

연구과제 최종보고서

과 제 명	콩 원산지 판별을 위한 유전자 분석 기술 정립 연구					
총연구기간	2018년 1월 ~ 2018년 12월		당해연도 연구기간	2018년 1월 ~ 2018년 12월		
수행부서/ 세부수행부서	시험연구소 원산지검정과 (자체)	연구 책임자	구분	직위(급)	성명	
			정	과장	한국탁	
			부	주무관	최정아	
		참여 연구원	직위(급)		성명	
			팀장		최장열	
			주무관		김남국	
			주무관		박혜민	
			주무관		이미정	
참여부서						
사업구분	단년도 (√) 다년도 ()	총 (1)개년 중 (1)차 연도				
연구결과 요약	<div>○ ‘콩 품종인식 바코드 시스템’ 기술이전<ul style="list-style-type: none">- 국유특허 통상실시권 147품종 분석법 무상이전 및 기술연수(‘18.04)</div> <div>○ 표준시료 수집: 16품종(국산 15, 미국 1)<ul style="list-style-type: none">- 국내 보급종(대원, 태광, 선유, 대풍, 풍산나물)포함 표준시료 확보</div> <div>○ 202개 InDel 마커set 검증<ul style="list-style-type: none">- 수집한 16품종에 대하여 삼입·결실 유전자형 분석 진행- 품종 구분이 가능한 최적의 마커세트 선발- 1차 선발: 27개 마커set선발 후 2반복실험, PCR조건수립- 2차 선발: 18개 마커set선발 후 3반복실험, PCR조건수립</div> <div>○ 선발된 18개 마커set로 품종판별표 작성</div> <div>○ 유통시료로 판별여부 확인실험(수입8점, 국산8점)</div> <div>○ 수입품종8점(기타판별), 국산 8점(국산품종으로 확인)</div> <div>○ 18개 Indel마커로 국산품종 판별가능<ul style="list-style-type: none">- 표준유전체품종을 제외하고는 국산품종에 한해서만 분석가능- 수입산의 경우 검정불가, 기타품종으로 결과통보</div> <div>○ 수입산을 판별가능한 분석법 보완연구 필요</div>					

콩 원산지 판별을 위한 유전자 분석 기술 정립 연구

1. 연구배경 및 목표

가. 연구배경

현재 우리원의 원산지 단속에 활용하고 있는 콩의 원산지 분석법은 1994년 최초 외관상의 특성 조사 결과(립의 윤기, 자반병, 파쇄립, 이중곡립, 검정배꼽, 재색 등) 차이 및 보리쌀에 사용하던 new M-G* 시약반응에서 시작하였다. 당시 콩 수요량의 86%를 수입에 의존하고 있었으며, 가격면에서도 수입산이 국내산보다 약 9배 정도 낮아 수입콩을 국산으로 둔갑 판매할 우려가 컸다. 따라서 농산물 원산지 관리 업무의 조기정착을 위하여 원산지 식별방법 연구가 필요한 실정이었다. 1994년 참깨에서 NIRS(근적외선분광분석법, 근적외선 파장중 1,100-2,500nm 범위에서 농산물 공시료가 흡수, 반사한 광량이 산지별로 다르게 나타나므로 그 차이를 정량·정성 분석하여 기준검량선을 작성하고, 알고자 하는 공시료를 대비하여 검정하므로 원산지 구별이 가능케하는 원리)를 활용하여 국내산 참깨와 중국산 참깨를 전처리 없이 수십초내에 비파괴적으로 구별할 수 있게 되는 연구에 성공함으로써 1995년에는 NIRS를 콩에도 이용하여 분석법을 적용하였다.

이후 무기분석 장비를 이용한 분석법이 추가되고 NIRS 파장대도 400-2,500nm으로 확장되었으나 전처리의 생략이라는 기기분석 장점이 시료간 공극차이로 기기재현성이 떨어지는 양면성을 가지며, 년도별 작황등에 따른 시료의 차이를 보정하기 위하여 반복적인 시료수집 및 기기측정으로 장비별 보정에 많은 시간과 인력이 소요되는 단점 등이 발생하게 되었다. 또한 혼합시료의 경우 정확한 결과값을 도출하는데 어려움이 있는등 이화학적 분석법에 한계에 봉착하게 된다. 따라서 DNA를 바탕으로 하는 품종분석의 필요성이 대두되었다.

농산물이 가지고 있는 고유한 유전정보(DNA)를 이용한 분석기술의 경우 낱알 단위의 분석이 가능하기 때문에 혼합시료에 대한 원산지 판별이 가능하고, 농산물의 대사산물이나 유기·무기 성분들을 분석하는 이화학적 분석법과는 달리 생

육환경에 변화에 영향을 받지 않고 물리·화학적인 외부 변화에도 크게 영향을 받지 않아 가공된 형태의 농산물에 대한 원산지 판별에도 이용될 수 있다는 장점이 있다.

이번 연구사업에서는 농촌진흥청에서 개발한 '콩 품종인식 바코드 시스템' 기술을 국유특허 통상실시권을 통해 무상으로 이전받고 147품종에 대하여 DNA 정보와 생물정보 분석기술을 활용하여 품종 고유의 변이영역 탐색 후, 이를 이용하여 202개 삽입/결실(InDel) 마커를 이용, 국내 육성 콩 147개 품종을 판별하는 기술을 도입하여 우리원의 업무에 적용 가능하도록 콩 원산지·품종 판별을 위한 유전자분석법을 정립하고, 이를 이용하여 원산지단속업무에 활용하고자 한다.

나. 연구목표

본 연구에서는 콩의 품종인식 바코드 시스템으로 국산 및 수입산의 원산지, 품종 구별이 가능한 품종별 유전자 마커(InDel marker)를 선별하고 이를 이용하여 원산지 검정법을 개발하고 콩 원산지 단속 업무를 지원하기 위하여 추진하였다.

2. 연구내용 및 방법

가. 연구내용

1) 품종인식 바코드 시스템 실험 프로토콜 기술이전

- DNA 추출: DNA 추출에 필요한 시약 소모품 및 실험장비
- 소모품 및 시약: Pater towel, 액체질소, 유발, 막자 Tube(1.5ml, 2ml, 15ml), 타이머, Latex장갑, 편센, 에탄올(70%,99%), extraction buffer('CTAB Buffer), Cholorform : Isoamylalcohol(24:1), Isopropanol, RnaseA, 멸균수
- 실험장비: 항온수조(water, bath), vortex maxer, 원심분리기(4℃), shaker, 아이스메이커

step 1> DNA 품종은 품종별로 파종후 15일정도의 어린잎의 조직을 채취한다.

step 2 > 채취한 조직을 막자사발에 넣고 즉시 20ml의 액체질소로 냉각하면서 분말상태로 분쇄한다.

step 3 > 이 시료에 5~10ml의 extraction buffer(0.1M Tris, pH 8.0인 1.4—NaCl, 0.02M EDTA, 2%Cetyltrimethlammonium bromide(CTAB), 1% 2-mercaptoethanol)용액을 넣고 곱게 분쇄한 후 15ml의 원심 분리 튜브에 넣고, 65℃ 항온수조에 2시간이상 반응시키며, 5분간 격으로 가볍게 뒤집어 주면서 섞음

※2-mercaptoethanol : 유독성 용매액으로 반드시 후드실에서 작업할 것

step 4> Chlorlisoamy alcohol(24:1)용액 10ml을 샘플에 첨가한 후 손 또는 Shaker를 이용하여 10분이상 뒤집어 주면서 섞음

※ Chlorlisoamy alcohol(24:1)용액은 반드시 후드실에서 작업할 것

step 5> 샘플을 3000rpm, 4℃ 30분간 원심분리한 다음 상층액 10ul(10ml/ul) Rnase A가 들어있는 새 튜브에 옮김

※남은 용액은 반드시 폐수통에 별도로 버릴 것

step 6 > 새 튜브에 옮긴 뒤 99% 에탄올(-20℃) 2배 또는 isopropanol을 2/3 정도 넣고 섞어주어 DNA를 엉키게 함

step 7 > 엉킨 DNA를 유리막대로 깎아서 70% 에탄올 및 10mM NH4OAc 20ml정도가 들어있는 Petri dish 등에 분주하여 엉킨 DNA를 세척한 뒤, 1ml의 70% 에탄올이 든 2ml 튜브에 DNA를 넣어둠

step 8 > 새 2ml튜브에 70%에탄올을 넣고 1분간 원심분리기를 이용하여 quick down하는 방법으로 세척함. 에탄올이 완전히 증발할 때까지 Pater Towel위에 거꾸로 놓고 DNA가 떨어지지 않도록 건조

step 9 > DNA양에 따라 200-500ul의 멸균수를 넣고 DNA를 녹임

step 10> DNA양을 확인하고 PCR에 적당한 농도(20ng/ul)로 희석하여 사용

- DNA 증폭: PCR에 의한 DNA 증폭에 필요한 시약, 소모품 및 실험장비
- 소모품 및 시약: PCR Plate, 8strip PCR tube, 1.5ml tube, 네임펜, 피펫, 8 채널 멀티피펫, 얼음, GO Taq Green Master Mix, 프라이머 set, 미네랄오일 또는 sealin tape, Latex장갑, 실험복
- 실험장비: PCR 기계, 원심분리기, 아이스메이커

step 1> PCR 기기 프로그램

단계	온도	시간	Cycle 수
1	95℃	5 min	1
2	94℃	30 s	35 cycles
3	48℃	30 s	
4	72℃	30 s	
5	72℃	10 min	1
6	10℃	∞	-

step 2> 프라이머 set를 96well plate에 최종농도 1pmole로 정량하여 분주하여 PCRreaction에 준비

시약	working sol 농도	합량(ul)	최종 농도
DNA	20ng	2	40ng
Go Taq	2X	5	1x
F, R primer set	10 Pmole	F-1 R-1	1 pmole
dH2O	-	1	-
Total		10	

- step 3> 1.5ml tube에 분석할 시료 수의 1~2개의 양을 더하여 PCR master mixture를 만듦
- step 4> 만든 PCR master mixture 12개의 양이 들어갈 수 있게 8 strip PCR tube에 분주
- step 5> 각각의 PCR master mixture를 프라이머 양만큼 뺀양을 8채널 멀티 피펫을 이용하여 분주
- step 6> 8채널 멀티피펫을 이용하여 미리 정량한 프라이머를 넣음, 그 후

미네랄 오일을 넣거나 Sealing tape를 붙여 PCR 준비

step 7> PCR기계의 온도가 70~80℃정도가 되면 PCR plate를 넣고 PCR을 수행

- 결과확인: 3% Agarose gel 만들기 및 전기영동
- 소모품 및 시약: Agarose, EtBr, 0.5X TBE buffer, 삼각플라스크, 메스실린더, 타이머, Latex장갑, 실험복, 쿠킹랩
- 실험장비: 저울, Agarose gel 트레이, 전자레인지, Comb, 전기영동기, Power supplier, 수평계

step 1> 평평한 바닥위에 gel을 분주할 트레이를 조립(수평확인-수평계)

step 2> 삼각플라스크에 0.5X TBE buffer 105ml(증발량을 고려하여 5ml 추가)을 넣고 3g의 agarose의 powder넣고 가볍게 섞음

step 3> 쿠킹랩으로 삼각플라스크 입구를 막고 수증기가 빠져나갈 작은 구멍을 몇 개 뚫은 뒤, 전자레인지에 놓고 3분정도 가열 뒤 꺼내어 agarose를 잘 섞어주고 다시 전자레인지에서 1분 30초 정도 더 가열함(ef 녹았을 경우 조금 더 가열). 부드럽게 흔들어 주면서 10-15분 뒤 55-60℃로 식힌 후 EtBr(10ml/ml)을 4ul첨가하고 섞음

※ EtBr은 유해한 시약이므로 뜨거운 수증기를 흡입하지 않도록 주의

step 4> 조립해둔 트레이에 기포가 생기지 않도록 조심해서 agarose를 분주하고 기포가 생겼을 경우 깨끗한 팁으로 재빨리 기포를 제거한 뒤 Comb을 위 아래로 2개를 꺾고, gel이 굳을 때까지 30분 정도 방치

step 5> gel이 굳으면 0.5X TBE buffer로 채워진 전기영동 탱크로 옮겨 Comb을 제거함

step 6> 전기영동 탱크로 옮겨진 agarose gel에 첫 번째 well은 DNA Ladder용으로 비워두고 두 번째 well부터 PCR product를 8채널 피펫으로 순서대로 loading한 후 running.

※ running 조건 :Hige voltage(100V)로 약 80분 이상

step 7> 전기영동이 끝난 agarose gel은 UV lamp아래에서 DNA밴드를 확인하고 사진을 찍음

※DNA밴드가 보이지 않을 경우 EtBrfh 염색한후 다시 확인

step 8> PCR증폭 유무 및 사이즈 확인

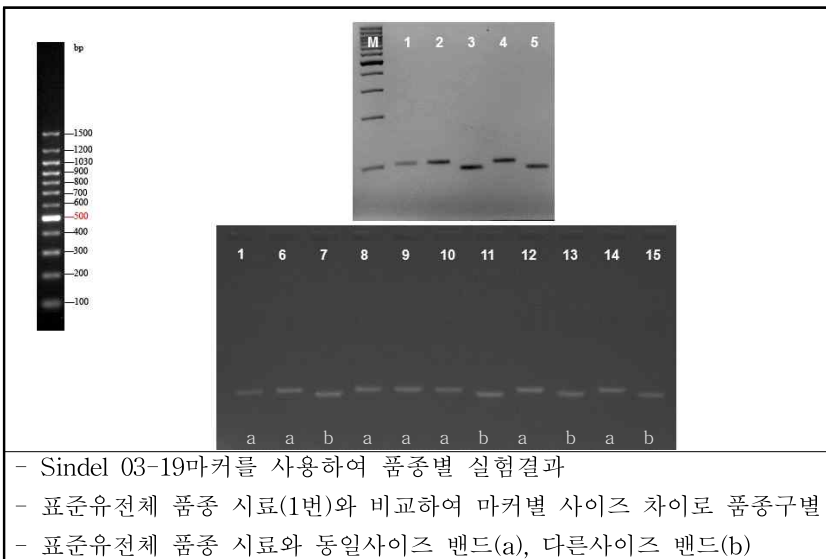
2) 농진청 콩 품종인식 분석법 분석법 검증

○ 표준시료 수집: 16품종(국산 15품종, 미국 1품종)

구분	품종명
미국	Williams82*
국산(보급종)	대원, 태광, 풍산나물, 선유, 대풍, 신화, 황금, 남평, 천상,우람, 황금울, 새단백, 풍원, 청자(1, 2호)

※Williams82 : 표준유전체 품종, 전장유전체 정보가 해독되어 있어 품종구분의 기준으로 사용

○ 202개 InDel 마커 검증: 수집한 16품종에 대하여 삽입·결실(InDel) 유전자형 분석



○ 품종 구분이 가능한 마커 세트 1차 선발

- 27개 마커 선발 후 16품종별 각 2반복 분석
- PCR 조건실험 실시(TM값에 따른 annealing 온도설정 등)
- PCR 결과 잡밴드 및 품종별 InDel 구별이 힘든 마커 탈락

<p>S11-09(will82, 대원, 태광, 풍산) a a a a</p>	<p>S01-19(will82, 대원, 태광, 풍산) a b a a</p>
전기영동 조건 : 100v 80min	전기영동 조건: 250v 40min
<p>S10-13(선유, 대풍, 신화, 황금) a b b a</p>	<p>S11-09(will82, 대원, 태광, 풍산) a a a a</p>
PCR조건이 맞지않는 경우 잡밴드	모든품종이 동일패턴인 경우
<p>S08-03(선유, 대풍, 신화, 황금) b a a b</p>	<p>S08-03(will82, 대원, 태광, 풍산) a b b a</p>
품종별 InDel 마커가 명확히 구분됨	품종별 InDel 마커가 명확히 구분됨

○ 품종 구분이 가능한 마커 세트 2차 선발
- 18개 마커 선발 후 16품종별 각 3반복 분석

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472	1473	1474	1475	1476	1477	1478	1479	1480	1481	1482	1483	1484	1485	1486	1487
--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

○ 품종 구분이 가능한 마커 세트 2차 선발

- 18개 마커 선발 후 16품종별 각 3반복 분석

- 18개 마커 품종판별표 작성

번호	마커	Williams 82	대원	태광	종산나물	선유	대풍	신화	미화	아리나	천상	우람	해미애	새단백	복원	청자 1호	청자 3호
1	Sindel_02_13	a	a	b	a	b	a	b	a	a	a	a	b	b	b	a	a
2	Sindel_03_13	a	a	a	a	a	b	b	a	b	a	b	a	b	a	a	a
3	Sindel_03_20	a	a	b	a	b	a	a	a	b	b	b	b	a	a	b	b
4	Sindel_07_04	a	b	b	a	a	a	a	b	a	b	a	a	a	b	b	b
5	Sindel_07_18	a	a	a	b	b	b	b	a	a	a	a	b	a	b	a	a
6	Sindel_08_03	a	b	b	a	b	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b
7	Sindel_09_05	a	a	a	a	a	b	a	a	a	a	a	a	b	a	a	a
8	Sindel_11_04	a	b	b	a	b	a	a	a	a	a	b	b	b	a	a	b
9	Sindel_12_18	a	b	b	b	b	a	b	b	b	b	b	b	b	a	b	b
10	Sindel_13_09	a	a	b	a	b	b	a	a	a	a	a	b	b	b	b	a
11	Sindel_13_18	a	b	b	b	b	a	b	b	a	a	b	b	b	a	b	a
12	Sindel_14_04	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
13	Sindel_14_15	a	a	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
14	Sindel_15_12	a	a	a	a	a	b	b	a	b	b	b	a	b	b	b	b
15	Sindel_16_03	a	a	a	a	a	a	b	a	a	a	a	b	b	a	a	a
16	Sindel_17_05	a	a	b	a	b	b	b	a	b	b	a	b	a	a	a	b
17	Sindel_19_17	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	b	b
18	Sindel_20_07	a	a	a	b	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

- 18개 마커 정보 및 PCR 밴드크기

번호	마커	위치	PCR fragment	Seq
1	Sindel_02_13	Gm02	92	F GGTACAAGAATGAGTGGGTG
				R TGACACATTGACACTCATTAAA
2	Sindel_03_13	Gm03	111	F AAACATGAATGGTGCTTTTT
				R TAAAGCCCCAAAAGTGAATA
3	Sindel_03_20	Gm03	117	F GACTGTATTTGTAAAGTAGGAGTTT
				R GCCTTTTACTTTTCATCCTTC
4	Sindel_07_04	Gm07	105	F ATGCTAAAAATTGGATTTGC
				R CAGAAGAAGAAAGAAAGCACA
5	Sindel_07_18	Gm07	120	F CAAATTAATGTTTCGAAAAGC
				R AGAATTAGGTCTGTGGGACC
6	Sindel_08_03	Gm08	113	F ACCAATATCGATCTTTACCAA
				R TCACTCTCTTAGCATATTAATCAAA
7	Sindel_09_05	Gm09	114	F TCCGATCAGTCTCTAACACC
				R GCAAGAAAATTGAATTGGAG
8	Sindel_11_04	Gm11	95	F TTTGCATGTTTTGTATTGG
				R AACAAATTAAGAGAAAGGCG
9	Sindel_12_18	Gm12	116	F TTGAAAATAGGGAAACCTGA
				R AACTGATGTTAGACAAGCCC
10	Sindel_13_18	Gm13	90	F ACATGACATTTAAGGGATGC
				R TTTCACCTCTTAGGTGCCIT
11	Sindel_13_09	Gm13	118	F GATCAAATCACTAAAATGTAGTCC
				R TCCAGATAAGAAAACAAAAACA
12	Sindel_14_04	Gm14	114	F TGTCAACCAATCTTTGTATAACAT
				R TCCTATACACGACGACTTCC
13	Sindel_14_15	Gm14	99	F TCACATACTATAGCATCCCGT
				R CGCTAGAGGTTGAAGATGAT
14	Sindel_15_12	Gm15	98	F TTTGAGGGTGTTTCTCACTT
				R TCAAAATTCAGTTATGTCCAA
15	Sindel_16_03	Gm16	120	F TCGGTCATTGGTATTTGATT
				R TGTGTAATTGTGTTATTGAATTAT
16	Sindel_17_05	Gm17	116	F TCCTCCTTTTGAAATGTGTC
				R CAAATCAAATGGAAGAAATACA
17	Sindel_19_17	Gm19	91	F TGTCTGTGTGTTGAATGGAG
				R ACAACCTGTCAAACAAGTCC
18	Sindel_20_07	Gm20	120	F GCTAAGCAATTAGCAACTCAA
				R TTTATAATGCATGCACATTTTT

3. 결과 및 고찰

- 품종구별이 가능한 18개 Indel 마커로 품종판별표 작성
- 유통시료로 판별여부 확인실험(국산 7점, 수입 8점, 총 15점×3반복)
 - 국산: 국산6, 기타1
 - 수입: 기타8점

번호	마커	중남형	원산보성	전북완주	경기고양	WILLMS82	광복예천	경남부산	충북음성	캐나다1	캐나다2	미국1	미국2	중국1	중국2	베트남1	태국1
1	Sindel_02_13	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
2	Sindel_09_13	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	a	a	a	a	a
3	Sindel_03_20	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	a	a	b
4	Sindel_07_04	b	b	a	a	a	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a
5	Sindel_07_18	a	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	a
6	Sindel_08_03	b	b	a	b	a	b	b	b	b	b	b	b	b	a	b	b
7	Sindel_09_05	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
8	Sindel_11_04	a	b	a	b	a	b	b	b	a	a	a	a	b	b	b	b
9	Sindel_12_18	b	b	b	b	a	b	b	b	a	b	a	a	a	a	a	a
10	Sindel_13_09	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	a	a	b	b
11	Sindel_13_18	a	a	b	b	a	b	b	b	a	a	a	a	a	a	a	a
12	Sindel_14_04	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	a	a	a
13	Sindel_14_15	a	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
14	Sindel_15_12	b	b	a	a	a	a	a	a	b	b	a	a	b	a	b	b
15	Sindel_16_03	a	a	a	b	a	a	a	a	b	a	a	a	b	b	a	b
16	Sindel_17_05	b	b	a	a	a	a	a	a	b	a	b	b	a	a	a	a
17	Sindel_19_17	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	a	a	a
18	Sindel_20_07	a	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	품종판별	천상	청자3호	풍산나물	기타	표준품종	대원	대원	대원	기타	기타	기타	기타	기타	기타	기타	기타

- 18개 Indel마커로 국산품종 판별가능
 - 표준유전체품종을 제외하고는 15개 국산품종에 한해서만 분석가능
 - 수입산의 경우 검정불가, 기타품종으로 결과판독
- 수입산을 판별가능한 분석법 보완연구 필요

4. 기대성과 및 활용방안

가. 기대성과

- 콩 품종 판별법 개발로 콩 및 콩 유래품목(콩나물, 청국장 등) 부정유통 방지
- 이화학 분석에 유전자분석을 추가하여 분석
 - 콩 원산지 판별결과 보완 및 신뢰도 상승
 - 유전자분석법을 추가 활용하여 원산지 판별결과 정확도 향상

나. 활용방안

- 품종 판별법에 대한 연구결과 논문, 학회 등 발표
- 콩 품종 판별법 매뉴얼 작성, 교육 등을 통해 원산지단속 업무에 활용

5. 참고문헌

- 벼·콩 품종인식 바코드 시스템 매뉴얼, 농촌진흥청 국립식량과학원
- 원산지연구실 일반콩 연구, 1995, 농관원 시험연구소
- 원산지연구실 참깨 연구, 1995, 농관원 시험연구소
- 근적외선분광광도계(NIRS)를 이용한 국내산 콩과 수입콩의 판별분석/안형균 등, 한국작물과학회 제57권 제3호(2012년 9월)
- 1913년부터 2013년까지 한국에서육성된 콩 품종의 이소플라본 함량의 변이와 다변량 분석에 의한 품종군 분류/정현삼 등, 한국육종학회지(2018.03.01.)
- AT KAMIS, 통계청 국내 농작물 생산조사(2017.12.22.)