



## 더덕 속 식물의 구분을 위한 InDel 마커의 개발

김주혁<sup>1#</sup> · 정영훈<sup>2#</sup> · 이미선<sup>3</sup> · 김문교<sup>4,5</sup> · 조남수<sup>6,7</sup> · 길진수<sup>8</sup> · 구성철<sup>9</sup> · 이 이<sup>10†</sup>

### Development of InDel Markers to Distinguish among *Codonopsis* Species

Ju Hyeok Kim<sup>1#</sup>, Young Hoon Jeong<sup>2#</sup>, Mi Sun Lee<sup>3</sup>, Moonkyo Kim<sup>4,5</sup>, Namsu Jo<sup>6,7</sup>, Jinsu Gil<sup>8</sup>, Sung Cheol Koo<sup>9</sup> and Yi Lee<sup>10†</sup>

#### ABSTRACT

Received: 2022 November 23  
1st Revised: 2022 December 5  
2nd Revised: 2022 December 26  
3rd Revised: 2023 January 5  
Accepted: 2023 January 5

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.



**Background:** Three medicinal plants of the Campanulaceae, *Codonopsis lanceolata*, *C. pilosula*, and *C. ussuriensis* are perennial vines of the genus *Codonopsis*, and are widely distributed in East Asia. *C. lanceolata*, *C. pilosula*, and *C. ussuriensis* have been used as medicine to alleviate inflammation, increase red blood cell count and hemoglobin levels, and improve spleen and stomach functions, respectively. The three species have similar morphologies, although their pharmacological effects differ.

**Methods and Results:** We identified polymorphic loci by comparing chloroplast and mitochondrial sequences of *C. lanceolata*, *C. pilosula*, and *C. ussuriensis*. We designed primers based on these polymorphic loci and conducted polymerase chain reaction (PCR) analysis to verify the polymorphisms. Three insertion–deletion (InDel) markers were ultimately developed: CD-mt-02, which identified *C. pilosula*; CD-mt-06, which identified *C. ussuriensis*; and CD-cp-07, which identified all the three species.

**Conclusions:** The three InDel markers developed in this study easily distinguished the three plant species based on a simple PCR test.

**Key Words:** *Codonopsis lanceolata*, *C. pilosula*, *C. ussuriensis*, Chloroplast, Insertion or Deletion, Mitochondria

#### 서 언

*Codonopsis* Wall.은 초롱꽃과 (Campanulaceae)로 한국, 중국, 일본과 같이 동아시아 지역에 분포하고 있으며, 우리나라에는 숙근성 다년생 덩굴 식물인 더덕, 만삼, 소경불알 등이 자생하고 있다.

더덕 [*C. lanceolata* (Siebold & Zucc.) Trautv.]은 한방에서는 양유근으로 불리며, 탄수화물, 단백질, 식물 섬유 등 다

량의 물질이 함유되어 있어 봄, 가을에 주로 뿌리를 채취해 약용 및 식용으로 널리 사용되고 있다 (Lee and Won, 2007; Lee *et al.*, 2019).

더덕의 효능은 해열, 해독, 인후염 등에 효과를 가진 약용식물로 알려져 있으며, 최근에는 간 보호 작용, 항산화 증진 등의 다양한 약리작용도 확인된 바가 있다 (Yoo *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2012). 특히, 더덕의 주요 성분인 사포닌으로 lancemaside A가 남성 갱년기 장애 개선과

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-43-261-3373 (E-mail) leeyi22@cbnu.ac.kr

<sup>#</sup>Ju Hyeok Kim and Young Hoon Jeong are contributed equally to this paper

<sup>1</sup>충북대학교 특용식물학과 석사과정생 / Master's student, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.

<sup>2</sup>충북대학교 특용식물학과 학부생 / Bachelor student, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.

<sup>3</sup>충북대학교 특용식물학과 석사과정생 / Master's student, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.

<sup>4</sup>충북대학교 특용식물학과 석사과정생 / Master's student, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.

<sup>5</sup>극지연구소 연구원 / Researcher, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Korea.

<sup>6</sup>충북대학교 특용식물학과 박사 / Ph. D. degree, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.

<sup>7</sup>(주)제농 에스엔티 농업회사법인 선임연구원 / Researcher, Biotechnology Research Institute, Jenong S&T Co., Ltd., Anseong 17602, Korea.

<sup>8</sup>충북대학교 특용식물학과 박사 / Ph. D. degree, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.

<sup>9</sup>농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부 연구사 / Researcher, Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 27709, Korea.

<sup>10</sup>충북대학교 특용식물학과 교수 / Professor, Department of Industrial Plant Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea.

기억력 및 불면증 개선, 대장염 완화, 피부염증 개선 등의 약리작용이 확인되면서 기능성 식품 원료로 중요도가 상승하고 있다 (Ushijima *et al.*, 2007; Joh *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2012).

만삼 [*C. pilosula* (Franch.) Nannf.]은 오래전부터 식욕부진, 피로감 등에 대한 강장약으로써 치료에 사용되어왔고, 중국에서는 인삼과 유사한 약효가 있어 당삼으로써 인삼 대용으로 사용되고 있다. 소화성 위궤양 완화, 배변 조절, 면역력 증가와 적혈구 및 헤모글로빈 수치 증가 등 약리작용도 확인된 바 있다 (Singh *et al.*, 2004). 최근에는 암세포 전이 억제에 대한 항종양, 항산화 효능이 만삼 뿌리에서 발견되었고, 신장 관련 질병의 발병율과 사망률을 증가시키는 신장 허혈-재관류 (renal ischemia-reperfusion)에 대해 만삼의 polysaccharide S-CPPA1이 효과가 있다고 보고되었다 (Li *et al.*, 2012; Xin *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2012).

소경불알 [*C. ussuriensis* (Pupr. & Maxim.) Hemsl.]은 만삼 아재비, 알더덕, 까치더덕 등 이명으로도 불리며, 한방에서는 작반당삼이라고 한다. 비장 및 위의 기능부족을 개선하고 인체에 필요한 체액을 충원시켜 갈증을 해소하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, 뿌리에서 phenylpropanoid와 triterpenoid 성분이 확인되었고, 이중 phenylpropanoid 성분이 bacterial neuraminidase (BNA)의 활성을 저해한다는 연구사례도 있었다 (Kim *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2018; Koo *et al.*, 2022).

한편 이들 3 종의 식물은 꽃의 크기나 색이 달라 식물 상 태에서는 쉽게 구분할 수 있지만, 주 사용 부위인 뿌리는 약제나 기능성 식품으로 가공하기 위해 말린 후 절단 및 포장했을 경우 형태적으로 구별하기가 어려워 오용 및 혼용의 위험성이 있다. 최근 유행하는 국제적 감염성 질환인 코로나 19 등으로 건강과 면역력의 중요성이 높아지는 만큼 더덕과 같은 기능성 식품 원료들을 각 효능에 맞게 사용하기 위해서 정확한 종을 분류하는 체계가 필요한 실정이다.

미토콘드리아는 핵 DNA에 비해 크기가 작아 조작이 용이하고, 비멘델성 유전으로 인해 식물 양친의 유전체 간 재조합이 거의 일어나지 않아 종 식별에 사용하기 쉽다. 이를 통해 미토콘드리아의 유전체 염기서열을 분석하여 종 판별을 위한 마커가 개발된 바 있으나, 2020년대 이후로는 미토콘드리아에 기반한 마커 개발이 부족한 실정이다 (McClellan and Hanson, 1986; Jo *et al.*, 2013).

엽록체는 식물의 종 판별에 사용하는 DNA 마커의 제작에 주로 이용되는 세포소기관이다. 대부분의 식물에서 엽록체가 모계유전을 하고 있으며, 이로 인해 유전체 재조합이 거의 일어나지 않아 엽록체 유전체가 잘 보존되어 있다. 이런 특징을 지녔음에도 불구하고 식물의 진화에 따라 변이가 누적되어 종 간 식별이 가능한 수준의 변이를 가져 엽록체 유전체가 계통 분석 및 종 판별을 위해 사용되고 있다 (Wicke *et al.*, 2011;

Li *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2021).

더덕 속 식물들을 DNA 수준에서 서로 비교하기 위해서 공공 데이터베이스인 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에 등록된 더덕 엽록체 유전체 데이터를 활용하여 엽록체 기반 마커를 개발할 필요가 있다.

Next-generation sequencing (NGS)는 대용량의 염기서열 정보를 적은 비용으로 빠른 시간 내에 분석할 수 있는 기술로 염기서열 정보 생성 속도를 크게 증가시킴으로써 분자마커 개발에 도움을 주었다 (Lv *et al.*, 2016). 분자마커는 생물이 가진 DNA 염기서열 정보를 토대로 염기서열 간 차이를 이용하여 종, 집단 간 유전적 관계를 규명하는 방법으로 다형성과 재현성이 높게 나타나는 유용한 도구로 사용된다 (Park *et al.*, 2017; Jeong *et al.*, 2021).

이러한 NGS 분석을 기반으로 더덕의 유전자원을 구분하는 simple sequence repeat (SSR) 마커가 개발된 사례가 있으며 (Kim *et al.*, 2021), 또 다른 종류의 DNA 분자 마커로는 insertion or deletion (InDel) 마커를 활용할 수 있다.

InDel 마커는 PCR을 이용하여 쉽게 검출이 가능하고, 전기영동을 이용하여 증폭산물의 크기를 비교해 간단히 확인할 수 있다는 장점이 있어 사용이 용이하다 (Kim *et al.*, 2022).

따라서 본 연구에서는 NGS 기술을 기반으로 한 InDel 마커를 개발을 통해 더덕, 만삼, 소경불알의 3 종을 구별하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료수집 및 genomic DNA 추출

본 실험에서 사용된 재료들은 국립원예특작과학원 인삼특작부에 식재중인 유전자원 및 시장에서 수집해  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다 (Table 1). DNA 추출은 잎 시료를 액체질소로 급냉각 후, NGS 분석용 genomic DNA는 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 사용해 추출하였고, polymerase chain reaction (PCR) 분석용 genomic DNA는 막자사발을 이용해 분쇄시켜 CTAB 방법을 사용해 추출하였다 (Doyle and Doyle, 1990).

추출된 DNA는 TE 완충액 (pH 8.0)에 용출하였고, PCR 실험에 이용하도록 DeNovix<sup>®</sup> DS-11+ spectrophotometer (DeNovix Inc., Wilmington, DE, USA)를 통해 농도를 측정 후 희석하여 사용하였다.

### 2. NGS 분석

더덕, 만삼, 소경불알 3 종을 각 1 개체씩 (CL-1, CP-1, CU-1) 선발하여 DNeasy Plant Mini Kit를 통해 추출된 DNA를 Illumina HiSeq 2500 platform (Illumina Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 NGS를 수행하였다. NGS 결과로 얻은 read

**Table 1.** List of 10 *C. lanceolata*, 4 *C. pilosula*, 4 *C. ussuriensis* genetic resources collected in Korea.

No.	Sample name	Species	Collection date	Collecting area
1	CL-1	<i>Codonopsis lanceolata</i>	Oct. 11, 2018	Chungbuk Eumseong <sup>1)</sup> 36°56'36"N 127°45'13"E
2	CL-2	<i>Codonopsis lanceolata</i>	Oct. 11, 2018	Chungbuk Eumseong <sup>1)</sup> 36°56'36"N 127°45'13"E
3	CL-3	<i>Codonopsis lanceolata</i>	Jun. 12, 2019	Gangwon Samcheok, 37°23'56"N 129°09'29"E
4	CL-4	<i>Codonopsis lanceolata</i>	Jul. 13, 2020	Seoul Dongdaemun-gu (Seoul Yangnyeongsi Market)
5	CL-5	<i>Codonopsis lanceolata</i>	Jul. 13, 2020	Seoul Dongdaemun-gu (Seoul Yangnyeongsi Market)
6	CL-6	<i>Codonopsis lanceolata</i>	Jul. 13, 2020	Chungbuk Jecheon (Jecheonsi Market)
7	CL-7	<i>Codonopsis lanceolata</i>	Jul. 13, 2020	Chungbuk Jecheon (Jecheonsi Market)
8	CL-8	<i>Codonopsis lanceolata</i>	Jul. 13, 2020	Chungbuk Jecheon (Jecheonsi Market)
9	CL-9	<i>Codonopsis lanceolata</i>	Jul. 13, 2020	Chungbuk Jecheon (Jecheonsi Market)
10	CL-10	<i>Codonopsis lanceolata</i>	Jul. 14, 2020	Daegu Jung-gu (Daegu Oriental Medicine Wholesale Market)
11	CP-1	<i>Codonopsis pilosula</i>	Jul. 31, 2019	Chungbuk Eumseong <sup>1)</sup> 36°56'36"N 127°45'13"E
12	CP-2	<i>Codonopsis pilosula</i>	Sep. 11, 2019	Chungbuk Eumseong <sup>1)</sup> 36°56'36"N 127°45'13"E
13	CP-3	<i>Codonopsis pilosula</i>	Sep. 11, 2019	Chungbuk Eumseong <sup>1)</sup> 36°56'36"N 127°45'13"E
14	CP-4	<i>Codonopsis pilosula</i>	Sep. 11, 2019	Chungbuk Eumseong <sup>1)</sup> 36°56'36"N 127°45'13"E
15	CU-1	<i>Codonopsis ussuriensis</i>	Jul. 31, 2019	Chungbuk Eumseong <sup>1)</sup> 36°56'36"N 127°45'13"E
16	CU-2	<i>Codonopsis ussuriensis</i>	Sep. 11, 2019	Chungbuk Eumseong <sup>1)</sup> 36°56'36"N 127°45'13"E
17	CU-3	<i>Codonopsis ussuriensis</i>	Sep. 11, 2019	Chungbuk Eumseong <sup>1)</sup> 36°56'36"N 127°45'13"E
18	CU-4	<i>Codonopsis ussuriensis</i>	Sep. 11, 2019	Chungbuk Eumseong <sup>1)</sup> 36°56'36"N 127°45'13"E

<sup>1)</sup>Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA.

들은 CLC Genomics Workbench ver. 20.0 (Qiagen, Aarhus, Denmark) 프로그램을 이용해 trimming 과정을 거쳐 품질을 높인 후, assembly를 시행해 미토콘드리아와 엽록체 DNA에 대한 contig를 작성하였다.

각 contig들은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에 등록된 *C. lanceolata*의 미토콘드리아 유전체 정보 (accession No. NC\_037949.1) 또는 엽록체 유전체 정보 (accession No. MH251613.1)와 비교하여 다형성을 보이는 InDel 구간을 탐색하였다.

### 3. 미토콘드리아, 엽록체 기반 InDel primer 제작

미토콘드리아와 엽록체 유전체에 대한 *in silico* 분석을 통해 다형성이 확인된 InDel 구간에 대한 primer 제작은 CLC Main Workbench ver. 20.0.4 (Qiagen, Aarhus, Denmark)를 사용해 디자인하였고, InDel 부위를 포함하는 forward, reverse primer를 각각 디자인하였다.

Primer 제작 조건으로 길이 18 bp - 22 bp, annealing 온도는 48°C - 60°C, GC content 비율은 40% - 60%, 예상되는 증폭 product size는 400 bp 이하로 하였다. 디자인된 조건대로 primer를 제작 의뢰 (Bionics Co., Ltd., Seoul, Korea)하여 PCR 실험에 사용하였다.

### 4. PCR (Polymerase chain reaction)

PCR을 위한 혼합 용액 구성은 10 ng/ $\mu$ l 농도로 희석한 genomic DNA (gDNA) 2  $\mu$ l, 5 uM 농도의 forward primer와 reverse primer 각각 1  $\mu$ l, 2  $\times$  Taq mix (0.25 U/ $\mu$ l Taq DNA polymerase, 2  $\times$  PCR buffer, 0.4 mM dNTPs, 3.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02% bromophenol blue) 10  $\mu$ l, 3차 증류수 6  $\mu$ l를 첨가하여 총 20  $\mu$ l으로 하였고, T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA)를 사용하여 증폭하였다.

PCR 조건은 95°C에서 pre-denaturation 3 분을 수행한 후, 95°C에서 denaturation 30 초, 프라이머마다 annealing 온도인 52.0°C와 53.0°C에서 각각 annealing 30 초, 72°C에서 extension 1 분 과정을 1 cycle로 하여 35 cycles 반복하였다. 72°C에서 final extension 5 분간 실시하였다. PCR product는 -20°C에 보관하였다.

### 5. 전기영동

증폭된 PCR product를 전기영동을 이용해 다형성을 확인하였다. 전기영동에 사용할 gel은 3% agarose로 만들었으며 ethidium bromide (EtBr)을 사용해 DNA를 염색하였다. 1  $\times$  TAE 용액에 gel을 넣고 PCR product를 6  $\mu$ l씩 분주하였고, 각 agarose gel 줄의 첫 lane마다 1 kb ladder plus (Dongsheng

**Table 2.** Primer information for the InDel markers used to distinguish among *C. lanceolata*, *C. pilosula* and *C. ussuriensis*.

Marker name	Primer sequence	Position of InDel locus	Amplicon size (bp)	Annealing temperature (°C)
CD-mt <sup>1)</sup> -02	F <sup>3)</sup> : 5'-GACTGGCTTCTACTTCCT-3' R <sup>4)</sup> : 5'-ACTCTCCCAATCTCATCTAC-3'	356,905 - 357,144 <sup>5)</sup>	240, 296	52.0
CD-mt-06	F: 5'-CTGAGGGAAAGTAGTCCAA-3' R: 5'-AAAGCGAAAGTAGAGGGT-3'	227,156 - 227,326 <sup>5)</sup>	171, 216	52.0
CD-cp <sup>2)</sup> -07	F: 5'-CACAGCAACAATAACGTCA-3' R: 5'-GATCTTCGCCCTTACTTT-3'	81,794 - 82,035 <sup>6)</sup>	180, 213, 249	53.0

<sup>1)</sup>mt; mitochondria, <sup>2)</sup>cp; chloroplast, <sup>3)</sup>F; foward primer, <sup>4)</sup>R; reverse primer, <sup>5)</sup>Locus from GenBank accession number MG775430, <sup>6)</sup>Locus from GenBank accession number MH251613.

Biotech Ltd., Guangzhou, China)를 4 µl 씩 넣었다.

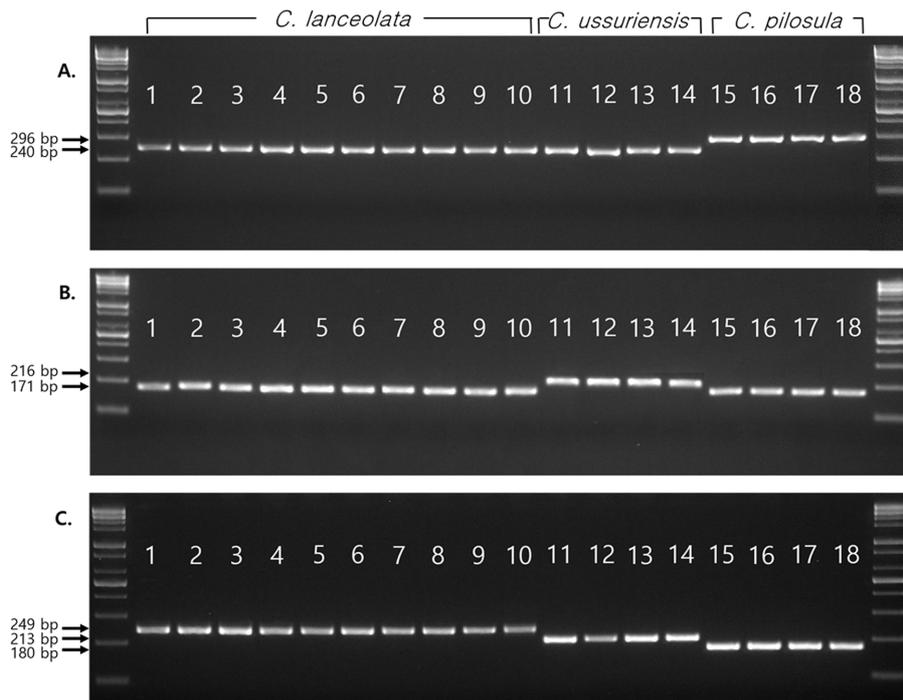
전기영동에 사용한 기기는 Mini Sub-cell GT (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA)로 120 V에서 30 분간 전기영동을 실시하였고, Gel Doc™ XR+ System (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA)를 이용해 밴드를 시각화시켜 분석하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. NGS 분석을 통한 더덕, 만삼, 소경불알의 미토콘드리아, 엽록체 유전체 기반 InDel 마커 개발

삽입 (insertion), 결실 (deletion) 차이를 가진 것으로 보이는 구간을 미토콘드리아 염기서열에서 6 개의 변이구간을, 엽록체 염기서열에서 7 개 변이구간을 발굴하였다. 이들 마커 후보를 검증하기 위하여 primer를 제작하여 PCR 실험 후, 전기영동을 통해 다형성 분석을 실시하였다.

*In silico* 분석에서 다형성을 보이는 InDel 구간이 전기영동 분석 결과에서 확인된 것은 미토콘드리아에서 2 개, 엽록체에서 1 개였다. 이들을 자세히 살펴보면, 미토콘드리아 DNA에 기반한 primer에서 만삼을 구분하는 CD-mt-02와 소경불알을 구분하는 CD-mt-06 마커를, 엽록체 DNA에 기반한 primer에



**Fig. 1.** Results of electrophoresis performed on 18 genetic resources using the CD-mt-02 (A), CD-mt-06 (B), and CD-cp-07 (C). 1; CL-1, 2; CL-2, 3; CL-3, 4; CL-4, 5; CL-5, 6; CL-6, 7; CL-7, 8; CL-8, 9; CL-9, 10; CL-10, 11; CU-1, 12; CU-2, 13; CU-3, 14; CU-4, 15; CP-1, 16; CP-2, 17; CP-3, 18; CP-4, CL; *C. lanceolata*, CU; *C. ussuriensis*, CP; *C. pilosula*.

서 더덕, 만삼, 소경불알을 구분하는 CD-cp-07 마커를 개발하였다 (Table 2).

개발된 프라이머들의 위치를 NCBI에 등록된 더덕의 미토콘드리아와 엽록체 유전체에서 확인한 결과, CD-mt-02는 *atp1* (ATP synthase subunit alpha, mitochondrial) 유전자의 일부에 걸쳐 존재하였으며 이 유전자는 ATP 생성에 관여하는 유전자이다. CD-mt-06은 *trnQ-UUG* (tRNA-Gln)과 *rrn26* (26S ribosomal RNA)의 intergenic space에 위치하였다. 또한 CD-cp-07은 *rpl14* (Ribosomal protein L14) 유전자의 일부에 걸쳐서 존재하였고 이 유전자는 리보솜을 통한 단백질 합성에 관여한다.

## 2. 미토콘드리아와 엽록체에서 개발된 InDel 마커를 통한 genotyping

수집된 더덕 10 점, 만삼 4 점, 소경불알 4 점 등 총 18 점의 재료들을 미토콘드리아 DNA 기반의 CD-mt-02 마커를 이용해 genotyping한 결과, 더덕 (CL-1, CL-2, CL-3, CL-4, CL-5, CL-6, CL-7, CL-8, CL-9, CL-10)과 소경불알 (CU-1, CU-2, CU-3, CU-4)에서 240 bp로 밴드가 나타났고, 만삼 (CP-1, CP-2, CP-3, CP-4)에서 296 bp의 밴드가 나타나 수집된 3종 중 만삼을 구별할 수 있었다 (Fig. 1A).

CD-mt-06 마커의 경우 더덕 (CL-1, CL-2, CL-3, CL-4, CL-5, CL-6, CL-7, CL-8, CL-9, CL-10)와 만삼 (CP-1, CP-2, CP-3, CP-4)에서 171 bp로, 소경불알 (CU-1, CU-2, CU-3, CU-4)에서 216 bp로 밴드가 검출되어 *Codonopsis* 속에서 소경불알을 구별할 수 있었다 (Fig. 1B).

미토콘드리아 기반의 마커들은 더덕 속 식물 3 종 중, 1 개의 종에 대한 특이적 변이를 식별해 낼 수 있었다. CD-mt-02는 만삼에서 변이를 보이고, 더덕과 소경불알에서는 특이적인 변이가 없었다. CD-mt-06은 소경불알에서 변이를 나타내고, 더덕과 만삼에서 특이적인 변이가 없었다. 한 종류의 마커만 사용할 경우 *Codonopsis* 속 식물 3 종을 모두 구별하기에는 어려움이 있지만, 두 종류의 마커를 같이 사용하면 더덕도 식별할 수 있었다. 또한, 두 마커의 정확한 식별 능력과 최근까지 식물에서 미토콘드리아 유전체를 기반으로 마커를 제작한 사례가 거의 없음을 고려한다면, 본 연구는 식물에서 엽록체 유전체 뿐만 아니라 미토콘드리아 유전체도 마커 개발에 이용할 수 있음을 알 수 있다 (McClellan and Hanson, 1986; Jo *et al.*, 2013).

엽록체 유전체에 기반한 CD-cp-07 마커는 더덕 10 개체에서 249 bp, 소경불알 4 개체에서 213 bp로, 만삼 4 개체에서 180 bp로 밴드가 나타나 *Codonopsis* 속 3 종을 모두 구별할 수 있었다 (Fig. 1C).

결과적으로 미토콘드리아 기반 마커 CD-mt-02의 경우, 만삼에 56 bp 크기의 insertion이 있었고, CD-mt-06의 경우, 소

경불알에 35 bp 크기의 insertion이 있었다. 엽록체 기반 마커인 CD-cp-07에서는 더덕이 소경불알보다 36 bp 길었고, 만삼보다는 69 bp 길었다.

CD-cp-07 마커는 더덕, 만삼, 소경불알 모두 구별 가능하기 때문에 CD-cp-07 마커 만으로도 충분히 *Codonopsis* 속 식물을 식별할 수 있다고 할 수 있다. 하지만 엽록체 기반 마커 하나만을 사용해 동정하기보다 본 연구에서 같이 개발한 미토콘드리아 마커 2 개를 포함하여 총 3 개의 마커를 필요에 따라 중복 마커로써 조합하여 사용할 경우 종 판별의 신뢰성이 증가할 것이라 판단된다.

본 연구에서 개발된 마커의 활용을 통해 더덕, 만삼, 소경불알 등 3 종의 분자적 판별이 가능할 것으로 판단되며, 형태적 유사성에 의해 오용 및 혼용되는 더덕속 주요 식물의 유통질서 확립에 도움이 될 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 연계 농생명혁신기술개발사업 (PJ01588301)의 지원에 의하여 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Doyle JJ and Doyle JL. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12:13-15.
- Du YE, Lee JS, Kim HM, Ahn JH, Jung IH, Ryu JH, Choi JH and Jang DS. (2018). Chemical constituents of the roots of *Codonopsis lanceolata*. *Archives of Pharmacol Research*. 41: 1082-1091.
- Jeong HJ, Lee JB, Gil JS, Hong CP, Kang SH, Kwon SJ, Kim HJ, Kim CK, Lee JH and Lee Y. (2021). Development of chloroplast-based InDel markers for the discrimination of *Schisandraceae* plant species. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 29:11-16.
- Jo IH, Bang KH, Kim YC, Kim JU, Shin MR, Moon JY, Noh BS, Hyun DY, Kim DH, Kim Dh, Cha SW and Kim HS. (2013). Analysis of mitochondrial DNA sequence and molecular marker development for identification of *Panax* species. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 21:91-96.
- Joh EH, Lee IA, Han SJ, Chae S and Kim DH. (2010). Lancemaside A ameliorates colitis by inhibiting NF- $\kappa$ B activation in TNBS-induced colitis mice. *International Journal of Colorectal Disease*. 25:545-551.
- Jung IH, Jang SE, Joh EH, Chung JY, Han MJ and Kim DH. (2012). Lancemaside A isolated from *Codonopsis lanceolata* and its metabolite echinocystic acid ameliorate scopolamine-induced memory and learning deficits in mice. *Phytomedicine*. 20:84-88.
- Kim JA, Park EJ and Choi YE. (2012). Induction and proliferation of adventitious roots in *Codonopsis* spp.. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 20:493-499.

- Kim JH, Lee DW, Kim MK, Lee MS, Jo NS and Lee Y.** (2022). Development of InDel markers to distinguish between *Prunus mume*, *Prunus armeniaca* var. *ansu*, and their interspecific hybrids. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 30:210-216.
- Kim SH, Choi HJ, Oh HT, Chung MJ, Cui CB and Ham SS.** (2008). Cytoprotective effect by antioxidant activity of *Codonopsis lanceolata* and *Platycodon grandiflorum* ethyl acetate fraction in human HepG2 cells. Korean Journal of Food Science and Technology. 40:696-701
- Kim SR, Jo NS, Gil JS, Koo SC, Um Y, Hong CP, Park SG, Kim OT, Kim SC, Kim HB, Lee DH, Jeong BH and Lee Y.** (2021). Development of genome-wide simple sequence repeat markers in *Codonopsis lanceolata* using next-generation sequencing. Horticulture, Environment, and Biotechnology. 62:985-993.
- Koo SC, Woo HS, Kim JW, Kim YS, Kim JY, Kim JH, Yu J, Kim YC and Kim DW.** (2022). Discovery and characterization of chemical compounds that inhibit the function of bacterial neuraminidase from *Codonopsis ussuriensis*. Applied Sciences. 12:6254. <https://www.mdpi.com/2076-3417/12/12/6254> (cited by 2022 Nov 4).
- Lee CY and Won JY.** (2007). Effects of shading treatments on photosynthetic rate and growth in *Codonopsis lanceolata* Trautv.. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 15:152-156.
- Lee MJ, Nam JH, Um IE, Kang CK and Rho IR.** (2019). Determination of the optimum extraction method for saponin lancemasides in *Codonopsis lanceolata*. Korean Journal of Food Science and Technology. 51:103-108.
- Li X, Yang Y, Henry RJ, Rossetto M, Wang Y and Chen S.** (2015). Plant DNA barcoding: From gene to genome. Biological Reviews. 90:157-166.
- Li Z, Zhu L, Zhang H, Yang J, Zhao J, Du D, Meng J, Yang F, Zhao Y and Sun J.** (2012). Protective effect of a polysaccharide from stem of *Codonopsis pilosula* against renal ischemia/reperfusion injury in rats. Carbohydrate Polymers. 90:1739-1743.
- Lv Y, Liu Y and Zhao H.** (2016). mInDel: A high-throughput and efficient pipeline for genome-wide InDel marker development. BMC Genomics. 17:290. <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-016-2614-5> (cited by 2022 Oct 15).
- McClellan PE and Hanson MR.** (1986). Mitochondrial DNA sequence divergence among *Lycopersicon* and related *Solanum* species. Genetics. 3:649-667.
- Park SI, Hwangbo K, Gil JS, Chung H, Kim OT, Kim SC, Koo SC, Um Y and Lee Y.** (2017). Determination of the origin of *Angelica* roots using *Angelica gigas* chloroplast based SSR markers. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 25:361-366.
- Park YS, Kim YJ, Yang TJ and Kim JY.** (2021). Authentication of *Rubus coreanus* and related species via DNA barcoding and HPLC approaches. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 29:425-433.
- Singh B, Song H, Liu XD, Hardy M, Liu GZ, Vinjamury SP and der Martirosian C.** (2004). Dangshen(*Codonopsis pilosula*) and bai guo(*Ginkgo biloba*) enhance learning and memory. Alternative Therapies in Health and Medicine. 10:52-56.
- Song CH, Seo YC, Choi WY, Lee CG, Kim DU, Chung JY, Jung HC, Park DS, Ma CJ and Lee HY.** (2012). Enhancement of antioxidative activity of *Codonopsis lanceolata* by stepwise steaming process. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 20:238-244.
- Ushijima M, Mizuno I, Suzuki E, Amayasu R, Ishii S, Nishihama, T, Morihara N, Kashimoto N, Mouri Y and Sumioka I.** (2007). Improvement of PADAM-like symptoms in middle-aged men by a designer food containing *Codonopsis lanceolata*. Pharmacometrics. 72:23-30.
- Wicke S, Schneeweiss GM, dePamphilis CW, Müller KF and Quandt D.** (2011). The evolution of the plastid chromosome in land plants: Gene content, gene order, gene function. Plant Molecular Biology. 76:273-297.
- Xin T, Zhang F, Jiang Q, Chen C, Huang D, Li Y, Shen W, Jin Y and Sui G.** (2012). The inhibitory effect of a polysaccharide from *Codonopsis pilosula* on tumor growth and metastasis *in vitro*. International Journal of Biological Macromolecules. 51:788-793.
- Xu C, Liu Y, Yuan G and Guan M.** (2012). The contribution of side chains to antitumor activity of a polysaccharide from *Codonopsis pilosula*. International Journal of Biological Macromolecules. 50:891-894.
- Yoo HH, Baek SH, Park YK, Lee SH, Kim CM, Lee KS, Park MK and Park JH.** (2002). Quality control of dried roots of *Codonopsis lanceolata*. Korean Journal of Pharmacognosy. 33: 85-87.