수행되어 종간 및 종내 개체간의 유전변이를 확인하는 새로운 방법이 등장하였다. RFLP는 서로 다른 개체의 DNA를 특정 염기서열을 인지하는 제한효소로 처리하였을 때 생기는 DNA의 절편 크기의 차이를 이용한다. 이 방법은 DNA 염기서열상의 자연 돌연변이에 의한 염기 하나의 차이로도 서로 다른 결과를 나타낼 수 있으므로 매우 정밀하게 유전자 변이를 식별할 수 있다. RFLP 분석에는 RFLP probe의 선발이 선행되어야 하는데 RFLP probe를 선발하는 데는 시간과 노력이 많이 들고 실험 수행상에 제한점이 따르는 단점이 있다. 따라서 이런 문제점을 보완하기 위해 최근에는 PCR-aided RFLP 기술이 이용되고 있는데, 이 방법을 수행하기 위하여 식물체에 따라서 염기배열의 차이를 보이는 엽록체 DNA를 PCR을 사용하여 증폭한 후, 그 염기배열의 차이를 보기 위해서 제한효소를 이용하여 절단하고 그 단편의 양상을 조사하여 종 및 품종간의 차이를 보고한 바 있다.
- 본 연구는 인삼의 종, 변종 및 계통간의 유전적 다양성을 PCR-aided RFLP 기술을 이용하여 인삼의 품종육성을 위한 적용의 기초자료로 활용하고자 인

삼의 엽록체 DNA중 *atpB* gene 및 *rpoB* gene, *trnL* gene과 *trnF* gene, *psbA* gene 과 *rbcL* gene을 추출하여 그 중 *psbA* gene과 *rbcL* gene을 여러 제한효소로 절단하여 그 양상을 조사하였다(Table 6). 또한 상기 추출한 *psbA* gene과 *rbcL* gene의 엽록체 DNA를 대상으로 하여 RAPD를 적용함으로써 그 양상을 조사하였다.

- 본 연구에 사용된 재료는 구 한국인삼연구원(대덕연구단지소재)에서 분양받은 유전적으로 안정화되어 계통육성된 KG 9계통과 유전자원으로 분류된 고려인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)과 미국삼(*Panax quinquefolium* C. A. Meyer), 그리고 죽절삼(*Panax japonicum* C. A. Meyer)을 이종간 분류에 사용하였으며, 고려인삼을 일본에서 품종화한 미마끼(*Panax ginseng* C. A. Meyer), 고려인삼속인 중국삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer), 소련삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)과 고려인삼의 변종인 황숙종, 청경종, 자경종, 풍기황숙등의 잎과 뿌리를 채취하여 종 및 변종 분류에 사용하였다. 잎의 경우 인삼의 생육이 가장 왕성한 5월 전후에 상단부의 완전히 전개된 잎을 사용하였고 뿌리의 경우 11월 전후에 6년근과 묘삼을 채취하여 사용하였다. 각각의 시료는 채취 후 실험실에서 흐르는 물로 일차 깨끗이 세척한 후 3차 증류수로 행군 다음 표피의 물기를 제거한 즉시 total DNA 분리에 이용하거나 또는 필요시 까지 -80℃의 deep freezer에 냉동 밀폐 보관하였다.

Table 6. Oligonucleotide primer used for chloroplast DNA analysis

No.	Primer	Locus	Position ^{a)}	Length(mer)	Sequence(5'→ 3')
1.	<i>psbA</i> -N (S)	<i>psbA</i>	+ 1	23	ATGACTGCAATTTTAGAGAGACG
	<i>psbA</i> -C (A)	<i>psbA</i>	+1008	23	CATTACGTTTCATGCATAACTTCC
2.	<i>rbcL</i> -N (S)	<i>rbcL</i>	+ 1	22	ATGTCACCACAAACAGAAACTA
	PX -1 (A)	<i>rbcL</i>	+1336	22	CTAGTTCAGGACTCCATTTGCA
3.	<i>atpB</i> -RV(S)	<i>atpB</i>	+232	20	CCATCTGTAGCACTCATAGC
	RV -1 (A)	<i>rbcL</i>	+242	17	TTGTAACGATCAAGACT
4.	<i>atpB</i> -NR(S)	<i>atpB</i>	+22	22	AAGTAGTAGGATTGGTTCTCAT
	<i>rbcL</i> -NR(A)	<i>rbcL</i>	+22	22	TAGTTTCTGTTTGTGGTGACAT

5. <i>rpoB</i> -1 (S) <i>rpoB</i>	+2759	21	TCGGGTTCAAATACCCATGGA
<i>rpoB</i> -2 (A) <i>rpoB</i>	+1473	23	TCAGGAAGAACAGGTTGTTCCAG
6. Uni'C (S) <i>trnL</i> (UAA)	*	20	CCGAATCGGTAGACTCTACG
Uni'f (A) <i>trnF</i> (GAA)	*	20	ATTTGAACTGGTGACACGAG

a) Nucleotide position of a base at 5' end of the oligonucleotides in the corresponding genes.

- Total DNA 분리 및 정제 0.3g의 인삼잎을 1.5mL Eppendorf tube에 넣고 600 μ l의 추출 버퍼 (100mM Tris pH 7.5, 50mM EDTA pH 8.0 500mM NaCl, 10mM Mercaptoethanol)를 넣고 드릴 팁으로 마쇄한 다음 12,000rpm에서 3분간 원심분리하였다. 상등액 500 μ l를 새로운 튜브로 옮기고 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) 500 μ l를 첨가하여 30초간 vortex한 후 3분간 12,000rpm으로 원심분리하였다. 상등액 300 μ l를 새로운 tube로 옮긴 다음 200 μ l의 isopropanol을 첨가하고 2분동안 실온에 방치한 후 -4 $^{\circ}$ C에서 10분간 12,000rpm으로 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액은 버리고 DNA pellet을 70%의 ethanol용액으로 세척 후 건조하였다. 건조가 끝난 DNA pellet은 100 μ l의 TE buffer를 넣고 용해하였다.
- 엽록체 DNA의 PCR-aided RFLP분석은 인삼의 엽록체 DNA에서 photosystem II 인 32kd protein(*psbA*) gene과 rubisco large subunit(*rbcL*) gene을 추출하여 RFLP를 실행하기 위하여 사용된 primer는 Table 6과 같이 *psbA*-N, *psbA*-C, *rbcL*-N, PX-1을 각각 사용하였다. PCR에 의해서 인삼으로부터 엽록체 DNA를 합성하기 위해서 인삼 DNA 50ng과 primer 20pmol을 PremixTM에 넣고 total volum을 20 μ l로하여 PCR반응을 실시하였다. PCR 반응조건은 92 $^{\circ}$ C의 pre- denaturation 온도에서 2분 반응 후 94 $^{\circ}$ C denaturation 온도에서 30초, 55 $^{\circ}$ C annealing 온도에서 30초, 72 $^{\circ}$ C extension 온도에서 2분간의 반응을 45 cycle로 고정하였으며 post extention을 72 $^{\circ}$ C에서 15분간 처리하였다. Data base에서 엽록체관련 유전자의 제한효소 site를 조사하여, 선발된 제한효소로 PCR product를 절단했다. 절단 후 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 형성된 band를 분석하였다.

- 인삼 genomic DNA로부터 *psbA*, *rbcL*, *atpB*, *rpoB*, *trn* gene의 증폭 :
일반적으로 RAPD 방법에 사용된 primer는 10mer 이기 때문에 PCR시 annealing temperature가 매우 낮아서 재현성에 문제가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 10mer의 primer 대신 20mer 이상의 specific primer를 사용하여 annealing temperature를 높여서 매우 재현성이 높은 band를 획득하고자 하였다. 환경조건에 민감한 인삼에 있어 세포질 DNA(mt DNA, cpDNA)는 모본에 영향을 주지 않아 품종간에 세포질 DNA에 의한 차이가 있을 것으로 사료되는 바, 본 실험은 엽록체 DNA에 coding 되어 있는 *psbA* 및 *rbcL* gene을 추출하여 제한효소로 절단하여 그 절단 양상을 비교하고자 수행하였다. 사용한 인삼은 KG101-109계통 9종, 미국삼, 중국삼, 소련삼, 미마끼, 죽절삼, 황숙종, 청경종, 산양삼, 자경종등 모두 18종 및 변종을 사용하였다.
- Chloroplast DNA의 *psbA*, *rbcL* gene(Fig. 8)과 *atpB*, *rpoB*, *trn* gene(Fig. 9)이 PCR로서 증폭되었다. Table 6 에서와 같이 *psbA* gene을 분리하기 위해서는 *psbA*-N, *psbA*-C primer를 그리고 *rbcL* gene을 분리하기 위해서는 *rbcL*-N, PX-1 Primer를 각각 사용하였으며, 그 외 동일한 방법으로 gene 추출을 위한 primer를 각각 사용하였고, PCR을 한 결과 *psbA* gene을 사용한 KG101-109에서는 1,008bp에서 각각 유사한 1개의 band가 나타났다. *rbcL* gene을 사용한 KG101-109에서는 1,336bp에서 유사한 1개씩의 band가 형성되었다. *PsbA* gene을 사용한 종 및 변종간에는 1,008bp에서 유사한 1개의 band가 동일하게 보였으며, *rbcL* gene을 사용한 종 및 변종간에는 밴드가 형성되지 않은 소련삼 미마끼를 제외하고는 1,336bp에서 유사한 1개씩의 band가 형성되었다.

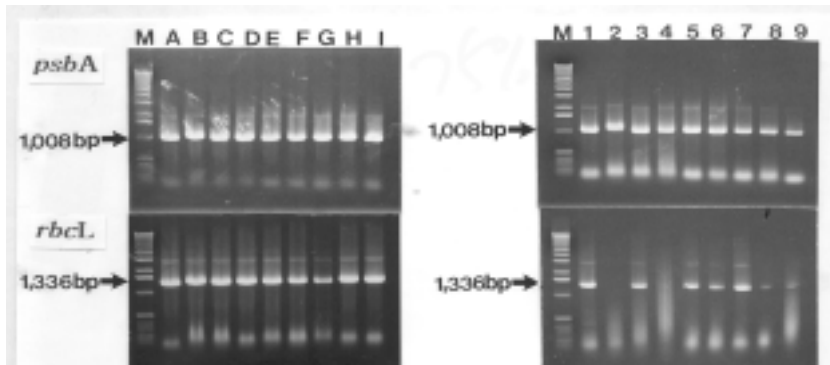


Fig. 8. PCR product of *Panax ginseng* using primer for *psbA* gene and *rbcL* gene. A: KG101, B: KG102, C: KG103, D: KG104, E: KG105, F: KG106, G: KG107, H: KG108, I: KG109, 1: *Panax quenquifolium*, 2: USSR, 3 : China, 4: Mimaki, 5: *Panax japonicum*, 6: Hwangsukjong, 7: Chungkyungjong, 8: Sanyang 9: Jakyungjong ; M, Molecular marker(1Kb DNA ladder).

- 또한 Fig. 9에서 *atpB* gene을 사용한 자경종, 미국삼, 죽절삼간에는 1,336bp와 900bp에서 동일한 band양상을 보였으며, *rpoB* gene을 사용한 경우 1,300bp에서 이종간 동일한 band양상을 보였다. 또한 *trnL* gene을 사용한 경우 자경종, 미국삼, 죽절삼간에도 1,008bp에서와 같은 양상을 보임으로서 인삼의 엽록체에 coding되어 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 이(1995)가 백합의 엽록체 DNA에서 *psbA*와 *rbcL* gene을 추출하여 분리한 바 각각 유사한 banding pattern을 보여 본 실험과 유사한 결과를 보고하였고, Terachi 등 (1994)도 서로 다른 식물체 98종중 59종에서 *psbA* product가 형성되었고 *rbcL* 경우에는 56종의 동일한 위치에서 *rbcL* product가 형성되었다고 보고하여 본 실험의 결과와도 유사하였다. 이상의 결과에서 *psbA* gene을 사용한 종 및 변종간에는 1008bp에서 유사한 1개의 band가 동일하게 보였으며, *rbcL* gene을 사용한 종 및 변종간에는 1,336bp에서 동일한 1개씩의 band가 형성되었다.

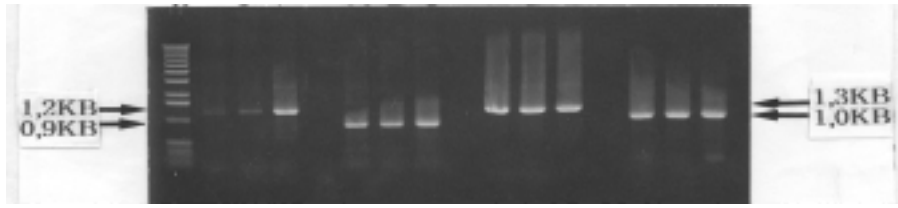


Fig. 9. PCR product of ginseng using primers for *atpB* gene, *rpoB* gene, *trnL* gene. A: *Panax ginseng*. B: *Panax quenquifolium*., C: *Panax japonicum* ; M, Molecular marker(1Kb DNA ladder).

- *psbA* gene 및 *rbcL* gene의 PCR-aided RFLP : 증폭된 인삼을 계통별 *psbA* gene 및 *rbcL* gene을 제한효소로 절단하여 RFLP pattern을 보고자 *TaqI*, *AluI*, *HaeIII*을 처리하여 2시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 전기영동하여 band양상을 조사한 결과 *TaqI* 제한효소 처리구에서 KG Line과 중 및 변종간 모두 절단이 되었으며 800 bp에서 band가 위치하고 있다(Fig. 10). *AluI*의 제한효소 처리구에서는 KG Line에 800bp에서 1개의 동일한 band를 보였으나, 유전자원에서는 제한효소가 완전히 절단이 되어 band가 보이지 않았으므로 구별이 용이했다. 제한효소 *HaeIII*에서는 KG Line의 경우 500bp의 위치에서 희미하게 band를 동일하게 보였다. 그러나 유전자원에 있어 *HaeIII* 제한효소처리구에서는 band가 관찰되지 않아 KG Line과 구별이 용이 했다. Mishio 등은 PCR-aided RFLP 방법을 사용하여 당근의 계통간 분류에 이용하였으며, 엽록체 DNA로부터 PCR의 증폭산물을 획득하여 PCR-aided RFLP분석에 의한 Rosaceae의 종간 구별을 보고하였다. 한편 이 등은 엽록체 DNA를 이용하여 *Populus* 수종별 RAPD분석을 한 결과 primer *rpoC1* 및 *rpoC2*를 이용하여 각 수종에 특이한 band들을 확인할 수 있었다. Terachi 등(1994)도 9종의 *Filipendula*와 2종의 연관된 종들은 *rbcL* gene을 증폭한 후 여러종류의 제한효소로 절단하였을 때 다양한 밴드 양상이 나타나서 종분류를 위한 좋은 marker가 될 수 있음을 나타내어, PCR-aid RFLP방법에 의한 종간 혹은 종내의 구분이 가능할 것으로 사료되

지만 인삼의 경우에는 현저한 차이를 보이지 않아 본 실험에서 사용한 제한 효소로서는 어려움이 있는 것으로 판단된다. 따라서, 이와 같은 결과로 볼 때 4-mer 인식 제한효소뿐만 아니라 사용폭을 넓혀 6-mer 인식 제한효소 등 여러종류의 제한효소를 사용하여 절단한다면 서로 차이가 나타나는 절편을 획득할 수 있을 것으로 사료되며, 어떤 경우에도 서로 다른 절편이 나오지 않을 경우에는 염기서열을 분석하여 분류하는 방법을 사용해야 할 것으로 생각된다.

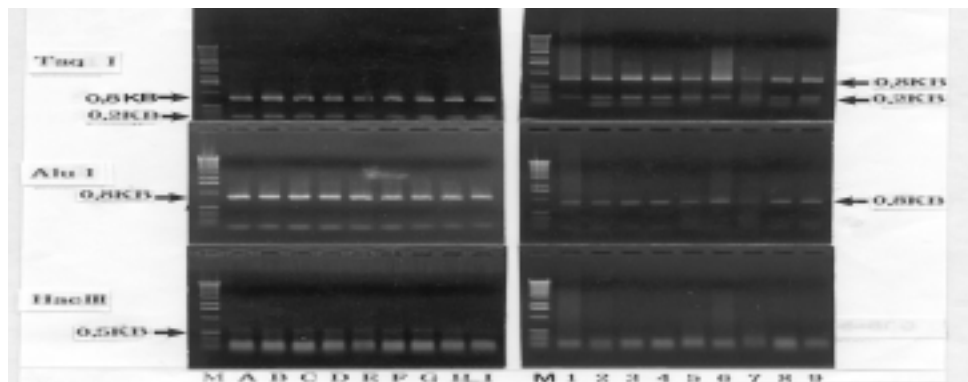


Fig. 10. Restriction fragment patterns of PCR products obtained from *psbA* gene in chloroplast of *Panax ginsengs* using Taq I, Alu I and Hae III restriction enzyme. A: KG101, B: KG102, C: KG103, D: KG104, E: KG105, F: KG106, G: KG107, H: KG108, I: KG109, 1: *Panax quenquifolium*, 2: USSR, 3: *Panax notoginseng*, 4: Mimaki, 5: *Panax japonicum*, 6: Hwangjukjong, 7: Chungkyungjong, 8: Sanyang, 9: Jakyungjong; M: Molecular marker(1Kb DNA ladder).

- 결론적으로 본 연구결과 DNA수준에서 인삼의 종내 및 종간 개체간의 유전 변이를 확인할 수 있는 새로운 방법인 PCR-aided RFLP를 사용하여 품종육성의 기초자료로 삼고자 수행하였다. 인삼의 엽록체 DNA중 *psbA* gene과 *rbcL* gene을 제한효소처리하여 그 band 양상을 조사하고자 하였다. Chloroplast DNA중 *psbA* gene과 *rbcL* gene을 분리하기 위하여 각각

psbA-N, *psbA*-C primer 및 *rbcL*-N, PX-1 primer를 사용한 결과 적정 분자량인 *psbA* gene은 1,008bp에서, *rbcL* gene은 1,336bp에서 band가 나타났다. 또한 *atpB* gene, *rpoB* gene, *trn* gene을 분리하기 위한 primer를 사용한 결과 역시 예상대로 1,366bp, 900bp, 1,500bp, 1,008bp에서 band가 나타났다. PCR에 의하여 분리한 *psbA* gene과 *rbcL* gene을 *Sau3A*, *TaqI*, *AluI*, *HaeIII* 등의 제한효소로 절단하여 RFLP양상을 조사한 결과 모든 인삼에서 *TaqI* 제한효소 처리구에서 KG Line 과 종 및 변종간 모두 절단이 되었으며 800bp에서 band가 위치하고 있다. *Alu I*의 제한효소 처리구에서도 KG Line과 유전자원에서 800bp의 동일한 band를 보였다. 제한효소 *HaeIII*에서는 KG Line의 경우 500bp의 위치에서 희미하게 band를 동일하게 보였다. 그러나 유전자원에 있어 *HaeIII* 제한효소처리구에서는 band가 관찰되지 않아 KG Line과 차이를 보였다. 모든 chloroplast gene은 PCR 증폭에 의하여 밴드를 형성하였으나 제한효소 처리후 각 인삼종내 또는 종간 식별이 용이하지 않아서 좀 더 많은 제한효소를 사용하거나 증폭된 DNA를 염기서열을 분석하여 비교하는 방법이 고려 되어야 할 것으로 사료된다.

다) RAPD에 의한 인삼신품종 천풍(KG101) 및 연풍(KG103)의 마커 유전자 개발

- 인삼근중 순계분리에 의하여 선발된 KG101(천풍)과, 사포닌의 함량이 많은 KG103(연풍)뿌리를 대상으로하여 UBC primer 중 실험결과 선발한 91종의 primer중 우선 36종을 대상으로 하여 RAPD분석을 하였던 바, 36종의 primer중에서 모두 band를 나타낸 것은 28종이었으며(Fig. 11), 이중 6번(CCTGGGCCTA), 29번(CCGGCCTTAC), 33번(CCGGCTGGAA), 105번(CTCGGGTGGG), 125번(GCGGTTGAGG), 149번(AGCAGCGTGG), 157번(CGTGGGCAGG), 159번(GAGCCCGTAG), 174번(AACGGGCAGC), 177번(TCAGGCAGTC), 181번(ATGACGACGG)에서 KG101 및 KG103계통간에 차이를 보였다. 또한 나타난 band의 특성은 Table 7와 같다. 특히 6번, 105번, 149번, 159번, 174번, 177번에는 KG101은 없지만 KG103에서 band를

형성하였으며, 29번, 33번, 125번, 157번, 181번에서는 KG101에서 band를 형성하였다. 또한 2차로 181번부터 300번까지 선발한 50종의 primer를 대상으로 band를 조사한 결과 32종에서 KG101 및 KG103모두 band가 형성되었으며, 그중 9종에서 서로 다른 차이를 보였다(Fig. 12). 특히 181(ATGACGACGG, 이중조사), 218(CTCAGCCCAG), 220(GTCGATGTTCG), 250 (CGACAGTCCC)번은 KG101에서 band를 형성하였고, 211(GAAGCGC GAT), 225(CGACTCACAG), 239(CTGAAG-CGGA), 248(GAGTAAG CGG) 에서는 KG103에서 band가 형성되었고 270(TGCGCGCGGG)번에서는 KG103에서 매우 진한 band가 형성되었다 (Table 7, Fig. 12).

Table 7. Characteristics of banding pattern on KG101 and KG103 according to selected primer

UBC Primer Number	Band Shown		Molecular Weight (Kb)	Number of Band
	KG101	KG103		
6		x	3	5
105		x	2.5	3
149		x	0.75	4
159		x	1	3
174		x	2.5	3
177		x	0.7	5
29	x		1.5	2
33	x		3	3
125	x		1	1
157	x		1.6	5
181	x		1.8	3
218	x		1.4	4
250	x		1	1
211		x	2.5	4
220		x	1.5	4
225		x	1.8	3
239		x	0.8	3
248		x	1.7	5

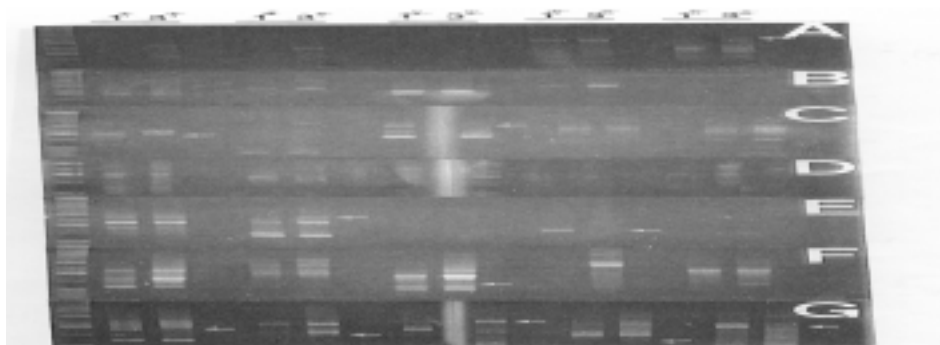


Fig. 11. RAPD banding pattern of ginseng roots containing normal(KG101; 1*) or high level(KG103; 3*) of ginsenoside according to different primers. A: UBC-1, 2, 3, 4, 6, B: UBC-12, 13, 17, 23, 25, C: UBC-29, 30, 33, 34, 63, D: UBC-77, 82, 83, 89, 100, 102, E: UBC-193, 105, 106, 125, 127, F: UBC-137, 147, 149, 150, 155, G: UBC-157, 159, 174, 177.

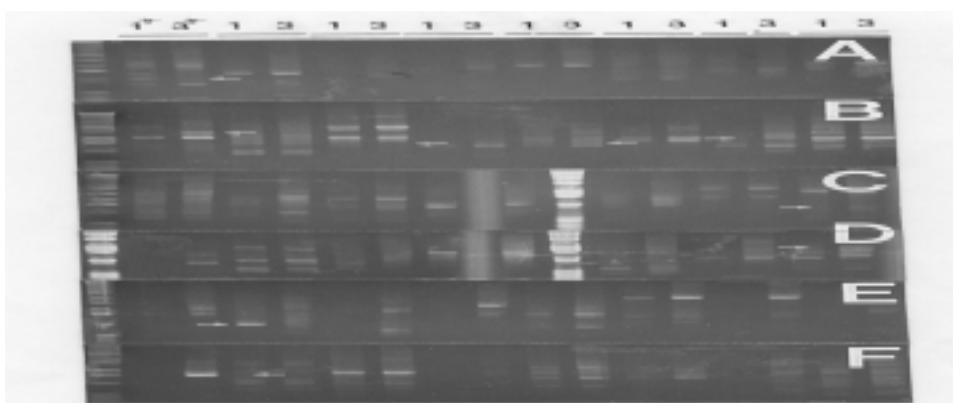


Fig. 12. RAPD banding pattern of ginseng roots containing normal(KG101; 1*) or high level(KG103; 3*) of ginsenoside according to different primers. A: UBC-181, 184, 190, 198, 199, 203, 204, 208, B: 211, 213, 218, 219, 220, 222, 225, 226, C: 228, 230, 231, 232, 234, 237, 239, D: 240, 241, 243, 244, 245, 246, 248, E: UBC-249, 250, 251, 253, 254, 262, 264, 266, F: UBC-270, 273, 275, 276, 280, 282, 283, 285.

라) 최적의 SNP primer의 적용을 위한 PCR조건의 개발

- Sequence alignment와 phylogenetic analysis : ITS region의 영역은 기존에 발표된 sequence 들과 비교하여 결정하며, ClustalV program, Autoassembly, Sequencer 등을 이용하여 일단 염기서열의 정확도와 sequence alignment를 실행 및 확인한 후, 최종적으로 육안에 의하여 결과를 검토하였다. 염기서열분석결과 얻어진 유전정보의 분석은 PHYLIP(Phylogenetic Inference Package, ver. 3.5c)내의 DNADIST program의 Kimura's two parameter에 의한 genetic distance matrix를 작성하였다.
- 우선 국내삼과 외국삼을 SNP primer를 제작하여 쉽게 하기 하기 위해서 SNP를 여러부위에서 발견할 수 있었다(Fig. 13)

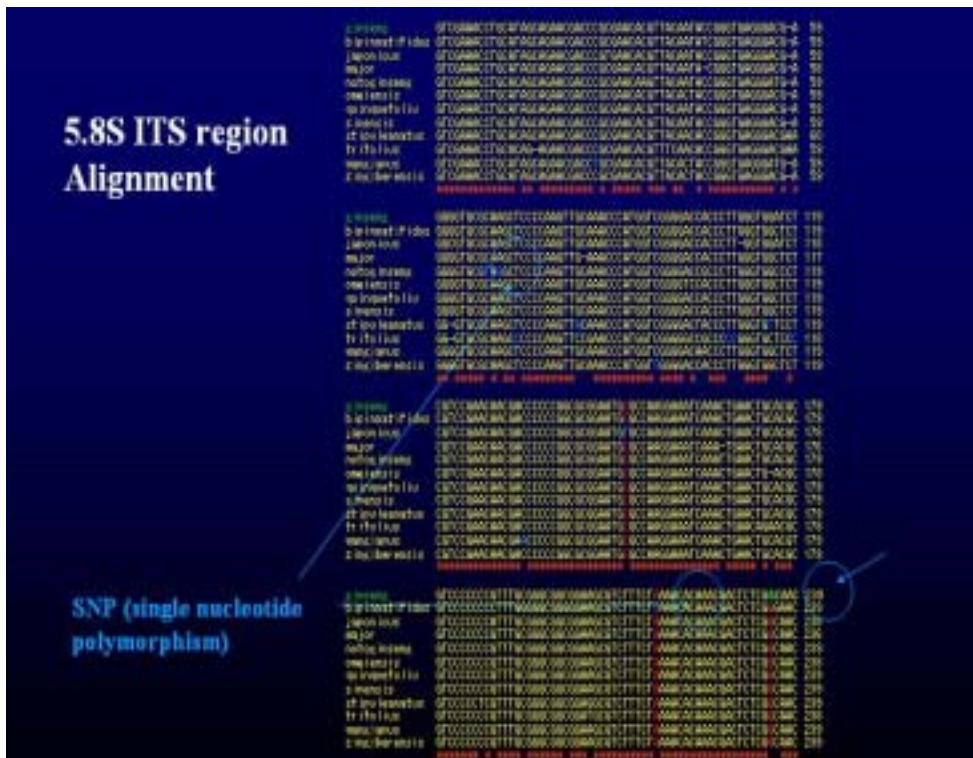


Fig. 13. SNP of ginseng species.

- 상기 결과를 이용하여 **phylogenetic analysis**를 한 결과 고려인삼의 자경종은 일본삼인 죽절삼과 상당한 유연관계를 가지고 있으며 오히려 미국인삼인 화기상과는 많은 차이를 보였다(Fig. 14).

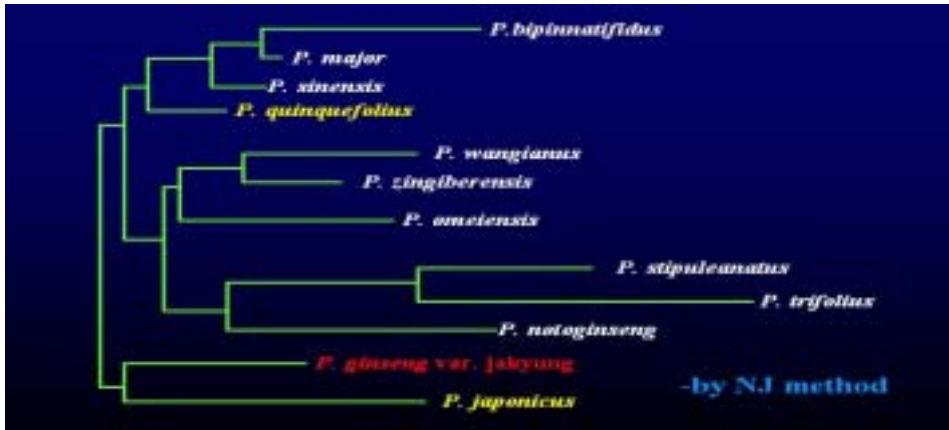


Fig. 14. Phenogram of clustering pattern for ginseng species.

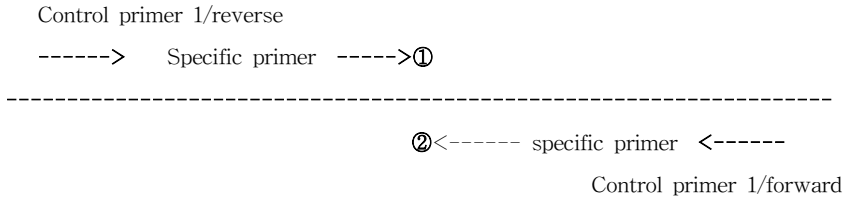
- 상기 결과를 이용하여 SNP를 찾은 결과 한국삼(자경종, 천풍, 연풍, 황숙종, 청경종)과 외국삼을 구별할 수 있는 SNP가 발견되었다(Fig. 15).

Specific SNP position in 5.8S ITS region *P. ginseng*

	Sequences of 5.8S rDNA	Accession No.
<i>Panax ginseng</i>		
Jiuying (var.)	CAAACGACTCTCGACAACGG	AF043871
Yungwang (rad.)	CAAACGACTCTCGACAACGG	AF174552
Changwang (rad.)	CAAACGACTCTCGACAACGG	AF174553
Hwangsook (var.)	CAAACGACTCTCGACAACGG	AB043872
Chongkyung (var.)	CAAACGACTCTCGACAACGG	AF174543
<i>P. alpinum</i> (det.)	CAAACGACTCTCGACAACGG	U141679
<i>P. japonicus</i>	CAAACGACTCTCGACAACGG	U141703
<i>P. major</i>	CAAACGACTCTCGACAACGG	U141683
<i>P. notoginseng</i>	CAAACGACTCTCGACAACGG	U141685
<i>P. nototenale</i>	CAAACGACTCTCGACAACGG	U141692
<i>P. golvogolobus</i>	CAAACGACTCTCGACAACGG	U141698
<i>P. sinensis</i>	CAAACGACTCTCGACAACGG	U141703
<i>P. stipuloniense</i>	CAAACGACTCTCGACAACGG	U141696
<i>P. trilobus</i>	CAAACGACTCTCGACAACGG	U141698
<i>P. wanglianus</i>	CAAACGACTCTCGACAACGG	U14691
<i>P. ginsengoides</i>	CAAACGACTCTCGACAACGG	U141700

Fig. 15. Confirm of SNP of inter- and intra- species.

- **SNP primer의 제작** : SNP primer의 개발 및 분석시스템 개발의 기본원리는 Amplification Refractory Mutation System (ARMS)을 이용한다. 일반적으로 Taq 폴리머라제(polymerase)를 사용하여 PCR증폭을 할 경우에 primer의 3'-nucleotide에서 주형(template DNA)과 mismatch되면 PCR증폭은 일어나지 않는데 이것을 이용하여 primer를 제작한다. 전제조건으로 증폭에 사용되는 Taq 폴리머라제는 3'-exonucleolytic proofreading 활성기능이 없는 것을 사용하여야 한다. ARMS primer들은 G/T 혹은 A/C (primer/template) mismatch를 유발하게끔 제작한다. Primer 제작은 목적으로 하는 유전자의 염기서열 중에서 임의로 적당한 크기의 1차 control primer를 결정하고 1차 control primer 증폭산물의 안쪽에 특이적인 primer 부위를 결정하여 2차 primer를 합성하고 3'nucleotide 부위에서 특이적인 nucleotide의 바로 앞 nucleotide염기를 임의의 nucleotide로 치환함으로써 특이적으로 증폭되도록 하며, 이때 반드시 primer간에 경합을 시키도록 제작하였다(Fig. 16).



예) Specific Primer를 design할 경우 (SNP)

G specific 5'- GCG TCT TTC TAA AAC ACA CAA CGA CTC TC(G) G - 3'



5'- GCG TCT TTC TAA AAC ACA CAA CGA CTC TC(A) G - 3'

Fig. 16. Design of specific SNP primer to distinguish Yunpoon of *Panax ginseng* C.A. Meyer from other ginseng cultivar, variety and species.

- SNP primer의 최적 PCR조건 구명 : 본 SNP 분석시스템은 각각의 개발되는 SNP에 따라 그 반응특성에 차이가 있기 때문에 각 primer의 특성에 맞게 PCR의 반응조건(DNA의 농도, 증폭회수, primer간의 농도비율, dNTPmix 농도)을 새로이 설정하였다(Fig. 17-21).

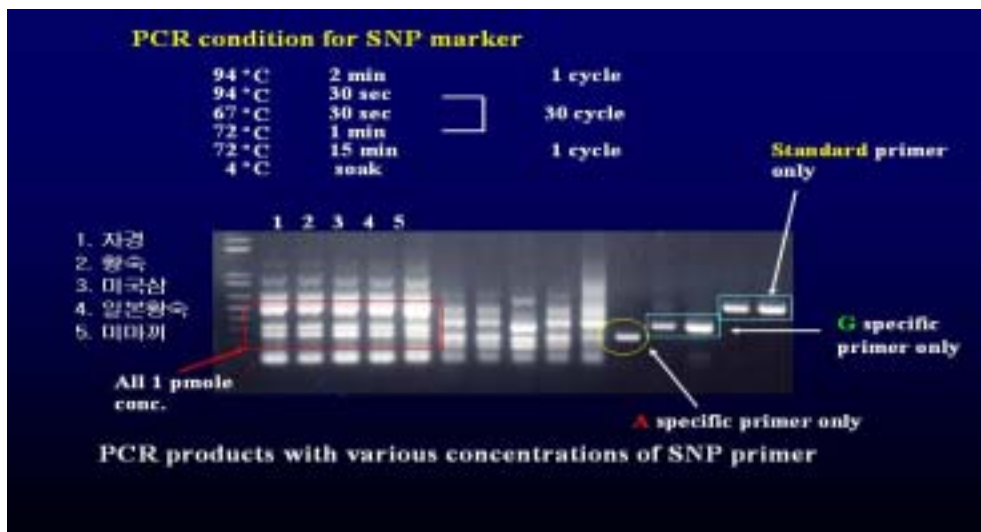


Fig. 17. PCR products with various concentrations of SNP primer.

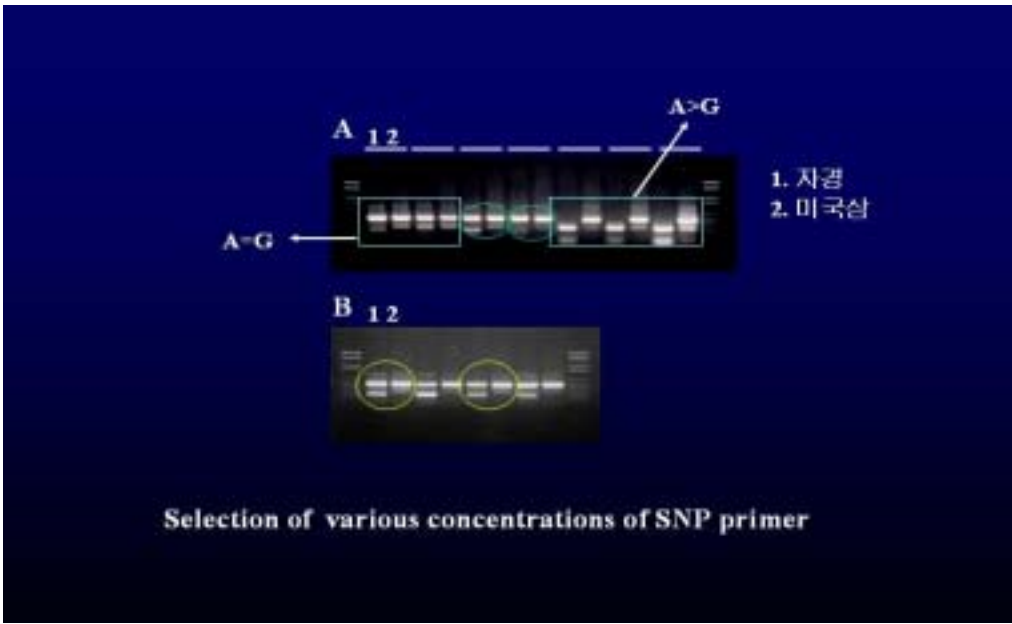


Fig. 18. Selection of various concentrations of SNP primer.

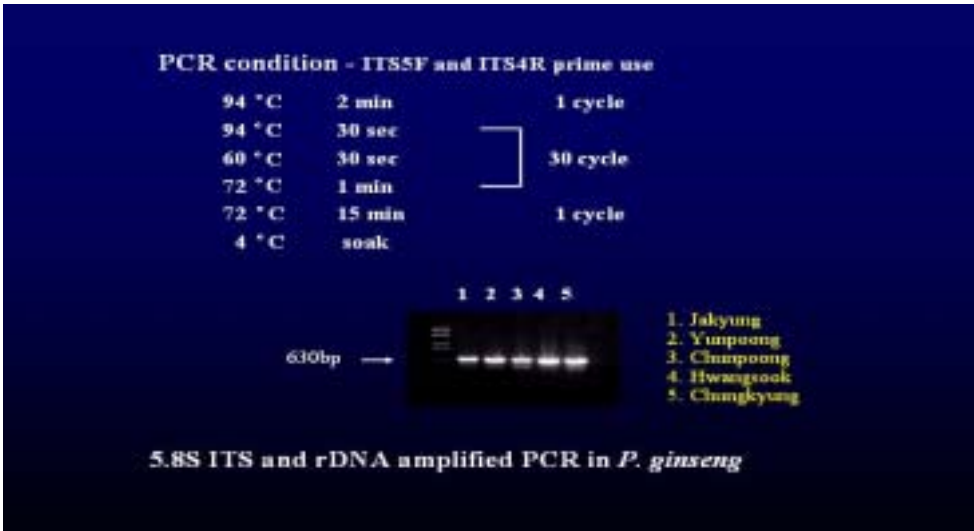


Fig. 19. 5.8S ITS rDNA amplified PCR in *Panax. ginseng*.



Fig. 20. PCR condition for SNP marker of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*.



Fig. 21. Application of SNP marker for distinguish of Hybride of ginseng species.

- 단일염기서열분석방법이 용이해짐에 따라 단일염기다형성 (Single Nucleotide Polymorphism: SNPs)과 삽입/삭제 (insertion/deletion: indels)의 분석이 용이해졌다. 이에 따라 앞으로는 간접적인 분자마커들과 함께 전세계적으로 유전분석에 SNP 기술이 이용될 것이다.
- SNP 개발방법의 개요를 보면, (1) Oligonucleotide hybridization, (2) Nuclease cleavage of mismatches, (3) Oligonucleotide ligation, (4) Primer extension, (5) Direct sequencing. 하지만 SNP 개발방법은 아직 일반화되어 있지 않다. 따라서 본 기술이 완성되면 매우 부가가치가 높을 것이다.
- 생물산업이 폭발적으로 발전할 것으로 예상되는 현 시점에서, 생명공학분야에서 SNP의 특허 허용 문제가 핫 이슈로 등장하고 있다. 만약 모든 유전정보의 기초가 되는 SNP에 대하여 특허권이 허용된다면, 우리 나라와 같이 생명공학분야의 후발국가들은 영원히 기술선진국에 예속될 것이며, 따라서 SNP 기술 개발 및 지식재산권 확보는 선진국과 후발국가에 서로 양보할 수 없는 중요한 문제이므로 우리 나라에서도 이 분야에 좀더 적극적인 투자를 통해 SNP 분석 및 SNP primer 개발 기술을 발전시켜 기술선진국과의 격차를 점차 좁혀 후발주자인 우리 나라의 기술수준이 이 분야에서 우위를 점할 수 있을 것이다.
- SNP primer 개발은 국내에서 개발된 품종의 국내외 도용을 막으며, 유출시 그 진위여부를 검정하기 위한 방법으로 활용할 수 있다. 특히 인삼(천풍, 연풍, 고풍)과 감자(수미, 대서, 대지 등)의 SNP부분에 대하여 분자마커 (molecular marker)로서의 유용성을 검토하여 각각 SNP primer를 합성한 후 PCR 증폭을 통하여 개발된 신품종과의 판별여부를 확인할 수 있을 것이다.

2) D/B검색을 통한 인삼의 SNP의 탐색

가) 인삼 EST로부터 SNP의 탐색

- 고려인삼으로부터 품종간 구별을 위한 SNP 탐색을 위해서 cDNA library에

서 무작위로 뽑은 ESTs sequence들을 비교검색을 실시하였다. 5개의 cDNA library로부터 분석된 EST data를 BioEdit 프로그램을 이용하여 Local Blast 분석을 실시한 결과 연풍과 천풍의 EST 중에서 SNP로 추정되는 유전자의 염기서열들을 다수 확보하였다. 그 중에서 SNP일 가능성 높은 것으로 보이는 유전자들을 다수 선발하였다. 그중 DC03과 DC05에서 단염기 C와 T에서 차이 났으며 기타 품종에서도 차이났다(Fig. 22, 23). DC03의 염기서열이 어떤 유전자에 속하는 지를 확인 하기 위하여 NCBI에서 Blast를 한 결과 이미 알고 있는 기타 식물들과 상동성이 많이 떨어졌으므로 어떤 유전자인지 확인하기 어려웠다. 그중 중국에서 재배된 *Panax ginseng*과의 상동성이 비교적 높았다(Fig. 24). 영역에 존재하는 SNP의 명확성을 확인하기 위해서 이들 클론을 5'과 3' 영역에서 sequencing primer를 이용하여 full sequence를 확보하였다.

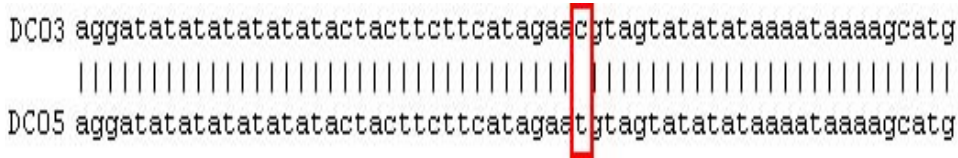


Fig. 22. Nucleotide sequence alignment for the SNP discovery between Chunpoong(DC03) and Yunpoong(DC05). The red square is a SNP (C/T).

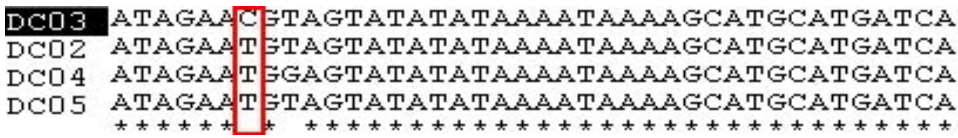


Fig. 23. Comparing a SNP with other new ginseng variety. In the result of the SNP cleared up separate from other new ginseng variety. DC03 is Chunpoong.

```

Sequences producing significant alignments:
Score      E
(bits)     Value
gi|29123071|gb|AF495336.1| Panax ginseng GBR3 (GBR3) mRNA, ... 349 7e-53
gi|31455577|gb|AF495332.1| Panax ginseng GBR5 (GBR5) mRNA, ... 301 2e-78

>gi|29123071|gb|AF495336.1| Panax ginseng GBR3 (GBR3) mRNA, complete cds
Length = 265
Score = 288 bits (17%), Expect = 7e-32
Identities = 199/206 (96%), Gaps = 2/206 (1%)
Strand = Plus / Plus

Query: 206 ttcttcctatgaaatgtagtatatataaaataaaagcatgcatgatcattcaatataat---g 211
      |||
Sbjct: 51 ttcttcctatgaaatgtagtatatataaaataaaagcatgcatgatcattcaatataatata 110

Query: 212 tttaacacacactaatatcatttgaattaatgatgcccgactactaaattttccctttaa 271
      |||
Sbjct: 111 tttaacacacactaatatcatttgaattaatgatgcccgactactaaattttccctttaa 170

Query: 272 atattgaactgaattaatatatacttgaattttcatctttacaaatcacattaaatgat 431
      |||
Sbjct: 171 atattgaactgaattaatatatacttgaattttcatctttacaaatcacattaaatgat 230

Query: 432 tatatgaatataaaatgactattta 457
      |||
Sbjct: 231 tatatgaatataaaatgactattta 255

Score = 80.0 bits (30), Expect = 1e-05
Identities = 30/30 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 206 actctagctctatgatatatagtatogaaaag 234
      |||
Sbjct: 1 actctagctctatgatatatagtatogaaaag 30

```

Fig. 24. Comparing a SNP with other new ginseng variety. In the result of the SNP cleared up separate from other new ginseng variety. DC03 is Chunpoong.

나) 고려인삼 신품종 연풍과 타 품종간의 SNP 분석

- SNP(single nucleotide polymorphism)의 비교연구는 종간의 진화나 계통연구에 새로운 돌파구를 제시하고 있으며, 또한 SNP는 질병저항성에 대한 다양성의 원인으로도 작용한다는 것이 알려져 있다(Collins *et al.*, 1997; Risch and Merikangas, 1996). 이러한 SNP의 유용성을 활용하면 근연관계에 있는 식물체들의 유연관계를 규명할 수 있고 또한 특정한 식물체의 종간 및 품종간의 구별에도 활용할 수 있다. 인삼은 보통 4년에 1회 채종을 원칙으로 하고 있기 때문에 타작물에 비해 육종기간이 매우 길다. 현재 고려인삼 신품종은 순계분리에 의하여 천풍, 연풍, 고평등이 등록되었으며 상품화되고 있는 실정이지만 중국등 외국으로 종자가 이미 반출되어 그곳에서 재배되어 비싸게 국내로 다시 반입될 가능성이 매우 높다. 따라서 이런 신품종과 기

존의 인삼과 구별하기 위해서는 바이오 마커가 절대로 필요한 상황이다. 본 연구에서는 바이오마커를 찾기 위해서 고려인삼의 품종들에서 EST(expressed sequence tag)분석을 통하여 대량으로 확보한 cDNA sequence data에 대하여 BioEdit 프로그램을 사용하여 99% 상동성 있는 sequence data만을 수집한 후 그 중에서 SNP로 추정되는 sequence를 NCBI의 Blast 검색을 통하여 인삼 SNP를 탐색하는 것을 목적으로 하고 있다.

- 고려인삼으로부터 품종간 구별을 위한 SNP 탐색을 위해서 분석된 EST data를 비교, 검색을 실시하였다. 5개의 cDNA library로부터 분석된 EST data를 BioEdit 프로그램을 이용하여 Local Blast 분석을 실시한 결과 연풍과 천풍의 EST 중에서 SNP로 추정되는 유전자의 염기서열들을 다수 확보하였다. 그 중에서 SNP일 가능성 높은 것으로 보이는 유전자들을 다수 선별하였으며, 이들 중 하나가 ADP-ribosylation factor를 code하는 유전자(Yunpoong)이다(Fig. 25). ADP-ribosylation factor의 유전자 영역에 존재하는 SNP의 명확성을 확인하기 위해서 이들 클론을 5'과 3' 영역에서 sequencing primer를 이용하여 full sequence를 확보한 후, NCBI의 GeneBank에 등록되어 있는 다른 식물들의 ADP-ribosylation factor와 비교, 검색을 실시하였다. 그 결과 신품종 연풍의 ADP-ribosylation factor 유전자 내부에 존재하는 SNP는 다른 식물들과 명확히 구별되는 것을 확인할 수 있었다.

```

Chunpoong   TCATCTTTGTTGTTGACAGCAATGATCGAGACCGTGTGGTCCGAGGCTAGA
Yunpoong    TCATCTTTGTTGTTGACAGCAATGATCGAGACCGTGTGGTCCGAGGCTAGA
Chunpoong   GATGAACTGCACAGGATGTTGAAATGAGGATGAACTGAGAGATGCTGTACT
Yunpoong    GATGAACTGCACAGGATGTTGAAATGAGGATGAACTGAGAGATGCTGTACT
Chunpoong   CCTTGTGTTTGCAAACAAGCAAGATCTTCCAAATGCCATGAATGCTGCTG
Yunpoong    CCTTGTGTTTGCAAACAAGCAAGATCTTCCAAATGCCATGAATGCTGCTG
Chunpoong   AGATTACTGACAAGCTTGGCTTGCATTCTCTTCGACAACGACATTGGTAT
Yunpoong    AGATTACTGACAAGCTTGGCTTGCATTCTCTTCGACAACGACATTGGTAT
Chunpoong   ATTCAGAGCACATGCGCCACATCTGGAGAAGGTCTATACGAGGGACTGGA
Yunpoong    ATTCAGAGCACATGCGCCACATCTGGAGAAGGTCTATACGAGGGACTGGA
  
```

Fig. 25. Nucleotide sequence alignment for the SNP discovery between Yunpoong and Chunpoong. Red square is a SNP (G/A).

다) 고려인삼 신품종과 차이가 나는 유전자의 염기서열 비교

- 고려인삼(*Panax ginseng*) chlorophyll a/b binding protein(CAB) 유전자 염기서열 비교 : 식물에 이용되는 대부분의 광 에너지는 엽록소 a/b에 의해 흡수되는데 이 엽록소는 엽록체 내의 틸라코이드 막에 단백질과 비공유결합되어 엽록소-단백질 복합체 형태로 존재한다. 엽록소-단백질 복합체는 photosystem I과 photosystem II로 구성되어 있다. 각 광계의 반응 중심에는 LHC(light-harvesting complex)로 둘러싸여 있으며, 이 복합체는 핵내의 CAB(chlorophyll a/b binding protein) 유전자에 의해 발현된다. 본 연구에서는 반음지성 식물인 인삼의 엽소현상을 이해하기 위해서 광에너지 흡수의 중추적인 역할을 수행하는 인삼의 CAB gene의 특성을 비교·분석하였다. 인삼은 반음지성 작물로서 자연광의 5-10% 정도의 저광도에서 안정적으로 광합성을 하여 생육하며 30% 이상의 고광도에서는 엽소현상으로 잎이 말라 죽는 피해를 입게 된다. 고광도에서는 너무 많은 광에너지의 흡수로 광합성 과정에서 광반응계 전자전달기작의 과부하로 생성되는 singlet oxygen에 의해 엽록소 및 엽육세포가 파괴되는 것으로 알려져 있다. 반음지성 약용식물인 인삼의 잎에서 발현되는 유전자의 발현양상을 조사하기 위해서 전장(full length) cDNA library를 제작한 후 expressed sequencing tags(ESTs) 분석을 실시하였다. 무작위로 3,000개의 EST clone을 선별하여 염기서열분석을 실시한 결과 인삼의 cDNA가 삽입이 안된 104개의 clone을 제외한 2,896개의 유용한 인삼 잎의 유전자 염기서열 정보를 얻었다. 인삼의 잎으로부터 작성된 cDNA Library로부터 확보한 유전자 중 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 blastx 검색 결과, 259개의 유전자들이 CAB 유전자와 상동성을 나타냈다. CAB 유전자는 type I(89.9%), type II(6.2%), type III(3.9%)의 발현 빈도를 보였다. 가장 많이 발현이 된 CAB I 유전자는 201개의 amino acid을 가지는 open reading prime (ORF)로 나타났다 (Fig. 26). CAB I 유전자는 *Solanum tuberosum* 에서 G+C content가 51.0%로 가장 높았다. 또한 CAB I은 G+C content가 48.9-51.0%로 종간의 차이가 있음을 나타냈다 (Table 8). 인삼의 계통학적 위치는 CAB I의 계통

수에서 *Prunus persica*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum* 분지군과 다른 분지군에 포함되었으며 *Petunia x hybrida*과는 같은 분지군에 포함되었다(Fig. 27; Fig. 28). 인삼의 CAB I은 다른 종의 CAB I과 근연관계가 차이가 있음을 보여준다.

```

1  GAAAGCAGCT TTCATCAATA AGCATGGCAA CCTCAGCAAT CCAACGGTCT
   K Q L S S I S M A T S A I Q R S
51 GCATTGCGCCGCCAGACTGC TTTGAAGCCG CAGAATGAGC TGGTCAGGAA
   A F A G Q T A L K P Q N E L V R K
101 GATTGGCAGC TTGGGAGGTG GCCGCATCAC CATGAGGCGT ACCGTCAGAA
   I G S L G G G R I T M R R T V R S
151 GTGCTCCAGA GAGCATATGG TACGGACCTG ACCGCCAAA GTACTTGGGC
   A P E S I W Y G P D R P K Y L G
201 CCATTCTCCG AGCAAACCTCC ATCATACCTG ACCGGTGAAT TCCCTGGAGA
   P F S E Q T P S Y L T G E F P G D
251 CTATGGGTGG GACACTGCTG GACTTTCAGC TGACCCAGAG ACATTTGCCA
   Y G W D T A G L S A D P E T F A K
301 AGAACCCTGA GCTCGAAGTG ATCCACAGCA GATGGGCCAT GCTTGGTGCA
   N R E L E V I H S R W A M L G A
351 CTAGGCTGTG TCTTCCCTGA AATTCTTGCA AGGAATGGTG TCAAATTCGG
   L G C V F P E I L A R N G V K F G
401 CGAGGCAGTT TGGTTC AAGG CCGGAGCCCA AATCTTCTCC GAAGGTGGCC
   E A V W F K A G A Q I F S E G G L
451 TTGACTATCT TGGCAACCCA AACCTTGTCC ATGCCAGAG CATCCTGGCT
   D Y L G N P N L V H A Q S I L A
501 ATCTGGGCCA GCCAAGTTGT GCTCATGGGA TTTGTGGAAG GATACAGAGT
   I W A S Q V V L M G F V E G Y R V
551 TGGGNGGGAG GTCCACTTGG TGAAGGACTT GACAAAATTT ACCCCGGGAG
   G ? E V H L V K D L T K F T P G G
601 GTTCTTTTGA CCCACTTGGG TTGGCTTGAT GATCCTGAAG CATTTGCTGA
   S F D P L G L A *
651 ATTTGAAGGG TTAAGGAGCT TAAGAACCGA CGATTGGGCA ATGTTTTTCT
701 ATGGTTTGGG TTTNTTTGTC CAGGCCAT

```

Fig. 26. The nucleotide and predicted amino acid sequence of the *Panax ginseng* C.A. Meyer CAB I gene.

Table 8. List of CAB I registered in other plants.

Species	G+C content	GeneBank accession No.
<i>Panax ginseng</i>	51.0 %	
<i>Petunia x hybrida</i>	49.0 %	CAA28639
<i>Prunus persica</i>	50.0 %	AAC34983
<i>Nicotiana tabacum</i>	48.9 %	CAA41188
<i>Solanum tuberosum</i>	51.0 %	Z35160

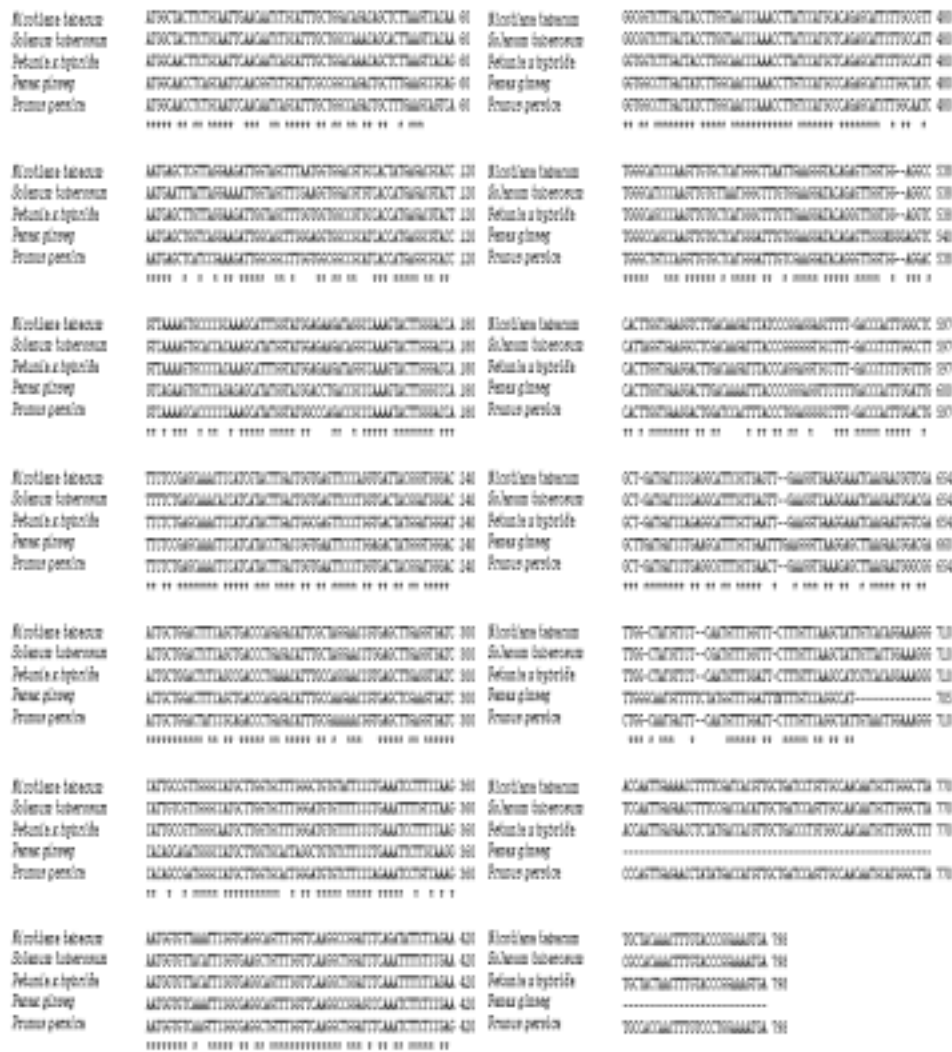


Fig. 27. Alignments of predicted amino acid sequence of ginseng CAB I with other selected plant chlorophyll a/b binding protein. Amino acid were aligned with the aid of the CLUSTAL W program. *Petunia x hybrida* (CAA28639); *Prunus persica* (AAC34983); *Nicotiana tabacum* (CAA41188); *Solanum tuberosum* (Z35160).

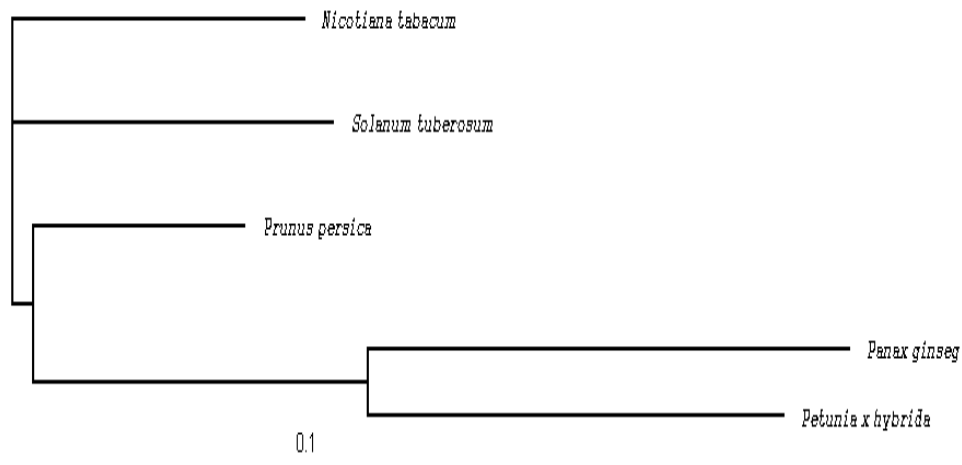


Fig. 28. Phylogenetic relationship of the CAB I to other plants CAB I . Phylogenetic analysis is based on the deduced amino acid sequences of CAB I from various species. The tree was generated by Clustal W (version 1.4) and? phylogenetic tree (BioEdit version 5.0.9). The cDNA sequences used for amino acid translation was retrieved from GenBank.

- **고려인삼(*Panax ginseng*) Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Small Subunit (*rbcS*) 유전자 염기서열 비교:** 고려인삼의 경우 최근 서구에서도 그 효능을 인정받는 등 수요가 급증하고 있으나 재배 과정에서 직사광선에 약하여 차광시설을 설치해야 하는 등 경제적 문제점이 있으므로 인삼의 광합성에 대한 이해가 매우 중요시되고 있다. 그러나 이러한 중요성에도 불구하고 생리학적 접근이 부분적으로 이루어지고 있을 뿐, 인삼 광합성에 대한 분자생물학적 연구는 거의 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 인삼 cDNA의 유전자은행을 작성한 후 광합성의 암반응에서 CO₂의 고정과 연관되어 있는 유전자인 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small Subunit (*rbcS*) gene의 아미노산 서열비교를 통해 유연관계 분석을 하고자 한다. 고려인삼의 주근으로부터 작성된

cDNA로 부터 선발한 *rbcS* 유전자의 염기서열을 확인한 결과, *rbcS* 유전자의 길이는 552bp의 Nucleotide가 존재하며, 184개의 amino acid을 가지는 open reading prime (ORF)로 가장 긴 것으로 나타났다 (Fig. 29). 선발한 *rbcS* 유전자중 522 bp의 nucleotide를 가진 *Flaveria pringlei*가 가장 작은 것으로 나타났다. 이들 분류군의 G+C content는 *rbcS*에서는 51.0%로 나타났다(Table 9). *Spinacia oleracea*에서? G+C content가 52.0%로 가장 높았다. 또한 *rbcS*을 G+C content가 49.0-51.0%로 종간의 차이가 있음을 나타냈다. 한편, 고려인삼의 계통학적 위치는 *rbcS*의 계통수에서 *Lactuca sativa*, *Malus domestica* x *Pyrus communis*, *Flaveria pringlei*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Helianthus annuus*, *Glycine max*, *Spinacia oleracea* 분지군과 다른 분지군에 포함되는 것으로 나타났다(Fig. 30).. 이는 고려인삼이 다른 종의 *rbcS*과 근연관계가 차이가 있음을 보여준다(Fig. 31).

```

1  GGCACGAGGA  CCAAGGTTAG  TGAAGTTAGG  AGAAACAATT  TTTTAGTTAA
51  TGGCTTCTCTC  CGTGATCTCC  TCGGCCACCG  TGGCCGCCGT  GAGCCGGGCC
   A S S S  V I S  S A T V  A A V  S R A
101  GTCCCAGCTC  AAGCCAGCAT  GGTTCACACC  TTCACCGGCC  TCAAGTCTAC
   V P A Q  A S M  V A P  F T G L  K S T
151  CGCAGCTTTT  CCGGTCACCA  GAAAGGTCAA  CGACATTACC  TCTCTCCTA
   A A F  P V T R  K V N  D I T  S L P S
201  GCAATGGTGG  AAGAGTGCAA  TGCATGAAGG  TGTGGCCACC  ACTTGGTTTG
   N G G  R V Q  C M K V  W P P  L G L
251  AACAAAGTTCG  AGACTCTGTC  TTACCTCCCA  CAACTCACAC  AAGAACAATT
   N K F E  T L S  Y L P  Q L T Q  E Q L
301  GTCAAAGGAA  GTCGATTATC  TCCTCCGTAG  TGGATGGGTT  CCTTGCTTGG
   S K E  V D Y L  L R S  G W V  P C L E
351  AATTCGAGTT  GGAGCACGGA  TTCGTGTACC  GTGAGCACCA  CCACTCACCG
   F E L  E H G  F V Y R  E H H  H S P
401  GGGTACTATG  ACGGACGTTA  CTGGACAATG  TGGAAAGCTGC  CCATGTTTGG
   G Y Y D  G R Y  W T M  W K L P  M F G
451  ATGCACTGAT  TCATCTCAGG  TGTTGAAAGA  AGTAGAGGAG  TGCAAGAAGG
   C T D  S S Q V  L K E  V E E  C K K E
501  AGTACCCAAA  TGCATACATC  CGAATTATTG  GATTCGACAA  CGTCCGTCAA
   Y P N  A Y I  R I I G  F D N  V R Q
551  GTGCAAGTCA  TCAGTTTCAT  TGCCTTCAAG  CCACCTTCTG  CCTCTACCTA
   V Q C I  S F I  A F K  P P S A  S T *
601  ATTAATTAAT  TAAGCAAGCT  ACATTTATTT  ATTTCTGTAT  CTTAATTAAT
651  TTCTCCTCCA  TTTTCCCAT  CCAATTGCAA  ATTTACTGGT  TTGAATTCCT
701  TTTCTTCTCC  TGTCTGCTTC  GATTTCTGGT  TGCGGATTTT  GAATGACAAT
751  CATGTTTGAT  GAGGAGATTA  TCAAGTAATT

```

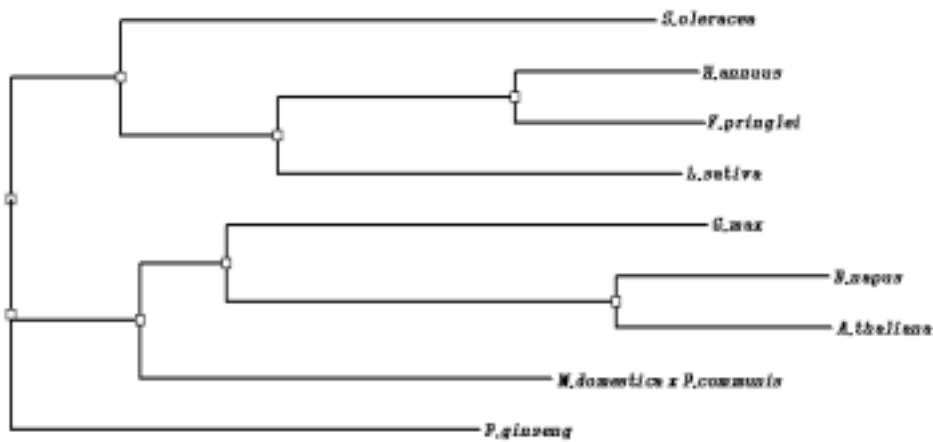
Fig. 29. The nucleic acid and predicted protein sequence of the *Panax ginseng* C.A. Meyer *rbcS* gene.



Fig. 30. Alignments of predicted amino acid sequence of rbcS along with other selected plant ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small Subunit . Sequences were aligned with the aid of the CLUSTAL W program. *Lactuca sativa*(BAA03103) rbcS; *Malus domestica x Pyrus communis*(AAA33866) rbcS; *Flaveria pringlei*(AAB67847) rbcS; *Arabidopsis thaliana*(RKMUA1) rbcS; *Brassica napus*(CAA39402) rbcS; *Helianthus annuus*(CAA68490) rbcS; *Glycine max*(AAA81328) rbcS; *Spinacia oleracea*(CAA66201) rbcS.

Table 9. List of rbcS registered in other plants

Species	G+C content	Amino acid residue	GeneBank accession No.
<i>P. ginseng</i>	51 %	184	
<i>L. sativa</i>	49 %	182	BAA03103
<i>M. domestica x P. communis</i>	50 %	180	AAA33866
<i>F. pringlei</i>	49 %	174	AAB67847
<i>A. thaliana</i>	50 %	181	RKMUA1
<i>B. napus</i>	50 %	182	CAA39402
<i>H. annuus</i>	50 %	179	CAA68490
<i>G. max</i>	50 %	179	AAA81328
<i>S. oleracea</i>	52 %	181	CAA66201



001

Fig. 31. Phylogenetic relationship of the rbcS to other plants rbcS. Phylogenetic analysis is based on the deduced amino acid sequences of rbcS from various species. The tree was generated by Clustal W (version 1.4) and phylogenetic tree (BioEdit version 5.0.9). The cDNA sequences used for amino acid translation were retrieved from GenBank. The respective accession number is described next to plant name.

- 고려인삼(*Panax ginseng*)의 EST database에서 Energy 관련 유전자 염기서열 분석 : 광합성은 생물계에 에너지를 공급하는 근원적 mechanism으로 광합성에 대한 이해는 학문적 가치 이외에도 식량자원 및 기타 농업 생산성 증대 등 그 가치가 매우 크므로 광합성과 관련한 많은 연구가 이루어져 왔다. 특히 최근에는 식량문제가 심각해지고 식물자원의 경제적 가치가 더욱 중요해지고 있으며, 생화학 및 분자생물학 등의 연구방법이 발달함에 따라 광합성에 관한 연구가 더욱 활발해지고 있다. 본 연구에서는 고려인삼의 잎에서 expressed sequence tags(ESTs)를 통해 얻어진 cDNA clones의 염기 서열 분석을 실시하였다. ESTs를 가지고 GenBank에 보고

되어있는 염기서열과 비교 분석하여 인삼의 잎에서 발현이 되는 에너지 관련 유전자를 분리하여 분석을 실시하였다. 인삼의 잎으로부터 작성된 cDNA로 부터 선발한 유전자의 염기서열을 확인한 결과, 전체 2,896개의 유전자중 349(12.1%)개의 에너지 관련 유전자가 검색이 되었다. 에너지 관련 유전자들은 *Arabidopsis thaliana* 유전자 기능을 분류화한 MIPS (<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html>) database를 이용하여 유전자의 기능을 분석한 결과(Fig. 32), 에너지 관련 유전자의 세부 항목으로 aerobic respiration (48.4%), accessory proteins of electron transport and membrane associated energy conservation (17.2%), glycolysis and gluconeogenesis (3.4%), electron transport and membrane associated energy conservation (2.9%), respiration (2.0%), glycolysis methylglyoxal bypass (1.7%), metabolism of energy reserves (0.6%), alcohol fermentation (0.3%), other (23.5%) 군으로 분류가 되었다(Table 10). Chlorophyll A/B-binding protein, photosystem II oxygen-evolving complex protein등 aerobic respiration에 관련된 유전자가 다발현되고 있음을 보여주었다(Table 11).

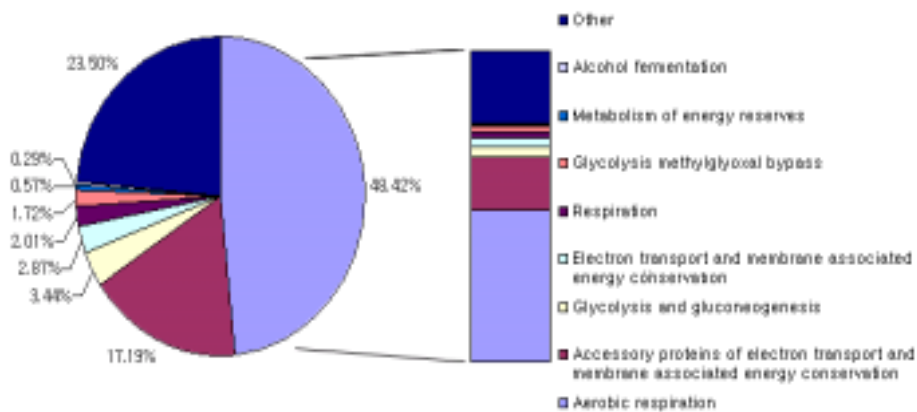


Fig. 32. Functional classification of *Panax ginseng* C.A. Meyer ESTs. The ESTs that had sequence similarity to known genes were classified based on energy related functions.

Table 10. Categorization of 349 Energy related genes

Energy	Number	%
Aerobic respiration	169	48.4
Accessory proteins of electron transport and membrane associated energy conservation	60	17.2
Glycolysis and gluconeogenesis	12	3.4
Electron transport and membrane associated energy conservation	10	2.9
Respiration	7	2.0
Glycolysis methylglyoxal bypass	6	1.7
Metabolism of energy reserves	2	0.6
Alcohol fermentation	1	0.3
Other	82	23.5

Table 11. Most abundant mRNA in energy-related cDNA library

Putative identification	Source	Acc. No.	No. child	E-value
Chlorophyll a/b binding protein of lhci type i	<i>P. ginseng</i>	AF034631	128	2E-76
Chlorophyll a/b-binding protein	<i>D. carota</i>	AF207690	26	4E-77
Photosystem II oxygen-evolving complex protein 3	<i>S. oleracea</i>	S00008	23	5E-66
Chlorophyll a/b-binding protein type ii (cab-7)	<i>L. esculentum</i>	S07408	16	E-68
Photosystem I chain II	<i>C. sativus</i>	A60695	13	E-53
Chlorophyll a/b-binding protein (cab-11)	<i>L. esculentum</i>	S14305	11	2E-89
Chlorophyll a/b-binding protein type i (cab-6a)	<i>L. esculentum</i>	S00443	10	E-123
Photosystem ii oxygen-evolving complex protein 1	<i>N. tabacum</i>	T02066	8	E-162
Early light inducible protein	<i>M. sativa</i>	AF383622	6	7E-57
Chlorophyll a/b-binding protein cp26	<i>A. thaliana</i>	T04049	6	E-124
Photosystem I chain II	<i>L. esculentum</i>	S00449	5	4E-48
Early light-inducible protein	<i>Soybean</i>	JC5876	5	8E-38
Chlorophyll a/b binding protein	<i>A. graveolens</i>	AGCHLABBP	4	4E-84
CHLOROPHYLL A-B BINDING PROTEIN 4	<i>Mus musculus</i>	BC002118	4	E-125
Latex plastidic aldolase protein	<i>H. brasiliensis</i>	AF467803	3	E-83
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>S. chloroplast</i>	T09012	3	3E-63
Photosystem ii protein w protein	<i>Oryza sativa</i>	AP003269	3	3E-15
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	<i>N. tabacum</i>	G3PA	3	E-134
Light harvesting chlorophyll a /b binding protein	<i>H. helix</i>	HHLHC	3	5E-46
Ubiquinol-cytochrome-c reductase chain 14K	<i>S. tuberosum</i>	T07368	2	5E-46
Glycolate oxidase	<i>L. esculentum</i>	LEGLYCOX	2	1E-55
Fructose-bisphosphate aldolase M3E9.40	<i>A. thaliana</i>	T05051	2	E-101
Cytochrome p450	<i>A. thaliana</i>	AB018112	2	E-29
Photosystem i chain psi-e isoform b	<i>N. tabacum</i>	T16963	2	8E-41
Glycolate oxidase	<i>M. crystallinum</i>	MCU80071	2	E-124
Hypothetical protein	<i>A. thaliana</i>	T47672	2	8E-50
Oxygen-evolving enhancer protein 1	<i>S. tuberosum</i>	PSBO	2	8E-73
Chlorophyll a/b-binding protein cab10b	<i>L. esculentum</i>	S11878	2	3E-90
Chlorophyll a/b-binding protein	<i>A. thaliana</i>	A86423	2	2E-82
Chlorophyll a/b-binding protein type III (cab-13)	<i>L. esculentum</i>	CDTO33	2	5E-34

4) 고려인삼의 SNP D/B의 구축

Table 12. Arrangement ESTs by gene function

Function of Gene	Function ID	DC03	DC01	DC02	DC04	DC05	DC06
aluminium induced protein	AF363286_1	DC03021B12			DC04001B05		
calmodulin	S22971	dc03018e10 dc03027b01			dc04014e02 dc04014h04	dc05012b07	dc06004h05 dc06005c01 dc06012g11
	TVU38786_1			dc02004g08			
	AY070232_1				dc04001a03		
	HAU79736_1	dc03010a10 dc03031b07					
	MDCAMG_1				dc04014a02		
Cu/Zn superoxide dismutase	AF034630_1	dc03015b02 dc03015f03 dc03043h07		dc02017f12	dc04004b08 dc04035b02	dc05028a12	dc06002d12 dc06008h12
	AF355460_1	dc03032f01					
dehydration-induced protein ERD15	AF261139_1	dc03015c01					dc06015f08
farnesylated protein ATFP6	T05686	dc03034c01		dc02030h09	dc04019e05		
glycine-rich protein	AB007818_1	dc03041f03 dc03019g12		dc02025h05			
	S32123				dc04005h03 dc04028d02		dc06009c03
	C85356	dc03014d09	dc01019f09	dc02018f07		dc05012a10	

	F84469		dc01032f08				
	LEPT53_1		dc01025h09				
GTP-binding protein	AF495716_1	dc03015a05	dc01029e09				
	CAR299064_1	DC03042D10					
	T50814						DC06014A10
heat shock protein 17.6	T07602	DC03032A12		DC02026C08			DC06003C07 DC06005C04 DC06007B09 DC06008G01 DC06023B10 DC06023E11
metallothionein	JQ2128	DC03040D05	DC01008G05	DC02010A01	DC04002G05 DC04004H01 DC04009G12 DC04017D07 DC04030E10	DC05003H07 DC05011A01	DC06001A02 DC06001B01 DC06010G05 DC06014D04 DC06020A10 DC06020E08 DC06024B09 DC06025G01 DC06001G01

NOI protein nitrate-induced	AB018120_3	dc03039h05	dc01014e04	dc02015g02			
nucleoside diphosphate kinase.txt	AF108881_1	DC03018B10	DC01024G10	DC02005D02		DC05018B06	
pathogenesis-related protein 2	S12568	DC03029G02 DC03030D02 DC03046H04	DC01005G01 DC01012G01	DC02009A02 DC02019B01 DC02022F05			DC06001B11 DC06011A01 DC06013H02 DC06024A12 DC06025E07
peroxiredoxin	AF483268_1	DC03014H09 DC03029B01	DC01032E11	DC02020G03 DC02010E04	DC04031D11		DC06004D10 DC06010A12 DC06017H08
proline-rich protein 14K embryonic	S35714	DC03007B11 DC03047E01	DC01009G01 DC01021H04	DC02014C02 DC02015A03	DC04004G07		
protease inhibitor II	S30578	DC03018B06 DC03046C02	DC01029B03		DC04029A07 DC04032H06		
RIBONUCLEASE 1	RNS1_PANGI	DC03030F10 DC03042G04	DC01017C02 DC01016E12	DC02018C01 DC02021D05 DC02022B06 DC02022C05	DC04019E02 DC04026C10 DC04033D09	DC05003G07 DC05031B04	DC06001H04 DC06006G03 DC06009F11 DC06022F03

				DC02022E12 DC02022G03 DC02024E07 DC02026C03 DC02026G03 DC02029D01 DC02029G05 DC02030D01 DC02031B05 DC02031E09 DC02008C02 DC02012C02 DC02017C04 DC02021A07			
RIBONUC LEASE 2	RNS2 PANG1	DC03007F01 DC03014F08 DC03018B09 DC03025B07 DC03030C02 DC03032A03 DC03045D11	DC01021E09 DC01017A01 DC01008A03	DC02005C06 DC02010B12 DC02015B09 DC02015B10 DC02015F12 DC02016B11 DC02019F07 DC02020F02 DC02022F06 DC02023H10 DC02027H12 DC02001A12 DC02001F03 DC02001F07 DC02003A06 DC02009A04 DC02014C04 DC02015C10 DC02022F11 DC02024H12 DC02030D11	DC04027E02 DC04028G07	DC06009D07 DC06014E02 DC06017G11	
wound induced protein	LEPT5 2_1	DC03020F09				DC06022C08	

5) 인삼 신품종으로 탐색된 SNP의 primer의 제작 및 확인

- **SNP의 재확인:** 인삼 신품종간 SNP를 찾기는 매우 어려웠으나 인삼의 EST 20,000여개를 bioinformatics에 의하여 SNP를 확인한 결과 천풍과 연풍, 고풍, 자경종, 황숙종에서 차이가 나는 염기서열을 확인하여 천풍 specific SNP를 확인하였다(Table 13). 그러나 차이가 나는 EST는 unknown 유전자이었다. 반면에 연풍의 경우에도 다른 품종과 차이가 나는 연풍 specific primer를 확인하였는데(Table 14), 이 유전자는 ADP-ribosylation factor gene으로 확인되었다.

Table 13. Analysis of Yunpoong specific SNP compared with various ginseng cultivar based on ADP-ribosylation factor gene

연풍	CCTTGTGTTTGC AAACAAGCAAGATCTTCCAAATGCCATGAATGCTGCTG
천풍	CCTTGTGTTTGC AAACAAGCAAATCTTCCAAATGCCATGAATGCTGCTG
고풍	CCTTGTGTTTGC AAACAAGCAAATCTTCCAAATGCCATGAATGCTGCTG
자경종	CCTTGTGTTTGC AAACAAGCAAATCTTCCAAATGCCATGAATGCTGCTG
황숙종	CCTTGTGTTTGC AAACAAGCAAATCTTCCAAATGCCATGAATGCTGCTG

Table 14. Analysis of Chunpoong specific SNP compared with various ginseng cultivar

천풍	ATAGAACG TAGTATATATAAAAATAAAAGCATGCATGATCATTCAATATA
연풍	ATAGAATG TAGTATATATAAAAATAAAAGCATGCATGATCATTCAATATA
고풍	ATAGAATG TAGTATATATAAAAATAAAAGCATGCATGATCATTCAATATA
자경종	ATAGAATG TAGTATATATAAAAATAAAAGCATGCATGATCATTCAATATA
황숙종	ATAGAATG TAGTATATATAAAAATAAAAGCATGCATGATCATTCAATATA

- **Sequence alignment와 phylogenetic analysis** : ITS region의 영역은 기존에 발표된 sequence 들과 비교하여 결정하며, ClustalV program, Autoassembly, Sequencer 등을 이용하여 일단 염기서열의 정확도와 sequence alignment를 실행 및 확인한 후, 최종적으로 육안에 의하여 결과를 검토하였다. 염기서열분석결과 얻어진 유전정보의 분석은 PHYLIP(Phylogenetic Inference Package, ver. 3.5c)내의 DNADIST program의 Kimura's two parameter에 의한 genetic distance matrix를 작성하였다.
- **SNP primer의 제작** : SNP primer의 개발 및 분석시스템 개발의 기본원리는 Amplification Refractory Mutation System (ARMS)을 이용한다. 일반적으로 Taq 폴리머라제(polymerase)를 사용하여 PCR증폭을 할 경우에 primer의 3'-nucleotide에서 주형(template DNA)과 mismatch되면 PCR증폭은 일어나지 않는데 이것을 이용하여 primer를 제작한다. 전제조건으로 증폭에 사용되는 Taq 폴리머라제는 3'-exonucleolytic proofreading 활성기능이 없는 것을 사용하여야 한다. ARMS primer들은 G/T 혹은 A/C (primer/template) mismatch를 유발하게끔 제작한다. Primer 제작은 목적으로 하는 유전자의 염기서열 중에서 임의로 적당한 크기의 1차 control primer를 결정하고 1차 control primer 증폭산물의 안쪽에 특이적인 primer 부위를 결정하여 2차 primer를 합성하고 3'nucleotide 부위에서 특이적인 nucleotide의 바로 앞 nucleotide염기를 임의의 nucleotide로 치환함으로써 특이적으로 증폭되도록 하며, 이때 반드시 primer간에 경합을 시키도록 제작하였다.
- **SNP primer의 PCR 반응의 최적조건규명** : 본 SNP 분석시스템은 각각의 개발되는 SNP에 따라 그 반응특성에 차이가 있기 때문에 각 primer의 특성에 맞게 PCR의 반응조건(DNA의 농도, 증폭회수, primer간의 농도비율, dNTPmix 농도)을 새로이 설정하였다(Fig. 33).

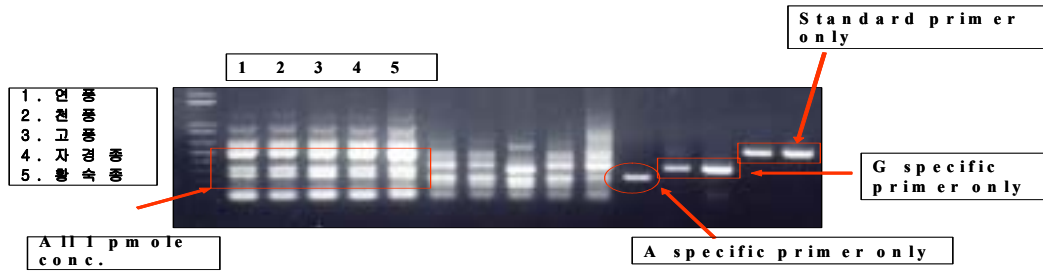


Fig. 33. PCR products with various concentration of SNP primer and reaction time for PCR.

- 효율적인 SNP primer을 이용한 품종 확인

상기 확인된 염기서열중에서 연풍의 specific 염기인 G와 A 간의 함량을 달리처리한 후 PCR를 한결과 G와 A의 함량을 동일하게 할 경우에는 밴드가 모두 형성되었으나 A보다 G를 많이 넣을 경우 연풍에서만 밴드가 형성되었다(Fig. 34).

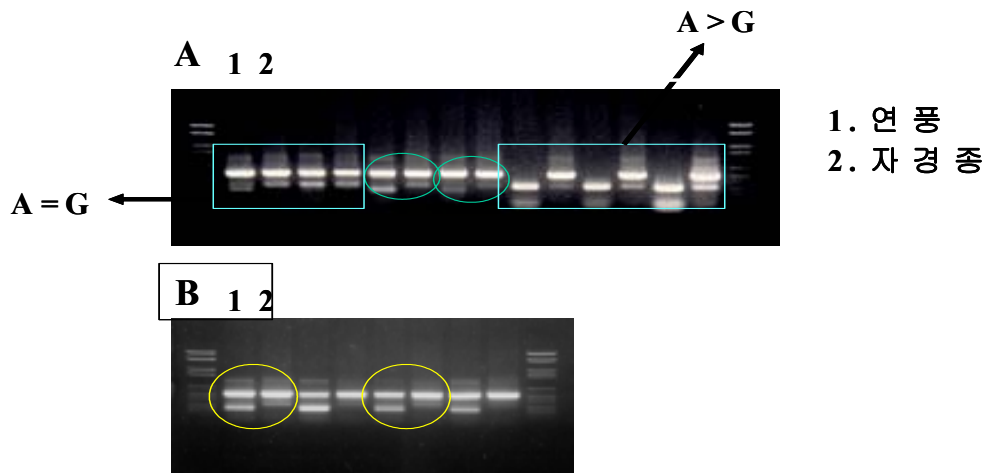


Fig. 34. PCR product of Yunpoo and jakyungchong by concentration of G>A Yunpoo specific primer.

3) 신품종 재배인삼의 유전적 정체성 확인

가) Sequence alignment와 phylogenetic analysis

- 염기서열분석이 수행된 엽록체 DNA *trnL-F* region과 핵리보솜 DNA ITS region, ETS region의 영역은 기존에 발표된 sequence 들과 비교하여 결정하였으며, ClustalX program, Autoassembly, Sequencer 등을 이용하여 일단 염기서열의 정확도와 sequence alignment를 실행 및 확인한 후, 최종적으로 육안에 의하여 결과를 검토였다(Appendices 1, 2, 3). 또한, 각 분류군에 대한 색소체 DNA *trnL-F* region과 핵리보솜 DNA ITS region, ETS region의 유전정보를 요약하여 제시하였으며(Table 15), 기존에 발표된 동일한 분류군의 sequence와 비교할 수 있도록 제시하였다(Table 16). 염기서열분석결과 얻어진 유전정보의 분석은 PHYLIP(Phylogenetic Inference Package, ver. 3.5c)내의 DNADIST program의 Kimura's two parameter에 의한 genetic distance matrix를 작성하였다. 또한 PAUP*(Phylogenetic Analysis Using Parsimony) program을 이용하여 molecular phylogenetic tree를 작성하고, 계통도의 신뢰도와 정확성을 구축하기 위하여, Jackknife analysis 및 bootstrap analysis를 수행하였다(Fig. 35, 36, 37).

나) 인삼 신품종간 phylogenetic analysis

- 본 연구의 주재료와 비교군으로 확정된 23분류군(국외산 4분류군 포함) 인삼에 대한 색소체 DNA *trnL-F* region과 핵리보솜 DNA ITS region 그리고 ETS region의 염기서열분석을 수행한 결과 총 1490개의 정렬된 염기서열자료가 확보되었고 (Table 16; Appendices 1, 2, 3), 그 중에서 3개의 염기만이 한국산 인삼의 19개 strains을 구분할 수 있는 유용한 계통학적 정보를 갖는 것으로 확인되었다(Table 17). 염기서열분석결과 pairwise distance matrix와 patristic distance matrix가 작성되었다. 또한, 계통학적

분석을 통하여 대상 유전자별 및 결합정보를 이용한 최단거리의 계통도 (Maximum Parsimonious Tree)가 도출되었다(Figs. 35, 36, 37). 색소체 DNA *trnL-F* region과 핵리보솜 DNA ITS region 그리고 ETS region의 염기서열에 기초한 최단거리계통도(Fig. 35)에 의하면, 비교군인 *P. quinquifolius*, *P. japonicum*, *P. pseudoginseng* 및 *P. notoginseng*로부터 주재료인 *P. ginseng* group이 94%의 높은 bootstrap value를 보이며 명확히 구분되는 것으로 나타났다. 이는 핵과 색소체 DNA상의 염기서열분석을 통한 이전의 연구결과들(Wen and Zimmer, 1996; Lee and Wen, 2003; Ngan *et al.*, 1999)과 일치하였으며, GeneBank 및 EMBL을 유전자은행 정보를 통하여 재확인 할 수 있었다. 그러나, *P. ginseng* group에 포함되는 분류군들 사이에는 연풍2, 천풍3, 금풍2, 선풍을 제외한 모든 group간에 모두 동일한 염기서열을 갖는 것으로 관찰되었으나, 1개씩의 염기차이를 나타내는 4집단(연풍2, 천풍3, 금풍2, 선풍) 조차도 각각의 품종내에서도 일정한 분자유전학적 불연속성을 나타내지는 못하였다. 따라서, 연구목적에 합당한 유전자의 발굴 및 선택과 대상 분류군의 검토 등을 토대로 향후 *P. ginseng* group 전체에 대한 분자유전학적 재검토가 필요한 것으로 생각된다.

Table 15. Materials and collection data

Taxa	Localities & Collection date	Abb.
<i>Panax ginseng</i> (채배인삼)	Korea(Kyunghee Univ.), Cultivation(Jagyeong), 22 July 2003	PGCJ
	Korea(Kyunghee Univ.), Cultivation(Hwangsuk), 22 July 2003	PGCH PGCC
<i>Panax ginseng</i> (신품종인삼)	Jilin, China, Cultivation, 22 July 2003	PGCR
	Ussurisk, Russia, Cultivation, 22 July 2003	
	Yeonpung, Korea(KT&G), 22 July 2003	PGCY1
	Yeonpung, Korea(KT&G), 22 July 2003	PGCY2
	Yeonpung, Korea(KyungHee Univ.), 22 July 2003	PGCY3
	Cheonpung, Korea(KT&G), 22 July 2003	PGCC1
	Cheonpung, Korea(KT&G), 22 July 2003	PGCC2
	Cheonpung, Korea(Kyunghee Univ.), 22 July 2003	PGCC3
	Cheonpung, Korea(Kyunghee Univ.), 22 July 2003	PGCC4
	Geumpung, Korea(KT&G), 22 July 2003	PGCG1
	Geumpung, Korea(KT&G), 22 July 2003	PGCG2
	Gopung, Korea(KT&G), 22 July 2003	PGCG
	Seonpung, Korea(KT&G), 22 July 2003	PGCS
<i>Panax ginseng</i> (야생형인삼-산삼)	Mt. Baekdu, Korea(KT&G), 24 Sep. 2003	PGSB
	Pyeongchang-gun, Gangwon-do, Korea(Kyunghee Univ.), 9 Oct. 2003	PGSK
	Mt. Sobaek, Korea, 20 Oct. 2003	PGSS
	Cheolwon, Gangwon-do, Korea, 25 Sep. 2003	PGJ
<i>P a n a x quinquefolia</i>	Ontario, Canada(KT&G), 22 July 2003	PQC
	Wisconsin, United State(KT&G), 22 July 2003	PQU
<i>P a n a x japonicum</i>	Kwandong, Japan (KT&G), 1 Sep. 2003	PJJ
<i>P a n a x pseudoginseng</i>	Ghorapani, Himalaya, Nepal, 25 Aug. 2002	PPG
<i>P a n a x notoginseng</i>	AY271919	PNG

Table 16. Sequence characteristics of plastid DNA *trnL*-F region and nrDNA ITS region, ETS region for taxa

Taxa	<i>trnL</i> -F				ITS				ETS			
	Length	G+C	In,Del	Info.	Length	G+C	In,Del	Info.	Length	G+C	In,Del	Info.
PGCJ	371	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGCH	371	36.1	0	0	619	60.42	0	1	499	50.50	0	0
PGCC	371	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGCR	371	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGCY1	371	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGCY2	371	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGCY3	371	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGCC1	371	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGCC2	371	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGCC3	371	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGCC4	371	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGCG1	371	36.1	0	0	619	60.42	0	1	499	50.50	0	0
PGCG2	371	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGCG	371	36.1	0	0	619	60.42	0	1	499	50.50	0	0
PGCS	371	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGSB	371	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGSK	371	36.1	0	0	619	60.42	0	1	499	50.50	0	0
PGSS	371	35.8	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGJ	371	36.1	0	0	619	60.42	0	1	498	50.40	0	0
PQC	371	36.4	0	2	619	60.58	0	4	500	50.60	1/	0
PQU	371	36.4	0	2	619	60.58	0	4	501	50.69	2/	0
PJJ	371	35.8	0	0	619	60.58	0	4	499	50.50	0	0
PPG	371	36.1	0	0	619	60.58	0	6	500	49.80	2/	0
PNG					619	60.42	0	7				

Table 17. Sequence comparison with previous nrDNA ITS region data from GeneBank

Taxa	ITS							
	This Study				Previous Study			
	Lengt h	G/C	In/De l	Info	Lengt h	G/C	In/De l	Info
<i>Panax ginseng</i> (purple)	619	60.30	0	0	619	60.26	0	0
<i>Panax ginseng</i> (yellow)	619	60.42	0	1	619	60.42	0	1
<i>Panax ginseng</i> (cheonpung)	619	60.30	0	0	619	60.26	0	0
<i>Panax japonicum</i>	619	60.58	0	4	618	59.39	1	4
<i>Panax quinquefolia</i>	619	60.58	0	4	619	60.60	0	4
<i>Panax pseudoginseng</i>	619	60.58	0	6	617	59.58	2	7

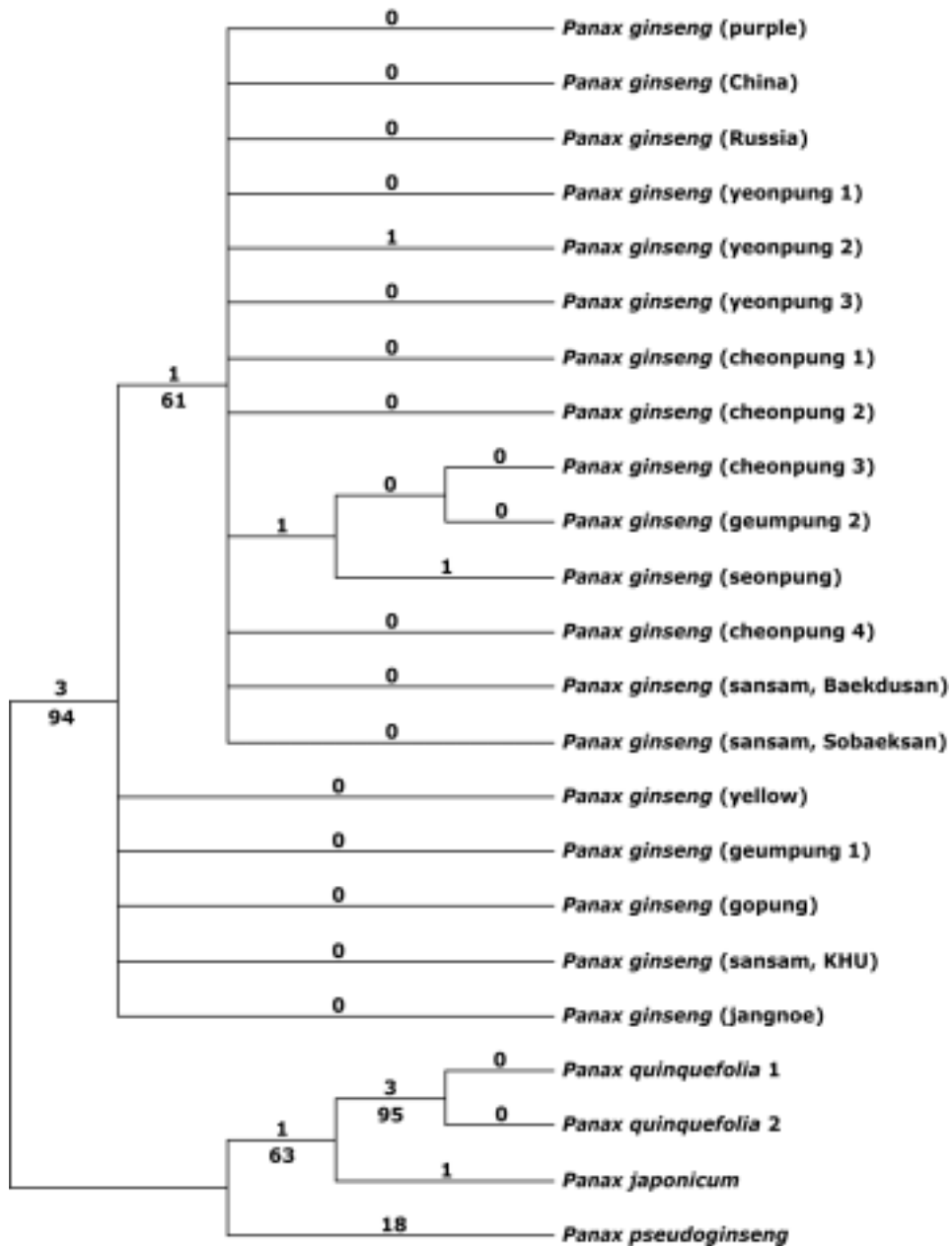


Fig. 35. One of the most parsimonious tree of genus *Panax* based on the combined plastid DNA *trnL* gene, nuclear ribosomal DNA ITS region, and ETS region (CI=0.968, RI=0.957, tree length=31). The numbers above the line indicate bootstrap values from 1000 replicates.

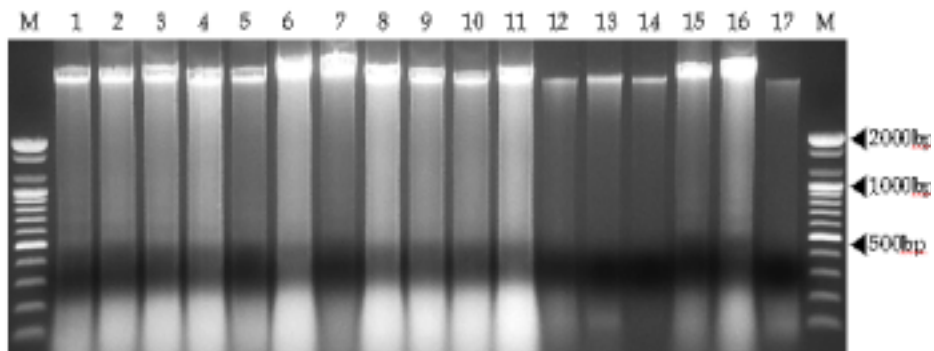


Fig. 36. Electrophoresis photograph of extracted DNA of *Panax ginseng* and investigated taxa. M : Molecular Marker (100bp ladder).

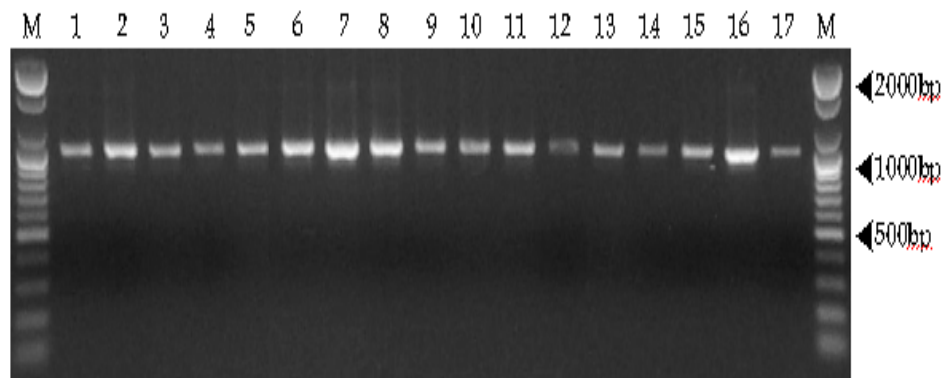


Fig. 37. Electrophoresis photograph of amplified chloroplast DNA 3'-end half *trnL-F* region of *Panax ginseng* and investigated taxa. M : Molecular Marker (100bp ladder).

2) 인삼 신품종간 SNP D/B의 구축

염기서열분석이 수행된 엽록체 DNA *trnL*-F region의 영역은 기존에 발표된 sequence 들과 비교하여 결정하며, ClustalX program, Autoassembly, Sequencer 등을 이용하여 일단 염기서열의 정확도와 sequence alignment를 실행 및 확인한 후, 최종적으로 육안에 의하여 결과를 검토하고 있다(Table 18). 염기서열분석결과 얻어진 유전정보의 분석은 PHYLIP(Phylogenetic Inference Package, ver. 3.5c)내의 DNADIST program의 Kimura's two parameter에 의한 genetic distance matrix를 작성한다. 또한 PAUP*(Phylogenetic Analysis Using Parsimony) program을 이용하여 molecular phylogenetic tree를 작성하고, 계통도의 신뢰도와 정확성을 구축하기 위하여, Jackknife analysis 및 bootstrap analysis를 수행한다.

Table 18. Materials and collection data for investigated taxa.

Taxa	Localities (voucher specimens)	Serial No
<i>Panax ginseng</i> (채배인삼)	Korea(Kyunghee Univ.), Cultivation(Jagyeong), 2003.07.22	P01
	Korea(Kyunghee Univ.), Cultivation(Hwangsuk), 2003.07.22	P02
	Jilin, China, Cultivation, 2003.07.22	P03
	Russia, Cultivation, 2003.07.22	P04
<i>Panax ginseng</i> (신품종인삼)	Korea(KT&G), Yeonpung, 2003.07.22	P05
	Korea(KT&G), Cheonpung, 2003.07.22	P06
	Korea(Kyunghee Univ.), Cheonpung, 2003.07.22	P07
	Korea(KT&G), Geumpung, 2003.07.22	P08
	Korea(KT&G), Geumpung, 2003.07.22	P09
	Korea(KT&G), Gopung, 2003.07.22	P10
	Korea(KT&G), Seonpung, 2003.07.22	P11
<i>Panax ginseng</i> (산삼, wild type)	Mt. Baekdu, Korea, 2003.09.24	P12
	Pyeongchang-gun, Gangwon-do, Korea(KHU), 2003.10.09	P13
	Mt. Sobaek, Korea, 2003.10.20	P14
<i>Panax quinquefolia</i>	Alberta, Canada, unknown data	P15
	West, United States of America, unknown data	P16
<i>Panax japonicum</i>	Kwantong, Japan, 2003.09.01	P17

나. 신품종 인삼 및 감자의 SNP primer의 활용기술개발

1) 국내산 인삼 신품종 천풍에서 SNP primer의 활용

가) 천풍 EST의 비교 및 후보 유전자 탐색

- 약용식물로서 옛부터 한방에서 중요한 약재로 사용되어온 인삼은 혼계형으로 현재 자경을 비롯하여 황숙, 천풍, 청경, 연풍, 고품 등 여러 신품종이 재배되고 있으나 이들은 순계분리를 통하여 우수한 형질의 것을 선발·고정한 것이다. 현재 재배되고 있는 인삼 품종들의 구별은 외부 형태적인 특징으로 구별할 뿐 이들을 정확히 구별할 수 있는 분자마커 (molecular marker)가 없는 실정이다. 인삼은 종자를 얻기 위해서는 최소 3년 이상 재배기간이 소요되기 때문에 교배를 통한 새로운 품종육성에는 최소 60년 이상이 소요된다. 따라서 인삼의 품종육종을 위한 기간 단축과 뿌리삼의 유통과정에서 품종을 명확히 구별하기 위한 품종별 분자마커의 개발이 절실히 요구되고 있다. 본 연구에서는 이러한 재배인삼의 품종 구별을 위한 마커개발 (marker development)을 목적으로 인삼에서 분리된 EST 분석 자료를 이용하였다. 현재 인삼에서는 자생식물이용기술개발사업단의 gene pool에 29,117개의 EST가 분석되어 있는데 (<http://genepool.kribb.re.kr/new/>), 본 연구에서는 우선 천풍을 자경과 구별하기 위한 분자마커의 개발을 목적으로 4년근 천풍 뿌리와 14년근 자경뿌리에서 분석된 6천여개의 EST 자료를 분석하였다. 마커 선발을 위한 후보 유전자 선발위해서 천풍과 자경종의 뿌리에서 다발현되는 유전자를 각각 선발하여 비교하였다. 그 결과 천풍에서는 major latex protein homolog가 41개와 major latex-like protein이 12개로 가장 많이 검출되었고 ribonuclease 2가 36개, metallothionein 2가 35, ribonuclease 1이 21개 등의 유전자가 발견되었다 (Table 20). 그러나 14년근 자경 종에서는 ribonuclease 2이 87개로 가장 많이 발견되었고, ribonuclease 1가 67개, protein WSI724가 25개, praline-rich protein 14Krk 16개 등의 순으로 많이 발현되는 것으로 추정되었다 (Table 21).

Table 20. Most abundant ESTs expressed in 4-year root of *Panax ginseng* new cultivar Chunpoong

Putative identification	Source	Ace. No.	No. of child
Major latex protein homolog	<i>Common ice</i>	T12249	41
Ribonuclease 2	<i>Panax ginseng</i>	RNS2_PA NGI	36
Metallothionein-2	<i>Oenanthe javanica</i>	AF017787	35
Ribonuclease 1	<i>Panax ginseng</i>	RNS1_PA NGI	21
Protein WSI724	<i>Rice</i>	T07613	18
Fungal elicitor-induced protein	<i>Parsley</i>	T15043	17
Hypothetical protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	E86255	16
Hydroxyproline-rich glycoprotein DZ-HRGP	<i>Volvox carteri</i>	VCA242540	15
Pherophorin-dz1 protein	<i>Volvox carteri f.</i>	VCA429230	13
Major latex-like protein	<i>Prunus persica</i>	AF239177	12
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Garden snapdragon</i>	DESKG	11
Chromosome 2L section	<i>D r o s o p h i l a melanogaster</i>	AE003588	11
Dcarg-1	<i>Daucus carota</i>	AB027501	10
Extensin homolog T9E8.80	<i>Arabidopsis thaliana</i>	T06291	10
Ribosomal protein S26	<i>Garden pea</i>	T50822	9
Acidic ribosomal protein p1a	<i>Maize</i>	T02039	9
Ag13 protein	<i>A. glutinosa</i>	AGAG13	9
Specific tissue protein 2	<i>Cicer arietinum</i>	CANST2P RO	9

Table 21. Most abundant ESTs expressed in 14-year root of *Panax ginseng* Jakyung cDNA library

Putative identification	Source	Accession no.	No. of child
RIBONUCLEASE 1	<i>Panax ginseng</i>	RNS1_PAN GI	67
RIBONUCLEASE 2	<i>Panax ginseng</i>	RNS2_PAN GI	65
protein WSI724	rice	T07613	25
Proline-rich protein 14K	carrot	S35714	16
AG13 protein	<i>A. glutinosa</i>	AGAG13_1	13
RIBONUCLEASE 2	<i>Panax ginseng</i>	RNS2_PAN GI	11
RIBONUCLEASE 2	<i>Panax ginseng</i>	RNS2_PAN GI	11
Beta-amylase	<i>Castanea crenata</i>	AF353207_1	11
pEARLI 1 protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	T07640	10
Catalase	upland cotton	S17493	10
Fungal elicitor-induced protein	parsley	T15043	9
Embryogenic potential marker Dc3	carrot	A61044	9
Peroxidase	upland cotton	T10790	8
Cytochrome P450 82C1	soybean	T05942	8
Sucrose synthase	carrot	S37560	8
Hypothetical protein	carrot	S10911	8
ADP-ribosylation factor	rice	T52341	7
Starch phosphorylase	Potato	STSTARC H_1	7

- 인삼은 보통 재배토양에서는 6년근 이상 재배할 경우 급격히 병충해 등의 원인으로 소실되는데, 특이하게도 14년근 자경의 경우는 장수한 경우로 천풍 4년근에 비교해서 특이적으로 발견된 유전자는 항산화 등에 관련된 catalase (10개)와 peroxidase (8개)가 있다. 이에 반하여 4년근 천풍 뿌리에서는 major latex protein 유전자가 53개로 가장 많이 발견되었는데, 14년근

의 경우에는 5개의 EST clone이 발견되었을 뿐이다. 이 major latex protein 은 다중유전자족 (multifamily gene)에 속하여 다양한 유전자가 존재한다. 따라서 본 연구에서는 4년근 천풍에서 상대적으로 많이 발견된 major latex protein 유전자를 대상으로 천풍을 구별할 수 있는 천풍 특이적 SNP를 발견할 수 있는 가능성이 높다고 판단되어 이 유전자를 선발하였다.

나) 천풍 특이적인 SNP의 탐색

- 약용식물 Major latex protein은 주로 과일 꽃에 병원균이나 해충의 침입을 받았을 때 발현하는 유전자 중의 하나이다 (Ruperti *et al.*, 2002). Latex는 식물에 상처가 났을 때 유액분비 조직에서 나오는 유체로써 많은 defense-related protein을 함유하고 있는데, chitinase, β -1,3-glucanase, hevamines, hevein, glucosidase 등의 유전자들이 다수 포함되어 있다 (Kim *et al.*, 2003). Major latex protein은 여러 종류의 유전자에 의해서 code되는 다중유전자족 (multifamily)으로 알려져 있다 (Nessler, 1994). Major latex protein homolog EST clone과 genomic DNA상에서의 차이를 알아보기 위하여 majorFor (5'-ATA TTA ATG GGT TTA ACT GGT AAG T-3') 와 majorRev(5'-ATG ATG AGC CTC AAT ATC TCT-3') 두개의 primer를 제작한 후 PCR을 이용하여 증폭한 후, 무작위로 10개 clone을 선발하여 sequencing한 후 염기서열을 비교·분석하였다. 그 결과 염기서열에서 EST clone과 genomic DNA clone에서는 차이가 많이 나지 않았고 MEGA 3에서 phylogeny tree를 Neighbor Joining 방법 (Saitou and Nei, 1987; Saitou, 1991)으로 조사한 결과 크게 3개 그룹으로 분류할 수 있었다 (Fig. 38).

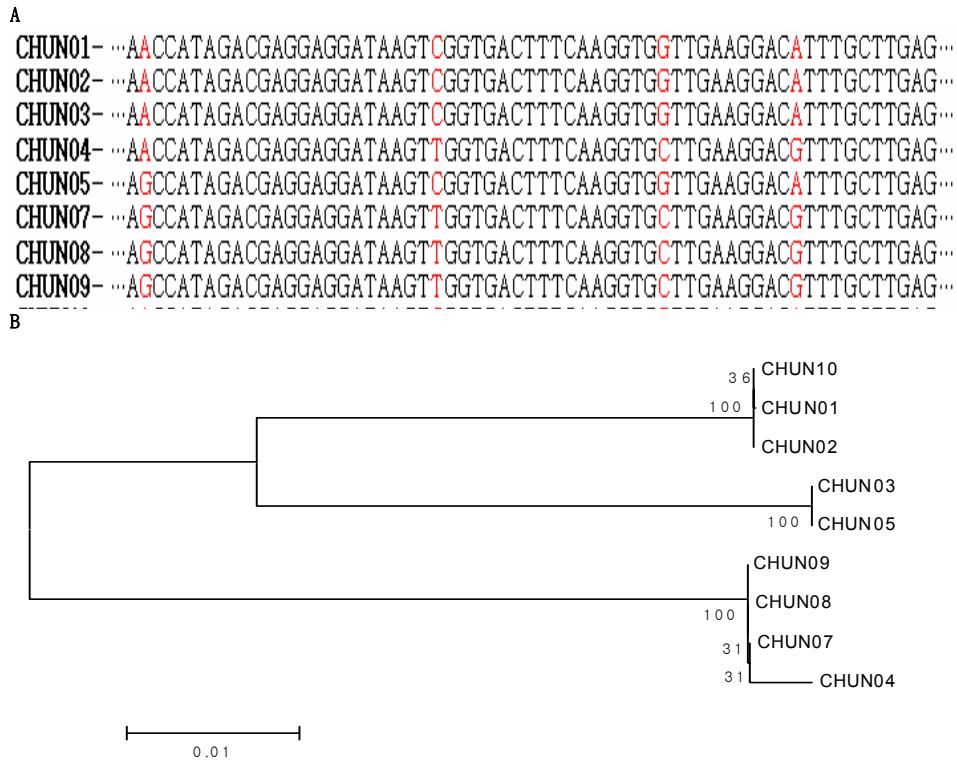


Fig. 38. Sequence alignment (A) and phylogenetic analysis (B) of the major latex protein homolog gene in *Panax ginseng* new cultivar Chunpoong.

- NCBI에서 blastx 프로그램을 사용하여 GenBank에 등록되어 있는 다른 식물들과 상동성을 비교하고 계통관계를 보았을 때 major latex protein homolog, major latex-like protein homolog와 major latex-like protein 에 대하여 높은 상동성을 보였다 (Fig. 39). 천풍의 특이적인 SNP 위치는 4년근 천풍, 14년근 자경종, 그리고 천풍의 genomic DNA로부터 증폭한 major latex protein homolog clone 들을 비교하여 발견하였다 (Fig. 40).

A

```

> gi|13064032|gb|AAC14179.1 major latex protein homolog [Mesembryanthemum crystallinum]
Length=182

Score = 156 bits (395), Expect = 4e-37
Identities = 75/149 (50%), Positives = 102/149 (68%), Gaps = 6/149 (4%)
Frame = +1

Query  7  NGLTQKLIQQTGIRSDGDVFNELFSSFPHHVENITPANLH-----EGEFGV-GSVVIMNY 168
      8  N+TGKL + IRD GD+FEELF +PHIV NITP+ +H   EGEFG GD++ U+V
Sbjct  1  NAITQKLEVEVDIKSCGDFFELFQKPKPHVSHITPKINDCEVSKOEKQKPKQSIIMNDY  60

Query 169  SIDGKASIAKEEIVTIDEEDESVTFKVVVECHLLEEFNSVVFRVSVSTGEMMSVTHTIDY 348
      170 ++DGR +ARE I +DE+ + V FR++EG LL EFRD+ +HV +EG  V U ++
Sbjct  61  TLDGKRCVAREIIEKLDKESVVEFKIIEGDLLEKFKSLTVTIRVIRKQATTQVKMIARF 120

Query 349  EKLNEGVKDPDYSYLDFFLQVTRDIEAHHL 435
      350 ER+ + PT LDF ++T+DIEAHHL
Sbjct 121  EKIADDPVPTKLLDFCTASTEDIEAHHL 149

> gi|14524031|emb|CAC43292.1 major latex like protein homolog [Beta vulgaris]
Length=150

Score = 138 bits (347), Expect = 1e-31
Identities = 66/149 (44%), Positives = 97/149 (65%), Gaps = 6/149 (4%)
Frame = +1

Query  7  NGLTQKLIQQTGIRSDGDVFNELFSSFPHHVENITPANLH-----EGEFGV-GSVVIMNY 168
      8  N +TGKL + I GD+FE+FS+RPH V ++P N+H   +GE G G+++ MNY
Sbjct  1  NHTTQKLEVEVDINCHGDIFREIFSTRPHVSTHSPENIHGCVSDGECCKRFGAIFMNY  60

Query 169  SIDGKASIAKEEIVTIDEEDESVTFKVVVECHLLEEFNSVVFRVSVSTGEMMSVTHTIDY 348
      170 ++DGR +ARE + +DEE K V FR++EG LL+EFRD  V V K  V WT ++
Sbjct  61  TLDGKRCVARELVEAVDEKESVVEFKIIEGDLLEKFKSFLVVQVIFKSHITQVRRYARF 120

Query 349  EKLNEGVKDPDYSYLDFFLQVTRDIEAHHL 435
      350 ER+++ PT +DF ++VT+DIEA+ +
Sbjct 121  ERVHDEGHVPTKLLDFCIAVTEDEIAYQI 149

```

B

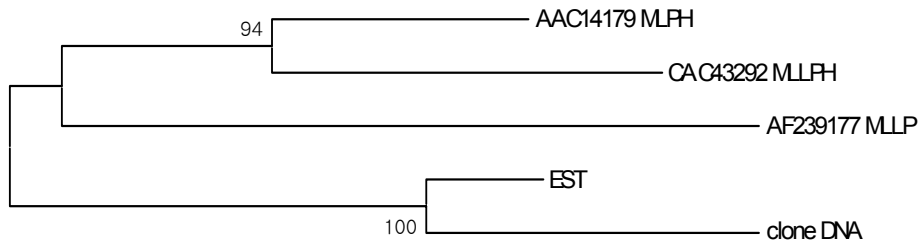


Fig. 39. Putatively identified major latex protein homolog using blastx program in NCBI database (A) and phylogenetic analysis (B) of the major latex protein homolog gene of in *Panax ginseng* new cultivar Chunpoong's EST and genomic clone (clone DNA) with GenBank's Data of *Mesembryanthemum crystallinum* (AAC14179), *Beta vulgaris* (CAC43292), *Prunus persica* (AF239177).

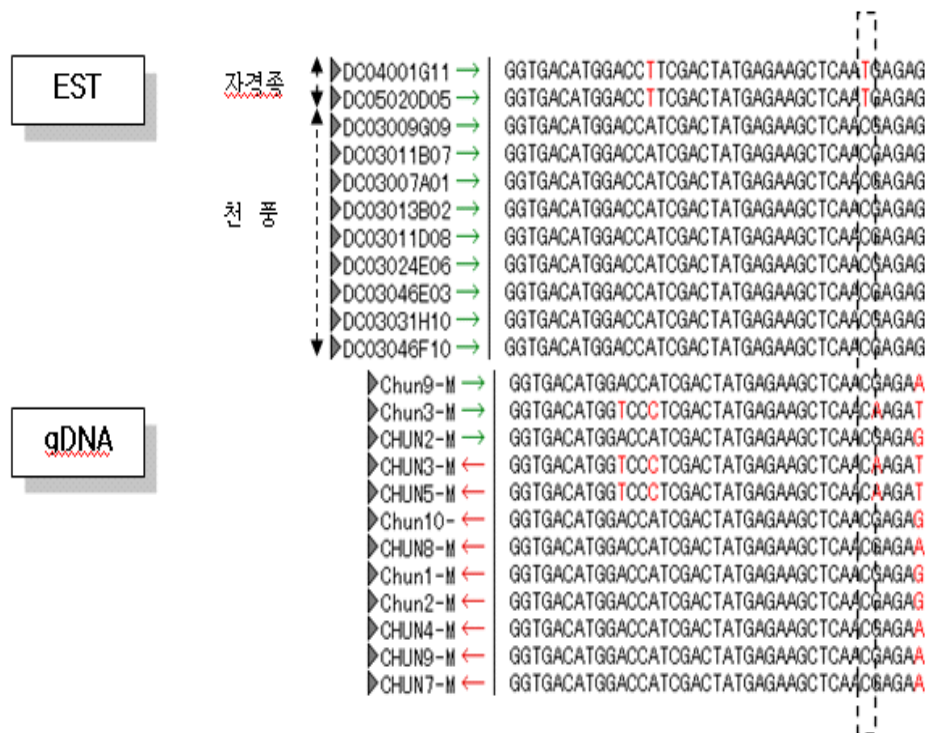


Fig. 40. Sequence alignment of major latex protein homolog between Chunpoong and Jakyung ESTs for the detection of *Panax ginseng* new cultivar Chunpoong specific SNP.

다) 천풍구별을 위한 분자마커 선발 및 조건 확립

- **Multiplex PCR** : 근연관계에 있는 품종 또는 종내 구별을 위한 SNP는 경우에 따라서는 단 하나의 염기차이를 이용하여 구별하여야 하는 경우도 있어 SNP primer도 보통 사용하는 primer와는 다르게 의도적으로 mismatching방법을 사용하여 디자인하였다. Hayashi 등 (2004년)이 사용한 실험방법에 의하면 sense 쪽에서 3'-end부근에 mismatching을 하는데 A-G 혹은 C-T로 하고 anti-sense쪽에서는 mismatching하지 않았다. 하지만 본 실험에서는 multiplex PCR방법을 사용하기 위하여 위의 방법을 다소 변경하여 anti-sense쪽에서도 mismatching을 사용하여 실험을 실시하였다 (Table 1). Multiplex PCR 방법은 1개 또는 그 이상의 marker 감별에 널리 사용되고 있는 방법 (Kapley *et al.*, 2000)으로써 multiplex nested PCR (Brestovac, 2005), multiplex RT-PCR (Rohayem, 2004)과 같이 기존의 nested PCR과 RT-PCR 등 방법과 혼합해서도 사용한다. Multiplex PCR의 가장 큰 장점은 Marker로 사용되는 여러 개의 primer를 한번에 전부 혼합하여 사용하기 편리한 장점을 가지고 있다 (Chen, 1998). 하지만 primer의 농도 비율과 PCR조건에 영향을 많이 받는 단점이 있어 PCR 반응조건의 최적화에 다소 어려움이 있다 (Henegariu *et al.*, 1997). 천풍과 자경종1, 자경종2에 대해 primer1:primer2:primer3:primer4를 일정한 비율로 하여 multiplex PCR를 시도해 보았다. 그 중 universal 하게 나오는 band의 size는 525 bp이고 specific하게 천풍에서만 나오는 band size는 107 bp였으며 자경종은 475 bp되게 primer를 디자인 하였다. Multiplex PCR이 성공적으로 되면 1번(천풍)에서 525 bp와 107 bp에 band가 나타나고 2번과 3번에서는 525 bp와 475bp에서 band가 나타날 것으로 예측하였다 (Fig.41).

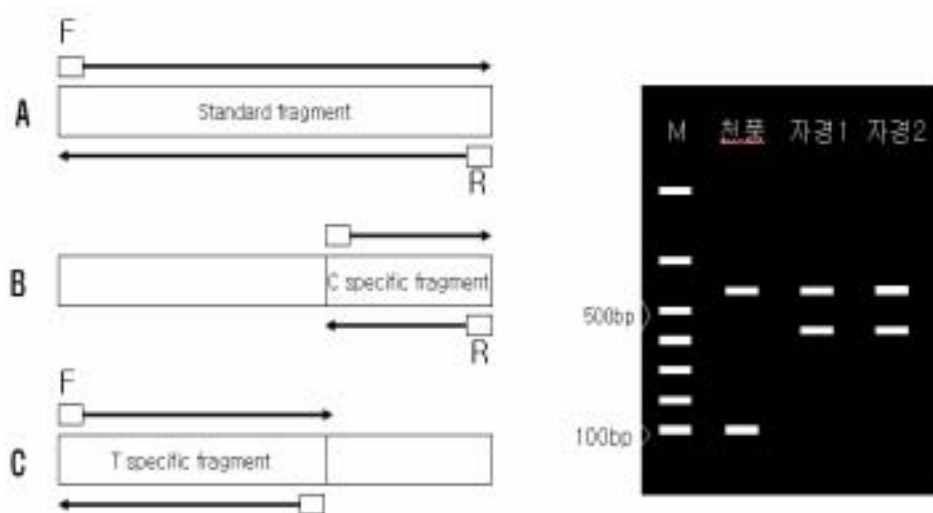


Fig. 41. Schematic representation of PCR-amplification for distinction of *Panax ginseng* new cultivar Chunpoong from other cultivars of Korean ginseng. A: Standard primers, B: C specific primer (Chunpoong), C: T specific primer (others).

- 각 Primer의 농도 비율을 5 M:5 M:15 M:10 M로 하였을 때 universal한 band는 나타나지 않았고, 5 M:5 M:5 M:5 M로 하였을 때 나타났으므로 multiplex PCR는 primer 농도의 영향에 민감하게 반응한다는 것을 보여주고 있다 (Fig. 42A). 하지만 두 결과에서 107 bp되는 위치에서 증폭되었고 475 bp에서는 증폭되지 않은 것을 보아 annealing temperature 값에 문제 있는 것으로 사료되었다. 이를 확인하기 위해서 primer농도를 10 M:10 M:2 M:10 M로 달리하고 annealing temperature 값을 55°C부터 66°C까지 변형하여 실험을 수행하였지만 큰 차이는 보이지 않았다 (Fig. 42D).

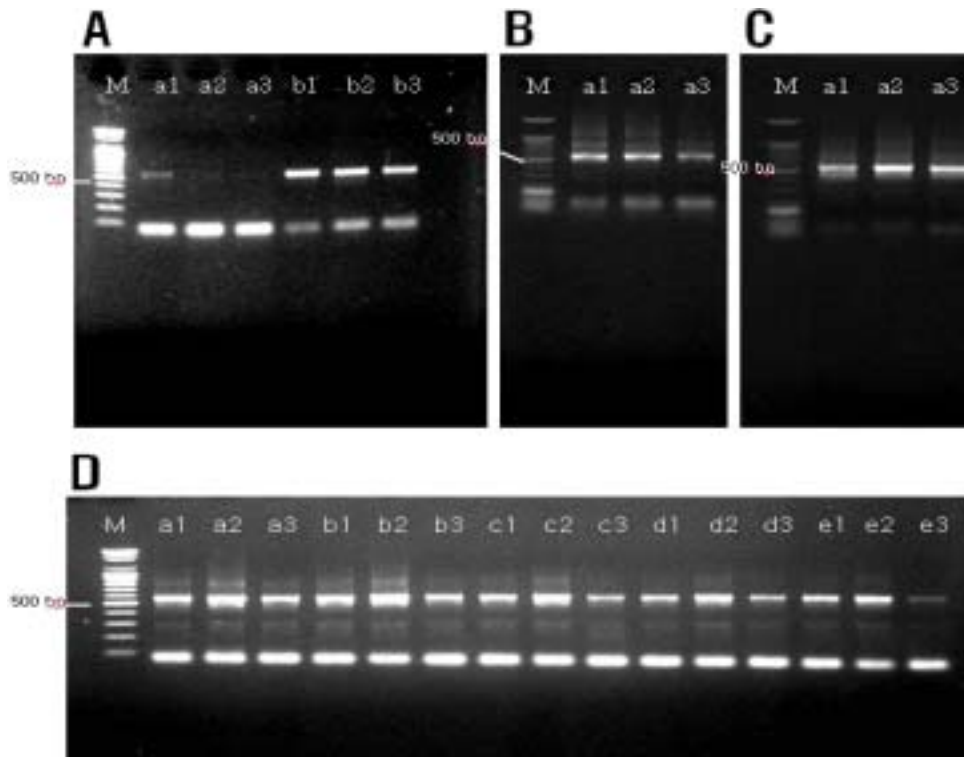


Fig. 42. PCR amplification in *Panax ginseng* Chunpoong(1), Jakyung1(2), Jakyung2(3), using SNP primers to be designed for the distinction according to PCR conditions. **[A]** a (primer1: primer2: primer3: primer4- 5 M: 5 M: 15 M: 10 M) and b (primer1: primer2: primer3: primer4- 5 M: 5 M: 5 M: 5 M) using PCR program A; **[B]** a (primer1: primer2: primer5: primer6- 5 M: 5 M: 20 M: 15 M); using PCR program C; **[C]** a (primer1: primer2: primer5: primer6- 10 M: 10 M: 5 M: 5 M); using PCR program C; **[D]** a, b, c, d, e (primer1: primer2: primer3: primer4- 10 M: 10 M: 2 M: 10 M) using PCR program B; AT- a) 55°C/b) 58°C/c) 60°C/d) 62°C/e) 66°C Appropriate 0.5 U DNA polymerase (SolGent Co., LTD.). PCR products were electrophoresis by 2 % gel electrophoresis. Size marker(M) was used with 2 ul of 100 bp DNA ladder (Bioneer Co., LTD).

- 이러한 결과로 볼 때 목적으로 하는 DNA 단편이 증폭되지 않는 것은 multiplex PCR의 단점으로 제시되고 있는 PCR 반응에서의 반응조건 설정의 어려움을 제시하고 있다고 볼 수 있다. SNP primer에서 mismatching을 시켜 한번에 성공하기는 어렵다. 이번에는 천풍의 specific한 primer의 3'-end 2번째 위치와 3번째 위치에 mismatching을 두었고 자경종도 동일한 방법을 사용하였다. 이것을 농도별로 하여 Fig. 42BC과 같은 결과를 얻었는데, 비록 원하는 결과는 아니지만 primer의 비율만 보았을 때 5 M:5 M:5 M로 하였을 때의 결과가 가장 좋은 것으로 나타났다.

라) 천풍 구별을 위한 마커선발

- 천풍과 자경종의 구별을 위한 분자마커를 개발하기 위해서 Toni (2003) 등의 지적인 사항을 참고로 하여 Taq polymerase를 2 U로 농도를 높게하여 시도해보았다. 107 bp에서 band는 나왔지만 천풍뿐만 아니라 자경종에서도 나타났고 특이하게 대략 900 bp되는 위치에서 자경종만 band가 나타났다 (Fig. 43A). 오염이나 실험상의 오차로 인한 결과일 가능성이 있어 반복실험을 통해 재현성을 검증해 보았다 (Fig. 43B).

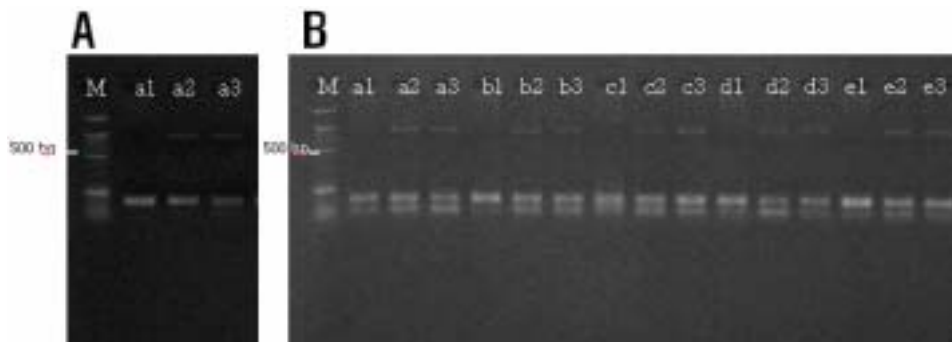


Fig. 43. Reproducibility confirmation of 900 bp band from using primer 5 and primer 8 with PCR program C in *Panax ginseng* Chunpoong(1), Jakyung1(2), Jakyung2(3). [A] First test. [B] Try 5 times to show reproducibility.

- 자경종에서만 검출된 900 bp의 DNA band는 재현성 있게 검출되었는데 annealing temperature 값을 55°C와 58°C로 달리하여 PCR 반응을 다르게 하였을 경우에도 역시 재현성 있는 결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 44). 이중 annealing temperature (AT) 58°C에서 가장 선명한 밴드를 형성하여 이 DNA 밴드를 gel purification 한 후 direct sequencing을 하였다.

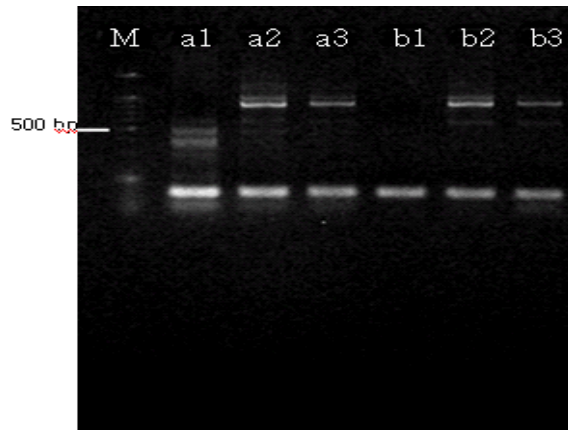


Fig. 44. PCR amplification of 900 bp band from using primer 5 and primer 8 with PCR program D in *Panax ginseng* Chunpoong(1), Jakyung1(2), Jakyung2(3). Annealing temperature (a) -55°C, and (b)- 58°C.

- 자경종에서 증폭된 DNA clone의 total size는 대략 780 bp였고 원 primer의 위치는 뒤바뀌어 존재하였는데, sense는 reverse 위치에서 나타났고 anti-sense는 forward 위치에서 나타났다 (Fig. 45). 이런 문제는 아마도 Fig. 46 에서 보는 바와 같이 자경종에 천풍의 specific한 primer와 겹치는 다른 영역이 있으므로 대략 900 bp정도 증폭된 것으로 보인다.

- 이 DNA의 기능을 알아보기 위해서 NCBI blastx를 통하여 검색한 결과 major latex protein homolog에 높은 상동성을 나타내어 MLPH에 속하는 유전자로 판단되었다. 재현성을 확인하기 위하여 sense (5'- AGA GAT ATT GAG GCT CAT CAT-3')와 anti-sense (5'-GAG GAG CTT CTC ATA GTC GAT GGT CCA T-3') primer를 사용하여 PCR 증폭을 하였다. Fig. 47의 A에서 천풍의 경우 대략 900 bp에서 band는 검출이 안되는 것을 볼 수 있으며, 이러한 결과는 Fig. 11의 B에서 보는 바와 같이 재현성 있는 결과를 나타내어 이 DNA 단편은 천풍에서만 증폭되진 않는 negative marker로서 유용할 것으로 판단된다.



Fig. 47. Check out the negative marker by twenty samples of 1-year-old ginseng. [A] PCR result that the primer(primer9+primer10) designed from 780 bp sequences. Using PCR program D and AT was 58°C. M-1kb DNA ladder. [B] Using PCR program E, primer9 and primer10. a-Chunpoong, b-Jakyung1, c-Jakyung2. Taq concentration 1 unit, M-100bp DNA ladder.

- 이 negative marker를 사용하여 천풍을 구별할 때 천풍에서는 증폭되지 않기 때문에 시료가 모두 천풍일 경우 PCR 반응이 정상적으로 되었는지를 확인하기 어렵다. 따라서 PCR 반응이 제대로 되었는지를 확인하기 위하여 control primer를 사용한 mutiplex PCR 방법이 필요하다. 하지만multiplex PCR는 최소 4개의 primer를 사용하고 농도의 비율도 맞추어야 하는 단점이 있어 본 실험에서는 primer 2개로 시도해보았다. Sense쪽 primer 1의 길이

를 줄인 primer 3를 사용하고 PCR조건을 program c로 변경하여 실시하였다. 500 bp에서 천풍과 자경종은 모두에서 DNA band가 증폭되었어 control primer 작용을 할 수 있었고 대략 900 bp에서는 자경종 모두에서 DNA가 증폭되었으므로 천풍을 구별하는 목적을 이루었다 (Fig. 49).

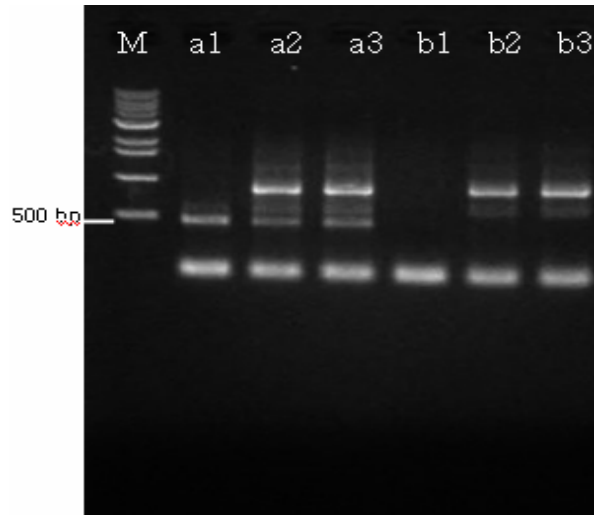


Fig. 49. Finding the best PCR condition of Chunpoong negative marker. PCR program E in *Parax ginseng* Chunpoong(1), Jakyung1(2), Jakyung2(3). Taq concentration 1 unit. a-primer11 and primer8, AT-50°C b- primer12 and primer8, AT-55°C.

마) 이중 맹검법에 의한 천풍인삼 판별을 위한 DNA추출 및 PCR

- 상기 개발된 천풍 specific primer를 이용하여 천풍의 개발한 KT&G 중앙연구원(전 한국인삼연초연구원)과 공동으로 천풍구별여부를 확인하였다. 우선 T&G에서 임의로 천풍이 혼합된 신품종 20개를 우리 우리 팀에게 두어 천풍을 찾아 내는 방법인데, 상호신뢰를 위하여 전혀 모른 상태에서 실험을 수행하고자 하였다.
- 따라서 당 연구팀은 신품종, 황숙종과 같은 변종들이 섞여 있을 경우에도 확실히 구별할 수 있는지를 확인하기 위하여 2006년 4월에 KT&G

인삼육종팀에서 6년근인 신품종 천풍, 연풍, 금풍, 그리고 일반품종 자경종, 황숙종의 잎을 total 20개를 채취하여 이중 맹검법으로 실험을 실시하였다. Wang(1993) 등의 방법에 따라서 DNA를 추출한 후 PCR 분석을 실시한 결과 대략 900 bp 위치에서 4, 8, 11, 14번은 band가 발견되지 않았고 negative 반응을 통한 천풍 품종임을 확인하였다. 이중 맹검법으로 실험을 실시하였기 때문에 실험자의 의도가 배제된 결과로 이 검증을 통하여 본 실험에서 찾은 분자마커는 정확성과 재현성이 있어 천풍 구별을 위한 negative marker로서의 활용성이 기대된다 (Fig. 50).

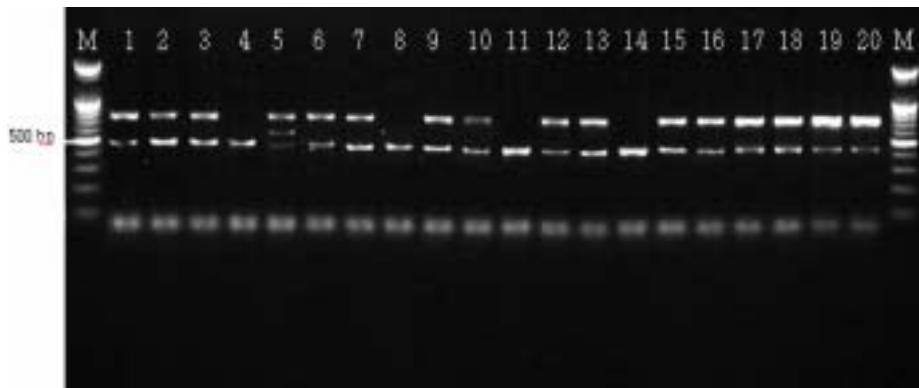


Fig. 50. Result of double blind test using the negative marker in *Panax ginseng* cultivars. The PCR reaction was conducted with primer 11 and primer 8 using PCR program E under the annealing temperature at 50°C. Chunpoong (4, 8, 11, 14), Yunpoong (1, 5, 16, 18), Gumpoong (3, 7, 10, 17), Jakyung (2, 12, 19, 20), HwangSook (6, 9, 13, 15).

- 약용식물로서 옛부터 한방에서 중요한 약재로 사용되어온 인삼은 혼계형으로 현재 자경을 비롯하여 황숙, 천풍, 청경, 연풍, 고평 등 여러 신품종이 재배되고 있으나 이들은 순계분리를 통하여 우수한 형질의 것을 선발·고정한 것이다. 현재 재배되고 있는 인삼 품종들의 구별은 외부 형태적인 특징으로 구별할 뿐 이들을 정확히 구별할 수 있는 분자마커 (molecular marker)가 없는 실정이다. 따라서 인삼의 품종육종을 위한 기간 단축과 뿌리삼의 유통과정에서 품종을 명확히 구별하기 위한 품종별 분자마커의 개발이 절실히 요구되고 있다. 본 연구는 새로운 신품종인 인삼 (*Panax ginseng* C.A.Meyer) 천풍구별을 위한 분자마커를 개발할 목적으로 인삼 신품종 4년근 천풍과 14년근 자경종의 뿌리조직 EST 분석을 통하여 천풍 특이적인 negative 분자마커를 개발하고자 하였다. 천풍을 자경과 구별하기 위한 분자마커의 개발을 목적으로 4년근 천풍 뿌리와 14년근 자경뿌리에서 분석된 6천여개의 EST 자료를 분석하였다. 마커 선발을 위한 후보 유전자 선별위해서 천풍과 자경종의 뿌리에서 다발현되는 유전자를 각각 선별하여 비교하였다. 그 결과 천풍에서는 major latex protein homolog가 41개와 major latex-like protein이 12개로 가장 많이 검출되었고 ribonuclease2가 36개, metallothionein 2가35, ribonuclease 1이 21개 등의 유전자가 발견되었다. 이중 major latex protein homolog 유전자를 대상으로 천풍을 구별할 수 있는 천풍 특이적 SNP를 발견할 수 있는 가능성이 높다고 판단되어 이 유전자를 선별하였다. 천풍의 분자마커 확인 실험은 SNP에 근거하여 3'-end에서 mismatching을 주는 방법을 사용하여 SNP primer를 디자인 하고 PCR, multiplex PCR 등 방법으로 확인해 보았다. 여러 SNP primer를 사용하면서 실험하는 중에 primer 5와 primer 8을 사용하였을 때 자경종에서만 증폭되었다. 특이한 것은 sequencing하여 얻은 이 영역에 원sense로 사용된 primer 5와 anti-sense로 사용된 primer 8의 순서가 완전 바뀌어진 것이다. 이 한쌍의 primer를 총 30개의 천풍과 자경종 샘플에 실험해보았을 때 높은 재현성과 정확성을 보였다. 하지만 이것은 negative marker이므로 인삼 모두에서 증폭될 수 있는 control primer가 필요하다. 이 문제를 해결하기 위하여 primer 8와 primer 11를 사용하여 control primer가 나타나게 하여

보완하였다. 개발된 negative marker를 이용하여 천풍과 다른 인삼 품종간의 구별이 가능한지를 알아보기 위하여 6년근 신품종 천풍, 연풍, 금풍, 자경종, 황숙종을 대상으로 하여 이중 맹검법으로 실험을 실시한 결과 천풍을 다른 인삼품종과 명확히 구별할 수 있었다. 본 연구 결과는 순계율이 낮은 천풍 순수율을 100%로 높일 수 있는 분명한 기준을 제시하였다. 이 방법을 이용할 경우 농가에서 일반품종 (자경종)을 신품종 (천풍)으로 둔갑시켜 고가로 판매하는 것을 방지할 수 있다. 나아가, 앞으로 개발되는 신품종의 육종기간을 대폭 감소시킬 수 있을 것으로 기대한다.

2) 신품종 감자에서 SNP primer의 적용가능성

가) 육성된 실험 품종 형태적 특성 조사표(1차년도)

- 강원대학교 육성 유망 대상으로 UPOV의 특성조사항목에 의거하여
 피경에 대한 특성조사를 실시하였다.

계통명	식물체특성				
	키	형태	습성	안토시아닌 정도	성숙시기
V-4	1	2	3	1	3
V-8	3	2	7	1	3
V-13	5	2	5	1	5
V-42	3	2	7	7	5
V-47	5	1	5	5	3

계통명	피경모양	눈깊이	표피매끄러움	표피색깔	눈기부색	피경육색
V-4	2	5	3	1	1	2
V-8	2	5	3	1	1	2
V-13	2	5	3	1	1	3
V-42	2	5	3	3	3	7
V-47	3	5	3	1	1	4

- ⇒ 식물체 : 키 - 매우작다 1, 작다 3, 중간 5, 크다 7, 매우크다 9
- ⇒ 식물체 : 형태 - 열려있다 1, 중간 2, 닫혀있다 3
- ⇒ 식물체 : 습성 - 직립 3, 반직립 5, 개장 7
- ⇒ 줄기 안토시아닌 정도 - 없거나매우연하다 1, 연하다 3, 중간 5, 진하다 7, 매우진하다 9
- ⇒ 성숙시기 - 매우빠름 1, 빠르다 3, 중간 5, 늦다 7, 매우늦다 9
- ⇒ 피경모양 - 둥근형 1, 짧은계란형 2, 계란형 3, 긴계란형 4, 긴형 5
- ⇒ 눈깊이 - 매우얕다 1, 얕다 3, 중간 5, 깊다 7, 매우깊다 9
- ⇒ 표피매끄러움 - 매끄럽다 3, 중간 5, 거칠다 7
- ⇒ 표피색깔 - 황색 1, 적색 2, 자색 3, 부분적색 4, 부분자색 5
- ⇒ 눈기부색 - 황색 1, 적색 2, 자색 3
- ⇒ 피경육색 - 백색 1, 유백색 2, 담황색 3, 노랑 4, 농황색 5, 적색 6, 자주색 7

나) 품종 특성

(1) 품종 V-4

- **교배조합:** 1996년에 Suncrisp × A87109-10 조합을 교배하여 1997-1998년에 실생양성을 하였으며 1999-2001년에 생산력검정시험 및 지역적응 시험을 실시하여 선발된 극조생 이기작 식용 품종이다.
- **식물체의주요형태적특성 :** 지상부 식물체 형태는 반 줄기형이며 직립형으로서 숙기는 극조생이다. 지하부 덩이줄기의 모양은 짧은 계란형이며 황색표피로서 과육색은 유백색이다. 덩이줄기의 과육색은 유백색이고 휴면은 짧아서 이기작용으로 재배가 가능하다. 본 품종은 특히 겨울하우스 재배시 조기재배용으로 매우 적합하다. 기존의 겨울하우스 조기재배용 품종이 지니고 있는 결점인 내부갈색반점과 성숙된 감자괴경 표피의 결점이 없다. 극조생종으로 괴경비대가 빠르기 때문에 상대적으로 비중이 높지 못하다. 겨울하우스 재배시 환원당함량이 상대적으로 적어서 칩색도가 매우 양호하였다.
- **기존품종과구별되는특성:** V-4가 대조품종과 구별되는 특성: 모양은 수미보다 둥글다. 대서와 수미의 중간 형태의 괴경모양이다. 더덩이병에 대한 저항성은 기존의 수미 품종 보다 낮다. 비중은 여름재배시 수미 (1.066) 에 비해서 낮았다. 봄재배에서도 1.042 로 수미 (1.055) 보다 낮았다. 겨울하우스와 가을재배도 수미 (1.071/1.054) 에 비해서 하우스에서는 1.058 로 낮았지만 가을재배는 1.055 로 유사했다. 극조생품종으로서는 매우 낮은 환원당함량을 지닌 품종이며 겨울하우스재배시 칩가용으로 사용이 될 정도의 칩색도를 지닌다.
- **병해충및생리장해에대한저항성:** 더덩이병에 대한 저항성이 지역에 따라서 매우 달랐다. 여름재배지역인 대관령에서는 수미 보다는 낮지만 대서 정도의 저항성을 보여 주었지만, 양구해안 지역에서는 대서 보다 약한 저항성을 보여 주었다. 춘천지역과 겨울 하우스에서는 수미와 비슷한 저항성을 보여 주었다. 일반적으로 더덩이병에 저항성은 수미보다 낮았다. 바이러스, 역병 등에 대한 저항성은 수미와 별 차이가 없는 것으로 나타났다. 중심공동 및

내부갈색반점에 대해서는 대체로 강하였지만 괴경의 크기가 매우 크기 때문에 고온의 영향을 받는 춘천에서는 중심공동이 일부 발견되었다.



(2) 품종 V-8

- **교배조합** : 1996년에 Suncrisp × A87109-10 조합을 교배하여 1997-1998년에 실생양성을 하였으며 1999-2001년에 생산력검정시험 및 지역적응 시험을 실시하여 선발된 다수확 품종이다.
- **식물체의 주요 형태적 특성**: 지상부 식물체 형태는 반 줄기형이며 직립형으로서 조생종이다. 지하부 덩이줄기의 모양은 짧은 계란형이며 황색 표피로서 과육색은 유백색이다. 덩이줄기의 과육색은 유백색이고 휴면은 비교적 빨라서 2기작으로 가능하다. 주로 식용으로 개발되었지만 겨울하우스재배시 칩색깔이 매우 뛰어나다. 기존의 겨울하우스 조기재배용 품종이 지니고 있는 결점인 내부갈색반점과 성숙된 감자괴경 표피의 결점이 없다. 얼리벨리와 같은 교배조합에서 선발된 품종으로 겨울하우스 재배시 얼리벨리보다는 약간 타원형을 지닌다. 조생종이지만 비중이 높고 환원당 함량도 낮다. 겨울하우스 재배시 환원당함량이 상대적으로 적어서 칩색도가 매우 양호하였다.
- **기존품종과 구별되는 특성**: 겨울하우스 재배시 모양이 수미보다 길쭉하다. 더 덩이병에 대한 저항성은 기존의 수미 품종 보다 낮다. 비중은 여름재배시 수미 (1.066) 보다 높은 1.076 이었다. 봄재배에서도 1.053 로 수미 (1.052) 보다 높았다. 겨울하우스와 가을재배도 수미 (1.071/1.054) 에 비해서 하우스에서는 1.068, 가을재배는 1.055 로 유사했다.

- **병해충 및 생리장해에 대한 저항성:** 더덩이 병에 대한 저항성이 지역에 따라서 매우 달랐다. 여름재배지역인 대관령에서는 수미 정도의 저항성을 보여 주었지만, 양구해안 지역에서는 대서 보다 약한 저항성을 보여 주었다. 일반적으로 더덩이병에 저항성은 수미보다 낮았다. 바이러스, 역병 등에 대한 저항성은 수미와 별 차이가 없는 것으로 나타났다. 중심공동 및 내부갈색반점에 대해서는 대체로 강하였다.



(3) 품종 V-13

- **교배조합 :** 1996년에 Atlantic Superior 조합을 교배하여 1997-1998년에 실생양성을 하였으며 1999-2001년에 생산력검정시험 및 지역적응 시험을 실시하여 선발되었다.
- **식물체의 주요 형태적 특성:** 지상부 식물체 형태는 반 줄기형으로서 중생종이다. 지하부 덩이줄기의 모양은 짧은 계란형으로서 지역적응성이 우수하며 특히 김제지역의 하우스 재배와 고랭지 여름재배에서 수량성이 좋았으며, 식용으로 선발되었지만 감자의 칩 색도가 아주 좋았을 뿐 아니라 식용으로 맛이 좋았다. 덩이줄기의 표피색은 담황색이고 매끈하였고 감자의 비중이 대조 품종인 수미 (1.066) 보다 월등하게 높았다 (1.073). 재배 적합한 지역은 대관령, 김제, 김해, 춘천지역 광범한 지역에서 감자의 비대가 잘 되었다.
- **기존품종과 구별되는 특성:** 수미와 대서 사이에서 나온 자식인 만큼 수미의 특성을 많이 가지고 있으면서 비중, 숙기, 수량면에서는 대서를 닮아서 매우

우수하였다. 상서율이 수미보다 높았다. 껍질의 표피색이 수미와 비슷하였지만 약간 더 황색을 보여 주었다. 환원당 함량은 수미보다 (0.612) 보다 높은 0.940 이었다. 수량성에 있어서도 평균적으로 수미 (3,186kg/ha) 보다 높은 4,357kg/ha 였다.

- **병해충및생리장해에 대한저항성:** 더텡이 병, 바이러스, 역병, 중심공동, 내부갈색 등 감자에서 자주 발생하는 병에 관한 저항성이 강하며 특히 중심공동, 내부갈색반점 저항성에 있어서는 대조품종인 대서보다 아주 높은 저항성을 나타내고 있을 뿐만 아니라 대조품종인 수미와 같거나 더 높은 저항성을 나타냈다.



(4) 품종 V-42

- **교배조합 :** 1996년에 6545B0850-4 × B0975-1 조합을 교배하여 1997-1998년에 실생양성을 하였으며 1999-2001년에 생산력검정시험 및 지역적응 시험을 실시하여 선발되었다.
- **식물체의주요형태적특성:** 지상부 식물체 형태는 반 줄기형이며 개장형으로서 중생종이며 줄기의 안토시아닌의 착색이 보통이다. 지하부 덩이줄기의 모양은 짧은 계란형이며 자주색색 표피로서 과육색은 부분 자주색이고 표피는 매끄럽다. 2001년 대관령에서 퍼플벨리 수량은 5,193kg/ha로서 대조품종인 수미 2,666kg/ha 보다 수량성이 아주 높았다. 본 품종은 식용으로 적합하

다.

- 기존품종과 구별되는 특성: V-42는 모양은 대조품종인 대서보다는 수미보다 더 가까웠고 자주색 표피이다. 비중은 1.062로서 수미 1.066과 비슷하였다. 싹 기부 색깔이 수미는 적보라인 반면 청보라였다. 괴경의 눈 깊이도 더 양호하였다. 환원당함량이 적어서 칩을 만들었을 경우 칩 색깔도 수미보다 우수하였다.
- 병해충 및 생리장해에 대한 저항성: 자주색 표피 감자지만 더뎡이 병에 강하였다. 중심공동 및 내부갈색반점에도 강했다. 역병과 바이러스 저항성은 대조품종인 수미와 유사한 것으로 나타났다.

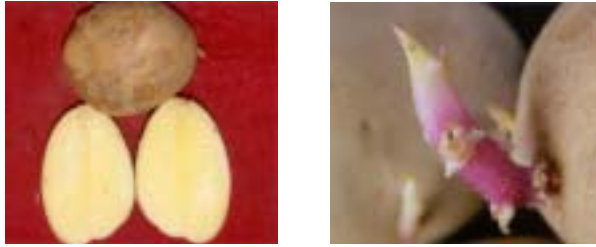


(5) 품종 V-47

- 교배조합 : 1996년에 A83359-5R × A89655-5DY 조합을 교배하여 1997-1998년에 실생양성을 하였으며 1999-2001년에 생산력검정시험 및 지역적응 시험을 실시하여 선발되었다.
- 식물체의 주요 형태적 특성 : 지상부 식물체 형태는 반줄기형이며 반직립형으로서 중생종이다. 지하부 덩이줄기의 모양은 계란형이며 황색 표피로서 과육색은 황색이다. 이 품종은 대조품종인 수미와 비교해 볼 때 중부지역인 춘천을 제외한 대관령 고랭지 지역, 김제하우스재배에서의 수량성이 대조품종인 수미보다 높았다.
- 기존품종과 구별되는 특성: 이 품종이 대조품종인 대서와 구별되는 특성은 모양이 수미의 짧은 계란형과 다른 긴 계란형이었으며 과육색이 짙은 황색이라는 것이다. 비중은 1.044로서 대조품종인 수미 1.066보다 낮은 반면 수

량은 대조품종은 수미보다 훨씬 높았고 가공 시 식미성이 매우 우수하였다. 환원당 함량은 수미 (0.612) 보다 두 배에 가까운 1.173의 높은 수치를 보여 주었다. 수미보다 숙기가 다소 늦은 감이 있다.

- 병해충 및 생리장해 에 대한 저항성 : 더덩이병에 대한 저항성이 수미 정도로 높았고, 열 개서도 없었고, 중심공동과 내부갈색반점에 대한 저항성도 높았다.



나) 육성된 실험 품종 형태적 특성 조사표(2차년도)

- 한국감자육종소재은행에서는 1995년부터 본격적으로 감자육종을 시작하였다. 본 연구팀에서는 매년 3만개의 실생 종자를 파종한 후 그해 가을 비교적 따뜻한 지역인 김제지역에 재배하는 등 1년에 감자를 2번 재배하는 새로운 감자육종프로그램을 도입하였다. 새로운 육종프로그램의 개발은 감자육종기간을 10-12년으로부터 7-8년으로 단축하였고, 한국감자육종소재은행에 보유하고 있는 다양한 유전자원을 활용하여 교배육종을 통해 국내 환경에 적합하고 품질이 우수한 계통을 선발하였으며, 본 실험에는 이렇게 선발되어진 신품종 감자 V-1, V-2, V-5, V-9, V-16을 이용하였다.
- 품종의 특성 구별을 위하여 감자 식물체 형태적 특성 조사 및 생산량, 상서율, 괴경의 표피색, 내병성과 같은 감자 괴경의 특성을 조사 하였다. 이러한 감자 품종별 특성 조사는 'UPOV Test Guideline for Potato'를 활용하였으며, 또한 국립종자관리소 감자 특성조사요령을 활용하여 실행되었다. 감자 괴경 표피의 색깔은 3가지(황색, 적색, 자색)으로 구분하였고, 감자의 괴경

육색은 7가지(백색, 유백색, 담황색, 노랑색, 농황색, 적색, 자주색)로 구분하였다. 감자 더듬이병, 열개, 중심공동, 내부갈색반점의 발병율(이병피경수/총조사피경수 ×100)을 조사하여 9가지 등급(1: 저항성이 매우 좋음; 0%~5%, 3: 저항성이 좋음; 6~10%, 5: 저항성 중간; 11~20%, 7: 저항성이 나쁨; 21~30%, 9: 저항성이 매우 나쁨; 30% 이상)으로 나누어서 평가하였다. 또한 수확된 품종의 수확량 평균을 산출하여 기록하였다 (Fig. 51).



Fig. 51. Tubers and flowers of Atlantic and Superior.

(1) V-1

- 교배조합: Shepody × A8812-3 이며, 지상부 식물체 형태는 춘천에서는 반 줄기형으로 장평에서는 줄기형으로 나타났으며, 생육 속도는 중생종이다. 줄기의 안토시아닌의 착색정도는 중간정도이고 지하부 덩이줄기의 모양은 춘천에서는 긴 계란형, 장평에서는 긴 형으로서 나타나 프렌치프라이용으로 가능할 정도로 길다. 덩이줄기(감자피경)의 특성은 양친중 하나인 Shepody 을 닮아서 아주 매끈하며 길며, 표피색은 적색이고 광택이 있다.
- 본 품종이 식용으로 개발되었기에 비교하기에 적합한 품종은 수미(SP)이며, 대조품종과 비교해 보면 우선 고구마 같은 피경의 표피색과 모양성이 기존의 품종과 다른점이라고 하겠고, 휴면이 수미보다 길어서 저장성이 좋았다. 수량성은 3,713(kg/10a)로 수미(2,988kg/10a) 보다 높았고, 비중은 1.067로 수

미(1.066)와 큰 차이를 보여 주지 못했다(Table 22).

- 더텡이병(Common Scab)에 대한 저항성이 높으며, 중심공동(Hollow heart) 및 내부갈색반점(Internal brown spot)과 같은 생리적장해 현상이 거의 발견되지 않았다. 열개(Dehiscence) 발생율도 매우 낮았다(Fig. 52).

Table 22. Comparison of agronomic characteristics, tuber quality and disease response of V-1 and controls

Location	Variety	Plant : height	Plant : type	Plant : growth habit	Flower color	Plant : time of maturity
Chuncheon	V-1	medium	intermediate type	erect	red-violet	medium
Jangpyung		short	stem-type	erect	red-violet	medium
Control	Superior	tall	intermediate type	semi-erect	red-violet	early
	Atlantic	very tall	intermediate type	erect	red-violet	medium
Location	Variety	Tuber : shape	Tuber : depth of eyes	Tuber : smoothness of skin	Tuber : color of skin	Tuber : color of flesh
Chuncheon	V-1	long-oval	medium	smooth	red	cream
Jangpyung		long	medium	smooth	red	cream
Control	Superior	short-oval	deep	medium	yellow	cream
	Atlantic	round	medium	rough	yellow	cream

Variety	Total Yield kg/10a	the naked eye of chip color	Colormeter of chip color	Specific gravity
V-1	3,713	2	66.08	1.067
Superior	3,186	2	57.92	1.066
Atlantic	3,723	1	68.07	1.078
Variety	Dehiscence*	Common Scab*	Hollow heart*	Internal brown spot*
V-1	1	1	1	1
Superior	1	1	1	1
Atlantic	3	1	5	5

*Degree of occurrence : 1=resistance, 5=medium, 9=susceptible



Fig. 52. Tubers and flowers of V-1.

(2) V-2

- **교배조합:** A90356-1R × Co86218-2R 이며, 지상부 식물체 형태는 줄기형으로서 중생종이다. 지하부 덩이줄기(괴경)의 모양은 짧은 계란형으로서 표피색은 적색이고 매끈하다. 기존의 식용감자의 주 품종인 수미와 비교해서 표피가 붉은 색으로 구별될 뿐만 아니라 본 품종은 껍질은 깎 후에 생감자로 먹거나 생즙으로 만들어 먹어도 감자 특유의 역겨운 맛이 거의 없어 생감자로 식용이 가능하다는 것이 이 품종이 대조 품종과 구별될 수 있는 중요한 특성이라 할 수 있다. 휴면 또한 기존의 대비품종보다 길어서 저장 중 부패율과 감모율이 적었다. 본 품종은 지역에 따라서 괴경모양에 있어서 균일성을 유지 하였고 수량성에 있어서도 안정성을 보여 주었다. 수량성은 4,942(kg/10a)으로 수미(3,186kg/10a) 보다 매우 높았다(Table 23). 본 품종의 비중은 수미(1.066)과 유사한 1.065 이다. 본 품종은 더텡이 병에 대한 저항성과 중심공동, 내부갈색 등 감자에서 자주 발생하는 생리적 장애에 대한 저항성이 수미만큼 좋거나 더 강했다. 하지만 열개의 경우 몇몇 괴경에서 발견되었다(Fig. 53).

Table 23. Comparison of agronomic characteristics, tuber quality and disease response of V-2 and controls

Location	Variety	Plant : height	Plant : type	Plant : growth habit	Flower color	Plant : time of maturity
Chuncheon	V-2	medium	stem-type	erect	red-violet	medium
Jangpyung		short	stem-type	erect	red-violet	medium
Control	Superior	tall	intermediate type	semi-erect	red-violet	early
	Atlantic	very tall	intermediate type	erect	red-violet	medium
Location	Variety	Tuber : shape	Tuber : depth of eyes	Tuber : smoothness of skin	Tuber : color of skin	Tuber : color of flesh
Chuncheon	V-2	short-oval	shallow	smooth	red	light yellow
Jangpyung		short-oval	medium	smooth	red	cream
Control	Superior	short-oval	deep	medium	yellow	cream
	Atlantic	round	medium	rough	yellow	cream

Variety	Total Yield kg/10a	the naked eye of chip color	Colormeter of chip color	Specific gravity
V-2	4,942	2	64.31	1.065
Superior	3,186	2	57.92	1.066
Atlantic	3,723	1	68.07	1.078
Variety	Dehiscence*	Common Scab*	Hollow heart*	Internal brown spot*
V-2	3	1	1	1
Superior	1	1	1	1
Atlantic	3	1	5	5

*Degree of occurrence : 1=resistance, 5=medium, 9=susceptible



Fig. 53. Tubers and flowers of V-2.

(3) V-5

- 교배조합 : Atlantic × DG55 이며, 지상부 식물체 형태는 반줄기형이며 개장형으로서 조생종이다. 지하부 덩이줄기의 모양은 춘천에서는 둥근형을 장평에서는 짧은 계란형을 나타내고, 백색 표피로서 과육색은 유백색이며, 꽃색은 흰색을 나타낸다. 본 품종은 고온기에 비대가 잘되고, 더덩이병에 강하며 모양이 균일하고 상서율이 매우 뛰어나다. 이 품종의 대서의 모양을 닮아서 매우 둥글다. 식용으로 개발되었지만 비중이 매우 높고 칩 가공 시 칩 색깔도 좋았다(Table 24).
- 더덩이병에 강하며 모양이 균일하고 상서율이 매우 뛰어나다. 수량은 3,898 (kg/10a)로 수미 3,186(kg/10a)에 비해서 매우 높았다. 또한 기형서의 발생이 거의 없는 균일성을 보여 주었으며, 비중은 1.071로 식용인 수미(1.066)보다 높았다. 본 품종의 표피는 수미와 유사하지만 형태나 비중에 있어서는 대서와 매우 흡사하였다. 그러나 숙기는 장평에서 대서보다 훨씬 빨라서 추작용으로 가능하였다. 본 품종은 봄, 가을 재배시 문제가 되는 더덩이병에 대한 저항성이 높고 수량성과 비중, 맛에서도 뛰어나기 때문에 이기작 품종으로 가능하며, 또한 중심공동, 내부갈색, 열개, 기형서들 등 감자에서 자주 생리장애가 거의 발생하지 않았다(Fig. 54).

Table 24. Comparison of agronomic characteristics, tuber quality and disease response of V-5 and controls.

Location	Variety	Plant : height	Plant : type	Plant : growth habit	Flower color	Plant : time of maturity
Chuncheon	V-5	short	intermediate type	spreading	white	medium
Jangpyung		short	intermediate type	spreading	white	early
Control	Superior	tall	intermediate type	semi-erect	red-violet	early
	Atlantic	very tall	intermediate type	erect	red-violet	medium
Location	Variety	Tuber : shape	Tuber : depth of eyes	Tuber : smoothness of skin	Tuber : color of skin	Tuber : color of flesh
Chuncheon	V-5	round	medium	smooth	yellow	cream
Jangpyung		short-oval	medium	smooth	yellow	cream
Control	Superior	short-oval	deep	medium	yellow	cream
	Atlantic	round	medium	rough	yellow	cream

Variety	Total Yield kg/10a	the naked eye of chip color	Colormeter of chip color	Specific gravity
V-5	3,898	2	60.11	1.071
Superior	3,186	2	57.92	1.066
Atlantic	3,723	1	68.07	1.078
Variety	Dehiscence*	Common Scab*	Hollow heart*	Internal brown spot*
V-5	1	1	1	1
Superior	1	1	1	1
Atlantic	3	1	5	5

*Degree of occurrence : 1=resistance, 5=medium, 9=susceptible



Fig. 54. Tubers and flowers of V-5.

(4) V-9

- 교배조합: W870 × A88431-1 이며, 지상부 식물체 형태는 반줄기형으로서 조생종이며, 지하부 덩이줄기의 모양은 둥근형으로서 지역적응성이 뛰어나게 우수하며 감자의 칩 색도가 아주 좋았을 뿐 아니라 비중이 높아서 가공용으로 적합한 품종이라고 판단된다. 덩이줄기의 표피색은 황색이고 매끈하였고 감자의 비중이 대조 품종인 대서보다 모든 재배지역에서 월등하게 높았다. 더텡이병에 강하며 모양이 균일하고 상서율이 매우 좋았으며 칩색깔이 뛰어났다(Table 25).
- 비중이 1.085로 매우 높고 수확 직후나 저온저장 후 칩 가공시 칩색깔이 매우 우수하였다. 본 품종은 고랭지 여름 재배시 문제가 되는 중심공동과 내부갈색반점에 대한 저항성이 대서에 비해서 매우 높을 뿐만 아니라 더텡이

병에 대한 저항성도 대서보다 훨씬 좋았으며 본 품종은 수량성에 있어서 재배작형에 관계없이 우수하였다. 가공용 품종에 있어서 가장 중요한 비중과 칩색깔에 있어서 기존의 품종인 수미와 대서와 비교시 우수하였고 재배환경에 따른 기형서의 발생이 매우 적고 특히 더덩이병에 강하기 때문에 안정적인 수량성을 보장한다(Fig. 55).

Table 25. Comparison of agronomic characteristics, tuber quality and disease response of V-9 and controls.

Location	Variety	Plant : height	Plant : type	Plant : growth habit	Flower color	Plant : time of maturity
Chuncheon	V-9	medium	intermediate type	semi-erect	blue-violet	early
Jangpyung		medium	intermediate type	semi-erect	blue-violet	early
Control	Superior	tall	intermediate type	semi-erect	red-violet	early
	Atlantic	very tall	intermediate type	erect	red-violet	medium
Location	Variety	Tuber : shape	Tuber : depth of eyes	Tuber : smoothness of skin	Tuber : color of skin	Tuber : color of flesh
Chuncheon	V-9	round	medium	smooth	yellow	light yellow
Jangpyung		round	medium	smooth	yellow	light yellow
Control	Superior	short-oval	deep	medium	yellow	cream
	Atlantic	round	medium	rough	yellow	cream

Variety	Total Yield kg/10a	the naked eye of chip color	Colormeter of chip color	Specific gravity
V-9	4,122	1	68.52	1.085
Superior	3,186	2	57.92	1.066
Atlantic	3,723	1	68.07	1.078
Variety	Dehiscence*	Common Scab*	Hollow heart*	Internal brown spot*
V-9	1	1	1	1
Superior	1	1	1	1
Atlantic	3	1	5	5

*Degree of occurrence : 1=resistance, 5=medium, 9=susceptible



Fig. 55. Tubers and flowers of V-9.

(5) V-16

- 교배조합 : Chipeta×A90359-7 이며, 지상부 식물체 형태는 반 줄기형이며 개장형으로서 중생종이고, 지하부 덩이줄기의 모양은 짧은 계란형이며 황색 표피로서 과육색은 유백색이고 상서울이 튀어나며, 꽃색은 대조품종들과 구별되는 청보라를 나타낸다. 이 품종은 수량성이 매우 뛰어나고, 중심공동과 내부갈색반점에 대한 저항성이 대서에 비해서 매우 높을 뿐만 아니라 더텡 이병에 대한 저항성도 대서보다 훨씬 좋았다(Table 26).
- 본 품종은 상서울이 대조품종인 수미, 대서보다 월등하게 좋았으며 기형서가 거의 없었고 균일도가 아주 좋았다. 이 품종의 가장 우수한 특징은 표피가 깨끗하였고 크기가 대조 품종인 대서 보다 크다. 또한 중심공동, 내부갈색, 열 개, 기형서 등 감자에서 자주 생리장해가 거의 발생하지 않았다. 대서의 표피가 거친 반면 본 품종은 매끄럽다. 숙기 또한 대서 보다 다소 빠른 경향을 보여 주었다(Fig. 56).

Table 26. Comparison of agronomic characteristics, tuber quality and disease response of V-16 and controls.

Location	Variety	Plant : height	Plant : type	Plant : growth habit	Flower color	Plant : time of maturity
Chuncheon	V-16	short	intermediate type	spreading	blue-violet	medium
Jangpyung		short	intermediate type	spreading	blue-violet	medium
Control	Superior	tall	intermediate type	semi-erect	red-violet	early
	Atlantic	very tall	intermediate type	erect	red-violet	medium
Location	Variety	Tuber : shape	Tuber : depth of eyes	Tuber : smoothness of skin	Tuber : color of skin	Tuber : color of flesh
Chuncheon	V-16	short-oval	medium	smooth	yellow	cream
Jangpyung		short-oval	deep	smooth	yellow	cream
Control	Superior	short-oval	deep	medium	yellow	cream
	Atlantic	round	medium	rough	yellow	cream

Variety	Total Yield kg/10a	the naked eye of chip color	Colormeter of chip color	Specific gravity
V-16	3,569	2	6685	1.064
Superior	3,186	2	5792	1.066
Atlantic	3,723	1	6807	1.078
Variety	Dehiscence*	Common Scab*	Hollow heart*	Internal brown spot*
V-16	1	1	1	1
Superior	1	1	1	1
Atlantic	3	1	5	5

*Degree of occurrence : 1=resistance, 5=medium, 9=susceptible



Fig. 56. Tubers and flowers of V-16.

다) 감자 DNA 추출 및 PCR

- 감자 DNA 추출 : 감자 품종 V-4, V-8, V-13, V-42, V-47의 필드 식물체 잎과 기내 식물체 잎으로 채취하여, 'Nucleo Spin Plant kit' 와 '2X CTAB extraction buffer', 'Rapid salt extraction of plant genomic DNA' 등 다양한 방법을 활용하여, 간편하고 우수한 DNA 추출법을 비교·선택하여, genomic DNA를 추출하였다.
- 감자 품종 ITS 영역 PCR : 감자 품종 V-4, V-8, V-13, V-42, V-47의 genomic DNA를 ITS primer를 이용하여 ITS region을 증폭하였다. 증폭은 다음의 PCR(polymerase chain reaction) 반응을 이용하여 실시한다. PCR 반응은 전체 100µl 부피로 행하며, 10-50ng DNA, 1.5unit Taq DNA Polymerase, 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 0.5-1.0µM primer 및 200µM의 각 dATP, dCTP, dGTP, dTTP 등이 포함되어 있다. 우선 ITS region의 증폭을 위하여는 ITS4 primer와 ITS5 primer를 이용하여, ① 94°C에서 3분간 pre-denaturation, ② 94°C에서 1분간, 52°C에서 2분간, 72°C에서 4분으로 구성된 amplifying cycle을 30회 반복, 마지막으로 ③ 72°C에서 7분동안의 final extension으로 구성된 3단계의 PCR과정을 거쳐 dsDNA template를 만들어 낸다.

- 신품종 감자 DNA 시퀀스 비교 분석 및 SNP 영역 탐색

감자 품종들을 ITS PCR 후에 시퀀싱 분석을 통해서 SNP 후보 영역을 분석하였다.

```

v-47      ACCTGCAGAGCAGAACGACCCGCGAACACGTTTTAAACACTTGGGGGCGCTTGCGCCCTC 120
SP        ACCTGCAGAGCAGAACGACCCGCGAACACGTTTTAAACACTTGGGGGCGCTTGCGCCCTC 120
v-8       ACCTGCAGAGCAGAACGACCCGCGAACACGTTTTAAACACTTGGGGGCGCTTGCGCCCTC 120
v-42      ACCTGCAGAGCAGAACGACCCGTGAACACGTTTTAAACACTTGGGGGGGTTG-GCCTTC 118
v-13      ACCTGCAAGCAGAACGACCCGCGAACACGTTTTAAACACTTGGGGGCGCTTGCGCCCTC 119
v-4       ACCTGCAAGCAGAACGACCCGCGAACACGTTTTAAACACTTGGGGGCGCTTGCGCCCTC 120
*****

```

v-47 CCGTCCCCGAC-GACTTGCGCGCTTGC GCGCTCGTTTTTGGGGCCAACGAACGAAACCC 179
SP CCGTCCCCGAC-NACTTGCGCGCTTGC GCGCTCGTTTTTGGGGCCAACGAACGAA-CCC 178
v-8 CCGTCCCCGAC-GACTTGCGCGCTTGC GCGCTCGTTTTTGGGGCCAACGAACGAA-CCC 178
v-42 CCTTCCCCGA-GACTTGCGCGCTTGC GCGCTCGTTTTTGGGGCCAACGAACGAA-CCC 176
v-13 CCGTCCCCGACGACTTGCGCGCTTGC GCGCTCGTTTT-TGGGGCCAACCAACGAA-CCC 177
v-4 CCGTCCCC-GACGACTTGCGCGCTTGC GCGCTCGTTTT-GGGGGCC---AACGAA-CCC 173

** ***** ***** ***** ***** **

v-47 CGGCGCGAAAGCGCCAAGGAATACTAAAATCGGCAGCCCTCCCCTCGGCCCGGTTGCG 239
SP CGGCGCGAAAGCGCCAAGGAATACTAAAATCGGCAGCCCTCCCCTCGGCCCGGTTGCG 238
v-8 CGGCGCGAAAGCGCCAAGGAATACTAAAATCGGCAGCCCTCCCCTCGGCCCGGTTGCG 238
v-42 CGGCGCGAAAGCGCCAAGGAATACTAAAATCGGCAGCCCTCCCCTCGGCCCGGTTGCG 236
v-13 CGGCGCGAAAGCGCCAAGGAATACTAAAATCGACAGCCCTCCCCTCGGCCCGGTTGCG 237
v-4 CGGCGCGAAAGCGCCAAGGAATACTAAAATCGGCAGCCCTCCCCTCGGCCCGGTTGCG 233

***** *****

v-47 GGATCGCCCGGGGGACGCGCGCTGCTCTTTAAACACAACGACTCTCGGCAACGGATAT 299
SP GGATCGCCCGGGGGACGCGCGCTGCTCTTTAAACACAACGACTCTCGGCAACGGATAT 298
v-8 GGATCGCCCGGGGGACGCGCGCTGCTCTTTAAACACAACGACTCTCGGCAACGGATAT 298
v-42 GGATCGCCCGGGGGACGCGCGCTGCTCTTTAAACACAACGACTCTCGGCAACGGATAT 296
v-13 GGATCGTGGGGGGACGCGCGCTGCTCTTTAAACACAACGACTCTCGGCAACGGATAT 297
v-4 GGATCGTGGGGGGACGCGCGCTGCTCTTTAAACACAACGACTCTCGGCAACGGATAT 293

***** *****

v-47 CTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAA 359
SP CTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAA 358
v-8 CTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAA 358
v-42 CTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAA 356
v-13 CTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAA 357
v-4 CTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAAACGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAA 353

***** *****

v-47 TCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAA-GTTGCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGG 417
 SP TCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAA-GTTGCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGG 416
 v-8 TCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAA-GTTGCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGG 416
 v-42 TCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAA-GTTGCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGG 414
 v-13 TCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAA-GTTGCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGG 415
 v-4 TCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAAGGCCGAGGG 413

v-47 CAC-GTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCGCGCACCTTGCGCGGGGCGGA 476
 SP CAC-GTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCGCGCACCTTGCGCGGGGCGGA 475
 v-8 CAC-GTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCGCGCACCTTGCGCGGGGCGGA 475
 v-42 CAC-GTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCGCGCACCTTGCGCGGGGCGGA 473
 v-13 CAC-GTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCGCACCT-TTGC CGGGGCGGA 473
 v-4 CACAGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCGCACAT-T-GCGCGGGGCGGA 471

*** ***** * *****

v-47 AGCTGGCCTCCCGTGCGCCCGGAGCGCGGCTGGNCCTAAATGCGAGTCCACGTCGAC 536
 SP AGCTGGCCTCCCGTGCGCCCG-GAGCGCGCGGCTGGCC-TAAATGCGAGTCCACGTCGAC 533
 v-8 AGCTGGCCTCCCGTGCGCCCG-GAGCGCGCGGCTGGCC-TAAATGCGAGTCCACGTCGAC 533
 v-42 AGCTGGCCTCCCGTGCGCCCG-GAGCGCGCGGCTGGCC-TAAATGCGAGTCCACGTCGAC 531
 v-13 AGCTGGCCTCCCGTGCGCCCG-GAGCGCGCGGCTGGCC-TAAATGCGAGTCCACGTCGAC 531
 v-4 AGCTGGCCTCCCGTGCGCCCGGAGCGCGGCTGGCC-TAAATGCGAGTCCACGTCGAC 530

v-47 GGACGTGCGGCAAGTGGTGGTTGAAACTCAACTCTCTCTCGTTGTCGCGGCTACAGCCC 596
 SP GGACGTGCGGCAAGTGGTGGTTGAAACTCAACTCTCTCTCGTTGTCGCGGCTACAGCCC 593
 v-8 GGACGTGCGGCAAGTGGTGGTTGAAACTCAACTCTCTCTCGTTGTCGCGGCTACAGCCC 593
 v-42 GGACGTGCGGCAAGTGGTGGTTGAAACTCAACTCTCTCTGTTGTCGCGGCTACAGCCC 591
 v-13 GGACGTGCGGCAAGTGGTGGTTGAAACTCAACTCTCTCTCGTTGTCGCGGCTACAGCCC 591
 v-4 GGACGTGCGGCAAGTGGTGGTTGAAACTCAACTCTCTCTCGTTGTCGCGGCTACAGCCC 590

- **신품종 감자 DNA 시퀀스 비교 분석 및 SNP 영역 탐색** : 감자 품종 V-4, V-8, V-13, V-42, V-47의 genomic DNA를 본 실험에서는 지금 국내에서 가장 널리 재배되는 기존 감자 품종과 본 연구실에서 개발된 신품종 감자들 중 기능성 및 품종 특성이 가장 뛰어나며, 기존 품종 수미(SP)와의 구별이 가장 어려운 신품종(V-1, V-2, V-5, V-9, V-16)의 genomic DNA를 추출하여 ITS5F primer와 ITS4R primer를 이용하여 ITS 영역을 PCR 증폭을 실시하였다. 증폭된 ITS PCR 산물을 direct sequencing을 하여 염기서열을 분석하였으며, NCBI의 BLAST program을 이용하여 유전자 은행에 등록되어 있는 기존 감자 품종들의 ITS영역의 염기서열을 비교한 결과 신품종(V-4, V13)과 기존 감자 품종을 구별할 수 있는 여러 곳의 SNP(single nucleotide polymorphism)를 찾아낼 수 있었고, 이들 SNP 부분에 대하여 분자마커(molecular marker)로서의 유용성을 검토하였다.

```

v-1      ACCTGCAGAGCAGAACGACCCGCGAACACGTTTTAAACACTTGGGGGCGCTTGCGCCCTC 120
sp       ACCTGCAGAGCAGAACGACCCGCGAACACGTTTTAAACACTTGGGGGCGCTTGCGCCCTC 120
v-2      ACCTGCAGAGCAGAACGACCCGCGAACACGTTTTAAACACTTGGGGGCGCTTGCGCCCTC 120
v-5      ACCTGCAGAGCAGAACGACCCGTGAACACGTTTTAAACACTTGGGGGGGTTG-GCCTTC 118
v-9      ACCTGCAAAGCAGAACGACCCGCGAACACGTTTTAAACACTTGGGGGCGCTTGCGCCCTC 119
v-16     ACCTGCAAAGCAGAACGACCCGCGAACACGTTTTAAACACTTGGGGGCGCTTGCGCCCTC 120
*****
v-1      CCGTCCCCGAC-GACTTGCGCGCTTGCGCGCTCGTTTTTGGGGCCAACGAACGAAACCC 179
sp       CCGTCCCCGAC-NACTTGCGCGCTTGCGCGCTCGTTTTTGGGGCCAACGAACGAA-CCC 178
v-2      CCGTCCCCGAC-GACTTGCGCGCTTGCGCGCTCGTTTTTGGGGCCAACGAACGAA-CCC 178
v-5      CCTTCCCCGA-GACTTGCGCGCTTGCGCGCTCGTTTTTGGGGCCAACGAACGAA-CCC 176
v-9      CCGTCCCCGACGACTTGCGCGCTTGCGCGCTCGTTTT-TGGGGCCAACCAACGAA-CCC 177
v-16     CCGTCCCC-GACGACTTGCGCGCTTGCGCGCTCGTTTT-GGGGGCC---AACGAA-CCC 173
** *****
v-1      CGGCGCGGAAAGCGCCAAGGAATACTAAAATCGGCGAGCCCTCCCTCGGCCCGTTGCG 239

```

SP CGGCGCGAAAGCGCCAAGGAATACTAAAATCGG**G**CAGCCCTCCCCTCGCGCCCGTTTCGC 238
v-2 CGGCGCGAAAGCGCCAAGGAATACTAAAATCGG**G**CAGCCCTCCCCTCGCGCCCGTTTCGC 238
v-5 CGGCGCGAAAGCGCCAAGGAATACTAAAATCGG**G**CAGCCCTCCCCTCGCGCCCGTTTCGC 236
v-9 CGGCGCGAAAGCGCCAAGGAATACTAAAATCG**A**CAGCCCTCCCCTCGCGCCCGTTTCGC 237
v-16 CGGCGCGAAAGCGCCAAGGAATACTAAAATCGG**G**CAGCCCTCCCCTCGCGCCCGTTTCGC 233

v-1 GGATCG**CC**CGGGGGACGCGCGCTGCTCTTTAAACACAACGACTCTCGGCAACGGATAT 299
SP GGATCG**CC**CGGGGGACGCGCGCTGCTCTTTAAACACAACGACTCTCGGCAACGGATAT 298
v-2 GGATCG**CC**CGGGGGACGCGCGCTGCTCTTTAAACACAACGACTCTCGGCAACGGATAT 298
v-5 GGATCG**CC**CGGGGGACGCGCGCTGCTCTTTAAACACAACGACTCTCGGCAACGGATAT 296
v-9 GGATCG**TG**CGGGGGACGCGCGCTGCTCTTTAAACACAACGACTCTCGGCAACGGATAT 297
v-16 GGATCG**TG**CGGGGGACGCGCGCTGCTCTTTAAACACAACGACTCTCGGCAACGGATAT 293

v-1 CTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAG**CG**GAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAA 359
SP CTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAG**CG**GAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAA 358
v-2 CTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAG**CG**GAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAA 358
v-5 CTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAG**CG**GAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAA 356
v-9 CTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAG**CG**GAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAA 357
v-16 CTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAG**CG**GAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAA 353

v-1 TCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAA-GTTGCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGG 417
SP TCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAA-GTTGCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGG 416
v-2 TCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAA-GTTGCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGG 416
v-5 TCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAA-GTTGCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGG 414
v-9 TCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAA-GTTGCGCCCGAAGCCATTA-GGCCGAGGG 415
v-16 TCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAAGGCCGAGGG 413

```

v-1      CAC-GTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCGCGCACCTTGC GCGGGGCGGA 476
SP       CAC-GTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCGCGCACCTTGC GCGGGGCGGA 475
v-2      CAC-GTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCGCGCACCTTGC GCGGGGCGGA 475
v-5      CAC-GTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCGCGCACCTTGC GCGGGGCGGA 473
v-9      CAC-GTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCGCACCT-TTGC GCGGGGCGGA 473
v-16     CACAGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCGCACAT-T-GCGCGGGGCGGA 471
*** ***** * * *****

v-1      AGCTGGCCTCCCGTGC GCGCCCGAGCGCGGCTGGNCCTAAATGCGAGTCCACGTCGAC 536
SP       AGCTGGCCTCCCGTGC GCGCCC-GAGCGCGCGGCTGGCC-TAAATGCGAGTCCACGTCGAC 533
v-2      AGCTGGCCTCCCGTGC GCGCCC-GAGCGCGCGGCTGGCC-TAAATGCGAGTCCACGTCGAC 533
v-5      AGCTGGCCTCCCGTGC GCGCCC-GAGCGCGCGGCTGGCC-TAAATGCGAGTCCACGTCGAC 531
v-9      AGCTGGCCTCCCGTGC GCGCCC-GAGCGCGCGGCTGGCC-TAAATGCGAGTCCACGTCGAC 531
v-16     AGCTGGCCTCCCGTGC GCGCCCGAGCGCGGCTGGCC-TAAATGCGAGTCCACGTCGAC 530
***** ***** * *****

v-1      GGACGTCGCGGCAAGTGGTGGTTGAAACTCAACTCTCTCTCGTTGTCGCGGCTACAGCCC 596
SP       GGACGTCGCGGCAAGTGGTGGTTGAAACTCAACTCTCTCTCGTTGTCGCGGCTACAGCCC 593
v-2      GGACGTCGCGGCAAGTGGTGGTTGAAACTCAACTCTCTCTCGTTGTCGCGGCTACAGCCC 593
v-5      GGACGTCGCGGCAAGTGGTGGTTGAAACTCAACTCTCTCTGTTGTCGCGGCTACAGCCC 591
v-9      GGACGTCGCGGCAAGTGGTGGTTGAAACTCAACTCTCTCTCGTTGTCGCGGCTACAGCCC 591
v-16     GGACGTCGCGGCAAGTGGTGGTTGAAACTCAACTCTCTCTCGTTGTCGCGGCTACAGCCC 590
***** *****

```

Fig. 57. Aligned sequence data matrix of nuclear DNA ITS region of various potatoes.

- 신품종 감자 SNP primer의 제작 및 PCR 조건 구명 : SNP primer의 개발 및 분석시스템 개발의 기본원리는 Amplification Refractory Mutation System(ARMS)을 이용하였다. ARMS primer들은 G/T 혹은 A/C

(primer/template) mismatch를 유발하게끔 제작하는데, 그 이유는 일반적으로 Taq 폴리머라제(polymerase)를 사용하여 PCR증폭을 할 경우에 primer의 3'-nucleotide에서 주형(template DNA)과 mismatch되면 PCR증폭은 일어나지 않는다는 원리를 이용한 것으로 이 방법을 이용하여 SNP G specific primer를 제작하였다.

- 본 실험에서 개발된 SNP primer의 특성에 맞게 PCR의 반응조건(DNA의 농도, 증폭회수, primer간의 농도비율, dNTP mix 농도)을 새로이 설정하기 위한 반복 실험을 추진하였다. PCR 반응은 전체 20 μ l 부피로 행하였으며, 50~100ng DNA, 1.5unit Taq DNA Polymerase, 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 각각 0.5-1.0 μ M primer 및 200 μ M의 각 dATP, dCTP, dGTP, dTTP 등이 포함되어 있다. 우선 SNP primer의 증폭을 위해서 SNP primer를 이용하여, ① 94°C에서 2분간 pre-denaturation, ② 94°C에서 30초, 65°C에서 30초, 72°C에서 1분으로 구성된 amplifying cycle을 25회 반복, 마지막으로 ③ 72°C에서 15분동안의 final extension으로 구성된 3단계의 PCR과정을 거쳤다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발 목표의 달성도

가. 당초 목표했던 대로 연구가 진행되었으며, 특히 인삼 신품종 천풍의 marker를 성공적으로 개발하여 이중맹검법에 의하여 신품종 육성기관과 공동test에서 좋은 결과를 보였다.

나. 본 기술을 통해서 앞으로 인삼 신품종의 marker를 계속적으로 쉽게 선별할 수 있는 기반을 조성하였다.

2. 관련분야에 기여도

- 단일염기서열분석방법이 용이해짐에 따라 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism: SNPs)과 삽입/삭제 (insertion/deletion: indels)의 분석이 용이해졌다. 이에 따라 앞으로는 간접적인 분자마커들과 함께 전세계적으로 유전분석에 SNP 기술이 이용될 것이다.
- SNP 개발방법의 개요를 보면, (1) Oligonucleotide hybridization, (2) Nuclease cleavage of mismatches, (3) Oligonucleotide ligation, (4) Primer extension, (5) Direct sequencing. 하지만 SNP 개발방법은 아직 일반화되어 있지 않다. 따라서 본 기술이 완성되면 매우 부가가치가 높을 것이다.
- 생물산업이 폭발적으로 발전할 것으로 예상되는 현 시점에서, 생명공학분야에서 SNP의 특허 허용 문제가 핫 이슈로 등장하고 있다. 만약 모든 유전정보의 기초가 되는 SNP에 대하여 특허권이 허용된다면, 우리 나라와 같이 생명공학분야의 후발국가들은 영원히 기술선진국에 예속될 것이며, 따라서 SNP 기술 개발 및 지식재산권 확보는 선진국과 후발국가에 서로 양보할 수 없는 중요한 문제이므로 우리 나라에서도 이 분야에 좀더 적극적인 투자를 통해 SNP 분석 및 SNP primer 개발 기술을 발전시켜 기술선진국과의 격차를 점차 좁혀 후발주자인 우리 나라의 기술수준이 이 분야에서 우

- 위를 점할 수 있을 것이다.
- SNP primer 개발은 국내에서 개발된 품종의 국내의 도용을 막으며, 유출시 그 진위여부를 검정하기 위한 방법으로 활용할 수 있다. 특히 인삼(천풍, 연풍, 고풍)과 감자(수미, 대서, 대지 등)의 SNP부분에 대하여 분자마커 (molecular marker)로서의 유용성을 검토하여 각각 SNP primer를 합성한 후 PCR 증폭을 통하여 개발된 신품종과의 판별여부를 확인할수 있을것이다.
 - 이 SNP 분자마커 제작이 성공한 후 이 기술을 이용하면 품종 육종 연한 단축할 수 있으며, 개발된 SNP primer을 특허화하여 지적재산권 확보할 수 있고, 개발된 SNP primer 및 SNP 기술을 다른 작물들에게도 적용 될 경우 본 연구실뿐만 아니라 국내에서 시행되는 육종 연구 및 신품종 보호에 큰 역할을 하며, 농업 경제적으로 엄청난 부의 창출을 가져다 줄 것이다.
 - 얼마 전 우리 나라 장미화훼농가와 세계 육종시장의 65%를 점유하고 있는 독일의 코르데스사간의 특허분쟁이 있었다. 만일 코르데스사의 특허출원이 등록된다면 그간의 코르데스사의 권리행사가 보다 강력하게 이루어질 것이며 장미꽃값은 폭락전의 값에 로열티를 더한 훨씬 높은 가격으로 오른다는 것이다. 지금까지 우리는 특허와는 상관없는 사람들이라고 생각하며 살아왔고, 매스컴 등을 통하여 특허는 고생하여 받아 봤자 모방 당하기만 하는 골치 아픈 것이라고 어설픈 인식하여 그 동안 품종육성보다는 외래 품종을 수입하거나 도용하여 사용한 것이 우리 농업을 실정이다. 그러나, 장미의 경우에서와 같이 산간벽지의 화훼농가라고 하여도 특허문제 및 품종에 대한 로열티 지급 문제 때문에 이제 작물도 마음대로 선정할 수 없게 되었다. 이러한 사건은 비단 장미뿐만 아니라 앞으로는 모든 작물에 일어날 수 있는 문제이며 현재 국내에서 생산되는 대부분의 품종이 외국에서 도입된 것인 감자 또한 예외가 될 수 없을 것이다.
 - 따라서, SNP는 품종마다 지닌 고유한 단일염기변이를 선별하여 품종 진위 여부판단에도 이용될 수 있으며, 단일염기변이를 밝혀냄에 따라 품종간의 특이성의 지표로 이용될 수 있어 국내에서 개발된 신품종의 유출 방지 및 유출시 검정 방법으로 활용 할 수 있다. 이 방법이 활성화되어 국내의 고유

품종들에 활용되었을 경우 국내 품종 보호뿐만 아니라 육종가들의 지적 재산권 또한 보호받을 수 있다. 그리고 SNP 기술을 감자에 적용하였을 경우에는 감자의 육종 연한을 단축시킬 수 있어 감자 품종 육성에 큰 도움을 주며, 각 품종별 특이성을 검정할 수 있는 SNP primer가 개발되면 개발된 새로운 품종이 외국에 불법적으로 도용되는 것을 막아줄 수 있다

- .- 감자와 인삼으로부터 marker 유전자의 선발 및 염기서열분석을 통한 SNP 탐색을 통하여 선발된 marker 유전자를 통한 SNP primer 제작하고 이를 특허출원하여 국내에서 재배되는 작물들의 유전자원에 대한 재산권을 확보한다.- 국내에서 확보된 선발마커유전자를 활용하여 외국산과 구별할 수 있는 시스템을 개발하여 국내 농가의 권익을 보호하는데 활용한다.
- 개발된 SNP primer를 이용하여 간편하고 신속한 분석법을 개발하고 이를 제품화(kit)하여 일반에 공급함으로써 그 활용성을 높인다.- SNP primer 및 적용기술이 개발되면 외국에서 밀려오는 모든 농산물을 값싸고 쉽게 구별이 가능하여 자국의 농업의 보호할 수 있을것이다.
- 감자뿐만 아니라 모든 작물은 유전적으로 고유한 단일염기변이를 가지고 있다. 만약 이를 찾아내어 식별할 수 있다면 신품종을 도용을 막을 수 있으며, 품종 도용 시 그 품종의 진위 여부를 가려낼 수 있다. 이와 같은 품종이 지닌 유전적 특이성을 검정하기 위해 꼭 필요한 기술이 SNP(Single Nucleotide Polymorphism) 분자 마커의 개발이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 인삼으로부터 marker 유전자의 선발 및 염기서열분석을 통한 SNP 탐색을 통하여 선발된 marker 유전자를 통한 SNP primer 제작하고 이를 특허출원하여 국내에서 재배되는 작물들의 유전자원에 대한 재산권을 확보할 수 있을 것이다.
2. 국내에서 확보된 선발마커유전자를 활용하여 외국산과 구별할 수 있는 시스템을 개발하여 국내 농가의 권익을 보호하는데 활용할 수 있을 것이다.
3. 개발된 SNP primer를 이용하여 간편하고 신속한 분석법을 개발하고 이를 제품화(kit)하여 일반에 공급함으로써 그 활용성을 높일 수 있을 것이다.
4. SNP primer 및 적용기술이 개발되면 외국에서 밀려오는 모든 농산물을 값싸고 쉽게 구별이 가능하여 자국의 농업의 보호할 수 있을 것이다.
5. 특히 인삼 신품종 천풍의 marker가 확인되었으며 이중맹검법에 의하여 완벽하게 test가 되었기 때문에 바로 농가에 적용함으로써 일반 자경종이 천풍으로 둔갑하여 고가로 판매되는 것을 막을 수 있어 유통질서체계를 순기능적으로 확립할 수 있으며, 현재 중국등으로 유출되어 대량으로 재배되고 있는 천풍이 국내에 무단으로 반입될것 경우 사전 방지가 가능할 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

제 7 장 참고문헌

- Adams, M.D., J.M. Kelley, J.D. Gocayne, M. Dubnick, M. Polymeropoulos, H. Xiao, C.R. Merrill, A. Wu, B. Olde, and R.F. Moreno. 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Sci.* 252:1651-1656.
- Ahn, S.D., C.M. Chung, W.S. Kwon, E.R. Son, Y.S. Lee, and K.E. Yoon. 1985. Molecular Weight Estimation and Protein Patterns of *Panax ginseng*, *Codonopsis lanceolata* and *Platycodon grandiflorum* by Polyacrylamide gel Electrophoresis. *Korean J. Crop Sci.* 30(4): 35-358.
- Artyukova, E.V., M.M. Kozyrenko, O.G. Koren, T.I. Muzarok, G.D. Reunova, and Yu.N. Zhuravlev. 2004. RAPD and Allozyme Analysis of Genetic Diversity in *Panax ginseng* C.A. Meyer and *P. quinquefolius* L. *Russian journal of genetics* 40(2): 178-185.
- Bang, K.H., S.W. Lee, D.Y. Hyun, J.H. Cho, S.W. Cha, N.S. Seong, and M.K. Huh. 2004. Molecular Authentication and Genetic Polymorphism of Korean Ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) by Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) Markers. *Journal of Life Science.* 14(3):425-426.
- Bimboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7:1531-1520.
- Boehm, C.L., H.C. Harrison, G. Jung, and J. Nienhuis. 1999. Organization of American and Asian Ginseng Germplasm Using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124(3): 252-256.
- Brestovac, B., G.B. Harnett, D.W. Smith, F. Frost, and G.R. Shellam. 2005. Multiplex nested PCR (MNP) assay for the detection of 15 high risk genotypes of human papillomavirus. *J. of Clinical Virology* 33: 116-122.
- Chen, B., P.E. North, and D.M. Parham. 1998. Implications of a common polymorphism in intron 12 of the dystrophin gene for deletion detection

- by multiplex PCR. *Gene* 209: 211-217.
- Corell, B. and B. Zoll. 1988. Evidence against a tumour-specific *EcoRI* RFLP of the *c-mos* locus. *FEBS letters* 230(1/2): 81-84.
- Cui, X.M., C.K. Lo, K.L. Yip, T.T.X. Dong, and K.W.K. Tsim. 2003. Authentication of *Panax notoginseng* by 5S-rRNA Spacer Domain and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. *Planta Med.* 69: 584-586.
- Hayashi, K., N. Hashimoto, M. Daigen, and I. Ashikawa. 2004. Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus. *Theor. Appl. Genet.* 108:1212-1220.
- Heiko, S. and M.K. Wojciech. 2003. Comparison of rice and *Arabidopsis* annotation. *Current Opinion in Plant Biology* 6:106-112.
- In, D.S., Y.C. Kim, K.H. Bang, J.W. Chung, O.T. Kim, D.Y. Hyun, S.W. Cha, T.S. Kim, and N. S. Seong. 2005. Genetic Relationships of *Panax* Species by RAPD and ISSR Analyses. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 13(5):249-253.
- Kapley, A., K. Lampel, and H.J. Purohit. 2000. Thermocycling steps and optimization of multiplex PCR. *Biotechnology Letters* 22: 1913-1918.
- Kim, B.B., J. H. Jeong, S.J. Jung, D.W. Yun, E.S. Yoon, and Y. E. Choi. 2005. Authentication of Korean *Panax ginseng* from Chinese *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* by AFLP analysis. *Journal of plant biotechnology* 7(2): 81-86.
- Kim, J.H., J.A. Yuk, S.K. Cha, H.H. Kim, B.J. Seong, S.I. Kim, and J. E. Choi. 2003. Genetic variation in pure lines of *Panax ginseng* based on by RAPD analysis. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 11(2): 102-108.
- Kim, J.S., Y.O. Kim, H.J. Ryu, Y.S. Kwak, J.Y. Lee, and H. Kang. 2003. Isolation of Stress-Related Genes of Rubber Particles and Latex in Fig Tree (*Ficus carica*) and their Expressions by Abiotic Stress or Plant Hormone Treatments. *Plant cell physiol.* 44(4): 412-414.

- Komatsu, K., S. Zhu, H. Fushimi, T.K. Qui, S. Cai, and S. Kadota. 2001. Phylogenetic Analysis Based on 18S rRNA Gene and matK Gene Sequences of *Panax vietnamensis* and Five Related Species. *Planta Med.* 67: 461-465.
- Kwak, Y.S., J.D. Park, and J.W. Yang. 2003. Present and Its Prospect of Red Ginseng Efficacy Research. *Food Industry and Nutrition* 8(2):30-37.
- Kwon, W.S., C.M. Chung, and Y.T. Kim. 1998. Breeding Process and Characteristics of KG101, a Superior Line of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Korean J. Ginseng Sci.* 22(1):11-17.
- Kwon, W.S., J.Y. Kang, J.H. Lee, M.G. Lee, and K.T. Choi. 1998. Red Ginseng Quality and Characteristics of KG101 a Promising Line of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *J. Ginseng Res.* 22(4):244-251.
- Kwon, W.S., M.G. Lee, and K.T. Choi. 2000. Breeding Process and Characteristics of Yunpoong, a New Variety of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *J. Ginseng Res.* 24(1):1-7.
- Kwon, W.S., J.H. Lee, C.S. Park, and D.C. Yang. 2003. Breeding Process and Characteristics of Gopoong, a New Variety of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *J. Ginseng Res.* 27(2):86-91.
- Lee, S.S., J.H. Lee, and I.O. Ahn. Characteristics of New Cultivars in *Panax ginseng* C.A. Meyer. 2005. *The Korean Society of Ginseng.* 3-18.
- Leem, K., S.C. Kim, C.H. Yang, and J. Seo. 2005. Genetic Identification of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* by Pyrosequencing Methods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69(9): 1771-1773.
- Lim, Y.P., C.S. Shin, S.J. Lee, Y.N. Youn, and J.S. Jo. 1993. Survey of Proper Primers and Genetic Analysis of Korean Ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) Variants using the RAPD Technique. *Korean J. Ginseng Sci.* 17(2):153-158.
- Lim, Y.P., C.S. Shin, S.J. Lee, Y.N. Youn, and J.S. Jo. 1993. Survey of proper primers and genetic analysis of Korean ginseng (*Panax*

- ginseng* C. A. Meyer) variants using the RAPD technique. Korean J. Ginseng Sci. 17:153-158.
- Luo, Z.Y., G. Zhou, S.Q. Zhou, X.H. Chen, J.Q. Luo, and W.X. Hu. 2000. Construction of Genomic DNA Fingerprinting in *Panax ginseng* and *P. Quinquefolium* by AFLP. Acta pharmaceutica sinica 35(8): 629-633.
- Mathur, A., A.K. Mathur, R.S. Sangwan, A. Gangwar, and G.C. Uniyal. 2003. Differential morphogenetic responses, ginsenoside metabolism and RAPD patterns of three *Panax* species. Genetic Resources and Crop Evolution 50: 245-252.
- Mayer, K. and H.W. Mewes. 2001. How can we deliver the large plant genomes: Strategies and perspectives. Curr. Opin. Plant Biop. 5:173-177.
- Mihalov, J.J., A.D. Marderosian, and J.C. Plerce. 2000. DNA Identification of Commercial Ginseng Samples. J. Agric. Food Chem. 48: 3744-3752.
- Nessler, C.L. 1994. Sequence analysis of two new members of the major latex protein gene family supports the triploid-hybrid origin of the opium poppy. Gene 139(2): 207-209.
- Park, M.J., M.K. Kim, J.G. In, and D.C. Yang. 2006. Molecular identification of Korean ginseng by amplification refractory mutation system-PCR. Food Research International 39: 568-574.
- Rohayem, J., S. Berger, T. Juretzek, O. Herchenröder, M. Mogel, M. Poppe, J. Henker, and A. Rethwilm. 2004. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect Norovirus, Astrovirus and Adenovirus in clinical stool samples. J. of Virological Methods 118: 49-59.
- Ruperti, B., C. Bonghi, F. Ziliotto, S. Pagni, A. Rasori, S. Varotto, P. Tonutti, J.J. Giovannoni, and A. Ramina. 2002. Characterization of a major latex protein (MLP) gene down-regulated by ethylene during peach fruitlet abscission. Plant Science 163: 265-272.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.

- Saitou, N. 1991. Reconstruction of molecular phylogeny of extant hominoids from DNA sequence. *Am. J. of Physical Anthropology* 84: 75-85.
- Seo, S.D., J.A. Yuk, S.K. Cha, H.H. Kim, B.J. Seong, S.I. Kim, and J.E. Choi. 2003. Analysis of Diversity of *Panax ginseng* Collected in Korea by RAPD Technique. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 11(5):377-384.
- Tanaka, H., N. Fukuda, Y. Shoyama. 2006. Identification and differentiation of *Panax* species using ELISA, RAPD and eastern blotting. *Phytochemical analysis* 17(1): 46-55.
- Thomas, C.M., P. Vos, M. Zabeau, and D.A. Jones. 1995. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *The Plant journal for cell and molecular biology* 8(5): 785-794.
- Toni, P.M., and R. Henry. 2003. Single-nucleotide polymorphism detection in plants using a single-stranded pyrosequencing protocol with a universal biotinylated primer. *Analytical Biochemistry* 317: 165-170.
- Um, J.Y., H.S. Chung, M.S. Kim, H.J. Na, H.J. Kwon, J.J. Kim, K.M. Lee, S.J. Lee, J.P. Lim, K.R. Do, W.J. Hwang, Y.S. Lyu, N.H. An, and H.M. Kim. 2001. Molecular Authentication of *Panax ginseng* Species by RAPD Analysis and PCR-RFLP. *Biol. Pharm. Bull* 24(8): 872-875.
- Wang, H., M. Qi, and A.J. Cutler. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Research* 21(17): 4153-4154.
- Wen, J. and A.Z. Elizabeth. 1996. Phylogeny and Biogeography of *Panax* L. (the Ginseng Genus, Araliaceae): Inferences from ITS Sequences of Nuclear Ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6(2): 187-177.
- Williams J.G.K., A.R. Kubelik, A.J. Licak, J.A. Ratajski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids. Res.* 18: 6531-6535

- Wolfsberg, T.G., and D. Landsman. 2001. Expressed sequence tags (ESTs), pp 283-301. In A.D. Baxevanis and B.F. Ouellette. 2002. Bioinformatics. Wiley-Interscience, New York.
- Yang, D.C. and M.S. Kim. 2003. DNA Analysis of Ginseng Using PCR-aided RFLP Technology. J. Ginseng Res. 27(3):146-150.
- Yang, D.C., K.J. Yang, and E. S. Yoon. 2001. Comparison of ITS (Internal Transcribed Spacer) and 5.8S rDNA Sequences among Varieties and Cultivars in *Panax ginseng*. Journal of Photoscience 8(2): 55-60.
- Zhu, S., H. Fushimi, S. Cai, and K. Komatsu. 2003. Phylogenetic Relationship in the Genus *Panax*: Inferred from Chloroplast trnK Gene and Nuclear 18S rRNA Gene Sequences. Planta Med. 69: 647-653.
- 전문진, 권석태, 이철호, 임변삼. 2003. 현대의 생물공학과 생물산업. 아카데미서적 P. 69.
- 한국인삼사 편찬위원회. 2002. 한국인삼사 II.

Appendix 3. Aligned sequence data matrix of nuclear ribosomal DNA 3'-end ETS region of *Panax ginseng* and investigated taxa.

Taxon/Node	111111111122222222223333333333444444444455555555556666666666777
Taxon/Node	123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012
PGEJ	TGGGGTGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG
PGEH	TGGGGTGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG
PGEI	TGGGGTGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG
PGER	TGGGGTGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG
PGCY 1	TGGGGTGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG
PGCY 2	TGGGGTGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG
PGCY 3	TGGGGTGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG
PGCC 1	TGGGGTGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG
PGCC 2	TGGGGTGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG
PGCC 3	TGGGGTGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG
PGCC 4	TGGGGTGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG
PGCG 1	TGGGGTGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG
PGCG 2	TGGGGTGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG
PGCG	TGGGGTGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG
PGCS	TGGGGTGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG
PGSB	TGGGGTGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG
PGSK	TGGGGTGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG
PGSS	TGGGGTGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG
PGJ	TGGG?TGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG
PQC	TGGGGTGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG
PQU	TGGGGTGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG
PJJ	TGGGGTGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG
PPG	TGGGGTGCATTAGATGGCGTTGGCATAAGTGTACGATAGGC?GCGTGAAGTGGTGT TGGTTTGT TGGGTGGG

Taxon/Node	77777788888888889999999999000000000011111111112222222222333333333344444
Taxon/Node	345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234
PGEJ	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT
PGEH	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT
PGEI	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT
PGER	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT
PGCY 1	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT
PGCY 2	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT
PGCY 3	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT
PGCC 1	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT
PGCC 2	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT
PGCC 3	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT
PGCC 4	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT
PGCG 1	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT
PGCG 2	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT
PGCG	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT
PGCS	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT
PGSB	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT
PGSK	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT
PGSS	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT
PGJ	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT
PQC	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT
PQU	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT
PJJ	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT
PPG	TTGGATCCCTGCTTGTGCA GCGACGACGCGCTCTTCA TT OCT TTT CAT TCT TGA TCCAAGAGCAGT AAGCCT

Appendix 4. EST comparison of Chun-poong and Jakyung cultivars

aluminium induced protein

```

          10      20      30      40      50      60      70      80
dc03021d12  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DC04001B05  .....G....C.....G....G.....T.....

          90      100     110     120     130     140     150     160
dc03021d12  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DC04001B05  GATCACCTTCGAGAGCTTGTGAAGAGGTTCTGGAAAAGAAAACCCCTCGGCGGTGCCATGCAGATTGGCAACGACGCTC
          170     180     190     200     210     220     230     240
dc03021d12  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DC04001B05  AATTGGCCTATACCCACCATAACCAGTCAGCTTTACATCCCAGATCATTGCGGTTAAGGACGAGATATTCTGCCTGTTT
          250     260     270     280     290     300     310     320
dc03021d12  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DC04001B05  GAGGGTGCACCTTGACAATTTAGGCAGCTTGAAGCAACAATACGGCTAGCTAAGTCTGCAACGAGGTGTTTTGGTGAT
          330     340     350     360     370     380     390     400
dc03021d12  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DC04001B05  TGAGGCTTACAAGGCTCTCCGTGACCGGGCACCTTATCCTCCAACCATGTTGTTGGCCATCTTGATGGAAAATTCGCCT
          410     420     430     440     450     460     470     480
dc03021d12  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DC04001B05  TCGTAGTCTTTGACAAGTCAAAAATCCACATTGTTT-GTGGCTGCTGATCAATCTGGTAAGGTTCCCTTGTATTGNGGAAT
          490     500     510     520     530     540     550     560
dc03021d12  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DC04001B05  CACTGCCGATGGATGTTGATTTGCTGATGATGCTGATTTGCTTAAGGTGCCTGTGGCAAGTCCCTTGCTTCTCTCCC
          570     580     590
dc03021d12  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DC04001B05  TCAAGGGTGTTCCTCTCGACCGAAGATGGACAACCTGA

```

Appendix 4. Continued

glycine rich protein_C85356

		10	20	30	40	50	60	70	80
	
dc03014d09	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
dc01019f09	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
dc02018f07	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
dc05012a10		ATGGCTGCTTTACAGTCTCTAGCTCTCCTTGCTTTGCTTATTTACGCCATTTCCTACTATCTCTGAAAAGCCGCTAGCAAG							
		90	100	110	120	130	140	150	160
	
dc03014d09	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
dc01019f09	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
dc02018f07	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
dc05012a10		GAAGGATCTTGATTGAATCTTGGAAAATGGTCTTGGTCTTGGAGTTGGGATTGG.....AATA..CCTT..ACT.GG.G							
		170	180	190	200	210	220	230	240
	
dc03014d09	-----	AAGGAGG--CG-GATCGGCCAAAGGCCGTGG---GCAACAAGGCTCAGGTCACGG---GTCTGGATCGGGACGTGG---							
dc01019f09	-------CC.....T.....C.---.....T.....---.....							
dc02018f07	-------..T.....---.....G.....---.....							
dc05012a10		G.A.C..TT..G.C..T.GTGC...TGC...CTC.GGCTCC....TA.CTC.A.CTC...TC...ATC.A..TCCAAT							
		250	260	270	280	290	300	310	320
	
dc03014d09	-----	--TGAAGGGTCCGGTGAGGGATCCGGATCTGGAAAAGGTGAAGGTGGTGGTCCAGGATCAGGGTATGGTAGCG-GACATG							
dc01019f09	-----	--C...T.....C.....C..T.....C...C..							
dc02018f07	-----	--.....A.....T.C.....-.....							
dc05012a10		TC..GGA.T..G..CTCC..TG.A.....A.A.GCG...TC.TAC.C..N...CATG.TN..GTC..G.T.A-.GGTG.							
		330	340	350	360	370	380	390	
	
dc03014d09	-----	GCAA-ATGAACAATTAATTGGGCTATCTATCCTAGGCCAACCAAGAATAA-----							
dc01019f09	-----	.A.GC.....A.....A.G.G.....CCATCAGGGTACACCAACCTAATTA-----							
dc02018f07	-----GG.....							
dc05012a10		AA.TC.A.G.GGGCGG..C..C.A.AGGGC.G.G.....A.G.CTC.GGTCACGGGTCTGGATCGGGACGTGGTGA							

Appendix 4. Continued

dehydration induced protein ERD15

```

|          10          20          30          40          50          60
DC03015C01 -----ATGGCACTAGTCTCAGGAGGAAGGTCTACGTTGAATCCAAATGCT
DC06015F08 ATGGCGATGAACGTA..TT.G.GTAA.ATTTC.TC.GCA..A..TC.....C..C...

          70          80          90          100         110         120
DC03015C01 CCTCTCTTTATTCCAGCTGCTGTTCCACCAAGTGGAGGACTTCTTGCCAGAATGGTGGCAG
DC06015F08 ..GA.G..CG.G..GT.G...TA..GTGCG.....T...CGACC.G.....GCC

          130         140         150         160         170         180
DC03015C01 TTGGTAACAACATCAACATGGTTTCATGACTATTGGCTCAACCAGCAACAGGGGTGATGAT
DC06015F08 C...TGAGT.C..CC.T.....G...T..C.....C.AG..TGCTTCTC...TC.

          190         200         210         220         230         240
DC03015C01 GGTTTCTATGGTAATAATGAAGATGACTTGGAAAGATATTACTGGCCTGCTACCGGAT-AC
DC06015F08 CAAA.T..C.A.CC.GTCCTCCCG...AA.C..C.CC-..GT.C.A.GC....GACG.CGA

          250         260         270         280         290         300
DC03015C01 CATTGATCTTGGTATTGAGGAAGAATTTTAAACATGGAAGCCAGTTTGAGC--AATTC
DC06015F08 .G..C.GTCCTAC.CC.TCA....---...G.A.AAC.G.G...AAAG..TTTG.TC..

          310         320         330         340         350         360
DC03015C01 ATTCAATCGTCTAAAGCTGAAGCAGGAACCAAATCATTTCYATTTGATCAGAAGGGAATG
DC06015F08 G..GGGATC.T.G...T--G..G.A.G..GCG..TGGCGGCGGA..CGCC...T.CA.

          370         380         390         400         410         420
DC03015C01 CTTGAAAATGGTATTGAAGTTGATCATGTGGCACTGATGAAGAGCCTGAGCCTTGTCAAAT
DC06015F08 .CA...T.--CCGA.GA.C.T.A.C..AAA.G...GTCCT..A.C..TTCA.C---,G

          ....|....
DC03015C01 TCTTTTAA
DC06015F08 C.GAGG..G

```


Appendix 4. Continued

proline rich protein 14K embryonic

```

|          10          20          30          40          50          60
DC03007B11  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
DC03047E01  ATGGGTTCCAATAAGAACACTGCTTC---AATTGCCCTCTTTCTATCTCTTAACATTCTC
DC01009G01  -----G.TGT.T..GG.T.T.GG....T.CT.G
DC01021M04  .....CA.....TTC.C....T.T....C....C..C.CA..
DC02014C02  .....T.....
DC02015A03  .....T.....C.....
DC04004G07  .....

          70          80          90          100         110         120
DC03007B11  TTCITTTCTTFASTCAGTTTCATGCAACACTTGCCCTGGTCTTAAGCCCAAACCAAATCCC
DC03047E01  ...CC..T...G.---A.TA..T.TG..CAT-T...GGAGC.AATGT.AT..G.TTT
DC01009G01  .....
DC01021M04  A..C..G..C.....G...ATG.TG---A.A...A..A...C..T.....C...T
DC02014C02  .....
DC02015A03  .....T.....
DC04004G07  .....

          130         140         150         160         170         180
DC03007B11  AATCCCACCTACCAATCCCACCTCCCAATCCTATTAATACAGCCAAATGCCCTAGAGATGCC
DC03047E01  ---.G..C.AT.---TG..T.TTG.A..CCT.CTTGT.T.GC.C.ATGT..AG..A-
DC01009G01  .....
DC01021M04  .G-----T.....TT..T-----C.G..A.....
DC02014C02  .....
DC02015A03  .....
DC04004G07  .....

          190         200         210         220         230         240
DC03007B11  CTAAAATTAGGTGTATGTGTCAGATGTGCTCAATTTGGTGAATAATGTAATTGTCCGGATCC
DC03047E01  ---.G..C.AT.---TT..-..ATGTGGA..AA---A..AAA..AAAAAAA..CT.
DC01009G01  .....
DC01021M04  .....A.....CA.....T.....---C..A...GAA..A.....
DC02014C02  .....
DC02015A03  .....
DC04004G07  .....

          250         260         270         280         290         300
DC03007B11  CC&CCAAACCGCTCCCATGCTGCAATCTTTCTTCAAGGCTTGTCAACCTTGAGGCAGCTCTA
DC03047E01  GAGGGGGG..G...G.A.CC..A.TCG.C.AT.,-----
DC01009G01  .....
DC01021M04  ..G..C..C..T.....C....G..A....TG.T....T...A.T
DC02014C02  .....
DC02015A03  .....
DC04004G07  .....

          310         320         330         340         350         360
DC03007B11  TGCCTATGCACTGCCATTAAGCCCAACATTTGGGGATTAACCTTAATGTTCTCTGTTCA
DC03047E01  -----
DC01009G01  .....T.....T.....T..CC.T..CG.....C.....
DC01021M04  .....
DC02014C02  .....
DC02015A03  .....
DC04004G07  .....

          370         380         390         400         410         420
DC03007B11  CTCAGCTTAGTTCCTTAATAACTGCGGCCAGAAACTCCCAAATGGCTTCGAATGTACCTAA
DC03047E01  -----
DC01009G01  .....
DC01021M04  .....AA.....C.....
DC02014C02  .....
DC02015A03  ...A.....A.....A.....
DC04004G07  .....

```

Appendix 4. Continued

GTP-binding protein_AF495716_1

```

          10   20   30   40   50   60   70   80
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DC03015A05 ATGAACCAACCATTGGTGTGGAAGTTCATCCATTGGATTCTTTACGAACTGTGAAAAAATTCGATTTTACTGCTGGGAC
DC01029C09 .....

          90   100  110  120  130  140  150  160
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DC03015A05 ACAGCTGGGCAAGAGAAAATTCGGTGGGCTTAGGGATGGTTACTACATTCATGGACAGTGTGCCATCATGTTTGATGT
DC01029C09 .....C.....

          170
.....|.....|.....
DC03015A05 TACTGCTAGGCTGA
DC01029C09 .....

```

wound induced protein

```

          10   20   30   40   50   60   70   80
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DC03020F09 ATGAATATTGCAGCAAGCAGAGCATGGATTGTGGCAGGAAGCCTTGGTGTAGTGGAGGCACTGAAAGATCAAGGATTTC
DC06022C08 .....G.....T.....G.....A.....

          90   100  110  120  130  140  150  160
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DC03020F09 GAGATOGAATTACACCOCTCAGGTCCATCCACCAACATACAAAATCCAATCTCCGGTGGGTTTCTCAGTCCAAAABACTCT
DC06022C08 .....C.....A.....G.....

          170  180  190  200  210  220  230  240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DC03020F09 CTTCTCCGGCCGATGGTTCCTAAAATATAGACAGGAGAAAGAAAGTTAAGCAGCAGCCGATCCGAGAGTCTCTGAGA
DC06022C08 .....C.....G.....A.....

          250  260  270
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DC03020F09 AAGTCATGTCCCTCAGCTGTTCGGTCTAATTGA
DC06022C08 .....A.....G.....

```

Appendix 4. Continued

glycine rich protein_AB007818_1

nucleoside diphosphate kinase

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DC03018B10 ATGGAAACAGACCTTCATCATGATTAAGCCTGATGGGTGTTCAAAGAGGCCTGGTGGTGAAGTTATTGGCAGATTTGAGAA
DC01024610 -----
DC02085B02 -----
DC05018B06 -----

      90      100     110     120     130     140     150     160
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DC03018B10 GAAAGGTTTCACCTTGAAGGTTTGAAGCTCATTACTGTGGATCAGTCTTTTGTGAGAAAGCACTATGCTGACCTCTCCG
DC01024610 -----
DC02085B02 -----
DC05018B06 -----

      170     180     190     200     210     220     230     240
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DC03018B10 CAAAGACCTTTCCTCCGTTGGATTGGTTGACTATATTGTCCTGGTCCCTGTTGTTGCAATGGTTTGGGAGGGTAAAGATGTA
DC01024610 -----,G.CA.TCA...CAGC.A..CA.TTG-A.AGC.CA...AA.CA.A.TGC
DC02085B02 -----
DC05018B06 -----

      250     260     270     280     290     300     310     320
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DC03018B10 GTTAAGACTGGTCCGAAAGATTATGGTGGCAGACAAACCCCTGCAGATTCTGCCCCCTGGCACTATCCGTTGGTGAATTTGCTAT
DC01024610 TC.GT.GT.CCCA.A.G.CA.TGCA.AAT.G..G.----...CG.TCA.T.T...AT...CGA...AA.T.C..CG.G.
DC02085B02 -----
DC05018B06 -----

      330     340     350     360     370     380     390     400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DC03018B10 TGATATTGGCAGGAATGTCATTTCATGGCAGCGATGCAAGTTGAGAGCCCAAGGAAAGAAATTGCTCTGTGGTTCCAGAAAG
DC01024610 ...T...--.TA....T.CCTG..A.T-TT...TTC.CTCTC.CTTGTT.GG.....-ATGA.TT.GA.TGTG.T
DC02085B02 -----
DC05018B06 -----

      410     420     430     440
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DC03018B10 GCATTGCAGAAATGGCAGACAGCGTTCACTCTTGGATCTACGAGTGA
DC01024610 .G..AAT.C...AT.CT.A-----
DC02085B02 -----
DC05018B06 -----

```

Appendix 4. Continued

calmodulin

```

          10      20      30      40      50      60      70      80
4c03018e10  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
4c03027b01  ATGGCGGATCAAGCTCAAGGACGATCAGATCTCTGAGTTCAAGGAAAGCCCTTCAGCCCTATTGACAAAGGATGCGGATGTTG
4c04014E02  .....
4c04014H04  .....
4c05013B07  .....A.....C.....T.....
4c06004H05  .....C.....C..A.....G..T.....T.....T.....A.....
4c06005C01  .....
4c06012G11  .....A.....C.....T.....

          90      100     110     120     130     140     150     160
4c03018e10  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
4c03027b01  CATCACTACCAAGGAGCTTGGGACTGTGATGAGGTCCTAGGCGAAGACCCACTGAGGCTGAACTCCAGGATATGATAA
4c04014E02  .....T.....
4c04014H04  .....T.....
4c05013B07  .....T.....A.....T..T..C.....T.....
4c06004H05  T.....T.....A..C.....C..T..A.....T..A.....G..T.....C.....C..
4c06005C01  .....G.....T.....
4c06012G11  .....T.....A.....T..T..C.....T.....

          170     180     190     200     210     220     230     240
4c03018e10  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
4c03027b01  ATGAAATGGATGCTGATGGTAATGGAAACCATCGACTTTCCTGAGTTCCCTTAATCTCATGGCCAGGAGATGAAAGATACT
4c04014E02  .....C.....
4c04014H04  .....C.....
4c05013B07  .....T..T..T.....A..C.....C.....
4c06004H05  ...G..T.....G.....C..T..T..T.....T..G..C..G.....T..A.....C..A.....
4c06005C01  .....C.....
4c06012G11  .....T..T..T.....A..C.....C.....

          250     260     270     280     290     300     310     320
4c03018e10  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
4c03027b01  GACTCGAAGAGGAGCTGAAAAGAGGCATTCGAGTTTTGACAAAGATCAGAATGGTTTCATTCTGCTGCTGAGCTGGC
4c04014E02  .....G.....
4c04014H04  .....G.....
4c05013B07  .....G.....C.....G.....T.....
4c06004H05  ...T..G.....C..G..A..T.....G..A.....C.....C.....C.....A.....A..T..
4c06005C01  .....G.....
4c06012G11  .....G.....C.....G.....T.....

          330     340     350     360     370     380     390     400
4c03018e10  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
4c03027b01  CCATGTCATGAOCCAACCTGMSGGAGAGCTTACTGATGAAGAAGTTGACGAGATGATACGGGAGGC-TGATGTTGATGGC
4c04014E02  .....N.....
4c04014H04  .....
4c05013B07  .....T..T.....C..T.....A.....T.....
4c06004H05  ...T..T..T..C..T.....G.....G.....T.....T..T.....G.....T.....
4c06005C01  .....
4c06012G11  .....T..T.....C..T.....A.....C.....

          410     420     430     440     450
4c03018e10  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
4c03027b01  GATGGCCAGATCAATTATGAAGAATTTGTTAAGGTGATGATGGCCAAAGTGA
4c04014E02  .....N.....
4c04014H04  .....C.....
4c05013B07  .....G.....C..A.....T.....
4c06004H05  ..C..G..A.....C..C..G..G..C..C.....C.....
4c06005C01  .....
4c06012G11  .....

```


주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.