

## Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 기술을 이용한 고려인삼의 유전분석을 위한 Primer 선발 및 변종별 비교

임용표\* · 신최순 · 이석중 · 윤영남 · 조재성

충남대학교 농과대학  
(1993년 7월 27일 접수)

### Survey of Proper Primers and Genetic Analysis of Korean Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) Variants using the RAPD Technique

Y. P. Lim, C. S. Shin, S. J. Lee, Y. N. Youn and J. S. Jo

College of Agriculture, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea

(Received July 27, 1993)

**Abstract** □ The study was carried out for comparison of variants and development of genetic markers using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis method. The ginseng variants used were as follows; Chungkyung-Chong, Hwangskoog-Chong, KG101 selected by the pure-line selection method, and 6 kinds of Jakyung-Chong strains (Jinjakyung, Jakyung-Chong 81783, Jakyung-Chong 847913, Jakyung-Chong 79742, Jinjakyung of USSR, and Mimaki of Japan).

Four of 10 RAPD primers showed the distinctive polymorphism among 9 ginseng variants and lines, and were selected for more detailed polymorphic analysis. The sequences of 4 selected primers were TGCCGAGCTG (primer #2), AATCGGGCTG (#4), GAAACGGGTG (#7), and GTGACGTAGG (#8). All primers produced several common bands among the strains. However, when primer #2 was applied, the electrophoregram showed the specific band at 1.8 kb region in Chungkyung-Chong, Hwangskoog-Chong, and KG101, and 1 kb in the Jakyung-Chong 847913. In primer #4, 1.1 kb band was shown in Chungkyung-Chong, Hwangskoog-Chong, KG101, and Jakyung-Chong 79742. In primer #7, 700 bp band was appeared in Jakyung-Chong 81783 and Jinjakyung of USSR. In primer #8, 800 bp band was observed only in Mimaki, comparing to another strains.

When Similarity Index (SI) was calculated, Chungkyung-Chong and Hwangskoog-Chong, and Jakyung-Chong 81783 and Jinjakyung of USSR showed the most close SI, 0.11 and 0.08, respectively. The data of KG101, which showed the SI of 0.13 with the group of Chungkyung-Chong and Hwangskoog-Chong, coincided with the fact that it was released from Hwangskoog-Chong by breeding process. The data of Jakyung strains indicated the significant variation among the strains. From these results, RAPD analysis method could be succesively applied to the classification and genetic analysis for breeding of Korean ginseng.

**Key words** □ Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD), PCR, *Panax ginseng*, C.A. Meyer.

#### 서 론

고려인삼은 고대로부터 불로장생의 영약으로 동양에서 가장 중요한 약재로 이용되어 왔다. 인삼은 반

음지성 작물이며, 생장이 늦기 때문에 가장 적절한 재배조건에서도 적어도 6년을 재배해야 좋은 질의 인삼을 수확할 수 있다. 환경요인에 반응하는 인삼의 유전적, 생리생화학적 특성을 구명하고 유전적, 생리적 요인의 치유를 통해서 이러한 저생산성의 개선이

\*To whom correspondence should be addressed.

가능하며 최근 10여년간 육종 및 생리학적 측면에서 많은 연구들이 수행된 바 있다.<sup>1,2)</sup>

인삼의 유전 및 육종연구의 체계화를 위하여는 인삼 변종, 계통, 품종 등의 분류 및 적정 marker의 개발이 필요하다. 그러나 인삼의 유전적연구는 인삼의 재배 기간이 4~6년이 소요되며 개화기까지 적어도 2~3년 이상의 기간이 소요되어 품종육성을 위해 적어도 50년 이상의 기간이 걸림으로 인해 국내에서는 해방 후 한국인삼연구소에서 국책사업으로 인삼의 육종 사업을 수행하여 왔을 뿐 체계적인 유전연구는 거의 전무한 현실이다. 품종의 육종에 있어서도 열매와 줄기의 색소변화에 따른 4가지 변종으로만 분리되어 사용되고 있을 뿐 아직까지 품종으로서 확립되지 않고 있는 실정이다.

식물의 종 및 품종의 분류동정을 위하여 그간 많은 연구가 수행되어 왔으며 형태학적,<sup>3)</sup> 세포학적,<sup>4)</sup> 해부학적,<sup>5)</sup> 생리생태학적,<sup>6)</sup> 방법 등 여러 가지 방법으로 비교 분류되고 있으며, 근래에는 isozyme을 이용한 작물의 품종 및 계통 감별법 등을 비롯한 생화학적 분류방법<sup>7)</sup>이 발달되고 있고, 특히 최근의 분자생물학의 발달로 DNA 수준에서의 분류연구가 활발하게 이루어지고 있다.<sup>8,9)</sup>

최근의 분자생물학의 발전은 제한효소에 의한 핵 또는 세포질 DNA의 절단 pattern의 차이에 의한 Restriction Fragments Length Polymorphism(RFLP) 기술이 개발되어 이러한 RFLP 유전자 marker를 이용하여 작물의 품종 및 계통 감별법을 개발함으로써 육종효율을 증진시키는 방법이 시도되고 있다. 고등생물의 유전분야에서 RFLP의 이용가능성에 대하여는 1980년 인체 유전자 연구분야에서 처음으로 주장되었으며, 최근에는 *Arabidopsis*,<sup>10)</sup> 옥수수<sup>11)</sup> 등 많은 작물에서 RFLP 지도가 작성 발표되고 있다.

RFLP 기술을 이용한 인삼의 변종간 분류를 위하여 인삼의 변종인 자경종, 청경종, 황숙종의 mitochondrial DNA<sup>12)</sup> 및 chloroplast DNA<sup>13)</sup>내 구조를 제한효소를 이용하여 분석하여 그 차이를 검토하여 보았는 바 차이가 나타나지 않아, 인삼의 변종 및 육종계통에 RFLP 방법을 이용하는데 세포질유전자로는 한계가 있음이 밝혀진 바 있다. 또한 RFLP 기술은 시간과 노력이 너무 소요되며, 방사성동위원소를 사용해야 하는 Southern blot 기술에 기본을 둠으로서 상대적으로 값이 비싸고 위험성이 따르는 등 여러 가지 단

점으로 인하여, 실제 육종에서 뿐 아니라 분자유전학적 기초연구에 있어서 보편적으로 사용하기에는 많은 문제점이 제기되고 있다.

이러한 기술적인 문제를 보충하기에 가장 적합한 것이 최근에 개발된 Polymerase Chain Reaction(PCR) 방법<sup>14,15)</sup>의 응용이다. Randomly Amplified Polymorphic DNA(RAPD)법은 무작위로 합성한 oligonucleotide 10-mer를 이용하는 것인데 이 primer는 4<sup>10</sup>가지 즉 약 100만 가지의 염기배열 조합을 가질 수 있어 이 primer 중에서 몇 가지를 이용하여도 기존의 RFLP 기술에 의해서 나타날 수 있는 DNA변이 보다는 월등히 많은 polymorphism을 찾을 수 있다는 것이 밝혀졌고,<sup>16)</sup> 기술이 용이하고 신속하며, 소량의 DNA만 필요하며, 상대적으로 위험성이 적어, RFLP 기술보다도 더 유전 및 육종연구에 응용이 되고 있다.<sup>17)</sup>

본 연구에서는 이러한 RAPD를 이용한 인삼의 변종간 분석 및 변종내 육종계통의 분류를 실시하여 육종계통을 조기선발을 위한 marker를 개발하여 50년 이상 소요되는 인삼의 신품종 육성효율을 증대시키며, 외국인삼과 고려인삼의 감별법을 개발하여 외국으로부터 밀수입되는 중국인삼 등을 효율적으로 감별할 수 있는 감별법을 개발하며, 고려인삼의 특수성을 과학적으로 규명하고자 본 실험을 실시하였다. 그 첫 연구로서 기본 인삼종 수가지를 이용하여 인삼에의 RAPD 이용 가능성을 타진하며 동시에 적절한 primer를 선별하고 이를 이용하여 고려인삼의 변종 및 일부 외국 변종의 유전적 차이를 검토하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료 및 기기

인삼 식물재료로는 한국인삼연구소로부터 분양받은 기본종인 청경종, 황숙종, KG101, 진자경, 자경종 847913, 자경종 81783, 내병성 자경종 79742, 일본 육성종 미마끼, 소련 진자경 등 9개 변종 및 계통을 사용하였으며, PCR을 위한 *Taq* polymerase는 한국생공(주)으로부터 구입하여 사용하고 있으며, oligodeoxynucleotide primers(10-mer set)는 미국의 Operon Company로부터 300가지 조합 set를 구입하여 사용하였다. Agarose, Tris, EDTA 및 그 밖의 모든 시약은 Boehringer Mannheim, Sigma 등에서 구입한 것을 사용하였다. PCR을 위한 기기는 Perkin Elmer

Cetus DNA Thermal Cycler를 사용하였으며, 통계 분석을 위하여는 IBM personal computer 486DX를 이용하였다.

## 2. Genomic DNA의 준비

Genomic DNA를 추출하기 위하여 각 인삼 계통의 뿌리를 액체질소를 사용하여 분쇄한 후 시료를 Dellaporta 등<sup>18)</sup>의 방법을 수정한 urea extraction method를 이용하여 total DNA를 추출하였다. 이렇게 추출된 DNA는 RNase 처리 후 phenol/chloroform법을 사용하여 정제한 다음, spectrophotometer를 이용하여서 DNA의 정확한 양을 측정하였다.

## 3. DNA 증폭의 조건 및 전기영동

PCR은 한국생공(주)에서 구입한 *Taq* polymerase와 이에 첨부된 반응조건에 따라 실시하였으며, 이에 5 pM의 10 mer primer와 50 ng의 genomic DNA를 사용하여 초기 94°C에서 2분 반응 후, 94°C에서 1분, 35°C에서 1분, 72°C에서 2분의 순환을 45회 반복한 후 최후에 72°C에서 3분간 추가로 반응시켰다. 반응이 끝난 product는 1.2% agarose gel에 전기영동한 후 EtBr로 염색을 하여 DNA 변이를 확인하였다.

## 4. RAPD를 이용한 유전분석

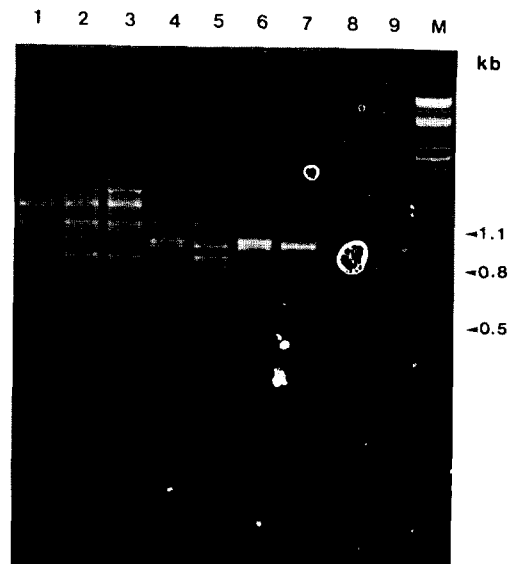
증폭된 polymorphic DNA 조각의 polymorphic band를 이용하여 각 변종간 또는 변종내 근연관계를 분석하기 위하여 Similarity Index(SI)를 구하였다. Similarity Index Program은 Statistical Ecology Program의 Cluster 분석법 중 dissimilarity index를 구하여<sup>19)</sup> 계통간 유의도를 분석하였으며 본 연구실에 설치되어 있는 IBM 486DXII기종을 이용하였다.

## 결과 및 고찰

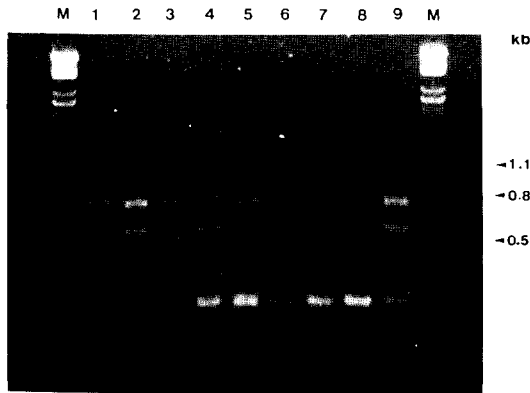
**Table 1.** The sequence of selected RAPD primers

Primer No.	Sequence
Primer # 1	CAGGCCCTTC
Primer # 2	TGCCGAGCTG
Primer # 3	AGTCAGCCAC
Primer # 4	AATCGGGCTG
Primer # 5	AGGGTCTTG
Primer # 6	GGTCCCTGAC
Primer # 7	GAAACGGGTG
Primer # 8	GTGACGTAGG
Primer # 9	GGGTAACGCC
Primer # 10	GTGATCGCAG

RAPD 기술을 이용하여 9종의 인삼간의 유연관계를 비교 분석하기 위하여 10개의 primer를 사용하여 검토한 결과 4개의 primer (Table 1)를 선발하였다. PCR에 사용한 10가지 primer (Table 1) 중 4가지의 primer(#2, #4, #7, #8)를 사용했을 때 인삼 변종 및 계통 모두에서 유의성을 비교할 수 있는 PCR product가 관찰되었다. 실험에 사용된 10가지의 random primer를 이용하였을 때 #2, #4, #7, #8 primer를 이용한 PCR에서는 분석하기에 좋은 DNA 증폭이 일어난 반면, #1, #3, #5, #6, #9, #10 primer를 이용한 PCR에서는 증폭된 DNA 절편이 관찰되지 않거나 증폭된 DNA 절편이 각 계통에서 똑같은 양상으로 관찰되어 각 변종 및 계통의 유전형을 결정하는데 유용하지 않았다. 이는 Fritsch 등<sup>20)</sup>이 사용한 primer 중 어떤 것은 증폭된 DNA 절편이 잘 관찰되는 반면 어떤 것에서는 관찰되지 않았다고 보고한 것과 유사한 결과였다. 10가지의 primer 중 6가지의 primer에서 유의차를 보이는 PCR product가 관찰되지 않은 것은 주형이 되는 DNA의 양과 증폭조건이



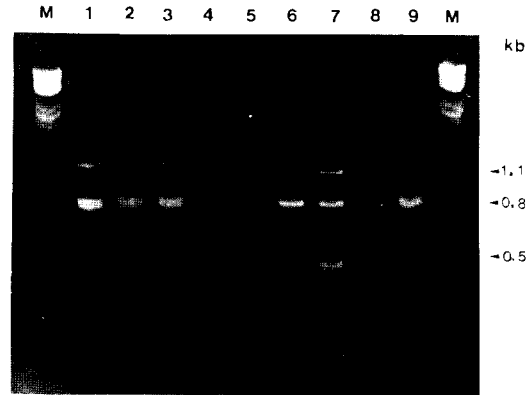
**Fig. 1.** RAPD amplification products of genomic DNA from 9 variants and strains of Korean ginseng (*Panax ginseng*) using primer #2. Lane 1: Chungkyung Chong; lane 2: Hwangskoog Chong; lane 3: KG101; lane 4: Jinjakyung Chong; lane 5: Mimaki; lane 6: 847913; lane 7: 81783; lane 8: Jinjakyung Chong of USSR; lane 9: 79742; lane M: Molecular marker.



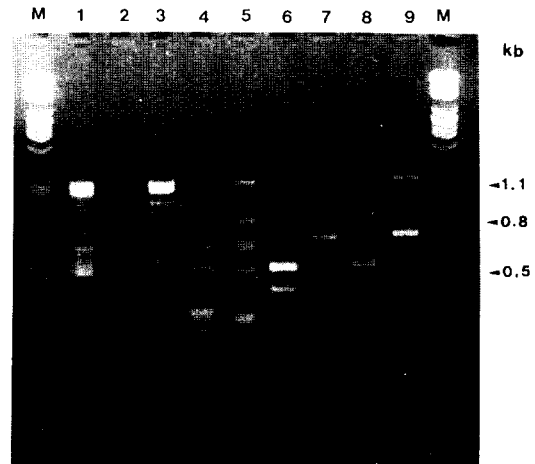
**Fig. 2.** RAPD amplification products of genomic DNA from 9 variants and strains of Korean ginseng (*Panax ginseng*) using primer #4. Lane 1: Chungkyung Chong; lane 2: Hwangskoog Chong; lane 3: KG101; lane 4: Jinjakyung Chong; lane 5: Mimaki; lane 6: 847913; lane 7: 81783; lane 8: Jinjakyung Chong of USSR; lane 9: 79742; lane M: Molecular marker.

PCR product 형성에 대단히 중요하다는 Munthali 등<sup>21)</sup>의 연구에 비추어 보아 지속적인 실험이 요구된다고 생각된다.

Fig. 1은 primer #2을 이용하여 인삼 DNA를 증폭한 경우로 1.8 kb band가 청경종, 황숙종, KG101에서 나타났고, 1 kb band는 자경종 847913에서 특이하게 나타났다. 또한 700 bp band가 자경종 81783과 소련 진자경에서 나타났다. Fig. 2는 primer #4를 이용하였을 경우를 보여주고 있다. 1.1 kb band가 청경종, 황숙종, KG101, 내병성 79742에서 나타났고, 1.6 kb, 800 bp, 650 bp, 400 bp band 등이 진종에서 동일하게 나타났다. Primer #7을 이용하였을 경우(Fig. 3), 800 bp band가 공통으로 나타났으며, 700 bp band가 진자경 81783, 소련 진자경에서 특이하게 나타났으며, 450 bp band가 진자경 81783에서 보였다. 또한 청경종, 황숙종, KG101은 모두 같은 band를 보였으며, 나머지 자경종계통은 계통내에서 커다란 변이를 보이고 있었다. Primer #8의 경우(Fig. 4)도 청경종, 황숙종, KG101은 거의 같은 band를 보였으며, 나머지 자경종계통은 계통내에서 커다란 변이를 보이고 있었고, 1.1 kb band와 0.9 kb band가 대부분 동일하게 나타났다. 또한 800 bp band가 미마끼에서 특이하게 나타났다. 이와 같은 DNA 다형 현상은 pri-



**Fig. 3.** RAPD amplification products of genomic DNA from 9 variants and strains of Korean ginseng (*Panax ginseng*) using primer #7. Lane 1: Chungkyung Chong; lane 2: Hwangskoog Chong; lane 3: KG101; lane 4: Jinjakyung Chong; lane 5: Mimaki; lane 6: 847913; lane 7: 81783; lane 8: Jinjakyung Chong of USSR; lane 9: 79742; lane M: Molecular marker.



**Fig. 4.** RAPD amplification products of genomic DNA from 9 variants and strains of Korean ginseng (*Panax ginseng*) using primer #8. Lane 1: Chungkyung Chong; lane 2: Hwangskoog Chong; lane 3: KG101; lane 4: Jinjakyung Chong; lane 5: Mimaki; lane 6: 847913; lane 7: 81783; lane 8: Jinjakyung Chong of USSR; lane 9: 79742; lane M: Molecular marker.

mer의 종류 뿐 아니라 실험된 primer의 염기조성 특성이 DNA가 증폭되는데에 중요함을 보여주었다.<sup>22)</sup> Reiter 등<sup>23)</sup>은 애기장대(*Arabidopsis*)를 대상으로 한

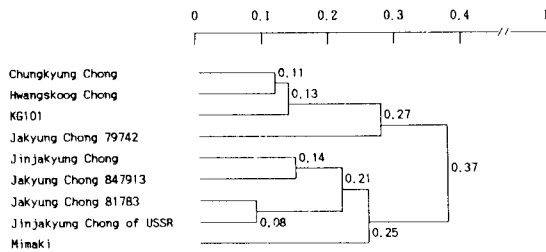


Fig. 5. Phenogram of clustering pattern for 9 variants and strains of Korean ginseng (*Panax ginseng*).

연구에서 RAPD marker가 유전형을 결정하는데 유용하다고 보고하였는데, 본 실험에서도 10-mer random primer를 이용하여 증폭된 DNA 절편은 유전적 marker로서 인삼의 각 변종 및 계통의 유전형을 결정하는데 유용하여 RAPD 기술을 이용한 품종간의 분류 가능성을 확인할 수 있음을 시사하고 있다.

RAPD 분석결과를 계통분석용 프로그램으로 Cluster analysis 방법중 Similarity Index를 구하여 각 변종간 또는 변종내 원연관계를 밝혔다. Fig. 5는 인삼 변종간 또는 변종내 원연관계를 보여주는 포로서 자경종과 황숙종은 0.11의 SI를, 자경종 81783과 소련 진자경은 0.08의 SI를 가져 가장 가까운 연관관계를 가졌으며, 한국인삼연구소에서 육성된 KG101은 황숙종 및 청경종과 0.13의 SI를 가져 육종과정에서 KG101이 황숙종에서 유래했음과 일치하는 결과를 얻었다. 자경종은 계통에 따라 상당한 변이를 보이고 있는데 847913과 진자경은 0.14의 SI를 보인 반면, 이 group과 81783은 0.21, 79742와는 0.37의 SI를 보여 자경종내의 변이정도가 상당한 차이를 보이고 오히려 81783은 소련 진자경과 0.08의 아주 가까운 근연관계를 보였다. 79742의 경우는 황숙종 및 청경종에서 더 근연한 관계를 보임으로 해서 금후 인삼 자경종의 계통을 분류하기 위하여는 국내에 재배하고 있는 자경종을 포함한 더 많은 재료를 이용하여 자경종의 기본종을 정하는 것이, 중국 등에서 재배되고 있는 인삼 품종과의 비교에 앞서 선행되어야 할 것으로 사료되었다.

금후 본 연구의 결과를 이용하여 국내 재배인삼의 유전적 및 진화적 의미를 탐구하고, 외국종과의 비교를 통하여 인삼의 육종체계와 진화체계 확립 및 기본종의 체계가 확립되고 유용유전자의 marker가 확보될 것이다.

## 요 약

최근에 개발된 Randomly Amplified Polymorphic DNA(RAPD) 기술을 이용하여 인삼 변종 및 계통에 대한 DNA polymorphism을 분석하고 유연관계를 비교하며, 유용 marker를 개발할 목적으로, 청경종, 황숙종, KG101, 자경종(진자경, 자경종, 847913, 자경종 81783, 소련 진자경, 내병성 자경종 79742, 미마끼) 등 9개 변종 및 계통의 인삼 DNA에 대하여 10개의 primer 중 4개의 primer를 선발하여 사용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Primer #2(TGCCGAGCTG)을 이용하였을 경우, 1.8 kb band가 청경종, 황숙종, KG101에서 나타났고, 1 kb band는 자경종 847913에서 특이하게 나타났으며, 또한 700 bp band가 자경종 81783과 소련 진자경에서 나타났다. Primer #4(AATCGGGCTG)를 이용하였을 경우, 1.1 kb band가 청경종, 황숙종, KG101, 내병성 79742에서 나타났고, 1.6 kb, 800 bp, 650 bp, 400 bp band 등이 전종에서 동일하게 나타났다. Primer #7(GAAACGGGTG)를 이용하였을 경우, 700 bp band가 진자경 81793, 소련 진자경에서 특이하게 나타났으며, 450 bp band가 진자경 81783에서 보였다. Primer #8(GTGACGTAGG)의 경우, 1.1 kb band와 0.9 kb band가 대부분 동일하게 나타났으나 800 bp band가 미마끼에서 특이하게 나타났다. 이러한 결과는 RAPD 기술을 이용하여 쉬운 방법으로 품종간의 분류를 할 수 있음을 시사하며, 위의 data를 가지고 Similarity Index(SI)를 구하여 각 변종간 또는 변종내 원연관계를 밝힌 결과, 자경종과 황숙종은 0.11의 SI를 자경종 81783과 소련 진자경은 0.08의 SI를 가져 가장 가까운 연관관계를 가졌으며, 한국인삼연구소에서 육성된 KG101은 황숙종 및 청경종과 0.13의 SI를 가져 육종과정에서 KG101이 황숙종에서 유래했음과 일치하는 결과를 얻었다. 자경종은 일반적으로 계통간에 상당한 변이를 보이고 있다.

## 인 용 문 헌

1. Lee, C.H.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **12**, 11 (1988).
2. Park, H.: *Proc. 3rd Intl. Ginseng. Sym.*, 151 (1980).
3. Eames, A.: *Morphology of the Angiosperms*. McGraw-Hill, New York (1961).

4. Stebbins, G.L.: *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. Addison-Wesley, Reading, Mass (1971).
5. Radford, A.W., Dickison, W.C., Massey, J.R. and Bell, C.R.: *Vascular Plant Systematics*, Harper and Row, New York (1974).
6. Kruckeberg, A.R.: *Taxon*, **18**, 92 (1969).
7. Gibbs, R.D.: *Chemotaxonomy of Flowering Plants*. 4. Vols. McGill-Queens University Press, Montreal (1974).
8. Hamrick, J.L. and Allard, R.W.: *Evolution*, **29**, 438 (1975).
9. Mabry, T.J.: *Plant Syst. Evol.*, **126**, 79 (1976).
10. Nam, H.G., Giraudat, J., den Boer B., Moonam, F., Loos W.D.V., Hauge, G.M. and Goodman, H.W.: *The Plant Cell* **1**, 699 (1989).
11. Burr, B., Ebola, S.V., Burr, F.A. and Beckman, J.S.: The application of restriction fragment length polymorphism to plant breeding. In: *Genetic Engineering Principles and Methods*, Vol. 5 (ed.), Plenum Press, 45 (1983).
12. Lim, Y.P. and Choi, K.-T.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **14**, 310 (1990).
13. Lee, J.H., Lim, Y.P. and Choi, K.-T.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **17**, 39 (1993).
14. Mullis, K.B. and Fakiina, F.A.: *Methods in Enzymology*, **155**, 335 (1987).
15. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Schraf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T. and Erlich, H.A.: *Science*, **239**, 487 (1988).
16. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V.: *Nucl. Acids Res.*, **18**, 6531 (1990).
17. Waugh, R. and Powell, W.: *Trends in Biotechnology*, **10**, 186 (1992).
18. Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B.: *Plant Molec. Biol. Reporter* **1**, 2 (1984).
19. Bray, J.R. and Curtis, J.T.: *Ecological Monographs*, **27**, 325 (1957).
20. Fritsch, P., Hanson, M.A., Spore, C.D., Pack, P.D. and Rieseberg, L.H.: *Mol. Biol. Rep.*, **11**(1), 10 (1993).
21. Munthali, M., Ford-Lloyd, B.V. and Newbury, H.J.: *PCR Methods and Application*, **1**, 274 (1992).
22. Rieseberg, L.H., Choi, H., Chan, R. and Spore, C.D.: *Heredity* (1992).
23. Reiter, R.S., Williams, J.G.K., Feldmann, K.A., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. and Scolnik, P.A.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 1477 (1992).