

당근 종모 형질 관련 EST profiling과 이를 이용한 EST-SSR 및 SNP 마커 개발

오규동¹ · 황은미¹ · 심은조¹ · 전상진² · 박영두^{1*}

¹경희대학교 원예생명공학과, ²(주)캐로톱씨드 육종연구소

EST Profiling for Seed-hair Characteristic and Development of EST-SSR and SNP Markers in Carrot

Gyu-Dong Oh¹, Eun-Mi Hwang¹, Eun-Jo Shim¹, Sang-Jin Jeon², and Young-Doo Park^{1*}

¹Department of Horticultural Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea

²Breeding Research Institute, Carrotop Seed Co., Anseong 456-882, Korea

Abstract. Carrot (*Daucus carota* L. var. *sativa*) is one of the most widely used crops in the world. Moreover it is an important crop because of its high content of β -carotene, well-known as the precursor of vitamin A carotenoid. However, seed-hair which is generated in epidermal cell of seeds inhibits absorption and germination. For that reason, carrot seeds are commercialized after mechanical hair removal process. To overcome such cumbersome weaknesses, new breeding program for developing hairless-seed carrot cultivar has been needed. Therefore, in this study, cDNA libraries from seeds of short-hair seed phenotype CT-ATR615 OP 666-13line and hairy seed CT-ATR615 OP-CK1-9 line were constructed and expression patterns related to generation of seed-hair were analyzed by comparison of EST sequences. Differential EST sequence results between two lines were classified into FunCat functional categories based on the results of BlastX search. Higher expression quantities belonging to metabolic category were shown on short-hair seed line than hairy-seed one. Differential expression quantities between those two lines in the protein folding and stabilization, subcellular localization categories were supposed to contribute variously on the generation of seed-hair. We confirmed 50 and 59 SSR sites, and 2 SNP sites by analyzing EST sequences in two lines; thereafter, we designed SNP and SSR primer sets from these EST sequence information as a molecular marker. These markers are thought to be used in research of molecular markers for classification of carrot family and related to various traits, as well as seed-hair characteristic.

Additional key words: BlastX, cDNA library, *Daucus carota*, FunCat

서 언

당근(*Daucus carota* L. var. *sativa*)은 중국과 한국 등 아시아 국가들은 물론 세계적으로 다양한 요리에 사용되는 유용한 작물 중 하나이다. 아프가니스탄 지방으로부터 유래된 야생종 당근은 쓴맛을 줄이고 단맛을 증가시키며, 근목심부를 최소화하는 과정으로 오랜시간에 걸쳐 육종되었으며 오늘날 세계적으로 중국에서 가장 많이 재배되고 있다. Vitamin A의 전구체인 β -carotene의 함량이 100g 당 850-8500 μ g으로

높아(Bajaj 등, 1980) 영양학적으로도 주요한 작물이다.

당근은 산형화서를 가진 대표적인 작물로서 종자의 성숙 시기의 차이가 있어 균일한 종자 품질을 유지하기 어려워 파종 후 발아율이 낮아(Min, 1992), 발아력 향상을 위한 연구들이 진행되고 있지만(Li 등, 1999; Lim 등, 2001), 여전히 발아의 불균일 및 지연등이 주요 문제점으로 지적되고 있다. 당근종자에는 종피세포에서 연장된 형태로 생성되는 종자모가 존재하며(Menon과 Dave, 1989), 이러한 종자모에는 carotol이라는 물질이 존재하여 종자발아를 억제한다고

*Corresponding author: ydpark@khu.ac.kr

※ Received 8 November 2010; Accepted 13 November 2010. 본 연구는 농림수산식품부 (농림, 식품, 수산) 기술개발사업과 농촌진흥청 바이오 그린 21사업(과제번호: 20070301034037008010) 지원에 의해 이루어진 것임.

알려져 있다. 또한 종자모는 종자발아시 흡수를 저해하여 발아율을 떨어뜨린다. 현재 시중에서 판매되고 있는 당근의 종자의 경우 당근 종자모를 기계적인 방법으로 제모작업을 거쳐 상품화하고 있다. 이러한 과정을 통해 생산되는 종자는 기계적인 처리에 의해 일부 종자가 손상되어 종자수명이 단축되거나 재배에 영향을 줄 수 있는 단점을 보이고 있다. 이와 더불어 제모과정에 추가적인 인력과 생산비가 들어가며 상품화 기간이 늘어나게 된다.

무모종자 당근 품종을 육종하면 이와 같은 시간과 인력, 생산비의 축소를 가져올 수 있으며 종자모에 의한 발아율 저하의 문제점을 개선할 수 있다. 이를 위해 단모종자 표현형 당근 개체를 이용하여 양적 형질로 판단 되어지는(Nieuwhof와 Garritsen, 1984) 당근 종자모 형성 관련형질을 연구하며 이를 바탕으로 분자마커를 개발함으로써 무모종자 당근 품종의 육종기한을 단축시키고 효율성을 높일 수 있다.

식물의 유전학적 연구는 전통적인 접근방법인 형태적인 또는 생태학적인 차이를 이용하여 분류하여 왔으나, 이들 방법들은 변이 발생에 따른 정확한 동정이 어렵고, 효율성이 낮은 한계점이 있다. 최근에는 분자생물학적 분석법이 발달함에 따라 전통적인 접근방법의 한계점을 보완할 수 있게 되었다. 본 연구는 이와 같은 목적으로 단모종자 표현형 개체와 유모종자 표현형 개체의 종자 cDNA library를 작성하여 EST sequencing을 통해 종자 생성초기 단계의 발현 양상을 비교 분석하여 종자모 형성에 관련된 메커니즘을 연구하고, EST sequence를 분석하여 SNP 및 SSR sites를 확인하여 마커로 개발하여 종자모 형성에 관련한 특이적 마커를 개발하고자 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

(주)캐로톱씨드(경기도 안성)에서 2008년도부터 2010년도에 걸쳐 육성된 CT-ATR615 계통을 사용하였다. CT-ATR615 계통은 인도 유래종인 Imperator type의 Fusa red계 당근으로 조기 추대성이며 평균적인 초세를 보이며 추근성이 안정적이며 근미비대 중만생, 뿌리의 비대성이 중형이며 뿌리의 길이는 중장형을 보이며 숙성 중만생의 특성을 보이는 당근이다. 2008년도 CT-ATR615 OP 계통의 형매교배를 실시하여 2009년도 CT-ATR615 OP 394 개체군을 재배하였으며 그 중 단모종자 표현형을 보인 394-6개체를 자가수분 하여 2010년도 CT-ATR615 OP 666 개체군을 재배하였다. 생성된 종자의 종자모 길이 측정은 Video Microscope System (Alphasystec Co., Korea)을 이용하였으며 종자모 길이 측정시 종자당 5개의 모를 5종자에 걸쳐 측정하였다. 본 연구에

이용된 각 개체들의 표현형과 종자 표현형 및 종모 길이는 결과 및 고찰 부분에서 자세히 설명하였다.

cDNA library 작성

단모종자 표현형 개체와 유모종자 표현형 개체를 이용하여 cDNA library를 작성하였다. 단모종자 표현형을 보인 CT-ATR615 OP 666-13개체와 유모종자 표현형을 보인 CT-ATR615 OP-CK1-9 개체를 각각 자가수분 시킨 후 자방이 팽창되기 시작할 시기에 종자모가 생성되기 시작하므로 이 시기에 샘플을 채취하여 total RNA를 분리하여 cDNA library 작성하였다. 작성 방법은 결과 및 고찰 부분에서 자세히 설명하였다

EST sequence 분석 및 SNP, SSR site 확인

단모종자 표현형을 보인 CT-ATR615 OP 666-13개체와 유모종자 표현형을 보인 CT-ATR615 OP-CK1-9 개체의 cDNA library의 EST sequencing은 ABI 3730(Applied Biosystems Co., USA)을 이용하여 Macrogen Inc.(Korea)에 의뢰하여 실시하였다. EST sequencing 결과를 assembly 하여 contig로 재조합 하였으며 contig와 singleton을 각각 NCBI의 Blast Program(V.2.2.10)과 데이터 베이스를 사용하여 BlastX를 수행하였다. BlastX 결과를 토대로 발현양상의 비교분석을 위해 각각의 EST sequence를 FunCat(Functional Catalogue, http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/search_main_frame.html)를 이용해 기능별 category로 구분하였다(Mewes 등, 2003; Ruepp 등, 2004).

분석된 EST sequence 상의 SNP site를 확인하기 위해 단모종자 표현형을 보인 CT-ATR615 OP 666-13개체와 유모종자 표현형을 보인 CT-ATR615 OP-CK1-9 개체의 contig와 singleton EST sequence를 Sequencher ver. 4.10.1 program을 이용해 assembly하여 두 개체간 EST sequence의 SNP site를 확인하였다(Ayeh, 2008; Kantety 등, 2002). 이와 같이 분석된 SNP site를 DNASIS MAX program을 이용해 primer를 작성하였다. 또한 각각의 개체 EST sequence상의 SSR site확인을 위해 WebSat site(<http://wsmartins.net/websat>)를 이용하였다. 검색 조건으로는 mono, di, tri, tetra, penta, hexa motif와 5repeats를 minimum으로 설정하여 분석하였다(Varshney 등, 2005; Yu 등, 2004).

결과 및 고찰

개체 육성 및 종모 표현형과 길이

2008년도에 CT-ATR615 OP 계통을 형매교배하여 차년

도에 CT-ATR615 OP 394 개체군을 확보하였으며 그 중 단모종자 표현형을 보인 394-6개체를 자가수분 하여 2010년도에 CT-ATR615 OP 666 개체군을 선발하였다. 이 개체들을 다시 자가수분하여 종자모 표현형 측정 결과를 바탕으로 cDNA library 작성에 사용된 개체는 CT-ATR615 OP 666 개체군중 단모종자 표현형을 보인 CT-ATR615 OP 666-13 단모형 개체와 2008년도 CT-ATR615 OP 계통을 형매교배하여 재배된 2009년도 CT-ATR615 OP-CK1 유모종자 표현

형 개체를 다시 자가수분을 실시하여 2010년도 재배된 유모종자 표현형 개체인 CT-ATR615 OP-CK1-9 개체를 control로서 사용하였다. 각각의 종자모 길이 측정 결과는 CT-ATR615 OP 666-13개체가 CT-ATR615 OP-CK1-9개체의 종자모 길이 보다 약 3.05배 짧은 것으로 조사 되었다(Fig. 1).

cDNA library 작성

단모종자 표현형 개체와 유모종자 표현형 개체를 이용하

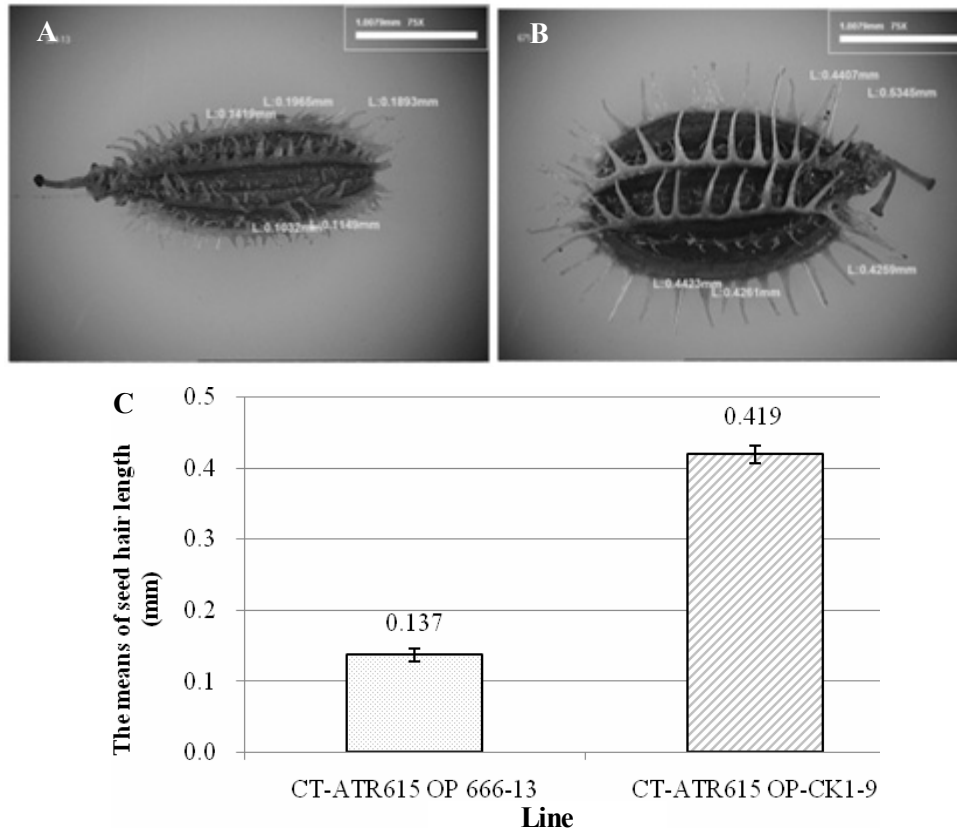


Fig. 1. Seed-hair phenotype and seed-hair length. (A) short-hair seed line CT-ATR615 OP 666-13; (B) hairy seed CT-ATR615 OP-CK1-9 line; (C) the mean and standard error of CT-ATR615 OP 666-13 line and CT-ATR615 OP-CK1-9 line seed-hair length.

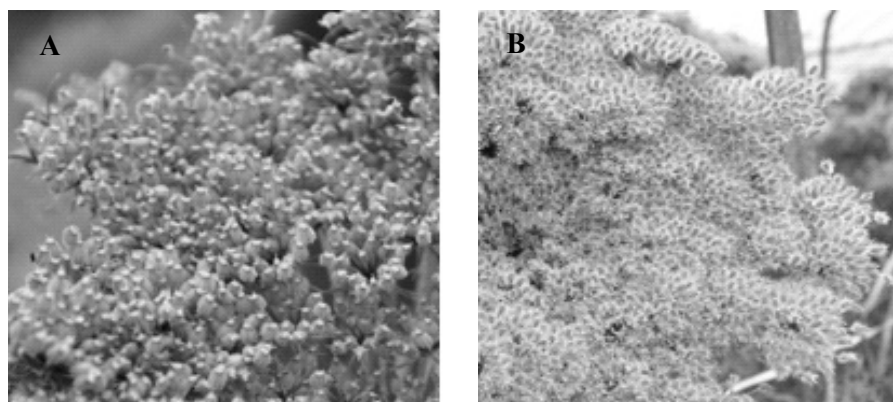


Fig. 2. Individuals used for cDNA library construction at the early stage of seed maturation. (A) short-hair seed line CT-ATR615 OP 666-13; (B) hairy seed line CT-ATR615 OP-CK1-9.

여 cDNA library를 작성하였다. 단모종자 표현형을 보인 CT-ATR615 OP 666-13개체와 유모종자 표현형을 보인 CT-ATR615 OP-CK1-9 개체를 각각 자가수분 시킨 후 자방이 팽창되기 시작할 시기에 종자모가 생성되기 시작하므로 이 시기에 샘플을 채취하여 total RNA를 분리하고(Fig. 2) 전기영동을 실시하여 분리 상태와 농도를 확인하였다(Table 1, Salzman 등, 1999). 그 뒤 mRNA 분리 및 농도를 확인한 후 Oligo(dT) linker-primer와 reverse transcriptase를 통하여 first-strand cDNA를 합성하였다. 이후 DNA polymerase I을 이용해 second-strand를 합성하여 adaptor를 ligation하였다. Gel filtration을 통하여 size fraction 한 다음 pBluescript[®] SK- vector를 이용하여 excised phagemid type의 cDNA library를 SOLR strain을 통해 colony-forming units titer 0.2×10^7 cfu(total 20ml)의 값에서 작성하였다(Macrogen Inc., Korea) (Wang 등, 2006). 한편 insertion check는 EcoRI과 XhoI 제한효소를 이용하였다(Fig. 3).

EST sequence 분석 및 FunCat 분석 결과

단모종자 표현형을 보인 당근 개체와 유모종자 표현형을 보인 당근 개체의 종자 생성 초기 단계의 발현양상 비교 분석을 위해 cDNA library를 작성하였다. 작성된 cDNA library의 EST sequencing 후 CT-ATR615 OP 666-13개체와 control CT-ATR615 OP-CK1-9개체에서 각각 576개의 sequence data와 총 403,168 base pair 및 384,434 base pair의 결과를 확인하였다. CT-ATR615 OP 666-13개체는 sequence cleaning process과정을 거친 후 assembly하여 48개의 contig와 363개의 singleton data를 확보하였다. 한편 CT-ATR615 OP-CK1-9개체는 50개의 contig와 354개의 singleton data를 확보하였다(Table 2).

CT-ATR615 OP 666-13와 CT-ATR615 OP-CK1-9 개체로부터 확보된 EST sequence의 개체별 BlastX 분석결과 각각 54%, 53%의 sequence에서 유의적인 발현정보를 획득하였다(Fig. 4). 이들 발현정보를 FunCat을 이용하여 각각의 기

Table 1. Total RNA and mRNA quantity results of short-hair seed line CT-ATR615 OP 666-13 and control hairy seed line CT-ATR615 OP-CK1-9.

Phenotype	Line No.	RNA	Conc. (ng· μ L ⁻¹)	A260/A280	Total vol. (μ L)	Total quantity
Short-hair seed	CT-ATR615 OP 666-13	Total RNA	549.4	2.04	550	300 μ g
		mRNA	95.5	1.86	35	3.3 μ g
Hairy seed	CT-ATR615 OP-CK1-9	Total RNA	930.5	2.01	850	800 μ g
		mRNA	128.1	1.96	35	4.4 μ g

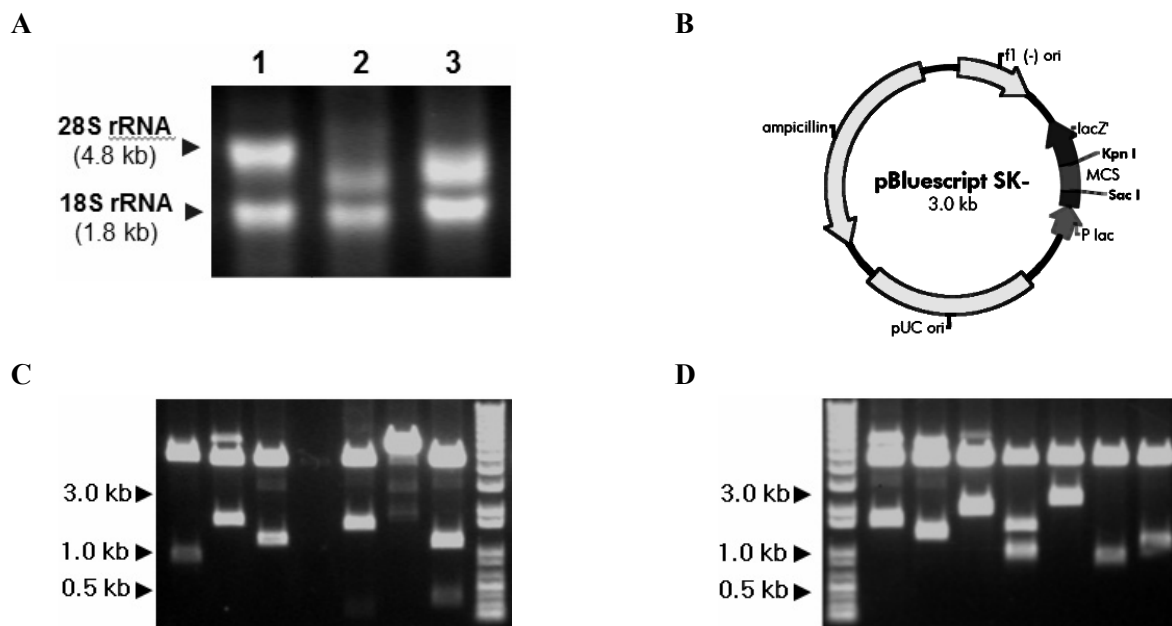


Fig. 3. Agarose gel loading results and vector map used for cDNA library construction. (A) total RNA(1:human total RNA, 2: short-hair seed line CT-ATR615 OP 666-13, 3: hairy seed line CT-ATR615 OP-CK1-9); (B) pBluescript[®] SK- vector map; (C) short-hair seed line CT-ATR615 OP 666-13 cDNA library plasmid DNA digested with EcoRI and XhoI which isolated from randomly picked colonies; (D) hairy seed line CT-ATR615 OP-CK1-9 cDNA library plasmid DNA digested with EcoRI and XhoI which isolated from randomly picked colonies.

Table 2. EST sequencing, cleaning process and assembly results of short-hair seed line CT-ATR615 OP 666-13 and hairy seed line CT-ATR615 OP-CK1-9.

Classification of EST sequencing step	CT-ATR615 OP 666-13		CT-ATR615 OP-CK1-9	
	No. of reads	Total bp	No. of reads	Total bp
Total EST sequences	576	403,168	576	384,434
After 3730 sequencing	570		549	
After seq cleaning process ²	554		527	
Trashed reads	16		22	
Short of trashed reads	13		22	
Lowqual of trashed	0		0	
Dust of trashed reads	0		0	
ShortQ of trashed reads	3		0	
After clustering contigs	48	44,281	50	43,198
After clustering singletons	363	253,610	351	257,696

²Minimum length: 200 bp.

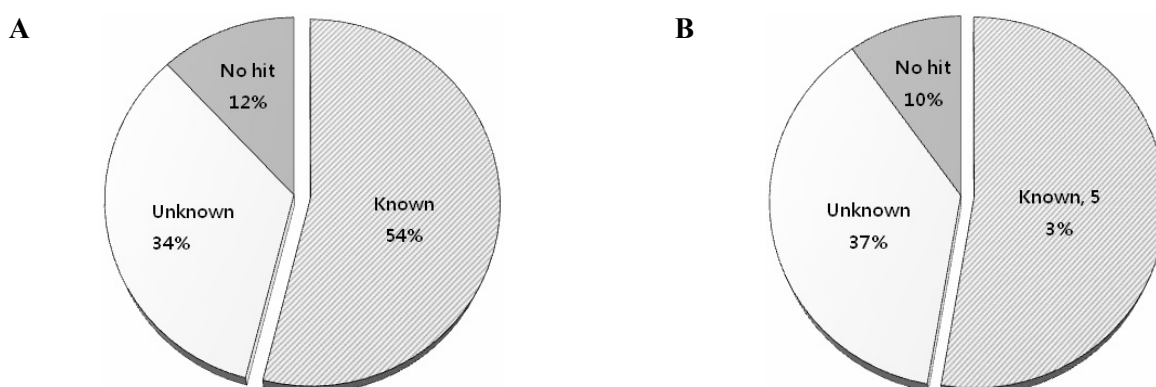


Fig. 4. Results of (A) short-hair seed line CT-ATR615 OP 666-13 and (B) hairy seed line CT-ATR615 OP-CK1-9 EST sequences using BlastX. (known: E-value $\leq 1.00E-5$, unknown: match to unknown or unclassified function gene, no hit: E-value $> 1.00E-5$)

Table 3. BlastX FunCat results of short-hair seed line CT-ATR615 OP 666-13 and hairy seed line CT-ATR615 OP-CK1-9 EST sequences.

No.	Category	EST sequence number	
		CT-ATR615 OP 666-13	CT-ATR615 OP-CK1-9
1	Metabolism	92	65
2	Energy	13	13
10	Cell cycle and DNA processing	2	1
11	Transcription	11	9
12	Protein synthesis	13	18
14	Protein fate (folding, modification, destination)	22	18
16	Protein with binding function or cofactor requirement (structural or catalytic)	109	119
18	Regulation of metabolism and protein function	15	17
20	Cellular transport, transport facilities and transport routes	18	14
30	Cellular communication / signal transduction mechanism	4	7
32	Cell rescue, defense and virulence	7	8
34	Interaction with the environment		1
36	Systemic interaction with the environment	1	1
40	Cell fate		1
41	Development (systemic)	1	1
42	Biogenesis of cellular components	1	
70	Subcellular localization	46	55
	Total	355	348

능별 category로 분류하였다.

분류한 결과 CT-ATR615 OP 666-13개체의 경우 metabolism 과 protein with binding function 또는 cofactor requirement (structural or catalytic), subcellular localization의 기능 category에 관련된 발현이 70%를 차지하였으며, CT-ATR615 OP-CK1-9개체는 69%를 차지하는 것으로 나타났다. 이는 종자가 생성되는 초기단계에서 시료를 채취하여 이와 같은 결과가 나왔다고 생각된다. 또한 그 뒤를 이어 두 개체 모두 protein

fate(folding, modification, destination), cellular transport, transport facilities and transport routes, regulation of metabolism과 protein function, 그리고 energy category에서 상대적으로 높은 발현량을 보였다(Table 3, Fig. 5). 이와 더불어 세부적인 기능적 category별 분류 또한 수행하여 분석하였다(Table 4).

기능별 category로 분류된 EST sequence정보를 바탕으로 단모종자 표현형 CT-ATR615 OP 666-13개체와 유모종자

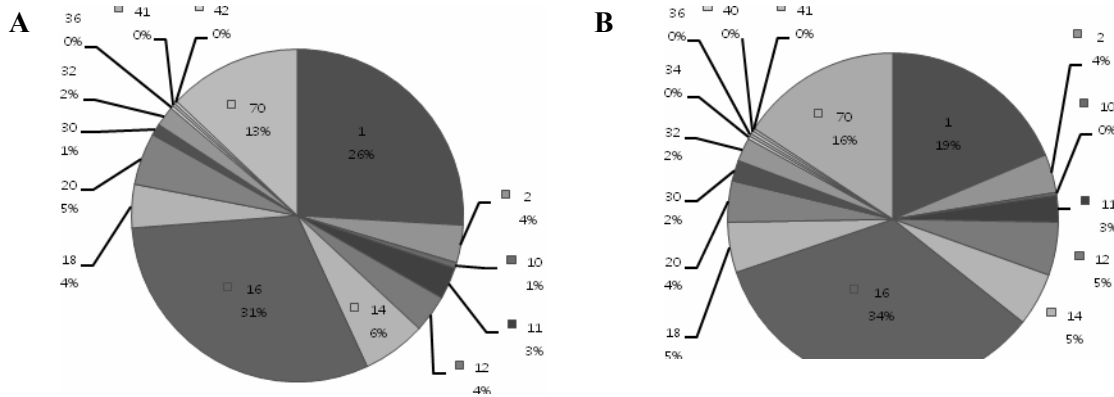


Fig. 5. BlastX FunCat results of (A) short-hair seed line CT-ATR615 OP 666-13 and (B) hairy seed line CT-ATR615 OP-CK1-9 EST sequences [1:Metabolism, 2:Energy, 10:Cell cycle and DNA processing, 11:Transcription, 12:Protein synthesis, 14:Protein fate (folding, modification, destination), 16:Protein with binding function or Cofactor requirement (structural or catalytic), 18:Regulation of metabolism and Protein function, 20:Cellular transport, transport facilities and transport routes, 30:Cellular communication / signal transduction mechanism, 32:Cell rescue, defense and virulence, 36:Systemic interaction with the environment, 41: Development(systemic), 42:Biogenesis of cellular components 70:Subcellular localization].

Table 4. BlastX FunCat results of short-hair seed line CT-ATR615 OP 666-13 and hairy seed line CT-ATR615 OP-CK1-9 EST sequences depending on the more detailed categories.

No.	Category	Count	
		CT-ATR615 OP 666-13	CT-ATR615 OP-CK1-9
	Metabolism		
1	Metabolism	32	31
1.01	Amino acid metabolism	9	6
1.02	Nitrogen, sulfur and selenium metabolism	3	1
1.05	C-compound and carbohydrate metabolism	40	23
1.06	Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism	11	7
1.2	Secondary metabolism	1	2
	Energy		
2.01	Glycolysis and gluconeogenesis	7	6
2.04	Glyoxylate cycle	1	
2.07	Pentose-phosphate pathway	3	1
2.1	Tricarboxylic-acid pathway (citratecycle, krebscycle, TCA cycle)	2	4
2.3	Photosynthesis	3	4
	Cell cycle and DNA processing		
10	Cell cycle and DNA processing		1
10.01	DNA processing	2	
10.03	Cell cycle		1

Table 4. BlastX FunCat results of short-hair seed line CT-ATR615 OP 666-13 and hairy seed line CT-ATR615 OP-CK1-9 EST sequences depending on the more detailed categories. (Continued)

No.	Category	Count	
		CT-ATR615 OP 666-13	CT-ATR615 OP-CK1-9
	Transcription		
11	Transcription	5	1
11.02	RNA synthesis	10	7
11.04	RNA processing	1	2
	Protein synthesis		
12	Protein synthesis	10	14
12.04	Translation	3	4
12.1	Aminoacyl-trna-Synthetases	2	1
	Protein fate (folding, modification, destination)		
14	Protein fate (folding, modification, destination)	10	12
14.01	Protein folding and stabilization	6	4
14.04	Protein targeting, sorting and translocation	2	2
14.07	Protein modification	14	12
	Protein with binding function or cofactor requirement (Structural or catalytic)		
16.01	Protein binding	12	11
16.03	Nucleic acid binding	29	32
16.06	Motor protein binding	1	
16.07	Structural protein binding	2	1
16.09	Lipid binding	4	4
16.11	Amino acid/amino acid derivatives binding	1	
16.13	C-compound binding	5	3
16.17	Metal binding	34	41
16.19	Nucleotide/nucleoside/nucleobase binding	36	34
16.21	Complex cofactor/cosubstrate/vitamin binding	13	23
	Regulation of metabolism and protein function		
18.01	Regulation by	14	17
18.02	Regulation of protein activity	1	
	Cellular transport, transport facilities and transport routes		
20	Cellular transport, transport facilities and transport routes	12	12
20.01	Transported compounds (substrates)	10	7
20.03	Transport facilities	2	
20.09	Transport routes	3	1
	Cellular communication / signal transduction mechanism		
30	Cellular communication/ signal transduction mechanism	1	2
30.01	Cellular signaling	4	6
30.05	Transmembrane signal transduction	1	1
	Cell rescue, defense and virulence		
32.01	Stress response	6	8
32.07	Detoxification	2	3
	Interaction with the environment		
34.11	Cellular sensing and response to external stimulus		1
	Systemic interaction with the environment		
36.2	Plant/fungal specific systemic sensing and response	1	1
	Cell fate		
40.1	Cell death		1

Table 4. BlastX FunCat results of short-hair seed line CT-ATR615 OP 666-13 and hairy seed line CT-ATR615 OP-CK1-9 EST sequences depending on the more detailed categories. (Continued)

No.	Category	Count	
		CT-ATR615 OP 666-13	CT-ATR615 OP-CK1-9
	Development (systemic)		
41	Development (systemic)	1	1
	Biogenesis of cellular components		
42.27	Extracellular/ secretion proteins	1	
	Subcellular localization		
70.01	Cell wall	1	
70.03	Cytoplasm	13	16
70.04	Cytoskeleton	1	
70.07	Endoplasmic reticulum		2
70.08	Golgi		3
70.1	Nucleus	13	20
70.16	Mitochondrion	5	2
70.19	Peroxisome		1
70.25	Vacuole or lysosome	2	
70.26	Plastid	11	13
Total		419	413

Table 5. Categories showing more than 50% difference of expression level between short-hair seed line CT-ATR615 OP 666-13 and hairy seed line CT-ATR615 OP-CK1-9.

CT-ATR615 OP 666-13 > CT-ATR615 OP-CK1-9	CT-ATR615 OP 666-13 < CT-ATR615 OP-CK1-9
Amino acid metabolism	Tricarboxylic-acid pathway (citratecycle, krebscycle, TCAcycle)
Nitrogen, sulfur and selenium metabolism	
C-compound and carbohydrate metabolism	Cell cycle
Lipid, fatty acid and isoprenoid metabolism	RNA processing
Glyoxylate cycle	Translation
Pentose-phosphate pathway	Aminoacyl-tRNA-synthetases
Protein folding and stabilization	Complex cofactor/cosubstrate/vitamin binding
Protein binding	Cellular signaling
Regulation of protein activity	Cell death
Transport facilities	Cytoplasm
Transport routes	Endoplasmic reticulum
Extracellular / secretion proteins	
Cell wall	
Mitochondrion	

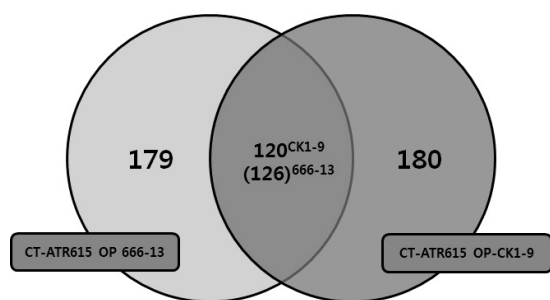


Fig. 6. Comparison of EST sequence results using BlastX between short-hair seed line CT-ATR615 OP 666-13 and hairy seed line CT-ATR615 OP-CK1-9.

표현형 CT-ATR615 OP-CK1-9개체의 EST 발현양상을 비교하였다. 두 개체간 동일한 BlastX결과를 보인 CT-ATR615 OP-CK1-9 개체의 120 EST sequence, CT-ATR615 OP 666-13개체의 126 EST sequence를 제외한 뒤 각각의 개체에서만 발현된 179개(CT-ATR615 OP-CK1-9)와 18개(CT-ATR615 OP 666-13)의 EST sequence 발현양상을 FunCat 기능적 category에 따라 비교하였다(Fig. 6, 7).

각각의 category에서 단모종자 표현형 CT-ATR615 OP 666-13개체의 발현이 유모종자 표현형 CT-ATR615 OP-CK1-

9개체의 발현보다 50%이상 높은 category가 14, CT-ATR615 OP-CK1-9개체의 발현이 CT-ATR615 OP 666-13개체의 발현보다 50%이상 높은 category가 10개인 것을 확인하였다 (Table 5). 종자모 형성에 가장 영향을 줄 수 있는 metabolism category에서 차이를 가장 많이 보였으며 세부적인 category

를 살펴보았을 때 단모종자 표현형 개체가 오히려 높은 발현량을 보이는 것을 확인하였다. 또한 protein folding and stabilization, subcellular localization category의 발현차이가 종자모 형성에 가장 영향이 많이 끼칠 것으로 생각된다. 이러한 50%이상의 발현차이가 나는 functional category에

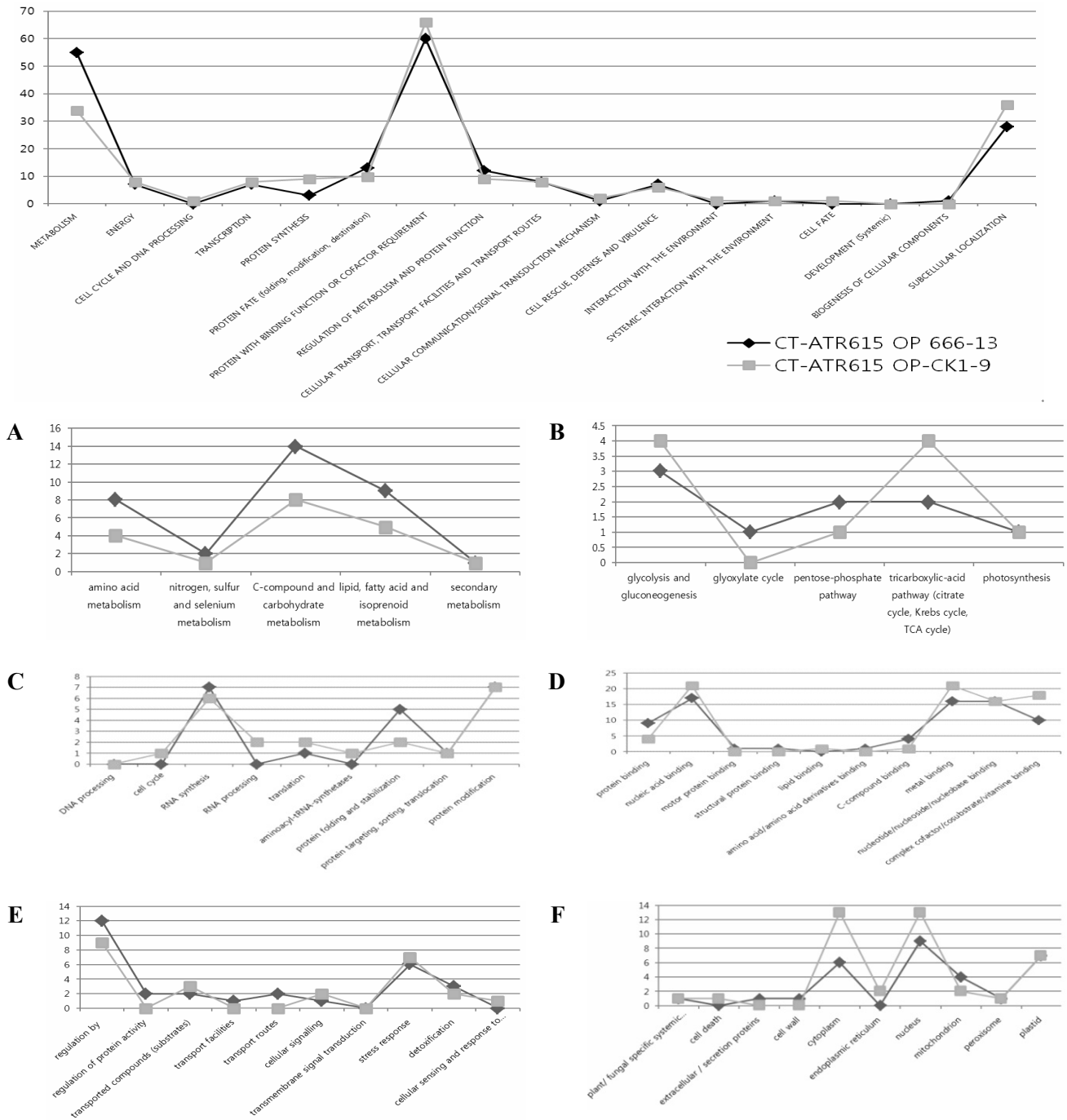


Fig. 7. Comparison of BlastX FunCat results of short-hair seed line CT-ATR615 OP 666-13 and hairy seed line CT-ATR615 OP-CK1-9 EST sequences depending on FunCat categories except same results of BlastX between 2 individuals. (A) metabolism; (B) energy; (C) cell cycle and DNA processing, transcription, protein synthesis, protein fate; (D) protein with binding function or cofactor requirement; (E) regulation of metabolism and protein function, cellular transport, cellular communication & signal transduction, cell rescue, defense and virulence, interaction with the environment; (F) systemic interaction with the environment, cell fate, biogenesis of cellular components, subcellular localization.

해당하는 단백질들이 당근 종자형성시기에 조직특이적으로 발현율을 달리함으로 인해 종자모 형성에 깊이 관여 할 것으로 생각된다. 이를 통해 해당 category에 속하는 단백질 중 이러한 종자모 형성 형질에 영향을 미칠 수 있다고 연구된 결과들과 비교하여 후보군을 선별하면 형질발현의 기작 연구에 이용할 수 있으리라 기대된다(Ji 등, 2003; Park 등, 2006; Wang 등, 2004).

SNP 및 SSR site 확인 및 primer design

단모종자 표현형을 가진 CT-ATR615 OP 666-13개체와 유모종자 표현형을 가진 CT-ATR615 OP-CK1-9개체의 EST sequence assembly 결과를 바탕으로 동일한 염기서열이 일치되는 두 개체의 EST sequence간 SNP site가 존재하는 두 부분을 분석하였다. CT-ATR615 OP 666-13개체의 CL4Contig1 EST sequence와 CT-ATR615 OP-CK1-9개체의 CL3Contig1 EST sequence상에서 T/C SNP site를 확인하였으며, 이를

바탕으로 3'말단의 염기서열이 일치하지 않을 시 PCR 결과 band가 나타나지 않는 특성을 이용하는 allele specific PCR을 수행하기 위해 primer를 design하였다(Myakishev 등, 2001; Ye 등, 2001). 두 개체간 EST sequence에 하나의 염기서열 차이를 보이는 SNP site에 일치하는 각각의 forward primer를 작성하였으며 두 EST sequence간 동일한 reverse primer를 작성하였다. 또한 CT-ATR615 OP 666-13개체의 CL12-Contig1 EST sequence와 CT-ATR615 OP-CK1-9개체의 CL10Contig1 EST sequence상에서 T/C SNP site를 확인하였으며, 동일하게 primer를 design하였다. 두 개체간 EST sequence에 하나의 염기서열 차이를 보이는 SNP site에 일치하는 각각의 reverse primer를 작성하였으며 두 EST sequence간 동일한 forward primer를 작성하였다(Fig. 8).

또한 각각의 개체 EST sequence를 바탕으로 SSR site를 분석한 결과 CT-ATR615 OP 666-13개체 EST sequence에서 50건을 확인하였으며 전체 EST sequence의 8.68%의 비율로

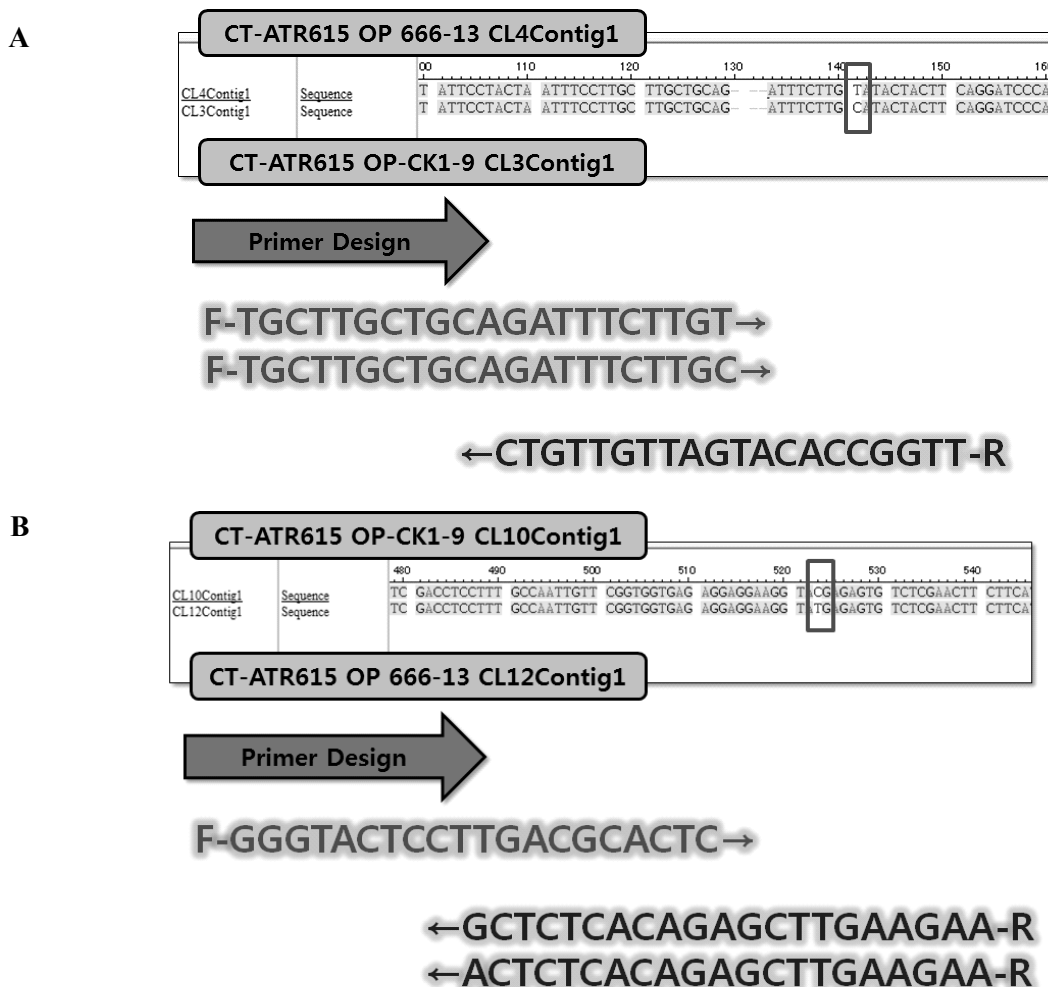


Fig. 8. SNP site between short-hair seed line CT-ATR615 OP 666-13 and hairy seed line CT-ATR615 OP-CK1-9 and primer design for allele specific PCR. (A) SNP site between short-hair seed line CT-ATR615 OP 666-13 CL4Contig1 and hairy seed line CT-ATR615 OP-CK1-9 CL3Contig1; (B) SNP site between hairy seed line CT-ATR615 OP-CK1-9 CL10Contig1 and short-hair seed line CT-ATR615 OP 666-13 CL12Contig1.

Table 6. Results of SSR search using EST sequences of short-hair seed line CT-ATR615 OP 666-13.

EST sequences	(Motif) repeats	EST sequences	(Motif) repeats
666-13-01-A05-R	(TA) ₇	666-13-04-G12-R	(TAT) ₅
666-13-01-C11-8	(CGG) ₆	666-13-05-A04-R	(CA) ₅
666-13-02-A09-R	(GA) ₁₀	666-13-05-A08-R	(CA) ₅
666-13-02-F08-R	(GA) ₆	666-13-05-A08-R	(GC) ₅
666-13-03-A01-R	(TG) ₅	666-13-05-B01-R	(TA) ₅
666-13-03-A07-R	(GA) ₅	666-13-05-C12-R	(TGA) ₅
666-13-03-A07-R	(AG) ₆	666-13-05-D08-R	(TGA) ₅
666-13-03-B06-R	(CA) ₅	666-13-05-E03-R	(TA) ₅
666-13-03-C01-R	(AT) ₅	666-13-05-F04-R	(TA) ₅
666-13-03-C07-R	(AT) ₅	666-13-05-G02-R	(AC) ₅
666-13-03-D10-R	(GC) ₅	666-13-05-H04-R	(AC) ₅
666-13-03-G04-R	(AT) ₅	666-13-06-A03-R	(TC) ₁₆
666-13-03-G06-R	(CAG) ₅	666-13-06-A08-R	(CAG) ₅
666-13-03-H05-R	(TA) ₅	666-13-06-B12-R	(TA) ₅
666-13-03-H07-R	(CAAC) ₆	666-13-06-C07-R	(GA) ₈
666-13-03-H10-R	(AAG) ₅	666-13-06-C07-R	(GA) ₅
666-13-04-A02-R	(GA) ₅	666-13-06-C11-R	(ATC) ₅
666-13-04-A11-R	(TA) ₅	666-13-06-D12-R	(TC) ₇
666-13-04-B11-R	(TA) ₅	666-13-06-E04-R	(TA) ₅
666-13-04-D01-R	(GCACAT) ₅	666-13-06-E10-R	(TC) ₆
666-13-04-D06-R	(TA) ₅	666-13-06-F06-R	(AG) ₅₆
666-13-04-D10-R	(CT) ₈	666-13-06-F06-R	(GA) ₁₅
666-13-04-D10-R	(CT) ₇	666-13-06-G08-R	(TC) ₅
666-13-04-E07-R	(TA) ₅	666-13-06-H07-R	(CA) ₅
666-13-04-F05-R	(TA) ₅	666-13-06-H09-R	(TA) ₅

존재하였으며 CT-ATR OP-CK1-9개체에선 EST sequence에서 59건을 확인하였으며 전체 EST sequence의 10.24%의 비율로 존재한다. 두 개체 모두 di-repeat motif가 대부분의 SSR site을 구성하고 있었다(Table 6, 7, 8). SSR site를 이용한 marker개발을 위해 200-300bp 크기의 primer를 작성하였다(Table 9). 이를 종자모 형성에 관련된 분자마커 개발에 이용하는 것은 물론 당근의 계통 분류 및 여러 형질 관련 분자마커 연구에 활용할 수 있으리라 판단된다.

초 록

당근(*Daucus carota* L. var. *sativa*)은 세계적으로 널리 이용되는 작물 중 하나이다. 또한 Vitamin A의 전구체인 β-carotene의 함량이 높아 영양적으로도 주요한 작물이다. 하지만 종자 표피세포에서 생성되는 종자모는 종자발아시 흡수를 저해하며 발아를 억제하여 기계적인 제모작업을 거쳐 상품화되고 있다. 이러한 과정에서 발생하는 여러가지 단점을 보완하기 위해 무모종자 당근 품종의 육종이 필요하다.

따라서 본 연구는 단모종자 표현형 CT-ATR615 OP 666-13 개체와 control 유모종자 표현형 CR-ATR615 OP-CK1-9개체의 종자 cDNA library를 작성하여 EST sequence비교를 통해 표현형의 차이에 따라 종자모 형성에 관련하여 발현양상을 비교 분석하였다. BlastX 결과를 바탕으로 개체간 동일한 결과를 제외한 EST sequence를 각각 FunCat 기능별 category로 분류하였다. Metabolism category에서 단모종자 표현형 개체가 오히려 유모종자 표현형 개체보다 높은 발현량을 보이는 것을 확인하였으며, 단모 및 장모종자 개체간의 protein folding and stabilization, subcellular localization category에서 나타난 뚜렷한 발현량 차이는 종자모 형성에 많은 영향을 미치는 것으로 예측되었다. 또한 분석된 EST sequence를 바탕으로 개체별로 각각 50개 및 59개의 SSR site를 확인하였으며, 각각 2개씩의 SNP site를 확인하였다. 이들 SSR 및 SNP site의 primer 작성하여 마커로 개발하였으며, 이를 종자모 형성에 관련된 분자마커 개발에 이용하는 것은 물론 당근의 계통 분류 및 여러가지 형질 관련 분자마커 연구에 활용 가능할 것으로 기대된다.

Table 7. Results of SSR search using EST sequences of hairy seed line CT-ATR615 OP-CK1-9.

EST sequences	(Motif) repeats	EST sequences	(Motif) repeats
671-9-01-A02-R	(TC) ₁₀	671-9-03-F03-R	(GA) ₄₅
671-9-01-B09-R	(GAT) ₅	671-9-03-F03-R	(GA) ₆
671-9-01-C06-R	(TC) ₁₀	671-9-03-F03-R	(GA) ₇
671-9-01-C09-R	(CT) ₆	671-9-03-G06-R	(TA) ₅
671-9-01-C09-R	(CT) ₅	671-9-03-H12-R	(CA) ₅
671-9-01-C09-R	(TC) ₁₇	671-9-04-A08-R	(AC) ₅
671-9-01-D08-R	(GA) ₇	671-9-04-C09-R	(TA) ₅
671-9-01-E02-R	(GA) ₇	671-9-04-D02-R	(CT) ₈
671-9-01-E07-R	(GAA) ₆	671-9-04-E12-R	(TC) ₅
671-9-01-H02-R	(TC) ₈	671-9-04-F08-R	(TA) ₅
671-9-02-A01-R	(AT) ₅	671-9-04-G05-R	(CT) ₅
671-9-02-B03-R	(GA) ₈	671-9-04-G11-R	(TA) ₅
671-9-02-C02-R	(AT) ₅	671-9-05-C11-R	(CT) ₅
671-9-02-D03-R	(TC) ₇	671-9-05-E04-R	(AT) ₅
671-9-02-D07-R	(AAG) ₆	671-9-05-E04-R	(AT) ₅
671-9-02-D11-R	(TA) ₅	671-9-05-E12-R	(GTG) ₅
671-9-02-F05-R	(AAG) ₆	671-9-05-F02-R	(TA) ₅
671-9-02-G04-R	(TA) ₅	671-9-05-F05-R	(AC) ₅
671-9-02-G09-R	(CA) ₅	671-9-05-G10-R	(TC) ₉
671-9-02-H05-R	(TC) ₈	671-9-06-A04-R	(GA) ₆
671-9-03-A05-R	(TA) ₅	671-9-06-E08-R	(GCG) ₆
671-9-03-A06-R	(AT) ₅	671-9-06-E10-R	(CT) ₇
671-9-03-B03-R	(CA) ₆	671-9-06-E10-R	(TC) ₅
671-9-03-B03-R	(TC) ₅	671-9-06-F12-R	(CA) ₅
671-9-03-B05-R	(TA) ₅	671-9-06-G09-R	(GA) ₈
671-9-03-B05-R	(AT) ₆	671-9-06-G09-R	(TA) ₅
671-9-03-B05-R	(TA) ₅	671-9-06-H06-R	(CT) ₈
671-9-03-B09-R	(CCG) ₅	671-9-06-H06-R	(CT) ₇
671-9-03-E08-R	(CT) ₅	671-9-06-H07-R	(CT) ₇
671-9-03-E08-R	(CT) ₅		

Table 8. Analysis of EST-SSRs searched from carrot seed EST.

Line	No. of ESTs	No. of EST-SSRs	% of ESTs with SSRs	No. of repeats			
				di-	tri-	tetra-	hexa-
CT-ATR615 OP 666-13	576	50	8.68	40	8	1	1
CT-ATR615 OP-CK1-9	576	59	10.24	52	7	-	-

추가 주요어 : BlastX, cDNA 라이브러리, *Daucus carota*, FunCat

인용문헌

Ayeh, K.O. 2008. Expressed sequence tags (ESTs) and Single nucleotide polymorphisms (SNPs): Emerging molecular marker tools for improving agronomic traits in plant biotechnology. African J. Biotechnol. 7:331-341.

Bajaj, K.L., G. Gurdeep, and B.S. Shkhiuja. 1980. Chemical composition and some plant characteristics in relation to quality of some promising cultivars of carrot (*Daucus carota* L.). Qual Plant Plant Foods Hum. Nutr. 30:97-107.

Ji, S.J., Y.C. Lu, J.X. Feng, G. Wei, J. Li, Y.H. Shi, Q. Fu, D. Liu, J.C. Luo, and Y.X. Zhu. 2003. Isolation and analyses of genes preferentially expressed during early cotton fiber development by subtractive PCR and cDNA array. Nucleic Acids Res. 31:2534-2543.

Kantety, R.V., M. La Rota, D.E. Matthews, and M.E. Sorrells.

Table 9. SSR primer design using confirmed SSR sites from EST sequences of short-hair seed line CT-ATR615 OP 666-13 and hairy seed line CT-ATR615 OP-CK1-9.

CT-ATR615 OP 666-13				
EST sequences	Motif	Forward primer	Reverse primer	Product length
666-13-01-C11-R	(CGG) ₆	GTCCAGCTTCTCGCAGACTT	TCTCAGCTGGCAGGTCATTA	269
666-13-03-G06-R	(CAG) ₅	TCTGCACTCTTCTCCCAACA	TCTCCATTATAGGCGAATGG	286
666-13-03-H07-R	(CAAC) ₆	GGCCGCTCTAGAACTAGTGGA	ATTTGCTTTGCAGGTTTCAGC	338
666-13-03-H10-R	(AAG) ₅	GCCCTTTGCACAAATAAACA	TCAGCTCTGGAATCAAATCG	276
666-13-04-D01-R	(GCACAT) ₅	GCACGAGGCTAATGTGTAGG	CTCCGCATAAAAACGCAGAAT	361
666-13-04-F07-R	(TAT) ₅	CTCTCCAAGCTCCTCCGAAT	GCAGAAGACAGACTCGAGCA	310
666-13-04-G12-R	(TAT) ₅	CGGCACGAGGAGAGAACTA	TGGGTCTCAAACAGAGAATGG	267
666-13-05-A04-R	(ATCT) ₄	GAACGACGGAAAATGCAAGT	ACAGGCTCACTGGACTCTGG	284
666-13-06-A03-R	(TC) ₁₆	GGCCGCTCTAGAACTAGTGGA	TCAAACCGTGCAACTGACAT	265
666-13-06-C07-R	(GA) ₈	GCACGAGGGGTAGTTGAAAA	TTGGCCCTCAGATAAAGCAG	289
666-13-06-C11-R	(ATC) ₅	GGGCAACATTTGTTTTGCT	TGAGGTTCCCATATTTTTCG	288
CT-ATR615 OP-CK1-9				
EST sequences	Motif	Forward primer	Reverse primer	Product length
671-9-01-A02-R	(TC) ₁₀	AGGCCTTCCCATTGCTTT	CCACTTCGATCAAACGATGA	303
671-9-01-C06-R	(TC) ₁₀	TGGAATATTTGGGTGACAA	CGCTGCGTCAACGTATCAAT	279
671-9-01-E07-R	(GAA) ₆	CCCATTTCGATCCTTCAAAAA	TTCCTTCCCATGGTAACTGC	275
671-9-02-D07-R	(AAG) ₆	CACCCAGATTATTCACCGAAA	TTGGTTTCGAGAATTGAGAAAA	274
671-9-02-F05-R	(AAG) ₆	CATCGACAAGGTCAAGGACA	CAGGCCTAAACAAGGGGAGA	256
671-9-02-H05-R	(TC) ₈	GCCGCTCTAGAACTAGTGGA	TCGTAGGAATCGAGGAGTCG	307
671-9-03-F03-R	(GA) ₄₅	GCCGCTCTAGAACTAGTGGA	CCTGGTTACAACGTTAGTTCATTG	253
671-9-04-D02-R	(CT) ₈	ATTCGGCACGAGGTCCTT	CATGAGGGAGGGGTGAAAG	264
671-9-06-E08-R	(GCG) ₆	AGCAAACCTACCCCAATCAA	CAGCCCTAGGGTCAGCAC	250
671-9-06-H06-R	(CT) ₈	GAGGCTCTCCCAAACAACT	AGGCCTCATATAGGGCGAGT	271

2002. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Mol. Biol.* 48:501-510.
- Li, X.R., C.Y. Tu, and I.S. Kim. 1999. Effect of presowing seed treatments on germination and seedling emergence of carrot. *Int. of Agr. Sci., Kangwon Univ.* 10:10-17.
- Lim, J.M., J.L. Cho, S.M. Kang, and J.S. Kang. 2001. Effect of prepriming on improving germinability of pelleted carrot seeds. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 19:511-514.
- Menon, A.R.S. and Y. Dave. 1989. Micromorphology of hairs and spines on ovary and fruit of *Daucus carota* L. var. *sativa*. *Bot. Mag. Tokyo.* 102:503-509.
- Mewes, H.W., C. Amid, R. Arnold, D. Frishman, U. Güldener, G. Mannhaupt, M. Münsterkötter, P. Pagel, N. Strack, V. Stümpflen, J. Warfsmann, and A. Ruepp. 2004. MIPS: Analysis and annotation of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res.* 32:D41-D44.
- Min, T.G. 1992. Effect of density separation after pretreatment on embryo growth and radicle emergence of carrot (*Daucus carota* L.) seeds. *Kor. J. Crop. Sci.* 37:134-140.
- Myakishev, M.V., Y. Khripin, S. Hu, and D.H. Hamer. 2001. High-throughput SNP genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers. *Genome Res.* 11:163-169.
- Nieuwhof, M. and F. Garristsen. 1984. Inheritance of spine formation on seeds of carrot (*Daucus Carota* L.). *Euphytica* 33:75-80.
- Park, J.S., I.S. Kim, M.S. Cho, S. Park, and S.G. Park. 2006. Identification of differentially expressed genes involved in spine formation on seeds of *Daucus carota* L. (carrot), using annealing control primer (ACP) system. *J. Plant Biol.* 49: 133-140.
- Ruepp, A., A. Zollner, D. Maier, K. Albermann, J. Hani, M. Molrejs, I. Tetko, U. Güldener, G. Mannhaupt, M. Münsterkötter, and H.W. Mewes. 2004. The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res.* 32:5539-5545.
- Salzman, R.A., T. Fujita, K. Zhu-salzman, and P.M. Hasegawa. 1999. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant Mol. Biol. Rep.* 17:11-17.
- Varshney, R.K., R. Sigmund, A. Börner, V. Korzun, N. Stein, M.E. Scorrells, P. Langridge, and A. Graner. 2005. Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice. *Plant Sci.* 168:195-202.
- Wang, S., J.W. Wang, N. Yu, C.H. Li, B. Luo, J.Y. Gou, L.J. Wang, and X.Y. Chen. 2004. Control of plant trichome develop-

- ment by a cotton fiber MYB gene. *The Plant Cell* 16:2323-2334.
- Wang, Y.C., C.P. Yang, G.F. Liu, J. Jiang, and J.H. Wu. 2006. Generation and analysis of expressed sequence tags from a cDNA library of *Tamarix androssowii*. *Plant Sci.* 170:28-36
- Ye, S., S. Dhillon, X. Ke, A.R. Collins, and I.N.M. Day. 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acid Res.* 29:e88.
- Yu, J.K., M. La Rota, R.V. Kantety, and M.E. Sorrells. EST derived SSR markers for comparative mapping in wheat and rice. *Mol. Gen. Genomics* 271:742-751.