

# 당근 EST 염기서열을 이용한 종자모 형질 관련 SNP 분자표지 개발

오규동<sup>1</sup> · 심은조<sup>1</sup> · 전상진<sup>2</sup> · 박영두<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>경희대학교 원예생명공학과, <sup>2</sup>㈜캐로톱씨드 육종연구소

## Development of SNP Molecular Markers Related to Seed-hair Characteristic Based on EST Sequences in Carrot

Gyu-Dong Oh<sup>1</sup>, Eun-Jo Shim<sup>1</sup>, Sang-Jin Jun<sup>2</sup>, and Young-Doo Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Horticultural Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea

<sup>2</sup>Breeding Research Institute, Carrotop Seed Co., Anseong 456-882, Korea

**Abstract.** Carrot (*Daucus carota* L. var. *sativa*) is one of the most extensively used vegetable crops in the world and a significant source of nutrient because of its high content of  $\beta$ -carotene, well known as the precursor of vitamin A carotenoid. However, seed-hairs generated and elongated from the epidermal cell of seeds inhibit absorption and germination by various factors such as carotol and so on. Accordingly, mechanical hair removal process is essential before commercialization of carrot seeds. Because of this process, producers will have additional losses such as time consuming, manpower, capital and so on. Furthermore, physical damage of seeds causes irregular germination rate. To overcome such cumbersome weaknesses, new breeding program for developing hairless-seed carrot cultivar has been needed and studies for molecular markers related to seed-hair characteristic is needed for a new breeding program. Therefore, in this study, cDNA libraries from seeds of short-hair seed phenotype CT-SMR 616 OP 659-1 line, hairy-seed phenotype CT-SMR 616 OP 677-14 line and short-hair seed phenotype CT-ATR 615 OP 666-13 line, hairy-seed phenotype CT-ATR 615 OP 671-9 were constructed, respectively. Furthermore, 1,248 ESTs in each line, total 4,992 ESTs were sequenced. As a result, 19 SNP sites and 14 SNP sites in each of 2 combinations were confirmed by analyzing these EST sequences from short-hair and hairy-seed lines. Then we designed SNP primer sets from EST sequences of SNP sites for high resolution melting (HRM) analysis. Designed HRM primers were analyzed using hairy seed phenotype CT-SMR 616 OP 1040 line and short-hair seed phenotype CT-SMR 616 OP 1024, 1025, 1026 lines. One set of HRM primers showed specific difference between the melting curves of hairy and short-hair seed phenotype lines. Based on this result, allele-specific (AS) PCR primers were designed for easier selection between hairy-seed carrot and hairless seed carrot. These results of HRM and AS-PCR are expected to be useful in breeding of hairless seed carrot cultivar as a molecular marker.

**Additional key words:** allele-specific PCR, cDNA library, *Daucus carota*, high resolution melt

### 서 언

당근(*Daucus carota* L. var. *sativa*)은 중국과 한국 등 아시아 국가들은 물론 전세계적으로 다양한 방법으로 요리에 사용되는 유용한 채소 작물 중 하나이다. 아프가니스탄 지방으로부터 유래되었다고 알려진 야생종 당근은 점차 쓴맛을 줄이고 단맛을 증가시키며, 근목심부를 최소화하는 과정을 거쳐 오랜 시간 동안 육종되었으며 현재 중국에서 가장

많이 재배되고 있다. 또한 vitamin A의 전구체인  $\beta$ -carotene의 함량이 100g당 850-8500 $\mu$ g으로 높아(Bajaj et al., 1980) 영양학적으로도 주요한 작물로 취급되고 있다.

당근은 산형화과, 미나리과의 산형화서를 가진 대표적인 작물로 종자의 성숙시기에 차이가 있어 균일한 종자 품질을 유지하기 어려워 파종 후 발아율이 낮아(Min, 1992), 발아력 향상을 위한 연구들이 진행되고 있지만(Li et al., 1999; Lim et al., 2001), 여전히 낮은 발아율 및 발아 지연 등의

\*Corresponding author: ydpark@khu.ac.kr

※ Received 21 September 2012; Revised 4 October 2012; Accepted 10 October 2012. 본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업(과제번호: 108097054SB010)의 지원에 의해 이루어진 것임.

주요 문제점들이 지적되고 있다. 당근 종자에는 종피의 epidermal cell에서 연장된 형태로 생성되는 종자모가 존재하며(Menon and Dave, 1989), 이러한 종자모에는 carotol이라는 종자 발아를 억제하는 물질이 존재한다고 알려져 있다. 또한 종자모는 종자 발아 시 수분 흡수를 억제하는 특성을 보이며 이에 따라 발아율을 떨어뜨린다. 현재 시중에서 판매되고 있는 당근 종자의 경우 당근 종자모를 기계적인 방법으로 제모 작업을 거쳐 상품화하고 있다. 이러한 과정을 통해 생산되는 종자는 기계적인 제모 과정에 의해 일부 종자가 손상되어 종자 수명이 단축되거나 재배에 영향을 줄 수 있는 단점을 보이고 있다. 이와 더불어 제모 과정에 추가적인 인력과 생산비가 들어가며 상품화 기간이 늘어나게 되는 단점을 보여주고 있다.

무모종자 당근 품종 육성을 통해 이와 같이 부과적으로 발생하는 시간과 인력, 생산비의 증가를 줄일 수 있으며 종자모에 의한 발아율 저하의 문제점을 개선할 수 있다. 이를 위해 무모종자표현형 당근개체를 이용하여 양적 형질로 판단되는(Nieuwhof and Garritsen, 1984) 당근 종자 모형성 관련 형질을 연구하며 이를 바탕으로 분자표지를 개발함으로써 무모종자 당근 품종의 육종 기한을 단축시키고 효율성을 높일 수 있을 것이다. 본 연구는 이와 같은 목적으로 당근의 종자모 형질 관련 분자표지개발을 통해 무모종자 품종개발에 이용하고자 하며, 이를 위해 무모종자에 가까운 단모종자 표현형 개체와 유모종자 표현형 개체를 확보하였다. 제모과정을 거쳐 판매중인 유모종자들의 종자모 길이와 확보된 단모종자의 종자모 길이를 비교하였을 때 판매되는 종자들보다 오히려 짧은 개체들을 확보하였으며, 이러한 개체들을 이용하여 연구한 결과는 충분히 종자모 형질 관련 분자마커로서 활용 가능할 것이다. 이들 단모종자 표현형 개체 및 유모종자 표현형 개체의 종자를 이용하여 cDNA library를 작성하고 EST sequencing분석을 통해 종자 생성초기 단계의 발현 양상을 종자모 형질에 관련하여 비교 분석하였다. 또한 단모종자 표현형 개체와 유모종자 표현형 개체의 EST sequence를 비교 분석하여 SNP sites를 확인하고 종자모 형성에 관련한 특이적 SNP분자표지를 개발하여 무모종자 당근 품종 육성에 이용하도록 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

당근(*Daucus carota* L. var. *sativa*) 종자모 형질 관련 특이적 SNP분자표지의 개발을 위해 (주)캐로톱씨드(안성, 경기도)에서 2008년도부터 2010년도에 걸쳐 육성된 CT-SMR

616계통의 단모형 종자 표현형 개체와 유모형 종자 표현형 개체 조합 및 CT-ATR 615계통의 단모형 종자 표현형 개체와 유모형 종자 표현형 개체 조합의 2조합을 이용해 cDNA library 작성 및 EST sequencing을 실시하였다. 2008년도에 CT-SMR 616 및 CT-ATR 615 계통의 형매 교배를 실시하여 2009년도에 각각 CT-SMR 616 OP 389, CT-ATR 615 OP 394 개체군을 육성하였으며 그 중 단모종자 표현형을 보인 CT-SMR 616 OP 389-1, CT-ATR 615 OP 394-6개체를 선발하여 자가수분을 실시해 2010년도에 CT-SMR 616 OP 659 개체군 및 CT-ATR 615 OP 666 개체군을 육성하였다. 육성된 개체군들의 종자모 길이는 Video Microscope System (Alphasystec Co., Korea)을 이용하여 측정하였으며 각각의 개체군에서 cDNA library 작성을 위해 단모 종자 표현형 개체로는 CT-SMR 616 OP 659-1과 CT-ATR 615 OP 666-13을 대조군으로 이용될 유모 종자 표현형 개체로는 CT-SMR 616 OP 677-14와 CT-ATR 615 OP 671-9를 각각 선발하였다. 선발된 개체들을 이용하여 작성된 cDNA library 및 EST sequencing 결과를 바탕으로 SNP 분자표지를 개발하였으며 표지의 검정을 위해 단모형 종자 표현형을 보인 CT-SMR 616 OP 659-1, 2, 3 세 개체의 자가수분 후대 CT-SMR 616 OP 1024, 1025, 1026 개체군과 대조군으로써 유모 종자 표현형을 보인 CT-SMR 616 OP 677-14 개체의 자가수분 후대 CT-SMR 616 OP 1040 개체군을 이용하였다. 또한 검정을 통해 확인된 종자모 형질 관련 분자표지는 유모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1040-7 자가수분 후대 CT-SMR 616 OP 7208, 단모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1024-8, 1025-14, 1026-17 자가수분 후대 CT-SMR 616 OP 7021, 7065, 7111을 이용해 후대에서의 정확도 검정을 실시하였으며, 이와 함께 SNP site 탐색에 이용된 실험재료 계통과 상이한 계통의 유모 종자표현형 928 개체군과 단모종자 표현형 7159, 7148 개체군을 이용하여 종자모 형질 관련 분자표지로서의 정확성을 확인하였다.

### cDNA Library 작성 및 EST Sequencing 결과를 바탕으로 한 SNP Site 검색

단모종자 표현형 개체와 유모종자 표현형 개체를 이용하여 cDNA library를 작성하였다. 단모종자 표현형을 보인 CT-SMR 616 OP 659-1과 CT-ATR615 OP 666-13 개체와 유모종자 표현형을 보인 CT-SMR 616 OP 677-14와 CT-ATR 615 OP 671-9 개체를 각각 자가수분 시킨 후 종자모가 생성되기 시작하는 시점인 자방이 팽창하기 시작하는 시기에 샘플을 채취하여 RNA를 분리하여 cDNA library 작성하였다. 작성된 cDNA library의 EST sequencing은 ABI 3730(Applied

Biosystems Co., USA)을 이용하여 Macrogen Inc.(Korea)에 의뢰하여 실시하였다. 확인된 EST sequence들을 각각의 개체별로 assembly하여 contig와 singleton으로 재조합하였으며 이러한 sequence들은 각각 NCBI의 Blast Program(V.2.2.10)과 데이터 베이스를 사용하여 BlastX를 수행하였다. BlastX 결과를 토대로 EST sequence들의 발현양상의 비교분석을 위해 각각의 EST sequence를 FunCat(Functional Catalogue, [http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/search\\_main\\_frame.html](http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funcatDB/search_main_frame.html))를 이용해 기능별 category로 구분하였다 (Mewes et al., 2004; Ruepp et al., 2004).

분석된 EST sequence 상의 SNP site를 확인하기 위해 단모종자 표현형을 보인 CT-SMR 616 OP 659-1 개체와 유모종자 표현형을 보인 CT-SMR 616 OP 677-14 개체로부터 확보된 EST sequence들을 다시 assembly하여 비교분석하였다. 마찬가지로 단모종자 표현형을 보인 CT-ATR 615 OP 666-13개체와 유모종자 표현형을 보인 CT-ATR 615 OP 671-9 개체의 확보된 EST sequence들을 다시 assembly하여 비교 분석 하였다. 이렇게 두 조합의 단모종자 표현형 개체와 유모종자 표현형 개체의 비교분석은 contig와 singleton EST sequence를 Sequencher ver. 4.10.1 program을 이용해 assembly 하는 방법으로 두 개체간 EST sequence의 SNP site를 확인 하였다(Ayeh, 2008).

#### 확인된 SNP Site를 이용한 High Resolution Melting(HRM) 및 Allele-specific(AS) PCR 프라이머 작성 및 검증

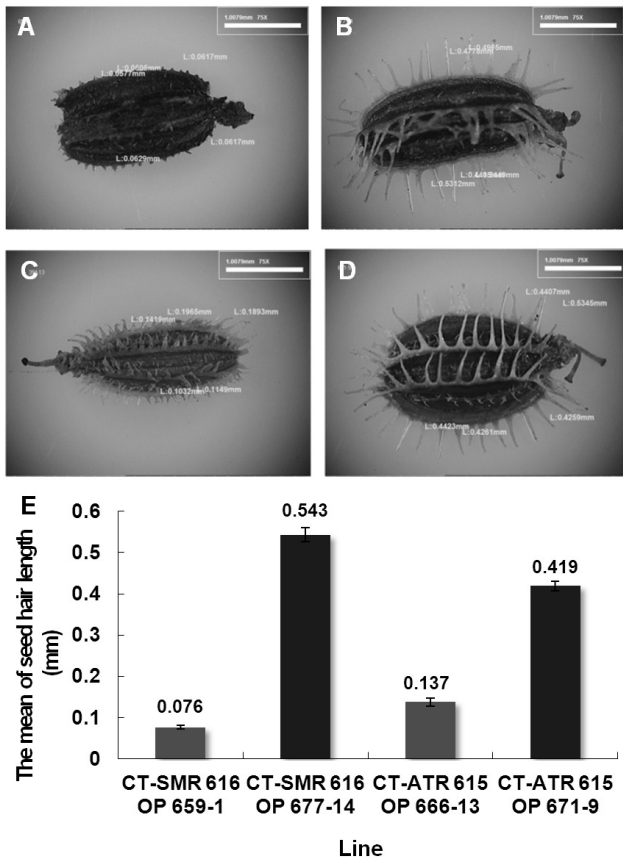
단모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 659-1과 CT-ATR 615 OP 666-13개체와 유모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 677-14와 CT-ATR 615 OP 671-9 개체간 비교 분석을 통해 확인된 SNP site를 바탕으로 효과적인 분석을 위해 산물 크기 범위는 60-90bp로 설정하여 Primer 3 software를 이용하여 HRM 분석을 위한 프라이머를 작성하였다. 작성된 SNP-HRM 프라이머를 이용하여 당근 종자모 형질 관련 분자표지로서의 활용을 위한 확인을 위해 cDNA library 작성 및 EST sequencing에 사용된 단모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 659-1 개체를 비롯한 CT-SMR 616 OP 659-2, 3 개체의 자가 수분 후대 개체군인 CT-SMR 616 OP 1024, 1025, 1026 개체군에서 각각 6개체씩을 선발하였으며, 또한 cDNA library 작성 및 EST sequencing에 사용된 유모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 677-14 개체의 자가 수분 후대 개체군인 CT-SMR 616 OP 1040 개체군에서 6개체를 선발하여 확인을 실시하였다. 이와 더불어 후대검정 및 분자표지 정확성 검정을 유모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1040-7 자가수분 후대 CT-SMR 616 OP 7208, 단모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1024-8,

1025-14, 1026-17 자가수분 후대 CT-SMR 616 OP 7021, 7065, 7111 및 SNP site 탐색에 이용된 실험재료 계통과 상이한 계통의 유모종자 표현형 928 개체군과 단모종자 표현형 7159, 7148 개체군을 이용하여 수행하였다. 또한 HRM 분석과 더불어 더욱 간단한 방법으로 SNP site를 확인할 수 있는 분자표지로서의 개발을 위해 AS-PCR 프라이머를 작성하여 마찬가지로 단모 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1024, 1025, 1026 개체군과 유모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1040 개체군에서 각각 6개체씩을 선발하여 실험을 수행하였다. AS-PCR 프라이머는 확인된 SNP site의 특이적 다형성을 프라이머의 3'말단에 위치하게 하여 PCR을 통해 확인할 수 있도록 유모종자 특이적 front 프라이머와 단모종자 특이적 front 프라이머를 구분하였고 동일한 reverse 프라이머를 작성하였다.

## 결과 및 고찰

### 개체 육성 및 종모 표현형과 길이

2008년도에 CT-SMR 616 OP 및 CT-ATR 615 OP 계통을 각각 형매 교배하여 차년도에 육성된 계통 중 단모종자 표현형을 보이는 CT-SMR 616 OP 389, CT-ATR 615 OP 394 개체군을 확보하였다. 그 중 단모종자 표현형을 보이며 생육이 우수한 CT-SMR 616 OP 389-1 및 CT-ATR 615 OP 394-6 개체를 선발하여 후대 양성을 위해 자가수분을 실시하였고 2010년도에 자가수분 계통 중 CT-SMR 616 OP 659과 CT-ATR 615 OP 666 개체군을 선발하였다. 최종적으로 cDNA library 작성을 위해 이 개체들을 다시 자가수분한 후종자모 표현형 측정 결과 및 개체별 생육, 충분한 종자 확보 등을 바탕으로 CT-SMR 616 OP 659 개체군 중 CT-SMR 616 OP 659-1 개체와 CT-ATR 615 OP 666 개체군중 CT-ATR 615 OP 666-13 개체를 선발하였다. 한편 대조 개체로는 2008년도에 CT-SMR 616 OP 및 CT-ATR 615 OP 계통을 형매 교배하여 2009년도에 CT-SMR 616 OP 677과 CT-ATR 615 OP 671 유모종자 표현형 개체를 확보하고 이들 개체들을 다시 자가수분하여 2010년도에 재배된 유모종자 표현형 개체인 CT-SMR 616 OP 677-14와 CT-ATR 615 OP 671-9 개체를 사용하였다. 각각의 종자모 길이 측정 결과 단모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 659-1 개체는  $0.076\text{mm} \pm 0.004$ , CT-ATR 615 OP 666-13 개체는  $0.137\text{mm} \pm 0.009$ 로 각각 대조구인 유모 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 677-14 개체  $0.543\text{mm} \pm 0.017$ 의 14.1%, CT-ATR 615 OP 671-9 개체  $0.419\text{mm} \pm 0.012$ 의 32.7% 수준의 종자모 길이를 가진 것으로 조사되었다 (Fig. 1).



**Fig. 1.** Seed-hair phenotype and length of selected lines used for construction of cDNA library and EST sequencing. A, Short-hair seed CT-SMR 616 OP 659-1; B, Hairy seed CT-SMR 616 OP 677-14; C, Short-hair seed CT-ATR 615 OP 666-13; D, Hairy seed CT-ATR 615 OP 671-9; E, The mean and standard error of seed-hair length from CT-SMR 616 OP 659-1, CT-SMR 616 OP 677-14, CT-ATR 615 OP 666-13, and CT-ATR 615 OP 671-9.

#### cDNA Library 작성 및 EST Sequencing 분석 결과

단모종자 개체와 유모종자 개체를 이용하여 cDNA library를 작성하였다. 단모종자 표현형을 보인 CT-SMR 616 OP 659-1 개체와 유모종자 표현형을 보인 CT-SMR 616 OP 677-14 개체 조합 및 단모종자 표현형을 보인 CT-ATR 615 OP 666-13 개체와 유모종자 표현형을 보인 CT-ATR 615 OP 671-9 개체 조합을 각각 자가수분시킨 후 종자모가 생성되는 시기인 수정된 자방이 팽창되기 시작할 시기에 샘플을 채취하여 total RNA를 분리하고 전기영동을 실시하여 분리 상태와 농도를 확인하였다(Salzman et al., 1999). 그 뒤 mRNA concentration를 확인한 후 Oligo(dT) linker-primer와 reverse transcriptase를 이용하여 first-strand cDNA를 합성하였다. 이후 DNA polymerase I을 이용해 second-strand를 합성하여 adaptor를 ligation하였다. Gel filtration을 통하여 size fraction을 실시한 다음 pBluescript® SK- vector를 이용하여 excised phagemid type의 cDNA library를 SOLR

strain을 통해 colony-firming units titer  $0.2 \times 10^7$ cfu(total 20mL)의 값에서 작성하였다(Macrogen Inc., Korea)(Wang et al., 2006). 한편 삼입 형태의 확인은 *EcoRI*과 *XhoI* 제한 효소를 이용하여 수행하였다.

개체별로 작성된 cDNA library로부터 EST sequencing후 CT-SMR 616 OP 659-1, CT-SMR 616 OP 677-14 개체 및 CT-ATR 615 OP 666-13, CT-ATR 615 OP 671-9 개체에서 각각 1248개의 염기서열 결과를 확인하였다. 또한 이러한 EST sequence 결과를 바탕으로 sequence cleaning 과정을 거친 후 assembly clustering하여 CT-SMR 616 OP 659-1 개체는 98개의 contig와 761개의 singleton data를, CT-SMR 616 OP 677-14 개체는 90개의 contig와 827개의 singleton data를 확보하였다. 또한 CT-ATR 615 OP 666-13 개체는 97개의 contig와 772개의 singleton data를, CT-ATR 615 OP 671-9 개체는 107개의 contig와 786개의 singleton data를 확보하였다.

#### SNP Site 확인 및 Primer 제작

단모종자 표현형을 가진 CT-SMR 616 OP 659-1 개체와 유모종자 표현형을 가진 CT-SMR 616 OP 677-14 개체 조합과 단모종자 표현형을 가진 CT-ATR 615 OP 666-13 개체와 유모종자 표현형을 가진 CT-ATR 615 OP 671-9 개체 조합의 EST sequencing 분석 결과를 바탕으로 Sequencher ver. 4.10.1 program을 이용해 단모종자 표현형 개체와 유모종자 표현형 개체의 EST sequence를 assembly하여 단모종자 개체와 유모종자 개체간의 EST sequence상 SNP site를 확인하였다. 단모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 659-1 개체와 유모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 677-14 개체간 비교를 통해 19개의 SNP site를 확인하였으며, 단모종자 표현형 CT-ATR 615 OP 666-13 개체와 유모종자 표현형 CT-ATR 615 OP 671-9 개체간 비교를 통해 14개의 SNP site를 확인하였다. 확인된 SNP site 중 우선적으로 자가수분 자식세대의 확보가 이루어진 CT-SMR 616 OP 659-1 개체와 CT-SMR 616 OP 677-14 개체의 SNP 검정을 위해 high resolution melting 분석을 실시하였고 이를 위해 CT-SMR 616 OP 659-1 개체와 CT-SMR 616 OP 677-14 개체의 SNP site를 바탕으로 product size range를 60-90bp로 설정하여 Primer 3 software를 이용하여 프라이머를 작성하였다(Table 1, Ujino-ihara et al., 2010; Wu et al., 2008). 작성된 프라이머를 이용해 CT-SMR 616 OP 1024, 1025, 1026 개체군 및 CT-SMR 616 OP 1040 개체군을 대상으로 HRM analysis를 실시하여 종자모 형질 관련 특이적 분자표지로 선발하였다. 또한 선발된 SNP site에 대하여 보다 간편한 확인이 가능하

**Table 1.** SNP primer sequences for high resolution melting analysis.

SNP site	Primer	Sequence <sup>2</sup>	Tm	bp
659-677-1	Front	5'-CCAATCTCGATTCGGAGTTC-3'	59.63	89
	Reverse	5'-AACAAACACCTGGAAACTCAGTG-3'	59.16	
659-677-2	Front	5'-CACGCCAAAGTGTGTCAAG-3'	60.34	90
	Reverse	5'-GCCTTGAGACAGTTGCAAGAA-3'	60.57	
659-677-3	Front	5'-TGTTTTGCCAACAAATGCTC-3'	59.71	79
	Reverse	5'-CTCATCGCTAGGGGGACAT-3'	60.04	
659-677-4	Front	5'-ACTTAAAGCCCAGCAACCTG-3'	59.38	82
	Reverse	5'-TCTGTGTTATGACGAGCGAGA-3'	59.61	
659-677-5	Front	5'-ATGGATTCTTGCCGACATTC-3'	59.90	77
	Reverse	5'-TTGGACAAGTACAGGTGTCA-3'	59.04	
659-677-6	Front	5'-GGGGCCTTTCGGAACAAT-3'	62.13	61
	Reverse	5'-AAGTCCATTGTTGGCAGCAT-3'	60.53	
659-677-8	Front	5'-CCCTCTCATACCTTCCACCA-3'	59.92	88
	Reverse	5'-TCCAAGCAAGGAACCCATC-3'	61.00	
659-677-10	Front	5'-TTTCATCAGCCACAGGAATG-3'	59.65	63
	Reverse	5'-GCACGAAAATGTTTATGCAGTC-3'	59.66	
659-677-11	Front	5'-ACAAGGACAAGGTGGAAACAA-3'	59.48	60
	Reverse	5'-TGACCATATGGACCTTGTGG-3'	60.62	
659-677-14	Front	5'-TGCTAAAATCTCAGTACTAATCCA-3'	59.36	84
	Reverse	5'-TCCCTGTCAGCACTTTTGGAG-3'	59.01	
659-677-16	Front	5'-GCTTGTGGACTTCAAACAAAA-3'	59.29	90
	Reverse	5'-TTGACCCTTTGATGGTGGAT-3'	60.17	
659-677-17	Front	5'-TGTTGGACAACCAGGTATTGG-3'	60.65	84
	Reverse	5'-GGTTGTGATCCTCCAGTTG-3'	60.36	
659-677-18	Front	5'-ATGAATTCGAGACGCTTGC-3'	60.36	87
	Reverse	5'-CTTTCCTGCCATTGAGCATT-3'	60.21	
659-677-19	Front	5'-TGGACGTGAGATGGTAGGAA-3'	59.09	78
	Reverse	5'-TGCTAGTCACCTTGCACAGAC-3'	52.38	

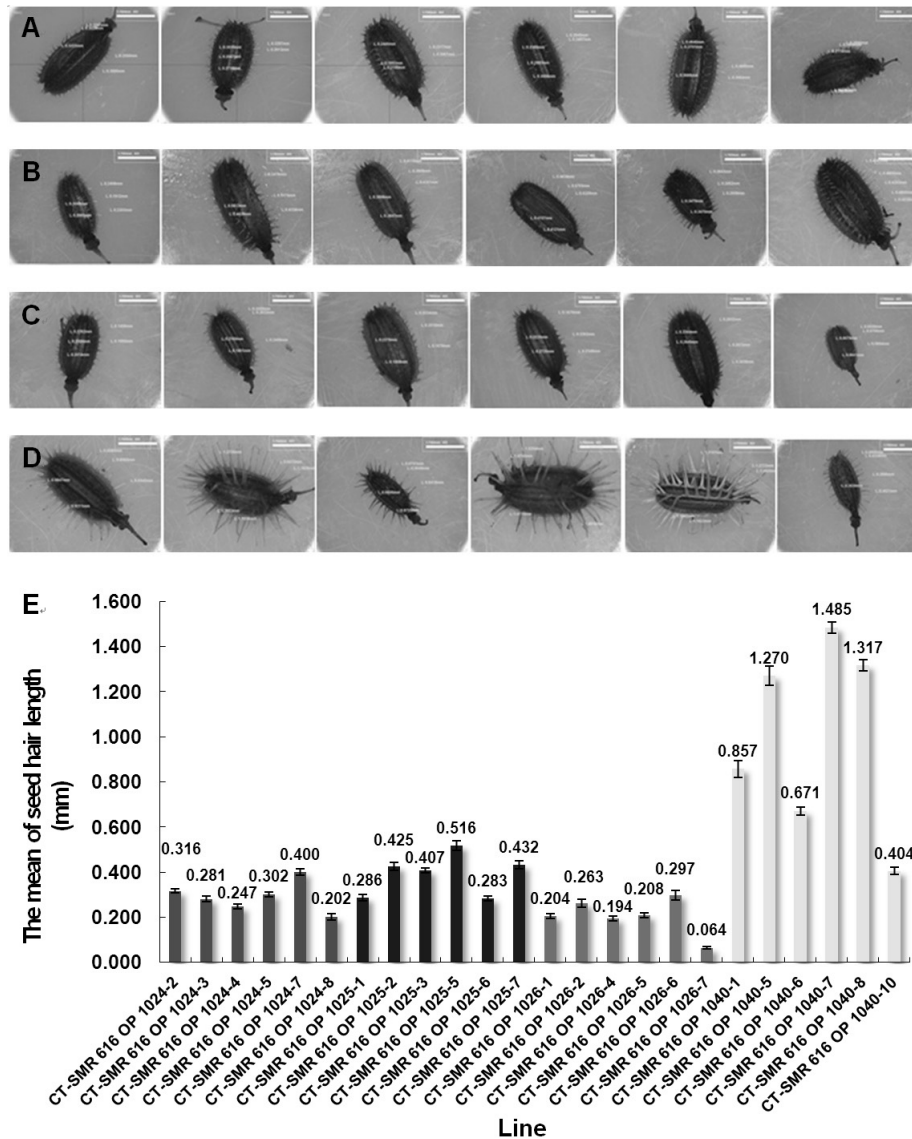
<sup>2</sup>Primer sequences were designed using SNP sites derived from CT-SMR 616 OP 659-1 and CT-SMR 616 OP 677-14 EST sequences.

도록 하기 위해 allele-specific PCR 수행을 위한 프라이머도 새로이 작성하였다(Myakishev et al., 2001; Ye et al., 2001).

#### HRM 및 AS-PCR 분석 결과

HRM 프라이머를 이용하여 CT-SMR 616 OP 659 개체군에서 단모종자 표현형을 보인 CT-SMR 616 OP 659-1, 2, 3 개체의 자가수분 개체군 CT-SMR 616 OP 1024, 1025, 1026 개체군의 6개체씩과 유모종자 표현형을 보인 CT-SMR 616 OP 677-14 개체의 자가수분 개체군 CT-SMR 616 OP 1040 개체군의 6개체를 대상으로 high resolution melting 분석을 수행하였다. CT-SMR 616 OP 1024, 1025, 1026 개체군의 평균 종자모 길이는 0.291mm ± 0.027, 0.392mm ± 0.037, 0.205 ± 0.033으로 각각 유모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1040 개체군의 평균 종자모 길이 1.001mm ± 0.172

의 29%, 39.1%, 20.4%의 종자모 길이를 보이는 것으로 확인하였다(Fig. 2). Qiagen Type-it HRM PCR kit를 이용하여 12.5μL 2x HRM PCR Master Mix, 각각의 1.78μL 10p primer, 8μL RNase free water, 개체별 DNA 1μL 의 조성으로 Corbett Rotor-Gene 6000을 통해 95°C에서 5분간 denaturation 한 후 95°C에서 10초, 60°C에서 35초 45cycle을 진행한 후 65°C에서 95°C까지 2초에 0.1°C씩 올라가며 진행하였다. 19개의 SNP를 대상으로 실험을 수행하였으나 CT-SMR 616 OP 659-1 개체와 CT-SMR 616 OP 677-14 개체간 657-677-6 SNP site를 바탕으로 작성된 프라이머를 이용한 실험결과에서만 각각의 개체에서 homozygous한 특이적 SNP를 나타내는 것으로 확인되었다. 단모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 657-1 개체의 659-1\_09-E02 EST sequence의 291bp와 유모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 677-14 개체의 677-14\_03-B01-R



**Fig. 2.** Seed-hair phenotype and length of selected lines used for HRM and AS-PCR analysis. (A) Short-hair seed CT-SMR 616 OP 1024 lines; (B) Short-hair seed CT-SMR 616 OP 1025 lines; (C) Short-hair seed CT-SMR 616 OP 1026 lines; (D) Hairy seed CT-SMR 616 OP 1040 lines; (E) The mean and standard error of seed-hair length from CT-SMR 616 OP 1024, 1025, 1026 lines and CT-SMR 616 OP 1040 line.

EST sequence의 285bp에서 확인된 G/A SNP site(Fig. 3)를 바탕으로 작성된 HRM 프라이머의 실험결과 CT-SMR 616 OP 1024, 1025, 1026 개체군과 CT-SMR 616 OP 1040 개체군간의 melting curve normalized graph 및 difference graph 를 통해 뚜렷한 single nucleotide polymorphism을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 단모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1024, 1025, 1026 개체군과 유모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1040 개체군간의 SNP site차이로 인해서 melting point의 차이를 보였으며, 각각의 개체군들이 동일한 결과를 보인 것으로 보아 659-677-6 SNP site를 바탕으로 작성된 HRM 프라이머는 당근 종자모 형질 관련 분자표지로서 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

뚜렷한 SNP 다형성을 확인한 659-677-6 SNP site를 바탕으로 HRM 분석과 더불어 더욱 간단한 방법으로 선발할 수 있는 allele-specific PCR을 위한 프라이머를 작성하였다. AS-PCR 프라이머는 확인된 659-677-6 SNP site의 G/A 특이적 다형성을 프라이머 3'말단에 위치하게 하여 PCR을 통해 확인할 수 있도록 유모종자 특이적 front 프라이머와 단모종자 특이적 front 프라이머 및 동일한 reverse 프라이머를 작성하였다(Table 2). HRM 분석과 동일하게 단모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1024, 1025, 1026 개체군과 유모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1040 개체군에서 각각 6개체씩을 선발하여 실험을 수행하였다. Annealing 온도를 64.5°C로 설정하여 35cycle을 유모종자 특이적 프라이머를 이용하여

```

>cl161417
Length=1236
Score = 1938 bits (995), Expect = 0.0
Identities = 1027/1040 (99%), Gaps = 11/1040 (1%)
Strand=Plus/Plus
Query 14 GCGGTGGCGGCGCTCTAGAAGTGTGGATCCCCGGGGCTCAGGAATTCGGCACGAGGG 73
Sbjct 13 GCGGTGGCGGCGCTCTAGAAGTGTGGATCCCCGGGGCTCAGGAATTCGGCACAG-GG 71
Query 74 TATCATTTCATACACATCTAATTCAGCCATGGGAAGTGTACCCACAGTGAAGCGAGG 133
Sbjct 72 ----ATTTTCATACACATCTAATTCAGCCATGGGAAGTGTACCCACAGTGAAGCGAGG 127
Query 134 AGTACAGAGTGTCTGTGCACAAATGCAGAGGAAAGCTCAGAGGATTCATCGCTGAGAAGA 193
Sbjct 128 AGTACAGAGTGTCTGTGCACAAATGCAGAGGAAAGCTCAGAGGATTCATCGCTGAGAAGA 187
Query 149 ATTGTGCTCCCTCTATCTTCGCTTCGCTGGGACTCAGCTGGTACTTATGATGTTAAGA 253
Sbjct 188 ATTGTGCTCCCTCTATCTTCGCTTCGCTGGGACTCAGCTGGTACTTATGATGTTAAGA 247
Query 254 CCAAGACTGGGGGGCCCTTCGGAAACATGAGGAAGATTGAGCAGTCTCATGCTGCCA 313
Sbjct 248 CCAAGACTGGGGGGCCCTTCGGAAACATGAGGAAGATTGAGCAGTCTCATGCTGCCA 307
Query 373 ACAATGGACTTGATATGCTGTTAGGCTGTTGGAGCCCTTTAAGGAGCAGTTCGCCATCA 373
Sbjct 308 ACAATGGACTTGATATGCTGTTAGGCTGTTGGAGCCCTTTAAGGAGCAGTTCGCCATCA 367
Query 374 TCTCTTATGGGATTTGATCAGTTGGCTGGAGTGTGCTGTGCGAAATTAATGGAGTTC 433
Sbjct 368 TCTCTTATGGGATTTGATCAGTTGGCTGGAGTGTGCTGTGCGAAATTAATGGAGTTC 427
Query 434 CTGATGTTCCGCTTCACCCAGGAAGCCGGACAAGAGAGGAGCCACACAGGAAGCCGCT 493
Sbjct 428 CTGATGTTCCGCTTCACCCAGGAAGCCGGACAAGAGAGGAGCCACACAGGAAGCCGCT 487
Query 498 TGCCTAATGCTACTTTGGAAATGATCATTGAGAAATGTGTTGTTGAACAATGGGAC 553
Sbjct 488 TGCCTAATGCTACTTTGGAAATGATCATTGAGAAATGTGTTGTTGAACAATGGGAC 547
Query 513 TTTGTGACAAGGATATCGTTACCCCTCTCGTGGCCACACCCCTGGAGCCGCTCATAAAG 614
Sbjct 514 TTTGTGACAAGGATATCGTTACCCCTCTCGTGGCCACACCCCTGGAGCCGCTCATAAAG 607
Query 614 AGCGTTCGGGTTTGAAGAGCCCTGGACAACCAATCCTCATCTTTGATTAACCTACT 673
Sbjct 608 AGCGTTCGGGTTTGAAGAGCCCTGGACAACCAATCCTCATCTTTGATTAACCTACT 667
Query 674 TCAAGGAACCTCTGACCCGAGAGAGGAAGGGCTTCTCACTCCCACTGACAAAGTCTC 733
Sbjct 668 TCAAGGAACCTCTGACCCGAGAGAGGAAGGGCTTCTCACTCCCACTGACAAAGTCTC 727
Query 734 TTTCTGAAGACCCCTGTCTCCGTCGCCCTGTGCAGCAAAATAGCTGCTGATGAGGATGCC 793
Sbjct 728 TTTCTGAAGACCCCTGTCTCCGTCGCCCTGTGCAGCAAAATAGCTGCTGATGAGGATGCC 787
Query 794 TCTTGGCGACTATGCAAGATCTCACATGAAGCTTCTGAACCTGGGTTTGGCTGAGGCTT 853
Sbjct 788 TCTTGGCGACTATGCAAGATCTCACATGAAGCTTCTGAACCTGGGTTTGGCTGAGGCTT 847
Query 854 AAGCTCTGGAGAACAGACAGCTTCTCAATATGAGTGTGATGTTTGTAGTTACAAAGTT 913
Sbjct 848 AAGCTCTGGAGAACAGACAGCTTCTCAATATGAGTGTGATGTTTGTAGTTACAAAGTT 907
Query 914 TGAGTTCATTATGATGAAAGAGTTCGCTAGCTACCCATTTTGTCAATTTACCCGCATAA 973
Sbjct 908 TGAGTTCATTATGATGAAAGAGTTCGCTAGCTACCCATTTTGTCAATTTACCCGCATAA 967
Query 974 TAATCGATTGAACCTTTCCACCTTTGGGTTTTATAACAGCCCAAGTATCTGCATCGGC 1033
Sbjct 968 TAATCGATTGAACCTTTCCACCTTTGGGTTTTATAACAGCCCAAGTATCTGCATCGGC-- 1022
Query 1034 AACCTATGTGGTATTGGC 1053
Sbjct 1028 AACCT-ATGTGGTATTGGC 1041

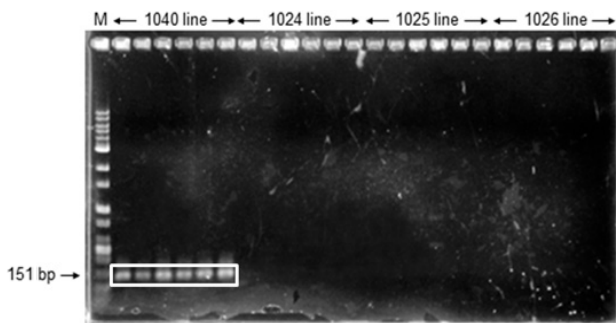
```

**Fig. 3.** SNP site, 659-677-6, between 291bp of 659-1\_09-E02-R EST from short-hair seed CT-SMR 616 OP 659-1 and 285bp of 677-14\_03-B01-R EST from hairy seed CT-SMR 616 OP 677-14.

**Table 2.** SNP primer sequences for allele-specific PCR.

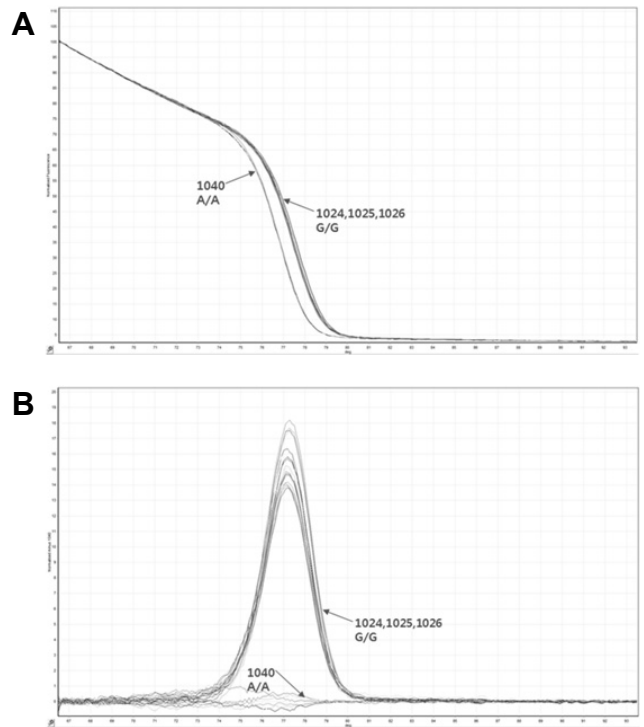
SNP site	Primer	Sequence <sup>2</sup>	Tm
659-677-6	Hairy front	5'-TTTCGGAACAATGAGGAAGAAA-3'	60.93
	Hairless front	5'-TTTCGGAACAATGAGGAAGAAG-3'	60.58
	Reverse	5'-TTCGACAGCAACAACCTCCAG-3'	60.02

<sup>2</sup>Primer sequences were designed using SNP sites derived from CT-SMR 616 OP 659-1 and CT-SMR 616 OP 677-14 EST sequences.



**Fig. 5.** Allele-specific PCR analysis of hairy seed CT-SMR 616 OP 1040 line and short-hair seed CT-SMR 616 OP 1024, 1025, 1026 lines using 659-677-6 SNP primers. 151 bp of PCR product was obtained from hairy seed CT-SMR 616 OP 1040 line.

PCR을 수행한 결과 유모 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1040 개체군에서 151bp의 뚜렷한 PCR 산물을 확인하였고 단모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1024, 1025, 1026 개체군에서 밴드가 나타나지 않는 결과를 확인하였다(Fig. 5).

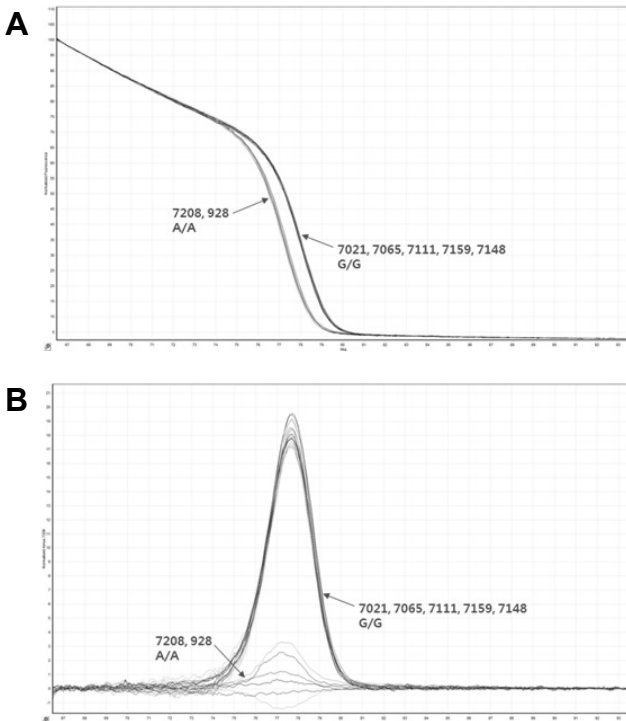


**Fig. 4.** High resolution melting curve profiles of short-hair seed CT-SMR 616 OP 1024, 1025, 1026 lines and hairy seed CT-SMR 616 OP 1040 line using 659-677-6 SNP primers. (A) Normalized graph; (B) Difference graph based on CT-SMR 616 OP 1040.

현재 단모종자 특이적 프라이머를 이용한 실험은 진행중에 있으나, 유모종자 특이적 프라이머를 이용한 실험결과만으로도 개발된 유모 관련 SNP표지가 개체별 종자모 형질 관련 선발에 충분히 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

#### 확인된 SNP 표지를 이용한 후대검정 및 정확성 검정을 위한 HRM 분석

CT-SMR 616 OP 659 개체군에서 단모종자 표현형을 보인 CT-SMR 616 OP 659-1, 2, 3개체의 자가수분 개체군 CT-SMR 616 OP 1024, 1025, 1026 개체군과 유모종자 표현형을 보인 CT-SMR 616 OP 677-14 개체의 자가수분 개체군 CT-SMR 616 OP 1040 개체군을 이용해 확인된 당근 종자모 형질 관련 SNP 분자표지를 유모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1040-7 자가수분 후대 CT-SMR 616 OP 7208 개체군과 단모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1024-8, 1025-14, 1026-17 자가수분 후대 CT-SMR 616 OP 7021, 7065, 7111



**Fig. 6.** High resolution melting curve profiles of short-hair seed 7021, 7065, 7111, 7159, and 7148 lines and hairy seed 7208 and 928 lines using 659-677-6 SNP primers. (A) Normalized graph; (B) Difference graph based on CT-SMR 616 OP 7208.

개체군을 이용하여 후대검정을 실시하였다. 또한 확인된 SNP 분자표지의 정확성을 확인하기 위해 SNP 탐색에 이용된 CT-SMR 616 OP 계통이 아닌 다른 계통에서 확인된 유모종자 표현형 928 개체군과 단모종자 표현형 7159, 7148 개체군을 이용하여 검정을 실시하였다. 이를 위해 HRM 분석을 수행하였으며, 분석은 7148 개체군에서 3개체, 나머지 개체군에서 무작위로 4개체씩을 선발하여 위와 동일한 조건으로 실시하였다. 그 결과 유모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 7208개체군과 928 개체군, 단모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 7021, 7065, 7111 개체군과 7159, 7148 개체군간의 뚜렷한 single nucleotide polymorphism을 melting curve를 통해 확인하였다(Fig. 6). 이로써 659-677-6 SNP site에 대한 당근 종자모 형질 관련 HRM 분자표지의 후대검정 및 다른 계통의 개체들을 이용한 실험을 통해 개발된 SNP 분자표지가 당근 종자모 형질 관련 분자표지로서의 정확성을 가지고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구에서 개발된 당근 종자모 형질 관련 SNP분자표지를 이용한다면 생육초기에 당근 개체의 종자모 형성 관련 선발을 수행할 수 있으므로 무모종자 당근 품종 육성에 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

당근(*Daucus carota* L. var. *sativa*)은 세계적으로 광범위하게 사용되는 채소 작물 중 하나로 비타민 A 카로티노이드의 전구체로 잘 알려진 베타카로틴이 다량 함유되어 있어 영양학적으로도 중요한 작물이다. 하지만 당근 종자는 종피의 epidermal 세포에서 연장되는 형태로 생성되는 종자모의 캐로톨 등과 같은 다양한 요인들에 의해 종자의 수분흡수와 발아가 억제된다. 따라서 당근 종자를 상품화하기 이전에 기계적인 종자모 제거과정을 거쳐야 하며 이러한 과정 때문에 생산자는 종자의 물리적인 손실은 물론 시간과 노동력, 그리고 자본금과 같은 추가적인 손실을 감수해야만 한다. 그리고 종자의 물리적인 손실은 종자발아율을 불균일하게 한다. 이러한 문제점들을 보완하기 위해서 무모종자 당근 품종 개발을 위한 육종이 필요하게 되었으며 이러한 육종과정을 위해 종자모 형질관련 분자표지에 관한 연구가 필요하게 되었다. 이에 따라, 본 연구에서는 단모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 659-1 개체와 유모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 677-14 개체, 그리고 단모종자 표현형 CT-ATR 615 OP 666-13 개체와 유모종자 표현형 CT-ATR 615 OP 671-9 개체의 cDNA library를 각각 작성하였다. 또한 각각의 개체별로 1,248개의 EST, 합계 4,992개의 EST를 sequencing하였다. 단모종자와 유모종자 개체의 EST sequence들을 2개의 조합에서 각각 비교 분석하여 19개의 SNP site, 14개의 SNP site를 확인하였으며 이를 바탕으로 SNP site에 대한 High Resolution Melting 분석을 위한 프라이머를 작성하였다. 작성된 HRM 프라이머들은 유모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1040 개체군과 무모종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1024, 1025, 1026 개체군을 이용하여 확인하였다. 그 중 한 세트의 HRM 프라이머에서 유모 및 단모종자 표현형 개체군들의 melting curve간 특이적 다형성을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 유모종자 당근 및 단모종자 당근간의 보다 간편한 선발을 위해 allele-specific PCR 프라이머를 작성하였다. 이러한 HRM 및 AS-PCR 결과는 무모종자 당근 육종에 있어 유용한 분자표지로서 사용될 수 있을 것이라 기대된다.

**추가 주요어:** 대립형질 특이적 중합효소 연쇄 반응, cDNA 라이브러리, *Daucus carota*, high resolution melt

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.
- Li, X.R., C.Y. Tu, and I.S. Kim. 1999. Effect of presowing seed treatments on germination and seedling emergence of carrot. *Int. 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 Acid 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. Garritsen. 1984. Inheritance of spine formation on seeds of carrot (*Daucus carota* L.). *Euphytica* 33:75-80.
- 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 Acid 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.
- Ujino-ihara, T., Y. Taguchi, Y. Moriguchi, and Y. Tsumura. 2010. An efficient method for developing SNP markers based on EST data combined with high resolution melting (HRM) analysis. *BMC Res. Notes* 3:51-55.
- 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.
- Wu, S.B., M.G. Wirthensohn, P. Hunt, J.P. Gibson, and M. Sedgley. 2008. High resolution melting analysis of almond SNPs derived from ESTs. *Theor. Appl. Genet.* 118:1-14.
- 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.