

연구과제 최종보고서

과 제 명	꽃감(감) 품종 구별을 위한 유전자 분석법 개발				
총연구기간	2018년 6월 ~ 2018년 11월	당해연도 연구기간	2018년 6월 ~ 2018년 11월		
수행부서/ 세부수행부서	시험연구소 원산지검정과 (용역)	연구 책임자	구분	직위(급)	성명
			정	과장	한국탁
			부	주무관	김남국
		참여 연구원	직위(급)		성명
			선임연구원		김일희
			연구원		박민철
			연구원		류재하
참여부서	(주)미소진				
사업구분	단년도 (√) 다년도 ()	총 (1)개년 중 (1)차 연도			
연구결과 요약	<연구개발 목표> ○ 50개 꽃감(감) 품종 구분을 위한 Multiplex allele specific PCR 검정법 개발 <연구개발 내용> ○ 9개 감 품종의 NGS data 분석을 통한 34,006개의 후보군 SNP 마커 발굴 ○ 100개 이상의 allele specific primer test 진행 ○ 품종 판별에 사용이 가능한 12쌍의 allele specific primer set 개발 ○ 각 마커의 간섭현상 및 증폭산물의 크기를 고려한 2 set의 multiplex PCR 조건 완성 ○ 개발 기술의 증폭 민감도 확인 및 사용 가능 범위 설정 ○ One-step lysis method를 이용한 template DNA 준비 간소화 ○ 47종 표준 꽃감(감) 시료를 대상으로 개발 기술의 검증 ○ 각 품종별 증폭 코드 확인 및 품종판정표 작성				

꽃감(감) 품종 구별을 위한 유전자 분석법 개발

1. 연구배경 및 목표

가. 연구배경

최근 수입개방 등으로 외국산이 무분별하게 국내에 유입되며, 이로 인하여 외국산이 국내산으로 둔갑되는 부정유통이 발생함에 따라 우리 농산물에 대한 국민적인 관심이 높아지고 있다. 꽃감(감)은 2015~16년 기준으로 매년 1천톤 이상 수입되고 있으며, 중국으로부터 수입량의 99%가 수입되고 있다. 중국산 꽃감(감)은 1kg당 약 10,000원으로 국내산(28,000원/kg) 보다 저렴하여 원산지 부정유통의 개연성이 높은 품목 중에 하나이다. 또한 ‘상주꽃감’ 등 지리적 표시 제도를 통해 원산지 관리를 하고 있으나, 타 지역 생감 등을 상주로 유입하여 건조 후 ‘상주꽃감’ 으로 판매하는 등 지리적 표시 위반 사례가 증가되고 있다. 이러한 시점에서 꽃감(감)의 국내산과 외국산 여부를 판별하는 방법뿐만 아니라, 정확한 품종을 구별하는 과학적인 판별방법의 개발이 요구 되고 있다. 이에 농관원에서는 2012년 꽃감(감) 원산지 판별 유전자 분석법을 개발하였으나, 국내산과 외국산을 판별하는 정확도가 약 90%로 정확한 원산지 판별이 어려운 실정이며, 품종을 구별하는 과학적인 방법은 아직 개발되고 있지 못한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 국내산 주요 꽃감(감) 품종과 외국산 품종을 구별할 수 있는 유전자 마커 및 판별법 개발을 통해 정확한 품종과 원산지 정보를 제공하여 국내 꽃감 재배농가의 소득보존과 소비자의 알 권리 보호하고, 원산지 둔갑 판매 등 부정유통 방지에 도움이 되고자 한다.

나. 연구목표

본 연구개발과제의 목표는 꽃감(감) 품종(원산지) 검정법 개발로 검정의 신뢰도 제고 및 농산물의 유통질서를 확립하는 것이다.

2. 연구내용 및 방법

가. NGS data 분석을 통한 후보 SNP 선발

1) 염기서열 분석 시료 목록

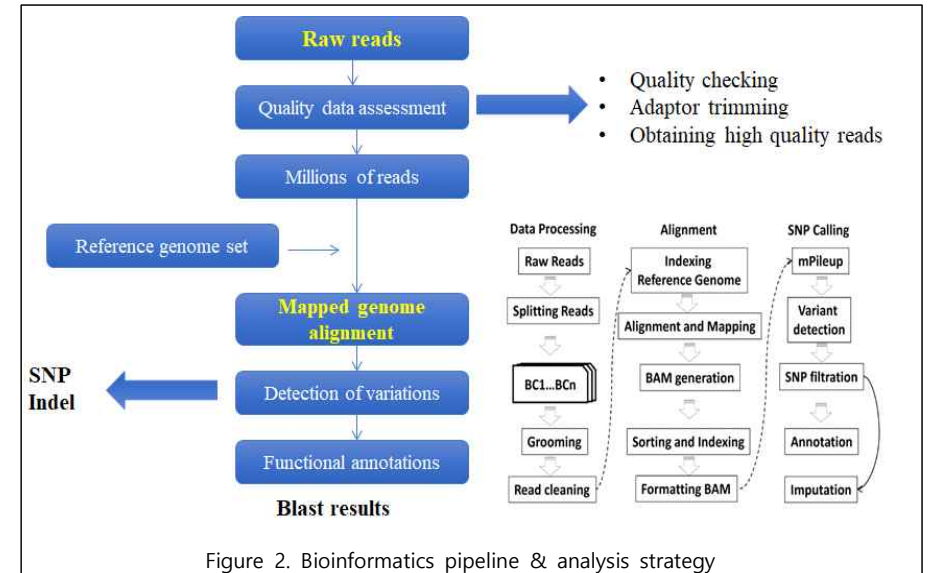
꽃감(감) 염기서열 분석 시료는 상주동시를 read sample로 국내산 4품종, 수입산 5품종에 대해 농산물품질관리원 시험연구소로부터 NGS raw data를 전달받았으며 1차 목표는 Denovo assembly를 통해 유전체의 염기서열을 모두 확보하는 것이었다. 전달받은 NGS data 및 각 품종에 대한 설명은 다음과 같다.

국내산	NGS	Comment	수입산	NGS	Comment
산청고종시 (K)	○	나주배연구소수집 산청지역재배	Mopanshi (중국, C1)	○	서북농림과학기술대학수집 중국분포넓음
산청단성시 (K)	○	나주배연구소수집	Fupinglanshi (중국, C2)	○	서북농림과학기술대학수집 재배면적소량
함안수시 (K)	○	나주배연구소수집 물림이라불림	Yueshi (중국, C3)	○	서북농림과학기술대학수집 광사지역재배 재배면적이 가장 넓은 수출용
영동월하시 (K)	○	나주배연구소수집 영동동시로 불림	Nuxinshi (중국, C4)	○	산동성의 농가수집 지역별 감의 형태적 차이 보임
상주동시 (K)	○ (Reference)	진영단감연구소수집 국내 대표 꽃감용감 품종 NGS용으로 사용	Hachiya (일본, J1)	○	나주배연구소수집 대형으로 불림

Figure 1. NGS 분석 시료 정보

2) Bioinformatics pipeline & Analysis strategy

먼저 fastq file 형태의 raw read를 대상으로 quality data assessment를 진행하였으며 quality checking, adaptor trimming 과정을 거쳐 high quality read를 확보하였고, 100만 단위의 read를 Reference genome set과 비교하였다. Reference genome set과의 mapping이 끝난 서열들에 대해 alignment를 진행한 후 염기서열상의 변이 부분을 확인하고 SNP 및 Indel marker를 추출하여 Blast search를 통해 functional annotation 작업을 진행하였다.



나. Multiplex allele specific PCR set up

1) Allele specific primer design

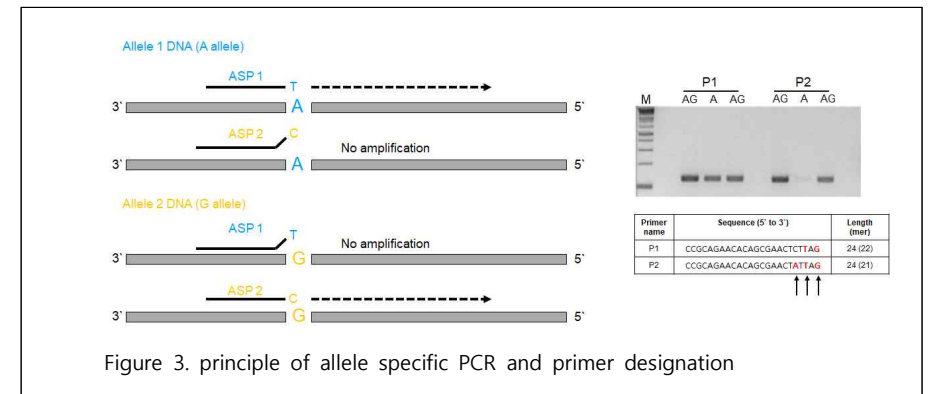


Figure 3. principle of allele specific PCR and primer designation

제작한 allele specific primer는 각각 5 picomoles/ul가 되도록 희석하여 특이도 및 증폭율을 확인하였으며 변별력 있는 primer set을 확보하기 위해 총 6차의 후보군 마커 선별을 진행하였다.

2) Template preparation

① genomic DNA precipitation

꽃감(감)의 genomic DNA 추출을 위해 시험연구소로부터 수령한 시료를 대상으로 실험을 진행하였으며 1차 수령 시료는 DNA 추출이 어려운 상태로 확인되었고, 추가로 10개의 품종에 대해 시료를 전달받아 실험을 진행하였다.

식물에서의 DNA 추출은 대체로 다른 종의 DNA 추출과 비교하여 매우 어려운 것으로 알려져 있으며, 감의 DNA 추출과 관련된 논문들에서는 모두 어린 잎을 대상으로 genomic DNA를 추출하여 실험을 진행한 것으로 확인되었다. 본 과제에서는 2차 수령 시료의 각 부위별로 DNA 추출을 진행하였으며, NGS data analysis가 완료되기 이전의 실험이기 때문에 house keeping gene의 하나인 actin-2 gene 및 SCAR marker를 이용한 primer를 합성하여 DNA 추출 후 PCR 가능성의 확인에 사용하였다.

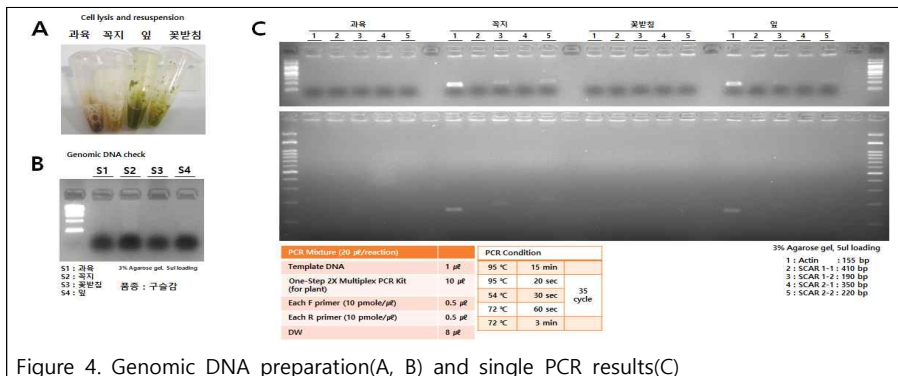


Figure 4. Genomic DNA preparation(A, B) and single PCR results(C)

② One step lysate preparation

One step lysate를 준비하기 위하여 시료 100mg을 측정 후 막자 및 막자사발과 액체질소를 이용하여 마쇄한 다음 1.5 ml microtube에 담고 One-step solution 200 µl를 첨가하였다. 일반적으로 신선한 상태의 시료의 경우 별도의 마쇄과정이 없어도 PCR 반응에 사용이 충분한 lysate를 확보할 수 있으나, 본 실험에 사용된 꽃감(감)시료는 반 건조 상태의 과육이 장기 보관되었던 것으로 판단하였기 때문에 마쇄 과정을 포함하였다. 이후 30초간 vortexing하여

골고루 혼합한 다음 상온에서 15분간 정치하였다. 정치 반응 후 10초간 spin down하여 상등액 2 µl를 PCR 반응에 template로 사용하였으며 남은 반응물은 13,200 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액 100 µl를 취하여 새 1.5ml microtube로 옮긴 다음 사용 전까지 -20℃에 보관하였다.

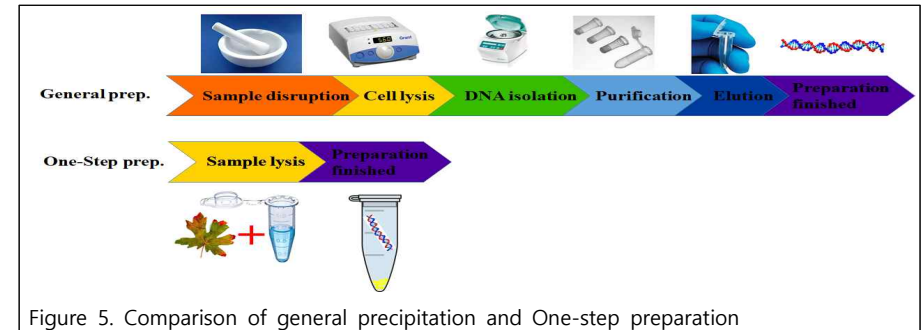


Figure 5. Comparison of general precipitation and One-step preparation

One-step solution을 사용하여 3차로 수령한 47종의 꽃감(감)시료를 대상으로 lysate준비를 진행하였다. genomic DNA의 추출 및 PCR 실험에서 과육을 대상으로 진행한 실험 결과는 증폭 산물이 거의 확인되지 않았기 때문에 씨가 있는 품종은 씨를 이용하였고 나머지 시료들에 대해서는 과육을 대상으로 실험을 진행하였다.

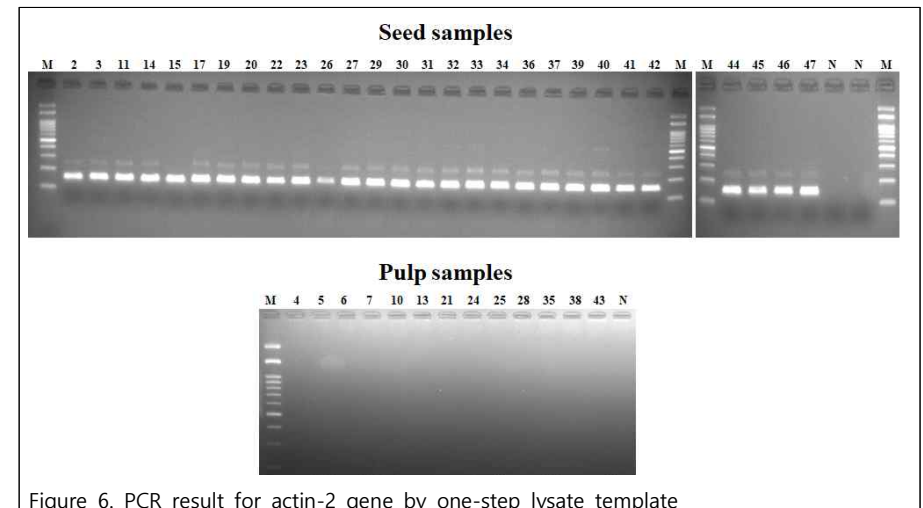


Figure 6. PCR result for actin-2 gene by one-step lysate template

씨앗을 이용한 실험 결과에서는 전 실험군에서 증폭 산물을 확인할 수 있었으며 genomic DNA를 사용한 실험 결과보다 증폭 산물의 양이 월등히 높은 것을 확인할 수 있었다. 그러나 과육을 대상으로 진행한 실험 결과는 genomic DNA를 사용한 실험 결과와 마찬가지로 PCR 증폭 산물을 확인할 수 없었다.

3) Candidate primer selection

① 후보군 allele specific primer 선별 실험

NGS data 분석 결과를 바탕으로 각 data에 해당하는 국내산 품종 5개를 이용하여 single PCR을 진행하였다. 총 6차에 걸쳐 후보군 SNP들을 선별하고 primer를 제작하였다. PCR 반응액은 2 μ l의 one step lysate를 주형으로 사용하고 1 μ l의 정방향 primer (5 picomoles/ μ l)와 1 μ l의 역방향 primer (5 picomoles/ μ l) 및 10 μ l의 2X Multiplex PCR Mix, 6 μ l의 멸균된 증류수를 혼합하여 최종 20 μ l가 되도록 하였다. PCR 반응 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 15분간 pre-denaturation을 한 후 95 $^{\circ}$ C 20초, 60 $^{\circ}$ C 40초, 72 $^{\circ}$ C 60초로 32 사이클을 진행한 후 72 $^{\circ}$ C에서 3분간 post extension을 진행하였고, 반응종료 후 PCR 산물 5 μ l를 취하여 3% agarose gel에 loading 한 다음 250 volt에서 30분간 전기영동을 진행하고 결과를 확인하였다.

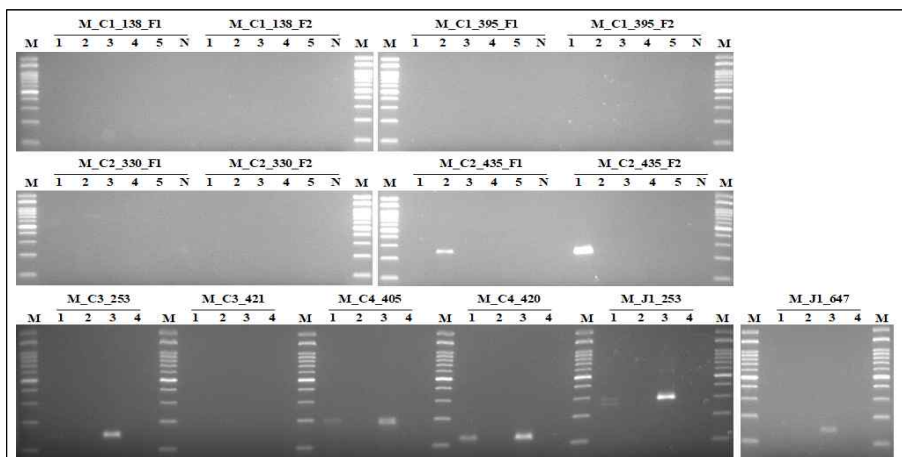


Figure 7. PCR result for 1st candidate allele specific primer test (C1, C2, C3, C4, J1)

선별한 후보군 마커중 일부를 대상으로 PCR 증폭 및 정제과정을 거친 후 염기서열 분석을 진행하였다. 변별력이 없는 마커로 확인된 M_190273 마커 및 변별력이 있는 M_221225 마커는 함안수시, 영동 월하시, 상주동시 시료의 SNP 부위를 확인하였으며 변별력이 확인된 M_224309마커는 함안 수시, 상주 동시, 산청 단성시 시료를 대상으로 분석을 진행하였다.

먼저 변별력이 없는 마커로 확인된 M_190273 마커의 SNP위치 유전자형 확인을 위한 직접염기서열 분석법을 진행한 결과, 실험에 사용한 3종의 시료 모두에서 2종류 이상의 PCR 산물이 혼합되어 있는 double peak이 확인되었으며 해당 SNP를 포함한 영역이 여러 염색체 위치에 존재할 것으로 예상된다. 또한 다배체의 경우에도 SNP 마커가 고정되어 있는 경우에는 동일한 염기서열을 갖기 때문에 2종 이상의 peak이 겹쳐 보이더라도 단일 peak의 형태로 보이므로 이와 같은 현상은 여러 위치에 존재하는 SNP 마커 및 인접한 염기서열상에서 서열의 길이 및 변이가 다양하게 존재할 것으로 예상된다.

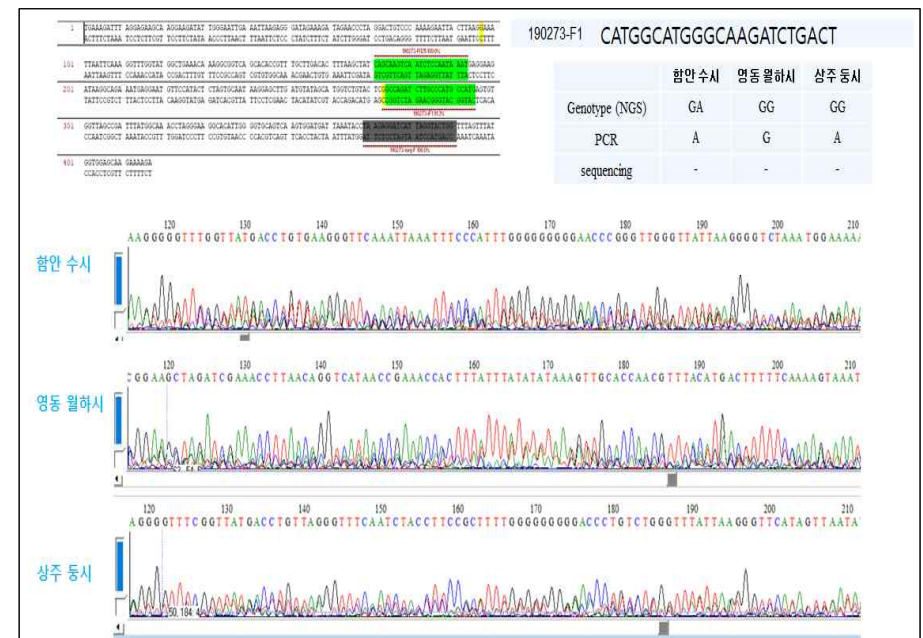


Figure 8. Sequencing result for M_190273 SNP genotyping



Figure 9. Sequencing result for M_221225 SNP genotyping

4) Multiplex allele specific PCR set up

① Candidate primer의 순차적 추가를 통한 증폭 특이도 및 증폭을 비교

PCR 반응액은 2 μ l의 one-step lysate를 주형으로 사용하고 2 μ l의 primer mixture (each 5 picomoles/ μ l) 및 10 μ l의 2X Multiplex PCR Mix, 6 μ l의 멸균된 증류수를 혼합하여 최종 20 μ l가 되도록 하였다. PCR 반응 조건은 95℃에서 15분간 pre-denaturation을 한 후 95℃ 20초, 60℃ 40초, 72℃ 60초로 32 사이클을 진행한 후 72℃에서 3분간 post extension을 진행하였고, 반응종료 후 PCR 산물 5 μ l를 취하여 3% agarose gel에 loading 한 다음 250 volt에서 30분간 전기영동을 진행하고 결과를 확인하였다.

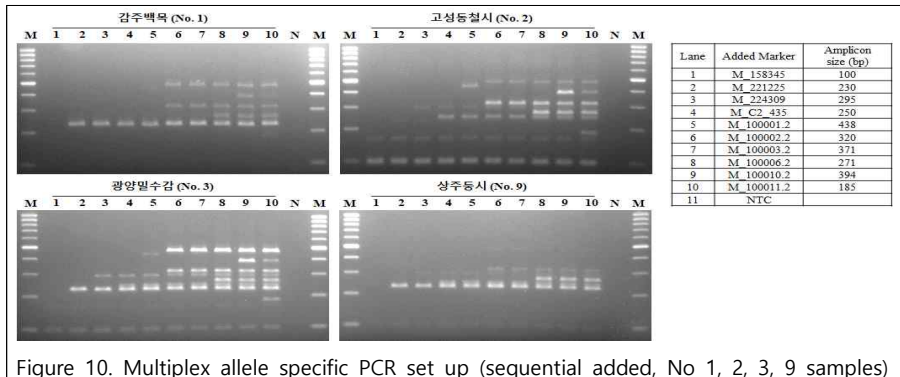


Figure 10. Multiplex allele specific PCR set up (sequential added, No 1, 2, 3, 9 samples)

5) Multiplex allele specific PCR system의 증폭 민감도 확인

표준 시료로 제공받은 꽃감(감)의 씨앗 및 과육은 보존 기간이 불분명하고 시료의 건조상태의 편차로 인해 정확한 증폭 특이도 및 민감도를 확인할 수 없었다. 따라서 시중에서 유통되고 있는 감 시료를 구매하여 genomic DNA를 추출하고 농도 및 순도를 측정된 다음 3% agarose gel에 5 μ l loading 하여 genomic DNA의 상태를 확인하였다. 농도 및 순도가 확인된 genomic DNA를 이용하여 PCR 반응액에 사용할 수 있는 최대 부피인 8 μ l부터 1/2씩 순차적으로 희석하여 증폭 민감도를 확인하고자 하였다.

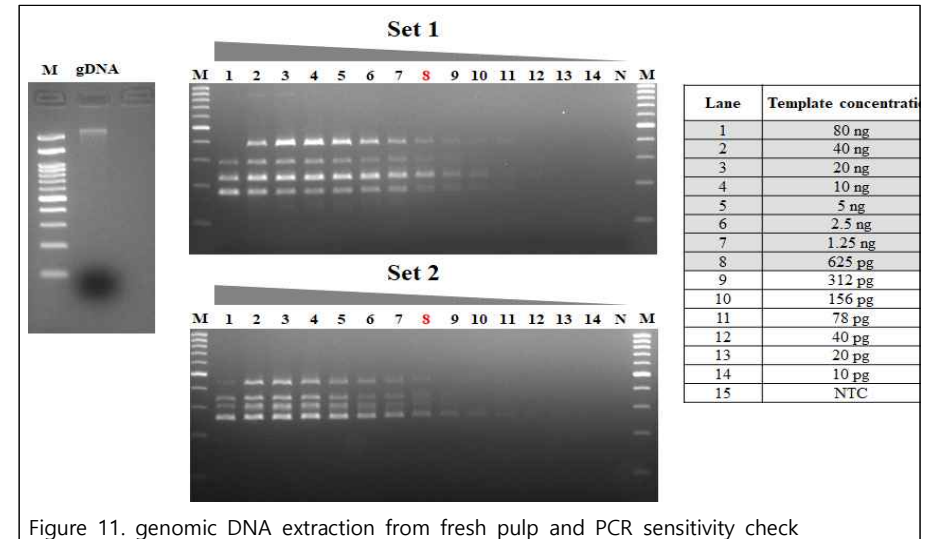


Figure 11. genomic DNA extraction from fresh pulp and PCR sensitivity check

3. 결과 및 고찰

가. 표준 시료의 template 준비 및 PCR 확인

1) 47종의 국내산 표준 꽃감(감) 시료를 대상으로 genomic DNA를 추출하여 PCR한 결과에서는 대부분의 시료에서 증폭 산물을 확인할 수 없었다. 따라서 One-step lysate를 준비한 후 actin-2 gene primer를 사용하여 PCR 반응 여부를 확인하였으며, 씨앗이 있는 품종은 씨앗 내부의 조직을 대상으로 진행하였고, 씨앗이 없는 품종은 과육을 대상으로 lysate를 준비하였다.

2) PCR반응의 정상적인 진행 유무를 확인하기 위하여 Internal control 마커를 추가하였고, 각 마커들의 증폭 산물의 크기를 재조정하여 Set 1, Set 2에 재 조합하였다. Internal control 마커는 100bp의 증폭 산물이 형성되도록 제작하였으며 35품종의 시료를 대상으로 multiplex allele specific PCR 분석을 진행하였다. PCR 반응액은 2 μ l의 one-step lysate를 주형으로 사용하고 2 μ l의 primer mixture 및 10 μ l의 2X Multiplex PCR Mix, 6 μ l의 멸균된 증류수를 혼합하여 최종 20 μ l가 되도록 하였다. PCR 반응 조건은 95℃에서 15분간 pre-denaturation을 한 후 95℃ 20초, 60℃ 40초, 72℃ 60초로 35 사이클을 진행한 후 72℃에서 3분간 post extension을 진행하였고, 반응종료 후 PCR 산물 5 μ l를 취하여 3% agarose gel에 loading 한 다음 250 volt에서 30분간 전기영동을 진행하고 결과를 확인하였다.

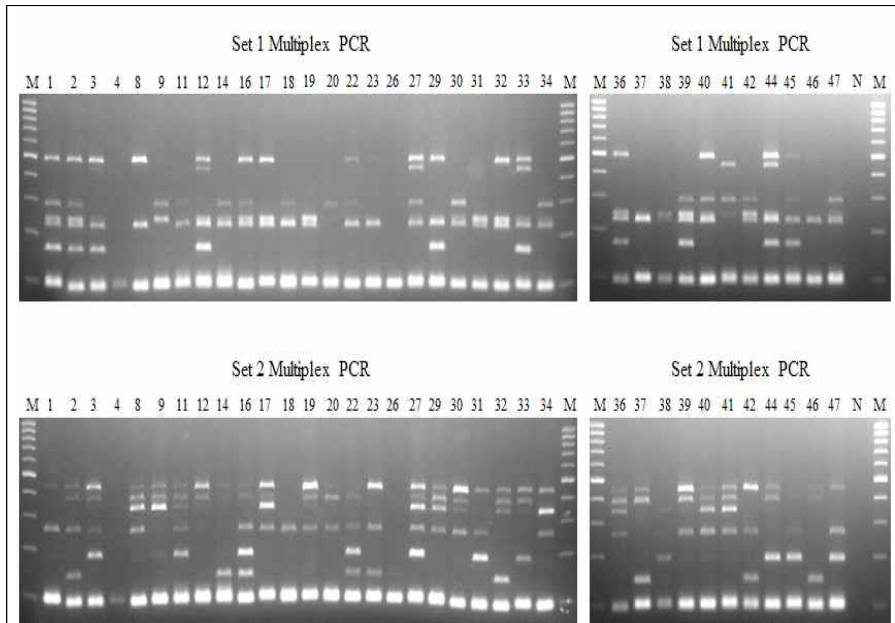


Figure 12. Multiplex allele specific PCR results (internal control marker added)

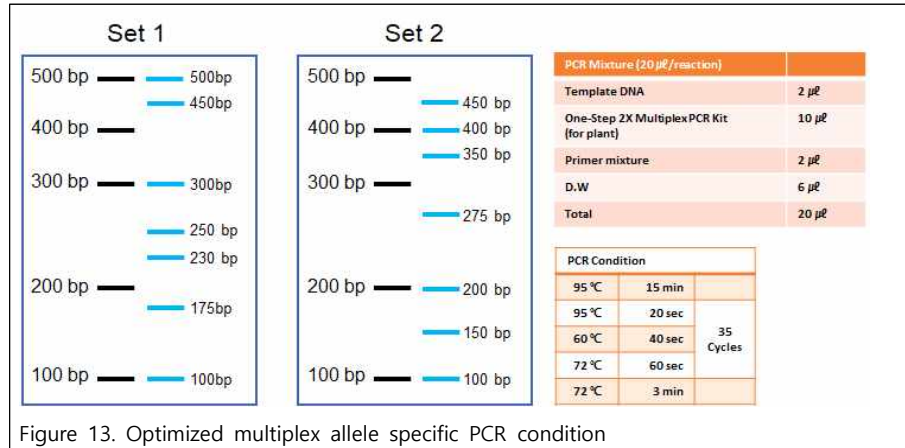
3) 각 품종의 증폭 패턴을 코드화하여 품종 판정표를 작성하였으며 미 증폭된 마커는 숫자 0으로 표기하였고, 증폭된 마커는 1로 표기하였다.

Table 1. Analysis table for PCR result

No	품종	M	500	450	300	250	230	175	100	450	400	350	275	200	150	100	Code
1	감주백목		1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	10111111001001
2	고성동철시		1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	10111111101011
3	광양밀수감		1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	11001111101101
4	도근조생		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	00000010000001
5	산청고종시		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00000000000000
6	산청꾸리감		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00000000000000
7	산청단성시		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00000000000000
8	상감동시		1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	10001011111001
9	상주동시		0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	00110011110101
10	수홍		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00000000000000
11	예천고종시		0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	00101001111101
12	영동월하시		1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	11011111110001
13	은풍준시		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00000000000000
14	의성사곡시		0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	00110111000011
15	장성먹시		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00000000000000
16	청도반시		1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	10110111011111
17	하동월애감		1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	10011011111001
18	함안수시		0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	00101010001001
19	강릉남양시		0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	00011011111001
20	강원따배감		0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	00100010100001
21	강화고반시		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00000000000000
22	거창반시		1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	10101010101111
23	경주따배감		0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	00001011011011
24	고령반시		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00000000000000
25	공주수시		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00000000000000
26	광주파시		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	00000010000011
27	구례장동이		1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	11101011111101
28	김천따배감		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00000000000000
29	나주파시		1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	10001111111001
30	담양먹시		0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	00111011111001
31	대구통두리		0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	00011011001101
32	명주돌감		1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	10011011110011
33	무주대반시		1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	11011111110101
34	미농		0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	00111011011001
35	밀양고종감		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00000000000000
36	봉화만시		1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	10011111111001
37	상주돌감		0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	00001011100011
38	시흥상시		0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	00011010001101
39	안동수시감		0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	00111111101001
40	영덕상시		1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	10111011111001
41	예산반시		0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	01110011111001
42	용인반시		0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	00111011001011
43	의령반시		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	00000000000000
44	임실반시		1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	11011111100101
45	장성쇠도加里		1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	10101110001101
46	제주돌감		1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	10001011100101
47	창녕반시		0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	00101011100101

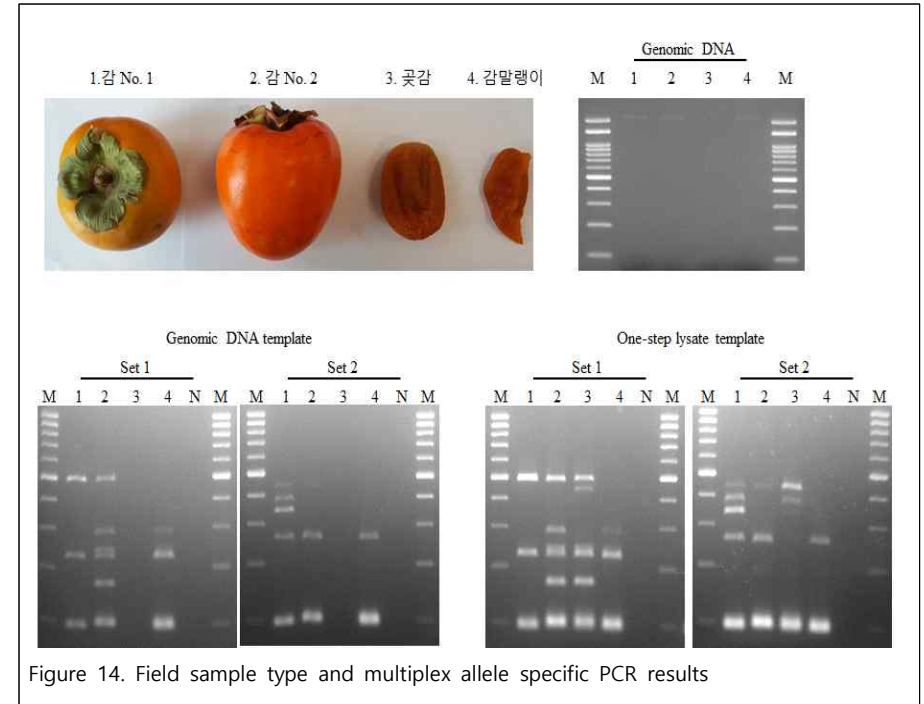
나. 최종 확립된 primer set의 정보 및 분석 조건

1) Set 1 및 set 2의 primer mixture는 각각 6쌍의 allele specific primer가 서로 다른 농도로 혼합되어 있다. 또한, Multiplex allele specific의 단점이라 할 수 있는 증폭 민감도의 향상을 위해 single PCR 분석 조건보다 3 cycles를 증가한 PCR 반응 조건을 최종 설정 하였다.



2) 완성된 분석법의 검증을 위해 시중에 유통되는 감(꽃감) 시료를 일부 구매하여 genomic DNA 추출 및 one-step lysate template를 제조하였으며 multiplex allele specific PCR을 진행하여 결과를 비교하였다. 시료 1, 2 번은 일반 감의 형태이며 시료 3은 꽃감, 시료 4는 감말랭이 이다. 각 시료의 과육 부위를 대상으로 template 준비를 진행하였으며 genomic DNA를 추출 후 3% agarose gel에 5 ul loading하여 확인하였다. PCR 반응액은 2 µl의 genomic DNA 또는 one-step lysate를 주형으로 사용하고 2 µl의 primer mixture 및 10 µl의 2X Multiplex PCR Mix, 6 µl의 멸균된 증류수를 혼합하여 최종 20 µl가 되도록 하였다. PCR 반응 조건은 95°C에서 15분간 pre-denaturation을 한 후 95°C 20초, 60°C 40초, 72°C 60초로 35 사이클을 진행한 후 72°C에서 3분간 post extension을 진행하였고, 반응종료 후 PCR 산물 5 µl를 취하여 3% agarose gel에 loading 한 다음 250 volt에서 30분간 전기영동을 진행하고 결과를 확인하였다.

3) 시중에 유통되는 감(꽃감) 시료를 대상으로 genomic DNA를 추출한 결과, 과육을 대상으로 진행한 실험에서는 genomic DNA 및 PCR 증폭 산물을 확인할 수 없었다. 따라서 후속 실험으로 2종의 감 시료에서는 꼭지 부분을 취하였고 꽃감 시료의 꼭지 부분과 감말랭이 시료의 씨앗을 대상으로 genomic DNA를 추출한 후 PCR을 진행하였다.



4) 꼭지 및 씨앗을 대상으로 genomic DNA를 추출한 결과, 3번 꽃감 (꼭지) 시료에서는 genomic DNA를 확인할 수 없었으며 PCR 결과에서도 증폭산물이 확인되지 않았다. 그러나 1, 2번의 감 시료 (꼭지) 및 4번 감말랭이 (씨앗) 시료에서는 genomic DNA가 전기영동결과에서 확인 되었으며 PCR 반응후 결과에서도 증폭 산물이 확인되었다. One-step lysate를 제조하여 template로 사용한 PCR 결과에서는 4종의 시료에서 모두 증폭 산물을 확인할 수 있었으며 증폭산물의 양도 genomic DNA를 template로 사용한 실험결과보다 상대적으로 높은

것으로 확인되었다. 각 시료에서의 증폭산물에 해당하는 코드를 확인하여 품종을 확인해본 결과, 1번 감 시료는 상감동시, 2번 감 시료는 감주백목, 3번 귤감 시료는 영동월하시, 4번 감말랭이 시료는 함안수시인 것으로 확인되었다.

			500	450	300	250	230	175	100	450	400	350	275	200	150	100	
No	품종	M	A1	A2	A3	A4	A5	A6	AC	B1	B2	B3	B4	B5	B6	BC	Code
8	상감동시		1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	10001011111001
1	감주백목		1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	10111111001001
12	영동월하시		1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	11011111110001
18	함안수시		0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	00101010001001

Figure 15. Analysis of field sample PCR results

다. 결론

1) 농산물품질관리원으로부터 제공받은 NGS data를 분석하여 총 34,006개의 후보군 마커를 확보하였다.

2) 귤감(감)시료의 각 부위별 DNA 추출 및 One-step lysate 제조를 통해 미량의 template를 이용한 PCR 반응 조건을 확립하였다.

3) 총 6차에 걸친 후보군 SNP 마커를 선별하고 allele specific primer를 제작하여 실험을 진행하였으며 최종 12쌍의 변별력있는 primer 쌍을 확보하였다.

4) 2 set으로 구성된 Multiplex allele specific PCR system을 완성하여 총 47품종의 귤감(감)시료 중 DNA 확인이 가능한 35개의 품종에 대해 판별이 가능하였고, 12종의 미확인 품종은 actin-2 gene primer를 이용하여 PCR 반응 산물이 확인되지 않았으므로 추가 품종 분석이 필요한 것으로 확인하였다.

5) PCR 반응의 정상적 진행 유무를 확인하기 위한 internal control 마커를 추가하고 증폭산물의 크기 및 마커의 set 별 제조합을 진행하여 분석 결과의 판독이 용이하도록 보완하였다.

6) 4종류의 시중 유통시료를 대상으로 genomic DNA 및 one-step lysate를 제조하여 품종 판별을 진행하였으며 4개의 시료 모두 꼭지 및 씨앗 시료를 이용하여 품종 판정이 가능함을 확인하였다.

4. 기대성과 및 활용방안

가. 기대성과

국내산 및 외국산(중국산) 귤감(감) 원산지·품종 판별법 개발로 정확한 정보 제공을 통한 원산지 단속 업무 효율성 제고

나. 활용방안

- 1) 귤감(감) 원산지·품종 판별법에 대한 특허출원 및 연구결과 발표 등
- 2) 교육 및 기술이전 등을 통한 원산지 단속 업무에 활용

5. 참고문헌

1. Greg Tucker, Xueren Yin, Aidi Zhang, MiaoMiao Wang, Qinggang Zhu, Xiaofen Liu, Xiulan Xie, Kunsong Chen and Don Grierson. Ethylene and fruit softening. Food Quality and Safety, 1(4), 253–267 (2017)
2. Wang, P.,Xiong, A.,Gao, Z.,Yu, X.,Li, M.,Hou, Y. Selection of Suitable Reference Genes for RT-qPCR Normalization under Abiotic Stresses and Hormone Stimulation in Persimmon(Diospyros kaki Thunb). PLoS ONE, 11(8), e0160885. doi:10.1371/journal.pone.0160885 (2016)
3. Yeo-Ok Park, Hee-Jeong Jae, Ji-Young Shon, Seong-Tae Choi, Sung-Chul Kim, Yong-Cho Cho, Kwang-Pyo Hong, Younghoon Park. Efficiency of Sequence Characterized Amplified Region Markers for Selecting Non-Astringent Persimmon (Diospyros kaki Thunb). Plant Breed. Biotech. 4(3) : 336~344, (2016)