

서동혜¹⁾, 임철진¹⁾, 서지호²⁾, 이준수²⁾, 김우택^{1)*}¹⁾이공분야 대학중점연구소, 생명시스템연구원, 연세대학교²⁾1 ㈜한국인삼공사 R&D 본부

Development of Drought-Tolerant Ginseng Cultivar Using Digital Breeding II. NGS-based Transcriptome Analysis of Ginseng under Drought Stress Conditions

Dong Hye Seo¹⁾, Cheol Jin Lim¹⁾, Jiho Seo²⁾, Joon Soo Lee²⁾, and Woo Taek Kim^{1)*}¹⁾Institute of Life Science and Biotechnology, Yonsei University, Seoul 03722, Korea²⁾R&D Headquarter, Korea Ginseng Corp., Gwacheon 13840, Korea

초록

Background: Climate changes, mainly caused by global warming, provoke various biotic and abiotic stresses, which have adverse effects on the agricultural environments. Among these stresses, dehydration is a major cause of agricultural losses. *Panax ginseng*, as a perennial plant, requires long cultivation periods (4-6 years) until harvest. Also, the possibility of repetitive exposure to drought stresses in *P. ginseng* is highly increased compared to those in annual crops, leading to significant yield reduction. Thus, the importance of the development of drought-tolerance variety and molecular diagnostic systems for the detection of drought stress resistance in *P. ginseng* has been increased.

Results and Conclusions: Two-year-old ginseng seedlings whose whole leaves were fully spread out were treated with various concentrations of PEG 6000. Because the water tension limitation of Korean ginseng root is -2.89 bar, we focused on -3 bar. After 1 week of stress treatment at -3 bar, wilting started to appear. Osmotic stress resistances were determined using more than 25 plants per treatment group, enabling the elucidation of the drought stress responses surpassed individual variation. As a result, it was confirmed that Chunpoong cultivar showed a more robust phenotype to drought stress than Sunmyoung cultivar. In order to obtain further insight into the regulatory mechanism of ginseng cultivars CP and SM in response to drought stresses, we performed next-generation sequencing (NGS)-based genome-wide transcriptome analysis. A total of 7641 and 6368 differentially expressed genes (DEGs) were identified in PEG-treated CP and SM cultivars compared to untreated controls. Next, we analyzed the Gene Ontology (GO) enrichment of these DEGs and constructed a t-distributed Stochastic Neighbor embedding (t-SNE) plot. The results of the GO analysis showed that the upregulated DEGs of PEG-treated CP and SM cultivars were significantly enriched in response to water deficit and leaf senescence, reinforcing the results of phenotypic analysis. Especially, the results of the GO analysis showed that the downregulated DEGs of the PEG-treated CP cultivar were markedly enriched in photosynthesis, response to light stimulus, and light harvesting photosystem I. Taken together, our results carefully propose that the tolerant phenotypes under osmotic stress conditions in CP cultivars may be mediated by the regulation of water use efficiency via controlling the photosynthesis pathway.

서론

고려인삼은 파종부터 수확까지 4년 이상의 긴 재배기간을 가지는 재배상의 특징을 가지는 작물이다. 따라서, 환경 스트레스에 대한 빠른 대응이 상대적으로 어려우며, 재해에 대한 피해 발생 시 다년간에 걸쳐서 영향을 받게 된다. 이러한 문제를 극복하기 위하여 건조 스트레스에 대한 내성을 가지는 품종 개발의 중요성이 점차 커지고 있으나 생육기간이 길고 교배가 어려운 고려인삼은 품종을 개발하는데 매우 오랜 시간이 필요하다. 또한, 복잡하고 다양한 환경적 변수에 영향을 많이 받는 생리 실험을 기반으로 품종을 개발하는 것은 품종 검증에 많은 시간과 노동력을 필요로 할 뿐 아니라, 일관된 표현형을 확인하는데도 어려움이 따른다. 따라서, 본 연구를 통하여 건조스트레스에 대한 내성 보유 여부를 진단하기 위한 분자진단시스템을 종자와 묘상을 이용하여 개발하고 궁극적으로 빠르고 안정적인 품종 개발을 위한 시스템을 확립하는 것이 본 연구의 목적이다.

재료 및 방법

1. Osmotic stress 유발을 위한 PEG 처리

Osmotic stress를 처리한 후 표현형을 관찰하기 위하여, 전엽이 완료된 2년생 묘상에 다양한 농도의 PEG6000을 처리하였으며, 각각의 수분 장력을 0, -1, -2, -3, 그리고 -4.5 bar가 되도록 조절하였다. 특히, 고려인삼의 뿌리의 수분한계장력은 -2.7 bar로 보고된 바가 있으므로, 이에 -3 bar를 주요 기준점으로 삼고 -4.5 bar까지 처리하는 연구를 진행하였다. PEG처리 10일 후, 잎의 위조현상을 관찰하고 전사체 분석을 위한 leaf 조직을 확보하였다.

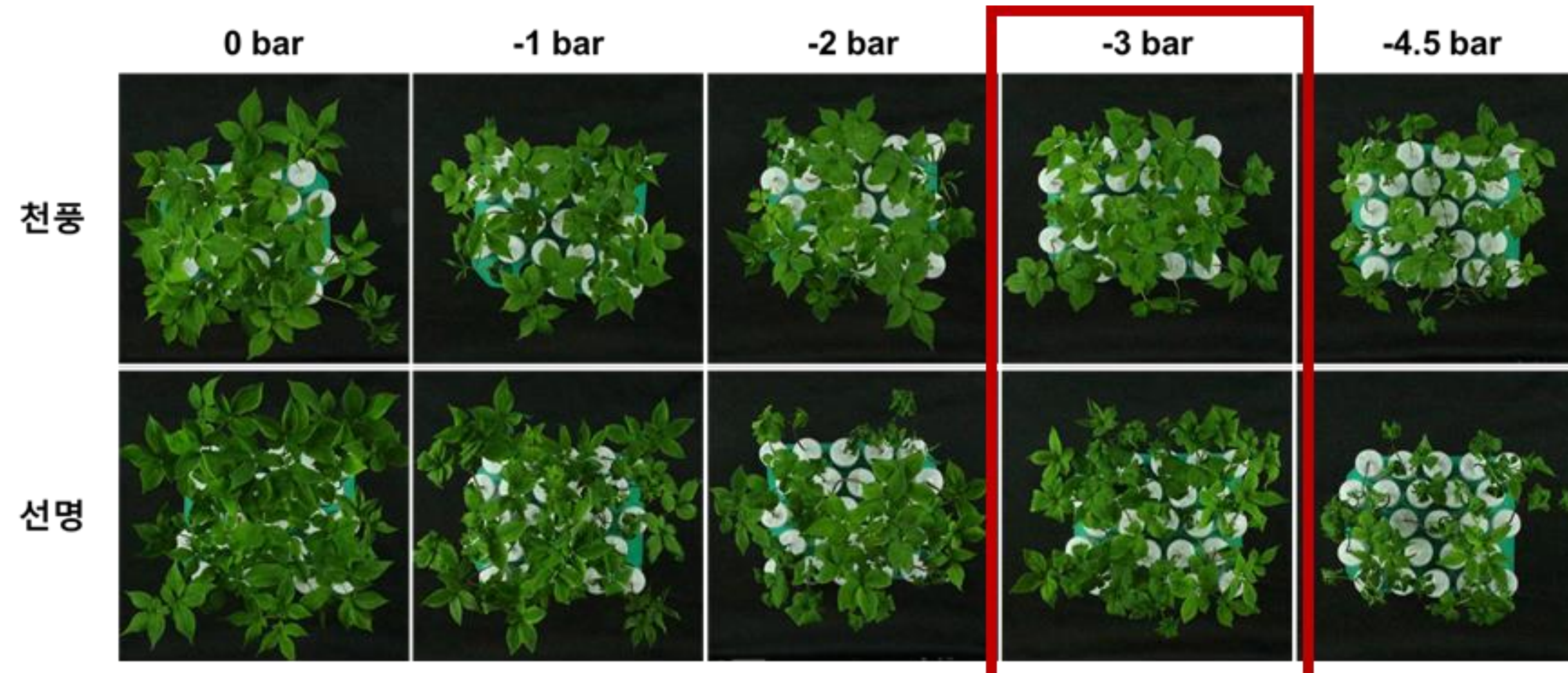
2. 전사체 분석

수분장력이 0과 -3 bar가 되도록 PEG를 처리한 천풍과 선명의 잎을 수확하여 total RNA를 추출하였다. 이후 해당 샘플로 RNA 시퀀싱을 수행하였고 이를 통해 유의확률이 0.05 이하이며 $\text{Log}_2|\text{배수 변화}| > 1$ 인 유전자에 대해 차등 발현 유전자 분석과 유전자 온톨로지 분석을 진행하였다.

결론

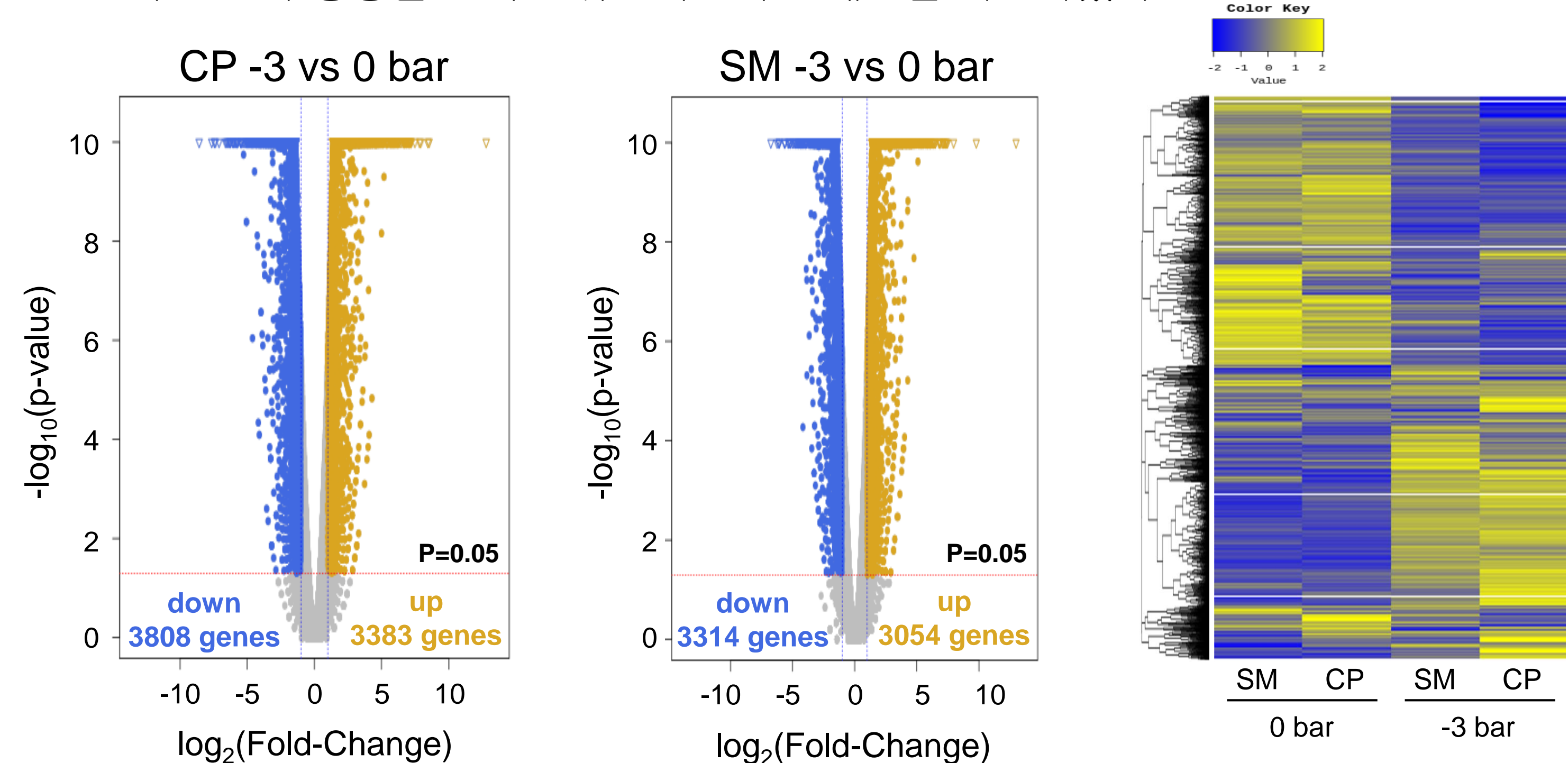
1. PEG-induced osmotic stress 처리에 따른 위조 현상 관찰

- 스트레스 처리 후 10일이 되었을 때 잎의 위조 현상을 관찰하였으며, 천풍이 상대적으로 선명에 비하여 위조가 덜 되어 osmotic stress에 강한 표현형을 보였다.
- 인삼은 개체간 표현형의 차이가 크게 나타나는 종으로 25개체 이상의 식물체를 이용하여 위조현상의 전체적인 양상을 비교하였다.



2. Transcriptome analysis I: Differentially Expressed Genes (DEGs) 분석

- 3 bar의 PEG가 처리된 천풍과 선명에서 0 bar가 처리된 대조군에 비하여 2배 이상 차등 발현되고 p-value 0.05 이하의 신뢰도를 가지는 유전자의 분포를 volcano plot을 이용하여 확인하였다.
- heat-map analysis를 통하여 PEG가 -3 bar가 처리되었을 때, 천풍과 선명에서 서로 다른 변화 양상을 보이는 유전자군이 존재함을 확인하였다.



3. Transcriptome analysis II: Gene Ontology (GO) 분석

- 3 bar의 PEG가 처리된 천풍과 선명에서 0 bar가 처리된 대조군에 비하여 2배 이상 차등 발현된 유전자군의 기능학적 분포를 확인하기 위하여 Gene ontology 분석을 하여 t-SNE plot을 제작하였다.
- PEG가 처리되었을 때, 천풍과 선명에서 동시에 response to water deprivation 및 leaf senescence군이 공통적으로 과분포 되어있음을 확인하였다. 또한, 특히 천풍에서 PEG 처리가 되었을 때 photosynthesis와 response to light stimulus 군에서 강하게 과분포 되어있음을 확인하였다.

