미토콘드리아 DNA 염기서열 변이를 이용한 인삼 종 판별 연구

조익현*¹ · 방경환*^{1†} · 김영창* · 김장욱* · 신미란* · 문지영**

노봉수*** · 현동윤* · 김동휘* · 차선우* · 김홍식****

*농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부, **국립농산물품질관리원 시험연구소,

서울여자대학교 식품공학과, *충북대학교 식물자원학과

Analysis of Mitochondrial DNA Sequence and Molecular Marker Development for Identification of *Panax* Species

Ick Hyun Jo*¹, Kyong Hwan Bang*^{1†}, Young Chang Kim*, Jang Uk Kim*, Mi Ran Shin*, Ji Young Moon**, Bong Soo Noh***, Dong Yun Hyun*, Dong Hwi Kim*, Seon Woo Cha* and Hong Sig Kim****

*Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 369-873, Korea.

**Experiment Research Institute of National Agricultural Products Quality Management Service, MIAFF, Seoul 150-043, Korea.

***Department of Food Science and Technology, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea.

****Department of Plant Resources, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea.

ABSTRACT : This study describes the identification of *Panax* species using mitochondrial consensus primers. Initially, a total of thirty primers were tested in ten Korean ginseng cultivars and two foreign *Panax* species, *P. quinquefolius* and *P. notoginseng*. In the polymerase chain reaction (PCR) amplification results, three primers (cox1, nad1/2-3 and nad2/1-2) generated co-dominant polymorphic banding patterns discriminating Korean ginseng cultivars from *P. quinquefolius* and *P. notoginseng*. However, these primers could not generated polymorphisms among the Korean ginseng cultivars, and simply represented species-specific polymorphisms for *P. quinquefolius* and *P. notoginseng*. Primers PQ91 and PN418 were designed from the consensus sequence of nad1/2-3 region. Two banding patterns (A or B) were detected in PQ91. Korean ginseng cultivars and *P. notoginseng* shared the same banding pattern (A type) and *P. quinquefolius* was identified another banding pattern (B type). In the case of PN418, two banding patterns (A or B) were detected in the Korean ginseng cultivars and two foreign *Panax* species. Korean ginseng cultivars and *P. quinquefolius* shared the same banding pattern (A type) and *P. notoginseng* was identified another banding pattern (B type). The combination banding patterns of three *Panax* species, Korean ginseng cultivars (*Panax ginseng* C. A. Mey.), *P. quinquefolius* and *P. notoginseng*, was identified as 'AA', 'BA' and 'AB', respectively. Consequently, PQ91 and PN418 primer sets can be used to distinguish among *Panax* species.

Key Words : *Panax* Species, cox1, nad1/2-3, nad2/1-2, Mitochondria, Species-Specific Polymorphisms

서 언

고려인삼 (*Panax ginseng* C. A. Mey.)은 Araliaceae과의 *Panax* 속에 속하는 뿌리를 이용하는 약용식물로서 2,000년 전부터 한약재로 사용되어 왔다 (Hu, 1976). 인삼 속에 속하는 식물은 분류학자에 따라 다른 견해를 보여 약 12종에서 18종으로 존재하는 것으로 알려져 있으며, 이 중 *Panax ginseng* C. A.

Mey. (고려인삼)과 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen (중국삼), *Panax quinquefolius* L. (미국삼) 등이 상업적인 인삼제품의 원료로 널리 사용되고 있다 (Wen and Zimmer, 1996; Lee and Wen, 2004).

최근 웰빙과 천연 건강식품에 대한 관심으로 인삼 가공품 시장 규모와 원료삼의 수요가 증가함에 따라 값싼 외국삼이 밀수입되어 국내산 인삼으로 불법 유통되고 있다. 향후 중국,

[†]Corresponding author: (Phone) +82-43-871-5539 (E-mail) bang31@korea.kr

Received 2012 January 11 / 1st Revised 2013 January 31 / 2nd Revised 2013 February 12 / Accepted 2013 February 27

¹Jo IH and Bang KH contributed equally to this paper.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

미국, 캐나다 등 인삼산업 경쟁국과의 자유무역협정이 발효되면 더욱 더 그 피해가 심각해질 것으로 전문가들은 예상하고 있다 (Bang *et al.*, 2011a). 또한 홍콩 등 해외시장에서 한국산 고려인삼에 대한 소비자 인식이 좋아 국내 인삼 제품의 모조품까지 유통되고 있는 실정이다. 따라서 국내 인삼 재배농가들의 안정적인 소득 보장과 인삼의 유통질서를 바로잡기 위해 인삼의 과학적인 판별시스템 개발이 필요하다.

전통적으로 인삼의 종을 구분하기 위해서 형태적 형질의 차이를 이용하는 방법과 동위효소 변이와 성분적 차이를 확인하는 방법 등이 주로 사용되어 왔으나, 형태적 형질을 이용한 종의 구분은 주관적 요소가 배제되기 힘들고 동위효소 변이와 성분적 차이를 이용하는 방법은 재배환경의 영향을 받을 수 있으므로 정확하게 종을 구분하기 어렵다 (Um *et al.*, 2001; Shim *et al.*, 2005). 더욱이 건강식품 및 보조제의 원료로 쓰이는 인삼의 경우 분말이나 추출물 형태로 가공되기 때문에 외국삼의 혼입여부를 판별하는 것이 극히 어렵다.

따라서 식물의 종을 정확하고 신속하게 판별하기 위해 외부 요소에 영향을 받지 않는 DNA 마커를 활용한 방법이 최근 주요작물을 대상으로 활발히 연구되고 있다. DNA 마커를 이용한 방법은 식물체의 모양과 크기 등 형태적 특성과 달리 외부환경의 영향을 받지 않고 식물의 종을 구분할 수 있으며, 사용할 수 있는 마커 수의 제한이 없어 정확한 판별이 가능하다 (Hwang *et al.*, 2012).

DNA 마커를 이용한 인삼의 종 판별연구는 internal transcribed spacer (ITS)와 5.8S 부위의 염기서열 변이를 이용한 방법 (Wen and Zimmer, 1996; Ngan *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007), 엽록체 DNA의 변이를 이용한 PCR-RFLP (Choi and Wen, 2000), universal primer를 적용시킨 RAPD (Um *et al.*, 2001, Shim *et al.*, 2003; Bang *et al.*, 2004) AFLP (Ha *et al.*, 2002), ISSR (In *et al.*, 2005) 등의 방법이 있다. 그러나 선행된 연구결과들은 제한적인 품종의 적용과, PCR 이후의 추가적인 실험으로 인한 오랜 시간 소요와 임의 프라이머를 이용함으로써 발생하는 재현성 등의 문제점이 제기되어 왔다 (Bang *et al.*, 2012).

미토콘드리아는 핵 DNA에 비해 크기가 작아 조작이 용이하며 돌연변이율도 높고 재조합이 거의 없어 오랜 세월 진화해 오는 과정동안 수많은 변이를 축적하여 다른 어느 genome 보다 5내지 10배의 변이를 가진다 (McClellan and Hanson, 1986). 뿐만 아니라 비멘델성 유전을 하기 때문에 양친의 염색체가 재조합하여 일어나는 복잡성을 피할 수 있어 식물의 종을 분류하는 연구에 많이 적용되어 왔다.

따라서 본 연구는 인삼의 종 판별을 위하여 고려인삼, 미국삼 및 중국삼의 미토콘드리아 DNA 염기서열 분석을 통해 분자생물학적 판별을 시도하였으며, 향후 다양하게 가공된 다

Table 1. Korean ginseng cultivars and foreign *Panax* species used in this study.

No.	Name	Classification	Collection sites
1-2	Chunpoong	Korean cultivar	Eumsung, Chungbuk, Korea
3-4	Yunpoong	Korean cultivar	Eumsung, Chungbuk, Korea
5-6	Gopoong	Korean cultivar	Eumsung, Chungbuk, Korea
7-8	Gumpoong	Korean cultivar	Eumsung, Chungbuk, Korea
9-10	Sunpoong	Korean cultivar	Eumsung, Chungbuk, Korea
11-12	Sunun	Korean cultivar	Eumsung, Chungbuk, Korea
13-14	Sunone	Korean cultivar	Eumsung, Chungbuk, Korea
15-16	Cheongsun	Korean cultivar	Eumsung, Chungbuk, Korea
17-18	Sunhyang	Korean cultivar	Eumsung, Chungbuk, Korea
19-20	Cheonryang	Korean cultivar	Eumsung, Chungbuk, Korea
21-22	<i>P. quinquefolius</i>	American accession	Wisconsin, USA
23-24	<i>P. notoginseng</i>	Chinese accession	Yunnan, China

량의 인삼원료제품을 대상으로 단위시간당 처리 능력 (through put)이 향상된 종판별 시스템을 구축하고자 DNA 단편의 증폭 크기를 줄인 효율적인 마커 개발을 목적으로 수행하였다.

재료 및 방법

1. 연구재료 및 DNA 추출

본 연구에 사용된 재료는 농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부 시험포장에 보존 증식된 것으로 고려인삼 10품종, 중국삼 및 미국삼의 4년생 잎을 각각 채취하여 사용하였다 (Table 1). 수집한 샘플은 액체질소로 급랭시켜 막자사발을 이용하여 분말상태가 되도록 마쇄한 후, DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)을 이용하여 제작사가 제공한 실험방법에 따라 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, USA) 기기를 이용하여 농도를 측정하였는데, 각각의 DNA 최종농도는 멸균된 증류수를 이용하여 5 ng/μL로 조정하였다.

2. PCR (Polymerase Chain Reaction)

추출된 DNA로부터 PCR은 Biometra Tprofessional thermal cycler (Whatman, Germany)에서 수행하였다. PCR 반응액의 총 부피는 50 μL로서, 10 ng DNA, 0.5 unit Taq DNA

polymerase (Inclone, Korea), 2.5 mM MgCl₂, 20 pmole primer 그리고 0.25 mM dNTPs를 포함시켰다. Primer는 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.의 미토콘드리아 DNA를 바탕으로 짜여진 30쌍의 primer를 합성하여 사용하였다 (Dumimil *et al.*, 2002). PCR 반응은 95°C에서 5분간 pre-denaturation한 후, 95°C에서 30초, 55~60°C에서 30초, 72°C에서 2분으로 구성된 amplifying을 35 cycles로 수행하였고, 마지막 단계인 final extention 과정은 72°C에서 5분간 진행시켰다. 증폭된 DNA 산물은 1.5% agarose gel에서 180V로 전기영동한 후, EtBr (Ethidium Bromide)로 염색하여 UV-illuminator에서 band를 확인한 후 현상을 사진으로 기록하였다.

3. 다형성 탐색 및 염기서열분석

30쌍의 프라이머를 국내인삼 10품종과 2종의 외국삼에 적용시켜 중간 다형성을 나타내는 삽입 또는 결실 (In/Del, Insertion or Deletion) 프라이머를 선발하였다. 선발된 PCR 산물은 Mega Quick-spin Kit (Intron Bio, Korea)를 사용하여 정제한 후 Macrogen Co., Ltd. (Korea)에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열은 Bioedit program을 이용하여 편집하였고, no gap으로 저장한 후 Cluster X (ver. 1.83)로 염기서열을 정렬하였다.

4. 프라이머 합성 및 PCR 반응

염기서열 분석을 통해 중간 삽입 및 결실의 다형성이 확인된 프라이머를 선발하였으며, 염기서열 변이를 토대로 보다 정확하고 빠른 분석을 위해 PCR 산물의 증폭사이즈를 500 bp 미만으로 하여 신속한 실험이 가능하도록 primer3 (<http://primer3.wi.mit.edu/>)를 이용하여 프라이머를 디자인하였다. 새롭게 합성된 프라이머는 증폭구간을 짧게 설계하여 기존의 프라이머 보다 반응 시간을 단축시켰으며 중간 DNA 증폭 밴드 길이의 차이를 명확하게 식별할 수 있도록 제작하였다. PCR 반응은 95°C에서 5분간 pre-denaturation 한 후, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초로 구성된 amplifying을 35 cycles로 수행하였고, 마지막 단계인 final extention 과정은 72°C에서 5분간 진행시켰다.

결 과

1. In/Del 다형성 프라이머 선발

애기장대의 미토콘드리아 DNA를 바탕으로 합성된 30쌍의 consensus primer를 국내인삼 10품종과 외국삼 2종에 적용시킨 결과 *cox1*, *nad1/2-3*, *nad2/1-2* 부위에서 삽입 또는 결실 (In/Del)에 의한 다형성이 확인되었다. 3쌍의 프라이머 모두 고려인삼의 품종 간 다형성은 없었으나 고려인삼과 외국삼 (중국삼, 미국삼) 간의 다형성은 확인되었다. *cox1*에서는

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the PCR products amplified with mitochondrial consensus primers. (A) *cox1*, (B) *nad1/2-3*, (C) *nad2/1-2*. lane 1-2, Chunpoong; lane 3-4, Yunpoong; lane 5-6, Gopoong; lane 7-8, Gumpoong; lane 9-10, Sunpoong; lane 11-12, Sunwoon; lane 13-14, Sunwon; lane 15-16, Chungsun; lane 17-18, Sunhyang; lane 19-20, Cheonryang; lane 21-22, *P. quinquefolius*; lane 23-24, *P. notoginseng*; M, 2-log DNA ladder (NEB. Beverly. MA, USA).

고려인삼과 중국삼의 증폭된 DNA 단편의 크기가 약 1.3 kb로 확인되었으며 나머지 미국삼의 DNA 단편의 크기는 약 2.1 kb로 800 bp의 In/Del polymorphisms을 확인할 수 있었다. *nad1/2-3*에서는 고려인삼과 미국삼의 DNA 단편의 크기는 약 1.3 kb로 비슷하였으나 미국삼의 DNA 단편이 조금 더 작은 것으로 확인되었다. 반면 중국삼의 DNA 단편은 약 1.5 kb로 중간 약 200~300 bp의 In/Del polymorphisms이 확인되었으며 동시에 3종의 인삼을 식별할 수 있었다. 마지막으로 *nad2/1-2*에서는 고려인삼과 미국삼의 DNA 단편의 크기는 동일하게 1.1 kb로 확인되었으나 중국삼의 DNA 단편은 1.2 kb로 약 100 bp의 삽입 또는 결실에 의한 다형성을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

2. 염기서열분석

공우성을 나타내는 3쌍 (*cox1*, *nad1/2-3*, *nad2/1-2*)의 프라이머 중 국내인삼과 중국삼과 미국삼을 모두 식별할 수 있고, 중간 In/Del의 차이가 크지 않아 마커로 전환이 용이한 *nad1/2-3* 프라이머를 선발하였으며, 이들의 PCR 증폭산물에 대해 염기서열 분석을 수행하였다. 그 결과 국내인삼 10품종의 염기서열 길이는 모두 1,355 bp였으며, 미국삼은 1,334 bp, 중국삼은 1,587 bp로 각각 다르게 확인되었다. 국내인삼 10품종의 염기서열 길이는 모두 같았고 1,150~1,370 bp 위치에서 10품종 모두 237 bp의 염기 결실이 확인되었다. 그러나 10품종 중 '천량'은

Fig. 2. Nucleotide sequence alignment of polymorphic fragments amplified from ten Korean ginseng cultivars and two foreign *Panax* species, *P. quinquefolius* and *P. notoginseng* by nad1/2-3 primer. The areas enclosed by the boxes indicates In-Del and SNP variations. Primer binding regions and directions were indicated with arrows.

Table 2. The DNA marker combination consisted with two primer sets for discrimination of *Panax* species.

Clone information			Primer sequence		PCR information	
ID	Insert size (bp)	Primer name	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')	PCR product size (bp)	Anneal. temp. (°C)
nad1/2-3	1,587-1,334	PQ91 [†]	GAGCAACACTCGAACGTGA	CGCCACTTCTCTGAAAGCAT	91	60
		PN418	TGATGAAACCACTCCAGTCG	AACCACACGTGCAAGTTTCC	418	60

[†]PQ and PN, stand for 'Panax quinquefolius' and 'Panax notoginseng'.

Fig. 3. Polymorphic banding patterns among *Panax* species. (A) PQ91 and (B) PN418. These primers also discriminate Korean Ginseng cultivars from two foreign ginseng. Lane 1-2; Chunpoong, lane 3-4; Yunpoong, lane 5-6; Gopoong, lane 7-8; Gumpoong, lane 9-10; Sunpoong, lane 11-12; Sunun, lane 13-14; Sunone, lane 15-16; Chungsun, lane 17-18; Sunhyang, lane 19-20; Cheonryang, lane 21-22; *P. quinquefolius*, lane 23-24; *P. notoginseng*, lane M; DNA step ladder (s-Log DNA ladder; NEB. Beverly, MA, USA).

염기서열 80~90 bp 위치에서 4개의 염기치환 (T → C, G → T, A → T, G → A)이 확인되어 국내인삼 9품종과 2종의 외국삼과 확연한 차이를 나타내었다. 미국삼의 경우 360~380, 985~995, 1,150~1,370 bp 위치에서 각각 14, 7, 237 bp의 염기서열 결실을 보였으며 염기치환은 확인되지 않았다. 마지막으로 중국삼은 가장 많은 변이를 보였으며 7곳 (326, 458, 504, 1,077, 1,288, 1,290, 1,373 bp)에서 염기치환 (A → T, G → C, A → G, C → T, C → A, C → G, G → T)이 확인되었고 700~710 bp 위치에서 5 bp의 염기서열 결실이 확인되었다 (Fig. 2).

3. 미토콘드리아 nad1/2-3 지역을 이용한 종 특이적 프라이머 제작 및 PCR

국내인삼 10품종과 미국삼 및 중국삼의 nad1/2-3 지역을 PCR 증폭한 결과 삽입 및 결실에 의한 다형성으로 3종을 모두 구별할 수 있었다. 그러나 종 특이적인 염기결실의 차이가 너무 작아 육안으로 DNA 단편 길이의 차이를 식별하기에 무리가 있었으며, 타겟 DNA의 증폭구간도 길어 반응시간이 많이 소요되고 이로 인해 정확성과 재현성이 떨어지는 단점이 발생하였다. 따라서 Fig. 2와 같이 종 특이적인 염기서열 결실 부위를 타겟으로 2쌍의 프라이머 (PQ91, PN418)를 제작하였다. PQ91은 미국삼을 식별할 수 있는 마커로써 미국삼의 360~380 bp 사이에 존재하는 14 bp의 염기서열 결실 부위를 타겟으로 설계하였다. PN418은 중국삼을 식별할 수 있는 마커로써 중국삼을 제외한 국내인삼 10품종과 미국삼의 1,150~1,370 bp 위치에 존재하는 237 bp의 염기결실 부위를 타겟으로 설계하였다 (Table 2). PQ91과 PN418을 국내인삼 10품종과 2종의 외국삼에 적용한 결과, PQ91에서 미국삼은 91 bp

Table 3. Banding patterns of *Panax* species by two primer sets based on conserved sequences within the nad1/2-3 region.

Primer	Cultivars and accessions/banding patterns		
	Korean ginseng cultivars (<i>Panax ginseng</i>)	American accession (<i>P. quinquefolius</i>)	Chinese accession (<i>P. notoginseng</i>)
PQ91	A	B	A
PN418	A	A	B
Banding patterns	AA	BA	AB

의 DNA 단편이 국내인삼 10품종과 중국삼은 각각 105 bp의 DNA 단편이 확인되어 미국삼을 명확하게 판별할 수 있었다. PN418에서는 중국삼이 418 bp, 국내인삼 10품종과 미국삼의 밴드는 179 bp로 확인되어 중국삼을 명확하게 식별할 수 있었다 (Fig. 3).

고찰

본 연구는 국내외 인삼시장에서 고려인삼의 경쟁력 제고를 위해 외국삼으로부터 고려인삼을 간편하고 신속하게 판별을 할 수 있는 기술을 개발하였다. 공우성 (Co-dominant)인 PQ91, PN418 마커는 미토콘드리아를 기반으로 제작되어 agarose gel 에서 쉽게 확인이 가능한 장점이 있어 대량의 샘플을 대상으로 종 판별에 효율적으로 사용이 가능하다. PQ91, PN418 마커는 미토콘드리아의 nad1/2-3 부위를 기반으로 개발되었으며, nad1/2-3 부위는 미토콘드리아 NADH dehydrogenase subunit 1 (NAD1) 유전자와 exon 2, 3 및 약간의 coding sequence (CDS)가 포함된 유전자 부위로써 제라늄과, 벚과, 버어먼초과, 박과 등의 유연관계 분석, (Bakker *et al.*, 2000; Guo and Ge, 2005; Merckx *et al.*, 2006; Schaefer and Renner, 2011)에 널리 이용되고 있다.

고려인삼과 미국삼 및 중국삼을 구별하기 위해 종 특이적인 2쌍의 마커(PQ91, PN418)를 개발하였으며 이들의 조합으로 국내인삼과 2종의 외국삼을 완벽하게 판별할 수 있었다 (Table 3). 그러나 국내 인삼 10품종 간의 판별은 불가능하였으며, 이러한 결과는 고려인삼의 유전적 다양성이 작고, 품종, 육성종, 국내 재배종 간의 유전적 유사도 높아 구분이 힘들다는 Bang 등(2011b)의 연구보고와 일치하였다. 하지만 국내인삼 품종 중 ‘천량’에서 품종 특이적 단일염기서열 변이 (SNP, Single Nucleotide Polymorphism)가 nad1/2-3 부위에서 확인되어 ‘천량’ 특이적 SNP 마커의 개발가능성을 보여주었다. 이는 Wang 등(2009)에 의해 미토콘드리아 지역을 바탕으로 ‘천량’을 구분할 수 있는 SNP 마커를 개발한 연구와 비슷한 결과이며 이러한 연구 결과를 토대로 향후 ‘천량’ 특이적 SNP 마커 개발을 추가적으로 진행할 계획이다.

본 연구를 통하여 개발된 PQ91, PN418은 상업적으로 사용

되는 3종의 인삼을 단시간 내에 판별할 수 있는 마커로써, 밀수 인삼, 국내 인삼 제품의 모조품 등의 부정유통 방지를 위한 현장 단속기술로 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 수량성이 좋고 병해충에 안정적인 ‘친량’ 품종의 지적재산권 보호를 위한 구별성의 확보와 종자생산 및 관리의 목적으로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

LITERATURE CITED

- Bakker FT, Culham A, Pankhurst CE and Gibby M.** (2000). Mitochondrial and chloroplast DNA-based phylogeny of *Pelargonium*(Geraniaceae). *American Journal of Botany*. 4:727-734.
- Bang KH, Lee SW, Hyun DY, Cho JH, Cha SW, Seong NS and Huh MK.** (2004). Molecular authentication and genetic polymorphism of Korean ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer) by inter-simple sequence repeats(ISSRs) markers. *Journal of Life Science*. 14:425-428.
- Bang KH, Chung JW, Kim YC, Lee JW, Jo IH, Seo AY, Kim OT, Hyun DY, Kim DH and Cha SW.** (2011a). Development of SSR markers for identification of Korean ginseng(*Panax ginseng* C. A. Mey.) cultivars. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 19:185-190.
- Bang KH, Jo IH, Chung JW, Kim YC, Lee JW, Seo AY, Park JH, Kim OT, Hyun DY, Kim DH and Cha SW.** (2011b). Analysis of genetic polymorphism of Korean ginseng cultivars and foreign accessions using SSR markers. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 19:347-353.
- Bang KH, Seo AY, Chung JW, Kim YC, Jo IH, Kim JU, Kim DH, Cha SW, Cho YG and Kim HS.** (2012). Analysis of genetic polymorphism and relationship of Korean ginseng cultivars and breeding lines using EST-SSR marker. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 20:277-285.
- Choi HK and Wen J.** (2000). A phylogenetic analysis of *Panax*(Araliaceae): Integrating cpDNA restriction site and nuclear rDNA ITS sequence data. *Plant Systematics and Evolution*. 224:109-120.
- Duminil J, Pemonge MH and Petit RJ.** (2002). A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA. *Molecular Ecology Notes*. 4:428-430.
- Guo YL and Ge S.** (2005). Molecular phylogeny of *Oryzaeae*(Poaceae) based on DNA sequences from chloroplast, mitochondrial, and nuclear genomes. *American Journal of Botany*. 9:1548-1558.
- Ha WY, Shaw PC, Liu J, Yau CF and Wang J.** (2002). Authentication of *Panax* ginseng and *Panax quinquefolius* using amplified fragment length polymorphism(AFLP) and directed amplification of minisatellite region DNA(DAMD). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 7:1871-1875.
- Hu SY.** (1976). The genus *Panax*(ginseng) in Chinese medicine. *Economic Botany*. 30:11-28.
- Hwang TY, Seo MJ, Lee SK, Park HM, Jeong KH, Lee YY, Kim SL, Yun HT, Lee JE and Kim DW.** (2012). Discrimination of 110 Korean soybean cultivars by sequence tagged sites(STS)-CAPS markers. *Korean Journal of Breeding Science*. 3:258-272.
- In DS, Kim YC, Bang KH, Chung JW, Kim OT, Hyun DY, Cha SW, Kim TS and Seong NS.** (2005). Genetic relationships of *Panax* species by RAPD and ISSR analyses. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 13:249-253.
- Kim OT, Bang KH, In DS, Lee JW, Kim YC, Shin YS, Hyun DY, Lee SS, Cha SW and Seong NS.** (2007). Molecular authentication of ginseng cultivars by comparison of internal transcribed spacer and 5.8S rDNA sequences. *Plant Biotechnology Reports*. 1:163-167.
- Lee C and Wen J.** (2004). Phylogeny of *Panax* using trnC-trnD intergenic region and the utility of trnC-trnD in interspecific studies of plants. *Molecular Phylogenetics Evolution*. 31:894-903.
- McClellan PE and Hanson MR.** (1986). Mitochondrial DNA sequence divergence among lycopersicon and related *Solanum* species. *Genetics*. 3:649-667.
- Merckx V, Schols P, Van de kamer HM, Maas P, Huysmans S and Smets E.** (2006). Phylogeny and evolution of *Burmanniaceae*(Dioscoreales) based on nuclear and mitochondrial data. *American Journal of Botany*. 11:1684-1698.
- Ngan F, Shaw P, But P and Wang J.** (1999). Molecular authentication of *Panax* species. *Phytochemistry*. 50:787-791.
- Park MJ, Kim MK, In JG and Yang DC.** (2006). Molecular identification of Korean ginseng by amplification refractory mutation system-PCR. *Food Research International*. 5:568-574.
- Schaefer H and Renner SS.** (2011). Phylogenetic relationships in the order *Cucurbitales* and a new classification of the gourd family(Cucurbitaceae). *Taxonomy*. 60:122-138.
- Shim YH, Choi JH, Park CD, Lim CJ and Cho JH.** (2003). Molecular differentiation of *Panax* species by RAPD analysis. *Archives of Pharmacal Research*. 8:601-605.
- Shim YH, Park CD, Kim DH, Cho JH, Cho MH and Kim HJ.** (2005). Identification of *Panax* species in the herbal medicine preparations using gradient PCR method. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 28:671-676.
- Um JY, Chung HS, Kim MS, Na HJ, Kwon HJ, Kim JJ, Lee KM, Lee SJ, Lim JP, Do KR, Hwang WJ, Lyu YS, An NH and Kim HM.** (2001). Molecular authentication of *Panax* ginseng species by RAPD analysis and PCR-RFLP. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 24:872-875.
- Wang H, Sun H, Kwon WS, Jin H and Yang DC.** (2009). Molecular identification of the Korean ginseng cultivar “Chunpoong” using the mitochondrial nad7 intron 4 region. *Mitochondrial DNA*. 20:41-45.
- Wen J and Zimmer EA.** (1996). Phylogeny and biogeography of *Panax* L.(the ginseng genus, Araliaceae): Inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 6:167-177.