

## 18S rDNA를 이용한 인삼(*Panax ginseng*)의 내생균근 균의 동정

엄안흠\* · 어주경<sup>1</sup> · 김동훈<sup>1</sup> · 정현숙<sup>1</sup>

한국교원대학교 자연과학연구소, <sup>1</sup>생물교육과

(2004년 5월 19일 접수, 2004년 6월 14일 수리)

아바스큀라 내생균근(arbuscular mycorrhizae, AM) 균은 대부분의 육상식물 뿌리와 공생하며, 식물의 성장에 도움을 주는 균이다. 인삼은 다년생 식물로서 뿌리를 약재로 사용하는 대표적인 약재 중 하나이다. 본 연구에서는 우리나라 8개 지역에서 인삼을 채집하여 AM 균을 염색을 통하여 형태적으로 관찰하고, 분자생물학적인 방법을 사용하여 뿌리내에 공생하는 다양한 AM 균을 확인하였다. 인삼의 뿌리에 감염되어 있는 AM 균을 염색하여 형태적으로 관찰한 결과 감염률이 낮고 흐리게 염색되었다. 또한 균사와 vesicle 이 발견되었고 이들은 Arum-type 으로 판단되지만 arbuscule을 관찰하지 못했기 때문에 Arum-type으로 단정하기는 어려웠다. 식물 내에 공생하는 AM균들의 종류를 확인하기 위하여 채집된 인삼의 뿌리에서 내생균근 균의 DNA를 AM균에 특이적인 18s rDNA primer 를 이용한 nested PCR을 수행하여 AM 균의 18S rDNA중 일부를 확보하였다. 증폭된 DNA는 클로닝을 통해서 개별 내생균근 균 종의 염기서열들로 분리하였고, 이들은 *AluI*, *HinfI*과 같은 제한 효소를 사용하여 RFLP하였다. RFLP 패턴에 따라 그룹을 나누어, 각 그룹에서 1개씩 염기서열 분석을 수행하였다. 염기서열은 기존의 서열과의 유사성과 계통 관계의 분석을 통하여 모두 AM균인 것으로 확인되었고, 다음 2개의 종과 가장 유사한 것으로 판단되었다; *Paraglomus brasilianum*, *Glomus spurgum*이 중 *Paraglomus*에 속하는 종인 *P. brasilianum*. 이 인삼의 뿌리에서 공통적으로 관찰되어 이들 균과 인삼과의 특이적 관계에 관하여 추측할 수 있었고, *G. spurgum*은 유사한 것으로 분석된 염기서열들이 계통도 상에서 특이한 분지를 형성하는 것으로 나타났는데, 이들 분지에 대해서는 확충된 염기서열들과 비교 분석과 같은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

**Key words:** arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus spurgum*, *Panax ginseng*, *Paraglomus brasilianum*, RFLP

### 서 론

내생균근 균은 식물과 공생관계를 유지하면서 생존하고 있으며, 지구 상에 존재하는 식물의 약 95%정도가 내생균근 균과 공생관계를 맺고 것으로 알려져 있다<sup>25</sup>. 매우 광범위한 공생관계를 갖는 식물과 AM 균은 그에 따른 필요충분 조건을 만족시켜야만 한다. 즉, 식물체는 내생균근 균의 생존과 성장에 필요한 양분으로 탄소원을 제공하고 동시에 내생균근 균은 식물체가 흡수하기 어려운 무기 원소인 질소(N), 인(P), 칼륨(K), 아연(Zn), 구리(Cu), 마그네슘(Mg), 칼슘(Ca) 등을 식물체에 공급하며<sup>6,12,14,19</sup>, 또한 중금속에 대한 저항성<sup>7</sup>, 염분토양에 대한 저항성<sup>15</sup>, 수분압력에 대한 저항성<sup>4</sup>, 그리고 물리적으로 뿌리가 침투하기 어려운 토양의 틈새에 균사를 침투시킴으로 인해서 형성되는 근권은 위와 같은 이점을 식물체에게 공급하기 위한 중요한 전제조건으로 생각된다. 이와 같이 식물의 성장에 중요한 역할을 하는 AM 균은 화학비료의 사용을 줄이는 동시에 생물 농약으로 이용할 수 있어 환경친화적 농업으로의 이용 가능성으로 인해 많은 연구들이 있어왔다<sup>9</sup>. 육상식물의 대부분이 이들 균과 공생관계에 있으며, 식물에 의해 생산된 탄소의 상당 부분이 균근을 통하여 지하생태계로 이동한다는 사실과, 식물의 생태에 큰 역할을 한다는 연구 결과들이 보고되어, 현재

이들 균에 대한 생태학적 관심이 높아지고 있다.

그러나 이러한 유용한 균의 연구가 다양하게 이루어지지 않고 있으며 그 이유는, 균의 분류와 동정이 대단히 어렵다는 것과 균이 배지상에서 배양이 가능하지 않다는데 있다. 연구의 대부분이 토양에서 형성되는 포자를 채취하여 현미경적 관찰을 하는 것이지만<sup>20</sup>, 포자의 형태만으로는 변이가 많지 않아 종을 동정하기는 어려운 것으로 보고되고 있다<sup>13</sup>. 또한 포자는 토양에서 형성되므로 실제로 식물의 뿌리에 서식하고 있다고 보기는 어렵다. 따라서 식물의 뿌리 내에 어떤 균들이 공생하는지를 파악하기 위해서는 뿌리내의 균들을 분리 배양하여 동정하여야 하나 현재로서는 불가능 하다. 그리고 뿌리에 감염된 균의 형태를 이용하여 직접 동정하는 방법 또한 속 수준 이하에서는 가능하지 않은 것으로 알려져 있다. 따라서 AM균의 형태적인 동정의 한계를 극복하기 위하여 현재의 분자생물학적 기법을 AM 균의 동정에 이용하려는 시도들이 이루어지고 있는데, 특히 내생균근 균의 DNA를 이용하여 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)<sup>11</sup> 및 AFLP(Amplified fragment-Length Polymorphism)<sup>18</sup> 등과 같은 방법을 통하여 동정하는 연구와, AM 균의 ITS 지역 및 18S rDNA 지역에 특이적인 PCR primer 를 개발하여<sup>16</sup> 뿌리 속에 사는 다른 생물들의 DNA를 제거하고 AM균의 DNA만을 확보하기 위한 연구들이 이루어지고 있다. 확보된 AM균의 DNA는 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)를 통해서 손쉽게 동정이 가능하다는 연구결과도 보여지고 있다<sup>17</sup>. 이러한 연구결과를 바탕으로 내생균근 균의 밝혀진 서열을 이용하여 계통적 연구가 가능

\*연락처

Phone: 82-43-230-3843; Fax: 82-43-232-2695

E-mail: comah@knu.ac.kr

한 단계에 있다<sup>21)</sup>.

인삼은 고부가가치의 특용작물로서 오래 전부터 사용되어 온 귀한 약재이다. 인삼은 다년생 식물로서 뿌리가 발달하여, 뿌리를 약재로 사용하는 식물이다. 인삼의 뿌리는 다양한 종류의 이차대사산물들을 합성하는데, 일반적인 균의 침투가 일시적으로 방어 기작에 관련된 유전자의 발현을 촉진하며 인삼추출물 중 사포닌이 항균작용을 보인다는 연구<sup>3)</sup>로부터 이들 이차대사산물들은 일반적으로 토양에 존재하는 병원균들로부터 식물의 뿌리를 보호하기 위해 분비되는 물질로 추측된다. 균근이 식물의 성장을 돕고, 병원균에 대한 내성을 높인다는 기존의 연구 결과를 고려할 때 인삼에서도 균근의 역할은 클 것으로 보이지만 현재까지는 이에 관련된 연구가 거의 없는 실정이다. 따라서 AM 균의 어떤 종이 그리고 어떠한 형태로 인삼 뿌리에 감염되는지를 뿌리 염색을 통한 전통적 관찰 방법과 분자생물학적 방법을 이용하여 조사하고자 한다.

## 재료 및 방법

**인삼 채집.** 전국의 8개 인삼재배 지역에서 인삼을 채집하였다(경북 영주, 전북 무주, 충남 금산, 충북 청원, 충북 불정, 충북 증평, 충북 보은, 충북 괴산). 내생균근 균의 감염 확인을 위한 염색과 분자생물학적 방법을 이용하기 위한 DNA 추출을 위해서 채집된 인삼의 뿌리를 사용하였다.

**뿌리 염색 및 관찰.** 채집한 뿌리를 물로 씻어 흙을 제거한 후 약 1 cm 정도 길이로 잘라 시험관에 담아 염색에 사용하였다. 2.5% KOH 용액을 인삼의 뿌리가 잠길 정도로 넣고, 121°C에서 15분간 가열하여 조직세포가 가지고 있던 세포 내용물들을 제거하였다. 1% HCl 용액에서 상온에서 12시간 방치한 후 0.05% trypan blue 용액으로 121°C에서 15분간 염색하여 광학현미경 상에서 균근의 감염여부를 확인하였다<sup>9)</sup>.

**DNA 추출.** 채집한 뿌리를 물로 세척하고 상온에서 90분 동안 건조시켜 뿌리 0.5 g씩을 막자 사발에서 갈아 cTAB 방법으로 DNA를 추출하였다<sup>2)</sup>. 추출된 DNA는 각각의 농도를 20 ng/ $\mu$ l로 맞추어 PCR 반응에 이용하였다.

**PCR.** 모든 DNA 시료를 nested PCR 방법<sup>26)</sup>에 의해 증폭하였으며, 추출된 주형 DNA를 PCR master mix(Promega Co., USA)에 넣고 진핵생물 universal primer인 NS1/NS4로 18s rDNA 지역을 증폭하였다. PCR 반응물은 1% agarose gel 상에 전기영동하여 EtBr(ethidium bromide)로 염색하고 흐르는 물에 탈염하여 약 1100 bp의 밴드를 확인하였다. 남은 반응물은 TE buffer 를 이용하여 1/100로 희석한 다음 두 번째 단계 PCR의 주형 DNA로 사용하였다. 두 번째 PCR은 내생균근 균에 특이적인 18s rDNA primer인 AML1/AML2를 이용하여 첫 번째 PCR 과 동일하게 수행하였다<sup>10)</sup>.

**Cloning.** PCR의 최종 반응물을 1% agarose gel상에서 전기영동하여 예상된 크기의 DNA band 를 확인하고, 예상된 것과 일치하는 밴드만을 오려내어 DNA를 정제하였다. 정제된 DNA와 pGEM-T Easy Vector(Promega Co., USA)를 3:1 비율이 되도록 맞추어 넣고, 2X rapid ligation buffer, T4 DNA ligase 과 멸균수를 넣어 5분 동안 원심분리 한 후 4°C에서 16-24시

간 배양하였다. 처리된 각각의 반응액을 5분간 원심분리하여 가라앉은 시료에 competent cell(JM109, Promega Co., USA)을 ligation 반응액에 넣고 42°C에서 50초간 열 충격을 주었다. Transformation된 cell 에 LB medium을 첨가하여 37°C에서 1시간 30분간 150 rpm의 속도로 배양하였다. LB/ampicillin/IPTG/X-gal plates에 각각의 transformation된 세포의 배양액을 도말한 후, 37°C incubator에서 12시간 배양한 후에 나타난 콜로니를 확인하였다. 흰색의 콜로니를 취하여 30  $\mu$ l의 LB/ampicillin 배지에 넣고 LB/ampicillin medium을 첨가하여 37°C에서 150 rpm으로 12시간 배양하였다.

**PCR-RFLP.** PCR 반응물을 RFLP에 사용하였다. 제한효소는 *HinfI*과 *AsuC21*(Bioneer Co., Korea)을 사용하여 37°C incubator 에서 90분 동안 반응시켰다. 반응물은 3% agarose gel 에서 25분간 전기영동하여 RFLP band 패턴을 확인하고 촬영하였다.

**Plasmid 추출.** LB/ampicillin medium(50  $\mu$ g/ $\mu$ l)에 cell 배양액을 넣고, 37°C에서 150 rpm의 속도로 12시간 배양하였다. 배양된 cell을 5,700 rpm 속도로 4°C에서 10분간 원심분리하여 cell을 침전시킨 후, 배양된 cell을 농축시키기 위하여 배양액을 버리고 멸균수를 넣어 cell을 재 부유 시켰다. 이것을 5,700 rpm, 4°C, 10분간 원심분리하여 cell을 침전시킨 후, 침전된 cell에서 플라스미드를 추출하였다.

**Sequencing.** cloning을 통하여 나온 콜로니들에 대한 RFLP 패턴에 따라서 몇 개의 서로 다른 그룹으로 구분하였다. RFLP 패턴이 같은 것은 같은 DNA가 삽입된 것으로 판단하여 각 그룹 마다 하나의 colony에서 유래한 plasmid를 선택하였다. plasmid내 insert DNA의 증폭에는 standard primer SP6와 T7이 사용되었으며, 염기서열결정은 ABIPRISM(Perkin-Elmer, USA)을 이용하여 Eugeneteck Co. (Korea)에서 수행하였다.

**자료 분석.** 염기서열들을 NCBI에 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)하여 일치도가 가장 높은 종을 확인함과 동시에 NCBI 에 등재되어 있는 대표적인 내생균근 균의 염기서열을 받아 clustal X(ver. 1.81)를 이용하여 alignment을 수행하였고<sup>24)</sup>, 동일한 크기로 편집을 한 후, 계통도로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

**뿌리 관찰.** 8개 인삼 뿌리를 염색한 결과 8개의 시료 중 2개에서 내생균근 균의 구조를 가진 균사와 vesicle을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). Vesicle의 출현 빈도는 다른 식물들의 뿌리에서 관찰된 바와 달리 적은 수가 분포하고 있었고 수직상 구조인 arbuscule도 모든 표본에서 관찰할 수 없었다. 뿌리 세포 사이로 뻗은 AM균의 균사 형태 및 vesicle을 관찰 할 수 있었으며 이는 Gallaud에 의한 균근 감염유형<sup>22)</sup>에 따라 구분을 하면 전형적인 Arum-type의 균근 관계를 가지고 있는 것으로 보여진다. 그러나 arbuscule이 관찰 되지 않았으므로 더 많은 관찰이 필요할 것으로 생각된다. 균근의 형태적 특징을 살펴보면 vesicle이 선명하게 관찰되는 것으로 보아 Glomineae 아목에 속하는 균들이 감염되어 있다는 것을 확인할 수 있었다.

**염기서열 분석.** 8개의 인삼 시료로부터 2개의 시료에서만

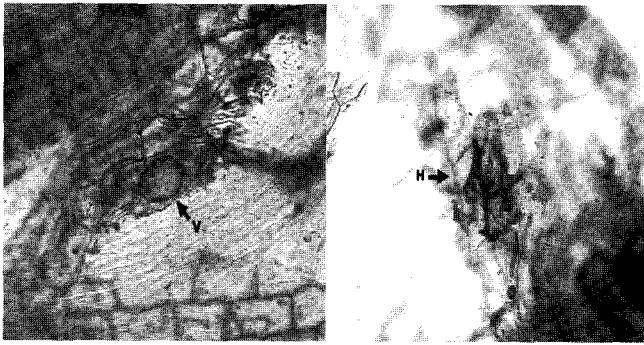


Fig. 1. Hairy roots of *Panax ginseng* stained with trypan blue, showing hyphae without septum. (H; hypha, V; vesicle, x128)

균근 균의 DNA를 얻을 수 있었다. 내생균근 균의 RFLP에서 구분능력이 뛰어나 기본적으로 사용되어 온 제한효소 *HinfI*과 기본적인 RFLP 패턴은 *AluI*과 유사하나 *Fusarium* 등과 같은 기타 균들을 제거할 수 있는 제한효소 *AsuC21*<sup>10)</sup>을 통해서 RFLP패턴에 따라 4개의 그룹으로 나눌 수 있었다(Fig. 2). 4개 그룹의 염기서열을 NCBI의 DNA 데이터 베이스에서 BLAST 검색을 통하여 기존의 밝혀진 염기 서열 중에서 가장 유사도가 높은 서열을 찾은 결과, 4개의 그룹 중에서 *HinfI*에 의해서는 절단되지 않으나 *AsuC21*에 의해 절단된 그룹이 *Paraglomus brasilianum*과 98%의 가장 높은 상동성을 보였으며, 그 외 3개의 group은 모두 *Glomus spurgum*과 98%, 96%, 그리고 93% 정도로 상동성이 높은 것으로 나타났다. 이들 세 개의 염기서열은 계통수에서 다른 분지에 포함되었다(Table1, Fig. 3). 따라서 두 개의 염기서열은 하나의 종으로 판단되며 나머지 하나는 상동성과 계통수에서의 거리로 보아 다른 종일 것으로 생각된다. 두 인삼시료에서는 *Glomus*속과 *Paraglomus*속에 속하는 균들만을 발견할 수 있었다.

*G. spurgum*과의 상동성이 96%와 93%인 염기서열들을 포자의 형태적 관찰과 함께 이루어질 수 없었기 때문에 다른 종으로 판별하기보다는 종 내의 변이로 간주할 수도 있겠으나, 설계된 primer의 특징이 기본적으로 종 간에 18S rDNA 내에서 유전적으로 변이가 높은 지역을 증폭할 수 있도록 되어 있는 이유와<sup>10)</sup>, NCBI의 염기서열 데이터베이스로부터 확보한 기존에 알려진 염기서열들과 본 연구에서 분석된 염기서열들을 종합하여 진화적인 계통수를 작성해서 살펴보면 *G. spurgum*과는 진화적인 계통수상에서 전혀 다른 분지를 형성하므로 종 내의 변이 보다는 서로 다른 종으로 보는 것이 타당할 것으로 생각된다. 따라서 두 시료에서 확인된 내생균근 균은 총 2속 3종으로 볼 수 있다. 그러나 BLAST 결과와 계통수에서 보여진 결과는 현재 이 두 염기서열과 가장 유사한 종은 *G. spurgum*이나 상동성이 낮은 편이며, 또한 계통수 상에서도 완전히 다른 분지를 형성하기 때문에 이에 대한 확인작업이 필요하다. 현재까지는 보고되지 않은 새로운 종일 가능성이 있으나 이를 확인하기 위해서는 포자로부터 유사한 염기서열을 확보해야만 가능하다. 이는 위의 인삼이 채취된 지역의 토양을 이용하여 포자를 배양하여 확인해야 할 것이다.

본 연구결과에서 중요하게 생각되는 점은 *Paraglomus*에 속

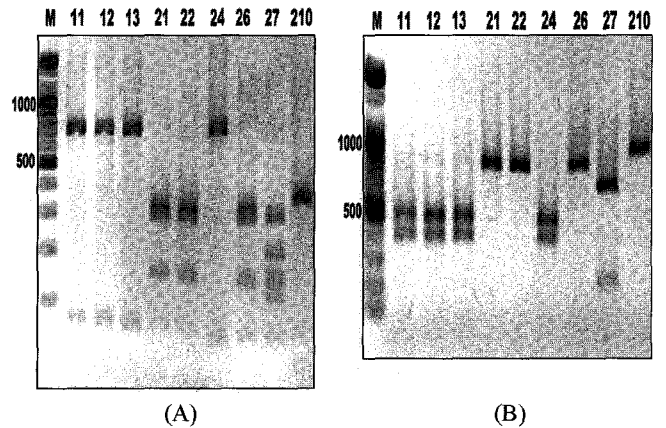


Fig 2. Restriction fragment patterns of partial 18S rDNA gene of arbuscular mycorrhizal fungi colonized in *Panax ginseng*. (A) 18S rDNA digested by *AsuC21* (B) 18S rDNA digested by *HinfI*. Four different groups were distinguished by both enzymes and one clone was selected and sequenced from each group. Lanes 11, 12, 13, 24 for Group1; Lanes 21, 22, 26 for Goup2; Lane 27 for Group 3; Lane 210 for Group4. M; molecular marker.

하는 종을 아외의 식물 뿌리에서 분자적으로 확인한 결과이다. 18S rDNA를 통해서 포자 상태에서만 확인된 것을 뿌리에 감염되어 있는 균사로부터 직접 확인하게 된 것이다. 기존의 AM1 프라이머<sup>8)</sup>와 같은 AM균 특이 프라이머는 *Paraglomus*와 *Archeospora*와 같은 균들을 증폭시킬 수 없었으며 Redecker 등은<sup>16)</sup> 특정 분류군에 특이한 여러 가지 프라이머를 개발하였으나 많은 제한 점들이 있었다. 이러한 문제점들을 극복하기 위해 새로운 AM균에 특이적 PCR프라이머인 AML1과 AML2를 설계하였는데<sup>10)</sup>, 이 프라이머 역시 AM균 이외의 다른 균들도 일부 증폭시키는 문제점을 보이기는 했으나 기존의 다른 프라이머에 비해서는 쉽게 사용이 가능하고, 현재까지 보고된 대부분의 AM균을 특이적으로 증폭시킬 수 있는 장점을 가지고 있다. 따라서 이들 종의 분자적 검증이 가능하게 됨으로써, 이들 종이 실제적으로 식물과 생리, 생태적으로 어떠한 공생관계를 맺고 살아가는지에 대해서 활발히 연구할 수 있는 가능성을 제공했다고 생각한다.

대부분의 인삼뿌리에서 AM균이 관찰되지 않았고 감염의 정도도 낮게 나타났으며 종의 수 또한 다양하지 않은 것으로 나타났다. 이는 일반적으로 인삼의 재배와 같은 경작지에 사용되는 다량의 농약과 화학비료의 영향일 수 있을 것으로 추정할 수 있는데, 뿌리 AM균의 감염상태를 형태적으로 관찰한 결과에서도 보여지듯이 분자생물학적 분석 결과에서도 *Paraglomus*와 *Glomus*에 속하는 균들만이 관찰되었다. 기존의 일반적인 경작지에 대한 연구에서 볼 때 경작지에 분포하는 내생균근 균의 92% 또는 97%가 *Glomus*속에 속한다.<sup>8,23)</sup> 그러나 위의 결과들은 AM1프라이머를 사용하였으므로 *Paraglomus*의 DNA를 확보할 수 없었다. 따라서 경작지에서 *Glomus*가 우점을 보이고 *Paraglomus*에 대해서는 알 수 없다. 그러나 본 연구에서 사용된 프라이머와 동일한 프라이머를 사용하여 대두 및 옥새의 뿌리를 조사한 결과<sup>10)</sup> *Paraglomus*는 관찰되지 않고 대부분 *Glomus*만이 관찰되었다는 점에서, 인삼과 *Paraglomus*의 관계에

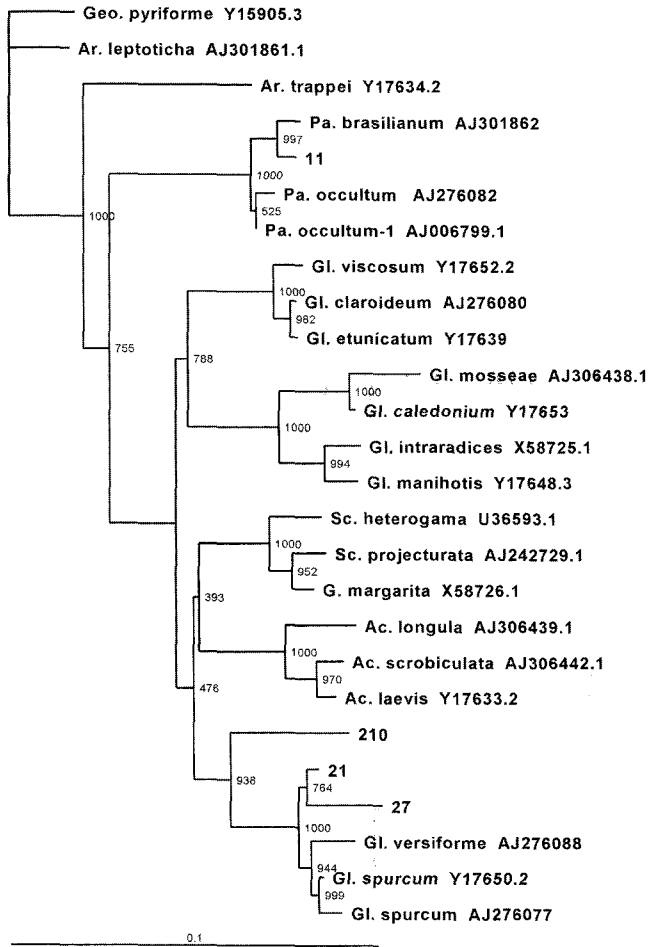


Fig 3. Neighbour-joining phylogenetic relationships among arbuscular mycorrhizal fungi inferred from partial 18S rDNA of the fungi colonizing *Panax ginseng*. Bootstrap values (1000 replicates) on each clade.

관한 보다 깊이 있는 지속적인 연구가 필요하다고 보여진다. 또한 이들 균이 실제로 인삼의 성장이나, 약효의 증가에 어떠한 영향을 끼치는 지에 관한 후속 연구가 반드시 필요하다고 보여진다.

인삼에 관한 연구에서 특히 인삼의 약리학적 측면의 연구가 상당히 이루어 졌으며, 그에 따라 사포닌의 성분을 조절하는 주요인자를 발견하기 위한 연구가 진행되고 있다<sup>27)</sup>. 뿐만 아니라 미량 및 다량 원소를 통해서 인삼에 함유된 사포닌의 성분을 변화시키는 연구들이 다양하게 이루어져 왔다. 식물체는 외부의 균의 침투로부터 저항하기 위해 방어물질을 분비하기 위해 방어기작과 관련된 유전자가 일시적으로 발현된다는 연구와<sup>3)</sup>

인공적인 배지상에서 사포닌이 항균작용을 나타낸다는 연구결과를 바탕으로 인삼에 다량의 사포닌이 함유된 원인에는 내생균근 군도 일종의 주요인자로서의 역할이 있을 것으로 판단되며 이와 관련된 후속 연구가 필요하다.

사 사

이 논문은 한국학술진흥재단 연구비지원(KRF 2002-075-C00027)에 의해 수행되었음.

참고문헌

1. Abbas, J. D., Hetrick, B. A. D. and Jurgenson, J. E. (1996) Isolate specific detection of mycorrhizal fungi using genome specific primer pairs. *Mycologia* **88**, 939-946.
2. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1999) In *Short protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, Inc, New York.
3. Bonfante, P. and Perotto, S. (1995) Tansley Review No. 82: Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytologist* **130**, 3-21.
4. Busse, M. D. and Ellis, J. R. (1985) Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal *Glomus-Fasciculatum* Influence on Soybean Glycine-Max Drought Tolerance in High Phosphorus Soil. *Can. J. Bot.* **63**, 2290-2294.
5. Dehne, H. W. and Backhaus, G. F. (1986) The use of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in plant production I. Inoculum production. *Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten Pflanzenschutz* **93**, 415-424.
6. Elmes, R. P. and Mosse, B. (1984) Vesicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production 2. Experiments with maize zea-mays and other hosts in nutrient flow culture. *Can. J. Bot.* **62**, 1531-1536.
7. Gildon, A. and Tinker, P. B. (1983) Interactions of vesicular arbuscular mycorrhizal infections and heavy metals in plants 2. The effects of infection on uptake of copper. *New Phytologist* **95**, 263-268.
8. Helgason, T., Daniell, T. J., Husband, R., Fitter, A. H. and Young, J. P. W. (1998) Ploughing up the wood-wide web? *Nature* **394**, 431.
9. Koske, R. and Gemma, J. N. (1989) A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.* **92**, 486-505.
10. Lee, J. K. and Eom, A. H. (2003) Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing plant roots. in press.

Table 1. Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi from Genbank database with highest sequence similarity to each clone from *Panax ginseng*

Clone ID	Fungal Species	NCBI codes	Identities
21	<i>Glomus spurcum</i>	Y17650.2	785/795 (98%)
27	<i>Glomus spurcum</i>	Y17650.2	769/794 (96%)
210	<i>Glomus spurcum</i>	Y17650.2	747/795 (93%)
11	<i>Paraglomus brasilianum</i>	AJ301862	761/771 (98%)

11. Lee, J. K., Tae, M. S., Eom, A. H. and Lee, S. S. (2003) Restriction analyses of PCR amplified partial SSU ribosomal DNA to distinguish arbuscular mycorrhizal fungi from other fungi colonizing plant roots. *Mycobiology* **31**, 68-73.
12. Menge, J. A., Raski, D. J., Lider, L. A., Johnson, E. L. V., Jones, N. O., Kissler, J. J. and Hemstreet, C. L. (1983) Interactions between mycorrhizal fungi soil fumigation and growth of grapes in California USA. *Am. J. Enology Viticulture* **34**, 117-121.
13. Merryweather, J. and Fitter, A. (1998) The arbuscular mycorrhizal fungi of *Hyacinthoides non-scripta*: I. Diversity of fungal taxa. *New Phytologist* **138**, 117-129.
14. Mosse, B. (1973) Plant Growth Responses to Vesicular Arbuscular Mycorrhiza Part 4 in Soil Given Additional Phosphate. *New Phytologist* **72**, 127-136.
15. Pond, E. C., Menge, J. A. and Jarrell, W. M. (1984) Improved growth of tomato in salinized soil by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi collected from saline soils. *Mycologia* **76**, 74-84.
16. Redecker, D. (2000) Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* **10**, 73-80.
17. Redecker, D., Thierfelder, H., Walker, C. and Werner, D. (1997) Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order glomales. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1756-1761.
18. Rosendahl, S. and Taylor, J. W. (1997) Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP. *Mol. Ecol.* **6**, 821-829.
19. Safir, G. R., Boyer, J. S. and Gerdemann, J. W. (1971) Mycorrhizal enhancement of water transport in soy bean-D. *Science* **172**, 581-582.
20. Schenck, N. C. and Perez, Y. (1990) In *Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi*. Synergistic Publications, Gainesville, Florida. pp. 1-286.
21. Schuessler, A., Gehrig, H., Schwarzott, D. and Walker, C. (2001) Analysis of partial *Glomales* SSU rRNA gene sequences: implications of primer design and phylogeny. *Mycol. Res.* **105**, 5-15.
22. Smith, F. A. and Smith, S. E. (1997) Tansley review No. 96 structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* **137**, 373-388.
23. Tae, M. S. (2002) In *Molecular and morphological diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Mt. Work*. Korea National University of Education, Chungbuk.
24. Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL X: Improving the sensitivity of multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* **26**, 179-182.
25. Trappe, J. M. (1981) In *Advance in food producing systems for arid simiarid lands.: Mycorrhizae and productivity of arid and semiarid rangelands.* pp. 581-599.
26. vanTuinen, D., Jacquot, E., Zhao, B., Gollotte, A. and Gianinazzi, P. V. (1998) Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Molecular Ecology* **7**, 879-887.
27. Yeoman, M. M. and Yeoman, C. L. (1996) Tansley Review No.90. Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. *New Phytologist* **134**, 553-569.

#### Identification of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Colonizing *Panax ginseng* Using 18S rDNA Sequence

Ahn-Heum Eom,\* Ju-Kyeong Eo<sup>1</sup>, Dong-Hun Kim<sup>1</sup> and Hyeon-Suk Jeong<sup>1</sup> (*Institute of Natural Science and*  
<sup>1</sup>*Department of Biology Education, Korea National University of Education, Chungbuk, 363-791, Korea)*

**Abstract:** Morphological observation of roots and molecular technique were used to investigate the symbiotic relationships between arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and ginseng roots. Korean ginseng, *Panax ginseng*, was collected from 8 sites in Korea. Colonization pattern of AM fungi in ginseng roots was determined as an *Arum* type under light microscopes. Nested PCR using AM fungal specific primers was employed to amplify a partial region on 18s rDNA of AM fungi from the root extracted mixed DNA. The amplified DNA was cloned and analyzed by random fragment length polymorphism (RFLP) with restriction enzymes, *AluI*, *HinfI* and *AsuC21*. One from each RFLP pattern was selected for sequencing. A total 16 clones were sequenced and identified as 2 species of AM fungi; *Paraglomus brasilianum* and *Glomus spurcum*. *Paramglomus brasilianum* was found from most of the ginseng roots, in this study suggesting that this species of AM fungi could have specific relationship with the ginseng root. Possible roles of AM fungal species in ginseng roots are discussed.

Key words: arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus spurcum*, *Panax ginseng*, *Paraglomus brasilianum*, RFLP

\*Corresponding author