

(뒷면)

돌연변이 육종기술을 활용한
신품종 개발

발간등록번호

11-1543000-000385-01

5cm



돌연변이 육종기술을
활용한 신품종 개발

(Development of new cultivar
using mutation breeding technique)

주 의
(편집순서 8)

(15 포인트 고딕체열)

↑
6cm
↓

농림축산식품부

↑
3cm
↓

한국원자력연구원

↑
9cm
↓

농림축산식품부

↑
4cm
↓

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “돌연변이 육종기술을 활용한 신품종 개발”에 관한 연구과제(4개 세부과제 10개의 협동과제)의 보고서로 제출합니다.

2013년 12 월 19 일

주관연구기관명 : 한국원자력연구원
주관연구책임자 : 강시용
연 구 구 : 류재혁
" : 이덕만

세부연구기관명 : 한국원자력연구원
주관연구책임자 : 정일운
연 구 구 : 진창현
" : 조병옥

세부연구기관명 : 한국원자력연구원
주관연구책임자 : 김진백
연 구 구 : 하보근
" : 이경준

세부연구기관명 : 한국원자력연구원
주관연구책임자 : 김동섭
연 구 구 : 김상훈
" : 박민수

협동연구기관명 : 서울대학교
주관연구책임자 : 고희종
연 구 구 : 이주현
" : 김백기

협동연구기관명 : 서울대학교
주관연구책임자 : 강병철
연 구 구 : 권진경
" : 정희진

협동연구기관명 : 고려대학교
주관연구책임자 : 서용원
연연구구 : 김대연
연구구 : 홍민정

협동연구기관명 : 한국스케이바(주)
주관연구책임자 : 김영호
연연구구 : 최진수
연구구 : 문정혜

협동연구기관명 : 전북대학교
주관연구책임자 : 은종선
연연구구 : 김진수
연구구 :

협동연구기관명 : (주)바이오브리딩연구소
주관연구책임자 : 이수성
연연구구 : 김태윤
연구구 :

협동연구기관명 : 한경대학교
주관연구책임자 : 강권규
연연구구 : 정유진
연구구 : 한희

협동연구기관명 : 한국생명공학연구원
주관연구책임자 : 권석윤
연연구구 : 소영주
연구구 : 임찬

협동연구기관명 : 강원대학교
주관연구책임자 : 장철성
연연구구 : 조현용
연구구 : 황선구

요 약 문

I. 제 목

- 돌연변이 육종기술을 활용한 신품종 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 첨단 돌연변이 육종기술 개발 및 이를 적용하여 새로운 수요 및 환경 변화에 대응한 고품질 기능성 식품·의약품, 바이오매스용 및 채소류 신품종과 유용 유전자원을 개발 실용화함으로써 우리나라 농업 및 종자산업 발전에 기여함.
2. 세계적으로 식량 및 사료 수급을 위한 육종에서 산업용 의약품 등의 기능성 물질 개발에 초점이 맞춰지고 있는 실정이므로 돌연변이 육종 기술을 이용한 고품질 벼·밀·블랙베리·스테비아 신품종 개발이 필요한 실정임.
3. 최근 많은 나라에서 화석연료를 대체할 바이오 에너지 작물에 대한 연구를 주도적으로 하고 있는 실정으로, 이에 우리나라도 기후, 토양, 작형, 재배기술, 경제성 확보에 맞는 바이오매스용 섬유작물 케나프 신품종개발 및 바이오에너지용 유채·고구마 신품종 개발이 필요함.
4. 국내 원예산업은 교배를 통한 신품종 육종에 유용 유전자의 제한 문제가 대두되고 있어, 새로운 유전적 다양성을 확보하고 유용한 형질에 대한 연구를 위해서 다양성을 가지는 새로운 유전자원의 확보가 시급한 실정임.
5. 기후온난화로 인한 이상고온 및 이상저온 및 각종 병 발생에 의한 피해 경작지 증대로 기후변화대응 및 병저항성 벼 품종개발에 대한 관심이 고조되고 있으나 이들 형질은 복잡한 메카니즘을 가져 기존 유전자원을 활용한 관련 유전자에 대한 분석에 한계성이 있음. 따라서 벼 돌연변이 유전자원의 대량창출 및 내염성, 내병성, 온도 스트레스 내성 관련 기능 유전체 연구 필요성이 대두됨.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 방사선, 화학물질 및 조직배양 등 전세계적으로 널리 안전하게 이용되고 있는 돌연변이 육종기술을 이용하여, 다음과 같은 다양한 품목을 개발하여 실용화함.
2. 기능성 작물 분야에서는 녹색거대배찰미, 저아밀로스미, 저글루테린미 등 기능성 쌀 품종, 조숙성 고품질 우리밀 품종, 복분자 대체 및 신기능성 작물로 유망한 블랙베리의 신품종 및 최근 감미료 및 친환경 농자재로 유망한 스테비아 품종개발 실용화, 그리고, 돌연변이 차조기 및 블랙베리를 이용한 향산화성 기능성 식·의약 소재개발 실용화
3. 바이오매스 작물 개발 분야에서는 최근 바이오에탄올, 바이오플라스틱 및 바이오섬유 등의 소재로 유망한 케나프 품종개발 보급, 바이오디젤용 조숙 및 내염성 유채 품종, 바이오에탄올 생산에 적합한 전분특성을 갖는 고구마 품종개발

4. 지역특산 및 채소자원 분야로는 순창 장류용 및 전주 나물용 등 지역특산 우수 브랜드 콩 품종개발 실용화, 녹색꽃양배추의 우성 불임성 돌연변이체 개발 실용화, 바이러스저항성 고추 개발, 그리고, 고색소 및 영양성 강화 토마토 유전자원 개발
5. 벼 유전체연구 기법이용 품종개발 분야에서는 원자력연구원에서 구축한 벼 TILLING 돌연변이 집단을 대상으로 내염성, 병저항성, 고·저온 내성에 관한 유용 유전자원을 마이크로어레이, 유전마커 시스템 및 유전자 네트워크 분석기법을 이용하여 탐색하고 품종개발에 활용하는 연구를 추진함.

IV. 연구개발결과

1. 기능성 및 바이오에너지 작물 개발(핵심 분야 1)

가. 벼 고기능성 쌀 품종 개발 및 실용화

- 고시히카리와 일품벼에 MNU(N-methyl-N-nitrosourea)를 처리하여 얻어진 돌연변이 집단에서 저장단백질 돌연변이(esp2, esp3) 검정
- 녹미특성을 가진 생동찰과 거대배 특성을 가진 서농6호를 교잡육종하여 녹미거대배 유망계통 (00002, 00003) 선발
- '서농16호' (녹미거대배) 품종보호 출원
- 분상질 종자의 표현형을 가지는 돌연변이체의 유전분석 결과 분질종자형질(flo)관련 유전자는 LOC_OS 04g5523로 1번 exon 73번째 nucleotide 가 A에서 T로 돌연변이 되어 flo mutant에 STOP codon 발생
- 노란색 종피 형질(yel), 고단백 돌연변이(hpm)형질 및 rolled leaf 돌연변이에 관한 유전분석 실시

나. 돌연변이 육종기술을 이용한 밀 신품종 개발

- 금강밀과 올그루밀에서 유래한 방사선 돌연변이 계통에서 포장 평가 및 생산력 검정 시험을 통해 국내에서 가장 많이 재배되는 품종인 '금강'보다 농업형질이 우수한 5계통 선발
- 우수 밀 품종인 조은, 조경 및 연구진이 보유한 전좌계통 (2BS/2RL)에 방사선을 조사하여 출수기, 재해저항성 등의 다양한 농업형질 지표로 약 818개체 수선발 실시
- 우수돌연변이 계통에 대한 유전생화학적 분석을 실시하여 (glutenin subunits) 금강계열 4개 계통(M1133, M1156, M1231, M1284)에서 HMW-GS 변화 확인
- 국내 밀 생산 재배 요건을 고려한 조숙성 관련 유전자 [UFO (Unusual Floral Organ), SCF (Skp1-Cullin-F-box protein) complex]에 대한 분자유종 연구 실시

다. 블랙베리 유망돌연변이 계통의 품종 실용화 및 스테비아 육종

- 블랙베리 우수변이체 메이플 특허출원 (출원번호:10-2010-0130380)
- 블랙베리 신품종 '메이플'의 기술실시계약 (2012.2.17. (주)바이오플러스:(주)태준)
- 블랙베리 신품종 '메이플'을 조직배양 및 삼수를 이용하여 대량생산 기술을 개발하고 묘목 6,000주 생산
- 스테비아 물리적·화학적 돌연변이원을 이용한 돌연변이 유기 후 기능성물질 함량 및 내

- 병성 테스트를 통해 우수변이체 총 10계통 선발
- 내병성 및 품질이 우수한 스테비아 돌연변이 3 계통을 선발하여 신품종 출원진행 중
- 라. 친환경산업 소재용 케나프 및 유채 품종개발 실용화
- 유망 케나프 유전자원 개발을 위한 적정 방사선 조사 선량 구명(500Gy~ 750Gy) 및 국내·외 유전자원 재배평가를 통한 국내 채종 가능한 17계통 선발
 - 케나프 내습성 증진 계통 육성을 위한 논포장 재배 시험 및 케나프 내염성 증진 계통 육성을 위한 새만금·화옹 간척지 재배 시험을 통해 내염성이 강한 돌연변이 5계통 선발
 - 케나프 리그닌 생합성 관련 7종의 유전자의 크로닝 및 염기서열분석 완료
 - 케나프 고 bio-mass 생산 및 국내채종 가능한 유망계통 품종 보호권 3건 출원 ('장대', '백마', '적봉') 및 1건 등록 완료('장대')
 - 유채 신품종 육성을 위한 돌연변이 유도를 위해 방사선 감수성 테스트를 통해 적정 조사선량 (600, 800, 1000Gy) 선정 및 형태적 돌연변이체 선발
- 마. 내염성 및 조숙·단간성 유채 돌연변이 품종 개발
- 유채 '내한', '탐미', '한라' 등 3품종의 종자에 양성자와 감마선을 0~2,000 Gy 처리하여 M8세대까지 육성
 - 조숙, 단간성과 간척지에서 내염성계통 선발 및 실내검정, 유연관계분석 등을 실시하여 구별성, 균일성, 안정성이 확보된 5계통 선발하여 품종보호권 출원
 - 품종보호권 출원 계통은 조숙·단간성 3계통(출원품종명: '조단', '온누리', '미소'), 조숙·대화성 1계통(출원품종명: '대화'), 내염성 1계통(출원품종명: '만금')
- 바. 돌연변이 기술을 이용한 산업용 고구마 품종육성
- 고구마 생장점을 이용한 배발생 캘러스 유도 및 재분화시스템 확립
 - 장려품종 '올미' 및 '신건미'를 모본으로 감마선을 조사하여 돌연변이체 (올미변이체 31계통, 신건미변이체 70계통)을 육성
 - '올미' 및 '신건미' 돌연변이 선발계통의 포장재배 시험과 함께 각 계통의 수량성, 성분분석, 표현형을 분석하여 데이터화
- 사. 돌연변이 차조기 및 블랙베리를 이용한 생체 산화적 기능성 식품 개발 및 실용화
- 생리활성 평가 및 대사체 분석을 통해 항산화 효능이 뛰어난 방사선육종 돌연변이 차조기(CJM-12) 및 블랙베리('메이플') 품종 선발
 - WEE(water ethanol extract) 공법을 이용하여 지표성분을 다량 함유하는 최적의 추출 조건 확립.
 - 돌연변이 차조기의 경우 대조구 대비 6배 가량의 rosmarinic acid를 함유하고 있었고 블랙베리의 경우 cyanidin-3-glucoside(C3G)의 함량이 2.3배 높았음
 - 방사선 돌연변이 차조기 및 블랙베리 추출물을 이용해 in vitro, ex vivo 에서 항산화 효능 평가를 완료함
 - 산화적 스트레스를 유발한 동물모델을 제작하여 방사선 돌연변이 차조기 및 블랙베리 추출물이 항산화 효능을 증진시킨다는 것을 확인함
 - 방사선 돌연변이 블랙베리를 이용해 간기능 개선 기능성 음료 시제품을 제작하였고 동물 모델에서 효능을 검증하였음

2. 지역 특산작물 및 원예소재 개발(핵심 분야 2)

- 가. 돌연변이 기술이용 우수 브랜드 장류 및 나물용 콩 신품종 개발 및 실용화
- 밥밑용/장류용 콩 돌연변이 신품종 2건 품종보호권 등록('원율', '원현') 및 1건 출원('조생서리 2호')
 - 장류 (8) 및 나물용(3) 적합 돌연변이 계통의 선발
 - 장류 적합 돌연변이 계통에 대한 된장 제조, 관련 성분분석(아미노산성질소, 색도, pH, 적정산도, 아미노산 함량) 및 식미테스트 수행
 - 최종 나물용 콩 우수 3계통에 대한 농업형질, 콩나물 일반성분분석, 수율조사 및 아미노산 함량 분석 수행
 - Lipoxygenase가 결핍된 돌연변이 4 계통에 대한 Kunitz Trypsin inhibitor(KTi) 함량 또는 활성의 차이 검정
- 나. 돌연변이 유도 녹색 꽃 양배추의 단인자 우성 응성불임성의 실용화
- 응성불임성의 일시적 타파 기술 개발
 - 응성불임성 인자 호모 계통 육성
 - 응성불임성 인자 연관 마커 개발
 - 소포자 배양에 의한 순계 다량 육성
- 다. 돌연변이 기술을 이용한 바이러스 저항성 고추 유전자원개발
- EMS 처리를 통해 돌연변이를 유도시킨 돌연변이 집단 6,812개의 M1 식물체에서 총 5,023개의 M2 돌연변이 집단 확보
 - HRM 분석법을 이용하여 eIF4E 유전자를 활용한 바이러스 저항성 개체 선발
 - 고추 유전자원에 대한 대량 접종 방법으로 CMV와 TSWV 저항성 계통 선발
 - 바이러스 CMV-P1 helicase domain과 상호작용하는 고추 유전자 동정 및 바이러스 CMV-P1에 저항성 돌연변이 2계통 선발
 - 돌연변이 집단을 활용한 Capsaicinoids 분석 결과 대조구에 비해 캡사이시노이드 함량이 300배 정도 낮은 돌연변이 1계통 선발
- 라. 돌연변이 육종기술을 이용한 색소 및 영양 강화 토마토 계통 선발 및 품종 육성
- 고 색소 및 비타민 강화 자식계통을 이용하여 방사선 돌연변이 유기
 - 총 6700개체의 M2 분리 세대 (방사선 돌연변이)로부터 식물체 형태의 일반형질과 및 과일 당도 및 색도 등의 특수 형질을 조사하여 37계통을 선발
 - 국내외에서 수집한 771계통의 토마토 유전자원의 분류 및 특성 평가 실시

3. 돌연변이 유전체 연구(핵심분야 3)

- 가. TILLING 기법을 활용한 내염성 유전자 대량검정 벼 품종개발
- 벼 돌연변이 기능유전체 연구용 TILLING 집단 (약, 3,000계통) 구축 후 한국원자력연구원(간척지적응), 강원대(기후변화대응), 생명공학연구원(병저항성) 연구 수행을 위한 기본재료로 제공.
 - 아미노산 합성 유전자를 이용 TILLING 분석 체계 구축을 통한 아미노산 합성이 증가된 4개의 돌연변이 계통 검정

- 간척지적응 벼 품종개발을 위한 분리세대 약 3,000계통 대상 대량 선발 시스템 확립 (In vivo 및 간척지 선발)을 통한 내염성 벼 품종화 가능 유망계통인 ST-87과 ST-301 계통 최종 선발
 - 간척지적응 품종화 유망 돌연변이 계통의 유전자 발현정보 분석 및 단백질 발현 패턴 검정
 - 간척지 적응 신품종 ‘원해 2호’(‘Wonhae-2ho’, 계통명 ST-301) 품종보호권 출원
- 나. 유전자마커 시스템을 이용한 병저항성 벼 돌연변이 계통선발 및 분자마커 개발
- 동안벼에 감마선을 처리해 구축한 돌연변이 집단(M3)을 이용 벼 흰잎마름병에 대해 저항성을 보이는 6계통 선발
 - 병 저항성 개체로 선발한 TILL300-651 (Bacterial Blight Resistance 1; bbr1)을 대상으로 microarray 분석 실시 후 돌연변이 개체에서 병 접종에 따라 발현이 변화되는 유전자들의 특성 분석
- 다. 돌연변이체를 이용한 기후변화 대응 벼 유전자 네트워크 구축 및 품종 개발
- 원자력연구원 정읍방사선과학연구소에서 분양 받은 3000 계통을 대상으로 내염성 검정하여 13 계통을 선발
 - 내열 처리를 위한 최적 처리 조건 확립 (45°C, 24hrs) 및 스트레스 처리 후 회복된 총 20 계통 42 개체를 선발
 - 내염성 계통을 이용 스트레스 관련 유전자 분석
 - 환경 스트레스 관련 중요 조절 유전자인 RING E3 ligase를 coding하고 있는 유전자들의 고온스트레스 매카니즘 분석을 위한 분자 생물학적 분석

V. 연구성과 및 성과활용 계획

개발 신품종은 품종보호권 확보 후 민간기업, 지자체에 이전 또는 무상으로 농민에게 보급하고, 참여 산업체가 개발한 것은 자체 또는 타 업체에 매각하여 산업화를 추진함. 특히, 콩, 케나프, 블랙베리, 스테비아 및 유채 등은 방사선과학연구소가 위치한 전북도 및 각 시군 지자체와 연계하여 재배단지 조성 및 지역특산 작물로 조기에 실용화를 추진함. 이러한 5년간 연구개발을 통하여 품종보호권 출원 총 17건, 등록 5건, 관련 특허출원 9건, 등록 3건 및 기술이전 1건등을 포함 향후 관련 분야 경제적 파급효과는 2015년 기준 300억원, 2020년 기준 1,000억원의 시장규모를 예상하고 있음.

SUMMARY

I. TITLE

- Development of new cultivar using mutation breeding techniques

II. OBJECTIVE AND NECESSITY OF THE STUDY

1. This study is conducted to enhance agricultural growth and foster the development of a domestic seed industry in Korea through development and commercialization of new genetic resources for functional foods and medicines, bio-mass, and vegetables dealing with new demand and environmental change using high advanced mutation breeding technologies
2. As food quality has become a more important concern than crop productivity, it is important for the development of high functional cultivars for rice, wheat, blackberry, and stevia using mutation breeding techniques
3. Recently, global biofuel production has been increasing rapidly to reduce dependency on fossil fuels and greenhouse gas emission. Therefore, it is important for the development of new cultivars of kanaf, rapeseed, and sweetpotato showing high biomass and bio-energy production in Korean agricultural environment
4. Currently, progress in traditional horticultural breeding is limited by the lack of useful genetic resources. Therefore, it is important to develop new genetic resource for increasing genetic diversity and discovering new useful traits
5. Development of rice cultivar with enhanced tolerance to abiotic and biotic stresses is important for food production in response to climate change. However, abiotic and biotic stress tolerance are regulated by numerous genes and complex mechanism. Therefore, it is necessary to develop rice mutant population for the study of gene function related with salt stress, heat stress, and disease stress

III. CONTENTS

1. This study contains the development and commercialization of various plants using mutation breeding technologies (radiation, chemical and tissue culture)
2. The studies for functional crops contain development of high quality grain rice having giant embryo and low amylose content, early maturity and high yielding wheat mutant cultivars, blackberry mutant cultivar improving liver function, stevia mutant cultivars showing high antioxidant activity and various disease resistance, and practical application of anti-oxidant functional food using mutagenized perilla and blackberry

3. The studies for biomass crops contain development of bio-industrial plants kenaf, rapeseed mutant cultivars with early maturity, short stem, large flower and salt tolerance, and new industrial sweetpotato cultivar
4. The studies for local crops and vegetables contain development of new soybean mutants for soybean paste and sprouts, genic male sterility mutant in broccoli, virus-resistant mutants in pepper, and tomato mutants enhanced nutrition and pigment
5. The studies for rice genomics contain development of salt tolerant rice mutants, high-throughput screening methods by TILLING approach, disease resistant mutant rice lines and molecular markers, and construction of rice gene networks against climate change

IV. RESULTS

1. The studies for functional and bio-mass crops

- A. Development and commercialization of high quality grain rice
 - From the MNU(N-methyl-N-nitrosourea) treated rice of Koshihikari and Ilpum varieties, two storage protein mutants (esp2, esp3) were developed
 - By crossing between 'Sangdongchal', which shows green color gain, and 'Seonong 6', which shows giant embryo, two elite lines (00002 and 00003) which show both traits were developed
 - 'Seonong 16' (green color - giant embryo gain) variety was registered
 - Through genetic analysis of floury mutant, the gene for floury trait was detected as LOC_OS 04g5523, where 1st exon of 73rd nucleotide was changed from A to T resulting in STOP codon
 - Conducting genetic analysis for yellow color grain (yel), high protein, and rolled leaf mutants.
- B. Development of new wheat cultivar using mutation breeding techniques
 - Wheat (hexaploid common wheat) cultivars that are cultivated most in Korea have been gamma irradiated and mutant populations were generated for selection. Early maturity and high yielding mutant lines were consecutively selected in the field of Southern (Jeongeup) and Middle (Namyangju) regions. High generation of mutant lines that showed superior agronomic performance than control varieties are currently evaluated as year and regional adaptation test. The highest yielding and disease resistance mutant line will be applied for "Plant Variety Protection" registration.
 - Changes of HMW-GS are compared with mutant lines by analysis of seed storage protein (glutenin subunits) for prediction of end-use quality. Also, Since earliness is most required trait for wheat development in Korea, molecular breeding technologies are applied for elucidation of factors related to growth changes from vegetative to

reproductive phase. Genes that showed crucial role in wheat spike and grain development were cloned and their functions were identified.

C. Application of elite mutant blackberry line and stevia breeding

- Patent of the elite mutant blackberry line 'Maple' for improving liver function (The patent application #: 10-2010-0130380)
- License agreement of 'Maple' new varieties was conducted with Bioplus co. (2012. 2. 17)
- Development of massive production system by cutting method and tissue culture technology for 'Maple' and production of 6,000 seedlings.
- Mutation induction of stevia by gamma-ray and chemical mutagen treatments and selection of ten stevia lines showing high antioxidant activity and various disease resistance

D. Development and application of bio-industrial plants kenaf and rapeseed

- Determination of the optimum dose (500Gy ~ 750Gy) for mutation induction to develop new varieties of kenaf
- Selection of 17 lines showing early maturation from domestic and foreign germplasm of kenaf
- After seedling into flooded experimental fields, selection of kenaf mutant lines showing resistance to high moisture
- Selection of salt tolerant kenaf mutant lines in the reclaimed fields of Semankum and Hwaong
- Cloning and sequence analysis of lignin bio-synthesis genes (*4CL*, *HCT*, *C3H*, *CCoAOMT*, *CCR*, *F5H*, *COMT* and *CAD*) in kenaf
- Plant variety protection applications of new kenaf mutant cultivars ('Jangdae', 'Bakma', 'Jukbong')
- Determination of the optimum dose (600, 800, 1000 Gy) for mutation induction for develop new varieties of rapeseed

E. Development of new variety on the salt tolerance, early maturity and short stem by means of mutation in rapeseed

- The seeds of three rapeseed varieties, 'Naehan', 'Tammi', and 'Halla' were irradiated with 0~2,000 Gy of proton ion beams and gamma rays, and then cultured to M₈ generation.
- Selected 5 useful mutant lines, early maturity, short stem, and salt tolerance in the reclaimed field and laboratory, and investigated the genetic relationship analysis, distinctness, uniformity, stability, etc.
- New variety protection applications - three lines with early maturity and short stem ('Jodan', 'Onnuri', and 'Miso'), one line with early maturity and large flower ('Daehwa'), and one line with salt tolerance ('Mankeum')

F. Development of new industrial sweetpotato cultivar using mutation breeding techniques

- Gamma-induced mutants were grown in the field and assessed for their starch characteristics, yields and phenotype.
 - Thirty-one plant lines were selected by estimating storage root size, shape and yield from the original "Yulmi" breed cultivar and seventy lines were selected from the original "Shinyulmi" breed cultivar
 - These putative mutant lines were detected genetic variations by RAPD analysis and were cultivated in the field to assay the yield, starch and soluble sugar contents, carotenoid content and color of sweetpotato storage roots for two years
- G. Development and practical application of anti-oxidant functional food using mutagenized Perilla and Blackberry
- The two species, mutagenized Perilla 'CJM-12' and Blackberry 'Maple', were selected for their improved anti-oxidant activity via physiological screening and analysis of metabolites.
 - Optimal extraction condition using WEE(water ethanol extract) method was developed
 - The mutagenized Perilla contained rosmarinic acid more than 6-fold from wild type species and the mutagenized Blackberry contained cyanidin-3-glucoside(C3G) more than 2.3-fold from wild type species.
 - It was investigated the in vitro and ex-vivo anti-oxidant properties of the extracts of mutagenized Perilla and Blackberry.
 - Animal model of oxidant stress was developed, and then the anti-oxidant activity of the extracts of mutagenized Perilla and Blackberry was conformed in that model.
 - The functional beverage prototypes for liver damage was developed using mutagenized Blackberry, and then it's anti-oxidant activity was investigated in animal model.

2. The studies for local crops and vegetables

- A. New soybean-variety development and industrialization for elite soybean paste and sprouts by using mutation technique
- Soybean registration ('Wonyul', 'Wonhyun') and application ('Josaengseori 2') for usage of cooking with rice and soybean paste
 - Putative line selection of usage for soybean paste (8) and sprouts (3)
 - Suitability examination for making a soybean paste with mutant varieties (component analysis, amino-nitrogen, coloriness, pH, adequate acidity, amino acid contents and taste)
 - Final line selection for soybean sprouts (agronomic performance, component analysis, yield test and amino acid contents)
 - Examination of contents or activity for Kunitz Trypsin inhibitor(KTi) with

lipoxygenase-deficient mutant lines

- B. Utilization of dominant genic male sterility induced by mutation in broccoli
 - Developing temporary breaking system of the male sterility
 - Raising homozygote lines of the male sterile allele
 - Creating markers related to the male sterile system
 - Acquiring doubled haploid lines using microspore culture
 - Breeding F1 hybrids using the male sterility hypothesis
- C. Development of virus-resistant germplasm using mutation technique in pepper
 - Development of M2 mutation population containing a total of 5,023 individuals derived from 6,812 M1 individuals in which mutations were induced by EMS treatment
 - Selection of virus-resistant individuals using HRM analysis
 - Selection of individuals resistant to CMV and TSWV from pepper germplasm using a virus inoculation method optimized for large-scale screening
 - Isolation of the pepper gene which interacts with CMV-P1 helicase domain and selection of two mutant lines resistant to CMV-P1, a virus strain
 - Selection of a mutant line in which Capsaicinoids content was 300 times lower than the control group by the analysis of Capsaicinoids content in mutation population
- D. Selection and development of tomato lines enhanced nutrition and pigment by using mutation breeding technology
 - Breeding of inbred lines enhanced pigment and vitamin using gamma radiation mutation
 - Tomato genetic resources (771 strains) were conducted the classification and characterization for genetic diversity
 - 37 mutant lines containing fruit traits such as sweetness, color and the special traits were screened from a total of 6,700 plants of M2 generation (radiation mutation)
 - F1 crosses combinations among 37 inbred lines were evaluated to select parent lines from value of high recombinant ability

3. The studies for rice genomics

- A. Development of salt tolerant rice mutants and high-throughput screening of salt tolerant genes by TILLING approach
 - Development of TILLING population (approximately 3,000 lines), and then provided materials to KAERI (salt testing in saline field), Kangwon national university (respond to climate change), KRIBB (study for disease resistance)
 - Selection of 4 mutant lines showing the increased amino acid contents through TILLING approach

- Selection of high salt tolerant mutant lines (ST-87 and ST-301) through high-throughput screening methods in vivo and saline field
 - Profiling the expression of rice genes and protein involved in the salt tolerant phenotype of rice mutants (ST-87 and ST-301)
 - Variety patent application of salt tolerant mutant rice ('Wonhae 2', ST-301)
- B. Development of disease resistant mutant rice lines and molecular markers
- Selection of 6 lines (TILL300-534, TILL300-537, TILL300-1212, TILL300-793, TILL300-693 and TILL300-651) with Bacterial Blight resistant phenotype from gamma-ray irradiated 'Dongan' mutant pool (M3)
 - Profiling of the expression of rice genes involved in the disease resistance phenotype of rice mutant, TILL300-651 (Bacterial Blight Resistance 1, bbr1) using microarray
- C. Construction of rice gene networks against climate change and the development of variety using mutants by ionized energy
- Selection of 13 lines from the cold tolerance test of 3000 lines received from Advance Technology Radiation Laboratory, KAERI.
 - Establishment of optimized condition for heat treatment (45°C, 24 hrs) and the selection of the recovered 42 plants at 20 lines after heat stress treatment.
 - Analysis of genes related to cold stress using cold-tolerance lines
 - Molecular biological assessment of the RING E3 ligase genes coding which are major regulating genes of environmental stress for investigating high temperature stress mechanism.

V. FUTURE PLANS

New cultivars through R&D achievements in this study will be applied for the plant variety protection, and then will be distributed into private companies, institutes, or farmers. Also, the new products developed from company in this study will be commercialized. Especially, new cultivars for soybean, kenaf, blackberry, stevia, and rapeseed will be commercialized as developing large-scale agricultural districts and local specialty products supported by Jeollabuk-do local government. Based on this study, a total of 26 plant variety protection and 17 patents were applied, and 13 products developed from R&D achievements will be commercialized. The results of this study have 30 billion KW of economic inductive effect in 2015, which will reach 100 billion KW in 2020.

CONTENTS

Chapter 1	Introduction	18
Section 1	Objectives of study	18
Section 2	Necessity of study	19
Section 3	Contents and scopes	22
Chapter 2	Domestic and International Trends	25
Section 1	Status of development in domestic	25
Section 2	Status of development in international	28
Section 3	The technology gap between Korea and the developed countries and perspective of technical development	32
Chapter 3	Research Contents and Results	36
Section 1	Development and application of bio-industrial plants kenaf and rapeseed	36
Section 2	Development and practical application of anti-oxidant functional food using mutagenized Perilla and Blackberry	58
Section 3	New soybean-variety development and industrialization for elite soybean paste and sprouts by using mutation technique	83
Section 4	Development of salt tolerant rice mutants and high-throughput screening of salt tolerant genes by TILLING approach	109
Section 5	Development and commercialization of high quality grain rice	140
Section 6	Development of virus-resistant germplasm using mutation technique in pepper	161
Section 7	Development of new wheat cultivar using mutation breeding techniques	192
Section 8	Application of elite mutant blackberry line and stevia breeding	232
Section 9	Development of new industrial sweetpotato cultivar using mutation breeding techniques	250
Section 10	Development of new variety on the salt tolerance, early maturity and short stem by means of mutation in rapeseed	278
Section 11	Utilization of dominant genic male sterility induced by mutation in broccoli	316
Section 12	Selection and development of tomato lines enhanced nutrition and pigment by using mutation breeding technology	337
Section 13	Development of disease resistant mutant rice lines and molecular markers	335
Section 14	Construction of rice gene networks against climate change and	

the development of variety using mutants by ionized energy-----	374
Chapter 4 Degree of Achieving the Research Goals and Contribution to the Related Fields-----	411
Chapter 5 Plans for the Utilization of Results-----	432
Section 1 New varieties and elite mutant lines-----	432
Section 2 New mutant screening technologies-----	434
Section 3 Molecular markers and genes-----	435
Section 4 Commercialization-----	436
Section 5 New products-----	437
Section 6 Popularization-----	437
Chapter 6 Scientific and Technological Informations Collected during the Study-----	438
Chapter 7 Status of Research Facilities and Equipment-----	439
Chapter 8 References-----	440

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	18
제1절	연구개발의 목적	18
제2절	연구개발의 필요성	19
제3절	주요 연구개발 내용 및 범위	22
제 2 장	국내외 기술개발 현황	25
제1절	국내 기술개발 현황	25
제2절	국외 기술개발 현황	28
제3절	선진국과의 기술수준 격차 및 국내기술발전 전망	32
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	36
제1절	친환경산업 소재용 케나프 및 유채 품종개발 실용화	36
제2절	돌연변이 차조기 및 블랙베리를 이용한 생체 산화적 기능성 식품 개발 및 실용화	58
제3절	돌연변이 기술이용 우수 브랜드 장류 및 나물용 콩 신품종 개발 및 실용화	83
제4절	TILLING 기법을 활용한 내염성 유전자 대량검정 밀 벼 품종개발	109
제5절	벼 고기능성 쌀 품종 개발 및 실용화	140
제6절	돌연변이 기술을 이용한 바이러스 저항성 고추 유전자원개발	161
제7절	돌연변이 육종기술을 이용한 밀 신품종 개발	192
제8절	블랙베리 유망돌연변이 계통의 품종 실용화 및 스테비아 육종	232
제9절	돌연변이 기술을 이용한 산업용 고구마 품종육성	250
제10절	내염성 및 조숙·단간성 유대 돌연변이 품종 개발	278
제11절	돌연변이 유도 녹색 꽃 양배추의 단인자 우성 응성불임성의 실용화	316
제12절	돌연변이 육종기술을 이용한 색소 및 영양 강화 토마토 계통 선발 및 품종 육성	337
제13절	유전자마커 시스템을 이용한 병저항성 벼 돌연변이 계통선발 및 분자마커 개발	353
제14절	돌연변이체를 이용한 기후변화 대응 벼 유전자 네트워크 구축 및 품종 개발	374
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	411
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	432
제 1절	연구개발 신품종 및 유망 선발 돌연변이 계통	432

제 2절 신 돌연변이육종 선발 기술 -----	434
제 3절 개발 분자마커 및 유전자-----	435
제 4절 실용화 및 산업화 기술 -----	436
제 5절 개발 시제품 -----	437
제 6절 교육·지도·홍보 등의 기술 확산 -----	437
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	438
제 7 장 연구시설·장비 현황 -----	439
제 8 장 참고문헌 -----	440

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적

첨단 돌연변이 육종기술 개발 및 이를 적용하여 새로운 수요 및 환경 변화에 대응한 고품질 기능성 식품·의약품, 바이오매스용 및 채소류 신품종과 유용 유전자원을 개발 실용화함으로써 우리나라 농업 및 종자산업 발전에 기여함.

1. 기능성 및 바이오에너지 작물 개발(핵심 분야 1)

- 가. 기능성 강화 녹미 품종 육성, 저아밀로스 품종 개발, 저장단백질 변이 및 저 그루테린 품종 개발을 수행하고 품종, 등록 품종실시권을 민간에 이전하여 산업화 추진.
- 나. 방사선 유용 밀 돌연변이 계통 특성 검정 및 계통 전개를 통한 우수 계통 선발, 중간모본/신품종 육성. 우수 품종을 대상으로 방사선 조사를 통한 유용 돌연변이 유도 및 신품종 육성하고 우수 돌연변이 계통에 대한 유전 분석 및 생화학적 분석.
- 다. 블랙베리 유망 돌연변이 계통을 이용한 고당도 고수량 계통 선발 및 품종 등록, 개발 품종의 실용화 추진. 스테비아 돌연변이 육종 체계 확립 및 우수변이체 선발 및 대량생산 체계 확립 후 국내 및 중국 농가 실증재배 확립 및 고소득 작물화 수행.
- 라. 유채 신품종 육성을 위한 유용 돌연변이 유전자원 개발 및 유채의 내염성, 단간, 조숙, 다수성 등 유용한 형질에 대한 신품종 개발 수행.
- 마. 감마선 조사한 고구마 생장점을 이용한 배발생 캘러스 유도 및 재분화를 통한 *in vitro* system 확립 및 바이오에탄올 생산을 위한 소재 적합 품종 선발하고 분자생물학적 기법을 이용한 계통별 유전형 분석 및 계통 특이적 marker 개발을 수행. 선발된 목적별 유망 계통(바이오에탄올 생산다수성, 고아밀로함량 계통 등)의 생산력 검정, 품종 출원을 수행
- 바. 돌연변이 차조기 및 블랙베리의 WEE(water ethanol extract) 공법을 통한 최적 추출조건 확립하고 산화 및 질환 유발 표적인자 제어에 대한 *in vitro/ex vivo* 효능 평가를 수행. 산화적 손상 유발 동물모델 제작 및 효능 평가 확립. 산화 및 질환 유발 표적인자 조절에 대한 지표 물질의 분리 및 구조 평가 기술 확립. pilot scale 및 실용화를 위한 소재의 규격화 및 표준화 기술 확립 최종 개발 소재의 지적재산권 확보(2건 이상) 및 기술이전에 의한 산업화

2. 지역 특산작물 및 원예소재 개발(핵심 분야 2)

- 가. 기존 선발 장류 및 콩나물용 돌연변이 유전자원의 농업형질 특성검정 및 예비계통 선발하여 된장 가공 및 생산 적합성 평가와 콩나물용의 기능성 및 수량성 특성평가에 따른 생산적합성을 확인하고 수량성 및 지역 적응시험을 거쳐 품종출원 및 브랜드 선정 실용화.
- 나. 선행 연구 경험을 활용하여, 단인자 우성불임성(Ss)의 일시적 타과에 의한 가임화 기술의 개발과 소포자 배양에 의한 우성불임성인자의 동형접합체(SS)를 확보 유묘기 우성불임성성과 가임

성 개체 구별 표지인자 개발 및 음성불임성인자의 동형접합체(SS) 이용 1대잡종(2-way hybrid)의 육성 체계 확립.

- 다. 식물바이러스는 유전자 수가 적기 때문에 기주인자에 대한 의존도가 높으며, 다른 병원균에 비해 기주인자의 돌연변이에 의한 저항성 개체 선발 성공률이 높으므로 방사선을 이용한 고추의 돌연변이체 유기 선발 및 돌연변이를 이용한 바이러스 저항성 계통 선발 수행
- 라. 수집 유전자원을 이용한 기능성 토마토 계통 육성하고 방사선 돌연변이원을 이용한 토마토 유전자원 창출 및 돌연변이체 이용 왜성 및 카로티노이드 강화 기능성 토마토 육종체계 확립 비타민 A 강화 기능성 토마토 품종육성

3. 돌연변이 유전체 연구(핵심 분야 3)

- 가. 벼 돌연변이 기능유전체 연구용 TILLING 집단(약 3,000 계통) 및 분석체계 구축하고 Microarray 및 TILLING 기술을 이용한 간척지 적응 유망 돌연변이체의 유전자 발현정보 분석에 의한 관련 유전자 대량 규명, SNP 마커개발 및 네트워크 구축 간척지적응 벼 품종 개발을 위한 유망 돌연변이 계통 선발 및 품종화
- 나. 돌연변이 집단을 활용하여 세균병 또는 바이러스병에 대한 저항성 돌연변이체 선발하고 선발된 개체를 이용하여 유전자 지도를 활용한 저항성 관련 유전자 및 마커 분리, Microarray를 이용한 발현유전자 대량 분석으로 저항성 관련 유전자군의 선발 및 검정, 병저항성 돌연변이체의 특성 분석을 통한 계통 확립, 병저항성 관련 유전자의 특성 분석 및 활용 병저항성 마커를 활용한 MAS 체계 확립
- 다. 기후변화 대응 유용돌연변이 벼 선발 및 이용 온도 스트레스(고온, 저온)들에 반응 유전자 네트워크 비교 연구 및 활용 고온, 저온 온도 스트레스 내성 벼 선발 유망 돌연변이 계통의 품종 개발

제2절 연구개발의 필요성

돌연변이 육종의 기술체계는 신품종 개발이 주목적이거나 이 과정에 나오는 돌연변이체를 이용하여 신규 유전자나 분자마커를 개발함으로써 육종 효율을 높이거나 분자생물학적 연구의 소재로도 활용될 수 있어, 유전자원 측면에서도 중요함. 세계적으로 식량 및 사료 수급을 위한 육종에서 산업용 의학용 등의 기능성 물질 개발에 초점이 맞춰지고 있는 실정이므로 돌연변이 육종 기술을 이용한 신규 유전자원의 개발 및 신품종 육성, 그에 관련된 분자생물학적 연구가 필요함.

1. 기능성 및 바이오에너지 작물 개발(핵심 분야 1)

- 가. 현재 벼는 공급의 과잉과 WTO 협정에 따른 일정량의 수입이 불가한 현실에 처해있음. 벼를 재배하는 농민들의 소득의 유지와 부가가치의 향상을 위해 쌀의 주식 기능이 외에 건강 기능성 쌀, 특수미(산업용, 의학용)로의 전환이 필요함. 변화하는 소비자의 수요와 다양한 용도로의 수요 변화에 대응하여 기능성 물질을 함유한 돌연변이 육종소재를 개발하고, 고기능성 벼 신품종 육성 전략이 필요함.

- 나. 국내 밀 자급률은 0.8%로 국내 자급 능력을 상실하였으며, 벼 등 타 작물과의 안정 다수성 이모작 작부체계를 유지할 위한 조숙 품종 육성 및 이를 위한 제반 연구가 지속적으로 요구되는 실정임. 따라서 국내 밀 재배여건에 적응하는 조숙성, 고품질, 다수성 및 환경스트레스 내성이 우수한 품종 육종 기술의 개발이 절실히 요구됨.
- 다. 블랙베리는 과실음료 및 주류시장 등 그 수요가 늘어가는 추세이나 이에 대한 공급이 부족한 실정이고 기존에 재배되었던 품종은 단위면적 당 생산성이 부족하고 병충해에 약한 단점이 있으므로 다수성과 내충성 품종 육종이 필요함.
- 라. 스테비아는 대체감미료 시장의 확대로 그 수요가 꾸준히 증가하는 추세이며, 현재 재배되고 있는 품종보다 생산성이 좋고 기호에 맞는 감미성분(레바우디오사이드)이 많이 함유하고 있는 뛰어난 품종 개발이 필요한 실정임.
- 마. 케나프 (영명: Kenaf, 학명: *Hibiscus cannabinus* L.)는 양마(洋麻)라고도 불리며 서부 아프리카 원산의 아욱과 (Malvaceae)에 속하는 1년생 초본식물로 세계 3대 섬유작물임. 아프리카 및 남아시아에서는 오래 전부터 주로 밧줄 및 포낭 재료로 이용되어 왔으며, 케나프는 주로 줄기를 섬유자원 (fiber crop)으로 이용하지만, 줄기나 잎은 조단백질 함량이 높아 사료적 가치가 높고 최근 펄프, 기능성 벽지, 화장용 티슈, 바이오플라스틱, 건축용 보드, 기능성 의류, 숯, 사료용, 기름흡착제, 버섯/식물재배용 배지, 축사 깔재, 바이오에탄올 생산용 등 다양하여 산업소재의 국산화를 위해 국내 재종이 가능하면서, 바이오메스 생산성이 뛰어난 품종 개발이 필요함.
- 바. 유채는 식용, 산업용, 밀원, 관광자원, 바이오디젤 원료 등 다양한 유용성을 가지고 있으며 최근 많은 나라에서 화석연료를 대체 에너지 원료작물로 주목을 받고 있는 실정이므로 이에 우리나라도 기후, 토양, 작형, 재배기술, 경제성 확보에 맞는 바이오디젤용 유채의 신품종 개발이 필요함. 이에 따라 간척지의 농경용지에 재배할 수 있는 내염성과 답리작이 가능한 조숙성 그리고 다수성과 기계화 재배에 적합한 단간성 품종 등 유용형질에 대한 개발이 요구됨.
- 사. 고구마는 식용, 공업용 등으로 주로 이용되어 왔으며 최근 항암, 항산화작용 및 혈중 콜레스테롤의 강하작용 등 약리적 효과가 인정되어 성인병 예방 건강식품으로 수요가 증가하는 추세임. 국내의 고구마 품종개발은 대부분 식용위주로 단순화되어 있으며, 교잡육종을 통해 이루어지고 있으나 개화 유도등의 인위적 처리가 필요하므로 새로운 육종체계 정립과 사용 목적에 적합한 산업용 고구마 품종 개발이 필요함.
- 아. 인간 삶의 질 개선과 질환의 예방 및 치료를 위해 부작용이 적은 천연물 대체 의약품 및 기능성식품 시장의 저변 확대되고 있음. 이에 따라, 국내에서는 ‘천연물신약연구개발촉진계획(01-10)’을 수립하여 천연자생식물로부터 고부가가치의 식·의약 제품을 개발하는 연구가 진행되고 있으나 종의 다양성 및 유용성분 함유량의 한계로 산업화 추진에 어려움이 발생함에 따라 유용성분이 다량 함유되어 산업화의 적용성이 용이한 대체소재 발굴의 필요성이 대두되고 있음.

2. 지역 특산작물 및 원예소재 개발(핵심 분야 2)

- 가. 콩은 식량작물 중 생산액이 연간 3.5천억원으로 쌀을 이은 농가소득 2위 작물로 식용 콩은 연간 소비량 45만 톤 중 국내 생산량은 15만톤으로 자급률 33% 수준에 불과함.

WTO 협정에 따른 TE관세율의 저하 및 저율관세에 따른 시장접근물량(CMA)의 증가로 인한 수입콩 확대에 대응하여 차별화된 국산콩 품종개발 및 목적 특이적인 품종화 전략이 필요

- 나. 녹색꽃양배추(*Brassica oleracea* var. *italica*)는 양배추 류(*B. oleracea* var.)의 일종인데 보급품종은 대부분이 1대잡종이며 그 채종은 주로 자가불화합성을 이용하지만 자가불화합성의 활력이 비교적 약하기 때문에 채종 과정에 자식종자가 생기고 그 결과 1대 잡종 품종의 순도가 나빠지는 문제점이 있음. 따라서 품종의 균일성을 높일 수 있을 뿐 아니라 품종의 자체보호가 가능한 1대 잡종 품종을 육성하고 실제 이용 가능한 음성 불임성 이용체계 확립이 필요함.
- 다. 고추는 매운맛을 내는 캡사이신이라는 화합물로 인해 식품의 양념으로 널리 이용되고 있으며, 식품 산업 이외에도 약학, 의학 등 다양한 분야에서 사용되고 있지만 재배시 생물적, 비생물적 스트레스로 인한 생산의 감소가 문제이며 교배를 통한 내병성 품종 육종에는 유용 유전자의 제한이 문제가 됨. 따라서 새로운 유전적 다양성을 확보하고 유용한 형질에 대한 연구를 위해서는 다양성을 가지는 새로운 유전자원의 확보가 시급한 실정임.
- 라. 토마토는 비타민 A, C 및 베타카로틴 등 영양성이 높고 국내 생산량이 많은 과채류이나 국내에서 토마토 육종연구는 몇몇 종묘회사 및 토마토시험장 중심으로 기존의 제한된 유전자원을 활용하여 진행하고 있음. 따라서 국내 토마토 종자 육종산업을 위해 과실 중에 비타민 C 및 카로티노이드 색소 함량이 높은 돌연변이 유전자원 개발과 이를 통한 품종육성 연구가 절실히 필요함.

3. 돌연변이 유전체 연구(핵심 분야 3)

- 가. 산업화와 농업 인구의 감소에 의한 농경지의 감소로 간척지 개발(새만금)에 의한 농경지 확대와 간척지적응 벼, 기후온난화로 인한 이상고온 및 이상저온 및 각종 병 발생에 의한 피해 경작지 증대로 기후변화대응 및 병저항성 벼 품종개발에 대한 관심이 고조되고 있으나 이들 형질은 복잡한 메카니즘을 가져 기존 유전자원을 활용한 관련 유전자에 대한 분석에 한계성이 있음. 따라서 벼 돌연변이 유전자원의 대량창출 및 간척지적응성 벼 계통 선발과 TILLING(Targeted Inducing Local Lesion IN Genome) 기술을 이용한 내염성 관련 기능 유전체 연구 필요성이 대두됨.
- 나. 기후변화에 따른 온난화의 영향과 고품질 벼의 재배확대에 따라 벼에 발생하는 병의 종류와 피해가 증대되고 있으며, 특히 바이러스병(벼줄무늬잎마름병)의 경우 보독층의 월동범위가 확대되고 있어 점차 경작지에서의 피해가 증가될 것으로 예상되고 있음. 벼 돌연변이 집단을 활용하여 병저항성 계통을 선발하고 기능유전체학적 접근에 의한 병저항성 기구의 이해를 통해 분자유종기반 확립의 필요성이 증대되고 있음.
- 다. 기후변화 대응 유용돌연변이 벼를 선발하여 온도 스트레스(고온, 저온)들에 반응하는 유전자 네트워크 연구 및 이를 활용하여 온도 스트레스 내성 벼 선발 유망 돌연변이 계통의 품종을 개발하여 실용화 전략이 필요

제3절 주요 연구개발 내용 및 범위

1. 방사선, 화학물질 및 조직배양 등 전세계적으로 널리 안전하게 이용되고 있는 돌연변이 육종기술을 이용하여, 다음과 같은 다양한 품목을 개발하여 실용화함.

- 가. 기능성 및 바이오에너지 작물 분야에서는 녹색거대배찰미, 저아밀로스미, 저글루테린미 등 기능성 쌀 품종, 조숙성 고품질 우리밀 품종, 복분자 대체 및 신기능성 작물로 유망한 블랙베리의 신품종 및 최근 감미료 및 친환경 농자재로 유망한 스테비아 품종개발 실용화, 바이오에탄올, 바이오플라스틱 및 바이오섬유 등의 소재로 유망한 케나프 품종개발 보급, 바이오디젤용 조숙 및 내염성 유채 품종, 바이오에탄올 생산에 적합한 전분특성을 갖는 고구마 품종개발, 그리고, 돌연변이 차조기 및 블랙베리를 이용한 향산화성 기능성 식의약 소재개발 실용화
- 나. 지역특산 및 채소자원 분야로는 순창 장류용 및 전주 나물용 등 지역특산 우수 브랜드 콩 품종개발 실용화, 녹색꽃양배추의 우성 불임성 돌연변이체 개발 실용화, 바이러스저항성 고추 개발, 그리고, 고색소 및 영양성 강화 토마토 유전자원 개발
- 다. 벼 유전체연구 기법이용 품종개발 분야에서는 원자력연구원에서 구축한 벼 TILLING 돌연변이 집단을 대상으로 내염성(원자력연), 병저항성(생명연), 고·저온 내성(강원대)에 관한 유용 유전자원을 마이크로어레이, 유전마커 시스템 및 유전자 네트워크 분석기법을 이용하여 탐색하고 품종개발에 활용하는 연구를 추진함.

2. 기능성 및 바이오에너지 작물 개발(핵심 분야 1)

- 가. 서울대학교 분자유종 실험실에서 유기한 다양한 벼 돌연변이 유전자원을 대상으로 특이적인 특성을 가진 계통들을 스크리닝하고 이러한 계통들을 육종소재로 이용하여 품종 개발 및 품종보호권 출원·등록. 또한 돌연변이들의 특성에 대한 유전현상을 구명하고 유전자를 클로닝하여 분자 수준에서 기능 연구 및 논문 작성. 이화학적 특성이나 성분을 분석하여 실용 가능 여부를 확인하고 적용.
- 나. 고려대학교에서 보유중인 방사선 유용 돌연변이 계통 특성 검정 및 계통 전개를 통한 우수계통 선발 및 중간모본/신품종을 지속적으로 육성하고 국내 우수 품종을 대상으로 방사선 조사를 통한 유용돌연변이 유도 및 신품종 육성하여 우수 돌연변이 계통에 대한 유전생화학적 분석을 통한 농업적으로 유용한 germplasm의 개발 뿐 아니라 고품질·고기능성 작물의 육성기반을 위한 연구를 추진하였음.
- 다. (주)한국스테비아에서는 블랙베리 유망 돌연변이 계통의 특성 및 생산력 검정, 대량증식 및 재배 기술개발, 품종등록(특허/품종보호권)과 묘목 대량증식, 자체 상품화 또는 품종실시권 매각 이전, 지자체 등과 연계한 실증 및 재배단지 조성등을 추진. 또한 스테비아 돌연변이 육종 체계 확립 및 우수변이체 선발 및 대량생산 체계 확립하고 내병성 및 성분 향상 우수 품종 선발 및 품종화하여 국내 및 중국 농가 실증재배 확립 및 고소득 작물화를 추진.
- 라. 한국원자력연구원 방사선육종연구팀의 강시용 박사는 국내외서 케나프 유전자원을 수집하여 특성평가와 아울러 방사선을 이용한 돌연변이 육종기술에 의한 국내 재배에

적합하거나 새로운 형질의 신품종 개발연구를 추진하여 현재까지 국내 최초로 국내에서 종자생산이 가능하며 생산성 및 특이 형질 등이 뛰어난 케나프 신품종 3종을 개발하여 품종 출원하였으며, 방사선 처리 돌연변이 등 유망/유용계통 50종 이상, 국내의 유전자원 30종 이상 수집하여 육성하여 케나프를 활용한 친환경 소재 개발 추진

- 마. 전북대학교에서는 유채 3품종의 건조종자에 각각 양성자와 감마선을 처리하여 일반포장과 간척지포장 재배로 유용한 돌연변이체를 선발하고 변이 발생률, 후대재배에 의한 고정성 등 농경상 주요 특성을 조사하여 유용 변이계통의 선발, 내염성계통의 간척지포장 및 실내검정, 변이계통과 모품종간의 유연관계 분석 등 M₈세대까지 육성하면서 유용형질인 조숙, 단간성 품종과 간척지토양에서도 재배가 가능한 내염성 품종을 선발하여 품종보호권을 출원하고 유용한 농업유전자원은 관련기관에 기탁함.
- 바. 서울시립대학교에서는 고구마 돌연변이 육종을 위한 *in vitro* system 확립을 통한 순계 돌연변이 라인 확보하고 shoot apical meristem을 이용한 방사선 돌연변이체 유도 및 multiple shoot 배양법을 이용한 기내방사선 돌연변이 유도 수행. 기내 배양 체계에서 생산된 고구마 계통중 수량성, 성분분석 및 표현형 조사를 통한 29계통 선발 후 성분 분석 조사 결과 실시하여 전분 특성조사에 따른 목적별 라인 분리 및 RAPD 기법을 이용한 계통별 유전형질을 분석함. 또한 우수 품종을 대상으로 방사선 조사를 통한 유용돌연변이 유도를 수행
- 사. 본 연구에서는 한국원자력연구원 방사선육종연구센터에서 방사선 육종기술을 기반으로 다양한 돌연변이 천연 식물유전자원을 육성 및 보관 중인 품종 중에서 차조기 및 블랙베리를 대상으로 자생품종과의 정성적/정량적 성분 비교분석과 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 항산화 효능을 통한 간기능조절이 가장 우수한 품종을 선발하고 지표 성분(유효성분)의 규명 및 최적 추출조건을 확립하여 시제품의 표준화를 통해 산업화의 적용성이 용이한 항산화 건강기능식품 소재를 발굴하고자 함.

3. 지역 특산작물 및 원예소재 개발(핵심 분야 2)

- 가. 한국원자력연구원 방사선 육종연구팀에서 육성 및 보관 중인 다양한 돌연변이 콩 유전자원 대상 생산성 검정 및 지역적응 시험을 통한 장류 및 나물용 적합 유망계통을 대량확보하고, 확보된 유망계통을 대상으로 한 실제 장류 제조를 통한 이화학적 특성 검정, 관련 유용성분 분석 및 나물용 콩 실제 발아·수율 조사를 통한 품종가능화 계통을 선발하여 품종보호권 출원·등록을 통한 전북도 브랜드화 사업추진 기반 마련
- 나. 바이오브리딩에서는 녹색 꽃 양배추에서 단인자 응성불임개체(Ss)와 가임개체(ss)가 1:1로 혼합된 집단의 개체별 임성을 조사하고 Ss 및 ss 개체의 마커 개발용 DNA sampling 수행. 불임개체의 일시적 가임화 유도 후 자식하는 한편 소포자 배양으로 응성불임성 인자 호모(SS) 개체 및 계통 육성. 응성불임성 인자와 그 억제인자를 이용한 응성불임성 인자 호모 계통 육성과 마커 개발용 인자형별 호모 계통 육성 선발. SS 호모 계통과 다양한 가임성 계통간 F1 조합 작성 검정 후 우량 1대잡종 선발 보급, 응성불임성 인자 호모(SS) 개체의 영양번식에 의한 다량 증식체계 확립, 우량 시판 품종 및 자체 육성 우수 F1 조합의 소포자 배양에 의한 F1 품종 개발용 고정계통의 조기 육성.

- 다. 서울대학교에서는 유용형질에 대한 연구를 위해 우리나라 재래종 고추를 이용하여 돌연변이 집단을 구축하였고, potyvirus와 CMV(*Cucumber mosaic virus*)에 저항성을 가지는 개체를 선발하고자 하였으며 돌연변이 유도를 통해 형태적으로 변이된 형질들의 특성을 조사하고 분류하여 육종에 필요한 유용 개체를 선발함. 매운 고추에서 돌연변이 유도로 맵지 않은 개체를 선발을 통해 매운맛 합성물질인 캡사이시노이드 생합성 과정에서 매운맛을 조절하는 새로운 유전자를 동정하는데 유용한 육종재료를 확보하고자함.
- 라. 한경대학교 원예학과 유전육종실에서는 수집 유전자원을 이용한 기능성 토마토 계통 육성, 방사선 돌연변이원을 이용한 토마토 유전자원 창출을 통한 돌연변이체 이용 왜성 및 카로티노이드 강화 기능성 토마토 육종, 돌연변이체로부터 왜성 및 카로티노이드 강화 계통 선발, 비타민 A 강화 기능성 토마토 품종육성등을 통해 고색소함유 비타민 A 강화 토마토 계통 육성(기존품종보다 60% 증가) 및 과실 Brix 강화 토마토 계통 육성(기존품종보다 1.6배 증가)을 수행하여 우수 품종 육성을 위한 중간 계통 육성 기반을 마련

4. 돌연변이 유전체 연구(핵심분야 3)

- 가. 한국원자력연구원에서 구축된 벼 돌연변이 TILLING 집단(M₃)을 한국원자력연구원(간척지적응), 강원대(기후변화대응), 생명공학연구원(병저항성) 연구 수행을 위한 기본재료로 제공. 벼 돌연변이 기능유전체 연구용 TILLING 집단 및 분석체계를 구축하고, 간척지적응, 기후변화 대응, 병저항성 벼 품종 개발을 위한 유망 돌연변이 계통 선발 및 검정과 DB화와 Microarray 및 TILLING 기술을 이용한 간척지적응 기후변화 대응, 병저항성 유망 돌연변이체의 유전자 발현정보 분석에 의한 관련 유전자 규명, SNP 마커 개발 및 네트워크 구축
- 나. 한국생명공학연구원에서는 한국원자력연구원 방사선 육종팀에서 육성한 벼 돌연변이 집단을 대상으로 병저항성 돌연변이체를 선발하기 위한 스크리닝 체계를 구축하고, 병발생이 상이한 돌연변이체를 선발하여 병발생과 관련된 특성을 파악하고 이를 대상으로 유전자 수준에서의 분석을 위해 microarray 분석 및 유전체 재분석을 수행하였음. 이와 같은 과정을 통해 병 저항성과 관련된 유전자를 확보하며 병저항성 계통으로 육성하기 위한 기반을 확보하고자 하였음.
- 다. 강원대학교에서는 방사선과학연구소에서 육성된 벼 돌연변이 3,000 개체들에 대한 고온 및 저온 내성 개체 선발 체계 확립 및 우수 후대를 양성하고, 내열성 및 내냉성을 지니는 후대에 대한 마이크로어레이 기법을 이용한 대량 전사체 발현 분석 및 기존에 구축된 데이터베이스와 연동하여 관련 유전자군에 대한 분석 및 *in silico* 분석을 통하여 내열성 및 내냉성 관련 유전자 네트워크 구축 및 허브유전자를 분리하여 선발된 돌연변이체에서 허브유전자의 염기서열의 변화에 대한 기능 분석 및 육성된 기후변화 대응 유용 유전자원에 대한 재배생리적 특성 분석 및 유전자원화 가능성을 평가함.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내 기술개발 현황

1. 돌연변이육종 국내 기술개발 일반 현황

- 가. 2012년 8월 기준으로 FAO/IAEA META (돌연변이품종 데이터베이스) (<http://mvgs.iaea.org>) 에 등록된 우리나라의 품종 수는 35개로 세계 17위 수준에 불과함.
- 나. 현재 국내 돌연변이 품종의 재배통계는 추정이 어렵지만, 벼의 경우 총재배면적의 0.2-0.3% 내외 수준인 약 2,000~3,000ha/년으로 미미함. 1980년대에 방사선을 이용해 육성된 방사콩 및 참깨 등이 많이 재배되었고, 이들 품종을 교배모본으로 한 신품종들이 개발되었음.
- 다. 1960년대부터 전세계적인 방사선육종 연구붐에 따라 1966년에 방사선농학연구소가 설립되어 관련연구가 진행되었으나, 1973년 방사선농학연구소가 원자력연구소와 통합되면서 그 후 이 분야의 전담 연구조직의 와해와 연구개발 투자 미흡으로 국내 방사선육종 연구가 크게 낙후하게 됨.
- 라. 방사선농학연구소가 원자력연구소로 통합된 이후 돌연변이 육종분야가 명맥을 이어 오면서 현재는 돌연변이 육종전담기관으로써 방사선돌연변이 육종센터를 준공(농림축산식품부지원 132억, 2010~2013)하여 관련 연구를 활발하게 수행 중에 있음.
- 마. 방사선기술에 생명공학기술을 융합한 새로운 첨단 돌연변이 육종기술 개발과 중이온빔 및 양성자빔 등의 신방사선원을 활용한 육종기술 개발, 방사선유전자원을 활용한 기능유전체 연구, 돌연변이 유전자원 데이터베이스 구축 및 해외관련분야와의 인적네트워크 구축을 통한 국제협력연구도 진행 중에 있음.
- 바. 한국원자력 연구원 신품종 개발현황
- (1) 벼 신품종(12개 품종) 개발현황 : '원평벼', '원광벼', '원미벼', '흑선찰벼', '원청벼', '원품벼', '원추벼', '흑광찰벼', '녹원찰벼', '원해벼', '골드아미 1호' 및 '원명벼'
 - (2) 콩 신품종(4개 품종) 개발현황 : '조생서리', '조생서리 2호', '원울' 및 '원현'
 - (3) 무궁화 신품종(6개 품종) 개발현황 : '백설', '꼬마', '선녀', '대광', '창해' 및 '다솜'
 - (4) 국화 신품종(7개 품종) 개발현황 : '아티퍼플', '아티퀸', '아티엘레강스', '아티그레이스', '아티엘로스타', '아티레드스타' 및 '아티다크초코렛'

2. 기능성 및 바이오에너지 작물 개발(핵심 분야 1)

- 가. 국내 벼 재배면적 중에서 기능성 벼나 유색벼, 향미벼, 양조벼 등 특수 기능성 벼가 차지하는 비율이 점점 늘어나고 있고 이들의 시장가격은 일반 벼 보다 4배까지 높게 거래되고 있음. 또한 다이어트 쌀, 미네랄 쌀, 황금 쌀, 발아현미 등 특수 목적에 부합하는 기능을 가진 벼들이 육성되고 있음. 또한 쌀의 전분이나 겨 등을 이용하여 바이

오 신소재를 만드는 다양한 시도가 이루어지고 있음.

- 나. 사료용을 포함한 우리나라 2011년 전체 곡물자급률은 22.6% (농림수산식품 주요통계, 2012)이며, 주요 곡물인 밀의 자급률은 1.1%로 사실상 국내자급 기반이 상실된 실정임. 밀 수입량은 2011년 247만 톤을 기록하여 2007년보다 25% 증가(2012 통계청, 양곡소비량조사)하였고, 우리나라 국민 1인당 밀의 소비량은 2005년 기준 31.8kg에서 2012년 기준 35kg로 증가 추세(쌀의 경우 2005년 기준 82kg에서 2012년 기준 69.8kg로 감소, 2012 통계청, 양곡소비량조사)에 있음. 돌연변이 육종기술의 안정성 측면 및 국내의 밀 생산 기반을 감안했을 때 농업적으로 유용한 germplasm의 개발 뿐 아니라 고품질·고기능성 작물의 육성을 가능하게 하는 mutation breeding의 중요성이 대두되고 있음.
- 다. 현재 국내에서 생산되는 나무딸기는 복분자, 줄딸기, 명석딸기가 주류를 이루며 이들의 묘목생산은 종자발아와 삼목을 사용하여 왔으나 종자는 발아율이 떨어질 뿐만 아니라 수확시기가 늦고 초기 수확량이 적으며, 배의 발육과 후숙이 잘 이루어지지 않는 어려움으로 농가에서 잘 이용되지 않고 있음. 따라서 종자번식은 주로 신품종을 육성하기 위해서 새로운 개체를 만들려 할 경우에 이용되는 실정이며 삼목 증식방법은 발근률이 5%미만으로 실용성이 떨어짐. 따라서 국내시장에서 소비자의 욕구에 비해 생산이 적은 실정이므로 묘목의 대량생산이 필요하고 묘목 자체에서도 우수한 품질과 결실의 효과가 큰 것이 필요함.
- 라. 케나프는 양마(洋麻)라 하여 1960년대 초에 국내에 도입되어 가마니 대체용 마대자루 생산을 위하여 도입 유전자원의 평가 및 재배시험 등이 이루어졌는데, 1970년대 초에 화학제품의 마대가 보급됨에 따라 연구개발이 중단되었으며, 1990년 말부터 일부 연구자가 일본 및 미국에서 종자를 도입하여 단편적인 연구개발을 진행 중임. 최근 국내에서도 케나프 소재를 활용하는 연구가 여러 군데에서 수행되고 있음. 한국교원대 등의 연구진 중심의 바이오섬유 연구, 강원대를 중심으로 한 케나프 잎의 화장품 및 기능성 식품 소재 연구, 금오공대 및 원자력연구원 중심의 바이오 플라스틱 연구 등이 진행되고 있음. 또한 업체에서도 케나프 소재를 이용하여 제품 개발에 많은 관심을 보이고 있음.
- 마. 국내 바이오디젤 기술개발은 1990년대부터 시작되어 1999년 하남국제환경박람회 기간 중 유채유를 원료로 한 바이오디젤을 최초로 차량에 사용하였으나 상용화되지 못하였고 우리나라에서 연간 평균 경유사용량의 5%를 바이오디젤로 대체하기 위해서는 전체 농지의 약 36%에 해당되는 면적에 유채를 재배해야 하는 문제가 있음. 국내 유채 품종 개발은 대부분 고전육종에 의해 1980년대까지는 주로 지방산 개량에 노력하였으며 이후 잡종강세를 이용하여 생산성이 획기적으로 증수된 1대 잡종 품종(450kg/10a)을 육성하였음. 최근에는 올레인산 함량이 68% 이상 함유된 품종들을 육성한 바 있음. 그러나 돌연변이 육종기술을 이용한 품종개량 연구는 미비하며, 바이오디젤 원료생산에 있어 경제성 확보에 유리한 조숙, 단간성, 내염성 등의 특성을 갖는 유채 품종 개발은 저조한 실정임.
- 바. 국내 고구마 시장은 현재 약 30여만 톤 정도의 수준이며, 1960년대 중반을 넘기면서 그 재배면적이 크게 감소하였으며, 최근에 와서는 재배면적이 2002년 14,727ha에서 2007년 21,093ha로 다시 증가하고 있는 추세이며 절대다수가 식용으로 이용되고 있음.

국내의 고구마 연구는 바이오에너지작물센터에서 주축이 되어 고구마육종, 재배, 품종 유지 등에 관련한 연구를 수행하고 있으며, 생명공학연구원에서는 형질전환을 통한 환경내성 고구마 개발 및 적용, 전분합성 유전자들이 상호작용 및 그 기능과 관련한 연구, 서울시립대학교에서는 고구마의 재분화시스템을 비롯한 기내배양묘의 증식체계, 돌연변이 육종을 통한 신품종 개발에 관련한 연구를 수행중임. 현재 바이오에너지 작물로서 산업용 작물로서의 고구마의 중요성이 증대되고 있으나 이에 대한 국내 연구는 아직 부족한 실정임.

사. 국내 건강기능식품 시장은 선진국보다 뒤지긴 하였지만 96년까지 꾸준한 성장을 하다 IMF때 급격한 감소세를 나타냈으나 99년부터 빠른 회복세를 보여 2001년 1조2000억원으로 10%이상의 지속적인 상승세를 보임. 건강기능식품 시장은 식품의약품안전청에서 제공하는 식품 및 식품첨가물 생산실적 통계자료를 기준으로 분석한 결과, 2004년도 소비자 가격기준 시장규모는 1조 8000억원 규모로 추산되고, 2005년 2조 1,000억원, 2006년 2조 1,500억원으로 증가 추세이며 이는 장기적인 경기 침체임에도 불구하고 건강을 지향하는 소비자들의 요구가 일부 반영된 것으로 판단됨.

3. 지역 특산작물 및 원예소재 개발(핵심 분야 2)

가. 국내 콩 시장규모는 연간 140만톤 수준이고 이중 식용은 45만톤으로 32% 차지하고 있고, 식용 콩의 연간 국내 생산량은 15만톤으로 33% 자급률 수준임. 장류 총생산량은 2000년 252천톤에서 2004년 365천톤으로 증가 추세에 있으며 관련 매출액도 2000년 3,370억원에서 5,000억원으로 증가함. 콩발효식품은 우리나라 고유의 전통식품이지만 장류의 기능성에 대한 과학적인 연구는 많지 않았음. 최근 발효장류에서 항돌연변이, 항암, 항노화, 항산화, 항동맥경화 등의 임상효과가 알려지면서 관련 연구가 진행되고 있음.

나. 국내의 녹색꽃양배추는 아직 소비가 적기 때문에 독립적인 재배면적, 생산량, 종자 생산량 등의 통계자료가 없는 실정이며 국내 면적이 약 1.737ha정도인 것으로 추산되며 주로 제주도에서 생산생산이 되며 재배된 품종은 대부분 외국 도입종임. 최근 국내 종자회사들의 노력으로 일부 시험 재배되고 있으나 가장 중요한 특성은 저온인 겨울에도 잎과 구에 자색의 색소가 형성되지 않아야 한다는 문제점이 있음.

다. 국내 병 저항성 분자마커 연구는 CMV 및 TSWV 저항성 마커와 역병 저항성 주동유전자와 연관된 M3-CAPS 마커를 들 수 있으며 TSWV, Potyvirus 등에 저항성분자표지의 사용이 점진적으로 늘고 있는 추세이다. 서울대학교 강병철 교수팀은 다양한 분자마커들을 이용하여 고밀도 유전자 지도 작성을 진행해 왔으며, 서로 다른 몇 개의 집단을 대상으로 2,000개 이상의 마커를 사용하여 유전자 지도를 작성하였음. 고추의 경우 형질전환이 어려운 관계로 유전자의 기능 등에 대한 연구가 부족하며, 매운맛이나 병에 대해 저항성을 가지는 품종과 같은 유용한 개체를 선발하기가 어렵기 때문에 이를 개선하기 위한 방법으로 물리적 또는 화학적인 돌연변이 유도 물질을 통해 제초제 저항성, 병 저항성 그리고 작물품질개선을 위한 새로운 유용형질을 분석하기 위해 TILLING 기술을 사용하고 있으며, 추가로 고추에

돌연변이를 유도시켜 loss-of-function을 통해 캡사이신의 합성을 조절하는 새로운 유전자 동정에 대한 연구를 수행중임.

- 라. 국내의 토마토 재배면적 및 종자시장이 크게 증가되고 있으나, 종자의 대부분을 수입에 의존하고 있는 실정임. 토마토는 고부가가치 작물로 최우선적으로 국내시장의 수입품종을 대체할 수 있는 품종을 개발하여 달러의 해외 유출을 막고 농가에게 소득증대 뿐만 아니라 국내 토마토산업의 활성화를 통하여 기하여야 함

4. 돌연변이 유전체 연구(핵심 분야 3)

- 가. 이온화 에너지 돌연변이 기술은 이 분야 최고의 기술력을 가진 방사선과학연구소를 중심으로 대량 창출된 벼 유전자원을 대상으로 간척지적응성, 내병성 및 온도스트레스에 적합한 벼 계통을 선발하고, 기능유전체학적 접근에 의한(TILLING, Targeted Inducing Local Lesion IN Genome) 목적형질 관련 기작을 해석하며, 유전자 네트워크 크 연구가 진행 중.
- 나. 생명과학분야에서 분자생물학적 연구에 의한 DNA 유전정보 규명, 염기서열 분석 방법의 개발과 더불어 대량 유전자 transcript profile 연구가 활발하게 진행 되면서 이를 이용한 다양한 유전자 네트워크 모델링이 이루어지고 있음. 사람의 경우 대량 유전자 transcript profile을 이용한 유전자 네트워크를 이용하여 복잡한 생명 현상의 규명 및 신약 개발 등을 하고 있으나, 식물의 경우 최근 유전자 네트워크 구축이 시작 단계로 미미함.

제2절 국외 기술개발 현황

1. 돌연변이육종 국외 기술개발 일반 현황

- 가. 2012년 8월 기준으로 FAO/IAEA META (돌연변이품종 데이터베이스) (<http://mvgs.iaea.org>)에 의하면 돌연변이품종 개발은 세계 68개국, 220식물에 3,218여 품종임.
- 나. 국가별 품종등록실적은 중국이 810개 품종으로 1위이며, 일본(481), 인도(329), 러시아 연방(216), 네덜란드 순이며, 한국은 35개 품종으로 17위임. 작물별로는 벼(815), 보리(309), 국화(271), 밀(254), 콩(170)순으로 식량작물이 가장 많으며, 개도국에서는 식량작물, 선진국에서는 원예작물의 비중이 높은 편임.
- 다. 돌연변이 유기원별 품종수는 물리적 돌연변이원이 77%로 가장 많으며, 화학적 돌연변이원은 11%를 차지하고 있음. 물리적 돌연변이원 중 감마선이 52%로 가장 많고, X선이 18%를 차지하고 있으며, 나머지 7%는 복합처리에 의한 품종 개발이 이에 해당됨.
- 라. 최근에는 돌연변이체를 이용한 기능유전체 (functional genomics) 연구와 돌연변이 유전자원은행사업이 미국, 일본 등 선진국을 중심으로 진행되고 있음.
- 마. 중국 : 돌연변이 품종수는 FAO-IAEA DB기준 세계 제 1위로 현재까지 810종이 넘는 품종이 육성되어 활용되고 있으며, 중국농업과학원(CAAS) 산하의 작물과학연구소돌연

변이육종과가 중심기관이며, 성(省) 단위의 농업과학원 및 대학 등에 방사선농학 또는 방사선육종을 하는 연구조직을 설치 운영하고 있음

- 바. 일본 : 돌연변이 품종수는 FAO-IAEA DB기준 세계 제 2위로 현재까지 480종이 넘는 품종이 육성되어 활용되고 있으며, 농림수산성 산하의 농업생물자원연구소 부설로 방사선육종 연구를 전담하는 방사선육종연구소(Institute of Radiation Breeding) 운영 중에 있음. 1990년대 초반부터 중이온(중립자)가속기를 이용한 돌연변이 육종기술을 세계 최초로 체계화하고 화훼류 등 품종 개발에 많은 성과를 내고 있는 실정임.
- 사. 인도 : FAO-IAEA DB에는 329품종이 등록되어 있으나, 인도원자력연구소(BARC) 추계로는 629품종이 현재 보존 유지되고 있음.
- 아. 미국 : FAO-IAEA DB 등록기준으로 미국에서는 130여 돌연변이 품종이 개발되어 재배되고 있으며 경제적 규모는 연간 112억 불에 달하는데, 밀, 벼 및 두류 등이 주요 품목에 해당함. 최근에는 분자생물학 및 생화학 연구분야에서 돌연변이 유전자원을 활용한 기능유전체 연구가 활발하게 진행되고 있음
- 자. 기타 유럽국가 : 방사선 돌연변이 육종 연구는 1930년대부터 스웨덴, 러시아 및 유럽 각국에서 활발하게 진행되었으나, 1970년대 이후 교배육종 및 생명공학 연구가 활성화됨에 따라 관련 연구가 많이 감소함. 화훼산업으로 유명한 네덜란드에서는 방사선을 이용하여 다양한 화훼 품종을 육성하고 있음.

2. 기능성 및 바이오에너지 작물 개발(핵심 분야 1)

- 가. 특수미의 개발과 이용은 우리나라를 비롯하여 일본과 중국에서 주도되고 있음. 하지만 근래 미국에서도 유색미와 기능성 쌀의 수요가 늘고 있고 소비량도 점점 증가되는 추세임. 특히 일본에서는 벼에서 바이오 에탄올을 추출하여 그 쓰임의 범위를 확대하고 있으며 다양한 플라스틱 포장용기를 만들어 산업용으로 사용하고 있음. 또한 친환경, 최첨단 소재의 원료로 벼와 그 부산물을 활용하고 있음.
- 나. 유전자변형 작물의 세계 곡물시장 점유율은 높아지고 있으나, 현재 GM 밀은 상품화/품종화 된 것이 없으며, 돌연변이 육종을 통한 계통/품종들은 CIMMYT 등 국제연구기관과 대학연구소등에서 활발히 개발 이용되고 있음. 기존 연구 내용은 돌연변이 화훼류 신품종 개발 분야에 치중되어 있고, 국외의 연구 동향을 볼 때 현재까지 밀 (common wheat)을 포함한 맥류분야에는 돌연변이 기술을 활용한 신품종 육성 연구가 극히 미미한 실정임.
- 다. 일본이나 중국에서는 과일음료와 다양한 과일잼의 소비가 증가하고 있는 실정이며 유럽 등에서는 잼을 만드는데 있어서 나무딸기를 더 많이 선호하고, 나무딸기의 중에서도 블랙베리를 주로 사용하기 때문에 연간 소비량이 증가할 것으로 생각됨. 그러나 내병성 다수확 신품종개발과 대량생산체계는 아직까지 어느 곳에서도 이루어지지 않고 있는 실정임. 스테비아의 경우 20여년전 일본에서 개발된 품종인 일본 2가 아시아 전역에서 재배되고 있으며 미국의 코카콜라와 카길사에서 스테비오사이드(성분 중 레바우디오사이드)를 정식 식품첨가제로 사용함으로써 공급이 모자란 실정이고 오래전 개발된 품종이 장기간 재배되면서 품종의 고유성을 잃어버렸거나 재배면적이 적어지고

있는 실정임.

- 라. 전세계적으로 많이 재배되던 북방형 케나프 품종은 단일성의 식물로 개화 및 결실이 잘되나 바이오메스 생산성이 낮은 것이 특징, 1980년대 이후 미국 및 중국 등에서는 바이오메스 생산성이 높은 중일성(day-neutral)의 품종이 많이 개발되어 재배되고 있는데, 이들 품종은 중위도 지역에서는 종자 결실이 잘 안되기 때문에 저위도 지역 및 국가에서 종자를 채종하여 재배하는 방식을 택하고 있음. 일본에서는 1980년대 중반 이후, 케나프를 이용한 다양한 연구개발이 이루어지고 있는데, 특히 펄프 및 기능성 벽지 뿐만 아니라 바이오플라스틱, 보드, 기능성 의류, 숯, 사료용 등의 다양한 연구개발 및 실용화가 이루어지고 있으며, 특히 이산화탄소 흡수량과 건물생산성이 높기 때문에 지구온난화 및 열대우림 보호 대책용으로 활용될 수 있기 때문에 케나프 보급 및 실용화 연구를 주도하는 케나프 협의회/연구회가 지역별로 결성되어 활발한 활동을 벌이고 있음.
- 마. 2009년 이후 세계 각국은 경유 및 휘발유에 바이오연료를 의무적으로 혼합해 사용하는 의무혼합제도를 도입하였으며 핀란드, 독일, 영국, 일본, 네덜란드 등지에서 항공기에 바이오연료 활용을 시험하고 있음. 또한 오스트리아 무레크 마을은 유채로 바이오디젤을 만들고 유박은 돼지사료로 활용하고 있음. 1974년 캐나다에서는 에루신산과 글루코시놀레이트 함량이 낮은 “카놀라”라고 명명한 최초의 ‘Double-low’ 품종을 개발하였으며, 각 나라별로 자국의 실정에 맞는 유채 품종개발에 노력하고 있음. 최근에는 유채의 기름함량 증진을 위한 분자유전학적 접근과, 저 포화지방산, 고 올레인산 품종개발에 노력하고 있으며, 돌연변이 품종육성과 관련하여 IAEA/FAO MVD(mutant variety database)에 의하면 전 세계적으로 유채는 17품종이 등록되어 있음.
- 바. 세계 고구마 재배면적 및 생산 상황은 75년의 재배면적 14,825천ha에서 그 5년 이후에는 12,026천ha로 20% 감소하였고, 85년 이후에는 해에 따라 다소의 증감은 있으나 대체로 9,100천ha 내외였으며 2000년에는 9,498천ha 까지 늘어나다 증감을 반복하고 있음. 고구마의 주요 용도를 보면, 중국은 전분원료용이 40%, 사료용이 30%로 대다수를 차지하고, 일본은 식용과 전분원료용으로 고구마의 이용이 양분되어 있음. 현재 바이오에너지 작물로서 산업용 작물로서의 고구마의 중요성이 증대되고 있으며 일본의 경우 1996년부터 식물 전분을 이용한 폴리머 및 바이오에너지 개발에 정부 및 민간회사를 중심으로 연구를 추진하고 있음. 현재의 발효공정기술로도 헥타르당 약 5,000리터 이상의 에탄올을 생산할 수 있고 밝혀졌으며, 최근에는 미 항공우주국에서 우주정거장에 고구마를 재배하는 연구가 시도되어 우주시대의 식량자원으로 고구마의 잠재능력 개발에 나서고 있는 실정임.
- 사. 전세계 기능식품 시장은 꾸준히 성장을 거듭하고 있으며 2008년에도 10%이상의 성장을 예측하고 있음. 97년 650억 달러였던 세계기능성식품시장은 2000년 1,380억 달러로 높은 성장률을 보였으며 2010년도에는 2000년도 시장의 10배 이상 규모로 증가할 전망이다. NBJ (Nutrion Business Journal, 2000)에 따르면 세계 기능식품 시장을 형성하고 있는 나라는 미국, 유럽, 일본 등이며, 미국은 99년 445억 달러의 매출로 세계시장의 35%를 차지하였으며, 유럽은 433억 달러로 33%, 일본은 232억 달러로 18%를 점유하고 전 세계 기능식품 시장의 85%를 차지함으로써 세계 기능식품을 주도하고 있음.

3. 지역 특산작물 및 원예소재 개발(핵심 분야 2)

- 가. 2006년 미국발간 월간지 'Health'는 한국 김치, 일본 낫또, 그리스 요거트, 인도 렌틸 콩, 그리고 스페인 올리브유를 세계 5대 건강식품으로 발표하였고, 이 중 3가지가 발효식품으로 발효식품에 대한 관심이 급증하고 있음. 콩나물은 한국, 중국, 일본 및 미국 등의 동양계 사회에서 일부 이용되고 있으나 소량이어서, 국외의 경우 콩나물 콩의 품종육성이나 재배법에 관한 연구는 전무한 형편임.
- 나. 양배추 류 중 꽃양배추(cauliflower)와 녹색꽃양배추(broccoli)는 국제적인 작물로서 FAO 통계에 의하면 전 세계 재배면적이 약 100만 ha 정도이며 그 중 동남아시아의 중국 36만ha, 인도 24만ha, 일본 1만ha로 그 재배면적이 크고 그 외 미국 2만ha, 유럽 14만ha로 전 세계에 널리 재배되고 있음. 녹색꽃양배추의 품종은 오래전부터 일본의 사카다 사가 미국 등 국제 시장을 거의 석권하였으며, 일본의 다끼이, 유럽의 몇몇 종자회사가 경쟁적으로 품종을 보급하고 있는 실정임. 특히 최근에 육성되는 품종은 대부분 세포질 응성불임성을 이용한 것으로서 순도가 높고 유전자원으로 이용할 수 없는 특징을 가지고 있음.
- 다. 다국적 민간종자회사는 대부분의 분자표지를 SNP 분자표지형태로 전환하여 사용하고 있으며 분석과정의 대부분을 자동화하여 연간 수 십 만점의 분석 능력을 갖추고 있음. 네덜란드 민간 육종회사들이 육종 효율을 극대화하기 위하여 설립한 분자표지 개발 전문회사인 Keygene의 운영 효과가 매우 높아 현재 프랑스와 일본의 육종회사도 공동 투자하여 개발된 분자표지를 공동 혹은 독자 이용 등 각자의 요구와 필요에 따라 활용되고 있음. 미국의 USDA는 유전체 분석이 진행된 작물이나 분자표지 정보가 많이 축적된 작물을 대상으로 분자유종 기술을 개발하기 위한 번역유전체학(translational genomics) 프로젝트를 진행 중임.
- 라. 세계 토마토 재배면적은 약 470만 ha (FAO, 2011)이며, 이 중 20%인 98만 ha가 중국, 18%인 86만 ha가 인도, 5%인 26만 ha가 터키, 4%인 21만 ha가 이집트에서 재배되고 있음. 미국 Cornell의 연구진이 2,000여개의 RFLP, SCAR, CAPS marker를 개발하여 공유할 수 있는 여건을 조성하였으므로 토마토의 분자유종을 실현하기 위한 기초기반은 조성되어 있음. 국내에 상주하고 있는 몬산토, 신젠타 등 외국기업에서는 자국에서 개발된 마커를 이용한 토마토 육성을 하고 있으며, 네델란드의 Keygene 회사는 여러 유럽종자회사들과 일본의 다끼이 종묘 등이 출자하여 육종에 필요한 분자표지를 개발하여 출자회사에 공급하고 있으며, 개발한 표지 마커들은 첨단 마커로서 향후 신품종 육성에 지대한 영향을 미치고 있음.

4. 돌연변이 유전체 연구(핵심 분야 3)

- 가. 이온화 에너지가 유전체(genome) 내 유전자에 미치는 영향에 관한 연구는 모델 식물 (Arabidopsis)을 이용한 유전체 내 방사선 영향에 관한 연구의 유용성이 증명됨에 따라 (Science, Peters et al., 1998) 이 후 Arabidopsis의 특정 유전자 돌연변이를 이용 역으로 그 기능을 추정함에 의해(reverse genetics) 이온화 에너지의 영향에 관한 연구가 진행 중.
- 나. 최근에 방사선육종은 품종개발 뿐만 아니라 기능유전체 (Functional Genomics) 연구

재료 창출 면에서도 중요하며 일본, 미국 및 국제미작연구소(IRRI)에서는 모델식물로 각광을 받고 있는 애기장대(Arabidopsis) 및 벼 등의 돌연변이체를 방사선으로 대량 창출하여 유전체 분석 연구가 활발히 진행하고 있으며, 이들 돌연변이체를 DB화여 활용을 지원하는 유전자원 은행사업이 진행되고 있음.

※ 돌연변이 유전자원은행: 미국 (<http://www.gramene.org/>), <http://www.gramene.org/>), 일본 (<http://www.shigen.nig.ac.jp>), IRRI(<http://iris.irri.org/cgi-bin/Mutant.pl?trait>) 등.

- 다. 이온화 에너지 돌연변이 유전자원은 특정한 생물학적 프로세스에 변이를 유발하는 유전자를 밝혀내는 분석 재료로 활용성이 높으며, 방사선을 이용한 돌연변이기술로 대량 창출된 유전자원을 대상으로 유전자의 기능을 밝히는 기능유전체학적 연구가 많은 식물 종을 대상으로 국제 컨소시엄 연구로 진행 중.
- 라. FAO-IAEA MVD 등록 돌연변이 품종수는 59개국, 167식물, 3,200종이며, 방사선육종 품종 재배면적 점유율은 중국 20%, 일본 10%, 한국 0.5% 이내임

제3절 선진국과의 기술수준 격차 및 국내기술발전 전망

1. 정부 주도 관련 분야 국내 투자 현황 및 미래 시장규모 예측

- 가. 정부는 최근 신성장동력 산업으로 국내종자 산업을 육성하기 위한 『2020 종자산업 육성대책』을 수립하였으며, 민간육종역량 강화를 위한 기반조성 사업과제의 하나로 한국원자력연구원 정읍 첨단방사선연구소 내에 『방사선육종연구센터』를 설립하여 방사선육종의 국내 연구개발 활성화하는 계획을 포함시켰으며, '13년 센터준공과 더불어 관련분야 농림축산식품부와 미래부 양부처간 공동기획과제 도출을 위한 협의를 진행 중에 있음.
- 나. 글로벌 종자 강국으로 도약을 위한 수출전략 종자 개발 및 산업기반 구축 부·청 협력 R&D 사업으로 『Golden Seed 프로젝트』를 수행 중에 있으며, 수출시장 성장모형에 따라 글로벌 시장개척, 품종보호 전략종자, 미래형 종자 기술개발 등으로 분야를 세분하여 추진 중에 있음. 총 사업비는 정부 3,985억, 민간 926억원 등 4,911억원을 10년간 지원할 계획에 있음.
- 다. 「바이오그린21사업」은 우리나라를 세계 5위권의 농업생명공학기술 선진국에 진입시키고 농업을 국가 부 창출의 주력산업으로 전환한다는 목표로 시작된 농생명 분야 대표 사업으로 1단계는 원천기반을 확립하고, 2단계는 실용화 기반을 구축하고, 3단계는 실용화를 목적으로 추진 중에 있음. 현재는 2단계로 차세대바이오그린 사업21이라는 이름으로 사업을 추진 중에 있으며, 총사업비는 1단계('11~'14) 2,808억원을 투입했으며 2,3 단계('15~'20)까지 총 7,200억원을 투입 예정에 있음.
- 라. 농업분야의 방사선 산업 세계 시장 규모는 현재 15조원에서 2020년에는 50조 이상의 성장할 것으로 예상하며, 국내 방사선 산업 시장 규모는 현재 농업분야에서 5000억 원 규모이며, 2020년에는 2조8천억 원 이상의 시장규모로 성장할 것으로 전망함.
- 마. 세계 종자시장은 현재 70조원에서, 2020년에는 약 165조원에 이를 것이며, 농작물,

축산, 수산 등을 포함한 국내 종자시장 규모는 현재 약 1조 7천억 원이며 2020년에는 5조원 이상으로 성장할 것으로 전망함.

2. 국내 돌연변이 육종기술 발전 전망

- 가. 방사선육종연구센터의 설립에 의한 방사선육종 및 돌연변이 연구개발 활성화로 2020년 세계 돌연변이 육종기술 수준 5위권, 품종개발수 8위권 진입목표로 하고 있음. 또한, 돌연변이 품종의 경제적 파급 효과, 현재 연간 1,000억원 이내에서 2020년 종자시장 규모 500억원, 농산물생산액 1.5조억원 수준으로 확대할 수 있을 것으로 예상됨.
- 나. 지금까지 주로 이루어졌던 식량작물 위주의 연구에서 벗어나 선진국의 연구동향을 반영한 식량난 및 에너지난 대비 대체 품종의 개발, 생활여건의 향상으로 고부가 관상식물(화훼, 수목), 기능성 식·의약 식물, 채소 등의 개발에 중점을 두고 연구를 진행 중에 있음.
- 다. 방사선원 및 식물종의 다양화와 -Omics 기술을 포함한 생명공학 기술의 발달로 식물에 대한 방사선의 영향 연구가 단순조사에 의한 형태적 변이에서 전체 유전체 규모에서의 발현변화, 기타 환경요인과의 복합 영향, 장·단기 조사 영향, 우주환경 노출 등의 다양한 환경조건에 의한 멀티 효과 등 다각화, 전문화 되고 있음.
- 라. 육종기술이 고도로 발달함에 따라 육종에 활용할 우량한 변이체가 부족하다는 문제가 대두되고 있으며, 이에 다양한 변이 창출이 가능한 방사선 돌연변이체 pool의 확장을 통해 우수 품종 개발의 가능성을 높이고자 하는 노력이 이루어지는 추세에 있음.

3. 기능성 및 바이오에너지 작물 개발(핵심 분야 1)

- 가. 우리나라의 특수미 개발과 육종은 선진국과 큰 차이는 없으나 이러한 특수 기능성 쌀들은 가격 경쟁력에서 중국에 밀리고 있고 품종의 브랜드 가치나 품질 면에서는 일본에 뒤쳐져 있음. 아직 시도되지 않은 산업적 소재로 친환경 개념을 도입시켜 다양한 개발을 하고 그 대상 시장을 주식이 쌀이 아닌 국가들까지 확대할 필요가 있음. 식용 특수 기능성 쌀의 경우 품질을 향상시켜 브랜드의 가치를 올릴 필요가 있음.
- 나. 최근까지, 해외에서 진행되고 있는 돌연변이를 이용한 기존 연구내용은 돌연변이 화훼류 신품종 개발 분야에 치중되어 있으며, 맥류 신품종 육성은 주로 병충해 저항성(Hessian fly, Fusarium 저항성 등)에 초점을 두고 있는 연구 초기단계 실정임(Peidu Chen, 2013). 따라서, 국내 환경에 적응성이 높은 다수성, 조숙성 돌연변이 맥류 품종에 대한 지속적인 연구투자가 필요하며 이는 국내 맥류 산업육성에 지대한 역할을 하리라 사료됨.
- 다. 스테비아는 식품, 사료, 농업용 제품화함에 있어서 스테비오사이드 등 유효성분을 다량 함유한 스테비아 식물의 육종개발이 요구되어지고 있음. 현재 일반적으로 재배되고 있는 스테비아의 스테비오사이드 함량은 약 8~12% 수준이며, 일본을 중심으로 스테비오사이드 함량이 높은 품종개발이 세계적으로 진행 중이므로 스테비오사이드 함량이 높은 품종 개발 및 신품종을 활용한 다양한 제품화가 필요함.
- 라. 국내 조사료 시장규모는 약 1조 5천억원 규모로 국내 양질 조사료의 생산량은 전체

수요량의 40% 밖에 되지 않음. 케나프를 반추가축에 급여시 건물소화율과 조단백 함량과 소화율이 높고, 수량은 옥수수과 유사하거나 다소 높아 양질조사료 대량생산이 가능함. 또한 국내는 친환경 바이오 플라스틱 및 섬유 식물자원의 한계로 친환경 제품을 전량 수입에 의존하고, 일부 자동차 회사 및 기업들에서 원료 소재를 수입하여 제품 개발을 하고 있어 친환경 바이오 플라스틱 식물소재의 국산화로 수입대체 효과뿐 아니라 고 기능성 복합 소재 개발 및 제품화로 수출시장을 점유할 수 있음.

- 마. 유채 육종에 있어 교잡육종은 우리나라가 세계적으로 우수하여 많은 품종개량이 이루어 졌으나 바이오디젤용 유채 품종개발은 아직 미약한 수준임. 유채를 이용한 바이오디젤의 생산과 활용에 있어서도 선진국의 수준에 미치지 못한 실정임. 품종개발과 농가보급 및 재배, 바이오디젤에 대한 국가적 차원의 정책 수립 등의 연결고리가 형성된다면 농가소득 확대, 탄소중립, 에너지 공여에 큰 도움이 될 것으로 기대됨.
- 바. 고구마는 영양변식 작물의 하나로서 돌연변이 육종은 품종개량의 주요한 접근법 중의 하나이며, 이미 방사선조사에 의해 고구마의 병저항성, 전분함량, 카로티노이드 함량, 가용성 당 함량, 식물타입 등의 변화가 보고되어있음 (Kukimura 1986). 현재 국내에서 방사선을 이용한 돌연변이 육종은 벼, 콩, 참깨 등 19품종이 FAO/IAEA mutant varieties database (<http://www-mvd.iaea.org>)에 등록되어 있으며, 데이터베이스에 미등록된 품종을 포함하면 총 39종에 이를 정도로 그 효용성은 인정되고 있으므로 방사선돌연변이 육종을 통하여 고구마 육종체계의 정립은 물론 사용 목적에 적합한 산업용 고구마 품종을 개발이 가능할 것으로 기대됨.
- 사. 건강기능식품 관련 기술은 크게 탐색기술, 소재화기술, 제품화기술로 분류할 수 있는데 탐색기술만 선진국을 따라갈 수 있다면 기술격차를 줄이는데 어려움은 없음. 방사선 돌연변이 식물자원으로부터 기존 “밀크시슬”을 대체할 수 있는 항산화 소재를 탐색하고 지표성분을 규명한다면 건강기능식품 시장에 충분한 경쟁력을 지닐 수 있을 것이며 수입에 의존하고 있는 국내 시장에 경제적으로도 충분히 기여를 할 수 있을 것으로 전망됨.

4. 지역 특산작물 및 원예소재 개발(핵심 분야 2)

- 가. 장류수출은 국내 포화시장의 새로운 활로가 될 것이고, 58개국 3억불 이상의 수출금액이 미국, 중국, 일본, 러시아, 필리핀, 호주 등에 편중되고 있어, 세계화를 위해서는 커지고 있는 소스시장에 장류의 건강기능성 개념을 도입시켜 시장을 확대할 필요가 있음
- 나. 국내 고추 분자표지 개발 분야는 외국의 여러 나라에 비해 매우 높은 기술수준과 인프라를 갖추고 있음. 서울대학교에 소속되어 있는 식물유전체육종연구 센터에서 분자마커를 이용한 유전자 연관군 지도 작성, 병 저항성 연관 분자마커 (세균성 점무늬병, 역병, TMV), 매운 맛 유전자 분리 및 표지 개발, 옹성불임성 회복 유전자 연관표지 개발, 과실 색깔 연관 표지의 개발, 거대 염색체 유전자 은행 (BAC library) 구축 등의 연구를 수행하여 왔으나 이를 활용할 수 있는 기반이 취약하기에 유전체 정보가 확보되지 않은 작물의 경우 유전자원에 대한 유전체 정보를 확보하고 활용하기 위해 해당 작물의 core collection을 구축하고, 이들에 대한 유전체 정보

해독과 분자표지를 개발하기 위한 다양한 전략을 확보하여 분자유종에 필요한 분자표지를 확보할 수 있는 연구 추진이 필요함.

다. 토마토 육종 분야에 지난 10년간 주요 연구소로는 네덜란드의 Wageningen University, 미국의 Cornell University, 독일의 Max Planck Institutes and Research Groups, 미국의 University of California 이스라엘의 Hebrew University 미국의 University of California Davis 순으로 나타남. 토마토 육종 분야에 연구는 주로 대학교에서 주도하고 있는 것으로 나타났으며, 주요 대학으로는 네덜란드의 Wageningen University, 미국의 Cornell University, California University 및 University of California Davis, 일본의 Tskuba 대학, 중국의 Zhejiang Univesity 및 Huazhong Agricultural University, 이탈리아의 University of Naples FedericoII, 이스라엘의 Hebrew University 스페인의 University of Granada 등이 있음. 토마토 육종 분야에 연구는 주요 연구소로는 독일의 Max Planck Institutes and Research Groups, 이스라엘의 The Volcani Center, 일본의 Kazusa DNA Research Institute 등이 있음.

5. 돌연변이 유전체 연구(핵심 분야 3)

가. 역유전학적 분석을 위한 우수한 생물소재인 TILLING 계통은 2000년 애기장대에서 EMS 처리를 하여 처음 도입된 이래, 옥수수(2004년), 밀(2009년), 콩(2008년), 토마토(2010년) 등 다양한 작물에서 화학약품을 이용한 돌연변이체 유도 및 계통 전개가 이루어지고 있음. 벼의 경우 2007년 UCC Genome Center에서 벼 TILLING 프로젝트가 시작된 이래 화학약품 유기 돌연변이체에 대한 기능 유전체 분석을 실시하고 있음. 그러나 이온화 에너지를 이용한 TILLING 계통의 육성이 전 세계적으로 이루어지고 있지 않음. 따라서 상대적으로 다양한 에너지 스펙트럼을 가지는 이온화 에너지를 활용하여 광범위의 유전적 변이를 가지는 유전자원의 확보 및 이에 대한 기능 유전체 연구가 필요.

나. 내재해성 관련 연구에 있어서 각각의 단일 유전자 연구에 치우쳐 있었지만 많은 단백질간의 상호작용 network 지도를 만들어 여러 생물적, 비생물적 스트레스와 이와 관련된 신호전달과정(signal transduction pathway)에 대한 정확한 이해는 재해저항성 작물을 개발하는데 크게 기여 할 것으로 예상됨.

다. 중국 CAAS, 일본 JAEA Takasaki연구소 등 중심으로 다양한 방사선원을 이용한 돌연변이 육종 및 유전체 연구 수행 (DB 구축)을 하고 있으며, 국내의 기술수준은 선진국 대비 약 70% 수준임

라. 이온화에너지의 단기 급조사에 의한 생리, 생화학적 반응 및 특정 유전자의 변화 연구 및 다양한 방사선원 활용 식물 변이 유도 후 유전자 기능을 검정 (일본 JAEA, 중국 CAAS)하고 있으며, 국내는 선진국 대비 60%의 수준에 불과함.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 제1세부 친환경산업 소재용 케나프 및 유채 품종개발 실용화 (한국원자력연구원 강시용)

1. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
케나프 신품종 육성을 위한 돌연변이 유도 및 유망계통 선발	<ul style="list-style-type: none"> - 수집유전자원을 대상으로 국내에서 재배 적성 및 종자생산 가능성 여부 평가 - 유망 돌연변이 후대 및 수집유전자원 대상으로 형태 및 농업적 형질 조사 	<ul style="list-style-type: none"> - 케나프 방사선 감수성 테스트를 통해 적정 조사선량 (500, 750Gy) 결정 - 선발 유전자원 및 유망 돌연변이 후대 계통을 대상으로 형태 및 농업적 형질 조사 - 방글라데시 Jute 협회로부터 15개 유전자원 분양 및 생육 특성 조사
케나프 내습·내염성 증진 돌연변이 계통 육성	<ul style="list-style-type: none"> - 논토양 조건의 재배실험을 통한 내습성 강한 계통 선발 - 저염분 조건의 재배시험을 통해 고 bio-mass 생산 가능한 계통 선발 	<ul style="list-style-type: none"> - 습답 상태에서 고생산량 품종 육성을 위한 이양재배 시험 - 새만금 간척지 저염분 재배시험포에서 고 bio-mass 생산 가능 계통 선발 실시
케나프 기능성 검정 시험	<ul style="list-style-type: none"> - 가축 사료용 이용 가능성 검정을 위한 화학적 분석 실시 - 케나프 종자 식용 oil 이용 가치 조사를 위한 화학적 분석 실시 	<ul style="list-style-type: none"> - 케나프 유망 돌연변이 계통에서 사료용 기능성 성분 조사 - 케나프 유망 돌연변이 후대를 대상으로 종자의 조지방 함량 및 지방산 함량 분석
케나프 분자유종을 위한 분자유전학·생물학적 접근	<ul style="list-style-type: none"> - 유망 돌연변이 계통의 품종화를 위한 근연관계 분석 실시 - 3'와 5' RACE 기법을 이용하여 미지영역의 유전자 염기서열 분석 실시 	<ul style="list-style-type: none"> - AFLP 분석을 통한 케나프 유전자원간 근연관계 분석 - 섬유소를 이루는 리그닌 생합성 관련 유전자 크로닝 및 염기서열 분석
케나프 고 bio-mass 생산 및 국내채종 가능한 유망계통 품종보호권 출원	<ul style="list-style-type: none"> - 예비 선발품종을 대상으로 형태 및 농업적 형질 조사 - 유망 계통을 대상으로 품종출원 실시 	<ul style="list-style-type: none"> - “장대” 품종 등록 - “적봉” 품종 출원 - “백마” 품종 출원

유채 신품종 육성을 위한 돌연변이 유도 및 유망계통 선발	- 유채 종자에 다양한 선량범위의 방사선 급조사 실시 - 감마선에 의해 유기된 돌연변이체 중 원품종과 비교하여 우수형질 계통 선발	- 방사선 감수성 테스트를 통한 적정 조사선량 선정 - 형태적 돌연변이체 선발(M ₄₋₅) : 화색, 엽색, 엽형, 개화기 조사
---------------------------------	---	--

2. 연구개발 결과 및 고찰

가. 케나프 신품종 육성을 위한 돌연변이 유도 및 유망계통 선발

(1) 유망 케나프 유전자원 개발을 위한 적정 방사선 조사 선량 구명

(가) 모든 품종에서 선량의 증가에 따라 발아율, 생존율, 초장, 근장이 모두 감소함

(나) 지하부가 지상부보다 방사선 감수성이 높음

(다) 생존율을 기준으로 LD₅₀ 선량은 500Gy에서 750Gy 사이로 나타남(그림 1-1)

(라) 현재까지 감마선을 조사 유래 고바이오메스 및 형태학적 돌연변이 68개 계통 육성

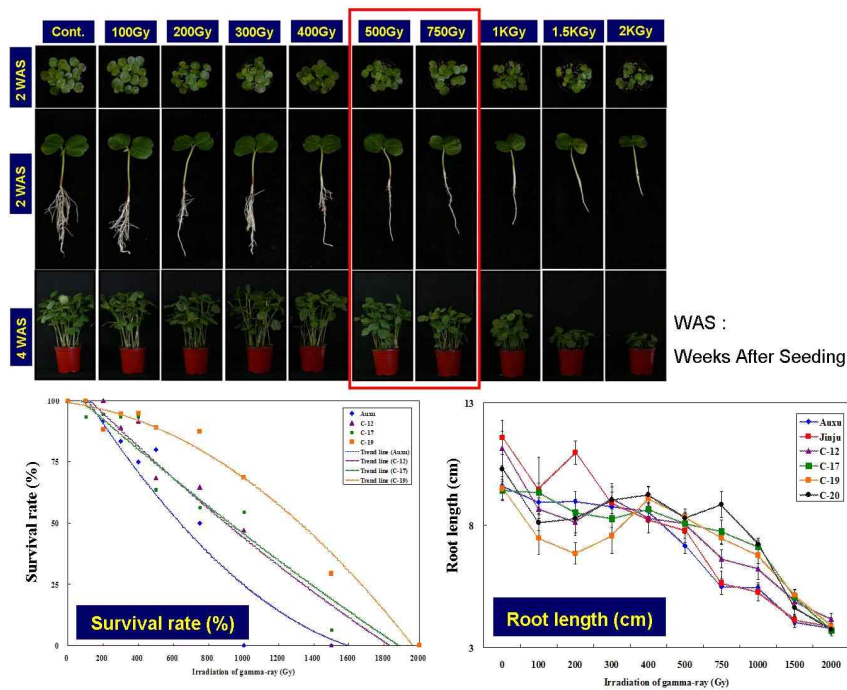


그림 1-1. 감마선 선량에 따른 케나프 유전자원의 생육특성

(2) 국내·외 유전자원 재배평가

(가) 조생종 케나프 품종은 단일성의 식물로 국내 재배환경에서 개화 및 종자 결실이 잘되나 바이오메스 생산성이 낮고, 만생종 케나프 품종은 국내에서 개화가 되지 않거나 종자 등숙이 안되고 일부 품종에서 소량 채종되나 상업화하기 어려움

(나) 케나프 실용화를 추진하기 위해서는 국내재종이 가능하고 생산성이 높은 중·장일

성 품종의 개발이 요구됨.

(다) 수집 유전자원 중 국내 채종 가능한 17 계통(조생종 14 계통, 만생종 3 계통)을 선 발함.

(라) 선발된 유전자원의 바이오메스 생산량은 조생종이 만생종의 50~60% 수준이며, 만 생종의 경우 등숙율이 40~50%로 국내 산업화가 어려움

표 1-1. 국내·외 케나프 유전자원 주요 생육특성

	품종명	기원국가	엽형	줄기색	초장	경직경	꼬투리수	개화기	종자 수확기
1	Everglades4 1	USA	Entire	Brown	325. 3	19.3	None	None	None
2	Everglades7 1	USA	Palmate	Brown	302. 7	18.1	None	None	None
3	Tainung 1	Taiwan	Palmate	Brown	312. 6	17.3	None	None	None
4	Tainung 2	Taiwan	Palmate	Brown	332. 9	18.1	None	None	None
5	Cubano	USA	Entire	Brown	291. 6	16.6	None	None	None
6	Cuba 108	USA	Entire	Brown	297. 8	17.2	None	None	None
7	C-7	USA	Palmate	Brown	315	18.4	None	None	None
8	C-8	USA	Palmate	Brown	301. 3	16.9	None	None	None
9	C-9	Russia	Palmate	Green	280. 4	16.4	49.2	August	October
10	C-10	Indonesi a	Palmate	Green	253. 8	15.8	61.8	July	October
11	C-11(P)	Iran	Palmate	Mix	286. 0	17.5	56.4	July	October
12	C-11(E)	Iran	Entire	Green	292. 6	20.2	75.4	August	October
13	C-12	Italy	Palmate	Mix	315. 4	17.8	62.2	August	October
14	C-13	Russia	Palmate	Green	286. 6	17.4	51.2	July	October
15	C-14	Italy	Palmate	Green	308. 0	18.7	60.0	July	October
16	C-15	Unknown	Palmate	Mix	298. 0	17.0	50.2	August	October
17	C-16	China	Palmate	Green	278. 6	15.8	67.8	July	October
18	C-17	China	Palmate	Green	276. 8	15.6	60.4	July	October
19	C-18	China	Palmate	Green	257. 2	11.7	26.0	July	October

20	C-19	Indonesia	Palmate	Green	245.2	13.6	35.0	August	October
21	C-20	Indonesia	Palmate	Green	306.0	19.2	58.3	August	October
22	C-22	Russia	Palmate	Green	269.4	15.4	54.8	August	October
23	C-26	Unknown	Palmate	Mix	347.2	20.7	63.2	September	October
24	Jinju	Unknown	Entire	Mix	321.0	18.8	54.8	September	October
25	Auxu	China	Palmate	Green	301.2	19.0	31.8	September	October
26	Hongma300	China	Palmate	Brown	348.3	26.4	None	September	None
27	Hongma74-1	China	Palmate	Brown	334.0	28.4	None	September	None
28	USA	USA	Palmate	Brown	376.6	26.9	None	September	None

(3) 신규 외래종 유전자원 도입 및 생육 특성 조사

(가) 방글라데시 Jute 협회로부터 분양받은 15개 유전자원 육성(표 1-2)

(나) 조사항목: 배축색, 엽형, 줄기색, 엽색, 초장, 경직경, 개화유무(9월 13일)

(다) 초장은 최소 233.9 cm(ACC5072)에서 최대 311.6 cm(ACC4985) 사이로 계통간 차이가 크게 나타났으며, 경직경은 ACC4985 (28.4 cm)를 제외하고 25~26cm 내외임

(라) 배축색은 녹색 4계통과 자색 8계통, 녹색과 자색이 혼재된 3계통으로 조사됨

(마) 엽형은 장상엽 6계통, 둥근엽 2계통이었고, 7계통은 장상엽과 둥근엽이 혼재됨

(바) 줄기색은 자색 2 계통, 녹색 4계통, 자색과 녹색이 혼재된 9 계통임

(사) 15계통 모두 만생종으로 10월초까지 개화하지 않아 국내 채종이 어려움

표 1-2. 신규 외래종 유전자원 생육특성

No.	Lines	Plant height	Stem diameter	Hypocotyl color	Leaf shape	Stem color	Flowering
1	ACC3748	280.9±7.5	26.9±1.0	Puple	Entire	Brown	×
2	ACC4111	276.8±7.3	26.0±0.7	Puple	Mix	Mix	×
3	ACC4135	286.2±7.6	26.9±0.8	Puple	Mix	Mix	×
4	ACC4139	271.2±5.7	25.9±0.9	G:P(5:5)	Mix	Mix	×
5	ACC4443	285.8±6.5	26.8±0.7	Puple	Palmate	Mix	×
6	ACC4649	285.1±7.1	26.3±0.6	Puple	Entire	Mix	×
7	ACC4751	286.4±6.3	26.2±0.7	Puple	Mix	Mix	×
8	ACC4985	311.6±4.7	28.4±0.6	Green	Palmate	Green	×
9	ACC5014	276.6±8.6	26.4±0.7	Green	Palmate	Green	×
10	ACC5017	279.1±7.3	26.5±0.5	Puple	Mix	Mix	×
11	ACC5047	272.1±5.9	25.9±0.9	G:P(5:5)	Mix	Mix	×
12	ACC5072	233.9±3.0	25.9±0.7	Green	Mix	Green	×

13	ACC5074	278.5±6.1	26.7±0.9	G:P(5:5)	Palmate	Mix	×
14	ACC5077	276.9±6.8	26.9±0.7	Puple	Palmate	Brown	×
15	ACC5113	269.8±7.6	26.4±0.6	Green	Palmate	Green	×

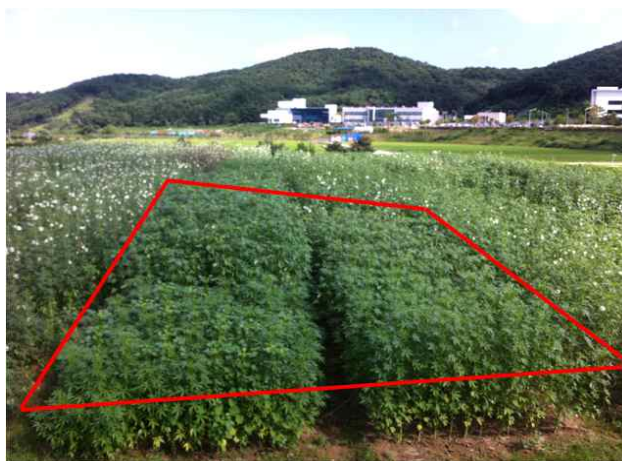


그림 1-2. 신규유전자원 재배평가 포장(8월)

나. 케나프 내습·내염성 증진 돌연변이 계통 육성

(1) 케나프 내습성 증진 계통 육성을 위한 논포장 재배 시험

- (가) 고 bio-mass 생산이 가능한 품종 5계통 및 유망 돌연변이 후대 13계통을 대상으로 습답 상태에서 이앙재배 시험을 실시함 (그림 1-3).
- (나) 케나프 파종 시기에 tray에 파종한 유묘를 4주간 육묘 후 논으로 이앙 재배
- (다) 밭에서 재배한 케나프와 생존율의 차이는 없으나, 초장, 경직경 등 생육이 다소 감소되고, 개화시기가 늦어짐.



그림 1-3. 케나프 논재배 포장 시험

(2) 케나프 내염성 증진 계통 육성을 위한 새만금 간척지 재배 시험

- (가) 유망 돌연변이 (M₅~M₇) 후대 36계통, M₂ 계통 및 원품종 (Auxu, Jinju, Jangdae)의 종자를 전북농업기술원 새만금 간척지 포장에 직파하여 생육을 검사 실시 (초장, 줄기 두께, 줄기색, 종자량 등)
- (나) 생산력 검정결과 직경이 굵고 초장이 긴 돌연변이 5계통 선발하였음.



그림 1-4. 새만금 간척지 재배시험

(3) 고 bio-mass 들연변이 계통 화용간척지 재배 시험

- (가) 화용간척지 재배평가 결과, 케나프 도입 유전자원의 생육은 중국 품종(옥수, 홍마 74-3, 홍마300)이 우수하였으나, 채종이 불가하거나 일부 소량만 가능하여 실용화가 어려움
- (나) 화용간척지에서 장대의 생육은 일반토양에 비해 낮았으나 채종이 가능함
- (다) 모든 간척지 재배에는 옥수가 생육이 양호하고 채종이 일부 가능하여 간척지 재배에 유망한 유전자원으로 선발됨
- (라) 옥수 중 채종이 가능하고 생육이 우수한 10 계통을 선발함

표 1-3. 화용간척지 케나프 생육 현황

품종명	생존율	초장	채종가능여부
장대	중간	240 ~ 270 cm	○
옥수	높음	250 ~ 280 cm	△
홍마74-3	높음	250 ~ 280 cm	×
홍마300	높음	300 cm 이상	×
미국종	중간	250 ~ 280 cm	×



그림 1-5. 고 bio-mass 들연변이 계통 화용간척지 재배 시험

다. 케나프 기능성 검정 시험

(1) 케나프 사료이용을 위한 사료가치 분석

- (가) 조사료 수량 검정: 장대가 타 품종(적봉, 옥수, C12) 품종보다 높은 생육특성을 보였으며 특히 생체중, 건물중, 줄기직경, 마디수에서 모두 1.6 ~ 3.1배 가량 높은 생육을 나타냄
- (나) 사료가치분석결과, 조단백질 함량은 장대가 전체 식물체와 잎에서 가장 낮게 함유하고 있는 것으로 나타났음. ADF함량은 옥수의 줄기와 잎에서 가장 많이 나타났으며 NDF는 장대의 줄기와 잎에서 가장 높게 나타났음.
- (다) 생육생장이 빠르며, 조단백질, ADF, NDF 함량이 다른 비교품종과 비교했을 때 차이가 유의적인 차이가 없는 장대의 사료적 가치가 높다고 사료됨.
- (다) 적봉의 경우 잎과 줄기에 안토시아닌이 다량 함유되어 있을 것으로 판단되며 추후 기능성 조사료 자원으로 개발이 기대됨



그림 1-6. 케나프 생육 100일째의 잎과 줄기 모습 (Jangdae, Auxu, C12, 적봉)

표 1-4. 케나프 돌연변이 품종 '장대' '적봉'과 유전자원 2 계통의 사료 수량

Cultivar	Fresh yield (g/plant)	DM yield (g/plant)	Leaf DM yield (g/plant)	Stem DM yield (g/plant)	Plant height (cm)	Number of node	Stem thickness (mm)
Jangdae	720	163	52	111	243	64.8	28.1
Auxu	480	102	33	69	226	46.8	24.0
C12	442	83	23	60	252	54.0	22.5
적봉	360	69	17	52	263	58.8	20.2

표 1-5. 케나프 돌연변이 품종 '장대' '적봉'과 유전자원의 사료가치 성분 분석

	Crude protein (%)	Crude fat (%)	Crude fiber (%)	Crude ash (%)	ADF (%)	NDF (%)
Whole plant						
Jangdae	8.33	2.09	32.88	8.06	45.32	44.78
Auxu	8.6	1.77	31.44	6.97	48.11	57.44
C12	8.52	2.26	33.39	6.87	42.63	49.57
적봉	8.96	2.11	37.29	7.43	54.41	55.08
Stem						
Jangdae	3.44	0.88	52.01	4.9	64.35	75.22
Auxu	2.24	0.76	53.07	5.26	68.25	72.62
C12	3.44	0.46	52.42	5.53	61.04	74.34
C14-DR	3.29	0.67	52.57	5.07	64.14	73.68
S						
Leaf						
Jangdae	16.74	2.78	16.78	9.12	33.88	32.52
Auxu	17.74	4.81	14.89	8.93	45.91	31.53
C12	19.42	3.85	14.63	9.70	20.71	23.90
적봉	18.94	4.91	17.33	9.55	24.36	28.59

(2) 케나프 계통별 종자 지방산 함량 분석

- (가) 케나프 종자의 주요 지방산은 Linoleic acid, oleic acid, palmitic acid이었음
- (나) 국내외에서 수집한 26계통의 지방산을 분석한 결과 C13 계통에서 불포화 지방산 함량이 71.05%로 가장 높게 검출되어 기능성 oil 자원으로 활용이 가능할 것으로 판단됨
- (다) C14계통에서 유래한 적색경 2 계통(C14-DRS, C14RS)과 흰꽃 변이 11 계통간 비교한 결과, 적색경 2 계통에서는 원품종보다 포화지방산 함량이 높고 불포화 지방산 함량이 낮았으며, 흰꽃변이 11 계통에서는 대부분 원품종과 비교하여 불포화지방산의 함량이 높거나 유사한 수준이었으나 WFM1-5, 1-6 계통은 불포화 지방산이 낮은 수준임.
- (라) 진주 종자에 감마선을 조사하여 선발한 7계통의 M2세대 종자의 지방산 함량은 모든 계통에서 palmitic acid와 oleic acid의 함량이 증가하였고, linoleic acid 함량은 감소함.
- (마) 옥수 종자에 감마선을 조사하여 선발한 11계통의 M2세대 종자에 지방산 함량은 oleic acid와 linoleic acid함량 변이가 크게 검출되었음

표 1-6. 케나프 유전자원의 지방산 조성

Lines	C14:0	C:16: 0	C:16: 1	C:18:0	C18:1	C18:2	SFA	MUFA	PUFA	UFA
Jangdae	0.2	40.5	ND	2.5	29.0	27.5	43.3	29.0	27.5	56.6
Auxu	0.2	32.0	0.2	3.2	15.3	48.9	35.5	15.5	48.9	64.4
Jinju	0.1	29.2	0.3	4.2	18.3	47.8	33.5	18.6	47.8	66.4
C9	ND	30.6	ND	3.3	32.3	33.6	34.0	32.3	33.6	65.9
C10	ND	33.5	ND	4.4	27.2	34.8	37.9	27.2	34.8	62.0
C11(E)	ND	38.2	ND	4.3	46.8	13.5	42.5	46.8	13.5	60.4
C12	0.1	38.2	ND	4.3	43.8	13.5	42.7	43.8	13.5	57.4
C13	ND	27.0	ND	1.8	46.7	24.2	28.9	46.7	24.29	71.0
C14	ND	31.7	ND	3.1	33.9	31.1	34.8	33.9	31.1	65.1
C14-DRS	ND	35.6	ND	2.6	27.0	34.7	38.3	27.0	34.7	61.7
C14-RS 1	ND	36.3	ND	2.0	33.7	27.8	38.3	33.7	27.8	61.6
C14-RS 2	ND	40.6	ND	2.5	28.0	28.7	43.2	28.0	28.7	56.7
C15	0.2	33.5	0.6	3.2	25.7	36.5	36.9	26.4	36.5	63.0
C16	ND	31.2	ND	3.1	34.4	31.1	34.3	34.4	31.1	65.6
C19	ND	32.1	ND	3.7	37.0	27.7	35.8	37.0	27.7	64.7
WFM1-1	0.2	28.8	ND	2.3	39.6	28.9	31.3	39.6	28.9	68.6
WFM1-2	0.4	30.7	ND	2.5	37.0	29.2	33.6	37.0	29.2	66.3
WFM1-4	ND	31.7	ND	2.5	40.8	24.8	34.3	40.8	24.8	65.7
WFM1-5	ND	37.0	ND	2.7	36.1	24.0	39.8	36.1	24.0	60.1
WFM1-6	0.2	42.7	ND	2.3	29.9	24.8	45.2	29.9	24.8	54.7
WFM2-1	ND	33.4	ND	2.8	33.4	30.2	36.3	33.4	30.2	63.6
WFM2-2	ND	28.8	ND	2.3	41.8	26.9	31.2	41.8	26.9	68.8
WFM2-3	ND	29.6	ND	3.0	41.6	25.4	32.7	41.6	25.4	67.0
WFM2-4	ND	28.2	ND	2.2	42.3	27.1	30.5	42.3	27.1	69.4
WFM2-5	ND	28.8	ND	2.3	41.8	26.9	31.2	41.8	26.9	68.8
WFM4-1	ND	33.5	ND	2.4	35.5	28.4	35.9	35.5	28.4	64.0
Min	0.1	27.0	0.2	1.8	15.3	13.5	28.9	15.5	13.5	54.7
Max	0.4	42.7	0.6	4.4	46.8	48.9	45.2	46.8	48.9	71.0
Mean	0.2	33.2	0.4	2.9	34.6	29.2	36.2	34.6	29.2	63.8

C14:0=myristic acid, C16:0=palmitic acid, C16:1c9=palmitoleic acid, C18:0=stearic acid, C18:1c9=oleic acid, C18:2c9,12=linoleic acid, ND-not detected, SFA=saturated fatty acid; MUFA=mono unsaturated fatty acid; PUFA=poly unsaturated fatty acid, UFA=total unsaturated fatty acid.

표 1-7. 진주 유래 케나프 돌연변이 계통들의 지방산 조성

Lines	C14:0	C:16:0	C:16:1	C:18:0	C18:1	C18:2	SFA	MUFA	PUFA	UFA
Jinju	0.1	29.2	0.3	4.3	18.3	47.8	33.5	18.6	47.8	66.4
J1	ND	32.9	ND	3.4	34.7	28.8	36.3	34.7	28.8	63.6
J3	ND	33.8	ND	4.1	35.6	26.4	37.9	35.6	26.4	62.0
J10	ND	32.1	0.7	3.9	28.6	34.6	36.0	29.3	34.6	63.9
J11	ND	38.1	ND	2.8	27.6	31.3	40.9	27.6	31.3	59.0
J14	0.3	43.7	0.6	2.7	25.4	27.2	46.6	26.0	27.2	53.3
J23	ND	36.6	ND	3.2	35.7	24.4	39.8	35.7	24.4	60.1
J24	ND	38.3	ND	1.6	31.2	28.7	39.9	31.2	28.7	60.0
Min	0.0	29.2	0.0	1.6	18.3	24.4	33.5	18.6	24.4	53.3
Max	0.3	43.7	0.6	4.2	35.7	47.8	46.6	35.7	47.8	66.4
Mean	0.2	35.6	0.2	3.2	29.6	31.2	38.9	29.8	31.2	61.0

C14:0=myristic acid, C16:0=palmitic acid, C16:1c9=palmitoleic acid, C18:0=stearic acid, C18:1c9=oleic acid, C18:2c9,12=linoleic acid, ND-not detected, SFA=saturated fatty acid; MUFA=mono unsaturated fatty acid; PUFA=poly unsaturated fatty acid, UFA=total unsaturated fatty acid.

표 1-8. 옥수 유래 케나프 돌연변이 계통들의 지방산 조성

Lines	C14:0	C:16:0	C:16:1	C:18:0	C18:1	C18:2	SFA	MUFA	PUFA	UFA
Auxu	0.2	32.0	0.2	3.2	15.3	48.9	35.5	15.5	48.9	64.4
A1	ND	34.8	ND	4.3	31.6	29.2	39.1	31.6	29.2	60.8
A6	ND	40.3	0.6	2.6	34.2	23.6	42.9	34.9	23.6	58.5
A7	ND	32.9	ND	3.1	37.1	26.7	36.0	37.1	26.7	63.9
A10	ND	33.6	ND	3.2	28.3	34.8	36.8	28.3	34.8	63.1
A12	0.3	28.7	ND	3.9	37.6	29.2	33.0	37.6	29.2	66.9
A14	ND	28.8	ND	3.2	39.4	28.5	32.0	39.4	28.5	67.9
A16	0.14	30.5	0.2	5.3	17.7	46.0	36.0	17.9	46.0	64.0
A18	0.15	31.9	0.2	3.7	17.0	46.8	35.8	17.3	46.8	64.1
A19	ND	30.4	ND	3.0	30.4	36.1	33.4	30.4	36.1	66.5
A20	ND	26.5	ND	2.9	36.0	34.4	29.5	36.0	34.4	70.4
Min	0.0	26.5	0.0	2.5	15.3	23.6	29.5	15.5	23.6	58.5
Max	0.3	40.3	0.6	5.3	39.4	48.9	42.9	39.4	48.9	70.4
Mean	0.1	31.7	0.1	3.5	29.5	35.0	35.3	29.6	35.0	64.7

C14:0=myristic acid, C16:0=palmitic acid, C16:1c9=palmitoleic acid, C18:0=stearic acid, C18:1c9=oleic acid, C18:2c9,12=linoleic acid, ND-not detected, SFA=saturated fatty acid; MUFA=mono unsaturated fatty acid; PUFA=poly unsaturated fatty acid, UFA=total unsaturated fatty acid.

(3) 케나프 잎의 유용 기능성 성분 분석

(가) 항산화 물질의 하나인 폴리페놀 함량은 옥수에서 28.0 mg/g으로 가장 높았으며, C12, 장대, C14-DRS순으로 각각 22.9 mg/g, 22.1 mg/g, 21.3 mg/g으로 나타났다.

(나) 총플라보노이드 함량도 폴리페놀 함량과 같은 경향으로, 옥수 C12, 장대, C14-DRS순으로 각각 13.9 mg/g, 7.5 mg/g, 7.4 mg/g, 6.6 mg/g을 보였다.

(다) 이는 Kim 등(2009)은 파종후 생육 98일 후의 케나프 도입품종에서 총폴리페놀과 플라보노이드 함량이 각각 22.6~27.1 mg/g과 48.1~55.4 mg/g 범위와 유사함

(라) 옥수는 잎의 기능성 성분이 높은 유망 유전자원임

라. 케나프 분자유종을 위한 분자유전·생물학적 분석

(1) AFLP 분석에 의한 유전적 다양성 및 유연관계 분석

(가) 국내·외 수집 유전자원 케나프 유전자원의 유전적 다양성

(나) 증폭된 3914개 밴드 중 3193개가 다형성을 나타내어 82%의 유전적 다형성을 나타냄

(다) 유연관계분석결과 유망 케나프 유전자원은 4개 그룹으로 유집되었으며, 옥수는 다른

유전자원과 유집되지 않고 독립적으로 존재하여 유전적 변이성이 높은 계통으로 선발

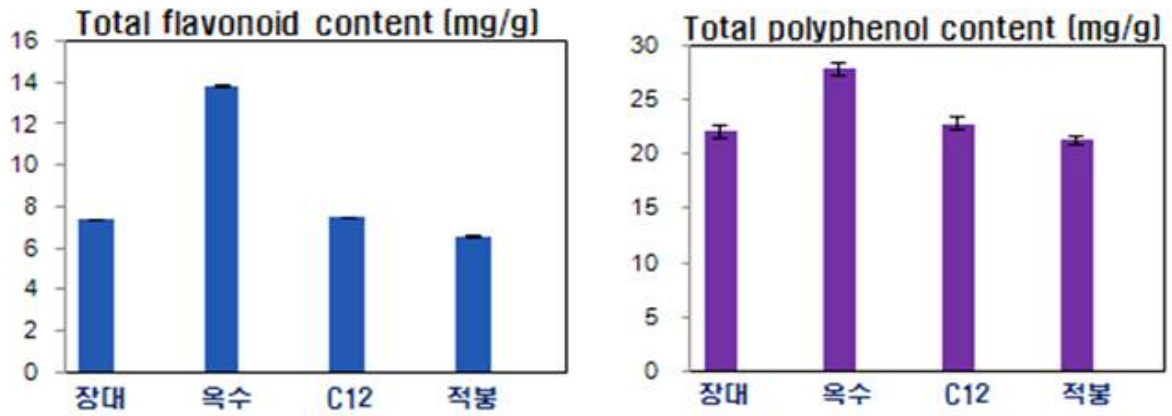


그림 1-7. 케나프 잎의 품종별 유용 기능성 성분 비교



그림 1-8. 케나프 유망계통 엽형

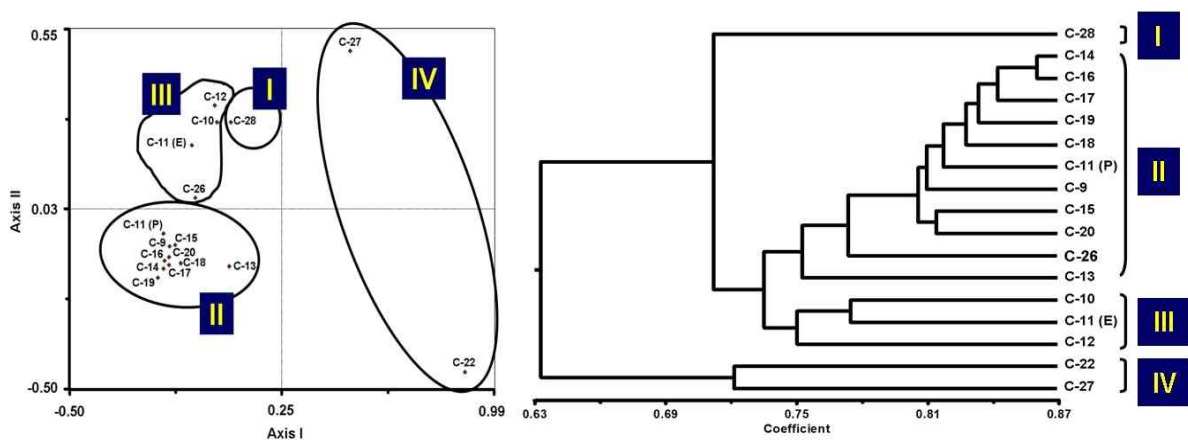


그림 1-9. 국내의 유전자원 17계통의 Pricpal Coordinate Analysis (PCoA) 분석 및 덴드로그램

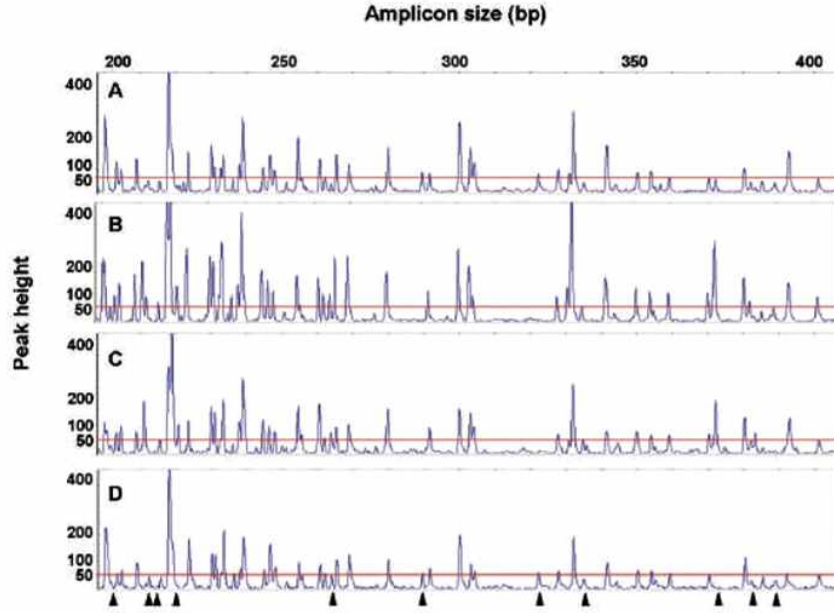


그림 1-10. AFLP capillary 영동 사진

표 1-9. AFLP 분석에 의한 국내외 17개 유전자원간 유전적 다형성

Primer pair	No. of total band	No. of polymorphic band	Polymorphism rate (%)	Primer pair	No. of total band	No. of polymorphic band	Polymorphism rate (%)
M-CAA/ E-ACA	128	123	96	M-CCA/ E-ACC	149	114	77
M-CAA /E-ATA	96	46	48	M-CCA/ E-AGC	109	83	76
M-CAA /E-ACC	111	79	71	M-CGA/ E-ACA	97	80	82
M-CAA /E-AGC	115	105	91	M-CGA/ E-ATA	55	49	89
M-CAG /E-ACA	84	79	94	M-CGA/ E-ACC	103	82	80
M-CAG /E-ATA	85	73	86	M-CGA/ E-AGC	118	104	88
M-CAG /E-ACC	104	92	88	M-CTA/ E-ACA	97	90	93
M-CAG /E-AGC	116	100	86	M-CTA/ E-ATA	105	79	75
M-CAT /E-ACA	130	103	79	M-CTA/ E-ACC	132	107	81
M-CAT /E-ATA	114	62	54	M-CTA/ E-AGC	113	96	85
M-CAT /E-ACC	130	92	71	M-CAA/ E-AAC	130	124	95
M-CAT /E-AGC	85	49	58	M-CAA/ E-AGG	151	138	91
M-CAC /E-ACA	97	91	94	M-CAA/ E-ACG	182	150	82
M-CAC	86	47	55	M-CAG/ E-ACC	121	106	88

/E-ATA				E-AAC			
M-CAC	138	114	83	M-CAG/	165	147	89
/E-ACC				E-AGG			
M-CAC	89	76	85	M-CAG/	161	143	89
/E-AGC				E-ACG			
M-CCA	125	122	98	Total	3,914	3,193	-
/E-ACA				Mean	115	94	82
M-CCA	93	48	52				
/E-ATA							

(2) 방사선조사 유래 유망 계통의 유전적 다양성

(가) 증폭된 45개 밴드 중 34개가 다형성을 나타내어 계통간 76%의 다형성을 나타냄

(나) 유연관계분석결과 원품종의 종류에 상관없이 유집되어 변이가 증대되었음을 시사

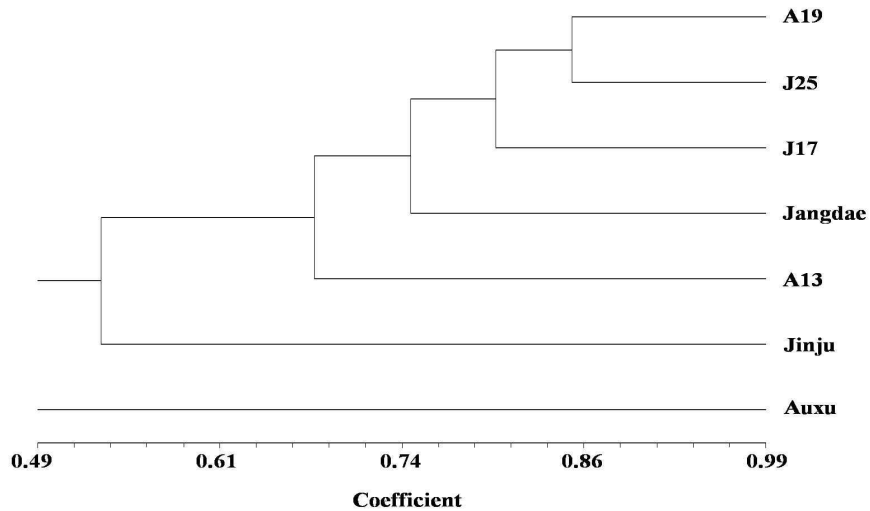


그림 1-11. 감마선 조사유래 유망 계통 덴드로그램

표 1-10. 감마선 조사 유래 유망 계통간 AFLP primer 조합별 polymorphism 결과

Primer pair	No. of total band	No. of polymorphic band	Polymorphism (%)
M-CAT/E-ACA	14	10	71
M-CAT/E-ATA	57	49	86
M-CAT/E-ACC	42	29	69
M-CAT/E-AGC	37	28	76
M-CGA/E-ACA	41	24	59
M-CGA/E-ATA	45	39	87
M-CGA/E-ACC	23	19	83
M-CGA/E-AGC	56	45	80
M-CTA/E-ACA	48	22	46
M-CTA/E-ATA	77	58	75
M-CTA/E-ACC	48	42	88
M-CTA/E-AGC	54	47	87
Total	542	412	-
Mean	45	34	76

(3) 리그닌 생합성 관련 유전자의 크로닝 및 염기서열분석

(가) Hc4CL, HcCCR, HcCAD는 각 1620, 1017, 1107의 nucleotide로 이뤄짐 (그림 1-12)

(나) *CCoAOMT*는 744bp의 open reading frame으로 이루어져 있었으며, *COMT*는 921bp, *REF8*은 1533bp, *4CL*은 1623bp, *CCR*은 1017bp, *CAD*는 1107bp 임을 확인함.

(다) 8종의 유전자 중 FAH1을 제외한 7종은 full-length CDS를 확보하였으며, 5종의 유전자 (*4CL*, *CCR*, *CAD*, *COMT*, *F5H*)를 NCBI genbank (Accession No. HM151379~81, KC859304, KC859305)에 등록함.

(라) *4CL*, *CAD* 2종의 유전자 구조를 확인하여 본 결과 2종 유전자 모두 5개의 exon과 4개의 intron으로 이루어져 있었음.

(마) 문헌 조사에 따르면 *CAD*는 monolignol의 type을 결정짓는 중요한 유전자로 알려져 있는데, *Arabidopsis*상에는 12 isotype이 존재하여 그중 #4, 5이 중요한 isotype으로 작용하는 것으로 보고됨. 본 연구팀에서 크로닝한 HcCAD는 AtCAD #4, 5과 가장 높은 상동성을 보임.

(바) 크로닝한 *HcCAD* 염기서열을 개량목표에 따라서 monolignol type 조절이 가능함.

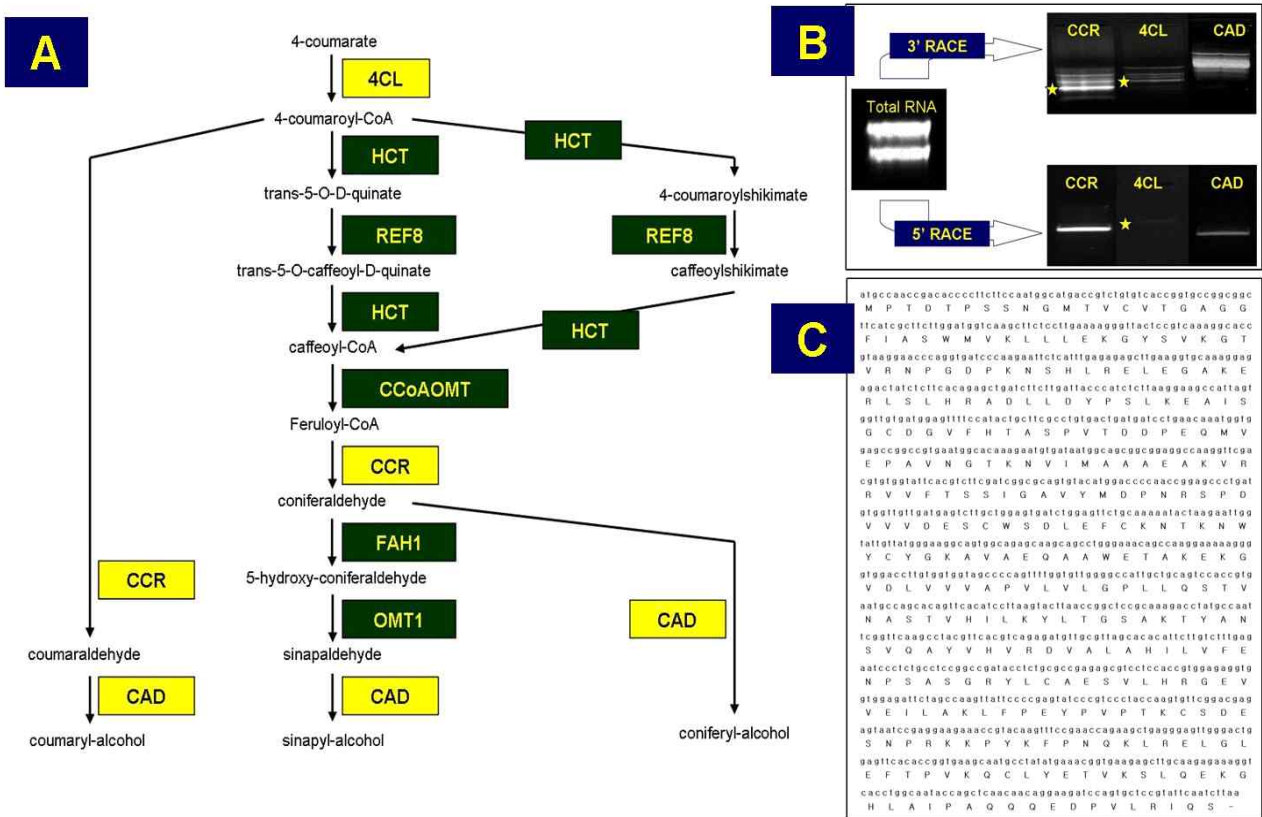


그림 1-12. 리그닌 생합성 경로 및 RACE로 분석된 염기서열

4CL

ATGAGTTCATCGGGTGGACCAAAATGCTCCGACAAAGTTCGGACGGAGGCAAC
H S S S G E F O H N I P F I O U S R E B N
TTGTCGCATGCACTGGCCAGTGCATGCTCGCATGGTCTCAAGTCAGCCATA
L F R H Q L R S R S U L P H U L R E R I
GAATGAGCCCTGGAAATCGCAAAAGTGGCCCGGCTCCCTTCCCGAAA
E L D L L E I H A K G C P G G S L S P K
GAATGAGCCCTGGAAATCGCAAAAGTGGCCCGGCTCCCTTCCCGAAA
E U R A Q L P I T N P D A P U H I D R I
CTCCGCTCCCTGGACATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCC
R L L R S V S I L L R S V S I L L R S V S I
AAATGCGAAGGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
R D F E L V C L D P L E K F L S L R M E D
GGTTCATCTTCCCGCTGAGCCTGAATCAAGAAAGTCCCTCGGAGAGTGG
E U F R L V C L D P L E K F L S L R M E D
TACTACTGAAAGTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
Y L R D A U L E G C I P F N K R A V E H
ACTGGTTCGAGTACCCTGGACGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCC
T A F E V M C T D P P R F N K U F N R E H
AATGTCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCC
M D H S T I I T N K K I L L E T V D G F D G
CTAAAACCCCTGGTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
L K F L U D U G U I G R T I S H I D S
AAGTACCCTGAAATCGCAAAAGTGGCCCGGCTCCCTTCCCGAAA
K V P A I R G I N F D L P N U I E D R A P
AGTATCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
R I F H K I C H D Q S D R E C S K F L
AAGACTGTAAGGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
R H C V R A L P Q D K S D R E C H S
TCCGATCCCGCACTAG
S R L P R R -

OMT

ATGAGTTCATCGGGTGGACCAAAATGCTCCGACAAAGTTCGGACGGAGGCAAC
H S S S G E F O H N I P F I O U S R E B N
TTGTCGCATGCACTGGCCAGTGCATGCTCGCATGGTCTCAAGTCAGCCATA
L F R H Q L R S R S U L P H U L R E R I
GAATGAGCCCTGGAAATCGCAAAAGTGGCCCGGCTCCCTTCCCGAAA
E L D L L E I H A K G C P G G S L S P K
GAATGAGCCCTGGAAATCGCAAAAGTGGCCCGGCTCCCTTCCCGAAA
E U R A Q L P I T N P D A P U H I D R I
CTCCGCTCCCTGGACATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCC
R L L R S V S I L L R S V S I L L R S V S I
AAATGCGAAGGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
R D F E L V C L D P L E K F L S L R M E D
GGTTCATCTTCCCGCTGAGCCTGAATCAAGAAAGTCCCTCGGAGAGTGG
E U F R L V C L D P L E K F L S L R M E D
TACTACTGAAAGTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
Y L R D A U L E G C I P F N K R A V E H
ACTGGTTCGAGTACCCTGGACGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCC
T A F E V M C T D P P R F N K U F N R E H
AATGTCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCC
M D H S T I I T N K K I L L E T V D G F D G
CTAAAACCCCTGGTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
L K F L U D U G U I G R T I S H I D S
AAGTACCCTGAAATCGCAAAAGTGGCCCGGCTCCCTTCCCGAAA
K V P A I R G I N F D L P N U I E D R A P
AGTATCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
R I F H K I C H D Q S D R E C S K F L
AAGACTGTAAGGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
R H C V R A L P Q D K S D R E C H S
TCCGATCCCGCACTAG
S R L P R R -

CAD

ATGAGTTCATCGGGTGGACCAAAATGCTCCGACAAAGTTCGGACGGAGGCAAC
H S S S G E F O H N I P F I O U S R E B N
TTGTCGCATGCACTGGCCAGTGCATGCTCGCATGGTCTCAAGTCAGCCATA
L F R H Q L R S R S U L P H U L R E R I
GAATGAGCCCTGGAAATCGCAAAAGTGGCCCGGCTCCCTTCCCGAAA
E L D L L E I H A K G C P G G S L S P K
GAATGAGCCCTGGAAATCGCAAAAGTGGCCCGGCTCCCTTCCCGAAA
E U R A Q L P I T N P D A P U H I D R I
CTCCGCTCCCTGGACATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCC
R L L R S V S I L L R S V S I L L R S V S I
AAATGCGAAGGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
R D F E L V C L D P L E K F L S L R M E D
GGTTCATCTTCCCGCTGAGCCTGAATCAAGAAAGTCCCTCGGAGAGTGG
E U F R L V C L D P L E K F L S L R M E D
TACTACTGAAAGTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
Y L R D A U L E G C I P F N K R A V E H
ACTGGTTCGAGTACCCTGGACGATCCGATCCGATCCGATCCGATCCGATCC
T A F E V M C T D P P R F N K U F N R E H
AATGTCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCCATCC
M D H S T I I T N K K I L L E T V D G F D G
CTAAAACCCCTGGTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
L K F L U D U G U I G R T I S H I D S
AAGTACCCTGAAATCGCAAAAGTGGCCCGGCTCCCTTCCCGAAA
K V P A I R G I N F D L P N U I E D R A P
AGTATCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
R I F H K I C H D Q S D R E C S K F L
AAGACTGTAAGGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
R H C V R A L P Q D K S D R E C H S
TCCGATCCCGCACTAG
S R L P R R -

CCR

ATGCAACGACACCCCTTCCCAATGGATCGCTGTGTACACGGTCCGCGGCG
H P I D I P S S N H N I U G E U I C R A G C
TCACTGCTTGTGATGATCAAGATCTCCCTCAAAAGGATGCTCCCAAGGCC
F I A S M H U K L L L E R G V S U K G T
GTGAAGACCAATGATCCCAATCTCCATTTCAAGGATGCTCCCAAGGCC
U R N P D D P K M S H I R E L G R K G
AAGTATCTTCCCAAGGATGCTCCCAAGGCCATGAT
R L S L N R A D L L D Y P L I L H A R I S
GGTGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
B E D U F N I A S P U I D P L D Q W
GGCCGCTCAATGCAAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
E P A U N E C T R N U V I N A A E R A K O R
CGTGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
R U U U U U U U U U U U U U U U U U U U
ATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
U U U U U U U U U U U U U U U U U U U U
TATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
V E C R A D E R A D E R A D E R A D E R A
G T C Y G E R A D E R A D E R A D E R A D E
AGTATCTTCCCAAGGATGCTCCCAAGGCCATGATGATGATGATGATGATGATG
A T C C G A C A G T T C A C C T T A G T T C A C C G C T C C A A A G C T G T
G D L U D U G U I G R T I S H I D S
TGCTCAAGCTCACTGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
T C A C C T T C A C C G C T C C A A A G C T G T
AATCTCTGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
A T C C T T C A C C G C T C C A A A G C T G T
GTGAAGTCCCAAGGATGCTCCCAAGGCCATGATGATGATGATGATGATGATG
G T L U D U G U I G R T I S H I D S
AGTATCTTCCCAAGGATGCTCCCAAGGCCATGATGATGATGATGATGATGATG
H P I R K P Y K S H D S R H P H S D E
AGTATCTTCCCAAGGATGCTCCCAAGGCCATGATGATGATGATGATGATGATG
S M P R K P Y K S H D S R H P H S D E
AGTATCTTCCCAAGGATGCTCCCAAGGCCATGATGATGATGATGATGATGATG
G T L U D U G U I G R T I S H I D S
CACTGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
W L A I F R A Q Q E P P L A T G S -

CCR

ATGCAACGACACCCCTTCCCAATGGATCGCTGTGTACACGGTCCGCGGCG
H P I D I P S S N H N I U G E U I C R A G C
TCACTGCTTGTGATGATCAAGATCTCCCTCAAAAGGATGCTCCCAAGGCC
F I A S M H U K L L L E R G V S U K G T
GTGAAGACCAATGATCCCAATCTCCATTTCAAGGATGCTCCCAAGGCC
U R N P D D P K M S H I R E L G R K G
AAGTATCTTCCCAAGGATGCTCCCAAGGCCATGAT
R L S L N R A D L L D Y P L I L H A R I S
GGTGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
B E D U F N I A S P U I D P L D Q W
GGCCGCTCAATGCAAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
E P A U N E C T R N U V I N A A E R A K O R
CGTGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
R U U U U U U U U U U U U U U U U U U U
ATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
U U U U U U U U U U U U U U U U U U U U
TATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
V E C R A D E R A D E R A D E R A D E R A
G T C Y G E R A D E R A D E R A D E R A D E
AGTATCTTCCCAAGGATGCTCCCAAGGCCATGATGATGATGATGATGATGATG
A T C C G A C A G T T C A C C T T A G T T C A C C G C T C C A A A G C T G T
G D L U D U G U I G R T I S H I D S
TGCTCAAGCTCACTGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
T C A C C T T C A C C G C T C C A A A G C T G T
AATCTCTGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
A T C C T T C A C C G C T C C A A A G C T G T
GTGAAGTCCCAAGGATGCTCCCAAGGCCATGATGATGATGATGATGATGATG
G T L U D U G U I G R T I S H I D S
AGTATCTTCCCAAGGATGCTCCCAAGGCCATGATGATGATGATGATGATGATG
H P I R K P Y K S H D S R H P H S D E
AGTATCTTCCCAAGGATGCTCCCAAGGCCATGATGATGATGATGATGATGATG
S M P R K P Y K S H D S R H P H S D E
AGTATCTTCCCAAGGATGCTCCCAAGGCCATGATGATGATGATGATGATGATG
G T L U D U G U I G R T I S H I D S
CACTGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
W L A I F R A Q Q E P P L A T G S -

F5H

ATGCAACGACACCCCTTCCCAATGGATCGCTGTGTACACGGTCCGCGGCG
H P I D I P S S N H N I U G E U I C R A G C
TCACTGCTTGTGATGATCAAGATCTCCCTCAAAAGGATGCTCCCAAGGCC
F I A S M H U K L L L E R G V S U K G T
GTGAAGACCAATGATCCCAATCTCCATTTCAAGGATGCTCCCAAGGCC
U R N P D D P K M S H I R E L G R K G
AAGTATCTTCCCAAGGATGCTCCCAAGGCCATGAT
R L S L N R A D L L D Y P L I L H A R I S
GGTGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
B E D U F N I A S P U I D P L D Q W
GGCCGCTCAATGCAAAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
E P A U N E C T R N U V I N A A E R A K O R
CGTGTATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
R U U U U U U U U U U U U U U U U U U U
ATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
U U U U U U U U U U U U U U U U U U U U
TATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
V E C R A D E R A D E R A D E R A D E R A
G T C Y G E R A D E R A D E R A D E R A D E
AGTATCTTCCCAAGGATGCTCCCAAGGCCATGATGATGATGATGATGATGATG
A T C C G A C A G T T C A C C T T A G T T C A C C G C T C C A A A G C T G T
G D L U D U G U I G R T I S H I D S
TGCTCAAGCTCACTGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
T C A C C T T C A C C G C T C C A A A G C T G T
AATCTCTGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
A T C C T T C A C C G C T C C A A A G C T G T
GTGAAGTCCCAAGGATGCTCCCAAGGCCATGATGATGATGATGATGATGATG
G T L U D U G U I G R T I S H I D S
AGTATCTTCCCAAGGATGCTCCCAAGGCCATGATGATGATGATGATGATGATG
H P I R K P Y K S H D S R H P H S D E
AGTATCTTCCCAAGGATGCTCCCAAGGCCATGATGATGATGATGATGATGATG
S M P R K P Y K S H D S R H P H S D E
AGTATCTTCCCAAGGATGCTCCCAAGGCCATGATGATGATGATGATGATGATG
G T L U D U G U I G R T I S H I D S
CACTGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCCGCTCC
W L A I F R A Q Q E P P L A T G S -

그림 1-13. NCBI 등록유전자 염기서열 정보

마. 케나프 고 bio-mass 생산 및 국내채종 가능한 유망계통 품종 보호권 출원

(1) 국내채종이 가능한 고생산성 “장대” 품종보호권 출원 및 품종 등록

(가) 육성경위

- ① 2001년도 경남 진주에서 종자를 수집(도입종으로 추정), 2002년 종자를 증식함.
- ② 2003년 500g의 종자에 감마선 300Gy 조사한 후, 재배하여 가을에 M2 종자를 수확함.
- ③ 2004년 엽형 및 개화시기 변이체 등을 선발함.
- ④ 2005~2007년도에 계통 선발을 실시하여 고정계통을 선발하고, 잎 모양이 장상(손바닥)모양으로 변이된 계통을 진주-장1호로 명명함.
- ⑤ 2008~2010년도에 특성검정 및 생산력 검정을 실시하고, 2010년 12월에 메이플1호(Maple 1)로 명명함.
- ⑥ 2011년 “장대”라는 이름으로 명명한 후 국립종자원에 신품종 등록을 위한 품종보호권 신청 (품종출원번호: 출원2011-0026)

(나) 주요특성

- ① 초장은 359.0 ± 7.5 cm) 정도이며, 주경은 24.78 ± 1.15 mm 정도임.
- ② 생육기간은 파종후 166일 정도, 조생종과 비교하여 45일 가량 길다.
- ③ 잎은 손바닥 모양이며, 잎의 길이(16.4 ± 1.7 cm) 및 너비(25.0 ± 2.2 cm)가 크다.
- ④ 대화로서 꽃의 너비는 8.2 ± 0.4 cm이며, 길이 9.6 ± 0.9 cm.
- ⑤ 개화기는 파종후 112일 정도이며, 조생종과 비교하여 30일 가량 늦다.
- ⑥ 수과의 너비는 중간 (1.9±0.1 cm)이며, 길이는 다소 길다 (3.9±0.2).

(다) 활용도

- ① 국내 채종이 가능하고 생산성이 뛰어난 새로운 형질의 케나프 신품종으로 국내 대

량생산 및 국산화 가능

- ② 조사료, 펄프, 및 산업용 소재(기능성 벽지, 화장용 티슈, 바이오플라스틱, 건축용 보드, 기능성 의류, 숯, 사료용, 기름흡착제, 버섯/식물재배용 배지, 축사 깔재, 바이오에탄올 생산용) 등 다양함.
- ③ 3년간 재배심사(국립종자원) 후 2013년 6월 품종보호권이 등록됨(품종보호 제 4560 호)



그림 1-14. 신품종 “장대” 및 원품종(진주)



그림 1-15. 장대품종보호권등록증 및 언론보도자료

(2) 관상용 화색 케나프 돌연변이 신품종 “백마” 품종보호권 출원

(가) 화색 돌연변이 "백마" 육성경위

- ① 2005년 이탈리아 원산의 'C14 계통(IT No.; 202794)에서 흰꽃변이주 1주를 선발
- ② 2006~2009년도에 생육이 왕성한 고정계통 선발
- ③ 2010~2012년도에 특성 및 생산성 검정을 실시한 후 가장 우량계통을 백마라 명명하고 2012년 품종보호권을 출원함(품종출원번호: 출원2012-538)

(나) 주요특성

- ① 백마는 조생종으로서 화색이 흰색으로 원품종의 아이보리색과 구별됨
- ② 개화기는 원품종(C14)보다 10일 가량 숙기가 느림
- ③ 엽형은 완전엽, 초장은 257 cm 로 원품종 (258 cm)과 유사하며, 꽃의 크기와 잎의 크기가 대조품종 보다 작음

(다) 활용도

- ① 흰색꽃으로 관상용으로 유망하며, 친환경 산업소재용으로 활용이 가능함
- ② 8월에 조기 수확하여 사료용 단기재배에 적합함

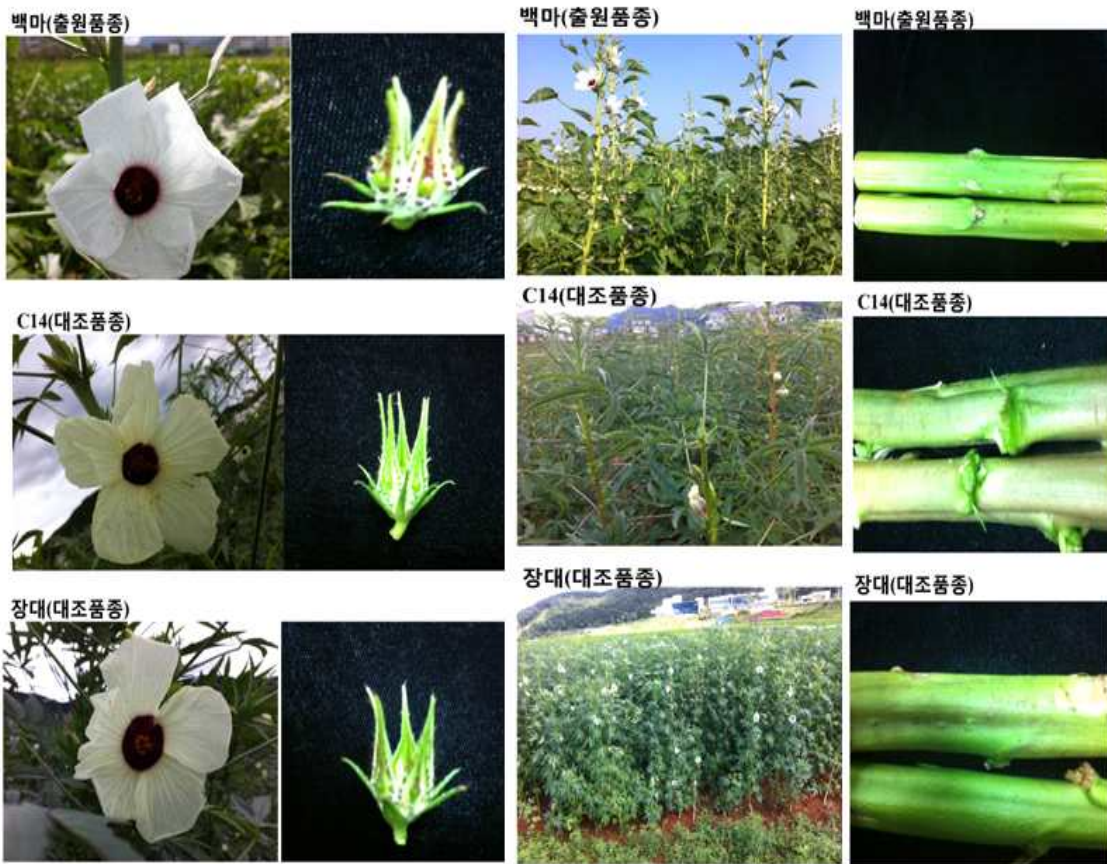


그림 1-16. 화색돌연변이 “백마”

(3) 적색경 케나프 돌연변이 신품종 “적봉” 품종보호권 출원

(가) 육성경위

- ① 2005년 이탈리아 원산의 'C14 계통(IT No.; 202794) 종자에 감마선 300Gy 처리

- ② M2 세대에서 줄기색이 진한 적색을 띠는 변이주를 선발함
- ③ 2006~'2007년 계통 선발을 실시하고 고정계통을 선발함
- ④ 2010~2012년도에 우량 3계통을 대상으로 특성 및 생산성 검정 후 2012년 가장우량종을 적봉으로 명명하고 품종보호권을 출원함(품종출원번호: 출원2012-537)

(나) 주요특성

- ① 적봉은 조생종으로서 주경의 색이 진한 적보라색인 것이 특징
- ② 엽형은 둥근잎으로 엽색은 보라색을 띠는 청색으로 원품종(C14)과 숙기와 초장(261cm)이 유사함

(다) 활용도

- ① 적색 줄기로 관상용으로 유망하며, 친환경 산업소재용 (바이오 플라스틱, 섬유, 건축용 보드등)용 소재로 활용이 기대됨
- ② 줄기와 잎이 진한 적보라색으로 다량의 안토시아닌을 함유하고 있으며 최근 축산물 내 항생제 잔류문제가 사회적인 문제로 대두되고 가축 사료 내 성장촉진용 항생제 사용을 전면 금지하는 법안이 마련됨에 따라 가축의 면역을 강화시키면서도 사료로서도 가치가 높은 고기능성 조사료 자원으로 활용이 기대됨.



그림 1-17. 줄기색 돌연변이 품종 “적봉”

(4) 신품종 장대 경종농가 실증 재배

- (가) 2012년 전북 2개 지역에서 장대를 실증 재배한 결과 사료가치 우수하고, 기호성이 좋으며, 수확량이 ha당 25톤으로 옥수수의 1.4배로 실용화 가능성이 매우 높았음.
- (나) 2013년 전북 4개 지역 실증재배 결과 지역에 따라 옥수수와 유사하거나 높은 수확량을 보임.
- (다) 특히 불량한 생육환경에 대한 적응력이 대단히 뛰어나 질소 요구량이 옥수수의 절

반 정도인 1,000m² 당 800kg 정도로 척박한 땅에서도 잘 자라는 특징이 있고 습해 저항성도 매우 강하여 논 대체작물로의 활용가능성도 매우 높을 것으로 예측되어 침체되어 있는 농업 현장 활성화를 이끌어 낼 수 있는 아주 좋은 작물로 평가됨.

(라) 2013년 정읍지역 축산 농가에서 기계화 재배 실증 및 수량을 검정한 결과 파종과 수확, 파쇄 및 원형베일링의 모든 과정이 기계화가 가능하였고, ha당 22~24톤(건물수량) 수준으로 옥수수(광다육 20톤) 보다 높은 수준임.



그림 1-18. “장대” 전북지역 경종농가 실증재배



그림 1-19. 정읍지역 농가 케나프 기계화 재배 시연회

바. 유채 신품종 육성을 위한 돌연변이 유도 및 선발

(1) 방사선 감수성 테스트를 통해 적정 조사선량 (600, 800, 1000Gy) 선정

(가) 적정 조사선량 결정을 위해 4품종 (한라, 탐라, 탐미, 영산)을 대상으로 선량별 (100~4000Gy), 20립씩 3반복으로 방사선 감수성 테스트를 2회 실시함.

(나) 발아율, 지상부 및 지하부 길이, 뿌리털 길이, 자엽폭 등 5항목을 측정된 결과 선량이 높아질수록 지상부 및 지하부 모두 생육이 감소됨.

(다) 생육조사 결과 600~1000 Gy 범위가 유채의 감마선 적정 조사선량임.

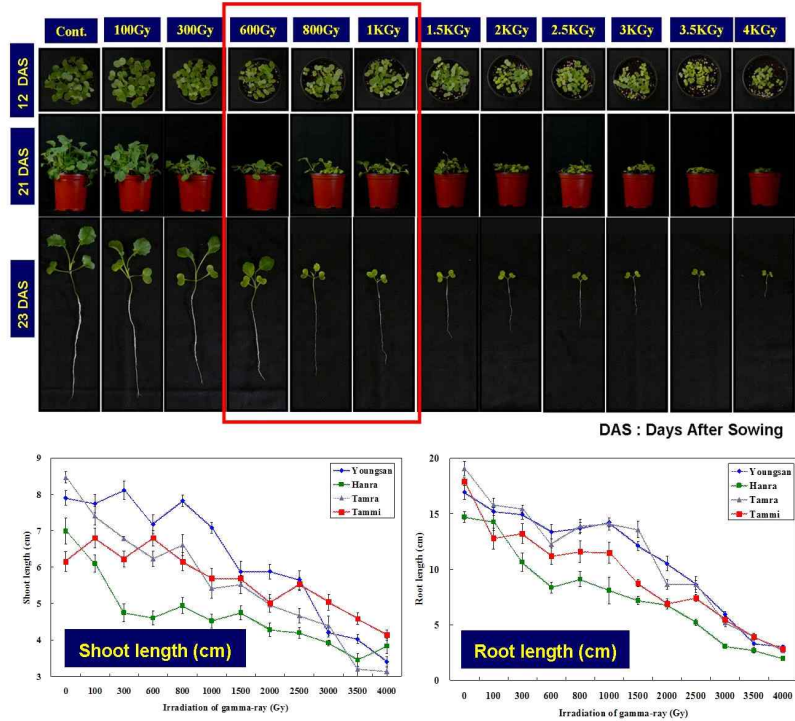


그림 1-20. 유채 방사선 감수성 평가

(2) 형태적 돌연변이체 선발 : 화색, 엽색, 엽형, 개화기 조사

(가) 재배품종 (한라, 탐미, 탐라, 영산)에 감마선을 완/급조사하여 M1~M2 후대 확보

(나) 2008년 4품종에 감마선 적정선량 (600 Gy, 800 Gy, 1,000 Gy)을 급조사하여 확보된 M₂ 계통 및 완조사 (14, 18, 25, 38, 65, 138 Gy)하여 얻은 M₁ 계통 육성

(다) 생육조사를 통해 형태 (초형, 엽형), 생육, 색 변이 (엽색, 화색, 줄기색), 개화시기 등의 변이를 보이는 551계통이 선발되었음.

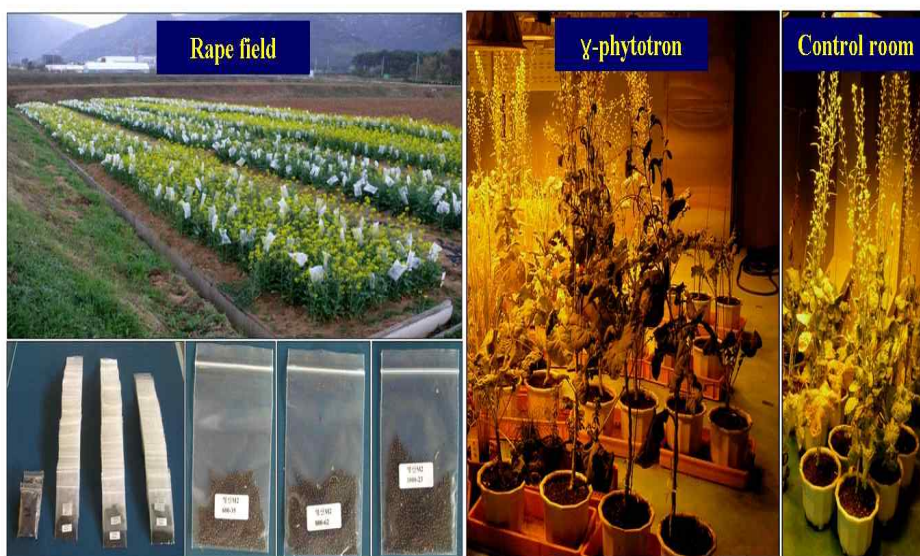


그림 1-21. 유채 선발포장 및 감마파이토타론

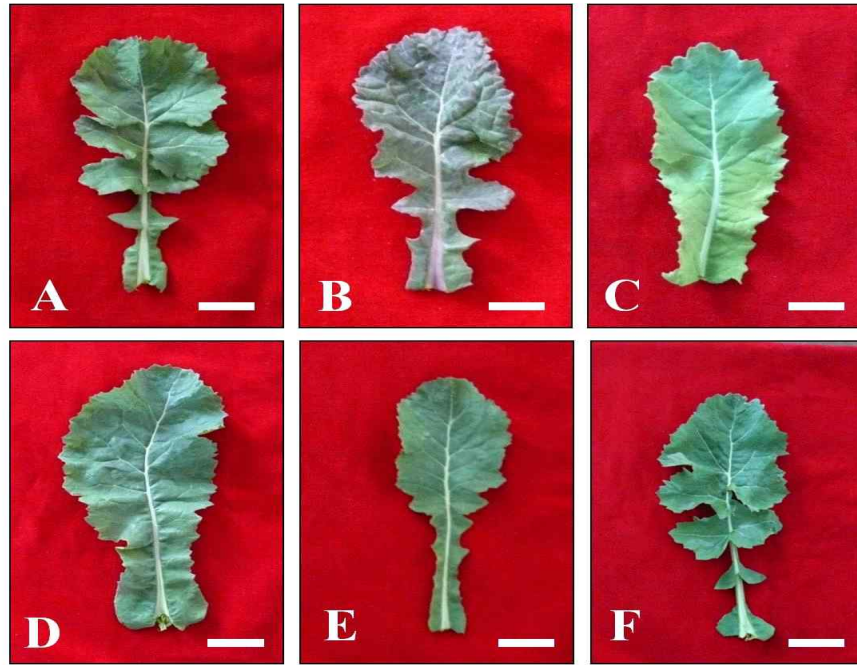


그림 1-22. 형태 및 색깔 변이를 보이는 M₂ 계통과 원품종과의 비교사진, A; 탐미 (원품종), B; 엽색변이 (자주색), C; 엽형 및 엽색변이 (엷은 녹색), D; 엽형변이, E; 영산 (원품종), F; 엽형변이, B-D; 탐미 M₂, F; 영산 M₂

- (라) 유채 4품종 (탐미, 탐라, 한라, 영산)에 600Gy, 800Gy, 1000Gy을 급조사하여 확보된 M₃ 계통 및 완조사 M₂ 계통을 직파하여 생육특성조사를 실시함
- (마) 원품종과 비교하여 생육이 균일하며 바이오매스가 높은 계통 및 형태 (엽형), 생육, 색 변이 (엽색, 화색, 줄기색), 개화시기, 숙기 등의 변이를 보이는 계통을 선발함



그림 1-23. 줄기색 변이 선발 계통

- (바) 2008년 4품종 (탐미, 탐라, 한라, 영산)에 방사선 감수성 테스트를 통해 결정한 조사 선량 (600, 800, 1000Gy)을 급조사하여 2011년 확보된 M₄ 계통 및 완조사 (14, 18, 25, 38, 65, 138 Gy) M₂~M₃ 계통을 2011년 10월 19일에 직파하여 생육특성조사

를 실시함

(사) 엽색은 녹색과 농녹색을 띠었고, 영산 M4-M5 변이 계통에서 안토시아닌이 축적된 것을 확인하였음

(아) 탐미 완조사 처리 계통에서 식물체 초장의 길이가 다른 완,급조사 품종 계통과 다르게 작게 관찰되었음

(자) M₅ 종자 수확시 선발계통은 개체 수확함

표 1-11. 2012년 유채 변이계통 선발

		Selected mutants No.				
			Hanra	Youngsan	Tammi	Tamra
Acute	M ₅	600 Gy	2	15	14	5
		800 Gy	2	2	17	3
		1 KGy	4	3	3	-
		Early flowering	3	-	11	-
Chronic	M ₄	600 Gy	-	8	5	-
		800 Gy	-	7	5	-
		1 KGy	-	5	2	-
Chronic	M ₄	-	-		18	
	M ₃			11		
Total			11	40	68	26
			145			

표 1-12. 유채 (*Brassica napus* L.) M₅ 계통의 변이 개수

		Selected mutants in M ₃									
Cultivar	Early Flowering	Leaf Color (5, green; 7, dark green)			Leaf development of lobes (2, oblong-ovate; 5, middle; 7, great)					Anthocyanin	Flower color
		(5)	(6)	(7)	(2)	(4)	(5)	(6)	(7)		
Hanra	3	-	3	5	-	-	6	-	2	2	-
Youngsan	-	2	1	17	1	1	16	1	1	16	2
Tammi	11	9	8	17	5	1	26	2	-	4	2
Tamra	-	2		6	-	-	8	-	-	1	-
Total	14	13	12	45	6	2	56	3	3	23	4

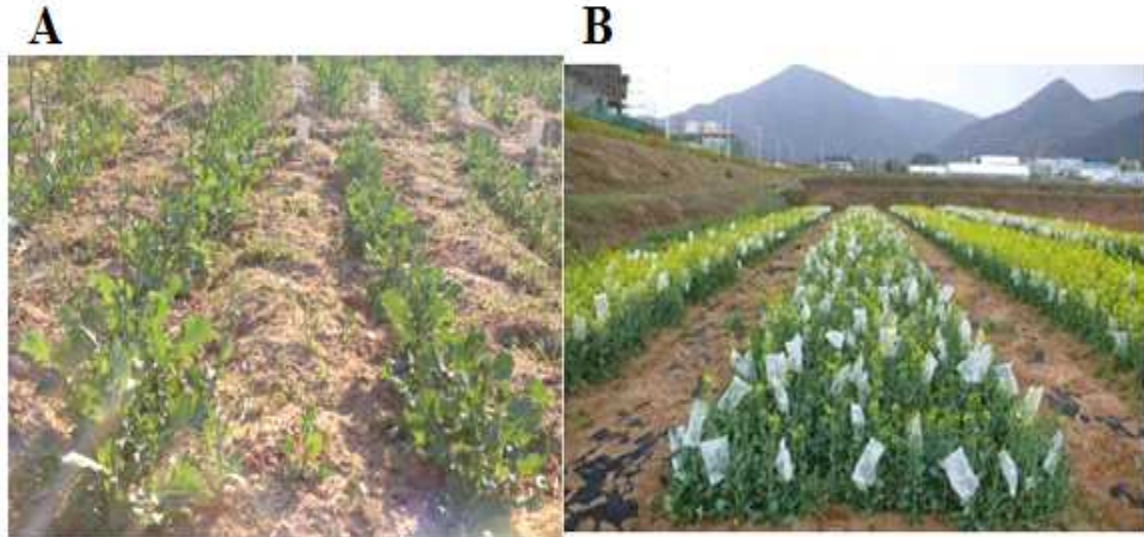


그림 1-24. 유채(*Brassica napus* L.) 생육 및 종자 채종. A.:완·급조사 계통의 초장 차이, B:채종망 처리

제2절 제2세부 돌연변이 차조기 및 블랙베리를 이용한 생체 산화적 기능성 식품 개발 및 실용화(한국원자력연구원 정일윤)

1. 돌연변이 차조기를 이용한 생체 산화적 기능성 식품 개발

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

(1) 연구배경

국내에서는 ‘천연물신약연구개발촉진계획(01-10)’을 수립하여 자생식물로부터 고부가가치의 식·의약 제품을 개발하는 연구가 진행되고 있으나 유용성분 함유량의 한계로 산업화 추진에 어려움을 겪고 있음. 따라서 유용성분이 다량 함유되어 있는 방사선 돌연변이 차조기 품종을 활용하여 산화적 손상 제어를 통한 고부가 질환예방 기능성 식품 신소재 개발을 하고자 함

(2) 연구개발 수행 내용

(가) 방사선 돌연변이 차조기의 WEE 공법 최적 추출조건 확립

(나) 지표성분의 분리 및 구조동정

(다) in vitro 항산화 효능 평가 기술 확립 및 수행

(라) ex vivo 항산화 효능 평가 기술 확립 및 수행

(마) 산화적 손상 동물모델 제작 및 항산화 효능 평가 수행

(3) 실험방법

(가) WEE(Water ethanol extract) 공법을 이용해 방사선 돌연변이 차조기의 추출물 획득

(나) UWLA, ESR을 이용한 항산화 효능 평가

(다) HPLC, LC/MS/MS 장비를 이용한 지표성분 분리/분석

- (라) HepG2 cell line에서 SIN-1을 이용해 산화적 스트레스를 가한 뒤 지표성분 및 추출물 의 항산화 효능 평가
- (마) Balb/c mouse에 감마선을 이용해 산화적 손상 유발 동물 모델 제작 및 효능 평가
- (바) Balb/c mouse에 CCl₄을 이용해 산화적 손상 유발 동물 모델 제작 및 효능 평가

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) LC 및 LC/MS/MS를 이용한 rosmarinic acid 다량 함유 돌연변이 차조기 선발

(가) 차조기 (CJC) 및 돌연변이 계통 (CJM)의 잎, 줄기, 뿌리를 대상으로 유효성분 변화 분석

: 지표성분으로 선정된 rosmarinic acid를 대상으로 정량 분석 결과 12번 돌연변이에서 가장 많은 rosmarinic acid 함량을 보였고, 부위별로는 잎에서 가장 많은 rosmarinic acid 함량을 보였음.

: CJM-12 잎에서 6.27 µg/mL로 가장 많은 rosmarinic acid 함량을 보임

그림2-1. 차조기 (control), 돌연변이 차조기 (CJM-12, 31, 44, 45 and 46)의 유효성분 분석

표2-1. LC/MS/MS를 이용한 돌연변이 차조기의 rosmarinic acid 함량

차조기 돌연변이	부위	함량 (µg/mL)
차조기 (CJC)	잎	1.07
	줄기	1.05
<i>CJM-12</i>	잎	6.27

	줄기	2.72
CJM-31	잎	5.09
	줄기	1.66
CJM-44	잎	3.99
	줄기	3.66
CJM-45	잎	1.12
	줄기	1.09
CJM-46	잎	-
	줄기	1.41

(2) UWLA 및 ESR을 이용한 뛰어난 항산화능 평가 및 돌연변이 선별

(가) UWLA를 이용한 superoxide 라디칼 소거능 평가에서 rosmarinic acid 다량 함유 돌연변이 CJM-12가 1.4 µg/mL의 IC50값을 보여 가장 뛰어난 라디칼 소거능을 보였다.

표 2-2. UWLA를 이용한 돌연변이 차조기의 항산화 활성 평가

차조기 돌연변이	IC ₅₀ (µg/mL)
차조기(CJC)	2.8
<i>CJM-12</i>	1.4
CJM-31	2.4
CJM-44	3.0
CJM-45	2.1
CJM-46	3.2

(나) ESR을 이용한 CJM-12의 DPPH 라디칼 소거 활성 평가는 50 µg/mL의 농도에서 81%의 라디칼 소거능을 보여 CJM-12의 항산화력을 다시 한 번 확인 하였다.

표 2-3. ESR을 이용한 돌연변이 차조기 (CJM-12)의 항산화 활성 평가

	CJM-12	Inhibition (%)
a	0	0
b	10 µg/mL	64
c	50 µg/mL	81
d	70 µg/mL	94

(3) CJM-12 열수 추출물의 지표물질 규명

- ① 돌연변이 차조기 CJM-12는 다양한 추출 분리법을 이용하여 rosmarinic acid를 포함한 4종 (ursolic acid, kaempferol, caffeic acid)의 지표성분이 분리 되었다.

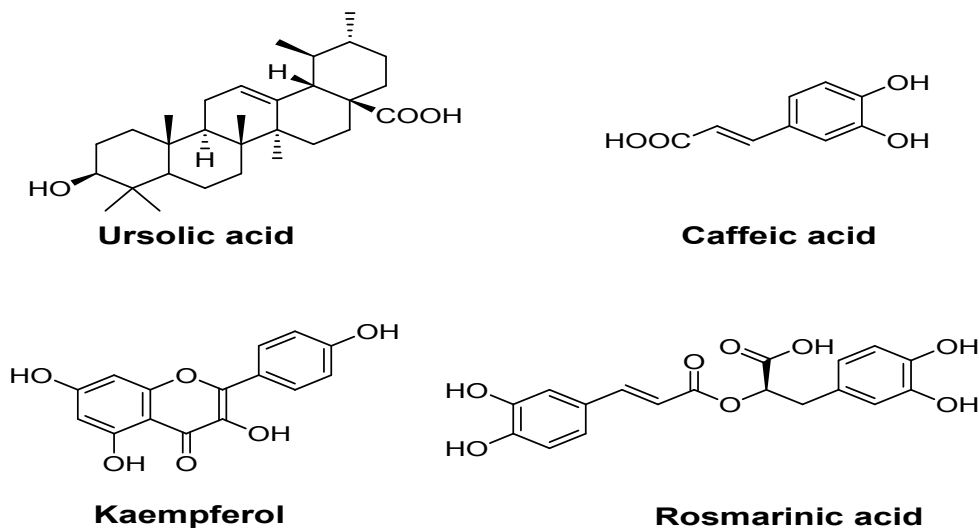


그림2-2. CJM-12로부터 분리된 지표성분

(4) WEE공법활용 CJM-12 열수 추출물 최적 추출조건 확립

- (가) 지표물질 대량 함유 열수 추출물 분획을 획득하기 위해 WEE공법활용 최적의 추출 조건을 확립하였다. 결과 물과 에탄올의 비율 (Water : EtOH = 1 : 2)에서 지표물질이 가장 많이 추출 되었다.

Caffeic acid

Rosmarinic acid

그림2-3. WEE공법의 최적 추출조건(Water : EtOH = 1 : 2)에서의 HPLC 스펙트럼

(5) HepG2 cells에서 rosmarinic acid의 항산화 효능 및 기작 규명

- (가) HepG2 cells에서의 SIN-1 산화적 스트레스 조건 확립
: SIN-1의 농도 (0, 0.25, 0.5, 1, 2 mM)와 처리 시간(5, 15, 24 hr)을 달리하여 실험한 결과 SIN-1 1 mM 농도를 24 hr 처리하는 것이 가장 적합한 조건임을 확인함
- (나) HepG2 cells에서의 rosmarinic acid 항산화 효능 평가

① SIN-1에 의한 산화적 스트레스에 대한 rosmarinic acid 효능 평가

: Rosmarinic acid가 농도 의존적으로 SIN-1에 의한 산화적 스트레스를 감소시키는 것을 확인함

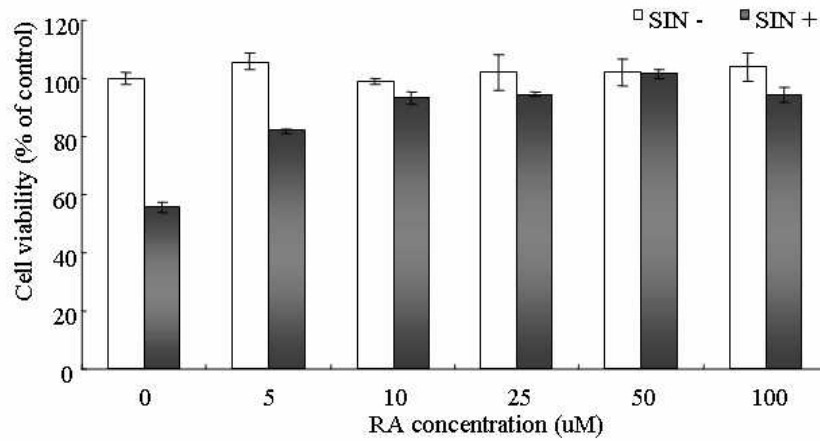


그림2-4. Effect of rosmarinic acid on SIN-1 induced oxidative stress in HepG2

② Rosmarinic acid의 활성산소 제거 효능 평가

: 활성산소 제거제(NAC)를 이용해 실험한 결과 rosmarinic acid를 SIN-1에 의해 생성된 활성산소를 효과적으로 제거하는 것을 확인함

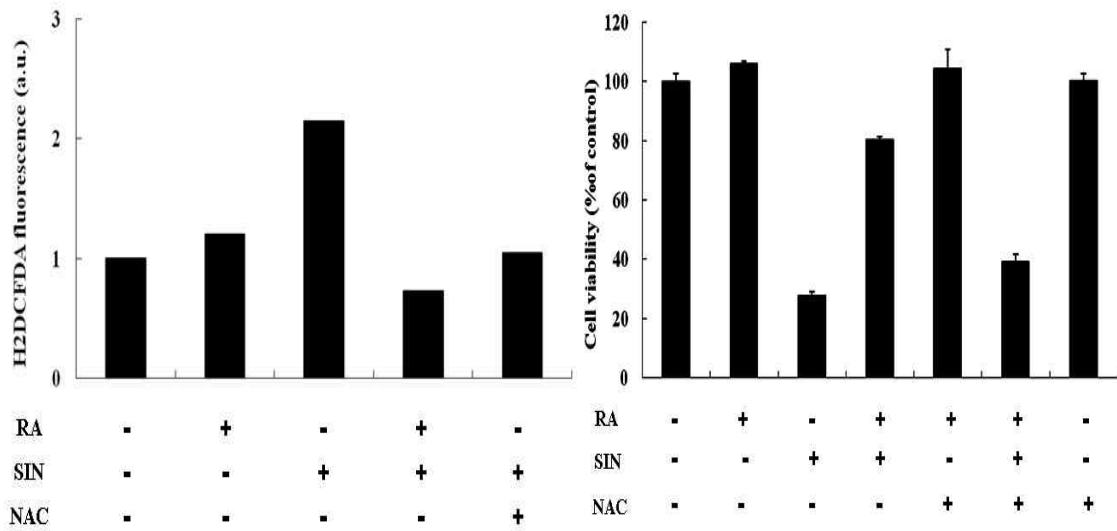


그림2-5. Effect of RA on SIN-1 induced ROS generation

③ Rosmarinic acid의 Heme oxygenase-1 (HO-1) 발현 여부 조사

: Rosmarinic acid는 HO-1을 효과적으로 생산하며 HO-1 inhibitor (SnPP)를 처리해 본 결과 rosmarinic acid의 항산화 효능에 HO-1 발현이 관여하고 있음을 확인하였음.

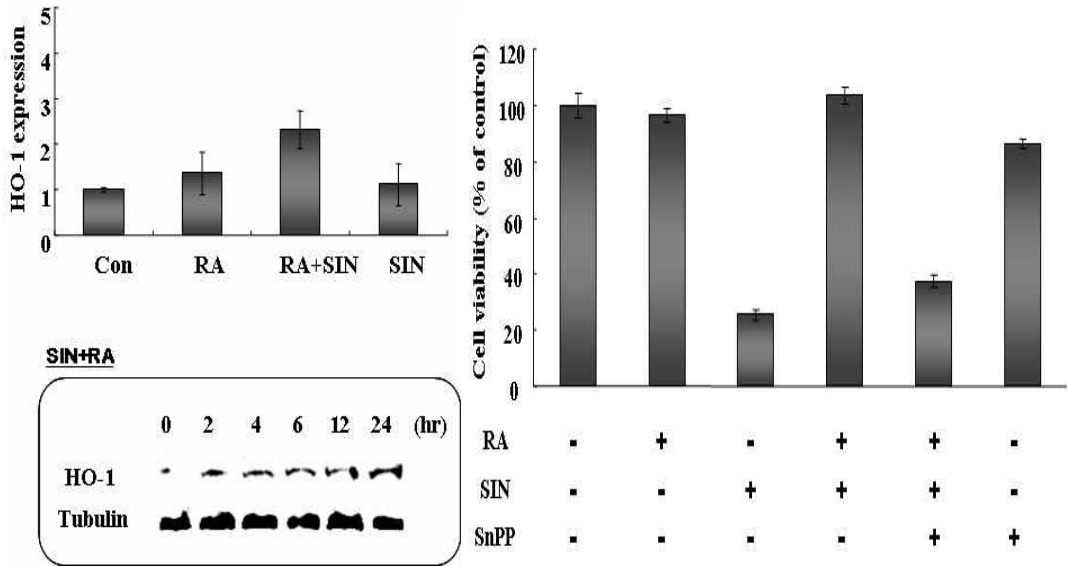


그림2-6. RA protects against SIN-1 induced cell death through HO-1 expression

㉠ Rosmarinic acid의 Nrf2 활성화 여부 조사

: Rosmarinic acid는 HepG2 cells에서 Nrf2를 발현양의 증가가 아닌 핵안으로의 이동을 촉진함으로써 활성화시킨다는 것을 확인하였음.

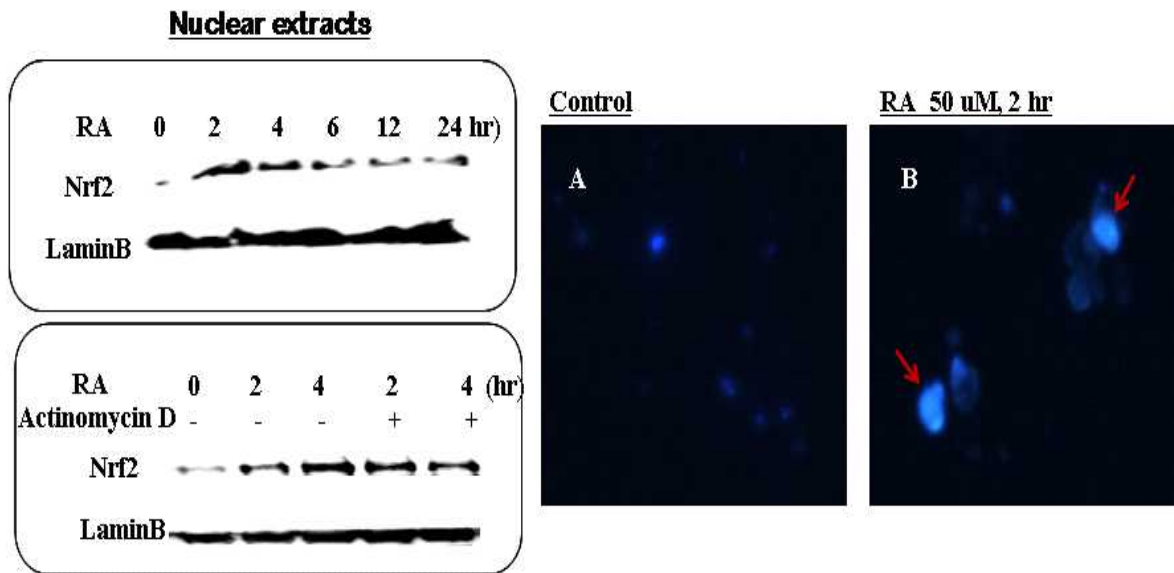


그림2-7. RA induced HO-1 expression mediated by Nrf2 signaling

㉡ Rosmarinic acid의 Nrf2 활성화 기작 연구

: Rosmarinic acid가 Nrf2를 활성화 시키는 신호전달 체계를 살펴본 결과 PI3K과 MAPK(JNK, ERK)가 연관되어 있음을 확인하였다.

: 결론적으로 rosmarinic acid는 HepG2 cells에서 활성산소를 제거함과 동시에 PI3K와 MAPK 활성을 통해 Nrf2를 활성화시키고 이를 통해 생성된 HO-1이 항산화 효능을 나타내고 있음을 확인하였음.

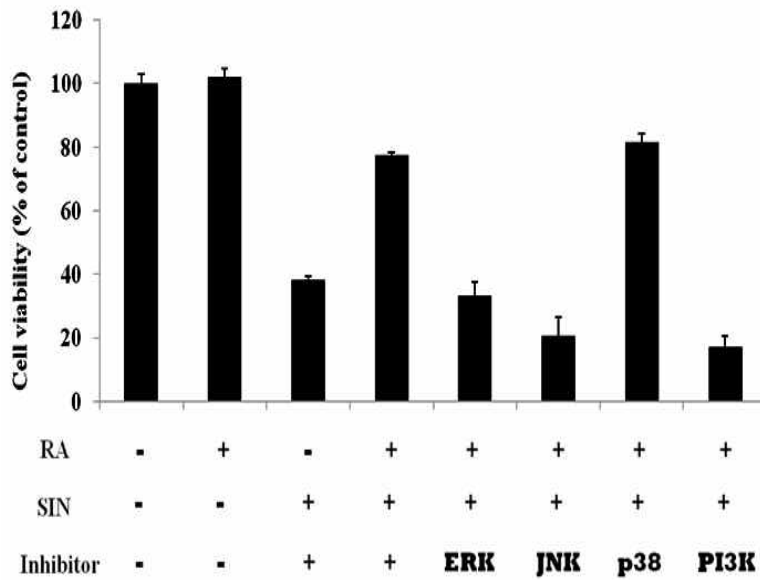
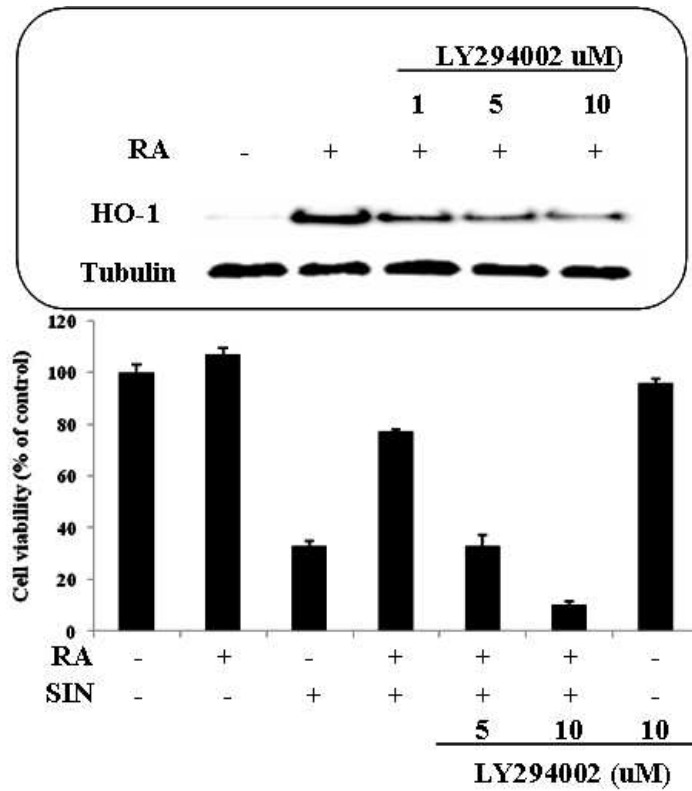


그림2-8. Involvement of PI3K/MAPK pathway in Nrf2 activation by RA

(6) HepG2 cells에서 돌연변이 차조기(CJM-12) 열수추출물의 항산화 효능 및 기작 규명
 (가) HepG2 cells에서의 돌연변이 차조기 (CJM-12) 열수추출물의 항산화 효능 평가
 : HepG2 cells에 SIN-1으로 산화적 스트레스를 유발한 뒤 돌연변이 차조기 (CJM-12)의 열수추출물과 WEE 추출공법에서 얻어진 분획물들을 가지고 항산화 효능을 평가한 결과 물:에탄올=1:2와 물:에탄올=1:4 상층액 부분이 가장 좋은 항산화 효능을 나타내었다.

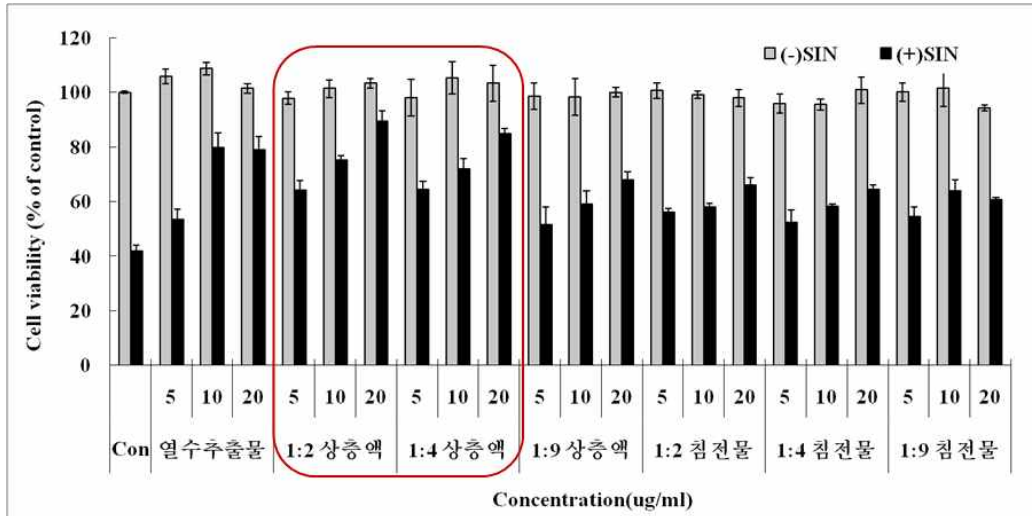


그림2-8. SIN-1 자극으로부터 들깨추출물의 복원효과

(나) 들연변이 차조기(CJM-12)의 추출물의 항산화 효능에 HO-1 연관성 유무 조사.

: HepG2 cells에 SIN-1에 의한 산화적 스트레스를 추출물이 효과적으로 복원하는 것을 관찰한 뒤 이러한 효능을 나타내는데 있어서 rosmarinic acid와 마찬가지로 HO-1 효소 생성이 관여하고 있는지 알아보기 위해 HO-1 특이적 저해제인 SnPP를 이용해 실험을 진행하였다. 그 결과 HO-1을 저해할 경우 추출물에 의한 산화적 스트레스 복원 효능이 떨어지는 것을 관찰하였다. 즉, 들연변이 차조기(CJM-12)의 물:에탄올=1:4 상층액에 의한 항산화 효능은 HO-1 효소 생성과 관계가 있음을 알 수 있었음.

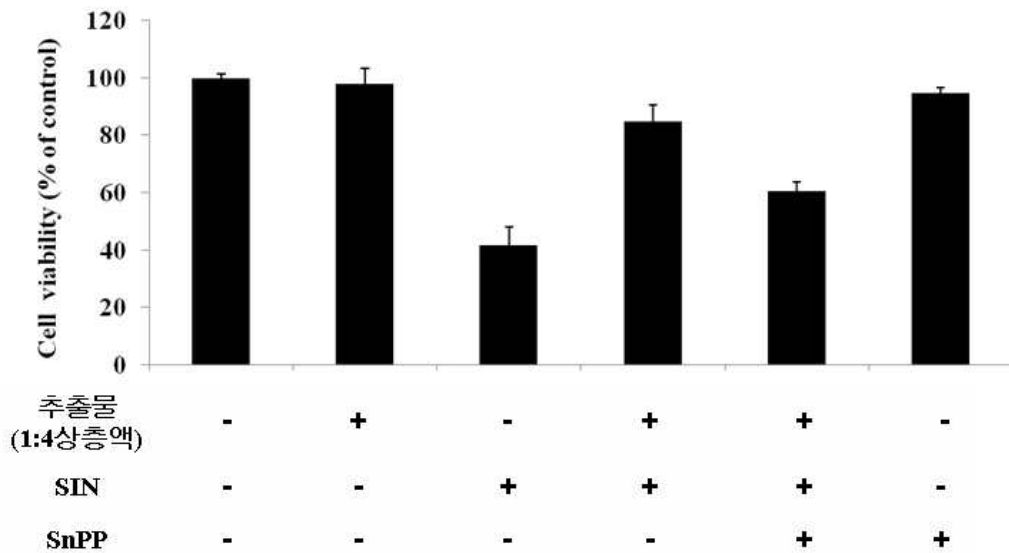


그림2-9. SIN-1 자극으로부터 HO-1 발현을 통한 들깨추출물의 보호효과

(7) 감마선을 이용한 산화적 손상 유발 동물모델 제작

(가) 감마선을 이용한 산화적 손상 유발 동물모델 제작

: 동물모델에서 차조기의 항산화 효능을 평가하기에 앞서 감마선에 의해 산화적 손상이 유발되는 조건을 확립하고자 하였음.

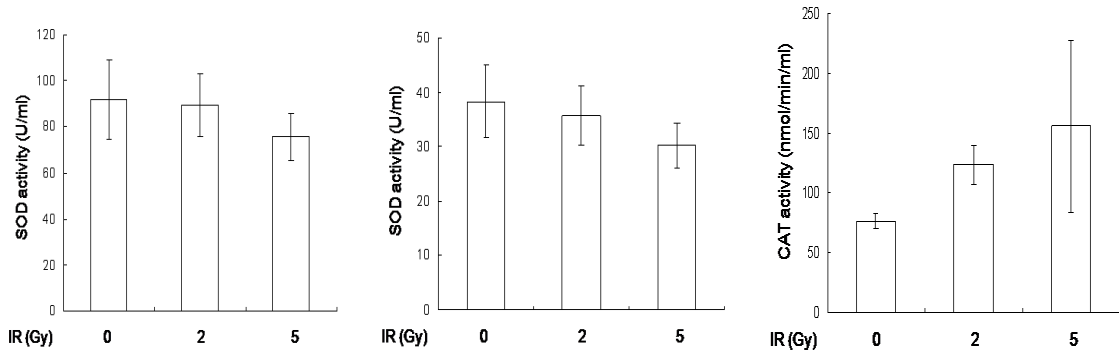


그림2-10. 감마선 조사(0, 2, 5 Gy)에 따른 BALB/C mouse의 plasma에 존재하는 항산화 효소의 활성 변화

(나) 감마선 유발 산화적 동물모델에서 차조기의 항산화 효능 평가

: BALB/C mouse에 차조기 열수추출물(10, 20, 50 mg/Kg)을 일주일동안 매일 IP로 처리해 준 뒤 감마선(5 Gy) 조사를 통해 산화적 손상을 유발한 뒤 mouse 혈액내에 존재하는 항산화 효소의 변화량을 측정하였음.

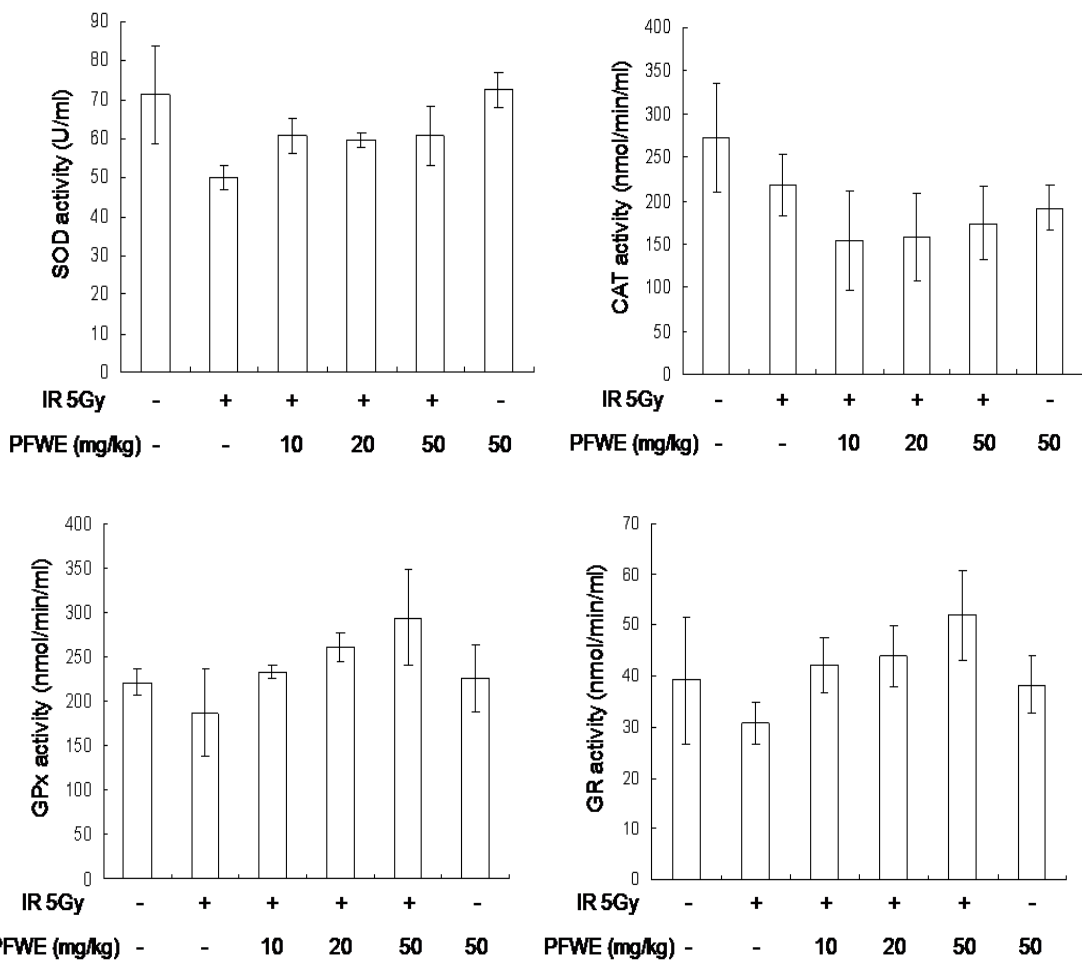


그림2-11. 감마선 조사(5 Gy)된 BALB/C mouse에서의 차조기 열수추출물(PFWE)의 항산화 효능 평가

: BALB/C mouse에 감마선(5 Gy) 조사로 인해 생겨난 산화적 손상을 차조기 열수추출물이 농도 의존적으로 복구하는 것을 확인하였음. SOD, GPx, GR 효소 활성의 경우 차조기 열수추출물에 의해 상당부분 복구되었으나 CAT의 경우 복구되는 양상이 미비한 것으로 나타남.

(8) CCl₄ 유발 산화적 동물모델에서 차조기의 항산화 효능 평가

(가) BALB/C mouse에 산화적 손상을 유발시키는 원인으로 감마선 (5 Gy) 조사 이외에 CCl₄(사염화탄소)를 사용하고자 하였음. CCl₄의 경우 간독성을 유발시키는 대표적인 물질로 알려져 있으며 동물모델에서 항산화 효능을 밝히고자 하는 실험에 일반적으로 사용되는 물질임.

(나) BALB/C mouse에 차조기 열수추출물(10, 20, 50 mg/Kg)을 일주일동안 매일 IP로 처리해 준 뒤 CCl₄ 투여를 통해 산화적 손상을 유발한 뒤 18시간동안 금식시킨 뒤 mouse 혈액내에 존재하는 항산화 효소의 변화량을 측정하였음.

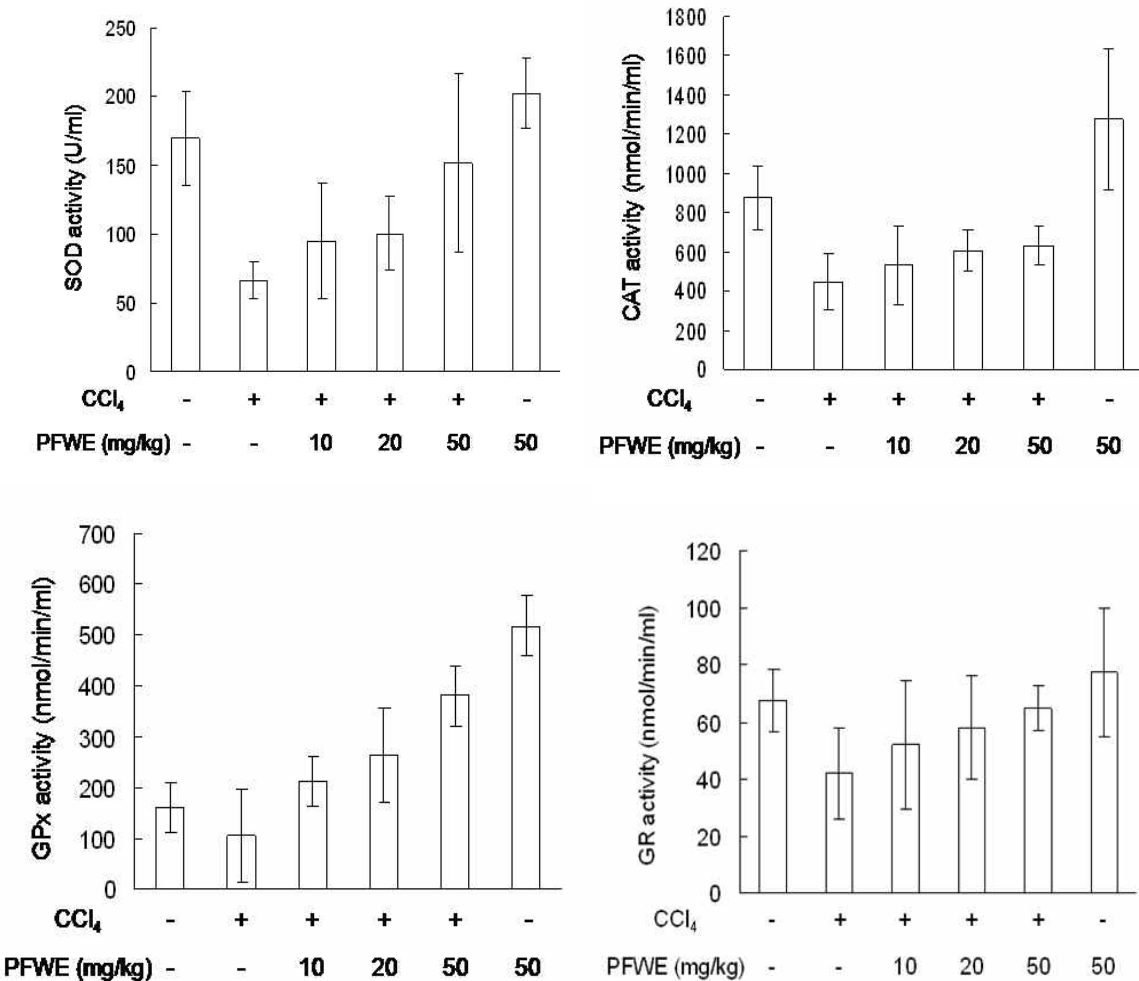


그림2-12. CCl₄ 처리된 BALB/C mouse에서 항산화 효소 활성화에 차조기 열수추출물(PFWE)이 미치는 영향

: BALB/C mouse에 CCl₄를 투여하였을 경우 간독성이 유발되어 항산화 효소의 활성이 떨어지는 것을 확인하였음. 이렇게 감소된 항산화 효소(SOD, CAT, GPx, GR) 활성 모두 차조기 열수추출물을 투여하였을 경우 농도 의존적으로 복구되는 것을 확인하였음. 따라서 차조기 열수추출물의 경우 산화적 손상 유발 동물모델에서 항산화 효능을 나타냄을 확인하였음.

(다) BALB/C mouse에 CCl₄를 투여하였을 경우 간독성이 유발되어 혈액내에 존재하는 ALP, AST, ALT 수치가 상승하는 것을 확인하였음. 이렇게 증가된 ALP, AST, ALT 수치는 차조기 열수추출물을 투여하였을 경우 농도 의존적으로 복구되는 것을 확인하였음. AST, ALT의 경우 차조기 열수추출물이 50 mg/Kg 이상 투여되었을 경우 수치가 다시 상승하는 것을 확인할 수 있었음.

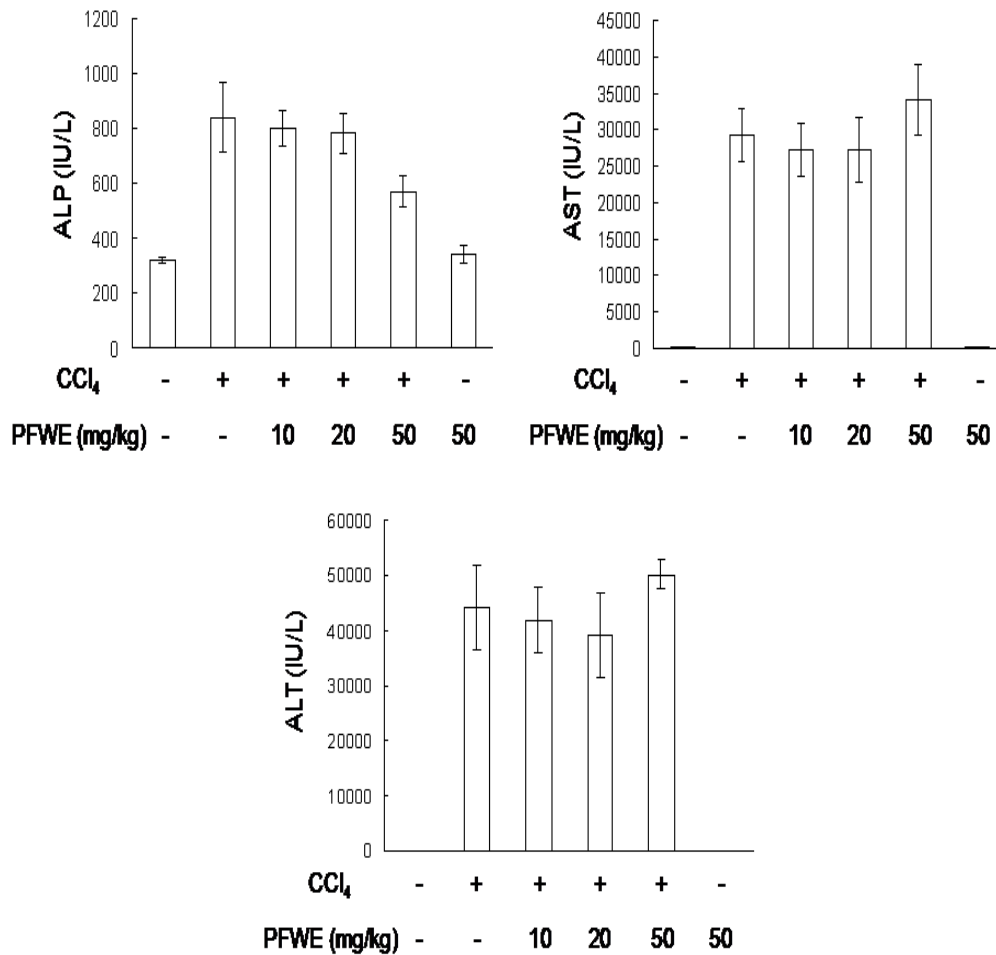


그림2-13. CCl₄ 처리된 BALB/C mouse에서 혈액내 ALP, AST, ALT에 차조기 열수추출물 (PFWE)이 미치는 영향

(라) BALB/C mouse에 CCl₄를 투여하였을 경우 지질 산화가 진행되어 그 산물인 MDA 수치가 상승하는 것을 확인하였음. 이렇게 증가된 MDA 수치는 차조기 열수추출물을 투여하였을 경우 농도 의존적으로 복구되는 것을 확인하였음.

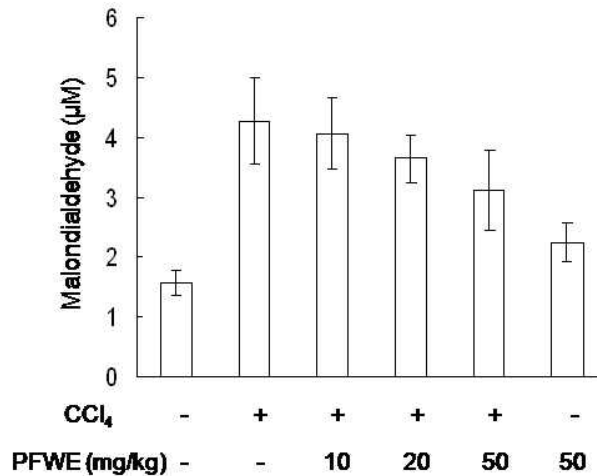


그림2-14. CCl₄ 처리된 BALB/C mouse에서 지질산화에 차조기 열수추출물(PFWE)이 미치는 영향

(마) BALB/C mouse에 CCl₄를 투여하였을 경우 항산화 효소 발현에 관여하는 Nrf2 발현이 감소되는 것을 확인하였고 차조기 열수추출물에 의해 Nrf2 발현이 다시 증가되는 것을 확인하였음.

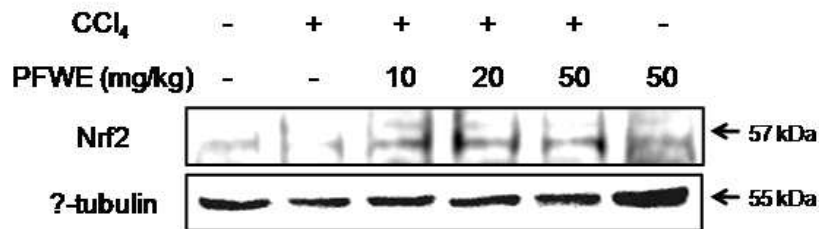


그림2-15. CCl₄ 처리된 BALB/C mouse에서 Nrf2 활성화에 차조기 열수추출물(PFWE)이 미치는 영향

2. 돌연변이 블랙베리를 이용한 생체 산화적 기능성 식품 개발 및 실용화

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

(1) 연구배경

국내에서는 '천연물신약연구개발촉진계획(01-10)'을 수립하여 자생식물로부터 고부가가치의 식·의약 제품을 개발하는 연구가 진행되고 있으나 유용성분 함유량의 한계로 산업화 추진에 어려움을 겪고 있음. 따라서 유용성분이 다량 함유되어 있는 방사선 돌연변이 블랙베리 품종을 활용하여 산화적 손상 제어를 통한 고부가 질환예방 기능성 식품 신소재 개발을 하고자 함

(2) 연구개발 수행 내용

- (가) 방사선 돌연변이 블랙베리의 WEE 공법 최적 추출조건 확립
- (나) 지표성분의 분리 및 구조동정
- (다) in vitro 항산화 효능 평가 기술 확립 및 수행

- (라) ex vivo 항산화 효능 평가 기술 확립 및 수행
- (마) 산화적 손상 동물모델 제작 및 항산화 효능 평가 수행

(3) 실험방법

- (가) WEE(Water ethanol extract) 공법을 이용해 방사선 돌연변이 블랙베리의 추출물 획득
- (나) HPLC, LC/MS/MS 장비를 이용한 지표성분 분리/분석
- (다) HepG2 cell line에서 H₂O₂을 이용해 산화적 스트레스를 가한 뒤 지표성분 및 추출물의 항산화 효능 평가
- (라) Balb/c mouse에 CCl₄을 이용해 산화적 손상 유발 동물 모델 제작 및 효능 평가
- (마) Balb/c mouse와 Sprague-Dawley Rat에 CCl₄을 이용해 산화적 손상 유발 동물 모델 제작 및 효능 평가

나. 연구개발 결과 및 고찰

- (1) CCl₄을 이용한 산화적 손상 유발 동물모델에서 신품종 블랙베리 추출물의 항산화 효능평가

- (가) Sprague-Dawley Rat에 신품종 블랙베리 추출물(100, 200, 400 mg/Kg)을 15일동안 격일로 경구투여한 뒤 CCl₄ 투여를 통해 산화적 손상을 유발한 뒤 18시간 동안 금식 시킨 뒤 Rat 혈액내에 존재하는 항산화 효소의 변화량을 측정

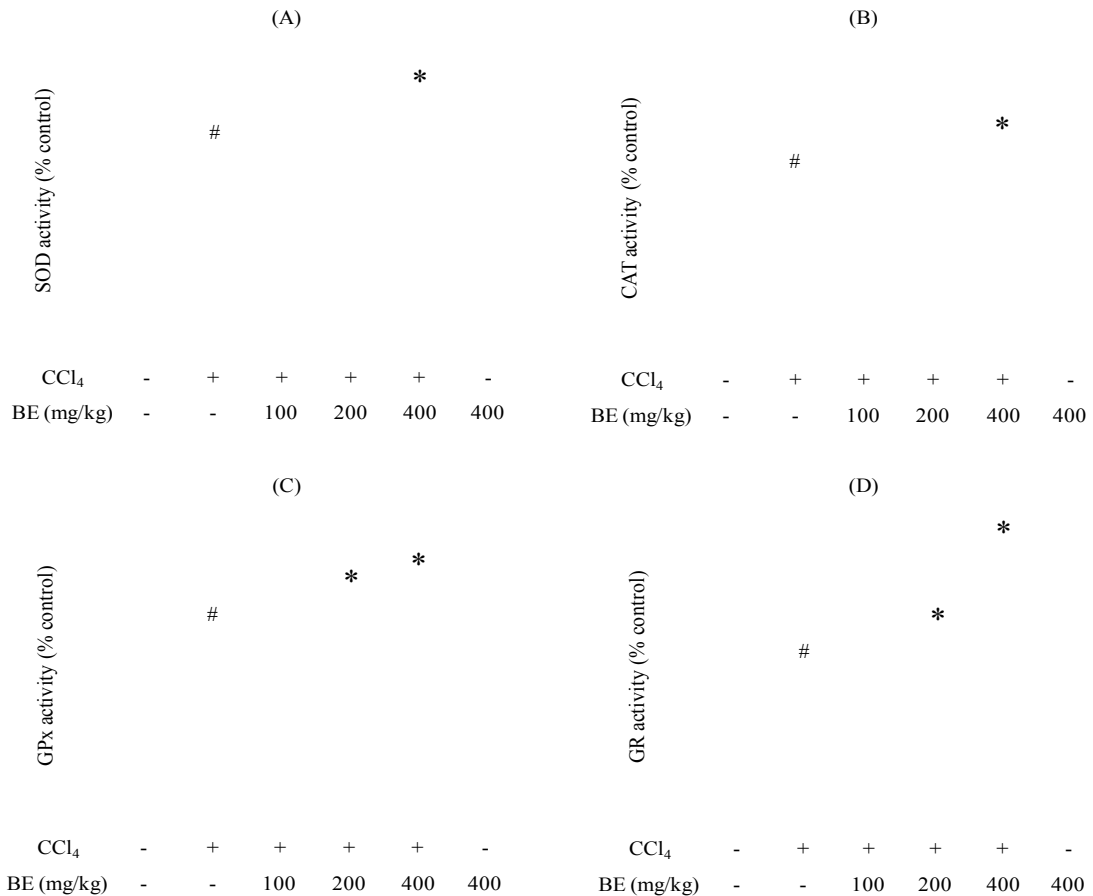


그림2-16. CCl₄ 투여된 Sprague-Dawley Rat에서의 항산화 효소 활성화에 신품종 블랙베리 추출물이 미치는 영향

: Sprague-Dawley Rat에 CCl₄를 투여하였을 경우 간독성이 유발되어 항산화 효소의 활성이 떨어지는 것을 확인하였음. 이렇게 감소된 항산화 효소(SOD, CAT, GPx, GR) 활성 모두 신포중 블랙베리 추출물을 투여하였을 경우 농도 의존적으로 복구되는 것을 확인하였음. 따라서 신포중 블랙베리 추출물의 경우 산화적 손상 유발 동물모델에서 항산화 효능을 나타냄을 확인하였음.

(나) Sprague-Dawley Rat에 CCl₄를 투여하였을 경우 SOD, GPx-1/2, HO-1과 같은 항산화 효소의 발현양이 감소하였지만 신포중 블랙베리 추출물을 투여할 경우 발현양이 다시 복원되는 것을 확인하였다. Catalase의 경우 발현양에 변화가 없었다.

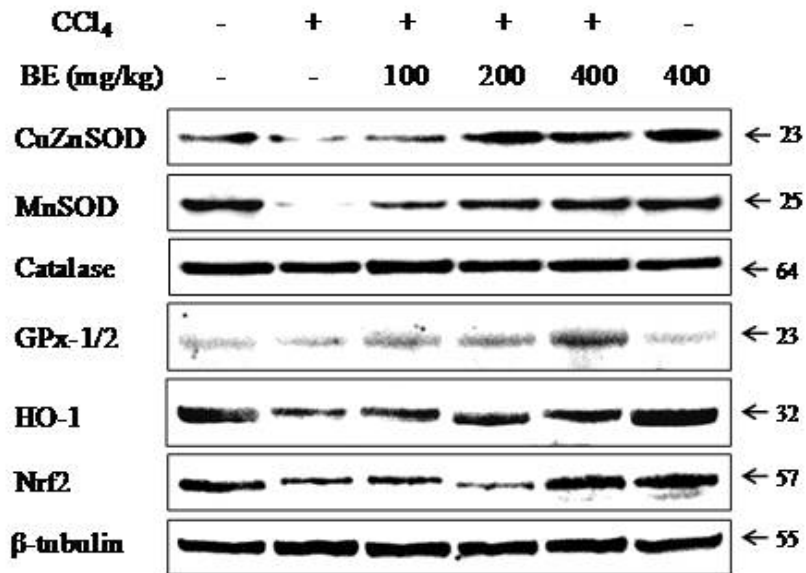


그림2-17. CCl₄ 투여된 Sprague-Dawley Rat에서의 항산화 효소 발현에 신포중 블랙베리 추출물이 미치는 영향

(다) Sprague-Dawley Rat에 CCl₄를 투여하였을 경우 혈액내에 AST와 ALT levels이 증가하였지만 신포중 블랙베리 추출물을 투여할 경우 다시 복원되는 것을 확인하였다.

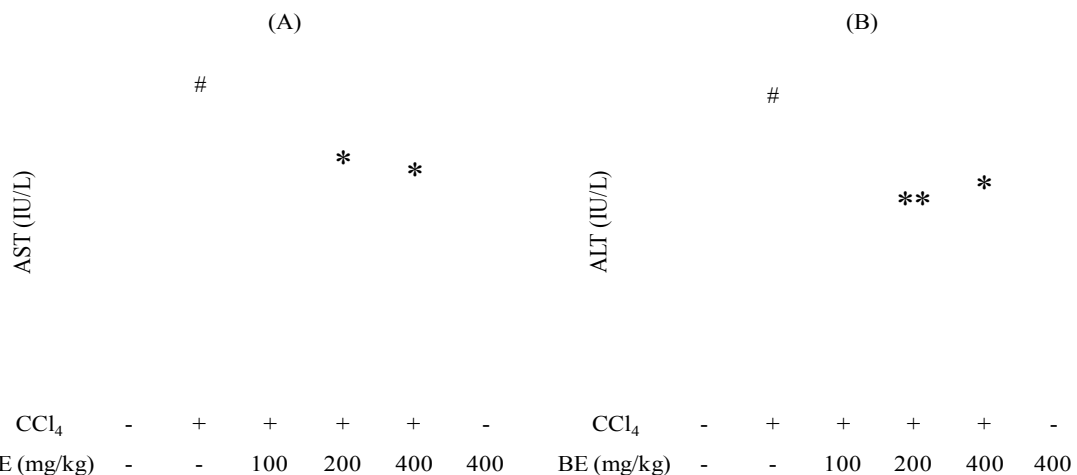


그림2-18. CCl₄ 투여된 Sprague-Dawley Rat에서 혈액내 AST, ALT에 신포중 블랙베리 추출물이 미치는 영향

(라) Sprague-Dawley Rat에 CCl₄를 투여하였을 경우 지질 산화가 진행되어 그 산물인 MDA 수치가 상승하는 것을 확인하였음. 이렇게 증가된 MDA 수치는 신품종 블랙베리 추출물을 투여하였을 경우 농도 의존적으로 복구되는 것을 확인하였음.

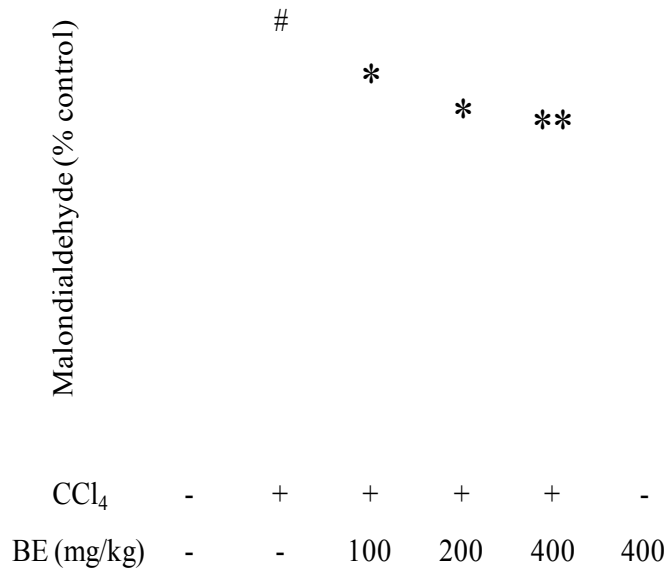


그림2-19. CCl₄ 투여된 Sprague-Dawley Rat에서 지질산화에 신품종 블랙베리 추출물이 미치는 영향

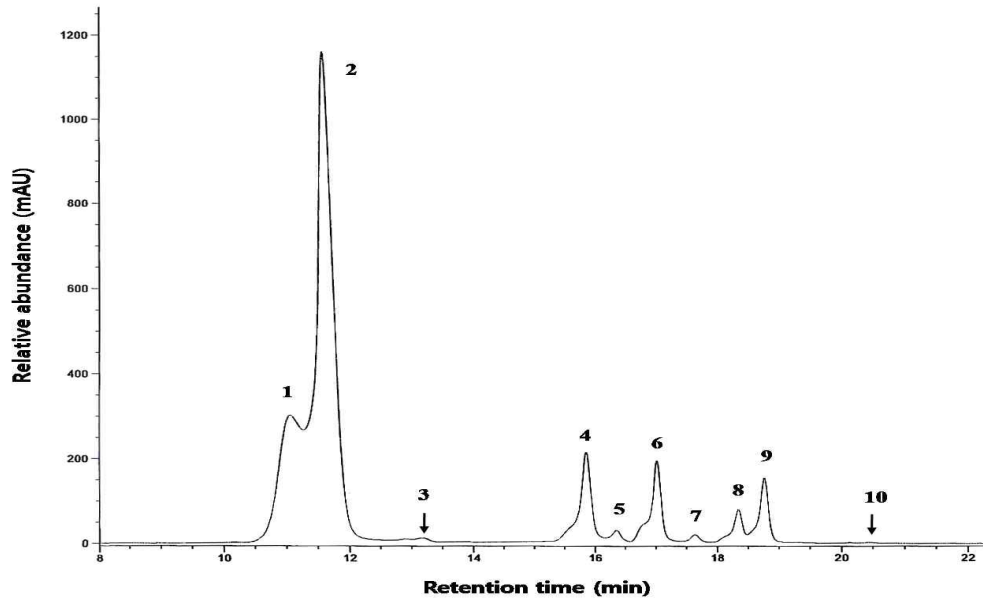
(2) 신품종 블랙베리 추출물을 얻기 위한 최적 추출조건 확립

(가) 에탄올:염산=9:1 용매를 신품종 블랙베리에 3배 볼륨으로 처리하여 3일간 추출하여 0.45μM 사이즈의 여과지로 여과한 뒤 감압 농축하여 추출물을 얻었음

(3) 신품종 블랙베리 추출물에 존재하는 지표성분 분석

(가) 신품종 블랙베리 추출물에 존재하는 항산화 지표성분을 규명하기 위해 HPLC, LC/MS 장비를 이용하여 분석을 진행하였음.

: 신품종 블랙베리 추출물에 10개의 지표성분이 존재함을 확인하였음.



➤ HPLC Conditions

- Instrument : Agilent 1100 series equipped with photodiode array detector
 - Column : TSK-GEL ODS column (150 × 4.6 mm, 5 μm)
 - Detection wavelength : 530 nm
 - Mobile phase : 10% Formic acid in Water/Acetonitrile
 - Flow rate : 1.0 ml/min
 - Column temperature : 20 °C
- Gradient condition: 0 ~ 0.5 min ; 0 → 9% Acetonitrile, 0.5 ~ 4.0 min ; 9 → 9% Acetonitrile
4.0 ~ 10 min ; 9 → 13% Acetonitrile, 10 ~ 20 min ; 13 → 30% Acetonitrile
20 ~ 30 min ; 30 → 100% Acetonitrile

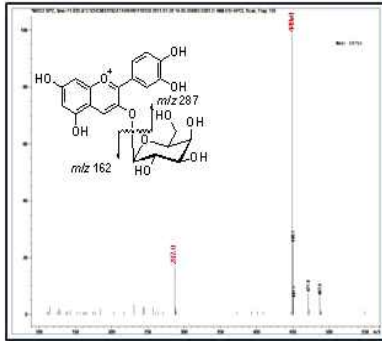
그림2-20. 신품중 블랙베리 추출물을 이용한 HPLC 분석 결과

(나) LC/MS 분석 결과 신품중 블랙베리 추출물에 존재하는 지표성분은 다음과 같음을 확인하였음.

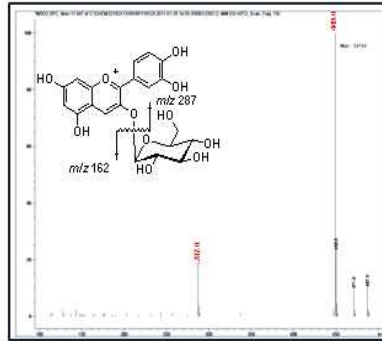
- : compound 1: cyanidin-3-O-galactoside; compound 2: cyanidin-3-O-glucoside;
- compound 3: cyanidin-3-O-arabinoside; compound 4: cyanidin-3-O-xyloside;
- compound 5: cyanidin-3-O-malonylglucoside compound 6:
- cyanidin-3-O-dioxalyglucoside; compound 8: cyanidin-3-O-methylmalonylglucoside;
- compound 9: cyanidin-3-O-methyldioxalyglucoside; compound 10: cyanidin-3-O-
- 3',6'-dimalonylglucoside.

➤ LC/MS Conditions

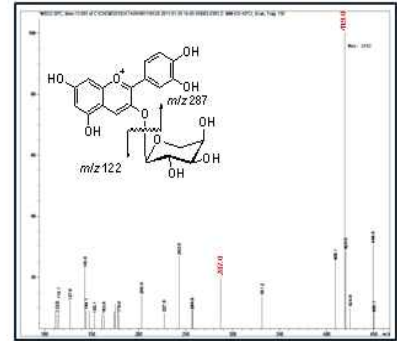
- Instrument : Agilent MSD
- Mode : MM-ES, Positive
- Nebulizer : 35 psig
- Mass range : 100 ~ 1000 m/z
- Dry temperature : 350 °C
- Dry gas : 12.00 L/min



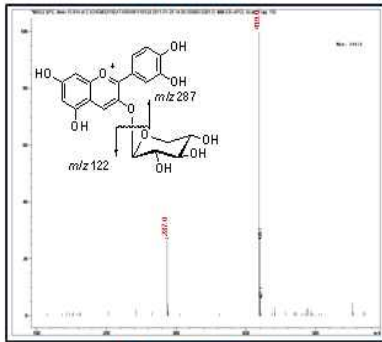
Compound 1



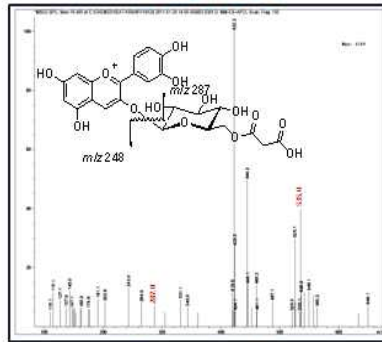
Compound 2



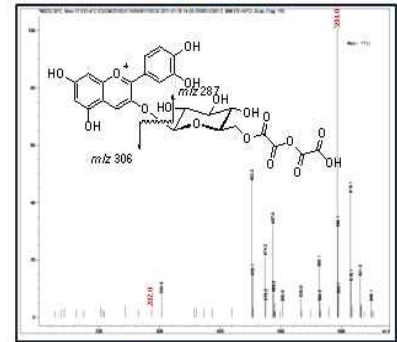
Compound 3



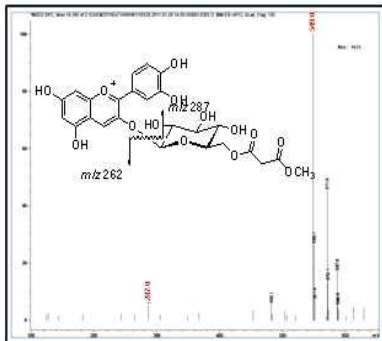
Compound 4



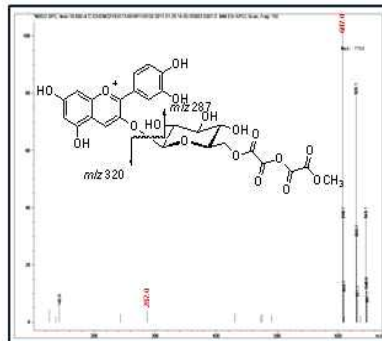
Compound 5



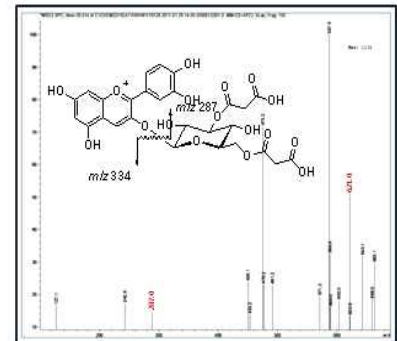
Compound 6



Compound 8



Compound 9



Compound 10

그림2-21. 신제품 블랙베리 추출물을 이용한 LC/MS 분석 결과

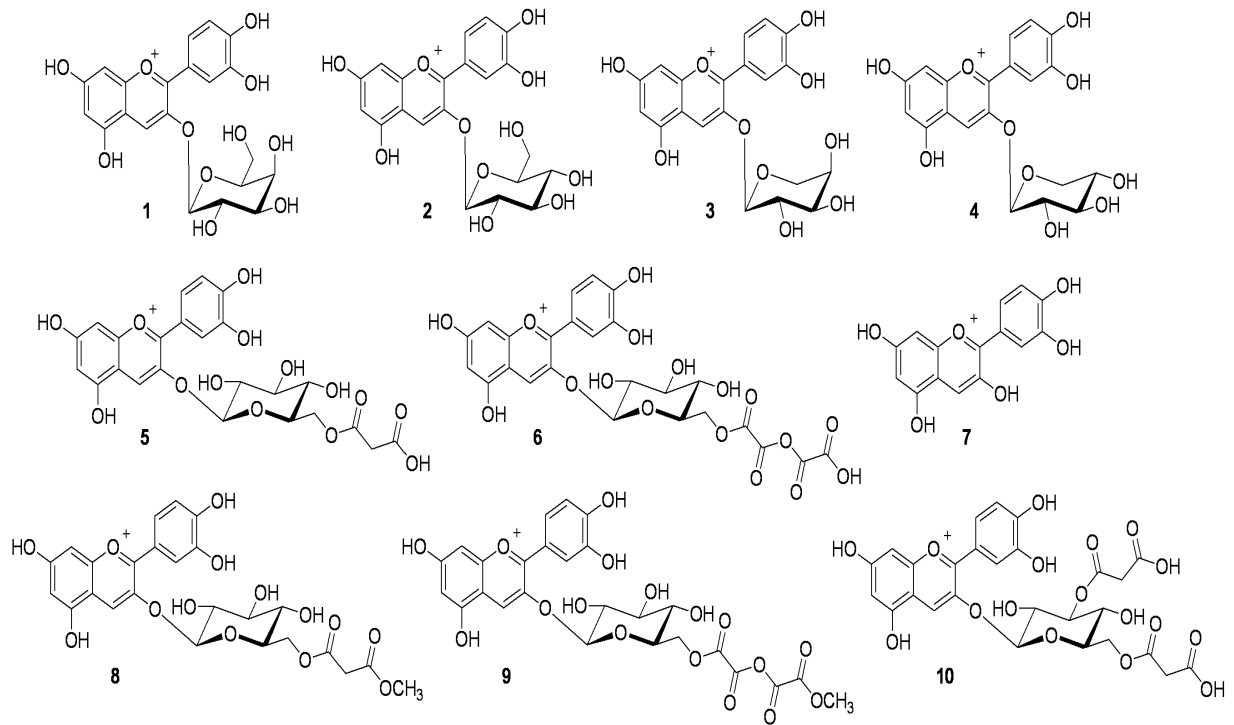


그림2-22. 신제품 블랙베리 추출물에 존재하는 지표성분의 구조

표2-4. 신제품 블랙베리 추출물에 존재하는 지표성분의 함량 비교

Peak	Name	t _R (min)	MW	Area (%)
1	Cyanidin-3-galactoside	11.08	449	20.02
2	Cyanidin-3-glucoside	11.65	449	57.63
3	Cyanidin-3-arabinoside	13.17	419	0.27
4	Cyanidin-3-xyloside	15.87	419	7.80
5	Cyanidin-3-malonylglucoside	16.35	535	0.85
6	Cyanidin-3-dioxalyglucoside	17.03	593	6.23
7	Cyanidin	17.64	287	0.49
8	Cyanidin-3-methylmalonylglucoside	18.35	549	2.31
9	Cyanidin-3-methyldioxalyglucoside	18.77	607	4.36
10	Cyanidin-3'',6''-dimalonylglucoside	20.45	621	0.05

표2-5. 품종에 따른 Cyanidin-3-glucoside(C3G)를 함유한 품종의 함량비교

품종	ppm1	mg/100g1	비고2
오디 (Mulberry)	181.1	301.8	-
블랙 브이3 (Black V3)	230.9	384.8	오디의 1배 함유
블루베리 (Blueberry)	434.5	724.1	오디의 2배 함유
블랙베리 메이플 (Blackberry Maple)	530.2	883.6	오디의 3배 블랙V3의 2.3배 블루베리의 1.2배 많이 함유.

(4) 신제품 블랙베리를 이용한 간기능 개선 기능성 음료 시제품 제작



그림2-23. 신제품 블랙베리를 이용한 간기능 개선 음료 시제품 사진

(5) 동물 모델에서 기능성 시제품의 간기능 개선 효능 검증

(가) 블랙베리 식초가 함유된 기능성 시제품을 농축한 뒤 6주령의 수컷 랫트를 대상으로 농축한 기능성 시제품을 15일간 구강으로 투여함. 간손상을 유발하기 위해 CCl₄를 처리한 후 18시간동안 절식 후 실험 진행한 뒤 랫트의 혈액으로부터 ALT, AST를 측정하였고 간조직으로부터 GPx 효소 활성을 측정하였음.

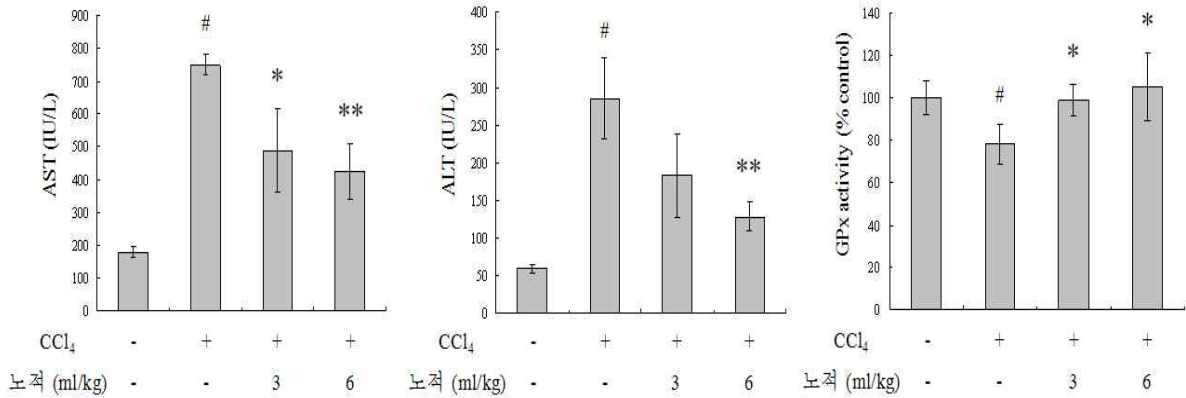


그림2-24. CCl₄ 투여된 Sprague-Dawley Rat에서의 항산화 효소 활성화에 시제품 노적이 미치는 영향

(6) 알코올을 이용한 산화적 스트레스 동물모델에서 시제품 노적의 숙취 해소 및 간기능 개선 효능 평가

(가) Sprague-Dawley Rat에 시제품 노적(6 mL/kg)을 1일간 단회 또는 6일간 6회 경구 투여한 뒤 마지막 투여 1시간 후에 알코올(3 g/kg) 투여를 통해 산화적 손상을 유발한 뒤 1, 5시간 후에 채혈하여 Rat 혈액내에 존재하는 에탄올과 아세트알데히드 농도 및 ADH(alcohol dehydrogenase)와 ALDH(acetaldehyde dehydrogenase) 효소 활성을 측정

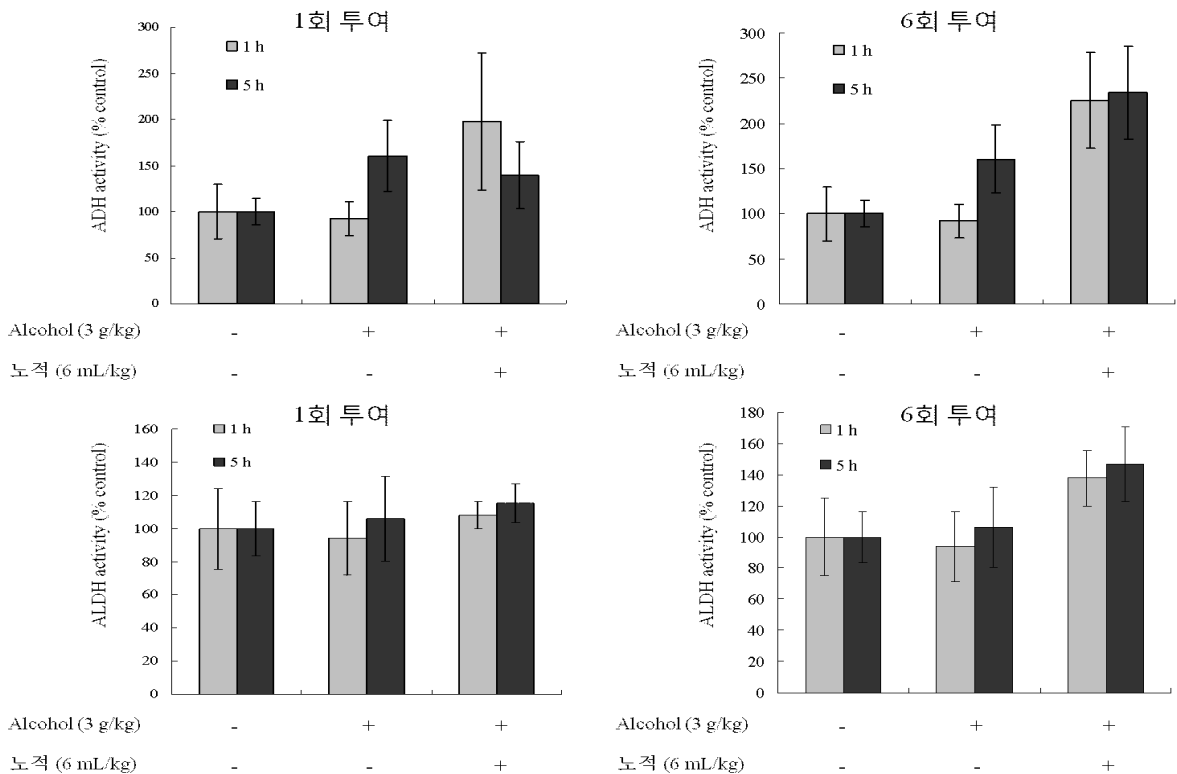


그림2-25. 알코올 투여된 Sprague-Dawley Rat에서의 ADH와 ALDH 효소 활성화에 시제품 노적이 미치는 영향

: Sprague-Dawley Rat에 알코올을 투여하였을 경우 1시간 후 ADH와 ALDH 효소 활성은 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 5시간 후 ADH 효소 활성은 증가하였으나 ALDH 효소 활성은 증가하지 않은 반면, 시제품 노적을 1일간 1회 투여시 ADH와 ALDH의 효소 활성이 소폭 증가하였으며, 6일간 6회 투여하였을 경우 1시간 후부터 ADH와 ALDH의 효소 활성이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였음. 따라서 시제품 노적의 경우 ADH와 ALDH의 효소 활성을 증가하여 숙취 해소 효능을 나타냄을 확인하였음.

(나) Sprague-Dawley Rat에 알코올을 투여하였을 경우 1시간 후부터 5시간 후까지 혈중 에탄올과 아세트알데히드 농도가 유의적으로 증가하였지만, 시제품 노적을 1일간 1회 또는 6일간 6회 투여하였을 경우 1시간 후부터 혈중 에탄올과 아세트알데히드 농도가 유의적으로 감소하는 것을 확인하였음. 따라서 시제품 노적을 투여할 경우 ADH와 ALDH의 효소 활성을 증가하여 혈중 에탄올과 아세트알데히드 농도를 감소시킴으로써 숙취 해소 효능을 나타냄을 확인하였음.

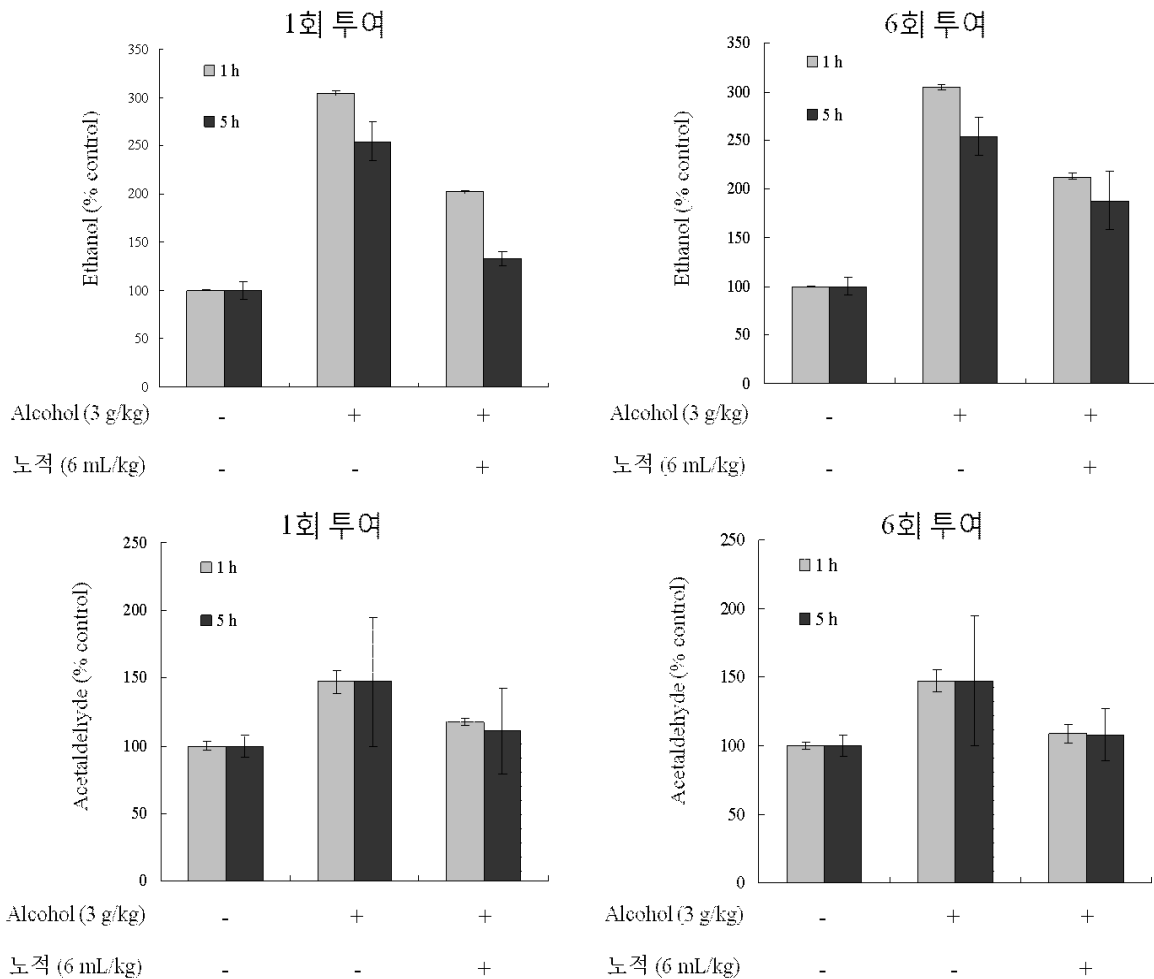


그림2-26. 알코올 투여된 Sprague-Dawley Rat에서의 혈중 에탄올과 아세트알데히드 농도에 시제품 노적이 미치는 영향

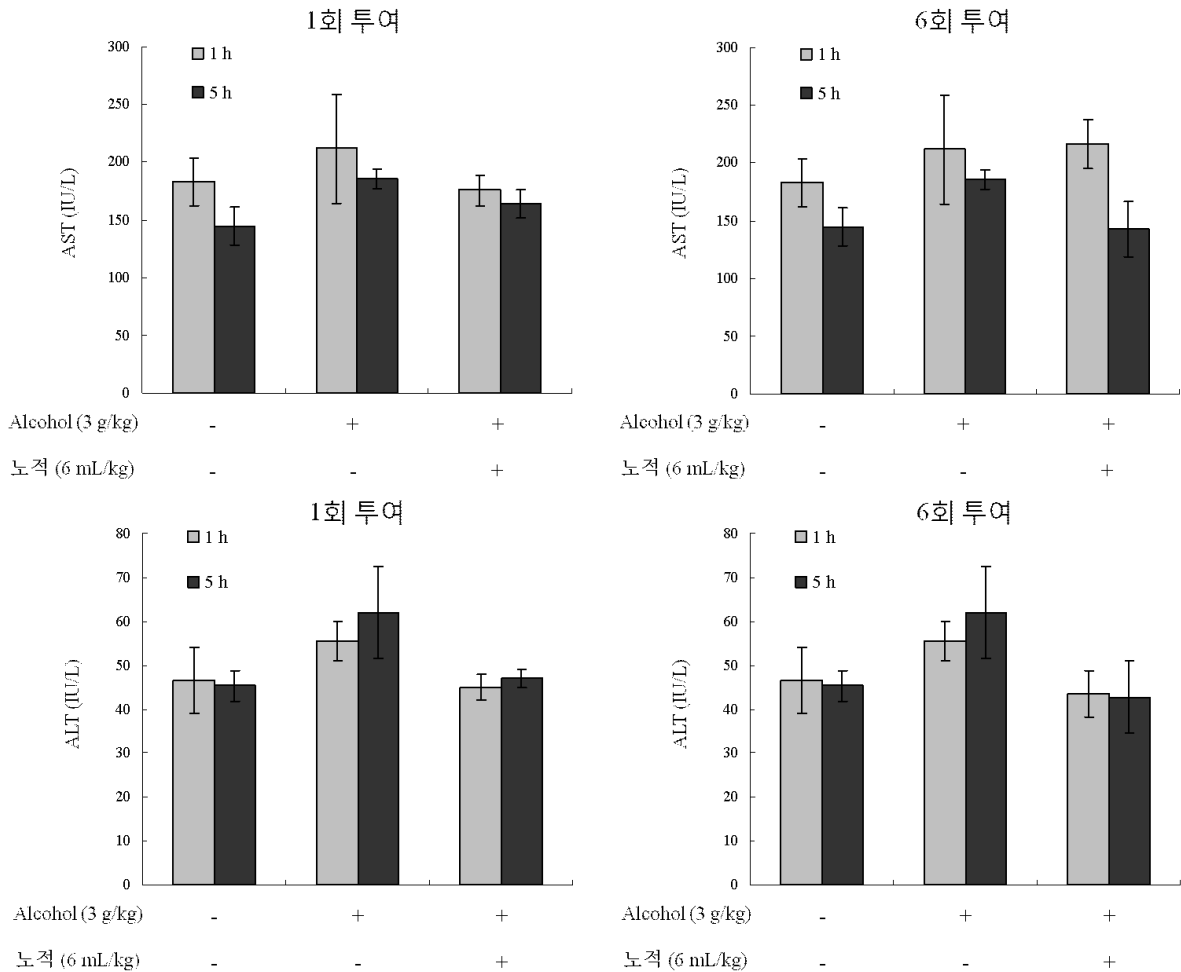


그림2-27. 알코올 투여된 Sprague-Dawley Rat에서 혈액내 AST, ALT에 시제품 노적이 미치는 영향

(다) Sprague-Dawley Rat에 알코올을 투여하였을 경우 혈액내에 AST와 ALT levels이 증가하였지만 시제품 노적을 1일간 1회 또는 6일간 6회 투여할 경우 다시 복원되는 것을 확인하였다.

(6) HepG2 cell에서 cyanidin 3-glucoside(C3G)의 항산화 효능 평가

(가) HepG2 세포에 H₂O₂를 처리하였을 경우 세포사멸 활성인자(apoptosis activator)인 caspase-3의 protein levels이 증가하였지만, cyanidin 3-glucoside(C3G)를 전 처리하였을 경우 caspase-3의 protein levels이 감소하는 것을 확인하였다. 또한, HepG2 세포에 H₂O₂를 처리하였을 경우 세포내 ROS 생성율이 크게 증가하였지만 cyanidin 3-glucoside(C3G)를 전 처리하였을 경우 농도 의존적으로 ROS 생성율이 감소하는 것을 확인하였다.

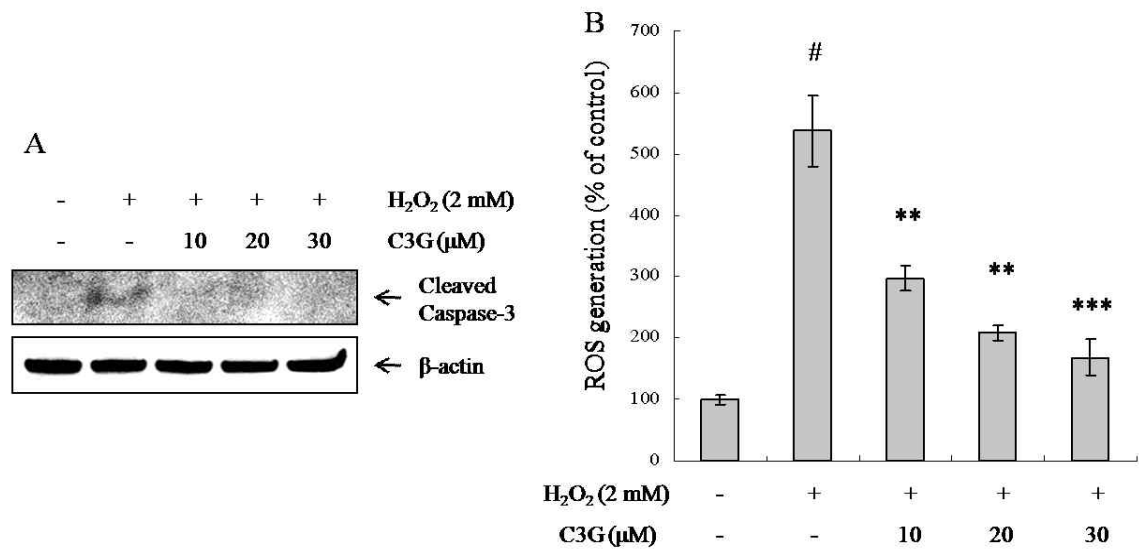


그림2-28. H_2O_2 처리된 HepG2 세포에서 cyanidin 3-glucoside(C3G)의 caspase-3 activation 억제 효능 및 intracellular ROS 소거 활성

(나) HepG2 세포에 H_2O_2 를 처리하였을 경우 DNA 손상의 지표인 tail moment가 급격히 증가하였지만, cyanidin 3-glucoside(C3G)를 전 처리하였을 경우 농도 의존적으로 tail moment가 감소하는 것을 확인하였다.

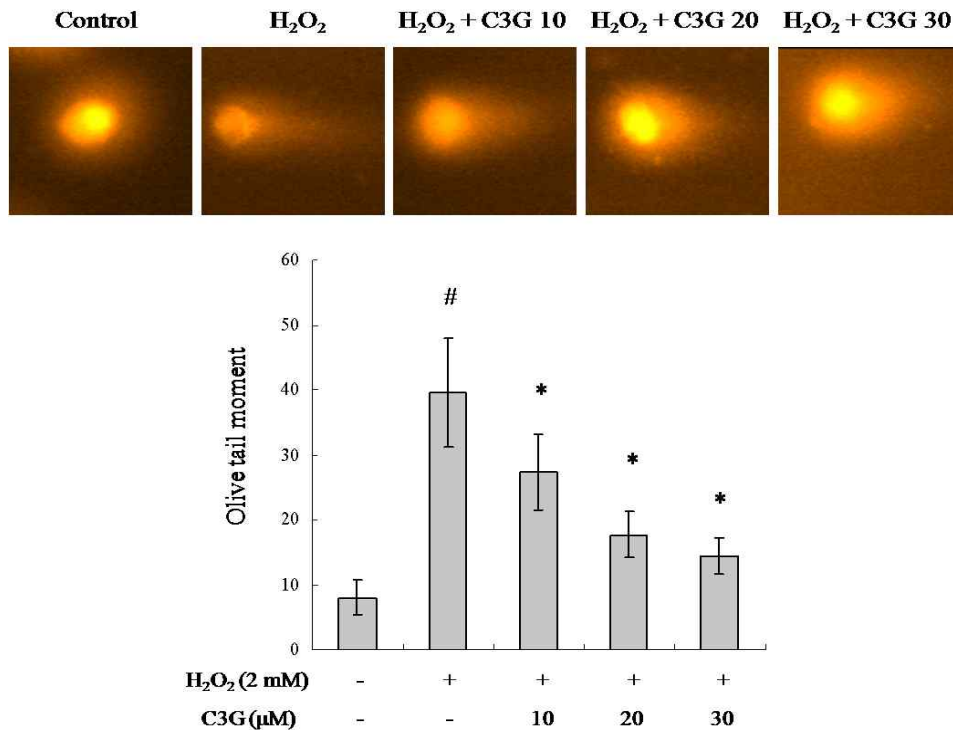


그림2-29. H_2O_2 처리된 HepG2 세포에서 cyanidin 3-glucoside(C3G)의 DNA 손상 억제 효능

(다) HepG2 세포에 H_2O_2 를 처리하였을 경우 항산화효소 SOD와 CAT의 활성이 감소하였지만, cyanidin 3-glucoside(C3G)를 전 처리하였을 경우 감소된 효소 활성이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다.

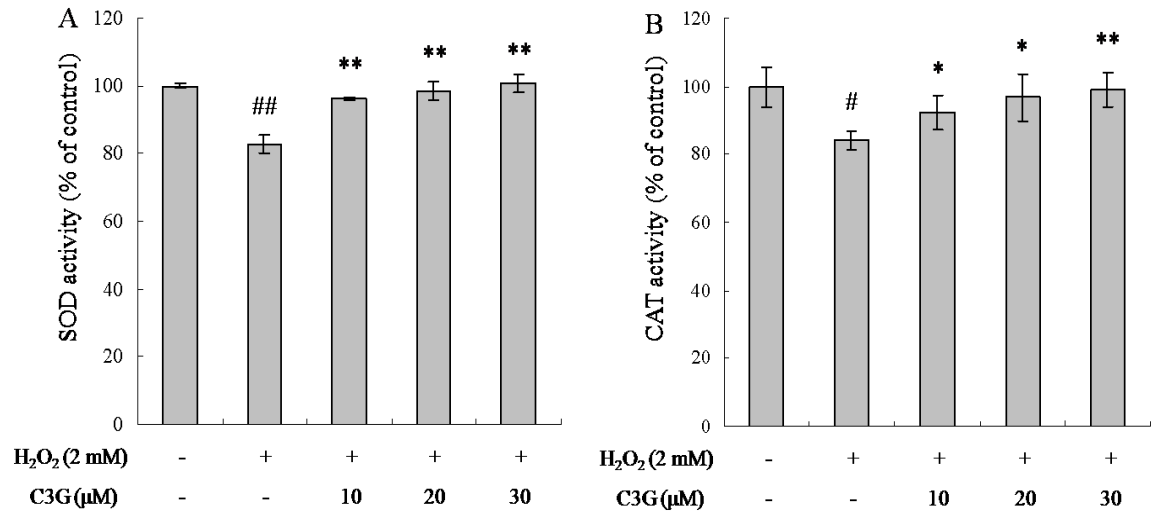


그림2-30. H₂O₂ 처리된 HepG2 세포에서 항산화 효소 활성화에 대한 cyanidin 3-glucoside(C3G)의 효능

(8) 산화적 스트레스 동물모델에서 C3G의 항산화 효능 평가

(가) Balb/c mice에 CCl₄를 투여하였을 경우 간 손상 지표인 AST와 ALT levels이 혈액 내에서 급격히 증가하였지만, CCl₄ 투여 전에 미리 C3G를 투여하였을 경우 AST와 ALT levels이 현저히 감소하는 것을 확인하였다.

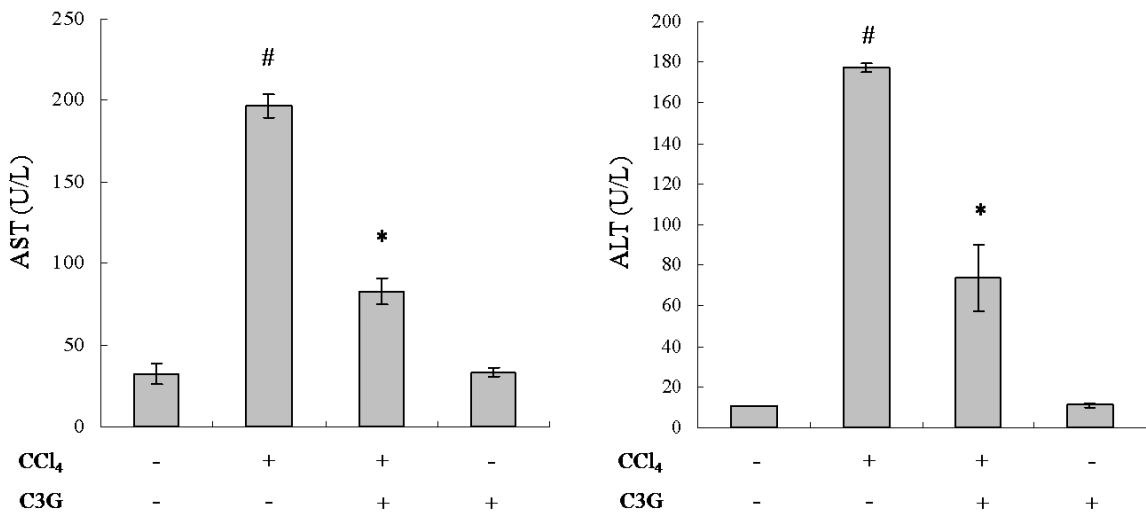


그림2-31. CCl₄ 투여된 Balb/c mice에서 혈액내 AST와 ALT에 C3G가 미치는 영향

(나) Balb/c mice에 CCl₄를 투여하였을 경우 DNA 손상의 지표인 tail moment가 급격히 증가하였지만, CCl₄ 투여 전에 미리 C3G를 투여하였을 경우 tail moment가 감소하는 것을 확인하였다. 또한, Balb/c mice에 CCl₄를 투여하였을 경우 DNA 손상의 지표 단백질인 γ-H2AX의 발현양이 증가하였지만, CCl₄ 투여 전에 미리 C3G를 투여하였을 경우 γ-H2AX의 발현양이 감소하는 것을 확인하였다.

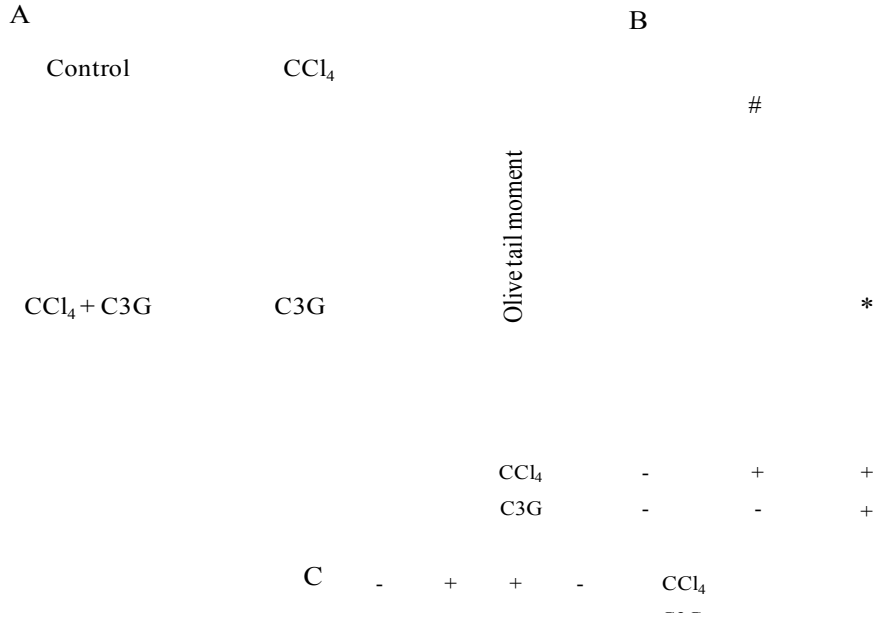


그림2-32. CCl₄ 투여된 Balb/c mice에서 DNA 손상에 C3G가 미치는 영향

(다) Balb/c mice에 CCl₄를 투여하였을 경우 산화 손상의 지표인 Malondialdehyde (MDA) 농도가 급격히 증가하였지만, CCl₄ 투여 전에 미리 C3G를 투여하였을 경우 증가한 MDA 농도가 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 또한, Balb/c mice에 CCl₄를 투여하였을 경우 간독성이 유발되어 염증세포의 침윤과 간세포의 괴사 및 세포자멸사가 관찰되었지만, CCl₄ 투여 전에 미리 C3G를 투여하였을 경우 간손상이 회복되는 것을 확인하였다.

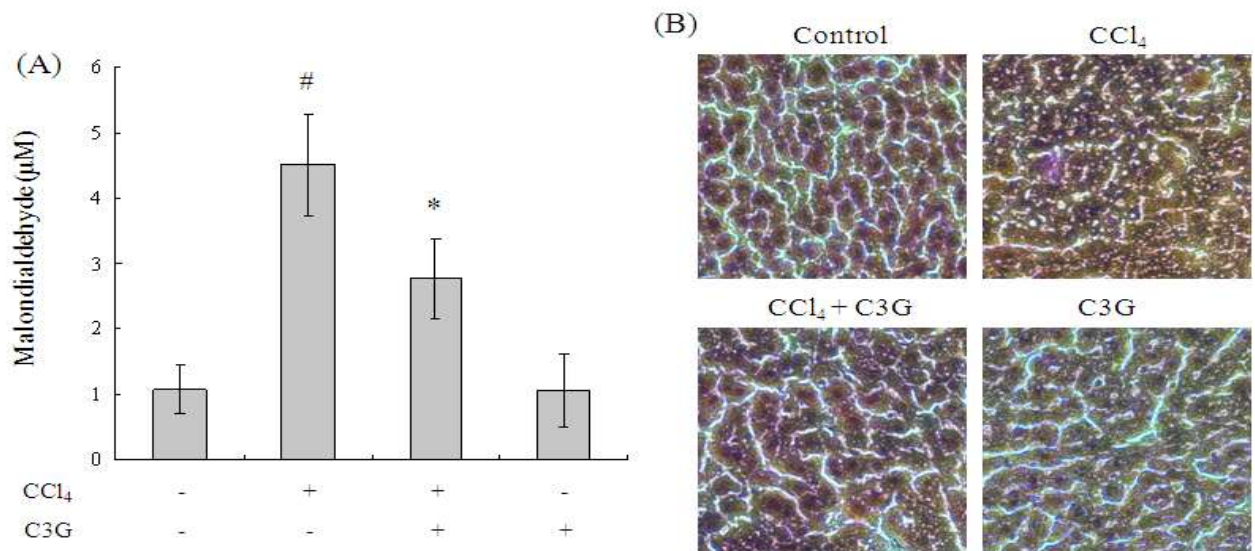


그림2-33. CCl₄ 투여된 Balb/c mice에서 지질과산화(A) 및 조직학적 변화(B)에 C3G가 미치는 영향

(라) Balb/c mice에 CCl₄를 투여하였을 경우 간독성이 유발되어 항산화 효소의 활성이 감소하는 것을 확인하였다. 이렇게 감소된 항산화 효소(SOD, CAT, GPx, GR) 활성 모두 C3G를 투여하였을 경우 감소된 효소 활성이 회복되는 것을 확인하였다. 따라서 C3G의 경우 산화적 손상 유발 동물모델에서 항산화 효능을 나타냄을 확인할 수 있었다.

OD activity (% of control)

그림2-34. CCl₄ 투여된 Balb/c mice에서 항산화 효소 활성에 C3G가 미치는 영향

제3절 제3세부 돌연변이 기술이용 우수 브랜드 장류 및 나물용 콩 신제품 개발 및 실용화(한국원자력연구원 김진백)

1. 유망돌연변이 콩신제품의 품종보호권 출원, 등록 및 국가품종목록등재 신청

가. 연구개발 수행 내용 및 실험 방법

(1) 밥밀용/장류용 콩 신제품 “원율”

(가) 육성 경위: 재래종 360-22계통에 감마선 250 Gy를 조사하여 선발한 돌연변이 후대. 장류용으로 주로 이용되는 재래종 360-22계통이 미이라병에 약하여 미이라병 내병성 선발을 통한 안정적인 수량 확보가 가능한 계통 선발을 육종방향으로 설정. 육종 과정에서 수량성이 좋으면서 종피색이 변한 원율콩을 최종적으로 선발함.

(나) 수량검정 시험: 밥밀용 대조구 품종으로 주로 이용되는 일품검정 및 태광콩과의 농업형질 비교를 위하여 충남예산 농업기술원 포장과 정읍 방사선 육종 시험장 포장에서 2004년도부터 수량 검정 시험을 실시.

(2) 밥밀용/청국장용 콩 신품종 “원현”

(가) 육성경위 - 1989년 팔달콩에 감마선 300Gy를 조사하여 선발한 돌연변이 후대. 2002년 수량이 우수한 20 계통 선발, 20계통중 수량성이 우수한 PD 900-326 계통을 최종 선발함.

(나) 수량검정시험: 2006년부터 2009년까지 4년간 정읍 및 충남(예산) 지역에서 수량검정 시험을 수행

(3) 밥밀용/청국장용 콩 신품종 “조생서리2호” 품종 출원 완료

(가) 육성경위 - 재래 수집종 중 서리태로 사용되고 있는 서리콩(94서리)에 감마선 250 Gy를 조사하여 선발한 돌연변이 후대로 성숙기를 빠르게 하여 수량성을 높이고자 선발을 하였고 그중 우수한 계통인 94서-112 (조생서리2호)를 최종 선발함.

(나) 수량검정시험: 2006년부터 2009년까지 4년간 정읍 및 충남(예산) 지역에서 수량검정 시험을 수행

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) 밥밀용/장류용 콩 신품종 “원울” 품종보호권출원, 등록 및 국가품종목록등재 신청

(가) 출원일: 2009년 11월 30일

(나) 품종출원번호: 10-2009-000473

(다) 국가품종목록등재번호: 20-2009-000031

(라) 등록일: 2012년 7월 11일

(마) 등록번호: 4087호

(바) 주요 특징: 재래종 360-22계통이 미이라병에 취약하여 미이라병 저항성 선발을 통한 안정적인 수량 확보가 가능한 계통 선발을 육종방향으로 설정. 종피색이 노란색에서 갈색으로 변했으며, 원래 재래종(360-22)의 장류용과 더불어 밥밀용으로도 이용가능성이 있음.



그림3-1. 왼쪽-360-22 (원품종)과 오른쪽-원울(출원 품종) 종자

표3-1. 재래종 360-22(원품종)과 원울콩의 농업형질 비교

Line No.	Stem Color	Flower Color	Period of Flowering	Period of Maturity	100 seeds weight (g)	Yield (Kg/1ha)	Seed coat	비고
----------	------------	--------------	---------------------	--------------------	----------------------	----------------	-----------	----

			(day)	(day)			color	
360-22 (control)	G	W	50	126	18.3	2470	Y	원품종
원율콩	P	P	68.5	148	28.2	1870	Br	밥밀용 /장류용
일품검정	P	P			28.4	1770	Bl	밥밀용 대조
태광콩	P	P			23.1	1840	Y	장류용 대조

(2) 밥밀용/청국장용 콩 신품종 “원현” 품종보호권출원, 등록 및 국가품종목록등재 신청

(가) 출원일: 2011년 4월 30일

(나) 품종출원번호: 10-2011-000302

(다) 국가품종목록등재번호: 20-2011-000018

(라) 등록일: 2012년 12월 27일

(마) 등록번호: 제 4278호

(바) 주요 특징: 팔달에 제색이 진하여 이를 제거하고자 육종방향을 설정하여 후대 전개를 하던 중에 종피색이 검정색으로 변했으며, 종자 크기가 커지고 안정적인 수량 확보가 가능한 계통 확보함. 종피색이 노란색에서 검정색으로 변했으며, 수량이 우수하여 밥밀용/청국장용 콩으로 사용가능할 것으로 사료됨.



그림3-2. 왼쪽-원품종(팔달)과 오른쪽-원현(출원 품종)

표3-2. 팔달(원품종)과 원현의 농업형질 비교

Line No.	Stem Color	Flower Color	Period of Flowering (day)	Period of Maturity (day)	100 seeds weight (g)	Yield (Kg/1ha)	Seed coat color
팔달	P	P	52.0	128.0	14.5	1545	Y
원현	P	P	70.0	150.0	25.4	1875	Bl

(3) 밥밀용/청국장용 콩 신품종 “조생서리2호” 품종보호권 출원

(가) 출원일: 2012년 6월 15일

(나) 품종출원번호: 10-2012-000393

(다) 주요 특징: 원품종 서리태에 비해서 개화기가 16일 정도 빨라졌으며, 백립종이 원품종

서리태(34.2 g) 보다 8 g정도 작은 중립종에 해당함. 종자는 원품종에 비해 작아졌으며 수확기가 빨라져 밥밑용콩으로 큰 콩을 선호하지 않는 사람들을 대상으로 이용 가능성이 원 품종보다 높을 것으로 생각되며, 일반 서리태에 비해서 30일 가량 수확시기가 빨라 안정적인 수량 확보가 가능할 것이라 사료됨.



그림3-3. 왼쪽-원품종 (서리태)과 오른쪽-조생서리 2호(출원 품종) 종자

표3-3. 서리태(원품종)와 조생서리 2호의 농업형질 비교

Line No.	Stem Color	Flower Color	Period of Flowering (day)	Period of Maturity (day)	100 seeds weight (g)	Yield (Kg/1ha)	Seed coat color
서리태	P	P	65	149	34.2	63.4	Bl
조생서리 2호	P	P	53	133	26.6	113.8	Bl

2. 우수 장류용 콩 예비 품종 후보군의 선발, 일반성분분석 및 대량증식

가. 연구개발 수행 내용 및 실험 방법

(1) 장류 적합 돌연변이 계통 Pre-screening

- (가) 선발 기준: 보관 육성중인 돌연변이 후대 계통들 중에서 종피색이 노란색이면서 종자의 크기가 비교적 큰 계통(백립중 25g 이상)을 위주로 선발
- (나) 계통 선발: 백운 유래 계통, 황금 유래 계통을 후보군으로 선정

(2) 황금 유래 계통 성분 분석

- (가) 황금콩은 단백질 함량이 우수하여 예로부터 장류용 콩으로 각광을 받아왔음
- (나) 선발 계통: 황금콩 유래 후대 9계통(#22, #38, #58, #78, #144, #165, #219, #328, #343)
- (다) 일반성분분석: 한국기능성 식품연구원과 연계 조단백, 조지방, 회분, 조섬유, Isoflavon 함량을 측정

(3) 장류용 콩 유망계통의 농업형질 조사: 콩 수량 구성요소인 초장, 마디수, 분지수, 꼬투리수 및 백립중을 조사하고 수량은 3열 (3.6 m²)를 측정한 후 10a로 환산하여 예측

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) 장류 적합 돌연변이 계통 Pre-screening

(가) 백운 품종 유래 돌연변이 계통

- ① 육성 경위- 1988년 백운콩에 감마선 300Gy를 조사하여 선발한 돌연변이 후대. 유망 10 계통 중 수량성을 기준으로 최종적으로 백운-2과 백운-3 등의 2계통 선발함
- ② 특징 - 2계통 모두 수량성이 우수하고 100립중이 20g내외이며, 노란색의 종피색을 가지고 있어 장류용으로 사용하기 적합

(나) 황금 품종 유래 돌연변이 계통

- ① 육성 경위 - 1997년 황금콩에 감마선 250 Gy를 조사하여 선발한 돌연변이 후대. 방사선 육종 시험농장 포장에서 농업형질 우수한 58계통을 1차적으로 선발하고 이 중에서 종자의 색깔 및 크기 등을 고려하여 최종적으로 9계통을 선발함
- ② 특징 - 황금콩은 우리나라에서 장류용 콩으로 선호되는 품종으로 황금-25-328계통은 황금(control)과 수량은 비슷하거나 조금 떨어지지만 포장이 습해도 생육이 왕성한 특성을 가짐. 따라서 추후 수량검정 및 지역적응 시험을 통한 논재배용 콩 품종 활용성 검토 예정

표3-4. 장류용 유망 예비 선발 계통의 농업형질

Line No.	Stem Color	Flower Color	Period of Flowering (day)	Period of Maturity (day)	100 seeds weight (g)	Yield (Kg/1ha)	Seed coat color
백운(control)	P	P	54.0	137.0	19.8	1393.0	Y
백운-2	P	P	53.8	137.0	17.8	1582.0	Y
백운-3	G	W	52.3	137.0	21.4	1546.2	Y
황금	P	P	54.3	128.8	24.3	2000.9	Y
황금 25-22	P	P	53.8	129.0	24.2	1802.4	Y
황금 25-38	P	P	53.8	129.0	25.3	1444.3	Y
황금 25-58	P	P	53.8	129.0	25.8	1343.1	Y
황금 25-78	P	P	53.3	127.0	24.6	2419.4	Y
황금 25-144	P	P	54.0	128.8	21.4	2143.0	Y
황금 25-165	P	P	53.0	127.8	19.5	2606.5	Y
황금 25-219	P	P	53.5	130.3	21.1	1716.5	Y
황금 25-328	P	P	53.5	128.5	23.8	1821.5	Y
황금 25-343	P	P	53.5	128.5	21.3	2580.9	Y



그림3-4. (좌) 황금(control)과 (우) 황금-25-328의 발 생육모습

(2) 황금 유래 계통의 일반 성분 분석

: 황금콩 유래 계통 중에서 단백질 함량이 control에 비해 증가된 계통(25-58 & 25-144), 아이소플라본 함량이 증가된 계통(25-38 & 25-328)들을 일반성분 분석을 통해서 확인할 수 있었음

표3-5. 황금 control과 후대 돌연변이 계통의 원료콩 일반성분분석 결과

계통명	조단백질 (%)	조지방 (%)	회분 (%)	조섬유 (%)	아이소플라본(mg/g) [Genistein, Daidzein, Glycitain]
황금 control	37.22	12.59	5.13	3.82	0.31
황금 25-22	38.45	13.11	5.04	3.96	0.26
황금 25-38	36.61	14.18	5.02	4.24	0.47
황금 25-58	40.19	13.39	5.13	5.26	0.29
황금 25-78	37.03	12.53	5.08	4.75	0.42
황금 25-144	40.08	14.07	5.09	5.13	0.37
황금 25-165	35.92	15	4.96	3.55	0.42
황금 25-219	39.07	13.84	5.22	3.59	0.3
황금 25-328	38.2	13.54	5.17	4.19	0.49
황금 25-343	37.59	14.2	5.45	4.89	0.35

(3) 장류용 유망계통의 포장 대량증식

: 순창장류 연구소와 연계하여 표준화된 장류의 제조 및 유용 성분 분석을 위해 8kg 원료콩 확보가 필요함. 이를 위해 방사선육종시험장 포장에서 대량 증식을 통해 차기년도 된장 제조 및 유용성분 분석 예정

3. 청국장용 콩 유망 예비계통 원료콩 성분분석 및 청국장 제조 및 관련 성분분석

가. 연구개발 수행 내용 및 실험 방법

- (1) 선발 계통 : 서리태(재래종)에 250 Gy를 조사하여 숙기가 빨라진 돌연변이 2계통(조생서리, 조생서리2호)과 서목태로 알려진 523-7계통(재래 수집종)을 대조구 사용
- (2) 서리태를 이용한 청국장 제조가 항산화 효과가 높다는 연구보고에 착안하여 서리태 후대 돌연변이 계통을 이용하여 순창장류 연구소와 연계 표준화된 청국장 제조 후의 성분을 비교
- (3) 분석 성분: 조단백, 조지방, 회분, 조섬유, Isoflavon 등의 일반 성분 분석
- (4) 청국장 제조 : 콩 2kg을 품종별로 각각 3회 수세한 후 상온(실험실)에서 15시간 침지하여 물을 뺀 다음 500g유리용기에 400g씩 넣어 멸균포로 밀봉한 후 121℃에서 15분간 증자함. 증자한 콩에 18시간 배양(35℃, 200rpm)한 Bacillus licheniformis SCC125037을 흡광도 0.16로 희석한 후 콩무게의 1%접종함. 접종한 증자 콩을 40℃, RH90%에서 24시간 발효시킴.

나. 연구개발 결과 및 고찰

- (1) 계통 선발의 이유 - 재래종 서리태 유래 계통은 종자 내에 안토시아닌, 레시틴 등의 기능성 물질이 일반 품종에 비해 많이 포함되어 있어 관련 연구가 많이 진행되고 있음. 이에 서리태 후대 2계통(조생서리, 조생서리 2호)과 검은콩으로 많이 사용되는 523-7계통을 대조구로 하여 원료콩에 대한 일반성분분석 (조단백, 조지방, 회분, 조섬유, Isoflavon)을 수행
- (2) 원료콩의 일반 성분 분석 결과: 재래종 서리태의 경우 아이소플라본 함량이 높게 나타났으며, 그 이외의 돌연변이 계통들에서 특별히 우수한 성분상의 차이점은 발견되지 않음.

표3-6. 청국장 재료 콩 돌연변이 계통의 원료콩 일반성분분석 결과

계통명	조단백질 (%)	조지방 (%)	회분 (%)	조섬유 (%)	아이소플라본(mg/g) [Genistein, Daidzein, Glycitain]
재래종 서리태	35.81	12.38	4.43	3.83	0.85
조생서리	34.7	12.65	4.97	4.04	0.49
112계통	38.07	15.73	4.87	3.96	0.61
523-7	37.96	12.17	5.7	4.07	0.49

- (3) 청국장의 유용 성분분석 결과: 청국장 일반 성분 분석 결과의 값을 비교하여 하나의 품종을 선별하기는 어려움이 있음. 기능성 측면인 아이소플라본이나 DPPH 분석을 통한 항산화 제거능을 보았을 때에는 재래종 서리태나 523-7 계통이 우수하며, 돌연변이 품종에 대한 특별한 우수한 점을 발견하기 어려움. 다만 청국장의 관능평가 기호도로는 조생서리 2호가 우수하게 나타남. 원료콩과 청국장 제조 후 성분분석의 경우 별다른 차이점을 발견할 수 없었으며, 원료콩의 Isoflavon함량이 높았던 재래종 서리태가 청국장 제조 후에도 그 함량이 높게 나타남. 장류 제조과정을 거치면서도 큰 함량 차이가 없다는 것은 좋은 원료콩 확보가 결국 경쟁력있는 장류 제조에 중요한 요소일 것으로 사료됨.

표3-7. 콩 품종에 따른 청국장의 pH, 아미노산성질소, 총질소, 효소활성도, Isoflavon, DPPH radical 소거능

계통명	pH	아미노산질소(mg%)	프로테아제활성도 (unit/g)	아밀라아제활성도 (unit/g)	총질소 (%)	Isoflavon		DPPH (%)
						genistein (mg/kg)	daidzein (mg/kg)	
재래종 서리태	7.44	308.86	23.13	0.28	7.52	2,686.88	600.83	65.78
조생서리	7.52	277.43	22.15	0.31	7.65	1,111.87	242.85	65.78
112계통	7.60	272.96	23.19	0.12	7.58	1,890.62	378.33	59.14
523-7	7.48	326.02	16.76	0.12	8.05	1,383.88	101.41	74.55

표3-8. 콩 품종에 따른 청국장의 유리당 함량 (단위 : mg/kg)

계통명	Fructose	glucose	maltose	total
조생서리	2014.14	1851.06	340.44	4205.65
재래종 서리태	3064.70	2217.10	799.64	6081.44
112계통	2651.96	2048.67	72.90	4773.52
523-7	5234.57	3179.15	0.00	8413.72

표3-9. 콩품종에 따른 청국장의 유기산 함량 (단위 : mg/kg)

계통명	citric acid	malic acid	lactic acid	formic acid	acetic acid
조생서리	1,025.85	17,692.11	2,385.60	1,374.98	-
재래종 서리태	923.24	13,130.13	2,155.59	1,324.23	62.62
112계통	656.78	14,299.95	1,010.55	1,038.48	-
523-7	2,522.68	11,789.50	2,543.86	2,973.37	363.12

4. 장류 적합성 신품종 개발을 위한 장류 제조, 관련 성분분석 및 식미테스트

가. 연구개발 수행 내용 및 실험 방법

- (1) 장류 적합성 검사를 위하여 돌연변이 8계통(황금콩 후대 6계통, 백운 유래 2계통 등 된장 제조를 위해 필요한 8kg의 원료콩 공급이 가능했던 계통)에 대한 된장 제조 및 성분 분석 수행
- (2) 된장 제조: 상온에서 15시간 침 지한 후 20분간 물을 뺀 다음 121℃에서 20분간 증자 하였다. 증자한 콩을 40℃로 냉각한 다음 0.1% 황국균(*Aspergillus oryzae*) 접종하여 RH 90%, 30℃에서 24시간 발효 후 콩알매주는 60℃에서 24시간 건조하여 실험에 사용함 (순창장류 연구소와 연계 표준화된 콩알 매주 방법)

표3-10. 된장 제조시 원료 배합비율

원료명	배합량
매주	3.94
소금	1.49
물	3.94
합계	9.37

- (3) 제조된장의 유용 성분분석: 발효 후 0, 2, 4, 6, 8 주의 간격으로 시료를 채취하여 이화학 분석 (아미노산성 질소함량, pH, 적정산도), 유리당, 유리아미노산 함량을 측정함.
- (4) 숙성 제조 된장의 항산화 활성도 측정 : DPPH를 이용하여 라디칼 소거능 측정함. 된장 0.5 g을 80% 에탄올에 추출한 추출물을 4 x 10⁻⁴M DPPH 용액과 반응시켜서 520 nm에서 흡광도를 측정.
- (5) 숙성 제조 된장의 관능평가
 - (가) 제조된 된장을 1년 숙성시킨 시료를 대상으로 관능평가 실시

(나) 본 연구에서 돌연변이 후대 품종으로 제조한 된장의 관능 조사를 위하여 1년간 숙성된 된장을 20대, 30대, 40대, 50대, 60대 이상의 다양한 연령대의 관능평가 요원을 대상으로 색, 냄새, 맛, 전반적인 기호도 등의 4가지 기준으로 관능평가를 실시함.

(다) 9점등급제(9 point hedonic scale)에 따른 평가: 해당항목의 관능평가 결과 좋은 경우는 6~9점, 싫은 경우는 1~4점, 중간을 5점으로 산정 평가함.

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) 제조 된장의 성분 분석 결과

(가) 아미노산성질소는 모든 계통이 대조군과 비교하여 높게 나타남. 특히 백운 3 계통에서 646.10mg%로 가장 높은 값을 나타냄.

표3-11. 발효기간에 따른 아미노산성질소 함량변화 (mg%)

계통명	0주	2주	4주	6주	8주
대조군	103.04	175.93	284.20	334.37	381.15
백운con	163.33	390.6	500.5	661.5	557.43
백운2	142.33	295.4	433.07	588.7	520.33
백운3	147.23	367.73	595.9	754.37	646.10
황금con	136.5	351.05	460.13	619.5	566.3
황금25-22	195.53	377.3	545.3	745.85	617.4
황금25-78	135.33	350.7	498.4	572.37	535.97
황금25-144	143.73	347.9	490.7	554.4	619.5
황금25-165	142.57	387.8	496.3	626.27	438.9
황금25-219	132.07	318.27	490	488.83	575.17
황금25-343	174.07	381.03	512.87	585.43	602.7

(나) pH 및 적정산도는 된장의 염도와 신맛에 관여한다고 알려져 있으며, pH는 돌연변이 후대모든 계통에서 대체적으로 대조군보다 높은 값을 보였으며, 적정산도의 경우도 대체적으로 대조군에 비해 높은 값을 나타냄. 이는 된장의 숙성이 빨리 진행되어 유기산의 함량이 높아진 이유 때문인 것으로 추정됨.

표3-12. 발효기간에 따른 pH변화

계통명	0주	2주	4주	6주	8주
대조군	5.81	5.87	5.63	5.56	5.50
백운con	6.14	6.14	5.94	5.85	5.77
백운2	6.15	6.14	6.13	6.02	5.87
백운3	6.11	6.18	6.08	5.94	5.96
황금con	6.35	6.21	6.07	6.06	5.93

황금25-22	6.34	6.33	6.29	6.21	6.25
황금25-78	6.21	6.14	6.05	5.89	5.77
황금25-144	6.28	6.31	6.23	6.08	6.07
황금25-165	6.13	6.03	6.05	5.91	5.79
황금25-219	6.07	6.11	5.92	5.81	5.74
황금25-343	6.33	6.2	6.14	6.05	5.88

표3-13. 발효기간에 따른 적정산도변화

계통명	0주	2주	4주	6주	8주
대조군	7.91	8.23	9.21	9.8	11.58
백운con	11.5	11.51	13.06	14.23	15.33
백운2	7.78	8.13	9.33	11.01	11.34
백운3	10.89	10.72	12.42	13.8	17.3
황금con	8.48	10.31	11.21	12.98	15.00
황금25-22	9.79	9.45	11.11	12.03	13.11
황금25-78	9.21	9.68	11.72	13	14.65
황금25-144	9.5	9.96	10.99	11.38	15.01
황금25-165	9.45	10.34	11.44	12.8	15.06
황금25-219	9.79	10.38	12.3	13.15	15.2
황금25-343	8.27	12.19	12.5	14.44	16.23

(다) 된장의 색도 기호도와 관련이 있으며, Color Difference Meter를 이용하여 표준색판으로 보정 후 Hunter's Lab값 즉 명도(L), 적색도(a), 황색도(b) 등이 값을 측정. 대조군에 비해 돌연변이 후대 계통에서 전반적으로 밝은 적갈색을 나타냄.

표3-14. 발효기간에 따른 색도변화 -L(명도)

계통명	0주	2주	4주	6주	8주
대조군	47.55	47.21	44.65	42.34	38.65
백운con	41.46	38.95	37.89	37.45	31.98
백운2	42.68	41.45	39.73	38.63	35.90
백운3	42.79	41.09	40.79	38.84	36.05
황금con	42.73	40.54	39.41	39.00	37.16
황금25-22	44.53	43.52	41.77	40.33	37.65

황금25-78	42.72	40.50	40.47	39.54	35.76
황금25-144	41.41	39.80	39.50	38.46	35.04
황금25-165	44.17	42.99	41.04	38.78	37.81
황금25-219	43.71	41.99	39.83	39.17	36.71
황금25-343	43.41	42.43	38.81	38.33	34.72

표3-15. 발효기간에 따른 색도변화-a(적색도)

계통명	0주	2주	4주	6주	8주
대조군	3.23	3.81	5.03	5.58	6.05
백운 con	3.94	4.31	5.64	5.63	5.70
백운2	4.85	5.21	5.85	6.24	6.68
백운3	4.01	5.09	5.83	6.64	6.71
황금con	4.63	4.81	6.27	6.57	6.24
황금25-22	4.27	4.72	5.40	5.94	6.24
황금25-78	4.48	5.24	6.21	6.53	7.04
황금25-144	5.09	5.30	6.16	6.48	6.39
황금25-165	4.41	4.99	5.94	6.93	7.25
황금25-219	4.76	5.14	6.48	6.84	7.40
황금25-343	5.00	5.06	6.37	6.94	6.55

표3-16. 발효기간에 따른 색도변화-b(황색도)

계통명	0주	2주	4주	6주	8주
대조군	16.29	17.03	17.33	16.84	15.88
백운 con	12.94	13.82	14.59	14.33	13.02
백운2	12.97	12.80	14.55	14.78	14.80
백운3	14.05	14.38	15.45	16.02	15.09
황금con	13.83	14.58	14.75	14.77	14.66
황금25-22	14.04	15.45	14.56	15.06	15.05
황금25-78	13.74	14.58	15.06	15.24	15.05
황금25-144	13.67	14.00	14.50	15.44	13.61
황금25-165	14.49	15.19	15.61	15.52	15.53
황금25-219	14.76	15.26	15.13	15.71	15.87
황금25-343	14.53	15.71	15.07	15.72	13.66

(라) 유리당 HPLC를 이용하여 Fructose, Glucose, Sucrose, Maltose의 함량을 측정. 백운 후대 (백운2, 백운3)은 대조군에 비해 낮은 함량을 보였으며, 황금콩 후대 또한 #22 (2.36)을 제외하고 모두 낮은 함량을 보임.

표3-17. 발효기간에 따른 유리당 변화

계통명	0주	2주	4주	6주	8주
대조군	0.27	0.42	10.43	1.8	0.54
백운 con	0.74	0.36	9.74	3.35	0.99
백운2	0.22	0.18	7.6	0.86	0.29
백운3	0.22	0.18	4.97	0.72	0.15
황금con	0.18	0.17	5.1	1.85	2.15
황금25-22	0.13	0.16	4.73	1.87	2.36
황금25-78	0.21	0.19	6.16	2.94	0.25
황금25-144	0.13	0.21	3.69	0.14	0.29
황금25-165	0.26	0.13	6.6	0.18	0.48
황금25-219	0.22	0.17	3.84	0.12	0.35
황금25-343	0.14	0.22	0.33	2.88	0.21

(마) 된장의 아미노산 함량은 된장 제조 직후(0일)에 측정을 하고 발효 후 8주째에 함량의 변화를 측정. 총 아미노산 함량은 대조군보다 모든 계통이 높았으며 백운3 (0일, 33.6 g/L; 8주차, 46.2g/L)로 가장 높은 수치를 보임. 지미(맛난맛)에 관련된 Glutamic acid는 대조군에 비해 0일에는 2.3 (백운2) ~ 4.1 (백운3)배 높게 나타났으며 8주차에는 2.2 (백운2) ~ 3.4 (백운3)배 높은 수치를 나타냄.

표3-18. 콩품종에 따른 된장의 아미노산함량 (0일)

Amino acids	대조구	백운	백운2	백운3	황금	#22	#78	#144	#165	#219	#343
P-ser	0.11	0.28	0.27	0.23	0.20	0.27	0.19	0.27	0.25	0.18	0.21
Asp	0.64	1.51	0.86	1.55	1.26	1.31	1.18	0.95	1.42	1.03	1.39
Thr	0.44	1.18	0.77	1.12	0.94	1.06	0.98	0.89	1.18	0.82	1.04
Ser	0.61	1.56	1.02	1.54	1.28	1.50	1.42	1.26	1.56	1.12	1.45
Glu	1.52	4.89	3.56	6.28	4.66	4.31	4.19	4.01	5.49	4.17	5.07
a-AAA	0.11	0.37	0.18	0.46	0.31	0.24	0.30	0.31	0.30	0.23	0.40
Pro	-	0.95	0.46	0.77	0.50	0.34	0.47	0.22	0.78	0.59	0.51
Gly	0.25	0.60	0.42	0.64	0.58	0.72	0.56	0.55	0.63	0.46	0.64
Ala	0.77	1.67	1.25	1.70	1.56	1.75	1.52	1.33	1.75	1.31	1.64
Cit	0.69	0.32	1.24	-	0.44	2.92	1.63	2.12	1.07	0.67	1.04

a-ABA	-	0.09	0.22	0.20	0.30	0.23	0.26	-	0.24	0.21	0.33
Val	0.88	2.00	1.40	1.71	1.39	1.61	1.44	1.61	1.66	1.26	1.52
Cys	0.13	0.39	0.37	0.53	0.50	0.34	0.39	-	0.49	0.44	0.55
Met	0.20	0.81	0.61	0.76	0.59	0.69	0.64	0.61	0.79	0.62	0.70
Cysthi	-	0.27	0.31	0.35	0.27	0.27	0.26	0.31	0.32	0.31	0.34
Ile	0.51	0.24	0.25	0.34	0.29	1.65	1.47	0.30	0.27	0.25	1.70
Leu	0.94	3.17	2.02	3.29	2.40	2.58	2.47	2.55	3.00	2.29	2.90
Tyr	0.54	1.71	1.30	1.90	1.31	1.33	1.25	1.46	1.88	1.39	1.73
Phe	0.74	2.38	1.69	2.63	1.80	1.86	1.86	2.16	2.46	1.89	2.42
b-Ala	0.08	0.13	0.10	0.08	0.06	-	0.07	-	0.09	0.08	0.07
b-AiBA	0.15	0.49	0.34	0.48	0.38	0.20	0.39	0.18	0.44	0.35	0.45
g-ABA	0.14	0.12	-	0.07	-	-	-	-	-	-	-
EOHNH2	0.05	0.09	0.07	0.10	0.09	0.10	0.08	0.03	0.09	0.07	0.09
NH3	1.41	2.00	2.01	2.38	1.96	2.86	2.23	2.53	2.21	1.85	2.45
Orn	0.13	0.15	0.13	0.16	0.14	0.34	0.17	0.24	0.14	0.11	0.18
Lys	1.08	2.77	1.55	2.53	1.87	2.30	1.99	1.90	2.31	1.76	2.11
1Mehis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
His	0.26	0.68	0.36	0.63	0.47	0.55	0.51	0.43	0.58	0.44	0.57
Ans	-	-	-	0.56	-	-	0.20	-	-	-	0.46
Arg	0.61	3.26	0.92	3.34	2.12	0.12	1.11	0.39	2.09	1.71	2.03
Totals	12.98	34.09	23.70	36.63	27.67	31.45	29.22	26.60	33.49	25.62	33.97

표3-19. 콩팥중에 따른 된장의 아미노산함량 (8주)

Amino acids	대조구	백운	백운2	백운3	황금	#22	#78	#144	#165	#219	#343
P-ser	0.12	0.17	0.20	0.21	0.18	0.22	0.19	0.20	0.19	0.18	0.21
Asp	1.22	2.67	1.83	3.01	2.60	2.97	2.51	1.98	2.77	2.42	3.16
Thr	0.73	1.70	1.20	1.74	1.56	1.87	1.61	1.38	1.77	1.51	1.85
Ser	0.99	2.25	1.74	2.48	2.22	2.67	2.28	2.06	2.34	2.09	2.58
Glu	2.75	7.46	5.95	9.39	7.89	8.40	7.61	6.70	8.67	8.19	9.10
a-AAA	0.24	0.59	0.39	0.68	0.60	0.57	0.53	0.48	0.53	0.53	0.74
Pro	0.64	1.56	0.97	1.49	1.16	1.00	1.16	0.57	1.53	1.44	1.28
Gly	0.40	0.87	0.59	0.99	0.91	1.21	0.88	0.87	1.01	0.85	1.05
Ala	1.07	2.17	1.61	2.39	2.23	2.54	2.21	1.99	2.37	2.14	2.51
Cit	0.93	0.34	1.79	-	0.65	3.68	2.00	2.48	1.43	0.85	1.24
a-ABA	-	-	-	-	-	-	-	-	0.23	-	-

Val	1.13	2.53	1.82	2.40	2.29	2.61	2.14	2.31	2.29	2.06	2.64
Cys	-	-	-	-	0.36	0.30	-	-	-	-	0.34
Met	0.26	0.12	-	0.77	0.21	0.18	0.65	0.23	0.78	0.68	0.21
Cysthi	-	0.94	0.75	0.08	0.09	0.20	0.06	0.25	0.05	0.07	0.09
Ile	0.92	0.13	0.12	0.19	0.18	0.29	0.15	0.27	0.11	0.14	0.21
Leu	1.76	4.19	1.73	2.54	3.94	4.25	3.92	3.82	4.14	3.88	4.55
Tyr	0.88	1.64	1.48	2.23	1.56	1.99	1.53	1.34	2.13	1.50	2.33
Phe	1.39	2.82	2.21	3.22	2.71	2.92	2.66	2.52	2.77	2.59	3.17
b-Ala	0.04	0.06	-	0.13	-	0.06	0.04	0.03	0.03	0.10	0.04
b-AiBA	0.19	0.31	0.23	0.44	0.28	0.23	0.30	0.18	0.27	0.36	0.35
g-ABA	0.14	0.14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EOH ₂ NH	-	-	-	-	-	0.09	-	-	-	-	0.06
NH ₃	1.43	2.24	2.26	2.66	2.51	3.79	2.73	2.89	2.55	2.42	3.05
Orn	0.13	0.01	0.17	0.03	0.01	0.83	0.23	0.43	0.13	0.12	0.19
Lys	1.71	3.46	2.48	3.53	2.98	3.71	3.08	2.75	3.22	2.98	3.44
1Mehis	0.42	0.86	0.61	0.91	0.77	0.90	0.78	0.65	0.82	0.75	0.92
His	1.10	3.95	1.32	4.67	3.45	0.23	1.89	0.79	2.78	3.13	3.59
Ans	20.58	43.19	31.47	46.16	41.36	47.72	41.13	37.18	44.94	40.97	40.97
Arg	0.61	3.26	0.92	3.34	2.12	0.12	1.11	0.39	2.09	1.71	2.03
Totals	12.98	34.09	23.70	36.63	27.67	31.45	29.22	26.60	33.49	25.62	33.97

(2) 숙성 제조 된장의 향산화활성도 검정

(가) 대조품중인 태광으로 제조한 된장에 비해 황금 및 백운 유래 돌연변이 계통들로 제조한 된장들이 향산화 능력이 높은 것을 확인

(나) 모품중인 황금 및 백운과 각 돌연변이 계통들 내에서는 향산화능력이 유의적 차이를 보이지 않음.

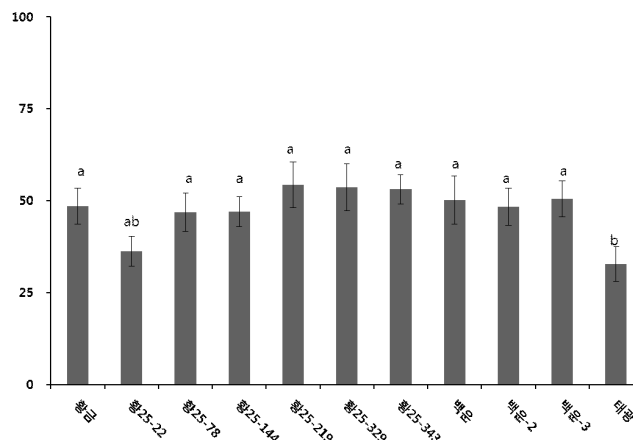


그림3-5. 장류 유망 콩 돌연변이 계통으로 제조된 된장의 향산화활성도 비교

(3) 숙성 제조 된장의 관능평가

(가) 백운 후대 계통에 대한 숙성된장의 관능평가 결과 백운3 계통이 전반적인 선호도 면에서 장류표준품종인 태광과 대조품종인 백운에 비해서 우수하게 나타났으나 평가요원들 개인 간의 선호도 편차가 심하게 나타나는 특징을 보였음.

(나) 황금 후대 계통에 대한 숙성된장의 관능평가 결과 대조품종인 황금이 전반적으로 우수한 선호도 양상을 나타냈으나, 황금25-343 계통이 전반적인 선호도 면에서 장류표준품종인 태광과 대조품종인 백운에 비해서 우수하게 나타났으며 평가요원들 개인 간의 선호도 편차도 크지 않은 특징을 보였음.

표3-20. 돌연변이 후대 제조 숙성 된장의 관능평가 결과 * 평균± 표준편차

	색	냄새	맛	전체적인 기호도
백운(대조구)	4.93±1.49	6.92±1.32	5.93±1.77	5.69±1.49
백운-2	5.46±1.92	5.14±2.48	5.46±1.94	5.13±1.68
백운-3	5.29±2.05	5.08±1.81	6.46±1.94	6.27±1.74
황금(대조구)	5.08±1.08	5.67±1.50	5.92±1.80	5.46±1.63
황금25-22	5.92±0.95	4.56±1.01	4.46±1.51	4.89±1.45
황금25-78	5.00±0.67	5.10±1.20	4.60±1.07	4.78±0.83
황금25-144	5.62±1.12	5.58±1.68	4.21±1.42	4.27±1.19
황금25-165	4.46±1.37	4.50±1.09	5.20±2.08	5.18±1.25
황금25-219	4.92±1.34	5.21±1.14	5.21±1.22	5.20±1.03
황금25-343	4.82±0.84	5.18±0.68	5.75±0.83	5.67±1.23
태광(장류표준품종)	5.71±1.67	5.42±0.54	4.86±1.02	4.78±1.05

5. 우수 나물용 콩 예비계통의 육안선발 및 선발계통의 발아실험을 통한 수율 조사

가. 연구개발 수행 내용 및 실험 방법

- (1) 콩나물 유망 계통 선발: 보관 육성중인 돌연변이 후대 계통들 중에서 종피색이 노란색이면서 제색이 없으며 종자의 크기가 비교적 작은 계통(백립종 15g미만)을 위주로 육안 선발
- (2) 1차 발아실험 및 수율조사: 정읍 산내면 소재의 콩나물 생산업체인 정산식품과 연계하여 수행. 콩나물로 이용가능한 돌연변이 예비계통(제색이 없고, 노란색 종피를 가진 종자)을 일차적으로 육안선발하여 원료콩 300g을 3시간 동안 물에 침지한 후 일주일 간 재배시험을 수행하고 수율을 조사함.
- (3) 2차 발아실험 및 수율조사: (주) 풀무원과 연계하여 수행. 원료콩 50g을 2시간 동안 물에 침지한 후 4~5일 간 재배시험을 수행하고 수율을 조사함.
- (4) 3차 종자외관 특성조사, 발아실험 및 수율조사: (주) CJ와 연계하여 수행. 원료콩 50g을 2시간 동안 물에 침지한 후 4~5일 간 재배시험을 수행하고 수율을 조사함.
- (5) 4차 발아실험 및 수율조사: 연구소 자체적으로 콩나물 새싹 발아기를 활용하여 2반복 수행. 원료콩 200g을 콩나물 발아기에 넣고 5일 간 재배시험을 수행하고 수율을 조사함

(6) 나물용 콩 유망계통의 농업형질 조사: 콩 수량 구성요소인 초장, 마디수, 분지수, 꼬투리 수 및 백립중을 조사하고 수량은 3열 (3.6 m²)를 측정한 후 10a로 환산하여 예측

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) 1차 발아실험 결과

- (가) 대상계통: 방사 후대 돌연변이계통 6계통(방사-#5, 11, 12, 13, 15, 16) 및 CB 27-15-52
- (나) 대상계통 선발 이유: 방사콩 유래 계통은 종자의 크기가 방사 control에 비해서 비교적 작고 100립중이 10g미만으로 나물용콩으로 이용 적합할 것으로 사료되며, CB 27-15-27계통은 하배축의 발달이 우수하여 찜용 콩나물 용도로 사용가능성을 타진코자 함. 또한 선발된 계통은 방사선 처리 이후 20세대 이상으로 형질이 고정된 계통들이며, 수량을 비롯한 농업형질이 우수하여 발아실험을 통한 결과에 따라 바로 품종화가 가능함.
- (다) 대체적으로 방사콩 유래 돌연변이 후대 계통들이 control에 비해서 수율이 우수했으며 CB 27-15-27계통의 경우엔 수율이 다소 떨어지지만 예상대로 발아율 불량외 단점만 보완된다면 찜용 콩나물 용도로 사용가능 할 것으로 예상됨.



그림6. 왼쪽-장류용 예비계통 대량증식을 위한 포장 재배 전경, 오른쪽-나물용콩 발아실험

표3-21. 나물용 유망 예비 선발 계통의 1차 발아실험 및 수율조사

계통명	100립중(g)	발아율(%)	콩나물 생육 후 무게(g)	수율(%)
방사control	14.4±0.4	93.7	1,872	624
방사 5	10.7±0.1	94.3	2,018	672
방사 11	10.3±0.1	94.7	2,068	689
방사 12	9.8±0.4	96	2,074	691
방사 13	9.8±0.2	95.7	2,130	710
방사 15	9.3±0.3	96.3	2,224	741
방사 16	9.6±0.1	96	2,264	754
CB 27-15-52	19.0±0.5	97	1,565	521

(2) 2차 발아실험 결과

(가) 대상계통: 방사 후대 돌연변이 6계통(방사-#5, 11, 12, 13, 15, 16) 및 야생콩 교배 후대 8계통(903-27-1, 903-27-3, 903-27-5, 903-27-6, 903-27-7, 904-4-7-3, 904-4-7-4, 904-3-10-3) 등 총 14계통

(나) 나물용 콩 유망계통의 선발과 발아 및 재배실험 결과

- ① 외형적 특성은 100립중, 종자특성 조사(립도, 형태, 색택, 제색 등) 등을 조사했으며, 그 결과 외관상 소립(방사-5, 방사-11, 방사-12, 방사-13, 방사-15, 방사-16, 903-27-7, 904-4-7-3) 또는 극소립(904-3-10-3, 904-4-7-4) 계통이 나물콩 계통으로 적합해 보이며, 이중 903-27-7, 904-4-7-3, 904-3-10-3, 904-4-7-4 계통이 가장 적합한 것으로 보임.
- ② 발아실험 결과: 방사-5, 방사-11, 방사-15, 방사-16 등의 4계통에서 대조군인 풍산나물콩, 방사콩에 비해서 발아율 및 발아세가 높게 나타남. 그러나 야생콩 후대의 경우 종자 상태 및 발아율이 불량하여 대조군과의 비교 관찰이 어려웠음.



그림3-7. 방사콩 후대 발아 실험(방사-5, 방사-11)

③ 재배실험 결과: 방사-5, 방사-11, 방사-12, 방사-15 등의 4계통이 대조군인 풍산나물콩, 방사콩과 비교하여 포장수율이 높게 나타났으며 발아상태와 발아세가 양호하여 재배 품질도 대체적으로 양호하게 나타남. 야생콩 후대의 경우 발아실험결과와 마찬가지로 종자의 발아불량으로 대조군과의 비교 관찰이 어려웠음.

(다) 무한콩과 야생종 교배 후대인 903유래 계통은 종실의 크기가 다소 크긴 하지만 포장 수량성이 높아 나물용 콩으로 유망할 것으로 사료되어 방사콩 후대와 함께 실험을 수행하였으나 발아율이 불량하고 종자부패가 심하여 유효한 데이터를 얻지 못함. 또한 904유래 계통은 종실의 크기가 나물용 콩으로 적합하나 발아불량으로 인해 정확한 수율 산정이 어려웠음.

(라) 2차 발아실험을 통한 모든 데이터를 종합해 보건대 종자의 크기, 발아 및 수율 조사 결과 방사-5와 15 계통이 나물용 콩으로써 형질이 우수하게 나타났으나 포장 형질 조사 과정중 도복이 심한 특징을 나타내어 다른 방사 계통으로 전환 실험코자 함.

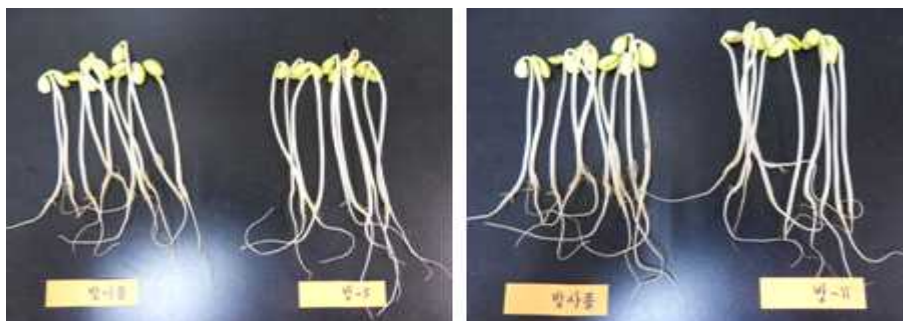


그림3-8. 재배 실험 (재배 4 ~5일) - 양호한 계통(방사-5, 방사-11)

표3-22. 나물용 유망 예비 선발 계통의 2차 발아실험 및 수율조사

계통명	100립중(g)	발아율(%)	하배축길이 (cm)	하배축두께 (mm)	수율(%)
방사control	15.53	95.0	8.2	2.24	299.8
방사 5	10.09	98.5	9.3	2.0	510.6
방사 11	10.11	97.0	9.5	2.13	492.6
방사 12	9.67	97.5	9.7	2.08	504.2
방사 13	10.53	97.8	9.6	2.1	470.2
방사 15	10.35	96.5	9.5	2.13	502.2
방사 16	10.49	96.3	9.7	2.11	442.2
903-27-1	12.74	-	-	-	-
903-27-3	12.95	-	-	-	-
903-27-5	14.76	-	-	-	-
903-27-6	14.35	-	-	-	-
903-27-7	12.27	-	-	-	-
904-3-10-3	8.07	92.0	6.9	1.81	172.0
904-4-7-3	10.37	94.0	7.1	6.8	213.0
904-4-7-4	7.64	88.8	6.8	6.9	124.0
풍산나물	10.79	98.8	6.8	1.94	321.4

(3) 3차 발아실험 결과

(가) 대상계통: 방사 후대 돌연변이 8계통(방-#25, 50, 62, 63, 64, 73, 74, 75) 및 야생콩 교배 후대 4계통(903-27-3, 903-27-5, 904-4-7-3, 904-4-7-4) 등 총 12계통

(나) 종자 외관 특성 조사: 립도, 형태, 색택, 제색 등의 기준을 적용, 종자특성은 외관상 소립(방-25, 방-74, 방-62, 방-63, 방-73, 904-4-7-3) 또는 극소립(904-4-7-4) 계통이 나물콩 계통으로 좋아 보이며, 이중 방-25, 방-74, 904-4-7-3, 904-4-7-4 계통이 좋아 보임.

표3-23. 나물용 유망 예비 선발 계통의 종자 외관 특성 조사

계통명	립도	형태	색택	제색	특징	
풍산나물	중소	구형	황색	흰색	양호	
방사콩	중립	구형	황색	갈색	굵고양호	
방-25	소립	구형	연녹황	갈색	갈색 줄무늬가 외관상 어렵게 보임. 종피에 갈색 줄무늬.	
방-50	소립	구형	연녹황	갈색		
방-62	소립	구형	연녹황	갈색		
방-63	소립	구형	연녹황	갈색		
방-64	소립	구형	연녹황	갈색		
방-73	소립	구형	연녹황	갈색		
방-74	소립	구형	연녹황	갈색		
방-75	소립	구형	황	갈색		
						불량립 多
						갈색반점

903-27-3	소중	편타	황	갈색	갈색반점, 자엽뒤틀림현상 발아세 매우 불량 중피색 녹색얼룩
903-27-5	중립	편타	황	갈색	
904-4-7-3	소립	편타	녹색	흑색	
904-4-7-4	극소	구형	황색	갈색	

(다) 발아율 및 재배 수율

- ① 발아율: 풍산나물콩, 방사콩 대비 방-62, 방-75, 904-4-7-3, 904-4-7-4 4품종이 대체적으로 높은 경향을 보여주고 있으나 발아세에서는 방-25, 방-74, 방-62, 904-4-7-3, 904-4-7-4 5품종이 높게 나타남.
- ② 재배 및 수율 실험 결과: 풍산나물콩, 방사콩 대비 재배수율이 방-25, 방-74, 904-4-7-3, 904-4-7-4 품종이 높게 나타났으며 발아상태와 발아세가 양호하여 재배품질도 대체적으로 양호하게 나타남.

표3-24. 나물용 유망 예비 선발 계통의 3차 발아실험

	조사수량(립)	발아율			발아수량(립)	발아율
방사콩	300	8	7	8	277	92%
방-25	300	32	47	55	166	55%
방-50	300	58	18	49	175	58%
방-62	300	23	13	19	245	82%
방-63	300	51	36	33	180	60%
방-64	300	31	20	27	222	74%
방-73	300	23	22	48	207	69%
방-74	300	16	33	20	231	77%
방-75	300	22	19	18	241	80%
903-27-3	300	20	24	25	231	77%
903-27-5	300	48	51	46	155	52%
904-4-7-3	300	16	14	13	257	86%
904-4-7-4	300	14	10	11	265	88%
풍산나물	300	23	22	17	238	79%

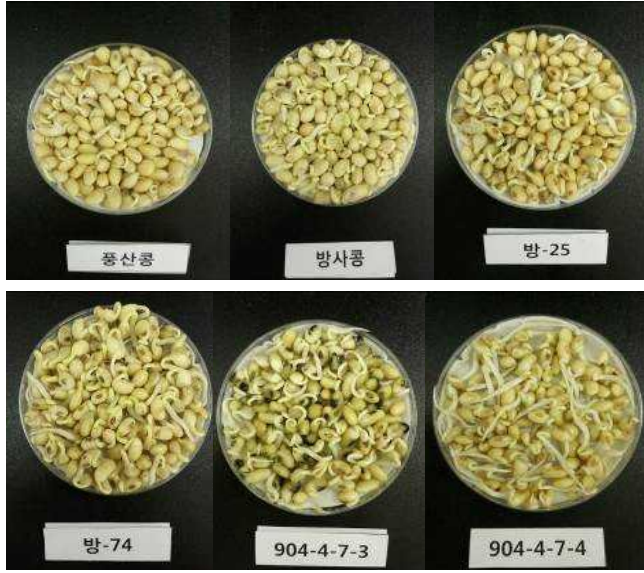


그림3-9. 풍산나물콩, 방사콩, 방-25, 방-74, 904-4-7-3, 904-4-7-4 petri-dish 발아실험

표3-25. 나물용 유망 예비 선발 계통의 3차 재배 및 수율 실험 결과

	재배량 (g)	재배수율	배축길이 (cm)	자엽			비고	
				크기	crack발생	배꼽색		
풍산나물콩	242	484%	10-12	대립	강	x	자반병 피해립 有	
방사콩	294	588%	13-14	대립	약	x		
방-25	256	512%	10-12	중립	약	brown		
방-50	232	464%	11-12	중립	중	brown		
방-62	242	484%	11-13	중립	약	brown		
방-63	246	492%	11-13	중립	약	light brown		
방-64	212	424%	12-13	중립	약	brown		
방-73	248	496%	10-12	중립	약	brown		
방-74	280	560%	12-14	대립	강	brown		
방-75	228	456%	13-15	중립	강	brown		
903-27-3	114	228%	8-12	중립	약	black		불량립多 갈색반점 자엽뒤틀림현상
903-27-5	90	180%	7-12	중립	약	light brown		발아세 매우 불량
904-4-7-3	-	-	-	-	-	-		중피색 녹색얼룩
904-4-7-4	-	-	-	-	-	-		-

(4) 4차 발아실험 결과

(가) 대상계통: 3차 발아실험 결과 나물용 콩으로 가능성이 높고 농업형질이 우수한 방사 후대 돌연변이 5계통(방-#25, 63, 73 74, 84) 및 야생콩 교배 후대 4계통(903-27-3, 903-27-5, 904-4-7-3, 904-4-7-4) 등 총 4계통을 선발하여 최종 발아실험 수행

(나) 발아율 및 재배 수율

- ① 발아율: 발아율은 904-4-7-3이 94.7%로 가장 낮았으나 표준 품종을 포함한 모든 계통간 에유의적 차이를 보이지 않음.
- ② 재배 및 수율 실험 결과: 수율은 방사콩과 풍산나물이 가장 좋았으며 방-74가 돌연변이 계통중에서는 가장 높은 수치를 보임. 하배축의 경우 방-25의 생육이 가장 저조하였으며 나머지 돌연변이 계통들은 대조 품종과 유의적 차이를 보이지 않음.

표3-26. 나물용 유망 예비 선발 계통의 4차 발아실험

	조사수량(g)	발아율	하배축 길이 (cm)	수율 (%)
방사콩	200	97.3	19	552
방-25	200	98.0	13	493
방-63	200	96.7	21	483
방-73	200	96.7	18	504
방-74	200	98.0	19	530
방-84	200	97.3	19	483
903-27-3	200	-	-	-

903-27-5	200	-	-	-
904-4-7-3	200	94.7	-	-
904-4-7-4	200	98.3	18	515
풍산나물	200	97.3	19	602

* 903-27-3, 903-27-5의 경우 농업형질 불량으로 발아 및 수율 조사 제외

* 904-4-7-3의 경우 수율 조사 실시 시 부패립 발생이 심하여 조사 불가



그림3-10. 콩나물 발아 실험기 (좌) 및 콩나물 하배측 길이 비교 (우, 풍산나물, 904-4-7-3, 방-84, 방-74, 방-73, 방-63, 방-25, 방사콩)

(다) 콩나물 성분분석

- ① 방사콩 후대 일반 성분 분석 결과 방사콩과 풍산나물콩에 비해 방-25, 방-73의 경우 칼슘 함량과 인 함량이 크게 높은 것으로 나타남.
- ② 비타민 C의 경우 방사콩이 가장 높게 나타났으며 방사콩 후대 중 방-73이 풍산나물보다 높은 함량을 보임.
- ③ 아미노산 구성 결과에서 전체 아미노산 함량은 방-25이 가장 높았으며 방-25, 방-63, 방-73이 방사콩과 풍산나물 보다 높은 아미노산 함량을 보임. 특히 글루타민산의 함량이 크게 증가한 모습을 보임.

표3-27. 나물용 유망 예비 선발 계통의 일반 성분 분석

일반성분	방사콩	방-25	방-63	방-73	방-74	방-84	904-4-7-4	풍산나물
수분 (g/100g)	85.8	85.3	86.6	86.3	88.1	87.7	86.3	88.1
비타민C (mg/100g)	6.3	3.3	1.7	5	3.1	2.2	3.1	3.1
Ca (mg/100g)	59.3	69.5	59	68.3	52.8	56.9	58.3	52.7
P (mg/100g)	119.9	165.7	141.7	159.8	131.9	149.8	129.2	127.2
Fe (mg/100g)	0.7	0.6	0.5	0.6	0.4	0.4	0.7	0.5

표3-28. 나물용 유망 예비 선발 계통의 구성아미노산 분석 (mg/100g)

아미노산	방사콩	방-25	방-63	방-73	방-74	방-84	904-4-7-4	풍산나물
Aspartic acid	1011.9	885	823.6	954.2	824.5	806.3	714.3	858.7
Threonine	223.1	303.1	272.3	282.4	228.9	240.8	231.1	248.2
Serine	284.6	362.5	315.5	327.3	265.2	267.2	262.9	273.7
Glutamic acid	745.4	1356.3	1095.7	1133.3	853.9	952.9	885.8	938.4
Proline	207.9	300.5	246.9	267.3	203.5	219.5	209.6	231.2
Glycine	216	330.8	280.4	290.6	227.6	245.3	232	247.1
Alanine	313.3	466.3	465.7	416.7	327.3	330.5	359.9	393.4
Valine	213.7	316.6	295.4	329	220.2	247.2	244.4	276.7
Methionine	42.6	55.3	51.7	64.5	34.3	46	45.9	52.3
Isoleucine	194.8	296.6	276.6	307.3	197.9	222	221.1	252.3
Leucine	415.9	607.4	534.9	567.5	430.4	459.5	439.4	484
Tyrosine	167.2	248.9	223.7	229.5	183.4	200.4	193.5	206.7
Phenylalanine	267.1	382.2	326.7	351.9	266.3	284.3	268.6	310.1
Lysine	308.4	487.7	410.3	390	319.1	356.4	336.9	370.1
Histidine	127.2	177.9	154.7	161.6	125.3	130.6	118.8	144.7
Arginine	242.2	364.6	345.4	365.2	249.1	264.4	244.3	309.3
Total	4981.3	6941.7	6119.5	6438.3	4956.9	5273.3	5008.5	5596.9

(5) 나물용 콩 유망계통의 농업형질

- (가) 방사콩 후대들의 경우 모품종에 비해 백립중이 현저하게 줄어들었으며 대조품종인 풍산나물보다 수량성이 높은 것으로 조사됨.
- (나) 야생종과 교배 후대인 903 계통과의 경우 대조품종과 백립중은 비슷하며 수량이 높은 것으로 조사 되었으며 904 계통의 경우 대조품종인 풍산나물과 수량에서 큰 차이가 없었으나 백립중에서 절반에 가까운 것으로 조사됨.
- (다) 903 계통의 경우 야생종과 교배 후대임에도 초형이 재배종과 같은 직립형으로 수량성이 높고 야생종에서 유래된 특이 성분 함량이 높을 것으로 사료됨.
- (라) 904 계통의 경우 야생종 형질을 가지고 있어 덩굴성을 띠며 옥수수 등의 혼작을 통한 제초 경감 등의 용도로 사용 가능할 것으로 사료됨.

표3-29. 나물용 유망 예비 선발 계통의 농업형질(2012)

Line no	초장	마디수	분지수	꼬투리수	백립중	수량 (Kg/10a)	비고
방사콩	60.0	2.5	14.8	20.5	15.9	188.0	대조구
방-25	54.3	2.5	16.2	22.8	9.5	285.7	
방-50	62.3	2.2	17.2	30.7	9.6	274.0	

방-62	62.7	2.3	17.2	34.8	11.2	424.7	
방-63	69.5	3.0	16.7	35.099	9.9	451.4	
방-64	58.6	2.3	16.7	22.2	10.5	430.2	
방-73	53.5	2.3	15.2	33.0	9.8	340.4	
방-74	53.9	3.3	16.3	26.2	9.7	343.9	
방-75	68.5	3.2	17.7	41.2	10.4	368.5	
903-27-3	39.2	15.8	8.5	100.8	11.4	298.6	
903-27-5	38.0	14.7	9.5	118.0	11.4	341.6	
904-4-7-3	52.3	7.4	17.1	107.1	7.3	229.7	
904-4-7-4	97.4	9.1	24.9	101.3	5.5	187.2	
풍산나물	41.7	4.9	14.1	72.9	12.8	208.7	대조구

6. Kunitz Trypsin inhibitor 함량 확인 및 SNAP marker 제작

가. 연구개발 수행 내용 및 실험 방법

- (1) Kunitz Trypsin inhibitor(KTi) 함량 또는 활성을 감소시켜 사료용 및 생식용 콩 품종 개발을 위해 콩 돌연변이 451 계통 Spectrophotometer를 이용하여 activity 측정 모품종과 activity의 차이를 보이는 157 계통을 확인, SNAP marker를 제작
- (2) KTi type 구분을 위해 제작한 SNAP marker 제작을 통한 단백질 수준의 발현 차이를 비교 분석
- (3) Western 분석을 통한 Tia 와 Tib type 비교 분석
- (4) 백운(Tia)과 백운-7-2(Tib)를 사료에 첨가하여 쥐에게 6주간 먹인 후 KTi type 간의 activity 차이를 체중 변화를 통해 확인
- (5) KTi type에 따른 체중의 변화는 정상 쥐 그룹에서는 보이지 않았으며, 당뇨 쥐의 그룹에서는 생두가 첨가된 그룹이 체중이 많이 증가한 것을 확인

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) Kunitz Trypsin inhibitor 함량 확인 및 SNAP marker 제작

- (가) Trypsin inhibitor는 콩에서 발견된 기능성 화합물의 일종으로 단백질 소화 억제에 의한 영양소 섭취 방해의 요인으로 작용한다는 보고가 있었으나 최근에는 당뇨를 비롯한 항암 등의 생리활성이 있는 것으로 알려짐. 콩을 비롯한 된장에서의 기능성 화합물인 TI 함량 변화 예측에 이용가능
- (나) Kunitz Trypsin inhibitor(KTi) 함량 또는 활성을 감소시켜 사료용 및 생식용 콩 품종 개발을 위해 콩 돌연변이 451 계통 Spectrophotometer를 이용하여 activity 측정 모품종과 activity의 차이를 보이는 157 계통을 확인
- (다) KTi sequence 정보를 이용하여 Kunitz Trypsin inhibitor type 관련 SNAP marker를 작성하였으며 작성한 SNAP marker를 콩 돌연변이 451 계통에 적용하여 계통들의 KTi type을 구분

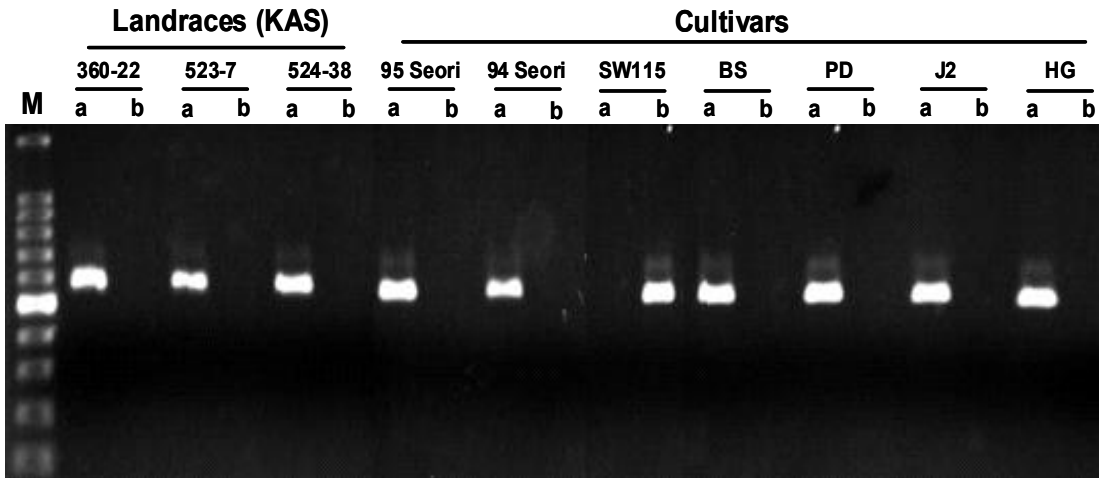


그림3-11. Amplification patterns of the SNAP marker for KTi type in 10 soybean cultivars and landraces. M: 100 bp ladder, 1: KAS 360-22, 2: KAS523-7, 3: KAS524-38. 4: 95 Seori, 5: 94 Seori, 6: Suwon115 (SW115), 7: Bangsa (BS), 8: Paldal (PD), 9: J2 and 10: Hwangguem (HG), a: Tia specific band lane, b: Tib specific band lane.

(2) KTi type이 변한 돌연변이 후대 계통들의 단백질적 특징 및 차이 분석

(가) KTi type 구분을 위해 제작한 SNAP marker를 통해 모품종의 type과 다른 type을 가진 돌연변이 계통들 중에서 3개의 계통 BW-7-2(백운 유래), PD-5-10(팔달 유래), SW115-24(수원-115 유래)을 이용하여 단백질적 차이를 비교 분석

(나) SDS-PAGE 및 Native-PAGE 결과 : SDS-PAGE에서는 KTi 밴드 (21 kDa)에서는 차이를 보이지 않았으나 Western을 통한 발현에서는 Tia와 Tib 상 차이를 나타냄. Native-PAGE 에서는 Tia와 Tib 밴드간 이동 속도의 차이를 보였으며 isozyme의 패턴에서도 차이를 보임.

(3) KTi type 간 생체 내 소화 억제 정도 확인 및 혈당 조절 여부 확인

(가) 백운(Tia)과 백운-7-2(Tib)를 사료에 첨가하여 쥐에게 6주간 먹인 후 KTi type 간의 activity 차이를 체중 변화를 통해 확인 (그룹 I, 정상 쥐 일반 사료; 그룹 II, 정상 쥐 백운 첨가 사료; 그룹 III, 정상 쥐 백운-7-2 첨가사료)

① KTi type에 따른 체중의 변화는 정상 쥐 그룹 (I, II, III)에서는 보이지 않았으며, 당뇨 쥐의 그룹 (IV, V, VI)에서는 생두가 첨가된 그룹이 체중이 많이 증가한 것을 확인함.

(나) STZ를 이용하여 당뇨를 유발한 쥐에게 같은 방식으로 먹인 후 체중 변화 및 혈당 변화 확인 (그룹 IV, 당뇨 쥐 일반사료; 그룹 V, 당뇨 쥐 백운 첨가 사료; 그룹 VI, 당뇨 쥐 백운-7-2 첨가 사료)

① KTi type에 따른 혈당의 변화는 Tia는 4주 후부터 감소가 나타났으며 Tib의 경우 6주간 유의적 변화는 없었으나 대조군 (IV)에 비해 낮은 수치를 유지한 것을 확인함.

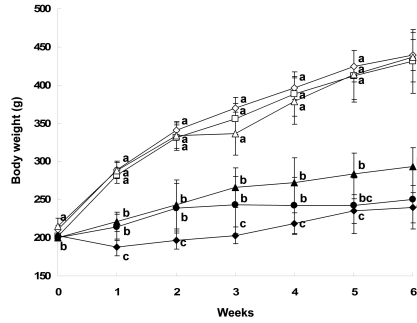


그림3-12. 6주간 그룹 간의 체중 변화. ◇: 그룹 I, ○: 그룹 II, △: 그룹 III, ◆: 그룹 IV, ●: 그룹 V, ▲: 그룹 VI

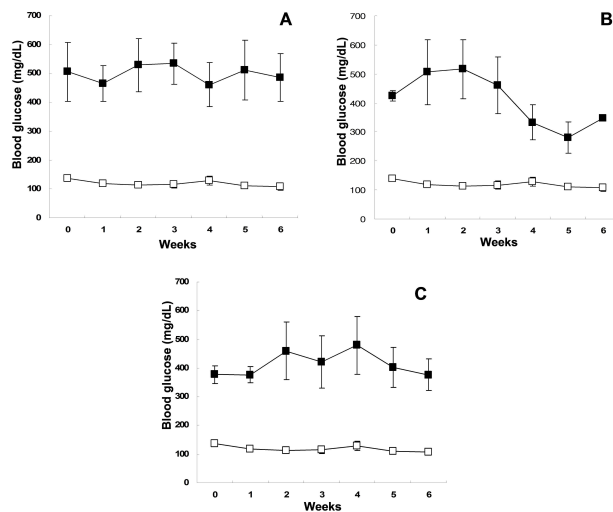


그림3-13. 6주간 그룹 간의 혈당 변화. A, 그룹 I(□)과 그룹 IV(■); B, 그룹 I(□)과 그룹V(■); C, 그룹 I(□)과 그룹 VI(■)

7. 비린내 저감 콩 계통 선발 및 연관 유전자 염기 서열 분석

가. 연구개발 수행 내용 및 실험 방법

- (1) 콩 종자 내에는 Lipoygenase (Lox)가 3가지 형태로 존재 하며 비린내를 유발하는 aniti-nutritional 요소로서 식용 및 가공을 위해 Lox가 제거 콩 품종 개발을 위하여 수행
- (2) 콩 돌연변이 451 계통을 이용하여 SDS-PAGE 분석 및 Colormetric assay를 수행
- (3) 황금 후대에서 H6, H22, H23, H70 4 계통의 종자 비린내 연관 단백질 Lox 1, 2, 3 가 모두 결여된 것을 확인
- (4) 황금과 H70을 이용하여 유전자 염기서열 비교를 통하여 변화된 부위 탐색 Lox1, Lox2는 exon 부위에서 차이를 보이는 것으로 확인 되었으나 Lox3의 경우 exon 내 차이를 보이지 않음.

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) 콩 종자내 비린내를 유발하는 단백질 Lipoxygenase (Lox) 1,2,3가 결여된 계통을 선발하고 자 황금콩 및 방사콩 후대를 포함한 돌연변이 451 계통의 SDS-PAGE 및 Colormetric assay를 통한 Lox 결여 여부 확인

(가) SDS-PAGE를 통하여 97 kDa의 band 유무를 확인하여 황금콩 후대인 H6, H22, H23, H70 4 계통에서 band가 없는 것을 확인

(나) 콩 자내 Lox1,2,3의 작용 여부를 알아보하고자 colormetric assay를 수행 : Linoleic acid 를 기질로 이용하여 종자에 증류수로 추출한 상등액을 반응시켜 변색여부를 이용하여 Lipoxygenase의 발현 여부를 확인. 선발된 4계통의 황금 후대 (H6, H22, H23, H70)에서 Lox가 발현하지 않음을 재차 확인.

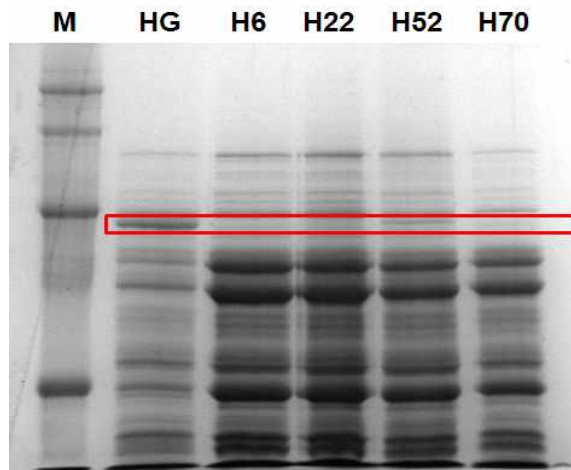


그림3-14. SDS-PAGE를 통한 97kDa band 유무 확인

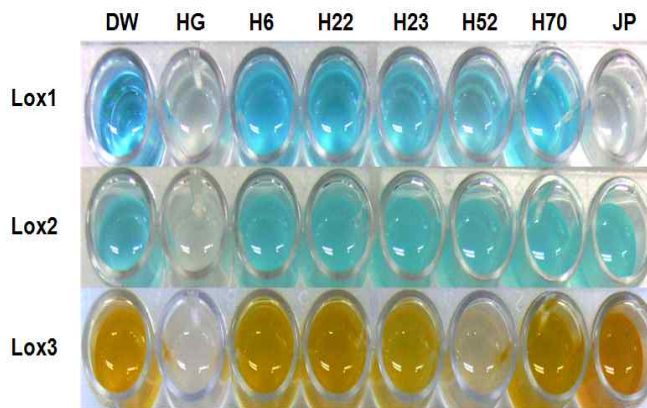


그림3-15. Colormetric assay를 통한 Lipoxygenase 발현 여부 확인.

(다) 선발된 4계통 중 H70과 황금콩을 이용하여 DNA 서열 분석 수행. Lox1, Lox2에서는 exon상에서 deletion이 발생한 것을 확인 하였으나 Lox3의 경우 exon상에서의 차이는 발견하지 못하였음. 문헌을 통하여 5'-UTR 부분의 변이가 있을 것으로 예측이 되어 분석 수행 중.

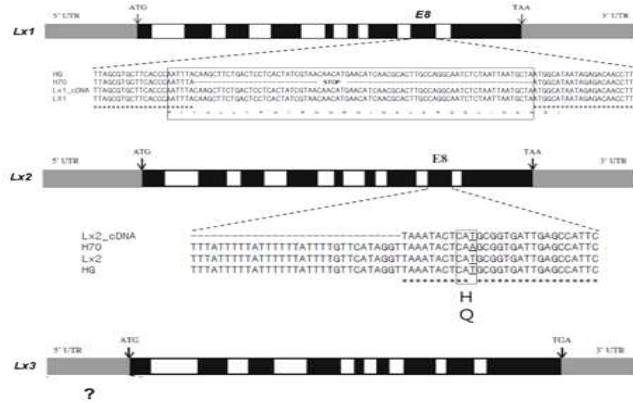


그림3-16. H70과 황금콩 간의 Lox1,2,3 DNA 염기 서열 비교

제4절 제4세부 TILLING 기법을 활용한 내염성 유전자 대량검정 및 벼 품종개발(한국원자력연구원 김동섭)

1. 벼 돌연변이 TILLING 집단 및 분석체계 확립

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

(1) 벼 돌연변이 기능유전체 연구용 TILLING 집단 (약 3,000 계통) 구축

- (가) 방사선 돌연변이 기술에 의해 유기된 고정, 분리 세대 대상 내염성 관련 허브 유전자군의 변이를 확인하기 위한 TILLING 집단 구축
- (나) 벼 돌연변이 TILLING 집단 (M₃)을 한국원자력연구원 (간척지 적응), 강원대 (기후변화대응), 생명공학연구원 (병저항성) 연구 수행을 위한 기본재료로 제공

(2) 변이 유전자의 대량검정을 위한 Capillary method를 접목한 TILLING 분석 체계 구축

- (가) 간척지적용 벼 품종개발을 위한 분리세대 3,000 계통의 TILLING 분석을 위한 Capillary method 체계 구축 : 기존 구축된 집단을 활용한 아미노산 합성 관련 벼 유전자 대상 분석체계 확립 (2-D pool, DNA 양, CEL 1 처리조건, primer 제작 등)
- (나) 문헌조사 및 Microarray 분석 결과를 활용한 TILLING 분석을 위한 허브유전자군 선별

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) 벼 돌연변이 기능유전체 연구용 TILLING 집단 (약 3,000 계통) 구축

- (가) 감마선 조사 유래 M₃ 계통 육성 : 200 Gy 유래 1,342 계통/300 Gy 유래 1,619 계통
- (나) 구축된 TILLING 집단의 목적형질별 유전자 네트워크 분석을 위한 협동 연구 분양 : 한국원자력연구원 (간척지적응성), 한국생명공학연구원 (내병성), 강원대학교 (기후변화적응성) 협동 과제 간 목적형질 선별을 위한 기능유전체 연구용 TILLING 집단을 분양 및 선별계통 대상 Microarray 결과를 활용한 형질별 유전자 네트워크 분석 공동연

구

(2) Capillary method를 접목한 TILLING 분석 체계 구축

(가) 아미노산 합성 유전자를 이용 TILLING 분석 체계 구축

- 기존 구축된 집단 (고정세대 M10)을 활용한 아미노산 합성 관련 벼 유전자 대상 분석 체계 확립(2-D pool, DNA 양, CEL 1 처리조건, primer 제작 등)
 - cTAB method에 의한 genomic DNA 추출
 - 타겟유전자(*OsASA1*, 6.4 kbp) 정보 조사 및 형광 표지 프라이머 디자인 (5 primer sets)
 - 2-D pool 구축을 위한 각 genomic DNA 농도(15 ng/ul) Normalization: dot assay, touchdown PCR 방법 활용
 - 2-D pool 구축 (8-pool) 및 agarose gel에서 DNA size & quantity 확인
 - CEL1 treatment - 42°C, 20 min
 - Capillary method(Genetic analyzer, ABI 3130 XL)를 이용한 SNP detection
- 아미노산 합성이 증가된 4개의 돌연변이 계통 활용 구축된 Capillary method를 접목한 TILLING 분석 체계 확립

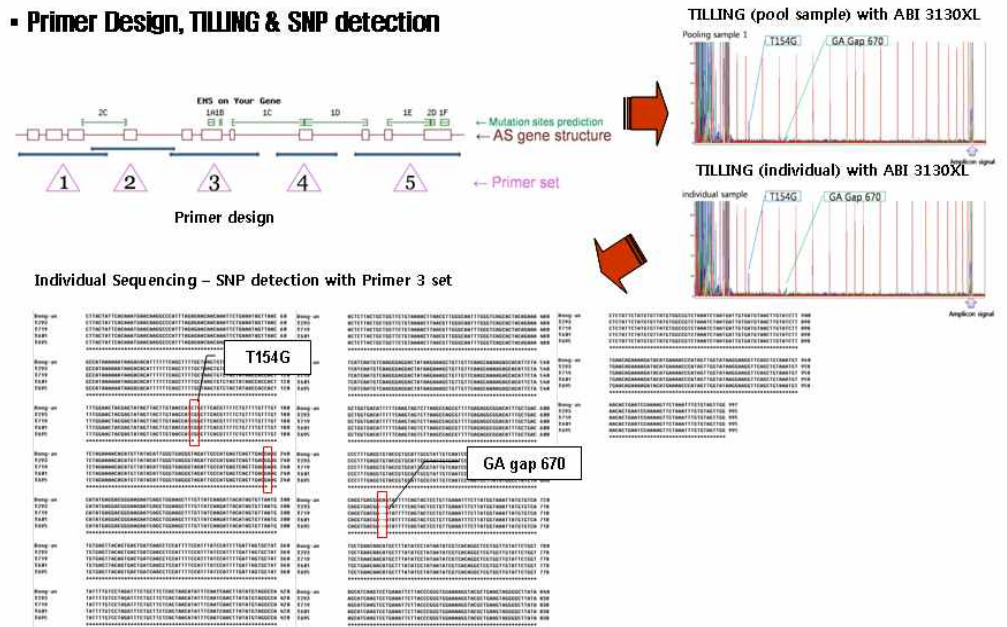


그림4-1. Schematic TILLING analysis of *OsASA1* gene with primer set 3 in high amino acid accumulating rice mutants. 5 primer sets were designed, and SNPs were detected and confirmed by re-sequencing.

(나) TILLING 분석을 위한 허브유전자군 선별

- 문헌정보 및 NCBI DB를 이용한 TILLING 분석을 위한 염 스트레스 관련 유전자 선별
 - 허브 유전자군의 function, sequence 및 primer 제작을 위한 정보 수집
 - 선정된 허브 유전자군 대상 품종화 유망 돌연변이 계통의 유전자 발현정보 data mining

표4-1. Hub gene list related to salt tolerance for the TILLING analysis and transcriptome expression profiling in 2 salt tolerant mutant lines (ST-87 and ST-301).

Common name	Gene size (bp)	Gene expression (Fold changes)			GO			description
		D.tr	ST87	ST301	biological	cellular	mol. func.	
Os07g0666900	1608	4.79	3.11	5.13	0055085,000688 5,0006814,00068 12,0006810,0006 811	0016021	0015385,001 5299,001529 7	NHX1 (NA ⁺ /H ⁺ EXCHANGER); sodium ion transmembrane transporter/sodium:hydrogen antiporter
Os02g0435000	1119	1.71	1.38	1.81	0015031	0016021	0008565	NSSC2 family transporter: translocation proteinSec62
Os01g0648000	2808	0.77	1.06	0.75	0055085,000681 3,0006811,00068 10	0016020,00 16021	00052160052 49,0030955,0 005267,0005 244,0005244, 005216	AKT1 (ARABIDOPSIS K TRANSPORTER 1); cyclic nucleotide binding / inward rectifier potassium channel
Os02g0175000	1596	0.05	0.06	0.03	0006812,005508 5,0006811,00681 0	0016021,00 16020	0008324	HKT1 (HIGH-AFFINITY K ⁺ TRANSPORTER 1); sodium ion transmembrane transporter
Os12g0641100	3429	1.06	1.35	1.30	0006810,000681 2,0055085	0016021	0015299	SOS1 Plasma membrane Na ⁺ /H ⁺ antiporter, putative, expressed
Os03g0397400	1314	4.74	3.56	3.17	0055085,000681 2	0016020,00 16021	0008324	CAX calcium:hydrogen antiporter
Os04g0613900	2376	1.53	0.77	1.18				KUP K ⁺ potassium transporter family protein
Os01g073780	1437	0.91	1.13	1.10			0003824	ERA1 Protein farnesyltransferase beta subunit
Os02g0175000	2367	0.69	0.93	0.66	0015992	0016020	0009678,000 4427	AVP vacuolar-type H ⁺ -pumping pyrophosphatase 1
Os05g0455500	2151	4.13	3.60	3.32	0008152,000656 1,00055114	0005737	0004350,000 4349,000382 4,0016491,00 05524,00086 52,0008152	P5CS1 DELTA1-PYRROLINE-5-CARBOXYLA TE SYNTHASE 1
Os02g0620600	1491	0.12	0.20	0.11	0006810,005508 5	0016020,00 16021	0008519	MT1D ammonium transporter
Os05g0579300	768	0.22	0.45	0.37	0045449		0003677	ZF-HD homeobox protein Cys/His-rich dimerisation region domain containing protein contains InterPro domain
Os12g0610600	1002	2.70	1.56	2.17	0045449		0003677	NAC NAM / CUC2-like protein
Os10g0575000	699	0.54	0.61	0.41	0045449,004544 9,	0005634,00 05634	0030528,003 0528,	atMYC2 Transcription factor MYC2E (Fragment)
Os05g0489700	1008	1.36	1.26	1.41	0006355	0005634	0 0 0 3 6 7 7 , 0003700,004 3565,004698 3	AREB Promoter-binding factor-like protein (ABA-responsive element binding protein 3) (AREB3)
Os02g0677300	675	0.10	0.27	0.10	0006350,000635 5,0006950	0005634	0003677,000 3700	DREB1D CRT/DRE binding factor 1
Os01g0165000	825	5.22	2.90	5.17	0006350,000635 5,0006950	0005634	0003677,000 3700	DREB2 DRE binding protein 2

2. 간척지 적응 유망계통 선발

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

- (1) 간척지적응 벼 품종개발을 위한 분리세대 약 3,000 계통 대상 대량 선발 시스템 확립 (Invivo 및 간척지 선발)

- (가) 간척지적응 벼 품종개발을 위한 대량 선발 시스템 확립 및 유망 계통 선발 (1 mM NaCl 농도의 in vivo 선발 및 간척지 0.3-0.4 % 농도 내염성 적응계통 선발)
- (나) 수확된 계통 대상 2차, 3차 in vivo 선발 및 세대 단축
- (2) 품종화 가능 유전적 고정세대 유망 돌연변이 계통 대상 간척지 적응 시험, 생리 분석 및 수량검정
 - (가) 고정세대 (M₁₀, 1,300 계통 대상) 중 내염성 계통 2계통 (ST-87, ST-3011) 최종 선발 후 생리, 생화학적 검정 및 수량 검정
 - (나) Microarray 기술을 이용한 간척지적응 유망 돌연변이 계통의 유전자 발현 정보 분석 : 염 스트레스 반응 유전자 대량 검정 및 유전적 변이 검정

나. 연구개발 결과 및 고찰

- (1) 간척지적응 벼 품종개발을 위한 대량 선발 시스템 확립
 - (가) In vivo 선발 시스템 확립 : 기능유전체 연구용 TILLING 집단 (약 3,000 계통) 대상 1 mM NaCl 농도 조건 하에서 M₃ 192 계통 선발 (200 Gy 유래 56 계통 / 300 Gy 유래 134 계통)
 - (나) 간척지 선발 시스템 확립 : 간척지적응 벼 품종개발을 위한 계화도 간척지 (염농도 0.3-0.4%) 선발

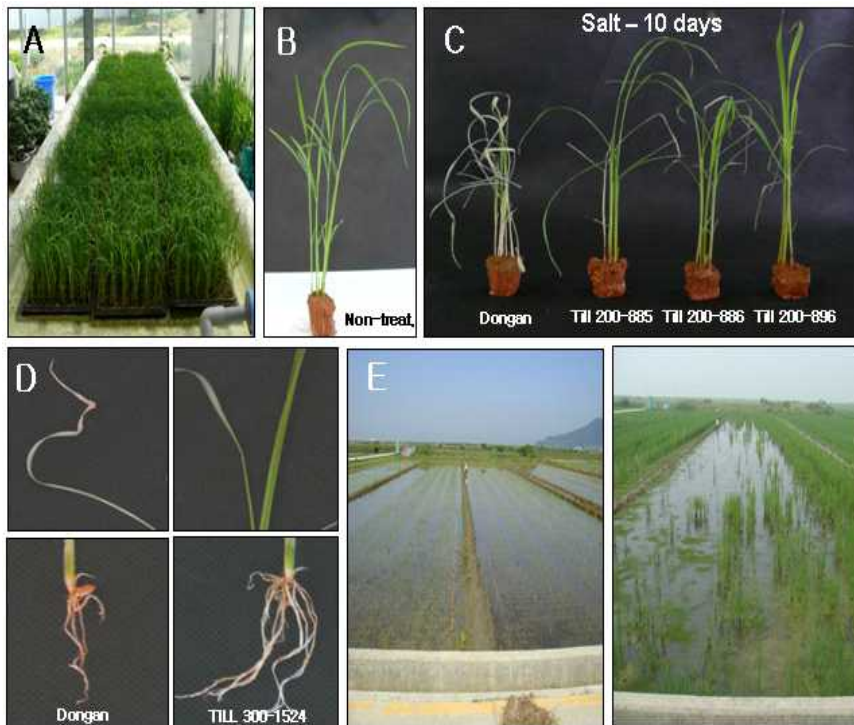


그림4-2. Selection of salt tolerant mutant lines in vivo and saline field. A, before salt treatment in vivo selection; B, cv. Dongan growth without salt stress; C, cv. Dongan and salt tolerant mutant lines 10 days after 1% salt treatment; D, leaf and root growth of cv. Dongan and TILL300-1524 line 10 days after 1% salt treatment; E, selection of salt tolerant lines in saline field, left- transplanted young plants, right- growth in saline field.

- (다) 1차 선발된 233 계통 대상 2차 in vivo 수행을 통해 14계통 65 식물체를 선발하였고 2차 선발된 14계통 대상으로 3차 in vivo를 수행하여 10계통을 선발함
- (2) 품종화 가능 유망 돌연변이 계통 특성 검정
- (가) 염 스트레스 반응 생리적 특성 검정 : 품종화 가능 유망계통인 ST-87과 ST-301 계통 (고정세대 M₁₀)의 생리적 특성 검정
- Electrolyte leakage(EL): 대조구인 동안벼와 ST-87, 301 계통은 무처리시 각각 7.7, 7.1, 7.2% 로 나타냈고 171mM 염처리 7일후 87.3, 29.4, 35% 로 EL 값이 동안벼는 약 10 배 이상 증가함을 보였고, 선발된 495와 532 계통은 50% 미만으로 나타남.
 - Malondialdehyde (MDA): 염처리 7일후 대조구와 ST-87, 301 계통은 각각 23.6, 19.0, 15.2 nmol/g 으로 ST-87, 301 계통의 MDA 함량이 염처리전후의 변화 폭이 적음.
 - Chlorophyll (chl) contents: 총 엽록소와 카로테노이드 함량을 조사한 결과 대조구인 동안벼와 ST-87, 301 계통은 무처리시 각각 16.5, 19.2, 19.6 와 0.36, 0.42, 0.42 (mg/g fresh wt)으로 큰 차이가 없었으나, 염처리 7일후 총 엽록소 14.2, 19.1, 18.9 와 카로테노이드 0.24, 0.34, 0.37 (mg/g fresh wt) 으로 각각 나타남.
 - Antioxidant enzymes: 항산화 효소 CAT 함량을 조사한 결과 동안벼와 ST-87, 301 계통은 무처리시 3.3, 4.1, 4.4 염처리 7일후 2.5, 4.8, 4.6 (Unit mg⁻¹ protein)으로 동안벼는 감소하였으나, ST-87, 301 계통은 증가. POD 함량은 동안벼와 ST-87, 301 계통은 무처리시 87.8, 84.1, 109.1 염처리 7일후 71.6, 114.9, 116.8 (Unit mg⁻¹ protein)으로 동안벼는 감소하였으나, ST-87, 301 계통은 증가.
 - Na, K 이온함량: 내염성 계통과 대조구 앞에서 이온함량을 비교한 결과, 대조구인 동안벼는 염처리 7일후에 Na 함량이 크게 증가하였으나 ST-87은 염처리 후에도 변화가 없었다.

표4-2. Effects of salinity on sodium (Na), potassium (K) contents and K/Na ratio in the leaves of the WT and ST-lines after treated with 171mM NaCl for 7 days.

Plants	0 mM NaCl			171 mM NaCl		
	Na	K	K/Na ratio	Na	K	K/Na ratio
WT	21.7	708.3	32.7	625.1	870.0	1.4
ST-87	22.6	651.3	28.9	32.3	719.4	22.3
ST-301	269.2	888.4	3.3	495.5	886.0	1.8

Numbers given are ppm.

- 아미노산 함량: 대조구인 동안벼는 염처리 7일후에 크게 3.4배 감소하였으나 ST-87, ST-301 은 약 1.04와 1.4배로 감소하였으나 염처리후에도 감소폭이 적음.
- (나) Microarray 기술을 이용한 간척지적응 품종화 유망 돌연변이 계통의 유전자 발현정보 분석
- 유망계통인 ST-87과 ST-301 계통을 이용 1 mM NaCl 염농도에서 염 스트레스에 의한 Transcriptome expression profiling 수행

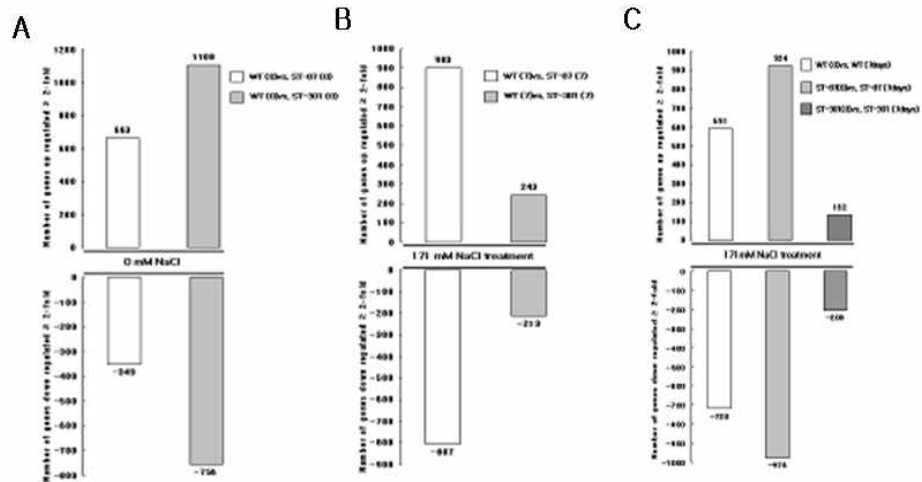


그림4-3. Representation of the genome-wide transcriptional responses to gamma irradiation and NaCl in rice. The values represent the numbers of genes were up and down-regulated more than 2-fold by the gamma-rays in the untreated two mutants lines compared with untreated WT(A), by the gamma-rays and salt treatment of two mutants lines compared with the salt treated WT(B), by salt treatment in the WT and two mutants lines compared with the untreated each control(C).

- Abiotic stress 관련 유전자를 활용한 RT-PCR 분석 수행 : 유망계통인 ST-87과 ST-301 계통 대상 내염성 기작과 연관된 15개의 유전자 이용 RT-PCR을 수행.

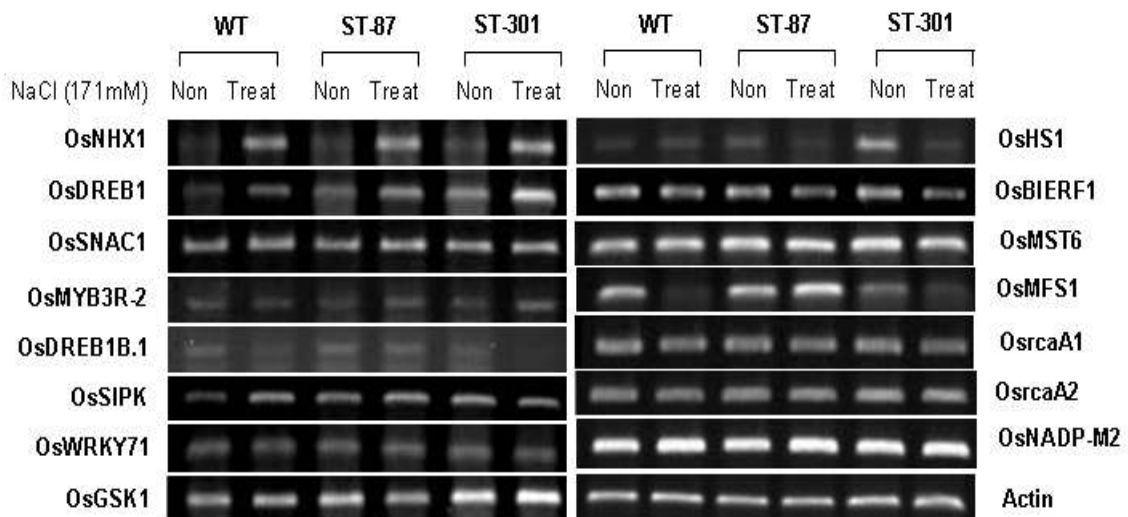


그림4-4. RT-PCR analysis of WT and 2 ST-lines with abiotic stress related genes and actin after 171mM NaCl treatment for 7 days and non-stress.

- proline biosynthetic pathway 와 관련된 유전자 (P5CD, P5CS, P5CR) 이용 RT-PCR 수행

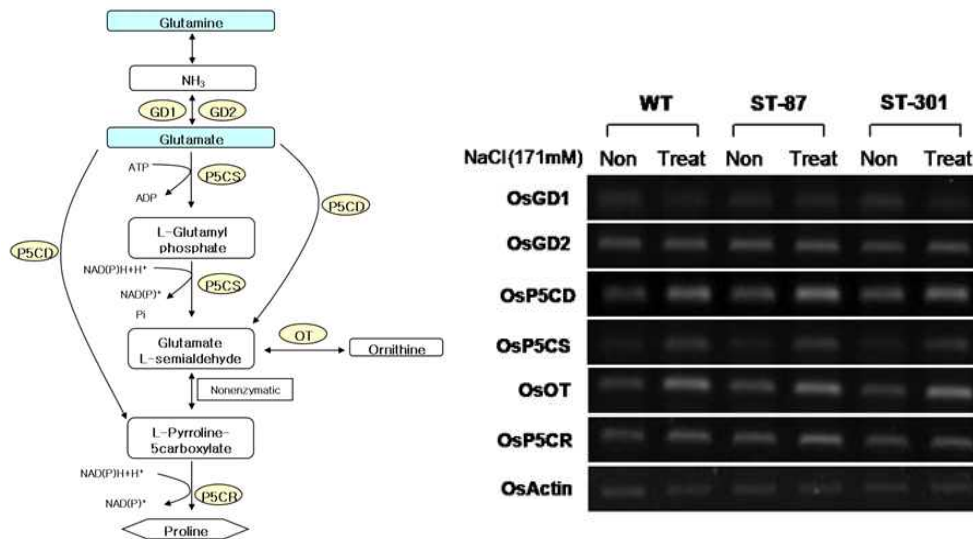


그림4-5. Proline biosynthetic pathway in oryza sativa japonica rice at KEGG. GD, glutamate dehydrogenase P5CD, pyrroline -5-carboxylate dehydrogenase P5CS, pyrroline-5-carboxylate synthetase OT, ornithine (amino) acid transaminase P5CR, pyrroline-5-carboxylate reductase (left). RT-PCR analysis of WT and 2 ST-lines with proline pathway related genes and actin after 171mM NaCl treatment for 7 days and non-stress (right).

- 식물세포에서 이온 항상성(ion homeostasis)과 이온 전송(ion transport)에 관여하여 삼투압 조절을 하는 7개의 유전자(NHX1, SOS1, AKT, HKT1, NSCC2, CAX2, KUP)를 이용하여 RT-PCR 분석 수행

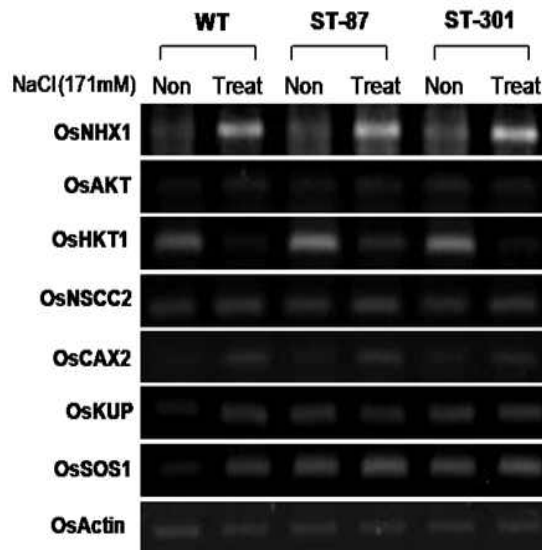


그림4-6. RT-PCR analysis of WT and 2 ST-lines with membrane transporter related to genes and actin after 171mM NaCl treatment for 7 days and non-stress.

- (다) 내염성 유망 계통의 단백질 발현 패턴 검정 : SKS-PAGE, 2-DE, MALDI-TOF, MS/MS 분석을 통한 내염성 계통의 특이변화 단백질 동정

○ 2-DE 기술을 이용한 내염성 유망 돌연변이 계통의 단백질 발현정보 분석 수행

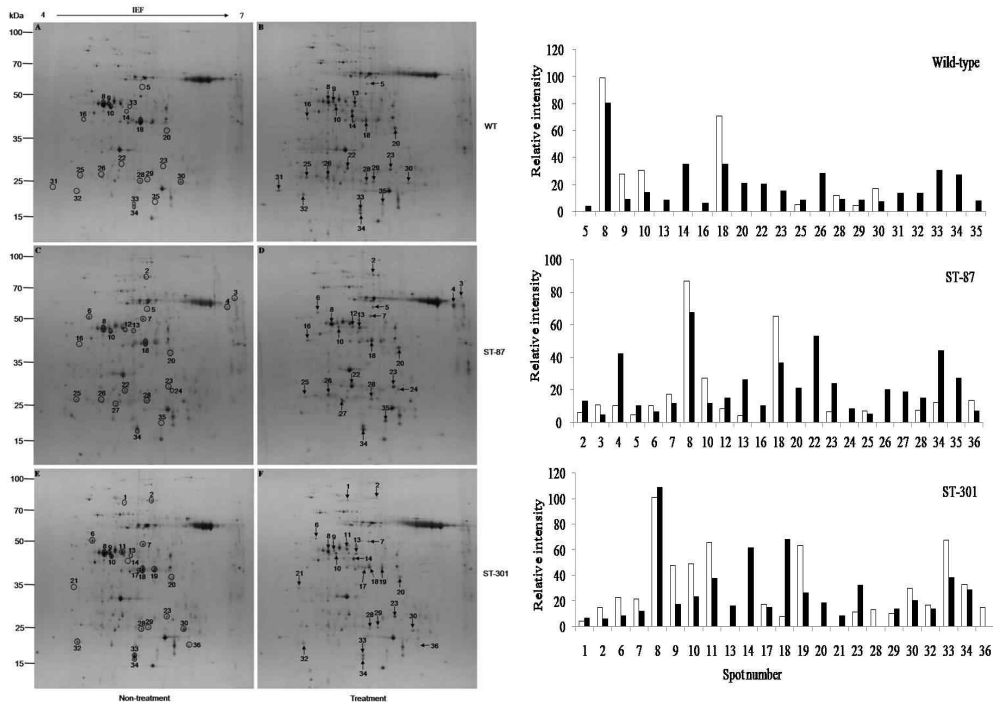


그림4-7. Protein expression patterns in the shoots of WT and ST-lines exposure to salt stress. Proteins were separated by 2-DE and stained by silver. Arrows indicate the positions of proteins changed by salt treatment, and circles mark the position of the same proteins in the non-treatment (left). The relative levels of protein expression were analyzed in wild-type and ST-lines by using PDQest software. The white and black bars show the non- and salt-treated plants, respectively (right).

○ 내염성 계통에서 단백질 spot 의 강도가 높거나 새로 형성된 8개 단백질을 확인

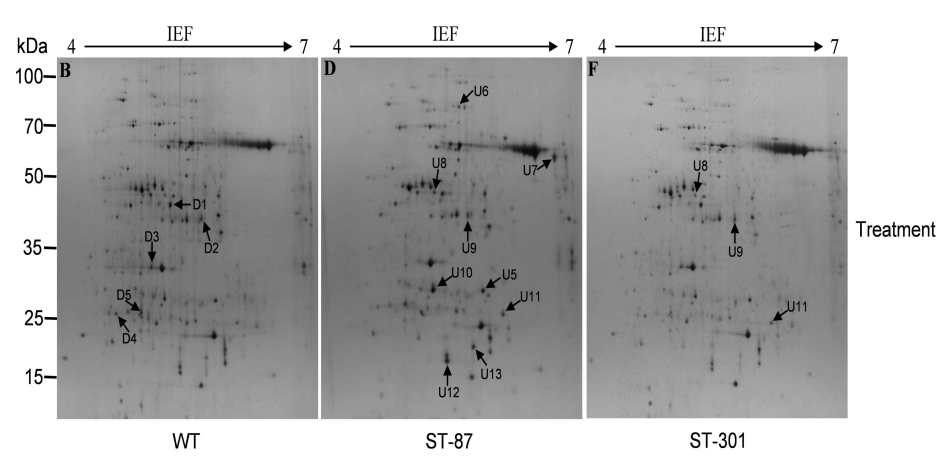


그림4-8. Representative 2-DE gels of WT and ST-lines proteins. Three-week-old rice seedlings were treated with 171 mM NaCl for 7 days. Total leaf proteins were extracted and separated by 2-DE. In IEF, 150 mg of proteins were loaded onto pH 4-7 IPG strips (17 cm, linear). SDS-PAGE was performed with 12% gels. The spots were visualized by silver staining. Differentially accumulated protein spots are indicated by arrows. All marked spots indicated changes between WT and ST-lines in response to salt stress as compared to WT.

○ 특이한 8개의 단백질 spot을 추출하여 MALDI-TOF MS/MS 분석 수행

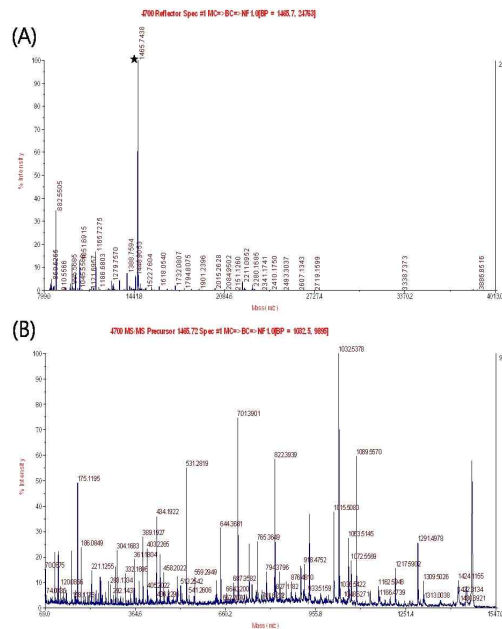


그림4-9. MS analysis of spot U13. The protein excised from gels was digested with trypsin and the resulting peptides were analyzed using a 4700 Proteomics Analyzer. A MALDI-TOF MS analysis. The spectral peaks show the intensities of different peptides. The 1465.74 m/z ion (marked with an asterisk) was further analyzed by MS/MS. B, MALDI-TOF MS/MS analysis of the 1465.74 m/z ion. The protein was identified as Ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor (NCBI accession number ABA96140) after database searching.

- MS/MS 를 이용하여 peptide화 된 단백질의 일부 아미노산 서열을 밝혀 기존 data base 와 비교, 분석
- 그 결과, 광합성, ATP synthase 등의 기능 및 unknown 단백질임을 확인

표4-3. Data obtained from MALDI-TOF-TOF MS/MS analysis and Mascot search Differentially expressed proteins in leaves of ST-87 (U1-U13) and WT (D1) seedlings under salt stress

Spot no.	NCBI accession no.	Protein name	Sequence ^d
U1	AAA84588	atpB gene product	AHGGVSVFGGVGER AHGGVSVFGGVGER
U2	AAA84588	atpB gene product	IVGNEHYETAQR FVQAGSEVSALLGR VALVYQGMNEPPGAR
U3	AAT07576	Putative chloroplast phosphor-glycerate kinase	LVSELPNGSVLLENVR LASLADLYVNDAFGTAHR
U4	AAC28134	rubisco activase	VYDDEVR FYWAPTR GQSIDFFGALR VGAEVIGEYTVAAALR
U5	NP_001058042	Os06g0608700 (hypothetical protein)	YYEAGAR LASINVENVEPNR TFQGPPHGIQVER
U7	NP_039391	rubisco activase	DTDILAAFR DNGLLLHIHR VALEACVQAR

U10	ABA91631	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplast precursor, putative, expressed	GGLDFTKDDENVNSQPFMR GLVPLAGSNNESWCQGLDGLASR LASIGLENTEANR EAAYYQQGAR EAAWGLAR
U11	NP_001060047	Os07g0570700 (hypothetical protein)	AIETVQNNFNTVR TFQGPPHGIQVER
U12	NP_001044494	Os01g0791600 (hypothetical protein)	DTDILAAFR LTYYTPEYETK ALRLEDLR
U13	ABA96140	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain precursor, putative	TFQGPPHGIQVER DTDILAAFR MCCLFINDLDAGAGR
D1	AAC28134	rubisco activase	VYDDEVV SFQCELVFAK FYWAPTR IVDSFPGQSIDFFGALR

^aThe amino acid sequence of the peptide with the highest score identified by MS/MS

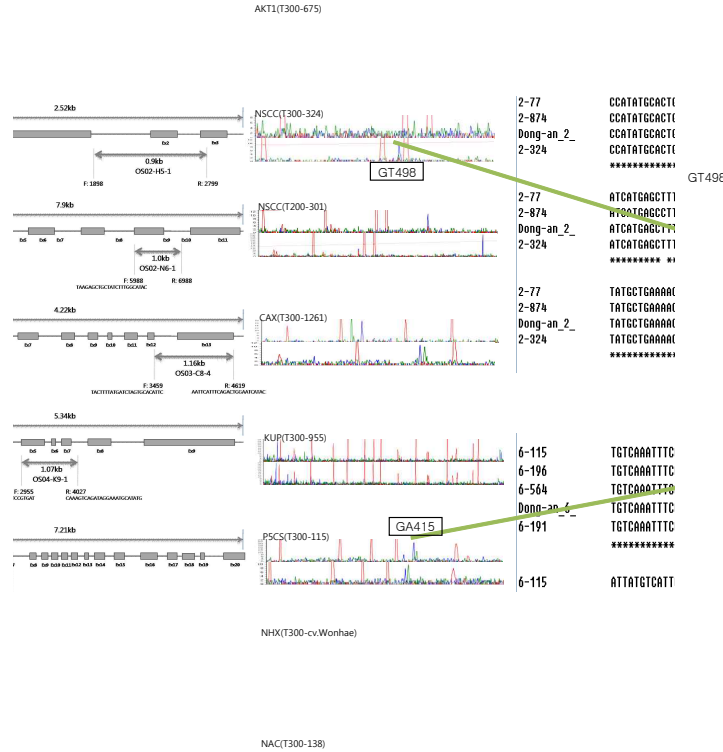
3. 내염성 관련 허브 유전자군 대상 TILLING 분석 및 염 스트레스 반응 유전자 네트워크 구축

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

- (1) 내염성 관련 허브 유전자군 대상 Capillary method를 접목한 TILLING 분석
 - (가) TILLING 분석을 위한 허브유전자군 선별 및 Cloning
 - (나) 벼 돌연변이 기능유전체 연구용 TILLING 집단 (약 3,000 계통) DNA 정제 및 2-D pool 구축
 - (다) 기능유전체 연구용 TILLING 분석을 위한 내염성 관련 타겟유전자 정보 조사 및 프라이머 구축
- (3) Microarray 결과를 활용한 내염성 관련 유전자 네트워크 분석
- (4) 염 스트레스에 대한 형태적, 생리적 분석

나. 연구개발 결과 및 고찰

- (1) 내염성 관련 허브 유전자군 대상 Capillary method를 접목한 TILLING 분석
 - (가) 내염성 관련 타겟유전자 (membrane transportaion 관련 유전자) : AKT, HKT, NSCC2, CAX, KUP, P5C5, NHX, NAC
 - 원품종(동안벼) 대상 타겟 유전자 cloning 및 TILLING 분석을 위한 fluorescence labeled 프라이머 제작



GA415

그림4-10. TILLING analysis of membrane transportation gene with primer set 8 in salt tolerant rice mutants. 9 primer sets were designed, and SNPs were detected and confirmed by re-sequencing.

표4-4. PCR primer sets for amplifying exon regions of membrane transportation gene in cv. Dongan cultivar. The touchdown PCR method was used by each primer set. The chromosome number in Os number indicates that the target so membrane transportation genes are wide and varied in loci.

primer name	Gene name	Description	Oligomer sequences	Touchdown Anneal. Temp. (°C)	Additional Anneal. Temp. (°C)	PCR product size (bp)
Os01g0648000-F	AKT1	Similar to <i>AKT1</i> -likepotassiumchannel	5' -GTCACACTTTTGGCTGTGCACTG-3'	60	54	1060
Os01g0648000-R			3' -GAAGTCTTGCCTGGTCTGCACC- 5'			
Os02g0175000-F	HKT	<i>Oryza sativa</i> high-affinity K ⁺ transporter	5' -GTAAGTCCCTTCTCAAACCTTCTC- 3'	61	55	1240
Os02g0175000-R		Sodiumiontransport, Ion transporter	3'-ATCACAAAAAGAACTGGAATACAA- 5'			
Os02g0435000-F	NSCC	Translocation protein Sec62 family protein	5' -TAAGAGCTGCTATCTTTGGCATA- 3'	61	55	1000
Os02g0435000-R			3' -CTTTTTTGTACAGCTAAAATAAAT- 5'			
Os03g0397400-F	CAX	Similar to Low affinity calcium transporter	5' -TACTTTTATGATCTAGTGCACATTC- 3'	61	55	1160
Os03g0397400-R			3' -GTATGATTCAGTCTGAAATGAATT- 5'			
Os04g0613900-F	KUP	Potassium uptake protein, kup domain	5' -ATGTTGTTGTAATGTTTCCGGTAT- 3'	62	56	1072
Os04g0613900-R		containing protein	3' -CATATGCATTTCTATCTGACTTTG- 5'			
Os05g0455500-F	P5CS	Similar to Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase	5' -TTTACAGGATTCATCTGGTATATTC- 3'	61	55	1201
Os05g0455500-R			3' -CTCATTTGCCTCAAAGCATCTG- 5'			
Os07g0666900-F	NHX1	Similar to Na ⁺ /H ⁺ antiporter <i>NHX6</i>	5' -GCTAGATTTGAGCGGCATTCTCA- 3'	61	55	1199
Os07g0666900-R			3' -TCAATGACTGGACGGTACGGCAA- 5'			
Os12g0610600-F	NAC	Similar to <i>NAM/CCUC2</i> -likeprotein	5' -AACTACCCCAATTAATCCCAAGTC- 3'	61	55	1200
Os12g0610600-R			3' -ATGAGTGAGTTGTGAAACATTTTAC- 5'			
Os12g0641100-F	SOS1	Similar to Na ⁺ /H ⁺ antiporter	5' -GCACCATGTAAAAACATGTAAATTC- 3'	59	53	1178
Os12g0641100-R			3' -CCAGCAAGTAAACAACATTTGTGC- 5'			

(나) 1세대에서 선발된 M₃ 돌연변이 계통을 활용한 내염성 관련 벼 유전자 대상 분석체계 확립 및 Capillary (Genetic analyzer, ABT 3130 XL)와 DNA sequencing을 이용하여 내염성 관련 계통 선발 및 SNP 검정 : 1차 in vivo 선발 192 계통 (M₃) 대상 타겟유전자 TILLING 분석으로 SNP를 갖는 14 계통 선발

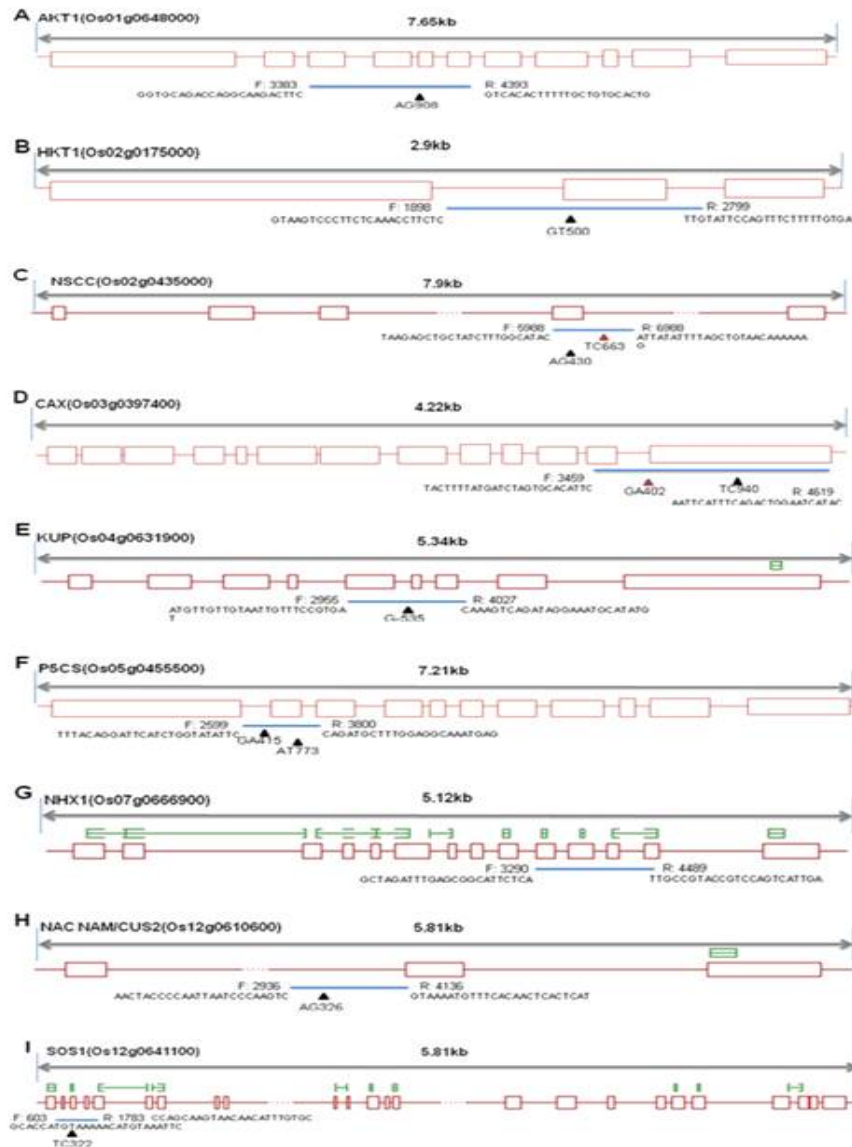


그림4-11. SNP site in each gene with 1 to 9 primers. A triangle indicates a detected SNP. In the case of *NSCC*, an SNP is identified at the same site of each gene from different DNA, which is indicated by the red triangles.

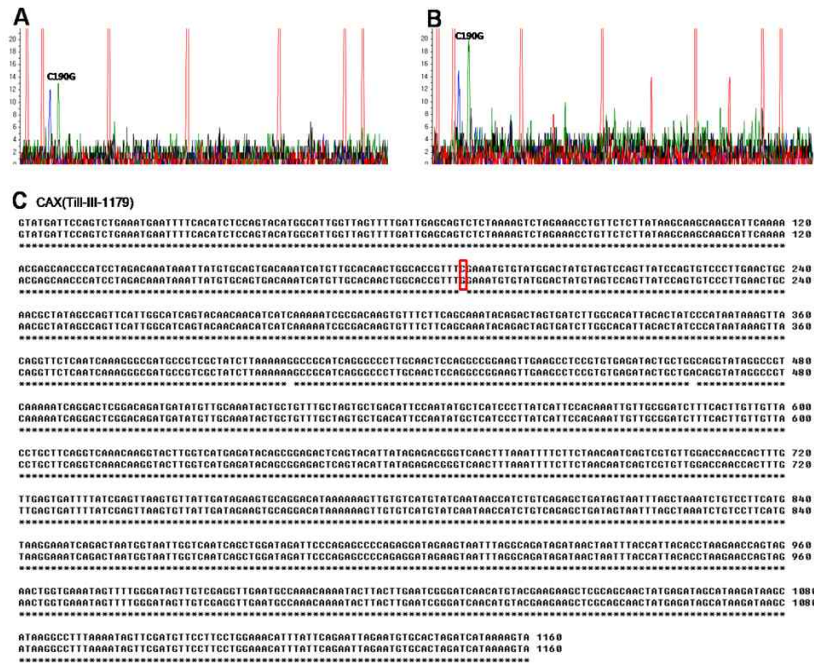


그림4-12. An example of the results of the discovered SNPs by comparing peak data from capillary electrophoresis with DNA sequencing alignment data in 2961 mutant lines. SNPs were detected differently in mutant lines according to each fluorescence primer set. A and B indicate the peaks of the pooled data. A and B are the results of data in a 2-dimensional pool: (A) is composed of the DNA of some lines, Till-III-1155, 1167, 1179, 1191, 1203, 1215, 1227, and 1239, while (B) consists of Till-III-1179, 1180, 1181, 1182, 1183, 1184, 1185, and 1186 (supplemental fig). Because the common line between (A) and (B) is 1179, the detailed site of an SNP can be shown through the results of sequencing the mutation line in (C).

- (다) TILLING 분석 완료 및 SNP 해당 유전자 re-sequencing 검정
- Capillary의 결과(TILLING 분석)와 DNA sequencing을 비교분석한 결과를 토대로 선발 개체의 치환된 염기(ex> A→G, G→T, C→T 등)를 확인하고 Database (<http://www.gramene.org/>)의 정보를 이용하여 SNP 위치 확인.
 - TILLING 분석결과와 염 저항성 선발을 통한 내염성 벼 14개 계통의 최종선발.

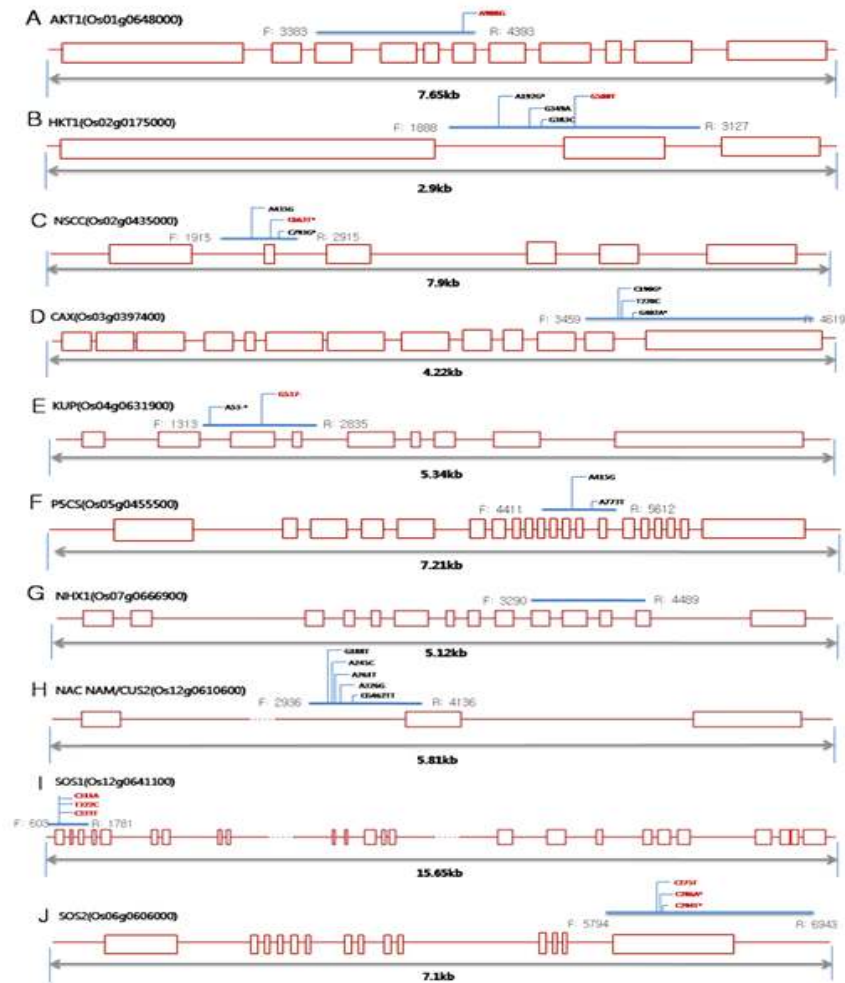


그림4-13. The position of the detected SNP in each target gene. Blue line indicates target gene and there are SNPs in blue lines variously. Accurate position of SNPs and the phase of the mutated sequence were marked as number and alphabet, respect. Red square boxes represent exons of the genes, and red letters indicate SNPs located in the exons. And, asterisk presents the position of SNPs detected in some lines commonly.

표4-5. The phase of the mutation lines having SNPs. Expected SNP size from the capillary was indicated by rounding off the average between the accounts of the two peak points referred to in 그림4-1. An asterisk indicates the lines that survived after the 1% (170 mM) salt treatment in 2961 M2 lines for 3 weeks.

Target gene	Mutation line (detected fluorescence)	Gene length	Expected SNP size from capillary	Calculated SNP site from capillary	Detected SNP site from Sequencing alignment	Changed Base pair	Total mutation site detected from sequence alignment	The number of the mutated sequence/ total gene sequence (range)	The number of mutation per each gene
<i>AKT1</i> (R)	Till-III-19* (FAM)	1060	170	890	908	A→G	627,729,852,908,1050-1060	5/1060 (0.47%)	1/628kb
<i>HKT</i> (F)	Till-II-724 (FAM)	1240	380	380	348	G→A	192,348,442,498	24/1240 (1.94%)	1/153kb
	Till-II-780 (FAM)	1240	161	161	192	A→G	192,227,478,521,835		
	Till-II-864 (FAM)	1240	160	160	192	A→G	192,442,498,835		
	Till-II-871 (FAM)	1240	356	356	383	G→C	192,383,442,498,835		
	Till-II-969 (FAM)	1240	161	161	192	A→G	192,349,442,835		
	Till-II-970 (FAM)	1240	160	160	192	A→G	192,349,406,442,498,564,812		
	Till-II-1062 (FAM)	1240	162	162	192	A→G	192,349,442,498,515,529,835		
	Till-III-43 (FAM)	1240	160	160	192	A→G	192,349,442,498,835		

	Till-III-324* (FAM)	1240	495	495	500	G→T	7,48,50,500,714,835,859,956,999,1072		
<hr/>									
NSCC (R)						C→G			
	Till-II-775 (FAM)	1000	210	790	793	C→G	663,793		
	Till-II-787 (FAM)	1000	212	788	793	C→G	663,793		
	Till-II-847 (FAM)	1000	211	789	793	C→G	663,793		
	Till-II-776 (FAM)	1000	221	779	793	C→G	663,793		
	Till-II-788 (FAM)	1000	198	802	793	C→G	663,793	9/1000 (0.9%)	1/329kb
	Till-II-848 (FAM)	1000	200	800	793	C→G	663,793		
	Till-III-114* (FAM)	1000	355	645	663	C→G	663,952		
	Till-III-142* (FAM)	1000	355	645	663	C→T	663, 735, 953		
	Till-III-255* (FAM)	1000	355	645	663	C→T	663,952		
	Till-II-301* (FAM)	1000	565	435	435	C→T	115,435,662,958		
						A→G			
<hr/>									
CAX(F)									
	Till-II-279 (FAM)	1160	193	193	190	C→G	190,403,466,		
	Till-II-406 (FAM)	1160	223	223	190	C→G	190,403,466		
	Till-II-785* (HEX)	1160	230	930	940	T→C	283, 402, 465, 940, 1152,		
	Till-III-203* (FAM)	1160	355	355	402	G→A	1155-1158		
	Till-III-325 (FAM)	1160	178	178	190	C→G	270, 402, 465, 1152,	10/1160 (0.86%)	1/343kb
	Till-III-459* (FAM)	1160	355	355	402	G→A	1155-1158		
	Till-III-1179 (FAM)	1160	164	164	190	C→G	190,403,466		
	Till-III-1378 (FAM)	1160	165	165	190	C→G	402, 465, 1152, 1155-1158		
							190,403,466		
							190,403,466		
<hr/>									
KUP(R)									
	Till-III-955* (HEX)	1072	537	537	537	G→-	330,400,537	6/1072 (0.56%)	1/529kb
	Till-II-1160 (FAM)	1072	1013	59	53	A→-	42,53		
	Till-II-1196 (FAM)	1072	1002	70	53	A→-	30,53		
<hr/>									
P5CS(R)									
	Till-III-191* (FAM)	1201	380	821	773	A→T	415,773	3/1201 (0.25%)	1/1185kb
	Till-III-196* (HEX)	1201	390	390	415	A→G	415,763		
<hr/>									
NHXI (F)		0	1199	-	-	-	-	0/1199 (0%)	0
<hr/>									
NAC (F)									
	Till-II-985 (FAM)	1200	221	221	245	A→C	245	9/1200 (0.75%)	1/395kb
	Till-II-1106 (FAM)	1200	469	469	469	CG→TT	469,472		
	Till-II-1173 (FAM)	1200	256	256	261	A→T	188,261,708,738		
	Till-III-157* (FAM)	1200	355	355	326	A→G	291, 326		
	Till-III-572 (FAM)	1200	178	178	188	G→T	188		
<hr/>									
SQS1 (F)									
	Till-III-1028 (FAM)	1178	288	288	323	C→T	323	4/1178 (0.34%)	1/872kb
	Till-III-1224* (FAM)	1178	310	310	322	T→C	322, 1142		
	Till-III-1431 (FAM)	1178	290	290	311	G→A	311		
<hr/>									
SQS2 (F)									
	Till-II-690 (HEX)	1149	275	874	863	C→A	510,855,863,879,897,914	7/1149 (0.61%)	1/486kb
	Till-II-691 (HEX)	1149	277	872	863	C→A	855,863,874,879,897,914		
	Till-II-726 (HEX)	1149	275	874	874	C→T	855,874,879		
	Till-II-727 (HEX)	1149	270	879	855	C→T	855,874,879,914		
	Till-II-739 (HEX)	1149	276	873	855	C→T	855,879,914		
<hr/>									
Total		47				GC-AT (61.7%)		77/11459(0.67%)	1/492kb

(라) 내염성 벼 선발 계통의 형태적, 생리적 특성의 비교분석 : TILLING 분석으로 선발된 계통 (약 200 계통)을 3주간 1%의 염 처리 후 동안벼 (대조품종)와 비교 분석하여 염 저항성을 가진 계통을 선발하고 각 계통의 형태적, 생리적 특성검정, 동안벼와 비교하여 선발계통의 잎, 줄기, 뿌리의 발달이 확연하게 차이 나는 것으로 확인

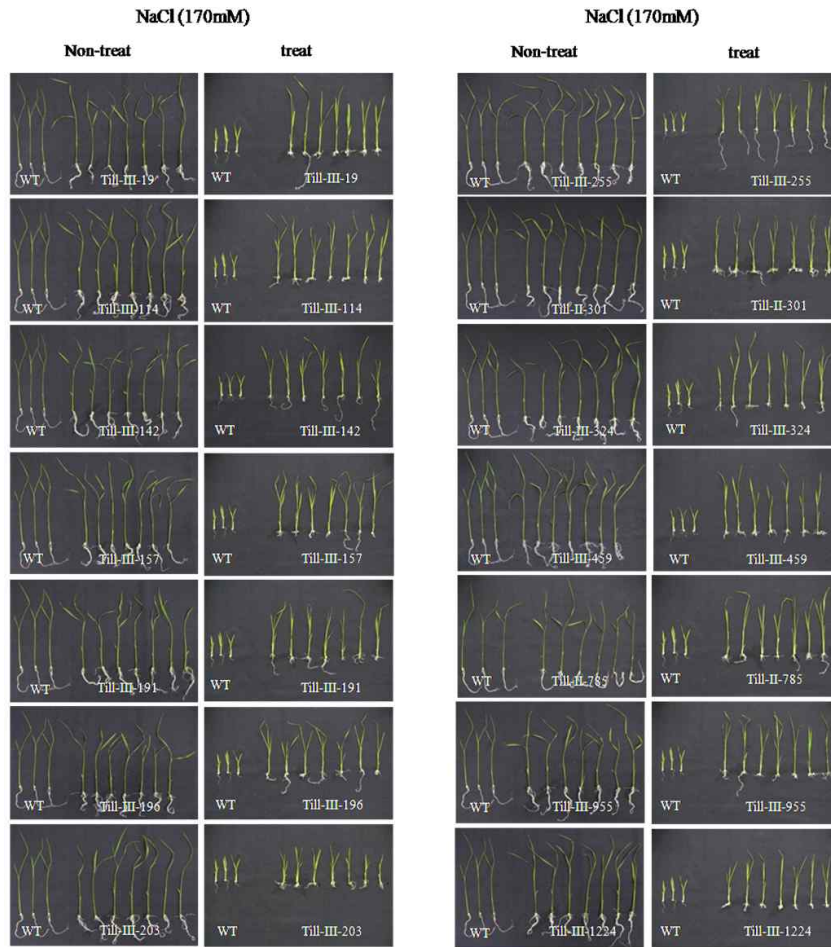


그림 4-14. The phenotype comparison between wild type and the salt tolerant lines having SNPs in membrane transportation gene through TILLING application and salt test. 14 selected mutation lines and wild type were treated to 1% NaCl for 3 weeks in vitro. These lines clearly appeared to morphological change in salt-treatment. While wild type has short leaf and root, most mutation lines except Till-III-203 show normal growth and development in salt-treatment.

표 4-6. A comparison of the germination rate and root, leaf, and plant length between the wild type and the salt stress lines. By performing TILLING and screening the salt tolerant lines that survived after the 1% NaCl solution for 3 weeks, we selected 14 salt tolerant lines from the 2961 lines. Additionally, 49 lines from the high-throughput screening and 192 lines from the NaCl test were chosen. Among these lines, the lines that underwent both the TILLING and salt treatment were screened as the final 14 lines. To survey their phenotype, a re-salt stress test was conducted in vitro for 3 weeks. Root and leaf lengths were expressed in the average value of 8 individuals in each line.

Germination rate		root length		Leaf length		plant length		Albino
Non-treat	Treat	Non-treat	Treat	Non-treat	Treat	Non-treat	Treat	

Wild type	41/50	5/70	11.1±0.9	2.97±1.0	22.57±2	3.57±0.2	33.67±2.9	6.54±0.9	
Till-III-19	26/26	34/36	7.43±2.7	2.63±6.2	22.54±4	13.4±4.6	29.97±6.6	16.03±10.8	
Till-III-324	19/22	31/31	9.96±7.7	2.53±2.7	21.84±4.1	16.63±5.6	31.8±3.6	14.5±1.7	3
Till-III-114	10/15	29/32	9.06±1.1	1.74±2.4	23.34±2.7	15.53±3.1	32.4±1.6	17.27±0.8	5
Till-III-142	12/13	29/29	8.87±3.5	8.84±1.2	20.01±4	14.66±2.1	28.88±0.5	23.5±3.3	
Till-III-255	27/27	11/12	7.67±1.7	8.93±3.7	31.46±5.6	7.84±1.8	39.13±7.4	16.77±1.8	
Till-II-301	13/14	11/11	10.64±4	2.74±5.1	19.39±2.6	10.31±1.3	30.03±6.6	13.05±3.8	
Till-III-203	20/20	24/26	7.91±2.9	1.93±1.1	22.06±6.4	7.17±1.5	29.97±3.5	9.1±0.4	
Till-III-459	21/21	33/36	8.39±1.7	2.6±1.5	24.47±3.3	10.91±2.1	32.86±5	13.51±3.6	
Till-II-785	9/9	55/55	10.3±2.2	2.86±3	20.18±5.3	13.39±2.7	30.48±3.1	16.25±5.8	
Till-III-955	20/20	48/48	9.56±2	2.96±4.3	20.6±6.6	14.76±3.5	30.16±8.6	17.72±0.9	
Till-III-191	20/22	36/38	9.87±2.2	3.43±2.6	18.81±2	13.61±5.4	28.68±0.2	17.04±8	
Till-III-196	11/12	24/27	8.56±1.6	3.36±3.6	20.47±5.3	12.44±3.6	29.03±7	15.8±7.2	
Till-III-157	28/28	25/32	8.17±2	2.86±4.4	21.76±1.8	16.1±2.5	29.93±0.1	18.96±6.8	
Till-III-1224	18/18	39/39	9.47±2	1.47±0.8	21.1±2.8	12.57±1.6	30.57±0.8	14.04±2.5	

- TILLING 분석 결과와 부합하는 exon 내 SNP를 가진 7계통 선발: Till-III-19, Till-III-114, Till-III-142, Till-III-255, Till-III-324, Till-III-955, Till-III-1244.



그림4-15. SNPs in 7 mutant lines with salt tolerance among 14 mutant lines. a to g indicate that DNA sequence was translated to protein sequence by the simulated translation program.

(2) Microarray 결과를 활용한 내염성 관련 유전자 네트워크 분석

(가) 염 스트레스 반응 유전자 네트워크 구축을 위해 Microarray 분석 전략 및 방법 구축: 처리구 비교, 무처리구 비교, 각 개체간 비교(2반복)로 분석

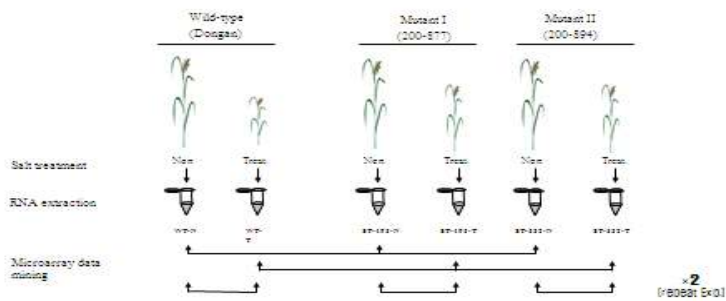


그림4-7. the strategy of microarray analysis to compare gene expression pattern Wild type and two mutant lines effectively.

- 원품종과 선발계통, 처리구와 무처리구에 대한 유전자 발현 비교로써 염 스트레스 반응 유전자 검정(원품종 vs TILL II-877, 원품종 vs TILL II-894, TILL II-877 vs TILL II-894)

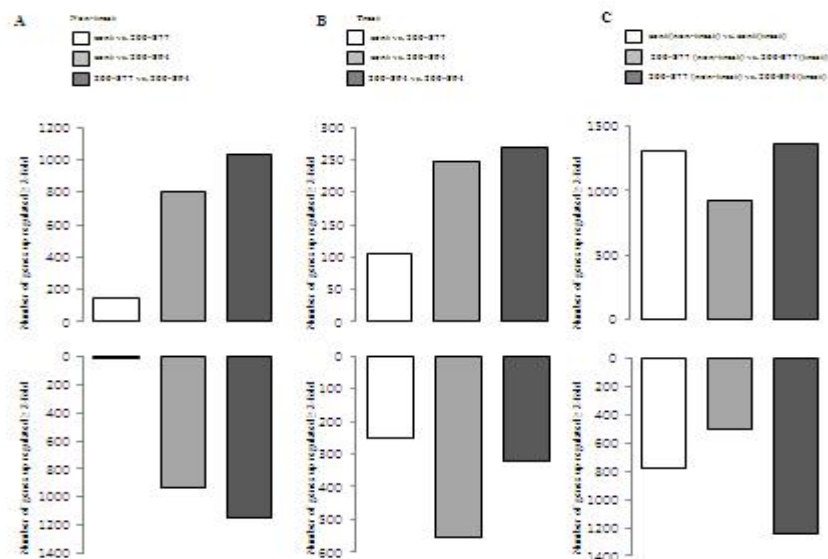


그림4-16. The number of genes up and down-regulated more than 2 fold among wild type, Till-II-877 and Till-II-894.

표4-7. The number of genes responded to salt stress among Wild type, TILL II-877 vs TILL II-894 .

	nontreat			treat			individual		
	WT vs 877	WT vs 894	877 vs 894	WT vs 877	WT vs 894	877 vs 894	WT vs 877	WT vs 894	877 vs 894
up	148	804	1030	104	248	270	1310	921	1359
down	13	928	1152	252	553	319	780	508	1241
Sum	161	1732	2182	356	801	589	2090	1429	2600

- 염 스트레스 반응 유전자의 발현 양상을 유전자의 기능에 대한 그룹별로 나누어서 분석: ion binding, membrane transportation 관련 유전자가 높은 발현을 보임

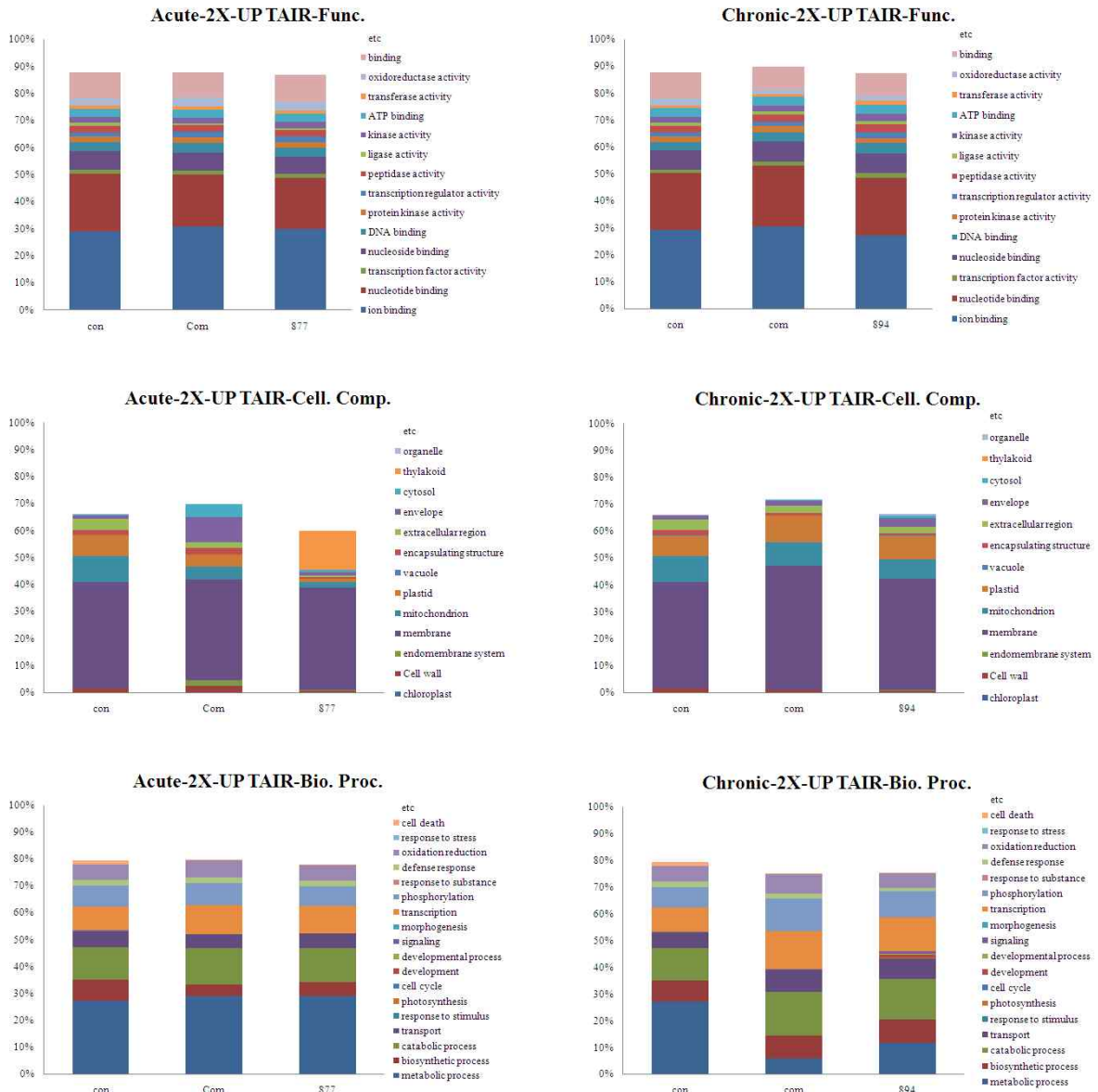


그림4-17. The graph of functional grouping genes up-regulated more than 2-fold

(나) 염 스트레스 반응 유전자 네트워크 구축을 위한 3차 in vivo 선발 계통 중 2 계통 (TILL II-877, TILL II-894)의 유전자 발현 대단위 검정 및 data mining : 과도한 염으로 인한 삼투스트레스와 세포독성 메커니즘에 따라 내염성 계통과 원품종에서 관련 유전자들 (ROS scavenging enzyme, membrane transportation, proline)의 발현 비교 및 분석 (붉은색이 up-regulation, 녹색이 down-regulation, 숫자는 발현 차이를 나타냄)

Figure 4-8. 2-fold up and down regulation gene related to ROS scavenging enzyme in two mutant lines compared to wild type between salt treatment and non-salt treatment in leaves.

Enzyme	Gene Name	LOC_Number	Degree of regulation						
			Non NaCl			NaCl treatment			
			WT	Till-II-877	Till-II-894	WT	Till-II-877	Till-II-894	
Superoxide dismutase(SOD)									
$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	Cu/ZnSOD	LOC_Os03g11960.1	1	0.14	1.41	1	0.17	-0.03	
Ascorbate peroxidase(APX)									
$2Asc + H_2O_2 \rightarrow 2MDA + 2H_2O$	APX5	LOC_Os12g07830.1	1	-0.09	-1.27	1	0.40	-0.05	
Peroxidase(POD)	peroxidase precursor, putative, expressed	LOC_Os04g59210	1	-0.31	4.57	1	1.03	1.11	
	peroxidase precursor, putative, expressed	LOC_Os05g04410	1	-0.30	0.64	1	0.99	1.39	
	peroxidase precursor, putative	LOC_Os06g35490	1	-0.05	-4.48	1	1.22	-2.64	
	peroxidase precursor, putative, expressed	LOC_Os07g47990	1	-0.10	-0.38	1	1.11	0.21	
	peroxidase precursor, putative, expressed	LOC_Os07g48020	1	-0.15	-1.65	1	0.83	1.25	
	peroxidase precursor, putative, expressed	LOC_Os07g48040	1	0.20	-5.37	1	3.09	3.01	
	peroxidase precursor, putative, expressed	LOC_Os09g29490	1	0.97	0.29	1	0.58	1.09	
	L-ascorbate peroxidase 4, putative, expressed	LOC_Os09g36750	1	-0.52	-1.83	1	1.55	-0.03	
	peroxidase precursor, putative, expressed	LOC_Os10g02070	1	-0.73	0.97	1	-0.38	1.03	

Figure 4-9. 2-fold up and down regulated genes which cord membrane transprtation protein in two mutant lines compared to wild type between salt treatment and non-salt treatment in leaves.

Gene name	annotation	LOC_Number	Degree of regulation					
			Non NaCl			NaCl treatment		
			WT	Till-II-877	Till-II-894	WT	Till-II-877	Till-II-894
KUP	potassium transporter, putative, expressed	LOC_Os08g36340	1	0.19	-2.06	1	-0.72	-0.34
OPT	transposon protein, putative, unclassified, expressed	LOC_Os02g02460	1	-0.15	1.07	1	-0.16	-0.41
HKT	OsHKT2:1 - Na ⁺ transporter, expressed	LOC_Os06g48810	1	-0.29	0.86	1	-0.29	2.08
NAC	NAC domain transcription factor, putative, expressed	LOC_Os01g60020	1	0.33	0.30	1	-1.43	-1.22
	no apical meristem protein, putative, expressed	LOC_Os08g10080	1	0.08	2.84	1	-0.09	0.01
	NAC domain transcription factor, putative, expressed	LOC_Os11g03300	1	0.76	3.03	1	-1.19	0.87
	No apical meristem protein, putative, expressed	LOC_Os12g05990	1	0.81	-1.86	1	-1.06	-1.66

Figure 4-10. 2-fold up and down-regulated genes related to proline pathway in two mutant lines compared to wild type between salt treatment and non-salt treatment in leaves.

annotation	LOC_Number	Degree of regulation					
		Non NaCl			NaCl treatment		
		WT	Till-II-87	Till-II-89	WT	Till-II-87	Till-II-894
adhesive/proline-rich protein, putative	LOC_Os01g57004	1	-0.04	1.22	1	0.23	0.67
proline-rich family protein, putative, expressed	LOC_Os01g59130	1	-0.15	-2.07	1	1.65	-0.14
proline-rich family protein, putative, expressed	LOC_Os03g24940	1	0.35	-0.80	1	-0.30	-1.22
basic proline-rich protein precursor, putative	LOC_Os03g58180	1	0.25	1.54	1	-0.07	0.68

basic proline-rich protein, putative, expressed	LOC_Os04g32850	1	0.43	-1.43	1	0.67	0.70
proline-rich protein, putative, expressed	LOC_Os05g46840	1	0.41	-1.57	1	-0.93	-3.33
proline-rich cell wall protein-like, putative, expressed	LOC_Os06g06530	1	0.14	-0.67	1	1.87	-1.37
gamete-specific hydroxyproline-rich glycoprotein a2, putative, expressed	LOC_Os07g48520	1	0.03	1.27	1	0.56	0.90
proline rich protein 3, putative, expressed	LOC_Os08g15080	1	0.22	0.20	1	0.06	1.07
hydroxyproline-rich glycoprotein family protein, putative, expressed	LOC_Os09g36890	1	-0.25	1.13	1	1.68	1.06
hydroxyproline-rich glycoprotein family protein, putative, expressed	LOC_Os10g02760	1	1.18	-0.17	1	-0.14	0.09

(다) 3차 in vivo 선발 2계통(TILL II-877, TILL II-894)의 Microarray 결과를 활용한 내염성 관련 유전자 네트워크 결과: 동안벼 원품종, Till-II-877, Till-II-894 라인으로 분리하였으며 R의 ARACNE 알고리즘을 이용하여 Pearson correlation 통계식을 사용

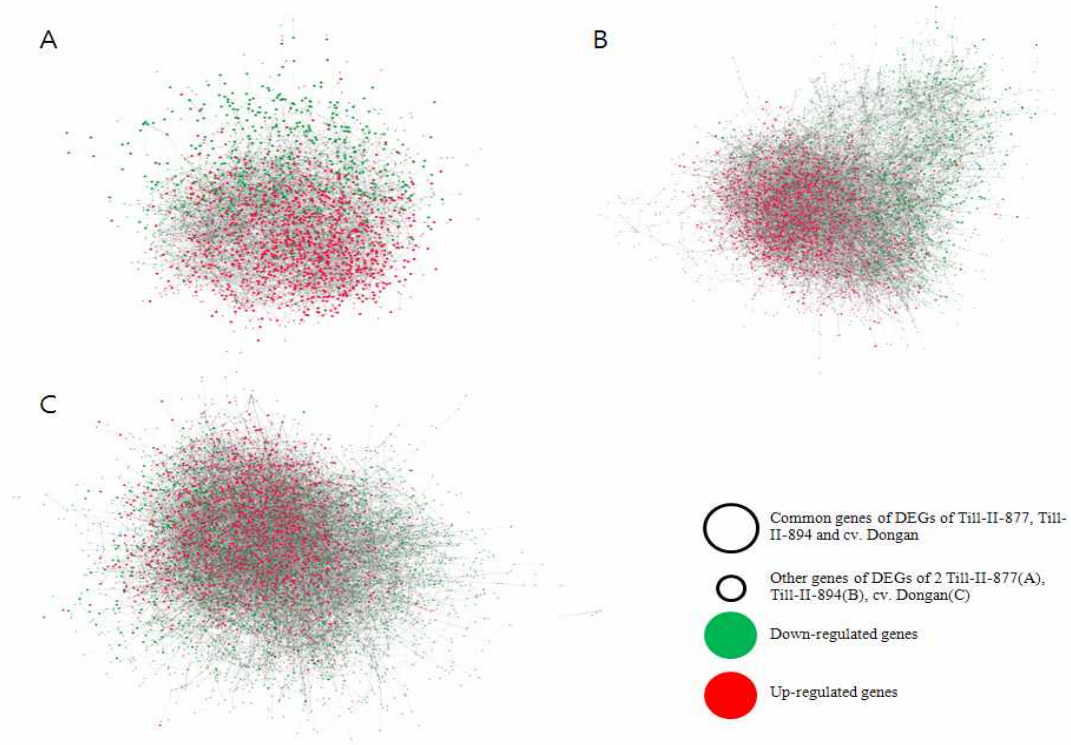


그림4-18. The network among the salt response genes. This analysis was constructed to pearson correlation statistic method using ARACNE algorism of R program. As result, the three figures (A, B, and C) consist of Till-II-877, Till-II-894, and cv. Dongan network, each other.

(3) 염 스트레스에 대한 형태적, 생리적 분석

(가) 염 스트레스 반응 형태, 생리분석을 위한 3차 in vivo 선발 2계통 (TILL II-877, TILL II-894) : 시간 경과에 따른 식물체의 염해 진행 양상을 살펴보기 위한 염 및 시간 처리 (NaCl 170mM, 14일 처리)



그림4-19. The comparison of phenotype between wild type and two mutation lines according time lapse for 14days after salt treatment.

(나) 원품종과 내염성 돌연변이 계통의 MDA, 광합성, ROS scavenging 효소 등 생리 분석 비교: 생리 분석의 결과로, 두 돌연변이 계통 (TILL II-877, TILL II-894)의 광합성 관련 요소, CAT 함량이 내염성을 증명

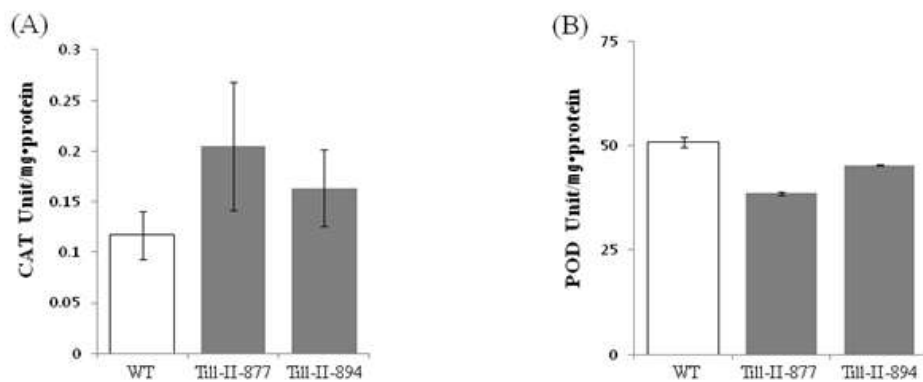


그림4-20. The change of catalase activity(CAT, A) and peroxidase activity (POD, B) contents in salt tolerance line of rice.

(4) 벼 품질(Tryptophan 함량) 관련 기능성 *OsASA1* 변이 유전자 등록

- TILLING (Capillary method) 분석으로 돌연변이 집단 내(1,350계통, M8세대)에서 ‘*OsASA1*’ 유전자에 SNP가 발생한 18개 계통을 선발.
- 선발 계통의 tryptophan 함량을 측정하여 대조품종 (동안벼)과 비교분석한 결과 exon 영역에서 SNP가 발생한 3개 계통에서 약 2배 이상의 tryptophan 함량 증가가 확인 됨.
- 3개 선발 계통의 아미노산 서열 분석, 각각 E→G, A→G, VS→FF 로의 서열변화 확인.
- ‘*OsASA1*’ 돌연변이 (tryptophan 함량증가) 3종의 염기서열을 분석하여 NCBI의 gene bank에 돌연변이 유전자정보 등재

4. 간척지 적응 유망계통 품종출원

가. 간척지 적응 신품종 원해 2호(Wonhae-2ho, 계통명 ST-301) 품종보호권 출원

- 품종보호권 출원일: 2012년 9월 27일
- 품종보호 출원번호: 출원 2012-490
- 품종명칭 출원번호: 명칭 2012-1092
- 육성자: 김동섭, 강시용, 김진백, 하보근, 김상훈, 이상재

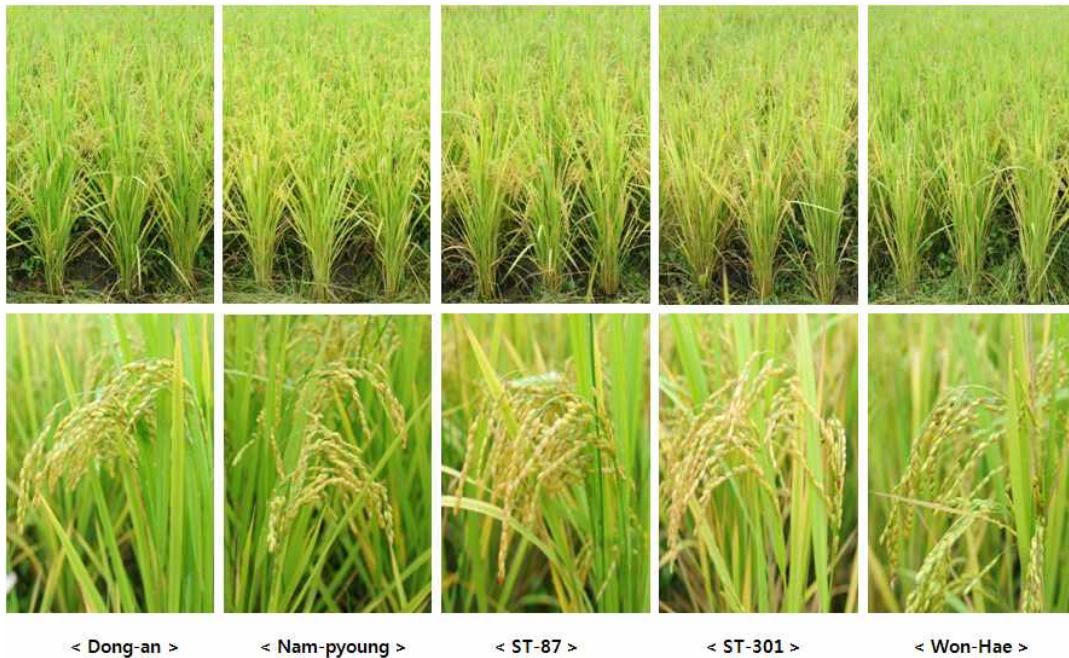


그림4-24. Agronomic traits of original variety "Dongan", two check varieties "Nampyoung", "Wonhae", and 2 mutant lines (ST-87 and ST-301) in Jeongeup.



그림4-25. Comparison of spikelets harvested at the saline field in new variety "Wonhae-2ho, original variety "Dongan", and check variety "Nampyoung".

나. 품종의 주요 특성

- (1) 내염성 유망계통인 ST-87과 ST-301의 수량 검정을 확인 : 원품종인 동안과 대조구인 남평, 원해와의 수량 검정을 비교

표4-11. Agricultural traits of new variety "Wonhae-2ho, original variety "Dongan", and check variety "Nampyoung".

품종명	지역 연도	출수기 (월.일)	간장 (cm)	수장 (cm)	주당 수수 (개)	수당 립수 (개)	등숙 비율 (%)	천립 중 (g)	정현 비율 (%)	10a 당 수량 (kg/10a)		
										정조	현미	백미
동안벼 (원품종)	정읍 '10	8. 8	75.0	19.7	12.8	102.0	87.0	28.1	81.2	721.2	585.6	540.7
	'11	8. 7	71.2	20.3	13.4	95.0	93.0	27.1	81.9	720.9	590.4	545.3
	평균	8. 8	73.1	20.0	13.1	98.5	90.0	27.6	81.6	721.1	588.0	543.0
	계화 '10	7. 30	59.4	18.3	13.1	79.4	88.4	28.1	78.5	600.3	471.2	433.5
	'11	8. 10	58.4	20.1	13.5	94.3	90.2	26.5	76.3	610.5	465.8	428.5
	평균	8. 5	58.9	19.2	13.3	86.9	89.3	27.3	77.4	605.4	468.5	431.0
남평벼 (전북대 조품종)	정읍 '10	8. 7	72.7	18.7	13.5	97.2	84.7	23.2	79.5	714.9	575.5	532.5
	'11	7. 31	71.8	20.4	14.4	101.5	92.6	23.6	80.0	744.4	595.5	552.8
	평균	8. 4	72.3	19.6	14.0	99.4	88.7	23.4	79.8	729.7	585.5	542.7
	계화 '10	8. 11	60.4	21.7	14.3	90.0	88.6	23.9	79.4	610.5	484.7	446.0
	'11	8. 10	64.2	19.5	14.6	96.3	89.8	23.6	76.5	605.3	463.1	426.0
	평균	8. 11	62.3	20.6	14.5	93.2	89.2	23.8	78.0	607.9	473.9	436.0
원해2호 (출원품종)	정읍 '10	8. 7	68.4	19.8	14.8	90.2	88.6	31.1	82.5	725.3	598.4	550.5
	'11	8. 7	67.5	22.2	15.2	105.0	92.7	25.8	84.3	722.6	609.2	560.4
	평균	8. 7	68.0	21.0	15.0	97.6	90.7	28.5	83.4	724.0	603.8	555.5
	계화 '10	8. 7	54.4	19.9	15.0	95.8	93.4	28.7	82.3	650.3	535.2	492.4
	'11	8. 6	61.4	21.5	15.6	105.5	95.7	26.9	80.5	660.9	532.0	489.5
	평균	8. 7	57.9	20.7	15.3	100.7	94.6	27.8	81.4	655.6	533.6	490.9

(2) 내염성 형질 특성

(가) 발아율과 biomass production은 내염성의 지표로서 사용된다. 3엽기에 171mM(1%) NaCl이 첨가된 1/2 MS 배지에서 7일 동안의 발아율을 3반복으로 조사하였다. 원해2호(ST-301)는 83%의 발아율을 보였고, 동안벼는 62% 발아율을 보이는 것으로 조사되었다. 무처리시 동안벼와 원해2호 모두 100%에 가까운 발아율을 보인 것으로 보아, 원해2호는 염분이 함유된 조건에서 내염성을 가져 원품종인 동안벼보다 발아율이 높은 것으로 생각된다.

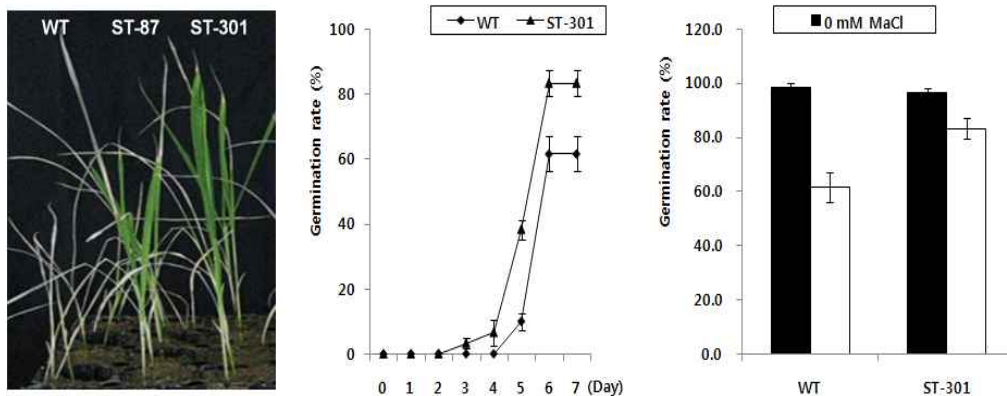


그림4-26. Growth comparison of the WT and 2 selected mutants. Seeds from the WT and 2 mutants were germinated and grown in soil trays (without salt) for 21 days, and then irrigated with 171 mM NaCl solutions for 7 days.

(나) 염처리에 의한 cell damage를 알아보기 위해 3엽기에 171mM(1%) NaCl을 7일 동안 처리하고 전해질 누출 분석을 3반복으로 조사하였다. 무처리시에는 전해질의 누출이 차이가 없었지만 염처리 후에는 동안벼에서 85% 전해질 누출 증가를 보인 반면, 원해2호(ST-301)에서는 35% 전해질 누출 증가를 보였다. 이러한 결과는 salt stress에 대해 원해2호가 세포막 상해를 덜 받음을 보여주는 것이다.

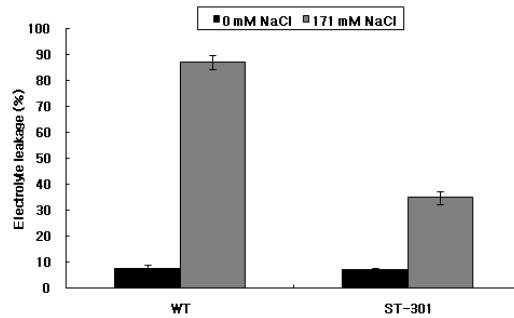


그림4-27. Electrolyte leakage analysis of the wild type and Wonhae-2ho(ST-301) under 171 mM NaCl after 7 days.

(다) salt stress에 의한 cell damage를 알아보기 위해 동안벼와 원해2호(ST-301) 잎에서 Na⁺와 K⁺이온의 함량을 3반복으로 측정하여 비교하였다. 무처리 시에는 동안벼와 원해2호 모두에서 Na⁺이온의 함량이 비슷하게 측정되었으나, 염처리 7일 후에는 Na⁺이온의 함량이 동안벼는 28.8배, 원해2호는 15.3배 증가를 보였다. K⁺/Na⁺ ratio를 비교했을 때, 동안벼(1.4)에 비해 원해2호(1.8)가 매우 높게 확인되었다.

표4-12. Effects of salinity on sodium (Na⁺) and potassium (K⁺) contents and K⁺/Na⁺ ratio in the leaves of the WT and Wonhae-2ho(ST-301).

Plants	0 mM NaCl			171 mM NaCl		
	Na ⁺	K ⁺	K ⁺ /Na ⁺ ratio	Na ⁺	K ⁺	K ⁺ /Na ⁺ ratio
Dongan	21.7	708.3	32.7	625.1	870.0	1.4
Wonhae-2ho (ST-301)	32.3	888.4	27.5	495.5	886.0	1.8

Numbers given are ppm.

(라) 염처리 유무에 따른 원해2호(ST-301)와 동안벼의 유식물에서 전체 아미노산 함량을 3반복으로 측정하여 비교하였다. 무처리 시에는 동안벼에 비해 원해2호의 전체 아미노산 함량이 39.8% 적은 것으로 조사되었고, 각 아미노산의 함량 역시 동안벼에서 높은 것으로 확인되었다. 그러나 염처리 시에는 동안벼의 전체 아미노산 함량이 70.5% 감소한 반면, 원해2호는 29.7% 감소를 보였다. 결과적으로는 171mM NaCl을 7일 처리하였을 때, 동안벼에 비해 원해2호의 전체 아미노산 함량이 1.4배 더 높은 것으로 조사되었다. 일반적으로 salt stress는 free amino acid의 증가를 유도하지만 극심한 salt stress의 경우 cellular damage를 야기해서 free amino acid의 축적을 방해하는 것으로 알려져 있다. 동안벼에서 염처리에 의해 아미노산 축적이 줄어든 것은 극심한 salt

stress에 의한 것으로써, 원해2호는 salt tolerance를 가지고 있기 때문에 아미노산의 함량 변화를 줄일 수 있었다.

표 4-13. The amino acid profiles in the leaves of the WT and Wonhae-2ho(ST-301) after 7-day treatment with 171 mM NaCl.

Amino acid	0 mM NaCl		171 mM NaCl	
	Dongan	Wonhae-2ho (Ratio)	Dongan	Wonhae-2ho (Ratio)
Asp ^b	19.8	14.1 (0.7)	2.5	6.9(2.8)
Glu ^c	38.1	25.9 (0.7)	9.1	16.5(1.8)
Ser	17.6	11.2 (0.6)	6.1	9.2(1.5)
Gly	29.6	16.7 (0.6)	6.5	9.6(1.5)
His	12.3	7.3 (0.6)	3.3	5.0(1.5)
Arg	12.8	7.8 (0.6)	4.2	5.7(1.4)
Thr	26.7	15.2 (0.6)	6.7	9.9(1.5)
Ala	24.9	15.0 (0.6)	8.8	11.3(1.3)
Pro	37.0	18.6 (0.5)	7.1	12.0(1.7)
Tyr	4.6	2.4 (0.5)	1.1	1.4(1.3)
Val	23.8	14.3 (0.6)	9.1	11.7(1.3)
Met	3.4	2.1 (0.6)	1.2	1.6(1.3)
Cys	0.3	0.2 (0.7)	0.1	0.1(1.2)
Ile	14.6	8.9 (0.6)	6.2	7.6(1.2)
Leu	24.7	15.1 (0.6)	10.8	12.9(1.2)
Phe	23.8	12.9 (0.5)	7.7	9.6(1.2)
Trp	0.5	0.3 (0.6)	0.3	0.3(1.2)
Lys	3.7	3.2 (0.9)	2.9	2.9(1.0)
Total	318.1	191.3(0.6)	93.6	134.4(1.4)

다. 발현되는 유전자들 간의 coexpression network analysis

(1) 염처리에 따른 선발 계통의 유전자 발현 차이 규명

- (가) ST-87과 ST-301에서 공통적으로 2배 이상 증가한 유전자가 1407개, 2배 이상 감소한 유전자가 1106개로 나타남. (Fig. A)
- (나) ST-87에서 특이적으로 발현되는 유전자는 2배 이상이 1198개, 2배 이상 감소가 527개였으며 ST-301에서 2배 이상 증가한 유전자는 1228개, 2배 이상 감소한 유전자는 1206개로 나타남 (Fig. B&C)
- (다) 염처리에 의해 두 계통에서 반대로 작용하는 유전자가 보였으며 65개 유전자가 ST-87에서 2배 이상 증가를 보였고 7개의 유전자가 ST-301에서 증가를 보임. (Fig D)

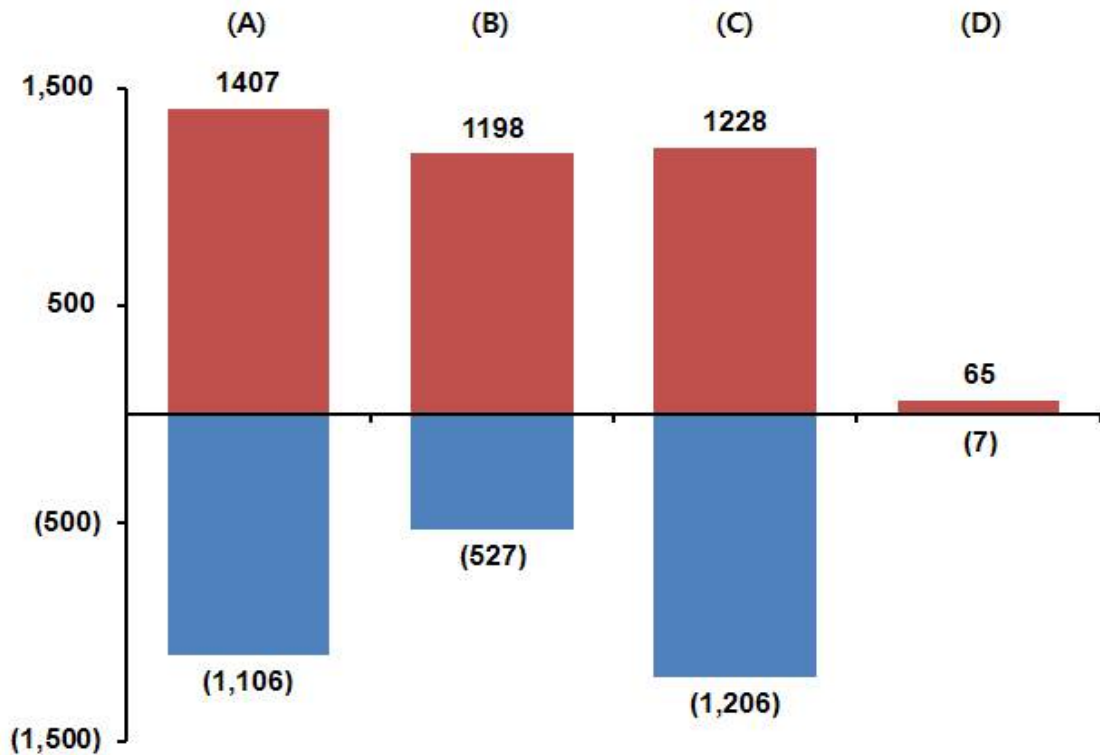


그림4-28. The number of genes that were differentially expressed between ST-87 and ST-301 under salt treatment. (A) Number of commonly expressed genes both ST-87 and ST-301 under stress, (B) Number of specific expressed genes in ST-87 under salt stress, (C) Number of specific expressed genes in ST-301 under salt stress, (D) Number of reversely expressed genes between ST-87 and ST-301.

(2) ST-87과 ST-301에서 발현되는 유전자들 간의 coexpression network analysis

(가) 두 계통에서 공통적으로 발현되는 유전자들을 이용하여 네트워크 분석을 한 결과, thiamine metabolic process, small molecule biosynthetic process, glutamine family amino acid catabolic process, mismatch repair, branched-chain amino acid metabolic process, glycoprotein catabolic process, galactose metabolic process, peptide transport, oligopeptide transport 등의 biological process에 관여하는 것을 확인

(나) 염처리 후 ST-87에서만 특이적으로 움직이는 유전자들 간에는 ncRNA metabolic process, ncRNA processing, mismatch repair 등의 biological process에 관여하는 network를 형성

(다) ST-301에서의 특이적 유전자들은 catecholamine metabolic process, organic substance transport, carbohydrate transport, peptide transport, oligopeptide transport 등의 biological process에 관여하는 network를 형성.

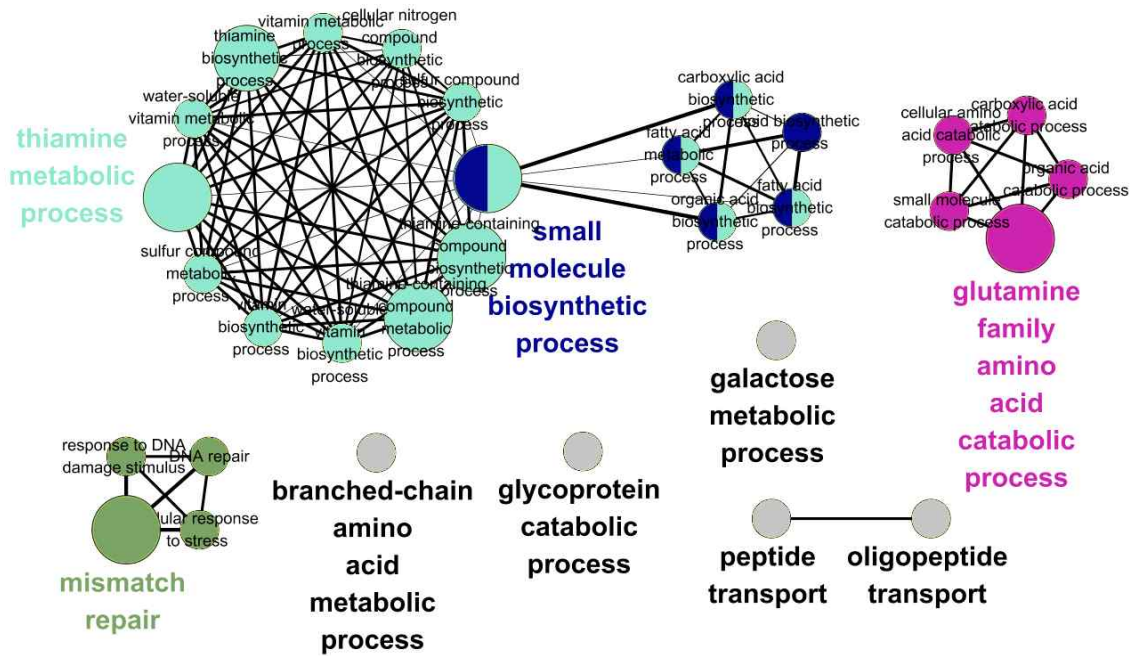


그림4-29. Coexpression network analysis of commonly expressed genes between ST-87 and ST-301 under salt stress.

(3) 염처리에 대한 식물 대사 반응

- (가) ST-87과 ST-301에서 공통적으로 발현되는 유전자들을 이용하여 식물 대사 전반적인 반응을 확인한 결과 광합성, 아미노산, 지방 및 세포벽에 관여하는 유전자들이 대체적으로 2배 이상 증가한 모습을 보였으며 2차 대사에 관여하는 유전자들이 2배 이상 감소한 것으로 나타남.
- (나) ST-87에서 특이적으로 발현되는 유전자들은 주로 광합성, 지방 및 세포벽에 관여하는 유전자들이 2배 이상 증가되는 모습을 보임.
- (다) ST-301에서 특이적으로 발현되는 유전자들의 경우 ST-87과는 대조적으로 세포벽, 광합성 특히, 광반응 유전자들, 2차 대사 쪽에 관여를 하며 2배 이상 감소함.
- (라) ST-87과 ST-301에서 반대로 발현하는 유전자들의 경우 광합성에서 광반응과 2차 대사 에서 N-misc에 관여하는 유전자들로 ST-87에서는 2배 이상 증가를 ST-301에서는 2배 이상 감소를 보임.

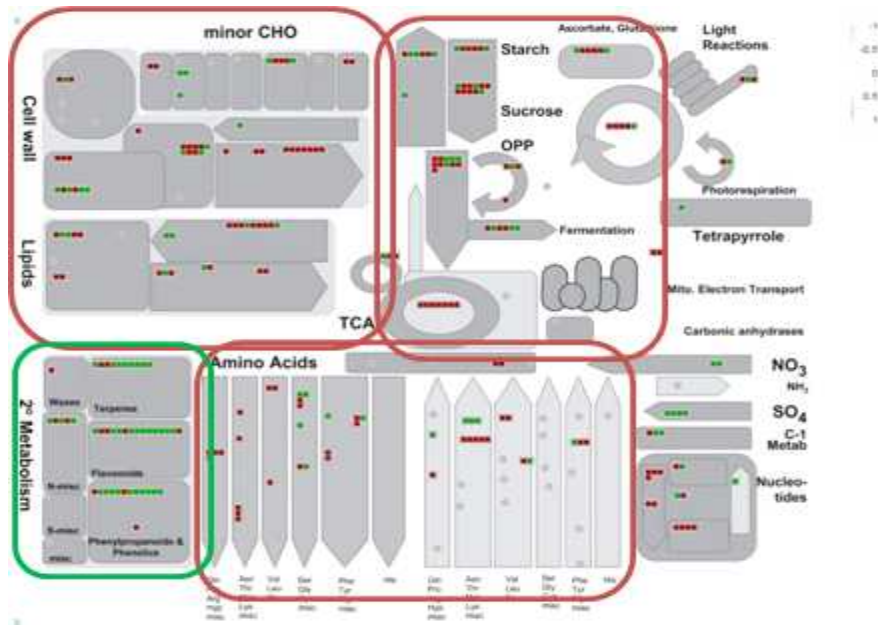


그림4-30. Metabolism overview of commonly expressed genes between ST-87 and ST-301 under salt stress.

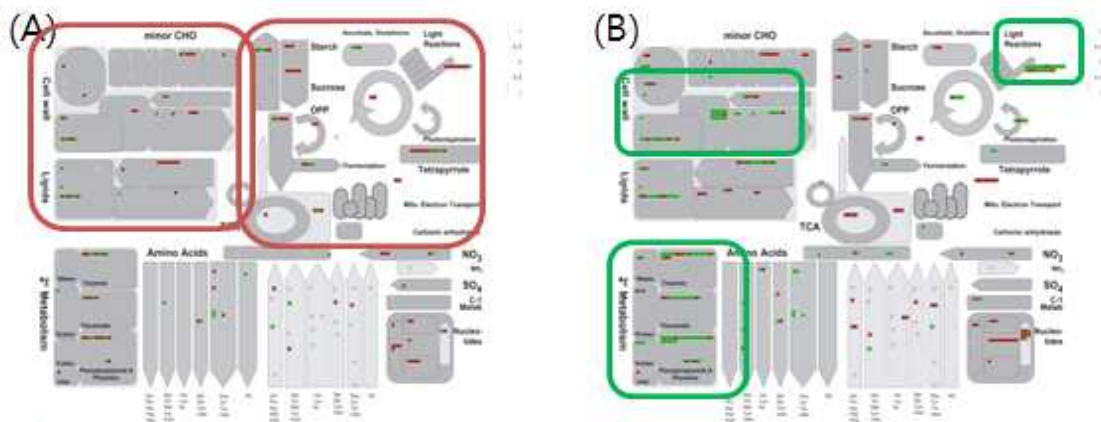


그림4-31. Metabolism overview of specific expressed genes between ST-87 and ST-301 under salt stress. (A) ST-87, (B) ST-301

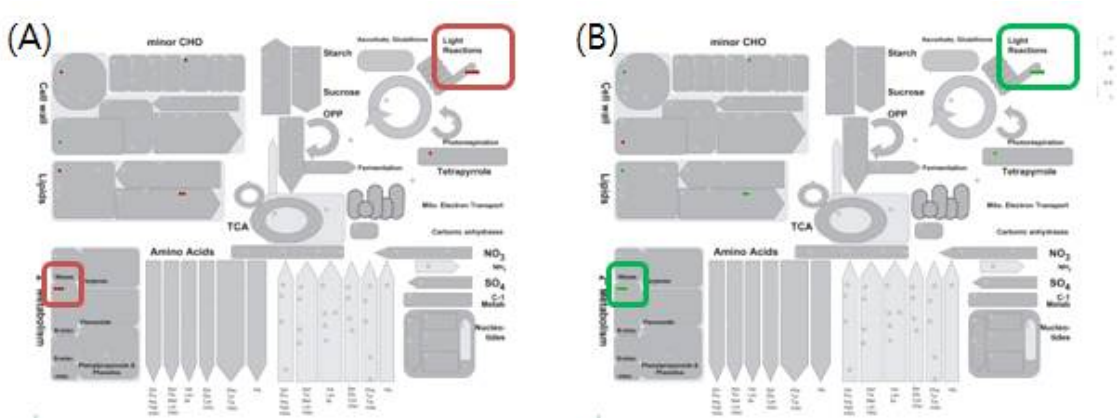


그림4-32. Metabolism overview of reversely expressed genes between ST-87 and ST-301 under salt stress. (A) ST-87, (B) ST-301

(4) 간척지 적응 출원품종과 간척지 적응 유망계통의 염 스트레스 내성시험

(가) 간척지 적응 출원품종(원해2호)의 염처리 후 형태적, 생리적 특성 분석 : 10%의 NaCl로 염 처리하여 동안벼를 대조군으로 사용하고 원해, ST87, ST301(원해2호)의 생육을 비교한 결과 간척지 적응 출원품종으로 등록된 원해2호가 가장 왕성한 생육을 보인 것으로 확인. 염 처리 12일 후 동안벼는 완전히 고사하고 원해, ST87, ST301(원해2호)에서는 꾸준히 성장하는 것으로 관찰됨. 특히 원해2호의 경우 무처리군과 비슷한 성장율을 보임.

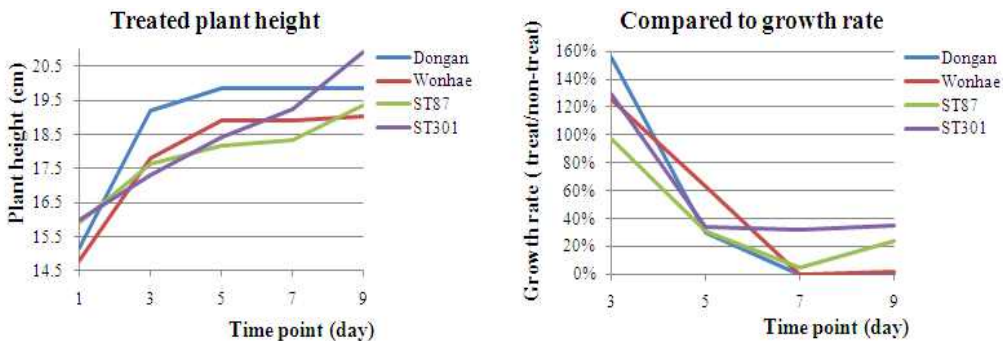


그림4-33. The comparison of 2 selected rice mutant lines and original cultivar under the salt treatment. ST87 and ST301(Wonhae-2) rice mutant lines were established through regeneration from Dongan callus by irradiated gamma-ray. They as known strong salt tolerant lines to our test were experiment to compared with control, cv. Dongan and cv. Wonhae about salt damage. In particular, in the case of the ST301(Wonhae-2), which has a very strong tolerance to salt damage was confirmed.

(나) TILLING을 통해 선발된 계통에 대한 내염성 검정 : 벼 돌연변이 기능유전체 연구용 집단(2,961계통)에서 내염성 선발, TILLING 분석을 통해 선발된 14계통에 대한 3차 내염성 실험(NaCl 10%처리)을 진행. 염 스트레스에 대한 저항성이 강한 5계통(Till III-114, Till III-142, Till III-196, Till III-203, Till III-324)을 최종 선발.

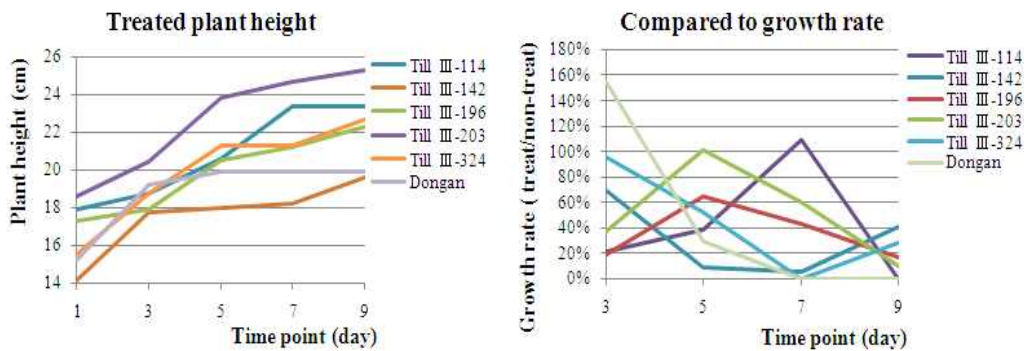


그림4-34. The selection of salt tolerant lines in TILLING assay. 14 lines by selected to TILLING analysis were tested 3rd salt test. We measured a shoot length of mutant lines and control for every 2 days during 9 days. In this data, we detected the strong salt tolerant line (TILL III-114, TILL III-142, TILL III-196, TILL III-203, TILL III-324) to compared with control, cv. Dongan.

제5절 제1협동 벼 고기능성 쌀 품종 개발 및 실용화 (서울대학교 고희중)

1. 저장단백질 돌연변이형질(esp2, esp3)을 일품벼에 도입

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

- (1) 보고된 저장단백질 조성 돌연변이체들을 확보하고 있다.
- (2) 단백질 변이체의 추가 확보를 위하여 고시히카리와 일품벼에 MNU (N-methyl-N-nitrosourea)를 처리하여 다수의 돌연변이 M3계통을 확보하였다. 그 중 NIRS를 통하여 배유 변이체로 추정되는 300여 계통을 선발하였다.
- (3) 저단백질 변이 돌연변이 계통 선발 : 예비 선발된 300 계통의 종자단백질을 추출하여, 단백질 함량 검량 Kit를 이용 저저장단백질 돌연변이 계통을 선발한다. 단백질전기영동 (1D-SDS-PAGE)을 통해 대표적인 저장단백질인 그루테린의 함량이 적은 계통을

선발하며, 1D-SDS-PAGE gel 상의 단백질 밴드 패턴을 모품종과 비교하여 특이한 단백질 발현을 보이는 돌연변이계통을 선발한다.

- (4) 저장단백질 돌연변이체 종자단백질체 특성 구명: 최근 개발된 high-throughput 단백질체 분석 기술로 선발된 저장단백질 변이체와 모 품종의 단백질체(proteome)의 구성 차이를 밝힌다.
- (5) 저장단백질 변이계통을 고정하고 농업형질을 평가한 후 품종으로 육성한다. 또한 기존 변이체와 우리 품종들을 교배 후 세대진전과 선발을 반복하여 단백질 변이 품종으로 육성한다.

나. 연구개발 결과 및 고찰

- (1) 1d-SDS PAGE 분석결과 esp-2, esp-3는 원 품종인 Kinmaza와 저장 단백질구성에
서 차이를 보인다.
 - (가) esp-2는 kinmaza와 비교하여 ~50kDa 저장단백질이 많이 축적되어있다.
 - (나) esp-3는 kinmaza와 비교하여 ~12kDa 저장단백질이 많이 축적되어있다.

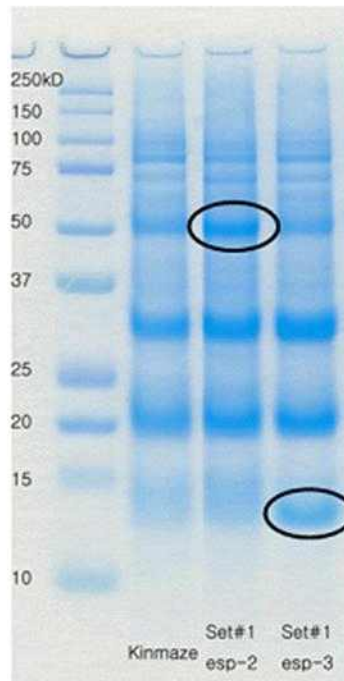


그림5-1. esp-2, esp-3종자 단백질 1D-SDS-PAGE

- (2) esp-2, esp-3에 일품벼를 여교배한 F₁ 개체 확보.
 - (가) 저장단백질 돌연변이체 esp-2, esp-3와 일품벼를 교배하여 얻은 BC₁F₂를 포장에 재배하였다.

2. 녹미거대배 유망계통 육성 및 선발

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

- (1) 본 연구진에서는 화청벼에 돌연변이체를 처리하여 거대배 돌연변이를 유발하였고,

이를 품종화 하였다.

- (2) 다양한 녹미 품종 및 계통을 보유중이며, 이들과 거대배 품종을 교배한 잡종집단을 확보하였다.
- (3) 거대배 돌연변이와 녹미 품종을 교배한 잡종집단을 세대진전하여 계통으로 육성한다.
- (4) 녹미이면서 거대배와 찰벼 특성을 동시에 보유하는 계통을 선발하여 거대배 녹미 계통을 육성한다.
- (5) 기능성 성분 분석과 생산력 검정을 통하여 거대배 및 녹미의 기능성을 동시에 보유한 우수 품종을 육성한다.

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) 녹미거대배 계통 육성

- (가) 녹미특성을 가진 생동찰과 거대배 특성을 가진 서농6호를 양친으로 교잡육종.
- (나) F₇ 까지 세대진전



그림5-2. 육성한 녹미 거대배(좌: 녹미거대배 계통, 우: 녹미찰벼거대배 계통)

(다) 녹미거대배 유망계통 생산력 검정

- ① 녹미거대배 유망계통 (00002, 00003)을 서울대학교 부속농장에서 3반복으로 재배

(2) 서농16호 (녹미거대배) 품종보호 출원

(가) 형태적 주요특성

- ① 서농 16호 호의 초형은 반직립형이며 지엽자세는 직립한다
- ② 벼알의 길이는 6.25mm로 녹원찰의 6.46mm 보다 약간 짧으나 현미의 길이는 약간 길어서 왕겨의 뚜껑이 얇은 특성이 있다.
- ③ 현미의 장폭비는 1.62 정도로 녹원찰과 비슷한 단원형이다.

(나) 성능관련 주요특성

- ① 서농16호의 현미색은 녹색이고 배유는 찰성이며 거대배 특성으로 녹원찰에 비하여 거대배 특성이 추가되었다.

(다) 생육관련 특성

- ① 서농16호의 출수기는 수원에서 9월 4일경으로 녹원찰의 8월 25일 보다 약 10일 늦게 출수되는 극만생종으로 등숙기간은 40일 정도다
- ② 주당 이삭수는 11.5개로 비슷하나, 정조 및 현미 천립중은 각각 17.5g와 13.4g으로 녹원찰의 20.3g과 17.4g 보다 가벼우나 정현율은 약간 높다.
- ③ 서농16호의 정조수량은 368.4kg/10a으로 녹원찰 보다 낮다.

(라) 성능관련 세부특성

- ① 서농16호는 배의 천립중이 1.86g으로 녹원찰의 0.57g 보다 3.3배가 무겁다

- ② 정현비율은 85.2%로 녹원찰 보다 약간 높다,
- ③ 현미의 녹색 정도는 녹원찰에 비해 더 진한 녹색을 나타낸다.
- ④ 서농16호의 알카리 붕괴도와 아밀로즈 함량은 각각 7과 4.8%로 녹원찰과 비슷하다.

(마) 품종의 사진

- ① 정조 (그림5-3)



< 서농16호 >



< 녹원찰벼 >

- ② 현미(그림5-4)



< 서농16호 >



< 녹원찰벼 >

③ 육성계통도(그림5-5)

년도	'05	'05/'06	'06	'07	'07/'08	'08	'09	'10
세대	인공교배	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇
서농8호 (거대배)								
×	HP8532→							
생동찰벼 (찰성, 녹미)								
		┌1 · · · · └19	┌1 · · · · └200	┌1 · · · · 5 · · · └10	→┌1 └3	→┌1 └2 └3 └4 └5	→┌1 └4	HP8532-10-1-5 서농16호
계통(개체)수	19립	(19)	(200)	10	3	5	2	
비 고	개 체 양 성			계통육성 및 특성검정			생산력검정시험	

3. 분질종자형질(flo)에 관한 유전분석 및 분질종자 특성 분석

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

- (1) 점차 특수한 용도로 쓰이는 쌀들의 수요가 늘어남에 따라 또 다양한 소비자들의 기호를 빠르게 충족시키기 위해 이에 부합하는 품종을 만들어 내는 일이 필요해지고 있다.
- (2) 화청 품종에 MNU를 처리하여 종자관련 mutant 라인을 확보하였다.
- (3) 그중 분상질 종자의 표현형을 가지는 돌연변이체는 쌀가루를 이용한 가공에 용이하게 쓰일 수 있기 때문에 이 표현형을 조절하는 유전자의 특성을 구명하여 앞으로 품종 개발에 이용한다.
- (4) Chromosome walking 방법으로 fine mapping을 하고 유전자지도를 작성하고 해당 유전자를 cloning 한다.

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) 분질종자 특성 분석

- (가) 종자의 외형은 화청과 비슷하다
- (나) 현미는 심복백특성을 보인다.
- (다) 전자현미경(SEM) 분석결과, 분상질종자의 배유는 전분립이 엉성하게 축적 되어있다.



그림5-6. 분상질종자 돌연변이체의 종자형태. A,D: 이삭, B,E: 현미, C,F: 현미 절단면

(2) 분질종자형질(flo)에 관한 유전분석

(가) BSA 분석결과 flo 유전자는 4번연색체에 위치한다.

(나) Fine mapping 결과 flo 유전자와 연관된 DNA 마커 두개를 찾았으며 이들 사이의 물리적 거리는 ~81kbp 이다

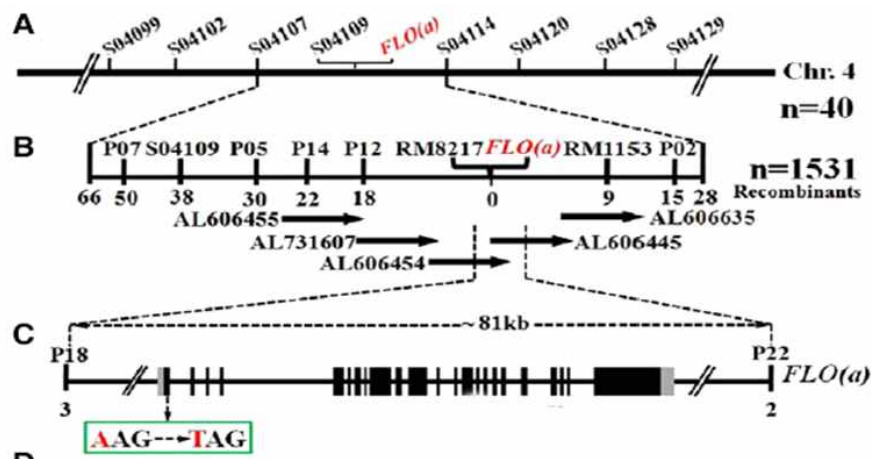


그림5-7. flo 유전자의 fine mapping

(3) Flo gene isolation

(가) rice genome database에 의하면 81kbp 사이에는 15개의 유전자가 있다.

(나) flo 돌연변이체에서는 이들 중 LOC_OS 04g5523 의 1번 exon 73번째 nucleotide 가 A에서 T로 돌연변이 되었음을 확인하였다.

(다) 이 돌연변이로 인해서 화청벼는 Lysine을 코딩하나 flo mutant는 STOP codon 이 된다.

(라) LOC_OS 04g5523는 tetratricopeptide repeat domain containing protein 단백질을 코딩한다. 분상질 형질은 tetratricopeptide repeat domain containing protein 단백질이

기능을 못하게 됨으로써 생기는 형질이다.

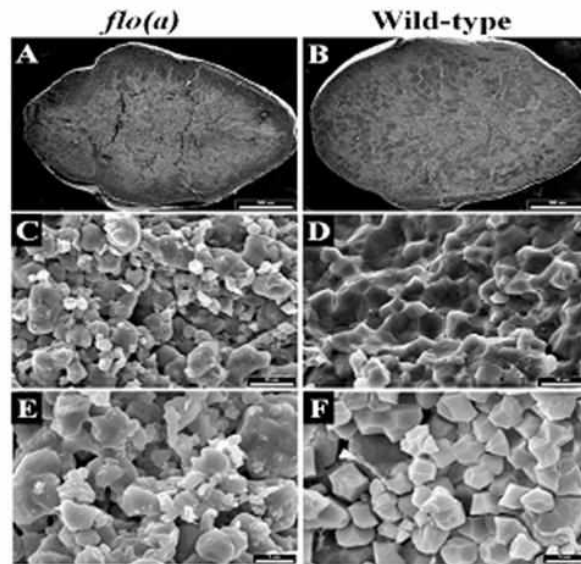


그림5-8. 배유절단면 전자현미경사진

4. 노란색 종피 형질(yel) 유전분석

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

- (1) 점차 특수한 용도로 쓰이는 쌀들의 수요가 늘어남에 따라 또 다양한 소비자들의 기호를 빠르게 충족시키기 위해 이에 부합하는 품종을 만들어 내는 일이 필요해지고 있다.
- (2) 화청 품종에 MNU를 처리하여 종자관련 mutant 라인을 확보하였다.
- (3) 그중 종피 색깔이 노란색이면서 배가 검게 되어 활성을 상실한 종자의 표현형을 가지는 돌연변이체를 발견하였다.
- (4) 이렇게 색을 종피에 축적하고 있는 벼들의 수요가 늘고 있고 이러한 성분들은 의학용이나 약학용으로 사용될 수 있기 때문에 물질을 동정하는 것도 중요하다. 따라서 이 물질을 HPLC, ms/ms 방법으로 스크리닝 및 동정을 한다.
- (5) Chromosome walking 방법으로 fine mapping을 하고 유전자지도를 작성하고 해당 유전자를 cloning 한다.
- (6) 형질전환 (RNAi, Overexpression) 기법을 이용하여 유전자의 기능을 complementary test 한다.

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) 특성 분석

- (가) 노란색 종피색과 배의 lethal은 다면발현이다.
- (나) 배는 검은색을 띠고 이러한 표현형을 가진 배는 발아하지 못한다.
- (다) 그 밖에 농업형질에 차이는 나타나지 않았다.



그림5-9. 노란색 종피 돌연변이의 종피 색과 lethal phenotype의 형태 (WT: wild type, M: mutant)

(2) 노란색 종피 형질(yel)에 관한 유전분석 및 mapping

- (가) wt과 yel 표현형의 분리비는 3:1로 나타났고 단일열성 유전자에 의해 표현형이 나타남을 알 수 있었다.
- (나) BSA 결과 yel 유전자와 연관된 마커를 2번 염색체상에서 찾았으며 이들 사이의 유전적 거리는 5.4cM이었다.
- (다) Fine mapping 결과 yel 돌연변이체는 Os02g53140의 UTR 일부와 start codon 및 첫번째 exon 일부 등 총 706bp가 deletion 됐음을 확인하였다.

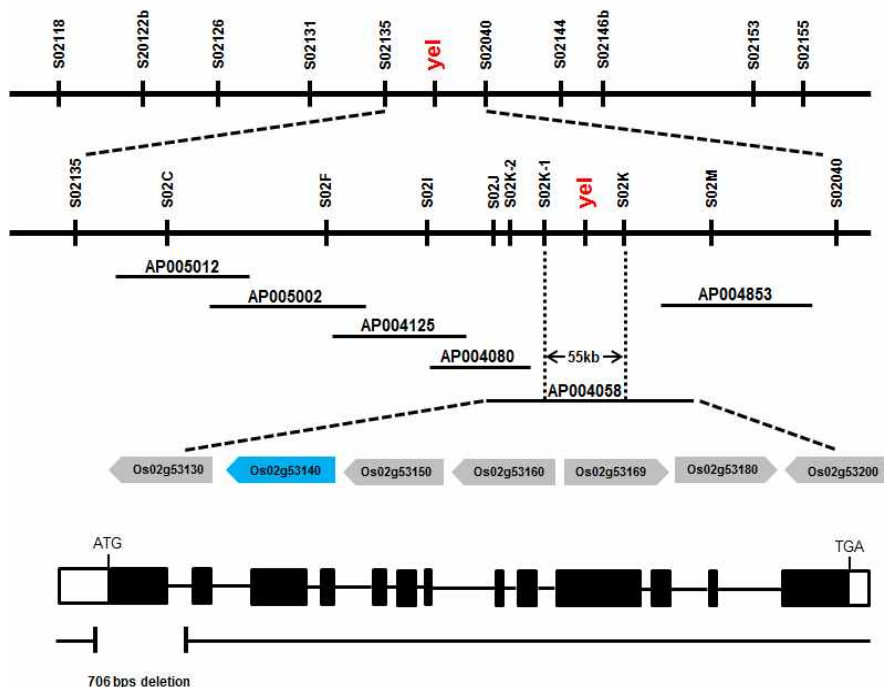


그림5-6. fine mapping and candidate genes for *yel*

(3) 노란색 종피 색소 동정

(가) 배와 배유의 발달과정에서 배유에서는 20 DAP부터 노란색을 보이기 시작했으며, 배유는 생성과 동시에 죽는 것을 확인하였다.

(나) 배는 5 DAP부터 검정색으로 변화함을 관찰하였다.

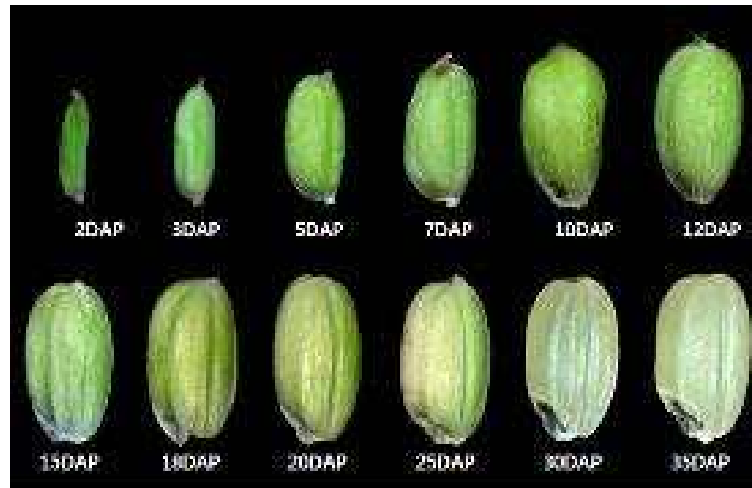


그림5-10. development of yel mutant seed DAP: days after pollination

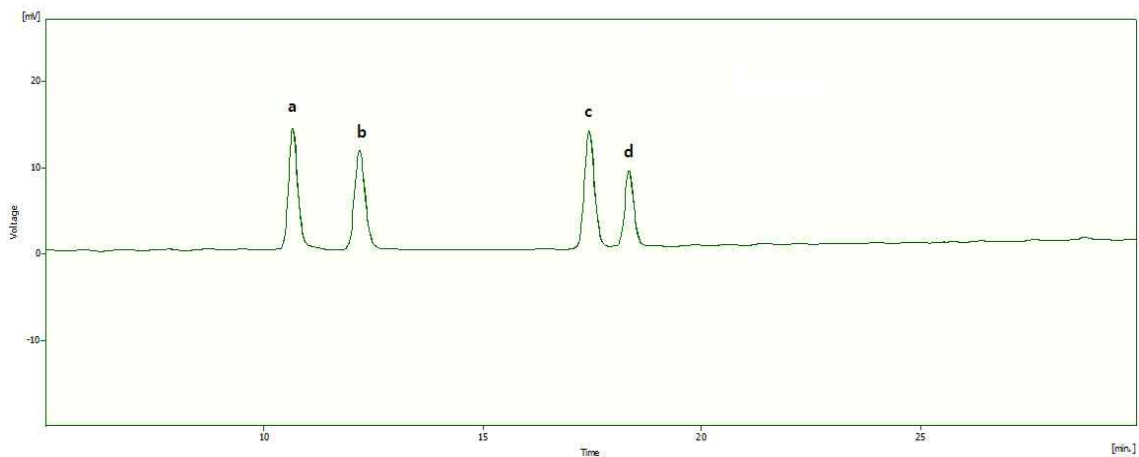
(다) 서로 다른 색을 보이는 배와 배유를 따로 분리하여 물질을 추출하고 분석하였다.

① HPLC 분석 결과 노란색 배유에서 6개의 특이 peaks 가 검출되었다.

② HPLC를 이용하여 4개의 후보물질 isoorientin, orientin, isovitexin, vitexin을 찾아내었다.

③ 노란색 배유와 배에 축적된 물질은 isoorientin, orientin, isovitexin 로 나타났다.

④ 정량한 결과 배에 Isoorientin이 고농도로 축적되어 있는 것을 확인했다.



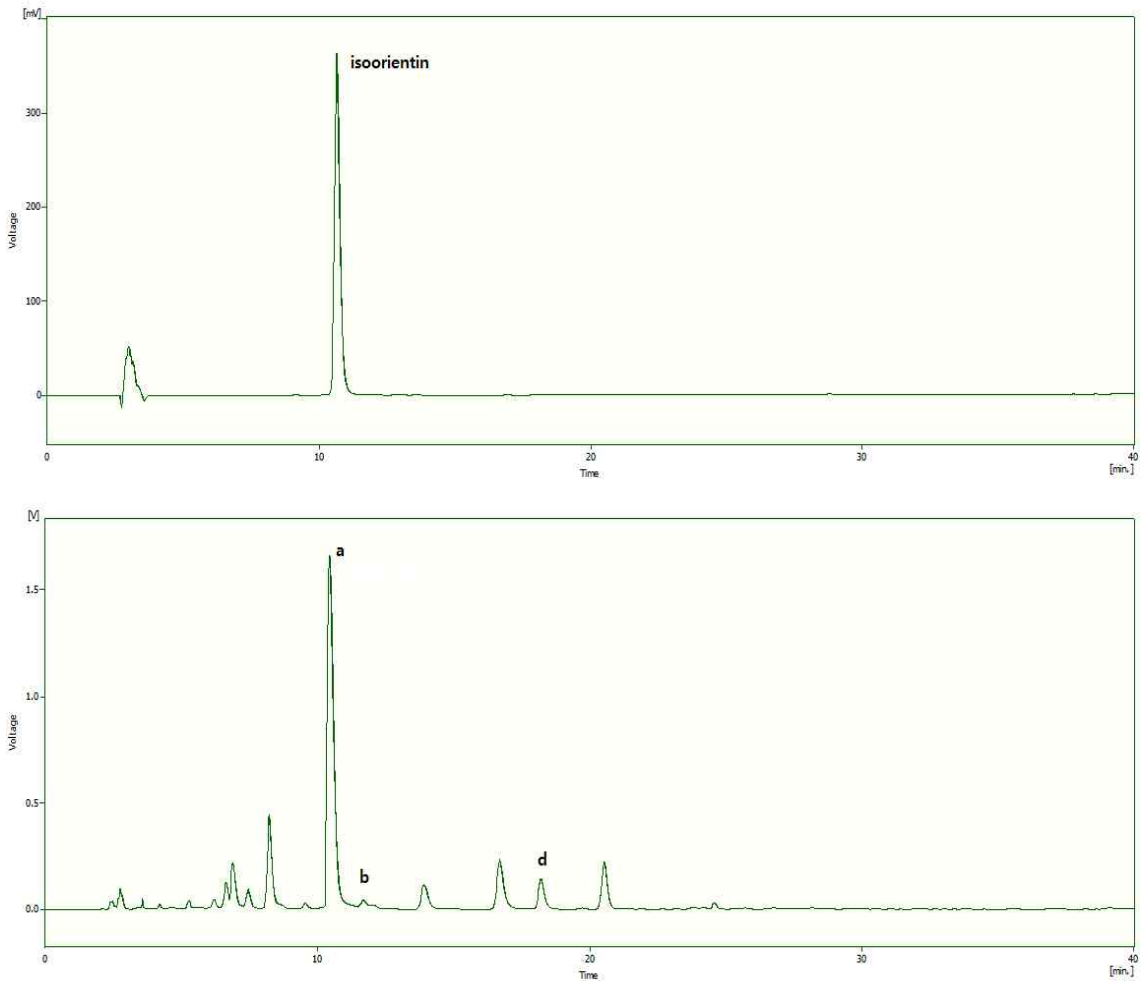


그림5-11. HPLC 크로마토그램. standard 물질(a-isorientin, b-orientin, c-vitexin, d-isovitexin)(위), Isoorientin(중간), Yellow embryo (아래)

표5-1. 배와 배유에 들어있는 노란색 물질의 정량

($\mu\text{g/g}$)	a	b	d
Yellow embryo	265.8	14.8	26.9
Yellow endosperm	15.1	10.5	9.4

a-isorientin, b-orientin, d-isovitexin

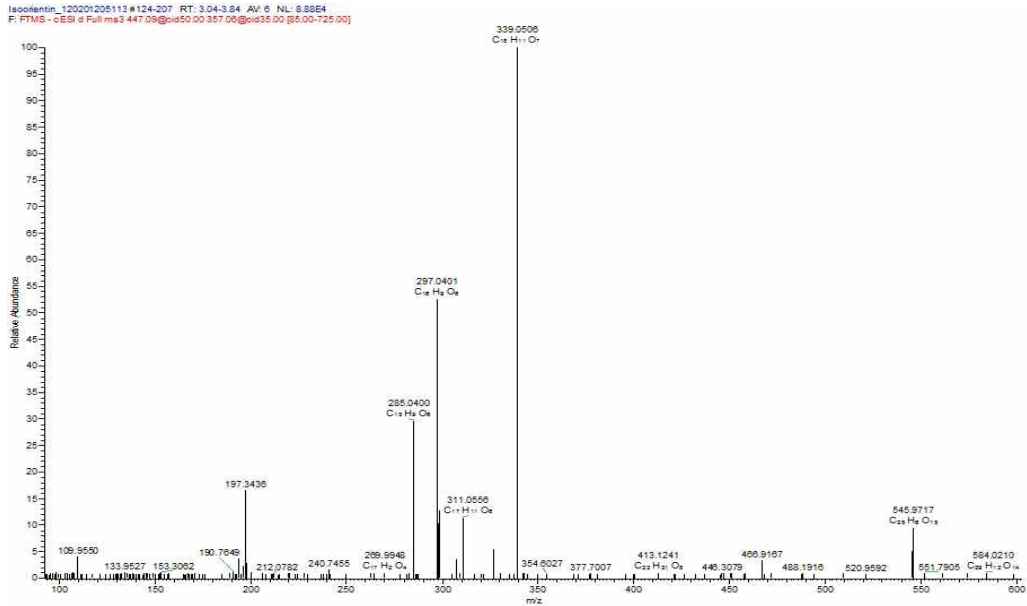


그림5-12. 배와 배유에서 높은 농도로 축적되어 있는 isoorientin 의 ms/ms

DPPH radical scavenging (%)		
	Yellow mutant	Wild-type
Whole grain	79.41±0.58	29.08±0.33
Endosperm	49.49±0.29	23.15±0.42
Embryo	86.32±0.11	47.94±0.45

그림5-13. DPPH (Diphenylpicrylhydrazyl) assay

FRAP value ($\mu\text{mol Fe(II)} / \text{g DW}$)		
	Yellow mutant	Wild-type
Whole grain	51.09±0.44	9.86±0.25
Endosperm	22.52±0.25	7.19±0.38
Embryo	80.63±1.50	19.71±0.20

그림5-14. FRAP (Ferric reducing ability of plasma) assay

TEAC value ($\mu\text{mol TE} / \text{g DW}$)		
	Yellow mutant	Wild-type
Whole grain	15.38±0.18	2.92±0.04
Endosperm	5.27±0.02	2.29±0.02
Embryo	343.37±1.93	7.52±0.01

그림5-15. TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)

- ⑤ 배와 배유에서 공통적으로 가장 높게 검출된 물질은 isoorientin 이었다.
- ⑥ 종피에 집적되어 있는 물질의 항산화 정도를 알아보기 위해 DPPH, FRAP, TEAC assay를 수행하였고, 그 결과 세 가지 항산화 테스트에서 모두 embryo에서 항산화능이 가장 높게 나왔다.

(4) 노란색 종피를 조절하는 유전자(yel)의 기능연구

(가) Gateway 방법을 이용한 RNAi

- ① 벼의 COP1 유전자로 알려진 Os02g53140의 5'을 포함한 첫 번째 exon을 targeting 하도록 RNAi vector를 제작하였다.
- ② vector는 pHGWIWG2(II)를 사용하였고 Agrobacterium strain은 LBA4404와 EHA105를 사용하여 식물체에 형질 전환시켰다.
- ③ 형질 전환 결과 종피가 노란색이 되거나 배가 죽는 표현형을 가진 형질 전환체는 발견할 수 없었다.
- ④ 완전 sterile인 T0 plant와 semi sterile과 fertile 개체가 분리하는 T1 line이 관찰되었다.



그림5-16. COP1 유전자의 RNAi 형질전환체 LBA4404 T0(왼쪽), 완전불임인이삭(가운데) semi sterile인 이삭 EHA105 T1(오른쪽)

(나) GUS staining

- ① COP1 유전자의 발현 level과 발현 부위를 알아보기 위해 GUS staining 수행하였다.
- ② COP1 유전자의 promoter로 예상되는 부분 2kb 정도를 pHGWFS7.0 GUS vector에 삽입하고 형질전환 하였다.
- ③ pollen과 node에서 GUS staining이 일어나는 것으로 보아 COP1 유전자의 화분과 node에서 강하게 발현됨을 알 수 있었다. (그림5-2)



그림5-17. GUS staining of COP1:GUS transgenic plant in spikelet (left), pollen (middle) and node (right)

5. 고단백 돌연변이(hpm)형질 유전분석

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

- (1) IR24에 MNU를 처리하여 고단백 돌연변이체를 육성하였다.
- (2) 고단백질 변이 돌연변이 계통 선발 : 예비 선발된 300 계통의 종자단백질을 추출하여, 단백질 함량 검량 Kit를 이용 고단백질 돌연변이 계통을 선발한다. 단백질전기영동 (1D-SDS-PAGE)을 통해 저단백질인 계통을 선발하며, 1D-SDS-PAGE gel 상의 단백질 밴드 패턴을 모품종과 비교하여 특이한 단백질 발현을 보이는 돌연변이계통을 선발한다.
- (3) 고단백질 변이계통을 고정하고 농업형질을 평가한 후 품종으로 육성한다. 또한 기존 변이체와 우리 품종들을 교배 후 세대진전과 선발을 반복하여 단백질 변이 품종으로 육성한다.

나. 연구개발 결과 및 고찰

- (1) IR24에 MNU를 처리하여 고단백 돌연변이체를 육성하였다.
- (2) 고단백 돌연변이 단백질체 분석
 - (가) 1D-SDS Page로 종자 저장단백질을 분석한 결과 모본 및 일반품종과 비교하였을 때 단백질의 조성에는 차이가 없었다.
 - (나) 고단백 돌연변이체의 amylose 함량이 21%에서 29.8%로 증가하였다.

표5-2. hpm 단백질 함량과 아밀로스함량

Sample	Protein (%)	Amylose(%)
IR24	6.30	21.0
고단백 돌연변이 (hpm)	10.08	29.8
다산	6.17	19.0
동진	6.67	21.0
삼광	5.67	18.5

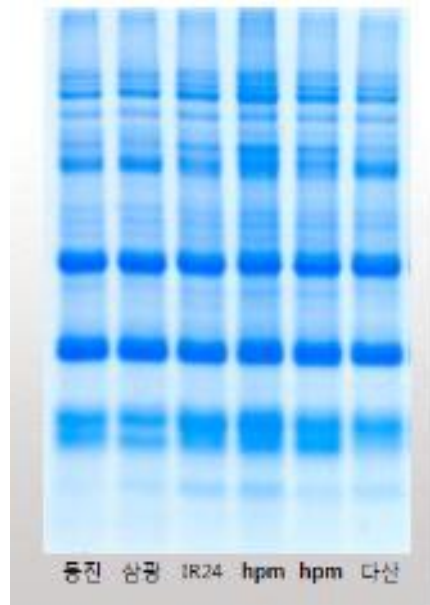


그림5-18. hpm 종자 단백질 1D-SDS-PAGE

6. rolled leaf 돌연변이 특성 및 유전분석

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

- (1) 고시히카리 품종에 MNU를 처리하여 벼의 잎 관련 mutant 라인을 확보하였다.
- (2) 벼의 잎 관련 유전자들은 식물체의 초형과 광합성과 관련이 있기 때문에 이 mutant의 유전현상을 연구하고 관여하는 유전자를 동정하면 앞으로 광합성과 초형이 좋은 품종을 육성하기에 기본적이고 중요한 정보를 제공할 것으로 여겨진다.
- (3) Chromosome walking 방법으로 fine mapping을 하고 유전자지도를 작성하고 해당 유전자를 cloning 한다.

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) rolled leaf 돌연변이체 형태적 특성

- (가) 잎 폭이 좁으며 잎이 말려서 위쪽을 향하고 있다.
- (나) rolled leaf 돌연변이체는 키가 작아지는 dwarfism을 보이는데 두 번째 와 세 번째 internode가 잘 신장하지 못한다.
- (다) 돌연변이체 종자는 발아율이 떨어진다.

(2) 영화의 특성

- (가) rolled leaf 돌연변이체는 영화에서도 기형의 형질을 보인다.
- (나) 완전 성숙한 영화에서 open-hull 형태를 보여서 암술과 수술이 노출된다.

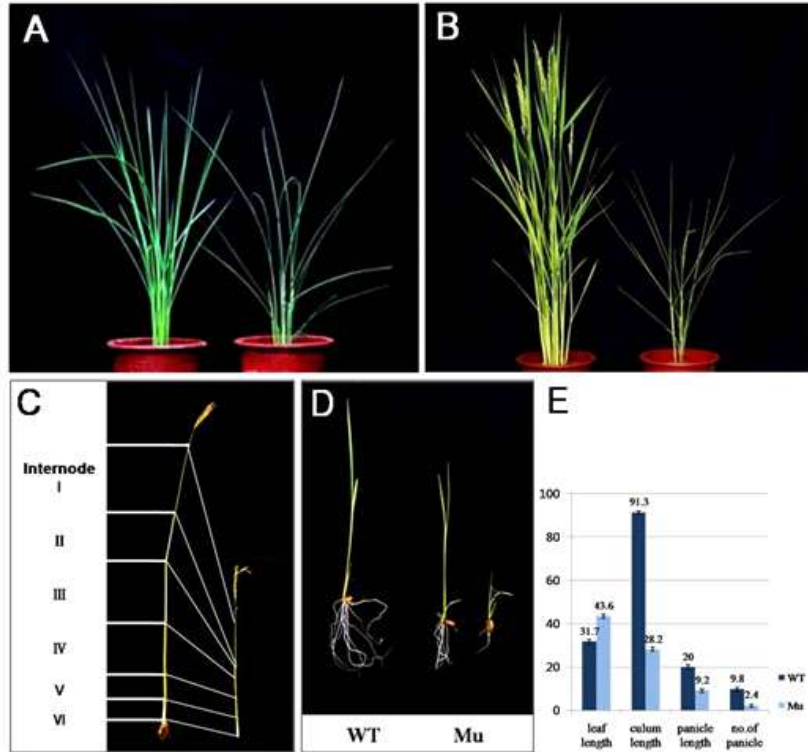


그림5-19. Phenotypes of wild-type and rolled leaf mutant

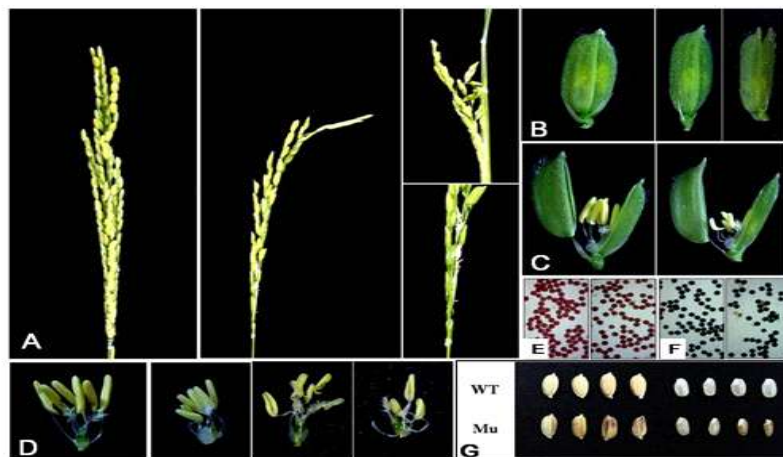


그림5-20. Panicle and floral organ phenotypes of wild-type and rolled leaf mutant

(3) 잎의 특성

(가) rolled leaf 돌연변이체의 가장 큰 특성은 잎이 말려있는 것이다.

(나) rolled leaf 돌연변이체 잎은 vein의 수가 적고 bulliform 세포의 크기가 작다.

(4) rolled leaf 형질에 관한 유전 분석.

(가) F1 식물체가 정상과 rolled leaf 돌연변이 형질로 분리한다.

(나) rolled leaf F1에서 얻은 F2 는 정상과 rolled leaf 형질로 1:3 비율로 분리하였다.

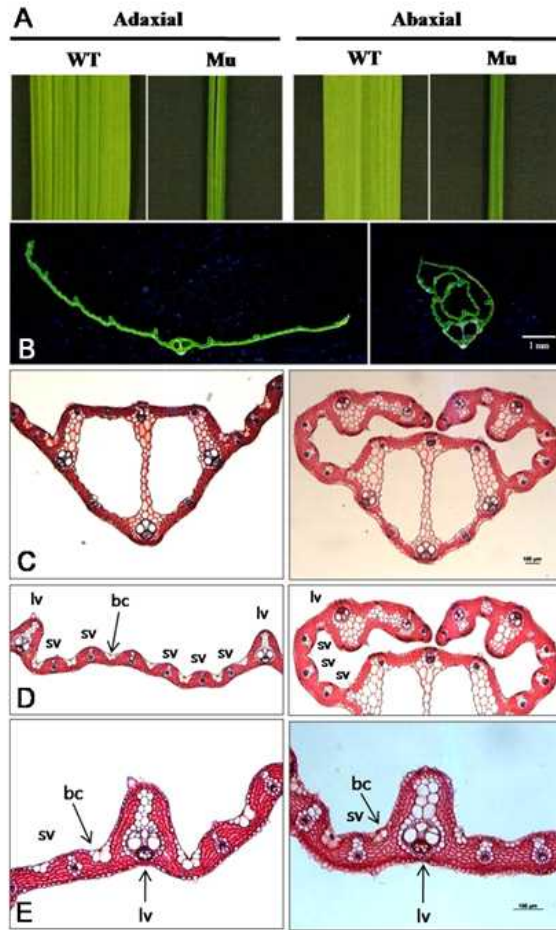


그림5-21. Comparison of leaf microstructure of wild-type and rolled leaf mutant

7. 새로운 돌연변이체 유기

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

- (1) 현재까지 여러 방법으로 벼에서 돌연변이들이 생성되고 있고 이렇게 만들어진 돌연변이를 이용해 많은 유전자의 기능이 밝혀지고 이와 관련된 표현형도 알 수 있게 되었다. 하지만 중복된 돌연변이의 반복적인 유기도 계속되어 새로운 돌연변이의 출현 비율이 떨어지고 있고 이에 따라 새로운 육종 재료도 부족해지고 있다. 따라서 새로운 돌연변이체의 유기에 계속해서 요구되고 있다.
- (2) 새로운 품종에 MNU를 이용해 돌연변이를 유기하여 새로운 돌연변이체를 확보하도록 한다.

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) MNU 처리 돌연변이

- (가) 보람찬, 남평, 칠보, 주남 에 MNU를 처리하여 5000 개의 M1 종자를 확보 하였다.
- (나) 보람찬, 남평, 칠보, 주남 품종을 MNU 처리해서 얻은 M2 식물체를 포장에 전개하여 표현형을 관찰하고 돌연변이 가능성이 있는 식물체를 선발 농업형질 조사

표5-3. 2012년 MNU처리 돌연변이 M2 세대 포장전개

2012 Entry NO	Pedigree	Source
72452	보람찬 MNU-SSD	71400
72454	남평 MNU-SSD	71402
72456	칠보 MNU-SSD	71404
72458	주남MNU-SSD	71406

8. Early senescence 특성을 보이는 돌연변이체의 조화과정에 따른 단백질체 발현 분석

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

- (1) Early senescence는 비단 식물뿐만 아니라 동물에서도 관심을 갖고 있는 분야이다. 노화와 생면연장과 관련하여 중요한 기능을 하고 있는 유전자의 연구는 앞으로 동.식물 분야에서 중요한 정보를 제공할 것으로 여겨지고 있다.
- (2) 벼의 잎집 (leaf sheath)에 검은색 반점을 발생시키며, 출수기 이후 급격한 노화로 까지 이어지는 작용에 관여하는 유전자를 fine mapping 하고, map-based cloning의 방법으로 동정하여 해당 유전자의 기능을 이해하고자 한다.
- (3) 본 연구에서는 돌연변이 유발제인 EMS (Ethyl-methane-sulfonate)를 Koshihikari 벼에 처리하여 획득한 mutant (Koshihikari E-B-164-1-2)를 밀양23호와 교배하여 얻은 F2, F3 집단을 유전자지도 작성에 이용하였다.

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) 돌연변이체 phenotype.

- (가) 돌연변이체와 모본의 외형은 차이가 없으며 최고 분얼기까지는 돌연변이체에서 노화 현상이 보이지 않는다.
- (나) 출수기를 기준으로 돌연변이체는 노화현상을 보이기 시작하여 고시히까리에 비하여 상대적으로 빠른 노화현상을 보이고 고사된다.
- (다) 출수기를 기준으로 돌연변이체의 엽록소 함량이 모본에 비하여 급격히 감소한다.
- (라) 출수기를 기준으로 돌연변이체의 광합성률도 급격히 감소한다.

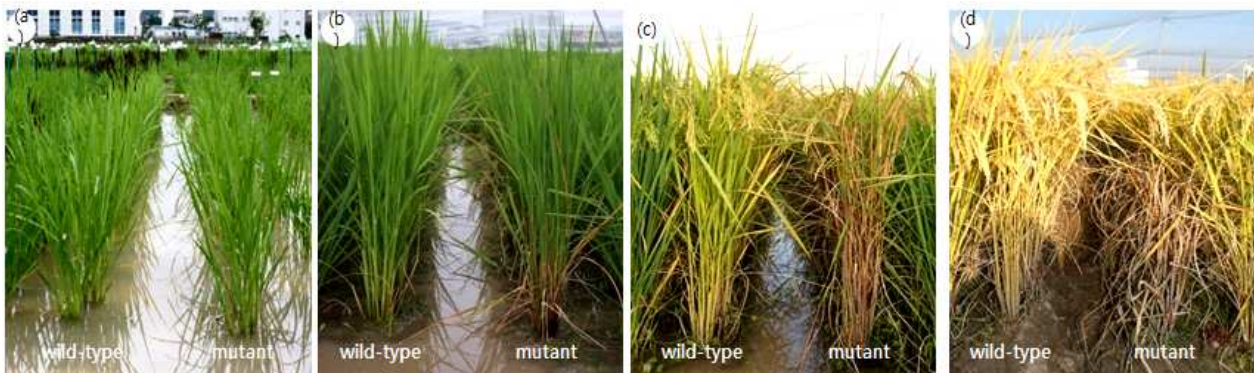


그림5-22. Morphological differences between wild-type and mutant plants. (a-d) comparison of leaf senescence in wild-type and mutant plants at (a) maximum tillering stage (b) heading stage (c) 30d after heading(DAH) and at (d) full maturation stage.

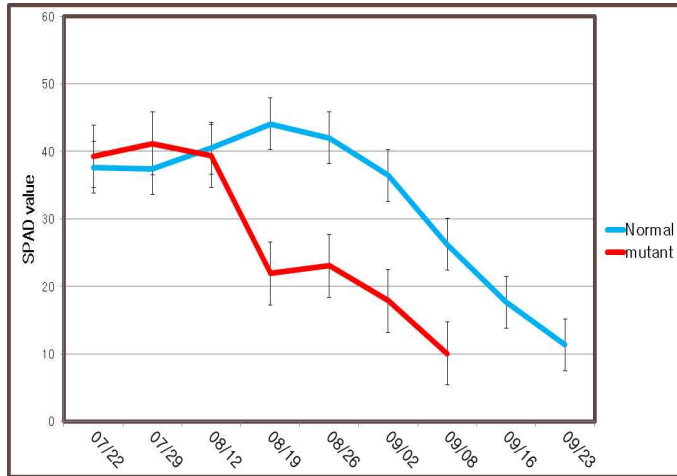


그림5-23, chlorophyll content measured by SPAD

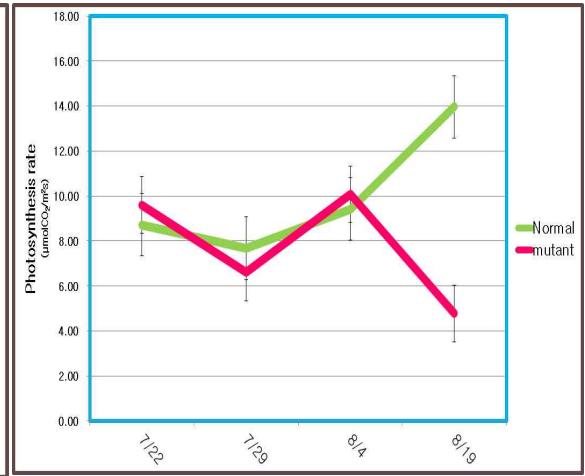


그림5-24. Photosynthesis rate

(2) early senescence 돌연변이체 노화과정의 단백질체 발현양상 분석.

(가) 노화 과정중의 돌연변이체와 모본에서 단백질을 추출하여 단백질을 1D-SDS PAGE 로 분석한 결과 모본과 돌연변이체 모두 노화과정에서 soluble 단백질 함량이 줄어들었으며 발현단백질의 차이는 보기 힘들어서 더욱 해상도가 높은 shotgun proteomics 분석을 실행하기로 함.

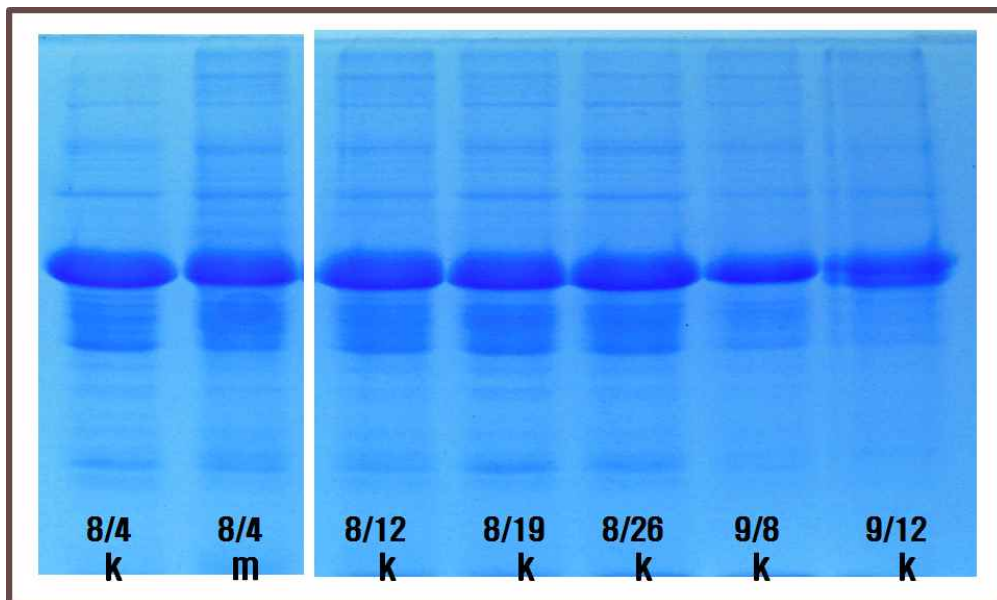


그림5-25. 1D-SDS-PAGE of leaf soluble protein

(3) early senescence 돌연변이체 Fine mapping

(가) BSA 결과 7번 염색체의 긴팔 370kb 구간 내에 해당 유전자가 존재하는 것으로 확인하였다.

(나) STS marker 147-1과 147-2 사이 66kb 내에 있음을 확인 하였다.

(다) 이 염색체 부위에 8개의 후보 유전자가 있었고, 염기서열 분석 결과 유전자

LOC_Os07g25680의 7번째 exon에서 아미노산이 치환(Alanine → Threonine) 되었음을 발견하였다.

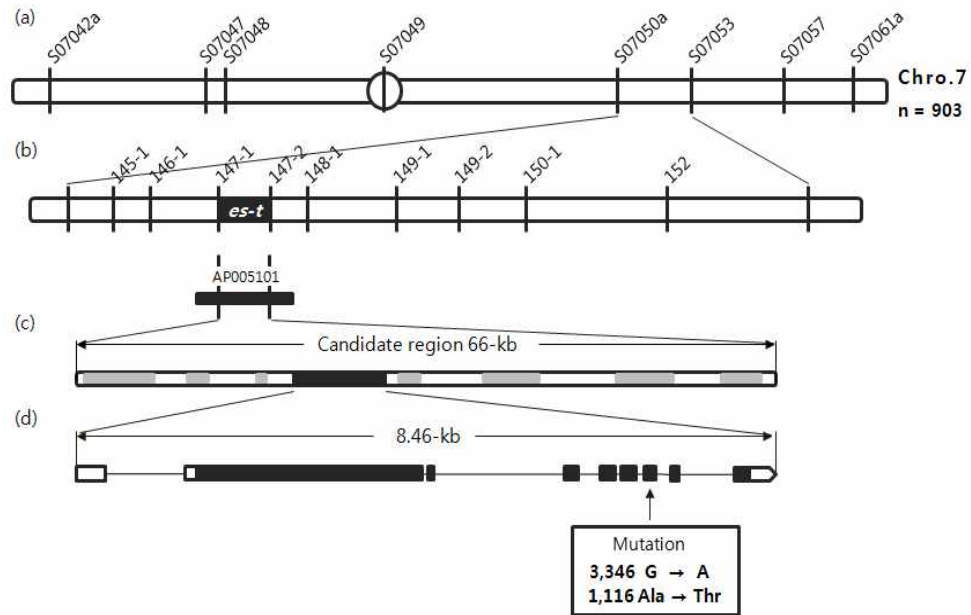


그림5-26. es-k 유전자의 정밀 유전자지도 작성

(라) 해당 유전자에서 mutation이 발생해 해당 형질이 나타나는 것임을 확인하기 위하여 경희대 T-DNA mutant line 중에서 해당 유전자에 insertion이 된 mutant 종자를 분양 받았으나 homo mutant 식물체가 없었고, hetero plant로부터 종자를 일부 수확하여 과중 후 plant의 표현형을 관찰 중이다. 또한 RNAi(RNA interference) 형질전환도 진행 중에 있다.

9. 분질흑미 유망계통 육성 및 선발

가. 형태적 및 생태적특성

- (1) 서농 15호는 중만생종으로서 출수 후 30일 정도면 종자성숙이 완료된다.
- (2) 초형은 반직립형이며 지엽자세는 반직립형으로 재배되는 일반 자포니카 품종들과 유사하다.
- (3) 잎과 줄기는 담록색으로 식물체와 종자에 안토시아닌 색소가 나타나지 않는다.
- (4) 초장은 중장간형이며 이삭의 추출도는 양호하고 탈립은 잘 안되고 종자의 까락이 거의 없다.
- (5) 주당수수수는 10개 정도이고 정조천립중은 18.3g이다.
- (6) 정조의 장폭비는 2.44이고 현미의 장폭비는 2.76으로 중원형이다. 외영색과 외영무늬는 황갈색이고 현미색은 진갈색이고 현미종자에서는 안토시아닌이 강하게 나타난다.
- (7) 배의 전분은 분질형태로 전분이 잘 부서진다.

나. 성능관련 주요특성

- (1) 서농 15호의 재배특성은 대조품종인 흑진주벼와 아주 유사하나 품질특성은 완전히 다른 특수미의 하나이다.
- (2) 서농 15호는 안토시아닌 함량이 높은 진갈색미와 분질미가 결합되어 새로운 가공특성 및 미질향상에 이용가능성을 높일 수 있다.

다. 생육관련 특성

- (1) 서농 15호는 중부지방에서 8월 16일경에 출수하는 중만생종이다.
- (2) 서농 15호의 간장은 79.2cm 정도의 중장간형으로 간장이 89.4cm 정도인 흑진주보다 작은 편이다.
- (3) 수장은 23.2cm 정도로 흑진주보다 약간 짧고 이삭수는 흑진주벼와 비슷하다.
- (4) 이삭당 립수는 127개로 흑진주벼보다 조금 많았고 정조수량은 468kg/ha로 흑진주벼보다 낮았다.
- (5) 정조와 현미의 장폭비는 흑진주벼보다 크고 분질미인 원인으로 친립중은 18.3g으로 흑진주벼보다 가볍다.

라. 성능관련 세부 특성

- (1) 서농 15호는 경도가 2.8kg/grain으로 흑진주벼에 비하여 아주 쉽게 부스러지는 특성을 가지고 있다.
- (2) 기능성 물질인 안토시아닌 C3G함량이 210.80mg/100g현미로 흑진주벼에 비하여는 낮지만 일반 품종에 비하여 월등히 높은 것이 특징이다.
- (3) 서농 15호의 아밀로스 함량은 15.4%로 흑진주벼에 비하여 낮고 현미 단백질 함량은 7.7%로 흑진주벼와 비슷하다.

표5-4 육성계보 및 계통도 : (흑진주/화청flo)HP6230-4-3-2-2-4-2-2-4-1

년도	1989 하계	89 동계	90~ 99	00	01	02	03	04	05	06	07	08	N09
세대	MNU 처리	M1	M2~1 3	흑진주 /M13	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
화청	화청 Mutant			4	180	25	6	6	6	6	6	6	6
선발		개체선발 및 계통선발	교잡	계통선발 집단선발						계통선발 및 생산력 검정			

(가) 품종의 사진

① 정조사진(그림5-27)



<흑진주벼>

<서농 15호>

② 현미 사진(그림5-28)



<흑진주벼>

<서농 15호>

③ 백미 사진(그림5-29)



<후진주벼>

<서농 15호>

제6절 제2협동 돌연변이 기술을 이용한 바이러스 저항성 고추 유전자원개발 (서울대학교 강병철)

1. 돌연변이 집단구축 및 세대진전

가. 제 1차년도

(1) EMS 돌연변이 유기를 위한 우수 재래종 선발

- 경북 지역 재래종인 유월초(*Capsicum annuum* L.)는 개장형, 조숙형(개화 소요일수 70~80일)으로 바이러스 및 균류 병에 취약하고 매운맛을 갖고 있으며, 일시 수확용 재료로 활용되고 있다. 영양 고추 시험장으로부터 10,000립 도입하여 병저항성 계통 선발과 돌연변이 유도를 통해 발생한 다양한 표현형에 대한 특성화 조사와 매운맛 조절 연구에 사용하고자 하였다(그림6-1).



그림6-1. 유월초 재배 포장 및 유월초 초형 (영양고추 시험장 제공)

(2) EMS 농도별 처리에 따라 적정 돌연변이 유기 조건 확립 및 M2 세대 확보

- 적정 돌연변이 집단을 구축하기 위하여 Menda 등의 실험에 따라 EMS 집단을 유기하였으며 EMS 처리 농도를 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%로 하였을 때, 종자의 유근 발생을 기준으로 발아율 및 발아시기를 조사하여 적정 농도인 EMS 1.5%에서 LD15를 보여 이를 활용하여 고추 돌연변이 M1 세대 유기하였다 (표 1). 유월초 품종에 LD15에 대한 값을 구하기 위하여 세 번의 반복실험을 거쳤으며 평균적인 발아율을 구하여 LD15을 구하였다. 실험 결과 1.0% (발아율 88.2%) ~ 1.5% (발아율 82.03%) 사이의 EMS 농도에서 LD15 정도의 돌연변이가 유기되었으며, 따라서 추후 M1 세대 집단 작성을 위해 1.5% 농도의 EMS를 이용하여 1,414개의 M1 세대 개체들을 유기하였다(표6-1).

표6-1. EMS 농도에 따른 LD15 값 조사

EMS 농도별처리	Control	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
과중수 (립)	102	107	110	112	108
발아수 (립)	97	96	92	92	80
발아율 (%)	96.2	90.6	88.2	82.03	73.73
최초발아시기 (일)	3	4	4	6	7

- 1,414개체의 M1 식물체로부터 자가 수정을 통하여 928개체의 M2 세대를 확보하였다 (불임율 : 34.4%)

나. 제 2차년도

(1) 돌연변이 M1 세대 추가확보 및 M2, M3 종자 확보

- 돌연변이 집단의 추가 확보 및 세대 진전을 위하여 M1 세대를 추가로 구축하였다. 2009년에 사용된 방법을 기준으로 하고, 그 당시 M1 세대 중 숙기가 늦고 성장이 더딘 개체를 대상으로 1.5% EMS를 이용하여 M0 식물체(유월초) 1,000립에 돌연변이를 유기해 928개체의 M2 종자를 확보하였다.
- 바이러스 저항성 특성을 가진 돌연변이체를 확보하기 위해서는 세대 진전을 통한 유전형 분석과 표현형에 대한 관찰이 이루어 져야 하기에 2009년 확보한 M2 세대 중 종자의 수가 많고 부모세대에서 활력이 좋은 500 계통을 추려 과중하였다. M2 돌연변이 세대 구축에 대한 확인을 위해 표현형 분리를 확인을 하였다. 바이러스 저항성 특성을 가진 돌연변이 집단 구축을 위해 M2 세대의 과실 5~10개를 각 개체별로 채종하여 M3 종자를 확보하였다.

다. 제 3차년도

(1) 돌연변이 M1 세대 추가확보 및 M3 세대 추가 확보

- 5,000개의 돌연변이체 확보를 위해 2009년 사용된 방법을 기준으로 1.5% EMS를 이용하여 M0 식물체(유월초) 3,600립에 돌연변이 유기하였다. 이를 통해 2009년부터 3년간 돌연변이 유기체를 4,300 개체를 확보하였으며, 이들에 대한 M2 분리세대에 대한 종자를 확보하였다.
- 바이러스 저항성 특성을 가진 돌연변이체를 확보하기 위해서는 세대 진전을 통한 유전형 분석과 표현형에 대한 관찰이 이루어 져야 하기에 2010년 확보한 M2 세대 중 종자의 수가 많고 부모세대에서 활력이 좋은 1,000 계통을 추려 파종하였다. 바이러스 저항성 특성을 가진 돌연변이 집단 구축을 위해 M2 세대의 과실 5~10개를 각 개체별로 채종하여 M3 종자를 확보하였다.

라. 제 4차년도

(1) 돌연변이 M1 세대 추가확보 및 M2, M3 종자 확보

- 안정적인 돌연변이의 확보 및 집단 구축을 위해서는 M0(유월초) 1,000립에 돌연변이 유기하여 그 결과 2009년부터 4년간 돌연변이 유기체를 5,023 개체를 확보하였다. 그 중 917계통의 M2 종자를 파종하여 M2 돌연변이 집단을 구축하였으며, M2 분리세대에 대한 547계통에서 M3 종자를 확보하였다 (표6-2).

표6-2. 연도별 EMS 집단 구축 현황

년도	EMS 처리 농도(%)	집단 크기	발아율 (%)	M2 종자 확보율 (%)
2009	1.0	200	85.4	168 (83.2)
	1.5	990	83.0	735 (74.2)
	2.0	72	74.1	25 (36.7)
2010	1.5	950	80.2	720 (75.8)
2011	1.5	3,600	81.0	2,700 (75.0)
2012	1.5	1,000	78.1	675 (67.5)
전체		6,812		5,023

마. 제 5차년도

(1) 돌연변이 M2 세대 확보 및 M3 종자 확보

- 2009년부터 확보한 M2 세대 중 종자의 수가 많고 부모세대에서 활력이 좋은 563개의 M2 돌연변이 계통을 추려 파종하였고, 그 중 439개의 M3 종자를 확보하였다.

2. 돌연변이 표현형 형질 조사

가. 제 1차년도

(1) M1 돌연변이 표현형 형질 조사

- 고추 품종 등록 조사표에 의거해 M1 세대에서 표현형 특성을 조사하였다. 특성조사를 통해 돌연변이에 따른 우성 표현형을 선발 및 형태조사를 하였으며, 초형, 화기구조, 과실 및 종자의 특성 등을 조사하였다. 그 결과 초형(41%), 잎의 모양(22%), 불임성(21%), 과실의 모양(17%) 순으로 돌연변이가 가장 많이 유기되었으며, 화기구조, 꽃의 모양 등에서 돌연변이가 유도되었으나 매우 적은 양인 5% 미만으로 관찰되었다. Menda 등(2004) 토마토 EMS에 의한 돌연변이 유기실험과 돌연변이율, 빈도수 등에서 유사한 결과를 보였으며 EMS 의해 돌연변이가 유기되었음을 확인하였다(그림6-2).

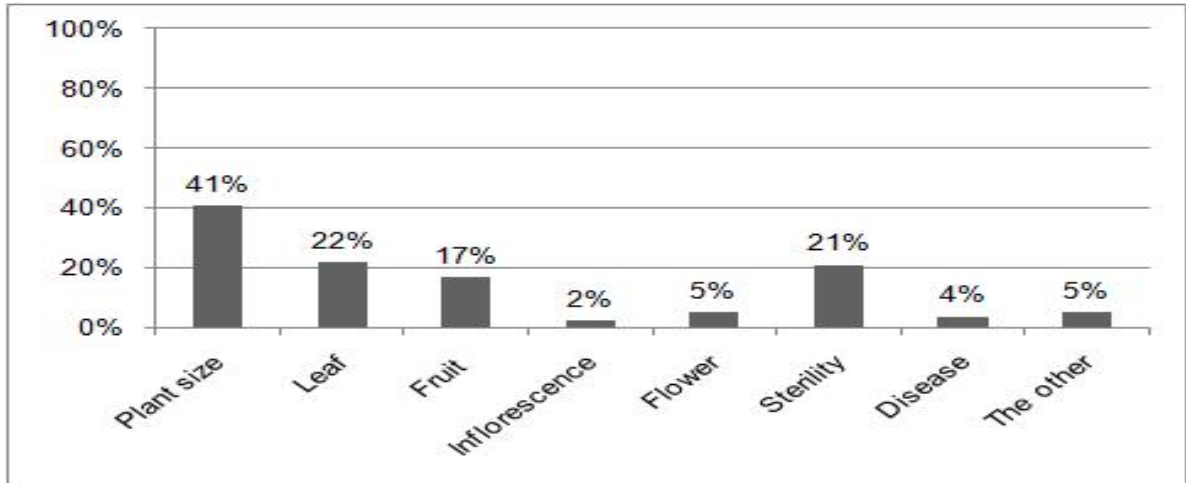


그림6-2. 고추의 EMS의 돌연변이 유기 M1 세대에 대한 표현형 차이 조사. 돌연변이 유기 결과 초형에서 가장 많은 돌연변이가 관찰되었음. 불임성은 화분 및 종자 형성이 되지 않는 현상을 모두 포함.

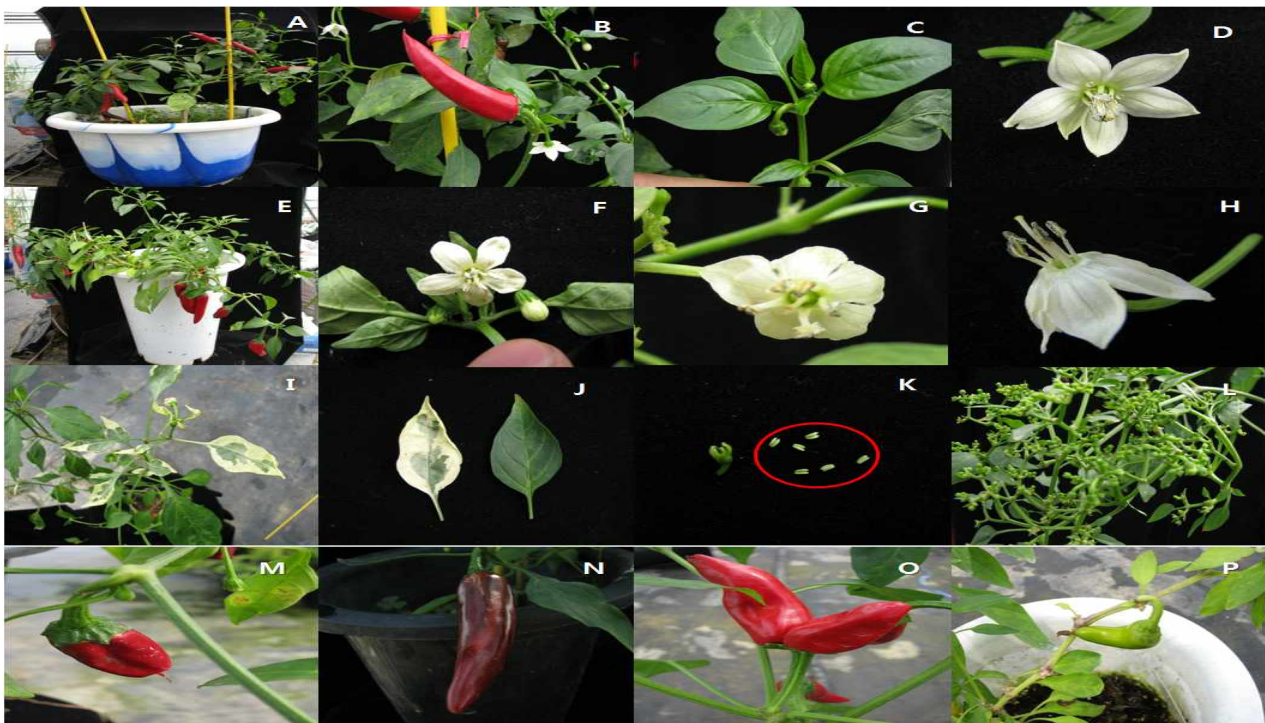


그림6-154. EMS 처리로 유기된 돌연변이 표현형. (A-D) 정상 유월초의 초형 및 과실의 모양,

잎과 꽃의 모양. (E-P) EMS mutants: Dwarf 표현형 (E), 꽃의 모양이 뭉툭해지고 사이가 벌어짐(F), 꽃잎사이가 붙어버림(G), 꽃잎이 뒤집어져서 생식기관이 돌출됨(H), 잎의 백화현상(I-J), 꽃봉오리 내에 암술이 없고 수술만 존재함(K), 화서의 변화(L), 과실이 작아짐(M), 속과색이 검붉은 색(N), 두 개의 과실이 붙음(O), 미숙과색이 투명한 녹색이며 과실의 모양이 작아짐(P).

나. 제 2차년도

(1) M2 돌연변이 표현형 형질 조사

- 돌연변이 500 계통에 대해 형질 조사를 통해 열성 유전 형질에 대해서 돌연변이 개체 확보 및 자가수정을 통한 형질 고정화를 목표로 세대 진전을 시켰으며, 고추의 주요 형질은 국립 유전자원 관리센터 고추 형질 조사표에 의거하여 각각의 세부기준을 이용하여 식물체를 생육, 화기, 줄기 및 잎, 과실 및 불임성 등으로 분류 하여 표현형 조사 하였다(그림6-4).

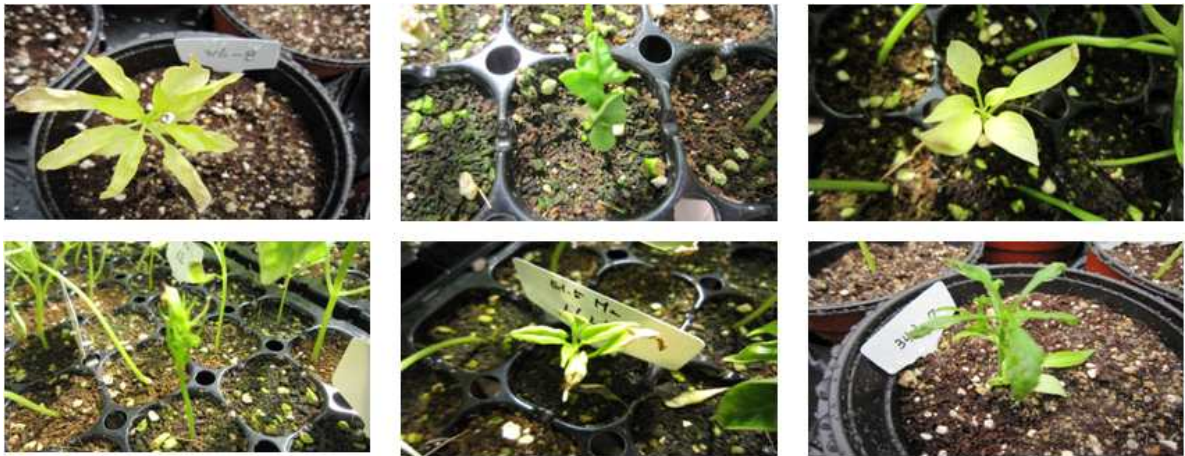


그림6-4. 돌연변이 유기 M2 돌연변이 형질체. 돌연변이 유도 식물체에 대하여 각각의 표현형적 특징을 확인하였으며, 돌연변이의 유도를 검정함. 이 그림에서는 주로 초기의 식물체의 형성에 영향을 주는 유전자에 돌연변이가 생겼을 것으로 추정되는 식물체 계통에 대한 예시임.

- 대조군(돌연변이 미처리 유월초)에 비해 표현형적인 차이를 보이는 돌연변이가 관찰되었으며, 이들의 돌연변이의 표현형적인 분리를 확인하였다. 이들 표현형적인 변이가 확인된 돌연변이 개체를 이용하여 돌연변이 은행 구축을 위한 돌연변이 집단의 유기 및 계통을 유지하였다.
- 돌연변이의 유전적인 분석을 하기 위해 DNA pooling 방법으로 gDNA를 추출하였다.

다. 제 3차년도

(1) M2 돌연변이 표현형 형질 조사

- 2010년 확보한 M1 세대의 자가 교배를 통해 얻은 M2 세대를 심어 표현형 및 유전형 검정을 한 결과 전체 284개의 M2 Family에서 다양한 표현형적인 돌연변이 형질을 관찰하였다. 전체 7가지 소분류 중 최소 1가지 이상에서 표현형적인 변이가 생긴 Family 수는 133개이며, 이중 1가지에서만 표현형 변이가 생긴 것이 104개(36.6%)로 가장 많았으며, 4가지 이상의 소분류(잎, 화서, 과실, 화기구조)에서 표현형적인 변이가 생긴 경우도 있었다(표 6-3, 6-4, 그림 6-5).

표 6-3. 표현형적인 특성에서 돌연변이의 다면 발현(Pleiotropy)가 생긴 개체수

Multiple phenotypic variation	해당 Family 수	비율
0	151	53.2
1	104	36.6
2	25	8.8
3	8	2.8
4	1	0.4
전체	284	100

표6-4. 고추 돌연변이 집단 표현형 검정에 사용된 세부 분류 및 해당 돌연변이 세대 수

분류	소분류	돌연변이 형질	돌연변이 세대	비율 (%)
		Small plant	9	5
		Large plant	5	3
1	Plant habit	Aborted growth	30	16
		Internode length	2	1
		other plant habit	1	1
		Leaf size	1	1
2	Leaf	Leaf texture	5	3
		Variegated	2	1
		Other leaf development	6	3
3	Inflorescence	Inflorescence	5	3
4	Flower	Flower organ size	5	3
		Flower morphology	24	13
		Large fruit	5	3
5	Fruit	Small fruit	15	8
		Fruit color	11	6
		Other fruit morphology	31	17
6	Sterility	Partial sterility	1	1
		Total sterility	11	6
7	Disease and stress reponse	Wilting	12	7
		Other disease response	1	1
		Total	182	100

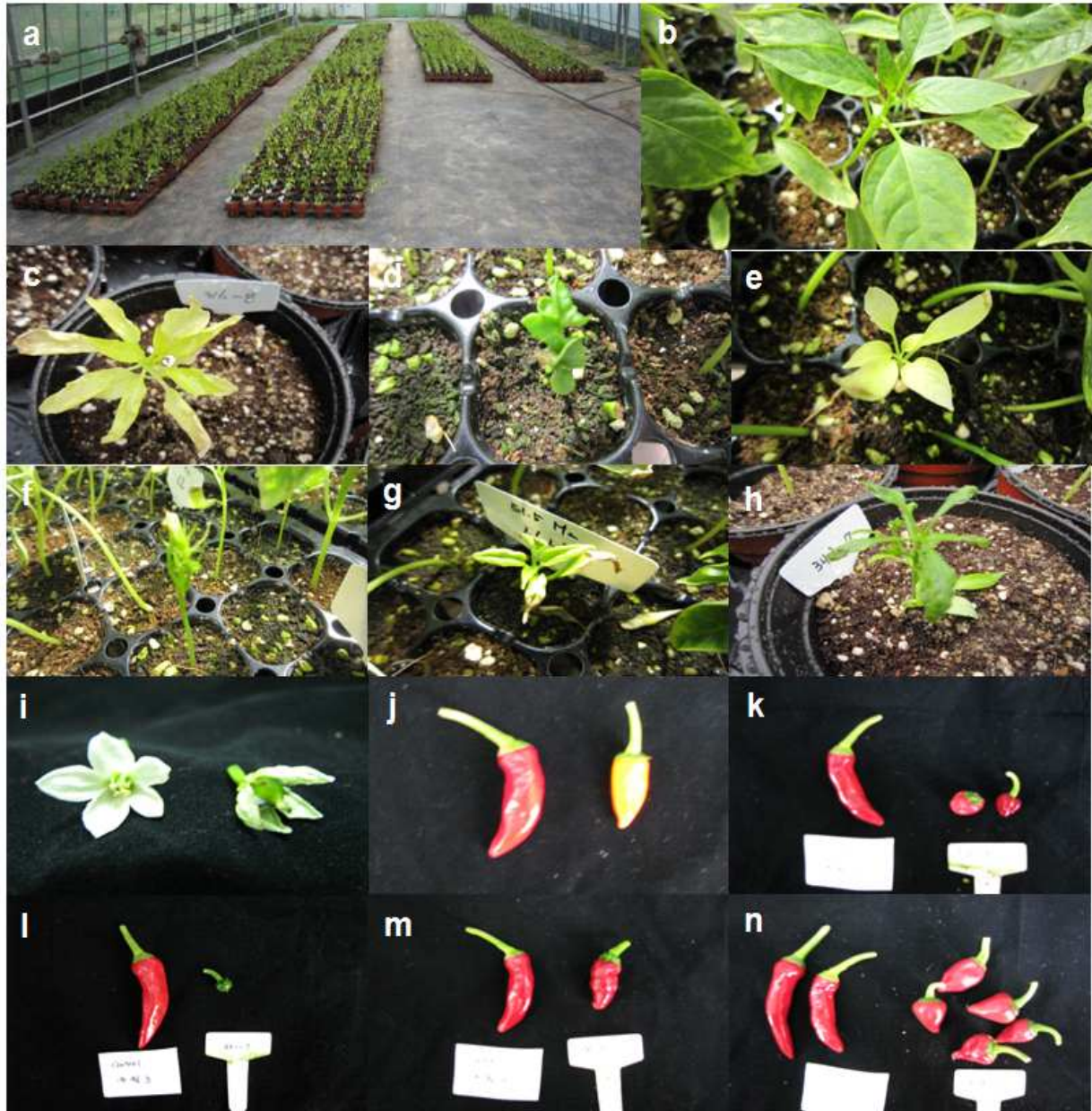


그림6-5. 돌연변이 유기 M2 분리세대 선발. (a) 유기된 돌연변이 M2 집단 정식 후 모습, (b) 정상적인 유월초 잎 모양, (c)-(h) 돌연변이 M2 집단의 표현형 차이, (i) 돌연변이 M2 집단에서 화기구조의 변화, (j) - (n) 돌연변이 M2 집단에서의 과실의 모양 및 색깔의 변화.

○ 돌연변이의 유전적인 분석을 하기 위해 DNA pooling 방법으로 gDNA를 추출하였다.

라. 제 4, 5차년도

(1) M2 돌연변이 형질 조사

○ 2009년도부터 2012년도까지 EMS 처리를 통해 돌연변이를 유도시킨 돌연변이 집단 6,812개의 M1 식물체에서 총 5,023개의 M2 돌연변이 집단을 확보하였다. 돌연변이 집단이 제대로 만들어졌는지 검증하고 표현형 변이를 통해 발생한 새로운 유용 형질을 확인하기 위해서 1,480계통 (13,172개체)의 M2 돌연변이 집단에서 표현형 변이를 관찰

하였다. 돌연변이 집단에서 표현형 관찰은 정상 유월초와 비교해 형태학적인 변이를 대상으로 특성을 조사하고 4개의 class와 10개의 sub-class로 분류하였으며, 353 M2 돌연변이 집단에서 다양한 돌연변이 표현형을 관찰할 수 있었다(표 5, 6, 그림 6). 각각의 표현형 변이는 1:3 비율로 대부분의 돌연변이 표현형이 열성 유전되는 것을 확인하였다.

- 353개의 M2 돌연변이 계통의 표현형을 관찰한 결과 위의 형태적인 형질에서 많은 변이가 관찰되었으며 새로운 형질의 돌연변이 표현형에 대하여 새롭게 돌연변이를 명명하고 각각의 특징들을 정리하였다. 돌연변이 표현형 데이터는 작물 품질 개선과 유용 형질과 관련 있는 유전자에 대한 연구에 유용한 식물재료로 활용될 것이다.
- 돌연변이 유전적인 분석을 하기 위해 DNA pooling 방법을 사용해서 1,480계통 DNA 확보하였고, 이는 대량 검정 분석 방법인 TILLING을 이용해서 병 저항성 계통 선발에 사용하고자 한다.

표6-5. 연도별 EMS 집단 구축 현황

연도	M2 계통	발아율 (%)	M2 계통 중 변이된 표현형
2012	525 (4,607)	81.8	133
	392 (4,025)	78.0	59
2013	563 (4,540)	76.0	161
Total	1,480 (13,172)		353

표6-6. 고추 돌연변이 집단 표현형 검정에 사용된 세부 분류 및 해당 돌연변이 세대 수

분류	소분류	계통수	비율 (%)	분리비 (mutant : wild type)	
Plant growth	small plant	96	27.2	3 : 7	
	dwarfism	11	3.1	3 : 7	
Leaf	variegation	white type	46	13.0	3 : 7
		pale green-green type	10	2.8	1 : 9
		yellow type	3	0.8	2 : 8
		ivory type	1	0.3	1 : 9
	color	pale green type	35	9.9	3 : 7
		yellow type	5	1.4	2 : 8
	abnormal	hair-like type	2	0.6	2 : 8
	morphology	squid leg type	16	4.5	1 : 9
		cabbage type	4	1.1	2 : 8
		scabrous type	3	0.8	1 : 9
	downward curling type	2	0.6	4 : 6	

		upward curling type	4	1.1	3 : 7
		undulation type	1	0.3	3 : 7
		flaccid type	1	0.3	1 : 9
		bushed type	53	15.0	3 : 7
		narrow leaf type	7	2.0	3 : 7
		elongated petiole type	24	6.8	1 : 9
Flower	inflorescence	flowerless type	3	0.8	1 : 9
		fasciculation type	2	0.6	3 : 7
	morphology	sunflower type	1	0.3	1 : 9
		two flowers on one calyx type	1	0.3	1 : 9
	organ color	replicated petal type	2	0.6	3 : 7
Fruit	morphology	black stamen type	1	0.3	1 : 9
		white calyx and petiole type	1	0.3	1 : 9
		tailed type	1	0.3	2 : 8
	color	round and small fruit type	8	2.3	3 : 7
		two fruits on one calyx type	1	0.3	1 : 9
		two color fruits per one plant type	1	0.3	1 : 9
		variegation type in immature fruits	1	0.3	3 : 7
		yellow color type	1	0.3	2 : 8
		orange color type	5	1.4	2 : 8
		Total	353	100	



그림6-6. 다양한 돌연변이 표현형 사례. (a-f) wild type: horizontal and vertical whole plant, normal leaf, flower, immature fruit and mature fruit, (g) small plant, (h-i) dwarfism, (j-q) variegated leaf: white, pale green-green, mottle yellow, and ivory color, (r-t) leaf color: pale green and yellow color, (u-am) abnormal morphology: wiry mutant, squid leg, cabbage, scabrous, downward and upward curling leaf, flaccid, compact and fused leaf, narrow, and elongated petiole leaf, (an-ap) inflorescence: flowerless and formation of floral cluster similar to the fasciculate mutant type, (aq-as) flower morphology: many petal and floral organ, two flower on one calyx and replicated petal, (at, au) flower organ color: black stamen and white calyx and petiole, (av-ax) fruit morphology: tailed fruit with no seed and abnormal ovary, small and round fruit and two fruit on one calyx, (ay-bb) fruit color: orange and yellow fruit on one plant, variegation type in immature stage and orange, yellow and orange fruit.

3. 병저항성 계통 선발

가. 제 1차년도

(1) HRM 분석법을 이용한 목적 유전자 돌연변이 검정 체계 확립

- 유용유전자의 돌연변이체를 알아보기 위한 가장 확실한 방법 중 하나는 특정유전자에 대한 염기서열 분석이나, 많은 비용과 노력이 요구되는 문제점이 있다. 최근 들어 유용 유전자의 돌연변이를 탐색하기 위한 TILLING, Eco-TILLING 등과 같은 방법이 개발되어 사용되고 있으나 M2 세대의 많은 집단의 검정이 필요하다. 이에 따라 보다 쉽고 간편하게 mutant screening하는 방법이 개발되어야 한다. 최근 high resolution melting(HRM) 방법이 개발되어 SNP을 분석하기 위한 연구에 활용되고 있으며, 이를 이용하면 TILLING이나 Eco-TILLING을 대체할 수 있을 것으로 판단된다. 최근 Hofinger 등(2009)은 의해 HRM 기술을 활용하여 보리의 유전자원에서 eIF4E의 자연 돌연변이를 검정한 사례가 보고되었다.
- HRM을 이용한 M1 세대 돌연변이 세대 돌연변이율을 검정하기 위해선 M1 세대에서 특정 유전자의 돌연변이율을 조사하기 위하여 eIF4E에 대한 돌연변이 조사를 진행하였다. 고추의 pvr1은 자연계에 존재하는 potyvirus 열성저항성 유전자로 eIF4E의 돌연변이에 의해 발생됨이 밝혀졌다(Kang et al. 2005, Yeam et al. 2007). eIF4E의 돌연변이율을 조사하기 위하여 eIF4E의 mutation을 HRM 방법으로 조사하였다.
- 현재 1,414 개체 중 254개체에 대해서 pvr1 유전자(eIF4E)에 돌연변이가 유기 되었는지를 조사하였고, 그 결과 254개체 중 2개체에서 정상개체의 HRM 곡선과 다른 곡선이 나타났다(그림6-7).

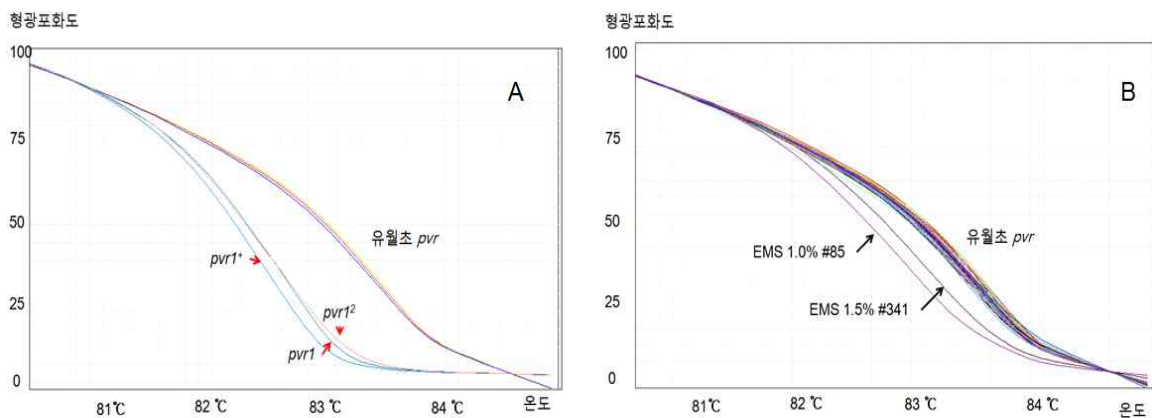


그림6-158. 고추 유월초 품종에 돌연변이를 유기한 M1세대에서의 pvr 유전형 screening 결과. 그림 A. HRM 곡선이 유월초와 기존의 pvr1 유전자와 큰 차이를 보이고 있으며, 이에 따라 유월초 pvr1 유전자가 기존에 보고된 pvr1 감수성 및 저항성 유전자와는 다른 종류의 염기서열을 가지고 있음. 그림 B. 돌연변이 유기된 M1 세대에서 유월초와 다른 종류의 melting 곡선을 가진 돌연변이체를 screening 하여, 전체 254개체의 개체 중 유월초와 다른 종류의 melting type을 가진 두 개의 개체가 선별되었음.

나. 제 2차년도

(1) 고추 유전자원을 활용한 바이러스 저항성 개체 선발

- HRM 분석법을 이용하여 주요 바이러스에 대한 저항성 유전자인 eIF4E 유전자를 이용하여 고추 유전자원 250점에 대한 자연적인 돌연변이에 대해 검정하였다. 추가로 ELISA 분석 및 염기서열 분석을 통해 TEV 바이러스 저항성 후보 유전자원 확보했으며, TEV 저항성 유전자인 eIF4E를 이용하여 HRM을 통한 분자 마커 개발하였다(그림 6-8, 6-9, 6-10).

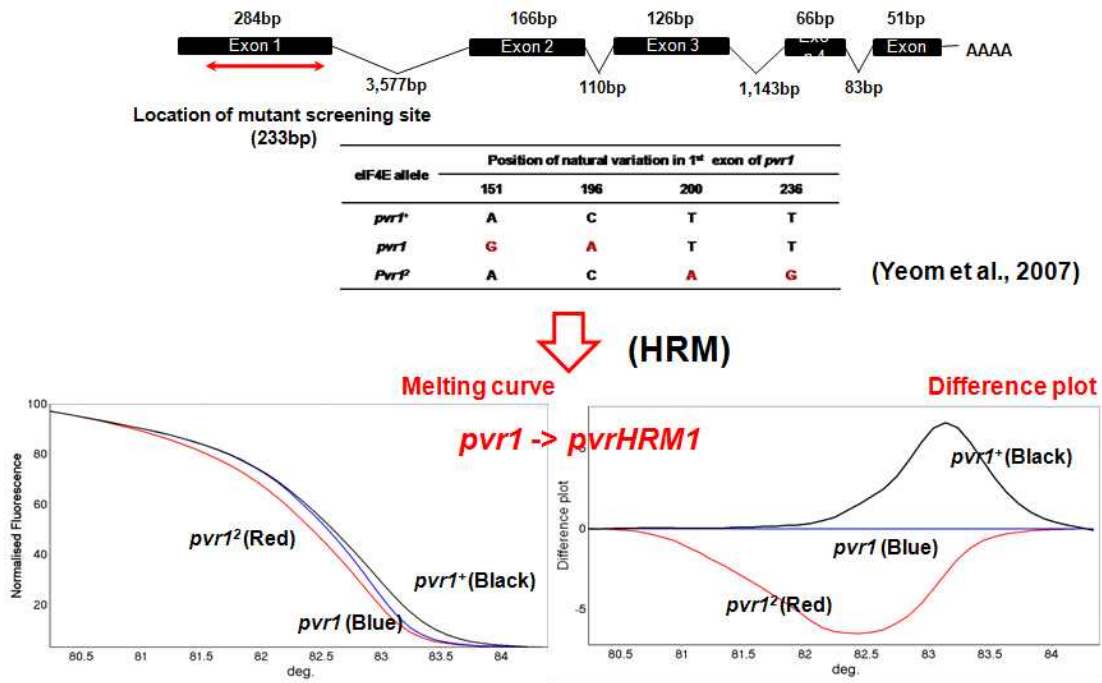


그림6-8. TEV 저항성 유전자인 eIF4E를 이용하여 기존에 개발된 CAPS marker의 정보를 활용하여 HRM을 통한 분자 표지 개발하였으며, 각각의 유전자를 잘 구별하는 것으로 판단됨.

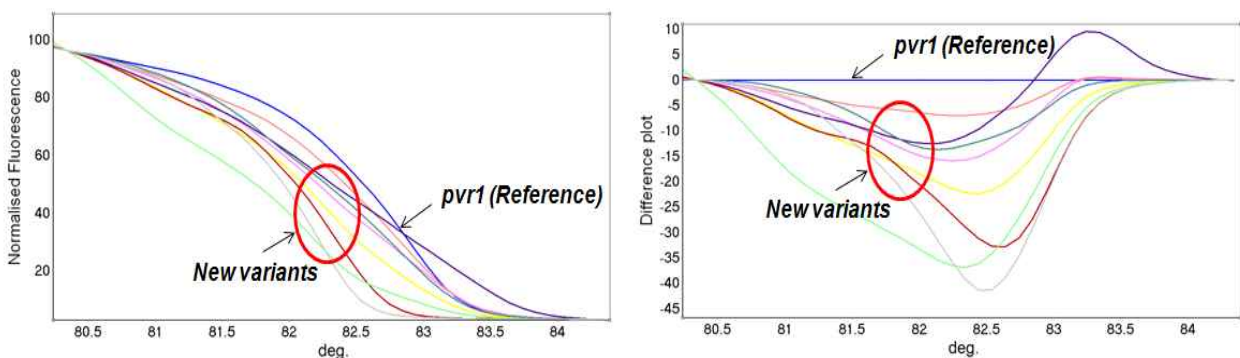


그림6-9. HRM을 통한 고추 유전자원 Screening. 고추 유전자원을 활용하여 기존에 보고된 유전자와는 다른 형태의 HRM 곡선을 확인하였고 새로운 바이러스 저항성 유전자 후보로써 판단됨.

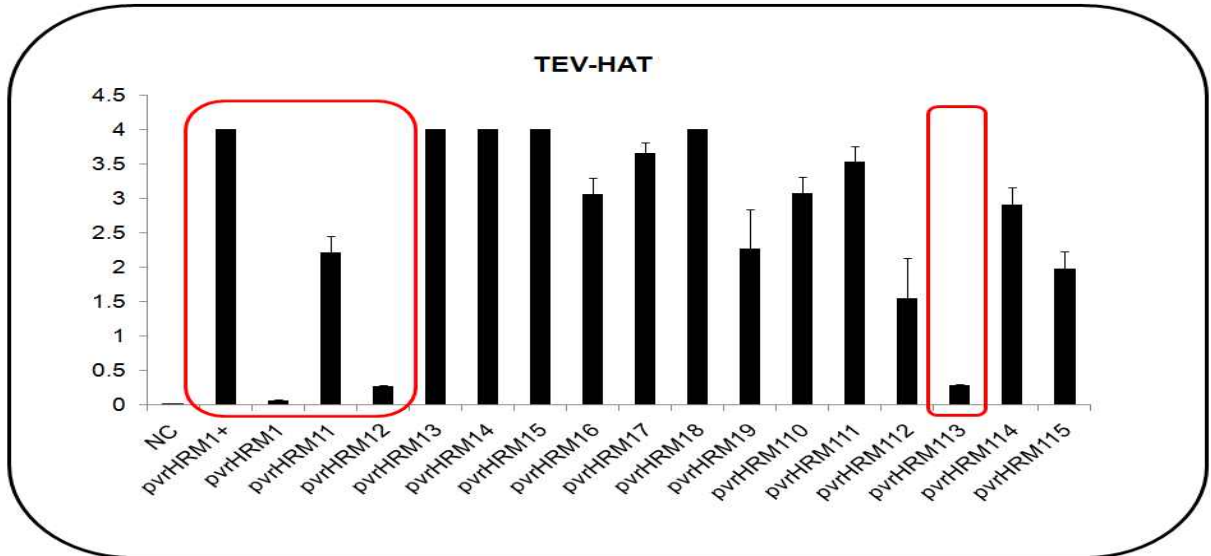


그림6-10. HRM을 통한 고추 유전자원 Screening. ELIZA 분석 및 염기서열 분석을 통하여 1개의 돌연변이에서 TEV에 대한 바이러스 저항성을 확인함.

(2) 돌연변이 M2 세대에서 eIF4E 유전자를 활용한 바이러스 저항성 개체 선발

- eIF4E 유전자는 Potyvirus에 대한 저항성을 갖게 해주는 유전자로 알려져 있으며, 다른 작물에서 열성유전자의 돌연변이를 유도시키기 위해 가장 널리 사용되는 유전자이다. 실험 목적은 M1 세대에서 확보된 eIF4E 유전자가 M2 세대로 유전되는지에 대한 파악하고 바이러스 저항성 개체로써의 가능성 확인하고자 하였으며, 2009년 확보된 eIF4E 유전자 돌연변이체가 M2 세대에서 분리됨을 확인하였다. 추가로 염기서열 분석을 통해 돌연변이를 확인하였다(그림 6-11, 6-12).

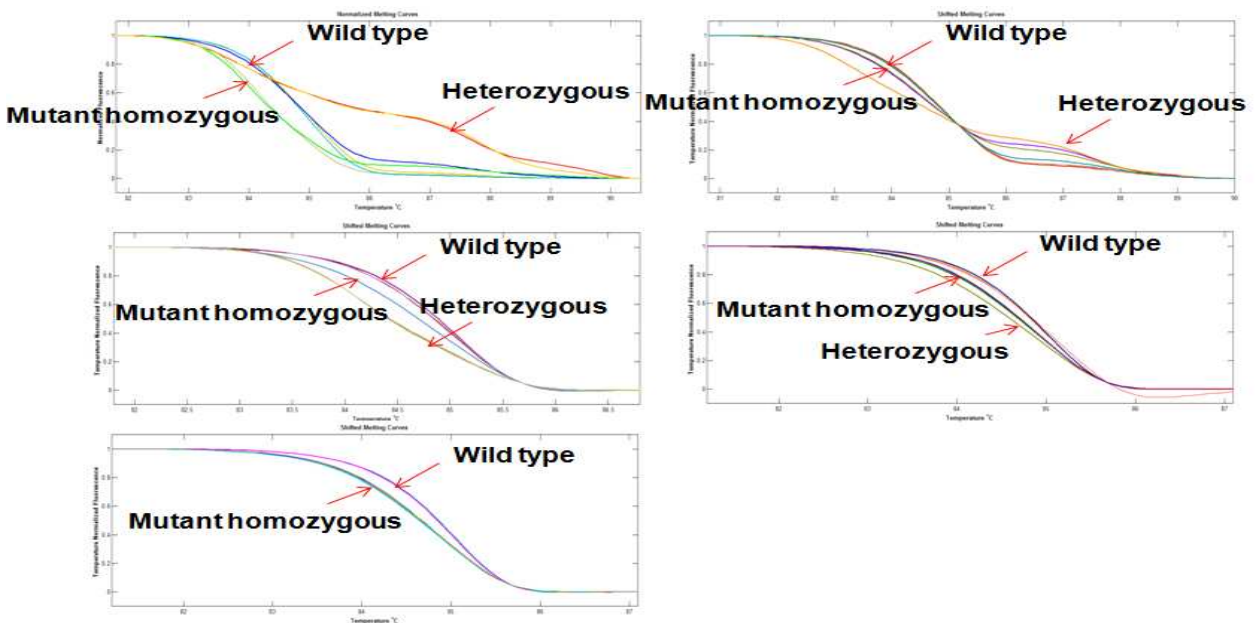


그림6-11. M2 세대에서 HRM 분석법을 통한 eIF4E 돌연변이 세대의 분리 확인함.

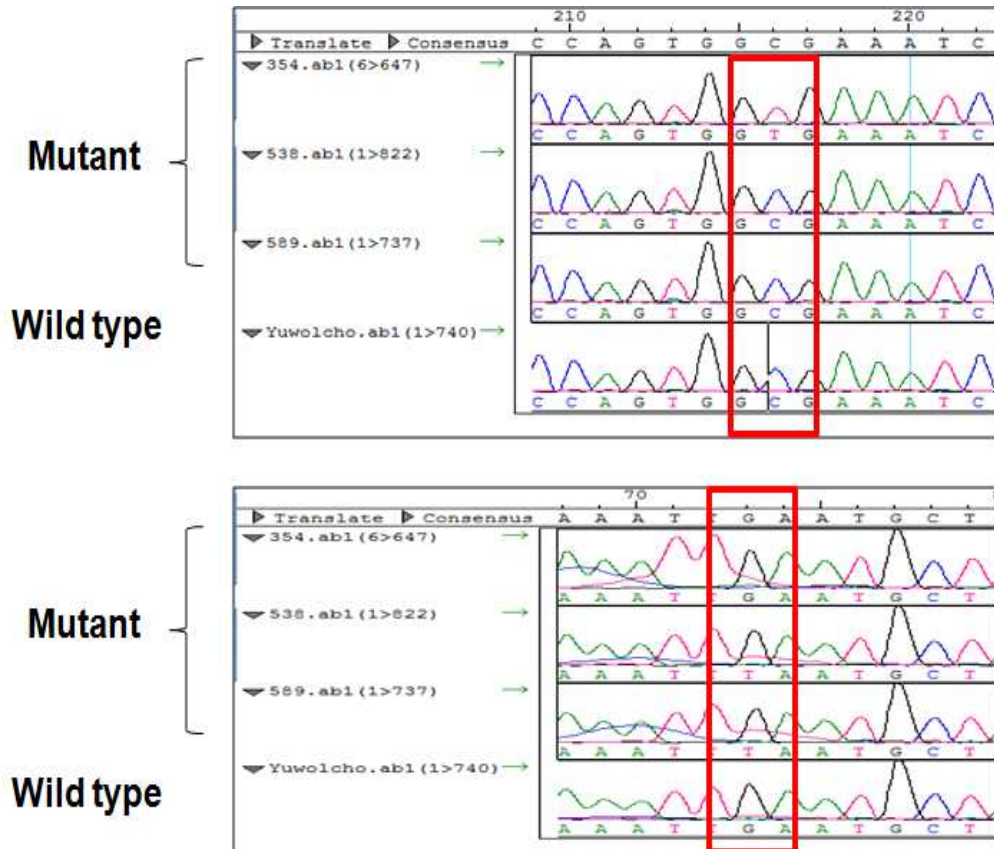


그림6-12. M2 세대에서 염기서열 분석을 통한 eIF4E 돌연변이 세대의 분리 확인함.

(3) 유전형 분석을 통한 M2 세대에서 돌연변이율 확인

- 전체 유전체(Genome)에 적절한 수준의 돌연변이가 유도됐는지를 확인하기 위해 전체 유전체에서 1개의 유전자에 1개의 돌연변이가 유도될 정도의 돌연변이를 구축하는 것을 목표로 지속적으로 집단 구축 하였으며, 효율적인 돌연변이 선별을 위하여 4X pooling 방법을 통하여 돌연변이를 선별하였다 그 결과 HRM 방법을 이용하였을 때, 4X pooling 방법이 돌연변이 선별에 가능한 것을 확인하였다. 따라서 COS II marker 및 주요 유전자에 대한 HRM screening 방법을 통하여 돌연변이 유무를 판단할 수 있었으며, 4X pooling에서 확인된 돌연변이 pooling DNA에서 보다 정확한 돌연변이 개체를 선별하기 위해 HRM을 이용하여 분석하였다(그림6-13, 6-14).

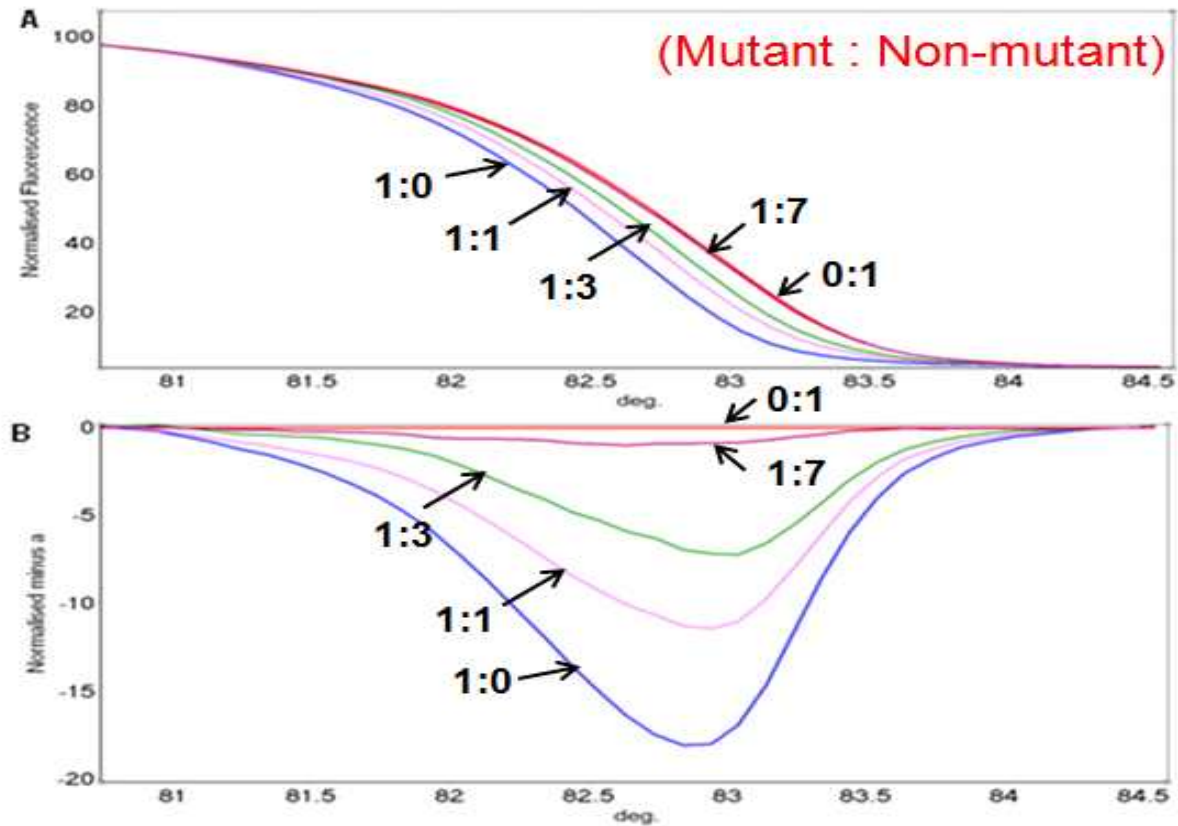


그림6-13. HRM 방법을 통한 4X pooling에서의 돌연변이 판단. 돌연변이 개체와 대조군을 섞어서 진행한 실험에서 돌연변이와 대조군이 1:3으로 섞여 있는 DNA pooling 개체(4X pooling)에서 기존의 HRM 패턴과 다른 곡선을 확인할 수 있었음. 이를 통해 4X pooling 방법으로 돌연변이를 선별하기로 함.

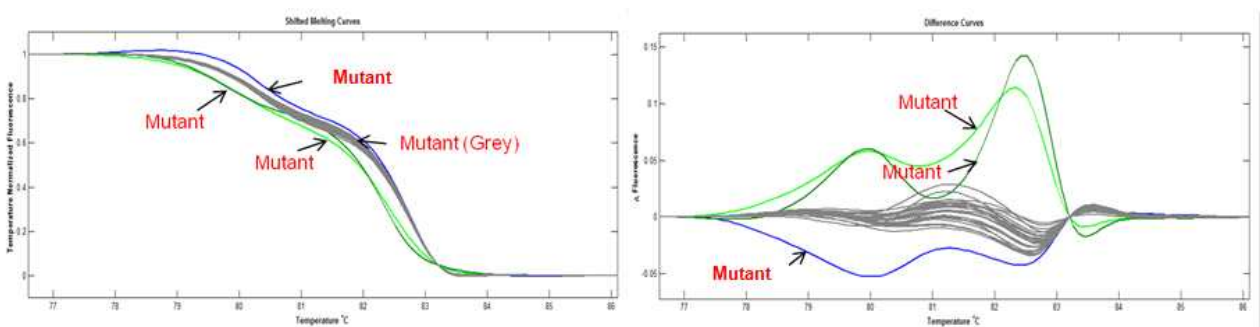


그림6-14. HRM 방법을 통한 4X pooling에서의 돌연변이 판단. 다음과 같은 방법으로 4X pooling에서 돌연변이가 충분히 구별되는 것을 확인할 수 있었음.

다. 제 3차년도

(1) CMV 저항성 계통 선발

- CMV는 고추에 중요한 피해를 입히는 바이러스 중 하나이며, 바이러스에 대한 감염에 대한 화학적인 방제는 불가능하므로 저항성 계통을 육종하는 것이 중요하다. 고추에서 CMV에 대해 저항성을 가지는 품종이나 계통이 여럿 보고되었으나, 재배 과정에서 이러한 저항성이 쉽게 붕괴되는 경우가 보고되어 새로운 저항성 품종을 육종하는 것이

필요하다. 바이러스에 대한 저항성 Test는 M3 이후 고정된 세대에서 이루어지는 것이 유리하므로, 우선적으로 186개체의 고추 유전자원을 활용하여 바이러스에 대한 대량 접종 방법에 대한 연구를 진행하였고, 고추 유전자원에 대한 대량 접종 방법에서 CMV에 대한 병징이 관찰됨을 확인하였다. 전체 186 개체 중에서 4개의 유전자원에서 저항성이 있는 것으로 선발하였다. 이는 돌연변이 집단에서도 대량 접종 방법에 대한 적용이 가능할 것으로 판단되며 M3세대 확보 이후 실험을 진행할 계획이다(그림6-15), (표 6-7).

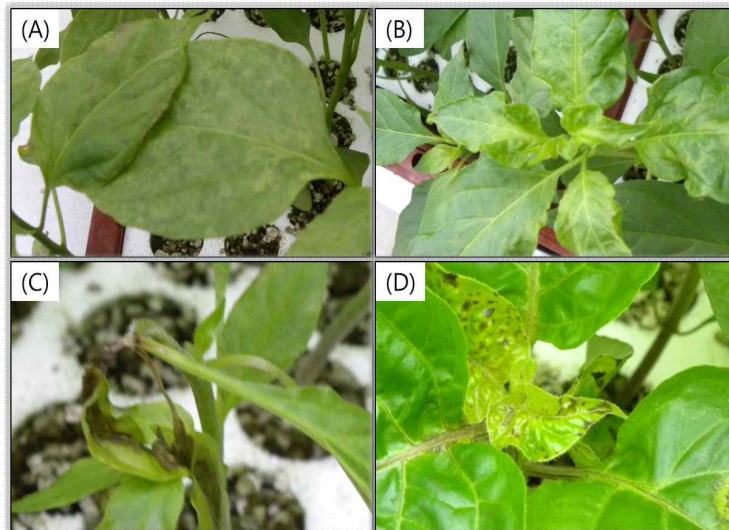


그림6-15. CMV에 대한 병 반응. 거의 모든 개체의 잎조직에서 mosaic(A)이나 mottle(B) 병징이 나타난다. 일부 유전자원에서는 stem necrosis(C)나 leaf necrosis(D) 병징도 나타남.

표6-7. 고추 유전자원의 CMV 병 반응 및 병 발생 빈도 요약

SNU	Species	Name	Symptoms					Infected No.	Total No.
			Mosaic	Mottle	Stunting	Necrosis	stem necrosis		
003	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	PBC 458	0					3	9
004	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	타일랜드1						0 (1) ²	10
007	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	Piquillo	0					4	5
009	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	Jamaican Yellow		0				6	9
010	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	Agronomico 10	0	0				7	9
011	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	Flavr2	0					5	7
012	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	VR-4	0					6	7
014	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	Pujab small Hot	0					2	9
015	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	Avelar 2001	0					4	10
021	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	Santa fe grand5	0					6	10
022	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	Pepperoncini	0					2	9
023	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	Tura	0		0			3	5
024	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	EU017	0					4	7
025	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	EU018	0	0			0	5	9
026	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	EU 019	0					1	1
027	<i>Capsicum baccatum</i>	J a v i t o t t	0				0	1	1

		bogyiszloi				
028	<i>Capsicum frutescens</i>	C00050	○		9	10
029	<i>Capsicum frutescens</i>	C00090		○	3	9
030	<i>Capsicum baccatum</i>	C00313	○		10	10

(2) TSWV 저항성 계통 선발

○ TSWV의 경우에는 유럽에서 가장 문제가 되고 있는 바이러스 중 하나이며, 국내에서도 이러한 바이러스가 외래에서 도입되고 있는 상황이다. TSWV의 바이러스 저항성 역시 방제가 어려우며, 특히 곤충을 매개체로 하여 쉽게 감염이 되므로 이에 대한 저항성 품종을 육성하는 것이 무엇보다 시급하다. 하지만, 국내외 적으로 TSWV에 대해서 저항성을 보이는 고추의 품종은 거의 없으며 따라서 돌연변이 육종 등을 통한 방법으로 저항성을 보이는 새로운 유전자원의 도입이 시급하다. 본 연구에서 사용된 유월초의 경우에는 TSWV 바이러스에 대해서는 이병성을 보이는 것을 확인하였으나, 대량으로 검정한 사례가 없어, M3 세대 증식 이전에 고추 유전자원을 이용하여 대량 접종 방법을 검정하였다. TSWV는 온도와 접종 시기에 따라 병징이 관찰되는 것이 다양하므로, 이에 대한 조건을 확립하고 대량으로 접종하였을 때 병징이 관찰되며 저항성을 보이는 것을 선발하고자 했으며, 실험에는 본 실험실에서 보유하고 있는 532개의 재배종과 3개의 야생종, 30개의 F1 종자를 이용하여 실험을 진행하였다. 그 결과 *C. annuum* 5개체와 *C. chinense* 1개체에서 TSWV에 저항성을 보이는 개체를 선발할 수 있었으며, 이를 통해 대량으로 접종하였을 때에도 선발이 가능함을 확인하였다(그림6-16), (표6-8).



그림6-16. 고추 유전자원을 이용하여 TSWV에 대한 대량 접종 방법을 통해서 저항성 계통을 찾아냄. TSWV에 경우에도 대량 접종 방법을 통해서 저항성 계통을 찾아낼 수 있음을 확인함.

표6-8. 고추 유전자원의 TSWV 병 반응 및 병 발생 빈도 요약

Species	No. of accessions ^a	Observed frequency of TSWV resistant accessions					
		No. of resistance accession (50-69%) ^b	%	No. of resistance accession (70-94%)	%	No. of resistance accession (94-100%)	%
<i>Capsicum annuum</i> ^c	111	6	5.4	5	4.5	0	0.0
<i>Capsicum chinense</i> ^d	15	1	6.7	0	0.0	1	6.7
<i>Capsicum frutescens</i>	18	4	22.2	0	0.0	0	0.0
<i>Capsicum baccatum</i>	15	3	20.0	0	0.0	0	0.0
<i>Capsicum pubescens</i>	2	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Capsicum chacoense</i>	3	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>C. annuum F1 hybrid</i>	30	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Total	194	14	7.2	5	2.6	1	0.5

^a 10 plants per accession were inoculated using TSWV_{Pap} isolate

^b TSWV symptom was scored at 30 days post inoculation (dpi)

^c All 30 susceptible control plants 'Special' showed TSWV symptom at 30 dpi

^d All 10 resistant control plants 'PI152225' showed free of TSWV symptom at 30 dpi

라. 제 4차년도

(1) 바이러스 CMV-P1 helicase domain과 상호작용하는 고추 유전자 동정 및 기능 분석

- 바이러스의 RNA 내에는 그들이 증식하는데 필수적 요소들을 포함하고 있으나 그 양이 제한적이므로 host 내 생존하기 위해서는 식물 단백질인 host factor을 이용 한다. 이전 연구를 통해, CMV-P1 helicase domain이 부강의 전신 감염을 조절한다는 것이 확인 되었으며, 이를 바탕으로 CMV-P1과 상호작용하는 고추 유전자를 확인하고 기능을 연구하였다. VIGS 방법을 이용하여 후보 유전자가 knock-down 되었을 때 바이러스 증식이 감소하는 유전자를 확인하고 향후 이 유전자의 돌연변이체를 TILLING 방법으로 확보하고자 하였다.
- Bait vector를 제작하기 위하여 CMV-P1 cDNA clone을 이용하여 CMV-P1 helicase domain 지역을 증폭하였고, 증폭된 helicase domain을 bait vector에 도입하여 yeast에 형질전환한 뒤 형질전환 된 yeast만을 선택배지(SD-Trp)에서 선발하여 prey vector를 도입 후 선택배지(SD-Trp, Leu)에서 2차 선발을 하였다. 100,080 clone을 선택 배지(SD-Trp, Leu, His)에서 배양하여 스크리닝 하였으며, 이중 156개의 CMV-P1 helicase domain과 상호작용하는 단백질을 분리하였다.
- Yeast two hybrid system을 통해 상호작용이 확인된 clone을 선발하여 상호작용 재확인을 위해 β-galactosidase filter lift assay를 수행하였으며, 그 결과, 82개의 clone이 파란색으로 변화되는 것을 확인 할 수 있었으며, 이 clone들만을 분리하여 추후 실험을 진행 하였다(표6-9, 그림6-17).

표6-9. CMV-P1 helicase domain과 상호작용하는 후보 유전자 분리 방법 및 개체 수 확인

Total number of clones	Yeast two-hybrid screening	Filter lift assay	PCR screening	Sequencing
100,080	156	82	80	78

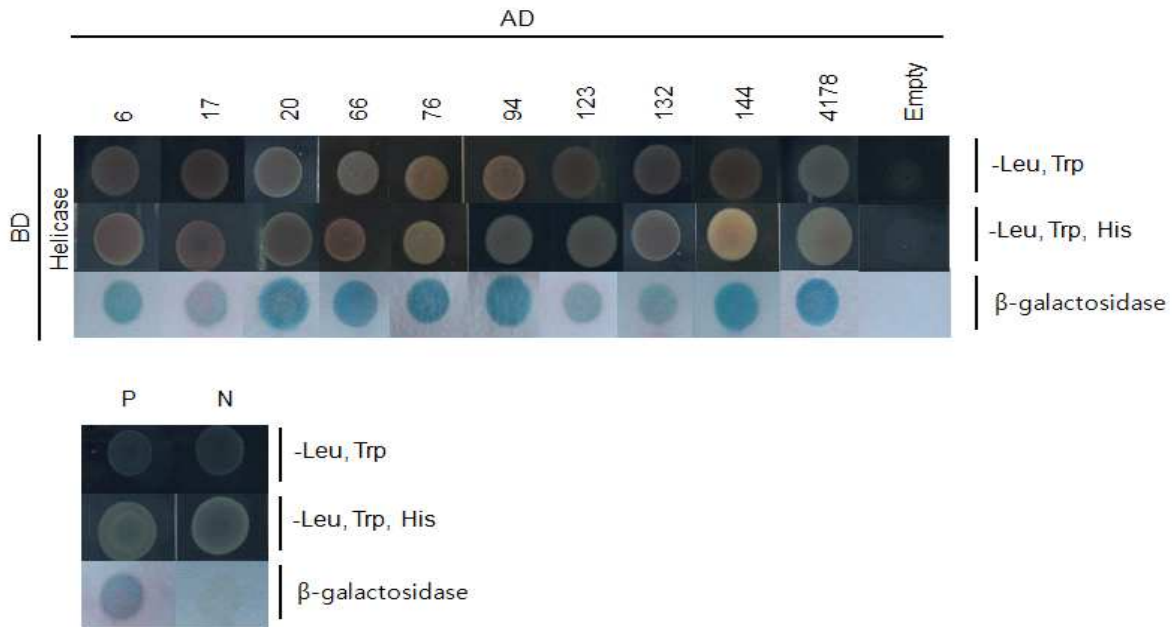


그림6-17. β -galactosidase filter lift assay를 이용한 후보 유전자 상호작용 확인.

- 상호작용하는 고추 유전자 분리를 위하여 82개의 후보 clone을 이용해 yeast colony PCR을 하였고, 이중 80개의 clone에서 증폭된 유전자를 분리하였다. 분리한 유전자를 TA cloning vector에 삽입하여 염기서열 분석 요청하였고, 분석된 염기서열을 database를 통해 확인한 결과 총 78개의 후보 유전자가 서로 다른 단백질을 암호화하는 것을 확인하였다. 78개 유전자 중 10개는 pathogen과 관련된 연구 사례가 존재하지 않았으며, 13개 유전자는 해당 유전자와의 일치도가 낮았다. 17개의 유전자는 pathogen과 관련된 연구사례가 존재하였으며, 나머지 38개 유전자는 알려지지 않은 기능을 갖고 있거나 false positive clone인 것으로 확인하였다 (표6-10). Pathogen과 관련된 17개 유전자 중에 이전 연구를 바탕으로 10개 유전자를 선별하였으며 각 유전자들은 acireductone dioxygenase, ADP-glucose pyrophosphorylase, ADP-ribosylation factor 1, ADP-ribosylation factor, calreticulin-3 precursor, cysteine synthase, formate dehydrogenase, histone-H3, phosphomannomutase, polyubiquitin 6PU11을 암호화하는 것을 확인하였고 Capsicum annuum BAC database를 통해 각 유전자들은 고추 genome 상에 1개의 copy로 존재하는 것을 확인하였다(표6-11).

표6-10. 후보 유전자 특성 별 분리.

Category	Number of genes
None-relation with pathogens	10
Low coverage and identity	13
Relation with pathogens	17
False or unknown function	38

표6-11. CMV-P1 helicase domain 과 상호작용하는 선발된 유전자 기능과 고추 genome 내 copy 수.

Candidate clones	Length	NCBI DB				<i>Capsicum annuum</i> BAC DB			
		Accession ID	Full length	Identity (%)	Function	Accession ID	Full length	Identity (%)	Copy number
6	1011	AB029512.2	1378	95	Cysteine synthase	CAW0_83_Conti g 066546	11151	100	1
17	401	NM_001247928.1	1572	88	Formate dehydrogenase	CAW0_83_Conti g 068332	11342	99	1
20	1176	EU961843.1	1675	79	Calreticulin-3 precursor	CAW0_83_Conti g 012645	51703	99	1
66	801	U85496.1	2105	94	ADP-glucose pyrophosphorylase	CAW0_83_Conti g 001531	86558	99	1
76	823	AY496112.1	705	99	Polyubiquitin 6PU11	CAW15S1_Conti g 047018	15627	90	1
94	770	DQ531849.1	928	90	ADP-ribosylation factor 1	CAW15S1_Conti g 004109	54440	97	1
123	657	AF108891.1	1139	99	ADP-ribosylation factor	CAW0_83_Conti g 034914	23611	100	1
132	673	AY491505.1	667	99	Histone-H3	CAW0_83_Conti g 125004	4793	99	1
144	733	AK323870.1	804	94	Acireductone dioxygenase	CAW0_83_Conti g 054981	13084	98	1
4178	586	NM_001246872.1	759	94	Phospho-mannomutase	CAW0_83_Conti g 069885	11221	100	1

○ 후보 유전자의 특정 250~350 bp를 부가 cDNA로부터 PCR 방법을 이용하여 증폭하였고, 이를 Tobacco rattle virus(TRV) vector에 클로닝 하여 *N. benthamiana*에서 gene-specific silencing을 유도하였다. Silencing 유도 후 10개 유전자 중 3개 유전자 ADP-ribosylation factor 1, ADP-ribosylation factor, Polyubiquitin 6PU11는 심한 발육 저해가 일어나 식물이 생존 할 수 없었으며, 이를 제외한 7개 유전자는 wild type보다는 성장이 저해되었으나 비슷한 phenotype을 보였다(그림6-18). 따라서 각 유전자가 실제로 silencing 됐는지 유무를 판단하기위해 semi qRT-PCR 방법을 이용하였으며, 그 결과 7개 유전자 중 5개가 silencing 되는 것을 확인하였다(그림6-19). Co-silencing 유무를 확인하고자, 각 silencing 한 식물체 cDNA에 gene-specific primer을 이용하여 PCR을 진행하였고, 그 결과 각 유전자는 유전자 간에 관계가 없음을 확인하였다.

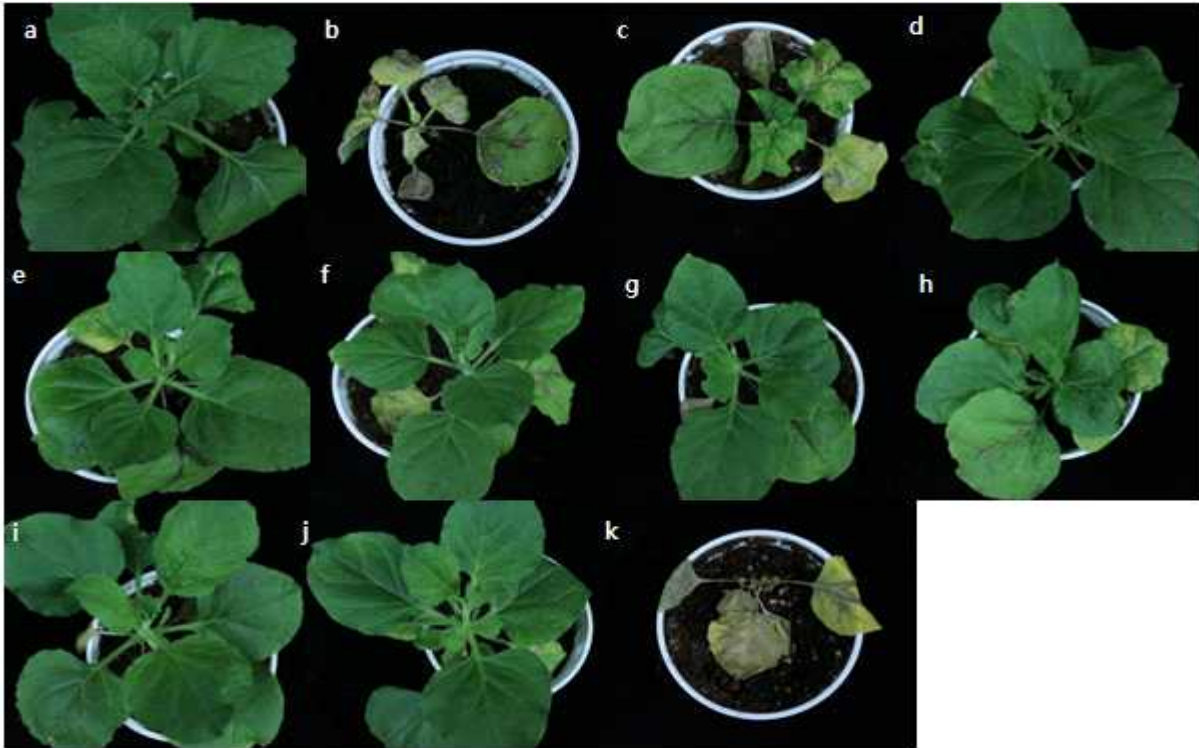


그림6-18. *N. benthamiana*에서 유전자 silencing에 의한 유전자별 phenotype. Wild-type (a), ADP-ribosylation factor 1 (b), ADP-ribosylation factor (c), Histone-H3 (d), Acireductone dioxygenase (e), Phosphomannomutase (f), Cysteine synthase (g), Formate dehydrogenase (h), Calreticulin-3 precursor (i), ADP-glucose pyrophosphorylase (j), Polyubiquitin 6PU11 (k).

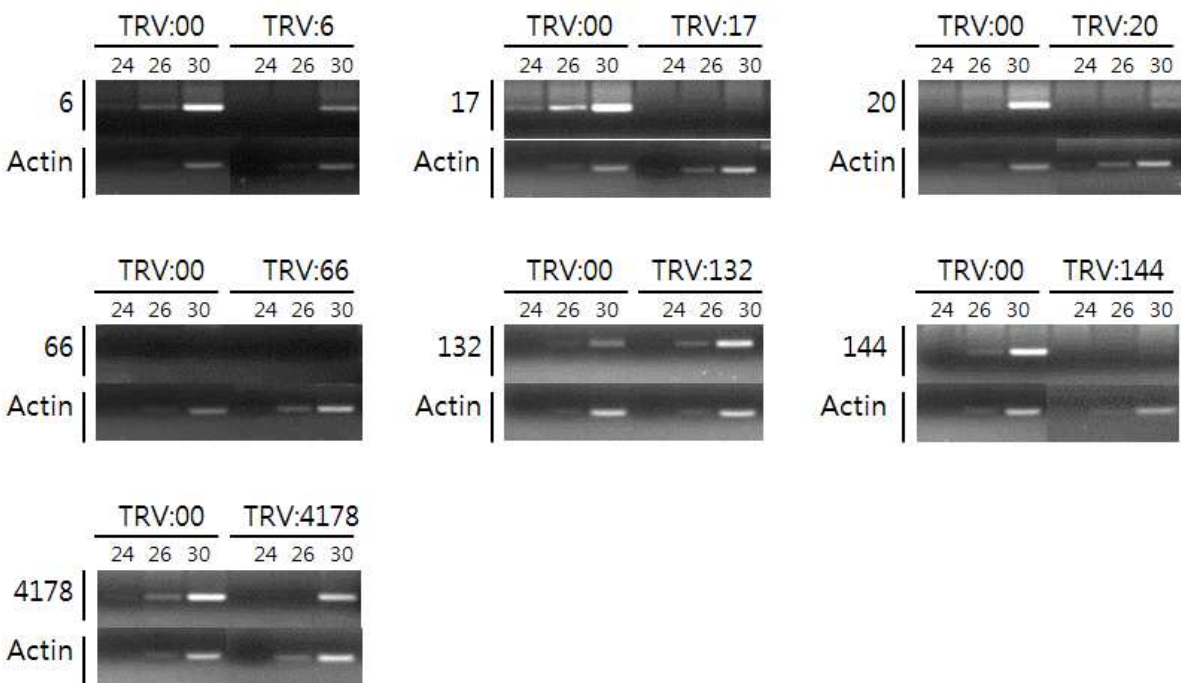


그림6-19. Semi qRT-PCR을 이용하여 silencing 진행한 식물체에서 각 유전자의 발현 양 확인.

- CMV-P1-GFP를 *N. benthamiana*에 접종하여 식물체에서 바이러스 증식 여부를 접종 후 10일에 확인하였고, Silencing 식물체와의 비교를 위해 TRV vector만 들어 간 TRV:00를 이용한 결과 TRV:00에서는 매우 강하고 접종엽 전체에서 GFP signal을 확인하였다. 유전자 6번과 132번 silencing 한 식물체의 경우에는 TRV:00보다 더 강하게 GFP signal을 보였고, 접종엽 뿐만 아니라 상엽에서도 signal을 확인하였고, 유전자 17번, 20번, 66번, 144번, 4178번은 TRV:00에 비해 GFP signal 강도가 낮고, 이 중 17번과 20번은 접종엽의 국소적 부위에서만 signal을 확인하였다 (그림6-20). 이 2개의 유전자(C3P, FDH)를 대상으로 네델란드 Keygene 회사와 공동연구를 통해 CMV-P1 TILLING 돌연변이 집단에서 C3P 유전자의 경우 Amino acid change, Intron, silent mutation, 그리고 stop된 45개의 돌연변이를 확인하였고, FDH 유전자의 경우 Amino acid change, Intron, silent mutation, 그리고 stop된 62개의 돌연변이를 확인하였다(표6-12).

표6-12. CMV-P1 TILLING 돌연변이 집단 중 변이된 유전자 정보

Gene	mutation type	No. of mutation	Rate (%)
<i>C3P</i>	Amino acid change	31	70
	Intron	3	6
	Silent mutation	8	18
	Stop	3	6
	Total	45	100
<i>FDH</i>	Amino acid change	31	50
	Intron	6	10
	Silent mutation	16	26
	Stop	9	14
	Total	62	100

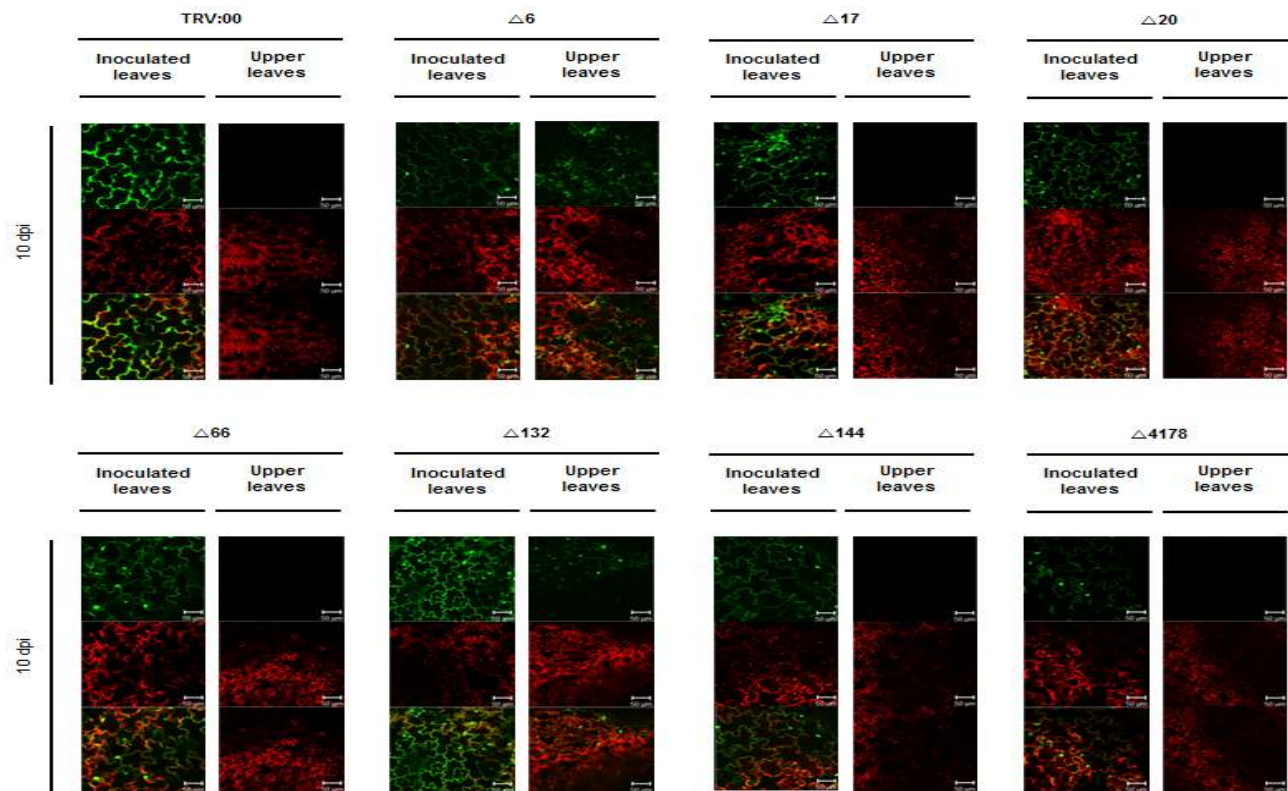


그림6-20. Silencing 식물체 내 바이러스 저항성 확인.

마. 제 5차년도

(1) 바이러스 CMV-P1에 저항성 돌연변이 고추 개발 및 식물체 특성 분석

- 바이러스에 저항성을 띠는 식물 유전자원의 수는 한정적이다. 때문에 바이러스에 저항성을 갖는 식물체를 만드는 방법으로 재래 고추인 유월초에 EMS처리한 돌연변이 집단을 CMV-P1으로 screening 하여 저항성 개체를 찾고자 하였다. 이전 연구를 통해, EMS 처리된 토마토 돌연변이 집단에서 potato virus X(PVX)라는 바이러스에 저항성을 갖는 개체를 찾은 것이 확인 되었으며(Sturbois B. et al., 2012), 이를 바탕으로 CMV-P1에 저항성을 보이는 M3 고추 개체를 찾아내고 저항성을 재확인 하고자 하였다. ELISA 방법을 이용하여 병징이 보이지 않는 식물체에서 실제로 바이러스 coat protein이 접종 상엽에서도 검출되는지 유무를 확인하였다.
- CMV-P1 저항성 검정을 하기에 앞서 실험재료인 유월초가 해당바이러스에 대해 저항성 인지 이병성인지의 유무를 확인하는 실험을 수행하였다(표6-13, 그림6-21). 본 실험에서 사용된 개체로는 이병성 control인 제주재래(C. annuum)와 부강 F1(C. annuum)이 사용되었고 저항성 control에는 LAM32(C. annuum)이 사용되었다. 실험 결과를 통해 돌연변이 집단도 CMV-P1에 이병성이라는 것을 가정하고 실험을 수행하였다.

표6-13. 각 식물체 종 별 CMV-P1에 대한 저항성 여부

	LAM32	Jejujaerae	BukangF1	Yuwol-cho
Character	R	S	S	S

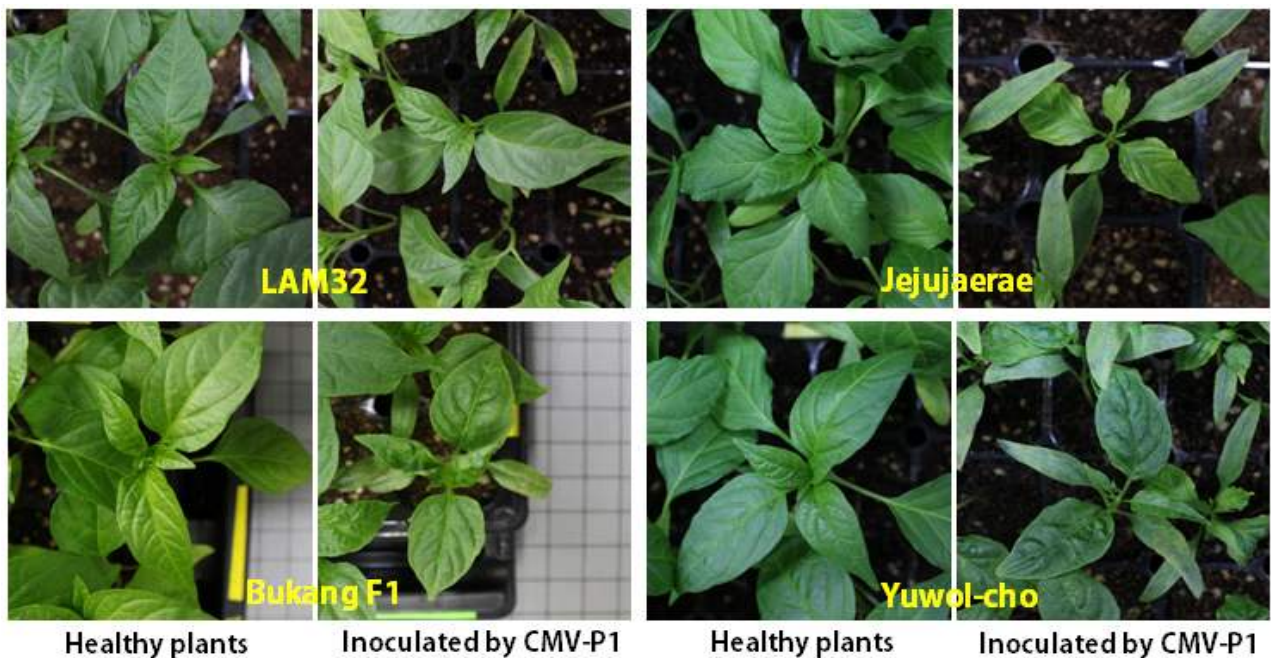


그림6-21. CMV-P1을 식물체의 떡잎에 접종 후 14일째의 사진. 각각의 사진의 좌측은 접종하지 않은 건강한 식물체의 모습을 나타내고 있으며 각 사진의 우측은 저항성 control을 제외한 나머지 식물체에서 병징이 확연하게 드러난 것을 나타내고 있음.

- M3세대까지 진전시켜 얻은 473개의 돌연변이 계통을 대상으로 연구를 수행하였다. 각 계통 당 평균 20립의 종자를 사용하였으며, 총 9,399개체 중 발아하여 떡잎에 접종한 개체는 7,891개체로 약 84%의 발아율을 보였으며, 7,891개체에 접종한 후 일주일째 1차 screening시 병징이 보이지 않은 개체는 821개체였으며, 이들 개체에 한해 2차 접종 후 다시 일주일 후 2차 screening시에도 병징이 나타나지 않은 개체는 28개의 계통에 속한 45개체였으며, ELISA 결과를 통해 접종 상업으로 바이러스의 검출이 낮은 것을 확인하였다(표6-14, 그림6-22).

표6-14. M3 계통 screening 결과

Total number of plant	Number of asymptomatic plants		ELISA analysis
	1st screening	2nd screening	
7,891	821	45	45

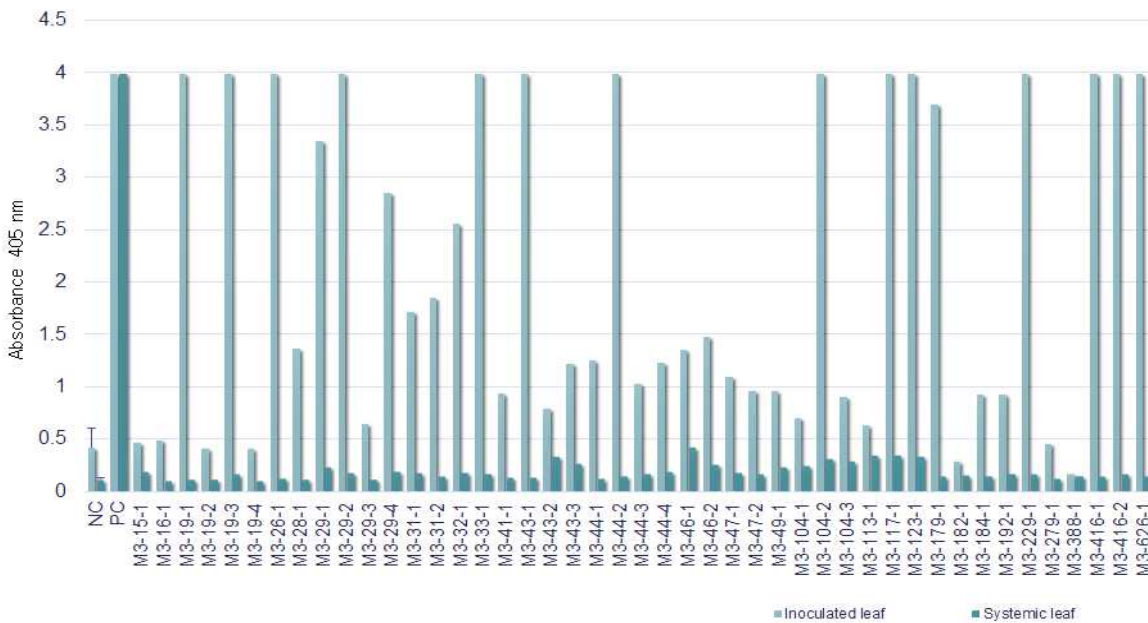


그림6-22. M3 계통 중 병징이 보이지 않은 45개체에 대해 ELISA를 시행함.

- M3 473 계통 중 CMV-P1으로 screening한 결과 선발한 28계통, 45개체에 대해 각각의 개체를 서울대 부속 농장으로 옮긴 후 자가 수정하여 M4 세대로 진전시켰다. 45개의 계통에 대한 종자를 확보한 후 각 계통 당 30립씩 파종하여 CMV-P1으로 screening을 실시하여 M3에서 나온 45개의 개체가 실제로 저항성인지 유무를 확인하고, 저항성이 고정 되었는지 저항성의 분리가 일어나는지를 확인하였다. 그 결과 2개의 계통에서만 병징이 나타나지 않았으며(그림6-23), 나머지 계통에서는 모두 분리가 일어났다. 병징이 나타나지 않은 계통인 M4-29-2, M4-32-1은 각각 30 개체 중 5개체, 13개체가 병징이 나오지 않았으며, 분리비는 각각 1 : 5와 7 : 9(R : S)로 분리 되었다(표6-15, 그림6-24).

at 21 dpi



■ M4-29-2 ■ M4-32-1

그림6-23. M4 screening 결과 중 저항성이 분리되는 계통의 사진. 붉은색 숫자는 M4-29-2번 계통 중 병징이 보이지 않는 개체의 사진을 나타내며, 노란색 숫자로 표시된 부분은 M4-32-1번 계통에서 병징이 보이지 않는 식물체를 표시하였다. 이 사진에서 보이는 식물체의 시기는 접종 후 21일 후의 모습을 찍은 것이며, 병징이 보이지 않는 개체에 한해 접종엽과 상업에 ELISA sampling 시행함.

표6-15. M4 계통 screening 결과

Mutant lines and controls	Number of plants			Ratio (R : S)
	Total	Resistant (R)	Susceptible (S)	
M4-29-2	30	5	25	1 : 5
M4-32-1	30	13	17	7 : 9
Yuwol-cho	15	0	15	0 : 1
Jejujaerae	15	0	15	0 : 1
LAM32	10	10	0	1 : 0



그림6-24. M4 screening 결과에서 병징이 보이지 않는 계통 M4-29-2번 계통의 개체들과 M4-32-1번 계통에 해당하는 개체들의 단독 사진의 모습이다. 우측 하단에 보이는 식물체는 같은 시기에 촬영된 CMV-P1의 병징이 보이는 유월초의 모습임.

- 선발 개체를 대상으로 ELISA를 수행한 결과 접종엽에서는 CMV coat protein이 positive control과 비슷한 수준으로 검출되었고, 접종상엽에서는 negative control과 유사한 수준으로 낮게 검출되어 저항성으로 판단하였다(그림6-25).

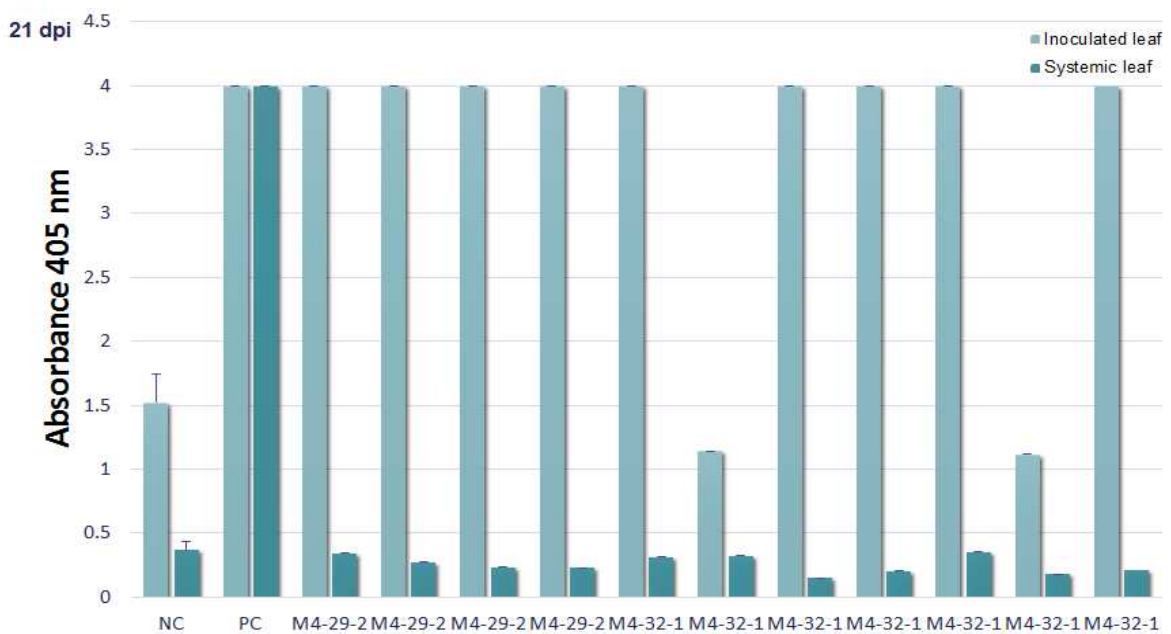


그림6-25. 병징이 보이지 않은 계통 M4-29-2번과 M4-32-1번에 해당하는 개체들 중 일부인 4개체와 7개체에 대한 ELISA 결과를 나타낸 그래프이다. 좌측에 보이는 NC는 negative control로 저항성 계통인 LAM32가 사용 되었고 3개체에 대한 평균값을 그래프로 나타내었다. 상업에서 아주 낮은 수준의 바이러스 coat protein이 검출된 것을 확인할 수 있다. 반대로 PC는 positive control로 유월초 3개체에 대한 접종엽과 상엽의 바이러스 coat protein의 값을 나타낸 그래프로써 접종엽과 상엽 모두 높은 수준의 바이러스 coat protein이 검출 된 것을 확인할 수 있다. 이를 토대로 M4-29-2번 계통과 M4-32-1번 계통에서 병징이 보이지 않은 개체들의 ELISA 결과를 비교하면 접종엽에서는 높은 수준의 coat protein이 검출되었지만 PC 와달리 상엽에서는 NC와 비슷한 수준의 coat protein이 검출된 것으로 보아 바이러스의 이동이 차단되어 병이 확산되지 않는 양상을 보여줌.

(2) eEF1B TILLING 돌연변이 집단에서 식물 RNA 바이러스 기주인자로서의 eEF1B 역할 구명

- eEF1B는 TMV 바이러스에 대해서 중요한 기주인자라는 것이 선행 연구를 통해 알려졌으며, 후속 실험을 통해서 eEF1B가 광범위한 바이러스의 기주인자로서 작용한다는 것을 확인하였다(그림6-26). TILLING은 식물 M0 집단에 돌연변이원을 처리하고, 이 중 특정 유전자 내 돌연변이를 high-throughput으로 확인하는 방법이며, 돌연변이 집단을 screening하는데 다양한 작물에서 많이 사용되고 있다. 예를 들면 현재 모델 식물인 애기장대와 작물로는 벼, 토마토 등에 대해 TILLING 프로젝트가 수행된 바가 있다. 이러한 선행 연구를 바탕으로 유월초에 돌연변이를 유도시킨 돌연변이 집단에서 eEF1B에 대한 TILLING 돌연변이 집단을 구축하고, 이를 이용해 RNA 바이러스 기주인자로서의 eEF1B 역할을 구명하고자 하였다.

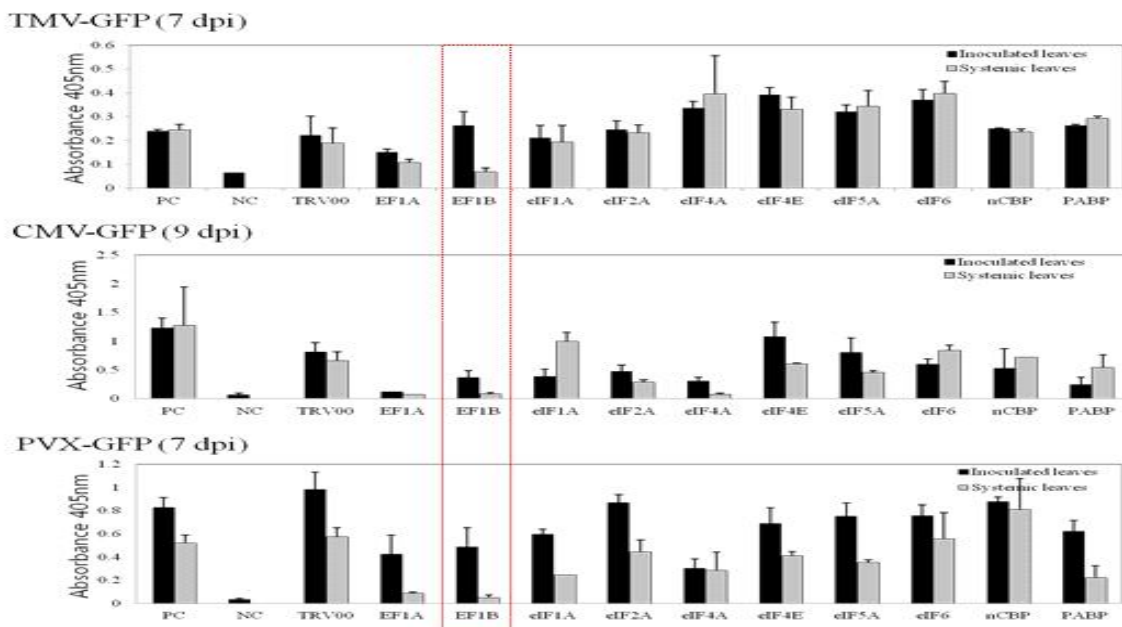


그림6-26. DAS-ELISA를 통해 eEF1B가 다양한 바이러스의 기주인자로서 작용하는 것을 알아냄.

- 네덜란드 Keygene 회사에서 유월초에 EMS를 처리하여 M1 세대를 진전시킨 이후에 TILLING 방법을 이용하여 유월초 M1 집단 중 eEF1B 유전자 부분에 돌연변이가 일어난 계통을 확인하였다(표6-16). M1 세대 21 계통을 chimera가 생길 경우를 대비해 세 줄기로 나누어 선발하였고, 이 21 계통의 M1 집단에서 세대 진전을 시켜 M2 종자를 채종하였다.
- eEF1B TILLING 방법을 통해 screening된 M2 종자를 확보하고, 이 M2 집단 21 계통을 세 줄기 별로 나누어 5개체씩 총 265 개체에 파종하였으며, 파종 후 떡잎이 나오는 단계에서 PVX-GFP 바이러스를 M2 돌연변이 집단에 접종하여 특정 집단의 병 저항성을 검정하였다. eEF1B의 돌연변이로 인해 PVX의 병징이 대조군에 비해 늦게 올라온 3 개체(#0166_Y1, #0132_B2, R2)와 병징이 관찰되지 않은 2 개체(#0096_R5, #0081_Y4)를 선발하였고(그림6-27), 이를 DNA 서열분석을 통해 실제로 eEF1B 서열 내 돌연변이가 동형접합 혹은 이형접합으로 일어났는지 확인하였다.
- DNA 서열 분석을 통해 eEF1B 서열을 확인한 결과, 2 개체(#0096_R5, #0081_Y4)는 eEF1B 서열 내에서 돌연변이가 동형접합의 형태로 일어났고, 3 개체(#0166_Y1, #0132_B2, R2)는 이형접합의 형태로 일어난 것을 확인하였다. 이 5 개체의 종자를 확보하기 위해 현재 세대를 진전시키고 있다(표6-17).

표6-16. eEF1B TILLING 돌연변이 집단 중 변이된 유전자 정보

Gene	mutation type	No. of mutation	Rate (%)
<i>eEF1B</i>	Amino acid chage	34	54
	Intron	15	24
	Silent mutation	14	22
	Total	63	100

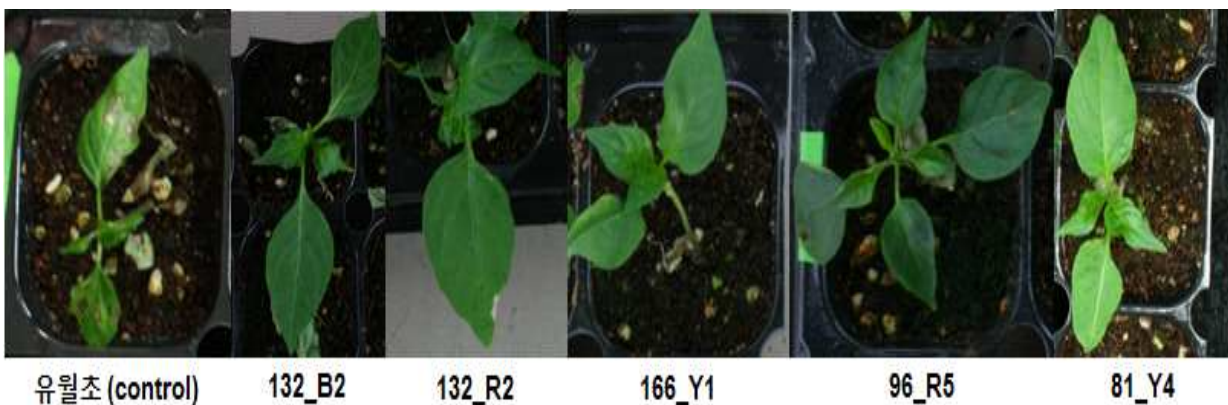


그림6-27. eEF1B TILLING 돌연변이 집단 중 병징이 대조군에 비해 늦게 올라오거나 병징이 관찰되지 않은 개체.

표6-17. eEF1B TILLING 돌연변이 집단 중 선발된 개체들의 돌연변이 정보

	mutation type	Nucleotide changes	Amino acid changes
#0132_B2	heterozygous	1B_453_G-A	1B_V89M
#0132_R2	heterozygous	1B_453_G-A	1B_V89M
#0166_Y1	heterozygous	1B_720_G-A	1B_G114D
#0081_Y4	homozygous	1B_299_G-A	1B_R66K
#0096_R5	homozygous	1B_266_C-T	1B_S55F

4. 돌연변이 집단을 활용한 Capsaicinoids 분석 연구

가. 제 4, 5차년도

(1) 고추의 매운맛의 중요성 및 돌연변이 집단의 활용

- 고추는 상업적으로 매우 중요한 작물로 유일하게 고추에서 매운맛을 생성한다. 매운맛은 알칼로이드 화합물인 캡사이시노이드의 합성으로 음식 의학, 약학 등 많은 분야에서 다양하게 쓰이고 있다. 이처럼 매운맛에 대한 중요도가 증가하고 있지만 매운맛의 경우 양적으로 조절되고 환경에 영향을 받으며, 제한된 식물재료, 마지막으로 분석방법의 한계점 때문에 연구하는데 있어 어렵다. 이러한 문제를 해결할 수 있는 방법으로 돌연변이 집단 구축을 통해서 매운맛과 관련된 유용 유전자를 지닌 식물체를 확보하고 분석방법의 한계를 극복할 수 있는 방법 개발이 필요하다. 본 2협동 과제에서는 2009년부터 현재까지 5,000개의 M2 집단을 구축하였으며, 그 중 917계통의 M2 돌연변이 집단을 대상으로 기존에 맵다고 알려진 유월초에 돌연변이가 유도되어 맵지 않게 된 고추를 선발함으로써 고추 capsaicinoid 생합성 과정에 연관된 유전자에 돌연변이가 생긴 개체를 선발해 매운맛 조절과 관련한 연구를 하고자 하였다.

(2) 매운맛 간이 분석 방법의 개발 및 screening 방법 확립

- 매운맛의 원인 물질인 캡사이시노이드의 함량을 측정하기 위한 방법으로 HPLC 분석방법이 가장 믿을 수 있고 정확한 데이터를 확보할 수 있기에 현재까지 많이 사용되어 왔다. 하지만 HPLC방법의 경우 전 처리를 하는데 있어 많은 시간과 비용 그리고 노동력이 든다는 단점을 갖고 있으며 돌연변이 집단과 같이 큰 집단을 다루기에는 어렵다. 따라서 시간, 비용 그리고 노동력을 줄일 수 있으면서 큰 집단에서도 활용 가능한 매운맛 분석 방법이 필요하다. 따라서 본 2 협동 과제에서는 고추 태좌 추출물과 생과의 태좌를 실험재료로 Gibb's reagent 이용한 매운맛 간이분석 방법을 개발해 특허 출원하였다. 유전자원 중 매운 품종과 맵지 않은 품종을 대상으로 실험을 한 결과 정성적 그리고 정량적으로 비교적 정확한 데이터를 얻을 수 있었으며, 뿐만 아니라 HPLC 결과와도 크게 다르지 않았다. 따라서 1차적으로 Gibb's reagent를 이용한 매운맛 간이분석을 통해 돌연변이 집단을 대량으로 screening하고 이를 통해 선발된 계통들을 2차적으로 HPLC로 정확한 정량값을 측정한다면 매우 효율적으로 돌연변이 집단을 screening을 할 수 있을 것이다.
- 본 연구에서는 돌연변이 집단 구축을 통해 표현형 검정과 동시에 1차적으로 Gibb's

reagent를 이용해 간이적으로 매운맛 대량 스크리닝을 수행하였으며, 그 결과 총 917개의 M2 돌연변이 계통에서 18개의 M2 돌연변이 계통을 선발 하였다.

- 2차적으로 Gibb's reagent를 통해 선발한 18개의 M2 돌연변이 계통을 대상으로 좀 더 정확한 데이터 확보를 위해 HPLC를 수행하여 6개의 맵지 았거나 캡사이시노이드 함량이 컨트롤에 비해 적은 M2 돌연변이 계통을 확보할 수 있었다. 좀 더 정확한 값을 확인하기 위해 6개의 선발된 돌연변이 계통을 M3로 세대를 진전시켰고, 다시 Gibb's reagent와 HPLC 분석을 통해 1개의 계통 내에서 총 4개의 저 신미 개체를 선발할 수 있었으며, 이를 그래프로 확인한 결과 컨트롤인 유월초에 비해 300배정도 낮은 캡사이시노이드 함량을 확인할 수 있었다(그림6-28, 표6-16, 그림6-29). 이러한 결과를 통해 Gibb's reagent를 1차적으로 사용해 대량 스크리닝을 하게 된다면 기존에 HPLC로 분석할 때 보다 가격, 시간적인 측면에서 매우 효과적인 방법임을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라 이렇게 확보한 식물재료는 매운맛을 결정하는 유전자 기능분석에 쓰일 수 있을 것이다.

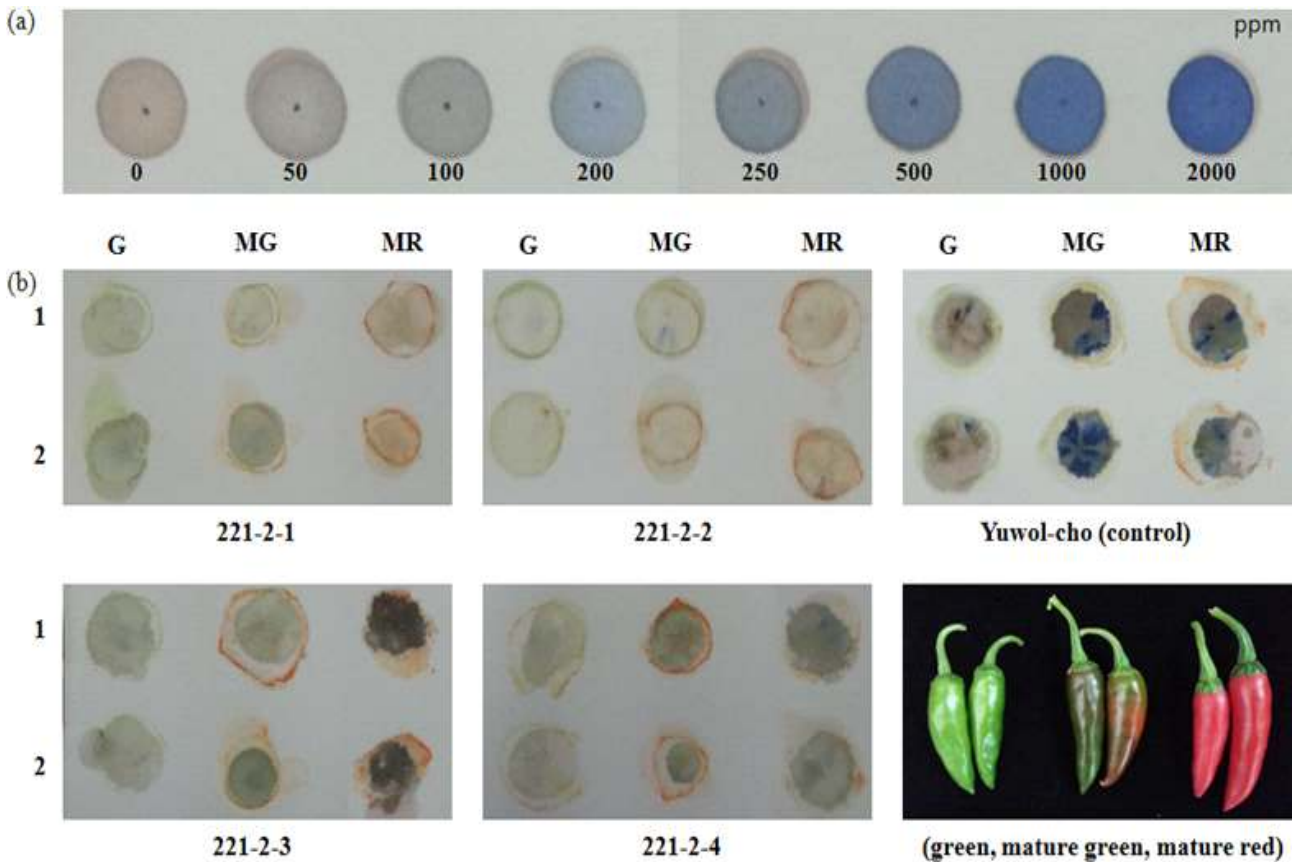


그림6-28. 맵지 았은 계통으로 선발된 M3 개체의 Gibb's reagent 실험 결과. (a) 캡사이신 표준 물질의 농도에 따른 Gibb's reagent 발색반응, (b) 정상 유월초와 맵지 았은 계통으로 선발된 221-2번의 Gibb's reagent 발색반응 비교한 결과 G: green, MG: mature green and MR: mature red, 왼쪽 숫자는 반복수를 나타냄.

표6-16. HPLC를 이용한 M2-221의 M3 개체들의 캡사이시노이드 함량 조사.

Name	Fruit stage	Gibb' s reagent reaction	Capsaicinoids contents by HPLC analysis (µg/gDW)		
			Total	CAP	DICAP
M3-221-2-1	Green	NP	172 ± 130	80 ± 56	92 ± 74
	Mature green		103 ± 2	52 ± 8	51 ± 6
	Mature red		189 ± 26	94 ± 10	95 ± 16
M3-221-2-2	Green	NP	159 ± 20	77 ± 5	82 ± 15
	Mature green		102 ± 37	51 ± 18	51 ± 18
	Mature red		95 ± 13	47 ± 2	48 ± 11
M3-221-2-3	Green	NP	56 ± 22	25 ± 6	31 ± 16
	Mature green		135 ± 98	77 ± 57	58 ± 41
	Mature red		170 ± 10	92 ± 0	78 ± 10
M3-221-2-4	Green	NP	132 ± 22	72 ± 21	60 ± 1
	Mature green		84 ± 30	41 ± 12	43 ± 18
	Mature red		478	281	197
Yuwol-cho	Green	P	27,995 ± 1,008	11,759 ± 1,118	16,236 ± 110
	Mature green		35,864 ± 2,969	15,285 ± 53	20,579 ± 2,916
	Mature red		26,709 ± 154	11,829 ± 791	14,880 ± 637
Dempsey	Mature green	NP	89	36	53

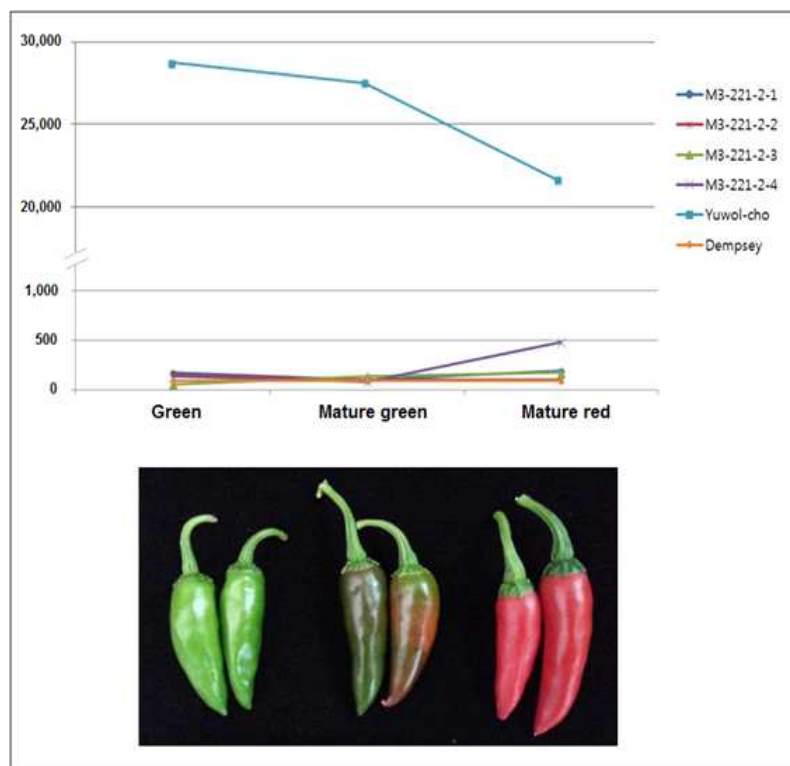


그림6-29. 캡사이시노이드 함량에 대한 선발계통과 컨트롤 간의 스테이지별 비교 결과

제7절 제3협동 돌연변이 육종기술을 이용한 밀 신품종 개발 (고려대 서용원)

1. 방사선 유용 돌연변이 계통 전개 및 특성 검정을 통한 우수계통 선발

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

(1) 1차년도 (2008-2009)

- (가) 금강밀과 올그루밀에 선량 (100 Gy, 200 Gy, 300 Gy)별로 처리된 방사선 돌연변이 M_{3.4} 계통을 head row로 파종 (금강 396 계통, 올그루 408 계통) 하여 계통증식을 하였으며, 국립식량과학원 벼 맥류부 포장 (익산)에서 일부 계통 (금강 91 계통, 올그루 50계통)을 증식함에 따라 지역 적응평가 실시
- (나) 농업 제 특성 (초장, 수장, 출수기, 흰가루병, 녹병, 종자색, 립크기, 종자모양) 조사를 통한 우수돌연변이 선발

(2) 2차년도 (2009-2010년)

- (가) 농업 형질평가 우수돌연변이계통 선발, 증식 (39 계통) 및 돌연변이 식물체의 환경재해저항성 평가하였으며, 출수기, 간장, 수장, 성숙기 등 제 농업특성 검정 실시
- (나) 1차년도 선발된 우수돌연변이 계통(M_{4.5}) 중 15 계통에 대한 생산력 검정시험을 국립식량과학원 전작과(수원) 및 국립식량과학원 벼맥류부 (익산)에서 실시

(3) 3차년도 (2010-2011년)

- (가) 2차년도에 선발된 28개 계통 및 추가로 선발된 4개 계통, 총 32 계통을 고려대학교 덕소농장에 파종하였고, 간장, 수장, 출수기 등의 제 농업 특성 검정 실시
- (나) 우수 방사선 돌연변이 계통을 국립식량과학원이 위치하고 있는 수원 (32계통)과 익산 (28계통) 포장에서 생산력 검정시험 실시

(4) 4차년도 (2011-2012년)

- (가) 우수 돌연변이 계통 포장 평가 및 생산력 검정시험(고려대학교 실험포장, 덕소)
- (나) 우수 돌연변이 계통 포장 평가 및 생산력 검정시험(첨단방사선연구소 실험포장, 정읍)

(5) 5차년도 (2012-2013년)

- (가) 우수 돌연변이 계통 포장 평가 및 생산력 검정시험 (고려대학교 실험포장, 덕소)
- (나) 우수 돌연변이 계통 포장 평가 및 생산력 검정시험 (첨단방사선연구소 실험포장, 정읍)

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) 1차년도 (2008-2009)

- (가) 금강밀과 올그루밀에 선량 (100 Gy, 200 Gy, 300 Gy)별로 처리된 방사선 돌연변이 M_{3.4} 계통을 head row로 파종 (금강 396 계통, 올그루 408 계통) 하여 계통증식을 하였으며 국립식량과학원 벼 맥류부 포장 (익산)에서 일부 계통 (금강 91 계통, 올그루 50계통)을 증식함에 따라 지역 적응에 대한 효과를 얻을 수 있었음(그림7-1).



그림7-1. Field performance ('08-'09) of M_{3.4} lines at the Korea University Research Farm (Deockso, Geonggi-Do). Some of the mutant lines showed better growth than control varieties.

(나) 초장, 수장, 출수기, 흰가루병, 녹병에 대한 조사 실시

- ① 초장과 수장을 측정한 결과 초장은 61-70 cm에 수장은 9-10 cm에 가장 많은 계통이 속해 있었음. 대조품종인 금강이 약 91-95 cm 내외인 것으로 미루어 볼 때 돌연변이 계통이 비교적 단간에 속하는 것을 알 수 있었으며, 측정한 결과로 알 수 있듯이 9cm 내외인 금강과는 수장에서 많은 차이를 보이지 않았고 49 계통은 금강보다 큰 수장을 가지고 있었음(그림7-2).

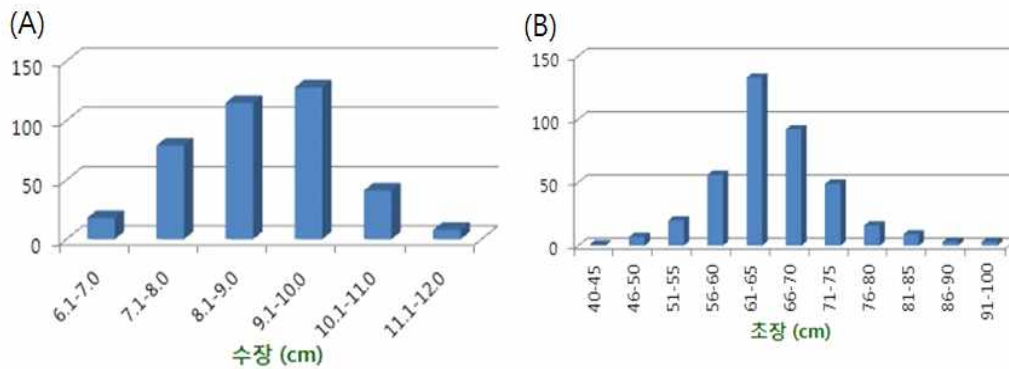


그림7-2. Distribution of (A) plant height and (B) spike length (M_{3.4} lines).

- ② 출수기는 4월 26일을 시작으로 5월 10일까지 진행 되었으며, 4월 28일에 출수한 계통이 가장 많았음. 4월 28일이 출수기인 금강에 비하여 출수기가 빠른 63 계통은 우수 돌연변이체 선발을 위한 계통으로 사용됨(그림7-3).

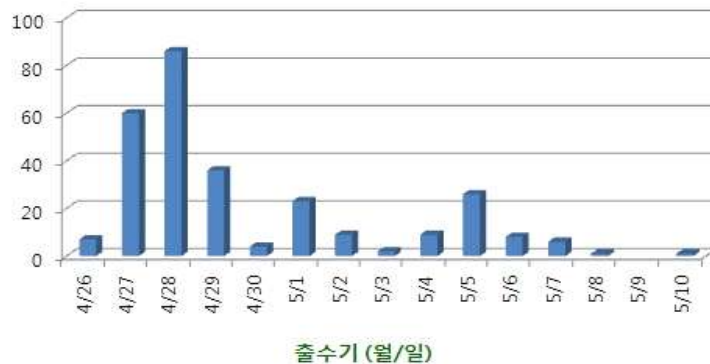


그림7-3. Distribution of flowering date (M_{3.4} lines).

③ 115 계통은 흰가루병에 저항성을 보였고 녹병에 저항성을 가진 계통은 273 계통이었음. 특히 녹병에 저항성을 가진 계통이 많았음. 흰가루병과 녹병 모두에 저항성을 가진 계통은 우수돌연변이 계통 선발에 이용됨(Fig. 4).

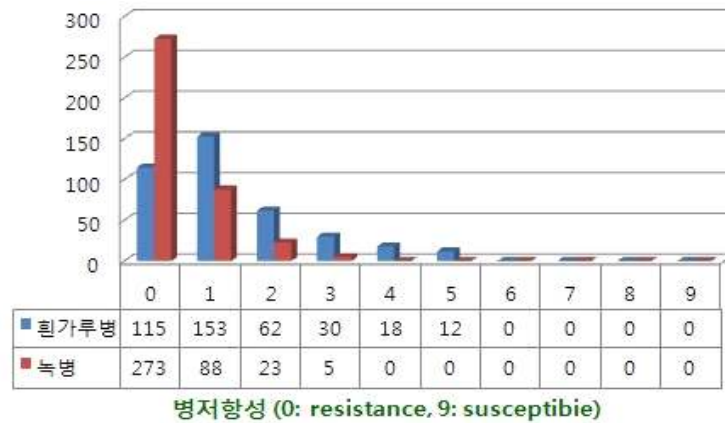


그림7-4. Distribution of disease resistance (M_{3-4} lines).

(다) 종자색, 립크기, 종자모양 조사

① 종피색은 백색(1)에서 적색(5) 수준으로 조사하였고 백색과 적색 사이 3에서 가장 많은 계통이 분포 되었음. 종자크기는 대부분 3과 4사이에 위치하고 있었고 종자모양은 2-4 사이에 고른 분포를 보임(그림7-5).

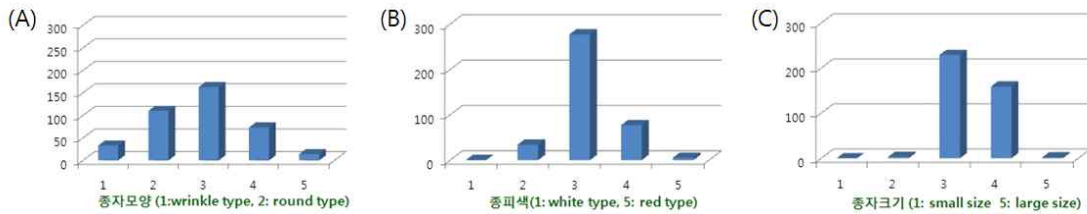


그림7-5. Distribution of (A) disease resistance, (B) seed color, (C) kernel shape and (D) kernel size (M_{3-4} lines).

(2) 2차년도 (2009-2010)

(가) 농업 형질평가 우수돌연변이계통 선발, 증식 (39계통) 및 돌연변이 식물체의 환경재해 저항성 평가

① 1차년도에 선발된 우수돌연변이 39계통에 대하여 출수기, 간장, 수장, 성숙기 등 제 농업특성 검정 실시 (고려대학교 덕소농장)(그림7-6)

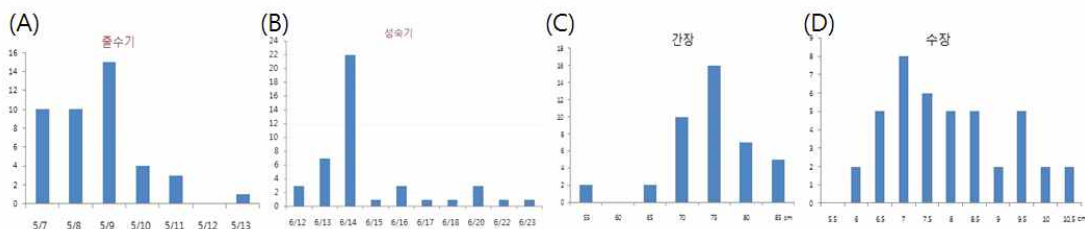


그림7-6. Distribution of (A) flowering date, (B) maturity date, (C) plant height and (D) spike length (M_{4-5} lines) in Deokso.

- ② 출수기는 대부분 5월 7-9일의 분포를 띠고 있어 대비품종인 금강(5월 8일)과 출수시기가 비슷하였고, 성숙기 또한 6월 13-14일에 가장 많은 분포를 차지하고 있음.
- ③ 간장은 65-75 cm 사이에 가장 많은 부분을 차지하며 80 cm 내외인 금강에 비하여 비교적 단간에 속하며 수장은 15 계통이 8-10 cm 내외로 대비품종과 비교했을 때 상대적으로 큰 값을 나타냄.
- ④ 특히 M785 (10.1 cm), M1231 (9.3 cm)은 대비품종 (8 cm)에 비하여 월등히 크게 나타났으며 위의 두 계통은 수량에서도 좋은 결과를 보임. M735와 M785는 출수기, 성숙기 등 농업형질이 우수한 것으로 판단되며, M1231은 출수기와 성숙기가 다소 늦으나 단간으로서 도복에 유리하고 높은 수량을 보임.
- ⑤ M885, M1133은 수량에서 월등히 뛰어난 결과를 보임(그림7-7, 표7-1).

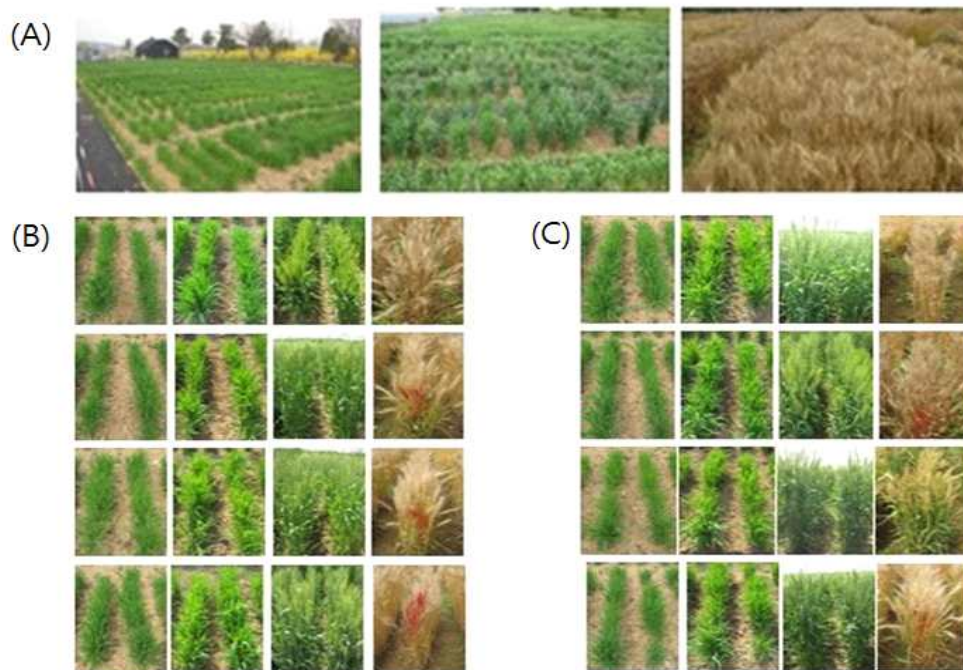


그림7-7. Field performance ('09-'10) of M_{4.5} lines at the Korea University Research Farm (Deockso, Geonggi-Do). (A) Growth at different stages. (B) & (C) Growth performance of selected mutant lines.

표7-1. Agronomic traits of selected M_{4.5} lines ('08-'09 Deockso, Korea Univ. farm)

Entry	Source	Plant height (cm)	Spike length (cm)	Flowering date (date/month)	Seed maturity (date/month)	Yield ^{a)}	leaf color ^{b)}	seed length (mm)	seed width (mm)	seed thick (mm)
M697	OiGeuruM ₄ 200G-36	75	7.5	8/5	12/6	463	1	6.67	3.52	2.99
M699	OiGeuruM ₄ 200G-38	62	9.2	7/5	14/6	352	2	6.51	3.46	3.00
M707	OiGeuruM ₄ 200G-45	69	8.9	7/5	14/6	399	2	6.48	3.41	2.97
M735	OiGeuruM ₄ 200G-72	63	9.8	7/5	14/6	483	2	6.48	3.46	3
M747	OiGeuruM ₄ 200G-83	72	9.5	8/5	12/6	470	2	6.56	3.45	2.97
M755	OiGeuruM ₄ 200G-91	66	9.7	7/5	15/6	505	2	6.76	3.47	2.98
M783	OiGeuruM ₄ 200G-117	69	10.1	7/5	14/6	474	2	6.52	3.43	2.97
M784	OiGeuruM ₄ 200G-118	69	7.6	7/5	14/6	352	2	6.47	3.44	3.07
M785	OiGeuruM ₄ 200G-119	72	10.1	7/5	14/6	620	2	6.65	3.52	3.04
M795	OiGeuruM ₄ 200G-126	71	9.2	8/5	12/6	459	2	6.64	3.43	3.01
M848	OiGeuruM ₄ 200G-154	70	8.2	8/5	13/6	377	2	6.7	3.49	3.07

M852	OiGeuruM ₄ 200G-157	71	6.8	8/5	14/6	518	2	6.57	3.45	3
M885	OiGeuruM ₄ 200G-177	72	8.3	11/5	20/6	804	2	6.54	3.41	2.96
M890	OiGeuruM ₄ 200G-180	72	9.1	10/5	14/6	529	2	6.73	3.46	3.07
M891	OiGeuruM ₄ 200G-181	71	7.5	8/5	13/6	521	2	6.52	3.48	3.07
M892	OiGeuruM ₄ 200G-181	70	7.6	8/5	13/6	438	2	6.69	3.52	2.99
M893	OiGeuruM ₄ 200G-182	70	8.4	8/5	14/6	385	2	6.52	3.4	3
M895	OiGeuruM ₄ 200G-177	73	7.3	9/5	16/6	243	2	6.67	3.46	3.06
M896	OiGeuruM ₄ 200G-184	71	8.3	9/5	13/6	517	2	6.43	3.44	2.97
M985	KeumkangM ₄ 300G-80	75	7.5	8/5	13/6	437	3	6.84	3.7	3.14
M990	KeumkangM ₄ 300G-85	74	8	10/5	14/6	420	2	6.53	3.43	2.94
M1030	KeumkangM ₄ 300G-123	75	6.8	9/5	14/6	436	3	6.69	3.52	2.95
M1034	KeumkangM ₄ 300G-136	70	5.7	7/5	13/6	315	2	6.6	3.46	2.98
M1044	KeumkangM ₄ 300G-136	75	6.1	9/5	16/6	279	2	6.56	3.63	3.06
M1092	Keumkang M ₄ 200G-20	73	7.2	9/5	17/6	304	3	6.49	3.47	2.96
M1133	KeumkangM ₄ 200G-59	77	8.7	11/5	20/6	641	1	6.9	3.44	2.72
M1156	KeumkangM ₄ 200G-81	85	6.9	9/5	20/6	495	1	6.26	3.18	2.78
M1221	KeumkangM ₄ 200G-142	80	6.9	9/5	14/6	452	2	6.69	3.59	3.05
M1231	KeumkangM ₄ 200G-152	51	9.3	13/5	22/6	486	2	6.28	3.3	2.8
M1246	KeumkangM ₄ 200G-166	80	6.8	8/5	14/6	444	2	6.76	3.52	2.94
M1273	KeumkangM ₄ 200G-191	81	6.8	9/5	14/6	376	2	6.8	3.53	2.96
M1284	KeumkangM ₄ 200G-201	79	6	10/5	14/6	439	1	6.62	3.31	2.79
M1445	KeumkangM ₄ 100G-3	70	6.2	9/5	14/6	499	2	6.67	3.57	3.04
M1446	KeumkangM ₄ 100G-3	80	7	9/5	14/6	538	2	6.64	3.61	3.06
M1448	KeumkangM ₄ 100G-5	76	7.6	9/5	18/6	-	2	-	-	-
M1449	KeumkangM ₄ 100G-5	78	6.3	10/5	13/6	305	2	6.43	3.3	2.89
M1462	KeumkangM ₄ 100G-15	79	6.7	9/5	14/6	430	2	6.73	3.39	2.89
M1465	KeumkangM ₄ 100G-17	81	6.3	9/5	14/6	472	3	6.64	3.48	2.96
M1475	KeumkangM ₄ 100G-26	83	7.3	9/5	14/6	437	3	6.72	3.48	3.02

²⁾harvested from two rows (row length : 1.5 m, row space : 45 cm),

^{y)}1-light green, 2-green, 3-dark green.

- (나) 우수 방사선 돌연변이 계통(M_{4.5}) 생산력 검정시험 (국립식량과학원 전작과 포장, 수원)
- ① 전년도 선발된 우수돌연변이 계통(M_{4.5}) 중 15 계통에 대한 생산력 검정시험을 수원에 위치하고 있는 국립식량과학원 전작과 포장에서 실시함.
 - ② 고려대학교 덕소포장 보다 출수기가 2-3일 가량 늦은 5월 9-11일이며 수장은 10계통이 대비품중에 비해 크게 나타남.
 - ③ M697과 M1092는 대비품중 및 다른 우수돌연변이 계통에 비하여 수량이 높았으며 출수기 또한 빠른 편이었음(그림7-8, 표7-2).

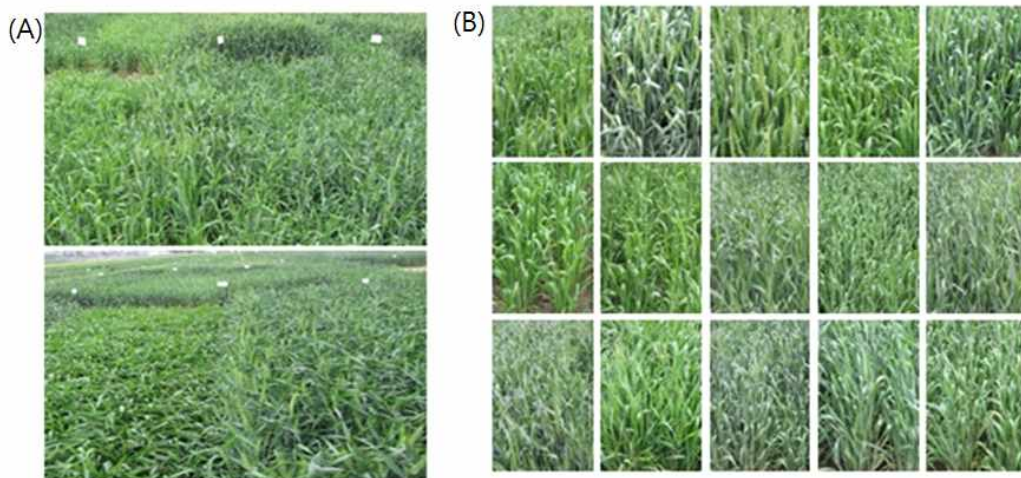


그림7-8. Field performance ('09-'10) of M_{4.5} lines at the RDA Research

Farm (Suwon, Geonggi-Do). (A) Field view at beginning of heading. (B) Selected mutant lines.

표7-2. Agronomic field data of selected M₄₋₅ lines ('09-'10 Suwon, Field)

Entry	Source	Flowering date(date/month)	Plant height(cm)	Spike length(cm)	Grain weight (kg/10a)	thousand grain weight(g)	Grain weight of liter(g)
M697	OIGeuruM4 200G-36	9/5	85	10.5	575	42.5	777.7
M747	OIGeuruM4 200G-83	10/5	82	8.7	537	39.8	769.9
M795	OIGeuruM4 200G-126	9/5	89	10.2	521	40.7	769.3
M888	OIGeuruM4 200G-179	11/5	59	9.2	308	38.6	768.2
M891	OIGeuruM4 200G-181	9/5	88	10.6	391	41.7	787.6
M892	OIGeuruM4 200G-181	12/5	58	9.4	166	35.4	783.6
M895	OIGeuruM4 200G-183	10/5	59	8.7	292	39.6	782.7
M985	KeumkangM4 300G-80	10/5	81	9	298	43.8	787.3
M1034	KeumkangM4 300G-127	14/5	81	7.2	480	36.6	777.9
M1044	KeumkangM4 300G-136	11/5	80	7.8	524	40.4	771.8
M1092	KeumkangM4 200G-20	9/5	82	8.9	575	39.4	784.1
M1231	KeumkangM4 200G-152	14/5	45	8.2	467	30.5	780.1
M1445	KeumkangM4 100G-3	11/5	79	6.9	215	38.9	781.2
M1446	KeumkangM4 100G-3	14/5	65	6.7	209	37.0	784.0
M1448	KeumkangM4 100G-5	13/5	72	7.9	214	36.9	791.8

(다) 우수 방사선 돌연변이 계통(M₄₋₅) 생산력 검정시험 (국립식량과학원 벼맥류부 포장, 익산, 김제)

- ① 우수 방사선 돌연변이 계통(M₄₋₅) 30계통은 국립식량과학원 벼맥류부 포장(익산, 김제)에서 생산력 검정 실시함.
- ② 출수기는 지역적 영향으로 인해 덕소 및 수원에 비해 전반적으로 앞당겨졌으며 (5월 2-4일), 성숙기는 6월 13일로 동일하게 조사되었음(그림7-9).

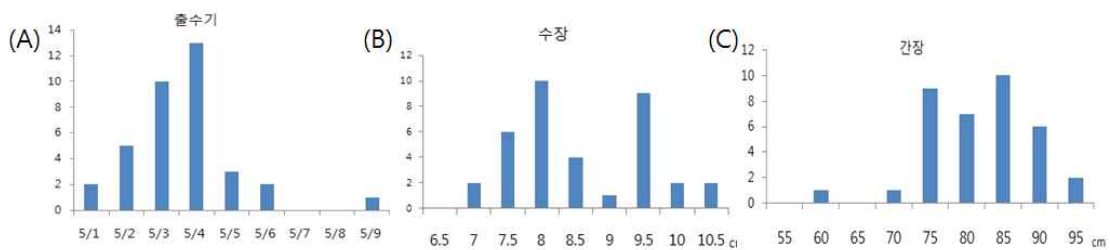


그림7-9. Distribution of (A) flowering date, (B) plant height and (C) spike length (M₄₋₅ lines) in Iksan.

- ③ M699는 출수기가 빠르게 관찰되었고, M1133과 M1156은 Scab(붉은곰팡이병)과 virus 병에 대하여 대비품종보다 저항성을 보였음.
- ④ M1231은 간장, 수장, 수량 등의 농업형질 조사결과가 30 계통 중 유일하게 지역의 영향을 받지 않았고 단간으로 도복에 유리하며 높은 수량성을 가짐.
- ⑤ 생산력 검정시험 결과가 우수한 계통에 대해서는 차년도 생산력 시험을 할 예정임 (28 계통)(그림7-10, 표7-3).



그림7-10. Field performance ('09-'10) of M_{4.5} lines that showed earliness at the RDA Research Farm (Iksan, Jeollabuk-do).

표7-3. Agronomic traits of selected M_{4.5} lines ('09-'10 Iksan, Field)

Entry	Source	Plant height	Spike length	number of tiller	Flowering date (date/month)	Seed maturity	lodging	scab	PM	vir	Grain number per one spike	Yield (Kg/10a)	Grain weight of liter	thousand grain weight
Geungangmil	Control	80	8.0	951	2/5	8/6	0	중약	중강	중	28.4	321	774	48.0
M697	OiGeuruM4 200G-36	78	9.3	1067	2/5	13/6	0	중	중	중	33.6	405	778	43.5
M699	OiGeuruM4 200G-38	71	9.6	911	1/5	13/6	0	중약	중	중	34.0	348	757	42.6
M707	OiGeuruM4 200G-45	74	9.4	844	2/5	13/6	0	중약	중	약	31.8	394	777	41.8
M735	OiGeuruM4200G-72	69	9.0	889	2/5	13/6	0	중약	중	약	32.2	325	761	42.0
M755	OiGeuruM4 200G-91	78	9.4	850	2/5	13/6	0	중약	중	중	39.0	326	780	43.1
M783	OiGeuruM4 200G-117	78	9.8	756	2/5	13/6	0	중약	중	중	42.0	390	773	42.6
M784	OiGeuruM4 200G-118	74	9.1	783	3/5	13/6	0	중약	중	중	27.6	332	777	42.0
M785	OiGeuruM4 200G-119	71	9.4	678	4/5	13/6	0	중약	중	약	34.2	275	769	40.6
M848	OiGeuruM4 200G-154	72	9.4	589	3/5	13/6	0	중약	중	약	33.4	275	773	41.9
M852	OiGeuruM4200G-157	71	10.1	767	3/5	13/6	0	중약	중	약	29.4	299	775	41.5
M885	OiGeuruM4 200G-177	70	7.9	600	6/5	13/6	0	중약	중	중	41.2	358	781	40.2
M890	OiGeuruM4 200G-180	76	9.1	722	4/5	13/6	0	중	중약	약	30.6	300	770	44.3
M893	OiGeuruM4 200G-182	72	9.2	767	4/5	13/6	0	중	중약	중	31.8	331	773	42.6
M896	OiGeuruM4 200G-177	75	9.1	950	4/5	13/6	0	중약	중약	중	32.6	356	773	42.9
M895	OiGeuruM4 200G-183	81	9.5	1017	3/5	13/6	0	중약	중약	중	23.8	432	785	45.7
M990	KeumkangM4 300G-85	79	7.7	928	4/5	13/6	0	중약	중	약	26.4	341	773	44.7
M1030	KeumkangM4 300G-123	86	8.1	978	4/5	13/6	0	중약	중	중	28.8	349	769	44.1
M1044	KeumkangM4 300G-136	86	7.5	928	5/5	13/6	0	중약	중	중	32.0	345	766	46.3
M1133	KeumkangM4 200G-59	84	8.0	811	5/5	13/6	0	중강	중강	중	38.2	395	768	41.0
M1156	KeumkangM4 200G-81	92	7.1	972	6/5	13/6	0	중강	중강	중	32.6	368	766	35.9
M1221	KeumkangM4 200G-142	86	7.6	756	4/5	13/6	0	중약	중	중	27.8	300	751	46.3
M1231	KeumkangM4 200G-152	55	10.2	1217	9/5	13/6	0	중	중약	중	37.2	422	767	37.9
M1246	KeumkangM4 200G-166	84	7.3	928	3/5	13/6	0	중	중	중	27.0	315	772	47.1

M1261	KeumkangM4 200G-179	81	7.8	867	4/5	13/6	0	중약	중	중 ⁶	23.8	274	774	47.7
M1273	KeumkangM4 200G-191	81	7.7	878	3/5	13/6	0	중약	중	중 ⁶	40.8	282	774	45.9
M1284	KeumkangM4 200G-201	86	7.8	983	2/5	13/6	0	중	중	중	30.0	393	768	40.4
M1449	KeumkangM4 100G-5	84	7.8	861	4/5	13/6	0	중약	중	중 ⁶	30.0	372	792	46.1
M1462	KeumkangM4 100G-15	91	7.0	961	3/5	13/6	0	중	중	중 ⁶	20.4	280	739	41.1
M1465	KeumkangM4 100G-17	85	8.3	1178	4/5	13/6	0	중약	중	중 ⁶	30.8	399	777	47.4
M1475	KeumkangM4 100G-26	82	7.5	1000	4/5	13/6	0	중약	중	중 ⁶	23.4	361	783	46.4

(3) 3차년도 (2010-2011)

(가) 우수들연변이 계통에 대한 농업형질평가

- ① 전년도 선발된 28개 계통 및 추가로 선발된 4개 계통, 총 32 계통을 고려대학교 덕소 농장에 파종하였고, 간장, 수장, 출수기 등의 제 농업 특성 검정을 실시하였음 (그림 7-11).

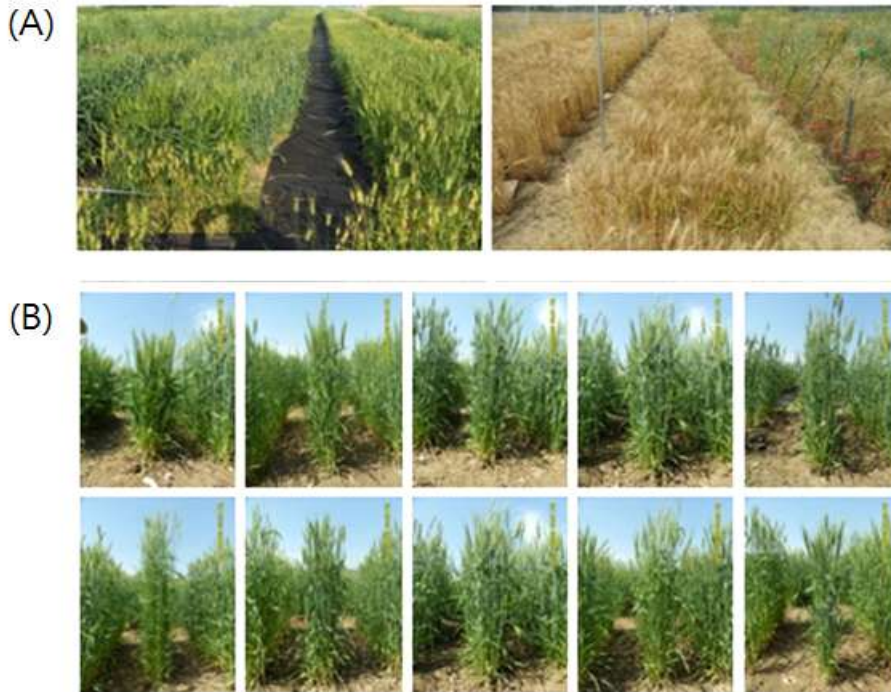


그림7-11. Field performance ('10-'11) of M_{5,6} lines at the Korea University Research Farm (Deockso, Geonggi-Do). (A) Field view at grain filling period. (B) Growth performance of selected mutant lines.

- ② 선발된 계통 대부분은 5월 4일-5일 사이에 출수기가 관측되었고, 간장은 70-90 cm였으며 수장은 8-9 cm에 가장 많은 분포를 차지하고 있음(그림7-12).
- ③ 수량은 M697, M785, M885, M1133에서 상대적으로 높게 나타났고 출수기 또한 5월 5일로 대비품종인 금강에 비해 크게 뒤지지 않음 (5월 4일). 특히, M785, M885, M1133은 전년도 수량 역시 높게 나타났음 (표7-4).
- ④ 농업형질이 우수한 계통에 대해서는 차년도 생산력 검정 시험을 실시하고 시험을 마친 후 품종출원 할 예정임.

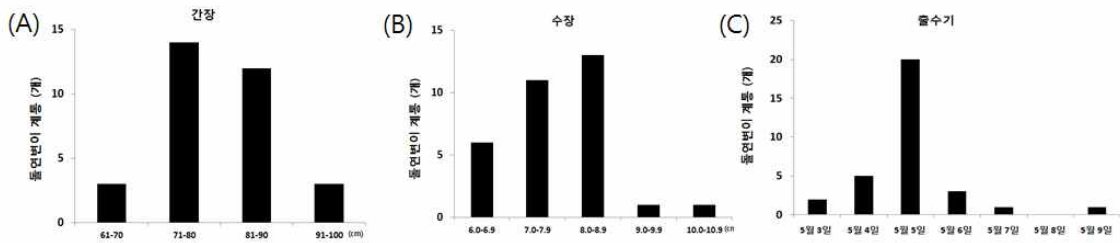


그림7-12. Distribution of (A) plant height, (B) spike length, and (C) flowering date lines in Deockso.

표7-4. Agronomic traits of selected M₅₋₆ lines ('10-'11 Deockso, Korea Univ. farm)

Entry	Source	Plant height	Spike length	Flowering date (date/month)	Yield ²⁾
MS599	OIGeuruM4 300G-45	78	7	5/5	272
M697	OIGeuruM4 00G-36	90	8	5/5	475
MS697	OIGeuruM4 200G-36	77	8	5/5	306
M699	OIGeuruM4 200G-38	80	7	4/5	267
M707	OIGeuruM4 200G-45	78	7	5/5	317
M735	OIGeuruM4200G-72	80	8	5/5	312
M755	OIGeuruM4 200G-91	79	8	7/5	302
M783	OIGeuruM4 200G-117	85	8	5/5	386
M784	OIGeuruM4 200G-118	80	7	5/5	320
M785	OIGeuruM4 200G-119	91	8	5/5	429
M848	OIGeuruM4 200G-154	80	8	6/5	317
M852	OIGeuruM4200G-157	86	7	5/5	310
M885	OIGeuruM4 200G-177	83	6	5/5	475
M890	OIGeuruM4 200G-180	78	8	5/5	277
M893	OIGeuruM4 200G-182	80	9	5/5	338
M896	OIGeuruM4 200G-177	83	8	6/5	258
M895	OIGeuruM4 200G-183	78	8	5/5	364
M990	KeumkangM4 300G-85	83	6	5/5	232
M1030	KeumkangM4 300G-123	70	7	3/5	160
M1044	KeumkangM4 300G-136	79	6	4/5	279
M1133	KeumkangM4 200G-59	87	7	5/5	484
M1156	KeumkangM4 200G-81	92	7	6/5	342
M1221	KeumkangM4 200G-142	82	7	4/5	274
M1231	KeumkangM4 200G-152	65	10	9/5	336
M1246	KeumkangM4 200G-166	83	6	5/5	224
M1273	KeumkangM4 200G-191	78	8	5/5	232
M1284	KeumkangM4 200G-201	93	7	5/5	400
M1449	KeumkangM4 100G-5	88	8	5/5	268
M1462	KeumkangM4 100G-15	90	8	3/5	410
M1465	KeumkangM4 100G-17	77	6	4/5	305
MS1468	KeumkangM4 100G-17	69	6	4/5	176
M1475	KeumkangM4 100G-26	82	7	5/5	211

²⁾harvested from two rows (row length : 1.5 m, row space : 45 cm)

(나) 우수 방사선 돌연변이 계통(M₅₋₆) 생산력 검정시험

① 우수 방사선 돌연변이 계통을 국립식량과학원이 위치하고 있는 수원 (32계통)과 익산 (28계통) 포장에서 생산력 검정시험을 실시하였음(그림7-13).

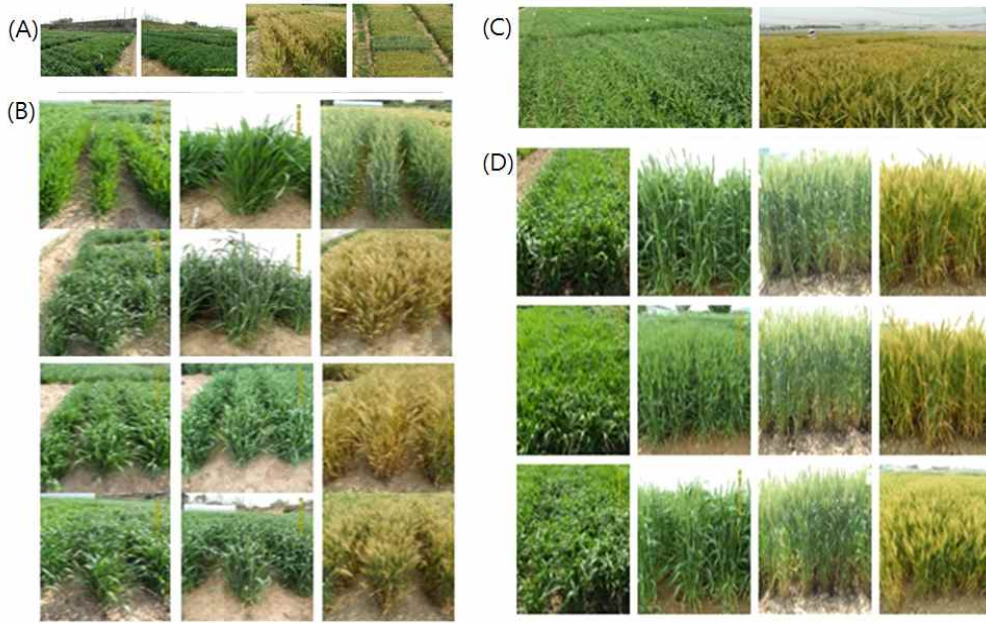


그림7-13. Field performance ('10-'11) of M₅₋₆ lines at the RDA Research Farms. (A) Field view at heading and grainfilling periods (Iksan), (B) Growth performance of selected mutant lines (Iksan), (C) Field view at heading and grainfilling periods (Suwon), (D) Growth performance of selected mutant lines (Suwon).

- ② 간장은 수원이 익산에 비해 10-12 cm 길게 나타났고 수장은 큰 차이를 보이지 않음. 출수는 지역차이에 의해 수원이 익산에 비해 2-4일 가량 늦게 확인되었음 (수원: 5월 7일-9일, 익산: 5월 5일-6일)(그림7-14).
- ③ 이번년도는 밀 성숙기에 발생한 우기로 인하여 병이 발생하였음. 흰가루병, 붉은 곰팡이병의 수치를 조사한 결과 수원에 비해 익산 포장에서의 병 발생비율이 높았고, 수원은 powdery mildew 발생이 관측되지 않았음. M1231 계통은 붉은 곰팡이 병 발병률이 다른 계통에 비해 상대적으로 낮았으며 계통 중 유일하게 지역의 영향을 받지 않은 것으로 나타남 (표7-5).

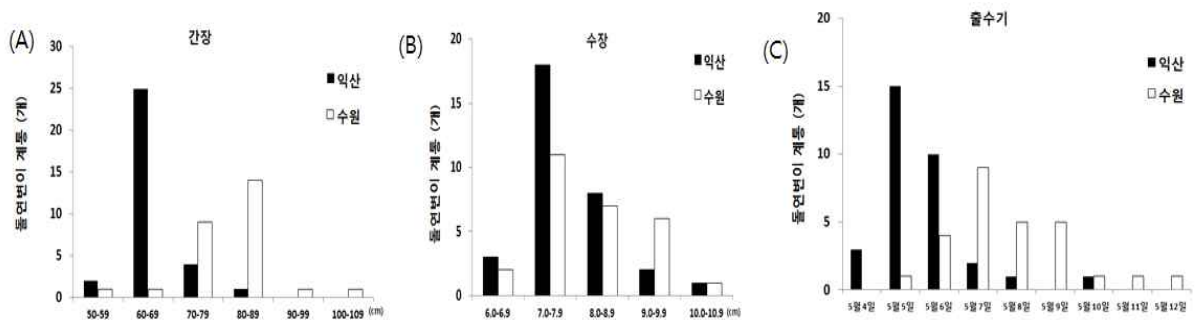


그림7-14. Distribution of (A) plant height, (B) spike length, and (C) flowering date (M₅₋₆) in Iksan and Suwon.

표7-5. Agronomic traits of selected M₅₋₆ lines ('10-'11 Iksan, Field)

Entry	Source	Plant height	Spike length	Flowering time (day/month)	Maturity (0 late - 5 early)	Powdery mildew (0-9)	Scab (%)	Yield (Kg/10 a)
MS599	OIGeuruM4 300G-45	64.5	8.1	5/5	2	8	80	480
M697	OIGeuruM4 00G-36	63.2	8.6	4/5	2	2	70	490
MS697	OIGeuruM3 200G-36	60.8	9.5	4/5	2	7	80	501
M699	OIGeuruM4 200G-38	62	7.8	5/5	2	7	40	577
M707	OIGeuruM4 200G-45	66.2	7.1	6/5	2	7	40	563
M735	OIGeuruM4200G-72	60.6	7.5	4/5	2	7	40	547
M755	OIGeuruM4 200G-91	66	8.8	5/5	2	0	60	363
M783	OIGeuruM4 200G-117	62.5	8.7	5/5	2	7	60	529
M784	OIGeuruM4 200G-118	64.1	6.6	5/5	2	7	40	475
M785	OIGeuruM4 200G-119	62.2	7.1	5/5	2	7	50	546
M848	OIGeuruM4 200G-154	63	7.6	5/5	2	5	40	517
M852	OIGeuruM4200G-157	67.3	8.3	5/5	2	7	20	463
M885	OIGeuruM4 200G-177	64.9	7.1	6/5	2	5	30	589
M890	OIGeuruM4 200G-180	66.6	9.5	6/5	2	4	40	435
M893	OIGeuruM4 200G-182	63.4	7.8	6/5	2	6	40	456
M896	OIGeuruM4 200G-177	69.8	8.9	5/5	2	2	60	522
M895	OIGeuruM4 200G-183	64.1	8.4	6/5	2	7	30	469
M990	KeumkangM4 300G-85	72.3	7.6	6/5	2	3	60	530
M1030	KeumkangM4 300G-123	59.9	7.3	5/5	2	1	70	459
M1044	KeumkangM4 300G-136	67.2	7.1	6/5	2	1	60	503
M1133	KeumkangM4 200G-59	70.3	7.9	7/5	1	3	30	554
M1156	KeumkangM4 200G-81	80.1	6.4	8/5	2	2	20	609
M1221	KeumkangM4 200G-142	69.3	7.1	6/5	2	2	70	479
M1231	KeumkangM4 200G-152	50.8	10.3	10/5	1	2	10	428
M1246	KeumkangM4 200G-166	65.5	7.1	5/5	2	0	80	455
M1273	KeumkangM4 200G-191	69	6.8	5/5	2	0	80	474
M1284	KeumkangM4 200G-201	69.2	7.5	6/5	2	3	40	586
M1449	KeumkangM4 100G-5	66	7.6	5/5	2	0	80	351
M1462	KeumkangM4 100G-15	74.7	8.1	7/5	1	3	30	404
M1465	KeumkangM4 100G-17	70.2	7.5	5/5	2	2	80	495
MS1468	KeumkangM4 100G-17	69.9	7	6/5	2	1	70	470
M1475	KeumkangM4 100G-26	68.2	7.6	5/5	2	0	80	504

- ④ 붉은 곰팡이병 감염에도 불구하고 M699, M885, M1133, M1156, M1284가 수량이 높게 나타났으며 특히 M885와 M1133은 덕소포장에서 높은 수량을 보임.
- ⑤ 두 지역에서의 생산력 검정 시험을 통해서 지역에 따라 계통의 농업형질의 변화를 볼 수 있었고 이는 지역의 자연환경 및 특색에 맞는 지역 특이적 품종을 육성이 필요할 것이라 사료됨.

(4) 4차년도 (2011-2012)

(가) 우수 돌연변이 계통 포장 평가 및 생산력 검정시험(고려대학교 실험포장, 덕소)

- ① 전년도 농업형질 평가 결과 성적이 좋은 우수돌연변이 35 계통을 고려대학교 덕소농장에 파종하였고, 월동성, 출수기, 수량, seed quality, seed color 등의 제 농업 특성 검정을 실시하였음.
- ② 서울의 겨울철 평균기온은 -1.9°C , 평균 최고기온은 2.4°C , 평균 최저기온은 -5.5°C 로 평년보다 각각 1.5°C , 1.2°C , 1.4°C 가 낮았고 겨울철 강수량은 14.6mm 로 평년보다 53.3mm (평년대비 22%)가 적어 1908년 관측 이래 최소 2위(1위 1987년 10.4mm)를 기록하였음. 또한 강수일수도 16일로 평년보다 3.7일이 적었음 (기후통계분석자료, 기상청).
- ③ 3월-4월 상순은 찬 대륙고기압의 영향으로 기온변화가 컸으며 4월 하순-5월은 고온 건조한 이동성 고기압의 영향으로 고온 및 적은 강수량을 나타냄 (기후통계분석자료, 기상청).
- ④ 중부 지방에서는 겨울철의 저온과 함께 가뭄이 지속되어 월동저항성 평가에 매우 좋은 환경이었음. 특히 대조군으로 파종 이용된 조경밀은 월동을 하지 못해 수확이 거의 불가능하였고, 조숙성인 금강밀 또한 수량성이 극히 저조하였으며 또한 봄철 적은 강수량은 drought stress를 유발시켜 예년에 비하여 밀 계통의 전체적인 수량에 악영향을 미침.



그림7-15. Field performance ('11-'12) of M_{6-7} lines at the Korea University Research Farm (Deokso, Geonggi-Do). Mutant lines response differently to the heavy pressure of drought.

- ⑤ 출수기는 5월 8-9일 사이에 가장 빈도수가 높게 나타났는데 이는 대비품종 (금강: 5월 7일, 우리: 5월 10일, 조경: 5월 9일, 조품: 5월 4일, 울그루: 5월 9일)과 비교했을 때 크게 뒤지지 않은 수치임(그림7-16).
- ⑥ HR359, HR362, HR365, HR378, HR406은 월동성이 매우 높아서 높은 수량성을 기대했으나 HR365을 제외한 나머지 계통은 비교적 낮은 수량성을 보여 수량은 월동성도

영향을 미치기는 하나 봄철 강수량에 따른 drought stress 저항성이 더 큰 요인으로 작용했음을 알 수 있었음.

- ⑦ 종자색은 비교적 다양한 분포를 가지나 dark yellow (MY), red (R) 에서의 빈도수가 가장 높게 나타났음.

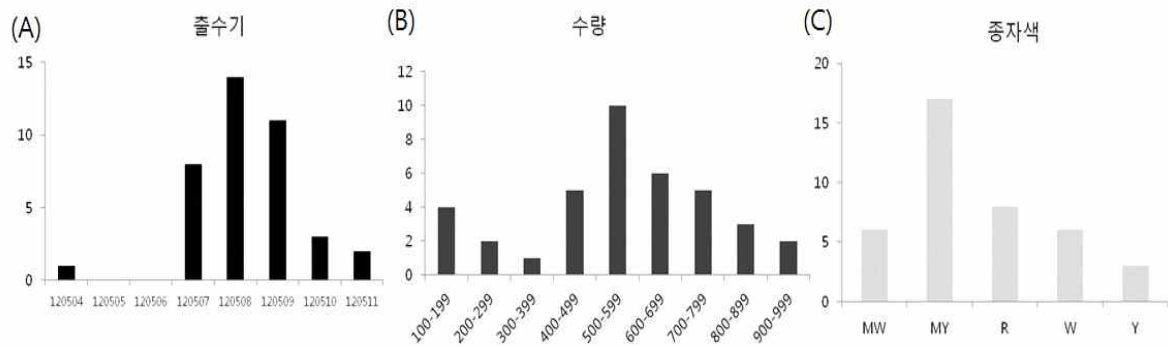


그림7-16. Distribution of (A) flowering date, (B) grain yield, and (C) seed color of M₆₋₇ mutants grown in Deockso. y-axis : number of lines.

표7-6. Agronomic traits of selected M₆₋₇ lines ('11-'12 Deockso, Korea Univ. farm)

Entry	Source	월동 (0: Res -9: Sus)	Flowering date (Y/M/D)	seed quality		seed color ²⁾	Yield ³⁾
				(0: bad - 9: good)			
1	10 DS HR 839	5	120510	8		Y	301
2	10 DS HR 389	6	-	7		MY	81
3	10 DS HR 412	8	120511	7		MY	56
4	10 DS HR 355	3	120509	7		R	527
5	10 DS HR 359	2	120511	7		MY	416
6	10 DS HR 362	2	120509	7		R	629
7	10 DS HR 365	0	120509	7		MY	961
8	10 DS HR 411	3	120509	8		Y	479
9	10 DS HR 405	3	120509	7		R	636
10	10 DS HR 406	3	120509	7		MY	560
11	10DSHR 411	4	120508	8		W	311
12	10 DS HR 379-1	3	120507	8		W	344
13	10 DS HR 372	9	120510	6		MY	8
14	10 DS HR 407	4	120508	6		MY	627
15	10 DS HR 356	5	120508	8		MY	524
16	10 DS HR 376	4	120509	7		R	503
17	10 DS HR 422	4	120508	7		W	419
18	10 DS HR 423	4	120508	8		W	469
19	10 DS HR 371	3	120509	8		R	638
20	10 DS HR 388	4	120508	8		R	637
21	10 DS HR 379	6	120508	8		W	400
22	10 DS HR 926	3	120508	7		R	833
23	10 DS HR 406	1	120508	6		R	486
24	10 DS HR 1023	5	120508	8		W	463
25	10 DS HR 378	2	120507	7		Y	772
26	10 DS HR 991	4	120507	7		MY	429
27	10 DS HR 359	4	120507	8		MY	846
28	10 DS HR 775	3	120507	7		MY	950
29	10 DS HR 361	3	120507	7		MY	757
30	10 DS HR 632	3	120507	8		MY	793
31	10 DS HR 890	6	120508	8		MW	458
32	10 DS HR 894	7	120508	7		MW	500
33	10 DS HR 382	6	120508	8		MW	567
34	10 DS HR 384	7	120508	8		MW	439
35	10 DS HR 402	8	120509	7		MW	194

²⁾White (W), Medium White (MW), Yellow (Y), Dark Yellow (MY), Red (R), Dark Red

(DR), Black (BL)

^{y)}harved from three rows (1.5 m x 3 m, row length : 3 m, row space : 50 cm)

(나) 우수 돌연변이 계통 포장 평가 및 생산력 검정시험(첨단방사선연구소 실험포장, 정읍)

- ① 고려대학교 실험포장에 파종된 우수 방사선 돌연변이 중 27 계통을 선택하여 정읍에 위치하고 있는 첨단방사선연구소 실험포장에 파종하여 생산력 검정시험을 실시하였으며 이에 따라 한 계통에 대한 지역 적응 시험 효과도 함께 볼 수 있었음(그림7-17).
- ② 정읍은 연평균 기온이 13.1℃로 서울의 연평균 기온 12.5℃ 보다 0.6℃ 높고 겨울철 강수량은 123.1mm로 서울의 67.4mm에 비해 다우지역에 속함. 이에 따라, 서울에 비해 정읍이 밀 월동성에서 유리할 것으로 생각됨.



그림7-17. Field performance ('11-'12) of M_{6.7} lines at the KAERI Research Farm (Jeongeup). (A) Field view at Heading and flowing time. (B) Growth performance of selected mutant lines.

- ㉔ 출수기는 지역차이에 의해 정읍이 덕소보다 일찍 8-10일 정도 일찍 관측되었음. 많은 계통이 4월 30일에 출수했으나 이는 대조군 (금강: 4월 28일, 우리: 4월 29일, 조경: 4월 26일, 조품: 4월 27일, 올그루: 4월 29일)에 비해 1-3일 정도 늦게 나타났음(그림 7-18).
- ㉕ HR379, HR405, HR406, HR412는 수량에서 다른 계통에 비해 높게 나타남 (표7-7). 전체적인 계통 수량은 덕소에 비해 정읍에서 비교적 높게 나타났는데 이는 겨울철 평균 온도가 높은 남부 지방에 위치한 정읍이 월동성에서 유리한 측면을 가지기 때문이라고 사료됨. 또한 정읍에서 높은 수량성을 갖는 계통이 덕소에서 높은 수량성을 나타내지 않은 경우로 보아 지역의 환경에 따라 적합한 계통이 따로 존재하며 이는 지역의 자연 환경 및 특색에 맞는 지역 특이적 품종 육성이 필요하다고 생각됨.
- ㉖ 종자색의 경우 덕소에서는 dark yellow (MY)와 red (R)에 대부분 분포가 되었으나, 정읍의 경우 red (R)과 white (W)에서 높은 분포를 이루고 있음. 같은 계통이 지역에 따라 다른 분포를 가지는 것은 종자색은 유전적인 영향 뿐 아니라 환경의 영향을 받을

것이라고 예측할 수 있음.

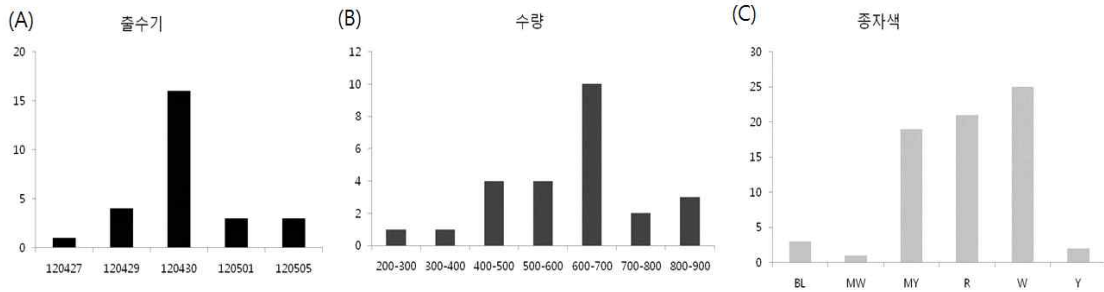


그림7-18. Distribution of (A) flowering date, (B) grain yield, and (C) seed color of M_{6-7} mutant lines grown in Jeongeup. y-axis : number of lines.

표7-7. Agronomic traits of selected M_{6-7} lines ('11-'12 Jeongeup, Field)

Entry	Source	생육상태	Flowering date (Y/M/D)	seed quotiy	seed color ²⁾	Yield ¹⁾
1	10 DS HR 839	9	120429	6	MW	552
2	10 DS HR 389	9	120502	7	R	749
3	10 DS HR 412	8	120502	7	R	827
4	10 DS HR 355	8	120430	7	R	640
5	10 DS HR 359	8	120430	7	MY	600
6	10 DS HR 362	8	120430	7	R	675
7	10 DS HR 365	8	120501	7	MY	589
8	10 DS HR 411	9	120430	7	W	603
9	10 DS HR 405	9	120430	7	MY	897
10	10 DS HR 406	9	120430	7	MY	814
11	10 DS HR 411_2	8	120430	7	W	657
12	10 DS HR 379-1	9	120430	7	W	954
13	10 DS HR 372	7	120427	8	R	680
14	10 DS HR 407	7	120430	6	R	732
15	10 DS HR 356	7	120430	7	MY	646
16	10 DS HR 376	7	120429	7	R	670
17	10 DS HR 422	7	120429	8	W	653
18	10 DS HR 423	8	120430	8	W	693
19	10 DS HR 926	8	120429	-	-	-
20	10 DS HR 406_2	7	120430	6	MY	294
21	10 DS HR 1023	7	120430	7	W	409
22	10 DS HR 378	7	120430	6	W	405
23	10 DS HR 991	7	120430	7	R	472
24	10 DS HR 361	7	120430	7	R	486
25	10 DS HR 632	7	120501	7	R	519
26	10 DS HR 890	8	120430	7	W	591
27	10 DS HR 894	8	120429	7	W	347

²⁾White (W), Medium White (MW), Yellow (Y), Dark Yellow (MY), Red (R), Dark Red (DR), Black (BL)

¹⁾harved from three rows (row length : 2 m, row space : 50 cm)

(5) 5차년도 (2012-2013년)

(가) 우수 돌연변이 계통 포장 평가 및 생산력 검정시험 (고려대학교 실험포장, 덕소)

- ① 우수돌연변이 31 계통에 대하여 출수기, 수량, 수장, 초장, 천립중 등 제 농업 특성 검정을 실시 [고려대학교 부속농장](그림7-19)



그림7-19. Field performance ('12-'13) of M₇₋₈ lines at the Korea University Research Field (Deockso, Gyeonggi-Do). (A) Field view of yield trials, (B) Selected lines showed higher number of spikes and relaxed/longer spike length than controls.

- ㉔ 중부지역의 겨울철 (밀의 월동 전에서 월동기 - 재생기) 평균 기온은 평년대비 2.5℃ 정도 낮아 월동성 평가에 유리하였으며 강수량은 전체 생육기간동안 평년대비 104%로 큰 차이가 없었음.
- ㉕ 출수기는 5월 7일부터 5월 15일까지 분포되어 있었으며 평균 5월 10일로 나타남. 5월 9일이 가장 빈도수가 높게 나타났는데 이는 대비품종인 금강 (5월 9일)과 비교했을 때 거의 비슷한 수치임. 31 계통 중 금강과 출수기가 같은 계통은 14개 (13DSPL037, 13DSPL040, 13DSPL042, 13DSPL044, 13DSPL048, 13DSPL050, 13DSPL053, 13DSPL071, 13DSPL072, 13DSPL094, 13DSPL097, 13DSPL098, 13DSPL099, 13DSPL101)였으며 그보다 빠른 5 계통 (13DSPL070, 13DSPL089, 13DSPL090, 13DSPL091, 13DSPL100)을 확인 (그림7-20, 표7-8).
- ㉖ 국내에서 가장 많이 재배되는 품종인 '금강'보다 수량이 높은 5개 계통 (13DSPL038, 13DSPL040, 13DSPL051, 13DSPL058, 13DSPL070)을 확인

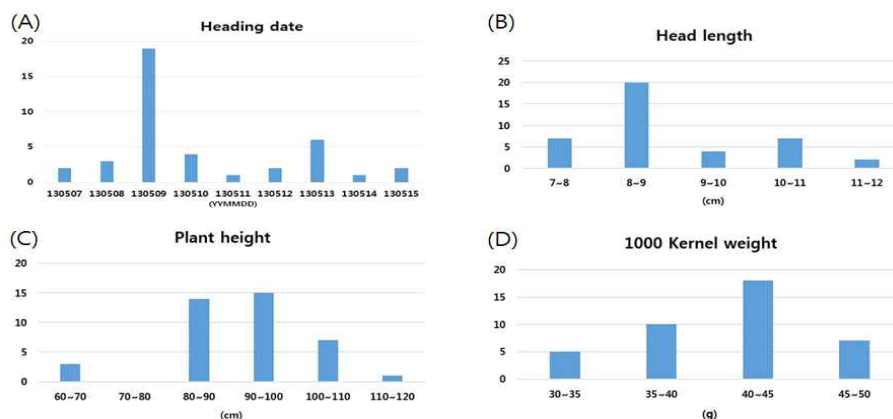


그림7-20. Distribution of (A) heading date, (B) head length, (C) plant height and (D) 1000 kernel weights of M₇₋₈ mutant lines grown in Deockso. y-axis : number of lines.

표7-8. Agronomic traits of selected M₇₋₈ lines ('12-'13 Deockso, Korea Univ. field)

Entry	Heading date (YYMMDD)	Plant height (cm)	Head length (cm)	1000 Kernel weight (g)	Seed color ²⁾	Seed quality ³⁾	Yield ⁰⁾
13DSPL010	130511	93.75	9.25	45.95	3	8	398.8
13DSPL011	130513	61.5	11	31.15	4	6	335.5
13DSPL013	130513	60	10.25	37.55	3	7	465.5
13DSPL037	130509	86.25	9	42.9	2	7	436.6
13DSPL040	130509	87.75	8.75	43	2	8	510
13DSPL042	130509	96	7	42.85	2	7	397.7
13DSPL044	130509	86.25	7.75	47.4	2	8	337.7
13DSPL045	130509	93.25	8.25	44.6	2	8	224.4
13DSPL048	130509	87.75	8	42.95	2	8	428.8
13DSPL050	130509	91.25	8	45.55	2	8	133.3
13DSPL051	130515	96	8.25	30.9	3	6	526.6
13DSPL053	130509	92.25	7.5	45.2	2	8	361.1
13DSPL054	130513	86.5	7.5	38.35	3	7	465.5
13DSPL058	130512	88.25	8	46.25	1	8	493.3
13DSPL070	130508	88.5	9	44.9	2	7	581.6
13DSPL071	130509	90.75	8.25	43.55	2	8	322.2
13DSPL072	130509	85.5	8	48	2	8	397.7
13DSPL074	130510	95.5	8.25	48.55	2	8	300
13DSPL089	130507	95	8	37.2	-	-	372.2
13DSPL090	130507	107	7	36.8	-	-	387.7
13DSPL091	130508	107.75	8.25	35.85	3	7	382.2
13DSPL092	130514	104.25	10.25	41.1	3	8	286.6
13DSPL093	130513	104.75	8.25	40.6	3	7	133.3
13DSPL094	130509	102.75	10.25	33.1	3	7	390
13DSPL095	130510	113.5	9	32.1	3	6	402.2
13DSPL096	130510	102.5	10	36.6	3	6	395.5
13DSPL097	130509	99.5	8.75	34.65	3	6	398.8
13DSPL098	130509	92.75	10.5	42.8	2	7	363.3
13DSPL099	130509	98.25	8.75	41.55	3	7	425.5
13DSPL100	130508	99.75	7.75	39.25	3	8	201.1
13DSPL101	130509	102	10	42	3	7	398.8

²⁾1: White, 5: Red

³⁾0: Poor, 9: Good

⁰⁾Kg/10a

- (나) 우수 돌연변이 계통 포장 평가 및 생산력 검정시험 (첨단방사선연구소실험포장, 정읍)
- ① 고려대학교 실험포장에 파종된 우수 방사선 돌연변이 31 계통을 정읍에 위치하고 있는 첨단방사선연구소 실험포장에도 파종하여 생산력 검정시험을 실시하였으며 이에 따라 한 계통에 대한 지역 적응 시험 효과도 함께 볼 수 있었음(그림7-21).
 - ② 정읍의 겨울철 평균기온은 평년대비 1.4℃ 정도 낮았으며 강수량은 160% 정도로, 눈이 많이 왔음을 알 수 있으며 이로 인해 초기 생육의 한해는 거의 입지 않았음.



그림7-21. Field performance ('12-'13) of M_{7.8} lines at the KAERI Research field, Jeongeup. (A) Field view at Heading and flowing time. (B) Growth performance of selected mutant lines.

- ③ 출수기는 4월 28일부터 5월 9일까지 분포되어있으며 평균 출수기는 5월 2일로 지역차이에 의해 정읍이 덕소보다 평균 8일 정도 출수기가 빠른 것이 확인되었음. 대비품종인 금강은 정읍에서 5월 1일에 출수하는 것으로 나타났으며 이는 우수 돌연변이 계통과 대비품종 간에 출수기에서 차이가 거의 없음을 나타냄(그림7-22).
- ④ 정읍에서는 8개를 제외한 대부분의 계통이 대비품종인 금강보다 수량이 높게 나타남(표7-9). 전체적인 계통 수량은 덕소에 비해 정읍에서 비교적 높게 나타났는데 이는 겨울철 평균 온도가 높은 남부 지방에 위치한 정읍이 월동성에서 유리한 측면을 가지기 때문이라고 사료됨.

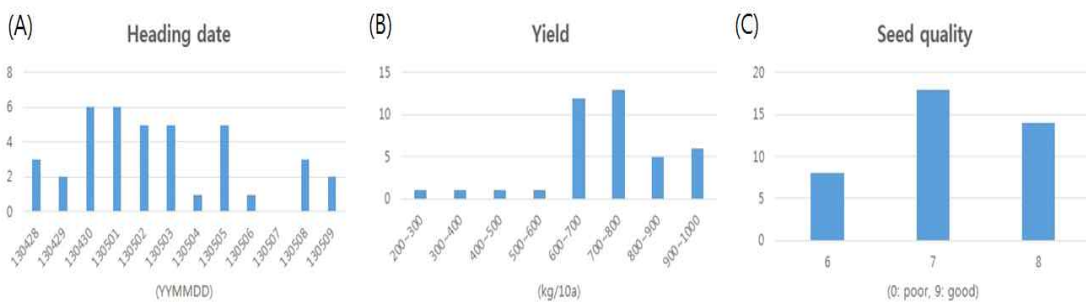


그림7-22. Distribution of (A) heading date, (B) grain yield, and (C) seed quality in Jeongeup. M_{7.8} mutant lines. y-axis : number of lines.

표7-9. Agronomic traits of selected M₇₋₈ lines ('12-'13 Jeongeup, Field)

Entry	Heading date (YYMMDD)	seed quality ²⁾	Yield ³⁾
13JP010	130508	8	691.6
13JP011	130508	6	733.1
13JP013	130506	8	753
13JP037	130429	6	309.5
13JP040	130428	7	289.9
13JP042	130503	7	679
13JP044	130503	8	638.6
13JP045	130503	8	662.5
13JP048	130502	7	685.5
13JP050	130502	8	986.4
13JP051	130505	7	951
13JP053	130501	8	601
13JP054	130503	6	913.6
13JP058	130501	8	585.5
13JP070	130430	7	726.3
13JP071	130502	7	871.6
13JP072	130501	7	780.2
13JP074	130501	8	726.1
13JP089	130428	7	720.1
13JP090	130428	8	728.1
13JP091	130430	7	820.7
13JP092	130509	8	821.1
13JP093	130509	8	912.4
13JP094	130502	7	751.4
13JP095	130505	6	900
13JP096	130505	6	656.2
13JP097	130505	7	879.5
13JP098	130430	7	865.6
13JP099	130430	7	761.8
13JP100	130430	6	658.4
13JP101	130502	6	689.5

²⁾0: Poor, 9: Good ³⁾Kg/10a

2. 우수 품종을 대상으로 방사선 조사를 통한 유용돌연변이 유도 및 세대진전

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

(1) 1차년도 (2008-2009)

(가) 우수 밀 품종인 조은, 조경 및 연구진이 보유한 전좌계통 (2BS/2RL)을 원자력연구원 정읍방사선과학연구소에서 방사선 조사

(나) M₁ seed를 이용한 돌연변이체 초기 형질평가 및 생육평가 [발아율(Germination rate), 잎길이, 뿌리길이 등]

(2) 2차년도 (2009-2010년)

(가) 1차년도에 선발된 M₂ 개체 포장평가, 선발 및 세대진전 (962계통)

(3) 3차년도 (2010-2011년)

(가) M₃ 세대 진전 및 우수 계통 선발

(나) 수선발 (head selection)을 통해 얻은 1027 계통을 고려대학교 덕소농장에 파종

(4) 4차년도 (2011-2012년)

(가) M₄ 개체에 대한 지속적 선발 및 세대진전

(나) 다양한 농업형질 지표로 약 2000 개체를 수선발하였고 덕소 농장에 파종

(5) 5차년도 (2012-2013년)

(가) M₅ 개체에 대한 지속적 선발 및 세대진전

(나) 수선발 (head selection)을 통해 얻은 812 계통을 고려대학교 덕소농장에 파종

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) 1차년도 (2008-2009)

(가) 우수 밀 품종인 조은, 조경 및 연구진이 보유한 전좌계통 (2BS/2RL)을 원자력연구원 정읍방사선과학연구소에서 방사선 조사

① 조은, 조경 - 200, 250, 300, 400 Gy

② WRT1333, WRT1344 - 300 Gy

③ WAYT15 (2BS/2RL) - 300, 400 Gy

④ 방사선을 조사한 밀 종자는 품종과 조사된 선량에 따라 파종 되었고 M₁ plant는 개체 별로 수확하여 2009 10월 파종

(나) M₁ seed를 이용한 돌연변이체 초기 형질평가

① 조은, 조경, WRT1333, WRT1344, WAYT15에 대한 발아율(Germination rate) 조사 결과, 조은 control은 DAG (Day After Germination) 4 에 약 92%가 발아했고 300, 400, 250, 200 Gy 순서로 발아율이 높게 측정되었음. 400 Gy는 DAG 2와 DAG 4 사이에 차이가 거의 나타나지 않았으나 250, 300 Gy는 DAG 4에서 약 10% 가량 높게 측정이 된 것으로 보아 400 Gy에 비하여 발아 회복력이 높은 것으로 판단됨(그림7-23).

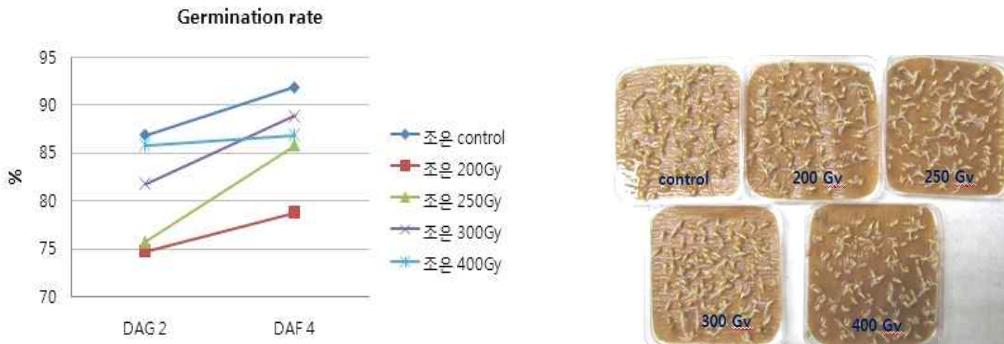


그림7-23. Germination rate of wheat plants (JoEun) irradiated by various doses of gamma-ray.

② 조경 control은 약 40% 가 발아되었으며 200 Gy는 31% 250,300,400 Gy는 약 27%로 비슷하게 관찰됨. 조은과 마찬가지로 250,300 Gy는 회복력을 보임(그림7-24).



그림7-24. Germination rate of wheat plants (Jokyung) irradiated by various doses of gamma-ray.

- ③ WRT1333 300 Gy는 95%의 발아율로 가장 높았고 WRT1344는 약 67%, 300 Gy는 약 57%를 보임. WAYT15 control은 76%, 400 Gy 69%, 300 Gy 60% 순으로 나타남(그림 7-25).

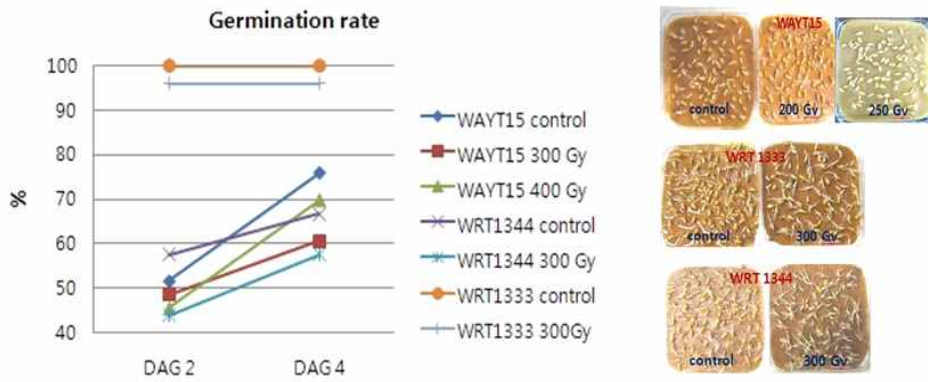
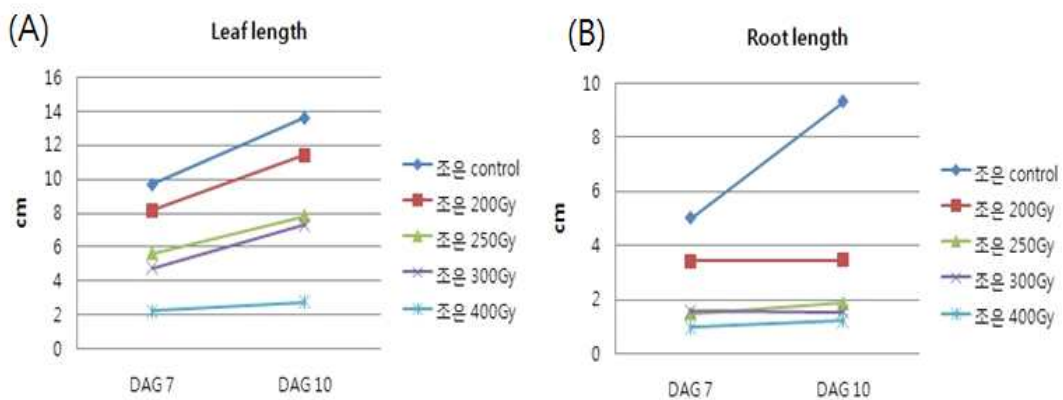


그림7-25. Germination rate of wheat plants (WAYT15, WRT1333, WRT1344) irradiated by various doses of gamma-ray.

- ④ 위의 발아율 결과를 통해서 품종과 조사량에 따라 방사선에 대한 감수성이 다르다는 것을 알 수 있었음.

(다) 조은, WRT1333, WRT1344, WAYT15 초기생육조사

- ① 초기생육을 조사하기 위해 DAG 7 과 DAG 10에 잎과 뿌리의 길이를 측정했을 때 조은, WRT1333, WRT1344, WAYT15 모두 방사선 선량이 증가함에 따라 잎과 뿌리의 길이가 감소하는 양상을 보임(그림7-26).



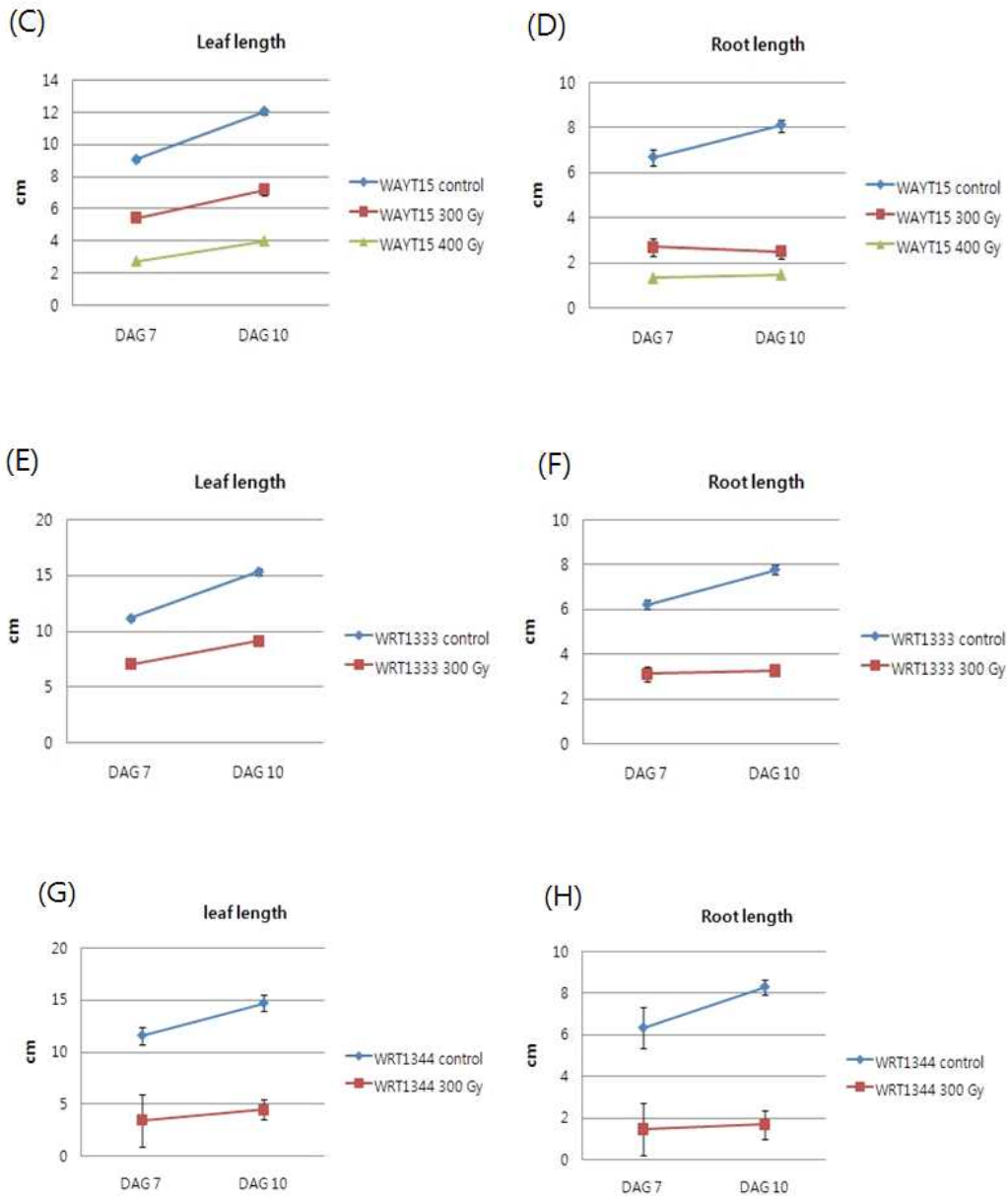


그림7-26. Seedling growth of Joeun: (A) leaf length, (B) root length, WAYT15: (C) leaf length, (D) root length, WRT1333: (E) leaf length, (F) root length, WRT1344: (G) leaf length, (H) root length,

- ② 특히 잎의 길이는 DAG 7과 DAG 10 사이에 관측했을 때 증가하는 쪽으로 변화하는 양상을 보이나 뿌리는 변화가 없었음.
- ③ 방사선은 초기 생육에 있어서 뿌리의 생장에 큰 영향을 미치는 것으로 판단됨.

(2) 2차년도 (2009-2010년)

(가) 1차년도에 선발된 M₂ 개체 포장평가, 선발 및 세대진전

- ① '08-'09년도에 선발된 M₂ 개체 파종 및 포장 평가 실시
- ② Gy 별 방사선 조사된 '조은', '조경'과 연구진이 보유하고 있던 전좌계통 (WRT1333, WRT1344, WAYT15)을 선발 및 유용돌연변이체 M2 계통을 고려대학교 덕소농장에 파종함 (926 계통)(표7-10, 그림7-27).

표7-10. List of selected M₂ lines

Source	Dose (Gy)	Line number
WRT1333	300	154
WRT1344	300	96
WAYT15(2BS/2RL)	300	135
	400	6
조경	200	16
	250	31
	300	22
조은	200	90
	250	229
	300	143
	400	4



그림7-27. Field performance ('09-'10) of M_{2,3} lines at the Korea University Research Farm (Deockso, Geonggi-Do).

- ③ 파종된 각 개체의 출수기에 대한 조사 결과 조은과 조경 돌연변이체는 5월 6-9대비품 중 금강 : 5월 7일)

(나) 우수돌연변이 개체에 대한 지속적 선발 및 세대진전

- ① 출수기를 최우선 선발 criteria로, phenotype이 좋은 유용돌연변이 개체에 대해 유전적 고정을 위하여 수선발 (head selection) 하였으며 선발된 개체는 '10-'11 고려대학교 덕소농장에 파종.

(3) 3차년도 (2010-2011년)

(가) M₃ 세대 진전 및 우수 계통 선발

- ① 조경, 조은, 2BS/2RL 의 품종에 다양한 방사선 선량을 통해 창출된 돌연변이 계체에 대한 지속적 선발을 실시하고 있으며, 전년도 수선발 (head selection)을 통해 얻은 1027 계통을 고려대학교 덕소농장에 파종하였음(그림7-28).
- ② 품종과 선량에 따라 조숙 또는 만숙의 출수기를 보였고 출수기 및 다양한 농업형질 (간장, 수장, 종자색 등)에 우수성을 보이는 개체는 유전적 고정을 위해 수선발 하였음.

수선발된 1200 개체는 2011-2012년 고려대학교 덕소농장에 파종 및 지속적인 선발, 세대진전 실시.



그림7-28. Field performance ('10-'11) of M_{3,4} lines at the Korea University Research Farm (Deockso, Geonggi-Do). Flowering time of wheat mutant lines are influenced by genetic background and radiation dosages.

(4) 4차년도 (2011-2012년)

(가) M₄ 개체에 대한 지속적 선발 및 세대진전

- ① 전년도 선발된 우수들연변이 1200 개체를 고려대학교 덕소 농장에 파종하였음 (그림 7-29).
- ② 1200 개체는 유전적으로 고정되지 않아 키분리, 출수기 분리 현상이 나타났음. 출수기, 재해저항성 등의 다양한 농업형질 지표로 약 2000 개체를 수선발(head selection)하였으며, 선발된 수선발 개체는 덕소농장 파종됨.



그림7-29. Field performance ('11-'12) of M_{4,5} lines at the Korea University Research Farm (Deockso, Geonggi-Do). (A) Field view at Heading and flowing time. (B) Growth performance of selected mutant lines.

(5) 5차년도 (2012-2013년)

(가) M₅ 개체에 대한 지속적 선발 및 세대진전

- ① 전년도 선발된 우수돌연변이 2000 개체를 고려대학교 덕소 농장에 파종하였음 (그림 7-30).
- ② 출수기, 재해저항성 등의 다양한 농업형질 지표로 약 818 개체를 수선발 하였으며, 선발된 수선발 개체는 덕소농장 파종되었으며, 이후 우수돌연변이 품종육성으로 활용될 예정임.



그림7-30. Field performance ('12-'13) of M₅₋₆ lines at the Korea University Research Farm (Deockso, Geonggi-Do). (A) Field view at grain filling period, (B) Growth performance of selected mutant lines.

3. 우수 돌연변이 계통에 대한 유전생화학적 분석

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

(1) 1차년도 (2008-2009)

(가) 우수돌연변이 계통에 대한 유전생화학적 분석은 2차년도부터 시행되었음.

(2) 2차년도 (2009-2010년)

(가) 우수돌연변이 계통에 대한 seed storage protein (HMW-GS: High Molecular Weight Glutein Subunit)분석

(나) 조숙관련 유전자의 분자유종적 연구

(3) 3차년도 (2010-2011년)

(가) 우수돌연변이 계통에 대한 seed storage protein (LMW & Gliadin subunit)분석

(나) 선발된 유용 돌연변이체의 genomic polymorphism 분석

(다) 조숙관련 유전자의 분자유종적 연구

(4) 4차년도 (2011-2012년)

(가) 조숙성 밀 육종을 위한 관련 분자유종 연구

(나) 화기형성 관련 생식생장기로 전환되는 시기 특이 발현 유전자 분자유전학적 검정

(5) 5차년도 (2012-2013년)

(가) 조숙성 밀 육종을 위한 관련 분자유종 연구

(나) 화기형성 관련 생식생장기로 전환되는 시기 특이 발현 유전자 분자유전학적 검정

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) 1차년도 (2008-2009)

(가) 우수돌연변이 계통에 대한 유전생화학적 분석은 2차년도부터 시행되었음.

(2) 2차년도 (2009-2010년)

(가) 우수돌연변이 계통에 대한 seed storage protein (glutenin subunits) 분석

- ① 올그루 23개 계통, 금강 22개 계통에 대해 주요 종자저장단백질인 high molecular weight glutenin subunits (HMW-GS)을 분석하기 위해 protein 추출.
- ② 추출한 protein을 SDS-PAGE/CBB 염색 후 분석한 결과 방사선을 조사한 통하여 금강 계열 4개 계통(M1133, M1156, M1231, M1284)에서 HMW-GS 변화를 확인하였으며 올그루 계통은 변화를 확인 할 수 없었음.
- ③ 대비품종인 금강의 HMW-GS 조성은 2, 7+8, 5+10로 구성되어 있는 반면 subunit에 변화가 생긴 3개 계통 (M1156, M1231, M1284)은 2번 subunit이 나타나지 않았고 1133은 7+8, 5+10 subunit은 그대로 존재하나 새로운 subunit이 발견되었는데 subunit 1번으로 판단되어짐.
- ④ 돌연변이 개체의 HMW-GS subunits의 변화는 bread, biscuit, noodle making quality 와 직접적인 영향을 미치므로 현재 각 계통들에 대한 품질평가의 방법으로 제시됨(그림7-31).

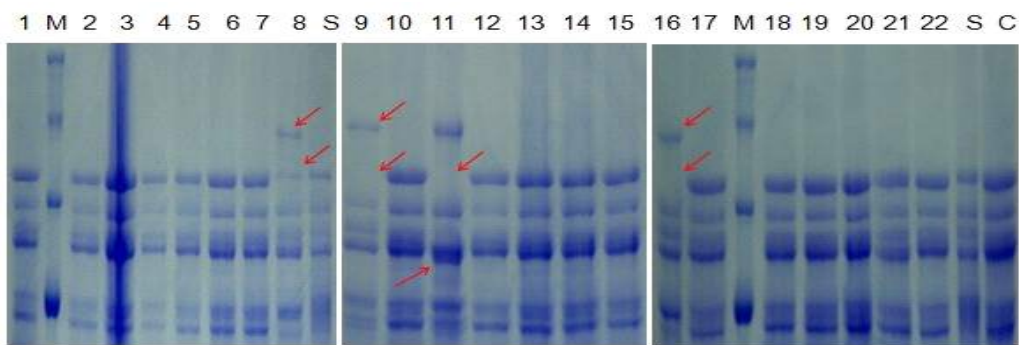


그림7-31. Reduced and alkylated glutenin subunit patterns of wheat mutant lines analyzed by one-dimensional SDS-PAGE, using a 7% gel for HMW-GS. The HMW-GS are labeled according to the nomenclature of Payne and Lawrence (1983). M: Marker, S: Chinese spring (standard sample), C: Geumgangmil control, lane 1: M985, 2: M990, 3: M1028, 4: M1030, 5: 1034, 6: M1044, 7: M1092, 8: M1133, 9: M1156, 10: M1221, 11: 1231, 12: M1236, 13: M1246, 14: M1261, 15: M1273, 16: M1284, 17: M1445, 18: M1446, 19: M1448, 20: M1449, 21: M1462, 22: M1465

(2) 조숙관련 유전자의 분자유종적 연구

- ① Arabidopsis의 UFO (Unusual Floral Organ)는 flowering initiation과 development, floral organ identity 등의 역할을 하는 화기형성 관련 유전자로 알려짐.

- ② 밀의 UFO를 full clone isolation 결과 1344 bp로 이루어져 있고, *Arabidopsis thaliana* UFO와 64 %의 amino acid sequence 유사성 가지고 있었으며 protein domain 검색 결과 N-terminal에 F-box domain을 C-terminal에 F-box associated type I과 β -galactosidase를 포함하고 있었음.
- ③ TaUFO의 onion epidermal cell에서 발현위치를 확인한 결과 핵에서 발현하는 것으로 확인됨(그림7-32).

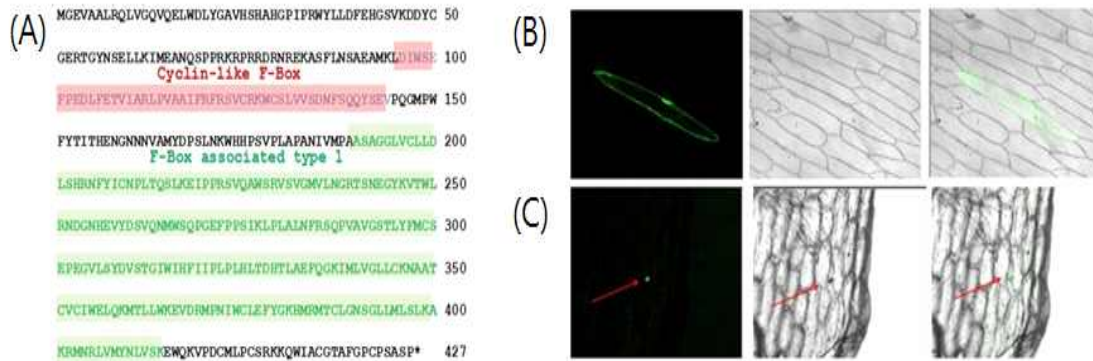


그림7-32. (A) Amino acid sequence of TaUFO. TaUFO encodes 427 amino acid residues. The cyclin like F-box and the F-box associated type 1 are noted by the red color and green color boxes. Subcellular localization of the TaUFO protein in onion epidermal cells. (B) TaUFO:smGFP fusion protein. (C) smGFP (control).

- ④ F-box domain은 다른 protein과 complex를 이루어 작용한다고 알려져 있어 밀에서의 TaUFO와 상호작용하는 protein을 찾기 위하여 Yeast two hybridization 실시한 결과 4 개의 positive clones을 확인하였고, 이 중 fructose-bisphosphate aldolase과 VHS subgroup 두 유전자에 대한 연구를 진행하였음(표7-11).

표7-11. Profile of potential TaUFO (full length of TaUFO) interactive proteins in wheat spikelet library

Clone	Putative Identification	Organism	E-value	Length	Full
Y2HF2 6	fructose-bisphosphate aldolase	<i>Triticum aestivum</i>	9e-43	1118	F
Y2H15	VHS subgroup	<i>Oryza sativa</i> (<i>Japonica Group</i>)	5E-132	320	P
Y2H17	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	8e-61	874	P
Y2H28	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	<i>Triticum aestivum</i>	9.00E-107	349	P

- ⑤ TaUFO의 특정 binding domain을 확인하기위해 5개의 Deletion line (DL)을 제작, Y2H를 통해 발견된 fructose-bisphosphate aldolase (FBA)를 cotransformation 하여 β -galactosidase activity를 한 결과 DL1, DL2, DL3에서 동일하게 높은 발현을 보였음(그림7-33).

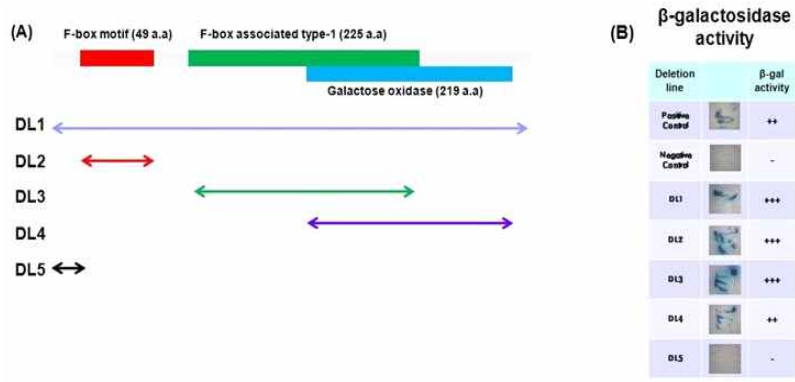


그림7-33. Identification of TaUFO that interacts with fructose biphosphate aldolase (FBA) in the yeast two hybrid system. (A) Bait diagram of the bait fragment (TaUFO); DL1: Full length of TaUFO, DL2: N-terminal of F-box motif, DL3: C-terminal of F-box associated type-1 and DL4: Galactose oxidase. (B) β-galactosidase activity. β -gal assays were performed on yeast two gold cells (clontech) co-transformed with pGADT7::FBA and various pGBKT7::UFO deletion constructs. Color development is indicated as follows: +++ (high interaction) and - (weak or no interaction).

⑥ 밀 화기 발달시기와 조직에 따른 TaUFO, TaFBA에 대한 발현양상을 qRT-PCR을 통해 검정한 결과 TaUFO와 TaFBA는 reciprocal pattern을 보임(그림7-34).

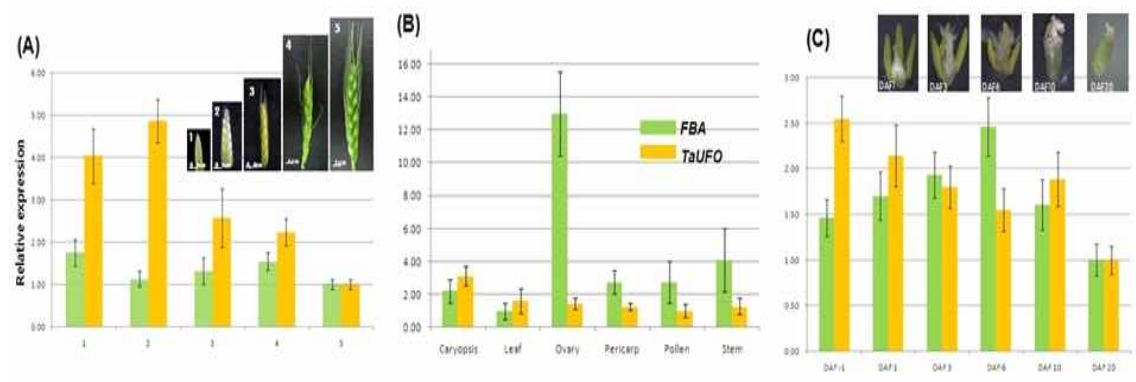


그림7-34. qRT-PCR analysis of TaUFO and TaFBA mRNA levels. (A) TaUFO and TaFBA expression level in the spikes at various developmental stages. 1: very young spikes, which are less than 3 mm length, 2: 5-10 mm , 3: 15-25 mm, 4: 50-70 mm and 5: 100-120 mm (heading stage). (B) Organ specificity of TaUFO and TaFBA expression. Total RNAs were isolated from mature leaves, stems, ovary, pericarp, pollen at the heading stage. (C) Expression of TaUFO and TaFBA at grain development stages

⑦ Glycolysis pathway에 관련된 FBA와 동물세포의 membrane trafficking에 관여한다고 알려진 VHS의 GFP sub-localization 연구 등 분자생물학적 연구가 수행되었음.

(3) 3차년도 (2010-2011년)

(가) 우수돌연변이 계통에 대한 seed storage protein (gliadin pattern)분석

- ① 금강 27개 계통, 울그루 36개 계통에 대해 주요 종자저장단백질 중 low molecular weight을 구성하는 gliadin 분석을 위해 protein 추출.
- ② 추출한 protein을 A-PAGE를 시행하여 대비 품종과 비교분석한 결과 금강 5개 계통, 울그루 2개 계통에서 pattern 차이를 확인하였음(그림7-6). 울그루 2개 계통은 도태되었고 금강 5개 계통 (M1130, M1122, M1156, M1231, M1284)은 세대진전이 이루어짐.
- ③ 밀가루 신장력에 영향을 미치는 gliadin는 최근들어 밀 단백질 과민반응이라고 일컫는 셀리악 스프루(celiac sprue)을 일으킨다는 보고가 있음. 방사선 조사를 통한 gliadin pattern 변화는 이용 목적에 따른 특이 품종 개발하는데 긍정적 효과를 불러일으키며 효율적 육종 선발 방법 가능성 제시하고 있음(그림7-35).

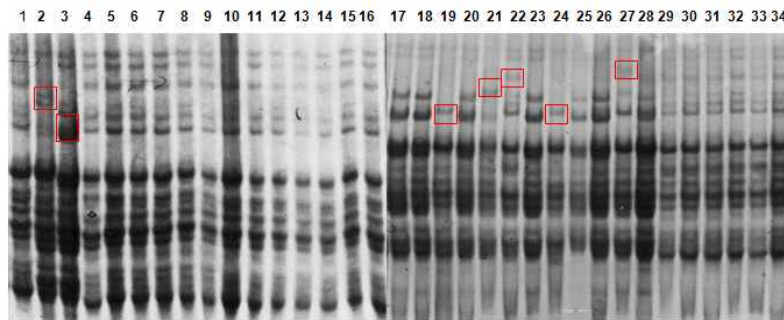


그림7-35. Gliadin patterns of wheat mutant lines analyzed by A-PAGE. lane 1: OlGeuru control, 2: M855, 3: M889, 4: M891, 5: M892, 6: M893, 7: M894, 8: M895, 9: M896, 10: OlGeuru control, 11: M897, 12: M672, 13: M699, 14: M733, 15: M735, 16: M738, 17: Keumkang control, 18: M1092, 19: M1130, 20: M1132, 21: M1133, 22: M1156, 23: M1221, 24: M1231, 25: M1261, 26: M1273, 27: M1284, 28: M1462, 29: OlGeuru control, 30: M742, 31: M742, 32: M745, 33: M747, 34: M750. Red boxes indicated difference of gliadin pattern.

(나) 선발된 유용 돌연변이체의 genomic polymorphism 분석

- ① 유용 돌연변이체의 유전적 다형성 및 특이 마커를 개발하기 위해 우수 돌연변이 계통 중 단간이고 수장이 특징을 가진 M1231 계통을 원품종인 금강과 함께 AFLP 실시하였음(그림7-36A).
- ② 22개의 AFLP selective primer를 선정하여 AFLP를 한 결과 23개의 polymorphic band 가 나타났고(그림7-36B), 23개의 band에 대해 클로닝 및 염기서열 분석을 진행하였음.

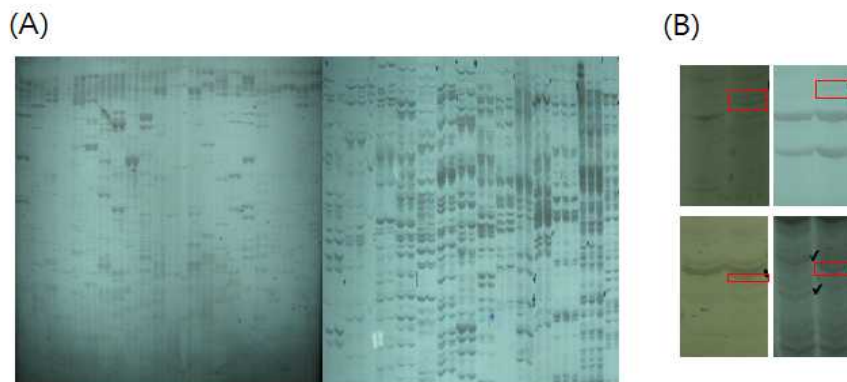


그림7-36. (A) Silver-stained polyacrylamide gels showing amplified fragments detected in

the M1231 mutant line and Keumkang control. (B) Different AFLP band patterns were observed for each primer combination in M1231 mutant line and Keumkang control.

(다) 조숙관련 유전자의 분자유종적 연구

- ① 특정 protein의 degradation을 일으키는 SCF (Skp1-Cullin-F-box protein) complex를 coding 하는 유전자 클로닝 및 기능 분석 실시
- ② F-box protein은 특정 substrate protein과 상호작용하여 그 protein에 ubiquitin molecule을 붙여줌으로써 26S proteasome에서 degradation 될 수 있게 도와주는 protein degradation 역할을 하는 유전자로 다양한 식물 발달 시기에 작용되어진다고 알려져 있음.
- ③ 화기 및 종자 발달/조직별(그림7-37A, B) 발현과 abiotic/phytohormone stress 처리에 따른 Ta F-box protein의 발현양상을 검정하기 위해 qRT-PCR 및 RT-PCR 실시.
- ④ 화기형성 초기에 큰 발현양상을 보이거나 발달 후반으로 갈수록 발현이 줄어드는 경향을 나타내고 종자발달 시기는 비슷한 수준의 발현양상을 보임(그림7-37C). 조직별 발현에서는 ovary에서 가장 높게 발현 되었으며(그림7-37D) 다양한 abiotic/phytohormone stress 처리는 cold treatment에서 시간대별로 증가하는 양상을 나타내는 것으로 보아 cold stress에 관련된 유전자라 생각됨(그림7-37E).

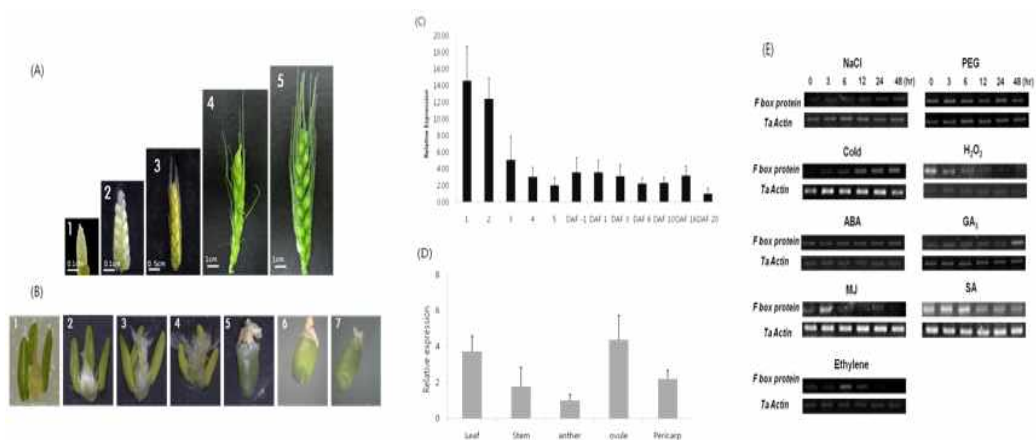


그림7-37. Expression of TaF-box protein gene in various development stages, tissues, and abiotic stresses. (A) 1, very young inflorescence, less than 3 mm in length; 2, 5 - 10 mm; 3, 15 - 25 mm; 4, 50 - 70 mm; 5, 100 - 120 mm. (B) 1, Different stages of wheat grain development (1 day before flowering (DAF - 1); 2, DAF 1; 3, DAF 3; 4, DAF 6; 5, DAF 10; 6, DAF 16; and 7, DAF 20. Transcript accumulation profiles of TaF-box protein gene expressed in various development stages, tissues and biotic & abiotic stress condition using qRT-PCR analysis (C, D, E).

- ⑤ Ta F-box protein에 대하여 종실 발달 시기 RNA를 사용한 yeast two-hybrid screening 결과 얻은 interacting protein의 세포 상의 위치 및 protein-protein 상호작용 시 세포상의 위치를 관찰하기 위해 GFP vector 및 BiFC vector를 제작하였으며, 담배 transient expression 후, confocal microscopy를 이용하여 담배의 표피세포 관찰하여 sub-cellular localization 및 BiFC assay를 활용한 co-localization을 확인.

- ⑥ Ta F-box protein은 plasma membrane과 cytoplasm에 나타났고(그림7-38A), F-box protein과 상호작용하는 유전자 aspartic protease (AP)과 26s proteasome subunit (26S)는 plasma membrane과 cytoplasm, fructose biphosphate aldolase (FBP)는 cytoplasm, VHS는 golgi body, wheat glycine rich protein (whGRP)는 plasma membrane에서 각 유전자의 sub-localization이 확인됨(그림7-38B).
- ⑦ BiFC (Bimolecule Fluorescence Complementation)는 살아있는 식물체 내에서 서로 결합하는 단백질의 위치를 확인할 수 있는 방법으로 형광단백질을 포함하는 N-절편과 C-절편의 vector에 검정하고자 하는 단백질을 넣고 두 단백질이 결합하였을 때만 형광을 발생시킴. 이러한 원리를 이용한 BiFC assay 결과, Ta F-box protein과 interaction하는 5개의 protein은 plasma membrane에서 관찰되었으며(그림7-38C), 이것은 F-box protein과 상호 작용 시 plasma membrane에서 protein degradation에 관련되어 있을 것이라 여겨짐.

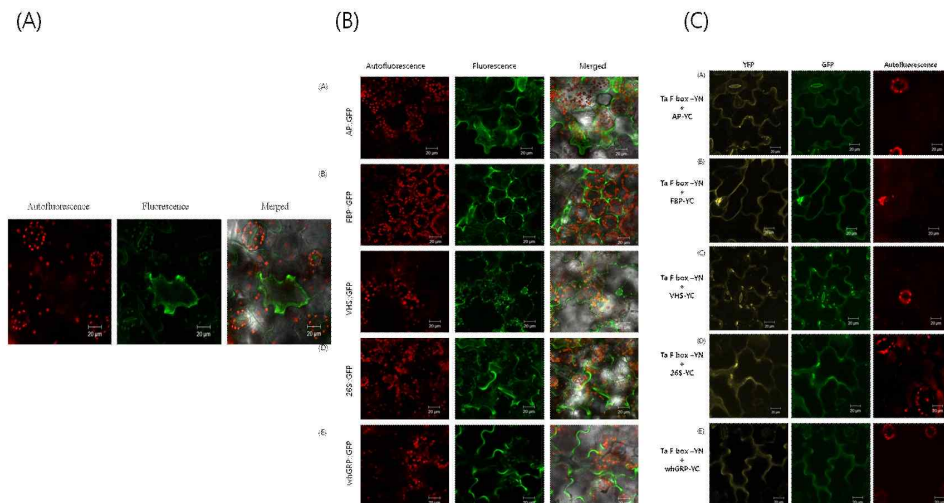


그림7-38. (A) Sub-cellular localization of Ta F-box fusion protein GFP imaged by confocal microscopy.(B) Sub-cellular localizations of Ta F-box protein interacting proteins. (C) Interaction between Ta F-box protein and interacting proteins using the BiFC assay

- ⑧ F-box protein과 함께 SCF complex를 이루는 subunit 중 하나인 Skp1 (S-phase kinase associated protein 1)과 homology가 높은 SKP1-related genes의 기능분석 실시.
- ⑨ 클로닝 결과, 6개 SKP1-related gene (*TSK1*, *WSK1*, *WSK2*, *WSK3*, *WSK4*, and *WSK5*)을 얻었고 WSK (wheat SKP1 protein)로 명명하였으며 각각의 유전자는 SKP1 component (IPR001232)가 conserved 되어 있었음.
- ⑩ 6개 *WSK* 유전자의 발현 양상을 검정하기 위해 조직/화기 발달/종자 발달과 다양한 stress 처리에서 RT-PCR을 실시한 결과, 밀의 생육초기 단계에서는 모든 유전자가 발현되었고 각 조직 (leaf, stem, pollen, ovary, and pericarp)에서 *WSK1,2,3,5*는 비슷한 발현 양상을 나타냈으나, *TSK1*는 leaf, stem에서만 약하게 발현이 확인되었고 *WSK4*는 pollen에서 발현을 나타내지 않음(그림7-39A, B). 화기발달시 *TSK1*, *WSK4*, *WSK5*는 감소되는 양상을 보였고 *WSK1*, *WSK2*, *WSK3*는 비슷한 정도의 발현을 나타내었음. *TSK1*, *WSK4*, *WSK5*와 *WSK1*, *WSK2*, *WSK3*는 종자발달시 반대경향성을 보이는데 이는

한 그룹의 발현이 감소하면 다른 그룹의 발현을 증가시켜 보완해주는 기능을 담당할 것이라 추측되어짐(그림7-39C).

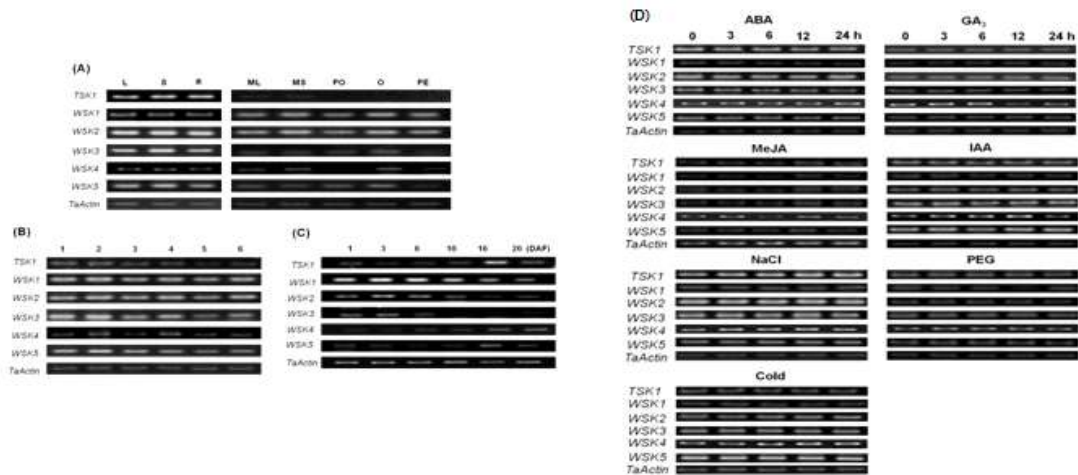


그림7-39. Expression of WSK genes in various development stages, tissues, and abiotic stresses. (A) Transcription profiling of TaSKP genes in different young seedling tissues and mature wheat plant. ML leaf in the heading stage, MS stem in the heading stage, A anther, S stigma, PE pericarp. (B) TaSKP gene expression levels in spikes at various developmental stages. 1 very young spikes, less than 3 mm in length; 2 5 - 10 mm; 3 15 - 25 mm; 4 50 - 70 mm; 5 100 - 120 mm (heading stage); 6 1 day after flowering (DAF). (C) Different stages of wheat grain development. (D) TaSKP gene expression levels under biotic and abiotic stress condition

- ① 6 WSK 유전자의 식물 세포내 위치를 확인하기 위해 담배에 transient expression 한 후 confocal microscopy를 이용하여 관찰한 결과, 모든 WSK 유전자가 plasma membrane에 위치하는 것을 확인함(그림7-40).

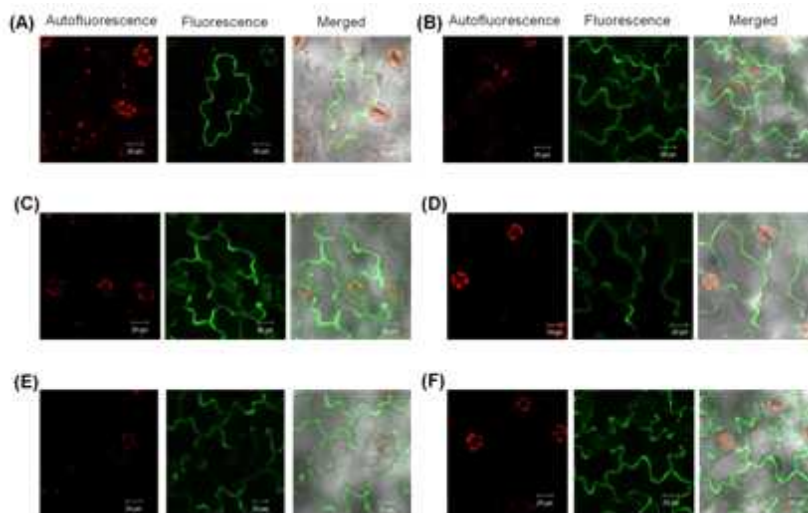


그림7-40. Subcellular localization of TaSKP:GFP-fusion proteins. Tobacco epidermis was infiltrated with *A. tumefaciens* containing a binary vector encoding the 35S promoter and GFP-fusion construct. (A) TaSKP1, (B) TaSKP2, (C) TaSKP3, (D) TaSKP4, (E) TaSKP5, and (F) TaSKP6.

- ⑫ SKP protein이 F-box protein과 상호작용 한다는 점에 착안, 밀에 존재하며 F-box domain을 포함하고 있는 다양한 F-box protein (Ta F-box protein, Triticum aestivum putative receptor kinase; RLK, ribosomal RNA apurinic site specific lyase; RA)을 클로닝한 후, 6개 WSK와 yeast two hybrid assay를 실시한 결과, RA-TSK1과 RA-WSK5가 매우 강한 interaction을 보였고, Ta F-box protein과 RLK에 결합하는 WSK protein은 약한 interaction을 보임(그림7-41).

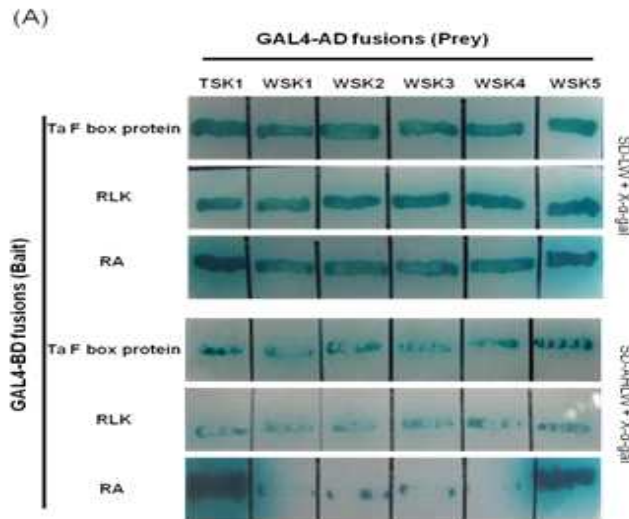


그림7-41. Yeast two-hybrid assay showing interaction between WSK proteins and F-box proteins in wheat.

- ⑬ Yeast two hybrid assay 결과를 토대로 F-box protein과 WSK protein의 식물세포 내에서의 co-localization을 확인하기 위해 BiFC vector 제작 후, 담배 transient expression을 통해 BiFC assay를 한 결과 Ta F-box protein과 결합한 모든 WSK는 plasma membrane에서 강한 YFP signal을 보였고(그림7-42A), yeast two hybrid assay에서 강한 interaction을 보였던 RA-TSK1 과 RA-WSK5는 nucleus에서 signal이 관찰됨(그림7-42B). RLK와 WSK protein의 조합에서는 어떤 signal도 관찰되지 않았고 RA-WSK1, 2, 3, 4 또한 signal이 관찰되지 않음.
- ⑭ 위의 결과를 통하여 WSK와 결합하는 F-box protein의 종류에 세포 내에서 작용하는 위치가 달지는 것을 알 수 있었고 비록 yeast two hybrid assay에서는 약한 결합 상태를 보였으나 식물세포 내에서는 매우 강한 결합을 보이는 것으로 보아 yeast two hybrid assay에서 간과될 수 있는 간접적인 상호작용을 BiFC assay를 통해서 증명할 수 있음.

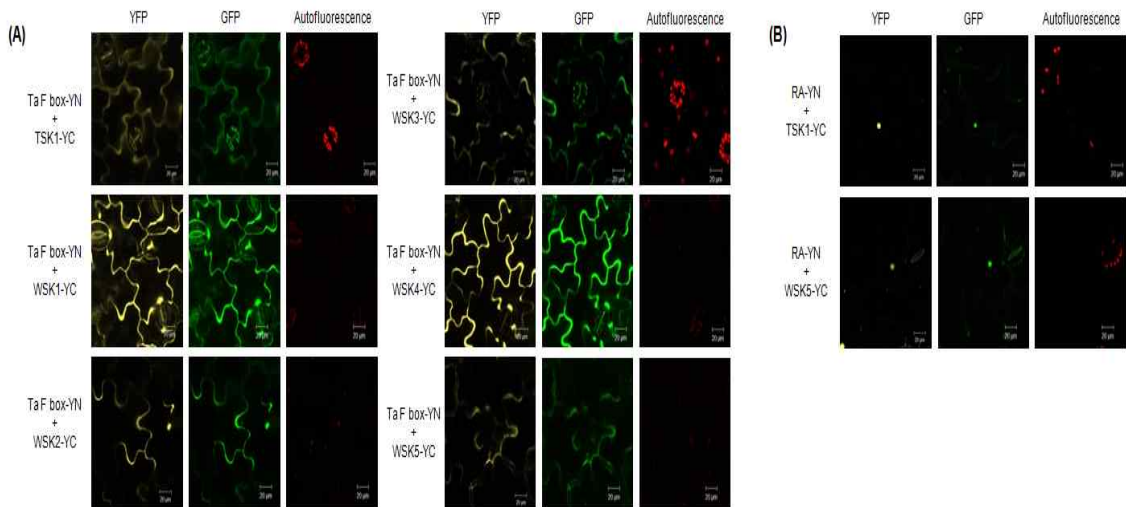


그림7-42. Interaction between WSK proteins and F-box proteins using the BiFC assay (A) Ta F-box-YN (Ta F-box protein fused with N terminus of YFP) + WSKs-YC (WSKs fused with C terminus of YFP), (B) RA-YN + WSK-YC.

(4) 4차년도 (2011-2012년)

(가) 조숙성 밀 육종을 위한 관련 분자유종 연구

- ① 26S proteasome system에 의해 특정 protein을 degradation 시키는 다양한 complex 중, multi-type complex 인 SCF (Skp1-Cullin-F box protein) complex 관련 유전자에 대한 클로닝 및 분석 실시.
- ② 전년도 연구결과, Ta F-box protein은 wheat SKP proteins과 상호작용하는 것으로 밝혀졌으나, SCF complex의 core component로 알려진 Cullin protein에 대한 기능은 현재 까지 잘 알려져 있지 않으므로 본 연구를 통하여 기능 검정을 실시함.
- ③ 밀에서 클로닝한 TaCullin 유전자는 2388bp nucleotide, 746 amino acid, 86.73 kDa으로 이루어져 있고 6.46 isoelectric point 값을 가지고 있었으며, domain 분석 결과 N-terminal은 Cullin like-containing domain을 C-terminal은 neddylation domain을 가짐.
- ④ 화기 및 종자 발달/조직별 발현과 abiotic/phytohormone stress 처리에 따른 TaCullin gene의 발현양상을 검정하기 위해 qRT-PCR와 RT-PCR 실시.
- ⑤ TaCullin은 화기형성 초기에 높은 발현양상을 보였으나 점차 줄어들었고, 종자발달 단계에서는 종자의 수정이 일어난 직후 발현이 높게 관측되었으며 종자발달 후반으로 갈수록 줄어드는 양상을 보임(그림7-43A, 43B, 43C). 조직별 발현에서는 ovary에서 가장 높게 나타났음. abiotic/phytohormone stress 처리에서는 Cold stress에서 시간이 지날수록 점차 증가하는 양상을 보였고 MeJA 12h treatment 처리에서 높게 관측되었음(그림7-43D).

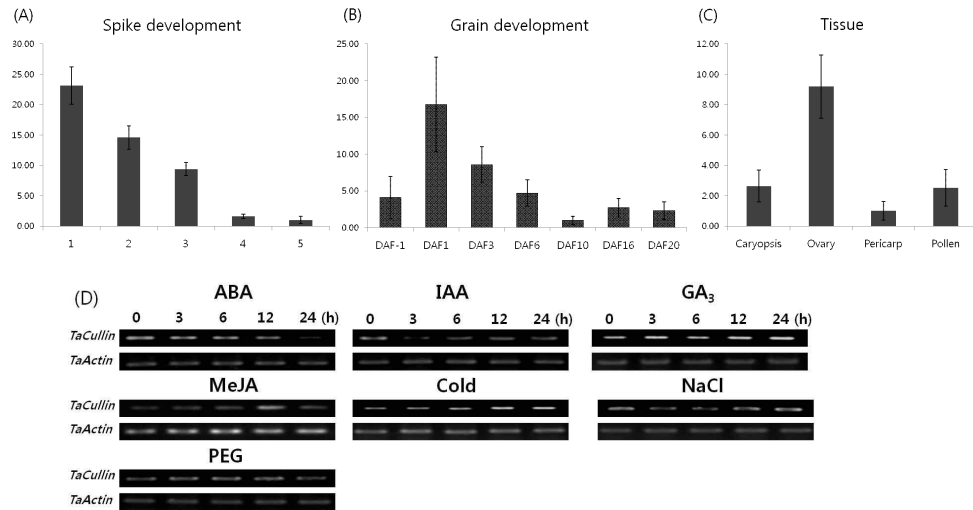


그림7-43. Transcript accumulation profiles of TaCullin gene expressed in various development stages and tissues using qRT-PCR analysis (A, B, C). (D) TaCullin transcripts quantified by RT-PCR of wheat young seedlings harvested at different time points during phytohormone and abiotic stress treatments.

⑥ Nulli-tetrasomic과 Ditelosomic을 사용하여 TaCullin 유전자의 chromosome 상의 위치를 확인한 결과, TaCullin은 밀의 2번 D chromosome의 long arm에 위치함 (그림7-44).

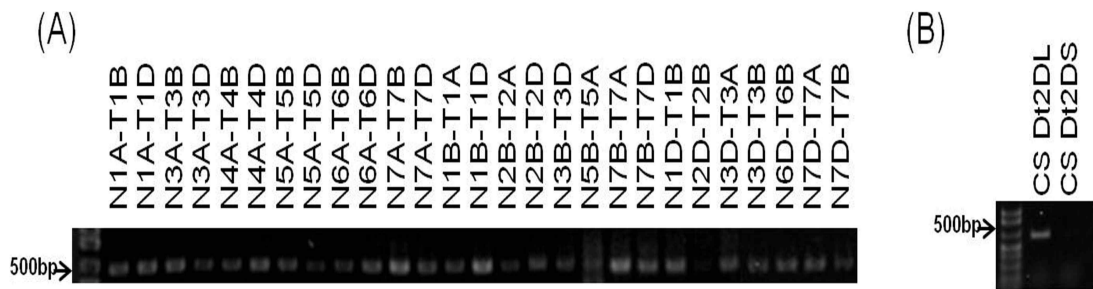


그림7-44. Chromosomal localization of the TaCullin gene in wheat. (A) PCR was performed on genomic DNA of the nulli-tetrasomic (NT) lines derived from var. 'Chinese Spring' (CS). (B) PCR was conducted on the genomic DNA of ditelosomic lines to define the chromosome arm location of the TaCullin gene.

(나) 화기형성 관련 생식생장으로 전환되는 시기 특이 발현 유전자 분자유전학적 검증

① 화기형성 관련 생식생장으로 전환되는 시기 특이 발현 유전자 분자유전학적 검증
Cullin protein은 SCF complex의 core component로 F-box, SKP gene 과 complex를 이루고 RING binding domain을 가지는 RBX1 protein과 상호결합 한다는 점에 착안, TaCullin protein에 대하여 yeast two-hybrid assay 실시함.

- ② SD/-LW+AbA의 1차 screening 결과, 72개의 positive한 클론을 얻었고 2차 screening 인 SD/-AHLW+AbA+X- α -gal 에서는 총 9개의 클론을 얻을 수 있었음 (표7-12). 9개 클론을 yeast mini-prep 방법으로 plasmid를 동정하여 sequence 정보를 얻었고 그 정보를 바탕으로 각 클론의 full sequence를 동정하였음. 9개의 클론 중, Y2H screen을 통해 RMD5 homolog A-like 유전자가 α -gal activity에 가장 강한 결과를 나타내는 것으로 보아 TaCullin과 상호작용하는 단백질로 여겨짐.

표7-12. TaCullin interacting partners identified by yeast two-hybrid screening

Clone No.	Putative Identification	Organism
1	SNF1-type serine-threonine protein kinase (SnRK2.4)	<i>Triticum aestivum</i>
2	SURP and G-patch domain-containing protein 1-like protein-like	<i>Brachypodium distachyon</i>
3	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) protein-like	<i>Brachypodium distachyon</i>
4	70 kDa heat shock protein (TaHSP70d) mRNA	<i>Triticum aestivum</i>
5	Small subunit precursor of RuBPCase	<i>Triticum aestivum</i>
6	sufE-like protein, chloroplastic-like	<i>Brachypodium distachyon</i>
7	RMD5 homolog A-like	<i>Brachypodium distachyon</i>
8	Ubiquitin-60S ribosomal protein	<i>Brachypodium distachyon</i>

- ③ Cullin과 상호작용하여 SCF complex를 이루는 SKP1-like protein은 Cullin protein의 N-terminal에 위치한 Cullin like containing domain과 결합한다고 알려져 있음. 이를 증명하기 위해 TaCullin을 N-terminal과 C-terminal domain으로 나누어 전년도 연구에서 밝힌 6개의 TaSKP와 Y2H를 실시한 결과, neddylation domain을 가지고 있는 C-terminal은 TaSKP protein과 결합이 일어나지 않으나 Cullin like containing domain을 가진 N-terminal에서는 TaSKP1, TaSKP5, TaSKP6과 강하게 상호결합 하는 것으로 보아 밀의 Cullin protein 또한 SKP1-like protein을 N-terminal domain에 결합시켜 작용하는 것을 증명하였음(그림7-45).

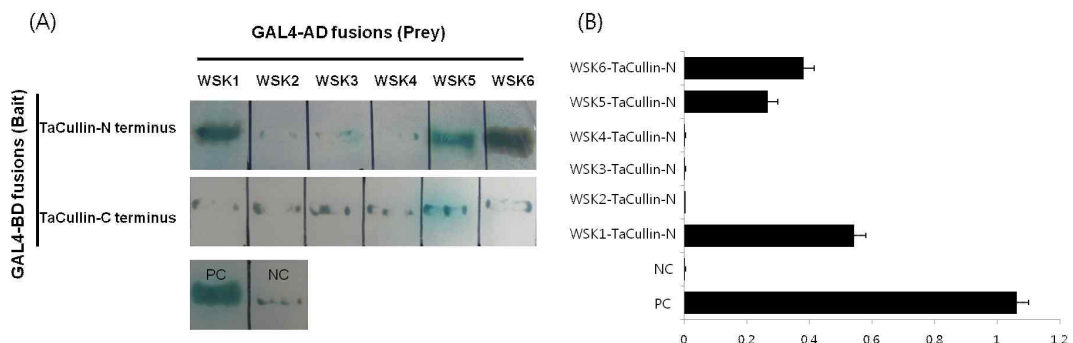


그림7-45. (A) Yeast two-hybrid interaction between TaCullin proteins and TaSKP proteins and the (B) β -galactosidase activity (β -gal) assay.

- ④ TaRMD5 protein은 TaCullin의 C-terminal domain (neddylation domain)과 강한 결합을 이루는 것을 확인하였고, 이는 TaRMD5 protein이 밀 SCF complex에서 RBX1 (Ring Box Protein1)로써 ubiquitin molecule를 target substrate로 옮겨주는 역할을 할 것이라고 사료됨(그림7-46A).
- ⑤ TaCullin-neddylation domain을 bait로 사용하고 TaRMD5를 특정 domain (CRA, RING Finger) 따라 나누어 prey vector construction 후, Y2H를 실시한 결과 CRA 와 RING Finger domain에서는 약한 결합을 나타낸 반면에 두 domain을 가지지 않은 부분에서 높은 결합 상태를 나타냄(그림7-46B). 이에 따라, TaCullin neddylation domain 은 TaRMD5의 특정 domain이 아닌 부분에서 결합을 하고, CRA와 RING Finger domain은 다른 단백질 또는 ubiquitin molecule과 상호결합할 가능성을 가질 것으로 생각됨.

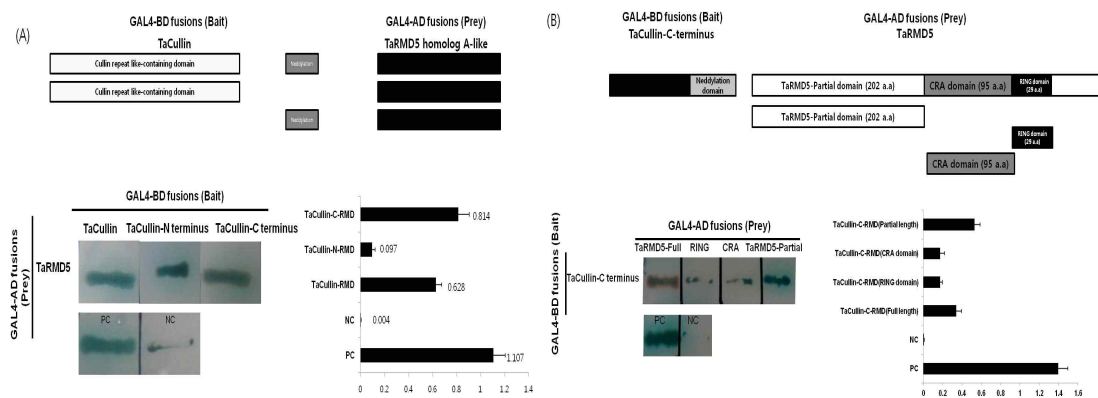


그림7-46. The interaction between TaCullin and TaRMD5 homolog A-like protein via yeast two-hybrid assays. (A) The schematic picture of the TaCullin fragments and deletion analysis of TaCullin-TaRMD5 homolog A-like protein interactions. (B) The yeast two-hybrid assays were performed with TaCullin-C terminus in the DNA-binding domain vector (pGBKT7) and deletion constructs of TaRMD5 in the activating domain vector (pGADT7).

- ⑥ TaCullin과 상호작용하는 단백질인 TaRMD5 식물세포 상의 위치 및 protein-protein 상호작용시 세포상의 위치를 관찰하기 위해 GFP vector 및 BiFC vector를 제작하였으며, 담배 transient expression 후, confocal microscopy를 이용하여 담배의 표피세포 관찰하여 sub-cellular localization 및 BiFC assay를 활용한 co-localization을 확인(그림 7-47).
- ⑦ TaCullin protein은 핵, TaRMD5 protein은 cytoplasm과 plasma membrane에 위치하고 있음을 확인할 수 있었고, BiFC assay를 통한 co-localization을 확인한 결과 plasma membrane에서 YFP signal이 발견되었고, 이들 단백질이 상호결합 했을 시 plasma membrane에서 발견되는 것으로 보아 각 유전자는 서로 다른 위치에 존재하나 결합하게 되면 translocation이 일어남을 알 수 있었음.
- ⑧ 위와 같은 실험을 통하여 밀에서도 다른 식물과 비슷하게 F-box/SKP1-like/Cullin의 조합으로 SCF complex를 형성한다는 것을 증명하였고, 이는 특정 substrate를 효과적으로 26S proteasome으로 옮길 수 있을 것이라고 생각됨.

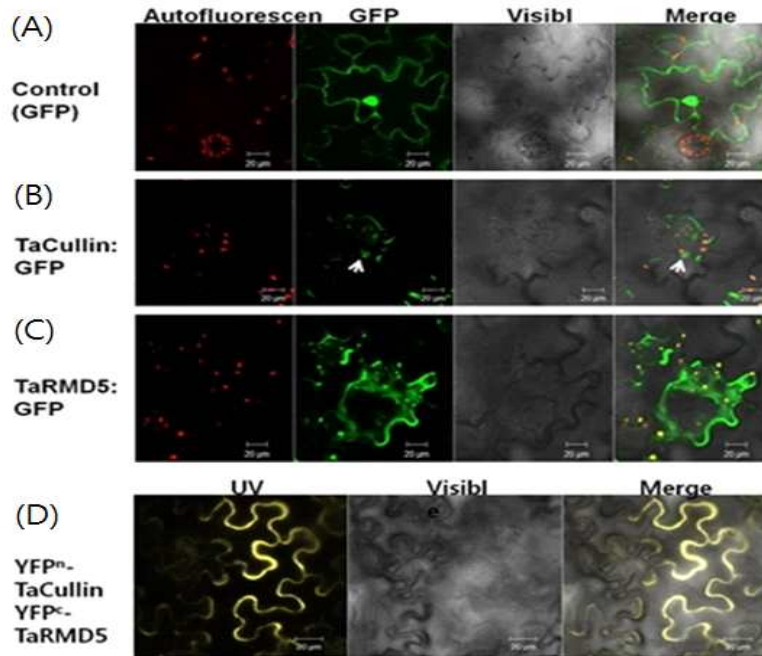


그림7-47. (A) Tobacco leaves cell transformed with the vector expressing GFP alone, as a control, showed green fluorescence. (B) Sub-cellular location of TaCullin-GFP fusion proetin. (C) Sub-cellular location of TaRMD5-GFP fusion proetin. (D) Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) visualization of TaCullin-TaRMD5 interactions in Agrobacterium-infiltrated tobacco leaves by confocal microscopy.

(5) 5차년도 (2012-2013년)

(가) 조숙성 밀 육종을 위한 관련 분자유종 연구

- ① 26S proteasome system에 의해 특정 protein을 degradation 시키는 다양한 complex 중, E3 ubiquitin ligase 역할을 하는 밀의 RING finger protein을 분리하였음.
- ② 밀에서 클로닝한 *TaRF1* 유전자는 756 bp nucleotide, 251 amino acid, 29.57 kDa으로 이루어져 있고 5.75 isoelectric point 값을 가지고 있었으며, domain 분석 결과 C-terminal에 C3HC4-type RINGfinger domain을 확인하였음(그림7-48).

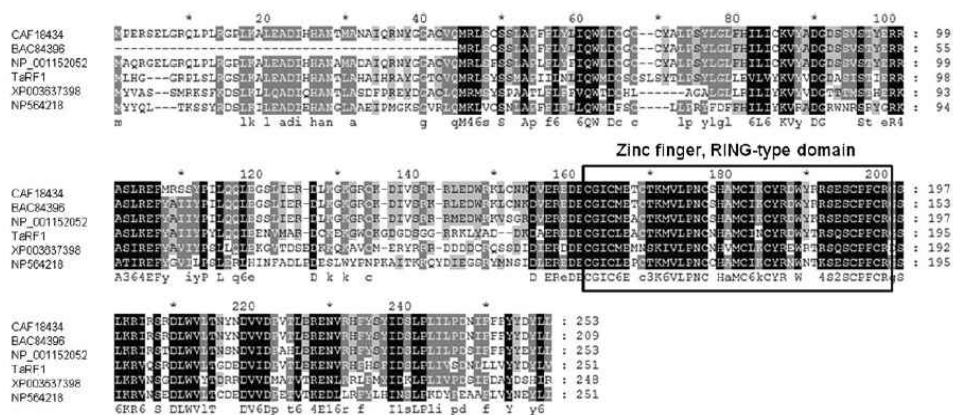


그림7-48. Comparison of the deduced amino acid sequence of the zinc finger/RING-type domain of wheat RING finger protein with rice E3 ubiquitin ligase, rice zinc finger (C3HC4-type RING finger) protein-like, Zea mays RNA-binding protein, Medicago

truncatula RING finger protein, and Arabidopsis thaliana RING/Ubox domain-containing protein. The box indicates a conserved RING-type domain (155 - 193 amino acids)

- ③ 화기 및 종자 발달/조직별 발현과 abiotic/phytohormone stress 처리에 따른 *TaRF1* gene의 발현양상을 검정하기 위해 qRT-PCR와 RT-PCR 실시.
- ④ *TaRF1*은 화기형성 후 4 stage에서 가장 큰 발현을 보였으며(그림7-49) 종자 발달후 점차 발현이 증가하다 DAF 6에서 발현이 최대에 도달했음. 종자발달 시기에 전반적으로 고르게 발현함을 관측하였음. Abiotic/phytohormone stress 처리 (ABA, GA₃, MeJA, IAA, NaCl, PEG, cold treatments)에서는 큰 변화가 없었음.

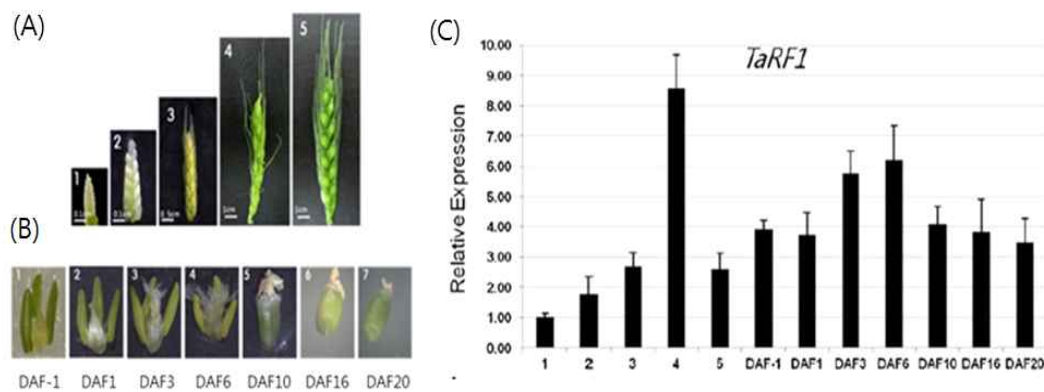


그림7-49. Expression of *TaRF1* gene in various development stages. (A) 1, very young inflorescence, less than 3 mm in length; 2, 5 - 10 mm; 3, 15 - 25 mm; 4, 50 - 70 mm; 5, 100 - 120 mm. (B) 1, Different stages of wheat grain development (1 day before flowering (DAF - 1); 2, DAF 1; 3, DAF 3; 4, DAF 6; 5, DAF 10; 6, DAF 16; and 7, DAF 20. (C) Transcript accumulation profiles of *TaRF1* gene expressed in various development stages.

(나) 화기형성 관련 생식생장기로 전환되는 시기 특이 발현 유전자 분자유전학적 검정

- ① SD/-LW+AbA의 1차 screening 결과, 30개의 positive한 클론을 얻었고 2차 screening 인 SD/-AHLW+AbA+X-α-gal 에서는 총 8개의 클론을 얻을 수 있었음 . 8개 클론을 yeast mini-prep 방법으로 plasmid를 동정하여 sequence 정보를 얻었고 그 정보를 바탕으로 각 클론의 full sequence를 동정하였음(표7-13)

표7-13. TaRF1 interacting partners identified by yeast two-hybrid screening.

Clone No.	Putative Identification	Organism
1	ubiquitin-conjugating enzyme E2 28-like	<i>Brachypodium distachyon</i>
2	heat shock protein 90	<i>Triticum aestivum</i>
3	alcohol dehydrogenase ADH1A	<i>Triticum turgidum</i>
4	uncharacterized LOC100840462, transcript variant 5	<i>Brachypodium distachyon</i>
5	probable mitochondrial saccharopine	<i>Brachypodium</i>

	dehydrogenase At5g39410-like	<i>distachyon</i>
6	sufE-like protein, chloroplastic-like	<i>Brachypodium</i>
		<i>distachyon</i>
7	peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase GLO5-like	<i>Brachypodium</i>
		<i>distachyon</i>
8	ATP synthase subunit d, mitochondrial-like	<i>Brachypodium</i>
		<i>distachyon</i>

② 8개의 clone 중 ubiquitin-conjugating enzyme E2 28-like와 heat shock protein 90을 선별하여 식물 세포내 위치를 확인하였음. 담배잎에 transient expression 한 후 confocal microscopy를 이용하여 관찰한 결과, bait로 사용하였던 TaRF1과 ubiquitin-conjugating enzyme E2 28-like, heat shock protein 90 모두 핵에서 발현됨을 확인함(그림7-50).

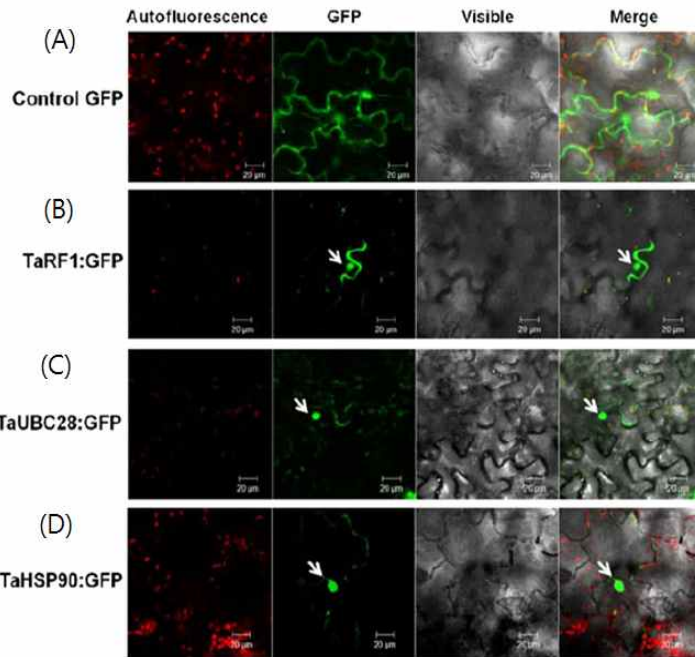


그림7-50. Tobacco epidermis cells were infiltrated with *Agrobacterium tumefaciens* containing a binary vector with the 35S promoter and GFP fusion protein. Subcellular localization of (B) TaRF1, (C) TaUBC28, and (D) TaHSP90 GFP fusion proteins was visualized by confocal microscopy. Tobacco epidermis cells transformed with the vector expressing GFP alone, as a control, showed (A) green fluorescence.

③ Yeast II hybridization으로 선별된 interaction protein 을 검정하기 위하여, co-transformation을 실시하였고, 그 결과 ubiquitin-conjugating enzyme E2 28-like, heat shock protein 90은 각각 TaRF1 과 interaction 함을 확인하였음(그림7-51A). 또한 BiFC 는 *in vivo*상에서 서로 결합하는 단백질의 위치를 확인할 수 있는 방법으로 형광단백질을 포함하는 N-절편과 C-절편의 vector에 검정하고자 하는 단백질을 넣고 두 단백질이 결합 하였을 때만 형광을 발생시킴. 이러한 원리를 이용한 BiFC assay 결과, TaRF1 protein과

interaction 하는 ubiquitin-conjugating enzyme E2 28-like은 plasma membrane에서 관찰되었으며 (그림7-51B), 이것은 TaRF1 protein과 상호 작용 시 plasma membrane에서 protein degradation에 관련되어 있을 것이라 여겨짐.

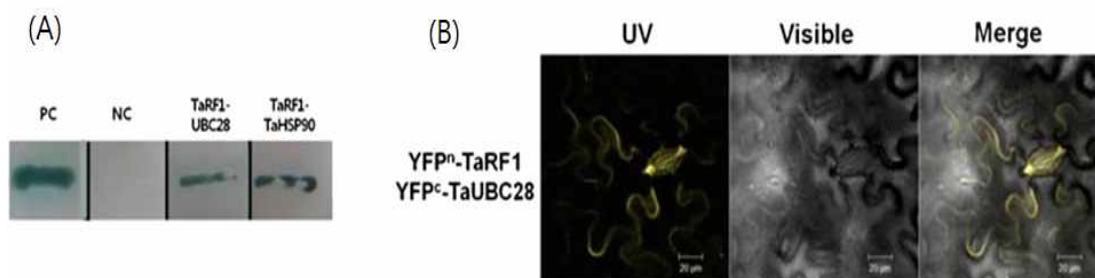


그림7-51. Detection of the interaction between TaRF1 and interacting proteins by the yeast 2-hybrid and BiFC assays. (A) The yeast 2-hybrid assay showing interactions between TaRF1 and TaRF1 interacting proteins (TaUBC28 and TaHSP90). (B) BiFC visualization of the TaRF1-TaUBC28 interaction in tobacco epidermal cells transiently coexpressing the proteins.

제8절 제4협동 블랙베리 유망돌연변이 계통의 품종 실용화 및 스테비아 육종 (한국스테비아(주), 김영호)

1. 블랙베리 유망돌연변이 계통의 품종 실용화

- 국내외적으로 건강한 먹거리에 대한 관심이 높아지면서 비타민과 항산화물질이 많은 기능성 생과류 등이 각광받고 있다. 이 중 블랙베리는 각종 비타민 B, C과 안토시아닌, 폴리페놀 등의 항산화물질이 풍부하고, 생과로서 맛도 좋다. 그러나 묘목생산이 어렵고, 종자 발아율이 떨어지며, 병충해에 대한 내병성을 가진 품종이 없으며, 수확시기 또한 늦어 초기 수확량이 적다. 또한 배의 발육과 후숙이 잘 이루어지지 않는 어려움으로 농가재배에 어려움이 있다. 본 과제에서는 이러한 문제점들을 극복하기 위하여 다수확성과 병충해에 강한 유망 돌연변이 계통을 특성 검정 후 대량증식, 재배 기술을 확립하고 품종화하여 농가에 경쟁력있고 고소득을 창출할 수 있는 품종을 보급하고자 하였다.

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

(1) 블랙베리 유망 계통 대량생산 체계 확립 및 품종화 준비

(가) 블랙베리 우수 변이체 조직배양 및 삽목에 의한 대량생산 기술 개발 및 묘목 대량 증식

- 대량생산 기술 개발을 위해 블랙베리의 우수변이체를 조직배양을 통하여 대량증식하고 기내 배양한 변이체를 순화하여 300평 시험포에 정식 후 2년생으로 실증재배 테스트를 수행하였다.

(나) 유망 계통 특성검정 및 품종출원 데이터 확보

- 유망 계통 특성검정 및 품종생산·수입판매 신고를 위한 데이터 수집을 위해 결실지 길이, 결과지 당 과실수, 가지수, 당도, 과중, 과실모양, 잎모양, 수확량 등을 조사하였다. 이 중 블랙베리 유용 돌연변이체 선발(잎색, 잎모양, 줄기색 등 변이체 10종 이상)하여 품종생산·수입판매 신고를 위한 특성검정을 실시하였다.

(다) 신 블랙베리 계통의 돌연변이 유기

- 우수변이체의 기내유식물체에 대하여 방사선(감마선)을 0~150Gy선량별로 처리 후 감수성을 테스트하고 잎색, 잎모양, 줄기색 변이체를 선발하였다.

(2) 블랙베리 우수변이체 특허출원 및 실증재배

(가) 블랙베리 우수변이체 특허출원

- 블랙베리 유용 돌연변이체 선발 후 '메이플'로 명명하고 조직배양을 통해 대량증식 하였다. 기내 배양한 유식물체를 순화하여 300평 시험포에 정식 후 3년생으로 실증재배 테스트를 수행하였으며, 품종생산·수입판매 신고하였다.

(나) 신품종 및 유망 계통 묘목대량 증식

- 블랙베리 신품종 '메이플'을 조직배양 및 삽수를 이용하여 대량생산 기술을 개발하고 묘목 6,000주 생산하였다.

(다) 신 블랙베리 유용 돌연변이체 선발

- 우수변이체의 종자 및 삽목묘에 대하여 화학적 돌연변이원(콜히친, NMU, NaN₃)을 농도와 처리기간에 따라 감수성을 테스트, 또한 방사선(감마선)을 선량에 따라 처리하여 감수성을 테스트하고 변이체를 선발하였다.

(3) 블랙베리 신품종 등록 및 재배법 확립

(가) 블랙베리 신품종 등록

- 블랙베리 신품종 '메이플'을 조직배양을 통해 대량증식하고 기내 배양한 유식물체를 순화하여 300평 시험포에 정식 후 연차 별로 실증재배 테스트를 계속 수행하였다.

(나) 농가 재배기술 개발 및 농가 실증재배

- '메이플'신품종을 정읍시, 고흥군 및 농가에 묘목을 기증하여 실증재배 테스트를 통하여 재배법을 교육하고 여러 지역에 맞는 품종인지 평가하기 위하여 적응 테스트 를 수행하였다.

(4) 블랙베리 신품종 및 재배법 농가보급 및 기능성 특화 상품 개발

(가) 블랙베리 신품종 및 재배법 농가보급

- 블랙베리 신품종의 재배법 농민 현장 교육을 위해 정읍시, 고흥군에서 지자체 블랙베리 신품종 실증재배 포장 운영 및 재배법 교육을 실시하였고, 민간육종가 및 농가 대상으로 블랙베리 신품종 재배법 및 돌연변이 육종관련 교육을 수행하였다.

(나) 신 돌연변이 선발 계통의 후대검정

- 블랙베리 우수 변이체의 실증재배 테스트를 통한 후대검정을 위해 블랙베리 우수 변이체를 맹아를 이용하여 기내 배양을 통하여 대량증식한 후, 기내에서 대량증식한 식물체를 순화기술을 이용하여 순화한 후 300평 규모의 시험포에 정식하여 4년차 실증재배 테스트를 수행하였다.

(다) 기능성 특화 상품개발 지원

- (주)태준과의 기술실시계약으로 블랙베리 묘목 판매 및 보급하였다. 또한 기능성 특화 상품의 개발 지원을 위해 2세부과제와 협의하여 간기능성 음료(헤베)의 상품화를 진행

중이다.

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) 블랙베리 유망 계통 대량생산 체계 확립 및 품종화 준비

(가) 우수 변이체를 근맹아를 이용하여 기내 배양을 통하여 대량증식, 기내에서 대량증식한 식물체를 순화기술을 이용하여 순화한 후 정식, 정식은 300평 시험포를 조성하여 실증재배 테스트를 수행하였다.



그림8-1. 우수변이체의 정식, 시설설치, 유인 등 실증재배 테스트

- 5월 중순~6월 초순 : 개화 및 수분
- 6월 초순~6월 중순 : 수정
- 6월 중순~6월 말 : 과실 비대
- 7월 초순~7월 중순 : 과실 비대 및 착색
- 7월 중순~8월 중순 : 과실 성숙 및 수확기
- 9월 중순 이후 : 전지 전정



그림8-2. 우수변이체 2년차 실증재배 테스트 장면

(1) 블랙베리 우수변이체 특허출원 및 실증재배

(가) 블랙베리 우수변이체 특허출원

- 기존 블랙베리 V-3 품종을 물리적·화학적 돌연변이원을 이용하여 돌연변이 유기를 시킨 후 우수변이체를 선발한 돌연변이 후대는 이전 국·내외 복분자 품종들의 떨어지는 수확량과 수확 시기가 6월 중순부터 15일정도로 장마기간과 겹치는 경우가 많아 병충해와 품질이 떨어지는 등의 문제점들을 보완하고 국내 환경에 맞는 내한성이 강한 품종으로 생산성과 품질이 우수하였다(표8-1).

표8-1. 우수변이 계통과 재래복분자 및 블랙베리 V-3 간의 생육량 비교

	재래복분자	V3	변이종-1	변이종-2
과중(g)	2.1	6.8	7.0	6.8
당도(Brix)	8.5 ~ 11	8 ~ 10	8.5 ~ 11	8.7 ~ 12
수확량(kg/주)	0.6	2.8	3.2	2.8
수확량(kg/평)	2.4	11.2	12.8	11.2
특징	병충해 약함, 수확량이 적음	병충해 강함 수확량 우수	당도 우수, 수확량이 많음	당도가 높고 내한성이 강함



그림8-3. 예비 품종 비교 및 격리재배 사진

(3) 우수변이체 계통의 기내 유식물체 돌연변이 유기 및 선발

- 블랙베리 근맹아에서 유도된 유식물체를 0.5mg/L의 kinetin이 함유된 MS기본배지에서 마디가 5~6개 정도 되도록 증식하였다. 유식물체를 정읍방사선과학연구소의 방사선조사실에서 감마선을 0~200Gy까지 조사하였다. 조사한 유식물체는 1주 동안 배양실에서 회복시킨 후 하위 마디에서 상위마디까지 분리하여 계대 배양하였다. 배양 후 45일에 치사, 초장, 가지수, 절간수 등의 생육상태를 조사하여 방사선 감수성을 평가하였다. 감마선을 조사한 유식물체의 마디별로 분리하여 계대 배양하여 조사 후 45일 만에 생육상태를 조사한 결과 감마선 20Gy까지는 생육에 큰 영향을 주지 않았고 40Gy부터 생육이 저해되는 현상을 보였다. 감마선 120Gy까지는 생육이 가능하지만 그 이상의 선량에서는 정식을 위한 순화에 접어들기까지 고사하여 생육이 불가능하였다. 블랙베리의 마디별 감수성은 하위 마디일수록 방사선 감수성이 높았고 돌연변이유기를 위한 적정선량은 60Gy 전후가 될 것으로 보여진다.

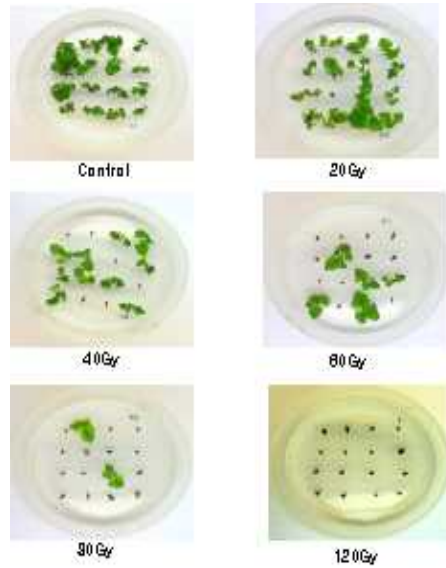


그림8-4. 블랙베리 기내배양에서의 감마선 조사의 영향

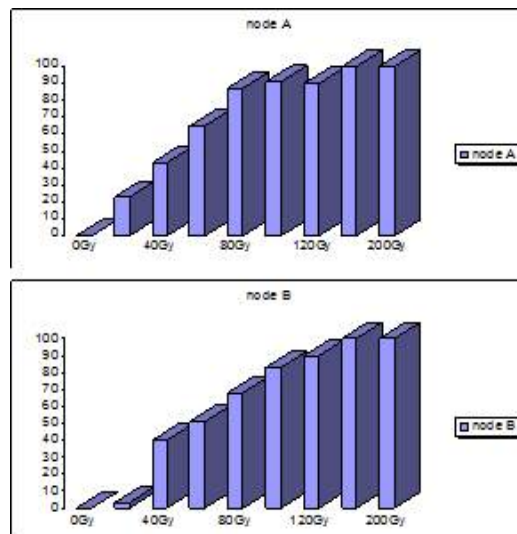


그림8-5. 블랙베리 기내배양에서 감마선 조사에 의한 치사율

표8-2. 신품종 ‘메이플’과 기 복분자 및 블랙베리 V-3 간의 생육량 비교

	기 복분자	블랙베리 ‘V-3’	블랙베리 ‘메이플’
과중(g)	1.95~2.38/개	4.38~6.83/개	4.75~6.93/개
과형	구형(직립)	타원형(도립)	타원형(도립)
당도	9~13brix	7~12brix	8~13brix
수확량(g/주)	600	4,000	4,500
숙기(채취기간)	6월중순부터 15일간	7월초부터 45일간	7월중순부터 45일간
노화시기	재식후 4~5년	재식 후 10년 이상	재식 후 10년 이상
병충해	우기에 잿빛곰팡이병	비교적 병충해 강함	내병성, 내한성 강함

가시
덕설치
식재간격

많음
I, Y, T자형
1.8m×40cm

없음
V자형
3m×50cm

없음
V자형
3m×50cm



기존 재배 복분자

블랙브이쓰리
(원품종)

메이플(신품종)

그림8-6. 재배 복분자, 블랙베리 원품종 및 신품종 '메이플'의 잎과 과실 모양

- 블랙베리 신품종 (메이플) 품종 생산/수입 판매신고

(*신고번호: 03-0019- 2010-2 *품종명청등록출원번호: 2010-1358)

- 블랙베리 신품종 메이플(출원번호:10-2010-0130380)

(4) 블랙베리 신품종 지자체 및 농가 실증재배포장 운영

- 메이플 신품종을 정읍시, 고흥군 및 농가에 묘목을 기증하고 실증재배를 통하여 재배법을 교육, 여러 지역에 맞는 품종인지 평가하기 위하여 적응 테스트를 수행하였다.



그림8-7. 블랙베리 신품종 '메이플'의 재배법 농가보급을 위한 현장교육 실시
(2012.7.31. 고산 실증재배 포장)

블랙베리(품종명: 메이플) 기술실시계약서

한국스타베리(주)이하 "갑"이라 한다)는 제1조의 연구사업에서 획득한 블랙베리(품종명: 메이플)의 실용화기술을 (주)바이오플러스(이하 "을"이라 한다)에서 이를 실시하게 하기 위하여 "을"에게 실시권을 제공하며, "을"은 그 대가로 "갑"에게 제4조에 의한 기술료를 지급하기로 하고 "갑"과 "을"은 아래와 같이 계약을 체결한다.

제 1 조(기술)
 ① 본 계약에서 "갑"이 "을"에게 이전하는 기술은 농림수산식품부 "돌연변이 육종기술을 활용한 신종종 개발(2008. 12. 20 - 2013. 12. 15)" 과제의 최종과제인 "블랙베리 육종을 위한 돌연변이 육종 기술" 및 "스타베리 육종" 과제에서 획득한 블랙베리(품종명: 메이플)의 실용화기술이다.

제 2 조(실시권)
 ① "갑"은 "을"에게 본 계약의 조건에 따라 제1조의 기술을 실시하는데 동의하며 기술실시권(이하 "실시권"이라 한다)을 부여한다.
 ② 전항의 실시권이긴 함은 "갑"이 제공한 기술을 이용·실시하여 "을"이 재판을 생산, 판매하는 권리를 말하며, "을"은 본 계약상의 실시권을 "갑"의 사전 동의 없이 제3자에게 제공하거나 양도할 수 없다.

제 3 조(기간 및 대상)
 ① 본 계약기간은 계약체결일로부터 3년으로 한다.
 ② 계약기간 중 권역, 품종, 재배지 지정사항에는 "메이플"을 공급하여 이의 사업할 한 기존의 블랙베리 품종(블랙3, 천문, 유과 등)은 품종 지정사항에는 공급하지 않는다.

제 4 조(기술료)
 "을"은 "갑"에게 실시권의 제공 대가로 매출액 발생년도부터 계약기간 종료년도 말일까지 매년 이전기술을 이용한 제품 판매액(기술료)의 10%에 해당하는 금액을 경상기술료로 지급하여야 한다.

제 5 조(기술료의 납부 기간 및 시기)
 경상기술료 산정을 위한 매출액의 산정은 매년 1월 1일부터 12월 31일까지 이전기술을 이용한 "을"의 매출액 실적 자료로 하며, "을"은 매출액 실적 자료에 의거 산정한 경상기술료를 다음달 2월 말일까지 "갑"에게 지급하여야 한다.

제 6 조(자료의 제공 및 조사)
 ① "을"은 경상기술료 납부시 관련 세부자료 등 공인된 기술료 산출근거를 "갑"에게 제시하여야 한다.
 ② "갑"은 "을"이 납부하여야 할 경상기술료 금액 확인을 위하여 필요하다고 인정되는 경우 공인회계사로 하여금 "을"의 회계장부 등 관련 서류를 열람 할 수 있다.

제 7 조(기술의 개량)
 "을"은 블랙베리의 신종종을 개발 할 수 있으나 본 계약 기간에는 사업할 수 없다.

제 8 조(비밀보장)
 "갑"과 "을"은 기술이 제3자에게 제공되거나 누설되지 아니하도록 기밀을 유지하여야 하며, 그 임의이나 임의자 또는 승계인을 통하여 위약되지 아니 하도록 필요한 조치를 취하여야 한다.

제 9 조(계약의 효력)
 ① "갑"과 "을"은 다음 각 조의 사유 중 하나가 발생하였다고 인정할 때에는 본 계약을 해지할 수 있다.

1. "을"이 기술의 이용, 실시를 포기한 때
 2. "을"이 조항을 위반하여 상당 기간 동안 조항이 재개될 가능성이 없다고 판단할 때
 3. "을"이 정당한 이유 없이 기술료를 납부하지 아니한 때
 4. "갑"과 "을"이 본 계약상의 의무이행을 거절할 한 때
 5. 기타 본 계약의 목적을 달성할 수 없는 사유가 발생한 때
- ② 제1항의 사유로 본 계약이 해지되는 경우 "갑"은 이미 징수한 기술료를 일절 환급하지 아니한다.

제 10 조(계약의 목적)
 ① 본 계약의 목적에 있어서 중요한 요건이, 본 계약서에 명시되지 아니한 사항은 거래의 관행과 신의성실의 원칙에 따라 해석하고 처리한다.
 ② 제1항의 규정으로도 처리하기 곤란한 사항에 대해서는 성의에 의한다.

제 11 조(분쟁의 해결)
 본 계약과 관련하여 당사들 간에 발생하는 분쟁, 논쟁 또는 의견 차이는 대한민국재판관의 당사중재규칙상의 신속중재에 의한 중재로 최종 해결한다.

제 12 조(준거법령)
 본 계약은 "갑"과 "을"의 서명 또는 날인한 날로부터 유효하다.

"갑"과 "을"은 본 계약을 성실과 신의에 입각하여 수행할 것을 약속하며, 계약서 2부를 작성하여 각각 1부씩 보관한다.

2012. 2. 17.

갑 권역 경영사 임영민 법치관 538-12 한국스타베리 주식회사 404-81-12522 대표 : 임 영 민	을 권역 연구관 고선면 소항관 793-1 주식회사 태운 402-81-92909 대표 : 유 영 린
---	--

그림8-8. 블랙베리 신종 '메이플'의 기술실시계약서 (2012.2.17. (주)바이오플러스:(주)태운)

표8-3. 블랙베리 신종 품목 보급 내역 ((주) 바이오플러스)

블랙베리 신규식재 분양 내역		
대상자	사업량(m ²)	묘목수(주)
전체	19,809	8000
정읍 옹동 권혁빈	3,765	1520
정읍 감곡면 송의수	990	400
정읍 고부면 이오형	4,160	1680
정읍 고부면 노경수	3,665	1480
정읍 상동 김경옥	990	400
정읍 부전동 이성태	990	400
정읍 상동 신채우	1,981	800
정읍 칠보면 김효선	3,268	1320

(5) 신 돌연변이 선발 계통의 후대검정

- 블랙베리 우수 변이체의 실증재배 테스트를 통한 후대검정 수행 블랙베리 우수 변이체를 멩아를 이용하여 기내 배양을 통하여 대량증식한 후, 기내에서 대량 증식한 식물체를 순화기술을 이용하여 순화한 후 300평 규모의 시험포에 정식하여 4년차 실증 재배 테스트를 수행 중이다.



그림8-9. 블랙베리 우수 변이체의 4년차 실증재배 사진(고산 실증재배 포장)

2. 스테비아 신품종 육종

- 스테비아는 대체감미료 시장의 확대로 각광받고 있으며, 현재 재배되고 있는 품종은 20여년 전 일본에서 개발된 품종인 일본 2가 아시아 전역에서 재배되고 있고, 국내에서는 1973년에 들여와 수원 2호, 수원 11호 등이 육종, 재배된 바 있으나 생산량이 적으며, 감미성분 또한 적은 문제점이 있었다. 또한 오래전 개발된 품종이 장기간 재배되면서 품종의 고유성을 잃어버렸거나 재배면적이 적어지고 있는 실정이다. 그래서 보다 감미성분 함량이 높고 생산성이 좋으며, 국내 재배환경에 맞는 스테비아 신품종 육종이 절실히 필요하다.

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

(1) 스테비아 물리적·화학적 돌연변이원을 이용한 돌연변이 유기 및 우수변이체 선발

(가) 스테비아 조직배양을 통한 재분화 체계 확립

- 스테비아 유식물체에 감마선을 조사하여 1주 동안 배양실에서 회복기를 거친 후 마디별로 분리하여 계대배양하였고 45일 후에 치사, 초장, 가지수, 절간수 등의 생육상태를 조사하여 방사선 감수성을 평가하였다. 방사선조사는 정읍방사선과학연구소의 감마선 조사실을 이용하였다.

(나) 스테비아 기내·외 돌연변이원을 이용한 돌연변이 유기 및 선발

- 스테비아의 종자 및 삼목묘에 화학적·물리적 돌연변이원(콜히친, NMU, NaN₃, 감마선)을 처리하여 돌연변이를 유기 후, 잎색, 잎모양, 잎두께, 털의 유무, 초장, 맛, 내병성 등을 고려한 변이체 30종 이상을 선발하였다.

(2) 스테비아 우수변이체 선발, 기능성물질 함량 테스트 및 2세대 우수변이체 선발

(가) 스테비아 우수변이체 선발 및 돌연변이원을 이용한 2차 돌연변이 유기

- 스테비아의 기내 유식물체에 감마선 선량별로 조사하여 감수성 테스트를 수행하였고 유기된 돌연변이로부터 우수한 변이체를 선발하였다.

(나) 우량 변이체의 기능성물질 함량 및 내병성 테스트

- HPLC를 이용, 스테비아 식물체로부터 분리한 스테비오사이드와 레바우디오사이드 A의 함량을 분석하였다. 또한 내병성 검정을 위해 실증포장에서 재배하며 검정하였다.

(다) 변이체 후대(M2) 검정 및 우수변이체 선발

- 변이체 후대(M2)를 DNA 분석을 통하여 변이율을 검정하고 이 중 우수변이체를 선발하였다.

(3) 스테비아 우수변이체 선발 및 대량생산 체계 확립

(가) 스테비아 최종 우수변이체 선발 및 기능성물질 함량 테스트

- 선발된 변이체 15종의 잎을 추출하여 스테비오사이드, 레바우디오사이드 A 및 스테비올의 함량을 분석하고 실증포장에서 적응성 시험을 수행하였다.

(나) 스테비아 우수변이체 대량생산 체계 확립

- 우수 변이체의 맹아를 이용, 기내 배양을 통하여 대량 증식하고, 대량 증식한 식물체를 순화 기술을 이용하여 순화한 후 300평 시험포에 정식 후 실증재배 테스트를 수행하였다.

(4) 스테비아 우수변이체 특허출원 및 신품종 실증재배 후 재배법 확립

(가) 스테비아 우수변이체 특허/신품종 출원

- 우수변이체 10 계통 중 성분분석 결과와 내병성 및 품질이 우수하 3 계통을 선발하여 실증재배 기간 중 특성을 조사하고 국립종자원에 신품종 출원을 진행하였다.

(나) 농가보급을 위한 실증재배법 확립

- 스테비아 신품종의 재배법 확립을 위해 고산 및 정읍 포장 내에서 실증재배를 수행하였다.

(다) 지역 농가 실증 재배

- 선발된 우수 변이체를 고산 및 정읍 시험포에 정식 후 실증재배 테스트를 수행하였다.

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) 스테비아 물리적·화학적 돌연변이원을 이용한 돌연변이 유기 및 우수변이체 선발

(가) 스테비아 조직배양을 통한 재분화 체계 확립

- MS기본배지에 계대배양한 스테비아 유식물체에 감마선을 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 200Gy를 조사하였다, 방사선조사는 정읍방사선과학연구소의 감마조사실을 이용하였다. 감마선을 조사한 유식물체는 1주 동안 배양실에서 회복기를 거친 후 마디별로 분리하여 계대배양하였고 45일 후에 치사, 초장, 가지수, 절간수 등의 생육상태를 조사하여 방사선 감수성을 평가하였다.
- 감마선을 조사한 유식물체의 마디별로 분리하여 계대배양하여 조사 후 45일만에 생육상태를 조사한 결과 60Gy까지는 별 영향을 미치지 않았으나 80Gy 부터 생육이 좋지 않았고 150Gy 까지는 생육이 가능하였으며 200Gy에서는 생존하는 개체가 일부 관찰되었다. 마디별 방사선 감수성은 하위 마디일수록 높은 것으로 나타났으며 타 식물에 비해 스테비아는 방사선 감수성이 강한 편으로 나타났다. 그러나 200Gy 선량에서는 정식을 위하여 순화과정까지 살아 남지 못하고 고사하였다. 일반적으로 식물은 정단 우세현상이 있어 하위마디의 잠아일수록 원기내의 시원세포수가 적어 solid mutation을 얻을 수 있기에 하부 마디의 감수성은 주목할 만하다.

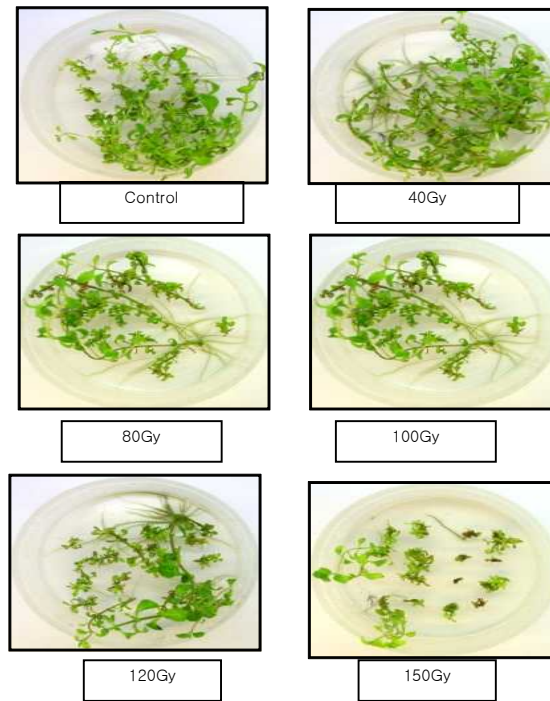
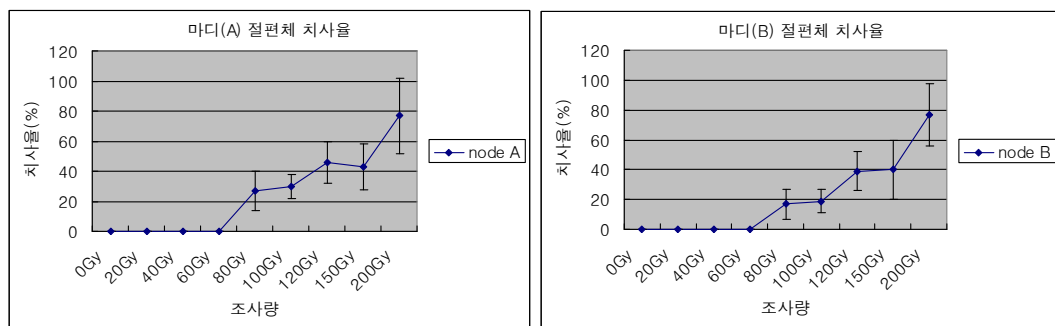


그림8-10. 기내배양한 스테비아 유식물에 감마선 조사에 의한 효과

(나) 스테비아 기내·외 돌연변이원을 이용한 돌연변이 유기 및 선발

- 기내배양한 스테비아의 유식물체에 감마선을 선량별로 조사하고 마디별로 구분하여 45일간 배양한 후 마디별 치사율을 조사한 결과 가장 하위 A 마디의 치사율은 60Gy까지는 0%이었고, 80Gy는 27%, 100Gy는 30%, 120Gy는 46%, 150Gy는 43%, 200Gy는 77%이었다. 100Gy까지는 치사율에 큰 영향을 미치지 못하였고 120Gy 이상에서 치사율이 현저히 증가하였다. B 마디에서는 60Gy까지 0%이었고 80Gy는 17%, 100%는 19%, 120Gy는 39%, 150Gy는 40%, 200Gy는 77%이었으며 B 마디의 치사율은 A 마디와 비슷한 경향을 보였다. C 마디는 60Gy까지 0%, 80Gy는 11%, 100Gy는 12%, 120Gy는 33%, 150Gy는 23%, 200Gy는 73%이었다. C 마디는 159Gy에서 치사율이 23%로 낮았는데 이것은 실험오차인 것으로 생각된다. D 마디는 80Gy까지 0%, 100Gy는 5%, 120Gy는 30%, 150Gy는 7%, 200Gy는 60%로 나타났다. D 마디의 치사율도 150Gy에서 7%로 현저히 낮았는데 실험상 착오가 있었던 것으로 사료된다. 가장 상위마디인 E 마디는 80Gy까지 0%, 100Gy는 3%, 120Gy는 21%, 150Gy는 3%, 200Gy는 50%이었다.



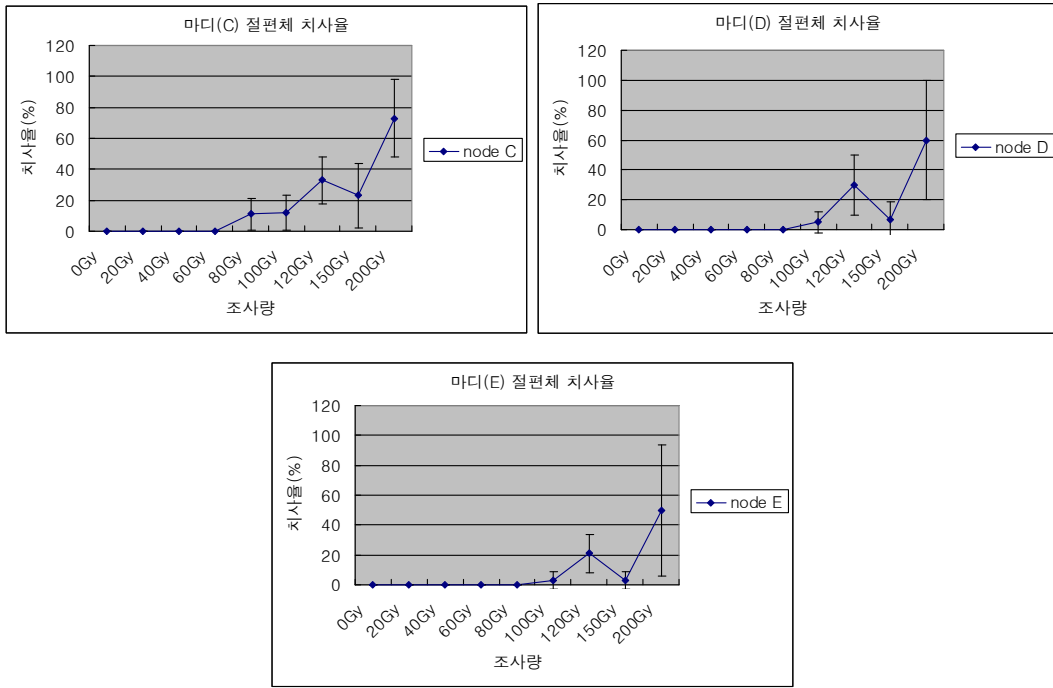
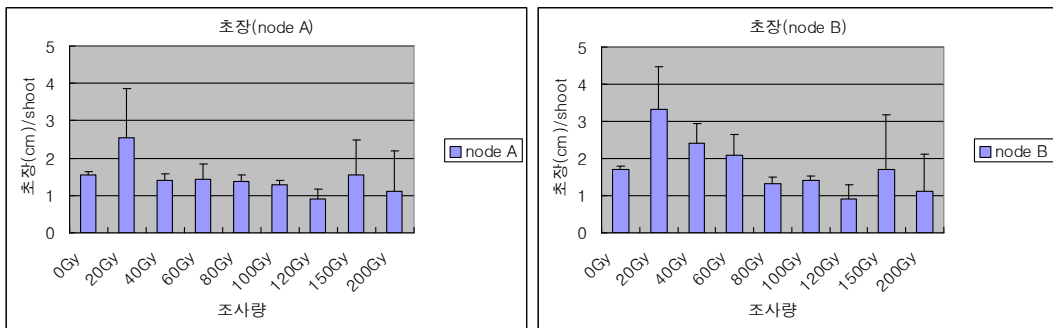


그림8-11. 스테비아 기내 배양 유식물체의 감마선 조사에 의한 치사율 검정

- 감마선을 조사한 후 마디별로 구분하여 배양한 유식물체의 초장은 A 마디의 무처리기는 1.5cm, 20Gy는 2.6cm, 40Gy는 1.4cm, 60Gy는 1.4cm, 80Gy는 1.4cm, 100Gy는 1.3cm, 120Gy는 0.9cm, 150Gy는 1.6cm, 200Gy는 1.1cm이었으며 가마선 20Gy 조사에서는 오히려 초장이 증가하는 현상을 나타내었다. B 마디의 무처리기는 1.7cm, 20Gy는 3.3cm, 40Gy는 2.4cm, 60Gy는 2.1cm, 80Gy는 1.3cm, 100Gy는 1.4cm, 120Gy는 0.9cm, 150Gy는 1.7cm, 200Gy는 1.1cm이었고 B 마디에서도 20Gy와 40Gydp 공히 초장이 증가하였다. C 마디의 무처리기는 1.8cm, 20Gy는 2.9cm, 40Gy는 2.2cm, 60Gy는 2.0cm, 80Gy는 1.6cm, 100Gy는 1.5cm, 120Gy는 1.0cm, 150Gy는 1.5cm, 200Gy는 1.5cm이었다. D 마디의 무처리기는 1.9cm, 20Gy는 2.8cm, 40Gy는 2.8cm, 60Gy는 2.2cm, 80Gy는 1.8cm, 100Gy는 2.1cm, 120Gy는 1.0cm, 150Gy는 1.9cm, 200Gy는 0.6cm이었다. C와 D 마디에서도 20Gy와 40Gy에서 증가하였다. 무처리기는 1.9cm, 20Gy는 2.5cm, 40Gy는 2.9cm, 60Gy는 2.4cm, 80Gy는 2.1cm, 100Gy는 2.1cm, 120Gy는 1.2cm, 150Gy는 1.7cm, 200Gy는 1.7cm이었으며 20Gy와 40Gy에서 증가하였다.



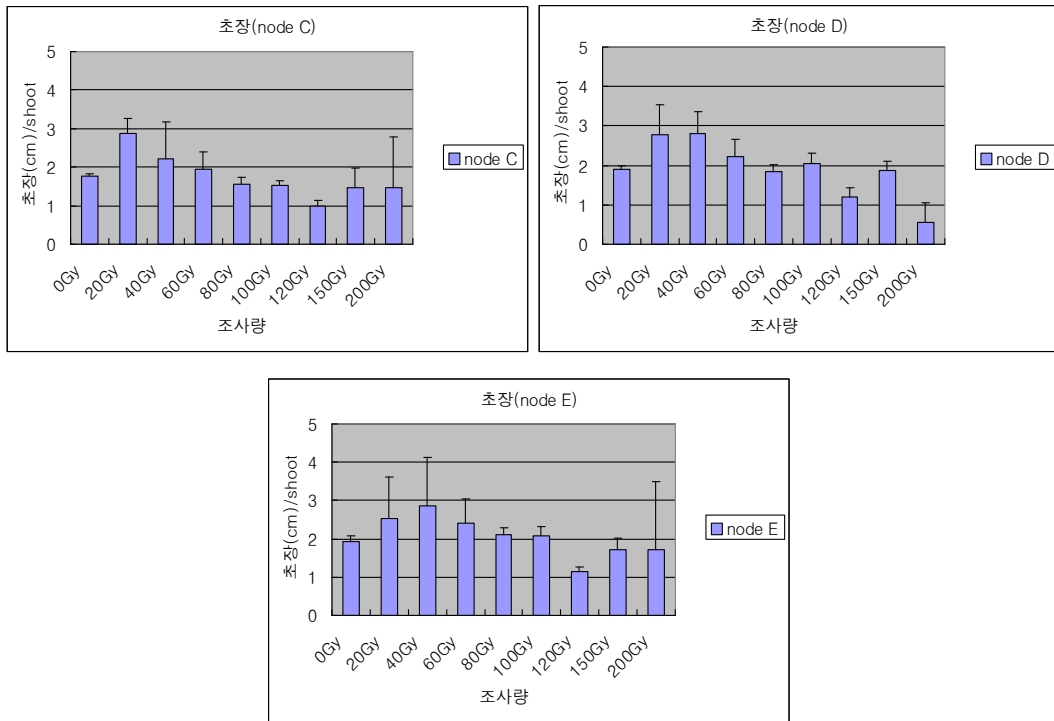
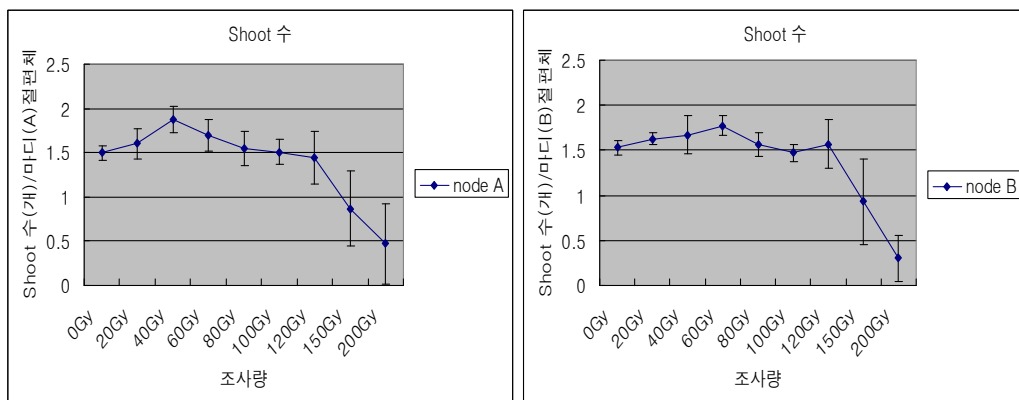


그림8-12. 스테비아 기내 배양 유식물체의 감마선 조사에 의한 초장 변화

- 각 마디별 줄기(shoot)수를 보면 A 마디의 무처리는 1.5개, 20Gy는 1.6개, 40Gy는 1.9개, 60Gy는 1.7개, 80Gy는 1.6개, 100Gy는 1.5개, 120Gy는 1.4개, 150Gy는 0.9개, 200Gy는 0.5개로 나타나 감마선 120Gy 이상의 선량에서 감소했지만 나머지 그 이하 선량에서는 큰 차이가 없었다. B 마디는 무처리 1.5개, 20Gy는 1.6개, 40Gy는 1.7개, 60Gy는 1.8개, 80Gy는 1.6개, 100Gy는 1.5개, 120Gy는 1.6개, 150Gy는 0.9개, 200Gy는 0.3개이었는데 역시 120Gy 이상의 감마선 조사에서 감소하였고 그 이하 선량에서는 별 차이가 없었다. C 마디는 무처리 1.6개, 20Gy는 1.8개, 40Gy는 1.6개, 60Gy는 1.7개, 80Gy는 1.5개, 100Gy는 1.5개, 120Gy는 1.6개, 150Gy는 1.2개, 200Gy는 0.4개이었으며, D 마디의 무처리는 1.6개, 20Gy는 1.7개, 40Gy는 1.6개, 60Gy는 1.6개, 80Gy는 1.4개, 100Gy는 1.5개, 120Gy는 1.4개, 150Gy는 1.4개, 200Gy는 0.5개로 나타났다. 가장 상위 E 마디는 무처리 1.6개, 20Gy는 1.7개, 40Gy는 1.5개, 60Gy는 1.5개, 80Gy는 1.4개, 100Gy는 1.5개, 120Gy는 1.5개, 150Gy는 1.4개, 200Gy는 0.7개이었다.



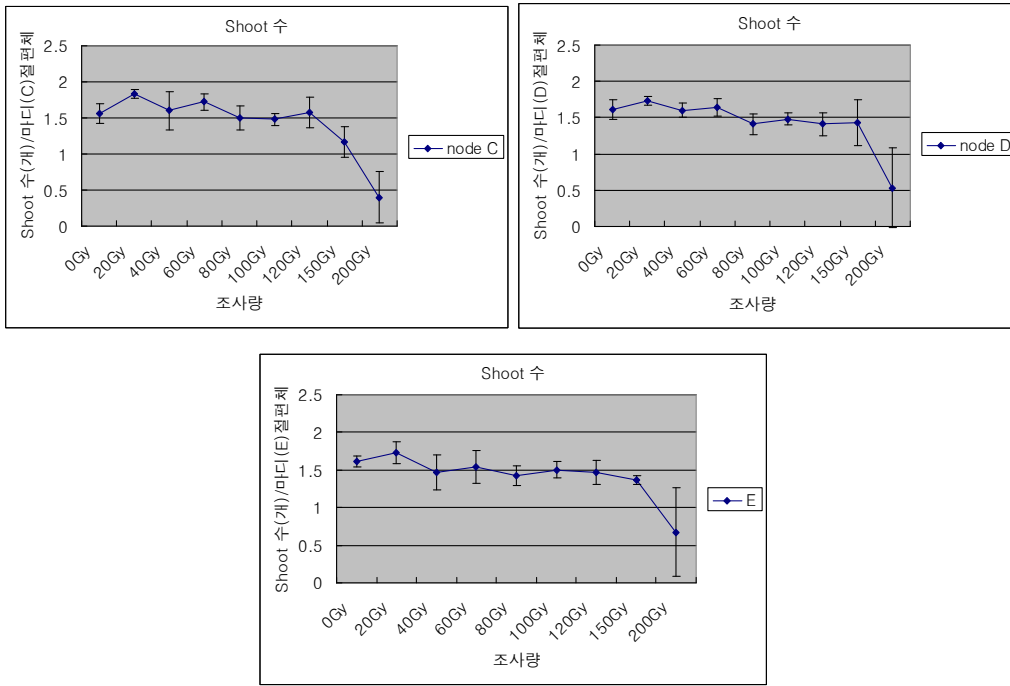


그림8-13. 스테비아 기내 배양 유식물체의 감마선 조사에 의한 초장 수



그림8-14. 스테비아 변이체 및 실증재배 사진



그림8-15. 스테비아 변이체 및 선발 포장 및 실증재배 사진

(2) 스테비아 우수변이체 선발, 기능성물질 함량 테스트 및 2세대 우수변이체 선발

(가) 우량 변이체의 기능성물질 함량 및 내병성 테스트

- 감마선 및 화학적 돌연변이원을 이용하여 종자 및 삽수에 처리한 후 파종한 스테비아의 잎을 계통별로 채취하여 음건 후 분쇄하여 -78℃ 냉동고에 보관하였다. 계통별 스테비아 잎을 수확한 후 음건하여 사용하였다. 각 시기별 건조 시료 4 g에 에탄올(40 mL)를 코니칼 튜브에 넣고 30℃에서 24시간 교반하여 추출물을 얻었다(Table 1). 추출한 여액은 0.45 μm 실린저 필터를 이용하여 필터 후 용매를 제거하였다. 추출물을 10 mg/mL의 농도로 녹여 HPLC에 주입하여 분석하였다. HPLC는 agilent technology 1200 series를 사용하여 분석하였다. pump system은 quaternary pump를 사용하였으며 컬럼은 Agilent사의 ZORBAX SB-aq(5 μm, 4.6×150 mm)을 사용하였으며 이동상은 물 (A, 0.1% trifluoroacetic acid)과 아세트니트릴(B, 0.1% trifluoroacetic acid)을 이용하여 기울기 용리를 이용하여 분석하였다. 스테비아는 1분자의 steviol 과 3분자의 glucose로 이루어진 디테페노이드계 화합물인 스테비오사이드 외 스테비오바이오사이드, 레바우디오사이드 A, B, C, D, E, 그리고 dulcoside A 가 주로 잎에 함유되어 있다(Nishiyama 등, 1992; Chalapathi와 Thimmegowda, 1997). 잎에 함유되어 있다. 스테비올은 이 들 디테페노이드계 화합물의 전구물질로 가능한 한 함량이 낮은 계통일수록 우수한 계통이라고 할 수 있다. 본 연구에서 선발하는 변이계통 중에 스테비올 함량은 낮고 스테비오사이드나 레바우디오사이드 A 함량이 높은 계통의 선발이 바람직한 수단이라고 생각되기 때문에 선발계통을 대상으로 성분분석을 실시하였다. 스테비올 함량은 전혀 검출되지 않는 계통에서부터 가장 높은 계통의 함량은 13.5 g/kg이었다. 스테비오사이드 함량은 가장 낮은 계통의 함량이 90.6 g/kg이었고 가장 높은 계통의 함량은 367.9 g/kg이었다. 레바우디오사이드 A의 함량은 가장 낮은 계통의 함량이 2.1 g/kg이었고 가장 높은 계통의 함량은 19.9 g/kg이었다.

스테비올은 스테비오사이드와 레바우디오사이드 A의 전구물질로 알려져 있어 제품용으로써 활용가치가 높은 계통으로는 스테비올 함량이 낮고 스테비오사이드나 레바우디오사이드 A의 함량이 높은 계통의 선발이 바람직하다고 볼 수 있다. 특히 스테비오사이드보다 레바우디오사이드 A 함량이 높은 계통의 선발이 보다 실용성이 있는 것으로 판단되기에 변이계통 중 레바우디오사이드 A 함량이 높은 계통을 선발하는 것을 목표로 하고 있다.

표8-4. 스테비아 변이계통 잎의 스테비올, 스테비오사이드, 레바우디오사이드 A의 함량

Treatment	Content(g/kg, extract)		
	Steviol	Stevioside	Rebaudioside A
Control	9.4	219.0	2.3
①R50-5-25	0.8	239.5	9.5
②R50-6-112	6.1	260.9	10.0
③R50-9-85	2.9	205.5	6.8
④R50-20-28	2.0	180.4	2.8
4			
⑤R100-11-2	7.4	225.8	9.5
13			

⑥R100-23-3 84	5.1	92.5	18.3
⑦R150-4-11 7	3.6	248.7	13.7
⑧R150-10-1 95	3.8	244.9	12.6
⑨R150-17-2 35	3.3	367.9	2.9
⑩R150-26-2 56	5.1	251.1	3.1
⑪R200-12-8 4	7.3	259.7	12.7
⑫R200-13-1 39	2.3	216.6	4.6
⑬C5-7-64	3.5	207.2	4.4
⑭C10-8-128	3.2	201.2	9.8
⑮C15-21-16 9	4.3	172.2	2.1
⑯S2-25-57	5.2	178.9	11.4
⑰S2-31-83	8.3	257.9	2.9
⑱S4-16-109	7.7	203.2	2.6
⑲S4-22-157	1.5	112.1	16.9
⑳S6-19-207	6.2	268.5	2.7
㉑N2-14-48	7.1	263.2	2.7
㉒N4-15-72	0.5	241.3	5.8
㉓N4-24-136	4.3	266.6	2.7
㉔N4-29-152	9.2	257.3	2.5
㉕N4-30-189	8.0	220.6	2.3
㉖N6-27-216	7.8	281.9	2.8

(다) 변이체 후대(M2) 검정 및 우수변이체 선발

- DNA 분석을 통한 유연관계 분석

ABI3310XL을 통해 확보된 DNA profile들은 Gene Mapper software (Applied Biosystems, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 다형성분석은 형광값이 50이상의 peak 으로 나타날 때 (1), 50 이하의 peak은 (0)으로 분리되도록 프로그램을 돌렸다. 얻어진 값들은 NTSYSpc version 2.0 (Exeter Software, Setauket, N.Y.) 프로그램을 이용하여 다형성 분석에 이용하였다. Phylogenetic tree는 UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic averages) 방법을 이용하였으며, Euclidean distance는 PCoA (Pricpal Coordinate Analysis) 분석방법을 이용하였다.

- AFLP 분석

분자마커시스템은 유전적 근연관계를 규명하는데 있어서 매우 유용하여 콩(Maughan 등, 1996), 옥수수(Ajmone 등, 1998), 양배추와 무우(권 등, 2003), 무궁화(김 등, 2009), 양마(김 등, 2010) 등 여러 작물에 이용되고 있다. 분자마커에는 AFLP, RAPD, RFLP 등 다양한 종류가 있다. AFLP는 식물의 유전자 염기서열이 밝혀지지 않은 작물에도 이용 가능하며, 1bp의 작은 염기차이도 구분할 수 있는 장점이 있다. 본 실험에서 이용한

capillary system은 신속정확하게 대량 분석이 가능하다는 장점을 가지고 있다. 13조합의 primer를 이용하여 분석한 결과 총 1,591개의 AFLP profile을 얻을 수 있었으며 그중 1,458개가 polymorphic peak으로 조합별 평균은 112개 였다. Primer조합에 따라 polymorphism은 81~96%를 보였으며, 92%의 평균을 보였다. 스테비아 26계통간의 근연관계는 UPGMA(Unweight Pair Group Method with Arithmetic averages) 방법을 이용하여 분석하였으며, 그 결과 0.87 coefficient값에서 2개의 그룹으로 나뉘었다. 또한 PCoA(Pricipal Coordinate Analysis) 분포도를 분석한 결과에 UPGMA 결과를 적용하여 보면, 그룹 1은 다시 4개의 소그룹으로 나뉠 수 있었다.

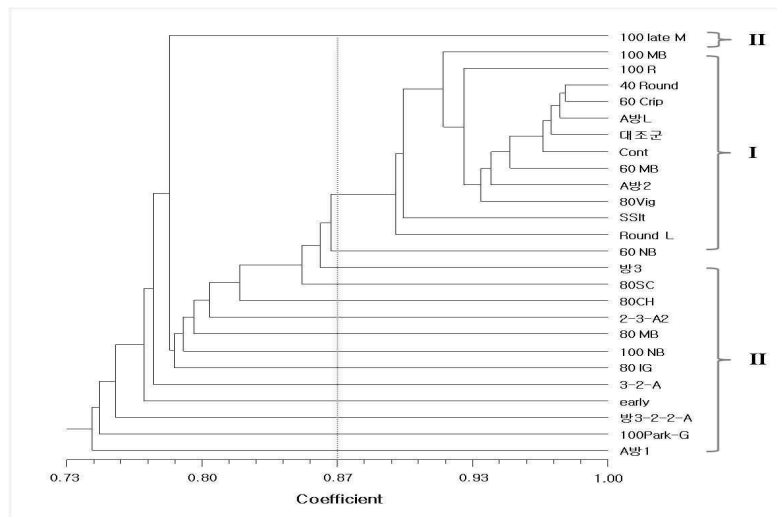


그림8-16. Dendrogram of 26 Stevia lines by unweighted pair grouping method of averages (UPGMA) cluster analysis using polymorphic peak profiling generated from the AFLP analysis.

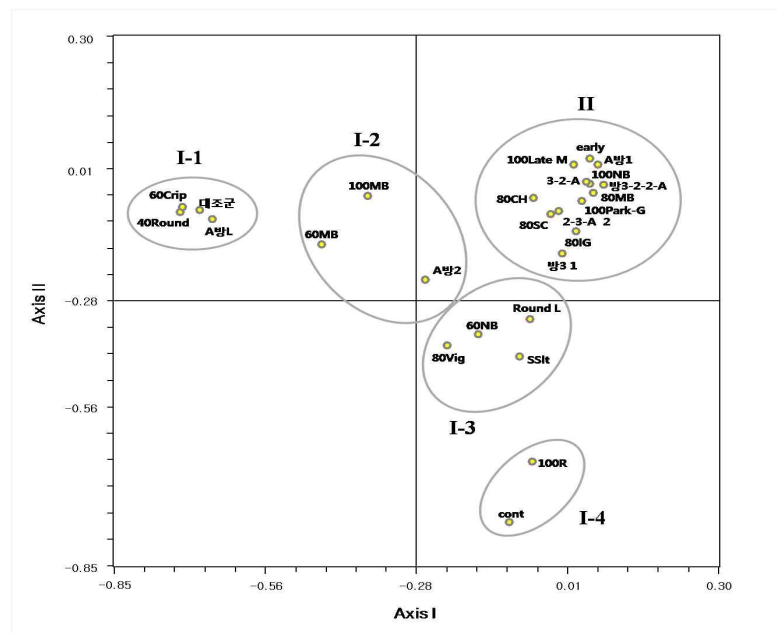


그림8-17. 2D Pricipal Coordinate Analysis (PCoA) of 24 varieties based on AFLP data.

(3) 스테비아 우수변이체 선발 및 대량생산 체계 확립

- 우수변이체를 총 10계통을 선발하여 M₁V₃세대로 공시하고 각 개체별로 근맹아로부터 나온 10~15개의 shoot를 정아가 포함된 3~4개 마디의 삽수를 채취하여 삼목하였고 이를 2회 반복하여 한 계통당 100~150개체들을 증식하였다



그림8-18. 스테비아 우수변이체 선발 및 실증재배 포장

(4) 스테비아 우수변이체 특허출원 및 신품종 실증재배 후 재배법 확립

(가) 스테비아 우수변이체 특허/신품종 출원

- 우수변이체 10계통(M₁V₃세대)를 각 개체별로 근맹아로부터 나온 10~15개의 shoot를 정아가 포함된 3~4개 마디의 삽수를 채취하여 삼목하였고, 이를 2회 반복하여 한 계통당 100~150개체들을 증식하였다. 이 중 성분분석 결과와 내병성 및 품질이 우수한 3 계통을 선발하여 각각 '다감', '다정', '다미'로 명명하고 실증재배 기간 중 특성을 조사하고 국립종자원에 신품종 출원을 진행 중이다.



그림8-19. 스테비아 신품종 '다감'사진



그림8-20. 스테비아 신품종 '다정'사진



그림8-21. 스테비아 신품종 '다미' 사진

(나) 농가보급을 위한 실증재배법 확립

- 재배적지 : 스테비아는 천근성이므로 습해에 아주 약하여 재배적지는 지하수위가 낮고, 토심이 깊으며 물빠짐이 좋은 토양이 좋다.
- 정식전 토양관리 : 삼목 2~3주 전 이랑을 만들어 토양 모세관이 형성되어 정식했을 때 뿌리의 활착이 용이하며, 화학비료나 염분이 많은 계분사용은 하지 말아야 한다. 또한 삼목토는 상토와 질석을 1:1로 섞어 사용하는 것이 좋다.
- 삼목 선정 방법 : 삼목수의 길이는 15~20 cm가 좋으며 묘목 두께는 직경이 굵으나 목 질화가 되지 않은 부분까지 사용한다.
- 봄 정식 : 토양이 해빙된 후 3월 중순 전후에 심는 것이 가장 적당하며 늦어도 4월 중순(맹아가 트기 전까지) 이전에 심어야 한다.
- 가을 정식 : 늦가을 낙엽이 완전히 진 후 11월 중순에 심는 것이 가장 적당하며 늦어도 12월 초순 전에 정식하여야 한다.
- 정식 후 관리 : 어린 묘목을 정식한 후 식재 시 충분히 물을 주고, 토양 수분을 관찰하며 뿌리가 완전히 활착할 때 까지 1~2회 물을 준다.
- 수확 시기 : 수확은 감미성분이 가장 많이 축적되었을 때(스테비오사이드 함량이 가장 높은 시기)인 개화기 직전이 가장 좋다.

(다) 지역 농가 실증 재배

- 선발된 우수 변이체를 고산 및 정읍 시험포에 정식 후 실증재배 테스트를 수행하였다.



그림8-22. 스테비아 우수변이체 실증재배 포장

제9절 제5협동 돌연변이 기술을 이용한 산업용 고구마 품종육성 (시립대 김선형)

1. 돌연변이 육종을 위한 in vitro system 확립 및 유용 돌연변이 유도

가. 고구마 생장점을 이용한 배발생 캘러스 유도 및 재분화시스템 확립

고구마의 생장점을 이용한 배발생 캘러스 유도 및 재분화 체계는 주요 보급품종인 율미 및 신건미를 대상으로 이루어 수행하였다. 생장점을 1mm이하의 크기로 적출하여 식물생장조절물질이 첨가된 배지에 치상후 캘러스 형성 등을 조사하였다(그림 1). 효과적인 배발생 캘러스 형성을 알아보기 위해 2,4-D 1~4mg/L 및 4-FA 1~3mg/L가 첨가된 배지에 치상한 결과 2,4-D는 2-3mg/L에서 캘러스 형성이 효과적이었으나, 농도가 높아지면서 약간 갈변되면서 캘러스 생장이 지연되는 경향을 나타내었다. 한편 4-FA 처리구에서는 2mg/L 첨가시 노란색의 둥근 배발생 캘러스의 형성이 잘 이루어졌다. 또한 2,4-D처리구에서는 전반적으로 무르며 비배발생 캘러스가 많이 발생하는 것으로 나타났으며, 처리간에는 4-FA 캘러스 유도 효율이 뛰어난 것으로 나타났다. 캘러스의 유지 및 증식은 2,4-D 1mg/L에서 효율적으로 이루어졌다. 4-FA 1mg/L의 처리는 캘러스의 유지 및 증식에는 부적적하였으나, 체세포배 및 shoot분화를 촉진시키는 것으로 나타났다(그림 2). 따라서 고구마 생장점을 이용한 재분화에는 캘러스의 유도에는 4-FA 2mg/L, 캘러스의 증식 및 유지에는 2,4-D 1mg/L, 캘러스로부터 재분화식물체의 유기에 4-FA 1mg/L의 적용이 효율적인 것으로 나타났다.

2,4-D 2.0mg/L 2,4-D 3.0mg/L 2,4-D 4.0mg/L 4FA 2.0mg/L

그림9-1. 고구마 생장점으로부터 캘러스 유도 및 식물호르몬에 따른 캘러스 상태

Embryogenic callus Shoot formation Regenerated plant

그림9-2. 배발생 캘러스 형성 및 식물체 재분화

나. 방사선 조사를 통한 돌연변이 유도선발 및 배수체 육성

(1). 율미 돌연변이라인의 유도 및 선발

감마선 50GY를 처리한 고구마 줄기를 배양토에 삽식한 후, 생존한 액아를 분리하여 MS배지

에 치상함으로써 기내 식물체를 얻을 수 있었다 (그림9-3). 액아를 포함한 줄기 0.5-1mm 를 분리하여 배지에 배양하여 direct로 뿌리의 발생 및 슈트를 발생 시켰으며 (그림9-3 B, C), 액아만을 분리하여 배지에서 배양한 경우에는 뿌리의 발생과 슈트의 발생에 많은 시간이 걸렸다. 캘러스를 이용하는 경우에는 한꺼번에 많은 슈트를 얻을 수 있으나, 같은 형질을 가진 많은 개체가 발생할 경우 돌연변이 선발과정에서 보다 많은 노력을 필요로 하므로 이와 같이 돌연변이 라인을 확립하기 위해서는 하나의 액아에서 하나의 식물개체를 만들어 내는 방법이 더 적합할 것으로 판단되었다. 감마선 30, 50, 70GY를 처리한 고구마 줄기를 삼식 하여 생존한 식물체에 다시 감마선을 재조사한 식물체의 재분화는 그림 4와 같이 방사선을 조사한 후 고구마 줄기를 직접 배양토에 삼식 하여 액아로부터 발생한 신초를 분리하여 발근시켰다 (그림 9-4A-C)). 이 결과 방사선을 조사한 후 식물체를 재분화시키는 과정이 매우 단순화 되었으나, 액아의 기내 배양에 비해 생존율이 감소하였다. 그러나 기내 배양을 거치지 않는 이 방법은 보다 많은 샘플을 준비하여 방사선 조사를 한다면 경비와 노력을 줄일 수 있는 효과적인 방법 중의 하나라고 판단되었다.

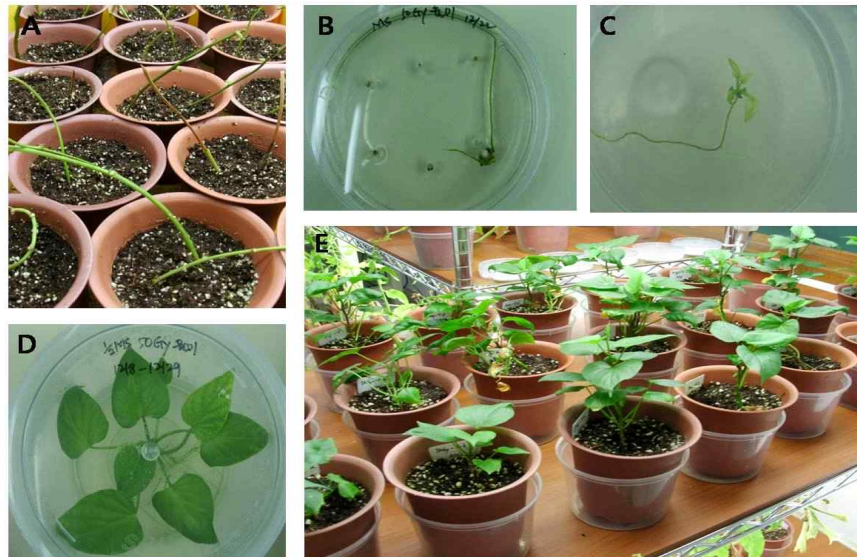


그림9-3 감마선 조사 고구마의 재분화. 감마선 50GY를 처리한 고구마의 삼식(A), 액아배양 및 기내 배양체 재분화(B, C, D), 재분화 기내 배양체의 순화(E).

1차 감마선 조사를 통해 얻은 기내 식물체와 감마선 재조사를 통해 얻은 소식물체는 각각 순화 과정을 거친 후, 포장(경기도 양평군)에 이식하여 재배시험을 실시하였다 (그림9-4 D,E). 이식 초기의 지온유지와 잡초의 간섭을 피하기 위하여 멀칭재배를 하였으며, 각각의 식물체의 재식거리는 30cm로 하였다. 이식 후 123일이 경과한 후, 총 600여개의 라인을 재배한 결과 3개의 라인에서 종피색 변화가 관찰되었으며, 그 외 수량성과 수확한 고구마의 모양 등을 기준으로 약 30여종의 라인을 선발하였다 (그림9-5).

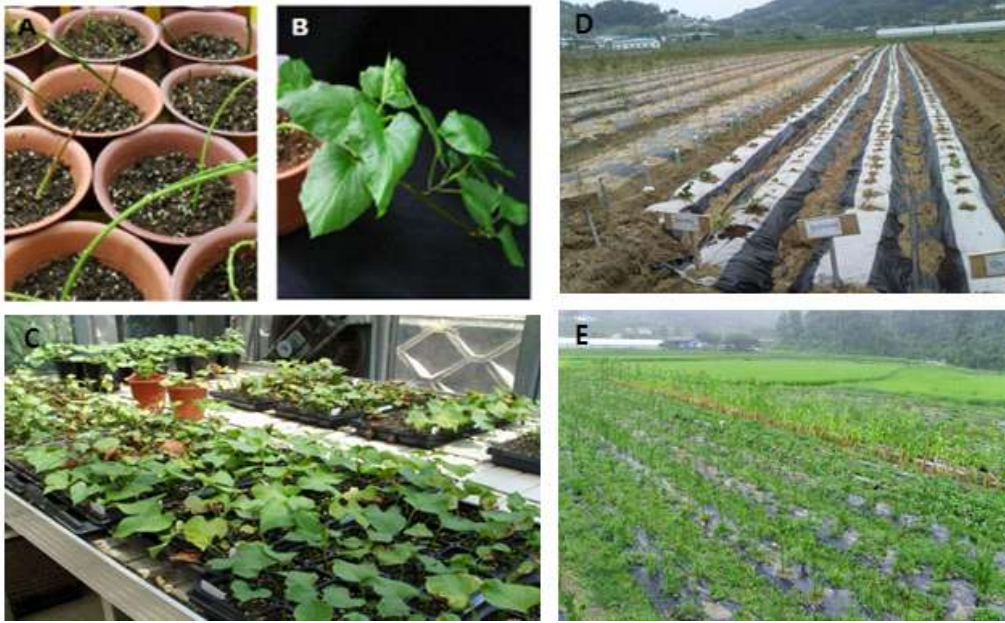


그림9-4 2차 감마선 조사 고구마의 재분화. 감마선을 조사한 고구마의 삼식(A), 액아의 잎과 줄기 출현(B) 및 발근(C), 포장재배선발(D, E)



그림9-5. 울미돌연변이 라인의 포장재배 후 선발 라인

선발된 29개 라인중에서 28개 라인을 대상으로 RAPD분석을 수행하였다. RAPD분석은 DNA 수준에서의 유전적 차이를 검출하는데 있어서 유용한 기술로 이용되고 있으며(Lynch & Milligan 1994, Williams et al. 1990), 본 실험에서는 25개의 프라이머의 234개의 PCR밴드를 이용하여 분석을 수행하였다. 그 결과, 각각 선발된 28개의 라인은 원품종인 “율미”와 독립적이라는 것을 추정할 수 있었다(그림9-6).

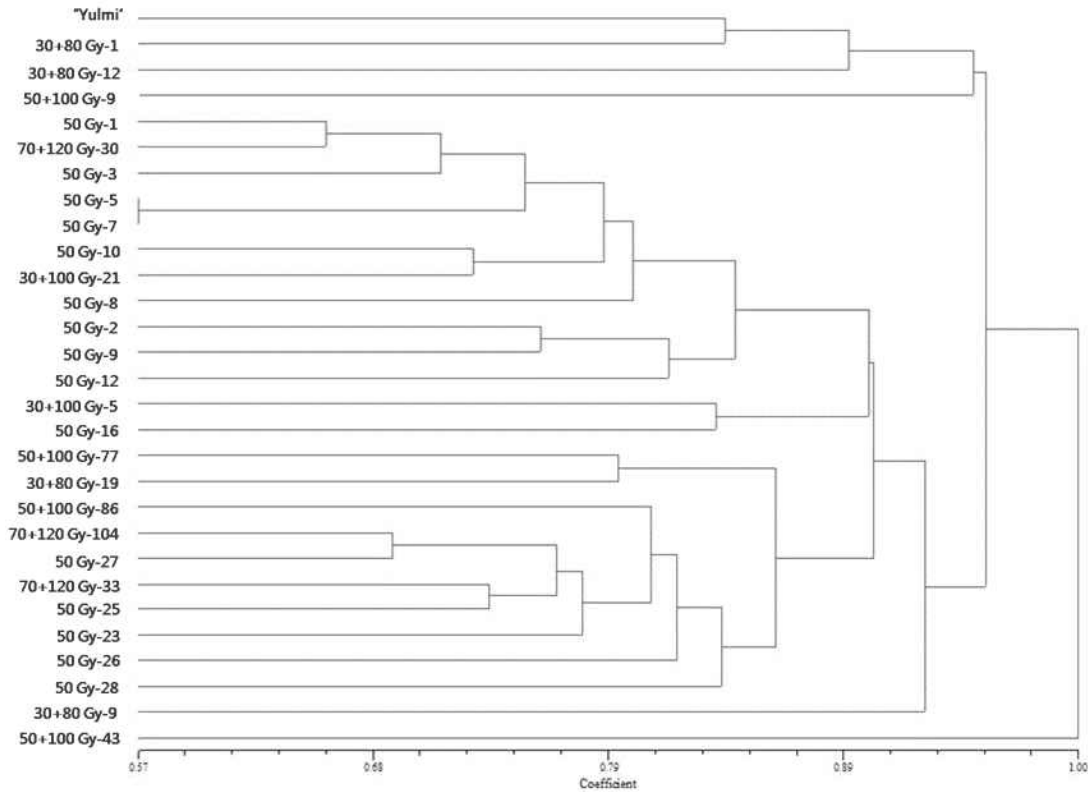


그림9-6 RAPD분석을 이용한 율미돌변이 라인의 유연관계분석

(2) 신건미 돌연변이라인의 유도 및 선발

주요 장려품종 중 하나인 신건미의 돌연변이 유도는 10마디 15~20cm정도 크기의 묘를 이용하여 수행하였다. 감마선 100Gy를 줄기의 생장점에 조사하고, 액아로부터 shoot를 도출하여 감마선 조사 식물체를 육묘하여(그9-7), 포장재배를 실시하여 괴근의 크기 모양 등을 기준으로 선발하였다(그림9-8). 감마선이 조사된 액아로부터 도출된 약 1200주 정도의 돌연변이 유기체를 전남 무안군 바이오에너지 작물센터내 고구마포장에 포장재배를 실시하였으며, 약 4개월(120일)을 생육시킨 후 수확하여, 잎과 괴근의 변이, 괴근모양, 수량성 등을 고려하여 선발하였으며, 최종 72개의 라인을 선발하였다.

돌연변이 유기한 고구마들을 수확하여 그 유전적 유연관계와 계통간의 유전적 차이를 알아보기 위하여 RAPD를 실시하였다(그림9-9). RAPD 결과를 보면 각 계통별의 유전적 차이가 존재함을 알 수 있었다. 1, 14 라인과 3, 5, 8, 10, 69, 11, 12, 13, 68, 23, 24, 29, 31, 50, 32, 46의 라인들의 경우 유전적으로 매우 유사하며 또한 기타 다른 라인들과의 차이 역시 가장 작은 것을 알 수 있었다. 한편 RAPD분석은 2012, 2013년 2개년도에 걸쳐 수행되었으며, 그결과 2012년도와 2013년도의 결과가 유사하면서도 상이한 점을 찾아볼 수 있었다(데이터 미제시). 이와

같은 차이는 명확하진 않으나, 2012년에 비하여 2013년에 실시한 RAPD 실험에서의 계통수가 늘어난 점과 영양번식체인 고구마 자체의 자연적인 변이 가능성과 방사선 돌연변이 유기된 DNA sequence의 repairing 이 일어났을 가능성도 배제 할 수는 없다.

방사선처리를 위한 신건미 육묘

감마선 조사 (100Gy)후 이식 준비

이식 후 감마선
조사식물체의 생육

그림9-7. 신건미의 돌연변이체 육성을 위한 감마선 조사 및 감마선 조사체의 생장



그림9-8. 신건미 돌연변이 라인의 포장재배 및 주요 라인의 선발

RAPD 결과와 표현형과 수확량 조사의 결과를 비교해 보면 그렇게 특이할 만한 결과를 보이지는 않고 있다. 이는 방사선 돌연변이 유도가 point mutation을 일으키는 것에 기인하는 것으로 생각된다. 만약 방사선 돌연변이 유도를 통해 특정 유전자의 서열이 바뀌어 그 것이 표현형에 변화를 준다고 하여도, RAPD를 통한 유전적 검정의 경우는 유전자의 양적인 변화를 보는 실험방법이기 때문에 key 유전자의 서열이 바뀌어 큰 표현형의 차이를 보인다고 하여도 그 질적인 차이를 확인하기에는 한계가 있을 수 있다. 그러나 추가적인 형질 특성 분석 결과가 나오면 이를 토대로 계통간의 비교분석하여 계통을 추려 선발 할 수 있을 것이며, RAPD 결과를 통해 추후 품종 등록을 위한 유전적 marker 개발과 어떤 유전자의 변화가 표현형의 차이에 까지 영향을 주었는지를 알아낼 수 있을 것이다.

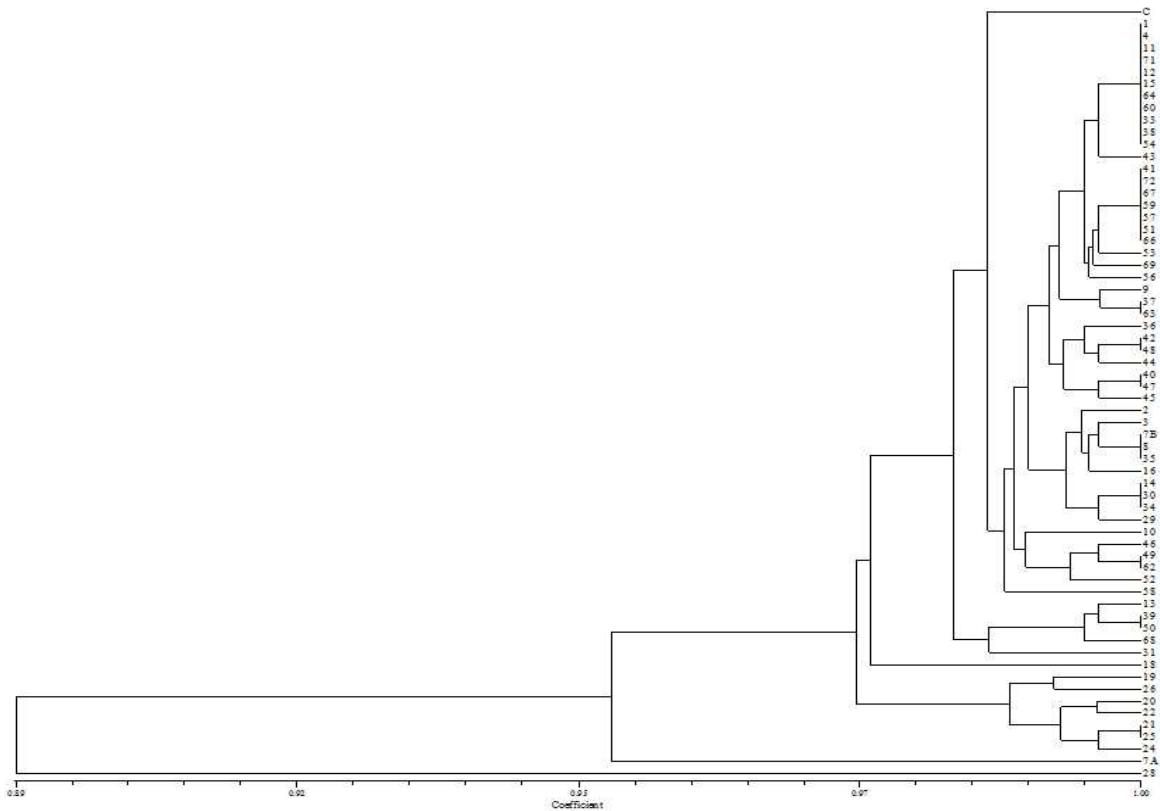


그림9-9 RAPD분석을 이용한 신진미 돌변이 라인의 유연관계분석

(3) 병저항성 호박고구마 돌연변이라인의 유도 및 선발

호박고구마의 경우에는 상업적 이용이 많이 되고 있는 품종이지만, 덩굴쪄짐병에 매우 약하여 많은 피해를 입고 있다. 따라서 감마선 조사를 하여 돌연변이체 생산하고, 육묘하여, 병포장에 포장재배를 실시하여, 덩굴쪄짐병에 강한 변이체 선발을 실시하였다(그림9-10). 대략 500여 주의 돌연변이 유기체를 병포장에 시험재배 하였으며, 아래 그림과 같이 많은 개체수의 병피해로 인한 고사가 관찰되었으며, 일부 생존개체가 존재하였다. 이들 개체중 생존한 10라인을 선발하였으며, 수량성 등에 대해 개선요인을 확인할수 없어, 단지 병해내성개선을 위한 모본으로서의 사용할 예정이다.



그림9-10. 호박고구마 감사선 조사체의 병포장재배실험(무안포장)

(4) 병저항성 호박고구마 돌연변이라인의 유도 및 선발

고구마배수체를 육종을 통한 고생산성 산업용 고구마 품종을 육성하기 위해, 울미품종의 생장점으로부터 캘러스를 유기하고, 이 캘러스에 콜히친을 처리한 후, 재분화를 통해 재분화체를 유기하였다(그림9-11). 콜히친의 처리 농도는 0.05%, 0.1%, 0.2%로 하여 처리기간은 1, 2, 3일 처리를 하여 변이체를 유기하였음. 이들 유기체는 특성조사를 위해 포장재배를 실시하였음. 포장재배실험중 일부 라인에서 잎형태의 변이가 발생였다(그림9-12).

콜히친을 처리하여 유기한 식물체의 배수성 검정을 위해 Flow Cytometry pick를 통해 살펴본 결과, 많은 유기체에서 repetition에 따라 모품종인 울미와 같은 피크 및 배수성 피크를 보이는 등 혼합되는 있는 상태를 보였으며, 몇몇 라인에서는 배수성으로 나타났다(그림9-13).

일반적으로 배수체는 기존의 작물에 비해 수량이 크게 증가하는 것으로 알려졌으나, 울미를 이용한 본 연구과제에서는 배수성의 증가에 따른 잎의 변이는 보였지만, 포장에서의 식물의 생장은 원활이 이루어지지 않았으며, 오히려 생장이 감소하여 괴근의 수확량 및 괴근의 형성정도가 대조구에 비해 빈약한 것으로 나타났다.

처리시간	24H	48H	72H
처리농도			
0.2%			
0.1%			
0.05%			
0%			

그림9-11. 배수성육종을 위한 울미 캘러스에 콜히친 처리 및 고구마의 재분화



그림9-12.. 콜히친처리하여 유기한 재분화체의 포장재배시험 및 잎형태의 변이라인

I. Trifida(2x)

야생종 Flow Cytometry standard pick

보급종(울미) Flow Cytometry standard pick

I. batata (6x)

I. Trifida(2x) and *I. batata* (6x)

#35

#69

colchicine 0.1%, 3day treatment

colchicine 0.1%, 1day treatment

#48

#78

colchicine 0.1%, 2day treatment

colchicine 0.05%, 2day treatment

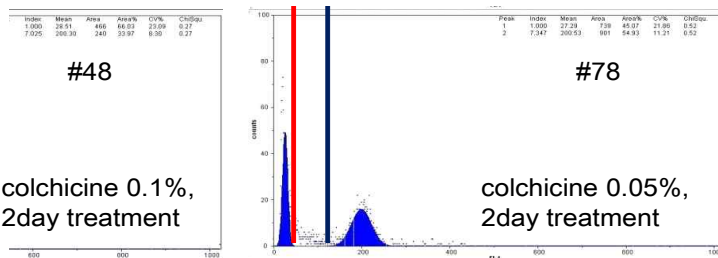


그림9-13. 콜히친 처리 유기체의 배수성 테스트

2. 포장재배시험을 통한 돌연변이라인의 형질 특성

가. 율미 돌연변이 라인의 특성 분석

(1) 돌연변이라인의 생육 특성 및 수량성 분석

1,2차년도에 선발한 율미 감마선 돌연변이 라인의 농업적 형질특성 및 성분분석을 위해 전남 무안군 바이오에너지 작물센터내 고구마 포장에서 포장재배를 실시하였다. 돌연변이 선발라인 들인 전체적으로 초기 생장 속도가 늦은 편이었으며, 잎형태나 괴근형태, 괴근의 피색의 차이가 나타나는 라인이 발생하였다. 모본인 율미와 돌연변이 선발라인의 1차 생육특성을 조사한 결과, 30+100Gy-21, 30+100Gy-34, 50Gy-7, 70+120Gy-30 등에서 모본에 비해 분지수가 많은 것으로 나타났다(표9-1). 그러나 1차 생육특성 조사에서는 전체적으로 지상부 생체중, 괴근의 생체중이 낮은 결과를 보였다. 이는 돌연변이 라인의 초기 생장 속도가 낮은 것과 정식시기의 차이에 기인하는 것으로 판단된다(율미 정식 후 100일, 돌연변이 라인 정식후 85일).

표9-1. 율미 및 방사선 돌연변이체의 1차 생육특성.

라인	지상부 생체중(g)	절수	분지수	괴근생체중	전분가(%)
율미	158	57	3	250	27.25
30+80GY-12	48.5	24	3	144	24.18
30+80GY-19	85	35	3	182	25.51
30+100GY-3	69	30	4	108	24.53
30+100GY-3B	108	45	3	168	27.06
30+100GY-5	50	21	2	45	25.15
30+100GY-5B	82	33	1	92	25.33
30+100GY-21	82	26	5	223	24.53
30+100GY-34	95	33	5	154	26.15
50GY-3	113	36	4	244	23.57
50GY-5	80	33	1	98	25.42
50GY-7	81.5	22	7	97	25.33
50GY-8	108	39	3	272	22.36
50GY-10	77	28	2	64	22.79
50GY-12	57	25	3	173	27.62
50GY-16	142	45	3	145	24.8
50GY-19	70	29	1	71	25.42
50GY-25	81	37	1	68	24.97
50GY-27	80	37	2	98	25.15
50GY-28	51	34	1	65	26.7
70+120GY-30	60	26	5	265	24.18
70+120GY-33	49	26	3	68	24.89
70+120GY-104	72	26	3	170	27.53
50+100GY-9	48	20	3	99	25.33
50+100GY-43	108	38	2	139	26.88
50+100GY-86	145	40	4	172	25.97

무안군 바이오에너지 작물센터내 고구마 포장에서 시험재배한 율미 돌연변이 라인의 주당 상저수, 상저평균중, 총저수량, 전분가 등을 조사한 결과(표9-2), 율미의 경우 전반적으로 대조구에 비해 주당 상저(30g이상의 괴근)수가 증가한 것으로 나타났으며, 반면 상저평균중은 YU7, YU9, YU14 등 일부 라인을 제외하고는 대부분 감소하였다. 총저수량에서는 YU9, YU29, YU5 라인 등에서 대조구와 비교해 현저히 높은 수치를 보였다. 그러나 이들 총저수량이 높은 라인들의 전분가는 대조구와 비교해 차이를 보이지 않았으며, 전분가가 27.5%으로 가장 높았던 YU22라인은 주당 상저수가 4.0개로 매우 높게 나타났으나, 상저평균중, 총저수량 등에서 매우 낮은 수량성을 나타냈다. 주당 저수량은 YU-3, YU-5, YU-9 등에서 율미 모본에 비해 높은 수치를 보여, 괴근의 평균적인 크기가 증가한 것으로 나타났다.

표9-2. 율미 돌연변이 라인의 수량성 분석

율미 라인	주당 상저수 (개/주)	상저 평균중 (g/개)	주당 저수량 (g/주)	총저수량 (kg/10a)	전분가 (%)
대조구	2.6	100	260	1950	23.3
YU1	3.1	96.9	293	2200	21.9
YU3	3.7	86.4	319	2390	21.4
YU4	2.7	83.3	231	1734	21.2
YU5	3.3	96.3	330	2478	20.6
YU6	2.7	72.2	196	1473	21.2
YU7	2.5	114.2	253	1899	20.9
YU8	2.4	69.9	165	1238	23.0
YU9	3.6	97.0	351	2632	23.1
YU10	2.0	85.3	175	1316	22.9
YU12	3.5	60.7	213	1594	20.8
YU13	2.3	69.2	162	1211	22.5
YU14	2.1	97.0	200	1499	23.5
YU15	3.5	83.3	296	2219	25.2
YU17	2.8	87.9	243	1823	21.3
YU18	3.1	85.9	263	1973	23.5
YU19	2.8	81.8	225	1688	24.2
YU20	3.2	87.5	290	2175	22.5
YU22	4.0	45.8	183	1375	27.5
YU23	3.2	82.7	263	1973	22.5
YU24	3.3	75.6	255	1913	22.5
YU25	4.2	60.9	255	1909	21.4
YU27	3.9	89.2	345	2586	23.2
YU28	3.8	78.8	308	2307	22.7
YU29	2.6	96.6	249	1870	25.1
YU30	3.1	75.0	234	1756	21.3
YU31	2.8	68.8	197	1477	21.0
YU32	2.6	91.5	239	1789	23.3
YU33	2.6	96.6	248	1861	23.3

(2) 돌연변이라인의 전분특성 분석

1차 선발된 29개의 율미 돌연변이 라인을 이용하여 고구마의 아밀로오스 함량 및 total 전분 함량을 조사하였다(표9-3). 아밀로오스의 함량은 전반적으로 낮은 12-17%의 수준을 보여 원품종인 “율미”의 13.3%와 비교하여 큰 차이를 보이지는 않았으나, 50Gy-10에서 17.2%로 아밀로오스 함량으로 높게 나타났으며 50Gy-8에서 15.8%의 아밀로오스 함량을 나타내 원품종인 “율미”보다 다소 높게 나타났다(표9-3). 전분함량은 매우 다양한 결과를 보여줬으며, 70+120Gy-33, 50Gy-27라인 등은 “율미”와 비교할 때 매우 낮은 전분함량을, 50Gy-23, 50Gy-26, 50Gy-28 등의 라인은 매우 높은 전분함량을 나타내었다(표9-3).

전분은 식물체의 종자와 tuber의 아밀로플라스트에 저장되어 있는 주된 탄수화물 물질로 인간의 영양에 주된 에너지를 공급하는 물질이고 아밀로오스와 아밀로펙틴의 두 종류의 구분할 수 있다(Ahloowalia & Maluszynski 2001). 고구마는 대표적인 전분 작물로서 생체내의 수분함량과 전분함량 및 전분의 구성비 및 아밀로오스와 아밀로펙틴의 함량은 고구마의 품질을 평가하는데 있어서 매우 중요한 요소이다. 일반적으로 고구마의 아밀로오스 함량은 10-25% 수준으로 다른 식물에 비하여 낮은 편이다 (Noda et al. 1998). 일반적으로 식물전분은 직선형인 아밀로오스와 가지를 치고 있는 고분자의 아밀로펙틴의 혼합물이며, 식물에서는 거의 1:3의 비율로 존재하며, Ahn et al. (2010)의 보고에 의하면 “율미” 품종에서는 12.8% : 87.2%의 비율로 존재하였다. 전분에서 아밀로오스와 아밀로펙틴의 비율은 여러 가지 전분을 이용한 가공물과 그 이용도에 있어서 매우 큰 영향을 미치기 때문에 아밀로오스와 아밀로펙틴의 비율을 조절하는 것이 중요하다. 하나의 예로서 전분을 이용한 바이오에너지 생산에 있어서도 아밀로오스와 아밀로펙틴은 중요한 요소이다. 전분을 이용하여 바이오에탄올을 생산하는 비용에서, 아밀로오스와 아밀로펙틴의 사슬을 끊어주는 아밀라제 (amylase), 글루코아밀라제 (glucoamylase) 등의 효소를 처리하는 과정이 필수이므로 이것이 에탄올 생산원가에 큰 영향을 미친다. 따라서 고구마 등 전분 작물을 이용한 바이오에너지 생산에서 아밀로오스 함량을 높여준다면 에탄올 생산비용을 크게 낮출 수 있을 것이다. 이러한 점을 감안하여 형질전환 기술을 이용하여 아밀로오스 함량을 증대시킨 고구마 개발에 대한 연구가 수행되었다(Shimada et al. 2006). 본 실험 결과에서 나온 50Gy-10, 50Gy-16, 50Gy-23, 50Gy-26, 50Gy-28과 같이 30% 이상의 전분 함량을 보이는 라인들은 충분한 수확량이 뒷받침 된다면, 산업용으로서의 활용 가능성이 높으리라고 예상된다. 50Gy-10라인은 다른 라인과 비교해 높은 아밀로오스 및 전분함량을 나타내고 있어 추가적인 실험을 실행하여 아밀로오스 함량이 월등히 높아진 고구마 라인을 구축한다면 바이오에너지 생산 및 산업용 고구마로 적합한 라인을 선발할 것이라 여겨진다.

표9-3. 율미 돌연변이 선발라인의 아밀로오스 및 total 전분 함량

Plant line	Amylose content (%)	Starch content (% based on dry weight)	Starch content (% based on fresh weight)
“Yulmi” ^y	13.25 a-e ^z	68.47 b-g	19.49 bcd
50 Gy-1	13.96 a-f	70.85 b-j	26.32 ghi
50 Gy-2	14.78 c-f	63.51 ab	17.74 abc
50 Gy-3	14.53 c-f	64.61 abc	20.05 cde
50 Gy-5	14.10 a-f	74.16 e-j	27.15 hij
50 Gy-7	14.07 a-f	77.37 g-j	27.55 hij

50 Gy-8	15.84 fg	74.07 d-j	26.26 ghi
50 Gy-9	15.41 efg	68.28 b-f	27.99 hij
50 Gy-10	17.21 g	76.73 f-j	32.34 lm
50 Gy-12	14.31 b-f	69.57 b-h	25.87 gh
50 Gy-16	12.75 abc	77.00 f-j	31.36 kl
50 Gy-23	14.10 a-f	76.54 f-j	34.83 m
50 Gy-25	14.21 b-f	74.62 e-j	27.32 hij
50 Gy-26	14.48 c-f	79.57 j	34.44 m
50 Gy-27	13.02 a-d	64.52 abc	16.86 ab
50 Gy-28	13.34 a-e	78.56 ij	34.21 m
30+80 Gy-1	13.39 a-e	65.44 a-d	20.85 de
30+80 Gy-9	14.39 c-f	78.38 hij	27.22 hij
30+80 Gy-12	15.28 d-g	70.58 b-i	23.81 fg
30+80 Gy-19	13.28 a-e	69.75 b-i	22.95 ef
30+100 Gy-5	14.34 b-f	64.06 abc	19.40 bcd
30+100 Gy-21	14.67 c-f	74.80 e-j	27.25 hij
30+100 Gy-34	13.90 a-f	67.00 b-e	20.39 cde
50+100 Gy-9	12.09 ab	72.50 c-j	24.93 fgh
50+100 Gy-43	11.89 a	76.54 f-j	29.08 ijk
50+100 Gy-77	13.23 a-e	69.02 b-g	22.16 def
50+100 Gy-86	12.57 abc	77.09 f-j	29.68 jkl
70+120 Gy-30	13.94 a-f	72.14 b-j	22.26 def
70+120 Gy-33	14.52 c-f	58.65 a	15.07 a
70+120 Gy-104	14.60 c-f	69.29 b-g	24.98 fgh

^YMean original plant which was not exposed to gamma-ray

^ZMean separation within columns by Tukey's test at p=0.05

(3) 돌연변이라인의 가용성 당 함량

율미 돌연변이 선발라인의 가용성 당 함량 분석은 2개년도에 걸쳐 수행되었으며, 1차 분석은 경기도 양평군에 소재하는 고구마 포장에 시험재배한 돌연변이라인을 대상으로, 2차 분석은 전남 무안군에 소재하는 고구마 포장에서 시험재배한 돌연변이라인을 대상으로 하였다. 먼저 1차 분석 결과, Glucose 함량은 50Gy-2, 50Gy-27, 30+80Gy-12, 70+120Gy-33 의 네 개 라인에서 매우 높은 함량을 보였으며 그 중 50Gy-27 라인에서 가장 큰 변화를 보였다(표9-4). 그 외의 라인에서는 "율미"와 비슷한 함량을 보이거나 "율미"보다 낮은 수준의 Glucose 함량을 보였다. 특히, 50Gy-5, 52Gy-28, 30+80Gy-1 라인에서는 Glucose 함량이 매우 낮게 나타났다. Fructose 함량은 "율미"와 비교했을 때 50Gy-27 라인에서 눈에 띄게 증가한 것을 확인할 수 있었으나 대부분의 선발라인에서는 낮게 나타났다(표9-4). Sucrose 함량은 대체적으로 "율미"의 함량 수준과 비슷했으나 50Gy-3, 50Gy-28, 30+80Gy-19, 50+100Gy-86 의 라인에서 대체적으로 높은 경향을 보였다(표9-4).

표9-4. 울미 돌연변이 선발라인의 가용성 당 함량(1차 분석)

Plant line	Glucose content (mg/g FW)	Fructose content (mg/g FW)	Sucrose content (mg/g FW)
“Yulmi” ^y	5.81 f-i ^z	5.95 hij	20.63 abc
50 Gy-1	3.01 a-f	2.02 a-d	20.57 abc
50 Gy-2	12.14 l	6.32 ij	20.16 abc
50 Gy-3	8.81 jk	4.15 fg	25.92 c
50 Gy-5	1.02 ab	0.90 ab	22.81 abc
50 Gy-7	4.05 c-h	2.99 c-f	22.04 abc
50 Gy-8	7.54 ij	3.71 efg	23.10 bc
50 Gy-9	3.73 b-g	1.50 abc	24.95 bc
50 Gy-10	5.37 e-i	1.87 a-d	24.55 bc
50 Gy-12	2.53 a-e	1.70 a-d	20.27 abc
50 Gy-16	4.41 c-h	1.63 a-d	20.44 abc
50 Gy-23	4.26 c-h	1.12 ab	16.20 ab
50 Gy-25	9.44 jk	4.18 fg	23.83 bc
50 Gy-26	2.92 a-f	0.90 ab	20.84 abc
50 Gy-27	15.56 m	9.21 k	22.11 abc
50 Gy-28	0.74 a	0.47 a	26.94 c
30+80 Gy-1	1.48 abc	0.99 ab	13.76 a
30+80 Gy-9	3.38 a-g	2.13 bcd	21.66 abc
30+80 Gy-12	10.79 kl	5.12 ghi	19.64 abc
30+80 Gy-19	6.76 hij	4.52 fgh	25.60 bc
30+100 Gy-5	7.74 ij	5.03 ghi	22.99 bc
30+100 Gy-21	5.88 f-i	2.42 b-e	20.68 abc
30+100 Gy-34	2.34 a-d	1.84 a-d	23.54 bc
50+100 Gy-9	2.97 a-f	2.14 bcd	21.53 abc
50+100 Gy-43	2.46 a-e	1.36 ab	21.80 abc
50+100 Gy-77	4.01 c-h	3.20 def	24.86 bc
50+100 Gy-86	6.02 ghi	3.08 c-f	27.97 c
70+120 Gy-30	5.14 d-i	2.98 c-f	25.00 bc
70+120 Gy-33	11.29 kl	7.13 j	23.07 bc
70+120 Gy-104	4.00 c-h	1.85 a-d	22.00 abc

^yMean original plant which was not exposed to gamma-ray

^zMean separation within columns by Tukey’s test at p=0.05

2차 돌연변이 선발라인의 가용성 당함량을 분석한 결과, fructose함량은 모품종인 울미에 비해 돌연변이라인이 전반적으로 낮은 함량을 보였다(그림9-14). glucose함량의 경우 300Gy+100Gy-21, 50Gy-25, 50Gy+100Gy-86라인에서 높게 나타났다(그림9-14). Sucrose함은 모품종인 울미에 비해 돌연변이라인에서 전반적으로 높은 함량을 보였으며, 특히 50Gy-7, 50Gy-9, 50Gy-28, 50Gy+100Gy-77라인에서 매우 높은 함량을 보였다(그림9-14).

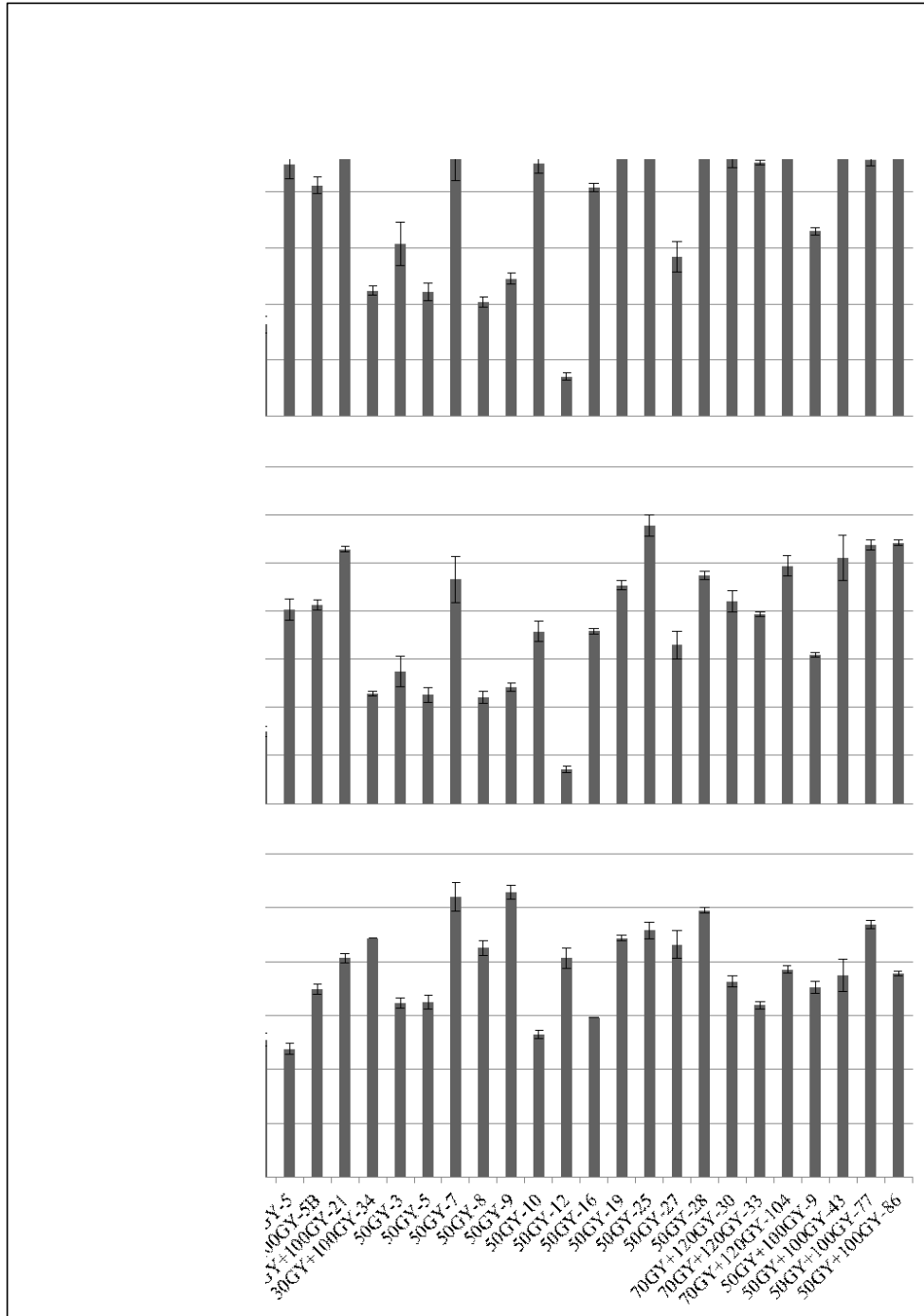


그림9-14. 울미 돌연변이 선발라인의 가용성 당 함량(2차 분석)

(4) 돌연변이 라인의 카로티노이드 함량

울미 돌연변이 선발라인의 total 카로티노이드 함량을 실시한 결과 모품종인 울미에 비해 돌연변이 선발라인의 카로티노이드의 함량은 전반적으로 낮은 함량을 보였다(그림9-15). 특히 50GY-8, 50GY+100GY-9, 50GY+100GY-43, 50GY+100GY-77, 50GY+100GY-86 라인의 total 카로티노이드 함량이 매우 낮아, 분석 및 시료보존 문제에 의한 것인지 또는 방사선 조사에 의한 카로티노이드 생합성계의 이상을 초래하여 발생한 것인지에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 모품종인 울미 역시 카로티노이드의 함량은 신태미나 주황미에 비해 낮은 카로

티노이드 함량을 나타내었으며, 카로티노이드화합물중 비타민 A의 전구물질이 되는 베타카로틴의 함량은 중요하다고 판단되어 카르티노이드 생합성계에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다. 감마선 조사를 통한 돌연변이체의 카르티노이드 및 베타카로틴의 함량 증가가 Wang 등 (2007)에 의해 보고되었으며, 고구마에서 영양학적 가치가 높은 물질에 대한 연구도 필요하다고 생각된다.

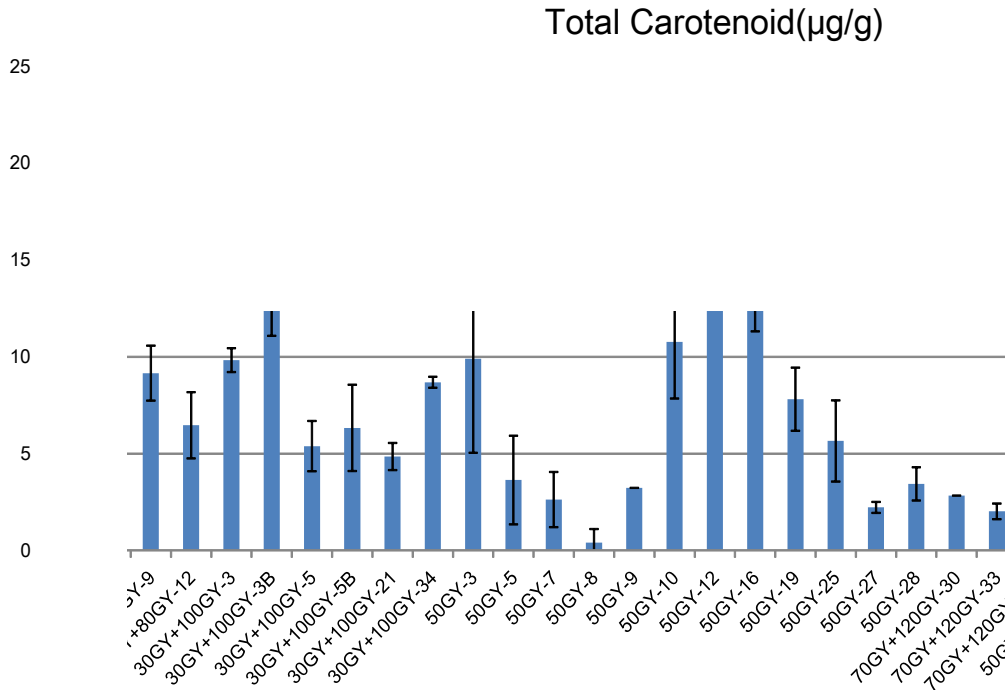


그림9-15. 주요 율미 돌연변이 선발 라인의 total 카로티노이드 함량

(5) 돌연변이 라인의 피색 및 육질색

율미 돌연변이 선발라인의 표피색 및 육질색의 변화를 조사한 결과(표9-5), YU5, YU6,, YU7, YU8, YU25라인에서 명도(L값)가 크게 증가하였으며, 또한 황색을 나타내는 b값은 증가를 나타냈다. 따라서 위 라인은 표피색이 홍색에서 황황색으로 변이가 일어났으며, ΔE값은 통해서도 상기 5개 라인에서 표피색의 큰 변화가 발생한 것을 확인할 수 있었다. 육질색에서는 표피색에 비해서 큰 차이가 없었으나, YU14라인에서 육질색이 보다 적색화 되는 현상을 보였다.

표9-5. 율미 돌연변이 선발라인의 표피색 및 육질색의 변화

율미 라인	표피색				육질색			
	L	a	b	ΔE	L	a	b	ΔE
대조구	47.5	17.3	16.5		88.3	-0.1	26.4	
YU1	50.9	12.4	15.1	6.1	87.0	-0.3	24.9	1.9
YU3	49.5	14.7	14.0	4.1	87.5	0.1	27.7	1.5
YU4	49.8	16.8	12.7	4.4	88.1	-0.3	27.0	0.7
YU5	64.9	10.9	24.5	20.2	85.8	0.5	26.3	2.6
YU6	64.8	8.8	27.0	22.0	87.4	-0.9	29.6	3.5

YU7	57.7	12.1	22.0	12.8	87.3	0.0	27.9	1.8
YU8	59.5	10.3	24.7	16.2	87.9	-0.5	27.5	1.2
YU9	49.5	13.2	14.1	5.2	86.9	0.1	27.5	1.7
YU10	50.9	12.7	15.6	5.8	87.2	-0.5	26.0	1.2
YU12	50.6	12.5	12.7	6.9	87.5	0.1	29.6	3.4
YU13	48.3	15.4	11.8	5.1	86.5	0.4	28.5	2.8
YU14	49.4	14.3	12.7	5.2	88.5	4.2	22.0	6.1
YU15	50.7	15.0	13.2	5.1	88.2	0.2	29.5	3.1
YU17	48.4	17.6	8.4	8.1	88.4	-0.6	24.9	1.5
YU18	46.4	15.2	10.4	6.5	87.1	0.4	27.5	1.7
YU19	47.8	13.2	14.5	4.6	88.7	-0.1	29.0	2.7
YU20	49.7	14.1	12.3	5.7	87.9	-0.5	27.3	1.1
YU22	45.5	11.5	14.2	6.5	86.2	1.3	29.8	4.2
YU23	51.2	13.9	14.4	5.4	88.4	-0.4	26.4	0.4
YU24	51.4	13.5	14.9	5.7	87.6	-0.1	27.2	1.0
YU25	62.9	12.3	23.1	17.5	88.0	-0.1	28.1	1.8
YU27	51.2	14.3	14.3	5.2	87.5	0.1	28.1	1.9
YU28	49.6	15.3	11.2	6.1	87.6	-0.1	25.0	1.6
YU29	48.1	14.3	12.2	5.2	86.5	0.4	28.1	2.5
YU30	48.7	14.6	12.0	5.4	87.8	-0.6	29.9	3.6
YU31	51.2	14.4	13.6	5.5	87.0	-0.4	26.8	1.3
YU32	46.9	14.6	12.0	5.3	87.2	-0.1	23.0	3.6
YU33	48.9	12.8	14.4	5.2	88.9	-0.4	24.1	2.4

나. 신건미 돌연변이 라인의 특성 분석

(1) 돌연변이라인의 수량성 분석

신건미 돌연변이 선발라인의 수량성 분석은 2개년도에 걸쳐 수행되었다. 먼저 1차 수량성 분석은 전남 무안군 바이오에너지 작물센터내 고구마 포장에서 각 라인 당 약 30~60개체씩 포장재배를 실시하여, 주당 상저수, 상저평균중, 주당저수량, 전분가 등을 조사하였다(표9-6). 신건미 돌연변이 라인은 울미 돌연변이 라인과 마찬가지로, 전반적으로 주당 상저수가 높게 나타났으며, SG34, SG21은 주당 상저수가 각각 5.8, 5.2로 매우 높아 상품 가치가 있는 괴근이 많이 생기는 것을 알수 있었다(표9-6). 또한 SG32, SG68, SG14, SG22, SG39, SG11, SG35, SG3, SG26, SG4, SG8, SG13, SG24, SG52, SG57 등도 주당 상저수가 4이상으로 상저 즉 상품성있는 고구마의 생성이 많이 되는 것으로 나타났다. 한편, 상저 평균중은 대조구에 비해 전반적으로 낮은 결과를 보였다(표9-6). SG59, SG6, SG37, SG44 라인에서 모본에 비해 높은 상저 평균중을 나타내었으며, SG59라인은 주당 상저수는 많지 않지만, 괴근의 하나하나 크기는 큰 것으로 나와 가공용 등에 이용 가능할 것으로 생각된다. 주당 저수량은 SG22, SG37, SG21, SG68라인 등에서 600g/주로 나와 모본에 비해 1.5배정도의 생산량을 보였다(표9-6). 총저수량은 SG21, SG22, SG37, SG68 등의 라인에서 대조구에 비해 1.5배정도 높게 나타나 산업용으로 이용가치가 높은 것으로 나타났다. 그러나 전분가의 경우 SG32, SG58과 같은 극히 일부 라인에서 대조구에 비해 비교적 높은 전분가를 보였으나, 대부분의 경우 낮은 전분가를 나타냈다.

표9-6. 신건미 돌연변이 선발라인의 수량성 분석(1차).

신건미라인	주당 상저수 (개/주)	상저 평균중 (g/ 개)	주당 저수량 (g/주)	총저수량 (kg/10a)	전분가 (%)
대조구	2.7	150.1	405	3039	22.7
SG1	3.6	134.6	492	3689	19.6
SG2	3.5	159.1	560	4198	19.9
SG3	4.1	133.8	552	4139	21.2
SG4	4	140.5	558	4186	22.2
SG5	3.4	138.9	470	3525	20.5
SG6	3.4	174.3	533	3994	21.9
SG7	3.6	123.9	444	3328	21.7
SG8	4	93	365	2738	20.8
SG9	3.4	124.2	398	2981	21.4
SG10	3.5	152.1	532	3986	21.6
SG11	4.2	119.7	506	3792	21.3
SG12	3.5	141.2	501	3756	19.6
SG13	4	135.8	523	3919	19.3
SG14	4.3	129.6	548	4106	21.1
SG15	3.5	126.1	449	3366	19.7
SG16	3.6	114.4	415	3113	22.2
SG17	3.7	120.8	450	3375	20.3
SG18	3.3	114.8	376	2822	21.7
SG19	3.8	125.8	472	3541	21.9
SG20	3.5	119.3	416	3117	22.5
SG21	5.2	123.8	638	4781	20.8
SG22	4.3	147.1	639	4796	19
SG23	3.8	139.4	519	3895	21.3
SG24	4	117.7	465	3488	19.2
SG26	4.1	123.7	504	3777	22.6
SG27	3.6	133.5	480	3599	23.3
SG28	3.3	90.7	149	2229	22.3
SG29	3.2	118.7	379	2841	23.2
SG30	3.8	139.3	526	3947	23.3
SG31	3.9	104	397	2978	22.3
SG32	4.9	99.5	488	3656	25.2
SG33	3	123.5	371	2779	20.9
SG34	5.8	91.3	525	3938	18.1
SG35	4.2	124.7	522	3913	21.9
SG36	3.9	107.1	408	3062	22.7

표9-6. 신건미 돌연변이 선발라인의 수량성 분석(1차)-계속.

신건미라인	주당 상저수 (개/주)	상저 평균중 (g/ 개)	주당 저수량 (g/주)	총저수량 (kg/10a)	전분가 (%)
SG37	3.7	172.5	638	4781	21.8
SG38	3.9	116.9	452	3389	21.9
SG39	4.3	119.4	505	3784	21.9
SG40	3.6	112.1	401	3005	22.3
SG41	3.9	98.7	387	2902	20.5
SG42	3.8	101.6	386	2897	20.5
SG43	3.3	125.7	418	3131	20.6

SG44	3.7	162.8	588	4411	22.5
SG45	3.1	115.5	353	2644	20.9
SG46	2.8	139.7	376	2819	23.2
SG47	3.9	136.2	531	3984	19.9
SG48	3.6	89.6	323	2419	20.2
SG49	3.3	111.7	373	2794	22.6
SG50	3.2	123	395	2963	19.5
SG51	3.7	110.2	413	3100	19.9
SG52	4	121.6	478	3586	20.9
SG53	2.7	124.6	328	2456	20.8
SG54	3.2	129.1	408	3063	21.2
SG55	3.7	137.7	501	3755	22.3
SG56	3.1	118.3	363	2723	21.5
SG57	4	122.8	493	3701	21.8
SG58	3.6	120.9	430	3223	25
SG59	3.1	193.1	589	4416	22.3
SG60	3.2	130.1	409	3066	22.1
SG61	3.6	103.2	363	2721	20.4
SG62	3.9	125.2	489	3665	21.2
SG63	4	116.6	460	3450	21
SG64	3.8	129.1	493	3700	22.5
SG65	3.9	121.1	472	3538	24.6
SG66	3.4	141.9	486	3642	21
SG67	3.9	116	442	3316	22.1
SG68	4.5	137.1	625	4691	21.9
SG70	3.7	110.7	413	3094	22.6
SG71	3.5	122.5	424	3183	21.5
SG72	3.5	119.4	420	3150	18.8

신건미 돌연변이 선발라인의 2차 수량성 분석은 전남 정읍시 소개의 3개 포장에서 재배한 고구마를 대상으로 이루어 졌으며, 각 포장에는 라인당 50~100주씩 정식하여 약 120±10일 정도 재배한 후 수확하여 수량성 분석을 하였다. 각 포장에서의 정식시기 또는 재배기간의 차이로 인해 포장간의 수량지수의 차가 크게 발생하였다. 먼저 제1포장에서의 각 신건미 돌연변이 선발라인의 주당 상저수(50g이상의 괴근)를 보면, SG6, SG3, SG35, SG30 등의 라인에서 모본에 비해 주당 0.8~1.0개정도의 상저수 증가가 관찰되었다(데이터 미제시). 상저수 수확 비율을 보면 SG3, SG52, SG62, SG30 등에서 높은 비율로 나타났다. 상저평균중은 SG64, SG44, SG62, SG58 등에서 높게 나타났으며, 이들 라인은 주당 상저수, 및 상저 비율은 낮으면서, 상저 1개당 무게비는 매우 높은 것으로 나타났다. 특히 SG64는 주당 상저수가 0.55개인 대신 상저평균중은 500g이상으로 나와, 많은 괴근이 달리지 않는 대신 크기가 매우큰 괴근만 발생하였다. SG3, SG35와 같이 주당 상저수와 상저비율이 높은 라인은 상저 평균중이 170~180g으로 낮게 형성되었다. 주당 저수량 및 총저수량은 SG6, SG30, SG53, SG35, SG4 등 주당 괴근수가 많으

며 일정이상의 평균중을 가진 라인에서 높게 나타났다.

제 2포장에서는 제 1포장과는 다른 결과를 얻을수 있었다(데이터 미제시). 각종 수량지수는 제 1지역에서 보다 높게 나왔으며, 특히 대조구인 모본의 생육이 좋았다. 주당 상저수는 SG58 라인에서만 대조구보다 높은 수치를 보였으며, 대부분의 라인에서는 대조구 보다 낮은 수치를 보였다. 상품성 있는 괴근의 생성비율은 SG66, SG3, SG42, SG4라인에서만 대조구보다 높게 나타났으며, 전반적으로는 대조구와 비슷하거나 낮은 경향을 보였다. 상저평균중에서는 SG66, SG24만 대조구와 비교해 유의성 있게 높은 수치를 보였으며, SG66라인은 상저비율, 상저평균중은 높았지만, 주당 괴근수가 매우 낮은 것으로 나타났다. 따라서 주당 저수량 및 총 저수량을 조사한 결과 제 2포장에서는 대조구가 가장 우수한 것으로 나타났으며, SG4, SG1 등의 라인에서만 대조구와 비슷한 수량지수를 보였다.

제 3 포장에서는 제1, 제2포장에 비해 고구마생장에 보다 적합한 토질을 가지고 있어, 각종 수량지수가 제1, 제2포장에 비해 높게 나타났다(데이터 미제시). 주당 상저수는 SG24, SG14등 몇 개 라인에서 높게 나타났으나, 대조구가 큰차이를 보이지 않았으며, 상저비율은 SG37, SG64 라인에서 90% 정도의 상저비를 보여, 형성된 대부분의 괴근이 상품성 있는 괴근으로 성장하는 것을 알 수 있었다. 상저평균중은 전반적으로 대조구에 비해 높게 형성되었으며, SG4가 366.98g으로 가장 높은 수치를 보였다. 주당저수량 및 총저수량은 SG68라인이 대조구에 비해 약 50% , SG60라인이 약 20% 증가한 것으로 나타났다.

이상의 신건미 돌연변이 선발라인의 2차 수량성 분석을 살펴보면, 각 포장에 따른 변이차가 크게 나타나고 있으며, 이는 정식 및 식재기간, 토양환경 등에 따라 수량성이 많은 영향을 받는 것으로 생각된다. 이하의 신건미 돌연변이 선발라인의 2차 수량성 분석은 제1, 2, 3포장의 분석결과를 평균값으로 제시하였다(표9-7).

주당 상저수는 SG21, SG24라인에서, 상저비율은SG5, SG12, SG49, SG3 등의 라인에서, 상저평균중은 SG66, SG64, SG63, SG4에서 우수한 것으로 나타났다. 주당 저수량 및 총저수량에서는 SG37, SG25, SG34에서 우수하였으나, 이들 라인은 생육이 저조하였던 제 1포장 데이터가 누락된 값으로 신용할 수 없으며, 그 외 SG68, SG6, SG60, SG24에서 우수한 수량을 보이는 것으로 나타났다(표9-7).

표9-7. 신건미 돌연변이 선발라인의 수량성 분석(2차).

신건미라인	주당 상저수 (개/주)	상저 비율 (%)	상저 평균중 (g/ 개)	주당 저수량 (g/주)	총저수량 (kg/10a)
대조구	2.5	60.1	186.1	505.5	3791.5
SG1	2.3	58.8	185.3	488.6	3664.7
SG2	1.9	59.8	176.4	385.3	2890.0
SG3	2.4	71.0	159.4	418.3	3137.0
SG4	1.7	61.0	264.0	468.2	3511.3
SG5	2.3	75.0	202.0	495.4	3715.6
SG6	2.2	59.6	195.8	530.9	3981.9
SG7	1.9	59.1	173.6	380.2	2851.8
SG8	1.6	61.5	145.3	266.9	2002.0
SG9	1.7	55.4	190.2	385.0	2887.4

SG10	1.8	57.5	160.6	306.3	2297.1
SG11	2.5	58.2	125.5	376.3	2822.5
SG12	2.5	72.9	166.6	455.6	3416.6
SG13	2.1	61.3	180.9	408.7	3065.0
SG14	2.5	60.1	152.6	426.2	3196.8
SG15	3.1	55.6	138.7	528.4	3963.0
SG16	1.6	55.0	181.4	331.7	2487.8
SG17	1.8	70.3	152.2	299.3	2244.6
SG18	1.9	71.5	173.9	357.0	2677.5
SG19	2.2	50.1	182.0	437.2	3278.9
SG20	2.3	55.4	146.5	391.8	2938.8
SG21	2.7	67.6	158.6	484.7	3635.6
SG22	2.0	48.1	171.2	411.1	3083.1
SG23	2.6	66.6	155.1	467.6	3506.7
SG24	2.6	65.4	190.8	514.3	3857.4
SG26	3.1	62.6	152.4	528.3	3962.3
SG27	1.9	71.1	181.0	356.8	2676.3
SG28	2.1	64.7	157.3	380.2	2851.5
SG29	2.2	62.6	143.6	368.0	2759.7
SG30	2.3	63.2	194.6	494.5	3708.5
SG31	2.3	66.2	150.2	388.4	2912.7
SG32	1.4	42.6	182.3	310.6	2329.8
SG34	2.8	67.9	186.3	579.1	4343.3
SG35	2.2	61.8	164.9	431.8	3238.5
SG36	2.0	59.0	138.9	351.3	2634.5

표9-7. 신건미 들연변이 선발라인의 수량성 분석(2차)-계속.

신건미라인	주당 상저수 (개/주)	상저 비율 (%)	상저 평균중 (g/ 개)	주당 저수량 (g/주)	총저수량 (kg/10a)
SG37	2.9	90.7	229.3	681.0	5107.5
SG38	2.6	61.2	149.6	457.1	3428.3
SG39	1.7	70.4	182.9	343.2	2574.2
SG40	2.1	59.2	159.1	358.7	2690.1
SG41	2.2	80.6	185.2	418.2	3136.5
SG42	1.7	59.0	176.3	350.3	2627.1
SG43	1.4	57.9	210.6	320.2	2401.2
SG44	1.6	56.5	220.9	362.2	2716.7
SG45	1.7	55.7	168.6	326.5	2448.4
SG46	1.9	70.7	157.2	348.6	2614.1
SG47	1.9	50.8	186.5	424.5	3184.1
SG48	2.7	78.1	152.3	436.3	3272.3
SG49	2.6	72.1	167.2	483.0	3622.6

SG50	1.9	58.3	167.6	403.5	3026.5
SG51	2.3	57.2	151.6	429.9	3224.1
SG52	2.0	60.7	195.7	422.6	3169.3
SG53	1.6	50.3	191.8	397.1	2977.9
SG54	2.2	64.3	219.4	513.7	3852.8
SG55	1.3	50.1	187.9	279.1	2093.6
SG56	2.7	81.6	155.0	436.8	3276.0
SG57	2.0	57.5	163.1	399.5	2995.9
SG58	2.4	52.3	194.6	459.6	3447.0
SG59	2.0	65.5	160.3	368.0	2760.0
SG60	2.4	67.0	184.9	525.0	3937.7
SG61	1.9	68.6	166.7	354.4	2658.0
SG62	1.9	52.5	186.7	358.3	2687.2
SG63	0.9	31.7	264.4	310.3	2327.5
SG64	1.5	58.5	284.5	354.7	2660.4
SG65	1.7	46.7	181.1	378.1	2835.8
SG66	1.3	67.2	290.6	362.8	2721.1
SG67	2.2	62.9	149.3	384.8	2885.8
SG68	2.3	54.4	214.5	551.2	4134.2
SG69	1.2	53.7	186.4	224.0	1679.7
SG71	1.7	59.5	217.0	384.5	2883.6
SG72	2.1	55.4	153.5	376.7	2825.6

(2) 돌연변이라인의 전분특성 분석

신건미 돌연변이 라인의 전분가는 표 6에 제시한 바와 같이, 전반적으로 모본과 큰 차이를 보이지 않았다. SG32, SG58, SG65 돌연변이 라인은 전분가가 24.6~25.2%로 비교적 높은 전분가를 보였으며, SG22, SG72, SG34라인은 19% 이하의 전분가를 나타내었다(표9-6). 그 외 대부분의 돌연변이 라인은 대부분 21±1%의 수준으로 모본과 큰 차이를 보이지 않았다.

전분에서 아밀로스/아밀로펙틴의 비율은 여러 가지 전분을 이용한 가공물과 그 이용도에 있어서 매우 큰 영향을 미치기 때문에 아밀로스/아밀로펙틴의 비율을 조절하는 것이 중요하다. 따라서 본 연구과제에서는 신건미 돌연변이 라인의 아밀로스 함량을 분석하여 전분특성의 변화를 관찰하였다. 그 결과 72개라인의 신건미 돌연변이 선발라인은 대조구와 비교한 큰 차이가 나타나지 않았다(그림9-16). SG51-54, SG62-66 라인에서 20% 이상의 비교적 높은 아밀로스 함량을 나타냈으며, 반면 SG37, SG38, SG48 등의 라인에서는 10%정도의 매우 낮은 아밀로스 함량을 나타내었다. 아밀로스/아밀로펙틴 함량비는 앞서 기술한 바와 같이 전분의 가공, 이용 등에 매우 큰 영향을 미치기 때문에 상대적으로 높은 아밀로스 함량을 나타내는 라인 및 저 아밀로스 라인에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다.

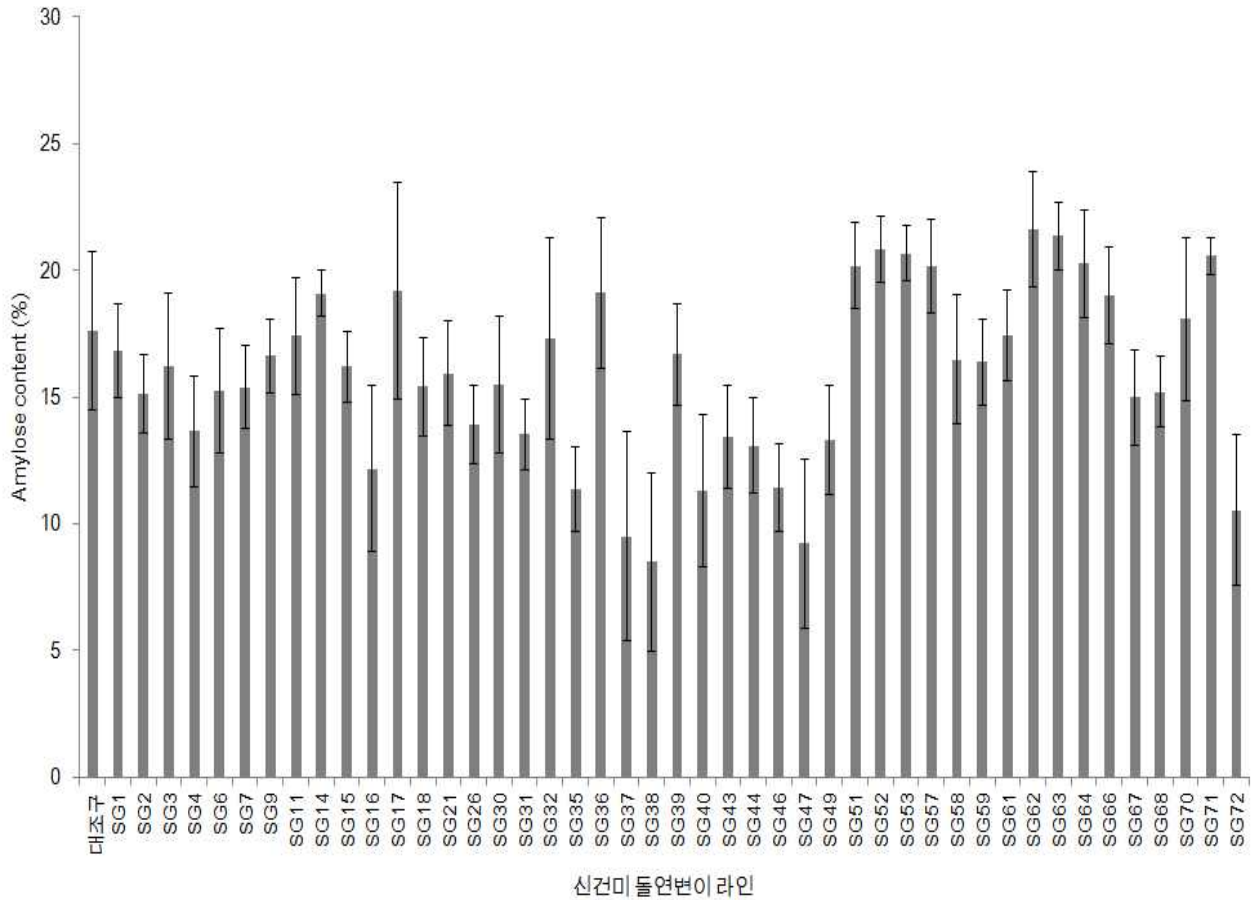


그림9-16. 신건미 돌연변이 라인의 아밀로스 함량 분석

(3) 돌연변이라인의 가용성 당 함량

신건미 돌연변이 선발라인의 가용성 당 함량은 전남 무안군에 소재하는 고구마 포장에서 시험재배한 돌연변이라인을 대상으로 brix당도계를 이용하여 측정하였다. 신건미 돌연변이 라인의 경우 SG32, SG52 라인에서 높은 당함량은 보였으나, 반면 SG23, SG55, SG61 라인에서는 매우 낮은 당 함량을 나타내었다(그림9-17).

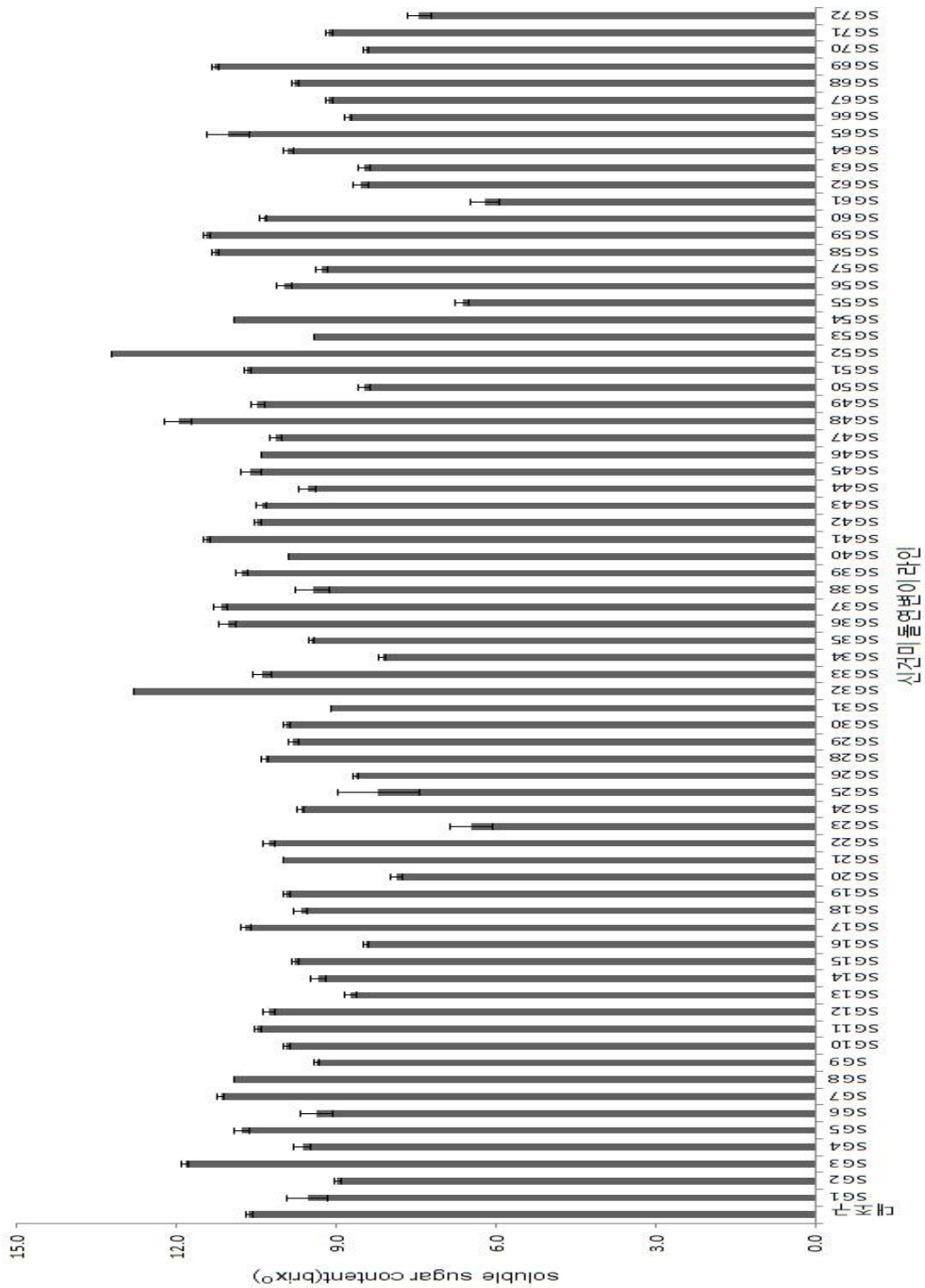


그림9-17. 신건미 돌연변이 선발라인의 가용성 당 함량

(4) 돌연변이 라인의 카로티노이드 함량

신건미 돌연변이 선발라인의 total 카로티노이드 함량을 실시한 결과, 라인별로 카로티노이드 함량이 매우 큰 차이를 보였다(그림9-18). SG14, SG31, SG32, SG33 등의 라인에서는 대조구와 비교해 상대적으로 높은 카로티노이드 함량을 나타냈으나, SG37, SG64, SG68, SG72, SG69 등의 라인에서는 매우 낮은 함량을 보였다. 이와 같은 결과와 관련해 이들 돌연변이 라인의 카로티노이드 생합성경로에 관련하는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

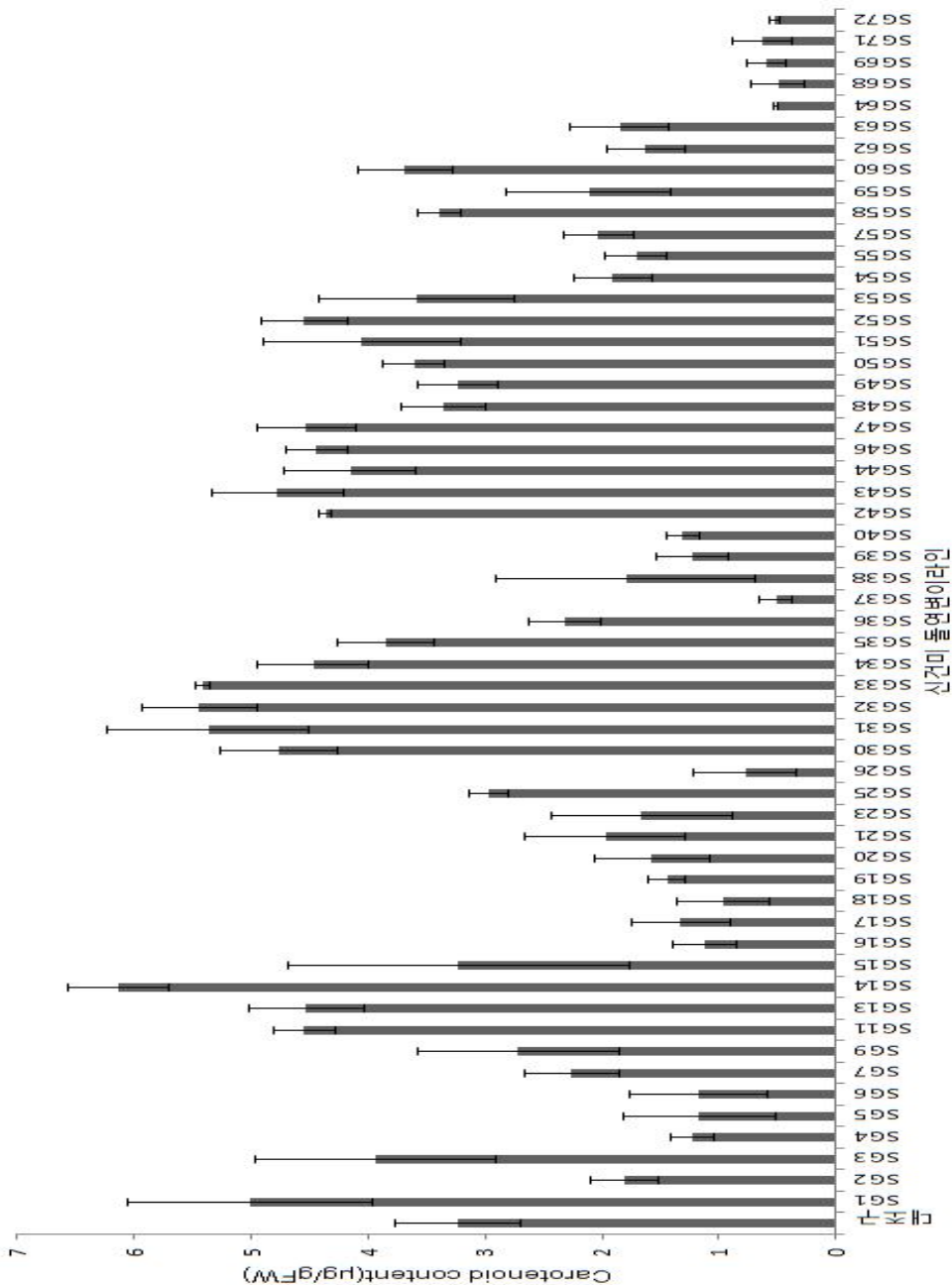


그림9-18. 신건미 돌연변이 선발 라인의 total 카로티노이드 함량

(5) 돌연변이 라인의 피색 및 육질색

신건미 돌연변이 선발라인의 표피색 및 육질색의 변화를 조사한 결과(표9-8), 율미와 달리 눈에 띄는 표피색의 변화는 없었으나, SG10, SG13, SG19, SG65 라인 등에서 붉은색(a값)의 증가 및 황색(b값)의 감소를 가져와 보다 선명한 피색을 나타내었다(표9-8). 육질색에 있어서는 전반적으로 대조구에 비교해 황색 값이 증가하는 것으로 나타났으며, SG1, SG20, SG34 라인에서 육질색의 변이가 매우 크며, 이들 라인의 육질은 보다 황색을 띠는 쪽으로 변이된 것으로 생각된다.

표9-8. 신건미 돌연변이 선발라인의 표피색 및 육질색의 변화

신건미 라인	표피색				육질색			
	L	a	b	ΔE	L	a	b	ΔE
대조구	49.4	18.2	15.3		88.5	0.9	28.7	
SG1	49.2	16.5	13.3	2.6	85.2	2.6	37.9	9.9
SG2	49.5	14.5	14.4	3.8	84.5	2.6	34.3	7.1
SG3	47.7	15.1	13.0	4.2	86.1	1.6	33.1	5.1
SG4	49.3	19.2	9.3	6.1	86.6	1.6	34.5	6.1
SG5	52.4	14.6	15.4	4.7	86.4	1.6	33.7	5.5
SG6	47.4	18.0	10.5	5.2	87.5	0.4	30.2	1.9
SG7	50.5	20.5	7.0	8.7	86.3	2.6	35.7	7.5
SG8	45.3	17.7	10.5	6.3	86.4	1.0	34.5	6.2
SG9	47.6	19.3	10.5	5.2	86.3	1.1	35.4	7.0
SG10	46.6	21.6	6.9	9.5	87.0	1.7	34.2	5.7
SG11	52.8	14.4	14.3	5.2	86.7	1.3	32.4	4.2
SG12	53.8	17.2	9.5	7.4	87.7	0.8	33.4	4.8
SG13	49.7	20.9	6.4	9.3	87.1	1.4	34.3	5.8
SG14	51.7	18.3	8.9	6.8	87.2	1.6	36.3	7.7
SG15	51.8	16.0	11.4	5.1	86.6	1.8	32.6	4.4
SG16	51.5	17.7	10.2	5.5	87.7	1.8	34.4	5.8
SG17	51.2	16.0	12.4	4.0	85.3	2.4	36.8	8.8
SG18	50.4	19.4	9.0	6.5	88.0	1.2	31.4	2.7
SG19	45.1	21.6	6.3	10.5	85.9	1.1	33.8	5.7
SG20	49.8	16.1	12.8	3.2	86.5	2.2	39.1	10.6
SG21	48.6	18.6	10.6	4.8	86.8	1.4	33.2	4.8
SG22	51.5	15.8	12.6	4.1	87.2	0.8	34.0	5.4
SG23	51.4	20.0	8.4	7.4	87.4	1.2	34.3	5.7
SG24	50.0	18.5	8.3	7.0	86.7	2.0	32.5	4.4
SG25	51.9	18.5	9.5	6.3	87.6	1.8	34.2	5.6
SG26	48.5	17.0	12.0	3.6	86.4	1.6	32.1	4.0
SG27	47.1	16.7	9.6	6.3	86.3	2.2	34.6	6.4
SG28	46.4	19.8	7.2	8.7	84.9	2.1	32.4	5.3
SG29	48.8	16.5	11.6	4.1	87.5	2.0	34.5	6.0
SG30	47.4	19.0	10.7	5.1	86.0	0.9	28.9	2.5
SG31	46.7	19.2	9.6	6.4	86.3	3.6	34.1	6.4
SG32	48.4	13.8	12.5	5.3	87.0	1.4	31.2	3.0
SG33	47.6	17.5	11.9	3.9	84.6	1.6	34.4	6.9
SG34	52.0	18.8	12.7	3.7	85.0	1.8	40.4	12.3
SG35	45.6	16.0	11.3	5.9	86.3	2.1	34.0	5.8

표9-8. 신건미 돌연변이 선발라인의 표피색 및 육질색의 변화(계속)

신건미 라인	표피색				육질색			
	L	a	b	ΔE	L	a	b	ΔE
SG36	50.1	18.7	11.7	3.7	86.1	3.1	35.1	7.2
SG37	48.0	14.6	15.7	3.8	86.6	1.6	33.1	4.8
SG38	46.0	16.4	10.9	5.8	84.6	2.4	33.1	6.1
SG39	51.0	21.5	8.3	7.9	87.2	1.4	31.9	3.5

SG40	51.2	20.1	9.3	6.6	85.2	3.5	35.8	8.3
SG41	51.9	16.2	14.1	3.4	86.9	1.4	34.4	5.9
SG42	49.1	16.0	10.7	5.1	87.4	0.6	33.6	5.0
SG43	50.4	17.7	11.2	4.3	87.4	0.5	33.4	4.8
SG44	48.6	19.8	8.2	7.4	86.8	0.9	34.4	5.9
SG45	49.0	20.8	7.1	8.6	86.3	1.9	36.0	7.7
SG46	52.1	19.9	10.2	6.1	88.3	0.8	34.6	5.8
SG47	52.4	12.5	12.7	6.9	85.5	2.3	34.7	6.8
SG48	48.2	16.0	10.1	5.8	86.1	1.2	34.2	6.0
SG49	47.9	16.9	10.8	4.9	87.5	1.3	33.8	5.2
SG50	50.2	15.8	11.1	4.9	86.5	2.1	32.8	4.7
SG51	49.2	14.0	13.9	4.4	85.6	1.1	35.9	7.8
SG52	53.3	19.1	10.7	6.1	86.9	1.0	36.0	7.4
SG53	46.6	17.6	10.1	5.9	86.1	1.2	35.3	7.0
SG54	51.7	17.4	11.4	4.6	87.3	1.2	35.1	6.5
SG55	48.8	20.4	8.3	7.4	83.8	1.9	31.6	5.6
SG56	49.1	14.3	9.3	7.1	86.0	2.5	35.3	7.2
SG57	49.8	17.4	11.3	4.1	86.5	1.4	34.5	6.1
SG58	50.2	19.7	9.8	5.8	88.2	1.3	31.8	3.1
SG59	51.5	14.6	15.6	4.1	87.0	2.1	33.9	5.6
SG60	50.7	15.9	13.1	3.5	86.1	1.6	34.0	5.8
SG61	53.9	12.0	16.5	7.8	86.5	2.1	33.9	5.7
SG62	47.0	15.0	12.7	4.7	86.4	1.4	33.3	5.1
SG63	49.1	16.5	10.8	4.8	86.7	1.5	32.8	4.5
SG64	52.0	16.2	9.5	6.6	86.2	2.2	35.3	7.1
SG65	46.5	22.4	8.3	8.6	87.3	1.3	32.5	4.0
SG66	49.8	15.3	14.5	3.0	86.2	1.8	32.8	4.7
SG67	47.3	15.7	13.2	3.8	85.6	2.0	34.3	6.4
SG68	47.3	15.3	12.8	4.3	86.4	1.7	34.7	6.4
SG70	50.3	16.9	10.8	4.7	86.5	1.9	32.6	4.4
SG71	50.1	15.8	12.5	3.8	85.4	1.5	31.1	4.0
SG72	50.5	18.1	10.9	4.6	85.3	1.7	35.1	7.2

다. 율미 및 신건미 돌연변이 계통의 품종화와 관련한 형질특성

(1) 율미 돌연변이 선발라인의 특성

율미 돌연변이 선발 라인 of 품종화를 위한 고구마 특성분석을 실시하였다(표9-9), 율미 돌연변이 라인에서는 잎모양과 줄기색에서는 큰 변화는 관찰되지 않았지만, 괴근모양은 장방추형, 단방추형으로의 변이가 관찰되었다(표9-9). YU5, YU7, YU17, YU22 라인의 장방추형으로 나타났으며, YU12, YU25는 단방추형으로 나타났다. 표피색의 경우에는 YU5, YU6, YU7, YU8, YU25 라인에서 황색계의 색도가 진하게 나타나는 홍황색을 나타내었다. 육색의 경우에는 각 돌연변이 라인에서 눈에 띄는 차이를 보이지 않았으며, 상저수량에서는 YU5, YU9, YU27에서 높은 수량을 나타냈다. 그러나 이들 라인에서의 전분가는 큰 차이를 보이지 않고, YU27 라인에서 가장 높은 전분가를 보였으나, 상저수량이 매우 낮은 것으로 나타났다.

표9-9. 울미 돌연변이 선발라인의 고구마 특성

라인	잎모양	줄기색	괴근모양	피색	육색	상저수량 (kg/10a)	전분가 (%)
울미	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	1842	23.3
YU1	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	1980	21.9
YU3	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	2151	21.4
YU4	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	1561	21.2
YU5	심장형	녹색	장방추	홍황색	담황색	2231	20.6
YU6	심장형	녹색	방추	홍황색	담황색	1326	21.2
YU7	심장형	녹색	장방추	홍황색	담황색	1710	20.9
YU8	심장형	녹색	방추	홍황색	담황색	1114	23.0
YU9	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	2369	23.1
YU10	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	1184	22.9
YU12	심장형	녹색	단방추	홍색	담황색	1434	20.8
YU13	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	1090	22.5
YU14	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	1350	23.5
YU15	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	1998	25.2
YU17	심장형	녹색	장방추	홍색	담황색	1640	21.3
YU18	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	1775	23.5
YU19	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	1519	24.2
YU20	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	1958	22.5
YU22	심장형	녹색	장방추	홍색	담황색	1238	27.5
YU23	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	1776	22.5
YU24	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	1721	22.5
YU25	심장형	녹색	단방추	홍황색	담황색	1718	21.4
YU27	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	2328	23.2
YU28	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	2076	22.7
YU29	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	1683	25.1
YU30	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	1580	21.3
YU31	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	1329	21.0
YU32	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	1610	23.3
YU33	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	1675	23.3

(2) 신건미 돌연변이 선발라인의 특성

신건미 돌연변이 라인에서 잎모양과 줄기색은 울미와 마찬가지로의 대조구에 비해 큰 변화는 관찰되지 않았지만, 괴근모양은 장방추형(SG37, SG48, SG58, SG62 라인) 과 단방추형(SG15, SG19, SG36, SG46 라인 등)으로의 변이가 관찰되었다(표9-10). 표피색의 경우, SG7, SG10, SG19, SG45, SG65 라인에서 적색도의 증가가 나타났으나, 육색은 각 돌연변이 라인에서 눈에 띄는 차이를 보이지 않았다. 상저수량에서는 SG37, SG68, SG34, SG21 라인에서 매우 높은 수량을 나타내, 산업적 이용가능성이 높은 것을 판단되었다. 전분가에서는 SG68, SG32 라인에서 대조구 보다 높은 것으로 나타났으며, 그외 라인에서의 전분가의 증가 등은 관찰되지 않았으며, 전반적으로 신건미 돌연변이 라인의 전분가는 대조구와 비교해 큰 변화가 관찰되지 않았다.

표9-10. 신건미 돌연변이 선발라인의 고구마 특성

라인	잎모양	줄기색	괴근모양	피색	육색	상저수량 (kg/10a)	전분가 (%)
신건미	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	3229	22.7
SG1	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	3178	19.6
SG2	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2826	19.9
SG3	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	3081	21.2
SG4	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	3303	22.2
SG5	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	3380	20.5
SG6	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	3440	21.9
SG7	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	2627	21.7
SG8	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	1991	20.8
SG9	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2475	21.4
SG10	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	2362	21.6
SG11	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2690	21.3
SG12	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	3248	19.6
SG13	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	2899	19.3
SG14	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2960	21.1
SG15	심장형	녹색	단방추	담홍색	담황색	3132	19.7
SG16	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2285	22.2
SG17	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2357	20.3
SG18	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2502	21.7
SG19	심장형	녹색	단방추	홍색	담황색	2794	21.9
SG20	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2664	22.5
SG21	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	3618	20.8
SG22	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2926	19.0
SG23	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	3311	21.3
SG24	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	3373	19.2
SG26	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	3466	22.6
SG27	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2652	23.3
SG28	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2247	22.3
SG29	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2402	23.2
SG30	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	3399	23.3

표9-10. 신건미 돌연변이 선발라인의 고구마 특성(계속)

라인	잎모양	줄기색	괴근모양	피색	육색	상저수량 (kg/10a)	전분가 (%)
SG31	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	1966	22.3
SG32	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2210	25.2
SG33	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2501	20.9
SG34	심장형	녹색	방추	담홍색	황색	3728	18.1
SG35	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	3012	21.9

SG36	심장형	녹색	단방추	담홍색	담황색	2384	22.7
SG37	심장형	녹색	장방추	담홍색	담황색	4670	22.7
SG38	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2996	19.6
SG39	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2717	19.9
SG40	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2485	21.2
SG41	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2799	22.2
SG42	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2236	20.5
SG43	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2277	21.9
SG44	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2799	21.7
SG45	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	2190	20.8
SG46	심장형	녹색	단방추	담홍색	담황색	2413	21.4
SG47	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2826	21.6
SG48	심장형	녹색	장방추	담홍색	담황색	2647	21.3
SG49	심장형	녹색	단방추	담홍색	담황색	3094	19.6
SG50	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2653	19.3
SG51	심장형	녹색	단방추	담홍색	담황색	2789	21.1
SG52	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2904	19.7
SG53	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2280	22.2
SG54	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	3148	20.3
SG55	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2114	21.7
SG56	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2789	21.9
SG57	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2822	22.5
SG58	심장형	녹색	장방추	담홍색	담황색	2880	20.8
SG59	심장형	녹색	단방추	담홍색	담황색	2950	19.0
SG60	심장형	녹색	단방추	담홍색	담황색	3329	21.3
SG61	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2418	19.2
SG62	심장형	녹색	장방추	담홍색	담황색	2500	22.6
SG63	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2395	23.3
SG64	심장형	녹색	단방추	담홍색	담황색	2613	22.3
SG65	심장형	녹색	방추	홍색	담황색	2547	23.2
SG66	심장형	녹색	단방추	담홍색	담황색	2660	23.3
SG67	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2707	22.3
SG68	심장형	녹색	단방추	담홍색	담황색	3846	25.2
SG70	심장형	녹색	단방추	담홍색	담황색	2873	20.9
SG71	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2680	18.1
SG72	심장형	녹색	방추	담홍색	담황색	2535	21.9

제10절 제6협동 내염성 및 조숙 · 단간성 유대 돌연변이 품종 개발 (전북대 은종선)

1. 조숙, 단간성 돌연변이체 선발 및 육성

가. 연구개발 수행내용 및 실험방법

(1) 연구개발 수행내용

유채는(*Brassica napus* L.) 십자화과 배추속(*Brassica*)에 속하는 1년생 또는 2년생 초본이다. 종자에는 35~45%의 기름이 함유되어 있고 erucic acid와 glucosinolate 함량이 낮은 양질유는 식용, 샐러드용, 바이오디젤용으로, erucic acid 함량이 높은 저급유는 공업용으로 이용하고 있다. 부산물인 유박은 40% 정도의 단백질과 필수아미노산인 lysine이 함유되어 있어 고단백 가축사료나 비료로 이용되고 있으며, 이른 봄에 피는 꽃은 노란색으로 다른 십자화과 꽃보다 크고 탐스럽기 때문에 관상용으로 관광자원화가 가능하며 꿀과 화분이 많아 밀원으로서도 부가가치가 매우 높다(Kim 등, 2007).

우리나라는 바이오디젤을 생산하기에 가장 적합한 작물로 유채에 주목하고 있는데 그 이유는 다수성인 유채의 1대잡종 품종이 개발되는 등 육종의 성과가 크고 겨울재배가 가능하여 작부체계가 유리하다는 점에 있다(Jang 등, 2002b). 따라서 바이오디젤의 생산과 보급에 있어서 가장 중요한 부분의 하나가 경제성 확보이므로 원료작물인 유채의 단위면적 당 수량이 많고, 지방함량이 높으며, 바이오디젤의 특성에 영향을 미치는 올레인산(oleic acid, C18:1) 함량이 높은 품종 개발이 필요하고, 보리 대체작물로서 답리작이 가능한 조숙, 동시성숙성 등의 품종과, 생력기계화 재배를 위하여 도복을 방지할 수 있는 단간성 품종 개발이 필요한 시점이다.

유채의 품종개발방법 중 돌연변이 육종은 교잡육종과 비교하여 기존에 없는 새로운 변이를 창출하고 이용한다는 점과 기존 품종의 우수한 형질은 그대로 유지하면서 단점 형질만을 단기간 내에 개량하기 위한 육종방법으로 알려져 있다(Cheong 등, 2004). 지금까지 돌연변이 유기수단으로는 감마선, X-선, 중성자, 화학약품 등이 있으나 선진국의 연구결과에 의하면 이온빔에 의한 돌연변이 유기효과가 감마선 또는 X-선에 비해 아주 높다고 한다(Lee 등, 2006).

따라서 본 연구는 바이오디젤의 원료가 되는 유채의 신품종을 개발하고자 종자에 양성자와 감마선을 조사하여 M₁~M₈세대까지 세대를 진전하여 유용형질인 조숙, 단간, 다수성, 지방함량 및 올레인산 고함유의 특성을 지닌 계통과 간척지 토양에서 재배가 가능한 내염성계통을 육성하고자 실시하였다.

(2) 실험방법

(가) 실험재료 및 방사선 조사

농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물센터에서 육성한 유채 '내한', '탐미', '한라' 등 3품종의 건조종자를 실험재료로 사용하였다. 방사선으로 이용한 양성자는 2005년 9월 한국원자력연구소의 MC-50 Cyclotron을 이용하여 35.7MeV, 10~20nA의 에너지 조건에서 10.5mm Be target으로부터 1.8~3.6Gy · s⁻¹의 선량률로 10cm 떨어진 위치에서 조사 시간을 달리하여 총 선량을 0~2,000Gy로 처리하였다. 감마선은 한국원자력연구소 정읍첨단방사선연구소의 저준위조사시설(⁶⁰Co)을 이용하여 선량률을 1.38~27.8Gy · h⁻¹로, 총 선량은 양성자와 동일하게 조사하였다.

(나) M₁~M₅세대의 육성

양성자 및 감마선을 처리한 3품종의 종자를 2005년 10월 상순 전북대학교 실험포장에 파종하고 총 10,300개체의 M₁세대를 육성하였다. M₂세대는 M₁세대의 화경별로 채종한 종자를 계통화하여 총 990계통을 파종하였고, M₂세대에서 선발한 변이계통들은 M₃~M₄세대까지 세대를 진전시켜 고정성 여부와 예비 특성조사를 실시한 후 고정성이 높고 유용형질의 특성을 갖는 31계통을 M₅세대로 공시하였다. M₅세대는 각 계통별로 50~60개체 3반복으로 2009년 10월 상순 파종하고 국립종자원 유채 신품종 심사를 위한 특성조사요령에 따라 고유특성 및 생육특성, 지

방함량, 지방산조성 등을 조사하고, 모품종과 변이계통들 사이의 유연관계 분석을 통해 유용형질을 갖는 6계통을 선발하였다.

(다) 특성조사

국립종자원 유채 신품종 심사를 위한 특성조사요령에 따라 경장, 개화기, 성숙기, 협장, 1수협수, 1협결실수, 천립중 등을 조사하였으며, 모든 조사는 20개체 또는 20개체의 식물체 부위에서 3반복으로 조사하였다. M₅세대에서 꽃의 크기가 큰 계통을 선발하였는데 이 계통의 꽃의 크기를 대조구와 비교하기 위해 꽃잎 한 장의 길이와 폭을 엽면적계를 이용하여 측정하였다.

(라) 지방 및 지방산 분석

지방의 추출은 Soxhlet법을 이용하였으며(Sekhon 등, 1980), 지방산 분석은 상법에 따라 시료를 조제하여 GC로 분석하였다.

(마) 자료분석

모든 측정값의 통계분석은 Window용 SAS system, release 8.01(SAS Institute Inc, Cary, NC, USA)로 유의수준 5%에서 Duncan의 다중검정(DMRT)과 T-test를 실시하였다.

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) M₁세대 육성

유채 '내한', '탐미', '한라' 3품종의 종자에 각각 양성자와 감마선을 처리하여 선원, 선량별로 육묘한 묘를 유리온실에 1주씩 재식하여 조기개화를 유도하였다. 또한 실험포장에 종자를 파종하여 총 10,300개체의 M₁세대를 육성 하였다. 양성자와 감마선 모두 100~1,000Gy까지는 선량별로 각각 720~840개체를 육성하였으나, 1,500~2,000Gy의 고선량처리구는 양성자의 경우 123개체, 감마선의 경우 39개체로 육성 개체수가 적었는데, 이는 1,500~2,000Gy의 고선량처리구에서 대부분 출현은 하였으나 성장 도중 방사선 장애를 받아 많은 개체가 고사하였기 때문이다(그림10-1).

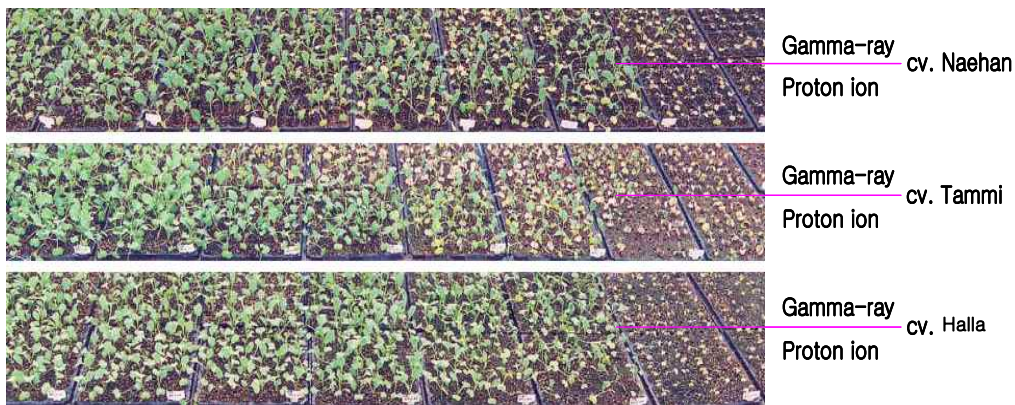


그림10-1. Growth response of M₁ generation after the seeds of 3 rapeseed cultivars were irradiated with various dosage of proton ion beams and gamma-ray, determined 1 month after sowing. From left to right: control, 100, 200, 400, 600, 800, 1,000, 1,500 and 2,000 Gy.

Lee(2008)는 유채와 같은 십자화과인 배추의 종자에 방사선을 처리할 경우 돌연변이 유거 적정선량으로 속중성자는 160Gy 내외, 감마선은 500Gy 내외로 보고한바 있다. 본 연구에 선행하여 유채 M₁세대의 방사선 감수성을 조사하였으며(Eun 등, 2007) 그 결과, 양성자와 감마선 두

선원 모두 1,000Gy를 초과하는 선량에서 생존율 및 생장이 50% 이상 감소하는 매우 높은 감수성을 보였다. 따라서 육종에 효율적인 선량을 1,000Gy 이하로 판단하고 연구를 수행하였으며, M₁세대 성장초기에서 후기까지 여러 가지 형태적 변이양상을 관찰한 결과 같은 품종 및 선원, 선량 내에서도 개체 간 다양한 변이체가 나타났다(그림10-2). ‘한라’의 감마선 100Gy 처리구에서 자엽시기부터 엽록소변이체가 나타났으며, 이 개체를 정식하였는데 계속 성장하였으나 엽록소가 결여되어 성장정도는 정상적인 개체에 비하여 70~80%로 저조하였다(그림10-2A). 또한 ‘내한’의 감마선 1,000 Gy 처리구에서도 성장 중기에 액아에서 발달한 잎에 엽록소변이체가 나타났고(그림10-2B), 양성자 800~1,000Gy 처리구에서는 많은 개체에서 중심부 잎이 주글 주글하거나(그림10-2C) 성장점의 생장이 중지되고 액아가 급속히 성장하는 변이체가 나타났다(그림10-2D). 또한 생육후기에도 여러 가지 형태적 변이체가 보였는데 잎에 키메라가 보였던 ‘한라’의 감마선 100Gy 처리구와 ‘내한’의 감마선 1,000Gy 처리구의 화퇴에 키메라가 나타났고, ‘탐미’의 감마선 1,000Gy 처리구에서 화판의 크기가 작은 기형화가 나타났으며, ‘내한’의 양성자 400Gy구에서는 화경이 서로 겹치는 기형의 개체가 보였다. 양성자와 감마선을 처리한 유채 3품종의 M₁세대에서는 각 개체의 이삭별로 채종하였는데 ‘내한’ 양성자처리 98개체, 감마선 처리 107개체, ‘탐미’ 양성자 116개체, 감마선 95개체, ‘한라’ 양성자 95개체, 감마선 74개체이다.

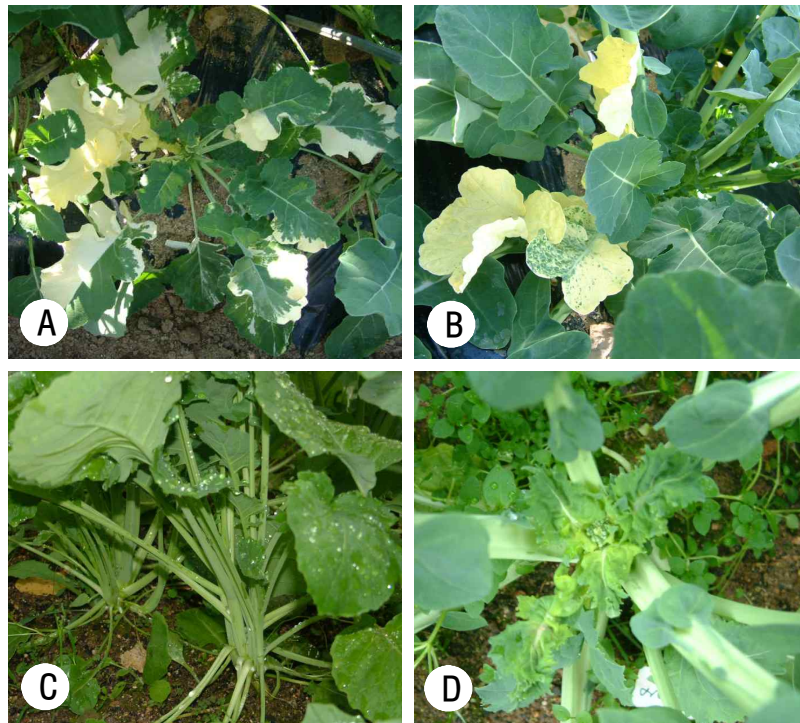


그림10-2. Various mutants of M₁ generation induced by irradiation of proton ion beams and gamma-ray to the rapeseed ‘Naehan’ and ‘Halla’ seeds. A: chlorophyll mutant appearing in ‘Halla’ treated with 100 Gy gamma-ray, B: chlorophyll mutant appearing in ‘Naehan’ treated with 1,000 Gy gamma-ray, C: multi-shoots and D: wrinkled leaves appearing in ‘Naehan’ treated with 800~1,000 Gy proton ion beams.

(2) M₂세대 육성

M₁세대 585개체에서 각 화경별로 채종한 종자를 계통화하여 M₂세대로 990계통을 파종하고

초기 생육에서 개화, 성숙기에 이르기까지 생육특성과 형태적 돌연변이 양상을 조사하였으며, 개화기와 경장에 대한 변이율을 조사하였다.

변이체로는 분지가 나오지 않고 주경이 단축되어 비대해진 이상경이 나타났으며(그림10-3A), M₁세대 ‘내한’의 감마선 1,000 Gy 처리구에서 채종한 엽록소변이체가 M₂세대에서도 유전되어 나타났고(그림10-3B), 줄기에 안토시아닌색소가 진하게 발현된 개체(그림10-3C), 주경은 단축되고 분지가 더 길어지는 이상경(그림10-3D) 등과 대조구에 비해 꽃 색이 연해진 변이체, 화경기형, 꼬투리기형, 다분지 등 다양한 형태의 변이체가 나타났다. M₁세대에서 나타난 엽록소변이체 중 ‘한라’의 감마선 100 Gy 처리구에서 줄기와 꼬투리에도 변이를 보였던 화경을 채종하여 M₂세대에 파종한 계통들은 대부분 출현하지 못하였으며, 출현한 개체도 생장이 미약하여 모두 고사하였다. 반면 ‘내한’의 감마선 1,000 Gy 처리구의 측아에서 발생한 변이체의 화경을 채종하여 파종한 총 96주 가운데 21개체가 엽록소변이체로 나타나 21.9%의 변이율을 보였다. Kwon 등(1981)은 콩에 감마선 300 Gy를 처리하여 M₂세대에서 엽록소변이체의 분리를 보고하였고, Lee(2008)도 M₂세대 유묘기 배추의 순계 계통별 엽록소 돌연변이 출현율에 차이가 있음을 보고 하였는데, 엽록체의 경우 많은 유전자좌가 관여하고 있고 각 유전자좌의 변이율과 동시에 변이를 일으키는 유전자수에 따라 형질의 돌연변이율이 달라지므로 위의 각각의 연구에서 엽록소변이체의 출현율이 다르게 나타난 것은 각 작물의 형질에 관여하는 유전자의 수와 방사선의 종류, 선량 등의 차이라고 생각된다.

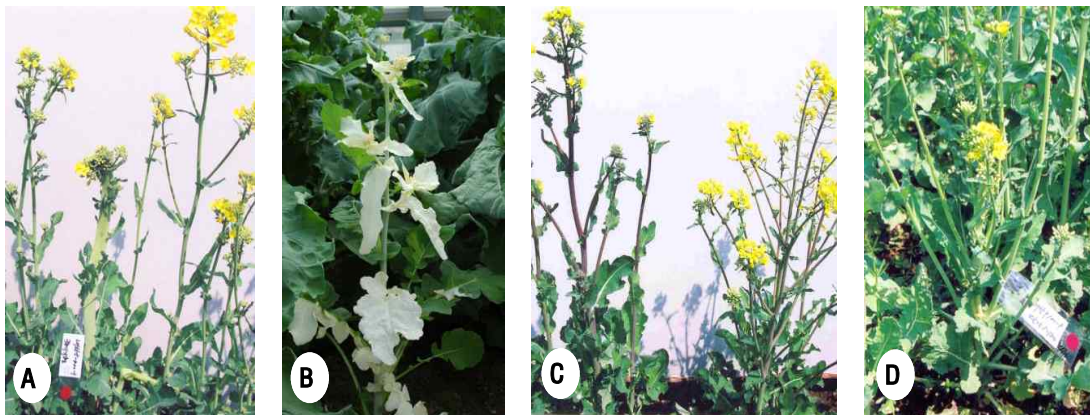


그림10-3. Various mutants of M₂ generation induced by irradiation of proton ion beams and gamma-ray to 3 rapeseed cultivar seeds. A: malformation of stem, B: chlorophyll mutant, C: color changes of stem and D: malformation of stem.

‘내한’ 유래 변이계통의 개화기에 대한 변이율 조사결과 모품종 4월 9일과 비교하여 3일 이상 일찍 개화한 개체가 양성자와 감마선처리 전체 1,068개체 중 207개체로 19.4%의 변이율을 보였으며, 양성자처리 계통이 599개체 중 15.2%, 감마선처리 계통이 469개체 중 24.7%로 나타나 감마선처리가 양성자처리 계통보다 9.5%가 높게 나타났으며 조기 개화한 207개체 중 6~8일 일찍 개화한 계통은 양성자와 감마선처리 각각 2.7%, 3.6%가 나타났다. 변이계통 중에는 4일 이상 늦은 개화를 보이는 개체들이 전체의 11.7%를 차지하였고, 양성자와 감마선처리 계통 각각 9.7%와 14.3%로 나타나 조기개화 변이율과 마찬가지로 감마선처리 계통이 높게 나타났다. ‘탐미’ 유래 변이계통들은 전체 1,029개체 중 모품종 4월 6일에 비해 3일 이상 일찍 개화한 개체가 230개체로 22.4%를 차지하였는데, 양성자처리 계통이 514개체 중 27.4%, 감마선처리 계

통이 469개체 중 17.3%로 나타나 '내한'의 경우와는 반대로 양성자처리 계통에서 조기개화 개체가 많았다. 그러나 6일 이상의 조기 개화를 보이는 개체와 4월 13일 이후 6일 이상 늦게 개화한 개체는 양성자와 감마선처리 계통 모두 없었으며, 모품종에 비해 4~6일 늦게 개화한 개체 수는 전체 9개체로 0.9%를 차지해 '탐미' 유래 계통들은 개화에 있어 아주 일찍 또는 늦은 개체가 적어 선발계통수가 적었다. '한라' 유래 변이계통들은 모품종 4월 7일과 비교하여 1~3일 일찍 개화한 개체는 전체 713개체 중 494개체로 63.9%의 높은 변이율을 보였으나, 4~6일 일찍 개화한 개체는 양성자처리 계통에서 3개체만 나타났다. 선원에 따라 모품종보다 1~3일 일찍 개화한 개체는 양성자처리 계통 61.7%, 감마선처리 계통이 77.7%가 나타나 '내한' 유래 변이계통에서와 같이 감마선처리가 높게 나타났다.

'내한', '탐미', '한라' 3품종 유래 변이계통들의 경장에 대한 변이율을 조사한 결과, '내한' 유래 계통의 경우 모품종 134cm와 비교하여 15cm이상 단간화 된 개체는 전체 1,068개체 중 293개체로 27.4%를 나타내었다. 양성자처리 계통은 599개체 중 160개체가 단간화 되어 26.7%이고, 감마선처리 계통들은 469개체 중 133개체로 28.4%가 나타나 두 선원이 비슷한 변이율을 보였다. 또한 모품종에 비해 15cm이상 길어진 개체가 전체 31.1%를 차지하여 '내한' 유래 계통의 경우는 단간보다는 장간 쪽으로 변이율이 높았다. '탐미' 유래 계통은 모품종의 경장 119cm와 비교하여 20cm이상 짧아진 개체가 전체 1,029개체 중 273개체로 26.5%를 보여 '내한' 유래 변이계통들과 비슷하였다. 단간 변이율은 양성자와 감마선처리 계통 모두 26.5%, 26.6%로 큰 차이가 없었고, 모품종에 비해 20cm이상 길어진 개체는 1.7%로 나타나 '탐미' 유래 계통들은 단간 변이율이 높았다. '한라' 유래 변이계통들은 모품종의 경장 137cm와 비교하여 15cm이상 짧아진 개체가 전체 713개체 중 306개체로 42.9%의 높은 변이율을 보였다. 양성자처리 계통보다 감마선처리 계통이 약 4.2% 높게 나타났으며, 35cm이상 단간화 된 개체가 양성자처리 계통에서 13.8%, 감마선 처리계통에서 16.2%로 높은 비율로 나타났다. 반면 20cm이상 장간화 된 개체는 양성자 800 Gy와 1,000 Gy에서 각각 4개체와 2개체만이 출현하여 전체 0.8%의 변이율을 보였고, 16.4%가 5~20cm 범위 내에서 모품종보다 경장이 길어졌다.

이상의 개화기와 경장에 대한 변이율 조사결과, '탐미'와 '한라' 유래 변이계통의 경우는 6~8일 일찍 개화한 개체가 없었으나 '내한' 유래 변이계통에서 3.1%인 33개체가 나타나 조숙계통에 대한 선발은 '내한' 유래 계통이 유리할 것으로 생각되며, 단간으로의 변이율은 '한라' 유래 계통에서 가장 높았으며, 다음으로 '탐미', '내한' 유래 계통 순 이었다. 경장의 변이율과 개화기와 천립중 등을 고려하여 각 품종 내에서 우수 개체를 선발하고 계통화하여 M₃세대 이후 세대를 진전시켜 고정성 여부를 검토해야할 것으로 생각되었다.

M₂세대 각 변이계통 내에서도 줄기 기형, 엽록소 변이, 조숙과 만숙개체, 단간과 장간개체 등으로 분리가 일어났으며, 일시적 일수도 있으나 고정된 계통들이 나타나기도 하였는데(그림 10-4) 이러한 고정성 여부와 여러 형질의 변이율, 계통의 특성 등을 고려하여 M₂세대에서 총 823개체를 선발하였다(표10-1). 변이율이 높았던 단간 321개체, 장간 254개체, 조숙 42개체, 만숙 51개체, 다분지 20개체, 엽록소변이 21개체, 줄기색변이 37개체와 기타 77개체를 선발하고 개체별로 채종하였다.

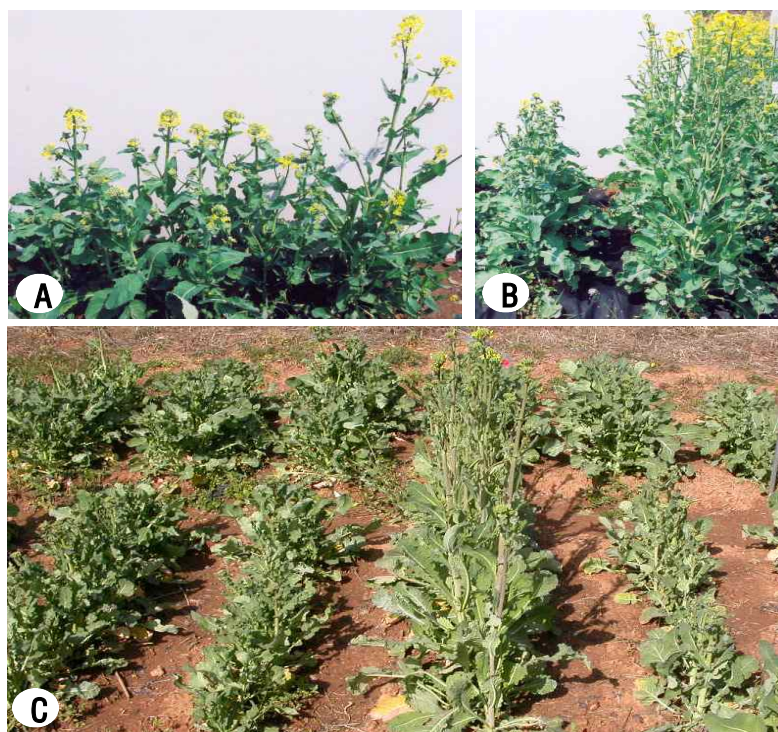


그림10-4. Growth characteristics of M₂ generation induced by irradiation of proton ion beams or gamma-ray to 3 rapeseed cultivar seeds. A: separation of short-stem line, B: fixation of short-stem line (left) and early flowering line (right) and C: early flowering line.

표10-1. The number of the mutant plants selected from M₂ generation in 3 rapeseed cultivars, as a function of irradiation source

Types of variation	No. of total plants	No. of selected plants					
		cv. Naehan		cv. Tammi		cv. Halla	
		^z P	γ	P	γ	P	γ
Short-stem	321	67	44	67	63	42	38
Long-stem	254	53	40	48	49	34	30
Early flowering	42	16	16	4	4	2	0
Late flowering	51	16	8	3	2	16	6
Multi-shoots	20	0	5	3	5	0	7
Large silique	5	0	1	2	2	0	0
Chlorophyll mutation	21	0	21	0	0	0	0
Malformation of stem	24	11	8	1	0	3	1
Color changes of stem	37	12	5	2	1	11	6
Color changes of flower	4	1	2	0	0	0	1
Malformation of silique	8	2	4	1	0	0	1
High vigor	36	4	19	2	6	2	3
Total	823	182	173	133	132	110	93

^zP and γ indicate proton ion beams and gamma-ray, respectively.

(3) M₃세대 육성

M₂세대에서 선발한 823개체 중 단간 255계통을 비롯하여 장간 167계통, 조숙 34계통, 만숙 14계통 및 기타 95계통을 재배하면서 개화기와 경장을 대조구와 비교 관찰하면서 고정성이 높은 계통들을 선발하고자 하였다.

M₃세대에서 개화기 분포는 전체 565계통 중 143계통이 높은 고정성을 보였고, '내한'의 양성자와 감마선처리 유래 계통은 각각 135계통 중 34계통과 118계통 중 32계통으로 조사되었다. 모품종 '내한'의 개화기 보다 5일 이상 일찍 개화한 계통이 양성자처리 유래 6계통, 감마선처리 유래 8계통이 분포하였다. '탐미'의 양성자와 감마선처리 유래 계통은 각각 88계통 중 19계통과 85계통 중 18계통으로 비슷한 고정성을 보였고, 모품종 '탐미'의 개화기는 5일 이상 일찍 개화한 계통은 전체 3계통이며 양성자처리 유래 2계통, 감마선처리 유래 1계통이 분포하였다. '한라'의 양성자와 감마선처리 유래 계통은 각각 69계통 중 20계통과 70계통 중 20계통으로 나타났고, '탐미' 유래 계통들과 같이 양성자와 감마선처리가 비슷한 고정성을 보였다. 모품종 '한라'에서는 개화기가 5일 이상 일찍 개화한 변이계통은 양성자와 감마선처리 유래 각각 6계통씩이며 그 외 계통들은 2~3일 이르거나 늦은 계통으로 나타났다. 개화기에 있어 고정성이 높은 143계통 중 '내한' 유래 변이계통이 66계통으로 고정된 계통이 많았는데 이는 M₂세대 개체별 개화기 조사결과와 유사하였다.

경장에서는 모품종 '내한'의 경장이 평균 131cm이고 이보다 10cm이상 단간인 개체는 양성자처리 유래 계통이 91개체로 13.8%, 감마선처리 유래 계통이 44개체로 10.1%가 나타났으며, 10cm이상 장간인 개체는 양성자처리 유래 계통이 324개체로 49.2%, 감마선처리 유래 계통이 202개체로 46.4%가 나타났다. '탐미' 유래 변이계통은 모품종의 경장 125cm와 비교하여 10cm이상 단간인 개체가 양성자처리 유래 37개체로 8.3%, 감마선처리 유래 87개체로 19.3%가 조사되었고, 10cm이상 장간 개체는 양성자처리 유래 133개체로 29.9%, 감마선처리 유래 66개체로 14.6%가 조사되어 파종 계통수 대비 양성자처리 유래 계통이 장간 쪽으로 더 나타났다. '한라' 유래 변이계통들도 모품종의 경장 132cm에 비해 10cm이상 단간 개체가 양성자와 감마선처리 유래 각각 43개체 14.4%와 51개체 15.8%로 나타났고 10cm이상 장간개체는 각각 98개체 32.9%와 96개체 29.8%로 나타났다.

변이계통들의 경장에 대한 분포를 모품종들과 비교하여 조사한 결과를 바탕으로 고정성 여부를 조사한 결과, 각 계통에 따라 차이가 있었고 조사한 전체 258계통 중 '내한' 유래 변이계통은 108계통 중 6계통이 91% 이상 고정되었으며 그중 단간, 장간이 각각 2계통과 1계통으로 나타났고 나머지 3계통은 모품종과 비슷한 크기로 고정되었다. 고정된 개체수가 50% 이하인 계통은 47계통으로 나타나 분리가 많이 일어났음을 알 수 있었다. '탐미' 유래 변이계통은 91% 이상 고정된 계통이 총 89계통 중 7계통으로 나타났고 71~90%의 고정률을 보인 계통이 40계통으로 가장 많았으며, 50% 이상 분리가 일어난 계통은 16계통으로 나타났다. '한라' 유래 변이계통 역시 91% 이상 고정된 계통이 4계통으로 적었으며 '내한' 유래 변이계통과 같이 분리가 일어난 계통이 많았다.

유채 수량구성요소로는 분지수, 1수협수, 1협결실수, 종자의 천립중 등 여러 가지가 있는데 이러한 요소들 중 천립중에 대하여 개화기와의 관계를 조사하였다(그림10-5). M₃세대에서 대조구로 파종하여 채종한 모품종 '내한'의 천립중은 2.7g이고 각 변이계통의 개화기에 따른 천립중은 모품종보다 가벼운 계통은 0.5g이 차이나는 2.2g인 것과 무거운 계통은 2.1g이 차이나는 4.8g까지 다양하였으나 개화기가 빠르거나 늦은 것과는 큰 관계($R^2=0.0089$)가 없었다. 모품종

‘탐미’의 천립중은 3.9g이고 변이계통 중 가벼운 것은 1.5g, 무거운 것은 2.6g의 차이가 났으나 ‘내한’ 유래 변이계통과 마찬가지로 개화기와는 큰 관계없이 천립중은 다양하게 나타났다. ‘한라’ 유래 변이계통 역시 개화기와 천립중은 큰 관계가 없는 것으로 나타났다.

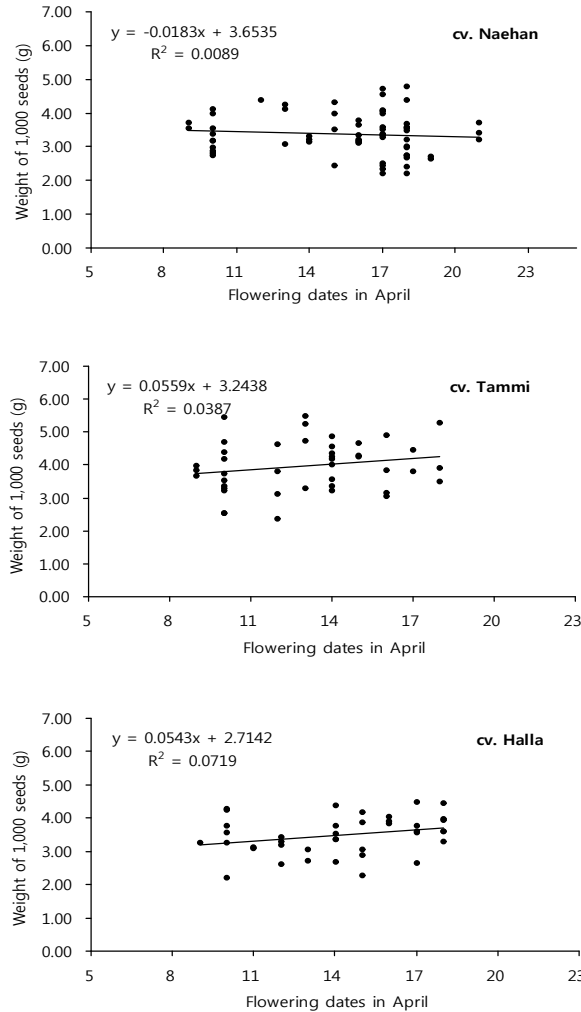


그림10-5. Relationships between flowering date and weight of 1,000 seeds in M₃ generation induced by irradiation of proton ion beams and gamma-ray to 3 rapeseed cultivar seeds.

M₃세대에서 개화기와 경장에 대한 고정 여부와 형태적 특성, 천립중 등을 조사하여 고정성이 높은 계통은 물론 분리가 일어난 계통일지라도 유용형질의 특성을 지닌 각 계통에서 개체별로 종자를 수확하여 총 66계통을 선발하였다(표10-2). 선발계통은 조숙·단간·대화의 3가지 특성을 갖는 계통도 있었는데 ‘내한’의 양성자처리에서 1계통을 선발하였다. 조숙·단간의 2가지 특성을 갖는 계통은 ‘탐미’의 양성자와 감마선처리 유래 각각 3계통과 2계통이었고, ‘한라’의 양성자와 감마선처리 유래 각각 1계통씩을 선발하였다. 그 외 개화기가 빠르고 생장이 강한 1계통을 ‘내한’의 감마선처리에서, 개화기가 빠르고 꽃이 큰 계통을 ‘내한’과 ‘탐미’의 감마선처리에서 각각 1계통씩을 선발하였다. 단일 특성으로 조숙 6계통, 단간 35계통과 생장이 강한 9계통, 엽록소변이 2계통을 각각 선발하였으며 이들 유용형질의 변이계통을 M₄세대로 공시하고 세대를 진전시켜 고정성 여부 등을 확인하여 우수계통을 선발하고자 하였다.

표10-2. The number of the mutant lines selected from M₃ generation in 3 rapeseed cultivars, as a function of irradiation source

Types of variation	No. of total lines	No. of selected lines					
		cv. Naehan		cv. Tammi		cv. Halla	
		P ^z	γ	P	γ	P	γ
Early flowering & short-stem & large flower	1	1	0	0	0	0	0
Early flowering & short-stem	11	3	0	3	2	2	1
Early flowering & high vigor	1	0	1	0	0	0	0
Early flowering & large flower	2	0	1	0	1	0	0
Early flowering	9	0	2	1	0	3	3
Short-stem	31	5	4	4	4	6	8
High vigor	9	2	2	1	4	0	0
Chlorophyll mutation	2	0	2	0	0	0	0
Total	66	11	12	9	11	11	12

^zP and γ indicate proton ion beams and gamma-ray, respectively.

(4) M₄세대 육성

M₄세대로 공시한 66계통의 종자를 전북대학교 내·외 실험포장에 파종, 재배하면서 M₂세대 및 M₃세대의 특성과 비교하여 고정성 여부 등을 조사하였다. ‘내한’ 유래 변이계통 중 NP1000-13-1-361은 M₂세대에서는 만숙이었으나 M₃세대에서 조숙이면서 단간, 대화의 특성이 있어 선발하였는데 M₄세대에서 개화기가 모품종 보다 5일이 빨랐고 경장은 105cm로 모품종 보다 15cm가 단간화 되었으며 꽃의 크기도 그대로 유전되어 모품종 보다 크게 나타나 M₃세대의 특성을 유지하였다. 조숙·단간의 특성을 지닌 3계통 중 2계통은 M₄세대에서 그 특성이 나타나지 않았으며, NP600-1-1-198계통은 모품종 보다 개화기가 7일 빠르고 경장이 17cm 짧아져 M₃세대의 특성을 유지하였다. M₂세대에 조숙 또는 단간의 특성으로 선발한 계통들은 M₃ 및 M₄세대에서 그 특성을 유지하는 계통도 있었으나 분리가 일어난 계통도 나타났다. M₂세대에서 엽록소변이체로 선발한 2계통은 M₃세대에서 50% 이상 분리가 일어났으나 M₄세대에서 Nγ-1000-4-268계통은 66.2%, Nγ1000-4-1-296계통은 62.3%의 고정률을 보였다. ‘탐미’ 유래 변이계통 중 TP600-2-1-240은 M₂세대와 M₃세대에서 조숙·단간으로 선발하였는데, M₄세대에서는 모품종 보다 오히려 개화기가 조금 늦고 경장은 비슷하여 변이가 회복된 것으로 생각되고 Tγ 1000-2-1-212계통은 M₂와 M₃세대에서 조숙·단간의 특성이었으나 M₄세대에서는 개화기가 모품종과 같고 경장은 96cm로 11cm가 짧아 조숙의 특성은 없고 단간의 특성만 나타났다. 또한 TP200-13-1-403, Tγ800-9-691계통은 M₂~M₄세대 모두 개화기는 모품종과 비슷하고 경장이 짧은 단간의 형질을 유지해 고정이 된 것으로 생각되었다. ‘한라’ 유래 변이계통들도 크게 다른 양상은 없었고 HP600-21-598계통은 M₂와 M₃세대에서 조숙·단간의 형질을 유지하다가 M₄세대에

서 개화기는 모품종과 비슷하여 조숙의 형질은 없어지고 경장이 26cm까지 짧아진 단간의 형질만 나타났으며, HP200-7-1-606계통은 M₂~M₄세대까지 개화기가 모품종보다 빠른 조숙의 형질을 계속 유지하였고 Hy400-12-1-475계통은 M₂~M₄세대까지 경장이 110~113cm로 고정되어 단간의 형질을 그대로 유지하였다.

방사선의 영향으로 변형된 염색체 종류에 따라 세포의 고정이 다르게 발생하여 돌연변이의 종류와 양상이 달라진다는 보고가 있고(Durante 등, 1998), Lee 등(2003)은 변형된 염색체의 재배열이 일어나기 전에 DNA에서 변이가 먼저 발생하면 고정이 빠르지만 염색체 재배열 이후 DNA에서 변이가 발생하면 후기 세대에서도 분리가 계속 발생할 것이라 가정하고 방사선을 이용한 벼 돌연변이 M₇세대에서도 분리되는 계통은 후자의 원인에 의한 것으로 생각된다고 하였는데, 본 연구에서도 M₃세대와 M₄세대에서 계속 분리가 일어나는 것은 위와 유사한 결과라고 생각된다. 따라서 M₂~M₄세대에 비교적 고정된 계통과 M₂세대에서는 나타나지 않았던 유용형질의 변이특성이 M₃와 M₄세대에서 나타나 높은 고정성을 보인 계통들을 선발하고 종자를 채종하여 M₅세대로 31계통을 공시하였다.

(5) M₅세대 육성 및 우수계통 선발

M₄세대에서 총 31계통을 선발하여 M₅세대로 공시하고 육성포장에 파종하여 재배하면서 국립종자원 신품종 심사를 위한 유체 특성조사요령에 따라 고유특성, 개화기, 경장, 성숙기, 1수협수, 협장, 1협결실수, 천립중, 지방함량, 지방산조성 등을 조사하였다. 파종계통은 두 가지 유용형질을 가진 조숙·단간 3계통, 조숙·대화 2계통, 조숙·생장강 2계통과 한 가지 유용형질을 갖는 조숙 7계통, 단간 10계통, 생육강 3계통, 대화 2계통, 엽록소변이 2계통이며, 각 선원별로는 양성자처리가 11계통, 감마선처리가 20계통이다(표10-3).

표10-3. The number of lines planted of M₅ generation in 3 rapeseed cultivars in the field, as a function of irradiation source

Types of variation	No. of total lines	No. of planted lines					
		cv. Naehan		cv. Tammi		cv. Halla	
		P ^z	γ	P	γ	P	γ
Early maturity & short-stem	3	3	0	0	0	0	0
Early maturity & large flower	2	0	1	0	1	0	0
Early maturity & high vigor	2	0	0	0	2	0	0
Early maturity	7	0	1	0	2	2	2
Short-stem	10	0	0	4	1	2	3
High vigor	3	0	1	0	2	0	0
Large flower	2	0	2	0	0	0	0
Chlorophyll mutation	2	0	2	0	0	0	0
Total	31	3	7	4	8	4	5

^zP and γ indicate proton ion beams and gamma-ray, respectively.

특성조사는 반복 당 40개체 이상 생존한 계통으로 하였고, 모품종과 차별성을 알아보하고자 5% 유의수준에서 다중검정을 실시하여 비교한 결과, '내한' 유래 변이계통은 총 10계통을 파종하였으나 생존율이 높은 8계통을 조사하였고, 모품종 '내한'의 개화기와 성숙기는 각각 4월 22일, 6월 16일이고 경장은 115.3cm로 조사되었는데, 변이계통의 개화기는 모품종과 2계통이 비슷하였고 4계통이 3~5일 이상 빨랐으며 2계통이 6일 이상 빠르게 개화하였다. 성숙기는 모품종과 1계통이 같았으며 2계통이 2~5일 빨랐고 5계통이 2~4일 늦었다. 경장은 3계통이 짧았고 5계통이 길게 나타났다. 천립중, 분지수, 1수협수, 협장, 1협결실수 등도 모품종과 비교하여 비슷하거나 감소 또는 증가하는 방향으로 다양하였는데, 천립중의 경우 모품종 3.6g보다 1.6g이 높게 나타난 계통이 있었고, 1협결실수에서는 약 6립이 더 많은 계통이 나타났다(표10-4).

표10-4. Agronomic characteristics of the mutant lines in M₅ generation induced by irradiation of proton ion beams and gamma-ray to the rapeseed 'Naehan' seeds

Line No.	Flowering date	Maturing date	Plant height (cm)	Weight of 1,000 seeds (g)	No. of branches	No. of siliqua	Siliqua length (cm)	No. of seeds
cv. Naehan	Apr. 22	Jun. 16	115.3 d ^z	3.6 d	8.6 d	60.0 ab	6.0 bcd	17.8 b
NP600-1-1-198-2	Apr. 14	Jun. 11	105.1 f	4.2 c	12.8 ab	52.2 bc	6.2 bc	22.6 a
NP1000-13-2-361-2	Apr. 19	Jun. 19	110.4 e	4.1 cd	13.1 a	48.1 c	5.3 cd	14.8 c
NP1000-13-2-362-4	Apr. 17	Jun. 14	94.3 g	4.2 c	11.1 bc	50.1 bc	5.6 bcd	18.5 b
N _γ 1000-4-1-268-1	Apr. 22	Jun. 19	117.6 c	3.5 e	8.7 d	38.1 d	5.2 d	11.4 d
N _γ 1000-4-2-292-1	Apr. 16	Jun. 20	122.0 a	4.5 b	12.9 ab	61.1 ab	5.6 bcd	15.5 c
N _γ 1000-4-2-296-1	Apr. 19	Jun. 19	117.8 c	3.6 d	13.0 a	65.0 a	6.4 ab	19.2 b
N _γ 600-20-1-638-1	Apr. 17	Jun. 18	119.2 b	5.2 a	10.8 c	47.3 cd	7.1 a	23.9 a
N _γ 600-21-1-641-1	Apr. 20	Jun. 16	122.6 a	4.1 cd	11.0 bc	51.7 bc	6.0 bcd	22.9 a

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at *P*=0.05.

특성조사를 바탕으로 변이계통의 유용형질이 고정되고 모품종과 차별성이 있는 4계통을 선발하였다. NP600-1-1-198-2계통은 M₄세대 특성이 조숙·단간으로 M₅세대에서 개화기와 성숙기가 모품종 '내한'보다 각각 8일과 5일이 빠르고(그림10-6A, B), 경장은 10.2cm가 짧아 조숙·단간의 특성이 그대로 나타났다. 또한 천립중은 모품종 3.6g보다 0.6g이 높고 분지수와 1협결실수는 각각 12.8개, 22.6립으로 모품종 8.6개와 17.8립보다 높게 나타났으나 협장은 6.2cm로 비슷하고 1수협수는 낮게 나타났다. NP1000-13-2-362-4계통의 M₄세대 특성도 조숙·단간으로 M₅세대에서 개화기와 성숙기가 모품종 '내한'보다 각각 5일과 2일이 빠르고 경장은 21.0cm가 단축되어 변이 특성이 고정되었다(그림10-6C). 천립중은 4.2g, 분지수는 11.1개로 모품종보다 높으나 1수협수는 50.1협, 협장은 5.6cm, 1협결실수는 18.5립으로 낮거나 비슷하였다.

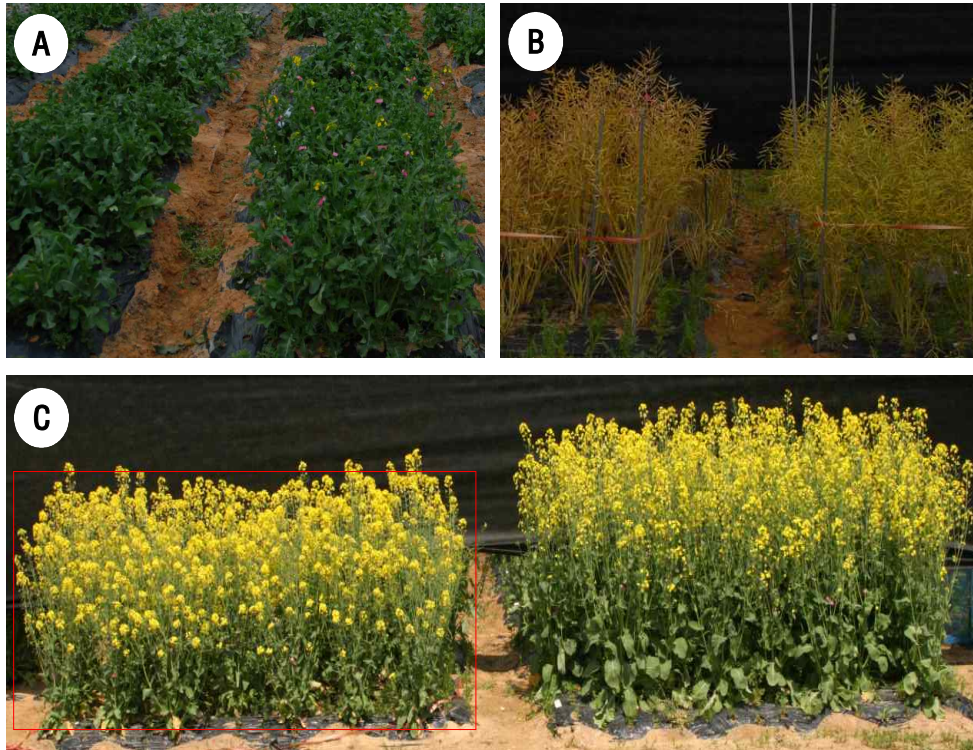


그림10-6. Growth characteristics of the mutant lines in M₅ generation induced by irradiation of proton ion beams to the rapeseed 'Naehan' seeds. A: early flowering line (NP600-1-1-198-2), B: early maturing line (NP600-1-1-198-2) and C: short-stem line (NP1000-13-2-362-4).

N₆600-20-1-638-1계통의 M₄세대 특성은 생육이 강하고 꽃이 큰 계통으로, M₅세대에서 개화기는 모품종보다 5일이 빠르나 성숙기는 2일이 늦고 경장은 119.2cm로 컸으며, 천립중이 5.2g으로 선발계통 중 가장 높았다. 협장은 7.1cm로 길고 1협결실수가 23.9립으로 높았다. 이 계통의 꽃과 종자의 크기를 비교한 결과(표10-5, 그림10-7), 모품종 '내한'에 비하여 꽃의 길이, 폭, 면적 및 자방과 주두까지의 길이가 5% 유의수준에서 모두 크게 나타났고, 국내 유채 육성품종 중 꽃의 크기가 가장 큰 '탐미'(Jang 등, 1998) 보다도 크게 나타났다. 종자의 크기도 2.07mm로 모품종 '내한'의 1.77mm와 '탐미' 1.83mm보다 크게 나타나 천립중이 높은 것으로 생각된다.

표10-5. Comparison of the flower and seed size of the mutant lines in M₅ generation induced by irradiation of proton ion beams and gamma-ray to the rapeseed 'Naehan' seeds

Line No.	Petal length (mm)	Petal width (mm)	Petal area (cm ²)	Carpel length (mm)	Seed size (mm)
cv. Naehan	13.7 c ^z	7.9 c	1.32 c	7.4 b	1.77 c
cv. Tammi	15.7 b	10.7 b	2.99 b	9.7 a	1.83 c
N ₆ 600-20-1-638-1	17.8 a	11.9 a	3.30 a	10.0 a	2.07 b
NP1000-13-2-361-2	15.0 b	11.5 a	3.01 b	9.7 a	2.14 a

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at P=0.05.

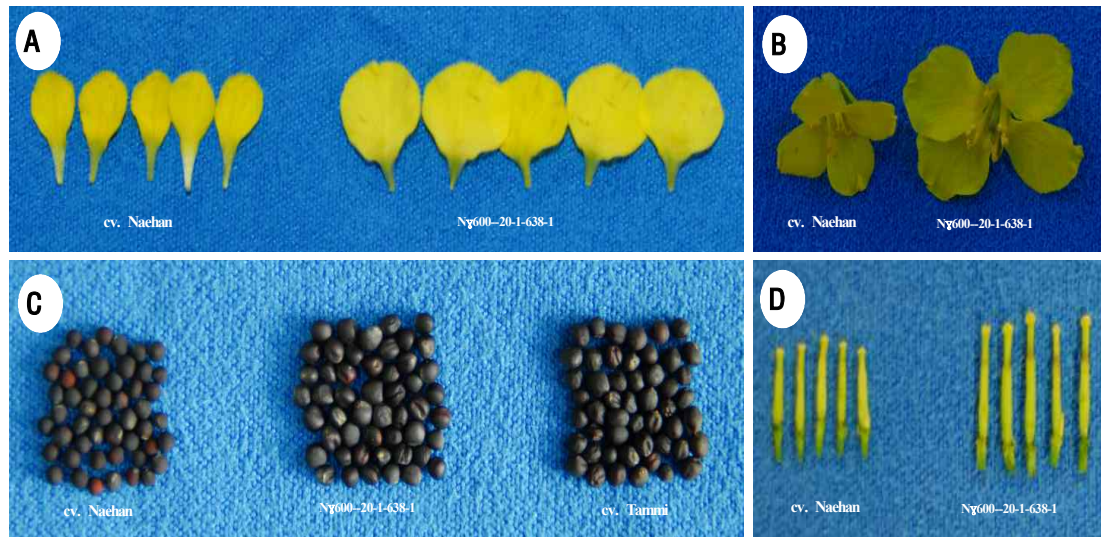


그림10-7. Comparison of the flower and seed size of the mutant line (N γ 600-20-1-638-1) in M₅ generation induced by irradiation of gamma-ray to the rapeseed 'Naehan' seeds. A: petals, B: flowers, C: seeds and D: carpels.

M₁세대 측아에서 발달한 엽록소변이 N γ 1000-4-1-268-1계통은 M₄세대에서 엽록소변이율이 66.2%가 고정 되었는데, M₅세대에서의 고정성 여부를 조사하였고 화분의 불임률과 크기를 관찰하였다(그림10-8). M₄세대에서 같은 엽록소변이계통으로 선발한 N γ 1000-4-2-296-1은 엽록소변이체가 M₄세대에서는 62.3%가 나타났으나 M₅세대에서 오히려 30%로 감소하여 분리가 많이 일어난 것으로 생각되며, N γ 1000-4-1-268-1계통은 M₄세대보다 6.8%가 많은 73%로 나타나 세대가 진전되면서 고정률이 높아졌다. 모품종인 '내한'의 정상화분은 98.2%로 관찰되었고, N γ 1000-4-1-268-1계통은 90.9%로 관찰되어 불임화분수가 많고 수정 능력이 떨어져 1협결실수가 적은 것으로 생각된다. 정상화분의 크기는 모품종이 30.84 μ m이고 변이계통인 N γ 1000-4-1-268-1계통은 31.51 μ m로 관찰되어 오히려 엽록소변이계통이 크게 나타났다.

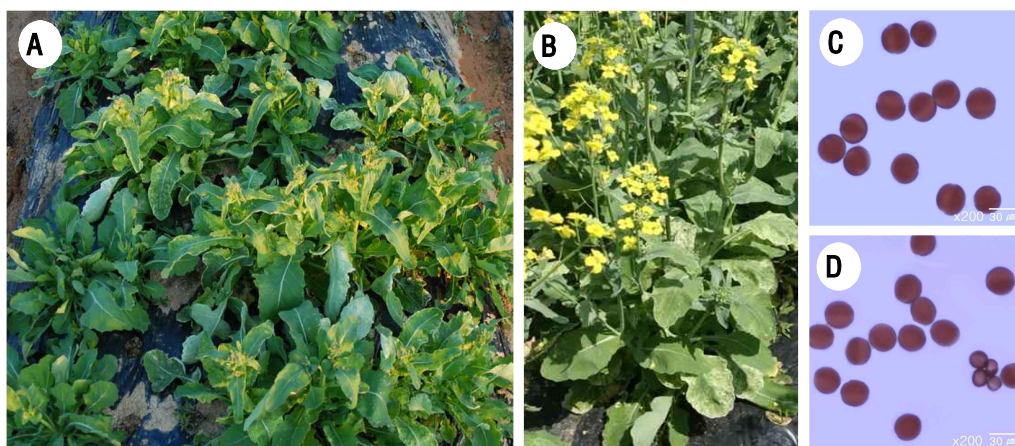


그림10-8. Growth characteristics and pollen shape of the chlorophyll mutant line (N γ 1000-4-1-268-1) in M₅ generation induced by irradiation of gamma-ray to the rapeseed 'Naehan' seeds. A: bolting stage, B: flowering stage, C: pollens of the control and D: pollens of the mutant line.

‘탐미’ 유래 변이계통은 12계통을 과종하여 육성하였으나 2계통이 대부분 고사하여 10계통을 조사하였는데(표10-6), 모품종 ‘탐미’의 개화기와 성숙기는 각각 4월 16일과 6월 16일로 조사되었고 경장은 106.7cm로 나타났다. 변이계통 대부분이 개화기는 모품종과 비슷하였고 2계통이 2~3일 빨랐으며, 성숙기는 1계통이 빠르게 나타났다. 경장의 경우는 1계통이 약 5cm가 짧게 나타났을 뿐 모품종과 큰 차이를 보이는 계통은 없었다. 천립중은 모품종 4.2g보다 1계통이 0.4g이 높았고, 1수협수가 약 5협이 많은 계통이 나타났다. 조사결과와 같이 ‘탐미’ 유래 변이계통들은 모품종과 뚜렷한 차이를 보이는 계통이 적게 나타난 것을 알 수 있었는데, 이러한 결과는 M₅세대에서 많은 계통들이 분리가 일어나고 또한 열성회복 되어 유용형질의 변이 특성이 나타나지 않은 것으로 생각된다.

‘내한’ 유래 변이계통에서와 같이 특성조사를 바탕으로 유용형질이 고정되고 모품종과 차별성이 인정되는 1계통을 선발하였는데, T_γ600-17-2-374-1의 개화기는 모품종 ‘탐미’의 4월 16일과 같고 성숙기는 4일이 빠른 6월 11일이다. 경장은 모품종이 106.7cm인데 이보다 3cm가 컸고 천립중은 4.6g으로 0.4g이 무거웠으며, 1차분지수는 14.3개, 1수협수 53.5협, 협장은 6.4cm로 모품종보다 높게 나타났으나 1협결실수는 비슷하였다.

표10-6. Agronomic characteristics of the mutant lines in M₅ generation induced by irradiation of proton ion beams and gamma-ray to the rapeseed ‘Tammi’ seeds

Line No.	Flowering date	Maturing date	Plant height (cm)	Weight of 1,000 seeds (g)	No. of branches	No. of siliqua	Siliqua length (cm)	No. of seeds
cv. Tammi	Apr. 16	Jun. 16	106.7 d ^z	4.2 bc	12.9 bc	48.6 b	5.7 cd	20.1 def
TP200-8-1-70-2	Apr. 18	Jun. 17	112.7 a	4.1 c	14.5 ab	53.3 a	5.7 cd	20.1 def
TP200-13-2-463-1	Apr. 17	Jun. 15	103.7 ef	4.4 ab	14.8 a	41.7 cd	6.1 abc	19.8 ef
TP800-20-1-590-2	Apr. 17	Jun. 17	103.0 f	4.0 d	12.2 c	40.2 d	6.0 abc	22.3 ab
T _γ 200-1-2-200-1	Apr. 18	Jun. 19	104.3 e	4.1 c	12.1 c	34.3 e	6.5 ab	23.9 a
T _γ 400-2-2-204-1	Apr. 17	Jun. 18	113.2 a	4.3 b	13.1 abc	51.8 a	5.6 d	21.1 bcd
T _γ 400-2-2-204-2	Apr. 13	Jun. 16	107.4 d	4.1 c	11.9 dc	48.7 b	5.6 d	22.2 abc
T _γ 1000-2-2-212-2	Apr. 14	Jun. 16	101.6 g	4.2 bc	11.9 dc	47.8 b	5.8 bcd	18.3 f
T _γ 600-17-2-374-1	Apr. 16	Jun. 11	109.7 c	4.6 a	14.3 ab	53.5 a	6.4 ab	20.5 cde
T _γ 600-17-2-374-2	Apr. 16	Jun. 15	111.1 b	4.0 d	13.9 ab	43.8 c	6.0 abc	21.7 bcd
T _γ 800-20-2-459-1	Apr. 18	Jun. 15	111.0 b	3.8 e	10.3 d	39.4 d	6.6 a	22.7 ab

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at *P*≦0.05.

‘한라’ 유래 변이계통은 9계통을 과종하여 육성하였으나 고사개체가 많은 4계통을 특성조사에서 제외시키고 5계통을 조사하였다(표10-7). 모품종 ‘한라’는 개화기와 성숙기가 4월 17일, 6월 17일인데, 변이계통 대부분은 이보다 늦었고 1계통이 개화기는 3일, 성숙기는 1일이 빨랐다. 모품종의 경장은 114.3cm이고 이보다 15cm이상 짧아진 2계통이 나타났으며, 그 외 계통은 경장이 모두 길었다. 천립중은 변이계통 대부분이 모품종과 비슷하거나 약간 낮았는데, 1계통이 모

품종 4.0g 보다 0.9g이 낮아 큰 차이를 보였다. 그러나 천립중이 가장 낮은 이계통의 1차분지수, 1수협수, 협장과 1협결실수는 모품종보다 높게 나타났다.

‘한라’ 유래 변이계통 역시 특성조사 결과를 바탕으로 1계통을 선발하였는데 Hy600-11-1-148-1은 개화기가 4월 14일로 모품종 ‘한라’보다 3일이 빠르고 성숙기는 6월 16일로 1일이 빠르며, 경장은 16cm가 짧아진 98.0cm로 조사되었다. 천립중은 3.7g으로 모품종 4.0g보다 가벼우나 1차분지수는 12.3개, 1수협수는 43.2협, 1협결실수는 21.7립으로 모품종과 비슷하였다.

표10-7. Agronomic characteristics of the mutant lines in M₅ generation induced by irradiation of proton ion beams and gamma-ray to the rapeseed ‘Halla’ seeds

Line No.	Flowering date	Maturing date	Plant height (cm)	Weight of 1,000 seeds (g)	No. of branches	No. of siliqua	Silique length (cm)	No. of seeds
cv. Halla	Apr. 17	Jun. 17	114.3 c ^z	4.0 a	12.2 cd	43.9 bc	6.1 b	21.4 bc
HP200-7-2-606-1	Apr. 15	Jun. 19	97.4 d	4.1 a	13.5 b	38.3 d	5.7 c	19.8 c
Hy600-11-1-148-1	Apr. 14	Jun. 16	97.6 d	3.7 c	12.3 cd	43.2 c	6.1 b	21.7 b
Hy1000-1-2-225-1	Apr. 21	Jun. 20	118.3 b	3.1 d	15.4 a	45.0 b	6.7 a	26.2 a
HP600-1-2-238-1	Apr. 18	Jun. 20	122.8 a	3.9 b	12.9 bc	49.3 a	6.1 b	20.9 bc
Hy400-8-1-745-1	Apr. 19	Jun. 20	118.6 b	4.0 a	11.7 d	36.0 e	6.2 b	21.1 bc

^zMean separation within columns by Duncan’s multiple range test at $P=0.05$.

‘내한’, ‘탐미’, ‘한라’ 유래 각 선발계통의 고유 특성을 조사한 결과 엽형은 모품종과 선발계통 대부분이 하부익상전열이고 결각은 적은 것부터 많은 것까지 다양하였다. 엽색은 NP600-1-1-198-2와 Ny600-20-1-638-1계통이 ‘한라’와 유사하게 농녹색이었고 나머지 계통은 녹색으로 조사되었다. 줄기색은 Hy600-11-1-148-1계통이 농녹색이고 나머지 계통은 녹색이었으며, 꽃색은 대부분 황색이었으나 Ny600-20-1-638-1과 Ty600-17-2-374-1계통이 진한 황색을 나타내었다. 종피색은 모든 계통이 흑색을 띠었으며, 많은 연구자들의 육종목표 중 하나인 노란색 종피를 갖는 변이 계통은 선발할 수 없었다.

선발계통들의 지방함량과 지방산조성을 분석한 결과(표10-8), 모품종 ‘내한’의 지방함량은 40.4%, 지방산 중 포화지방산인 palmitic acid는 4.3%, stearic acid는 2.1%로 나타났고, 불포화 지방산 중 oleic acid는 64.2%, linoleic acid는 19.7%, linolenic acid는 8.4%, eicogenic acid는 1.3%로 나타났다. NP600-1-1-198-2계통의 지방함량은 45.9%로 모품종보다 5.9%가 높고 포화지방산은 모품종과 비슷하였으나 oleic acid는 67.8%로 높게 나타났으며, linoleic acid와 linolenic acid는 각각 16.7%, 7.3%로 낮게 나타났다. NP1000-13-2-362-4계통은 지방함량이 모품종보다 높은 41.2%이며, 포화지방산 및 불포화지방산은 모두 모품종과 매우 비슷하게 나타났다. Ny600-20-1-638-1계통은 지방함량이 40.0%로 모품종보다 낮았고, 지방산 중 oleic acid와 linolenic acid는 낮게 나타났으나 linoleic acid는 22.7%로 높게 나타났다. 모품종 ‘탐미’의 지방함량은 38.6%인데 Ty600-17-2-374-1계통은 41.3%로 높게 나타났다. 포화지방산 중 palmitic acid와

stearic acid는 모품종이 4.2%, 2.3%인데 Ty600-17-2-374-1계통은 각각 4.4%와 2.0%로 나타났다. 불포화지방산 중 oleic acid는 모품종 66.9%보다 2.2%가 낮은 64.7%로 나타났고, linoleic acid와 linolenic acid는 각각 21.5%, 6.6%로 높았다. 모품종 '한라'와 Hy600-11-1-148-1계통의 지방함량은 각각 38.0%와 41.8%로 선발계통이 높았고 포화지방산은 6.7%와 6.6%로 비슷하였다. oleic acid는 Hy600-11-1-148-1계통이 68.8%로 모품종보다 2.7%가 높았으며, linoleic acid와 linolenic acid는 모두 낮게 나타났다. 모품종과 선발계통 모두 유채기름을 식용으로 섭취할 때 문제가 되는 erucic acid는 없는 것으로 나타났다.

표10-8. Oil contents and fatty acid compositions of the selected mutant lines in M₅ generation induced by irradiation of proton ion beams and gamma-ray to 3 rapeseed cultivar seeds

Line No.	OC ^z (%)	Composition of fatty acids (%)						
		PA (C16:0)	SA (C18:0)	OA (C18:1)	LA-1 (C18:2)	LA-2 (C18:3)	EA-1 (C20:1)	EA-2 (C22:1)
cv. Naehan	40.4	4.3	2.1	64.2	19.7	8.4	1.3	0
NP600-1-1-198-2	45.9	4.4	2.7	67.8	16.7	7.3	1.1	0
NP1000-13-2-362-4	41.2	4.3	2.1	64.1	19.6	8.6	1.3	0
Ny600-20-1-638-1	40.0	4.2	2.3	61.8	22.7	7.7	1.3	0
cv. Tammi	38.6	4.2	2.3	66.9	19.9	5.8	0.9	0
Ty600-17-2-374-1	41.3	4.4	2.0	64.7	21.5	6.6	0.8	0
cv. Halla	38.0	4.5	2.3	66.1	20.8	5.4	0.9	0
Hy600-11-1-148-1	41.8	4.2	2.4	68.8	18.6	5.1	0.9	0

^zOC, PA, SA, OA, LA-1, LA-2, EA-1 and EA-2 stand for oil content, palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, eicogenic acid and erucic acid, respectively.

Linoleic acid와 linolenic acid 같은 polyunsaturated fatty acid(PUFA)는 영양적으로 불리한 점이 있는데 유채는 8~10%의 linolenic acid를 포함하고 있기 때문에 linolenic acid가 적게 함유되거나 없는 기름보다 더 빨리 산패가 된다(Jang, 2002). Oleic acid는 불포화지방산 중 상대적으로 산화안정성이 높아 메칠에스터화반응 이전에는 융점이 상온이지만 에스터화반응 이후에는 -19.9℃로 융점이 낮아져 바이오디젤의 원료로 사용하기 위한 기름작물은 oleic acid가 많이 함유된 지방산조성을 갖는 것이 유리하다(Jang 등, 2010). 따라서 유채기름의 지방산조성에서 oleic acid와 linolenic acid의 함량은 품질을 결정짓는 중요한 요소라 생각되고 본 연구에서 NP600-1-1-198-2계통과 Hy600-11-1-148-1계통은 oleic acid는 높고 linolenic acid는 낮게 나타나 지방산 조성이 양호하였다. Guan과 Li(2006)는 유채 종자에 ¹²C 속중성자를 80 Gy 선량으로 처리한 M₂세대 선발계통에서 종자 내 지방함량은 41.3%가 나타났고, 지방산 중 oleic acid는 68.4%로 대조구에 비해 약 8.7%가 높았다고 하였으며, linolenic acid는 약 1.7%가 낮게 나타났다고 하였다. 따라서 본 연구와 위 연구 결과로 본다면 유채 품종육성에 있어 방사선처리를 통해 지방함량은 높고 지방산이 개량된 양질유의 우수계통을 선발하고 육성할 수 있을 것으로

기대되었다.

2. 내염성 돌연변이체 선발 및 육성

가. 연구개발 수행내용 및 실험방법

(1) 연구개발 수행내용

유체의 내염성에 관한 연구는 간척지별 토양 염농도에 따른 출현율과 생존율 조사(Sohn 등, 2009), 온실 내에서 '선망' 등 유채 12품종에 대한 해수 염 농도별 생육반응과 품종 간 내염성 차이 조사(Lee 등, 2009), '한라유채' 등 6품종에 NaCl의 농도를 0.2~1.6%까지 처리하여 발아 시험(Yoo, 1988)을 한 결과 등이 있으나 국내에서 내염성 유채의 품종육성에 관한 연구는 거의 이루어 지지 않은 실정이다.

세계 최장의 새만금 방조제가 완공되어 2만8천ha의 간척지 토양이 만들어짐으로써 여러 가지 개발계획이 발표되고 준비 중이며, 농지로의 활용이 구체화 되고 있는 시점에서 농업연기관에서는 간척지 토양에서 재배할 다양한 작물들을 연구하고 있고, 바이오디젤의 원료가 되는 유채의 재배도 검토되고 있는 바 내염성을 갖는 품종개발이 요구된다.

본 연구에서는 유채의 돌연변이 육종을 통해 선발한 유용변이체의 종자를 새만금과 계화도의 간척지포장에 파종하여 출현율, 생존율, 생육특성 등을 조사하고 실내에서 내염성 검정을 하여 염에 대한 내성을 지닌 품종을 육성하고자 하였다.

(2) 실험방법

(가) M₁~M₅세대 육성과정

전북대학교 내 실험포장에서 채종한 M₁세대 종자를 계통화하여 김제시 진봉면 소재 새만금 간척지포장에 115계통을 파종하고 생존율 및 토양의 pH와 EC를 조사하고 변화를 관찰하였다. 생존하여 개화·결실한 개체들의 경장을 측정하고 분포를 조사하였으며, 생존율과 경장의 특성 등을 고려하여 M₂세대 내염성 유망계통을 선발하였다. M₃세대는 M₂세대에서 선발한 내염성이 유망한 95계통과 일반재배포장에서 선발한 생장이 강하고 유용형질의 특성을 갖는 120계통을 파종하였으며 M₂세대와 마찬가지로 토양의 pH와 EC의 변화를 관찰하였고 생존율, 경장의 특성 등을 조사하여 내염성 유망계통을 선발하였다. M₄세대에서 선발한 9계통을 2009년 10월 15일 M₅세대로 공시하고 파종 당일부터 생육기간 중 토양의 pH와 EC의 변화를 조사하였고 각 시기별 pH와 EC 변화에 따른 생존율을 조사하였다.

(나) 실험포장의 토양분석

M₃~M₅세대의 내염성계통 선발포장에서 파종 1개월 후 출현율 조사 시기에 10~20cm 깊이의 토양을 채취하고 실내에서 음건하여 농촌진흥청 표준분석법(NIAST, 2000)에 준하여 pH와 EC는 토양과 증류수를 1:5로 하여 측정하였으며, EC는 측정값을 5배수로 환산하였다. 토양유기물은 Tyurin법, 유효인산은 Lancaster법, 치환성양이온은 1-NH₄OAc(pH 7.0)법으로 측정하였다.

(다) 내염성 유망계통 실내검정

M₄세대에서 선발한 9계통을 M₅세대로 공시하고 새만금간척지포장에 파종하였으며, 실험실 내에서 염 스트레스에 따른 발아율 조사는 천일염을 이용하였다. 천일염의 각 농도별 EC는 무처리(0mM)가 0.009 dS·m⁻¹였고, 처리구별로는 각각 12.6, 15.6, 19.1, 23.6 dS·m⁻¹를 나타내었다.

발아율 조사 결과를 바탕으로 출현율과 성장량의 변화를 비교하였으며, 3주일과 4주일 후에는 하배축장, 생체중, 본엽수, 엽면적 등 생육조사를 실시하였다. 또한 200mM 처리구에서 파종 3, 4, 5주일 후의 모품종과 각 계통별 잎의 엽록소함량 변화를 관찰하였고, 4주일과 5주일 후의 프롤린 함량을 측정하고 변화를 관찰하였다.

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) M₂~M₅세대 육성과정

M₁세대에서 각 화경별로 채종한 종자를 계통화하여 전북 김제시 진봉면 소재 새만금간척지 포장에 '내한'의 양성자처리 유래 15계통, 감마선처리 유래 22계통과 '탐미'의 양성자와 감마선처리 유래 18계통과 16계통을 각각 파종하였으며, '한라' 유래 계통은 양성자처리 23계통, 감마선처리 21계통을 파종하였다.

내염성을 갖는 계통을 선발하고자 3회에 걸쳐 성장특성과 생존율을 조사하였으며(그림10-9), 토양을 채취하여 pH와 EC의 농도 변화를 조사하였다. 파종 14일 후 '내한'의 경우 모품종과 변이계통 모두 대부분 출현하고 생존하여 88.9~100%의 높은 생존율을 보였으나 이듬해 3월 30일 조사에서는 염해에 의한 고사개체가 많았고, 모품종의 경우는 출현한 84개체 중 10개체만이 생존하여 11.1%의 생존율을 보였으며, 양성자 200, 600, 800Gy처리 유래 계통들도 50% 이하의 생존율을 보였다. 반면 1,000Gy처리 유래 계통은 53.3%를 보였고, 100Gy처리 유래 계통은 83.3%의 높은 생존율을 보였다. '내한'의 감마선 200, 400, 600Gy처리 유래 계통들의 경우 50% 이하의 생존율을 보였으며, 800Gy처리 유래 계통은 85.3%의 높은 생존율을 보였다. 개화 후 꼬투리가 맺히는 기간인 6월 6일의 조사에서는 더욱 생존율은 감소하였으며, 모품종의 경우 7.7%로 7개체가 생존하였고 변이 계통들도 고사 개체가 많아 양성자 600, 800Gy처리와 감마선 200Gy처리 유래 계통은 생존 개체가 전혀 없었다. 반면 3월 30일 조사에서 생존율이 높았던 계통들은 대부분 큰 차이 없이 생존하여 개화 결실하였다.

'탐미'의 경우도 파종 14일 후의 생존율은 모품종과 변이계통 모두 82.2~100%의 높은 생존율을 보였으나 시간이 지나면서 고사개체가 많아 모품종의 경우 24.8%를 보였고 양성자 1,000Gy처리 유래 계통은 생존개체가 없었으나, 나머지 계통들은 대부분 모품종 보다 생존율이 높았다. 특히 양성자 600Gy처리 유래 계통은 86.7%의 높은 생존율을 보여 내염성계통으로의 가능성을 보였다.

'한라' 유래 변이계통의 경우도 1차 조사의 생존율은 모품종을 비롯한 모든 변이계통이 90% 이상으로 높았으나 시간이 지나면서 고사개체가 많이 나타났다. 최종 조사에서 모품종은 6.7%를 보였고, 감마선처리 유래 계통들은 대부분 고사하였으며, 양성자처리 유래 계통들도 50% 이상 생존율을 보인 계통은 없었고, 200Gy처리 유래 계통이 40.0%가 생존하여 '한라' 유래 변이계통 중에서는 가장 높은 생존율을 보였다.

파종 당일과 생존율 조사 기간 동안의 토양 pH는 평균 7.7~7.9로 큰 변화가 없었다. EC의 경우는 파종 당일에는 부분적 차이는 있었으나 평균 2.8 dS·m⁻¹로 비교적 낮은 값을 나타냈고, 3월 조사에서는 평균 4.0 dS·m⁻¹로 증가하였으며, 6월의 3차 조사에서는 3월과 큰 차이가 없었다. 이러한 EC의 변화와 생존율과의 관계를 살펴보면 파종 당일에는 염농도가 낮아 대부분 발아하여 출현하였으나, 이듬해 3월 2차 생존율 조사에서 고사개체가 많은 것은 월동 중 EC의 증가와 함께 영하의 날씨 등 여러 가지 환경요인의 복합적 작용으로 생각된다.

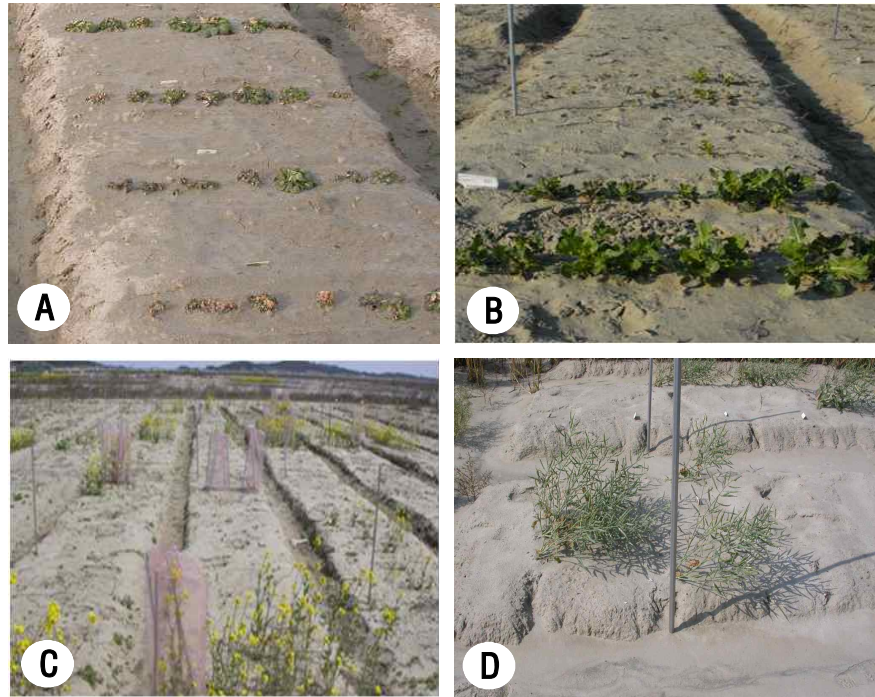


그림10-9. Growth characteristics of M₂ generation induced by irradiation of proton ion beams or gamma-ray to 3 rapeseed cultivar seeds, in the Saemangeum reclaimed field. A: early growth stage, B: mid growth stage, C: flowering stage, and D: seed maturation stage.

각 품종별 내염성 변이계통을 선발하기에 앞서 생존하여 개화 결실한 개체들의 경장 분포를 조사한 결과, '내한'의 경우 모품종 7개체의 평균 경장은 89cm였으며, 양성자처리 유래 계통의 경우 70cm이하가 36개체, 71~90cm가 20개체, 91~110cm가 11개체이고 111cm이상 되는 개체는 없었다. 감마선처리 유래 계통의 경우는 70cm이하가 14개체, 71~90cm가 46개체였으며, 91~110cm가 72개체로 가장 많았고, 111cm이상 되는 개체가 24개체였다. 따라서 생존율과 경장의 분포만을 본다면 '내한'의 경우는 양성자처리보다 감마선처리가 내염성계통의 선발에 유리할 것으로 기대되었다. '탐미'는 모품종 26개체의 평균 경장이 69cm이고, 양성자처리 유래 계통은 125개체 중 122개체가 70cm이하에 분포되어 있고 나머지 3개체만 71~90cm사이에 분포되어 있다. 감마선처리 유래 계통의 경우는 108개체 중 88개체가 70cm이하, 20개체가 71~90cm사이에 분포되어 있어 생존율은 양성자처리 유래 계통이 높았으나 경장의 경우는 감마선처리 유래 계통이 우수하게 나타났다. '한라'의 경우는 모품종 평균 경장이 93cm로 3품종 중 가장 높았으며, 양성자처리 유래 계통은 모품종과 같거나 큰 개체가 전체 75개체 중 41개체였는데 7개체가 111cm 이상으로 나타났다. 감마선처리 유래 계통은 생존한 9개체 모두 90cm이하로 작았다.

출현 후부터 개화·결실기까지의 생존율과 생장하여 채종이 가능한 개체들의 경장 조사 결과를 바탕으로 M₂세대에서 총 95개체를 선발하였다. '내한'은 생존율이 높고 경장이 우수한 개체가 많았던 감마선처리 유래 계통에서, '탐미'의 경우는 생존율이 높았던 양성자처리 유래 계통에서 선발개체가 많았다. '한라'의 경우는 경장이 크고 생육이 우수한 개체가 많은 양성자처리 유래 계통에서 대부분 선발하였고, 감마선처리 유래 계통은 생존율이 가장 낮아 선발계통수가 적었다.

새만금간척지 포장에서 선발한 M₂세대 95계통과 일반 재배포장에서 선발한 생장이 강한 120계통을 M₃세대로 공시하고 총 215계통을 각각 염농도가 다른 3개의 포장에 파종하여 육성하였

다. 파종 당일의 각 포장 내 토양을 채취하여 pH와 EC를 측정된 결과, pH는 3개의 포장 모두 6.9~7.0으로 큰 차이가 없었으나 EC의 경우는 제1포장이 $8.2 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ 로 가장 낮았고, 제2포장은 $23.9 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$, 제3포장은 $28.0 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ 로 높게 나타나 제2포장과 제3포장에서는 발아 및 출현 개체가 전혀 없었으며, EC가 $8.2 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ 인 제1포장의 경우도 모품종을 비롯한 변이계통들도 대부분 출현 및 생존율이 저조하였다.

염농도가 가장 낮았던 제1포장의 생존율을 조사한 결과, '내한'의 모품종이 전체 204개체 중 25개체가 출현하고 생존하여 12.2%를 보였고, 변이계통들도 50% 이하로 낮게 나타났다. 양성자처리 유래 계통이 전체 456개체 중 81개체로 17.8%, 감마선처리 유래 계통이 528개체 중 180개체로 34.1%가 생존하여 M₂세대에서와 유사하게 모품종과 양성자처리 유래 계통보다 생존율이 높았다. '탐미'의 경우도 비슷한 결과를 보여 모품종이 16.0%, 양성자처리 유래 계통이 17.4%를 보였으나, 감마선처리 유래 계통은 42.8%로 높은 생존율을 보였다. '한라' 역시 모품종 12.5%와 양성자처리 유래 계통 14.7%보다 감마선처리 유래 계통이 22.8%로 높게 나타났다. 월동 후 3월 15일 조사에서는 대부분 고사하여 생존한 개체가 매우 적었고, 모품종 '내한'은 5개체가 생존하여 2.5%, 양성자처리 유래 계통이 2개체인 0.4%, 감마선처리 유래 계통이 17개체로 2.0%를 보였고, '탐미'의 모품종과 양성자처리 유래 계통은 생존 개체가 없었으며, 감마선처리 유래 계통에서 29개체가 생존하여 6.7%의 생존율을 보였다. '한라'는 더욱 고사가 심해 모품종이 0%, 양성자와 감마선처리 유래 계통이 각각 1개체가 생존하였다. 채종 당일인 6월 21일 3차 조사에서도 대부분 고사하여 생존율이 낮아 '내한'과 '탐미'의 감마선처리 유래 계통에서 각각 4개체와 9개체가 개화 결실하여 채종하였다.

M₃세대 염농도가 낮았던 제1포장의 토양 pH는 7.0~7.2로 큰 차이를 보이지 않았으나 EC의 경우는 파종 당일 $8.2 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ 였으나 월동 후 3월 15일에는 급격하게 상승하여 $11.7 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$, 채종 당일인 6월 21일에는 $12.2 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ 로 나타나 M₂세대 육성 포장의 경우와 같이 월동 후 염농도가 증가하는 것을 알 수 있었으며, 이러한 결과가 생존율에 영향을 미친 것으로 생각되었다.

Sohn 등(2009)은 간척지별 토양 염농도 차이에 따른 유채의 출현율이 큰 차이를 보였다고 하였는데 이원간척지의 염농도는 평균 $4.9 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$, 영산강과 화홍간척지는 평균 $4.0 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ 를 나타내었고 월동 전 출현입모수(m^2 당)는 이원, 영산강, 화홍간척지가 각각 3개체, 52개체, 48개체로 나타났다고 하였다. 또한 월동기간 중 화홍간척지는 염농도가 가파르게 상승하여 모든 개체가 고사하였고, 이원간척지는 저농도 장소의 유채만이 생육을 보였으며, 영산강간척지는 염농도가 낮아 정상적인 생육을 보였다고 하였다. 본 연구의 결과에서도 M₂세대 육성 포장의 EC는 전 기간 동안 $2.8 \sim 4.0 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ 로 크게 높지 않아 출현 및 생존율이 높아 채종할 수 있는 개체가 많았으나, M₃세대 포장의 경우는 염농도가 제일 낮았던 제1포장의 경우도 파종 당일부터 결실기까지 $8.2 \sim 12.2 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ 로 염농도가 높아 출현율이 낮았고, 출현한 개체들도 대부분 성장하지 못하고 고사하였다. 따라서 생존하여 결실한 13개체는 염에 대한 내성이 있는 것으로 생각되었으며 채종한 종자를 M₄세대로 공시하였다.

새만금간척지 포장에서 채종한 M₃세대 13계통과 전북대학교 실험포장에서 선발한 M₃세대의 우수한 98계통을 추가하여 총 111계통을 M₄세대로 공시하여 파종하였다. 파종 당일 토양을 채취하여 이화학적 특성을 조사하였는데, pH는 7.3으로 M₂세대 육성 포장 보다는 낮았으며, M₃세대 육성 포장보다는 조금 높게 나타났다. 유기물함량은 $3.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 으로 매우 낮았으며, 유효인산은 $34.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 칼륨과 칼슘이 각각 0.75 와 $0.70 \text{ cmol}^+ \cdot \text{kg}^{-1}$, 마그네슘이 $2.00 \text{ cmol}^+ \cdot \text{kg}^{-1}$ 으로 조사되었고, EC의 경우는 $2.4 \text{ dS} \cdot \text{m}^{-1}$ 로 M₂세대 육성포장과 유사하여 비교적 낮았다.

따라서 M₂세대 육성 포장과 같이 종자의 발아 및 출현에는 큰 영향을 미치지 않았으나 간척지 토양의 특성상 월동 기간 동안 EC가 증가한다면 생존율 및 생육에는 차이가 있을 것으로 생각되었다.

전체 파종개체 수 대비 50%이상 생존하여 개화 결실한 9계통의 생존율을 조사한 결과, 모품종 '내한'은 생육초기 생존율이 90.3%를 보였으나 월동 후 3월 28일에는 4.2%로 급격히 떨어졌으며, 감마선처리 유래 2계통의 경우 66.7%와 70.1%의 높은 생존율을 보였다. '한라'의 경우도 모품종은 초기 생존율이 91.0%로 높았으나 월동 후에는 6.3%로 크게 떨어져 '내한'과 유사하였고, 감마선처리 유래 1계통이 79.2%로 아주 높은 생존율을 보였다. 모품종 '탐미'의 경우는 월동 후에도 30.7%가 생존하여 비교적 높은 생존율을 보였으나 50%에는 미치지 못하였고, 양성자처리 유래 2계통은 54.2%와 66.7%가 생존하였으며, 감마선처리 유래 4계통은 58.3~75.0%의 높은 생존율을 보였다. 70% 이상의 생존율을 보인 계통이 '내한'의 감마선처리 유래 1계통(N_γ600-21-1-641), '탐미'의 감마선처리 유래 2계통(T_γ100-1-1-94, T_γ800-20-2-461), '한라'의 감마선처리 유래 1계통(H_γ200-7-1-740)이 나타났다. 따라서 이들 4계통은 생존율이 높아 내염성계통 선발의 가능성을 보여 주었다.

M₄세대 생육기간 중 토양의 pH와 EC의 변화를 관찰하였는데 pH와 EC 모두 생육 후기로 갈수록 증가하였으며, 특히 염농도는 파종 당일의 EC가 2.4 dS · m⁻¹로 낮았으나 월동 기간 및 후에 4.1, 4.3 dS · m⁻¹로 상승하여 M₂ 및 M₃세대 포장과 유사한 변화를 보였다. 생존율 역시 파종 1개월 후에는 대부분 생존하였으나 월동 기간 동안 크게 감소하여 모품종과 변이계통 간에 차이를 보인 것으로 생각된다.

생존율이 50% 이상이고 생육이 우수한 9계통에 대하여 경장, 천립중, 지방함량 등을 조사한 결과, 모품종 '내한'은 경장 57cm, 천립중 3.27g, 지방함량은 37.5%인데 비해 N_γ600-21-1-641계통은 경장이 84cm로 모품종보다 27cm가 크고 천립중과 지방함량이 각각 0.2g, 5.3%가 높았다. 모품종 '탐미'의 경장은 45cm로 매우 작았고 천립중과 지방함량이 각각 4.17g, 34.8%인데 비해 선발계통 대부분은 경장이 크고 지방함량이 5.9% 이상 높았다. 특히, T_γ1000-11-1-675계통의 지방함량은 47.2%로 모품종보다 12.4%가 많이 함유된 것으로 나타났다. 모품종 '한라'의 경장은 73cm, 천립중과 지방함량은 각각 3.87g과 38.6%였으나 선발계통 H_γ200-7-1-740은 경장이 62cm로 모품종보다 작았고 천립중은 3.9g으로 비슷하였으며, 지방함량은 42.8%로 높았다. 따라서 생존율이 높고 생육이 양호한 이들 9계통의 종자를 채종하여 M₅세대에서 염에 대한 내성고정성 여부를 확인하고자 하였다.

M₄세대에서 선발한 9계통을 M₅세대로 공시하고 파종 당일부터 생육기간 중 토양의 pH와 EC의 변화를 조사하였는데, 파종 당일 pH는 7.5, EC는 3.2 dS · m⁻¹로 조사되었으며 월동 후 3월 13일 조사에서는 각각 7.7과 4.5 dS · m⁻¹로 조금 상승되어 나타나 M₄세대 육성 포장과 크게 다르지 않았다. 그러나 각 시기별 pH와 EC 변화에 따른 생존율을 조사한 결과, 파종 15일 후에는 대부분의 개체가 출현하고 생존하였으나 월동 후 3월 13일 조사에서는 모품종을 비롯한 모든 변이계통들이 고사 하여 내염성계통 선발이 어려웠다(그림10-10).

새만금간척지 광활지역의 토성은 사질양토(Lee 등, 2008)으로 배수가 불량한데 이러한 토양 조건에서의 잦은 강우는 토양 내 수분을 증가시키며, 토양 내 과다한 수분은 식물의 뿌리 발달을 저해한다. 또한 흐린 날씨와 저온은 식물의 광합성을 억제하여 생육이 불량해지므로 M₅세대의 모든 개체가 고사한 것은 염해에 더하여 습해와 여러 가지 불량한 환경조건이 원인인 것으로 생각된다. 이러한 이유로 M₄세대에서 선발한 9계통에 대한 내염성 고정 여부를 M₅세대

육성포장에서는 확인할 수 없었던 바 실내에서 천일염의 농도를 다르게 하여 발아실험과 출현율, 생육특성 등을 모품종과 비교하여 염에 대한 내성 여부를 확인하고자 하였다.



그림10-10. Growth characteristics of M₅ generation induced by irradiation of proton ion beams or gamma-ray to 3 rapeseed cultivar seeds, in the Saemangeum reclaimed field. A: Oct. 30, 2009, B and C: Mar. 13, 2010.

(2) 내염성 유망계통 실내검정

M₄세대에서 선발한 9계통에 대하여 내염성 여부를 알아보하고자 천일염의 농도를 0, 135, 170, 200, 250mM로 처리하여 발아율을 조사하였고, 발아율 성적이 우수한 계통을 상토에 재배하면서 천일염의 농도를 0, 200, 250mM을 처리하여 출현율, 성장량, 잎의 엽록소함량, 프롤린 함량 등을 조사하였다. 발아율의 경우 9계통 중 예비실험을 통해 ‘내한’과 ‘탐미’의 감마선처리 유래 각각 2계통, ‘한라’의 감마선처리 유래 1계통을 선발한 후 본 실험을 실시하였으며 그 결과, 파종 24시간 후의 조사에서 모품종을 비롯한 모든 계통이 무처리구에서 47.3~97.3%의 발아율을 보였다. 그러나 135mM이상 처리에서는 뚜렷한 차이를 보여 모품종 ‘내한’과 ‘탐미’는 전혀 발아 개체가 없었으며, ‘한라’는 135mM 처리에서 4.7%가 발아하였을 뿐 그 이상의 농도에서는 역시 발아하지 못하였다. 그러나 선발계통들은 천일염의 농도가 증가할수록 발아율이 감소는 하였으나 250mM 처리까지 발아 개체가 관찰되었다.

선발계통들 중 모든 처리농도에서 발아율이 가장 낮게 나타난 계통은 N_γ600-21-1-641이고, 가장 높게 나타난 계통은 ‘한라’의 감마선처리 유래 H_γ200-7-1-740계통으로 135mM 처리에서 73.3%가 발아하였고, 250mM 처리에서는 16.7%가 발아하였다. 72시간 후의 발아율은 24시간 후 조사와는 다르게 모품종 ‘내한’이 200mM 처리까지 48% 이상 발아 하였으나 250mM에서는 5.3%로 저조하였다. 반면 N_γ600-20-1-638, N_γ600-21-1-641 2계통은 250mM에서도 각각 66.0%, 65.3%의 발아율을 보였다. 또한 모품종 ‘탐미’도 200mM 처리까지 66.7%의 발아율을 보였으나 250mM에서는 ‘내한’과 비슷하게 6.7%에 그쳤고, 두 선발계통 T_γ100-1-1-94와 T_γ800-20-2-461은 각각 58.7%, 72.7%로 발아율이 높았다. 모품종 ‘한라’는 ‘내한’, ‘탐미’와 다르게 250mM 처리에

서도 86.0%의 발아율을 보였으며, 선발계통 Hy200-7-1-740은 96.0%가 발아하여 모품종과 선발계통들 중 가장 높은 발아율을 보였다.

M₄세대 육성포장에서 선발 성적과 실내에서 천일염 처리에 대한 발아율 시험 결과로 Ny 600-21-1-641, Ty800-20-2-461, Hy200-7-1-740 등 3계통이 내염성이 있는 것으로 생각되어 0, 200, 250mM의 농도로 천일염을 처리하고 출현율을 조사하였다. 무처리구는 파종 3일 후부터 모든 계통이 출현을 시작하여 4일째는 91.7% 이상 출현하였고 10일째 대부분 완료하였다. 200mM에서 4일째는 60% 이하였으나 10일경에 대부분 89.7% 이상 높은 출현율을 보였고, 250mM에서는 10일째 38.1~75.0%의 출현율을 보였다. 염농도가 증가할수록 출현일수가 길었으나 모품종과 선발계통 간 유의성은 인정되지 않았으며, 발아율 성적이 가장 좋았던 '한라'와 Hy200-7-1-740이 250mM에서 출현이 가장 저조한 것은 상이하였다. 출현율이 M₄세대 육성포장과 실내 실험에서 높은 것은 유사 하였으나 육성포장의 경우 시간이 지나면서 고사개체가 많았고, 모품종과 선발계통 간 생존율과 생육의 차이를 보였으므로 실내의 발아 및 출현율 결과만으로 내염성 유무를 판단하는 것은 어렵다고 생각되었다.

발아 및 출현율의 결과로는 내염성 판단이 어려워 파종 3주일 후 성장 반응을 조사한 결과, 하배축장을 비롯한 전체 생육은 처리농도 간 무처리구가 가장 높았고, 농도가 증가할수록 감소하였다. 각 계통 간 비교에서 하배축장은 Ny600-21-1-641계통이 모든 처리 농도에서 길었고, 다른 계통들과 모품종은 큰 차이를 보이지 않았다. 생체중은 무처리구에서 모품종 '내한'과 '탐미'는 선발계통보다 높거나 비슷하였으나 200mM에서는 Ny600-21-1-641계통이 266mg, 250mM에서는 Ty800-20-2-461계통이 167mg으로 높아 염처리에 대한 생체중의 감소가 모품종보다 적은 것으로 나타났고, '한라'는 반대의 경향을 보였다. 본엽수와 엽면적의 경우도 생체중과 유사하여 모품종인 '내한'과 '탐미'가 무처리구에서 높았으나 200mM은 Ny600-21-1-641계통이, 250mM은 Ty800-20-2-461계통이 높아 생장이 조금 더 진행된 것을 알 수 있었다.

염 스트레스는 식물의 잎 성장과 뿌리의 세포분열 및 신장을 억제하여 지상부 성장에 필요한 미네랄 등 양분 흡수를 저해하고, 염 스트레스를 극복하기 위해 대사적, 영양적, 삼투적 에너지 소비를 증가시켜 성장에 영향을 미치는 것으로 보고한 바 있는데(Ball, 1988; Dowton, 1985; Greenway 와 Munns, 1980), 본 연구에서도 천일염의 처리 농도가 증가할수록 뚜렷한 성장 감소를 보여 위와 유사한 결과였다. 천일염 처리농도에 따른 파종 3주일 후의 생육조사에서 '내한'과 '탐미'의 경우 무처리구에서는 모품종이 선발계통들 보다 생체중, 본엽수, 엽면적 등 생육이 좋았으나 200mM과 250mM처리는 선발계통들이 오히려 양호하여 염에 대한 스트레스를 적게 받았고, '한라'의 경우는 모품종과 선발계통이 크게 차이를 보이지 않았다. 200mM에서 생장이 가장 양호한 계통은 Ny600-21-1-641계통 이었고, 250mM에서는 Ty800-20-2-461계통 이었다.

파종 4주일 후 각 계통의 생육조사 결과, 3주일 후 조사와 비교하여 하배축장과 본엽수는 모품종을 비롯한 선발계통 모두 크게 변하지 않았으나 생체중은 무처리에서 Hy200-7-1-740계통을 제외한 대부분이 1.2~1.7배 증가하였다. 200mM처리도 1차 조사에 비해 각 모품종과 선발계통들의 생체중이 증가하였는데 '내한'의 모품종은 28mg이 증가하여 가장 적었고, Ny 600-21-1-641계통이 91mg이 증가하여 가장 양호하였다. 250mM에서는 Ty800-20-2-461계통이 77mg의 높은 증가를 보였다. 엽면적의 경우도 시간이 지나면서 증가 하였는데 200mM에서 생체중이 가장 높게 증가한 Ny600-21-1-641계통이 10.3cm²로 3주일 후 조사에 비해 2.8cm²가 증가하였다. 250mM에서는 Ty800-20-2-461계통이 3.9cm²로 각 모품종과 선발계통 중 가장 높았고, Hy200-7-1-740계통이 1.6cm²로 가장 낮았다. 4주일 후 생육조사 결과도 3주일 후와 마찬가지로

200mM에서는 Ny600-21-1-641계통이, 250mM에서는 Ty800-20-2-461계통이 모품종과 비교하여 생체중, 본엽수, 엽면적 등에서 유의적 차이를 보이며 생육이 양호하였다(그림10-11).



그림10-11. Growth responses of the mutant lines selected from M₄ generation of 3 rapeseed cultivars in response to salt treatments, determined 4 weeks after sowing. A: 200 mM and B: 250 mM. From left to right, cv. Tammi, Ty800-20-2-461, cv. Naehan, Ny600-21-1-641, cv. Halla and Hy200-7-1-740.

염농도 증가에 따른 엽록소 함량의 차이를 알아보려고 파종 3주일 후 조사한 결과, 모품종을 비롯한 선발계통 모두 무처리구보다 200mM 처리구가 총 엽록소함량이 비슷하거나 높게 나타났고, 250mM처리는 본엽이 거의 출현하지 못해 조사가 어려웠다. 200mM 처리에서 Ny 600-21-1-641계통이 무처리 1.15 mg·g⁻¹에 비해 0.43 mg·g⁻¹이 더 높은 1.53 mg·g⁻¹였고, Ty 800-20-2-461계통 역시 무처리에 비해 0.38 mg·g⁻¹이 높게 나타나 오히려 염처리가 엽록소함량의 증가를 가져왔다. Nam 등(2007)은 내염식물인 나문재, 해홍나물, 통통마디에 NaCl을 0~400mM 처리한 실험에서 엽록소함량은 종에 관계없이 염농도가 증가할수록 감소한다고 하였으나 Lee 등(1997)은 토양염분농도에 따른 배추의 엽록소함량은 6.8 dS·m⁻¹ 이상에서 높게 나타났다고 하였고, Kim 등(1993)도 이탈리아라이그래스의 유묘기 엽록소함량은 NaCl처리에 의해 증가하였다고 하였다. Shin(2002)은 벼 내염성과 감수성 품종의 엽록소 함량을 조사하였는데 유묘기 NaCl 처리 3일 후에는 내성과 감수성 모두 엽록소함량이 증가하다가 처리 7일 후에는 내성품종이 엽록소 a는 22%, 엽록소 b는 40%, 색소체는 18%의 증가를 나타낸 반면 감수성 품종의 경우 각각 80%, 40%, 90%의 감소를 나타냈다고 보고하였다. 본 연구의 천일염 처리 초기의 총 엽록소함량 조사 결과는 모품종들의 경우 염농도 증가에 따라 큰 차이를 보이지 않았으나 선발계통들의 경우는 유의적 차이를 보이며 엽록소함량이 증가하였다.

생장기간 동안 천일염 200mM 처리구에서 엽록소함량의 변화를 관찰하였으며 모품종과 선발계통의 차이를 비교한 결과, 모품종과 선발계통 모두 시간이 지나면서 엽록소함량이 감소하는 양상을 보였다. 모품종 '내한'과 Ny600-21-1-641계통은 3주와 5주일 후 엽록소함량 차이가 각각 0.41 mg·g⁻¹, 0.35 mg·g⁻¹으로 감소하였고, '탐미'와 Ty800-20-2-461계통은 각각 0.57 mg·g⁻¹,

0.53 mg·g⁻¹의 감소를 보였다. ‘한라’와 Hy200-7-1-740계통은 각각 0.61 mg·g⁻¹, 0.31 mg·g⁻¹의 감소를 보여 모품종 ‘한라’가 가장 큰 감소폭을 보였다. 200mM에서 3품종 유래 선발계통 간 엽록소함량 차이를 비교하였는데 ‘내한’ 유래 선발계통인 Ny600-21-1-641이 파종 3~5주일 후 3차례 조사 모두 엽록소함량이 가장 높았고, 다음이 ‘탐미’ 유래 선발계통이었으며, ‘한라’ 유래 선발계통인 Hy200-7-1-740은 가장 낮았다. 본 연구에서 천일염의 농도를 200mM로 처리한 모품종과 각 선발계통 중 Ny600-21-1-641계통이 다른 품종과 계통들 보다 염에 대한 내성이 있어 엽록소함량이 높고, 가장 양호한 생육을 보인 것으로 생각된다.

천일염의 농도에 따른 식물체의 프롤린함량을 파종 4주일 후 조사한 결과, 농도가 증가함에 따라 모품종과 선발계통들의 프롤린함량이 유의적으로 증가하였다. 무처리와 비교하여 250mM 처리에서 가장 높게 증가한 계통은 Ny600-21-1-641이며 무처리(0.67 μmol·g⁻¹)보다 2.22 μmol·g⁻¹이 증가하였고, 모품종 ‘한라’는 무처리(0.36 μmol·g⁻¹)와 1.31 μmol·g⁻¹의 차이로 가장 낮게 증가하였다. Nam 등(2007)은 염생식물인 나문재 등이 NaCl처리 농도가 높아질수록 식물체 내의 프롤린함량이 높아진다고 보고하였고, Kim 등(2002)은 근대의 경우 NaCl처리 농도에 따라 400mM 염 처리구에서 프롤린함량이 증가하였다고 하였는데 본 연구의 결과와 유사하였다.

염처리에 따른 프롤린함량의 차이는 내염성의 지표가 될 수 있다고 생각되어 모품종과 선발계통 간 프롤린함량의 변화와 차이를 비교하였는데 모품종과 선발계통 모두 파종 4주일 후보다 5주일 후 조사에서 프롤린함량이 증가하였다. 특히 모품종 ‘내한’과 Ny600-21-1-641계통은 1차에 비해 2차 조사에서 각각 0.90 μmol·g⁻¹과 0.89 μmol·g⁻¹이 증가하여 가장 큰 변화를 보였는데, 1, 2차 조사 모두 프롤린함량이 모품종 ‘내한’보다 Ny600-21-1-641계통이 각각 0.46 μmol·g⁻¹, 0.35 μmol·g⁻¹이 높게 나타났다. 반면 모품종 ‘한라’와 Hy200-7-1-740계통은 가장 낮은 변화를 보였다. 각 선발계통 간에는 파종 4주일 후 조사에서 Hy200-7-1-740계통이 프롤린함량이 가장 높았으나 5주일 후 조사에서는 Ny600-21-1-641계통이 가장 높았다. 내염성과 잎의 프롤린함량은 정의 상관이 있고, 프롤린함량과 식물체의 생육은 밀접한 관계가 있다고 Martinez 등(1996)은 보고한 바 있는데, 녹두(Misra와 Gupta, 2005), 옥수수(Yoon 등, 2005), 참깨(Koca 등, 2007)에서도 유사한 보고가 있다. 본 연구에서도 모품종보다 선발계통들의 잎에서 프롤린함량이 높고 비교적 양호한 생육을 보인 것은 위 연구자들의 결과와 유사하며, 선발계통들이 모품종들 보다 염에 대한 내성이 있다고 생각되었다.

M₄세대에서 선발한 내염성계통의 실내검정 결과, 발아율은 모품종에 비해 내염성계통들이 우수하였으나 출현율은 유의성이 인정되지 않았으며, 생육은 천일염 200mM에서 ‘내한’ 유래 Ny600-21-1-641계통이 가장 양호하였고, 엽록소함량 및 프롤린함량도 가장 높아 염에 대한 내성이 있는 것으로 생각된다. ‘탐미’ 유래 Ty800-20-2-461계통은 200mM에서 모품종과 크게 차이를 보이지 않았다. ‘한라’ 유래 Hy200-7-1-740계통은 모품종보다 약간 양호하거나 비슷한 생육을 보였고, 엽록소함량도 유의적 차이를 보이지 못하였다. 따라서 새만금간척지 포장에서의 출현 및 생존율, 생육특성 등과 실내검정에서 나타난 결과로 본다면 ‘내한’ 유래 Ny600-21-1-641계통이 염에 대한 내성이 가장 높은 것으로 생각되었다.

3. M₅세대 선발계통의 유연관계 분석

가. 연구개발 수행내용 및 실험방법

(1) 연구개발 수행내용

돌연변이체와 모품종 간의 차별성을 확인하는 방법으로 외부 형태적 특성을 비교하는 방법이 있으나 이는 재배방법, 환경, 식물의 생육상태, 육성자의 주관 등 여러 가지 요인에 의한 영향을 받을 수 있다. 그러나 분자 유전학 기법을 이용한 방법은 재배환경이나 식물의 생육상태 등 여러 가지 요인의 영향을 받지 않고 보다 용이하고 명확하게 중간 또는 개체 간 유연관계 및 다양성을 분석할 수 있다. 분자유전학의 마커 기술로 개발된 분석기법은 RFLP와 RAPD를 많이 사용하여 왔다. 그러나 RFLP 기법은 방사성 동위원소를 사용한다는 점과 Southern blot 분석법 등과 같이 시간과 노력이 많이 투자되는 단점이 있었다. RFLP 기법을 보완하기 위하여 PCR을 이용한 RAPD 기법이 개발되었다(Akkaya 등, 1992; Sharma 등, 1995; Williams 등, 1990). RAPD 기법은 염기의 수가 9~10개정도 되는 oligonucleotide를 primer로 사용하여 식물체의 genome DNA를 무작위로 PCR을 통해 증폭시킨 후 전기영동 하여 나타난 band의 수와 크기로 유전적 특성을 분석하는 방법이다. 따라서 RAPD 기법을 이용하여 M₅세대에서 선발한 변이계통들과 모품종 간의 유연관계를 분석하여 유용 돌연변이 계통 선발에 활용하고자 하였다.

(2) 실험방법

모품종 '내한', '탐미', '한라'와 이 3품종의 종자에 양성자와 감마선을 처리하여 M₅세대에서 육성한 후 유용 돌연변이체로 선발한 9계통(일반실험포장 6계통, 내염성실험포장 3계통)의 종자를 72공 트레이에서 7일간 생장시켜 지상부의 자엽과 하배축을 시료로 사용하였다(표10-9). 모품종과 변이계통들 사이의 유전적 근연관계 및 품종 식별의 RAPD marker 개발을 위한 genomic DNA는 각 식물체의 자엽과 하배축에서 plant DNA extraction kit(DNA zol ES, MRC, USA)를 이용하여 추출하였다. 유전적 근연관계 및 품종 식별은 RAPD marker를 이용하여 임의증폭다형 DNA(RAPD) 분석법을 사용하였다. 3개의 모품종과 각 변이계통들의 핵산지문은 SRILS Uniprimer kit(Seoulin Bioscience, Seoul, Korea)의 프라이머와 각 시료에서 추출한 genomic DNA를 사용하여 중합효소연쇄반응(PCR) 실험으로 분석하였다.

표10-9. Rapeseed (*Brassica napus*) accessions used for the analysis of the RAPD marker

Entry number	Plant sample	Note (Variety)
1	Naehan	wild type
2	198-2	mutant line(NP600-1-1-198-2)
3	362-4	mutant line(NP1000-13-2-362-4)
4	638-1	mutant line(Ny600-20-1-638-1)
5	641	mutant line(Ny600-21-1-641)
6	268-1	mutant line(Ny1000-4-1-268-1)
7	Tammi	wild type
8	374-1	mutant line(Ty600-17-2-374-1)
9	461	mutant line(Ty800-20-2-461)
10	Halla	wild type
11	148-1	mutant line(Hy600-11-1-148-1)
12	740	mutant line(Hy200-7-1-740)

PCR 반응액의 조성은 채취한 시료의 자엽과 하배축의 genomic DNA 5~10ng을 template DNA를 이용하여 10mM dNTPs와 *Taq* polymerase(1unit, Ex *Taq* PCR, TaKaRa), 2.5mM

MgCl₂, 10pmol SRILS Uniprimer를 첨가하여 실시하였다. PCR 반응과정은 초기변성(pre-denaturation)과정을 94℃에서 5분간 시행한 다음 변성(denaturation; 94℃, 1분간), 결합(annealing; 59℃, 1분간), 신장(extension; 72℃, 1분간) 과정의 1회 순환하는 반응을 40회 실시하였다. 최종 반응 후에는 최종신장(last extension; 72℃, 10분간) 과정을 두었다. PCR 반응에 의하여 증폭된 genomic DNA 단편은 1X TAE buffer를 이용하여 1.5% agarose gel에서 75V로 70분간 전기영동을 하였다. 증폭된 genomic DNA 단편은 전기영동을 마친 agarose gel을 ethidium bromide(0.5μg·ml⁻¹)로 5분간 염색한 후 증류수로 탈색하고 UV를 조사하여 육안으로 식별할 수 있게 한 다음 사진을 촬영하여 조사하였다.

나. 연구개발 결과 및 고찰

M₅세대에서 선발한 9계통(조숙, 단간, 대화 등 6계통, 내염성 3계통)에 대하여 모품종과의 유전적 유연관계를 알아보기 위하여 임의증폭다형 DNA(RAPD)법으로 분석한 결과, 12종의 SRILS Uniprimer로 증폭된 genomic DNA 단편 수는 총 72개(프라이머 당 평균 6개)이었으며, 증폭된 genomic DNA 단편은 모두 polymorphic로 확인되었다. 증폭된 genomic DNA의 크기는 100bp~3000bp이었으며 핵산지문 중에는 채취한 시료 간에 공통으로 나타나는 것과 차별적으로 나타나는 것이 있었다. SRILS Uniprimer 5번과 10번에서 증폭된 DNA 단편은 모품종 ‘내한’, ‘탐미’, ‘한라’와 변이계통인 NP600-1-1-198-2, NP1000-13-2-362-4, N_γ600-20-1-638-1, N_γ600-21-1-641, N_γ1000-4-1-268-1, T_γ600-17-2-374-1, T_γ800-20-2-461, H_γ600-11-1-148-1, H_γ200-7-1-740계통 모두에서 동일하게 증폭되었으며 SRILS Uniprimer 1번, 2번, 3번, 4번, 6번, 7번, 8번, 9번, 11번과 12번은 다른 양상을 보이며 증폭되었다(그림10-12).

12종의 SRILS Uniprimer로 확인된 핵산지문을 모두 이용하여 모품종 ‘내한’, ‘탐미’, ‘한라’와 변이계통들의 유전적 유사성과 차이정도를 추정하였다(Antonius와 Klemolak, 1999; Charcosset와 Moreau, 2004; Mohan 등, 1997; Rafalski와 Tingey, 1993). 유전적 유사성을 산출하는 방법은 NTSYS program을 이용하여 UPGMA method 로 분석하였다(Rohlf, 1993; Sneath와 Sokal, 1973). 이 방법에 의하여 얻어지는 유전적 거리의 수치가 1이면 유전적으로 완전히 동일함을 나타내고 1보다 작아질수록 유전적으로 다름을 의미한다.

NP600-1-1-198-2계통과 T_γ800-20-2-461계통은 유전적으로 매우 유사하며 ‘내한’과 0.74정도의 유전적 거리를 가진다. ‘탐미’와 N_γ1000-4-1-268-1계통도 매우 유사하고, T_γ600-17-2-374-1계통과 0.78정도의 유전적 거리를 가지며, ‘한라’와 H_γ200-7-1-740계통은 0.73정도의 유전적 거리를 가진다(그림0-13).

이상의 결과에서 NP600-1-1-198-2, T_γ800-20-2-461계통은 모품종 ‘내한’과 유사한 유전적 유연관계를 보이고 있으며, N_γ1000-4-1-268-1계통은 ‘탐미’와 매우 유사한 유전적 유연관계를 보이고 있다. 또한 T_γ600-17-2-374-1계통도 ‘탐미’와 유전적 유연관계를 갖고 있고, H_γ200-7-1-740계통은 ‘한라’와 유전적으로 유연관계를 나타내고 있다. N_γ600-20-1-638-1계통과 N_γ600-21-1-641계통은 서로 유전적 유연관계를 갖고 있으나 모품종 ‘내한’과는 유전적으로 거리가 멀었으며, NP1000-13-2-362-4계통은 모품종 ‘내한’과, H_γ600-11-1-148-1계통은 모품종 ‘한라’와 유전적 유연관계에서 차이를 보였다.

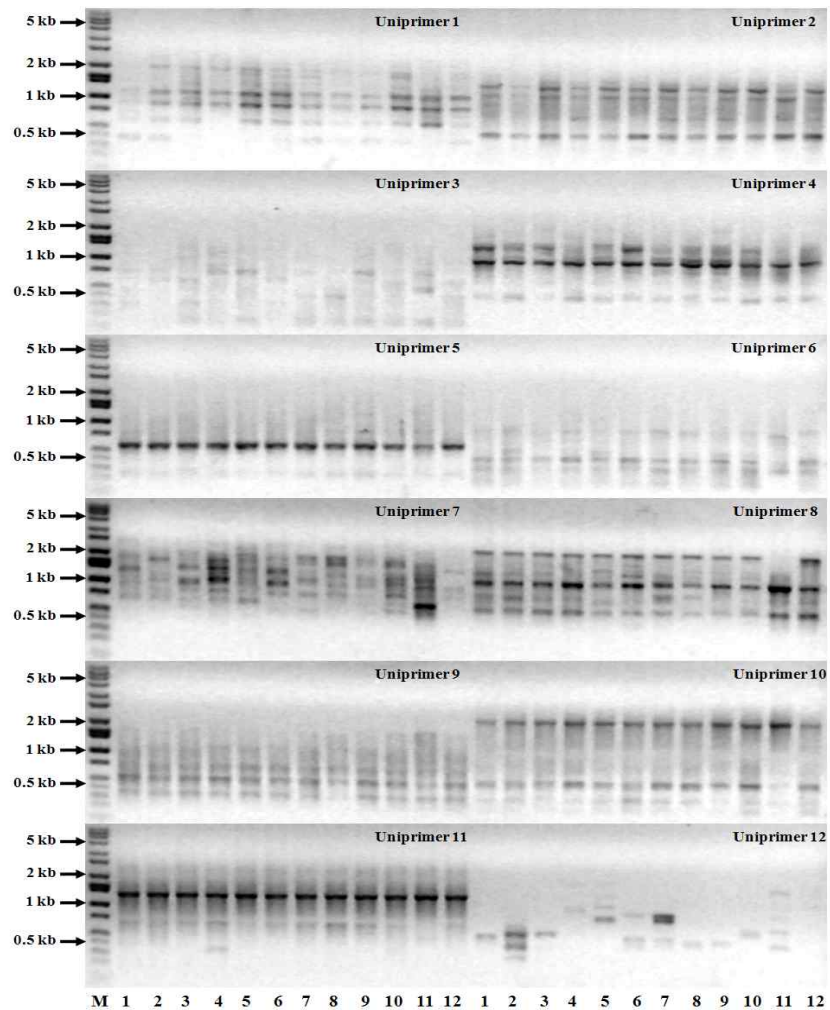


그림10-12. The 72 random amplified polymorphic DNAs generated from the 12 SRILS uniprimer. M: DNA ladder, 1: cv. Naehan, 2: NP600-1-1-198-2, 3: NP1000-13-2-362-4, 4: N γ 600-20- 1-638-1, 5: N γ 600-21-1-641, 6: N γ 1000-4-1-268-1, 7: cv. Tammi, 8: T γ 600-17-2-374-1, 9: T γ 800-20-2-461, 10: cv. Halla, 11: H γ 600-11-1-148-1 and 12: H γ 200-7-1-740.

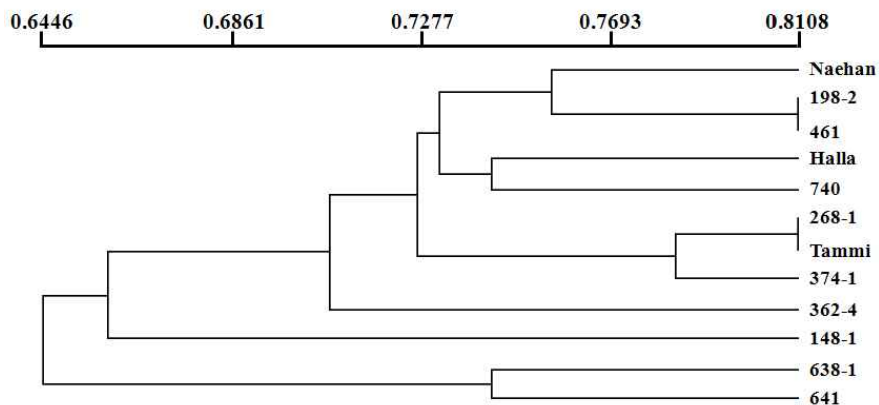


그림10-13. A phylogenetic from the 72 nuclear RAPD markers for above ground part of the twelve rapeseed (*Brassica napus*) accessions.

4. M₆~M₈세대 육성 및 품종보호 출원

가. 연구개발 수행내용 및 실험방법

M₅세대에서 선발한(일반실험포장 6계통, 내염성실험포장 3계통) 유용 돌연변이 9계통에 대하여 전북대학교 실험포장에서 M₆~M₇세대까지 세대를 진전시켜 국립종자원 유채 신품종등록 심사를 위한 특성조사요령에 따라 각 계통들의 특성을 조사 비교하였고, 특성조사 기술서를 바탕으로 구별성, 안정성, 균일성 평가를 한 후 품종보호 출원의 요건을 갖춘 계통을 국립종자원에 품종보호권을 출원하고자 하였다. 또한 내염성 유망계통은 M₄세대 간척지 시험포장 성적과 실내검정을 통해 선발한 3계통을 M₈세대까지 세대를 진전시켜 간척지 시험포장에서 재배·관리하면서 출현율, 생존율, 경장, 천립중 등 특성조사를 실시하였고 일반실험포장에서의 성적 등을 종합하여 품종보호권을 출원하고자 하였다. 한편 유용한 돌연변이 유전자원은 국립농업과학원 농업유전자원센터에 유채의 유전자원으로 기탁하고자 하였다.

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) M₆~M₇세대 선발계통의 특성(전북대학교 실험포장)

M₅세대에서 선발한(대학내포장 6계통, 내염성포장 3계통) '내한' 유래 5계통, '탐미' 유래 2계통, '한라' 유래 2계통을 M₆~M₇세대에 공시하여 재배하면서 생육특성을 조사한 결과 M₅세대에서 조숙·단간으로 선발한 '내한' 유래 2계통(NP600-1-1-198-2-1, NP1000-13-2-362-4-1)의 경우 M₆~M₇세대에서도 대조품종인 '내한'과 비교하여 개화기는 두 계통 모두 10~11일이 빠르고(그림10-14A), 성숙기의 경우 NP600-1-1-198-2-1계통이 6~7일, NP1000-13-2-362-4-1계통이 7~9일 빠르게 나타났다(그림10-14B).

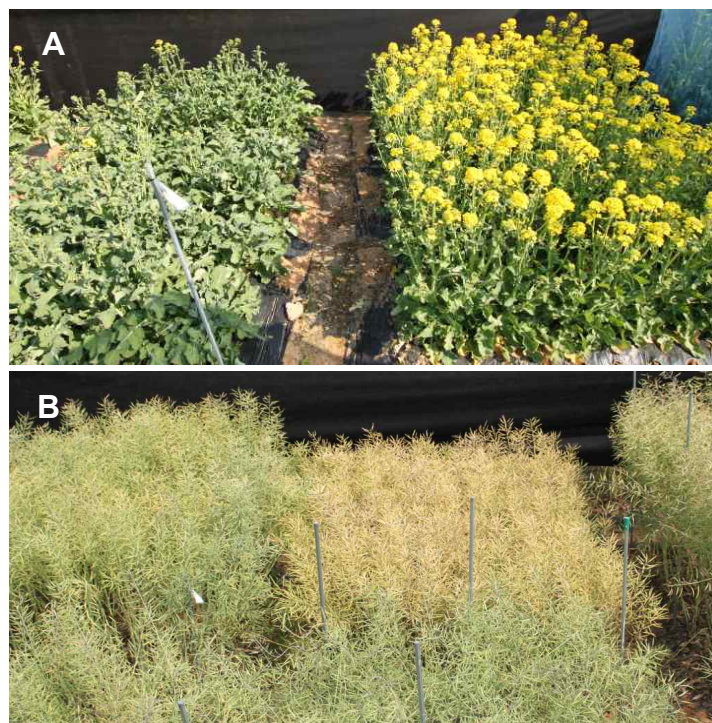


그림10-14. Growth characteristics of the early flowering and maturing mutants line (NP1000-13-2-362-4) in M₆ and M₇ generations induced by irradiation of proton ion beams to the rapeseed 'Naehan' seeds. A: M₆ generation and B: M₇ generation.

경장은 $M_6 \sim M_7$ 세대에서 NP600-1-1-198-2-1계통이 각각 15.6%, 16.5%가 짧게 나타났으며, NP1000-13-2-362-4-1계통은 각각 26.6%와 24.4%가 짧게 나타나 M_5 세대에서의 조숙·단간 특성을 그대로 유지하였다. 또한 이 두 계통의 천립중, 분지수, 1수협수, 1협결실수 등 수량구성요소도 대조구와 비슷하거나 높게 유지되어 나타났다. '탐미' 유래 T γ 800-20-1-461-3-1계통의 경우도 개화기와 성숙기가 $M_6 \sim M_7$ 세대에서 조숙을 유지하였으며, 경장 또한 대조품종 '탐미'에 비해 20% 이상 짧은 단간을 나타내었다. N γ 600-20-1-638-1-1계통은 '내한'의 감마선처리 유래계통으로 M_5 세대에서 꽃의 크기가 크고 탐스러워 선발하였는데, $M_6 \sim M_7$ 세대의 꽃의 크기를 비교한 결과 (표10-10 and 그림10-15A, B) 대조품종인 '내한'과 비교하여 꽃잎 1장의 길이와 폭, 꽃잎 전체의 면적 및 자방과 주두까지의 길이 모두 유의적으로 크게 나타났다.

표10-10. Comparison of flower size of the mutant line (N γ 600-20-1-638-1-1) in M_6 and M_7 generations induced by irradiation of gamma-ray to the rapeseed 'Naehan' seeds

Line No.	Petal length (mm)		Petal width (mm)		Petal area (cm ²)		Carpel length (mm)	
	M_6	M_7	M_6	M_7	M_6	M_7	M_6	M_7
cv. Naehan (wild type)	12.9 c ^z	13.6 c	7.4 c	7.6 c	1.25 c	1.76 c	7.9 c	7.9 b
cv. Tammi (wild type)	14.8 b	14.3 b	10.8 b	9.9 b	3.08 b	2.64 b	8.6 b	10.0 a
N γ 600-20-1-638-1-1	16.7 a	15.7 a	11.6 a	10.4 a	3.46 a	3.04 a	9.4 a	11.1 a

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at $P=0.05$.



그림10-15. Comparison of flower size of the mutant line (N γ 600-20-1-638-1-1) in M_6 and M_7 generations induced by irradiation of gamma-ray to the rapeseed 'Naehan' seeds. A: M_6 generation and B: M_7 generation (From left to right, cv. Naehan, N γ 600-20-1-638-1-1, cv. Tammi).

그 외 계통들의 경우도 대부분 개화기 및 성숙기, 경장에 있어서는 M₅세대의 특성을 M₆~M₇세대에서 그대로 유지하였으나 천립중, 분지수, 1수협수, 1협결실수 등에서는 부분적으로 약간의 차이를 보였다. Lee 등(1996)은 감마선을 처리한 들깨의 M₅세대에서 초장과 엽색, 엽형 등이 계속 분리가 일어나는 계통이 있다고 하였고, 이와 같이 M₅세대 이후에 계속해서 분리가 일어나는 형질은 이 형질에 관여하는 유전자수가 2개 이상일 것으로 추정하였으며, 형질고정을 위해 계속 개체별로 분리 상태를 조사하면서 후대에 형질을 고정시킬 수 있을 것이라고 보고하였는데, 본 연구에서도 M₄세대까지는 경장과 개화기 등이 분리되어 나타났으나 M₅세대 이후 M₆~M₇세대에서는 고정되어 균일성과 안정성을 확보한 것으로 생각되었다.

M₅세대에서 선발한 ‘내한’, ‘탐미’, ‘한라’ 유래 9계통의 M₆~M₇세대의 고유특성을 조사한 결과, 엽색, 줄기색, 꽃색, 종피색 모두 M₅세대에서 조사한 성적과 다르지 않게 나타나 고정된 것으로 생각되는데, ‘내한’ 유래 NP600-1-1-198-2-1과 Ny600-20-1-638-1-1의 경우 엽색이 ‘한라’와 유사하게 농녹색이었으며, 꽃색은 대부분 황색이었으나 ‘내한’ 유래 Ny600-20-1-638-1-1계통이 ‘탐미’와 유사하게 진한 황색을 나타내었다.

M₆~M₇세대의 지방함량과 지방산조성을 분석한 결과(표10-11,12), M₅세대에서 지방함량이 45.9%(모품종 ‘내한’ 40.4%)로 가장 높게 조사되었던 NP600-1-1-198-2-1계통이 M₆세대에서 45.1%, M₇세대에서 43.6% 로 대부분의 모품종과 선발계통들보다 높게 나타났다. 유채 종자의 기름에 erucic acid 함량이 높으면 소화흡수가 불량하고 심장병이나 골격근염을 유발시킬 수 있어(Ohlson, 1983) 오늘날 유채 기름의 산업화규격은 최고 1%로 제한하고 있는데(Daun과 Adolphe, 1997), 본 연구에서 선발한 계통들은 모두 0.5%이하로 조사되었다.

표10-11. Oil contents and fatty acid compositions of the mutant lines in M₆ generation induced by irradiation of proton ion beams and gamma-ray to 3 rapeseed cultivar seeds

Line No.	OC ^z (%)	Composition of fatty acids (%)							
		PA (C16:0)	SA (C18:0)	OA (C18:1)	LA-1 (C18:2)	LA-2 (C18:3)	AA (20:0)	EA-1 (C20:1)	EA-2 (C22:1)
cv. Naehan (wild type)	41.1	4.16	1.69	64.37	19.13	8.80	0.55	1.00	0.27
NP600-1-1-198-2-1	45.1	3.89	2.12	67.33	16.42	8.21	0.62	1.05	0.31
NP1000-13-2-362-4-1	41.3	4.08	1.95	65.79	18.35	8.01	0.61	0.98	0.19
Ny600-20-1-638-1-1	44.3	4.03	2.34	64.39	20.84	6.44	0.65	0.96	0.32
Ny600-21-1-641-1-1	42.6	3.88	2.16	66.07	17.86	8.15	0.60	0.97	0.28
cv. Tammi (wild type)	43.3	4.09	0.90	66.36	20.31	5.96	0.44	0.84	0.06
Ty600-17-2-374-2-1	41.9	4.39	2.11	64.42	21.47	6.21	0.42	0.82	0.05
Ty800-20-1-461-3-1	44.2	3.53	2.98	68.58	17.89	5.53	0.54	0.73	0.17
cv. Halla (wild type)	44.1	4.00	2.17	67.29	19.97	5.28	0.44	0.75	0.06
Hy200-7-740-1	43.6	3.96	2.38	66.56	19.63	5.48	0.46	1.10	0.38
Hy600-11-1-148-1-1	45.4	3.86	1.96	69.27	18.09	5.38	0.47	0.85	0.09

^zOC, PA, SA, OA, LA-1, LA-2, AA, EA-1, and EA-2 stand for oil content, palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, arachidic acid, eicogenic acid, and erucic acid, respectively.

표10-12. Oil contents and fatty acid compositions of the mutant lines in M₇ generation induced by irradiation of proton ion beams and gamma-ray to 3 rapeseed cultivar seeds

Line No.	OC ^z (%)	Composition of fatty acids (%)							
		PA (C16:0)	SA (C18:0)	OA (C18:1)	LA-1 (C18:2)	LA-2 (C18:3)	AA (20:0)	EA-1 (C20:1)	EA-2 (C22:1)
cv. Naehan (wild type)	41.5	3.9	2.3	65.9	17.5	8.3	0.7	1.1	0.3
NP600-1-1-198-2-1	43.6	3.9	2.5	66.9	16.8	7.8	0.7	1.1	0.3
NP1000-13-2-362-4-1	41.7	3.7	2.2	65.6	18.2	8.2	0.7	1.1	0.3
Ny600-20-1-638-1-1	42.4	3.9	2.5	64.0	21.0	6.6	0.7	1.0	0.3
Ny600-21-1-641-1-1	42.0	3.9	2.3	66.2	17.1	8.2	0.7	1.1	0.5
cv. Tammi (wild type)	41.1	3.9	2.1	66.0	20.6	5.9	0.5	0.9	0.1
Ty600-17-2-374-2-1	41.7	3.9	2.1	65.8	20.5	6.3	0.5	0.9	0.0
Ty800-20-1-461-3-1	39.0	3.6	2.1	65.4	20.8	6.5	0.5	1.0	0.1
cv. Halla (wild type)	41.2	3.9	2.5	66.1	20.3	5.6	0.5	1.0	0.1
Hx200-7-740-1	41.6	3.9	2.3	64.0	20.2	6.2	0.5	1.9	1.0
Hx600-11-1-148-1-1	42.6	3.7	2.3	67.5	18.5	6.2	0.6	1.0	0.2

^zOC, PA, SA, OA, LA-1, LA-2, AA, EA-1, and EA-2 stand for oil content, palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, arachidic acid, eicogenic acid, and erucic acid, respectively.

지방산 중 oleic acid의 함량이 M₅세대에서 모품종과 비교하여 높게 나타난 2계통(NP600-1-1-198-2-1, Hx600-11-1-148-1-1)이 있었는데, M₆~M₇세대에서도 높은 함량을 유지하였다. 특히, Hx600-11-1-148-1-1계통의 경우 M₅세대에서 68.8%(모품종 '한라' 66.1%), M₆세대에서 69.3%, M₇세대에서 67.5%로 가장 높게 나타났다. Oleic acid는 불포화지방산 중 상대적으로 산화안정성이 높아 메칠에스터화반응 이전에는 융점이 상온이지만 에스터화반응 이후에는 -19.9℃로 융점이 낮아져 바이오디젤의 원료로 사용하기 위한 기름작물은 oleic acid가 많이 함유된 지방산조성을 갖는 것이 유리하다(Jang 등, 2010). 식물 내에 주로 존재하는 포화지방산은 palmitic acid, stearic acid이며 이들의 포화지방산 함량이 낮게 함유된 바이오디젤용 유체의 품종개발 또한 요구되고 있다. 미국과 캐나다에서는 포화지방산 함량이 7.1% 미만인 것을 저 포화지방산으로 인정하고 있으며, 캐나다는 1차적으로 포화지방산의 함량이 6% 미만인 품종을 육성하는데 목표를 설정하였다(Rakow와 Raney, 2001). 본 연구에서 Hx600-11-1-148-1-1계통의 포화지방산은 M₆세대에서 5.8%, M₇세대에서 6.0%로 저 포화지방산으로 나타났다. 따라서 유채기름의 지방산 조성에서 oleic acid와 포화지방산의 함량은 품질을 결정짓는 중요한 요소라 생각되며 '한라' 유래 Hx600-11-1-148-1-1계통의 경우 oleic acid의 함량은 높고 palmitic acid, stearic acid의 함량은 낮아 바이오디젤용 유체 신품종 육성에 활용이 기대된다.

(2) M₆~M₈세대 내염성 선발계통의 특성(간척지 시험포장)

M₄세대 새만금포장 선발성적과 M₅세대 실내검정을 통해 선발한 3계통과 대조품종을 새만금(김제시 진봉면)에 2010년 10월 23일 파종하였으나 염농도가 높아(10~15dS/m) 전혀 출현하지 않아 학내에서 40일간 육묘한(대조구 포함) 각 변이계통을 2011년 3월 27일 동일 포장에 총 50

주씩 3반복으로 재식하여 생육을 관찰하였는데, 4월 23일(당일 토양의 EC는 5~10dS/m) 생존을 조사에서 내한'의 감마선 600Gy 처리 Ny600-21-1-641-1인 1계통만이 총 28주가 생존하였으며, 5월 21일에는 23주가 생존하였고 7월 3일 최종 개화 결실한 총 10주를 채종하였다(그림 10-16). Ny600-21-1-641-1계통의 평균 경장은 48.7cm, 1수협수는 34.7협, 협장은 4.7cm, 1협결실수는 15.7립으로 나타났다. Ny600-21-1-641-1은 M₄세대 내염성 실내검정 결과 발아율, 출현율, 생육, 엽록소 함량, 프롤린 함량 등이 가장 우수하였던 계통으로 새만금간척지포장에서도 유일하게 개화 결실하여 내염성 계통으로의 선발이 기대 되었다.



그림10-16. Flowing stage of M₆ generation induced by irradiation of gamma-ray to 'Naehan' rapeseed cultivar seeds, in the Saemangeum reclaimed field (May 21, 2011).

M₆세대에서 선발한 내염성 유망 변이계통인 Ny600-21-1-641-1계통을 비롯하여 2계통을 M₇세대로 공시하고 계화도 간척지시험포장에 저염도와 고염도의 포장을 선정하여 3반복으로 파종하고 재배 관리하였다. 파종 당일의 토양을 채취하여 pH와 EC를 조사 하였는데 저염도 포장의 경우 pH는 평균 6.86, EC는 0.2~0.7dS · m⁻¹로 나타났으며, 고염도 포장의 경우는 pH가 6.53, EC가 2.5~5.4dS · m⁻¹로 나타났다. 파종 후 출현 및 생존을 조사 결과, 저염도 포장에서는 대부분 발아하여 출현 및 생육하였다. 고염도 포장에서는 Ny600-21-1-641-1계통이 가장 양호한 출현율을 보였으나 생육이 부진하여 월동 후 대부분 고사하였다(그림10-17).

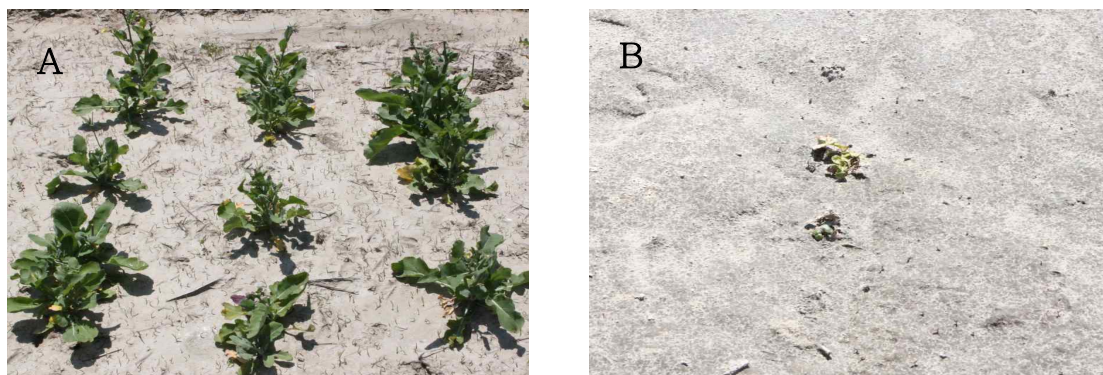


그림10-17. Growth characteristics of M₇ generation induced by irradiation of gamma-ray to 'Naehan' rapeseed cultivar seeds, in the Gyehawdo reclaimed field (May 04, 2012). A : lower-salinity reclaimed field, B : high-salinity reclaimed field.

전북대학교 실험포장에서 육성한 M₇세대 '내한' 유래 N_γ600-21-1-641-1계통과 '탐미' 유래 T_γ800-20-1-461-3-1계통, '한라' 유래 H_γ200-7-740-1-1계통(계화도 간척지시험포장 M₇세대에 파종한 3계통)을 M₈세대로 공시하고 M₇세대 시험포장과 동일하게 저염도 및 고염도의 포장으로 나누어 2012년 10월 26일 3반복으로 파종하고 출현율 및 생존율, 생육특성 등을 조사하였다. 출현율의 경우 내염성 유망계통인 N_γ600-21-1-641-1-1이 88.9%로 가장 높았으며, 생존율의 경우도 마찬가지로 4월 19일과 6월 22일 조사 모두 가장 높게 나타났다(표10-13).

표10-13. The emergence rate and survival rate of the mutant lines in M₈ generation induced by irradiation of gamma-ray to 3 rapeseed cultivar seeds, in Gyehawdo reclaimed field (lower-salinity).

lines	Emergence rate (Nov. 15, 2012)	Survival rate	
		Apr. 19, 2013	Jun. 22, 2013
cv. Naehan (wild type)	70.0 c ^z	7.8 cd	6.1 d
N _γ 600-21-1-641-1-1	88.9 a	28.3 a	27.2 a
cv. Tammi (wild type)	80.6 b	12.2 bcd	10.6 cd
T _γ 800-20-1-461-3-1	47.8 d	5.6 d	5.6 d
cv. Halla (wild type)	79.5 b	16.7 bc	15.5 bc
H _γ 200-7-740-1-1	84.4 ab	21.7 ab	20.5 ab

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at P=0.05.

생육특성 조사결과(표10-14), 경장의 경우 '한라' 유래 변이계통인 H_γ200-7-740-1-1이 98.0cm로 가장 컸으며, '탐미' 유래 변이계통인 T_γ800-20-1-461-3-1이 71.6cm로 가장 작았다. '내한' 유래 변이계통인 N_γ600-21-1-641-1-1은 83.9cm로 중간 정도의 크기를 나타내었는데, 이는 전북대학교 실험포장에서의 경장 특성과 유사하였다. 내염성 유망계통인 N_γ600-21-1-641-1-1의 협장은 5.8 cm, 1수협수는 27.1개로 길고 많은 편이며 1협결실수는 19.6립으로 가장 많았다. 천립중은 3.4g으로 대조구 및 다른 변이계통과 큰 차이는 없었다. 따라서 출현율과 생존율, 경장 및 1협결실수 등의 생장특성에서 나타난 바와 같이 M₈세대에서도 N_γ600-21-1-641-1-1이 내염성이 강한 계통으로 생각되었다.

표10-14. The agronomic characteristics of the mutant lines in M₈ generation induced by irradiation of gamma-ray to to 3 rapeseed cultivar seeds, in Gyehawdo reclaimed field (lower-salinity).

lines	Plant height (cm)	Silique length (cm)	No. of seeds/ silique	No. of siliqua/ panicle	Weight of 1,000 seeds (g)
cv. Naehan (wild type)	88.0 b	5.0 c	14.8 b	29.4 a	3.3 a
N _γ 600-21-1-641-1-1	83.9 b	5.8 ab	19.6 a	27.1 a	3.4 a
cv. Tammi (wild type)	84.7 b	5.4 bc	17.2 ab	23.7 b	3.4 a
T _γ 800-20-1-461-3-1	71.6 c	6.0 a	17.2 ab	16.3 c	3.3 a
cv. Halla (wild type)	91.2 ab	5.7 ab	18.2 a	28.9 a	3.4 a
H _γ 200-7-740-1-1	98.0 a	6.0 a	18.7 a	29.2 a	3.4 a

^zMean separation within columns by Duncan's multiple range test at P=0.05.

(3) 품종보호 출원

(가) 조숙, 단간 및 대화계통

유채 '내한', '탐미', '한라' 등 3품종의 종자에 양성자 및 감마선을 0~2,000Gy 선량으로 처리하여 M₁~M₅세대까지 세대를 진전시켜 선발한 유용형질의 9계통 중 M₅세대에서 변이주가 없고 형질이 고정된 조숙·단간성 1계통('내한'의 양성자 600Gy 처리)을 2010년 9월 28일 품종명 '조단'으로 품종보호 출원하였으며, M₆~M₇세대에서 지속적으로 국립종자원 유채 신품종 심사를 위한 특성조사요령에 따라 각 계통의 특성조사를 실시하고 구별성, 안정성, 균일성 평가를 통해 조숙·단간성인 '온누리'('내한'의 양성자 1,000Gy처리)를 조숙·대화성인 '대화'('내한'의 감마선 600Gy처리)를 2012년 2월 7일에 품종보호 출원하였다. 또한 2013년 2월 27일에 역시 조숙·단간성인 '미소'('탐미'의 감마선 800Gy처리)를 출원하였다.

(나) 내염성계통

유채 '내한', '탐미', '한라' 등 3품종의 종자에 양성자 및 감마선을 0~2,000Gy 선량으로 처리하여 전북대학교 실험포장에서 육성한 M₁세대의 종자를 계통화하여 간척지시험포장에서 M₈세대까지 세대를 진전시켜 재배하고 실내검정을 통해 내염성 유망계통인 '내한'의 감마선 600Gy 처리 N₈600-21-1-641-1-1계통을 품종명 '만금'으로 2013년 10월 1일에 품종보호 출원하였다.

(다) 출원품종의 주요 특성기술서

국립종자원에 품종보호 출원한 총 5품종의 주요 특성은 아래와 같다.

① 품종명 : 조단(Jodan)

㉠ 출원번호 : 출원 2010-429, 공개번호(임시보호권번호) : 2010-500

㉡ 식물체의 주요 형태적 특성 :

- 종실의 erucic acid는 없음
- 잎 : 자엽의 폭은 중간이고, 잎 테두리의 톱니꼴 모양과 열편은 약간 있으며, 잎색은 농록색, 잎의 모양은 매끄럽다.
- 안토시아닌 유무 : 안토시아닌은 적음
- 개화기는 4월 14일로 조숙, 성숙기는 6월 11일로 조숙임
- 꽃 색은 황색, 약의 얼룩은 없음
- 협장은 6.2cm로 중간이고, 1수 협수는 52개로 중간이며, 1협 결실수는 23개로 많은편임
- 경장은 105cm로 단간, 초형은 nIII
- 종피 색깔은 흑색이고, 1,000립중은 4.2g으로 '내한'보다 높음
- 기름함량은 45.9%로 높음
- 1차분지수는 13개로 많음

㉢ 출원품종이 대조품종과 구별되는 특성 :

- 경장 : 출원품종(105cm)이 대조품종(115cm)보다 10cm작음
- 개화기 : 출원품종(4월 14일)이 대조품종(4월 22일)보다 8일 일찍 개화
- 성숙기 : 출원품종(6월 11일)이 대조품종(6월 16일)보다 5일 일찍 성숙
- 1협 결실수 : 출원품종(23개)이 대조품종(18개)보다 5개 많음
- 기름함량 : 출원품종(45.9%)이 대조품종(40.4%)보다 5.5% 많음
- Oleic acid(18:1) : 출원품종(67.8%)이 대조품종(64.2%)보다 3.6% 많음
- Linolenic acid(18:3) : 출원품종(7.32%)이 대조품종(8.40%)보다 1.08% 적음

② 품종명 : 온누리(Onnuri)

㉠ 출원번호 : 출원 2012-98, 공개번호(임시보호권번호) : 2012-122

㉡ 식물체의 주요 형태적 특성

- 종실의 erucic acid는 없음
- 잎 : 자엽의 폭은 중간, 잎은 테두리에 톱니꼴 모양이 약간 있고, 열편은 중간정도이며, 잎 색은 녹색, 모용은 매끄러운 편임
- 안토시안 유무 : 안토시안은 적음
- 개화기는 4월 12일로 조숙, 성숙기는 6월 7일로 조숙
- 꽃 색은 황색, 약의 얼룩은 없음
- 협장은 5.3cm로 중간이고, 1수협수는 64.7개로 많으며, 1협결실수는 15.6개로 중간임
- 경장은 89.3cm로 단간, 초형은 nII
- 종피 색깔은 흑색이고, 1,000립중은 3.8g으로 중간
- 기름함량은 41.3%로 중간, 올레인산은 65.8%
- 1차분지수는 11.7개로 중간

㉢ 출원품종이 대조품종과 구별되는 특성

- 경장 : 출원품종(89.3cm)이 대조품종(121.7cm)보다 32.4cm 작음
- 개화기 : 출원품종(4월 12일)이 대조품종(4월 22일)보다 10일 일찍 개화
- 성숙기 : 출원품종(6월 7일)이 대조품종(6월 14일)보다 7일 일찍 성숙
- 1협 결실수 : 출원품종(15.6개)이 대조품종(13.6개)보다 2개 많음
- 1수협수 : 출원품종(64.7협)이 대조품종(61.0협)보다 3.7협이 많음
- Erucic acid(22:1) : 출원품종(0.19%)이 대조품종(0.27%)보다 0.08% 적음
- Oleic acid(18:1) : 출원품종(65.8%)이 대조품종(64.4%)보다 1.4% 많음
- Linolenic acid(18:3) : 출원품종(8.01%)이 대조품종(8.80%)보다 0.79% 적음

③ 품종명 : 대화(Daehwa)

㉠ 출원번호 : 출원 2012-99, 공개번호(임시보호권번호) : 2012-123

㉡ 식물체의 주요 형태적 특성

- 종실의 erucic acid는 없음
- 자엽의 폭은 매우 넓은, 잎은 테두리에 톱니꼴 모양이 많고, 열편이 약간 있으며, 잎 색은 녹색, 모용은 매끄러운 편임
- 안토시안 유무 : 안토시안은 보통
- 개화기는 4월 14일로 조숙, 성숙기는 6월 12일로 중숙
- 꽃 색은 황색, 약의 얼룩은 없음, 꽃잎 1장의 길이는 16.7mm, 폭은 11.6mm로 꽃의 크기가 큼
- 협장은 6.7cm로 길고, 1수협수는 63.8개로 많으며, 1협결실수도 24.4개로 많음
- 경장은 122.7cm로 중간, 초형은 nIII
- 종피 색깔은 흑색이고, 1,000립중은 4.1g으로 중간
- 기름함량은 44.3%로 많고, 올레인산은 64.39%
- 1차분지수는 12.8개로 중간

㉢ 출원품종이 대조품종과 구별되는 특성

- 자엽의 폭 : 출원품종(2.93cm)이 대조품종(2.47cm)보다 0.46cm가 넓은
- 잎 : 출원품종이 대조품종보다 테두리의 톱니꼴 모양이 많고 열편이 약간 있음
- 꽃 : 출원품종의 꽃잎(1장의 길이 16.7mm, 폭은 11.6mm)이 대조품종(12.9mm, 7.4mm)보다

매우 큼

- 개화기 : 출원품종(4월 14일)이 대조품종(4월 22일)보다 8일 일찍 개화
- 협장 : 출원품종(6.7cm)이 대조품종(5.3cm)보다 1.4cm가 큼
- 1수협수 : 출원품종(63.8협)이 대조품종(61.0협)보다 2.8협이 많음
- 1협 결실수 : 출원품종(24.4개)이 대조품종(13.6개)보다 10.8개 많음
- Erucic acid(22:1) : 출원품종(0.32%)이 대조품종(0.27%)보다 0.05% 많음
- Oleic acid(18:1) : 출원품종(64.4%)과 대조품종(64.4%) 비슷함
- Linolenic acid(18:3) : 출원품종(6.44%)이 대조품종(8.80%)보다 2.36% 적음

④ 품종명 : 미소(Miso)

㉠ 출원번호 : 출원 2013-169, 공개번호(임시보호권번호) : 2013-268

㉡ 식물체의 주요 형태적 특성 :

- 종실의 erucic acid는 없음
- 잎 : 자엽의 폭은 중간, 잎은 테두리에 톱니꼴 모양이 약간 있고, 열편은 중간정도이며, 잎 색은 녹색, 모용은 매끄러운 편임
- 안토시아닌 유무 : 안토시아닌은 많음
- 개화기는 4월 9일로 조숙, 성숙기는 6월 4일로 조숙
- 꽃 색은 황색, 약의 얼룩은 없음
- 협장은 5.0cm로 짧은 편이고, 1수협수는 33.3개, 1협결실수는 14.7개로 적음
- 경장은 76.8cm로 매우 단간, 초형은 nII
- 종피 색깔은 흑색이고, 1,000립중은 4.1g으로 중간
- 기름함량은 39.0%로 중간, 올레인산은 65.4%
- 1차분지수는 10.7개로 중간

㉢ 출원품종이 대조품종과 구별되는 특성

- 경장 : 출원품종(76.8cm)이 대조품종(98.3cm)보다 21.5cm 작음
- 개화기 : 출원품종(4월 9일)이 대조품종(4월 16일)보다 7일 일찍 개화
- 성숙기 : 출원품종(6월 4일)이 대조품종(6월 10일)보다 6일 일찍 성숙
- 1협 결실수 : 출원품종(14.7개)이 대조품종(20.4개)보다 약 6개 적음
- 1수협수 : 출원품종(33.3협)이 대조품종(37.3협)보다 4협이 적음
- Erucic acid(22:1) : 출원품종(0.1%)이 대조품종(0.1%)과 같음
- Oleic acid(18:1) : 출원품종(65.4%)이 대조품종(66.0%) 보다 0.6% 적음
- Linolenic acid(18:3) : 출원품종(6.5%)이 대조품종(5.9%)보다 0.6% 많음

⑤ 품종명 : 만금(Mangeum)

㉠ 출원번호 : 출원 2013-426, 공개번호(임시보호권번호) : 2013-452

㉡ 출원품종의 주요 형태적 특성

- 종실의 erucic acid는 없음
- 잎 : 자엽의 폭은 중간, 잎은 가장자리의 톱니와 열편은 중간정도이며, 잎 색은 녹색, 솜털은 적은편이다.
- 줄기의 안토시아닌의 정도 : 적음
- 개화기는 4월 16일로 이르고, 성숙기는 6월 12일로 중간이다.
- 꽃 색은 노란색, 약의 얼룩은 없음

- 협의 길이는 5.9cm로 중간, 수당 협수는 42.3개, 협당 결실수는 20.3립으로 많음
- 식물체의 키는 114.0cm로 중간, 식물체의 형은 3형
- 종피 색깔은 검은색이고, 천립중은 4.0g으로 중간
- 기름함량은 42.0%로 중간, 올레인산은 66.2%
- 1차분지수는 11.7개로 중간

㉔ 출원품종이 대조품종과 구별되는 특성

- 내염성 : 출원품종이 대조품종(‘내한’)보다 염에 대한 내성이 강함
- 개화기 : 출원품종(4월 16일)이 대조품종(4월 22일)보다 6일 일찍 개화
- 협당 결실수 : 출원품종(20.3립)이 대조품종(13.9립)보다 약 6립이 많음
- Erucic acid(22:1) : 출원품종(0.5%)이 대조품종(0.3%)과 비슷함
- Oleic acid(18:1) : 출원품종(66.2%)이 대조품종(65.9%)과 비슷함
- Linolenic acid(18:3) : 출원품종(8.2%)이 대조품종(8.3%)과 비슷함

(라) 농업유전자원 기탁

- ① 자원번호 K175491 : 엽록소 변이계통(등록일 : 2011. 09. 22)
- ② 자원번호 K175492 : 초단간 변이계통(등록일 : 2011. 10. 12)
- ③ 자원번호 K175551 : 조숙·초단간 변이계통(등록일 : 2011. 10. 12)
- ④ 자원번호 K175552 : 대화 변이계통(등록일 : 2011. 10. 12)
- ⑤ 자원번호 K175553 : 조숙·단간 변이계통(등록일 : 2011. 10. 12)
- ⑥ 자원번호 K204668 : 고오일 변이계통(등록일 : 2012. 11. 05)
- ⑦ 자원번호 K223115 : 내염성 변이계통(등록일 : 2013. 10. 10)

제11절 제7협동 돌연변이 유도 녹색 꽃 양배추의 단인자 우성 응성불임성의 실용화 ((주)바이오브리딩연구소 이수성)

본과제의 기본적인 연구개발 내용은 소포자 배양 때 NMU라는 돌연변이제를 처리하여 획득한 단인자 우성 응성불임성(유전자=S)이 있다. 그리고 또 다른 돌연변이 집단에서 발견된 S인자의 기능을 억제하는 인자가 있다. 이들을 1대잡종 육성에 이용하기위한 것인데 그 방법에는 세 가지가 있다.

첫째는 우수한 F1조합을 먼저 선발한 후 그 조합의 모계로 이용될 계통(친)을 단인자 우성 응성불임성 계통으로 만들어 가는 방법이다. 이 경우 응성불임계통을 유지하거나 증식하기위하여 가임성계통과 교잡하였을 때 응성불임성과 가임성 개체가 항상 1:1로 분리하여 나타난다. 따라서 불임성 유전자(S)와 연관된 표지인자를 개발하여 불임성 개체만 쉽게 선별할 수 있어야 한다(그림11-1).

Ss(불임) x ss(가임, 우수F1조합의 모계)
 ↓←반복여교잡에 의한 iso-line 육성
 Ss : ss
 1 : 1 ←연관마커이용 Ss 다량 선발

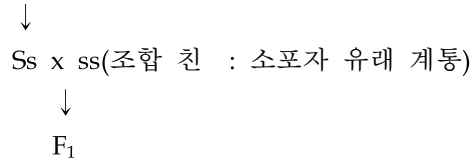


그림11-1. 단인자 우성 응성불임성을 이용한 1대잡종 육성 체계 1(3계통 이용법)

둘째는 이 응성불임성 개체가 장일 조건하에서 가임화된 예가 있으므로 먼저 가임화 시키는 방법을 확립한다. 그리고 가임화된 개체를 자식하여 후대(SS: Ss: ss= 1: 2: 1)를 확보함과 동시에 소포자 배양에 공시하여 고정된 응성불임성 호모개체(SS)를 양성한다(SS: ss= 1: 1로 분리). 이 SS개체의 일시적 가임화 방법이 있는지 검토한다. 만일 일시적 가임화가 가능하면 가임화된 개체를 자식하여 F1조합의 모계로 다량증식이 가능하다. 만일 일시적 가임화가 안 될 경우 소화경과 꽃봉오리 배양으로 다량증식이 가능함으로 이를 모계로 하여 우수한 부계를 탐색하면 2계통법에 의한 F1종자 생산이 가능하게 된다(그림11-2).

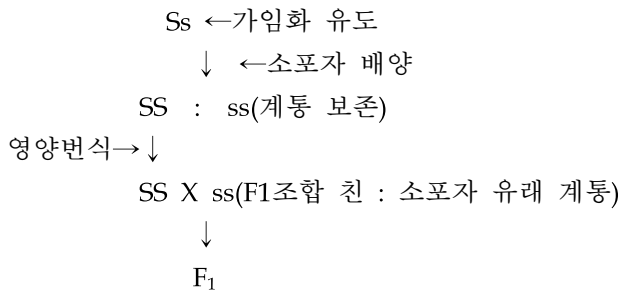


그림11-2. 단인자 우성 응성불임성을 이용한 1대잡종 육성 체계 2(2계통 이용법)

셋째는 응성불임성 인자의 발현을 억제하는 인자(F)가 발견되어 있으므로 이 인자를 이용하여 응성불임성인자의 호모계통(SSff)을 육성한다. 이 계통은 자식하면 SSF₁와 SSff가 3:1로 분리한다. 그 중 SSff개체를 위의 SS개체 이용과 같은 방법으로 활용할 수 있을 것이다. 또한 SSff 개체를 소포자 배양하면 SSFF와 SSff 개체가 1:1로 나타난다. SSff 개체는 위와 같은 방법으로 1대잡종 육성에 이용할 수 있다. SSFF 계통은 유전자원으로 보존하고 일반의 가임 계통 ssff 와 교잡하여 SsFf를 만든 후 이를 소포자 배양함으로써 SSFF, SSff, ssFF, ssff 등 원예적 형질이 고정된 다양한 계통과 함께 다양한 형질의 응성불임성 계통을 육성할 수 있다.

이상의 연구내용을 수행코자 1) 응성불임 개체의 일시적 가임화 유도, 2) 응성불임성 계통의 가임화유도 후 가임화된 개체의 자식 및 소포자 배양에 의한 응성불임성 인자 호모개체(SS) 양성, 3) 일시적 가임화 유도대신 단인자 우성 응성불성의 발현을 억제하는 인자를 이용한 응성불임성 인자 호모개체(SSff) 양성, 4) 응성불임성 개체 및 소포자 배양으로 육성된 고정계통을 이용한 우수 F1 품종 육성, 5) 응성불임성 인자 연관 표지인자 개발, 6) 주요 1대잡종 품종 및 F1 조합의 소포자 배양에 의한 다양한 순계육성 등 6개 분야의 시험을 수행하였다.

1. 응성불임 개체의 일시적 가임화 유도

가. 응성불임 개체 분리, 보존

단인자 우성 응성불임 계통(Ss)은 가임계통(ss)과 교잡하면 항상 불임개체(Ss)와 가임개체(ss)

가 1:1로 분리한다. 따라서 웅성불임개체를 우선 선발코자 기 보존 중인 분리집단을 1차 년도에 파종하여 조사하였다. 전체 5개 집단에서 107개체를 확보할 수 있었는데 39개체는 이상 생육을 보이면서 개화하지 않거나 개화가 너무 늦어 이용할 수 없었다. 전체 68개체가 개화하였는데 그 중 웅성가임주가 25개체였고 불임주가 43개체였다. (표 생략).

1차 년도에 이어 2차 년도에도 보존하고 있는 계통을 검정하여 웅성불임성의 분리 양상을 확인하고 이용 가능한 개체 또는 계통을 선발코자 하였다. 전체 9계통의 376립을 파종하였는데 생산된 지 7년 이상이 경과되어 47립만이 발아하였으며 웅성가임과 불임이 24:23이었다(표 생략). 이들은 계통별로 불임 주에 가임 주를 교잡하여 증식하였으며 보존 중이다. 그리고 S 인자 연관 마커 개발용으로 이용코자 DNA를 sampling 하였다.

나. 불임성개체의 가임화 유도

5개 집단 각각의 웅성불임주 1-2주씩을 가임화유도용 야간 조명하에 두고 화분의 발생유무를 수시로 조사하였다(그림 3). 그리고 08BCF1-137 계통과 08BCF1-138 계통의 불임주 각각 2주씩을 선정하여(2반복) 각 개체마다 개화하고 있는 2화지씩(2반복)을 gibberellin 10ppm 과 50ppm 용액에 1주일 간격으로 3회 순간 침지하였다. 또한 methyl jasmonate 22M 용액을 두 집단의 불임주 2주씩에 매일 2회씩 6일간 살포하였다.

2. 가임화된 개체의 처리

가. 자가수분 후대의 분리비

먼저 Gibberellin과 Methyl jasmonate 의 처리 구에서는 전혀 불임성이 타파되지 않았다. 조명처리 구에서는 가장 먼저 11월 19일부터 처리된 08BMS-14 계통의 한 개체가 처리 약 1개월 경에 약간의 화분을 생산하였다. 그러나 다른 개체는 이듬해 4월까지 전혀 변화를 보이지 않았다. 화분생산 개체는 곧바로 자가수분하는 한편 소포자 배양을 실시하였다.



그림11-3. 녹색꽃양배추의 웅성불임성과 가임성의 꽃과 수술 모양 및 불임성의 가임 유도를 위한 전조

적으나마 화분을 생산한 개체는 자가수분과 소포자 배양에 공시하였다. 자가수분은 12월 19일부터 2월17일까지 4회 실시하였다. 꽃봉오리 153개, 개화된 꽃 43개에 수분하였는데 얻어진 종자는 각각 20립과 26립이었다. 저온단일의 겨울이었기 때문이기도 하지만 대체로 종자생산성이 극히 낮았다. 앞에서 이야기한 바와 같이 이 종자들은 웅성불임성인자가 호모인 SS, 헤테로

인 Ss, 가임성인자의 호모인 ss가 1:2:1로 섞여있을 것이다. 그리고 이 집단은 분리하는 음성불임개체와 가임개체를 서로 교잡하여 유지하여온 것이므로 원예적 형질이 유전적으로 고정되지 않았을 것이다. 따라서 우선 형태적인 분리양상을 조사하는 한편 음성불임유전자의 호모개체를 선발코자 19립의 종자를 가을재배 적기인 7월 13일에 파종하고 16립이 발아하였다. 이들을 재배하여 특성을 조사한 후 성숙모본으로 유지하고 불임개체는 가임개체와 교잡하여 음성불임성인자의 조성을 확인코자 하였다. 따라서 이들을 9월7일 정식하였는데 뜻밖에 고라니가 밤중에 모두 파먹어서 한 포기도 남지 않았다. 부득이 남은 종자 중 10립을 9월 11일에 교배 모본용으로 재 파종하였다. 그 중 9주를 확보할 수 있었는데 2차년도에 MS 분리 현황에서 가임주(MF)가 4개체, 불임주(MS)가 5개체였다(표 생략). 만일 전조에 의한 반가임 주가 본래 불임주(Ss)가 아니고 가임주(ss)였다면 후대는 모두 가임주만 나타나야한다. 그런데 가임주와 불임주가 4:5로 분리한 것으로 보아 모본이 음성불임주였음을 알 수 있으며 전조에 의해 반가임화 된 것으로 알 수 있다.

불임주 5주는 SS 호모와 Ss 헤테로의 인자형일 것이지만 어느 개체가 SS일지 알 수 없다. 불임주에 가임주(ss)로 교잡하였을 때 후대에서 불임주만 나타나는 모계는 SS 호모이고 가임주와 불임주가 1:1로 분리하면 그 불임개체는 Ss 헤테로일 것이다. 따라서 5주 모두에 가임개체(ss)로 교잡하여 후대 분리비에 의한 SS호모 개체를 선발하여야 한다. 그런데 5주 모두 교배하지 못하고 온실에서 여름을 넘겼는데 불행히 중도에 사멸하였다. 자가수분으로 채종된 46립 중 1차와 2차로 파종된 32립 외에 14립이 남아있으므로 늦었지만 3차년도에 파종하여 음성불임성개체를 선발하고 후대를 채종하여 음성불임성 인자 호모(SS)개체 선발에 이용할 계획이었다. 그러나 불임성 계통의 일시적 가임화가 안 되는 개체가 많아 이용 상 불편이 많고 장일조건에서 일시적으로 가임화 된 계통이 후일 F1 채종에서 가임화되는 현상이 나타날 수 있다고 생각되었다. 그리고 다음에 기술하는 바와 같이 음성불임성을 억제하는 유전자 F를 이용한 음성불임성 인자 호모(SS)개체를 얻을 수 있었으므로 가임화 유도에 의한 음성불임성 인자 호모(SS)개체 선발 시험은 중단하였다.

나. 소포자 배양 및 그 후대의 분리비

소포자 배양은 이듬해의 5월 19일까지 12회에 걸쳐 실시하였다. 그 중 4회에서 배가 출현하여 전체 128개의 배를 획득하고 이들을 식물 재분화 배지에 옮겼다. 그런데 연휴중인 8월15일-17일에 정전사태가 일어나 배양실의 에어컨이 가동되지 못하였다. 따라서 약 70여 유식물체가 고온을 견디지 못하고 고사하였다(표 생략). 다행히 2개체가 순화되어 자라고 있었으며 8개체가 순화 중이었으므로 고정된 음성불임성인자 호모(SS) 개체가 얻어질 수 있을 것으로 기대되었다. 그러나 소포자 배양 유래의 식물 중 2개체만이 개화하였는데 모두 가임성(ss)으로 음성불임성인자의 호모개체를 얻는 데는 실패하였다.

3. 음성불임성의 억제인자를 이용한 우성음성불임성 인자 호모(SS) 계통 육성

가. SSff의 호모 계통 육성

과거 2003년도까지의 연구결과(F6 세대까지) 중에 돌연변이로 얻어진 우성 음성불임성 인자(S) 외에 이 인자의 발현을 억제하는 또 다른 돌연변이의 우성억제인자(F)가 보고된바 있다. 이 두 가지 인자가 조합되어 음성불임성 인자가 SS 호모이면서도 가임인 계통(SSFf)이 있는 것이

다. 이 SSff 인자의 계통은 자식하면 가임인 SSFF와 SSFf, 그리고 불임인 Ssff가 1:2:1로 나타기 때문에 SS의 호모계통을 고정할 수 있을 뿐 아니라 유지 증식할 수 있게 된다. 그리고 F인자와 연관된 마커가 개발되면 증식된 원원종에서 F인자에 의한 가임성 개체를 도태하고 불임성 개체만으로 불임성인 원종(Ss)을 다량으로 증식하여 F1종자 생산에 이용할 수 있다.

먼저 과거의 기록을 정리하여 웅성불임성 관련 유전자 조성이 SSFf로서 불임성인자가 호모인 계통 또는 한 세대를 자식하면 이러한 호모계통이 나타날 수 있는 계통을 찾았는데 모두 20계통이었으며 보존 종자가 1,185립이었다. 2차년도에 이들을 파종한 결과 4계통이 전혀 발아하지 않았고 전체적으로 27%정도가 발아하였다. 이들의 개화기에 화분 유무에 따라 웅성불임성을 조사하였다. 그리고 2003년도에 공시되어 웅성불임성인자의 분리비가 조사된 성적을 통합하여 계통별 웅성불임성의 분리 비를 나타내었다(표11-1).

두 번의 시험결과를 종합하였음에도 유전분석을 하기에는 개체수가 다소 충분치 못한 느낌이 있다. 웅성불임성 관련 추정인자가 SSFf인 경우 자식하면 웅성가임과 불임주가 3:1로 분리한다. 표 1에 있는 분리비를 보면 모두 3:1에 잘 부합하고 있다. 그런데 SSFf가 아니고 SsFf의 인자형으로도 추정할 수 있는데(전 세대의 분리비 분석결과, 여기에는 제시하지 않음) 이 인자형의 자식 후대는 가임과 불임주가 13:3으로 나타나게 된다. 이 3:1과 13:3과의 차이가 크지 않아 어느 인자형으로 추정하느냐가 큰 문제이다. 여기 있는 분리비 데이터는 χ^2 검정결과 모두 13:3보다 3:1 분리비에 더 가깝게 나타나고 있지만 13:3이 아니라고 단정하기는 어려울 것 같다. 만일 3:1분리비로 인자형이 추정된 SSFf라면 이는 웅성불임성 인자가 고정된 호모 SS이며 세대마다 SSFf의 가임성 개체를 자식함으로서 계통 고정이 가능해진다. 만일 13:3의 분리비로서 인자형이 SsFf라면 자식하였을 때의 가임개체는 SSFF, SSFf, SsFF, SsFf, ssFF, ssFf, ssff의 7종이나 된다. 이들 모두를 자식하여 후대에서 가임과 불임개체가 분리하여 나타나는 것을 찾아야 하는데 7가지 인자형 중 후대가 분리되는 인자형은 SSFf(3:1)와 SsFf(13:3)의 두 종류이다. 이들의 자식 후대를 얻어 분리비를 조사함으로써 SSFf 계통을 선발할 수 있을 것이다. 따라서 SSFf로 추정되고 자식 후대에서 가임성과 불임성 개체가 3:1로 분리하는 계통과 불임성개체에 이 가임성 계통을 교잡한 후대가 1:1로 분리하는 계통의 개체를 계통 당 2-5주씩 자가수분시키고 유전분석에 충분한 종자를 얻고자 하였다.

한편 추정된 웅성불임성 관련 유전자형의 정확성을 확인하고 순계를 조기에 고정하여 1대잡종 종자 생산에 이용코자 인자형이 SSFf로 추정되는 4계통의 후대 가임개체 5개체를 소포자 배양에 공시하였다. 유전자형이 SSFf인 개체의 소포자 유래 개체는 유전자형이 SSFF와 SSff로 고정되어 가임성과 불임성 개체가 1:1로 나타날 것이며 SsFf 개체의 소포자 유래 개체는 SSFF : SSff : ssFF : ssff 가 1:1:1:1로 나타나서 가임성과 불임성 개체가 3:1로 나타날 것이다. 따라서 소포자 유래 개체의 웅성불임성 분리비를 조사하면 그 모계의 인자조성을 쉽게 알게 되는 것이다.

소포자 배양 유래 개체와 자식에 의한 M₈ 세대의 분리 비를 확인하였다(표 2). 그 결과 5개체 모두 웅성가임개체와 불임개체가 분리하여 나타나고 있으며 분리비가 1:1 보다는 불임개체가 많이 나타나고 있다. 이처럼 가임 성 개체를 소포자 배양하여 가임개체만 나타나지 않고 불임개체가 나타났다는 것은 소포자 배양에 이용된 모본이 비록 가임일지라도 웅성불임성 인자를 가지고 있었음을 나타내는 것이다. 그리고 소포자 유래의 개체 중에는 반수체로서 불임인 개체가 30-40% 정도 되는 것으로 알려져 있다. 따라서 이 비율만큼의 불임개체를 제외하면 5개체 중 4계통이 대체로 1:1 분리 비를 나타내고 있음을 알 수 있다. 또한 SSFf로 간주된 3계

통의 후대 분리 비를 보면 모두 3:1로 분리하고 있으며 불임개체(SSff)에 가임개체(SSFf)를 교잡한 잡종의 경우는 비록 개체 수는 적지만 1:1(7:8)의 분리비를 나타내고 있다.

이상으로

- (1) 돌연변이로 유도된 음성불임성 인자와 이 인자의 억제인자에 대한 유전양식이 우성억제인자(epistasis) 관계임을 알게 되었으며 이러한 내용의 논문을 작성하여 SCI 학회지에 게재하였다(Hort. Environ. Biotechnol. 53:237-241(2012)).
- (2) 단인자 우성 음성불임성 인자는 호모이고 그 억제인자는 헤테로인 계통(SSff)이 억제인자의 도움으로 육성되었다.
- (3) 이 계통을 자식(自殖)함으로서 후대에 이들 두 인자가 모두 호모(SSFF)로서 가임인 개체, 음성불임성 인자는 호모이고 억제인자는 헤테로(SSff)인 가임성 개체, 음성불임성 인자는 호모이면서 억제인자가 열성 호모(SSff)인 음성불임성 개체가 분리함으로서 음성불임성인자의 호모계통을 육성할 수 있는 길이 열렸다.
- (4) 이러한 음성불임성 인자 호모 개체(SSff)에 SSFf 인자형의 개체를 교잡함으로서 다량의 음성불임성 인자 호모계통을 증식할 수 있게 되었다(SSff와 SSFf 개체가 1:1로 분리함).
- (5) SSFf 인자형의 개체를 소포자 배양하여 원예적 형질이 고정된 순계의 가임성 계통(SSFF)이 육성되어(표11-3) 새로운 유전자원으로 등록하였다.
- (6) 끝으로 본 과제의 궁극적 목표 중 하나인 우성음성불임성인자의 호모 계통(SSff)이 원예적 형질이 고정된 상태로 육성되어 다음에 설명하는 소포자 배양으로 육성된 다양한 계통과 F₁ 조합을 작성할 수 있게 되었다. 앞으로의 시험과 이용을 위해 다양한 음성불임성 인자 보유 계통의 후대를 채종하였다(표11-3).

그리고 이러한 유전자형이 확인되고 유전자 호모의 불임개체(SSff)중 우수한 형질의 개체(계통)가 발견되면 소화경과 화퇴 배양으로 증식하여 우량 1대잡종의 친으로 곧바로 이용할 수 있을 것이며 일시적 가임화 연구재료로도 이용될 수 있을 것이다.

또한 두 인자가 모두 호모인 가임개체(SSFF) 중 형질이 우수한 개체(계통)가 발견되면 불임개체(SSff)에 교잡하여 F₁(SSFf)을 작성하고 이후 여교잡으로 음성불임성 인자가 호모로 고정된 계통을 육성할 수 있을 것이다. 즉 본 과제의 최종 목표가 쉽게 달성될 수 있게 되는 것이다.

표11-1. 음성불임성 인자 호모(SS)개체 확인을 위한 추정 인자형별 분리 비 검정

세대	계통번호	추정인자형	식물수			분리비 MF:MS	과중 번호
			합계	MF	MS		
M6	[9-1-2x(8-1x9-3)-1]-5⊗	SSff	34	25	9	3:1	
	[9-1-2x(8-1x9-3)-1]-10⊗	"	69	52	17	"	204
	[9-1-2x(8-1x9-3)-1]-26⊗	"	27	21	6	"	
	[9-1-2x(8-1x9-3)-1]-27⊗	"	36	26	10	"	206
	소계	"	162	121	41		
	[9-1-2x(8-1x9-3)-1]-21x [9-1-2x(8-1x9-3)-1]-5	SSffxSSFf	45	20	25	1:1	
	[9-1-2x(8-1x9-3)-1]-21x [9-1-2x(8-1x9-3)-1]-10	"	90	45	45	"	215
	[9-1-2x(8-1x9-3)-1]-21x	"	95	50	45	"	216

	[9-1-2x(8-1x9-3)-1]-26						
	[9-1-2x(8-1x9-3)-1]-21x [9-1-2x(8-1x9-3)-1]-27	"	63	35	28	"	208
	소계	"	293	150	143	"	
	[9-1-2x(8-1x9-3)-1]-21x 9-1-28	SSffx_FF	57	57	0	1:0	
	[9-1-2x(8-1x9-3)-1]-15x 9-1-28	SSffx_FF	14	14	0	"	
	(8-1x109-3)-1-9x9-1-28	SSffx_FF	17	17	0	1:0	
	(8-1x109-3)-1-21x9-1-28	SSffx_FF	19	19	0	1:0	
	[9-1-2x(8-1x9-3)-1]-21x (8-1x9-3)-1-1	SSffXSSFf	128	58	70	1:1	214
M7	[9-1-2x(8-1x9-3)-1]-5-3(⊗)	SSFf(⊗)	18	12	6	3:1	218
	[9-1-2x(8-1x9-3)-1]-5-9(⊗)	SSFf(⊗)	17	11	6	3:1	
	[9-1-2x(8-1x9-3)-1]-5-28(⊗)	SSFf(⊗)	6	5	1	3:1	221
	[9-1-2x(8-1x9-3)-1]-10-3(⊗)	SSFF(⊗)	21	21	0	1:0	222
	[9-1-2x(8-1x9-3)-1]-10-11(⊗)	SSFf(⊗)	20	15	5	3:1	224

주 : 2003년도의 시험결과와 표 3의 성적을 종합한 것임

추정 MS 인자형 : M6(F6)세대까지의 응성불임성 분리 비에 따라 추정된 인자형

표11-2. 응성불임성 인자 호모로 추정되는 계통의 M₈ 세대 분리현황

과종번호	계 통 명	추정 인자형	식물수			분리 비	비고
			합계	MF	MS		
206-3M	[9-1-2x(8-1x9-3)-1] -27-3M	SSFf(M)	23	6	17 (10)	1:1	
331(206-4(⊗))	[9-1-2x(8-1x9-3)-1] -27-4(⊗)	SSFf(⊗)	53	37	16	3:1	
214-2M	{ [9-1-2x(8-1x9-3)-1] -21Sx (8-1x9-3)-1-1 } -2M	SSffxSSFf	15	1	15 (10)	1:1	
334(214-1(⊗))	{ [9-1-2x(8-1x9-3)-1] -21Sx (8-1x9-3)-1-1 } -1(⊗)	SSFf(⊗)	43	29	14	3:1	
215-5M	{ [9-1-2x(8-1x9-3)-1] -21Sx [9-1-2x(8-1x9-3)-1] -10 } -5M	SSFf(M)	41	17	24 (12)	1:1	
335(215-5(⊗))	{ [9-1-2x(8-1x9-3)-1] -21Sx [9-1-2x(8-1x9-3)-1] -10 } -5(⊗)	SSFf(⊗)	38	27	11	3:1	
336 (215-3Sx-5)	{ [9-1-2x(8-1x9-3)-1] -21Sx [9-1-2x(8-1x9-3)-1] -10 } -3Sx { } -5	SSffxSSFf	15	7	8	1:1	
218-2M	[9-1-2x(8-1x9-3)-1] -5-3-2M	SSFf(M)	10	3	7 (4)	1:1	

M: 소포자 배양. S: 응성불임성.

동일 색은 동일 조합으로 자식 후대 및 소포자 배양 유래 후대를 비교할 수 있음

()내는 소포자 유래 개체의 약 65%가 2배체임을 감안하여 환산한 수치임

나. 응성불임성인자 호모 계통의 소화경 배양에 의한 다량증식

녹색꽃양배추는 소화경과 화뢰를 배양하여 다량의 영양번식체를 얻는 기술이 1990년대에 우리연구실에서 확립되어 있다. 그러므로 F1종자 채종에 이용 가능한 우량 응성불임성인자 호모 계통이 얻어지면 1차로 소화경 배양에 의한 모계를 증식하여 이용할 계획이다. 따라서 응성불임성 인자가 호모로 추정되는 불임개체 09BMS214-20의 소화경을 배양하여 보았다. 예비시험임으로 배양에 의한 증식 가능성을 보고자 한 것인데 치상한 소화경 대부분에서 식물체가 분화되는 것을 확인하였다(그림11-4,표11-4). 이러한 결과는 응성불임성 호모계통을 이용한 우량 F1 조합이 선발되면 그 모계를 곧바로 이 방법으로 증식하여 이용하게 될 것이다.

표11-3. 브로콜리 GMS 계통의 후대 채종현황

파종번호	계통명	화지수	종자수	모본의인자형	추작공시
206-3M-7(⊗)	[9-1-2x(8-1x9-3)-1] -27-3M-7(⊗)	1	46	SSFF(⊗)	※
206-3M-10(⊗)	-3M-10(⊗)	1	26	SSFF(⊗)	※
206-3M-19S x -7	-3M-19S x -3M-7	1	1	SSffx SSFF	
206-3M-19S x -10	-3M-19S x -3M-10	2	91	SSffx SSFF	
206-4(⊗)	[9-1-2x(8-1x9-3)-1] -27-4(⊗)	3	41	SSFf(⊗)	
215-2(⊗)	{ [9-1-2x(8-1x9-3)-1] -21Sx [9-1-2x(8-1x9-3)-1] -10} -2(⊗)	5	166	SSFf(⊗)	※
215-5M-19(⊗)	{ [9-1-2x(8-1x9-3)-1] -21Sx [9-1-2x(8-1x9-3)-1] -10} -5M-19(⊗)	1	27	SSFF(⊗)	※
215-5M-35(⊗)	{ [9-1-2x(8-1x9-3)-1] -21Sx [9-1-2x(8-1x9-3)-1] -10} -5M-35(⊗)	2	25	SSFF(⊗)	※
215-7S x -2	{ [9-1-2x(8-1x9-3)-1] -21Sx [9-1-2x(8-1x9-3)-1] -10} -7Sx { } -2	4	91	SSffx SSFf	
218-11S x -17	[9-1-2x(8-1x9-3)-1] -5-3-11Sx-17	3	226	SSffx SSFf	
218-13(⊗)	[9-1-2x(8-1x9-3)-1] -5-3-13(⊗)	1	2	SSFf(⊗)	
218-17(⊗)	-17(⊗)	3	30	SSFf(⊗)	※
224-3(⊗)		4	29	SSFf(⊗)	※
227-3S x -2		1	1	SSffx SSFf	

그림11-4. 녹색꽃양배추의 소화경 배양 모습

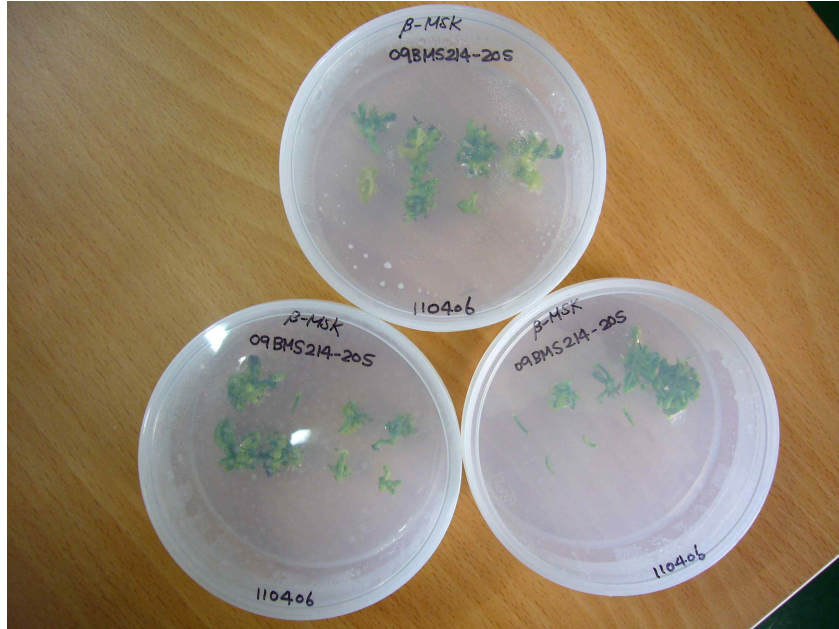


표11-4. 응성불임성 호모 개체의 소화경 배양결과

파종 번호	추정 유전자 형	화경 수		비고
		치상	식물체 분화	
09BMS 214-20	SSff	23	17	한 화경에서 많은 순이 자람

4. F1 조합 및 주요 계통의 생산력(특성) 검정

가. 1대잡종의 생산력 검정

1차년도에는 기존의 보유 계통 중 특성이 서로 다를 것으로 기대되는 계통과 그들 간의 몇몇 F1 조합을 7월 13일 파종하고 9월7일 발에 정식하였다. 불행이도 인가가 주변에 있는데도 고라니가 정식한 개체 모두를 뽑아 먹어버리는 사고가 발생하여 시험에 실패하였다. 계통과 F1 조합 검정이 정상적으로 수행된 3년차 이후의 성적에서 1차년도에 공시된 조합은 우수한 것이 없었다. 즉 정상적으로 시험이 수행되었더라도 경험을 얻는 정도이고 우수 조합은 선발될 수 없었었을 것으로 생각된다.

2차년도에는 봄에 채종된 계통 중 종자 량이 충분한 70계통과 응성불임성 인자형이 SS 호모로 가정된 개체에 소포자 배양에서 얻은 유망 개체를 교잡한 15 조합을 가을에 검정하였으나 7월 14일 파종기부터 정식 후 약 20일간(9월10일경까지)의 지속적인 폭우와 폭염으로 생육상태가 고르지 않아 특성이 제대로 발휘되지 못하였다.

이처럼 2개년간의 실패 때문에 우수 F1조합을 선발할 수 있는 기회가 그만큼 늦어졌다. 다행히 3년차부터는 포장에 울타리를 설치하고 일기가 고르지 못할 경우에는 PE필름하우스에 정식

하는 등의 노력에 힘입어 큰 차질 없이 시험이 수행되었다. 5개년간의 공시 계통 및 F1조합 수와 선발된 계통 및 조합수를 요약한 것이 표11-5이다.

3년차부터는 봄과 가을 2회에 걸쳐 시험을 수행하였다. 6회의 작기에서 대비품종에 비하여 우수성이 인정된 조합 수가 상당히 많았다(연차별 보고서 참조). 그 중 3조합씩을 선정한 것이 표11-6이다.

3년차 가을과 4년차의 봄과 가을에 선발된(3회 선발) 143M-103x145M-6 조합(청색표시)은 함께 공시된 3개의 대비 품종보다 훨씬 우수하였다. 그러나 모계인 143M-103가 임성이 극히 낮은 문제가 있었다. 따라서 최종적으로 남은 3립의 종자를 파종하고 보존되어 있는 한 포기 액아를 삼목하여 도합 7주를 확보하고 자식 종자 및 F1종자를 확보코자 온갖 노력을 다하였다. 그러나 불행하게도 2012-2013의 겨울 동안에 원인 모르게 시름시름 시들어 모두가 죽었다.

이 조합과 다소 유사성이 있는 다른 한 조합(적색표시), 143M-113x145M-6이 본 시험의 3년차부터 5년차까지 3년 연속 가을재배에서 우수성을 나타내었다(그림 5). 그리고 5년차의 봄재배에서도 우수하였다. 이 조합은 우선 자가불화합성을 이용한 F1품종으로 등록코자 종자를 증식 중이다. 2014년도에 품종보호 등록 후 기술을 이전코자 한다. 그리고 계속하여 융성불임성을 이용한 F1품종으로 발전시켜갈 계획이다.

표11-5. 5개년간 녹색꽃양배추의 생산력 검정 결과

구 분		공시 점수								
		1년차	2년차	3년차		4년차		5년차		
				봄	가을	봄	가을	봄	가을	
F1조합	DH 계통 간	12		5	15(2)	13(3)	7(3)	6(3)	3(1)	56(12)
	GMS 이용	8	15	7(3)	11(1)	10(3)	12(6)	12(8)	13(4)	81(22)
	소계	20	15	12(3)	26(3)	23(6)	19(9)	18(11)	16(5)	137(34)
계통	소포자 유래	-	38	32(6)	85(12)	23(13)	59(?)	54(12)	45(9)	336(46)
	기타	16	30	10	14	-	-	-	-	-
	소계	16	68	42(6)	99(12)	23(13)	59(?)	54(12)	45(9)	336(46)
대비종		2	2	-	4(1)	4(3)	3(2)	3(3)	3(2)	21(11)
합계		38	85	54	129	50	81	75	64	494
선발 조합 수		0	0	3(6)	3(15)	6(16)	6(2)	11(15)	5(11)	631(125)

() 내는 선발된 조합 또는 계통임)

5차년도(2013년) 가을선발조합: 143M-113x 145M-6 : 1.3.3.2

표11-6. 3년차 이후 선발 조합 내역

시험 연차	봄 검정		가을 검정	
	선발번호	계통 명	선발번호	계통 명
3년차	11BC봄-345	214-19Sx143M-20	11BC추-432	214-20Sx144M-43
	347	215-9Sx143M-20	411	143M-103x 145M-6
	351	224-12Sx143M-20	413	143M-113x 145M-6
4년차	12BC봄-600	143M-103x145M-6	12BC-661	143M-103x145M-6
	601	143M-103x162M-52	662	143M-103x162M-52
	605	162M-4x143M-113	663	143M-113x145M-6
5년차	13BC봄-223	143M-113x145M-6	13BC추-331	143M-113x145M-6
	-223	206M-19Sx143M-20	338	206M-19Sx143M-20
	239	214-20Sx145M-6	342	214-20Sx145M-6

청색조합: 우수하였으나 모계의 멸종.

적색조합: 3년연속 우수성을 나타내어 2014년도에 등록코자 하는 조합

녹색조합: GMS계통을 이용한 우수 조합



그림11-5. 선발조합,143M-113x145M-6(좌 하단과 우의 좌편)의 구(curd) 형태

한편 선발된 조합 중에는 GMS(개체번호 뒤에 S자가 붙은 개체)계통을 이용한 조합이 몇 개 있다. 그 중 206M-19Sx143M-20 조합을 제외한 조합, 즉 206M-19S 계통 외의 다른 GMS계통, 214-19S, 215-9S, 224-12S, 214-20S등과 교잡된 조합은 균일성이 다소 떨어지는 문제점이 있었다. 모계의 원예적 형질이 아직 고정되지 못하여 부계는 소포자 유래의 DH 계통이지만 균일성이 다소 낮은 것으로 이해된다. 그럼에도 불구하고 선발된 것은 수확된 대부분의 구(curd, 꽃송이 덩이)를 한 개씩 개별적으로 보았을 때 우수하게 보였기 때문이다.

다행히 응성불임성 인자가 SSff인 206-3번 개체를 소포자 배양하여 원예적 형질이 고정된 응성불임성 인자 호모계통(SSff) 3종, 06M-16S, 206M-19S, 206M-28S등, 이 유지 보존되고 있다(3년

차 연차실적보고서 참조). 이 3개체를 이용한 F1 조합을 2012년도에 작성하였다. 모계가 응성 불임성이므로 영양번식으로 일부 증식하여 채종하였으나 2개체는 채종량이 충분하지 못하였다. 다만 206-3M-19번 개체만이 2조합에서 생산력 검정이 가능할 정도의 종자를 생산하였다. 이들을 봄과 가을에 다른 F1조합들과 함께 검정하였는데 그 중 143M-20번 개체와 교잡된 206M-19x143M-20 조합이 가능성을 보였다(그림11-6). 현재 모계의 응성불임주를 개체별로 10주 이상씩 번식하여 관리하고 있으므로 앞으로 형질이 고정된 이들 GMS계통을 이용한 많은 조합이 공시될 것이다.

나. 계통 검정

(1) F1 조합 친

기존 계통 중에는 우수한 것이 발견되지 않았다. 그런데 시중의 우수 F1 품종을 소포자 배양하여 얻은 계통 중에는 우수한 것이 많았다. 그 중 F1조합 검정에서 우수성을 나타낸 조합의 친이 336계통 중 11계통이었다(표11-7). 이들은 많은 조합에서 우수성을 나타내어 조합 능력이 우수한 것으로 간주된다. 불행하게도 그들 중에 종자가 극히 적게 생기는 계통이 있다. 이들은 앞으로 자식과 F1 종자의 생산성을 좀 더 검토한 후 다소라도 종자 생산성이 높게 나타나면 F1친으로 널리 이용토록 할 계획이다.

(2)기타 우수 계통

비록 F1조합 친으로서 충분한 검정이 아직 안 되었지만 우수한 조합능력을 나타낼 것으로 기대되는 계통이 41개 선발되었다. 그 중 일부를 표 8에 나타내었다. 위의 우수 F1 조합 친과 이들은 모두 형질이 다양하지만 특히 저온기에 안토시아닌 색소가 잎과 화퇴에 생기지 않은 것 들이다.



그림11-6. 원예적 형질이 고정된 응성불임개체의 한 조합

표11-7. 소포자 배양 유래의 우수 조합 친 계통

계통명	보유 종자량	숙기	촉지	Bead 크기	Curd			비고
					모양	치밀성	외관	
143M-20	57립	조생	무	중	뚝	치밀	양	왜성
143M-55	3ml							
143M-103	멸종							멸종

143M-113	7립							
144M-43	192립	중조	다	중	뚝	치밀	중	직립
145M-6	57립							
149M-86	89립							
162M-4	89립							
162M-24	17ml	중	다	중소(불균일)	뚝	중	중	
162M-40	11ml							
162M-52	1ml							

저온기 색소가 발현되지 않는 계통임

표11-8. 기타 우수 친

계통명	숙기	측지	Bead 크기	Curd)			비고
				모양	치밀성	외관	
143M-31	중만	다	중	뚝	중간	양	사진
143M-45							
143M-107							
143M-132	중생	중	중	뚝	치밀	양	사진2
143M-152	극만	중	대	뚝	중간	양	세력 중
144M-27	조생	다	대(균일)	뚝	느슨	중	왜성
149M-52	조생	하부	중(균일)	평편	중	중	
162M-14	중조	중	극소	뚝	치밀	불양	사진. curd요철심
162M-31	조생	다	극소	중	치밀	중	curd황녹색
162M-41	중만	다	소	뚝	치밀	양	사진2
162M-51	중만	다	중	뚝	중	양	사진

저온기 색소가 발현되지 않는 계통임

5. 단인자 우성 응성불임성 관련 분자표지 인자 개발

1차 년도에는 응성불임성 인자의 호모계통 육성을 위한 연구에서 확인된 응성불임성(Ss)과 가임성(ss) 개체의 두 가지 bulk를 만들었다. 계통 번호 08BCF-138의 가임개체 14개 중 10개, 불임개체 25개 중 10개체씩의 DNA를 취합하여 bulk를 만들고 배추에서 개발된 SSR primer 237개와 IBP primer 464개 등 701개의 primer를 검정하였다. 먼저 녹색꽃양배추에서의 증폭여부를 조사한 결과 701개 중 530개의 primer가 증폭되었다. 이들을 Ss와 ss의 bulk에 적용하여 'S'에 연관된 primer를 찾고자 시험하였으나 연관된 primer는 찾을 수가 없었다(표11-9).

표11-9. 배추에서 개발된 primer의 녹색꽃양배추 단인자 우성우성불임성에 적용한 결과(1년차)

Primer 수	SSR	IBP	계
보유	237	464	701
녹색꽃양배추에서 증폭된 것	100	430	530
BSA에서 Polymorphic을 나타낸 것	0	0	0

1차년도의 우성우성불임성 인자형이 Ss의 헤테로 상태임으로 열성호모인 ss와 잘 구분되지 못하는지 모르겠다는 생각에서 2년차에는 각각의 인자형이 호모인 집단을 만들어 시험하였다. 먼저 단인자 우성불임성의 발현을 억제하는 인자 F가 확인되었으므로 이를 조합한 5종(ssff, ssFF, SSff, SSFF, SSFf)으로 구분하여(표11-10) 10~12개체씩 bulk를 작성하고 전년도와 같이 배추의 SSR-primer 238개와 IBP-primer 464개를 BSA로 검정하였다.

표11-10. 녹색꽃양배추의 단인자 우성 우성불임성 연관 마커 개발용 bulk 구성 내용(2년차)

번호	예상 유전자	불임성 반응	개체 번호	개체수
1	ssff	가임	09BMS 196-3.197-1,2. 198-2,3. 199-2,3. 200-1,2,3	10
2	ssFF	가임	195-2.4.5.6.7.8.10.11.12.13.14	11
3	SSff	불임	215-3.4.7.9.19.22.26.27.28.29.30.31	12
4	SSFF	가임	222-1.2.3.4.5.6.7.11.14.18.19.20	12
5	SSFf	가임	215-2.5.8.10.11.12.13.14.15.16.17.18	12

SSR primer 237개 중 S인자 연관 마커 2개(primer 번호: 142와 243)와 f인자 연관마커 3개(141, 166, 168)를 선발할 수 있었다(표11-11). 이들을 bulk 구성 개체에 적용한 결과 70%~91%의 적합성이 검정되었다(표11-12). 그러나 기타 계통의 검정에서 정확성이 낮았다.

표11-11. BSA에 의한 SSR-primer 선발(2년차의 1차 시험)

연관군	primer 번호	연관인자	우성불임성 인자형별 primer반응				
			ssff	ssFF	SSff	SSFF	SSFf
R3	141	f	0	-	0	-	0
	166	f	0	-	0	-	0
	168	f	0	-	0	-	0
R6	243	S	-	-	0	0	0
R8	142	S	-	-	0	0	0

3차년도에는 EcoR1 32개와 Mse1 32개를 조합한 1024개의 primer 조합으로 5종의 우성불임성관련 유전자 형 별 bulk를 만들어 BSA-AFLP를 수행하였다. 그 결과 bulk 간, 즉 우성불임성 관련 유전자 별 다형성을 나타낸 primer 조합이 S유전자 연관 64개, F유전자 연관 10개로 검

정되었다. 이 74개의 primer 조합을 bulk를 구성한 각각의 계통에 적용한 결과 S 유전자연관 마커로 적합한 것이 22개, F 유전자연관 마커로 적합한 것이 3개로 나타났다(사진 생략). 이들을 다시 bulk외의 다른 계통 또는 개체에 적용한 결과 육안으로 조사된 음성불임성 발현과 일치하는 것이 하나도 없었다(표11-13).

Bulk 간 그리고 bulk의 구성 개체 간 검정에서 유전자 별 다형성을 나타낸 primer 들이 다른 계통에 적용하였을 때 유전자별 적합성이 없는 것으로 나타난 원인이 무엇인지 이해되지 않은 상태에서 4차년도 시험을 수행하였다.

표11-12. 선발 primer 5개의 음성불임성 관련 인자형별 bulk내 개체 반응 결과

인자형	primer별 고유 band 유 : 무									
	142(f)		166(f)		168(f)		243(S)		142(S)	
	유	무	유	무	유	무	유	무	유	무
ssff	8	2	7	3	8	2	0	10	0	10
ssFF	0	11	0	11	0	11	0	11	0	11
SSff	11	1	10	2	11	1	9	3	12	0
SSFF	0	12	0	12	0	12	9	3	11	1
SSFf	10	2	11	1	12	0	11	1	11	1

4차년도에는 bulk의 재료를 바꾸어 다시 BSA-AFLP를 수행하였다(표11-14). 유전분석에서 가정된 인자형이 혹시 잘못되었을 지도 모른다는 생각에서였다. 수년간의 유전분석 연구에서 단 인자 우성 인자만이 음성불임성의 발현에 관여하는 것으로 알려진 재료 간 잡종의 후대 중 가임성 개체를 bulk I(ssff)로 하였다. 그리고 자가수분 시킨 후대에서 가임성과 불임성 개체가 3:1로 분리하여 그 유전자 조성이 SSff로 알려진 개체를 소포자 배양하여 유래된 개체 중 불임성인 것을 bulk III(SSff), 가임성인 것을 bulk IV(SSFF)로 하였다. 우선 이 3개의 bulk를 검정하여 다형성이 나타나면 기존의 bulk II와 bulk V에 그 primer를 적용하여 적합성을 검정하였다.

표11-13. 음성불임성 인자 연관 마커 개발을 위한 AFLP 수행 결과(3차년도)

구분	S인자 연관	F인자 연관
Bulk간 다형성 primer 수	64	10
Bulk구성 개체 간 다형성 primer 수	22	3
기타 계통의 개체 간 다형성 primer 수	0	0

*EcoR1 32 x Mse1 32의 1024개 primer 검정

먼저 3차년도의 bulk 검정에서 다형성을 나타낸 20개(EcoR1 21, 22 + Mse1 1~32)의 primer 조합을 새로운 재료의 bulk에 적용하였다. 만일 동일 결과가 나온다면 재료상의 문제가 아닐 수 있기 때문이다. 그런데 단 한 조합도 두 재료 간에 동일한 결과를 나타내지 않았다(성적 미제출).

표11-14. 녹색꽃양배추 GMS관련 유전자 연관 마커개발용 재료 내역(4차 년도)

Bulk		Bulk 구성 재료	
형	인자조성	3차년도 이전	4차 년도
I	ssff	09BMS-196~200	08BCF-138(244-12Sx-8)의 F
II	ssFF	09BMS-195(5159M-4 [⊗])	좌동
III	SSff	09BMS-215 [⊗] 의 후대 S	09BMS-206-3M의 S
IV	SSFF	09BMS-222(213-10-3)	09BMS-206-3M의 F
V	SSFf	09BMS-215 [⊗] 의 후대 F	좌 동

따라서 1024개 primer 모두 이 신 재료에 적용하여 검정하였다. 그 결과 전 재료와 비교하여 훨씬 적은 수의 primer 조합 9개가 'S'인자에 연관된 다형성을 나타내었고 'F'인자에 대한 다형성은 전혀 나타나지 않았다(표 13과 15 비교). 이 9개 primer 조합을 bulk 내 개체별로 적용한 결과 6개가 다시 다형성을 나타냈다. 이 6개 primer 조합을 계통의 내력이 다른 bulk V에 우선 적용한 결과 2개만이 적용될 수 있는 것으로 나타났다. 이 2개 primer 조합을 다시 'F'인자가 관여하지 않고 'S' 인자만으로 가임과 불임성 개체가 1 : 1로 분리하는 09BMS-174의 17개체에 적용하였다. 그 결과 한 primer조합(EcoR1-15 + Mse1-14)은 어떤 밴드도 나타나지 않았고 다른 한 primer 조합(EcoR1-27 + Mse1-16)은 모든 개체에서 밴드가 나타나 가임성의 'S'와 불임성의 's'를 구분할 수 없는 것으로 나타났다(사진 생략).

표11-15. 신 bulk 재료를 이용한 BSA-AFLP에서 나타난 다형성 primer 수(4년차)

다형성 종류	primer 수			
	Bulk간 다형성	Bulk내 개체간 다형성	Bulk V에 대한 다형성	S인자분리집단에 대한 다형성
S 연관 우성	6	5	2	0
S 와 s의 공우성	3	1		
F 연관 우성	0			
계	9	6	2	0

5차년도

1차 년도부터 4차 년도까지 bulk의 개체를 교체하거나 배추에서 개발된 SSR와 IBP primer 및 AFLP에 의한 검정 등 다양한 시험을 수행하였다. 그러나 범용의 마커는 얻어지지 않았다.

5년차에는 서울대학교 양태진 교수 연구팀에서 개발한 양배추의 SSR primer 1,469개를 이용한 시험을 수행하였다. 기존의 3, 4년차에 이용하였던 bulk 중 인자 조성이 다른 bulk II(ssFF)와 bulk III(SSff)에 먼저 이들을 적용하였다. 1차 실험결과 표11-16과 같이 1,189개의 primer가 증폭되었으며 그 중 2차 시험에서 33개가 bulk간 다형성을 나타내었다(그림11-7).

표11-16. 녹색꽃양배추 단인자 우성 응성불임 관련 Bulk II(ssFF) 와III(SSff)에 대한 양배추의 SSR primer 검정 결과(5차년)

Primer 검정 결과(1차 시험)				다형성 밴드의 내역(2차시험)		
검정수	증폭 수	비증폭 수	비 다형성	다형성	우성	공우성
1469	1189	280	1158	33	28	5

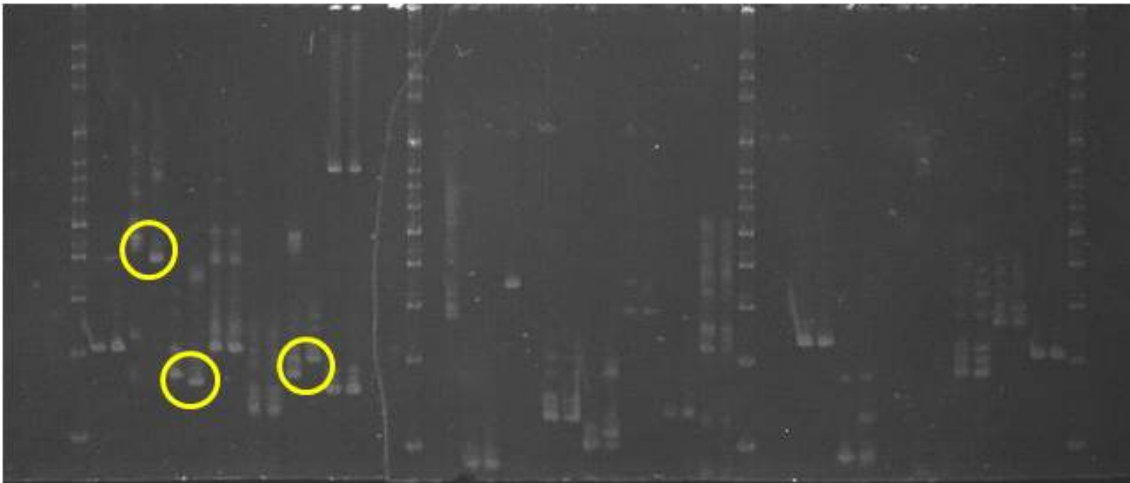


그림11-7. 녹색꽃양배추 단인자 우성 응성불임 관련 Bulk II(ssFF) 와III(SSff)에 대한 양배추의 SSR primer 검정 예(노란 원 안의 것)

이 다형성이 인정된 33개의 primer를 bulk I, II, III, IV와 bulk II, III,의 개체별로 적용하는 시험을 3차로 수행하였다. 여기서 S인자와 f인자에 연관된 것으로 생각되는 primer가 각각 3개와 12개씩 얻어졌다(표11-17).

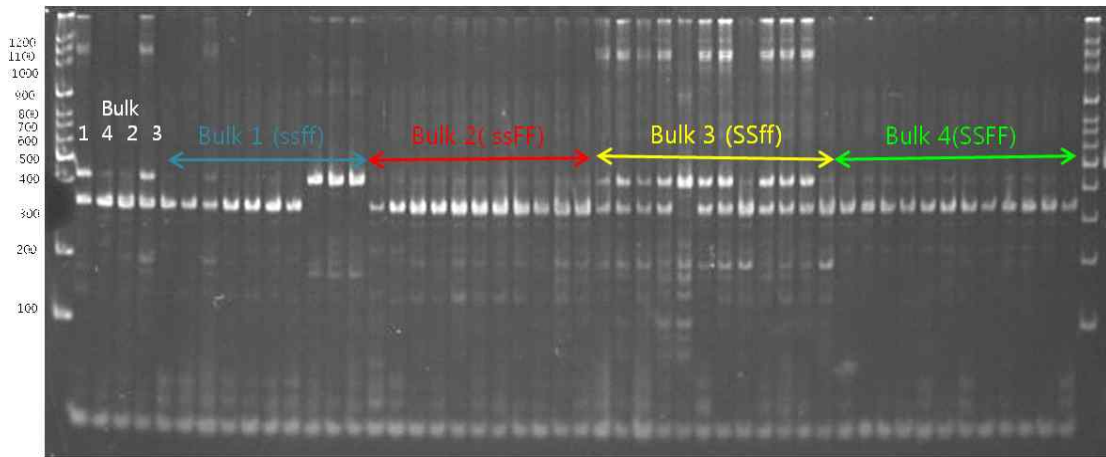
표11-17. 1차시험에서 선발된 녹색꽃양배추 단인자 우성 응성불임 관련 Bulk II(ssFF)와 Bulk III의 개체별 및 Bulk I(ssff),II(ssFF),III(SSff),IV(SSFF)에 대한 검정 결과(2차)

검정 수	검정 primer 수			
	S 연관	f 연관	무 연관	무 증폭
33	3	12	17	1

이 15개의 primer를 4차로 bulk I, II, III, IV의 각 개체에 적용하였다. 그 결과 S유전자 연관 마커 OI10-G08과 BoESSR795의 두 개가 선발되었으며 f 유전자 연관 마커는 전혀 선발되지 않았다.

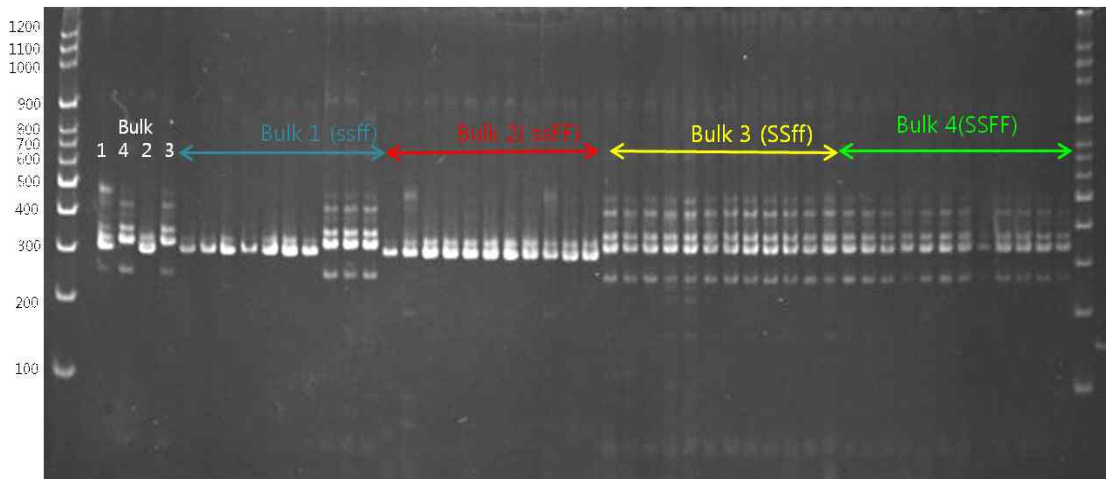
이렇게 f인자 연관 primer가 12개정도 선발되었었는데 개체 검정에서 한 개도 없는 것으로 나타난 이유는 bulk I에 잘 못 포함된 3개체 때문인 것으로 밝혀졌다. 특히 밴드가 bulk I(ssff)과 III(SSff)에서만 나타나고 II(ssFF)와 IV(SSFF)에서는 나타나지 않는 primer가 12개였었다. 예를 들어 그 중 하나인 PBCGSSRBo38(그림 8)은 bulk I(ssff)과 III(SSff)에서만 특이밴드가 나타

났으므로 f유전자 연관 마커처럼 보였다. 그러나 개체 검정 결과 bulk III의 10개체와 bulk I의 4개체(3, 8, 9, 10번 개체)에서만 이 특이밴드가 나타나고 다른 bulk III의 2개체와 bulk I의 6개체에서는 나타나지 않았다. Bulk I의 뒤쪽에 있는 8, 9, 10번 개체는 Bulk I의 ssff가 아니고 SS_가 잘못 포함된 것으로 다음 그림 9의 O110-G08와 BoESSR795에서 이해할 수 있다. 그러나 이 그림 8에서는 bulk III이 가진 아래의 밴드가 이 3개체에는 없어 전혀 다른 개체임을 알 수 있다. 따라서 f인자에 연관된 것으로 시험된 12개 primer 는 모두 이러한 원인에 의한 것이고 진정으로 이용할 수 있는 마커는 하나도 없었다. S 유전자에 연관된 것으로 선발된 O110-G08과 BoESSR795 primer는 모든 개체 검정에서 예상대로 잘 부합하고 있다(그림11-9).

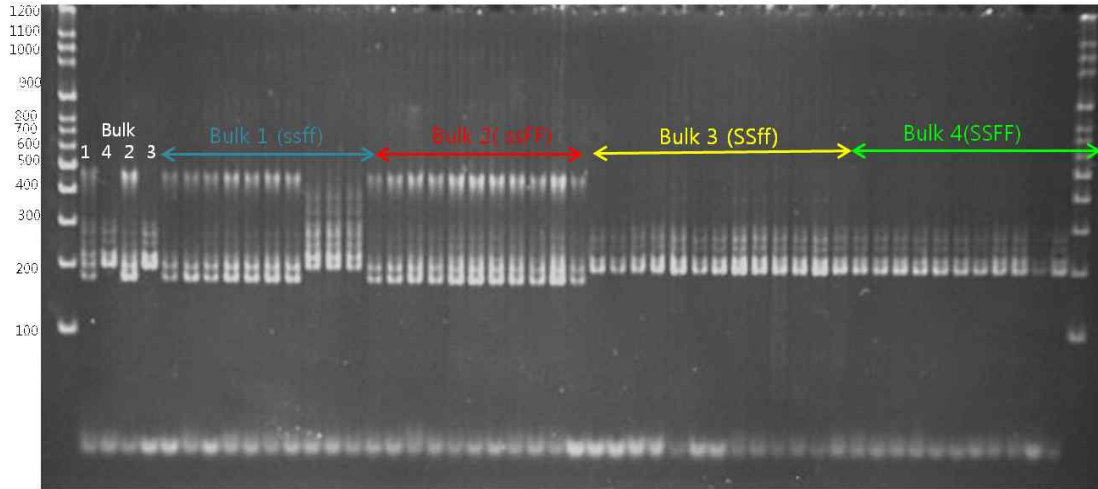


PBCGSSRBo38

그림11-8. f 인자 연관 마커로 선발된 primer의 bulk내 개체 검정결과
 ※Bulk I(ssff)의 3개체가 bulk III(SSff)과 동일 밴드양상을 보임



BoESSR795



O110-G08

그림11-9. Bulk내 개체 검정에서 S인자 연관마커로 선발된 2개 primer별 밴드 양상

6. 소포자 배양에 의한 순계 조기 다량육성

가. 우량 계통 육성

우량 1대잡종 육성에 이용할 자식계를 육성함에 있어 계통분리법은 시간이 오래 걸리고 선발을 위한 분리세대의 재배면적이 커야하며 1대잡종에서 우수성을 나타낼 계통을 정확하게 판단하여 선발하기가 어렵다. 따라서 소포자 배양으로 짧은 시간 내에 다양한 순계를 육성하고 그들 간의 교잡에 의한 우량 F1 품종을 육성토록 하였다.

1차년도와 2차년도에 주요 품종(F1) 6종과 자체 작성한 F1 1조합을 공시하여 배양하고 배양에서 발생한 배를 식물체 분화 배지로 이식하였다. 그리고 이식 후 정상적인 개체는 후대 채종에 공시하고 비정상적인 개체는 다시 MSK 등의 배지에 계대배양하여 정상식물로 유도하였다. 이러한 과정에 예기치 못한 사고로 많은 개체가 사멸되는 경우도 있었으며 계대배양에서 정상적인 식물체로 분화되지 못하고 기형으로 자라서 폐기되는 개체도 많았다. 그리고 배 발생과 식물체 분화과정에 자동적으로 2배체 화되어 꽃가루가 생산되고 후대 채종이 가능한 개체도 있지만 여전히 반수체로서 후대 채종이 불가능한 개체도 많았다. 그 중 1차년도와 2차 년도에 배양된 후 5차 년도까지의 결과를 요약한 것이 표11-19이다.

전체적으로 184개의 DH 계통을 육성할 수 있었다. 그러나 배양 1세대의 채종 량 저위로 많은 개체가 후대 검정에 충분한 종자를 생산하지 못하였다. 우선 채종 량이 적은 계통은 보존해 두고 충분한 종자가 생산된 83 계통만 후대 검정을 하였다. 그 중 저온에서도 안토시안닌 색소가 생성되지 않고 F1 조합의 친으로서 우수성을 나타내는 52계통이 선발되었다. 이 계통들은 그들 간의 자가불화합성을 이용한 F1 조합작성에도 이용될 것이며 특히 현재 보존 중인 우성 응성불임성 호모 계통 3개에 교잡하여 우수 조합육성에 이용될 것이다.

이 외 5차년도에 자체 작성한 한 F1조합을 소포자 배양에 공시하고 현재 230여 배가 식물체 분화배지에서 자라고 있다. 이 조합은 지금까지 검정한 조합 중 가장 우수한 것으로서 양친의 형태가 크게 다른 차이점을 나타내었던 것이다.

표11-19. 녹색꽃양배추 주요 품종의 소포자 배양 결과 요약(5개 년 간)

	품종명	획득 배수	순화 식물 수	종자 획득	후대검정 계통 수	선발 계통 수	비고
08BMC-143	BB-331	397	157	34	11	7	
08BMC-144	Heart land	144	43	26	7	9	
08BMC-145	Grace	52	20	10	5	2	
08BMC-149	Sawa yutaka	201	105	38	21	22	
08BMC-162	“	159	62	26	12	10	
08BMC-163	NXBB321	9	3	0	0	0	
194(F1조합)	5159x97	2515	62	50	27	2	
661(F1조합)	08BMC143-103x 08BMC-145-6	464	195	-	-	-	
계		3,941	647	184	83	52	

나. 응성불임성 인자 호모의 DH 계통 육성

2차년도에는 우성응성불임성 인자의 호모계통을 보존중인 SSff 개체를 이용하여 육성 할 수 있을 것으로 기대되어 이에 관한 시험을 시작하였다. 즉 응성불임성과 관련하여 추정 유전자형이 SSff인 개체의 소포자 유래 순계를 얻고자 소포자 배양에 공시하였다. 추정된 유전양식을 확인함과 동시에 SS호모개체를 조기에 획득하여 우량 F1 조합 친을 양성코자 하였다.

전체 5계통을 공시하여 많은 배를 획득하였다. 본 시험의 1차 목표가 분리 비를 확인하는 것이었으므로 많은 개체를 확보할 필요가 없다고 생각되었다. 즉 최대 90개까지의 배를 식물로 분화시키면 충분할 것으로 생각하였다.

소포자 유래의 식물을 온실에서 재배하여 개화까지 시킨 결과 90개체를 확보할 수 있었으며 그들의 임성을 조사한 결과 가임개체가 아주 적어 27개체였고 불임개체가 63개체였다(표11-20). 인자 조성이 SSff인 개체의 소포자 유래 식물은 가임인 SSFF와 불임인 SSff 인자형이 1:1로 나타나야한다. 그런데 가임개체가 아주 적게 나타났다. 이는 소포자 유래 식물의 자동 2배체화율이 낮았기 때문으로 이해된다.

이 시험을 통하여 얻은 응성가임의 SSFF 계통은 우성응성불임성인자를 가진 신 유전자원으로 보존코자 농촌진흥청 유전자원과에 위탁하였다. 그리고 09BMS 215-5 개체의 소포자 배양에서 유래된 불임인 SSff 개체는 S 인자의 분자마커 개발용 재료로 활용하고 있다. 또한 08BMS 206-3의 소포자 유래 식물 중 2개의 MF 개체(SSFF)와 3개의 MS 개체(SSff)를 확보하여 보존 중이다. 이 MS개체는 응성불임성 인자가 호모인 DH 계통임으로 1차로 영양번식과 소화경 배양으로 증식하여 1대잡종 채종에 이용하고 있다(5년차부터). 그리고 배추과의 다른 종이나 속과의 교잡에 의한 위수정(apomixis) 유도가 가능한지 시험코자 한다.

표11-20. 녹색꽃양배추 응성불임 주요 계통의 소포자 배양 결과(2차 년도 이후)

과종 번호	추정 유전자	배수	임성검정 결과	선발 계체수	비고
-------	--------	----	---------	--------	----

		획득	이식	계	MF	MS		
08BMS 206-3	SSff	897	92	23	6	17	5	
09BMS 208-2	“	121	90	-	-	-		
09BMS 214-2	“	67	67	16	1	15		
09BMS 215-5	“	1147	90	41	17	24		
09BMS 218-2	“	680	82	10	3	7		
계	-	2.912	421	90	27	63		

한편 4차년도에는 08BMS 206-4(SSff)번과 09BMS 218-7(SSff)번 개체를 다시 소포자 배양하였다. 그 중 08BMS 206-4번의 소포자 배양 유래식물은 140여 개체를 확보하고 1차로 잎의 모양, 측지성, 초자 등 특성이 서로 다른 균을 A~F까지 6개 정도로 구분하였다(그림11-10). 2차로 각 군별로 양배추에서 만들어진 SSR 마커로 유사성을 밝히고자 한다. 분자마커에 의한 유사성이 밝혀지고 각 군내 응성불임개체와 가임개체가 구분하여 나타나면 그들은 형태적 및 분자마커 상으로 유사계통(iso-line)이라고 할 수 있을 것이다. 그렇게 되면 6종류의 서로 다른 응성불임성 계통(SSff)과 그 유지친(SSFF)이 육성되는 결과가 된다.



그림11-10. 녹색꽃양배추 GMS의 SSff 개체 소포자 유래 개체의 군 분류

109BMS 218-7(SSff)번 개체의 소포자 유래 개체는 현재 13개체가 개화를 기다리고 있다. 이 역시 양배추에서 만들어진 SSR 마커로 유사성을 밝히고자 한다. 그리고 유사성이 있는 가임과 불임개체가 나타나면 이 역시 다른 응성불임성 계통(SSff)과 그 유지친(SSFF)이 육성되는 결과가 된다.

제12절 제8협동 돌연변이 육종기술을 이용한 색소 및 영양 강화 토마토 계통 선발 및 품종 육성 (한경대학교 강권규)

1. 방사선 돌연변이 유전자원 개발 및 육성

가. 방사선돌연변이원을 이용한 돌연변이체 유기

고 색소 및 비타민 강화 자식계통을 이용하여 방사선 돌연변이 유기하기 위해 자식종자에 감마선 25, 50, 100, 200, 300, 400, 800kR 처리하여 LD₅₀을 설정 받아올 및 엽록소 결핍 변이체 빈도 조사에 의한 돌연변이 event 빈도 조사하였다. M2 종자 육성을 위해 LD₅₀선량 200kR으로 조사하여 얻어진 M1식물체 (계통당 250개체)을 비닐온실에 육성 하고 각각의 M1 식물체들에서 M2 종자 육성 (계통당 3000립)하였다 (표12-1).

표12-1. Germination rate of gamma ray irradiation of Dongwon A, Dongwon B and Dongwon C enhancing high pigment and vitamin C

Inbred lines	Agronomic traits	Irradiation dose (kR)							
		0	25	50	100	200	300	400	800
Dongwon A	Gemination rate (%)	98	80	71	62	47	15	4	0
	Plant height (cm)	70.1	66.1	67.5	59.2	45.7	14.5	4.9	0
Dongwon B	Gemination rate (%)	96	84	73	66	44	17	7	0
	Plant height (cm)	71.7	72.0	69.1	61.3	49.8	11.5	4.3	0
Dongwon C	Gemination rate (%)	96	86	70	67	41	9	0	0
	Plant height (cm)	81.1	66.7	71.0	64.1	51.5	17.5	0	0

나. M2 세대에서 표현형 변이 및 목적형질 변이 계통 선발 및 육성

방사선 선량 200kR 유래 돌연변이 500개 M1식물체들의 1화방부터 5화방까지 과실을 이용하여 M2종자를 다량 육성하여 종자를 과종하고, 4월 24일 변이체로 간주되는 5600개체를 54공 pot에 옮겨 생육시킨 후, 5월 14일 포장에 정식하였다. M2세대 식물체에서는 다양한 표현형을 보여, 왜성, 엽색, 엽형, 과색, 과형, 과중 및 숙기 등의 변이가 보였다. 그중 과색 및 과형의 변이가 가장 높게 나타났으며, 숙기 및 왜성형 변이는 적게 나타났다 (그림12-2)



그림12-1. Phenotypic variation and mutation frequency in M2 generation plants derived from a gamma ray irradiation.

M₂ 식물체를 대상으로 당도 개선을 위해 5600 개체별로 3화방에서 수확한 과실을 대상으로 당도를 측정된 결과 다양한 당의 변화를 보였다. 이중 일반계통에서 가장 높았던 12.5 Brix 이상의 개체를 선발하고, pot에 삼목하여, 온실에서 자식종자를 육성하였다. 12.5 Brix 이상 선발한 13개체를 이용하여 HPLC를 이용하여 당 분획을 실시한 결과 대부분의 선발계통에서 glucose 및 fructose가 대조구에 비해 월등히 높게 나타났으며, 그중 가-O-17계통에서 대조구에 비해 fructose 함량이 5배 이상 높게 나타났다 (rmla 2).

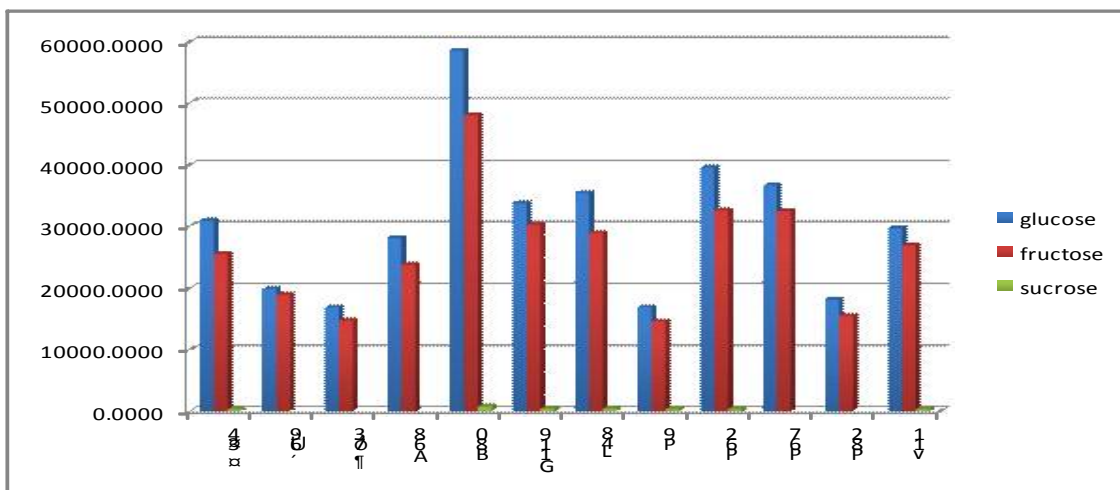


그림12-2. Sugar contents obtained through HPLC analysis of selected lines in M2 generation plants derived from a gamma ray irradiation.

다. 방사선 돌연변이 M2세대로부터 환경스트레스 저항성 계통육성

Osmotic 스트레스 저항성 개체를 선발하기 위하여, PEG 6000 농도를 저농도에서 고농도가 포함된 MS배지에서 생육상을 살펴본 결과 7%의 PEG 6000에서 뿌리 및 줄기생장을 현저히 감소되었다 (그림12-3). 따라서 감마선 조사 유래 M₂종자 약 10,000립을 10% PEG 6000가 함유한 MS배지에 무균적으로 파종한 결과 파종한 종자의 약 90%는 발아가 되지 않았으며, 발아한 종자의 대부분은 뿌리 및 줄기생육이 되지 않아 결국 고사되었다 (그림12-3). 그 중 뿌리 및 줄기생장이 되어 온전한 식물체로서 전개된 개체를 후보 저항성 돌연변이체로 선발하였다. 선발된

후보 저항성 돌연변이체는 총 57개로 뿌리 및 줄기 성장에서 다양한 경향을 보였다 (그림 3). 선발된 57 후보 돌연변이체로부터 자식종자를 육성하여, 계통별로 10립씩 10% PEG 6000가 함유한 MS배지에 무균적으로 파종한 결과 Osmotic 스트레스 저항성을 보인 Os-HK101, Os-HK102 및 Os-HK103 등 3계통을 최종적으로 선발하였다 (그림 3). Osmotic 저항성 돌연변이체는 M₂ 종자 10,000립에서 3식물체를 선발된 것으로 미루어 볼 때, 0.0003%의 빈도로 매우 낮은 선발을 보였다.

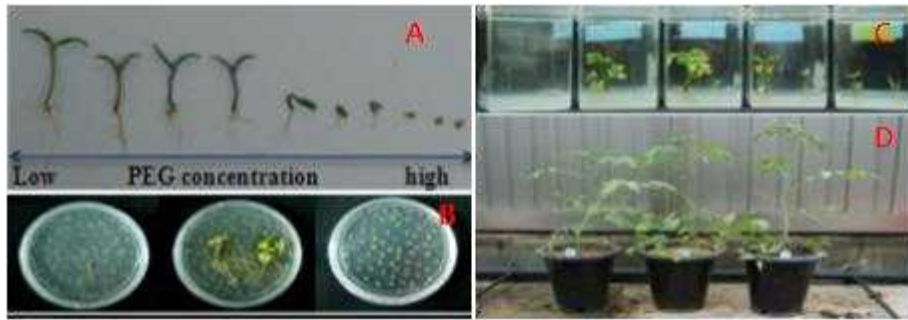


그림12-3. *In vitro* selection of osmotic resistance mutant lines from M₂ generation seeds derived from a gamma ray irradiation. A; Tomato seedling to PEG concentration, B and C; Selection of osmotic resistance mutants, D; Acclimatization of osmotic resistance mutants.

Osmotic 스트레스 저항성 계통인 Os-HK101, Os-HK102 및 Os-HK103을 대상으로 과실 생육을 녹색과 및 완숙과인 빨간 과실로 나누어 당도를 측정된 결과 Table 5와 같다. 선발한 3계통 중에서 당도는 녹색과 과실에서 완숙과 과실의 약 55% 수치를 보였으며, 녹색과 부터 완숙과에 이르는 기간은 약 일주일 정도로 완숙과에서 선발한 Os-HK101, Os-HK102 및 Os-HK103 계통은 대조구에 비해 당도가 1-1.5 Brix 정도가 상승되었다. 그러나 당 함유율(포도당/과당)은 당도에 비해 증가폭이 적게 나타났다. 토마토 과실에서 포도당과 과당의 비율은 과실의 숙기에 따라 거의 일정하게 유지되며, 완숙기에서 포도당의 비율이 약간 상승되는 경향을 보였다 (표 12-2).

표12-2 Change of sugar concentration and rate of fructose/glucose during maturation period of fruits in osmotic tolerance lines derived from a gamma ray irradiation

Lines	Sugar concentration (Brix)		Rate of fructose/glucose (%)	
	Green fruit	Red fruit	Green fruit	Red fruit
Wild type	4.32	8.81	0.86	0.82
Os-HK101	4.61	9.78	0.88	0.90
Os-HK102	4.48	10.11	0.92	0.89
Os-HK103	4.36	9.98	0.89	0.91

선발한 3계통의 과실에서 맛의 성분을 결정하는 L-glutamine 산의 함유량을 측정한 결과 착색 정도에 따라 증가되었으며, 대조구에 비해 선발한 계통에서 15-50%의 증가를 보였고, 그 중 Os-HK101 계통이 가장 높게 나타났다(표12-3). 비타민 C 함유량은 선발한 품종이 대조구에 비해 높은 경향을 보였으며, 그 중 Os-HK103 계통이 완숙기에 가장 높게 나타났다(표12-4). 선발한 3계통에서 과실 숙기에 따라 클로로필, 라이코펜 및 황색색소류 등 색소류의 함량을 측정

한 결과 표12-7와 같다. 클로로필 함량은 과실의 착색이 시작되면서부터 현저하게 감소되어 완숙과의 함량이 4.2~4.4 범위이었으며, 이와 반대로 리이코펜 함유량은 완숙과의 Os-HK101, Os-HK102 및 Os-HK103계통의 과실에서 각각 171.8, 118.7 및 177.6으로 나타났다 (표12-5). 또한 Carotin 류 및 키산토펜류를 포함한 황색 색소류는 3계통 모두에서 거의 유사한 비율로 증가함.

표12-3 Change of L-glutamine acid content during maturation period of fruits in osmotic tolerance lines derived from a gamma ray irradiation

Lines	L-glutamine acid (mg)	
	Green fruit	Red fruit
Wild type	62.42	146.86
Os-HK101	68.78	219.41
Os-HK102	69.36	210.11
Os-HK103	64.38	169.98

표12-4 Change of Vitamin C content during maturation period of fruits in osmotic tolerance lines derived from a gamma ray irradiation

Lines	Vitamin C (mg)	
	Green fruit	Red fruit
Wild type	26.34	23.61
Os-HK101	31.63	29.43
Os-HK102	27.81	26.54
Os-HK103	32.12	36.78

표12-5 Change of plant pigment content during maturation period of fruits in osmotic tolerance lines derived from a gamma ray irradiation

Lines	Chlorophyll (mg/kg)		Lycopine (mg/kg)		Yellow pigment (mg/kg)	
	Green fruit	Red fruit	Green fruit	Red fruit	Green fruit	Red fruit
Wild type	25.4	4.2	2.3	93.0	7.1	14.0
Os-HK101	30.9	4.4	4.1	171.8	6.9	19.6
Os-HK102	54.7	4.2	0.3	118.7	10.4	27.1
Os-HK103	43.2	4.1	1.3	177.6	12.1	26.3

Osmotic 스트레스 반응 실험을 하기위해, Os-HK101, Os-HK102 및 Os-HK103계통으로부터 성숙한 잎을 채취하여, 3% H₂O₂, 250mM NaCl 및 10% PEG 용액에서 경시적으로 Chlorophyll 함량을 측정 한 결과 대조구와 거의 유사하거나 약간 감소하였다(그림12-4).

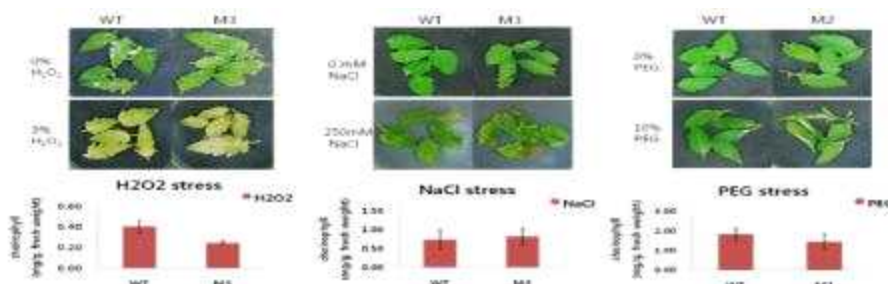


그림12-4 Chlorophyll content of osmotic resistance mutant lines derived from a gamma ray irradiation. WT; wild type, M3;Os-HK103 line, M2; Os-HK102 line.

또한 식물에서 스트레스 관련 유전자로 알려져 있는 (*LeMTHSP23*, *SIAPX3*, *LpHSF30*, *LeMBF1*, *LeDREB1*, *LeACS3*, *AtCDPK2*, *AtVAMP725*, *AtGAE5*, *LeTFT9*, *AtCDC48*, Adenylyl-sulfate reductase) 총 12개 유전자를 대상으로 선발한 Os-HK101, Os-HK102 및 Os-HK103계통의 발현 양상을 몇몇 abiotic stress 처리한 sample을 이용하여 Realtime PCR로 조사한 결과 *aucauc* 유전자에서 선발한 돌연변이체의 염 또는 cold, H₂O₂처리에서 높은 발현량을 보였다 (그림12-5).

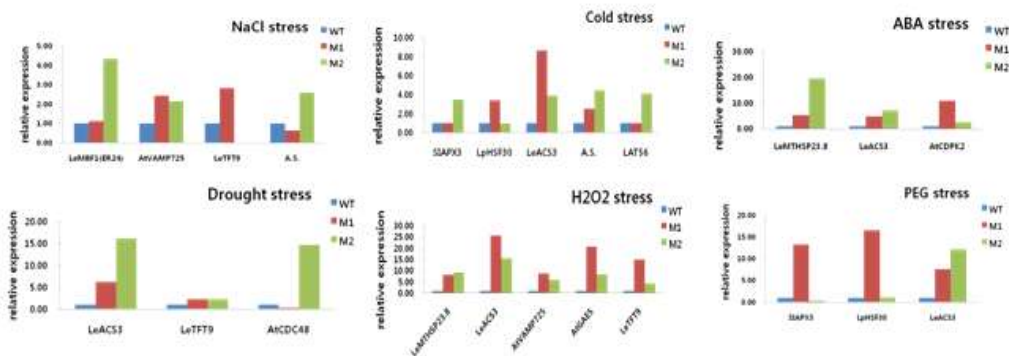


그림12-5. Ectopic gene expression pattern of PEG resistance mutant lines derived from a gamma ray irradiation. Real time PCR was investigated as described Gil Frank et al. (2009)

라. 돌연변이를 통한 기능성 토마토 유전자원 창출

M3세대에서 돌연변이체 screening (포장 및 온실): 총 6700 개체의 M2 분리 세대 (방사선 돌연변이)로부터 식물체 형태의 일반형질과 및 과실 당도 및 색도 등의 특수 형질을 조사하여 37계통을 선발하였다. 선발한 돌연변이 계통의 특성분석 및 세대육성을 위해 온실에 파종하여, 과실의 특성을 조사한 결과 그림 6와 같다. 선발한 37 돌연변이 계통의 과실의 형태적 특성은 대과종 2계통, 체리형계통 3계통 등 다양한 형태를 보였으며, 일반적 특성 및 기능성분석을 수행하여 육종소재로서 이용 가능한 유망 계통은 총 8계통을 선발하였다. 8개 선발 계통의 특성은 당도, 색도 등에서 기존 유전자원 보다 뛰어나서 고 품질 품종육성을 위한 교배친으로 사용하고자 함.



그림12-6. Mutant lines (M3) selected containing high pigment and sugar content from 6400 M2 plants

선발한 유망돌연변이 계통에서 고 색소 및 고당도를 가지고 있는 M3 계통들 중 L57, da51, la89 계통 (그림12-7)의 아미노산 분석을 실시한 결과 표12-6와 같다. Serine, glycine Threonine Arginine 및 Proline등에서 돌연변이 계통간 변이가 크게 나타났으며, 선발한 3계통모두 Tryptophan은 존재하지 않았다.

표12-6. Free amino acid analysis of M3 mutant lines (L57, da51, la89) selected in this study.

Free amino acid	L57	da 51	la 89
Aspartate	460.77	315.43	629.34
Glutamate	1787.32	2176.00	2408.54
Asparagine	243.12	314.40	496.68
Serine	30.42	79.69	125.47
Glutamine	1103.55	1084.02	1546.79
Histidine	31.92	46.47	65.08
Glycin	0.00	13.44	25.46
Threonine	34.56	47.59	66.93
Arginine	17.97	29.16	54.50
Alanine	84.76	80.29	117.45
Tyrosine	8.86	10.56	15.54
Valine	32.52	32.35	59.09
Methionine	8.84	12.61	23.77
Tryptophan	0.00	0.00	0.00
Phenylalanine	13.50	19.02	50.68
Isoleucine	14.01	16.21	49.58
Leucine	24.24	24.29	71.98
Lysine	48.55	63.60	112.67
Proline	68.26	244.62	84.59

선발한 유망돌연변이 L57, da51 및 la89 계통의 과실풍형은 그림12-5와 같다. L57 계통은 high round으로 송이형 방울토마토로 고당도 및 베타카로틴이 높으며, da51계통은 대과종이며, la89계통은 당도 및 색도면에서 기존의 육종소재보다 매우 높게 나타났다. 따라서 앞으로 2번 정도 자가수정하여 자식종자를 얻는다면 본 연구의 목표를 달성할 수 있는 고 부가가치 품종육성을 위한 parent친으로 활용가능 할 것으로 판단된다.



그림12-7. Mutant lines selected for breeding programing containing high sugar and pigment.

마. 선발 유망돌연변이의 계통화 및 특성분석

고당도 및 고색소의 특성으로 선발된 돌연변이 계통 (L57, da51 la89) 후대(M3-4세대)를 포장에 전개하여 농업 형질 조사 및 자식 종자 육성하였다. 농업형질 특성은 초장, 엽형, 줄기 색깔, 과색, 과형 등을 실시하였으며, L57계통은 방울토마토형으로 red fruit이며, 과실의 특성 등은 고정된 것처럼 일정한 형태를 보였다 (그림12-8). 그러나 식물의 형태에서는 잎형 및 줄기 등에서 다양한 색상을 보였다. da51 계통은 중과종으로 송이형 토마토의 특성을 지니고 있으며, 숙기가 매우 늦고, 당도가 매우 높은 특성을 지니고 있다. 이 계통은 과형의 크기 및 색상 그리고 많은 형태적 특성에 관련된 유전자 탐색 등의 재료로 활용가능하다. la89 계통은 노란색 과실로 독특한 형태를 지니고 있으며, 고당도를 함유하고 있으며, 과실의 형태, 색상, 표현형등에서 아직 분리가 많이 일어나는 계통이다 (표12-7).



그림12-8. Selected lines enhancing high pigments, high sugar from gamma ray mutant lines (M5).

돌연변이 유망 계통 L57, da51, la89, 고당도 계통 HK626, 가공용토마토를 대상으로 과실 숙기에 따른 당도 및 당 함유량을 조사한 결과 돌연변이 계통들에서 da 51계통은 break fruit 시점에서 가장높은 당도를 보였으며, 다른 두 계통에서는 red fruit에서 높게 나타났다. 선발한 돌연변이 계통들은 가공용토마토 보다 월등히 높았으며, 고당도소재 HK626 계통보다 낮게 나타났다.

표12-7. Variation of sugar contents and Brix according to fruit stages in selected lines

Mutant lines	Brix (%)				Sugar content (%)			
	G	B	P	R	G	B	P	R
L57	9.23	9.85	9.89	9.27	8.00	8.18	8.25	8.52
da51	7.97	8.08	8.00	7.99	7.80	7.11	7.18	6.12
la89	9.92	9.92	9.70	10.77	8.53	8.01	8.76	8.94
고당도 소재(HK626)	9.34	9.29	10.49	10.93	8.94	8.51	9.38	9.58
가공용 토마토	4.11	4.43	4.76	4.87	2.73	2.73	2.83	2.80

G: mature-green fruit, B: break fruit, P: pink fruit, R; red fruit

또한 돌연변이 유망 계통 L57, da51, la89, 고당도 계통 HK626, 가공용 토마토를 대상으로 과실 숙기에 따른 L-glutamin 함량을 조사한 결과 red fruit에서 모든 계통이 높게 나타났으며, 돌연변이 계통중에서 la89 계통이 대체적으로 높은 경향을 보였다 (표12-8).

표12-8. Variation of L-glutamin contents according to fruit stages in selected lines

Mutant lines	L-glutamin contents (mg %)			
	G	B	P	R
L57	43.1	90.1	173.4	219.5
da51	38.1	96.9	152.5	242.5
la89	68.9	99.2	176.6	255.4
고당도 소재(HK626)	62.7	127.6	146.1	287.1
가공용토마토	71.9	116.1	148.7	213.7

G: mature-green fruit, B: break fruit, P: pink fruit, R; red fruit

또한 돌연변이 유망 계통 L57, da51, la89, 고당도 계통 HK626, 가공용 토마토를 대상으로 과실 숙기에 따른 비타민 C 함량을 조사한 결과 HK626 계통과 유사한 결과를 얻었다. 숙기에 따른 돌연변이 계통에서는 L57 계통의 red fruit에서 높게 나타났으며, 가공용 토마토에서는 선발계통들에 비해 월등히 낮게 나타났다 (표12-9).

표12-9. Variation of Vitamin C contents according to fruit stages in selected lines

Mutant lines	Vitamin C contents (mg %)			
	G	B	P	R
L57	60.4	71.6	62.4	78.9
da51	31.5	31.9	44.2	48.9
la89	57.2	52.2	54.4	53.2
고당도 소재 HK626	56.3	65.2	64.2	63.1
가공용토마토	21.4	19.2	21.9	22.4

G: mature-green fruit, B: break fruit, P: pink fruit, R; red fruit

또한 돌연변이 유망 계통 L57, da51, la89, 고당도 계통 HK626, 가공용 토마토를 대상으로 과실 숙기에 따른 Chlorophyll, Lycopene 및 Yellow pigments의 변화를 살펴본 결과 먼저, Chlorophyll 함량은 Green fruit에서 조사한 계통들에서 차이를 보였으나 과실이 red fruit로 될 때 그함량은 거의 유사하였다 (표12-10). 또한 lycopene 함량은 대체적으로 고당도 HK626 > L57 > da51 > la89 > 가공용토마토 순으로 나타났다. 따라서 돌연변이 계통중 L57 계통은 고 색소 육종에 교배친으로 사용하여도 좋은 결과를 예상할 수 있다. 또한 황색색소 즉 carotenoid의 함량에서는 da51을 제외하고 거의 유사한 결과를 얻어, 과실 색상의 변화면에서

는 선발한 3 유망계통은 매우 우수하였다.

또한 돌연변이 유망 계통 L57, da51, la89, 고당도 계통 HK626, 가공용 토마토를 대상으로 과실 숙기에 따른 Lycopene / Yellow pigments 비율을 살펴본 결과 L57 > da52 > 고당도 HK626 > la89 > 가공용토마토 순으로 나타나 색도와 황색색소와의 관계도 매우 중요한 요인으로 생각된다 (표12-11).

표12-10. Variation of Chlorophyll, Lycopene and Yellow pigments according to fruit stages in selected lines

Mutant lines	Chlorophyll				Lycopene				Yellow pigments			
	G	B	P	R	G	B	P	R	G	B	P	R
L57	15.3	6.7	4.0	4.1	2.4	7.7	29.7	90.0	5.9	8.0	7.3	13.1
da51	19.6	11.2	4.8	4.0	3.3	9.0	25.7	75.2	6.9	7.8	10.2	16.1
la89	30.7	9.2	5.9	5.2	8.1	12.0	25.2	52.7	12.3	12.5	12.3	13.1
고당도(HK626)	25.4	11.7	6.6	4.2	2.3	9.9	36.6	93.0	7.1	9.9	11.7	14.1
가공용토마토	27.7	12.6	4.6	4.3	4.7	11.7	22.6	44.7	7.0	9.4	10.0	15.1

G: mature-green fruit, B: break fruit, P: pink fruit, R; red fruit

표12-11. Variation of lycopene/yellow pigments according to fruit stages in selected lines

Mutant lines	Lycopene / Yellow pigments			
	G	B	P	R
L57	0.22	0.46	0.76	0.89
da51	0.31	0.54	0.70	0.87
la89	0.29	0.37	0.52	0.62
고당도 소재 HK626	0.21	0.44	0.67	0.76
가공용토마토	0.40	0.52	0.80	0.57

G: mature-green fruit, B: break fruit, P: pink fruit, R; red fruit

2. 국내외 토마토 유전자원 수집 및 특성평가

가. 국내외 수집 유전자원 771계통의 특성평가

국내외에서 수집한 771계통의 토마토 유전자원의 분류 및 특성을 살펴본 결과 다양한 자원이 수집되어 특성 분류하였다.(표12-13)

표12-13. Classification and characterization of tomato genetic resource lines

Tomato type	No. of genetic resource lines	Character	Collected region
청과용 유한생장형	12	만생종, 과고 낮고,	유럽, 미국, 농진청
장명반유한생장형	27	중만생종, 과고 높음	농진청

장명무한생장형	17	조생종, 과고 낮음	중국, 유럽
유한생장형	57	조생종, 과고 높음	중국, 유럽
무한생장형	203	조생종, 중생종, 과고다양	국내, 중국, 미국, 유럽
방울토마토	312	조생종, 중생종, 과고다양	국내, 중국, 미국, 유럽
송이토마토	131	중생종, 과고다양	유럽, 미주
야생형토마토	7	만생종, 과고 낮고,	농진청
대목용토마토	5	만생종, 과고 높음	농진청

이들 유전자원의 특성분석을 과중, 과폭, 과장, 과색, 엽장, 엽폭, 절간장등 농업형질 및 고색소, 당도 및 비타민함량을 조사하여 고색소 함유 계통: 10계통, 고 당도 함유 계통: 6계통, 고비타민 A 및 C 함유계통: 5계통 우수계통 선발 하였다 (표12-14).

표12-14. Selection of excellent lines according to sugar Brix and vitamin contents from tomato genetic resource lines

No.	Line no.	Brix (%)	Fruit color	V.C content (mg/100g)
1	173	7.4 + 0.8	Red	42.5
2	173-1	9.3 + 0.3 **	Red	37.7
3	119	9.7 + 0.3 **	Yellow	47.5
4	119-1	10.2 + 0.3 **	Red	44.0
5	314-1	9.5 + 0.7 **	Red	55.2
6	402-1	8.9 + 0.9	Yellow	27.9
7	405	10.7 + 0.9 **	Orange	33.7
8	410	10.1 + 0.3 **	Red	41.0
9	504-1	9.3 + 1.0 **	Red	55.7
10	532-1	9.4 + 0.6 **	Yellow	50.3
11	533-1	9.0 + 0.3	Red	65.7
12	706	9.8 + 1.6 **	Red	48.3
13	707	11.5 + 0.7 **	Orange	28.4
14	608-1	9.8 + 0.5 **	Red	51.3
15	611-1	8.9 + 0.8	Red	47.5
16	612-1	7.8 + 0.5	Yellow	47.5
17	614	8.1 + 0.9	Red	28.0
18	614-1	8.3 + 0.6	Red	39.1
19	622	9.0 + 0.8	Yellow	47.5
20	624	8.1 + 0.6	Orange	170.0 #
21	624-1	9.3 + 0.4 **	Red	127.1 #
22	626	9.1 + 0.05	Orange	105.7 #
23	632	9.5 + 0.1 **	Yellow	51.2
24	644-1	8.7 + 0.05	Red	55.3
25	645-1	8.6 + 0.1	Orange	77.5
26	682	8.8 + 0.9	Red	51.3
27	803	6.6 + 0.5	Yellow	70.4
28	824-1	9.3 + 0.3	Yellow	47.5
29	825	9.4 + 0.2 **	Red	55.5
30	834	7.4 + 0.7	Orange	60.7

31	849	8.5 + 0.7	Orange	70.2
32	851-1	7.6 + 0.4	Red	77.5
33	853-1	9.1 + 0.4	Red	127.7 #
34	855	9.5 + 0.07 **	Yellow	115.0 #
35	49-2	5.1 + 0.2	Red	139.5 #

또한 선발한 육성계통의 유전적 다양성 분석은 18계통 (소과종 중과종 대과종 포함)의 목표형질을 위한 유전적 다양성 분석을 실시한 결과 (그림12-9) 과 같다.

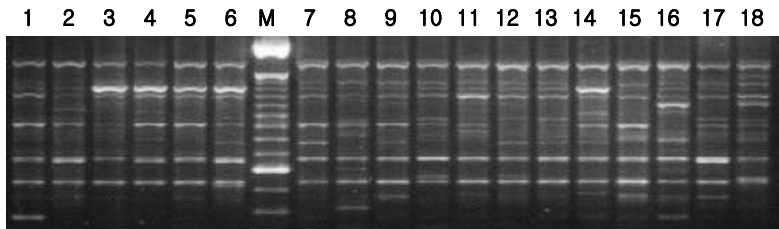


그림12-9. RAPD analysis of 18 excellent lines selected from tomato genetic resource lines

나. 고당도 및 색소 계통의 계통화

- 유망계통의 과실의 형태: 2차년도에 고당도 및 고색소 등의 특수 형질을 대상으로 선발한 22계통은 그림 10과 같다. 선발한 계통들의 과색은 red, yellow, black, orange 등을 보였다.



그림12-10. Fruit shape of inbred lines selected from tomato germplasm.

또한 선발한 22 계통의 과실의 특성 검정한 결과 표 15과 같다. 과실 형태는 round, high round, pear shaped, plum shaped, heart shaped 등을 나타냈으며, 과실중은 5~15g/fruit으로 나타났으나, HK123, HK202 계통은 중과종으로 각각 37g/fruit, 87g/fruit을 보였다. 과실당도는 2 차년도에 8.5 Brix이상 선발하였는데 3차년도 시험 결과 몇몇 계통에서는 예년에 비해 낮은 당도를 보였다. 그러나 HK314, HK626, HK639, HK701, HK604 등 5계통에서 10 Brix 이상을 보인 것으로 미루어 볼 때 선발효과가 있었던 것으로 평가된다. 또한 과실에 종자의 여부를 검토한 결과 4계통에서 parthnocarpy 성질을 지닌 것으로 판단되며, 이들 성질을 이용한 육종 소재로 활용한다면 매우 유용할 것으로 판단된다. 또한 식물의 생육 상태 및 과실의 생산량등을

살펴본 결과 22계통 중에서 3계통을 제외하고 uniform함에 따라 자식계통임을 확인하였다.

표12-15. Fruit characterization of inbred lines selected from tomato germplasm

Line	Fruit color	Fruit shape	Fruit weight	Brix (%)	No. Seed	Fixed
HK119	red	High round	10.6	9.9	300	F
HK121	viridescent	Round	13.6	9.9	150	F
HK123	black	pear shaped	37.9	9.7	450	F
HK173	red	High round	9.5	8.6	140	F
HK202	red	Plum shaped	87.6	9.0	2	F
HK314	Orange	High round	7.1	10.3	250	F
HK405	red	Round	8.4	9.0	3	F
HK410	Orange	Heart shaped	10.3	8.0	6	F
HK608	red	Round	6.1	8.1	400	F
HK610	red	High round	3.5	9.6	310	F
HK626	Orange	pear shaped	7.0	11.7	270	F
HK641	red	High round	7.0	10.7	330	F
HK659	red	pear shaped	14.8	9.1	270	F
HK706	Orange	High round	5.0	10.2	220	NF
HK707	Orange	Round	6.0	9.5	7	NF
HK709	Orange	Round	8.9	9.0	190	F
HK803	red	High round	2.3	8.8	600	F
HK825	Orange	Round	5.5	9.2	555	F
HK861	red	Plum shaped	10.6	9.2	338	NF
HK855	red	Heart shaped	8.5	9.0	472	F
HK604	red	Heart shaped	13.1	10.0	339	F
HK624	red	Round	7.5	9.6	510	F

선발 유망 자식 계통들의 내병성 정보를 알아보기 위하여 MAS (Marker Assistant Selection) 에 의한 방법으로 ToMV 저항성 및 감수성을 분석한 결과 그림 11와 같다. 저항성계통은 증폭 산물이 650bp, 감수성은 400bp로 나타나며, 헤테로인 경우, 650bp와 400bp가 동시에 나타난다. 따라서 이와 같이 분자 마커를 이용하여 반신위조병(Ve), 토마토 반점위조 바이러스 (TSWV), ToMV, 토마토황화잎말림 바이러스 (TYLCV), 줄기마름병 (Asc1), 고구마뿌리혹선충 (Rex) 등 10종의 병 저항성 여부를 분석한 결과 표 16와 같다. 그 결과 선발한 계통들 중에서 시들행 race 2, 반신위조병, 토마토 모자이크 바이러스, 고구마뿌리혹선충, 토마토 반점위조 바이러스에 저항성을 가진 계통들은 선발 할 수 있었으나, 농업적으로 중요한 황화잎말림 바이러스 race 1 등 몇몇 병원균에 대해 감수성을 보여 저항성 계통의 탐색이 시급한 실정임.

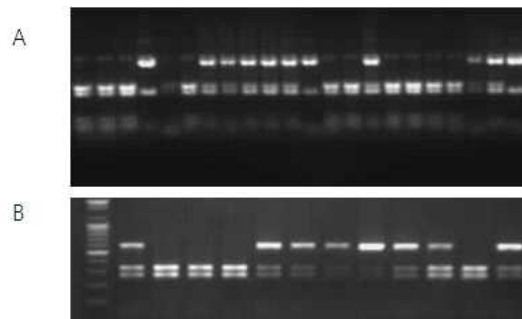


그림12-11. Selection of resistant plant in ToMV and Ve using MAS method. A was

selected ToMV resistance (RR=650bp, Rr: 650bp, 400bp, rr=400bp), B was selected Ve resistance (RR=332/270bp, rr=600bp).

표12-16. MAS test of of inbred lines selected from tomato germplasm.

Selected lines	Ve	TSWV	ToMV	Ty1	Ty2	Pto	I2	I3	Asc1	Rex
HK119	R	S	H	S	S	S	H	S	S	S
HK121	R	S	H	S	S	S	R	S	S	S
HK123	R	S	H	S	S	S	R	S	S	S
HK173	R	S	H	S	S	S	R	S	S	S
HK202	H	S	H	S	S	S	H	S	S	S
HK314	R	S	H	S	S	S	H	S	H	S
HK405	H	S	S	S	S	S	H	S	S	S
HK410	S	S	S	S	S	S	H	S	S	S
HK608	H	S	S	S	S	S	H	S	S	S
HK610	R	S	H	S	S	S	H	S	S	S
HK626	R	S	H	S	S	S	H	S	S	S
HK641	R	S	H	S	S	S	R	S	S	S
HK659	R	S	H	S	S	S	R	S	S	S
HK706	H	S	H	S	S	S	H	S	S	S
HK707	H	S	H	S	S	S	H	S	S	H
HK803	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
HK825	R	S	H	S	S	S	R	S	S	S
HK861	H	S	H	S	S	S	H	S	S	H
HK855	H	S	H	S	S	S	H	S	S	S
HK604	R	S	H	S	S	S	R	S	S	S
HK624	R	S	H	S	S	S	R	S	S	S

* I2: 시늬병 race 2, Ve: 반신위조병, ToMV: 토마토 모자이크 바이러스, Rex: 고구마뿌리혹선충, TSWV: 토마토 반점위조 바이러스, Ty1: 황화잎말림 바이러스 race 1, * R : Homo resistant, H : Hetero resistant, S : Susceptible.

교배조합 작성: 선발한 유망 계통을 대상으로 유전적 다양성 분석을 RAPD분석에 의해 조사한 결과 유전적 background가 다르게 나타났다. 따라서 선발한 유망 자식계통간 인공교배에 의해 26개의 F1 종자를 획득하였다. F1종자를 2011년 온실에 조합당 3반복으로 파종하고, 정식 후, 생육특성 및 과실특성, 생산량 등을 검토한 결과 표 17와 같다. 대조구에 비해 생산성이 높았던 교배 조합 (F1)에서 HK119/HK641, HK119/HK121, HK624/HK707, HK624/HK855조합에서 각각 과실중은 13.6, 17.9, 18.4 및 20.3, 당도는 9.2,9.7, 10.0, 9.2, Lycopine 함량은 55.8, 71.3, 68.3, 80.3, 베타 카로틴은 31.2, 19.6, 26.4, 32.1으로 나타났으며, 송이형 토마토이며, High round으로써 당도 및 고색소를 함유하고 있었다.

표12-17. Fruit characterization and carotenoid pigment contents for tomato F1 fruits

F1	Fruit color	Fruit shape	Fruit weight	Brix (%)	Lycopine content (µg/g)	β-carotene content (µg/g)
HK119/HK405	red	Round	15.6	10.9	67.5	22.4
HK119/HK649	red	Round	13.6	9.2	55.8	31.2
HK119/HK121	red	Round	17.9	9.7	71.3	19.6

HK121/HK604	red	High round	19.5	8.6	58.6	27.6
HK405/HK640	red	Round	17.6	9.0	77.8	25.7
HK853/HK855	red	High round	17.1	10.3	44.9	32.2
HK624/HK707	orange	Round	18.4	10.0	68.3	26.4
HK624/HK855	red	Round	20.3	9.2	80.3	32.1
HK803/HK861	red	Round	15.1	8.1	77.9	34.1

또한 이들 F1 조합들의 과실을 이용하여 Free amino acid를 측정된 결과 표 18과 같다. HK119와 교배된 있었던 F1에서 tryptophan이 13.72, 13.32가 존재하였다. 다른 아미노산함량은 조합내에서 거의 비슷한 경향을 보였다.

표12-18. Free amino acid content in tomato F1 fruits.

F1 hybrid	Amino acid									
	119/405	803/861	624/707	119/121	604/121	624/855	853/855	624/626	405/640	119/649
Aspartate	550.02	498.35	314.87	483.46	295.25	265.93	464.24	477.95	419.64	444.13
Glutamate	2518.54	1986.51	1261.78	2671.71	1424.06	1108.80	1884.73	2406.94	2246.61	2180.14
Asparagine	233.28	420.95	214.60	215.31	167.42	206.72	354.18	372.46	340.10	150.64
Serine	67.09	89.42	62.83	33.55	40.10	77.94	81.80	151.18	59.92	42.28
Glutamine	1001.67	1675.35	926.09	781.04	608.66	674.55	1329.77	1324.04	1031.67	569.01
Histidine	53.60	54.04	46.81	52.79	35.12	30.87	46.21	63.60	67.34	43.58
Glycin	11.26	13.21	10.42	8.95	0.00	16.88	14.61	26.85	11.38	10.39
Threonine	56.01	67.81	39.22	34.98	24.48	39.66	56.85	65.15	39.45	21.44
Arginine	31.64	50.69	19.13	41.03	16.96	20.41	34.60	37.19	32.22	27.08
Alanine	85.74	122.02	71.67	61.44	44.13	138.39	102.77	127.04	61.82	49.55
Tyrosine	11.45	26.03	13.06	8.80	0.00	17.74	19.18	38.76	15.63	0.00
Valine	29.18	41.06	35.24	33.85	28.58	31.89	42.82	53.20	36.95	38.92
Methionine	10.22	24.03	10.37	10.97	13.37	14.38	18.32	27.95	19.97	8.62
Tryptophan	15.14	12.84	0.00	13.70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	13.32
Phenylalanine	26.88	55.93	19.36	29.50	20.95	39.49	47.79	51.87	52.03	25.73
Isoleucine	20.72	24.49	15.55	15.04	10.84	15.35	21.11	30.88	19.14	10.72
Leucine	28.84	37.15	29.05	28.50	20.87	27.70	33.34	45.86	36.47	24.38
Lysine	70.79	150.77	45.32	55.53	42.96	32.66	52.44	89.85	78.29	58.11
Proline	264.62	79.81	159.90	61.69	91.87	342.70	120.15	617.96	115.46	52.59

조합 능력이 우수한 F1 예비 품종: 고당도 및 고색소 토마토 품종육성을 위해 2년간 선발한 계통을 대상으로 F1을 육성하고 특성분석 등을 통해 얻어진 F1조합은 HK119/ HK649, HK119/HK121, HK624/HK707 및 HK624/HK855 등 4조합은 그림 12과 같다. 특히 본 연구에서 선발하여 얻어진 4개의 F1은 당도가 10 Brix 정도이며, Lycopine 및 베타카로틴 함량이 높았다. 이들 조합을 이루는 HK119, HK649, HK121, HK624, HK707, HK855의 parent 계통들의 증식 품종합성 등을 통해 생산력 검정 및 지역적응 시험 등을 수행하여 품종화하고자 함.



그림12-12. F1 hybrid between inbred lines selected from tomato germplasm

다. 선발 고당도 고색소 자식계통의 제 특성

선발한 당도 및 색소가 높은 계통을 자식하여 얻어진 F6세대의 자식종자를 대상으로 안성 육묘장에 파종하고, 3월 30일 큰 포트에 이식하여, 20일간 생장시킨 후, 4월 10 경에 일종의 농가 포장에 정식하였다. 총 8계통의 자식계통을 대상으로 과색, 당도 및 lycopene 함량을 계통별 5개체를 선발하여 분석한 결과 과색은 계통내에서 거의 고정되었으며, 당도는 약 1 Brix 정도의 범위에서 화방 간 오차를 보였으나, 대체로 안정적인 결과를 얻었다. 선발한 계통들에서 Lycopene 함량의 변화는 계통 간 또는 계통 내에서 커다란 변화를 보였으며, 그중 가장 높은 수치를 보인 계통은 HK626으로 나타났다 (표12-19).

그림12-19. Lycopene contents of excellent lines with high brix and high pigments

Lines	fruit color	generation	no. plants	Lycopene contents ($\mu\text{g/g}$)			Brix
				average	max	min	
HK119	Red	F7	5	41.8	45.0	38.8	9.9
HK121	Viridescent	F7	5	37.3	45.2	27.69	9.8
HK314	Orange	F7	5	58.9	74.2	42.0	10.3
HK626	Orange	F7	5	68.3	98.6	40.1	11.7
HK641	Red	F7	5	59.1	70.1	45.1	10.7
HK707	Orange	F7	5	38.5	65.2	21.4	9.5
HK855	Red	F7	6	38.9	40.2	37.6	9.0
HK624	Red	F7	5	27.4	54.8	19.5	9.1

라. 선발 계통의 lycopene 합성과 유전자 발현

선발 계통 중에서 lycopene 함량이 많은 계통 HK626과 HK119 및 대조구 3계통을 대상으로 Lycopene 생합성 회로 상의 주요 유전자 *psy1*, *pds*, *zds* 관련 유전자를 NCBI database로부터 염기배열을 조사하여 유전자 특이적으로 primer를 합성하여 RT-PCR를 수행하였다. 각 계통에서의 과실 sample은 G: mature-green fruit, B: break fruit, P: pink fruit, R; red fruit로 나누어 분석하였다. 그 결과 lycopene 함량이 높은 HK626 계통에서 *psy1* 유전자의 발현량이 매우 높게 나타났으며, 특히 늦은 숙기 (P 및 R)에서 가장 높게 나타났다. 또한 *zds* 유전자의 발현은

대조구에 비해 HK119, Hk626에서 대체로 높은 발현량을 보였다 (그림12-13).

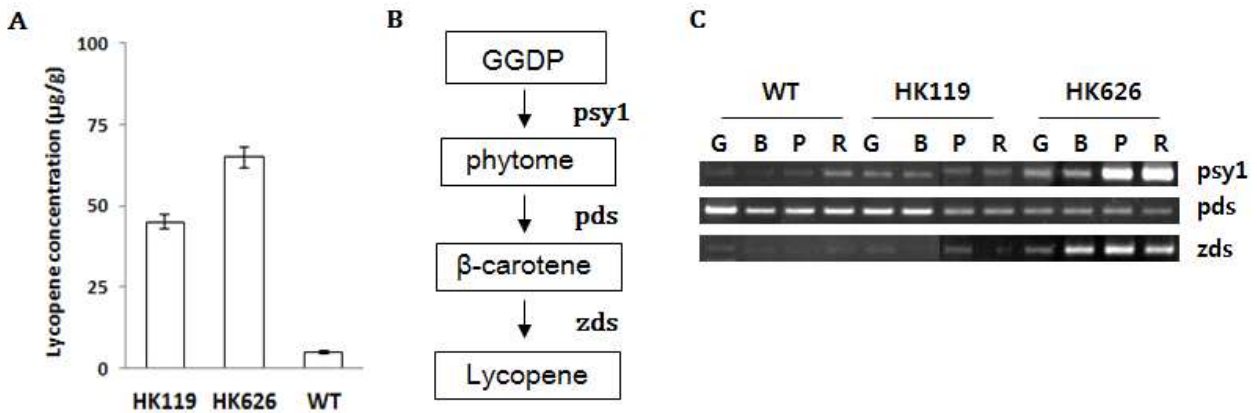


그림12-13. Lycopene contents and gene expression analysis in tomato breeding lines. (A) lycopene contents, (B) Lycopene biosynthase related genes, (C) RT-PCR analysis

마. 육성 자식계통을 이용한 조합 능력 평가

고당도 및 고색소 선발 자식계통 중 초세 및 과실 형태가 좋은 HK119, HK624를 화분친으로 하여 우량 계통에 F1 조합을 작성하여 과실의 생산량 및 산도를 분석하였다. 과실의 총 수량 면에서 볼 때, 시판하고 있는 A사와 B사를 대조구로 하여 비교 할 때 HK121/Hk119 조합과 HK121/Hk626 조합에서 높은 수량을 보였다 (표12-20). 그러나 1주에 량과의 수량에서는 거의 유사하거나 약간 낮은 수량을 보였다. 평균 과중에서도 거의 유사한 수치를 얻었다.

표12-20. Characterization of F1 recombination ability in tomato breeding lines.

Lines	F1	total fruit	good fruit	average	ratio	acidity
		(Kg/주)	(Kg/주)	(g)	(%)	(%)
1.	HK121	3.25	1.02	30.2	4.4	0.51
2.	HK314	4.65	1.30	25.1	9.2	0.37
3.	HK626	4.10	2.06	19.8	1.0	0.29
4.	HK707	4.61	1.93	20.1	2.7	0.49
5.	HK855	3.46	0.89	31.5	0.0	0.42
P2						
6.	HK119	3.87	1.88	40.2	4.6	0.44
7.	HK624	4.71	2.71	38.1	4.6	0.46
	HK121/HK119	6.09	2.03	34.2	32.6	0.46
	HK314/HK119	3.62	1.62	36.7	23.9	0.42
	HK626/HK119	5.04	2.84	12.5	10.8	0.37
	HK707/HK119	4.29	2.41	43.2	17.9	0.52
	HK855/HK119	4.44	1.23	36.1	27.3	0.43
	HK121/HK624	4.08	1.99	25.9	9.6	0.36
	HK121/HK626	6.59	2.49	27.1	15.5	0.49

	HK121/HK855	4.97	3.56	30.1	14.2	0.51
F1	A company	5.26	2.40	36.1	0.46	0.46
	B company	5.44	3.15	39.1	0.53	0.53

HK121/HK119 및 HK121/HK626 조합의 F1 과실 형태는 두조합 모두 red fruit로 송이형 토마토로서 색상 및 과실의 크기 등에서 시판하고 있는 A사 및 B사 품종보다 월등히 좋은 성적을 가지고 있다 (그림12-14). 따라서 몇몇 농가에 보급하여, 재배안정성 및 지역적응시험을 수행하고, 그 성적에 따라 품종등록을 하고자 한다.



그림12-14. Fruit character of excellent F1 selected from breeding lines. (A) HK121/HK119, (B)HK121/HK626

제13절 제9협동 유전마커 시스템을 이용한 병저항성 벼 돌연변이 계통선발 및 분자마커 개발(한국생명공학연구원 권석운)

1. 돌연변이 집단을 대상으로 병스크리닝 체계 구축 및 선발

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

- 벼흰잎마름병은 *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*에 의해 발생하는 도관병으로 세계적으로 광범위하게 발생하며 특히 동남아시아 지역에서 막대한 피해를 주는 주요 병해이다. IRRI를 중심으로 분리된 병저항성 계통을 이용하여 재배품종에 도입 육성되어 활발히 이용되고 있으며 30종이 넘는 벼흰잎마름병 저항성 품종이 개발되었다. 특정지역 특정계통의 병원균에 대해서만 저항성을 보이는 한계가 있어 다양한 계통의 병원균에 대한 저항성을 갖는 품종개발의 필요성이 제기되고 있다. 따라서 본 연구에서는 구축된 돌연변이체 집단을 대상으로 벼흰잎마름병에 대한 반응이 다르게 나타나는 계통을 선발하고자 하였다.
- 한국원자력연구원에서 동안벼(*Oryza sativa* L.) 재배품종을 감마선 조사(200, 300 Gy)를 통해 구축한 돌연변이체 집단(M3, 약 3,000계통)을 분양받아 사용하였다. 벼 돌연변이체

집단 3,000계통을 각각 파종 및 육묘하였으며 수도용 상토에 정식 후 온실에서 재배하였다. 접종을 위한 균주는 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (KXO85)를 사용하였으며, 균주 증식은 감자 반합성배 지(PSA배지: 감자 300 g 추출액, NaH₂PO₄ · 2H₂O 2 g, Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 0.5 g, peptone 5 g, sucrose 15 g, 증류수 1 L, pH 7.0)를 사용하여 27°C의 incubator에서 3일간 배양하였다. 배양된 병원균은 멸균수를 가하여 10⁸ cell/ml 농도로 희석한 다음 접종원으로 사용하였다. 병원균 접종은 주당 5~6개의 잎을 병원균을 함유한 가위로 약 5 cm 정도 잘라내면서 접종원을 접종하였다(Kang et al. 1996). 병반조사는 접종 21일 후에 5개씩 접종부위로부터 진전된 병반의 길이를 조사하여 평균하였다. 분얼 수, 및 생체중량은 접종 후 1달 후에 각각 측정하였다.

- 식물체의 잎으로부터 Trizol-reagent (Gibco BRL)를 이용하여 Total RNA를 추출하였다. Total RNA 1 µg을 주형으로 하여 SuperScript TMII (Invitrogen, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Second strand의 증폭은 <표13-1>의 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 2분간 cDNA 예비 분리한 후 94°C에서 30초, 54°C에서 30초, 72°C에서 1분을 1 반응주기로 하여 30주기 동안 증폭하였고 마지막으로 72°C에서 10분간 마지막으로 연장 반응시켰다. 최종 PCR산물은 1% Agarose Gel상에서 전기영동으로 전개하고 Ethidium Bromide 로 염색을 하여 확인하였다.

표13-1. 저항성 유전자의 RT-PCR 분석에 사용된 프라이머

Accession no.	Target genes	Primer sequences	Expected size (bp)
NM_001189679.1	<i>Xa21</i>	5'-TTCCAGCTGCTTTGGGCAAT-3' 5'-AAGGGATCCTGTCAAGGAGT-3'	746
DQ900896	<i>Pi36</i>	5'-TCAGCGATGTGTACAATATGA-3' 5'-TGCGAGGAATACGTAGACACA-3'	1023
AY196754	<i>Pi-ta</i>	5'-TGTGGGATATTGTTAGCCGT-3' 5'-TCCAGTGTCTGCAAGTGTGT-3'	1036
X16280	<i>Actin</i>	5'-GGAAGTGGATAGGTCAAGGC-3' 5'-AGTCTCATGGATACCCGCAG-3'	249

나. 연구개발 결과 및 고찰

내병성 돌연변이 계통을 선발하고자 동안벼에 감마선을 처리해 구축한 돌연변이 집단(M3)을 대량으로 온실에서 파종 후 재배하였다(계통당 7~8개체). 파종 후 30일째, 벼 흰잎마름 병원균을 대부분의 잎에 접종하였고, 그 후 21일째 잎의 병반조사를 수행하여 대조군에 비해 상대적으로 병반 길이(symptom length of bacterial blight)가 짧은 개체 191주를 1차 예비선발하고, 종자(M4)를 수확하였다(그림13-1 및 13-2).

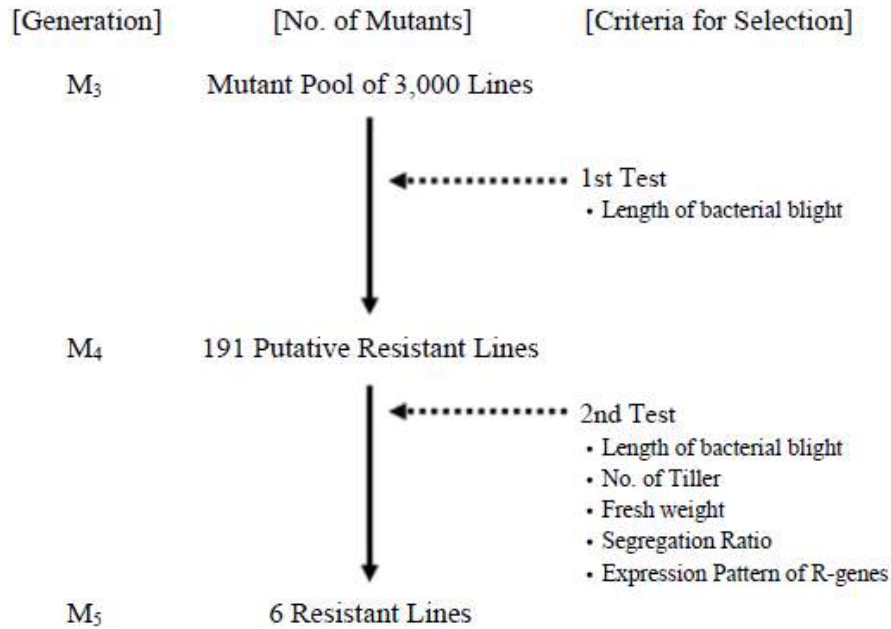


그림13-1. 병저항성 계통을 선발하기 위해 진행된 실험 절차.

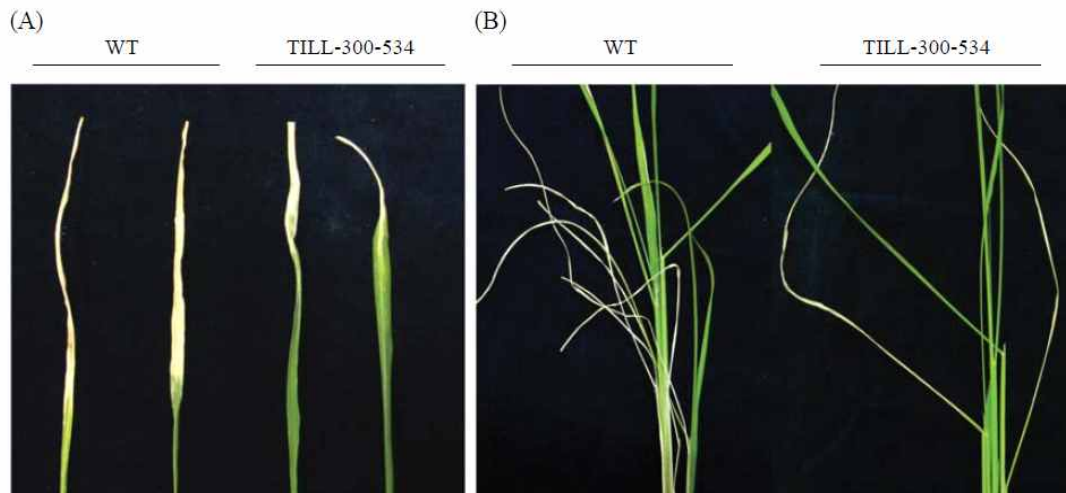


그림13-2. 벼에서의 병발생 양상 (A) 및 저항성 계통에서의 병반응 비교(B)

단기적으로는 잎의 병반 길이가 저항성 혹은 민감성을 나타내는 기준이 될 수 있겠으나, 장기적 기준으로 고려했을 때 생산성에 결정적 역할을 하는 분얼 수(No. of Tiller) 혹은 생체중량(Fresh Weight)이 높은 계통이 보다 저항성을 나타낸다고 할 수 있을 것이다. 따라서 2차 선발에는 잎의 병반 길이, 분얼 수, 생체중량을 모두 고려하여 1차 예비 선발한 191계통을 재차 테스트하였고 이를 모두 수치화 하였다(계통당 30~50개체). 이들 3가지 측정치, 병반 길이, 분얼 수, 그리고 생체중량의 상호 관계는 모든 계통에서 비례하지는 않았고, M3세대에서 이미 검증된 병반에 대한 형질 조차도 M4의 일부 돌연변이 계통에서 재현되지 않았다. 따라서 보다 신뢰성이 높은 내병성 돌연변이 계통을 선발하고자 이들 3가지 테스트조건에 모두 만족하는 (대조구에 비해 병반 길이는 짧으면서 분얼 수와 생체중량은 높은 형질) 6계통(TILL-300-651, TILL300-1212, TILL300-534, TILL300-537, TILL300-693, TILL300-793)을 선발하였다(그림 13-1 및 13-3).

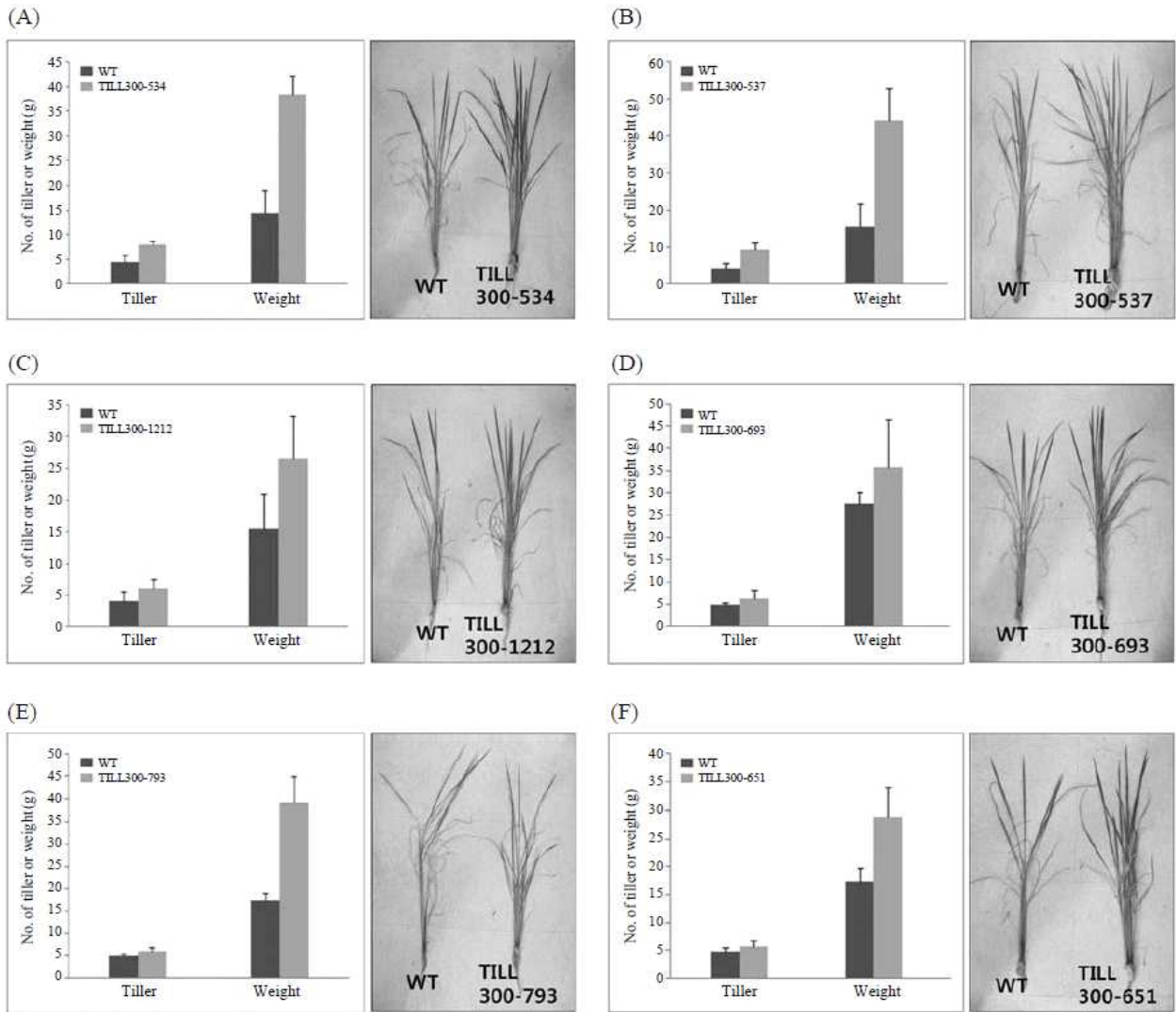


그림13-3. 선발된 6개체 (TILL-300-651, TILL300-1212, TILL300-534, TILL300-537, TILL300-693, TILL300-793)의 병저항성 조사 결과

선발된 6개 돌연변이 계통들이 가지는 형질이 감마선에 의해 유도된 유전자 돌연변이에 의한 것이라면, 멘델의 유전법칙(Mendel 1865)에 따를 것이라는 가정하에 이들 3가지 형질이 선발된 6계통이 M4세대에서 일정한 분리비를 보이는지 확인하였다. 그 결과, 선발된 6계통은 모두 열성유전의 분리비를 나타내는 것을 확인하였고, 최종적으로 이들 6계통의 M5종자를 수확하였다(그림13-1 및 13-3).

감마선 조사에 의해 유도된 돌연변이체 벼가 벼 흰잎마름병에 대해 다양한 형질로 저항성을 나타낼 뿐만 아니라 이러한 내병성 형질이 유전된다는 사실을 검증하였다. 이들 선발된 계통에서 정확히 어떤 유전자가 감마선에 의해 변이되어 이러한 결과를 보이는지는 파악하기 힘들겠지만, 기존에 알려져 있던 분자수준의 어떤 병 저항성 방어기작을 조절함으로써 병 저항성 표현형을 나타낼 가능성이 높았다. 따라서, 본 연구에서는 기존에 알려져 있던 다양한 병저항성 관련 유전자를 이용하여 선발된 6계통에서 RT-PCR분석을 수행하여 대조군에 비해 어떤 발현패턴의 변화를 보이는지 확인하였다 (그림13-1 및 13-4). 벼흰잎마름병에 대한 다양한 저항성 유전자(R gene) 중 흥미롭게도 Xa21의 전사체가 대조군에 비해 6계통 모두에서 강하게 발현하

고 있음을 확인하였다. 이는 Xa21 유전자의 발현을 상위에서 조절하는 어떤 조절 인자가 감마선 조사에 의해 변이되었음을 나타내는 것이라고 추정할 수 있을 것이다. 또한 예상치 않게 벼도열병원균(*Magnaporthe grisea*)에 대해 저항성 유전자로 알려진 Pi36과 Pi-ta의 발현이 대조군에 비해 일부 계통에서 높은 발현을 나타냄을 확인하였다(Pi36: TILL300-651, TILL300-1212; Pi-ta: TILL300-534, TILL300-537, TILL300-1212, TILL300-693, TILL300-651). 이것은 본 연구에서 선발한 돌연변이 계통이 벼 흰잎마름병 이외의 병원균에 대해서도 저항성을 갖고 있을 가능성을 보여주는 결과라고 할 수 있을 것이다.

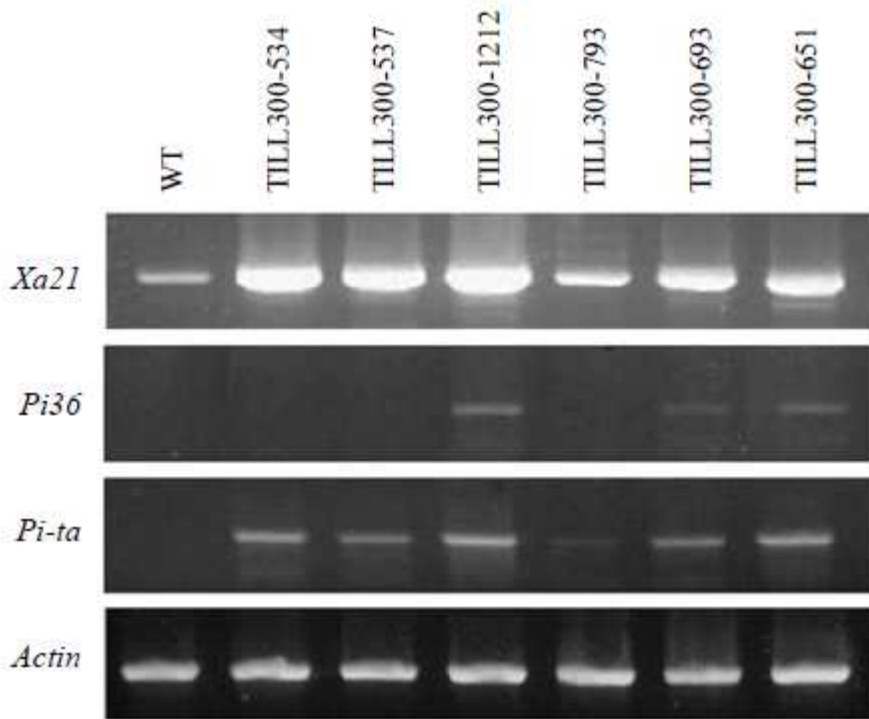


그림13-4 선발된 계통에서 저항성 유전자 (R-gene)의 발현 조사결과

방사선 처리에 의해 구축된 돌연변이 벼 집단(3,000계통)에서 벼 흰잎마름병에 대해 저항성을 나타내는 계통을 선발한 결과, 원품종(동안벼)에 비해 벼 흰잎마름병 접종 시 잎의 병반 길이가 짧으면서, 분얼 수가 많고, 생체중이 무거우며, 이러한 특징이 열성 유전되면서, 높은 저항성 유전자 (R-gene)의 발현을 나타내는, 6계통을 최종 선발할 수 있었다. 이들 계통은 앞으로 벼 흰잎마름병 저항성 육종을 위한 중요한 재료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

2. 병저항성 돌연변이 개체에서 유전자 발현 분석

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

- 벼흰잎마름병에 대한 저항성 유전자 Xa21가 분리된 이후 30여개의 유전자가 확인되었으며, 이중 Xa1, Xa3/Xa26, Xa5, Xa13 및 Xa27 등 5개의 유전자가 클로닝되고 특성이 확인되었다. 본 연구에서는 선발한 저항성 개체에서 이들 유전자 이외의 유전자에 의한 병반응 변화에 초점을 두고 DNA microarray 및 유전체 재분석을 통해 병저항성에 관여하는 유전자를 분리하고자 하였다.
- 병 저항성 개체로 선발한 TILL300-651 (Bacterial Blight Resistance 1; bbr1)을 대상으로

microarray를 수행하고 선발한 돌연변이 개체에서 병 접종에 따라 발현이 변화되는 유전자들의 특성을 살펴보고자 하였다.

나. 연구개발 결과 및 고찰

- 선발한 개체를 대상으로 병 저항성 마커 유전자들의 발현을 q-RT PCR을 통해 확인한 결과(그림13-5), PR1b 및 PR1a 등의 유전자 발현이 대조군에 비해 증가되어 있음을 확인하였다.

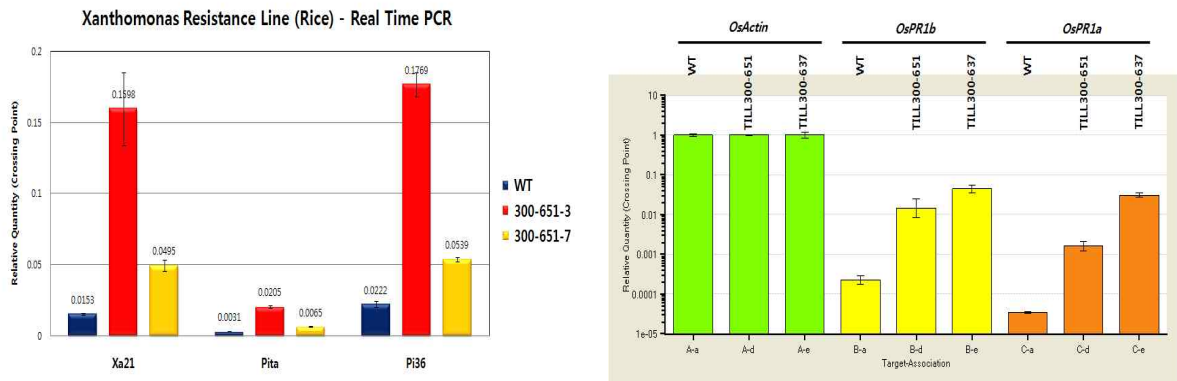


그림13-5. 선발된 돌연변이 개체에서 병저항성 마커 유전자의 발현 분석

- 이와 같이 확보된 대조군 및 bbr1를 대상으로 microarray 분석을 수행한 결과 (그림 6 및 그림 7), bbr1 개체에서 931개 유전자의 발현이 증가되었고 이들 발현 증가 유전자 중 병 저항성 관련 유전자를 선별하였다. 선발된 PLD, WRKY45, CIGR1, MAPK5, WRKY70 유전자의 발현을 qRT-PCR로 분석하여 유전자의 발현이 bbr1에서 증가되었음을 확인하였다.

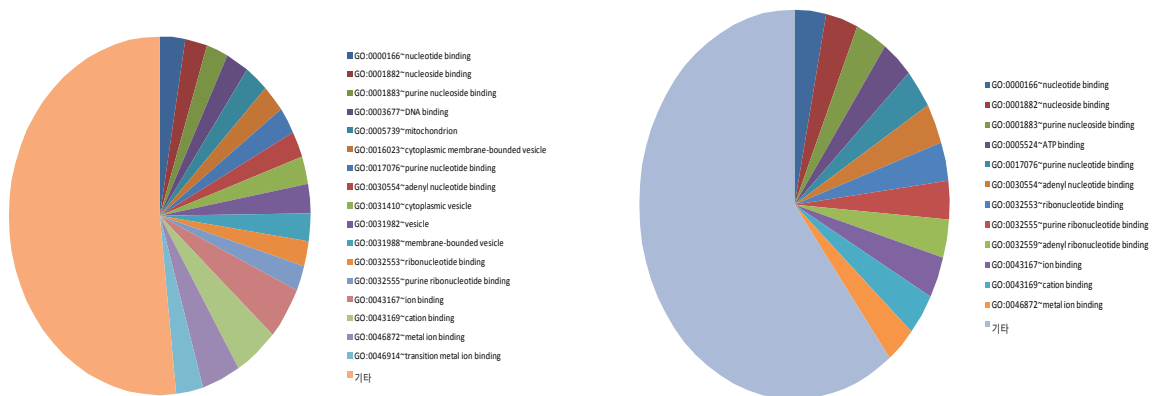


그림13-6. bbr1 계통에서 2배 이상 발현이 증가되거나 감소한 유전자의 Gene Ontology.

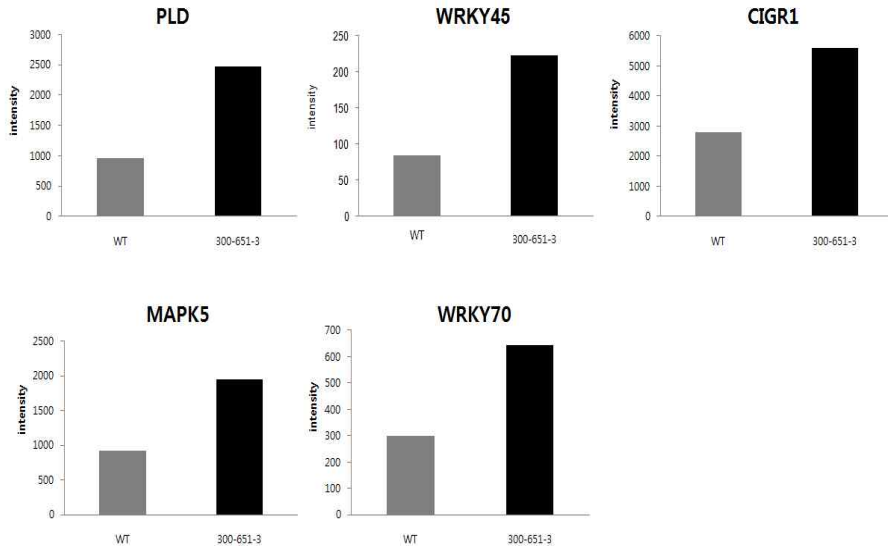


그림13-7. qRT-PCR을 이용한 병저항성 마커 유전자들의 발현 변화 확인

- 이와 같이 확보된 대조군 및 bbr1를 대상으로 microarray 분석을 수행한 결과 (그림 13-6 및 그림 13-7), bbr1 개체에서 931개 유전자의 발현이 증가되었고 이들 발현 증가 유전자 중 병 저항성 관련 유전자를 선별하였다. 선별된 PLD, WRKY45, CIGR1, MAPK5, WRKY70 유전자의 발현을 qRT-PCR로 분석하여 유전자의 발현이 bbr1에서 증가되었음을 확인하였다.
- bbr1 (TILL300-651)에서 발현이 증간되는 유전자를 DAVID 분석 시스템을 이용하여 분석한 결과 이 계통은 평소 Biosynthesis of alkaloids derived from shikimate pathway, Biosynthesis of phenylpropanoids, Biosynthesis of plant hormones, Phenylalanine-tyrosine-tryptophan biosynthesis pathway 관련 유전자들의 발현이 증가되어 있음을 확인할 수 있었다 (표 13-2 및 그림 13-8).

표13-2. TILL300-651라인에서 발현되는 여러 다양한 Pathway관련 유전자군

Affimatrix ID	Gene ID	Gene description	Fold Ratio	
			Mut.	Mut.+Xoo
Biosynthesis of alkaloids derived from shikimate pathway				
Os.13993.1.S1_at	Os08g0434300	Malate dehydrogenase precursor	3.91	4.85
Os.26406.1.S1_at	Os03g0126000	Phosphorybosyl anthranilate transferase 1	1.57	1.85
Os.6876.1.S1_at	Os04g0463500	Anthranilate synthase beta chain	5.68	5.81
Os.56273.1.S1_at	Os06g0225800	Shikimate kinase domain containing protein	2.46	2.35
Os.50903.2.S1_x_at	Os09g0255400	Indole-3-glycerol phosphate synthase	3.41	3.70
Os.52536.1.S1_at	Os04g0518400	Phenylalanine ammonia-lyase	6.77	3.33
Os.19375.1.S1_at	Os08g0448000	4-coumarate--CoA ligase 1	5.23	4.82
Biosynthesis of phenylpropanoids				
Os.3408.1.A2_a_at	Os01g0866400	---	2.02	1.56
Os.13993.1.S1_at	Os08g0434300	Malate dehydrogenase precursor	3.91	4.85
Os.26406.1.S1_at	Os03g0126000	Phosphorybosyl anthranilate transferase 1	1.57	1.85
Os.6876.1.S1_at	Os04g0463500	Anthranilate synthase beta chain	5.68	5.81
Os.56273.1.S1_at	Os06g0225800	Shikimate kinase domain containing protein	2.46	2.35
Os.50903.2.S1_x_at	Os09g0255400	Indole-3-glycerol phosphate synthase	3.41	3.70
Os.52536.1.S1_at	Os04g0518400	Phenylalanine ammonia-lyase	6.77	3.33
Os.19375.1.S1_at	Os08g0448000	4-coumarate--CoA ligase 1	5.23	4.82
Biosynthesis of plant hormones				
Os.13993.1.S1_at	Os08g0434300	Malate dehydrogenase precursor	3.91	4.85
Os.26406.1.S1_at	Os03g0126000	Phosphorybosyl anthranilate transferase 1	1.57	1.85
Os.6876.1.S1_at	Os04g0463500	Anthranilate synthase beta chain	5.68	5.81
Os.49507.1.S1_at	Os04g0578000	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	5.13	6.03
Os.56273.1.S1_at	Os06g0225800	Shikimate kinase domain containing protein	2.46	2.35
Os.50903.2.S1_x_at	Os09g0255400	Indole-3-glycerol phosphate synthase	3.41	3.70
Os.22278.1.S1_at	Os09g0555500	Phytoene synthase chloroplast precursor	3.39	3.68
Os.52536.1.S1_at	Os04g0518400	Phenylalanine ammonia-lyase	6.77	3.33
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis				
Os.26406.2.S1_x_at	Os03g0126000	---	1.79	2.25
Os.6876.1.S1_at	Os04g0463500	Anthranilate synthase beta chain	5.68	5.81
Os.56273.1.S1_at	Os06g0225800	Shikimate kinase domain containing protein	2.46	2.35
Os.50903.2.S1_x_at	Os09g0255400	Indole-3-glycerol phosphate synthase	3.41	3.70

- 또한 bbr1 (TILL300-651)에서 발현 증가되는 유전자와 Pathway를 KEGG 분석 시스템을 이용하여 분석한 결과, bbr1 (TILL300-651) 돌연변이 라인은 평소 Bacterial pathogen에 대한 방어기작과 연관성이 있는 Salicylic acid생합성 경로를 활성화 시키고 있음을 밝혀 낼 수 있었다 (그림 13-8).

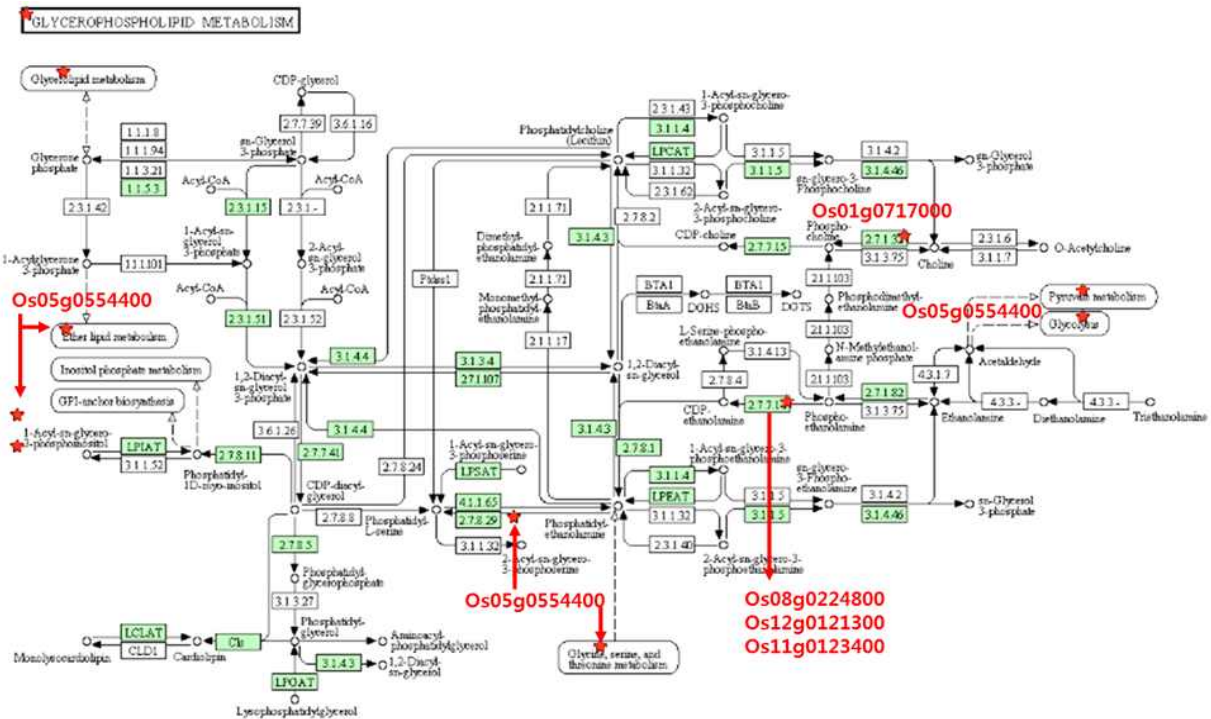
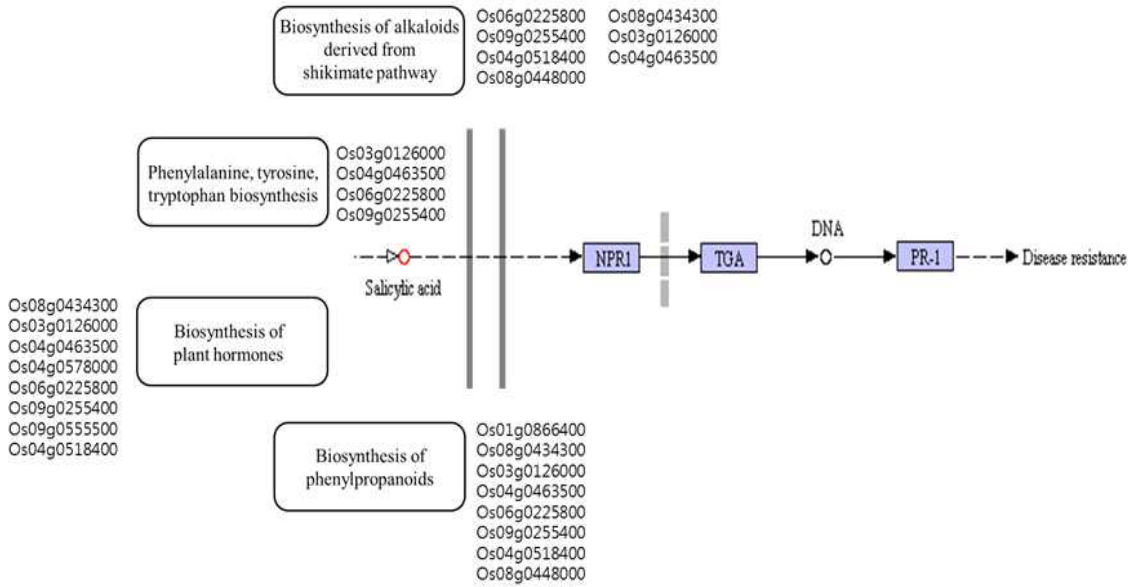


그림 8. bbr1 (TILL300-651) 돌연변이 라인의 Salicylic acid생합성 관련 Pathway 활성화.

- bbr1 (TILL300-651)에 병원균 접종에 따라 발현이 증가되는 유전자를 DAVID 분석 시스템을 이용하여 분석한 결과, 대조군에 비해 Glycerophospholipid metabolism, Starch-sucrose metabolism pathway 관련 유전자를 집단적으로 발현증가 시키고 있음을 확인할 수 있었다 (표 13-3, 그림 13-9,10). bbr1 (TILL300-651)에 병원균을 접종시 많은 유전자들의 변화를 확인할 수 있었으며 그 대표적 유전자를 <표13-3>에 나타내었다.

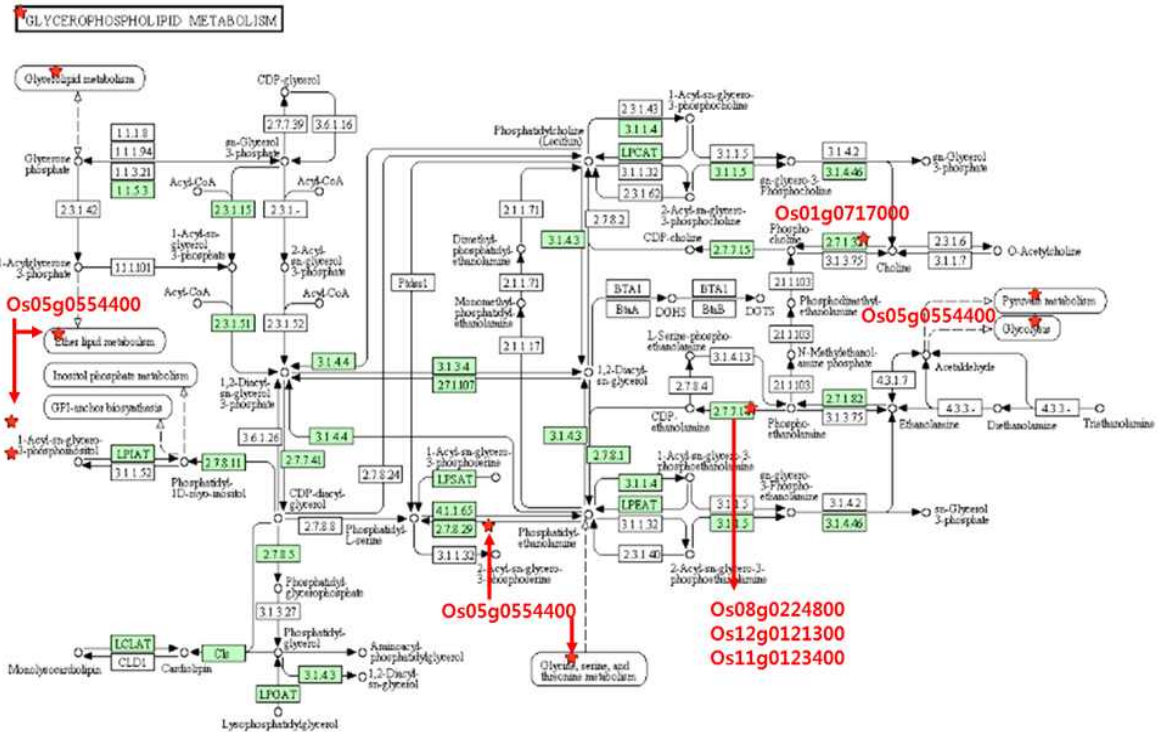


그림13-9. bbr1(TILL300-651)에 병원균 접종시 활성화 되는 Glycerophospholipid metabolism pathway의 활성화.

표13-3. bbr1(TILL300-651)에 병원균 처리 후 대조군에 비해 발현이 증가하는 여러 다양한 Pathway관련 유전자군

Affimatrix ID	Gene ID	Gene name	Fold Ratio	
			Mut.	Mut.+Xoo
Glycerophospholipid metabolism				
Os.13835.2.S3_a_at	Os01g0717000	Choline kinase	5.11	6.97
Os.54269.1.S1_s_at	Os05g0554400	Phosphatidylserine synthase 2	1.42	3.13
Os.46126.1.S1_x_at	Os08g0224800	---	1.38	2.29
OsAffx.30790.1.S1_at	Os11g0123400 /// Os12g0121300	---	1.70	3.93
OsAffx.30790.1.S1_at	Os11g0123400 /// Os12g0121300	---	1.70	3.93
Starch and sucrose metabolism				
Os.22169.2.S2_a_at	Os06g0726400	4-alpha-glucan-branching enzyme chloroplastic/ amyloplastic	1.40	2.40
Os.3122.1.S1_at	Os09g0298200	---	1.27	3.08
Os.35044.2.S1_x_at	Os01g0508000	---	1.47	5.62
Os.46618.1.S1_at	Os10g0565200	---	0.98	4.19
Os.11216.1.S1_at	Os03g0758100	Plastidic alpha 1%2C4-glucan phosphorylase 2	1.63	3.13
Os.12725.1.S1_at	Os06g0160700	---	2.56	4.67

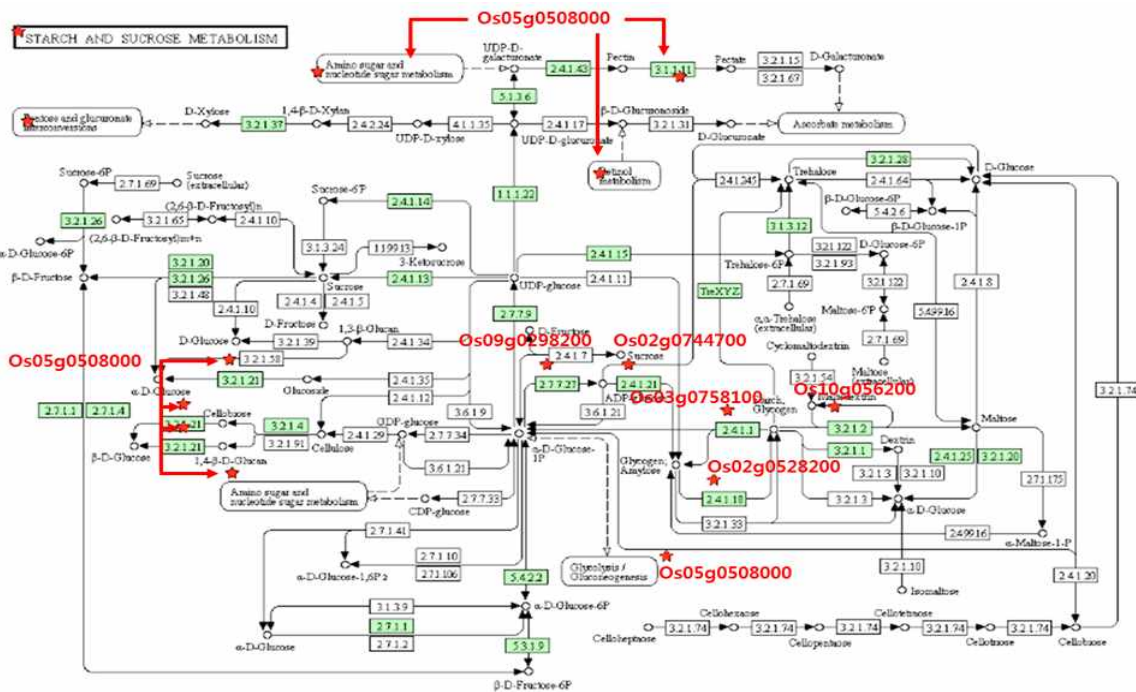


그림13-10. bbr1(TILL300-651)에 병원균 접종시 활성화 되는 Starch and sucrose metabolism pathway의 활성화.

- Glycerophospholipid metabolism, Starch-sucrose metabolism pathway는 병 저항성 관련성이 이미 보고된바 있다. 따라서 TILL300-651 돌연변이 벼는 평소 Salicylic acid생합성 관련 Pathway가 활성화 되어 병저항성이 증대된 상태로 있다가 병이 침입하면 여기에 더해서 Glycerophospholipid metabolism, Starch-sucrose metabolism pathway를 활성화 시켜 좀 더 효율적으로 Xoo에 방어 한다는 사실을 밝힐 수 있었다.
- bbr1 (TILL 300-651)의 M6 세대가 M5세대와 마찬가지로 병원균에 대한 저항성 표현형을 보이는지 여부를 실험하기 위해 8개 line의 (TILL 300-651-21-3; #1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) M6 plant에 병원균을 접종 한 후 병반 길이를 측정하였다 <그림13-11>

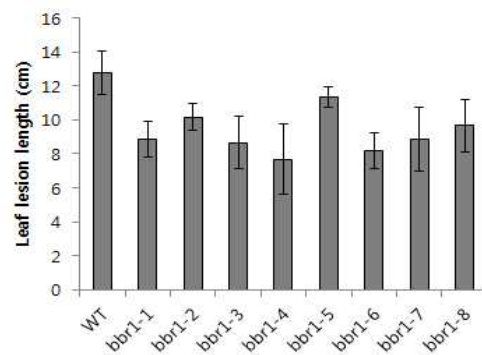
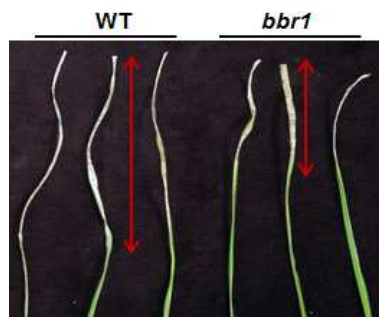


그림13-11. Phenotypic analysis of the rice bbr1 mutant

- Wild Type (WT) 과 8 line의 TILL 300-651-21-3 (M6) plant의 병반길이를 비교한 결과 mutant line들은 WT에 비해 평균 20% 병반길이가 짧은 것을 확인하여 TILL 300-651은 세대가 진전되어도 (M5세대에서 M6 세대) 병 저항성 표현형이 유전됨을 확인하다. TILL 300-651-21-3의 line들은 WT 과 비교했을 때 벼흰잎마름병 (bacterial blight)에 상대적으로 저항성을 나타내므로 bacterial blight resistance 1 (bbr1)으로 명명하였다.
- Microarray를 이용한 bbr1 특이적 유전자집단의 분석.
 - Microarray 분석은 두 가지 실험 set로 구성하여 진행하였으며, SET I은 병을 접종하지 않은 40일 자란 식물을 실험에 사용하였으며, WT과 bbr1의 basal expression pattern 분석 (2회의 독립적인 실험과 분석을 수행 함)하였다. 이 경우 WT과 bbr1의 basal expression pattern을 비교함으로써 bbr1 mutation이 basal expression에 영향을 주는지 여부를 분석할 수 있다. 또한 Xoo 접종후 expression pattern의 변화에 대한 control이 될 수 있다.
 - SET II 는 40일 자란 식물에 Xoo 접종 10일 후 WT 과 bbr1의 inducible expression pattern 분석(2회의 독립적인 실험과 분석을 수행 함)하였으며, Xoo에 반응하여 그 발현양이 감소하거나 증가하는 유전자 집단을 관찰하기 위한 실험으로서 WT과 비교했을 때 bbr1특이적이 pattern을 보이는 유전자 집단을 선별할 수 있다.
 - 다음과 같은 기준으로 bbr1특이적인 pattern을 보이는 유전자 집단을 선별하였다.
 - 방향성: 특정 유전자의 발현이 WT과 비교했을 때 두 번의 독립적인 반복실험에서 모두 증가했거나 모두 감소하는 경우
 - 평균 변화율 (fold change of bbr1/WT signal intensity)이 4보다 큰 경우 (즉 WT보다 bbr1에서 특정 유전자의 발현이 4배 이상 증가 하거나 감소하는 경우).
 - microarray 분석을 통해 WT과 비교했을 때 bbr1특이적인 발현을 보이는 총 114개의 유전자가 선별되었다. 이중 92개의 유전자는 4배 이상 발현이 증가하였고, 22개의 유전자는 4배 이상 발현이 감소하였다. 선별된 114개의 유전자들을 differentially expressed genes (DEGs)으로 명명하고, public database (<http://www.genome.jp/kegg>)를 이용해 gene ontology 및 기능을 분석하였다. DEGs는 11 biological process category로 분류되었는데, 이중 major category는 스트레스 반응 관련 혹은 nucleic acid metabolism관련 category로서 33개의 DEG가 포함되었다 (그림13-12, 표13-3)

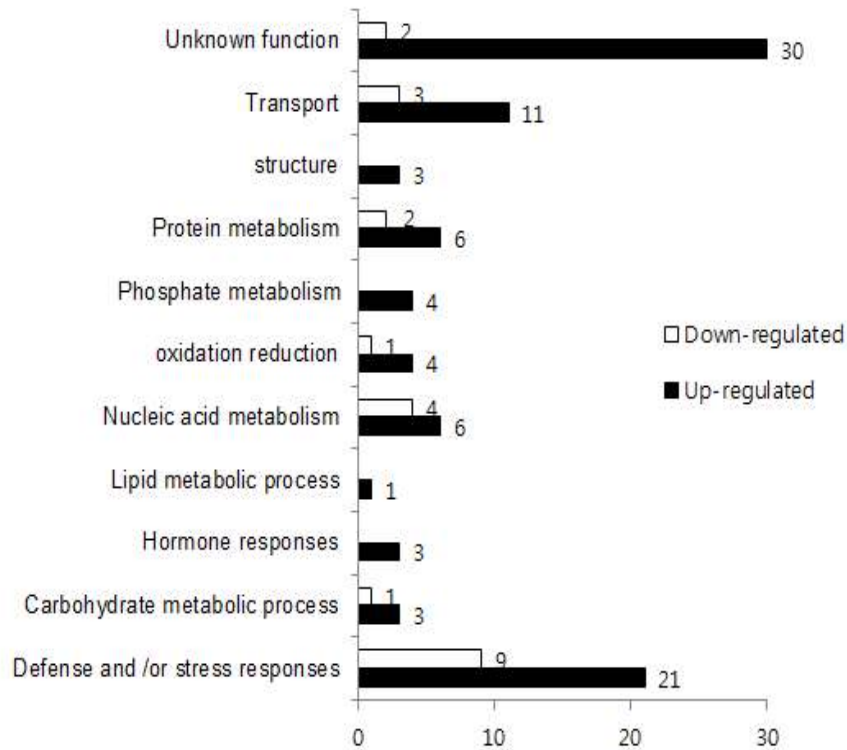


그림13-12. Gene ontology classification of differentially expressed genes in rice leaves at 10 day post inoculation

- microarray 분석을 통해 선발된 bbr1에 특이적인 발현유형을 보이는 유전자들을 qRT-PCR을 통해 재확인 하였다 <표 13-4, 그림 13-13.>

표13-4. 병원균 처리에 의해 발현변화(4배이상)를 나타내는 스트레스 반응 및 전사조절에 관련된 유전자군

Description	Gene Title	Average fold change ^a
Transcription factor activity		
TF-1; Similar to Heat shock transcription factor 31	Os02g0527300	11.52
TF-2; AP2, Similar to CBF-like protein	Os06g0127100	43.92
TF-3; AP2, Similar to AP2 domain containing protein RAP2.6	Os08g0474000	51.32
TF-4; MYB, Similar to LHY protein	Os04g0583900	6.12
TF-5; NAM, No apical meristem (NAM) domain containing protein	Os03g0327800	5.37
TF-6; MYB, Similar to Myb-related transcription factor LBM1	Os07g0558100	6.04
TF-7; MYB, Similar to Typical P-type R2R3 Myb protein	Os01g0975300	-7.52
TF-8; AP2, RAV-like protein	Os01g0141000	-4.17
Response to biotic stress		
R-1; Similar to Beta-1,3-glucanase-like protein	Os01g0944900	19.29
R-2; Similar to Lipoxygenase 2.3, chloroplast precursor	Os02g0194700	10.9
R-3; Seven transmembrane protein MLO2	Os03g0129100	8.27
R-4; Protein phosphatase 2C family protein	Os06g0698300	7

R-5; Similar to NtPRp27	Os10g0490800	14.22
Similar to Iron-phytosiderophore transporter protein yellow stripe 1	Os02g0649900	-6.28
Similar to Pathogen-related protein	Os01g0731100	-8.17
Response to oxidative stress		
POD-1; Peroxidase	Os03g0235000	-42.2
POD-2; Peroxidase	Os07g0677100	-7.73
POD-3; Peroxidase	Os07g0677200	-4.79
POD-4; Similar to Peroxidase 47 precursor	Os08g0113000	-14.6
Response to abiotic stress		
Late embryogenesis abundant (LEA) group 1 family	Os04g0589800	25.25
Similar to Low-temperature induced protein It101.2	Os05g0122700	16.92
Similar to Allyl alcohol dehydrogenase	Os04g0497000	11.48
Similar to 1-Cys peroxiredoxin;	Os07g0638300	9.16
Similar to Small heat stress protein class CIII	Os02g0782500	8.33
GRAM domain containing protein;	Os12g0478100	7.53
Similar to Acyl-CoA-binding protein 2 (ACBP 2)	Os06g0115300	6.89
Hly-III related proteins family protein	Os06g0652200	6.54
Similar to Dehydrin DHN1 (B8)	Os01g0702500	6.42
Heat shock protein DnaJ, N-terminal domain containing protein	Os01g0606900	6.34
EFA27 for EF hand, abscisic acid, 27kD	Os04g0511200	4.86
Glycoside hydrolase, family 17 protein	Os01g0860800	4.44
Similar to germin-like protein 8	Os08g0189850	-6.45
Similar to germin-like protein 12	Os08g0189900	-6.92

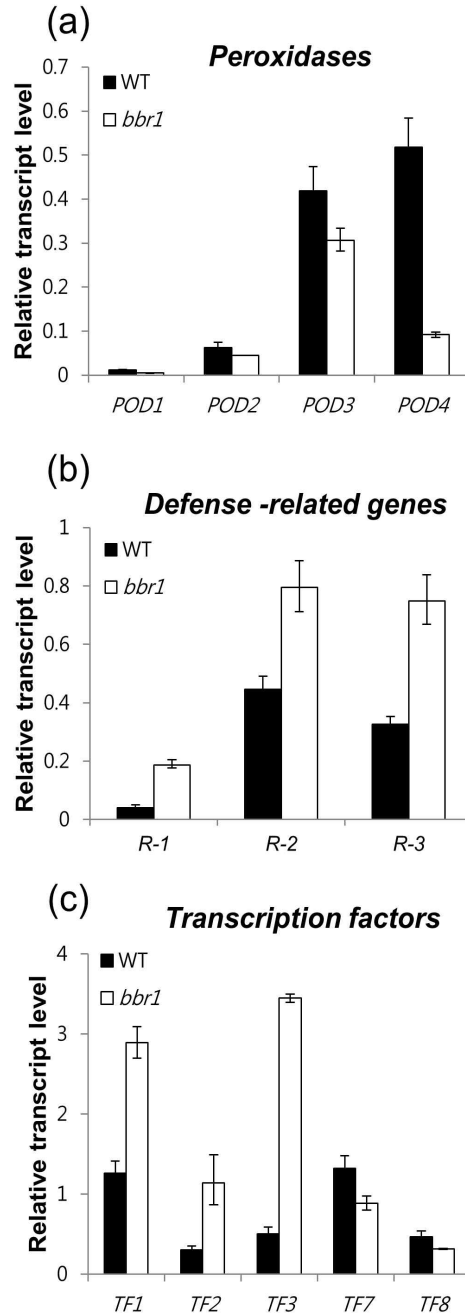


그림13-13. 12개 유전자의 qRT-PCR 분석을 통한 유전자 발현 변화 분석

이상의 결과는 아래와 같이 요약할 수 있다.

- (1) WT보다 bbr1에서 4배 이상 강한 발현을 보이는 5개의 병저항성 관련 유전자들 중 3개의 유전자가 qRT-PCR을 통해 발현증가가 재현되었다.
- (2) WT보다 bbr1에서 4배 이상 발현이 감소하는 4개의 PEROXIDASE 유전자들은 4개 모두 qRT-PCR을 통해 발현감소가 재현되었다.
- (3) WT보다 bbr1에서 4배 이상 강한 발현을 보이는 8개의 transcription factor 유전자들 중 5개가 qRT-PCR을 통해 재현되었다.

라. *bbr1* 특이적 유전자집단과 *bbr1*의 병저항성 표현형

○ *bbr1*에서 병저항성 관련 유전자들의 강한 발현

- β -1,3-glucanase (R-1) 는 PR-2 group의 pathogenesis-related (PR) protein으로서 감염 조직에서 발현이 증가되고, antifungal activity가 있다. lipoxygenase (R-2)에 의해 유도되는 Lipid peroxidation과 활성산소생산은 감염 후 식물이 보이는 대표적인 반응들로서 뒤이은 병저항성 반응을 위한 신호전달자로서의 기능이 있다.

seven transmembrane MLO (R-3) protein은 calmodulin과 상호작용하여 보리흰가루병 (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*)에 대한 저항성 반응 억제에 관여하며, MLO gene은 biotic and abiotic stress에 발현이 증가된다는 보고가 있다.

- Xoo 접종 후 병저항성 관련 유전자들의 강한 발현은 *bbr1*에서 균 증식 억제에 관여할 것이라 사료된다.

○ *bbr1*에서 PEROXIDASE 유전자들의 발현 감소

- 네 개의 class III peroxidase gene [Os03g0235000 (POD-1), Os07g0677100 (POD-2), Os07g0677200 (POD-3), Os08g0113000 (POD-4)] 들은 *bbr1*에서 WT 보다 발현양이 적다.

- Peroxidase는 활성산소를 무독화 하는 효소로서 PR-9 protein class에 속한다. Peroxidase의 활성 저하는 식물세포에서 활성산소의 농도를 높여서 병원체의 증식을 억제할 수 있다.

- *bbr1*에서 Peroxidase 유전자들의 발현감소는 효소의 활성 저하에 영향을 줄 거라 예상되고, 결과적으로 침입하는 병원체의 증식 억제에도 영향을 줄 거라 사료된다.

○ *bbr1*에서 AP2/EREBP gene family의 발현 변화

AP2 domain의 개수와 유전자의 기능에 따라 AP2/EREBP gene family는 AP2, RAV, DREB, ERF로 나뉜다. 특히 ERF와 DREB/CBF subfamily는 식물의 stress저항성 반응에 관여한다는 보고가 있다. *bbr1*에서 가장 강하게 발현되는 2개의 유전자는 RAP2.6 (Os08g0474000; >50 fold) 과 CBF (Os06g0127100; >40 fold)로서 모두 AP2/EREBP gene family이다. RAV (Os01g0141000; >4 fold)는 *bbr1*에서 WT보다 4배 이상 발현양이 감소한다.

ERF transcription factors는 식물의 biotic stress 저항성 반응에 관여하고, cis-acting element GCCGCC를 인식한다. DREBP transcription factor는 abiotic stress 저항성 반응에 관여하고, cis-acting element CCGAC를 인식한다. RAV transcription factor는 AP2와 B3 domain을 모두 가지고 있어서 CAACA와 CACCTG 두 개의 cis-acting element모두를 인식한다.

*bbr1*에서 ERF와 CBF gene의 강한 발현은 이들 두 transcription factor의 활성이 WT 보다 높아서 target 유전자의 발현에도 영향을 줄 가능성이 있다는 추측을 가능하게 한다. SETI과 SETII microarray 분석결과 두 종류의 microarray 실험 모두에서 WT 보다 2배 이상 발현이 감소하거나 증가하는 유전자 집단을 선별하고, 이들중 putative promoter region (2kb up stream)에 GCCGCC, CCGAC 또는 CAACA와 CACCTG cis-acting element가 존재하는 유전자 집단을 다시 선별했다 <표 13-5, 6, 7>.

Figure 13-5. Thirty-six GCC-box containing differentially expressed genes in *bb1* mutant compared to wild type.

Gene Description	Gene Title	AGI Number	Number of GCC-box in putative promoter region ^a			Average fold change ^b	
			GCC GCC	GGC GGC	Total NO.	NT	Xoo
Transcription factor activity							
MYB family transcription factor	Os01g0863300	AT2G38090	3	3	6	7.5	8.72
MYB family transcription factor	Os02g0104500	AT1G76890	5	10	15	-5.62	-2.1
Response to stress							
HSF-type protein	Os06g0553100	AT3G24520	0	4	4	2.69	24.9 3
VQ domain containing protein	Os01g0278000	AT2G41010	1	1	2	4.84	7.29
oxidoreductase	Os09g0445600	AT5G19875	1	5	6	3.57	6.87
Similar to F-BOX STRESS INDUCED 2	Os07g0561300	AT4G21510	5	3	8	3.64	6.57
Calmodulin-related calcium sensor protein	Os01g0955100	AT1G76640	1	1	2	7.24	6.32
phosphate carrier protein	Os09g0454600	AT3G48850	4	2	6	3.86	6.19
diacylglycerol kinase 1	Os12g0224000	AT5G63770	1	1	2	2.31	2.75
PR (pathogenesis-related) peptide	Os12g0437800	AT2G38870	12	5	17	-3.81	1.06
Protein modification process							
protein phosphatase 2C	Os03g0268600	AT2G29380	1	2	3	7.29	9.99
STE_MEKK_ste11_MAP3K.6	Os01g0699500	AT5G55090	2	0	2	9.48	9
CRINKLY4 precursor	Os08g0374600	AT3G55950	2	0	2	4.94	8.88
protein kinase	Os02g0165100	AT1G16670	2	0	2	6.63	8.63
STE_MEKK_ste11_MAP3K.4 - STE kinases	Os01g0699100	AT5G55090	2	2	4	3.1	7.44
protein phosphatase 2C	Os01g0583100	AT1G17550	1	1	2	2.93	3.77
Nucleotide binding							
WD domain containing protein	Os01g0383700	AT4G03020	2	0	2	4.42	5.19
Development							
late embryogenesis abundant protein D-34	Os06g0341300	AT3G22490	4	3	7	5.39	15.5 6
senescence-associated gene 29	Os02g0513100	AT3G48740	2	0	2	4.47	10.9 3
Auxin regulated protein?	Os01g0851100	AT2G37980	1	1	2	3.86	6.41
Metabolic process							
fringe-related protein	Os03g0269900	AT2G37730	3	2	5	3.86	6.94
gibberellin receptor GID1L2	Os03g0790500	AT5G06570	1	1	2	4.76	6.82
Anthranilate synthase alpha 2 subunit	Os03g0264400	AT2G29690	2	0	2	3.4	3.23
starch synthase	Os06g0133000	AT1G32900	1	1	2	13.45	1.23
Unknown function							
transposon protein	Os01g0186900		0	3	3	17.03	15.8 9
expressed protein	Os01g0305200	AT1G69510	1	9	10	4.3	9.88
RPGR, putative	Os03g0296200		1	1	2	6.77	8.97
expressed protein	Os02g0527200	AT2G27830	2	4	6	5.1	8.57
expressed protein	Os02g0601000		4	0	4	4.99	6.54
expressed protein	Os06g0133300		4	2	6	4.3	4.13
expressed protein	Os01g0138500	AT2G01260	0	1	1	2.88	4.13
DUF966 domain containing protein	Os01g0975000	AT5G59790	2	3	5	3.48	4.04
cyclase/dehydrase family protein	Os01g0772400	AT4G17650	1	3	4	3.36	3.38
expressed protein	Os12g0209700	AT4G10930	2	3	5	-2.31	-2.19
expressed protein	Os11g0307600		2	0	2	-7.41	-2.37
Similar to pnn protein	Os12g0516700		1	23	24	-3.88	-3.67

Figure 13-6. Seventy-nine DRE binding domain containing differentially expressed genes in bbr1 mutant compared to wild type.

Description	Gene Title	AGI Number	Number of DRE-box in promoter region ^a			Average fold change ^b	
			CCGAC	GTCGG	Total No.	NT	X _{oo}
Transcription factor activity							
Tify domain containing protein	Os10g0391400	No	5	3	8	2.98	85.24
transcription factor bHLH92-like	Os03g0741100	No	1	1	2	2.4	35.02
Heat shock transcription factor 31	Os02g0527300	AT2G26150	0	1	1	3.05	26.01
WRKY DNA -binding domain	Os01g0821300	No	2	6	8	2.14	25.72
Similar to MCB2 protein (Myb-type)	Os01g0863300	AT5G04760	4	0	4	3.39	19.37
Chitin-inducible protein	Os07g0545800	AT5G48150	1	3	4	2.08	12.32
RING/FYVE/PHD-type protein	Os02g0682300	No	1	0	1	2.65	8.86
Tify domain containing protein	Os09g0439200	No	2	1	3	3.07	8.84
MYC/bHLH transcription factor-like	Os06g0164400	AT5G67110	2	1	3	2.51	6.05
NAM domain containing protein	Os12g0123800	AT5G18270	0	1	1	2.85	4.36
Response to stress							
Avr9Cf-9 rapidly elicited protein 74	Os06g0248500	No	4	1	5	3.24	95.27
hypothetical protein	Os01g0186900	AT5G12010	1	1	2	2.97	92.16
Avr9Cf-9 rapidly elicited protein 74	Os03g0240600	No	1	0	1	2.65	57.38
EF-hand Ca ²⁺ -binding protein	Os06g0683400	AT4G27280	8	1	9	2.33	23.83
GLYCINE-RICH PROTEIN 8	Os01g0278000	AT4G39260	2	0	2	2.56	13.9
RPM1-INDUCED PROTEIN KINASE	Os09g0442100	AT2G05940	2	0	2	2.58	13.33
phosphate transport protein	Os09g0454600	AT5G14040	1	2	3	2.46	9.71
expressed protein	Os01g0582600	AT5G12010	2	1	3	2.18	9.36
putative beta-1,3 glucanase	Os09g0542900	AT1G76070	1	1	2	2.23	9.32
Similar to Protein phosphatase 2C	Os01g0583100	AT5G57050	1	1	2	2.93	5.22
heat shock protein Oshsp18.0	Os03g0267000	AT3G46230	0	5	5	2.54	4.68
Dehydrin Rab25	Os01g0702500	No	2	1	3	4.59	3.68
subtilisin-chymotrypsin inhibitor-2A-like	Os12g0437800	No	3	6	9	$\frac{-3.8}{1}$	1.06
Protein modification process							
protein kinase domain containing	Os01g0699600	No	0	1	1	3.65	70.53
protein kinase domain containing	Os01g0699500	No	2	0	2	3.25	26.42
HIGHLY ABA-INDUCED PP2C	Os03g0268600	AT2G29380	3	1	4	3.24	22.68
Protein kinase	Os02g0165100	No	2	1	3	2.76	20.92
Similar to Receptor kinase-like	Os08g0374600	No	1	1	2	3.02	14.39
MAPKKK18	Os01g0699400	AT1G05100	2	0	2	2.93	11.11
Oryza sativa MAP kinase BIMK1	Os03g0285800	No	3	2	5	2.61	10.7
protein kinase domain containing	Os01g0699100	No	4	3	7	3.61	6.43
diacylglycerol kinase	Os12g0224000	No	2	1	3	2.04	3.19
Chaperone protein dnaJ 1	Os03g0822800	AT5G59610	1	1	2	2.6	-1.12
Biosynthetic process							
Similar to Viviparous-14	Os07g0154100	No	0	1	1	2.48	16.14
Mog1/PsbP	Os01g0934400	AT3G05410	1	2	3	4.89	8.9
STARCH SYNTHASE 1	Os06g0133000	AT1G32900	2	2	4	$\frac{13.4}{5}$	1.23
Similar to Cytochrome P450	Os07g0635500	AT2G46960	6	1	7	2.82	6.25
Development							

zinc finger protein ZFP15 mRNA	Os03g0820400	No	4	2	6	3.91	34.75
Seed maturation protein domain containing protein	Os06g0341300	AT3G22490	1	2	3	4.37	19.29
CALMODULIN LIKE 39	Os01g0955100	AT1G76640		1	1	2.53	18.25
Late embryogenesis abundant protein	Os01g0705200	No	1	0	1	3.21	6.62
Gene regulation							
arginine/serine-rich 12	Os12g0516700		1	17	18	-3.84	-3.63
Metabolic process							
hypothetical protein	Os01g0952900	No	1	3	4	3.73	248.65
Nuclease, Phosphatase	Os01g0716800	AT1G71710	1	2	3	2.87	15.91
α/β hydrolase fold-3 domain containing	Os03g0790500	AT5G06570	2	0	2	2.83	11.52
putative beta-1,3 glucanase	Os03g0792800	AT1G64760	1	2	3	2.91	6.35
putative 4-coumarate-CoA ligase	Os01g0901600	AT5G63380	1	1	2	2.25	5.04
Similar to H-ATPase	Os03g0689300	AT5G62670	0	1	1	3.53	4.88
Transport							
peptidylprolyl isomerase ROC7	Os06g0708300	AT4G39220	1	1	2	2.65	10.09
Similar to MtN3 protein precursor	Os02g0513100	AT5G50800	1	1	2	5.73	8.59
putative axi 1 protein	Os01g0851100	AT2G37980	2	0	2	3.62	6.9
Anthranilate synthase component I	Os03g0264400	AT5G05730	2	2	4	2.24	4.94
dehydrase family protein	Os01g0772400	AT4G17650	2	1	3	4.09	2.8
GTP-binding nuclear protein Ran1B	Os06g0600301	AT5G55190	1	0	1	2.15	2.12
Nucleotide binding							
WD-40 repeat family protein	Os01g0383700	AT4G03020	4	2	6	3.56	6.49
Unknown function							
ZIM domain containing protein	Os03g0181100	No	3	5	8	2.73	56.55
hypothetical protein	Os06g0133500	No	1	0	1	3.01	45.58
hypothetical protein	Os02g0733900	No	1	1	2	3.47	44.9
DWNN domain domain containing	Os03g0659400	No	1	2	3	2.91	19.86
hypothetical protein	Os02g0527200	No	4	4	8	2.55	17.3
hypothetical protein	Os02g0601000	No	3	5	8	2.47	13.29
hypothetical protein	Os01g0305200	No	4	5	9	3.23	13.21
hypothetical protein	Os01g0121600	No	0	2	2	2.51	10.85
hypothetical protein	Os03g0296200	No	4	0	4	6.64	9.28
hypothetical protein	Os07g0115500	No	1	1	2	2.58	9.08
hypothetical protein	Os06g0133300	No	0	1	1	2.34	7.59
DUF604 family protein	Os03g0269900	AT2G37730	1	0	1	3.6	7.49
DUF966 family protein	Os01g0975000	No	2	2	4	2.24	6.31
Cyclin-like F-box domain containing	Os07g0561300	No	5	2	7	3.9	6.17
hypothetical protein	Os09g0445600	AT2G31940	0	2	2	4.22	5.75
DUF789 family protein	Os01g0138500	AT2G01260	4	4	8	2.28	5.22
TonB box domain containing protein	Os09g0532000	No	1	0	1	2.35	4.15
Conserved hypothetical protein	Os01g0121500	No	1	0	1	2.88	3.07
hypothetical protein	Os07g0516400	No	1	2	3	4.83	3
metallothionein-like type 2 (OsMT-2)	Os01g0149200	No	1	3	4	2.77	2.78
hypothetical protein	Os12g0209700	No	4	2	6	-2.36	-2.14
Hydroxyproline-rich glycoprotein	Os11g0307600	No	3	0	3	-4.59	-2.89
similar to GT-2 factor	Os02g0104500	No	2	0	2	$-\frac{5.6}{2}$	-2.1
hypothetical protein	Os01g0303800	No	3	3	6	-2.08	-14.42

Figure 13-7. Fifty-one RAV1 binding domain containing differentially expressed genes in bbr1 mutant compared to wild type.

Gene Description	Gene Title	AGI Number	Number of RAV-binding site in putative promoter region ^a			Average fold change ^b	
			CAACA+ CACCTG	TGTTG+ CAGGTG	NO	NT	X _{oo}
Transcription factor activity							
WRKY108, expressed	Os01g0821300	AT4G11070	1	1	2	5.86	9.35
HSF-type protein	Os06g0553100	AT3G24520	1	0	1	2.69	4.03
Response to stress							
U-box protein CMPG1	Os06g0248500	AT5G37490	0	1	1	14.72	20.82
cytochrome P450	Os12g0150200	AT2G27690	1	1	2	14.57	18.57
ATL31 and ATL6	Os02g0759400	AT5G27420	3	0	3	9.25	12.55
HSF-type protein	Os02g0527300	AT5G03720	1	1	2	6.84	11.51
RAP 2.4	Os03g0191900	AT1G78080	1	2	3	6.15	9.38
LEAprotein	Os01g0705200	AT3G15670	1	0	1	2.87	7.34
oxidoreductase	Os09g0445600	AT5G19875	1	0	1	3.57	6.87
phosphate carrier protein	Os09g0454600	AT3G48850	1	0	1	3.86	6.19
RPM1-induced kinase	Os09g0442100	AT2G05940	1	0	1	5.76	5.96
PEN3	Os01g0609300	AT1G59870	1	0	1	5.68	5.62
expressed protein	Os01g0582600	AT5G12010	1	0	1	4.24	4.81
4CL	Os08g0448000	AT3G21240	0	1	1	4.55	4
glutamate decarboxylase	Os03g0236200	AT5G17330	2	1	3	4.27	3.46
PR-6 proteinase inhibitor family	Os12g0437800	AT2G38870	1	0	1	-3.81	1.06
heat shock protein DnaJ	Os03g0822800	AT5G59610	1	0	1	2.6	-1.12
Protein modification process							
MAP3K.7 - STE kinases	Os01g0699600	AT2G32510	1	2	3	18.13	14.07
MAP3K.6 - STE kinases	Os01g0699500	AT5G55090	0	3	3	9.48	9
receptor protein kinase CRINKLY4	Os08g0374600	AT3G55950	0	1	1	4.94	8.75
protein kinase	Os02g0165100	AT1G16670	1	0	1	6.66	8.63
protein phosphatase 2C	Os09g0325700	AT2G29380	1	0	1	4.76	7.59
MAP3K.4 - STE kinases	Os01g0699100	AT5G55090	1	0	1	3.1	7.44
MAP3K.5 - STE kinases	Os01g0699400	AT5G55090	1	0	1	4.63	6.99
protein phosphatase 2C	Os01g0583100	AT1G17550	2	1	3	4.03	3.77
Nucleotide binding							
CCHC-type zinc finger	Os03g0659400	AT5G47430	0	1	1	6.23	9.25
WD domain	Os01g0383700	AT4G03020	1	0	1	4.42	5.19
Development							
EF hand family protein	Os06g0683400	AT2G46600	1	0	1	7.94	6.94
growth regulator related protein	Os01g0851100	AT2G37980	1	0	1	3.86	6.41
glucan endo-1,3-beta-glucosidase	Os03g0792800	AT2G19440	1	0	1	3.13	5.9
chloroplast stay-green protein 1	Os09g0532000	AT4G11910	0	1	1	2.72	3.57
Metabolic process							
luminal PsbP	Os01g0934400	AT3G05410	0	2	2	5.08	12.04
expressed protein	Os06g0203600	AT2G26310	1	0	1	9.19	11.35
AMP-binding domain containing	Os01g0901600	AT5G63380	1	0	1	2.69	4.2
Transport							
white-brown complex homolog	Os01g0121600	AT2G01320	1	2	3	4.87	5.54
Rer1 protein	Os06g0708300	AT4G39220	1	0	1	4.58	5.8

ras-related protein	Os06g0600301	AT5G55190	0	1	1	2.17	2.06
Unknown function							
expressed protein	Os01g0952900	AT5G12340	1	0	1	27.86	33.01
transposon protein	Os01g0186900		2	0	2	17.09	15.89
expressed protein	Os06g0133500		1	0	1	10.78	12.64
expressed protein	Os01g0305200	AT1G69510	1	0	1	4.3	9.88
RPGR, putative,	Os03g0296200		1	0	1	6.82	9
expressed protein	Os02g0527200	AT2G27830	1	0	1	5.1	8.57
expressed protein	Os02g0601000		1	1	2	4.99	6.5
expressed protein	Os07g0516400		1	0	1	2.27	6.34
expressed protein	Os01g0138500	AT2G01260	1	0	1	2.88	4.07
expressed protein	Os09g0542900	AT1G76070	1	0	1	5.26	3.93
transposon protein	Os01g0872900		1	0	1	5.68	3.64
cyclase/dehydrase family protein	Os01g0772400	AT4G17650	0	1	1	3.36	3.38
expressed protein	Os12g0209700	AT4G10930	0	1	1	-2.31	-2.13

- 총 117 유전자가 *bbr1*에서 Xoo 접종 전 후 모두 2배 이상 발현이 증감 하였다. 이들 중 79개의 유전자는 CCGAC (DRE binding domain)를, 51개의 유전자는 RAV-binding domain을, 36개의 유전자는 GCC-box를 putative promoter region에 포함하고 있었다. <그림13-14>.

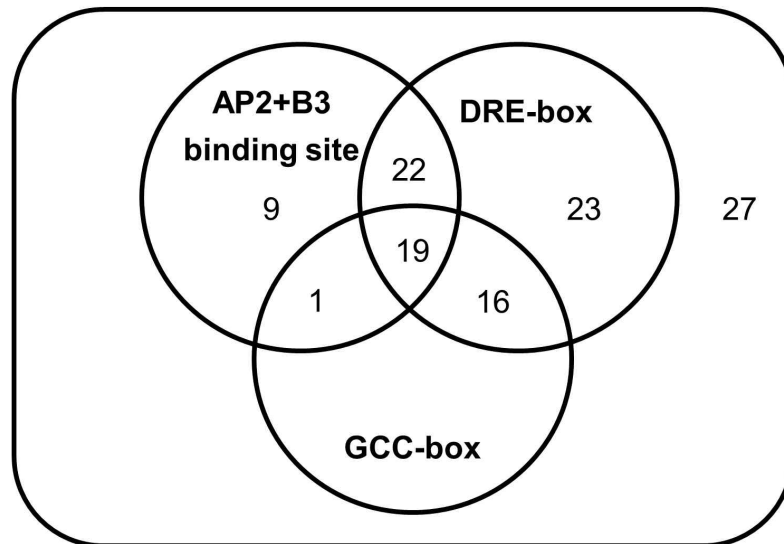


그림13-14. Venn diagram of more than two folds up- and down-regulated genes with different AP2 domain binding motif in *bbr1* mutant.

- 그림 14에서 보는 바와 같이 *bbr1*에서 2배 이상 발현의 변화가 있는 117개의 유전자들 중 90개가 (73%) putative promoter region에 AP2 domain binding element를 포함하고 있었다. 이들 중 F-BOX STRESS INDUCED 2 (Maldonado-Calderon et al. 2012), PEN3 (Xin et al. 2013), RPM1-INDUCED PROTEIN KINASE (Feng et al. 2012), WRKY108 (Higashi et al. 2008), BETA-1,3-GLUCANASE 2 (Silipo et al. 2005) 등과 같은 유전자들은 식물의 병저항성 반응에 관여한다는 보고가 있다. 이와 같은 분석

결과는 bbr1에서 매우 강하게 (WT보다 40-50배 이상) 발현되는 AP2 domain을 갖는 transcription factor가 bbr1에서 상이하게 발현되는 유전자집단의 발현조절에 관여할 가능성이 있다는 가설을 뒷받침 해준다. 그리고 이들 AP2/EREBP transcription factor의 putative target gene들의 발현변화가 bbr1의 Xoo저항성 표현형을 설명해줄 수 있을 것이라 사료된다.

제14절 제10협동 돌연변이체를 이용한 기후변화 대응 벼 유전자 네트워크 구축 및 품종 개발 (강원대 장철성)

1. 돌연변이 개체 선발 및 후대 양성

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

(1) 저온 및 고온 내성개체 선발 체계 확립 및 우수 후대 양성

(가) 국립춘천식량과학원의 내냉성 검정법(3엽기의 벼를 13℃ 냉수에 10일간 스트레스 처리 후 검정)을 응용하여 온실에서 평균 9℃ 냉수에서 처리 후 초장, 엽령, 생육상을 통해 검정

- 동안벼를 이용한 선발 최적 온도 및 최적의 시스템 검정
- 원자력연구원 정읍방사선과학연구소에서 분양 받은 3000 계통을 대상으로 내냉성 검정하여 200-0088, 200-0458, 200-0627 외 13 계통을 선발하였으며 포장에서 육성 및 종자를 수확하였고 추가적인 내냉성 검정

(나) 내열 처리 조건 확립을 위해 다양한 온도, 시간별 비교 실험을 수행 후 최적 처리 조건 확립 (45℃, 24hrs) 및 스트레스 처리 후 회복된 개체 선발

- 분양 받은 3000 계통을 대상으로 내열성 검정 실시, 총 20 계통 42 개체를 선발하였으며 포장에서 육성 및 종자 수확 하였으며 추가적인 내열성 검정

(다) 선발 계통들의 포장육성 및 후세대 재검정

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) 저온 스트레스 내성 돌연변이체 선발 system

(가) 저온 스트레스 내냉성 선발 체계 확립을 위해 대조구(동안벼)를 시험검정 한 결과 12℃이하에서 생육 지연현상 관찰

(나) 국립식량과학원 춘천출장소에서 실시하는 내냉성 검정법을 응용하여 온실에서 내냉성 test를 실시

- 3엽기의 어린 표를 춘천 지하수(9℃)를 이용하여 수온이 12℃이하가 되도록 유지하였으며 12일간 관수 후 생육검사
- 대조구 식물인 동안벼에서는 12일간 관수 시 엽령지수가 4엽기에 도달하지 못했지만 돌연변이 3000 계통 가운데 4엽기 이상의 개체가 발견되었고 이를 근거로 하여 초장, 엽령, 생육상 등을 평가(각 계통별로 3개 이상의 개체들을 평가하여 2개 이상의 개체가

내냉성을 보인 경우만 선발. 그림14-1, 표14-1)

- 생육은 육안으로 평가하여 가장 좋음은 5로 가장 나쁨은 1로 표시

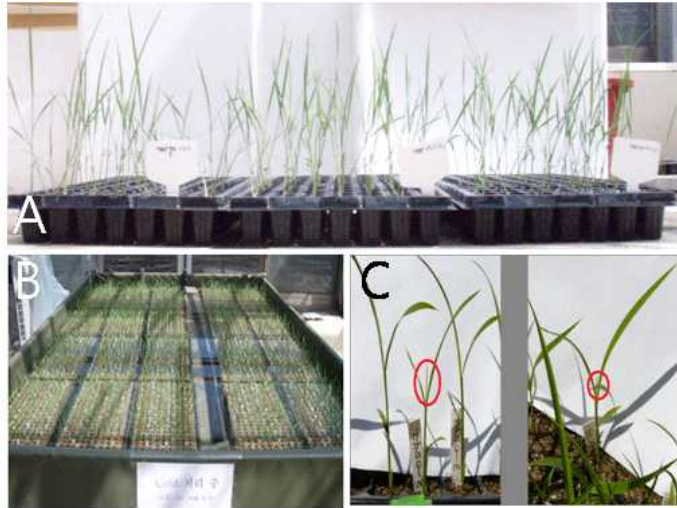


그림14-1. 내냉성 검정을 위한 선발 체계 확립 및 선발 개체 및 선발. A) 각각 다른 온도에서 벼 생육후 평가. 왼쪽 8°C, 가운데 12°C, 오른쪽 15°C. B) 내냉성 계통 선발 과정 C) 내냉성 개체

표14-1. 내냉성 검정 평가

	Dongan (control)			TILLING lines (3,000)			Resistant line (16 line)			Sensitive line	
	평균	편차	스트레스 전 후 차이	평균	편차	스트레스 전 후 차이	평균	편차	스트레스 전 후 차이	평균	편차
초장(cm)	9.5	2.4	1.8	9.6	3.8	1.1	11.8	1.6	2.4	10.2	3.8
엽령(기)	3.8	0.3	0.3	3.2	0.3	1.4	4.4	0.3	0.21	2.1	0.3
score	3			2.8			4.2			1	

(다) 저온 내성 돌연변이체 선발 및 육성

- 선발 체계 결과 얻은 평가 값을 근거로 16 계통 46개체를 선발
- 선발된 line 중 전 개체에서 강한 저온 저항성을 보이는 4 계통을 선정 후의 유전분석에 이용함
- 검정 후 선발 계통들을 포장으로 이식하여 증식함

(3) 고온 스트레스 내성 돌연변이체 선발 system

(가) 고온 스트레스 내냉성 선발 체계 확립을 위해 대조구 (동안벼)를 시험 검정 한 결과 45°C, 24시간, 습도 70% 처리시 고사됨을 확인.

(나) 고온 스트레스 처리 후 3주간의 회복기 후에 생육 검사를 통해 고사되지 않은 돌연변이 개체 선발.

- 대조구 식물인 동안벼에서는 45°C, 24시간 고온 스트레스 처리시 97%이상 고사했으며, 돌연변이 3000 계통 가운데 생육상태가 비교적 양호한 20 계통 42 개체를 선발함 (가장 좋음; 5, 고사; 1).

(4) 고온 내성 돌연변이체 선발 및 육성

(가) 선발된 line 중 전 개체에서 강한 저온 저항성을 보이는 20 계통을 온실에서 이식하여 증식 및 최종 4개체 선정 후의 유전분석에 이용함 (그림14-2).

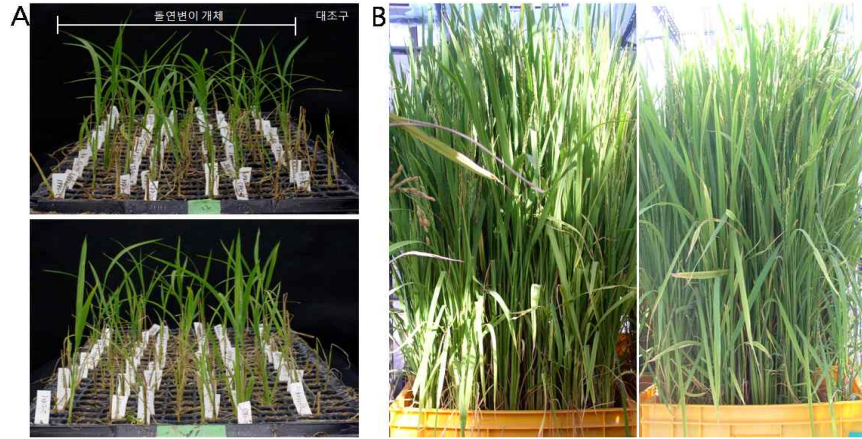


그림14-2. 고온 스트레스 처리 후 저항성 개체 선발 및 생육 A) 고온 스트레스 처리 3주후 생육 후 평가 B) 내열성 개체 선발 후 육성

2. 스트레스(저온, 고온) 관련 유전자 분석

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

(1) 선발된 계통을 이용 스트레스 관련 유전자군 분석

(가) 유전적 다양성 검증 기술인 AFLP기법을 통해 돌연변이 원종인 동안벼와 돌연변이 계통의 유전분석 비교를 통해 돌연변이 유래 유용 대립인자 분리

- 선발된 내냉성 계통의 AFLP분석을 통해 돌연변이 PCR 단편을 확인 후 염기서열분석을 통해 10개의 돌연변이 특이적 유용 대립인자 분리

(나) 유전자 네트워크 구축을 위한 관련 유전자들의 인프라 구축 및 분석

- *In silico* 분석을 통해 구축된 1,600 여종의 벼의 co-expression cluster 들을 이용하여 특이적 발현을 하는 유전자들과 상호 발현 할 것으로 예상되는 cluster 선발 및 네트워크 구축

(2) 내냉성 및 내열성 돌연변이 개체 유전 분석

(가) AFLP 기법을 통해 돌연변이 원종인 동안벼와 돌연변이 계통의 유전분석비교를 통한 돌연변이 유래 대립 유전인자 분리

- AFLP 분석을 통한 돌연변이 특이적 내냉성, 내열성 관련 대립유전자 분석 및 동안벼 염기서열과의 비교분석 실시

(나) 돌연변이 원종을 대상으로 고온 및 저온 관련 유전자들의 분자생물학적 특성 확인을 통한 내열성 돌연변이체 분석 접근성 제시

- 내열성 분석을 위한 돌연변이 원종(동안벼)의 분자 생물학적 분석: RT-PCR, yeast two hybridization, localization 등의 분자 생물학적 분석 실시

- *in silico* 분석을 통해 도출된 고온 관련 유전자 분석 및 유전자 기능 유추를 위한 과발

현 형질전환 애기장대 제작; RT-PCR, sub-cellular localization 분석, 과발현 형질전환 애기장대 제작

- 돌연변이 원종(동안벼)에서 고온에 특이적으로 반응하는 Os10g30850 유전자에 대한 분자생물학적 분석: Y2H 선발을 통해 선정된 상호결합하는 유전자들의 유전분석 실시
- 내냉성 돌연변이체에서 선발된 유전자 군을 대상으로 돌연변이 원종과의 비교 분석 및 유전자 기능 유추를 위한 과발현 형질전환 애기 장대 제작: RT-PCR genomic sequence 분석 등을 실시, 과발현 형질전환 애기장대 제작

(다) 내냉성, 내열성 유망 돌연변이체에 대한 지속적 검정 및 세대고정으로 대립 유전자의 분리

- 내냉성, 내열성 유망 돌연변이체의 지속적인 후대 검정 및 세대 고정
- 내냉성, 내열성 돌연변이체에 대한 농업적 형질 조사

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) 내냉성 계통을 이용 스트레스 관련 유전자 분석

(가) 내냉성 4계통에 대한 유전 분석

- 선발된 4 계통(2에서 5개체의 내냉성 개체들을 이용)으로부터 DNA를 추출하여 AFLP 분석을 통한 유전 분석 실시, 내냉성 특이적 단편을 확인하였고, 이를 클로닝하여 염기서열 분석 (그림14-3).

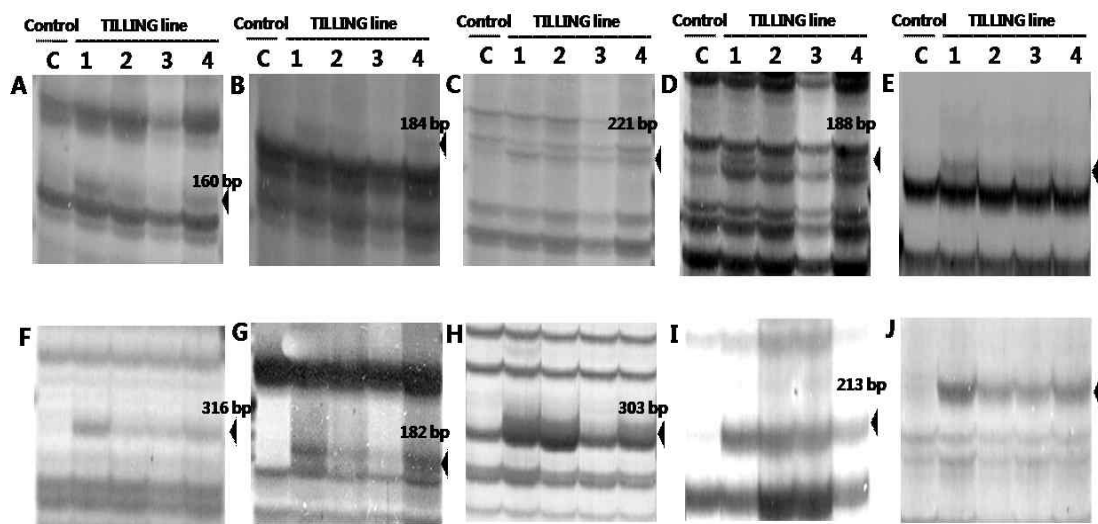


그림14-3. primer 조합별 PCR 단편. Primer 조합은 *EcoRI*(E)+AA/*MseI*(M)+CAC(A to D), E+AA/M+CAT(E, F), E+AA/M+CTC, E+AT/M+CAT, E+TT/M-+CTA. Lanes C, Dongan; lane 1, 200-88; lane 2, 200-458; lane 3, 200-627; lane 4, 200-1339

- *In silico* 분석을 통하여 내냉성 돌연변이체 특이적인 대립인자 확인. 총 10개 분석 결과 4개의 대립인자는 1kbp upstream region에서 변화가 발생한 반면, CDS와 intron 지역에서 각각 2개의 변이를 확인. 다른 두 개는 intergenic space로 예상됨 (표 2).

표14-2. *In silico* 분석을 통한 내냉성 돌연변이체 특이적 대립인자

No.	AFLP primer pairs	seq length	LocusName	Annotation	Mutated region	Identity text
1	E+AA/M+CA C	160	LOC_Os06g43020	expressed protein	1Kbp upstream	160/160 (100%)
2	E+AA/M+CA C	184	Not-matched			
3	E+AA/M+CA C	221	LOC_Os12g01890	SAG20	1 Kbp upstream	220/221 (99%)
4	E+AA/M+CA C	188	LOC_Os10g41020	flavonol synthase	CDS	187/187 (100%)
5	E+AA/M+CA T	116	LOC_Os10g21402	NADPH-dependent oxidoreductase	1Kbp upstream	115/116 (99%)
6	E+AA/M+CA T	316	LOC_Os11g02880	retrotransposon protein	CDS	306/316 (96%)
7	E+AA/M+CT C	303	LOC_Os09g30210	expressed protein	Intron	140/153 (91%)
8	E+AA/M+CT C	182	Not-matched			
9	E+AT/M+CA T	213	LOC_Os04g16738	chloroplast 30S ribosomal protein	1Kbp upstream	200/201 (99%)
10	E+TT/M+CT A	240	LOC_Os03g24640	terpene synthase	Intron	237/240 (98%)

- 돌연변이된 유전자들과 상호 작용하는 유전자들을 분리하기 위하여 본 연구실에서 구축 중인 유전자 네트워크를 이용하여 분석. GEO 데이터베이스에서 약 450여개의 microarray 자료를 이용하여 네트워크 구축 (그림14-4).

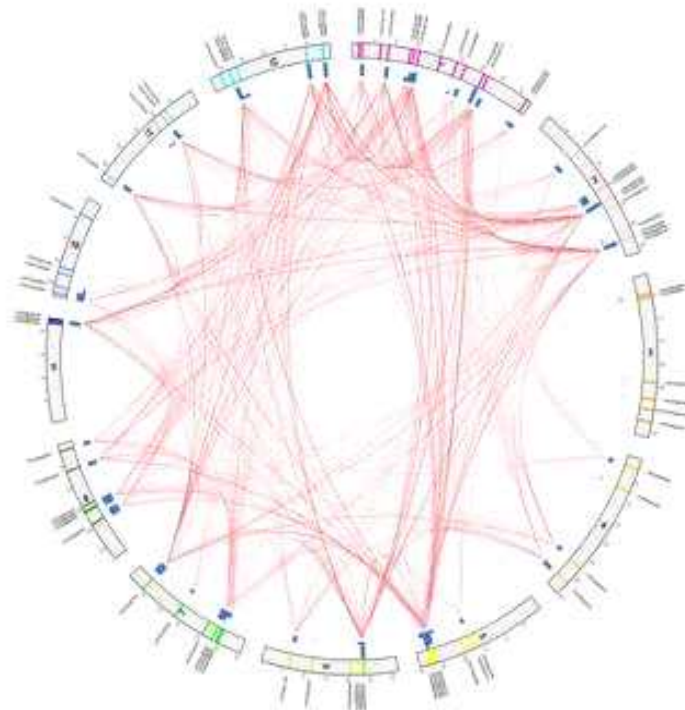


그림14-4. 변이된 대립인자인 flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase와 상호 발현할 것으로 예상되는 79개의 유전자들을 이용한 유전자 네트워크

(2) 내냉성 및 내열성 돌연변이 개체 유전 분석

(가) AFLP 분석을 통한 내냉성 관련 대립유전자 분석

- 내냉성 상위 4계통 및 동안벼를 대상으로 EcoRI/MseI enzyme처리를 하여 64조합의 marker를 통해 얻은 polymorphic loci를 유전분석한 결과 대립유전자의 변이를 확인하였으나 실제 내냉성 계통의 genomic 상에서는 변이가 없었음.
- 추가적으로 PstI/MseI enzyme 처리를 하여 다시 분석하였지만 내냉성 4계통과 돌연변이 원종인 동안벼간 polymorphic loci를 발견할 수 가 없었음.
- 이와 같은 결과는 선발된 내냉성 계통에서 상대적으로 적은 계놈상의 변화가 나타난 것으로 기대됨.

(나) AFLP 분석을 통한 내열성 관련 대립유전자 분석

- 육묘기에 선발된 고온 스트레스 (45°C, 24h) 저항성 20 계통을 온실에 이식하여 증식 및 최종 4 개체 선발 후 AFLP를 이용한 유전분석 실시 (그림14-5).
- 내냉성 AFLP 분석과 동일한 방법으로 진행하여 polymorphic loci 분석하였으며 *in silico analysis* 분석

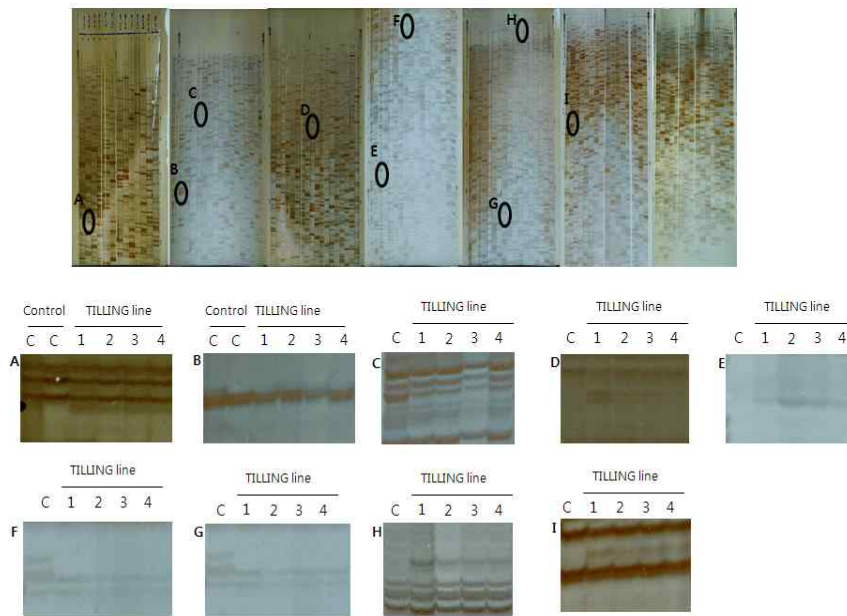


그림14-5. Primer 조합별 PCR 단편. Primer 조합은 EcoRI(E)/MseI(M), (A) E1M1, (B) E2M7, (C) E3M1, (D) E5M7, (E) E7M2 (F) E7M7, (G) E4M3, (H) E4M6, (I) E6M2. Lanes C; Dongan Lane, lane 1; 200-642, lane 2; 200-1142, lane 3; 300-206, lane 4; 300-221.

(3) 환경 스트레스 관련 중요 조절 유전자인 RING E3 ligase를 coding하고 있는 유전자들의 고온스트레스 매카니즘 분석을 위한 분자 생물학적 분석

- (가) 고온스트레스 저항성 유전자의 발현량을 분석하기 위해 RT-PCR을 실시. 총 48개의 RING E3 liagse를 coding 하고 있는 유전자들의 gene specific 한 primer pair를 제작 후 분석. 그 결과 고온 스트레스 처리 시 초기 (1 h)과 표현형의 변화가 생기는 시기 (48 h) 모두에서 강한 발현을 보이는 2개의 유전자 (*OsRINGH2-1*, *OsRINGH2-2*)를 선발하여 분자 생물학적 분석 (그림14-6).

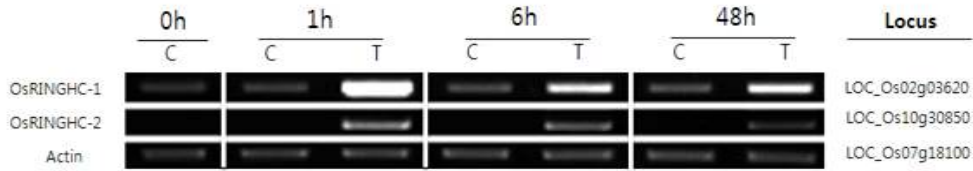


그림14-6. 고온스트레스에 강한 발현을 보이는 OsRINGHC-1, OsRINGHC-2 선발.

(나) 선발된 OsRINGHC-2의 세포내 기능을 유추하고 위치를 확인하기 위해, 식물용 binary vector 인 pBIN35S 를 이용하여 *35Spro: EYFP*를 제작, 이 vector를 이용하여 OsRINGHC- 2-EYFP fusion 단백질을 제작한 후 transient expression 방법을 이용하여 infiltration 함. 3일 후, confocal microscopy를 이용하여 담배의 표피세포 관찰 (그림 14-7, Jung et al. 2012).

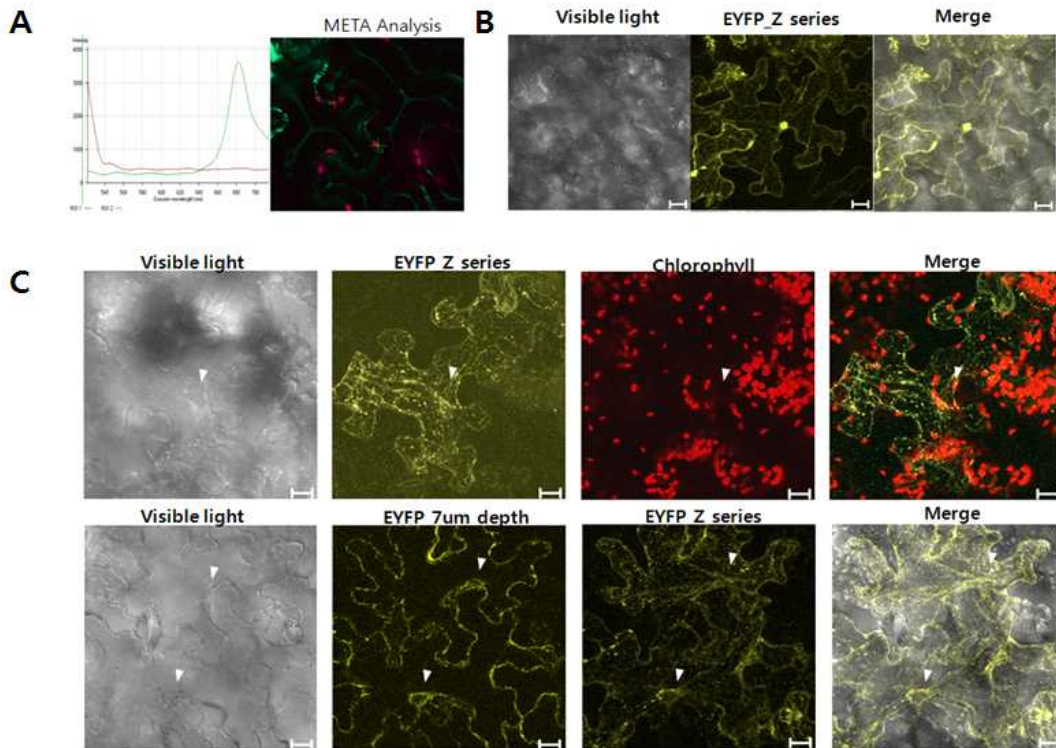


그림14-7. OsRINGHC-1-EYFP 의 세포내 골지체와 소포체에 punctate 한 형태로 존재. (A) META 분석을 통한 타겟 단백질의 현광 시그널과 자가현광 분석. (B) 세포질과 핵에서 발현하는 Empty-EYFP. (C) 세포질내에 punctate 한 골지체와 핵막 주위의 소포체에 높은 현광 시그널 관찰 (arrowhead marks ER surrounding the nucleus, scale bar = 20 μ m).

(다) 골지체에 위치한 OsRINGHC-2-EYFP fusion 단백질은 소포체에서 단백질이나 지질의 변형에 관여 할 것이라 예상되며, 매우 빠른 속도로 물질들을 세포내 또는 세포 밖으로 수송됨(그림14-8). 또한 세포내의 미세소관을 이용하여 독립적인 형태 또는 복합체를 이루는 형태를 반복하며 이동하는 것을 확인

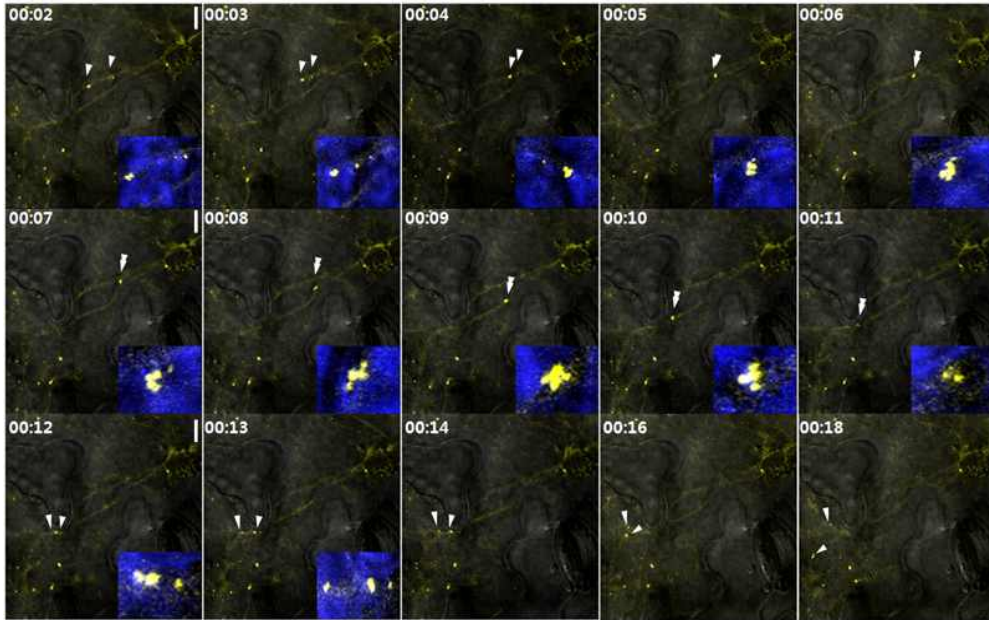


그림14-8. 시간대 별로 관찰 한 OsRINGHC-1-EYFP fusion 단백질의 세포내 위치 변화 (arrowhead marks Golgi, scale bar = 20 μ m).

(라) OsRINGHC-2 단백질과 상호 결합하는 단백질 파트너를 찾기 위해 벼 total RNA를 이용하여 library를 제작한 후 Yesat Two-Hybrid 기술을 이용한 screening 을 실시함. 1차 screening 시에 약 400개의 colony 들을 선발하여 2차 screening 을 실시하였으며, 선발된 21개의 유전자들을 cloning 하여 sequencing 진행 (그림14-9).

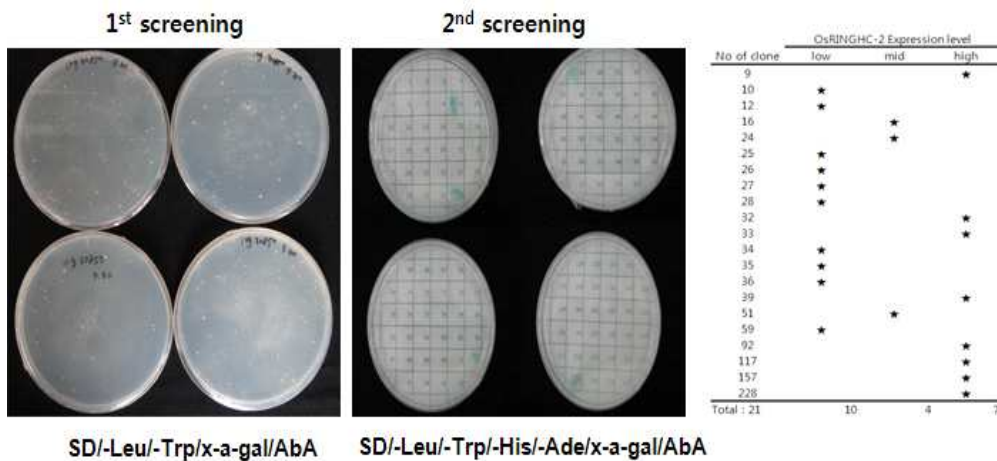


그림14-9. Yeast Two-Hybrid system을 이용한 OsRINGHC-2 단백질의 library screening

(3) 내열성 관련 유전자 분석

(가) 구축된 microarray expression database를 이용, 고온 관련 유전자군 선발

- Database를 이용, 네트워크 분석을 통해 고온 스트레스에 유도되는 DEG 유전자 군을 선발, 최상위에 속한 10개의 heat stress inducible 유전자를 선발 (표 14-3, Ham et al., 2013).

표14-3. 고온 스트레스에 관련된 10개 유전자의 expression profiles.

Gene	Annotation	Biological process	Probe	Stress					
				Drought	Salt	Heat	Cold	Chilling	Anoxia
LOC_Os04g01740	Heat shock protein 82	Response to stress	Os.11039.3.S1_at	-0.068033	0.0834544	9.3701755	0.0285698	-0.295464	0.1186847
			Os.11039.1.S1_s_at	-0.444304	-0.154966	9.2760619	-0.483441	-0.05702	-1.503176
			Os.11039.2.S1_x_at	-0.023625	0.1351138	6.7102431	0.0037391	0.0532671	-0.89564
			Os.49651.1.S1_s_at	-0.207804	-0.150653	6.3983548	-0.121469	-0.365937	-0.160575
LOC_Os04g28420	Peptidyl-prolyl isomerase	unknown	Os.25639.1.S1_at	2.1859712	2.2516071	8.1333019	2.4615295	-0.496938	2.3083797
LOC_Os03g16030	Hsp20/alpha crystallin family protein unknown	unknown	Os.37773.1.S1_at	0.7439881	2.8581003	6.5832049	1.0343494	-0.290815	3.9579664
			Os.37773.1.S1_x_at	0.9212522	2.7839907	6.4929288	1.1014386	-0.027482	3.6724678
LOC_Os01g04380	Hsp20/alpha crystallin family protein unknown	unknown	Os.4775.1.S1_at	-0.187113	0.6117814	6.7789321	0.4515514	3.0965916	-0.078592
LOC_Os03g14180	Hsp20/alpha crystallin family protein unknown	unknown	Os.8926.1.S1_at	-0.049748	-0.171784	8.8147488	-0.017937	-0.024309	2.1592272
LOC_Os04g06590	Expressed protein	unknown	OsAffx.25891.1.S1_at	3.3471356	0.9308196	6.5143965	0.1226745	-0.29316	1.7488228
			Os.26930.1.S2_x_at	1.0916637	0.1535678	5.7564836	0.3393368	-0.1106	1.317163
LOC_Os05g06920	RelA-SpoT like protein RSH4	unknown	Os.16903.1.A1_at	-1.325874	-1.010719	5.4825781	-1.348698	-2.424241	-5.476094
LOC_Os12g25200	Chloride transporter	Chloride transport	Os.27207.1.S1_at	-0.190577	0.0698422	5.1407532	1.335959	-1.921081	-1.026699
LOC_Os01g03360	BBTI5	unknown	Os.37729.1.S1_s_at	0.9078103	0.7134254	5.5520827	-0.220092	0.1444057	-1.135623
LOC_Os02g15930	Expressed protein	unknown	Os.51778.1.S1_at	0.6448199	0.6574683	5.1523365	0.8340736	1.8931467	0.5239581

- 선발된 대량의 DEG 유전자군을 대상으로 biological pathway를 분석 (그림14-10).

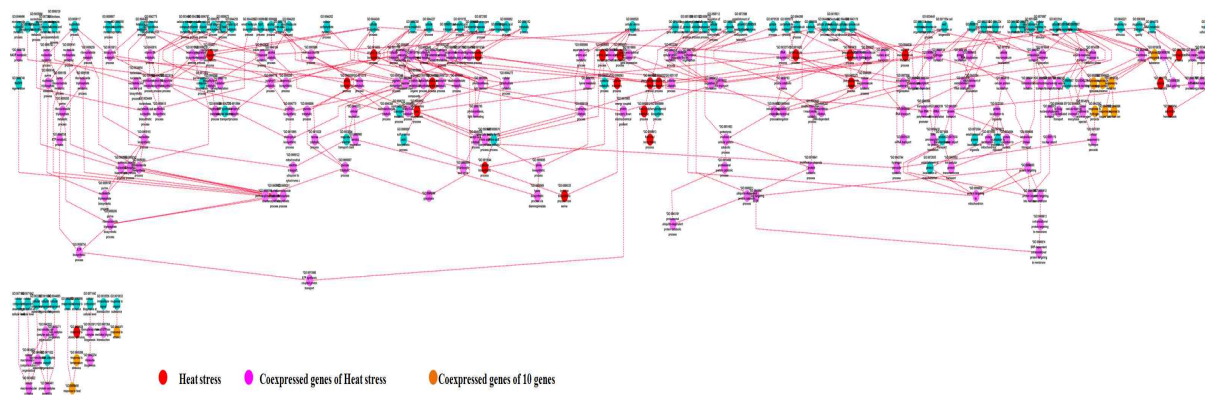


그림14-10. Heat stress via co-expressed 분석을 이용하여 고온 스트레스에 up-regulate되는 유전자의 biological pathway

(나) 내열성 관련 유전자의 분자생물학적 기능 탐색

- ① 고온에 관련된 10개의 유전자 중 4개의 Heat-stress inducible gene을 선발, 고온 inducible gene에 대한 다양한 abiotic stress 및 phytohormone 처리, RT-PCR 분석을 수행하여 내열성 관련 유전자들의 발현 패턴 비교 분석: Heat에서 유도되는 유전자들은 Salt, Drought, ABA에서도 발현이 증가됨을 확인하였으며 다양한 스트레스와 관련이 되어 있을 것으로 예상 (그림 14-11, Ham et al., 2013).

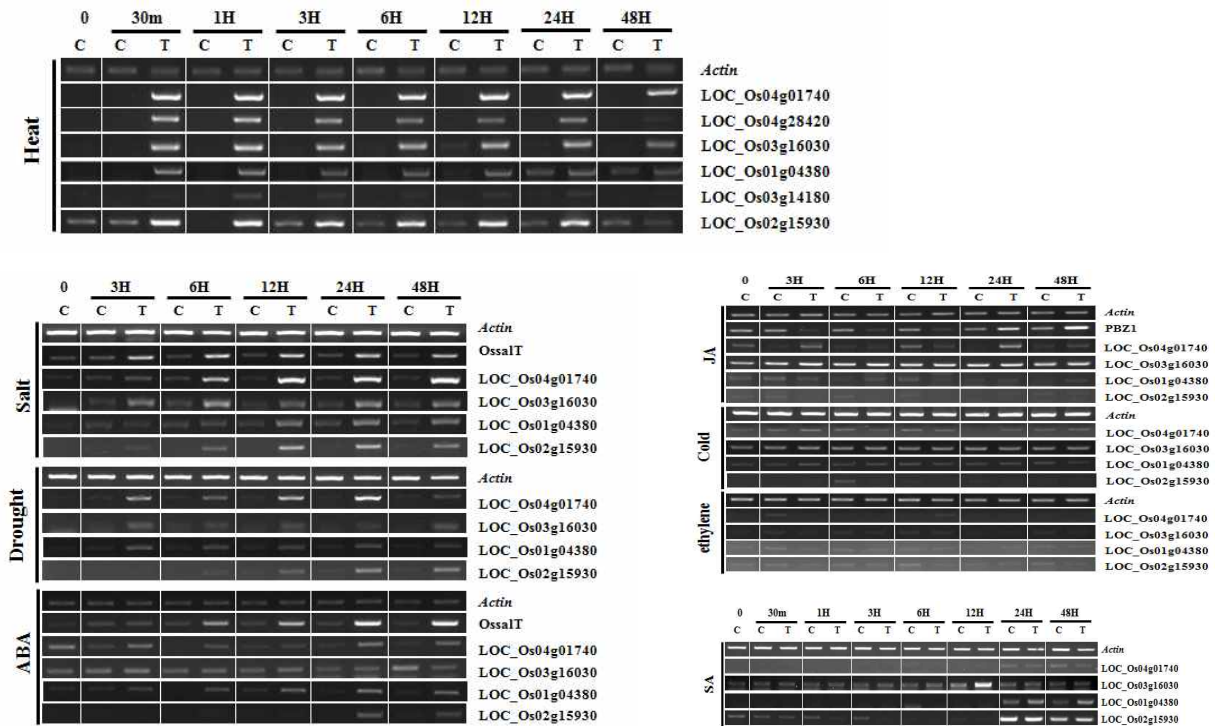


그림14-11. 다양한 abiotic stress 및 phytohormone 처리에 의한 동안벼(wild type plant) 내열성 관련 유전자 발현 양상 비교.

② 선발된 내열성 유전자의 식물 세포내 기능의 유추를 위해 vector 제작 및 세포내 유전자 위치 확인

- 식물용 binary vector인 pBIN35S를 이용하여 35Spro:EGFP를 제작함. 이 vector를 이용하여 선발된 3개 Heat-inducible gene의 GFP fusion protein을 제작하여 식물세포상 위치 분석 결과 Heat shock protein (HSP) 은 핵과 세포질에 위치하며 세포내 항상성에 관련할 것으로 예상됨 (그림14-12, Ham et al., 2013; Moon et al., 2013).

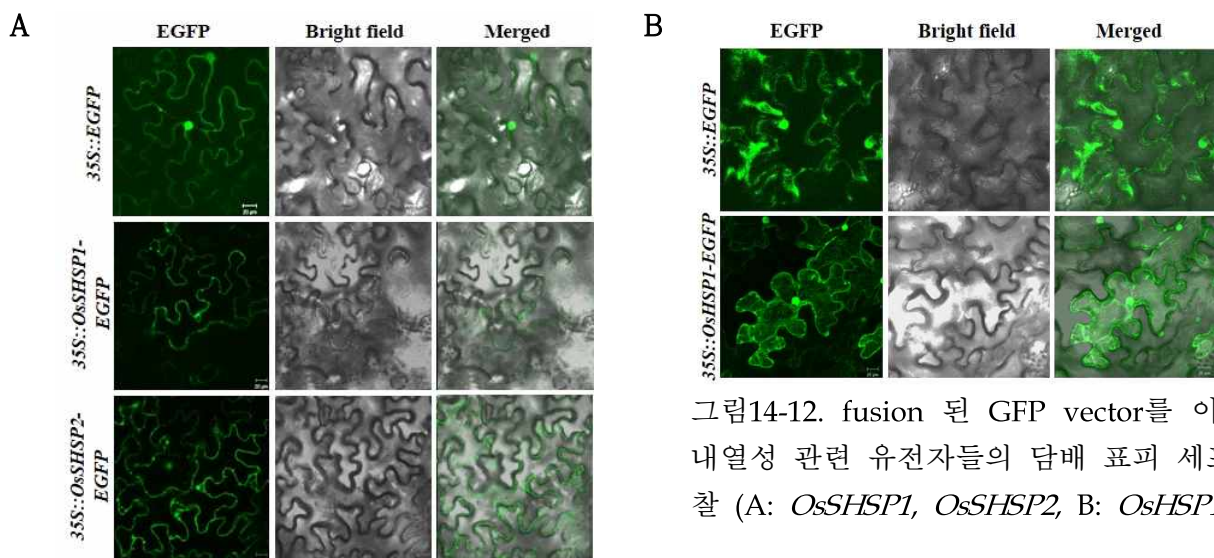


그림14-12. fusion 된 GFP vector를 이용한 내열성 관련 유전자들의 담배 표피 세포 관찰 (A: *OsSHSP1*, *OsSHSP2*, B: *OsHSP1*).

- Basal treatment (38°C) 및 acquired treatment (45°C) 후 온도 변화에 따른 내열성 유전자의 세포내 위치 변화는 확인되지 않음 (그림14-13, Moon et al., 2013).

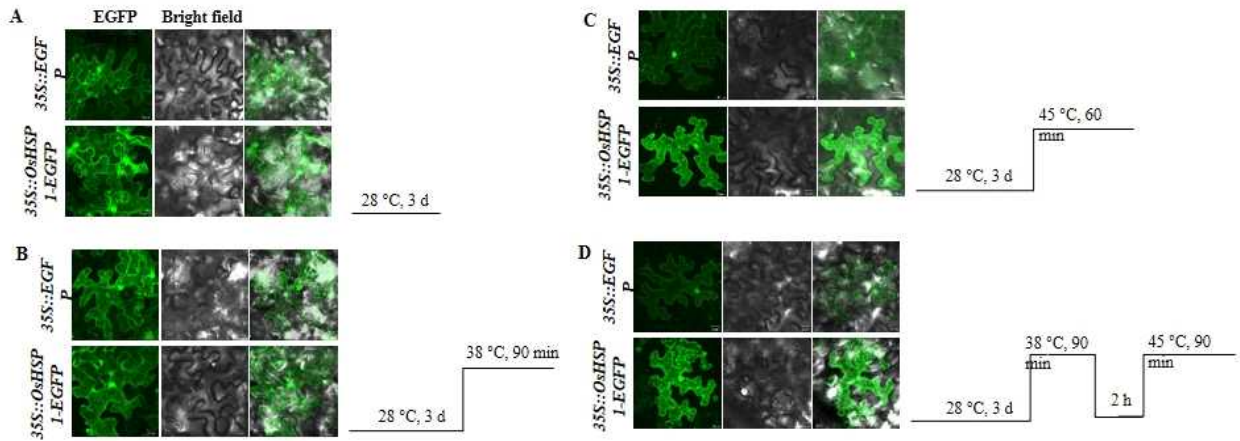


그림 13. 열처리 후 내열성 유전자의 세포내 위치 변화 (A: 무처리. B: basal treatment (38°C), C: basal treatment (45°C), D: acquired treatment)

③ 내열성 관련 유전자가 fusion 된 vector를 Arabidopsis 식물체에 도입하여 고온 및 abiotic stress에서의 발현 양상 분석

- 과발현 형질전환체를 받아시켜 열처리를 통하여 열내성을 확인한 결과 내열성 관련 유전자가 도입된 형질전환체는 대조구에 비해 생존율이 높았음 (그림14-14, Ham et al. 2013). 또한 과발현 형질전환체의 종자를 열처리하여 발아율을 확인한 결과 역시 내열성 관련 유전자가 도입된 형질전환 종자에서 대조구에 비해 발아율이 유의성 있게 높음을 확인 (그림14-15, Moon et al., 2013).

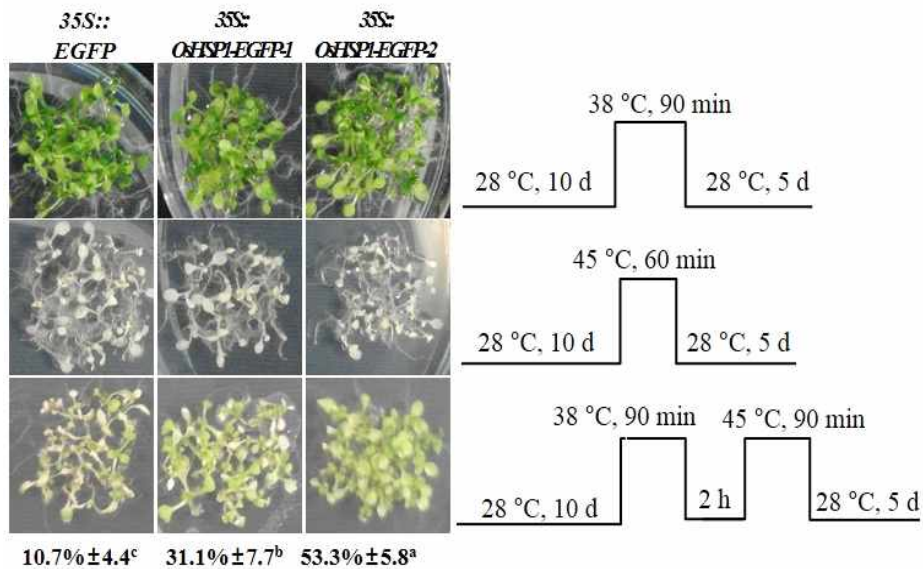


그림14-14. 고온 처리 후 과발현 형질전환체의 열내성 확인.

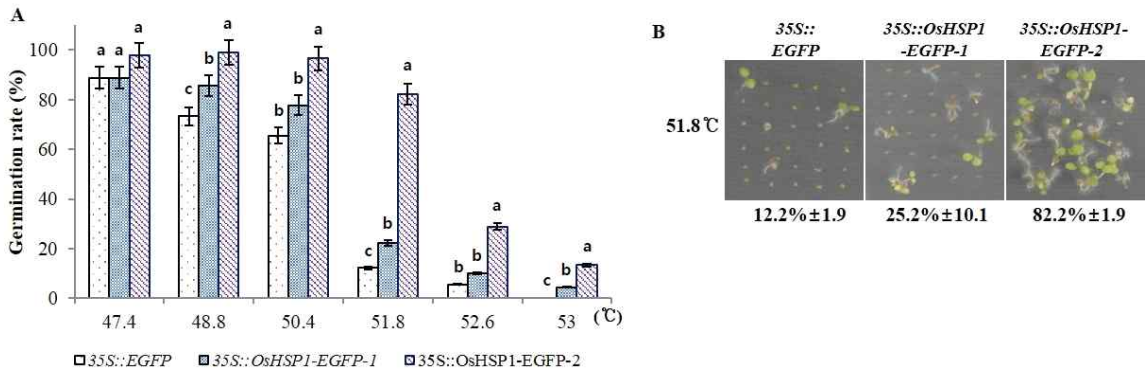


그림14-15. 종자에 열처리 후 과발현 형질전환체의 발아율 확인.

- 내열성 관련 유전자의 염 및 한발에 대한 발현 양상을 확인하기 위하여 과발현 형질전환체를 NaCl 및 PEG가 포함된 배지에서 발아율과 뿌리 성장율을 확인한 결과 무처리구에 비해 발아율 및 뿌리 성장율이 유의성 있게 낮음을 확인함 (그림14-16, Moon et al., 2013).

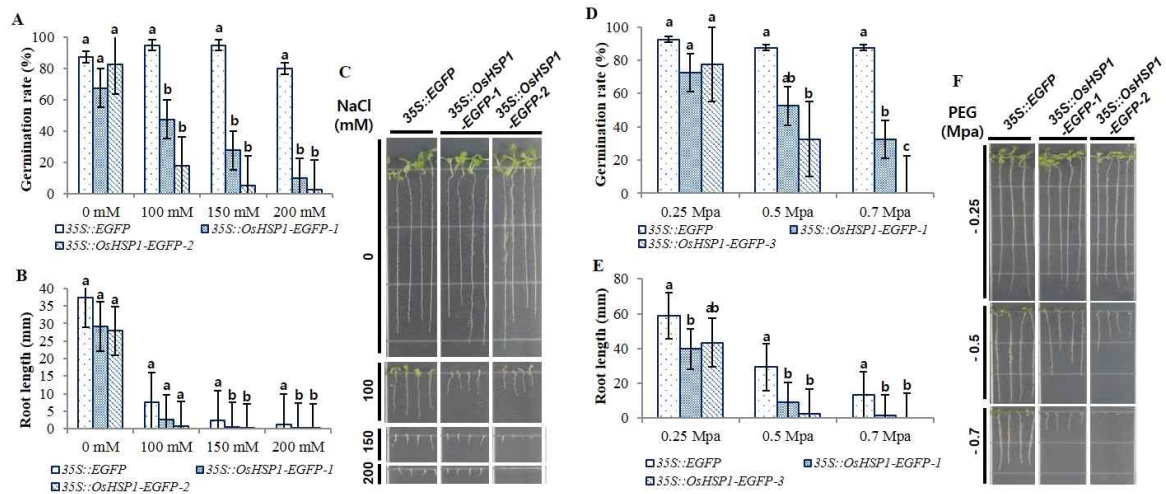


그림14-16. 염 및 한발 스트레스에 대한 과발현 형질전환체의 발현 양상 확인.

(다) 고온에 유도되는 OsRINGHC-1(Os10g30850) 유전자 분석

① Abiotic 스트레스에 대한 OsRINGHC-1 (Os10g30850)의 mRNA 발현양상

- 고온 스트레스에 민감하게 발현양이 증가하는 OsRINGHC-1 유전자의 transcript level을 다양한 abiotic 스트레스를 처리(그림14-17). 발아 후, 3주된 벼를 이용하여 염, 건조, 저온 스트레스를 처리하여 시간대 별로 샘플링하여 total RNA를 추출 후 RT-PCR을 수행; 이전 연구결과와 동일하게 고온 스트레스에서 1시간 이후부터 대조군과 비교 시 높게 발현하며, 저온 스트레스 처리시 12 시간 이후 발현양이 크게 증가하였다. 염, 건조 스트레스에서의 발현양이 대조군과 크게 다르지 않는 것을 참고했을 때, OsRINGHC-1이 온도 변화에 민감하게 증가하는 것이라 예상됨 (Jung et al., 2012).

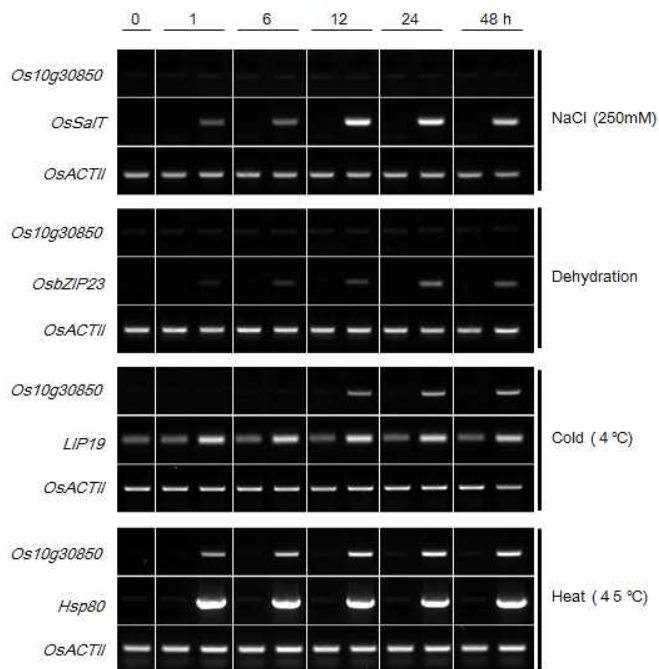


그림14-17. Abiotic 스트레스에 대한 OsRINGHC-1의 mRNA 변화 양상

② OsRINGHC-1 단백질의 세포내 위치 확인

- 온도에 민감하게 증가하는 *OsRINGHC-1* 단백질의 세포내 기능을 유추하고 확인하기 위해, OsRINGHC-1-EYFP 단백질을 CaMV 35S promoter를 이용하여 담배잎에서 과다 발현시켜 공초점현미경으로 관찰함. 골지체에 위치하는 것을 확인하였으며, 이를 증명하기 위해 ABRC (www.arabidopsis.org)에서 G-rk-mCherry 마커를 분양받아 OsRINGHC-1과 co-infiltration 하여 관찰 (그림14-18). 세포내에서 핵 주위를 둘러싸고 있는 모양과 작은 spot들이 OsRINGHC-1과 골지마커가 정확히 일치 하였으며, 이를 통해 OsRINGHC-1이 골지체에 위치한다고 판단됨.

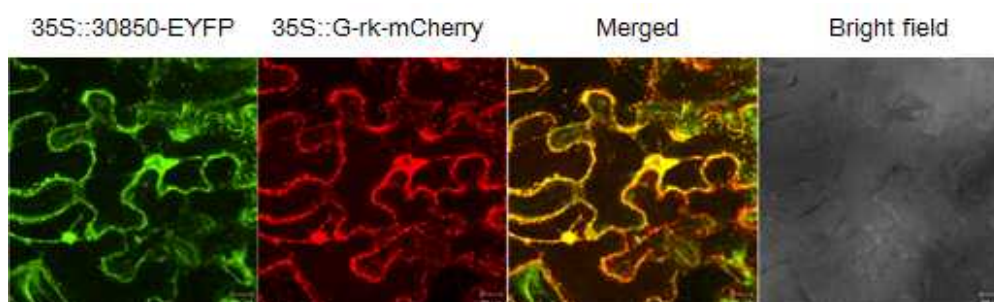


그림14-18. OsRINGHC-1-EYFP 의 골지체내 위치. OsRINGHC-1-EYFP와 G-rk-mCherry 두 개의 constructs를 아그로박테리움을 이용하여 담배잎에 co-infiltration 한 뒤, 3일 후 공초점현미경을 이용하여 시그널을 관찰하였으며 Z-stack image는 3D projection을 이용하여 visualization 시킴.

③ BiFC 기술을 이용한 OsRINGHC-1 단백질과 상호 결합하는 단백질 증명

- RING E3 ligase로 예상되는 OsRINGHC-1과 상호 결합하는 단백질을 탐색하기 위해 Yeast Two hybrid (Y2H) screen을 실시하였고, 총 22개의 positive한 클론들을 얻었으며, yeast로부터 plasmid 동정과 PCR을 통해 sequence를 분석하여 OsRINGHC-1과 상호결합 할 것이라 예측되는 후보유전자를 선별함. 이 들 중 Y2H screen을 통해 α -gal activity가 강한 8개의 후보유전자들을 재선발해 Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) assay를 실시하였다. 총 8개의 유전자 (Os01g59600; T1 family, Os02g55140; leucine aminopeptidase, Os03g53800; periplasmic beta-glucosidase, Os04g41570; ethylene-responsive protein, Os05g02770; glycine-rich cell wall structural protein, Os07g48510; thioredoxin, Os11g06390; actin, Os11g34450; 14-3-3)를 35S:SPYNE(R) vector에 각각 클로닝하였으며, OsRINGHC-1은 SPYCE(M) vector에 클로닝 후 담배잎에 co-infiltration 함. 총 8개의 후보자 유전자들 중 6개의 유전자들이 YFP 시그널을 관찰했으며 이를 통해 OsRINGHC-1과 최소 6개의 단백질들이 세포질과 핵에서 상호결합을 하는 것을 증명함(그림14-19, Lim et al., 2013).

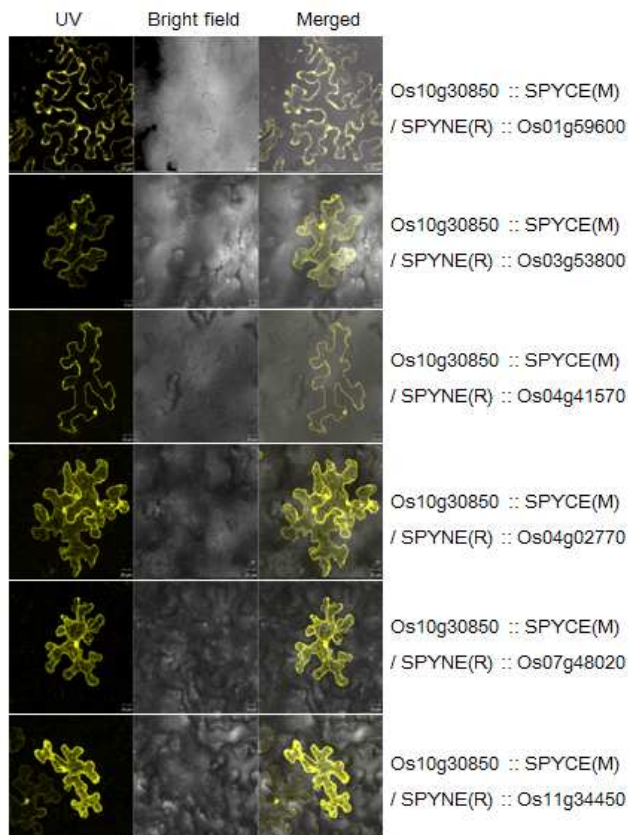


그림 19. OsRINGHC-1 단백질과 세포질과 핵에서 상호결합하는 8개의 단백질 확인.

④ OsRINGHC-1 단백질과 상호결합하는 단백질의 세포내 위치확인.

- 상호결합이 확인된 6개의 단백질들의 세포내 위치를 확인하기 위해 각 단백질들을 DsRED2 단백질을 태깅하여 CaMV 35S promoter를 이용하여 담배잎에서 과다 발현시켜 공초점현미경으로 관찰함. 그림 14-20와 같이, Os01g59600은 핵과 세포질, Os03g53800, Os04g41570, Os05g02770은 핵에서만, Os07g48020은 퍼옥시좀, Os11g34450은 세포질과 골격에 위치하였으며. 이 결과를 BiFC 결과와 비교했을 때,

Os03g53800, Os04g41570, Os05g02770의 단백질 단독으로는 핵에 위치하지만 OsRINGHC-1과 상호결합 시 세포질로 translocation되는 것을 확인하였으며 이를 확인하기 위한 추가 실험이 필요로 할 것이라 사료됨 (Moon et al., 2013).

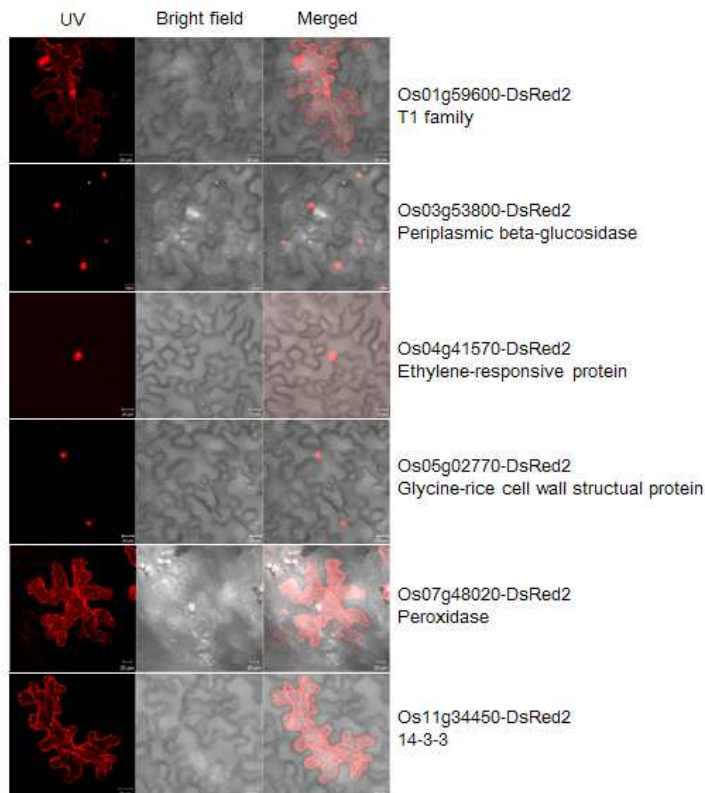


그림 20. OsRINGHC-1 단백질과 상호결합하는 8개 단백질들의 세포 내 위치 확인.

- ⑤ *OsRINGHC-1*과 상호작용하는 유전자들의 다양한 stress 상에서 발현양상 분석
 - 상호작용 유전자들의 다양한 stress 처리시 유전자의 발현양상을 비교 분석함 (그림 14-21).

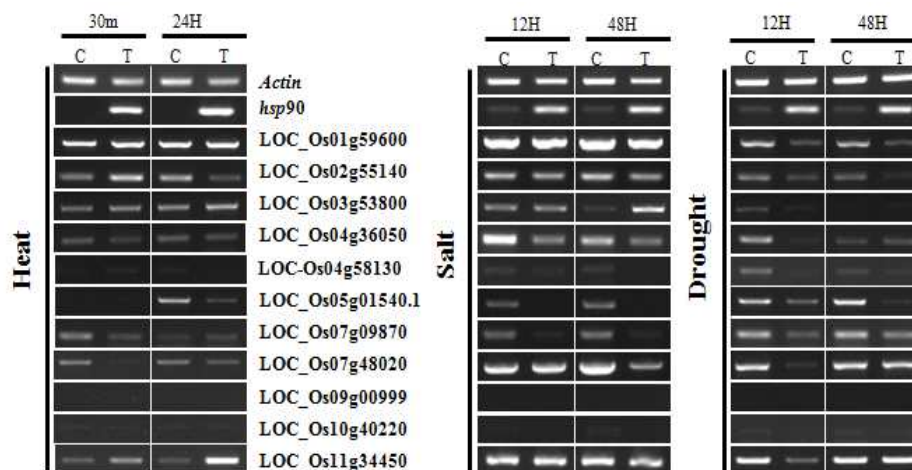


그림14-21. *OsRINGHC-1* interaction gene에 대한 Heat, Salt, Drought 처리에 의한 유전자 발현 양상 비교

(라) 고온에 유도되는 OsHCI1 (Os10g30850) 유전자 분석

① OsHCI1 단백질의 세포내 위치 확인

- 온도에 민감하게 반응하는 OsHCI1 단백질의 세포내 기능을 유추하고 확인하기 위해 CaMV 35S promoter를 이용하여 담배 및 벼의 원형질체에서 과다발현시켜 공초점현미경으로 관찰함 (그림14-22). 그 결과 OsHCI1 단백질은 담배잎과 벼의 원형질체에 주로 골지체에 위치하여 다양한 기능을 할 것으로 판단함 (Lim et al., 2013)

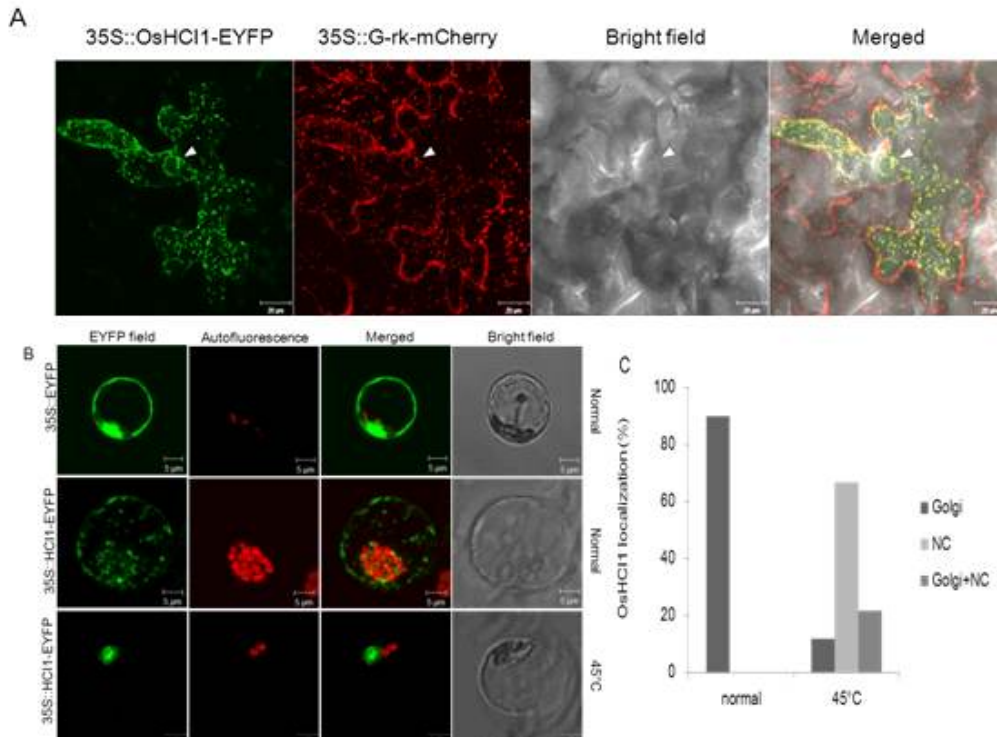


그림14-22, OsHCI1-EYFP의 세포내 위치. A) OsHCI1-EYFP와 G-rk-mCherry 두 개의 constructs를 아그로박테리움을 이용하여 담배잎에 co-infiltration 한 뒤, 3일 후 공초점현미경을 이용하여 시그널을 관찰하였으며 Z-stack image는 3D projection을 이용하여 visualization 시킴. B, C) OsHCI1-EYFP를 PEG-CaCl₂ 시약을 처리하여 벼의 원형질체로 형질전환 시킨후 24 시간 뒤에 공초점 현미경을 통해 관찰. 분석된 자료를 바탕으로 세포내 위치를 그래프화함.

② OsHCI1 단백질과 상호결합하는 단백질들의 기능 분석

- 연구 결과를 통해 Invivo 상에서 상호 결합하는 것으로 판단된 유전자들이 OsHCI1 단백질의 RING domain 부분에서 강하게 결합하는 것을 Yeast system을 통해 검증됨 (그림 23A). RING domain의 주요 기능인 단백질 분해 기능을 증명하기 위해 ubiquitin assay 분석을 실시하였으며 OsHCI1 단백질의 RING domain이 상호결합 단백질 상에 ubiquitin 체인을 형성하였고 이를 통해 단백질 분해를 야기하는 것으로 판단함 (그림 14-23B, Lim et al., 2013).

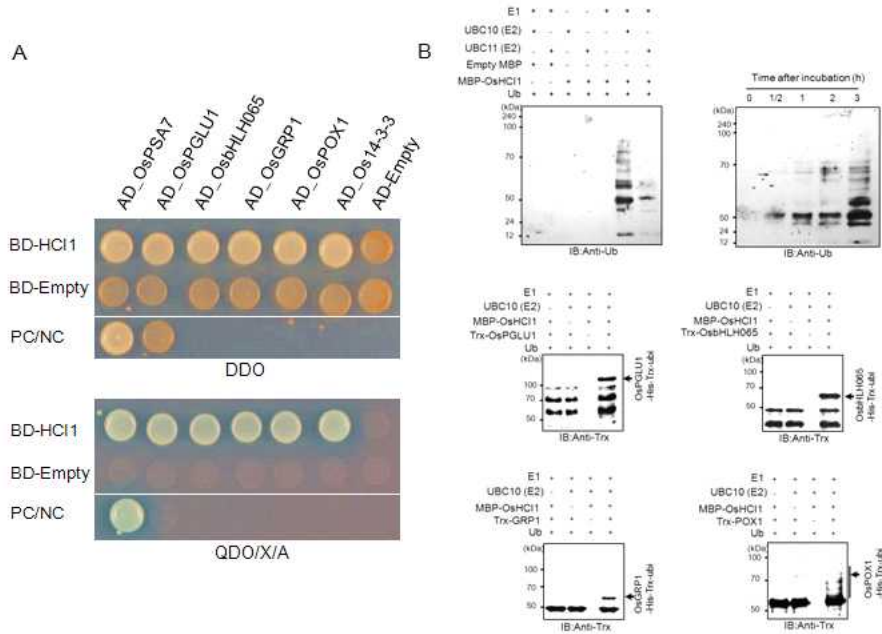


그림14-23. OsHCI1 단백질과 상호결합하는 유전자들에 대한 Invitro assay.

③ 형질전환 식물체를 이용한 OsHCI1 유전자와 고온과 관계 증명

- 과발현되는 OsHCI1 단백질과 상호결합하는 단백질들을 cotransformation 하여 벼의 원형질체와 담배로 형질전환 시킨 후 고온(45°C)을 처리하여 세포내에서의 위치 변화를 확인해 본 결과 핵에만 존재하던 상호 결합 단백질 군들이 OsHCI1 유전자가 위치하는 골지체로 이동하는 양상을 보였음 (그림14-24). 이를 통해 식물 세포내에서 고온이 미치는 양상을 유추할 수 있음 (Lim et al., 2013).

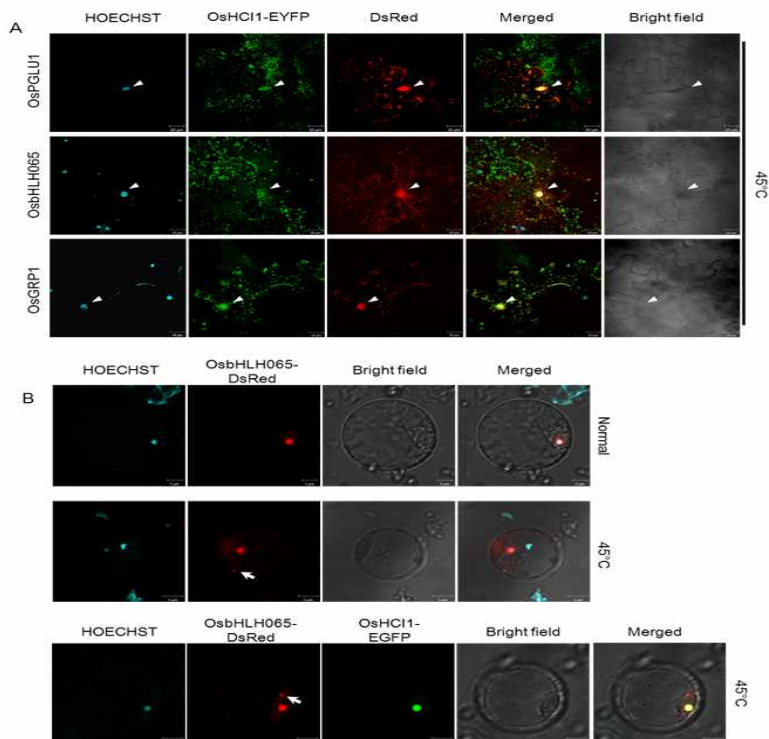


그림14-24. 세포에 고온 처리시 OsHCI1 단백질의 위치변화 규명.

- OsHCl1 단백질이 과발현되는 애기장대 식물을 이용하여 고온에서의 저항성을 검정하였으며 OsHCl1 유전자가 과발현되는 형질전환체가 벡터만 삽입된 식물체보다 강한 저항성을 보였음(그림14-25). 이와 같은 사실들로 토대로 OsHCl1 유전자는 mRNA 및 단백질상에서 고온과 민감하게 반응하며 OsHCl1 유전자를 통해 고온 내성을 획득할 수 있음을 제시함 (Lim et al., 2013).

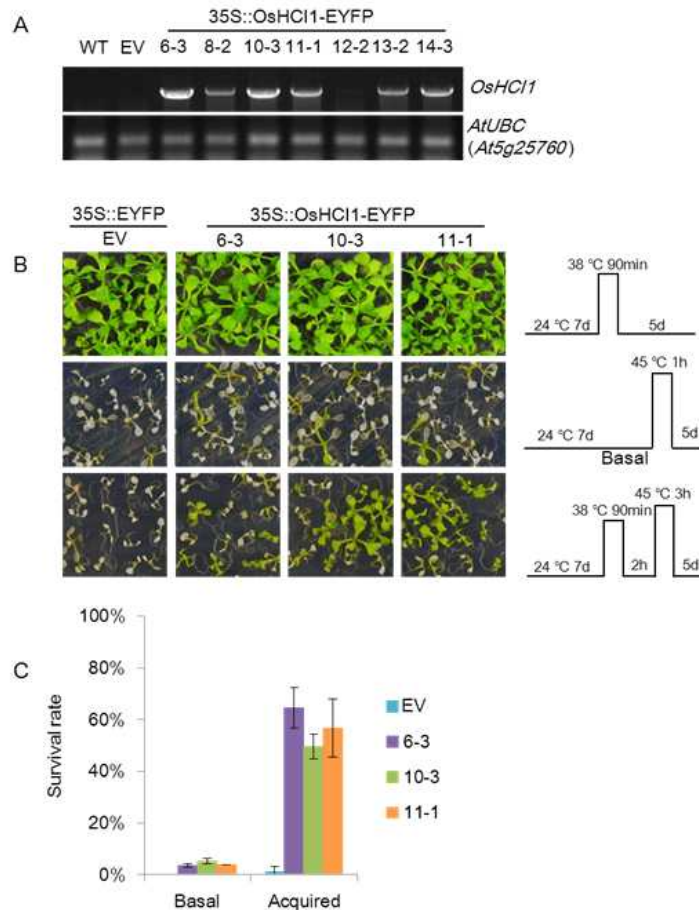


그림14-25. 과발현 OsHCl1 유전자가 삽입된 형질전환체를 통한 고온 내성 검정. A) 과발현 형질전환체 선발을 위한 RT-PCR B) 고온 처리에 대한 저항성 검정 C) 고온에 대한 생존률 검정.

④ OsHCl1 유전자와 식물 호르몬인 ABA와 연관성 분석

- 식물이 환경스트레스에 대처하기 위한 방어기작은 식물호르몬인 ABA와의 관계성에 따라 ABA 의존적/비의존적 경로로 이루어짐. 따라서 OsHCl1 단백질과 ABA와의 연관성을 규명하기 위해 형질전환 식물체를 이용하여 다양한 ABA 검정을 실시함(그림 14-26). 그 결과 OsHCl1 유전자는 ABA와 연관성이 무관였으며 이는 OsHCl1 단백질에 의한 고온 환경에서 식물의 저항성 획득은 ABA 비의존적인 경로를 통해 이루어진다고 판단됨 (Lim et al., 2013).

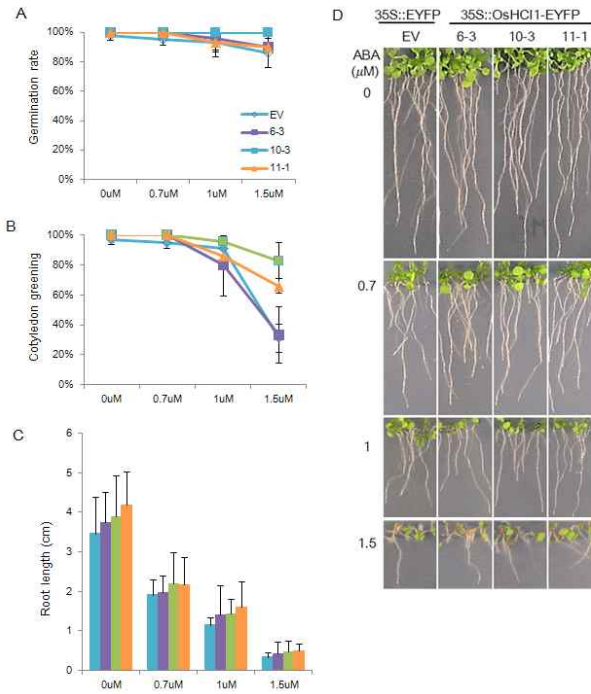


그림14-26. OsHCl1 과발현 형질전환체와 ABA와의 관계 규명. A-B 실험은 발아 후 4일차에 측정하였으며 C-D의 뿌리 길이 측정은 발아 후 1 주일 뒤에 측정함. 모든 실험은 3반복으로 진행함.

(5) 내냉성 관련 유전자 분석

(가) 내냉성 돌연변이 후대검정 및 내냉성 대립 유전 인자 고정을 위한 세대진전

- 이전 연구 결과에서 선발된 40 계통의 후대인 M₃ 내냉성 돌연변이체를 대상으로 저온수 내성 검정; 출아 후 3엽기가 된 어린 유묘에 10-12℃ 저온수를 유입하여 12일간 처리, 돌연변이 원종(동안벼)과 phenotype 비교를 통해 우수한 내성을 가진 M₄ 돌연변이 30 개체를 선발(엽색, 엽이 신장 우수 등) 및 대립 유전인자 고정을 위해 세대진전 (M₄->M₅) (표14-4, 그림14-27).

표14-4. 내냉성 우수 M₄ 돌연변이 계통들의 형태적 특성

No	Type	M. TILLING lines	294(mm)	334(mm)	L.A	Score
A ⁺ -average	WP	Dongganyeo	3.87	1.4	0.12	2.4
	TP		2.36	1.56	0.26	4.03
1		B_200-0082-2_1	2	0	0.3	4
2		C_200-0082-2_5	3	3	0.4	4
3		C_200-0082-3_3	12	1	0.2	4
4		B_200-0087-3_3	2	0	0.1	4
5		A_200-0088-1_2	1	1	0.4	4
6		A_200-0088-1_3	4	1	0.5	4
7		A_200-0088-1A_5	2	3	0.2	4
8		A_200-0088-2_5	1	0	0.4	4
9		B_200-0088-2B_1	1	0	0.2	4
10		A_200-0088-3_3	1	0	0.1	4
11		B_200-0088-3_2	1	1	0.1	4
12		B_200-0088-3_5	0	1	0.2	4
13		C_200-0088-3_3	4	8	0.1	4
14		C_200-0088-3_2	2	2	0.1	4
15		A_200-0088-4_3	9	0	0.2	4
16		A_200-0088-5_1	1	0	0.4	4
17		A_200-0088-5_4	1	0	0.4	4
18		B_200-0458-10_2	0	0	0.1	4
19		B_200-0458-10_3	0	2	0	4
20		A_200-0458-3_3	0	2	0.5	4
21		A_200-0458-5_3	1	2	0.4	4
22		A_200-0627-3_3	9	13	0.1	4
23		B_200-0627-3_4	4	2	0.1	4
24		B_200-0627-3_5	0	3	0.1	4
25		A_200-0700-2_3	0	0	0.2	4
26		A_200-1281-2_3	1	1	0.4	4
27		A_200-1300-3_5	0	1	0.4	4
28		A_200-1305-1_5	1	0	0.1	4

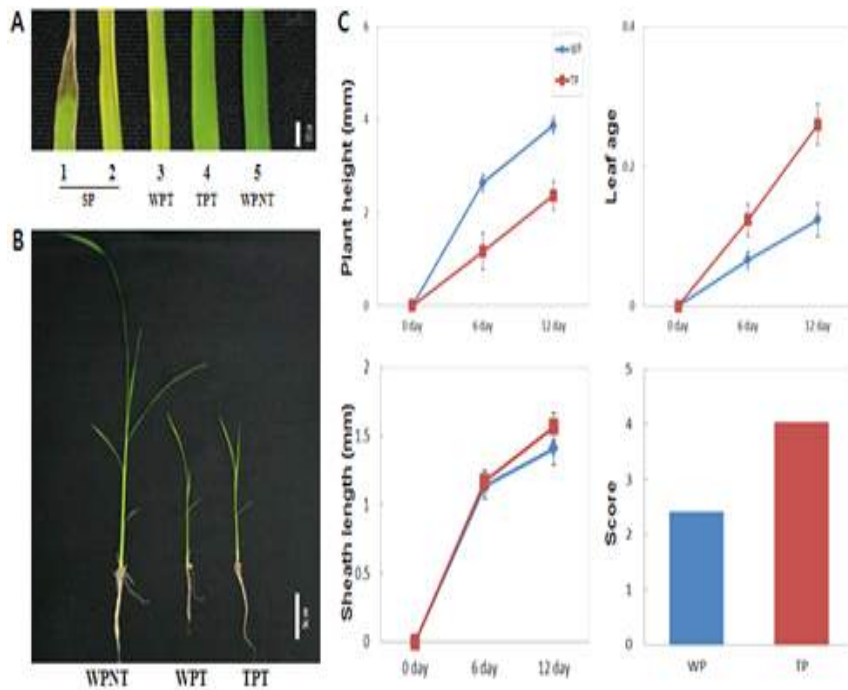


그림14-27. 선발된 내냉성 돌연변이 계통과 원종과 비교분석. A)내냉성 검정지표. B) 대조군과 처리구 간의 형태적 비교. C) 12일간의 초장, 엽령, 엽이 변화 및 내냉성 검정 score 값 비교

- 국립식량과학원 춘천출장소(내냉성시험장)에서 저온수 내성 품종인 설악벼와 열성 품종인 샛별벼를 분양받아 9°C 성장 조절상을 이용하여 저온 내성을 검정함. 그 결과 저온 처리 9일만에 열성 품종인 샛별벼는 잎이 고사하였고 내성 품종인 설악벼와 돌연변이 원종인 동안벼는 저항성을 보였음. 생리적인 검증을 위하여 Electrolyte leakage 분석을 실시하였고 형태적인 결과와 마찬가지로 실험 9일차의 샛별 품종에서 많은 전해질이 유출됨을 확인할 수 있었음(그림14-28).

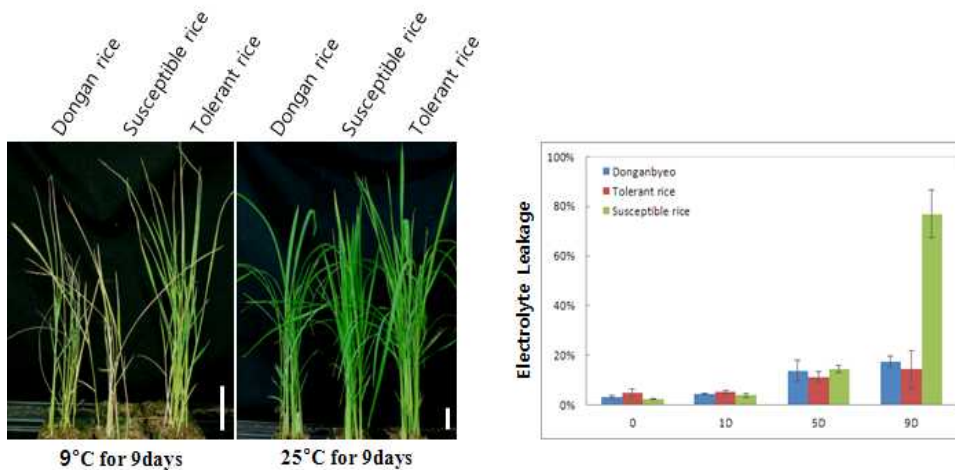


그림14-28. 9°C 성장 조절상을 이용한 다양한 벼 품종의 내냉성 검정

(나) 내냉성 관련 유전자에 대한 분자생물학적 분석

- 돌연변이 원종(동안벼)과 내냉성 계통을 대상으로 Salt, Drought, ABA를 처리, RT-PCR을 수행하여 내냉성 관련 유전자들의 발현 패턴 비교 분석함; 다양한 stress signaling에 관여하는 ABA 호르몬과 주요 환경 stress인 Salt, Drought에서 내냉성 돌연변이체에서만 특이적으로 유전자의 발현 양상이 증가함을 확인(그림14-29).

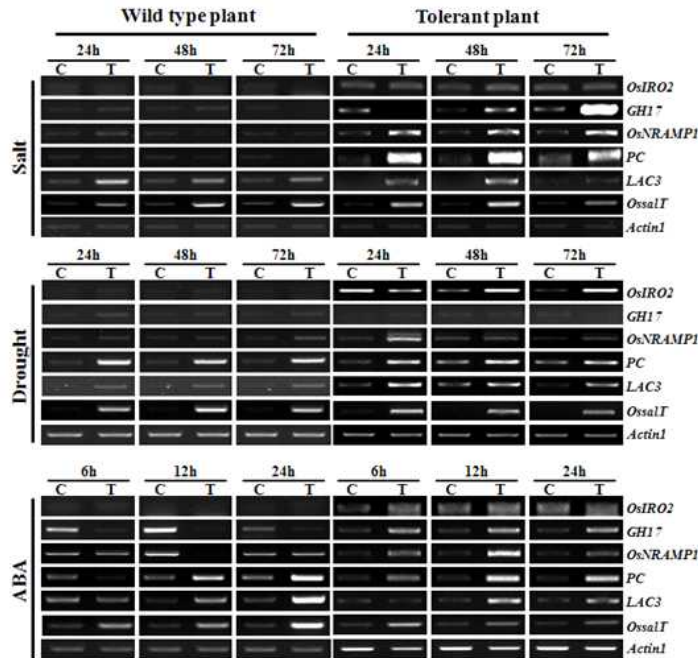


그림14-29. 다양한 abiotic stress 및 ABA 처리에 의한 동안벼(wild type plant)와 내냉성 계통간의 내냉성 관련 유전자 발현 양상 비교.

- 돌연변이 원종(동안벼)과 내냉성 계통간의 유전적 비교 분석; 상이한 발현 패턴을 보인 DEG 유전자들을 대상으로 genomic DNA를 비교 분석하였으나 sequence 상의 변화는 없었음. 상위 promotor 상에서의 유전적 변화로 인해 mRNA 전사양상이 차이를 보인 것으로 유추됨 (그림14-30).



그림14-30. 내냉성 관련 유전자 중 하나인 PC(Plastocyanin-like domain containing protein) 유전자에 대한 동안벼와 내냉성 계통간의 유전 분석. A) Gel 상에서 Genomic DNA 비교 B) Genomic DNA의 sequence 분석

- 선발된 내냉성 유전자의 식물 세포내 기능 유추를 위한 vector 제작 및 세포내 유전자

위치, 형질전환체 제작; 식물용 binary vector인 pBIN35S를 이용 35Spro;EGFP를 제작함 (그림 14-31). 이 vector를 이용하여 내냉성 관련 유전자 OsIRO2, GH17, OsNRAMP1, PC, LAC3들의 GFP fusion protein을 제작하고, 식물세포상 위치를 확인 (ER; Endoplasmic Reticulum, cytoplasm, plasma membrane) (그림 14-33, 34). 내냉성 관련 유전자가 fusion된 vector를 Arabidopsis 식물체로 도입, 내냉성 관련 유전자의 기능 유추를 위해 과발현되는 형질전환체를 제작하고 다양한 abiotic stress 검정 (그림 14-32).

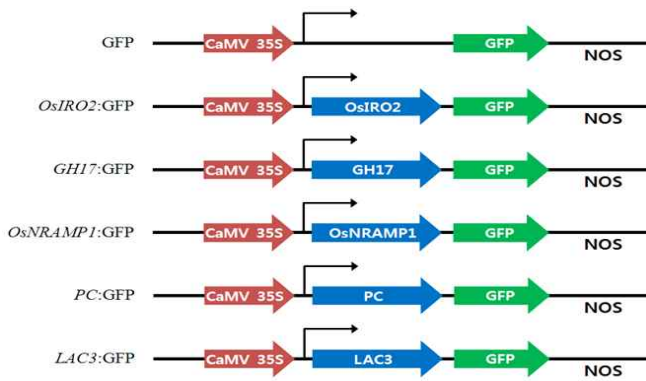


그림14-31. GFP fusion protein vector 구조.

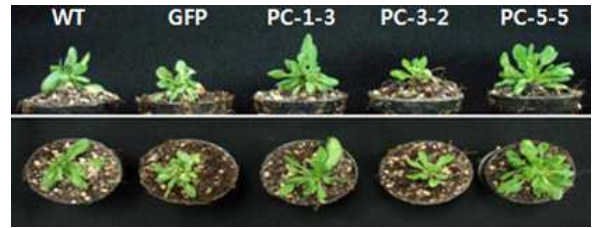


그림14-32. PC:GFP vector가 도입된 T3 세대의 Arabidopsis 형질전환체.

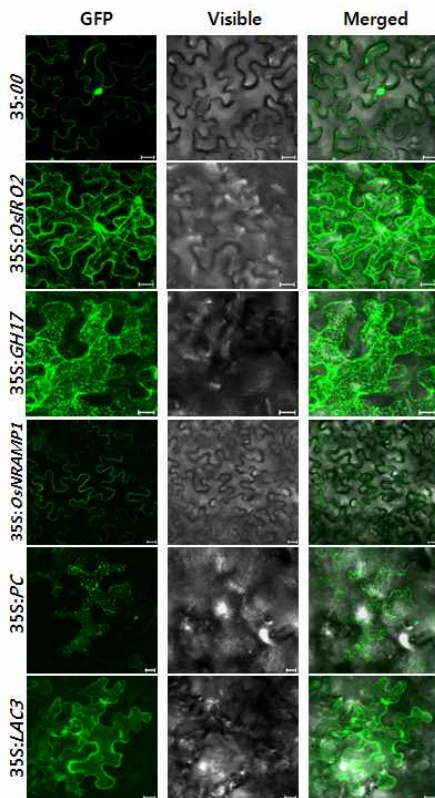


그림14-33. 내냉성 관련 유전자들과 fusion된 GFP vector를 이용한 담배 표피 세포 관찰(scale bar = 20 μ m).

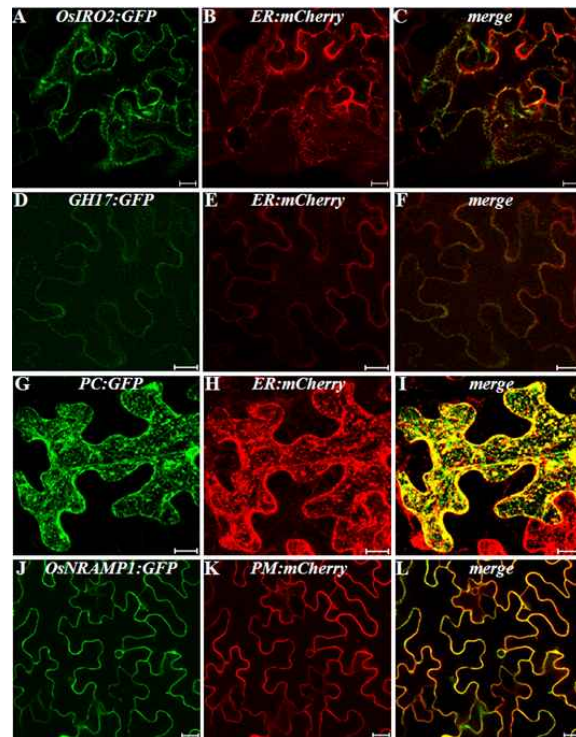


그림14-34. OsIRO2-, GH17-, PC-, OsNRAMP1- GFP fusion protein과 marker protein간의 colocalization을 담배 표피세포에서 관찰. ER (Endoplasmic Reticulum)-mCherry(B, E, I)과 Plasma membrane(PM; K)-mCherry. (scale bar = 20 μ m).

- 저온 유도 유전자들이 mRNA 발현 양상을 토대로 유전자의 과발현이 유도되는 형질전환된 애기장대를 이용하여 고농도의 염(100mM NaCl) 및 삼투압(200mM mannitol) 처리함(그림14-35). 그 결과 membrane에 위치하여 물질들의 운반자 역할을 하는 OsCHI3 과 OsCHI5 유전자들의 형질전환체들이 고염 및 삼투압 처리에서 내성을 보였으며 철 이온의 운반자 역할을 OsCHI1 유전자는 고염에서 내성을 보였음. 이러한 결과는 식물의 환경이 급변할 때 이를 대처하기 위한 식물의 방어기작 중 생체 내 이온 조절 단백질이 상당한 영향을 미칠 것으로 사료됨 (Lim et al., 2013).

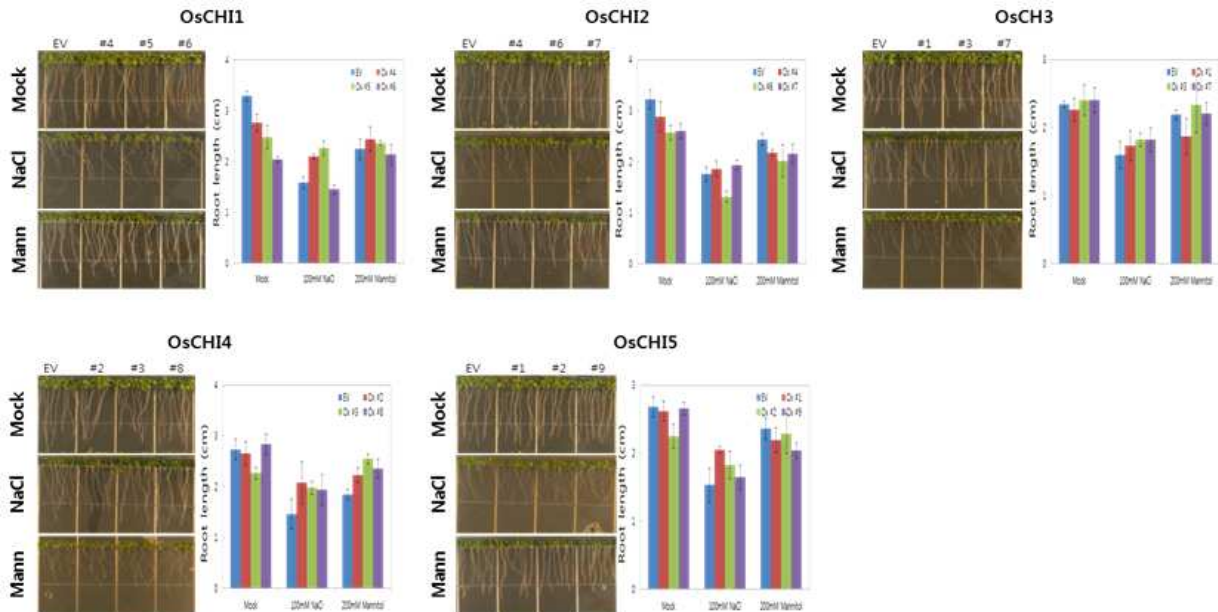


그림14-35. 과발현 형질전환체를 대상으로한 다양한 환경 스트레스 처리 실험

3. 기후변화대응 돌연변이체 후대 양성을 통한 전사체 대량분석

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

- (1) 내냉성, 내열성 유망 돌연 변이체에 대한 지속적 검정 및 세대고정으로 대립 유전자의 분리
 - (가) 내냉성, 내열성의 지속적인 후대검정 및 세대고정
 - (나) 대량전사체 발현 분석을 통한 온도 관련 유전자들의 네트워크를 구축하고 Hub 유전자군의 선정을 위한 *In silico* 분석을 실시
 - ① 내냉성(저온수내성) 돌연변이체에 대한 대량 발현 양상 규명: Affymetric 사의 chip을 사용하여 내냉성 관련 DEG 유전자군 선정
 - ② 도출된 DEG 유전자들과 DB화된 유전자 네트워크(바이오그린21 과제)에 의한 온도 관련 유전자 네트워크 완성
 - ③ 다양한 abiotic 스트레스 처리에서 선정된 상위 DEG 유전자의 발현 분석을 통한 profiling 실시

④ 고온 관련 microarray expression database를 통한 고온에서의 대량전사체 발현 비교 분석

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) 선발된 내냉성 계통의 지속적인 후대 검정

(가) 내냉성 계통의 보다 정확한 전사체 대량 분석을 위해 유묘기(3엽기) 처리 온도별(6 ~ 14°C) phenotype을 검정한 결과 10 ~ 12°C 처리구에서 가장 효과가 높았음(그림 14-36, Cho et al., 2012).

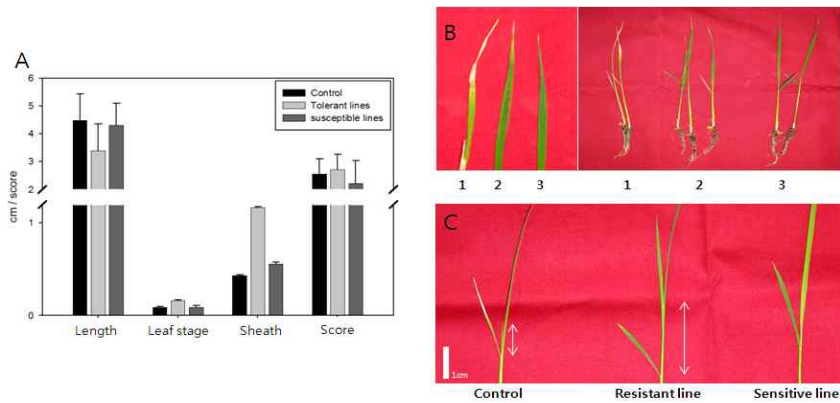


그림14-36. 내냉성 계통 선발(10~12°C) 및 형태적 특성. (A) 저온수 처리 후 phenotype 분석 (B) 저온처리간 생육상태 Score 분류 (C) 저온 처리에 의한 leaf sheath 및 leaf stage 비교

(나) 유묘기 처리 data를 근거로 전 생육기간에 걸친 내냉성 검정 실시: 18°C±3 수온 처리로 실험 진행 (그림14-37).

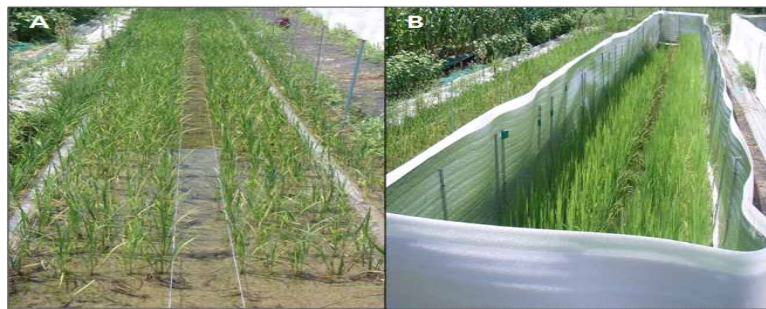


그림14-37. 농업적 형질과 관련된 성숙기 스트레스 처리. (A) 저온수에 의한 전 생육기 검정 (B) 출수기 고온 검정

(2) 선발된 내열성 계통의 후대 양성을 위한 개화기 고온 스트레스 저항성 검정

(가) 후대 양성을 위해 유묘기 저항성 계통의 개화시기 2차 검정 실험을 실시하였다. 강원대학교 실험 농장에서, 8월 27일부터 9월 10일까지 약 2 주간 낮 평균 온도 + 4°C, 밤 평균 온도 + 2°C (± 0.7 ~ 1°C)로 처리함. 실험 결과 유묘기 고온 스트레스 처리에 저항성을 보인 20 계통 중 대조군과 비교해서 등숙률이 높은 4개의 계통을 선발함 (그림14-38).

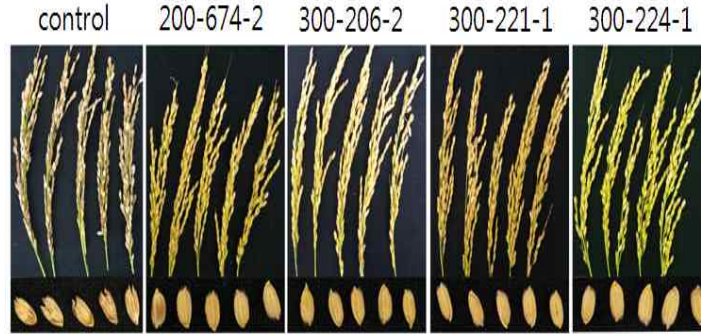


그림14-38. 등숙기 고온 저항성 계통 선발.

(3) 내냉성 계통의 전사체 대량 분석

(가) 저온수에 내성을 보인 TILLING 벼(200Gy 458)와 모품종인 동안벼의 저온처리에 따른 대량 전사체 변화 양상을 비교하기 위해 microarray 분석을 실시함.

(나) Microarray 분석 결과 저온수 처리에 의해 발현 증가되는 유전자들이 동안벼와 내냉성 계통간 비교했을 때 DEG 유전자들이 예상보다 적었음(16 up-regulated probe와 78 down-regulated probe, 그림14-39). 오히려 저온수 처리시 각 개체 내에서의 전사량 변화가 상당한 차이가 있었음(저온수에 유도된 probe set 중 개체 특이적 유전자가 동안벼는 1103개(up 619개/ down 483개), TILLING 벼는 1805개(up 987개/ down 818개)였음, 그림 40A). 이를 근거로 각 개체간의 전사체 변화 양상을 분석하여 TILLING 계통의 저온수 저항성 획득과 관련된 pathway 유전자군을 예측함(그림 14-40B, Cho et al., 2012).

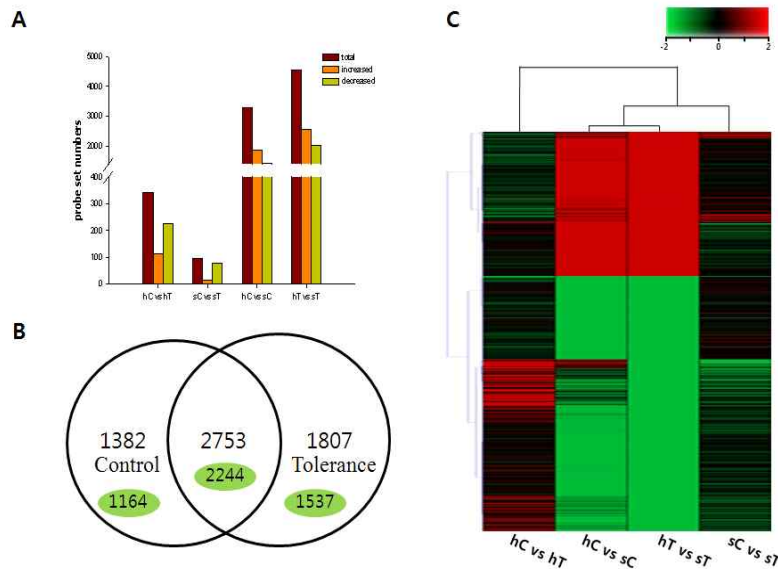


그림14-39. 저온수에 의한 내냉성 TILLING 계통과 동안벼의 Microarray data 비교 분석. (A) DEG 유전자 (\log_2 fold change) 대상으로 동안벼와 TILLING 계통간의 probe set 수 비교 (B) 각 개체 내에서 저온수로 인해 유도된 유전자 발현 패턴 덴드로그램. 녹색 동그라미에 표기된 숫자는 TIGR annotation program에 의해 확인된 유전자 중 중복 유전자를 제외한 수 (C) 4560 probe set의 4가지 실험군에 대한 cluster analysis.

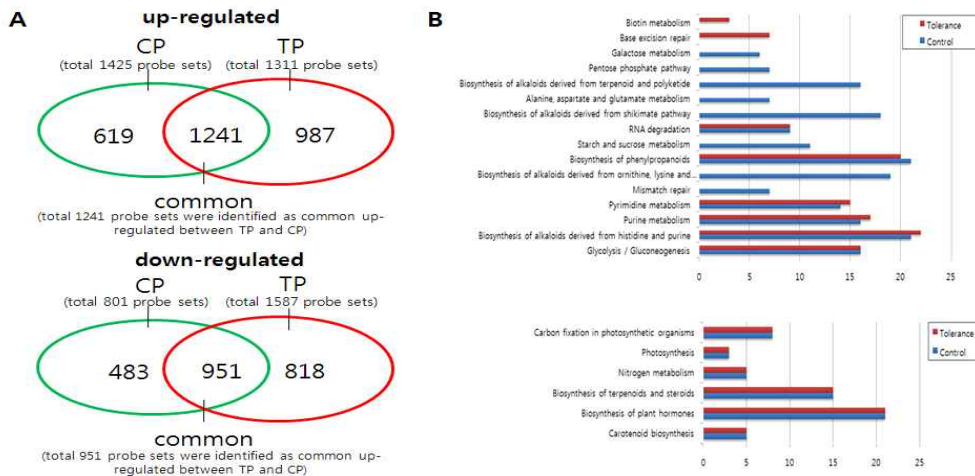


그림14-40. 동안벼와 TILLING 계통내의 개체 특이적 유전자 발현 분류 및 Enrichment 분석에 의한 DEG (differential expression genes)들의 Functional category. (A) 저온수 처리에 의해 유도된 DEG 유전자군의 덴드로그램. CP; 동안벼, TP; TILLING 계통, common; 동안벼와 TILLING 계통에서 공통으로 발현되는 유전자군 (B) Enrichment 분석에 의한 Up-regulate된 유전자군의 저온(저온수) response pathway(상)와 Down-regulate된 유전자군의 저온 response pathway 분류(하)

(다) Rice Array Database(RAD) 상의 160여개의 microarray data를 종합 및 분석하여 구축된 cluster와(바이오그린 21과제) 기준에 연구된 heat 스트래스 처리 data, 본 연구에서 얻은 data를 이용하여 온도 스트래스와 관련된 다양한 유전자들이 1021 cluster에 집중적으로 grouping 되는 것(1286 probe)을 확인 하였고 (표14-5), 이를 근거로 온도로 인한 up-regulated 유전자들의 Relevance를 구축하여 온도에 관련된 co-expression network 구축함 (그림14-41).

표14-5. 저온 스트래스와 고온 스트래스 관련 유전자 clustering

Cluster	No.of clusterprobe	No.oftotal coldstressprobe	No.ofcold upregulationprobe	No.ofcold downregulationprobe	No.oftotal heatstressprobe	No.ofheat upregulationprobe	No.ofheat downregulation probe
CLUSTER-1021	1286	240	59	181	153	101	52
CLUSTER-1020	635	203	21	182	127	38	89
CLUSTER-55	558	144	144	0	4	2	2
CLUSTER-1767	1013	98	75	23	42	36	6
CLUSTER-57	563	98	98	0	7	5	2
CLUSTER-1765	348	74	71	3	15	13	2
CLUSTER-346	233	72	72	0	4	2	2
CLUSTER-1019	368	69	34	35	50	7	43
CLUSTER-1005	357	65	34	31	50	21	29
CLUSTER-1004	267	59	11	48	22	12	10
CLUSTER-1696	150	53	13	40	22	5	17
CLUSTER-51	373	51	43	8	10	9	1
CLUSTER-41	72	47	0	47	17	13	4
CLUSTER-354	618	47	29	18	18	13	5
CLUSTER-54	325	47	46	1	6	1	5
CLUSTER-53	250	44	42	2	8	3	5
CLUSTER-1741	374	44	43	1	7	7	0
CLUSTER-1361	136	32	9	23	21	15	6
CLUSTER-379	140	31	3	28	19	5	14
CLUSTER-330	160	31	14	17	31	4	27

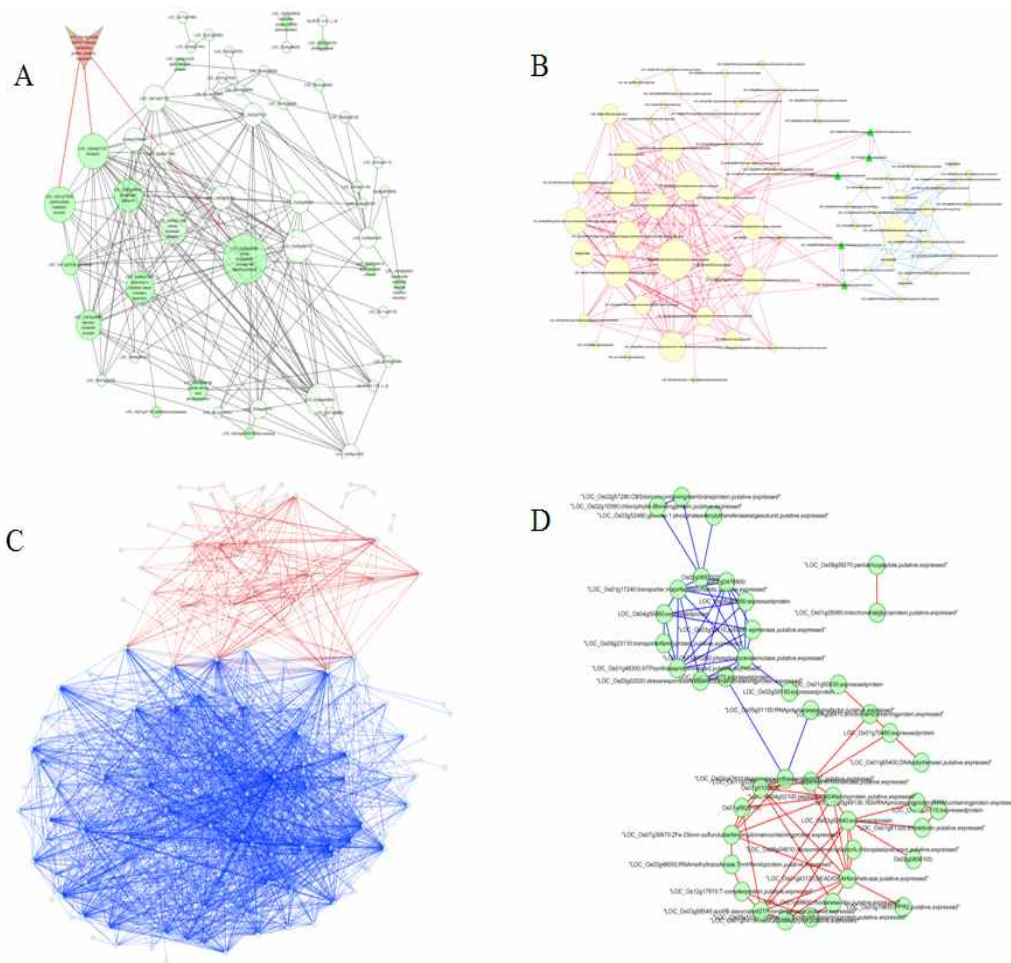


그림14-41. 1021 cluster상의 온돈 관련 유전자들의 *In silico* analysis. (A) Heat 스트레스 upregulation network, V형: Down regulation Hub gene (B) Heat 스트레스 up-regulated 유전자와 저온(저온수) up-regulated 유전자간의 network 분석 (C) Heat 스트레스 up-regulated 유전자와 저온 down-regulated 유전자간의 network 분석 (D) Heat 스트레스 down-regulated 유전자와 저온 스트레스 up-regulated 유전자간의 network 분석

(라) cluster 분석과 더불어 NCBI database상에서 abiotic stress 관련 GEO(The Gene Expression Omnibus) set만을 종합 및 분석하여 스트레스 관련 expression DB를 구축 하였음. 본 실험의 저온수 스트레스 expression data를 비교 분석한 결과 anoxica stress와 가장 유사한 발현패턴을 보였음(그림14-42). 이는 담수 처리에 의한 본 스트레스 처리 시스템과 관련 있는 것으로 사료되며, 관련 유전자들의 functional enrichment 분석을 통해 저온수 스트레스 specific function (ATPase activity, binding protein, oxidoreductase activity 외 7개의 cluster)과 anoxica 스트레스와 연관된 function(kinase/helicase activity, binding protein)을 예측함 (표14-6). 기존 DB상의 저온 스트레스(4℃)와는 구별되는 저온수 스트레스 specific functional category의 추가적인 *in silico* 분석 및 분자 생물학적 분석을 통해 저온수 스트레스 관련 pathway 예측이 가능할 것으로 사료됨.

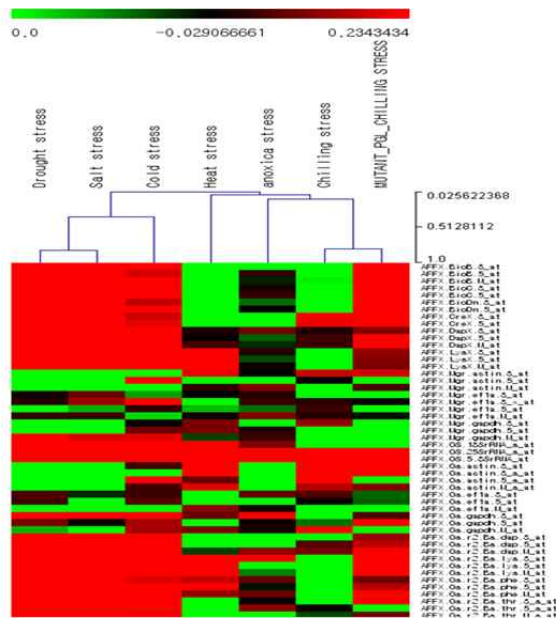


그림14-42. GEO를 통한 다양한 abiotic 스트레스 cluster 분석. Chilling stress; 저온수 처리 동안벼, Mutant PGL Chilling; TILLING 벼

표14-6. 저온수 스트레스 specific functional enrichment category.

No. of cluster	Gene Ontology ID	Description of molecular function	No. of Total genes	No. of genes	% of genes	P. value	Fold Enrichment
cluster 1: ATPase activity	GO:008026	ATP-dependent helicase activity	478	12	1.043	0.005	2.706
	GO:007035	purine NTP-dependent helicase activity	478	12	1.043	0.005	2.706
	GO:0004386	helicase activity	478	14	1.216	0.015	2.119
	GO:0042623	ATPase activity, coupled	478	17	1.477	0.039	1.627
	GO:0016887	ATPase activity	478	19	1.631	0.127	1.409
cluster 2: Binding protein	GO:0043566	structure-specific DNA binding	478	6	0.521	0.001	7.368
	GO:0003690	double-stranded DNA binding	478	3	0.261	0.085	6.028
	GO:0030683	mismatched DNA binding	478	3	0.261	0.085	6.028
	GO:0016769	transferase activity, transferring nitrogenous groups	478	8	0.695	0.015	3.049
	GO:0019842	vitamin binding	478	12	1.043	0.071	1.792
	GO:0070279	vitamin B6 binding	478	8	0.695	0.256	1.551
	GO:0030170	pyridoxal phosphate binding	478	8	0.695	0.256	1.551
	GO:0008483	transaminase activity	478	4	0.348	0.345	1.922
	GO:0032561	guanyribonucleotide binding	478	11	0.956	0.319	1.321
	GO:0005525	GTP binding	478	11	0.956	0.319	1.321
	GO:0019001	guany nucleotide binding	478	11	0.956	0.345	1.293
	GO:0015079	potassium ion transmembrane transporter activity	478	3	0.261	0.329	2.55
	GO:0030955	potassium ion binding	478	4	0.348	0.394	1.768
	GO:0031420	alkali metal ion binding	478	4	0.348	0.407	1.734
	GO:0022890	inorganic cation:transmembrane transporter activity	478	7	0.608	0.657	1.053
GO:0046873	metal ion transmembrane transporter activity	478	4	0.348	0.773	0.993	
GO:0015077	monovalent inorganic cation:transmembrane transporter activity	478	4	0.348	0.872	0.819	

(마) 저온수 처리에 의해 발현 증가된 4000여개의 유전자들이 다른 abiotic 스트레스와도 관련이 있다는 점을 착안하여 TILLING 계통에서만 특이적으로 up-regulation하는 상위 유전자 10여개와 동안벼와 같은 패턴을 보이거나 전사량이 상대적으로 높았던 상위 10여개의 유전자 선정함 (표14-7). 다른 abiotic 스트레스(4°C Cold, Salt, Drought, Wound, ABA, SA, JA, Ethylene)상에서의 발현패턴을 RT-PCR 이용하여 분석하였고, Salt, ABA, JA, SA 처리에서 대부분의 유전자들이 유도되었고, cold, drought,

wounding 처리에서 일부 유전자들의 발현이 유도됨을 확인(그림14-43, 14-44). 저온수 스트레스 관련 유전자들의 증가 양상 결과를 통해 직접적이지는 않지만 유전자 발현 수준 상에서 볼 때 또 다른 스트레스에 대한 내성 가능성을 제시할 수 있음 (Cho et al., 2012).

표14-7. TILLING 계통(Tolerance line) 특이적 발현 상위 유전자 list.

Location	MSU locus	Annotation	
Common	Os01g72370	3-ketoacyl-CoA synthase precursor, putative, expressed	
	Os02g43370	expressed protein	
	Os03g26210	glucan endo-1,3-beta-glucosidase precursor, putative, expressed	
	Os08g02380	metal transporter Nramp6, putative, expressed	
	Os08g23280	plastocyanin-like domain containing protein, putative, expressed	
	Os03g20680	expressed protein	
	Os01g67390	HVA22, putative, expressed	
	Os02g30974	CSLF8 - cellulose synthase-like family F; beta1,3;1,4 glucan synthase, expressed	
	Os06g41710	laccase precursor protein, putative, expressed	
	Os11g19730	expressed protein	
	Os09g36619	expressed protein	
	Tolerance	Os10g33370	helix-loop-helix DNA-binding domain containing protein, expressed
		Os11g15624	transposon protein, putative, unclassified, expressed
Os07g35520		helix-loop-helix DNA-binding domain containing protein, expressed	
Os07g15460		kinesin motor domain containing protein, putative, expressed	
Os02g43660		expressed protein	
Os09g17660		late embryogenesis abundant protein 1, putative, expressed	
Os09g27730		POEL32 - Pollen Ole e I allergen and extensin family protein precursor, expressed	
Os07g36630		expressed protein	
Os01g61160		CW-type Zinc Finger, putative, expressed	
Os12g26690		expressed protein	
Os06g16350		peroxidase precursor, putative, expressed	
Os07g37810		STRUBBELIG-RECEPTORFAMILY 1 precursor, putative, expressed	

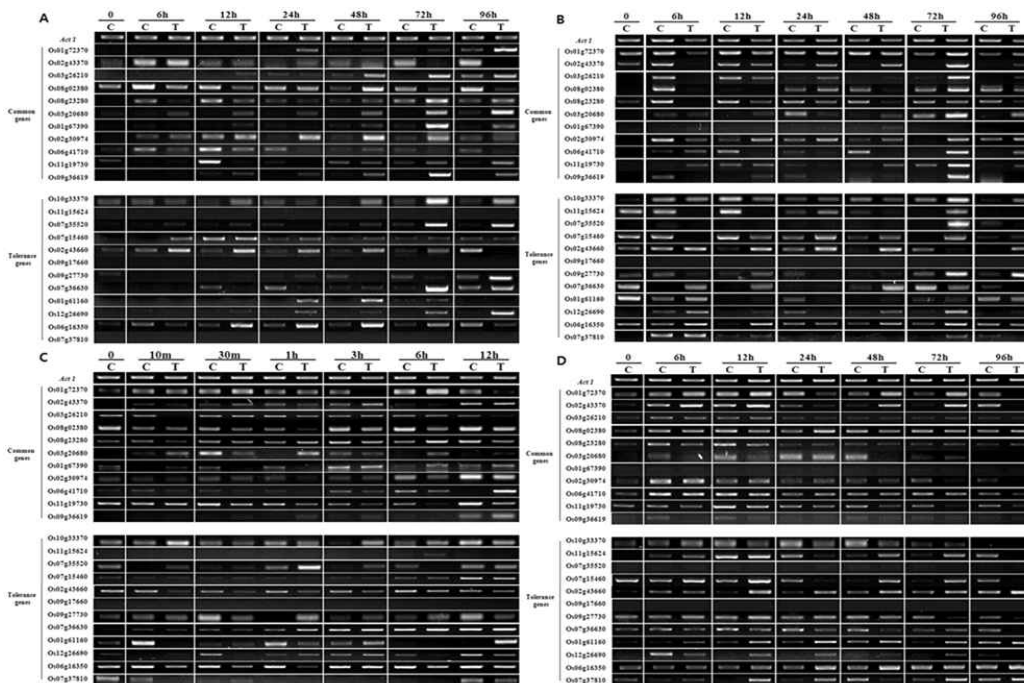


그림14-43. 저온수 처리 inducible gene들의 다양한 abiotic 스트레스에 대한 발현 패턴 분석 (RT-PCR) (A) Salt treatment (B) Cold(4°C) treatment (C) Wounding treatment (D) Drought(PEG) treatment

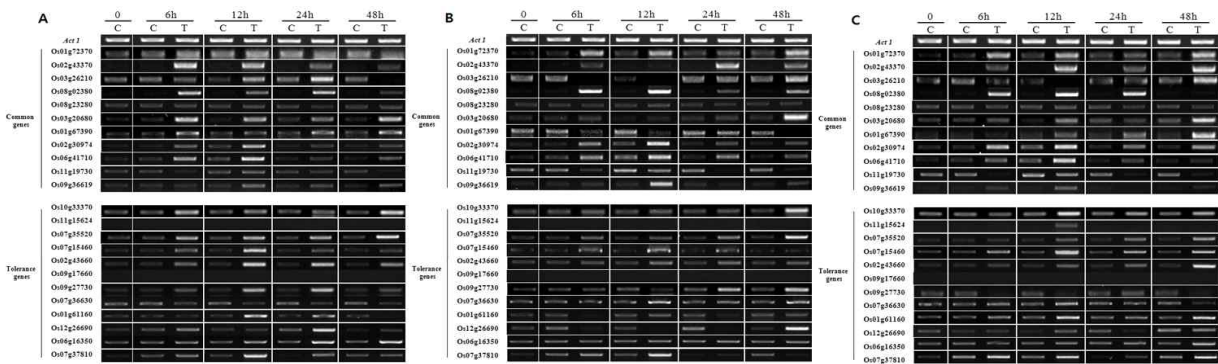


그림14-44. 저온수 처리 inducible gene들의 다양한 식물 호르몬 처리대한 발현 패턴 분석 (RT-PCR). (A) abscisic acid(ABA) treatment (B) jasmonic acid(JA) treatment (C) salicylic acid(SA) treatment

(4) Microarray 기술을 활용한 조숙성 돌연변이체의 전사체 분석

- 조숙성 벼의 유전자 전사체 발현 분석을 위하여 조숙성 식물체의 잎과 유수 조직을 이용하여 microarray 기술을 활용한 특이적으로 유전자 군 선발.
- Bioinformatics 기술을 활용한 *in silico* 분석 후 조숙성 벼의 up-regulated 유전자와 down-regulated 유전자 그룹 내에서 숙기와 관련한 특이적 생물학적 경로에서 변화를 보인 8개의 유전자를 탐색함 (그림14-45A, Hwang et al., 2013)
- 조숙성 벼에서 8개의 유전자를 통한 상호발현 유전자 그룹 내의 실제 발현의 다양성을 분석(그림14-45B, Hwang et al., 2013)

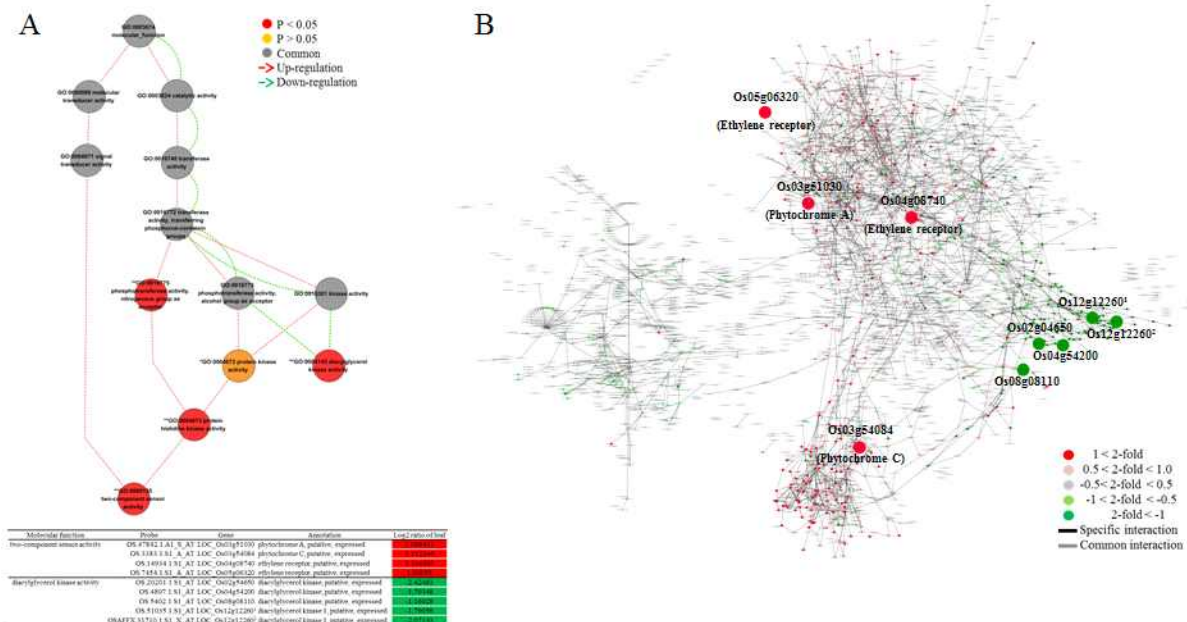


그림14-45. 조숙성벼의 특이한 생물학적 경로 탐색

- 선발된 4개의 up-regulated 유전자 (PHY A : Os03g51030, PHY C : Os03g54084, ethylene receptor : Os04g08740과 Os05g06320) 중에서 특히 조숙성에 관련한 PHY A의 Circadian-rhythm pathway의 변화된 생물학적 경로를 분석함 (그림14-46A)

- 변화한 Circadian-rhythm pathway의 관련 유전자 중 4개의 up-regulated 유전자들의 상호발현 유전자를 통하여 조숙성 식물의 변화된 유전자 발현 탐색 (그림14-46B) 그 결과 잎과 유수 조직의 마이크로어레이 실험 중 특히 잎에서 유의하게 변화함 (그림 14-46B).

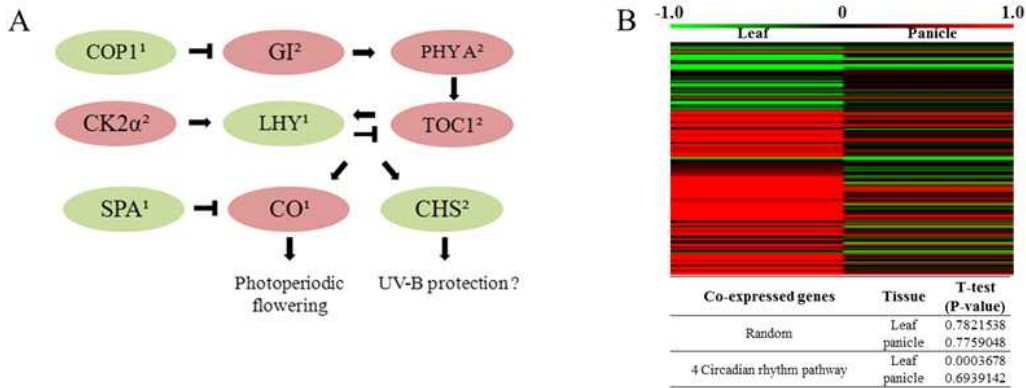


그림14-46. PHY A가 관련한 circadian rhythm pathway의 변화 분석

4. TILLING 유전자원 집단 분석

가. 연구개발 수행 내용 및 실험방법

(1) TILLING 계통들의 육성 및 증식

(가) TILLING 유전자원 육성을 위해 3000 계통에 대한 증식 및 유전자원 평가

- 원자력연구원 정읍방사선과학연구소에서 분양 받은 3000 계통은 중만생종인 동안벼에서 유래된 품종으로서 생육기간이 상대적으로 짧은 강원도 춘천에서의 생육재배를 위한 지역적응성 검정을 실시한 결과 대부분의 line에서 이상이 없음을 확인
- 3000 계통으로부터 각각 5개의 식물 개체를 과중하여 현재 약 15,000 종의 식물에 대한 유전자원 평가를 하였으며, 단일 식물별로 종자 수확
- 농업형질 조사를 통해 조숙성, 자색립, 단간종 등으로 분류함

(2) TILLING 계통에 대한 농업형질 조사 및 데이터베이스 구축

(가) TILLING 육성 계통에 대한 유전적 다양성 분석

- 3000 계통으로부터 각각 5개의 식물 개체에 대한 유전 정보 확보를 위해 15,000개체의 시료를 확보 및 3,000 line에 대한 DNA 분리
- 육성중인 계통들의 유전적 다양성 검정을 위해 무작위로 100 계통을 선발하여 AFLP 기법을 이용해 원종인 동안벼 및 각 계통간 유전적 특이성을 검정

(3) TILLING 유전자원 집단의 유전분석

(가) TILLING 육성 계통에 대한 유전적 다양성 분석

- 96 TILLING 계통의 유전분석을 통한 유전자원 다양성 검정 실시

(나) 향후 유전자원으로 이용적 가치가 높을 DNA pool 확보

- M₃ 2,911 TILLING 계통에 대한 DNA pool·종자 확보 및 타 연구기관으로의 분양

(4) TILLING 유전자원 집단의 세대 진전 및 지역 적응성 검정

(가) 고정된 TILLING 육성 계통 확보

- 15,000계통의 TILLING 유전자원 집단의 M₅ 세대로의 진전 완료 및 종자 확보

(나) 유전자원으로 이용가치가 높은 계통 선발

- 농업적으로 이용가치가 높은 조숙성 돌연변이체를 선발 및 형태적 분석 실시
- 대량 전사체 발현양상 분석을 통한 네트워크 구성

나. 연구개발 결과 및 고찰

(1) TILLING 계통 육성 및 유전자원 평가

(가) TILLING 3000 계통의 전개 및 유전자원 평가를 위해 강원대학교 시험포장에서 재배 함

- 600평 규모의 수도 포장에서 계통별 5개체 (3000 계통 X 5 = 15000 개체)를 재배하여 각 개체별 300립 이상의 종자 수확 (그림14-47).
- 획득한 종자는 다른 세부과제에 분양하여 공동연구를 진행
- 각 계통에 대한 농업 형질을 조사. 예) 조숙성, 단간, 초형, 분얼 등 조사



그림14-47. TILLING 3,000 계통의 개체별 수확 및 수확 및 종자 건조

(나) TILLING 계통에 대한 유전적 다양성 검정 및 데이터베이스 구축

① 3,000 line (15,000개체)의 농업형질 평가 (그림 48).



그림 48. 무분얼 개체 (200Gy-506 line) 및 조숙성 line(200Gy-6, 20)

② 유전적 다양성 검정

- 3000 line (15,000 개체)의 유전 분석을 위해 RAND 함수를 이용하여 100 line을 무작위 선정 AFLP 기법을 이용하여 유전적 다양성 평가
- TILLING 연구를 위해 각각 3,000 계통들 (각 계통 별로 5개의 식물체들을 bulk로 이용)에 대한 DNA 분리 및 pooling 실시
- 유전분석 결과를 통해 얻은 데이터를 데이터베이스를 구축하여 다른 유전연구를 위한 기초자료로 제공

(3) TILLING 유전자원 집단의 유전 분석

(가) 2,911 TILLING 계통의 유전적 다양성 분석

- 2,911 계통의 유전적 다양성 검정을 위해 96 계통을 무작위로 선정하여, AFLP 분석을 통한 유전분석을 실시
- 5개의 AFLP selective primer를 선정하여 AFLP 분석을 한 결과 각 조합별 평균 31.4%의 높은polymorphism을 확인 (표14-8).
- 28 polymorphic loci를 선정, cloning 및 염기서열 분석을 통해 감마선 조사에 의한 유전자 기능변화를 예측하였으며 향후 유전적 자원으로써의 효용가치가 높을 것으로 판단됨 (그림14-49, Cho et. al., 2010).

표14-8. 5 selective primer에 의한 유전적 다양성 검정

Primer combination	NTF ^a	NPF ^b	% Polymorphism
E+AA/M+CAT	100	26	26
E+AC/M+CTT	103	31	31
E+AG/M+CTT	97	34	35.1
E+TC/M+CAT	106	38	35.8
E+TG/M+CTG	96	29	30.2
total	502	158	31.4
Average	100.4	31.6	31.6

^a Total number of fragments generated (NTF).
^b Number of polymorphic fragment (NPF).

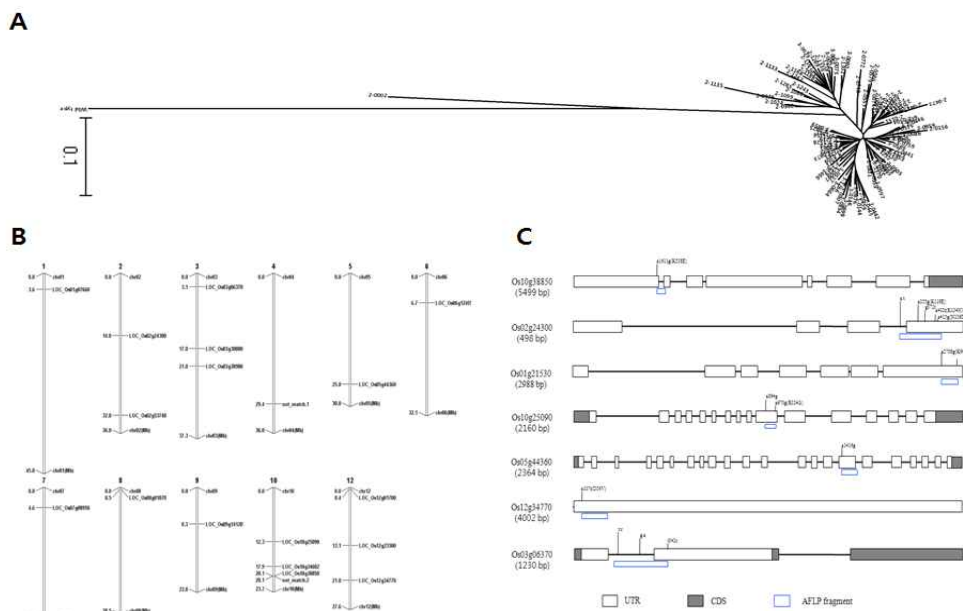


그림14-49. TILLING 계통의 유전적 다양성 분석. (A) 96 TILLING 계통과 동안벼간의 유전적 유사성 검정(Neighbor-Joining tree) (B) 벼 계놈상의 28 Polymorphic loci 위치 (C) 감마선 조사에 의한 염기서열 변이 양상

(4) TILLING M₅ 세대 육성 및 DNA pool database 구축

- (가) 강원대학교 수도포장(약 600평 규모)에서 M₆ 세대 육성(15,000개체) 및 종자 수확·보존.
- (나) M₃ 세대 2,911 TILLING 계통의 DNA 추출 및 장기 보관하여 향후 유전자 기능 연구를 위한 유전적 소재로써 이용 가능한 초석을 마련함 (그림14-50 A,B).
- (다) 보관 중인 2,911 계통 DNA와 15,000개체 M₃종자는 연구재료용으로 타 연구기관에 분양함

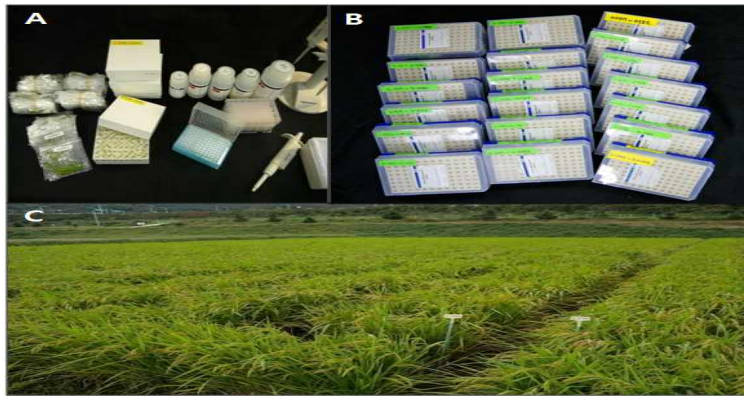


그림14-50. 2,911 TILLING 계통 벼 DNA 및 M₅ 세대 육성 A) DNA 추출 B) 장기보존 DNA

(5) 유용한 농업형질을 가지는 TILLING 유전자원 선발

- (가) 조숙성 돌연변이체 선발과 형태적 특성 및 유전 분석
 - 강원대학교 전문 포장에서 2,911계통의 15000개체 M₃ TILLING 돌연변이체 중 M₂세대의 3 계통으로부터 분리된 15개의 조숙성 돌연변이체 선발 (EMT; Early maturing type, 200Gy- 6, 20, 656 계통 선발)
- (나) 조숙성돌연변이 계통들의 형태적 분석
 - 조숙성 계통은 4월8일 파종 후 7월 25일 전후 출수를 함. 이와 달리 돌연변이 원종인 동안벼는 조숙성 돌연변이체보다 30일 늦게 출수함(그림14-51A). 조숙성 계통은 출수 전 동안벼와 비교하여 잎색이 더욱 짙은 녹색을 띄었으며(그림14-51B), 마디의 수는 동안벼 6개, 조숙성벼 5개로 차이가 났고, 같은 시기에 심은 동안벼와 조숙성벼 모두 출수를 하였을 시기에 조숙성벼는 추가적인 분얼을 통하여 또 다른 이삭가지를 형성함 (그림14-51C). 각각의 마디간 길이는 조숙성 벼가 동안벼보다 긴 형태적 특성을 지님 (그림14-51D).
 - 잎색을 토대를 식물의 광합성 기능에 대한 분석을 위한 클로로필 함량 검정 실시, 조숙성벼에서는 동안벼와 비교하여 전체 클로로필 함량에서 대략 3배 정도의 높은 수치를 보이고 클로로필 a/b 비율에서는 오히려 적은 수치를 보임. 이는 클로로필 b의 함량이 a에 비하여 더욱 많은 증가를 보였기 때문임 (표14-9).

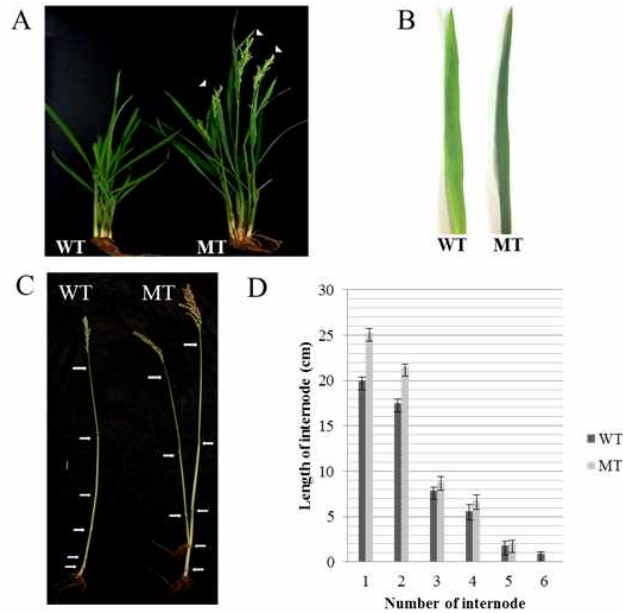


그림14-51. 조숙성 돌연변이 벼의 형태적 특성

표14-9. 동안벼와 조숙성벼 사이의 클로로필 함량 검정

Species	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Chl <i>a/b</i> Ratio	Total Chl
WT	9.46±1.01	3.1±0.27	2.84±0.45	13±0.98
EMT-6	21.44±0.86	11.66±1.35	1.93±0.26	33.33±1.41
EMT-20	30.76±1.6	16.73±0.67	1.81±0.03	47.73±2.24
EMT-656	24.52±2.3	12.29±1.57	1.87±0.09	36.8±3.8

Values shown are the mean (SD) from leaf of three independent plants

(다) 조숙성 돌연변이체의 광주기와 온도에 관련한 형태적 특성

- 조숙성 돌연변이체에서의 성장 온도와 형태적 특성 검정을 위하여 25°C와 27°C의 장일 조건에서 식물의 생육상태를 관찰함 (그림14-52A). 그 결과, 25°C에서와는 달리 27°C의 온도에서 길이 신장의 차이를 보임.
- 광주기 실험을 위하여 단일 조건 (10시간: 광조건, 14시간: 암조건)과 장일 조건 (14시간: 광조건, 10시간: 암조건)의 처리를 통하여 형태적 특성을 검정함 (그림14-52B,C) 모든 조건의 광조건에서 조숙성 식물체가 동안벼보다 빠르게 신장함.

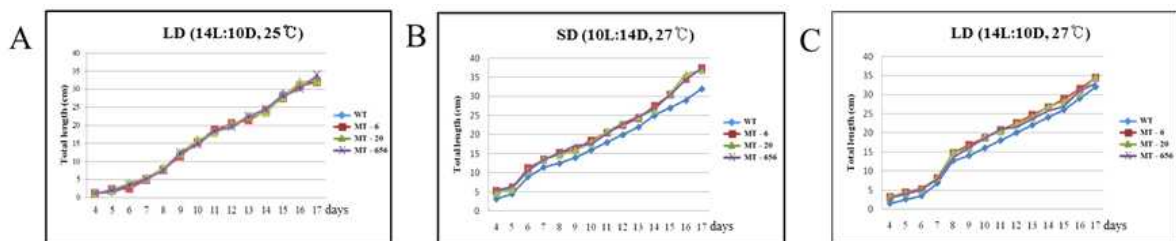


그림14-52. 광주기와 온도의 변화를 통한 조숙성 돌연변이체의 형태적 특성

(라) AFLP 마커를 통한 동안벼와 EMT 200Gy-6, 20, 656 계통들 간의 유전 분석

- 동안벼와 조숙성 개체들 간의 유전적으로 많은 차이를 보이거나 조숙성 개체들 사이에서는 다형성을 보이지 않음 (그림14-53). AFLP를 통하여 다형성을 보인 밴드는 유전자 염기서열 분석을 통하여 유전적 변화 검정 (표14-10).

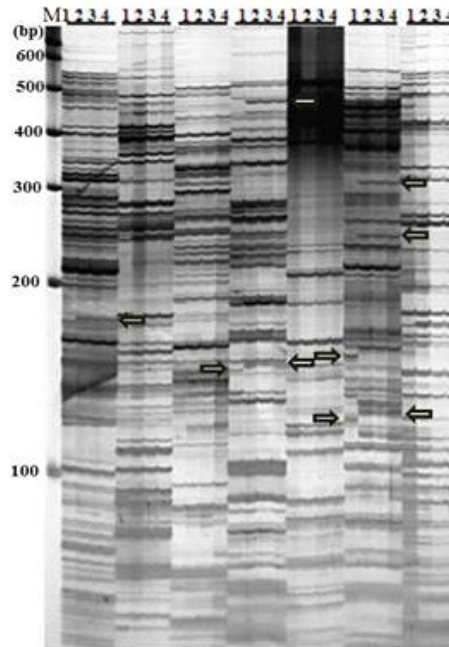


그림14-53. AFLP 마커 검정

표14-10. AFLP 마커의 다형성 밴드에 대한 유전자 염기서열 분석

Origin	Primer	Query Length(bp)	Identity(%)	Position	Gene	Annotation	
Mutant specific Fragments	E7M4	195	100	upstream	Os02g29530	glycosyl transferase, putative, expressed	
	E4M8	307	100	int	Os04g03250*	retrotransposon protein putative, Ty3-gypsy subclass	
	E6M4	368	83	int+exon	Os02g44599	expressed protein	
	E6M6	247	86	exon	Os11g40890*	expressed protein	
	E6M8	190	99	upstream	Os07g03279	SCP-like extracellular protein, expressed	
	E2M5	105	100	int+exon	Os11g44310*	calmodulin binding protein, putative, expressed	
	E3M6	156	48	int	Os01g67340	STRUBBELIG-RECEPTOR FAMILY 8 precursor, putative, expressed	
			56	int	Os11g31300	retrotransposon protein putative, Ty3-gypsy subclass	
		E3M2	206	100	int	Os11g11920*	resistance protein, putative, expressed
		E3M6	272	99	exon	Os11g31570*	expressed protein
	E1M6	333	100	upstream	Os10g17810	hypothetical protein	
Donganbyeo specific fragments	E4M3	157	100	int	Os08g09260	tRNA synthetase, putative	
	E8M3	190	100	int	Os05g41210	OsCam2-Calmodulin, expressed	
	E7M2	430	99	int+exon	Os04g42470	regulatory subunit, putative, expressed	
	E1M5	400	100	int	Os08g09260	tRNA synthetase, putative	
	E6M8	261	100	downstream	Os11g43860	sodium/calcium exchanger protein, expressed	

* indicates marker genes of no.6, 20, 656 lines.

- 다형성 밴드 중 E6M6 primer 조합은 유전자 염기서열 분석 결과로 Os11g40890 유전자임을 밝힘 (그림14-54). 이 표지 유전자를 통하여 동안벼와 조숙성벼 (EMT 6, 20, 656), 그리고 포장에서 만숙성을 보인 200Gy-1270, 1333 계통 간의 염기서열을 분석. 그 결과, Os11g40890 유전자는 조숙성 계통들 간의 특이적인 염기서열임을 확인(그림 54A). 동안벼와 조숙성 벼의 LOC_Os11g40890 유전자의 공통 염기서열을 이용한 RT-PCR을 수행하여 Os11g40890의 유전자 발현을 검정(그림14-54B).

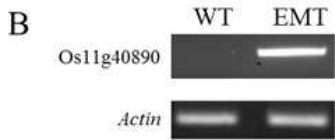
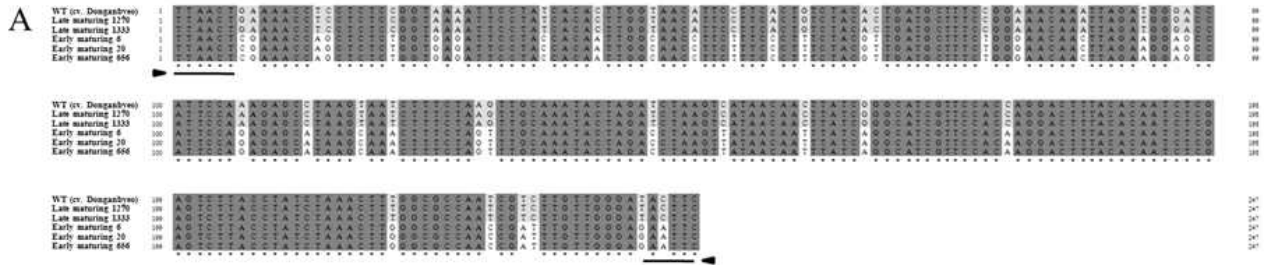


그림14-54. 조숙성에서 다형성을 보인 유전자를 통한 개체들 간의 검정

(마) 종자의 Seed storage protein을 통한 종자 품질 검정

- 조숙성 종자의 Seed storage protein (Albumin, Globulin, Prolamin, Glutelin)의 정량을 통하여 종자의 품질을 검정(그림14-55). 그 결과, 원종과 조숙성벼의 seed storage protein의 발현량에 차이가 없음을 확인.

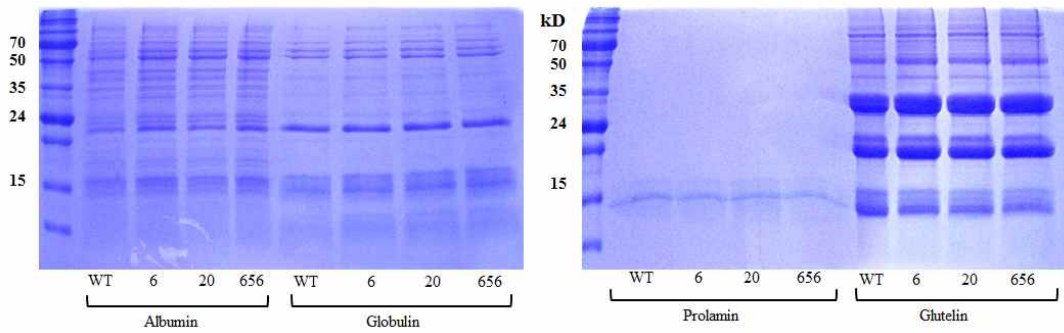


그림14-55. Seed storage protein 검정

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1세부 친환경산업 소재용 케나프 품종 육성 및 유채 품종개발 실용화 (한국원자력연구원 강시용)

구분	년차별 연구목표	연구목표 달성도	기술발전 기여도
1차년도 (2008)	<ul style="list-style-type: none"> 케나프 돌연변이 유도 및 유전자원의 대단위 재배 케나프 분자유종을 위한 분자유전·생물학적 분석 유채 신품종 육성을 위한 돌연변이 유도 	<ul style="list-style-type: none"> 케나프 종자에 감마선 조사 및 감수성 평가 및 국내외 유전자원 재배 AFLP 분석으로 유전자원 간 근연관계분석 유채 품종에 감마선을 완/급조사 	<ul style="list-style-type: none"> 국내·외 케나프 유전자원 생육 특성 검정
2차년도 (2009)	<ul style="list-style-type: none"> 케나프 유망돌연변이 계통 선발 케나프 논포장 재배 시험 케나프 분자유종을 위한 분자유전·생물학적 분석 유채 신품종 육성을 위한 돌연변이 선발 	<ul style="list-style-type: none"> 생육이 우수한 돌연변이 10 계통 선발 유망 돌연변이 (M₅~M₇) 후대를 논포장 재배 시험 리그닌 생합성 관련 유전자 크로닝 유채 형태, 생육 등의 551 개 변이 계통 선발 	<ul style="list-style-type: none"> 리그닌 생합성 관련 유전자 7종을 크로닝하여 염기서열을 확보
3차년도 (2010)	<ul style="list-style-type: none"> 케나프 고 bio-mass 생산 및 국내채종 가능한 유망 계통 품종보호권 출원 케나프 내염성 증진 계통 육성을 위한 새만금 간척지 재배 시험 케나프 가축사료 적합성 검정 시험 유채 신품종 육성을 위한 돌연변이 후대 선발 	<ul style="list-style-type: none"> “장대” 품종출원 (출원 2011 - 0026) 간척지 고 bio-mass 생산 가능한 계통선발 실시 유망계통의 사료가치 분석 유채 고바이오매스 계통 선발 	<ul style="list-style-type: none"> 국내 채종이 가능하고 바이오메스 생산량이 우수한 “장대” 품종출원 간척지 재배 유망계통 선발
4차년도 (2011)	<ul style="list-style-type: none"> 관상용 케나프 돌연변이 신품종 품종보호권 출원 신규 외래종 유전자원 특성평가 케나프 종자 지방산 함량 분석 유채 신품종 육성을 위한 돌연변이 후대 선발 	<ul style="list-style-type: none"> 케나프 돌연변이 신품종 “백마”(출원2012-538) “적봉”(출원2012-537) 품종보호권 출원 신규 외래종 15점 유전자원 생육특성 조사 케나프 28계통 종자에 함유된 지방산 함량 측정 형태적 돌연변이체 선발 (M_{4.5}) 	<ul style="list-style-type: none"> 간척지, 유휴지에 활용이 가능한 관상용 돌연변이신품종 품종보호권 출원 케나프 기능성 종자 오일 제조에 기초자료 제공
5차년도 (2012)	<ul style="list-style-type: none"> 케나프 유망돌연변이 계통 선발 및 보유 유전자원의 세대진척 케나프 앞에서 사료용 유용 성분 조사 유채 신품종 육성을 위한 돌연변이 후대 선발 	<ul style="list-style-type: none"> 감마선 조사를 유래 돌연변이 개체 선발 화옹간척지 실증재배실시 케나프 유망 유전자원의 잎에 기능성 성분 분석 유망 돌연변이 계통의 생육시기별 섬유 특성 검정 유채 고 바이오매스 및 형태변이 계통 특성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 조숙, 고생산성, 화색, 종자생산량이 향상된 돌연변이 개체선발 신품종장대 간척지 실증재배

제2세부 돌연변이 차조기 및 블랙베리를 이용한 생체 산화적 기능성 식품 개발 및 실용화 (한국원자력연구원 정일윤)

구분	년차별 연구목표	연구목표 달성도	기술발전 기여도
1차년도 (2008)	<ul style="list-style-type: none"> • 돌연변이 차조기의 최적 추출조건 확립 및 추출물을 이용한 항산화 효능평가 • 우수 품종 선별 및 지표성분 분리 	<ul style="list-style-type: none"> • WEE 공법으로 차조기 추출물 획득 • UWLA, ESR 항산화 효능 평가를 통해 CJM-12 품종 선별 • HepG2 cell에서 항산화 효능 평가 • 지표성분인 rosmarinic acid 분리 및 함량 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 방사선육종 식물자원의 대사체 분석 기술에 기여
2차년도 (2009)	<ul style="list-style-type: none"> • 산화적 손상 유발 동물모델 제작(감마선, CCl₄) • 돌연변이 차조기의 in vivo 효능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • Mouse에 감마선과 CCl₄를 처리하여 산화적 손상 동물모델 제작 완료 • 돌연변이 차조기 추출물을 이용해 동물모델에서 항산화 효능 검증 완료 	<ul style="list-style-type: none"> • 산화적 손상 유발 동물모델 제작 기술 확립 및 수행에 기여
3차년도 (2010)	<ul style="list-style-type: none"> • 방사선 돌연변이 블랙베리의 항산화 효능 평가 • 기능성 시제품 1종 제작 	<ul style="list-style-type: none"> • 신품종 블랙베리(메이플)의 추출물 획득 및 in vivo 항산화 효능 평가 완료 • 지표성분(C3G) 분리/구조규명 완료 • 신품종 블랙베리로부터 발효 식초를 제조한 뒤 이를 함유한 간기능 개선 기능성 음료 시제품 1종 제작 완료 	<ul style="list-style-type: none"> • 산업화를 위한 지표성분 표준화 및 시제품 제형 개발 기술에 기여
4차년도 (2011)	<ul style="list-style-type: none"> • 기능성 시제품의 in vivo 항산화 효능 평가 • 기능성 시제품의 in vivo 숙취해소 효능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 블랙베리를 이용해 제작한 시제품을 이용해 Rat 동물 모델에서 항산화 효능 평가 완료 • 블랙베리를 이용해 제작한 시제품을 이용해 Rat 동물 모델에서 숙취해소 효능 평가 완료 	<ul style="list-style-type: none"> • 산업화를 위한 시제품의 효능 평가에 기여
5차년도 (2012)	<ul style="list-style-type: none"> • 블랙베리 지표성분인 C3G의 in vitro, in vivo 항산화 효능 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 블랙베리 메이플의 항산화 지표성분인 C3G를 이용해 HepG2 cell에서 항산화 효능 평가 완료 • 마우스 동물 모델에서 C3G의 항산화 효능 평가 완료 	<ul style="list-style-type: none"> • 산업화를 위한 지표성분의 생리활성 규명에 기여

제3세부 돌연변이 기술이용 우수 브랜드 장류 및 나물용 콩 신제품 개발 및 실용화 (한국원자력연구원 김진백)

구분	년차별 연구목표	연구목표 달성도	기술발전 기여도
1차년도 (2008)	<ul style="list-style-type: none"> 장류 및 콩나물용 유전자원의 농업형질 특성검정 및 예비계통 선발 	<ul style="list-style-type: none"> 돌연변이 콩 자원 활용 농업형질 조사 우수 선발계통의 지역적응 시험 장류용 예비계통의 선발 나물용 예비계통 선발 밥밀용/장류용 신제품 '원울' 품종보호권 출원 	<ul style="list-style-type: none"> 보유 육성중인 콩 돌연변이 유전자원을 활용한 목적특이적 선발 육종법 기준 마련 우수품종의 출원을 통한 고급화 국산화 콩품종 개발
2차년도 (2009)	<ul style="list-style-type: none"> 선발계통의 청국장장 가공 및 생산 적합성 평가 및 우수계통의 선발 나물용 콩 예비계통의 수율조사 	<ul style="list-style-type: none"> 우수장류용 선발계통의 원료콩 일반성분분석 청국장제조 및 관련 품질검사 완료 정산식품과 연계한 1,2차 콩나물 재배 수율조사 	<ul style="list-style-type: none"> 순창장류 연구소와 연계한 육종 돌연변이콩 계통 기반 청국장 품질검사를 통한 지역특화산업가능성 모색 실제 콩나물생산업자와 연계한 재배수율조사
3차년도 (2010)	<ul style="list-style-type: none"> 선발계통의 된장 가공 및 생산 적합성 평가 및 우수계통의 선발 콩나물용 선발계통의 기능성 및 수량성 특성평가에 따른 생산적합 우수계통의 선발 	<ul style="list-style-type: none"> 장류적합 유망계통(황금6계통, 백운 2계통) 장류 제조 및 유용성분분석(순창장류연구소 연계) 풀무원과 연계한 콩나물 재배 수율조사 밥밀용/장류용 신제품 '원현' 품종보호권 출원 	<ul style="list-style-type: none"> 순창장류 연구소와 연계한 육종 콩계통 기반 장류 제조 및 성분분석 기준 마련 우수품종의 출원을 통한 고급화 국산화 콩품종 개발
4차년도 (2011)	<ul style="list-style-type: none"> 1년 숙성된장의 관능평가 및 항산화활성 평가 콩나물용 선발계통의 기능성 및 수량성 특성평가에 따른 생산적합 우수계통의 선발 	<ul style="list-style-type: none"> 숙성된장의 관능평가 숙성된장의 DPPH 방법을 활용한 항산화활성도 검정 우수 선발계통의 지역적응 시험 (주)CJ과 연계한 콩나물 재배 수율조사 밥밀용/장류용 신제품 '조생서리2호' 품종보호권 출원 	<ul style="list-style-type: none"> 소비자 수요를 반영한 고급화 이미지 된장제조를 위한 최적 콩품종 개발 기술 마련 우수품종의 출원을 통한 고급화 국산화 콩품종 개발
5차년도 (2012)	<ul style="list-style-type: none"> 콩나물용 선발계통의 수량성 검정 및 발아콩나물의 유용성분 분석 콩나물용 선발계통 대상 비린내 저감 콩 유전자원 활용 분자마커 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 발아콩나물의 유용성분(수분함량, 칼슘, 인, 철, 베타카로틴, 비타민C, 아미노산) 분석 Lipoxygenase(Lx 1,2,3) 유전자 분자마커 개발을 통한 비린내 저감 콩나물콩 유망계통의 선발 장류 및 나물용 우수 계통의 품종출원을 위한 자료준비, 종자증식 	<ul style="list-style-type: none"> 개발 분자마커를 활용한 비린내저감 유전자원의 육종초기세대 선발 기반마련 지역특산화 산업과 연계한 콩 신제품 출원을 통한 산업화 가능성 제시

제 4세부 TILLING 기법을 활용한 내염성 유전자 대량검정 및 벼 품종개발 (한국원자력연구원 김동섭)

구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2009)	벼 돌연변이 TILLING 집단 및 분석체계 확립	100	- 벼 돌연변이 TILLING 집단 구축 (M10 고정세대, M3 분리세대) 및 제8, 9협동과제 시료 분양: 목표형질에 따른 유망계통 선발 - Capillary method를 접목한 TILLING 분석 체계 구축: 아미노산 합성 관련 벼 유전자 대상 분석체계 확립
	간척지적응 유망계통 선발	100	- 간척지적응 벼 품종개발을 위한 대량 선발 시스템 확립(In vivo 및 간척지 선발) - 품종화를 위한 M10 고정세대 간척지 수량검정, 생리분석 및 M3 세대 3,000 계통 대상 In vivo 및 간척지 유망 계통 선발
2차 년도 (2010)	품종화를 위한 M ₁₁ 고정세대 유망계통의 간척지적응 특성검정 및 지역적응 시험	100	- 품종화를 위한 M ₁₁ 고정세대 간척지 수량검정, 생리·생화학적 특성 검정: ST-301, ST-87 계통 - 품종출원을 위한 3개 지역 (정읍, 익산, 계화도) 1년차 지역적응 시험
	품종화를 위한 M ₁₁ 고정세대 유망계통의 염 스트레스 반응 유전자 발현 대량검정 및 단백질 발현 검정	100	- Microarray 기법을 이용한 품종화 가능 유망 내염성 계통 2계통 (ST-87, 301)의 염 스트레스 반응 유전자 발현검정 및 염기작 관련 유전자군의 RT-PCR 검정 - 2-dimentional elecophoresis 기술을 이용한 품종화 가능 유망 내염성 계통 2계통 (ST-87, 301)의 염 스트레스 반응 단백질 발현 검정 및 MALDI-TOF 분석
	1차 선발 내염성 벼 233 계통 대상(M ₃₋₄) 세대 2, 3차 In vivo 내염성 선발 및 염 스트레스 반응 유전자 네트워크 구축을 위한 Microarray 분석	100	- 1차 선발 내염성 벼 233계통 대상(M ₃₋₄) 세대 2, 3차 In vivo 내염성 선발 - 염 스트레스 반응 유전자 네트워크 구축을 위한 3차 in vivo 선발 2계통(TILL II-877, TILL II-894)의 유전자 발현 검정
	내염성 관련 허브 유전자군 대상 Capillary method를 접목한 TILLING 분석(192 계통)	100	- TILLING 분석을 위한 허브유전자군 선별 및 Cloning: membrane transfer 관련 9 유전자 ((AKT, HKT, NSCC2, CAX, KUP, P5CS, NHX, NAC, SOS1) - 1차 In vivo 선발 192 계통(M ₂) 대상 Capillary method를 접목한 TILLING 분석
3차 년도	내염성 관련 허브 유전자군 대상 TILLING 분석	90	- 기능유전체 연구용 TILLING 집단(약 3,000 계통) 대상 membrane transpotation 관련 9개 유전자

(2011)	및 내염성 관련 유전자 네트워크 구축		<p>대상 TILLING 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - Microarray 기법을 이용한 염 스트레스 반응 유전자 대량검정 data mining 및 내염성 기작 유전자 네트워크 분석 - 염 스트레스에 대한 선발 집단의 형태적, 생리적 분석 - 염 스트레스 반응 특이 발현 유전자 검정 (RT-PCR, Northern blotting 등)
	간척지 적응 유전적 고정세대 유망계통 특성검정 (지역검정) 및 품종출원 준비	100	<ul style="list-style-type: none"> - 품종출원을 위한 간척지적응 유망 돌연변이 2계통(고정세대 ST301, ST87)의 2차 지역적응 시험 및 품종 출원 준비 - 간척지적응 유망계통 대상 수량검정
4차 년도 (2012)	내염성 관련 허브 유전자군 대상 TILLING 분석 검정 및 내염성 관련 유전자 네트워크 검증	100	<ul style="list-style-type: none"> - 기능유전체 연구용 TILLING 집단(약 3,000 계통) 대상 membrane transpotation 관련 11개 유전자 대상 TILLING 분석 완료 및 re-sequencing 검정 - 선발계통 세대진척 및 염 테스트 - Microarray 기법을 이용한 염 스트레스 반응 유전자 대량검정 data mining 및 내염성 기작 구축된 유전자 네트워크 검증 - 품질 관련 변이 유전자 클로닝 및 3건 NCBI 등록
	간척지 적응 유전적 고정세대 유망계통 품종출원	100	<ul style="list-style-type: none"> - 품종출원을 위한 간척지적응 유망 돌연변이 계통(고정세대)의 지역적응시험 완료(계화도, 정읍) - 내염성 고정세대 ST-301계통 기작해석 및 품종보호권 출원: 원해2호
5차 년도 (2013)	내염성 관련 허브 유전자군 대상 TILLING 분석 검정	100	<ul style="list-style-type: none"> - 기능유전체 연구용 TILLING 집단 (약 3,000 계통) 대상 membrane transportation 관련 9개 유전자 대상 TILLING 분석 re-sequencing 검정 - TILLING 분석 결과 활용 대상 유전자 SNP 마커 개발 및 검증 - 내염성 관련 분자표지의 간접선발 육종 효율 분석 (MAS)
	내염성 관련 유전자 네트워크 검정	100	- Microarray 결과 기반 DEGs 대상 염 스트레스 반응 특이 발현 유전자 검정 (RT-PCR)
	간척지 적응 출원 품종 재배시험 및 유전자발현 검정	100	<ul style="list-style-type: none"> - 출원품종 (원해2호) 간척지적응 재배시험 지원 - 간척지적응 유망계통 대상 유전자 발현 검정

제1협동 고기능성 쌀 품종 개발 및 실용화 (서울대 고희중)

구분 (연도)	년차별 연구목표	연구목표 달성도	기술발전 기여도
1차 년도 (2008)	저장단백질 돌연변이 형질 (esp2, esp3)을 일품벼에 도입	-저장단백질 돌연변이체 esp-2, esp-3를 일품벼와 교배 F1 종자 확보. -F1에 일품으로 역교배 하여 BC1F1 확보 및 F2 종자 확보예정	
	분질종자형질에 관한 유전 분석 분질종자 특성 분석	화청벼에서 유기된 분질종자 돌연변이계통 (flo)에 밀양23 품종을 교배하여 1,571 F2 집단을 육성하여 유전분석.	
	노란색 종피에 관한 유전 분석	화청벼에서 유기된 노란색 종피특성을 가진 돌연변이계통 (75094)에 밀양23 품종을 교배하여 900 F2 집단을 육성하여 유전분석.	
2차 년도 (2009)	녹미거대배 유망계통 육성 및 선발	-생산력예비 검정: 녹미거대배 유망계통 (00002, 00003) 과중 및 포장 재배	
	분질종자형질에 관한 유전 분석, 분질종자 특성 분석	-DNA 마커를 활용하여 분상질관여 유전자의 fine mapping 실시 및 유전자의 동정	
	노란색 종피에 관한 유전 분석	-DNA 마커를 활용하여 노란색 종피 관여 유전자의 fine mapping 실시 및 관여 유전자의 동정	
	고단백 돌연변이 계통의 유전자의 유전양상 분석	-유전분석용 F ₂ 집단 (790001/동진) 육성 및 유전자 mapping	
3차 년도 (2010)	녹미거대배 유망계통 육성 및 선발	-서농16호 (녹미거대배) 품종보호출원	
	노란색 종피의 생성과 관련된 유전자의 동정	- 노란색 종피와 관련된 유전자는 2번 염색체 long arm 부위의Os02g53140 으로 밝혀짐 - Wild-type과의 염기서열차이 분석결과 해당 유전자의 706bp 정도의 염기가 deletion	
	rolled leaf 돌연변이체 특성조사 및 유전분석	-rolled leaf 형질에 F2에서 유전 분석	
	새로운 돌연변이 유기	-보람찬, 남평, 칠보, 주남의 수정된 영화에 MNU를 처리하고 M1 종자를 확보함	
4차 년도 (2011)	노란색 종피를 조절하는 유전자의 기능연구	- 노란색 종피를 조절하는 것으로 생각되는 COP1 유전자를 RNAi를 통해 기능을 knock out 시켜 형질전환체 만듦. - GUS staining을 통해 COP1 유전자의 expression level과 부위를 확인함. - Yellow pigment isolation (4개의 candidate 물질과 비교)	
	early senescence 특성을 보이는 돌연변이체의 단백질체 발현 분석	-모본과 early senescence 특성을 보이는 돌연변이체에서 노화기 일어나기 전과 노화가 일어나기 시작하는 시점에서 10일 간격으로 잎을 수확하고 단백질 추출을 함.	
	새로운 돌연변이의 선발 및 phenotyping	- 확보한 M2 종자를 포장에 재배하여 특이 형질을 보이는 M2 개체를 선발.	
5차 년도	노란색 종피 pigment 동정 및 항산화 분석	-배와 배유에 축적된 물질은 isoorientin 으 로 생각됨	

		-isoorientin이 많이 축적되어 있는 배가 배유보다 항산화활성이 높음	
(2012)	early senescence mutant fine mapping	-7번 염색체 LOC_Os07g25680의 7번째 exon에서 아미노산이 치환(Alanine → Threonine) 되었음을 발견	

제 2협동 돌연변이 기술을 이용한 바이러스 저항성 고추 유전자원 개발 (서울대 강병철)

구분	년차별 연구목표	연구목표 달성도	기술발전 기여도
1차년도 (2009)	<ul style="list-style-type: none"> · M1 식물체 유기 · M2 종자확보 · M1 mutant screening · 바이러스 대량 검정법 시스템 확립 	<ul style="list-style-type: none"> · EMS mutagen을 이용한 M1 개체 유기 1,414개체 유기, 928개체의 M2 종자 확보 · HRM 분석법을 통한 M1 mutant 유기율 조사 (254개체 중 2개체에서 정상과 다르게 나옴) · 유월초에 바이러스 저항성 테스트 (CMV, TEV, TMV, CvMV) 	
2차년도 (2010)	<ul style="list-style-type: none"> · M1 식물체 유기 및 M2, M3 종자확보 · M2 mutant screening (형질조사) · 병저항성 계통 선발 (분자마커 개발) 	<ul style="list-style-type: none"> · EMS mutagen을 이용한 M1 개체 유기 1,000개체 유기, 928개체의 M2 종자 확보 · 500계통을 과중해 형질 조사 M3 종자 확보 · HRM 분석법을 이용하여 고추 유전자원 250점에 대한 자연변이 검정 · ELISA 분석 및 염기서열 분석을 통해 TEV 바이러스 저항성 후보 유전자원 확보 · TEV 저항성 유전자인 <i>eIF4E</i>를 이용하여 HRM을 통한 분자 마커 개발 	
3차년도 (2011)	<ul style="list-style-type: none"> · M1 식물체 유기 및 M2, M3 종자확보 · M2 mutant screening (형질조사) · 병저항성 계통 선발 	<ul style="list-style-type: none"> · EMS mutagen을 이용한 M1 개체 유기 3,600개체 유기를 통해 2009년부터 4,300개체의 M2 종자 확보 · 284계통을 과중해 133개 M2 계통에서 다양한 표현형 확인 후 M3 종자 확보 · 고추유전자원 186개체 중 4개체에서 CMV 저항성을 보였고 565개체 중 6개체에서 TSWV 저항성을 보였음 	
4차년도 (2012)	<ul style="list-style-type: none"> · M1 식물체 유기 및 M2 종자 확보 · M2 mutant screening (형질조사) · 매운맛 분석연구 수행 · 바이러스 기주인자 저항성 유전자의 동정 	<ul style="list-style-type: none"> · EMS mutagen을 이용한 M1 개체 유기 1,000개체 유기를 통해 2009년부터 5,023개체의 M2 종자 확보 · 917 M2 계통 중 192 계통에서 다양한 표현형 확인 후 547 개체의 M3 종자 확보, 추가로 Gibb's 시약과 HPLC 분석을 통해 6계통에서 맵지 않은 고추를 선발함 · Yeast two hybrid system을 이용한 바이러스 상호작용 유전자 분리 및 GFP 활용한 기능 분석을 통해 10개의 유전자를 선발 	
5차년도 (2013)	<ul style="list-style-type: none"> · M3 종자확보 · M2 mutant screening (형질조사) · 매운맛 분석연구 수행 · 병저항성 계통 선발(ELISA) · 바이러스 기주인자 저항성 유전자의 동정(TILLING) 	<ul style="list-style-type: none"> · 563 M2 계통 중 161 계통에서 다양한 표현형 확인 후 439개체의 M3 종자 확보 · 4차년도에 선발한 6계통의 맵지 않은 고추를 M3 계통으로 세대를 진전시킨 후에 분석한 결과 1계통(4개체)에서 맵지 않은 고추 선발 · 473 M3 계통을 대상으로 CMV-P1에 저항성이 있는지 ELISA방법으로 검정한 결과 2계통에서 병징이 나타나지 않음을 확인함 · 21 M2 계통 (265개체)에서 TILLING방법을 통해 <i>eEF1B</i>의 돌연변이로 인해 PVX의 병징이 대조군에 비해 늦게 올라온 3 개체와 병징이 관찰되지 않은 2 개체를 선발 	

제 3협동 돌연변이 육종기술을 이용한 밀 신품종 개발 (고려대 서용원)

구분	년차별 연구목표	연구목표 달성도	기술발전 기여도
1차년도 (2008-2009)	<ul style="list-style-type: none"> 방사선 유용 돌연변이 계통 전개 및 특성 검정을 통한 우수계통 선발 	<ul style="list-style-type: none"> 본 연구진의 선행연구로부터 얻은 적정 선량 (100 Gy, 200 Gy, 300 Gy) 별 우수 돌연변이 M3 계통의 세대 증진 (금강 396계통, 올그루 408계통) 돌연변이 계통에 대한 포장 평가 및 종자 특성 조사를 바탕으로 한 우수 계통 선발 	밀 유용 돌연변이 계통 유기 및 선발기초기술 확보로 적정 선량기준 제시
	<ul style="list-style-type: none"> 우수 품종에 대한 적정 방사선 조사를 통한 유용 돌연변이체 유도 	<ul style="list-style-type: none"> 국내 우수 장려 밀 품종인 “조은”, “조정” 및 연구진이 개발한 전좌계통 (2BS/2RL)에 다양한 선량의 방사선 조사를 통하여 유용돌연변이 유도 우수돌연변이개체는 head selection을 통하여 선발 	
2차년도 (2009-2010)	<ul style="list-style-type: none"> 선발계통 (M₄₅)에 대한 지속적 농업형질 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 우수 방사선돌연변이계통 육성 (생산력 검정시험, 36계통) 농업 형질평가 우수돌연변이계통 선발, 증식 (포장검정, 제 농업특성 검정, 선발 및 세대진전) 	돌연변이 집단으로부터 우수계통 선발 및 분자유종적 분석기술 제공
	<ul style="list-style-type: none"> M₂ 세대진전, 포장평가 및 선발 	<ul style="list-style-type: none"> 우수돌연변이 개체에 대한 지속적 선발 및 세대진전 (926 계통) 	
	<ul style="list-style-type: none"> 우수 돌연변이 계통에 대한 유전생화학적 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 유전생화학적 분석을 통한 유용돌연변이계통의 이용 목적(end-use quality)에 따른 평가 조숙관련 (화기형성)에 관련된 유전자를 분자유종학적 방법으로 분석 	
3차년도 (2010)	<ul style="list-style-type: none"> 선발계통 (M₅₆)에 대한 지속적 농업형질 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 지속적 유용 돌연변이계통육성 (32계통) 제 농업특성 검정, 선발 및 세대진전 밀 품종 보호권 출원: 트랜스 (2011 - 432호) 	화분과 작물의 숙기결정 기초기반연구를 통한 조숙성 밀 육종 연구 기여
	<ul style="list-style-type: none"> M₃ 세대진전, 포장평가 및 선발 	<ul style="list-style-type: none"> 우수돌연변이 개체에 대한 지속적 선발 및 세대진전 (1200 개체 수선발) 	
	<ul style="list-style-type: none"> 우수 돌연변이 계통에 대한 유전생화학적 분석 및 조숙 관련 유전자 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 우수 돌연변이 계통 gliadin pattern 분석 우수 돌연변이 genomic polymorphism 분석 분자유전학적 연구를 통한 조숙 관련 유전자 기능 분석 	
4차년도 (2011)	<ul style="list-style-type: none"> 우수 방사선돌연변이 계통(M₆₇)육성 및 생산력 검정 	<ul style="list-style-type: none"> 우수 돌연변이 계통육성 (덕소 35계통, 정읍 27계통) 포장검정, 제 농업특성 검정, 선발 및 세대진전 	밀 돌연변이 계통 세대진전을 통한 우수돌연변이 선발 기여
	<ul style="list-style-type: none"> M₄ 개체에 대한 지속적 선발 및 세대진전 	<ul style="list-style-type: none"> 우수돌연변이 개체에 대한 지속적 선발 및 세대진전 (2000 개체 수선발) 	
	<ul style="list-style-type: none"> 조숙성 밀 육종을 위한 분자유종 연구 	<ul style="list-style-type: none"> 생식생장 전환 시기 특정 protein을 degradation 시키는 SCF (Skp1-Cullin-F box protein) complex의 분자생물학적 검정 	분자유종기술의 조숙성 밀 육종 연구에 기여

5차년도 (2012)	<ul style="list-style-type: none"> • 우수 방사선돌연변이 계통(M₇₋₈)육성 및 생산력 검정 	<ul style="list-style-type: none"> • 우수 돌연변이 계통육성 (덕소 31계통, 정읍 21계통) • 포장검정, 제 농업특성 검정, 선발 및 세대진전 • 밀 품종 보호권 등록: 트랜스 (4695호) 	<p>유용 돌연변이 계통을 이용한 품종 및 기본식물 개발</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • M₅ 개체에 대한 지속적 선발 및 세대진전 	<ul style="list-style-type: none"> • 우수돌연변이 개체에 대한 지속적 선발 및 세대진전 (818 개체 수선발) • 밀 품종 보호권 출원으로 활용 	<p>유용변이 식물자원의 육종재료로서 직접기여 및 유전자의 분자유종연구에 기여</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • 조숙성 밀 육종을 위한 분자유종 연구 	<ul style="list-style-type: none"> • 생식생장 전환 시기 특정 protein을 degradation 시키는 TaRF1(E3 ligase ubiquitin)의 분자생물학적 검정 	

제4협동 블랙베리 유망돌연변이 계통의 품종 실용화 및 스테비아 육종 (한국스테비아(주) 김영호)

구분	년차별 연구목표	연구목표 달성도	기술발전 기여도
1차년도 (2008)	<ul style="list-style-type: none"> 블랙베리 유망 계통 대량생산 체계 확립 및 품종화 준비 스테비아 물리적·화학적 돌연변이원을 이용한 돌연변이 유기 및 우수변이체 선발 	<ul style="list-style-type: none"> 블랙베리의 우수 변이체를 조직배양 및 삼목에 의한 대량생산 기술 개발 및 묘목대량 증식 유망 계통 특성검정 및 품종출원 데이터 확보 신 블랙베리 계통의 돌연변이 유기 스테비아 조직배양을 통한 재분화 체계 확립 스테비아 기내·외 돌연변이원을 이용한 돌연변이 유기 및 선발 	<ul style="list-style-type: none"> 블랙베리 유식물체의 조직배양을 통한 대량생산기술 확립 블랙베리 신품종 육종 방사선을 이용한 돌연변이 육종 및 유식물체의 방사선 감수성 테스트
2차년도 (2009)	<ul style="list-style-type: none"> 블랙베리 우수 변이체 특허출원 및 실증재배 스테비아 우수 변이체 선발, 기능성물질 함량 테스트 및 2세대 우수변이체 선발 	<ul style="list-style-type: none"> 블랙베리 우수변이체 특허출원 (1건) 신품종 및 유망 계통 묘목대량 증식 신 블랙베리 유용 돌연변이체 선발 스테비아 우수변이체 선발 및 돌연변이원을 이용한 2차 돌연변이 유기 우량 변이체의 기능성물질 함량 및 내병성 테스트 변이체 후대(M2) 검정 및 우수변이체 선발 	<ul style="list-style-type: none"> 블랙베리 신품종 육종 방사선 및 물리화학적 처리원을 이용한 돌연변이 유기 방법 확립 스테비아 우량 변이체 확보 분자생물학적 기법을 이용한 변이도 검정
3차년도 (2010)	<ul style="list-style-type: none"> 블랙베리 신품종 등록 및 재배법 확립 스테비아 우수 변이체 선발 및 대량생산 체계 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 블랙베리 신품종(특허) 등록 1건 개발 품종 묘목 대량증식 농가 재배기술 개발 및 농가 실증재배 신 변이체 선발 및 특성 검정 스테비아 최종 우수변이체 선발 및 기능성물질 함량 테스트 스테비아 우수변이체 대량생산 체계 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 실증재배를 통한 신품종 특성 검정 실증재배를 통한 신품종의 재배법 확립 스테비아 식물체내 유용 기능성물질 함량 분석 우수변이체 대량생산 기술 확립
4차년도 (2011)	<ul style="list-style-type: none"> 블랙베리 신품종 및 재배법 농가보급 및 기능성 특화 상품 개발 스테비아 우수 변이체 특허출원 및 신품종 실증재배 후 재배법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 블랙베리 신품종 및 재배법 농가 보급 지자체 연계 지역 특산재배단지 조성 및 묘목보급 실용화 돌연변이 선발 계통의 후대검정, 선발 및 유망 계통 선발 기능성 특화 상품개발 지원(2세부 정일운) 스테비아 우수변이체 특허/신품종 출원 농가보급 위한 실증재배법 확립 지역 농가 실증 재배 	<ul style="list-style-type: none"> 블랙베리 신품종 재배법 확립 및 농가 보급 기능성 특화상품 개발 스테비아 신품종 출원 스테비아 신품종 재배법 확립 및 실증재배

<p>5차년도 (2012)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 블랙베리 신제품 및 재배법 농가보급 및 기능성 특화 상품 개발 • 스테비아 우수 변이체 특허출원 및 신제품 실증재배 후 재배법 확립 	<ul style="list-style-type: none"> • 블랙베리 신제품 및 재배법 농가보급 • 지자체와 연계 지역특산 재배단지 조성 및 묘목 보급 실용화 • 돌연변이 선발 계통의 후대검정 • 기능성 특화 상품개발 지원(2세부 정일운) • 스테비아 우수변이체 특허/신제품 출원 • 농가보급 위한 실증재배법 확립 • 지역 농가 실증 재배: 중국 품종 수출 가능성 검토 	<ul style="list-style-type: none"> • 블랙베리 신제품 재배법 확립 및 농가 보급 • 기능성 특화상품 개발 • 스테비아 신제품 출원 • 스테비아 신제품 재배법 확립 및 실증재배
------------------------	--	--	---

제 5협동 돌연변이 기술을 이용한 산업용 고구마 품종육성(서울시립대 김선형)

연구개발 목표	연구개발내용	달성도 (%)
<p>(1차년도)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 돌연변이 육종을 위한 in vitro system 확립 • 우수 품종을 대상으로 방사선 조사를 통한 유용돌연변이 유도 	<ul style="list-style-type: none"> - 돌연변이 육종을 위한 in vitro system 확립을 통한 순계 돌연변이 라인 확보 - shoot apical meristem을 이용한 방사선 돌연변이체 유도 - multiple shoot 배양법을 이용한 기내방사선 돌연변이 유도 - 율미를 대상으로 한 감마선 조사 	100
<p>(2차년도)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 고구마의 성장점을 이용한 배발생 캘러스 유도 및 재분화시스템 확립과 이를 이용한 고구마 배수체 육종 • 주요 품종을 대상으로 방사선 조사를 통한 돌연변이유도 • 우수선발라인의 생화학적/ 생리적/ 농업적 특성조사 	<ul style="list-style-type: none"> - 장려품종인 율미를 대상으로 성장점 이용한 배발생 캘러스를 유도하고, 캘러스에 콜히친 처리 - 콜히친이 처리된 캘러스의 재분화 시스템을 이용한 식물체 유도 - 콜히친 처리 재분화식물체의 배수성 확인 - 현 장려품종인 신건미를 대상으로 캘러스 유기 및 재분화능 조사 - 현 장려품종인 신건미를 이용하여 돌연변이를 유도하기 위해 방사선 조사 (100Gy) 실시 및 변이체 유도 - 수량성, 성분분석 및 표현형 조사를 통한 율미 돌연변이 29계통 선발 - 돌연변이 선발라인의 포장시험재배 	100
<p>(3차년도)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 방사선 조사 및 콜히친 처리를 통한 고구마의 돌연변이체 생산 및 포장재배를 통한 특성조사 • RAPD 등을 이용한 계통별 유전형 분석 및 마커개발 • 농업적 형질특성 검정 및 성분 목적별 계통선발 	<ul style="list-style-type: none"> - 장려품종인 신건미와 호박고구마를 대상으로 감마선을 조사하여 돌연변이체를 유도 - 신건미 돌연변이 유도라인의 포장재배시험 - 호박고구마 돌연변이라인의 병포장시험재배 및 덩굴쪼김병내성 라인 선발 - 콜히친을 이용한 배수체 육종 및 배수체 선발과 포장재배시험 - RAPD 기법을 이용한 계통별 유전형 분석 - 마커개발을 위한 돌연변이 유도라인의 모품종을 비롯한 국내외 주요 품종을 대상으로 RAPD분석을 실시 - 1, 2차년도 선발라인의 포장재배 시험 및 재배 특성 조사 - 돌연변이라인의 형태적 특성변화 조사 및 병포장재배를 통한 내병성 라인선발 - 선발라인 카로티노이드 함량분석 및 전분과 당 함량분석 	100

<p>(4,5차년도)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 포장재배를 통한 유용 돌연변이라인의 선발 및 재배형질 특성조사 • 유망 변이체의 수량성 및 성분특성 검정 • 분자마커 및 분자생물학적 기법을 이용한 유망 계통 선발 적용 • 유망 돌연변이 고정 계통의 품종화와 관련한 특성분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 2차년도, 3차년도 신건미(72라인) 및 울미(29라인)선발라인의 포장시험 재배 - 울미 및 신건미 돌연변이 선발라인의 형질 특성(표피색, 육질색) 조사 - 수량성 조사(주당 괴근수, 평균 괴근중, 총괴근수량 등) - 전분특성 분석 및 가용성 당함량분석 - 카로티노이드 함량분석 - 돌연변이 라인의 지상부 (잎모양, 줄기색) 특성조사 - 괴근(모양, 피색, 육색) 특성조사 - 수확량 분석 	100
--	--	-----

제6협동 내염성 및 조숙성, 단간성 유채 돌연변이 품종 개발(전북대,은종선)

구분	년차별 연구목표	연구목표 달성도	기술발전 기여도
1차년도 (2008)	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 돌연변이계통의 농경상 유용형질 특성검정 및 내염성, 단간, 조숙성 예비계통 선발 ◦ 변이계통 종자의 지방산 함량 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 유채 '내한' '탐미' '한라'의 돌연변이체의 유용 농업형질 특성조사 ◦ 내염, 단간, 조숙성, 엽록체변이 등 유용한 형질의 예비계통 선발 ◦ 선발계통의 지방 및 지방산함량 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 우리나라 유채 돌연변이 육종의 기초확립 및 유용형질의 선발 실용화에 기여
2차년도 (2009)	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 단간, 조숙, 내염성 등 유용형질 특성 및 고정성 조사 ◦ 단간, 조숙성 등 유채 예비품종출원용 유망계통 선발 ◦ M₄세대의 지방산 함량 및 유연관계 분석 ◦ 돌연변이계통 신품종 출원 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 내염, 단간, 조숙성 등 유용한 형질의 예비계통 선발 ◦ 변이계통의 유연관계 분석 ◦ 선발계통의 지방 및 지방산함량 분석 ◦ 조숙, 단간성 유채 신품종보호출원 '조단' 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 돌연변이 육종방법에 의한 유채의 조숙, 단간성 신품종보호출원으로 재배의 광역화 기여
3차년도 (2010)	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 내염, 조숙, 단간성 유용 변이계통 M₇세대 선발 ◦ 엽록소 변이계통 및 대화계통 M₇세대 선발 ◦ 유용변이체의 신품종 출원 및 농업유전자원 기탁 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 내염, 단간, 조숙성 등 유용한 형질의 예비계통 선발 ◦ 유채 엽록소변이, 초단간, 조숙 및 대화변이계통 5종의 농업유전자원 기탁 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 방사선처리에 의한 유채의 돌연변이 유전자원의 기탁에 의한 육종효율의 증대
4차년도 (2011)	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 내염, 단간, 조숙 등 유용형질의 특성 및 고정성 조사 ◦ 선발계통의 지방 및 지방산 함량 분석 ◦ 조숙·단간성 및 대화 변이계통 품종보호출원 ◦ 고오일함량계통의 농업 유전자원 기탁 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 내염, 단간, 조숙성 등 유용한 형질의 예비계통 선발 ◦ 조숙, 단간 및 대화성 유채 신품종보호출원 2건 '온누리'와 '대화' ◦ 유채 고오일 변이계통 1종의 농업 유전자원 기탁 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 돌연변이 육종방법에 의한 유채의 조숙, 단간성 및 대화성 신품종보호출원에 의한 유채재배 확대 가능 ◦ 육성종의 제주도 농업기술센터 시험재배 수행
5차년도 (2012)	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 조숙·단간성 및 내염성 변이계통 품종보호출원 ◦ 고오일함량계통의 농업 유전자원 기탁 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 조숙, 단간 및 내염성 유채 신품종보호출원 2건 '미나'와 '만금' ◦ 유채 내염성 변이계통 1종의 농업 유전자원 기탁 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 우리나라 유채 돌연변이 육종 체계 확립, 유용형질의 선발 실용화 및 재배의 광역화에 기여

제7협동 녹색꽃양배추(broccoli)의 돌연변이 유래 우성 응성불임성의 이용 연구 ((주)바이오브리딩연구소 이수성)

구분	년차별 연구목표	연구목표 달성도	기술발전 기여도
1차년도 2009	<ul style="list-style-type: none"> • 응성불임성 마커 개발 • 응성불임개체의 가임화 및 다양한 SS계통 육성 • 소포자 배양에 의한 다양한 고정 계통 육성 	<ul style="list-style-type: none"> • 배추에서 개발된 SSR 및 IBP 프라이머 701개를 Ss와 ss의 bulk에 적용하여 응성불임성 'S' 인자에 연관된 primer를 찾고자 시험하였으나 없었다. • 응성불임주의 전조처리로 일시적 가임화 유도에 성공. • 우수 F1 품종 5종을 소포자 배양하여 197개체를 순화함. 	<ul style="list-style-type: none"> • 1년차 이후 계속 연구하였으나 알맞은 마커를 찾지 못하였으며 5년차에 양배추 SSR프라이머 중 S 인자 연관 마커를 찾아 특허 신청함 • 응성불임성의 일시적 가임화 유도 기술 확립. 필요시 응용할 수 있음. • 소포자 유래 순계의 다량 육성으로 우수품종 육성 자료 다량 확보.
2차년도 2010	<ul style="list-style-type: none"> • 응성불임성 인자 호모의 SS계통 육성 • 소포자 배양에 의한 다양한 고정계통 육성 	<ul style="list-style-type: none"> • 우성응성불임성인자(S)와 그 발현을 억제하는 인자(F)가 있으며 이 두 인자가 조합되어 응성불임성 인자가 SS 호모이면서 가임인 계통(SSFf)이 확인 됨. • 1차년도 배양유래 88개체에서 채종 완료. 2차년도에는 응성불임성 인자형이 SSFf인 계통의 소포자 배양으로 94개체 순화. 	<ul style="list-style-type: none"> • 응성불임성 인자가 SS 호모이면서 가임인 계통(SSFf)의 소포자를 배양하여 SSff SSFF 인 계통을 육성 할 수 있게 됨 • 응성불임성 관련 유전자 조성이 SSFf인 개체를 소포자 배양하여 많은 개체 획득. 응성불임성 인자형이 SSff인 호모 계통 육성이 가능할 것으로 기대됨
3차년도 2011	<ul style="list-style-type: none"> • 응성불임성 인자 호모의 SS 계통 육성 • 소포자 배양에 의한 계통 육성 • 1대잡종 육성 	<ul style="list-style-type: none"> • SSFf 개체의 소포자 유래 개체 중 가임개체 SSFF와 불임개체 SSff 구분. SS 호모 계통 육성 • 소포자 유래 138계통의 후대 채종에 성공 • 봄과 여름에 계통과 F1조합을 검정하여 우수조합 3개 선발. 	<ul style="list-style-type: none"> • 원예적 형질이 고정된 응성불임성 호모 계통(SSff) 육성. 다양한 계통과 F1 조합 작성 가능. • 소포자 배양 유래 SSFF계통은 유전자원으로 등록 • 우수 조합 선발로 우량 품종육성의 가능성 확인 • 이상의 결과를 국내 SCI 논문으로 게재

<p>4차년도 2012</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 다양한 SS개통 육성 • 응성불임성이용 1대잡종육성 • 응성불임계통의 유지 증식 체계 확립 	<ul style="list-style-type: none"> • 원예적 형질이 고정된 응성불임성 호모 계통(SSff) 육성 • 봄과 가을 공히 우수한 1조합 선발 • 소화경과 꽃봉오리 배양으로 다량의 영양번식체 체계 확립 	<ul style="list-style-type: none"> • SSff계통은 소화경과 꽃봉오리 배양으로 증식하여 F1 품종 육성의 모계로 이용 • 선발조합은 5차년도의 재검 후 신품종으로 등록예정
<p>5차년도 2013</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 다양한 SS개통 육성 • 응성불임성 이용 1대잡종육성 	<ul style="list-style-type: none"> • 양배추 SSR프라이머 1468개를 검정하여 단인자 응성불임성 유전자 S연관 마커 개발 • 우수 F1조합 선발 	<ul style="list-style-type: none"> • 개발된 마커는 특허 신청 • 선발조합의 품종 등록(2014)을 위하여 종자 증식 중.

제8협동 돌연변이 육종기술을 이용한 색소 및 영양 강화 토마토 계통 선발 및 품종 육성 (한경대학교 강권규)

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용	기술발전 기여도
1차년도 (2008)	<ul style="list-style-type: none"> - 국내외 유전자원 수집, 분류 및 분자마커 개발 - 방사선 돌연변이 유전자원 개발 및 육성 	<ul style="list-style-type: none"> - 유전자원 수집 및 분류 - 국내외 토마토 유전자원 수집 및 특성평가 - 고색소 및 비타민 함량 높은 계통 선발 및 후대 육성 - 선발 육성계통의 유전적 다양성 및 분자마커 탐색 - 방사선 돌연변이 유기 및 M₁ 식물 육성 - LD에 의한 선량 결정 - 발아율 및 엽록소 결핍 변이체 빈도 조사에 의한 돌연변이 event 빈도 조사 - M₂ 종자 육성 - 방사선 이용 중간교잡 - 교잡불임성 및 교잡불화합성에 대한 방사선 조사효과 규명 	<ul style="list-style-type: none"> - 유전자원 수집 - 돌연변이원 처리 및 선발 조건 확립
2차년도 (2009)	<ul style="list-style-type: none"> - 국내외 수집 유전자원에서 유망형질 평가 및 교배조합 작성 - M2 세대에서 표현형 변이 및 목적형질 변이 계통 선발 및 육성 - 방사선 돌연변이 M2세대로부터 환경스트레스 저항성 계통육성 - 중간잡종 토마토의 유용 육종형질평가 	<ul style="list-style-type: none"> -전년도 선발계통으로부터 유망형질 재평가 위한 특성검정실시: 과색, 과형, 과중, 과형이층, pH, 산도, 당도 등 총 8가지 세부항목을 대상으로 조사하여 유망형질 평가 및 자식종자 육성 -고당도 및 고색소 선발 계통간 reciprocal cross 및 교배종자 획득 -돌연변이 후대 M2세대 5600개체를 포장에 전개하여 농업 형질 조사 : 당도 및 색도개화기 등 -M2식물을 대상으로 형질개선 (조숙, 고색소, 고당도) 돌연변이 개체선발 및 자식종자육성 (M3세대) -기내에서 M2 60000종자로부터 PEG 저항성 개체선발 및 자식종자 육성 -PEG 저항성계통의 농업형질 평가 -저항성계통에서 스트레스관련 유전자들의 발현현상 구명 -중간잡종으로부터 얻어진 잡종세대의 형질 평가 -잡종식물체의 분자생물학적 해석 -잡종식물체의 당도, 비타민, 색소 등 육종적 이용평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 선발체계 확립 - 형질 특성 구명

<p>3차년도 (2010)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 유망선발 계통의 교배조합 및 평가 - 목적형질 돌연변이 계통 육성 및 평가 	<ul style="list-style-type: none"> -고당도 및 색소 계통의 계통화: 과색, 과형, 과중, 과형이층, pH, 산도, 당도 등 총 8가지 세부항목을 대상으로 조사하여 유망형질 평가 및 자식종자 육성 -고당도 및 고색소 선발 계통간 reciprocal cross 및 교배종자 획득 -F1 잡종세대의 조합능력 평가 -MAS를 통한 내병성 정도 평가 -우수 예비품종의 선발 -Parent 계통의 증식 및 F1종자 육성 -돌연변이 후대 유망돌연변이체 선발 및 특성검정 -선발돌연변이체의 후대육성 -선발 돌연변이체의 농업 형질 조사 : 당도 및 색도개화기 등 -유망 돌연변이 선발계통들의 특수형질 조사 및 자식종자육성 (M4~M5세대) 	<p>-선발계통의 자식화</p>
<p>4차년도 (2011)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 유망 고당도, 색소 선발 계통의 고정화 및 특성분석 - 유망 선발 돌연변이체의 자식화 및 특성분석 	<ul style="list-style-type: none"> -고당도 및 고색소 계통의 자식종자 육성 -과실 특성분석(일반적 특성) -선발계통의 라이코펜 함량 -선발 계통의 조합능력 특성분석 -선발계통의 라이코펜 함량과 유전자 발현 - 돌연변이 유망계통의 당도 및 당 함량분석 -L-glutamin 함량분석 -비타민 C의 함량분석 - 클로로필, 라이코펜 함량분석 - 돌연변이체의 과실 속도에 의한 색소계의 변화 	<p>- 선발계통의 자식화 및 고정화</p>
<p>5차년도 (2012)</p>	<p>유망 선발 돌연변이 계통의 자식화 및 특성분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> -고당도 및 고색소 계통의 자식종자 육성 -과실 특성분석(일반적 특성) -선발계통의 라이코펜 함량 -선발 계통의 조합능력 특성분석 -선발계통의 라이코펜 함량과 유전자 발현 - 돌연변이 유망계통의 당도 및 당 함량분석 -L-glutamin 함량분석 -비타민 C의 함량분석 - 클로로필, 라이코펜 함량분석 - 돌연변이체의 과실 속도에 의한 색소계의 변화 	<p>- 선발계통의 자식화 및 고정화</p>

제 9협동 유전자마커 시스템을 이용한 벼 돌연변이 계통선발 및 분자마커 개발 (한국생명공학연구원 권석운)

구분	년차별 연구목표	연구목표 달성도	기술발전 기여도
1차년도 (2008)	<ul style="list-style-type: none"> • 병 저항성 스크리닝 체계 구축 및 벼 병저항성 돌연변이체 선발 	<ul style="list-style-type: none"> • 벼흰잎마름병 유발 병원균에 대한 병저항성 돌연변이 선발을 위한 스크리닝 체계 구축 • 벼흰잎마름병에 저항성을 나타내는 돌연변이 라인 191라인을 예비선발 	<ul style="list-style-type: none"> • 돌연변이 집단을 대상으로 병 스크리닝 체계 구축 및 저항성 계통 선발
2차년도 (2009)	<ul style="list-style-type: none"> • 병저항성 돌연변이체의 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 병 접종에 대한 반응이 대조군과 다른 6개 돌연변이 계통 선발 • 선발된 계통에 대한 특성 분석 • 유전자 발현 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 선발된 개체의 특성 (식물체 생장, 유전자 발현 변화) 조사 • 선발된 개체의 세대진전 및 특성 분석
3차년도 (2010)	<ul style="list-style-type: none"> • 돌연변이 개체의 세대진전 및 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 선발된 개체의 세대진전 (M6) 및 병 발생 관련 유전자 발현 분석 • Microarray 분석을 통한 유전자 발현 변화 대량 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 병 저항성 유망 계통 선발, 세대진전 및 특성 분석 • 선발된 계통에서 발현 변화를 보이는 유전자 대량 발굴
4차년도 (2011)	<ul style="list-style-type: none"> • 선발된 계통에서 발현 유전자 대량 분석 • 원인 유전자 규명 및 위한 유전체 재분석용 개체 확보 	<ul style="list-style-type: none"> • 선발된 계통에서 특정 생합성 관련 유전자의 발현 증대 확인 • 병 발생 반응이 상이한 후보 돌연변이체 추가 확보 및 유전체 재분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 병발생과 관련된 유전자 분석을 통해 후보 변이체 추가 확보 • 유전체 재분석 재료 확보
5차년도 (2012)	<ul style="list-style-type: none"> • 병저항성 계통에서 세대진전에 따른 저항성 유전분석 	<ul style="list-style-type: none"> • Microarray 분석을 통해 확보된 유전자의 발현 특성 분석 및 원인 유전자군 발굴 • 해당 돌연변이체의 병저항성 유전 확인 	<ul style="list-style-type: none"> • 확보한 돌연변이 계통을 대상으로 저항성 관련 유전자 발현 변화 확인 • 확보된 계통의 세대진전에 따른 병저항성 특성 확인 및 후속연구 재료 확보

제10협동 돌연변이체를 이용한 기후변화 대응 벼 유전자 네트워크 구축 및 품종 개발 (강원대학교 장철성)

구분	년차별 연구목표	연구목표 달성도	기술발전 기여도
1차년도 (2008)	<ul style="list-style-type: none"> 기후변화 대응 벼 돌연변이 유전자 선발 체계 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 고온 및 저온 스트레스 내성 돌연변이 선발체계 확립 선발된 개체에 대한 분자생리학적 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 고온 및 저온 스트레스 내성 돌연변이체 선발 조건 설정 고온 및 저온 노출 후 식물체의 피해 양상 규명
2차년도 (2009)	<ul style="list-style-type: none"> 기후변화 대응 돌연변이체 후대양성을 통한 대량 유전자 분석 	<ul style="list-style-type: none"> Microarray와 구축된 분석 기법을 이용한 전사체 대량 발현 양상 규명 기존 데이터베이스 연동 분석 유용 돌연변이체 후대 양성 	<ul style="list-style-type: none"> 전사체 대량 분석 기법 구축 빅 데이터를 활용한 분석 방법 설정 저온/고온 스트레스 내성 돌연변이체 선발 및 세대 진전
3차년도 (2010)	<ul style="list-style-type: none"> 내열성, 내냉성 관련 네트워크 분석 및 교배 모본으로 육성 	<ul style="list-style-type: none"> <i>In silico</i> 분석을 통한 고온 및 저온 스트레스 내성 관련 유전체 모델링 허브 유전자 규명 및 선발된 돌연변이체 분석 유용 돌연변이체의 재배, 생리적 특성검정 	<ul style="list-style-type: none"> <i>In silico</i> 분석을 통한 유전체 모델링 기법 구축 네트워크 분석을 통한 유전자 규명 및 분석 기법 유용 돌연변이체의 특성 검정 방법 설정
4,5차년도 (2011~2012)	<ul style="list-style-type: none"> 허브 유전자군의 TILLING 라이브러리 선발 기후변화대응 GAB 체계 확립 및 활용 유망 돌연변이체의 품종 육성 	<ul style="list-style-type: none"> 허브유전자가 변형된 TILLING 라이브러리 선발 및 특성 검정 네트워크 변화 규명 및 허브 유전자군들의 분자생물학적 분석 네트워크 구축 및 유용 유전자 분석을 통한 특허 출원 및 등록 선발된 돌연변이체의 후대 검정을 통한 유용유전자원 확보 선발 개체의 재배 특성 검정 및 품종 육성 	<ul style="list-style-type: none"> TILLING 3,000계통 15,000 개체 확보 및 DNA 분리, 유전자원 pool 확보 고온/저온 관련 유전자 분석 및 출원(1건), 등록(1건) 고온/저온 내성 돌연변이체 선발 및 후대 육성, 종자 확보 고온/저온 냉성 품종 육성을 위한 특성 검정

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1절 연구개발 신품종 및 유망 선발 들연변이 계통

1. 신품종 ‘장대’의 개화기는 조생종보다 35~40일 늦고, 원품종보다는 10~15일 빠르고, 주당 생체중은 원품종과 비슷하고, 조생종보다 최대 2.6배 무거우며, 종자생산량은 10a 당 28 kg으로 조생종 15~33 kg과 비교하여 유사하거나 높음. 또한, 사료 가치를 분석한 결과, 잎의 조단백 함량과 줄기의 조섬유 함량이 높고, 잎과 줄기의 상대적사료가치(RFV)가 각각 특급과 2등급으로 높으며, 단위면적당 생산량도 옥수수 1.5배로 높아 친환경소재 및 양질의 조사료 자원으로 활용이 기대됨.
2. 백마(출원 2012-538)는 꽃의 색이 흰색으로 원품종과 기존 품종의 아이보리색과 구별되고 개화기는 파종후 80일로 원품종(61일)보다 20일정도 늦고, “장대”(99일)보다 20일 가량 빠름. 성숙기 초장은 257.0 cm로 원품종 C14(258.5 cm)과 유사하며, “장대” 품종(311.3 cm)보다는 작은 것이 특징, 유희지 등을 이용한 산업소재 생산과 경관 작물 및 사료작물 단기재배로 이용이 기대됨.
3. 또한 적봉(출원 2012-537)은 줄기와 잎이 진한 적보라색으로 다량의 안토시아닌을 함유하고 있으며 최근 축산물 내 항생제 잔류문제가 사회적인 문제로 대두되고 2012년부터 가축 사료 내 성장촉진용 항생제 사용을 전면 금지하는 법안이 마련됨에 따라 가축의 면역을 강화시키면서도 사료로서도 가치가 높은 고기능성 조사료 자원으로 활용이 기대됨.
4. 콩 출원 및 등록 신품종 “원율”, “원현”, “조생서리 2호”
: 차별화된 국산콩 개발 및 고급화로 국내 콩 생산기반의 안정화 기반 마련. 농가 무상보급을 통한 들연변이 육종 개발 품종 저변 확대에 기여
5. 기타 장류 및 나물용 콩 유망들연변이 계통
: 농업형질 및 관련형질 추후 조사를 통한 우수 계통의 선발, 품종화 연구수행 및 관련 산·학·연 연구자에게 분양예정, 전북도 특화산업(장류-순창군, 나물류-전주콩나물생산자연합회 연계) 연계 기반 마련
6. 간척지 적응 내염성 벼 “원해2호”신품종
: 내염성 특성을 갖는 신품종 벼의 증식, 보급을 통해 확대되어 가고 있는 국내 간척지를 활용한 벼 생산을 가능케 하여 육성함으로써 농가소득 및 경제적 파급효과가 클 것으로 기대되며, 내염성 기작 해석을 통하여 유용변이의 분자유종적 원인을 분석하고 관련 유용유전자의 in vivo 검정을 통하여 대사 pathway의 이해와 함께 타 작물에서의 효율적 적용을 가능하게 함.
7. 녹미거대배 출원 “서농16호”
: 종피색이 녹색이고 배유가 찰성이며 거대배를 가지고 있는 품종 육성
8. 분질흑미 국가품종목록등록 “서농15호”
: 서농15호의 종피는 안토시아닌 함량이 높은 진갈색이고 배유부분은 분질 특성을 가지는 새로운 가공특성 및 미질향상에 이용가능성을 높일 수 있는 품종이다.

9. 유망돌연변이 계통 확보

: 고단백질 돌연변이, 저장 단백질 돌연변이 계통 확보.

10. 병저항성 계통 선발 및 바이러스 기주인자 저항성 유전자의 동정

- 돌연변이 집단에서 병저항성 계통을 선발하기 이전에 바이러스에 대한 저항성 검정은 M3 이후 고정된 세대에서 이루어지는 것이 유리하므로, 우선적으로 고추유전자원을 대상으로 병 저항성 스크리닝 한 결과 186개체 중 4개체에서 CMV 저항성을 보였고 565개체 중 6개체에서 TSWV 저항성 개체를 선발하였다. 돌연변이 집단을 구축한 이후에 이러한 방법을 활용하여 473개의 M3 계통을 대상으로 CMV-P1에 저항성이 있는지 육안의 1차적으로 선발하고 2차적으로 ELISA방법으로 검정한 결과 2계통에서 병징이 나타나지 않음을 확인하였다. 선발된 병저항성 계통들에 대해 여교배와 세대진전을 통해 CMV의 다른 strain들에도 저항성을 갖는지 확인하고 이를 유전자 동정에 육종소재로 활용하고자 한다.
- 돌연변이 집단 내에서 병저항성 계통을 선발하는 방법으로 바이러스 스크리닝에 대한 특허 1건을 출원하였으며, 바이러스 기주인자 저항성 유전자를 동정하기 위해서 Yeast two hybrid system을 이용한 바이러스 상호작용 유전자 분리 및 GFP를 활용한 기능 분석을 통해 바이러스 CMV-P1 helicase domain과 상호작용하는 10개의 유전자를 선발하였다. 선발한 유전자에 대해 VIGS를 수행하였고 실제로 silencing이 되었는지 확인하고자, qRT-PCR을 이용해 5개가 silencing 되는 것을 확인하였다. CMV-P1-GFP를 *N. benthamiana*에 접종하여 signal을 확인한 결과 이 중 2개의 유전자에서 접종엽의 국소적 부위에서만 signal을 확인하였다. 이 2개의 유전자(C3P, FDH)를 대상으로 네델란드 Keygene 회사와 공동연구를 통해 CMV-P1 TILLING 돌연변이 집단에서 C3P 유전자의 경우 Amino acid change, Intron, silent mutation, 그리고 stop된 45개의 돌연변이를 확인하였고, FDH 유전자의 경우 Amino acid change, Intron, silent mutation, 그리고 stop된 62개의 돌연변이를 확인하였다. TMV 바이러스에 대해서 기주인자로 알려진 eEF1B에 대한 연구는 M1 돌연변이 집단 내에서 TILLING 방법을 활용해 스크리닝 하였으며, eEF1B 유전자의 경우 Amino acid change, Intron, silent mutation, 그리고 stop된 63개의 돌연변이를 확인하였고, 선발된 21 M2 계통(265개체)에서 TILLING방법을 통해 eEF1B의 돌연변이로 PVX의 병징이 대조군에 비해 늦게 올라온 3 개체와 병징이 관찰되지 않은 2 개체의 M3 종자를 받아 현재 스크리닝 중이다. 이러한 스크리닝 방법을 활용하면 돌연변이 집단에서 병저항성 계통을 선발하고 기주인자 저항성 유전자 동정을 통해 바이러스 병 저항성 육종이 가능할 것이다.

11. 돌연변이 표현형에 대한 특성조사를 통해 새로운 형질 확보

- 1,480개의 M2 계통 중 353개의 M2 계통에서 다양한 표현형을 관찰하였고, 각각의 표현형 형질들 중 과색과 잎의 형태적인 형질이 변화된 계통들은 생육 및 수량에 대한 유용 유전자를 동정하는 연구와 TILLING 기술을 이용하여 유전자 기능을 규명하는 연구에 중요한 육종재료로 사용될 수 있으며, 잎 색이 변이되거나 왜소증을 보이는 계통은 관상용으로 활용 가능하다.

12. 저 신미 돌연변이 계통 선발

- 13. - 917개의 M2 계통 중 1계통(4개체)에서 기존에 매우 고추였지만 돌연변이 유도를 통해 맵지 않게 변이된 계통을 선발하였다. 이는 캡사이시노이드 생합성 과정에서 매운맛을 조절하는 유전자 연구에 유용한 육종재료로 활용 가능하며, 무신미, 저신미, 고신미 등을 선발하는 분자표지 개발 등에 필요한 육종소재로 사용 가능하다. 현재까지도 돌연변이

집단 내에서 맵지 않은 계통을 선발하기 위해 실험을 진행하고 있는 중이다.

14. 밀 출원 및 등록 신품종 “트랜스(Trans)”

: 대비품종 비교 다수성, 내한성, 흰가루병 저항성이 뛰어남. 국내 환경에 적응성이 높아 국내 밀 자급률 향상에 기여.

15. 블랙베리 출원 및 등록 신품종 “메이플”

: 기존의 재배종보다 생산성이 높고 내병성이 강한 품종을 육종하여 보다 안정적이고 상품 가치가 높은 품종을 농가에 보급. 이를 통한 돌연변이 육종 개발 품종 저변 확대에 기여

16. 스테비아 출원 신품종 “다감”, “다정”, “다미”

: 기존의 재배품종 보다 농업형질이 우수하고 생산성 및 식감 등이 우수한 3 품종을 선발, 현재 국립종자원에 품종을 출원하여 현장재배시험 1년차를 진행중. 추후 품종등록을 거쳐 본사에서 품종 판매 및 가공을 통한 제품생산에 활용할 것임.

17. 유채 품종보호출원 3건 - “조단”, “은누리”, “미니” : 모품종에 비하여 10~32cm 단간이면서 1주일정도 조숙하는 품종으로 기계화재배와 다수확 및 답리작재배에 유리함.

18. 유채 품종보호출원 1건 - “대화” : 모품종에 비하여 꽃의 크기가 30%이상 크고 1주일 정도 조숙, 다수성 특성으로 관상가치가 큼.

19. 유채 품종보호출원 1건 - “만금” : 내염성 품종으로 새만금 등 간척지재배로 바이오디젤 생산과 관광자원으로 활용가치가 높음. 농가 무상보급을 통한 돌연변이 육종개발 품종의 재배 확대에 기여함

20. 유채 유망돌연변이 계통 : 초단간, 조숙, 내염성, 고오일, 대화, 염록소변이 등 농경상 유용한 7개 돌연변이계통은 농업유전자원센터에 기탁하여 산·학·연 연구자의 유전·육종연구자원으로 활용하도록 하였음.

21. 병 저항성 돌연변이 벼 계통

: 벼흰잎마름병에 대한 저항성이 증진된 계통을 선발하였으며, 병 저항성 메커니즘 연구에 활용할 예정

22. 조숙성 및 고온/저온 내성 유망돌연변이 계통

: 농업형질 및 관련형질의 추후 조사를 통한 우수 계통의 선발, 품종화, 기후변화 대응 연구 수행에 이용 및 관련 산·학·연 연구자에게 분양예정,

제 2절 신 돌연변이육종 선발 기술

1. TILLING(targeting induced local lesion in genomes) 분석 기술

: TILLING(targeting induced local lesion in genomes)은 전통적인 돌연변이 유기와 단일염기변화(single nucleotide polymorphism)의 고처리(high-throughput) 검색을 결합한 역유전학체적 연구의 실험기법 중의 하나이며, 대규모 분석에 적합한 방법으로 대량의 시료를 저비용으로 짧은 시간 내에 빠르게 처리할 수 있는 것이 가장 큰 장점을 가짐

2. HRM 분석법을 이용한 목적 유전자 돌연변이 검정 체계 확립

- 유용유전자의 돌연변이체를 알아보기 위한 가장 확실한 방법 중 하나는 특정유전자에 대한 염기서열 분석이나, 많은 비용과 노력이 요구되는 문제점이 있다. 최근 들어 유용 유전자의 돌연변이를 탐색하기 위한 TILLING, Eco-TILLING 등과 같은 방법이 개발되어 사용되고 있으나 M2 세대의 많은 집단의 검정이 필요하다. 이에 따라 보다 쉽고 간편하게 mutant

screening하는 방법이 개발되어야 한다. 따라서 본 연구실에서는 M1 세대에서 특정 유전자의 돌연변이율을 조사하기 위하여 eIF4E에 대한 돌연변이 조사를 진행하였으며, 그 결과 254개체 중 2개체에서 정상개체의 HRM 곡선과 다른 곡선이 나타났다. 따라서 HRM 분석을 통해 mutant screening 한다면 쉽고 간편하게 고추 돌연변이 집단 내에서 병저항성과 관련된 유전자를 동정하는 방법으로 활용할 수 있을 것으로 기대한다.

3. Gibb's reagent를 이용한 매운맛 간이 분석 방법 개발

- 매운맛 분석 방법으로 널리 사용하고 있는 HPLC 방법의 경우 대량 집단을 스크리닝 하는데 전처리 과정이 길고 비용 그리고 노동력이 많이 든다는 단점이 있다. 따라서 본 연구실에서는 이를 개선하기 위한 방법으로 Gibb's reagent를 사용한 매운맛 간이 분석 방법을 개발해 특허 1건을 출원하였다. 방법을 소개하면 돌연변이 집단을 대상으로 Gibb's reagent를 통해 맵지 않은 계통을 1차적으로 선발하고, 선발된 맵지 않은 계통들을 HPLC 분석으로 정확한 캡사이시노이드 함량을 측정하였다. 이를 통해 효과적으로 돌연변이와 같이 큰 집단을 효과적으로 스크리닝하였으며, 그 결과 정상 유월초에 비해 300배정도 낮은 캡사이시노이드 함량을 지닌 1계통(4개체)을 선발하였다. 이러한 결과를 통해 Gibb's reagent를 이용한 돌연변이 집단 스크리닝 방법을 사용하면 매우 효율적으로 육종현장에서 간단하고 비교적 정량적으로 캡사이시노이드 함량 분석할 수 있을 뿐만 아니라 매운맛 조절에 중요한 유전자를 동정하는데 유용한 육종재료로 활용 가능할 것으로 기대한다.

4. 병저항성 개체에서 발현변화를 보이는 다수의 유전자군 확인

: 선발된 유전자에 대한 기능연구를 통해 병저항성 관련 유전자마커로 개발 예정

5. 대량의 전사체 발현 양상 분석 기법

: 전사체 대량 분석 기법을 이용하여 유용 돌연변이체의 선발 및 스트레스 또는 유용 형질 선발을 위한 유전체 모델링에 이용함.

제 3절 개발 분자마커 및 유전자

1. 리그닌 합성관련 유전자 5개 (Gene Bank accession No. HM151379, HM151380, HM151381, KC859304, KC859305) 염기서열 등록

표 3-1. 케나프 리그닌 관련 유전자 염기서열 등록

Name	Gene Bank accession *	Partial cDNA	Translated sequence(aa)**
<i>Hc4CL</i>	HM151379	1623 bp	540 bp
<i>HcCAD</i>	HM151380	1107 bp	368 bp
<i>HcCCR</i>	HM151381	1017 bp	338 bp
<i>Comt</i>	KC859304	921 bp	306 bp
<i>F5H</i>	KC859305	1179 bp	392 bp

2. Lipoxxygenase (Lox 1, 2, 3) 유래 분자마커를 활용한 비린내 저감 콩나물 유망계통 선발

: 콩나물 품질과 연관된 비린내관련 유전자 선발 기술을 통해 육성 중인 돌연변이 계통 내 콩나물 유망계통의 조기 선발이 가능

3. 이온화에너지 유기 돌연변이 자원을 활용한 유전체 연구 및 연관 유전자
 - : 이온화 에너지가 식물에 폭 넓게 미치는 유전적 영향으로 창출된 돌연변이 유전자원의 유전체 연구를 통해 농업 우량형질(allele, 유전자군) 대량발굴로 생물학적, 산업적 가치를 부여(지적재산권화, 2015년 \$ 2,000억 예상)하고 비교유전체 분석을 통해 관련 연구발전에 기여가 클 것으로 사료됨.
4. Floury (flo) 유전자의 정밀유전자지도는, 쌀의 분질배유 형질의 결정에 관여하는 FLO(a)좌를 확인할 수 있고 쌀 분질배유 형질의 유전적 배경에 대한 직접적인 정보를 제공할 수 있다. 이것을 기반으로 만들어진 flo(a) 분자마커는 floury 계통 라인을 쉽고 빠르게 선별하기에 용이하다.
5. 생식생장 전환 시 특정 단백질을 degradation 하는 SCF (Skp1-Cullin-F-box protein) complex를 밑에서 최초로 동정.
 - Skp1: wheat SKP family (*WSK1*, *WSK2*, *WSK3*, *WSK4*, *WSK5*)
 - Cullin: *TaCullin*
 - F-box: *TaF-box protein*
6. 생식생장 전환 시 단백질 degradation에 관여하는 E3 ligase ubiquitin 유전자 동정
 - Ring finger protein: wheat ring finger protein (*TaRFT*)
7. 고온/저온 관련 유전자 선별
 - : *OsHCL1*, *OsSHSP1*, *OsSHSP1*, *OsHSP1*, *OsCHI1*, *OsCHI2*, *OsCHI3*, *OsCHI4*, *OsCHI5*의 유전자 선별 및 각 유전자의 분자생물학적 분석을 통해 각 유전자의 발현 양상을 규명함.

제 4절 실용화 및 산업화 기술

1. 신제품 블랙베리 메이플 추출물을 이용해 동물모델에서 항산화, 숙취해소 효능을 확인하였음. 향후 간 기능 개선 건강기능식품으로 실용화하기 위해서는 임상시험을 거쳐 식약처로부터 개별인정형 원료로 인증받는 과정이 필요함. 개별인정형(간 기능개선) 원료로 인증받은 뒤 민간기업에 기술이전하고자 함
2. 블랙베리 출원 및 등록 신제품 “메이플”
 - : 기존의 재배종보다 생산성이 높고 내병성이 강한 품종을 육종하여 보다 안정적이고 상품 가치가 높은 품종을 농가에 보급. 이를 통한 돌연변이 육종 개발 품종 저변 확대에 기여
3. 스테비아 출원 신제품 “다감”, “다정”, “다미”
 - : 기존의 재배품종 보다 농업형질이 우수하고 생산성 및 식감 등이 우수한 3 품종을 선별, 현재 국립종자원에 품종을 출원하여 현장재배시험 1년차를 진행중. 추후 품종등록을 거쳐 본사에서 품종 판매 및 가공을 통한 제품생산에 활용할 것임.
4. 우수 돌연변이 계통은 농민(단체)에 무상이전할 계획이다.
5. 선별한 돌연변이 계통은 고구마품종육종 기관에 이전하여 품종개발의 유전자원으로 활용할 계획이다
6. 돌연변이 육종을 위한 in vitro system 및 재분화체계는 품종육종기관에 필요시 무상제공할 계획이며, 자체적인 고구마연구개발에 활용할 계획이다.
7. 고구마 돌연변이 품종 육성에 필요한 기초연구자료로 활용할 계획이다

8. 돌연변이 고구마 계통의 특성 database화를 통한 육종 소재 및 재배용 품종개발을 위한 기초자료 제공한다.
9. 콩 돌연변이 신품종(원율, 원현, 조생서리, 조생서리 2호)
: 품종보호권에 대한 통상실시권 이전을 계획 중에 있음. 기술이전 대상기업으로 (주)바이오플러스 및 (주)농우바이오 등과 협의를 진행 중에 있으며, 기술료 예상금액은 품종당 정액기술료 0.2억원 및 판매금액의 3% 해당하는 경상기술료 지급 조건을 협의 중에 있음.

제 5절 개발 시제품

1. 신품종 블랙베리 메이플 추출물을 이용해 발효 식초를 제조하고 이를 함유하는 간 기능개선 블랙베리 음료 시제품을 1건 제작하였음.

제 6절 교육·지도·홍보 등의 기술 확산

1. 민간육종가 돌연변이 육종 교육

가. 1차 교육

- (1) 기 간: 2012. 9.3 (월) ~ 9.7 (금) 1주일간
- (2) 장 소: 첨단방사선연구소, (주) 바이오플러스 육종회사(완주 고산 소재),
- (3) 참 가 자: 개인육종가, 기관직무육성가 등 20 명
- (4) 주요내용: 방사선 조사 실습, (주)바이오플러스 블랙베리 육종포 방문 재배기술 교육

나. 2차 교육

- (1) 기 간: 2013. 9.2 (월) ~ 9.6 (금) 1주일간
- (2) 장 소: 첨단방사선연구소, (주) 바이오플러스 육종회사(완주 고산 소재),
- (3) 참 가 자: 개인육종가, 기관직무육성가 등 20 명
- (4) 주요내용: 방사선 조사 실습, (주)바이오플러스 블랙베리 육종포 방문 재배기술 교육



그림 1-1. 돌연변이 육종가 교육

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

<제3협동>

전 세계적으로 GMO의 환경 및 건강 유해성에 대한 불안감이 고조되면서, 돌연변이 육종기술을 이용한 신품종 육성은 GMO 작물에 대한 대안으로 평가되고 있음. 2013년 7월 세계적인 종자회사인 Monsanto는 유럽연합 (EU)에 GMO 작물 수출을 포기하였으며, BASF와 DuPont은 동유럽의 GMO 종자 수요 감소에 따른 돌연변이 종자 수요가 2012년 대비 27% 증가했다고 보고하였음(The economic times, 2013). 이러한 세계적인 추세에 발맞추어 다양한 작물을 대상으로 한 돌연변이 육종기술에 대한 지속적인 연구 투자가 이루어져야한다고 사료됨.

<제7협동>

현재 시중에 유통되는 대부분의 품종이 세포질 응성불임성을 이용한 1대잡종이다. 따라서 이들을 수집하여 우수 계통을 분리하는 과거의 관행이 더 이상 계속될 수 없게 되었으며 따라서 우수 품종 육성을 위한 유전자원의 한계에 부딪힐 전망이다.

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당사항이 있는 과제 기입

* 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술

제 8 장 참고문헌

<제3세부>

- Carroll KK. 1991. Review of clinical studies on cholesterol-lowering response to soyprotein. J. Am. Diet. Assoc. 91:820.
- Kim HS, Hong EH, Kim SD, Ryu YH. 1996. Effects of locations and planting dates on disease occurrence and germination rate of seeds in vegetable soybean. Korean J. Crop Sci. 41(2):178-182.
- Kim WJ. 2006. Soybean: Health and use. Seoul, Hyoil Publishers, pp. 22-34.
- Lee CH. 2003. The role of biotechnology in modern food production, XII. Chicago: IUFoST Congress.
- Liu K. 1997. Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization. Aspen Publishers, Gaithersbrug, MD, p 532.
- Messina MJ. 1997 Soyfoods: Their roles in disease prevention and treatment. In soybeans, chemistry, technology and utilization, ed. K.S.Liu. New York: Chapman and Hall
- Song YS, Kwon TW. 2000. Hypocholesterolemic effect of soybean and soy products. Food industry and nutrition. 5(2): 36-41
- Zhang AW, Hartman GL, Riccioni L, Chen WD, Ma RZ, Pederson WL. 1997. Using PCR to distinguish *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from other soybean fungal pathogens and to detect them in soybean tissues. Plant Disease. 8(10) 1143-1149.

<제4세부>

- Comai L, Henikoff S. (2006), TILLING: practical single-nucleotide mutation discovery. Plant Journal 4: 684-94.
- Khalid Hussain, M. Farrukh Nisar, Abdul Majeed, Khalid Nawaz, Khizar Hayat Bhatti, Shahid Afghan, Aamir Shahazad and Syed Zia-ul-Hussnian. (2010), What molecular mechanism is adapted by plants during salt stress tolerance? African Journal of Biotechnology 9(4): 416-422.
- Marie-Andree Esnault, Florence Legue, Christian Chenal. 2010. Ionizing radiation: Advances in plant response. Environmental and Experimental Botany 68(3): 231-237.
- Blum A, Ebercon A (1981) Cell membrane stability as measure of drought and heat tolerance in wheat. Crop Sci 21:43-47.
- Cha-um S, Supaibulwatana K, Kirdmanee C (2007) Glycinebetaine accumulation, physiological characterizations, and growth efficiency in salt tolerant and salt sensitive lines of indica rice (*Oryza sativa* L. spp. Indica) response to salt stress. J Agron Crop Sci 193:157-166.

- Ding YC, Chand CR, Luo W, Wu YS, Ren XL, Wang P, Xu GH (2008) High potassium aggravates the oxidative stress induced by magnesium deficiency in rice leaves. *Pedosphere* 18:316-327.
- Gossett DR, Eddie PM, Cran LM (1994) Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Sci* 34:706-714.
- Henikoff, S., B.J. Till, and L. Comai (2004) TILLING. Traditional mutagenesis meets functional genomics. *Plant Physiol* 135, 630-6.
- Suzuki, T., M. Eiguchi, T. Kumamaru, H. Satoh, H. Matsusaka, K. Moriguchi, Y. Nagato, and N. Kurata (2008) MNU-induced mutant pools and high performance TILLING enable finding of any gene mutation in rice. *Mol Genet Genomics* 279, 213-23.
- Till, B.J., J. Cooper, T.H. Tai, P. Colowit, E.A. Greene, S. Henikoff, and L. Comai (2007) Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. *BMC Plant Biol* 7, 19.

<제1협동>

- Carroll KK. 1991. Review of clinical studies on cholesterol-lowering response to soyprotein. *J. Am. Diet. Assoc.* 91:820.
- Kim HS, Hong EH, Kim SD, Ryu YH. 1996. Effects of locations and planting dates on disease occurrence and germination rate of seeds in vegetable soybean. *Korean J. Crop Sci.* 41(2):178-182.
- Kim WJ. 2006. Soybean: Health and use. Seoul, Hyoil Publishers, pp. 22-34.
- Lee CH. 2003. The role of biotechnology in modern food production, XII. Chicago: IUFoST Congress.
- Liu K. 1997. Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization. Aspen Publishers, Gaithersbrug, MD, p 532.
- Messina MJ. 1997 Soyfoods: Their roles in disease prevention and treatment. In soybeans, chemistry, technology and utilization, ed. K.S.Liu. New York: Chapman and Hall
- Song YS, Kwon TW. 2000. Hypocholesterolemic effect of soybean and soy products. *Food industry and nutrition.* 5(2): 36-41
- Zhang AW, Hartman GL, Riccioni L, Chen WD, Ma RZ, Pederson WL. 1997. Using PCR to distinguish *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from other soybean fungal pathogens and to detect them in soybean tissues. *Plant Disease.* 8(10) 1143-1149.
- 강병철 등. 2013. 차세대 BG21 사업의 2단계 기획을 위한 농생명공학 원예작물분야 R&D 전략 보고서. 농촌진흥청.
- 박범석 등. 2011. 유전체 결과활용 기반 조사·분석·기획 보고서. 농촌진흥청 국립농업과학원 차세대유전체연구사업단.
- 양태진 등. 2012. 식물분자육종 기술동향 분석 보고서. 농림부.

- Jeong HJ, Kwon JK, Pandeya D, Hwang JN, Hoang, NH, Bae JH and Kang BC (2011) A survey of natural and ethyl methane sulfonated-induced variations of eIF4E using high-resolution melting analysis in Capsicum. *Molecular Breeding*. 29: 349-360.
- Jeong HJ, Hwang DY, An JT, Chun JY, Han K, Lee Y, Lee WM, Kwon JK and Kang BC (2012) Development of a simple method for detecting capsaicinoids using Gibb's reagent in pepper. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*. 30: 294-300.
- Menda N, Semel Y, Peled D, Eshed Y and Zamir D (2004) In silico screening of a saturated mutation library of tomato. *The Plant Journal* 38: 861 - 872.
- Minoia S, Petrozza A, D'Onofrio O, Piron F and Mosca G (2010) A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by TILLING technology. *BMC Research Notes* 3: 69.
- Stewart CJ, Kang BC, Liu K, Mazourek M, Moore SL, Yoo EY, Kim BD, Paran I and Jahn MM (2005) The Pun1 gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *The Plant Journal*. 42: 675 - 688.
- Tanaka Y, Hosokawa M, Miwa T, Watanabe T and Yazawa S (2010a) Newly mutated putative-aminotransferase in non-pungent pepper (*Capsicum annuum*) results in biosynthesis of capsinoids, capsaicinoid analogues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 1761 - 1767.
- Tanaka Y, Hosokawa M, Miwa T, Watanabe T and Yazawa S (2010b) Novel loss-of-function putative aminotransferase alleles cause biosynthesis of capsinoids, nonpungent capsaicinoid analogues, in mildly pungent chili peppers (*Capsicum chinense*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58:11762 - 11767.
- Wang D and Bosland PW (2006) The genes of Capsicum. *Hortscience* 41: 1169 - 1187.

<제3협동>

- Begum, T. and T. Dasgupta. 2011. Effect of mutagens on character association in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Pak. J. Bot.*, 43: 243-251.
- Heidarieh, M., A. Borzouei, S. Rajabifar, F. Ziaie and Sh. Shafiei. 2012. Effects of gamma irradiation on antioxidant activity of Ergosan. *Iran. J. Radiat. Res.*, 9: 245-249.
- Peidu Chen, Chunfang You, Yin Hu, Shengwei Chen, Bo Zhou, Aizhong Cao and Xiue Wang. 2013. Radiation-induced translocations with reduced Haynaldia villosa chromatin at the Pm21 locus for powdery mildew resistance in wheat. *Mol Breeding* 31:477 - 484.
- http://articles.economictimes.indiatimes.com/2013-11-25/news/44449827_1_seed-revenue-ba sf-crops. The Economic Times.
- http://ebook.mifaff.go.kr/20120905_103636 (2012) 농림수산식품 주요통계
- http://kostat.go.kr/portal/korea/kor_nw/2/1/index.board?bmode=read&aSeq=270147

<제4협동>

- Arenaz P and Nilan RA. 1981. Effect of sodium azide on sister-chromatid exchanges In human lymphocytes and Chinese hamster cell. Mutation Research, 88:217-221.
- Castillo AM, Cistue L, Valles MP, Sanz JM, Romagosa I and Molina-Cano JL. 2001. Efficient production of androgenic doubled-haploid mutants in barley by the application of sodium azide to anther and microspore culture. Plant Cell Rep. 20:105-111.
- Chalapathi MV and Thimmegowda S. 1997. Natural non-caloric sweetener *stevia*(*Stevia rebaudiana* Bertoni): A future crop of India. Crop Res. Hisar. 14(2):347-350.
- Choi NH, Kim GH, Kim ZH, Song HS and Jeong BR. 2006. Morphological characteristics of *Campanula punctata* Lam. var. *rubriflora* Mak. as affected by doses of γ -ray radiation. Flower Res. J. 14(2):116-120. Doo HS, Kang CS and Ryu JH. 2001. Induced mutation by gamma-ray irradiation on crown bud of *yacon*(*Polymnia sonchifolia* Poepolc & Endlicher). Korean J. Breed. 33(1):1-6.
- Goo DH, Yae BW, Song HS, Park IS, Han BH and Yu HJ. 2003. Color change in chrysanthemum flower by gamma ray irradiation. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 44(6): 1006-1009.
- Hanson JR and De Oliveira BH. 1993. Stevioside and related sweet diterpenoid glycosides. Nat. Prod. Rep. 10:301-309.
- Jeong JA and Lee CH. 2006a. Effects of γ -irradiation and chemical mutagenesis on *In vitro* culture of fern prothallus. Korean J. Plant Res. 19(2):348-354.
- Jeong JA and Lee CH. 2006b. induction of variants *Cyrtomium ceryoptideum* var. *coreanum* Nakai by chemical mutagenesis *In vitro* and RAPD analysis. Korean J. Plant Res. 19(2):374-380.
- Jin YH, You JH, Jang HW, Cho HW and Lee CH. 2003. Investigation of optimal concentration and treatment period of colchicine for mutation breeding of *Ulium* spp. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 21(Suppl. 11):112.
- Katayama O, Sumida T, Hayashi Hand Mitsuhashi H. 1976. The practical application of stevia and research and development data(English translation). ISU Company, Japan pp. 747.
- Kim JS and Lee YB. 1998. Ionizing radiation hormesis in crops. Kor. J. Environ. Aorl. 17(1):76-85.
- Kinghorn AD and Soelarto DD. 2002. Discovery of terpenoid and phenolic sweeteners from plants. Pure. Appl, Chern. 74(7): 1169-1179.
- Koh JC, Sang CK, Youn IK, Lee EJ and Lee JM. 2001. Effect of colchicine treatment for polyploidy induction of *Iris ensata*. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 19(5uppl. II):91.
- Kwon SH and Won JL. 1978. Recommendable dose of X- and gamma-ray for mutation breeding. Korean J. Breed. 10(2):127-132.
- Lee HJ, Lee GJ, Kim DS, Kim JB, Ku JH and Kang SY. 2008. Determination of the optimum dose range for a mutation induction of turfurasses by a gamma-ray. Kor. Turtarass Sci. 22(1):25-34.
- Lee Ji, Kang KH, Park HW and Kim JH. 1979. High-yielding stevia variety "Suweon 2". Res. Rept. ORD 21:167-169.
- Lee Ji, Kang KH, Park HW and Kim JH. 1982. New high rebaudioside-A stevia variety "Suweon 11". Res. Rept. ORD. 24:186-188.
- Lee KH, Lim JD and Yu CY. 2000. Variations in mutant plants by chemical mutagen treatments of *Dianthus superbis* L. Korean J. Medicinal Crop Sci. 8(4):334-341.
- Lim JD, Kim MJ and Yu CY. 2000. Induction and RAPD analysis of mutant plants by chemical mutagens in *Gentiana axi/arit/bra* Leveille. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 27:89-94.

- Nishiyama P, Alvarez M and Vieira LGE. 1992. Quantitative analysis of stevioside in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. J. Sci. Food Agri. 59(3): 277-281.
- Oh BK, Hong KA, Song SJ, U ZK, Lee SJ and Lee YI. 2003. Gamma radiation sensitivity and quantitative characters in M1 generation of *Heterocephalus hisoidus* (Thunb.). Korean J. Environ. Agri. 22(4):294-299.
- Park JO, Jeong BJ, Park MY, Kang SY, Kwack SN, Park YJ and Heo BG. 2010. Effect on the germination growth and variation induction in gamma rays irradiated seeds of lilac pink and nursery spiraea. Korean J. Plant Res. 23(1):19-24.
- Park JO, Cho HS, Park MY, Jo YS, Kang SY, Kwack SN and Heo BG. 2008. Effect of gamma ray irradiation on seed germination, growth and variant induction in *Hosta plantaginea* and *Fartugium laconicum*. Flower Res. J. 16(2):128-133.
- Sachs RM and Hackett WP. 1972. Chemical inhibition of plant height. Hort. Sci. 2:440-447.
- Schum A and Preil W. 1998. Induced mutations in ornamental plants. Somaclonal variation and induced mutation in crop improvement. 332-366. Kluwer Academic PUBL., Dordrecht. The Netherlands.
- Seong NS, Park CH, Kim KS, Lee ST and Chang YH. 1995. *In vitro* variant induction and its content of gentiopicroside of *Gentiana scabra* Bunge. Kor. J. Med. Crop 3:40-44.
- Shin JY, Lim HS, Kim JS, Han SK and Eun JS. 2005. Effects of gamma ray on the radiosensitivity of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). J. Honam Soc. Hort. Sci. 3:93-99.
- Scelarto DD, Compadre CM, Medon JP, Kamath SK and Kinhorn AD. 1983. Potential sweetening agents of plant origin II. Field search for sweet-tasting *Stevia* species. Econ. Bot. 37:71-79.
- Suh JT, Cho KS, Yang MH and Hong SY. 2005. Characteristics of mutant by colchicine treatment of wild *Lilium leichtlinii* seed native to Korea. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 23(4):430-432.

<제5협동>

- Ahloowalia BS, Maluszynski M. 2001. Induced mutations - A new paradigm in plant breeding. Euphytica 118: 167-173.
- Ahn YO, Kim SH, Kim CY, Lee JS, Kwak SS, Lee HS. 2010. Exogenous sucrose utilization and starch biosynthesis among sweetpotato cultivars. Carbohydrate Research 345 55-60.
- Austine DF. 1979. An infrageneric classification for *Ipomoea* (convolvulaceae). Taxon. 28:359-361
- Fuel production potential of several agricultural crops, Mays DA, W.Buchanan, BN Bradford, and PM Giordano (1990) : Fuel production potential of several agricultural crops. 260-263. In: J. Janick and J.E. Simon (eds.), Advances in new crops. Timber Press, Portland, OR).
- Kim JS. 1992. Synthetic development about industrialization of sweet potato as main product in chonnam region, Gwanju Chonnam gerional innovation Council. 9
- Kukimura H, 1996. Mutation breeding in sweet potato and tuber crops. Gamma Field Symp. 25: 109-130.
- Lynch M, Milligan BG. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD

- markers. *Molecular Ecology*. 3:91-9
- MAF 1994. The agriculture and forestry statistical annual report. The ministry of agriculture and forestry. South Korea.
- Noda T, Takahata T, Sato T, Kumagai T, Yamakawa O. 1998. Starch properties and cell-wall material contents in sweetpotatoes as affected by flesh color, cultivation method and year. *Japan App Glycosci* 45: 1 - 9.
- Shimada T, Otani M, Hamada T, Kim SH. 2006. Increase of amylase content of sweetpotato starch by RNA interference of the starch branching enzyme II gene (IbSBEII). *Plant Biotechnology*. 23(1):85-90.
- Van schreven AC 1954. Investigations on the flower biology and compatibility of sweetpotato (*Ipomoea batatas* Poir.) including some preliminary trials on the germination of the seed. Pemb., Balai Besar Penj., Pert., Bogor, Indonesia, No. 139: 1-44.
- Wang Y, Wang F, Zhai H, Liu Q. 2007. Production of a useful mutant by chronic irradiation in sweetpotato. *Scientia Horticulturae*. 111(2):173-8
- Water WM, Purcell AE, Nelson AM, 1975. Effects of amyolytic enzymes on moistness and carbohydrate changes of baked sweet potato cultivars. *J. Food Sci.* 40: 703.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18(22):6531-6535.
- 농촌진흥청. 2006. 고구마 재배. 표준영농교본. 농촌진흥청.

<제6협동>

- Akkaya, M.S., A.A. Bhagwat, and P.B. Cregan. 1992. Length polymorphism of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*. 132:1131-1139.
- Antonius and Klemolak. 1999. Molecular markers in *Rubus* (Rosaceae) research and breeding. *Hort. Bio. J.* 12:149-160.
- Ball, M.C. 1988. Salinity tolerance in the mangroves *Aegiceras corniculatum* and *Avicennia marina*. I. Water use in relation to growth, carbon partitioning and salt balance. *Aust. J. Plant Physiol.* 15:447-464.
- Charcosset, A. and L. Moreau. 2004. Use of molecular markers for the development of new cultivars and the evaluation of genetic diversity. *Euphytica*. 137:81-94.
- Cheong, Y.K., H.S. Doo, K.H. Park, J.C. Ko, J.H. Ryu, and S.D. Kim. 2004. Yield and quality characteristics of peanut mutants induced by gamma ray. *Korean J. Breed.* 36(5):260-265.
- Daun, J.K. and D.F. Adolphe. 1997. A revision to the canola definition. *Bulletin of GCIRC*. 14:134-141.
- Downton, W.J.S. 1985. Growth and mineral composition of the sultana grapevine as influenced by salinity and rootstock. *Aust. J. Agric. Res.* 36:425-434.
- Durante, M., Y. Furusawa, K. George, G. Gialanella, O. Grecco, G. Grossi, N. Matsufuji,

- M. Pugliese, and T.C. Yang. 1998. Rejoining and misrejoining of radiation-induced chromatin breaks. IV. Charged particles. *Radiat. Res.* 149:446-454.
- Eun, J.S., J.S. Kim, H.S. Lim, S.K. Han, S.R. Choi, and Y.S. Jang. 2007. Effect of proton ion and gamma-ray irradiation on radiosensitivity of M₁ seedlings in *Brassica napus*. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 25(1):17-23.
- Greenway, H. and R. Munns. 1980. Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31:149-190.
- Guan, M. and X. Li. 2006. Effect of ¹²C heavy ion beams irradiation on rapeseed (*Brassica napus*). *Acta Agronomica Sinica.* 32:878-884.
- Jang, Y.S. 2002. Prospect and situation of quality improvement in oilseed rape. *Korean J. Crop Sci.* 47(s):175-185.
- Jang, Y.S., C.W. Kim, I.H. Choi, Y.B. Oh, B.C. Jung, and J.H. Park. 2002b. Method of seed production of F₁ hybrids in *Brassica napus* L. *Korean J. Breed.* 34:158-162.
- Jang, Y.S., I.H. Choi, Y.B. Oh, S.Y. Cho, D.H. Chong, and H.J. Oh. 1998. A new early-maturing flower of large size and the use of sightseeing rapeseed variety "Tammiyuchae". *J. Indus. Crop Sci.* 40:67-70.
- Jang, Y.S., K.S. Kim, Y.H. Lee, H.J. Cho, and S.J. Suh. 2010. Review of property and utilization of crop for biodiesel. *J. Plant Biotechnol.* 37:25-46.
- Kim, C.S., S.Y. Lee, and J.U. Jo. 1993. Mechanisms of salt tolerance in crop plants. *Korean J. Crop Sci.* 38(4):371-376.
- Kim, J.A., Y.S. Choo, I.J. Lee, J.J. Bae, I.S. Kim, B.H. Choo, and S.D. Song. 2002. Adaptations and physiological characteristics of three Chenopodiaceae species under saline environments. *Kor. J. Ecology.* 25(3):171-177.
- Kim, K.S., Y.B. Kim, Y.S. Jang, and J.K. Bang. 2007. Bioenergy crop production and research trends. *J. Plant Biotechnol.* 34(2):103-109.
- Koca, H., M. Bor, F. Ödemir, and I. Tükan. 2007. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 60:344-351.
- Kwon, S.H., J.L. Won, and H.S. Song. 1981. Frequency of visible-macro mutation in gamma-irradiated soybean seeds. *Korean J. Breed.* 13(2):151-156.
- Lee, I.S., D.S. Kim, S.J. Lee, H.S. Song, Y.P. Lim, and Y.I. Lee. 2003. Selection and agronomic traits of radiation-induced variants in rice. *Korean J. Plant Biotech.* 30(1):19-25.
- Lee, K.B., J.B. Kang, K.D. Lee, G.H. Gil, and J.D. Kim. 2008. Soil physicochemical properties of reclaimed land in Saemangeum. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 41:83. (Abstr.)
- Lee, K.S., J.M. Lee, S.Y. Choi, and W.Y. Choi. 1997. Effect of soil salt concentration on early seedling growth and leaf function in Chinese cabbage. *Bulletin of the Agricultural College, Chonbuk Natl. Univ.* 28:25-32.
- Lee, S.B. 2008. Effect of radiation on the M₁ plant growth and chlorophyll mutation in

- Brassica rapa* var. *pekinensis*. M.S. Thesis, Chonbuk Natl. Univ.
- Lee, Y.H., K.S. Kim, S.S. Nam, Y.S. Jang, H.J. Jo, and S.J. Suh. 2009. Differences of salt-tolerance in rape varieties by the salt concentration in seawater. Korean J. Crop Sci. 54(Suppl. II):167. (Abstr.)
- Lee, Y.I., J.S. Kim, I.C. Shin, and K.K. Kang. 1996. Selection from gamma-ray induced leaf mutants in *Perilla frutescens*. Korean J. Breed. 28(1):75-79.
- Lee, Y.I., S.B. Lee, Y.K. Cho, G.W. Son, J.S. Eun, C.H. Bae, and T. Abe. 2006. Induction and selection of mutants in hot pepper by irradiation with C-12 ion beam. The 10th International Workshop on Accelerator and Beam Utilization. Epitome, Sep. 21-22, p. BU-20.
- Martinez, C.A., M. Maestri, and E.G. Lani. 1996. In vitro salt tolerance and proline accumulation in Andean potato (*Solanum* spp.) differing in frost resistance. Plant Sci. 166:177-184.
- Misra, N. and A.K. Gupta. 2005. Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram. Plant Sci. 169:331-339.
- Mohan, M., S. Nair, A. Bhagwat, T.G. Krishna, M. Yano, C.R. Bhatia, and T. Sasaki. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. Molecular Breed. 3:87-103.
- Nam, Y.K., J.A. Baik, and M.H. Chiang. 2007. Effects of different NaCl concentration on growth of *Suaeda asparagoides*, *Suaeda maritima*, and *Salicornia herbacea*. Korean J. Soil Sci. Fert. 40(5):349-353.
- NIAST. 2000. Analysis of soil and plant. National Inst. of Agr. Sci. & Teck. RDA, Suwon, Korea.
- Ohlson, J.S.R. 1983. Rapeseed oil JAOCS. 60(2):385-386.
- Rafalski, J.A. and S.V. Tingey. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPD's, microsatellites and machines. Trends Genet. 9:275-280.
- Rakow, G. and J.P. Raney. 2001. Low saturated fat *Brassica napus*. GCIRC Technical Meeting, B18, Poznan, Poland.
- Rohlf, F.J. 1993. NTSYSpc: Numerical Taxonomy an Multivariate Analysis System, Version 1.80. Exeter Publishers, Setauket, NY.
- Sekhon, K.S., S.K. Gupta, K.L. Ahuja, and S.V. Jaswal. 1980. Variability in fatty acid composition in semi-spreading peanut types. Oleagineux. 35:406-412.
- Sharma, S.K., I.K. Dawson, and R. Waugh. 1995. Relationships among cultivated and wild lentils revealed by RAPD analysis. Theor. Appl. Genet. 91:647-652.
- Shin, S.H. 2002. Physiological and anatomical characteristics of salt-tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) varieties. Ph. D. Thesis, Chonnam Natl. Univ.
- Sneath and Sokal. 1973. Numerical taxonomy. Freeman, San Francisco.
- Sohn, Y.M., G.Y. Jeon, J.D. Song, J.H. Lee, and M.E. Park. 2009. Effect of soil salinity and flooding on plant growth and yield of rape-castor bean cropping system in the newly reclaimed tidal land of western seaside of Korea. Korean J. Soil Sci. Fert.

42(5):355-363.

- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:651-653.
- Yoo, S.H. 1988. Effect of salt concentrations and temperatures on germination of rape seed varieties. M.S. Thesis, Chungnam Natl. Univ.
- Yoon, B.S., W.J. Cheng, S.U. Park, and D.H. Cho. 2005. Change in photosynthesis, proline content and osmotic potential of corn seedling under high-saline condition. *Kor. J. Crop Sci.* 50:28-31.

<제7협동>

- Anderson, W. C. and J. B. Carstens. 1977. Tissue culture propagation of broccoli, *Brassica oleracea*(*Italica* group), for use in F1 hybrid seed production. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 102:69-73
- Bannerot, H., L. Loulidard, and T. Tempe. 1974. Cytoplasmic male sterility transfer from *Raphanus sativus* to *Brassica*. in: *Eucarpia-Cruciferae Conference* pp. 52-54. *Scottish Hort. Res. Inst., mylnfield, Dundee, Scotland*
- Cardi, T. and E. D. Earle. 1997. Production of new CMS *Brassica oleracea* by transfer of 'Anand' cytoplasm from *B. rapa* through protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 94 :204-212
- Cole, K. 1959. Inheritance of male sterility in green sprouting broccoli(*Brassica oleracea* L. var. *italica*). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 95:13-14
- Dunemann, F. and J. Grunewaldt. 1991. Identification of a monogenic dominant male sterility mutant in broccoli(*Brassica oleracea* var. *Italica* Plenck). *Plant Breeding* 106:161-163
- Fang, Z., P. Sun, Y. Liu, L. Yang, X. Wang, A. Hou, and C. Bian. 1997. A male sterile line with dominant gene(Ms) in cabbage(*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) and its utilization for hybrid seed production. *Euphytica* 97: 265-268
- Jeong, H. W. and S.-S. Lee. 1997. Influence of mutagen, n-nitroso n-methyl urethane on embryo induction and plant development in microspore culture of broccoli. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 38:379-383
- Johnson, A. G. 1958. Male sterility in *Brassica*. *nature* 182 : 1523
- Kim J., S-S. Lee. 2012. Identification of monogenic dominant male sterility and its suppressor gene from an induced mutation using a broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) microspore culture. *Hort. Environ. Biotechnol.* 53(3):237-241
- Kit, C., M. A. C. M. Zaal, and W. H. J. Verbeek. 1993. Analysis of genic male sterility in *Brassica oleracea*. *Euphytica* 68:53-57
- Lazzeri, P. A. and J. M. Dunwell. 1986. In vitro regeneration from seedling organs of *Brassica oleracea* var. *italica* plenck cv. green comet. II. Effect of light condition and explant size. *Annals of Bot.* 58; 699-710
- Lee, S.-S., J.-H. Kim, and H.-R. Pang. 1993. Culture of flower buds and pedicel

- non-treated and treated with chemical mutagen in broccoli, *Brassica oleracea* var. *italica*. Rep. Food and Resources Institut. Chung-Ang Univ. 5: 1-12
- Lee, S. S. and S. C. Nam. 1995. Mirosore culture of broccoli(*Brassica oleracea* L. var. *italica*). J. Kor. Soc. Hort. Sci. 36:635-640
- Nieuwhof, M. 1961. Male sterility in some cole crops. *Euphytica* 10:351-356
- Renard, M., R. Delourme, J. Mesquida, G. Pelletier, C. Primard, L. Boulidard, C. Dore, V. Ruffio, Y. Herve, and J. Morice. 1992. Male sterilities and F1 hybrids in *Brassica*. In; *Reproductive biology and plant breeding*. eds. Y. Dattee, C. Dumas, A. Gallais. Springer, Berlin heidelberg New York. pp.107-119
- Sigareva, M. A. and E. D. Earle. 1997. Direct trasfer of a cold-tolerant *Ogura* male sterile cytoplasm into cabbage(*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). *Theor. Appl. Genet.* 94 :213-220
- Takahata, Y. and W. A. Keller.1991. High frequency embryogenesis and plantregeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea*. *Plant Sci.* 74; 235-242

<제8협동>

- 박용곤, 강윤한, 이병우, 석호문. 1997. 저장중 호박분말의 카로테노이드 색소 변화. 한국식품영양과학회지. **26**(1):32-36.
- Emmanuel E and Levy AA. 2002. Tomato mutants as tools for functional genomics. *Curr. Biol.* 5:112-117.
- Fridman E, Pleban T and Zamir D. 2000. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**:4718-4723.
- Hildering GJ and Verkerk K. 1965. Chimeric structure of the tomato plant after seed treatment with Ems and X-rays. pp. 317-320. *Ir: The Use of Induced Mutations in Plant Breeding*, Pergamon Press, Oxford (Rep FAO and IAEA).
- Knapp S, Larondelle Y, Robberg M, Furtek D and Theres K. 1994. Transgenic tomato lines containing Ds elements at defined genomic positions as tools for targeted transposon tagging. *Mol. Gen. Genet.* **243**:666-673.
- Li X, Song Y, Century K, Straight S, Ronald P, Dong X, Lassner M and Zhang Y. 2001. A fast neutron deletion mutagenesis-based reverse genetics system for plants. *Plant J.* **27**:235-242.
- Meissner R, Jacobson Y, Melamed S, Levyatuv S, Shalev G, Ashri A, Elkind Y and Levy A. 1997. A new model system for tomato genetics. *Plant J.* **12**:1465-1472.
- Menda N, Semel Y, Peled D, Eshed Y and Zamir D. 2004. In silico screening of a saturated mutation library of tomato. *Plant J.* **38**:861-872.
- Thomas CM, Jones D, English JJ, Carroll BJ, Bennetzen JL, Harrison K, Burbidge A,

- Bishop GJ and Jones JDG. 1994.
Analysis of the chromosomal distribution of transposon-carrying T-DNAs in tomato using the inverse polymerase chain reaction. *Mol. Gen. Genet.* **242**:573-585.
- Yamamoto N, Tsugane T, Watanabe M, Yano K, Maeda F, Kuwata C, Torki M, Ban Y, Nishimura S and Shibata D. 2005. Expressed sequence tags from the laboratory-grown miniature tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Micro-Tom and mining for single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in tomato cultivars. *Gene* **356**:127-134.
- Van der Hoeven R, Ronning C, Giovannoni J, Martin G and Tanksley S. 2002. Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *Plant. Cell.* **14**:1441-1456

<제9협동>

- Carroll KK. 1991. Review of clinical studies on cholesterol-lowering response to soyprotein. *J. Am. Diet. Assoc.* 91:820.
- Kim HS, Hong EH, Kim SD, Ryu YH. 1996. Effects of locations and planting dates on disease occurrence and germination rate of seeds in vegetable soybean. *Korean J. Crop Sci.* 41(2):178-182.
- Kim WJ. 2006. Soybean: Health and use. Seoul, Hyoil Publishers, pp. 22-34.
- Lee CH. 2003. The role of biotechnology in modern food production, XII. Chicago: IUFoST Congress.
- Liu K. 1997. Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization. Aspen Publishers, Gaithersbrug, MD, p 532.
- Messina MJ. 1997 Soyfoods: Their roles in disease prevention and treatment. In soybeans, chemistry, technology and utilization, ed. K.S.Liu. New York: Chapman and Hall
- Song YS, Kwon TW. 2000. Hypocholesterolemic effect of soybean and soy products. *Food industry and nutrition.* 5(2): 36-41
- Zhang AW, Hartman GL, Riccioni L, Chen WD, Ma RZ, Pederson WL. 1997. Using PCR to distinguish *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from other soybean fungal pathogens and to detect them in soybean tissues. *Plant Disease.* 8(10) 1143-1149.

<제10협동>

- Cho, H.Y., Park, S.J., Kim, D.S., Jang, C.J. 2010. A TILLING rice population induced by gamma-ray irradiation and its genetic diversity. *Korean J. Breed. Sci.* 42(4):365-373.
- Cho, H.Y., Hwang, S.-G., Kim, D.S., Jang, C.J. 2012. Genome-wide transcriptome analysis

- of rice genes responsive to chilling stress. *Can. J. Plant Sci.* 92:447-460.
- Ham, D.J., Moon, J.-C., Hwang, S.-G., Jang, C.S. 2013. Molecular characterization of two small heat shock protein genes in rice: their expression patterns, localization, networks, and heterogeneous overexpressions. *Mol. Biol. Rep.* 40(12):6709-6720.
- Hwang, S.-G., Hwang, J.G., Kim, D.S., Jang, C.S. 2013. Genome-wide DNA polymorphism and transcriptome analysis of an early-maturing rice mutant. Under revision.
- Jung, C.G., Lim, S.D., Hwang, S.-G., Jang, C.J. 2012. Molecular characterization and concerted evolution of two genes encoding RING-C2 type proteins in rice. *Gene* 505(1):9-18.
- Lim, S.D., Cho, H.Y., Park, Y.C., Ham, D.J., Lee J.K., Jang, C.S. 2013. The rice RING finger E3 ligase, OsHCI1, diverts nuclear export of multiple substrate proteins and its heterogeneous overexpression enhances acquired thermotolerance. *J. Exp. Bot.* 64(10):2899-2914.
- Moon, J.-C., Ham, D.J., Hwang, S.-G., Park, Y.C., Lee, C., Jang, C.J. 2013. Molecular characterization of a heat inducible rice gene, OsHSP1, and implications for rice thermotolerance. *Genes Genom.* doi:10.1007/s13258-013-0152-y.

□ 논문게재 실적

No.	제 목	학술지	발표자	게재일자	국가명 (SCI 여부)
제1세부 친환경산업 소재용 케나프 및 유채 품종개발 실용화					
1	Genetic Relationship Analysis of Kenaf Resources Based on AFLP and Morphological Characters	Journal of Crop Science and Biotechnology 13(4):243-249	강시용 외 5명	2010. 11.	한국 (비SCI)
2	Selection of high oleic acid in Rape by gamma-ray irradiation	방사선산업학회지 4(3):277-283		2010. 9	한국 (비SCI)
3	케나프 신육성 및 수집 품종의 생육과 사료적 특성 조사	한국작물학회지 57(2):132-136	강시용외 7명	2012.	한국 (비SCI)
4	Assessment of Growth and Seed Oil Composition of Kenaf (Hibiscus cannabinus L.) Germplasm	Journal of Crop Science and Biotechnology 16(4):1-7	강시용 외 5명	2013. 12.	한국 (비SCI)
제2세부 돌연변이 차조기 및 블랙베리를 이용한 생체 산화적 기능성 식품 개발 및 실용화					
1	방사선 유도 돌연변이 약용들깨 핵산 추출물의 inducible nitric oxide synthase 저해활성	J Radiat Ind 3(1):13-18	박용대 외	2009	한국 (비SCI)
2	Isoegomaketone inhibits LPS-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages through the heme oxygenase-1 induction and inhibition of the interferon-beta-STAT-1	J Agric Food Chem 58:860-867	진창현 외	2010	USA (SCI)
3	Phytochemical Profiles and in vitro Anti-inflammatory Properties of Perilla frutescens cv. Chookyoujaso Mutants Induced by Mutagenesis with γ -Ray	Food Sci Biotechnol 19(2):305-311	박용대 외	2010	한국 (SCI)
4	Anti-inflammatory activity of Stevia rebaudiana in LPS-induced RAW 264.7 Cells	J Food Sci Nur 15:14-18	정일윤 외	2010	한국 (비SCI)
5	RAW264.7 대식세포에서 방사선에 의한 MCP-1 발현 기작 연구	J Radiat Ind 4(3):227-231	진창현 외	2010	한국 (비SCI)
6	Protective Effects of Nelumbo nucifera on gamma-irradiation-induced Lipid Peroxidation in Mice Urine	J Radiat Ind 3(4):259-265	정일윤 외	2010	한국 (비SCI)
7	Isoegomaketone Induces Apoptosis through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Pathways in Human DLD1 Cells	Biosci.Biotechnol.Biochem 75(7):1306-1311	조병욱 외	2011	일본 (SCI)
8	Biological evaluation of isoegomaketone isolated from Perilla frutescens and its synthetic derivatives as anti-inflammatory agents	Arch Pharm Res 34(8):1277-1282	박용대 외	2011	한국 (SCI)
9	방사선 기술을 이용한 옷나무 수액의 피부 알러지 저감화 효과	J. Radiat. Ind. 5(1), 25-33	정일윤 외	2011	한국 (비SCI)

10	감마선에 의한 산화적 스트레스에 돌연변이 약용들깨 열수추출물의 방호 효능	J. Radiat. Ind. 5(2), 125-130	진창현 외	2011	한국 (비SCI)
11	Rosmarinic acid attenuated SIN-1-induced cytotoxicity in HepG2 cells through the HO-1 induction and radical scavenging activity	Food Sci Biotechnol 22(2):549-556	진창현 외	2013	한국 (SCI)
제3세부 돌연변이 기술이용 우수 브랜드 장류 및 나물용 콩 신제품 개발 및 실용화					
1	Development of AFLP and SIS markers linked to a waterlogging tolerance in Korean soybean landraces	Biologia Plantarum 54(1): 61-68	이경준 외	2010	네덜란드 (SCIE)
2	Identification of Kunitz trypsin inhibitor mutations using SNAP marker in soybean mutant lines	TAG 121:751-760	이경준 외	2010	USA (SCI)
3	Alteration of Seed Storage Protein Composition in Soybean [Glycinemax (L.) Merrill] Mutant Lines Induced by γ -Irradiation Mutagenesis	J. Agric. Food Chem.59:12405-12410	이경준 외	2011	USA (SCI)
4	Proteomic characterization of Kunitz trypsin inhibitor variants, Tia and Tib, in soybean [Glycine max (L.) Merrill]	Amino Acid 43:379-388	이경준 외	2011	USA (SCI)
5	돌연변이 육종에 재래종 서리태 개량 신제품 콩 '조생서리'	한국육종학회, 42(3): 222-225	송희섭 외	2010	한국 (비SCI)
6	돌연변이 육종에 의한 미이라병 저항성 콩품종 '원울'	한국육종학회, 45(3): 293-297	김진백 외	2013	한국 (비SCI)
제4세부 TILLING 기법을 활용한 내염성 유전자 대량검정 및 벼 품종개발					
1	The SNPs detection of gene encoding Anthranilate synthase from gamma-irradiated rice mutant lines by TILLING systems	Biologia Plantarum 53(3): 444-450	전재범 외	2009	네덜란드 (SCIE)
2	Biochemical characterization of 5-methyltryptophan resistant rice mutants through SDS-PAGE and 2-dimentional gel electrophoresis.	방사선 산업학회지 3(3):205-214	김동섭 외	2009	한국 (비SCI)
3	Selection and genetic relationship of salt tolerant rice mutants by in vitro mutagenesis.	방사선 산업학회지 4(4):301-312	김동섭 외	2010	한국 (비SCI)
4	Salt-responsive genes in salt tolerant rice mutants revealed through microarray analysis	방사선 산업학회지 4(4):325-334	김동섭 외	2010	한국 (비SCI)
5	Selection of gamma-ray induced salt tolerant rice mutants by in vitro mutagenesis.	방사선 산업학회지 4(2): 179-184	김동섭 외	2010	한국 (비SCI)
6	A TILLING rice population induced by gamma-ray irradiation and its genetic diversity.	한국 육종학회 42(4): 365-373	조현용 외	2010	한국 (비SCI)
7	Identification of mutations in OsASA1 gene from a gamma-irradiated rice mutant population	Plant Breeding 131:276-281	전재범 외	2012	네덜란드 (SCI)
8	Physiological characterization of gamma-ray induced salt tolerant rice mutants. Aust. J. Crop Sci	Aust. J. Crop Sci. 6(3): 421-429.	송미라 외	2012	오스트리아 (SCI)
9	Different Physiological Response to Salt in Salt Tolerant Rice Mutants Induced by Gamma-Mutagenesis	방사선 산업학회지 5(3): 259-266	장덕수 외	2011	한국 (비SCI)

10	Protein profiles in response to salt stress in seedling of salt tolerant rice mutants. J. Radiation Industry	방사선 산업학회지 6(2): 129-138	송미라 외	2012	한국 (비SCI)
11	The identification of candidate radio marker genes using a coexpression network analysis in gamma-irradiated rice	Physiologia plantarum 149: 554-570	김선희 외	2013	영국 (SCI)
제1협동 벼 고기능성 쌀 품종 개발 및 실용화					
1	Fine Mapping and Candidate Gene Analysis of the Floury Endosperm Gene, <i>FLO(a)</i> , in Rice	Molecules and Cells, 29:167-174	고희종 외	2010	한국 (SCI)
2	Characteristics and Genetic Segregation of a Rolled Leaf Mutant in Rice	한국육종학회, 43(4):192-196	이승이 외	2011	한국 (비SCI)
제 2협동 들연변이 기술을 이용한 바이러스 저항성 고추 유전자원 개발					
1	Charcterization and genetic analysis of a low temperature sensitive mutant, <i>sy-2</i> , in <i>Capsicum chinense</i>	Theoretical and Applied Genetics	안송지 외	2010	USA (SCI)
2	The survey of natural variations and EMS induced mutations in <i>Capsicum</i>	Molecular Breeding	정희진 외	2011	USA (SCI)
3	Reduced activity of ATP synthase in mitochondria causes cytoplasmic male sterility in Chili pepper	Planta	Jinjie Li 외	2012	USA (SCI)
4	Genetic Analysis of Carotenoids Content in Red Pepper (<i>Capsicum annuum</i> L.) Fruit using Complete Diallel Cross	The Korean Journal of Breeding Science	이우문 외	2012	한국 (비SCI)
5	Characterization and inheritance of a novel thermo-sensitive restoration of cytoplasmic male sterility in <i>Capsicum annuum</i>	Scientia Horticulturae	김영민 외	2013	USA (SCI)
6	Phenotypic variants among ethyl methanesulfonate (EMS) M2 mutant lines in <i>Capsicum annuum</i>	Plant Genetic Resources	황도연 외	2014 (예정)	USA (SCI)
제3협동 들연변이 육종기술을 이용한 밀 신품종 개발					
1	Functional characterization of pectin methylesterase inhibitor(PMEI) in wheat	Genes & Genetic Systems 85:97-106	홍민정 외	2010	Japan (SCI)
2	Employment of hordein subunit polymorphisms in establishing selection criteria for high quality malting barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	Journal of Crop Science and Biotechnology 13(2): 91-97	이용진 외	2010	한국 (비SCI)
3	Wheat F-box protein recruits proteins and regulates their abundance during wheat spike development	Molecular Biology Reports 39(10):9681-9696	홍민정 외	2012	Netherlands (SCI)
4	SKP1-like-related genes interact with various F-box proteins and may form SCF complexes with Cullin-F-box proteins in wheat	Molecular Biology Reports 40(2):969-981	홍민정 외	2012	Netherlands (SCI)
5	A potential role of UBC28 interacting RING finger	Journal of Plant	홍민정 외	2013	India

	protein TaRF1 in spike development of wheat	Biochemistry and Biotechnology DOI 10.1007/s13562-013-0227-5			(SCI)
6	Cullin, a component of the SCF complex, interacts with TaRMD5 during wheat spike development	Biologia plantarum online first	홍민정 외	2013	Netherlands (SCIE)
제4협동 블랙베리 유망돌연변이 계통의 품종 실용화 및 스테비아 육종					
1	스테비아의 아조돌연변이유기를 위한 기내유식물체의 방사선 감수성	한국방사선산업학회	윤태영	2010.12	비SCI
2	감마선 및 화학적 돌연변이원 처리가 스테비아(<i>Stevia rebaudiana</i> Bert.)의 종자 발아 및 초기 생장에 미치는 영향	한국방사선산업학회	윤태영	2012.12	비SCI
제6협동 내염성 및 조숙성, 단간성 유채 돌연변이 품종 개발					
1	양성자 및 감마선처리에 의한 유채 유용형질의 변이계통 선발	한국육종학회지 43(2), 145~153	은종선 외	2011	한국 (비SCI)
2	양성자 및 감마선처리에 의한 유채 내염성 변이계통 선발	방사선산업학회지 5(3), 211~220	은종선 외	2011	한국 (비SCI)
3	방사선 조사에 의한 유채 M ₆ ~M ₇ 세대 변이계통의 특성	방사선산업학회지 7(2-3), 101~108	은종선 외	2013	한국 (비SCI)
4	양성자 및 감마선 처리에 의한 유채(<i>Brassica napus</i> L.) 돌연변이 품종육성	-	김준수	2011	한국
5	양성자 및 감마선 처리에 의한 유채(<i>Brassica napus</i> L.) 돌연변이 품종육성	-	김준수	2011	한국
제8협동 돌연변이 육종기술을 이용한 색소 및 영양 강화 토마토 계통 선발 및 품종 육성					
1	Cloning and expression analysis of the Ccrboh gene encoding respiratory burst oxidase in <i>Citrullus colocynthis</i> and grafting onto <i>Citrullus lanatus</i> (watermelon)	Journal of Experimental Botany Vol. 61, No. 6, pp. 1635 - 1642	강권규 외	2010	영국 (SCI)
2	FOX hunting system을 이용한 배추 기능유전자 탐색	J Plant Biotechnol 37:175 - 186	강권규 외	2010	한국
3	국내외 수집 토마토에 있어서 당도, 산도, 카로티노이드 색소의 유전변이에 관한 연구	한국자원식물학회지 2010. 10월	강권규 외	2010	한국
4	감마선 돌연변이원에 의한 Osmotic 스트레스 저항성 토마토 계통 선발 및 특성	방사선산업학회지 4(3) (2010.9)	강권규 외	2010	한국
5	Expression, in vivo localization and phylogenetic analysis of a pyridoxine 50-phosphate oxidase in <i>Arabidopsis thaliana</i>	Plant Physiology and Biochemistry 2011 Jan;49(1):88-95	강권규외	2011	독일 (SCI)
6	Transgenic Tomato Plants Expressing BrOAT1 gene	Plant Breed. Biotech. 2013	강권규외	2013	한국

	from Brassica rapa var. SUN-3061 Show Enhanced Tolerance to Salt Stress	(March) 1(1):70~79			
제9협동 유전자마커 시스템을 이용한 병저항성 벼 돌연변이 계통선발 및 분자마커 개발					
1	방사선을 이용한 벼 흰잎마름병 저항성 돌연변이 벼 계 통의 선발	J Rad Indus 4(3); 209-213	임찬주 외	2010	한국 (비SCI)
2	Microarray analysis of bacterial blight resistance 1 mutant rice infected with Xanthomonas oryzae pv. oryzae	Plant Breed Biotech 1(4)	이소영 외	2013	한국 (비SCI)
제10협동 돌연변이체를 이용한 기후변화 대응 벼 유전자 네트워크 구축 및 품종 개발					
1	A TILLING rice population induced by gamma-ray irradiation and its genetic diversity	Korean J. Breed. Sci. 42(4):365-373	조현용 외	2010	한국 (비SCI)
2	Genome-wide transcriptome analysis of rice genes responsive to chilling stress	Can. J. Plant Sci. 92:447-460	조현용 외	2012	캐나다 (SCI)
3	Molecular characterization and concerted evolution of two genes encoding RING-C2 type proteins in rice	Gene 505(1):9-18	정창교 외	2012	네델란드 (SCI)
4	The rice RING finger E3 ligase, OsHCL1, drives nuclear export of multiple substrate proteins and its heterogeneous overexpression enhances acquired thermotolerance	J. Exp. Bot. 64(10):2899-2914	임성돈 외	2013	영국 (SCI)
5	Molecular characterization of two small heat shock protein genes in rice: their expression patterns, localization, networks, and heterogeneous overexpressions	Mol. Biol. Rep. 40(12):6709-6720	함덕재 외	2013	네델란드 (SCI)
6	Molecular characterization of a heat inducible rice gene, OsHSP1, and implications for rice thermotolerance	Genes Genom. doi:10.1007/s13258-013-0 152-y	문준철 외	2013	한국 (SCIE)
7	Genome-wide DNA polymorphism and transcriptome analysis of an early-maturing rice mutant	Under revision	황선구 외	2013	네델란드 (SCI)

특허출원 실적

No.	산업재산권명	출원일자	출원번호	출원국가	출원자
제2세부 돌연변이 차조기 및 블랙베리를 이용한 생체 산화적 기능성 식품 개발 및 실용화					
1	이소에고마케톤을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 조성물	2010.11.17	2010-0114674	대한민국	정일윤, 진창현, 박 용대, 조병욱, 강시 용, 김동섭
2	블랙베리 식초를 함유하는 간기능 개선용 음료 및 이의 제조방법	2011.10.14.	2011-0105353	대한민국	정일윤, 진창현, 강 시용, 김동섭, 서권 일
3	블랙베리 추출물을 유효성분으로 함유하는 간 기능 보호용 약학적 조성물	2011.03.31.	2011-0029608	대한민국	정일윤, 진창현, 서 권일, 강시용, 김동

					섭
4	블랙베리 신품종 '아모르' 및 이의 추출물을 유효성 분으로 포함하는 조성물	2013.02.22.	2013-0019420	대한민국	정일윤, 진창현, 김 동섭, 강시용
제1협동 벼 고기능성 쌀 품종 개발 및 실용화					
1	벼의 분질배유 유전자 FLO(a)와 분자마 커 및 유전자 부위 정밀유전자지도	2010.2	10-2010-0028 611	한국	고희종
제2협동 들연변이 기술을 이용한 바이러스 저항성 고추 유전자원 개발					
1	깁스 시약을 이용한 고추의 캡사이시노이드 분석 방법	2012.10.19	10-2012-0116 856	대한민국	강병철 권진경 정희진 황도연
2	식물 바이러스 예방 또는 억제용 조성물 및 식물 바이러스 예방 또는 억제용 물질의 스크리닝 방법	2013.10.10	10-2013-0120 872	대한민국	강병철 황지나
제4협동 블랙베리 유망들연변이 계통의 품종 실용화 및 스테비아 육종					
1	블랙베리 신품종 메이플 개발	10-12-20	10-2010-0130380	한국	한국스테비아(주)
2	스테비아 "다감"신품종 식물	12-12-31	10-2012-0157991	한국	한국스테비아(주)
제10협동 들연변이체를 이용한 기후변화 대응 벼 유전자 네트워크 구축 및 품종 개발					
1	벼 유래의 RMT1 유전자 및 이의 용도	2011.09.07	10-2011-0090530	한국	장철성, 임성돈
2	식물체의 염 스트레스 내성을 증가시키는 OsHSP 유전자 및 이의 용도	2013.04.04	10-2013-0036774	한국	장철성, 문준철, 합덕재

품종보호권 출원 실적

No.	산업재산권명	출원일자	출원번호	출원국가	출원자
제1세부 친환경산업 소재용 케나프 및 유채 품종개발 실용화					
1	친환경 산업소재용 케나프"장대"	2011. 1.3	2011-0026	한국	강시용 외 5명
2	관상용 케나프 "백마"	2012. 10.15	2012-538	한국	강시용 외 5명
3	관상용 케나프 "적봉"	2012. 10.15	2012-537	한국	강시용 외 5명
제3세부 들연변이 기술이용 우수 브랜드 장류 및 나물용 콩 신품종 개발 및 실용화					
1	밥밀용/장류용 콩 신품종 "원율"	2009.11.30	10-2009-000473	한국	강시용, 김진백, 송희섭, 김동섭, 이경준, 김상훈, 이덕만, 이승수
2	밥밀용/청국장용 콩 신품종 "원현"	2011.4.30	10-2011-000302	한국	김진백, 강시용, 송 희섭, 이덕만, 김상 훈, 김동섭, 이경준, 이승수
3	밥밀용/청국장용 콩 신품종 "조생서리2호"	2012.6.15	10-2012-000393	한국	김진백, 강시용, 김 동섭, 하보근, 이경 준, 김상훈, 이덕만, 송희섭
제4세부 TILLING 기법을 활용한 내염성 유전자 대량검정 및 벼 품종개발					

1	내염성 증진 신제품 “원해2호” 품종보호권 출원	2012.09.27	2012-1092	한국	김동섭, 강시용, 김진백, 하보근, 김상훈, 이상재
제1협동 벼 고기능성 쌀 품종 개발 및 실용화					
1	벼 “서농 16호”	2011.03.25	2011-271	한국	고희종, 김홍열, 진중현, 함태호, 추상호, 강문수, 이주현, 김백기
제3협동 들연변이 육종기술을 이용한 밀 신제품 개발					
1	트랜스(Trans)	2011.09.09	2011-432호	한국	고려대학교 산학협력단 (서용원)
제6협동 내염성 및 조숙성, 단간성 유채 들연변이 품종 개발					
1	조숙·단간성 신제품 유채 “조단”	2010. 09. 28	출원-2010-429	한국	전북대학교산학협력단 (은종선, 김준수)
2	조숙·단간성 신제품 유채 “은누리”	2012. 02. 07	출원-2012-98	한국	전북대학교산학협력단 (은종선, 김준수)
3	조숙·대화성 신제품 유채 “대화”	2012. 02. 07	출원-2012-99	한국	전북대학교산학협력단 (은종선, 김준수)
4	조숙·단간성 신제품 유채 “미니”	2013. 02. 27	출원-2013-169	한국	전북대학교산학협력단 (은종선, 김준수)
5	내염성 신제품 유채 “만금”	2013. 10. 01	출원-2013-426	한국	전북대학교산학협력단 (은종선, 김준수)

□ 유전자원 등록 실적

No.	산업재산권명	기탁일자	자원번호	등록국가	기탁자
제6협동 내염성 및 조숙성, 단간성 유채 들연변이 품종 개발					
1	엽록소 변이계통	2011. 09. 22	K175491	한국	은종선, 김준수
2	초단간 변이계통	2011. 10. 12	K175492	한국	은종선, 김준수
3	조숙·초단간 변이계통	2011. 10. 12	K175551	한국	은종선, 김준수
4	대화 변이계통	2011. 10. 12	K175552	한국	은종선, 김준수
5	조숙·단간 변이계통	2011.1 0. 12	K175553	한국	은종선, 김준수
6	고오일 변이계통	2012. 11. 05	K204668	한국	은종선, 김준수
7	내염성 변이계통	2013. 10. 10	K223115	한국	은종선, 김준수

□ 특허등록 실적

No.	산업재산권명	등록일자	등록번호	등록국가	출원자
제2세부 돌연변이 차조기 및 블랙베리를 이용한 생체 산화적 기능성 식품 개발 및 실용화					
1	이소에고마케톤을 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 조성물	2013.06.10	10-1275106	대한민국	정일윤, 진창현, 박용대, 조병옥, 강시용, 김동섭
2	블랙베리 식초를 함유하는 간기능 개선용 음료 및 이의 제조방법	2013.09.27.	10-1314829	대한민국	정일윤, 진창현, 강시용, 김동섭, 서권일
제4협동 블랙베리 유망돌연변이 계통의 품종 실용화 및 스테비아 육종					
1	블랙베리 신품종 메이플 개발	2013-4-2	제10-1252077호	한국	한국스테비아(주)
제10협동 돌연변이체를 이용한 기후변화 대응 벼 유전자 네트워크 구축 및 품종 개발					
1	벼 유래의 RMT1 유전자 및 이의 용도	2013.06.28	1012824060000	한국	장철성, 임성돈

□ 품종보호권등록 실적

No.	품종명칭	등록일자	등록번호	등록국가	출원자
제1세부 돌연변이 기술이용 우수 브랜드 장류 및 나물용 콩 신품종 개발 및 실용화					
1	양마 품종보호권 "장대"	2013. 6. 18	제4560호	한국	강시용 외 5명
제3세부 돌연변이 기술이용 우수 브랜드 장류 및 나물용 콩 신품종 개발 및 실용화					
1	원울	2012.7.11	4087호	한국	강시용, 김진백, 송희섭, 김동섭, 이경준, 김상훈, 이덕만, 이승수
2	원현	2012.12.27	4278호	한국	김진백, 강시용, 송희섭, 이덕만, 김상훈, 김동섭, 이경준, 이승수
제1협동 벼 고기능성 쌀 품종 개발 및 실용화					
1	벼 "서농 15호"	2012.10.19	제4178호	한국	고희중,함태호,추상호,강문수,이주현,김백기
제3협동 돌연변이 육종기술을 이용한 밀 신품종 개발					
1	트랜스(Trans)	2013.11.28	4695호	한국	고려대학교 산학협력단 (서용원)
제4협동 블랙베리 유망돌연변이 계통의 품종 실용화 및 스테비아 육종					
1	신품종 "다감" 품종보호	2012-10-15	출원2012-536	한국	한국스테비아(주)
2	신품종 "다정" 품종보호	2013-1-11	출원2013-37	한국	한국스테비아(주)
3	신품종 "다미" 품종보호	2013-1-11	출원2013-38	한국	한국스테비아(주)

□ 기술료 계약실적

No.	계약건명	계약금액 (천원) (계약조건)	계약업체 (국명)	계약일자	연구책임자 (연구원)
제1세부 친환경산업 소재용 케나프 및 유채 품종개발 실용화					
1	케나프 품종 실시권 이전	24,200	바이오플러스		강시용
제4협동 블랙베리 유망돌연변이 계통의 품종 실용화 및 스테비아 육종					
1	블랙베리 신품종 메이플 기술실시계약	해당년도 매출액의 10%	바이오플러스(주) (주)태준	2012.2.17	윤태영

□ 학술발표 실적

No.	제 목	회의명	발표자	발표일자	국가명
제1세부 친환경산업 소재용 케나프 및 유채 품종개발 실용화					
1	Genetic diversity analysis of kenaf by growth characterization and AFLP	한국식물생명공학회	김욱진	2009. 4. 4	한국
2	The effects of Kenaf seedlings by gamma-ray irradiation	한국육종학회	김욱진	2009. 7.1	한국
3	Cloning of monolignol bio-synthesis related gene from kenaf	한국작물학회		2009. 10.22	한국
4.	Cloning Monolignol Bio-Synthesis Related Genes from Kenaf (Hibiscus Cannabinus L.)	Crop Functional Genomics		2010. 4.14	한국
5	Morphology and growth evaluation of Kenaf (Hibiscus cannabinus L.) mutant lines induced by gamma-ray irradiation	한국육종학회		2010. 7. 8	한국
6	Radio-sensitivity Analysis of Rape (Brassica napus L.) by Gamma-ray Irradiation	한국환경생물학회		2010. 6. 18	한국
7	Evaluation of growth characteristics and genetic relationship of elite mutant lines induced by gamma irradiation in Kenaf	한국식물생명공학회		2011. 4. 28	한국
8	Evalutaion of yield and chemical composition of kenaf mutant line "Jangdae" as a potential forage crop	한국작물학회		2011. 10. 20	한국
9	Selection of mutant lines with high bio-mass and oleic acid by gamma irradiation in Brassica napus L.	한국작물학회		2011. 10. 20	한국
10	Variations in fatty acid compositions of the seed oil in kenaf (Hibiscus cannabinus L.) germplasm and gamma	한국육종학회		2012.	한국

	ray-induced mutants				
11	Growth Characteristics and Fatty Acid Compositions of Stem Color Mutants and Flower Color Mutants in Kenaf (<i>Hibiscus cannabinus</i> L.)	한국작물학회		2012.	한국
12	국내 채종이 가능하고 바이오매스 생산성이 뛰어난 케나프 신품종 '장대'.	한국식물생명공학회		2013.	한국
13	Effects of harvest times on yield of kenaf (<i>Hibiscus cannabinus</i> L.) mutant lines	한국방사선산업학회		2013. 11. 14	한국
14	Evaluating salt tolerance of kenaf (<i>Hibiscus cannabinus</i> L) genotypes at early growth stages	한국방사선산업학회		2013. 11. 14	한국
제2세부 돌연변이 차조기 및 블랙베리를 이용한 생체 산화적 기능성 식품 개발 및 실용화					
1	Isoegomaketone Inhibits LPS-Induced Nitric Oxide Production in RAW264.7 Macrophages through the Heme Oxygenase-1 Induction and Inhibition of the Interferon-beta-STAT-1 Pathway	대한면역학회	진창현 외	2009.11.9~10	한국
2	Isoegomaketone inhibits the LPS-induced expression of iNOS in RAW 264.7 Cells through the NF- B pathway, the JAK-2/STAT-1 pathway and the JNK pathway	한국분자세포생물학회	진창현 외	2009.2.4~6	한국
3	Phytochemical composition and in vitro anti-inflammatory properties of the <i>Perilla frutescens</i> cv. Chookyoupjaso mutants induced by mutagenesis with gamma-ray	대한약학회	박용대 외	2009.5.7~8	한국
4	Isoegomaketone inhibits cell growth and induces apoptosis in DLD1 human colon cancer cells	KSSMB annual meeting	조병욱 외	2010.5.18	한국
5	Rosmarinic acid attenuated SIN-1-induced cytotoxicity in HepG2 cells through the radical scavenging activity and HO-1 induction	대한면역학회	진창현 외	2010.4.9	한국
6	Biological evaluation of isoegomaketone isolated from <i>Perilla frutescens</i> and its synthetic derivatives as anti-inflammatory agents	대한약학회	박용대 외	2010.4.15	한국
7	암세포 사멸에 방사선과 isoegomaketone의 시너지 효능 연구	한국방사선산업학회	진창현	2010.11.5	한국
8	Protective Effect of <i>Perilla frutescens</i> cv. Chookyoupjaso Mutant Water Extract against in vitro and in vivo Oxidative Injury	대한약학회	조병욱 외	2011.4.21	한국
9	Antioxidant Activity and Chemical Composition of <i>Rubus fruticosus</i> Extract	대한약학회	정일윤 외	2011.4.21	한국

10	Protective Effect of Perilla frutescens cv. Chookyupjaso Mutant Water Extract on Gamma-Ray-induced Oxidative Stress in Mice	대한약학회	진창현 외	2011.4.21	한국
11	Hepatorotective Effect of Blackberry Extract on Carbon Tetrachloride-induced Liver Injury in Rats	대한약학회	류형원 외	2011.4.21	한국
12	Austroinulin and 6-O-Acetyl-Austroinulin attenuates LPS-induced NO production through the inhibition of IRF3/IFN-beta/STAT1 pathway in RAW264.7 cells	분자세포생물학회	조병욱 외	2012.10.11	한국
13	SD rat에서 블랙베리 시제품 노적의 혈중 알코올 감소 및 숙취에 미치는 효과	방사선산업학회	조병욱 외	2012.11.02	한국
14	방사선 돌연변이 블랙베리 품종별 C3G 함량 비교 분석	방사선산업학회	이창욱 외	2012.11.02	한국
15	CCl4에 의한 간 독성 동물모델에서 블랙베리 시제품 노적의 간 기능 개선 효과	방사선산업학회	조병욱 외	2012.11.02	한국
16	방사선 돌연변이 블랙베리 V-9과 화학적 돌연변이 신품종 블랙베리 E-32의 항산화 효능 비교 분석	방사선산업학회	조병욱 외	2013.11.15	한국
17	SD-rat에서 방사선 돌연변이 블랙베리 B201, V-9 품종 추출물의 간 보호 효과 비교	한국식품영양과학회	이창욱 외	2013.11.15	한국
18	HepG2 cell에서 방사선 돌연변이 블랙베리 B201, V-9품종의 항산화 활성비교	한국식품영양과학회	이창욱 외	2013.11.15	한국
19	신품종 블랙베리 메이플의 간 기능 및 숙취 조절 효과	한국식품영양과학회	조병욱 외	2013.11.15	한국
제3세부 돌연변이 기술이용 우수 브랜드 장류 및 나물용 콩 신품종 개발 및 실용화					
1	Identification of change of Kunitz trypsin inhibitor (KTI) type irradiated with a gamma ray by SNAP marker in soybean mutant lines	한국작물학회	이경준 외	2009.4.16~17	한국
2	방사선을 이용한 재래종 서리태 개량 신품종 '조생서리'	한국육종학회	김진백 외	2009.7.1~2	한국
3	Expressional analysis of flowering time genes in gamma irradiated mutant soybean variety	한국작물학회	김진백 외	2009.10.22.~23	한국
4	Change of Kunitz trypsin inhibitor in soybean mutant lines irradiated with a gamma ray	식물과학협의회	이경준 외	2009.10.26~27	한국
5	Identification of Kunitz trypsin inhibitor type changes in soybean mutant lines	Crop functional genomics	이경준 외	2010.4.14~16	한국(국제)
6	돌연변이 육종 기술을 이용한 장류 및 나물용 신품종 개발	한국육종학회	김진백 외	2010.7.8~9	한국
7	Change of the Kunitz trypsin inhibitor (KTI) and proteomic difference between KTI types in soybean mutant lines induced by gamma irradiation	한국육종학회	이경준 외	2010.7.8~9	한국
8	Change of seed storage proteins in soybean [Glycine max (L.) Merrill] mutant lines induced by gamma radiation	식물과학협의회	이경준 외	2010.11.8~9	한국
9	황금콩 돌연변이 계통으로 제조된 된장의 이화학적 특성 비교	한국식품위생안전성학회	김진백 외	2011.10.28.	한국

10	백운콩 돌연변이 계통으로 제조된 된장의 품질 특성 비교	한국식품위생안전성학회	이경준 외	2011.10.28.	한국
11	장류 적합 콩 돌연변이 계통을 이용한 장류 제조 및 성분 분석	한국작물학회	이경준 외	2012.10.11	한국
12	Development of new soybean mutants with null lipoxygenase genes	Genomics of Plant Genetic Resources	이경준 외	2011.04.16	한국
13	Evaluation of soluble sugar content in soybean mutant lines	한국육종학회	이경준 외	2011.07.04	한국
제4세부 TILLING 기법을 활용한 내염성 유전자 대량검정 및 벼 품종개발					
1	The SNPs detection of gene encoding Anthranilate synthase from gamma-irradiated rice mutant lines by TILLING systems.	한국작물학회	김동섭 외	2009.10.22-23	한국
2	Physiological response and gene expression profiling responding to salinity in salt tolerant rice mutants.	한국육종학회	송재영 외	2009.7.1~2	한국
3	The discovering polymorphic changes of AS(anthranilate synthase) gene from 4 rice mutants lines by mutation discovery using CEL1 enzyme treatment	한국작물학회	김동섭 외	2009.7.1-2	한국
4	Physiological response and transcriptome profiling responding to salinity in salt tolerant rice mutants.	6th International Rice Genome Symposium.	김동섭 외	2009.11.17-20	필리핀
5	Gene expression profiling in a high amino acid accumulating rice mutant	6th International Rice Genome Symposium.	김동섭 외	2009.11.17-20	필리핀
6	The DNA polymorphisms discovery of AS (Anthranilate Synthase) by TILLING and capillary electrophoresis detection from irradiated rice mutant population.	6th International Rice Genome Symposium.	김동섭 외	2009.11.17-20	필리핀
7	Protein profiles in response to salt stress in seedling of salt tolerant rice mutants.	2010 Crop Functional Genomics	김동섭 외	2010.4.14-16	한국
8	Antioxidative characterization of high amino acid accumulating rice mutants.	2010 Crop Functional Genomics	김동섭 외	2010.4.14-16	한국
9	The SNPs detection of genes related to the membrane transporting system from salt stress tolerant gamma-irradiated rice populations by TILLING application.	한국육종학회	장덕수 외	2010.7.8-9	한국
10	Characterization of the enhanced tryptophan content mutant lines selected from gamma-irradiation rice mutant population.	한국육종학회	전재범 외	2010.7.8-9	한국
11	Application of capillary fluorescence-labeled TILLING for the detection of OsASA1 mutant from gamma-irradiated rice mutant population	한국육종학회	김동섭 외	2010.7.8-9	한국

12	Proteomic characteristics in response to salt stress in seedling of salt tolerant rice mutants	한국육종학회	김동섭 외	2010.7.8-9	한국
13	Assessment of genetic diversity of a TILLING population induced by gamma-ray irradiation	한국작물학회	박서정 외	2010	한국
14	Different Physiological Response to Salt in Salt Tolerant Rice Mutants Induced by Gamma-Mutagenesis.	한국작물학회	장덕수 외	2011.4.21-22	한국
15	Elucidation of Salt-Responsive Genes in Salt Tolerant Rice Mutants Population through high throughput transcriptome profiling	한국작물학회	장덕수 외	2011.4.21-22	한국
16	High-Throughput Screening of Salt Tolerant Rice Mutant Population to Identify SNPs Related to Membrane Transport Genes by Using TILLING Application	한국식물생명공학회	장덕수 외	2011.4.28-29	한국
17	Microarray analysis of salt responsive genes in salt tolerant rice mutants	한국육종학회	장덕수 외	2011	한국
18	SNPs detection of membrane transporting genes in salt tolerant rice mutant population by TILLING assay	한국식물생명공학회	양영섭 외	2012.6.8-9	한국
19	Agronomic trait variations by carbon ion-beam irradiation in Rice (<i>Oryza sativa</i> L.)	한국방사선산업학회	한성민 외	2013. 11.	한국
20	Comparative genomic hybridization analysis of rice dwarf mutants induced by gamma-irradiation	3rd International Symposium on Genomics of Plant Genetic Resources	김선희 외	2013. 05	국외
제1협동 벼 고기능성 쌀 품종 개발 및 실용화					
1	Preliminary Studies of Molecular Mechanism of Hybrid Sterility Genes in Inter-subspecific Crosses in Rice	한국육종학회	레플리너 외	2009.7.1.~3	한국
2	Characterization and genetic analysis of the embryo lethal mutant in rice	Rice Genetics Symposium 6	김백기 외	2009.11.13.~16	필리핀
3	Fine Mapping and Candidate Gene Analysis of the Floury Endosperm Gene, FLO(a), in Rice	한국육종학회	이송이 외	2010.7.8.~9	한국
4	Fine mapping of the yellow pericarp lethal gene in rice	한국작물학회	김백기 외	2010.10.21.~22	한국
5	Map-based cloning of an Open-hull Sterile Mutant Gene in Rice	한국육종학회	유요예 외	2011.7.7.~8	한국
6	Characterizing a rice mutant showing early senescence phenotype.	한국육종학회	이강이 외	2012.7.5.~6	한국
7	Characterization and genetic mapping of the early senescence mutant in rice	한국육종학회	이동령 외	2013.7.4~5	한국
제 2협동 들연변이 기술을 이용한 바이러스 저항성 고추 유전자원 개발					
1	Natural variation and EMS-induced mutation survey in <i>Capsicum</i>	CFG 2010	정희진 외	2010. 04. 14	한국

2	Natural variation and EMS-induced mutation survey in <i>Capsicum</i>	한국육종학회	정희진 외	2010. 07. 08	한국
3	Species identification and mutation screening by SNP marker base on High resolution melting analysis in <i>Capsicum</i>	7th Solanaceae Conference	정희진 외	2010. 09. 05	영국
4	Natural variation and EMS-induced mutation survey in <i>Capsicum</i>	식물생명공학회	정희진 외	2011. 04. 28	한국
5	Biosynthesis of capsinoid is controlled by the <i>Pun1</i> locus in pepper	SOL2011	정희진 외	2011. 11. 28	일본
6	Selection of high capsinoid peppers using <i>pAMT</i> mutant screening	SOL2011	정희진 외	2011. 11. 28	일본
7	Development of an EMS Mutant Population in <i>Capsicum</i>	한국육종학회	황도연 외	2012. 07. 05	한국
8	Characterization of EMS Mutants in <i>Capsicum annuum</i>	GPGR3	황도연 외	2013. 04. 16	한국
9	Classification of the Various Characteristics in the Pepper EMS	한국원예학회	안정탁 외	2013. 05. 22	한국
10	Characterization of an ethyl methane sulfonate (EMS) mutant lines in <i>C.annuum</i>	한국육종학회	황도연 외	2013. 07. 04	한국
11	Development of an ethyl methane sulfonate (EMS) mutant lines in <i>C.annuum</i>	EUCARPIA	황도연 외	2013. 09. 02	이탈리아
제3협동 돌연변이 육종기술을 이용한 밀 신품종 개발					
1	Expression of wheat F-box protein gene under various phytohormones and abiotic stresses	한국육종학회 정기학술발표회	홍민정 외	2009.7.1~2	한국
2	Identification and Functional analysis of UNUSUAL FLORAL ORGAN (UFO) in wheat	한국작물학회 춘계학술발표회	홍민정 외	2010.4.8~9	한국
3	Truncated Hemoglobin involved in photosynthesis	한국작물학회 춘계학술발표회	김대연 외	2010.4.8~9	한국
4	Analysis of seed storage protein subunits and its application on high quality malts	한국작물학회 춘계학술발표회	이용진 외	2010.4.8~9	한국
5	Effects of gamma-irradiation of wheat on high molecular weight (HMW) glutenin subunit	한국육종학회 정기학술발표회	홍민정 외	2010.7.8~9	한국(국제)
6	Functions of F box protein in wheat	20th International Triticeae Mapping Initiative and 2nd Wheat Genomics in China	홍민정 외	2010.9.1~5	중국
7	Application of genome-wide expression analysis to wheat improvement	20th International Triticeae Mapping Initiative and 2nd Wheat Genomics in China	이동건 외	2010.9.1~5	중국

8	Isolation and identification of substrates of Wheat F box protein	한국작물학회 춘계학술발표회	홍민정 외	2011.4.21.~22	한국
9	Expression analysis of SKP related genes in wheat	한국육종학회 정기학술발표회	홍민정 외	2011.7.7.~8	한국
10	Characterization of Cullin protein in wheat.	한국작물학회 춘계학술발표회	홍민정 외	2012.4.19.~20	한국
제4협동 블랙베리 유망돌연변이 계통의 품종 실용화 및 스테비아 육종					
1	스테비아 돌연변이 육종	한국방사선산업 학회 심포지엄	윤태영	2009.10.7.	한국
2	블랙베리 돌연변이 육종	한국방사선산업 학회 심포지엄	윤태영	2009.10.7.	한국
3	스테비아의 아조돌연변이유기를 위한 기내유식물체의 방사선 감수성	한국육종학회	윤태영	2010.7.8.	한국
4	블랙베리의 아조돌연변이유기를 위한 기내유식물체의 방사선 감수성	한국육종학회	윤태영	2010.7.8.	한국
5	감마선 처리를 통한 블랙베리(<i>Rubus fruticosus</i>)의 신품종 육종 및 실용화	한국식물생명공학회	김영호	2013.6.20.	한국
6	감마선 처리를 통한 스테비아(<i>Stevia rebaudiana</i> Bert.)의 신품종 육종	한국식물생명공학회	김영호	2013.6.20.	한국
제6협동 내염성 및 조숙성, 단간성 유채 돌연변이 품종 개발					
1	방사선처리에 의한 유채의 단간·조숙 변이체 선발	한국육종학회	은종선 외	2009.07.01~07.03	한국
2	양성자 및 감마선처리에 의한 유채의 유용변이체 선발	한국육종학회	은종선 외	2009.07.01~07.03	한국
3	방사선처리에 의한 유채의 M ₄ 세대 변이체 선발	한국원예학회	은종선 외	2009.10.23~10.24	한국
4	조숙, 단간, 내염성 유채품종 개발을 위한 돌연변이 육종-M ₄ 세대 유망계통 선발	한국방사선산업학회	은종선 외	2009.11.05~11.07	한국
5	방사선 처리에 의한 유채 M ₄ 세대 내염성 변이계통 선발	한국원예학회	은종선 외	2010.05.28~05.29	한국
6	유채 M ₅ 세대 조숙, 단간, 고유지 변이계통 선발	한국원예학회	은종선 외	2010.10.22~10.23	한국
7	양성자와 감마선을 처리한 유채 M ₅ 세대의 단간, 조숙계통 선발	한국육종학회	은종선 외	2010.07.08~07.09	한국
8	양성자와 감마선을 처리한 유채 M ₅ 세대의 엽록소변이, 대화계통선발	한국육종학회	은종선 외	2010.07.08~07.09	한국
9	양성자처리에 의한 조숙·단간, 올레인산 고함유 유채 '조단' 육성	한국방사선산업학회	은종선 외	2010.11.04~11.06	한국
10	양성자와 감마선 처리에 의한 유채 M ₆ 세대 선발계통의 특성	한국육종학회	은종선 외	2011.07.07~07.08	한국
11	유채 M ₆ 세대 엽록소 및 왜성 변이계통의 특성	한국원예학회	은종선 외	2011.10.27~10.29	한국
12	방사선 처리에 의한 유채 M ₆ 세대 조숙·초단간 및 대화 변이계통 선발	한국방사선산업학회	은종선 외	2011.11.03~11.05	한국
13	방사선 처리에 의한 유채 선발계통의 균일성 및 안정성	한국육종학회	은종선 외	2012.07.05~07.06	한국(국제)
14	방사선 처리에 의한 유채 M ₆ 세대 선발계통의 유연관계	한국방사선산업학회	은종선 외	2012.11.01~11.03	한국

	분석				
제9협동 유전자마커 시스템을 이용한 병저항성 벼 돌연변이 계통선발 및 분자마커 개발					
1	Screening of gamma radiation-induced pathogen resistance rice lines against <i>Xanthomona oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	한국식물과학협회의회	임찬주 외	2010.11.08	한국
2	Radiation breeding for pathogen resistance rices and bbr (bacterial blight resistance) mutant	한국식물생명공학회	임찬주 외	2011.11.17	한국
3	SA-JA crosstalk is required for modulating flg22-induced responses in <i>Arabidopsis thaliana</i>	2012 KSP International Conference	이소영 외	2012.10.24	한국(국제)
4	Microarray analysis of Japonica rice mutant bacterial blight resistance 1 infected with <i>Xanthomonas oryzae</i> pv <i>oryzae</i>	한국식물생명공학회	이소영 외	2013.12.05	한국
제10협동 돌연변이체를 이용한 기후변화 대응 벼 유전자 네트워크 구축 및 품종 개발					
1	Rice mutants with cold tolerance: their selection, genomic change, and putative gene network	한국작물학회	조현용 외	2009.10.22~23.	한국
2	Assessment of genetic diversity of a TILLING rice population induced by Gamma-Ray irradiation	한국작물학회	박서정 외	2010.04.08~09.	한국
3	An Early-flowering mutant of rice induced by γ -radiation and its genomic change	한국육종학회	황선구 외	2010.07.08~09.	한국
4	Genome-wide expression profiles of cold tolerant rice under cold stress	한국육종학회	조현용 외	2010.07.08~09.	한국
5	Transcriptome analysis of responses to chilling stress in rice	한국작물학회	조현용 외	2011.04.21~22.	한국
6	Expression patterns of chilling inducible genes against salt and drought stress and their subcellular localization	한국육종학회	조현용 외	2011.07.07~08.	한국
7	Rice RING finger protein, OsRINGH2-1, with E3 ligase activity confers salt and ABA tolerance and regulates multiple substrate proteins via the ubiquitin-26S proteasome system	한국육종학회	임성돈 외	2011.07.07~08.	한국
8	Heat-stress inducible genes in rice: their expression patterns, subcellular localization, and networks	한국육종학회	함덕재 외	2011.07.07~08.	한국
9	Rice heavy metal induced gene (OsHMI1) harboring RING-H2 domain: its expression pattern, E2 ligase activity, subcellular localization, and the interaction partners	한국육종학회	황진규 외	2012.07.05~06.	한국
10	Identification and interaction partners of OsG계 in rice during gamma-ray irradiation	한국육종학회	박용찬 외	2013.07.04~05.	한국
11	Identification of rice genes associated with cosmic-ray response via co-expression gene network analysis	한국육종학회	황선구 외	2013.07.04~05.	한국

12	Molecular characterization of two <i>OsSHSP</i> (<i>Oryza sativa</i> Small Heat Shock Protein) genes in rice	한국육종학회	문준철 외	2013.07.04.~05.	한국
13	Overexpression of <i>OsCHI</i> genes increases tolerance to drought, and salt stress in transgenic arabidopsis	한국육종학회	조현용 외	2013.07.04.~05.	한국

□ 대외수상 실적

일자	수상명 또는 선진화 건명	수상사유 또는 개발내용
제1세부 친환경산업 소재용 케나프 및 유채 품종개발 실용화		
2012. 11.	강시용 (전라북도우수연구원상)	방사선육종 신품종 보급 및 소재 실용화
2013. 9. 26	강시용(대통령 표창)	농림축산식품개발을 통한 국가산업 발전 기여
제6협동 내염성 및 조숙성, 단간성 유채 들연변이 품종 개발		
2009. 07. 02	우수발표상	2009년 한국육종학회 40주년 기념 심포지엄에서 “양성자 및 감마선처리에 의한 유채의 유용변이체 선발” 구두발표
2011. 11. 05	최우수논문상	“양성자 및 감마선처리에 의한 유채 내염성 변이계통 선발”의 논문이 한국방사선산업학회 2010년~2011년 최우수논문으로 선정 됨

□ 언론보도(홍보) 실적

No.	기사 및 프로명	보도내용	매체명	보도일자	비고
제1세부 친환경산업 소재용 케나프 및 유채 품종개발 실용화					
1	SBS뉴스	“친환경 식물, 케나프를 아시나요?”	SBS	2009. 8. 21	
2	안면도 국제 꽃 박람회	안면도 국제 꽃 박람회 케나프전시			
3	생명산업 D.N.A. 展 전시회	생명산업 D.N.A. 展 전시회 케나프 전시	농식품부	2010. 6. 17	
4	“Special Knowledge	“육종” 기획기사	중앙일보		
5	우리품종 전시회	우리품종 전시회 케나프 전시	국립종자원	2010. 11. 18	
6	생명산업 D.N.A.展	케나프 전시	농림수산식품부	2011. 10. 13	
제4세부 TILLING 기법을 활용한 내염성 유전자 대량검정 및 벼 품종개발					
1	과학칼럼 - 방사선, 식물자원 개발 주역으로		디지털타임스	2010.3.26	
2	생활과경제뉴스 - 기능성 특수미		SBS	2010.7.9	
제4협동 블랙베리 유망들연변이 계통의 품종 실용화 및 스테비아 육종					
1	완주군 소양면 자원식물연구소, 정읍방사선연구소와 스테비아, 블랙베리 품종육성에 대한 공동연구를 수행	완주군 소양면 자원식물연구소, 정읍방사선연구소와 스테비아와 블랙베리 품종육성에 대한 공동연	밝은신문	2009. 8. 15.	

		구를 수행 중			
2	블랙베리 신제품 '메이플' 개발	블랙베리 신제품 메이플의 효능과 개발 내용	농식품부	2011. 8. 16	
3	간보호 2배 강화된 블랙베리 '메이플' 개발	간보호 2배 강화된 블랙베리 '메이플' 개발 내용	메디컬 투데이	2011. 8. 16	
4	블랙베리 신제품 '메이플' 국내 자체 개발	블랙베리 신제품 '메이플' 국내 자체 개발	이투데이	2011. 8. 16	
5	한국스테비아(주) 가시없는 블랙베리 개발	한국스테비아(주) 가시없는 블랙베리 개발	연합뉴스	2011. 8. 16	
6	가시없는 '블랙베리' 개발	가시없는 '블랙베리' 개발	아시아투데이	2011. 8. 16	
7	블랙베리 신제품 '메이플' 관련 기획기사 보도	블랙베리 신제품 '메이플' 관련 기획기사 보도자료 제공	중앙일보	2011. 11	
8	한국스테비아, 농자재 생산 업체서 첨단바이오 기업으로	한국스테비아 첨단바이오 산업 추진 내용	머니투데이	2012. 1. 24.	
9	원자력연-정읍시, 지역특화 산업으로 블루베리 육성키로	원자력연-정읍시, 지역특화 산업 블루베리 육성	뉴스1코리아	2012. 7. 31.	
10	정읍 첨단방사선연, 블랙베리 지역 특화산업 육성	정읍 첨단방사선연, 블랙베리 지역 특화산업 육성 내용	뉴시스	2012. 7. 31	
11	정읍시 블루베리 지역특화 산업 본격 육성나서	정읍시 블루베리 지역특화 산업	세전북신문	2012. 8. 1.	
제6협동 내염성 및 조숙성, 단간성 유채 들연변이 품종 개발					
1	CBNU News	유채 신제품 개발	전북대학교 뉴스	2011. 12. 13	
2	신문기사	유채 신제품 개발	전북도민일보 등	2011. 12. 15	5개 신문사

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

↑

6cm

↓