

인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 Microsatellite 마커에 대한 유전적 다형성과 특성 규명

박선화 · 현영세 · 정기화*

공주대학교 생명과학과

(2009년 8월 11일 접수; 2009년 9월 14일 수정; 2009년 9월 18일 수리)

Genetic Polymorphism of Microsatellite Markers in *Panax ginseng* C.A. Meyer

Sun Wha Park, Young Se Hyun and Ki Wha Chung*

Department of Biological Science, Kongju National University, Gongju, Chungnam 314-701, Korea

(Received August 11, 2009; Revised September 14, 2009; Accepted September 18, 2009)

Abstract : Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) is one of the most important medicinal plants in East Asia. Microsatellite or simple sequence repeat (SSR) markers are used in obtaining genetic analysis and authentication in many plants. The present study examined five microsatellites in conjunction with *P. ginseng* in Korea. The total observed allelic number was 17 (mean = 3.4), and gene diversities varied from 0.078 to 0.543 with an average of 0.314. Through a combined analysis of five loci in 100 ginseng samples, 44 different combined genotypes were observed. Expected and observed heterozygosities ranged from 0.077 to 0.541 (mean = 0.313) and 0.040 to 0.130 (0.083), respectively. All examined loci exhibited deficiency of heterozygosity and deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium. Such results may be explained by the non-random mating and inbreeding that has occurred for several hundred years. These microsatellite markers could be used for the study of molecular genetics and the establishment of DNA marker database, as well as authentication of ginseng species and chromosomal mapping of QTL loci in *P. ginseng*.

Key words : *Panax ginseng*, microsatellite, simple sequence repeats (SSR), polymorphism

서 론

인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 다년생 초본류로서 오래 전부터 동양에서는 매우 중요한 약용식물로 알려져 왔는데, 노화방지, 고혈압억제, 항암, 항산화, 미백 및 항스트레스 효과가 보고되어 왔다.¹⁾ 인삼류의 정확한 식별 (authentication)을 위해서는 사포닌 성분과 같은 주요 성분의 정량·정성적 분석이 활용될 수 있지만, 재배 환경이나 가공 공정에 따라 성분의 함량이나 종류의 변화가 초래되므로 종 식별의 신뢰도를 떨어뜨리는 요인으로 작용하고 있다.²⁾ 또한 뿌리의 형태적 분류도 원형이 보존되지 않은 절편이나 다른 성분과 섞인 혼합체로 존재할 경우 적용이 어렵다. 따라서 인삼의 근 연종을 정확히 구분할 수 있는 종-특이적 유전적 마커의 개발

이 중요해졌다.

인삼의 유전적 마커 개발에 대한 연구는 인삼 종들의 rRNA 유전자 서열의 차이에 기초한 PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP)의 이용을 시작으로,^{3,4)} randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)와 amplified fragment length polymorphism (AFLP)를 통해 인삼과 화기삼 (*Panax quinquefolius*) 사이의 차이를 분석하거나, 인삼의 분자유전학적 특성을 규명하는 연구가 수행되어졌다.⁵⁻⁷⁾ Fushimi 등 (1997)은 *Panax* 속 3 종에 대해 DNA 수준에서의 동정을 위해 18S rRNA 유전자 서열의 차이에 기반하여 PCR-RFLP와 mutant allele specific amplification (MASA)를 수행하여 각 종을 서로 구분할 수 있음을 보고하였다.³⁾ Ngan 등 (1999)은 *Panax* 속 6 종과 인삼류의 혼합물에 대해 ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 서열의 RFLP를 수행하여 *P. ginseng*과 *P. quinquefolius*를 구분하였다.⁴⁾ Um 등 (2001)은 RAPD와 PCR-RFLP를 수행하여 인삼 개체간에 서로 다른

*Corresponding author. E-mail: kwchung@kongju.ac.kr
Phone: 041-850-8506, Fax: 041-854-8505

DNA 지문 (DNA fingerprinting)을 얻은 바 있다.⁵⁾ Shao 등 (2004)은 인삼의 RAPD를 위한 18 개의 random primer를 제작하였으며,⁸⁾ Lim 등 (2007)은 북미에 서식하는 야생 화기삼 (*P. quinquefolius*) 집단에서 유전적 다양성을 조사하여 집단 특이적 RAPD marker들을 개발한 바 있다.⁹⁾ Shim 등 (2005)은 gradient PCR과 RFLP를 수행하여 여러 약용 식물의 혼합체로부터 인삼을 동정하였다.¹⁰⁾ Diao 등 (2009)은 상업적으로 유통되는 복합약제의 혼합물로부터 5S rDNA 서열에 기반한 PCR-RFLP와 amplification refractory mutation system (ARMS) 방법을 적용하여 *P. ginseng*의 존재를 입증하기도 하였다.¹¹⁾ 그렇지만, RAPD나 RFLP와 같은 마커들은 충분한 숫자의 좌위들이 유전체상에 분포하지 않으며, 민감도, 신뢰성, 변별력, 및 재현성 (reproducibility)이 낮은 경우가 많아 실제 적용이 어려운 경우가 허다하다.

Simple sequence repeats (SSR)로도 불리는 microsatellite는 개체식별을 위한 가장 유용한 유전적 마커로 알려졌는데, microsatellite는 유전체 상의 매우 빈번한 분포, 높은 변별력과 재현성, 그리고 근연종 간의 교차 적용성 (cross-species transferability)으로 어떤 유전적 마커보다 우수함이 밝혀졌다.¹²⁾

인삼의 microsatellite에 대한 개발은 다른 마커들에 비해 늦게 이루어져, 최근에 와서야 인삼의 microsatellite 들이 보고되고 있는 실정이다.¹³⁻¹⁶⁾ Kim 등 (2007)과 Ma 등 (2007)은 인삼에 대한 microsatellite-enriched genomic library 제작과 스크린을 통해 microsatellite를 동정하였으며,^{13,14)} Van Dam 등 (2009)은 BAC genomic library의 end-sequence 분석으로부터 microsatellite 서열을 분리하였다.¹⁶⁾ 또한 Kim 등 (2007)과 Van Dam 등 (2009)은 대부분의 동정된 마커들이 화기삼 (*P. quinquefolius*)에서도 교차 적용이 가능함을 보였다.^{13,16)} 그러나 Jo 등 (2009)은 인삼의 재배품종 (cultivars)과 야생 산삼간에 microsatellite의 대립유전자 분포도에서 유의적 차이가 없음을 보고하였다.¹⁵⁾ Hon 등 (2003)은 화기삼으로부터 분리한 microsatellite의 분석에서 인삼 (*P. ginseng*)과 화기삼 (*P. quinquefolius*)이 서로 구분이 가능할 수 있음을 시사하였고,²⁾ Kim과 Lee (2004)는 인삼의 엽록체 유전체로부터 종 특이적 변이를 보인 18 개의 SSR marker를 보고하였다.¹⁷⁾

최근 국내 인삼에 대한 microsatellite 연구가 일부 수행되었지만, 여전히 미흡한 수준이다.¹³⁻¹⁷⁾ 본 연구자들은 먼저 수행된 연구에서 인삼의 genomic microsatellite-enriched library의 스크린을 통해 251 개의 microsatellite 서열을 동정한 바 있다.¹³⁾ 본 연구에서는 국내 경작지나 인삼시장에서 유통되는 인삼의 유전적 특성을 규명하기 위해, 5 개의 다형

성 microsatellite 마커를 선별하여 대립유전자 빈도 및 유전자형 분포도를 조사하고, 각 마커의 특성을 규명하였다.

재료 및 방법

인삼 시료의 수집 및 DNA 추출

인삼 (n=100)의 뿌리 또는 잎은 Jo 등 (2009)에서 사용한 것과 동일한 시료로서, 청양, 당진, 금산, 공주, 대전, 파주, 강화, 대구, 서울의 재배 농가 및 시장을 통해 수집하였다.¹⁵⁾ 인삼 식물체의 조직 일부를 막자 사발에 넣고 액체질소로 냉각시킨 후 미세한 분말이 되도록 파쇄하였으며, 총 DNA는 분말로부터 DNeasy plant DNA isolation kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 정제하였다.

Microsatellite 마커의 PCR 증폭

PCR은 10-20 ng의 인삼 DNA를 주형으로 하여 0.5 pmole primer, 200 μ M dNTPs, 2 mM MgCl₂, 0.5 unit *Taq* DNA polymerase (Promega, USA) 및 1X buffer를 포함한 20 μ L의 반응 혼합액을 제조한 후, GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 수행하였다. PCR을 위한 마커 특이적 primer로 PG770, PG946 및 PG1663는 Kim 등 (2007)의 방법을 따랐으며,¹³⁾ PG186과 PG1419는 microsatellite motif의 flanking sequence를 이용하여 새롭게 제작하거나 변형시켜 사용하였다 (Table 1). PCR은 95°C에서 5 분간 초기변성 후, 94°C 30 초 변성, 58-60°C 30 초 결합, 및 72°C 1 분 신장의 조건으로 32 cycle을 수행하고, 마지막으로 72°C에서 7 분간 최종 신장 반응을 수행하였다.

변성 polyacrylamide 겔 전기영동 및 silver staining

Microsatellite 마커 가운데 PG186, PG770, PG946, 및 PG1663에 대해서는 PCR 증폭 후, 변성 polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)와 질산은 염색법 (silver staining)으로 유전자형을 결정하였다. 전기영동에 사용한 겔은 5% polyacrylamide (acrylamide : bisacrylamide = 19 : 1)와 1X TBE buffer에 7 M urea가 포함되도록 하였다 (두께 0.4 mm × 길이 40 cm). PCR 산물은 같은 양의 2X STR loading buffer (Promega, USA)와 섞고, 95°C로 2 분간 가열한 후 즉시 얼음에 담근 뒤, 예열된 겔에 주입하고 1600 V로 2-4 시간 동안 영동하였다. DNA 밴드는 silver staining kit (Promega, USA)를 사용하여 질산은 염색을 실시하였다.¹⁸⁾ 전기영동이 끝난 겔은 10% ethanol에 20 분간 고정시킨 후, 1% HNO₃ 용액에 10 분간 담그고, 이어

Table 1. Primer sequences, repeat motifs, allele number, and PCR sizes of five microsatellite markers in *P. ginseng*

Marker	Primer (5' → 3')	Repeat motif	Size (bp)	Allele No.	GenBank Acc. No.
PG186	F : ATGCTCGGACTCAGTCCAATCA R : TACCACTATTCTCCATCTCTCAC	(AGG) _n	291-230	3	EU401708
PG770	F : CCTCTTTGGGGCAGGGATATTTG R : CCAGCAAACCCAAACCCTCCTC	(ATC) _n	269-272	2	EF140896
PG946	F : GAATCGAAGTGTTAAGTTGAT R : CTTAAATCGATGATAACACC	(TG) _m N ₂₄ (AG) _n	250-258	3	EF200587
PG1419	F : CTAGCAGGCACGAGAGAGAGATG R : GATACCCAGGCAGTCTGATGAC	(AG) _m (AAAG) _n	101-115	5	EF140898
PG1663	F : CTACACGCTTTTTCATAGCTTACA R : TGTCTGCATAAAAGAGTTCGAGGC	(CTCCTTT) _n	171-185	4	EF140900

staining solution (silver nitrate 1 g, 37% formaldehyde 1.5 ml/L)에 30 분간 부드럽게 흔들어 주면서 반응시킨 후 증류수로 가볍게 행구어 주었다. 그 후 겔을 developing solution (sodium carbonate 30 g, 37% formaldehyde 900 μL, 1% sodium thiosulfate 500 μL/L)을 처리하여 밴드가 나타날 때까지 반응시키고, 10% acetic acid로 반응을 중단시켰다.

형광 표지 primer와 자동 염기서열 분석기를 이용한 타이핑

PG1419 마커는 한쪽 primer에 6-FAM으로 형광 표지한 후, 위에서와 동일한 방법으로 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 Hi-Di formamide와 GenScan-500 (LIZ) size standard와 혼합하고, 자동 염기서열 분석기인 ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)를 이용하여 분리한 후, 유전자형은 Genotyper program (ver. 3.7)을 사용하여 결정하였다.

통계적 분석

대립유전자의 빈도는 각 시료로부터 얻어진 유전자형으로부터 계산하였다. 각 좌위에 대한 Hardy-Weinberg 평형과 좌위 간 연관불평형 상태는 Lewis의 Genetic Data Analysis program (GDA, <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>)을 이용한 Fisher's exact test로 확인하였다. Power of exclusion (PE), polymorphic information content (PIC), probability of match (PM), 및 power of discrimination (PD)은 PowerStatsV12 program (<http://www.promega.com/geneticidtools>)으로 계산하였다. Genetic diversity (GD)는 Nei (1973)의 공식 $GD = n(1 - \sum P_i^2) / (n-1)$ 에 따라 결정하였으며, 이때, n은 개체수, P_i 는 얻어진 개체군 시료에서 얻어진 대립유전자의 빈도값이다.¹⁹⁾

결 과

유전자의 빈도와 분포

Microsatellite 5 좌위의 염기서열 분석을 통해 SSR 반복구조를 결정하고 반복 횟수를 기준으로 각 대립유전자를 명명하였다 (Fig. 1). PG186과 PG770은 각각 (AGG)_n과 (ATC)_n의 3염기 단순 반복이었으며, PG1663은 (CTCCTTT)_n의 7염기 반복 구조를 보였다. PG946과 PG1419는 각각 (TG)_mN₂₄(AG)_m과 (AG)_m(AAAG)_n으로 복합 반복 (complex repeats) 구조를 보였다.

각 좌위의 대립유전자 빈도 및 통계적 수치들은 Table 2에 보여주고 있다. PG1663은 한 개체에서 3 개의 대립유전자를 보이는 경우도 있어 중복 좌위로 추정되었으나, 각각의 좌위를 분리하는 것이 불가능하여 유전자형 분포도만 나타내었고, 다른 4 좌위에 대해서는 대립유전자의 빈도 및 분포의 다양한 통계적 분석을 수행하였다. PG1419는 가장 많은 5 개의 대립유전자를 보였고, 다음으로 PG1663은 4 개의 대립유전자를 보였으며, PG770은 단지 2 개의 대립유전자만이 관찰되었다. 전체적으로 총 17 개 대립유전자가 관찰되어 좌위당 평균 3.4 개의 대립유전자가 관찰되었다. 유전적 다양성 (GD)은 PG770에서 0.078로 가장 낮았으며, PG1419에서 가장 높은 0.543으로 계산되었다 (mean = 0.314). 다형성 정도의 척도인 PIC는 PG1419가 0.460으로 가장 높았고, 이어 PG186 (0.364), PG946 (0.150), PG770 (0.070) 순으로 나타났다 (mean = 0.261). 변별력의 척도인 PD값 역시 가장 많은 대립유전자를 보여준 PG1419가 0.620으로 가장 높았고, PG770은 0.114로 가장 낮게 나타났다.

PG1663 좌위를 제외한 나머지 4 개의 좌위들의 예상 이형접합도 (H_{exp})는 0.077에서 0.541 (mean = 0.313)로 계산되었으나, 관측 이형접합도 (H_{obs})는 0.040에서 0.130 (mean = 0.083)으로 H_{exp} 보다 훨씬 낮게 나타나 동형접합자의 비율이 매우 높음을 알 수 있었다 (Fig. 2). 또한 유전자

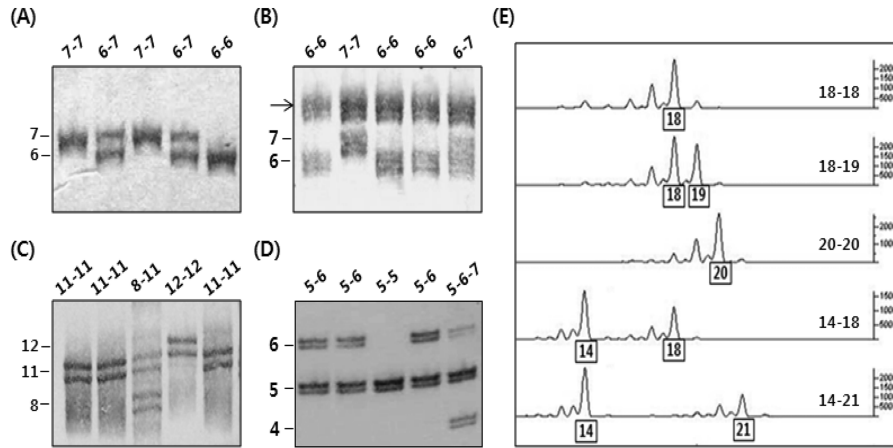


Fig. 1. Microsatellite markers in *P. ginseng*. PG186, PG770, PG946, and PG1663 were amplified with non-labeled primers, and the PCR products were separated on the denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and visualized by the silver staining. PG1419 was amplified using the FAM-labeled primer, and the PCR products were analyzed using the automatic sequencer. Allelic names were basically followed by the repeat numbers. Numbers on the top of the gels (A-D) or on the right side of chromatograms (E) indicate genotype of each sample. (A) PG186, (B) PG770 (Arrow indicates a monomorphic band), (C) PG946, (D) PG1663, and (E) PG1419.

Table 2. Allele frequencies and statistical values of five microsatellites in *P. ginseng*

Allele	PG186	PG770	PG946	PG1419	Genotype	PG1663
4					4	0.01
5					5	0.03
6	0.630	0.960			6	0.02
7	0.365	0.040			4-5	0.13
8			0.040		5-6	0.70
9	0.005				5-7	0.02
11			0.915		4-5-6	0.09
12			0.045			
14				0.030		
18				0.595		
19				0.325		
20				0.035		
21				0.015		
$H_{exp}^{1)}$	0.472	0.077	0.160	0.541		-
$H_{obs}^{2)}$	0.130	0.040	0.040	0.120		-
HWE ³⁾	>0.001	0.005	>0.001	>0.001		-
PIC ⁴⁾	0.364	0.070	0.150	0.460		-
PE ⁵⁾	0.014	0.001	0.001	0.012		-
PM ⁶⁾	0.429	0.886	0.813	0.380		-
PD ⁷⁾	0.571	0.114	0.187	0.620		-
GD ⁸⁾	0.475	0.078	0.161	0.543		-

¹⁾ H_{exp} : expected heterozygosity, ²⁾ H_{obs} : observed heterozygosity, ³⁾HWE: Hardy-Weinberg equilibrium, ⁴⁾PIC: polymorphism information contents, ⁵⁾PE: power of exclusion, ⁶⁾PM: matching probability, ⁷⁾PD: power of discrimination, ⁸⁾GD: gene diversity.

형의 분포는 4 좌위 모두에서 Hardy-Weinberg 평형상태에서 벗어났으며 ($P < 0.005$), 모든 좌위는 서로간에 연관불평형 (linkage disequilibrium) 상태에 있는 것으로 조사되었다 ($P < 0.001$).

복합 유전자형 및 이중 좌위의 분석

인삼 100 개체에 대해서 5 좌위의 복합유전자형 (combined genotype)을 분석한 결과 44 개의 서로 다른 복합유전자형이 관찰되었으며, 그 중 32 개는 한 개체에서만 관찰된 유일한

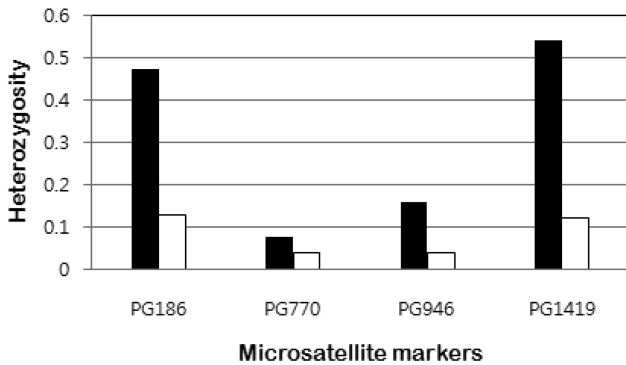


Fig. 2. Comparison of expected and observed heterozygosities of the examined microsatellites in population of *P. ginseng* in Korea (■: H_{exp}; □: H_{obs}).

복합유전자형으로 조사되었다. 가장 높은 빈도로 관찰된 복합 유전자형은 “6/6-6/6-11/11-18/18-5/6”으로 총 21 개체에서 나타났으며, 그 다음으로는 “7/7-6/6-11/11-18/18-5/6”이 12 개체에서 관찰되었다.

PG1663은 총 100 개체 중 9개에서 3개의 대립유전자가 관찰되었다 (Fig. 1D). 각 좌위의 DNA 밴드에 대해 염기서열을 결정하였는데, 반복 부위 외에는 서열의 변이성이 관찰되지 않았다. 이것은 인삼의 유전체 상에는 동일 서열의 PG1663 좌위가 2 곳에 존재하는 것으로 추정하게 한다. PG770의 경우, 아래의 변이를 보이는 밴드 외에도 언제나 위쪽에 동일한 크기의 밴드가 존재하는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 1B). 아마도 유사한 서열의 비다형성 좌위가 유전체의 다른 곳에도 존재하는 것으로 추정되었다. PG1419의 경우 Kim 등¹³⁾이 사용한 primer를 사용할 경우 2 개의 다른 좌위가 동시에 증폭이 되었지만, 염기서열 분석을 토대로 서로 다른 flanking sequence를 기준으로 특이적 primer를 제작하여 PCR을 수행한 결과 단일 좌위만을 깨끗하게 증폭할 수 있었다 (Fig. 1E).

고 찰

본 연구에서 개발한 5개의 microsatellite 마커들의 평균 대립유전자 수는 3.4 개였으며, 평균 GD는 0.314 였다. 전체적으로 볼 때, PG1419가 가장 높은 다형성을 보였으며 (PIC: 0.460, GD: 0.543), PG770은 가장 낮은 다형성을 나타내었다 (PIC: 0.070, GD: 0.078). 전반적으로 각 마커의 변별력은 높은 수준으로 볼 수는 없지만, 본 연구에서 조사한 5 좌위의 유전자형을 동시에 나타내는 복합유전자형을 조사하였을 때는 44 개의 서로 다른 복합유전자형이 관찰되었다. 각 좌위가 독립적임을 전제하여 결합 일치율(combined PM)을

계산하였을 때, 1.01×10^{-2} 에서 1.36×10^{-7} 로 상당한 변별력을 보임을 알 수 있었다. 기존에 보고된 microsatellite 마커나 앞으로 개발될 새로운 microsatellite 좌위들과 동시에 분석한다면, 각 개체간의 변별력은 훨씬 높아질 것으로 예상된다.

본 연구에서 조사한 5 마커 중 통계적 분석을 수행하지 않은 PG1663을 제외한 나머지 4 마커에서 대립유전자 빈도는 모두 H_{exp} (mean = 0.313)에 비해 H_{obs} (mean = 0.083)에 훨씬 낮은 값을 보여 높은 이형접합자의 결핍을 보였으며 (Fig. 2), 또한 모든 좌위의 대립유전자 분포가 Hardy-Weinberg 평형상태에서 있지 않음을 보여 주었다. 이와 같은 결과는 Jo 등 (2009)의 결과와 잘 일치하는 것으로서, 인삼은 자가수분율이 높으며, 수백년 동안 씨앗을 수확하여 이를 다시 심는 재배 방식의 비임의 교배가 이루어진 결과로 사료된다.¹⁵⁾ 즉, 역사적 기록을 통해보면 인삼의 재배가 15세기경부터 시작되었고, 오랜 기간 동안 농부들에 의해 우수한 개체를 제한적 및 선택적으로 교배를 시킴으로써, 국내 재배 인삼 집단의 유전적 동질화 (isogenic state)가 상당히 진행된 것으로 추정된다. 또한 본 연구에서 4 좌위들이 서로간에 연관 불평형 상태에 있는 것으로 조사되었는데, 이런 불평형은 모든 좌위들이 하나의 염색체에 분포하기 보다는 오랜 기간에 걸친 제한적 교배나 초기 인삼의 재배가 야생 집단으로부터 일부 작은 그룹에서 유래함으로써 일어난 유전적 부동 (genetic drift)에 기인할 가능성이 높다.²⁰⁾ 그런데 본 연구의 결과와는 다르게, 인삼의 microsatellite 좌위에서 H_{exp}가 오히려 H_{obs}보다 더 높게 나타나거나,¹⁴⁾ 조사된 모든 좌위가 Hardy-Weinberg 평형상태에 있음이 보고되기도 하였으므로,¹⁶⁾ 앞으로 인삼 집단에 대한 추가적인 연구가 요구된다. 아울러 이미 확립된 재배 인삼의 8 품종에 따른 microsatellite의 유전적 다형성의 유의적 차이성이 있는지도 조사할 필요성이 있다.

최근에 *Panax* 속 종의 신속한 동정을 위해 PCR-STR 방법이 결부된 microchip electrophoresis 방법이 발표되었는데, chip을 이용한 microsatellite에 대한 분석에서 *P. quinquefolius*는 *P. ginseng*과 다른 electropherogram을 보였으며, 또한 미국 재배삼과 야생삼을 대립유전자 크기에 따라 구분하였다.²¹⁾ 앞으로 미세 DNA chip이나 multiplex PCR법 등을 인삼에 대한 microsatellite의 유전자형 분석에 적용한다면, 훨씬 정확하고 신속한 타이핑이 가능해질 것이다.

요즘 세계적으로 자국에서 생산되는 주요 농산물의 microsatellite 마커를 동정하고 타이핑 결과를 DB화 하는 경향으로 나가고 있다.²²⁻²⁴⁾ 국내에서는 벼 및 고추 등에 대한 microsatellite에 대한 연구가 진행되고 있지만, 세계적 경쟁력을 가진 약용작물인 인삼에 대한 microsatellite의 연구 및 종합적 데이터베이스화는 아직 초보적 수준이다. 본 연구에서

개발한 인삼의 microsatellite 마커들은 인삼의 분자유전학적 연구 및 분자적 마커의 데이터베이스 확립의 자료로 활용될 뿐 아니라, 인삼의 분자적 식별법 및 주요 QTL 좌위의 염색체지도 작성에 유용하게 활용될 것이다.

요 약

인삼에 대한 microsatellite 개발은 다른 분자적 마커들에 비해 늦게 이루어져, 최근에 와서야 인삼의 microsatellite 들이 보고되고 있는 실정이다. 본 연구에서는, 분리된 microsatellite들 중에서 5 개의 다형성 마커를 선별하여 국내 경작지나 시장에서 유통되는 인삼을 대상으로 유전적 다형성을 조사하고, 각 마커의 특성을 규명하였다. 유전자형 분석은 변성 PAGE와 silver staining법으로 하거나 형광표지 primer로 표지한 PCR 산물을 자동 염기서열 분석기로 분석하였다. 본 연구에서 개발한 5개의 microsatellite 마커들의 평균 대립유전자 수는 3.2 개였으며, 평균 GD는 0.367 였다. 전체적으로 볼 때, PG1419가 가장 높은 다형성을 보였으며 (PIC: 0.460, GD: 0.543), PG770은 가장 낮은 다형성을 나타내었다 (PIC: 0.070, GD: 0.078). 각 좌위들의 예상 이형접합도 (H_{exp})는 0.077에서 0.541 (mean = 0.313)로 계산되었으나, 관측 이형접합도 (H_{obs})는 0.040에서 0.130 (mean = 0.083)으로 훨씬 낮게 관찰되었으며, 유전자형의 분포는 Hardy-Weinberg 평형상태에서 벗어남을 보였다. 본 연구에서 개발한 인삼의 microsatellite 마커들은 인삼의 분자적 마커의 데이터베이스 확립의 기초 자료로 활용될 뿐 아니라, 인삼의 분자적 구별법 및 QTL 좌위의 염색체지도 작성에 유용하게 활용될 것이다.

감사의 말씀

이 논문은 농림수산식품부의 농림기술개발사업 (ARPC grant No: 109092-03)의 지원에 의하여 연구되었습니다.

인용문헌

- Nam, KY. Recent Korean Ginseng (Components and Efficacy). Korea Tobacco & Ginseng Research Institute. Taejeon. Korea (1996)
- Hon CC, Chow YC, Zeng FY, Leung FC. Genetic authentication of ginseng and other traditional Chinese medicine. Acta Pharmacol Sin. 24: 841-846 (2003)
- Fushimi H, Komatsu K, Isobe M, Namba T. Application of PCR-RFLP and MASA analyses on 18S ribosomal RNA gene sequence for the identification of three ginseng drugs. Biol Pharm Bull. 20: 765-769 (1997)
- Ngan F, Shaw P, But P, Wang J. Molecular authentication of *Panax* species. Phytochemistry 50: 787-791 (1999)
- Um JY, Chung HS, Kim MS, Na HJ, Kwon HJ, Kim JJ, Lee KM, Lee SJ, Lim JP, Do KR. Hwang WJ, Lyu YS, An NH, Kim HM. Molecular authentication of *Panax ginseng* species by RAPD analysis and PCR-RFLP. Biol Pharm Bull. 24: 872-875 (2001)
- Ha WY, Shaw PC, Liu J, Yau FC, Wang J. Authentication of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* using amplified fragment length polymorphism (AFLP) and directed amplification of minisatellite region DNA (DAMD). J Agric Food Chem. 50: 1871-1875 (2002)
- Shim YH, Choi JH, Park CD, Lim CJ, Cho JH, Kim HJ. Molecular differentiation of *Panax* species by RAPD analysis. Arch Pharm Res. 26: 601-605 (2003)
- Shao AJ, Li X, Huang LQ, Wei JH, Lin SF. Genetic analysis of cultivated ginseng population with the assistance of RAPD technology. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 29: 1033-1036 (2004)
- Lim W, Mudge KW, Weston LA. Utilization of RAPD markers to assess genetic diversity of wild populations of North American ginseng (*Panax quinquefolium*). Planta Med. 73: 71-76 (2007)
- Shim YH, Park CD, Kim DH, Cho JH, Cho MH, Kim HJ. Identification of *Panax* species in the herbal medicine preparations using gradient PCR method. Biol Pharm Bull. 28: 671-676 (2005)
- Diao Y, Lin XM, Liao CL, Tang CZ, Chen ZJ, Hu ZL. Authentication of *Panax ginseng* from its adulterants by PCR-RFLP and ARMS. Planta Med. 75: 557-560 (2009)
- Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res. 17: 6463-6471 (1989)
- Kim J, Jo BH, Lee KL, Yoon ES, Ryu GH, Chung KW. Identification of new microsatellite markers in *Panax ginseng*. Mol Cells 24: 60-68 (2007)
- Ma K-H, Dixit A, Kim Y-C, Lee D-Y, Kim T-S, Cho E-G, Park Y-J. Development and characterization of new microsatellite markers for ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). Conserv Genet. 8: 1507-1509 (2007)
- Jo BH, Suh DS, Cho EM, Kim J, Ryu GH, Chung KW. Characterization of polymorphic microsatellite loci in cultivated and wild *Panax ginseng*. Genes Genomics 31: 119-127 (2009)
- Van Dan N, Ramchiary N, Choi SR, Uhm TS, Yang T-J, Ahn I-O, Lim YP. Development and characterization of new microsatellite markers in *Panax ginseng* (C.A. Meyer) from BAC end sequences. Conserv Genet. In press (2009)

17. Kim KJ, Lee HL. Complete chloroplast genome sequences from Korean ginseng (*Panax schinseng* Nees) and comparative analysis of sequence evolution among 17 vascular plants. *DNA Res.* 11: 247-261 (2004)
18. Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 196: 80-83 (1991)
19. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 3321-3323 (1973)
20. Ohta T, Kimura M. Linkage disequilibrium at steady state determined by random genetic drift and recurrent mutation. *Genetics* 63: 229-238 (1969)
21. Qin J, Leung FC, Fung Y, Zhu D, Lin B. Rapid authentication of ginseng species using microchip electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Anal Bioanal Chem.* 381: 812-819 (2005)
22. Kantety RV, La Rota M, Matthews DE, Sorrells ME. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Mol Biol.* 48: 501-510 (2002)
23. Kraic J, Gregová E, Jomová K, Hudcovicová M. Microsatellite markers discriminating accessions within collections of plant genetic resources. *Cell Mol Biol Lett.* 7: 745-751 (2002)
24. Sharopova N, McMullen MD, Schultz L, Schroeder S, Sanchez-Villeda H, Gardiner J, Bergstrom D, Houchins K, Melia-Hancock S, Musket T, Duru N, Polacco M, Edwards K, Ruff T, Register JC, Brouwer C, Thompson R, Velasco R, Chin E, Lee M, Woodman-Clíkeman W, Long MJ, Liscum E, Cone K, Davis G, Coe EH Jr. Development and mapping of SSR markers for maize. *Plant Mol Biol.* 48: 463-481 (2002)