

STS 마커를 이용한 고려인삼 품종 및 육성계통 판별

조익현*¹ · 신미란*¹ · 김영창* · 이승호* · 김장욱* · 문지영** · 노봉수*** · 강성택**** · 이동진****
현동운* · 김동휘* · 김기홍* · 방경환*[†]

*농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부, **국립농산물품질관리원 시험연구소,
서울여자대학교 식품공학과, *단국대학교 식량생명공학과

Discrimination of Korean Ginseng Cultivars by Sequence Tagged Sites (STS) Markers

Ick Hyun Jo*¹, Mi Ran Shin*¹, Young Chang Kim*, Seung Ho Lee*, Jang Uk Kim*, Ji Young Moon**,
Bong Soo Noh***, Sung Taek Kang****, Dong Jin Lee****, Dong Yun Hyun*, Dong Hwi Kim*,
Kee Hong Kim* and Kyong Hwan Bang*[†]

*Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 369-873, Korea.

**Experiment Research Institute of National Agricultural Products Quality Management
Service, MFAFF, Seoul 150-043, Korea.

***Department of Food Science and Technology, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea.

****Department of Crop Science and Biotechnology, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea.

ABSTRACT : Korean ginseng (*P. ginseng* C. A. Meyer) is one of the most important medicinal plant in the world. Understanding genetic variability among the assortment of Korean ginseng is important for breeding. The aim of this study was to molecularly characterize Korean ginseng cultivar and breeding lines through the use of eight previously reported STS markers (MFGp183, MFGp130, MFGp110, UFGp74, UFGp163, MFGp108, MFGp81 and UFGp156). All STS markers produced interpretable electropherograms from 31 accessions consisting of 11 Korean ginseng cultivars and 20 breeding lines. When eight STS markers were combined, we identified to total 19 genetic patterns; in particular, nine cultivars (Chunpoong, Yunpoong, Gopoong, Gumpoong, Sunpoong, Sunone, Cheongseon, Sunhyang, Cheonryang) and 5 breeding lines (G08012, G04079, G04075, G08036, G04110) in ginseng samples can be discriminated from the others. Together with other available markers, these STS markers will contribute to the management of ginseng genetic resources and the protection of breeders' rights.

Key Words : *P. ginseng*, Discrimination, Sequence Tagged Site, Cleaved Amplified Polymorphic Sequence

서 언

인삼은 오갈피나무과 (Araliaceae) *Panax*속에 속하는 다년생 초본으로서 한국, 중국, 시베리아 동부에 자생하며 면역 기능 강화, 자양강장, 원기 회복 등에 효과가 탁월하여 예로부터 동양의학에서 널리 이용되어 왔다 (Hu, 1976).

우리나라에서 인삼육종이 시작된 시기는 1920년대이며, 1970년대부터는 인삼 우량개체의 종자증식과 계통의 육성 및

우량계통의 생산력 검증 시험 등이 본격적으로 수행되었다 (Chung *et al.*, 1992; Choi *et al.*, 1979). 그리고 1980년대 이후에 선발된 육성계통 중에서 우수한 계통이 선정되어 산지 적응시험이 수행되었으며, 1990년대에 들어와서는 인삼 품종이 최초로 출원되었다. 국내 인삼 품종은 2002년에 천풍과 연풍이 품종으로 등록되었으며, 그 후 고품, 금풍, 선풍 등의 품종들이 잇달아 등록되기 시작 하였다 (Kwon *et al.*, 1991, 2000, 2001, 2003). 한편, 현재까지 우리나라에서 개발된 인삼

¹Jo IH and Shin MR contributed equally to this paper.

[†]Corresponding author: (Phone) +82-43-871-5534 (E-mail) bang31@korea.kr

Received 2013 September 4 / 1st Revised 2013 September 13 / 2nd Revised 2013 September 20 / 3th Revised September 24 / Accepted 2013 Revised September 24

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

품종은 천풍, 연풍, 고평, 금풍, 선풍, 선운, 선원, 선향, 청선, K-1, 천량의 11품종으로, 이들 품종 중에 현재 국내 인삼 농가에서 주로 재배되고 있는 것은 천풍, 연풍 및 금풍의 3 품종이다 (Bang *et al.*, 2011a). 인삼 육종에서 주로 활용되고 있는 순계분리에 의한 육종방법은 여건상 제한된 유전자원들로부터 우수형질을 선발하기 때문에 이로 인하여 품종 간의 유전적인 다양성이 작은 것으로 알려져 있다 (Bang *et al.*, 2011b). 또한 고려인삼의 신품종은 교잡이 아닌 선발육종에 의해 육성되어 왔으며, 신품종 등록 기준 또한 대조품종과의 질적형질의 차이를 바탕으로 하고 있어 전문가 아닌 이상 육안으로 품종을 식별하기 어려운 실정이다.

최근 분자생물학의 발달로 DNA를 이용한 분자 마커가 널리 이용되고 있다. 특히, 식물 분야에서는 연구목적과 원리, 적용성과 다형성 비율, 비용과 시간의 요구도 등에 따라 다양한 분자 마커들이 개발되고 있으며 그 종류로는 AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms), RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSRs (Simple Sequence Repeats, microsatellite), STS (Sequence Tagged Sites), CAPS (Cleaved Amplification Polymorphic Sequence) 등이 있다. 이중 STS 마커는 공우성이며 (co-dominant) 재현성과 안정성이 높고 유전체에 고르게 분포하고 있으며 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 기반으로 아가로스 겔 상에서 쉽게 확인 할 수 있을 뿐만 아니라, 분석 방법이 매우 간단하여 품종을 판별하고 유전자원을 평가하는데 효율적인 방법으로 알려져 있다. 또한 STS는 PCR 기반의 분자표지로 염기서열을 알고 있는 프라이머를 사용하여 특정 유전자 부위를 증폭하는 기술로 DNA 단편의 존재 유무 또는 길이의 변이로 나타나며, Olson 등 (1989)에 의해

처음으로 보고되었다. CAPS는 증폭된 PCR 산물에 제한효소를 처리하여 절단위치에 따른 DNA 단편의 크기 차이를 확인하는 방법으로 증폭구간 내 존재하는 SNP (Single Nucleotide Polymorphism)의 변이를 예측할 수 있다. STS-CAPS 마커는 콩 (Hwang *et al.*, 2012), 보리 (Talbert *et al.*, 1994; Blake *et al.*, 1996; Erpelding *et al.*, 1996), 무궁화 (Lee *et al.*, 2002), 텔피늄 (Li *et al.*, 2002) 등의 품종판별과 유전적 다양성 분석에 널리 활용되고 있다.

Bang 등 (2010)은 methylation filtering (MF) 기법을 이용하여 고려인삼의 연풍 품종으로부터 genomic DNA library를 구축하였고 이러한 정보를 기반으로 STS-CAPS 마커를 개발한 바 있다. MF 기법은 메틸화된 repetitive DNA를 제거하는 방법으로 유전자 영역의 클로닝 빈도를 높일 수 있는 방법으로 알려져 있으며 (Rabinowicz, 2003), 옥수수, 담배, 밀, 사탕수수 등에서 유전자 영역의 DNA library 구축에 성공적으로 활용된 바 있다 (Palmer *et al.*, 2003; Whitelaw *et al.*, 2003; Timko *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010).

따라서 본 연구는 기존에 개발된 STS 마커 8종을 인삼 11개 품종과 20개의 육성계통에 적용하여 이들의 판별 여부를 확인하였으며, 향후 국내 육성 품종, 육성계통 및 다양한 유전자원을 대상으로 이들의 유전적 다형성 분석, 구별성 및 균일성 검정 등에 활용하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 시험재료

본 연구에서 사용한 재료는 충청북도 음성군 소재 농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부 시험연구 포장에서 재배중

Table 1. Information of Korean ginseng cultivars and breeding lines used in this study.

No.	Name	Origin	Classification	No.	Name	Origin	Classification
1	Chunpoong	Korea	cultivar	17	G04058	Korea	breeding line
2	Yunpoong	Korea	cultivar	18	G04068	Korea	breeding line
3	Gopoong	Korea	cultivar	19	G04079	Korea	breeding line
4	Kumpoong	Korea	cultivar	20	G08010	Korea	breeding line
5	Sunpoong	Korea	cultivar	21	G08020	Korea	breeding line
6	Sunun	Korea	cultivar	22	G08089	Korea	breeding line
7	Sunone	Korea	cultivar	23	G08078	Korea	breeding line
8	Cheongsun	Korea	cultivar	24	G08042	Korea	breeding line
9	Sunhyang	Korea	cultivar	25	G08038	Korea	breeding line
10	Cheonryang	Korea	cultivar	26	G08034	Korea	breeding line
11	K-1	Korea	cultivar	27	G08085	Korea	breeding line
12	G03146	Korea	breeding line	28	G08055	Korea	breeding line
13	G04062	Korea	breeding line	29	G08039	Korea	breeding line
14	G04075	Korea	breeding line	30	G08036	Korea	breeding line
15	G04110	Korea	breeding line	31	G08031	Korea	breeding line
16	G08012	Korea	breeding line				

인 천풍, 연풍, 고품, 금풍, 선풍, 선운, 선원, 청선, 선향, K-1, 천량 등 11품종과 G08010 등 20계통을 대상으로 하였으며, 인삼의 연근 (年根)은 4년생을 기준으로 하였다 (Table 1).

인삼 본밭은 2008년 10월에 두둑 폭 90 cm, 고랑폭 90 cm, 두둑 높이 30 cm 이상으로 하여 만들었고, 2009년 7월에 7×10 주 (90×180 cm)를 식재거리 15×20 cm 로 하여 묘삼을 이식 하였다. 해가림시설은 인삼이 출아하기 전에 목재A형 후주연 결식으로 설치하였는데, 청색3+흑색1의 4중직 차광 망을 피복한 후, 5월 하순 고온장해 예방을 위해 흑색 2중직 차광 망을 덧씌워주었다. 병해충 방제, 잡초제거 및 기타 관리는 인삼 GAP 표준재배지침서에 준하였다 (Rural Development Administration, 2009).

2. DNA추출

인삼 식물체로부터 genomic DNA를 확보하기 위하여 4년생 잎을 채취하여 세척한 후 암실냉장 조건에서 하루 동안 보관하였다. 이후 액체질소로 급랭시켜 막자사발과 유봉을 이용하여 고온 분말 상태가 되도록 마쇄한 후, 분말 상태의 시료를 2 ml 튜브에 10 mg 넣고, 68°C로 미리 가열된 extraction buffer type-I 용액 300 µL (50 mM Tris, 25 mM EDTA 및 0.35M sorbitol), 5% sarcosyl 용액 50 µL, 5M NaCl 용액 60 µL 및 CTAB (8.6%) 35 µL를 넣어, 65°C 조건의 항온 수조에 30분 동안 처리하면서 시료가 멍치지 않도록 5분 간

격으로 흔들여 주었다. 다음 과정은 PIC (phenol 25:chloroform 24:isoamylalcohol 1) 용액을 600 µL 첨가하여 시료가 잘 섞이도록 1분 이상 inverting 시킨 후, 12,000 rpm으로 15분간 원심분리를 하였다. PIC 처리를 통해 분리된 상층액 450~500 µL를 새 튜브에 옮긴 후, 3M NaOAc (pH 5.2) 50 µL, Isopropyl alcohol 600 µL를 각각 넣어 펠릿이 생성 될 때까지 흔들여준 뒤 -70°C의 초저온 냉장고에 20분간 방치하여 펠릿을 응축시켰다. 응축된 펠릿을 확보하기 위하여 10°C에서 12,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 펠릿을 제외한 나머지 용액을 버린 후, 70% 에탄올 600 µL를 넣어 1분 이상 흔들여 주었으며, 12,000 rpm으로 2분간 원심분리 하여 에탄올을 버린 후 실온에서 펠릿을 건조 하였다. 완전히 건조된 펠릿은 0.5×TBE 버퍼를 100 µL 넣어 실온에서 잘 녹여주었다.

이러한 과정을 거쳐 추출된 DNA는 Nano Drop (Thermo Fisher Scientific, USA) 기기를 이용하여 농도를 측정하였으며, 농도 측정이 완료된 각각의 DNA 샘플들은 멸균된 증류수를 이용하여 최종 DNA 농도를 5 ng/µL로 정량하였다.

3. STS-CAPS 프라이머를 이용한 PCR 반응

국내 고려인삼 11품종과 20계통을 대상으로 이들이 유전적으로 구별되는지의 여부를 확인하기 위하여, Bang 등 (2010)이 개발한 8종의 STS marker를 이용하여 유전분석을 수행하

Table 2. STS primer sets for discriminating Korean ginseng cultivar.

gDNA Library			STS-primer			
Clone Information [†]			Primer Sequence [‡]		PCR Information	
ID	Insert Size(bp)	Gene Bank Acc.	Primer Name	Forward (5'→3') Reverse (5'→3')	Expected Size(bp)	Anneal. Temp.(°C)
MFG183	1002	HN339418	MFGp183	TGACCCTTTGCCTTTGATTC CTACGTTAGCGCATCCGTTT	281	65
MFG130	1124	HN339417	MFGp130	TTTTGCGACCCGACTATTTT AAATGCTGTCAAGCCCAGAG	322	65
MFG110	1129	HN339416	MFGp110	GTCCCAACGGAATTTTCATCA TTCCGCTTATGTTGCAGTTG	930	60
UFG74	717	HN339415	UFGp74	TGGCGAATTTACAGAATTAGA CACAGGTCTCGAAACAATTGAA	639	60
UFG163	1205	-	UFGp163	GTACCGAGAGCAGATCCTTTG TCAAACCCTAACGTTTAGCTG	933	60
MFG108	698	-	MFGp108	CAGCCCCATGAAATGTCTC ATTGGCTATCAGCTTGATTTG	655	60
MFG81	1230	-	MFGp81	GGGAGCTGATCCGGAGATAG GAGCGCTGCCGTATGTTTG	427	65
UFG156	913	-	UFGp156	AGGCTTGGTGAGGACATCAG TTGCCACCACTCCTTCTCTC	161	65

[†]gDNA library clones of *P. ginseng* cv. Yunpoong. For the clone IDs, the first two letter, MF and UF, stand for 'Methylation-filtered' and 'Methylation-unfiltered', respectively. [‡]STS primers were converted from gDNA library clones of *P. ginseng* cv. Yunpoong and were designed by Bang et al. (2010).

Table 3. Discrimination of 11 Korean ginseng cultivars and 20 breeding lines by STS marker combinations with different genotypes denoted as A~D.

NO. [†]	Primer									Genotypes
	MFGp 183	MFGp 130	MFGp 110_E	UFGp 74_E	UFGp 163	MFGp 108	MFGp 81	UFGp 156		
1	A	A	A	A	A	A	A	A	AAAAAAAA	
2	B	B	B	B	B	B	B	A	BBBBBBBA	
3	C	A	A	B	B	B	A	B	CAABBBAB	
4	D	A	B	B	B	B	A	A	DABBBBAA	
5	B	B	B	A	B	A	B	B	BBBABABB	
6	B	B	B	B	A	B	B	A	BBBBABBA	
7	D	B	A	B	A	B	B	A	DBABABBA	
8	D	A	B	B	A	B	A	A	DABBBBAA	
9	A	A	A	B	A	B	A	B	AAABABAB	
10	B	B	A	B	A	B	B	B	BBBABBBB	
11	B	B	B	B	A	B	B	A	BBBBABBA	
12	B	B	B	B	B	B	B	A	BBBBBBBA	
13	A	A	A	B	B	B	A	A	AAABBBAA	
14	A	A	B	B	B	B	A	A	AABBBBAA	
15	B	B	B	B	B	B	A	A	BBBBBBAA	
16	A	A	B	A	A	B	A	A	AABAABAA	
17	B	B	B	A	B	A	B	A	BBBABABA	
18	A	A	A	B	B	B	A	A	AAABBBAA	
19	A	A	B	B	A	B	A	A	AABBABAA	
20	D	A	B	A	B	B	A	A	DABBBBAA	
21	B	B	B	B	A	B	B	A	BBBBABBA	
22	D	A	B	B	A	B	A	A	DABBBBAA	
23	A	A	B	A	A	A	A	A	AABAAAAA	
24	A	A	B	A	A	A	A	A	AABAAAAA	
25	B	B	B	B	B	B	B	A	BBBBBBBA	
26	B	B	B	B	B	B	B	A	BBBBBBBA	
27	B	B	B	B	A	B	B	A	BBBBABBA	
28	D	A	B	A	B	B	A	A	DABBBBAA	
29	A	B	A	B	B	B	B	A	ABABBBBA	
30	A	B	B	B	B	B	B	A	ABBBBBBA	
31	A	B	A	B	B	B	B	A	ABABBBBA	

[†]NO: 1-31 : discrimination of Cultivar and breeding lines in Table 1.

였다 (Table 2). 8종의 프라이머 중 4개의 프라이머 (MFGp130, MFGp183, MFGp81, UFGp156)는 삽입 또는 결실(InDel, Insertion or deletion)에 의한 다형성을 나타내며, MFGp110와 UFGp74는 제한효소 처리에 의한 CAPS이며 나머지 UFGp163과 MFGp108은 DNA 단편의 증폭 유무를 확인할 수 있는 우성마커이다.

PCR에 사용한 혼합용액의 조성은 5 ng의 DNA를 2 µL, 20 pmoles의 forward와 reverse 프라이머를 각각 1 µL, Excel TB 2×Premix with Dye (Inclone, Korea)를 12.5 µL 넣고 멸균수로 전체 반응용액을 25 µL로 맞춰 주었다.

DNA 증폭기기는 Tprofessional thermocycler (Biometra, Gottingen, Germany)을 이용하였고, PCR 반응은 95°C에서 5 분간 초기변성 후, 95°C 30초 변성, 60°C 또는 65°C에서 30 초 결합 및 72°C에서 1분의 신장 조건으로 총 40 cycles을 수행하였고, 마지막으로 72°C에서 10분간 신장 반응을 수행하였다. MFGp110, UFGp74 프라이머는 PCR을 수행한 후 37°C에서 24시간 HinfI의 제한효소를 처리하였다. 증폭된 PCR 산물은 0.5×TBE buffer를 이용하여 1.5% agarose gel에서 전기영동 과정을 거쳐 EtBr (Ethidium bromide)로 염색한 후 UV transilluminator로 유전양상을 확인하였다.

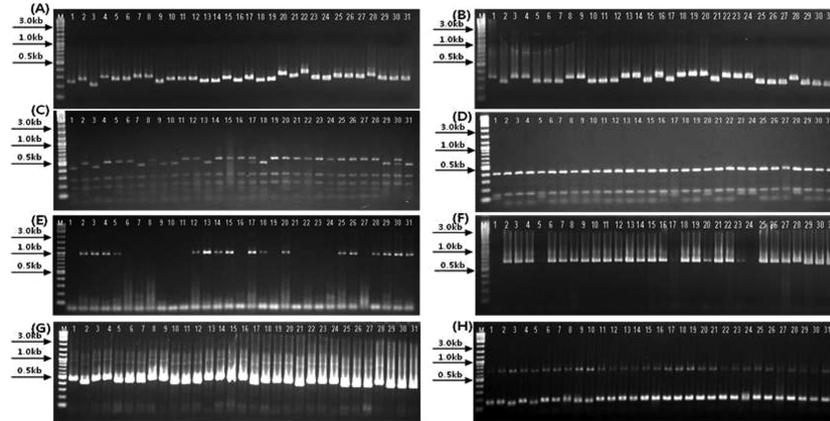


Fig. 1. Polymorphic band patterns with MFGp183(A), MFGp130(B), MFGp110(C), UFGp74(D), UFGp163(E), MFGp108(F), MFGp81(G) and UFGp156(H) primers among 11 Korean ginseng cultivars and 20 breeding lines. Lanes 1-31; discrimination of cultivars and breeding lines in Table 1.

결과 및 고찰

인삼 11품종과 20계통을 대상으로 8종의 STS마커를 적용하여 이들이 유전적으로 구분되는지의 여부를 확인한 결과는 그림 1과 표 3과 같다. 8종의 STS 프라이머 중 MFGp183, MFGp130, MFGp81, UFGp156의 4종의 프라이머는 DNA 염기의 삽입 또는 결실 (In/Del)에 의한 다형성을 나타내는 것이 특징이다. 이 중 MFGp183 프라이머에서는 4가지의 유전자형을 확인 할 수 있었으며, MFGp130, MFGp81, UFGp156는 In/Del 차이에 의해 2가지의 유전자형을 확인 할 수 있었다. 한편, MFGp110, UFGp74에서는 PCR 산물에서 다형성이 확인 되지 않았고, 제한효소 *Hinf*-I의 처리에 의해 2가지의 유전자형을 확인 할 수 있었다. 나머지 UFGp163, MFGp108에서는 프라이머 결합부위의 변이에 의한 대립유전자 특이적 증폭반응 (allele-specific PCR)에 의해 2가지의 유전자형을 나타냈다. 한편, 8종의 STS 프라이머로부터 나타난 유전자형 결과를 보다 쉽게 식별하기 위하여 유전자형을 알파벳 A, B, C, D로 정의하였다.

MFGp183 프라이머를 이용한 PCR 결과, 인삼 2품종 (천풍, 선향)과 10계통 (G04062, G04068, G04075, G04079, G08012, G08031, G08036, G08039, G08042, G08078)에서 약 250 bp 크기에서 DNA 단편이 증폭되었고 (allele type-A), 연풍을 포함한 5품종 (연풍, 선풍, 선운, 천량, K-1)과 7계통 (G03146, G04058, G04110, G08020, G08034, G08038, G08085)은 280 bp 크기의 DNA 단편이 증폭 (allele type-B) 되었다. 고품은 220 bp 크기의 DNA 단편이 증폭되었으며 (allele type-C), 금풍을 포함한 3품종 (금풍, 선원, 청선)과 3계통 (G08010, G08055, G08089)은 300 bp 크기의 DNA (allele type-D) 단편이 증폭되었다 (Fig. 1A).

MFGp130 프라이머를 이용하였을 때는, 5품종 (천풍, 고품, 금풍, 선향, 청선)과 10계통 (G04062, G04068, G08078, G08042, G08012, G04079, G04075, G08010, G08055, G08089)에서 320 bp 크기의 DNA 단편 (allele type-A)이 증폭되었고, 반면 연풍을 포함한 6품종 (연풍, 선풍, 선운, 선원, 천량, K-1)과 10계통 (G03146, G04058, G04110, G08020, G08031, G08034, G08036, G08038, G08039, G08085)에서는 270 bp 크기의 DNA 단편 (allele type-B)이 증폭되었다 (Fig. 1B).

MFGp110과 UFGp74 프라이머를 이용하였을 때는 PCR 증폭 확인 결과에서는 샘플 간 다형성이 없는 동일한 DNA 단편이 확인 되었으나, 증폭된 DNA 단편을 제한효소로 절단하여 다형성을 확인 하는 CAPS 기법을 적용한 결과, 제한효소 인지 부위에 따른 다형성을 확인 할 수 있었다. MFGp110 프라이머를 이용하여 증폭된 DNA 단편을 *Hinf*-I의 제한효소를 처리 하였을 때 5품종 (천풍, 고품, 선원, 선향, 천량)과 4계통 (G04062, G04068, G08039, G08031)에서 *Hinf*-I의 제한효소 인식 부위가 동일하여 절단된 단편 또한 같은 형태를 보였다 (allele type-A). 그러나 연풍을 포함한 6품종 (연풍, 금풍, 선풍, 선운, 청선, K-1)과 16계통 (G03146, G04058, G04075, G04079, G04110, G08010, G08012, G08020, G08034, G08036, G08038, G08042, G08055, G08078, G08085, G08089)의 절단된 DNA 단편은 *Hinf*-I의 제한효소 인식 부위가 위의 A타입과 다르게 확인 되어 (allele type-B) 뚜렷하게 구분되었다 (Fig. 1C).

UFGp74 프라이머를 이용하여 제한효소 *Hinf*-I에 의한 다형성을 확인한 결과, 2품종 (천풍, 선풍)과 6계통 (G08078, G08042, G08012, G04058, G08010, G08055)에서 *Hinf*-I의 동일한 인식부위에 의한 같은 형태의 DNA 단편이 확인되었고 (allele type-A), 연풍을 포함한 9품종 (연풍, 고품, 금풍,

선운, 선원, 청선, 선향, 천량, K-1)과 14계통 (G03146, G04062, G04068, G04075, G04079, G04110, G08020, G08031, G08034, G08036, G08038, G08039, G08085, G08089)은 A타입과는 다른 형태의 DNA 단편을(allele type-B) 확인 할 수 있었다 (Fig. 1D).

UFGp163 프라이머를 이용한 PCR 결과, DNA 단편의 유무에 따라 유전자형이 구분되는 우성 마커 (dominant marker) 로 확인되었으며 이는 프라이머 부착 위치의 염기서열 변이에 의한 결과라 생각된다. 7품종 (천풍, 선운, 선원, 청선, 선향, 천량, K-1)과 7계통 (G08012, G04079, G08020, G08089, G08078, G08042, G08085)은 PCR 증폭 반응이 이루어지지 않았으나 (allele type-A), 연풍을 포함한 4품종 (연풍, 고평, 금풍, 선풍)과 13계통 (G03146, G04062, G04075, G04110, G04058, G04068, G08010, G08038, G08034, G08055, G08039, G08036, G08031) 에서는 930 bp 크기의 DNA 단편이 (allele type-B) 증폭되었다 (Fig. 1E).

또한 MFGp108 프라이머도 우성 마커 (dominant marker) 로써, 2품종 (천풍, 선풍)과 3계통 (G04058, G08078, G08042)에서는 PCR 증폭 반응이 일어나지 않았으나 (allele type-A), 연풍을 포함한 9품종 (연풍, 고평, 금풍, 선운, 선원, 청선, 선향, 천량, K-1)과 17계통 (G03146, G04062, G04075, G04110, G08012, G04068, G04079, G08010, G08020, G08089, G08038, G08034, G08085, G08055, G08039, G08036, G08031)에서는 650bp 크기의 DNA 단편이 증폭되어 샘플 간 다형성을 (allele type-B) 나타내었다 (Fig. 1F).

MFGp81 프라이머를 이용하였을 때는 5품종 (천풍, 금풍, 고평, 청선, 선향)과 11계통 (G04062, G04075, G04110, G08012, G04068, G04079, G08010, G08089, G08078, G08042, G08055)에서 420 bp에서 DNA 단편이 증폭되었으며 (allele type-A), 연풍을 포함한 6품종 (연풍, 선풍, 선운, 선원, 천량, K-1)과 9계통 (G03146, G04058, G08020, G08038, G08034, G08085, G08039, G08036, G08031)에서는 400 bp 크기의 DNA 단편이 증폭되어 (allele type-B) 샘플 간 다형성을 확인 할 수 있었다 (Fig. 1G).

UFGp156 프라이머를 이용한 PCR 결과, 7품종 (천풍, 연풍, 금풍, 선운, 선원, 청선, K-1)과 20계통에서 160 bp 크기의 DNA 단편이 증폭 되었으며(allele type-A), 고평을 포함한 4 품종 (고풍, 선풍, 선향, 천량)에서는 150 bp 크기의 DNA 단편 (allele type-B)이 증폭되었다 (Fig. 1H).

8종의 STS 프라이머를 이용하여 인삼 11품종과 20계통을 대상으로 이들의 유전형질을 종합한 결과, 총 19가지의 유전자형을 확인 할 수 있었으며 각각의 유전형질의 조합은 표 3과 같다. 천풍, 연풍, 고평, 금풍, 선풍, 선원, 청선, 선향, 천량의 유전형질의 조합은 각각 AAAAAAAA, BBBBBA, CAABBBAB, DABBBBAA, BBBABABB, DBABABBA, DABBABAA,

AAABABAB, BBABABBB로 확인 되었으며 선운과 K-1의 유전형질의 조합은 BBBBABBBA로 동일하게 나타났다.

인삼 품종과 같은 유전자형의 조합을 갖는 계통들은, 연풍과 G03146, G08038, G08034, 선풍과 G04058, 청선과 G08089, 그리고 천량과 G08036 이었다. 계통과 계통 간의 유전형질의 조합이 같은 것은 G04062와 G04068 (AAABBBAA), G08078과 G08042(AABAAAAA), G08039와 G08031 (ABABBBBA), G08010과 G08055 (DABABBBAA) 이었다.

현재까지 개발된 국내 고려인삼 품종들은 자경종, 청경종, 황숙종 등의 재래종으로부터 순계분리에 의해 육성되었기 때문에 유전적으로 유사도가 매우 높은 편이며, 또한 육안으로 품종의 구분이 불가능하기 때문에 DNA 마커를 이용한 품종 판별은 무척 중요한 일로 생각된다.

Bang 등 (2010)은 4쌍의 STS 마커 (UFGp163, MFGp108, MFGp81, UFGp156)를 개발하여 국내 고려인삼 6품종을 대상으로 품종판별을 시도 한바 있었으나, 일부 품종만 식별이 가능하였다. 따라서 본 연구는 기존의 STS 마커와 신규 발굴한 STS 마커를 이용하여 고려인삼의 11품종과 20계통에 확대 적용시켰으며, 이를 통해 품종 또는 계통 간의 판별 가능성을 검토 하였다.

본 연구에서 확인 된 DNA 염기의 삽입 또는 결실에 의한 다형성은 PCR 이후 제한효소 처리 등의 추가적인 실험을 수행하지 않아도 되고, 실험방법 또한 상대적으로 간편하여 벼 (Steele *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2009)와 토마토 등의 품종 판별 (Yamamoto *et al.*, 2005) 등 에 널리 적용되어 왔다. 따라서 4쌍의 STS In-del 프라이머 (MFGp183, MFGp130, MFGp81, UFGp156)는 간편하고 실용적인 방법으로 활용될 수 있을 것이며, 추후 DNA 마커가 지속적으로 개발 된다면 이들 마커들과의 조합을 통해 유전적 다양성 평가와 품종 판별에 널리 이용 될 수 있을 것이다.

그러나 인삼과 같이 유전적 유사도가 매우 높은 품종의 경우에는 본 연구에서 사용한 마커 조합으로 품종을 판별하는데 한계가 있는 것으로 나타났다. 인삼 11품종 중 9품종은 8종의 STS 프라이머로 구별이 가능하였으나, 나머지 2품종은 계통과 같은 유전자형의 조합을 보여 구별이 불가능하였다.

따라서 고려인삼 11품종을 명확하게 식별하기 위해 추가적인 마커의 발굴이 필요할 것으로 판단된다. 한편 육성 계통 중 5계통 (G08012, AABAABAA; G04079, AABBBABAA; G04075, AABBBBAA; G08036, ABBBBBBA; G04110, BBBBBA)은 기존의 품종과 다른 유전형질의 조합을 보여 육종소재로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 고려인삼의 genomic library를 기반으로 하는 STS는 유전자 기반의 마커로서 비교적 실험방법이 간편하고, 시간적, 비용적 측면의 효율성과 노동력 절감 등의 이점이 있어 대량의 고려인삼 품종판별과 유전자원의 평가 등에 효율적인 실험방법으로

활용될 수 있을 것으로 판단된다.

우리나라는 식물품종 보호제도가 종자산업법에 의해 1997년부터 시행되고 있으며, 2002년에 UPOV (International Union for the protection of New Varieties of plants)에 가입한 이후 신규성, 구별성, 균일성, 안정성 및 고유한 품종명칭을 갖추어야만 품종 보호권을 부여하고 있다 (UPOV, 1994). 품종의 구별성 여부는 형태적 특성에 따라 구분하는 것이 일반적이나, 재배환경 및 연차에 따라 품종의 특성이 다르게 나타나기 때문에 구별성의 판단에 큰 문제점이 되는 것으로 알려져 있다 (Cheo *et al.*, 2002). 이러한 문제점을 보완하기 위하여 UPOV에서는 형태적 특성에 의한 DUS 검정방법 이외에 생화학 및 분자생물학적 기법을 이용한 새로운 신품종 심사기술 및 적용기준을 검토하고 있다.

따라서 본 연구에서 개발된 STS 마커는 향후 고려인삼의 신품종 심사기준에 적용될 수 있으며, 품종의 지적재산권보호와 종자 소유권 분쟁 등에도 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 앞으로도 유전적 다형성이 높은 STS 마커를 지속적으로 개발하여 고려인삼의 품종 육성에 활용한다면, 빠른 시간 안에 기존품종과 다른 유전형질을 선별할 수 있어 다양한 육종재료의 확보와 육종연한의 단축에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

LITERATURE CITED

- Bang KH, Lee JW, Kim YC, Kim DH, Lee EH and Jeung JU.** (2010). Construction of genomic DNA library of Korean ginseng(*Panax ginseng* C. A Meyer) and development of sequence-tagged sites. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 33:1579-1588.
- Bang KH, Chung JW, Kim YC, Lee JW, Jo IH, Seo AY, Kim OT, Hyun DY, Kim DH and Cha SW.** (2011a). Development of SSR markers for identification of Korean ginseng(*Panax ginseng* C. A. Mey.) cultivars. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 19:185-190.
- Bang KH, Seo AY, Chung JW, Kim YC, Jo IH, Kim JU, Kim DH, Cha SW, Cho YG and Kim HS.** (2011b). Analysis of genetic polymorphism and relationship of Korean ginseng cultivars and breeding lines using EST-SSR marker. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 20:277-285.
- Blake TK, Kadyrzhanova D, Shepard KW, Islam AKMR, Langridge PL, McDonald CL, Erpelding J, Larson S, Blake NK and Talbert LE.** (1996). STS-PCR markers appropriate for wheat-barley introgression. *Theoretical and Applied Genetics*. 93:826-832.
- Cheo YW, Park DY, Shin HK, Kwon YS, Yoon HM, Moon JY and Park HY.** (2002). Studies for similarity evaluation of radish and chinese cabbage cultivars. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*. 20:160-167.
- Choi KT, Lee CH and Chen SR.** (1979). Studies on the variation of flowering date in Korean ginseng plants. *Journal of Ginseng Research*. 3:35-39.
- Chung YY, Lee MG, Chung CM and Jo JS.** (1992). The comparison of growth and morphological characteristics among the Korean ginseng, the American ginseng and the bamboo ginseng. *Journal of Ginseng Research*. 22:147-153.
- Erpelding JE, Blake NK, Blake TK and Talbert LE.** (1996). Transfer of sequence tagged site PCR markers between wheat and barley. *Genome*. 39:802-810.
- Hu SY.** (1976). The genus *Panax*(ginseng) in Chinese medicine. *Economic Botany*. 30:11-28.
- Huang GQ, Hua YW, Gao Z and Huang HS.** (2010). Construction of a methylation filtration library in *Hevea brasiliensis*. *Yi Chuan*. 32: 1071-1076.
- Hwang TY, Jung SM, Lee SK, Park HM, Jeong KH, Lee YY, Kim SL, Yun HT, Lee JE, Kim DW, Jung GH, Kwon YU, Kim HS and Kim YH.** (2012). Discrimination of 110 Korean soybean cultivars by sequence tagged sites(STS)-CAPS markers. *Korean Journal of Breeding Science*. 44:258-272.
- International Union for the Protection of New Varieties of plants(UPOV).** (2005). Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability. *Ginseng. UPOV Geneva, Swiss*. TG/224/1.
- Kwon WS, Moon CH, Kim YT, Lee MG and Choi KT.** (1991). Comparisons of growth, crude saponin, ginsenosides, and anthocyanins in superior lines of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Journal of Ginseng Research*. 23:11-17.
- Kwon WS, Lee MG and Choi KT.** (2000). Breeding process and characteristics of Yunpoong, a new variety of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Journal of Ginseng Research*. 24:1-7.
- Kwon WS, Lee MG and Lee JH.** (2001). Characteristics of flowering and fruiting in new varieties and lines of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Journal of Ginseng Research*. 25:41-44.
- Kwon WS, Lee JH, Park CS and Yang DC.** (2003). Breeding process and characteristics of Gopoong, a new variety of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Journal of Ginseng Research*. 27:86-91.
- Lee SJ, Jeung JU, Cho SK, Um BY, Chung WI, Bae JM and Shin JS.** (2002). Diversity and varietal classification of *Hibiscus syriacus* L. with the heterogeneity within retrotransposon-like elements. *Molecules and Cells*. 13:362-368.
- Li X, Gardner DR, Ralphs MH and Wang RRC.** (2002). Development of STS and CAPS markers for identification of three tall larkspurs(*Delphinium spp.*). *Genome*. 45:229-235.
- Lu BR, Cai X and Xin J.** (2009). Efficient indica and japonica rice identification based on the InDel molecular method: Its implication in rice breeding and evolutionary research. *Progress in Natural Science*. 19:1241-1251.
- Olson M, Hood L, Cantor C and Botstein D.** (1989). A common language for physical mapping of human genome. *Science*. 245:1434-1435.
- Palmer LE, Rabinowicz PD, O' Shaughnessy AL, Balija VS, Dike S LU, de la Bastide M, Martienssen RA and McCombie WR.** (2003). Maize genome sequencing by methylation filtration. *Science*. 302:2115-2117.
- Rabinowicz PD.** (2003). Constructing gene-enriched plant genomic libraries using methylation filtration technology. *Methods in Molecular Biology*. 236:21-36.
- Steele KA, Ogden R, McEwing R, Briggs H and Gorham J.** (2008). InDel markers distinguish Basmati from other fragrant

- rice varieties. *Field Crops Research*. 105:81-87.
- Talbert LE, Blake NK, Chee PW, Blake TK and Magyar GM.** (1994). Evaluation of “sequence-tagged-site” PCR products as molecular markers in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 87:789-794.
- Timko MP, Rushton PJ, Laudeman TW, Bokowiec MT, Chipumuro E, Cheung F, Town CD and Chen X.** (2008). Sequencing and analysis of the gene-rich space of cowpea. *BMC Genomics*. 9:103.
- Whitelaw CA, Barbazuk WB, Perteua G, Chan AP, Cheung F, Lee Y, Zheng L, Van Heeringen S, Karamycheva S, Bennetzen JL, SanMiguel P, Lakey N, Bedell J, Yuan Y, Budiman MA, Resnick A, Van Aken S, Utterback T, Riedmuller S, Williams M, Feldblyum T, Schubert K, Beachy R, Fraser CM and Quackenbush J.** (2003). Enrichment of gene-coding sequences in maize by genome filtration. *Science*. 302:2118-2120.
- Yamamoto N, Tsugane T, Watanabe M, Yano K, Maeda F, Kuwata C, Torki M, Ban Y, Nishimura S and Shibata D.** (2005). Expressed sequence tags from the laboratory-grown miniature tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Micro-Tom and mining for single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in tomato cultivars. *Gene*. 356:127-134.