

분자마커에 의한 인삼 적변관련 유전자의 분석

이범수, 양덕춘¹⁾*

(주)바이오피아, 경희대학교 한방재료가공학과¹⁾

Gene Analysis Related to Red-skin Disease of Ginseng by Molecular Marker

Bum-Soo Lee and Deok-Chun Yang¹⁾*

Phytopia Research Institute, BioPia Co., Ltd., Yeongi, Chungnam 339-813, Korea

¹⁾College of Life Science & Center for Oriental Medicinal Materials and Processing, Kyung Hee Univ., Suwon 449-701, Korea

ABSTRACT

Panax ginseng discarded and lower than 4th grade is caused by red skin disease showing red color skin in ginseng. This kind of red skin ginseng is found a lot in *Panax ginseng* rather than *Panax quinquefolium*, and it is considered that red skin disease might be caused by gene. Therefore, this study was carried out to detect genes resistant to red skin disease using RT-PCR. RNA was extracted from three years old ginseng root of both red skin and normal portion in the same root. After RNA extraction, PCR amplification was performed from cDNA using many random primers. As a result, specific band for red skin was found. It is considered that the gene forming band has possibility to be related with red skin disease, and this gene should be decided if it's related with red skin disease. If that gene is related with red skin disease, it will be used for transformation to foster for resistance to red skin disease as well as for selection marker. However, if it's not related with red skin disease, more primers should be used to find gene related with red skin disease.

Key words : *Panax ginseng*, red skin disease, RT-PCR, PCR, primer

서언

인삼의 재배면적은 연차간 약간씩 상이하나 한국 담배인삼공사의 자료에 의하면 96년도의 전국 식부 계획면적은 백삼포가 2,000 헥타, 홍삼포가 800 헥타이다(최, 1996). 이중 홍삼포의 경우 식부 면적과 수

매실적 자료를 보면 89년에 이식지정면적은 홍삼포 750 헥타, 백삼포 3,040 헥타였고 93년도 수매실적자료에 의하면 홍삼제조용 6년근 수확면적은 488헥타로서 89년 이식면적 대비 수매면적은 65%이고 나머지 35%의 면적은 중도에 폐포가 되었다(최, 1996). 또 6년근 수확, 수매삼중 53%만 3등삼 이상이고 나

*교신저자 : E-mail : dcyang@khu.ac.kr

머지 47%는 4등과 등의 또는 수매에 응하지 못할 정도로 불량한 삼이었다. 폐포와 4등이하 등급의 원인의 90% 이상은 적변삼이라고 불리는 인삼의 표피 색택이 붉은 삼이 그 원인이다(Lee *et al.*, 2002). 이를 요약하면 이식삼의 약 59%가 적변삼인 것으로 환산된다. 93년도 수매 실적을 기준하여 볼 때, 적변에 의한 농민의 손실액을 6년근 3등삼 생산시를 가산하여 그 차액은 6년근 4등 이하에 의한 것이 약 95억원, 폐포에 의한 것이 120억, 계 215억원인 것으로 환산된다. 이 금액은 6년에 한한 것이므로 백삼의 경우도 적변발생이 6년근의 비율과 비슷할 것이므로 농민의 손실 총액은 대략 600억원이 상회할 것이다. 이는 6년근 총 수매액 약 635억과 비슷할 것으로 추정된다. 그러므로 적변이 없는 인삼을 생산하는 것이 인삼재배에서는 제일 중요한 과제이나 지금까지 해결을 못한 것은 복잡한 토양환경(Ahn *et al.*, 1982; Yang *et al.*, 1997) 등과 더불어 인삼 식물의 대사와 그 산물 및 그 산물이 어떤 화합물로 식물체 외부로 유출되고 있고, 그 유출물과 토양내의 물질과 결합하여 붉은 색소를 띠는 지의 복합적인 요인(Zhou *et al.*, 1990)을 종합 이해하여야 해결될 수 있을 것임을 연구를 진행하여 온 과정에서 새로운 의문으로 대두되기만 하고 있다. 지금까지 토양과 인삼체내 무기원소에 대한 조사(Ko *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2002), 미생물에 대한 조사(Yun and Yang, 2001; Lee and Lim, 1976) 등이 있었는데 이들은 각각 별개로 단순요인만 조사하였 뿐 식물의 대사산물, 외부로 유출되는 물질과 토양내의 물질과 결합성분 등의 연구는 없었다. 또 인삼의 종 중에는 우리나라에서 재배하고 있는 *Panax ginseng*과는 다른 종인 *Panax quinquefolium*은 우리나라 토양 조건에서 *P. ginseng*과 같은 포지에서 재배한 결과, *P. ginseng*은 적변삼율이 90% 이상인데 비하여 *P. quinquefolium*은 적변삼이 전혀 발생하지 않음을 발견하였다(이, 1995). 이는 유전적으로 적변에 관련된 유전자가 존재함을 의미한다. 따라서 본 연구는 *P. ginseng*과 *P. quinquefolium*의 DNA를 분석하기 위하여 RAPD를 수행하였으며, 또한 인삼개체에서 적변이 나타난 부위와 나타나지 않은 부위에서 RNA를 추출하여

cDNA를 제작하여 특이하게 적변에 관련하여 발현되는 유전자를 RT-PCR을 이용하여 탐색하고자 수행하였던 바, 얻어진 결과를 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험재료

표준경작법에 의하여 재배된 (전) 한국인삼연구소 연구원의 실험포에서 적변이 나타난 고려 인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer) 3년근을 채집하여 사용하였다.

2. DNA 추출

포장에서 채취한 인삼 엽조직 0.3 g의 시료를 채취하여 1.5 mL의 Eppendorf tube에 넣고 멸균된 프라스틱봉을 드릴에 장착하여 4℃하에서 10초 간격으로 30초간 미세하게 마세하며, 600 μ l의 DNA 추출버퍼(2% CTAB, 1.5 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris, pH 8.0, 2% soluble polyvinylpyrrolidone, 2% mercaptoethanol)를 첨가하여 30초간 완전히 마쇄한 후 30초간 vortex하였다. 이 추출액을 12,000 rpm에서 3분간 원심분리 한 후 상등액 500 μ l를 취하여 새로운 tube에 넣고 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) 500 μ l를 첨가하였다. 이 용액을 다시 30초간 vortex한 후 3분간 12,000 rpm으로 원심분리하여 상등액 300 μ l 취하여 새로운 tube로 옮긴 후 200 μ l의 isopropanol을 첨가하여 2분간 실온에서 방치한 후 4℃에서 10분간 12,000 rpm으로 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액은 버리고 70% ethanol용액 500 μ l로 2회 세척 후 건조하였다. 건조가 끝난 DNA pellet은 100 μ l의 TE buffer에 용해시켰다.

3. PCR

인삼 genomic DNA를 이용한 polymerase chain reaction(PCR)의 조건을 찾기 위해 PCR을 행하였다. PCR을 위한 genomic DNA의 최적농도 조건을 구명하기 위해 genomic DNA를 10 ng, 25 ng, 50 ng의 조건으로하여 총 20 μ l의 용량으로 PCR을 행하였으

며, 적합한 primer와 최적농도를 구명하기 위해서 UBC primer(University of British Columbia, Canada)를 대상으로 primer의 농도를 5 ng, 10 ng으로 하였다. 적합한 primer를 선별하기 위하여 300개의 UBC primer를 사용하여 2회 반복하여 명확하고 수가 많이 나타나는 primer를 선별하였다. PCR 반응은 96℃에서 2분간 pre-denaturation한 후, 94℃ 1분, 37℃에서 1분, 72℃에서 1분간씩 45 cycle을 반응 하였고, 최종적으로 72℃에서 15분간 수행하였다. PCR의 최적 annealing 온도를 구명하기 위하여 37℃, 45℃, 55℃로 달리하여 PCR을 실시하였다.

4. RT-PCR

UltraspecII RNA isolation kit를 이용하여 RNA가 추출되었다. 고려인삼 3년근 1개체중에서 적변이 발생된 부위 (R)와 건전부위 (N)의 RNA를 추출하여 사용하였다. Premix-RT/PCR kit를 이용하여 cDNA를 합성하였는데, cDNA를 합성하기 위하여 5 µl의 10x RT buffer, 5 µl의 0.1 M DTT, 10 µl의 1 mM dNTP, 120 pmol Random hexamer, 3 µg RNA, 500 U RNase inhibitor, 100 U reverse transcriptase로 하여 총량 50 µl로 하였다. Reverse transcriptase를 넣기전에 5분간 실온에 방치하고, RT를 넣고 37℃에서 1시간 동안 방치하였다. 이렇게 형성된 cDNA는 PCR을 이용하여 증폭되었는데, 5 µl의 10x PCR buffer, 4 µl의 2.5 mM dNTP, 20 pg의 Random primer, 20 ng의 cDNA를 혼합하여 총량이 50 µl가 되게하였다. PCR 조건으로서 96℃에서 2분간 pre-denaturation하고서 96℃에서 1분 denaturation, 42℃에서 1분 annealing, 72℃에서 1분 extension으로서 45 cycle로 수행하고서 최종적으로 72℃에서 15분간 post extension하였다.

결과 및 고찰

1. RAPD를 위한 PCR 조건

20 µl의 Premix(Bioneer)에 부가되는 template DNA, primer의 량을 결정하기 위하여 실험한 결과,

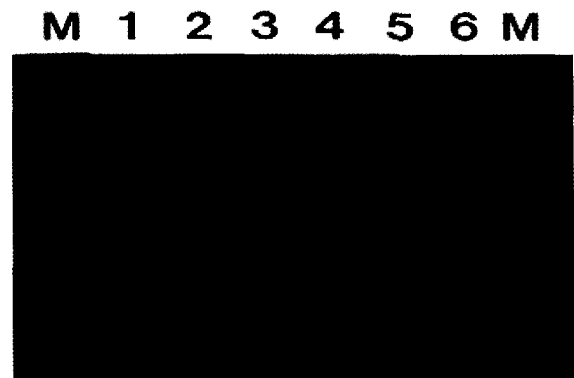


Fig. 1. Banding pattern of *Panax ginseng* according to the concentration of DNA and primer. M, Marker; 1, 10 ng DNA and 5 ng primer; 2, 10 ng DNA and 10 ng primer; 3, 25 ng DNA and 5 ng primer; 4, 25 ng DNA and 10 ng primer; 5, 50 ng DNA and 5 ng primer; 6, 50 ng DNA and 10 ng primer

DNA 10ng에서 50ng, 그리고 primer 5ng와 10ng의 처리간에는 유의한 차이는 나타내지 않았으나(Fig. 1), 50 ng의 template DNA, 10 ng의 primer에서 PCR을 수행하는 것이 가장 구분이 용이할것으로 생각되었다.

2. 인삼종간의 RAPD 패턴조사

인삼 종간의 DNA분석을 위하여 5종의 UBC primer 30, 31, 33, 34, 43를 이용하여 *P. ginseng*, *P. quinquefolium* 및 *P. japonicum*를 대상으로 RAPD를

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M



Fig. 2. PCR amplification by RAPD for DNA analysis between interspecific ginsengs. M, Marker; 1, 4, 7, 10, 13, *Panax ginseng*; 2, 5, 8, 11, 14, *P. quinquefolium*; 3, 6, 9, 12, 15, *P. japonicum*. 1, 2, 3, UBC-30; 4, 5, 6, UBC-31; 7, 8, 9, UBC-33; 10, 11, 12, UBC-34; 13, 14, 15, UBC-43.

수행한 결과, UBC primer 31, 44에서는 적변에 내성을 가진 *P. quinquefolium*에서는 밴드가 형성되지 않았다(Fig. 2). 또한 UBC primer 34번에서는 *P. japonicum*에서만 다른 부위에서 밴드가 진하게 나타났다. 그러나 이런 차이가 적변에 관련되어진 밴드인지의 여부는 판단하기 매우 어렵다. 따라서 적변이 형성된 부위와 형성되지 않은 부위에서 발현되는 유전자의 검색을 통해서 본 연구를 수행함이 현실적일 것으로 판단되었다.

3. 적변관련 유전자 탐색을 위한 RT-PCR의 이용

DNA 수준에서 적변관련 유전자를 탐색하는 대신 RNA 수준에서 탐색하는 방법인 RT-PCR을 사용하는 이유는 RAPD를 사용할 경우 너무 많은 band의 차이가 나와서 그 band가 적변과 관련된 유전자인지를 식별하는 데에 어려움이 있을 것으로 사료되어 1개의 인삼 개체내에서 적변이 유발된 부위와 유발되지 않는 부위의 RNA를 추출하여 유전자 발현을 나타내는 부위에서 band의 양상을 살펴보면 그 차이가 나는 band에서 적변을 유발 또는 내성을 나타내는 유전자가 될 가능성이 높아질 것을 가정하여 RT-PCR을 수행하였다.

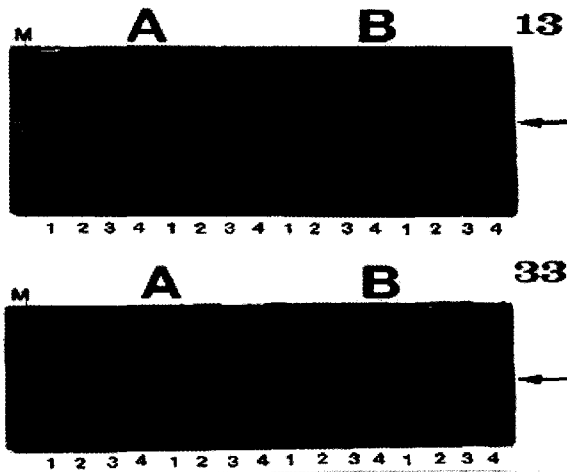


Fig. 3. Banding pattern amplified by RT-PCR primers(13 and 33) according to cDNA synthesis agents - oligo-dT(A) and hexamer(B), and reaction solution(1 μ l to 4 μ l). M; 1 kb marker, 1; 1 μ l, 2; 2 μ l, 3; 5 μ l, 4; 10 μ l reaction solution. UBC primer 13(CCTGGGTGGA), 33(CCGGCTGGAA).

상기 RAPD실험에서 총 300개의 UBC primer를 이용하여 PCR을 수행한결과 DNA절편을 나타내는 primersms 186개이었으며, 이중에서 다시 이차조사를 한 결과 91개의 밴드를 형성하는 UBC primer를 선발하였다(data 미제시). 이런 결과를 중심으로 일부 primer 13번과 33번을 이용하여 RT-PCR 수행에 사용하였다. 우선 최적의 RT-PCR를 위해서 추출된 RNA에서 cDNA를 합성할 때 사용되는 oligo-dT와 hexamer를 비교하여 이때 반응액을 함량별로 PCR를 수행한 결과 oligo-dT를 이용하여 cDNA를 합성한 경우에는 반응액의 함량과 primer에 관계없이 전혀 밴드를 형성하지 않았으나 hexamer를 이용한 경우에는 밴드가 형성되었으며, 특히 반응액 1ul를 첨가한 처리구에서 primer 13번 및 33번 공히 밴드가 형성되었다(Fig. 3).

또한 DNA의 RAPD방법에 의하여 선발된 91개의 UBC primer중에서 2, 3, 12, 13, 17, 25, 33, 64번 8개를 대상으로 적변이 형성된 부위(R)의 형성되지 않은 부위(N)의 인삼의 RNA로부터 hexamer로 합성된 cDNA를 이용하여 annealing 온도를 37 $^{\circ}$ C로 하여 RT-PCR를 수행한 결과 모두 밴드가 형성되었으며 적변부위와 비적변부위간에 cDNA양상의 차이를 발견할 수 있긴하였으나 육안적인 구별이 쉽지 않았다. 그러나 그중에서도 13번, 25번, 33번 및 64번에서는 다소 차이가 심하게 나타남을 알수 있었다(Fig.

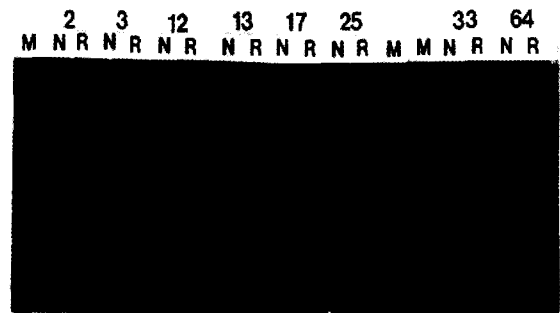


Fig. 4. Banding pattern amplified by RT-PCR according to UBC primers from cDNA constructed from RNA extracted from red skin (R) and normal (N) portion of ginseng. Primer 2;cctgggcttc, 3;cctgggctta, 12;cctgggtcca, 13;CCTGGGTGGA, 17;cctgggcctc, 25 ; A C A G G G C T C A , 33 ; c c g g c t g g a a , 64;GAGGGCGGGA.

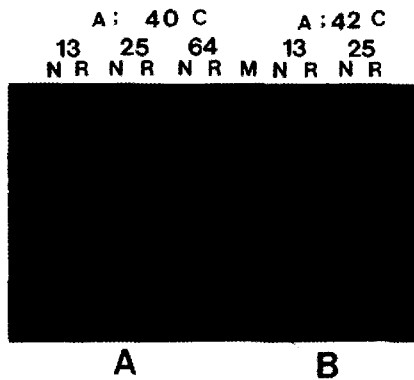


Fig. 5. Banding pattern amplified by RT-PCR according to annealing temperature, 40°C and 42°C of cDNA constructed from RNA extracted from red skin (R) and normal (N) portion of ginseng using primers, UBC-13(CCTGGGTGGA), 25(ACAGGGCTCA), and 64(GAGGGCGGA).

4). 그러나 RAPD의 경우에 재현성이 매우 떨어짐을 감안하여 annealing 온도를 높임으로서 밴드의 선명도를 확인 할 수 있으므로 기대된다.

상기 실험에서 cDNA에서 RT-PCR에 의해 형성된 밴드가 명확히 나오지 않고 재현성 여부가 문제되어 다시 상기 실험에서 사용한 annealing 온도 37°C에서 40°C 및 42°C로 온도를 높혀 조사한 결과 42°C에서 40°C에서 더 선명한 밴드가 형성되었으며(Fig. 5) 밴드 차이도 확인할 수 있었다.

또한 새로운 UBC primer 17번에서는 적변삼과 정상삼간에 밴드의 선명도가 확연히 나타났는데 1KB보다 큰 밴드의 경우에는 적변삼에서는 매우 희미하게 나타났지만 정상삼에서는 매우 선명히 나타났고 반면에 1KB보다 적은 밴드의 경우에는 오히려 적변삼에서는 선명히 나타났지만 정상삼에서는 약하게 나타나는 것으로(Fig. 6) 보아 발현의 정도가 적변 및 비적변삼간에 차이가 있어 나타나는 것으로 생각되어 이렇게 차이를 나타내는 밴드들이 적변과 관련된 유전자부위일 가능성이 있는 것으로 사료된다. 따라서 이러한 차이를 나타내는 band는 차후 cloning하고 sequencing하여 그 homology를 조사하여 그 유전자가 적변을 나타내는 유전자와 관계가 있는지를 확인해 봐야 할 것으로 사료된다. 유전자가 적변에 관련된 유전자로서 판명이 되면, 선발 마커로서 이용

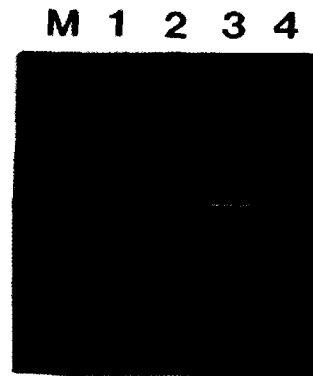


Fig. 6. RT-PCR banding pattern of cDNA constructed from RNA extracted from red skin(R) and normal(N) portion of ginseng using primer, UBC-17(CCTGGGCCTC).

되어 적변에 강한 품종을 조기에 선발하여 노동력을 감소시키고 품질이 우수한, 즉 적변 감염률이 적은 품종 육성을 해 나갈 수 있을 것이다. 또한 적변 내성 유전자를 도입한 새로운 인삼품종을 형질전환 방법에 의하여 개발할 수 있을 것이다. 현재 4개의 primer 중 1개의 primer에서만 차이가 나는 band를 발견하였지만, 좀 더 많은 primer를 사용하여 그 차이 band를 발견하고 homology를 확인하여 적변과의 관계 여부를 조사하여 좀 더 확실하게 적변과 관계된 유전자를 찾아 낼 수 있을 것이다.

적요

고려 인삼중 폐포와 4등급 이하를 유발시키는 90% 이상이 적변삼이라고 불리는 인삼의 표피 색택이 붉은 삼이 그 원인이다. 이러한 적변삼은 미국삼보다는 고려인삼에서 다량 발견되는 바, 적변은 유전적 요인이 있다고 사료된다. 그러므로 이 연구의 목적은 RT-PCR을 이용하여 인삼적변에 내성을 가지는 유전자를 탐색하기 위하여 실시되었다. 고려인삼 3년근 1개체 중에서 적변이 발생된 부위와 건전 부위의 RNA를 추출하여 형성된 cDNA를 여러개의 random primer를 사용하여 PCR 증폭을 한 결과 정상 부위의 cDNA에서 발견되지 않는 band가 적변삼의

부위에서 발견되었다. 따라서 band가 형성된 부위의 유전자가 적변과 관련될 가능성이 있는 것으로 사료되고 이러한 유전자는 향후 염기서열을 분석하여 어떠한 유전자인지 판명을 하여야 하며 적변관련 유전자이면 선발마커로서 사용되고 또한 형질전환을 통한 적변내성 인삼계통을 육성할 수 있으며, 만약 적변과 관련이 없는 유전자로 판명된다면 더 많은 primer를 사용하여 적변관련 유전자를 탐색해야 할 것이다.

사사

본 연구는 2003년부터 수행되는 농림기술개발과제(주요 신품종의 유전적 마커확인을 위한 SNP primer의 활용기술개발) 연구비로 수행된 연구결과로 연구비의 지원에 대해서 심심한 감사를 표하는 바이다.

인용문헌

Ahn, B.O., S.D. Kim, and H.W. Park. 1994. Effect of gibberellin treatment on interspecific crossability in peanut. *Kor. J. Breed.* 26:394-399.

Ahn, Y.J., H.J. Kim., S.H. Ohh, and S.Y. Choi. 1982. Effect of soil fumigation on growth, root rot, and red discoloration of *Panax ginseng* in replanted soils. *Kor. J. Ginseng Sci.* 6:46-55.

Ko, S.R., K.J. Choi, and K.W. Han. 1996. Comparison of proximate composition, mineral nutrient, amino

acid and free sugar contents of several *Panax* species. *Kor. J. Ginseng Sci.* 20:36-41.

Lee, C.Y., and S.U. Lim. 1976. An coehemical study on soil sickness. *Kor. J. Ginseng Sci.* 1:51-58.

Lee, J.S., S.M. Yun., J.I. Choi, and S.K. Cha. 2002. Comparison of inorganic elements and epidermis structures in healthy and rusty ginseng. *Kor. J. Crop Sci.* 47:161-168.

Lee, S.S., K.H. Lee, and E.S. Kim. 2002. Mineral nutrition contents of rusty-root tolerance ginseng lines in 6-year old root. *Kor. J. Ginseng Res.* 26:159-164.

Yang, D.C., Y.H. Kim., K.Y. Yun., S.S. Lee., J.N. Kwon, and H.M. Kang. 1997. Red-colored phenomena of ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer) root and soil Environment. *Kor. J. Ginseng sci.* 21:91-97.

Yun, K.Y. and D.C. Yang. 2001. Microorganisms and the red-colored phenomena of ginseng(*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Kor. J. Ginseng Res.* 25:53-58.

Zhou, Z.M., Z.L. Li., L.X. Li., X.M. Sun, and W.L. Wang. 1990. Effects of Korea red ginseng on substance metabolism and endocrinic function in animals. *Kor. J. Ginseng. Sci.* 2:210-212.

이명구. 1995. 인삼연구결과 보고서(재배분야). 한국인삼연초연구원.

최광태. 1996. 최신고려인삼(재배편). 천일인쇄사. 서울 p. 247-252.

(접수일 2004. 5. 01)

(수락일 2004. 6. 10)