

어젠다코드	3 - 12 - 35		구분	계속	
기술분야코드	V1	기술유형코드	S01	작목구분코드	VC--06-140104 1412
과제종류	농업현장실용화기술개발		세부사업(약어)	지역특화작목기술개발	
과제명	곰취·산마늘 저장유통 품질 향상 규격화 및 판별기술 개발				
과제책임자	성명		직급	소속기관 및 부서	
	노희선		농업연구사	강원도원 농식품연구소	
연구기간	2016 ~ 2018		참여연구기관	-	
세부과제명			부서	세부책임자	연구기간
3) 곰취, 산마늘 분자마커를 이용한 품종 및 원산지 판별 기술			산채연구소	김용복	'16~'18
색인용어	곰취, 산마늘, 분자마커, 유전자마커				

I. 연구목적

- 곰취는 급속한 재배면적 증가에 따른 근연종 및 유사종의 혼합재배로 품질 특성이 다양하여 품종 및 계통의 판별기준 제공
- 곰취, 산마늘 등 수입산의 국내산 둔갑 우려가 높은 작목에 대한 원산지를 판별할 수 있는 품종 및 계통의 분자마커를 개발하여 제공하고자 함

II. 2017년도 추진목표 대비 당해연도 목표 달성도

추진목표	달성내용	달성도
<제3세부과제 : 곰취, 산마늘 분자마커를 이용한 품종 및 원산지 판별기술> ○ Barcoding DNA 서열 분석 및 종 특이 SNP 분자마커 개발	[결과활용 건수 : 학술발표 3, 논문게재 1] ○ 학술발표 - 곰취 품종판별 분자마커 개발 - 곰취 종 및 품종판별 SNPs 마커 개발 - Production and Utilization of Wild Vegetables on the Cultural Aspect ○ 논문게재 - Molecular authentication of two medicinal plants <i>Ligularia fischeri</i> and <i>Ligularia stenocephala</i> using allele-specific PCR (AS-PCR) strategy	100%

Ⅲ. 주요 연구내용 및 결과요약

1. 연구내용(재료 및 방법)

<제3세부과제명: 곰취, 산마늘 분자마커를 이용한 품종 및 원산지 판별기술>

(시험 1) NGS를 활용한 전사체 분석

가. NGS 장비를 활용한 곰취 reference 유전자 세트 작성

- 시험재료 : 국내 수집 '한대리' 곰취
- 시험방법 : PacBio platform을 이용하여 전사체 분석
- 분석유전자 : 곰취 (*Ligularia fisheri*) full length cDNAs 및 iso-form 분석

(시험 2) 전사체 정보를 활용한 유용유전자 발굴

가. 곰취 전사체 정보 기반 유용 물질 관련 유전자 대량 발굴

- 시험재료 : '한대리' 곰취 reference 유전자 세트
- 시험방법 : Full length cDNA로 구성되어 있는 곰취 유전자 세트를 대상으로 *in-silico* 기능 분석을 수행하여 개별 유전자들의 예상 기능을 결정하고 곰취 특이적 유용물질 합성에 관련이 있을 것으로 예상되는 유전자들 및 생합성 경로를 찾고자 하였음
- 분석유전자 : 곰취 (*Ligularia fisheri*) full length cDNAs 및 유전자 iso-form

(시험 3) EST-SSR 분자마커 개발

가. 곰취 전사체 정보로부터 EST-SSR 분자마커 개발

- 시험재료 : '한대리' 곰취 EST 유전체 정보
- 시험방법 : Transcriptome내의 SSR-motif를 탐색하고 분자마커로 전환시켜 수집 유전자원들의 평가 및 분자유종에 활용하고자 하였음. 먼저 PacBio isoform에서 개발한 유전자 EST sequence에서 SSR site를 조사하고 후보 서열들로부터 100-300bp 정도 크기의 PCR 산물들이 증폭 가능하도록 primer를 디자인하였음. 선발 조건은 아래와 같음

※ SSR repeat 조사 : NICEMSSRFiner 프로그램을 이용

※ 반복서열 수는 2, 3, 4의 set((NN)n, (NNN)n, (NNNN)n)으로 수행

2. 연구결과 요약

(시험 1) NGS를 활용한 전사체 분석

- 곰취(*Ligularia fisheri*)의 경우 유전체 분석을 위한 reference gene set이 존재하지 않기 때문에 국내 대표 수집종인 한대리 곰취 식물체를 재료로 PacBio platform을 활용하여 전사체 분석을 수행하였음. PacBio system의 경우 read length가 길기 때문에 게놈 DNA 서열 없이도 full length cDNA 서열들의 생성

이 가능하다는 장점을 가지고 있음. 각 단계별 기술적 특성 및 상세 모식도는 아래 그림에 명시하였음.

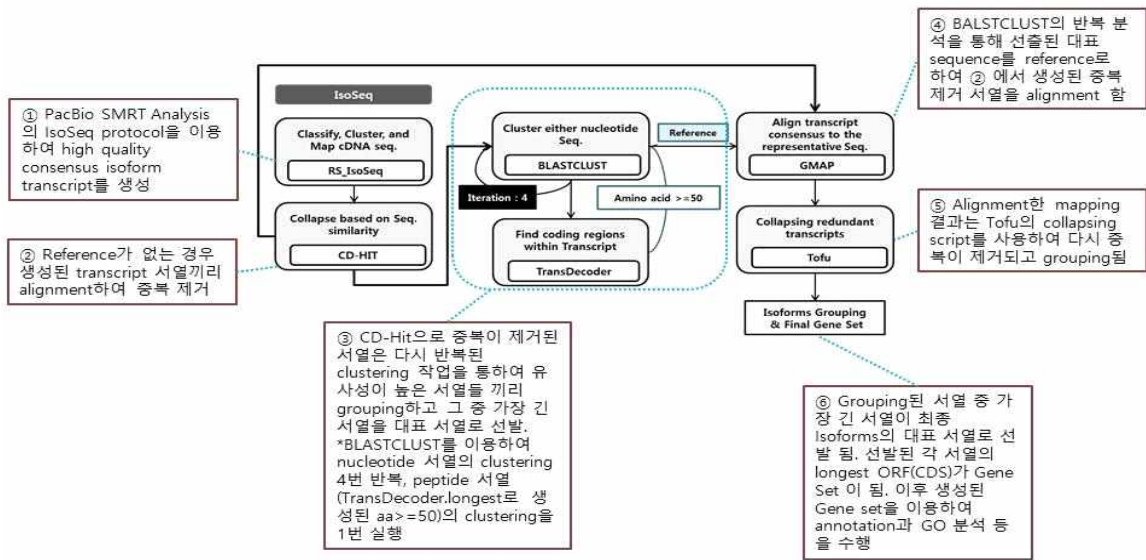


그림 6, 곰취 IsoSeq(전사체) 분석 workflow 설명>

- 곰취(*Ligularia fischeri*, 한대리곰취)의 PacBio 전사체 분석 결과 중복서열이 제거된 27,453개 full length cDNA로 구성되어진 곰취 reference gene set의 작성완료.

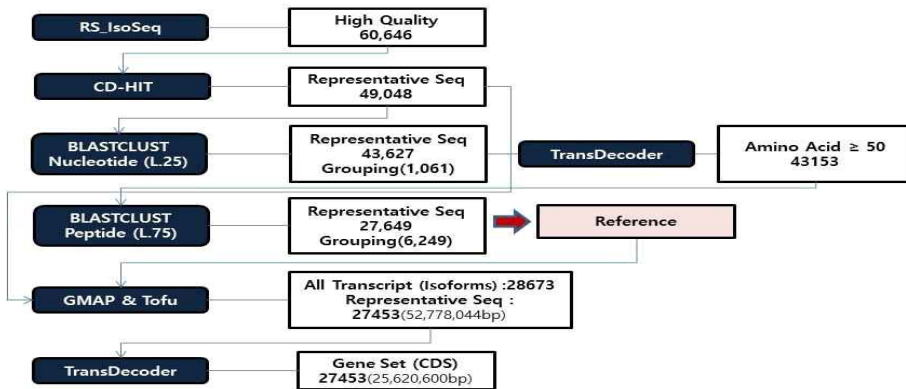


그림 7, 전사체 분석으로 얻어진 *Ligularia fischeri* (곰취)의 reference gene set 정보

- 곰취 iso-form 분석 : iso-form은 한 개의 유전자 좌에서 두 개 이상의 전사물이 생성되는 형태를 말하며 최근 이 전사물들이 서로 다른 기능을 수행한다는 결과가 보고되고 있음. 이 iso-form은 주로 유전자의 alternative splicing 기작으로 인해 생성되어지며, PacBio system을 활용하여 곰취에 존재하는 모든 Iso-form 들을 분리동정 하였음. 그 결과 2개 이상의 iso-form을 만드는 1,030개의 유전자를 동정하였음.

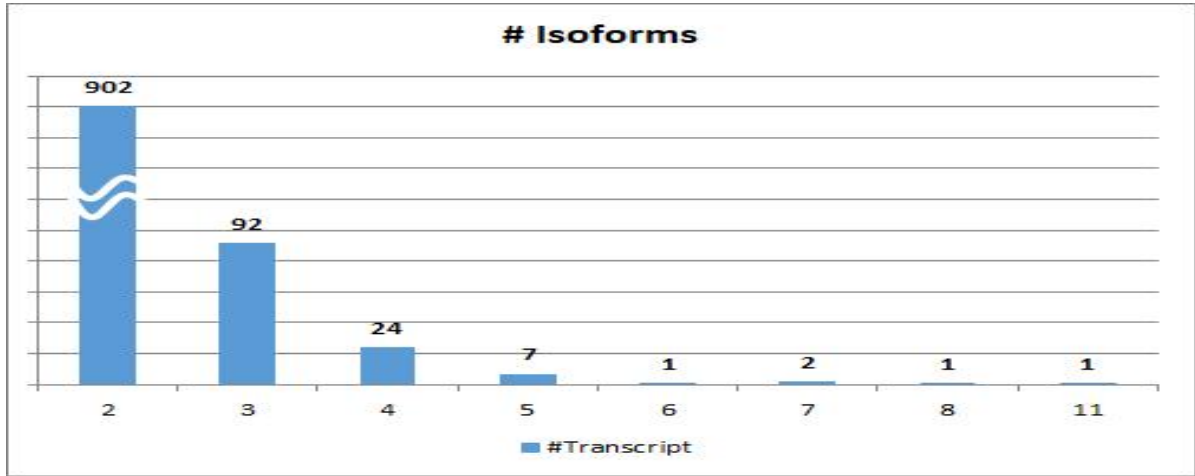


그림 8. 전사체 분석으로 얻어진 *Ligularia fischeri* (곰취)의 iso-form 정보

(시험 2) 전사체 정보를 활용한 유용유전자 발굴

- GenBank의 blast 프로그램을 사용하여 동정된 27,453개 곰취 reference 유전자들의 *in-silico* 기능분석을 수행하였으며 그 상세 결과는 아래 그림에 표시하였음

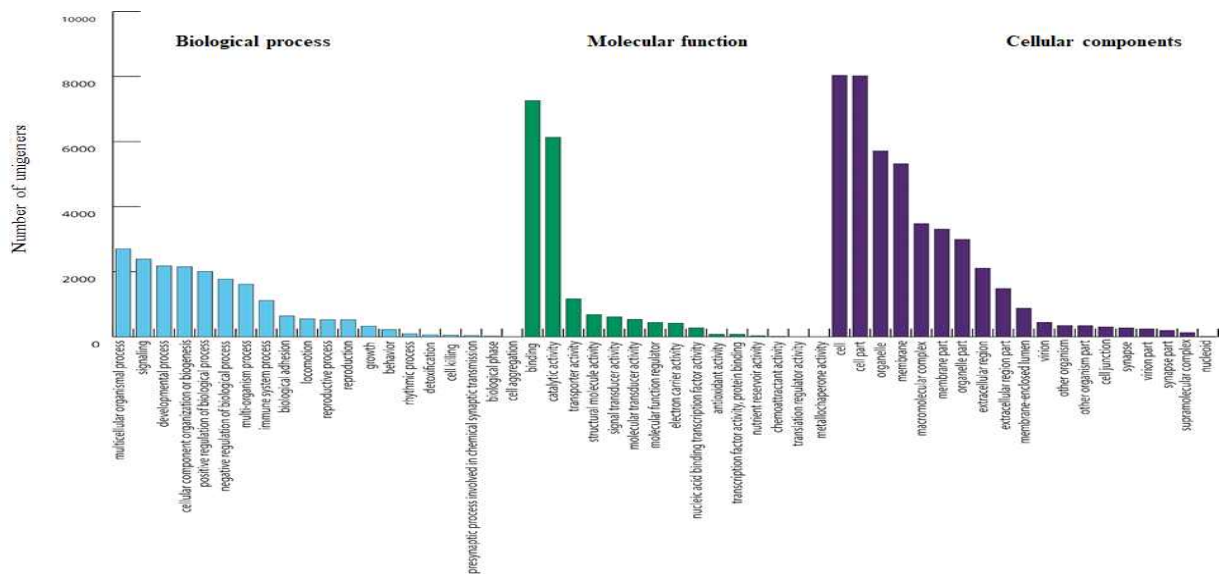


그림 9. 기능에 따른 곰취 reference 유전자들의 분류 히스토그램

- GenBank의 blast 프로그램을 사용하여 곰취 유전자들과 유사성이 높은 근연종을 탐색한 결과 *Cynara cardunculus* var. *scolymus* 가 가장 유사도가 높은 것으로 확인되었으며 2차 확인 중에 있음.

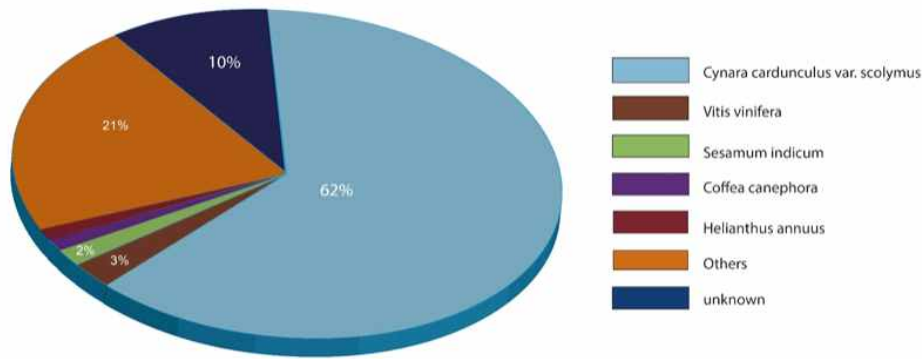


그림 10. 곶취 reference 유전자들과 높은 유사성을 보이는 근연종 정보

- 곶취 전사체 결과 선발한 1,030개의 iso-form들 중 4개 이상의 iso-form을 가지는 유전자 36개를 최종 선발 하였으며 이들의 유추되어지는 기능을 아래 표에 표시하였음. 현재 곶취의 유용 물질 생합성과 연관성을 가지고 있는 iso-form들의 분류를 진행 중에 있음.

Cluster ID	Length	#isoforms	Description	Matched Species	Gene bank no.
cluster_00012	6659	11			Lfis_00009
cluster_00004	6835	8			Lfis_00004
cluster_00069	5886	7	PREDICTED: ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA homolog CD4B, chloroplastic-like	[Nicotiana sylvestris]	Lfis_00032
cluster_00523	3828	7	RNA-dependent RNA polymerase, eukaryotic-type	[Cynara cardunculus var. scolymus]	Lfis_00339
cluster_02210	3431	6	hypothetical protein Ccrd_011317	[Cynara cardunculus var. scolymus]	Lfis_01117
cluster_00970	3671	5	TIR-NBS-LRR resistance-like protein RGC151	[Helianthus annuus]	Lfis_00566
cluster_01115	3632	5	Protein of unknown function DUF2921	[Cynara cardunculus var. scolymus]	Lfis_00639
cluster_01550	3535	5	cytochrome b245, heavy chain	[Cynara cardunculus var. scolymus]	Lfis_00813
cluster_02155	3438	5	hypothetical protein Ccrd_011446, partial	[Cynara cardunculus var. scolymus]	Lfis_01087
cluster_02191	3434	5	PREDICTED: probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase MRH1	[Vitis vinifera]	Lfis_01104
cluster_02555	3386	5	petB protein (chloroplast)	[Arabis alpina]	Lfis_01259
cluster_05185	3160	5	putative protein kinase superfamily protein	[Zea mays]	Lfis_02482
cluster_00002	7355	4	Cellulose synthase, partial	[Cynara cardunculus var. scolymus]	Lfis_00002
cluster_00003	6845	4	Cellulose synthase	[Cynara cardunculus var. scolymus]	Lfis_00003
cluster_00008	6784	4	plasma membrane H ⁺ -ATPase	[Daucus carota]	Lfis_00007
cluster_00096	4472	4	Coatomer beta' subunit (COPB2)	[Cynara cardunculus var. scolymus]	Lfis_00049
cluster_00097	4464	4	hypothetical protein Ccrd_018254	[Cynara cardunculus var. scolymus]	Lfis_00050
cluster_00405	3890	4	hypothetical protein Ccrd_011446, partial	[Cynara cardunculus var. scolymus]	Lfis_00265
cluster_00604	3788	4	Phox/Bem1p	[Cynara cardunculus var. scolymus]	Lfis_00385
cluster_00742	3737	4	DNA mismatch repair protein MutS, core	[Cynara cardunculus var. scolymus]	Lfis_00462
cluster_00848	3707	4	PREDICTED: protein transport protein Sec24-like At4g32640	[Vitis vinifera]	Lfis_00512
cluster_00943	3680	4	Molybdenum cofactor biosynthesis, MoeB, partial	[Cynara cardunculus var. scolymus]	Lfis_00555
cluster_01159	3619	4	Rab-GTPase-TBC domain-containing protein	[Cynara cardunculus var. scolymus]	Lfis_00660
cluster_01176	3615	4	Concanavalin A-like lectin/glucanase, subgroup	[Cynara cardunculus var. scolymus]	Lfis_00668
cluster_01305	3585	4	PREDICTED: CSC1-like protein At4g02900	[Eucalyptus grandis]	Lfis_00726
cluster_01874	3479	4	Nucleic acid-binding, OB-fold	[Cynara cardunculus var. scolymus]	Lfis_00954
cluster_02078	3449	4	Concanavalin A-like lectin/glucanase, subgroup	[Cynara cardunculus var. scolymus]	Lfis_01049
cluster_02375	3407	4	Kinesin, motor domain-containing protein	[Cynara cardunculus var. scolymus]	Lfis_01191
cluster_05487	3140	4	Calcium-binding EF-hand	[Cynara cardunculus var. scolymus]	Lfis_02613
cluster_09047	2968	4	hypothetical protein Ccrd_000578	[Cynara cardunculus var. scolymus]	Lfis_04461
cluster_18049	2117	4	plastidic aldolase family protein	[Populus trichocarpa]	Lfis_09981
cluster_22234	1901	4	hypothetical protein Ccrd_019845	[Cynara cardunculus var. scolymus]	Lfis_12528
cluster_22523	1883	4	Aldolase-type TIM barrel	[Cynara cardunculus var. scolymus]	Lfis_12691
cluster_36089	1219	4	PREDICTED: uncharacterized protein LOC107304437	[Oryza brachyantha]	Lfis_20538

그림 11. 4개 이상의 iso-form을 가지는 곶취 유전자들의 기능 정보

(시험 3) EST-SSR 분자마커 개발

- 전사체 분석으로 확보한 mRNA 염기서열 정보들을 NICEM에서 제공하는 SSR Finder 프로그램을 사용하여 SSR motif를 포함하는 모든 서열들을 동정하였으

- 가. 곶취(*Ligularia fischeri*, 한대리곶취)의 PacBio 전사체 분석 결과 중복서열이 제거된 27,453개 full length cDNA로 구성되어진 곶취 reference gene set의 작성완료함
- 나. 곶취 iso-form 분석 : PacBio system을 활용하여 곶취에 존재하는 모든 Iso-form들을 분리동정 하였음. 그 결과 2개 이상의 iso-form을 만드는 1,030개의 유전자를 동정하였음.

(시험 2) 전사체 정보를 활용한 유용유전자 발굴

- 가. GenBank의 blast 프로그램을 사용하여 곶취 유전자들과 유사성이 높은 근연종을 탐색한 결과 *Cynara cardunculus var. scolymus* 가 가장 유사도가 높은 것으로 확인되었으며 2차 확인 중에 있음.
- 나. 곶취 전사체 결과 선발한 1,030개의 iso-form들 중 4개 이상의 iso-form을 가지는 유전자 36개를 최종 선발 하였으며 이들의 유추되어지는 기능을 아래 표에 표시 하였음. 현재 곶취의 유용 물질 생합성과 연관성을 가지고 있는 iso-form들의 분류를 진행 중에 있음.

(시험 3) EST-SSR 분자마커 개발

- 가. 전사체 분석으로 확보한 mRNA 염기서열 정보들을 NICEM에서 제공하는 SSR Finder 프로그램을 사용하여 SSR motif를 포함하는 모든 서열들을 동정하였으며 그들 중 반복서열 수에 따라 2bp 반복서열의 경우 8반복, 3bp 반복서열의 경우 5반복, 그리고 4bp 반복서열의 경우 4반복 이상이 포함된 353개의 서열을 최종 선발하였음.
- 나. 선발된 transcript들은 SSR motif의 flanking region으로부터 PCR증폭을 위한 primer 위치를 결정하였으며 353개로 구성된 곶취 EST-SSR primer set의 작성을 완료, 다양한 곶취 유전 집단의 DNA를 활용하여 PCR 검정을 진행 중에 있음.

IV. 연구결과 활용

연도(연차)	활용구분	제목
2017(2년)	학술발표	곶취 품종판별 분자마커 개발 곶취 종 및 품종판별 SNPs 마커 개발
	논문게재	Production and Utilization of Wild Vegetables on the Cultural Aspect Molecular authentication of two medicinal plants <i>Ligularia fischeri</i> and <i>Ligularia stenocephala</i> using allele-specific PCR (AS-PCR) strategy

V. 기대 및 파급효과

- 분자표지 개발로 국산 산채 품종/계통의 효율적인 관리 및 보호
- 분자마커를 이용한 산채 품종 및 원산지 판별 기술로 체계적 품질 관리
- 산채 분자유종 시스템 구축으로 고급산채 품종 조기육성 및 안정적인 먹거리 제공