

**EST-SSR Primer를 이용한 인삼 품종 및 계통의 유전분석**

국립원예특작과학원 인삼특작부 : 서아연, 방경환\*, 조익현, 김영창, 김동휘, 차선우  
충북대학교 : 김홍식

**Genetic Analysis of Korean Ginseng Cultivars**

**(*Panax ginseng* C. A. Meyer ) and Breeding Lines using EST-SSR Primer**

Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA : A-Yeon Seo\*, Kyong-Hwan Bang,  
Ick-Hyun Jo, Young-Chang Kim, Dong-Hwi Kim, Seon-Woo Cha  
College of Agriculture, Life & Environment Sciences, Chungbuk National University : Hong-Sig Kim

**실험목적**

최근 수입농산물의 개방으로 인하여 국내산 농산물과 외국산 농산물에 대한 원산지 관리, 국내에서 개발된 품종에 대한 대내·외 지적재산권 보호가 중요시되고 있다. 따라서 EST-SSR 프라이머를 적용하여 재래종 집단 내에서 선발된 인삼 계통의 유전자형을 분석하여 현재까지 등록된 품종과 구별성을 검토하고, 이를 토대로 신품종 등록에 대한 과학적 근거자료로 활용하고자 실험을 수행하였다.

**재료 및 방법**

o 실험재료

- 고려인삼 품종 : 천풍, 연풍, 고풍, 금풍의 4품종
- 고려인삼 계통 : G04009 등 유망 20계통

o DNA 추출

- Genomic DNA를 확보하기 위하여 3년생 잎을 채취하여 세척한 후 액체질소로 급냉시켜 막자사발을 이용하여 분말상태가 되도록 마쇄
- DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)을 이용하여 Protocol에 따라 DNA추출
- 추출된 DNA는 1% agarose gel에  $\lambda$ DNA와 함께 전기영동한 후, EtBr(Ethidium Bromide)로 염색하여 UV transilluminator에서 DNA band의 밝기를 상대 비교하여 농도 측정
- 농도 측정이 완료된 각각의 DNA샘플들은 멸균된 증류수를 이용하여 최종 DNA농도를  $5\text{ng}/\mu\text{l}$ 로 조정하여 EST-SSR 분석 시 사용

o EST-SSR 분석

- GenBank (National Centre for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>)에 등록된 dbEST로부터 인삼 EST 염기서열을 확보
- SSR search tool (<http://cgssr.cs.ntou.edu.tw/seq.php>)을 이용하여 반복염기서열을 확인
- SSR을 바탕으로 30쌍의 EST-SSR Primer를 제작하고, PCR에 사용된 sample의 조성은 genomic DNA 약  $10\text{ng}/2\mu\text{l}$ 이고, 총 반응액은  $25\mu\text{l}$ 임
- PCR 조성 primer 30 pmole, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.25mM dNTPs, 0.5U Taq polymerase (Neurotics, Deajeon, Korea)를 사용

-----  
교신저자 연락처 (Corresponding author) : 방경환 E-mail : bang31@Korea.kr. Tel : 043-871-5534

- PCR 반응은 95℃에서 5분간 초기변성 후, 95℃ 30초 변성, 55℃ 30초 결합 및 72℃ 1분 신장의 조건으로 35cycles을 수행하였고, 마지막으로 72℃에서 10분간 신장 반응을 수행
- 증폭된 DNA products는 0.5x TBE buffer를 사용하여 5% polyacrylamid gel에서 전기영동하여 EtBr (Ethidium Bromide)로 염색한 후 UV transilluminator로 그 패턴을 확인

### 실험결과

- 인삼 품종 및 계통의 유전적 다양성을 확인하기 위해 총 30쌍의 프라이머를 적용한 결과, 20쌍의 프라이머가 1차로 선발되었으며, 선발된 프라이머의 재현성 검정을 통해 최종적으로 13쌍의 프라이머 선발
- 선발된 프라이머 중 P26, P35는 품종 및 계통간의 polymorphism이 가장 좋았으며, 이들 프라이머로 유전분석을 한 결과 각각 9패턴, 10패턴으로 품종 및 계통을 구분할 수 있었음
- P2 프라이머는 연풍, G04086 및 G04116 계통에서 특이적인 유전양상을, P25 프라이머는 특히 미국에서 수집 육성된 G04116 계통에서 특이적인 유전양상을 나타냈음

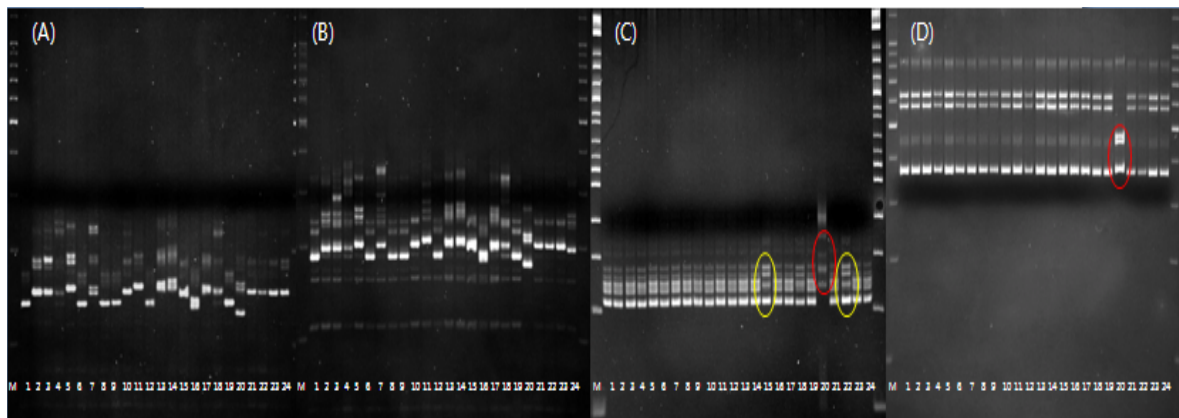


Fig. 1. Polymorphisms by P26(A), P35(B), P2(C), and P25(D) between Korean ginseng cultivars and Breeding Lines, lane 1, G04009; lane 2, G04012; lane 3, G04020; lane 4, G04021; lane 5, G04026; lane 6, G04030; lane 7, G04046; lane 8, G04047; lane 9, G04049; lane 10, G04065; lane 11, G04069; lane 12, G04076; lane 13, G04084; lane 14, G04085; lane 15, G04086; lane 16, G04090; lane 17, G04097; lane 18, G04098; lane 19, G04113; lane 20, G04116; lane 21, Chunpoong; lane 22, Yunpoong; lane 23, Gopoong; lane 24, Kumpoong; M, 100bp molecular weight marker (Promega).