

319107-4

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)
농생명산업기술개발사업 2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004419-01

생명공학
기술을
활용한
고기능성
들깨 개발

생명공학기술을 활용한 고기능성 들깨 개발

최
종
보
고
서

2023.06.27

2023

주관연구기관 / 세종대학교
위탁연구기관 / 동아대학교
위탁연구기관 / (주)아시아종묘

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “생명공학기술을 활용한 고기능성 들깨 개발”(개발기간 : 2019.09.20 ~ 2023.02.19.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2023.06.27

주관연구기관명 : 세종대학교산학협력단(대표자) 송진우 (인)

위탁연구기관명 : 동아대학교산학협력단(대표자) 김성재 (인)

위탁연구기관명 : (주)아시아종묘 (대표자) 류경원(인)

주관연구책임자 : 황성빈

위탁연구책임자 : 허재복

위탁연구책임자 : 김태운

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서										보안등급	
										일반[], 보안[]	
중앙행정기관명				사업명		사업명					
전문기관명 (해당 시 작성)				사업명		내역사업명 (해당 시 작성)					
공고번호				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)							
				연구개발과제번호							
기술분류	국가과학기술 표준분류	LA0299	50%	LB0206	50%	3순위 소분류 코드명				%	
	농림식품과학기술 분류	AA00302	100%	2순위 소분류 코드명		%		3순위 소분류 코드명		%	
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문									
		영문									
연구개발과제명		국문		생명공학기술을 활용한 고기능성 들깨 개발							
		영문		Development of new functional Perilla using biotechnology							
주관연구개발기관		기관명		세종대학교산학협력단		사업자등록번호		206-82-07591			
		주소		(우)05006 서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동) 세종대학교		법인등록번호		240171-000-7766			
연구책임자		성명		황성빈		직위		교수			
		연락처		직장전화				휴대전화			
				전자우편				국가연구자번호			
연구개발기간		전체		2019. 09. 20 - 2023. 02. 19(3년05개월)							
		단계 (해당 시 작성)		1단계		YYYY. MM. DD - YYYY. MM. DD(년 개월)					
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금		합계		연구개발 비외 지원금	
		현금		현금 현물		지방자치단체 기타()		현금 현물 합계			
총계		1,100,000						1,100,000		1,100,000	
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편	
		역할								비고 기관유형	
위탁연구개발기관		동아대학교		허재복		교수				책임 대학	
		아시아종묘		김태윤		부장				책임 중소기업	
연구개발담당자 실무담당자		성명		김동관		직위		조교수			
		연락처		직장전화				휴대전화			
				전자우편				국가연구자번호			

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2023년 04월 14일

연구책임자: 황성빈 (인)

주관연구개발기관의 장: 송진우 (직인)

위탁연구개발기관의 장: 김성재 (직인)

위탁연구개발기관의 장: 류경오 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명						총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)						연구개발과제번호			
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LA0299	50%	LB0206	50%	3순위	소분류 코드명	%	
	농림식품 과학기술분류	AA00302	100%	2순위 소분류 코 드명	%	3순위	소분류 코드명	%	
총괄연구개발명 (해당 시 작성)									
연구개발과제명		생명공학기술을 활용한 고기능성 들깨 개발							
전체 연구개발기간		2019. 09. 20 - 2023. 02. 19(3년05개월)							
총 연구개발비		총1,100,000천원 (정부지원연구개발비:1,100,000천원, 기관부담연구개발비 : 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)							
연구개발단계		기초[] 응용[√] 개발[√] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]			기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(1) 종료시점 목표(2)		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)									
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)									
연구개발 목표 및 내용		최종 목표		<ul style="list-style-type: none"> • 들깨를 우리나라의 대표 유지작물로 개발하고자 들깨의 지방산 (Fatty acid)과 지방(Triacylglycerol) 합성 대사를 분자 수준에서 조절하는 생명공학기술을 활용하여 현재 들깨 품종에 없는 신규한 건강기능성 및 식품 산업용으로 가치가 우수한 지방산으로 조성이 강화된 새로운 소비자 맞춤형 들깨를 개발하고자 한다. 					
		전체 내용		<ul style="list-style-type: none"> • 들깨기름은 산패가 잘되고 트랜스지방을 생산하기 때문에 식용유 등의 식품산업용으로 사용되지 못하고 있다. 이에 생명공학기술 첨단기술인 유전자교정을 중점적으로 그리고 화학적 돌연변이 기술을 추가적으로 활용하여 현재 품종에 없는 고기능성 (건강기능성 및 식품산업용) 들깨를 개발하고자 한다. • 다중 불포화지방산인 오메가3인 리놀렌산 (18:3)을 다량 (약 60%) 생산하는 일반적인 들깨에서 지방산 대사를 조절하여 산패에 강하고, 건강에 해로운 트랜스지방을 생산하지 않는 튀김용 및 샐러드용으로 적합한 단일불포화 지방산인 올레산 (18:1)을 다량(25-50%) 생산하는 새로운 들깨를 개발한다. • 기존의 들깨 품종에는 없는 인간의 면역 활성 증진과 관련된 오메가6 지방산인 리놀레산(18:2)을 다량(30-50%) 생산하는 새로운 들깨를 개발한다. • 현재 들깨의 장점은 건강기능성인 오메가3 다중 불포화지방산인 리놀렌산(18:3)을 다량 생산하는 것이다. 이에 기존의 대부분의 들깨 품종이 생산하는 종자 지방산의 50%~60% 차지하는 비율을 넘어서는 최소 65%이상의 오메가3 지방산을 다량 생산 하는 들깨를 개발한다. 					
연구개발성과		<ul style="list-style-type: none"> ○ 올레산(18:1)을 최대 36%까지 생산하는 고 올레산 남천 돌연변이 계통을 선발함. ○ 리놀레산(18:2)을 40%생산하는 고 리놀레산 다유 돌연변이 계통을 개발하고 또한 그 원인이 FAD3b 유전자의 4bp 결실임을 규명하고 이 돌연변이를 선발하는 PCR 분자 마커를 개발함. ○ 리놀레산(18:2)을 30%생산하는 고 리놀레산 남천 돌연변이 계통을 개발하고 또한 그 원인이 FAD3a의 결실임을 규명하고 이 돌연변이를 선발할 수 있는 							

PCR-RFLP 분자마커를 개발함.

- 알파-리놀레산(18:3)을 67% 생산하는 고 리놀렌산 다유 돌연변이 계통을 개발함
- 들깨의 FAD3a와 FAD3b의 불포화지방산 효소의 활성을 규명함
- 세종대에서 제작한 들깨의 FAD2, FAD3 유전자 교정 재조합 DNA를 들깨 조직배양 및 재분화 기술을 활용한 유전자 교정 형질전환체 제작 및 선발
- 들깨 FAD2 유전자교정 형질전환체 (T2)라인 확보 및 유전자 교정 확인
- 들깨 FAD3 유전자교정 형질전환체 (T2)라인 확보 및 유전자 교정 확인
- 생명공학기술을 기반으로 한 유전자교정기술을 이용하여 들깨의 리놀렌산 (오메가 3) 오일생산의 핵심 유전자인 PIFAD3 유전자 돌연변이를 유도하여 산패를 일으키는 리놀렌산 함량을 낮추고, 리놀레산 (오메가 6) 오일 함량을 84%까지 증대된 들깨 품종을 개발함.
- 생명공학기술을 기반으로 한 유전자 교정기술을 이용하여 들깨의 리놀레산 오일생산의 핵심 유전자인 PIFAD2 유전자 돌연변이를 유도한 유전자교정 들깨 개발함. 해당 유전자교정 들깨는 리놀레산 및 리놀렌산 함량이 낮고 올레산 함량이 증대되었을 것으로 기대됨. 세대진전 후 고급 오일 인 올레산 함량 및 타불포화지방산 오일 조성 검증 및 분석이 이루어질 예정임

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과

- 식품산업용 (튀김용, 샐러드용) 및 건강기능성 등 다양한 지방산을 생산하는 들깨를 개발하여 우리나라 대표 유지작물로 개발한다.
- 다양한 식품 맞춤형 지방산 생산은 식품가공 산업에 활용이 가능하며 농민의 수입 증대, 수출, 수입대체에 기여 할 수 있다.
- 고 리놀레산 돌연변이 다유와 납천 들깨 계통과 선발 분자마커는 특허출원 진행 중이다.
- 고 올레산, 고 리놀레산 돌연변이 다유와 납천 들깨 계통은 건강기능성인 동시에 산패에 안정하여 저장성이 증진된 오일을 생산하는 들깨로 신제품화 한다.
- 고 리놀렌산 돌연변이 다유 들깨 계통은 기존 품종보다 더욱 오메가3이 증진된 들깨로 신제품화 한다.
- 본 연구에서 개발한 고 올레산, 리놀레산, 리놀렌산 계통은 소비자들에게 다양한 종류의 들깨 오일을 제공하는 계기가 되어 농가 소득향상에 기여하는 농업 분야의 신산업을 창출 할 수 있다.
- 리놀렌산 함량이 낮은 들깨의 경우 산패가 늦게 일어나며, 들깨오일 보관기간을 연장 할 수 있어 소비자 만족도를 높일 수 있음. 해당 유전자 교정 들깨는 기존 재배종과의 교배육종의 소재로 활용 가능함
- 들깨의 FAD2 유전자 교정체 또한 고급 올레산 함량이 증대 되었을 것으로 기대가 됨. 해당 유전자 교정체 들깨 역시 재배종 종실용 들깨의 교배육종 소재로 활용 가능 할 것으로 기대됨.
- 일반적 들깨 오일은 높은 리놀렌산이 포함되어 있어 산패우려와 일반 향미유로만 주로 이용되어 왔음. 본 연구에서 개발된 들깨의 오일은 산패우려가 낮고, 일반 튀김용을 이용이 가능하여 다방면으로 이용 가능하여 소비자들로부터 많은 선택이 이루어져 농가 소득도 향상 될 것으로 기대됨

연구개발성과의 비공개여부 및 사유

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신제품	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	16	1										
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	들깨		지방산		올레산		리놀레산		리놀렌산			
영문핵심어 (5개 이내)	Perilla		Fatty acid		Oleic acid		Linoleic acid		Linolenic acid			

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)]

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

별첨 자료 (참고 문헌 등)

1. 연구개발과제의 개요

○**연구개발개요:** 생명공학기술을 활용하여 현재 들깨 품종에는 없는 고기능성 (건강기능성 및 식품산업용) 지방산을 생산하는 들깨를 개발한다.

○연구 개발 내용:

첫 번째, 종자에 **올레산 (18:1)** 지방산이 증진된 들깨를 개발하여 산패에 안정하여 상온 저장성이 뛰어나고, 고온에서 트랜스지방의 발생이 적은 튀김용 식용유 생산 들깨를 개발한다.

두 번째, **리놀레산 (18:2)** 지방산이 증진된 들깨를 개발하여 현재 들깨 오일 보다 산패에 안정되며 또한 면역 증진기능성이 증가된 고 리놀레산 들깨를 개발한다.

세 번째, 들깨 기름 성분의 장점인 오메가3 지방산인 **리놀렌산(18:3)**의 함량이 더욱 강화된 들깨를 개발하여 건강기능성 고 오메가3 지방산 생산 들깨를 개발한다.

○ 핵심기술1

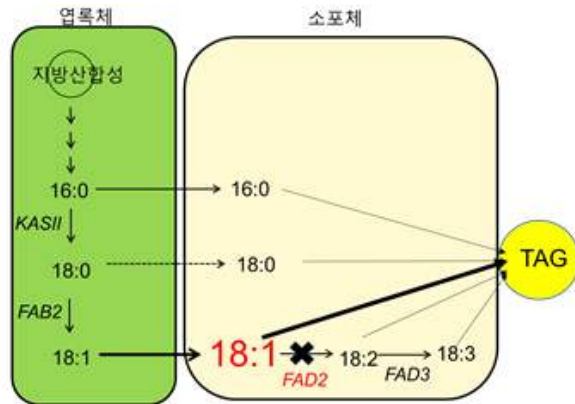
• 유전자교정에 의한 다양한 기능성 지방산이 강화된 들깨 개발

들깨는 유지작물로 종자의 30-40%에 해당하는 지방을 생산하며 지방산중 약 50-60%가 오메가 3 지방산 (리놀렌산) 이다. 들깨 종자의 지방산 분석 결과 2종의 포화지방산인 팔미틱산 (16:0)과 스테아릭산 (18:0)이 소량 차지하고 있고, 불포화지방산인 올레산(18:1)과 리놀레산(18:2)이 약 15-16% 차지하고 있으며 리놀렌산(18:3)이 60%로 다량 존재한다 (표1). 본 연구에서는 들깨의 불포화지방산 합성에 관여하는 *Fatty acid desaturase 2 (FAD2)*와 *FAD3* 유전자를 각각 유전자 교정기술로 상실 (knock-out) 시켜 산패에 안정하고 트랜스지방을 생산하지 않는 식용유와 샐러드 기름으로 유용한 **올레산 (18:1)**을 대량 생산하는 들깨를 개발한다. 한편으로는 인간의 면역기능과 관련이 있는 오메가6 지방산인 **리놀레산 (18:2)**의 생산이 증진된 들깨를 만들고자 한다 (그림1).

표1. 우리나라 대표 들깨 품종의 종자 지방산 조성 분석 (총지방산에 대한 각지방산의 %)

현재 들깨 품종	팔미틱산 (16:0)	스테아릭산 (18:0)	올레산 (18:1)	리놀레산 (18:2)	리놀렌산 (18:3)
남천	6.4	1.6	16.4	15.4	60.1
다유	6.7	1.8	14.5	15.0	62.0

(A) 고 올레산 (18:1) 들깨 개발



(B) 고 리놀레산 (18:2) 들깨 개발

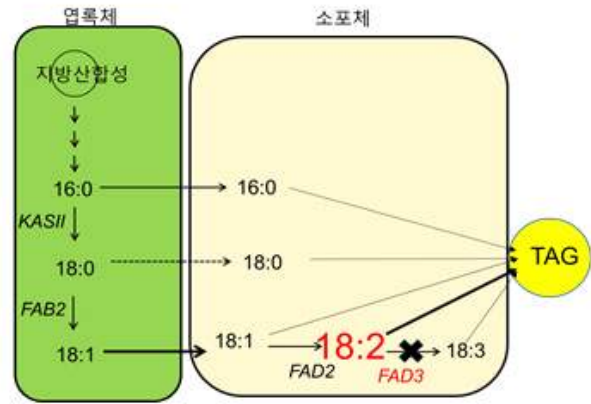


그림 1. 유전자 교정에 의한 2종류의 기능성 지방산 생산 들깨 개발 전략. (A) FAD2 유전자를 KO 시켜 올레산(18:1)을 증진 시킨다. (B) FAD3 유전자를 KO 시켜 리놀레산(18:2)을 증진시킨다. TAG: triacylglycerol

○ 핵심기술2

• 기존에 확보한 지방산 돌연변이 들깨 계통을 활용한 고기능성 지방산 들깨 품종 개발

본 연구팀은 남천과 다유 두 개의 현재 품종을 대상으로 감마선 돌연변이 육종을 통해 M2 세대 에서 올레산 (18:1)이 25%, 리놀레산 (18:2)이 30%, 리놀렌산(18:3)이 65%로 각각 증진된 계통을 선발하였다. 이들 돌연변이 자원을 활용하여 현재 품종에는 없는 올레산(18:1), 리놀레산(18:2), 리놀렌산(18:3)이 증진된 들깨를 고정하여 품종화 하고자한다. 또한 들깨 유전체는 4배체이기 때문에 2쌍의 유전자 즉 4개의 동일 유전자를 돌연변이 시켜야 유전자의 기능을 상실 시킬 수 있기 때문에 이들 선발 고정된 들깨 계통을 2차 화학적 돌연변이 (EMS)를 유발하여 이들 3종의 지방산 함량이 더욱 증가된 들깨를 개발하고자 한다 (그림 2).

들깨의 게놈이 4 배체 이기 때문에 2차에 걸친 돌연변이 유도가 필요함

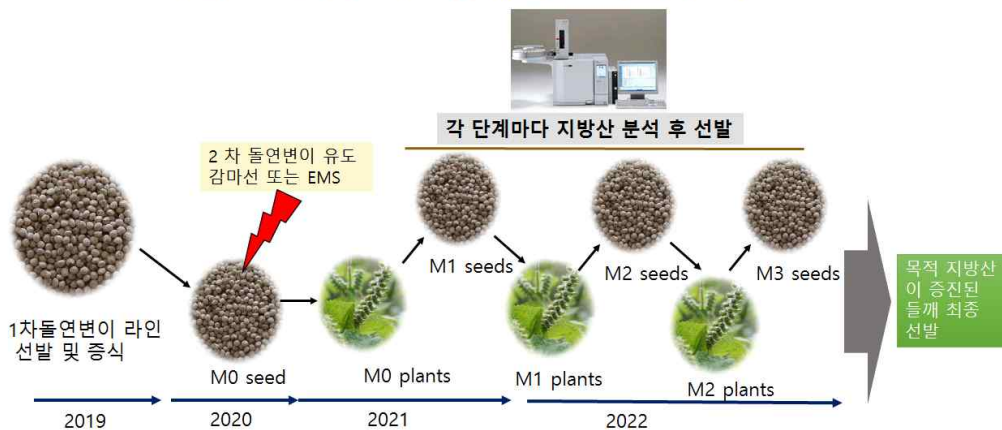


그림 2. 기존 확보한 돌연변이 계통과 2차 화학적(EMS) 변이에 의한 기능성 지방산 성분이 강화된 들깨 품종 개발

○ 최종 목표

1. 유전자 교정을 활용한 고기능성 들깨 2종 개발

- 고 올레산 들깨: 최소 40% 이상의 올레산 (18:1)을 생산하는 들깨: 튀김용, 샐러드 용
- 고 리놀레산 들깨: 최소 50% 이상의 리놀레산(18:2)을 생산하는 들깨: 면역 건강기능성, 샐러드용

2. 기존 돌연변이 계통과 화학적 돌연변이 활용 고 기능성 들깨 3종 개발

- 고 올레산 들깨: 최소 25% 이상 올레산(18:1)을 생산하는 들깨: 튀김용, 샐러드 용
- 고 리놀레산 들깨: 최소 30% 이상의 리놀레산(18:2)을 생산하는 들깨: 면역 건강기능성, 샐러드용
- 고 리놀렌산 들깨: 최소 65% 이상의 리놀렌산(18:3)을 생산하는 들깨: 오메가3 건강기능성

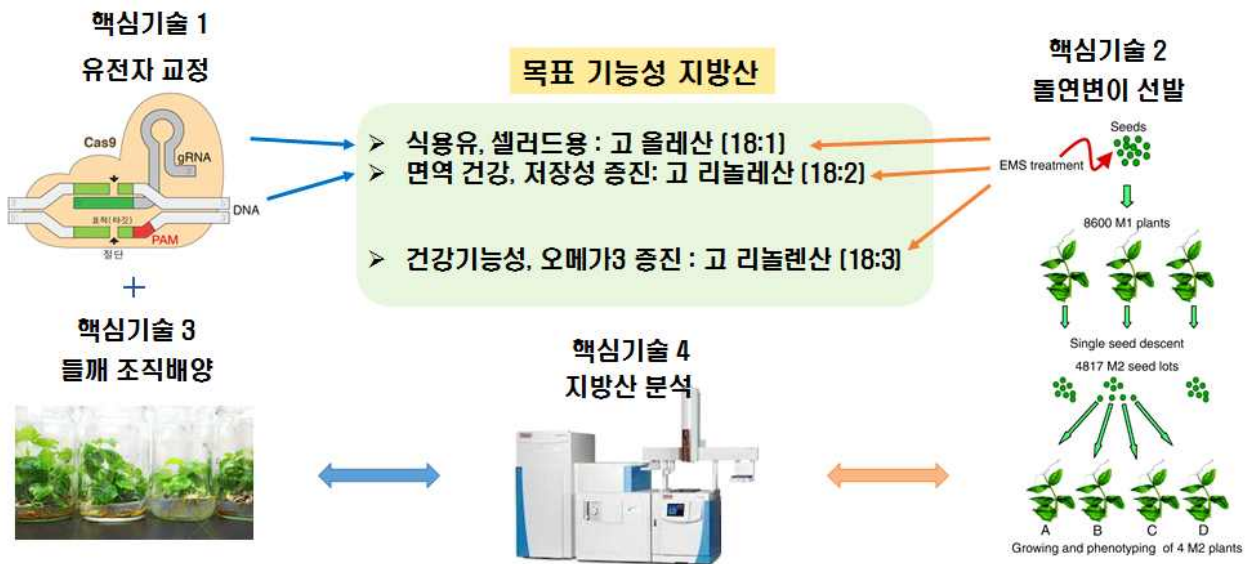


그림 3. 핵심기술(유전자 교정과 돌연변이)에 의한 고기능성 들깨 개발 목표

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

<주관연구기관(세종대학교)>

가. 들깨 FAD2-1과 FAD3 유전자 Cas9 편집 라인 형질전환 및 유전자 교정 분석

○ 들깨 FAD2-1과 FAD3 유전자 Cas9 편집 라인 형질전환

- 엽실 들깨 품종으로 pHEE401E-pfrUBQ-Bar-FAD2-1, pHEE401E-pfrUBQ-Bar-FAD3 vector의 형질 전환을 시도하였다. 엽실 종자의 경우 종자 발아 시 곰팡이 오염이 심하여 종자를 원액 황산으로 1분간 처리 한 다음 흐르는 물에 충분히 씻어주고 50% 락스 용액으로 10분간 소독하고 멸균 증류수로 5번 이상 세척하여 소독을 실시하였다. 발아배지에서 2주간 발아시킨 후 하배축을 잘라 형질전환에 사용하였다. 이후 shoot 유도배지에서 2주 간격으로 계대 배양해주며 지상부를 유도하고 (그림 1, 2) 유도되는 지상부가 있으면 뿌리 유도배지로 옮겨 뿌리를 유도하였다 (그림 3). 뿌리가 유도되는 개체가 있을 경우 바로 흙으로 옮겨 순화 과정을 거쳤다 (그림 4).



그림 1. 엽실종자를 사용한 pHEE401E-pfrUBQ-Bar-FAD2-1, pHEE401E-pfrUBQ-Bar-FAD3 형질전환. Shoot 유도.



그림 2. 엽실종자를 사용한 pHEE401E-pfrUBQ-Bar-FAD2-1, pHEE401E-pfrUBQ-Bar-FAD3 형질전환. 지상부 shoot 유도 및 줄기 유도.



그림 3. 엽실종자를 사용한 pHEE401E-pfrUBQ-Bar-FAD2-1, pHEE401E-pfrUBQ-Bar-FAD3 형질전환. 뿌리유도.

- 지상부가 유도되는 개체들 중 지상부가 크게 자라는 라인들을 선별하여 뿌리 유도 배지로 옮겨 뿌리를 유도하였다. 개체들 중 뿌리가 유도되는 개체들이 있기는 하였으나 줄기가 자라지 않고 뿌리가 유도되면서 바로 개화를 하는 현상이 관찰되었다. 뿌리 유도가 많이 되지 않았기에 바로 흙으로 옮겨 순화 과정을 거치지 못하고 뿌리 유도 배양 용기 안에서 뿌리가 유도되도록 기다리는 동안 종자가 결실되었다.



그림 4. 뿌리 유도과정과 종자결실, 그리고 뿌리가 유도된 FAD3 라인 개체의 순화과정

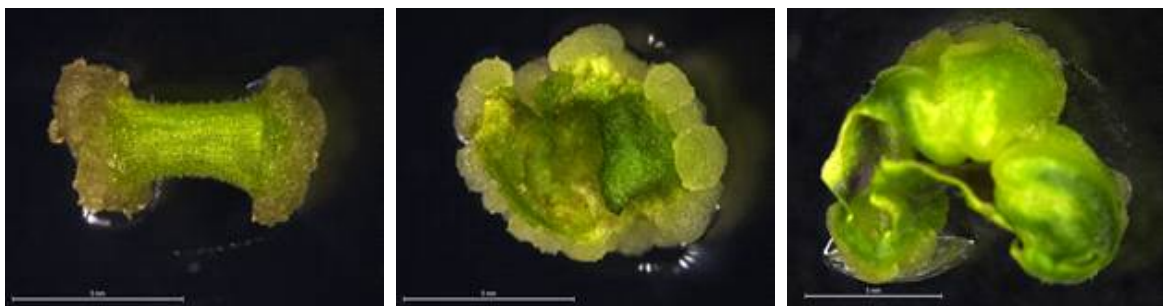
- pHEE401E-pfrUBQ-Bar-FAD3라인에서 뿌리가 유도된 개체를 선별하여 순화과정을 시작하였다. 배양 용기 안에서 습도 유지와 공기 순화를 위하여 공기 필터가 달려있는 Duchefa E1674.0001 배양용기를 사용하였고 이 후 순화과정을 마치면 개방된 화분으로 옮기고자 하였으나 용기 안에서 고사하여 더 이상 진행할 수 없었다. 다른 개체들로부터 지속해서 뿌리 유도가 되는 개체를 찾고 순화과정을 진행하고자 한다.

나. 들깨 FAD2와 FAD2-1 유전자 Cas9 편집 라인 형질전환 및 유전자 교정 분석

○ 들깨 FAD2와 FAD2-1 유전자 Cas9 편집 라인 형질전환

- pHEE401E-pfrUBQ-FAD2 라인(Hygromycin selection)과 pHEE401E-pfrUBQ-FAD2-1라인(Basta selection)에서 Cas9으로 인한 유전자 편집라인을 선별하고자 하였다. 항생제가 포함 된 배지에서 Hypocotyl과 자엽을 이용하여 Callus를 유도하고 (그림 5 A,B) 이어서 지상부 shoot을 유도하였다 (그림 6, 그림 7).

A,

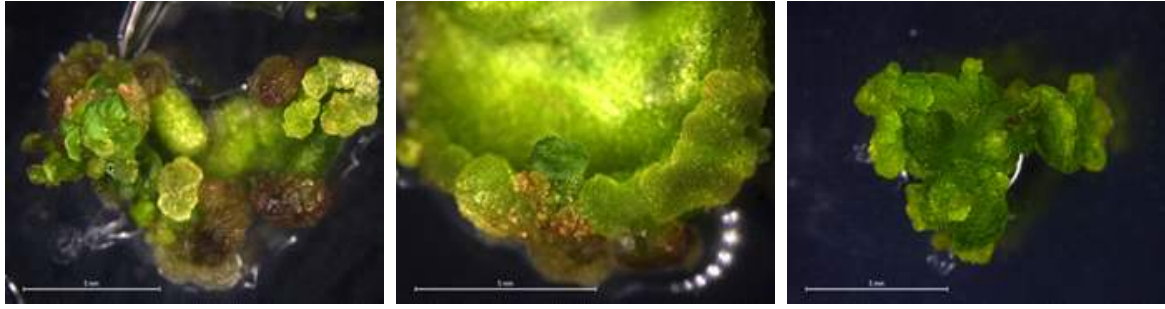


B.



그림 5. pHEE401E-pfrUBQ-FAD2 라인(A)과 pHEE401E-pfrUBQ-FAD2-1라인(B)에서 Callus 유도

A.

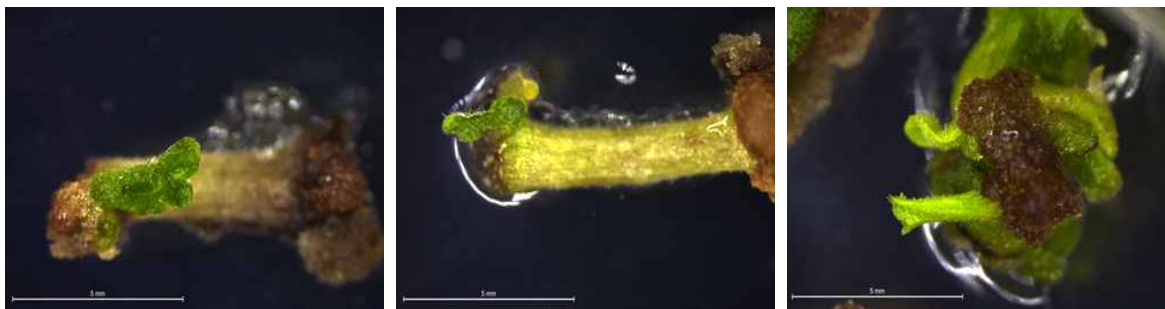


B.



그림 6. pHEE401E-pfrUBQ-FAD2 라인(A)과 pHEE401E-pfrUBQ-FAD2-1라인(B)에서 지상부 shoot 유도

A.



B.

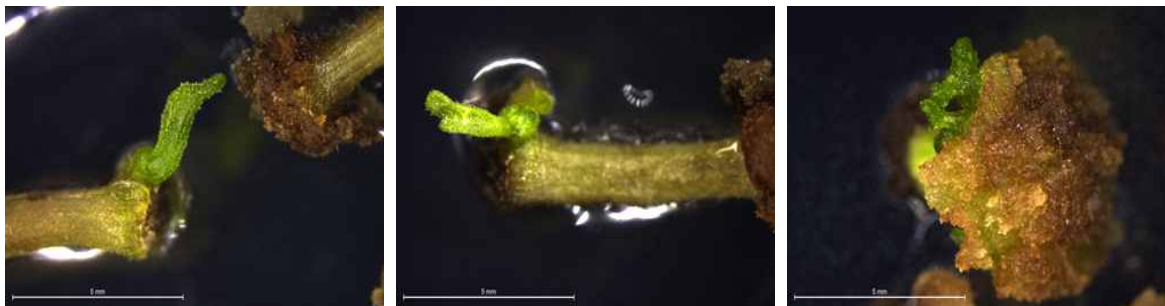


그림 7. pHEE401E-pfrUBQ-FAD2 라인(A)과 pHEE401E-pfrUBQ-FAD2-1라인(B)에서 지상부 shoot 유도

지상부가 성공적으로 유도된 개체는 뿌리 유도 배지로 옮겨주어 뿌리 발아를 유도하고 지상부를 성장시켰다 (그림 8).

A.



B.

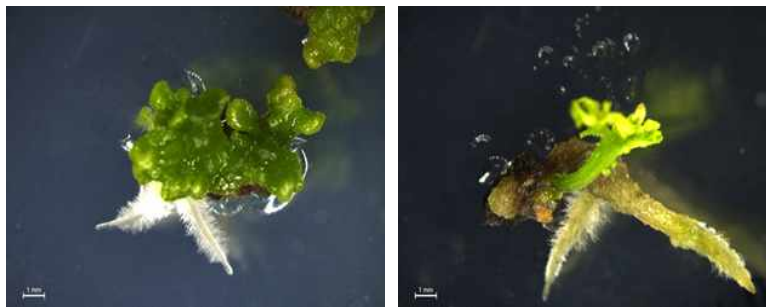
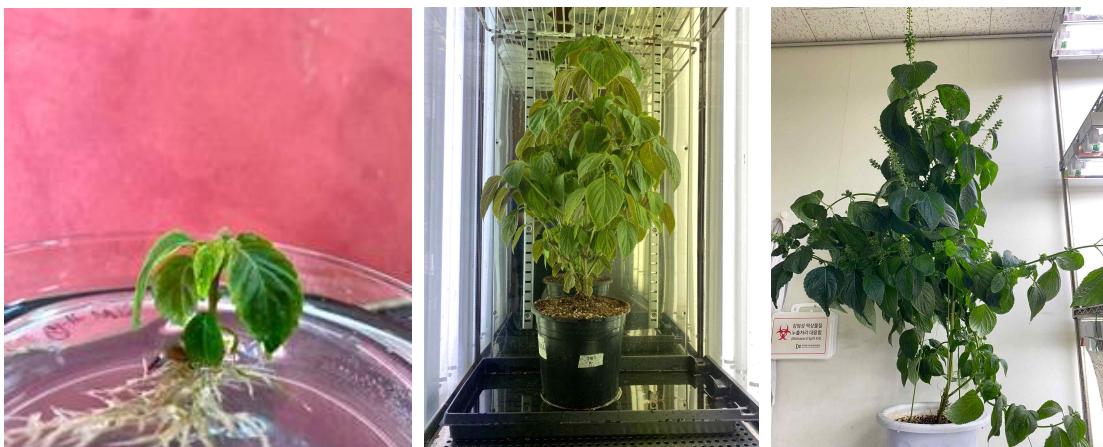


그림 8. pHEE401E-pfrUBQ-FAD2 라인(A)과 pHEE401E-pfrUBQ-FAD2-1라인(B)에서 뿌리 발아 유도.

○ 들깨 FAD2와 FAD2-1 유전자 Cas9 편집 라인 유전자 교정 분석

- 항생제가 함유된 배지에서 성공적으로 자라난 개체는 순화 과정을 거쳐 흙으로 옮겨주고 습도를 유지하며 성장시키다가 잘 자라는 것이 확인되면 큰 화분으로 정식하였다. 각 개체에서 유전자 편집을 확인하기 위하여 앞으로부터 gDNA를 추출하고 sgRNA target주변 부위를 증폭 할 수 있는 primer를 design하여 PCR product를 얻었다. 이를 sequencing하여 target부위와 혹은 2개의 sgRNA target부위가 변이 혹은 결실이 일어났는지 확인하였다. 그 결과 FAD2라인에서 첫 번째 얻어진 형질전환체는 nucleotide가 TGG(Tryptophan)에서 TAG로 바뀌어 stop codon으로 치환된 것을 확인하고 이름을 Q plant로 명명하였다 (그림 9A, 그림 10). 또 다른 하나의 개체는 TAC(Tyrosine)에서 TTC(Phenylalanine)으로 치환된 것을 확인하고 P plant로 명명하였다(그림 9B, 그림 11). 각각의 개체는 그림 16과 같이 화분에서 성장시키며 다음 T2 세대 종자를 받도록 하였다. Q plant와 P plant의 아미노산 서열을 야생형과 비교하여 이들이 확실히 stop codon으로 바뀌고 아미노산의 change가 일어났음을 그림 12에 나타내었다.

A.



B.



그림 9. 재분화가 일어나 화분으로 정식 한 Q plant(A)와 P plant(B).

A.

```

NCBI      TCCATTCCCTCGTTCCTTTTCCTATGTCCTATATGACCTCGTCATTGCCTCTCTGTTTTAC      60
FAD2-Q2   TCCATTCCCTCGTTCCTTTTCCTATGTCCTATATGACCTCGTCATTGCCTCTCTGTTTTAC      60
FAD2-Q3   TCCATTCCCTCGTTCCTTTTCCTATGTCCTATATGACCTCGTCATTGCCTCTCTGTTTTAC      60
*****

NCBI      TATGTCGCCACAACTATTTCCATCAACTCCCTTACCCTCTCTCCTACGTAGCCTGGCCT      120
FAD2-Q2   TATGTCGCCACAACTATTTCCATCAACTCCCTTACCCTCTCTCCTACGTAGCCTGGCCT      120
FAD2-Q3   TATGTCGCCACAACTATTTCCATCAACTCCCTTACCCTCTCTCCTACGTAGCCTAGCCT      120
*****

NCBI      CTTTATATGATATGCCAAGGTTGCATTCTAACTGGTGTGGGTCATAGCCCATGAATGT      180
FAD2-Q2   CTTTATATGATATGCCAAGGTTGCATTCTAACTGGTGTGGGTCATAGCCCATGAATGT      180
FAD2-Q3   CTTTATATGATATGCCAAGGTTGCATTCTAACTGGTGTGGGTCATAGCCCATGAATGT      180
*****

NCBI      GGCCACCATGCCTTCAGTGACTACCAATGGCTGGACGACACCGTCGGCCTAGTCCTCCAC      240
FAD2-Q2   GGCCACCATGCCTTCAGTGACTACCAATGGCTGGACGACACCGTCGGCCTAGTCCTCCAC      240
FAD2-Q3   GGCCACCATGCCTTCAGTGACTACCAATGGCTGGACGACACCGTCGGCCTAGTCCTCCAC      240
*****
  
```

B.

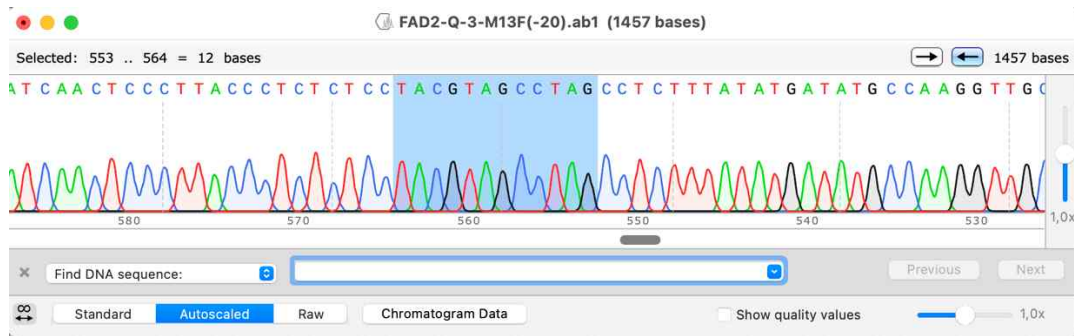


그림 10. Q plant의 염기서열 변이 sequencing 결과(A)와 변이 부위 염기서열 확인(B).

A.

```

WT      TCCATTCCCTCGTTCCTTTTCCTATGTCCTATATGACCTCGTCATTGCCTCTCTGTTTTAC      60
FAD2-P   TCCATTCCCTCGTTCCTTTTCCTATGTCCTATATGACCTCGTCATTGCCTCTCTGTTTTAC      60
*****

WT      TATGTCGCCACAACTATTTCCATCAACTCCCTTACCCTCTCTCCTACGTAGCCTGGCCT      120
FAD2-P   TATGTCGCCACAACTATTTCCATCAACTCCCTTACCCTCTCTCCTACGTAGCCTGGCCT      120
*****

WT      CTTTATATGATATGCCAAGGTTGCATTCTAACTGGTGTGGGTCATAGCCCATGAATGT      180
FAD2-P   CTTTATATGATATGCCAAGGTTGCATTCTAACTGGTGTGGGTCATAGCCCATGAATGT      180
*****

WT      GGCCACCATGCCTTCAGTGACTACCAATGGCTGGACGACACCGTCGGCCTAGTCCTCCAC      240
FAD2-P   GGCCACCATGCCTTCAGTGACTACCAATGGCTGGACGACACCGTCGGCCTAGTCCTCCAC      240
*****
  
```

B.

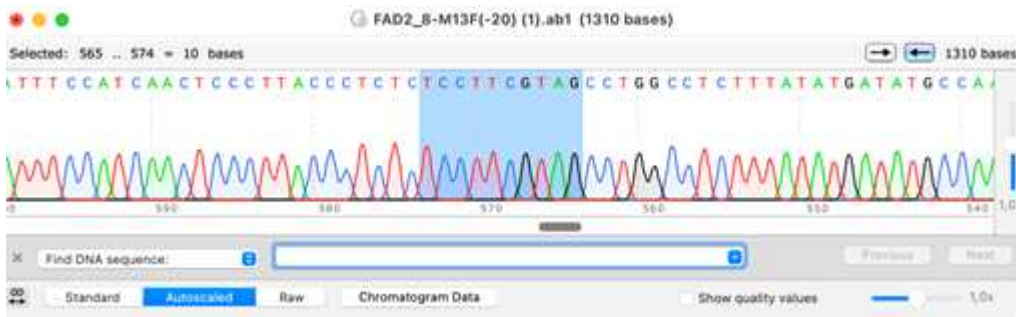


그림 11. P plant의 염기서열 변이 sequencing 결과(A)와 변이 부위 염기서열 확인(B).

FAD2-Q	MGAGGRMSVPEGKKAKSVVERVPFTKPPFTLGE IKKAI PPHCFKRS IPRSF SYVLYDLV	60+
WT	MGAGGRMSVPEGKKAKSVVERVPFTKPPFTLGE IKKAI PPHCFKRS IPRSF SYVLYDLV	60+
FAD2-P	MGAGGRMSVPEGKKAKSVVERVPFTKPPFTLGE IKKAI PPHCFKRS IPRSF SYVLYDLV	60+

FAD2-Q	IASLFYYVATNYFHQLPYPLSYVA-----	119+
WT	IASLFYYVATNYFHQLPYPLSYVA PLYMICQGCILTGWVVI AHECGHHA FSDYQWLDDT	120+
FAD2-P	IASLFYYVATNYFHQLPYPLSYVA PLYMICQGCILTGWVVI AHECGHHA FSDYQWLDDT	120+

FAD2-Q	-----	119+
WT	VGLVLHS FLLVPYFWSWKYSHRRHHSNTGSLERDEVFV PKVKSALGSSAKYLNNPPGRILT	180+
FAD2-P	VGLVLHS FLLVPYFWSWKYSHRRHHSNTGSLERDEVFV PKVKSALGSSAKYLNNPPGRILT	180+

FAD2-Q	-----	119+
WT	LIVQFTL GWPLYL MFNVS GRPYDRFACHFDPKSPIYSDRERAQIFLSDVGI LAMLYGLYR	240+
FAD2-P	LIVQFTL GWPLYL MFNVS GRPYDRFACHFDPKSPIYSDRERAQIFLSDVGI LAMLYGLYR	240+

FAD2-Q	-----	119+
WT	LT LAKGLAWVLCVYGVPLLVVNGFLVLITYLQHTHASLPHYDSSEWDWLRGALSTVDRDY	300+
FAD2-P	LT LAKGLAWVLCVYGVPLLVVNGFLVLITYLQHTHASLPHYDSSEWDWLRGALSTVDRDY	300+

FAD2-Q	-----	119+
WT	GVLN TVFHNI TDTHVAHHLFSTMPHYHAMEATKAIK PILGEYYQFDGTPVAKAVWREAKE	360+
FAD2-P	GVLN TVFHNI TDTHVAHHLFSTMPHYHAMEATKAIK PILGEYYQFDGTPVAKAVWREAKE	360+

FAD2-Q	-----	119+
WT	CVYVE PDEGDKNKGVFWYNNKL	382+
FAD2-P	CVYVE PDEGDKNKGVFWYNNKL	382+

그림 12. 야생형과 형질전환 식물체의 아미노산 염기서열 비교.

이들 개체는 현재 T2 종자를 받기 위하여 배양실에서 성장 중이며 종자를 수확하게 되면 GC를 이용하여 지방산 변이를 측정할 예정이다.

다. 고 올레산 (18:1) 납천 돌연변이 들깨 계통 개발

○ 납천 감마선 돌연변이 3개의 라인에 2차로 EMS를 처리하여 올레산이 더욱 증가한 6 계통을 선발하였다 (그림 20).

-납천 112-15 #15 감마선 돌연변이 라인에 EMS를 2차 처리한 M1 세대 429 개체의 종자 지방산을 분석하여 올레산 (18:1)을 최대 27.8% 생산하는 계통을 선발하였다.

-납천 116-10 #14 감마선 돌연변이 라인에 EMS를 2차 처리한 M1 세대 396 개체의 종자 지방산을 분석하여 올레산 (18:1)을 최대 25.8% 생산하는 계통을 선발하였다.

-납천 117-10 #16 감마선 돌연변이 라인에 EMS를 2차 처리한 세대 395 개체의 종자 지방산을 분석하여 올레산 (18:1)을 최대 36.0% 생산하는 계통을 선발하였다.

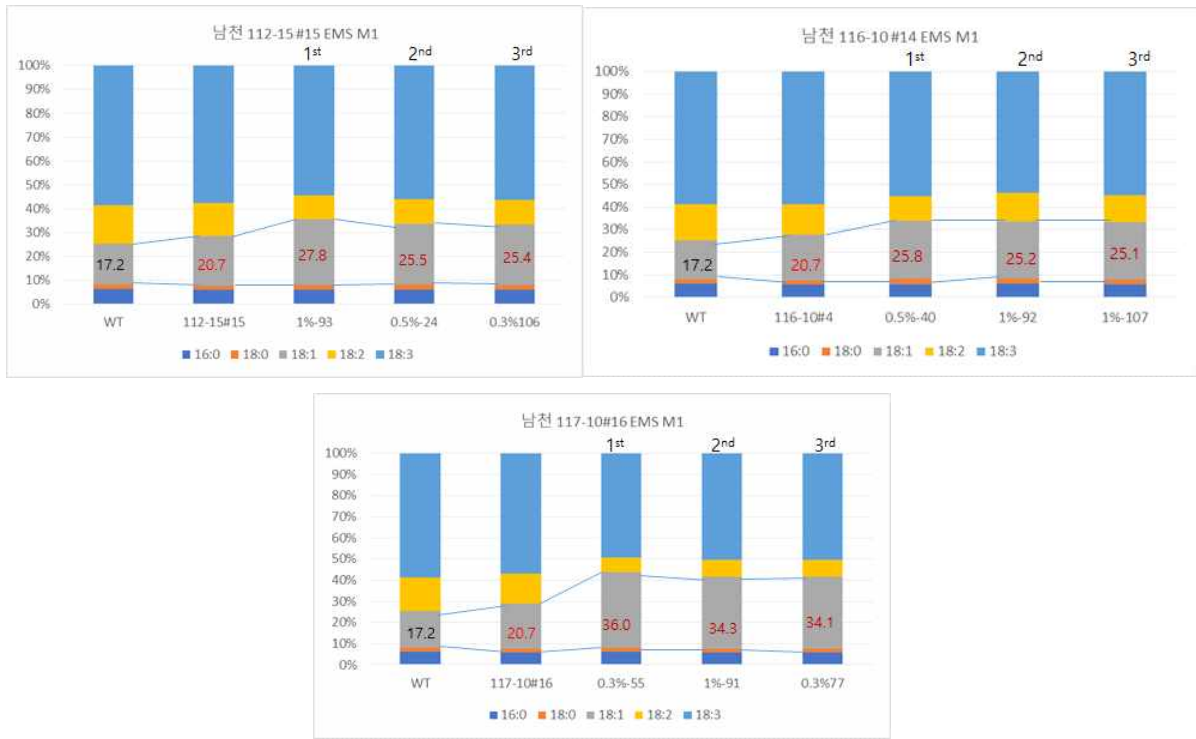


그림 13. 남천 감마선 돌연변이 라이에 EMS 2차 돌연변이에 의한 고 올레산 계통 선발: 최소 25-36% 올레산(18:1) 생산 계통을 선발함

라. 고 리놀레산 (18:2) 다유 들깨 개발

○ 종자와 잎에서의 지방산 분석

- 감마선을 처리한 다유 들깨로부터 얻은 돌연변이 계통을 M0에서 M3까지 세대를 진전시킨 후 재배한 다유 돌연변이 계통의 종자들을 가스 크로마토그래피(Gas Chromatography)로 지방산 조성을 분석하였다. WT인 '다유'와 비교하여 오메가-6 지방산인 리놀레산(C18:2)이 높고, 반면에 오메가-3 지방산인 리놀렌산(C18:3)이 낮은 다유 돌연변이 계통을 최종 선발 고정했다. 선별한 고 리놀레산 계통의 이름을 'SJDY-1-19'로 칭하였다. 이 때 'SJ'는 'Sejong University'에서 'Sejong'의 약자이며, 'DY'는 모계통인 'Dayu'의 약자이다. '1-19'는 돌연변이 계통의 번호를 뜻한다.

- 다유와 감마선 처리한 다유 개체 'SJDY-1-19'로부터 얻은 돌연변이 계통의 single seed를 5반복 하여 지방산 조성을 비교 분석하였다. 이후에 종자 지방산 조성을 분석한 SJDY-1-19의 종자와 다유 종자를 발아시켜 흠에 이식한 후 잎을 채취하여 각각 5개체를 지방산 조성을 비교 분석하였다 (그림 14).

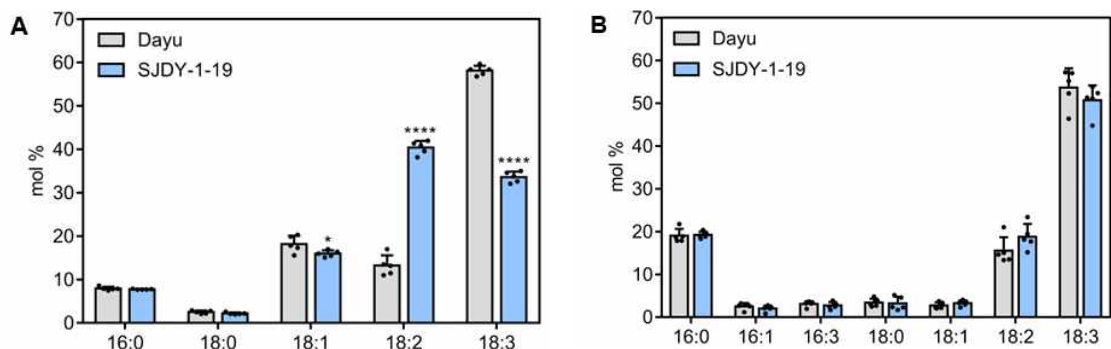


그림 14. A. 다유와 SJDY-1-19 종자의 지방산 조성 분석, B. 다유와 SJDY-1-19 잎에서의 지방산 조성 분석

- SJDY-1-19과 다유 종자의 지방산 조성을 비교 분석한 결과 다유 종자의 리놀레산(18:2)이 평균 13% 함유하고 있는 것과 비교하여 SJDY-1-19은 리놀레산이 약 40%까지 증가하였다. 반면에 다유 종자의 리놀렌산(18:3)이 평균 58% 함유하지만, SJDY-1-19에서는 리놀렌산이 약 34%로 감소하였다. 이는 다유와

비교하여 리놀레산이 27% 증가한 ‘고 리놀레산’ 계통을 선발한 결과이다 (그림 14A).

- 잎 지방산 조성에서는 다유 잎에서는 리놀레산이 평균 15% 함유하고, SJDY-1-19은 리놀레산이 평균 19%를 함유한 것으로 분석되었다. 그리고 다유 잎의 리놀렌산이 평균 54%이며 SJDY-1-19 잎의 리놀렌산은 평균 50%로 나타났다. 그래프로 보기에 적은 비율이지만 리놀레산이 증가하고, 리놀렌산이 감소한 것으로 보이나 통계 처리 결과 유의미한 차이가 나타나지 않았다 (그림 14B).

○ 종자의 오일함량 분석

- 다유와 SJDY-1-19의 종자들을 하나씩 무게를 재고, 종자 하나를 실험용 칼로 4등분하여 각각 샘플링 하였다. 이후 5반복 하여 오일 함량을 분석하였다. 오일 함량 분석은 종자 하나의 오일 함량과 무게 당 오일 함량을 분석하였다 (그림 15).

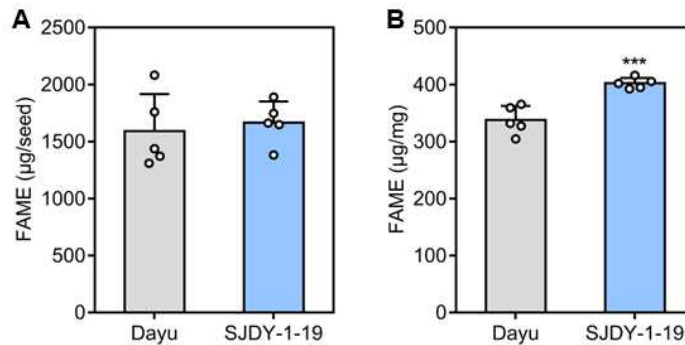


그림 15. A. 다유와 SJDY-1-19의 종자 하나 당 오일 함량 분석, B. 다유와 SJDY-1-19의 종자 무게 당 오일 함량 분석

- 종자 하나의 오일 함량은 다유는 평균 1592µg, SJDY-1-19은 평균 1666µg이었다. 무게 당 오일 함량을 분석했을 때 다유는 평균 337µg이며, SJDY-1-19에서는 402µg이었다. 종자 하나의 오일 함량 분석은 유의미한 차이가 없었지만 종자 무게 당 오일 함량은 다유 돌연변이 계통이 다유보다 더 높다는 유의미한 차이가 있었다. 오일함량은 유지작물인 들깨의 상품성을 결정짓는 특성 중 하나로, 오일 함량이 조금 증가했다는 것은 SJDY-1-19가 좋은 상품성이 있다는 증거가 되는 결과이다 (그림 15A,B).

○ 종자의 크기와 모양 분석

- 다유와 SJDY-1-19의 종자간의 크기, 모양, 무게를 분석하였다. 현미경으로 다유와 SJDY-1-19의 종자들을 5개씩 일렬로 찍는 것을 5번 반복하여 크기와 모양을 분석하였다. 사진의 배치는 다유를 첫째 줄에 SJDY-1-19을 둘째 줄에 배치하였다. 그림 A에 나타난 scale bar는 2mm를 나타낸다. 종자의 길이는 종자의 배에서 수직으로 측정하였고, 종자의 너비는 종자의 배에 수평 방향으로 가장 긴 곳을 측정하였다. 종자의 크기는 측정된 길이와 너비의 값을 곱하여 나타내었다. 종자의 무게는 종자들을 하나씩 측정하였다. 그래프는 5개 종자들의 평균값을 하나의 점으로 표현하였다 (그림 16).

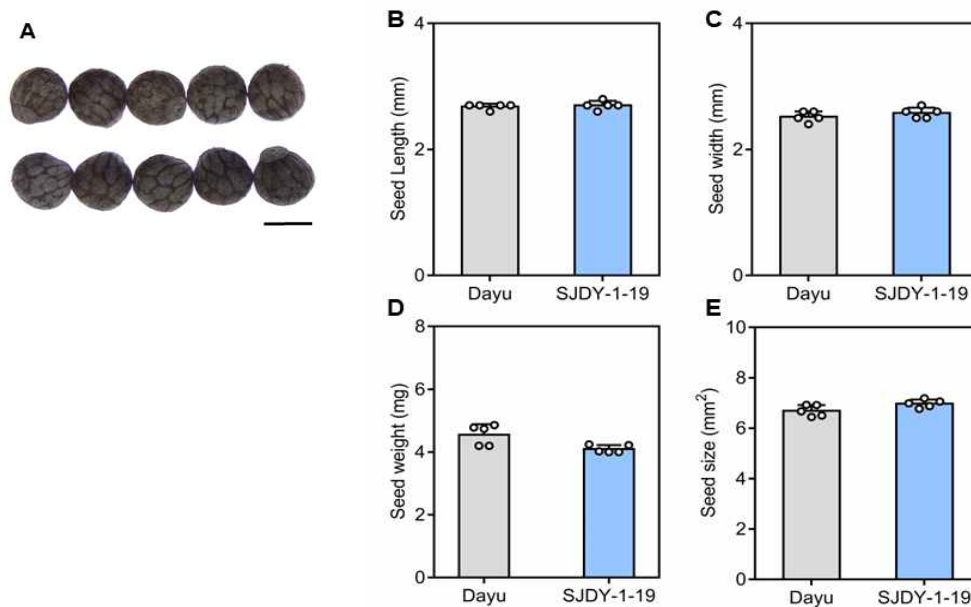


그림 16. A. 다유와 SJDY-1-19의 종자들의 모양 비교, B. 다유와 SJDY-1-19의 종자 길이 비교, C. 다유와 SJDY-1-19의 너비 길이 비교, D. 다유와 SJDY-1-19의 무게 비교, E. 다유와 SJDY-1-19의 크기 비교 (길이 × 너비).

- 다유 종자와 SJDY-1-19 종자의 모양, 길이, 너비, 크기, 무게를 분석하여 비교하였다. 다유 종자의 평균 길이는 2.68mm, SJDY-1-19 종자의 평균 길이는 2.7mm였다. 다유 종자의 평균 너비는 2.52mm이고, SJDY-1-19 종자의 평균 너비는 2.58mm이다. 다유 종자의 평균 크기는 6.67 mm²이고 SJDY-1-19의 평균 종자 크기는 6.978 mm²이다. 마지막으로 다유 종자의 평균 무게는 4.556mg, SJDY-1-9 종자의 평균 무게는 4.1mg이었다. 통계처리 결과 다유와 SJDY-1-19의 길이, 너비, 크기, 무게 모두 통계학적으로 유의미한 차이가 없었다 (그림 16).

○ 종자와 잎에서 FAD3 유전자 발현 분석

- 들깨(*Perilla frutescens*)는 4배체 식물이기 때문에 2쌍의 유전자가 존재한다. 이를 PfrFAD3a, PfrFAD3b로 구분하여 유전자 발현을 비교하기 위해 PfrFAD3a, PfrFAD3b를 각각 특정할 수 있는 primers를 제작하였다. 또한 조직별로 FAD3의 발현의 비교를 위하여 다유와 SJDY-1-19의 잎과 developing seed에서 RNA를 추출한 뒤 cDNA를 합성하였다. 이후에 조직별로 PfrFAD3a, PfrFAD3b의 발현을 분석하였다 (그림 17).

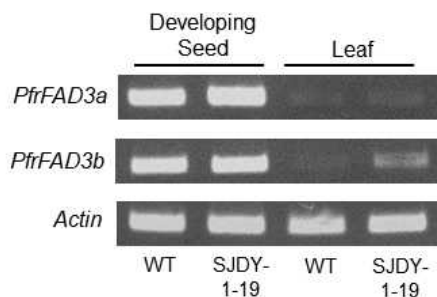


그림 17. 다유와 SJDY-1-19간의 FAD3 유전자 발현 분석

- FAD3는 종자에서 주로 발현하는 유전자로 알려졌다. 먼저 PfrFAD3a, PfrFAD3b 유전자 간에 발현량을 비교하면 PfrFAD3a, PfrFAD3b 모두 종자에서 높게 발현하였으며 잎에서는 거의 발현하지 않았다. 그러나 다유에서 developing seed와 잎에서의 PfrFAD3a와 PfrPfrFAD3b 간에 발현 차이는 육안으로 크게 차이가 나타나지 않았다. 다음으로 다유와 SJDY-1-19의 차이는 developing seed에서 SJDY-1-19이 다유보다 PfrFAD3a의 발현이 조금 더 높은 것으로 나타났고, PfrFAD3b에서 SJDY-1-19이 PfrFAD3b의 발현이 더 높은 것으로 나타났다 (그림 17).

○ 들깨 FAD3 유전자 돌연변이 분석

- 다유 돌연변이 개체의 종자의 지방산 조성은 다유에 비하여 리놀레산(18:2)이 40%까지 증가하였으며 리놀렌산(18:3)이 34%까지 감소하였다. 감마선을 처리로 생성된 돌연변이 계통은 특정 유전자가 아닌 임의의 유전자에 돌연변이가 유도되는 것이기 때문에 원인 유전자를 선정하여 분석해야 한다. FATTY ACID DESATURASE 3 (FAD3)은 소포체(Endoplasmic reticulum)에서 리놀레산에서 리놀렌산으로 전환하는 효소이기에 FAD3 유전자를 우선 고려하였다. 더불어 들깨에 존재하는 두 쌍의 유전자 PfrFAD3a와 PfrFAD3b의 구분을 위하여 그림 24의 RT-PCR을 수행하기 위해 제작한 primers를 사용하여 developing seed로 합성한 cDNA로 PCR 한 뒤 pGEMT-vector에 cloning하여 plasmid DNA를 분리하여 sanger sequencing으로 분석하였다 (그림 18). 이후에 단백질 서열의 변화를 translate tool을 이용하여 분석 비교하였다 (그림 19).

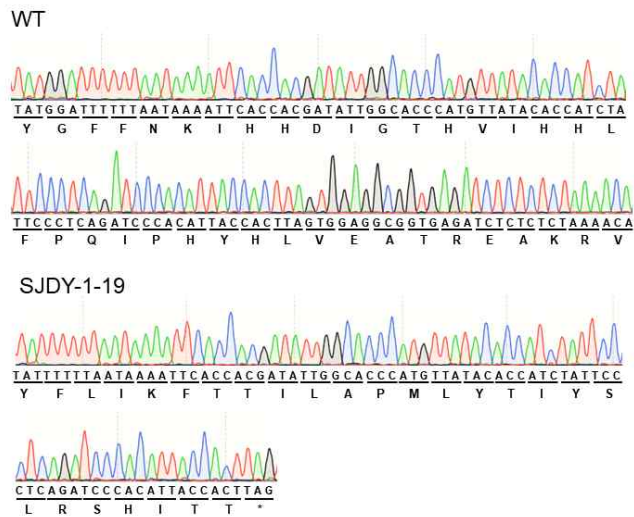


그림 18. 다유와 SJDY-1-19의 FAD3 유전자 sanger sequencing chromatogram 비교

- 다유와 SJDY-1-19의 Sanger sequencing 분석 결과 PfrFAD3a는 유전자 서열에 변화가 없었으나, PfrFAD3b의 Exon7에 'GGAT' 4개의 base pair가 삭제된 것을 확인하였다 (그림 18). 4개의 염기쌍 (basepair)의 삭제로 단백질 서열에 변화가 발생하여 그림 10에 표현된 histidine box3의 단백질 서열이 바뀌어서 SJDY-1-19의 단백질이 제대로 합성되지 못하고, 기능하지 못한다는 사실을 밝혔다. 더불어 4개의 염기쌍이 삭제(deletion)되어 SJDY-1-19에 reading frame의 변화가 나타나 exon7에 종결코돈이 생성되는 것을 확인하였다 (그림 19).



그림 19. 다유와 SJDY-1-19의 PfrFAD3b 유전자의 단백질 서열 비교 분석

- 그림 25의 다유 돌연변이 계통의 cDNA 서열을 통해 PfrFAD3b의 Exon7에 서열 변화가 있음을 확인하

였다. 이에 대한 정확한 분석을 위하여 genomic DNA PCR을 진행하여 sequencing 분석을 진행하였다. genomic DNA 서열상에 intron6 부분에 PfrFAD3b에만 특정하게 증폭될 수 있는 forward primer와 3'UTR 부분으로 추측되는 부분에 PfrFAD3b에만 특정하게 증폭될 수 있는 reverse primer를 제작한 (그림 20A) 뒤 다유 돌연변이 계통의 앞에서 추출한 genomic DNA로 PCR 하고, purification을 진행하여 sanger sequencing을 진행하였다 (그림 20B).

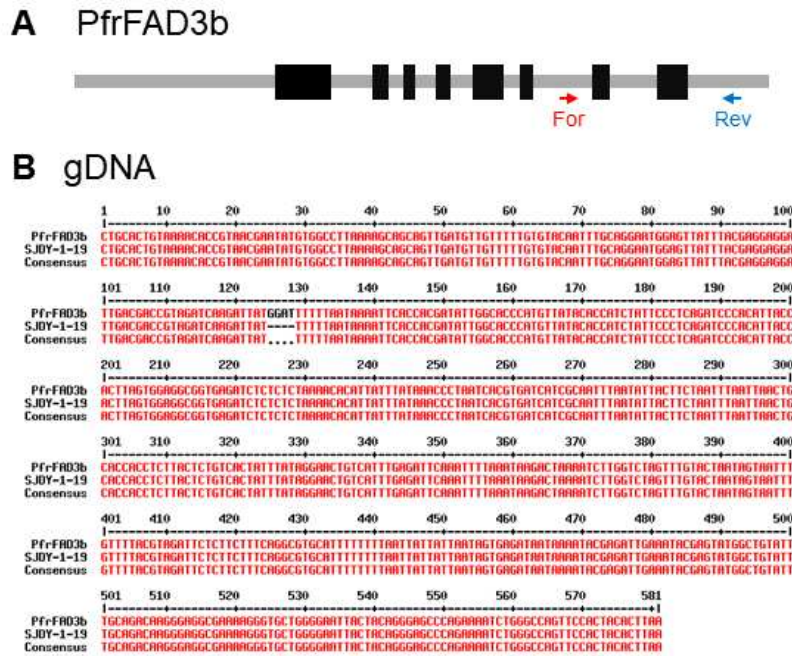


그림 20. A. Genomic DNA 서열 상에 PfrFAD3b를 특정할 수 있는 primers, B. SJDY-1-19의 PfrFAD3b의 Genomic DNA 서열 비교

- genomic DNA를 통해 Sanger sequencing을 분석한 결과 cDNA를 통한 분석과 동일하게 PfrFAD3b의 exon7에 4개 염기쌍의 삭제(deletion)을 확인하였다. 더불어 intron에서의 서열 변화는 없는 것을 확인하였다 (그림 20B).

○ 고 리놀레산 다유 들개 판별 마커 개발

- 개발한 SJDY-1-19를 육종에 활용에 효율적으로 활용할 수 있도록 판별할 수 있는 분자 마커를 개발하였다. SJDY-1-19의 PfrFAD3b의 deletion 영역을 target하여, Reverse primer를 제작하였다 (그림 21). PfrFAD3a exon7과 PfrFAD3b exon7의 sequence가 100% 일치하기 때문에, Reverse primer는 PfrFAD3a와 PfrFAD3b 공통으로 타겟하도록 제작하되, forward primer를 통해 PfrFAD3a와 PfrFAD3b가 구분되도록 제작하였다. PfrFAD3a-MF와 PfrFAD3-MR은 PfrFAD3a의 424bp 영역을 증폭시키고, PfrFAD3b-MF와 PfrFAD3-MR은 PfrFAD3b의 237bp 영역을 증폭시킨다. 이에 <표 1>에 나타난 3가지 프라이머들을 한 용액에 넣어 증폭하면 타겟할 수 있는 PfrFAD3a와 PfrFAD3b의 두 영역이 동시에 증폭되게 용액을 조성하였다. Reverse primer의 경우에 공통으로 두 영역을 타겟하기 때문에 forward primer의 2배의 양을 넣었다. Nex-eTaq 제품을 이용하여 위의 그림과 같이 용액을 조성하고, 그림 22과 같은 조건으로 PCR을 증폭시켰다.

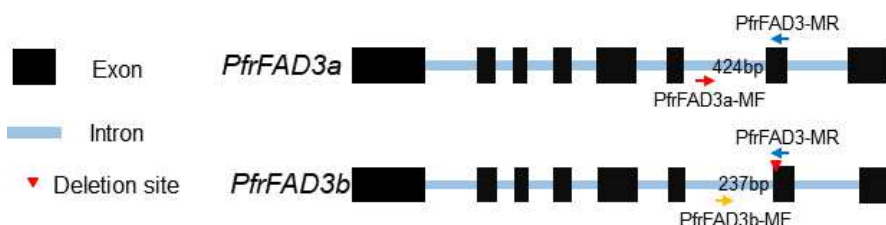


그림 21. PfrFAD3a와 PfrFAD3b의 gDNA 구조와 SJDY-1-19를 식별하는 primer 위치 및 증폭 범위

표 1. SJDY-1-19를 식별하는 primer

Primer name	Sequence	bp	Tm
PfrFAD3a-MF	5'-TTTTACTTATGCCTCTTACCATATA	25	52.6
PfrFAD3b-MF	5'-TGGCCTATCTCAATTTTGAATC	22	55.3
PfrFAD3-MR	5'-CGTGGTGAATTTTATTAATAAATCC	25	53.3

A	B
10X e-taq Buffer	2 μ l
dNTP	1.5 μ l
PfrFAD3a-MF	1 μ l
PfrFAD3b-MF	1 μ l
PfrFAD3b-MR	2 μ l
Template	1 μ l
e-taq	0.1 μ l
D.W	11.4 μ l
20 μ l	
	95 $^{\circ}$ C 5min
	95 $^{\circ}$ C 30sec
	53 $^{\circ}$ C 30sec
	72 $^{\circ}$ C 30sec
	72 $^{\circ}$ C 5min
	8 $^{\circ}$ C ∞
	} 27 cycles

그림 22. SJDY-1-19 식별을 위한 PCR 용액 조성과 PCR 증폭 조건

- 다유 야생형(WT)은 PfrFAD3a와 PfrFAD3b에 해당하는 두 band가 전기영동을 통해 Agarose gel에 나타나지만, SJDY-1-19는 PfrFAD3b의 mutation으로 인해 PfrFAD3a에 해당하는 하나의 밴드만 Agarose gel에 나타난다. 이는 SJDY-1-19를 식별과 18:2가 증가한 들깨 육종에 사용할 수 있는 분자 마커 역할을 한다 (그림 23).

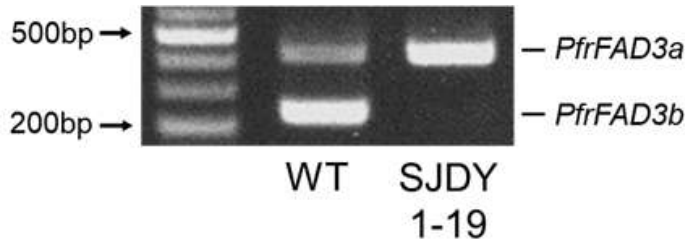


그림 23. SJDY-1-19 식별을 위한 PCR 후 전기영동 결과

마. 고 리놀레산 (18:2) 남천 들깨 개발

○ 종자와 잎에서의 지방산 분석

- 감마선을 처리한 남천 들깨로부터 얻은 돌연변이 계통을 M0에서 M3까지 세대를 진전시킨 후 재배한 남천 돌연변이 계통의 종자들을 가스크로마토그래피(Gas Chromatography)로 지방산 조성을 분석하였다. WT인 '남천'과 비교하여 오메가-6 지방산인 리놀레산(C18:2)이 높고, 반면에 오메가-3 지방산인 리놀렌산(C18:3)이 낮은 남천 돌연변이 계통을 최종 선발 고정했다. 선별한 고 리놀레산 계통의 이름을 'SJNC-110-18'로 칭하였다. 이 때 'SJ'는 'Sejong University'에서 'Sejong'의 약자이며, 'NC'는 모계통인 'Namcheon'의 약자이다. '110-18'은 돌연변이 계통의 번호를 뜻한다.

- 남천과 감마선 처리를 한 남천 개체로부터 얻은 돌연변이 계통 'SJNC-110-18'의 single seed를 5반복하여 지방산 조성을 비교 분석하였다. 이후에 종자 지방산 조성을 분석한 SJNC-110-18의 종자와 남천 종자를 발아시켜 흠에 이식한 후 잎을 채취하여 각각 5개체를 지방산 조성을 비교 분석하였다 (그림 24A,B).

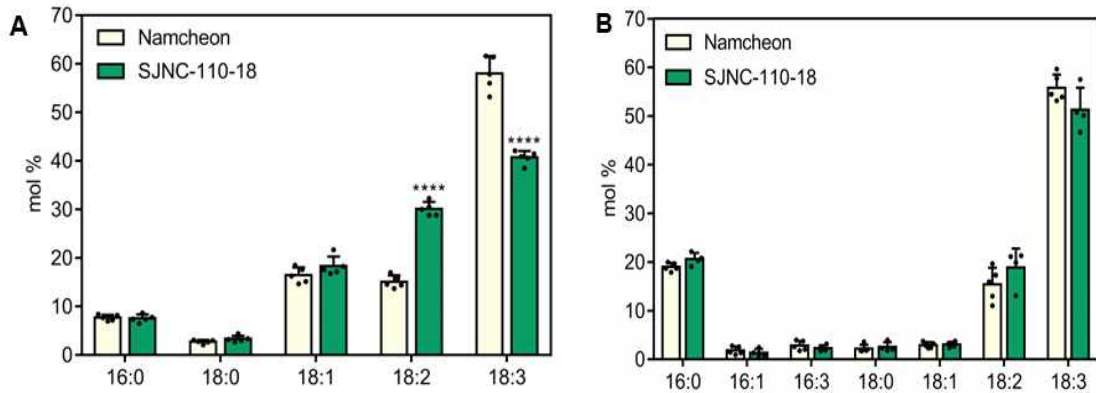


그림 24. A. 남천과 SJNC-110-18 종자의 지방산 조성 분석, B. 남천과 SJNC-110-18 앞에서의 지방산 조성 분석

- SJNC-110-18과 남천 종자의 지방산 조성을 비교 분석한 결과 남천 종자의 리놀레산(18:2)이 평균 15% 함유하고 있는 것과 비교하여 SJNC-110-18은 리놀레산이 약 30%까지 증가하였다. 반면에 남천 종자의 리놀렌산(18:3)이 평균 58% 함유하지만, SJNC-110-18에서는 리놀렌산이 약 40%로 감소하였다. 더불어 리놀레산과 리놀렌산의 변화는 통계학적으로 유의미한 차이가 있었다 (그림 24A). 이는 남천과 비교하여 리놀레산이 15% 증가한 ‘고 리놀레산’ 계통을 선발한 결과이다

- 잎 지방산 조성에서는 남천 앞에서는 리놀레산이 평균 15% 함유하고, SJNC-110-18은 리놀레산이 평균 19%를 함유한 것으로 분석되었다. 그리고 남천 앞의 리놀렌산이 평균 56%이며 SJNC-110-18 앞의 리놀렌산은 평균 41%로 나타났다. 그래프로 보기에 적은 비율이지만 리놀레산이 증가하고, 리놀렌산이 감소한 것으로 보이나 통계 처리 결과 유의미한 차이가 나타나지 않았다 (그림 24B).

○ 종자의 오일 함량 분석

- 남천과 SJNC-110-18의 종자들을 하나씩 무게를 재고, 종자 하나를 실험용 칼로 4등분하여 각각 샘플링 하였다. 이후 5반복 하여 오일 함량을 분석하였다. 오일 함량 분석은 종자 하나의 오일 함량과 무게 당 오일 함량을 분석하였다 (그림 25).

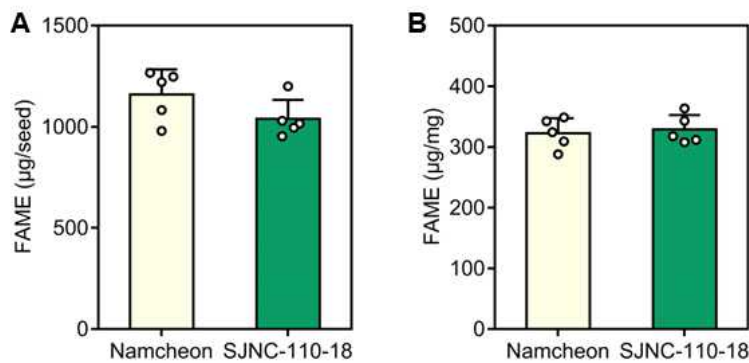


그림 25. A. 남천과 SJNC-110-18의 종자 하나 당 오일 함량 분석, B. 남천과 SJNC-110-18의 종자 무게 당 오일 함량 분석

- 종자 하나의 오일 함량은 남천은 평균 1159µg, SJNC-110-18은 평균 1038µg이었다. 무게 당 오일 함량을 분석했을 때 남천은 평균 322µg/mg이며, SJNC-110-18에서는 328µg/mg이었다. 통계분석결과 종자 하나의 오일 함량과 종자 무게 당 오일 함량은 남천과 SJNC-110-18간의 유의미한 차이가 없었다 (그림 25A,B). 오일함량은 유지작물인 들깨의 상품성을 결정짓는 특성 중 하나로, 오일 함량에 변화가 없는 것은 상품성에 결함이 없다는 증거가 될 것이다.

○ 종자의 크기와 모양 분석

- 남천과 SJNC-110-18의 종자간의 크기, 모양, 무게를 분석하였다. 현미경으로 남천과 SJNC-110-18

의 종자들을 5개씩 일렬로 찍는 것을 5번 반복하여 크기와 모양을 분석하였다. 사진의 배치는 남천을 첫째 줄에 SJNC-110-18을 둘째 줄에 배치하였다. 그림 A에서 나타난 scale bar는 2mm를 나타낸다. 종자의 길이는 종자의 배에서 수직으로 측정하였고, 종자의 너비는 종자의 배에 수평 방향으로 가장 긴 곳을 측정하였다. 종자의 크기는 측정한 길이와 너비의 값을 곱하여 나타내었다. 종자의 무게는 종자들을 하나씩 측정하였다. 그래프는 5개 종자들의 평균값을 하나의 점으로 표현하였다 (그림 26).

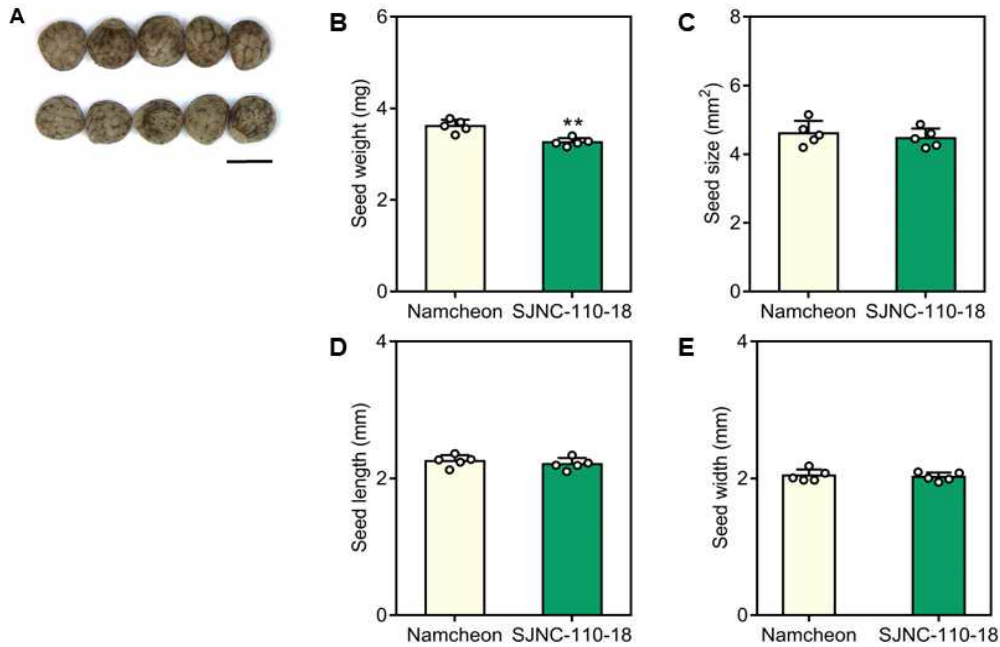


그림 26. A. 남천과 남천 SJNC-110-18의 종자들의 모양 비교, B. 남천과 남천 SJNC-110-18의 무게 비교, C. 남천과 남천 SJNC-110-18의 크기 비교 (길이 × 너비), D. 남천과 남천 SJNC-110-18의 종자 길이 비교, E. 남천과 남천 SJNC-110-18의 너비 길이 비교

- 남천 종자의 평균 길이는 2.25mm, SJNC-110-18 종자의 평균 길이는 2.20mm였다. 남천 종자의 평균 너비는 2.04mm, SJNC-110-18 종자의 너비는 2.02mm이다. 남천 종자의 평균 크기는 4.61mm²이고, SJNC-110-18의 평균 종자 크기는 4.47mm²이다. 마지막으로 남천의 종자의 평균 중량은 3.616mg, SJNC-110-18 종자의 평균 중량은 3.264mg이었다. 통계 처리를 진행하였을 때, 무게에서 SJNC-110-18이 더 적다는 유의미한 차이를 보였다. 그러나 남천과 SJNC-110-18의 길이, 너비, 크기는 통계적으로 유의미한 차이가 없었다 (그림 26A,B).

○ 종자와 잎에서 FAD3 유전자 발현 분석

- 들깨(*Perilla frutescens*)는 4배체 식물이기 때문에 2쌍의 유전자가 존재한다. 이를 PfrFAD3a, PfrFAD3b로 구분하여 유전자 발현을 비교하기 위해 PfrFAD3a, PfrFAD3b를 각각 특정할 수 있는 primers를 제작하였다. 또한 조직별로 FAD3의 발현의 비교를 위하여 남천과 SJNC-110-18의 잎과 developing seed에서 RNA를 추출한 뒤 cDNA를 합성하였다. 이후에 조직별로 PfrFAD3a, PfrFAD3b의 발현을 분석하였다 (그림 27).

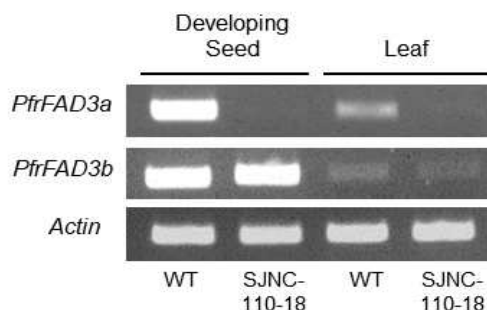


그림 27. 남천과 SJNC-110-18간의 FAD3 유전자 발현 분석

- FAD3는 종자에서 주로 발현하는 유전자로 알려진다. 먼저 PfrFAD3a, PfrFAD3b 유전자 간에 발현량을 비교하면 PfrFAD3a, PfrFAD3b 모두 종자에서 높게 발현하였으며 잎에서는 거의 발현하지 않았다. 또한 잎에서 남천에서 PfrFAD3a가 PfrFAD3b보다 조금 더 발현이 높게 나타났다. 그러나 남천에서 developing seed에서 PfrFAD3a와 PfrFAD3b 간에 발현 차이는 맨눈으로 크게 차이가 나타나지 않았다. 다음으로 남천과 SJNC-110-18간의 차이를 비교하면, PfrFAD3a가 SJNC-110-18은 developing seed와 잎에서 모두 발현하지 않았다 (그림 27). 이를 통해서 SJNC-110-18에서는 PfrFAD3a가 작동하지 않으며, 기능하지 않는다는 사실을 추측할 수 있다.

○ Genomic DNA PCR을 통한 돌연변이 원인 분석

- 감마선을 처리로 생성된 돌연변이 계통은 특정 유전자가 아닌 임의의 유전자에 돌연변이가 유도되는 것이기 때문에 원인 유전자를 선정하여 분석해야 한다. FATTY ACID DESATURASE 3 (FAD3)은 소포체 (Endoplasmic reticulum)에서 리놀레산에서 리놀렌산으로 전환하는 효소이다. FAD3 유전자를 고려하였다. PfrFAD3a와 PfrFAD3b의 구분을 위하여 PfrFAD3a와 PfrFAD3b를 각각 특정할 수 있는 primers를 조합하였다 (그림 28). 이는 그림 19에 각각 PfrFAD3a와 PfrFAD3b의 schematic structure 위에 forward primer는 빨간색 화살표로 reverse primer는 파란색 화살표로 표시하였다. 제작한 primers를 조합하여 제작한 primer를 조합해 증폭되는 영역을 다양화하여 PCR 진행하였다. 이후 전기영동을 통하여 확인하였다 (그림 28A,B).

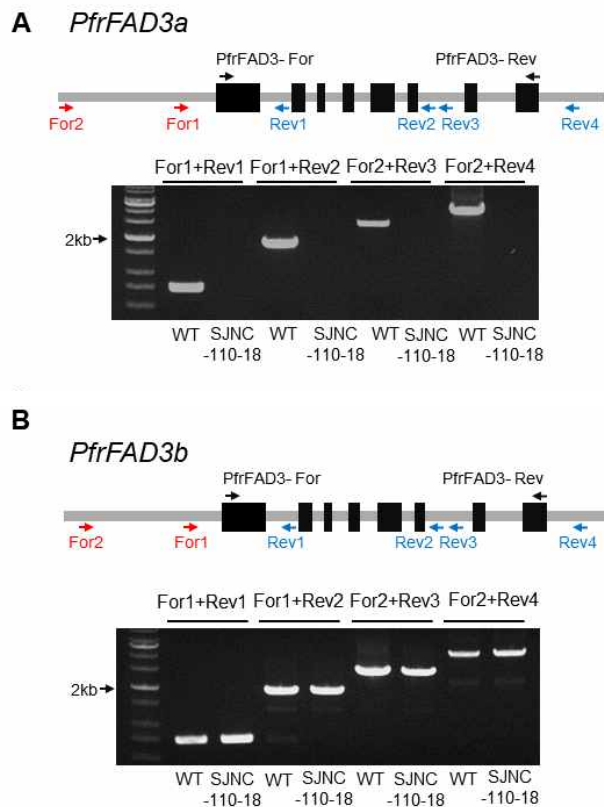


그림 28. A. PfrFAD3a에 특정한 primers 조합 및 남천과 SJNC-110-18간의 PCR band 분석 비교. B. PfrFAD3b에 특정한 primers 조합 및 남천과 SJNC-110-18간의 PCR band 분석 비교

- 그림 28의 A에서는 PfrFAD3a에 특정하는 primers를 사용하여 PCR을 진행하였을 때 WT은 PCR이 증폭되어 PCR band가 보였지만, 반면에 남천에서는 PCR이 증폭되지 않았으며, PCR band가 나타나지 않았다. PfrFAD3a와 달리 PfrFAD3b에서는 남천과 WT 모두 PCR band가 나타났다. 이는 PfrFAD3b에는 변화가 나타나지 않았으나 PfrFAD3a의 큰 영역이 deletion 되었다는 것을 추측할 수 있는 결과이다.

○ SJNC-110-18의 PfrFAD3b sanger sequencing 분석

- Genomic DNA PCR을 통해서 시작코돈에서 종결코돈까지 1176bp모두 SJNC-110-18의 PfrFAD3b 염기서열에는 변화가 없다는 것을 확인하였다 (그림 29).

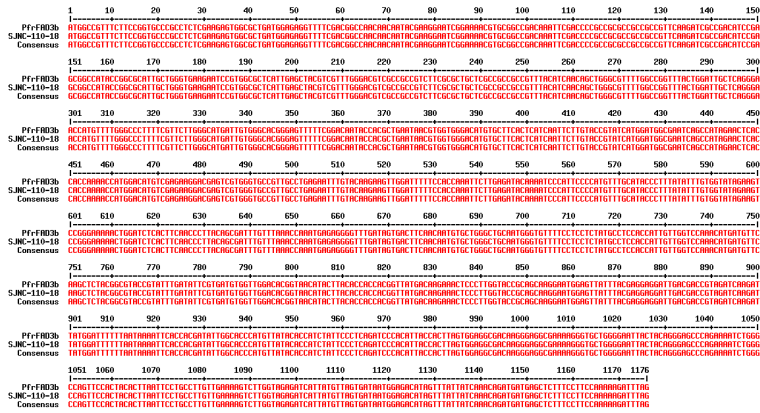


그림 29. 생거 시퀀싱을 통한 SJNC-110-18 *PfrFAD3b* sequence 분석

○ 돌연변이 원인 분석 및 육종활용 분자 마커 개발

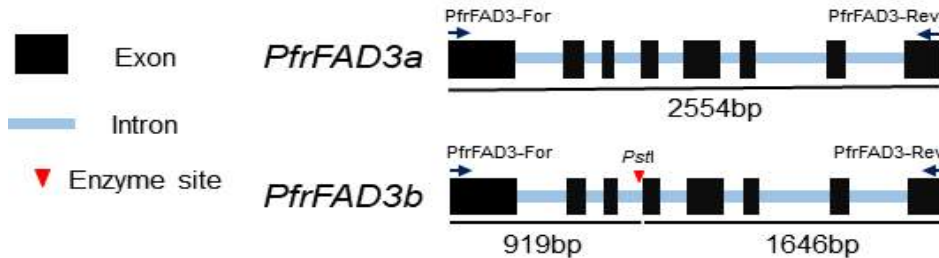


그림 30. *PfrFAD3a*와 *PfrFAD3b*의 gDNA 구조와 *PfrFAD3b*에만 존재하는 '*PstI*' enzyme site

- 앞서 실험을 통해 SJNC-110-18에 PfrFAD3a 영역이 크게 손실되었다는 것을 증명하였다 (그림 28). SJNC-110-18을 식별하기 위한 marker를 PCR-RFLP 방법으로 개발하였다. 남천과 SJNC-110-18의 genomic DNA를 이용하여, PfrFAD3a와 PfrFAD3b를 공통으로 포함할 수 있는 프라이머 (표 2) 'PfrFAD3-For'과 'PfrFAD3-Rev'를 이용하여 PCR product를 생성하였다. PCR product 제작은 Profi-taq 을 이용하였으며, 그림 31의 용액 조성과 PCR 조건을 이용하였다.

표 2. SJNC-110-18을 식별 PCR primer

Primer name	Sequence	bp	Tm
PfrFAD3-For	ATGGCCGTTTCTTCCGGTG	19	59.7
PfrFAD3-Rev'	CTAAATCTTTTTGGAAGGAAAGAGCTC	27	58.1

A		B	
Template (gDNA)	1μl	95°C	5min
10X Reaction Buffer	5μl	95°C	20sec
10mM dNTP mix	4μl	56°C	30sec
PfrFAD3-For	2.5μl	68°C	2min30sec
PfrFAD3-Rev	2.5μl	68°C	5min
Profi-Taq	0.25μl	8°C	∞
D.W	34.75μl		
50μl			

그림 31. PCR product를 생성을 위한 PCR 용액 조성과 PCR 증폭 조건

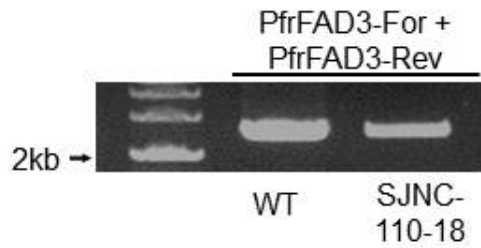


그림 32. 조건에 따른 PCR 후 남천과 SJNC-110-18의 전기영동 결과

- 남천과 SJNC-110-18에 대한 PCR로 약 2.5kb 크기의 PCR product를 제작하였다. PCR product로 purification을 진행하였다 (그림 32). 이후에 PfrFAD3a에는 enzyme site가 없고, PfrFAD3b에 enzyme site가 존재하는 Pst1으로 Enzyme cutting을 진행하였다. NEX 제품의 'Pst1' 제품을 이용하였으며, rCutSmart™ Buffer와 함께 37도 incubator에서 3시간 동안 반응시켰다. 이후에 enzyme cutting된 product를 1% Agarose gel에 내려 전기영동 하였다 (그림 33).

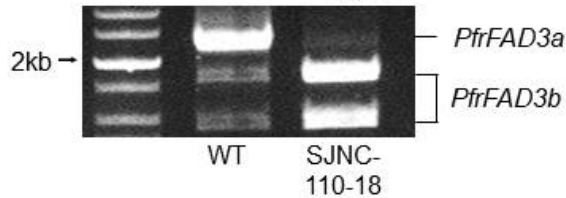


그림 33. 남천과 SJNC-110-18의 Pst1 cutting 후 전기영동 결과

- 그 결과 남천에서는 잘린 두 개의 PfrFAD3b band에 해당하는 919bp와 1,646bp크기의 두 개의 band와 잘리지 않은 2,554bp 크기의 PfrFAD3a band 하나 총 3개의 band가 나타난다. 반면에 SJNC-110-18은 PfrFAD3b band에 해당하는 919bp와 1,646bp 크기의 두 개의 band만 나타난다 (그림 44). 이는 PfrFAD3a가 deletion된 SJNC-110-18을 식별할 수 있는 marker이다 (표 2).

바. 고 리놀렌산(18:3) 다유 들깨 개발

○ 종자와 잎에서의 지방산 분석

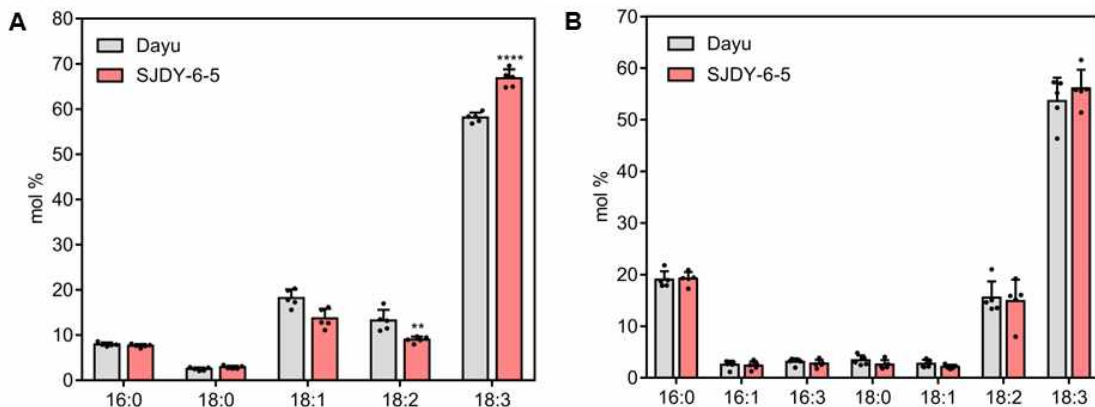


그림 34. A. 다유와 SJDY-6-5 종자에서의 지방산 조성 분석, B. 다유와 SJDY-6-5 종자에서의 지방산 조성 분석

- 감마선을 처리한 남천 들깨로부터 얻은 돌연변이 계통을 M0에서 M3까지 세대를 진전시킨 후 재배한 남천 최종 돌연변이 계통의 종자들을 가스 크로마토그래피(Gas Chromatography)로 지방산 조성을 분석하였다. WT인 '남천'과 비교하여 오메가-3 지방산인 리놀렌산(C18:3)이 높고, 반면에 오메가-6 지방산인 리놀레산(C18:2)이 낮은 다유 돌연변이 계통을 선발 고정했다.

- 다유와 감마선 처리를 한 다유 개체로부터 얻은 돌연변이 계통을 'SJDY-6-5'로 칭한다. 이 때 'SJ'는 'Sejong University'에서 'Sejong'의 약자이며, 'DY'는 모계통인 'Dayu'의 약자이다. '6-5'는 돌연변이 계통의 번호를 뜻한다. 다유와 SJDY-6-5의 single seed를 5반복 하여 지방산 조성을 비교 분석하였다. 이후에 종자 지방산 조성을 분석한 SJDY-6-5의 종자와 다유 종자를 발아시켜 흠에 이식한 후 잎을 채취하여 각각 5개체를 지방산 조성을 비교 분석하였다 (그림 34).

- 다유의 리놀렌산(18:3)이 평균 58% 함유하는 것과 비교하여, SJDY-6-5의 리놀렌산은 약 67%까지 증가하였다. 반면에 다유 종자의 리놀레산(18:2)이 평균 13% 함유하지만, SJDY-6-5의 리놀레산이 약 9%로 감소하였다. 이는 다유와 비교하여 약 10%의 리놀렌산이 증가한 '고 리놀렌산' 계통을 선발한 결과이다 (그림 34A).

- 들깨 종자의 지방산 조성의 변화에 따라 잎 지방산 조성에 변화를 분석하였다. 잎 지방산 조성에서, 다유 잎에서는 리놀렌산이 평균 53% 함유하고, SJDY-6-5는 리놀렌산이 평균 56%를 함유하는 것으로 분석되었다. 그리고 다유 잎의 리놀레산이 평균 16%이며 SJDY-6-5 잎의 리놀레산은 평균 13%로 나타났다 (그림 34B).

○ 종자의 오일 함량 분석

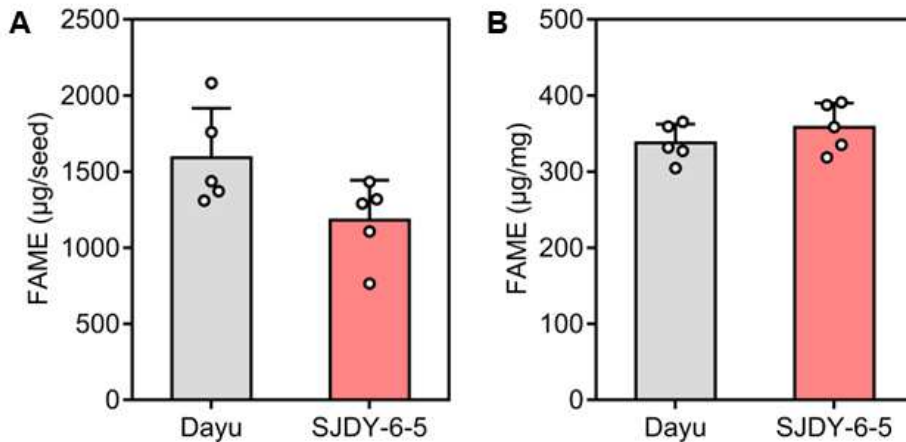


그림 35. A 다유와 SJDY-6-5의 종자 하나 당 오일 함량 분석, B 다유와 SJDY-6-5의 종자 무게 당 오일 함량 분석

- 다유와 SJDY-6-5의 각각의 종자들에 대해 무게를 재고, 종자를 실험용 칼로 4등분하여 종자 하나를 하나의 샘플로 하였다. 이를 5반복 하여 오일 함량을 분석하였다. 오일 함량 분석은 종자 하나의 오일 함량과 무게 당 오일 함량을 분석하였다 (그림 35).

- 종자 하나의 오일 함량은 다유는 평균 1592µg, SJDY-6-5는 평균 1183µg이었다. 무게 당 오일 함량을 분석했을 때 다유는 평균 337µg/mg이며, SJDY-6-5에서는 358µg/mg이었다. 통계처리를 진행했을 때, 오일 함량에서 두 계통 간의 유의미한 차이가 없다는 결론을 얻었다 (그림 35).

○ 종자의 크기와 모양 분석

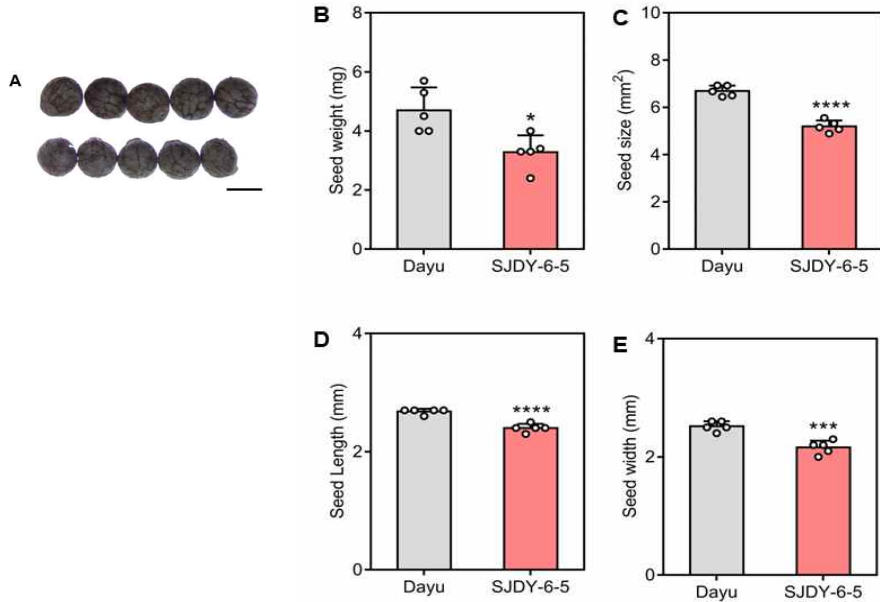


그림 36. A. 다유와 SJDY-6-5의 종자들의 모양 비교, B. 다유와 SJDY-6-5의 종자 무게 비교, C. 다유와 SJDY-6-5의 크기 길이 비교 (길이 × 너비), D. 다유와 SJDY-6-5의 길이 비교, E. 다유와 SJDY-6-5의 너비 비교

- 다유와 SJDY-6-5의 종자간의 크기, 모양, 무게를 분석하였다. 현미경으로 다유와 SJDY-6-5 종자들을 5개씩 일렬로 찍는 것을 5번 반복하여 크기와 모양을 분석하였다. 사진의 배치는 다유를 첫째 줄에 SJDY-6-5을 둘째 줄에 배치하였다. 그림 36A에서 나타난 scale bar는 2mm를 나타낸다. 종자의 길이는 종자의 배에서 수직으로 측정하였고, 종자의 너비는 종자의 배에 수평 방향으로 가장 긴 곳을 측정하였다. 종자의 크기는 측정한 길이와 너비의 값을 곱하여 나타내었다. 종자의 무게는 하나씩 측정하였다. 그래프는 5개 종자들의 평균값을 하나의 점으로 표현하였다 (그림 36C).

- 다유 종자와 SJDY-6-5 종자의 모양, 길이, 너비, 크기, 무게를 분석하여 비교하였다. 다유 종자의 평균 길이는 2.68mm, SJDY-6-5 종자의 평균 길이는 2.4mm였다. 다유 종자의 평균 너비는 2.52mm이고, SJDY-6-5 종자의 평균 너비는 2.16mm이다. Dayu 종자의 평균 크기는 6.67 mm²이고 SJDY-6-5의 평균 종자 크기는 5.52 mm²이다. 마지막으로 다유 종자의 평균 무게는 4.556mg, SJDY-6-5종자의 평균 무게는 3.28mg이었다 (그림 36B).

○ 고 알파-리놀렌산(18:3) 다유 돌연변이 원인 분석

- SJDY-6-5의 종자 지방산 변화 원인을 규명하기 위해 다유 야생형(wild-type)과 SJDY-6-5의 유전체 전체 염기서열을 비교 분석하였다. 이때, Yujun Zhang(2021)에서 미리 분석한 *perilla frutescens*의 genome 서열을 reference로 하였다. 이러한 전체 염기 서열 분석은 감마선 처리가 임의의 유전자가 돌연변이 되는 특성이 있어 이를 통해 지방산 조성 변화의 원인 유전자를 밝히려 하였다.

- Yujun Zhang (2021)에 나타난 서열 분석 후 wild type인 다유와 비교했을 때 SJDY-6-5에 특이적으로 나타나는 변이를 선별하여 161,437개의 변이가 선별되었다. 161,437개의 변이 중에 indel 변이이며, 유전자 내부 변이 중 exon 내에서만 존재하는 변이를 선별하여 총 159개의 변이를 찾았다 (그림 37). 이 결과로 SJDY-6-5의 유전자 서열에 변화가 있음을 알 수 있었다.

Gene_Name	Transcript	No. of	Dayu	DG_1	DG_6	Dayu	DG_1	DG_6	Dayu	DG_1	DG_6	Dayu	DG_1	DG_6	7_DP	Dayu	DG_1	8	InDel
C2551_000001	protein_cc	3	0/0	0/0	1/1				Hom_inDx31.0	19.0	0.5	31	19	5			Diff	Diff	45
C2551_000522	protein_cc	2	0/0	/	1/1				Hom_inDx40.2	0.0	0.3	42	0	3			Diff	Diff	-4
C2551_000522	protein_cc	2	0/1	/	1/1	Het_inDel			Hom_inDx41.3	0.0	0.3	44	0	3			Diff	Diff	-13
C2551_000522	protein_cc	2	0/1	/	1/1	Het_inDel			Hom_inDx38.3	2.0	0.4	41	2	4			Diff	Diff	-5
C2551_000522	protein_cc	2	0/0	/	1/1				Hom_inDx42.3	4.0	0.4	45	4	4			Diff	Diff	-4
C2551_000522	protein_cc	2	0/1	/	1/1	Het_inDel			Hom_inDx37.3	7.0	0.5	40	7	5			Diff	Diff	2
C2551_000522	protein_cc	2	0/0	/	1/1				Hom_inDx43.0	0.0	0.2	43		2			Diff	Diff	3
C2551_000807	protein_cc	1	/	/	1/1				Hom_inDx0.0	0.0	0.17	0	0	17			Diff	Diff	2
C2551_000807	protein_cc	1	/	/	1/1				Hom_inDx0.0	0.0	0.17	0	0	17			Diff	Diff	5
C2551_000807	protein_cc	1	/	/	1/1				Hom_inDx0.0	0.0	0.15	0	0	15			Diff	Diff	43
C2551_001717	protein_cc	1	/	/	1/1				Hom_inDx3.0	0.0	0.8	3	0	8			Diff	Diff	56
C2551_003062	protein_cc	3	0/0	0/0	1/1				Hom_inDx18.0	25.0	0.3	18	25	3			Diff	Diff	8
C2551_003062	protein_cc	1	/	/	1/1				Hom_inDx18.0	23.0	0.3	18	23	3			Diff	Diff	20
C2551_003089	protein_cc	1	/	/	1/1				Hom_inDx0.0	0.0	0.11	0	0	11			Diff	Diff	6
C2551_003089	protein_cc	1	/	/	1/1				Hom_inDx0.0	0.0	0.11	0	0	11			Diff	Diff	40
C2551_003272	protein_cc	2	0/0	/	1/1				Hom_inDx24.0	0.0	0.1	24	0	1			Diff	Diff	15
C2551_003272	protein_cc	2	0/0	/	1/1				Hom_inDx48.0	26.0	1.17	48	26	18			Diff	Diff	-1
C2551_003273	protein_cc	3	0/1	0/1	1/1	Het_inDel	Het_inDel		Hom_inDx18.8	3.12	0.14	26	15	14			Diff	Diff	2
C2551_003273	protein_cc	3	0/1	0/1	1/1	Het_inDel	Het_inDel		Hom_inDx18.8	3.12	0.14	26	15	14			Diff	Diff	-1
C2551_003273	protein_cc	3	0/1	0/1	1/1	Het_inDel	Het_inDel		Hom_inDx18.8	3.12	0.15	26	15	15			Diff	Diff	1
C2551_003273	protein_cc	3	0/1	0/1	1/1	Het_inDel	Het_inDel		Hom_inDx18.8	3.12	0.15	26	15	15			Diff	Diff	-2
C2551_003273	protein_cc	3	0/1	0/1	1/1	Het_inDel	Het_inDel		Hom_inDx9.7	3.7	0.17	21	10	17			Diff	Diff	-2
C2551_003322	protein_cc	3	0/0	0/1	1/1				Hom_inDx0.0	1.4	0.3	2	5	3			Diff	Diff	-6
C2551_003322	protein_cc	3	0/1	0/1	1/1	Het_inDel	Het_inDel		Hom_inDx2.4	4.4	0.5	6	9	5			Diff	Diff	-1
C2551_019756	protein_cc	3	0/1	0/1	1/1	Het_inDel	Het_inDel		Hom_inDx4.34	4.53	0.47	38	57	47			Diff	Diff	5
C2551_020195	protein_cc	3	0/0	0/0	1/1				Hom_inDx22.0	22.0	0.2	22	22	2			Diff	Diff	17
C2551_021499	protein_cc	3	0/0	0/1	1/1				Hom_inDx31.0	1.2	0.4	31	3	4			Diff	Diff	-27
C2551_021652	protein_cc	1	/	/	1/1				Hom_inDx1.0	0.0	0.4	1	0	4			Diff	Diff	3
C2551_021658	protein_cc	1	/	/	1/1				Hom_inDx5.0	1.0	0.1	5	1	1			Diff	Diff	1
C2551_021658	protein_cc	2	0/0	/	1/1				Hom_inDx5.0	1.0	0.1	5	1	1			Diff	Diff	5
C2551_021658	protein_cc	2	/	0/0	1/1				Hom_inDx4.0	1.0	0.2	4	1	2			Diff	Diff	-1
C2551_021658	protein_cc	3	0/0	0/0	1/1				Hom_inDx4.0	2.0	0.2	4	2	2			Diff	Diff	3

그림 37. 다유와 비교했을 때 SJDY-6-5에 특이적으로 변이가 나타나는 159개의 변이 중 일부

11	# Query: Pfu2.0_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1																		
12	# Database: 3_sample_variant_filtered_Dayu_1_consensus_genome.fasta																		
13	query accver	subject accver	% Identity	alignment	mismatch	gap	opens	q.start	q.end	s.start	s.end	evaluate	bit score	Direction		subject acc	s.start	s.end	length(bp)
14	# 5592 hits found																		
15	Pfu2.0_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1	99.897	21355	8	5	1	21353	48260323	48281665	0	39301	Plus				<= 제일 잘 매치됨 QFCC020001_48260323	48281665	21343	
16	Pfu2.0_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1	95.777	7719	207	44	6186	13826	9730956	9738633	0	12338	Plus							
17	Pfu2.0_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1	94.69	1902	59	9	13826	15686	9738757	9740657	0	2915	Plus							
18	Pfu2.0_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1	97.673	1461	25	3	444	1896	9725195	9726654	0	2501	Plus							
19	Pfu2.0_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1	95.041	1089	25	10	4107	5186	9728791	9729859	0	1685	Plus							
20	Pfu2.0_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1	95.225	1068	25	3	5146	6187	9729858	9730925	0	1666	Plus							
21	Pfu2.0_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1	94.019	1070	39	16	3001	4057	9727748	9728805	0	1598	Plus							
22	Pfu2.0_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1	95.816	980	32	4	1934	2912	9726653	9727624	0	1574	Plus							
23	Pfu2.0_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1	83.744	1421	115	54	17001	18361	9740867	9742231	0	1238	Plus							
24	Pfu2.0_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1	90.365	768	36	9	16206	16958	69450243	69449499	0	974	Minus							
25	Pfu2.0_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1	90.289	762	44	6	16204	16958	12687306	12686568	0	970	Minus							
26	Pfu2.0_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1	89.556	766	43	7	16202	16952	42706076	42706819	0	937	Plus							
27	Pfu2.0_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1	89.865	740	46	5	16220	16952	18708118	18708835	0	924	Plus							
28	Pfu2.0_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1	89.125	754	52	8	16210	16956	13246271	13247001	0	911	Plus							
29	Pfu2.0_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1	88.652	749	56	4	16202	16943	5004769	5004043	0	885	Minus							
30	Pfu2.0_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1	87.28	794	69	6	16194	16978	67027969	67027199	0	878	Minus							
31	Pfu2.0_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1	88.329	754	56	6	16202	16946	68790004	68708274	0	876	Minus							
32	Pfu2.0_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1	87.405	786	61	8	16202	16982	16591045	16590293	0	869	Minus							
33	Pfu2.0_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1	87.387	777	65	11	16202	16968	57924759	57924006	0	861	Minus							
34	Pfu2.0_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1	87.032	802	50	12	16195	16986	16012309	16011552	0	856	Minus							
35	Pfu2.0_QFCC02000001.1_4827090_QFCC02000001.1	87.919	745	60	13	16221	16958	45528222	45527501	0	850	Minus							

그림 38. Yujun Zhang(2021)의 참조 유전자 서열과 다유와의 매치에서 DGAT1으로 예상되는 유전자 서열 후보 분석의 일부

- SJDY-6-5은 18:3 지방산이 증가하였다. 즉, SJDY-6-5은 지방산 조성에 변화가 생긴 돌연변이체이다. 그러므로 지방산과 관련된 유전자들을 선별하여 이에 대한 유전자 서열의 변화를 살펴보았다. 지금까지 특정 유전자가 돌연변이 되었을 때 18:3이 증가하는 유전자는 지금까지 'DGAT1'으로 알려져 있다. 이에 원인 유전자의 후보를 'DGAT1'과 'DGAT1과 관련된 유전자 'DGAT2', 'DGAT3'도 원인 유전자 후보로 염두에 두었다. 들개는 4배체 식물이기 때문에 2쌍의 유전자가 존재한다. 그러나 지금까지 연구에 따르면 들개 DGAT1의 모든 유전자쌍 정보에 대해 밝혀진 바가 없다. 전체 유전체 서열의 분석을 통해 DGAT과 관련된 유전자 서열에 대한 정보를 얻으려 하였다. 먼저 PfrDGAT1_candidate_gDNA 유전자 서열을 모아, Yujun Zhang(2021)의 참조 유전자 서열과 매치되는 서열을 추출하였다 (그림 38). 이를 다유와 SJDY-6-5의 변이 탐색 결과를 반영해 각각의 consensus genome을 작성하여, 이를 local BLASTn program을 이용하여 정렬하여 비교하였다.

- 참조 유전자와 다유의 전체 염기 서열 분석 결과와 비교하여 DGAT1으로 추정되는 유전자 서열을 정리하여 다양한 유전자 서열을 얻을 수 있었다. 그 중에서 가장 상동성이 높은 유전자 서열을 선정하여 다유와 SJDY-6-5간에 서열을 비교하여 SJDY-6-5의 염기 서열 변화를 살펴보았다

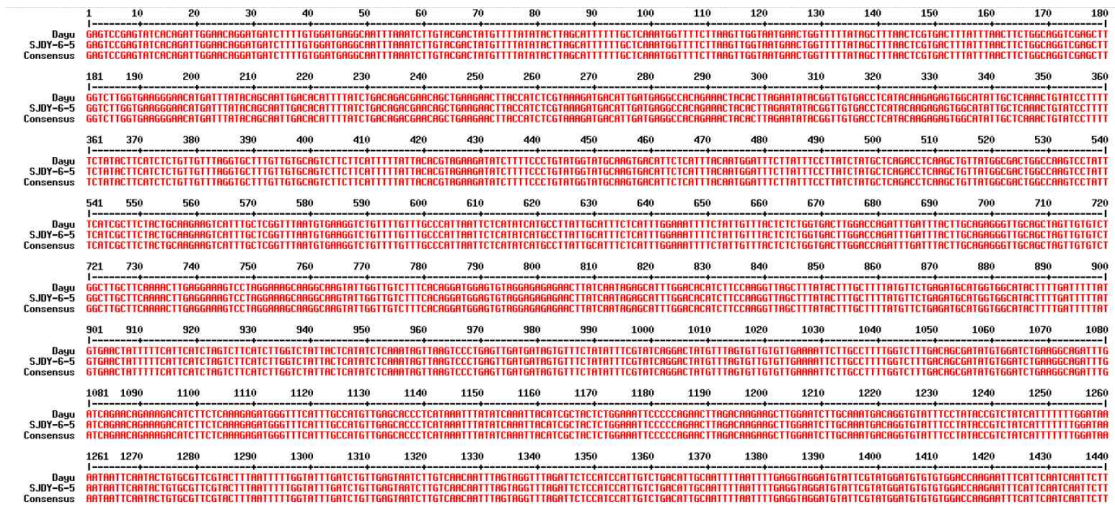


그림 39. DGAT1으로 추정되는 유전자의 다유와 SJDY-6-5간의 서열 분석의 일부

- 염기서열 비교 분석을 통해서 DGAT1으로 가장 유사한 서열을 추출해 다유 유전자 서열과 SJDY-6-5 염기서열을 비교 분석하였다. 그러나 100% 일치하는 결과를 통해서 SJDY-6-5의 지방산 조성 변화의 원인이 DGAT1이 아님을 밝혔다 (그림 39). 앞으로 전체 염기 서열 분석 결과에 따라 변이된 유전자 list의 서열을 비교하면 SJDY-6-5에 대한 지방산 조성 변화 원인을 밝힐 수 있을 것이다.

사. 들깨 FAD3 유전자 기능 분석

○ 들깨 종자 지방산 대사 예측과 FAD3의 역할

- Kennedy pathway에 근거하여 FATTY ACID DESATURASE 3(FAD3)에 연관되는 지방산 및 트리아실글리세롤 합성의 pathway를 그렸다 (그림 40).

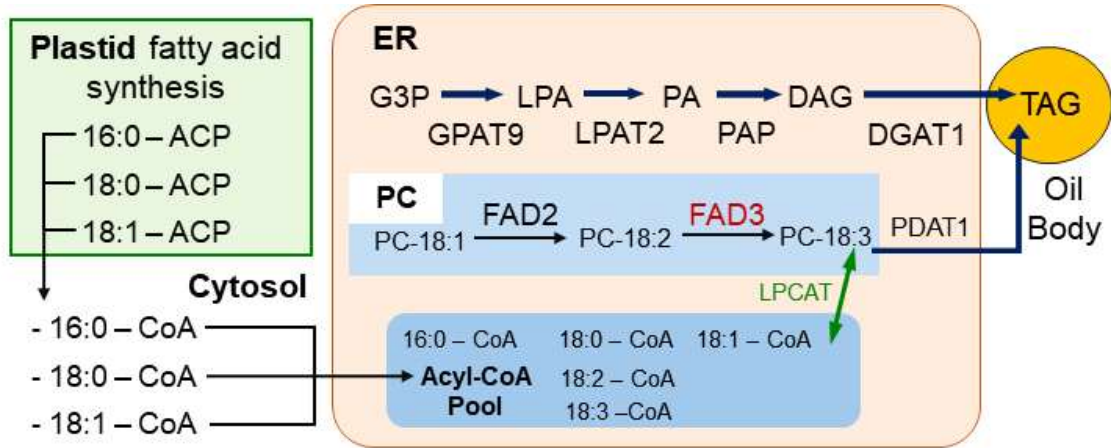
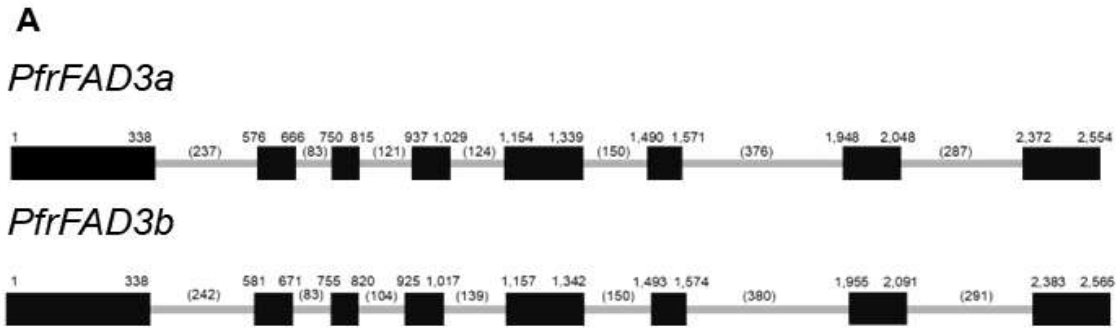


그림 40. *Perilla frutescens*의 FATTY ACID DESATURASE 3(FAD3)와 관련된 지방산 및 트리아실글리세롤 합성의 pathway

○ 들깨 FAD3 유전체 분석

- PfrFAD3a와 PfrFAD3b의 genomic DNA 서열을 분석하여 exon과 intron 서열을 구분하였다. 이후에 Exon 영역은 검정색 box로 intron 영역은 회색선으로 표현하였다. PfrFAD3a와 PfrFAD3b의 genomic DNA 서열을 분석하여 exon과 intron 서열의 상동성을 비교하였다. 더불어 PfrFAD3a와 PfrFAD3b의 CDS 서열을 비교하여 Amino acid의 상동성도 함께 분석하였다. PfrFAD3a와 PfrFAD3b의 CDS 서열을 비교하여 Amino acid의 서열을 비교 분석하였다 (그림 41).



B

PfrFAD3a&PfrFAD3b	% of identity	
	nt	AA
Exon1	98	99
Intron1	91	
Exon2	99	100
Intron2	94	
Exon3	100	100
Intron3	89	
Exon4	99	100
Intron4	92	
Exon5	98	100
Intron5	96	
Exon6	100	100
Intron6	92	
Exon7	100	100
Intron7	96	
Exon8	99	100

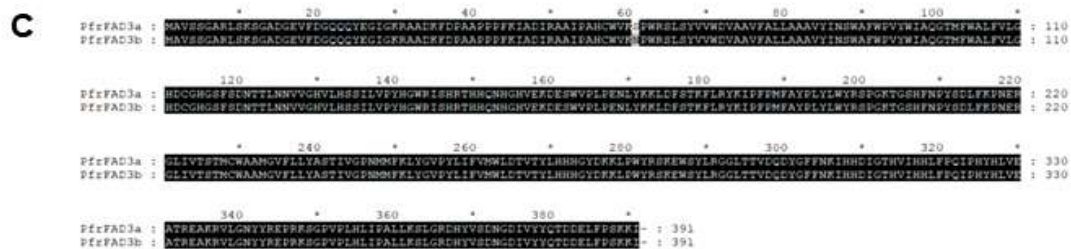


그림 41. A. *PfrFAD3a*와 *PfrFAD3b*의 schematic structure, B. *PfrFAD3a*와 *PfrFAD3b*의 amino acid와 nucleotide의 identity 분석, C. *PfrFAD3a*와 *PfrFAD3b*의 amino acid 서열 비교 분석

- PfrFAD3a와 PfrFAD3b는 8개의 exon과 8개의 intron으로 구성되어 있다. PfrFAD3a와 PfrFAD3b간의 서열에 큰 차이가 없으며 특히 amino acid 서열은 한개만 다른 것을 확인할 수 있었다 (그림 41C).

○ 들깨 FAD3 계통 분석

- 논문에서 밝혀진 개체들의 FAD3 유전자의 CDS 서열들을 수집하였고, 특히 ER에서 작동하는 FAD3 유전자들만을 수집하였다. 유전자 정보는 phylogenetic tree에 각각 작성하였다. 수집한 정보를 통하여 쌍떡잎식물과 외떡잎식물을 구분하여 phylogenetic tree를 그렸다 (그림 42).

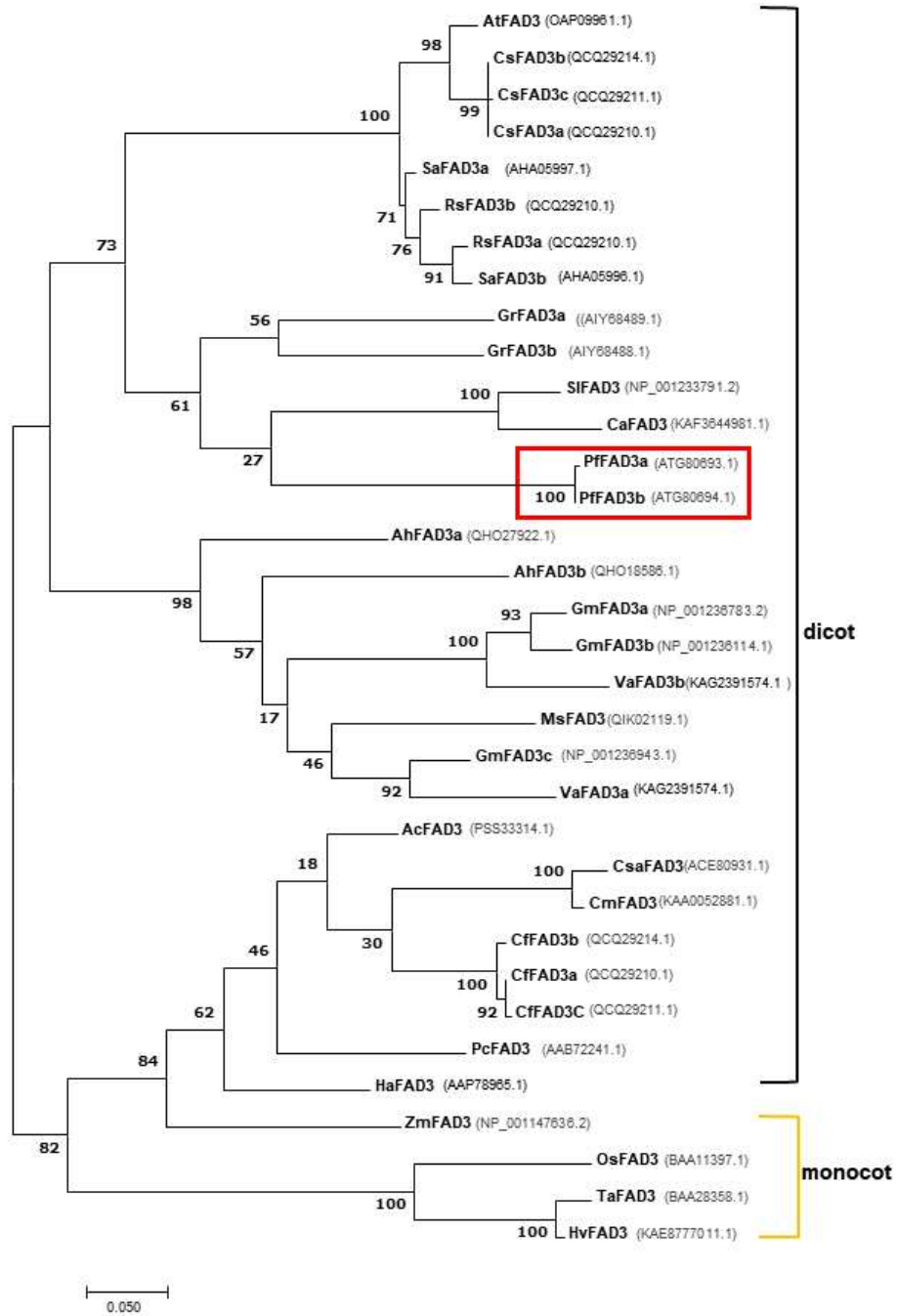


그림 42. *Perilla frutescens*의 FAD3 유전자의 phylogenetic tree

- 들깨의 PfrFAD3a와 PfrFAD3b는 계통이 100% 일치하였다. 애기장대의 FAD3는 계통 간의 거리가 먼 것으로 확인되었다.

○ 들깨 FAD3a와 FAD3b 애기장대 FAD3 mutant fad3-2에서의 기능 분석

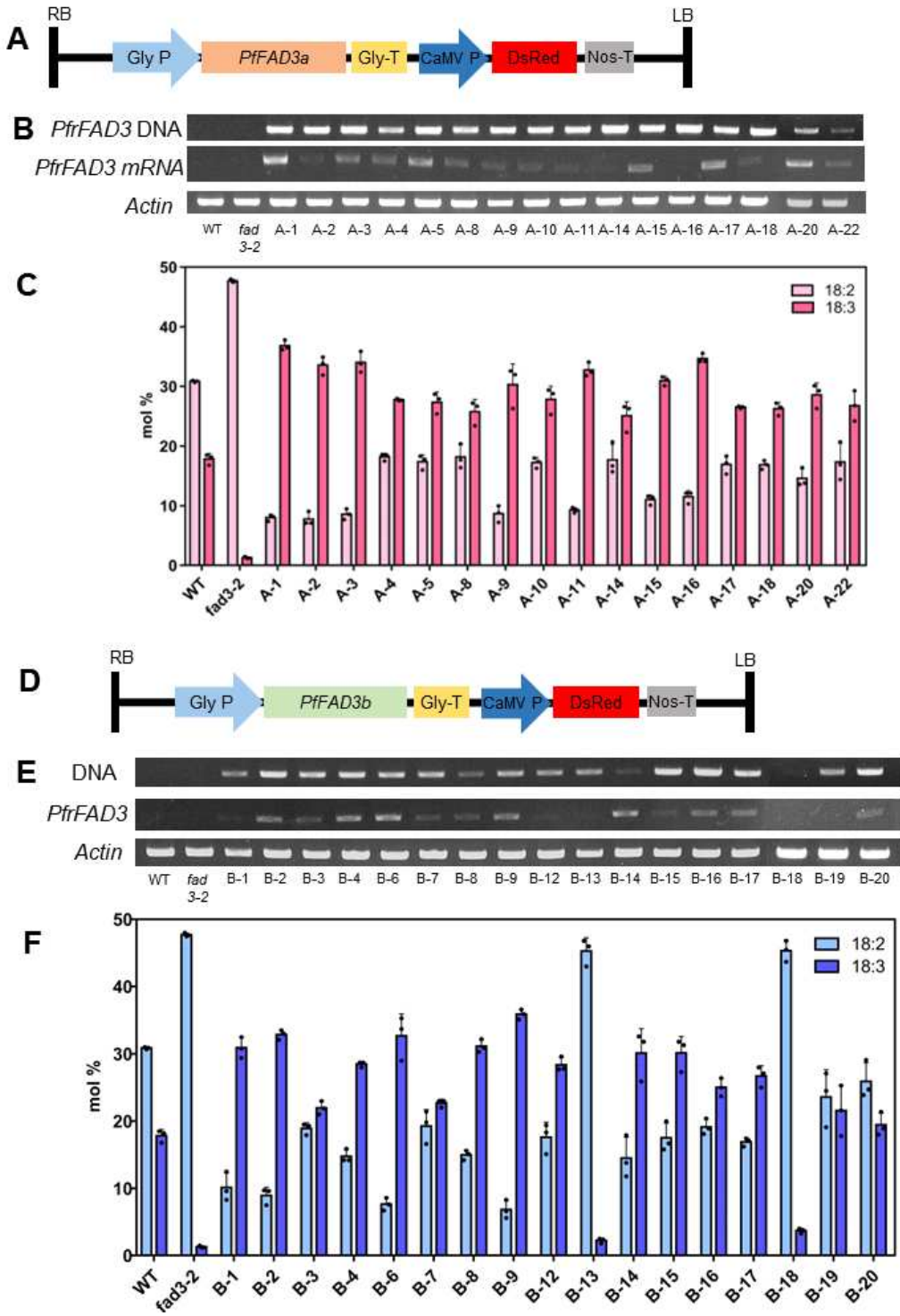


그림 43. 들깨 FAD3 유전자 기능분석

A. PfFAD3a 종자 특이 과발현벡터, B. 애기장대 *fad3-2* 돌연변이체 PfFAD3a 형질전환체 분석, C. 애기장대 *fad3-2* 돌연변이체 PfFAD3a 형질전환체 종자지방산 분석에 의한 18:2와 18:3 조성변화, E. PfFAD3b 종자 특이 과발현벡터, F. 애기장대 *fad3-2* 돌연변이체 PfFAD3b 형질전환체 분석, G. 애기장대 *fad3-2* 돌연변이체 PfFAD3b 형질전환체 종자지방산 분석에 의한 18:2와 18:3 조성변화.

- PfrFAD3a와 PfrFAD3b를 각각 isolation하여 pGEMT-vector에 cloning 한 후 plasmid DNA를 확보하였다. 이후에 Seed specific vector인 'pBINGLY-Red3' vector에 isolation한 *Perilla frutescens*의 PfrFAD3a와 PfrFAD3b를 도입하여 pBINGLY-Red3-PfrFAD3a, pBINGLY-Red3-PfrFAD3b vector를 제작하였다 (그림 43A, D).

- 애기장대 FAD3 mutant인 *fad3-2*에 pBINGLY-Red3-PfrFAD3a, pBINGLY-Red3-PfrFAD3b vector를 도입하여 형질전환체를 만들었다. 형질전환체들의 잎으로 genomic DNA를 extraction하여 *Perilla frutescens*의 FAD3 primers를 이용하여 PCR 하여 형질전환체임을 밝히고, 형질전환체임을 확인한 개체들 앞에서 RNA를 extraction하여 RT-PCR로 발현을 확인하였다. 수확한 종자로 gas chromatography 분석을 진행하여 애기장대 FAD3 mutant인 *fad3-2*에 비교하여 18:3이 얼마나 회복되었는지 분석하였다 (그림 43 B, E).

- pBINGLY-Red3가 seed specific vector이므로 잎에서의 발현이 높지 않았다. 그러나 수확한 종자들의 gas chromatography 분석 결과에서 *fad3-2*의 리놀렌산(18:3)이 평균 1.2%임에 비하여 형질전환체는 pBINGLY-Red3-PfrFAD3a, pBINGLY-Red3-PfrFAD3b 모두 리놀렌산(18:3)이 약 35%~40%까지 증가하였다. 이는 WT에서 리놀렌산 (18:3)이 약 18% 정도 함량이 나타난 것과 비교하여 약 2배가량 높게 함유된 것을 알 수 있었다 (그림 43C, F). 이는 isolation한 PfrFAD3a와 PfrFAD3b가 애기장대 mutant에서 FATTY ACID DESATURASE 3의 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

<위탁기관 1 (동아대학교)>

가. 들깨 자엽을 이용한 조직배양 및 형질전환 성공

○ 자엽을 이용한 조직배양 형질전환 성공 (pHEE401E-pfrUBQ-mDsRED-FAD2, FAD3)

- 들깨 하배축을 이용한 조직배양 형질전환을 pHEE401E-pfrUBQ-FAD2-Bar, pHEE401E-pfrUBQ-mDsRED-FAD2-Bar, pHEE401E-pfrUBQ-mDsRED-FAD3-Bar, pHEE401E-pfrUBQ-FAD3-Bar, pHEE401E-pfrUBQ-FAD3-Hyg 다섯개의 construct를 형질전환을 수행을 하였으나 positive 형질전환체 확보 확률이 낮아 자엽을 이용한 조직배양 및 형질전환을 시도하였음 (그림 44).

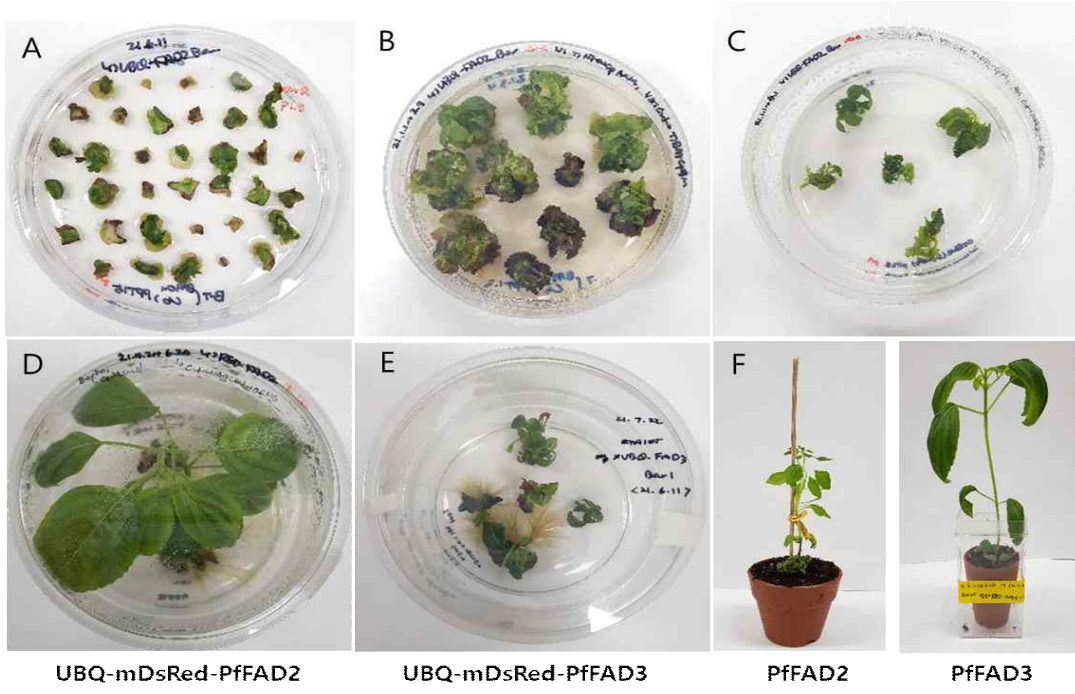


그림 44. 들깨 자엽을 이용한 pHEE401E-pfrUBQ-mDsRED-FAD2, FAD3 형질전환. A: 아그로 박테리아 활용 FAD2, FAD3 유전자 교정 construct 감염 후 치상. B: 잎줄기 재분화 진행을 위해 SIM 배지에서 배양 2개월. C: 잎 줄기가 유도된 explant들로부터 재분화된 식물체를 절단하여 뿌리유도 배지에서 배양. D E: 뿌리가 유도된 형질전환 들깨. F: 뿌리유도된 형질전환 들깨들을 흙으로 옮겨 순화

○ 흙에서 순화하여 안정화된 형질전환 들깨들을 genomic PCR로 형질전환체 확인 (그림 45).

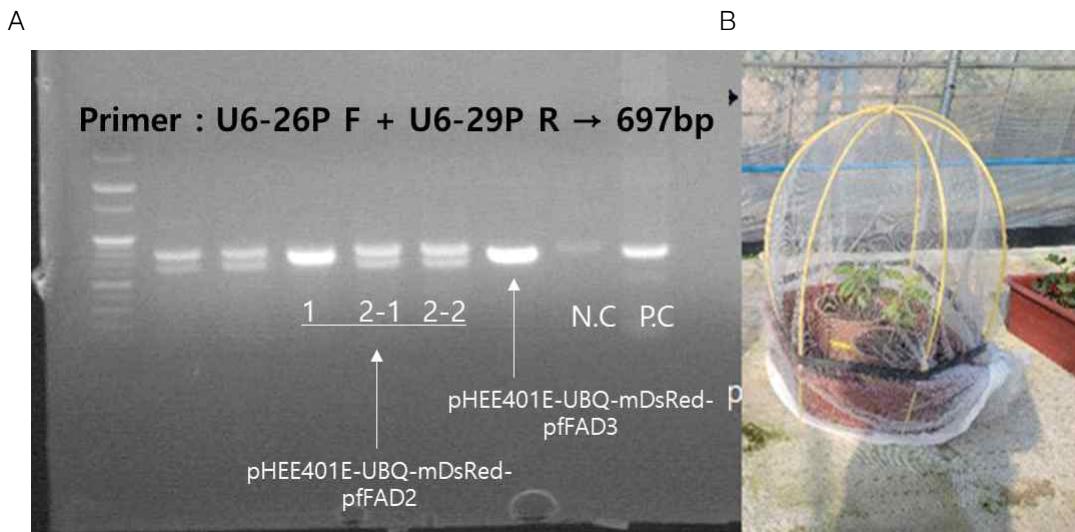


그림 45. 형질전환 들깨의 확인. A: genomic PCR을 수행하여 삽입된 재조합 DNA를 PCR로 증폭 후 확인. B: 확인된 형질전환 들깨들을 옮겨심기 후 유리온실에서 다음세대 종자 수확을 위한 증식. 확보된 형질전

환체는 pHEE401E-pfrUBQ-mDsRED-FAD2, FAD3 임.

○ 자엽을 이용한 pHEE401E-pfrUBQ-FAD3-Hyg 형질전환 성공

- 들깨의 조직들이 hygromycin 항생제에 대해 아주 민감하여 형질전환 효율이 현저히 떨어짐. 그리하여 많은 개체 확보가 어려웠음 (그림 46).

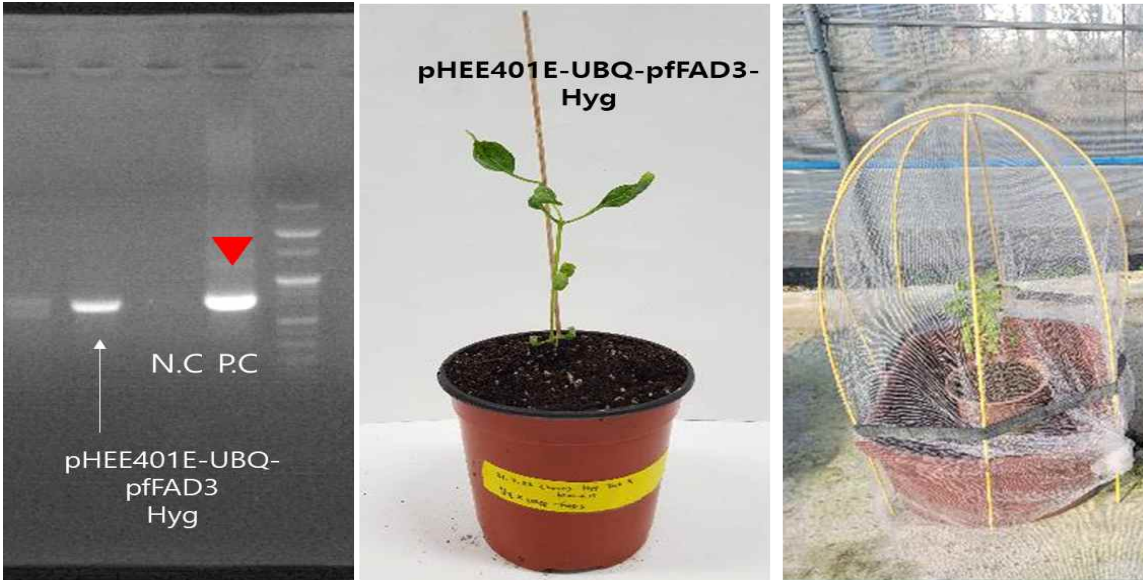


그림 46. pHEE401E-pfrUBQ-FAD3-Hyg 형질전환체 선발. Genomic PCR을 수행하여 검증된 형질전환 들깨를 흙에서 순화 후 유리온실에서 증식 중.

○ 자엽을 이용한 pHEE401E-UBQ-PfFAD2, PfFAD3-Bar 형질전환체 선발

- 들깨 조직배양체의 Hygromycin 항생제에 대한 민감성 때문 Basta 항생제로 대체하여 형질전환 수행. Basta 항생제는 식물에 가장 일반적으로 사용하는 선발 항생제로 본 연구에서도 형질전환 들깨 선발에 이용함. Basta 항생제 하에서 들깨 조직배양을 통한 형질전환 선발 때에 hygromycin과 같이 민감성을 보이지 않았으며 positive 형질전환체들이 적절히 선발되었음.

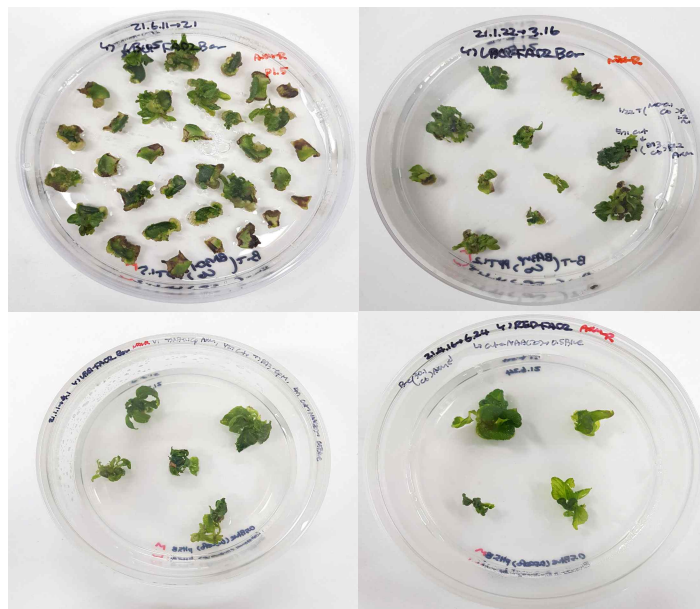


그림 47. pHEE401E-UBQ-PfFAD2, pHEE401E-UBQ-PfFAD3 Basta 항생제 선발 배지에서 형질전환체 선발 및 뿌리 유도.



그림 48. pHEE401E-UBQ-PfFAD2, pHEE401E-UBQ-PfFAD3 Basta 항생제 선발 배지에서 선발된 형질 전환체 흙으로 옮겨 심어 식물배양상에서 순화



그림 49. 식물배양상에서 순화된 pHEE401E-UBQ-PfFAD2-Bar 유전자교정 형질전환 들깨 (T1 generation) 겨울 유리온실에서 배양.



그림 50. 식물배양상에서 순화된 pHEE401E-UBQ-PfFAD3-Bar 유전자교정 형질전환 들깨 (T1 generation) 겨울 유리온실에서 배양.

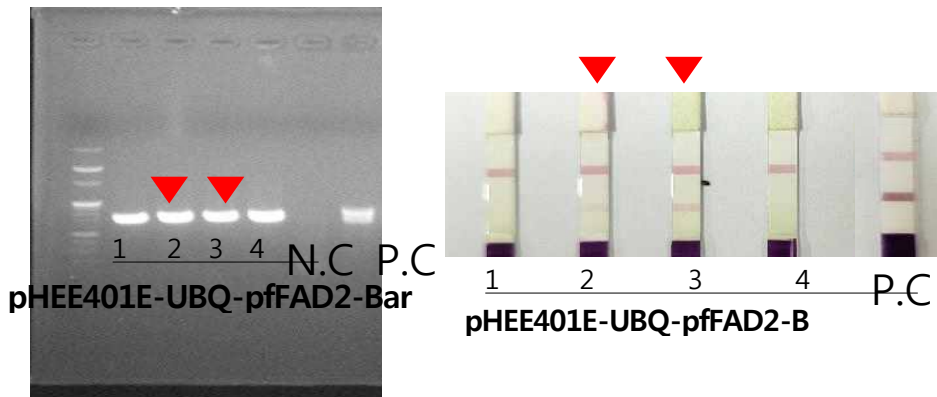


그림 51. pHEE401E-UBQ-PfFAD2-Bar 유전자교정 형질전환 들깨 (T1 generation) genomic PCR과 bastrip을 이용한 검증.

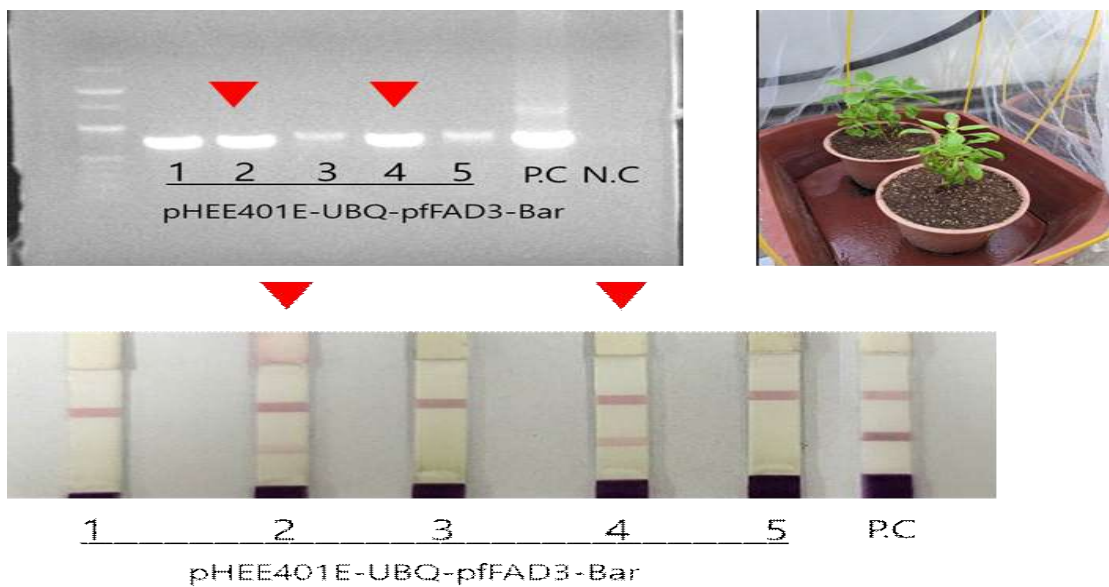


그림 52. pHEE401E-UBQ-PfFAD3-Bar 유전자교정 형질전환 들깨 (T1 generation) genomic PCR과 bastrip을 이용한 검증.

○ T1 세대 유전자 교정 형질전환 들깨 (pHEE401E-UBQ-PfFAD2-Bar) 유전자 교정 확인
- 세종대팀에서 수행

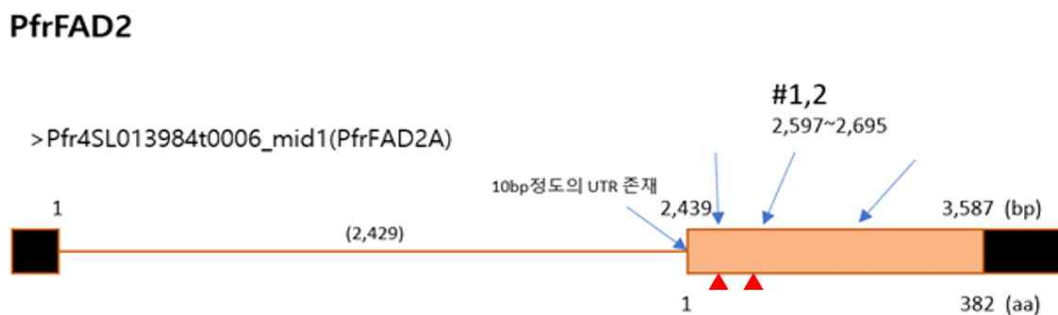


그림 53. pHEE401E-UBQ-PfFAD2-Bar vector map과 PfrFAD2 유전자의 genomic structure와 가이드 RNA 위치.

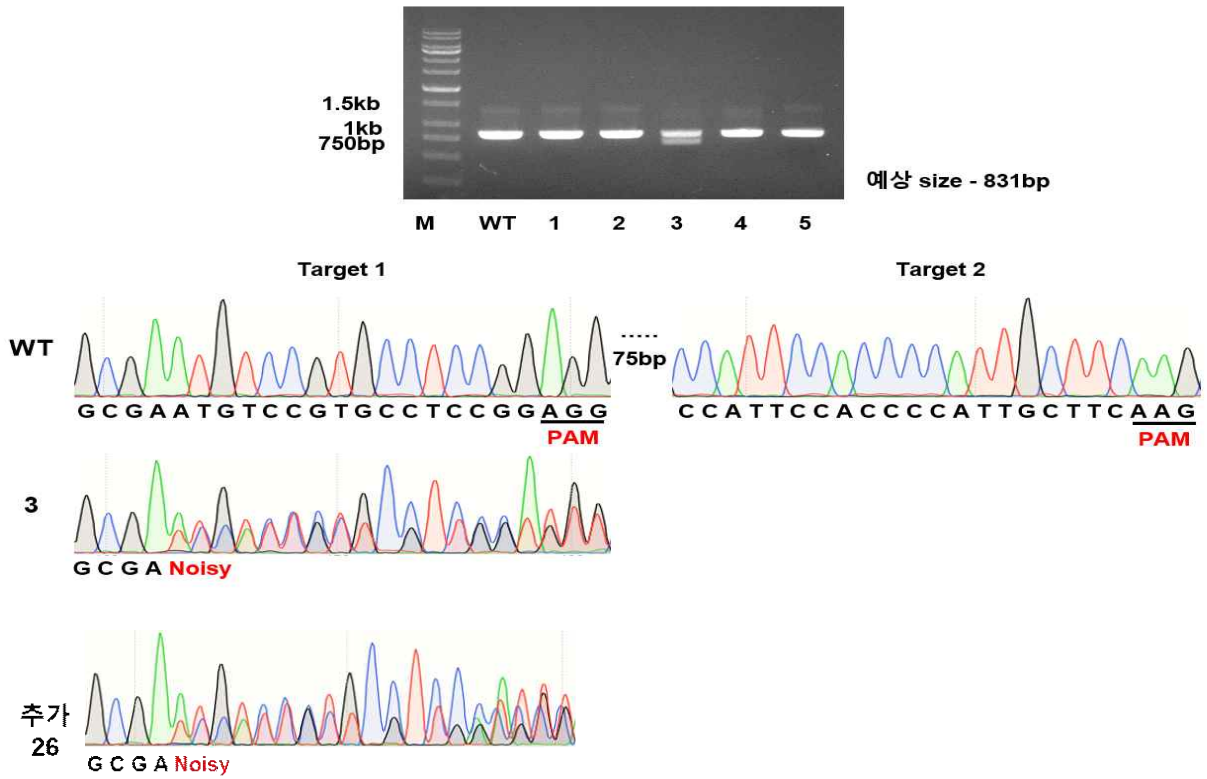


그림 54. PfAD2 유전자 교정확인을 위한 genomic PCR 및 유전자 교정확인을 위한 염기서열 분석 - PfAD2 유전자의 경우 3번 26번 라인에서 유전자 교정 확인됨.

○ T1 세대 유전자 교정 형질전환 들깨 (pHEE401E-UBQ-PfFAD3-Bar) 유전자 교정 확인

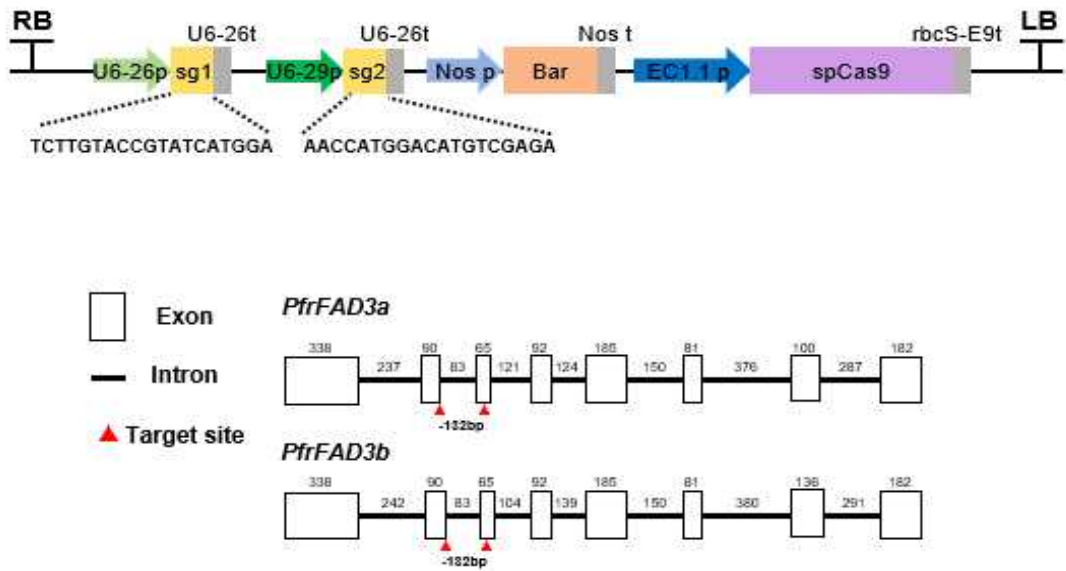


그림 55. pHEE401E-UBQ-PfFAD3-Bar vector map과 PfFAD3 유전자의 genomic structure와 가이드 RNA 위치.

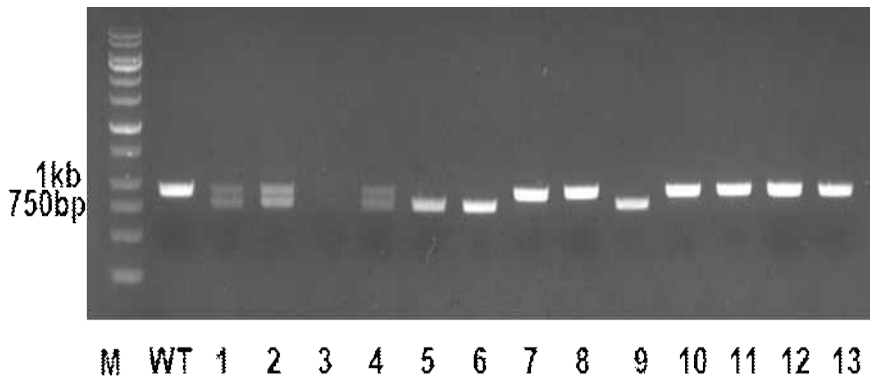


그림 56. PfFAD3a 유전자 교정확인을 위한 genomic PCR.

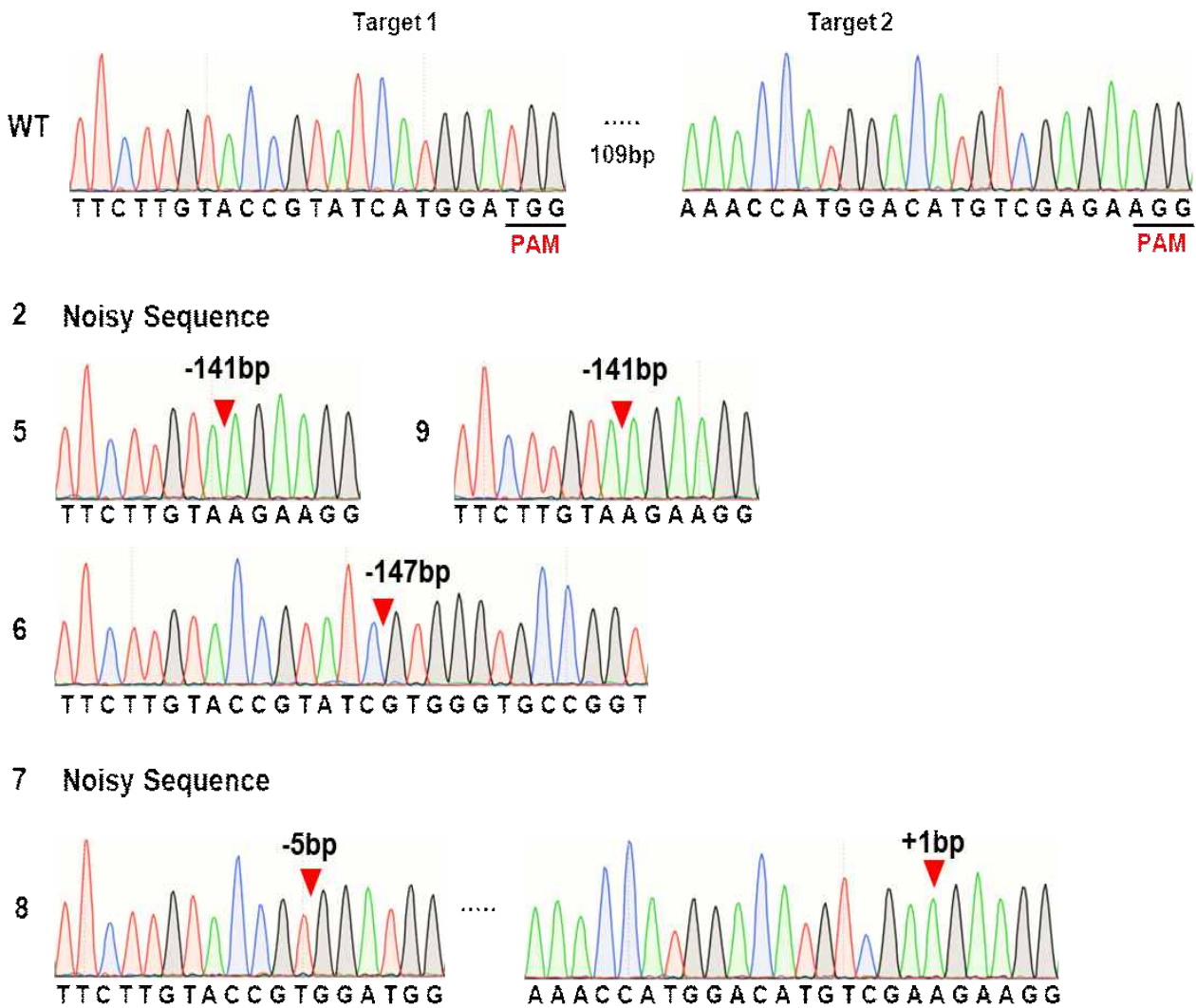


그림 57. 유전자교정 확인을 위한 염기서열 분석 - PfFAD3a 유전자의 경우 5, 6, 8번 라인에서 유전자 교정 확인됨.

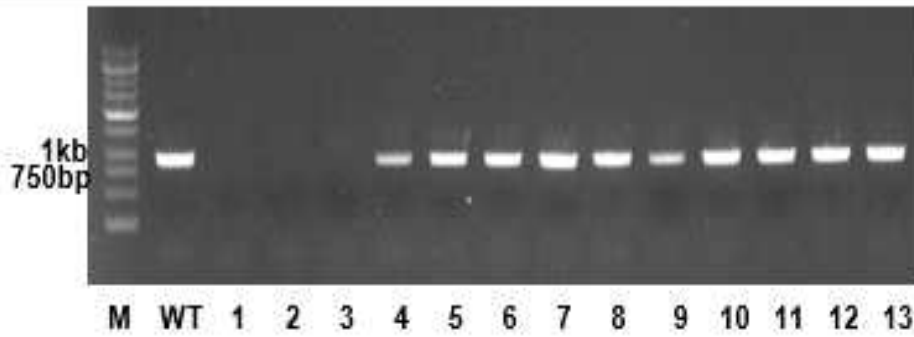


그림 58. PfFAD3b 유전자교정 확인을 위한 genomic PCR.

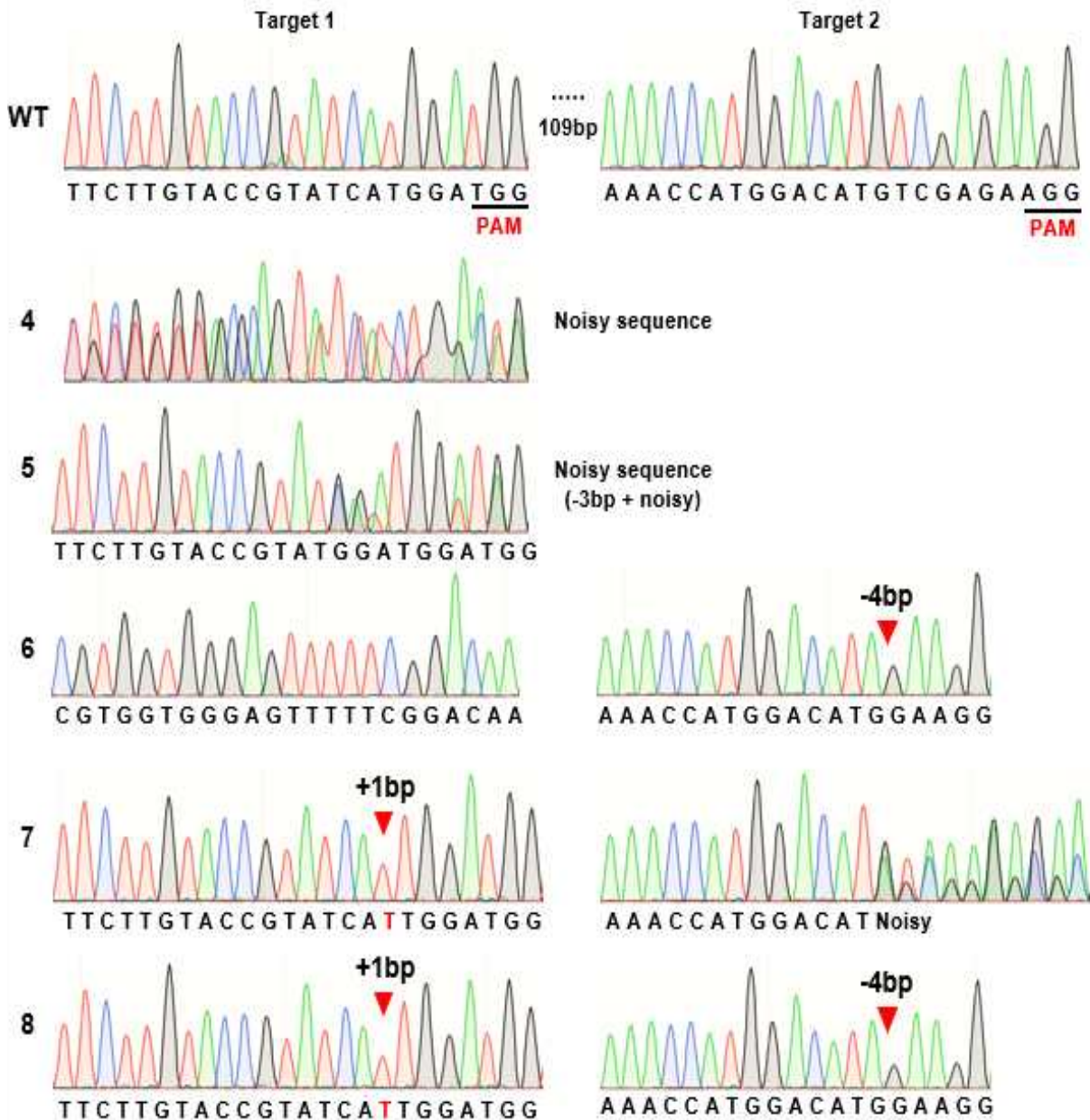


그림 59 . 유전자 교정확인을 위한 염기서열 분석 - PfFAD3b 유전자의 경우 6, 8번 라인에서 유전자 교정 확인됨.

▶ PfFAD3a와 PfFAD3b들의 교정이 확인 된 라인은 6번과 8번 라인임을 확인- T2 세대 확보를 위한 세대 진전 수행

○ 세대진전을 통한 pHEE401E-UBQ-PfFAD2-Bar, pHEE401E-UBQ-PfFAD3-Bar 유전자교정 형질전환 들깨 T2 generation 확보

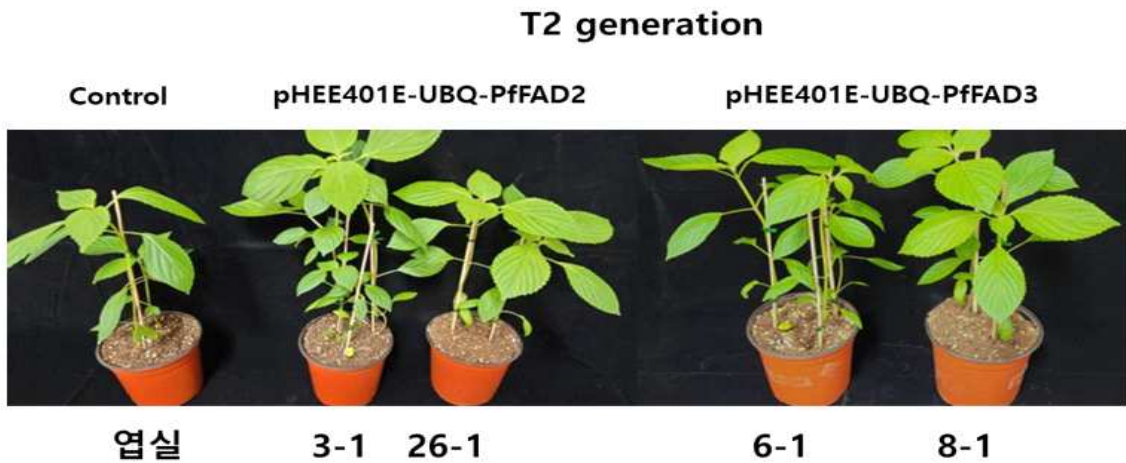


그림 60. T2 세대 pHEE401E-UBQ-PfFAD2-Bar, pHEE401E-UBQ-PfFAD3-Bar 유전자교정 형질전환 들깨 세대진전.

나. 형질전환 들깨의 지방산 성분 분석

○ T2 세대 pHEE401E-UBQ-PfFAD3-Bar 유전자교정 형질전환 들깨 활용 불포화지방산 성분 분석 -세종대 팀에서 수행

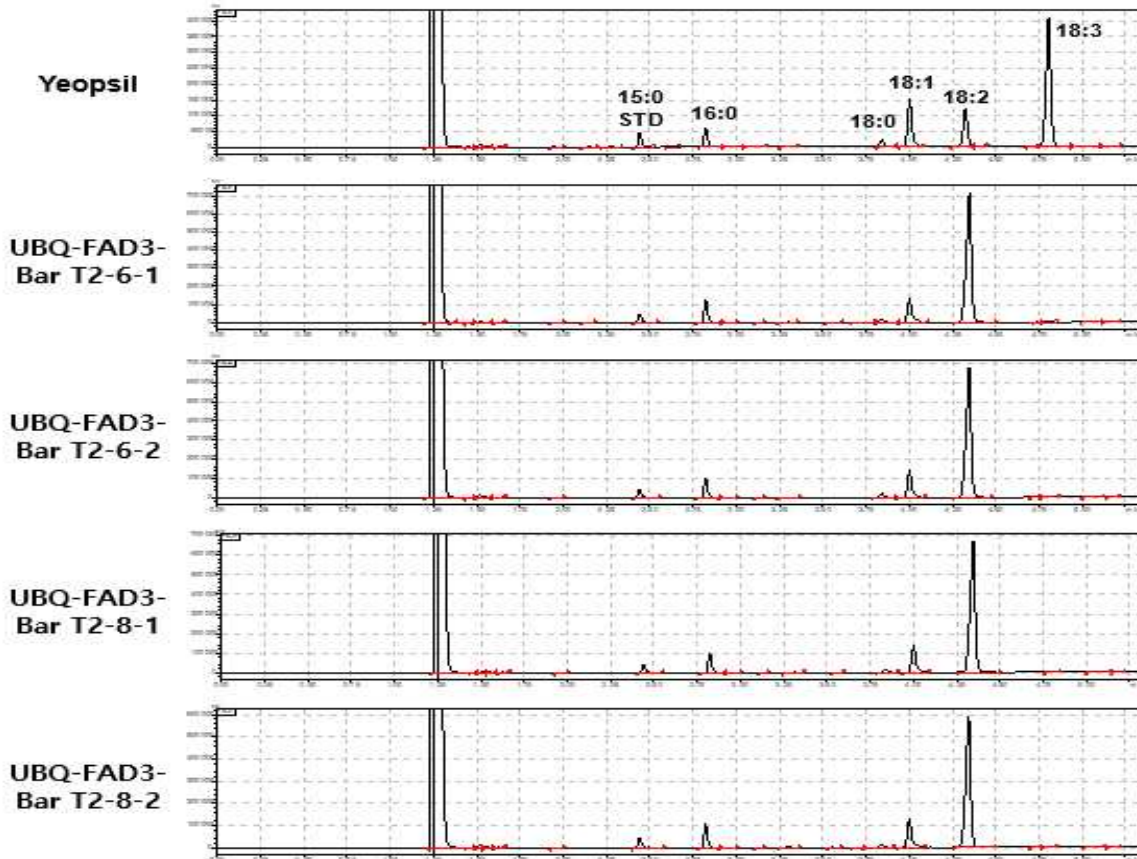


그림 61. Gas-크로마토그래피 분석을 통한 유전자교정 PfFAD3 형질전환체의 불포화지방산 성분 분석.

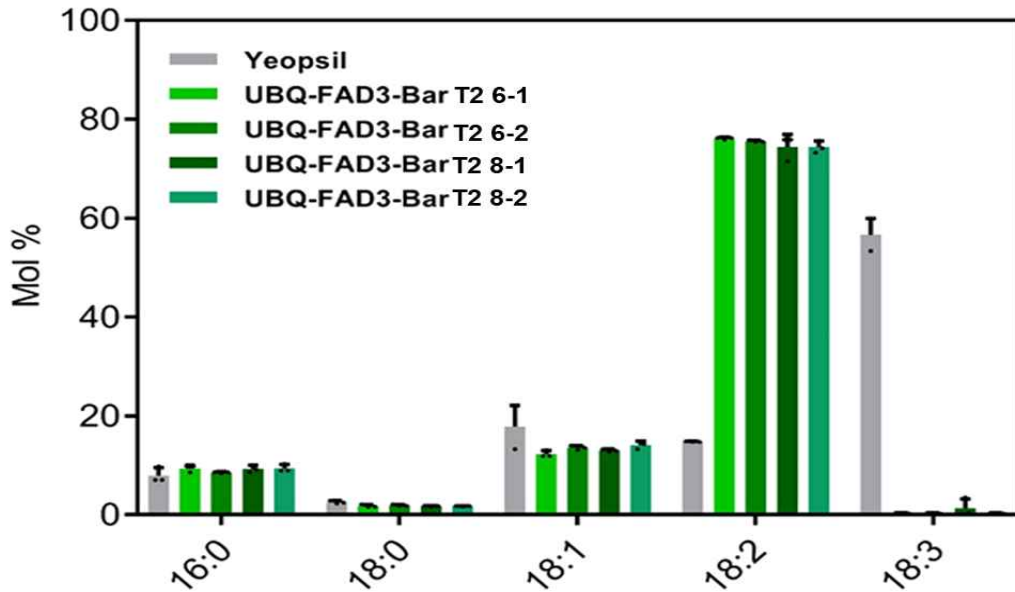


그림 62. GC 분석을 통한 유전자 교정 들깨의 불포화 지방산 성분 비교.

▶ 들깨의 FAD3 유전자를 유전자 교정 기술을 활용하여 돌연변이를 제작하였을 때 60% 수준의 알파리놀렌산(오메가3)의 함량이 거의 생산되지 않고, 리놀레산(오메가6) 함량이 15% 수준에서 80% 까지 증가된 것을 확인함

▶ 들깨의 FAD2 유전자를 유전자 교정 기술을 통해 돌연변이를 제작하는 실험의 경우 빠른 세대증식을 위해 조기개화를 유도하는 극 단일조건에서 형질전환 식물체를 재배하였는데 수확한 종자수가 너무 적어 불포화 지방산 함량 분석을 수행 하지 못하였음.

▶ 그리하여 다음세대에서 많은 종자를 수확하여 불포화 지방산 함량을 GC분석을 통해 확인하려고 함.

표 3. 유전자 교정 형질전환체 개체 확보 최종 현황-동아대학교 수행.

Construct	T0 세대	T1 세대	T2 세대
pHEE401E-UBQ-pfFAD2-Bar	13 라인 확보	5개 라인 확보 8개 라인 segregation	3, 26번 라인 editing 확인-세대진전중
pHEE401E-UBQ-mDsRED-pfFAD2	4개 라인 확보	1개 라인 확보- No editiong 3개 라인 segregation	No test
pHEE401E-UBQ-pfFAD3-Bar	10 라인	6개라인 확보 4개라인 segregation	6, 8번 개체 editing 확인- 세대진전중
pHEE401E-UBQ-pfFAD3-hyg	1 라인	segregation	No test
pHEE401E-UBQ-mDsRED-pfFAD3	1 라인	segregation	No test

<위탁기관 2 (아시아종묘)>

가. 1차년도 연구개발 결과

○ 위탁자원에 대한 재료 육성 및 계통 특성 검정

- 위탁유전자원 재배 및 계통육성
- 공시재료는 OP종으로 국내에서 많이 판매되고 있는 잎들깨의 대표적인 남천을 공시하였다.
- 기보유 및 위탁 유전자원 14계통을 특성 파악 및 모본 선발의 목적으로 육성을 실시하였다.
- 파종 : 105공 트레이에 계통 별 45주

○ 경종 개요

시험장소	공시수	파종	정식	수확	재식거리 (cm)	면적(m ²)	비고
김제연구소	14계통	2019.05.10	2019.06.20	2019.10.20~	25 × 20	990	흑색비닐



계통 육성 및 특성검정

○ 계통 특성조사

BN	파종후 개화일 수	파종후 성숙일 수	안유대비		개화기- 성숙기 일수	꽃색 1:흰 2:분홍 3:기타	앞앞면색 1:연녹 3:녹 5:진녹 7:녹자 9:자주	앞뒷면색 1:연녹 3:녹 5:진녹 7:녹자 9:자주	잎모양 1:피침형 2:심장형 3:장타원 형	잎의 모양 1:적음 2:보통 3:많음	비고
			개화 시기	성숙 시기							
1	137	156	38	38	19	1	3	3	2	3	남천
2	114	124	15	6	10	1	3	3	2	2	
3	114	131	15	13	17	1	3	3	2	2	
4	114	138	15	20	24	1	3	3	2	2	
5	120	137	21	19	17	1	4	4	2	3	
6	114	141	15	23	27	1	3	3	2	3	
7	114	141	15	23	27	1	3	3	2	3	
8	114	141	15	23	27	1	3	3	2	3	
9	110	131	11	13	21	1	3	3	2	3	
10	92	120	-7	2	28	1	3	3	2	1	
11	92	124	-7	6	32	1	3	3	2	1	
12	99	124	0	6	25	1	2	2	2	2	
13	99	120	0	2	21	1	2	2	2	2	
14	114	124	15	6	10	1	2	2	2	2	

○ 시험결과 및 금후계획

- 위탁 유전자원 및 보유 유전자원을 공시하여 개화기, 성숙기, 엽색, 형태 등을 조사한 후 계통 및 우수조합을 선발하였다.
- 선발된 계통의 경우에는 만추대성 및 기능성 종실들깨로 나누어 선발하고, 특성을 조사하여 차년도에 교배 모본으로 사용할 것이다.

○ 돌연변이 M1세대 증식

- 전년도 기능성 성분 분석을 통해 선발된 계통을 전달받아 시험포장에 정식하여 특성을 조사하고 아래와 같이 증식하여 세종대 지방산 조성 분석을 의뢰하였다.
- 남천과 M1 종자를 지베렐린에 24시간 침지 처리하여 105구 트레이에 파종하고 45일 후 시험포장에 정식하였다.
- 관수와 비배관리를 통해 동일한 환경조건을 조성하고 개화기부터 수확기까지 각 개체의 특성을 조사하여 과제 육성 목표 계통에 맞는 돌연변이체를 선발
- 지방산 조성의 평가를 통해 선발된 계통의 경우 세대 진전하여 M2 를 수확하여 차년도 재배육성을 통해 계통으로 선발하여 조합작성 및 모본으로 활용할 계획이다.



돌연변이 M1세대 증식

계통명	Line	종자량(g)	계통명	Line	종자량(g)	계통명	Line	종자량(g)
남천	C-1	17	DG3×15	-4	13	DG9×6	-12	29
	-2	30		-5	96립		-14	15
	-5	1		-6	30		-15	30
	-6	26		-7	12		-16	9
	-8	6		-8	7		-17	20
	-9	12		-9	10		-19	12
	-10	9		-12	11		-20	20
	-11	14		-13	6		-23	19
	-12	10		-14	2		-24	30
	-13	9		-15	20		25	25
	-15	6		-16	2	-27	30	
	-18	17		-17	15립	-1	30	
	-19	28		-18	30	-2	3	
	-20	0.3		-19	17	-3	30	
	-21	17		-20	0.3	-4	16	
	-22	24		-21	23	-5	7	
	-24	19		-22	5	-7	17	
	-27	20		-24	30	-8	13	
	DG1	-1		8	-25	6	-9	30
		-2		10	-26	3	-10	19
-3		10	-27	27	-11	6		
-5		10	-28	2	-12	14		
-6		7	-30	30	-13	20		
-7		3	-1	0.3	-14	4		
DG1×19	-9	8	-3	12	102×1	-15	5	
	-1	28	-4	3		-16	14	
	-2	4	-6	11		-17	8	
	-3	26	-7	2		-18	8	
	-4	24	-8	5		-19	12	
	-5	7	-9	17		-20	7	
	-6	18	-10	5		-22	14	
	-7	15	-11	3		-23	5	
	-8	12	-12	6		-24	6	
	-9	12	-13	1		-25	20	
	-10	17	-14	7	-26	8		
	-11	11	-15	8	-27	15		
	-12	16	-16	3	-28	9		
	-13	4	-17	1	-29	4		
	-14	6	-18	26	-1	17		
	-15	13	-19	10	-2	2		
	-17	18	-20	0.4	-3	10		
	-18	15	-21	6	-4	11		
	-19	16	-22	1	-5	2		
	-20	2	-23	5	-6	11		
-21	18	-24	5	-7	18			
-22	4	-25	2	-8	9			
-23	14	-27	4	-9	9			
-24	30	-1	9	-10	16			
-25	4	-2	29	-11	4			
-26	2	-3	31	-12	4			
-27	3	-4	9	-13	19			
-28	12	-5	8	-14	4			
-29	1	-7	4	-15	14			
-30	22	-8	11	-16	15			
DG3×15	-2	4	-9	30	-17	4		
	-3	25	-11	75립	-18	20		

나. 2차년도 연구개발 결과

○ 들깨 종자 파종

- 지방산 선발 계통 증식을 위한 들깨 종자 수령 및 파종
- EMS 처리종자 (2020. 04. 14처리) 4월 16일수령, 4월 20일 파종

- 파종량

	번호	처리	파종량	번호	처리	파종량	번호	처리	파종량
다유	1	DG 1-1 #2 0.3%	210립	2	DG 1-1 #2 0.5%	210립	3	DG 1-1 #2 1.0%	210립
	4	DG 1-19 #8 0.3%	210립	5	DG 1-19 #8 0.5%	210립	6	DG 1-19 #8 1.0%	210립
	7	DG 6-5 #14 0.3%	210립	8	DG 6-5 #14 0.5%	210립	9	DG 6-5 #14 1.0%	210립
남천	10	110-11 #21 0.3%	210립	11	110-11 #21 0.5%	210립	12	110-11 #21 1.0%	210립
	13	110-18 #15 0.3%	210립	14	110-18 #15 0.5%	210립	15	110-18 #15 1.0%	210립
	16	112-15 #15 0.3%	210립	17	112-15 #15 0.5%	210립	18	112-15 #15 1.0%	210립
	19	116-10 #4 0.3%	210립	20	116-10 #4 0.5%	210립	21	116-10 #4 1.0%	210립
	22	117-10 #16 0.3%	210립	23	117-10 #16 0.5%	210립	24	117-10 #16 1.0%	210립
엽실	무처리		210립	발아율이 떨어지는 계통은 추가 파종함					



204동 육묘



파종 17일 후

○ 들깨 정식

- 경종 개요

시험장소	공시수	파종	정식	수확	재식거리 (cm)	면적(㎡)	비고
김제연구소	24계통	2020.04.20	2020.05.25	2020.10.28~	25 × 20	1,320	흑색비닐

- EMS 처리종자를 파종 후 35일째 되는 날에 아시아종묘 김제 연구소 재배포장에 정식하였다.
- 이랑 폭을 90cm로 하고 주간 거리를 20cm로 하여 400평에 5000주를 정식하였다.
(번호당 200주)
- 1주씩 개체별 채종을 하여 선발



7단지 재배포장



정식 5월 25일



정식 16일 후 (6월 11일)



정식 40일 후 (7월 5일)

○ 계통 특성조사

- 2020년 6월 11일부터 계통의 특성을 조사하였다.
- 엽색의 농도 차이 및 자색의 발현양상을 개체별로 조사하였다.
- 계통 내에서 돌연변이 출현 비율을 조사



○ 시험결과 및 금후계획

- P20-1 ~ P20-24까지 각각의 주별 특성을 조사하였다. 처리 농도별로 0.3%는 돌연변이율이 약 15~20% 정도 발생하였으며 0.5%에서는 30~35% 정도 1.0%에서는 60~70% 정도 표현형 변이가 발생하였다.
- 위탁 유전자원 및 보유 유전자원을 공시하여 개화기, 성숙기, 엽색, 형태 등을 조사한 후 계통 및 우수조합을 선발하였다.
- 선발된 계통의 경우에는 유지성분 분석을 통해 선발하고, 특성을 조사하여 차년도에 증식을 할 것이다
- 증식 및 정선된 종자의 경우 세종대 전달하여 분석
- 각 개체별 표현형 내 돌연변이 출현을 조사

2020년 들깨 수확량

파종일자: 200420

정식일자: 200525

수확일자: 201028

작물명	계통명	계통명				계통명				계통명				계통명						
		종자량(g)	변이발생	업색변이	업색변이	종자량(g)	변이발생	업색변이	업색변이	계통명	종자량(g)	변이발생	업색변이	업색변이	계통명	종자량(g)	변이발생	업색변이	업색변이	
들깨	P20-1	-1	0.7			P20-2	-1	5.9	○		P20-3	-1	5.5			P20-4	-1	4.8		
		-2	4.8	○			-2	3.4				-2	2.9				-2	5.5	○	
		-3	7.9				-3	1.0				-3	2.8	○			-3	8.4		
		-4	2.7				-4	5.0				-4	1.1	○			-4	2.8		
		-5	0.7	○			-5	5.0				-5	3.3	○			-5	9.4		
		-6	2.4				-6	3.7	○			-6	6.0				-6	5.8		
		-7	2.3				-7	3.6				-7	2.8				-7	4.0		
		-8	2.1				-8	7.8				-8	4.8	○			-8	10.2		
		-9	7.6				-9	2.1				-9	4.4				-9	7.9		
		-10	3.3	○			-10	5.2	○			-10	1.8	○			-10	3.0		
		-11	3.7				-11	9.8				-11	0.3				-11	0.3	○	
		-12	0.8				-12	3.3	○			-12	2.4	○			-12	4.4		
		-13	3.1				-13	2.0				-13	12.7				-13	1.0		
		-14	1.3	○			-14	8.9				-14	5.8	○			-14	5.0		
		-15	2.9				-15	4.7				-15	5.8				-15	0.6		
		-16	2.4				-16	5.8	○			-16	4.3	○			-16	4.8		
		-17	4.4				-17	7.0				-17	7.0				-17	5.2		
		-18	10.2				-18	2.9				-18	7.6				-18	1.9		
		-19	5.1				-19	1.2				-19	2.9	○			-19	9.1		
		-20	8.8				-20	6.1	○			-20	4.2				-20	8.5	○	
		-21	8.1				-21	2.0				-21	2.2				-21	8.2		
		-22	8.8	○			-22	7.3				-22	3.5				-22	5.7		
		-23	0.4				-23	4.5				-23	1.2				-23	8.8		
		-24	10.0				-24	3.2	○			-24	1.1	○			-24	9.0		
		-25	2.3				-25	6.1				-25	5.0				-25	9.2		
		-26	8.3				-26	7.7				-26	4.8				-26	7.9		
		-27	5.9	○			-27	2.1	○			-27	2.9				-27	3.4		
		-28	1.1				-28	1.4				-28	0.1	○			-28	4.8		
		-29	10.8				-29	4.4				-29	7.7				-29	9.5		
		-30	1.4				-30	3.8				-30	3.9				-30	6.6	○	
		-31	0.5				-31	6.6				-31	7.8	○			-31	2.4		
		-32	14.1	○			-32	2.5	○			-32	3.1				-32	3.3		
		-33	2.9				-33	3.1				-33	0.2	○			-33	6.2		
		-34	5.0				-34	1.2				-34	3.8				-34	6.3		
		-35	3.7				-35	0.5				-35	0.2				-35	4.4		
		-36	6.6				-36	2.7	○			-36	6.1				-36	0.9	○	
		-37	5.4	○			-37	9.9				-37	0.4	○			-37	1.0		
		-38	5.6				-38	0.1				-38	0.1				-38	3.2		
		-39	5.2				-39	1.1				-39	0.1				-39	3.5		
		-40	2.0				-40	2.8	○			-40	0.8				-40	5.4		
들깨	P20-1	-41	2.8			P20-2	-41	0.4			P20-3	-41	2.4	○		P20-4	-41	3.4		
		-42	5.9				-42	0.5				-42	1.6				-42	4.7		
		-43	9.2	○			-43	3.0				-43	0.7				-43	1.3	○	
		-44	11.4				-44	1.4				-44	1.0				-44	4.8		
		-45	2.5				-45	1.5	○			-45	1.3	○			-45	3.9		
		-46	0.8				-46	3.3				-46	0.3				-46	3.8		
		-47	3.6				-47	2.4				-47	0.1				-47	4.2		
		-48	16립	○			-48	2.1				-48	5.8				-48	3.9		
		-49	4.9				-49	1.5	○			-49	1.9	○			-49	5.9		
		-50	3.7				-50	1.3				-50	4.6				-50	3.5		
		-51	2.2				-51	1.5				-51	1.2				-51	5.4	○	
		-52	1.1				-52	0.7	○			-52	1.9	○			-52	5.8		
		-53	2.2				-53	1.4				-53	1.3	○			-53	2.6		
		-54	4.0	○			-54	1.3				-54	0.7	○			-54	4.1		
		-55	1.3				-55	1.3	○			-55	1.0				-55	0.8		
		-56	0.9				-56	1.6				-56	0.4				-56	2.9		
		-57	4.0				-57	2.6				-57	1.2				-57	3.3		
		-58	2.3				-58	1.9				-58	1.4	○			-58	1.6		
		-59	2.5	○			-59	1.4				-59	0.5				-59	1.6	○	
		-60	3.2				-60	2.4				-60	1.9				-60	1.5		
		-61	0.5				-61	5.7	○			-61	1.4	○			-61	2.4		
		-62	3.3				-62	1.3				-62	2.3				-62	6.8		
		-63	2.5				-63	2.0				-63	14립				-63	5.6		
		-64	2.4				-64	1.6				-64	1.1	○			-64	1.7		
		-65	0.4	○			-65	0.4				-65	2.4				-65	4.3		
		-66	10.7				-66	1.8				-66	0.2				-66	2.6		
		-67	1.7				-67	2.8	○			-67	2.1	○			-67	2.4		
		-68	0.7				-68	1.7				-68	2.0				-68	1.6		
		-69	2.2				-69	1.2				-69	1.2				-69	4.8		
		-70	2.9				-70	3.2				-70	4.9	○			-70	3.4	○	
		-71	2.5				-71	1.9				-71	0.9				-71	3.3		
		-72	4.0				-72	2.0				-72	0.1				-72	5.0		

다. 3차년도 들깨 종자 파종 및 돌연변이 라인 증식

○ EMS 처리 들깨 돌연변이 M2 종자 파종 및 증식

- 세대진전 후 지방산 분석을 하기 위해 각 계통별로 김제에 파종하였고 키우는 중임. 돌연변이 및 야생형 총 16계통 총 1,350라인을 김제 포장에 2021년 5월에 파종하여 11월에 수확한 후 지방산 분석을 할 예정임.

표. 아시아종묘 김제연구소에서 재배한 총 16계통 1,350 라인들을 나타낸 표

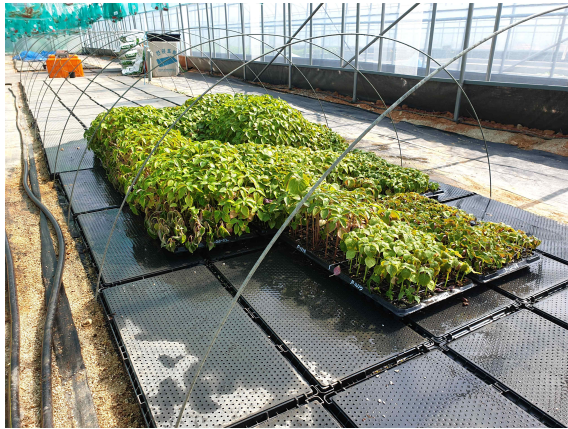
계통 번호	계통명	지방산특성	들깨품종	종자 량	모본계통	목적	개체수	특성
1	P20-1-7	18:2(40%)	다유(EMS돌연변이)	2.29g	DG1-1 #2 0.3% EMS_#7	세대진전 분석	120	고리놀레산(다유)
2	P20-2-122	18:2 (41%)	다유(EMS돌연변이)	2.4g	DG1-1#2 0.5% EMS_#122	세대진전 분석	120	고리놀레산(다유)
3	P20-3-36	18:1 (22.2%)	다유(EMS돌연변이)	6.1g	DG1-1 #2 1% EMS-#36	세대진전 분석	120	고올레인산(다유)
4	P20-07-32	18:3(72.4%)	다유(EMS돌연변이)	2.9g	DG6-5 #14 0.3%EMS-#32	세대진전 분석	120	고오메가3 (다유)
5	P20-8-23	18:3 (72.2%)	다유(EMS돌연변이)	4.9g	DG6-5 #14 0.5% EMS-#23	세대진전 분석	120	고오메가4 (다유)
6	P20-11-09	18:2 (33%)	남천(EMS돌연변이)	1.8g	110-11 #21 0.5%EMS_09	세대진전 분석	120	고리놀레산(남천)
7	P20-14-56	18:2 (35.7%)	남천(EMS돌연변이)	1.1g	110-18 #15 0.5%EMS_56	세대진전 분석	120	고리놀레산(남천)
8	P20-22-04	18:1 (32.3%)	남천(EMS돌연변이)	0.4g	117-10 #16 0.3%EMS_04	세대진전 분석	120	고올레인산(남천)
9	P20-22-77	18:1(34.1%)	남천(EMS돌연변이)	0.8g	117-10 #16 0.3%EMS_77	세대진전 분석	120	고올레인산(남천)
10	DG1-19 #8	18:2 (약 40%)	다유 (감마돌연변이)	25g	DM14	품종개발	50	고리놀레산(다유)
11	DG6-5 #27	18:3 (약 70%)	다유 (감마돌연변이)	7g	DM84	품종개발	50	고오메가3 (다유)
12	110-18#15	18:2 (약35%)	남천 (감마돌연변이)	25g	NM-89	품종개발	50	고리놀레산(남천)
13	117-10 #16	18:1 (약 30%)	남천 (감마돌연변이)	74g	NM180	품종개발	50	고올레인산(남천)
14	엽실 (야생형)		엽실 (야생형)			형질전환	50	
15	다유(야생형)		다유(야생형)			대조구	10	
16	남천 (야생형)		남천 (야생형)			대조구	10	
총라인수							1350	

○ 들깨 종자파종

- 지방산 선발 계통 증식을 위한 들깨 종자 수령 및 파종
- 2020년 EMS 처리하여 각 개체별로 수확한 종자를 표현형적 특성과 지방산 분석을 통해 선발된 개체의 세대진전과 증식을 위해 4월 09일 파종하였다

표. 들깨 종자 파종량

파종번호	계통명	들깨품종	종자량(g)	목적	필요개체수	특성
P21-01	P20-1-7	다유	2.29	세대진전분석	120	고리놀레산
P21-02	P20-2-122	다유	2.4	세대진전분석	120	고리놀레산
P21-03	P20-3-36	다유	6.1	세대진전분석	120	고올레인산
P21-04	P20-7-32	다유	2.9	세대진전분석	120	고오메가3
P21-05	P20-8-23	다유	4.9	세대진전분석	120	고오메가4
P21-06	P20-11-9	남천	1.8	세대진전분석	120	고리놀레산
P21-07	P20-14-56	남천	1.1	세대진전분석	120	고리놀레산
P21-08	P20-22-4	남천	0.4	세대진전분석	120	고올레인산
P21-09	P20-22-77	남천	0.8	세대진전분석	120	고올레인산
P21-10	DG1-19 #8	다유	25.0	품종개발	50	고리놀레산
P21-11	DG6-5 #27	다유	7.0	품종개발	50	고오메가3
P21-12	110-18 #15	남천	25.0	품종개발	50	고리놀레산
P21-13	117-10 #16	남천	74.0	품종개발	50	고올레인산
P21-14	엽실	엽실	5.0	형질전환	50	증식용
P21-15	다유	다유	2.0	대조구	10	
P21-16	남천	남천	2.0	대조구	10	
P21-17	17-078		1.5		50	
P21-18	17-078		1.5		50	
P21-19	17-080		1.5		50	
계			167.19		1,500	



204동 육묘 - 파종 50일 후 개체

○ 들깨 정식

- 경종개요

시험장소	공시수	파종	정식	수확	재식거리 (cm)	면적(m ²)	비고
김제연구소	19계통	2021.04.09	2020.06.11	2020.10.28~	25 × 20	1,320	흑색비닐

- 1차 EMS처리 후 선발된 종자를 육묘상에 파종 후 63일째 되는 날에 아시아종묘 김제 연구소 재배포장에 정식하였다. 파종 후 재배포장의 기상여건이 맞지 않아 정식이 늦어짐.
- 이랑 폭을 90cm로 하고 주간 거리를 20cm로 하여 400평에 1,500주를 정식하였다
- 추후 1주씩 개체별 채종하여 선발



9단지 재배포장 정식(2021년 6월 11일)



계통별, 계체별 수확 및 건조 후 탈종작업

- P21-01~P21-19 까지 각각의 주별 특성을 조사하였다. 표현형의 돌연변이 발생 빈도 및 만추대 여부를 조사하였다.
- 각 계통을 세종대에 전달하여 지방 성분 분석을 통해 2차 선별하여 차년도 증식에정
- 일부 만추계통(P17, P18, P19)의 경우 개화 및 종자가 결실을 맺기 전에 서리를 맞아 종자 생산에 차질을 빚게 되었으며 차후 만추계통의 경우 하우스 재배가 필요하다고 생각된다.
- 잦은 강수량과 갑작스러운 기온변화로 인해 식물체의 생육환경이 매우 불량해졌으며 채종량이 현저히 감소하였다.

2021년들깨계통증식용종자생산량

계통번호 개체번호	중량(g)															
	1번	2번	3번	4번	5번	6번	7번	8번	9번	10번	11번	12번	13번	14번	15번	16번
1	14	13	19	11	20	20	11	x	x	10	0.19	12	4	9	22	29
2	17	20	10	14	13	5	11	x	x	30	1	11	6	17	1	13
3	23	20	20	13	12	10	14	x	x	24	2	14	1	25	23	15
4	21	25	15	12	13	15	13	x	x	6	2	6	6	9	19	7
5	21	39	19	3	14	16	17	x	x	18	1	9	4	20	16	7
6	20	26	22	11	19	12	5	x	x	22	2	6	7	13	x	6
7	16	16	15	5	22	13	x	x	x	25	3	6	1	16	x	5
8	21	3	23	5	7	5	9	x	x	20	0.18	4	5	13	x	13
9	30	19	20	10	18	23	17	x	x	31	4	6	4	13	6	5
10	21	21	5	12	9	18	5	x	x	20	8	8	4	15	26	7
11	4	20	28	14	20	19	21	x	x	19	5	3	3	17	9	13
12	20	21	19	12	9	13	7	x	3	19	6	7	1	11	12	12
13	21	20	23	11	16	12	7	x	x	7	3	8	7	10	12	10
14	16	28	22	11	9	18	7	x	x	13	7	7	10	9	16	10
15	21	19	21	5	17	7	11	x	x	10	2	6	3	19	27	7
16	20	18	21	15	10	13	10	x	6	33	5	6	5	13	19	8
17	20	21	15	9	3	18	1	1	x	25	2	3	5	17	18	4
18	22	19	14	9	9	16	12	x	x	13	5	9	2	10	28	5
19	24	20	12	6	14	14	5	x	x	30	x	8	1	15	27	7
20	22	16	20	4	12	12	11	x	5	14	7	5	5	12	15	4
21	21	14	x	10	13	9	2	x	x	8	1	7	x	16	26	6
22	11	22	13	1	12	15	5	x	x	11	2	12	7	16	31	11
23	20	14	x	9	7	10	10	2	x	20	3	7	6	14	19	7
24	20	19	23	12	8	20	4	x	x	7	3	5	5	10	26	17
25	20	16	x	9	14	13	3	x	x	31	25	12	5	21		5
26	24	7	x	7	13	11	4	0.25	x	5	4	5	7	15		4
27	2	7	x	9	11	9	6	x	x	23	6	15	2	10		9
28	21	20	x	9	5	14	5	1	x	28	2	14	14	14		3
29	23	22	x	1	9	9	4	1	x	35	5	16	14	10		5
30	20	19	x	5	11	19	4	x	x	34	6	10	3	13		14
31	15	15	x	8	8	17	11	x	x	8	3	7		15		
32	16	13	x	4	15	16	7	x	x	9		12		9		
33	15	7	23	5	11	11	14	x	x	17		8		16		
34	21	25	11	11	7	17	6	x	x			10		6		
35	8	16	21	1	7	16	8	4	x							
36	22	20	22	11	10	20	11									
37	20	23	12	3	17	11	5									
38	21	20	21	10	10	13	18									
39	9	16	13	11	12	19	7									
40	25	24	10	7	17	19	12									
41	20	17	17	9	6	13	3									
42	18	20	20	8	24	17	6									
43	17	29	19	6	11	12	11									
44	14	15	19	29	16	17	8									
45	11	1	31	8	10	6	18									
46	21	19	9	3	9	22	8									
47	18	20	20	9	12	21	4									
48	20	22	11	7	14	13	3									
49	16	4	16	8	7	17	5									
50	20	16	24	8	7	14	4									
51	20	11	18	14	18	17	13									
52	20	19	16	7	13	16	7									
53	2	19	8	10	18	15	7									
54	16	24	21	8	18	19	5									
55	23	11	22	10	4	19	12									
56	6	20	19	6	19	20	7									
57	21	22	19	6	19	11	12									
58	21	15	27	4	13	17	22									
59	19	15	20	7	13	12	x									
60	22	12	10	3	11	18	9									

61	0.01	17	18	10	12	18	18										
62	22	21	27	4	14	27	8										
63		35	22	5	15	20	11										
64			25	10		19	4										
65			18	9		23	3										
66			22	5		25	28										
67			23				16										
68			28				8										
69			18														
70			21														
71			34														
72			14														

라. 4차년도 우수형질 선발 들깨 생산 유지성분 분석

○ 들깨 파종 및 시험재배

- 지방산 선발 계통 증식을 위한 들깨 종자 수령 및 파종
- EMS 처리종자 수확(2021년) 및 선발된 개체의 종자를 2022년 4월 18일 파종

- 파종량

파종번호	계통명	들깨 품종	종자량(주)	목적	특성
P22-01	DG6-5	#27-30	전량 파종	우수품종선발	고오메가3
P22-02	DG6-5	#27-7			
P22-03	DG6-5	#27-24			
P22-04	DG1-19	#8-26			고리놀렌산(다유)
P22-05	DG1-19	#8-1			
P22-06	DG1-19	#8-20			
P22-07	110-18	#15-6			고리놀렌산(남천)
P22-08	110-18	#15-19			
P22-09	110-18	#15-26			
P22-10	3-36			유지성분분석	
P22-11	5-23				
P22-12	6-110				
P22-13	18-93				
P22-14	22-77				
P22-15	24-91				
P22-16	남천		200	대조구	
P22-17	다유		200	대조구	
P22-18	P060		200	증식	
P22-19	P028		200	증식	
P22-20	P027		200	증식	
계					

○ 들깨 재배포장 정식

- 경종개요

시험장소	공시수	파종	정식	수확	재식거리 (cm)	면적(m ²)	비고
김제연구소	20계통	2022.04.18	2022.05.24	2022.11.10~	25 × 20	1,320	흑색비닐

- 이미 선발된 계통 중 기능성이 높은 계통 위주로 육묘상에 파종 후 45일째 되는 날에 아시아종묘 김제연구소 재배포장에 정식하였다. 파종 후 발아율이 저조하거나 상태가 좋지 않은 모는 배제하고 필요 수량만큼 추가로 직파하였다.

- 이랑 폭을 90cm로 하고 주간 거리를 20cm로 하여 400평에 1,500주를 정식하였다
- 추후 선발된 계통별로 채종하여 유지성분을 분석을 준비하였다.



5월 24일 정식 및 직파



6단지 재배포장 정식 직후

○ 들깨 재배 작황

- 4월 말 포장에 퇴비 및 비료 투입 후 저설관수 설치
- 육묘 중 고사 및 발아불량 계통의 경우 정식 후 포장에 직파
- 정식 후 살균제 및 살충제 2회 살포 제초작업 4회 실시
- 동일한 조합을 다량 정식 함으로써 11월 생산시 유지성분 분석 시행
- 우수한 선발 조합의 경우 품종등록을 세종대와 협의 후 진행 예정
- 20조합 중 DG6-5에서 이형주가 5%이상 관찰됨
- 종자 손실을 막기 위해 9월 중순 새가림망 설치



7월 20일 포장



8월 30일 포장



재배 특성 조사 및 개화시기 조사

22년 들깨 종자 생산량

종자 번호	계통명	계통 No	종자량 (g)	종자 번호	계통명	계통 No	종자량 (g)
22-1	DG6-5		22	22-11	5-23		890
22-2	DG6-5		770	22-12	6-110		710
22-3	DG6-5		720	22-13	18-93		700
22-4	DG1-19		715	22-14	22-77		740
22-5	DG1-19		710	22-15	24-91		390
22-6	DG1-19		1,170	22-16	남천		1,060
22-7	110-18		1,030	22-17	다유		960
22-8	110-18		1,310	22-18	P060		1,000
22-9	110-18		1,010	22-19	P028		1,000
22-10	3-36		500	22-20	P027		1,000

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

○ 주관연구기관(세종대학교)

- **FAD2 유전자교정 들깨 개발:** FAD2 유전자에 stop codon 및 아미노산 치환 변이체 두종 확인.
- **고 올레산 (18:1) 돌연변이 남천 들깨 개발 :** 남천 112-15 #15, 116-10 #14, 117-10 #16 3종의 감마선 돌연변이 라인에 EMS 처리한 M1 세대 총 1,220 개체의 종자 지방산을 분석하여 올레산 (18:1)을 최대 36% 까지 생산하는 계통을 선발함.
- **고 리놀레산 (18:2) 돌연변이 다유 들깨 및 그 선발 마커 개발:** 감마선 돌연변이 3세대를 거쳐 종자에서 리놀레산 (18:2)을 40%생산하는 SJDY-1-19를 개발하고 그 원인이 FAD3b 유전자 변이임을 규명하고 선발 분자PCR 마커를 개발함.
- **고 리놀레산 (18:2) 돌연변이 남천 들깨 및 그 선발 마커 개발:** 감마선 돌연변이 3세대를 거쳐 종자에서 리놀레산 (18:2)을 30%생산하는 SJNC-110-18를 개발하고 그 원인이 FAD3a 유전자 변이임을 규명하고 선발 PCR-RFLP 분자마커를 개발함.
- **고 리놀렌산 (18:3) 돌연변이 다유 들깨 및 그 선발 마커 개발:** 감마선 돌연변이 3세대를 거쳐 종자에서 알파-리놀렌산(18:3)을 67%생산하는 SJDY-6-5를 개발하고 유전자 게놈 서열분석을 통해 총 159개의 유전자 변이를 확인함.
- **들깨 FAD3 기능 규명:** 들깨 게놈 분석을 통해 다중 불포화지방산 합성을 조절하는 들깨 FAD3a와 FAD3b 유전자를 발굴하고 애기장대 fad3-2 돌연변이에 도입하여 FAD3 기능을 규명함.

○ 참여기관 1 (동아대학교)

- **들깨의 FAD2 유전자교정 들깨 개발:** 고함량의 올레산 생산 검증 예정
- **들깨의 FAD3 유전자교정 들깨 개발 및 고함량 (84%)의 리놀레산 생산 들깨 품종개발**

○ 참여기관 2 (아시아종묘)

- P21-01~P21-19 까지 각각의 주별 특성을 분석. 표현형의 돌연변이 발생 빈도 및 만추대성 여부를 분석.
- 각 계통을 세종대에 전달하여 지방 성분 분석을 통해 2차 선발하여 차년도 증식예정.

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

○ 주관연구기관(세종대학교)

- 들깨 품종 남천과 다유의 기능성 지방산인 올레산 (18:1), 리놀레산(18:2), 알파-리놀렌산(18:3)이 각각 증진된 감마선 돌연변이라인에 2차로 EMS 화학적 돌연변이 처리를 한 EMS 돌연변이 M1 세대 총 3,287 라인을 재배하여 종자를 수확 후, 종자 지방산 조성을 가스크로마토그래피로 분석함.
- 올레산, 리놀렌산, 알파-리놀레산이 증진된 라인을 고정하기 위해 총 1,080라인을 재배하여 종자의 지방산 분석을 수행함.

< 정량적 연구개발성과표 >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도	1단계 (2019~2022)	n단계 (YYYY~YYYY)	계	가중치 (%)
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	목표(단계별)				
		실적(누적)			
	실적(누적)				
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	목표(단계별)				
		실적(누적)			
	실적(누적)				
계					

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/ 비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Integration of Abscisic Acid Signaling with Other Signaling Pathways in Plant Stress Responses and Development	Plants	Manu Kumar	8	스위스	MDPI	SCIE	2019.12	2223-7747	50
2	Variant castor lysophosphatidic acid acyltransferases acylate ricinoleic acid in seed oil	Industrial Crops and Products	김현욱	150	미국	ELSEVIER	SCIE	2020.08	0926-6699	30
3	PCR-Base InDel Marker Associated with Powdery Mildew-Resistant MR-1	Agronomy	최유리	10(9)	스위스	MDPI	SCIE	2020.09	2223-7747	30
4	CAX3 (cation/proton exchanger) mediates a Cd tolerance by decreasing ROS through Ca elevation in Arabidopsis	Plant Molecular Biology	Mahsa Modareszadeh	105	네덜란드	SPRINGER	SCIE	2020.09	0167-4412	50
5	Mechanism for Higher Tolerance to and Lower Accumulation of Arsenite in NtCyc07-Overexpressing Tobacco	Plants-basel	DongGwan Kim	9(1480)	스위스	MDPI	SCIE	2020.11	2223-7747	50
6	Transcriptome Analysis and Identification of Lipid Genes in Physaria lindheimeri, a Genetic Resource for Hydroxy Fatty Acids in Seed Oil	International Journal of Molecular Sciences	Grace Chen	22(2)	스위스	MDPI	SCIE	2021.01	1422-0067	10
7	Decreases in arsenic accumulation by the plasma membrane intrinsic protein PIP2;2 in Arabidopsis and yeast	Environmental Pollution	Mahsa Modareszadeh	275	영국	ELSEVIER SCI LTD	SCIE	2021.02	0269-7491	100
8	Chloroplast Localized FIBRILLIN11 Is Involved in the Osmotic Stress Response during Arabidopsis Seed Germination	Biology	최유리	19(5)	스위스	MDPI	SCIE	2021.06	2079-7737	10
9	C-to-G Base Editing Induces Enhancement of Oleic Acid Production by Generating Novel Alleles of FATTY ACID DESATURASE2 in Plant	Frontiers in Plant Science	박민음	12	스위스	Frontiers	SCIE	2021.10	1664-462X	10
10	Construction of Multiple Guide RNAs in CRISPR/Cas9 Vector Using Stepwise or Simultaneous Golden Gate Cloning: Case Study for Targeting the FAD2 and FATB Multigene in Soybean	Plants	김원녕	10(11)	스위스	MDPI	SCIE	2021.11	2223-7747	30
11	Cadmium enhances root hair elongation through reactive oxygen species in Arabidopsis	Environmental and Experimental Botany	Ramin Bahmani	196	영국	ELSEVIER SCIENCE LTD	SCIE	2022.02	0098-8472	100
12	The mysterious role of fibrillin in plastid metabolism: current advances in understanding	Journal of Experimental Botany	김인영	73,9	영국	Oxford University Press	SCIE	2022.04	0022-0957	10
13	The seed-specific transcription factor DPBF2 modulates the fatty acid composition in seeds	Plant Direct	김인영	6:e395	영국	John Wiley and Sons Inc.	SCIE	2022.03	2475-4455	10

14	Fibrillin2 in chloroplast plastoglobules participates in photoprotection and jasmonate-induced senescence	Plant Physiology	김인영	189:33	미국	ASPB	SCIE	2022.06	0032-0889	10
15	Applications and Prospects of Genome Editing in Plant Fatty Acid and Triacylglycerol Biosynthesis	Frontiers in Plant Science	박민음	10	스위스	Frontiers	SCIE	2022.08	1664-462X	10
16	Methylcytosine-binding protein VIM1 decreases As(III) accumulation by epigenetic downregulation of the As(III) importer NIP3;1 in Arabidopsis	Journal of Hazardous Materials	Ramin Bahmani	441	네덜란드	ELSEVIER	SCIE	2022.09	0304-3894	100

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	Cadmium enhances root hair elongation by inducing ROS and modulating gene expressions involved in root hair elongation in Arabidopsis	황성빈	2019.10.	충남부여	대한민국
2	CAX3 (cation/proton exchanger) mediates a Cd tolerance by decreasing ROS through Ca elevation in Arabidopsis	황성빈	2019.10.	충남부여	대한민국
3	Coexpression of four castor acyltransferases with hydroxylase 12 to increase	김현욱	2019.11.	Canberra, Australia	호주
4	Loss-of-function mutation in FIBRILLIN2 decreases high-light dependent photoprotection and accelerates jasmonate dependent senescence in Arabidopsis	김현욱	2019.11.	Canberra, Australia	호주
5	2020 KSBS International Conference: Comparison of fatty acid biosynthesis 2 genes in diploid and tetraploid perilla	이혜지 김현욱	2020.08.	온라인/비대면	대한민국
6	International Conference KSMCB 2020: Isolation and functional characterization of fatty acid biosynthesis 2 genes in diploid and tetraploid perilla	이혜지, 김현욱	2020:10.	온라인/비대면	대한민국
7	International Conference KSMCB 2020: Cytosine Base Editing of FAD2 Gene Enhance Oleic Acid in Arabidopsis	박민음 김현욱	2020.10.	온라인/비대면	대한민국
8	2020년 한국식물생명공학회 정기학술발표회: C-to G base editing induces enhancement of oleic acid production by generating novel alleles of FATTY ACID DESATURASE 2 in plantss	박민음, 김현욱	2020.10.	온라인/비대면	대한민국
9	CAX3 (cation/proton exchanger) enhances salt tolerance by reducing Na accumulation through increasing Ca level in Arabidopsis	황성빈	2020.11.	곤지암리조트	대한민국
10	HIPP24 enhances arsenite tolerance and decrease oxidative stress in Arabidopsis	황성빈	2020.11.	곤지암리조트	대한민국
11	2021년 한국육종학회 공동학술대회: Modification of seed oil biosynthesis by base editing in DGAT1 gene of Arabidopsis thaliana	김원녕, 김현욱	2021.07.	제주 라마다 호텔	대한민국
12	2021 한국식물생명공학회 정기 학술발표회: Discovery of LEC2-regulated transcription factors involved in triacylglycerol biosynthesis	도형주, 김현욱	2021.08.	제주 라마다 호텔	대한민국
13	Improved method for Cucumber (Cucumis sativus L.) transformation and current progresses in generation of Powdery mildew resistant cucumber using CRISP	황성빈	2021.08.	제주 라마다 호텔	대한민국
14	2021 한국식물생명공학회 정기 학술발표회: Cytosine base editing induces high oleic acid production by generating novel alleles of FATTY ACID DESATURASE2 in plants	박민음, 김현욱	2021.08.	제주 라마다 호텔	대한민국
15	2021 한국식물학회 정기학술대회: The DPBF2 transcription factor regulates fatty acid composition during seed maturation	김인영, 김현욱	2021.11.	곤지암리조트	대한민국
16	2021 한국식물학회 정기학술대회: Identification and functional characterization of fatty acid biosynthesis 2 genes in perilla	최현아, 김현욱	2021.11.	곤지암리조트	대한민국
17	2022 KSBMB 제12회 동계학술대회: Identification and characterization of FATTY ACID BIOSYNTHESIS 2 genes	최현아, 김현욱	2022.01.	비발디파크	대한민국
18	2022 한국육종학회: Molecular characterization of high linoleic acid mutant and FAD3 genes in perilla	최현아, 김현욱	2022.06.	제주 라마다 호텔	대한민국
19	2022 한국육종학회: Functions of ARR21 and ARR13 transcription factors in seed fatty acid synthesis	최유리, 김현욱	2022.06.	제주 라마다 호텔	대한민국
20	Methylcytosine-binding protein VIM1 reduces As(III) accumulation by epigenetic downregulation of the As(III) importer NIP3;1 in Arabidopsis	황성빈	2022.11.	부산농심호텔	대한민국

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	가이드 RNA 및 이를 이용한 들깨 오일에서 지방산 조절방법	대한민국	세종대/ 동아대 산학협력 단	2023.02 .06	10-2023 -001568 9				50%		
2	흰가루병 저항성 멜론 품종 식별용 분자 마커 및 이를 이용한 식별 방법	대한민국	세종대 산학협력 단	2020.09 .29	10-2020 -012660 4	세종대 산학협력 단	2022.02. 25	10-2369 882	25%		
3	PirFAD3b 변이를 이용한 리놀레산 함량이 증가한 들깨 판별용 조성물 및 판별 방법	대한민국	세종대 산학협력 단	2023.04 .13	10-2023 -004898 1				50%		
4	PirFAD3a 변이를 이용한 리놀레산 함량이 증가한 들깨 판별용 조성물 및 판별 방법	대한민국	세종대 산학협력 단	2023.04 .13	10-2023 -004898 2				50%		

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 종질지(80g/m²)

(22쪽 중 8쪽)

□ 표준화

○ 국내 표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자

- * 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제 표준

번호	표준화단계구분 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	제안자	표준화 번호	제안일자

- * 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	통상실시	고 리놀레산 들깨	아시아 종묘	2023.02.19	업무 협약서 체결	

- * 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

- * 1) 기술이전 또는 자기실시
- * 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)]

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내			
	국외				
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			yyyy년	yyyy년	
합계					

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력		
		생산인력		
	개발 후	연구인력		
		생산인력		

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
	학위	2023	1	4	1		2	4	6					

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	기타	농림식품기술기획평가원	2020농식품 R&D 우수성과 54선	2021.11.23
2	중앙일간지	News1	농기평, 토종작물 들깨로 수입 식용유 대체...신품종 개발	2021.12.21
3	중앙일간지	조선일보	황성빈 세종대 바이오산업자원공학과 교수 연구팀, 불포화 지방산 함유량 높은 들깨 품종 개발	2021.12.29

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기본법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 고 올레산 들깨 개발: 최소 25% 이상 올레산(18:1)을 생산하는 들깨 개발	○ 올레산(18:1)을 최대 36% 까지 생산하는 남천 돌연변이 계통을 선발함.	○ 100
○ 고 리놀레산 들깨개발: 최소 30% 이상의 리놀레산(18:2)을 생산하는 들깨 개발	○ 리놀레산 (18:2)를 40%생산하는 다유 돌연변이 (SJDY-1-19)를 개발하고, FAD3b 유전자 변이를 규명하고 선발 분자PCR 마커 를 개발함. 리놀레산 (18:2)를 30%생산하는 남천 돌연변이 (SJNC-110-18)를 개발하고, FAD3a 유전자 변이를 규명하고 선발 PCR-RFLP 분자마커 를 개발함.	○ 100
○ 고 리놀렌산 들깨개발: 최소 65% 이상의 리놀렌산(18:3)을 생산하는 들깨 개발	○ 알파-리놀렌산(18:3)을 67%생산하는 다유 돌연변이 (SJDY-6-5)를 개발함	○ 100
○ 돌연변이 들깨의 지방산 변화 유발 유전자 규명	○ 고 리놀레산 다유 (40%) 및 남천 (30%) 돌연변이체의 원인이 각각 FAD3b 및 FAD3a 유전자 변이 에 기인함을 규명	○ 100
○ 들깨 FAD2 유전자 교정백터 형질 전환 및 형질전환체 선발	○ 들깨의 FAD2 유전자 교정 형질전환체 확보 (T2 확보- T3 세대 진전중). 지방산 함량 분석 예정.	○ 95
○ 들깨 FAD3 유전자 교정백터 형질 전환 및 형질전환체 선발	○ 들깨의 FAD3 유전자 교정 형질전환체 확보 (T2 확보- T3 세대진전중). 리놀레산이 84%까지 증가 확인.	○ 100

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

○ 들깨의 FAD2 유전자교정 형질전환체 확보 및 불포화지방산 성분분석

- 동아대학교에서 성공적으로 들깨의 FAD2 유전자교정 형질전환체를 확보하였지만 수확한 T2 세대 종자 수가 적어 불포화지방산 성분분석 미수행, 수확한 종자활용 세대진전 수행후 지방산 분석 예정
-

2) 자체 보완활동

-
- 들깨의 FAD2 유전자 교정 형질전환체의 빠른 세대진전을 위해 극 단일조건에서 발아 및 재배를 시도하고 있음. 최대한 빠른 세대진전을 통해 T3 세대 종자를 빨리 확보하고 GC 분석을 통해 들깨 종자내 불포화지방산 함량을 분석하여 올레산 함량이 증가 되었는지를 확인할 예정임
-

3) 연구개발 과정의 성실성

-
- 들깨의 조직배양 및 형질전환은 숙달된 전문연구원이 수행을 해도 쉽지 않은 실험으로 많은 시간과 노력을 필요로 함. 들깨의 조직배양 형질전환의 경우 국내에서는 현재 유일하게 동아대학교에서 성공리에 수행하고 있지만 형질전환 효율이 높지가 못하여 많은 횟수의 반복실험을 통해 연구결과를 얻어내어 그 가치가 높음.
 - 연구과제 시작 1차년도에 참여한 학생연구원들의 이탈로 연구진행이 약간 지체되었지만 2-3차년도에 전문 조직배양 연구원이 본 과제에 참여하게 되어 2년 만에 해당 성과를 이루어 내게 되었음.
-

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 종질지(80g/m²)]

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

(단위 : 백만원, %)

총괄과제명	세부과제명	기관명	유형	총 연구 개발비 (A)	정부지원 연구개발비 (B)	정부지원 연구개발비 비율 (C=B/A)	성과 유형	기술기여도	
								산정 근거	비율
								해당 없음	-
계				0	0	-	-	-	-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

연구개발성과 활용계획표 성과항목 중 사업화 계획(매출액, 기술료 등) 작성 필수

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내				
		2023	2024	2025	2026	2027
국외논문	SCIE	2				
	비SCIE					
	SCIE					
	비SCIE					
특허출원	국내					
	국외					
특허등록	국내			2		
	국외					
품종출원	국내			2		
	국외					
품종등록	국내					2
	국외					
인력양성	학사					
	석사					
	박사					
사업화	시제품개발					
	상품출시					
	기술이전					
	공정개발					
	매출액(단위 : 천원)					
	기술료(단위 : 천원)					
비임상시험 실시						
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상				
		2상				
		3상				
	의료기기					
진료지침개발						
신의료기술개발						
성과홍보						
포상 및 수상실적						
정성적 성과 주요 내용						

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서 2) 연구성과 활용계획서
2.	1) 2)

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)]

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 종질지(80g/m²)]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		319107-4	
사업구분					
연구분야	생명자원 생산·관리			과제구분	단위
사업명	농생명산업기술개발				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	생명공학기술을 활용한 고기능성 들깨 개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구개발기관	세종대학교산학협력단			연구책임자	황성빈
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2019.09~2020.02	200,000	0	200,000
	2차년도	2020.03~2021.02	300,000	0	300,000
	3차년도	2021.03~2022.02	300,000	0	300,000
	4차년도	2021.03~2023.02	300,000	0	300,000
	5차년도				
	계		1,100,000		1,100,000
참여기업	(주)아시아종묘				
상대국		상대국연구개발기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 :2023.04.14

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
세종대학교	교수	황성빈

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	황성빈(인)
----	--------

[별첨 1]

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 우수)

1. 방사선 및 화학물질 돌연변이 기술을 활용해 현재 들깨 품종에는 없는 고 올레산, 고 리놀레산, 고 리놀렌산 들깨 3종을 개발함.
2. 고 리놀레산 돌연변이 들깨의 원인이 FAD3 유전자 변이에 있음을 규명함.
3. 유전자교정을 이용하여 FAD2 및 FAD3 변이체 개발. FAD3 유전자교정 들깨의 고 리놀레산 (84%) 특성 확인.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수)

1. 방사선 및 화학물질을 이용하는 육종 분야에 기여.
2. 유전자 교정을 이용하는 육종 분야에 기여.
3. 들깨 품종 개발(육종)에 기여.
4. 지방산 공학 분야에 기여.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수)

1. 돌연변이 및 유전자교정 기술을 통해 개발한 고 올레산, 고 리놀레산, 고 리놀렌산 들깨는 다양한 기능성 지방산을 생산하는 '특화된 맞춤형 기능성 들깨 품종'으로서
 - 1) 종자 보급을 통한 농가 소득 향상
 - 2) 맞춤형 오일 생산을 통한 들깨오일 사업화를 유발
 - 고 올레산 들깨: 튀김용, 샐러드 용
 - 고 리놀레산 들깨: 면역 건강기능성, 샐러드용
 - 고 리놀렌산 들깨: 오메가3 건강기능성

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 우수)

1. 들깨 형질전환 효율이 너무 낮아서 형질전환체 제작에 많은 난관이 있었으나 수많은 노력 끝에 FAD2 유전자 교정체 (세종대, 동아대) 및 FAD3 유전자 교정체 (동아대)를 성공적으로 개발
2. 고 올레산, 고 리놀레산, 고 리놀렌산 돌연변이 들깨를 성공적으로 개발함.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수)

1. 16편의 SCI 논문 (평균 IF 6.4) 발표
2. 20편의 학술발표
3. 국내특허 등록 1건, 출원 4건.
4. 기술이전 1건(아시아종묘)

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
FAD2 유전자 교정을 활용한 고 올레산 들깨 개발	20	95	FAD2 유전자 교정체 개발. 지방산 함량 측정 예정
FAD3 유전자 교정을 활용한 고 리놀레산 들깨 개발	20	100	FAD3 유전자 교정체 개발. 고 리놀레산 (84%) 품종 확인.
방사선 및 화학적 돌연변이 활용 고 올레산 (25% 이상) 들깨 개발	20	100	고 올레산 (36%) 들깨 개발.
방사선 및 화학적 돌연변이 활용 고 리놀레산 (30% 이상) 들깨 개발	20	100	고 리놀레산 (40%) 들깨 개발
방사선 및 화학적 돌연변이 활용 고 리놀렌산 (65% 이상) 들깨 개발	20	100	고 리놀렌산 (67%) 들깨 개발
합계	100 %	99 %	성공적임

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

<p>1. 최종목표인 ‘고 올레산’, ‘고 리놀레산’, ‘고 리놀렌산’ 돌연변이 들깨 및 ‘FAD2 유전자교정체’, ‘FAD3 유전자교정체’ 들깨를 성공적으로 개발하였음.</p> <p>2. ‘고 리놀레산 돌연변이 들깨’의 원인이 FAD3 유전자 변이 때문임을 규명하였음.</p> <p>3. 들깨 FAD3 유전자의 기능이 리놀렌산 (오메가3) 합성임을 증명하였음.</p> <p>이에 성공적으로 연구개발을 완료하였다고 판단됩니다.</p>
--

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

<p>1. 완료하지 못한 특허등록 1건은 이미 출원 4건이 있기에 연구종료 후 기간에 달성 가능합니다.</p> <p>2. 완료하지 못한 품종등록 2건은 개발한 품종 5건이 있기에 연구종료 후 기간에 달성 가능합니다.</p> <p>이상의 상황을 평가에 고려해주시길 요청 드립니다.</p> <p>감사합니다.</p>

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 1. 특허 등록 완료 후, 기술이전 가능.
- 2. 품종 등록 완료 후, 종자 판매, 오일 생산 판매, 기술이전 가능.

IV. 보안성 검토

특별히 보안성이 필요해보이지 않음.

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	생명공학기술을 활용한 고기능성 들깨 개발			
주관연구개발기관	세종대학교 산학협력단	주관연구책임자	황성빈	
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	1,100,000,000			1,100,000,000
연구개발기간	2019. 09. 20 - 2023. 02. 19(3년05개월)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 유전자 교정을 활용한 고 올레산 및 고 리놀레산 들깨 개발	1. FAD3 유전자 교정과 형질전환을 통한 고 리놀레산 들깨 개발 완료. 2. 고 올레산 생산용 FAD2 유전자 교정체 제작 완료. 지방산 분석 예정.
② 방사선 및 화학적 돌연변이 활용 고 올레산, 고 리놀레산 및 고 리놀렌산 들깨 개발	1. 감마선-EMS 처리를 통한 돌연변이 유도과 선별을 통하여 고 올레산, 고 리놀레산 및 고 리놀렌산 들깨 개발 완료. 2. 고 리놀레산 들깨의 원인이 FAD3 유전자 변이 때문임을 규명.
③ 들깨 리놀렌산 생산 기전 연구	들깨 FAD3 유전자 분리 후 리놀렌산 합성 기능 규명

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구 활용액) (명)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논 문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
													SCI	비 SCI						
단위	건	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건			
가중치	10	20	30		10									10		10	10			
최종 목표	2	2	2		1							9		3.0	14	5	2			
1차 년도	목표													3.0	2					
	실적											1		4.7	4					
2차 년도	목표											2		3.0	4	1				
	실적	1										4		4.8	6	2				
3차 년도	목표	2										3		3.0	4	2	1			
	실적											5		6.5	6	4	3			
4차 년도	목표		2	1		1						4		3.0	4	2	1			
	실적	3	1			1						6		7.6	4					
중요후목표			1																	
실적 소계	4	1	0		1							16		6.4	20	6	3			
달성률 (%)	100	50	0		100							100		100	100	100	100			

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	유전자교정에 의한 다양한 기능성 지방산이 강화된 들깨 개발
②	돌연변이 고기능성 지방산 들깨 품종 개발
③	들깨 오메가3 불포화지방산 합성 유전자 기능규명

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술	√					√	√			
②의 기술	√					√	√			
③의 기술	√									

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	세계 최초로 들깨 유전자교정에 의한 고 올레산 및 고 리놀레산 들깨 개발을 성공하여 앞으로 들깨에서 다양한 기능성 물질을 생산 하는 유전자 교정 플랫폼 확립
②의 기술	돌연변이 고 올레산, 고 리놀레산 및 고 리놀렌산 들깨의 기술이전 및 품종화
③의 기술	들깨 종자에 오메가3 지방산인 리놀렌산이 많은 이유를 분자수준에서 규명하여 저명 국제 학술지에 발표

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구 활용액)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제품 화	매출 액	수출 액	고용 창출		투자 유치	논문				학술 발표	정 책 활 용	
											SCI		비 SCI	논 문 평 균 I F					
단위	건	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건		
가중치	10	20	30		10									10		10		10	
최종목표	2	2	2		1							9		3.0	14		5		2
연구기간내 달성실적	4	1	0		1							16		6.4	20		6		3
연구종료후 성과창출 계획		2	2									2							

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)]