

어젠다코드	3 - 12 - 35		구분	완결	
기술분야코드	V1	기술유형코드	S03	작목구분코드	VC-06-1401
과제종류	기관고유		세세부사업	-	
연구과제 및 세부과제			수행기간	소속	과제책임자
곰취 우량종묘 대량증식을 위한 조직배양 및 유전자 마커 개발			'14~'15	특화작물연구소	최성진
1) 곰취 조직배양 효율증진 기술 개발			'14~'15	특화작물연구소	최성진
2) 곰취 유용 유전자 마커 개발			'14~'15	특화작물연구소	최성진
색인용어	곰취, 산마늘, 조직배양, 유전자마커				

## ABSTRACT

This studies were conducted to propagate Jin-Hyang(*L. fischeri* variety bred at WVRC in Pyong-Chang, Korea) massively through plant tissue culture and to establish the variety identifying method using genetic marker.

Wild edible greens cultivated in farmland are mainly originated from wild plants and their cultivation history is not long enough to fixate genetic characteristics of cultivated wild edible greens. Especially cultivation of *Ligularia fischeri*(Gom-Chwi in Korean) known as “Queen of Wild Edible Greens” in Korea had progressed rapidly and its cultivation acreage reached 208 ha in the year of 2015. Nine similar species of genus *Ligularia* have been cultivated mixed together according to increasement of acreage and various kinds of genetic characteristics would appear due to the inter-species hybridization in *L. fischeri* cultivation sites. And concerns about origin deception of imported wild edible greens has recalled the urgent needs to develop variety identification technique using genetic marker.

### 1. 연구목표

최근들어 산채가 건강지향농산물의 대표주자로 널리 알려지면서 산채의 소비가 증가하고 있다. 산채의 소비증가에 따라 생산량 및 생산액도 증가하여 2015년도에는 생산액이 3,000억 원, 생산량이 3만 톤으로, 2014년도 농림업 상위 30개 품목 중 오이, 참외, 산약, 마늘, 벌꿀 등에 이어 29위로 조사되고 있다. 그러나 현재 재배되고 있는 대부분의 산채는 야생에서 기원하였고, 재배역사도 짧아 일반 재배포장에서는 유전적 특성이 다양한 개체들을 볼 수 있다. 특히, 곰취의 경우 재배화가 급속히 이루어져 재배면적이 208ha(강원도농업기술원, '15)에 이르고 있으나, 급속한 재배면적 증가에 따라 한대리 곰취, 어리곤달비, 긴잎곰취, 화살곰취, 무산곰취, 곤달비 등의 근연종 및 유사종의 혼합재배와 타가수분 특성에 따른 중간 교잡으로 품

질 특성이 다양하게 나타나고 있어 영양번식에 의한 유전자원의 고정과 판별기술의 개발이 시급한 실정이다. 육성 품종도 유전형질의 고정이 완벽하지 않은 경우 분주 등의 방식으로 번식이 이루어지나 효율이 낮아 조직배양에 의한 대량증식이 요구되고 있다. 지금까지 산채류 조직배양은 참나물(김&김 등, 1996), 산마늘(김&한 등, 1996), 두릅(장 등, 1993) 등에서 일부 이루어졌으나 실용화에는 미흡한 실정이다. 또한 곱취의 경우, 수입산이 국내산으로 둔갑할 우려가 높아 원산지 판별 기술 개발의 필요성이 증대되고 있다. 네덜란드에서는 SSR marker 를 활용한 장미, 토마토 등의 품종 식별에 활용하고 있으며, 스페인의 경우에도 고추, 가지, 체리에, 일본은 딸기, 벼, 복숭아, 밤 등의 작물에서 품종보호권의 침해에 활용하고 있다. 우리나라에서는 ISSR marker를 이용한 달래와 산달래의 분류(이 등, 2011)와 RAPD 및 염기서열 분석을 이용한 곱취속(*Ligularia*) 식물의 유연관계 분석(안 등, 2010) 등이 보고되고 있다. 식물감별법 중 형태학적 특성은 자연환경에 따라 차이를 나타내므로 감별기준에 어려움이 있다.

산채연구소에서 육성한 곱취 “진향”은 다분얼성으로 잎의 크기가 균일하고 내병성의 특성을 가지고 있어 농가에 보급될 경우 파급효과가 큰 것으로 여겨져 조직배양을 통한 대량증식의 필요성이 있어, 이에 대한 조직배양의 효율을 높이기 위하여 곱취 재분화 배지를 개발하고자 하였다. 또한, DNA marker 개발을 통하여 곱취 유사종 판별 및 곱취 육종에 이용하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### <제1세부과제 : 곱취 조직배양 효율증진 기술 개발>

본 시험은 2014~2015년도에 산채연구소내 조직배양실에서 육성 품종인 곱취 “진향”의 대량증식을 위한 재분화 배지 조성 구명하고자 실시하였다. 곱취 “진향” 종자를 원예용 상토를 사용하여 육묘상자에 파종하여 잎이 2~3매 전개되었을 때, 자엽, 엽병, 성장점 등을 조직배양 시료로 사용하였다. 배지로는 N6 배양염류(Sigma-Aldrich, USA)를 기본으로 배지조성을 변경하였고, 성장조정제로는 2,4-D(Sigma-Aldrich, USA), Zeatin(Sigma-Aldrich, USA), Zeatin(Sigma-Aldrich, USA), CPPU(Sigma-Aldrich, USA) 등을 사용하였다. 배양실의 온도는 23℃로, 광주기는 16/8hrs(day/night)를 유지하였다. 조사내용은 캘러스 생성 및 신초, 뿌리로의 분화 여부, 계대 배양조건 등으로 하였다.

### <제2세부과제 : 곱취 유용 유전자 마커 개발>

본 시험은 2014~2015년도에 자생종 곱취 3종(태백산 곱취, 오대산 곱취, 제주 곱취), 곱취 유사종 3종(중국 곱취1, 중국 곱취 2, 곤달비), 육성종 6종(진향, 다목이, 씹마니, 곱마니, 육성계통 2종) 등 총 12종의 곱취 근연종 및 곱취 육성계통을 대상으로 1년차에는 다형성 밴드 검정 및 프라이머를 선발, 2년차에는 곱취속 특이 SNP-primer를 개발하고자 하였다. primer의 작성은 NCBI data base 및 선행 연구논문을 참조하여 자체제작 하였으며, DNA는

Yeast genomic DNA extraction kit(ThermoFisher scientific, USA)을 사용하여 추출하였다. PCR은 GeneAmp PCR system(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 제작하였으며 특이 염기서열은 ABI sequencing analyzer(Applied Biosystems, USA)를 사용하여 분석하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### <제1세부과제 : 곰취 조직배양 효율증진 기술 개발>

N6 기본배지에 2,4-D, BA, NAA, Kinetin 등의 여러 가지 성장조절제를 20조합 이상 처리한 배지에 정단 조직을 소독하여 치상하였을 때 성장조절제가 정단조직의 캘러스, 신초 및 발근에 미치는 영향은 표 1과 같다. 표 1은 20조합 이상의 처리 중에 의미있는 결과를 얻은 것만 나타낸 것이다. 캘러스는 2,4-D 1ppm 농도처리에서만 생성되었으며, 신초는 2,4-D 단독 처리시 저농도인 1%에서 발생하지 않았으나, 1.5, 3, 5ppm 처리에서는 낮은 정도로 신장발생하였다. 성장조절제 복합처리인 2,4-D + BA 처리와 BA + Kinetin 처리에서 중간정도로 발생하였다. 뿌리의 분화가 모든 성장조절제 단독 및 복합처리에서 관찰되지 않아, 곰취 “진향” 정단조직의 N6 배지의 여러 가지 성장조절제 단독 및 복합처리에서 완전한 식물체로의 재분화를 관찰할 수 없었다.

표 1. 정단조직의 배지별 반응

배지	성장조절제(ppm)				생육반응		
	2,4-D	BA	NAA	Kinetin	캘러스	신초	발근
N6	1				+		
	1.5					+	
	1	2				++	
	1		1			+	
	5					+	
	1			1		+	
			2		1		++
			1	1			+
	3						+

※ 반응을 나타낸 성장조절제 처리만 표시함

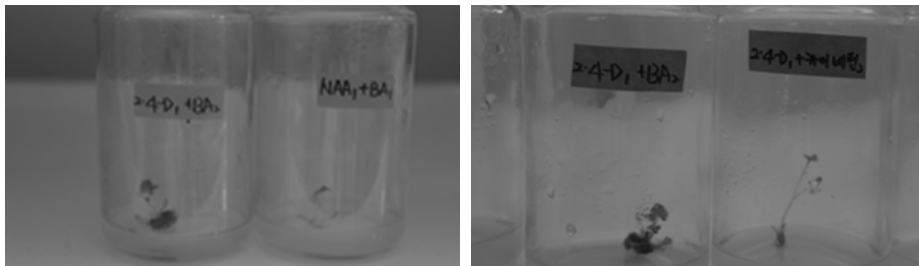
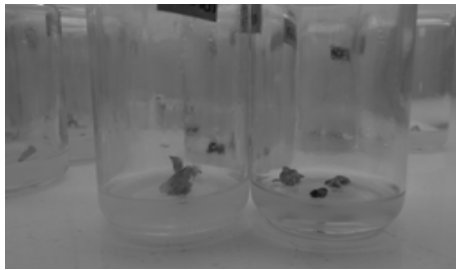


그림 1. 성장조절제 조합에 따른 배지별 신초발생 양상

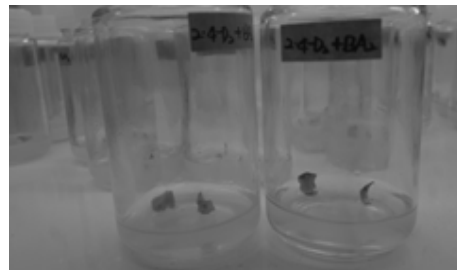
N6 기본배지에 2,4-D, BA, NAA, Kinetin 등의 여러 가지 성장조정제를 단독 및 복합처리한 자엽 조직을 소독하여 치상하였을 때 성장조정제가 자엽 조직의 캘러스, 신초 및 발근에 미치는 영향은 표 2와 같다. 표 2는 성장조정제 20조합 이상의 처리 중에 의미있는 결과를 얻은 것만 나타낸 것이다. 캘러스는 2,4-D + BA 각 2ppm 농도 처리에서 캘러스 생성이 가장 양호하여 계대배양 하였으나 재분화에 필요한 배발생 캘러스나 신초로의 분화는 나타나지 않았다. 신초는 모든 성장조정제 단독 및 혼합처리에서 발생하지 않았다. 뿌리의 분화가 2,4-D (1.5ppm), 2,4-D(1.5ppm) + BA(1ppm) 처리 등 일부에서 관찰되었으나, 곰취 “진향” 자엽 조직의 N6 배지의 여러 가지 성장조정제 단독 및 복합처리 에서 완전한 식물체로의 재분화는 이루어지지 않았다.

표 2. 자엽의 배지별 반응

배지	성장조정제(ppm)				생육반응		
	2,4-D	BA	NAA	Kinetin	캘러스	신초	발근
N6	1.5				+		+
	1	1			+		+
	1	2			+		+
	2	1			+		
	2	2			++		+
	1		1				+
	1		2				+
	2			5		+	



자엽 NAA 처리에서 발근



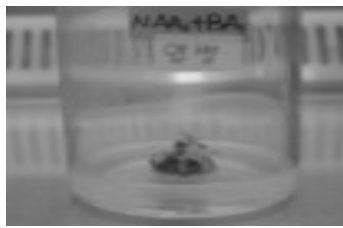
왼 2,4-D에서 캘러스 발생

그림 2. N6배지에서의 분화양상

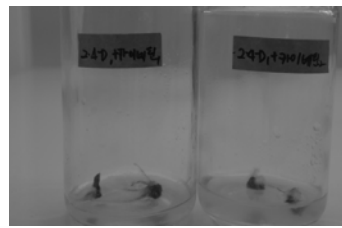
N6 기본배지에 2,4-D, BA, NAA, Kinetin 등의 여러 가지 성장조정제를 단독 및 복합처리한 엽병 조직을 소독하여 치상하였을 때 성장조정제가 엽병 조직의 캘러스, 신초 및 발근에 미치는 영향은 표 3와 같다. 표 3은 성장조정제 20조합 이상의 처리 중에 의미있는 결과를 얻은 것만 나타낸 것이다. 캘러스는 2,4-D 1.5ppm에서 발생이 양호하였다. 2,4-D 1.5ppm 처리와 2,4-D 2ppm + Kinetin 2ppm 처리에서는 신초 및 분리가 발생하여 완전한 식물체를 얻을 수 있었으나, 캘러스의 재분화 효율이 낮아, 재분화 효율을 높일 필요가 있었다(그림 3).

표 3. 엽병조직의 배지별 반응

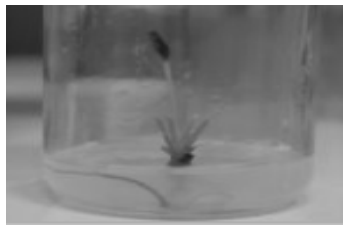
배지	생장조절제			생육반응		
	2,4-D	BA	Kinetin	캘러스	신초	발근
N6	1					
	1.5			++	+	+
	1	1		+		+
	2	1		+		
	1		1	+		++
	2		2	+	+	++
		5		+		



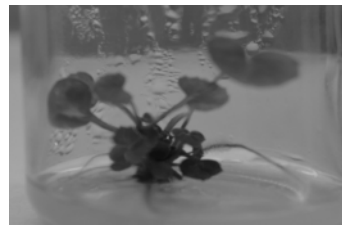
캘러스 형성



발근



식물체 분화



다아성 식물체 분화

그림 3. N6배지에 치상한 엽병조직에서의 식물체 분화

엽병 조직으로부터 유래한 캘러스의 재분화 효율이 낮아서, 이를 높이기 위하여 1/2N<sub>6</sub> 염류에 1/2 자당을 포함한 배지를 기본으로 여러 가지 성장조정제를 처리하여 계대배양의 재분화율을 높이고자 하였다(표 4). 캘러스와 신초 및 뿌리가 모두 발생한 처리는 2,4-D 1.5ppm + NAA 1.5ppm 처리와 2,4-D 1ppm + Kinetin 2ppm 처리, 2,4-D 2ppm + Kinetin 5ppm 처리였다.

표 4. 엽병기원 캘러스의 계대배양에 따른 배지별 반응

배지	생장조정제				생육반응		
	2,4-D	BA	NAA	Kinetin	캘러스	신초	발근
1/2N <sub>6</sub> + 1/2sucrose	1.5		1.5		+	+++	+
	1	1					+
	1			2	+	+	+
	2	1			+	+	
	2	2					+
	1		1		+		+
	1		2				+
	2			5		+	+

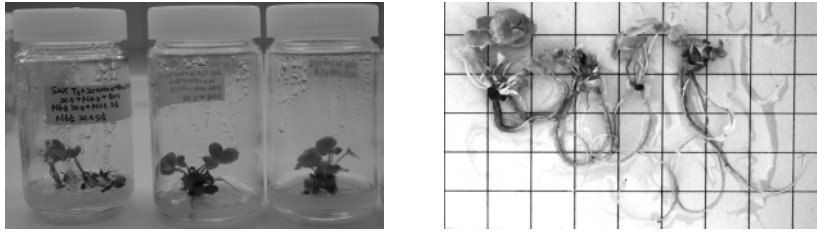


그림 4. 엽병조직으로 유래한 캘러스로부터의 식물체 재분화

지금까지의 결과를 종합해 보면 곱취 “진향”의 조직배양을 위해서는 엽병을 활용하고 단계별로 다른 조건의 배지에 계대배양하여야 재분화가 이루어지는 것으로 판단된다. 따라서 계대배양 조건에 대한 추가적인 연구가 이루어지면 아직까지 낮은 재분화율을 높일 수 있을 것으로 생각된다

### <제2세부과제 : 곱취 유용 유전자 마커 개발>

#### 가. 분석용 유전자원 수집 및 보존

분자마커 개발을 위한 곱취속 12계통의 유전자원을 수집하여 강원도농업기술원 산채연구소 포장에 구획별로 구분하고 고유번호를 부여하여 유지 증식하였다(표 5). 곱취 유전자 분자마커 개발 분석용 시료는 생육조건의 균일성을 유지하기 위하여 육성자로부터 분양 받거나 자체 보존 중인 시료를 엄밀히 검정하여 비가림하우스에 계통별로 정식하여 생육이 왕성한 6월 말에 동시에 분석용 시료를 채취하였으며, 분석개체는 표시하여 차년도 반복시료로 활용할 수 있도록 하였다(그림 5).

표 5. 분석용 수집 유전자원 내역

분류	이름	계통수
자생종	태백, 오대산, 제주	3
유사종	중국곱취(2), 곤달비	3
육성종	진향, 다목이, 싹마니, 곱마니, 육성계통 2	6



표본용 곱취속 유전자원 보존포



분석 개체표시

그림 5. 유전자원 포장 및 분석개체

#### 나. SSR 기반 분자마커 개발

SSRs 분자마커는 분석력이 뛰어나고 재현성이 높으며 그밖에 매우 많은 장점들을 가지고 있어 식물분자육종에 그 활용도가 매우 높다. 다만, 게놈 정보가 밝혀지지 않은 식물체를 대상으로 할 때는 많은 시간이 필요하다. 곱취속 식물들의 유전적 특성을 분석하여 SSR primer set를 개발하기 위하여 NCBI, Pubmed, Google scholar 등에서 제공하는 생물정보학적 툴을 활용하여 곱취속 식물들로부터 개발되어진 SSR 분자마커 또는 해독된 게놈 염기서열정보들을 120건을 동정하였으며 이들로부터 SSR 분자마커의 PCR 증폭이 가능한 primer pair를 작성하였다. 그 결과 14개로 구성된 곱취속 식물 게놈 증폭용 SSR primer set을 최종 완료하였다(표 6).

표 6. 곱취(*Ligularia*)속 식물 게놈에서 개발된 SSR primer set의 염기서열 및 주요 특성

Locus	Repcat motif	Primer sequncnes(5' -3')	T <sub>a</sub> (°C)	Allele size (bp)
Lho12	(GT) <sub>2</sub> TC(GT) <sub>6</sub>	F: CTCCTTTCTACTCCTCTATG R: CAAGAATACGAAGATTTACC	54	276-295
Lho17	(GT) <sub>5</sub>	F: TTGCCTCAAAGGTCCTCTT R: CCCTAACACCACTCAATG	54	132-142
Lho29	(TC) <sub>5</sub> ...(AC) <sub>7</sub>	F: TCCACTCACTAAGGGGAACA R: ACGGATCGTTAGGGTTCA	58	143-153
Lho35	(TC) <sub>9</sub>	F: AACCATCGCTGCACATTC R: GCAACACCACCACTGACG	57	170-210
Lho36	(CT) <sub>5</sub> ...(AC) <sub>5</sub> ...(AC) <sub>5</sub>	F: ACCTTCGAATTATTCTTTTCGC R: TCTCAGAGCTTTTCAGTGTCTAT	57	229-250
Lho37	(GA) <sub>4</sub> T(AG) <sub>3</sub> ...(AG) <sub>6</sub>	F: ACTCCAAAATACTTTCAAAC R: CATGTCCTGCAAATGGGT	56	300-325
Lho38	(AC) <sub>5</sub> ...(AC) <sub>4</sub> ...(AC) <sub>7</sub>	F: CTTACACCTCCGAACCTGATC R: TCTAAAAGGGAAATGGAAACA	57	272-290
Lho40	(CT) <sub>6</sub> ...(TG) <sub>4</sub>	F: ATCATACTTGCCTCAAAGT R: CAATAGTTCCGAACACCCCT	57	192-202
Lho41	(AG) <sub>4</sub> AT(AG) <sub>8</sub> ...(AG) <sub>9</sub>	F: ACGAGTAGACACCCAACGTC R: CCTTCTTCCCAACACAA	57	180-205
Lho64	(ATG) <sub>6</sub> ...(AG)rich	F: CGAATGACATGAACACCAC R: CCTTCCTCCTTGAGCCTAT	57	160-195
Lho75	(CT) <sub>18</sub>	F: CCACCATCATTTTCTGTAG R: GTATGAGACACCACCGAAT	54	185-220
Lho77	(TG) <sub>7</sub>	F: AGTTTTGTAGTAAAACGGAGTT R: CGCATAAATAATGTAAGCA	55	178-198
Lho114	(GA) <sub>6</sub>	F: AGTTCGGTTTGCTGCTAT R: TGGGCTTATGGACTTGAT	55	220-235
Lho154	(GT) <sub>6</sub> ...(GT) <sub>7</sub> T(GT) <sub>6</sub>	F: CACCTTCTCCTCCTACACG R: CCTAGATCTTCATCTCTTTTCT	58	175-195

개발된 SSR primer set을 제작하여 효율을 검증하기 위하여 12 계통의 어린잎을 채취하고 DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen, USA)을 사용하여 PCR 증폭을 위한 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 DNA들은 0.8% agarose gel에 전기영동하고 Smart View Pro Imager System (Major Science, USA)을 활용하여 PCR 증폭에 적합한 농도로 genomic DNA를 정량하였다(그림 6).



그림 6. 곰취속 식물 genomic DNA 정량  
(1 한대리, 2 제주도, 3 태백, 4 곤달비, 5 진향, 6 곶마니, 7 다목이, 8 싹마니, 9 계통35, 10 계통91, 11 중국종1, 12 중국종2)

PCR은 94℃에서 2분간 초기 변성 후 94℃에서 30초, 55℃에서 30초, 그리고 72℃에서 1분을 1cycle로 최종 35회를 반복하고 마지막으로 72℃에서 5분간 반응을 지속한 후 종료하였다. 최종 PCR 산물들은 1.2% agarose gel에 전기영동 하여 PCR 단편들의 증폭 여부를 검증하였으며, PCR 결과 agarose gel에서 DNA 산물의 증폭이 확인된 primer 수는 6조합(Lho29, Lho37, Lho40, Lho64, Lho77, 그리고 Lho114)이었으며 6조합 모두 agarose gel 상에서는 다형성이 관찰되지 않았다(그림 7).

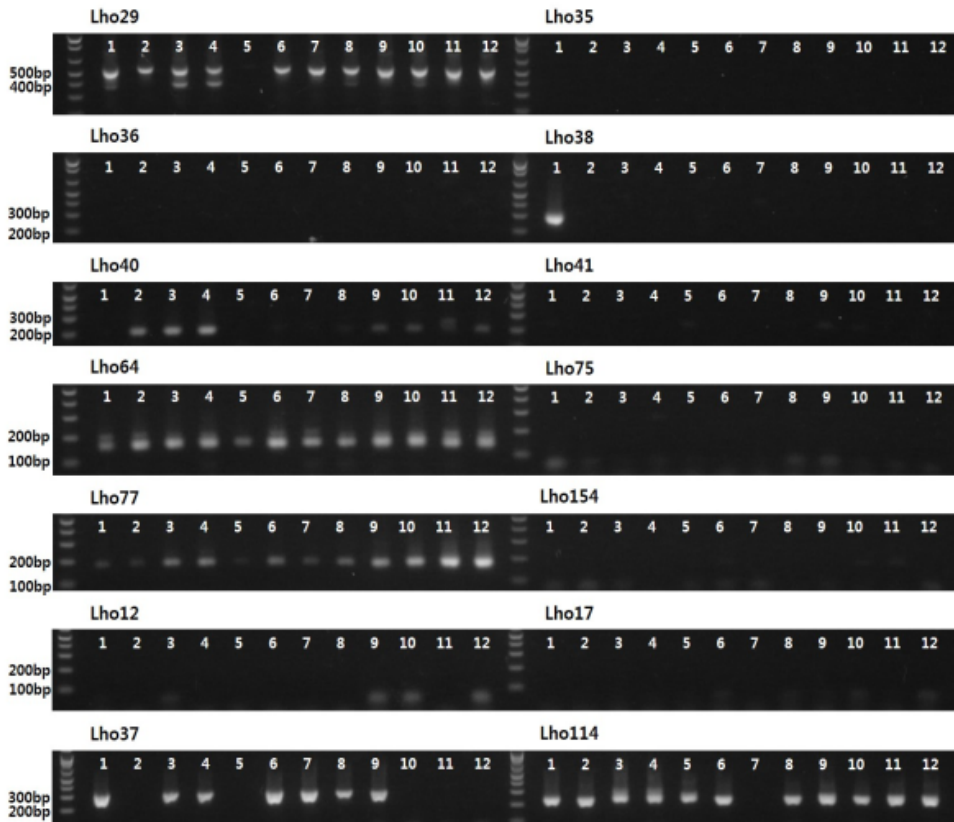


그림 7. 12개 곰취속 식물을 재료로 개발된 SSR primer set을 활용한 PCR 분석 결과  
(1 한대리, 2 제주도, 3 태백, 4 곤달비, 5 진향, 6 곶마니, 7 다목이, 8 싹마니, 9 계통35, 10 계통91, 11 중국종1, 12 중국종2)

그러나 DNA 단편의 증폭이 확인된 PCR 산물들을 6% denaturing polyacrylamide gel에 전기영동 함으로 제작된 14개 primer pair들의 개별적인 효율을 검증하였다. 전기영동 한 결과 6조합 모두에서 다형성을 형성하는 것을 확인 할 수 있었다. 이들을 추가적인 프라이머를 선 발하여 분석하면 곰취속 식물들의 유전적 평가에 매우 유용하게 활용되어 질 수 있을 것으로 기대되었다.

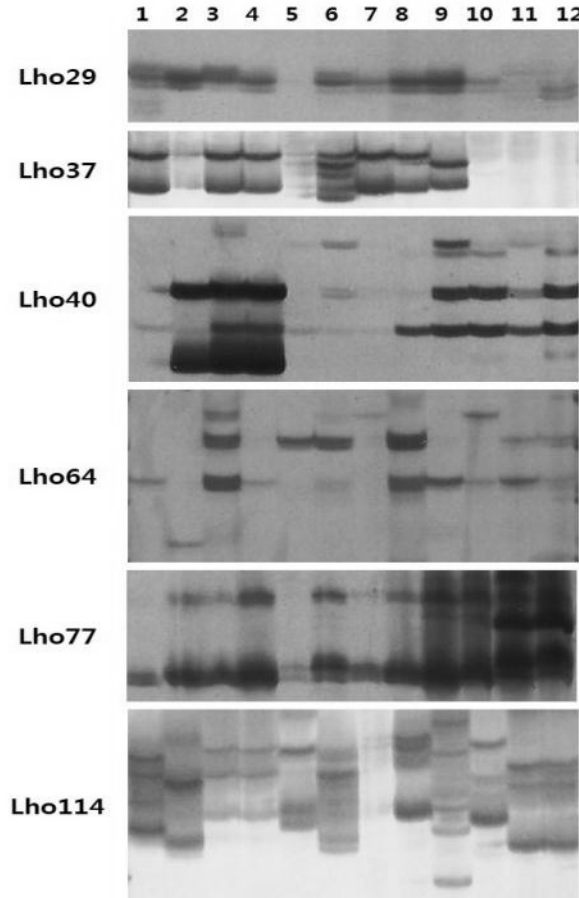


그림 8. Agarose gel에서 증폭이 확인된 6개 PCR 산물들의 denaturing polyacrylamide gel 전기영동 분석 결과  
(1 한대리, 2 제주도, 3 태백, 4 곤달비, 5 진향, 6 곶마니, 7 다목이, 8 싹마니, 9 계통35, 10 계통91, 11 중국종1, 12 중국종2)

#### 다. 곰취속 식물들의 유연관계 분석을 위한 ISSR primer 선발

ISSR 분자마커 시스템은 식물 게놈에 산재하는 SSRs (Simple sequence repeats) 또는 microsaatelites 등의 반복 서열(1-6bp)간에 존재하는 inter-sequence variations을 활용하는 분자마커 시스템이다. 최근 보고에 따르면 식물들의 유전 분석을 위한 게놈 fingerprinting, 유전적 다양성분석, 계통학적 분석, 그리고 효율적인 분자유종을 위한 MAS (Marker assisted selection) 시스템에 ISSR 분자마커가 성공적으로 사용되어지고 있다. 추가적으로 다양한 곰취

속 식물들의 유전 분석을 위하여 ISSR 분자마커 시스템 활용을 시도하였으며, 그 결과 성공적으로 사용할 수 있음을 확인하였다. ISSR 분석을 위한 primer는 100개로 구성된 UBC #801~#900 primer set을 사용하였으며, SSR 분석에 사용되었던 동일한 식물 계통 DNA를 재료로 PCR 분석을 수행하였다. 1차로 20개 primer pair를 임의로 선발하여 PCR screening에 사용하였다. 최종 PCR 산물들은 1.2% agarose gel에 전기영동 하여 DNA 단편들의 증폭 여부를 확인하였다. PCR 결과 ISSR primer 834번 primer는 자생종, 유사종 및 육성종 식물체들의 구분이 가능하였으며, 3차례 이상의 반복 실험으로 그 재현성이 확인되었다(그림 9).

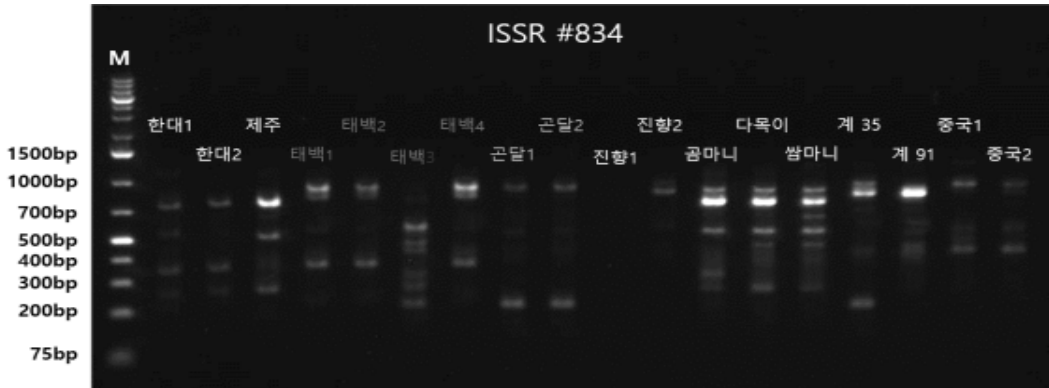


그림 9. ISSR-primer 834번 primer의 banding profiles

라. 곰취속 식물을 재료로 DNA 바코딩 primer를 사용한 PCR

식물의 DNA 바코드로 이용 가능한 지역 중 분석력이 뛰어난 ITS(핵 DNA) 지역과 색소체 *rbcLa*, *matK*, *trnH-psbA* 등 네 개의 유전자 구간의 염기서열을 사용하여 곰취 품종 또는 계통 판별용 SNP 분자마커의 개발을 시도하였다. DNA barcoding primer 제작은 Pubmed에서 선행 연구논문들을 검색, 현재 식물에서 사용되는 DNA barcoding primer를 확보하였으며 이들 중 핵 DNA의 ITS 지역과 색소체 *rbcLa*, *matK*, *trnH-psbA* 지역을 증폭하기 위한 primer set을 최종 선발하였다(표 7).

표 7. 연구에서 사용된 식물 DNA barcoding primer 정보.

Region	Primer Name	Sequences	References
<i>rbcL</i>	<i>rbcLa</i> -F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	Levin et al.(2003)
	<i>rbcLa</i> -R	GTAATCAAGTCCACCRG	Kress and Erickson(2009)
<i>matK</i>	<i>matK</i> -nf	CTATATCCACTTATCTTTCAGGAG	Nomura et al (2010)
	<i>matK</i> -nr	AAAGTTCTAGCACAAGAAAGTCGA	Nomura et al (2010)
ITS	AB101	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG	Sun et al.(1994)
	AB102	TAGAATCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC	Sun et al.(1994)
<i>trnH-psbA</i>	<i>psbA</i>	CGAAGCTCCATCTACAAATGG	Hamilton (1999)
	<i>trnH</i> (GUG)	ACTGCCTTGATCCACTTGGC	Hamilton (1999)

다양한 곰취속 식물을 대상으로 (표 7)의 primer를 사용하여 PCR 분석을 수행한 결과 4개의 DNA 바코딩 지역 모두 단일밴드가 성공적으로 증폭되는 것을 확인하였다(그림 10). 곰취속 식물들로부터 증폭되어진 4개(ITS, *matK*, *rbcLa* 및 *trnH-psbA*)의 DNA 바코딩 지역 PCR 산물들은 염기서열 결정을 위해 pGEM T-EASY vector에 클로닝 하였다(그림 11, 그림12).

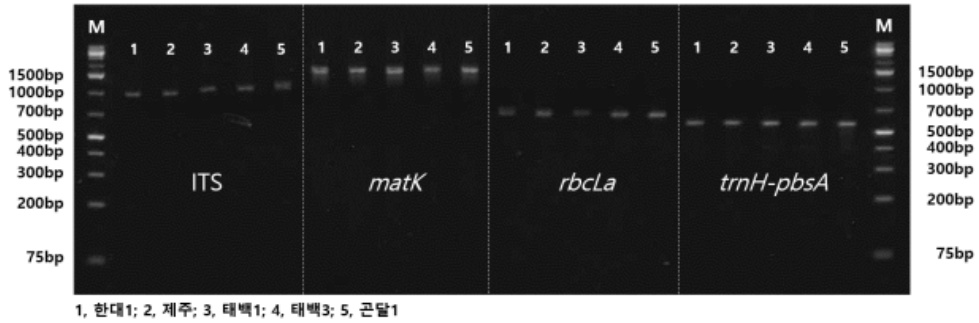


그림10. 곰취속에서 증폭된 ITS 식물에서 DNA 바코딩 primer 사용 PCR 결과

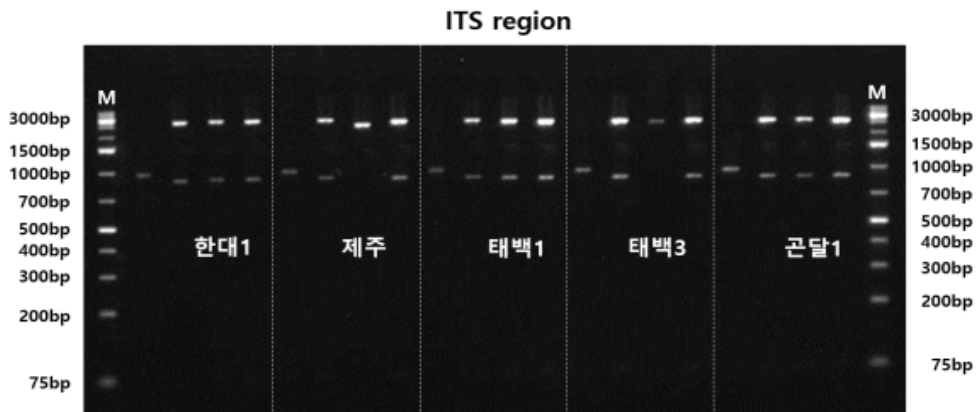


그림11. 곰취속에서 증폭된 ITS 지역의 PCR 단편을 cloning 한 결과.

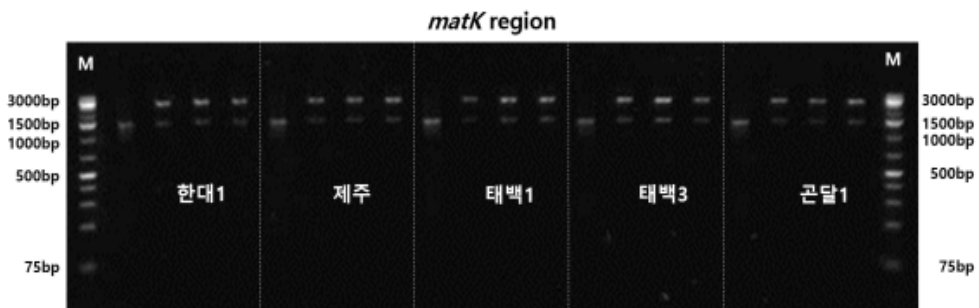


그림12. 5개 곰취속 식물에서 증폭된 *matK* 지역의 PCR 단편을 cloning 한 결과.

마. 곰취속 식물 바코딩 지역 염기서열 분석 및 종 특이 SNPs 분석

4개의 식물 바코딩 지역(ITS, *matK*, *rbcLa*, 그리고 *trnH-psbA*)의 염기서열 결정을 완료하였다. 그 결과 ITS 지역은 902bp, *matK* 지역은 1259bp, *rbcLa* 지역은 602bp, *trnH-psbA* 지역은 530bp의 염기서열을 가지고 있음을 확인하였다. 곰취속 식물 판별을 위한 SNP 분자 마커 개발을 위하여 유전자별로 확보된 consensus 염기서열을 MAFFT와 Box shade 프로그램을 사용하여 다중 염기서열 정렬 분석을 수행하였다. 유전자별 상세 결과는 아래와 같다.

- ITS 지역 : 곰취속 식물들의 판별이 가능한 다수의 SNPs가 존재하고 있음이 확인되었다. 특히 종간(예, 곰취와 곤달비) 구분이 가능한 SNP 뿐만 아니라 종내(곰취 단일종) 수집 지 별 판별이 가능한 SNPs 또한 존재하고 있음이 확인되었다
- *matK* 지역 : 곰취와 곤달비의 구분이 가능한 3개의 SNPs가 존재함이 확인되었다. 그러나, 단일 종내 구분이 가능한 SNP는 존재하지 않음이 확인되었다(그림 13).
- *trnH-psbA* 지역 : 곰취와 곤달비의 구분이 가능한 2개의 SNPs가 존재함이 확인되었다. 이 지역 역시 단일 종내 구분이 가능한 SNP는 존재하지 않음이 확인되었다(그림 14).
- *rbcLa* 지역 : 어떠한 SNP도 존재하지 않음이 확인되었다(그림 15).

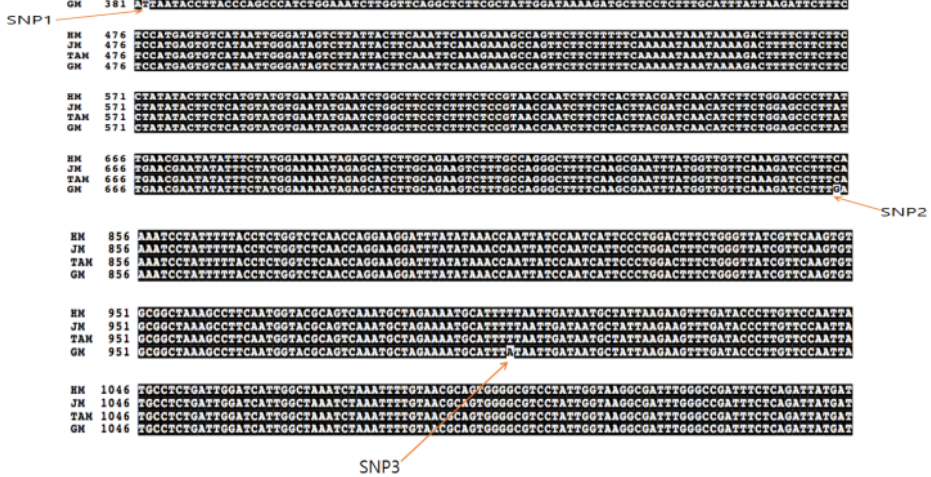


그림 13. 식물체별 결정된 *matK* consensus 염기서열 간 다중 염기서열 정렬 결과.

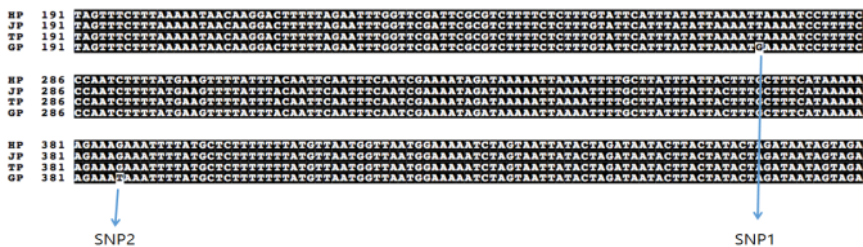


그림 14. 식물체별 결정된 *trnH-psbA* consensus 염기서열 간 다중 염기서열 정렬 결과.

```

HR1 1 ATGTCACCACAACAGAGACTAAAGCGAGTGTGGATTCAAAGCTGGTGTAAAGATTATAAATTGACTATTATACCTCGACTATGAAACCAA
HR2 1 ATGTCACCACAACAGAGACTAAAGCGAGTGTGGATTCAAAGCTGGTGTAAAGATTATAAATTGACTATTATACCTCGACTATGAAACCAA
GR3 1 ATGTCACCACAACAGAGACTAAAGCGAGTGTGGATTCAAAGCTGGTGTAAAGATTATAAATTGACTATTATACCTCGACTATGAAACCAA

HR1 96 GGAATCTGATATCTTGGCAGCATTTCGAGTAACCTCAACCAGGAGTTCGCCCTGAAGAAGCAGGGGCCGCGTAGCTGCCGAATCTTCTACCG
HR2 96 GGAATCTGATATCTTGGCAGCATTTCGAGTAACCTCAACCAGGAGTTCGCCCTGAAGAAGCAGGGGCCGCGTAGCTGCCGAATCTTCTACCG
GR3 96 GGAATCTGATATCTTGGCAGCATTTCGAGTAACCTCAACCAGGAGTTCGCCCTGAAGAAGCAGGGGCCGCGTAGCTGCCGAATCTTCTACCG

HR1 191 GTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGACTTACGAGCCTGATCGTTACAAGGGCGATGCTATGGAATCGAGCCCTGTTCTGGAGAAGAAAAT
HR2 191 GTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGACTTACGAGCCTGATCGTTACAAGGGCGATGCTATGGAATCGAGCCCTGTTCTGGAGAAGAAAAT
GR3 191 GTACATGGACAACCTGTGTGGACCGATGGACTTACGAGCCTGATCGTTACAAGGGCGATGCTATGGAATCGAGCCCTGTTCTGGAGAAGAAAAT

HR1 286 CAATTTATGCTTATGTAGCTTACCCATTAGACCTTTTGAAGAAGGTTCTGTACTAACATGTTACTTCCATTGTAGGTAATGATATTGGGGT
HR2 286 CAATTTATGCTTATGTAGCTTACCCATTAGACCTTTTGAAGAAGGTTCTGTACTAACATGTTACTTCCATTGTAGGTAATGATATTGGGGT
GR3 286 CAATTTATGCTTATGTAGCTTACCCATTAGACCTTTTGAAGAAGGTTCTGTACTAACATGTTACTTCCATTGTAGGTAATGATATTGGGGT

HR1 381 CAAAGCCCGCGCTCTACGCTCGGAAGATTTGCGAATCCCTACTGCGTATGTTAAAACCTTCCAAGGTCGCGCTCACGGCATCCAAGTGGAGA
HR2 381 CAAAGCCCGCGCTCTACGCTCGGAAGATTTGCGAATCCCTACTGCGTATGTTAAAACCTTCCAAGGTCGCGCTCACGGCATCCAAGTGGAGA
GR3 381 CAAAGCCCGCGCTCTACGCTCGGAAGATTTGCGAATCCCTACTGCGTATGTTAAAACCTTCCAAGGTCGCGCTCACGGCATCCAAGTGGAGA

HR1 476 GAGATAAATGAAACAAGTATGGTCGCTCTATTGGGATGACTATTAAAACCTAAAATGGGGCTATCCCGTAAAACCTACGGTAGAGCTGTTAT
HR2 476 GAGATAAATGAAACAAGTATGGTCGCTCTATTGGGATGACTATTAAAACCTAAAATGGGGCTATCCCGTAAAACCTACGGTAGAGCTGTTAT
GR3 476 GAGATAAATGAAACAAGTATGGTCGCTCTATTGGGATGACTATTAAAACCTAAAATGGGGCTATCCCGTAAAACCTACGGTAGAGCTGTTAT

HR1 571 GAGTGTCTTCGTGGTGGACTGATTTTACAAT
HR2 571 GAGTGTCTTCGTGGTGGACTGATTTTACAAT
GR3 571 GAGTGTCTTCGTGGTGGACTGATTTTACAAT

```

그림 15. 식물체별 결정된 *rbcLa* consensus 염기서열 간 다중 염기서열 정렬 결과.

#### 바. 곰취속 식물 판별용 PCR primer 개발 및 분석

곰취속 식물들의 판별을 위하여 개발된 중간 또는 종내 특이 SNPs 서열을 바탕으로 PCR 증폭용 프라이머를 제작하였다. *trnH-psbA* 지역에 존재하는 종 특이 SNPs의 경우 AT rich 지역 내에 존재하는 이유로 인해 PCR 증폭을 위한 프라이머 제작이 불가능하였으며 ITS 지역 및 *matK* 지역에 존재하는 SNPs 들은 성공적으로 allele-specific 프라이머의 제작이 완료되었다(표 8). 제작된 allele-specific 프라이머를 사용하여 PCR 분석을 수행 중에 있으며 이들 중 *matK* 지역에 존재하는 첫 번째 SNP를 토대로 제작된 두 개의 프라이머의 PCR 분석 결과 곰취와 곤달비의 구분이 가능함이 검증되었다(그림 16).

표 8. 종 특이 SNPs를 토대로 제작된 allele-specific PCR primer 정보.

No	Primer Name	Sequences	Allele-Specific
1	ITS-SNP-NP1	ACCGATTGTTGTTACATGTTTCAGA	Gom-chi specific
2	ITS-SNP-NP2	ACCGATTGTTGTTACATGTTTCAGG	Gon-dal-bi specific
3	ITS-SNP-NP3	GCTTGTACCATGCTTCCCCGTTTCT	Gom-chi specific
4	ITS-SNP-NP4	GCTTGTACCATGCTTCCCCGTTTCC	Gon-dal-bi specific
5	ITS-SNP-NP5	TACTCCTTAGAACGCACAACCTTGCG	Gom-chi specific
6	ITS-SNP-NP6	TACTCCTTAGAACGCACAACCTTGCT	Gon-dal-bi specific
7	matK-SNP-NP1	CAGATGGGCTGGGTAAGGTATTCCG	Gom-chi specific
8	matK-SNP-NP2	CAGATGGGCTGGGTAAGGTATTCA	Gon-dal-bi specific
9	matK-SNP-NP3	TCCTTGATACCTAACACAATGCAGG	Gom-chi specific
10	matK-SNP-NP4	TCCTTGATACCTAACACAATGCAGC	Gon-dal-bi specific

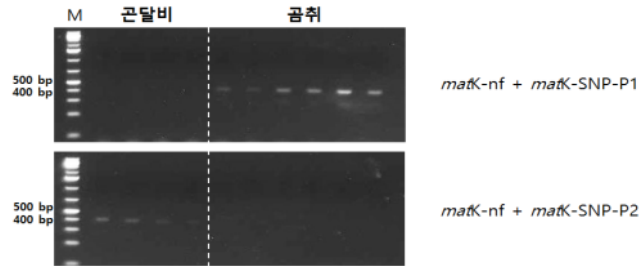


그림 16. 곰취와 곤달비 판별을 위하여 개발된 프라이머를 사용하여 SNP-PCR 수행 결과 (matK-SNP-P1 : 곰취 특이 바인딩 프라이머, matK-SNP-P2 : 곤달비 특이 바인딩 프라이머)

#### 4. 적 요

##### <제1세부과제 : 곰취 조직배양 효율증진 기술 개발>

- 가. N6 염류배지에서 정단조직, 자엽조직의 배양시 여러 가지 성장조정제 단독 및 복합처리에서 완전한 식물체로의 재분화는 이루어지지 않았다.
- 나. N6 염류배지에 2,4-D, BA, NAA, Kinetin 등의 여러 가지 성장조정제를 단독 및 복합처리한 엽병 조직을 소독하여 치상하였을 때, 2,4-D 1.5ppm 처리와 2,4-D 2ppm + Kinetin 2ppm 처리에서 싹초 및 뿌리가 발생하여 완전한 식물체를 얻을 수 있었으나, 캘러스의 재분화 효율이 낮아, 재분화 효율을 높일 필요가 있었다.
- 다. 엽병 조직으로부터 유래한 캘러스의 재분화 효율이 낮아서, 이를 높이고자 1/2N<sub>6</sub> 염류에 1/2 자당을 포함한 배지에 캘러스를 재분화시켰을 때, 싹초 및 뿌리가 모두 발생한 처리는 2,4-D 1.5ppm + NAA 1.5ppm 처리, 2,4-D 1ppm + Kinetin 2ppm 처리, 2,4-D 2ppm + Kinetin 5ppm 처리였다.

##### <제2세부과제 : 곰취 유용 유전자 마커 개발>

- 가. 곰취속 식물들의 유전적 특성을 분석하여 SSR primer set를 개발하기 위하여 NCBI, Pubmed, Google scholar 등에서 제공하는 생물정보학적 틀을 활용하여 곰취속 식물들로부터 개발되어진 SSR 분자마커 또는 해독된 게놈 염기서열정보들을 120건을 동정하였으며 이들로부터 SSR 분자마커의 PCR 증폭이 가능한 primer pair를 작성하였다. 그 결과 14개로 구성된 곰취속 식물 게놈 증폭용 SSR primer set을 최종 완료하였다.
- 나. PCR 결과 agarose gel에서 DNA 산물의 증폭이 확인된 primer 수는 6조합 (Lho29, Lho37, Lho40, Lho64, Lho77, 그리고 Lho114)이었으며 6조합 모두 agarose gel 상에서는 다형성이 관찰되지 않았다.
- 다. 전기영동 결과 6조합 모두에서 다형성을 형성하는 것을 확인 할 수 있었다. 이들을 추가적인 프라이머를 선별하여 분석하면 곰취속 식물들의 유전적 평가에 매우 유용하게 활용되어 질 수 있을 것으로 기대되었다.

- 라. ISSR 분석을 위한 primer는 100개로 구성된 UBC #801~#900 primer set을 사용하였으며, SSR 분석에 사용되었던 동일한 식물 계통 DNA를 재료로 PCR 분석을 수행하였다. 1차로 20개 primer pair를 임의로 선발하여 PCR screening에 사용하였다. 최종 PCR 산물들은 1.2% agarose gel에 전기영동 하여 DNA 단편들의 증폭 여부를 확인하였다. PCR 결과 ISSR primer 834번 primer는 자생종, 유사종 및 육성종 식물체들의 구분이 가능하였으며, 3차례 이상의 반복 실험으로 그 재현성이 확인되었다.
- 마. DNA barcoding primer 제작은 Pubmed에서 선행 연구논문들을 검색, 현재 식물에서 사용되는 DNA barcoding primer를 확보하였으며 이들 중 핵 DNA의 ITS 지역과 색소체 *rbcLa*, *matK*, *trnH-psbA* 지역을 증폭하기 위한 primer set을 최종 선발하였다. 다양한 곰취속 식물을 대상으로 primer를 사용하여 PCR 분석을 수행한 결과 4개의 DNA 바코딩 지역 모두 단일밴드가 성공적으로 증폭되는 것을 확인하였다. 곰취속 식물들로부터 증폭되어진 4개(ITS, *matK*, *rbcLa* 및 *trnH-psbA*)의 DNA 바코딩 지역 PCR 산물들은 염기서열 결정을 위해 pGEM T-EASY vector에 클로닝 하였다.
- 바. 4개의 식물 바코딩 지역(ITS, *matK*, *rbcLa*, 그리고 *trnH-psbA*)의 염기서열 결정을 완료하였다. 그 결과 ITS 지역은 902bp, *matK* 지역은 1259bp, *rbcLa* 지역은 602bp, *trnH-psbA* 지역은 530bp의 염기서열을 가지고 있음을 확인하였다. 곰취속 식물 판별을 위한 SNP 분자마커 개발을 위하여 유전자별로 확보된 consensus 염기서열을 MAFFT와 Box shade 프로그램을 사용하여 다중 염기서열 정렬 분석을 수행하였다. ITS 지역은 곰취속 식물들의 판별이 가능한 다수의 SNPs가 존재하고 있음이 확인되었다. 특히 종간(예, 곰취와 곤달비) 구분이 가능한 SNP 뿐만 아니라 종내(곰취 단일종) 수집지 별 판별이 가능한 SNPs 또한 존재하고 있음이 확인되었다. *matK* 지역은 곰취와 곤달비의 구분이 가능한 3개의 SNPs가 존재함이 확인되었다. *trnH-psbA* 지역은 곰취와 곤달비의 구분이 가능한 2개의 SNPs가 존재함이 확인되었다.
- 사. 곰취속 식물들의 판별을 위하여 개발된 종간 또는 종내 특이 SNPs 서열을 바탕으로 PCR 증폭용 프라이머를 제작하였다. *trnH-psbA* 지역에 존재하는 종 특이 SNPs의 경우 AT rich 지역 내에 존재하는 이유로 인해 PCR 증폭을 위한 프라이머 제작이 불가능하였으며 ITS 지역 및 *matK* 지역에 존재하는 SNPs 들은 성공적으로 allele-specific 프라이머의 제작이 완료되었다. 제작된 allele-specific 프라이머를 사용하여 PCR 분석을 수행 중에 있으며 이들 중 *matK* 지역에 존재하는 첫 번째 SNP를 토대로 제작된 두 개의 프라이머의 PCR 분석결과 곰취와 곤달비의 구분이 가능함이 검증되었다.

## 5. 인용문헌

- 강원도농업기술원. 2015. 산채재배면적(내부자료)
- 김원배, 김정기, 이은애, 김병현, 김정간, 임학태. 1996. 산마늘 인경조직으로부터 식물체 재분화. 식물조직배양학회지, 23권 2호. pp.123~127.
- 김인현, 한태진, 김우택, 이광웅, 김준철, 조성호. 1996. 참나물(*Pimpinella brachycarpa*) 유

식물 생장에 미치는 유기질소원의 효과와 잎 절편에서의 부정근 형성. 식물조직배양학회지, 23권 6호. pp.323-328.

안순영, 조광수, 유기역, 서종택. 2010. RAPD 및 ITS 염기서열 분석을 이용한 곰취 속 (*Ligularia*) 식물의 유연관계 분석. 원예과학기술지, 28권 4호. pp. 638-647.

이선태, 김창길, 오중열, 김경민. 2011. ISSR 마커를 이용한 달래와 산달래의 분류. 원예과학기술지, 29권 6호. pp.600-609.

장한호, 장익환, 이용선, 박철호, 신영범. 1993. 두릅의 조직 및 배양조직편에 따른 Callus 의 유기 및 식물체 재분화. 한국육종학회 학술발표회 발표요지, 25권 2호. pp.40-41.

## 6. 연구결과 활용

연도(연차)	활용구분	제 목
2015(2년)	학술발표	곰취 특이 결합 matK-SNP 분자마커 개발
	논문게재	곰취 특이 결합 matK-SNP 분자마커 개발
	특허출원	곰취 특이 결합 matK-SNP 분자마커 개발

## 7. 연구원 편성

구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도	
					'14	'15
과제책임자	특화작물연구소	농업연구사	최성진	과제 총괄	○	○
1세부책임자	특화작물연구소	농업연구사	최성진	세부주관 수행	○	○
공동연구자	산채연구소	농업연구사	김용복	시험수행 및 평가	○	○
	산채연구소	농업연구사	김세원	조직배양 지원	○	○
	산채연구소	농업연구사	최병곤	자료 정리	-	○
	산채연구소	일 반 직	신동근	평가분석 지원	○	○
	산채연구소	일 반 직	김대진	현장조사 지원	○	○
	환경농업연구과	농업연구관	김인종	평가분석 지원	○	○
2세부책임자	산채연구소	농업연구관	홍대기	조직배양 자문	-	○
	특화작물연구소	농업연구사	최성진	세부주관 수행	○	○
공동연구자	산채연구소	농업연구사	김용복	시험수행 및 평가	○	○
	산채연구소	농업연구사	김세원	분석 지원	○	○
	산채연구소	농업연구사	최병곤	자료 정리	-	○
	산채연구소	일 반 직	신동근	평가분석 지원	○	○
	산채연구소	일 반 직	김대진	분석 지원	○	○
	산채연구소	농업연구관	홍대기	시험수행 자문	-	○