

엽록체 DNA *trnL-F* 및 핵리보솜 DNA ITS, ETS 염기서열에 의한 고려인삼의 유전적 변이와 계통학적 유연관계

방찬국 · 김주환¹ · 백명현² · 김창식² · 엄동명³ · 김동희*

대전대학교 한의과대학 병리학교실, 1:대전대학교 생물학과 식물생태분류학교실,
2:대한자연산삼연구소, 3:한국한의학연구원

Genetic Variation and Phylogenetic Relationship of Korean Ginseng based on cpDNA *trnL-F*, nrDNA ITS and ETS Sequences

Chan Kuk Bang, Ju Hwan Kim¹, Myeong Hyun Baek², Chang Sik Kim², Dong Myeong Um³, Dong Hee Kim*

Department of Pathology, Collage of Oriental Medicine, Daejeon University,
1:Department of Biology, Collage of Oriental Medicine, Daejeon University,
2:Department of Neurophysiology, Collage of Oriental Medicine, Daejeon University,
3:Korea Research Institute for Natural Ginseng

Genetic variations and relationship based on the sequences of cpDNA *trnL-F* gene, nrDNA ITS and ETS region among the twenty four taxa including *Panax ginseng* C.A. Meyer and its related species were investigated. And taxonomic status and molecular phylogenetic relationship between *P. ginseng* and related groups were discussed. Molecular systematic data from cpDNA and nrDNA sequences were very useful to elucidate the genetic variations and relationships among the treated taxa. It was found that *P. ginseng* is the independent unique species with distinct genetic limitation from the related species such as *P. quinquefolius*, *P. japonicum*, *P. notoginseng* and *P. pseudoginseng*. *P. ginseng* including cultivated types as well as wild ones formed monophyletic group with high genetic similarities. *P. quinquefolius* and *P. japonicum* were the most related sister groups of *P. ginseng* based on the molecular phylogenetic results in this study.

Key words : Genetic variations, cpDNA *trnL-F* gene, nrDNA ITS, ETS *Panax ginseng*

서 론

1. 연구사 및 배경

인삼屬(*Panax* L.)은 두릅나무과(Araliaceae), 두릅나무족(Aralieae)에 속하는 식물군으로⁴⁶⁾, 장상복엽을 갖는 초본인 뿌려한 식별 형질로 인하여 두릅나무과내에서 다른 근연屬(두릅나무속[Aralia L.], 오가피나무속[Eleutherococcus Maxim.], 황칠나무속[Dendropanax Dec. et Planch.], 송악속[Hedera L.], 팔손이나무[Fatsia Dec. et Planch.])들과 명확히 구분되고 있다²⁹⁾. 인삼속에 속하는 식물들은, 학자들에 따라 동부아시아와 북미 등의 온

대 및 아열대지역에 6내지 11종이 분포하는 것으로 알려져 있다^{33,46,73)}. 일반적으로 인삼속 식물들의 뿌리와 지하경을 주요 약재로 이용하고 있으며, 현재 세계적으로 가장 폭넓게 사용되는 약용자원 중의 하나이다³⁸⁾. 인삼속에 속하는 대표적인 약용식물로는 인삼(*Panax schinseng* Nees; 高麗人蔘, *P. ginseng* C.A. Meyer), 美國蔘(*P. quinquefolius* L.) 田七蔘(*P. notoginseng* F. H. Chen) 등이 있다. 그 중 고려인삼은 한반도와 중국 동북부에 제한적으로 분포하는 다년생 초본으로서 널리 재배되고 있으나, 현재 자생지에서는 매우 드물게 발견되고 있는 멸종 위기 및 희귀식물이다.

고려인삼의 주요 약성분은 triterpene saponin인 'ginsenoside'로 한의학과 서양의 대체의학에 매우 중요한 재료로 이용되고 있으며, 현재까지 약효와 성분에 대한 수많은 연구가 진행 중이다^{7,24,34)}. 또한, 이와 같이 인삼의 중요한 약효에 대한 동서의학에

* 교신저자 : 김동희, 대전시 동구 용운동 대전대학교 한의과대학
· E-mail : dhkim@dju.ac.kr, · Tel : 042-280-2623
· 접수 : 2004/09/24 · 수정 : 2004/10/21 · 채택 : 2004/11/24

서의 많은 인식의 전환에 따라, 고려인삼, 美國蔘, 田七蔘 등에 대한 재료 확보를 위하여 재배 기법과 특성 등에 의한 연구들도 계속적으로 동시에 진행되고 있다^{1,3,6)}. 상기와 같이, 고려인삼에 대한 연구는 약용 자원으로서의 연구가 주류를 이루고 있지만, 최근에는 인삼속의 계통과 미국삼(*P. quinquefolius* L.)을 중심으로 속내 주요 종들에 대한 분자유전학적 연구가 시도되고 있다.

인삼속의 계통학적 위치에 관한 연구로는 Wen과 Zimmer⁷⁰⁾가 핵리보솜 DNA ITS 염기서열을 기초로 인삼속내 12분류군에 대한 연구를 통하여 인삼속의 단계통군을 확인한 바 있으며, Lee와 Wen³⁹⁾은 엽록체 DNA trnC-trnD의 염기서열 분석을 통하여 인삼속내의 계통학적 유연관계를 논한 바 있다. Tochika-Komatsu 등⁶⁶⁾, Schluter와 Punja⁵⁸⁾, Ho와 Leung³¹⁾, Ngan 등⁵¹⁾, Dapeng 등²⁰⁾, Hon 등³²⁾이 RAPD 분석과 DNA fingerprinting 등을 이용하여 고려인삼과 미국삼에 대한 분자유전학적 변이와 다양성 및 유전적 지표확인을 위한 연구를 수행한 바 있다. 그러나 국내에서는 Lee 등⁴⁰⁾, Lim 등⁴²⁾, Um 등⁶⁷⁾이 몇몇의 수집종과 외국종과의 유연 관계를 검토하였을 뿐이고 고려인삼의 유전적 다양성을 검토한 연구는 이루어지지 않고 있다. 상기한 연구들은 실험 재료의 확보와 사용에 있어서, 원산지내에서 wild type의 미확보 및 재배종에 있어서 기원의 불확실성 등, 심각한 문제를 갖고 있으며, 국내에서조차도 원산지 확인이 선행 해결되지 않고, 유통 과정 등을 통해 재료를 확보하는 등, 연구의 기초 단계에서부터 객관성이 결여되어 있다. 국내에서는 고려인삼을 중심으로 재배종에 대한 연구가 주로 수행되었다. 인삼의 재배 품종에는 자경종, 황숙종, 청경종 외에 다양한 품종들이 알려져 있다¹³⁾. 우리나라에서 재배되고 있는 고려인삼은 대부분이 줄기와 잎자루가 자색이고 열매는 붉은 색인 자경종으로 개체에 따라 부위별로 자색의 발현이 다르며 열형이나 화서도 일정하지 않아 혼계 상태임을 알 수 있다고 하였다^{15,16)}. 고려인삼은 개화 결실에 필요한 기간이 3년이 소요되고 개체당 결실량도 적어 품종을 육성하는 데는 적어도 30년 이상이 필요하다. 따라서 단기간에 품종을 육성하는 방법 중의 하나는 재래종으로부터 우량한 순계를 선발하는 방법일 것이다. 그러나 고려인삼은 다른 작물과 달리 형태적으로 심한 변이를 나타내지 않기 때문에 줄기, 엽병 및 열매의 색, 개화기, 지상부의 길이, 줄기의 직경, 뿌리의 형태 등의 차이로 구분할 수 있으나 지상부의 길이, 줄기의 직경, 뿌리의 형태 등은 환경 변이가 크므로 선발에 어려움이 있다. 또한 인삼은 뿌리를 수확하는 작물이므로 채굴하기 전에는 수량을 파악하기 어려워 선발 및 탐색의 방법으로 수량 구성 형질과 관련지어 형질간상관 관계를 해석하여 왔으나^{4,16)}, 개체 선발에서는 이러한 방법을 이용하기가 곤란하다. 현재까지 주요 작물의 품종이나 계통 분류에 있어서 형태적 및 해부학적 특성 이외에 단백질, 동위효소 분석 등이 주로 이용되어 왔으나, 정확도나 객관성이 떨어지는 단점을 가지고 있기 때문에^{35,37)}, 앞으로는 분자생물학적 표지인자를 이용한 분자계통학적 연구방법의 필요성이 점점 요구되고 있다.

2. 유전자 분석을 기초로 한 식물계통학 연구의 필요성

계통분류학은 분류군들이 겪어온 진화 역사를 반영하는 분

류 체계를 확립하고, 이를 기초로 분류군간의 진화적 상호 연관 관계를 규명하려는 데 근본 목적이 있다²¹⁾. 과거의 형태학적 형질에 기초한 식물의 계통학적 분류체계는 다소 이해하기 어려운 문제점으로 인하여 학자간에 심한 논란의 대상이 되기도 하였다¹⁹⁾. 그러나, 최근 1980년대 후반에 이르러서 분자생물학적 연구 방법의 발달과 함께 유전자의 변이에 기초한 계통학적 연구가 활발히 진행되고 있다⁴⁹⁾. 유전자에 관한 연구는 외부 형태에 기초한 전통적 연구에서의 문제점을 보완하여 주고, 특정 유전자의 특성에 기초한 식물의 계통체계 및 진화 과정을 밝혀주고 있다²²⁾. 계통분류학에 있어서 근연분류군간의 유전적 유연관계 분석에 대한 요구가 증대됨에 따라, DNA fingerprinting(유전자지문 검색) 방법을 이용하여 핵산의 다형현상(polymorphism)을 직접 분석함으로써 유전형(genotype)의 기본적인 차이를 결정하는 여러 가지 방법들이 개발되어 사용되고 있는데⁶⁹⁾, 그중 최근 식물 계통분류학에서 가장 많이 사용되는 대표적인 것이 Random amplified polymorphic DNA(RAPD)⁷²⁾와 Amplified fragment length polymorphism(AFLP)이다⁴³⁾. 이 중 RAPD 분석은 간단한 10-mer primer를 가지고 미량의 DNA로부터 polymerase chain reaction (PCR)을 이용하여 많은 양의 분자유전학적 표지인자(molecular genetic marker)를 손쉽게 검색할 수 있는 장점을 가지고 있다. 식물체의 DNA는 존재 위치에 따라 핵DNA(nDNA)와 세포 소기관내의 엽록체DNA(cpDNA) 및 미토콘드리아 DNA(mtDNA)로 구분되어진다. 그러나 미토콘드리아DNA는 식물체에서의 분자유전학적 연구 방법상 적합하지 않은 구조 및 방법론 등에 의해⁵⁵⁾, 현재 식물 분자계통학에서는 핵DNA와 엽록체DNA가 중요한 계통학적 도구로 가장 폭넓게 사용되고 있다. 핵 DNA 중 현재까지 계통학적 유연관계를 가장 잘 반영하는 것으로 알려져 있는 핵리보솜 DNA(nrDNA)의 구조를 보면 각 unit는 intergenic spacer(IGS)에 의해 나뉘어지며, external transcribed spacer(ETS), 18S coding gene, internal transcribed spacer 1(ITS1), 5.8S coding gene, internal transcribed spacer 2(ITS2) 및 26S coding gene이 tandemly repeated sequence로 구성되어 있다(Fig. 1).

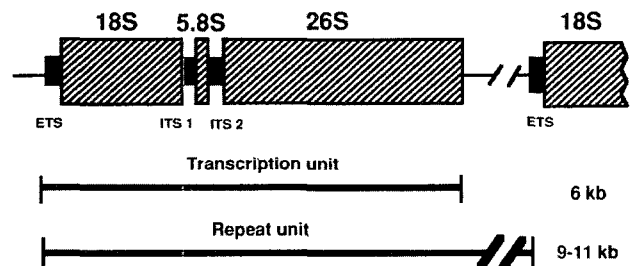


Fig. 1. Repeated unit of nuclear ribosomal DNA in higher plants.

이들 중 18S, 5.8S, 26S gene 등의 coding region은 sequence가 매우 보존적인데 반해 ITS, ETS 등은 속, 종 및 경우에 따라서는 개체간에도 sequence에 차이를 보이는 등 비교적 변이가 심한 지역이다. 때문에 핵리보솜DNA는 과 이상의 상위 분류군의 연구^{11,28,48,64)} 뿐만 아니라 속 이하의 하위 분류군의 연구^{18,27,57)} 혹은 근연종간의 기원에 관한 연구^{5,14,37,53)} 등에도 폭넓게 이용되

풍, 선풍)과 야생형의 산삼 4계열(백두산, 평창군, 소백산, 철원)에서 소수의 개체를 임의로 선택하여 주재료로 사용하였다. 또한, 고려인삼의 유전적 유연관계를 검토하기 위하여 외국산 근연종 5집단을 비교군으로 사용하였다(Table 1). 실험에 사용된 재료는 결실기의 성체를 석유표본으로 제작한 후, 증거 표본으로써 확보하여 대전대학교 자원식물표본실(TUT)에 보관하였다. DNA 추출을 위하여 채집된 식물의 잎은 얼음과 함께 ice box를 이용하여 실험실로 운반하거나, silica gel로 건조하여 밀폐된 비닐주머니에 넣어 실험실로 운반하였다. 채집된 잎은 액체질소를 넣어 막자사발로 분말로 파쇄하여 -70℃의 deep freezer에 보관하였다.

Table 1. Materials and Collection data

Taxa	Localities & Collection date	Abb.
Panax ginseng (재배인삼)	Korea(KHU), Cultivation(Jagyeong), 22 July 2003	PGCJ
	Korea(KHU), Cultivation(Hwangsook), 22 July 2003	PGCH
	Jilin, China, Cultivation, 22 July 2003	PGCC
	Ussurisk, Russia, Cultivation, 22 July 2003	PGCR
Panax ginseng (산품중인삼)	Yeonpung, Korea(KT&G), 22 July 2003	PGCY1
	Yeonpung, Korea(KT&G), 22 July 2003	PGCY2
	Yeonpung, Korea(KyungHee Univ.), 22 July 2003	PGCY3
	Cheonpung, Korea(KT&G), 22 July 2003	PGCC1
	Cheonpung, Korea(KT&G), 22 July 2003	PGCC2
	Cheonpung, Korea(KHU), 22 July 2003	PGCC3
	Cheonpung, Korea(KHU), 22 July 2003	PGCC4
	Geumpung, Korea(KT&G), 22 July 2003	PGCG1
	Geumpung, Korea(KT&G), 22 July 2003	PGCG2
	Gopung, Korea(KT&G), 22 July 2003	PGCG
Seonpung, Korea(KT&G), 22 July 2003	PGCS	
Panax ginseng (야생형인삼-산삼)	Mt. Baekdu, Korea(KT&G), 24 Sep. 2003	PGSB
	Pyeongchang-gun, Korea(KHU), 9 Oct. 2003	PGSK
	Mt. Sobaek, Korea(DJU), 20 Oct. 2003	PGSS
Panax quinquefolia	Cheolwon, Gangwon-do, Korea(DJU), 25 Sep. 2003	PGJ
	Ontario, Canada(KT&G), 22 July 2003	PQC
Panax japonicum	Wisconsin, United States(KT&G), 22 July 2003	PQU
	Kwandong, Japan (KT&G), 1 Sep. 2003	PJJ
Panax pseudoginseng	Ghorapani, Himalaya, Nepal, 25 Aug. 2002	PPG
Panax notoginseng	AY271919	PNG

2. 방법

1) DNA 추출

DNA 추출은 2X CTAB method를²³⁾ 다소 변형한 아래의 방법으로 실시하였다. 우선 냉동 보관된 약 1.0g의 분말 조직을 0.5% 2-β-mercaptoethanol이 첨가된 15 ml의 extraction buffer (2% CTAB; 100 mM Tris, pH 8.0; 50 mM EDTA, pH 8.0; 500 mM NaCl)에 넣은 후 65℃에서 20분간 incubation하며, 조직내 phenol 화합물, 탄닌 등의 불순물을 제거하기 위하여, extraction buffer에 2% PVP-40을 첨가하였다. 이를 Incubation 후 SEVAC 용액(chloroform:Isoamyl alcohol=24:1) 7.5 ml를 첨가하여, 8,000 g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하고 이 부피의 2/3이 되는 양의 isopropanol을 첨가한 후 -20℃에서 12시간 이상 보관하였다가 8000 g로 30분간 원심분리하여 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA pellet은 70% ethanol로 세척한 후 TE buffer(1 M Tris, 0.5 M EDTA, pH 8.0)에 용해하였으며, 그 후 필요에 따라 7.5 M ammonium acetate, 2.5 M sodium acetate 등을 이용한 정제 과정을 거쳤다. 추출된 DNA 용액에 RNA를 제거하기 위하여 RNase(2 unit/ml, 37℃, 1 hour; Berhinger Mannheim)을 처리하며, GeneClean kit(Bio 101 Inc., CA, USA)와 Chelex 100(Bio-Rad

Lab., CA, USA)를 이용하여 DNA를 순수 정제하였다. 정제된 DNA(Fig. 1)는 0.7% Agarose gel로 전기영동한 후 1% EtBr로 염색하여 UV illuminator상에서 marker와의 밝기 정도를 비교하는 spot-test를 실시하거나, spectrophotometer를 이용하여 그 농도를 계산하였다.

2) PCR에 의한 엽록체DNA의 trnL-F region과 핵리보솜DNA의 ITS region, ETS region의 증폭

추출된 DNA로부터 trnL-F region과 ITS region 그리고 ETS region의 증폭은 다음의 PCR(polymerase chain reaction) 반응을 이용하여 실시하였다. PCR 반응은 전체 100μl 부피로 행하였고, 10-50ng DNA, 1.5unit Taq DNA Polymerase, 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 0.5-1.0μM primer 및 200μM의 각 dATP, dCTP, dGTP, dTTP 등이 포함되어 있다. 우선 trnL-F region의 증폭을 위하여 T1 primer와 T6 primer(Fig. 3), ITS region의 증폭을 위하여 ITS4 primer와 ITS5 primer(Fig. 4), ETS region의 증폭을 위해서는 ETS 1F primer와 18S-R primer(Fig. 5)를 각각 이용하였다. PCR cycle은 다음과 같이 ① 94℃에서 2분간 pre-denaturation, ② 94℃에서 1분간, 52℃에서 2분간, 72℃에서 4분으로 구성된 amplifying cycle을 30회 반복, 마지막으로 ③ 72℃에서 7분동안의 final extension으로 구성된 3 단계의 PCR 과정을 거쳐 dsDNA template를 만들어 내었다.

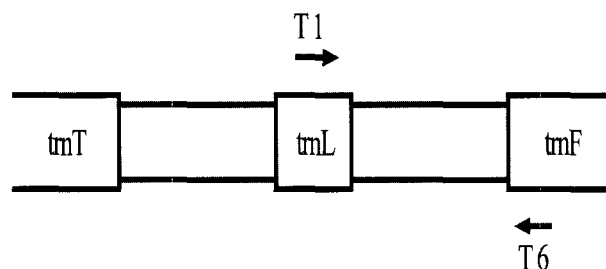


Fig. 3. Diagram and position of PCR/sequencing primers for cpDNA trnL-F gene. T1 : CGAAATCGGTAGACGCTACG, T6 : ATTTGAACTGGTGACACGG

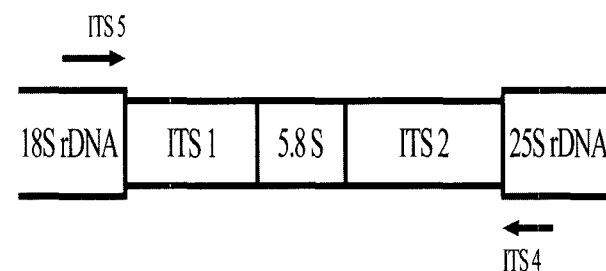


Fig. 4. Diagram and position of PCR/sequencing primers for NrDNA ITS region. ITS5 : GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG, ITS4 : TCCTCCGCTTATTGATGCG

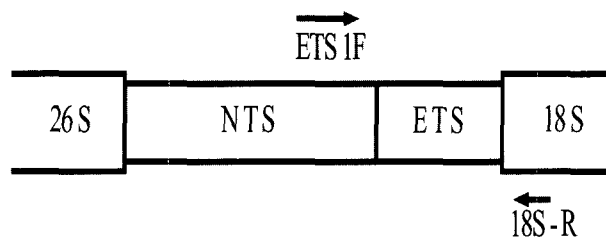


Fig. 5. Diagram and position of PCR/sequencing primers for NrDNA ETS gene. ETS 1F : CTGTGGGTGCGATGAGTTG, 18S-R : AGACAAGCATATGACTACTGGCAGG

3) Gene Cloning 및 Sequencing

PCR 과정을 통하여 엽록체DNA trnL-F region과 핵리보솜DNA ITS region, ETS region의 합성이 성공한 분류군을 제외하고 유전자 증폭상의 문제가 있는 분류군들의 template dsDNA의 정확하고 용이한 Sequencing을 수행하기 위하여, TA Cloning kit(In Vitro Gene)을 사용하여 공급자의 Manual에 따라 Gene cloning을 실시하였다. PCR과 Cloning 과정을 통하여 대량 증폭된 엽록체DNA trnL-F region은 공급자의 manual에 따라서 dye labelled dideoxy termination method를 이용하여 Automated sequencer(Perkin Elmer Ltd., ABI 3700)로 염기서열 분석을 수행하였다.

4) Sequence alignment와 phylogenetic analysis

염기서열분석이 수행된 엽록체DNA trnL-F region과 핵리보솜DNA ITS region, ETS region의 영역은 기존에 발표된 sequence 들과 비교하여 결정하였으며, ClustalX program, Autoassembler, Sequencer 등을 이용하여 일단 염기서열의 정확도와 sequence alignment를 실행 및 확인한 후, 최종적으로 육안에 의하여 결과를 검토하였다(Appendices 1, 2, 3). 또한, 각 분류군에 대한 색소체 DNA trnL-F region과 핵리보솜DNA ITS region, ETS region의 유전정보를 요약하여 제시하였으며(Table 2), 기존에 발표된 동일한 분류군의 sequence와 비교할 수 있도록 제시하였다(Table 3). 염기서열 분석 결과 얻어진 유전 정보의 분석은 PHYLIP(Phylogenetic Inference Package, ver. 3.5c)내의 DNADIST program의 Kimura's two parameter에 의한 genetic distance matrix를 작성하였다. 또한 PAUP* program⁶⁵⁾을 이용하여 molecular phylogenetic tree를 작성하고, 계통도의 신뢰도와 정확성을 구축하기 위하여, Bootstrap analysis를 수행하였다.

관찰 및 결과

본 연구의 주재료와 비교군으로 확정된 24분류군(국외산 5 분류군 포함) 인삼에 대한 엽록체 DNA trnL-F region과 핵리보솜 DNA ITS region 그리고 ETS region의 염기서열 분석을 수행한 결과, 기존의 연구 결과와 일부 다소 상이한 결과를 나타냈으나, 계통학적 분석에 영향을 미칠 수 있을 정도의 차이는 나타나지 않았다(Table 2). 본 연구 결과, 총 1490개의 정렬된 염기서열 자료가 확보되었고(Table 3; Appendices 1, 2, 3), 그 중에서 3개의 염기만이 한국산 인삼의 19개 strains을 구분할 수 있는 유용한 계통학적 정보를 갖는 것으로 확인되었다(Table 3). 염기서열 분석 결과 pairwise distance matrix와 patristic distance matrix가 작성되었다(Table 4, 5, 6, 7). 또한, 계통학적 분석을 통하여 대상 유전자 별 및 결합정보를 이용한 최단거리의 계통도(MP tree; Maximum Parsimonious Tree)가 도출되었다(Fig. 6, 7, 8, 9).

1. 엽록체DNA trnL-F 염기서열에 의한 분자계통학적 연구

고려인삼과 가장 유연관계가 높은 것으로 알려져 있는³⁹⁾ P. quinquefolius, P. japonicum, 및 P. pseudoginseng 등 인삼속내 3분류군 4집단을 비교군(outgroup)으로 선정하여, 야생종 및 재

배종 인삼 19 집단내의 유전적 변이와 분자계통학적 유연 관계를 파악하고, 계통학적 분석에 있어서의 자매군 및 군외군의 타당성을 검증하고자 본 연구를 실시하였다. 염기서열 정렬을 통하여 엽록체 DNA trnL-F gene의 각 부위가 결정되었고, 인삼속 23 분류군에 대한 염기서열 분석 결과 계통학적으로 정보를 갖는 염기의 수는 없는 것으로 확인되었다(Table 2). 이를 근거로 유전적 거리 지수 행렬이 도출되었으며, 최단 거리 계통도(MPT, maximum parsimonious tree)가 작성되었다. 또한, 계통도의 각 분지 경로에 대한 지지도를 확인하기 위하여 bootstrap 분석을 실시하여 반복지수를 산출하였다.

Table 2. Sequence comparison with previous nrDNA ITS region data from GeneBank(NCBI)

Taxa	ITS							
	This Study				Previous Study			
	Length	G/C	In/Del	Info	Length	G/C	In/Del	Info
Panax ginseng (purple)	619	60.30	0	0	619	60.26	0	0
Panax ginseng (yellow)	619	60.42	0	1	619	60.42	0	1
Panax ginseng (cheonpung)	619	60.30	0	0	619	60.26	0	0
Panax japonicum	619	60.58	0	4	618	59.39	1	4
Panax quinquefolia	619	60.58	0	4	619	60.60	0	4
Panax pseudoginseng	619	60.58	0	6	617	59.58	2	7

Table 3 Sequence characteristics of cpDNA trnL-F, nrDNA ITS and ETS region for taxa

Taxa	trnL-F				ITS				ETS			
	Length	G+C	In/Del	Info	Length	G+C	In/Del	Info	Length	G+C	In/Del	Info
PGCJ	863	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGCH	863	36.1	0	0	619	60.42	0	1	499	50.50	0	0
PGCC	863	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGCR	863	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGCY1	863	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGCY2	863	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGCY3	863	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGCC1	863	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGCC2	863	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGCC3	863	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGCC4	863	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGCG1	863	36.1	0	0	619	60.42	0	1	499	50.50	0	0
PGCG2	863	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGCG	863	36.1	0	0	619	60.42	0	1	499	50.50	0	0
PGCS	863	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGSB	863	36.1	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGSK	863	36.1	0	0	619	60.42	0	1	499	50.50	0	0
PGSS	863	35.8	0	0	619	60.30	0	0	499	50.50	0	0
PGJ	863	36.1	0	0	619	60.42	0	1	498	50.40	0	0
PQC	863	36.4	0	2	619	60.58	0	4	500	50.60	1	0
PQU	863	36.4	0	2	619	60.58	0	4	501	50.69	2	0
PJW	863	35.8	0	0	619	60.58	0	4	499	50.50	0	0
PPG	863	36.1	0	0	619	60.58	0	6	500	49.80	2	0
PNG					619	60.42	0	7				

염기서열 분석 결과 엽록체 DNA trnL-F gene의 길이는 863bp로 나타났다. 염기서열 정렬을 위하여 사용된 indel수는 없었으며, GC 함량은 35.8%에서 36.4%로 관찰되었다(Table 3). 유전적 변이율은 재배종 인삼간에 0.00%, 자연산 인삼(산삼)간에는 0.00%, 개발종인 신품종 인삼간에 0.00-0.23%를 나타내어 인삼의

종내 집단간에는 매우 낮은 유전적 변이를 나타내었다. 한편, 고려인삼과 외국종사이에는 0.12-0.58%의 상대적으로 높은 유전적 변이를 나타내어 인삼과는 분류학적으로 뚜렷한 유전적 한계가 있는 것으로 나타났으며, 신품종 4집단을 제외하고는 특히 재배종 인삼과 야생형 자연산 인삼집단간에는 거의 동일한 매우 높은 유전적 동질성을 갖는 것으로 관찰되었다(Table 4).

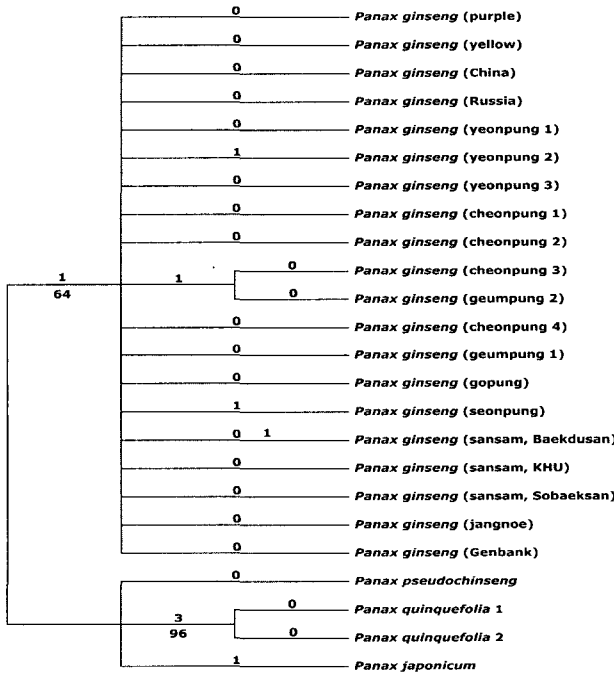


Fig. 6. One of the most parsimonious tree of genus *Panax* based on the chloroplast DNA trnL-F region (CI=0.889, RI=0.857, tree length=9). The numbers below the line indicate bootstrap values from 1000 replicates

엽록체DNA trnL-F gene 염기서열을 기초로 하여 7개의 최단거리 계통수가 산출되었다. 염기서열 분석 결과에 의해 도출된 계통도(Fig. 6)에 의하면, 재배종 및 자연형이 포함된 고려인삼 종 집단은 64%의 Bootstrap value를 나타내며 단계통군으로 비교군으로부터 분리되어 하나의 커다란 분계군을 형성하였다. 내군 중 KT&G에서 순계 분리되고 있는 신품종 3집단(천풍3, 금풍2, 선풍)에서는 1개의 염기가 다른 집단들과 차이가 있지만, 뚜렷한 분계군을 형성하지는 못하였다. 또한, 계통학적 유연 관계 분석에 이용되었던 비교군중 *P. quinquefolia* 2집단은 96%의 bootstrap value를 보이며 *P. pseudoginseng*, *P. japonicum*과는 뚜렷하게 구분되었다. 결국, 자연산 및 재배형을 포함한 고려인삼 집단의 분자유전학적 한계와 유연관계에 대한 문제점을 해결하고자 엽록체DNA trnL-F gene 염기서열을 기초로 하여 분자계통학적 분석을 실시한 결과, 고려인삼은 집단간의 유전적 한계가 매우 낮은 동질적인 하나의 커다란 종집단인 것으로 관찰되었다.

2. 핵리보조염 DNA ITS 염기서열에 의한 분자계통학적 연구

P. quinquefolia, *P. japonicum*, *P. pseudoginseng* 및 *P. notoginseng* 등 인삼속내 4분류군 5집단을 비교군(outgroup)으

로 선정하여, 야생종 및 재배종 인삼 19집단내의 유전적 변이와 분자계통학적 유연관계를 파악하고자 핵리보조염DNA ITS 염기서열에 의한 분자유전학적 연구를 실시하였다. 염기서열 정렬을 통하여 핵리보조염 DNA ITS의 각 부위가 결정되었고, 인삼속 24 분류군에 대한 염기서열 분석 결과 계통학적으로 정보를 갖는 염기의 수는 32개인 것으로 확인되었다(Table 2). 이를 근거로 유전적 거리지수행렬이 도출되었으며, 최단거리계통도를 도출하였다. 염기서열 분석 결과 핵리보조염DNA ITS 지역의 길이는 619bp로 전 분류군에서 동일하게 나타났다(Table 2). 염기서열 정렬을 위하여 사용된 indel수는 없었으며, GC 함량은 60.30-60.58%로 관찰되었다(Table 2). 유전적 변이율은 재배종 고려인삼간에 0.00-0.16%, 자연산 고려인삼간에는 0.00-0.16%, 개발종인 신품종 인삼간에 0.00-0.16%를 나타내어 고려인삼의 종내 집단간에는 매우 낮은 유전적 변이를 나타내었다. 한편, 고려인삼과 외국종사이에는 0.32-2.83%의 상대적으로 높은 유전적 변이를 나타내어 인삼과는 분류학적으로 뚜렷한 유전적 한계가 있는 것으로 나타났다. 고려인삼은 비교군중 *P. quinquefolia*와 *P. japonicum*와 다른 종들에 비해 높은 유전적 유연 관계를 나타냈으며(0.32-0.62%), *P. pseudoginseng*과는 1.40-1.55%, *P. notoginseng*과는 2.67-2.83%로 상대적으로 먼 유전적 거리를 나타내었다. 핵리보조염DNA ITS 염기서열 분석 결과, 재배종 고려인삼과 야생형 자연산 고려인삼 집단간에는 거의 동일한 매우 높은 유전적 동질성을 갖는 것으로 관찰되었다(Table 5). 핵리보조염DNA ITS 염기서열을 기초로 하여 4개의 최단거리 계통수가 산출되었다. 염기서열 분석 결과에 의해 도출된 계통도(Fig. 7)에 의하면, 재배종 및 자연형이 포함된 인삼종 집단은 85%의 높은 Bootstrap value를 나타내며 단계통군으로 비교군으로부터 분리되어 하나의 커다란 분계군을 형성하였다. 내군중에는 백두산과 소백산으로부터 채집된 야생 고려인삼이 포함된 14개의 집단이 1개의 염기 차이를 나타내며 커다란 분계군을 형성하기는 하지만 뚜렷한 계통학적 해상도를 갖지는 못하였다. 또한, 계통학적 유연 관계 분석에 이용되었던 비교군중 *P. quinquefolia* 2집단은 96%의 bootstrap value를 보이며 *P. pseudoginseng*, *P. japonicum*과는 뚜렷하게 구분되었다(Fig. 7). 결국, 자연산 및 재배형을 포함한 고려인삼 집단의 분자유전학적 한계와 유연관계에 대한 문제점을 해결하고자 핵리보조염DNA ITS 염기서열을 기초로 하여 분자계통학적 분석을 실시한 결과, 엽록체DNA trnL-F gene 염기서열을 기초로 한 결과와 마찬가지로 고려인삼은 집단간의 유전적 한계가 매우 낮은 동질적인 하나의 커다란 종집단인 것으로 관찰되었다.

3. 핵리보조염 DNA ETS 염기서열에 의한 분자계통학적 연구

P. quinquefolia, *P. japonicum*, 및 *P. pseudoginseng* 등 인삼속내 3분류군 4집단을 비교군(outgroup)으로 선정하여, 야생종 및 재배종 고려인삼 19집단내의 유전적 변이와 분자계통학적 유연관계를 파악하고자 핵리보조염DNA ETS 염기서열에 의한 분자유전학적 연구를 실시하였다. 염기서열 정렬을 통하여 핵리보조염DNA ETS의 각 부위가 결정되었고, 인삼속 23분류군에 대

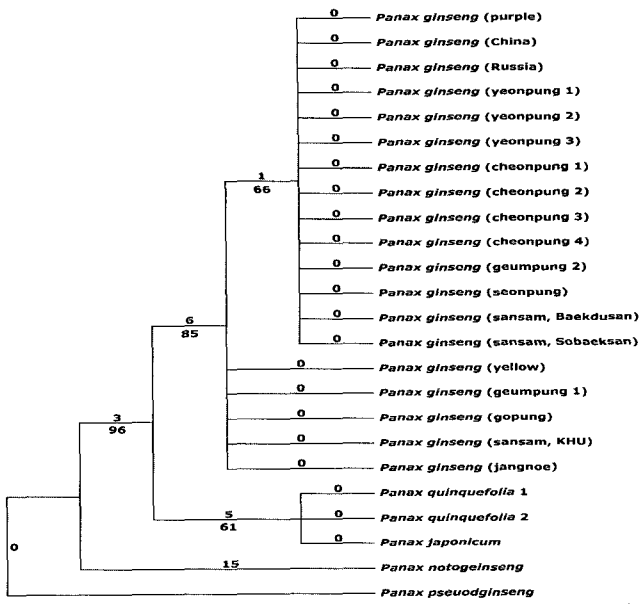


Fig. 7. One of the most parsimonious tree of genus *Panax* based on the nuclear ribosomal DNA ITS region(CI=1.000, RI=1.000, tree length=23). The numbers below the line indicate bootstrap values from 1000 replicates.

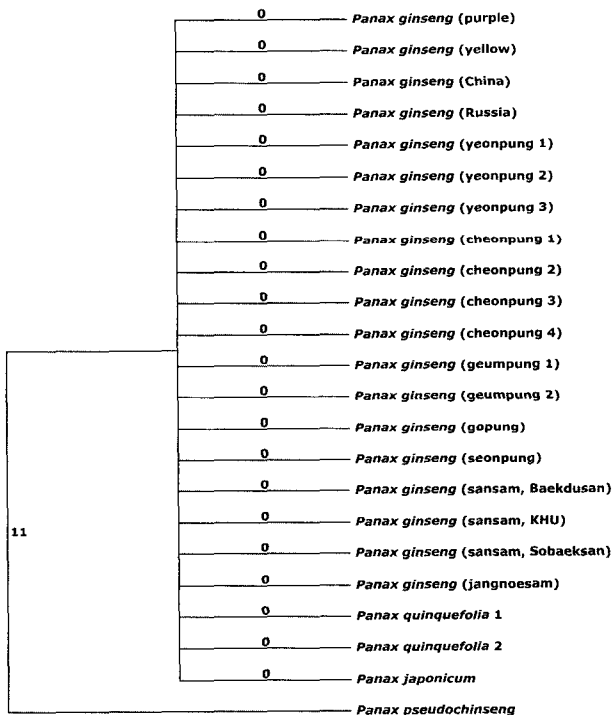


Fig. 8. One of the most parsimonious tree of genus *Panax* based on the nuclear ribosomal DNA ETS region(CI=1.000, RI=0/0, tree length=11). The numbers above the line indicate base substitutions.

한 염기서열 분석 결과 계통학적으로 정보를 갖는 염기는 없는 것으로 확인되었다(Table 3). 이를 근거로 유전적 거리 지수 행렬이 도출되었으며, 최단 거리 계통도를 도출하였다. 염기서열 분석 결과 핵리보솜DNA ETS 지역의 길이는 498-501bp로 나타났다. 염기서열 정렬을 위하여 사용된 indel은 *P. quinquefolius*와 *P. pseudoginseng*에서만 수 개가 필요하였고, GC 함량은

49.80-50.69%로 관찰되었다(Table 3). 유전적 변이율은 재배종, 자연산 및 신품종 고려인삼간에 0.00%를 나타내어 고려인삼의 종내 집단간에는 매우 높은 유전적 동질성을 갖는 것으로 관찰되었다. 또한 한편, 고려인삼과 외국종 사이에는 0.32-2.83%의 상대적으로 높은 유전적 변이를 나타내어 분류학적으로 뚜렷한 유전적 한계가 있는 것으로 나타났다. 고려인삼은 비교군중 *P. pseudoginseng*과 2.23%의 유전적 변이를 나타내었을 뿐, *P. quinquefolius*와 *P. japonicum*와는 거리의 차이외에는 0.00%의 유전적 변이를 나타내어, 핵 DNA ETS 염기서열에서는 고려인삼과 동일한 것으로 나타났다(Table 3). 핵리보솜DNA ETS 염기서열을 기초로 하여 1개의 최단거리 계통수가 산출되었다. 염기서열 분석 결과에 의해 도출된 계통도(Fig. 8)에 의하면, 재배종 및 자연형이 포함된 고려인삼 종집단은 *P. quinquefolius*와 *P. japonicum*이 포함된 하나의 커다란 분계군을 형성하여, *P. pseudoginseng*으로부터 분지되는 것으로 나타났다. 내군중에는 백두산과 소백산으로부터 채집된 야생형 고려인삼이 포함된 14개의 집단이 1개의 염기차이를 나타내며 커다란 분계군을 형성하기는 하지만 뚜렷한 계통학적 해상도를 갖지는 못하였다.

4. 엽록체DNA trnL-F gene, 핵리보솜DNA ITS 및 ETS 염기서열의 종합 분석

엽록체DNA trnL-F region과 핵리보솜 DNA ITS region 그리고 ETS region의 결합염기서열을 근거로 한 계통 분석을 실시한 결과, 지속지수(CI, Consistent Index)가 0.968, 유지지수(RI, Retention Index)가 0.957인 매우 견고한 최단 거리 계통도가 산출되었다(Fig. 9). 염기서열 분석 결과(Table 7), 유전적 변이율은 재배종 고려인삼간에 0.00-0.05%, 자연산 고려인삼간에 0.00-0.05%, 개발중인 신품종 고려인삼간에 0.00-0.10%를 나타내어 고려인삼의 종내 집단간에는 매우 낮은 유전적 변이를 나타내었다. 한편, 고려인삼과 외국종사이에는 0.25-1.16%의 상대적으로 높은 유전적 변이를 나타내어 분류학적으로 뚜렷한 유전적 한계가 있는 것으로 나타났다. 종합염기서열 분석 결과, 재배종 고려인삼과 야생형 자연집단간에는 거의 동일한 매우 높은 유전적 동질성을 갖는 것으로 관찰되었다(Table 7). 핵리보솜DNA와 엽록체DNA 염기서열이 결합된 종합염기서열을 기초로 하여 2개의 최단거리 계통수가 산출되었다. 염기서열 분석 결과에 의해 도출된 계통도(Fig. 7)에 의하면, 재배종 및 자연형이 포함된 고려인삼 종집단은 94%의 높은 Bootstrap value를 나타내며 단계통군으로 비교군으로부터 분지되어 하나의 커다란 분계군을 형성하였다. 내군중에는 백두산과 소백산으로부터 채집된 야생형 고려인삼이 포함된 14개의 집단이 1개의 염기 차이를 나타내며 커다란 분계군을 형성하기는 하지만 뚜렷한 계통학적 해상도를 갖지는 못하였다. 또한, 계통학적 유연관계 분석에 이용되었던 비교군중 *P. quinquefolius* 2집단은 95%의 bootstrap value를 보이며 *P. pseudoginseng*, *P. japonicum*과는 뚜렷하게 구분되었다(Fig. 9). 그러나, *P. ginseng* group에 포함되는 분류군들 사이에는 연풍2, 천풍3, 금풍2, 선풍을 제외한 모든 group간에 모두 동일한 염기서열을 갖는 것으로 관찰되었으나, 1개씩의 염기 차이를 나

타내는 4집단(연풍2, 천풍3, 금풍2, 선풍) 조차도 각각의 품종내에서도 일정한 계통학적 불연속성을 나타내지는 못하였다.

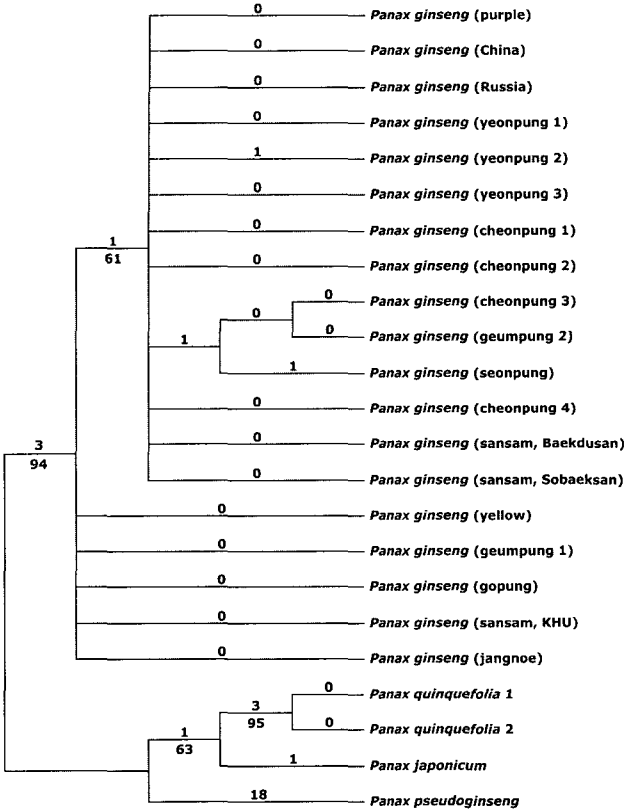


Fig. 9. One of the most parsimonious tree of genus *Panax* based on the combined plastid DNA *trnL-F* gene, nuclear ribosomal DNA ITS region, and ETS region(CI=0.968, RI=0.957, tree length=31). The numbers below the line indicate bootstrap values from 1000 replicates.

고찰

인삼은 Nees⁵⁰⁾에 의해 *P. schinseng*으로 처음 학계에 보고되었고, 그 이후 동일 식물을 대상으로 Meyer⁴⁷⁾에 의해 *P. ginseng*으로 기재된 바 있으며, 약용명인 'ginseng'의 광범위한 사용으로 인하여 현재까지도 인삼의 학명을 *P. ginseng*으로 일반적으로 많이 이용하고 있다. 또한, Siebold⁵⁹⁾는 *P. quinquefolia* var. *corensis*, Baillon¹⁰⁾은 *Aralia ginseng*, Regel과 Maack⁵⁶⁾는 *P. quinquefolia* var. *ginseng* 등의 異名으로 각각 그들의 보고서에 신종을 발표하였다. 결국, 국제식물명명규약(ICBN, International Code of Botanical Nomenclature)²⁶⁾원칙 3조 '학명의 선취권'에 의거하여 인삼의 정명은 Nees⁵⁰⁾에 의해 최초 발표된 *P. schinseng*이 타당하다. 그러나, 본 연구는 식물학적인 규범에 의한 분류학적 고찰을 하려는 것이 아니고, 고려인삼의 유전적 다양성과 유연관계에 관한 내용을 고찰하고자 하였으므로, 인삼의 광범위한 명칭인 *P. ginseng* C.A. Meyer를 일반명으로 사용하였으며, 인삼의 정확한 학명 고찰에 대한 내용은 차후에 독립적으로 연구되어야 할 것이다.

인삼속과 근연속이 포함된 두릅나무과의 분자계통학적 연구

로는 Wen과 Zimmer⁷⁰⁾가 핵리보솜 DNA ITS 염기서열을 기초로 인삼속내 12분류군에 대한 연구를 통하여 인삼속의 단계통군을 확인한 바 있으며, Lee와 Wen³⁹⁾은 엽록체DNA *trnC-trnD*의 염기서열 분석을 통하여 인삼속내의 계통학적 유연 관계를 논한 바 있다. 최근의 분자유전학적 방법을 이용한 DNA의 분자계통학적 분석은 종의 진화 과정을 가장 직접적으로 추적할 수 있는 중요한 방법론의 하나로 인정되고 있으며, 분류군의 한계 및 유연관계의 해석이 어렵고, 진화 방향의 설정이 힘든 분류군의 기원과 진화경향성을 확인하고 계통학적 분류 체계를 확립하는 데에 매우 유용한 것으로 입증되고 있다.^{28,61)}

특히 최근에는 엽록체 DNA *trnL-F* gene, 핵 DNA ITS 및 ETS region의 염기서열 분석을 이용하여 속 이하 또는 지리적 아종간의 계통학적 유연관계를 입증하는 가장 효율적인 방법으로서 빈번하게 이용되고 있는 것으로 알려져 있다^{8,12,14,45,63,64,68)}. 본 연구에서도 nrDNA ITS region의 염기서열분석 결과는 인삼과 근연종간의 유전적 변이와 유연관계를 설명하는데 매우 유용한 것으로 판단되었고, 이는 Wen and Zimmer⁷⁰⁾의 견해를 지지하는 것으로 나타났다. 고려인삼과 그 근연종에 대한 엽록체 DNA *trnL-F* gene, 핵 DNA ITS 및 ETS region의 염기서열 분석에 의한 분자계통학적 본 연구결과는 고려인삼의 종집단간의 유전적 변이와 유연관계분석에 매우 유용한 것으로 나타났다. 또한, 본 연구를 통하여 고려인삼의 최근연종과 유용한 재배종의 유전적 한계가 파악됨으로써, 향후 고려인삼에 대한 정밀한 연구의 기초자료로서 매우 유용하게 활용될 것으로 생각된다.

결론

고려인삼과 근연종 24 분류군에 대한 엽록체DNA *trnL-F* gene, 핵리보솜DNA ITS 및 ETS 염기서열 분석을 수행하여 고려인삼 종집단의 유전적 변이와 유연 관계를 검토하였고, 고려인삼과 근연종간의 분류학적 위치와 분자계통학적 유연관계 등을 논하였다. 엽록체 DNA 및 핵 DNA 염기서열 분석 결과는 고려인삼과 근연종간의 유전적 변이와 유연관계를 설명하는데 매우 유용한 것으로 판단된다. *P. ginseng*은 근연종인 *P. quinquefolia*, *P. japonicum*, *P. notoginseng*, *P. pseudoginseng* 등과는 유전적으로 뚜렷한 불연속성을 나타내는 독립된 고유한 종이다. 재배종과 야생형 등 고려인삼의 여러 집단 사이에는 유전적 변이가 거의 없는 매우 안정된 단계군을 형성하고 있는 것으로 나타났다. 본 연구 결과 고려인삼의 최근연종은 *P. quinquefolia*와 *P. japonicum*으로 고려인삼의 자매군으로 나타났다.

참고문헌

1. 권우생, 이명구, 이장호. 인삼 신품종과 계통의 개화 및 결실 특징. *고려인삼학회지* 25(1): 41-44, 2001.
2. 심정기, 박종대, 김동희, 백명현, 김창식. 나도 산삼을 캘 수 있다. 대한자연산삼연구소. 도서출판 보림. 134, 2004.
3. 黃鐘奎, 宮澤洋一. 美國人蔘의 形態 및 發生學의 研究. 全北

- 大學校 農科大學 論文集 177-194, 1979.
4. Ahn, S.D. and K.T. Choi. Characteristics of flower organ, inflorescence and flowering in *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium*. J. of Ginseng Res. 8 : 45-56. (in Korean), 1983.
 5. Ainouche, A.-K. and R. J. Bayer. Phylogenetic relationships in *Lupinus* (Fabaceae) based on ITS of nrDNA. Amer. J. Bot. 86(4): 590-607, 1999.
 6. Anderson, R., M.R. Anderson, and G. Houseman. Wild American Ginseng. Native Plants Journal 3(2): 93-105, 2002.
 7. Anonymous. Ginseng - What it is and isn't !. BCMAF An Information Guide. Part 1. September 1-8, 1999.
 8. Bakker F.T., A. Culham & M.A. Gibby. Phylogenetics and diversification in *Pelargonium*. In: Hollingsworth, Bateman & Gornall "Molecular Systematics and Plant Evolution" Chapman & Hall, 353-374, 1999.
 9. Bakker, F.T., A. Culham, R. Gomez-Zartinez, J. Cervalho, J. Compton, R. Dawtrey, and M. Gibby. Patterns of Nucleotide Substitution in Angiosperm cpDNA trnL (UAA)-trnF (GAA) Regions. Reaking Univ, 2000.
 10. Baillon. Histoire des Plantes 7: 152, 1880.
 11. Baldwin, B.G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA in Plants: an example from the Compositae. Phylog. and Evol. 1: 3-16, 1992.
 12. Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S., Donoghue, M.J. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann. Mo. Bot. Gard. 82: 247-277, 1995.
 13. Cha, S.K. An analysis of genetic diversity in *Panax ginseng* using RAPD markers. MA thesis, Chungnam University. 36. (in Korean), 2001.
 14. Choi, B.H. and J.-H. Kim. ITS sequences and speciation on Far Eastern Indigofera (Leguminosae). Jour. Pl. Res. 110: 339-346, 1997.
 15. Choi, K.T. and Shin, H.S. Morphological characteristics of inflorescence, flowering and fruit and leaf of Korean ginseng. J. Korean Ginseng Sci. 6 : 67-74. (in Korean), 1982.
 16. Choi, K.T., Ahn, S.D., Park, K.J., and Yang D.J. The characteristics and correlation coefficients of characters in *Panax ginseng* violet stem variant and yellow berry variant and *Panax quinquefolium*. J. of Ginseng Res. 7 : 133. (in Korean), 1983.
 17. Crawford, D. J., Lee, N. S., and Stuessy, T. F. Plant species disjunctions: Perspectives from molecular data. Aliso 13: 395-409. 1992.
 18. Crisci, J.V., Zimmer, E.A., Hoch, P.C., Johnson, G.B., Mudd, C., and Pan, N.S. Phylogenetic implications of ribosomal DNA restriction site variation in the plant family Onagraceae. Ann. Mo. Bot. Gard. 77: 523-538, 1990.
 19. Cronquist, A. The Evolution and Classification of Flowering Plants. The New York Bot. Gard., New York, 1988.
 20. Dapeng B., Brandle J. and Reeleder R. Genetic diversity in North American ginseng(*Panax quinquefolius* L.) grown in Ontario detected by RAPD analysis. Genome 40 : 111-115, 1997.
 21. Donoghue, M. J., J. A. Doyle, J. Gauthier, A. G. Kluge and T. Rowe. The importance of fossils in phylogeny reconstruction. Annu. Rev. Ecol. Syst. 20: 431-460, 1989.
 22. Doyle, J. J., M. Lavin, and A. Bruneau. Contributions of molecular data to Papilionoid Legume Systematics. In Molecular Systematics of Plants, Soltis et al. eds. 223-251. Chapman and Hall. New York, 1992.
 23. Doyle, J.J. and J.L. Doyle. A rapid DNA isolation methods for small quantities of fresh tissues. Phytochemical Bulletin 19: 11-15, 1987.
 24. Fukuda, N., H. Tanaka, and Y. Shoyama. Double staining of gin senosides by western blotting using anti-ginsenoside Rb1 and Rg1 monoclonal antibodies. Biol. Pharm. Bull. 24(10): 1157-1160, 2001.
 25. Gonzalez, I.L., Sylvester, J.E., Smith, T.F., Stambolian, D., and R.D. Schmickel. Ribosomal RNA gene sequences and homonoid phylogeny. Mol. Biol. Evol. 7: 203-219, 1990.
 26. Greuter, W. International Code of Botanical Nomenclature, Tokyo Code. Koeltz Scientific Books, Germany. 489, 1994.
 27. Hahn, W.J. and K.J. Sytsma. Molecular systematics and biogeography of the Southeast Asian Genus *Cayrota* (Palmae). Syst. Bot. 24(4): 558-580, 1999.
 28. Hamby, R.K., and Zimmer, E.A. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. In Molecular systematics of Plants, Soltis et al. eds. 50-91. Chapman and Hall. New York, 1992.
 29. Hara, H. Enumeratio Spermatophytarum Japonicarum 3. Iwanami Shoten, Tokyo, 1954.
 30. Hiratsuka, J., H. Shimada, R. Whittier, T. Ishibashi, M. Sakamoto, M. Mori, C. Kondo, Y. Honji, C.R. Sun, B.Y. Meng, Y.Q. Li, A. Kanno, Y. Nishizawa, A. Hirai, K. Shinozaki, and M. Sugiura. The complete sequence of the rice(*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. Mol. Gen. Gent. 217: 185-194, 1989.
 31. Ho, I.S.H. and F.C. Leung. Isolation and characterization of repetitive DNA sequences from *Panax ginseng*. Mol. Genet. Genomics 266: 951-961, 2002.
 32. Hon, C.C., Y.C. Chow, F.Y. Zeng, and F.C.C. Leung. Genetic authentication of ginseng and other traditional Chinese medicine. Acta Pharmacol. Sin. 24(9): 841-846, 2003.

33. Kajita, T., K. Kamiya, K. Nakamura, H. Tachida, R. Wickneswari, Y. Tsumura, H. Yoshimaru, and T. Yamazaki. Molecular Phylogeny of Dipetrocarpaceae in Southeast Asia Based on Nucleotide Sequences of matK, trnL Intron, and trnL-trnF Intergenic Spacer Region in chloroplast DNA. *Mol. Phy. and Evol.* Vol. 10, No. 2, Oct., 202-209, 1997.
34. Kiefer, D. and T. Pantuso. *Panax ginseng*. *Amer. Fam. Physician* 68(8): 1539-1542, 2003.
35. Kim H.K. Chlorophyll content and genetic variation of *Ginkgo biloba* L. planted on streets in Seoul. 3rd conference on agricultural and forest meteorology : 171-174, 2001.
36. Kim K.J., H.L. Lee. Evolutionary genomics of the chloroplast genome of *Panax schinseng*(Araliaceae). The 34th Annual Meeting of the Plant taxonomic society of Korea <Programs and Abstracts> p.25, 2002.
37. Kim T.C. Classification of persimmon(*Diospyros kakithunb.*) cultivars by isozyme analysis. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 36 : 669-677, 1995.
38. Kim, K.-J., H.-L. Lee and Y.-D. Kim. Phylogenetic position of *Abeliophyllum* based on nuclear ITS sequence data. *Kor. J. Pl. Tax.* 30(3): 235-250, 2000.
39. Lee, C. and J. Wen. Phylogeny of *Panax* using chloroplast trnC-trnD intergenic region and the utility of trnC-trnD in interspecific studies of plants. *Mol. Phylogenetics and Evol.* . 15. (in Press), 2004.
40. Lee, J.H., Y.P. Lim and K.-T. Choi. Isolation and characterization of chloroplast DNA in Korean Ginseng, *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Korean J. Ginseng Sci.* 17(1): 39-44. (in Korean), 1993.
41. Li, Jianhua., J. Alexander III, T. Ward, P.D. Tredici, and R. Bicholson. Phylogenetic relationships of Empetraceae inferred from sequences of chloroplast gene matK and nuclear ribosomal DNA ITS region. *Mol. Phy. and Evo.* 25(2002): 306-315, 2002.
42. Lim Y.P., Shin C.S., Lee S.J., Youn Y.N., and S.J. Jo. Survey of proer primers and genetic analysis of Korean ginseng(*Panax ginseng* C.A. Meyer) variants using the RAPD technique. *Kor. J. Medicinal Crop Sci.* 2 : 142-145. (in Korean), 1993.
43. Lin, J., J. Kuo, J. Ma, J. Saunders, H. Beard, M. MacDonald, W. Kenworthy, G. Ude and B. Matthew. Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA mapping techniques. *Plant Molecular Biology Report* 14: 156-169, 1996.
44. Mabberley, D.J. *The Plant Book*. Cambridge University Press, 1987.
45. McDade, L. A. and M. L. Moody. Phylogenetic relationships among Acanthaceae and their closest relatives: Evidence from noncoding chloroplast DNA sequences. *American Journal of Botany* 86: 70-80, 1999.
46. Melchior, H. A. Engler's syllabus der pflanzenfamilien. II. 403-405, 1964.
47. C.A. Meyer. *Rep. Pharm. Prakt. Chem. Russ.* 7: 524, 1842.
48. Mitchell, A.D. and P.B. Heenan. Systematic relationships of New Zealand endemic Brassicaceae inferred from nrDNA ITS sequence data. *Syst. Bot.* 25(1): 98-105, 2000.
49. Moritz, C. and D.M. Hillis. Molecular systematics: context and controversies. In *Molecular systematics*, D. M. Hillis and C. Moritz eds. pp.1-10. Sinauer Associates. Massachusetts, 1990.
51. Ngan, F., P. Shaw, P. But., and J. Wang. Molecular authentication of *Panax* species. *Phytochemistry* 50: 787-791, 1999.
52. Nees. *Icon. Pl. Medic.* 5: t. 16 A-A3 d-f, 1833.
52. Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T.S., Umesono, Kol, Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H. and Ozeki, H., *Nature(London)*.322, 572, 1986.
53. O'Kane S.T. Jr., B.A. Schaal and I.A. Al-Shehbaz. The origin of *Arabidopsis suecica* as indicated by nrDNA ITS sequences. *Syst. Bot.* 21(4): 559-566, 1996.
54. Palmer, J. D., R. K. Jansen, H. Michaels, J. Manhart. and M. W. Chase. Phylogenetic analysis of chloroplast DNA variation. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 75: 1180-1218, 1988.
55. Palmer, J.D. *Mitochondrial DNA in plant systematics of Plants.* 36-49. Chapman and Hall, New York, 1992.
56. Regel, A.E., *Tentamen florum Ussuriensis, oder Versuch einer Flora des Ussuri-Gebietes.* Nach den von H.R. Maack gesammelten Pflanzen bearbeitet. *Mem. Acad. Sci. St. Petersburg.* 7. 4(4): 72-73, 1861.
57. Sang, T., D.J. Crawford, T.F. Stuessy, M. Silva O. ITS sequences and the phylogeny of the genus *Robinsonia* (Asteraceae). *Syst. Bot.* 20(1): 55-64, 1995.
58. Schluter, C. and Z.K. Punja. Genetic diversity among natural and cultivated field populations and seed lots of American ginseng(*Panax quinquefolius* L.) in Canada. *Int. J. Plant Sci.* 163(3): 427-439, 2002.
59. Siebold. *Verhandelingen van het bataviaasch genootschap van kunsten en wetenschappen* 12: 45, 1830.
60. Shinozaki, K., Ohme, M., Tanake, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubauashi, T., Zaita, N., Chunwonse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shonozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B.Y., sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F.,

- Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H. and Sugiura, M.: EMBO J., 5, 2043, 1986.
61. Soltis, P.S., D.E. Soltis & J.J. Doyle. Molecular Systematics of Plants. 434 Chapman and Hall, New York, 1992.
62. Soltis, D.E. and R. Kuzoff. Discordance between nuclear and chloroplast phylogenies in the Heuchera group (Saxifragaceae). Evolution 49: 727-742, 1995.
63. Suh, Y. DNA and reconstruction of plant phylogeny. Kor. J. Plant Tax. 22(2): 121-140. (in Korean), 1992.
64. Suh, Y., L.B. Thien, H.E. Reeve, and E.A. Zimmer. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. American Journal of Botany 80: 1042-1055, 1993.
65. Swofford, R.A. Phylogenetic Analysis Using Parsimony. ver. 4.10b. Sinauer press, New York, 2003.
66. Tochika-Komatsu, Y., I. Asaka and I. Ichio. A RAPD primer to assist the identification of selected strain, Aizu K-111 of Panax ginseng and the sequence amplified. Biol. Pharm. Bull. 24(10): 1210-1213, 2001.
67. Um, J.-Y., H.-S. Chung, M.-S. Kim, H.-J. Na, H.-J. Kwon, J.-J. Kim, K.-M. Lee, S.-J. Lee, J.-P. Lim, K.-R. Do, W.-J. Hwang, Y.-S. Lyu, N.-H. An, and H.-M. Kim. Molecular authentication of Panax ginseng species by RAPD Analysis and PCR-RFLP. 2001. Biol. Pharm. Bull. 24(8): 872-875, 2001.
68. Vijverberg K and K Bachmann Molecular evolution of a tandemly repeated trnF(GAA) gene in the chloroplast genomes of Microseris (Asteraceae) and the use of structural mutations in phylogenetic analyses Mol. Biol. Evol. 16: 1329-1340, 1999.
69. Weising, K., H. Nybom, K. Wolff and W. Meyer. DNA fingerprinting in Plants and Fungi. CRC press, 1995.
70. Wen, J. and E.A. Zimmer. Phylogeny and biogeography of Panax L. (Araliaceae): Inference from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. Mol. Phylogenetics and Evol. 6(2): 167-177, 1996.
71. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" (M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, and T. White, Eds.), 315-322, Academic Press, San Diego, 1990.
72. Williams, J., A. Kubelik, J. Rafalski and S. Tingey. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6231-6239, 1990.
73. Willis, J.C. A dictionary of the flowering plants and ferns. Royal Bot. Gard., Kew Press, 1973.
74. Zimmer, E.A., Jupe, E.R., and V. Wallbot. Ribosomal gene structure, variation and inheritance in maize and its ancestors. Genetics. 1988 Dec. 120(4): 1125-36, 1988.