

(뒷면)

(앞면)

213002041  
CGI00

발간등록번호
11-1543000-001643-01

육  
종  
기  
반  
  
기  
술  
개  
발

육종기반 기술 개발  
(Development of supporting system for  
breeding)

주 의 (편집순서 8)
-----------------

농림축산식품부  
해양수산부  
농촌진흥청  
산림청

충남대학교

농림축산식품부·해양수산부·  
농촌진흥청·산림청

## 제 출 문

농림축산식품부장관 . 해양수산부장관 . 농촌진흥청장 . 산림청장 귀하

이 보고서를 “Golden Seed” 프로젝트(세부프로젝트 “육종기반 기술 개발”)의 보고서로 제출합니다.

2017년 2월 14일

프로젝트 연구기관명 : 충남대학교

프로젝트 책임자 : 박 상 언

세부프로젝트 연구기관명 : 국립원예특작과학원

세부프로젝트 책임자 : 박 수 형

세부프로젝트 연구기관명 : 충남대학교

세부프로젝트 책임자 : 최 수 련

세부프로젝트 연구기관명 : 충남대학교

세부프로젝트 책임자 : 김 흥 기

## 보고서 요약서

과제고유번호	4년차 프로젝트 과제번호	해당 단계 연구기간	42개월	단계구분	1단계
연구사업명	단위사업명	채소종자사업단			
	세부사업명	Golden Seed 프로젝트			
연구과제명	프로젝트명	육종기반 기술 개발			
	세부 프로젝트명 (주관 연구기관 / 연구책임자)	배추 유전자원 수집 및 육종재료 신속작성 기술(농진청/박수형)			
		글루코시놀레이트 고함유 배추 육종 지원을 위한 실용적 분자표지 개발(충남대/박상언)			
		분자 및 유전체육종 효율화 시스템 개발(충남대/최수련)			
		시판 및 수출용 배추와 무 뿌리혹병 검정기술 개발(충남대/김흥기)			
연구책임자	박상언	해당단계 참여 연구원 수 70명	총: 70 명 내부: 66 명 외부: 4 명	해당단계 연구개발비 1,630,000,000원	정부: 1,630,000천원 민간: 천원 계: 천원
		총 연구기간 참여 연구원 수 70명	총: 70 명 내부: 66 명 외부: 4 명	총 연구개발비 1,630,000,000원	정부: 1,630,000천원 민간: 천원 계: 천원
연구기관명 및 소속부서명	충남대학교 농업생명과학대학			참여기업명	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약				보고서 면수	
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 배추 소포자 배양에 효과적인 9배지 조건 구멍 및 7개사 자원 450점 이상 소포자 배양 서비스 완료</li> <li>○ 배추 글루코시놀레이트 생합성에 관여하는 후보유전자군 선발 및 분자표지 개발</li> <li>○ 여교배 효율화를 위한 MABC 시스템구축: 유전체 고르게 분표하며 다형성이 높은 마커 선발 및 validation. MABC 시스템으로 육종계통(내병성 형질도입) 선발에 적용, 순도검정용 분자표지 선발.</li> <li>○ 내병성(뿌리혹병) 형질 개체 선발위한 내병성 분자표지 개발</li> <li>○ 국내 배추 재배지역 우점 race파악, 특성 분석을 통한 분포지도 작성, 시판 및 수출용 배추, 무의 저항성 분석, 검정기법 개발</li> </ul>				343쪽	

## 요 약 문

### I. 제 목

육종기반 기술 개발

### II. 연구성과 목표 대비 실적

- 유용 자원 수집 및 특성 평가를 통하여 선발된 자원의 DH라인 육성, 육성된 계통은 수출 증진을 위한 맞춤형 육종소재로 제공
- 알리페틱 글루코시놀레이트 고함유 배추 실용적 분자표지 개발함
- 분자 및 유전체육종 효율화 시스템 개발
- 시판 및 수출용 배추와 무 뿌리혹병 검정기술 개발함

### III. 연구개발의 목적 및 필요성

- 배추 종자 수출 증진을 위한 소재의 순도 증진 기술 개발 및 적용
- 글루코시놀레이트가 많이 함유된 배추를 찾는 마커를 개발하는 연구가 필요
- 육종에서 선발 효율성을 높일 수 있는 시스템 및 분자표지가 필요
- 국내 배추 재배지역 우점 race 파악, 시판 및 수출용 배추, 무의 저항성 분석, 검정기법 개발이 필요

### IV. 연구개발 내용 및 범위

- 배추 소포자 배양 조건 구명 및 종자회사 요청 자원의 소포자 배양 서비스 실시
- 글루코시놀레이트 고함유 배추 육종 지원을 위한 실용적 분자표지 개발
- 여교배 효율화를 위한 MABC 시스템구축: 유전자원 25계통을 resequencing 하여 유전체 구조 분석을 위한 대량의 SNP 정보생산 및 선발. 육종재료 사용하여 MABC에 적용
- 내병성(뿌리혹병) 개체 선발위한 내병성 분자표지 개발 및 개선
- 신속 정확한 뿌리혹병 내병성 품종개발을 위한 내병성 분석시스템을 구축

### V. 연구개발결과

- 배추 소포자 배양에 효과적인 9배지 조건 구명 및 7개사 자원 450점 이상 소포자 배양 서비스 완료
- 배추 글루코시놀레이트 생합성에 관여하는 후보유전자군 선발 및 분자표지 개발
- 여교배 효율화를 위한 MABC 시스템구축: 유전체 고르게 분표하며 다형성이 높은 마커 선

발 및 validation. MABC 시스템으로 육종계통(내병성 형질도입) 선발에 적용, 순도검정용 분자표지 선발.

- 내병성(뿌리혹병) 형질 개체 선발위한 내병성 분자표지 개발
- 국내 배추 재배지역 우점 race과약, 특성 분석을 통한 분포지도 작성, 시판 및 수출용 배추, 무의 저항성 분석, 검정기법 개발

## VI. 연구성과 및 성과활용 계획

- 배추 소포자 배양 조건의 기술이전 실시 및 육성된 DH line의 민간 회사 분양으로 고순도 품종 개발의 육종 연구 기반 마련
- 육성한 배추 계통 글루코시놀레이트 평가 및 육종시스템에 제공
- 성과: 논문게재 2건, 특허출원 1건, 분자마커 개발 4건, 기술이전 1건, 유전자원 수집 7건, 유전자원 등록 6건, DH계통 개발 66건, 자원분양 10건, 분자마커 분석 서비스 26,187건의 실적
- 육종가들에게 실용화 될 수 있도록 분석 서비스를 제공 혹은 농업실용화재단에 정보를 이관하여 서비스 받을 수 있도록 하여 배추 분자유종체계가 활성화될 수 있도록 지원할 것임.
- 시행착오 없는 시판 및 수출용 무, 배추 내병성품종 육성에 기여

## SUMMARY (영문요약문)

### **I. Title**

Development of supporting system for breeding

### **II. Performance against targets**

- Generation of DH lines fostered by selection of resources through collecting and evaluating useful resource collection, DH lines provide customized breeding materials for export promotion
- Establishment of practical molecular marker for Chinese cabbage with high content of aliphatic glucosinolate
- Establishment of the molecular and genomic breeding system
- Development of clubroot resistance judgement system for commercial and exported cabbage and radish

### **III. The purpose and need for research and development**

- Development and application of material purity enhancement technology for export of Chinese cabbage seeds
- Requirement of practical molecular marker development for Chinese cabbage with high content of glucosinolate
- Requirement of practical molecular marker development and construction of MABC system
- Requirement for the characterization of the dominant clubroot disease race in domestic kimchi-cabbage and radish cultivation area and development of resistance analysis and qualification technique for the domestically bred cultivars

### **IV. Research contents and scope**

- The study of conditions for microspore culture of Chinese cabbage and the implementation of services of microspore culture for seed company requests
- Development of practical molecular marker using Chinese cabbage with high content of glucosinolate for supporting breeding

- Re-sequencing of breeding germplasm and selection of SNPs, development of molecular marker for disease resistant
- Establishment of the rapid and accurate resistance analysis system for the clubroot disease resistance cultivar

#### **V. Research Results**

- Completion of 9 culture medium conditions for effective microspore culture of Chinese cabbage and cultivation of microspore culture of more than 450 resources of 7 seed companies
- Development of molecular marker and selection of candidate genes related to glucosinolate biosynthesis in Chinese cabbage
- Construction of MABC system and development of molecular marker for clubroot disease resistant
- Establishment of the disease distribution map using the dominant race and characteristic analysis of the race in the domestic Kimchi cabbage cultivation area, resistance analysis among the cultivars, and qualification technique development

#### **V. Research achievements and future plan**

- Establishment of research base for breeding of high purity varieties development through the transfer of technology of microspore culture conditions of Chinese cabbage and the distribution of seed company of cultivated DH lines
- Characterization of glucosinolate in new Chinese cabbage for supply to breeding system
- Supporting breeder with clubroot disease marker and marker assisted backcrossing system
- Contribution for non-erroneous cultivation of disease resistance kimchi cabbage and radish for the commercial and the expored

CONTENTS  
(영 문 목 차)

Chapter 1. Purpose and Outline of Project

Chapter 2. Domestic and International Research and Development

Chapter 3. Results and Contents of Research and Development

Chapter 4. Contribution of Research and Development for Related Research Area

Chapter 5. Research Results and Their Application Plans

Chapter 6. International Information of Science and Technology

Chapter 7. Reference



## 목 차

### 제 1 장 프로젝트(세부프로젝트 포함)의 개요 및 성과목표

- \* 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술
- \* 연구성과 목표 대비 실적

### 제 2 장 국내외 기술개발 현황

- \* 국내.외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내.외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

- \* 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과를 기술

### 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- \* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에의 기여도 등을 기술

### 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- \* 실용화.산업화 계획(기술실시 등)
- \* 교육.지도.홍보 등 기술확산 계획 등
- \* 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등
- \* 추가연구, 타연구에 활용 계획 등
- \* 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함

### 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 7 장 참고문헌

- \* 보고서 작성 시 인용된 모든 참고문헌을 열거

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

# 제 1 장 프로젝트(세부프로젝트 포함)의 개요 및 성과목표

## 1 절. 연구개발의 목적 및 내용

### 1. 연구개발 목표 및 내용

가. 최종목표 : 육종기반 기술 개발

나. 주요 연구 내용

- (1) 제1세부 과제: 배추 유전자원 수집 및 육종재료 신속작성 기술
- (2) 제2세부 과제: 글루코시놀레이트 고함유 배추 육종 지원을 위한 실용적 분자표지 개발
- (3) 제3세부 과제: 분자 및 유전체육종 효율화 시스템 개발
- (4) 제4세부 과제: 시판 및 수출용 배추와 무 뿌리혹병 검정기술 개발

프로젝트	육종기반 기술 개발
1세부프로젝트	○ 다양한 특성의 고순도 DH line 개발 및 배추의 효과적 소포자 배양법 개발 ○ 국내 종묘회사의 품종 육성 재료의 부가가치 향상이 가능하도록 순도가 높은 DH line 개발 및 무 과제 참여 종묘회사에 보급
2세부프로젝트	글루코시놀레이트 고함유 배추 육종 지원을 위한 실용적 분자표지 개발
3세부프로젝트	유전체 정보 적용 분자 육종의 효율화 시스템 개발
4세부프로젝트	국내 주요 배추와 무 재배지역에 분포하는 병원균의 우점 race를 밝히고 이를 이용하여 국내에서 육종한 배추와 무 품종들의 뿌리혹병 저항성을 정확하게 검정함으로써 내병성 보유여부와 그 특성을 사전에 분석하는 시스템을 구축함으로써 추후 수출용 종자의 뿌리혹병 내병성 특성을 사전에 분석하는데 있음

다. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

- (1) 제1세부 과제: 배추 유전자원 수집 및 육종재료 신속작성 기술

○ 연구개발의 최종 목표
- 유용자원 수집 및 특성 평가와 선발 자원의 DH라인 육성을 통한 맞춤형 육종소재의 신속한 제공
○ 연구개발의 내용
- 맞춤형 품종 개발을 위한 유용 유전자원 등 반수체 배양용 재료의 수집, 평가 및 선발 (종묘회사 공동, 25점/회사, 4회사/년)
- 반수체 배양용 재료의 효과적 재배 조건 구명
- 수집 자원별 반수체 배양 및 발생배 무상 분양
- 배양 용이 및 난이 집단 구분 및 유전 분석 의뢰
- 유전 분석용 집단 육성 및 제공
- 획득된 DH plant의 종자 증식 및 평가
- 우수 육성 계통 품종 보호 출원

(2) 제2세부 과제: 글루코시놀레이트 고함유 배추 육종 지원을 위한 실용적 분자표지 개발

- 글루코시놀레이트 고함유 배추 육종 지원을 위한 실용적 분자표지 개발
- 품종, 재래종 및 야생종 등 다양한 유전자원을 이용하여 HPLC로 글루코시놀레이트 함량 분석으로 선발 및 우수 자원 확보
- 글루코시놀레이트 생합성에 관여하는 후보유전자군 선발 및 SNP 분자표지 개발
- 글루코시놀레이트 고함유 고 기능성 품종 육성 지원
- 종간잡종으로 응성불임 배추 계통 육성

(3) 제3세부 과제: 분자 및 유전체육종 효율화 시스템 개발

- 최종목표: 유전체 정보 적용 분자 육종의 효율화 시스템 개발
  - 배추 품종 개발과정에서 우수 형질(내병성 등)을 도입하는데 있어 우량형질 개체 선발의 효율성 증대 및 품종개발 연한 단축위한 시스템 개발
- 연구개발 목표
  - 여교배 효율화(Marker Assisted Backcrossing, MABC)를 위한 분자표지 개발
    - 내병성 (뿌리혹병 등) 형질 연관 마커도움선발용 (Marker-Assist Selection, MAS) 마커 개발
    - MABC 방법 적용하여 뿌리혹병 저항성에 관여하는 여러 유전자좌를 집적(gene pyramiding)하여 뿌리혹병에 저항성 있는 우수 계통 육성
    - gene pyramiding으로 복합내병성 (뿌리혹병, 노균병, 등) 계통 육성
    - F<sub>1</sub> 종자 순도검정용 분자표지 개발
- 연차별 연구내용
  - 우수 형질 도입하기 위한 여교배 과정에서 선발효율을 높이기 위한 MABC(marker assist backcrossing) 용 분자표지 개발.
    - 표준재료 유전체(배추과 계놈 컨소시엄, MBGP에서 염기서열 분석에서 표준재료로 사용한 지부) 정보 및 지부와 권심을 교배하여 8번 자가수정하여 생성한 CKRIL 집단 이용한 효과적인 background selection 조건 규명.
    - CKRIL 집단 중 25계통을 resequencing 하여 유전체 구조 분석을 위한 대량의 SNP 정보생산.
    - Resequencing 데이터에서 분석한 SNP 기반으로 하여 10개 염색체 내에서 LD 분석.
    - MABC(marker assist backcrossing)용 분자표지의 분포, 적정 마커 수 예측 및 분석용 셋트 선발.
    - 교배 양친/집단에서 *In-silico* 상에서 예측된 SNP를 HRM 방법을 이용한 실험으로 검증.
  - 여교배 효율화 위한 분자표지 검정, 효과적인 background selection 조건(MABC 기술)에 대한 실험적 검증으로 내병성(뿌리혹병) 형질 사용 .
    - 뿌리혹병 저항성 자원 확보 및 기보고된 분자표지 이용 검정.
    - 기 보고된 뿌리혹병 저항성 유전자좌 중 주동 QTL 영역에 대하여 교배시 재조합 빈도 및 삽입되는 물리적 염색체 단편(크기) 예측 및 검정(gene stacking을 하기 위한 염색체 단편 크기 탐색 및 형질연관 마커 개발).
    - LD 결과를 활용한 linkage drag 현상 분리용 마커 개발.
    - MAB 이용한 실험적 검정용 집단 양성.

- 뿌리혹병 저항성 형질에 관여하는 서로 다른 주요 유전자좌를 도입(gene pyramiding)한 우수 내병성 계통 육성에 MABC 적용.
  - 뿌리혹병 저항성에 관여하는 주동 QTL 유전자좌 보유 계통간 교배조합 작성.
  - MAS(저항성 연관 마커/linkage drag 분리용 마커) 이용 저항성 형질 보유 개체군 선발.
  - MABC 이용 선발한 개체들의 background 정보 확보.
- 복합내병성 (뿌리혹병, 노균병, 바이러스병 등) 형질 집적(gene pyramiding)에 MABC 적용.
  - 뿌리혹병, 노균병, 바이러스 병 중 2가지 이상의 병에 저항성 있는 복합내병성 계통 육성.
  - 병 저항성에 관여하는 유전자좌 보유 계통간 교배조합 작성.
  - MAS(저항성 연관 마커/linkage drag 분리용 마커) 이용 저항성 형질 보유 개체군 선발.
  - 선발한 개체들의 병리검정으로 표현형 검정.
  - MAB 이용 선발한 개체들의 background 정보 확보 .
- F<sub>1</sub> 순도 검정용 분자표지 개발.
  - 우수계통 보안 위한 양친의 유전자형 정보 확보.
  - 교배조합별 F1 순도 검정 셋트 선발.

(4) 제4세부 과제: 시판 및 수출용 배추와 무 뿌리혹병 검정기술 개발

- 1) 국내 주요 배추와 무 재배지역에 분포하는 병원균의 우점 race를 밝히고 이를 이용하여 국내에서 육종한 배추와 무 품종들의 뿌리혹병 저항성을 정확하게 검정함으로써 내병성 보유여부와 그 특성을 사전에 분석하는 시스템을 구축하고자 함
- 2) 생물적 및 재배적 방법을 활용한 환경친화적 뿌리혹병 방제법을 개발함
  - 내생균과 균근균을 이용한 방제법 개발
- 3) 수출용 배추·무 종자의 뿌리혹병 내병성에 관한 정확한 자료 제공

## 2 절. 연구개발의 필요성

### 1. 연구개발의 필요성

[제1세부]

가. 배추 유용자원 수집 및 육종 재료 신속 작성 기술

- 배추는 생육 기간이 2~3개월로 다른 채소보다 짧으나, 동 기간 형성되는 Bio-mass의 양은 3~4kg/개체로 많음. 따라서 기능성 물질 고함유 계통 개발 시 그 물질 생합성량이 많음
- 최근 전세계적으로 고조되는 건강 기능성 물질을 효과적으로 공급 할 수 있을 것으로 기대되며, 인공 합성 물질의 거부감도 없어 배추의 부가가치 향상에 매우 효과적으로 판단됨
- 지구 온난화로 인한 기상이변으로 모든 작형의 배추 재배에 병해충 및 생리장해가 빈번하게 발생되고 있음. 따라서 기상이변에 견디는 힘이 있으며 내병성인 품종의 육성이 요구됨

☞ 소포자 배양법을 통하여 단기간에 유전적으로 고정된 다양한 계통의 육성 가능

#### ○ 주요 연구 내용

##### ■ 맞춤형 품종 개발을 위한 자원 수집 및 평가

- 다양한 유전자원 수집, 특성 평가 및 선발 (200점/년)
- 선발 및 육성 자원의 개화 유도를 위한 춘화 처리 및 개화 유도 (작물 관리)
- 분자표지 개발 등 유전 분석 연구의 재료 및 육종 소재로 활용
- ☞ 활력 있는 반수체의 풍부한 생산을 위해 양액공급, 병해충 관리 등 작물 관리가 중요

##### ■ 목표 형질별 반수체 배양

###### ● 내재해성 계통 육성

- 다양한 국내외 배추 자원 수집, 평가(내서성, 내건성 등) 및 선발
- 반수체 유기율이 높은 계통을 육성하여 우수 자원과 교배함으로 배양 효율 증진

###### ● 내병성 계통 육성

- 국내외 다양한 배추과 자원 수집, 평가(인공접종) 및 선발
- 선발 및 도입 자원의 반수체 배양을 통한 우수 계통 단기 육성
- 내병성 관련 유전 분석 재료 및 육종 소재로 활용

☞ GSP 참여 기업별 다양한 자원을 배양, 분석함으로 연구 효율 증진(25점/회사, 4회사/년)

#### ○ 선행연구 및 기술개발

- 배추의 소포자 배양에 효과적인 조건 탐색 완료 및 DH Line 500여 계통 육성('12)
- 무, 배추, 양배추, 브로콜리 등 다양한 배추과 채소의 효과적인 소포자 배양법 구명  
.배추 : NLN배지(1X)+활성탄(간혹 NAA, BA) 첨가 배지, 열처리-32°C 하루가 효과적  
.무, 양배추 : NLN배지(2X)+활성탄(간혹 NAA, BA) 첨가 배지, 열처리-32°C 2일이 효과적
- 소포자 배양에 의한 고순도 배추 계통 육성 및 품종보호 출원 완료 : '원교20034호' 등7점



무 DH inbred 평가 모습('10)



배추 DH품종 '원교20034호'



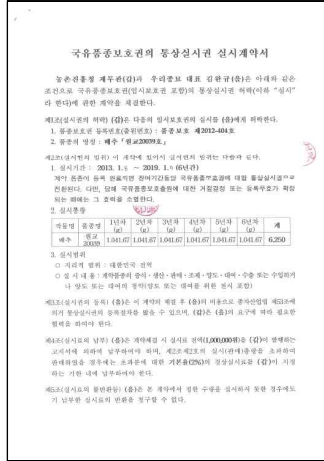
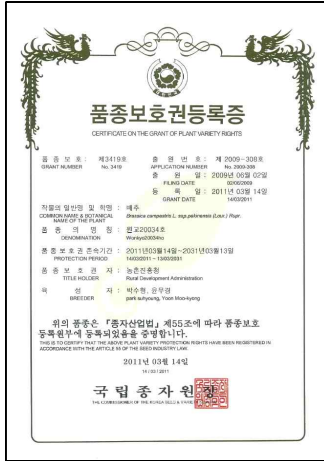
배추 DH품종 '원교20039호'

○ 연구기관 자격 관련 자료

1. 반수체 육종 기술 확립 및 관련 기술 보유 :

- 무, 배추, 양배추, 브로콜리 등 다양한 배추과 채소의 소포자 배양 기술 기 보유
- 소포자 배양으로 배추 계통 육성, 품종보호출원 및 판매 완료 :

- 반수체 유래 육성 계통 : 500여 점('12 기준)
- 반수체 유래 품종보호출원 : '원교20034호' 등7점
- 반수체 유래 품종보호등록 : '원교20034호'(품종보호 제 3419호), '원교20035호'(제3420호)
- 반수체 유래 품종 통상 실시 : '원교20039호'(품종출원 2012-404) - W종묘



2. 반수체 배양이 가능한 연구공간 (배양실, 저온 저장고 등) 확보 필수

- 크린벤치 : 8명이 동시 배양 가능
- 배양실 : 배양체의 효과적 생육이 가능한 공조시스템으로 온도 조절
- 저온저장고 : 수확물의 보관 및 저장을 위한 저온 창고 3기 보유

3. 다양한 계통 및 품종을 재배할 수 있는 재배공간 확보

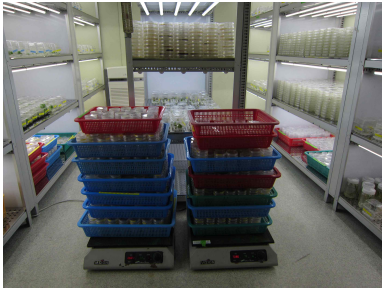
- 선발 계통 재배용 : 200평 비닐 하우스 2동 (가온)
- 육종 세대 단축을 위한 시설 온실 : 7평 3동 (가온)
- 육성 계통 특성 평가용 노지 : 700평 2개소

4. 준화처리가 가능한 온실 (준화처리실) 확보 필수

- 50공 트레이에 정식할 경우 3,600점 저온처리 가능 시설 보유 :  
처리 과정의 정상 생육을 위한 자연광 채광, 관수 및 차광 장비 보유



크린벤치 및 작업 모습



반수체 배양 가능 배양실



준화처리실 모습

[제2세부]

- 글루코시놀레이트 (Glucosinolates, GSLs)는 유기화합물의 일종으로 포도당으로부터 유래한 황과 질소를 함유하고 있고, 십자화과 채소(겨자, 양배추, 케일, 콜리플라워, 배추, 브로콜리 등)에 공통으로 들어있는 이차대사산물로서, 최근 GSLs는 항암효과, 항산화, 항균력 때문에 많은 주목을 받고 있다.
- 배추 (Chinese cabbage, *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)는 아시아에서 가장 많이 소비되는 채소 중에 하나이다. 하지만, 브로콜리와 다르게, 많은 배추 품종은 글루코라파닌 (Glucoraphanin)을 많이 함유하고 있지 않다.
- 김치의 원료인 배추에 암을 예방하는 기능성 물질, 즉 글루코시놀레이트가 다량으로 존재하는 것이 확인됐다. 농촌진흥청은 국내 배추 23품종에 대해 성분 분석을 실시한 결과, 강력한 항암작용을 하는 것으로 알려진 ‘글루코시놀레이트(glucosinolate)’ 14종이 함유돼 있는 것을 확인했다.
- 본 연구진이 배추의 유식물 (sprout)과 식물의 부위별로 글루코시놀레이트를 분석한 결과, 유식물들의 경우 5가지의 aliphatic GSLs (Glucoraphanin, sinigrin, glucoalyssin, gluconapin, glucobrassicinapin)과 4가지의 indolic GSLs (4-Hydroxyglucobrassicin, glucobrassicin, 4-Methoxyglucobrassicin, neoglucobrassicin)로 구성되어 있는 것으로 분석되었고, 부위별로는 유식물에서 확인되지 않았던 aromatic GSLs (Gluconasturtiin)이 있는 것으로 확인되었다.
- 국내 배추 23품종 성분 분석결과를 보면 유방암 억제 효과가 탁월한 ‘인돌형 글루코시놀레이트’는 모든 배추 품종에 평균 2.31mg/g이 있는 것으로 나타났으며, ‘CR맛’ 품종에 가장 많은 4.0mg/g이 함유돼 있는 것으로 분석됐다. 또한, 광범위한 암 억제 효과를 지닌 ‘글루코브라시신(Glucobrassicin)’은 일반적으로 브로콜리에 들어있는 0.7mg/g 보다 많은 평균 0.8mg/g이 함유돼 있는 것으로 확인됐다. 암 유발 물질을 제거시키는 전구체(전 단계 물질)로 알려져 있는 ‘글루코브라시카나핀(Glucobrassicinapin)’, ‘글루코나핀(Gluconapin)’도 각각 평균 1.3mg/g과 0.9mg/g이 존재하는 것으로 나타났다. 23개 배추 품종 중 총 글루코시놀레이트 함량이 가장 많은 품종은 ‘꼬리’로 14mg/g이나 들어 있었다고 보고했다.
- 글루코시놀레이트는 물에 잘 녹는 이온으로 배당체(glucosides)에 속하며, 자연에는 약 130가지 이상의 서로 다른 글루코시놀레이트들이 알려져 있는데, 아미노산(트립토판 : Tryptophan, 메티오닌 : Methionine, 페닐알라닌 : Phenylalanine, 티로신 : Tyrosine)들로부터 합성된다 (Figure 1).
- 글루코시놀레이트는 다른 아미노산 전구체의 구조를 바탕으로 세 그룹으로 분류될 수 있다. 즉, 1) Methionine, isoleucine, leucine 또는 valine으로부터 유도된 aliphatic 글루코시놀레이트 2) Phenylalanine 또는 tyrosine으로부터 유도된 aromatic 글루코시놀레이트 3) Tryptophan으로부터 유도된 indole 글루코시놀레이트이다. 특히, indole 글루코시놀레이트는 배추과에서 중요한 이차대사산물의 그룹이다.

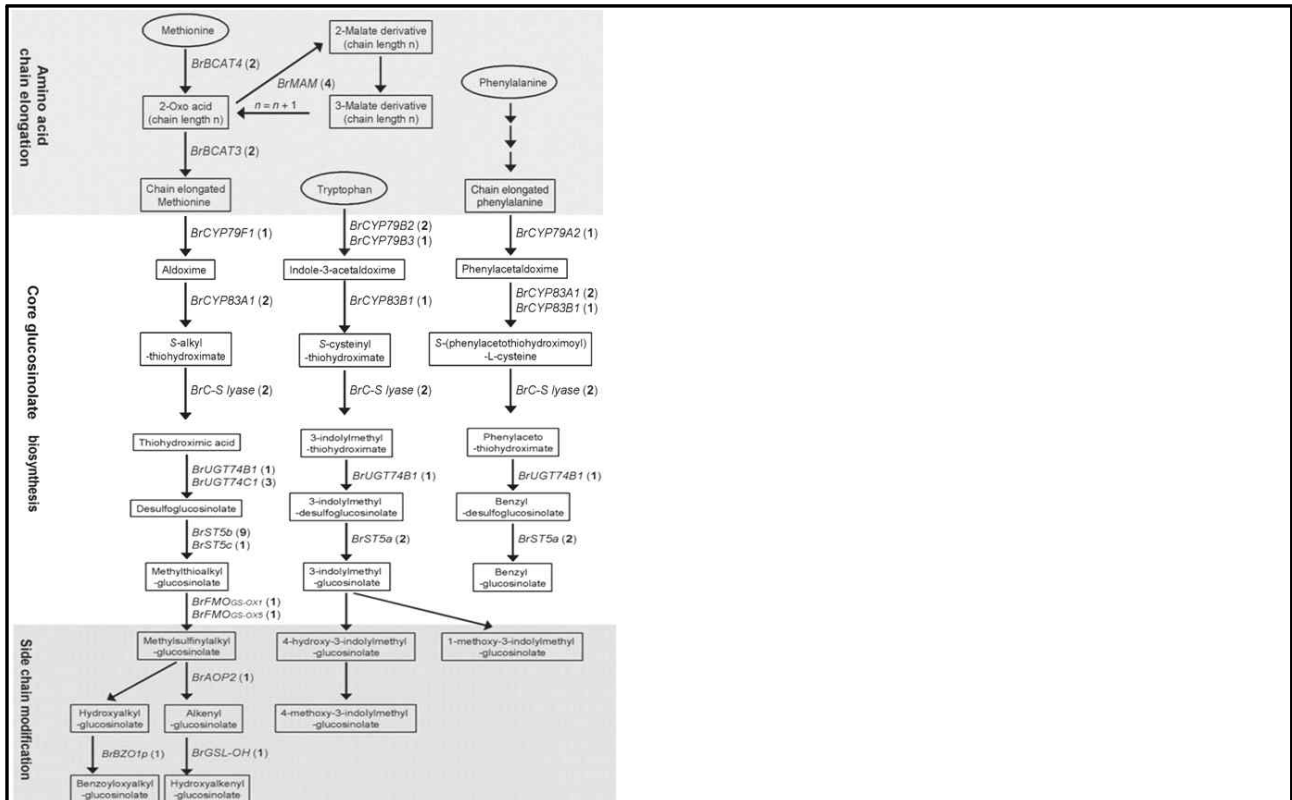


Figure 1. Biosynthesis pathways of the three major groups of glucosinolates in *B. rapa*. The genes involved in each step are shown. Numbers in parenthesis denote gene copy numbers (Zang et al., 2007).

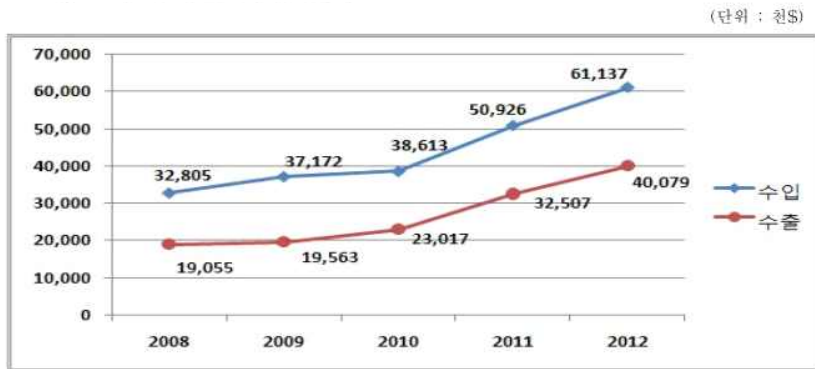
- Aliphatic과 aromatic 글루코시놀레이트의 생합성은 세 단계로 이루어진다. 1) 첨가된 methylene 그룹들이 side chain으로 삽입되는 단계인 amino acid chain elongation, 2) core glucosinolate 생합성 단계 3) side chain modification 단계
- Aliphatic 글루코시놀레이트 합성의 처음 단계는 elongated homologs 형태를 만들기 위해서 methylthioalkylmalate synthase (MAM)에 의해 촉매된다. Core structures는 cytochrome P450 enzymes, CYP79와 CYP83에 의한 산화과정을 통해 만들어지고, 다음으로 C-S cleavage, glucosylation, sulfation에 의해 만들어진다. 마지막으로, side chains는 oxidation, elimination, akylation 또는 esterification에 의해 modify된다. 이 단계에 관련된 유전자들은 *FMOGS-OX1-5*, *AOP*, *G4-OH*, *BZO1* 등은 최근 분리되었다 (Figure 1).
- 또한, GSLs 생합성은 biotic과 abiotic 스트레스에 반응하고 R2R3-MYB family에 속하는 Transcription factors (TFs)의 복잡한 network에 의해 대사 작용이 이루어진다. MYB28, MYB76, MYB29는 aliphatic GSLs 생합성 조절에 특이적으로 관여하는 조절인자이다, 반면에 MYB51, MYB122, MYB34는 indolic GSLs를 조절하는 유전자이다.
- 글루코시놀레이트 생합성에 관련된 110개의 유전자를 이용하여 글루코시놀레이트가 많이 함유된 배추를 찾는 마커를 개발하는 연구가 필요하다.



(1) 세부프로젝트 도출 배경

□ 중국, 인도 등 시장의 경제력 발달과 더불어 시장 수요 및 요구도 증가

- 최근 5년간 채소종자 수출입액은 지속 증가 추세로 수입액은 5년 평균 17%, 수출액은 5년 평균 21% 증가함. - 2011년 대비, 2012년도 수입은 20%, 수출은 23%로 증가함 (그림 1, 그림 2)



<그림 1. 채소종자 연도별 수출입액>

연 도		2008	2009	2010	2011	2012
수 입	수량(kg)	1,591,354	1,143,297	1,348,409	1,795,351	2,010,527
	금액(천\$)	32,805	37,172	38,613	50,926	61,137
	전년 금액대비(%)	86	113	104	132	120
수 출	수량(kg)	312,988	455,796	348,195	690,498	544,606
	금액(천\$)	19,055	19,563	23,017	32,507	40,079
	전년 금액대비(%)	92	103	118	141	123

<그림 2. 채소종자 연도별 수출입 현황>

- 배추를 비롯하여 십자화과 채소는 채소종자 수출액의 약 40%를 차지하는 농업적, 경제적으로 매우 중요한 작물임. 한국에서는 김치의 주재료로 사용되는 배추는 국내 수입 및 수출액을 보면 고추, 무, 양배추에 이어 네 번째로 큰 종자시장을 이루고 있으며, 배추는 종자 수출액의 9%로 지속적으로 수출 증가 추세임 (표 1).
- 우리나라 배추품종의 육종기술은 세계적인 수준이나 내수시장은 정체된 상태이며 중국 경제발달과 더불어 종자 시장의 급성장하고 있음.
- 중국이나 인도와 같은 주요 배추종자 소비 대상으로 수출을 위해서 내병성 계통은 배추 품종의 품질 개선과 맞추어 기본으로 요구되는 형질임.

<표 1. 2012년도 채소종자 작물별 수출입 현황>

	수입							
		금액(천\$)	전년대비(%)		수량(kg)		전년대비(%)	
			수량	금액			수량	금액
고추(단고추 포함)	45,750	8,093	101	135	19,999	9,934	141	158
무	928,280	9,022	115	145	168,557	6,924	104	197
양배추	66,438	2,914	113	143	30,063	3,688	78	84
<b>배추</b>	<b>151,834</b>	<b>1,565</b>	<b>210</b>	<b>163</b>	<b>60,104</b>	<b>3,535</b>	<b>110</b>	<b>110</b>
토마토	3,660	6,102	160	100	1,561	3,177	245	303
당근	127,194	4,669	175	175	46,993	2,180	59	65
시금치	333,467	2,883	86	98	128,597	1,927	56	57
브로콜리	40,174	1,579	237	157	3,918	1,186	143	173
오이	16,120	1,009	100	133	11,457	1,107	87	89
호박	93,633	5,680	85	109	11,557	854	71	90
수박	12,434	1,146	97	119	6,527	679	523	504
양파	50,622	1,289	112	103	3,878	366	77	79
상추	50,531	885	116	140	779	170	77	231
과	89,125	2,542	85	90	3,395	168	38	47
참외	1,263	150	99	103	57	59	111	104
기타	-	-	-	-	47,164	4,127	75	120
계	2,010,527	61,137	112	120	544,606	40,079	79	123

출처: 한국종자협회, 2013

- 수출 시장의 경제력 향상과 더불어 배추 시장에서 요구하는 소비자 기호가 빠르게 변하고 있으며 이에 호응하기 위하여 전통육종에서 소요되는 육종 연한 단축으로 육종의 효율화가 요구됨.

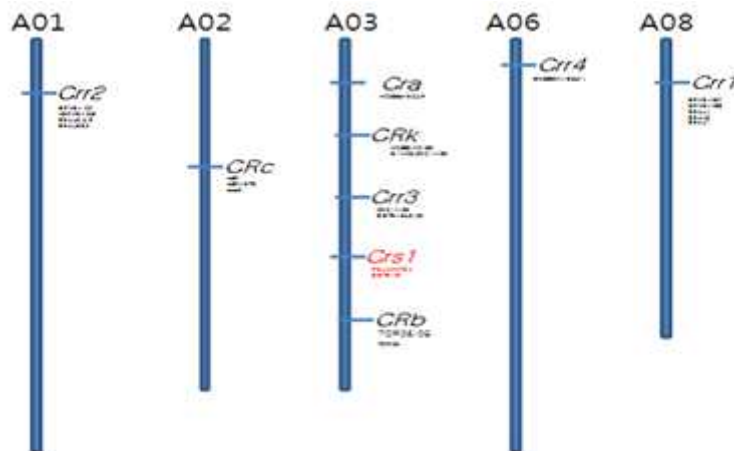
□ 기후변화 및 경쟁이 치열한 시장 환경은 새로운 육종 시스템을 요구함

- 기후변화로 농산물 생산가능 권역권이 변화, 빈번하게 발생하는 등 기존의 종자 공급체계가 변화, 농작물 재배적지 변동, 농업용지 감소, 병해충 피해증가 등 수확량 및 품질저하 등의 문제로 기후변화에 적응이 가능한 작물의 개발은 현재의 가장 중요한 과제중 하나임.
- 십자화과 작물에서 뿌리혹병은 세계적으로 문제화 되고 있음.
- 생육 초기에 발병할 경우 폐기하여야 하며, 중기 이후에는 30~70%의 수량 감소.
  - 자연친화적이며 약제방제 비용과 노력을 절감할 수 있는 내병성 품종이 필요함.
  - 한국, 중국, 일본, 동남아시아, 유럽 및 미주 지역에서 병이 자주 발생함.
- 배추, 양배추, 브로콜리, 무 등 다양한 배추과 채소 재배의 제한 요인이 됨.

□ 수출용 고부가가치 품종 개발을 위해 내병성(뿌리혹병, 노균병, 바이러스병 등) 특성 반드시 필요

- 특히 중국 남부 및 고랭지 지역에 뿌리혹병이 만연함에 따라 일본 및 한국의 저항성 품종을 수입하여 재배하고 있음. 향후 병 저항성 품종의 요구도가 증가할 것으로 보이므로 육종소재 탐색 및 관련 DNA 마커의 개발이 필요함.
- 병원체는 토양 내에서 포자체로 오랜 기간 생존하고, 유전적 다양성으로 race가 분화되어 있어 race에 따라 병원성도 다르게 나타나는 경우가 많아 방제를 어려움.

- 우리나라는 1990년 중반부터 채소 종자회사를 중심으로 저항성을 지닌 품종이 개발되어 상용화되고 있으나 연작 및 병원체의 race 변화에 의하여 저항성 품종이 이병화되기도 하여 새로운 저항성 유전자 도입, 유전양식 구명, 나아가 복합 race 저항성 품종육성이 요구됨.
- 뿌리혹병의 발병은 환경에 민감하게 반응하며 다수의 유전자가 관여하는 것으로 보고됨, 현재 까지 배추에서 뿌리혹병 저항성에 관여하는 8개의 유전자좌(*CRa*, *Crr1*, *Crr2*, *Crr3*, *Crr4*, *CRb*, *CRc*, *CRk*)가 보고되었음. 이들 저항성 QTLs 을 배추의 표준 유전자지도에서 살펴보면 5개의 연관그룹에 위치하고 있음(그림 3).
- 병원균의 변이가 신속하므로 병저항성 유전자가 서로 다른 다양한 저항성 계통을 육성하여 군주별 저항성 품종 개발 기반 조성.
- 뿌리혹병을 극복하기 위해서는 서로 다른 뿌리혹병 저항성 유전자좌가 집적되어 있는 복합 저항성 (유전자좌 보유) 품종 요구됨.



<그림 3. 배추에서 기 보고된 뿌리혹병 저항성 형질 연관 유전자좌의 종류 및 위치>

\* 붉은색으로 표기한 *Crs1*은 무에서 보고된 유전자좌

- 노균병 (Downy mildew, *Hyaloperonospora parasitica*) 은 기온이 서늘하고 습도가 높을 경우 작물의 유효기 및 성체의 지상부에 나타나는데 배추에 발병하는 병 중에서 식물의 생존에 심각한 영향을 주지는 않으나 병해를 입은 배추는 상품성이 떨어짐.
- 노균병은 배추뿐만 아니라 기타 십자화과 작물(*B. napus*, *B. oleracea*)에서 광범위하게 보고됨. 배추에서 유전양식은 단인자 우성으로 작용한다는 보고(Yuen 1991; Niu et al. 1983).
- 양배추에서 저항성 형질이 식물의 유효기와 성숙모본시기에 서로 다른 유전자에 의해 조절된다는 보고(Coelho and Monteiro 2003; Monteiro et al. 2005)가 있었는데 배추도 유사한 것으로 보고됨. Yu 등(2009)은 유효기에 나타나는 노균병 저항성 형질에 관여하는 QTLs 을 분석하여 *BraDM* 으로 명명하였으며 A8 연관그룹에 위치한다고 보고. Kim 등(2011)은 성숙모본의 유전 분석의 수행 결과 단인자 우성으로 확인하였고 저항성 형질 유전자좌 (*BrRHP1*)가 A1 연관그룹에 위치함을 밝히고 근접한 마커를 (M05, N18) 보고하였음.

## □ 시장 요구도와 경쟁력을 위해 육종의 효율화를 위한 방법 필요

- 관행육종과 분자육종 기술을 겸비한 육종인력 양성.
- 축적된 배추 유전체 분석 기술을 응용하여 배추과 유전체 정보 및 이를 기반으로 유용 형질 선 발용 분자표지 개발 선점.
- 우량형질을 도입하기 위해 보편적으로 사용하는 여교잡 기법에서 BC4-BC6세대까지 세대를 진 전함에 있어서 수년이 소요될 뿐만 아니라 여교잡으로 고정되는 정도가 염색체 부위, 형질, 계 통, 교배조합에 따라 달라짐.
- 유전체 기반의 육종 시스템을 구현하기 위해서는 육종소재에 대한 정확한 데이터베이스, 표준 유전체 정보, 모든 유전자의 유전양상을 이해할 수 있는 초고밀도 유전지도(Ultra-density genetic map)가 필요함.
- 배추는 표준유전체가 완성되고 resequencing이 활발하게 이루어지면서 genome-wide SNP와 같은 대규모 분자마커가 확보 가능함.
- SNP는 유전체 전반에 걸쳐 분포하며 그 수가 방대하여 특정 유전자에서 allelic variation 구분 이 가능하여 각종 진단을 위해 사용되고 있고, 육종에서 형질 연관 마커로서 뿐 아니라 고밀도 유전자지도 작성용으로도 주목 받고 있음 (Rafalski 2002; Snowdon and Friedt 2004; Rahman et al. 2007)
- 기존 배추 10종을 resequencing하여 생산한 데이터의 SNP 분석 결과를 보면 100,000 ~ 500,000 개의 SNP를 확보할 수 있고, 이는 대부분의 유전자를 포함하는 충분한 분자마커를 개발할 수 있어, resequencing을 이용한 SNP분석이 대량분자표지 확보에 가장 효율적인 방법으로 판단됨.
- 여교잡 육종에 필요한 MABC(maker-assisted backcrossing) 분자마커는 염색체를 적절히 구획 하여 background selection을 실시하는 기술임. 이를 위해 표준 유전체 정보를 이용한 물리적인 거리 단위로 구획을 나누거나 유전지도를 통한 유전적 거리 단위로 구획을 나누어 효과적인 background selection 조건을 규명해야 함.
- Bi-parent 유래의 RIL 집단을 sequencing 하고 이들 정보를 기반으로 교배집단에서 재조합이 일어나는 위치, 정도를 확인하여 배추의 10개 염색체를 나타내면서 목표하는 특정 형질이 교배 시에 움직이는 크기(재조합 단위)를 SNP로 가시화 하고자 함.
- 교배 및 선발이 반복되는 육종과정에서 background selection 용 분자마커를 활용한 육종시스 템 적용이 목표 형질에 대한 집적 (gene pyramiding), 선발 (selection), 및 유용형질 외 불순 부위 분리 (gene dragging) 에 유용함.

[제4세부]

- 1) 최근 전세계적으로 배추과 채소작물에 대한 뿌리혹병의 피해가 점차 더 심각해지고 있는 추세이며 이를 극복하기 위해 선진국에서도 많은 연구자들이 관련연구에 투입되고 있는 실정임
- 2) 병원균의 독특한 특성상 한번 감염되면 지속적으로 피해를 일으키며 피해는 더 심해짐
- 3) 김치의 기본 재료로써 우리나라 주요 채소작물 중 하나인 배추와 무에도 최근에 뿌리혹병이 작물의 다수확에 최대 걸림돌이 되고 있으나 화학적 방제 외에 마땅한 방제법이 없고 국내 균주들에 대한 특성분석 조차도 제대로 이루어져 있지 않고 있음
- 4) 가장 효과적인 방제법은 저항성 품종 육성과 예방적 방제 이지만 국내 균주들의 race등 특성분석이 되어있지 않은 상황에서 제대로 된 저항성 품종육성은 불가능하며, 예방차원의 방제를 위해서는 토양의 감염밀도 및 병원균 존재유무를 파악하는 것이 우선적이며 급선무임.
- 5) 사전에 뿌리혹병균의 존재여부를 판정하는 데는 종특이적 primer의 개발이 필수이며 그 최적 활용 방법 개발은 병방제상 중요한 의미가 있으며 토양을 비롯한 종자의 감염유무 및 개발된 품종의 내병성분석을 통해 재배적 방제의 실용화가 가능함

### 3 절. 연구개발개발결과의 성과목표

#### 1. 연구성과목표

(단위 : 건수)

구분	품종개발		특허		논문		분자마커개발	유전자원		DH계통개발	유전자원분양	기술이전	소포자배양서비스	홍보	인력양성
	출원	등록	출원	등록	SCI	비SCI		수집	등록						
1차년도					1			10	63				100		1
2차년도	1				1	2		10	23	1			100		1
3차년도	2				3	1		10	20	1	5	1	100		1
4차년도	1				3	2		10	15	1	5		150		1
계	4				8	5		40	121	3	10	1	450		4

#### 2. 목표대비 연구성과

(단위 : 건수)

구분	품종개발		특허		논문		분자마커개발	유전자원		DH계통개발	유전자원분양	기술이전	소포자배양서비스	홍보	인력양성
	출원	등록	출원	등록	SCI	비SCI		수집	등록						
1차년도					1			28	20		8		100	2	1
2차년도	1				3		4,822	11	10	29	9		150		1
3차년도	2				1	2	3,299	14	35	23	5	1	50	2	5
4차년도	1				3	1	18,066	8	85	29	16		195	3	4
계	4				8	3		61	150	81	38	1	495	7	11

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1 절. 국내 기술개발 현황

#### 1. 제1세부 과제: 배추 유전자원 수집 및 육종재료 신속작성 기술

- 배추는 채소 전체 재배면적 261천ha 중 약 14%인 36천ha의 재배면적을 차지하고 전체 채소 생산량 9,747천 톤 중 28%인 2,681천 톤을 차지하는 주요 채소 중 하나임(농림수산식품 주요통계, 2012)
- 배추는 소비량이 많고 김치 형태로 가공되어 일년내내 꾸준한 소비가 이루어지는 채소로 공급 하락이 가격변동에 미치는 영향이 심함
- 시설 재배가 이루어지고 있는 봄배추는 상대적으로 연도별 단수의 변동이 적으나 고랭지와 가을, 월동 재배 작형에서는 연도별 단수 증감 폭이 크며, 이는 최근 잦아진 이상기상 및 병해충 대량발생의 영향으로 판단됨
- 배추를 주재료로 하는 김치, 절임 배추 등으로 가공 또는 반가공 되어 유통되며, 농가 및 많은 산업체의 소득에 기여하고 있음
- 가공식품인 김치, 레트르트 식품의 경우 국내 소비 뿐 아니라 해외 수출 시장도 형성되어 있어 산업적 영향이 큼
- 배추 계통 프로젝트 종료(2011) 이후 병저항성 관련 유전 정보가 해독되어 사용 가능한 분자 표지가 이미 개발되었음
- 다양한 분자표지의 효과적 적용이 가능한 실험 조건과 장비가 확보되었음
- MAS(Marker assisted breeding)를 수행할 수 있는 노하우와 시설이 확보되었으며, 세대단축이 가능한 온실과 춘화처리 시설이 확보되어 있음
- 배추의 자가불화합성 및 응성불임성을 적절하게 활용하여 다양한 일대잡종 품종을 개발하였음. 특히 만추대성 품종을 수출함으로 중국에 새로운 재배 작형을 도입하였으며 현재는 봄 재배용 배추, 무 품종의 90%정도는 한국 품종이 재배되고 있음.
- 배추는 생육 기간이 2~3개월로 다른 채소보다 짧으나, 동 기간 형성되는 Bio-mass의 양은 3~4kg/개체로 많음. 따라서 기능성 물질 고함유 계통 개발 시 그 물질 생합성량이 많음, 최근 전세계적으로 고조되는 건강 기능성 물질을 효과적으로 공급 할 수 있을 것으로 기대되며, 인공 합성 물질의 거부감도 없어 배추의 부가가치 향상에 매우 효과적으로 판단됨
- ☞ 국립원예특작과학원 채소과에서는 1900년대 말부터 배추과 채소의 소포자 배양 관련 연구를 실시한 결과 본 과제를 협약할 당시인 2013년도에는 **소포자 배양법**을 통하여 **단기간에 유전적으로 고정된 다양한 계통의 육성이** 가능한 실정임

#### 2. 제2세부 과제: 글루코시놀레이트 고함유 배추 육종 지원을 위한 실용적 분자표지 개발

##### 가. 배추과 작물의 글루코시놀레이트 분석

배추과 작물을 대표하는 글루코시놀레이트는 유기화합물의 일종으로 포도당으로부터 유래한

황, 질소 등을 함유하고 있다. 물에 잘 녹으며 글루코시드에 속한다. 자연에는 약 120가지의 서로 다른 글루코시놀레이트들이 알려져 있는데, 아미노산(트립토판, 메싸이오닌, 페닐알라닌, 타이로신)들로부터 합성된다. 글루코시놀레이트와 그 분해효소인 미로시나제는 정상적인 조건에서 물리적으로 분리되어 있으나 조직이 파괴되면 글루코시놀레이트가 미로시나아제에 의해 포도당 계열이 분해되면서 이때 남아 있는 분자는 싸이오사이안산염인 아이소싸이오사이아네이트 또는 나이트릴로 변화된다. 일반적으로 HPLC를 이용하여 분석하며, 국내에서는 농촌진흥청과 충남대학교에서 분석이 활발하게 이루어지고 있다.

#### 나. 글루코시놀레이트 고함유 배추

국민소득수준의 증가와 삶의 질 향상, 고령화 사회 진입에 따라 건강의 유지 및 증진이 무엇보다 중요하다는 사회적 트렌드가 형성되면서 건강기능식품산업에 대한 관심이 더 높아졌다. 관련 업계 전문가들에 따르면 건강기능식품으로 촉발된 식품과 의약품의 산업간, 학문간, 시장간의 부분적 통합 움직임이 활발히 이뤄지고 있어 잠재적 시장성은 더욱 확대될 것으로 전망된다. 기능성배추 또한 최근 일반인들에게 큰 관심을 끌고 있으며 종묘회사를 중심으로 기능성 배추 품종 육성이 활발히 진행 중이다.

#### 다. 글루코시놀레이트 생합성 관련 분자표지 개발

국내에서는 글루코시놀레이트 생합성 관련 분자표지 개발 시도가 이 과제를 통하여 처음 시도된 것으로 알고 있다.

### 3. 제3세부 과제: 분자 및 유전체육종 효율화 시스템 개발

#### 가. 배추과 작물의 내병성 형질 연구 및 분자표지 개발

토양에 있는 미생물 *Plasmodiophora brassicae*에 의해 야기되는 뿌리혹병은 토양전염성 식물병으로 배추, 무, 양배추, 브로콜리 등 배추과 채소에 발생하여 전 세계적으로 커다란 피해를 주고 있다. 병원체는 토양 내에서 포자체로 오랜 기간 생존하고, 유전적 다양성으로 race가 분화되어 있어 race에 따라 병원성도 다르게 나타나는 경우가 많아 방제를 어렵게 한다 (Wallenhammar et al. 1996; Hirai et al., 2006). 현재 배추에서 뿌리혹병 저항성 형질에 관여하는 유전인자로는 11 종류의 유전자좌가(*CRa*, *CRaki*, *Crr1*, *Crr2*, *Crr3*, *Crr4*, *CRb*, *CRc*, *CRk*, *PbBa 3.1*, *PbBa 3.3*) 보고되었다(Chen et al. 2013). 배추 육종에서 뿌리혹병 저항성 형질은 turnip type의 형질을 교배육종으로 도입한 것으로 알려졌다. *CRa*는 Matsumoto(1998) 등이 뿌리혹병 저항성 QTLs을 보고하였고, Hayashida(2008) 등은 이를 쉽게 이용 가능하도록 SCAR 마커로 전환 하였다. Suwabe (2003) 등은 Siloga S2 (European fodderturnip)에서 유래한 저항성 유전자좌 3개를 보고하였는데, *Crr1*이 주요 저항성 형질에 작용하며 Cloning를 통하여 *Crr1a*와 *Crr1b*를 구분하였고 *Crr1a*의 유전자를 동정하였다. *Crr2*는 *Crr1*과 *Crr4*에 영향을 주는 미동인자로 보고하고 이에 연관된 SSR, SNP 마커를 보고하였다. *Crr3*는 Milan White에서 유래한 저항성 QTLs로 단인자 우성으로 작용하는 것으로 알려져 있는데 Hirai (2004) 등이 형질과 연관된 RAPD를 Saito(2006) 등이 STS 마커를 개발하였다. Piao (2004)는 저항성인 ‘CR Shinki’를 재료로 하여 저항성 형질 연관 QTLs을 찾아 ‘*CRb*’로 명명하였고, 이에 연관된 AFLP/SCAR 마커를 보고하였고, Sakamoto (2008) 등은 European fodder turnip인 ‘Debra’에서 유래한 저항성 유전자좌를 *CRc*, *CRk*라 명명하였다. Chen (2013) 등은 European fodder turnip인 ‘ECD04’에서 유래한 저항성 유전자좌를 *PbBa3.1*, *PbBa 3.3*로 명명하였다. 이들 저항성 QTLs

를 배추의 표준유전자 지도에서 살펴보면 5개의 연관그룹에 위치하고 있다. 즉, *Crr2*는 A1, *CRc*는 A2, *Crr4*는 A6, *Crr1*은 A8 그리고 *Cra*, *CRk*, *CRb*, *Crr3*, *PbBa3.1*, *PbBa 3.3*는 A3에 위치하고 있다.

#### [위탁과제]

1. 배추 붕소결핍증에 관계된 유전 육종 적 연구는 국내외 어느 곳에서도 찾기가 힘 든다. 일본과 중국 등 동양에서 배추가 주로 재배되는데 충분한 붕소를 밀거름으로 사용하여 어느 정도 예방이 가능한 것으로 나타나 있다. 그리고 붕소결핍증이 열성으로 나타나는 것처럼 보여 F1품종을 육종하는 경우 대부분 잘 나타나지 않는다. 따라서 배추 붕소결핍증은 1980년대까지 흔히 발생하는 재배 상 큰 생리장해였으나 최근에는 발생하는 예가 별로 없다.
2. 배추 붕소결핍증의 고유 증상은 엽병(잎의 줄기 부분)이 가로 또는 세로로 갈라지면서 갈색의 딱지가 생기는 것이다. 배추 뿌리혹병의 모든 균주에 내병성을 나타내는 순무가 있는데 순무는 배추와 동일종임으로 교잡이 잘 된다. 따라서 그 인자를 배추에 도입코자 서로 교잡하여 잡종을 만든 후 소포자 배양으로 DH계통을 육성하였다. 그런데 그 DH계통 중에 붕소결핍증상을 나타내는 계통이 의외로 많았다. 이 계통들의 붕소함량과 포장에서의 붕소결핍증상발현과의 상관관계를 밝혀두면 앞으로의 붕소 결핍증과 관련된 연구의 기초와 재료가 될 것으로 생각된다.

#### 4. 제4세부 과제: 시판 및 수출용 배추와 무 뿌리혹병 검정기술 개발

가. 병원균의 순수 race 획득 : 실험이 굉장히 어려운 순환물기생자이다 워낙 하등균류이기 때문에 대부분의 연구기관에서도 1-2개 race만으로 실험 중에 있다. 순수 race를 분석한 종자회사는 전무하다.

나. race 분포지도 작성 : 국내에서는 전무하며 이번 시도가 최초이다.

다. 국내 균주의 특성검정 : 학문적으로나 기술적으로 아직 초보이며 극소수 기관에서만 수행되고 있다.

라. 순수 DNA 확보 연구 : 국내에서는 시도된 적이 없는 새로운 실험이다.

마. 생물적 방제 : 일부 기관에서 연구된 바 있고 세계적 관심과 추세에 따라 지금도 연구 중에 있다.

바. 접종원의 장기저장법 개선 : 현재까지도 모두 140여 년 전에 개발된 방법을 그대로 따라하고 있다.

사. 저항성 검정방법 : 복잡하고 시간이 오래 걸리고 문제점이 많은 방법을 사용하고 있다.

## 2 절. 국외 기술개발 현황

### 1. 제1세부 과제: 배추 유전자원 수집 및 육종재료 신속작성 기술

가. 전 세계적으로 상업화된 매우 다양한 배추 품종들이 개발되었으며, 특히 배추과 작물과 유전적으로 상당히 유사한 애기장대 풀을 이용한 유전 및 생리 관련 연구가 많이 수행되었음. 최근 연구 진행 중인 Multi-national Brassica Genome Project 등 유전자 염기서열



분석 관련 연구가 활발하게 진행 중에 있음. 또한 이러한 연구 결과를 육종에 활용하기 위한 마커 개발 등 실용화를 위한 연구가 다방면에서 수행되고 있음(Brassica 2008 International Symposium).

- 나. 품종보호를 위한 옹성불임 자원의 개발 관련 연구가 1970년대부터 미국의 Cornell 대학교, 프랑스 Inra 연구소 등에서 활발하게 이루어졌으며, 현재는 무의 원형질을 도입한 다양한 옹성불임 배추, 양배추, 브로콜리 등을 개발하여 특허를 보유하고 있음.
- 다. 배추과 채소의 뿌리에 발생하는 뿌리혹병 또한 전 세계적으로 문제가 되고 있으며, 특히 일본의 경우 배추의 뿌리혹병으로 인하여 현재는 저항성 품종이 아니면 재배가 어려운 실정임. 일본야채다업시험장에서는 배추의 뿌리혹병에 저항성인 *Crr1*유전자 클로닝, *Crr2*, *3*, *4*유전자 연관 분자표지 개발, 형질전환 등 다방면으로 뿌리혹병에 완전히 저항성인 배추를 개발하고자 노력하고 있음(2007, Nature).

## 2. 제2세부 과제: 글루코시놀레이트 고함유 배추 육종 지원을 위한 실용적 분자표지 개발

### 가. 배추과 작물의 글루코시놀레이트 분석

배추를 채소로 먹는 주변 국가 특히 중국과 일본에서 글루코시놀레이트 분석이 활발히 진행 중에 있다.

#### 나. 글루코시놀레이트 고함유 배추

국외에서도 글루코시놀레이트 고함유 배추의 육종에 관한 연구 정보가 거의 없다.

#### 다. 글루코시놀레이트 생합성 관련 분자표지 개발

유럽에서 글루코시놀레이트 생합성 관련 분자표지 개발에 관한 논문이 발표된 적이 있었으며. 아직 연구 정보가 많은 편이 아니다.

## 3. 제3세부 과제: 분자 및 유전체육종 효율화 시스템 개발

### 가. 배추과 작물의 내병성 분자표지 개발

배추에서 뿌리혹병에 대한 연구는 중국, 일본, 한국을 포함한 아시아 지역에서 활발히 진행 중이다. 배추과 작물에 속하는 유채의 내병성 연구를 위해 캐나다에서 분자표지에 관한 발표를 했었고, 내병성 기작에 대한 연구를 독일과 스웨덴에서 하고 있다.

## 4. 제4세부 과제: 시판 및 수출용 배추와 무 뿌리혹병 검정기술 개발

가. 중국, 일본, 유럽 각국들이 자국의 배추과 작물의 안정적 생산과 내병성 관련 연구 발전을 위해 자국 내 병원균 race의 분석에 힘쓰고 있다.

나. 일부 국가에서는 병원균의 근본적 특성을 밝혀내고자 극히 일부 race에 대한 염기서열 분석을 마쳤거나 시도하고 있다.

다. 배추과 작물과 병원균간의 발병 관여 유전자나 상호작용 분석에 노력 중에 있으나 모두 한결같이 순수 다량 DNA 확보에 어려움을 겪고 있다.

라. 환경친화적 병 방제를 위한 뿌리혹병의 생물적 방제는 작물의 상대적 중요성과 병원균의 생태적 특성 때문에 그리 활발하지가 않은 편이다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1 절. 제1세부 과제: 배추 유전자원 수집 및 육종재료 신속작성 기술

#### 1. 1년차 연구 내용 및 결과

##### 가. 연구 내용

- 다양한 특성 (기능성, 맞춤형, 내재해성 및 내병성)의 고순도 Doubled-haploid(DH) line의 개발 및 배추에 효과적인 소포자 배양법 개발
- 1단계 종료시까지 품종보호 출원 3점, 유전자원 등록 75점, 비SCI논문 2편, DH line 등 유전자원 분양 10점, 배양서비스 450점 실시를 목표함
- 고부가가치 소재의 지속적 개발 및 공급으로 배추 품종 육성의 활력 제고(유전자 풀 확대로 1인 육종의 한계 극복)
- 민간 회사 육종 담당자와 긴밀한 협력 : 육종 목표 설정(내병성, 기능성, 황심계 소형 등)
- 소포자 배양으로 육성된 계통은 순도가 높아 일대잡종 개발용 재료로 가치가 높아 관련 기술 및 육성 계통의 지속적 개발이 필요
- 배추의 효과적 소포자 배양법 구명 및 서비스 실시 : 배추의 소포자 배양에 효과적인 배지 9조건 선발, 종묘회사 요청 소포자 배양 배상체 분양 및 소포자 배양 기술 이전
- 국내외 다양한 배추 자원 수집, 평가, 선발을 통한 목적별 수출용 육성 재료 선발 : 자원수집(중국, 미국, 일본, 이스라엘 등, DH line 평가 및 증식하여 우수 자원 등록

##### 나. 재료 및 방법

###### (1) 반수체 배양용 재료 수집 및 재배

- 다양한 자원의 원예적 특성 평가 : 원예적 특성은 봄 및 가을 노지 재배를 통하여 실시
- 선발 : 포장 공개 행사 등을 통하여 종묘회사 및 공동 연구 기관 간 의견 조율
- 평가 : 2013년 파종기 이전 수집된 자원 중 일부는 노지 재배를 통하여 평가
  - 노지 가을 재배 일정 : 파종(2013. 8. 13.) → 정식(2013. 9. 4.) → 작물 관리(표준영농교본에 준하여 관리) → 수확 및 조사(2013. 11. 21.~) → 선발(2013. 11. 28.)

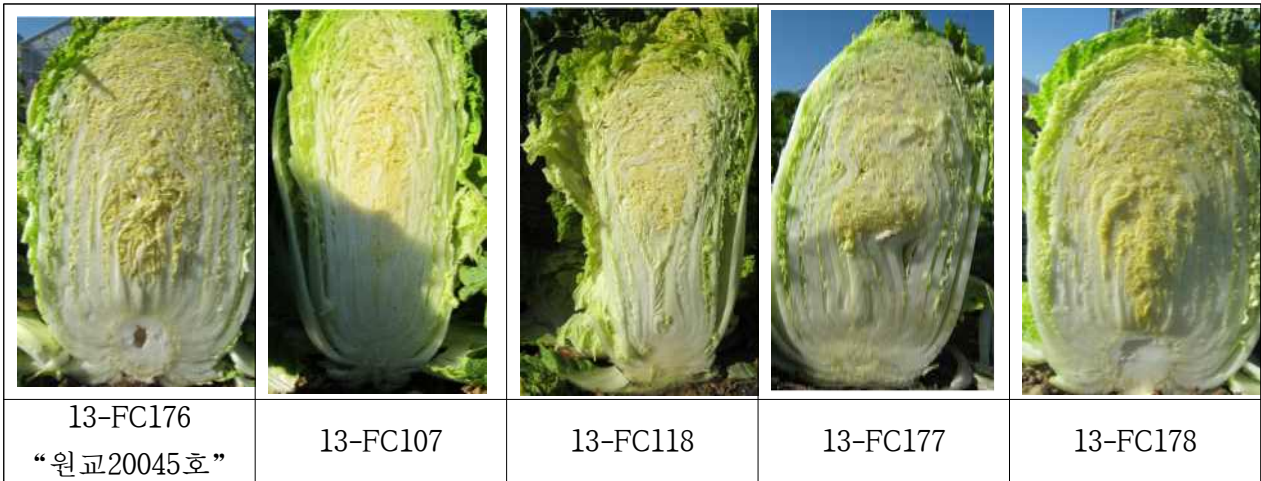
###### (가) 예비시험 결과 육성된 31계통 종자 증식 및 특성 평가 완료

- 소포자 배양을 통하여 육성된 계통의 가을 재배를 통한 특성 평가 : 민간 종묘회사와 공동 선발 결과 새로운 품종 선발 (13-FC176, 원교20045호) 및 원예적 특성이 양호한 4계통 선발 (13-FC107, 13-FC118, 13-FC177, 13-FC178)

<표 1> 신규 육성된 31계통의 채종 및 파종 내역

13라벨	교배번호(품종명)	채종 년도	조제 번호	13라벨	교배번호(품종명)	채종 년도	조제 번호
13-FC106	09-CFK302-2	2012	2	13-FC122	09-CFK311-8	2012	26
13-FC107	09-CFK302-4	2012	3	13-FC123	09-CFK312-3	2012	28

13-FC108	09-CFK302-13	2012	4	13-FC124	09-CFK312-4	2012	29
13-FC109	09-CFK302-14	2012	5	13-FC125	09-CFK312-5	2012	30
13-FC110	09-CFK303-1	2012	6	13-FC126	09-CFK312-6	2012	31
13-FC111	09-CFK303-2	2012	7	13-FC176	11-CFF136-1	2013	
13-FC112	09-CFK303-5	2012	8	13-FC177	11-CFF136-3	2013	
13-FC113	09-CFK303-7	2012	9	13-FC178	11-CFF136-6	2013	
13-FC114	09-CFK303-8	2012	10	13-FC179	11-CFF197-1	2013	
13-FC115	09-CFK303-10	2012	11	13-FC180	11-CFF197-2	2013	
13-FC116	09-CFK303-17	2012	17	13-FC181	11-CFF197-11	2013	
13-FC117	09-CFK311-1	2012	19	13-FC182	11-CFF197-17	2013	
13-FC118	09-CFK311-2	2012	20	13-FC183	11-CFF197-22	2013	
13-FC119	09-CFK311-4	2012	22	13-FC184	11-CFF197-48	2013	
13-FC120	09-CFK311-5	2012	23	13-FC185	11-CFF197-50	2013	
13-FC121	09-CFK311-6	2012	24				



<그림 1> 1차년도 선발 품종(원교20045호) 및 신규 선발 계통 4점의 모습

※ 선발 품종은 종자 증식을 위해 뇌수분 및 별교배를 실시하였으며, 추가로 선발된 4계통은 가을 포장 품평회를 통하여 종묘회사와 공동으로 선발되었음.

○ 새롭게 선발된 품종 농작물직무육성품종심의회 통과 : 원교20045호

## 농작물직무육성품종심의회 통과 신품종 배추 ‘원교20045호’ (1차년도)

1. 구분 : 중간모본
2. 육성내력 : 2009년 국내 수집종 ‘아시아노랑미니’ 배양 후대
  - 속노란 배추 선발 위해 2009년 국내 시판종 재배
  - 세대진전 : 속잎색이 노란 개체 선발 및 뇌수분(2010년)
  - 개체 선발 : 속잎색이 노란 개체 선발(배양 모본으로 활용)
  - 소포자 배양 : 2011년 겨울부터 2012년 봄
  - 종자 증식 : 2012년 가을
  - 소포자 배양으로 육성된 계통의 최종 선발은 2013년 포장 품평회 과정을 통하여 다양한

종묘회사의 배추 육종가들과 공동으로 선발 됨

3. 주요특성

- 육성계통은 속잎의 색택이 노랗고, 겉잎의 색택이 진하여, 소형의 조숙성 구를 형성함
- 대조인 불암3호에 비하여 지상부의 생육이 아담함

4. 적응지역 : 전국

5. 재배상 유의점 : 석회에 민감함

6. 보완을 요하는 특성 : 없음

7. 시험성적

가. 고유특성

<표 1> 13-FC176 고유특성

품종 및 계통명	초자	결구형	겉잎색	속잎색	엽형	모용	숙기
원교20045호 불암3호	소형	반포합	4.0	4.3	계란형	중	조
	중간	반포합	3.3	4.7	계란형	중	중

나. 가변특성

<표 2> 13-FC176 가변특성

품종 및 계통명	주중 (g)	구중 (g)	구폭 (cm)	구고 (cm)	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	겉잎수 (매)	속잎수 (매)
원교20045호	2,300	1,760	17.7	23.0	41.3	27.0	8.0	67.0
불암3호	3,383	2,178	19.7	26.0	51.0	33.0	13.0	75.3

다. 병해충 저항성 : 병충해 저항성은 대비종과 유사함

라. 수량성 : 6,900 kg/10a (대조구 : 10,149 kg/10a)

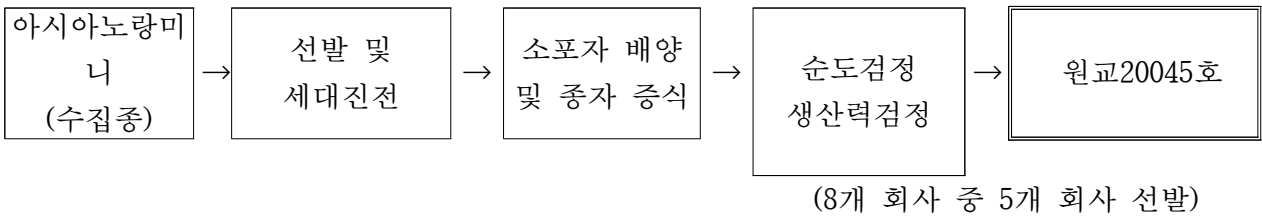
마. 품질특성 : 겉잎의 색은 진한 녹색이며, 속잎색은 연한 노랑으로, 소형의 구를 빠르게 형성함

8. 육성경과

가. 육성계통도 (13-FC176)

년 도	2009	2010	2011			2012	2013																				
세 대	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	TC <sub>1</sub>																								
구분	가을 재배	뇌수분	<table border="1"> <tr><td></td><td>아시아노랑미니</td></tr> <tr><td></td><td>노랑쌈배추</td></tr> <tr><td></td><td>셋노랑배추</td></tr> <tr><td></td><td>탐복배추</td></tr> <tr><td></td><td>진노랑배추</td></tr> <tr><td></td><td>아시아미니배추</td></tr> <tr><td></td><td>겨울노랑배추</td></tr> <tr><td></td><td>단맛배추</td></tr> <tr><td></td><td>서울배추</td></tr> </table>				아시아노랑미니		노랑쌈배추		셋노랑배추		탐복배추		진노랑배추		아시아미니배추		겨울노랑배추		단맛배추		서울배추	한국수집품종후대	1 2 3 4 5 6	--	원교 20045호
	아시아노랑미니																										
	노랑쌈배추																										
	셋노랑배추																										
	탐복배추																										
	진노랑배추																										
	아시아미니배추																										
	겨울노랑배추																										
	단맛배추																										
	서울배추																										
비고	속노란 품종 선발	선발개체 세대진전	선발 품종 파종 및 배양			소포자배양체 증식	순도 검정 후 선발																				

나. 육성계보도



9. 종자 확보량

- 현재 보유량 200립으로 증식 필요

10. 대체품종 : 없음

11. 임시보호권 처분 가능여부 :가능

12. 기타 참고사항

가. 품종명칭 추천안: 13-FC176 → 원교20045호

나. 품종특성표

No	특 성	표 현 형 태									출 원 품 종		대 조 품 종	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No	실 측 치	No	실 측 치
9 (*) Ⓢ (b)	바깥잎: 색깔	황 록 색	녹 색	회 록 색							2	4.0	2	3.3
22 Ⓢ (a)	구: 키			작 다		중 간		크 다			4	23.0	5	26.0
23 Ⓢ (a)	구: 너비			좁 다		중 간		넓 다			4	17.7	5	19.7
31	구 : 단단한 정도	매		약		중		강		매	5		5	

㉔ (a)		우약하다	하다	간	하다	우강하다			
33 (* ㉔	수확 성숙기	매우빠르다	빠르다	중간	늦다	매우늦다	3		5

다. 사진 제출(양식5)



<고순도 품종 ‘원교20045호’ 모습>

○ 국내외의 다양한 배추과 자원 수집 : 본 과제 수행을 위해 광저우 종자 전시회 출장 시 다양한 배추과 자원 종자 수집(배추 17점), 타과제로 베이징 출장 시 수집(배추 11점)



<그림 2> 중국 광저우 수집 배추 자원 17점 모습



<그림 3> 중국 북경 수집 배추 11점 모습

(2) 반수체 배양 수행

(나) 효과적 조건 구명 실험 및 배양 서비스(6개 회사,100점)실시

- 배추의 소포자 배양에는 품종의 유전적 소질, 재배 환경 등 다양한 요인이 작용하므로 한 두 개의 배양 조건을 선발하기는 어렵다. 따라서 다양한 배지를 한꺼번에 실험하는 것이 가장 효과적으로 판단되어 아래의 9가지 조건을 선발하였다.

<표 2> 배추의 소포자 배양 서비스에 사용된 선발된 배지 조성

배지번호	배지조성
1	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13%
1-A	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + Kao. Vit 1mg
1-B	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + Gamberg Vit 1mg
1-C	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + MS.Vit 1mg
1-D	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + Micronutrient
1-E	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + Macronutrient
2	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + NAA 50 $\mu$ l+BAP 50 $\mu$ l
3	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S15%

5	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + Micro Element 1mg + S13%
---	---

※ 화퇴가 충분할 경우 추가 배지 시험 실시 : 5-C, 6, 12, 13

<표 3> 배추 소포자 배양 서비스 실시중인 자원 20점 목록(품종당 5개체)

라벨	번호	소속	책임자	작물명	품종명	파종수	순위	프로젝트명
13-KC1	1	(주)코레곤	안춘희	배추	Koregon1	10	1	GSP프로젝트 배추 과제
13-KC2	2	(주)코레곤	안춘희	배추	Koregon2	10	2	GSP프로젝트 배추 과제
13-KC3	3	(주)코레곤	안춘희	배추	Koregon3	10	3	GSP프로젝트 배추 과제
13-KC4	4	(주)코레곤	안춘희	배추	Koregon4	10	4	GSP프로젝트 배추 과제
13-KC5	5	우리종묘(주)	김완규	배추	HM77***	10	1	만추대 고품질 한국형 봄배추 품종 육성
13-KC6	6	우리종묘(주)	김완규	배추	HM85***	10	2	만추대 고품질 한국형 봄배추 품종 육성
13-KC7	7	우리종묘(주)	김완규	배추	HM86***	10	3	만추대 고품질 한국형 봄배추 품종 육성
13-KC8	8	우리종묘(주)	김완규	배추	HM87***	10	4	만추대 고품질 한국형 봄배추 품종 육성
13-KC9	9	뉴란바이오	이병균	팍초이	PC-1(8A)	10	1	볶음용 팍초이 품종 육성
13-KC10	10	뉴란바이오	이병균	팍초이	PC-1(8O)	10	2	볶음용 팍초이 품종 육성
13-KC11	11	동부팜한농(주)	박용	배추	C1	10	1	뿌리혹병/바이러스 저항성 한국형 봄배추 품종
13-KC12	12	동부팜한농(주)	박용	배추	C2	10	2	뿌리혹병/바이러스 저항성 한국형 봄배추 품종
13-KC13	13	동부팜한농(주)	박용	배추	C3	10	3	뿌리혹병/바이러스 저항성 한국형 봄배추 품종
13-KC14	14	(주)바이오브리딩	이수성	배추	춘광 배추	10	1	중국 수출용 4계성 및 하우스용 배추



								품종 개발
13-KC15	15	(주)바이오브리딩	이수성	배추	불암플러스	10	2	중국 수출용 4계성 및 하우스용 배추 품종 개발
13-KC16	16	현대종묘(주)	조운섭	배추	WC	10	1	중국형 만추대 조생종 하우스용 품종육성
13-KC17	17	현대종묘(주)	조운섭	배추	KB-3	10	2	중국형 만추대 조생종 하우스용 품종육성
13-KC18	18	현대종묘(주)	조운섭	배추	CB-1	10	3	중국형 만추대 조생종 하우스용 품종육성
13-KC19	19	현대종묘(주)	조운섭	배추	266-3	10	4	중국형 만추대 조생종 하우스용 품종육성
13-KC20	20	원예원	박수형	배추과	Kr-kr4	10	1	배추 유전자원 수집 및 육종재료 신속작성 기술

(다) 소포자 배양 1차 서비스 결과 - 6개 회사에 1,094여점의 배상체 분양 완료

- 1차 서비스 결과 효과적 배지 선발 : 1, 5, 6번 배지와 비타민 등이 첨가된 1-B, 1-C, 1-D, 6-B, 6-C, 6-D 9종

배추소포자 배양 실험 표 모습 (2014. 4. 30.)

라벨	온도	1	2	5	6	1-A	1-B	1-C	1-D	1-E
13-KC 1	30°C	1d								
	32.5°C	2d								
13-KC 2	30°C	1d								
	32.5°C	2d								
13-KC 3	30°C	1d								
	32.5°C	2d								
13-KC 4	30°C	1d								
	32.5°C	2d								
13-KC 5	30°C	1d								
	32.5°C	2d								
13-KC 6	30°C	1d								
	32.5°C	2d								
13-KC 7	30°C	1d								
	32.5°C	2d								
13-KC 8	30°C	1d								
	32.5°C	2d								

<그림 4> 9종류의 선발 배지로 소포자 배양을 실시한 표 모습 (2014. 4. 30.)

<표 4> 배추 소포자 배양 1차 서비스 실시 결과

라벨	소속	최적 배지	배 개수	차선배지	배 개수	전체 배수	MS치상개수
13-KC1	(주)코레곤	1	14	6	3	25	20
13-KC2	(주)코레곤	6	3	-	-	3	3
13-KC3	(주)코레곤	1-B	101	1	8	111	98
13-KC4	(주)코레곤	1-B	145	1-C	31	204	173
13-KC5	우리종묘(주)	5	13	2	2	17	12

13-KC6	우리종묘(주)	1	19	6	12	54	45
13-KC7	우리종묘(주)	1	7	1-D	7	25	20
13-KC8	우리종묘(주)	6	24	1	3	35	10
13-KC9	뉴란바이오	13	150	12	8	170	126
13-KC10	뉴란바이오	1-B	1	-	-	1	1
13-KC11	동부팜한농(주)	1	15	1-D	8	35	35
13-KC12	동부팜한농(주)	1-B	220	5	60	441	291
13-KC13	동부팜한농(주)	1-C	3	2	1	5	4
13-KC14	(주)바이오브리딩	6	9	5-C	6	18	17
13-KC15	(주)바이오브리딩	2	106	5	3	109	101
13-KC16	현대종묘(주)	1	97	5	18	129	84
13-KC17	현대종묘(주)	1-D	20	1-C	4	26	24
13-KC18	현대종묘(주)	1-C	1	-	-	1	1
13-KC19	현대종묘(주)	5	4	2	1	5	5
13-KC20	원예원	13	10	12	9	32	24
합계						1,446	1,094



<그림 5> 1차 소포자배양 서비스 결과 획득된 배상체의 각 종묘회사 전달

(다) 수집한 유전자원을 노지포장 및 비닐하우스에서 재배하여(그림 6) 특성평가와 소포자 배양 재료 및 채종용으로 이용하였다. 특성평가용 수집 유전자원은 중국 도입종 중 향암성분이 많은 추옥1호와 재배품종 및 소포자 유래 계통(35종) 등 41종을 파종 후 20일간 육묘하고, 2013년 9월 10일에 정식하여, 11월 28일부터 30일 까지 형태적 특성을 조사하였다(표 5 및 6).



노지재배



분재배

<그림 6> 유전자원 특성평가를 위한 노지재배 및 채종과 소포자 배양을 위한 분재배

<표 5> 배추 수집 유전자원의 바깥잎 관련 특성

품종(계통)	잎자세	잎 길이 (cm)	잎 너비 (cm)	잎모양	잎 요철 크기	잎색깔	바깥잎 털 다소	중륵 가로 면	중륵 길이 (cm)	중륵 너비 (cm)	중륵의색
추옥1호	곧추서다	48	27	넓은달갈형	크다	회록색	적다	불록	32	7	연녹색
추옥1호-4 <sup>2</sup>	곧추서다	35	20	역달갈형	크다	녹색	없거나약함	평평	23	6	연녹색
추옥1호-15	곧추서다	38	18	긴타원형	크다	회록색	없거나약함	불록	28	6	연녹색
추옥1호-39	곧추서다	34	18	좁은달갈형	중간	황녹색	적다	불록	23	5	연녹색
추옥1호-47	곧추서다	40	18	좁은달갈형	크다	녹색	없거나약함	불록	29	6	연녹색
추옥1호-59	곧추서다	34	17	역달갈형	중간	녹색	없거나약함	불록	21	6	연녹색

추옥1호-73	곧추서다	38	17	좁은달갈형	중간	회록색	없거나약함	볼록	24	6	연녹색
추옥1호-81	곧추서다	47	21	좁은달갈형	크다	녹색	없거나약함	볼록	32	5	연녹색
추옥1호-86	약간서다	29	14	역달갈형	중간	황녹색	없거나약함	평평	19	5	연녹색
추옥1호-88	곧추서다	41	18	긴타원형	크다	회록색	적다	볼록	29	6	연녹색
추옥1호-94	곧추서다	39	17	긴타원형	크다	녹색	적다	볼록	30	6	연녹색
추옥1호-137	곧추서다	36	18	역달갈형	중간	녹색	없거나약함	볼록	24	6	연녹색
추옥1호-152	곧추서다	38	18	좁은달갈형	크다	회록색	없거나약함	볼록	26	5	연녹색
추옥1호-153	곧추서다	34	17	좁은달갈형	크다	황녹색	없거나약함	볼록	24	6	연녹색
추옥1호-170	곧추서다	43	20	좁은달갈형	크다	녹색	없거나약함	볼록	29	6	연녹색
추옥1호-172	곧추서다	33	17	역달갈형	크다	황녹색	없거나약함	볼록	23	6	연녹색
추옥1호-175	곧추서다	34	19	역달갈형	크다	녹색	없거나약함	볼록	23	6	연녹색
추옥1호-178	곧추서다	44	24	역달갈형	크다	녹색	적다	볼록	28	7	연녹색
추옥1호-185	곧추서다	39	17	좁은달갈형	크다	녹색	적다	볼록	27	6	연녹색
추옥1호-190	곧추서다	43	18	역달갈형	크다	회록색	없거나약함	평평	26	6	연녹색
추옥1호-195	곧추서다	48	27	넓은달갈형	중간	회록색	없거나약함	볼록	31	7	연녹색
추옥1호-198	곧추서다	45	21	긴타원형	크다	녹색	없거나약함	볼록	31	7	연녹색
추옥1호-213	곧추서다	34	18	넓은달갈형	크다	회록색	없거나약함	볼록	23	6	연녹색
추옥1호-241	곧추서다	37	25	넓은달갈형	크다	녹색	적다	볼록	25	8	연녹색
추옥1호-242	곧추서다	41	25	역달갈형	크다	녹색	없거나약함	볼록	28	7	연녹색
추옥1호-252	곧추서다	44	24	역달갈형	크다	회록색	없거나약함	볼록	31	6	연녹색
추옥1호-257	곧추서다	49	28	좁은달갈형	중간	녹색	없거나약함	볼록	34	6	연녹색
추옥1호-260	곧추서다	33	20	역달갈형	중간	녹색	없거나약함	볼록	22	7	연녹색
추옥1호-263	곧추서다	42	24	원형	중간	녹색	없거나약함	평평	25	6	연녹색
추옥1호-264	곧추서다	45	23	좁은달갈형	중간	녹색	없거나약함	볼록	31	7	연녹색
추옥1호-275	곧추서다	49	26	넓은달갈형	크다	회록색	없거나약함	볼록	31	7	연녹색
추옥1호-277	약간서다	37	21	역달갈형	중간	녹색	없거나약함	볼록	25	6	연녹색
추옥1호-279	곧추서다	32	18	좁은달갈형	크다	황녹색	없거나약함	볼록	22	6	연녹색
휘파람	곧추서다	45	33	넓은달갈형	크다	녹색	없거나약함	볼록	29	7	흰색
휘파람-1	곧추서다	45	28	넓은달갈형	크다	녹색	적다	볼록	28	6	연녹색
황성	곧추서다	47	30	넓은달갈형	작다	녹색	적다	볼록	27	7	흰색
불암3호	곧추서다	45	31	넓은달갈형	크다	녹색	없거나약함	볼록	26	8	연녹색
대통	곧추서다	44	31	넓은달갈형	중간	회록색	적다	볼록	29	7	연녹색
불암플러스	곧추서다	45	30	넓은달갈형	중간	녹색	적다	볼록	29	7	연녹색
불암플러스-2	곧추서다	44	26	넓은달갈형	중간	녹색	적다	볼록	28	7	연녹색
불암플러스-3	곧추서다	46	30	넓은달갈형	크다	황녹색	없거나약함	볼록	27	6	연녹색

<sup>2</sup>-000 표시는 소포자 배양 유래 계통임.

<표 6> 배추 수집 유전자원의 구 관련 특성

품종(계통)	구중 (kg)	구 키 (cm)	너비 (cm)	결구 형태	결구잎 결침	윗부분 색	외엽 요철	속색깔	단단한 정도	세로자른면	고갱이 선단모양
추옥1호	4.5	34	12	단함	심함	연두	중간	노랑	강	장타원형	돌기형
추옥1호-4 <sup>2</sup>	1.8	26	9	반열림	중간	연두	심함	노랑	중간	장타원형	평평
추옥1호-15	2.0	29	11	반열림	중간	노랑	심함	노랑	중간	긴장타원형	평평
추옥1호-39	2.5	23	11	단함	심함	노랑	중간	노랑	강	역달갈형	둥근모양
추옥1호-47	2.8	27	10	반열림	중간	연두	중간	노랑	중간	긴장타원형	둥근모양
추옥1호-59	2.8	25	10	반열림	중간	연두	약함	노랑	중간	장타원형	돌기형
추옥1호-73	3.3	31	11	단함	중간	연두	약함	노랑	강	장타원형	돌기형
추옥1호-81	3.4	32	11	단함	중간	연두	중간	진노랑	중간	긴장타원형	돌기형
추옥1호-86	0.9	22	7	열림	약함	연두	약함	진노랑	매우약함	역달갈형	돌기형

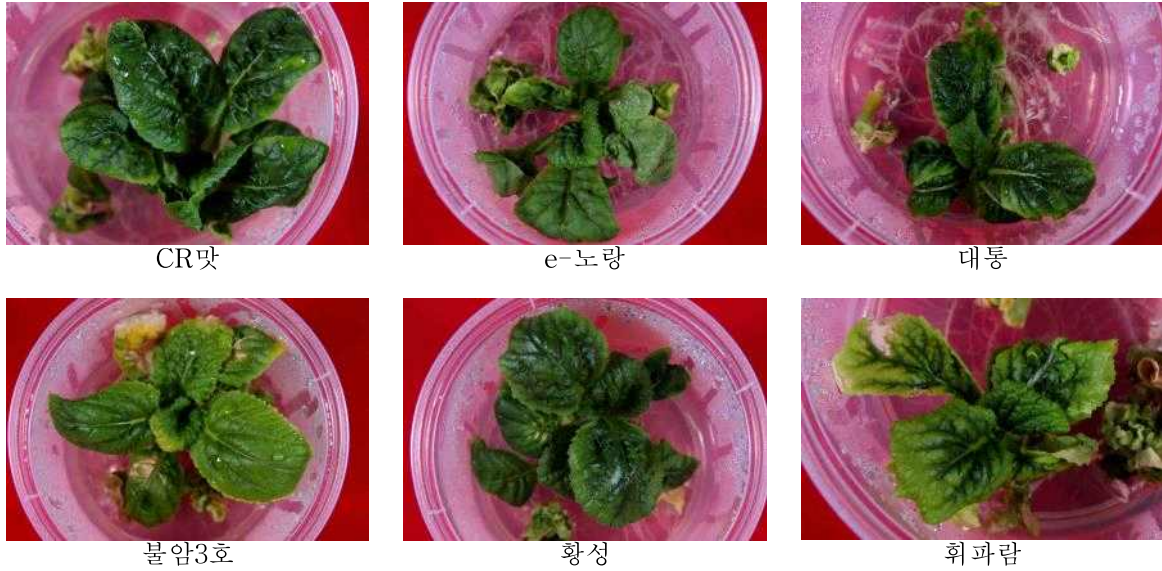
추옥1호-88	3.2	30	13	단힙	심함	연두	중간	진노랑	강	역달갈형	둥근모양
추옥1호-94	2.3	32	12	반열립	중간	연두	심함	연노랑	약함	긴장타원형	둥근모양
추옥1호-137	2.6	27	11	반열립	중간	연두	중간	진노랑	중간	장타원형	돌기형
추옥1호-152	2.7	30	12	반열립	중간	연두	심함	노랑	중간	장타원형	둥근모양
추옥1호-153	1.7	27	11	단힙	중간	연두	중간	노랑	중간	긴장타원형	둥근모양
추옥1호-170	2.5	36	11	반열립	약함	연두	중간	노랑	약함	긴장타원형	둥근모양
추옥1호-172	2.5	27	10	단힙	중간	연두	중간	연노랑	중간	역달갈형	돌기형
추옥1호-175	2.2	23	12	단힙	중간	연두	심함	진노랑	중간	역달갈형	평평
추옥1호-178	2.6	32	11	반열립	중간	노랑	중간	연노랑	중간	긴장타원형	둥근모양
추옥1호-185	2.7	29	10	단힙	심함	노랑	심함	연노랑	강	긴장타원형	둥근모양
추옥1호-190	2.3	29	10	반열립	약함	연두	심함	노랑	약함	장타원형	둥근모양
추옥1호-195	2.9	31	12	반열립	약함	연두	중간	연노랑	약함	장타원형	둥근모양
추옥1호-198	2.7	32	9	단힙	심함	노랑	중간	연노랑	강	긴장타원형	돌기형
추옥1호-213	2.2	27	9	반열립	중간	연두	중간	노랑	중간	역달갈형	평평
추옥1호-241	3.2	26	14	단힙	중간	연두	중간	노랑	중간	역달갈형	둥근모양
추옥1호-242	2.8	26	12	반열립	약함	연두	중간	노랑	매우약함	역달갈형	평평
추옥1호-252	2.4	32	11	반열립	약함	연두	심함	노랑	중간	장타원형	돌기형
추옥1호-257	3.9	33	14	반열립	중간	연두	중간	노랑	중간	역달갈형	둥근모양
추옥1호-260	2.7	26	12	반열립	약함	노랑	중간	연노랑	중간	역달갈형	둥근모양
추옥1호-263	4.0	27	9	반열립	약함	연두	약함	연노랑	중간	역달갈형	평평
추옥1호-264	3.4	33	13	반열립	약함	노랑	중간	노랑	중간	장타원형	둥근모양
추옥1호-275	3.3	29	11	반열립	중간	연두	중간	노랑	중간	역달갈형	둥근모양
추옥1호-277	3.4	21	10	반열립	약함	연두	약함	노랑	약함	역달갈형	돌기형
추옥1호-279	2.1	23	11	반열립	약함	연두	중간	연노랑	약함	역달갈형	돌기형
휘파람	4.2	27	18	단힙	심함	연두	약함	진노랑	강	달갈형	둥근모양
휘파람-1	2.7	29	15	단힙	중간	연두	중간	진노랑	강	역달갈형	평평
황성	4.6	28	17	단힙	심함	연두	약함	진노랑	강	달갈형	둥근모양
불암3호	4.6	28	18	단힙	심함	노랑	중간	진노랑	강	달갈형	둥근모양
대통	3.3	27	16	단힙	심함	노랑	중간	노랑	강	달갈형	평평
불암플러스	4.3	30	17	단힙	심함	연두	약함	노랑	강	달갈형	둥근모양
불암플러스-2	3.0	27	14	단힙	중간	연두	약함	진노랑	강	달갈형	평평
불암플러스-3	3.8	29	16	단힙	심함	노랑	중간	노랑	강	역달갈형	평평

<sup>2</sup>-000 표시는 소포자 배양 유래 계통임.

○ 소포자 배양에서 유래된 계통들은 형태적으로 다양한 차이를 보이고 있으며, 구중은 원래 품종에 비하여 작은 것이 대부분이었다. 추옥1호에서 나온 계통들은 원래의 품종이 항암성분이 많은 품종이므로, 추후 항암성분 등 기능성 물질의 함량과 형태적 특성을 고려하여 우수한 계통을 선발하면, 유전적으로 고정된 계통이므로 육종소재로 사용이 가능할 것이다.

(라) 소포자 배양을 통한 DH line을 육성하고 또한 기 보유한 DH line의 증식을 위하여 30일간 5℃에서 저온처리한 후 비닐하우스에서 재배하였다. 새로운 DH line을 육성하기 위해서는 시판 품종인 ‘CR맛’, ‘e노랑’, ‘대통’, ‘불암3호’, ‘황성’, ‘휘파람’ 등 6품종을 이용하였다. 각각의 품종에서 소포자배양을 통하여 다량의 배상체를 유도하고 이를 배양하여

식물체로 유도하였으며(그림 7), 배양실에서 다양한 유식물체를 순화시켰다(그림 8). 2014년 4월 현재 6품종으로부터 3,500여 개체의 기내 유식물체를 생산하였고, 400여개체를 순화하여 5℃에서 저온처리 하였다(그림 9).



<그림 7> 소포자 배양에서 유기된 기내 유식물체



<그림 8> 소포자 배양에서 유기된 유식물체의 순화

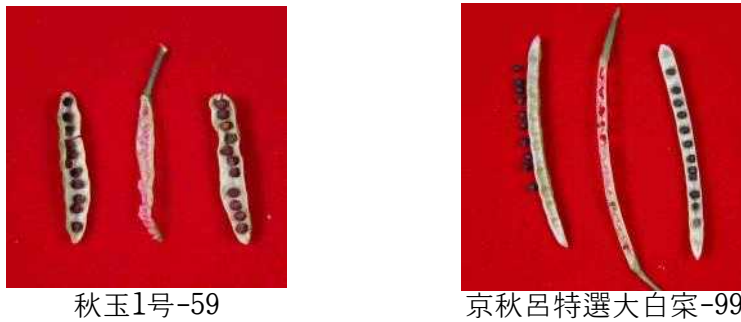


<그림 9> 순화된 유식물체의 저온처리

○ ‘추옥1호’의 소포자 배양에서 나온 36종과 ‘경추여특선대백채’에서 나온 2종 및 ‘불암플러스’에서 나온 2종, ‘휘파람’에서 나온 1종 등 총 41종의 계통 육성을 위하여 종자를 파종하고 저온 처리한 다음, 다시 selfing 하여 채종(그림 10)하였다. 종에 따라 장각과와 결실형태는 차이를 보이고 있으며(그림 11), 채종량 또한 차이가 있으나, 2014년 4월 현재 41종에 대하여 약 74,000립을 채종하였으며, 그중 10종을 농업유전자원센터에 기탁하였다(농업유



<그림 10> 채종과정



<그림 11> 秋玉1号 및 京秋呂特選大白菜 장각과 및 결실 형태

**다. 연구 결과**

○ 반수체 배양용 재료 수집 및 재배

- 국내외 다양한 배추과 자원 수집 : 본 과제 수행을 위해 광주우 종자 전시회 출장 시 다양한 배추과 자원 종자 수집(배추 17점), 타과제로 베이징 출장 시 수집(배추 11점)
- 보유 및 수집 자원 재배 : 봄 재배 및 배양(예비 선발 자원), 가을 재배 및 배양(신규 선발 자원)
- 다양한 자원의 원예적 특성 평가 : 원예적 특성은 봄 및 가을 노지 재배를 통하여 실시
- 선발 : 포장 공개 행사 등을 통하여 종묘회사 및 공동 연구 기관 간 의견 조율

○ 반수체 배양 수행

- 배추과 소포자 배양에 효과적인 배지 조건의 지속적 변형 및 선발 : 9조건
- 종묘회사 요청 배추과 자원의 파종, 준화처리, 정식, 개화 유도, 병해충 관리 및 소포자 배양 실시(6개 종묘회사 20종 100점 서비스 실시 결과 1,466점 순화, 1,094점 분양 완료)

**2. 2년차 연구 내용 및 결과**

**가. 재료 및 방법**

(1) 반수체 배양용 재료 수집 및 재배

(가) 1차년도 시험 결과 육성된 35계통의 종자 증식 및 특성 평가 완료

- 증식 완료 계통의 가을 재배 및 민간 종묘회사와 공동 선발 결과 : 원예적 특성이 우수하여 중국 등 수출에 적합할 것으로 기대되는 4계통 신규 선발

<표 1> 가을 노지 재배 품종 목록

14포장라벨	배양체 라벨	14포장라벨	배양체 라벨
14-FH229	11-CFF516-29	14-FH247	11-CFF518-31
14-FH230	11-CFF516-30	14-FH248	11-CFF518-32
14-FH231	11-CFF516-31	14-FH249	11-CFF518-33
14-FH232	11-CFF516-32	14-FH250	11-CFF518-35
14-FH233	11-CFF516-33	14-FH251	11-CFF518-37
14-FH234	11-CFF518-2	14-FH252	11-CFF518-38
14-FH235	11-CFF518-4	14-FH253	11-CFF518-43
14-FH236	11-CFF518-5	14-FH254	11-CFF518-44
14-FH237	11-CFF518-7	14-FH255	11-CFF518-47
14-FH238	11-CFF518-8	14-FH256	11-CFF518-49
14-FH239	11-CFF518-11	14-FH257	11-CFF518-59
14-FH240	11-CFF518-12	14-FH258	11-CFF518-60(신품종 후보)
14-FH241	11-CFF518-13	14-FH259	11-CFF518-61
14-FH242	11-CFF518-16	14-FH260	11-CFF518-62
14-FH243	11-CFF518-24	14-FH261	11-CFF518-65
14-FH244	11-CFF518-26	14-FH262	11-CFF518-66
14-FH245	11-CFF518-27	14-FH263	11-CFF518-68
14-FH246	11-CFF518-28		



<그림 1> 2차년도 신규 선발 품종 4점의 모습

※ 선발된 4계통은 가을 포장 품평회를 통하여 종묘회사와 공동으로 선발되었으며, 뇌수분을 통한 종자 증식을 위해 성숙모본하우스로 이식하였음.

○ 기존에 출원한 품종보호 출원용 종자 증식 및 특성 평가 완료 : 원교20040호

**품종보호 출원용 종자 증식 및 특성 평가 완료  
배추 원교20040호 (2차년도)**

1. 구분 : 육성계통
2. 육성내력

- 가. 재료수집 : ECD04, ECD05 (1998, 도입종)
- 나. 교배 : 2003 ~ 2004년
- 다. 원예적 특성 및 저항성 선발 : 2005, 2007, 2009
- 다. 생산력검정시험 : 2010
- 라. 육성기관 : 국립원예특작과학원 채소과

3. 주요특성

- 가. 뿌리혹병 race4 및 평창 균주에 저항성임
- 나. 속잎색이 연노랑이며, 구를 형성하지 않음
- 다. 겉잎색은 진한 녹색임
- 라. 용도 : 뿌리혹병 내병성 재료

4. 적응지역

- 전국

5. 재배상 유의점

- 석회에 민감하므로 기비에 반드시 석회를 사용하고 고온, 가뭄이 올 경우 석회를 엽면시비 하여 관리

6. 보완을 요하는 특성

- 원예적 특성이 우수하지 못함

7. 시험성적(품종의 특성설명)

가. 고유특성

- 원교20040호는 속잎색이 연노랑이며 느슨한 결구를 형성

(’14, 수원)

품종 및 계통명	초자	결구형	겉잎색	속잎색	엽형	모용	숙기
원교20040호	중간	불결구	3.5	2.3	긴구형	소	만
불암플러스	중간	반포합	3.3	3.8	계란형	다	중

나. 가변특성

- 원교20040호는 수량이 적고, 진한 초록색의 구를 형성함

(’09 ~ ’10, 수원)

품종 및 계통명	작기	주중 (g)	구중 (g)	구폭 (cm)	구고 (cm)	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	겉잎수 (매)	속잎수 (매)
원교20040호	09가을	3,314	1,254	11	41	63	27	17	22
	10가을	1,945	1,286	9	39	54	25	8	23



불암플러스	10가을	2,596	1,777	17	25	42	26	11	61
-------	------	-------	-------	----	----	----	----	----	----

**다. 병충해 저항성**

- 원교20040호는 뿌리혹병 평창군주에 저항성임

(’09, 수원)

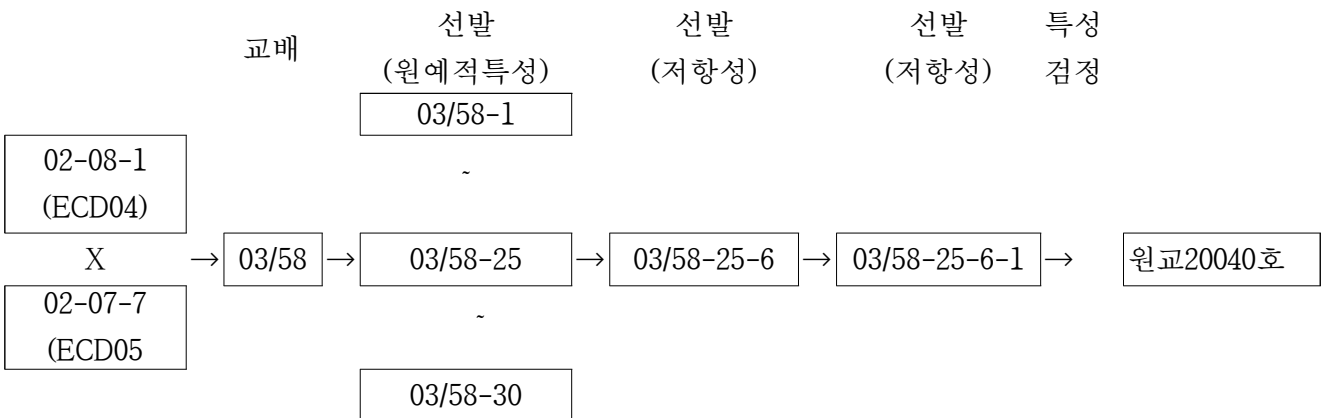
품종 및 계통명	저항성개체수	이병성개체수		저항성비율(%)
		중간	이병성	
불암3호	0	0	6	0
원교20040호	13	0	0	100

**8. 육성경과**

**가. 육성계통도**

연도	'96	'02	'03	'04	'05	'06	'07	'08	'09	'10
세대			F <sub>1</sub>	F <sub>1</sub>	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>
내용	자원 도입	뇌수분	교배 조합 작성	종자 수확	원예적 특성 검정	세대 진전	저항성 검정	세대 진전	저항성 검정	원예적 특성 - 원교20040호 뿌리혹병 저항성 검정
주요과정	도입	증식	교배	채종	선발	채종	선발	채종	선발	검정 및 선발

**나. 육성계보도**



**9. 종자 확보량**

- 현재 품종보호 출원이 가능한 종자량 증식 완료

10. 대체품종 : 기존 품종과 병행

11. 임시보호권 처분 가능여부 : 가능.

12. 기타 참고사항

가. 품종특성표

○ 대조품종(제일 유사한 품종)의 명칭 : 불암플러스

No	특 성	표 현 형 태									출 원 품 종		대 조 품 종	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No	실 측 치	No	실 측 치
9 (*) Ⓚ (b)	바깥잎: 색깔	황 록 색	녹 색	회 록 색							2	3.5	2	3.3
22 Ⓚ (a)	구: 키			작 다		중 간		크 다			7		5	
23 Ⓚ (a)	구: 너비			좁 다		중 간		넓 다			3		5	
31 Ⓚ (a)	구 : 단단한 정도	매 우 약 하 다		약 하 다		중 간		강 하 다		매 우 강 하 다	1		5	
33 (*) Ⓚ	수확 성숙기	매 우 빠 르 다		빠 르 다		중 간		늦 다		매 우 늦 다	7		5	

나. 사진 제출(양식6)



- 국내외 다양한 배추과 자원 수집 : 공동연구원 등의 해외 출장 시 11점의 자원 수집 (미국 3점, 이스라엘 3점, 중국 5점)



〈그림 2〉 이스라엘 수집 자원 3점(왼쪽 상), 미국 수집자원 3점(왼쪽 하)과 중국 자원 5점의 모습

(2) 반수체 배양 실시

(가) 2차 서비스를 위해 5개 기관에서 요청한 145점의 소포자 배양 실시

〈표 5〉 배추 소포자 배양 2서비스 실시중인 자원 29점 목록(품종당 5개체, 총 145점)

라벨	번호	소속	품종명	과종일
14-KC1	1	동부팜한농(주)	1	10월31일
14-KC2	2	동부팜한농(주)	2	10월31일
14-KC3	3	동부팜한농(주)	3	10월31일
14-KC4	4	현대종묘(주)	1	10월31일
14-KC5	5	현대종묘(주)	2	10월31일
14-KC6	6	현대종묘(주)	3	10월31일
14-KC7	7	현대종묘(주)	4	10월31일
14-KC8	8	현대종묘(주)	5	10월31일
14-KC9	9	(주)바이오브리딩	1	10월31일
14-KC10	10	(주)바이오브리딩	2	10월31일
14-KC11	11	(주)코레곤	1	10월31일
14-KC12	12	(주)코레곤	2	10월31일
14-KC13	13	(주)코레곤	3	10월31일
14-KC14	14	(주)코레곤	4	10월31일
14-KC15	15	충남대	ECD01	10월31일
14-KC16	16	충남대	ECD02	10월31일
14-KC17	17	충남대	ECD03	10월31일
14-KC18	18	충남대	ECD04	10월31일
14-KC19	19	충남대	ECD05	10월31일
14-KC20	20	충남대	ECD06	10월31일
15-KC1	21	충남대	ECD07	10월31일
15-KC2	22	충남대	ECD08	10월31일
15-KC3	23	충남대	ECD09	10월31일
15-KC4	24	충남대	ECD10	10월31일
15-KC5	25	충남대	ECD11	10월31일
15-KC6	26	충남대	ECD12	10월31일

15-KC7	27	충남대	ECD13	10월31일
15-KC8	28	충남대	ECD14	10월31일
15-KC9	29	충남대	ECD15	10월31일

※ ECD판별기주는 뿌리혹병 관련 연구의 기초 재료로 활용 가능성이 높아 실시

(나) 배추과 소포자 배양에 효과적인 배지 조건의 지속적 변형 및 선발 : 1차 서비스 결과 비 효율적 1조건 삭제(배지 3), 신규 1조건 추가(배지 6)하여 9조건 유지

<표 7> 배추 소포자 배양 2차 서비스 실시 결과

배지번호	배지조성
1	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13%
2	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + NAA 50μl+BAP 50μl
5	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + Micro Element 1mg + S13%
6	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + Micro Element 1mg + S13% + NAA 50μl + BAP 50μl
1-A	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + Kao. Vit 1mg
1-B	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + Gamberg Vit 1mg
1-C	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + MS.Vit 1mg
1-D	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + Micronutrient
1-E	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + Macronutrient

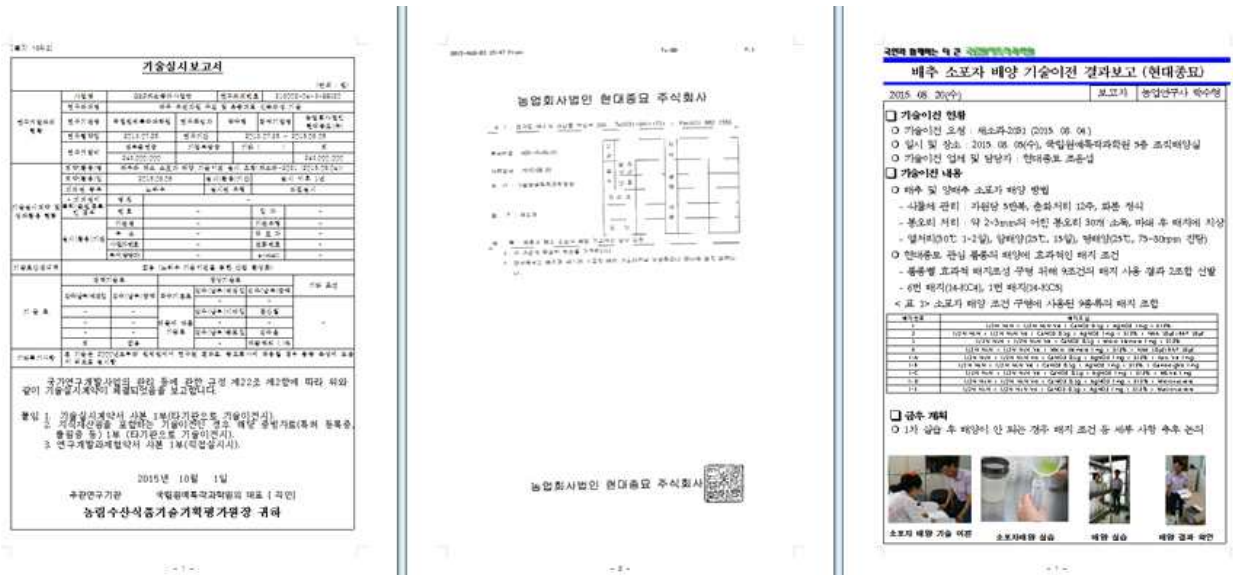
※ 화퇴가 충분할 경우 추가 배지 시험 실시 : 6-B, 6-C, 6-D

(다) 2차년도 수행 결과 획득된 소포자 유래 식물체 1,578점 5개사에 분양 완료

<표 8> 배추 소포자 배양 2차 서비스 실시 결과

라벨	작물	소속	배발생 배지수	최적배 지	개체수	차선택배지	개체수	배발생 개수	MS치상개수
14-KC1	배추	동부팜한농(주)	2	2	5	6	1	6	6
14-KC2	배추	동부팜한농(주)	-	-	-	-	-	-	-
14-KC3	배추	동부팜한농(주)	6	2	211	5	176	432	416
14-KC4	배추	현대종묘(주)	10	6	64	1	14	151	141
14-KC5	배추	현대종묘(주)	6	1	7	6	10	30	26
14-KC6	배추	현대종묘(주)	4	2	22	5	3	27	27
14-KC7	배추	현대종묘(주)	4	1	38	5	8	55	52
14-KC8	배추	현대종묘(주)	6	6	92	2	36	175	168
14-KC9	배추과	(주)바이오브리딩	7	6	265	2	132	460	459
14-KC10	배추과	(주)바이오브리딩	6	5	28	1	15	53	50
14-KC11	배추	(주)코레곤	4	6	4	2	4	11	11
14-KC12	배추	(주)코레곤	6	6	9	2	26	42	32
14-KC13	배추	(주)코레곤	8	1	49	6	19	119	116
14-KC14	배추	(주)코레곤	5	5	30	2	6	45	43
14-KC15	배추과	충남대	-	-	-	-	-	-	-

14-KC16	배추과	충남대	5	2	2	1-A	2	10	9
14-KC17~20	배추과	충남대	-	-	-	-	-	-	-
14-KC21~22	배추	(주)코레콘	-	-	-	-	-	-	-
14-KC23	배추	(주)코레콘	1	6-D	8	-	-	8	6
14-KC24	배추	(주)코레콘	1	6-C	12	-	-	12	12
14-KC25	배추	(주)코레콘	1	5	2	-	-	2	2
14-KC26	배추	(주)코레콘	2	6-D	4	1-C	1	5	2
14-KC27	배추	(주)코레콘	1	6-B	1	-	-	1	-
14-KC28~30	배추	(주)코레콘	-	-	-	-	-	-	-
합계								1,641	1,578



<그림 3> 소포자 배양 관련 기술이전 1건 실시 (2015. 10. 1.)

(3) 반수체 유래 계통 육성

(가) 소포자 배양 유래 식물체의 종자 증식 완료 : 11-CFF302-121등 52점의 소포자 배양 유래 식물체의 순화, 춘화처리, 정식 및 화지 유도도 100립 이상의 종자 채종에 성공함.

<표 8> 2014년 가을 노지 생육조사를 위해 파종된 DH inbred 목록

포장라벨	13라벨	채종 년도	조제 번호	포장라벨	13라벨	채종 년도	조제 번호
14-FH71	11-CFF302-121	2013	161	14-FH239	11-CFF518-11	2013	378
14-FH72	11-CFF302-123	2013	162	14-FH240	11-CFF518-12	2013	379
14-FH73	11-CFF302-125	2013	164	14-FH241	11-CFF518-13	2013	380
14-FH74	11-CFF302-127	2013	166	14-FH242	11-CFF518-16	2013	382
14-FH75	11-CFF302-128	2013	167	14-FH243	11-CFF518-24	2013	385
14-FH76	11-CFF302-132	2013	170	14-FH244	11-CFF518-26	2013	386
14-FH77	11-CFF302-133	2013	171	14-FH245	11-CFF518-27	2013	387
14-FH78	11-CFF302-134	2013	172	14-FH246	11-CFF518-28	2013	388
14-FH79	11-CFF302-140	2013	177	14-FH247	11-CFF518-31	2013	390
14-FH80	11-CFF302-146	2013	183	14-FH248	11-CFF518-32	2013	391
14-FH81	11-CFF302-148	2013	185	14-FH249	11-CFF518-33	2013	392
14-FH82	11-CFF302-157	2013	192	14-FH250	11-CFF518-35	2013	394
14-FH83	11-CFF302-159	2013	194	14-FH251	11-CFF518-37	2013	396

14-FH84	11-CFF302-163	2013	198	14-FH252	11-CFF518-38	2013	397
14-FH85	11-CFF302-166	2013	201	14-FH253	11-CFF518-43	2013	400
14-FH86	11-CFF302-168	2013	203	14-FH254	11-CFF518-44	2013	401
14-FH87	11-CFF302-173	2013	207	14-FH255	11-CFF518-47	2013	403
14-FH229	11-CFF516-29	2013	363	14-FH256	11-CFF518-49	2013	405
14-FH230	11-CFF516-30	2013	364	14-FH257	11-CFF518-59	2013	410
14-FH231	11-CFF516-31	2013	365	14-FH258	11-CFF518-60	2013	411
14-FH232	11-CFF516-32	2013	366	14-FH259	11-CFF518-61	2013	412
14-FH233	11-CFF516-33	2013	367	14-FH260	11-CFF518-62	2013	413
14-FH234	11-CFF518-2	2013	369	14-FH261	11-CFF518-65	2013	415
14-FH235	11-CFF518-4	2013	371	14-FH262	11-CFF518-66	2013	416
14-FH236	11-CFF518-5	2013	372	14-FH263	11-CFF518-68	2013	418
14-FH237	11-CFF518-7	2013	374	14-FH300	불암	대조	
14-FH238	11-CFF518-8	2013	375	14-FH301	진청	대조	

(나) 민간 종묘회사와 공동 선발 결과 14-FH258 최종 선발



<그림 4> 2014년가을 포장 품평회 모습과 선발 자원 14-FH258, 14-FH253의 모습

(다) 특성평가용 유전자원은 중국 도입종을 이용한 교배조합 중, 셀룰로스의 함량이 많고 칼슘, 칼륨, 마그네슘 함량도 높은 “秋玉1호와 律冠75 교배조합”의 개체(F<sub>1</sub>)를 이용한 소포자 배양 유래 계통 32종과, 대비종으로 시판품종 ‘대통’ 등 7종을 포함하여 총 39종을 이용하였다. 종자파종 후 23일간 육묘하고, 2014년 9월 11일에 정식하여, 12월 17일부터 18일 까지 형태적 특성을 조사하였다(표 9 및 10).

<표 9> 배추 유전자원의 바깥잎 관련 특성

품종(계통)	잎자세	잎 길이 (cm)	잎 너비 (cm)	잎모양	잎결 크기	잎색깔	바깥잎 털 다소	중륵 가로면	중륵 길이 (cm)	중륵 너비 (cm)	중륵의 색
(秋玉1호×律冠75)-2 <sup>2</sup>	약간서다	31	20	넓은 달걀형	중간	녹색	없거나 약함	평평	19	5	연녹색
(秋玉1호×律冠75)-3	곧추서다	34	20	넓은 달걀형	크다	회록색	없거나 약함	볼록	22	6	녹색
(秋玉1호×律冠75)-4	곧추서다	36	25	넓은 달걀형	크다	녹색	없거나 약함	볼록	22	6	연녹색
(秋玉1호×律冠75)-5	곧추서다	33	21	넓은 달걀형	중간	회록색	없거나 약함	볼록	21	7	연녹색
(秋玉1호×律冠75)-6	곧추서다	34	21	넓은 달걀형	크다	회록색	없거나 약함	볼록	21	6	연녹색
(秋玉1호×律冠75)-11	곧추서다	36	22	넓은 달걀형	크다	회록색	없거나 약함	볼록	24	7	녹색
(秋玉1호×律冠75)-17	곧추서다	40	21	넓은 달걀형	중간	회록색	없거나 약함	볼록	27	7	연녹색

(秋玉1号×律冠75)-18	곧추서다	37	20	넓은 달갈형	크다	녹색	없거나 약함	불록	26	6	연녹색
(秋玉1号×律冠75)-19	약간서다	36	18	넓은 달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	25	6	연녹색
(秋玉1号×律冠75)-23	곧추서다	33	18	좁은 달갈형	중간	회록색	없거나 약함	불록	22	5	녹색
(秋玉1号×律冠75)-24	곧추서다	37	22	넓은 달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	26	6	연녹색
(秋玉1号×律冠75)-25	약간서다	32	20	넓은 달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	20	5	연녹색
(秋玉1号×律冠75)-26	약간서다	35	19	넓은 달갈형	크다	녹색	없거나 약함	불록	23	5	연녹색
(秋玉1号×律冠75)-27	곧추서다	31	19	넓은 달갈형	크다	황록색	없거나 약함	불록	20	5	연녹색
(秋玉1号×律冠75)-28	약간서다	36	21	넓은 달갈형	작다	회록색	없거나 약함	불록	24	6	연녹색
(秋玉1号×律冠75)-30	곧추서다	34	21	넓은 달갈형	크다	회록색	없거나 약함	불록	22	6	녹색
(秋玉1号×律冠75)-44	곧추서다	30	19	넓은 달갈형	중간	회록색	없거나 약함	불록	18	6	연녹색
(秋玉1号×律冠75)-47	곧추서다	36	20	좁은 달갈형	작다	회록색	없거나 약함	불록	24	6	연녹색
(秋玉1号×律冠75)-53	곧추서다	36	21	좁은 달갈형	중간	회록색	없거나 약함	불록	24	6	연녹색
(秋玉1号×律冠75)-55	곧추서다	41	23	넓은 달갈형	중간	회록색	없거나 약함	불록	28	6	연녹색
(秋玉1号×律冠75)-56	곧추서다	36	23	넓은 달갈형	중간	회록색	없거나 약함	불록	22	6	녹색
(秋玉1号×律冠75)-57	곧추서다	36	24	넓은 달갈형	중간	회록색	없거나 약함	불록	23	7	연녹색
(秋玉1号×律冠75)-60	곧추서다	34	21	넓은 달갈형	크다	회록색	없거나 약함	불록	23	6	연녹색
(秋玉1号×律冠75)-63	곧추서다	36	23	넓은 달갈형	중간	회록색	없거나 약함	불록	24	7	연녹색
(秋玉1号×律冠75)-68	곧추서다	37	22	넓은 달갈형	크다	황록색	없거나 약함	불록	23	6	연녹색
(추옥1号×律冠75)-78	곧추서다	34	22	넓은 달갈형	중간	회록색	없거나 약함	불록	22	6	연녹색
(秋玉1号×律冠75)-79	곧추서다	33	23	넓은 달갈형	크다	녹색	없거나 약함	불록	22	6	연녹색
(秋玉1号×律冠75)-81	곧추서다	35	19	역 달갈형	크다	회록색	없거나 약함	불록	24	6	녹색
(秋玉1号×律冠75)-86	곧추서다	38	20	긴타원형	중간	회록색	없거나 약함	불록	26	7	연녹색
(秋玉1号×律冠75)-88	곧추서다	33	20	넓은 달갈형	크다	회록색	없거나 약함	불록	21	6	연녹색
(秋玉1号×律冠75)-90	곧추서다	37	21	넓은 달갈형	중간	녹색	없거나 약함	평평	24	5	녹색
(秋玉1号×律冠75)-94	약간서다	34	25	넓은 달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	21	6	연녹색
대통	곧추서다	35	19	넓은 달갈형	중간	녹색	없거나 약함	평평	16	5	연녹색
불암3호	곧추서다	35	23	넓은 달갈형	작다	황록색	없거나 약함	불록	22	6	흰색
불암플러스	곧추서다	27	22	넓은 달갈형	크다	녹색	없거나 약함	불록	20	6	흰색
황성	곧추서다	32	23	넓은 달갈형	크다	황록색	적다	불록	19	6	흰색
휘과람	곧추서다	30	21	넓은 달갈형	중간	황록색	없거나 약함	불록	18	5	흰색
CR맛	약간서다	35	24	넓은 달갈형	크다	회록색	없거나 약함	불록	15	5	흰색
e-노랑	곧추서다	32	24	넓은 달갈형	작다	회록색	없거나 약함	불록	19	6	흰색

<sup>2</sup>-00 표시는 소포자 배양 유래 계통임.

#### <표 10> 배추 유전자원의 구 관련 특성

품종(계통)	구중(kg)	구 키(cm)	너비(cm)	결구 형태	결구있 결집	윗부분 색	외엽 요철	속색갈	단단한 정도	세로자른면	고갱이 선단모양
(秋玉1号×律冠75)-2 <sup>2</sup>	1.8	20	12	반열림	약함	연두	심함	진노랑	약	역달갈형	평평
(秋玉1号×律冠75)-3	1.5	18	11	반열림	약함	연두	중간	연노랑	약	역달갈형	등근모양
(秋玉1号×律冠75)-4	2.2	15	12	반열림	약함	연두	중간	노랑	약	역달갈형	돌기형
(秋玉1号×律冠75)-5	2.2	21	14	반열림	중간	연두	중간	노랑	중간	장타원형	등근모양
(秋玉1号×律冠75)-6	2.5	22	13	달힘	중간	연두	심함	노랑	중간	역달갈형	등근모양
(秋玉1号×律冠75)-11	2.0	25	12	달힘	약함	연두	중간	노랑	약	역달갈형	등근모양

(秋玉1号×律冠75)-17	2.0	28	13	반열립	약함	연두	약	연노랑	약	긴장타원형	등근모양
(秋玉1号×律冠75)-18	1.7	24	11	단립	중간	흰색	중간	노랑	중간	긴장타원형	등근모양
(秋玉1号×律冠75)-19	2.0	27	12	단립	중간	연두	중간	노랑	중간	긴장타원형	돌기형
(秋玉1号×律冠75)-23	2.2	28	12	단립	약함	연두	중간	노랑	약	장타원형	돌기형
(秋玉1号×律冠75)-24	2.8	31	13	단립	중간	흰색	중간	노랑	중간	긴장타원형	등근모양
(秋玉1号×律冠75)-25	1.6	16	11	반열립	약함	연두	중간	노랑	매우약	역달갈형	돌기형
(秋玉1号×律冠75)-26	1.4	17	10	반열립	약함	연두	중간	노랑	약	역달갈형	돌기형
(秋玉1号×律冠75)-27	2.3	20	13	단립	약함	연두	중간	노랑	약	장타원형	돌기형
(秋玉1号×律冠75)-28	1.9	24	14	반열립	중간	연두	심함	연노랑	중간	역달갈형	등근모양
(秋玉1号×律冠75)-30	1.6	18	11	단립	약함	노랑	심함	노랑	약	역달갈형	돌기형
(秋玉1号×律冠75)-44	2.1	27	14	반열립	중간	연두	중간	노랑	중간	장타원형	등근모양
(秋玉1号×律冠75)-47	1.9	30	13	열립	약함	연두	중간	노랑	매우약	장타원형	돌기형
(秋玉1号×律冠75)-53	2.0	31	13	반열립	중간	연두	중간	노랑	중간	장타원형	등근모양
(秋玉1号×律冠75)-55	2.2	27	9	단립	중간	노랑	중간	노랑	중간	긴장타원형	돌기형
(秋玉1号×律冠75)-56	2.1	22	13	반열립	약함	연두	중간	노랑	매우약	역달갈형	돌기형
(秋玉1号×律冠75)-57	2.4	30	14	반열립	중간	연두	중간	노랑	중간	장타원형	등근모양
(秋玉1号×律冠75)-60	2.2	29	14	반열립	중간	연두	약	노랑	매우약	장타원형	등근모양
(秋玉1号×律冠75)-63	2.2	24	13	열립	약함	연두	중간	노랑	중간	역달갈형	등근모양
(秋玉1号×律冠75)-68	2.4	17	12	반열립	약함	흰색	중간	노랑	약	장타원형	돌기형
(秋玉1号×律冠75)-78	2.4	31	14	반열립	중간	연두	중간	노랑	중간	긴장타원형	등근모양
(秋玉1号×律冠75)-79	2.1	23	12	단립	약함	연두	중간	노랑	약	장타원형	돌기형
(秋玉1号×律冠75)-81	2.0	28	12	단립	중간	연두	심함	노랑	중간	긴장타원형	돌기형
(秋玉1号×律冠75)-86	2.3	29	14	반열립	중간	연두	심함	노랑	약	긴장타원형	등근모양
(秋玉1号×律冠75)-88	2.5	23	14	반열립	중간	연두	중간	노랑	중간	역달갈형	돌기형
(秋玉1号×律冠75)-90	2.5	25	10	단립	중간	연두	중간	노랑	약	긴장타원형	돌기형
(秋玉1号×律冠75)-94	2.2	16	13	반열립	약함	연두	중간	진노랑	약	달갈형	돌기형
대통	2.1	19	16	단립	중간	노랑	약	진노랑	중간	역달갈형	평평
불암3호	3.1	23	18	단립	중간	연두	약	노랑	중간	역달갈형	등근모양
불암플러스	2.7	18	16	단립	중간	노랑	중간	진노랑	중간	역달갈형	등근모양
황성	2.9	17	14	단립	중간	노랑	중간	노랑	중간	역달갈형	등근모양
휘파람	2.7	16	13	단립	중간	노랑	중간	진노랑	중간	역달갈형	등근모양
CR맛	1.8	8	15	반열립	약함	연두	중간	진노랑	약	역달갈형	등근모양
e-노랑	2.8	22	18	단립	중간	연두	약	노랑	중간	타원형	등근모양

<sup>2</sup>-00 표시는 소포자 배양 유래 계통임.

(라) 소포자 배양에서 유래된 유전자원의 초기생육은 시판 대비품종에 비하여 생육이 느리고 잎의 결각이 있는 등 시판 품종과는 다른 양상을 보였으며(그림 5), 시판품종과는 달리 부.모본과 같이 직원통형이 대부분이었다. 결구형태는 시판품종이 단립인데 반해 소포자 유래 계통은 반열립 형태가 18종으로 가장 많았고, 구 세로로 자른면의 형태도 장타원형과 긴장타원형이 19종으로 대부분을 차지했다. 구의 단단함은 상대적으로 시판품종보다 약했지만 (秋玉1号×律冠75)-24, (秋玉1号×律冠75)-55, (秋玉1号×律冠75)-81은 직원통형이면서 결구상태가 비교적 양호하였다(그림 6). 이러한 계통들은 항암성분이나 미네랄, 셀룰로스과 같은 기능성 물질의 함량



분석을 통해 우수한 계통을 선발하면, 유전적으로 고정된 계통이므로 육종소재로 사용이 가능할 것이다.



정식직후

정식 20일 후

<그림 5> 특성검정용 유전자원 초기 생육상태



(秋玉1号×律冠75)-24



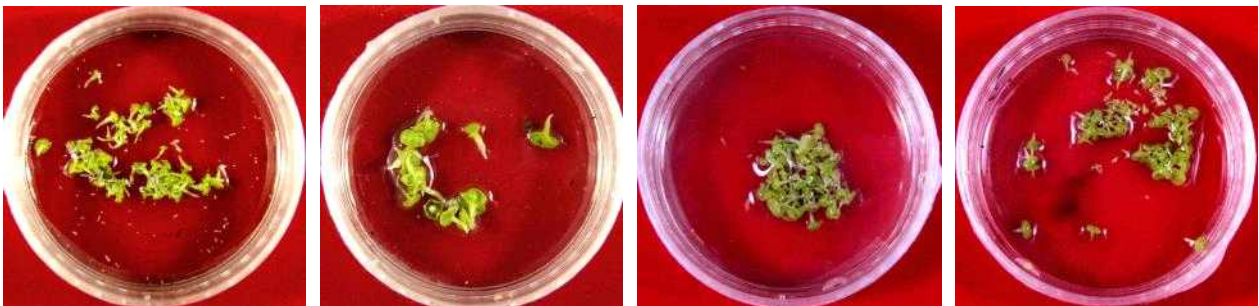
(秋玉1号×律冠75)-55



(秋玉1号×律冠75)-81

<그림 6> 비교적 결구상태가 좋은 직원통형 DH line

(마) 새로운 DH line을 육성하기 위한 소포자 배양에는 시판 품종인 ‘CR맛’, ‘e노랑’, ‘대통’, ‘불암3호’, ‘진청’, ‘옥황씨알’ 등 6품종과 일본도입종인 ‘坂東白菜’ ‘冬冴 Fuyusae’ ‘干勝’ ‘大福’ ‘大福75’ ‘耐性アポロ60’ ‘金閣75白菜’ 등 7종을 이용하였다. 각각의 품종에서 소포자배양을 통하여 다량의 배상체를 유도하고(그림 7) 이를 배양하여 식물체로 유도하였으며(그림 8), 배양실에서 다양한 유식물체를 순화시켰다(그림 9). 이들 개체는 순화 후 포트에 이식하여 저온처리하고 selfing을 통하여 채종하였다.



坂東白菜

耐性アポロ60

金閣75白菜

불암3호

<그림 7> 소포자 배양에서 유기된 배상체



대통



e-노랑



불암3호



옥황씨알



干勝



金閣75白菜

<그림 8> 소포자 배양에서 유기된 기내 유식물체



<그림 9> 소포자 배양에서 유기된 유식물체의 순화

(바) 육성한 DH line의 증식을 위해서는 종자를 파종하고 30일간 5℃에서 저온처리한 후 비닐하우스에서 재배하면서 selfing 하였다(그림 10). 증식을 위한 채종에 이용한 계통은, 향암성분이 많은 ‘秋玉1号’와 셀룰로스 함량이 높은 ‘津冠75’를 교배하여 나온 F1 유래 DH line으로, 다량의 장각과가 형성되었으며(그림 11), 이들을 채종하였다.



<그림 10> 채종을 위한 selfing



<그림 11> Selfing 후 형성된 장각과

## 나. 연구 결과

### ○ 반수체 배양용 재료 수집 및 재배

- 국내외 다양한 배추과 자원 수집 : 공동연구원 등의 해외 출장 시 수집(미국 3점, 이스라엘 3점, 중국 5점)
- 보유 및 수집 자원 재배 : 봄 재배 및 배양(전년 선발 자원), 가을 재배 및 배양(신규 선발 자원)
- 다양한 자원의 원예적 특성 평가 : 육성 계통 및 전년 수집 자원의 원예적 특성은 봄 및 가을 노지 재배를 통하여 실시
- 선발 : 포장 공개 행사 등을 통하여 종묘회사 및 공동 연구 기관 간 의견 조율

### ○ 반수체 배양 실시

- 배추과 소포자 배양에 효과적인 배지 조건의 지속적 변형 및 선발 : 9조건(비효율적 3조건 삭제, 신규 3조건 추가)
- 종묘회사 요청 배추과 자원의 파종, 춘화처리, 정식, 개화 유도, 병해충 관리 및 소포자 배양 실시(5개 종묘회사 30종 150점 서비스 실시 결과 배상체 1,641점 순화, 1,578점 분양 완료)

### ○ 반수체 유래 계통 육성

- 배양에 효율 증진 가능 신규 물질 첨가 및 배양 조건 변형
- 서비스용 다양한 자원의 배양을 위한 파종, 춘화처리, 정식, 개화 유도, 병해충 관리 및 소포자 배양 실시

## 3. 3년차 연구 내용 및 결과

### 가. 재료 및 방법

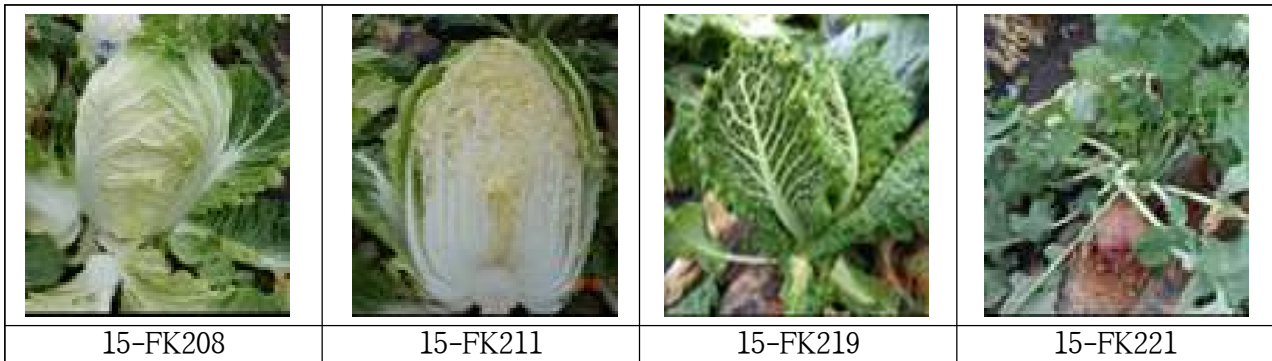
#### (1) 반수체 배양용 재료 수집 및 재배

(가) 당해년도 32점의 원예적 특성 평가 결과 3점 선발

<표 1> 국내·외 수집자원 32점의 파종 내역

포장라벨	도입번호	도입내역	포장라벨	도입번호	도입내역
15-FK205	15-02-01	한국 수집종	15-FK221	15-2-19	미국 도입

15-FK206	15-02-02	한국 수집종	15-FK222	15-2-20	미국 도입
15-FK207	15-02-03	한국 수집종	15-FK223	15-2-21	미국 도입
15-FK208	15-02-04	한국 수집종	15-FK224	15-2-22	미국 도입
15-FK209	15-02-05	한국 수집종	15-FK225	15-2-23	중국 청도 도입
15-FK210	15-02-06	한국 수집종	15-FK226	15-2-24	중국 청도 도입
15-FK211	15-02-07	한국 수집종	15-FK227	15-2-25	중국 청도 도입
15-FK212	15-2-08	중국 무한 도입	15-FK228	15-2-26	중국 청도 도입
15-FK213	15-2-09	중국 도입 종	15-FK229	15-2-27	중국 청도 도입
15-FK214	15-2-10	중국 도입 종	15-FK230	15-2-28	중국 청도 도입
15-FK215	15-2-11	북한 도입 종	15-FK231	삼진배추	한국 종자
15-FK216	15-2-12	북한 도입 종	15-FK232	추노배추	한국 종자
15-FK217	15-2-15	이스라엘 도입 종	15-FK233	불암3호배추	한국 종자
15-FK218	15-2-16	이스라엘 도입 종	15-FK234	노란자배추	한국 종자
15-FK219	15-2-17	이스라엘 도입 종	15-FK235	불암플러스배추	한국 종자
15-FK220	15-2-18	이스라엘 도입 종	15-FK236	황성배추	한국 종자



<그림 1> 1차년도 수집 자원의 특성 평가 결과 선발된 4점의 모습

※ 선발 자원은 차년도 교배 및 배양 재료로 활용

(나) 3차년도 신규 수집 자원 : 타과제 출장 시 배추속 수집(일본 14점)



<그림 2> 3차년도 일본 수집 자원 14점의 모습

## 2. 반수체 배양 실시

(가) 3차 서비스를 위해 2개 기관에서 요청한 50점의 소포자 배양 실시

<표 2> 배추 소포자 배양 3차 서비스 요청 자원 50점 목록

라벨	번호	소속	품종명	라벨	번호	소속	품종명
----	----	----	-----	----	----	----	-----

15-KC1	1	충남대	ECD07	15-KC6	6	충남대	ECD12
15-KC2	2	충남대	ECD08	15-KC7	7	충남대	ECD13
15-KC3	3	충남대	ECD09	15-KC8	8	충남대	ECD14
15-KC4	4	충남대	ECD10	15-KC9	9	충남대	ECD15
15-KC5	5	충남대	ECD11	15-KC10	10	(주)코레곤	배추과

(나) 배추과 소포자 배양에 효과적인 배지 조건의 지속적 변형 및 선발 : 9조건 및 추가 1조건

<표 3> 배추 소포자 배양 2차 서비스 실시 결과

배지번호	배지조성
1	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13%
2	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + NAA 50 $\mu$ l+BAP 50 $\mu$ l
5	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + Micro Element 1mg + S13%
6	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + Micro Element 1mg + S13% + NAA 50 $\mu$ l + BAP 50 $\mu$ l
1-A	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + Kao. Vit 1mg
1-B	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + Gamberg Vit 1mg
1-C	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + MS.Vit 1mg
1-D	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + Micronutrient
1-E	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + Macronutrient

※ 화뢰가 충분할 경우 추가 배지 시험 실시 : 10-D

(다) 3차년도 수행 결과 획득된 소포자 유래 식물체 70점 2개사에 분양 완료

<표 4> 배추 소포자 배양 3차 서비스 실시 결과

라벨	작물	소속	배발생 배지수	최적배지	개체수	차선배지	개체수	배발생 개수	MS치상개수
15-KC1	배추	충남대	-	-	-	-	-	-	-
15-KC2	배추	충남대	-	-	-	-	-	-	-
15-KC3	배추	충남대	-	-	-	-	-	-	-
15-KC4	배추	충남대	-	-	-	-	-	-	-
15-KC5	배추	충남대	-	-	-	-	-	-	-
15-KC6	배추	충남대	-	-	-	-	-	-	-
15-KC7	배추	충남대	-	-	-	-	-	-	-
15-KC8	배추	충남대	2	10-C	3	10-D	2	5	5
15-KC9	배추과	충남대	-	-	-	-	-	-	-

15-KC10	배추과	(주)코레곤	6	6	20	1-C	18	72	65
합계								77	70

(3) 반수체 유래 계통 육성

(가) 소포자 배양 유래 식물체의 종자 증식 완료 : 12-SK53-1 등 74점의 소포자 배양 유래 식물체의 순화, 준화처리, 정식 및 화지 유도 100립 이상의 종자 채종에 성공함.

<표 5> 2015년 가을 노지 생육조사를 위해 파종된 DH inbred 74점의 목록

포장라벨	배양모본	포장라벨	배양모본	포장라벨	배양모본
15-FK24	10-CFP108-13	15-FA29	12-CFA30-1	15-FK147	12-SK 53-1
15-FK25	10-CFP108-22	15-FA30	12-CFA30-2	15-FK148	12-SK 54-2
15-FK26	10-CFP108-24	15-FA31	12-CFA30-3	15-FK149	12-SK 61-3
15-FK27	10-CFP114-1	15-FA32	12-CFA39-1	15-FK150	12-SK 64-3
15-FK28	10-CFP115-3	15-FA33	12-CFA39-4	15-FK151	12-SK 66-1
15-FK29	10-CFP129-3	15-FA34	12-CFA39-5	15-FK152	12-SK 68-1
15-FK30	10-CFP150-2	15-FA35	12-CFA39-8	15-FK153	12-SK 71-1
15-FK31	11-CFF136-1(선발)	15-FA36	12-CFA39-9	15-FK154	12-SK 74-2
15-FK32	11-CFF136-3	15-FA37	12-CFA39-10	15-FK155	12-SK 76-1
15-FK33	11-CFF136-6	15-FA38	12-CFA39-11	15-FK156	12-SK 83-1
15-FK34	12-FA129-2	15-FA39	12-CFA39-15	15-FK157	12-SK 31-3
15-FK35	12-FA154-1	15-FA40	12-CFA39-16	15-FK158	12-CFA 39-21
15-FK36	12-FA154-2	15-FK11	12-FA24-2	15-FK159	12-CFA 39-22
15-FK37	12-FA162-1	15-FK12	12-FA42-1	15-FK160	12-CFA 39-26
15-FK38	12-FA162-2	15-FK13	12-FA43-2	15-FK161	12-CFA 39-27
15-FK39	11-CFF302-18	15-FK14	12-FA45-1	15-FK162	12-CFA 39-32
15-FK40	11-CFF302-88	15-FK15	13-FA137-1	15-FK163	12-CFA 39-34
15-FK41	11-CFF303-87	15-FK16	09-CFK302-4	15-FK164	12-CFA 39-35
15-FK42	11-CFF303-99	15-FK17	09-CFK311-2	15-FK165	12-CFA 39-39
15-FK43	11-CFF514-1	15-FK18	10-CFP98-1	15-FK166	12-CFA 39-46
15-FK44	11-CFF518-33	15-FK19	10-CFP100-4	15-FK167	12-CFA 39-48
15-FK45	11-CFF518-43	15-FK20	10-CFP100-11	15-FK168	12-CFA 39-51
15-FK46	11-CFF518-60(선발)	15-FK21	10-CFP102-12	15-FK169	12-CFA 39-52
15-FK47	11-CFF518-68	15-FK22	10-CFP107-2	15-FK170	12-CFA 39-53
		15-FK23	10-CFP108-12	15-FA28	12-CFA25-1

(나) 민간 종묘회사와 공동 선발 결과 15-FK31, 15-FK46 선발



<그림 3> 2015년 가을 포장 품평회 모습 및 선발자원 15-FK31, 15-FK46

(다) 추후 품종보호 출원을 위한 직무육성 신품종 심의 완료 : 2점

**배추(*Brassica rapa*. L.)**  
**계통명 : 원교20046호 (3차년도)**

1. 구분 : 중간모본
2. 육성내력 : 국내 시판품종인 ‘불암플러스’의 소포자 배양 유래 계통
  - 자원 수집 : 소포자 배양을 위해 2010년 수집된 시판품종 5점 구매
  - 특성 평가(’ 10) : 원예적 특성(가을 노지 재배) 및 속잎색 선발
  - 선발 및 배양(’ 11 ~ ’ 12) : 우수 선발 개체 뇌수분 및 소포자 배양 병행
  - 종자 증식(’ 13) : 소포자 배양 유래 식물체 종자 증식(뇌수분)
  - 계통 선발(’ 14) : 원예적 특성, 순도 검정, 포장품평회로 공동 선발
  - 종자 증식(’ 15) : 선발 계통 종자 증식 및 병저항성 검정
  - 육성자 : 박수형(70%), 윤무경(30%)
3. 주요특성
  - 대조인 불암3호에 비교하여 폭이 좁고 높으며 가벼운 구를 형성하며, 속잎색이 노랗고 속잎의 숫자는 적어 느슨하게 형성된다.
  - 뿌리혹병 강릉균주에 강한 저항성을 보임
4. 적응지역
  - 전국
  - 가을 재배용 (노지, 하우스 가능)

5. 재배상 유의점

- 일대잡종 모본용으로 육성된 계통으로, 가뭄, 석회 결핍에 민감함

6. 보완을 요하는 특성

- 중모본용 육성 계통으로 수량성 등 일부 원예적 특성은 양호치 못함

7. 시험성적(품종의 특성설명)

가. 주요 특성

<표 1> 15-FA31 앞의 주요 특성

품종 및 계통명	초자	결구형	겉잎색*	속잎색*	엽형	모용	숙기
원교20046호	소형	반포합	3(연초록)	4(노랑)	계란형	중	만
불암3호	중간	반포합	4(초록)	3(연노랑)	계란형	중	중

\* 색차트(겉잎색) 0; DIC 2087, 1; DIC 2088, 2; DIC 2089, 3; DIC 2540, 4; DIC 2324, 5; DIC 2336, 6; DIC 2325, 7; DIC 2356, 8; DIC 2355 (속잎색) 0; DIC 361, 1; DIC 362, 2; DIC 246, 3; DIC 369, 4; DIC 167, 5; DIC 166, 6; DIC 86, 7; DIC 85, 8; DIC 84



나. 구의 주요 가변특성

<표 2> 15-FA31 결구 특성(가을재배)

품종 및 계통명	주중 (g)	구중 (g)	구폭 (cm)	구고 (cm)	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	겉잎수 (매)	속잎수 (매)
원교20046호	2,815.0b	1,487.5b	17.0b	36.5a	48.0b	32.5b	13.5a	51.0b
불암3호	6,355.0a	4,741.5a	24.5a	31.5b	53.0a	41.0a	13.5a	77.5a

\* DMRT : 0.05%

다. 병해충 저항성 : 뿌리혹병 강릉균주에 저항성을 보임

		
원교20046호(15-RFK133) DI* 0 (저항성)	대조(불암3호) DI* 125 (이병성)	15-RFK132 DI* 125 (이병성)



조사주수 : 25주	조사주수 : 25주	조사주수 : 25주
------------	------------	------------

\* Disease Index(DI) :  $\{(2n_2 + 3n_3 + \dots + 9n_9) \times 100\} / (8 \times N_T)$  ;  $n_1$ -병증을 보이지 않는 개체수,  $n_2$ -가장 약한 병증을 보이는 개체수,  $\dots n_9$ -병증이 가장 심한 개체수,  $N_T$ -전체 개체수 (Werner 등, TAG2008)

라. 수량성 : 3,566 kg/10a (대조구 : 9,474 kg/10a)

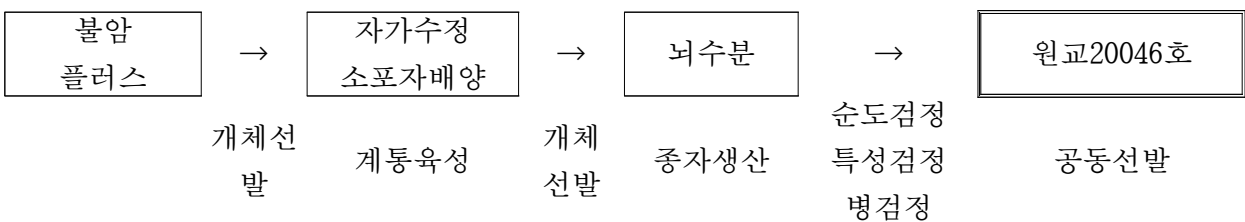
마. 품질특성 : 속잎색은 진한 노랑색이며, 느슨하고 긴 구를 형성함

8. 육성경과

가. 육성계통도 (15-FK133, 원교20046호)

년 도	2010	2011	2012	2013	2014	2015
세 대	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>2</sub> , TC <sub>0</sub>	TC <sub>1</sub>	TC <sub>2</sub>	TC <sub>2</sub>
구 분	불암 플러스	10-FP149-1 10-FP149-2 10-FP149-3 10-FP149-4	소포자배양 →→→	CFA30-1 CFA30-2 CFA30-3	가을 노지 재배 →→	원교 20046호
비 고	- 자원 구매 - 특성 조사 - 개체 선발 (속노란개체)	- 세대 진전 (춘화처리, 뇌수분) - 개체 선발	- 조직배양 - 개체순화 - 춘화처리	- 뇌수분 (종자생산) - 개체선발 (3점 중 1점)	- 계통선발 - 순도 및 특성검정 (15-FA31)	- 공동선발 (저항성 검정) (15-RFK133)

나. 육성계보도



9. 종자 확보량

- 현재 보유량 500립으로 증식 필요

10. 대체품종 : 없음

11. 임시보호권 처분 가능여부 : 가능

12. 기타 참고사항

가. 품종명칭 추천안: 15-FK133 → 원교20046호

# 배추(*Brassica rapa*. L.)

## 계 통 명 : 원교20047호 (3차년도)

1. 구분 : 중간모본

2. 육성내력 : 국내 시판품종인 ‘한동지월동’ 의 소포자 배양 유래 계통

- 자원 수집 : 소포자 배양용 국내 시판종 분양받음(40점, 충남대)
- 특성 평가(' 10) : 원예적 특성(가을 노지 재배) 및 속잎색(황색)
- 선발 및 배양(' 11) : 속잎색 진한 선발 개체 선발 및 배양
- 계통 육성(' 12 ~ ' 13) : 배양 유래 개체 증식, 원예적 특성 및 내서성 선발
- 계통 선발(' 14) : 원예적 특성 및 포장품평회를 통해 공동선발
- 종자 증식(' 15) : 내서성(하우스) 선발 및 순도 검정
- 육성자 : 채소과 박수형(70%), 윤무경(30%), 충남대 임용표(0%)

3. 주요특성

- 구의 폭은 20cm로 대조인 불암3호의 24.5cm보다 다소 좁으나, 구의 높이는 35cm로 대조의 31.5cm보다 크고, 구의 무게는 2.5kg으로 대조의 4.7kg의 약 절반 가량으로 폭이 좁고 길으며 느슨한 구를 형성함
- 더위에 견디는 힘이 강하여 더운 계절 비가림 하우스 재배에 용이

4. 적응지역

- 제주 제외 전국, 가을 재배(노지), 늦봄 및 초여름 재배(비가림)

5. 재배상 유의점

- 일대잡종 모본용으로 육성된 계통으로, 가뭄, 석회 결핍에 민감함

6. 보완을 요하는 특성

- 중모본용 육성 계통으로 수량성 등 일부 원예적 특성은 양호치 못함

7. 시험성적(품종의 특성설명)

### 가. 주요특성

<표 1> 15-FK126 의 주요 특성

품종 및 계통명	초자	결구형	겉잎색*	속잎색*	엽형	모용	숙기
원교20047호	소형	반포합	4(초록)	45(진노랑)	계란형	중	만
불암3호	중간	반포합	4(초록)	3(연노랑)	계란형	중	중

\* 색차트(겉잎색) 0; DIC 2087, 1; DIC 2088, 2; DIC 2089, 3; DIC 2540, 4; DIC 2324, 5; DIC 2336, 6; DIC 2325, 7; DIC 2356, 8; DIC 2355 (속잎색) 0; DIC 361, 1; DIC 362, 2; DIC 246, 3; DIC 369, 4; DIC 167, 5; DIC 166, 6; DIC 86, 7; DIC 85, 8; DIC 84



#### 나. 구의 주요 특성

<표 2> 15-FK126 결구 특성(가을 재배)

품종 및 계통명	주중 (g)	구중 (g)	구폭 (cm)	구고 (cm)	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	겉잎수 (매)	속잎수 (매)
원교20047호	5019.5b	2525.5b	20.0b	35.0a	58.0a	38.0b	16.5a	52.0b
불암3호	6355.0a	4741.5a	24.5a	31.5b	53.0b	41.0a	13.5b	77.5a

\* DMRT : 0.05%

다. 병해충 저항성 : 병충해 저항성은 대비종과 유사함

라. 수량성 : 6,054 kg/10a (대조구 : 9,474 kg/10a)

마. 품질특성 : 속잎이 진한 노랑색이며 우수한 형태의 느슨한 구 형성

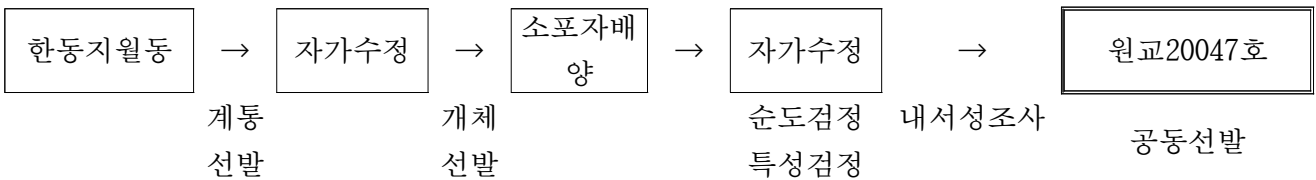
#### 8. 육성경과

가. 육성계통도 (14-FH258, 원교20047호)

년 도	2010	2011	2012	2013	2014	2015
세 대	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>2</sub> , TC <sub>0</sub>	TC <sub>1</sub>	TC <sub>2</sub>	TC <sub>2</sub>

구분	10-FP105	→	10-FP120-1	소포자 배양 →→→	11CF518-1	→	가을 노지 재배 14-FH 258 등 5점	(15-FK 126)  원교 20047호
	10-FP106		10-FP120-2		11CF518-2			
	10-FP107		10-FP120-3		11CF518-3			
	10-FP108		10-FP120-4		11CF518-4			
	10-FP109				중략			
	10-FP110				11CF518-60			
	중략				중략			
	10-FP120				11CF518-66			
	10-FP121				11CF518-67			
	10-FP122				11CF518-68			
	중략							
	10-FP144							
	비고		- 자원 수집 - 특성 조사 - 계통 선발 (40점 중 1점)		- 세대 진전 (춘화처리, 뇌수분) - 개체 선발			

나. 육성계보도



9. 종자 확보량

- 현재 보유량 500립으로 증식 필요

10. 대체품종 : 없음

11. 임시보호권 처분 가능여부 :가능

12. 기타 참고사항

가. 품종명칭 추천안: 15-FK126 → 원교20047호

(라) 특성평가용 유전자원은 ‘불암3호’의 소포자 배양 유래 DH line 20종과 ‘e노랑’의 소포자 배양 유래 DH line 35종 및 대비종으로 원 품종 2종 등 총 37종을 이용하였다. 2015년 8월 19일에 파종하고 9월 9일에 정식하여, 11월 27일과 30일에 국립종자원의 배추 특성조사 요령에 의하여 형태적 특성을 조사하였다(표 6 및 7).

<표 6> 배추 유전자원의 바깥잎 관련 특성

품종(계통)	잎자세	잎 길이 (cm)	잎 너비 (cm)	잎모양	잎 요철 크기	잎색깔	바깥잎 털 다소	중략 가로면	중략 길이 (cm)	중략 너비 (cm)	중략의 색
불암3호-90 <sup>2</sup>	고추서다	37	22	넓은달걀형	중간	녹색	없거나 약함	블록	22	6	흰색
불암3호-91	고추서다	37	25	넓은달걀형	중간	녹색	없거나 약함	블록	22	5	연녹색

불암3호-92	고추서다	45	27	넓은달갈형	작다	녹색	없거나 약함	불록	26	5	연녹색
불암3호-93	고추서다	39	24	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	23	7	연녹색
불암3호-96	고추서다	40	26	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	25	7	연녹색
불암3호-98	고추서다	38	25	넓은달갈형	작다	녹색	없거나 약함	불록	22	5	흰색
불암3호-108	고추서다	40	26	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	24	7	연녹색
불암3호-109	고추서다	39	25	넓은달갈형	작다	녹색	없거나 약함	불록	22	6	흰색
불암3호-123	고추서다	40	25	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	23	6	연녹색
불암3호-133	고추서다	41	24	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	25	6	연녹색
불암3호-139	고추서다	37	28	넓은달갈형	작다	녹색	없거나 약함	불록	23	6	연녹색
불암3호-140	고추서다	39	25	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	23	6	연녹색
불암3호-141	고추서다	40	24	좁은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	24	7	연녹색
불암3호-144	고추서다	38	24	넓은달갈형	작다	녹색	없거나 약함	불록	21	5	연녹색
불암3호-149	고추서다	37	26	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	22	6	흰색
불암3호-152	고추서다	41	25	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	25	7	연녹색
불암3호-155	고추서다	39	26	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	22	6	흰색
불암3호-157	고추서다	39	26	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	21	5	연녹색
불암3호-172	고추서다	39	27	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	24	6	흰색
불암3호-184	고추서다	39	25	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	22	6	흰색
불암3	고추서다	45	30	넓은달갈형	크다	녹색	없거나 약함	불록	29	7	연녹색
e노랑-6	고추서다	44	27	넓은달갈형	크다	녹색	없거나 약함	불록	28	7	흰색
e노랑-9	고추서다	44	25	좁은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	26	6	연녹색
e노랑-11	고추서다	41	24	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	23	6	연녹색
e노랑-13	고추서다	47	27	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	26	6	연녹색
e노랑-16	고추서다	47	29	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	29	6	연녹색
e노랑-18	고추서다	45	26	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	28	5	연녹색
e노랑-19	고추서다	44	24	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	25	5	연녹색
e노랑-28	고추서다	36	25	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	22	5	연녹색
e노랑-35	고추서다	42	26	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	25	6	연녹색
e노랑-36	고추서다	40	24	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	24	7	연녹색
e노랑-41	고추서다	43	28	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	26	13	연녹색
e노랑-45	고추서다	41	28	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	24	7	연녹색
e노랑-49	고추서다	50	28	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	31	6	연녹색
e노랑-50	고추서다	42	23	좁은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	26	6	흰색
e노랑-51	고추서다	42	26	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	24	6	연녹색
e노랑	고추서다	49	31	넓은달갈형	중간	녹색	없거나 약함	불록	30	6	연녹색

<sup>2</sup>-00 표시는 소포자 배양 유래 계통임.

<표 7> 배추 유전자원의 구 관련 특성

품종(계통)	구중 (kg)	구 키 (cm)	너비 (cm)	결구 형태	결구일 결침	윗부분 색	외엽 요철	속색갈	단단한 정도	세로자른면	고갱이 선단모양
불암3호-90 <sup>2</sup>	3.4	29	14	단합	중간	연두	중간	노랑	중간	타원형	돌기형
불암3호-91	3.8	27	16	단합	중간	연두	중간	연노랑	중간	타원형	돌기형
불암3호-92	3.8	29	17	단합	중간	연두	약	연노랑	중간	타원형	둥근모양

불암3호-93	4.1	28	16	달힙	중간	연두	중간	노랑	중간	타원형	돌기형
불암3호-96	3.9	29	16	달힙	중간	연두	중간	연노랑	중간	타원형	돌기형
불암3호-98	4.0	30	19	달힙	중간	연두	약	연노랑	중간	타원형	돌기형
불암3호-108	4.0	30	15	달힙	중간	연두	중간	노랑	중간	타원형	돌기형
불암3호-109	3.9	30	19	달힙	중간	연두	약	연노랑	중간	달걀형	둥근모양
불암3호-123	4.1	27	18	달힙	심하다	연두	심	연노랑	강	타원형	돌기형
불암3호-133	3.9	24	17	달힙	중간	연두	약	연노랑	중간	타원형	돌기형
불암3호-139	3.9	30	19	달힙	중간	연두	약	연노랑	중간	타원형	돌기형
불암3호-140	4.3	30	17	달힙	중간	연두	중간	연노랑	중간	타원형	돌기형
불암3호-141	3.9	28	16	달힙	중간	연두	중간	노랑	중간	타원형	돌기형
불암3호-144	4.1	31	18	달힙	중간	연두	약	연노랑	중간	타원형	둥근모양
불암3호-149	4.0	29	17	달힙	중간	연두	약	연노랑	중간	달걀형	돌기형
불암3호-152	4.1	29	17	달힙	중간	연두	중간	연노랑	중간	타원형	돌기형
불암3호-155	4.1	27	17	달힙	중간	연두	중간	연노랑	중간	타원형	돌기형
불암3호-157	3.8	28	17	달힙	중간	연두	중간	연노랑	중간	달걀형	돌기형
불암3호-172	4.4	30	17	달힙	중간	연두	중간	노랑	중간	달걀형	돌기형
불암3호-184	3.9	28	17	달힙	중간	연두	중간	연노랑	중간	타원형	돌기형
불암3	5.1	28	17	달힙	심하다	연두	중간	연노랑	강	타원형	둥근모양
e노랑-6	3.9	15	16	달힙	중간	연두	심	연노랑	중간	타원형	둥근모양
e노랑-9	4.3	28	15	달힙	중간	연두	중간	노랑	중간	타원형	둥근모양
e노랑-11	3.0	28	15	달힙	중간	연두	중간	노랑	중간	타원형	둥근모양
e노랑-13	3.8	31	15	달힙	중간	연두	중간	연노랑	중간	장타원형	돌기형
e노랑-16	4.4	30	17	달힙	중간	연두	중간	연노랑	중간	타원형	둥근모양
e노랑-18	3.8	33	16	달힙	중간	연두	중간	노랑	중간	타원형	둥근모양
e노랑-19	4.2	30	18	달힙	중간	연두	약	연노랑	중간	타원형	둥근모양
e노랑-28	3.3	25	15	달힙	중간	연두	중간	연노랑	중간	타원형	돌기형
e노랑-35	4.0	27	17	달힙	중간	연두	중간	노랑	중간	타원형	둥근모양
e노랑-36	3.8	26	16	달힙	중간	연두	중간	노랑	약	타원형	둥근모양
e노랑-41	4.3	30	16	달힙	중간	연두	중간	노랑	약	타원형	둥근모양
e노랑-45	4.4	27	18	달힙	심하다	연두	중간	연노랑	강	타원형	돌기형
e노랑-49	4.2	29	15	달힙	중간	연두	중간	노랑	중간	타원형	둥근모양
e노랑-50	3.6	26	15	달힙	중간	연두	중간	노랑	약	타원형	둥근모양
e노랑-51	4.2	29	20	달힙	중간	연두	약	연노랑	중간	타원형	둥근모양
e노랑	6.5	32	21	달힙	심하다	연두	약	연노랑	강	타원형	둥근모양

<sup>z</sup>-00 표시는 소포자 배양 유래 계통임.

(마) 소포자 배양에서 유래된 유전자원의 초기생육은 원 품종에 비하여 큰 차이를 보이지 않았으나 수확기에는 다소 차이를 보였는데 대부분의 ‘불암3호’ 및 ‘e노랑’ 유래 DH line이 원품종 보다는 작은 경향이였다(표 6, 7 및 그림 4),



생육 초기(2015. 9. 25.)



수확 직전(2015. 11. 20.)

<그림 4> 특성검정용 유전자원 생육상태

(바) 소포자 배양 유래 대부분의 계통은 원 품종과 유사한 형태를 지지고 있으나, 구중이나 앞의 길이와 너비, 중륵의 길이 등은 ‘불암3호’ 유래 계통이나 ‘e노랑’ 유래 계통 모두 원 품종보다 작았다. 중륵의 색에는 약간의 차이가 있어 원 품종 모두 연녹색이었으나, DH line 에는 흰색을 띠는 경우도 있었다. 구속색갈도 원 품종 2종 모두 연노랑이었으나 DH line 에서는 그보다 진한 노랑색을 띠는 경우도 있었으며, 구 세로자른면에서도 대부분은 원품종과 유사 하였으나(그림 5, 6), 일부는 원품종과 다른 형태를 띠는 경우도 있었다.



‘불암3호’



‘불암3호’ -123



‘불암3호’ -140



‘불암3호’ -172

<그림 5> ‘불암3호’ 및 ‘불암3호’ 에서 유래된 몇가지 DH line



‘e노랑’



‘e노랑’ -9



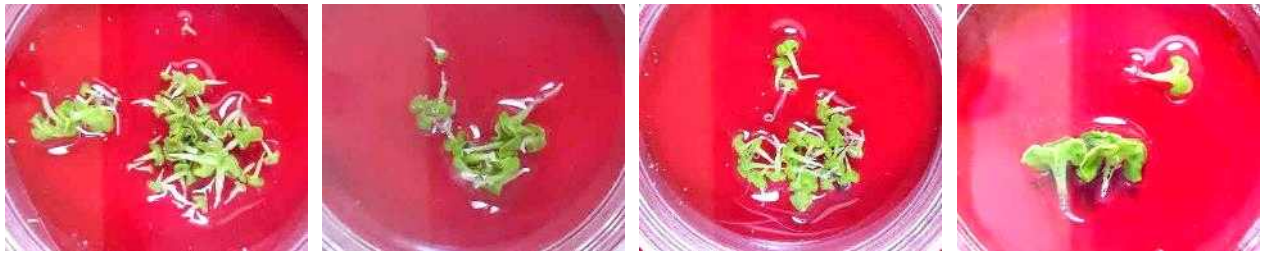
‘e노랑’ -16



‘e노랑’ -45

<그림 6> ‘e노랑’ 및 ‘e노랑’ 에서 유래된 몇가지 DH line

(사) 새로운 DH line을 육성하기 위한 소포자 배양에는 시판 품종인 ‘CR맛’, ‘e노랑’, ‘대통’, ‘불암3호’, ‘진청’, ‘옥황씨알’ 등 6품종과 일본도입종인 ‘坂東白菜’ ‘冬冴 Fuyusae’ ‘干勝’ ‘大福’ ‘大福75’ ‘耐性アポロ60’ ‘金閣75白菜’ 등 7종을 전년도에 이어 계속 이용하였다. 각각의 품종에서 소포자배양을 통하여 다량의 배상체(40계통 이상)를 유도하고(그림 7.), 이를 배양하여 식물체로 유도하여(그림 8.) 저온처리하고 selfing한 다음, 장각과를 수확하고 건조하여 총 6,472립을 채종하였다(표 8).



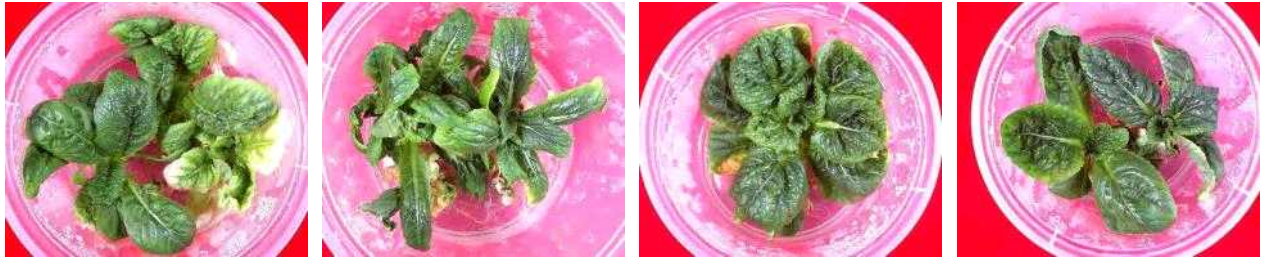
‘冬冴 Fuyusae’

‘大福75’

‘대통’

‘옥황씨알’

<그림 7> 소포자 배양에서 유기된 배상체



‘坂東白菜’

‘씨알맛’

‘불암3호’

‘진청’

<그림 8> 소포자 배양에서 유기된 기내 유식물체

<표 8> DH line 육성 및 채종

계통(품종)	육성 line 수	채종립	계통(품종)	육성 line 수	채종립
坂東白菜	20	425	불암3호	90	6,122
冬冴 Fuyusae	47	2,140	옥황씨알	6	2,779
干勝	5	167	진청	28	2,526
大福	1	7	e노랑	21	6,472
大福75	2	17	대통	25	1,284
耐性アポロ60	18	638	CR맛	8	400
金閣75白菜	12	3,858			

(아) 육성한 DH line의 증식을 위해서는 종자를 파종하고 30일간 5℃에서 저온처리한 후 비닐하우스에서 재배하면서 selfing 하였다. 증식을 위한 채종에 이용한 계통은, 항암성분이 많은 ‘秋玉1号’와 셀룰로스 함량이 높은 ‘津冠75’를 교배하여 나온 F1 유래 DH line과, ‘天津绿青麻叶’, ‘丰盈’, ‘中狮子頭’, ‘小狮子頭’, ‘锦424-S8’, ‘京绿60 (F1)’에서 유도된 미네랄 고함유 DH line으로, 다량의 장각과가 형성되어 채종하였으며, 이중 ‘秋玉1号’와 ‘津冠75’의 F1 유래 DH line 20종을 채종하여 유전자원으로 기탁하였다(기탁번호 BP1234284 ~ BP1234303, 2015. 12. 24.).

## 나. 연구 결과

### ○ 반수체 배양용 재료 수집 및 재배

- 국내외 다양한 배추과 자원 수집 : 공동연구원 등의 해외 출장 시 수집(일본 14점)
- 보유 및 수집 자원 재배 : 봄 재배 및 배양(전년 선발 자원), 가을 재배 및 배양(신규 선발 자원)



- 다양한 자원의 원예적 특성 평가 : 육성 계통 및 전년 수집 자원의 원예적 특성은 봄 및 가을 노지 재배를 통하여 실시
- 선발 : 포장 공개 행사 등을 통하여 종묘회사 및 공동 연구 기관 간 의견 조율

○ 반수체 배양 실시

- 배추과 소포자 배양에 효과적인 배지 조건의 지속적 변형 및 선발 : 9조건
- 종묘회사 요청 배추과 자원의 파종, 춘화처리, 정식, 개화 유도, 병해충 관리 및 소포자 배양 실시(2개 종묘회사 10종 50점 서비스 실시 결과 배상체 77점 순화, 70점 분양 완료)
- 난배양 자원 후대 채종

○ 반수체 유래 계통 육성

- 배양에 효율 증진 가능 신규 물질 첨가 및 배양 조건 변형
- 서비스용 다양한 자원의 배양을 위한 파종, 춘화처리, 정식, 개화 유도, 병해충 관리 및 소포자 배양 실시

#### 4. 4년차 연구 내용 및 결과

##### 가. 재료 및 방법

(1) 반수체 배양용 재료 수집 및 재배

(가) 수집 및 육성 자원 196점의 원예적 특성 평가 : 6점 선발

<표 1> 국내외 수집자원 196점의 파종 내역

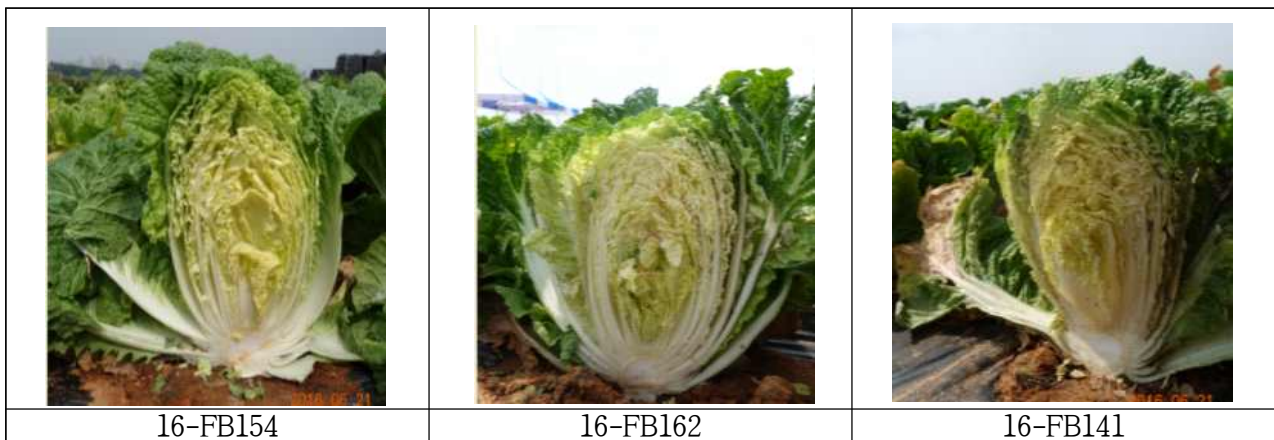
16라벨	교배번호(품종명)	계통번호	16라벨	도입번호	도입국가
16-FB01	춘광		16-FB99	12-2-1	중국
16-FB02	아라리		16-FB100	12-2-2	중국
16-FB03	킹콩		16-FB101	12-2-3	중국
16-FB04	15-FD16		16-FB102	12-2-4	중국
16-FB05	15-FD26		16-FB103	12-2-5	중국
16-FB06	15-FD27		16-FB104	12-2-6	중국
16-FB07	15-FD29		16-FB105	12-2-7	중국
16-FB08	15-FD30		16-FB106	12-2-8	중국
16-FB09	15-FD35		16-FB107	12-2-9	중국
16-FB10	15-FD36		16-FB108	12-2-10	중국
16-FB11	15-FD43		16-FB109	12-2-11	중국
16-FB12	15-FD44		16-FB110	12-2-12	중국
16-FB13	15-FD45		16-FB111	12-2-13	중국
16-FB14	15-FD50		16-FB112	12-2-14	중국
16-FB15	15-FD52		16-FB113	12-2-15	중국
16-FB16	15-FD53		16-FB114	12-2-16	중국
16-FB17	15-FD54	10-FP81-1	16-FB115	12-2-3	일본
16-FB18	15-FD59		16-FB116	12-2-19	일본
16-FB19	15-FD60		16-FB117	12-2-20	일본
16-FB20	15-FD61		16-FB118	12-2-21	일본
16-FB21	15-FD64		16-FB119	12-2-22	일본
16-FB22	15-FD65		16-FB120	12-2-23	일본
16-FB23	15-FD116	13-FC118	16-FB121	12-2-24	일본

16-FB24	15-FD119	13-FC132	16-FB122	12-2-25	일본
16-FB25	15-FD121	13-FC139	16-FB123	12-2-26	일본
16-FB26	15-FD124	13-FC150	16-FB124	12-2-27	일본
16-FB27	15-FD06	14-FH17	16-FB125	12-2-28	일본
16-FB28	15-FD11	14-FA21	16-FB126	12-2-29	일본
16-FB29	15-FD69		16-FB127	12-2-30	일본
16-FB30	15-FD70		16-FB128	12-2-31	일본
16-FB31	15-FD71	11-FF202-1	16-FB129	12-2-32	일본
16-FB32	15-FD72		16-FB130	12-2-33	일본
16-FB33	15-FD73		16-FB131	12-2-34	일본
16-FB34	15-FD145	14-FH258	16-FB132	12-2-35	일본
16-FB35	15-BT23	14-FH21	16-FB133	12-2-36	일본
16-FB36	15-BT24	14-FH38	16-FB134	12-2-37	일본
16-FB37	15-BT25	14-FH30	16-FB135	12-2-38	일본
16-FB38	15-BT26	14-FH27	16-FB136	12-2-39	일본
16-FB39	15-FD111	13-FC88	16-FB137	12-2-40	일본
16-FB40	15-BT27	14-FH108	16-FB138	12-2-41	일본
16-FB41		14-FA52	16-FB139	12-2-42	일본
16-FB42	원교20034호	14-FH123-1	16-FB140	12-2-43	일본
16-FB43	원교20035호	14-FH124-1	16-FB141	13-2-1	중국
16-FB44	원교20035호(뿌리순무)	14-FH5-1	16-FB142	13-2-2	중국
16-FB45	원교20036호	15-FA2-1	16-FB143	13-2-3	중국
16-FB46	원교20037호	14-FH126-2	16-FB144	13-2-4	중국
16-FB47	원교20038호	14-FH127-1	16-FB145	13-2-5	중국
16-FB48	원교20039호	14-FH128-4	16-FB146	13-2-6	중국
16-FB49	원교20040호	14-FH117-1	16-FB147	13-2-7	중국
16-FB50	원교20041호	14-FH130-1	16-FB148	13-2-8	중국
16-FB51	원교20042호	14-FH131-1	16-FB149	13-2-9	중국
16-FB52	원교20043호	14-FH120-2	16-FB150	13-2-10	중국
16-FB53	원교20044호	13-FC-127-2	16-FB151	13-2-11	중국
16-FB54	원교20045호	14-FH134-1	16-FB152	14-2-1	중국
16-FB55	14-fs58	11-CFF302-16	16-FB153	14-2-2	중국
16-FB56	14-fs59	11-CFF302-18	16-FB154	14-2-3	중국
16-FB57	14-fs62	11-CFF302-72	16-FB155	14-2-4	중국
16-FB58	14-fs64	11-CFF302-88	16-FB156	14-2-5	중국
16-FB59	14-fs69	11-CFF302-106	16-FB157	14-2-6	중국
16-FB60	13-FD36 후대	11-FD74-1	16-FB158	14-2-7	중국
16-FB61	13-FD41 후대	11-FD85-1	16-FB159	14-2-8	중국
16-FB62	13-FD49 후대	11-FF108-1	16-FB160	14-2-9	중국
16-FB63	13-FD50 후대	11-FF113-1	16-FB161	14-2-10	중국
16-FB64		13-SB31	16-FB162	14-2-11	중국
16-FB65		13-SB32	16-FB163	14-2-12	중국
16-FB66		13-SB33	16-FB164	14-2-13	중국
16-FB67		13-SB34	16-FB165	14-2-14	중국
16-FB68		13-SB35	16-FB166	14-2-15	중국
16-FB69		13-SB89	16-FB167	14-2-16	중국
16-FB70		13-SB91	16-FB168	14-2-17	중국
16-FB71		16-SB01	16-FB169	15-2-1	중국
16-FB72		16-SB02	16-FB170	15-2-2	중국
16-FB73		16-SB03	16-FB171	15-2-3	중국

16-FB74		16-SB04	16-FB172	15-2-4	중국
16-FB75		16-SB05	16-FB173	15-2-5	중국
16-FB76		16-SB06	16-FB174	15-2-6	중국
16-FB77		16-SB07	16-FB175	15-2-7	중국
16-FB78		16-SB08	16-FB176	15-2-8	중국
16-FB79		16-SB09	16-FB177	15-2-9	중국
16-FB80		16-SB10	16-FB178	15-2-10	중국
16-FB81		16-SB11	16-FB179	15-2-11	북한
16-FB82		16-SB12	16-FB180	15-2-12	북한
16-FB83	10-FP12-3	13-SB64	16-FB181	15-2-13	이스라엘
16-FB84	10-FP23-2	13-SB65	16-FB182	15-2-14	이스라엘
16-FB85	10-FP24-11	13-SB66	16-FB183	15-2-15	이스라엘
16-FB86	10-FP2511	13-SB67	16-FB184	15-2-16	이스라엘
16-FB87	10-FP27-1	13-SB68	16-FB185	15-2-17	이스라엘
16-FB88	10-FP28-1	13-SB69	16-FB186	15-2-18	이스라엘
16-FB89	10-FP29-1	13-SB70	16-FB187	15-2-19	미국
16-FB90	10-FP31-2	13-SB71	16-FB188	15-2-20	미국
16-FB91	10-FP32-3	13-SB72	16-FB189	15-2-21	미국
16-FB92	09-CMP60-63	13-SB73	16-FB190	15-2-22	미국
16-FB93	09-CFK302-3	13-SB74	16-FB191	15-2-23	중국 청도
16-FB94	10-FP3-1	13-SB75	16-FB192	15-2-24	중국 청도
16-FB95	10-FP13-2	13-SB76	16-FB193	15-2-25	중국 청도
16-FB96	10-FP17-3	13-SB77	16-FB194	15-2-26	중국 청도
16-FB97	10-FP21-1	13-SB78	16-FB195	15-2-27	중국 청도
16-FB98	10-FP30-3	13-SB82	16-FB196	15-2-28	중국 청도

<표 2> 종자회사 공동으로 6점 선발

선발라벨	선발회사
16-FB141	(주)코레곤, 아시아종묘, 한국종묘
16-FB154	아시아종묘
16-FB162	(주)코레곤, 한국종묘
16-FB159	(주)코레곤, 아시아종묘, 한국종묘
16-FB185	(주)코레곤, 한국종묘
16-FB182	(주)코레곤



<그림 1> 선발 된 자원 3점의 모습

☞ 선발 자원은 교배 및 배양 재료로 활용

(나) 4차년도 신규 수집 자원 : 타과제 출장 시 배추 8점 수집(미국 1점, 일본 7점)



<그림 2> 미국 수집 자원 1점 모습



<그림 3> 일본 수집 자원 7점 모습

(2) 반수체 배양 실시

(가) 4차 서비스를 위해 4개 기관에서 요청한 195점의 소포자 배양 실시

<표 3> 배추 소포자 배양 3차 서비스 요청 자원 50점 목록

라벨	작물	소속	라벨	작물	소속
16-KC1	배추	대일바이오	16-KC21	배추	동부팜한농(주)
16-KC2	배추	대일바이오	16-KC22	배추	동부팜한농(주)
16-KC3	배추	대일바이오	16-KC23	배추	동부팜한농(주)
16-KC4	배추	대일바이오	16-KC24	배추	(주)코레곤
16-KC5	배추	대일바이오	16-KC25	배추	(주)코레곤
16-KC6	배추	대일바이오	16-KC26	배추	(주)코레곤
16-KC7	배추	대일바이오	16-KC27	배추	(주)코레곤
16-KC8	배추	대일바이오	16-KC28	배추	(주)코레곤
16-KC9	배추	대일바이오	16-KC29	배추과	충남대
16-KC10	배추	대일바이오	16-KC30	배추과	충남대
16-KC11	배추	(주)코레곤	16-KC31	배추과	충남대

16-KC12	배추	(주)코레곤	16-KC32	배추과	충남대
16-KC13	배추	(주)코레곤	16-KC33	배추과	충남대
16-KC14	배추	(주)코레곤	16-KC34	배추과	충남대
16-KC15	배추	(주)코레곤	16-KC35	배추과	(주)코레곤
16-KC16	배추	(주)코레곤	16-KC36	배추과	(주)코레곤
16-KC17	배추	(주)코레곤	16-KC37	배추과	(주)코레곤
16-KC18	배추	(주)코레곤	16-KC38	배추과	(주)코레곤
16-KC19	배추	(주)코레곤	16-KC39	배추과	(주)코레곤
16-KC20	배추	(주)코레곤			

(나) 4차년도 서비스에 실시된 배지 조합 : 9조건 및 추가 3조건

<표 4> 배추 소포자 배양 2차 서비스 실시 결과

배지번호	배지조성
1	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13%
2	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + NAA 50 $\mu$ l+BAP 50 $\mu$ l
5	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + Micro Element 1mg + S13%
6	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + Micro Element 1mg + S13% + NAA 50 $\mu$ l + BAP 50 $\mu$ l
1-A	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + Kao. Vit 1mg
1-B	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + Gamberg Vit 1mg
1-C	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + MS.Vit 1mg
1-D	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + Micronutrient
1-E	1/2N NLN + 1/2N NLN Vit + CaNO3 0.5g + AgNO3 1mg + S13% + Macronutrient

※ 화퇴가 충분할 경우 추가 배지 시험 실시 : 10, 10-C, 10-D

(다) 4차년도 수행 결과 획득된 소포자 유래 식물체 3,190점 4개사에 분양 완료

<표 5> 배추 소포자 배양 4차 서비스 실시 결과

라벨	작물	소속	최적배지	개체수	차선배지	개체수	배발생 개수	MS치상개수
16-KC1	배추	대일바이오	1	5	5	5	15	13
16-KC2	배추	대일바이오	5	199	1	22	232	229
16-KC3	배추	대일바이오	1-B	24	6	1	28	24
16-KC4	배추	대일바이오	1-B	18	1	2	20	17
16-KC5	배추	대일바이오	5	11	1-B	8	27	27
16-KC6	배추	대일바이오	1-D	1	-	-	1	1
16-KC7	배추	대일바이오	1-D	390	1-A	26	421	294
16-KC8	배추	대일바이오	1-B	11	1-A	3	15	15
16-KC9	배추	대일바이오	10	5	-	-	5	4
16-KC10	배추	대일바이오	1	3	-	-	3	3

16-KC11	배추	(주)코레곤	1-A	10	1-D	2	20	16
16-KC12	배추	(주)코레곤	10	1	-	-	1	1
16-KC13	배추	(주)코레곤	1-B	173	10	30	237	113
16-KC14	배추	(주)코레곤	1-B	111	1	10	152	144
16-KC15	배추	(주)코레곤	1-B	82	1	49	261	210
16-KC16	배추	(주)코레곤	1-C	67	1	14	98	94
16-KC17	배추	(주)코레곤	1-D	17	1-C	10	49	47
16-KC18	배추	(주)코레곤	1-A	149	1-B	94	338	241
16-KC19	배추	(주)코레곤	1	108	1-D	67	325	299
16-KC20	배추	(주)코레곤	10-D	3	10-C	2	8	8
16-KC21	배추	동부팜한농(주)	배양중	-	-	-	-	-
16-KC22	배추	동부팜한농(주)	배양중	-	-	-	-	-
16-KC23	배추	동부팜한농(주)	배양중	-	-	-	-	11
16-KC24	배추	(주)코레곤	6	72	1-D	31	137	129
16-KC25	배추	(주)코레곤	1-A	234	5	221	535	434
16-KC26	배추	(주)코레곤	5	236	1	144	443	286
16-KC27	배추	(주)코레곤	1-B	149	6	42	249	219
16-KC28	배추	(주)코레곤	6	97	1-B	36	154	135
16-KC29	배추과	충남대	배양중	-	-	-	-	-
16-KC30	배추과	충남대	배양중	-	-	-	-	-
16-KC31	배추과	충남대	배양중	-	-	-	-	-
16-KC32	배추과	충남대	배양중	-	-	-	-	-
16-KC33	배추과	충남대	배양중	-	-	-	-	-
16-KC34	배추과	충남대	배양중	-	-	-	-	-
16-KC35	배추과	(주)코레곤	10	47	10-C	40	136	135
16-KC36	배추과	(주)코레곤	10-C	15	10-D	6	21	18
16-KC37	배추과	(주)코레곤	10-C	16	11	7	26	23
16-KC38	배추과	(주)코레곤	-	-	-	-	-	-
16-KC39	배추과	(주)코레곤	-	-	-	-	-	-
합계							3,957	3,190



<그림 4> 4차 소포자배양 서비스 결과 획득된 배상체의 각 종묘회사 전달

(3) 반수체 유래 계통 육성

(가) 소포자 배양 유래 식물체의 종자 증식 완료 : 12-CFA20-5 등 97점의 소포자 배양 유래 식물체를 재파종 하여 뇌수분에 성공 100립 이상의 종자 채종 성공.

<표 6> 2016년 가을 노지 생육조사를 위해 파종된 DH inbred 96점의 목록

번호	16라벨	교배번호(품종명)	번호	16라벨	교배번호(품종명)
----	------	-----------	----	------	-----------

1	16-FFB150	12-CFA20-5	50	16-FFB199	12-CFA52-3
2	16-FFB151	12-CFA22-1	51	16-FFB200	12-CFA52-5
3	16-FFB152	12-CFA22-5	52	16-FFB201	12-CFA52-7
4	16-FFB153	12-CFA22-57	53	16-FFB202	12-CFA52-9
5	16-FFB154	12-CFA22-60	54	16-FFB203	12-CFA52-11
6	16-FFB155	12-CFA22-64	55	16-FFB204	12-CFA52-13
7	16-FFB156	12-CFA39-3	56	16-FFB205	12-CFA52-14
8	16-FFB157	12-CFA39-17	57	16-FFB206	12-CFA52-17
9	16-FFB158	12-CFA39-18	58	16-FFB207	12-CFA52-22
10	16-FFB159	12-CFA39-19	59	16-FFB208	12-CFA52-26
11	16-FFB160	12-CFA39-20	60	16-FFB209	12-CFA52-27
12	16-FFB161	12-CFA39-33	61	16-FFB210	12-CFA97-3
13	16-FFB162	12-CFA39-36	62	16-FFB211	12-CFA97-5
14	16-FFB163	12-CFA39-37	63	16-FFB212	12-CFA97-6
15	16-FFB164	12-CFA39-40	64	16-FFB213	12-CFA97-11
16	16-FFB165	12-CFA39-41	65	16-FFB214	12-CFA97-13
17	16-FFB166	12-CFA39-43	66	16-FFB215	12-CFA97-16
18	16-FFB167	12-CFA39-44	67	16-FFB216	12-CFA97-17
19	16-FFB168	12-CFA39-45	68	16-FFB217	12-CFA97-18
20	16-FFB169	12-CFA39-49	69	16-FFB218	12-CFA97-21
21	16-FFB170	12-CFA39-59	70	16-FFB219	12-CFA97-22
22	16-FFB171	12-CFA39-74	71	16-FFB220	12-CFA97-23
23	16-FFB172	12-CFA39-83	72	16-FFB221	12-CFA97-24
24	16-FFB173	12-CFA39-91	73	16-FFB222	12-CFA97-25
25	16-FFB174	12-CFA39-95	74	16-FFB223	12-CFA97-27
26	16-FFB175	12-CFA39-101	75	16-FFB224	12-CFA97-28
27	16-FFB176	12-CFA39-102	76	16-FFB225	12-CFA97-35
28	16-FFB177	12-CFA39-107	77	16-FFB226	12-CFA97-38
29	16-FFB178	12-CFA39-109	78	16-FFB227	12-CFA97-40
30	16-FFB179	12-CFA39-111	79	16-FFB228	12-CFA97-44
31	16-FFB180	12-CFA39-112	80	16-FFB229	12-CFA97-46
32	16-FFB181	12-CFA39-114	81	16-FFB230	12-CFA97-48
33	16-FFB182	12-CFA39-115	82	16-FFB231	12-CFA97-50
34	16-FFB183	12-CFA39-117	83	16-FFB232	12-CFA97-51
35	16-FFB184	12-CFA39-118	84	16-FFB233	12-CFA97-52
36	16-FFB185	12-CFA39-120	85	16-FFB234	12-CFA97-54
37	16-FFB186	12-CFA39-121	86	16-FFB235	12-CFA97-55
38	16-FFB187	12-CFA39-123	87	16-FFB236	12-CFA97-56
39	16-FFB188	12-CFA39-124	88	16-FFB237	12-CFA97-59
40	16-FFB189	12-CFA39-130	89	16-FFB238	12-CFA97-62
41	16-FFB190	12-CFA39-132	90	16-FFB239	12-CFA97-67
42	16-FFB191	12-CFA39-133	91	16-FFB240	12-CFA97-68
43	16-FFB192	12-CFA39-134	92	16-FFB241	12-CFA97-70
44	16-FFB193	12-CFA39-136	93	16-FFB242	12-CFA97-72
45	16-FFB194	12-CFA39-137	94	16-FFB243	12-CFA97-73
46	16-FFB195	12-CFA39-138	95	16-FFB244	12-CFA97-74
47	16-FFB196	12-CFA39-140	96	16-FFB245	12-CFA97-75

48	16-FFB197	12-CFA39-141	97	16-FFB246	12-CFA97-76
49	16-FFB198	12-CFA39-144			

(나) 민간 종묘회사와 공동 선발 결과 16-FFB209, 16-FFB190 2점 선발



<그림 3> 2016년 가을 포장 품평회 모습 및 선발자원 16-FFB209, 16-FFB190의 모습

(다) 추후 품종보호 출원을 위한 직무육성 신품종 심의 완료 : 1점

**배추×순무**  
*(Brassica rapa spp. pekinensis × Brassica rapa spp. rapa )*  
**계통명 : 원교20049호 (4차년도)**

1. 구분 : 육신품종(고정종)
2. 육성내력 : 순무와 배추 교배종 후대의 소포자 배양으로 육성
  - 수집 자원 선발 및 교배 : 원예원 보유 순무(우즈백 수집 자원, IT033820) 및 배추(월동, 설봉, 중국도입종)의 뿌리흑병 race4 접종 결과 살아남은 개체의 방임 수분(2006)
  - 소포자 배양 : 2006 ~ 2007년
  - 순화 및 종자 생산 : 2008 뇌수분 실시
  - 특성 평가 ('09 ~ '10) : 뿌리흑병 저항성, 균일성, 원예적 특성  
→ 뿌리흑병에는 저항성이나 결구를 형성하지 않아 종자 1차 증식 후 보관
  - 계통 선발('14 ~ '16) : 병에 강한 특성 활용 위해 '14년부터 재평가 실시, '15년 기능성 성분인 글루코시놀레이트 함량이 높아 선발됨 (15-FK69), '16년 1월 유통업체와 공동 선발하여 11월 농가 시범재배 실시
  - 육성자 : 국립원예특작과학원 박수형, 채원병, 장석우
3. 주요특성
  - 지상부는 구를 형성하지 않으며, 색이 진하며 결각이 있는 잎 형성
  - 지하부는 식용 가능한 형태의 뿌리 형성
4. 적응지역 : 남부지역, 노지 가을 재배용
5. 재배상 유의점



- 일대잡종 모본용으로 육성된 계통으로, 가뭄, 석회 결핍에 민감함

6. 보완을 요하는 특성

- 일대잡종 모본용으로 육성된 계통으로 원예적 특성은 양호하지 못함

7. 시험성적

가. 고유특성

<표 1> 15-FK69 고유특성

품종 및 계통명	초자	결구형	겉잎색	속잎색	엽형	모용	숙기
15-FK69	중간	불결구	4.7	0.7	긴계란형	중	만
불암3호	중간	반포합	5.0	1.0	계란형	중	중

나. 가변특성

<표 2> 15-FK69 가변특성

( ' 15 가을, 완주)

품종 및 계통명	주중 (g)	구중 (g)	구폭 (cm)	구고 (cm)	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	겉잎수 (매)	속잎수 (매)
15-FK69	3,183.3	414.3	6.7	39.7	58.8	29.2	16.0	17.0
불암3호	4,485.0	3,124.0	18.0	25.9	47.2	29.3	13.3	67.0
p-value	0.08	0.00**	0.00**	0.01**	0.01**	0.95	0.56	0.00**

\* t-test 결과 계산된 p-value 값이 0.05보다 작은 경우

\*\* t-test 결과 계산된 p-value 값이 0.01보다 작은 경우

<표 3> 15-FK69 가변특성

( ' 16 가을, 완주)

품종 및 계통명	주중 (g)	구중 (g)	구폭 (cm)	구고 (cm)	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	겉잎수 (매)	속잎수 (매)
15-FK69								
불암3호	1,392.3	928.7	12.2	22.5	35.7	17.7	13.7	50.0
p-value	0.03*	0.10	0.03*	0.89	0.00**	0.06	0.18	0.02**

※ ' 16년 가을 잦은 비와 고온으로 전년 대비 생육 부진

\* t-test 결과 계산된 p-value 값이 0.05보다 작은 경우

\*\* t-test 결과 계산된 p-value 값이 0.01보다 작은 경우

다. 병해충 저항성 : 뿌리혹병에 저항성을 보임

라. 수량성 : 9,232 kg/10a (대조구 : 13.455 kg/10a, ' 15년)

마. 품질특성

- 구를 형성하지 않는 불결구형 배추
- 잎의 글루코시놀레이트 함량이 높음
  - ※총 글루코시놀레이트 함량이 26.63  $\mu$ mol/dry weight으로 대조보다 2.6배 많음
- 식용 가능한 굵기의 뿌리가 형성되며, 뿌리의 식용도 가능함

<표 4> 채소과 육성 배추 품종의 글루코시놀레이트 함량분석

(단위 :  $\mu$ mol/dry weight)

Trivial name	원교20038호	원교20039호	신품종 (20049호)	대조 (불암3호)
Progoitrin	0.99±0.09	0.17±0.02	0.09±0.01	0.30±0.02
Glucoraphanin	0.09±0.01	ND	0.04	0.04±0.01
Sinigrin	ND	ND	ND <sup>a)</sup>	ND
Unknown 1	0.06±0.01	0.06±0.01	0.12±0.03	0.09±0.03
Glucoalyssin	0.65±0.03	0.27±0.03	0.21±0.02	0.52±0.18
Gluconapoleiferin	0.28±0.08	ND	ND	0.05±0.01
Gluconapin	0.48±0.19	1.04±0.36	17.22±5.38	1.80±0.14
Unknown 2	0.10±0.03	0.11±0.02	ND	0.08±0.02
4-Hydroxyglucobrassicin	0.06±0.03	0.04±0.01	0.04	0.03±0.02
Glucocochlearin	0.57±0.02	ND	0.08±0.04	0.04±0.00
Glucobrassicinapin	1.09±0.11	1.31±0.38	6.39±2.32	3.34±0.34
Glucoerucin	0.25±0.04	0.06±0.01	0.08±0.03	0.08±0.01
Glucobrassicin	2.25±0.49	0.75±0.08	0.54±0.10	0.67±0.24
4-Methoxyglucobrassicin	2.77±0.15	1.84±0.14	0.78±0.14	1.82±0.35
Glucoberteroin	1.24±0.22	0.31±0.10	0.18±0.02	0.48±0.03
Gluconasturtiin	0.71±0.09	0.34±0.05	0.71±0.32	0.69±0.09
Neoglucobrassicin	0.21±0.01	0.09±0.01	0.14±0.04	0.20±0.07
<b>계</b>	<b>11.82±0.65</b>	<b>6.37±1.00</b>	<b>26.63±5.53</b>	<b>10.25±0.80</b>

※ 분석 : 충남대학교

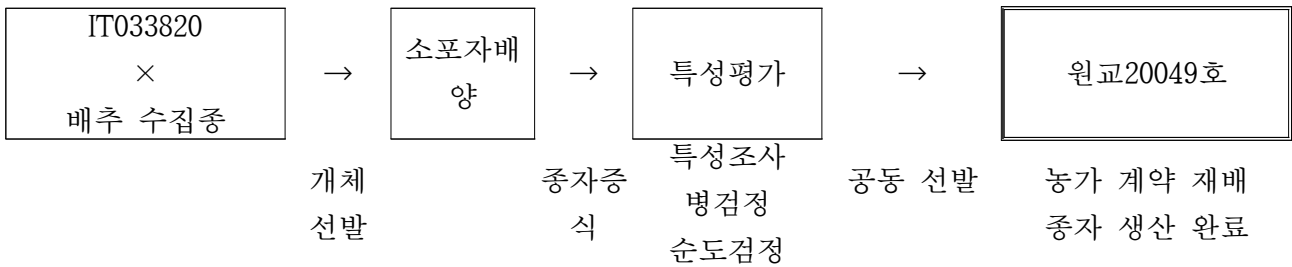
8. 육성경과

가. 육성계통도 (15-FK69)

년 도	2006	2007	2008	2009	2015	2016
세 대	F <sub>1</sub>	TC <sub>0</sub>	TC <sub>1</sub>	TC <sub>1</sub>	TC <sub>1</sub>	TC <sub>1</sub>
구분	순무 도입종(IT0338)	소포자 배양	1개체 증식 성공		기능성 성분 분석, 포장	원교 20049호

	20)과 원예원 보유 자원간 교배	병저항성, 원예적 특성 검정	품평회			
비고	교배	배양	뇌수분	종자유지	재선발	종자 생산 완료

나. 육성계보도



9. 종자 확보량

- 현재 보유량 15g 이상

10. 대체품종 : 없음

11. 임시보호권 처분 가능여부 :가능

12. 기타 참고사항

가. 품종명칭 추천안 : 15-FK69 → 원교20049호

나. 품종특성표(양식3)

(양식2) 신규 추천계통 명명(안)

○ 작성기관 : 국립원예특작과학원

○ 작성양식 :

작 물 명	계 통 명	명 명 안	명명사유
배추×순무	원교20049호	1안 : 똑심(Ttukshim) 2안 : 갓채(Gatchae)	1안 : 배추와 달리 굵은 뿌리 형성 2안 : 갓김치로 가공에 적합함

(양식3) 품종특성표

No	특 성	표 현 형 태									출 원 품 종		대 조 품 종	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	No	실 측 치	No	실 측 치
9 (* Ⓢ b)	바깥잎: 색깔	황 록 색	녹 색	회 록 색							2	4.7	2	5.0
22	구: 키			작		중		크			7	39.7	5	25.9

㉔ (a)			다	간	다						
23 ㉔ (a)	구: 너비		좁다	중간	넓다		2	6.7	5	18.0	
31 ㉔ (a)	구 : 단단한 정도	매우약하다	약하다	중간	강하다	매우강하다	1		5		
33 (* ㉔)	수확 성숙기	매우빠르다	빠르다	중간	늦다	매우늦다	7		5		

다. 사진 제출



원교20049호 내부 모습



대조와 출원 품종의 비교



노지 포장 수확 모습

(라) 일본 수집품종 ‘干勝’, ‘大福’, ‘大福75’, ‘金閣65白菜’ 등 총 11품종으로부터 소포자 배양을 통하여 40종 이상 배상체 유도하였다(그림 4). 유도된 배상체를 계대배양하여 식물체로 유도하여(그림 5) 저온처리하고 selfing한 다음, 장각과를 수확하고 건조하여 채종하였는데(그림 6), 소포자 배양을 통하여 총 189 line 육성하고 61609립을 채종하였다(표 7). 이중 Ca, Mg, Fe, Mn, Zn 등의 고함유 DH line 10종을 유전자원으로 기탁하였다(기탁번호 BP1295272 ~ BP1295281 2016. 12. 7.).



<그림 4> 소포자 배양에서 유도된 배상체



<그림 5> 소포자 배양에서 유도된 기내 유식물체



<그림 6> 소포자 배양 유래 유식물체 selfing 및 장각과 수확, 채종

<표 7> DH line 육성 및 채종

계통(품종)	육성 line 수	채종립	계통(품종)	육성 line 수	채종립
中獅子頭	2	1,106	干勝	89	5,822
小獅子頭	1	2,683	大福	14	1,397
錦424-S8	4	25,447	大福75	18	3,861
天津綠青麻叶	1	9,370	金閣75白菜	54	3,789
丰盈	1	1,242	e노랑	14	1,359
京绿60	1	5,533	(합계)	189	61,609

(마) 특성평가용 유전자원은 ‘干勝’, ‘大福’, ‘大福75’, ‘金閣65白菜’ 및 각각의 소포자 배양 유래 DH line과 대비종 등 총 42종을 이용하였다. 2016년 8월 11일에 파종하고 9월 1일에 정식하여, 11월 15일과 16일에 국립종자원의 배추 특성조사 요령에 의하여 형태적 특성을 조사하였다(표 8 및 9).

<표 8> 배추 유전자원의 바깥잎 관련 특성

품종(계통)	잎자세	잎 길이 (cm)	잎 너비 (cm)	잎모양	잎 요철 크기	잎색깔	바깥잎 털 다소	중록 가로면	중록 길이 (cm)	중록 너비 (cm)	중록의 색
干勝 <sup>2</sup>	곧추서다	51.0	32.3	긴타원형	중간	녹색	없거나 약함	불록	30.1	6.3	연녹색
干勝-12	곧추서다	46.5	27.3	넓은달걀형	중간	황록색	없거나 약함	불록	28.9	5.5	연녹색
干勝-24	약간서다	42.2	16.4	긴타원형	작다	녹색	없거나 약함	평평	24.8	3.9	연녹색
干勝-27	약간서다	52.8	27.3	넓은달걀형	중간	녹색	없거나 약함	불록	32.1	4.6	연녹색
干勝-40	곧추서다	41.8	24.2	넓은달걀형	작다	녹색	없거나 약함	불록	21.0	4.8	연녹색
干勝-57	곧추서다	44.7	25.3	넓은달걀형	작다	녹색	없거나 약함	불록	24.2	6.2	연녹색
干勝-58	곧추서다	52.1	28.2	긴타원형	중간	녹색	없거나 약함	불록	31.4	5.9	연녹색
干勝-59	곧추서다	50.5	29.8	넓은달걀형	중간	황록색	없거나 약함	불록	25.8	5.9	연녹색
干勝-66	약간서다	45.7	29.3	넓은달걀형	중간	녹색	없거나 약함	불록	22.7	6.2	연녹색
干勝-69	곧추서다	40.9	27.5	넓은달걀형	중간	녹색	없거나 약함	불록	21.2	5.8	연녹색
干勝-73	곧추서다	42.0	26.5	넓은달걀형	작다	녹색	없거나 약함	불록	20.4	5.8	연녹색
干勝-75	곧추서다	43.8	21.4	긴타원형	중간	녹색	없거나 약함	평평	25.4	5.3	연녹색
干勝-104	곧추서다	50.2	25.7	넓은달걀형	작다	녹색	없거나 약함	불록	27.5	5.3	연녹색
干勝-110	곧추서다	32.4	22.2	넓은달걀형	중간	녹색	없거나 약함	평평	16.0	5.2	흰색
干勝-111	곧추서다	43.8	28.0	긴타원형	중간	녹색	없거나 약함	불록	20.9	5.7	연녹색
干勝-173	곧추서다	38.3	22.6	좁은달걀형	중간	녹색	없거나 약함	불록	26.1	5.2	연녹색
大福	곧추서다	44.2	27.5	넓은달걀형	중간	녹색	없거나 약함	불록	21.3	6.3	연녹색
大福-10	곧추서다	45.5	26.3	넓은달걀형	중간	녹색	없거나 약함	불록	24.5	5.2	연녹색
大福-17	곧추서다	45.2	30.3	넓은달걀형	중간	녹색	없거나 약함	불록	21.8	6.1	연녹색
大福-20	곧추서다	42.8	26.8	넓은달걀형	중간	황록색	없거나 약함	불록	24.7	7.0	연녹색
大福75	곧추서다	43.2	29.0	넓은달걀형	중간	녹색	없거나 약함	불록	22.8	5.8	연녹색
大福75-14	곧추서다	37.6	25.8	넓은달걀형	중간	녹색	없거나 약함	불록	19.7	5.9	연녹색
大福75-18	곧추서다	38.5	26.5	넓은달걀형	작다	녹색	없거나 약함	불록	17.7	5.3	연녹색
大福75-23	곧추서다	45.5	27.5	넓은달걀형	크다	녹색	없거나 약함	불록	23.3	4.9	연녹색
大福75-30	곧추서다	44.8	26.6	넓은달걀형	크다	녹색	없거나 약함	불록	20.7	5.1	연녹색
大福75-32	곧추서다	37.1	22.5	좁은달걀형	중간	녹색	없거나 약함	불록	21.2	3.3	연녹색
大福75-34	곧추서다	38.1	24.0	넓은달걀형	중간	녹색	없거나 약함	불록	20.6	4.5	연녹색
大福75-39	곧추서다	37.5	22.9	긴타원형	중간	녹색	없거나 약함	불록	18.4	5.3	연녹색
大福75-40	곧추서다	41.3	49.1	넓은달걀형	중간	녹색	없거나 약함	불록	23.5	4.6	연녹색
大福75-42	곧추서다	40.1	23.4	넓은달걀형	중간	회록색	없거나 약함	불록	23.7	4.1	녹색
大福75-43	곧추서다	36.3	24.2	넓은달걀형	중간	녹색	없거나 약함	불록	18.0	5.3	연녹색
金閣65白菜	곧추서다	44.4	29.2	넓은달걀형	중간	녹색	없거나 약함	불록	23.5	5.8	연녹색
金閣65白菜-44	곧추서다	38.7	22.5	좁은달걀형	중간	황록색	없거나 약함	불록	21.7	5.6	흰색
金閣65白菜-45	곧추서다	43.3	25.6	긴타원형	중간	녹색	없거나 약함	평평	24.5	4.9	연녹색
金閣65白菜-60	약간서다	41.8	23.9	넓은달걀형	중간	녹색	없거나 약함	불록	26.6	5.3	연녹색
金閣65白菜-65	약간서다	39.5	24.8	넓은달걀형	작다	녹색	없거나 약함	불록	20.2	6.2	연녹색
金閣65白菜-92	곧추서다	34.8	23.0	넓은달걀형	중간	녹색	없거나 약함	불록	19.6	5.3	연녹색
金閣65白菜-163	곧추서다	38.9	21.9	좁은달걀형	중간	녹색	없거나 약함	평평	25.7	4.5	연녹색
金閣65白菜-180	곧추서다	35.9	25.1	넓은달걀형	중간	녹색	없거나 약함	불록	19.6	5.0	연녹색
대통	곧추서다	47.0	31.7	넓은달걀형	중간	녹색	없거나 약함	불록	23.5	6.3	연녹색

불암플러스	곧추서다	51.2	30.6	긴타원형	중간	녹색	없거나 약함	평평	28.9	6.0	연녹색
e노랑	곧추서다	45.5	29.4	넓은달갈형	크다	황록색	없거나 약함	볼록	23.7	6.7	연녹색

<sup>2</sup>-00 표시는 소포자 배양 유래 계통임.

<표 9> 배추 유전자원의 구 관련 특성

품종(계통)	구중(kg)	구 키(cm)	너비(cm)	결구 형태	결구있 결침	윗부분 색	외엽 요철	속색 깔	단단한 정도	세로자른면	고갱이 선단모양
干勝 <sup>2</sup>	5.40	32.5	20.3	달힙	심하다	연두	중간	흰색	강	달갈형	평평
干勝-12	3.72	28.9	14.9	달힙	약함	연두	심함	연노랑	약	타원형	평평
干勝-24	1.34	17.4	11.7	열림	약함	녹색	매우약	연녹	매우 약	장타원형	돌기형
干勝-27	3.90	32.3	15.6	달힙	약함	연두	중간	연노랑	약	장타원형	돌기형
干勝-40	3.26	28.2	18.8	달힙	중간	연두	중간	연노랑	중간	타원형	돌기형
干勝-57	3.19	28.7	17.1	달힙	약함	연두	심함	연노랑	약	달갈형	돌기형
干勝-58	3.93	33.6	15.5	달힙	약함	연두	중간	연노랑	약	달갈형	평평
干勝-59	3.48	32.5	19.0	달힙	중간	연두	중간	연노랑	중간	달갈형	평평
干勝-66	3.88	28.8	16.3	반열림	약함	연두	중간	연노랑	약	달갈형	평평
干勝-69	3.90	22.1	17.8	달힙	심하다	연두	중간	흰색	강	달갈형	돌기형
干勝-73	3.76	28.8	20.3	달힙	중간	연두	중간	연노랑	약	달갈형	평평
干勝-75	3.33	27.2	16.0	반열림	약함	연두	중간	연노랑	약	거꾸로세운달갈형	돌기형
干勝-104	3.07	31.0	15.0	달힙	약함	연두	중간	연노랑	매우 약	장타원형	둥근모양
干勝-110	3.65	24.2	19.7	달힙	심하다	연두	중간	흰색	강	원형	돌기형
干勝-111	4.52	29.8	20.5	달힙	중간	연두	중간	흰색	중간	거꾸로세운달갈형	평평
干勝-173	3.49	24.4	16.2	달힙	중간	연두	중간	흰색	중간	달갈형	돌기형
大福	4.36	30.3	19.8	달힙	중간	연두	중간	연노랑	중간	달갈형	돌기형
大福-10	4.82	31.1	18.8	달힙	중간	연두	중간	노랑	중간	달갈형	돌기형
大福-17	4.47	30.2	19.0	달힙	중간	연두	중간	노랑	중간	달갈형	둥근모양
大福-20	3.77	30.3	18.8	달힙	중간	노랑	심함	노랑	중간	타원형	돌기형
大福75	4.05	28.5	17.8	달힙	중간	연두	중간	연노랑	중간	달갈형	둥근모양
大福75-14	3.25	27.1	17.3	달힙	중간	연두	중간	연노랑	중간	타원형	평평
大福75-18	3.55	30.3	19.5	달힙	중간	연두	중간	연노랑	중간	달갈형	돌기형
大福75-23	3.43	32.4	16.1	달힙	약함	노랑	심함	노랑	약	긴장타원형	둥근모양
大福75-30	3.56	28.2	14.6	달힙	중간	연두	중간	노랑	중간	장타원형	둥근모양
大福75-32	2.94	26.1	14.6	달힙	심하다	연두	중간	노랑	강	타원형	돌기형
大福75-34	2.93	26.6	14.4	달힙	중간	연두	중간	노랑	중간	타원형	둥근모양
大福75-39	2.82	27.2	16.4	달힙	중간	연두	중간	연노랑	중간	거꾸로세운달갈형	둥근모양
大福75-40	3.76	32.3	17.7	달힙	중간	연두	중간	연노랑	중간	장타원형	돌기형
大福75-42	3.23	28.3	14.0	달힙	중간	노랑	심함	노랑	중간	달갈형	둥근모양
大福75-43	3.10	30.0	19.2	달힙	중간	연두	약	연노랑	중간	타원형	둥근모양
金閣65白菜	4.94	31.2	21.0	달힙	중간	연두	중간	연노랑	중간	타원형	둥근모양
金閣65白菜-44	3.30	25.8	16.2	달힙	중간	노랑	중간	노랑	중간	달갈형	둥근모양
金閣65白菜-45	3.16	28.0	19.0	반열림	약함	연두	중간	연노랑	약	거꾸로세운달갈형	둥근모양
金閣65白菜-60	3.81	29.8	20.0	반열림	약함	연두	중간	노랑	매우 약	달갈형	둥근모양
金閣65白菜-65	3.08	29.3	17.5	반열림	약함	연두	약	노랑	약	달갈형	돌기형
金閣65白菜-92	3.52	24.5	18.6	달힙	중간	연두	중간	노랑	중간	원형	둥근모양
金閣65白菜-163	3.53	29.2	17.4	달힙	약함	연두	중간	노랑	약	달갈형	둥근모양
金閣65白菜-180	3.33	27.3	16.1	달힙	중간	연두	중간	연노랑	중간	거꾸로세운달갈형	돌기형
대통	4.41	32.8	21.8	달힙	중간	연두	중간	연노랑	중간	달갈형	평평
불암플러스	5.89	32.0	18.6	달힙	심하다	연두	중간	연노랑	강	거꾸로세운달갈형	평평
e노랑	4.16	32.3	20.3	달힙	중간	연두	중간	진노랑	중간	타원형	둥근모양

<sup>2</sup>-00 표시는 소포자 배양 유래 계통임.

(바) 소포자 배양 유래 대부분의 계통은 원 품종과 유사한 형태를 지지고 있으나, 구중이나 잎의 길이와 너비, 중륵의 길이 등은 모두 원 품종보다 작았다. DH line 중에는 중륵의 가로면이 평평한 경우도 있었으며, 중륵의 색이 흰색을 띠는 경우도 있었다. 干勝의 경우 구속색깔도 중심부 조금을 제외하고는 흰색이었으나 DH line 에서는 연노랑색을 띠는 경우가 많았으며, 구세로자른면에서도 대부분은 원품종과 유사하나 일부는 원품종과 다른 형태를 띠는 경우도 있었다(그림 7, 8).



‘干勝’ ‘干勝-24’ ‘干勝-111’ ‘干勝-173’

<그림 7> ‘干勝’ 및 ‘干勝’ 에서 유래된 몇가지 DH line



‘大福75’ ‘大福75-18’ ‘大福75-30’ ‘大福75-32’

<그림 8> ‘大福75’ 및 ‘大福75’ 에서 유래된 몇 가지 DH line

## 나. 연구 결과

### ○ 반수체 배양용 재료 수집 및 재배

- 국내외 다양한 배추과 자원 수집 : 타과제 출장 시 배추 8점 수집(미국 1점, 일본 7점)
- 보유 및 수집 자원 재배 : 봄 재배 및 배양(전년 선발 자원), 가을 재배 및 배양(신규 선발 자원)
- 다양한 자원의 원예적 특성 평가 : 육성 계통 및 전년 수집 자원의 원예적 특성은 봄 및 가을 노지 재배를 통하여 실시
- 선발 : 포장 공개 행사 등을 통하여 종묘회사 및 공동 연구 기관 간 의견 조율

### ○ 반수체 배양 실시

- 배추과 소포자 배양에 효과적인 배지 조건의 지속적 변형 및 선발 : 9조건
- 종묘회사 요청 배추과 자원의 파종, 춘화처리, 정식, 개화 유도, 병해충 관리 및 소포자 배양 실시(4개 종묘회사 39종 195점 서비스 실시 결과 3,957점 순화, 3,190점 분양 완료)

### ○ 반수체 유래 계통 육성

- 배양에 효율 증진 가능 신규 물질 첨가 및 배양 조건 변형
- 서비스용 다양한 자원의 배양을 위한 파종, 춘화처리, 정식, 개화 유도, 병해충 관리 및 소포자 배양 실시



## 2 절. 제2세부 과제: 글루코시놀레이트 고함유 배추 육종 지원을 위한 실용적 분자표지 개발

### 1. 1년차 연구 내용 및 결과

#### 가. 연구 내용

Glucosinolates (GSLs)는 tryptophan 뿐만아니라 aromatic과 aliphatic amino acids로부터 유도된 side chain, sulfonated oxime, thioglucose moiety를 가짐으로써 만들어지는 천연 물질이다 (Figure 1). 그림1에서 보듯이 글루코시놀레이트의 공통적인 skeletal 구조는 하나의 glucone moiety와 variable aglycone R-group으로 이루어져있다. 지금까지 약 130개의 GSLs이 자연에서 동정되었다. GSLs은 식물내에 있는 내성의 thioglucosidases와 myrosinases가 함께 작용한다. 곤충이 식물을 먹음으로써 식물의 조직이 파괴되고 그때 GSLs는 myrosinases에 의해 가수분해가 된다. 이것은 isothiocyanates, nitriles, thiocyanates를 포함하고 있는 다양한 생물학적 활성을 가지고 있는 물질의 형성을 이끈다. 이 물질들의 생물학적 활성들은 미생물들의 성장을 저해하고(Mari et al., 1993; Manici et al., 1997), indole phytoalexins의 생합성에서 중간역할을 한다 (Pedras et al., 2000). 또한 GSLs는 초식동물과 미생물에 대한 식물방어 물질로 중요한 역할을 한다(Halkier and Gershenzon, 2006). 게다가 GSLs는 향기 성분, 암을 예방하는 물질, 유기물 살충제로써 중요하다. 브로콜리와 배추 같은 십자화과의 채소에서 많이 생산된다. Cauliflower, brussels sprouts, cabbage, broccoli 같은 Brassica 채소와 특히 broccoli sprouts는 강한 항발암성의 성질을 가지고 있는 글루코시놀레이트를 많이 함유하고 있다(Fahey et al., 1997). 홍고추와 마늘과 함께 김치의 주재료인 배추는 한국에서 가장 중요한 채소 중에 하나이다. 최근 GSLs는 항암효과, 항산화, 항균력 때문에 많은 주목을 받고 있다 (Fahey et al., 1997, 2002; Talalay et al., 2001). 브로콜리와 콜리플라워의 발아 후 3일된 유식물체는 성숙한 식물보다 glucoraphanin의 함량이 10-100배 가량 높았다.

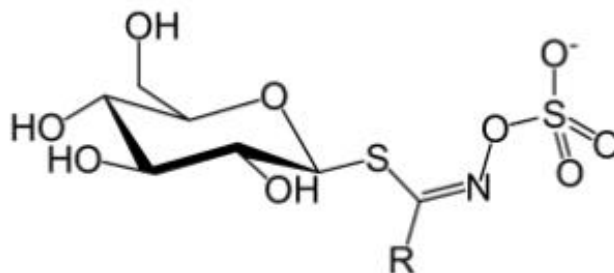


그림 1. The glucosinolate structure.

GSLs은 Met, Trp, Phe을 포함하고 있는 몇 가지 아미노산들에 의해 합성된다. 글루코시놀레이트는 크게 aliphatic과 indolic GSLs로 나뉘는데 이것은 각각 아미노산 methionine과 tryptophan으로부터 유도된다. Methionine에서 유도된 aliphatic 글루코시놀레이트는 총 55-90%까지 차지하는 glucoraphanin, sinigrin, progitrin, glucoerucin, glucoiberin를 포함하고 있는 Brassica 채소

에서 가장 풍부하다. 반면에, tryptophan에서 유도된 indole 글루코시놀레이트는 4-hydroxyglucobrassicin, neoglucobrassicin, glucobrassicin을 포함하는 Brassica에서 분석되었다. Gluconasturtiin은 Brassica 채소에서 글루코시놀레이트에서 유도된 뚜렷한 phenylalanine이다. 글루코시놀레이트 합성은 biotic과 abiotic 스트레스에 반응하여 transcription의 복잡한 네트워크에 의해 조절된다. Methionine, tryptophan, phenylalanine의 아미노산들은 대부분 중요한 GSLs 생합성의 전구체들이고 각각 indolic, aliphatic, aromatic GSLs을 이끈다(Grubb and Abel, 2006; Halkier and Gershenzon, 2006).

GSLs 생합성 경로과정은 Figure 2에서 보여준다(Zhang et al., 2009). 배추과에서 Tryptophan 이차대사산물의 중요한 그룹은 indolic GSL이다. Indolic GSLs와 다른 GSLs는 생물학적 활성인 nitrile, isothiocyanate, 또는 thiocyanate forms으로 myrosinases에 의해 조절된다(Wittstock and Halkier, 2002). GSLs 생합성은 biotic과 abiotic 스트레스에 반응하고 R2R3-MYB family에 속하는 Transcription factors (TFs)의 복잡한 network에 의해 대사 작용이 이루어진다(Celenza et al., 2005; Gigolashvili et al., 2007; Sønderby et al., 2007). MYB29, MYB76과 MYB29는 높은 aliphatic GSLs 생합성 조절에 특이적으로 관여하는 조절인자이다(Gigolashvili et al., 2007; Hirai et al., 2007; Sønderby et al., 2007). 반면에 MYB51, MYB122와 MYB34는 높은 indolic GSLs를 조절할 수 있는 유전자이다(Celenza et al., 2005; Gigolashvili et al., 2007; Malitsky et al., 2008). Skirycz 등 (2006)은 초식동물과 MeJA에 의해 유도될 수 있는 DOF TF AtDof1.1 (OBP2)는 애기장대에서 GSL 생합성을 부분적으로 조절한다고 보고한 바 있다. 애기장대 IQD1 (a novel calmodulin-binding nuclear protein) 식물 방어와 GSL 축적을 자극한다(Levy et al., 2005). GSLs 생합성은 주된 Sulfur metabolism과 직접적으로 관련이 있다. GSLs core 합성의 마지막 단계는 desulfo-Glucosinolates 전구체들의 sulfation이다(Underhill et al., 1973). Yatusевич 등 (2010)은 ATPS (ATP sulfurylase), APK (APS kinase), APR (APS reductase) 유전자들은 core GSLs 생합성 조절에 관여하는 R2R3-MYB TFs에 의해 직접적으로 조절된다고 보고했다. 브로콜리, 콜리플라워, 케일, 브르셀 sprouts를 포함하는 있는 십자화과 식물들은 방어기작에 중요한 역할을 한다 (Verhoeven et al., 1996, 1997). 많은 브로콜리 품종의 sprouts들은 아주 소량의 indolic GSLs이 존재하고 성숙한 채소에는 훨씬 많다. 이들은 종양형성을 유도할 수 있는 indole-3-carbinol 생산을 억제시킬 것이라고 보고된바 있다 (Fahey et al., 1997).

브라시카 채소들은 글루코시놀레이트와 항산화 비타민의 좋은 소스이다. 위에서 언급했듯이 브로콜리, 콜리플라워, 양배추, 배추 등을 섭취하는 것은 인간의 건강에 큰 이로우를 줄 것이다. 특히, 배추는 세계적으로 생산하고 소비하고 있는 채소 중에서 중요한 역할을 한다. 한국 배추를 포함하여 브라시카 채소들은 bladder, colon, lung에 있는 암에 대해 보호하는 역할을 하고 있는 글루코시놀레이트를 함유하고 있다. Isothiocyanates thiocyanates, nitriles 같이 휘발성으로부터 유도된 글루코시놀레이트들은 브라시카 채소들의 특쓰는 듯한 맛과 쓴 맛을 책임진다. 글루시놀레이트 함량은 생육시기와 성장하는 계절에 따라서 식물의 종에 따라 틀리고 같은 식물에서도 부위마다 틀리다. 야생종 중에서, 한국 배추는 가장 높은 함량 즉 6.1 mM/g을

보였다고 한다. 배추에서는 잎에서보다 midrib에서 더 높은 글루코시놀레이트 함량을 보였다고 보고 되었다. 최근에는 봄에 파종한 배추의 총 글루코시놀레이트 함량 (22  $\mu\text{mol/g}$ )이 가을에 파종하여 재배한 배추의 글루코시놀레이트 함량 (13  $\mu\text{mol/g}$ )보다 높았다. 계절과 환경의 영향에 따라 글루코시놀레이트 함량의 차는 크다. 또한 배추의 저장과 요리하는 과정은 글루코시놀레이트 함량에 영향을 미치것이라고 보고된바 있다. 브로콜리의 경우 글루코시놀레이트의 가장 큰 감소는 전자레인지 사용과 끓였을 때라고 보고되었고, 스팀을 이용했을 때는 작은 양의 글루코시놀레이트가 감소되었다.

본 연구에서는 농촌진흥청 국립원예특작과 박수형 박사님이 육종 실험을 하는 포장에서 총 50 계통의 라인을 수확하여 indolic과 aliphatic 글루코시놀레이트 함량을 분석하였다. 본 연구의 목적은 김치의 재료로 사용되고 있는 배추에서 높은 글루코시놀레이트 함량을 가지고 있는 배추를 분석하여 고함량의 글루코시놀레이트를 함유하고 있는 배추를 선발하여 이를 바탕으로 글루코시놀레이트 고함유 배추 육종 지원을 위한 실용적 분자표지 개발에 활용하고자 한다.

## 나. 재료 및 방법

### 1) 글루코시놀레이트 계통 물질의 성분 분석 및 대량 분석 방법 확립

- 글루코시놀레이트 추출 방법은 ISO 9167-1(1992)에 의하여 DEAE-Sephadex A-25를 통하여  $\text{H}^+$  형태로 활성화 한 뒤, aryl sulfatase에 의해 desulfation하여 분석하는 방법이 널리 알려져 있기 때문에 본 과제의 연구에서도 위와 같은 방법을 이용하여, 다음과 같은 추출 방법을 확립하였음. 2.0 mL tube에 100 mg씩 평량한 분말시료에 boiling(약  $70^\circ\text{C}$ ) 70%(v/v) MeOH(1.5 mL)를 넣고 진동혼합(vortex)을 한 후 항온수조(water bath)( $70^\circ\text{C}$ )에 2분 동안 넣어둠. 2분 후에 진동혼합을 한 번 더하고 항온수조에 3분 동안 넣어둔 후 원심분리(12,000 rpm, 10 min,  $4^\circ\text{C}$ )하여 상층액을 수거함. 이 과정을 2번 더 반복하여 각 상층액을 합함.
- Mini-column 충전용 DEAE-Sephadex A-25(30 g dry wt.)는 초순수에 녹여 분액여두에 넣은 다음 약 1.5배(v/v)의 초순수를 흘려 보내고 거의 빠져나간 후, sodium acetate(0.5 M, 102 g/1.5 L)를 넣어  $\text{H}^+$ 형태로 활성화 시키고, 다시 초순수로 세척함. Mini-column 제작은 1mL pipette tip 끝을 탈지면으로 막고 상기의 활성화된 DEAE-Sephadex A-25(약 40 mg dry wt.)를 기포가 생기지 않게 주의하면서 pasteur pipette으로 조금씩 넣은 다음(약 4cm) GSL 조추출물을 pasteur pipette으로 로딩 함. 추출물이 모두 빠져나가면, 초순수로 세척하여 중성 및 양이온을 세척하여 흘려 보낸 다음, column 아래 부분을 paraffin film으로 막고 aryl sulfatase solution(115 mg/5 mL, desulfation) 75  $\mu\text{L}$ 을 수평으로 로딩함. 그리고 column 윗부분을 paraffin film으로 막고 충분한 효소반응을 위하여 실험실 상온에서 다음 날(약 16 ~ 18 시간)까지 정치한다. 초순수를 0.5 mL씩 흘려서 desulfo-GSLs를 2.0 mL tube에 용출(0.5 mL 씩 총 3회)시킴. 용출시킨 시료는 0.45  $\mu\text{m}$  hydrophilic PTFE millipore filter(직경 13 mm)로

필터한 후 HPLC용 vial병에 넣어 냉장보관함.

- HPLC에 의한 글루코시놀레이트 분석은 Inertsil ODS-3 column(150 × 3.0 mm i.d., particle size 3 μm)을 장착한 Agilent 1260 Series HPLC Systems로 분석하였다.

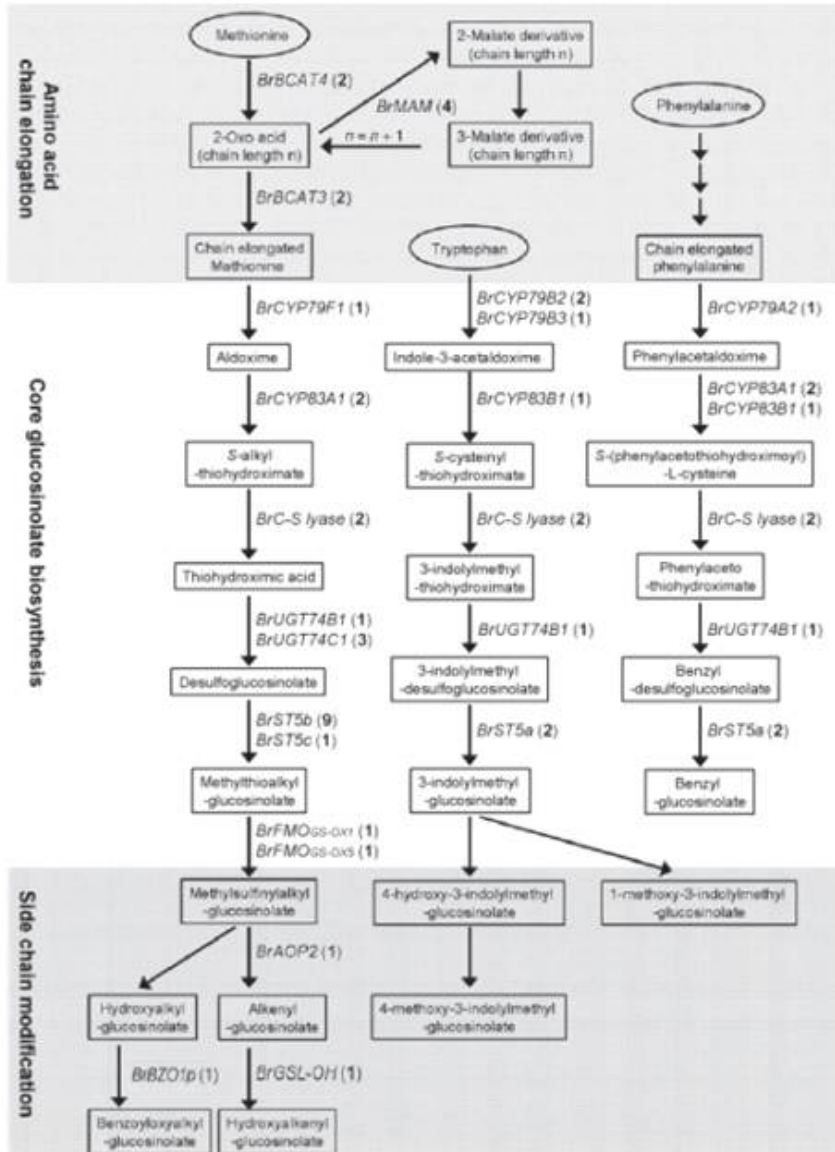


그림 2. Biosynthesis pathways of the three major groups of glucosinolates in *B. rapa*. The genes involved in each step are shown. Numbers in parenthesis denote gene copy numbers.

## 2) HPLC, LC-MS 등 분석기기를 이용한 분석 방법의 매뉴얼

- 배추 내 글루코시놀레이트의 HPLC 분석법

표 1. Glucosinolates identified in Chinese cabbage

	Trivial name	[M+H]
1	Progoitrin	310

2	Glucoraphanin	358
3	Sinigrin	280
4	Glucoalyssin	372
5	Gluconapoleiferin	324
6	Gluconapin	294
7	Glucocochlearin	296
8	Glucobrassicinapin	308
9	Glucobrassicin	369
10	4-Methoxyglucobrassicin	399
11	Glucoraphenin	356
12	Gluconasturtiin	344
13	Neoglucobrassicin	399

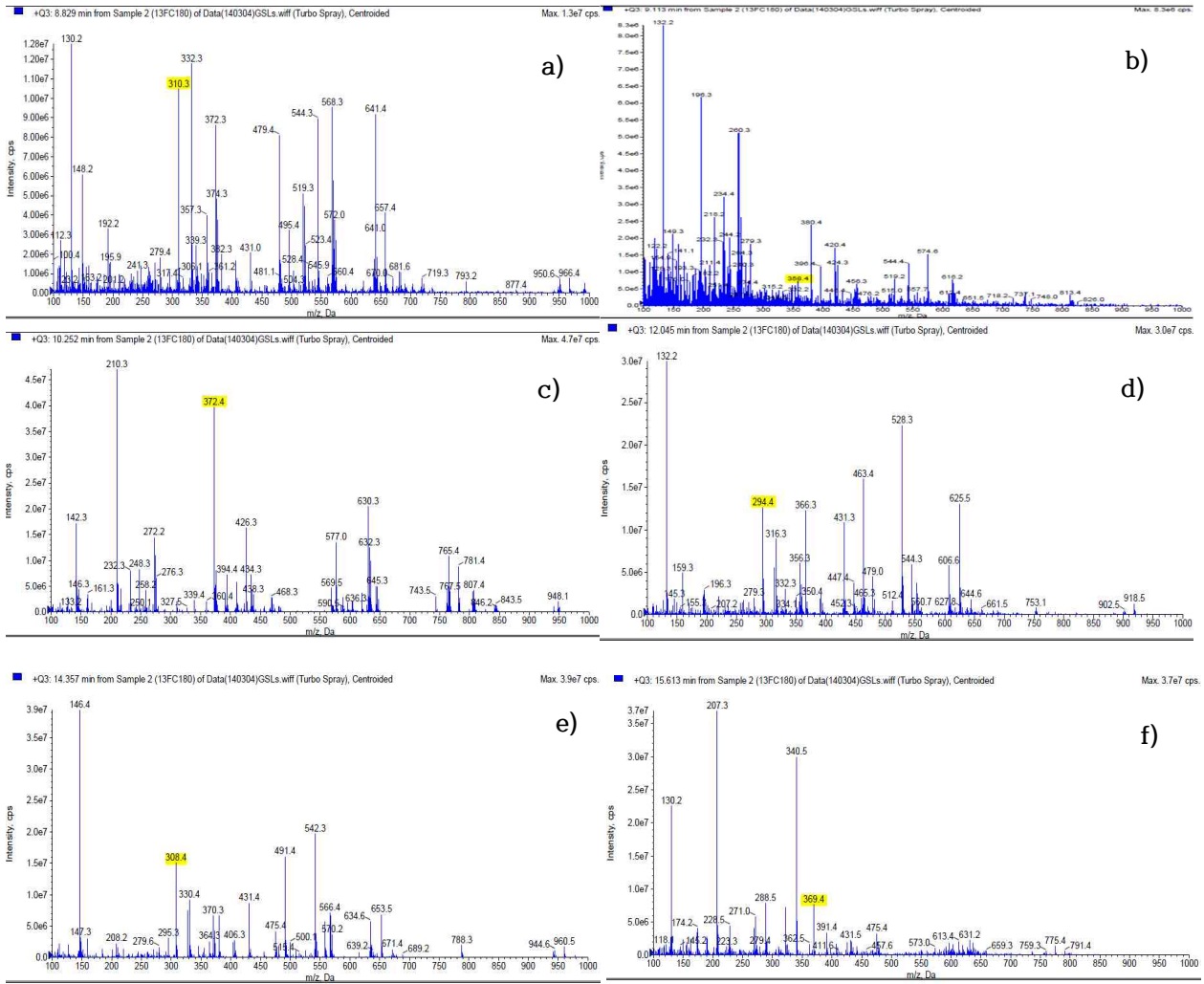
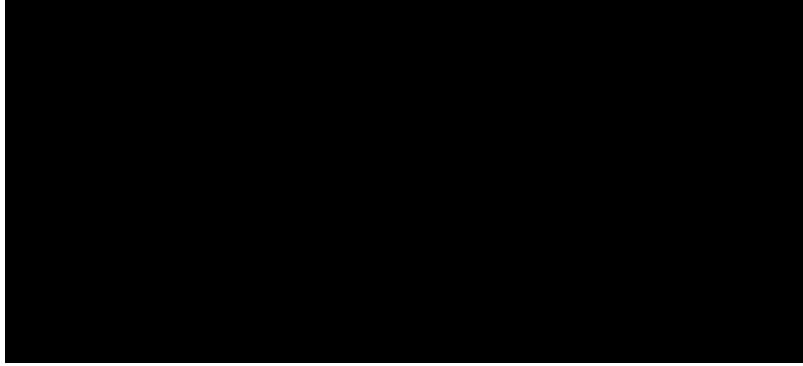
표 2. HPLC analysis for glucosinolates in Chinese cabbage

HPLC	Agilent Technologies 1260 series
Column	Inertsil ODS-3 column (150 × 3.0 mm i.d., particle size 3 μm)
Guard Column	Inertsil ODS-2 Cartridge Guard column E (10 × 3.0 mm i.d., particle size 5 μm)
Detector	227 nm
Column temperature	40 °C
Mobile phase	Solvent A (Water) Solvent B (ACN)
Flow rate	0.4 ml/min
Gradient conditions	0 min solvent B 0 % 2 min solvent B 0 % 7 min solvent B 10 % 16 min solvent B 31 % 19 min solvent B 31 % 21 min solvent B 0 % 27 min solvent B 0 %

· 배추 내 글루코시놀레이트 HPLC 분석 조건(Table 2)을 통하여 총 13종류의 GSL가 분리됨 (Fig. 1).

◦ 배추 내 글루코시놀레이트의 LC-ESI-MS 분석법

Table 3. LC-ESI-MS analysis conditions for glucosinolates in Chinese cabbage



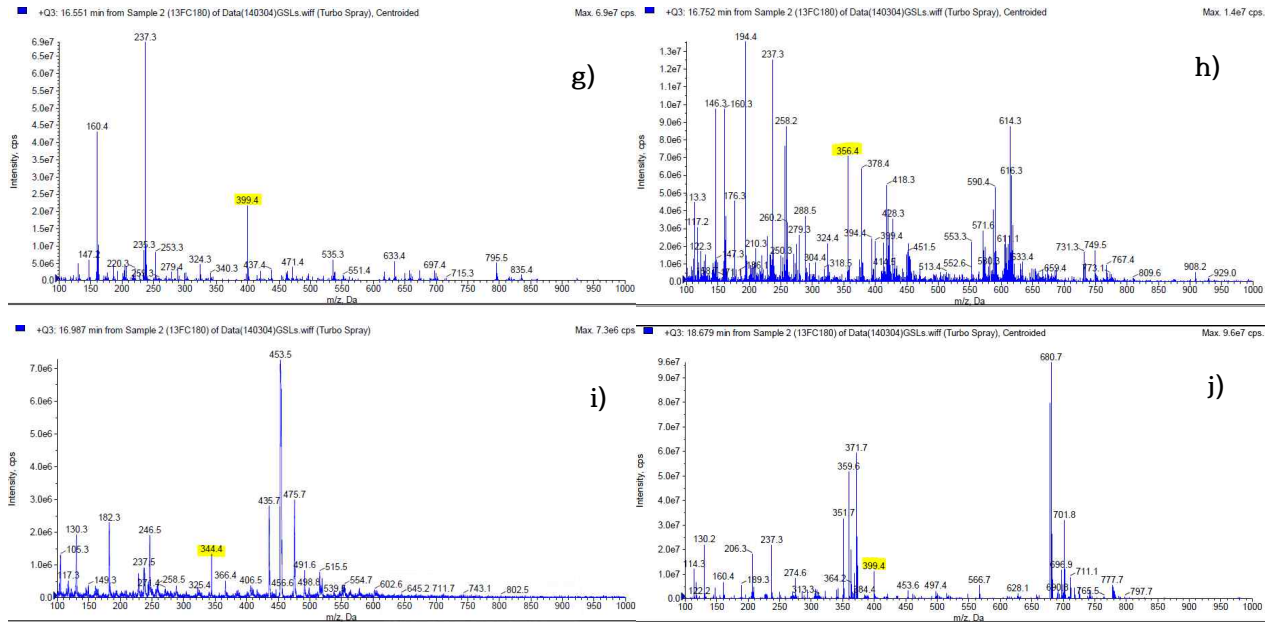


그림 3. LC-ESI-MS spectra of glucosinolates. a), progoitrin; b) glucoraphanin; c), glucoalyssin; d), gluconapin; e), glcubrassicin; f), glucobrassicin; g), 4-methoxyglucobrassicin; h), glucoraphenin; i), gluconasturtiin; j), neoglucobrassicin.

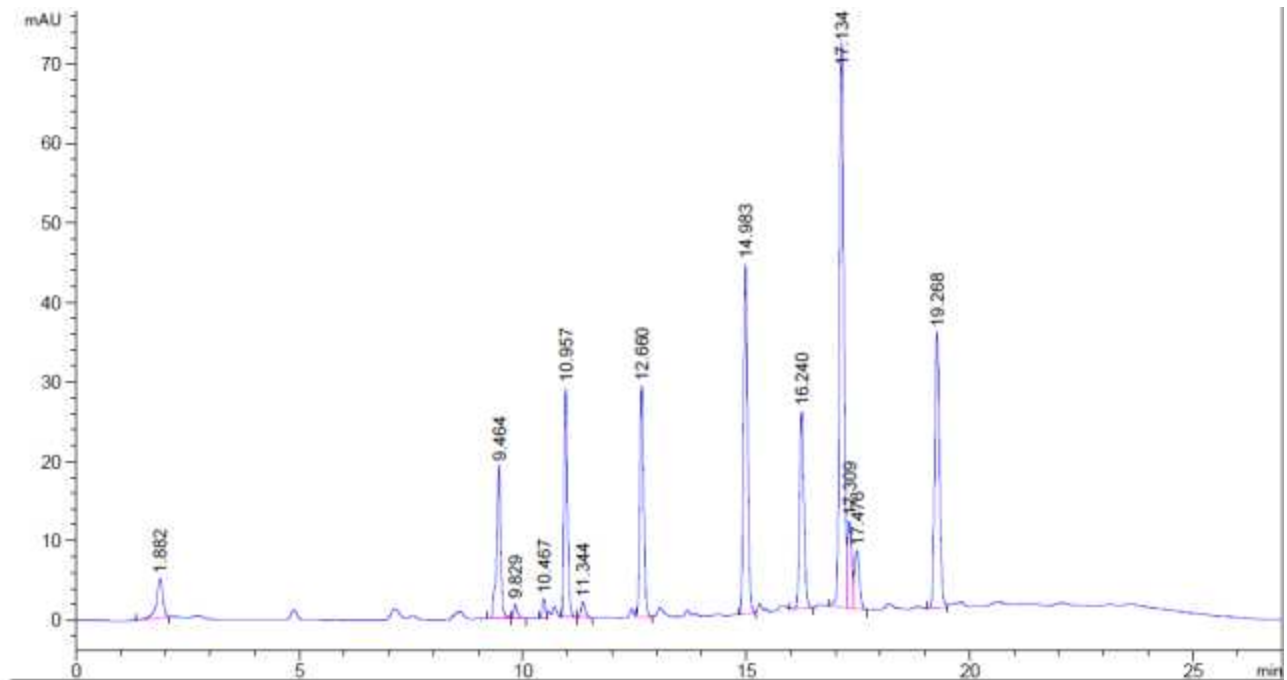


그림 4. Chromatogram of glucosinolates in Chinese cabbage

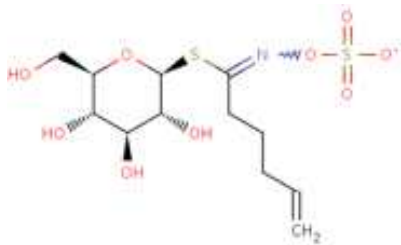
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.882	BB	0.1483	49.21426	4.93896	2.6405
a) 2	9.464	BV	0.0946	123.32054	19.27975	6.6166
b) 3	9.829	VB	0.0860	10.40696	1.78612	0.5584
4	10.467	BV	0.0767	12.41475	2.46706	0.6661
c) 5	10.957	BB	0.0828	155.72960	28.93303	8.3555
d) 6	11.344	BB	0.0960	12.64762	2.02201	0.6786
e) 7	12.660	VB	0.0946	178.49176	29.07157	9.5767
f) 8	14.983	BV	0.0979	279.30905	44.10486	14.9859
g) 9	16.240	BB	0.1068	169.42842	24.77593	9.0904
h) 10	17.134	BV	0.1063	485.72589	71.46818	26.0610
i) 11	17.309	VV	0.1006	72.85101	10.95745	3.9087
j) 12	17.476	VB	0.1122	54.17519	7.32985	2.9067
k) 13	19.268	BV	0.1174	260.09183	34.70153	13.9549

그림 5. HPLC report of glucosinolates a), progoitrin; b) glucoraphanin; c), glucoalyssin; d), gluconapoleiferin; e), gluconapin; f), glucobrassicinapin; g), glucobrassicin; h), 4-methoxyglucobrassicin; i), glucoraphenin; j), gluconasturtiin; k), neoglucobrassicin.

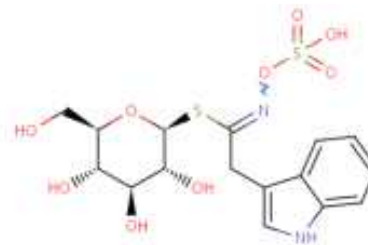
#### 다. 연구 결과

HPLC, LC-MS 등 분석기기를 이용하여 50개 계통의 배추 내 글루코시놀레이트의 분석한 결과 그림 6에서 처럼 표준 물질인 sinigrin을 제외한 progoitrin, glucoraphanin, glucoalyssin, gluconapoleiferin, gluconapin, glucocochlearin, glucobrassicinapin, glucobrassicin, 4-methoxyglucobrassicin, glucoraphenin, gluconasturtiin, neoglucobrassicin를 포함한 총 12종의 글루코시놀레이트가 존재하는 것을 알 수 있었으며, 표 3에서 배추에서 분석한 12종의 글루코시놀레이트의 특성을 조사하여 정리하였다. Progoitrin은 50개 계통에서 분석한 결과, 모두 존재하였으나 계통간의 함량 차이가 큰 편이었다. Glucoraphanin의 경우는 13FC21을 포함한 13개 계통에서 존재하였으나 나머지 37개 계통에서는 존재하지 않는 것으로 나타났다. 특히 13FC21 계통에서 가장 많이 함유 되어 있는 것으로 나타났다. Glucoalyssin은 13FC110, 13FC126 2 계통을 제외하고 나머지 48 계통에서 존재하는 것으로 나타났으며 계통간의 함량 차이가 큰 편이었다. Gluconapoleiferin은 13FC3을 포함한 13개 계통에서 존재하지 않았으며 나머지 37개 계통에서는 존재하는 것으로 나타났다. Guconapin은 13FC17 계통에서 존재하지 않았으며 나머지 49개 계통에서는 존재하는 것으로 나타났다.

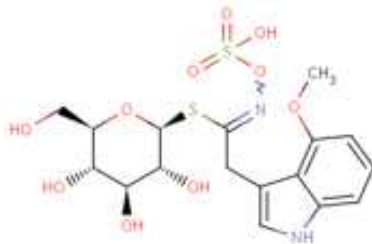




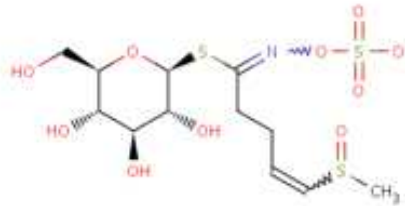
**glucobrassicinapin**



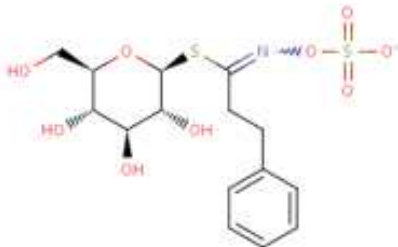
**glucobrassicin**



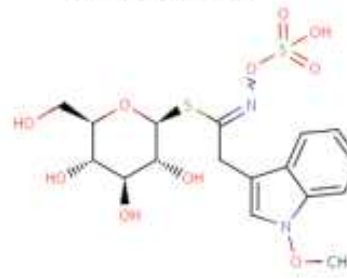
**4-methoxyglucobrassicin**



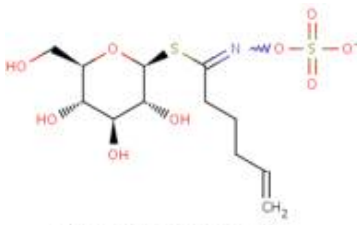
**glucoraphenin**



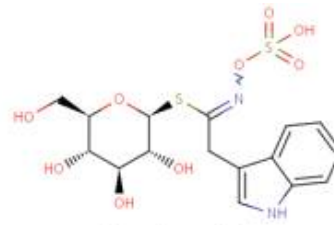
**gluconasturtiin**



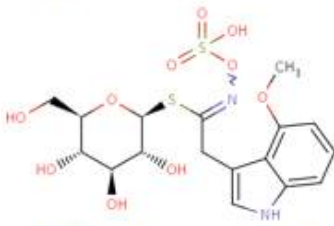
**neoglucobrassicin**



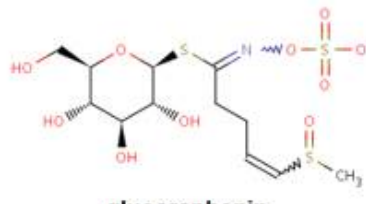
**glucobrassicinapin**



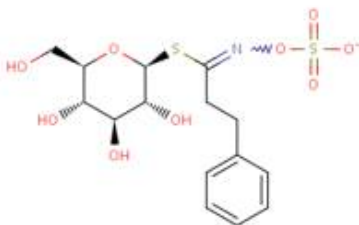
**glucobrassicin**



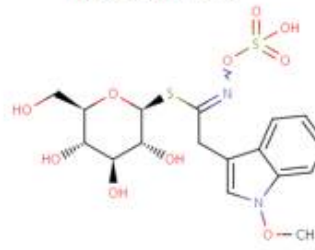
**4-methoxyglucobrassicin**



**glucoraphenin**



**gluconasturtiin**



**neoglucobrassicin**

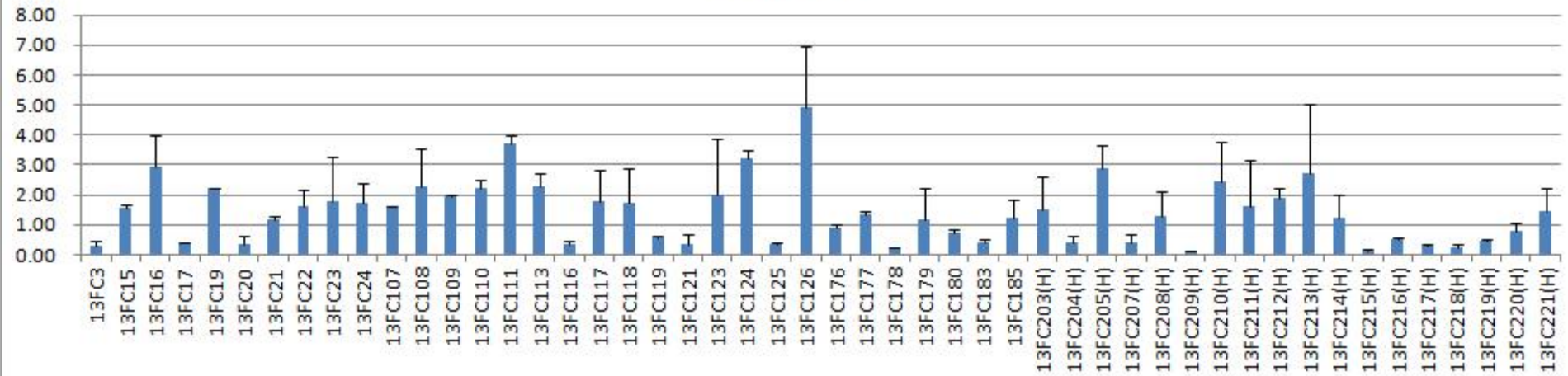
그림 6. Chemical structures of 12 glucosinolates in Chinese cabbage

Glucocochlearin은 13FC21, 13FC116, 13FC118, 3개 계통에서 존재하였으나 나머지 47개 계통에서는 존재하지 않는 것으로 나타났다. 특히 13FC21 계통에서 가장 많이 함유되어 있었다. Glucobrassicinapin은 13FC110 계통에서 존재하지 않았으나 나머지 49개 계통에서는 존재하였으며 함량 변이 크게 나타났다. Glucobrassicin은 50개 계통에서 모두 존재하였으나 계통간의 함량 차이가 큰 편이었다. 4-Methoxyglucobrassicin 또한 50개 계통에서 모두 존재하였으나 계통간의 함량 차이가 큰 편이었다. Glucoraphenin은 13FC20을 포함한 13개 계통에서 존재하지 않았으며 나머지 37개 계통에서는 존재하는 것으로 나타났다. Gluconasturtiin과 neoglucobrassicin은 50개 계통에서 모두 존재하였으나 계통간의 함량 차이가 큰 편이었다. 50개 계통의 배추에서 12개의 글루코시놀레이트 분석 결과를 바탕으로 각 glucosinolate 고함유 배추 육종 지원을 위한 실용적 분자표지 개발에 활용하고자 한다.

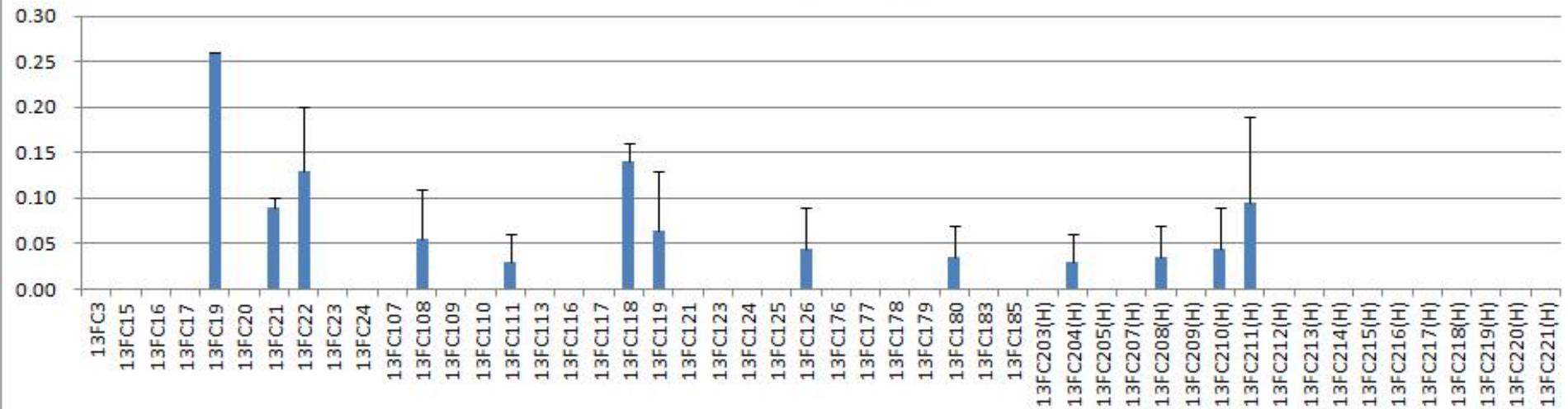
표 3. Characterization of 12 glucosinolates in Chinese cabbage

Desulfo glucosinolate data base					
No.					Molecular weight
1	Progoitrin	Olefins alcohols	R-2-hydroxy-3-butenyl DS-GSL	CH <sub>2</sub> CH(OH)CHC H <sub>2</sub>	309.1
2	Glucoraphanin	Alkyl thioalkyl	4-(methylsulfinyl)butyl DS-GSL	CH <sub>3</sub> SO(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	357.21
3	Glucoalyssin	Alkyl thioalkyl	5-(methylsulfinyl)pentyl DS-GSL	CH <sub>3</sub> SO(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	371.24
4	Gluconapoleiferin	Olefins alcohols	2-hydroxy-4-pentenyl DS-GSL	CH <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> (OH)C HCH <sub>2</sub>	323.13
5	Gluconapin	Olefins	3-butenyl DS-GSL	CH <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	293.1
6	Glucocochlearin	Aliphatic	1-methylpropyl DS-GSL	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> )CH	295.12
7	Glucobrassicinapin	Olefins	4-pentenyl DS-GSL	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	307.13
8	Glucobrassicin	Indole	3-indolylmethyl DS-GSL	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> NCH <sub>2</sub>	368.17
9	4-Methoxyglucobrassicin	Indole	4-methoxy-3-indolylmethyl DS-GSL	4-(CH <sub>3</sub> O)C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> N CH <sub>2</sub>	398.2
10	Glucoraphenin	Alkyl thioalkyl	4-(methylsulfinyl)-3-butenyl DS-GSL	CH <sub>3</sub> SOCHCH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	355.19
11	Gluconasturtiin	Aromatic	2-phenylethyl DS-GSL	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	343.16
12	Neoglucobrassicin	Indole	1-methoxy-3-indolylmethyl DS-GSL	1-(CH <sub>3</sub> O)C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> N CH <sub>2</sub>	398.2

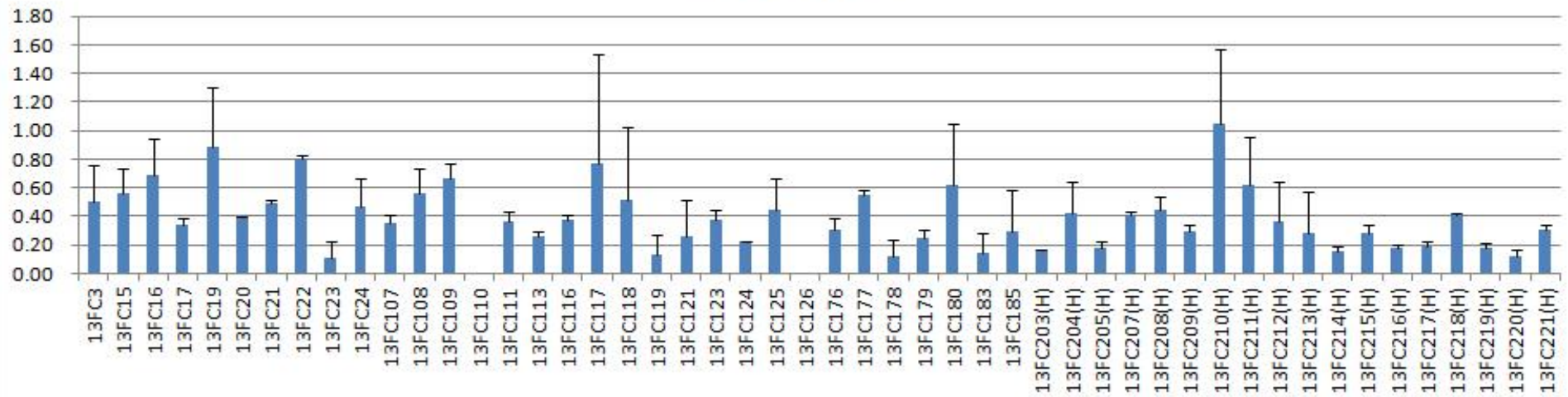
### Progoitrin



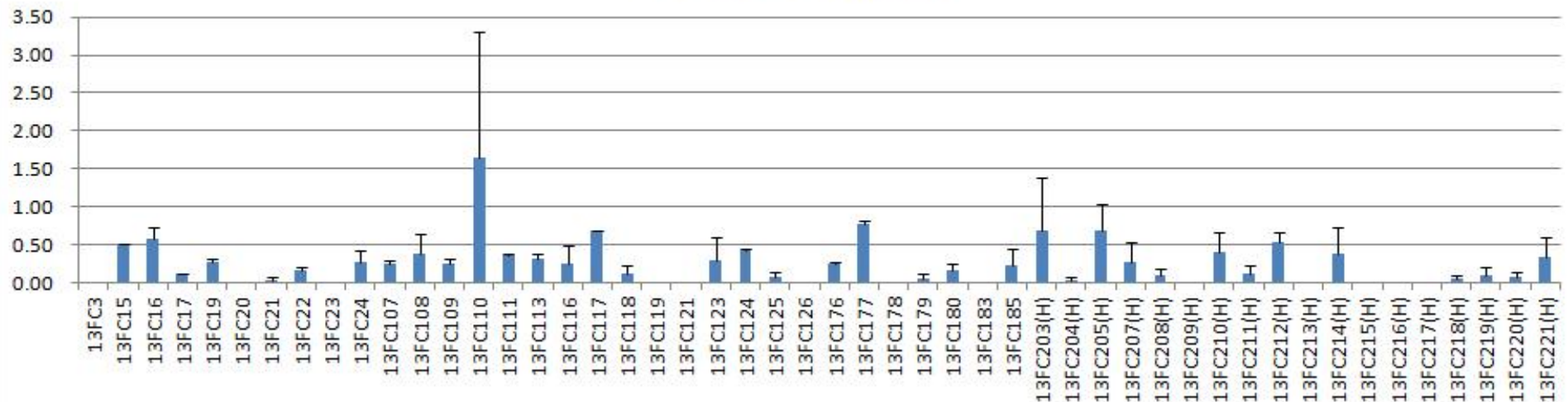
### Glucoraphanin

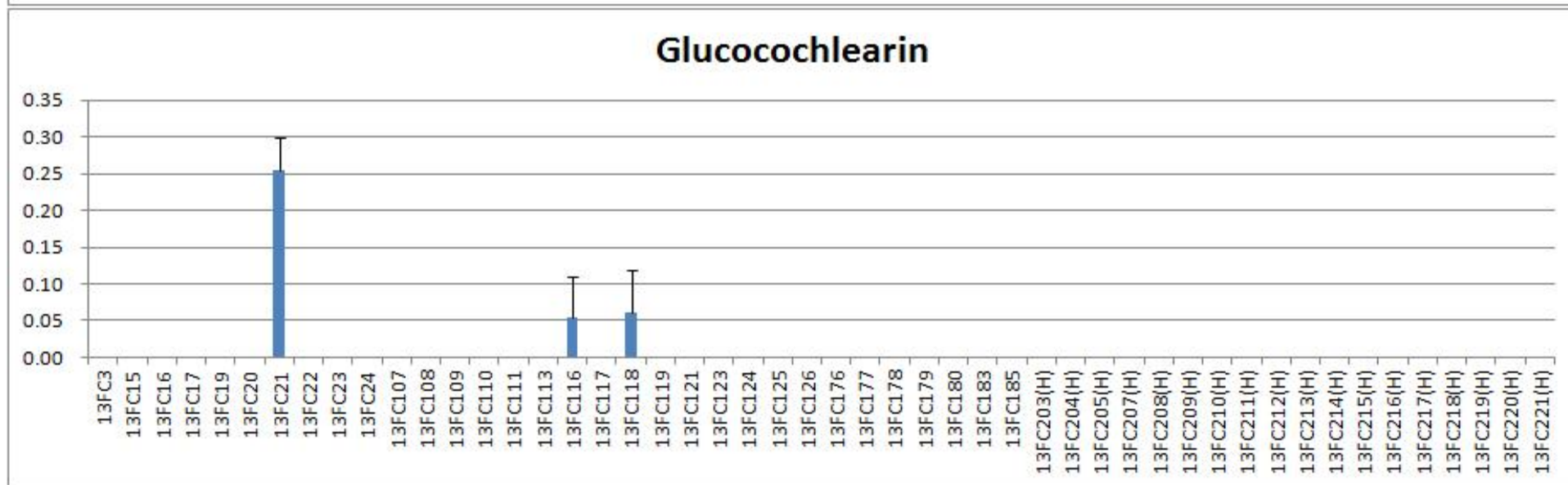
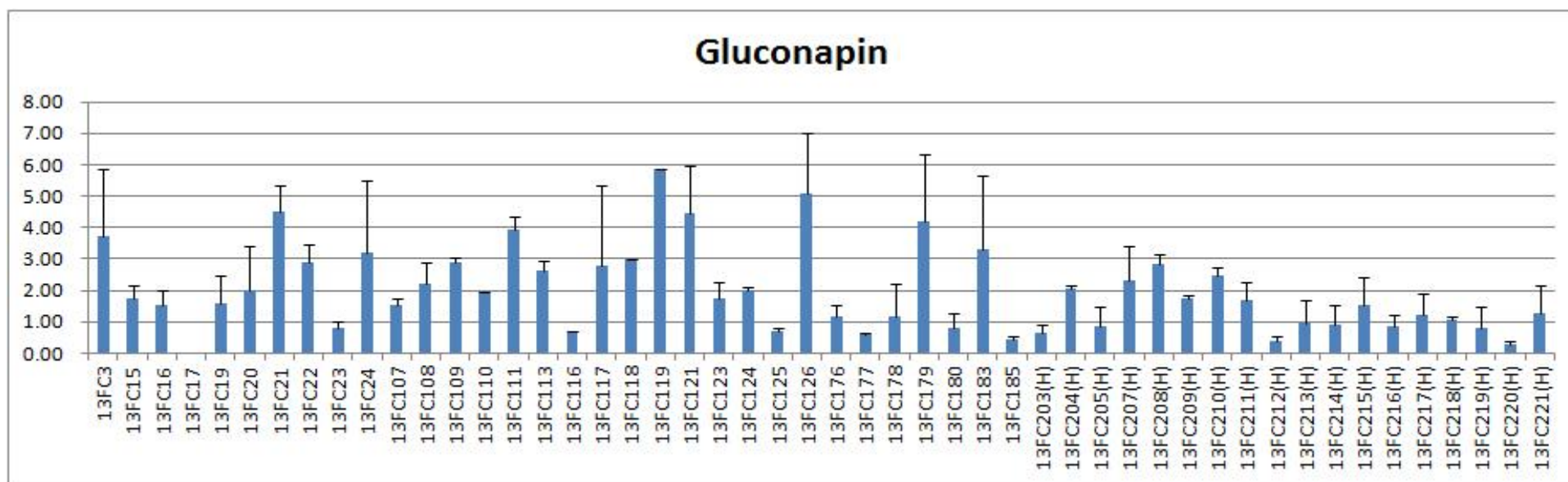


### Glucoalyssin

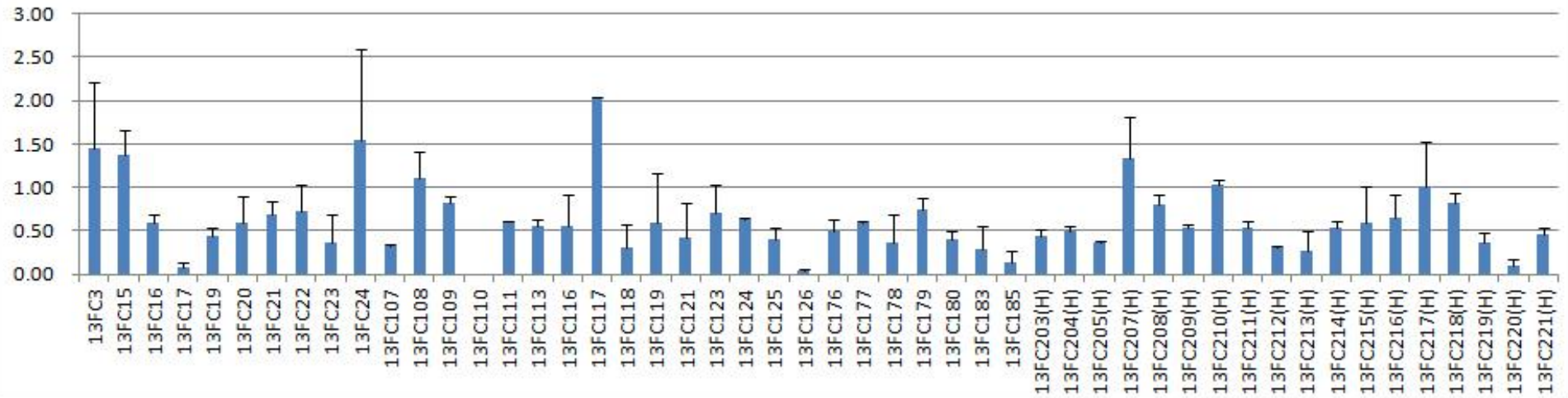


### Gluconapoleiferin

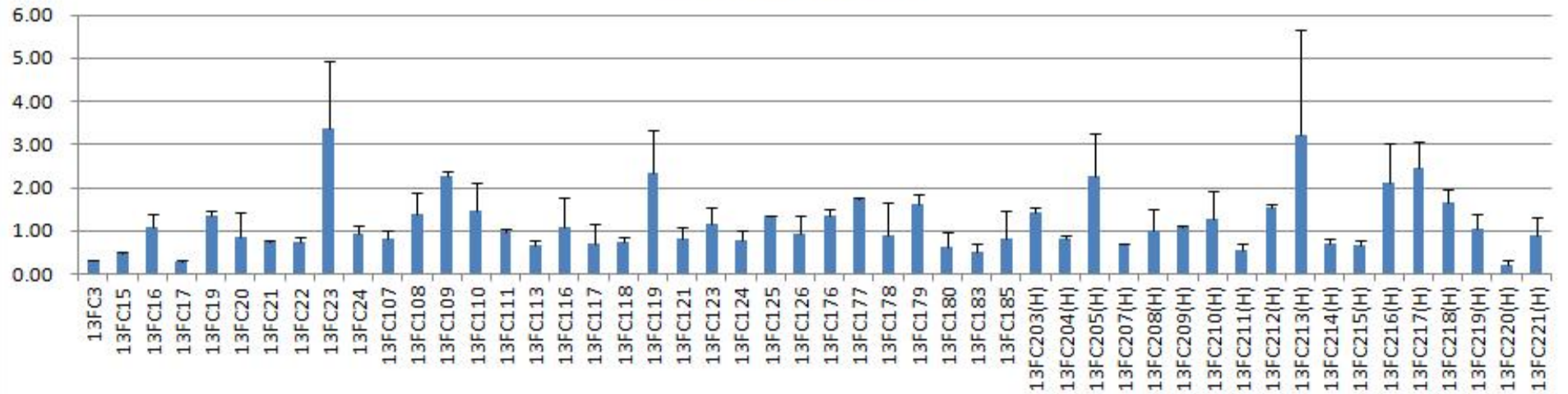




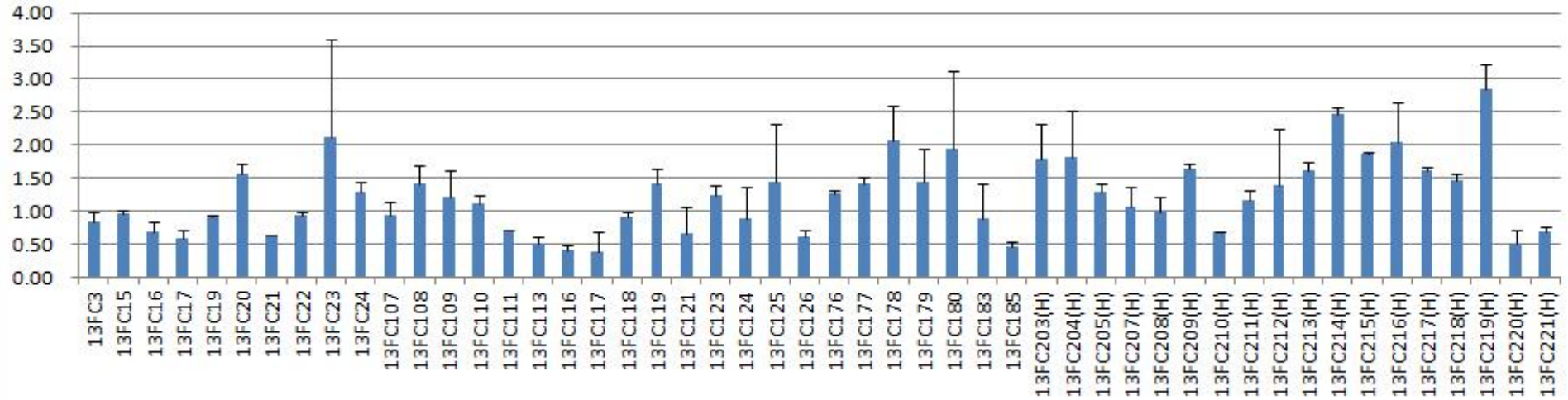
### Glucobrassicinapin



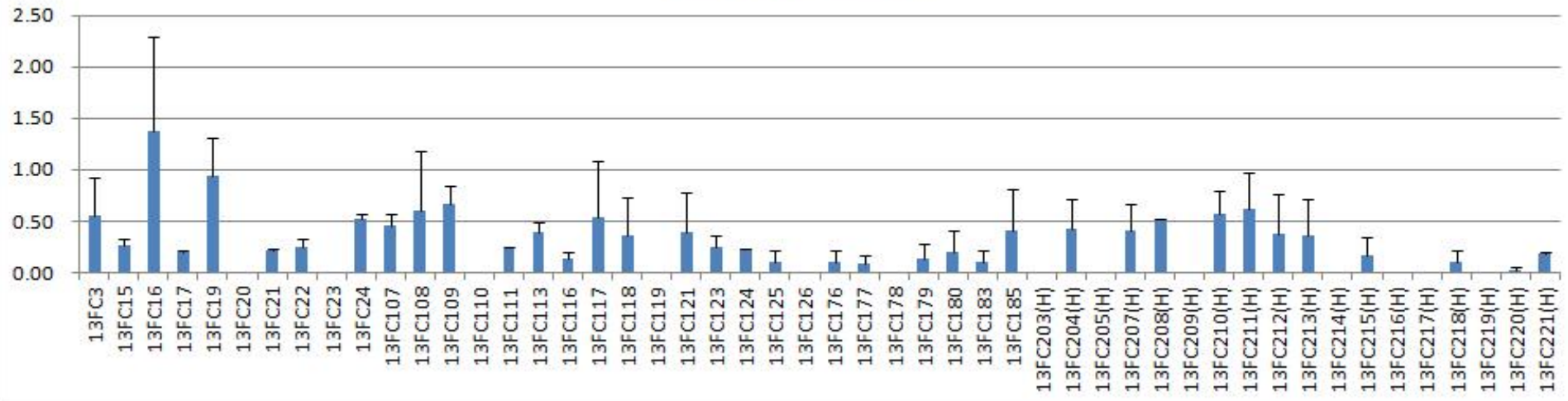
### Glucobrassicin



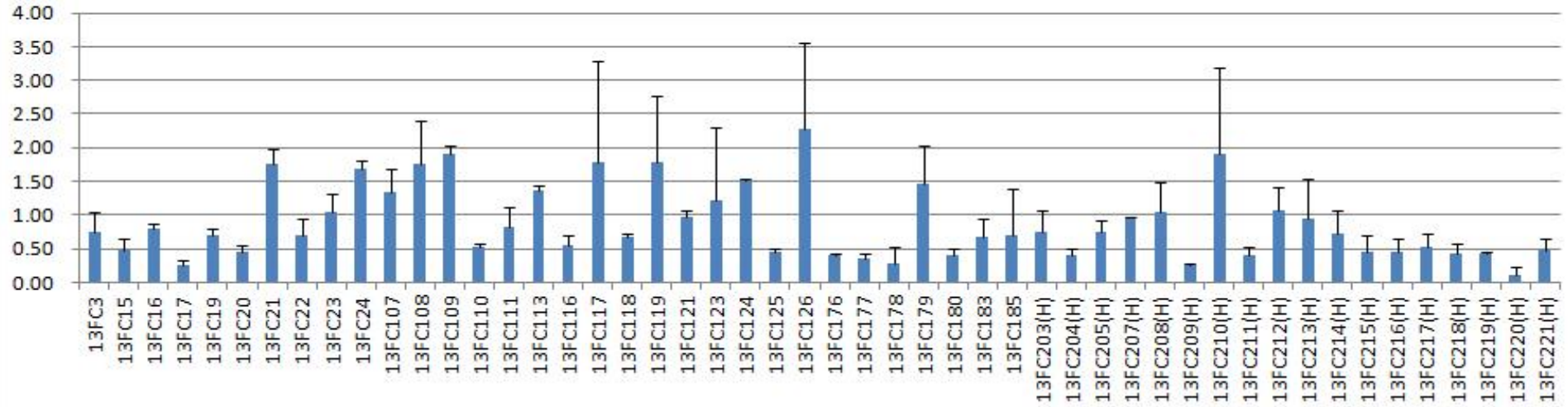
### 4-Methoxyglucobrassicin



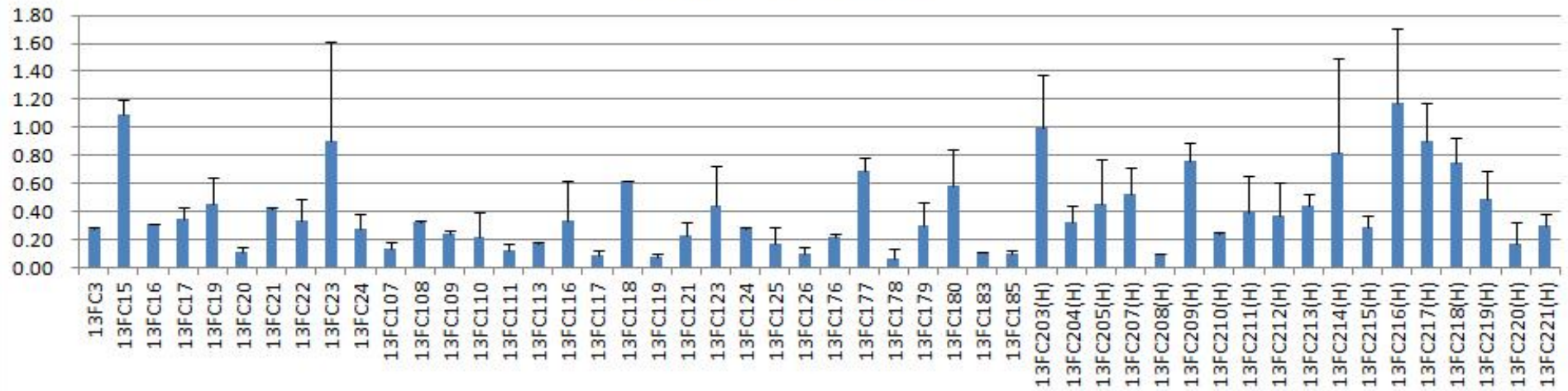
### Glucoraphenin



### Gluconasturtiin



### Neoglucobrassicin





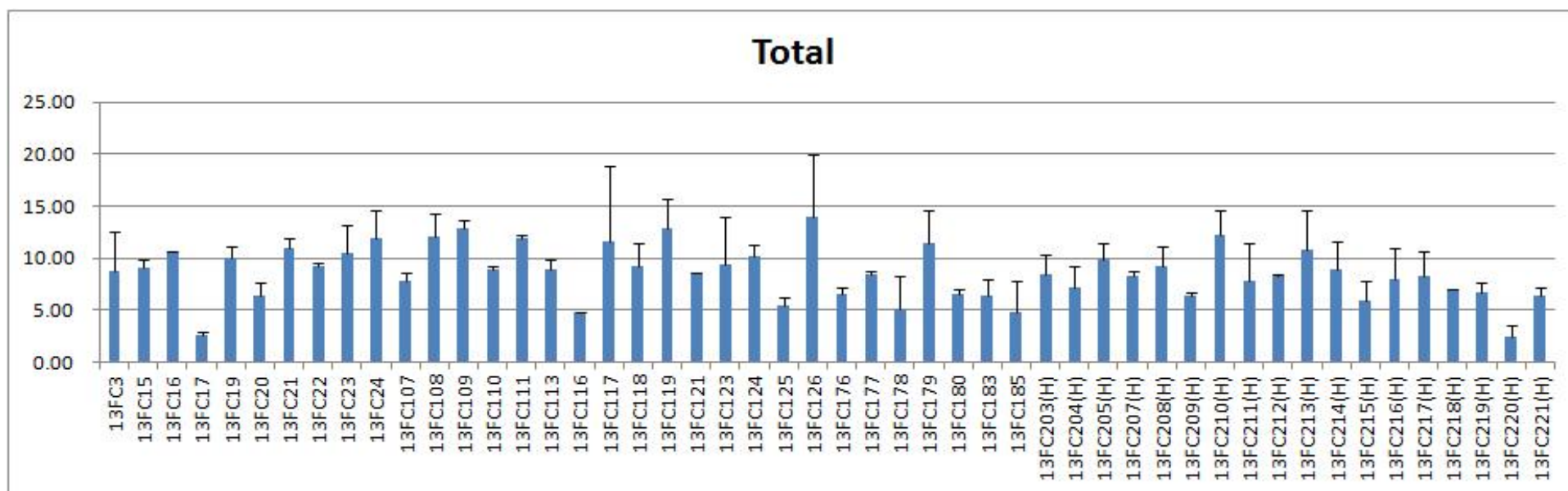


Fig. 5. Glucosinolates content ( $\mu\text{mol/g DW}$ ) in Chinese cabbage

## 2. 2년차 연구 내용 및 결과

### 가. 재료 및 방법

#### 1) 글루코시놀레이트 생합성 관련 유전자 발현 분석

배추의 글루코시놀레이트 생합성을 조절하는 유전자를 분리하여 real-time PCR 분석을 통해 발현 양상을 분석하고자 하였다. 먼저 기존에 보고된 애기장대의 글루코시놀레이트 생합성 관련 유전자의 염기 서열 정보를 얻어 tblastx 방법으로 배추의 전사체 분석 DB에서 유사한 서열을 갖는 유전자를 탐색하였다. 배추 전사체 염기서열이 저장되어 있는 Brassica database (<http://brassicadb.org/brad/>)에서 tblastx로 검색 후  $10^{-5}$  이하의 e-value를 갖는 유전자를 선별하였다. Isoform을 포함한 총 79개의 유전자를 선별하였고 primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)와 blastn를 통해 배추의 다른 유전자와 유사한 서열을 갖지 않는 특이적으로 증폭되는 primer를 제작하였다 (표 3). 제작한 primer는 PCR과 염기서열 분석을 통해 특이적으로 증폭되는 것을 확인하였다. Real-time PCR 분석은 Bio-rad CFX96 Real-Time PCR System을 이용하였으며 반응 조건은 95°C 30초, 55°C 15초, 72°C 30초를 40 사이클 반복하였고 Solgent사의 2X Real-Time SYBR mix를 사용하였다.

표 3. 글루코시놀레이트 생합성 관련 유전자의 real-time PCR primer 염기서열

Primer name	5' -sequence-3'	Primer name	5' -sequence-3'
1) BCAT-4-1-RT(F)	CAGGACAGAAGATGGCCGGAT	41) BrST5b-2-RT(F)	AGGAGGACCAAACCAGGACGA
BCAT-4-1-RT(R)	CGAATTGATCGACCGTGGGA	BrST5b-2-RT(R)	GCCTTCACGCGCAAGAATTG
	AGAGGGAAGTATTGTTCTTACGCTG		
2) BCAT-4-2-RT(F)	A	42) BrST5b-3-RT(F)	TACCGTGCCAAACCATGACG
BCAT-4-2-RT(R)	TCCGGCCATCTTCTGTCTCTG	BrST5b-3-RT(R)	GAGATTTTCGGCTCCAGCCT
3) BAT5-1-RT(F)	TCTTGGCTTTCGTGCGTGGT	43) BrST5b-4-RT(F)	CATTGGTGGATACAGCCTATCCTTGA
BAT5-1-RT(R)	GTCGCGAGAGCCAGAGCAAG	BrST5b-4-RT(R)	TGATTTGAGCCAAGTGGTACCTGTC
4) BAT5-2-RT(F)	TTTCTTCTTCAGCAAGGCACCTG	44) BrST5b-5-RT(F)	TACCGTGCCAAACCATGACG
BAT5-2-RT(R)	ATTGCGGGAGGCACTCCAA	BrST5b-5-RT(R)	GGGTTTCGTGAGGTGGTCGAA
5) MAM1-1-RT(F)	AGCGGACGTCATGCTGTGAA	45) BrST5b-6-RT(F)	CTGTCTCCAGCGCAAGAGTT
MAM1-1-RT(R)	GCCTTCAGATCATCATCCGTGATT	BrST5b-6-RT(R)	AGCGGTTGGCTATAGCGGAAGT
6) MAM1-2-RT(F)	CGTCATGCAGTTAAAGTCTGCTCTG	46) BrST5b-7-RT(F)	CGCCACGTTTCTCTCACACC
MAM1-2-RT(R)	TCGTTGTCGTCAGTGCCGTT	BrST5b-7-RT(R)	CGTGAAGCCAACGTTCAAGGA
7) MAM1-3-RT(F)	GATTCATGCATTGTTCTTGGAAAGC	47) ST5b-8-RT(F)	TGGCATCAGAACAACAAATCTTCG
MAM1-3-RT(R)	TGCTTGGTTAACTCCCTGAATCGT	ST5b-8-RT(R)	GCCTCGTCTTGGTGGCTCAG
8) MAM3-1-RT(F)	CGAGAGCGACCTTCATCAGGA	48) BrST5b-9-RT(F)	TACCGTGCCAAACCATGACG
MAM3-1-RT(R)	TTCACAGCATGACGTCCACTAAGC	BrST5b-9-RT(R)	TCCACCAATGACCACCGTACC
9) MAM3-2-RT(F)	CAATCACATAAGCCATTGTTGGAG	49) BrST5b-10-RT(F)	GCCTCTCCTTGAAGGTTGGCTT
MAM3-2-RT(R)	TCACAACCTCAACATCTTCTGGTGA	BrST5b-10-RT(R)	TTGAGCCAAGTGGTGCCTGA
10) MAM3-3-RT(F)	AATTCAGGCATTGTTCTTGGAAAGC	50) BrST5c-RT(F)	GGACGAAGGCAACACGCTCT
MAM3-3-RT(R)	GCTTGGTTAAATCTCTGAACCGTGAG	BrST5c-RT(R)	TCCTTGTGAGCGAACGTCCA
11) MAM3-4-RT(F)	TGAGCTCGATGATGATAAATTGAACG	51) BrFMOGS-OX2-RT(F)	GCCACAGGGAAGTTCTTTCG
MAM3-4-RT(R)	GCGCCGTTTAGTGACGAGATCA	BrFMOGS-OX2-RT(R)	TTCCATCAACCGCTCAACC
12) IPMI LSU1-1-RT(F)	TGCAACATGGTGGTGGAAAGC	5 2 )	CGCATCGTCTTGGTGTGCTC
IPMI LSU1-1-RT(R)	CAGGCTGAAAGGTACAGATGTCTCT	BrFMOGS-OX5-1-RT(F)	
		BrFMOGS-OX5-1-RT(R)	CGGAACGTGTCTGCTTGTGTG
13) IPMI LSU1-2-RT(F)	ACATCTGTACCTTTGAGCCCGTAT	5 3 )	TGGTCTGTGTCACGCTTCTTC
IPMI LSU1-2-RT(R)	GAGGCTTAGCCACCACAGGCT	BrFMOGS-OX5-2-RT(F)	
14) IPMISSU2-RT(F)	CGGTGACGATCGAGCTGAGA	BrFMOGS-OX5-2-RT(R)	CTTGCTCAGCTATCCAGTCGAGGT
IPMISSU2-RT(R)	ACCACCCGCATCAATAACCG	54) BrAOP1-1-RT(F)	TGCAGAGAAAGTCAACGACTTCATTC
15) IPMDH1-RT(F)	TCGGTGTATCGGGACCTGGA	BrAOP1-1-RT(R)	CCAGTTCCACTAGTTGCGTTCGAG
IPMDH1-RT(R)	ATTGCAGCGCTGAGAACGGT	55) BrAOP1-2-RT(F)	GGGATTGAAGAAGCTAATGATGCTGA
		BrAOP1-2-RT(R)	CGGAATTTGTGATCGTCTCAC
16) BCAT-3-1-RT(F)	CCACGCGCTCCACTACTTC	56) BrAOP2-1-RT(F)	CGAATACAACCTGTAACGCTGATGC

BCAT-3-1-RT(R)	CCTCCGCACTGGAAGACGAA	BrAOP2-1-RT(R)	GCACCAGTGCAAACGTCACC
17) BCAT-3-2-RT(F)	GCGCCTCCACTCATTCTGCT	57) BrAOP2-2-RT(F)	GGAAGTGTGGACGAGCAGCA
BCAT-3-2-RT(R)	ACGGCGTTGCACCGAGTAAG	BrAOP2-2-RT(R)	CCGGAGACGGCACAATAAGC
18) CYP79B2-1-RT(F)	CTCCAGGCCTTTGCGGCTAT	58) BrAOP2-3-RT(F)	TGCTAATGATGCTGGTGATGGTTC
CYP79B2-1-RT(R)	AAACGGGACGGCTCTTTAGCA	BrAOP2-3-RT(R)	CCAATGTGCGCCATTAGCCGTA
19) CYP79B2-2-RT(F)	TTCTCTCCACAGGTCCTCA	59) BrGSL-OH-1-RT(F)	GTGCGACGCGGAATCACAA
CYP79B2-2-RT(R)	CTTCATGATGCTGTGGAGCCAA	BrGSL-OH-1-RT(R)	CGTGGACTCGAACACGCAAC
20) CYP79B2-3-RT(F)	GGCAAACATGGTCGTTCAGCA	60) BrGSL-OH-2-RT(F)	ATCGGCGTGAAGGGTCTCGT
CYP79B2-3-RT(R)	GGGCCATCCGATAGGTCCAG	BrGSL-OH-2-RT(R)	GGACTCGAACACGCCACCTC
21) CYP79B3-RT(F)	GGCCATGGCGGAGATGATAA	61) BrGSL-OH-3-RT(F)	CAGGCAAGTTGTTGTTACAGTTGA
CYP79B3-RT(R)	GGTATGTCGGATTCCCTGGACGA	BrGSL-OH-3-RT(R)	CACAAAGAAAGACGCGACCGA
22) CYP83A1-1-RT(F)	GTCCCGCGACGAGAAGGAGT	62) BrCYP81F2-1-RT(F)	TGTTTTGGGAACGGACGAAGG
CYP83A1-1-RT(R)	CGCATTCAGGGCACAATTCT	BrCYP81F2-1-RT(R)	CGGTATATCAATTTCCCTCACCGT
23) CYP83A1-2-RT(F)	GGGAATGCGTCTTGGGTCAG	63) BrCYP81F2-2-RT(F)	CGGCCGACCACCTTCTTGTA
CYP83A1-2-RT(R)	AGATGCTCGGCCTTGTGCAT	BrCYP81F2-2-RT(R)	GGTCTCTGTGGATGGCCCAA
24) GSTF9-1-RT(F)	AGTCATGGGATTCCCTCCGA	64) BrCYP81F2-3-RT(F)	GTCCCGGTTCTCCTTCTGA
GSTF9-1-RT(R)	CTTGCTCTTGGCGAGATGTGC	BrCYP81F2-3-RT(R)	CGCTCGGGCATGAACTTCTC
25) BrGSTF9-2-RT(F)	AAGCTCTCAGCTGTGCTCGATGT	65) BrBZO1p1-1-RT(F)	CAGCGGAACCTGCTGGTCAT
BrGSTF9-2-RT(R)	ACGGGAGGTGAGCCAAGTCA	BrBZO1p1-1-RT(R)	CGGAACATACGTGCAACCGA
26) BrGSTF10-RT(F)	GGAGAGCAGAGGCAGCCTGA	66) BrBZO1p1-2-RT(F)	CCGTACAGGAGATCCTTCGCAA
BrGSTF10-RT(R)	TGATGGCAGTACTCGAAGA	BrBZO1p1-2-RT(R)	GTCCGCTGTTGTACCAGACGTG
27) BrGSTF11-RT(F)	TCGTACGCCGTTTGGTCAAGT	67) BrAPK1-1-RT(F)	CAAGCTTGACAGTGGTGA
BraGSTF11-RT(R)	TCCGTTCTTGGTCCGCATA	BrAPK1-1-RT(R)	TCGGAGAAGTTCCCGTTCCCTC
28) BrGSTU20-RT(F)	GCATCGAGGCAGAGAGTCCAA	68) BrAPK1-2-RT(F)	CGCTCGAGGTTTGTGAGGCT
BrGSTU20-RT(R)	CAGCGGCGTACGCAACAAT	BrAPK1-2-RT(R)	CGCAATTCATGGTGGCTCA
29) BrGGP1-1-RT(F)	CGAAGTGTTAGTGTTCCTGAATCTG	69) BrAPK2-1-RT(F)	TTCCGGCGTCTCCAATG
BrGGP1-1-RT(R)	ACGATCAACGATCTCGTGGAGAA	BrAPK2-1-RT(R)	CAGCGGTGAGGGAAGCTTGA
30) BrGGP1-2-RT(F)	TGCCGGAAGGTGCCAAAGTA	70) BrAPK2-2-RT(F)	GGCCATTCTCAGCGACAACC
BrGGP1-2-RT(R)	GCCAAGACGAAGAACACGATCTACA	BrAPK2-2-RT(R)	GCGGTGAGGGAAGCTTGTGA
31) BrGGP1-3-RT(F)	GCATCCAAGGTATCCCGAGT	71) BrAPK2-3-RT(F)	GCGACTGCTCTAAGTGACGGTT
BrGGP1-3-RT(R)	TGGTTCCGCAGTCTCCATCG	BrAPK2-3-RT(R)	TTAACGGCGGAGATCGGATG
32) BrGGP1-4-RT(F)	TGCCAAAGTACTAGCTTATCCGACA	72) BrGSH1/PAD2-1-RT(F)	TCAGGCAGGAGGAGCATAACTG
BrGGP1-4-RT(R)	A GCCAAGACGAAGGACACGATCT	BrGSH1/PAD2-1-RT(R)	TGCTCCTTGATTTGGTAGAGAGATC
33) BrSUR1-1-RT(F)	GAAGCACACGCCAACCTTGC	73) BrGSH1/PAD2-2-RT(F)	C GTTGCAAGCAACCAAGGGACA
BrSUR1-1-RT(R)	GCTTTCGCGGCCTTATCAGC	BrGSH1/PAD2-2-RT(R)	TCTCGTGTCCGTACCTATTCTCCA
34) BrSUR1-2-RT(F)	CATCGAAGCCATTGCAGACG	74) BrGSH1/PAD2-3-RT(F)	TGTTGCGGCTAGCCCTCCTA
BrSUR1-2-RT(R)	CGAGCCGTCTCTGCGACCT	BrGSH1/PAD2-3-RT(R)	ATTTGACGCCAGAGGCGAGA
35) BrUGT74B1-RT(F)	CTTGCCGGCTTTGAGCTACG	75) BrCHY1-1-RT(F)	AGATAAGAATCCAAAGTGGGAGCCA
BrUGT74B1-RT(R)	TTCGAAGCCGTTGACGAACA	BrCHY1-1-RT ? ?	GCCATTGCTAAGGCTGGCAAA
36) BrUGT74C1-1-RT(F)	TCACCGTCCACACCATCCAC	76) BrCHY1-2-RT(F)	AGCAGATCTTTGCAGAGTTGGTTCA
BrUGT74C1-1-RT(R)	GCCCCATAACTTCTGCCTGGA	BrCHY1-2-RT(R)	TGCCTGTGGCAAGCACTCTTT
37) BrUGT74C1-2-RT(F)	TGAAGCAAGCGGTATGTGC	77) BrCHY1-3-RT(F)	GCCTCAACAATTTCTCGATGCCTAC
BrUGT74C1-2-RT(R)	CGGTGGTTATTGGAGGCGATT	BrCHY1-3-RT(R)	TGGCAAGATAAAGAACTGGTGACACA
38) BrST5a-1-RT(F)	AGGAAGAGGAGAATGGTGTGCTG	78) BrCHY1-4-RT(F)	AGCGACTGGAGCAGGTGACG
BrST5a-1-RT(R)	GCTATTGCGATAAACCGCAGGA	BrCHY1-4-RT(R)	ACAGCTTTGCGATTATTGAAGAAGAC
39) BrST5a-2-RT(F)	CCACGCCAAAGACCACTTCC	79) BrAAO4-RT(F)	A TCCGCTCTTTCAAACGCACA
BrST5a-2-RT(R)	GTTTGAGGAGCGGGTTCGTG	BrAAO4-RT(R)	TCGGCAATGGGACGATAACC
40) BrST5b-1-RT(F)	CGACCGTACCGAACCAAGACA		
BrST5b-1-RT(R)	CCAGTGACCACCGTACTCGATG		

## 나. 연구 결과

### 1) 배추 우수소재 선발

글루코시놀레이트 고함량 배추 계통을 육성하기 위한 바이오마커를 개발하고 글루코시놀레이트 생합성 관련 핵심 유전자를 동정하기 위한 연구 개요를 그림 1에 나타내었다. 2차년도에서는 이 중 글루코시놀레이트 고함량, 저함량 계통을 선발하고 선발한 계통 간 글루코시놀레이트 생합성 경로의 변화를 비교하여 핵심 유전자를 탐색하는 실험을 수행하였다.

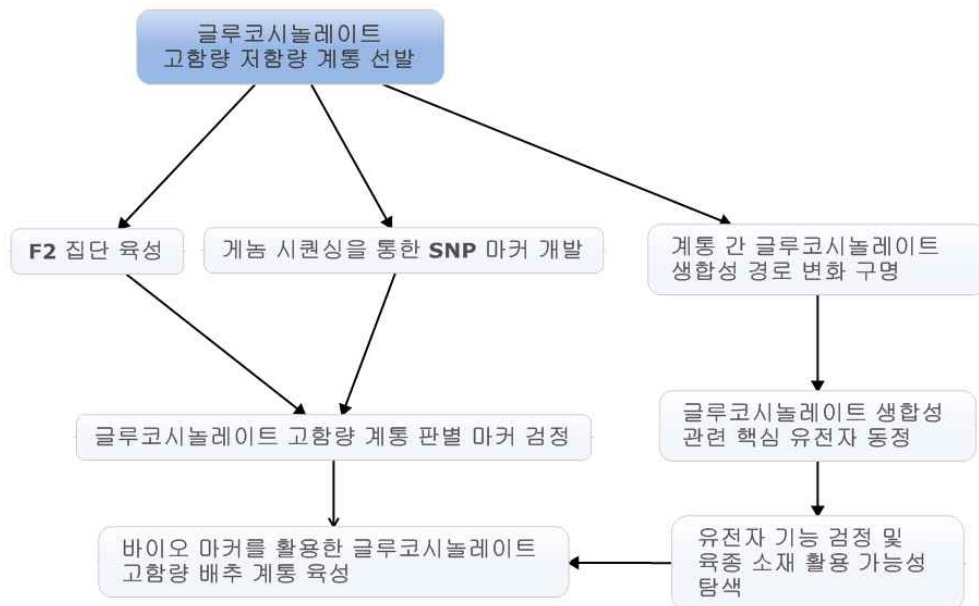


그림 1. 연구개요

1차년도에서는 소포자 배양을 통해 육성된 Double haploid (DH) 50 계통의 결구된 배추를 수확하여 글루코시놀레이트 함량을 분석하였다. High performance liquid chromatography (HPLC)와 liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)를 이용하여 progoitrin, glucoraphanin, glucoalyssin, gluconapoleiferin, gluconapin, glucocochlearin, glucobrassicinapin, glucobrassicin, 4-methoxyglucobrassicin, glucoraphenin, gluconasturtiin, neoglucobrassicin를 포함한 총 12종을 분석하였고 이를 통해 함량의 차이가 큰 14개의 DH 계통을 선발하였다 (그림 2). 그 결과 총 12종의 글루코시놀레이트 중 특히 progoitrin, glucoraphanin, glucoalyssin, gluconapoleiferin, gluconapin, glucocochlearin, glucoraphenin에서 계통 간 함량의 차이가 두드러지게 나타났다.

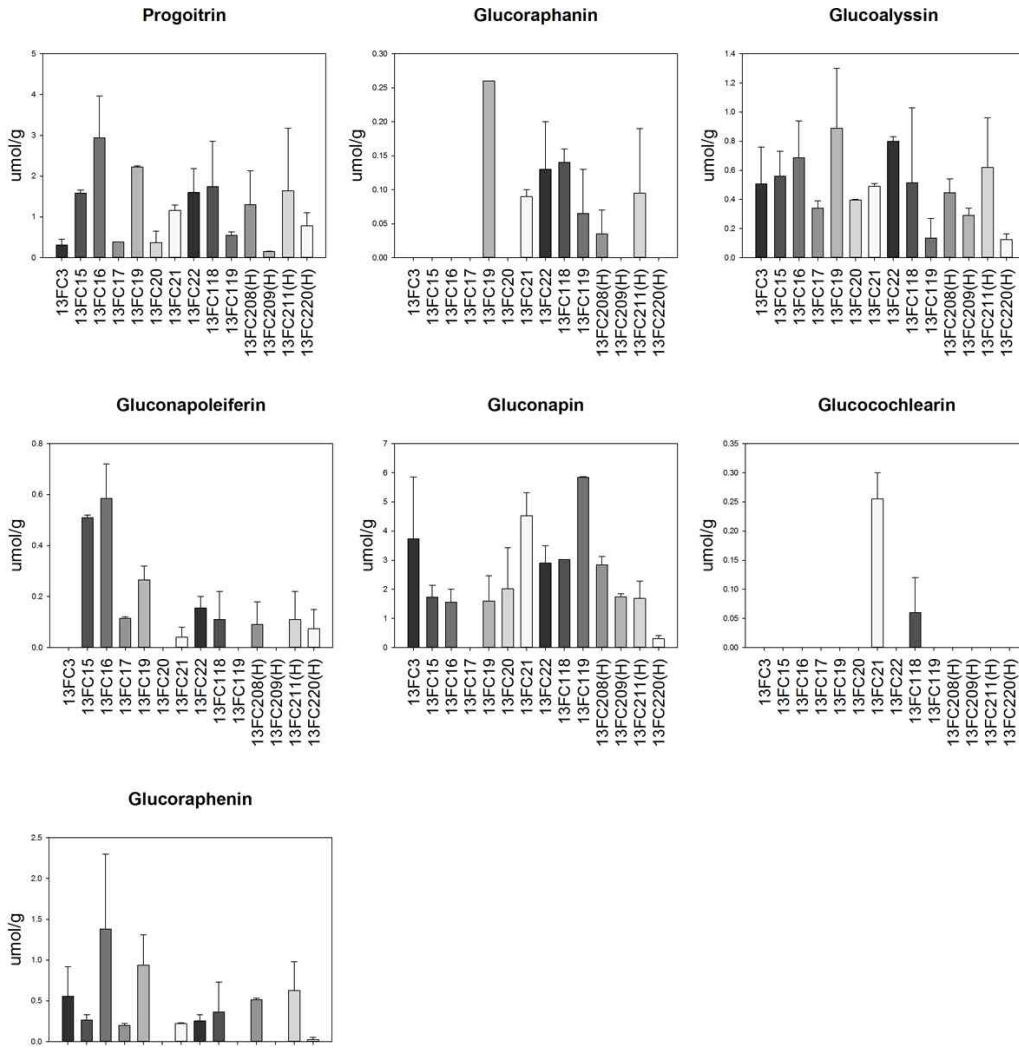
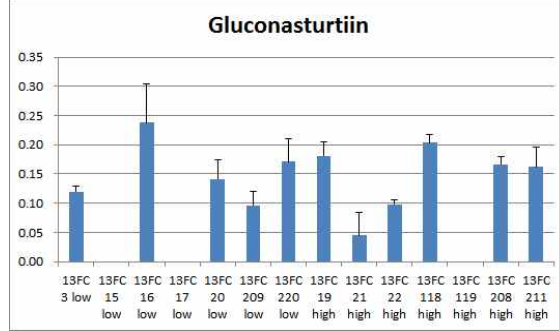
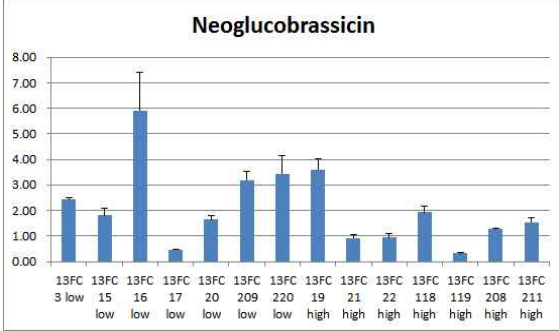
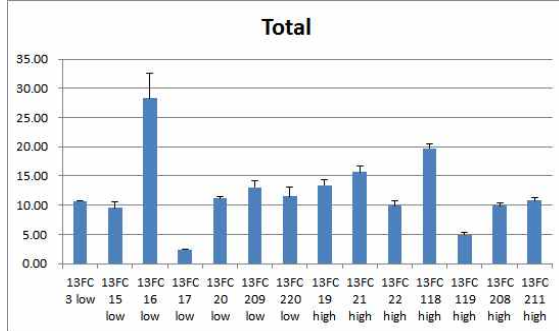
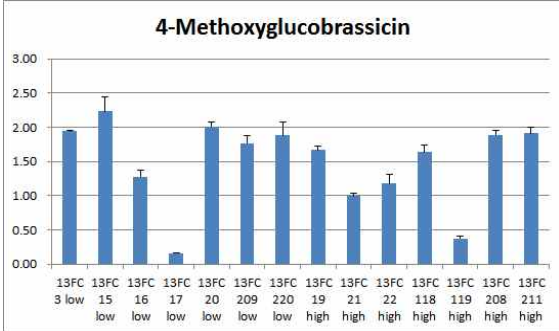
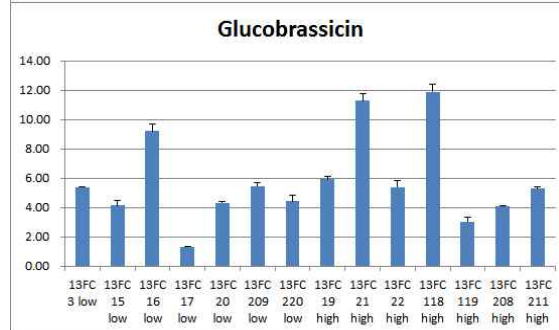
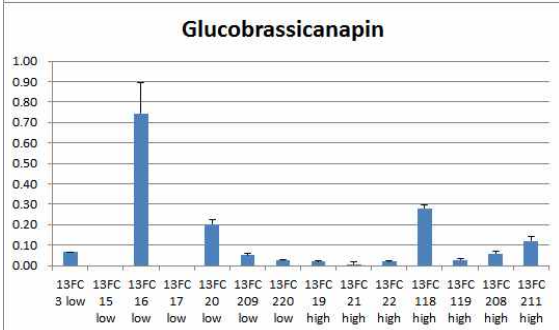
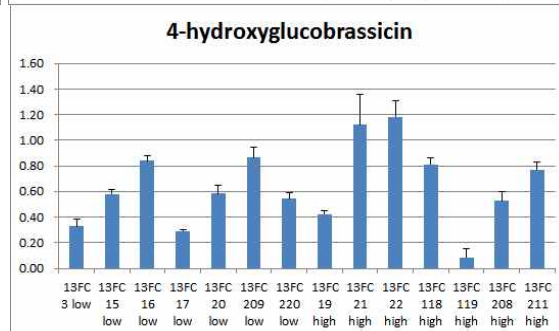
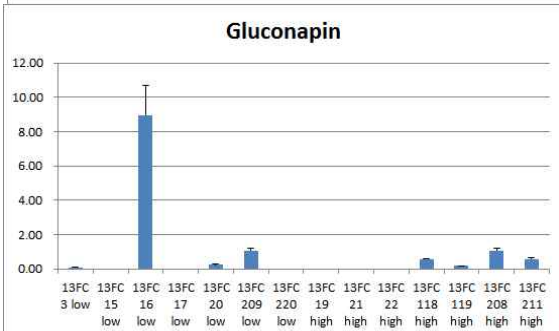
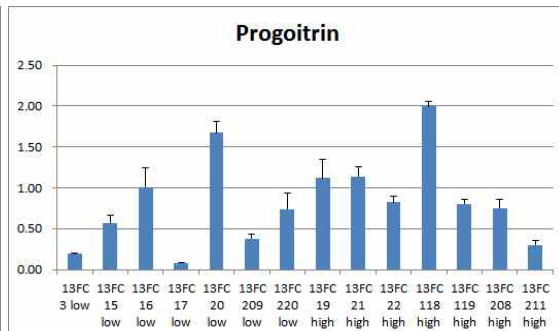
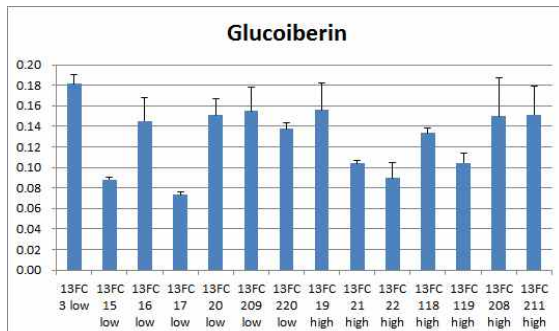


그림 2. 선발된 14개 계통의 progoitrin, glucoraphanin, glucoalyssin, gluconapoleiferin, gluconapin, glucocochlearin, glucoraphenin 함량

2차년도에서는 1차년도에서 분석한 결과를 기반으로 선발한 총 14 계통의 글루코시놀레이트 함량을 다시 측정하여 재배 조건과 환경 등의 변화에도 물질 축적 양상이 재현되는 우수 계통을 선발하고자 하였다. 이를 위해 14 계통을 충남대학교 온실에서 재배하였고 발아 후 30일의 유모 전 부위와 90일의 3-5번째 잎을 샘플링하여 글루코시놀레이트의 함량을 다시 분석하였다 (그림 3).



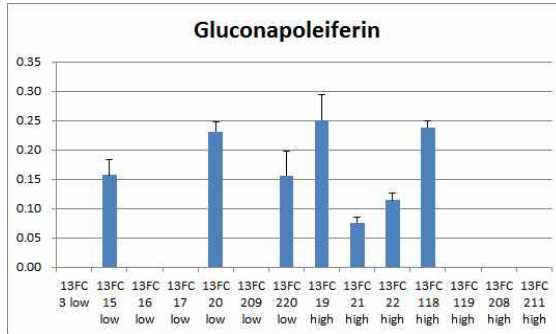
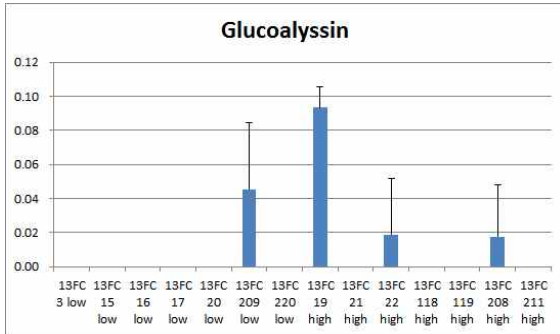
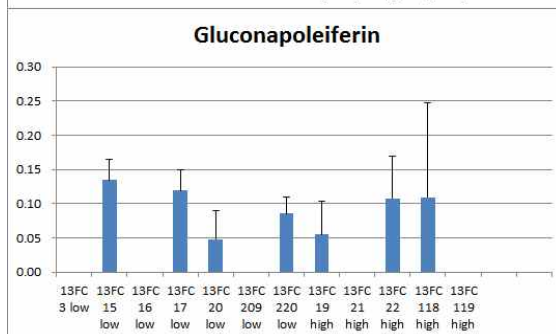
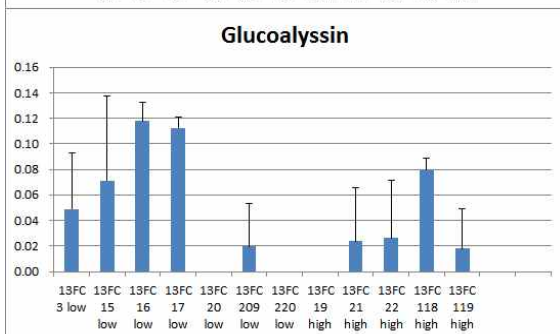
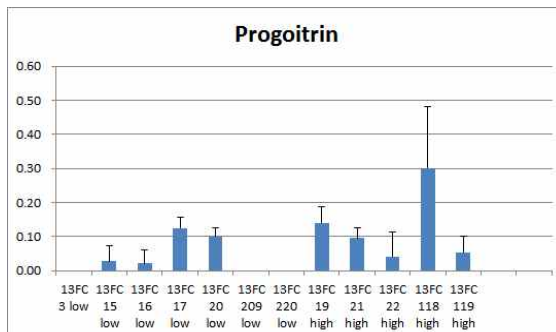
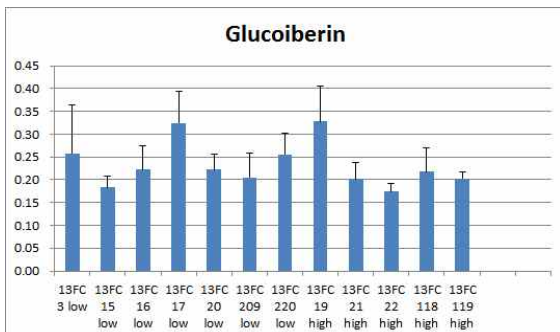


그림 3. 발아 후 30일이 경과된

선발된 14 계통의 글루코시놀레이트 함량

1차년도에서 결구배추로 분석한 결과와 다소 차이를 보이는 결과를 얻었다. 1차년도에서는 검출되었던 glucoraphanin, glucocochlearin, glucoraphenin의 3종이 2차년도에서는 검출되지 않았다. 하지만 glucoiberin, 4-hydroxyglucobrassicin의 2종이 새롭게 검출되었다. 또한 1차년도 분석에서는 계통 간 다소 적은 차이를 보였던 glucoalyssin의 경우 2차년도 분석에서는 매우 적은 양이 검출되는 계통이 새롭게 발견되었다. 이는 일반적으로 환경 변화와 식물의 부위, 발달단계에 따라 이차대사산물의 축적이 매우 달라지기 때문인 것으로 생각된다 (Akula and Ravishankar 2011). 발아 후 90일 경과된 계통을 샘플링하여 분석한 결과에서는 발아 후 30일이 경과된 계통의 분석결과와 비슷한 양상을 보였다 (그림 4).



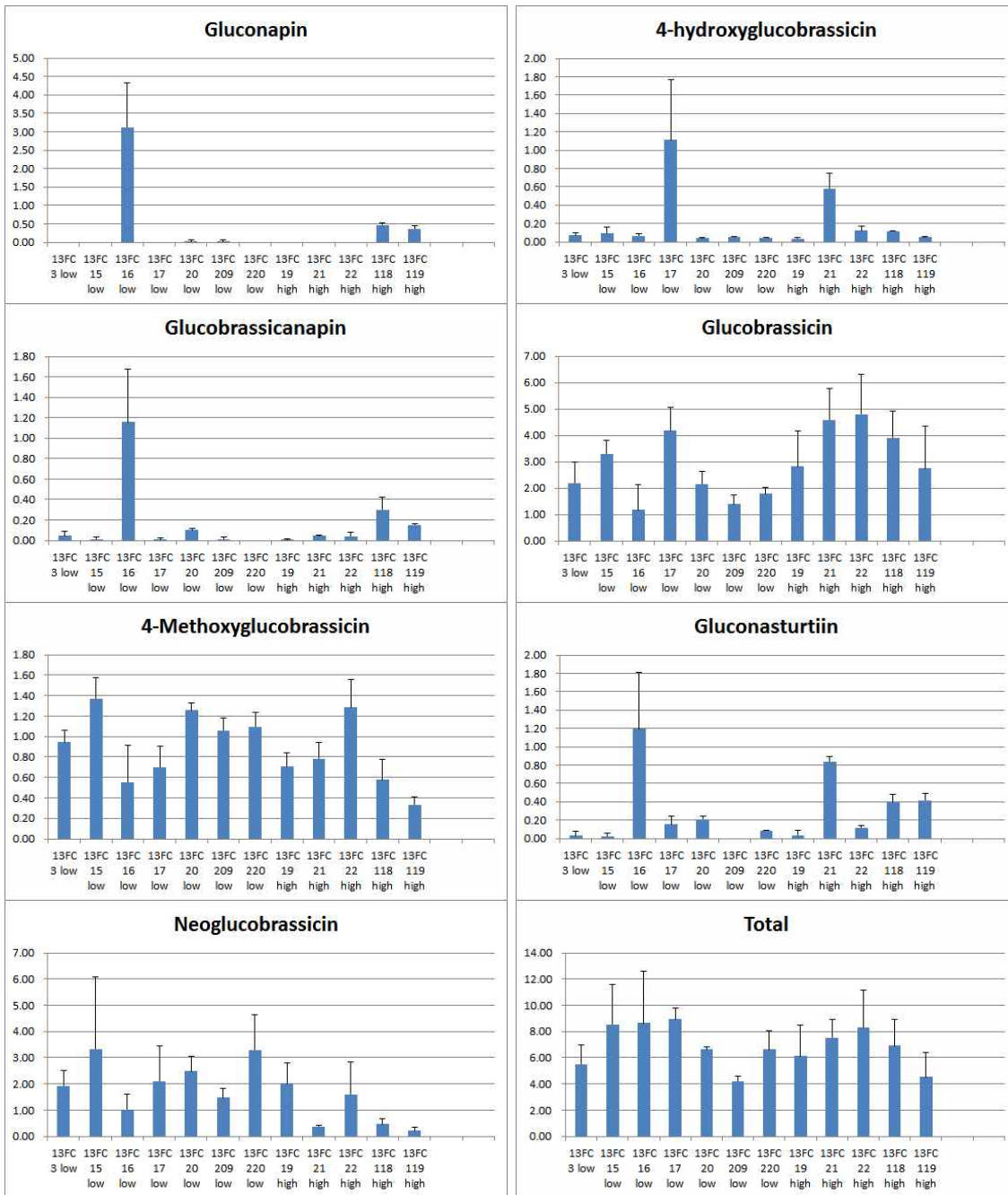


그림 4. 발아 후 90일이 경과된 선발된 14 계통의 글루코시놀레이트 함량

1차년도에 50계통을 대상으로 한 분석과, 이를 통해 선발한 14계통을 대상으로 한 두 번의 분석을 포함한 총 세 번의 분석 모두에서 일관되게 함량의 차이가 재현되는 13FC-16, 13FC-17 두 계통을 선발하였다. 특히 13FC-16과 13FC-17 계통에서 gluconapin과 glucobrassicinapin, gluconasturtiin의 함량이 특히 현저하게 차이는 것을 발견하였다. Gluconapin의 경우 싹양배추에서 쓴 맛을 내게 하는 물질로 glucobrassicinapin, gluconasturtiin과 함께 항암효과가 있다고 알려져 있는 유용 물질이다 (Mithen, Richard 2001). 13FC-16 계통에서는 이들 물질의 함량이 매우 높은 반면 13FC-17 계통에서는 검출되지 않았다. 따라서 현재 이 두 계통에서 계놈



염기서열을 분석하여 이들 물질의 함량과 관련된 바이오 마커를 개발하고 있다. 이를 위해 13FC-16과 13FC-17 계통에서 genomic DNA를 추출 후 illumina사의 Hiseq 2000을 이용하여 게놈 시퀀싱을 진행하고 있다. 또한 두 계통을 교배하여 F2 집단을 만들어 글루코시놀레이트 함량의 다양한 변이를 가진 계통을 육성하는 실험을 진행하고 있다. 차후 게놈 시퀀싱을 통해 개발한 마커를 이 집단에 적용하여 글루코시놀레이트의 함량 차이를 검출할 수 있는 마커를 검정하는데 이용하고 글루코시놀레이트의 함량이 높은 배추 품종을 선별하고 육성할 수 있도록 활용할 계획이다.

## 2) 글루코시놀레이트 생합성 관련 유전자 DB 작성 및 유전자 발현 분석

한편 13FC-16과 13FC-17 계통 간에 큰 함량 차이를 보인 gluconapin과 glucobrassicinapin은 methionine을 전구체로 하여 합성되는 지방족 (aliphatic) 글루코시놀레이트이고 gluconasturtiin은 phenylalanine을 전구체로 하여 합성되는 방향족 (aromatic) 글루코시놀레이트이다 (Radojčić Redovniković et al. 2008). 기존에 알려진 글루코시놀레이트 합성 경로는 전구체로 사용되는 아미노산의 사슬길이가 신장되는 chain elongation 경로와, 글루코시놀레이트의 기본 골격이 형성되는 core glucosinolate biosynthesis 경로, 기본 골격에 잔기를 수식하여 다양한 type의 글루코시놀레이트가 형성되는 secondary modifications 경로의 3 단계로 크게 나뉜다 (Sønderby et al. 2010). 본 연구에서 13FC-16과 13FC-17 계통 간에 glucoiberin, progoitrin, glucoalyssin, gluconapoleiferin과 같은 다른 지방족 글루코시놀레이트는 함량의 차이가 없었지만 gluconapin과 glucobrassicinapin의 경우는 차이를 보였다는 것은 두 계통에서 특히 아미노산의 사슬길이가 신장되는 chain elongation 단계와 secondary modifications 경로에 변화가 일어났다는 것을 암시한다. 따라서 chain elongation 단계와 secondary modifications 단계를 포함하는 글루코시놀레이트의 합성 경로 전체의 발현을 real-time PCR 방법으로 분석하고 글루코시놀레이트의 type을 결정하는 유전자를 동정하고자 하였다. 기존에 알려진 배추와 같은 십자화과에 속하는 애기장대의 글루코시놀레이트 생합성 관련 유전자를 조사하였고 유사한 서열을 갖는 orthologous 배추 유전자를 탐색하였다. Tblastx 방법을 이용하여 e-value가  $10^{-5}$  이하인 배추 유전자를 선별하였고 primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)와 blastn을 이용하여 Brassica database (BRAD)에서 제공하는 다른 배추 유전자의 염기서열 (<http://brassicadb.org/brad/>)과 유사성을 보이지 않는 특이적인 부위를 대상으로 하는 real-time PCR primer를 제작하였다 (표 3). Real-time PCR 결과와 글루코시놀레이트 합성 경로를 각각 그림 6, 8, 10, 12와 5, 7, 9, 11에 나타내었다.

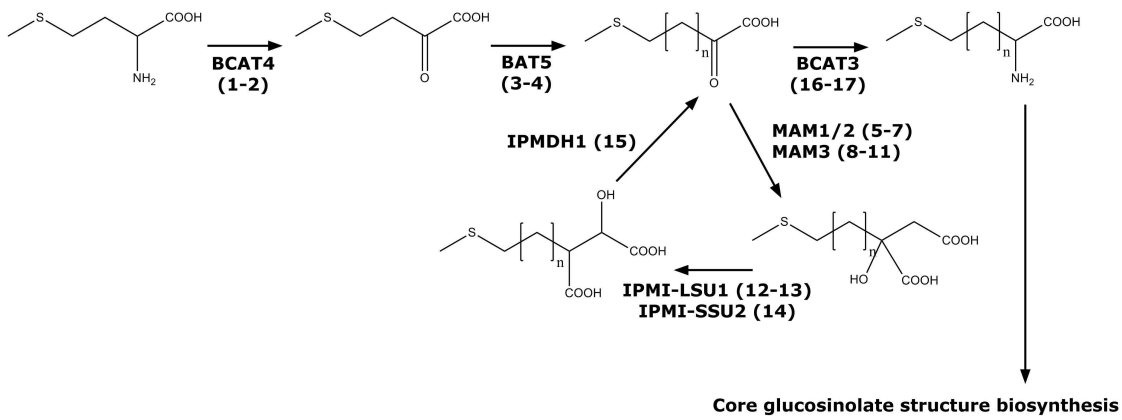


그림 5. 글리코시놀레이트 생합성 경로의 chain elongation 단계 (숫자는 primer 번호)

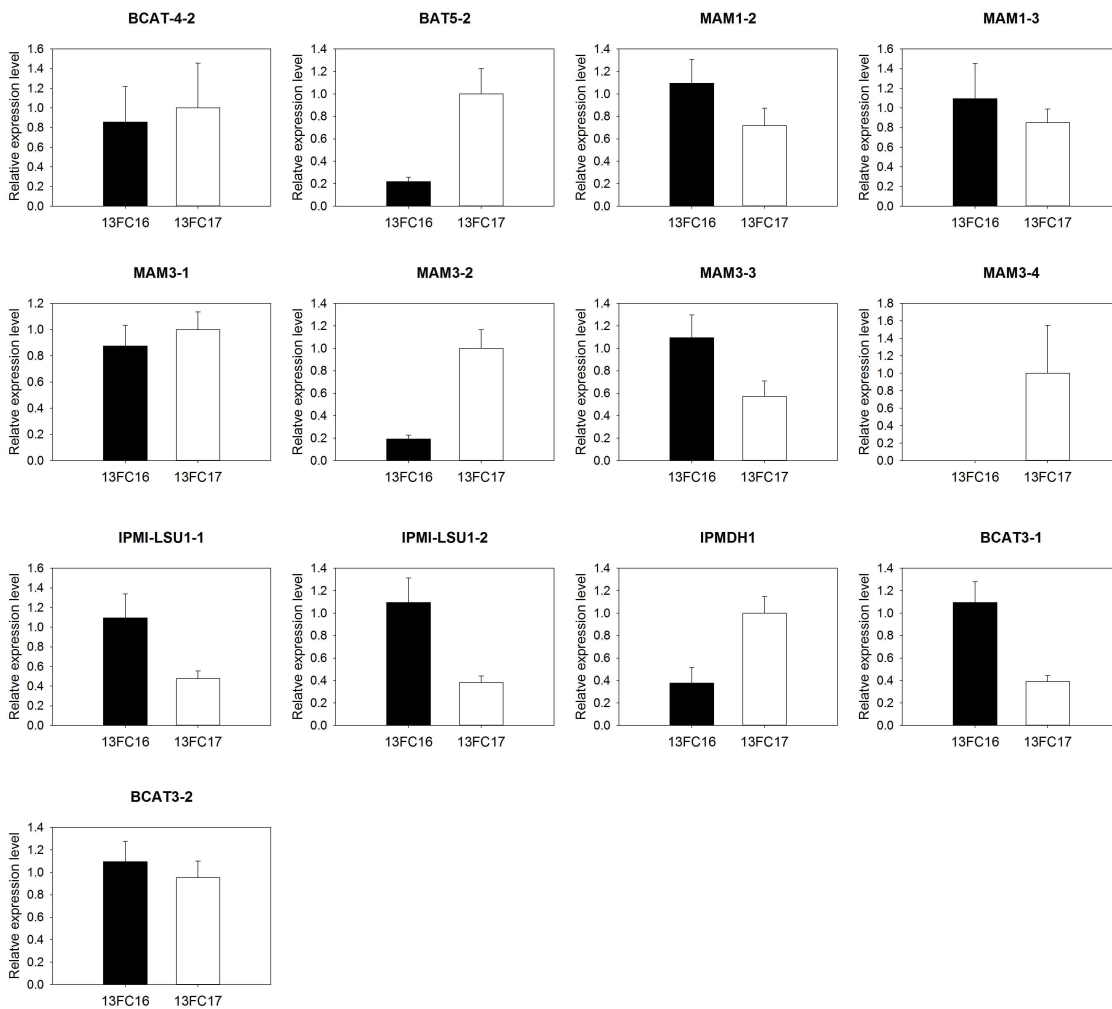


그림 6. 글리코시놀레이트 생합성 경로의 chain elongation 단계 합성을 조절하는 유전자의 발현 분석

전구체인 아미노산의 사슬이 신장되어 글루코시놀레이트의 기본 골격을 형성하는 단계로 진입하기 전의 단계인 chain elongation 단계에서 초기 *BAT5*에 의해 조절되는 단계에서는

13FC-17이, 후기 *BCAT3*에 의해 조절되는 단계에서는 13FC-16이 높은 발현을 보였다 (그림 5, 6). 13FC-16의 경우 3-Butenyl glucosinolate인 gluconapin과 4-Pentenyl glucosinolate인 glucobrassicinapin의 함량이 모두 높았다. *MAM3*의 경우 두 개의 paralogous 유전자가 다른 발현 양상을 보였으며 *IPMI-LSUI*의 경우 13FC-16에서 높게 발현되었고, *IPMHI*의 경우 13FC-17에서 높게 발현되었다. 따라서 *BAT5-2*의 경우 C3와 C4의 글루코시놀레이트 보다는 다른 type의 글루코시놀레이트 합성과 관련된 것으로 생각되고 gluconapin와 glucobrassicinapin의 합성은 이외에 다른 유전자에 의해 조절되는 것으로 생각된다.

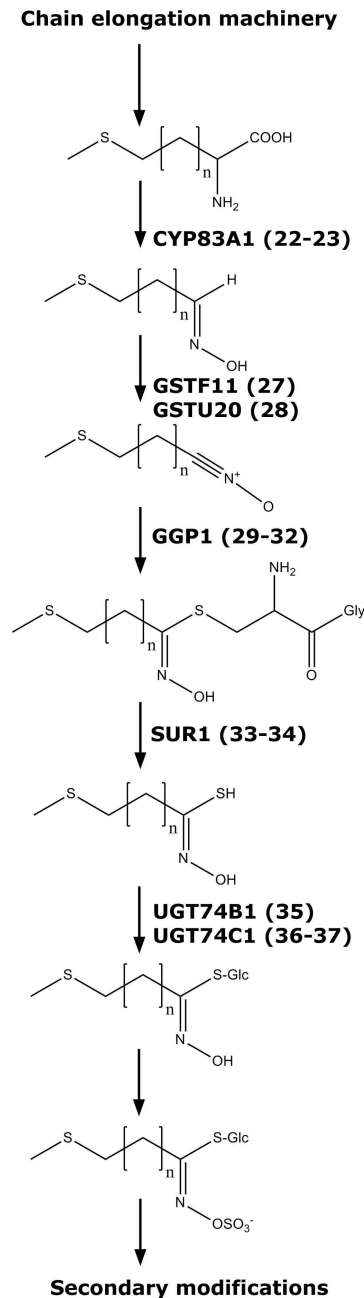


그림 7. 지방족 (aliphatic) 글루코시놀레이트 생합성 경로에서 core glucosinolate structure 합성 단계 (숫자는 primer 번호)

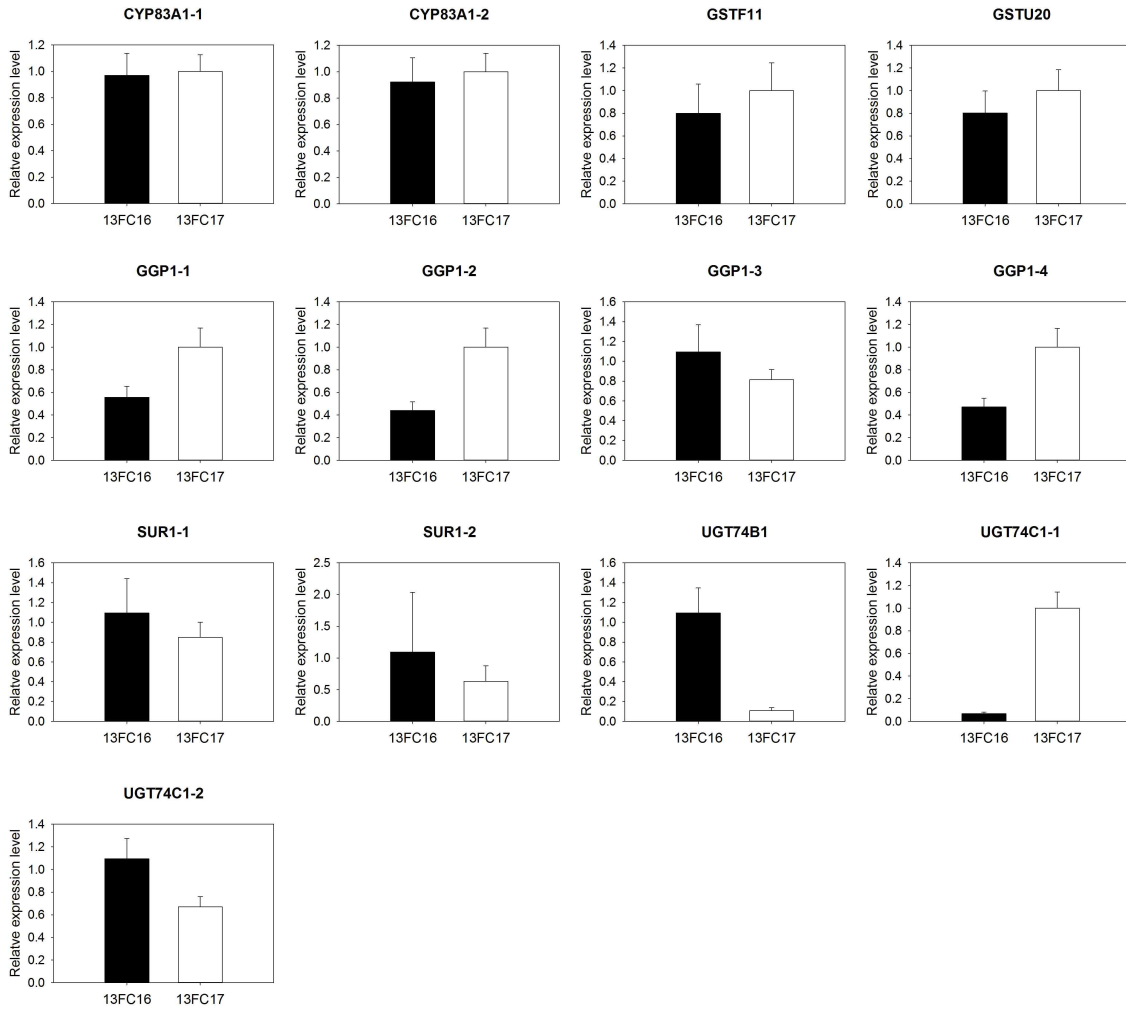


그림 8. 지방족 (aliphatic) 글루코시놀레이트 생합성 경로에서 core glucosinolate structure 합성을 조절하는 유전자의 발현 분석

지방족 (aliphatic) 글루코시놀레이트를 합성하는 경로에서 core glucosinolate structure를 합성하는 단계를 조절하는 유전자의 발현을 조사하였다. *CYP83A1*, *GSTF11*, *GSTU20*의 경우 두 계통 간 발현 차이를 보이지 않았지만 *GGP1*, *SUR1*, *UGT74C1*은 두 계통 간 발현 차이가 나는 것을 확인하였다 (그림 7, 8). 특히 *GGP1*의 경우 13FC-17 계통에서 발현양이 많았고 *SUR1*의 경우 반대로 13FC-16 계통에서 높은 발현을 보였다. *UGT74C1*은 두 개의 isozyme을 코딩하는 유전자의 발현이 다른 양상을 보였다. 이를 종합하면, 지방족 (aliphatic) 글루코시놀레이트의 core glucosinolate structure를 합성하는 단계에서는 두 계통 간에 발현 차이를 보이지 않았다는 것을 알 수 있다.

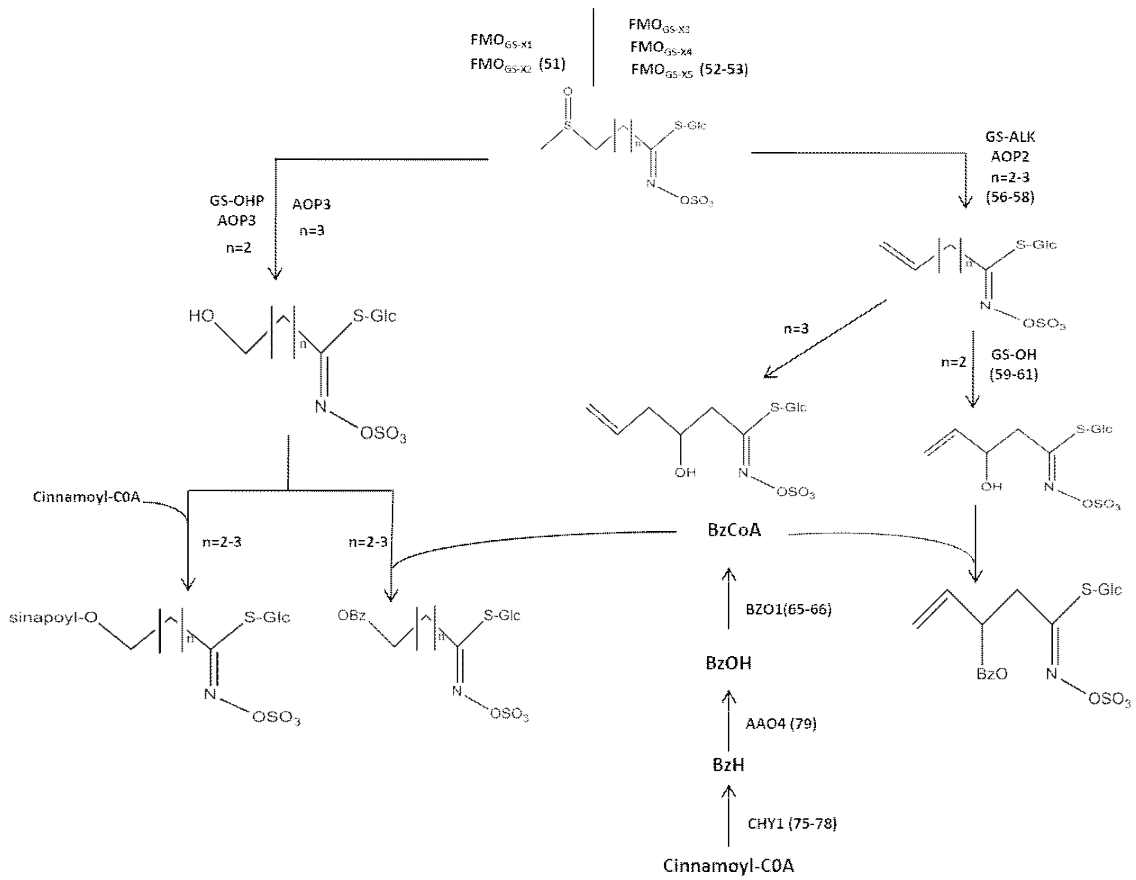
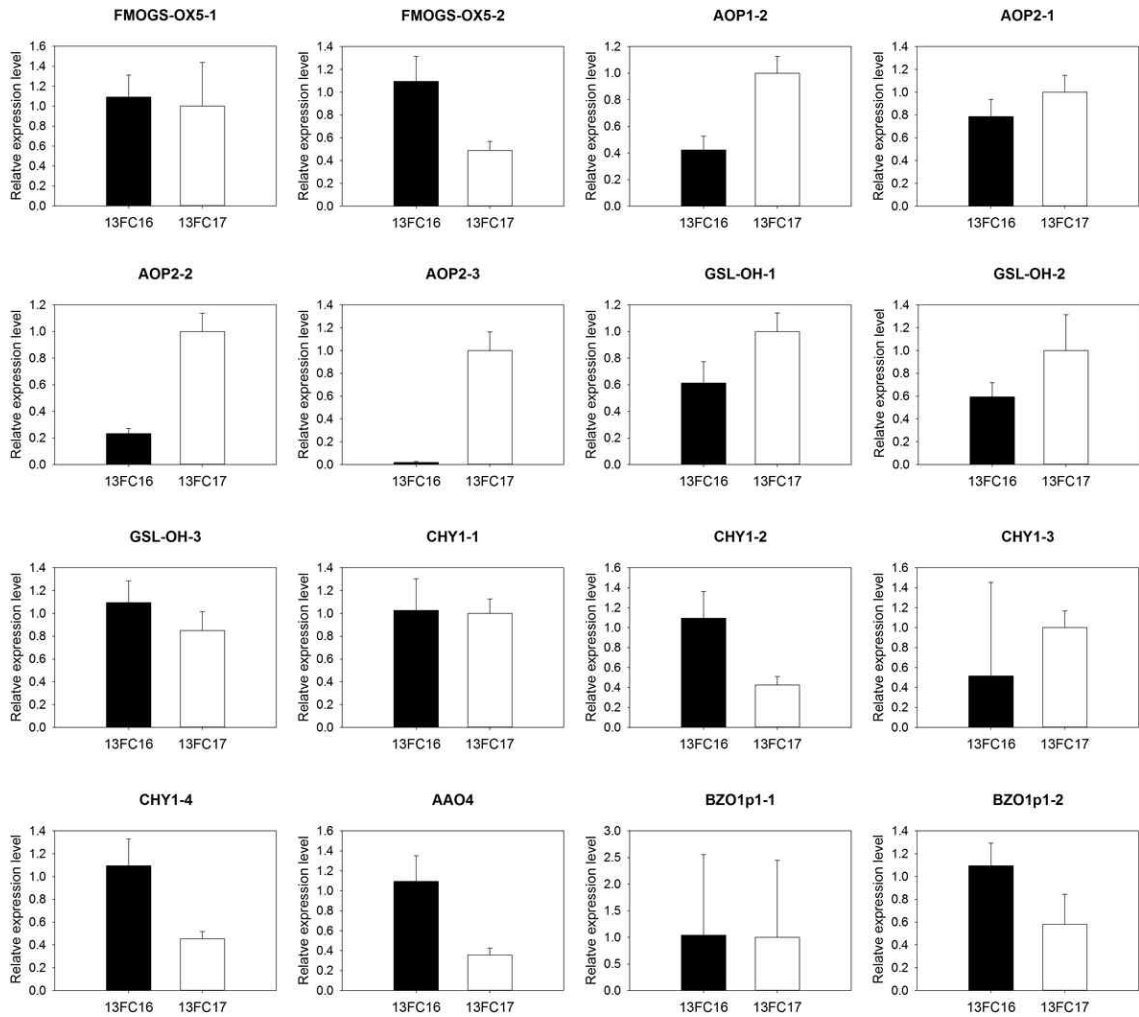


그림 9. 지방족 (aliphatic) 글루코시놀레이트 생합성 경로에서 secondary modification 합성 단계 (숫자는 primer 번호)

그림



### 10. 지방족 (aliphatic) 글루코시놀레이트 생합성 경로에서 secondary modification 합성을 조절하는 유전자의 발현 분석

13FC-16 계통에서 함량이 높았던 gluconapin과 glucobrassicinapin은 그림 9의 *AOP2*에 의해 만들어지는 대사산물이다. 하지만 오히려 *AOP2*의 발현은 13FC-17 계통에서 매우 높은 것을 확인할 수 있었다 (그림 9, 10). 반면 *FMO<sub>GS-OX5</sub>*의 경우는 *FMO<sub>GS-OX5-2</sub>*가 13FC-16 계통에서 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었고 그림 7에서 core glucosinolate structure 합성단계에서 *UGT74B1*이 매우 높게 발현하는 것으로 보아 *AOP2* 보다는 *UGT74B1*에 의해 gluconapin과 glucobrassicinapin의 합성이 조절되는 것으로 생각된다. 추후 *UGT74B1*에 의해 gluconapin과 glucobrassicinapin의 합성이 어떻게 조절되고 이 유전자의 발현 조절을 통해 어떻게 물질의 함량을 높일 수 있을지에 대해 연구할 예정이다.

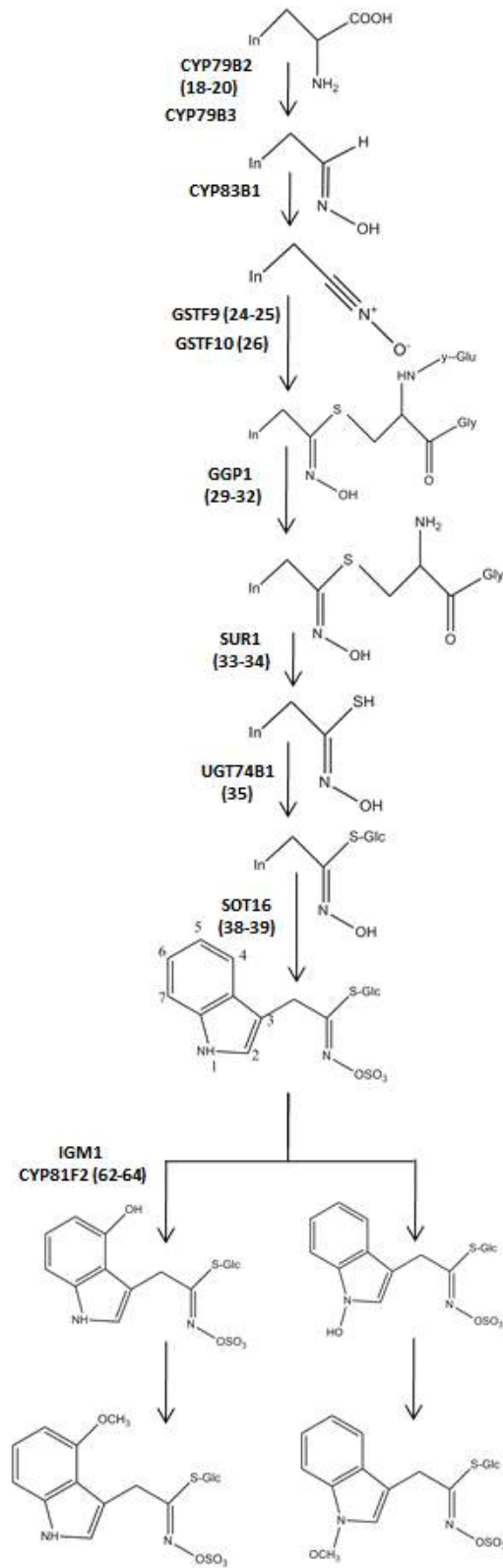


그림 11. 방향족 (indolic) 글루코시놀레이트 생합성 경로에서 core glucosinolate structure와 secondary modification 합성 단계 (숫자는 primer 번호)

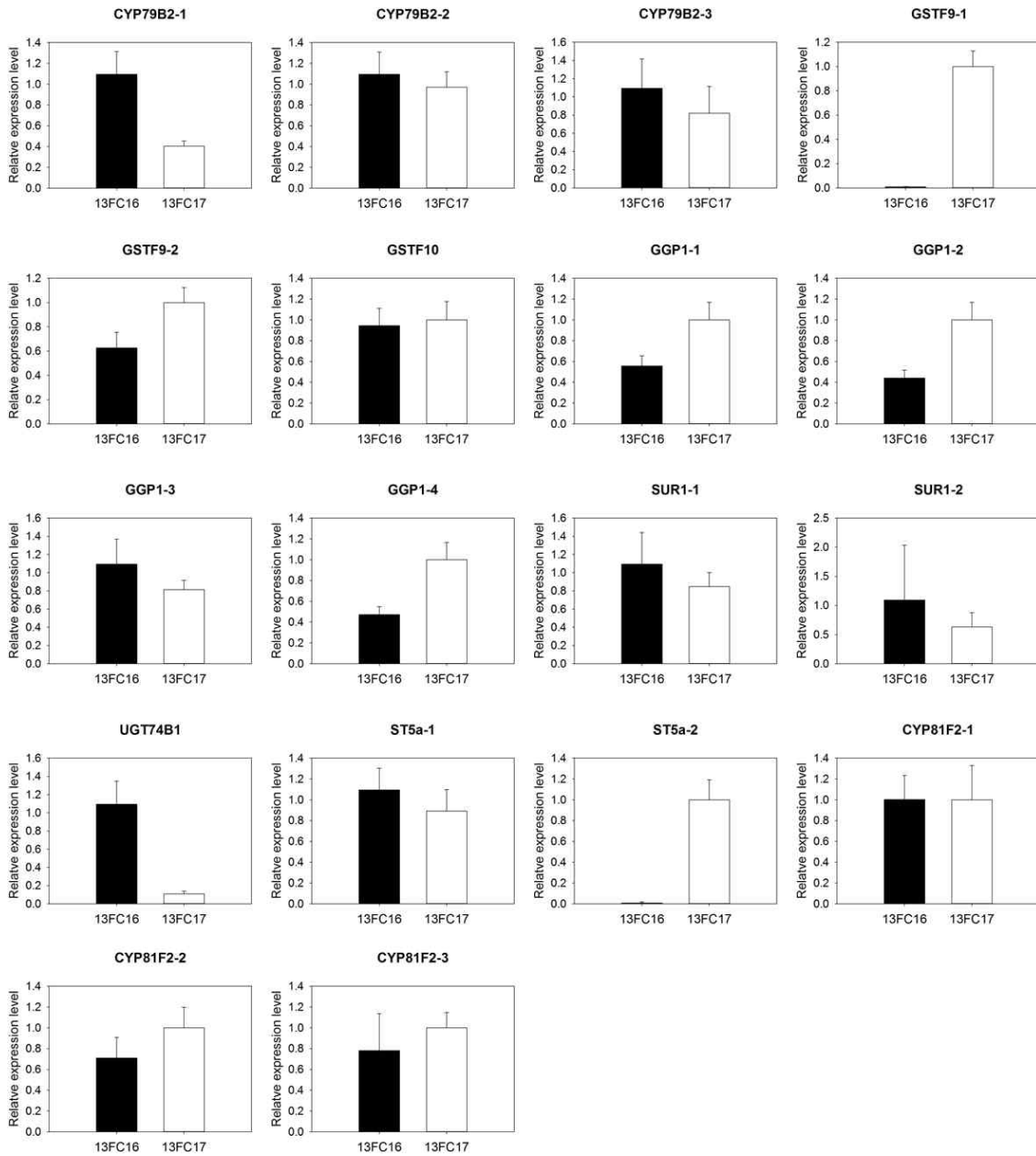


그림 12. 방향족 (indolic) 글루코시놀레이트 생합성 경로에서 core glucosinolate structure와 secondary modification 합성을 조절하는 유전자의 발현 분석

방향족 (indolic) 글루코시놀레이트의 경우 세 번에 걸친 물질 분석에서 13FC-16과 13FC-17 계통 간에 동일한 발현 양상을 보이지 않았다. 반면 유전자의 발현 분석에서는 *GSTF9-1*과 *ST5a-2*가 특히 13FC-17 계통에서 매우 강하게 발현하였고 *UGT74B1*의 경우 13FC-16 계통에서 매우 높게 발현하였다 (그림 11, 12). 이렇듯 일부 유전자의 발현이 두 계통 중 하나에서 높게 발현되는 양상을 보였지만 방향족 (indolic) 글루코시놀레이트의 합성을 조절하는 유전자 중 아직 식물에서 동정되지 못한 것이 많고 배추 내에 여러 개의 isoenzyme이 존재하기 때문에 이 유전자들의 복잡한 발현 조절에 의해 방향족 (indolic) 글루코시놀레이트의 발현 양상도 복잡하



계 나타난 것으로 보인다. 세 번에 걸친 물질 분석에서 두 계통 간에 방향족 (indolic) 글루코시놀레이트의 함량이 차이가 났지만 재현되지 못한 것은 이런 이유 때문인 것으로 보인다.

현재 이 연구결과를 토대로 13FC-16과 13FC-17 계통 간에 차이를 검출할 수 있는 바이오마커를 제작하는 실험을 수행하고 있다. 차세대 염기서열 분석 시스템을 활용하여 게놈 re-sequencing을 수행하고 알려진 글루코시놀레이트 합성 유전자와 이들의 유전자 발현을 조절하는 전사인자에서의 두 계통 간 염기서열 차이를 분석할 예정이다. 이를 통해 글루코시놀레이트의 함량과 연관된 바이오마커를 개발할 계획이다. 또한 두 계통을 교배하여 글루코시놀레이트의 함량 변이를 가진 F2 집단을 만들고 본 연구를 통해 개발한 마커를 적용하여 집단 간 글루코시놀레이트의 함량 변이와 일치하는 염기서열의 변이를 갖는 마커를 최종 선발할 계획이다.

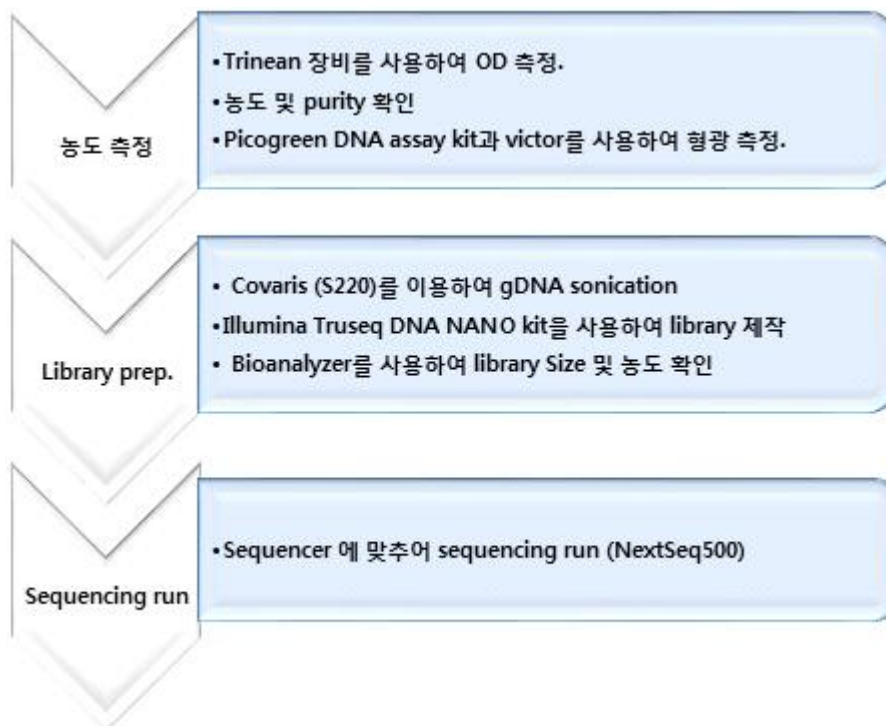
### 3. 3년차 연구 내용 및 결과

#### 가. 연구 방법

##### 1) Whole genome sequencing을 위한 라이브러리 준비

2차년도에 선별한 글루코시놀레이트 고함량군 13FC-16과 저함량군 13FC-17 계통의 게놈 시퀀싱 수행을 위한 모식도는 다음과 같다 (표 1).

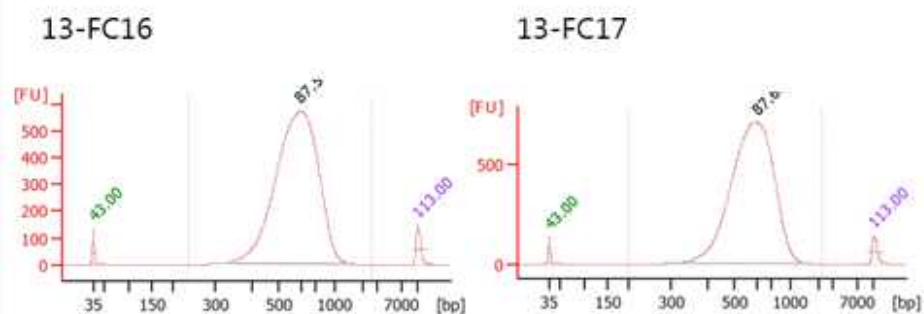
표 1. 라이브러리 제작 실험 과정 모식도.



13FC-16과 13FC-17 계통 200ng genomic DNA를 S220 Ultra sonicator (Covaris) (power 175 w, duty factor 5 %, 200 cycles per burst, treatment time 35 s)로 500 bp가 되게 절단한다. 라이브러리 제작은 Illumina TruSeq Nano DNA sample prep kit을 사용한다. Purification bead를 사용하여 정제한 genomic DNA를 30°C 에서 30분 동안 end-repair 후 500 bp 크기의 DNA만 선별한다. A-tailing 혼합 시약을 사용하여 37°C 에서 30분 동안 DNA 단편 3' 말단 부위에 'A' 뉴클레오타이드를 부착한 후 70°C 에서 5분동안 반응한다. 30°C 에서 10분동안 ligation 혼합 시약을 사용하여 DNA 절편에 adapter를 부착한다. Purification bead를 사용하여 두 번 정제한 후, adapter가 부착된 DNA 절편을 증폭하기 위해 95°C 에서 3분, 98°C 에서 20초, 60°C 에서 15초, 72°C 에서 30분을 8회 반복, 마지막으로 72°C 에서 5분동안 PCR을 수행한다. Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent)을 사용하여 라이브러리의 양질을 확인 후 CFX96 Real Time System (Biorad) qPCR을 사용하여 정량한 결과는 표 2와 같다.

표 2. 라이브러리 제작 결과와 전기영동 이미지

Sample ID.	Peak table			Region table				Adapter Index	Adapter Index Sequence	Volume (ul)
	Size (bp)	Conc. (pg /ul)	Molarity (pmol/l)	From(bp)	To(bp)	Average Size	Conc. (pg /ul)			
13-FC16	594	4,308	11	236	2618	606	4,647	AR002	GCCAAT	20
13-FC17	598	5,012	12,699	200	2273	605	5,418	AR004	CAGATC	20



NextSeq system (Illumina)을 사용하여 150 bp paired-end로 준비된 라이브러리를 시퀀싱한 결과는 표 3과 같다.

## 2) 대사체 및 전 전사체 분석을 통한 이차대사산물 관련 분자마커 개발

### 가) 식물 재료

권농 종묘로부터 '권농 카로틴' 녹색 배추와 '권농 붉은 3호' 붉은 배추를 분양받아 약 두달간 노지에서 재배하였다. 유전자 분석과 물질 함량의 변화를 분석하기 위해 결구 배추의 잎을 각각 샘플 채취하였다. 수확된 배추는 액체질소에 얼려 -80도에 저장하였다.

표 3. 라이브러리 시퀀싱 결과.

Lane			Raw data				Filtered data				
#	Sample	Barcode sequence	Clusters	% of the lane	% Perfect barcode	% One mismatch barcode	Clusters	Yield (Mbases)	% PF Clusters	% $\geq$ Q30 bases	Mean Quality Score
1	13FC16	CGATGT	16,971,603	13.83	97.08	2.92	16,971,603	5,125	100	76.58	31.62
1	13FC17	TGACCA	16,420,481	13.38	88.03	11.97	16,420,481	4,959	100	76.65	31.61
2	13FC16	CGATGT	16,658,591	13.83	96.76	3.24	16,658,591	5,031	100	76.13	31.52
2	13FC17	TGACCA	16,038,273	13.31	87.18	12.82	16,038,273	4,844	100	76.29	31.54
3	13FC16	CGATGT	17,161,402	13.92	97.34	2.66	17,161,402	5,183	100	76.54	31.62
3	13FC17	TGACCA	16,605,764	13.47	90.15	9.85	16,605,764	5,015	100	76.63	31.63
4	13FC16	CGATGT	16,817,152	13.93	97.13	2.87	16,817,152	5,079	100	76.71	31.66
4	13FC17	TGACCA	16,219,877	13.43	89.43	10.57	16,219,877	4,898	100	76.83	31.67

#### 나) 녹색 배추와 붉은 배추의 전 전사체 분석

녹색 배추와 붉은 배추의 전 전사체 분석은 분석 전문 회사인 LAS에 의뢰하였고 이를 간단히 요약하면 다음과 같다. Brassica database에서 제공한 배추 서열에 전처리 과정을 통과한 cleaned reads를 mapping하여 유전자가 발현되는 정도를 나타내는 발현값 (read count)을 측정하였다. Read mapping은 bowtie2 (v2.1.0) software (mismatch  $\leq$  2bp, penalty 방식으로 계산)를 사용하였으며, 발현값은 각 유전자에 mapping된 reads의 총 수로 계산하였다. RNA-seq 데이터는 샘플의 양에 따라 데이터 편차가 존재하기 때문에 샘플의 적절한 유전자 발현값을 계산하기 위해 총 발현량에 대한 normalization 보정을 수행하였고 normalization 방식은 R의 DESeq library를 사용하였다. 유전자의 서열비교를 위해 BLASTX (e-value  $\leq$  1e-10, identity  $\geq$  80) 프로그램을 이용하였다. 녹색 배추를 기준으로 하여 유의하게 발현되었다고 판단되는 유전자 (DEGs; Differentially Expressed Genes) 선별은 DESeq library에 포함된 방법론을 사용하여 분석 및 추출하였다. 추출 방법은 각 유전자의 raw read의 합이 100개 이상이 되는 유전자를 대상으로 녹색 배추와 붉은 배추 사이에 비율적으로 2배 이상 발현의 차이를 보이는 유전자를 선택하는 fold change 방법과, adjust P-value(FDR)이 0.01 이하를 만족하는 binomial test 방법을 동시에 사용하였다. 본 분석에서 앞의 기준을 만족하는 유전자 중에서 log2 fold change의 값이 1보다 크면 up-regulation, -1보다 작으면 down-regulation되었다고 판단하였다.

#### 다) 안토시아닌 함량 분석

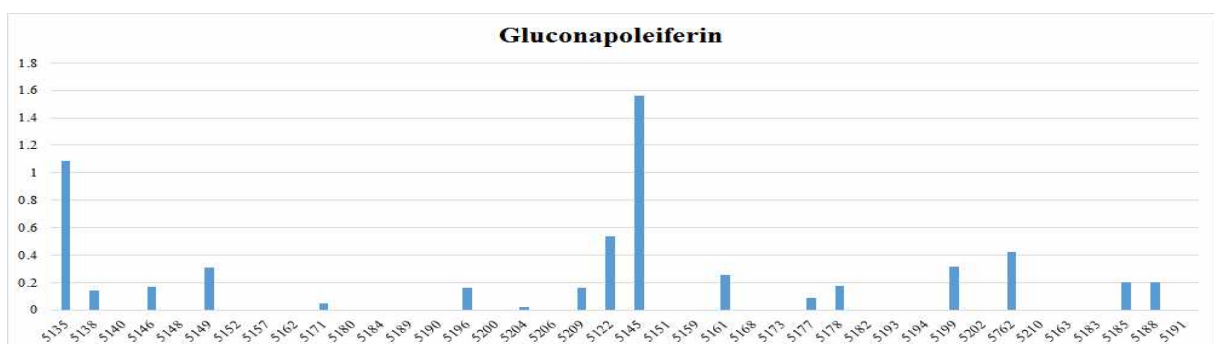
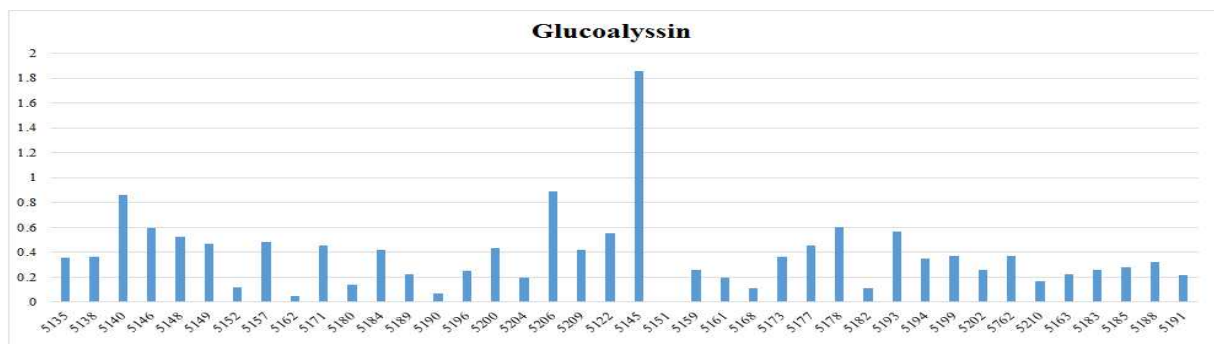
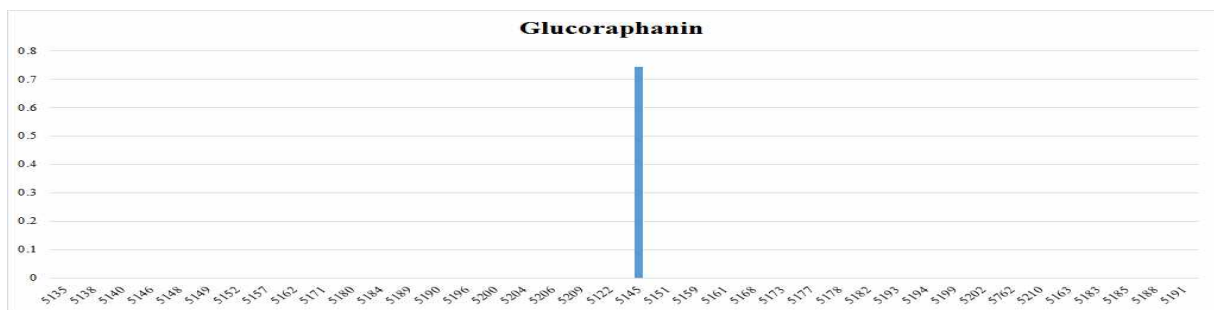
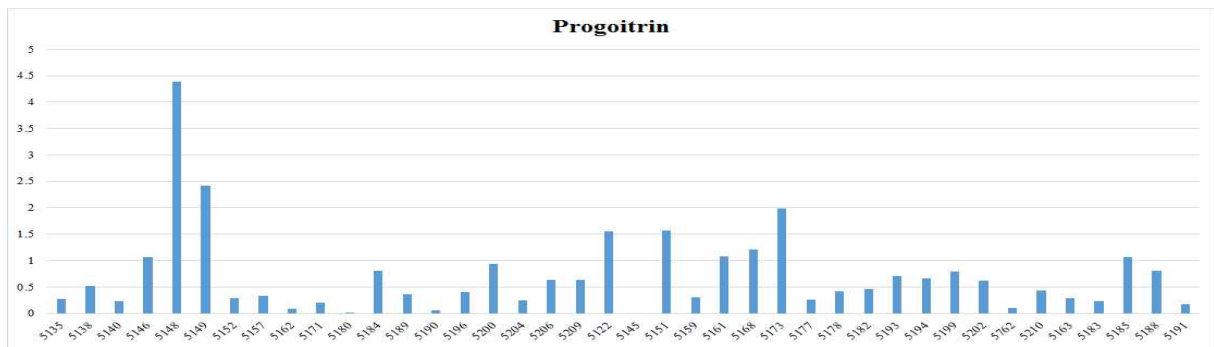
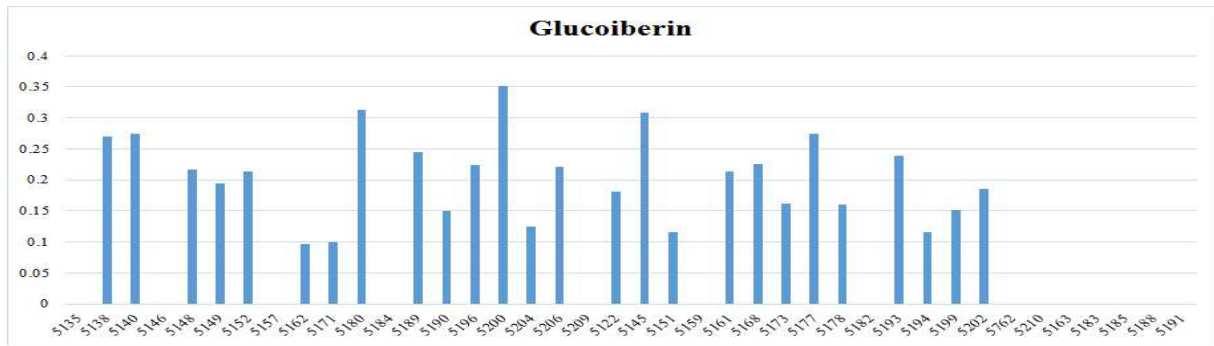
물과 포믹산이 혼합된 용액에 100mg 건조된 샘플을 넣은 후 20분동안 sonicator 상에서 반응하여 상층액만 분리한다. Agilent 1200 HPLC가 부착된 4000 Q-Trap LC-ESI-MS/MS system (Applied Biosystems)을 사용하여 HPLC 분석을 수행하였다. Security Guard Cartridges Kit AQ C18 column (Phenomenex, Torrance, CA, USA)이 장착된 CSynergi 4  $\mu$ m POLAR-RP 80A column (250  $\times$  4.6 mm, i.d., particle size 4  $\mu$ m; Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 사용하여 520 nm 파장에서 물질을 탐지한다.

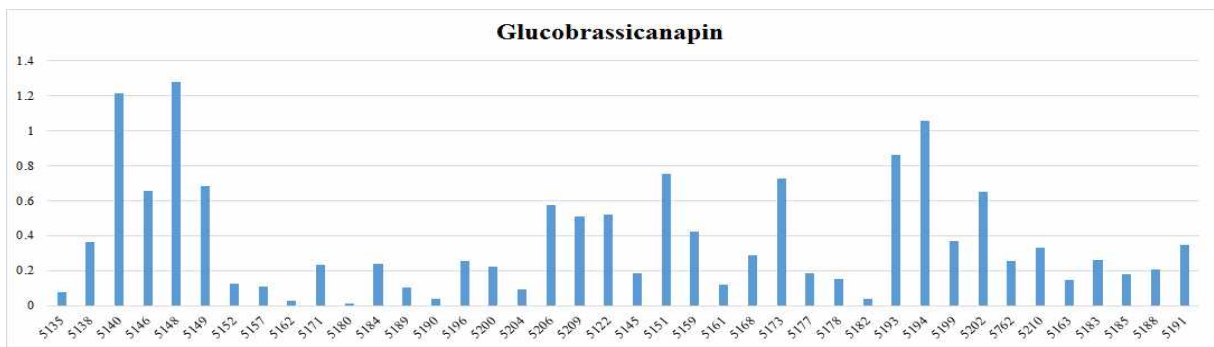
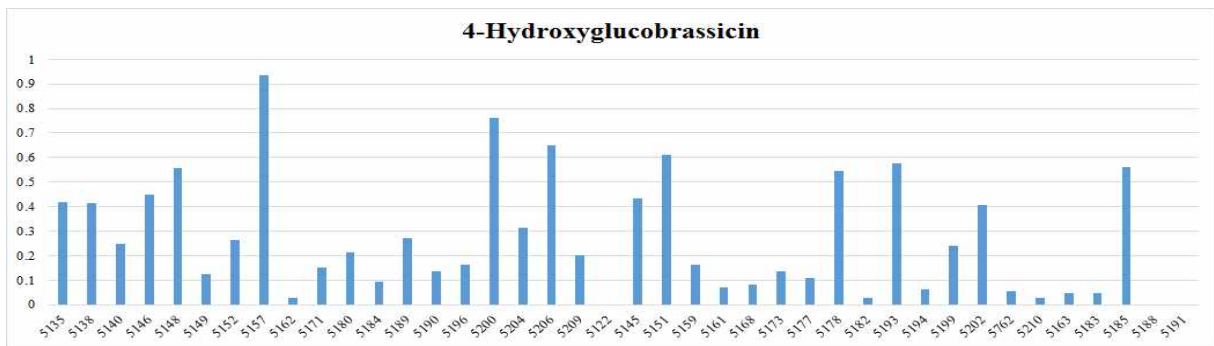
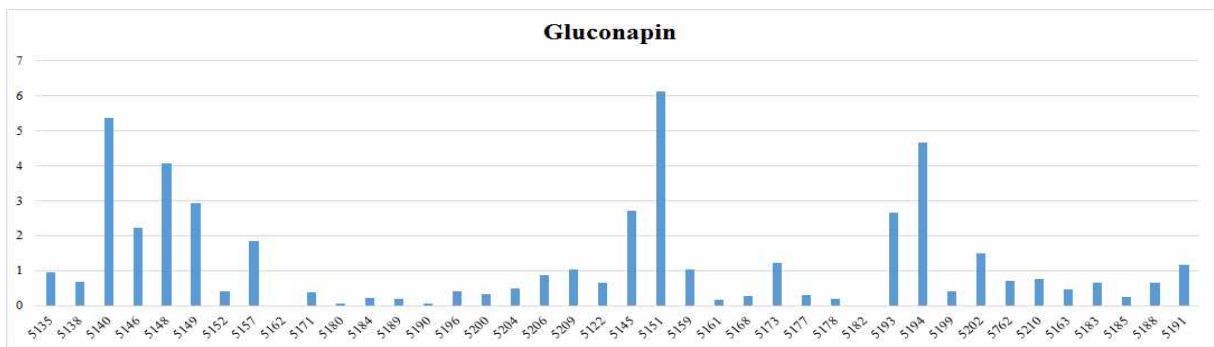
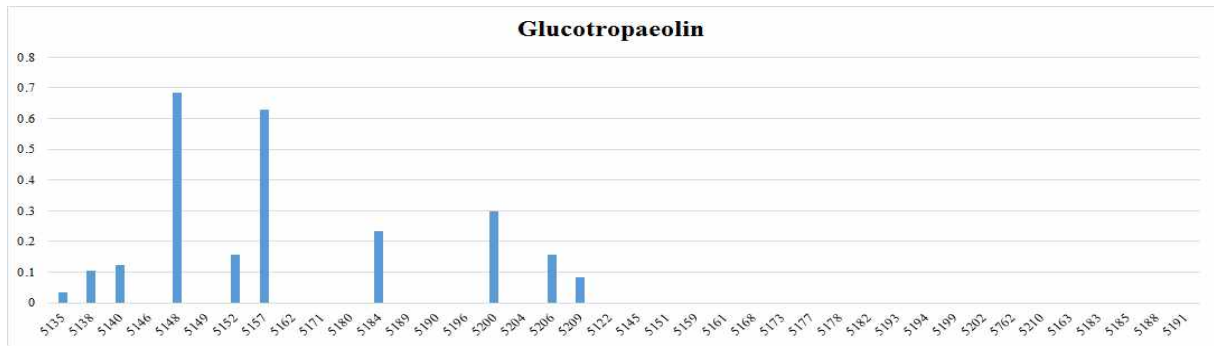
## 나. 연구결과

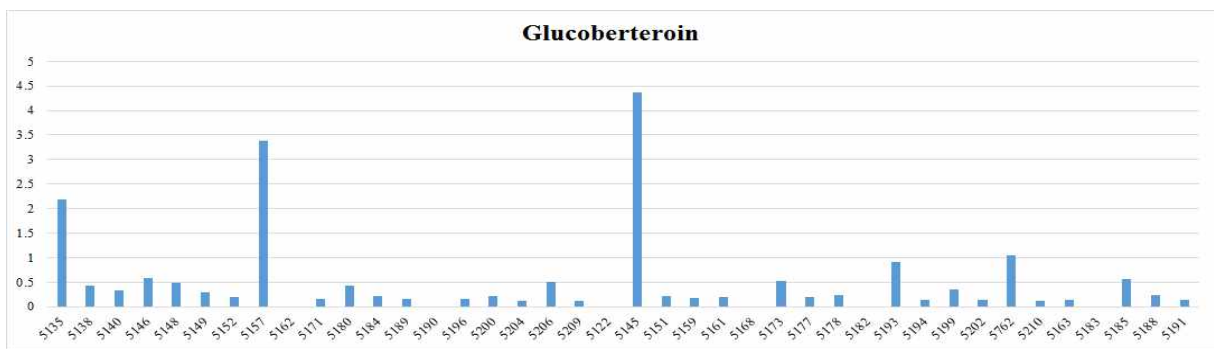
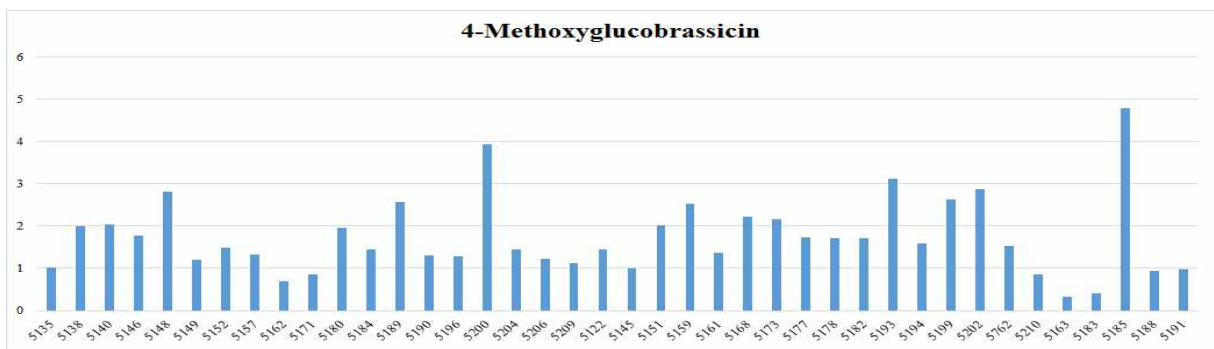
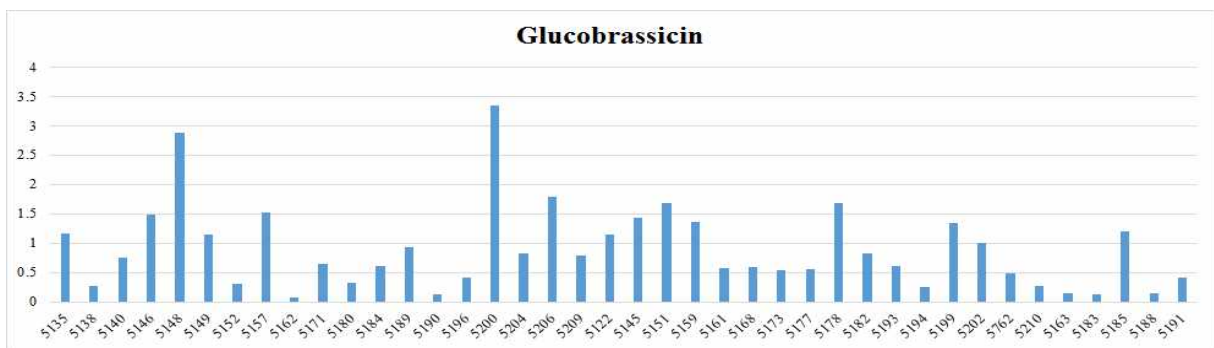
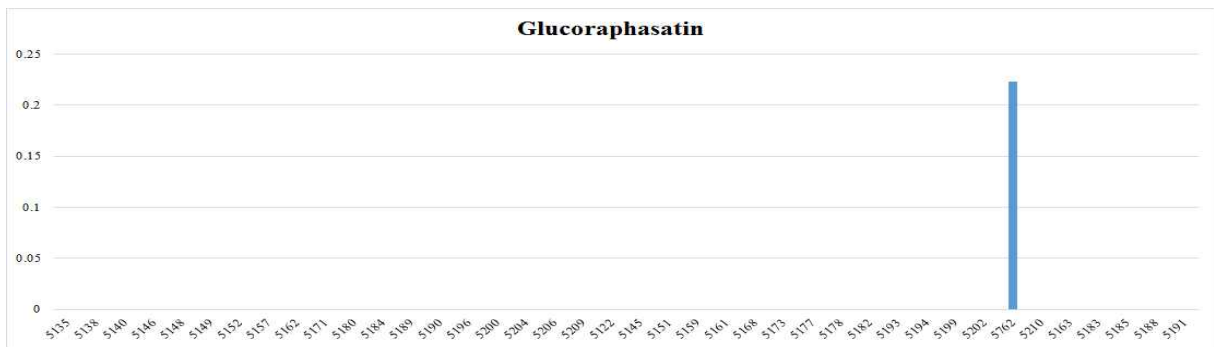
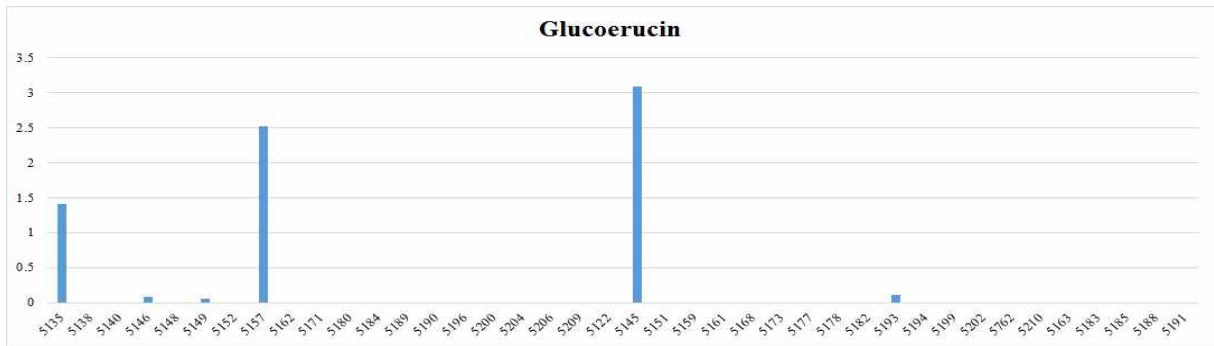
### 1) 글루코시놀레이트 추출

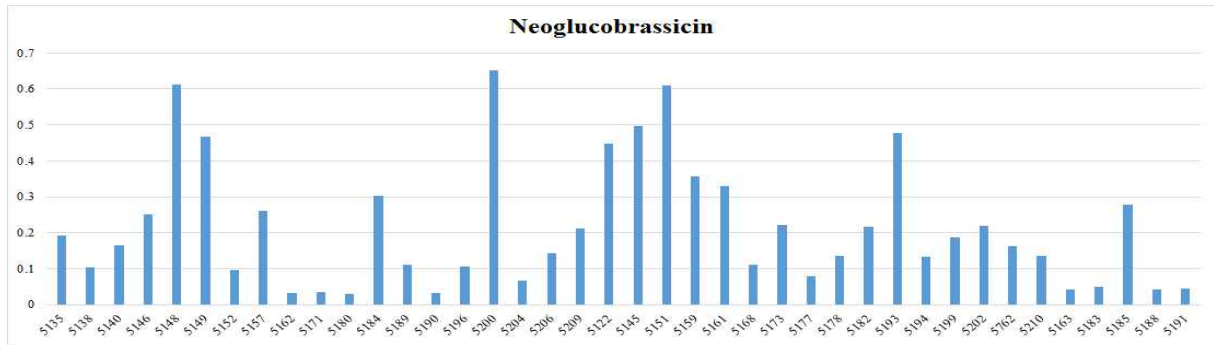
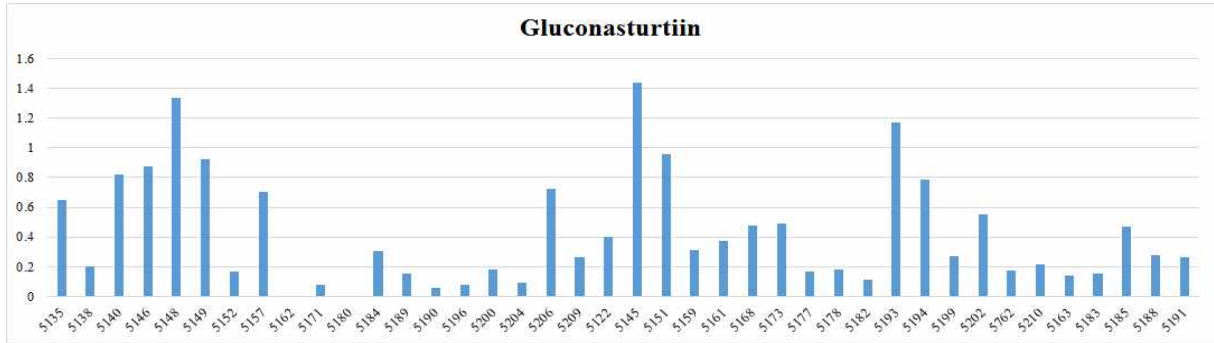
HPLC 분석을 통하여 40개 품종의 배추 내 글루코시놀레이트 분석결과 표준 물질인 sinigrin을 제외한 Glucoiberin, Progoitrin, Glucoraphanin, Glucoalyssin, Gluconapoleiferin, Glucotropaeolin, Gluconapin, 4-Hydroxyglucobrassicin, Glucobrassicinapin, Glucoerucin, Glucoraphasatin, Glucobrassicin, 4-Methoxyglucobrassicin, Glucoberteroin, Gluconasturtiin, Neoglucobrassicin을 포함하는 총 16 종의 글루코시놀레이트가 존재하는 것으로 밝혀졌다.

Glucobrassicinapin, 4-Methoxyglucobrassicin, Glucobrassicin, Neoglucobrassicin을 포함하는 4종의 글루코시놀레이트는 40개 품종 모두에 분포하며 품종 간 함량의 차이가 큰 것으로 나타났다. 특히, Glucobrassicin 와 Neoglucobrassicin은 5200 품종에서 최대값을 보였으며, Glucobrassicinapin, 4-Methoxyglucobrassicin의 경우 각각, 5148, 5185 품종에서 가장 높은 분포를 나타냄을 확인 할 수 있었다. Glucoalyssin은 5151 품종을 제외한 39 품종에서 분포하였으며 품종 5145에서 다른 품종들과 비교하여 상당히 높은 함량을 보였다. 반면에, Gluconapin 의 경우에는 5151 품종에서 가장 많이 함유되어 있는 것으로 밝혀졌다. 38개 품종에서 관찰된 Progoitrin, Gluconasturtiin은 각각 5148과 5145 품종에서 최대의 함량을 보였다. 5148의 경우 Gluconasturtiin의 함량 또한 2 번째로 높은 것으로 나타났으나, 5145의 경우 Progoitrin이 존재하지 않는 것으로 밝혀졌다. 4-Hydroxyglucobrassicin은 품종 5188, 5191, 5122를 제외한 나머지 37개 품종에서 존재하며 5157 품종에서 최대값을 나타냈다. 게다가, Glucobrassicin 와 Neoglucobrassicin에서 최대값을 나타낸 5200 품종에서도 매우 높은 함량을 보였다. Glucoberteroin, Gluconapoleiferin, Glucoerucin 은 각각 34개, 17개, 5개 품종에서만 분포하는 것으로 관찰되었으며, Glucoalyssin, Gluconasturtiin과 마찬가지로 5145 품종에서 최대값을 보였다. Glucoiberin은 26 품종에서만 존재하는 것으로 품종 5200 에서 함량이 가장 높았으나, 4-Methoxyglucobrassicin의 함량에서 최대값을 나타냈던 5185 품종에서는 해당 글루코시놀레이트가 존재하지 않는 것으로 나타났다. Glucobrassicinapin, Progoitrin와 동일한 결과로, Glucotropaeolin은 5148 품종에서 가장 높은 함량을 나타내었으며 오직 10 품종에서만 존재하는 것으로 관찰되었다. 특이적으로, Glucoraphanin과 Glucoraphasatin의 경우 오직 5145 품종과 5762 품종에서만 각각 관찰 되는 것으로 밝혀졌다. 40개 품종의 배추에서 16종의 글루코시놀레이트 분석 결과를 토대로 각 글루코시놀레이트 고함유 배추 육종 지원을 위한 실용적 분자표지 개발에 활용하고자 한다.









## 2) 글루코시놀레이트 관련 분자마커 후보군 개발

2차년도에 선별한 글루코시놀레이트 고함량군 13FC-16과 저함량군 13FC-17 계통 간에 차이를 검출할 수 있는 바이오 마커를 제작하고자 차세대 염기서열 분석 시스템을 활용하여 계놈 re-sequencing을 수행하고 이미 알려진 글루코시놀레이트 합성 유전자와 이들의 유전자 발현을 조절하는 전사인자에서 두 계통 간 염기서열 차이를 분석하였다. 먼저 단일 카피나 적은 카피 수 (copy number)를 갖는 좌위로부터 선별된 마커들이 유전학적 분석에 있어서 더 유용하기 때문에 우선 마커들의 불필요한 중복을 감소시키고자 reference 배추 계놈의 반복 지역을 마스킹하였다. 전체 서열 중 28,305,315bp (9.97%)가 repeat으로 N 마스킹되었다 (표 4).

표 4. 배추 지놈 시퀀스의 repeat 마스킹 결과

file name: Bra.genome.fasta  
 sequences: 40367  
 total length: 283841084 bp (273106717 bp excl N/X-runs)  
 GC level: 35.26 %  
 bases masked: 28305315 bp ( 9.97 %)

	number of	elements	length	occupied	percentage of sequence
Retroelements		21,612		15,090,463	5.32
SINEs:		1,789		210,609	0.07
Penelope		0		0	0.00
LINEs:		5,786		4,809,545	1.69
CRE/SLACS		0		0	0.00
L2/CR1/Rex		0		0	0.00



R1/LOA/Jockey	0	0	0.00
R2/R4/NeSL	0	0	0.00
RTE/Bov-B	0	0	0.00
L1/CIN4	5,520	4,784,123	1.69
LTR elements:	14,037	10,070,309	3.55
BEL/Pao	0	0	0.00
Ty1/Copia	6,289	6,081,771	2.14
Gypsy/DIRS1	6,994	3,779,077	1.33
Retroviral	0	0	0.00
DNA transposons	20,621	5,979,401	2.11
hobo-Activator	7,351	1,705,385	0.60
Tc1-IS630-Pogo	3,454	683,078	0.24
En-Spm	87	139,026	0.05
MuDR-IS905	0	0	0.00
PiggyBac	0	0	0.00
Tourist/Harbinger	2,309	1,016,991	0.36
Other (Mirage, P-element Transib)	0	0	0.00
Rolling-circles	0	0	0.00
Unclassified:	3,392	667,856	0.24
Total interspersed repeats:		21,737,720	7.66
Small RNA:	1,766	259,168	0.09
Satellites:	70	13,304	0.00
Simple repeats:	107,899	4,934,321	1.74
Low complexity:	28,909	1,536,900	0.54

글루코시놀레이트 관련 마커를 발굴하기 위해 글루코시놀레이트 고함량군 13FC16과 저함량군 13FC17 계통의 게놈을 읽었다. 13FC16 계통은 71배의 coverage를, 13FC17 계통은 69배의 coverage를 보였다 (표 5). Phred Quality 20 이상 trim 후 Raw read 대비 약 85% 정도 남았고 샘플 별 genome coverage는 13FC16 계통은 61배, 13FC17 계통은 58배의 coverage를 보였다 (표 6).

표 5. Raw read 정보

Sample	형질 glucoraphanin & gluconapin	Raw				Total Yield	Genome covarge X
		R1		R2			
		#Read	Yield	#Read	Yield		
13FC16	많음	67,608,748	10,208,920.9 48	67,608,748	10,208,920,948	20,417,841,896	71.93
13FC17	적음	65,284,395	9,857,943,64 5	65,284,395	9,857,943,645	19,715,887,290	69.46

표 6. Phred Quality 20 이상 read length 60bp 이상 preprocessing 결과

Sample	형질 glucoraphanin	Filtering
--------	---------------------	-----------

& gluconapin		R1		R2		Total Yield	Genome coverage X	Trim/Raw Yield
		#Read	Yield	#Read	Yield			
13FC16	많음	60,267,729	8,767,317,184	60,267,729	8,598,572,793	17,365,889,977	61.18	85.05%
13FC17	적음	58,055,840	8,421,785,531	58,055,840	8,277,394,932	16,699,180,463	58.83	84.70%

BWA 프로그램을 사용하여 repeat masking 된 reference genome 서열에 샘플 별로 Trimming 된 read를 가지고 mapping을 수행 후 (표 7) samtools, Picard, GATK 같은 tool을 이용하여 BAM file에서 potential SNP를 찾아내었다.

표 7. read mapping 후 chromosome당 read mapping 개수

Samples	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07
13FC16_S2	9,870,235	8,718,297	8,449,917	6,022,293	8,754,268	12,458,642	8,185,089
13FC17_S3	9,880,389	8,457,844	8,256,038	5,499,552	8,132,295	12,023,972	7,807,959

A08	A09	A10	Scaffolds	Total mapping read count	Trim reads count	% mapping
6,634,814	13,896,423	6,092,568	26,247,236	115,329,782	120,535,458	95.68%
6,223,231	13,625,541	5,982,564	24,953,445	110,842,830	116,111,680	95.46%

Calling variation 으로 얻어진 potential SNP 들이 모두 유전적으로 의미를 갖는 variation 이라고 보기는 어려우므로 이전 단계에서 얻어진 variation 정보를 이용한 filtering 을 통해 significant SNP 만을 추려내야 한다. 특별히 정해져 있는 기준이 없기 때문에 mapping 된 read 들의 depth, variation call rate (frequency) 등을 고려한 적정 기준을 세워 filtering 을 진행하였다. 일정 기준 이하의 frequency 를 갖는 SNP 들은 heterozygous 로 보고 filtering 해낸 후, homozygous SNP 만을 significant SNP 로 취하는데 frequency 가 높더라도 variation 이 일어난 위치에 mapping 된 read 의 수 (depth)가 너무 적은 경우엔 significant SNP 라고 보기 어렵기 때문에 filtering 한다. Depth 값을 살펴본 결과 13FC16 계통과 13FC17 계통 모두 적정한 depth 값을 가짐을 확인하였다 (그림 1).

13FC16 계통과 13FC17 계통 각각의 10개 chromosome상에서 read depth와 SNP 개수를 확인해 보았다. 중심선을 기준으로 위쪽으로 100은 reference에 대한 read depth를, 아래쪽으로 2000은 SNP 개수를 나타내고 있다. 빨간 실선은 높은 read depth와 SNP 개수를 나타내며 이들이 크게 겹치지 않는 것으로 보아 신뢰도 있는 결과임을 확인해 볼 수 있었다 (그림 2와 그림 3).

13FC16 계통과 13FC17 계통 VCF 파일의 genotype 차이를 보기 위하여 VCF 파일을 병합 후 영역별 SNP의 분포 및 관련 유전자의 검색을 위하여 annotation을 수행하였다. 13FC16 계통과 13FC17 계통에서 공통으로 나타난 SNP를 제외하고 13FC16 계통과 13FC17 계통은 intergenic 부분에서 각각 561159개와 543214개, 프로모터 1 kbp ~ 2 kbp에 해당하는 부분에서 각각

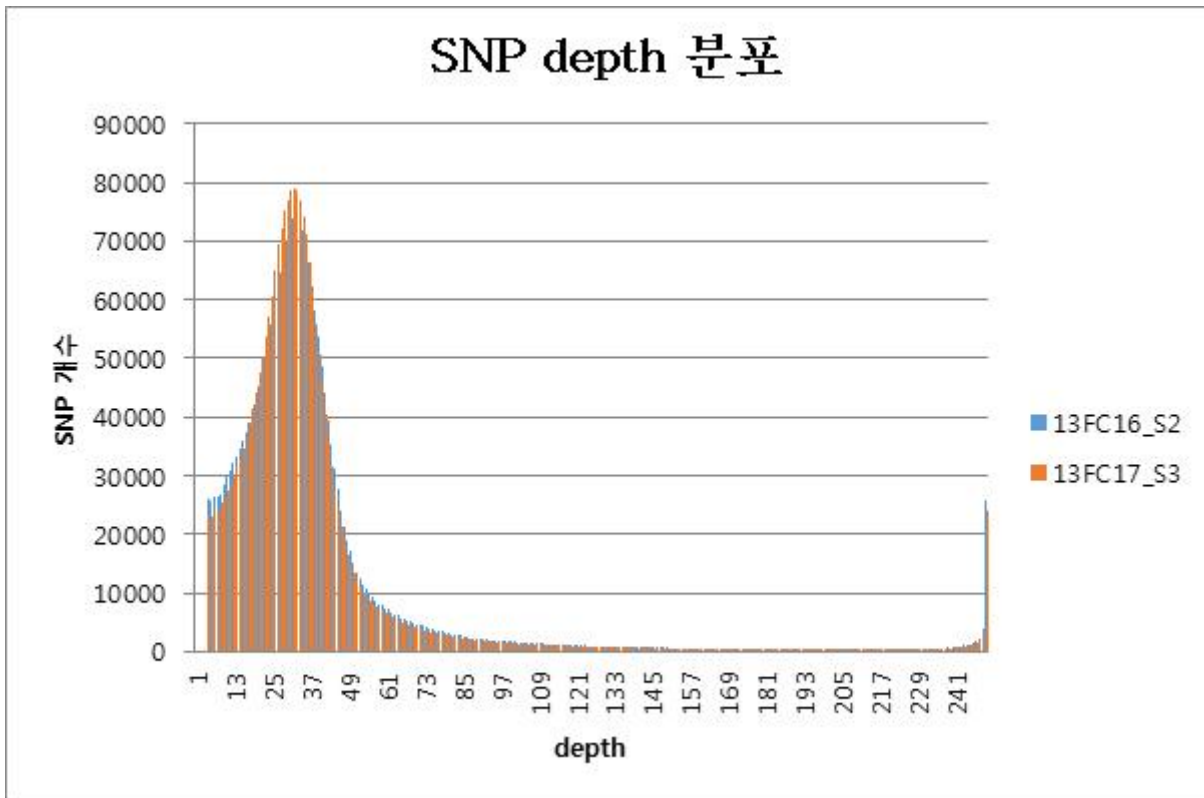


그림 1. SNP calling 중 최소 depth가 4이상만 calling 된 것을 SNP로 filtering

115806개와 112920개, 프로모터 1 bp ~ 1 kbp에 해당하는 부분에서 각각 180877개와 173629개, exon 부분에서 각각 243999개와 236962개, intron 부분에서 각각 196068개와 194035개 해당 유전자는 31612개와 30404개임을 확인할 수 있었다 (표 8).

Merge한 VCF 에서 13FC16\_S2, 13FC17\_S3 두 개의 샘플간 genotype이 다르고 SNP 중심 주변 부 양쪽으로 50~60bp 에 variant 가 없는 영역의 시퀀스 121bp 서열을 primer로 제작하였다. Blast 검색으로 genome 서열에서 유일하게 primer pair가 붙는 primer를 marker로 선별하고 글루코시놀레이트 관련 데이터 베이스는 모델식물체인 애기장대에서 나온 72개 유전자에서 *B.rapa* 및 phytozomeV10에 Blast검색과 Interproscan의 도메인 검색으로 *B.rapa* 유전자 329개를 매뉴얼 선별하였다. 선별된 primer를 *B.rapa* 글루코시놀레이트 관련 유전자 (329개) 영역에서 나오는 574개 primer 중 공통으로 나타난 69개 primer를 제외한 505개 primer를 선별하였다 (그림 4-6). 또한 전체 SNP와 Indel은 각 chromosome별로 정리하여 파일 저장하였다 (표 9). 이를 통해 글루코시놀레이트의 함량과 연관된 바이오마커를 개발중에 있으며, 본 연구를 통해 개발한 마커를 적용하여 집단 간 글루코시놀레이트의 함량 변이와 일치하는 염기서열의 변이를 갖는 마커를 최종 선별하고자 현재 두 계통을 교배하여 글루코시놀레이트의 함량 변이를 가진 F2 집단을 만들고 있는 중이다.

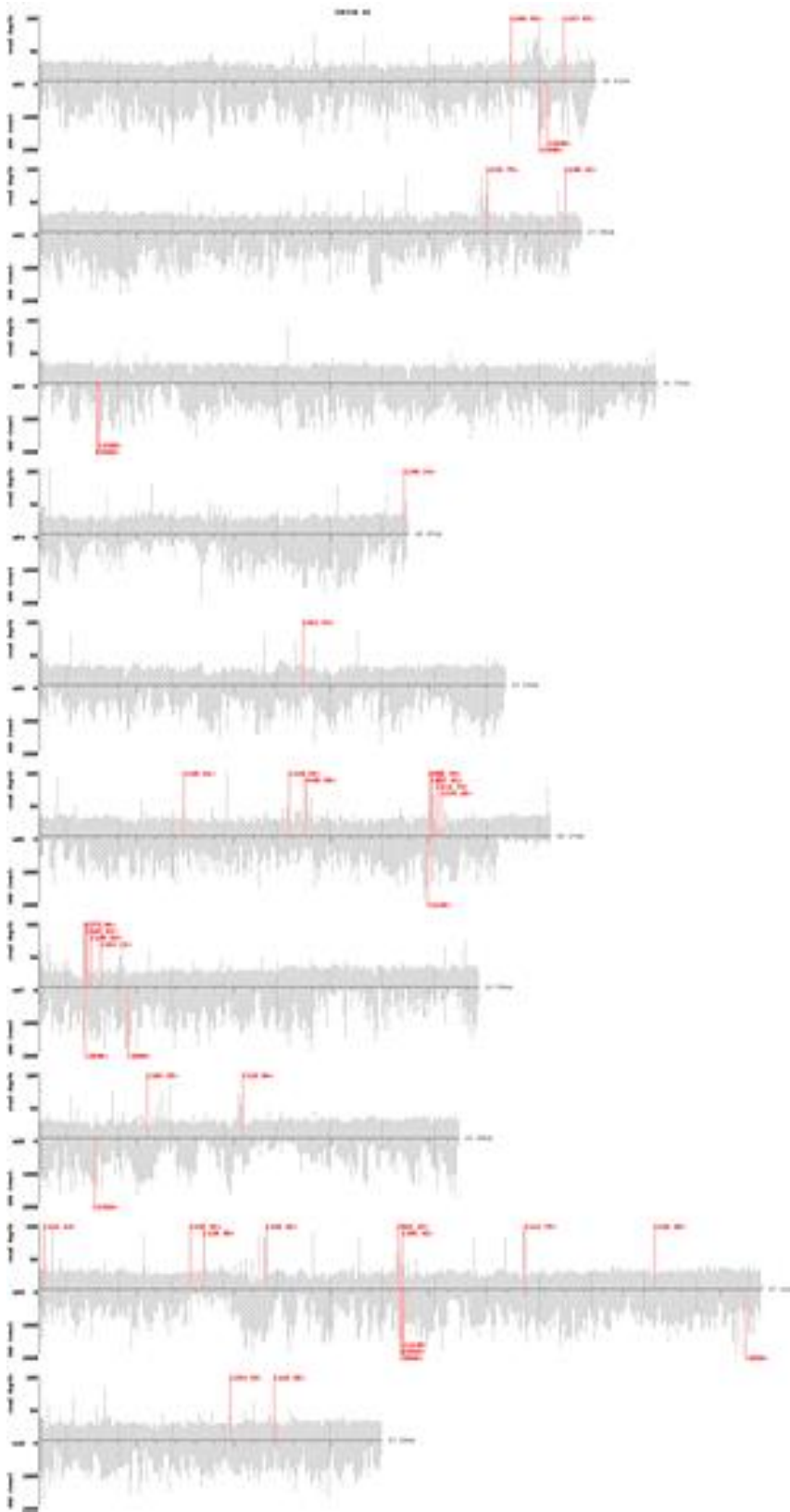


그림 2. 13FC16\_S2의 read depth 및 count plot

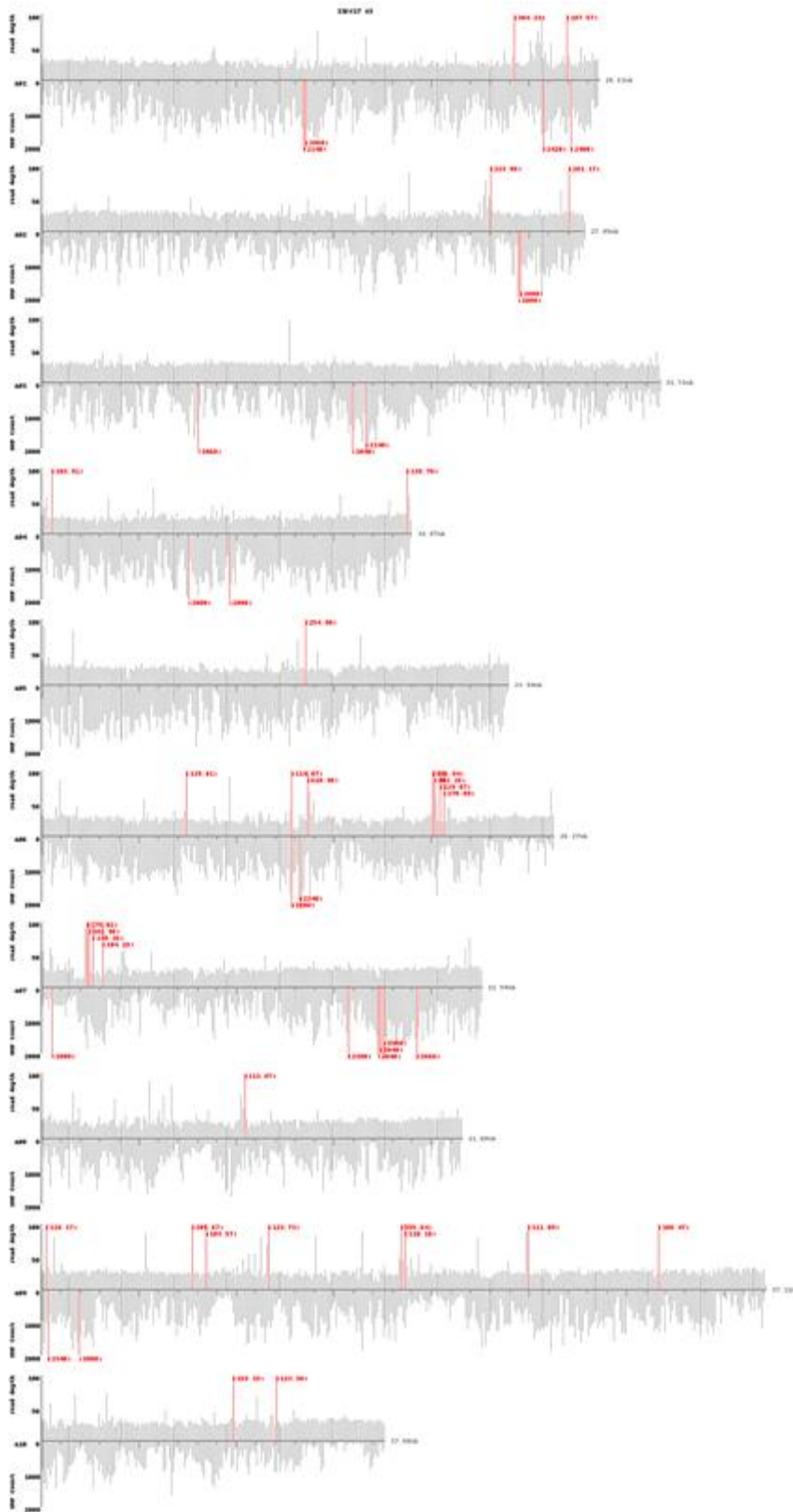


그림 3. 13FC17\_S3의 read depth 및 count plot

표 8. 각 영역별 SNP 개수 분포

	SNP 의 전체 데이터		
	13FC16_S2	공통	13FC17_S3
intergenic	561,159	545,164	543,214
up2kb	115,806	95,023	112,920
up1kb	180,877	141,125	173,629
exon	243,999	213,657	236,962
intron	196,068	157,858	194,035
Include Genes	31,612	29,950	30,404

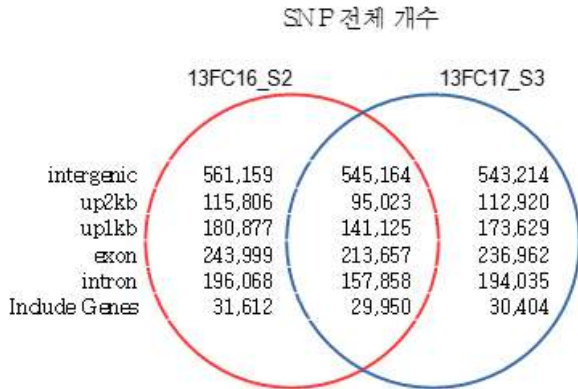


그림 4. 13FC16과 13FC17에서 확인된 전체 SNP 개수

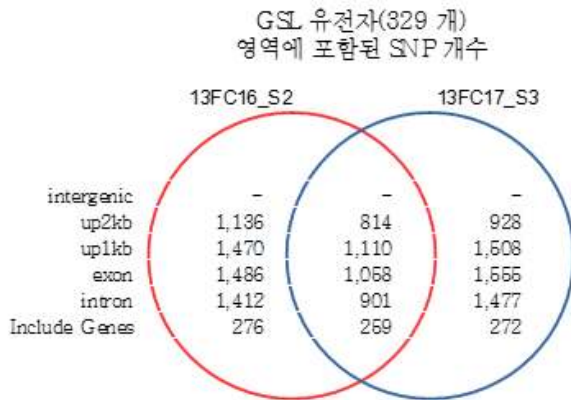


그림 5. 13FC16과 13FC17에서 확인된 글루코시놀레이트 유전자 관련 SNP 개수

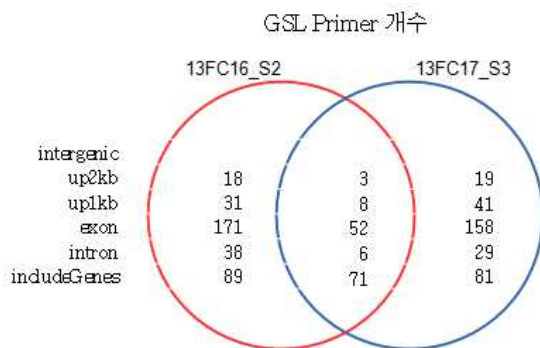


그림 6. 13FC16과 13FC17에서 확인된 글루코시놀레이트 유전자 관련 primer 개수

표 9. 각 Chromosome 별 SNP, InDel, Primer 개수

Chrom	SNP	InDel	No. primer
A01	425,691	65,766	12,116
A02	346,891	58,276	9,888
A03	375,359	66,634	12,080
A04	280,552	45,372	7,640
A05	330,814	51,603	9,578
A06	344,374	55,911	9,975
A07	312,737	51,600	9,195
A08	253,366	37,535	6,990
A09	509,777	79,968	14,404
A10	211,594	34,513	7,180
Scaffold	323,907	21,224	250
Total	3,715,062	568,402	99,296

2) 대사체 및 전 전사체 분석을 통한 이차대사산물 관련 분자마커 개발

권농종묘를 통해 분양받은 잎의 색이 붉은 배추 품종을 대상으로 배추의 고기능성 물질을 분석 후 물질 합성과 관련된 유전자를 분리하고 관련 분자마커를 발굴하고자 하였다. 대조군으로는 일반적으로 많이 재배되는 권농카로틴 녹색배추를 사용하였다. 버미쿨라이트에 파종한 배추 종자를 노지 재배하여 출아 후 두달째에 샘플을 채취하여 RNA 추출 후 차세대 염기서열 분석 장비인 illumina sequencer를 이용하여 분석을 수행하였다. 시퀀싱된 녹색 배추와 붉은 배추의 short read를 이용하여 RPKM 분석을 통해 유전자 발현양을 비교 하였고 발현에 유의한 차이를 보이는 유전자를 선별하고 그것의 기능을 분석하기 위해 annotation, Functional Category(GO)를 수행하였다. 녹색배추와 붉은 배추의 DEG 분석 후 플라보노이드 및 안토시아닌 관련 유전자의 발현이 붉은 배추에서 유의하게 증가된 것을 확인할 수 있었다 (표 10). 특히 안토시아닌과 프로안토시아닌 전사 인자 중 하나인 *TRANSPARENT TESTA 8 (TT8)*의 발현이 녹색 배추에 비해 붉은 배추에서 38배 이상 증가하였고 이 전사인자에 의해 조절을 받는 *ANTHOCYANIN SYNTHASE (ANS)*와 *DIHYDROFLAVONOL REDUCTASE (DFR)*의 발현 또한 녹색 배추에 비해 붉은 배추에서 각각 354배, 718배 증가하였다.

표 10. 녹색 배추와 붉은 배추상의 플라보노이드 관련 유전자 발현

gene	Green	Red	log2(fold_change)	p_value	TAIR ID	BLAST e-value	Gene
Bra039362	5.39558	39.3498	2.86651	0.04715	AT3G55120.1	6.00E-24	CHI
Bra031290	6.16553	50.1794	3.0248	5.00E-05	AT3G21560.1	0	UGT84A2
Bra022803	11.38	139.375	3.61439	5.00E-05	AT2G30490.1	0	C4H
Bra004109	2.88113	46.0099	3.99724	5.00E-05	AT1G65060.1	0	4CL3
Bra007142	9.32743	198.235	4.40959	5.00E-05	AT3G55120.1	2.00E-113	CHI

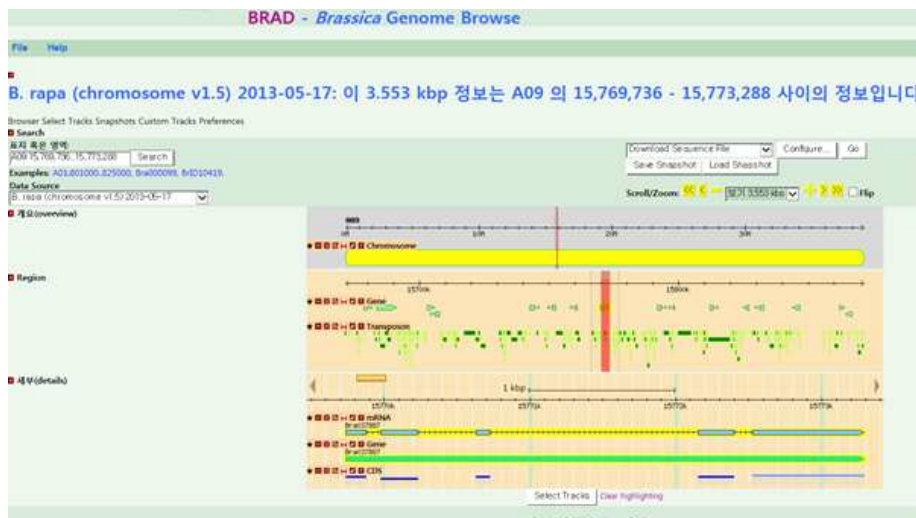
Bra036828	13.5737	321.031	4.56382	5.00E-05	AT3G51240.1	0	F3H
Bra013652	1.14707	390.912	8.41274	0.00195	AT4G22880.2	0	ANS
Bra027457	0.879524	625.811	9.47479	0.0037	AT5G42800.1	0	DFR
Bra037887	1.18907	45.3957	5.25466	0.00075	AT4G09820.1	0	TT8

유전자의 발현에 따른 안토시아닌 물질 변화를 분석하고자 HPLC-TOF-MS 분석을 이용하여 녹색 배추와 붉은 배추의 안토시아닌 함량을 분석하였다. 분석 결과 녹색 배추에서는 안토시아닌이 검출되지 않았지만 붉은 배추에서는 cyanidin 3-diglucoside-5-glucoside를 기본구조로 *p*-coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid, sinapic acid와 같은 아실기가 붙은 18 종류의 안토시아닌이 검출되었고 이들이 총 함량은 3.42mg/g이었다 (표 11).

표 11. 붉은 배추의 안토시아닌 함량

No. <sup>*)</sup>	Trivial names	Total
1	Cyanidin 3-diglucoside-5-glucoside	0.09±0.01
2	Cyanidin 3-diglucoside-5-(malonyl)glucoside	0.23±0.05
3	Cyanidin 3-(feruloyl)diglucoside-5-glucoside	0.01±0.00
4	Cyanidin 3-(glycopyranosyl-sinapoyl)diglucoside-5-glucoside	0.00±0.00
5	Cyanidin 3-(feruloyl)diglucoside-5-(malonyl)glucoside	0.02±0.00
6	Cyanidin 3-(caffeoyl)diglucoside-5-glucoside	0.01±0.01
7	Cyanidin 3-(caffeoyl)diglucoside-5-(malonyl)glucoside	0.18±0.03
8	Cyanidin 3-( <i>p</i> -coumaroyl)diglucoside-5-glucoside	0.06±0.00
9	Cyanidin 3-(feruloyl)diglucoside-5-glucoside	0.15±0.01
10	Pelargonidin 3-(caffeoyl)diglucoside-5-(malonyl)glucoside	0.41±0.08
11	Unknown	0.09±0.02
12	Cyanidin 3-(feruloyl)diglucoside-5-(malonyl)glucoside	1.24±0.22
13	Cyanidin 3-(feruloyl)(feruloyl)diglucoside-5-glucoside	0.03±0.00
14	Unknown	0.06±0.01
15	Cyanidin 3-O-( <i>p</i> -coumaroyl)(sinapoyl)diglucoside-5-O-(malonyl)glucoside	0.17±0.02
16	Cyanidin 3-O-[2-O-(2-O-(sinapoyl)xylyloxy)-6-O-( <i>p</i> -coumaroyl)glucoside]-5-O-[6-O-(malonyl)glucoside]	0.06±0.01
17	Cyanidin 3-O-(sinapoyl)(feruloyl)diglucoside-5-O-(malonyl)glucoside	0.39±0.04
18	Cyanidin 3-O-( <i>p</i> -coumaroyl)(sinapoyl)diglucoside-5-O-(malonyl)glucoside	0.22±0.02
Total		3.42±0.47

녹색 배추와 붉은 배추 TT8의 유전자 특징 및 차이점을 살펴보고자 Brassica database (<http://brassicadb.org/brad/index.php>)에서 해당 유전자에 대한 정보와 유전자 염기서열에 대한 정보를 획득 후 각 배추 샘플에서 추출한 RNA를 cDNA로 전환 후 해당 유전자를 클로닝하였다 (그림 7).





>Bra037887 (TT8)

```
ATGGATGAATTAAGTATTATACCGTTATGGAAAGTGATCGGGGCTGAGAAAGAAGAGATTCAAGG
GCTACTTAAGGCGGTGGTGAATCTGTGGGGTGGACTTATAGTGTCTTCTGGCAACTTTGTCCTCA
ACGAAGGAAATTGATGTGGAGTAGTGGATACTACAACGGCGCAATAAAGACTAGAAAGACAACCTCA
GCCGGCGGAAGTTACGGCTGAAGAGGCTGCGTCGGAGAGAAGCCAACAGCTCATGGAGCTTTACG
AGACGCTTTTTGCTGGAGAATCATCGATGGAAGCGAGGGCTTGCACAGCACTGTCGCCGGAGGATT
TGACAGATCCTGAATGGTTTTATGTGCTGTGTTTCACTTACTCTTTTCGAACCTCCTTCTGGGATGCC
AGGAAAAGCGTATGCGAGGAGGAAGCACATATGGCTACGTGGTGCAAATGAGGTTGACAATAAAA
TCTTCTCTAGGGCTATTTCTGCAAAGGTCAAAGAGAGTGAAGAGTTTGTGAGCACATAAAGAGTT
TCTTCCACAACCACCCGAAGTCAAACACTAAGCCTACTCTTTCTGAACACTTCATCAACGAAGAGCA
CGAAGAAGACGAAGAAGAAGTAGAAGAAGAAGAAATGACAATGTCAGAAGAGATAAGACTTGGTT
CTCCTGATGACGATGACGTCTCCAATCAAAATCTACTCTCTGATTTCCATATAGAAGCAACCAATAG
TTTAGATACACACATGGACATGATGAATCTAATGGAGGAAGGCGGAAATTATTCTCAGACAGTATC
AACACTTCTATGTCACAACCCACAAGTCTTCTTTCAGATTCAGTTTCCACATCTTCTTACGTTCAAT
CATCGTTTTGTCTCGTGGAGAGTTGAGAATGTCAAAGAGCATCAGCAATATCAGCGAGTGGAGAAAG
CGGCGTGGTCATCGTCGCAATGGATGCTCAAACACATAATCTTGAAAGTTCCTTTCCTCCACGACA
ACACTAAAATAAGAGGCTACCGCGAGAAGAGCTTAACCATGTGGTGGCCGAGCGACGCAGAAGA
GAGAAGCTAAATGAGAGATTCATAACGTTGAGATCATTGGTTCCATTTGTGACCAAGATGGATAAA
GTCTCGATCCTTGGAGACACCATTGAATACGTAAACCATCTTTCTAAGAGGATACATGAGCTGGAA
TCTACTCATCACGAGCCAAACCAAAAAGCGGATGCGTATCGGTAAGGGAAGAACTTGGGAAGAGGTG
GAGGTTTCCATTATAGAGAGCGATGTTTTGTTAGAGATGAGATGCGAGTACCGAGATGGTTTATTG
CTCAACATTCTTCAGGTACTTAAGGAGCTGGGTATAGAGACCACTGCGGTTCACACTGCCTTGAAC
GACAATCATTTTGAGGCAGAGATAAGGGCGAAAGTGAGAGGGAAGAAACCAACCATTGCTGAGGT
TAAAATAGCCATCCATCAAATCATATATAATAATAAACTCTAG
```

그림 7. 배추 TT8 유전자 구조 및 염기서열

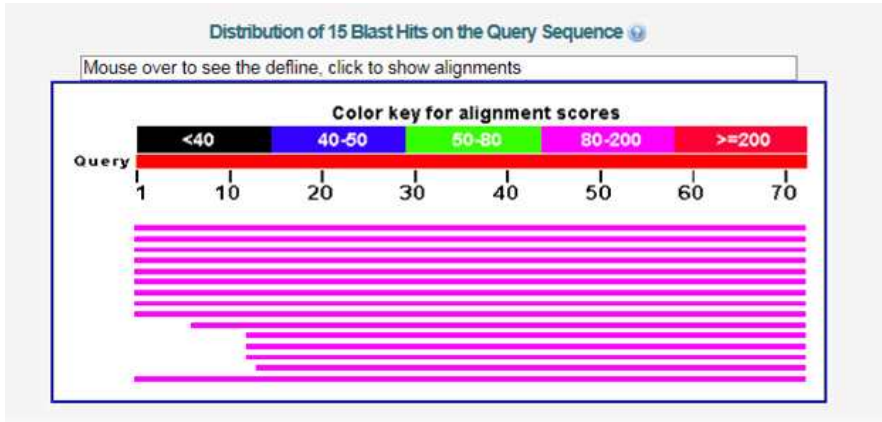
녹색 배추와 붉은 배추 각각의 *TT8* 유전자를 클로닝한 결과 붉은 배추 염기서열 486 bp와 558 bp 사이에서 녹색 배추에는 존재하지 않는 72 bp의 염기서열을 확인하였다 (그림 8). BLAST 검색을 통해 붉은 배추에서 보인 72bp 또한 *TT8* 유전자의 일부분이며 (그림 9) 이를 통해 배추에 여러 isoform이 존재함을 짐작해 볼 수 있었다.

붉은 배추에만 존재하는 72 bp 염기서열이 InDel 분자마커로 작동할 수 있는지 규명하기 위해 해당 염기서열을 포함한 주변 부위에서 primer를 제작 후 녹색 배추와 붉은 배추의 genomic DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다 (그림 10). 녹색 배추는 147 bp, 붉은 배추는 72 bp가

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	
TT8	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
Green	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
Consensus	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
TT8	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	
Green	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
Consensus	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
TT8	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	
Green	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
Consensus	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
TT8	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	
Green	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
Consensus	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
TT8	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	
Green	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
Consensus	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
TT8	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780	
Green	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
Consensus	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
TT8	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910	
Green	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
Consensus	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
TT8	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	
Green	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
Consensus	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
TT8	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	
Green	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
Consensus	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
TT8	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	
Green	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
Consensus	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
TT8	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	
Green	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
Consensus	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
TT8	1431	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560	
Green	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														
Consensus	ATGAGTAAATTTAGATTTATTTACTTTATGAGGATGATTCAGGCTGGAGAGAGAGATTCAGAGGCTTCTTAGAGGCTGGATGATCTGATGGAGAGATTTATTTACTTTCTGGACATTTCTCTC														

그림 8. 녹색배추 (위)와 붉은 배추 (아래)의 TT8

더해진 219 bp PCR 결과물을 예상하였으나 예상과 다르게 녹색 배추와 붉은 배추 모두 147 bp의 같은 크기의 PCR 결과물을 확인할 수 있었다. 클로닝 결과와 달리 genomic DNA를 주형으로 사용하였을 때 두 배추간에 염기서열 차이가 없는 것은 앞서 예측하다시다 다른 TT8 isoform이 존재할 가능성이 있거나 전사 과정 중 modification에 의한 현상일 것으로 추정되고 현재 원인 규명중에 있다.



Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

Alignments @ Download - GenBank - GenBank Database of results

	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Brassica napus transcription factor TT8-like (LOC106380955), mRNA</a>	134	134	100%	2e-28	100%	NM_001315974.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Brassica oleracea var. oleracea transcription factor TT8 (LOC106316105), mRNA</a>	134	134	100%	2e-28	100%	XM_017253974.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Brassica rapa cultivar Zi He bHLH transcription factor (TT8) mRNA, complete cds</a>	134	134	100%	2e-28	100%	KM403452.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Brassica rapa transcription factor TT8 (LOC103838877), mRNA</a>	134	134	100%	2e-28	100%	XM_006115326.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Brassica rapa subsp. rapa cultivar Tsuda transparent testa II (TT8) mRNA, complete cds</a>	134	134	100%	2e-28	100%	HQ337791.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Brassica napus bHLH DNA-binding domain transcription factor (TT8.1) mRNA, complete cds</a>	134	134	100%	2e-28	100%	EU192027.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">PREDICTED: Brassica napus transcription factor TT8-like (LOC106386676), mRNA</a>	128	128	100%	9e-27	99%	XM_013834366.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Brassica juncea TT8 mRNA, complete cds</a>	128	128	100%	9e-27	99%	KJ942581.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Raphanus sativus var. niger transcription factor TT8 (TT8) mRNA, partial cds</a>	128	128	100%	9e-27	99%	JN625953.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Brassica rapa cultivar Chifu bHLH DNA binding domain transcription factor BraA-TT8 (TT8) gene, complete cds</a>	117	117	91%	2e-23	98%	GU255868.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Brassica oleracea cultivar C10 bHLH DNA binding domain transcription factor BoC-TT8 (TT8) gene, complete cds</a>	111	111	83%	9e-22	100%	GU255867.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Brassica napus cultivar Darmor-92b bHLH DNA binding domain transcription factor BraC-TT8 (TT8) gene, complete cds</a>	111	111	83%	9e-22	100%	GU255865.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Brassica oleracea var. botrytis cultivar Stovopepe TT8 (TT8) gene, complete cds</a>	111	111	83%	9e-22	100%	GU219950.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Brassica napus cultivar Darmor-92b bHLH DNA binding domain transcription factor BraA-TT8 (TT8) gene, complete cds</a>	110	110	81%	3e-21	100%	GU255864.1

그림 9. 붉은 배추에 존재하는 72 bp 염기에 대한 BLAST 검색

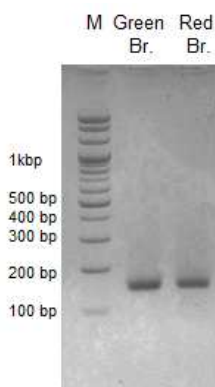


그림 10. 녹색 배추와 붉은 배추 TT8 유전자의 PCR 결과

#### 4. 4년차 연구 내용 및 결과

##### 가. 재료 및 방법

##### 1) 글루코시놀레이트 생합성 조절 유전자 발현 분석

배추의 글루코시놀레이트 생합성을 조절하는 유전자의 real-time RT-PCR 분석을 통해 발현 양상을 분석하고자 하였다. 먼저 기존에 보고된 배추의 글루코시놀레이트 생합성 조절 유전자의 염기서열 정보를 얻어 배추의 다른 isoform와 유사한 서열을 갖지 않는 특이적으로 증폭되는 primer를 제작하였다 (표 1). 제작한 primer는 PCR과 염기서열 분석을 통해 특이적으로 증폭되는 것을 확인하였다. Real-time RT-PCR 분석은 Bio-rad CFX96 Real-Time PCR System을 이용하였으며 반응 조건은 48°C 30분 반응 이후 95°C 30초, 55°C 15초, 72°C 30초를 40 사이클 반복하였고 Solgent사의 2X Real-Time SYBR mix를 사용하였다.

표 1. 배추 글루코시놀레이트 조절 유전자 발현 분석을 위한 primer.

Gene Name	Gene No.	Primer name	Sequence (5'-3')
BrMYB28.1	Bra012961	Bra012961 QRT F	GTC AACACGCCTCCAGAG
BrMYB28.1	Bra012961	Bra012961 QRT R	ATCTTTGTTGGTAAGACGAGAC
BrMYB28.2	Bra035929	Bra035929 QRT F	TCAACACGGTTTTTCGAGAATAC
BrMYB28.2	Bra035929	Bra035929 QRT R	TTCCATGGAAGCAGACAAAGC
BrMYB28.3	Bra029311	Bra029311 QRT F	GCACAACATGAATGTCGATCAG
BrMYB28.3	Bra029311	Bra029311 QRT R	CTCTGTTAATGAAATTCACATACTATC
BrMYB29	Bra005949	Bra005949 QRT F	CTTCAAACATCATGCAATATACTTG
BrMYB29	Bra005949	Bra005949 QRT R	GATATTGCCCATGGAAGCTG

##### 2) 배추 F<sub>2</sub> 집단 형성

글루코시놀레이트 관련 마커 개발을 위하여 글루코시놀레이트 고함량 계통인 13FC16을 모본으로, 글루코시놀레이트 저함량 계통인 13FC17을 부분으로 사용하여 교배한 후 F<sub>1</sub> 식물체를 만들고, 이 F<sub>1</sub> 식물체를 자가수정하여 F<sub>2</sub> 200개체를 얻었다. 다시 글루코시놀레이트 고함량 계통인 13FC16을 부분으로, 글루코시놀레이트 저함량 계통인 13FC17을 모본으로 사용하여 교배한 후 두개의 F<sub>1</sub> 식물체를 만들고, 이 F<sub>1</sub> 식물체 각각을 자가수정하여 F2-5 297 개체와 F2-6 352 개체를 획득하였다.

##### 3) 글루코시놀레이트의 추출 및 함량 분석

1차년도에 확립한 글루코시놀레이트 추출 방법을 이용하여 글루코시놀레이트의 함량을 분석하였다. 동결건조 후 곱게 갈은 분말 시료 100 mg에 약 70°C의 70% (v/v) MeOH을 1.5 mL 넣고 혼합한 후 70°C의 향온수조에서 5분 동안 물질을 추출하였다. 그 후 12,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하였고 이 과정을 총 2회 반복하여 상층액을 수거하였다.

Mini-column 충전용 DEAE-Sephadex A-25 30 g을 초순수 증류수에 녹인 후 0.5M sodium acetate를 더하여 resin을 H<sup>+</sup> 형태로 활성화 시켰다. Mini-column은 1 mL 피펫 팁의 끝을 탈지

면으로 막고 활성화된 DEAE-Sephadex A-25를 약 4cm 높이로 넣어 제작하였다. 그 후 먼저 얻은 조추출물을 제작한 mini-column에 넣어 resin을 통과시키고 초순수로 세척한 후 column 아래 부분을 paraffin film으로 막고 115 mg/5 mL aryl sulfatase solution 75  $\mu$ L을 더하여 상온에서 약 16시간 동안 반응시켰다. Desulfo-글루코시놀레이트는 증류수를 0.5 mL씩 통과시켜 총 3회 용출하였다. 용출된 시료는 0.45  $\mu$ m hydrophilic PTFE millipore filter로 거른 후 HPLC용 vial병에 넣어 분석할 때까지 냉장 보관하였다.

글루코시놀레이트 분석을 위한 HPLC는 Inertsil ODS-3 column (150  $\times$  3.0 mm i.d., particle size 3  $\mu$ m)을 장착한 Agilent 1260 Series HPLC Systems을 사용하였고 분석 조건은 표 2과 같다.

표 2. 배추의 글루코시놀레이트 분석을 위한 HPLC 분석 조건.

HPLC	Agilent Technologies 1260 series
Column	Inertsil ODS-3 column (150 $\times$ 3.0 mm i.d., particle size 3 $\mu$ m)
Guard Column	Inertsil ODS-2 Cartridge Guard column E (10 $\times$ 3.0 mm i.d., particle size 5 $\mu$ m)
Detector	227 nm
Column temperature	40 $^{\circ}$ C
Mobile phase	Solvent A (Water) Solvent B (ACN)
Flow rate	0.4 ml/min
Gradient conditions	0 min solvent B 0 % 2 min solvent B 0 % 7 min solvent B 10 % 16 min solvent B 31 % 19 min solvent B 31 % 21 min solvent B 0 % 27 min solvent B 0 %

#### 4) Genomic DNA 추출

13FC16, 13FC17, F1, 및 F2 90 개체의 잎 조직을 채취 후 액체질소를 이용하여 마쇄하였다. 마쇄한 조직으로부터 Genomic DNA mini kit (Geneaid, Taiwan)을 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 NanoDrop Nanovue (GE healthcare, USA)를 이용하여 정량하고 최종 농도가 20 ng/ $\mu$ L 가 되도록 희석하였다.

#### 5) High Resolution Melt (HRM) 분석을 위한 PCR 증폭 및 HRM 분석

주형 DNA 20 ng, forward, reverse 올리고핵산 프라이머 10 pmol, taq DNA polymerase, dNTP을 포함한 PCR mixture에 형광 dye인 Evagreen (Biofact, Korea)을 최종 부피 10  $\mu$ L로 만들어 96 well plate에 넣은 후 동량의 mineral oil을 상층에 올려주었다. PCR 분석은 Bio-rad CFX96 PCR System (Bio-rad, USA)을 이용하였으며 반응 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시킨 후 95 $^{\circ}$ C 20초, 58 $^{\circ}$ C 20초, 72 $^{\circ}$ C 20초를 45 사이클을 반복하였다. HRM 분석은 Idaho technology 사의 Lightscanner를 사용하여 65 $^{\circ}$ C에서 95 $^{\circ}$ C에 걸친 온도에서 시행하였고 매 초에 1 $^{\circ}$ C씩 상승시키

며 진행하였다. HRM 분석을 위해 형광 dye에 결합된 증폭 산물을 65°C에서 95°C로 가열시켰으며 각 단계마다 온도를 0.1°C 상승시켜 예상되는 녹는점 (melting point) 전 범위를 포함할 수 있도록 하였다. 수집된 HRM 자료를 소프트웨어를 이용하여 분석 하였다. 형광 강도 값은 각 검체의 melting transition 전과 후의 직선 기준선(baseline)으로 결정되는 0%와 100% 사이로 규격화하였다. 각 acquisition의 형광은 HRM curve로 얻어졌으며 각각의 acquisition 온도의 최고와 최저 기준선에서의 형광의 백분율로 계산되었고, 신뢰문턱값 (confidence threshold)은 80%로 하였다.

## 나. 연구결과

### 1) 글루코시놀레이트 생합성 조절 유전자의 발현 분석

글루코시놀레이트 생합성은 [L/F]LN[K/R]VA라는 특징적인 모티브를 포함하는 수많은 R2R3-MYB 계열의 전사 인자 복합체에 의해 조절된다고 알려져 있다 (Stracke et al., 2001). 모델식물체인 애기장대에서 HIGH ALIPHATIC GLUCOSINOLATE1 (HAG1)/MYB28, HAG2/MYB76, HAG3/MYB29는 지방족 글루코시놀레이트 생합성을 조절하는 반면 (Gigolashvili et al., 2007b, Hirai et al., 2007, Sønderby et al., 2007, Gigolashvili et al., 2008, Malitsky et al., 2008, Sønderby et al., 2010a), HIGH INDOLIC GLUCOSINOLATE1 (HIG1)/MYB51, HIG2/MYB122, ALTERED TRYPTOPHAN REGULATION1 (ATR1)/MYB34는 인돌족 글루코시놀레이트 생합성을 조절하는 것으로 알려져 있으며 (Malitsky et al., 2008, Gigolashvili et al., 2009) 이와 같은 전사 조절 인자들은 같은 십자화과 식물체인 배추에서도 유사하게 작동한다고 알려져 있다 (그림 1). 특히 AtMYB34와 AtMYB51은 인돌족 글루코시놀레이트 합성의 주요 조절 전사 인자로, AtMYB122는 보조 조절 전사 인자로 작동한다. MYB 계열의 전사 인자 이외에도, 핵에 존재하는 calmodulin 결합 단백질인 IQD1 (Levy et al., 2005)과 CYP83B1의 전사를 유도하는 AtDof1.1 (Skirycz et al., 2006)이 지방족과 인돌족 글루코시놀레이트 생합성 조절에 관여한다고 알려져 있다.

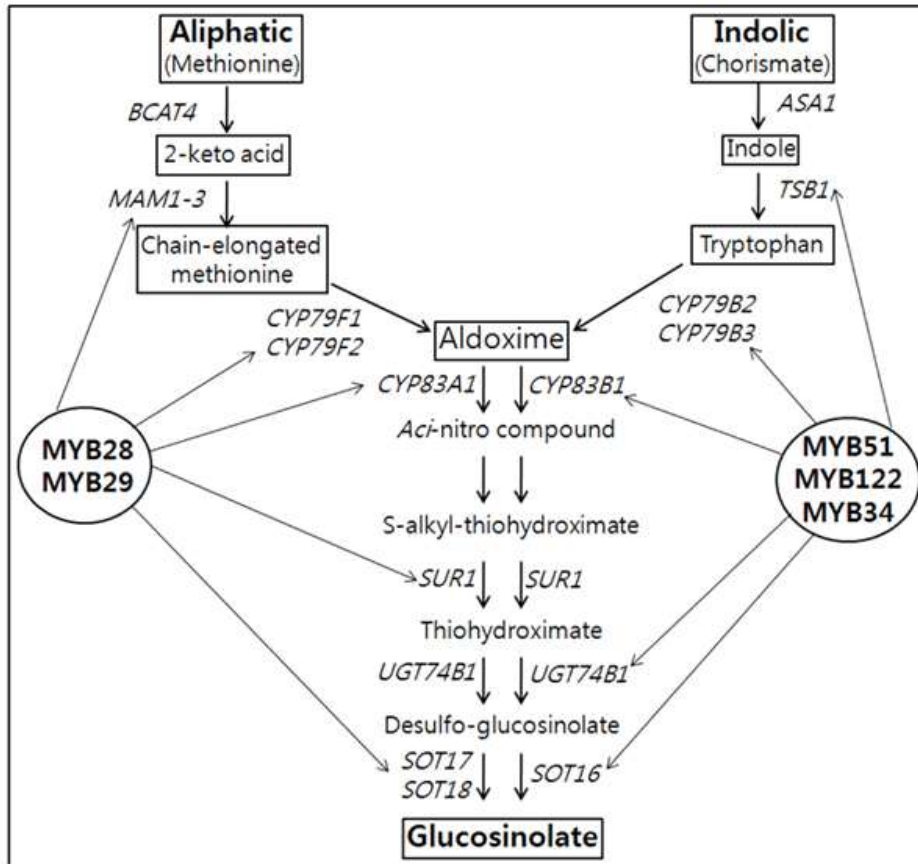


그림 1. Brassica rapa의 지방족 (aliphatic) 및 방향족 (indolic) 글루코시놀레이트 생합성 경로 및 생합성에 관여하는 전사 조절 인자.

지방족 글루코시놀레이트 생합성 조절 전사 인자 중 MYB28은 배추에 3개의 isoform이 존재한다 (표 3) (Seo et al., 2016). BrMYB28.1 (Bra012961)의 CDS는 1065 bp로 3번 염색체에 위치하며, BrMYB28.2 (Bra035929)의 CDS는 1074 bp로 9번 염색체에, BrMYB28.3 (Bra029311)의 CDS는 1119 bp로 2번 염색체에 위치한다. 이들 유전자는 반복된 R2R3 MYB-DNA 결합 도메인을 포함하고 있으며 AtMYB28 (At5G61420)과는 94-99%의 높은 아미노산 유사성을 가지고 있다 (그림 2).

표 3. 배추와 애기장대에 존재하는 MYB28 유전자의 비교.

Gene name	Length (bp)		No. of exons [length (bp)]	No. of introns [length (bp)]	Chromosome position of <i>B. rapa</i>	Corresponding <i>B. rapa</i>	
	Gene	CDS				BAC clone	EST clone
<i>AtMYB28</i> (AT5G61420) <sup>a</sup>	1321	1101	3 (133,130,838)	2 (80,140)	-	-	-
<i>BrMYB28.1</i> (Bra012961)	1350	1065	3 (133,130,802)	2 (89,196)	A03	KBrB034G03	KBLS-095C01
<i>BrMYB28.2</i> (Bra035929)	1378	1074	3 (133,130,811)	2 (166,138)	A09	KBrB051M06	KBFL-120H07
<i>BrMYB28.3</i> (Bra029311)	1618	1119	3 (133,130,856)	2 (83,416)	A02	KBrH005L20	KFFB-103G11

<sup>a</sup> Arabidopsis genome ID of NCBI and *Brassica rapa* gene ID of BRAD

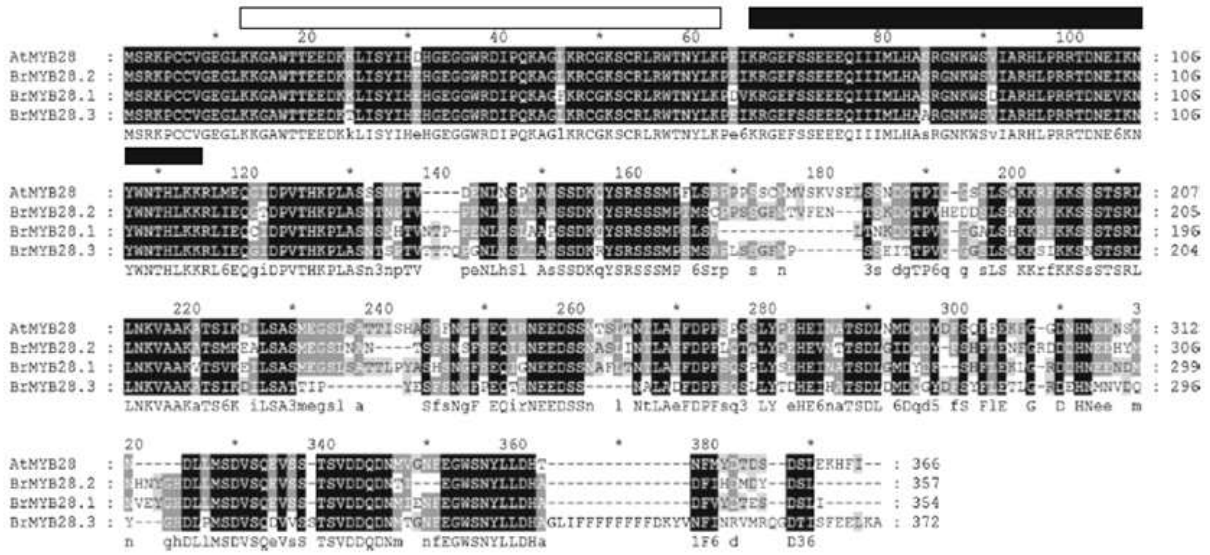


그림 2. 배추와 애기장대의 글루코시놀레이트 생합성을 조절하는 MYB28 단백질의 아미노산 서열 비교. 흰색과 검정색 박스는 각각 R2와 R3 결합 도메인을 의미한다.

지방족 글루코실놀레이트 생합성 조절 전사 인자 중 MYB29은 배추에 2개의 isoform이 존재하며 Bra009245의 CDS는 267 bp로 10번 염색체, Bra005949의 CDS는 993 bp로 3번 염색체에 위치한다 (그림 3). 두 유전자의 N-말단 부위는 90% 이상의 염기 서열 상동성을 보였으나, Bra009245는 C-말단 부위가 존재하지 않았다.

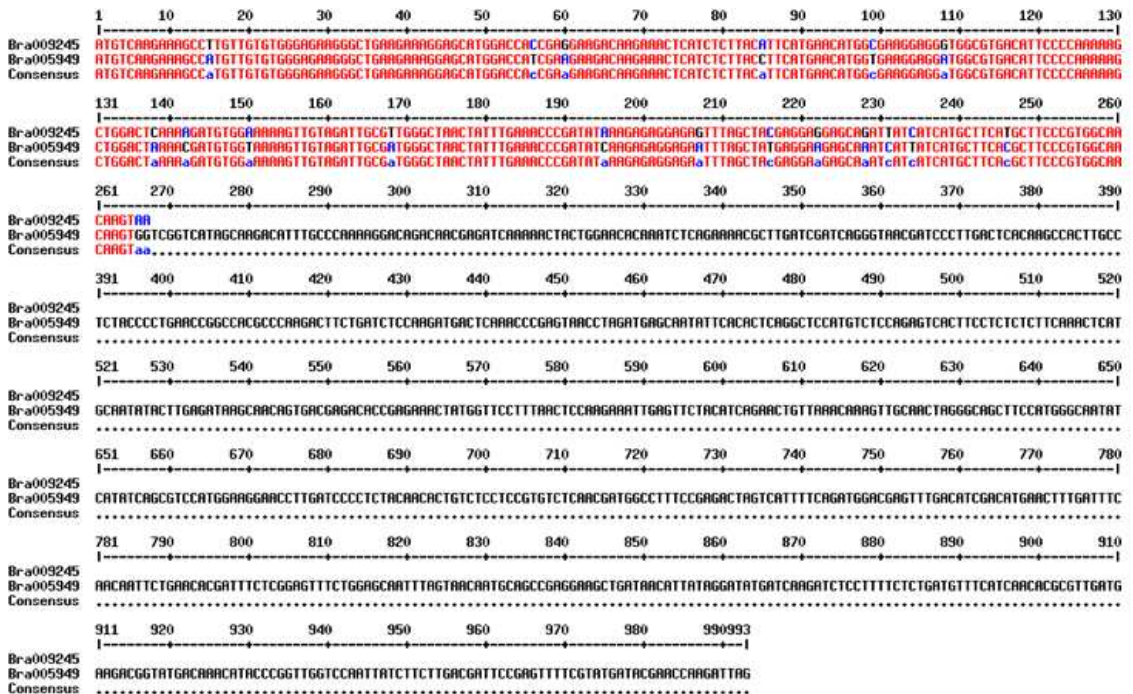


그림 3. 배추의 글루코시놀레이트 생합성을 조절하는 MYB29 유전자의 염기 서열 비교.



지방족 글루코시놀레이트의 생합성을 조절하는 MYB28과 MYB29 유전자의 발현을 발아 후 10일과 30일된 13FC16과 13FC17 식물체에서 각각 조사하였다. 발아 후 10일된 시료에서 *BrMYB28.2*, *BrMYB28.3* 경우 두 계통 간 의미있는 발현 차이를 보이지 않았지만 *BrMYB28.1*과 *BrMYB29*는 13FC16에 비해 13FC17에서 해당 유전자의 발현이 의미있게 감소하였다 (그림 4). 발아 후 30일된 시료에서는 *BrMYB28.1* 경우 발아 후 10일된 샘플과 동일한 패턴으로 13FC16에 비해 13FC17에서 해당 유전자의 발현이 의미있게 감소하였지만, *BrMYB29* 경우 두 계통 간 의미있는 발현 차이를 보이지 않았고, *BrMYB28.2*과 *BrMYB28.3* 경우 13FC16에 비해 13FC17에서 해당 유전자의 발현이 의미있게 증가하였다 (그림 5). 또한 전체적으로 발아 후 10일 시료에 비해 발아 후 30일된 시료의 유전자 발현률이 증가하는 양상을 보였다. 해당 분석들을 통해 *BrMYB28.1*이 13FC16과 13FC17 식물체의 글루코시놀레이트 함량 조절에 깊이 관여하리라 예상된다.

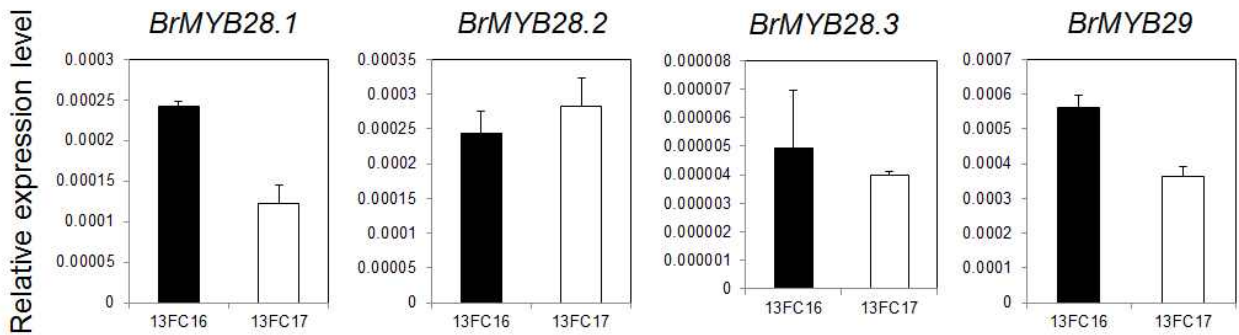


그림 4. 발아 후 10일된 시료상에서 지방족 글루코시놀레이트 생합성 경로를 조절하는 MYB 전사 인자의 유전자 발현 분석.

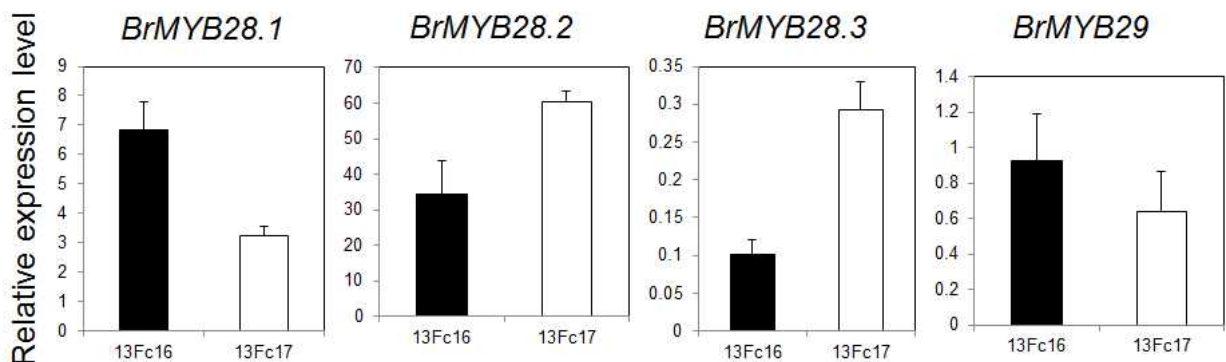


그림 5. 발아 후 30일된 시료상에서 지방족 글루코시놀레이트 생합성 경로를 조절하는 MYB 전사 인자의 유전자 발현 분석.

## 2) 글루코시놀레이트 관련 분자마커 개발을 위한 집단 형성 및 글루코시놀레이트 분석

1차년도에 50계통을 대상으로 한 분석과, 이를 통해 선발한 14계통을 대상으로 한 2차년도의 두 번의 분석을 포함한 총 세 번의 분석 모두에서 일관되게 함량의 차이가 재현되는 13FC-16,

13FC-17 두 계통을 양친간의 다형성을 나타내는 글루코시놀레이트 관련 분자 마커를 개발하기 위한 재료로 선발하였고, 3차년도에 13FC-16, 13FC-17 두 계통의 genome 시퀀싱을 수행하였다. 다양한 글루코시놀레이트 함량을 가진 식물체를 확보하기 위해 글루코시놀레이트 고함량인 13FC16을 모본으로, 글루코시놀레이트 저함량인 13FC17을 부분으로 하여 이들 배추 간의 교배로 얻은 F<sub>1</sub> 식물을 자가수정하여 F<sub>2</sub> 종자를 생산하였다. F<sub>2</sub>-7번 집단은 200 개체를, F<sub>2</sub>-10번 집단은 354 개체를 각각 확보하였다. 다시 글루코시놀레이트 고함량인 13FC16을 부분으로, 글루코시놀레이트 저함량인 13FC17을 모본으로 하여 이들 배추 간의 교배로 두 집단의 F<sub>1</sub> 식물을 획득하였고 이를 다시 자가교배하여 F<sub>2</sub> 종자를 생산하였다. F<sub>2</sub>-5번 집단은 297 개체를, F<sub>2</sub>-6번 집단은 352 개체를 각각 확보하였다.

표 4. 글루코시놀레이트 관련 유전분석을 위한 집단종자 생산.

13FC16X 13FC17 교배라인					
	모본	부분			
13FC16X 13FC17	13FC16	13FC17	F1	13FC16-4 X 13FX17-1	311
			F2	(13FC16-4 X 13FX17-1)-7	200
				(13FC16-4 X 13FX17-1)-10	354
13FC17X 13FC16	13FC17	13FC16	F1	13FC17-1 X 13FX16-1	174
				13FC17-2 X 13FX16-1	89
			F2	(13FC17-1 X 13FX16-1)-6	352
				(13FC17-2 X 13FX16-1)-5	297

글루코시놀레이트 고함량인 13FC16, 글루코시놀레이트 저함량인 13FC17 및 이들의 F<sub>1</sub> 개체, 그리고 F<sub>2</sub>-7번 집단 90 개체를 이용하여 글루코시놀레이트 함량을 분석하였다. HPLC를 이용하여 배추 내 글루코시놀레이트 함량을 분석한 결과 progoitrin, glucoraphanin, gluconapin, 4-hydroxyglucobrassicin, glucobrassicinapin, glucoerucin, glucoraphasatin, glucobrassicin, 4-methoxyglucobrassicin, glucoberteroin, gluconasturtiin, neoglucobrassicin를 포함한 총 12종의 글루코시놀레이트가 검출되었으며, 13FC16, 13FC17 및 F<sub>1</sub> 개체와 달리 F<sub>2</sub> 개체에서는 4-hydroxyglucobrassicin, glucobrassicinapin, glucoerucin 와 같은 글루코시놀레이트가 검출되지 않았다 (표 5, 표 6). 1, 2 차년도 연구와 유사하게 13FC16 계통에서는 gluconapin의 함량이 매우 높은 반면, 13FC17 계통에서는 gluconapin이 검출되지 않았으며, F<sub>1</sub> 계통에서는 13FC16의 절반 정도되는 gluconapin 수치가 확인되었다. F<sub>2</sub> 집단에서는 20개 개체에서 gluconapin이 검출되지 않았고 70개 개체에서 함량이 분석되었으며, 이들 개체간에 gluconapin 함량차이가 크게 존재하였고 F<sub>2</sub>-35번 개체에서 가장 많은 glucosinolate가 검출되었다.

표 5. 13FC16, 13FC17, 및 F<sub>1</sub> 개체의 글루코시놀레이트 함량 분석.

No.	Trivial name	13FC16		13FC17		F1	
		Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.
2	Progoitrin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	Glucoraphanin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	Gluconapin	66.86	0.31	0.00	0.00	39.06	0.18
9	4-Hydroxyglucobrassicin	8.35	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
10	Glucocochlearin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
11	Glucosiberin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
12	Glucobrassicinapin	16.67	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
13	Glucoerucin	11.10	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
14	Glucohirsutin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15	Glucoraphasatin	0.00	0.00	0.00	0.00	1.01	0.00
16	Glucobrassicin	26.79	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
17	4-Methoxyglucobrassicin	463.27	0.48	93.02	0.10	3.93	0.00
18	Glucoberteroin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
19	Gluconasturtiin	0.00	0.00	0.00	0.00	1.62	0.01
20	Neoglucobrassicin	0.00	0.00	85.56	0.05	0.00	0.00
Total		593.04	0.85	178.58	0.14	45.63	0.19

표 6. F<sub>2</sub> 개체의 글루코시놀레이트 함량 분석.

No.	RT (min)	Trivial name	F2-1		F2-2		F2-3		F2-4	
			Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin		0.00	6.52	0.03		0.00		0.00
3	9.72	Glucoraphanin		0.00	6.11	0.03		0.00		0.00
8	12.37	Gluconapin	28.14	0.13	41.91	0.19	25.80	0.12		0.00
15	15.63	Glucoraphasatin		0.00	12.50	0.02	1.60	0.00	2.65	0.00
16	15.84	Glucobrassicin	9.16	0.01	8.92	0.01	9.01	0.01	12.54	0.02
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin		0.00	33.69	0.04		0.00		0.00
18	17.36	Glucoberteroin	1.73	0.01		0.00	1.63	0.01		0.00
19	17.82	Gluconasturtiin	1.22	0.00	1.27	0.01	0.98	0.00	0.79	0.00
20	18.51	Neoglucobrassicin	0.81	0.00	0.88	0.00		0.00		0.00
Total			41.05	0.15	111.80	0.32	39.01	0.14	15.98	0.02

No.	RT (min)	Trivial name	F2-5		F2-7		F2-8		F2-9	
			Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin		0.00	9.02	0.04		0.00		0.00
3	9.72	Glucoraphanin		0.00	0.86	0.00		0.00		0.00
8	12.37	Gluconapin	43.36	0.20	43.74	0.20	14.44	0.07	72.65	0.34
15	15.63	Glucoraphasatin	1.14	0.00	2.77	0.00	0.98	0.00	2.28	0.00
16	15.84	Glucobrassicin	16.60	0.02	10.86	0.01	16.33	0.02	0.86	0.00
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin	22.80	0.02		0.00		0.00	10.25	0.01
18	17.36	Glucoberteroin	2.06	0.01		0.00	2.45	0.01		0.00
19	17.82	Gluconasturtiin		0.00	1.23	0.00	1.22	0.00		0.00
20	18.51	Neoglucobrassicin		0.00	0.00	0.00		0.00		0.00
Total			85.95	0.25	68.47	0.27	35.41	0.10	86.04	0.35

No.	RT (min)	Trivial name	F2-10		F2-11		F2-12		F2-13	
			Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin		0.00		0.00		0.00		0.00
3	9.72	Glucoraphanin		0.00		0.00		0.00		0.00
8	12.37	Gluconapin	43.16	0.20		0.00	42.16	0.19	108.06	0.50
15	15.63	Glucoraphasatin	2.11	0.00	2.13	0.00	3.12	0.01	1.68	0.00
16	15.84	Glucobrassicin	17.73	0.02	5.96	0.01	19.23	0.02	22.09	0.03
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin	7.09	0.01		0.00	5.10	0.01	9.22	0.01
18	17.36	Glucoberteroin	3.62	0.01	1.65	0.01	1.45	0.01	3.51	0.01
19	17.82	Gluconasturtiin	1.58	0.01		0.00	1.27	0.01		0.00
20	18.51	Neoglucobrassicin	3.76	0.00		0.00	3.02	0.00		0.00
Total			79.06	0.25	9.74	0.02	75.34	0.24	144.56	0.55

No.	RT (min)	Trivial name	F2-14		F2-15		F2-16		F2-17	
			Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin		0.00		0.00		0.00		0.00
3	9.72	Glucoraphanin		0.00		0.00		0.00		0.00
8	12.37	Gluconapin	76.66	0.35	99.27	0.46	117.55	0.54	125.71	0.58
15	15.63	Glucoraphasatin	1.77	0.00	1.79	0.00	1.72	0.00	1.68	0.00
16	15.84	Glucobrassicin	23.86	0.03	22.56	0.03	19.89	0.02	22.53	0.03
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin	26.17	0.03	13.45	0.01	20.26	0.02	9.07	0.01
18	17.36	Glucoberteroin	2.32	0.01	2.62	0.01	3.33	0.01	3.88	0.01
19	17.82	Gluconasturtiin		0.00		0.00		0.00		0.00
20	18.51	Neoglucobrassicin		0.00		0.00		0.00		0.00
Total			130.78	0.42	139.69	0.51	162.76	0.60	162.87	0.63

No.	RT (min)	Trivial name	F2-18		F2-19		F2-21		F2-22	
			Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin		0.00		0.00		0.00		0.00
3	9.72	Glucoraphanin		0.00		0.00		0.00		0.00
8	12.37	Glucanapin	33.24	0.15	24.59	0.11	71.82	0.33		0.00
15	15.63	Glucoraphasatin	0.85	0.00	1.63	0.00	1.02	0.00	1.91	0.00
16	15.84	Glucobrassicin	22.32	0.03	21.67	0.03	23.25	0.03	1.64	0.00
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin		0.00		0.00	1.29	0.00	9.32	0.01
18	17.36	Glucoberteroin	3.20	0.01	4.49	0.02	3.80	0.01		0.00
19	17.82	Glucanasturtiin		0.00	0.78	0.00		0.00		0.00
20	18.51	Neoglucobrassicin		0.00		0.00		0.00		0.00
Total			59.61	0.19	53.16	0.16	101.18	0.38	12.88	0.01

No.	RT (min)	Trivial name	F2-23		F2-24		F2-26		F2-27	
			Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin		0.00		0.00		0.00		0.00
3	9.72	Glucoraphanin		0.00		0.00		0.00		0.00
8	12.37	Glucanapin	95.14	0.44		0.00		0.00	59.31	0.27
15	15.63	Glucoraphasatin	2.18	0.00	2.46	0.00	2.53	0.00	0.71	0.00
16	15.84	Glucobrassicin	25.79	0.03	4.51	0.01	10.96	0.01	21.24	0.03
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin	2.79	0.00	5.69	0.01	32.70	0.03	6.33	0.01
18	17.36	Glucoberteroin	3.31	0.01	1.95	0.01	3.41	0.01	2.44	0.01
19	17.82	Glucanasturtiin		0.00		0.00		0.00		0.00
20	18.51	Neoglucobrassicin		0.00	1.97	0.00		0.00		0.00
Total			129.22	0.49	16.57	0.02	49.60	0.06	90.04	0.32

No.	RT (min)	Trivial name	F2-29		F2-30		F2-31		F2-32	
			Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin		0.00		0.00		0.00		0.00
3	9.72	Glucoraphanin		0.00		0.00		0.00		0.00
8	12.37	Glucanapin	30.51	0.14		0.00		0.00	21.77	0.10
15	15.63	Glucoraphasatin	3.31	0.01	2.44	0.00	10.56	0.02	2.95	0.00
16	15.84	Glucobrassicin	11.24	0.01	10.61	0.01	10.50	0.01	9.66	0.01
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin	3.38	0.00	1.22	0.00	36.45	0.04	25.52	0.03
18	17.36	Glucoberteroin	5.65	0.02	2.98	0.01	1.63	0.01	4.18	0.02
19	17.82	Glucanasturtiin		0.00	2.02	0.01	1.62	0.01		0.00
20	18.51	Neoglucobrassicin		0.00	1.55	0.00	1.26	0.00	6.72	0.01
Total			54.10	0.18	20.84	0.04	62.02	0.08	70.79	0.17

No.	RT (min)	Trivial name	F2-33		F2-34		F2-35		F2-36	
			Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin		0.00		0.00	2.66	0.01		0.00
3	9.72	Glucoraphanin		0.00		0.00	1.87	0.01		0.00
8	12.37	Glucanapin	140.66	0.65		0.00	392.63	1.81		0.00
15	15.63	Glucoraphasatin	2.61	0.00	2.66	0.00	6.56	0.01	3.40	0.01
16	15.84	Glucobrassicin	25.03	0.03	8.42	0.01	10.71	0.01	15.29	0.02
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin	2.10	0.00	6.80	0.01	19.72	0.02	23.54	0.02
18	17.36	Glucoberteroin	4.90	0.02		0.00	25.95	0.10	2.30	0.01
19	17.82	Glucanasturtiin	1.41	0.01	1.91	0.01		0.00	2.39	0.01
20	18.51	Neoglucobrassicin		0.00		0.00	2.19	0.00	1.33	0.00
Total			176.70	0.71	19.79	0.03	462.28	1.98	48.25	0.07

No.	RT (min)	Trivial name	F2-37		F2-38		F2-41		F2-42	
			Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin		0.00		0.00		0.00		0.00
3	9.72	Glucoraphanin		0.00		0.00		0.00		0.00
8	12.37	Glucanapin	228.75	1.06	97.54	0.45		0.00		0.00
15	15.63	Glucoraphasatin	2.82	0.00	3.49	0.01	5.28	0.01	11.89	0.02
16	15.84	Glucobrassicin	28.75	0.03	24.35	0.03	12.40	0.01	14.28	0.02
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin	9.19	0.01	39.60	0.04	106.54	0.11	38.54	0.04
18	17.36	Glucoberteroin	5.99	0.02	4.23	0.02	3.55	0.01	1.18	0.00
19	17.82	Glucanasturtiin	0.95	0.00		0.00		0.00		0.00
20	18.51	Neoglucobrassicin		0.00		0.00		0.00	1.13	0.00
Total			276.46	1.13	169.21	0.54	127.78	0.15	67.01	0.08

No.	RT (min)	Trivial name	F2-43		F2-44		F2-45		F2-46	
			Area	µmol/g dry wt.	Area	µmol/g dry wt.	Area	µmol/g dry wt.	Area	µmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin		0.00		0.00		0.00		0.00
3	9.72	Glucoraphanin		0.00		0.00		0.00	6.79	0.03
8	12.37	Glucanapin	35.66	0.16	43.36	0.20		0.00	160.19	0.74
15	15.63	Glucoraphasatin	1.33	0.00	2.48	0.00	2.74	0.00	3.60	0.01
16	15.84	Glucobrassicin	25.88	0.03	12.95	0.02	10.75	0.01	27.17	0.03
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin		0.00		0.00	19.74	0.02	2.51	0.00
18	17.36	Glucoberteroin	3.59	0.01		0.00	2.51	0.01	4.65	0.02
19	17.82	Glucunasturtiin	1.33	0.01	2.15	0.01		0.00		0.00
20	18.51	Neoglucobrassicin		0.00		0.00		0.00		0.00
Total			67.79	0.22	60.93	0.23	35.74	0.05	204.91	0.83

No.	RT (min)	Trivial name	F2-48		F2-49		F2-51		F2-52	
			Area	µmol/g dry wt.	Area	µmol/g dry wt.	Area	µmol/g dry wt.	Area	µmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin		0.00		0.00		0.00	13.46	0.06
3	9.72	Glucoraphanin		0.00		0.00		0.00	7.06	0.03
8	12.37	Glucanapin		0.00		0.00	212.42	0.98	133.68	0.62
15	15.63	Glucoraphasatin	8.33	0.01	2.18	0.00	3.73	0.01	1.87	0.00
16	15.84	Glucobrassicin	8.45	0.01	7.99	0.01	29.25	0.04	25.26	0.03
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin	17.76	0.02		0.00	75.69	0.08	5.31	0.01
18	17.36	Glucoberteroin	2.69	0.01		0.00	5.32	0.02	6.48	0.02
19	17.82	Glucunasturtiin		0.00	1.19	0.00		0.00		0.00
20	18.51	Neoglucobrassicin	0.86	0.00	0.79	0.00		0.00	1.47	0.00
Total			38.10	0.05	12.15	0.02	326.40	1.12	194.59	0.77

No.	RT (min)	Trivial name	F2-53		F2-54		F2-56		F2-57	
			Area	µmol/g dry wt.	Area	µmol/g dry wt.	Area	µmol/g dry wt.	Area	µmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin		0.00		0.00		0.00		0.00
3	9.72	Glucoraphanin		0.00		0.00		0.00		0.00
8	12.37	Glucanapin		0.00		0.00	16.96	0.08		0.00
15	15.63	Glucoraphasatin	4.46	0.01	3.64	0.01	4.57	0.01	2.20	0.00
16	15.84	Glucobrassicin	11.42	0.01	6.88	0.01	9.94	0.01	9.78	0.01
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin		0.00	5.53	0.01	17.20	0.02	5.30	0.01
18	17.36	Glucoberteroin		0.00	1.51	0.01	3.97	0.01	2.20	0.01
19	17.82	Glucunasturtiin		0.00		0.00	1.70	0.01	1.47	0.01
20	18.51	Neoglucobrassicin		0.00	5.80	0.00	1.09	0.00		0.00
Total			15.87	0.02	23.36	0.03	55.42	0.14	20.95	0.04

No.	RT (min)	Trivial name	F2-58		F2-59		F2-60		F2-65	
			Area	µmol/g dry wt.	Area	µmol/g dry wt.	Area	µmol/g dry wt.	Area	µmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin		0.00		0.00		0.00		0.00
3	9.72	Glucoraphanin	1.71	0.01	1.63	0.01	3.01	0.01	0.70	0.00
8	12.37	Glucanapin	81.53	0.38	60.29	0.28	94.95	0.44	110.98	0.51
15	15.63	Glucoraphasatin	5.27	0.01	6.77	0.01	3.01	0.01	3.61	0.01
16	15.84	Glucobrassicin	42.14	0.05	5.73	0.01	34.26	0.04	27.16	0.03
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin	7.11	0.01	64.27	0.07	34.23	0.04	34.97	0.04
18	17.36	Glucoberteroin	1.78	0.01	1.54	0.01	1.84	0.01	2.82	0.01
19	17.82	Glucunasturtiin		0.00	1.17	0.00	2.18	0.01		0.00
20	18.51	Neoglucobrassicin		0.00	0.98	0.00		0.00		0.00
Total			139.54	0.46	142.37	0.38	173.47	0.55	180.24	0.60

No.	RT (min)	Trivial name	F2-66		F2-67		F2-68		F2-69	
			Area	µmol/g dry wt.	Area	µmol/g dry wt.	Area	µmol/g dry wt.	Area	µmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin		0.00		0.00		0.00		0.00
3	9.72	Glucoraphanin	1.11	0.00	0.77	0.00	1.60	0.01	1.54	0.01
8	12.37	Glucanapin	113.15	0.52	124.06	0.57	115.19	0.53	153.96	0.71
15	15.63	Glucoraphasatin	7.18	0.01	3.60	0.01	7.49	0.01	5.49	0.01
16	15.84	Glucobrassicin	29.35	0.04	32.75	0.04	35.49	0.04	30.94	0.04
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin	71.07	0.07	9.84	0.01	44.41	0.05	14.06	0.01
18	17.36	Glucoberteroin	2.20	0.01	2.47	0.01	2.31	0.01	3.17	0.01
19	17.82	Glucunasturtiin		0.00		0.00	2.39	0.01		0.00
20	18.51	Neoglucobrassicin	0.83	0.00		0.00		0.00		0.00
Total			224.91	0.66	173.50	0.64	208.89	0.66	209.14	0.79

No.	RT (min)	Trivial name	F2-70		F2-71		F2-72		F2-73	
			Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin		0.00		0.00		0.00		0.00
3	9.72	Glucoraphanin	0.82	0.00	0.96	0.00	1.33	0.01	0.92	0.00
8	12.37	Gluconapin	145.22	0.67	174.14	0.80	128.94	0.60	152.17	0.70
15	15.63	Glucoraphasatin	6.45	0.01	2.60	0.00	5.70	0.01	4.42	0.01
16	15.84	Glucobrassicin	30.34	0.04	27.61	0.03	29.59	0.04	36.53	0.04
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin	20.69	0.02	6.85	0.01	5.21	0.01	21.38	0.02
18	17.36	Glucoberteroin	3.04	0.01	3.82	0.01	2.72	0.01		0.00
19	17.82	Gluconasturtiin	1.29	0.01		0.00		0.00		0.00
20	18.51	Neoglucobrassicin		0.00		0.00		0.00		0.00
Total			207.86	0.76	215.97	0.87	173.50	0.66	215.41	0.78

No.	RT (min)	Trivial name	F2-74		F2-75		F2-76		F2-77	
			Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin		0.00		0.00		0.00		0.00
3	9.72	Glucoraphanin	1.58	0.01	1.85	0.01	1.97	0.01	0.59	0.00
8	12.37	Gluconapin	126.67	0.59	90.05	0.42	71.86	0.33	62.51	0.29
15	15.63	Glucoraphasatin	5.72	0.01	3.92	0.01	7.16	0.01	5.65	0.01
16	15.84	Glucobrassicin	27.83	0.03	31.35	0.04	31.86	0.04	30.37	0.04
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin	12.93	0.01	27.41	0.03	13.26	0.01	47.51	0.05
18	17.36	Glucoberteroin	2.35	0.01	2.18	0.01	1.73	0.01	1.44	0.01
19	17.82	Gluconasturtiin		0.00	1.35	0.01		0.00		0.00
20	18.51	Neoglucobrassicin	0.94	0.00		0.00		0.00		0.00
Total			178.02	0.66	158.12	0.51	127.84	0.41	148.07	0.39

No.	RT (min)	Trivial name	F2-79		F2-80		F2-81		F2-83	
			Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin		0.00		0.00		0.00		0.00
3	9.72	Glucoraphanin	1.04	0.00	0.58	0.00		0.00	1.47	0.01
8	12.37	Gluconapin	51.84	0.24	44.72	0.21	33.61	0.16	60.29	0.28
15	15.63	Glucoraphasatin	5.73	0.01	2.64	0.00	1.87	0.00	3.97	0.01
16	15.84	Glucobrassicin	36.37	0.04	35.42	0.04	6.92	0.01	30.19	0.04
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin	42.37	0.04	57.49	0.06	53.05	0.06	76.85	0.08
18	17.36	Glucoberteroin	1.15	0.00	1.23	0.00	1.45	0.01	1.25	0.00
19	17.82	Gluconasturtiin	2.01	0.01	1.39	0.01		0.00		0.00
20	18.51	Neoglucobrassicin	0.93	0.00		0.00		0.00		0.00
Total			141.42	0.35	143.48	0.33	96.90	0.23	174.01	0.41

No.	RT (min)	Trivial name	F2-86		F2-87		F2-88		F2-90	
			Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin		0.00		0.00		0.00		0.00
3	9.72	Glucoraphanin		0.00		0.00		0.00	2.59	0.01
8	12.37	Gluconapin	49.89	0.23	52.18	0.24	56.34	0.26	53.28	0.25
15	15.63	Glucoraphasatin	4.55	0.01	5.02	0.01	7.03	0.01	2.23	0.00
16	15.84	Glucobrassicin	32.84	0.04	35.69	0.04	32.23	0.04	40.19	0.05
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin	50.70	0.05	21.77	0.02	34.02	0.04	47.73	0.05
18	17.36	Glucoberteroin	1.40	0.01	1.52	0.01	1.53	0.01	1.21	0.00
19	17.82	Gluconasturtiin	0.91	0.00		0.00		0.00		0.00
20	18.51	Neoglucobrassicin		0.00		0.00		0.00		0.00
Total			140.30	0.34	116.19	0.32	132.07	0.36	147.24	0.36

No.	RT (min)	Trivial name	F2-92		F2-94		F2-95		F2-96	
			Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin		0.00		0.00		0.00		0.00
3	9.72	Glucoraphanin		0.00		0.00		0.00		0.00
8	12.37	Gluconapin	42.43	0.20		0.00	33.30	0.15	46.33	0.21
15	15.63	Glucoraphasatin	5.06	0.01	64.43	0.11	3.57	0.01	11.36	0.02
16	15.84	Glucobrassicin	39.87	0.05	22.81	0.03	34.66	0.04	33.33	0.04
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin	77.77	0.08	120.81	0.13	52.31	0.05	20.51	0.02
18	17.36	Glucoberteroin	1.33	0.00		0.00	1.07	0.00	1.04	0.00
19	17.82	Gluconasturtiin	2.31	0.01	1.30	0.01		0.00	1.38	0.01
20	18.51	Neoglucobrassicin		0.00		0.00		0.00		0.00
Total			168.77	0.35	209.35	0.27	124.90	0.26	113.95	0.30

No.	RT (min)	Trivial name	F2-97		F2-98		F2-99		F2-100	
			Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin		0.00		0.00		0.00		0.00
3	9.72	Glucoraphanin	2.12	0.01	2.11	0.01	0.69	0.00		0.00
8	12.37	Glucanapin	34.48	0.16	35.14	0.16	38.55	0.18		0.00
15	15.63	Glucoraphasatin	7.32	0.01	16.66	0.03	5.35	0.01	13.08	0.02
16	15.84	Glucobrassicin	35.55	0.04	39.34	0.05	40.21	0.05	14.25	0.02
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin	27.60	0.03	66.85	0.07	64.55	0.07	28.53	0.03
18	17.36	Glucoberteroin	1.25	0.00	1.28	0.00	1.36	0.01		0.00
19	17.82	Glucanasturtiin		0.00		0.00	2.09	0.01		0.00
20	18.51	Neoglucobrassicin		0.00		0.00		0.00		0.00
Total			108.32	0.26	161.38	0.32	152.81	0.32	55.86	0.07

No.	RT (min)	Trivial name	F2-101		F2-102		F2-103		F2-105	
			Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin	2.63	0.01		0.00		0.00		0.00
3	9.72	Glucoraphanin		0.00	3.15	0.01	1.41	0.01	1.05	0.00
8	12.37	Glucanapin		0.00	71.51	0.33	50.39	0.23	35.73	0.17
15	15.63	Glucoraphasatin		0.00	3.99	0.01	27.24	0.05	6.36	0.01
16	15.84	Glucobrassicin	7.96	0.01	31.19	0.04	37.37	0.05	34.71	0.04
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin	84.82	0.09	32.76	0.03	68.42	0.07	33.46	0.03
18	17.36	Glucoberteroin	9.54	0.04	1.93	0.01	1.88	0.01	1.62	0.01
19	17.82	Glucanasturtiin	21.50	0.09	2.36	0.01		0.00		0.00
20	18.51	Neoglucobrassicin		0.00		0.00		0.00	0.90	0.00
Total			126.46	0.23	146.88	0.44	186.71	0.41	113.84	0.26

No.	RT (min)	Trivial name	F2-106		F2-107		F2-109		F2-110	
			Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin		0.00		0.00		0.00		0.00
3	9.72	Glucoraphanin	1.72	0.01	1.48	0.01	0.82	0.00	0.84	0.00
8	12.37	Glucanapin	48.30	0.22	44.18	0.20	34.54	0.16	50.06	0.23
15	15.63	Glucoraphasatin	3.45	0.01	1.80	0.00	4.45	0.01	3.94	0.01
16	15.84	Glucobrassicin	27.31	0.03	30.38	0.04	31.59	0.04	29.70	0.04
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin	30.70	0.03	38.62	0.04	26.14	0.03	52.96	0.06
18	17.36	Glucoberteroin	1.85	0.01	2.77	0.01	1.65	0.01	1.74	0.01
19	17.82	Glucanasturtiin		0.00		0.00	1.05	0.00		0.00
20	18.51	Neoglucobrassicin	5.24	0.00	5.83	0.00	4.43	0.00	4.64	0.00
Total			118.57	0.31	125.06	0.31	104.67	0.25	143.88	0.34

No.	RT (min)	Trivial name	F2-112		F2-114		F2-115	
			Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.	Area	μmol/g dry wt.
2	9.59	Progoitrin		0.00		0.00		0.00
3	9.72	Glucoraphanin		0.00	1.23	0.01	0.94	0.00
8	12.37	Glucanapin	44.87	0.21	30.85	0.14	40.78	0.19
15	15.63	Glucoraphasatin	3.55	0.01	2.41	0.00	2.46	0.00
16	15.84	Glucobrassicin	22.55	0.03	27.81	0.03	33.64	0.04
17	16.53	4-Methoxyglucobrassicin	35.75	0.04	32.06	0.03	27.13	0.03
18	17.36	Glucoberteroin	2.03	0.01	2.18	0.01	1.91	0.01
19	17.82	Glucanasturtiin		0.00		0.00		0.00
20	18.51	Neoglucobrassicin	5.61	0.00	4.30	0.00		0.00
Total			114.34	0.29	100.83	0.23	106.85	0.27

### 3) 글루코시놀레이트 관련 Single Nucleotide Polymorphism (SNP) 분자마커 탐색

13FC16 계통은 glucanapin과 같은 물질의 함량이 매우 높은 반면, 13FC17 계통에서는 이러한 물질이 검출되지 않았다. 따라서 glucanapin 함량과 관련된 분자 마커를 발굴하고자 두 계통간의 게놈 염기서열을 분석하여 총 3,715,062 개의 single nucleotide polymorphism (SNP)을 발굴하였고, 해당 SNP 중 글루코시놀레이트 관련 유전자 내에 존재하는 SNP를 중심으로 총 574개의 primer를 제작하였다. 글루코시놀레이트 생합성 및 전사 조절 관련 유전자의 유전자 발현 분석 실험을 바탕으로 13FC17에 비해 13FC16에서 유전자 발현률이 의미있게 증가했던 글루코시놀레이트 관련 유전자인 *BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE 3 (BCAT3)*, *METHYLTHIOALKYLMALATE SYNTHASE 1 (MAM1)*, *METHYLTHIOALKYLMALATE SYNTHASE 3 (MAM3)*, *BETA-HYDROXYISOBUTYRYL-COA HYDROLASE 1 (CHY1)*, *ISOPROPYL MALATE*

*ISOMERASE LARGE SUBUNIT 1 (IPMI-LSU1)*, *UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 74B1 (UGT74B1)*, *FLAVIN-MONOOXYGENASE GLUCOSINOLATE S-OXYGENASE 5 (FMOGS-OX5)*, *ARABDOPSIS THALIANA ALDEHYDE OXIDASE 4 (AAO4)*, *MYB DOMAIN PROTEIN 28.1 (MYB28.1)*, *MYB DOMAIN PROTEIN 28.2 (MYB28.2)*, *MYB DOMAIN PROTEIN 28.3 (MYB28.3)* 상에 존재하는 48개 primer 조합을 글루코시놀레이트 함량과 관련된 SNP 분자마커를 탐색하기 위한 후보군으로 최종 선정하였다 (표 7).

표 7. 글루코시놀레이트 함량 관련 SNP 분자마커 탐색을 위한 프라이머.

Ch	Pos	Ref	ALT	13FC16	13FC17	Gene	AtID	Tag	F-primer	R-primer	Ftm	Rtm	size		
A01	15364162G	[T]	1/1	None	[Bra029966]	AT3G49680	BCAT3	[intron]	BrGM1-F	TGTTATGGTGACGAGAATGGT	TAAGACCGAACCCGATGGTTG	BrGM1-R	57.7	57.6	97
A02	25660202T	[A]	None	0/1	[Bra029355]	ATS623010	MAM1	[intron]	BrGM2-F	TCGCATGACCAAGCAAAATAGC	ACCAATGGTAGCCTAGTGGTG	BrGM2-R	59.6	59.4	96
A02	25660675A	[C]	None	0/1	[Bra029355]	ATS623010	MAM1	[intron]	BrGM3-F	CGATGACGACATCACTGGGA	TGGCAATGAAGAAATGGTCA	BrGM3-R	60.0	59.7	104
A02	25661123C	[T]	None	1/1	[Bra029355]	ATS623010	MAM1	[intron]	BrGM4-F	TGGCACCACCAACTATTGTGT	ATACACCGATTAATACTCCCACT	BrGM4-R	59.6	57.3	91
A02	25662177A	[G]	None	0/1	[Bra029355]	ATS623010	MAM1	[exon]	BrGM5-F	CTTCTCGGSGAGTAAGGG	TTCCGAAACCAAGCTCCAGAC	BrGM5-R	60.1	60.0	101
A02	25662411A	[C]	None	0/1	[Bra029355]	ATS623010	MAM1	[exon]	BrGM6-F	CGGACAGATCCAAGGGTAAGA	TGGCATCTGACCTTGACA	BrGM6-R	59.5	59.3	91
A02	27830876G	[A]	1/1	None	[Bra031802]	ATS665940	CHY1	[upstream-1K]	BrGM7-F	AATGGGATGAGAGGCAAGCC	TGTGTGGTGGGTATGATAAAAGCT	BrGM7-R	60.1	59.2	96
A02	27832394T	[A]	1/1	None	[Bra031802]	ATS665940	CHY1	[intron]	BrGM8-F	TGCTACTATTATCCTCTCAACA	AGAACCAACCCGCTTAGTGA	BrGM8-R	58.1	60.0	101
A02	27832530C	[T]	1/1	None	[Bra031802]	ATS665940	CHY1	[intron]	BrGM9-F	TCATCTCATGCCAAGGAATGT	CGCTGGCTGGAGAAAATAACA	BrGM9-R	58.0	59.5	107
A02	27832713C	[G]	1/1	None	[Bra031802]	ATS665940	CHY1	[intron]	BrGM10-F	ACATTCTGAGTGACTTTGACAC	CCTGACTAAGTAAACACTCTTGA	BrGM10-R	57.9	59.3	97
A02	27832975C	[G]	None	1/1	[Bra031802]	ATS665940	CHY1	[intron]	BrGM11-F	TTCTTTCTATTGTACCAGGATTTGC	ACAGATCAAAATGTTTTAGCACATGA	BrGM11-R	59.6	57.8	90
A02	27833262T	[C]	1/1	None	[Bra031802]	ATS665940	CHY1	[intron]	BrGM12-F	AGCTGACTGTGAGTTTTCA	TGATAGAGACGCCTGCAACGG	BrGM12-R	59.2	60.0	91
A03	21030712G	[A]	1/1	None	[Bra013011]	ATS623010	MAM1	[exon]	BrGM13-F	TTGGCTGTGTCATTCTGTGT	AATCTTTGTATGTAGTCTGTGA	BrGM13-R	60.2	57.6	90
A04	13128840C	[A]	None	0/1	[Bra039968]	ATS665940	CHY1	[upstream-1K]	BrGM14-F	ACTGGATGTAAGAGCATAACACT	ACTCGTTCAGACTGAAAAGCT	BrGM14-R	58.5	59.9	110
A04	13129243A	[T]	None	0/1	[Bra039968]	ATS665940	CHY1	[intron]	BrGM15-F	ACTGTCTCGCTGATGAGGA	ACAAGGGCTCCTATATAATGCA	BrGM15-R	59.1	57.3	108
A04	13130977G	[T]	None	1/1	[Bra039968]	ATS665940	CHY1	[exon]	BrGM16-F	ACCAGATGATTGGATCTCAGCT	TGCATCTCGAACCAACCG	BrGM16-R	59.0	59.2	97
A04	13192856T	[C]	None	1/1	[Bra039975]	ATS665940	CHY1	[exon]	BrGM17-F	ACAACCTCCACAATAACTTTGCT	GAAGGACGAGTGCAAGGTGT	BrGM17-R	59.8	60.2	102
A04	15323495G	[C]	0/1	None	[Bra021947]	ATS623020	MAM3	[exon]	BrGM18-F	CGCAAGAATCCGGCAACT	GGTAGCACACCAAGTGCTG	BrGM18-R	59.8	60.3	104
A04	15323982T	[A]	0/1	None	[Bra021947]	ATS623020	MAM3	[intron]	BrGM19-F	GGCTTTGAAATCGCGGAGG	AAGAAGTTACCATCGGCTAGTAGC	BrGM19-R	59.5	60.2	95
A05	7909879T	[C]	None	0/1	[Bra018392]	ATS665940	CHY1	[acceptor]	BrGM20-F	ACGCACGTTTCGAAACGGAAGA	TGCTATGTTTGAAGGCGGA	BrGM20-R	57.6	59.9	93
A05	7911396A	[G]	None	0/1	[Bra018392]	ATS665940	CHY1	[intron]	BrGM21-F	ATTCGGCGCCTCATTAACCT	TGCATGAGACAAAATTATTGAGCT	BrGM21-R	59.8	59.1	108
A05	7912405G	[A]	None	0/1	[Bra018392]	ATS665940	CHY1	[intron]	BrGM22-F	ACCCTGTGGAAAAGTTATTGCA	GGATGACCCACAGTGAACCT	BrGM22-R	58.4	59.4	99
A05	8956868G	[A]	1/1	None	[Bra018524]	ATS623010	MAM1	[intron]	BrGM23-F	TGTCATACCTCAGTACATGGA	AATCAACTCCGAAATCCAAGAA	BrGM23-R	59.0	57.2	108
A05	8959639G	[A]	1/1	None	[Bra018524]	ATS623010	MAM1	[intron]	BrGM24-F	CCGGTCTTATTTGATGCAACA	GATTTGCAGACAGGAGGA	BrGM24-R	59.8	59.5	91
A05	8960856G	[A]	1/1	None	[Bra018524]	ATS623010	MAM1	[exon]	BrGM25-F	GAACAGGTTACGTCGGCT	CGGCCTCTCGCTACTTTA	BrGM25-R	60.0	60.2	96
A06	9134973G	[T]	None	1/1	[Bra017964]	AT3G49680	BCAT-3	[exon]	BrGM26-F	CCAGTTCATGTGTCTCGC	TGGAGAAGGTAGCTTGGTGC	BrGM26-R	59.5	59.4	91
A06	9135281T	[A]	1/1	None	[Bra017964]	AT3G49680	BCAT-3	[intron]	BrGM27-F	ACTAGTTGTGTAAGATGCGAGT	AGTATAATCGACTGGCTGC	BrGM27-R	59.5	57.3	92
A06	9135769T	[C]	None	1/1	[Bra017964]	AT3G49680	BCAT-3	[exon]	BrGM28-F	TGCTCTAACCAACCAGGTAC	TCTCTCAGGAAAGTGTGGCA	BrGM28-R	59.6	60.5	90
A08	5949839C	[T]	None	1/1	[Bra040341]	AT4G13430	IPMI LSU1	[exon]	BrGM29-F	ACTAGGACTGTGGGTGTGT	GGATGTGTATGCCACCCTG	BrGM29-R	60.1	59.9	94
A08	5950446T	[A]	0/1	None	[Bra040341]	AT4G13430	IPMI LSU1	[intron]	BrGM30-F	TGTCAAGGAAATGAGGCTGA	TGATGTGCAGCAATTTATACCT	BrGM30-R	58.1	57.2	99
A09	23902466A	[G]	None	0/1	[Bra024634]	AT1G24100	UGT74B1	[exon]	BrGM31-F	CGCTCGGAGGAGGTATGT	TGCTTCAAAAGACCACTGCA	BrGM31-R	59.7	57.7	97
A09	23902934G	[A]	None	0/1	[Bra024634]	AT1G24100	UGT74B1	[exon]	BrGM32-F	AGGAGATGTGGAAGAGAGAGT	TCCGATCAGAGCTTCTCT	BrGM32-R	59.7	59.7	104
A09	23903003G	[T]	None	0/1	[Bra024634]	AT1G24100	UGT74B1	[exon]	BrGM33-F	BCTGTAAAGCGATGATGTA	TGCTTACCTTCAATGTTCTTCC	BrGM33-R	60.4	58.8	91
A09	24642876C	[T]	0/1	None	[Bra026988]	AT1G12140	FMOGS-OX5	[exon]	BrGM34-F	CATAGATTGTCGGCCCCG	GGGACTTAAAGAGGATGGCT	BrGM34-R	60.3	59.0	94
A09	24643313C	[A]	0/1	None	[Bra026988]	AT1G12140	FMOGS-OX5	[exon]	BrGM35-F	GGACACCCATCGGAGTTTC	TCGTGGAGATGGTTCGGTTC	BrGM35-R	60.4	59.8	95
A09	24644882A	[G]	0/1	None	[Bra026988]	AT1G12140	FMOGS-OX5	[upstream-2K]	BrGM36-F	TCCTCTGATGTTGAACACTAAC	GGAGGCAGAGAGATAATAGAGAGG	BrGM36-R	58.1	59.1	109
A10	2452719T	[A]	None	1/1	[Bra015330]	AT1G04580	AAO4	[exon]	BrGM37-F	GACTCAGTTGGATTTTTCTGTGCA	ACTCTCGACTTTCTGTGACAC	BrGM37-R	60.0	60.0	90
A10	2453160T	[C]	None	1/1	[Bra015330]	AT1G04580	AAO4	[exon]	BrGM38-F	GGAAAGGGGAAAGCAGAGAAGA	GGCTTCAAGAAATCCGGAA	BrGM38-R	60.0	57.4	92
A10	2453894T	[C]	None	1/1	[Bra015330]	AT1G04580	AAO4	[exon]	BrGM39-F	TGCTTATATCAACCGTCTCT	CAACCAAAAGCAACCAACCA	BrGM39-R	57.4	60.1	102
A10	2454757A	[G]	None	1/1	[Bra015330]	AT1G04580	AAO4	[intron]	BrGM40-F	ACCCTTATTGCTGTCTGCT	AGCTTTACTGCCAATCTGCA	BrGM40-R	57.6	58.5	97
A10	2455092G	[A]	None	1/1	[Bra015330]	AT1G04580	AAO4	[exon]	BrGM41-F	TGAGTCTGTTGATTGGTT	TTCTCTGCGCAAGCAAGT	BrGM41-R	58.3	59.9	93
A10	2455236A	[G]	None	1/1	[Bra015330]	AT1G04580	AAO4	[exon]	BrGM42-F	CGAAGCGACTCACAACAGC	CGAAGCCACTCCAAGTCT	BrGM42-R	60.1	60.0	94
A10	2455353G	[C]	None	1/1	[Bra015330]	AT1G04580	AAO4	[intron]	BrGM43-F	AGTCAATGCTGTAAGTGTACT	ATGTTTCATCTGTTTTGCC	BrGM43-R	57.1	57.3	107
A10	2456667C	[T]	1/1	None	[Bra015330]	AT1G04580	AAO4	[exon]	BrGM44-F	GCCGAGACTCTTCTGACAG	AGGGAACGGCTAAAATGATAGT	BrGM44-R	60.1	59.8	90
A02	25945099G	[A]	None	0/1	[Bra029311]	ATS661420	MYB28.3	[upstream-2K]	BrGM45-F	ACCATGGGCTGTATACCAT	GGATGATGGTCTTGGGCAA	BrGM45-R	58.2	60.0	109
A02	25946669C	[A]	None	0/1	[Bra029311]	ATS661420	MYB28.3	[exon]	BrGM46-F	AGCCATGTTGTGTCGAGAGA	AGCCACTTCTCATGTTCCG	BrGM46-R	59.6	60.0	99
A03	21303381A	[T]	1/1	None	[Bra012961]	ATS661420	MYB28.1	[exon]	BrGM47-F	GGAGGATCCAGTACATACA	GCGAGGTTTATGTCAGAGGA	BrGM47-R	57.1	59.2	107
A09	2869381A	[G]	1/1	None	[Bra035929]	ATS661420	MYB28.2	[upstream-2K]	BrGM48-F	AAGTTTCCGTCATCAGTGG	CGTATTGCCACTGTCTGAT	BrGM48-R	59.4	58.3	93

High Resolution Melting (HRM) 분석을 통한 SNP 탐색을 수행할 때에는 여러 다양한 조건들이 고려되어야 한다. 우선 단일 밴드로 PCR 산물의 크기가 300 bp 이하일 때 구분하기가 용이하며 PCR 산물 내에 SNP가 하나 일 때 HRM 분석이 가장 적당하다. 따라서 primer는 하나의 SNP를 중심으로 주변부 양쪽으로 50-60 bp에 변이 없이 대략 121 bp의 PCR 산물이 형성되게 제작하였다. PCR 산물의 크기와 단일 밴드 증폭 여부를 확인하기 위해 13FC16 계통의 gDNA를 주형으로 PCR을 수행한 결과, 30번 primer 조합은 PCR 산물이 증폭되지 않았으며 45번 primer 조합은 여러 밴드가 형성됨을 확인하였다 (그림 6). 따라서 이를 제외한 나머지 46개의 primer 조합을 두 계통간의 HRM 분석을 위해 사용하였다.



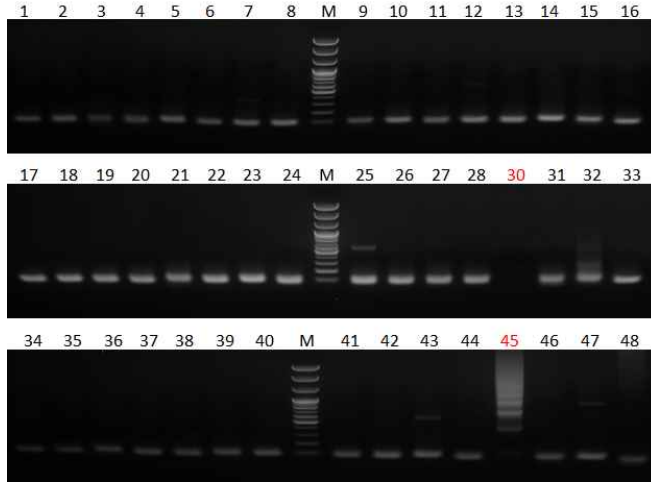


그림 6. 글루코시놀레이트 함량 관련 SNP 분자마커 탐색을 위한 프라이머의 PCR 결과. 앞서 선별된 46개의 primer 조합을 사용하여 13FC16과 13FC17 간에 HRM 분석을 실시한 결과 아래 제시된 6번 primer 조합과 같이 총 15개의 primer 조합에서 양친 간 다형성을 확인할 수

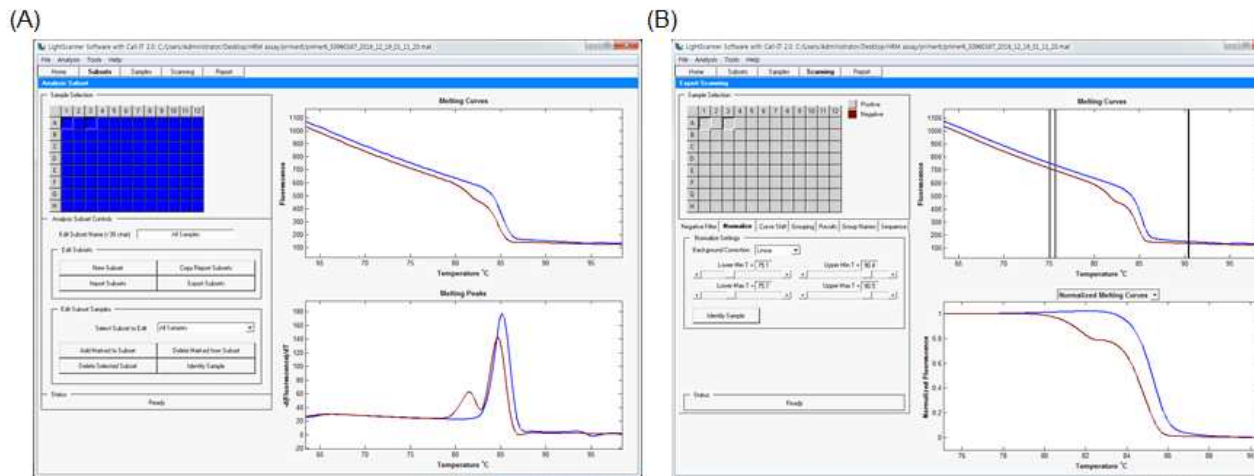


그림 7. 6번 프라이머 조합상에서 13FC16 (파란색)과 13FC17 (붉은색)의 HRM 분석. (A) Melting curve, (B) Normalized melting curve. 있었다 (그림 7).

선별된 15개의 SNP 마커를 13FC16, 13FC17, F<sub>1</sub>, 및 F<sub>2</sub> 90개체를 포함한 총 93 개체에 적용했을 때 다음과 같은 결과가 얻어졌다 (표 8). 우선 각각의 primer 조합에서 양친 간에 다른 해리 곡선을 확인할 수 있었으며, F<sub>1</sub>에서는 이와는 다른 해리 곡선 패턴을 확인할 수 있었다. 3번, 6번, 7번, 8번, 12번, 20번, 23번, 34번, 41번, 42번 primer 조합을 사용하여 HRM 분석을 수행했을 때 F<sub>2</sub> 개체 상에서 양친의 다른 해리곡선 패턴뿐만 아니라 F<sub>1</sub>의 해리곡선 패턴이 섞여있음을 볼 수 있었다. 이와 달리 10번, 24번, 25번, 31번, 47번 primer 조합을 사용해 HRM 분석을

표 8. SNP 분자마커의 HRM 분석.

Primer	3	6	7	8	10	12	20	23	24	25	31	34	41	42	47
Gene ID	Bra029353	Bra029353	Bra031802	Bra031802	Bra031802	Bra031802	Bra018392	Bra018524	Bra018524	Bra018524	Bra024634	Bra026988	Bra015330	Bra015330	Bra012961
Gene name	MAMI	MAMI	CHY1	CHY1	CHY1	CHY1	CHY1	MAMI	MAMI	MAMI	UGT74B1	FMOGS- OXS	AAO4	AAO4	MYB28.1
13FC16	AA	AA	AA	AA	GG	CC	TT	AA	AA	AA	CC	GG	AA	TT	
13FC17	AC	AC	GG	TT	CC	TT	TC	GG	GG	GG	AG	CT	AA	GG	AA
F1-2															
F2-1	F1	AA	AA	AA	GG	F1	TT	AA	GG	GG	AA	CC	F1	GG	TT
F2-2	F1	F1	F1	TT	CC	TT	TC	GG	GG	GG	AA	CC	F1	GG	AA
F2-3	F1	F1	AA	AA	GG	CC	TT	GG	AA	GG	AG	CC	GG	AA	AA
F2-4	F1	F1	AA	AA	GG	CC	F1	AA	?	AA	?	CC	GG	GG	AA
F2-5	AC	AC	F1	TT	CC	TT	TT	AA	?	AA	AA	CT	?	GG	AA
F2-7	F1	AA	F1	TT	CC	CC	F1	GG	GG	GG	?	CT	GG	GG	AA
F2-8	F1	F1	F1	AA	GG	CC	TT	AA	AA	AA	AA	CT	GG	F1	AA
F2-9	F1	F1	F1	AA	GG	F1	F1	F1	AA	AA	AA	CT	F1	F1	AA
F2-10	AA	F1	F1	TT	CC	TT	TT	AA	AA	AA	AA	CT	F1	F1	TT
F2-11	AC	AC	GG	TT	CC	TT	TC	F1	AA	AA	AA	CT	?	GG	TT
F2-12	F1	F1	F1	AA	GG	F1	TC	F1	AA	AA	AA	CT	F1	F1	AA
F2-13	AC	AC	GG	TT	CC	TT	TC	GG	GG	GG	AA	F1	F1	F1	TT
F2-14	F1	AA	GG	TT	CC	F1	TC	GG	GG	GG	AA	F1	F1	F1	TT
F2-15	F1	F1	F1	AA	GG	F1	TC	F1	AA	AA	AG	F1	AA	GG	AA
F2-16	F1	F1	AA	AA	GG	F1	TC	F1	AA	AA	AA	CT	F1	F1	TT
F2-17	AC	AC	F1	TT	?	TT	TC	F1	AA	AA	AG	CC	F1	GG	TT
F2-18	AC	AC	AA	AA	GG	F1	TC	F1	AA	AA	AA	CT	F1	F1	AA
F2-19	F1	F1	GG	TT	CC	F1	TC	F1	AA	AA	AA	CT	F1	F1	TT
F2-21	F1	AA	GG	TT	CC	F1	TC	GG	GG	GG	AA	CT	F1	F1	TT
F2-22	AC	AA	GG	TT	CC	F1	TC	GG	GG	GG	AG	CT	?	GG	AA
F2-23	F1	F1	AA	F1	GG	F1	TT	AA	AA	AA	AG	CT	?	GG	TT
F2-24	F1	AA	F1	AA	CC	F1	TC	GG	GG	GG	AA	F1	F1	F1	TT
F2-26	F1	F1	AA	AA	GG	F1	F1	GG	GG	GG	AA	F1	F1	F1	AA
F2-27	AC	AA	GG	TT	?	F1	F1	GG	GG	GG	AG	F1	F1	GG	AA
F2-29	?	AC	F1	TT	CC	TT	TC	GG	GG	GG	AA	CT	?	GG	AA
F2-30	F1	AA	F1	TT	CC	F1	TT	F1	AA	AA	AA	F1	F1	F1	TT
F2-31	AC	AC	F1	TT	CC	F1	TC	GG	GG	GG	AG	F1	F1	F1	TT
F2-32	F1	?	F1	TT	CC	TT	TC	GG	GG	GG	AG	CT	AA	GG	TT
F2-33	F1	F1	AA	AA	GG	F1	F1	F1	AA	AA	AA	F1	AA	GG	TT
F2-34	F1	AA	F1	TT	CC	F1	TC	GG	GG	GG	AG	CT	F1	F1	TT
F2-35	F1	F1	F1	?	F1	TC	GG	GG	GG	GG	AA	F1	F1	F1	TT
F2-36	F1	F1	AA	F1	GG	F1	TT	GG	GG	GG	AG	CT	F1	F1	AA
F2-37	AC	AC	F1	TT	CC	TT	TT	GG	GG	GG	AG	F1	F1	GG	TT
F2-38	F1	F1	AA	F1	GG	F1	TC	F1	AA	AA	AA	F1	F1	GG	TT
F2-41	F1	AA	GG	TT	CC	F1	TC	GG	GG	GG	AA	CT	F1	F1	TT
F2-42	AC	AC	F1	TT	CC	TT	TC	GG	GG	GG	AA	CC	F1	F1	TT
F2-43	F1	AA	AA	AA	GG	F1	TC	GG	GG	GG	AA	CC	F1	F1	TT
F2-44	F1	F1	F1	TT	GG	F1	F1	GG	GG	GG	AG	CT	F1	F1	AA
F2-45	AC	AC	F1	TT	CC	TT	TT	GG	GG	GG	F1	CT	F1	F1	TT
F2-46	F1	F1	F1	AA	GG	F1	TC	GG	GG	GG	AA	CC	F1	F1	AA

Primer	3	6	7	8	10	12	20	23	24	25	31	34	41	42	47
Gene ID	Bra029353	Bra029353	Bra031802	Bra031802	Bra031802	Bra031802	Bra018392	Bra018524	Bra018524	Bra018524	Bra024634	Bra026988	Bra015330	Bra015330	Bra012961
Gene name	MAMI	MAMI	CHY1	CHY1	CHY1	CHY1	CHY1	MAMI	MAMI	MAMI	UGT74B1	FMOGS- OXS	AAO4	AAO4	MYB28.1
13FC16	AA	AA	AA	AA	GG	CC	TT	AA	AA	AA	CC	GG	AA	TT	
13FC17	AC	AC	GG	TT	CC	TT	TC	GG	GG	GG	AG	CT	AA	GG	AA
F1-2															
F2-1	F1	AA	AA	AA	GG	F1	TT	AA	GG	GG	AA	CC	F1	GG	TT
F2-2	F1	F1	F1	TT	CC	TT	TC	GG	GG	GG	AA	CC	F1	GG	AA
F2-3	F1	F1	AA	AA	GG	CC	TT	GG	AA	GG	AG	CC	GG	AA	AA
F2-4	F1	F1	AA	AA	GG	CC	F1	AA	?	AA	?	CC	GG	GG	AA
F2-5	AC	AC	F1	TT	CC	TT	TT	AA	?	AA	AA	CT	?	GG	AA
F2-7	F1	AA	F1	TT	CC	CC	F1	GG	GG	GG	?	CT	GG	GG	AA
F2-8	F1	F1	F1	AA	GG	CC	TT	AA	AA	AA	AA	CT	GG	F1	AA
F2-9	F1	F1	F1	AA	GG	F1	F1	F1	AA	AA	AA	CT	F1	F1	AA
F2-10	AA	F1	F1	TT	CC	TT	TT	AA	AA	AA	AA	CT	F1	F1	TT
F2-11	AC	AC	GG	TT	CC	TT	TC	F1	AA	AA	AA	CT	?	GG	TT
F2-12	F1	F1	F1	AA	GG	F1	TC	F1	AA	AA	AA	CT	F1	F1	AA
F2-13	AC	AC	GG	TT	CC	TT	TC	GG	GG	GG	AA	F1	F1	F1	TT
F2-14	F1	AA	GG	TT	CC	F1	TC	GG	GG	GG	AA	F1	F1	F1	TT
F2-15	F1	F1	F1	AA	GG	F1	TC	F1	AA	AA	AG	F1	AA	GG	AA
F2-16	F1	F1	AA	AA	GG	F1	TC	F1	AA	AA	AA	CT	F1	F1	TT
F2-17	AC	AC	F1	TT	?	TT	TC	F1	AA	AA	AG	CC	F1	GG	TT
F2-18	AC	AC	AA	AA	GG	F1	TC	F1	AA	AA	AA	CT	F1	F1	AA
F2-19	F1	F1	GG	TT	CC	F1	TC	F1	AA	AA	AA	CC	F1	F1	TT
F2-21	F1	AA	GG	TT	CC	F1	TC	GG	GG	GG	AA	CT	F1	F1	TT
F2-22	AC	AA	GG	TT	CC	F1	TC	GG	GG	GG	AG	CT	?	GG	AA
F2-23	F1	F1	AA	F1	GG	F1	TT	AA	AA	AA	AG	CT	?	GG	TT
F2-24	F1	AA	F1	AA	CC	F1	TC	GG	GG	GG	AA	F1	F1	F1	TT
F2-26	F1	F1	AA	AA	GG	F1	F1	GG	GG	GG	AA	F1	F1	F1	AA
F2-27	AC	AA	GG	TT	?	F1	F1	GG	GG	GG	AG	F1	F1	GG	AA
F2-29	?	AC	F1	TT	CC	TT	TC	GG	GG	GG	AA	CT	?	GG	AA
F2-30	F1	AA	F1	TT	CC	F1	TT	F1	AA	AA	AA	F1	F1	F1	TT
F2-31	AC	AC	F1	TT	CC	F1	TC	GG	GG	GG	AG	F1	F1	F1	TT
F2-32	F1	?	F1	TT	CC	TT	TC	GG	GG	GG	AG	CT	AA	GG	TT
F2-33	F1	F1	AA	AA	GG	F1	F1	F1	AA	AA	AA	F1	AA	GG	TT
F2-34	F1	AA	F1	TT	CC	F1	TC	GG	GG	GG	AG	CT	F1	F1	TT
F2-35	F1	F1	F1	F1	?	F1	TC	GG	GG	GG	AA	F1	F1	F1	TT
F2-36	F1	F1	AA	F1	GG	F1	TT	GG	GG	GG	AG	CT	F1	F1	AA
F2-37	AC	AC	F1	TT	CC	TT	TT	GG	GG	GG	AG	F1	F1	GG	TT
F2-38	F1	F1	AA	F1	GG	F1	TC	F1	AA	AA	AA	AA	F1	F1	GG
F2-41	F1	AA	GG	TT	CC	F1	TC	GG	GG	GG	AA	CT	F1	F1	TT
F2-42	AC	AC	F1	TT	CC	TT	TC	GG	GG	GG	AA	CC	F1	F1	TT
F2-43	F1	AA	AA	AA	GG	F1	TC	GG	GG	GG	AA	CC	F1	F1	TT
F2-44	F1	F1	F1	TT	GG	F1	F1	GG	GG	GG	AG	CT	F1	F1	AA
F2-45	AC	AC	F1	TT	CC	TT	TT	GG	GG	GG	F1	CT	F1	F1	TT
F2-46	F1	F1	F1	AA	GG	F1	TC	GG	GG	GG	AA	CC	F1	F1	AA

Primer	3	6	7	8	10	12	20	23	24	25	31	34	41	42	47
Gene ID	Bra029355	Bra029355	Bra031802	Bra031802	Bra031802	Bra031802	Bra018392	Bra018524	Bra018524	Bra018524	Bra024634	Bra026988	Bra015330	Bra015330	Bra012961
Gene name	MAMI	MAMI	CHY1	CHY1	CHY1	CHY1	CHY1	MAMI	MAMI	MAMI	UGT74B1	FMOGS-OX5	AAO4	AAO4	MYB28.1
F1-2															
F2-48	AC	AA	F1	TT	CC	F1	TC	GG	GG	GG	AA	CT	F1	F1	TT
F2-49	F1	F1	AA	AA	GG	F1	TC	F1	AA	AA	AA	CT	AA	F1	AA
F2-51	F1	F1	F1	F1	GG	F1	TT	AA	AA	AA	AA	CC	F1	F1	TT
F2-52	AC	AC	F1	TT	CC	TT	TT	F1	AA	AA	AA	CT	F1	F1	TT
F2-53	F1	AA	F1	TT	CC	F1	TT	GG	GG	GG	AG	F1	F1	F1	TT
F2-54	AA	F1	F1	TT	CC	F1	TT	F1	AA	AA	AA	F1	F1	F1	AA
F2-56	F1	F1	AA	AA	GG	F1	TT	F1	AA	AA	AA	AG	F1	F1	TT
F2-57	F1	F1	AA	TT	GG	F1	TT	F1	GG	AA	AA	CT	F1	F1	AA
F2-58	F1	AA	AA	AA	GG	F1	TC	GG	GG	GG	AA	F1	AA	GG	AA
F2-60	F1	AA	GG	TT	GG	F1	TT	GG	GG	GG	AA	F1	F1	F1	TT
F2-65	F1	F1	AA	F1	GG	F1	TC	GG	GG	GG	AA	CT	F1	F1	TT
F2-66	F1	F1	AA	AA	GG	F1	TC	GG	GG	GG	AA	CC	AA	GG	AA
F2-67	F1	AA	F1	TT	CC	F1	F1	GG	GG	GG	AA	CT	F1	F1	TT
F2-68	F1	F1	AA	AA	GG	F1	F1	F1	AA	AA	AA	CT	F1	F1	TT
F2-69	F1	F1	F1	TT	CC	F1	TC	GG	GG	GG	AG	CT	F1	F1	AA
F2-70	F1	F1	F1	AA	GG	F1	TC	GG	AA	GG	AA	CT	GG	F1	AA
F2-71	F1	AA	AA	F1	GG	F1	F1	GG	GG	GG	AG	CT	F1	F1	AA
F2-72	F1	F1	F1	TT	CC	CC	TT	F1	AA	AA	AA	CT	GG	F1	TT
F2-73	F1	F1	?	AA	GG	F1	TT	F1	AA	AA	AA	F1	F1	F1	AA
F2-74	F1	F1	F1	TT	CC	F1	TT	GG	GG	GG	AA	CT	F1	F1	TT
F2-75	F1	AA	GG	TT	CC	F1	F1	F1	AA	AA	AA	CT	F1	F1	AA
F2-76	F1	F1	F1	TT	CC	TT	F1	F1	AA	AA	AA	CT	AA	F1	AA
F2-77	F1	F1	AA	AA	GG	F1	F1	AA	AA	AA	AA	F1	AA	GG	TT
F2-79	F1	F1	AA	F1	GG	F1	TT	AA	AA	AA	AG	CT	F1	F1	AA
F2-80	F1	AA	F1	AA	GG	F1	TC	GG	GG	GG	AG	CT	F1	GG	TT
F2-81	F1	F1	F1	TT	CC	CC	TC	GG	GG	GG	AA	CT	F1	F1	TT
F2-83	AA	F1	AA	AA	GG	F1	F1	GG	GG	GG	AA	CT	F1	F1	AA
F2-86	AC	AC	F1	TT	CC	TT	TT	AA	GG	AA	AA	CT	F1	F1	TT
F2-87	AC	AC	F1	TT	?	TT	TC	GG	AA	GG	AA	CT	?	GG	TT
F2-88	AC	AC	AA	AA	GG	F1	TC	F1	AA	AA	AG	CT	F1	F1	AA
F2-90	AC	AC	F1	TT	CC	TT	TC	GG	GG	GG	AA	F1	F1	F1	TT
F2-92	F1	AA	AA	AA	GG	F1	F1	F1	AA	GG	AA	CT	F1	F1	TT
F2-94	F1	F1	AA	AA	GG	F1	F1	F1	AA	AA	AG	CT	F1	GG	AA
F2-95	F1	AA	F1	TT	CC	F1	TC	GG	GG	AA	AG	F1	F1	F1	AA
F2-96	F1	F1	F1	TT	CC	F1	F1	F1	AA	AA	AG	CT	F1	F1	TT
F2-97	F1	F1	AA	AA	GG	F1	TC	GG	GG	GG	AG	CC	F1	F1	TT
F2-98	AC	AC	F1	TT	CC	F1	F1	F1	AA	AA	AA	CT	F1	F1	TT
F2-99	F1	AA	F1	TT	CC	F1	TC	GG	GG	GG	AG	CC	F1	F1	AA
F2-100	AC	AC	F1	TT	CC	TT	TC	AA	AA	AA	AA	CT	F1	F1	AA

Primer	3	6	7	8	10	12	20	23	24	25	31	34	41	42	47
Gene ID	Bra029355	Bra029355	Bra031802	Bra031802	Bra031802	Bra031802	Bra018392	Bra018524	Bra018524	Bra018524	Bra024634	Bra026988	Bra015330	Bra015330	Bra012961
Gene name	MAMI	MAMI	CHY1	CHY1	CHY1	CHY1	CHY1	MAMI	MAMI	MAMI	UGT74B1	FMOGS-OX5	AAO4	AAO4	MYB28.1
F1-2															
F2-101	AC	AC	F1	TT	CC	TT	F1	AA	AA	AA	AA	CC	F1	F1	TT
F2-102	F1	AA	F1	TT	CC	F1	TC	GG	GG	GG	AG	CC	F1	F1	AA
F2-103	F1	F1	F1	TT	CC	F1	TC	GG	GG	GG	AA	CT	F1	F1	TT
F2-105	AC	AA	F1	TT	CC	F1	TC	F1	AA	AA	AG	CT	AA	GG	AA
F2-106	F1	F1	F1	AA	GG	F1	TT	F1	AA	AA	AA	CT	F1	F1	TT
F2-107	F1	F1	AA	F1	GG	F1	F1	AA	AA	AA	AG	CT	AA	GG	TT
F2-109	F1	AA	AA	TT	GG	F1	F1	GG	GG	GG	AA	CC	AA	GG	AA
F2-110	F1	F1	F1	AA	GG	F1	TC	GG	AA	AA	AA	CT	F1	F1	AA
F2-112	F1	F1	AA	F1	GG	F1	F1	F1	AA	AA	AA	CT	F1	F1	TT
F2-114	F1	F1	AA	AA	GG	F1	TC	GG	GG	GG	F1	CT	F1	F1	TT
F2-115	F1	AA	F1	TT	CC	F1	TT	F1	AA	AA	AG	CC	AA	F1	TT

수행했을 때 F<sub>2</sub> 개체 상에서 양친의 다른 해리곡선 패턴만이 확인되었다.

선별된 SNP 마커와 글루코시놀레이트 함량간의 상관관계를 살펴보기 위해 글루코시놀레이트 함량을 고함량부터 저함량까지 나열한 후 해당 개체의 염기서열을 나열해 보았다. 대부분의 SNP 분자마커가 글루코시놀레이트 함량과 별다른 상관관계를 보이지 않았지만 47번 SNP 분자 마커 경우 글루코시놀레이트 함량 상위 21%의 F<sub>2</sub> 개체는 모두 글루코시놀레이트 고함량 계통인 13FC16과 같은 염기서열을 가지고 있었다 (표 9). 47번 SNP 분자마커는 *BrMYB28.1* 유전자에 존재하는 마커로 *BrMYB28.1* 유전자는 지방족 글루코시놀레이트 생합성에 중요한 영향을 미치는 전사 인자를 생성하는 것으로 알려져 있다. 또한 앞선 유전자 발현 분석실험을 통해 13FC16 계통에 비해 13FC17 계통에서 *BrMYB28.1* 유전자 발현률이 감소됨을 확인 할 수 있었고 여러 실험적 근거를 통해 47번 SNP 분자마커가 글루코시놀레이트 함량 예측에 가장 근접하

게 활용될 수 있으리라 생각된다. 하지만 이는 일부 개체만을 가지고 수행한 실험으로 앞으로 더 많은 개체상에서 해당 분자마커와 글루코시놀레이트 함량간의 상관관계를 파악해 나가야 할 것이다.

표 9. 상위 25% 글루코시놀레이트 함량을 포함한 F<sub>2</sub> 식물체의 HRM 분석 결과.

Primer			3	6	7	8	10	12	20	23	24	25	31	34	41	42	47
Gene ID	Glucosinolate content		Bra029355	Bra029355	Bra031802	Bra031802	Bra031802	Bra031802	Bra018392	Bra018524	Bra018524	Bra018524	Bra024634	Bra026988	Bra015330	Bra015330	Bra012961
Gene name	Area	μmol/g dry wt	MAM1	MAM1	CHY1	CHY1	CHY1	CHY1	CHY1	MAM1	MAM1	MAM1	UGT7481	FMOGS -OX5	AAO4	AAO4	MYB28.1
13FC16	66.862	0.309	AA	AA	AA	AA	GG	CC	TT	AA	AA	AA	AA	cc	GG	AA	TT
13FC17	0.000	0.000	AC	AC	GG	TT	CC	TT	TC	GG	GG	GG	AG	CC	AA	GG	AA
F1-2	39.059	0.181															
F2-35	392.631	1.815	F1	F1	F1	F1	?	F1	TC	GG	GG	GG	AA	F1	F1	F1	TT
F2-37	228.751	1.057	AC	AC	F1	TT	CC	TT	TT	GG	GG	GG	AG	F1	F1	GG	TT
F2-51	212.422	0.982	F1	F1	F1	F1	GG	F1	TT	AA	AA	AA	AA	CC	F1	F1	TT
F2-71	174.139	0.805	F1	AA	AA	F1	GG	F1	F1	GG	GG	GG	AG	CT	F1	F1	TT
F2-46	160.190	0.740	F1	F1	F1	AA	GG	F1	TC	GG	GG	GG	AA	CC	F1	F1	-
F2-69	153.957	0.712	F1	F1	F1	TT	CC	F1	TC	GG	GG	GG	AG	CT	F1	F1	TT
F2-73	152.166	0.703	F1	F1	?	AA	GG	F1	TT	F1	AA	AA	AA	F1	F1	F1	-
F2-70	145.219	0.671	F1	F1	F1	AA	GG	F1	TC	GG	AA	GG	AA	CT	GG	F1	TT
F2-33	140.661	0.650	F1	F1	AA	AA	GG	F1	F1	F1	AA	AA	AA	F1	AA	GG	TT
F2-52	133.684	0.618	AC	AC	F1	TT	CC	TT	TT	F1	AA	AA	AA	CT	F1	F1	TT
F2-72	128.943	0.596	F1	F1	F1	TT	CC	CC	TT	F1	AA	AA	AA	CT	GG	F1	TT
F2-74	126.672	0.585	F1	F1	F1	TT	CC	F1	TT	GG	GG	GG	AA	CT	F1	F1	TT
F2-17	125.714	0.581	AC	AC	F1	TT	?	TT	TC	F1	AA	AA	AG	CC	F1	GG	TT
F2-67	124.055	0.573	F1	AA	F1	TT	CC	F1	F1	GG	GG	GG	AA	CT	F1	F1	TT
F2-16	117.555	0.543	F1	F1	AA	AA	GG	F1	TC	F1	AA	AA	AA	CT	F1	F1	TT
F2-68	115.187	0.532	F1	F1	AA	AA	GG	F1	F1	F1	AA	AA	AA	CT	F1	F1	TT
F2-66	113.153	0.523	F1	F1	AA	AA	GG	F1	TC	GG	GG	GG	AA	CC	AA	GG	-
F2-65	110.981	0.513	F1	F1	AA	F1	GG	F1	TC	GG	GG	GG	AA	CT	F1	F1	TT
F2-13	108.057	0.499	AC	AC	GG	TT	CC	TT	TC	GG	GG	GG	AA	F1	F1	F1	TT
F2-15	99.269	0.459	F1	F1	F1	AA	GG	F1	TC	F1	AA	AA	AG	F1	AA	GG	-
F2-38	97.540	0.451	F1	F1	AA	F1	GG	F1	TC	F1	AA	AA	AA	F1	F1	GG	TT
F2-23	95.143	0.440	F1	F1	AA	F1	GG	F1	TT	AA	AA	AA	AG	CT	?	GG	TT
F2-60	94.948	0.439	F1	AA	GG	TT	GG	F1	TT	GG	GG	GG	AA	F1	F1	F1	TT

### 3 절. 제3세부 과제: 분자 및 유전체육종 효율화 시스템 개발

#### 1. 이론적, 실험적 접근방법

##### 가. 우수 형질 도입위한 여교배에서 선발 효율을 높이기 위한 MABC(marker assist backcrossing)검정 시스템 구축

- 우량형질을 도입하기 위해 사용하는 여교잡 기법에서 BC4-BC6세대까지 세대를 진전함에 있어서 수년이 소요될 뿐만 아니라 여교잡으로 고정되는 정도가 염색체 부위, 형질, 계통, 교배조합에 따라 달라짐.
- 유전체 기반의 육종 시스템을 구현하기 위해서는 육종소재에 대한 정확한 데이터베이스, 표준유전체 정보, 모든 유전자의 유전양상을 이해할 수 있는 초고밀도 유전지도 (Ultra-density genetic map)가 필요함.
- 초고밀도 유전지도는 정확한 QTL mapping 및 진단용 분자마커 개발을 가속화 함
- 배추는 표준유전체가 완성되고 resequencing이 활발하게 이루어지면서 genome-wide SNP 와 같은 대규모 분자마커가 확보 가능함.
- SNP는 유전체 전반에 걸쳐 분포하며 그 수가 방대하여 특정 유전자에서 allelic variation 구분이 가능하여 각종 진단을 위해 사용되고 있고, 육종에서 형질 연관 마커로서 뿐 아니라 고밀도 유전자지도 작성용으로도 주목 받고 있음 (Rafalski 2002; Snowdon and Friedt 2004; Rahman et al. 2007)
- 기존 배추 10종을 resequencing하여 생산한 데이터의 SNP 분석 결과를 보면 100,000 ~ 500,000개의 SNP를 확보할 수 있고, 이는 대부분의 유전자를 포함하는 충분한 분자마커를 개발할 수 있어, resequencing을 이용한 SNP분석이 대량분자표지 확보에 가장 효율적인 방법으로 판단됨.
- 여교잡 육종에 필요한 MABC(marker-assisted backcrossing) 분자마커는 염색체를 적절히 구획하여 background selection을 실시하는 기술임. 이를 위해 표준 유전체 정보를 이용한 물리적인 거리 단위로 구획을 나누거나 유전지도를 통한 유전적 거리 단위로 구획을 나누어 효과적인 background selection 조건을 규명해야 함.
- Bi-parent 유래의 RIL 집단을 sequencing 하고 이들 정보를 기반으로 교배집단에서 재조합이 일어나는 위치, 정도를 확인하여 배추의 10개 염색체를 나타내면서 목표하는 특정 형질이 교배시에 움직이는 크기(재조합 단위)를 SNP로 가시화 하고자 함.
- 교배 및 선발이 반복되는 육종과정에서 background selection 용 분자마커를 활용한 육종 시스템 적용이 목표 형질에 대한 집적 (gene pyramiding), 선발 (selection), 및 유용형질 외 불순 부위 분리 (gene dragging) 에 유용함.

##### 나. 내병성 (뿌리혹병 등) 형질 연관 마커도움선발용 (Marker-Assist Selection, MAS) 마커 선발 및 개발

- 십자화과 작물 및 모델식물에서 내병성 형질에 대한 문헌 조사로 유전자 및 마커 정보 확보
- 수집한 유전자원에 적용하여 범용성 검정 및 개선
- 기존 마커 타입이 아닌 신규 자원을 이용하여 새로운 병저항성 마커 개발

**다. 내병성 자원으로 MAS용 마커 개발용 계통 육성 및 MABC 검정용 집단 양성**

- 수집한 내병성 자원을 소포자 배양으로 계통 육성
- 목적형질 도입 후 고정하는 과정에서 유전체 정보 및 MABC 마커검정으로 고정된 선발 개체의 효율성을 보기위하여 교배조합 작성.

## 2절 연구내용

**가. 우수 형질 도입위한 여교배에서 선발 효율을 높이기 위한 MABC(marker assist backcrossing)검정 시스템 구축**

(1) MABC(marker assist backcrossing)검정위한 SNP 데이터 생산 및 선발

- 효과적인 background selection 조건 규명하기 위해 표준재료 유전체 정보를 이용한 CKRIL(8번 자가수정 집단) 사용
- CKRIL 집단 중 25계통을 resequencing 하여 유전체 구조 분석을 위한 대량의 SNP 확보
- 염기서열 근간으로 하는 초고밀도 유전지도 정보 사용, 교차율 정보에 따라 초고밀도 유전 지도에서 교배 자손의 지놈이 교차되는 크기마다 격자(window)를 구성하여 해당 부위를 표현하는 분자마커를 선발
- Resequencing 으로 분석한 SNP 기반으로 하여 10개 염색체 내에서 LD 분석
- 우수계통 보안 위한 양친의 유전자형 정보 확보
- MABC(marker assist backcrossing)용 분자표지의 분포 조사 및 분석용 선발
- 교배 양친/집단에서 In-silico 상에서 예측된 SNP를 HRM, fluidigm을 사용하여 실험적 검증(validation).

(2) 여교배 효율화 위한 MABC 검정 시스템 적용, background selection에 대한 실험적 검증

(가) 내병성(뿌리혹병) 형질 및 자원의 MS화를 위한 여교배 집단에서 MABC 적용

- 뿌리혹병 저항성 자원 확보 및 기보고된 분자표지 이용 검정
- 교배조합에 사용한 두 내혼계 사이에서 MAB 이용 선발한 개체들의 background 정보 확보
- 목표하는 회복친과 유사도 높은 개체 선발로 여교배 세대진전 단축
- MAB 이용한 실험적 검정용 집단 양성, gene pyramiding위하여 병저항성 형질에 관여하는 주동 QTL 유전자좌 보유 계통간 교배조합 작성

나. 뿌리혹병 저항성 형질에 대하여 MAS을 위한 분자마커 선발 및 개발

- 내병성 형질에 대한 문헌 조사로 저항성 유전자 및 마커 정보 확보
- 뿌리혹병 저항성자원을 기 보고된 분자표지 이용 분류 및 마커의 범용성 검정 및 개선
- 기존 마커 타입이 아닌 신규 자원을 이용하여 새로운 병저항성 마커 개발

다. 내병성 자원이용 MAS용 마커 개발용 계통 육성 및 MABC 검정용 집단 양성

- 수집한 내병성 자원을 소포자 배양으로 계통 육성, 병리검정으로 내병성 계통 선발
- 뿌리혹병 저항성에 관여하는 주동 QTL 유전자좌 보유 계통간 교배조합 작성.
- MAS(뿌리혹병 저항성 형질 마커) 이용 저항성 형질 보유 개체군 선발.

○ MAB 이용 선발한 개체들의 background 정보 확보

### 3절 연구결과

[1년차]

#### 1. MABC(marker assist backcrossing) 시스템 구축

##### 가. 염기서열 재분석을 통해 대용량 염기서열 정보 확보

○ 우량형질을 도입하기 위해 보편적으로 사용하는 여교잡 기법에서 BC4-BC6세대까지 세대를 진전함에 있어서 수년이 소요될 뿐만 아니라 여교잡으로 고정되는 정도가 염색체 부위, 형질, 계통, 교배조합에 따라 달라진다. 따라서 여교잡 육종에 필요한 MABC(marker-assisted backcrossing) 분자마커는 염색체를 적절히 구획하여 background selection을 실시하는 기술로 이를 위해 표준 유전체 정보를 이용한 물리적인 거리 단위로 구획을 나누거나 유전지도를 통한 유전적 거리 단위로 구획을 나누어 효과적인 background selection 조건을 규명해야 한다. 기존 배추 10종을 resequencing하여 생산한 데이터의 SNP 분석 결과를 보면 100,000 ~ 500,000개의 SNP를 확보할 수 있고, 이는 대부분의 유전자를 포함하는 충분한 분자마커를 개발할 수 있어, resequencing을 이용한 SNP분석이 대량분자표지 확보에 가장 효율적인 방법으로 판단되었기에 표준유전체와 권심계 내혼계를 교배한 집단을 이용해 SNP 발굴을 하고자 하였다.

지부계와 권심계의 교배로 생성한 자식 일세대를 SSD(single seed descent) 방법으로 자가 수정하여 고정시킨 집단, F9 세대 recombinant inbred lin(RIL) 집단 12 계통을 Illumina HiSeq2000 platform을 이용하여 paired-end 방식으로 염기서열 재분석(resequencing) 하였다 (표 1).

<표 1. CKRIL 집단 시료 12점의 염기서열 생산량(raw data) 통계치>

File name	Sample	No. of Reads	Avg. length	Total length (bp)	Genome coverage*
TN1305D2418_1.fq	279008	14,077,100	100	1,407,710,000	≈9.92X
TN1305D2418_2.fq		14,077,100	100	1,407,710,000	
TN1305D2419_1.fq	279011	12,676,625	100	1,267,662,500	≈8.93X
TN1305D2419_2.fq		12,676,625	100	1,267,662,500	
TN1305D2421_1.fq	279018	15,222,457	100	1,522,245,700	≈10.73X
TN1305D2421_2.fq		15,222,457	100	1,522,245,700	
TN1305D2422_1.fq	279030	11,540,457	100	1,154,045,700	≈8.13X
TN1305D2422_2.fq		11,540,457	100	1,154,045,700	
TN1305D2423_1.fq	279053	13,953,197	100	1,395,319,700	≈9.83X
TN1305D2423_2.fq		13,953,197	100	1,395,319,700	

TN1305D2424_1.fq	279055	12,594,176	100	1,259,417,600	≈8.87X
TN1305D2424_2.fq		12,594,176	100	1,259,417,600	
TN1305D2426_1.fq	279064	15,622,970	100	1,562,297,000	≈11.01X
TN1305D2426_2.fq		15,622,970	100	1,562,297,000	
TN1305D2427_1.fq	279066	16,201,530	100	1,620,153,000	≈11.42X
TN1305D2427_2.fq		16,201,530	100	1,620,153,000	
TN1305D2428_1.fq	279067	15,320,888	100	1,532,088,800	≈10.80X
TN1305D2428_2.fq		15,320,888	100	1,532,088,800	
TN1305D2429_1.fq	279081	13,661,343	100	1,366,134,300	≈9.63X
TN1305D2429_2.fq		13,661,343	100	1,366,134,300	
TN1305D2430_1.fq	279085	15,052,460	100	1,505,246,000	≈10.61X
TN1305D2430_2.fq		15,052,460	100	1,505,246,000	
TN1305D2431_1.fq	279087	14,317,694	100	1,431,769,400	≈10.09X
TN1305D2431_2.fq		14,317,694	100	1,431,769,400	

\*Genome coverage : 각 샘플의 read total length 를 reference genome 의 총 길이(약 283Gb)로 나눈 값.

- 생산한 염기서열 raw data의 퀄리티는 SolexaQA package 프로그램을 이용하여 전처리를 수행하였으며, 조건은 Phred score, 20 과 trimmed read length 를 25mer 이상을 기준값으로 사용하였다. 전처리 후 평균적으로 raw data의 약 83% 데이터를 확보 하였다(표 2).

<표 2. CKRIL 집단 시료 12점의 염기서열 퀄리티에 따른 전처리 (trimming) 통계치>

File name	Sample	No. of Reads	Avg. length	Total length (bp)	Trimmed/raw*
TN1305D2418_1.fq	279008	13,045,349	90.72	1,183,449,796	84.07%
TN1305D2418_2.fq		13,045,349	88.73	1,157,531,129	82.23%
TN1305D2419_1.fq	279011	11,740,858	90.75	1,065,452,000	84.05%
TN1305D2419_2.fq		11,740,858	89.38	1,049,349,547	82.78%
TN1305D2421_1.fq	279018	13,911,138	90.33	1,256,612,775	82.55%
TN1305D2421_2.fq		13,911,138	88.64	1,233,027,458	81.00%
TN1305D2422_1.fq	279030	10,567,708	90.28	954,007,905	82.67%
TN1305D2422_2.fq		10,567,708	88.8	938,366,340	81.31%



TN1305D2423_1.fq		12,972,775	90.57	1,174,990,640	84.21%
	279053				
TN1305D2423_2.fq		12,972,775	89.62	1,162,614,199	83.32%
TN1305D2424_1.fq		11,790,663	90.78	1,070,406,422	84.99%
	279055				
TN1305D2424_2.fq		11,790,663	89.57	1,056,043,203	83.85%
TN1305D2426_1.fq		14,555,785	90.84	1,322,312,275	84.64%
	279064				
TN1305D2426_2.fq		14,555,785	89.4	1,301,223,065	83.29%
TN1305D2427_1.fq		14,879,352	90.54	1,347,204,078	83.15%
	279066				
TN1305D2427_2.fq		14,879,352	88.23	1,312,852,687	81.03%
TN1305D2428_1.fq		14,198,152	90.69	1,287,590,960	84.04%
	279067				
TN1305D2428_2.fq		14,198,152	88.74	1,259,924,756	82.24%
TN1305D2429_1.fq		12,732,027	90.5	1,152,296,511	84.35%
	279081				
TN1305D2429_2.fq		12,732,027	88.83	1,131,022,077	82.79%
TN1305D2430_1.fq		13,921,235	90.56	1,260,689,989	83.75%
	279085				
TN1305D2430_2.fq		13,921,235	88.65	1,234,180,838	81.99%
TN1305D2431_1.fq		13,002,558	85.17	1,107,470,949	77.35%
	279087				
TN1305D2431_2.fq		13,002,558	88.24	1,147,404,637	80.14%

#### 나. SNP 발굴 및 SNP validation을 위한 HRM 프라이머 디자인

- Trimming을 거친 샘플의 염기서열 reads를 표준유전체에 mapping 하여 각 샘플별 표준유전체의 해당 위치에 mapping 하여 SNP 발굴하였으며 reads의 depth 정보를 통해 SNP의 정확성을 높이고자 하였다.
- 12샘플의 alignment 수행 후, 표준유전체 기준으로 교배친 및 12 계통의 대량 SNP를 발굴하고, 교배양친의 유전형을 확인할 수 있도록 in silico genotyping을 하여 SNP matrix를 작성하였다. 기준으로 사용한 표준유전체는 약 283Mb(283,822,784 bp)의 크기이며 최근 release 된 ‘v.1.5 chromosome’ 을 사용하였다. 더불어 표준유전체에 alignment 되지 않았으나 배추 표준유전체 정보가 들어있는 Scaffolds 정보(총 40,550 개로 구성)도 SNP 분석에 동시에 기준으로 사용하였다.
- Chromosome 정보 연결 방법은 먼저, SNP matrix 상의 SNP position을 기준으로 좌우 250mer, 총 500mer의 서열을 reference scaffolds에서 얻어 BLASTN으로 chromosome sequence에 mapping 하여 Identity 99% 이상으로 붙은 영역(position)을 선별하였다. 더 정확한 위치를 찾기 위해 SNP position의 좌우 25mer, 총 50mer의 서열을 한번 더 따다 bowtie2로 chromosome sequence에 한번 더 mapping 하였을 때 이전 BLASTN로 mapping 되었던 영역 안에 붙되, 그 영역 안에서 1번만 붙은 SNP position만을 선별하여 SNP matrix에 chromosome 정보를 추가하였다.(표 3)

<표 3. CKRIL 집단 시료의 염기서열 mapping 통계치>

File name	Sample	Total reads #	Mapped reads (%)
TN1305D2418	279008	26,090,698	19,198,389 (73.58%)
TN1305D2419	279011	23,481,716	18,947,706 (80.69%)
TN1305D2421	279018	27,822,276	20,009,123 (71.92%)
TN1305D2422	279030	21,135,416	16,428,391 (77.73%)
TN1305D2423	279053	25,945,550	19,694,359 (75.91%)
TN1305D2424	279055	23,581,326	17,820,925 (75.57%)
TN1305D2426	279064	29,111,570	23,063,972 (79.23%)
TN1305D2427	279066	29,758,704	22,460,064 (75.47%)
TN1305D2428	279067	28,396,304	22,547,001 (79.40%)
TN1305D2429	279081	25,464,054	18,855,609 (74.05%)
TN1305D2430	279085	27,842,470	20,211,563 (72.59%)
TN1305D2431	279087	26,005,116	20,074,653 (77.20%)

- 부/모본인 resequencing 지부와 권심 간 homotype SNP 이며, reference와 권심 간 SNP 인 것만을 선별하고자 하였다. 표준유전체와 권심간의 SNP를 조사한 결과 715,605 개 homozygous SNP를 확인 하였으며 이들을 지부와 CKRIL 집단 염기서열간의 SNP를 모은 SNP matrix에서도 존재(SNP가 발생한 곳)하는지를 확인하고자 하였다. 12계통에서 72-81%의 short reads가 mapping되었으며(표3), SNP발굴시에 SNP의 정확도를 높이고자 read depth를 3 이상으로 filtering 하였다. 12계통에서 평균 3607개의 homozygou SNP를 확인하였으며, 전체 계통간 최종 SNP matrix의 합집합(lines) 개수는 4,254개였다(표 4, 표 5).

<표 4. CKRIL 집단 시료의 SNP matrix의 요약>

Sample	File name	No. of Total SNPs	No. of homotype SNP	No. of heterotype SNP
279008	TN1305D2418	3,696	3,676	20
279011	TN1305D2419	2,675	2,494	181
279018	TN1305D2421	4,157	4,135	22
279030	TN1305D2422	4,327	4,269	58
279053	TN1305D2423	2,189	2,148	41
279055	TN1305D2424	4,560	4,538	22
279064	TN1305D2426	3,909	3,747	162
279066	TN1305D2427	3,952	3,931	21
279067	TN1305D2428	3,117	2,982	135
279081	TN1305D2429	3,506	3,385	121
279085	TN1305D2430	4,310	4,289	21
279087	TN1305D2431	3,768	3,690	78

<표 5. SNP matrix 결과의 일부 예시>

chr_#	chr_pos	chr_ref	scaffold_id	scaffold_pos	scaffold_ref	strand	jibu	jibu_depth	Kens-ori	Kens-ori_depth	279008	279008_depth	279011	279011_depth
A01	8610825	T	BGIScaffold000014 A01	4051509	T	+	T	70 70	A	71 71	T	3 3	W	4,2 6
A01	8616198	G	BGIScaffold000014 A01	4056882	G	+	G	68 68	A	58 58	G	5 5	R	3,2 5
A01	10759963	A	BGIScaffold000147 a01	219745	T	-	A	85 85	C	58 58	A	6 6	M	2,2 4
A01	10800410	G	BGIScaffold000147 a01	179298	C	-	G	73 73	T	55 55	G	4 4	T	4 5
A01	10801286	G	BGIScaffold000147 a01	178422	C	-	G	96 96	A	50 51	G	6 6	A	3 4
A01	10861478	C	BGIScaffold000147 a01	118230	G	-	C	77 77	T	41 41	C	6 6	T	5 5
A01	10873950	G	BGIScaffold000147 a01	105758	C	-	G	69 69	A	65 65	G	6 6	R	2,5 7
A01	10969104	A	BGIScaffold000147 a01	10604	T	-	A	65 65	G	99 99	A	5 5	G	3 4
A01	11006898	C	IVFScaffold040553 a01	486782	G	-	C	97 97	A	63 63	C	5 5	M	2,2 4

- SNP matrix 결과 엑셀 파일에서 12 RILs의 SNP가 부분유래인지, 모본유래인지 표시하기 위해 SNP의 cell을 resequencing 지부 타입이면 붉은색으로, 권심 타입이면 파란색으로 표시, Heterotype SNP의 경우, cell 색깔을 흰색으로 나타내 구분했다.
- 총 SNP matrix에서 선발한 합집합 4,254개 대상으로 실험으로 SNP validation 하기 위해 프라이머 디자인이 가능했다. HRM(High Resolution Melting) 법으로 validation 하고자 함으로써 프라이머 디자인시에 melting temperature 차이를 크게 하는 편이 유리하다. 따라서 A-T, G-C 로 변하는 SNPs를 1차로 필터링해서 제외하였다. Primer design을 위한 SNP 부근의 300mer 영역 내에 target SNP 외에 SNP가 발견되는 것을 2차로 필터링해서 제외하였다 (모든 샘플에서 공통으로 primer design 이 가능한 SNP position).
- 프라이머 디자인 조건은 1) Input된 SNP position 이외에 heterozygous SNP나 In/Del, mismatch 등을 고려하였음. ( ‘base=N’ 일 경우는 genotype을 알 수 없기 때문에 filter되

어 선발대상에서 제외됨). 2) Product size = 80~150bp, 3) Melting temp. = 55~65°C, 4) primer size = 20~24bp 로 사용하였다.

- 최종 선발한 SNP 를 대상으로 프라이머를 디자인 하였다(표6). 차년도에 이 프라이머를 우선순위로 하여 HRM 방법을 이용하여 실험으로 SNP를 검정 및 선발하고자 한다. 또한 추가로 진행되는 CKRIL 데이터와 합쳐서 SNP간의 haplotyping을 하고자 한다. 유전체 부위별로 haplotyping 결과는 통상적으로 염색체별로, 염색체 부위별로 다르고 이러한 데이터는 여교배 선발을 위한 마커 셋트 선발에 있어 도움을 줄 수 있을 것이라고 본다. 여교배 선발을 위한 마커 셋트는 일단 배추가 가지고 있는 고유의 유전체를 대표할 수 있어야 하면서, 교배를 하는 계통의 특이성을 대변할 수 있어야 할 것이다. 배추 고유의 유전체 특성을 나타내기 위해서는 유전체 정보의 물리적인 거리당 분포하는 마커 선발을 우선으로 계획하고 있으며, 계통 특이적인 마커 선발에 있어서는 계통이 나타내는 특징(형질)에 관여하는 유전체 부위를 좀 더 고려해 봐야 할 것이다. 이에 본 과제에서는 병 저항성 형질을 목표로 하고 있는 만큼 병 저항성 형질에 연관한 QTL이 위치하는 유전체 부위에서 LD를 참조하여 보다 세분화 한 유전체 단편을 대변할 수 있는 SNP 마커를 선발하는데 있어 유전체 정보를 참고하고자 한다. 차년도에 마커 선발에 있어서 일단 유전체 정보에서 물리적인 거리를 기준으로 선발하여 진행할 예정이나 추후 LD 분석결과를 참조로 했을 때 유전체 부위별로 선발할 마커의 개수를 조절할 수 있어 더 효율성을 높일 수 있을 것이라고 예상하고 있다. (표 6)

<표 6. HRM 분석용 SNP 프라이머 디자인 결과의 일부 예시>

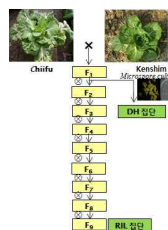
chr_#	chr_pos	chr_ref	5'_primer_start	5'_primer_length	5'_primer_tm	5'_primer_seq	3'_primer_start	3'_primer_length	3'_primer_tm	3'_primer_seq	Product_size	SNP_300mer_seq
A01	303886	C										
A01	317588	A	317536	21	57.71	TGCCATTATCGGGTTCATGA	317673	23	58.47	ACTTCCAAAGCAAGTCAAAGA	138	CCCAAAAATAGTTCAGGTTTAATGAGTTTTATTG
A01	341433	T										
A01	392939	G										
A01	399586	T	399538	20	59.46	ACCCACACGACCATACATC	399677	20	59.03	AACGGGAAGGTACGTAGCAA	140	GTTATAATAATTTAGAACTGCTGAATGTTTTG
A01	399821	G										
A01	438492	G	438426	23	57.82	AGCTAGGCTGATTAGGAAAACA	438517	20	55.41	AATAGATTCTGCCATTCGG	92	CAAAAATGCAAGCAAAACAATCACACAAGCAAA
A01	451580	G										

[2년차]

1. MABC(marker assist backcrossing) 시스템 구축

가. 염기서열 재분석을 통해 대용량 염기서열 정보 확보

- 일차년도에 이어 지부계와 권심계의 교배로 생성한 자식 일세대를 SSD(single seed descent) 방법으로 자가수정하여 고정시킨 집단, F9 세대 recombinant inbred lin(RIL) 집단 중 14 계통을 Illumina HiSeq2000 platform을 이용하여 paired-end 방식으로 염기서열 재분석(resequencing) 하였다.(그림 1)



<그림 1. 지부계와 권심계의 교배로 RIL, DH 집단 생성 모식도>

- 생산한 염기서열 raw data의 퀄리티 확인은 1차년도와 같은 방법으로 하였으며, 조건은 Phred score, 20 과 trimmed read length 를 25mer 이상을 기준값으로 사용하였다. 전처리 후 평균적으로 raw data의 약 83% 데이터를 확보 하였다(표 7, 표 8, 표 9, 표 10).

<표7. CKRIL 집단 시료 13점의 염기서열 생산량(raw data) 통계치>

File name	Sample	Num. of Reads	Avg. length	Total length (bp)	*Genome coverage
TN1305D2432_1.fq	279088	13,745,935	100	1,374,593,500	≈9.69X
TN1305D2432_2.fq		13,745,935	100	1,374,593,500	
TN1305D2433_1.fq	279090	18,477,291	100	1,847,729,100	≈13.02X
TN1305D2433_2.fq		18,477,291	100	1,847,729,100	
TN1305D2434_1.fq	279093	19,563,087	100	1,956,308,700	≈13.79X
TN1305D2434_2.fq		19,563,087	100	1,956,308,700	
TN1305D2435_1.fq	279161	14,286,290	100	1,428,629,000	≈10.07X
TN1305D2435_2.fq		14,286,290	100	1,428,629,000	
TN1305D2436_1.fq	279137	19,146,337	100	1,914,633,700	≈13.49X
TN1305D2436_2.fq		19,146,337	100	1,914,633,700	
TN1305D2437_1.fq	279099	18,326,960	100	1,832,696,000	≈12.91X
TN1305D2437_2.fq		18,326,960	100	1,832,696,000	
TN1305D2439_1.fq	279140	20,263,164	100	2,026,316,400	≈14.28X
TN1305D2439_2.fq		20,263,164	100	2,026,316,400	
TN1305D2440_1.fq	279150	18,773,489	100	1,877,348,900	≈13.23X
TN1305D2440_2.fq		18,773,489	100	1,877,348,900	
TN1305D2859_1.fq	279106	19,015,284	100	1,901,528,400	≈13.40X
TN1305D2859_2.fq		19,015,284	100	1,901,528,400	
TN1305D2860_1.fq	279015	17,159,203	100	1,715,920,300	≈12.09X
TN1305D2860_2.fq		17,159,203	100	1,715,920,300	
TN1305D2861_1.fq	279002	18,019,445	100	1,801,944,500	≈12.70X
TN1305D2861_2.fq		18,019,445	100	1,801,944,500	
TN1305D2862_1.fq	279022	18,070,692	100	1,807,069,200	≈12.73X
TN1305D2862_2.fq		18,070,692	100	1,807,069,200	
TN1305D2866_1.fq	279012	16,214,727	100	1,621,472,700	≈11.43X
TN1305D2866_2.fq		16,214,727	100	1,621,472,700	
TN1305D2867_1.fq	279101	15,166,036	100	1,516,603,600	≈10.69X
TN1305D2867_2.fq		15,166,036	100	1,516,603,600	

\*Genome coverage : 각 샘플의 read total length를 reference genome의 총 길이(약 283Gb)로 나눈 값.

<표 8. CKRIL 집단 시료 13점의 염기서열 퀄리티에 따른 전처리 (trimming) 통계치>

Short read file	Sample	Num. of Reads	A v g . length	Total length (bp)	*trimmed/raw
TN1305D2432_1.fq	279088	12,560,075	90.27	1,133,855,867	82.49%
TN1305D2432_2.fq		12,560,075	88	1,105,321,232	80.41%
TN1305D2433_1.fq	279090	17,309,397	85.46	1,479,322,729	80.06%
TN1305D2433_2.fq		17,309,397	90.7	1,569,998,883	84.97%
TN1305D2434_1.fq	279093	18,375,122	85.55	1,571,902,055	80.35%
TN1305D2434_2.fq		18,375,122	90.78	1,668,125,237	85.27%
TN1305D2435_1.fq	279161	13,272,929	90.43	1,200,216,723	84.01%
TN1305D2435_2.fq		13,272,929	89.36	1,186,055,977	83.02%
TN1305D2436_1.fq	279137	17,857,255	90.29	1,612,290,137	84.21%
TN1305D2436_2.fq		17,857,255	89.3	1,594,610,581	83.29%

TN1305D2437_1.fq	279099	17,116,895	90.3	1,545,630,530	84.34%
TN1305D2437_2.fq		17,116,895	89.5	1,531,942,850	83.59%
TN1305D2439_1.fq	279140	18,937,706	90.42	1,712,341,455	84.51%
TN1305D2439_2.fq		18,937,706	89.88	1,702,212,376	84.01%
TN1305D2440_1.fq	279150	17,588,253	90.43	1,590,458,413	84.72%
TN1305D2440_2.fq		17,588,253	90.09	1,584,602,727	84.41%
TN1305D2859_1.fq	279106	17,421,878	91.85	1,600,274,978	84.16%
TN1305D2859_2.fq		17,421,878	89.28	1,555,459,225	81.80%
TN1305D2860_1.fq	279015	15,777,287	91.69	1,446,694,591	84.31%
TN1305D2860_2.fq		15,777,287	89.28	1,408,620,242	82.09%
TN1305D2861_1.fq	279002	16,959,856	92.19	1,563,497,679	86.77%
TN1305D2861_2.fq		16,959,856	91.49	1,551,740,566	86.11%
TN1305D2862_1.fq	279022	16,552,004	91.9	1,521,106,682	84.18%
TN1305D2862_2.fq		16,552,004	89.51	1,481,541,999	81.99%
TN1305D2866_1.fq	279012	15,131,783	91.96	1,391,492,306	85.82%
TN1305D2866_2.fq		15,131,783	90.76	1,373,341,457	84.70%
TN1305D2867_1.fq	279101	13,889,020	91.72	1,273,920,025	84.00%
TN1305D2867_2.fq		13,889,020	88.69	1,231,756,063	81.22%

<표 9. CKRIL 집단 시료의 염기서열 mapping 통계치>

File name	Sample	Total reads #	Mapped reads (%)
TN1305D2432	279088	25,120,150	19,845,619 (79.00%)
TN1305D2433	279090	34,618,794	26,278,250 (75.91%)
TN1305D2434	279093	36,750,244	29,406,280 (80.02%)
TN1305D2435	279161	26,545,858	20,782,763 (78.29%)
TN1305D2436	279137	35,714,510	27,842,651 (77.96%)
TN1305D2437	279099	34,233,790	25,024,181 (73.10%)
TN1305D2439	279140	37,875,412	29,478,433 (77.83%)
TN1305D2440	279150	35,176,506	26,682,156 (75.85%)
TN1305D2859	279106	34,843,756	26,886,424 (77.16%)
TN1305D2860	279015	31,554,574	24,367,583 (77.22%)
TN1305D2861	279002	33,919,712	26,675,829 (78.64%)
TN1305D2862	279022	33,104,008	24,975,776 (75.45%)
TN1305D2866	279012	30,263,566	24,695,078 (81.60%)
TN1305D2867	279101	27,778,040	22,115,728 (79.62%)

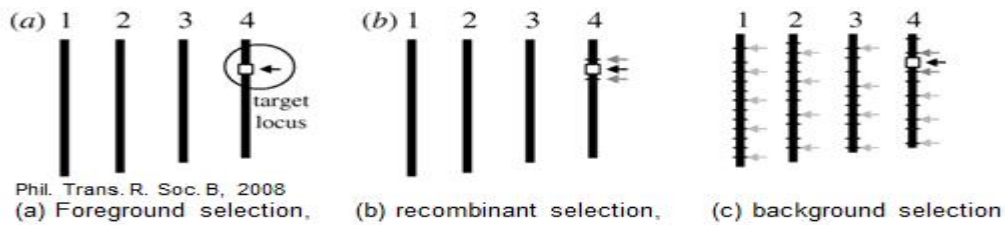
<표 10. CKRIL 집단 시료의 SNP matrix의 요약>

Sample	File name	No. of Total SNPs	No. of homotype SNP	No. of heterotype SNP
279002	TN1305D2861	5,056	4,087	969
279012	TN1305D2866	2,876	2,803	73
279015	TN1305D2860	4,555	4,536	19
279022	TN1305D2862	3,792	3,766	26
279088	TN1305D2432	2,173	2,122	51
279090	TN1305D2433	4,056	4,023	33
279093	TN1305D2434	3,502	3,446	56
279099	TN1305D2437	3,655	3,621	34
279101	TN1305D2867	3,805	1,895	1,910
279106	TN1305D2859	3,950	3,930	20
279137	TN1305D2436	4,768	4,574	194
279140	TN1305D2439	2,701	2,650	51
279150	TN1305D2440	3,133	3,066	67
279161	TN1305D2435	3,019	2,799	220

**나. SNP 마커 선발 및 HRM 방법으로 SNP validation**

- 1차년도에 확립한 방법으로 trimming을 거친 샘플의 염기서열 reads를 표준유전체에 mapping 하여 각 샘플별 표준유전체의 해당 위치에 mapping 하여 SNP 발굴하였으며 reads의 depth 정보를 통해 SNP의 정확성을 높이고자 하였다. alignment 수행 후, 표준유전체 기준으로 교배친 및 집단계통의 대량 SNP를 발굴하고, 교배양친의 유전형을 확인할 수 있도록 in silico genotyping을 하여 SNP matrix를 작성하였다.
- 부/모본인 resequencing 지부와 권심 간 homotype SNP 이며, reference와 권심 간 SNP 인 것만을 선발하고자 하였다. 표준유전체와 권심간에서 확인한 715,605 개 homozygous SNP를 염기서열 재분석을 통해 추가로 작성한 CKRIL 집단의 SNP matrix에서도 존재(SNP가 나타남)하는지를 확인하였다. 14계통에서 73-82%의 short reads가 mapping되었으며(표9), SNP의 정확도를 높이고자 read depth를 3 이상으로 filtering 하였다. 14계통에서 평균 3380개의 homozygous SNP를 확인하였다. 전체 26 RIL 계통분석에서 90602개의 homozygous SNP를 확인하였고, 계통당 평균 3,485 개였다(표10).
- 전체 계통간 최종 SNP matrix의 합집합 개수는 7254개였고, 이들을 대상으로 in silico 개발된 SNP를 실험(HRM, High Resolution Melting) 방법으로 validation 하고자 하였다. 최종 선발한 SNP 를 대상으로 1차년도 기준으로 HRM용 프라이머를 디자인 하였다.
- 교배와 선발을 과정으로 진행되는 육종에 있어서 분자마커는 노동력 및 시공간 감소 등 선발의 효율성을 높여주는 방법으로 인식(보편화) 되고 있다. 목적에 따라서 유전체 특정 부위(형질 관련 유전자 위치)에 위치하고 있는 목표 형질(예, 내병성)을 가지고 있는 개체 선발을 위해 사용이 가능할 뿐만 아니라(a, b), 집단에서 목표하는 식물체와 전반적인 구조가 비슷한 개체 선발(c)을 위한 마커도 있다.
- 육종에서 우량 형질(반복친)을 가지고 있는 계통과 목표 형질(1회친)을 가지고 있는 계통을

교배하여, 목표형질을 도입한 후 반복친을 지속적으로 교배(여교배)하여 계통의 순도를 고정하는데 있어, 분자마커를 이용한 방법은(marker assist backcrossing, MABC) 목표하고 있는 개체의 선발에 효율성을 높일 수 있다.(그림 2)



<그림 2. 분자마커를 이용한 이용도, 마커 도움 선발의 종류>

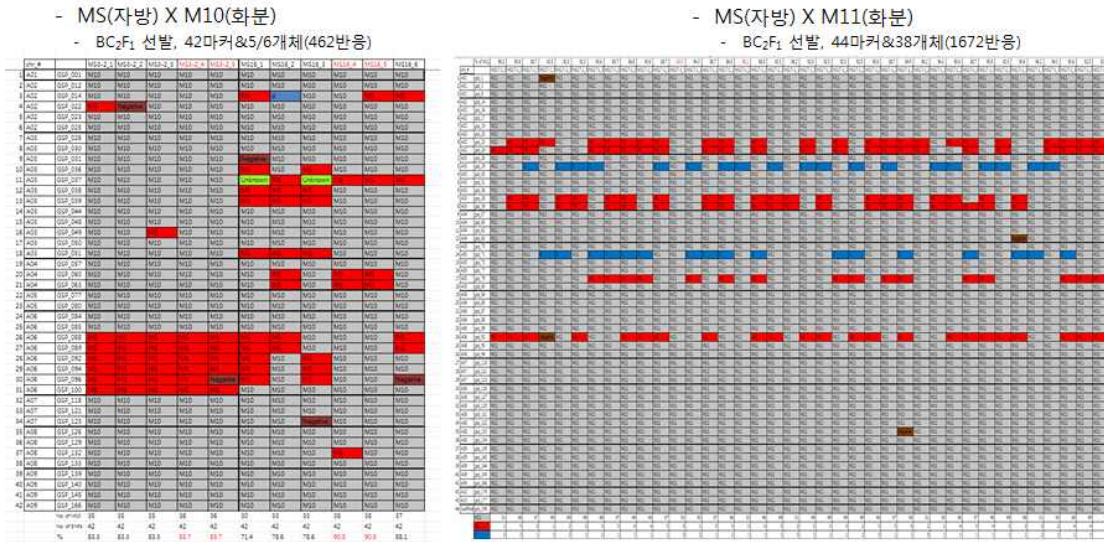
- 여교배 후 선발을 위한 마커 셋트는 일단 배추가 가지고 있는 고유의 유전체를 대표할 수 있어야 하면서, 교배를 하는 계통의 특이성을 대변할 수 있어야 할 것이다. 1) 배추 고유의 유전체 특성을 나타내기 위해서는 유전체 정보의 물리적인 거리당 분포하는 마커 선발을 우선으로 계획하고 있으며, 2) 계통 특이적인 마커 선발에 있어서는 계통이 나타내는 특징(형질)에 관여하는 유전체 부위를 좀 더 고려해 봐야 할 것이다.
- 배추 유전체를 대표하고자 첫 번째 마커 셋트는 물리적 거리를 고려해서 SNP를 선발하였다. 배추 유전체 크기가 529Mb로 알려져 있으나, 표준 유전체 정보의 크기는 약 283Mb 크기가 발표되어 있어, 1Mb 당 1개의 SNP를 선발하여 총 285개를 HRM용 프라이머로 합성, validation 하였다. 이 중에서 총 222개(77.9%)가 lightScan에서 다형성을 나타냈고, 이 중에서 패턴이 매우 분명하여 마커로 사용하기 편리한 것은 191개(67%)였다. 285개의 마커 셋트가 많은 수는 아니지만, 여교배 후 목표 개체 선발을 위한 마커로 (MABC) 가능성을 검정하였다.

#### 다. 선발 마커로 MABC(marker assist backcrossing) 에 적용

- 285개의 마커 셋트 중에 199개를 이용하여 여교배 후 목표 개체 선발을 위한 마커로 (MABC) 가능성을 검정하였다. 농협종묘에서 품종육성에 사용하고 있는 우량 계통 중에서 자원의 보호를 위해 MS화 하고자 진행 중인 시료의 잎을 분양받아 검정하였다. MS 계통에 육종에 사용하고 있는 우량계통 M10, M11를 교배하여 MS도입하고 우량계통을 여교배하고 있는 BC2F1(이하 M10집단(11개체), M11 집단(38개체))을 사용하여, 집단 내에서 M10과 M11과 가장 유사한 개체를 선발하고자 하였다. 199개 SNP 중에서 HRM방법으로 MS와 M10, MS와 M11 간에 다형성을 나타내는 SNP은 각각 108개(54.3%), 116개(58.3%)였고 이중에서 패턴차이가 커서 구별이 쉬운 것은 각각 73(36.7%), 70(58.3%)였다. 이 중 M10집단은 42개 마커, M11 집단은 44개 마커로 분석하였고 유사도가 높은 개체는 시료 ID를 붉은색으로 표기하였다. MS계통의 유전자형은 붉은색으로 표기하여 고정되지 않은 부위를 구분할 수 있다. M10 집단에서는 전반적으로 A06 염색체 부위에서 고정이 되지 않았음을 확인할 수 있었다. M11 집단에서는 A02, A03, A05, A06에서 공통적으로 고정이 되지 않은 부위(높은 빈도)가 부분적으로 나타났다. 또한 모든 마커에서 M11 계통의 유전자형을 가지고 있는 것으로 나타나, 유사도가 높은 개체 2개를 선발 할 수 있었다. 추후 검정용 마커의 수를 늘리



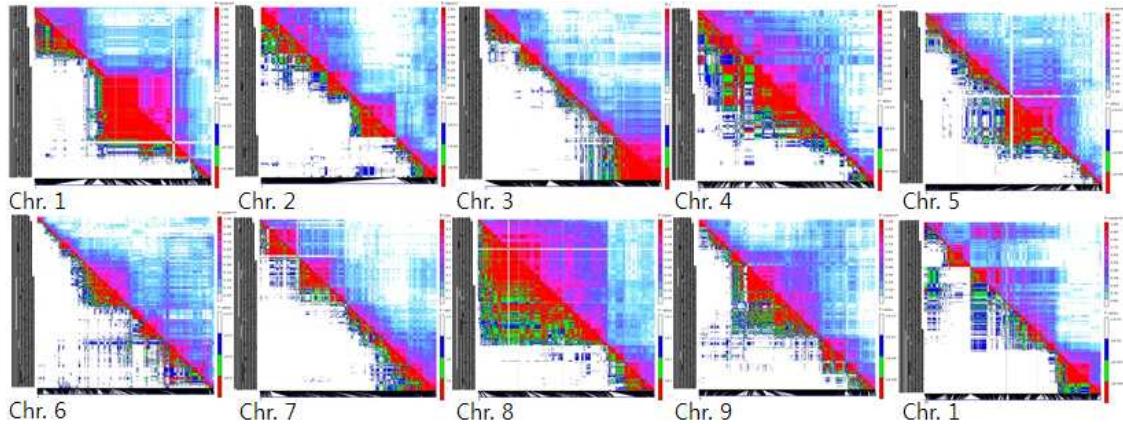
고, 염색체별 마커의 분포 비율을 맞추기 위해서는 더 충분한 마커 풀을 만들고 선발을 해야 할 것이다. (그림 3)



<그림 3. MS 형질 도입을 위한 여교배 집단에서 MABC 마커 셋트를 이용한 선발 결과>

#### 라. 이차 SNP 선발 및 SNP validation

- 물리적 거리로 선발한 285개의 SNP를 실험실에서 기 보유하고 있는 175계통 유전체 재분석(re-sequencing) 한 자료에서 빈도(allelic frequency)를 확인한 결과 58개의 SNP에서 SNP를 확인할 수 있었다. 적용 가능성을 높이고자 두 번째 선발은 배추에 분포하는 unigene에 위치하는 SNP를 목표로 150개를 선발하였고, 이들 모두는 MAF 값 20을 기준으로 하였을 때 175계통에서 SNP가 있음을 확인하였다. 총 435개의 SNP를 HRM으로 validation 하였고, 327개의 SNP에서 다형성을 실험으로 검증할 수 있었다. 이 중 일부는 Fluidigm 분석용으로 프라이머를 변환 할 예정이다.
- 유전체 부위별로 haplotyping 결과는 통상적으로 염색체별로, 염색체 부위별로 다르고 이러한 데이터는 여교배선발을 위한 마커 셋트 선발에 있어 도움을 줄 수 있을 것이라고 본다. 이에 본 과제에서는 병 저항성 형질을 목표로 하고 있는 만큼 병 저항성 형질에 연관된 QTL이 위치하는 유전체 부위에서 LD를 참조하여 보다 세분화 한 유전체 단편을 대변할 수 있는 SNP 마커를 선발하는데 있어 유전체 정보를 참고하고자 한다. RIL 집단 유전체 재분석 데이터에서 확보한 SNP를 기본 자료로 하여 LD 분석을 수행하였다. 표준유전체와 관심간 715,605개 SNP homozygous SNP 확인, filtering 후 최종 7024개 SNP를 대상으로 분석하였다. 이러한 결과는 차년도 마커 개발하는데 있어 SNP 선발에 참조할 예정이다. 추후 보고된 뿌리혹병 저항성 유전자좌의 물리적인 위치를 유전체 정보에서 확인해 보고 인접 영역의 haplotype을 조사할 예정이다. 이들 haplotype을 기반으로 마커를 선발하여 저항성 개체의 표현형과 비교하고자 한다. 이는 기존의 저항성 연관 마커의 개선을 목적으로 하며 이는 저항성 유전자좌 집적(gene pyramiding)을 위하여 개체 선발에 이용 가능할 것으로 본다. (그림 4)



<그림 4. SNP 데이터를 이용한 염색체별 LD 결과>

[ 3 년차]

1. MABC(marker assist backcrossing) 시스템 구축

가. SNP 마커 선발 및 SNP validation방법에서 HRM에서 Fluidigm으로 전환

- 교배와 선발을 과정으로 진행되는 육종에 있어서 분자마커는 노동력 및 시공간 감소 등 선발의 효율성을 높여주는 방법으로 인식(보편화) 되고 있다. 목적에 따라서 유전체 특정 부위(형질 관련 유전자 위치)에 위치하고 있는 목표 형질(예, 내병성)을 가지고 있는 개체 선발을 위해 사용이 가능할 뿐만 아니라(a, b), 집단에서 목표하는 식물체와 전반적인 구조가 비슷한 개체 선발(c)을 위한 마커도 있다(그림 1).
- 육종에서 우량 형질(반복친)을 가지고 있는 계통과 목표 형질(1회친)을 가지고 있는 계통을 교배하여, 목표형질을 도입한 후 반복친을 지속적으로 교배(여교배)하여 계통의 순도를 고정하는데 있어, 분자마커를 이용한 방법(marker assist backcrossing, MABC) 목표하고 있는 개체의 선발에 효율성을 높일 수 있다.
- 여교배 후 선발을 위한 마커 셋트는 일단 배추가 가지고 있는 고유의 유전체를 대표할 수 있어야 하면서, 교배를 하는 계통의 특이성을 대변할 수 있어야 할 것이다. 따라서 2차년도에 두 교배친 유전체 정보에서 두 가지를 기준으로 하여 마커 개발을 수행하였는데, 1) 배추 고유의 유전체 특성을 나타내기 위해서는 유전체 정보의 물리적인 거리당 분포하는 마커 선발하고자 1Mb 당 1개의 SNP을 선발하여 총 285개를 HRM용 프라이머로 합성, validation 하여 패턴이 매우 분명하여 마커로 사용하기 편리한 191개(67%)개를 선발하였고, 2) 적용 가능성을 높이고자 두 번째 선발은 배추에 분포하는 unigene 에 위치하는 SNP를 목표로 150개를 선발하였고, 이들 모두는 MAF 값 20을 기준으로 하였을 때 175계통에서 SNP이 있음을 확인하였다. 총 435개의 SNP을 HRM으로 validation 하였고, 327개의 SNP에서 다형성을 실험으로 검증하였었다. 이 중 염색체별로 고르게 분포하는 192개의 SNP를(1차 마커세트에서 111개, 2차 마커세트에서 81개) 선발하여 Fluidigm 분석용으로 전환하였다. 내병성 형질에 관한 5개 분리집단의 양친인 10계통 및 09CR집단에서 검정해 보았을 때 1차 셋트에서 39%, 2차 셋트에서 30%의 다형성을 나타냈다. 내병성 형질에 관한 5개 분리집단의 양친에서도 평균 32%의 다형성을 나타냈다. 역설적으로 1차 셋트에서 다형성을 나타

내지 않았던 마커들의 50%는 2차년도에 농협종묘의 MABC 적용 가능성 검정시에 사용한 마커였다. 따라서 다양한 유전자원에 사용하기 위하여 마커의 효율성(적용 가능성)을 더 높이고자 SNP 선발에 있어 다른 방법을 고려해 보고자 하였다.

#### 나. 선발 마커로 MABC(marker assist backcrossing) 에 적용

- 기존 HRM 마커를 사용하여 여교배 후 목표 개체 선발을 위한 마커로 (MABC) 가능성을 검정하였다. 한국종묘에서 품종육성에 사용하고 있는 우량 계통 ‘MAB4’ (만추대, 황심, 결구모양 우수)에 내병성 자원 ‘C’의 내병성 형질을 도입하고자 진행 중인 시료의 잎을 분양받아 검정하였다. 내병성 계통 ‘C’에 육종에 사용하고 있는 우량계통 ‘MAB4’를 교배하여 내병성 형질을 도입하고 우량계통을 여교배하고 있는 BC1F1을 사용하여, 집단 내에서 내병성 형질이 있는 개체를 선발하고, 이 중에서 우량계통과 가장 유사한 개체를 선발하고자 하였다. 총 277개체의 BC1F1 중에서 내병성 형질 마커 도움 선발로 뿌리혹병 3개의 유전자좌 CRa, CRa1, CRb에 해당하는 마커로 분석하여 77개체(28%)를 선발하였다. 이들 중에서 우량 계통 ‘MAB4’와 유사도가 높은 10개체(85% 이상)를 선발하여 제공하였다. 추후 검정용 마커의 수를 늘리고, 염색체별 마커의 분포 비율을 맞추기 위해서는 더 충분한 마커 풀을 만들고 선발을 해야 할 것이다.

### [ 4 년차 ]

#### 1. MABC(marker assist backcrossing) 시스템 구축

##### 가. 유전체 정보에서 변이가 많은 지역 (variable region)을 이용하여 추가 SNP 개발

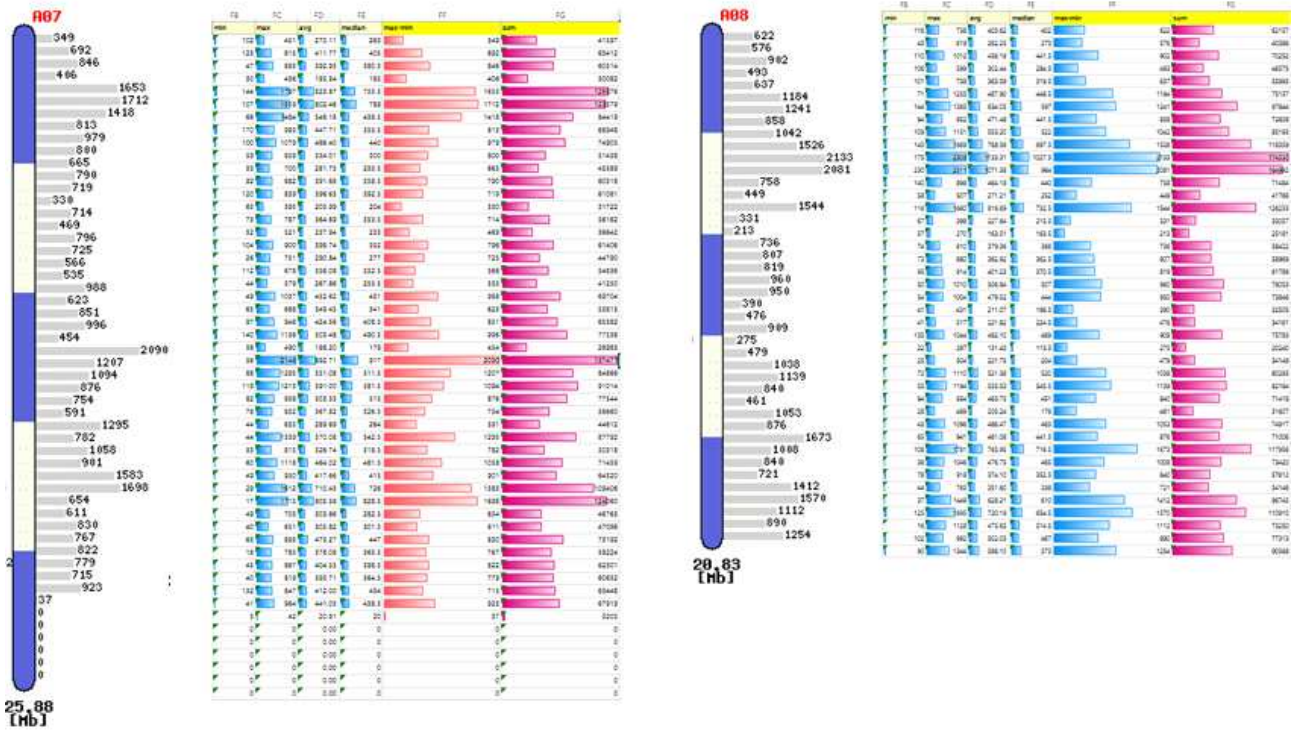
- 추가 SNP 개발을 위하여 실험실에서 기 보유하고 있는 유전체 재분석(re-sequencing)한 자료 중 Brassica rapa 154점의 유전자원(배추 149계통, 순무 5계통)에 대하여 표준유전체 정보를 기반으로 SNP를 조사했을 때 총 biallelic SNP 는 총 1,684,601 개였다. 이중 MAF(minor allele frequency)가 5% 이상이며, PIC value가 0.3 이상인 조건으로 필터한 후에 프라이머를 디자인하고자 각 SNP 주변에서 ‘N’ 이 없고, AT-rich 영역을 제외하고 GC 함량을 고려하여 프라이머 디자인 할 수 있는 SNP을 선발하였다. 총 456,990개의 SNP를 대상으로 프라이머 디자인을 하였다.(그림 5)

SNP필터 단계	필터 항목	유전자원 154종의 합집합 SNP matrix loci (배추 149, 순무 5)
1	SNP loci of biallelic	1,684,601
2	MAF (minor allele frequency) > 5%	1,678,054
3	PIC value > 0.3	573,747
4	SNP random selection of 10,000 (3 replicate)	10,000
5	HRM 후보	456,990

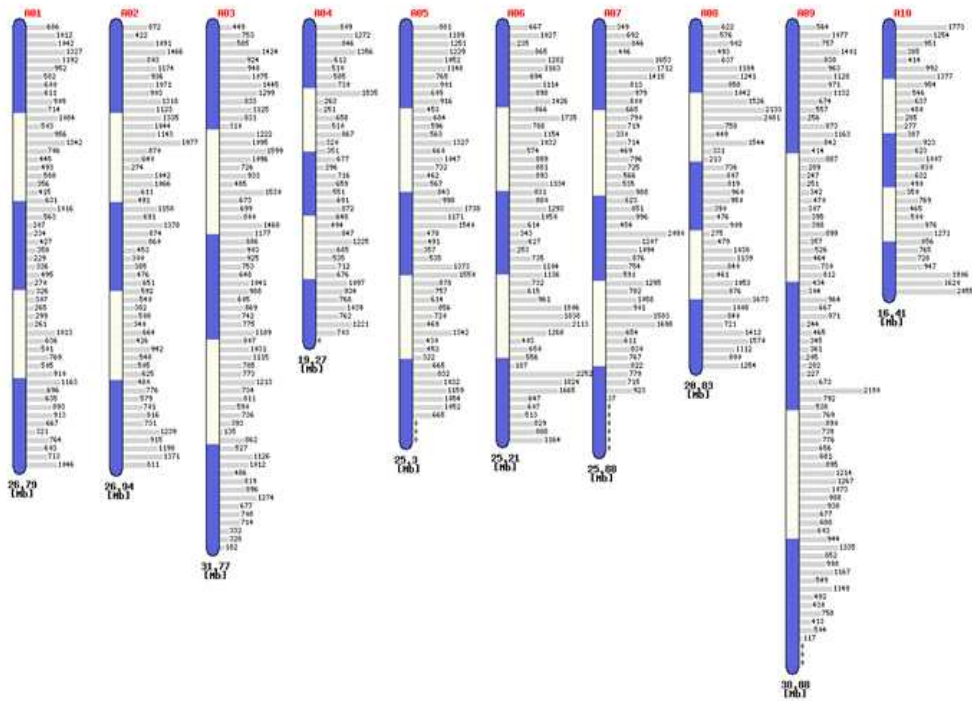
<그림 5. 154 점 유전자원의 유전체에서 SNP 조사 및 선발 >

유전자원들의 유전체에서 SNP의 빈도(allelic frequency)를 확인하였다. 각 자원(계통)별로

500Kb 당 SNP의 개수를 세고, 동일 지역에서 모든 계통이 가지고 있는 SNP의 수를 합하여 그림으로 나타냈다(그림 2). SNP는 각 염색체별, 염색체의 위치별로 차이가 다양했다. 모든 계통에서 SNP의 합으로 비교해 보았을 때, 염색체 A08의 5-6Mb 사이에는 2133개, 2081개가 확인되어 가장 높은 빈도로 SNP가 존재함을 알 수 있었고, 8Mb 부분에서는 213개로 가장 적은 빈도로 관측되는 부분이 있었다. 이들은 154계통에서 나타나는 SNP 개수의 합이므로 이 수치(빈도)가 높은 곳에서 SNP를 선발할 경우 보다 다양한 배추에서 실험해 볼 때 효율성을 높일 수 있으리라 기대한다.(그림 6, 그림 7)

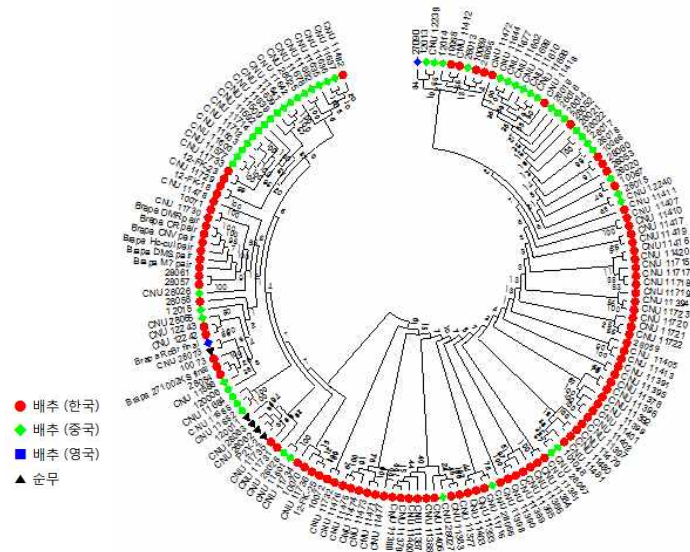


<그림 6. 154 점 유전자원의 유전체의 A07, A08 연관그룹에서 500kb 당 존재하는 SNP의 빈도 >

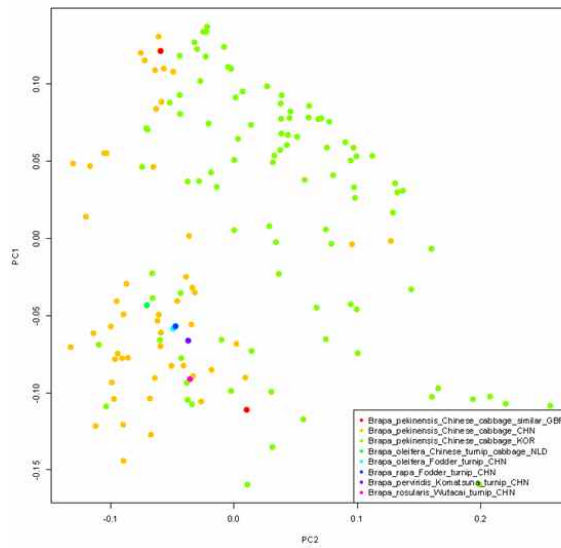


<그림 7. 154 점 유전자원의 유전체에서 500kb 당 존재하는 SNP의 빈도 >

- 154 점 유전자원의 전체 SNP 1,684,601개를 사용하여 유전적 유사도를 분석하였다(그림 8). 연두색 점으로 표기된 배추는 한국형 배추는 넓게 분포하고 있어 다양성을 나타냈고, 이 중에서 황색점으로 표기된 자원은 주로 중국에서 도입된 자원으로써 중국 유래 배추는 한국유래 배추와는 구분되어 그룹을 형성하는 것을 볼 수 있었다. 십자화과의 A genome에 속하나 subspecies가 다른 순무는 총 5점 중에 4점이 한 그룹으로 나타났다. PCA 분석 결과는 유전자원 수집한 지리적 특성에 준하여 다소 그룹이 형성하는 경향을 나타냈다(그림 9). 이러한 정보는 한국유래 배추에서 공통그룹을 형성한 것은 보다 유전적으로 매우 유사한 계통이며 이들을 구분할 수 있는 영역을 찾는데 참조할 수 있으리라 생각된다. 따라서 이들 데이터를 기반으로 하여 In-silico로 154 점을 구분할 수 있는 SNP 영역을 찾고자 250 SNP를 선발 하였다.

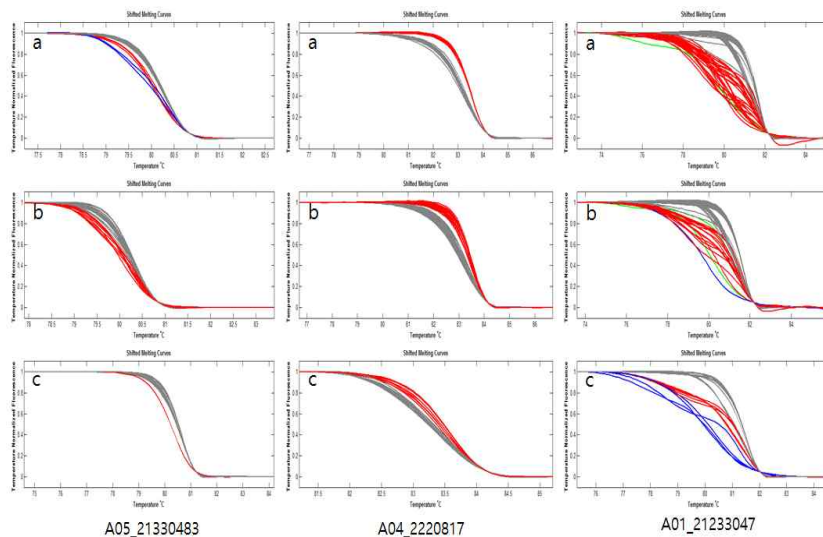


<그림 8. 154 점 유전자원의 SNP 데이터로 본 유전적 유사도>



<그림 9. 154 점 유전자원의 PCA 분석>

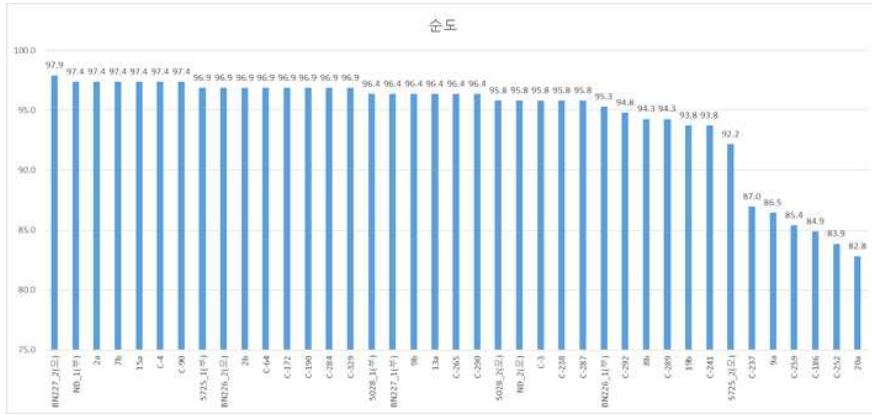
그러나 이들 SNP 중에는 matrix 작성시 filter 과정을 거쳤으나, assemble error와 reference assemble 한 SNP 이므로 실제 모든 자원의 실제 유전체 구조를 그대로 나타냈다고 할 수 없는 점을 고려해 보면, false-positive 가 존재할 가능성이 있으므로, 선발한 SNP 를 대상으로 HRM 방법으로 SNP validation을 하였다. 총 70개의 SNP를 대상으로 validation 이 진행중이다. A05\_21330483 마커와 A04\_2220817 마커의 경우 유전자원의 유전체 정보에서 In-silico로 예측했던 것이 실제 유전체에서 SNP 정보와 일치함을 나타냈다. 반면, A01\_21233047 마커의 경우 예측했던 것과는 다르게 5개의 형태로 나타났다. 따라서 추후 validation을 거쳐서 최종 마커 100개로 구성된 셋트를 선발하고자 한다(그림 10).



<그림 10. 배추 유전자원에서 HRM 방법으로 SNP validation>

#### 나. 마커의 선발 효율성 검토

- 바이오막의 fluidigm system은 한번 실험이 진행되면 48개, 96개, 또는 192개의 마커가 한 셋트로 동시에 진행되는 시스템으로 대용량 SNP을 단시간에 할 수 있는 장점이 있다. 그러나 적용하는 시료의 유전형에 따라 차이가 있으므로 실제로 실험에 적용되는 모든 마커에서 데이터를 기대할 수는 없다. 마커의 사용 효율성을 조사해 보고자 한국종묘에서 19종류의 내훈계와 이들을 사용하여 생성한 F1을 포함하여 교배 집단 24종류, 코레콘 종묘에서 10종류의 내훈계와 이들을 사용하여 생성한 F1을 포함하여 교배 집단 5종류, 실험실의 30종류의 내훈계통을 대상으로 하여 192개의 fluidigm SNP 마커로 검정하였다.
- 192개 SNP 위치에서 SNP genotype을 비교하여 종묘회사에서 분양받은 29종류의 내훈계의 순도를 수치화 할 수 있었다. 일반적으로 육종 소재로 사용하는 내훈계는 자가수정을 8회 이상한 것으로 이론적으로는 98% 이상이 homozygous 이나 실험으로는 낮게는 83%에서 높게는 98%로 나타나서 육종소재로 사용하는 계통의 순도를 예측하는데 도움을 줄 수 있었다(그림 11).



<그림 11. 29계통의 내혼계통에서 192 SNP의 homozygous 빈도>

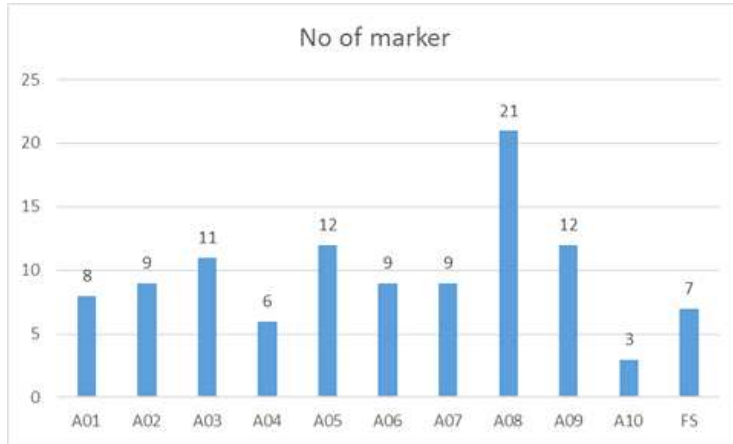
- 또한 모계와 부계, 그리고 이들의 교배로 만든 F1에서 genotype을 비교해 봄으로써 F1이 오염 없이 양친의 교배로 만들어 진 것인지를 확인할 수 있었다. 29개의 교배조합 중 한조합에서는 192개 SNP 중에서 66개가 모계와 부계에서 다형성을 나타냈으나, 이 교배조합의 F1의 genotype은 191개 SNP가 모계와 일치 했다. 이러한 결과는 육종가가 의도했던 F1이 만들어졌는지 또는 자식주인지를 판단할 수 있는 정보를 제공할 수 있음을 나타냈다.
- MABC 마커로 적합한 SNP를 선발하고자 29종류의 각 교배집단의 양친간에 다형성이 나타나는 빈도를 조사하였다. 교배조합에서 다형성을 정도는 BN227F1 조합에서 38%로 가장 많이 나타났고, 평균 다형성 비율은 33.3% 였다(그림 12).



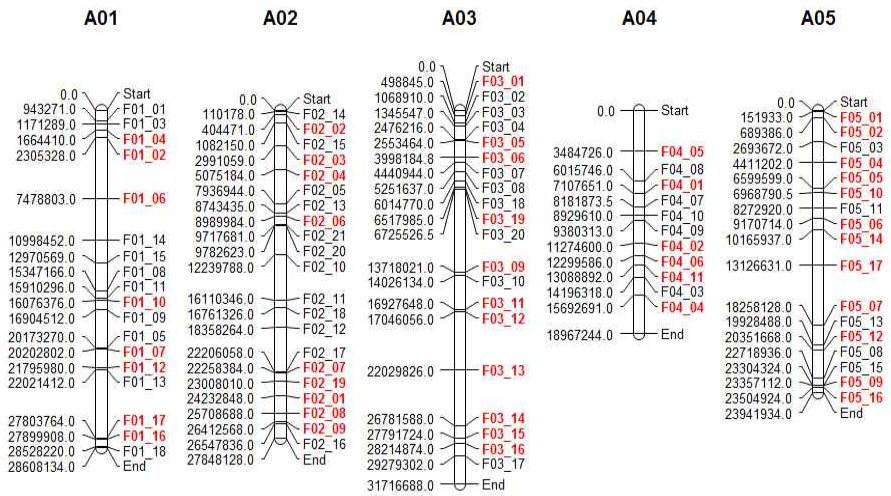
<그림 12. 29계통의 내혼계통에서 192 SNP의 다형성 비율>

- 192 마커 중 다형성이 많이 나타나며 염색체에 고루 분포하는 96개를 한 셋트로 선발하고자 하였다. 다형성 정도를 20% 이상으로 하였을 때 107개 마커를 선발할 수 있었고, 이들 중 100개는 10개의 염색체에서 적게는 3개(A01), 많게는 21개(A08)로 분포하였다. 아직 염색체 위치가 모호한 scaffolds에서 7개 위치하였다(그림 13). 염색체 위치 확인이 안 된 마커를 제외하고 100개 마커를 배추 유전체 위치에 표기하였다. 선발한 마커는 fluidigm으로 MABC 검정할 때 우선으로 사용 가능하다(그림 14, 그림 15).

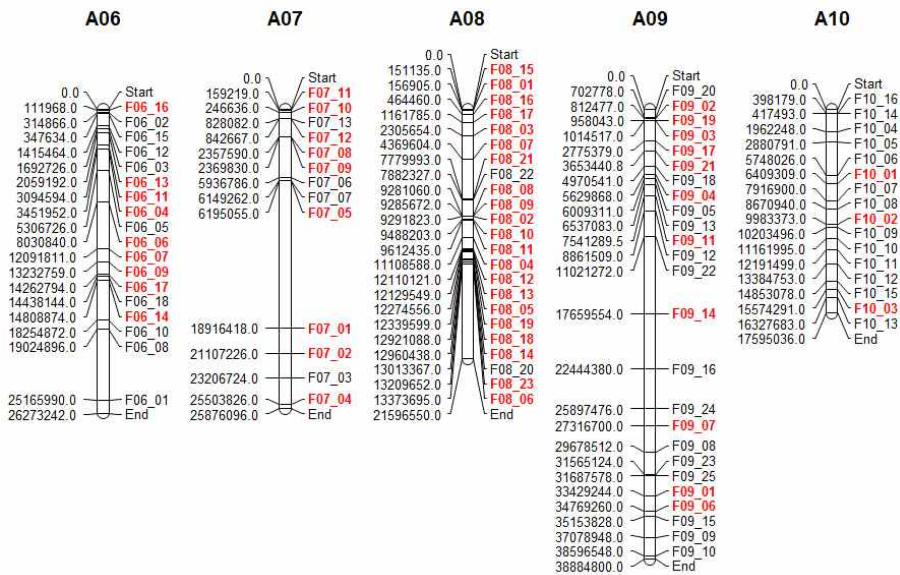




<그림 13. 선발한 107 마커의 염색체 분포>



<그림 14. 선발한 96마커의 염색체 분포 1>



<그림 15. 선발한 96마커의 염색체 분포 2>

#### 다. 순도검정에 적용

- 다섯 농가에서 채종한 F<sub>1</sub>종자를 받아 순도검정을 하였다. 모계, 부계, 농가별로 100개체의 F<sub>1</sub>을 2개의 마커로 분석하고 부모의 유전자형과 비교해 보았다. 농가1과 농가2에서 채종한 F<sub>1</sub>의 순도는 100%였으나, 농가2, 농가3, 농가4의 순도는 다소 낮았다. 채종한 종자에서 부계 유전자형을 가진 것, 모계의 유전자형을 가진 것이 나타나 일부 농장의 교배 및 채종 오류를 확인, 육종자원 유출의 가능성이 있음을 나타냈다(표 11).

농가	마커	H	A	B	증폭안됨	H개수	F <sub>1</sub> 비율
1	Marker 1	100	0	0	0	100	100%
	Marker 2	100	0	0	0	100	100%
2	Marker 1	95	0	4	1	95	95.9%
	Marker 2	95	0	4	1	95	95.9%
3	Marker 1	99	0	1	0	99	99%
	Marker 2	99	0	1	0	99	99%
4	Marker 1	99	1	0	0	99	99%
	Marker 2	99	1	0	0	99	99%
5	Marker 1	100	0	0	0	100	100%
	Marker 2	100	0	0	0	100	100%

<표 11. 다섯 농가에서의 순도 검정 결과>

#### [ 1 년차]

##### 1. 내병성 형질 유전자원 수집 및 병저항성 형질 모니터링

###### 가. 뿌리혹병 내병성 형질 유전자원(저항성, 일본판별품종) 확보

- 뿌리혹병은 연작과 병원균의 race변화로 인해 저항성 품종이 저항성을 나타내지 못하게 되는 것이 문제가 되고 있다. 뿌리혹병원균의 분류는 Williams 판별법과 ECD host를 이용한 판별법이 보편적으로 사용되고 있다. 국내에서 자주 사용되고 있는 Williams 판별법인 경우, 양배추 2종과 Rutabaga 2종으로 구성되어 있어 실제 배추는 사용되고 있지 않다. 이는 배추에서 작용하는 뿌리혹병원균을 Williams 방법으로 분류했을 때 race 판별하는데 있어 정확성이 떨어진다는 실험 결과에 대한 이유로 해석되기도 한다. 이에 일본에서는 배추에서 뿌리혹 병원균의 race 검정 (병원균의 분류)하는데 있어 배추에 적용할 수 있는 고유의 방법으로써, 현재 3가지 배추 품종(SCR Hiroki, CR Ryutoku, Musou)을 이용해 일본 전 지역에서 수집한 병원균을 병원성 표현형을 기준으로 하여 4가지로 종류로 분류하는 방법에 대해서 보고하였다(표 12). 국내 배추 품종 품종 분류 및 배추에서 기 보고된 저항성 유전자좌 연관 마커를 재현 및 변환 하여 실용화 하기 위해 일본 NARO Institute of Vegetable and Tea Science (NIVTS)에서 분양받았다(표7). 각 pathotype 그룹별로 관여하는 저항성 유전자좌를 3가지 (*Crr1*, *Crr2*, *CRb*)로 예측하고 있으나, 현재 배추에서 뿌리혹병 저항성 유전자좌로 보고된 것이 9개임을 고려해 보면, 각 저항성 그룹이 나타내는 표현형에 관여하는 저항성 유전자좌를 이해하기에는 부족하므로 이에 대해서는 더 연구가 필요한 부분이 있음을 알 수 있다.

<표 12. 일본 뿌리혹병원균 병원균 관별 품종 확보>

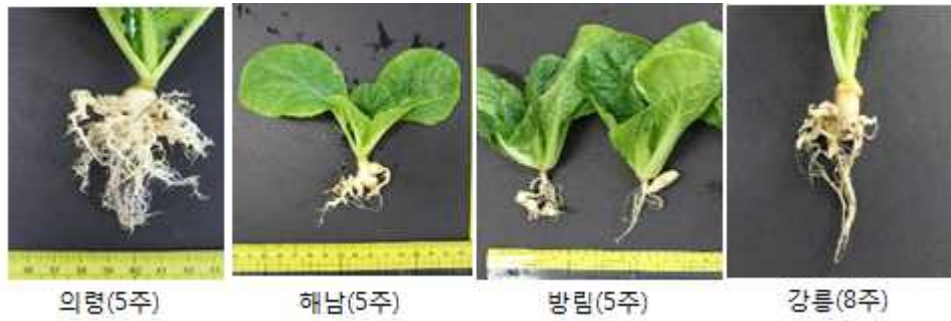
품종명	도입	Pathotype*				저항성 유전자좌
		Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	
SCR Hiroki	NARO Institute of Vegetable and Tea Science(NIVTS)	S	R	S	R	Unknown CR genes ( <i>Crr1a</i> ?)
CR Ryutoku	NARO Institute of Vegetable and Tea Science(NIVTS)	S	S	R	R	<i>CRb</i> hetero
Musou	NARO Institute of Vegetable and Tea Science(NIVTS)	S	S	S	S	No CR
Akimeki	NARO Institute of Vegetable and Tea Science(NIVTS)	R	R	R	R	<i>Crr1</i> & <i>Crr2</i> homo, <i>CRb(aki)</i> hetero

\*Hatakeyama et al., 2004

- 내병성 형질 연구를 위해 종묘회사에서 보유하고 있는 자원을 분양받았다. 식물 자원은 농협종묘(뿌리혹병 형질 저항성 및 이병성 14계통), 바이오브리딩(뿌리혹병 저항성 4계통, TuMV 저항성 1계통, 연부병 저항성 1계통), 한국종묘(노균병 저항성 및 이병성 2계통)에서 분양 받았다. 병원균은 농협종묘(해남지역, 의령지역, 강릉지역), 바이오드리딩(방림지역)에서 수집 및 보유 중인 지역균주를 분양 받았다.

#### 나. 뿌리혹병 병리검정 조건(표현형 검정 지표) 확립 및 QTL 분석

- 균주의 활성 확인 및 증식을 위해 춘정 품종을 기주로 이용해 2013년 11월에 접종 실험을 실시하였다. 15일에 파종해서 27일에 유묘에 뿌리혹병에 걸린 흙을 갈아서 106 spores/mL의 농도로 5ml씩 관주법으로 접종하였다. 접종 후 3주부터 병 증상을 눈으로 확인 할 수 있었으며 모든 식물 뿌리는 접종 후 지역 균주 종류에 따라 5주-8주 후에 수확하였다(그림 16). 증식한 뿌리혹은 -70°C의 초저온 냉동고에 보관하였다. 단포자에서 유래한 뿌리혹병원균 한 종류도 춘정을 기주식물로 해서 접종 및 증식이 진행중이다. 확보한 해남균주와 의령균주를 이용하여 뿌리혹병저항성 품종 16종류를 대상으로 접종하여 표현형을 조사하였다(표 13). 병증상에 따라 5등급으로 분류하여 표현형 값을 기록하였다(병징이 없는 것:0, 측근에 작은 혹:1, 측근에 굵은 혹:2, 주근이 변형된 혹:3, 주근 및 측근에 큰 혹:4). 표현형 값이 0-1 은 저항성, 1-1.5 는 중도저항성, 1.5 이상은 이병성으로 간주하였다. 실험에 사용한 뿌리혹저항성 품종이 해남 균주에서 저항성, 중도저항성, 이병성으로 분리된 표현형을 나타냈으며, 저항성 및 중도저항성을 나타냈던 품종에서도 일부는 의령 균주에는 이병성으로 나타났다. 따라서 현재 확보한 뿌리혹병원균주는 병을 내는데 있어 서로 다른 균주 종류로 판단할 수 있다. 강릉지역균주는 병징이 나타나는데 기타 지역균주와 달리 시간이 더 필요했다. 따라서 앞서 균주들과는 다른 종류의 균으로 판단된다.



<그림 16. 뿌리혹 병원균 증식>

<표 13. 뿌리혹저항성 시판 품종에서 표현형 검정>

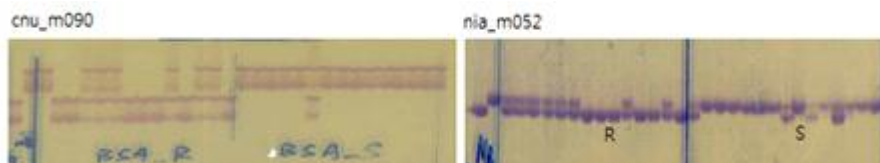
자원명정보	종류	해남지역균주(Avg.)	저항성	의령지역균주(Avg.)	저항성
CR명월	F <sub>1</sub>	1.0	R	3.5	S
CR참진	F <sub>1</sub>	1.3	MR	1.5	MR
CR강산	F <sub>1</sub>	1.0	R	3.5	S
CR대북	F <sub>1</sub>	0.8	R	4.0	S
CR김장	F <sub>1</sub>	0.8	R	2.8	S
CR봄노랑	F <sub>1</sub>	2.3	S	3.8	S
CR진심	F <sub>1</sub>	2.3	S	3.0	S
CR농심	F <sub>1</sub>	2.0	S	3.3	S
CR황금	F <sub>1</sub>	2.5	S	3.5	S
CR안심	F <sub>1</sub>	1.8	S	3.5	S
CR봄치녀	F <sub>1</sub>	3.0	S	3.8	S
CR춘대길	F <sub>1</sub>	1.5	MR	1.8	S
CR하광	F <sub>1</sub>	1.3	MR	3.3	S
CR황상	F <sub>1</sub>	1.5	MR	3.0	S
CR계왕	F <sub>1</sub>	0.5	R	3.8	S
CR황태자	F <sub>1</sub>	2.3	S	3.8	S

- 농협종묘에서 뿌리혹병 저항성 계통 11계통과 이병성 3계통을 분양받았다. 이들 11계통 중에서 저항성과 이병성 계통간의 교배로 만든 F3 집단(150계통)을 분양받아 저항성 유전자 좌위를 분석하고자 하였다. 농협종묘에서 선행된 유전분석 결과 이 저항성 형질은 단일자 우성으로 작용한다는 것을 알고 있었으나 집단에서 개체들의 표현형 값이 없어서 QTL 분석을 위해 표현형 조사를 수행하였다. F3 집단의 150계통을 계통당 10개체씩 106 spores/mL의 농도의 현탁액을 관주법으로 접종하였으며 접종 후 5주 후에 각 식물체별로 표현형을 조사하였다. 저항성 계통은 표현형값이 0.5로 저항성을, 이병성 계통은 4로 이병성을 나타냈으며 Williams 판별법에 의하면 race2로 나타났다(그림17).

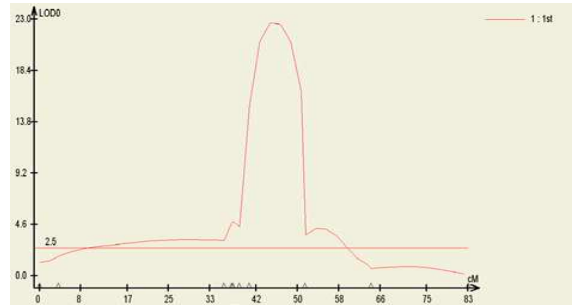


<그림 17. 저항성계통, 이병성계통에서 표현형, race 판별품종 결과>

- 저항성 형질이 연관된 유전자좌를 찾고자 빠른 검색 방법으로 저항성 유전자좌와 연관된 유전체 부위를 선발하고자 하였다. F<sub>3</sub> 집단에서 저항성 표현형값을 기준으로 하여 저항성 14계통, 이병성 15계통을 선발하여 gDNA를 동량으로 혼합해서 BSA 방법으로 다형성 마커를 조사했다. 유전자지도에 분포하는 마커 중에서 190개를 선발하여 다형성 조사를 한 결과 총 171개의 마커가 PCR로 증폭되었으며 이중 69개가 다형성을 나타냈다. 이중 저항성과 저항성 bulk, 이병성과 이병성 bulk가 동일 양상으로 나타나는 마커를 선발하여 재확인하였다(그림 18). 선발한 마커는 A3와 A8번에 위치하였다. 저항성 표현형에 대하여 QTL 분석을 하고자 F<sub>3</sub> 집단의 150계통 중 92 계통을 이용하여 다형성을 나타내는 69개의 마커와 문헌 조사로 기 보고된 뿌리혹병 저항성 형질 연관마커를 부모본에서 다형성 검정하여 다형성이 나타나는 것은 집단에서 genotype분석하여 유전자지도 초안을 만들었다. 유전자지도는 JoinMap v.4.0을 이용하였으며, QTL 분석은 WinQTL v.2.5를 사용하여 분석하였다. 분석 결과 A8에서 저항성 QTL을 확인할 수 있었고 이는 문헌조사에 의하면 A8에 위치하고 있는 저항성 유전자좌, *Crr1* 으로 판단할 수 있었다. 따라서 이 저항성 자원은 *Crr1* 유전자좌를 판단할 수 있는 마커개발 및 저항성 유전자좌 집적을 위하 소재로 사용 가능할 것으로 보인다(그림 19).



<그림 18. BSA 방법으로 마커 선발>



<그림 19. 뿌리혹병 저항성 형질의 QTL분석 결과>

#### 다. 마커 정보 수집 및 보유 자원 평가

- 기존 병 저항성 표현형을 나타내는 계통과, 목적 병 관련하여 보고된 저항성 형질 연관 분자마커간의 연관성을 알아보고자 하였다. 이는 추후 저항성 유전자원을 형질 연관 유전자좌로 분류하여 육종의 소재로 사용하는데 있어 효율성을 높일 수 있다. 배추에서 뿌리혹병, 노균병, 바이러스 병관련하여 문헌조사를 하였다. *CRA*, *Crr1*, *Crr2*, *Crr3*, *Crr4*, *CRk*, *CRC*, *CRb*, *CRaki* 총 9개의 유전자좌가 저항성 형질에 관여한다고 보고되었다. *CRA* 는 Matsumoto (1998) 등이 ‘T136-8’ 를 재료로 사용하여 보고를 시작으로 하여, RFLP/RAPD/SCAR/STS/RAPD 마커등이 보고되었다. Suwabe (2003) 등은 Siloga S2 (European fodder turnip) 에서 유래한 저항성 유전자좌 3개를 (*Crr1*, *Crr2*, *Crr4*) 보고하였는데 이중 *Crr1* 이 주요 저항성형질에 작용하며 *Crr2* 는 *Crr1* 과 *Crr4* 에 영향을 주는 미동인자로 보고하고 이에 연관한 SSR, SNP 마커를 보고하였다. *Crr3* 는 Milan White (European turnip) 에서 유래한 저항성 QTLs 로 단인자 우성으로 작용하는 것으로 알려져 있는데 Hirai (2004) 등이 형질과 연관된 RAPD, Saito (2006) 등이 STS 마커를 개발하였다. Piao (2004) 는 저항성인 ‘CR Shinki’ 를 재료로 하여 *CRb* QTLs에 연관한 AFLP/SCAR 마커를 보고하였고, Sakamoto (2008) 등은 european fodder turnip 인 ‘Debra’ 에서 유래한 저항성 유전자좌를 *CRC*, *CRk*라 명명 하였다. 최근에 보고된 *CRaki*는 *CRb*, *CRA* 와 매우 근접한 부위에 위치함으로써 같은 저항성 유전자좌 일 수도 있다고 해석되고 있다. 이들 저항성 QTLs 를 배추의 표준유전자 지도에서 살펴보면 5개의 연관그룹에 위치하고 있다. 즉, *Crr2*는 A1, *CRC*는 A2, *Crr4*는 A6, *Crr1*은 A8 그리고 *Cra*, *CRk*, *CRb*, *Crr3*는 A3 에 위치하고 있다. 최근 *Crr1* 유전자좌에 관한 fine mapping 결과는 이 유전자좌가 두 개의 유전자에 의해 조절된다고 보고하고 이 중에 하나인 *Crr1a*의 구조 및 기능을 보고하였다.

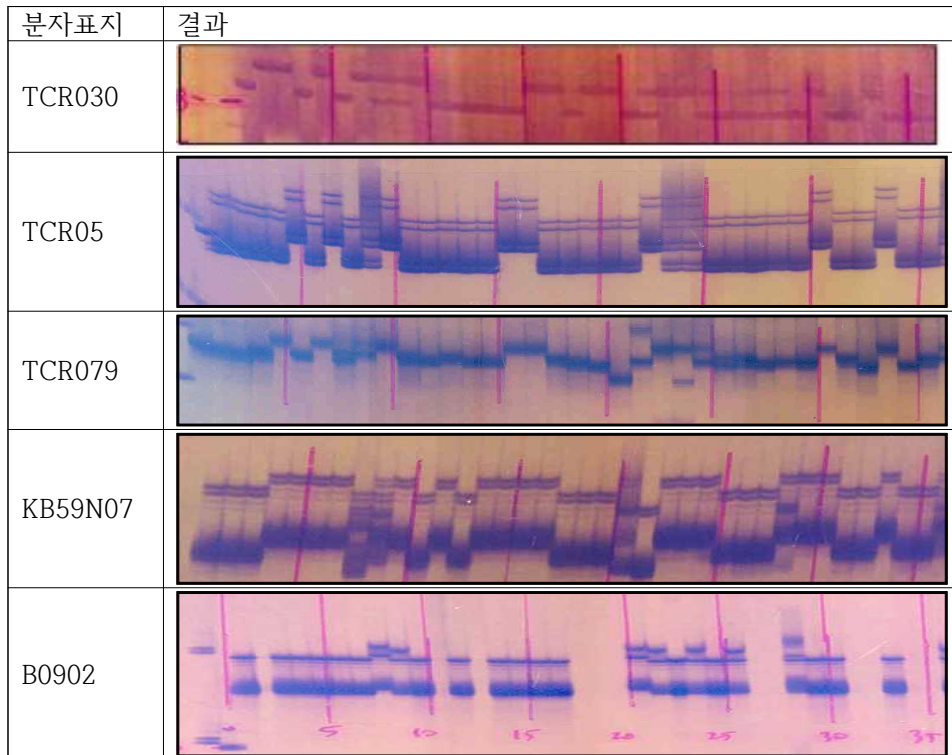
노균병은 배추에 발병하는 병 중에서 식물의 생존에 심각한 영향을 주지는 않으나 병해를 입은 배추는 상품성을 저하시키는 문제를 나타낸다. 배추에서 노균병 저항성 형질에 대한 연구는 유묘기(Yu 등, 2009)와 성숙기(Kim 등, 2011)에 관여하는 유전자좌 (*BrRHP1*(*BrassicaraparecognitionofHyaloperonosporaparasitica*))가 다른 것으로 보고되었다. 배추에서 바이러스 저항성 형질에 대한 유전자좌로는 *TuRB01b* (Rusholme 등, 2007)와 *TuRBCH01d*(Wang 등, 2011), *TuRB07*(Jin and Lee 등, 2013)이 보고되었다(표 14).

<표14. 배추에서 보고된 병 저항성 형질 문헌조사>

Species	Trait	Locus name	Marker type	Map position	Reference		
<i>B. rapa</i>	Clubroot	<i>CRa</i>	RFLP/RAPD	A3	Kuginuki et al. 1997		
			SCAR/STS		Matsumotoetal.1998		
			RAPD		Matsumoto et al. 2005		
			SCAR		Hayashida et al. 2008		
			STS		Sakamoto et al 2008		
			SCAR		Matsumoto et al. 2012		
			Gene		Ueno et al. 2012		
			<i>Crr1</i>		SSR	A8	Suwabe et al. 2003
					SNP		Suwabe et al. 2006
					Gene		Hirakeyama et al. 2013
			<i>Crr2</i>		SSR	A1	Suwabe et al. 2003
					SNP		Suwabe et al. 2006
			<i>Crr4</i>		SSR	A6	Suwabe et al. 2006
			<i>Crr3</i>		RAPD	A3	Hirai et al. 2004
					STS		Saito et al. 2006
<i>CRk</i>	RFLP	A3	Sakamoto et al. 2008				
<i>CRc</i>	RAPD	A2	Hirai et al. 2004				
	SCAR/RAPD/STS		Matsumoto et al. 2012				
<i>CRb</i>	AFLP/SCAR	A3	Piao et al. 2004				
<i>Craki</i>	SSR		Kato et al. 2012				
	SSR		Kato et al. 2013				
<i>B. rapa</i>	Downy	<i>BraDM</i>	RAPD/Isozyme	A8	Yu et al. 2009		
	mildew	<i>BrRHP1</i>	SCAR/InDel	A1	Kim et al. 2011		
<i>B. rapa</i>	TuMV	<i>TuMV-R</i>	SSR	A6	Chung et al. 2013		
		<i>TuRB07</i>	SSR	A1	Jin and Lee et al. 2013		
		<i>TuRB01b</i>			Rusholme et al. 2007		
		<i>TuRBCH01</i>			Wang et al. 2011		

- 확보한 병저항성 소재의 표현형과 저항성 유전자좌 연관 분자 마커를 이용하여 저항성 형질과 분자표지와의 연관성을 알아보고자 하였다. 또한 기존에 문헌에 의해 보고된 저항성 형질 연관 마커는 바로 저항성 표현형을 나타내는 자원에 적용하는데 있어 마커 개발에 사용된 동일 재료가 없이 문헌에 보고된 PCR 단편의 크기로만 판별하는데는 무리가 있었다. 이에 *Crr1*, *Crr2*, *Crr4*가 유래된 것으로 보고된 Siloga(중국도입, 국립원예특작원 도입), *CRb*가 유래된 것으로 보고된 Gelia를 비롯하여 일본 NTVIS에서 도입한 자원(SCR hiroki, CR rytoku, Akimeki, CR shinki를 이용하여 적어도 3개의 유전자좌 (*Crr1*, *Crr2*, *CRb*)에 대해서 마커 적용성을 확인 할 수 있는 준비가 되었다. 기타 CR 유전자좌가 도입된 유전자원 ECD2와 ECD4를 확보하였으며 이 외에 아직 수집하지 못한 저항성 유전자좌 유래 자원 Debora, Milan white 등에 대해서도 추후 도입 할 수 있도록 지속적으로 시도할 계획이다. 현재까지 *CRb* 유전자좌 연관 마커로 보고된 모든 마커를 사용하여 저항성 CR shinki와 94SK에서 분명한 다형성을 나타내는 마커를 선별하고, 보유하고 있는 내병성 유전자원에 대하여 *CRb* 유전자좌를 가지고 있는 계통을 구분하고자 하였다. TCR05/TCR09/TCR01뿐만

아니라, 추가로 개발한 KB59N07/B0902/TCR079/TCR030 이 구분하는데 사용하였다. *Crb* 유전자가 도입된 Gelia 이외에 기타 CR 유전자좌 도입 자원(siloga, ECD2, ECD4)을 사용하여 이들이 구분되는지를 확인하였다(그림 21). 또한 일본 판별품종을 같이 사용하여 이들이 보유하고 있다고 알려진 유전자좌를 확인하고자 하였다.

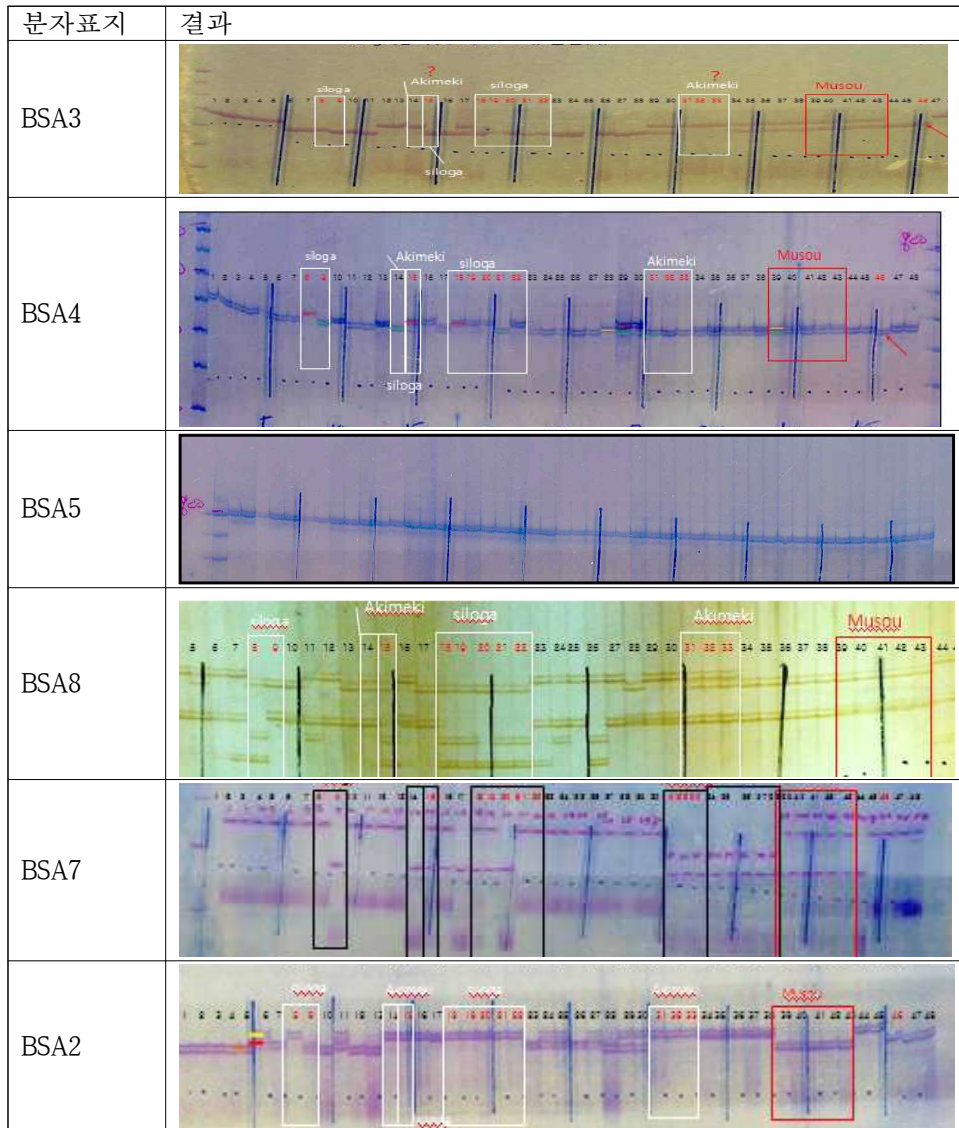


<그림 21. 배추에서 보고된 뿌리혹병 저항성 형질 유전자좌 분석>

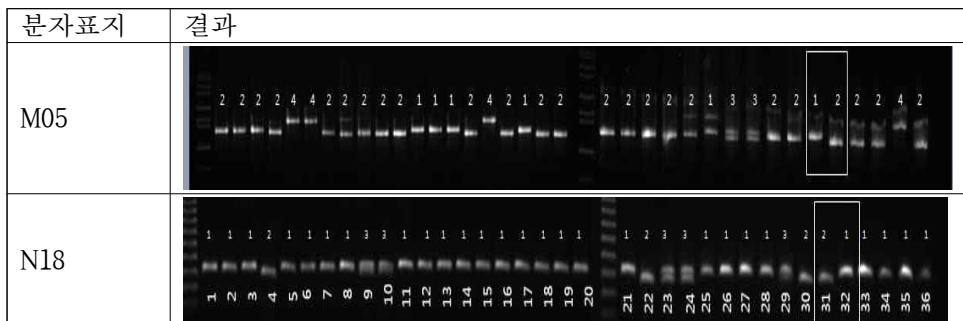
- *Crr1* 유전자좌에 연관된 마커 BRMS088, BSA1, BSA2, BSA7, BRMS297, BRMS173을 사용, *Crr2* 유전자좌에 연관된 마커 BRMS096, BSA3, BSA4, BSA5, BSA6, BSA8, BSA9, BRMS100을 사용하여 분석하였다. BSA3 마커는 QTL 분석결과 *Crr1* 유전자좌를 가지고 있는 것으로 보이는 저항성 M7계통과 이병성 M8 계통에서 다형성 결과가 나타났으나, 거의 모든 저항성계통에서 공통밴드로 나타났고, 이병성인 Musou에서도 공통밴드가 나타남으로 인해 마커로 적용하기에는 적합하지 않았다. BSA3, BSA4, BSA5, BSA8, BRMS096 마커에서는 저항성인 M7과 Akimeki에서 공통되는 밴드가 나타나기도 했으나 유전자좌가 도입되었다고 하는 siloga에서 공통밴드를 나타내지 않았으므로 적용하기에는 적합하지 않았다.
- *Crr1b* 유전자좌(*Crr1* 유전자좌에서 minor 효과)를 검정할 수 있다고 보고된 BSA2는 저항성 계통 M7과 이병성 계통 M8에서 다형성을 나타냈으며 원예연구소 도입 siloga(9)와도 공통 밴드를 관찰 할 수 있었으나 이는 Akimeki에서 볼 수 없었고, 중국siloga와 Akimeki 와 동일한 밴드가 있었으나 이는 M7에서는 일치하지 않았다. 따라서 이는 *Crr1* 검정용으로는 적합해 보이지 않으나, Ryutoku, SCR hiroki, ECD2, ECD4 (다른 CR 저항성 계통)에서도 밴드 구성에서 차이가 있어 일본 판별품종기준을 구분가능 하였다. *Crr1* 유전자좌에서 major 효과를 나타내는 *Crr1a*와 가까이 위치한 BSA7 마커는 siloga와 Akimeki에서 공통 밴드가 있으나 기타 저항성 계통 ECD4, SCR hiroki 에서도 검출되었으며, 이병성 계통이 공통 밴드



와 그 외의 밴드가 hetero로 나타났기에 마커로 사용하기에는 명료함에 있어 개선의 필요성이 있다(그림 22). 이러한 결과는 마커가 저항성 형질에 연관한 마커임으로, 추후 형질에 연관한 유전자에서 마커가 개발 되었을 때 형질을 구별하는데 보다 유용할 것이다(그림 23).



<그림 22. 배추에서 보고된 뿌리혹병 저항성 형질 유전자좌 분석>



<그림 23. 배추에서 보고된 노균병 저항성 형질 유전자좌>

[ 2 년차]

1. 내병성 형질 유전자원 수집 및 병저항성 형질 모니터링

가. 지역균주에서 단포자 분리 배양한 뿌리혹 분양 및 증식

○ 내병성 형질 보유 식물유전자원 및 병원균은 내병성 육종에서 중요한 재료이다. 1차년도에 확보한(분양) 재료가 있으나 지역균주였다. 실제 포장에서 피해를 입은 밭에서 채취한 시료에서 다양한 race가 혼재하여 있으며, 이는 내병성 연구에서 결과를 해석하는데 어려움을 줄 수 있다. 따라서 단일 포자에서 증식한 단포자 유래 병원균은 내병성 형질 연구에 있어서 좋은 재료로 생각 할 수 있다. 이에 충남대학교 김흥기 교수님 실험실에서 분리한 단포자 유래 병원균 9종을 분양받았다(표 15). 매우 미미한 뿌리혹병 증상(뿌리의 꼬임, 매우 작은 혹)을 나타내고 있어 바로 사용할 수 없어 증식이 필요했다. 2014년 12월 5일에 과중하여 전체 식물체를 갈아 관주법으로 접종 후, 성장상에서 증식 과정이 진행 중이다(그림 24). 차년도에 수확한 병원균은 기 보유한 저항성, 이병성 계통에 접종을 진행할 예정이다.

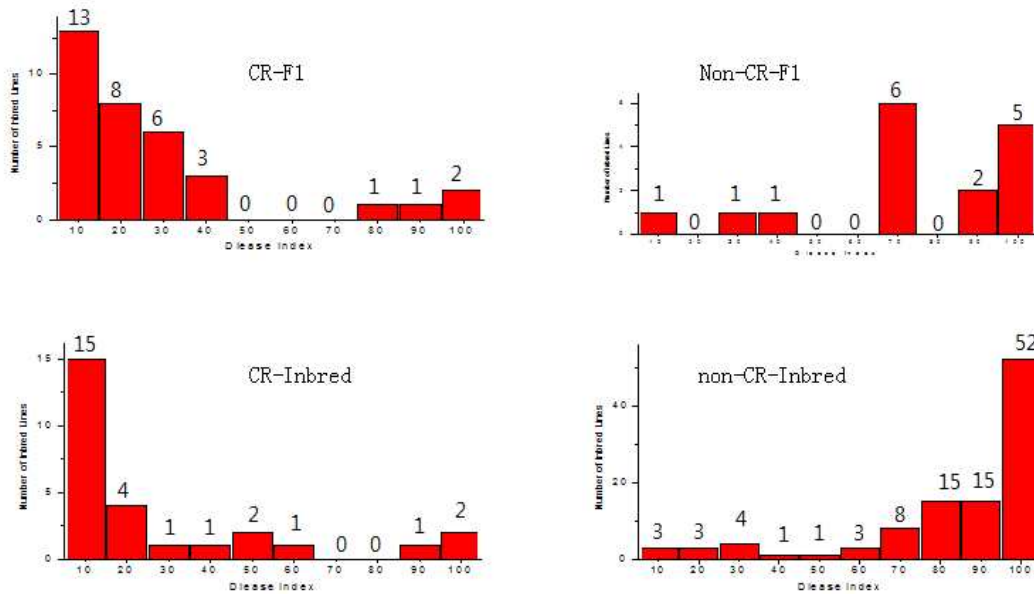
<표 15. 단포자 배양 뿌리혹병 균주 분양>

WCDrace판별	단포자접종일	뿌리혹 수집 지역
race 4	2014.08.13	배방(2010년채집)
	2013.07.25	연천(2003년채집)
	2013.05.06	연천(2003년채집)
race 8	2013.10.26	연천(2012년채집)
	2014.08.13	배방(2010년채집)
race 3	2014.08.13	배방(2010년채집)
race 5	2014.08.13	배방(2010년채집)
	2013.10.26	연천(2012년채집)
race 9	2013.10.26	연천(2012년채집)



<그림 24. 단포자 배양 뿌리혹병 균주 증식, 성장상>

- 1차년도에 확보한 (분양) 뿌리혹병 지역균주 중에서 비교적 저항성이 약한 균주를 사용하여 2014년 9월 22일에 182종의 유전자원(내혼계 132종, F1 50종)을 대상으로 병리검정을 수행했다. 1차 년도에 확립한 방법대로 106 spores/mL의 농도로 관주법으로 접종하였으며 계통당 10주씩 반복구로 실험했다. 내혼계 중 27종, F1 중 34종이 뿌리혹병 내병성 자원으로 알려져 있었고, 그 외의 자원에서는 뿌리혹병에 대한 정보가 없었으나 병리 검정 결과 저항성과 이병성의 개체수는 예상 했던 것과 유사했다(그림 25). 표현형 조사 자료의 정확성을 높이고자 현재 2차 접종 실험이 진행 중이다.



<그림 25. 182종 유전자원 대상으로 지역균주(강릉균주) 1차 병리검정 결과>

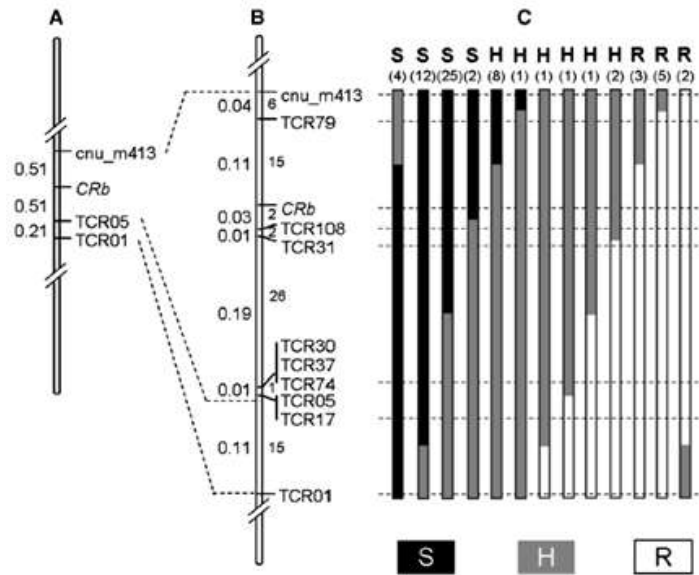
- 182종 중에 132 계통의 유전체 재분석(re-sequencing)정보를 확보하고 있다. 차년도에는 1차, 2차 표현형 조사 데이터를 기반으로 genome wide association 분석으로 병 저항성 형질과 연관된 유전자좌 탐색 또는 보다 근접한 연관 마커 개발을 위한 자료로 활용 하고자 한다.
- 추후 조사한 형질과 연관정도를 유전체 재분석 결과(re-sequencing data)와 비교하여 뿌리혹병과 연관한 부위를 탐색하고자 한다.
- 기 확보한 저항성 자원과 표현형(저항성 또는 이병성)을 알 수 없는 유전자원 14종을 화학연구원 채소병리검정센터에 뿌리혹병의 병리검정을 의뢰했다(그림 26). 화학연구원에서 보유 및 서비스에 활용하고 있는 병원균에 대하여 저항성이 있는 유전자원을 선발할 수 있다면, 이는 마커 개발에 활용할 예정이다.

병리검정뢰서( <i>in vivo</i> 검정용)			
호주명	환자번호	성명	성별
입원번호	042-221-0846	김정호	남
진료과	042-221-0847	내과	www.herep.com
주소	대한생명사 유전자 진단부 29 동대문로4길		
시험 종류	<input checked="" type="checkbox"/> 종자 <input type="checkbox"/> 사육 <input type="checkbox"/> 환경배양 <input type="checkbox"/> 교배배양		
종류	교주	크로 수컷명	수컷
교배명		부교배명	702-5
배양명		배양명(대조군)	10021
배양조건			
배양기간			
배양장소			
배양방법			
시험 결과에 대한 문의사항은 전화로 문의하십시오. 2015 년 1 월 30 일			
유전자 진단부 (내과 221 동) 유전자 진단부 (내과 221 동) 한국생명연구원 최경자 귀하			
* 첨부: 1. 실험결과 보고서 1P			
*비밀유지 1. 유전자 진단부 유전자 진단부 2. 유전자 진단부 유전자 진단부 3. 유전자 진단부 유전자 진단부			

<그림 26. 병리검정뢰서>

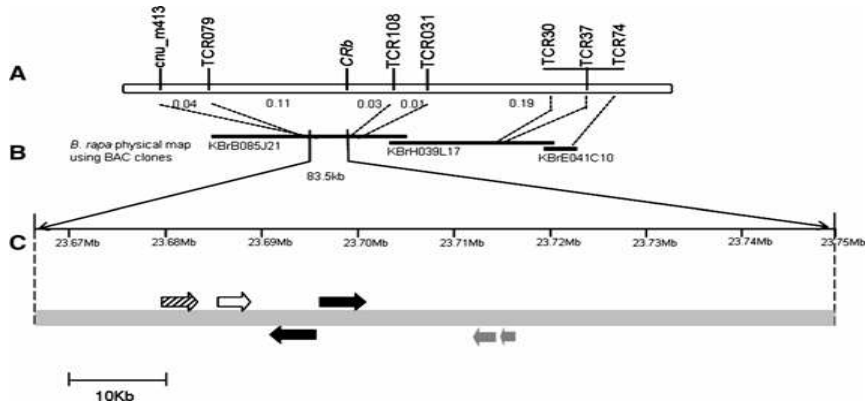
나. 뿌리혹병 *CRb* 유전자좌, 내병성 형질 유전자원 분석 및 저항성 형질 연관 마커 개발 내용 논문 발표

- 뿌리혹병 저항성 형질인 CR shinki(CRb) 와 박초이 ‘702-5’ 를 교배하여 나온 F1 개체를 자가수정하여 만든 F2집단(8696)에서 recombinants 67개체를 선발하여 fine scale mapping을 했다(그림 27, 그림 28).



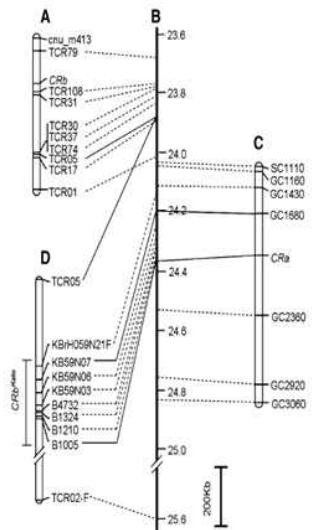
<그림27. CRb 유전자좌 지도화>

A, 초기 map; B, 67개 recombinant 이용 fine mapping; C, 마커 유전자형과 recombinant의 표현형 비교



<그림 28. CRb 유전자좌 영역에서 후보 유전자 표기>

- CRb와 가장 인접한 마커 TCR079와 TCR108 사이의 물리적 거리는 표준 유전체 정보를 기준으로 약 83.5 kb거리를 두고 있었다. 해당 영역에서 15개 유전자를 확인했고 이중, 5개의 유전자의 기능이 병저항성에 연관된 것으로 보아 후보유전자로 선발했다.
- 기 보고된 뿌리혹병 유전자좌 중에서 가장 최근 새로운 유전자좌로 보고된 CRaki 유전자좌가 CRb 일수도 있을 것이라는 보고를 일본에서 한 바 있다. 연관 마커의 염기서열을 사용하여 배추 유전체 정보에서 물리적인 위치를 비교해보면, 두 유전자좌가 매우 인접해 있음을 알 수 있다. 또한 CRaki 유전자좌는 CRb 보다는 CRa 유전자좌와 같은 것으로 보인다. 이러한 내용은 Mol Breeding(2014, 34:1173-1183)에 출판하였다(그림 29).



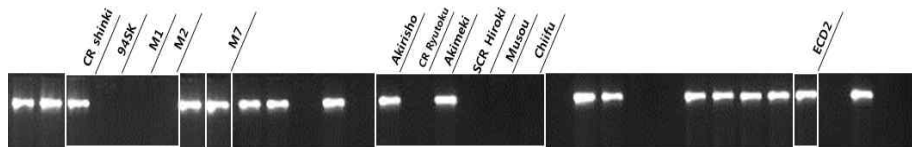
<그림 29. CRb, CRaki 유전자좌의 물리적 위치 비교>

### 다. 뿌리혹병 기타 유전자좌, 내병성 형질 연관마커 이용 유전자원 분석 및 저항성 형질 연관 마커 개발

- 1차년도에 수집한 내병성 형질 연관 마커 정보를 이용하여 기존 병 저항성 표현형을 나타내는 계통들에 적용하여 마커와 형질 연관성(마커 분석 서비스 가능성)을 알아보고자 했다.

논문에서 사용한 저항성 계통을 보유하지 못한 상황이므로, 대조구로 기 보고된 저항성 유전자좌의 유래(origin)를 가지고 있는 것(ECD2, Siloga, Gelia)을 사용했다. 대조구가 현재 없는 유전자좌(*CRk*, *CRc*, Milan white)에 대해서는 기 보고된 논문의 자료를 토대로 분석하여 재현성을 보고, 현재 보유하고 있는 일본 판별품종과 저항성 계통을 이용하여 결과를 판단하였다. 또한 대부분의 뿌리혹병 저항성 유전자좌가 일본에서 발표, 이러한 자원이 육종의 소재로 사용되었을 수도 있을 것이라는 가정하에 일본에서 판매하고 있는 뿌리혹병 저항성 F1 품종을 이용하여 마커 분석을 수행했다. 마커 검정 결과 이들 유전자좌에 해당하는 저항성 밴드를 가지고 있는 재료는 해당 유전자좌를 보유하고 있을 가능성이 있으므로 선발하고자 하였다.

- *Crr3* 연관 마커로 70종의 일본 F1 품종과 16계통의 내흔계 계통을 대상으로 분석하였을 때, 일본 F1 품종 6개, 2개의 내흔계에서 저항성 밴드를 확인 할 수 있었다. 그러나, 이들 저항성 밴드는 뿌리혹병 race 판별 기주 품종에서도 동일한 밴드가 나왔으므로(이병성 개체에서는 없음) 저항성 형질에 연관된 마커임에는 분명하나 저항성 유래(origin) 특이적인 마커는 아닌 것으로 보인다.
- *Cra* 연관마커의 경우 fine mapping에서 개발된 것으로 보고된 마커의 경우 일부 이병성 마커에서 동일 밴드가 관찰되었다. 이는 이 마커가 비록 fine mapping을 통하여 보다 저항성 유전자좌에 인접한 마커로 개발되었으나, 논문에서 사용한 저항성, 이병성 계통간에 염기서열의 차이가 있었을 뿐, 뿌리혹병 저항성 형질에 연관된 특이적 밴드가 아닌 것으로 보인다. 따라서 뿌리혹병 저항성 계통을 구분하기 위해 마커 검정용으로는 차선으로 가까이 위치한 마커가 더 유용한 것으로 보인다. 이 마커는 여러 이병성 계통에서는 나타나지 않으나 ECD2 이외의 다른 저항성 유래 식물체 및 저항성 계통에서는 동일 밴드가 나타난다. 따라서 저항성 여부를 판별하는데 사용할 수 있으나, 특정 저항성 유전자좌 유래를 검출하기에는 개선의 여지가 있다(그림 30).



<그림 30. CRa 유전자좌 연관 마커 분석>

- *CRc*와 *CRk* 연관마커 분석 결과는 논문의 밴드는 재현성 있게 증폭되나, 이들 밴드들이 분석에 사용한 식물 시료의 표현형(저항성, 이병성)과 달리 여러 종류의 이병성 개체에서 혼재되어 나타나므로 마커 분석용으로 판단하기에는 보다 주의가 필요하다.
- 1차년도에 150개체로 구성된 분리집단을 이용하여 표현형(병리)검정을 하고, QTL 분석을 하여 A8 에 저항성 유전자좌가 위치한 것으로 나타났다. 이는 문헌(선행연구) 조사 결과 A8 에 위치한 저항성 유전자좌는 *Crr1*과 매우 유사한 부위에 위치하고 있었다. *Crr1* 유전자좌에서 major 효과를 나타내는 *Crr1a*와 가까이 위치한 마커(BSA7)가 기 보고되었다. 그러나, 이는 siloga(저항성 인자 보유, 도입함)와 Akimeki(*Crr1*, *Crr2*, *CRb* 보유한 것으로 보고됨)에서 공통 밴드가 있어 *Crr1* 유전자좌 검색용으로 유용한 것으로 보이나, 동일 밴드가 기타

저항성 계통 ECD4, SCR hiroki 에서도 검출되었으며, 이병성 계통이 공통 밴드와 그 외의 밴드가 hetero로 나타났기에 마커로 사용하기에는 명료함에 있어 개선의 필요성이 있다. 따라서 본 저항성 자원을 Crr1 유전자좌를 판단할 수 있는 마커개발 및 저항성 유전자좌 집적을 위한 소재로 사용하였다. 표준 유전체 정보를 이용하여 인접한 부위에 위치하는 SSR 마커들을 디자인하여 저항성 계통과 이병성 계통에서 적용해 보았다. 총 3개의 마커 (GSP\_CR\_1, GSP\_CR\_2, GSP\_CR\_3) 가 저항성과 이병성 계통을 구분할 수 있었다. 그러나 이들 마커가 siloga와 akimeki에서와는 밴드가 일치하지 않았다. 이 마커가 개발에 사용한 계통 특이적으로 차이가 있는 염기서열 부위를 이용해서 개발했기 때문일 수도 있다. 그러나 이들 마커를 바이오브리딩에 분양했고, 자체 보유 계통을 분석했을 때, GSP\_CR\_2, GSP\_CR\_3 마커가 보유하고 있는 저항성개체와 이병성 개체, 및 분리집단에서 저항성과 이병성을 분명하게 분류할 수 있었다는 결과를 참고해 보면, 이들은 저항성 형질에 연관된 마커일 가능성이 매우 높다.

### [ 3 년차 ]

#### 1. 내병성 형질 유전자원 수집 및 병저항성 형질 모니터링

##### 가. 뿌리혹병 내병성 형질 유전자원 확보

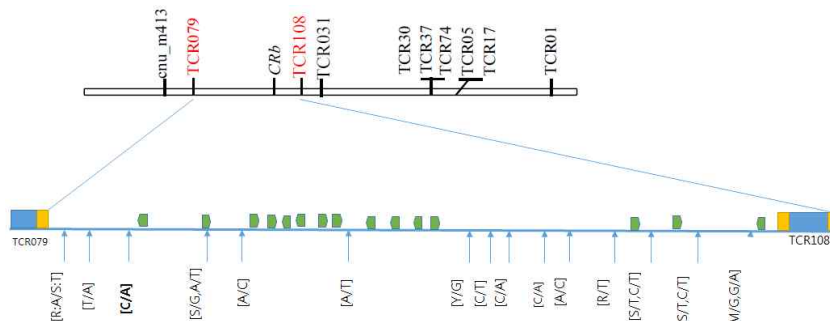
- 일본 NIAS (National Institute of Agrobiological Sciences) genebank에서 내병성 소재로 기재되어 있는 유전자원을 도입하였다. 이들 순무에 대하여 화학연구소에 병리검정을 의뢰하였다(표 16).

<표 16. 일본에서 도입한 내병성 유전자원>

도입	품종명	학명
NIAS Genebank, National Institute of Agrobiological Sciences	25971	<i>Brassica rapa</i> L. Oleifera Group (Turnip rape)
	26827	<i>Brassica rapa</i> L. Rapifera Group (Turnip)
	26850	<i>Brassica rapa</i> L. Rapifera Group (Turnip)

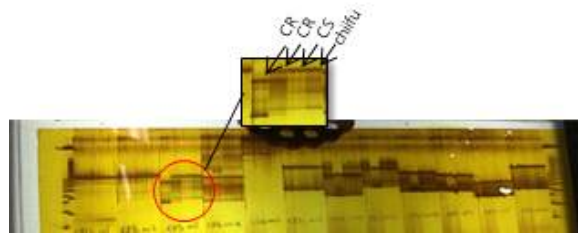
##### 나. 뿌리혹병 CRb 유전자좌 마커 개발 내용 특허 출원

- 기 보고한(Mol Breeding, 2014) 결과에서 CRb와 가장 인접한 마커 TCR079와 TCR108 사이의 물리적 거리는 표준 유전체 정보를 기준으로 약 83.5 kb거리를 두고 있었다. 해당 영역에서 15개 유전자를 확인했고 이중, 5개의 유전자의 기능이 병저항성에 연관된 것으로 보아 후보유전자로 선발했었다(그림 31).



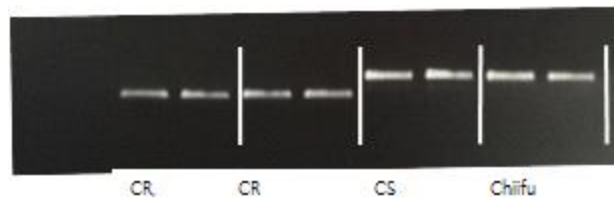
<그림 31. CRb 유전자좌 fine mapping 결과 목적 영역에서 SNP위치 표기>

- 내병성 계통과 이병성 계통의 유전체 분석데이터를 이용하여 염기서열간의 차이를 비교해 보았다. 마커 TCR079와 TCR108 구간을 target region으로 하여 내병성 계통의 유전체 재분석정보를 blast 분석을 진행하였으며, 총 250개의 scaffold가 hit 되었다. 이중 A03에 위치하며 유사도가 높은 scaffold를 기준으로 하여 scaffold를 선발하였다. 선발한 Scaffold를 target region과 alignment한 결과 총 20개의 SNP가 발견됐으며 이를 통해 15개의 primer를 제작하였고, HRM 분석을 하였다. 12쌍의 primer가 증폭되었으며 3쌍의 primer에서 증폭이 되지 않았다. 이들 PCR 산물을 HRM과 동시에 PAGE 분석을 수행한 결과 ‘특허용 마커\_1’에서 저항성과 감수성과 구별이 가능했으며, 나머지 primer에서는 다형성이 나타나지 않았다(그림 32).



<그림 32. PCR 반응 산물의 전기영동 결과>

- Target region인 TCR\_079와 TCR\_108 사이의 서열을 CR shinki 유전체 재분석 데이터에서 유사도 분석을 수행하였다. 그 결과 250개의 contig가 hit 되었으며 HSP가 높은 순서대로 alignment를 실시하였다. 31개의 contig를 alignment 하여 저항성 절편을 보유하고 있는 contig(C6605327 외)를 확보하였고, InDel과 SNP를 확인하였으며, 이를 이용하여 마커를 개발하였다(그림 33).



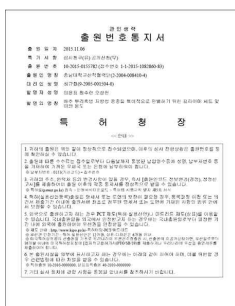
<그림 33. 특허용 마커\_3 의 전기영동 결과>

- 배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별하기 위한 총 5종의 프라이머 세트를 개발하였고, 상기 프라이머 세트를 이용하여 저항성 계통인 CR shinki, gelria 및 감수성 계통인 94SK, chiifu를 대상으로 PCR을 수행하여 분석한 결과, 저항성 계통 특이적인 결과물을 확인할 수 있었다. 이들 마커는 결과 확인을 아가로스젤, PAGE, HRM으로 모두 검출이 가능하므로, 보다 효율적으로 배추 뿌리혹병 저항성 품종의 판별을 가능하게 하였다(표 17). 해당 내용으로 발명의 명칭이 ‘배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도’로 하여 특허출원을 하였다 (출원번호 10-2015-0155782, 그림 34).



<표 17. 특허용 마커의 전기영동 방법>

	Agarose gel	PAGE	HRM
특허용 마커_1		+	
특허용 마커_2		+	
특허용 마커_3	+		+
특허용 마커_4	+		+
특허용 마커_5			+



<그림 34. 특허출원번호 통지서>

○ 위의 5개중 하나인 ‘특허용 마커\_1’ 를 가지고 실험실에서 집단양성 중인 SRC-152011 집단에 마커 검정을 실행하여 기존에 사용하던 TCR-079와의 결과를 비교해 보았다(표 18).

<표 18. 기존 마커 검정 결과와 개선한 마커 검정 결과 비교>

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
TCR_079	H	R	H	R	H	R	H	R	R	R	H	R	H	H	R	H	H	H	R	H	R	
특허마커 1	S	R	S	R	S	R	S	S	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R	
	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	
TCR_079	R	H	R	R	H	H	H	H	R	H	H	R	H	H	R	H	-	H	H	H	R	
특허마커 1	-	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S	S	R	
	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	
TCR_079	R	R	H	-	-	R	H	-	H	R	R	H	R	R	H	H	R	R	R	H	H	
특허마커 1	R	R	S	-	-	R	S	-	S	-	R	S	R	R	-	S	R	R	R	S	S	
	64	65	66																			
TCR_079	R	R	H																			
특허마커 1	R	R	S																			

- 결과를 비교해보면 TCR\_079에서 저항성으로 나타난 밴드는 8번의 경우를 제외하고 ‘특허용 마커\_1’에서 저항성으로 뜨고 TCR\_079에서 hetero type으로 두 개의 밴드가 증폭된 개체는 감수성인 것으로 나타났다. 이는 보다 인접한 마커(유전자 기준)로 분석함으로써 결과가 달라진 것으로 생각된다. 결과의 정확도를 높일 뿐만 아니라 다형성 차이가 미미하여 PAGE 에서 MAS로 사용하기에 어려움이 있었던 TCR\_079 마커를 ‘특허용 마커\_1’로 대체가 가능하였다.

**다. 뿌리혹병 내병성 분리집단을 이용하여 QTL 분석 및 마커 개발**

- 배추 뿌리혹병은 우리나라에서 1926년 처음 등장하였으며, 십자화과 작물에 심각한 경제적 피해를 일으킨다. 뿌리혹병균은 거의 모든 배추과 작물에 발생하여 기주가 다양할 뿐만 아니라, 토양 내에서 최대 17년 동안 생존하고, 유전적 다양성으로 race가 분화되어 있어 race에 따라 병원성도 다르게 나타나는 경우가 많아 방제를 어렵게 한다. 현재 배추에서 뿌리혹병 저항성 형질에 관여하는 11개의 유전자좌(*CRA*, *CRaki*, *CRb*, *CRC*, *CRk*, *Crr1*, *Crr2*, *Crr3*, *Crr4*, *PbBa 3.1*, *PbBa3.3*)가 보고되었다(표 19).

<표 19. 기 보고된 뿌리혹병 유전자좌>

	Locus name	Resistance Origin	Map posituion	Reference
1	<i>CRA</i>	ECD2	A03	Kuginuki et al. 1997
2	<i>CRb</i>	Gelia	A03	Piao et al. 2004
3	<i>CRaki</i>	Akiriso	A03	Kato et al. 2012
4	<i>CRC</i>	Debra	A02	Hirai et al. 2004
5	<i>CRk</i>	Debra	A03	Sakamoto et al. 2008
6	<i>Crr1</i>	Siloga S2	A08	Suwabe et al. 2003
7	<i>Crr2</i>	Siloga S2	A01	Suwabe et al. 2003
8	<i>Crr3</i>	Milan white	A03	Hirai et al. 2004
9	<i>Crr4</i>	Siloga S2	A06	Suwabe et al. 2006
10	<i>PbBa3.1</i>	C59-1	A03	Jingjingchen et al. 2013
11	<i>PbBa3.3</i>	C59-1	A03	Jingjingchen et al. 2013

- *Crr1*이 주요 저항성 형질에 작용하며 *Crr2*는 *Crr1*과 *Crr4*에 영향을 주는 미동인자로 보고하고 이에 연관한 SSR, SNP 마커를 보고하였다. *Crr3*는 Milan White에서 유래한 저항성 QTLs로 단인자 우성으로 작용하는 것으로 알려져 있는데 Hirai (2004) 등이 형질과 연관된 RAPD를 Saito(2006) 등이 STS 마커를 개발하였다. Piao (2004)는 저항성인 ‘CR Shinki’를 재료로 하여 *CRb* QTLs에 연관한 AFLP/SCAR 마커를 보고하였고, Sakamoto (2008) 등은 european fodder turnip인 ‘Debra’에서 유래한 저항성 유전자좌를 *CRC*, *CRk*라 명명하였다. Chen (2013)등은 ‘ECD4’에서 유래한 저항성 유전자좌를 *PbBa3.1*, *PbBa3.3*으로 보고하였다. 이들 저항성 QTLs를 배추의 표준유전자 지도에서 살펴보면 5개의 연관그룹에 위치

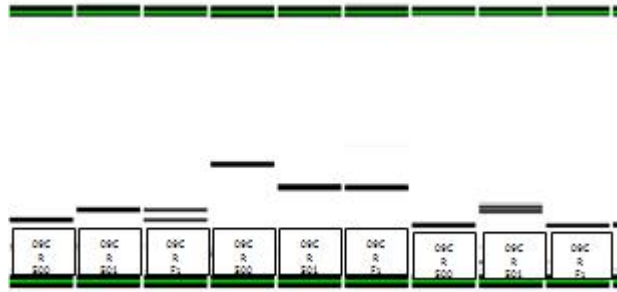
하고 있다. 즉, *Crr2*는 A1, *CRc*는 A2, *Crr4*는 A6, *Crr1*은 A8 그리고 *CRa*, *CRk*, *CRb*, *Crr3*, *PbBa3.1*, *PbBa3.3*은 A3에 위치하고 있다. 이미 11개의 유전자좌가 보고 되었음에도 불구하고 병원체는 유전적으로 다양성으로 race가 분화되어 있어 race에 따라 병원성도 다르게 나타나며 변이가 다양해 저항성 품종 육성에 어려움이 많다. 이를 해결하기 위한 방법 중에 한가지로 새로운 저항성 유전자좌 탐색이 필요한 실정이다.

- 이를 위해 NGS를 통해 개발된 SNP들을 HRM 분석에 용이하도록 프라이머를 제작하여 유전자 지도 작성을 수행하였다. 뿌리혹병 저항성 유전자좌 탐색을 위해 뿌리혹병에 저항성을 보이는 09CR-500과 이병성을 보이는 09CR-501을 이용하여 만든 84개체로 구성된 DH 집단을 사용하였다. 84개의 DH lines을 유리 온실에 파종 후 발아 2주 후에 1 X 10<sup>7</sup> spores/mL씩 관주하였으며 접종 후 14일 후에 뿌리를 수확하여 발병도를 조사하였다. 발병도는 총 7개로 분류하였으며 병이 없는 것은 0점 그리고 완전 이병성은 6점으로 발병도를 측정하였다. 이를 자세히 나타내면 0점은 증상이 없는 것, 1점은 측근에 미세한 swelling이 있는 것, 2점은 측근에 몇 개의 미세한 혹이 있는 것, 3점은 측근에 경도의 중도의 혹이 있는 것, 4점은 측근에 큰 혹과 주근에 작은 swelling이 있는 것, 5점은 주근에 큰 혹이 있는 것, 6점은 뿌리혹전체에 혹이 있는 것으로 나누었다. 1차 표현형 검정에서 발병도를 분석해보면 발병도가 10점에서 20점엔 개체는 27개이며 90점에서 100점 사이의 개체는 28개로 저항성과 이병성의 비율이 1:1.03 양분화 됨을 볼 수 있었으며 2차 표현형의 경우는 10점에서 20점엔 개체는 36개이며 90점에서 100점 사이의 개체는 41개로 저항성과 이병성의 비율이 1:1.13으로 나타났다(표 20).

〈표 20. 표현형 조사 및 발병도〉

	1차	2차
DI	Number of line	
10	11	32
20	16	4
30	4	3
40	3	2
50	3	0
60	1	0
70	3	0
80	9	0
90	5	2
100	23	39
Total	82	82

- 연관지도 작성을 위해 총 703개의 마커를 이용하여 survey를 진행하였다. 또한 기보고된 뿌리혹병 연관마커도 함께 진행하였다. 양친간의 survey결과 227개(32.2%)의 마커에서 다형성이 확인하였다(표 21, 그림 35).



<그림 35. LabChip을 이용한 다형성 검정 예시>

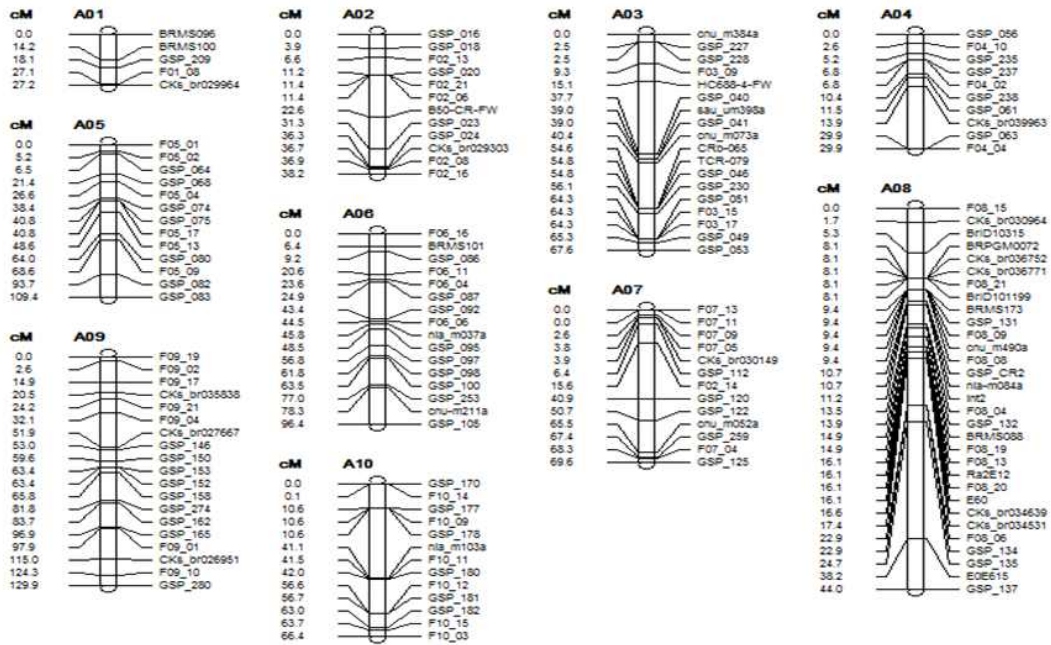
<표 21. 다형성 검정 결과>

Marker type	No. of total primer assayed	No. of polymorphism	No. of non polymorphism	Percent of polymorphism
SNP	628	198	430	31.5%
SSR/InDel	75	29	46	38.6%
Total	703	227	476	32.2%

- Joinmap4를 이용하여 연관지도를 구축 하였으며 총 10개의 그룹이 만들어 졌고 150개의 마커가 연관지도에 사용되었다 (표 22, 그림 36).

<표 22. 다형성 있는 마커 선발 후 집단에서 유전자형 분석한 결과>

Marker Type	No. of total Markers	No. of genotyping with population	No. of markers Mapped
SNP	198	142	125
SSR/InDel	29	29	25
Total	227	171	150



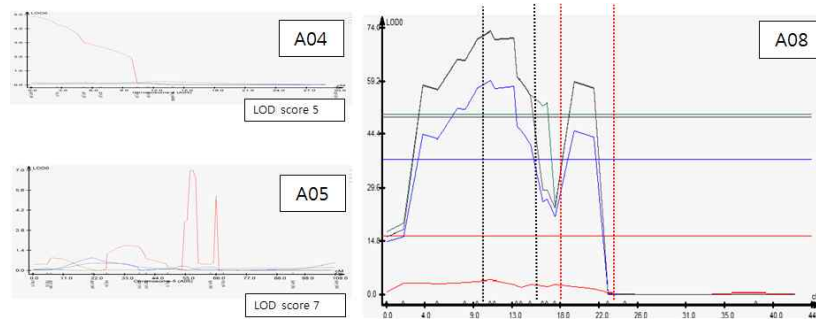
<그림 36 . 유전자 지도>

○ 유전자지도의 총 길이는 678.4cM이며 평균 거리는 5.2cM이다. 가장 긴 연관 그룹은 A09의 129.9cM이며 가장 짧은 연관 그룹은 27.1cM이다. 가장 많은 마커의 수는 31개로 A08에 위치하며 가장 적은 수의 마커로 이루어진 연관 그룹은 A01로 5개이다 (표 23).

<표 23. 유전자지도 요약>

Linkage map	No. of markers	Genetic length(cM)	Average distance(cM)
A01	5	27.1	4.3
A02	12	38.2	3.4
A03	18	67.6	4.1
A04	10	29.9	3.4
A05	13	109.4	9.5
A06	16	96.4	6.4
A07	13	69.6	6.3
A08	31	44.0	1.5
A09	19	129.9	7.5
A10	13	66.4	6.0
Total	150	678.5	5.2

- QTLs 분석 결과 A04, A05 그리고 A08에서 QTLs이 확인 되었다. A04에 위치한 QTL의 경우 LOD 값이 4.90이며 0.00cM에서 10.38cM 사이에 위치하며 마커 GSP\_056, GSP\_238 사이에 위치하였다. A05에 위치한 QTL은 LOD 값이 6.96이며 48.56cM에서 63.99cM 사이에서 마커 F05\_13과 GSP\_080사이에 위치하였다. A08에는 2개의 QTL 위치하며 각각 LOD 값은 73.05, 59.06 이었다(그림 9).

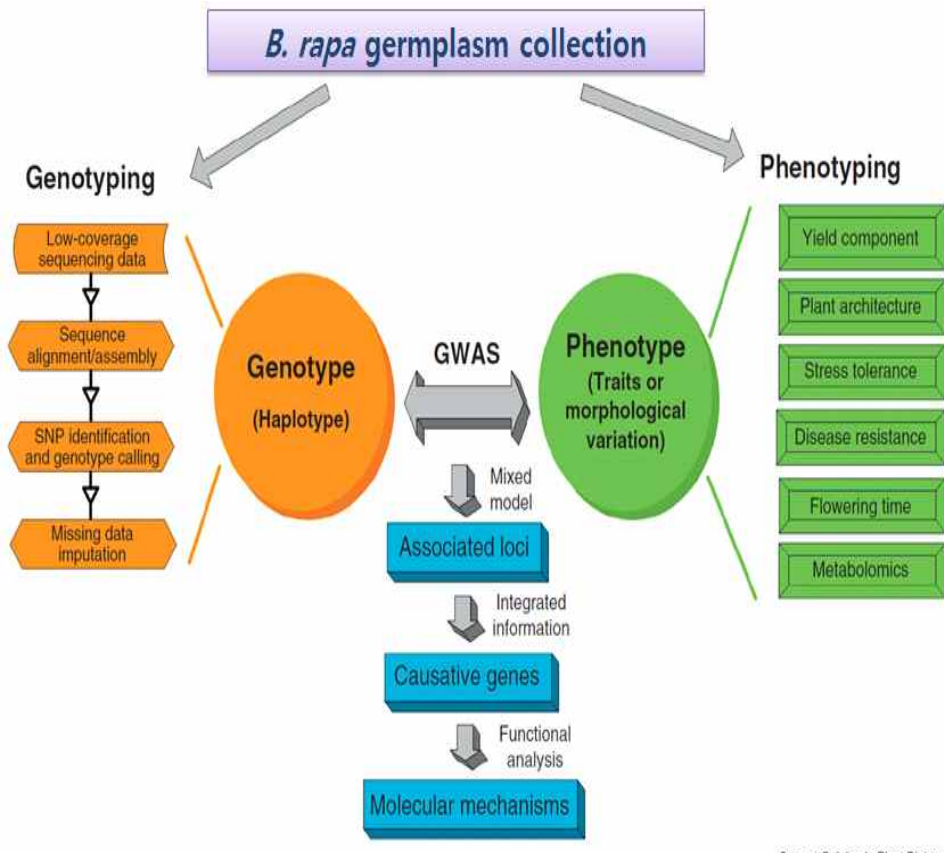


〈그림 37. 내병성 형질 연관 QTL 결과〉

- A08에 위치한 QTL 중 한 곳은 기존에 보고된 적이 없는 신규 QTL 이었다. 이 구간에서 병저항성 관련 유전자는 4개가 위치하고 있음을 확인하였고 추후 이들을 대상으로 마커 개발을 진행 할 예정이다.

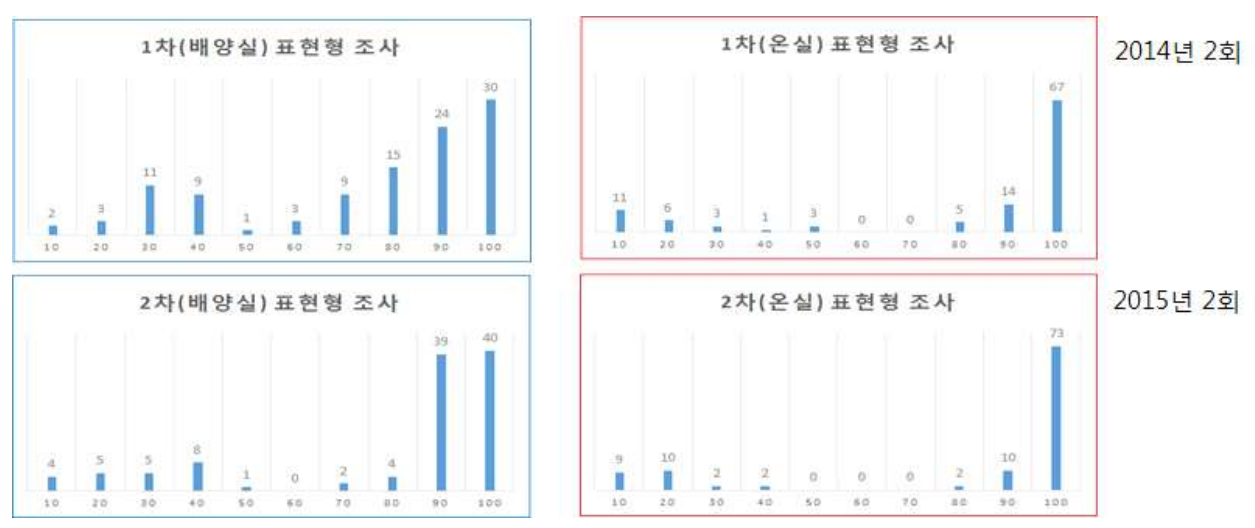
#### 라. 수집단내 내병성 형질과 유전체 정보간의 연관성 분석(genome wide association study)

- 182종 중에 132 계통의 유전체 재분석(re-sequencing)정보를 확보하고 있다. 이들 유전자형과 표현형(병리검정)과의 연관성을 조사하여 저항성 유전자좌 탐색을 하고자 하였다(그림 38).
- 1차년도에 확보한 (분양) 뿌리혹병 지역균주 중에서 비교적 저항성이 약한 균주를 사용하여 2차년도인 2014년 9월 22일에 182종의 유전자원(내흔계 132종, F1 50종)을 대상으로 병리검정을 수행했다. 1차 년도에 확립한 방법대로 106 spores/mL의 농도로 관주법으로 접종하였으며 계통당 10주씩 반복구로 실험했다. 내흔계 중 27종, F1 중 34종이 뿌리혹병 내병성 자원으로 알려져 있었고, 그 외의 자원에서는 뿌리혹병에 대한 정보가 없었으나 병리검정 결과 저항성과 이병성의 개체수는 예상 했던 것과 유사했다. 표현형 조사 자료의 정확성을 높이고자 3차년도에 반복실험을 수행하였다. 동일 장소에서 반복 수행한 표현형 조사 데이터를 기반(1차 2회, 2차 2회, 총 4회)으로 genome wide association 분석으로 병저항성 형질과 연관된 새로운 유전자좌 탐색 또는 보다 기 보고된 유전자좌에서 근접한 연관 마커 개발을 위한 자료로 활용 하고자 하였다(그림 39).



Current Opinion in Plant Biology

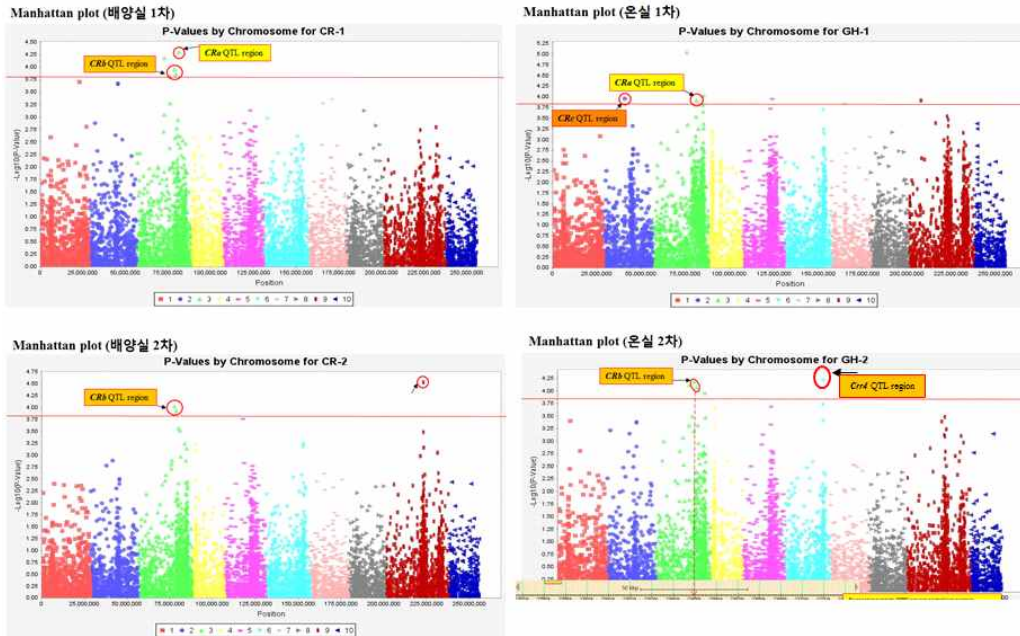
<그림 38. GWAS, genome wide association 방법으로 내병성 형질 유전자원 분석 모식도, Current Opinion in Plant Biology 발췌>



<그림 39. 182종 유전자원 대상으로 지역균주(강릉균주) 병리검정 결과>

○ 2년차에 수행한 표현형 조사에서 배양실에서 발병도와 온실에서 발병도에 차이가 있었다. 두 곳의 실험결과에 차이가 있어 3차년도에 다시 반복 실험을 수행하였다. 2차년도와 마찬가지로 배양실 조건 실험과 온실에서 조건 실험의 경향이 다르게 나타났다 (그림 40). 그러나 1차와 2차 실험 결과가 각각 동일 조건(배양실 또는 온실)에서는 반복적으로 나타남으로

인해 발병도가 환경 영향을 받고 있다는 것을 시사했다. 이는 또한 배양실에서는 식물재배를 위한 광량이 온실에 비해 부족한 실정이고 이러한 이유가 식물의 생육상태, 시기에 영향을 줄 수 있다. 결과적으로 식물체의 생체중이 작거나 식물의 생육이 느려짐으로 인해 활물기생하는 뿌리혹병의 병징을 육안을 관찰시 발병도가 낮아 보일 수 있다.



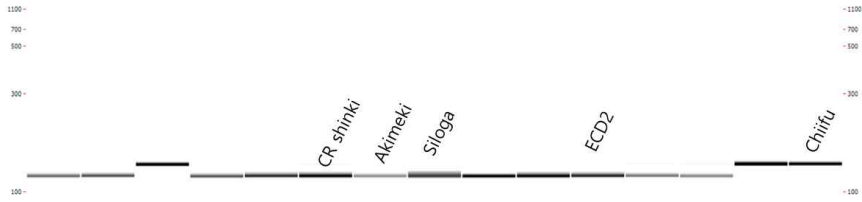
<그림 40. 뿌리혹병에 대하여 배양실, 유리온실에서 수행한 1차, 2차 접종 실험에서 발병도와 연관된 SNP를 나타내는 Manhattan plots>

- 유전체 재분석한 110계통에서 선발한 7180 SNP 정보를 이용하여 genome wide association (GWAS) 분석을 하였다. Manhattan plots에서 뿌리혹병에 대하여 배양실, 유리온실에서 수행한 1차, 2차 접종 실험에서 발병도와 연관된 SNP를 나타냈다. 기 보고된 QTL 영역과 비교하여 본 결과, *CRa*, *CRb*, *Crr4* 영역에서 SNP가 탐지되었다. 이 외에 아직 보고되지 않은 유전체 영역에서 SNP가 탐지 되었다. 추후 이들에 대한 haplotype을 조사해 보고, 표현형 결과와 비교해 볼 예정이다.

#### 마. 뿌리혹병 기타 유전자좌 연관 마커 개선

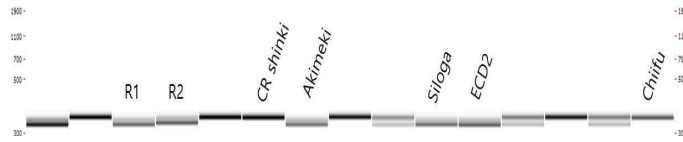
- *CRa* 유전자좌를 판별하는 마커로는 기보고된 유전자에서 개발된 마커가 있는데 이는 우성 마커이다. 더욱이 *CRa* 가 도입된 것으로 보고된 ECD2 이외의 다른 저항성 유래 식물체 및 저항성 계통에서 동일한 밴드가 나타난다. 따라서 저항성 여부를 판별 할 수 있으나, 특정 저항성 유전자좌의 유래를 검출 할 수 없으며 우성마커로 개발되어 PCR 실수로 인한 데이터 오류를 판단 할 수 없으며 동형접합체, 이형접합체를 구별 할 수 없는 단점이 있다. 이를 개선하기 위해 *CRa*의 InDel을 이용하여 공우성 마커를 개발 하였다(그림 41).





<그림 41. CRa 마커 개선, 공우성 마커 >

○ *Crr1a* 마커의 경우 기보고된 유전자 마커는 일부 이병성 마커에서 동일 밴드가 관찰되며 된다. 또한 우성 마커로써 PCR 실수로 인한 데이터 오류를 판단 할 수 없으며 동형접합체, 이형접합체를 구별 할 수 없는 단점이 있다. 이를 개선하기 위해 *Crr1a*의 InDel을 이용하여 공우성 마커를 개발 하였다 (그림 42, 표 24).



<그림 42. Crr1 개선 마커, 유전자좌 연관 마커 분석>

<표 24. 뿌리혹병 저항성 유전자좌 구별용 분자마커 목록>

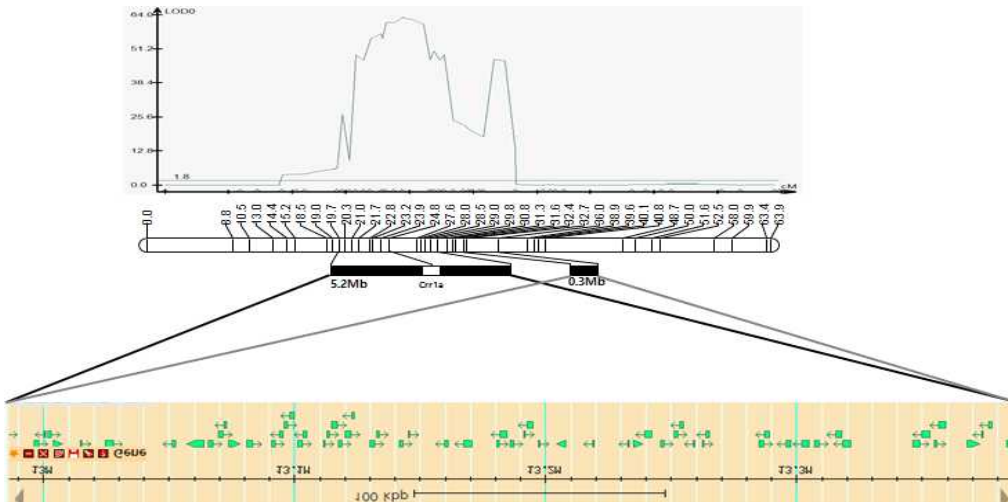
Loci	marker type	마커 분석 사용	개선 요구사항	마커개발진도	
CRa	STS	Dominant	가능	Codominant 마커로 개선	완료
CRb	SSR, STS	Codominant	가능	InDel, SNP 마커로 개선	완료
Crr1	STS	Dominant	가능	Codominant 마커로 개선	완료
Crr2	SSR	Codominant	가능	InDel, SNP 마커로 개선	
Crr3	STS	Codominant	가능	InDel, SNP 마커로 개선	
Crr4	SSR	Codominant	가능	InDel, SNP 마커로 개선	
CRc	STS	Dominant	가능	Codominant 마커로 개선	
CRk	STS	Dominant	가능	Codominant 마커로 개선	
CRaki	SSR	Codominant	가능	InDel, SNP 마커로 개선	

[ 4 년차]

1. 내병성 형질 유전자원 수집 및 병저항성 형질 모니터링

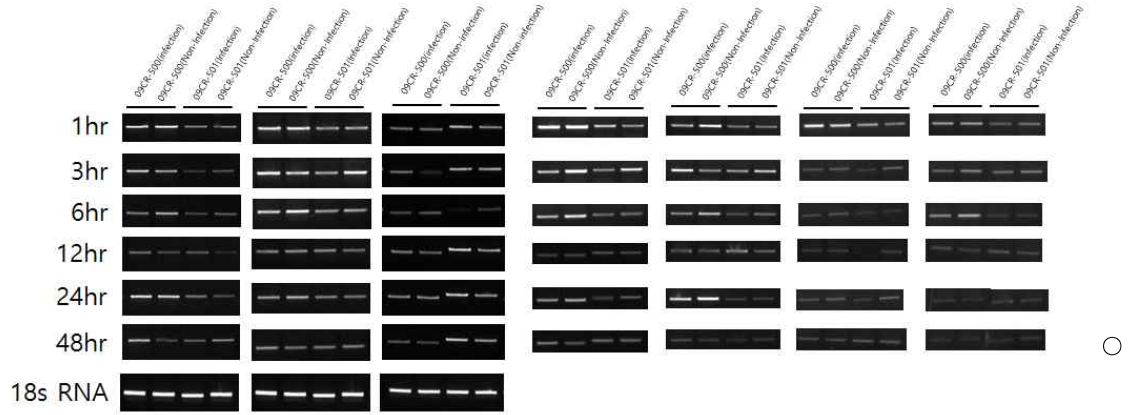
가. 뿌리혹병 내병성 분리집단을 이용하여 QTL 분석 및 마커 개발

○ 3년차에 배추 뿌리혹병 저항성 계통인 09CR500의 저항성 유전자좌를 QTL분석으로 찾았고, 이 QTL 영역에서 해당 형질에 관여하는 후보유전자를 찾고자 하였다. A08에 위치하는 QTL 영역은 2군데로 표준유전체를 참조해보면 물리적 거리는 5.2Mb와 0.3Mb에 해당했다. 각각의 QTL 부위에는 585개와 56개의 유전자가 있고 18개의 저항성 관련 유전자가 있었다. 그 중 TIR-NBS-LRR 관련 유전자는 5개였는데 그 중 *Crr1a* 유전자가 포함되어 있었다(그림 43). 저항성 QTL에 관여하는 후보유전자를 확인하고자 하였다. *Crr1a*에 관여하는 해당 유전자가 저항성에서 발현이 확인되는 반면 감수성에서는 발현되지 않는다고 보고되었는데, 본 연구에서 사용한 저항성 계통 ‘09CR-500’ 과 이병성 계통 ‘09CR-501’ 에서는 전혀 발현되지 않아 다른 양상을 나타냈으므로 저항성 형질에 *Crr1a*가 관여하지 않음을 시사하였다.



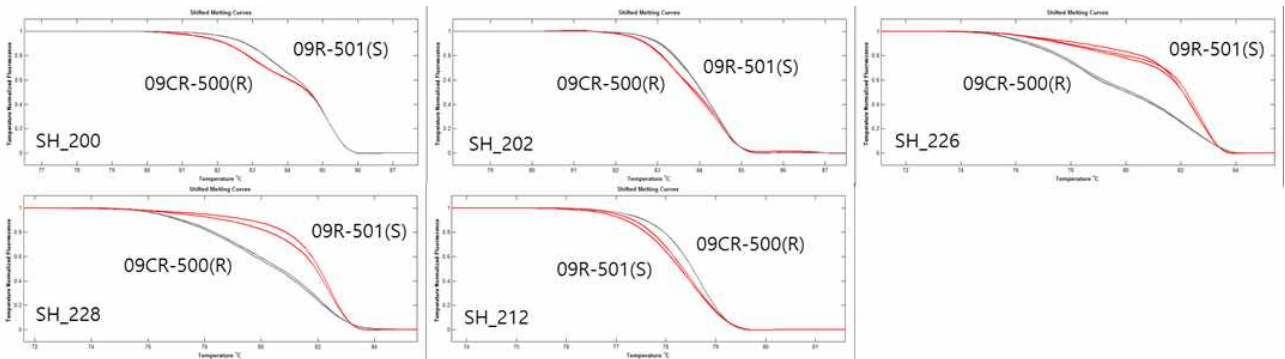
<그림 43. 내병성 형질 QTL 영역과 표준유전체 비교로 후보유전자 검색>

○ 이외에 7개의 유전자의 발현을 병원체를 접종 후 1hr, 3hr, 6hr, 12hr, 24hr, 48hr 시간으로 확인하였다. 이 중에서 일부 유전자가 저항성계통에서 발현이 증가하는 것을 확인하였으므로 이를 후보 유전자를 선발 하였다(특허출원 준비중으로 유전자 정보 및 염기서열 정보 미공개에 대한 양해구합니다, 그림 44).



<그림 44. QTL 영역에서 선발한 유전자의 발현양 비교>

○ 후보유전자를 대상으로 저항성계통과 이병성계통간의 구조적 차이를 비교하고 마커 개발 내용 추가할 것임(그림 45).



<그림 45. 계통간 후보유전자 비교 또는 후보유전자를 구조적차이를 이용한 저항성 형질 선발 마커개발>

나. 전사체 분석으로 내병성 마커 개발

- 농협종묘에서 선발한 뿌리혹병 저항성 계통 ‘M7’ 과 이병성 계통 ‘M8’ 을 분양받아 전사체 분석에 사용하였다. 저항성계통과 이병성계통에 유전자군의 발현량을 조사하고, 뿌리혹병 병원균접종을 한 후 발현되는 유전자군을 조사하여 병처리 전, 후로 저항성계통에서 이병성과 달리 특이적으로 발현되는 유전자군 선발 및 이병성 계통에서 특이적으로 발현되는 유전자군을 선발하여 저항성 형질을 진단할 수 있는 마커로 개발하고자 하였다. 전사체 염기서열분석은 illumina HiSeq 2000을 사용하여 데이터를 생산하였다.(표 25)

<표 25. Raw sequencing data>

File name	Sample description	Num. of reads	Avg. length	Total length (bp)
TN1510R0947--ATCACG_1.fq	M7_1_Ctrl	19,208,645	101	1,940,073,145
TN1510R0947--ATCACG_2.fq		19,208,645	101	1,940,073,145
TN1510R0948--CGATGT_1.fq	M7_1_Infect	20,711,873	101	2,091,899,173
TN1510R0948--CGATGT_2.fq		20,711,873	101	2,091,899,173
TN1510R0953--CAGATC_1.fq	M7_2_Ctrl	20,475,516	101	2,068,027,116
TN1510R0953--CAGATC_2.fq		20,475,516	101	2,068,027,116
TN1510R0952--GCCAAT_1.fq	M7_2_Infect	19,759,509	101	1,995,710,409
TN1510R0952--GCCAAT_2.fq		19,759,509	101	1,995,710,409
TN1510R0949--TTAGGC_1.fq	M8_1_Ctrl	21,072,105	101	2,128,282,605
TN1510R0949--TTAGGC_2.fq		21,072,105	101	2,128,282,605
TN1510R0950--TGACCA_1.fq	M8_1_Infect	25,539,946	101	2,579,534,546
TN1510R0950--TGACCA_2.fq		25,539,946	101	2,579,534,546
TN1510R0951--ACAGTG_1.fq	M8_2_Ctrl	19,618,907	101	1,981,509,607
TN1510R0951--ACAGTG_2.fq		19,618,907	101	1,981,509,607
TN1510R0954--ACTTGA_1.fq	M8_2_Infect	20,806,237	101	2,101,429,937
TN1510R0954--ACTTGA_2.fq		20,806,237	101	2,101,429,937
<b>Total</b>	<b>8ea</b>	<b>334,385,476</b>	<b>101</b>	<b>33,772,933,076</b>
TN1511R0454--ATCACG_1.fq	M7_3_Ctrl	16,000,143	101	1,616,014,443
TN1511R0454--ATCACG_2.fq		16,000,143	101	1,616,014,443
TN1511R0455--CGATGTAT_1.fq	M7_3_Infect	17,472,205	101	1,764,692,705
TN1511R0455--CGATGTAT_2.fq		17,472,205	101	1,764,692,705
TN1511R0456--TTAGGC_1.fq	M8_3_Ctrl	19,028,499	101	1,921,878,399
TN1511R0456--TTAGGC_2.fq		19,028,499	101	1,921,878,399
TN1511R0457--TGACCA_1.fq	M8_3_Infect	16,338,371	101	1,650,175,471
TN1511R0457--TGACCA_2.fq		16,338,371	101	1,650,175,471
<b>Total</b>	<b>4ea</b>	<b>137,678,436</b>	<b>101</b>	<b>13,905,522,036</b>

- 전처리과정(Cox et al, 2010; Zerbino and Birney, 2008)을 통과한 cleaned reads를 mapping 하여 유전자가 발현되는 정도를 나타내는 발현값(read count)을 계산하였다. Mapping은 Bowtie2 (v2.1.0) software (mismatch ≤2bp, penalty 방식으로 계산)를 사용하였으며, 발현값은 각 유전자에 mapping된 reads의 총수로 측정하였다(Schulz et al., 2012; Langmead and Salizberg, 2012, 표 26).

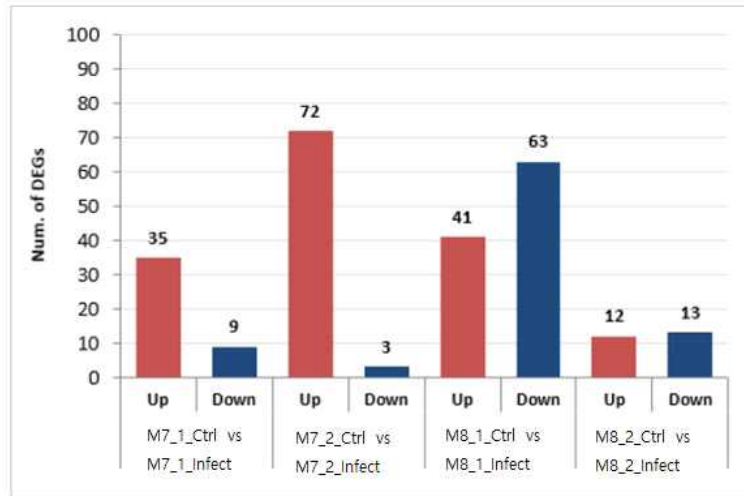
<표 26 . 조건1과 조건2에서 선발한 DEG의 수>

비교대상 (Treatment vs Control)	Regulation pattern	Num. of DEGs	Annotated DEGs
M7_1_Ctrl vs M7_1_Infect	Up	35	34
	Down	9	9
M7_2_Ctrl vs M7_2_Infect	Up	72	38
	Down	3	3
M8_1_Ctrl vs M8_1_Infect	Up	41	28
	Down	63	61
M8_2_Ctrl vs M8_2_Infect	Up	12	11
	Down	13	13

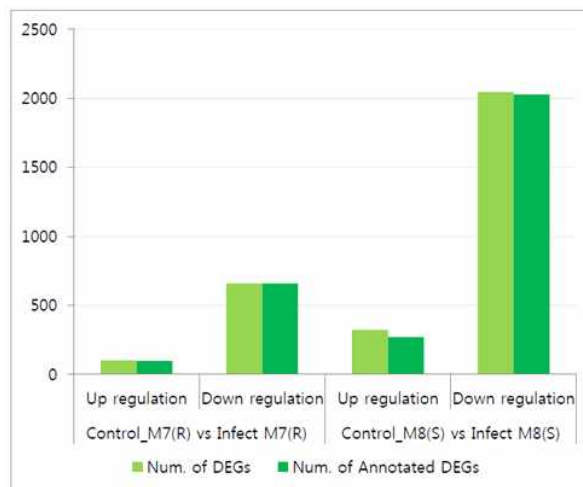
○ 샘플간 유의하게 발현되는 유전자(DEGs, Differentially Expressed Genes)선발은 각 유전자에 mapping된 발현값이 샘플간에 비교에서 2배이상 발현의 차이를 구분하는 2 fold change 방법과, adjust P-value(FDR)이 0.01 이하를 만족하는binomial test 방법을동시에 사용하였다 (Anders and Huber). 분석에서 앞의 기준을 만족하는 유전자 중에서 log2(Fold Change)의 값이 1보다 크면 up-regulation, -1보다 작으면 down-regulation되었다고 판정하였다. 시료는 시간차를 두고 3조건으로 준비하였다(이하 조건1, 조건2, 조건3). DEG 수는 조건1에서 148개, 조건2에서 100개, 조건3에서 3687개로 가장 많았다. M7에서 up regulation은 조건 3에서 102로 가장 많았으며 조건1에서 35로 가장 적었고, down regulation은 조건3에서 659로 가장 많았고 조건2에서 9로 가장 적었다. M8에서 upregulation은 조건3에서 323으로 가장 많았고 조건2에서 12로 가장 적었으며, down regulation도 조건3에서 2046으로 월등히 많았고, 조건2에서 13으로 가장 적었다(표 27, 그림 46, 그림 47).

<표 27 . 조건3에서 선발한 DEG의 수>

비교대상 (Control vs Treatment)	Regulation pattern	Num. of DEGs	Num. of Annotated DEGs
M7_3_Ctrl vs M7_3_Infect	Up regulation	102	97
	Down regulation	659	658
M8_3_Ctrl vs M8_3_Infect	Up regulation	323	271
	Down regulation	2,046	2,029

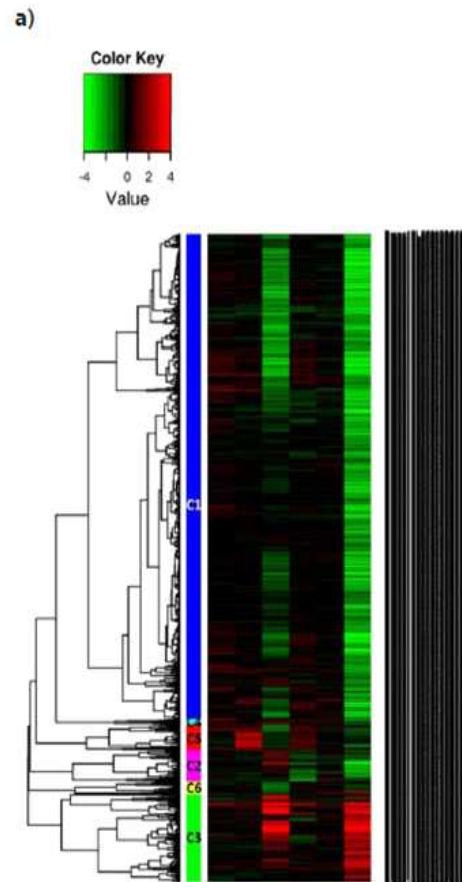


<그림 46. 조건1과 조건2의 DEG의 유의하게 발현하는 유전자 수>



<그림 47. 조건3의 DEG의 유의하게 발현하는 유전자 수>

○ 유의하게 발현된 유전자 정보를 이용하여 유전자의 발현패턴을 확인하는 clustering 분석을 수행하였다. Clustering 분석은 R의 **amap**(Lucas, 2014)과 **gplots**[Warnes et al, 2015] library를 이용하여 hierarchical clustering 분석을 진행하며, 유전자의 발현되는패턴이 유사한 정도를 계산하는 방법으로 pearson's correlation과 유전자의 grouping 방식으로 complete방법론을 사용하였다. 유의하게 발현하는 유전자후보군과 clustering 분석에서 각 cluster에 구분된 DEGs 유전자의 기능분석을 위하여 **gene ontology**(Ashburner et al, 2000)에서 제공하는 서열정보를 이용하여 분석을 수행하였다. Thresholds는 기능별 유전자의 총합인 counts  $\geq 1$  이상을 사용하였으며, GO depth는 3으로 지정하여 3가지functional category인 BP(Biological Process), CC(Cellular Component), MF(Molecular Function)로 구분하여 분석하였다. Clustering에서 차이가 나타나는 clustering2, clustering4, clustering6에 해당하는 유전자군을 선발하였고 gene ontology 및 KEGG 분석결과를 바탕으로 후보 유전자군을 선발하였다(그림 48).



<그림 48. Clustering set의 heatmap>

[ 1 년차]

1. MABC 시스템의 실증적 검정을 위해 우수 내병성 형질 집적(gene pyramiding)으로 계통 육성

○ 뿌리혹병 및 기타 내병성 형질 보유 자원간의 교배로 저항성 형질을 집적하고자 하였다. 각각의 계통들은 바이오브리딩, 농협종묘, 한국종묘에서 분양받은 것으로 뿌리혹병, 바이러스병, 연부병, 노균병에 저항성 특성이 있는 계통들로, 이들간의 교배조합을 이용한 유전집단 양성을 하고자 하였다(표 28, 그림 49). 집단양성의 목표는 1) 뿌리혹병 저항성에 관여하는 주동 QTL 유전자좌 보유 계통, 2)뿌리혹병 저항성 자원과 노균병 또는 연부병 또는 바이러스병 저항성계통의 교배하여 두 가지 이상 저항성 형질 유전자좌를 갖는 F<sub>1</sub>을 생성하고자 하였다. 1)을 위해서 뿌리혹병 저항성 유전자좌 특성을 알고 있는 (CRb 유전자좌 보유하고 있는 CR shinki와 현재 QTL 분석으로 *Crr1*을 보유하고 있는 것으로 추정되는 M7계통)을 사용하여 기타 계통간의 교배조합을 작성하여 두 개 이상의 (현재까지 자원의 특성이 마커로 분류된 기준으로) 뿌리혹병 저항성 유전자좌를 집적하기 위해 교배조합을 작성하였으며(표 29), 2)를 위해서 뿌리혹병 저항성 유전자좌 특성이 알고 있는 CR shinki와 M7 계통에 기타 유전자좌(노균병, 바이러스병, 연부병) 보유 계통을 이용하여 교배조합을 작성하였다. F<sub>1</sub> 확보를 위해 자방친과 화분친을 교번하여 총 26 조합을 작성해 교배가 진행 중이다.

<표 28. 교배조합 작성용 저항성 계통 목록>

계통명	형질	분양	교배조합빈도	
			자방친	화분친
10M1-1	뿌리혹병	농협종묘	1	1
M1-1	뿌리혹병	농협종묘	1	1
siloga	뿌리혹병	심양농대	1	1
Gelria	뿌리혹병	심양농대	1	1
11수-3	뿌리혹병	바이오브리딩	3	3
11수-7	뿌리혹병 + TuMV	바이오브리딩	3	3
CR shinki	뿌리혹병	충남대	6	6
M7(CR702)	뿌리혹병	농협종묘	7	7
CHKC-003	노균병	한국종묘	2	2
11수-6	연부병	바이오브리딩	2	2



			
10M1-1	M1-1	siloga	Gelria
			
11수-3	11수-7	CR shinki	
			
M7(CR702)	CHKC-003	11수-6	

<그림 49. 교배조합 작성용 저항성 계통의 온실 재배 전경>

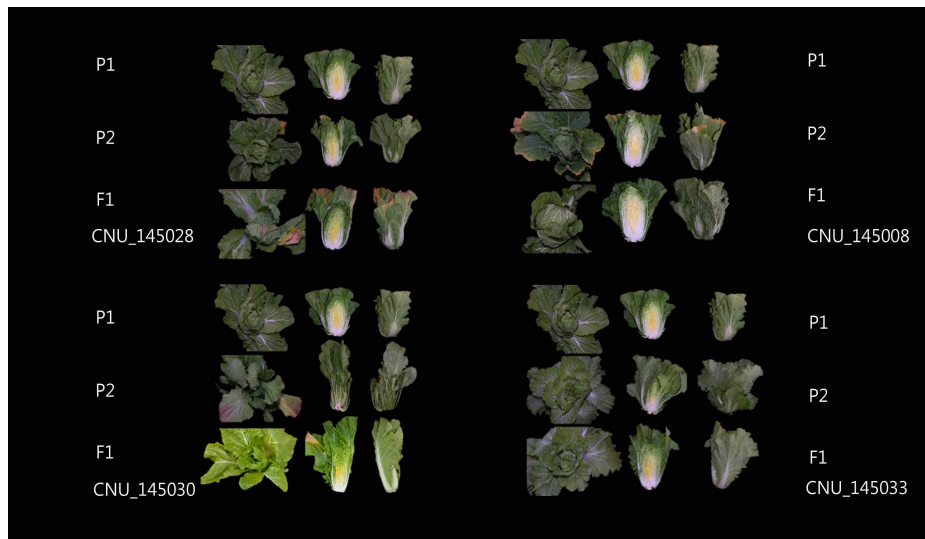
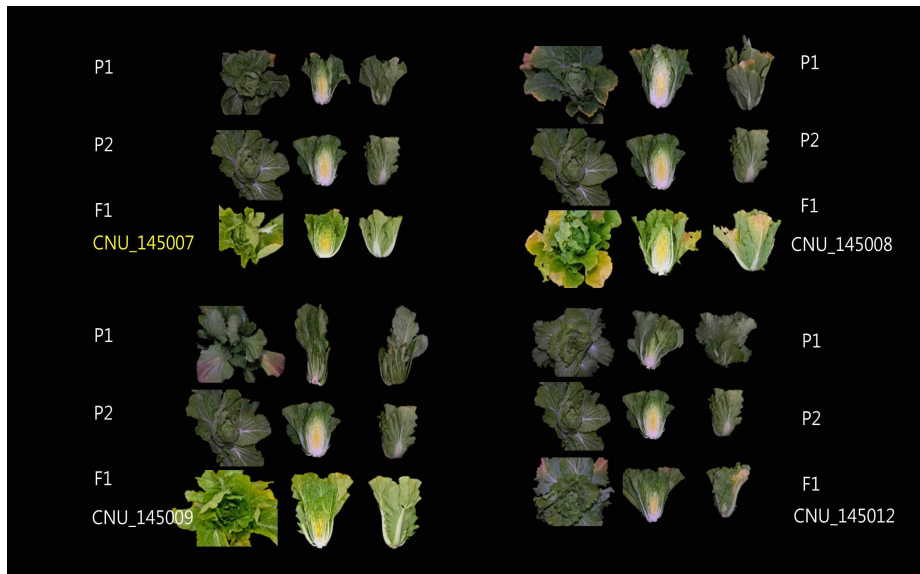
〈표 29. 저항성 유전자좌 집적위한 교배조합〉

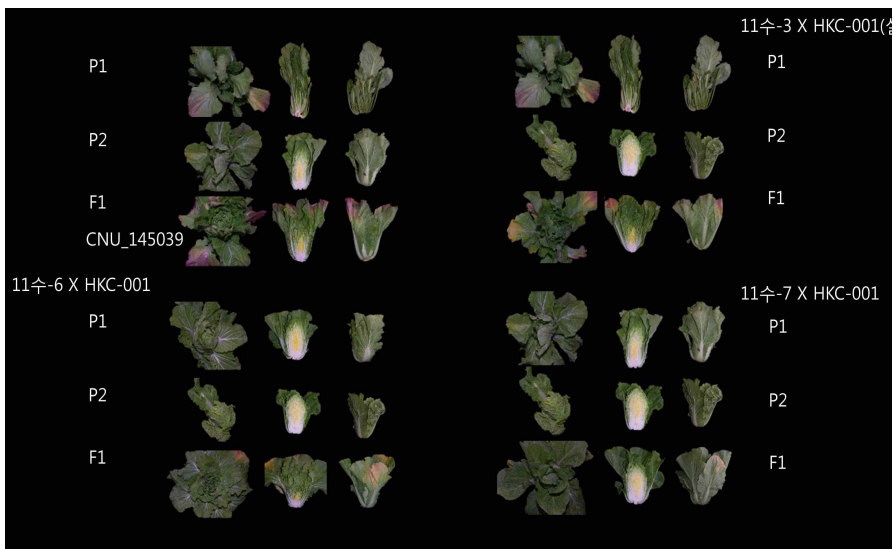
교배 조합	모계	부계	교배형질/저항성유전자좌	교배 조합	모계	부계
1	CN_2	CN_5	<i>Crr1+CRb</i>	14	CN_5	CN_2
2	CN_2	CN_1	<i>Crr1+?</i> (강릉 강)	15	CN_1	CN_2
3	CN_2	CN_3	<i>Crr1+?</i> (방립 강)	16	CN_3	CN_2
4	CN_2	CN_4	<i>Crr1+ ? + TuMV</i>	17	CN_4	CN_2
5	CN_2	CN_10	<i>Crr1+CRb</i>	18	CN_10	CN_2
6	CN_3	CN_4	<i>?(방립 강)+?</i>	19	CN_4	CN_3
7	CN_5	CN_3	<i>CRb+?(방립 강)+ TuMV</i>	20	CN_3	CN_5
8	CN_5	CN_4	<i>CRb+?</i>	21	CN_4	CN_5
9	CN_5	CN_9	<i>Crr1+Crr2+CRb</i>	22	CN_9	CN_5
10	CN_2	CN_7	<i>Crr1+노균병</i>	23	CN_7	CN_2
11	CN_2	CN_8	<i>Crr1+연부병</i>	24	CN_8	CN_2
12	CN_5	CN_7	<i>CRb+노균병</i>	25	CN_7	CN_5
13	CN_5	CN_8	<i>CRb+연부병</i>	26	CN_8	CN_5

[ 2 년차]

2. MABC 시스템의 실증적 검정을 위한 집단 양성

○ 1년차에 뿌리혹병 및 기타 내병성 형질 보유 자원간의 교배로 저항성 형질을 집적한 F1을 만들고자 교배를 했었다. 뿌리혹병 저항성에 관여하는 주동 QTL 유전자좌 보유 계통간 교배조합 작성 또는 뿌리혹병, 노균병, 바이러스, 연부병 중 각기 다른 저항성 계통을 교배함으로써 두 개 이상의 복합내병성을 집적하고자 하였다. F1을 생성하기 위한 모본, 부분과 F1의 형태적 표현형은 그림과 같다. 각 교배조합 별로 집적하고자 하는 형질과 교배조합 별 수확한 종자량은 다음과 같다. 이 중에서 붉은색으로 표기한 14 조합 F1을 이용하여 BC1F1 이 진행 중이다(그림 50).





<그림 50. 집단양성위한 모본, 부분, F1의 가을재배 표현형>

- 추후 확보한 BC1F1 중에서 1조합을 선정하여 기 확보한 마커를 이용하여 선발하고자 한다. 이때 선발되는 정도를 선발 예상 비율과 비교하고자 한다. 개체 파종부터, 각각의 마커로 선발 비율을 기록하고 저항성 마커로 선발한 개체에서 공여체 식물과 가장 유사한 개체를 선발할 예정이다. 이중 세대진전을 통해 BC1F2 로 진행할 개체를 최종 선발하고자 한다 (표 30).

<표 30. 집단 작성용 교배조합>

No.	모(계승)		부	교배수	종자 수확	종자 량수	F1 종자 관리번호	목적 형질
1	BN 302	X	BN 305	45	6.9	216립	CNU_145002	TuMV+CR_? 강
2	BN 302	X	BN 306	48	6.2	330립	CNU_145003	내한성 QTL
3	BN 303	X	BN 308	48	6.12	198립	CNU_145005	연부병 QTL
4	BN 316	X	BN 317	47	6.10	3ml	CNU_145007	CR_CRb + Crr1 ?
5	BN 310	X	BN 317	52	6.10	672립	CNU_145008	CR_강릉균주(10M1)+Crr1?
6	BN 314	X	BN 317	48	6.10	13립	CNU_145009	CR_방립균주 강+Crr1?
7	BN 315	X	BN 317	172	6.23	8립	CNU_145010	TuMV+CR 강 + Crr1?
8	BN 313	X	BN 317	49	6.10	3.3ml	CNU_145012	연부병+Crr1?
9	BN 313	X	BN 316	44	6.9	4ml	CNU_145014	연부병+CRb
10	BN 314	X	BN 316	54	6.12	18립	CNU_145015	CR_방립 + CRb
11	BN 315	X	BN 316	81	6.18	89립	CNU_145016	TuMV + CR?강 + CRb
12	BN 311	X	BN 316	81	6.18	196립	CNU_145017	siloga + CRb
13	BN 315	X	BN 314	136	6.18	47립	CNU_145018	TuMV+CR?강 + 방립균주 강
14	BN 305	X	BN 302	5	6.27	3립	CNU_145023	TuMV+CR_? 강
15	BN 306	X	BN 302	41	6.10	504립	CNU_145024	내한성 QTL
16	BN 308	X	BN 303	56	6.9	4ml	CNU_145026	연부병 QTL
17	BN 317	X	BN 316	25	6.10	70립	CNU_145028	CR_CRb + Crr1 ?
18	BN 317	X	BN 310	50	6.10	334립	CNU_145029	CR_강릉균주(10M1)+Crr1?
19	BN 317	X	BN 314	31	6.10	94립	CNU_145030	CR_방립균주 강+Crr1?
20	BN 317	X	BN 315	4	6.10	18립	CNU_145031	TuMV+CR 강 + Crr1?
21	BN 317	X	BN 313	43	6.10	406립	CNU_145033	연부병+Crr1?
22	BN 316	X	BN 313	37	6.10	266립	CNU_145035	연부병+CRb
23	BN 316	X	BN 314	39	6.9	387립	CNU_145036	CR_방립 + CRb
24	BN 316	X	BN 315	47	6.10	3ml	CNU_145037	TuMV + CR?강 + CRb
25	BN 316	X	BN 311	52	6.10	5ml	CNU_145038	siloga + CRb
26	BN 314	X	BN 315	43	6.10	26립	CNU_145039	TuMV+CR?강 + 방립균주 강

### 3. 1차년도 생산한 F1 및 중국에서 도입한 뿌리혹병 강한 자원 소포자 배양

- 유전적으로 안정된 저항성 계통 확보를 위해 1차 년도에 수집한 일본 뿌리혹병 판별품종 3종을 이용한 소포자 배양을 진행하였으며 방법은 1차년도 조건에 준하였다. 저항성 품종 3종에서 추대 후 개화시기에 Akimeki 는 꽃가루가 생성되지 않아 소포자 배양을 진행 할 수 없었다. 1차 년도에 일부 순화처리가 진행되었던 CR Ryutoku로 배양체에서 총 10개의 성숙 식물체를 확보하였고 이들을 자가수분하여 종자를 수확하였다(표23). SCR Hiroki로 진행한 소포자 배양에서 순화 및 저온처리 후 18개의 소포자배양 성숙 식물체를 확보 하였고 이중에서 5개체의 식물체에서 종자를 수확하였고 나머지는 자가 수분 후 꼬투리 상태로 종자 등숙 및 수확 후 건조 중에 있다. 추후 이들 소포자 배양체에서 수확한 종자를 이용하여 뿌리혹병 접종 실험 및 마커를 이용한 분석을 수행하고자 한다. 앞서 작년 12월에 파종

하여 현재 저온처리 중에 있고 봄 재배 기간에 종자를 증식하고자 진행 중이다(표 31).

<표 31. 일본 뿌리혹병 내병성 형질 관별용 유전자원 이용 소포자 배양>

관리번호	소재정보	소포자 배양체 번호	종자(립)
CNU_11373	CR Ryutoku (CRb hetero), F1	CNU_11373-DH1	90
CNU_11373	CR Ryutoku (CRb hetero), F1	CNU_11373-DH2	28
CNU_11373	CR Ryutoku (CRb hetero), F1	CNU_11373-DH3	70
CNU_11373	CR Ryutoku (CRb hetero), F1	CNU_11373-DH4	18
CNU_11373	CR Ryutoku (CRb hetero), F1	CNU_11373-DH5	23
CNU_11373	CR Ryutoku (CRb hetero), F1	CNU_11373-DH6	157
CNU_11373	CR Ryutoku (CRb hetero), F1	CNU_11373-DH7	615
CNU_11373	CR Ryutoku (CRb hetero), F1	CNU_11373-DH8	206
CNU_11373	CR Ryutoku (CRb hetero), F1	CNU_11373-DH9	51
CNU_11373	CR Ryutoku (CRb hetero), F1	CNU_11373-DH10	150
CNU_11146	소구형 배추 소포자 배양 계통, F1	CNU_11146-DH1	273
CNU_11146	소구형 배추 소포자 배양 계통, F1	CNU_11146-DH2	311
CNU_11146	소구형 배추 소포자 배양 계통, F1	CNU_11146-DH3	617
CNU_11375	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH1	32
CNU_11375	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH2	3
CNU_11375	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH3	종자 교배 후 등숙 중
CNU_11375	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH4	종자 교배 후 등숙 중
CNU_11375	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH5	종자 교배 후 등숙 중
CNU_11375	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH6	종자 교배 후 등숙 중
CNU_11375	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH7	종자 교배 후 등숙 중
CNU_11375	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH8	종자 교배 후 등숙 중
CNU_11375	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH9	종자 교배 후 등숙 중
CNU_11375	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH10	종자 교배 후 등숙 중
CNU_11375	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH11	종자 교배 후 등숙 중
CNU_11375	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH12	종자교배후등숙중
CNU_11375	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH13	종자교배후등숙중
CNU_11375	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH14	종자교배후등숙중
CNU_11375	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH15	종자교배후등숙중
CNU_11375	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH16	종자교배후등숙중
CNU_11375	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH17	종자교배후등숙중
CNU_11375	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH18	종자교배후등숙중

○ 위에서 소포자 배양체로 확보한 계통 중에서 6종을 한국생명공학연구원에 유전자원으로 기탁하였다. 3종은 기탁이 완료 되었고, 3종은 진행 중이다(그림 51).



<그림 51. 유전자원 기탁증>

- 1차년도에 진행하던 것 이외에, 두 가지 목적으로 2차년도에 추가 소포자 배양을 실시하였다. 1) 1차년도에 저항성 계통간에 교배로 생성한 F1 자원을 이용하여 소포자 배양을 했을 경우 두 개의 유전자좌를 집적한 계통을 단기간에 확보하고자 함이고, 2) 중국에서 뿌리혹병에 매우 강하다고 알려져 있는 F1 품종을 소포자 배양함으로써 저항성 계통의 단기간 확보하고자 함에 있다(표 31).

<표 31. 유전자원 소포자 배양>

종류	관리번호	자원	소재 확보	특성	목적
1	CNU_145007	F1	교배	뿌리혹병 저항성	CR 집적(CRb/Crr1)
2	CNU_145038	F1	교배	뿌리혹병 저항성	CR 집적(CRb/Siloga)
3	CNU_145017	F1	교배	뿌리혹병 저항성	CR 집적(Siloga/CRb)
4	CNU_145014	F1	교배	뿌리혹병, 연부병 저항성	연부병,CRb (복합내병성)
5	CNU_145036	F1	교배	뿌리혹병 저항성	CR 집적(CRb/방립)
6	(주)코레콘 636	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성	강한 뿌리혹병 저항성 계통 육성
7	(주)코레콘 637	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성	강한 뿌리혹병 저항성 계통 육성
8	(주)코레콘 638	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성	강한 뿌리혹병 저항성 계통 육성
9	(주)코레콘 639	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성	강한 뿌리혹병 저항성 계통 육성

- 1차년도에 저항성 계통간에 교배로 생성한 F1 자원 중 일부(4종)를 이용하여 소포자 배양을 진행 중이다. 뿌리혹병 저항성 유전인자를 교배를 통해 집적하여, 두 개 이상의 저항성 인자가 들어 있는 F1을 소포자 배양의 재료로 사용함으로써 단기간에 계통화 하고자 하였다. 뿌리혹병 저항성 유전자좌 집적 이외에 뿌리혹병 저항성 계통과 연부병 저항성 계통을 교배하여 생성한 F1을 소포자 배양의 재료로 사용함으로써 두 가지 병에 대하여 복합내병성 계통을 단기간 확보를 목표로 현재 소포자 배양이 진행 중이다(그림 51).



<그림 51. 소포자배양용 F1 및 모본, 부분의 가을 재배>

- 중국에서 뿌리혹병에 매우 강하다고 알려져 있는 F1 품종을 소포자 배양함으로써 저항성 계통의 단기간 확보하고자 함에 있다. F1 품종인 덕고 시리즈 4종 (덕고CR5, 덕고CR95, 덕고CR117, 덕고CR1016)은 중국 포장에서 재배시에 매우 강한 병저항성 표현형을 나타내고 있으나, 어떤 저항성 유전자좌를 가지고 있는가에 대하여 기 보고된 바가 없었다. 따라서 보유하고 있는 저항성 유전자형을 분류해 보고자, 현재 기 보고된 저항성 연관 유전자좌 9개 중에 5개 유전자좌에(*CRb*, *CRaki*, *Crr1*, *Crr3*, *CRa*) 해당하는 연관된 마커를 사용하여 분자마커 검정을 수행한 결과 어떠한 저항성 밴드도 증폭되지 않았다. 이는 이들 F1 품종이 나타내는 내병성 표현형은, 이들 5개 유전자좌 이외에 4개의 저항성 연관 유전자좌 (*Crr2*, *Crr4*, *CRc*, *CRk*) 중에서 한 개 이상의 저항성 유전자좌를 가지고 있는 복합저항성이거나 지금까지 보고되지 않은 새로운 저항성 유전자좌를 가지고 있을 가능성이 있다고 생각할 수 있다. 라벨 636은 덕고 CR5, 라벨 637은 덕고 CR95, 라벨 638은 덕고 CR 117, 라벨 639는 덕고 CR1016 F1 품종이다. 코레콘(주)에서 분양받은 F1은 모두 4종(반복 식물체 2점씩, 총 8개)이며, 춘화처리가 완료되었고 3종(6개체)에서 추대가 진행 중이다(그림 52).



<그림 52. 소포자 배양용 식물체 재배>



[ 3 년차]

1. 저항성 형질 유전자원의 소포자 배양

- 2차 년도에 일부 순화처리 및 교배가 진행되었던 SCR Hiroki 배양체에서 9개 식물체를 자가수분하여 종자를 수확하였다(표 32).

<표 32. 뿌리혹병 저항성 유전자좌 구별용 소포자 부양. 분자마커 목록>

관리번호	소재정보	소포자 배양체 번호
1	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH1
2	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH2
3	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH3
4	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH4
5	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH5
6	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH6
7	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH7
8	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH8
9	SCR Hiroki (Unknown CR), F1	CNU_11375-DH9
10	덕고CR 5, F1	636-1
11	덕고CR 5, F1	636-12
12	덕고CR 5, F1	636-2
13	덕고CR 5, F1	636-3
14	덕고CR 5, F1	636-5
15	덕고CR 5, F1	636-7
16	덕고CR 117, F1	638-1
17	덕고CR 117, F1	638-15
18	덕고CR 117, F1	638-2
19	덕고CR 117, F1	638-7
20	덕고CR 1016, F1	639-1
21	덕고CR 1016, F1	639-2
22	덕고CR 1016, F1	639-8

- 2차년도에 두 가지 목적으로 추가 소포자 배양을 실시하였고 이를 연계하여 진행하였다. 1) 1차년도에 저항성 계통간에 교배로 생성한 F1 자원을 이용하여 소포자 배양을 했을 경우 두 개의 유전자좌를 집적한 계통을 단기간에 확보하고자 함이고, 2) 중국에서 뿌리혹병에 매우 강하다고 알려져 있는 F1 품종을 소포자 배양함으로써 저항성 계통의 단기간 확보하고자 함에 있다(표 33).

〈표 33. 소포자 배양용 식물체 재료 및 진도〉

종류	관리번호	자원	소재 확보	목적	소포자 수	식물체 수
1	CNU_145007	F1	교배	CR 집적(CRb/Crr1)	0	0
2	CNU_145038	F1	교배	CR 집적(CRb/Siloga)	8	0
3	CNU_145017	F1	교배	CR 집적(Siloga/CRb)	4	0
4	CNU_145014	F1	교배	연부병, CRb (복합내병성)	98	0
5	CNU_145036	F1	교배	CR 집적(CRb/방립)	242	5
6	(주)코레콘 636	F1	중국 도입	강한 뿌리혹병 저항성 계통 육성	47	6
7	(주)코레콘 637	F1	중국 도입	강한 뿌리혹병 저항성 계통 육성	22	2
8	(주)코레콘 638	F1	중국 도입	강한 뿌리혹병 저항성 계통 육성	36	7
9	(주)코레콘 639	F1	중국 도입	강한 뿌리혹병 저항성 계통 육성	68	3

○ 뿌리혹병 저항성 유전인자를 교배를 통해 집적하여, 두 개 이상의 저항성 인자가 들어 있는 F1을 소포자 배양의 재료로 사용함으로써 두 가지 병에 대하여 복합내병성 계통을 단기간 확보를 목표로 했으나 ‘CNU\_145036’에서만 소포자를 확보할 수 있었고 현재 5개체의 식물체를 생산하였다.

○ 중국에서 뿌리혹병에 매우 강하다고 알려져 있는 F1 품종을 소포자 배양함으로써 저항성 계통의 단기간 확보하고자 함에 있다. F1 품종인 덕고 시리즈 4종 (덕고CR5, 덕고CR95, 덕고CR117, 덕고CR1016)은 중국 포장에서 재배시에 매우 강한 병저항성 표현형을 나타내고 있으나, 어떤 저항성 유전자좌를 가지고 있는가에 대하여 기 보고된 바가 없었고, 본 과제에서 기 확보하고 있는 저항성 마커로 유전자형을 분류해 보고자 하였으나 어떠한 저항성 밴드도 증폭되지 않았다. 이는 이들 F1 품종이 나타내는 내병성 표현형은, 지금까지 보고되지 않은 새로운 저항성 유전자좌를 가지고 있을 가능성이 있다고 생각할 수 있다. 소포자 배양체에서 수확한 종자의 양이 충분한 계통에 한해서 (SCR hiroki 유래 9계통, 덕고 시리즈의 6계통) 화학연구소에 병리검정을 의뢰 하였다. 종자량이 50립 미만의 계통들에 준하여 병리검정을 위한 종자 확보를 위해 봄 재배 기간에 종자를 증식하고자 진행 중이다.

[ 4 년차]

1. 저항성 형질 유전자원의 소포자 배양

○ 3차년도 연계로 수집한 뿌리혹병 저항성 자원으로 DH계통 육성을 하였다. 총 29계통에서 종자를 수확하였다. 이들의 병리검정으로 내병성 자원을 선발하였다(표 34, 그림 53).

〈표 34. 소포자 배양으로 종자를 확보한 계통〉

종류	계통번호	자원	소재 확보	목적
1	CNU_160009	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성

2	CNU_160010	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
3	CNU_160022	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
4	CNU_160012	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
5	CNU_160013	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
6	CNU_160023	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
7	CNU_160024	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
8	CNU_160014	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
9	CNU_160025	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
10	CNU_160026	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
11	CNU_160027	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
12	CNU_160028	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
13	CNU_160030	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
14	CNU_160031	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
15	CNU_160032	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
16	CNU_160034	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
17	CNU_160019	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
18	CNU_160020	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
19	CNU_160035	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
20	CNU_160036	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
21	CNU_160037	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
22	CNU_160021	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
23	CNU_160033	F1	중국 도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
24	CNU_140064	F1	일본도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
25	CNU_140065	F1	일본도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
26	CNU_140066	F1	일본도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
27	CNU_150001	F1	일본도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
28	CNU_150002	F1	일본도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성
29	CNU_150005	F1	일본도입	뿌리혹병 저항성 계통 육성



<그림 53. 병리검정을 통한 내병성 자원 선발>

[위탁과제]

1. 연구개발 수행 내용

가. 선행연구에서 알려진 배추 뿌리혹병 내병성 계통 중 붕소결핍증이 잘 나타나는 계통과 잘 나타나지 않는 계통 8개를 대비 종 4개와 함께 공시하였다. 대비 종 중에 F1조합이 있는데 그것은 8개의 시험 계통 중 붕소결핍증이 잘 나타나는 계통과 대비 계통 중 결핍증이 잘 나타나지 않는 계통 간 조합으로 양친과 일대잡종의 발현 양상을 알고자 한 것이다. 각 계통 별 생육 말기의 붕소결핍증 발생을 조사하고 충남대학교 분석실에 의뢰하여 분석한 붕소 및 석회 함량과의 관계를 조사하였다.

나. 붕소와 석회는 서로 길항작용이 있으며 붕소 결핍증은 겉잎에 나타나고 석회결핍증은 속잎에 나타남으로 속잎과 겉잎으로 나누어 두 성분을 분석하고 외형적으로 나타나는 붕소 결핍증 상과의 연관관계를 조사하였다.

다. 위의 12계통을 봄과 가을에 2반복으로 공시하였다.

가. 포장에 재배한 계통을 조사한 결과(표 1) 역시 뿌리혹병에 강한 계통들은 대체로 붕소결핍증이 잘 나타나는 것으로 생각되었다. 16붕소-990번의 CR태M-57번 계통은 공시 계통 중 증상이 가장 심하게 발생하여 발병지수가 5.0이었다(사진 1). 그러나 뿌리혹병에 강한 계통 중 붕소결핍증이 거의 나타나지 않는 계통도 발견되었으며 특히 CR경M 유래의 두 계통(16붕소-989와 16붕소-995)은 거의 증상을 나타내지 않았다(사진 2).

나. 봄과 가을 재배의 발생은 계통 간에 비슷한 경향을 보였다. 그러나 가을은 봄보다 결핍증이 적게 나타나는 경향을 보였고 붕소결핍증이 나타나는 것과 안 나타나는 것이 분명하게 구분되는 경향을 보였다.

다. 대비 계통 중 한 계통은 결핍증상이 많이 나타났으며 다른 두 계통은 거의 나타나지 않았

다. 한 조합은 양친의 한 계통이 심하게 결핍증을 나타내고 다른 친은 거의 결핍증을 나타내지 않았는데 이 조합도 결핍증이 약간 보일 정도였다. 즉 붕소결핍증 내성이 우성 적으로 나타는 것 같았다(사진 3).

표 1. 붕소결핍증 발현 시험 용 기초 조사

과종번호	모본 번호	계통번호	주중 (kg)	엽장 (cm)	엽맥 증상(0-5(심) <sup>Y</sup>		비고
					봄	가을	
16붕소-985	14모582	CR291M-7	0.6	38	3.0	3.0	
986	14모 562	CR291M-40	0.6	41	1.0	3.0	
987	12모-692	CR291M-71	0.3	37	1.0	-	가을 거의 전멸(가을)
988	12모-693	CR291M-96	1.0	38	4.0	2.5	
989	12모-695	CR경M-7	0.8	48	0.0	0.0	직립
990	14모 591	CR태M-57	0.6	50	5.0	4.0	농록
991	11MC81M-18	불경M-18	1.0	42	4.0	3.0	대비
992	12모-702	CR불M-31	1.2	47	4.0	2.5	
993	14모 534 1	C218M-13	1.2	39	0.5	0.0	대비. 결구 중
994	14모 556	휘M-2	1.2	38	0.0	0.0	대비. 결구 중
995	14모 560	CR경M-90	0.7	42	0.0	0.0	
996	14모 564X 14모 556	CR291M-96 X휘M-2	1.5	43	0.5	0.0	대비F1(16붕소-988x994). 내서성 강

(봄: 160420과중, 160620 조사, 가을 :160807 과중, 161106 조사)

<sup>Y</sup>엽맥 증상(0-5(심): 엽맥이 가로 또는 세로로 트면서 갈색의 딱지가 앉는 현상(붕소 결핍 증)

※ 붉은 색 글자는 대비중임(이하 동)



사진 1. 배추 붕소결핍증상이 심한 계통(증상 지수=5.0)



사진 2. 배추 붕소결핍증상이 없는 계통(증상 지수=0.0)



사진 3. 배추 붕소결핍증이 심한 계통(지수=4.0)과 없는 계통(지수=0.0)간 F1조합의 증상(지수=0.5)

- 성분분석 결과(표 2의 1, 2, 3, 4) 붕소와 석회의 두 성분 간, 그리고 각 성분과 붕소결핍증 증상 간에는 상관관계를 인정하기 어려웠다. 그러나 속잎의 경우 두 성분의 함량이 비교적 적은 쪽이 결핍증상을 덜 나타내는 것으로 나타나고 있다. 앞으로 보다 면밀한 연구가 필요하다고 생각되는 점이다.
- 우선은 배추의 붕소 결핍증과 관련하여 성분분석으로 판단하기 어렵고 계통을 공시하여 외형적으로 나타나는 증상으로 판단하여야 할 것으로 생각되었다. 가을보다 봄에 결핍증이 심하게 나타남으로 봄재배로 판단하는 것이 옳다고 생각된다.
- 한편 자세히 보면 16봉소-989(CR경M-7)의 경우 붕소결핍증이 전혀 나타나지 않았는데 붕소와 석회의 속잎과 겉잎 모두 가장 적은 것으로 나타났다(다만 붕소의 겉잎 함량이 53.5로 53.2(CR291M-71)와 유사함).
- 그리고 역시 붕소결핍증이 전혀 나타나지 않았던 16봉소-995(CR경M-90)는 내엽의 붕소함량

이 28.8ppm으로 최저계통의 7.7ppm보다 3.7배 정도 높고 외엽의 함량은 101.7ppm으로 가장 높았으며 최저 계통의 53.2ppm보다 약 두 배정도였다. 즉 붕소함량이 비교적 높은 계통에 속하는 것 같다(표 2-1, 2-2).

- 이처럼 두 계통이 모두 붕소결핍증상은 보이지 않았는데 잎의 붕소함량은 서로 크게 다르게 나타나 더욱 체내 붕소함량 분석으로 내성 계통을 선별하기는 어렵다고 생각되었다.
- 석회의 경우 16붕소-989(CR경M-7)은 이미 앞에서 이야기 한바와 같이 속잎에서 가장 적은 것으로 나타났다. 그리고 16붕소-995(CR경M-90)번 계통도 역시 적은 것 같다. 속잎의 경우는 순위가 뒤편이지만 실제 함량에서 보면 5,960ppm으로 최저치인 2,597 ppm의 2배정도 보다 조금 많은데 최대치인 39,270ppm의 16%에 불과할 정도였다. 겉잎의 경우는 순위가 두 번째로 낮았으며 실제 함량에서도 24,350ppm으로 가장 적은 16,420ppm 보다 약간 많은 정도이고 최고치인 73,980ppm의 1/3 정도였다. 즉 배추 뿌리혹병에 강하고 붕소결핍증에도 강한 두 계통은 모두 석회성분 흡수가 비교적 적은 계통에 속하는 것 같다(표 2-3, 2-4).
- 이상의 결과는 앞으로 보다 많은 계통을 공시하고 생육시기별로 두 성분을 분석하여 좀 더 정확하게 붕소결핍증과 성분 함량과의 관계를 구명할 필요가 있다는 것을 암시하는 것 같다.

표 2. 배추 계통 별 붕소(B) 및 석회(Ca) 성분 분석 결과  
2-1. 속잎의 붕소함량 내림차순과 결핍증상과의 관계

검정자체 번호	시료	계통 명	속잎		겉잎		엽맥 증상 0-5(십)
			B (ppm)	Ca (ppm)	B (ppm)	Ca (ppm)	
9	16붕소-989	CR경M-7	7.7	2597	53.5	16420	0
17	993	C218M-13	17.3	3642	60.1	25320	0.5
23	996	CR291M-96X 휘M-2	18.9	4877	54.8	50250	0.5
19	994	휘M-2	21.3	3986	75.8	51390	0
1	985	CR291M-7	22.9	5333	65.9	38860	3
7	988	CR291M-96	23.6	6318	90.2	73980	4
3	986	CR291M-40	28.1	11550	55.9	32390	1
21	995	CR경M-90	28.8	5960	101.7	24350	0
15	992	CR불M-31	30.8	5538	54.6	47200	4
13	991	불경M-18	33.1	4616	61.1	40220	4
11	990	CR태M-57	38.1	10850	79.9	43450	5
5	987	CR291M-71	76.1	39270	53.2	36820	1

2-2. 겉잎의 붕소함량 내림차순과 결핍증상과의 관계

검정자체 번호	시료	계통 명	속잎		겉잎		엽맥 증상 0-5(심)
			B (ppm)	Ca (ppm)	B (ppm)	Ca (ppm)	
5	16붕소- 987	CR291M-71	76.1	39270	53.2	36820	1
9	989	CR경M-7	7.7	2597	53.5	16420	0
15	992	CR불M-31	30.8	5538	54.6	47200	4
23	996	CR291M-96X 휘M-2	18.9	4877	54.8	50250	0.5
3	986	CR291M-40	28.1	11550	55.9	32390	1
17	993	C218M-13	17.3	3642	60.1	25320	0.5
13	991	불경M-18	33.1	4616	61.1	40220	4
1	985	CR291M-7	22.9	5333	65.9	38860	3
19	994	휘M-2	21.3	3986	75.8	51390	0
11	990	CR태M-57	38.1	10850	79.9	43450	5
7	988	CR291M-96	23.6	6318	90.2	73980	4
21	995	CR경M-90	28.8	5960	101.7	24350	0

2-3. 속잎의 석회함량과 결핍증상과의  
관계

검정자체 번호	시료	계통 명	속잎		겉잎		엽맥 증상 0-5(심)
			B (ppm)	Ca (ppm)	B (ppm)	Ca (ppm)	
9	16붕소- 989	CR경M-7	7.7	2597	53.5	16420	0
17	993	C218M-13	17.3	3642	60.1	25320	0.5
19	994	휘M-2	21.3	3986	75.8	51390	0
13	991	불경M-18	33.1	4616	61.1	40220	4
23	996	CR291M-96X 휘M-2	18.9	4877	54.8	50250	0.5
1	985	CR291M-7	22.9	5333	65.9	38860	3
15	992	CR불M-31	30.8	5538	54.6	47200	4
21	995	CR경M-90	28.8	5960	101.7	24350	0
7	988	CR291M-96	23.6	6318	90.2	73980	4
11	990	CR태M-57	38.1	10850	79.9	43450	5
3	986	CR291M-40	28.1	11550	55.9	32390	1
5	987	CR291M-71	76.1	39270	53.2	36820	1



2-4. 겉잎의 석회함량과 결핍증상과의 관계

검정자체 번호	시료	계통 명	속잎		겉잎		엽맥 증상 0-5(심)
			B (ppm)	Ca (ppm)	B (ppm)	Ca (ppm)	
9	16봉소-989	CR경M-7	7.7	2597	53.5	16420	0
21	995	CR경M-90	28.8	5960	101.7	24350	0
17	993	C218M-13	17.3	3642	60.1	25320	0.5
3	986	CR291M-40	28.1	11550	55.9	32390	1
5	987	CR291M-71	76.1	39270	53.2	36820	1
1	985	CR291M-7	22.9	5333	65.9	38860	3
13	991	불경M-18	33.1	4616	61.1	40220	4
11	990	CR태M-57	38.1	10850	79.9	43450	5
15	992	CR불M-31	30.8	5538	54.6	47200	4
23	996	CR291M-96X 휘M-2	18.9	4877	54.8	50250	0.5
19	994	휘M-2	21.3	3986	75.8	51390	0
7	988	CR291M-96	23.6	6318	90.2	73980	4

## 4절. 제4세부 과제: 시판 및 수출용 배추와 무 뿌리혹병 검정기술 개발

### 1. 서론

배추무사마귀병은 순환물 기생체인 *Plasmodiophora brassicae* Woron.에 의해 발생되며 십자화과 작물에 발병하는 대표적인 토양전염병이다. 병원균은 뿌리혹균문, 뿌리혹균목의 뿌리혹균속(Plasmodioprid)에 속하고 휴면포자, 유주자, 변형체등으로 토양내에 존재한다(Braselton, 1995). 배추가 감염되면 지상부는 건전한 배추에 비해 생육이 부진하고, 병이 진행됨에 따라 그 뿌리에 혹이 형성되고 수분과 양분 흡수에 저해를 받아 식물체가 점차 시들게 된다.

*P.brassicae*는 휴면포자가 발아하여 뿌리털을 감염하는 1단계와 감염된 뿌리로부터 나출된 2차 유주자에 의해 뿌리조직 세포를 감염하는 2단계로 구성된 생활환(Fig. 2)을 가지고 있다(Ingram and Tommerup, 1972; Ludwig-Müller, 1999, Devos *et al.*, 2005;).

국내에서 발견 초기에는 그 피해가 심하지 않았으나 1990년대에 들어서 주산지에서의 연작재배와 재배방식의 변화로 그 피해가 점차 심각해져, 한 포장에서 발병하면 거의 100% 발병하는 것으로 알려져 있다. 특히 *P.brassicae*의 휴면포자가 토양 내에서 17년 이상 생존이 가능(Wallenhammar, 1996)하기 때문에 그 피해를 더욱 키울 수 있다. 최근 전세계적으로 십자화과 채소작물에 대한 뿌리혹병의 피해가 더 심각해지고 있는 추세이며 이를 극복하기 위해 선진국에서도 많은 연구자들이 관련연구에 투입되고 있는 실정이다.

배추는 국내 채소 재배면적의 21%에 해당하는 35,951ha에서 생산된다(통계청, 2011). 우리나라에서도 뿌리혹병의 발생이 병원균의 독특한 특성상 한번 감염되면 지속적으로 피해를 일으키며 피해는 더 심해지고 있다.

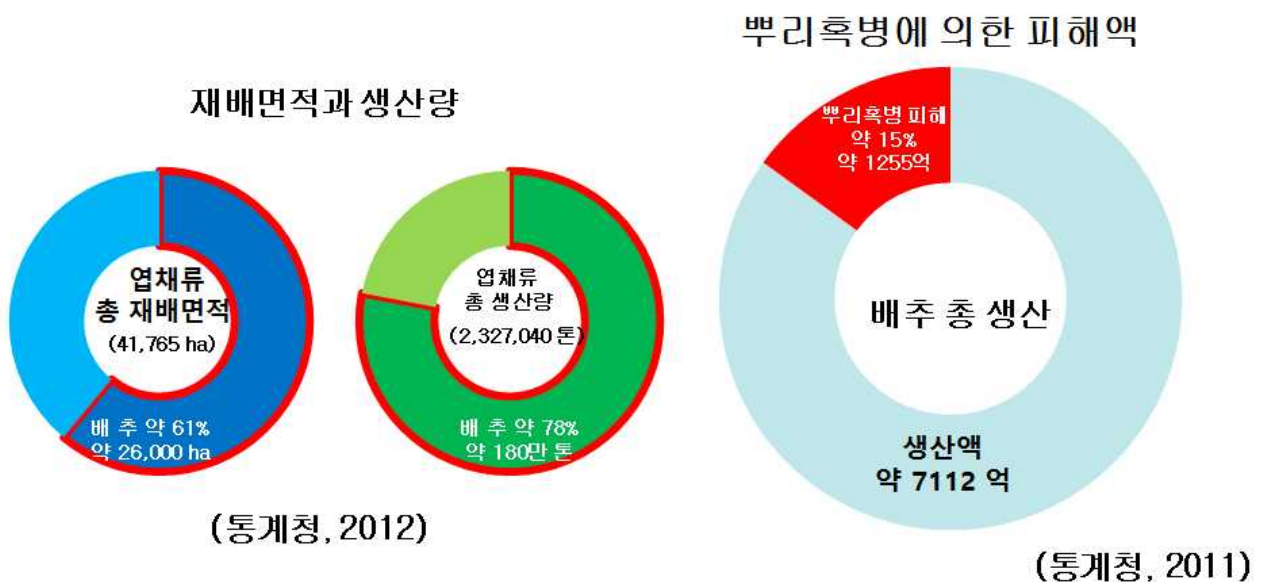


Fig. 1. Economical damage of kimchi cabbage by clubroot disease in Korea.

이렇게 많이 재배되는 우리나라 주요 채소작물 중 하나인 배추와 무에도 최근에 뿌리혹병이 다수확에 최대 걸림돌이 되고 있으나 화학적 방제 외에 마땅한 방제법이 없고 국내 균주들에

대한 특성분석 조차도 제대로 이루어져 있지 않고 있다.

뿌리혹병에는 다양한 race가 존재하고 있는데(Wallenhammar, 1996), race별로 각기 다른 병원성을 가지고 있고 나라별, 지역별 각각 다른 분포를 나타내고 있다. 이 race의 정확한 판별을 하기 위해서는 단포자 하나가 가지고 있는 race를 분석하는 단포자 분리방법이 필요하다. 이 단포자 분리로 국내 주요 배추, 무 재배지역의 race를 분석하여 국내 뿌리혹병 race 지도 제작이 뿌리혹병 연구를 위해 매우 중요하다.

가장 효과적인 방제법은 저항성 품종 육성과 예방적 방제이지만 저항성 품종육성에 사용되는 병원균의 병원성과 그 발병도가 제각각이고 변이가 생길 수 있는 가능성이 많아 어려운 실정이다. 그래서 국내 균주들의 race 등 특성분석이 되어있지 않은 상황 하에서 제대로 된 병원균 존재유무를 파악하는 것이 우선적이며 급선무이다. 그리고 토양병원균이기 때문에 방제할 때 농약살포, 토양소독으로도 어려운 부분이 있는데, 이 때문에 생물학적 방제방법이 대두되고 있다. 그렇기에 토양이나 식물체로부터 유용한 길항미생물을 분리하여 식물체에 처리하여 생물적 방제제로 개발한 다음 다른 병방제방법과 종합적으로 사용하게 된다면 더 큰 효과를 볼 수 있을 것이나 현재까지 효과가 우수한 미생물체는 개발되어 있지 못해 반드시 그 개발이 필요한 실정이다(Cheah and Page, 1995; Cheah *et al.*, 2000).

이전에 박 (2009)의 연구에 따르면 배추 뿌리혹병균의 경우 병원성의 변이가 매우 신속하여서 저항성 품종도 경우에 따라 2년 이상 연작하면 그 저항성이 감수성으로 변한다고 한다. 이렇게 변화도 많고 다양한 race로 인해서 시중 판매되고 있는 저항성 품종에서 대해서는 꾸준한 분석이 필요하고 국내에서 채집되는 뿌리혹병균에 대해서 매년 지속적으로 채집을 가고 그 병원균들 중 강병원성 병원균에 저항성을 띄는 품종이 개발되어야 한다.

사전에 뿌리혹병균의 존재여부를 판정하여 이병포장과 이병종자를 사용하지 않는 것이 병방제에 중요하다. 그러기 위해서는 병원균의 존재 여부를 확인할 수 있는 종특이적 primer의 개발이 필수이며 그 최적 활용방법 개발은 병방제상 중요한 의미가 있을 것이며, 토양을 비롯한 종자의 감염유무 및 개발된 품종의 빠른 내병성분석을 통해 재배적 방제의 실용화가 가능하다. 이 연구에서는 본 실험실에서 개발된 종특이적 primer의 개량을 통해 배추와 무를 비롯한 주요 십자화과 작물에 보다 효율적이고 보다 더 넓은 목적으로 적용하려 한다. 그리하여 내병성 품종 육종을 개발할 때 배추작물의 주요 병해에 대한 효율적인 병리검정 체계를 확립하고 확립한 기술로 육종가에게 병리검정을 지원하는 것을 목적으로 한다.

한편, 뿌리혹병균은 순환물 기생체로서 인공 배양이 불가능하고 포자의 크기가 매우 작고(3.8  $\mu\text{m}$ ), 토양 및 식물체 내에서 존재하기 때문에 다른 균들과 달리 이 균의 순수분리는 매우 어렵다. 실험에서 순수 DNA를 분리할 때 그 양 또한 매우 적어 분자생물학적 연구에 어려움이 있다.

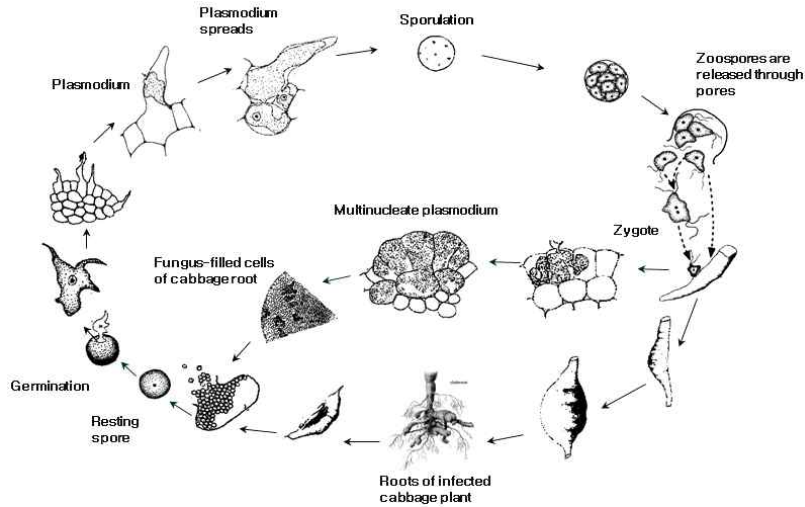


Fig. 2. Life cycle of *Plasmodiophora brassicae*

뿌리혹병 연구에 큰 걸림돌이 되어왔던 이러한 여러 가지 문제점들을 해결하기 위해 본 연구에서는 감도가 높은 균 검출 및 동정방법을 일부 연구하고 토양 및 식물체 잔재물이 혼재되어 있는 환경에서 순수한 휴면포자를 수거할 수 있는 종류가 다른 filter를 사용하는 방법을 연구에 대한 예비정보를 얻었다. 또한 단포자 접종 균주의 증식량이 적은 고질적 문제점 해결 방법을 개발하여 접종 균주의 대량증식을 통해 이로부터 대량의 휴면포자를 분리할 수 있는 방법을 개발해 *P.brassicae*의 더 나은 분자생물학적 연구에 기여하고자 기본연구를 수행하여 일부 유용한 결과를 얻었으며 좀 더 연구한다면 이는 추후 관련 연구에 꼭 필요한 자료로 사용될 것이다.

지금까지의 저장방법은 Woronin이 1877년 논문에 발표한 그대로 -20℃에서 뿌리혹 상태로 저장하는 것이 일반적인 방법이다. 그러나 이 상태로 오랜 시간 뿌리혹을 저장하면 병원균의 특성이나 병원성의 변화 등으로 인해 뿌리혹병균의 특성 연구를 정확히 수행할 수 없고 병원균을 다른 기주에 재접종할 때 기주, 환경 등 다양한 요인에 의해 그 병원성이 변화될 위험도 무시할 수 없다. 이처럼 오래전부터 해왔던 방식이라고 해도 약 오래전에 사용했던 방법을 검증과정 없이 그대로 따라 하는 것 역시 문제가 있고 판단된다.

또한 장기적인 연구와 종자회사 차원에서 직접 병원성 분석에 활용 가능하게 하기위하여 위해 채집한 뿌리혹과 인공재배 뿌리혹의 효율적인 장기 저장방법을 1차 분석하여 보았다.

위의 모든 실험과 분석은 기반과제로써 종자회사들의 배추나 무의 뿌리혹병 저항성 검정을 위한 체계적이고 효율적인 병 검정 시스템 확립에 직접적으로 유용하게 활용될 것이며 나아가 국내의 뿌리혹병 발생과 관련된 정보를 제공하는데 그 목적이 있다.

또한 본 연구는 병저항성 품종 선발에 활용하기 위해서 배추 주요 재배지역에서 수집한 *P. brassicae*에 대해 국내 주요 배추 및 무 품종에 대한 병원학적 특성과 유전적 다양성을 분석하였으며, 생물학적 방제에 활용을 위하여 유용 길항미생물을 선발하고 그 항균 활성을 검정하였다.

## 2. 재료 및 방법

가. 전국 주요 배추 · 무 재배지역 뿌리혹병균의 race 분석 및 우점 race 파악

### (1). 배추뿌리혹 채집 지역 및 공시균주

실험 첫해인 실험수행 계획대로 2014년에는 대전광역시 유성구와 청양, 아산, 서산을 중심으로 충남지역을 위주로 수집(Fig. 3)하였으며 해마다 뿌리혹병으로 인해 큰 피해를 입고 있는 그리고 평창을 중심으로 강원지역의 각 포장으로부터 뿌리혹을 채집하여 뿌리로부터 뿌리혹병균의 휴면포자를 단포자 분리한 후 실험하였다. 수집한 뿌리혹은 다음 실험을 위해 -70℃에 보관하였다. 이후 실험에는 가장 먼저 채집된 아산의 뿌리혹과 평창의 뿌리혹을 사용하여 실험하였으며 다른 지역의 수집균주들도 지속적으로 각종 특성을 분석 중이다.

2014년도에는 우선적으로 가장 피해가 심하고 병원성에도 차이를 보였던 충남 아산의 다른 2개의 포장에서 채집한 아산 1(B1), 아산 2(B2)병원균과 강원도 평창에서 다른 2개의 포장에서 채집한 평창 1(D1), 평창 2(D2)을 사용하여 균의 생리 생태적 특성과 race 분석 등 병원학적 분석을 실시하였다.



Fig. 3. Collecting areas(O) of clubroot galls and representative disease occurrence areas in Korea.



Fig. 4. Gall of clubroot on kimchi cabbage root, and experimental field used for this study . Root formed a big gall.

2015년 과제의 목표 지역인 경기도의 연천, 동두천, 포천, 가평, 여주, 화성, 평택지역 배추뿌리혹을 채집하였다(Fig. 5). 올해 봄과 여름 최악의 가뭄으로 인해 주로 수매전반으로 병확산하는 뿌리혹병균의 특성상 발병이 적었다. 하지만 많은 노력 끝에 경기도의 주요 배추 재배로부터 뿌리혹을 찾을 수 있었다. 경기도 포천시에서는 건전한 개체와 이병 개체의 물질 양의 차이를 알기 위해 같은 ‘CR맛 배추’ 배추품종을 키우는 두 개의 포장에서 건전한 배추뿌리와 이병뿌리혹(Fig. 6)을 채집하였다. 올해 수집한 배추뿌리와 2014년도에 채집된 뿌리혹 또한 다음 실험을 위해  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.



Fig. 5. Collecting area(dark blue) of clubroot in Gyeonggi Province.



Fig. 6. Collected gall of clubroot from Pocheon-si.

2016년도 과제의 목표 지역인 강원도의 철원, 춘천, 홍천, 평창, 정선, 영월지역 배추뿌리혹을 채집하였다(Fig. 7). 강원도 정선군, 영월군에서는 건전한 개체와 이병 개체의 물질 양의 차이를 알기 위해 두 개의 포장에서 건전한 배추뿌리와 이병뿌리혹(Fig. 8)을 채집하였다. 올해 수집한 배추뿌리와 2015년도에 채집된 뿌리혹 또한 다음 실험을 위해  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.



Fig. 7. Collecting area(dark green) of clubroot in Gangwon Province.



Fig. 8. Collected gall of clubroot from yeongwol-gun.

(2) 단포자 접종과 Williams' 판별품종을 이용한 race 판별

(가) 단포자 접종

뿌리혹병균 내에 여러 race가 동시에 존재하는 것으로 알려져 있어 그 race 분석을 위해 시판종인 배추, 양배추, 순무 등 다양한 기주들과 함께 상대적으로 감수성 품종으로 알려진 춘정



(우리종묘)을 사용하여 단포자 접종하였다. 먼저 멸균된 Petri dish에 멸균된 여과지 2겹을 깔아 멸균수로 충분히 적신 후 소독한 종자를 파종하였다.

파종 후 3일이 지나 배추 유묘의 뿌리털이 생성될 무렵 접종을 실시하였고, 접종은 커버글라스법(Kageyama, 1995)을 사용하였다.

접종을 위해 수집된 뿌리혹으로부터 얻은 포자 현탁액을 현미경 상에서 Hemocytometer를 이용하여  $1 \times 10^3$  spore/ml 농도로 맞춘 후, 1 $\mu$ l를 커버글라스 위에 떨어뜨려 현미경으로 휴면포자가 1개임이 확인되면 실내 파종 후 습실조건을 유지해주며 3일 동안 키운 유묘에 상처를 내어 커버글라스 위에 올려놓고 피펫을 이용하여 접종해준다. 그리고 1 ~ 2시간 정도 접종이 잘 되게 비닐로 감싸 습한 조건을 만들어준다. 그 후 멸균된 상토로 덮은 다음 포트에 정식하였다(Fig. 5, 6). 정확한 race 분석을 위해 수분이 혼입되지 않도록 포트 간의 간격을 충분히 떨어뜨려 놓았다. 접종한 배추는 20 ~ 25° C의 온실에서 8주 재배 후 뿌리혹의 생성 여부를 관찰하였다.

아울러 매주  $10^{-7}$ /ml로 희석한 auxin(IAA Sigma, USA)을 5ml 처리하여 보다 빠르게 뿌리혹 형성을 촉진시켜 다량의 포자를 얻고자 하였다.



Fig. 5. Transplanted plants after single spore inoculation in the pots.

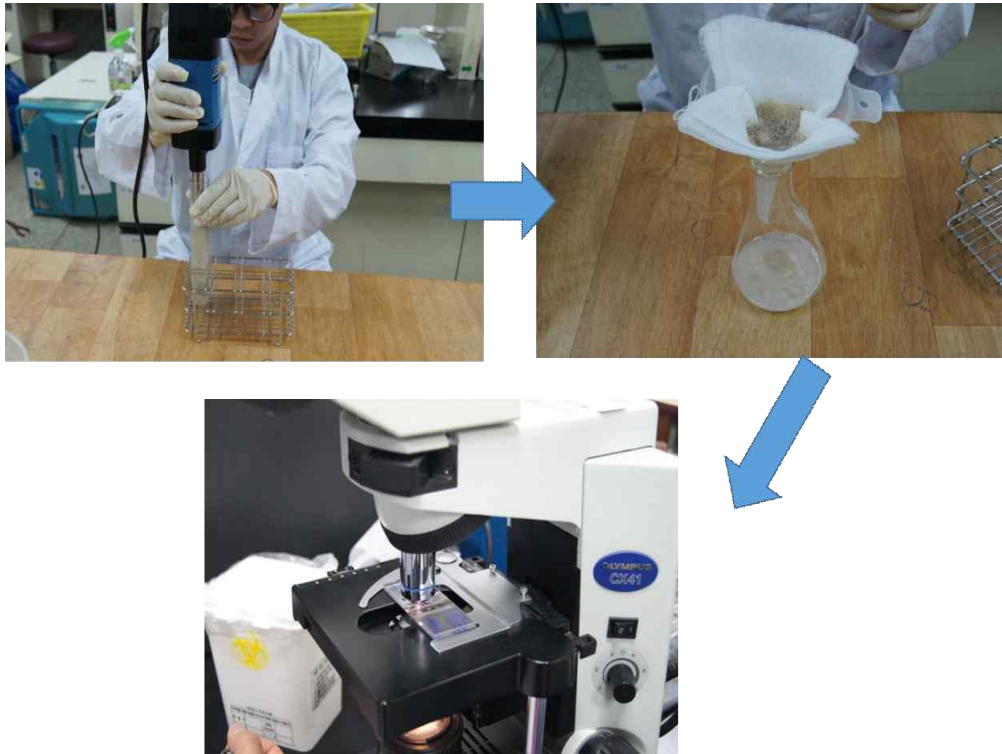


Fig. 6. Procedure of monospore inoculation.

(나) Race의 동정

Race 판별품종인 Laurentian(WCD3), Wilhelmsburger(WCD4), BadgerShipper (WCD2), Jersey Queen(WCD1(Williams, 1966)를 충남대학교 원예학과 분자유전학 실험실에서 분양받았다. 파종한 종자에 단포자 접종에서 발병이 잘된 개체들에서 휴면포자를 분리해 뿌리혹을 Homogenizer로 갈아 접종한 다음 혹 형성 유무에 기초하여 Williams 판별분류표(Table 1)를 이용해 race를 동정하였다(Fig. 7.).

Table 1. Williams' clubroot differential set for race identification used in this study

Differential variety	race															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Cabbage : Jersey Queen	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Badger Shipper	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Rutabaga : Laurentian	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
Wilhelmsburger	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+

+ : susceptible reaction, - : resistant reaction

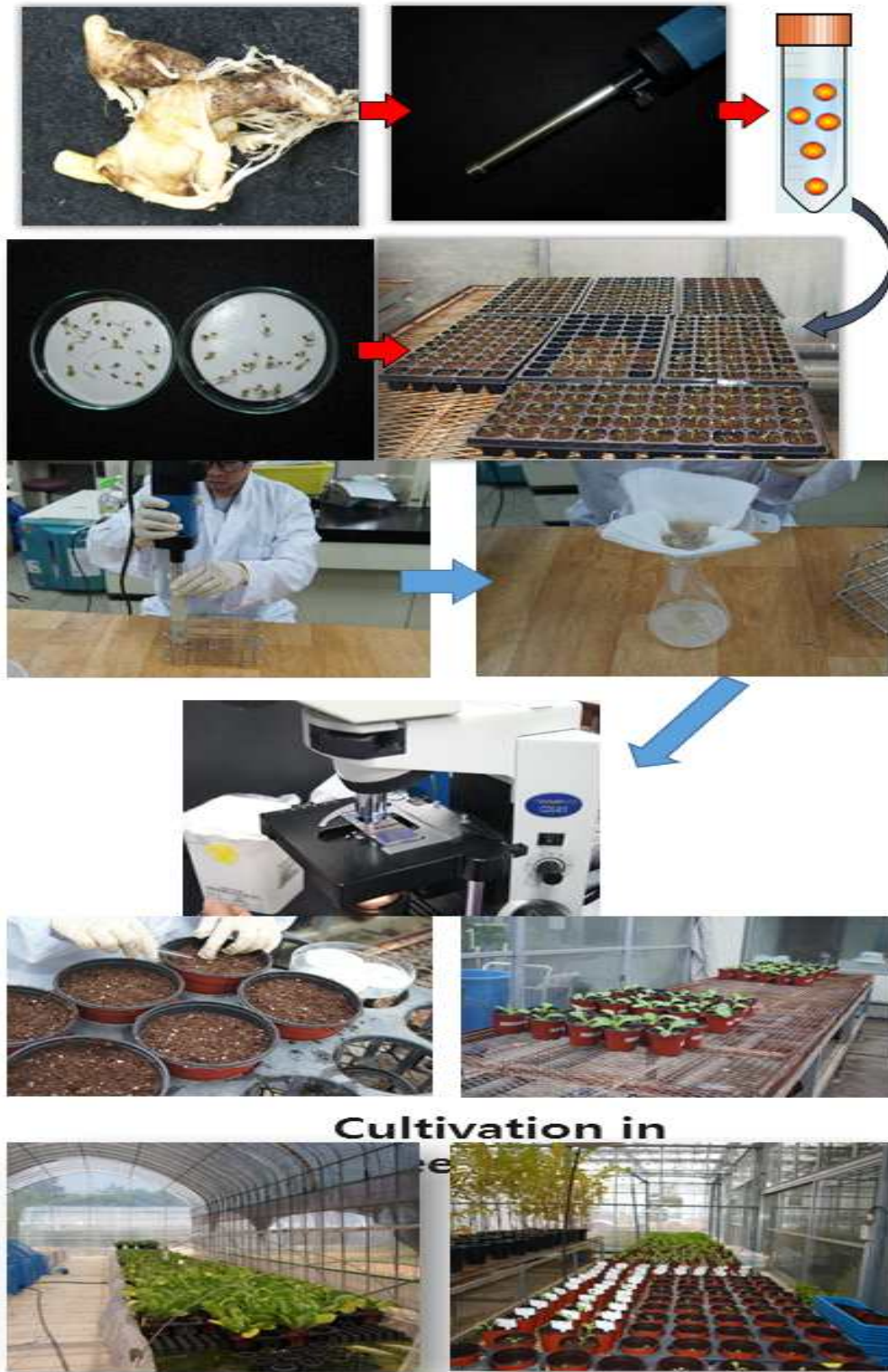


Fig. 7. Procedure of pathogenicity test for identification of race.

나. 최적의 뿌리혹 저장온도조건 개발

지금까지 사용되어온 저장방법을 되짚어 보고 개선하기 위해 최적의 저장온도조건을 알아보고

자 일차적으로 다양한 온도에서 뿌리혹을 저장해 보았다. 실험에 쓰인 온도조건은 -70℃, -20℃, 4℃, 25℃로 4가지로 구분하였다.

각 온도에서 저장한 뿌리혹의 병원성을 확인하기 위해서 저장 후 3개월 단위로 포자를 모아 접종실험을 하였다. 병원성이 지속적으로 나타나는지에 대한 검정을 위해 7일 정도 기른 감수성 품종인 춘정 유묘에 각각 온도별로 현탁액 접종하여 25±5℃의 온실에서 8주간 키운 후 혹의 형성 유무를 통해 병원성 지속여부를 확인하였다.

다. 국내 시판 배추·무 품종의 뿌리혹병 저항성 검정 및 시판종자 종합분석

(1). 시판 배추·무 품종의 뿌리혹병 저항성 검정

2014년도에는 국내에서 판매되고 있는 배추·무 품종과 감수성 배추품종인 춘정을 포함하여 CR맛배추, 불암3호, 가을맛배추, 춘광, 알찬들, 불암플러스로 실험한 뒤 3개의 품종을 추후에 더 추가하여 실험을 진행하였다(Table 3). 무 품종 또한 멧진맛깎무, 서호무, 국보무, 백운무 총 7개의 무품종을 가지고 10개체씩 접종실험하였다(Table 4). 이중 특히 배추품종에서 탐스런배추와 휘파람골드, 불암플러스, CR맛배추가 뿌리혹병에 내병성을 가진 품종으로 알려져 있어 많은 농민들이 재배하고 있다.

접종 병원균은 아산시 배방읍의 2개 포장에서 채집한 다른 병원균 2개와 평창군 대관령면에서 채집한 다른 포장 병원균 2개를 가지고 실험하였다. 접종 농도는 1.0× 10<sup>6</sup>spore/ml로 맞추어 관주 접종하였다.

발병도 공식은 장(2006)의 방법을 따라 Table 2와 같은 공식을 사용해 실시하였고, 발병도 기준 설정은 새로이 하였다.

Table 2. Formula for calculation of disease severity(DS) by *P. brassicae*

---

<b>Disease severity(DS)%</b>
= (1n <sub>1</sub> +2n <sub>2</sub> ) × 100/2n <sub>t</sub>
n <sub>1</sub> to n <sub>2</sub> is the number of plants in the indicated grade and n <sub>t</sub> is the total number of plants tested

---

Table 3. Kimchi cabbage cultivars for virulence test used in this study

	<b>Cabbage cultivar</b>	<b>Company</b>
1	CRmatt	Nongwoobio
2	BulamNo.3	Dongbupamhannong
3	Gaulmatt	Nongwoobio
4	Chungwang	Sakatakorea
5	Tamsrun	Dongbupamhannong
6	Chunjeong	Woori
7	Alchandeul	NH seed
8	Huiparamgold	Sakatakorea
9	Huangboc	Nongwoobio
10	Norangbom	Dongbupamhannong
11	Bulamplus	Hungnong

Table 4. Radish cultivars for virulence test used in this study

	<b>Radish cultivar</b>	<b>Company</b>
1	Meotginmatggalmu	Nongwoobio
2	Seohomu	Nongwoobio
3	Gucboomu	Kwonnong
4	Baekunmu	Nongwoobio
5	Seodongmu	Hungnong
6	Geumbongmu	Kwonnong
7	Daeseungdaehyeongbommu	Dongbupam hannong

2015년도 국내에서 판매되고 있는 배추·무 품종들의 뿌리혹병에 대한 저항성과 감수성을 분석함으로써 배추·무 재배 농가에 도움을 주고 병원균 집중실험하기 좋은 품종을 찾아내고 이로 인해 저항성 감수성 분석을 할 병원균을 선별할 수 있다.

시판배추 품종인 CR맛배추, 불암3호, 가을맛배추, 춘광, 탐스런배추, 알찬들, 휘파람골드, 황복배추, 노랑봄배추, 불암플러스로 2014년도에 뿌리혹병 저항성 분석을 실시하였다(Fig. 8). 각 10

반복으로 실험하였고, 올해 한번 더 실시하였다. 타 연구기관에서 저항성 품종이라고 보고했던 천하장군과 김금3호대백채를 추가로 실험하였다(Table 5).



Fig. 8. Transplanted plants after single spore inoculation in the pots.

Table 5. Kimchi cabbage cultivars for virulence test used in this study

	Cabbage cultivar	Company
1	CRmatt	Nongwoobio
2	BulamNo.3	Dongbupamhannong
3	Gaulmatt	Nongwoobio
4	Chungwang	Sakatakorea
5	Tamsrun	Dongbupamhannong
6	Chunjeong	Woori
7	Alchandeul	NH seed
8	Huiparamgold	Sakatakorea
9	Huangboc	Nongwoobio
10	Norangbom	Dongbupamhannong
11	Bulamplus	Hungnong
12	Cheonhajanggun	Sakatakorea
13	Gimgeum No.3 daebaekchae	China cultivar

무는 기존의 7개의 품종에서 3개의 품종(향수무, 대박무, 백자무)을 추가하여 반복 실험하였다 (Table 6). 각 종자는 정확한 실험을 위하여 종자표면에 처리되어있는 종자소독제를 표면소독액(NaOCl 1%)로 씻어내어 과중하였다. 무는 25±5°C 에서 약 8주간 재배되었다.

접종 병원균은 작년과 마찬가지로 아산시 배방읍의 2개 포장에서 채집한 다른 병원균 2개(B1, B2 isolate)와 평창군 대관령면에서 채집한 다른 포장 병원균 2개(D1, D2 isolate)를 가지고 실험하였다. 접종 농도는 Hemocytometer를 이용하여  $1.0 \times 10^6$  spore/ml로 맞추어 관주 접종하였다. 발병도 공식은 장(2006)의 방법을 따라 Table 2와 같은 공식을 사용해 실시하였고, 발병도 기준 설정은 현실성 있는 평가를 위해 배추는 Table 7와 같이 무는 Table 8과 같이 설정하였다.

Table 6. Radish cultivars for virulence test used in this study

	Radish cultivar	Company
1	Meotginmatggalmu	Nongwoobio
2	Seohomu	Nongwoobio
3	Gucboomu	Kwonnong
4	Baekunmu	Nongwoobio
5	Seodongmu	Hungnong
6	Geumbongmu	Kwonnong
7	Daeseungdaehyeongbommu	Dongbupamhannong
8	Hyangsumu	Nongwoobio
9	Baekjjamu	Nongwoobio
10	Daebangmu	Nongwoobio

Table 7. Grades of representing disease severity index based on symptom development on kimchi cabbage root

Grade	Symptom
0 =	병징없음.
1 =	주근은 곧게 뻗어있으나, 아래부분의 뿌리는 심하게 분지되어 있다.
2 =	
3 =	
4 =	
5 =	11mm 이상의 흑이 있다.

Table 8. Grades representing disease severity index based on symptom development on radish root

Grade	Symptom
0 =	병징없음.
1 =	주근이 여러 갈래로 분지해 손가락처럼 되어있다.
2 =	흑이 있다.

2016년도에는 시판배추 품종인 탐스런배추, CR맛배추, 불암플러스, 불암3호, 휘파람골드, 노랑봄배추, 알찬들, 춘광, 춘정, 가을맛배추, 황복, 추월, 가을전설, 진청, 명가가을, 챔피언노랑, 대통, 휘모리, 참노랑, 씨알가을알파, 신통노랑, 제일참진노랑, 새벽이슬, 천고마비로 뿌리흑병 저항성 분석을 각 10반복으로 실시하였다(Table 9).



Table 9. Kimchi cabbage cultivars for virulence test used in this study

	Cabbage cultivar	Company
1	CRmatt	Nongwoobio
2	BulamNo.3	Dongbupamhannong
3	Gaulmatt	Nongwoobio
4	Chungwang	Sakatakorea
5	Tamsrun	Dongbupamhannong
6	Chunjeong	Woori
7	Alchandeul	NH seed
8	Huiparamgold	Sakatakorea
9	Huangboc	Nongwoobio
10	Norangbom	Dongbupamhannong
11	Bulamplus	Hungnong
12	Chuwol	Jungangseed
13	Gauljeonseol	Nongwoobio
14	Jincheong	Dongbupamhannong
15	Myeonggagaul	Jeilseed
16	Chaempieonnorang	Jeilseed
17	Daetong	Nongwoobio
18	Hwimori	Asiaseed
19	Chamnorang	Dongbupamhannong
20	SSialgaulalpha	Asiaseed
21	Sintongnorang	Hyeondaeseed
22	Jeilchamjinnorang	Jeilseed
23	Saebyeogiseul	Nongwoobio
24	Cheongomabi	Nongwoobio

무는 기존의 10개의 품종에서 5개의 품종(청우무, 명산무, 참조은무, 청운플러스무, 청우플러스무)을 추가하여 반복 실험하였다(Table 10). 각 종자는 정확한 실험을 위하여 종자표면에 처리되어있는 종자소독제를 표면소독액(NaOCl 1%)로 씻어내어 파종하였다. 무는  $25 \pm 5^\circ\text{C}$  에서 약 8주간 재배되었다.

접종 병원균은 작년과 마찬가지로 아산시 배방읍의 2개 포장에서 채집한 병원균(B2 isolate)을 가지고 실험하였다. 접종 농도는 Hemocytometer를 이용하여  $1.0 \times 10^6$  spore/ml로 맞추어 관주 접종하였다. 발병도 공식은 장(2006)의 방법을 따라 Table 2와 같은 공식을 사용해 실시하였고, 발병도 기준 설정은 현실성 있는 평가를 위해 배추는 Table 7과 같이 무는 Table 8과 같이 설정하였다.

Table 10. Radish cultivars for virulence test used in this study

	Radish cultivar	Company
1	Meotginmatggalmu	Nongwoobio
2	Seohomu	Nongwoobio
3	Gucboomu	Kwonnong
4	Baekunmu	Nongwoobio
5	Seodongmu	Hungnong
6	Geumbongmu	Kwonnong
7	Daeseungdaehyeongbommu	Dongbupamhannong
8	Hyangsumu	Nongwoobio
9	Baekjjamu	Nongwoobio
10	Daebangmu	Nongwoobio
11	Cheongumu	Hyeondaeseed
12	Myeongsanmu	Syngenta
13	Chamjoeunmu	Syngenta
14	Cheongunpeulleosmu	Dongbupamhannong
15	Cheongupeulleosmu	Hyeondaeseed

라. 발병도 기준의 설정

현재까지 뿌리혹병균의 병원성 검정을 위한 뚜렷한 기준이 설정되어있지 않아 연구자에 따른 판정에 혼돈이 있어왔기 때문에 이 문제점을 개선하고자 그간의 경험을 바탕으로 배추와 무에 각각 적용할 수 있는 발병도를 표준화하고자 시도하였다(Table 2, 7, 8).

마. 배추뿌리혹병에서 혼합된 race의 영향

B2포장 병원균과 B1포장 병원균은 배추품종에 병을 일으키는 병원성 차이가 많이 난다. 여기서 race 판별을 한 후 race의 차이가 보였다. B1포장 병원균에는 race 1이 판별되지 않았으나, 강력한 병원균인 B2포장 병원균에서는 race 1이 존재하였다. 그래서 race판별결과에는 없던 race 1이 혼합될 때 병원성이 증가되는지 알아보기 위하여 race 1을 각 race 4, 9, 11에 혼합접종을 실시하였다. 배추 품종으로는 race별 뿌리혹병 저항성 검정에서 각 race별 발병도가 가장 비슷한 두 가지 품종인 휘파람골드, 불암3호를 사용하였고 각 병원균의 농도는  $5 \times 10^6$  spore/ml로 접종하고 처리구는 race 1, 각 race 4, race 9, race 11, race 1 + race 4, race 1 + race 9, race 1 + race 11로 설정하고  $25 \pm 5^\circ$  C의 온실 내에서 8주간 재배하였다.

바. Pectin 및 Pectinase의 정량분석

Pectin은 배추뿌리의 세포벽을 구성하는 성분이다. 이 Pectin을 분해하는 pectinase를 많이 분비하는 균일 수록 더 강한 병원균이고, 병원균이 더 많은 pectinase를 분비할 수 있게 하는 품종이 감수성을 가지고 있다고 추정하고 본 실험을 진행하였다.

Pectin의 분석을 위해서 강원도 정선군, 영월군에서 채집된 배추의 뿌리혹과 건전배추 뿌리

및 인공접종으로 키운 가을저널, CR맛배추, 휘파람골드 배추품종의 뿌리혹과 건전배추 뿌리와 Pectin을 분해하는 Pectinase의 분석을 위해서 경기도 포천시에서 채집된 CR맛 배추 품종의 뿌리혹과 건전배추 뿌리 및 인공접종으로 키운 춘정 배추품종의 뿌리혹과 건전배추 뿌리를 가지고 금산인삼약초시험장에서 정량분석하였다.

그 방법으로는 기질용액 20ml를 100ml 삼각플라스크에 넣고 40°의 수욕조에서 미리 10분간 항온시키고 기질용액에 시험용액 2ml를 넣어 60분간 작용시킨다. 이에 위의 반응액 20ml에 1M 탄산나트륨(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)용액 2.5ml를 가해주어 반응을 중지시킨 다음 0.1N 요오드용액 5ml를 가해주고 밀전하여 암소에서 20분간 방치한 후 2M 황산 5ml, 전분시액 4~5방울을 가하여 0.01N 치오황산나트륨용액으로 적정한다. 여기에 소비된 양(ml)을 S라 한다. 따로, 공시험용으로 시험용액 대신 10분간 수욕조에서 가열 실행시킨 시험용액 2ml를 사용하여 위의 시험조작에 따라 시험하여 0.01N 치오황산나트륨(Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>)용액의 소비 ml 수를 B라 한다. 정량 계산은 다음 계산식에 따라 효소제의 역가를 구한다.

23

$$\text{펙티나아제역가(U/g)} = (B - S) \times f \times 3.35 \times \frac{23}{3 \times 20 \times W}$$

3.35 : 0.01N 치오황산나트륨용액 1ml에 해당하는 galacturonic acid의  $\mu\text{mol}$  수

f : 0.01N 치오황산나트륨용액의 factor

23 : 최종 반응액의 양(ml)

3 : 사용된 시험용액의 양(ml)

20 : 사용된 반응액의 양(ml)

W : 시험용액 1ml에 함유된 검체의 양(g)

#### 사. 친환경적인 뿌리혹병 방제를 위한 유용 길항세균 선발

##### (1) 유용 길항세균 분리

뿌리혹병은 토양병원균이기 때문에 방제에 어려움이 있다. 이 문제를 타파하기 위한 한가지 방법으로 생물농약이 있는데, 가장 보편적인 생물농약으로 세균이 있다.

이 길항작용을 하는 세균을 얻기 위해서 산은 보편적으로 미생물이 많은 곳인데, 그래서 충남대학교 농업생명과학대학 주변 산의 토양과 배추식물체 속에서 존재하고 있는 내생세균을 분리하기 위하여 건전한 배추의 식물체내에서 세균을 분리하였다. 채집한 식물체의 표면을 tap water로 씻어낸 후, 단편을 만들어 NaOCl 1%에 1분간 표면 소독 한 다음 2차례 멸균수로 씻어내고 풍건을 실시하였다. 분리는 Nutrient agar(NA, Difco) 배지에 단편을 바로 치상한 다음 배지에서 누출되는 세균을 다시 NA 배지에 계대하여 단일 콜로니를 분리하는 방법과 멸균수 5 ml에 식물체 단편을 30분간 침지한 용출액을 NA 배지에 도말 후, 배양된 세균을 분리하는 두가지 방법을 통해 세균을 분리하고 20% glycerol 용액에 현탁하여 deep-freezer(-70°C)에 보관하였다(Sieber, 2002; Hallmann, 2006).

##### (2) 유용 길항세균의 선발

뿌리혹병방제용 유용 길항 내생세균을 선발하고자 식물체와 토양으로부터 분리된 균주는 뿌리혹병균의 특성상 인공배양이 불가능하기 때문에 우선적 선발을 위해 주요 식물병원균과 대

치배양을 진행하였다.

PDA 배지 상에서 대치배양을 통해 항균활성 보유균주가 1차 선발하였다. 효과검정을 위해 사용한 주요 토양 식물병원균은 *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*(Table 11) 등을 사용하였다. 대치배양시 세균과 병원균의 3cm로 동일하게 거리를 두고 억제율을 비교하여 1차 세균을 선발하였다. 억제율은 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{억제율 (\%)} = \frac{\text{무처리구 균총직경(mm)} - \text{처리구의 균총직경 (mm)}}{\text{무처리구의 균총직경(mm)}} \times 100$$

1차 선발된 균주들을 대상으로 항균활성을 재평가하여 병원균에 강하고 지속적인 항균활성을 보이며 세균의 생장이 빠른 균주를 선발하였다.

### (3) 길항균 동정

토양에서 세균을 분리하여 실험실 내의 식물병원균과 대치배양해 보았다. 뿌리혹병인 *P. brassicae*과 분류학상 같은 유사군류인 고추역병과 대치배양해본 결과 2014년의 길항균에서 일부를 제외하고 다른 길항균을 추가해 5개가 분리되었다. 이 길항균들은 임의로 S7, S10, S11, D2, J4로 명명하였다. 추후 인삼, 토마토 잎에서 분리한 길항균 중, 실험실 내의 식물병원균과 대치 배양을 통해 선발한 길항균들은 임의로 S4, TL1, TL4로 명명하였다. 이 길항균들을 형태학적 동정으로 NA배지 상에서 30°C, 24시간 배양해 colony 형태를 관찰하였다. 생화학적 분석은 세균분류에 많이 사용되는 API kit(BioMerieux, France)을 이용하였고, API 20E kit와 API 50 CHB kit를 이용하여 생화학적 특성을 분석하여 API 홈페이지(<http://apiweb.biomerieux.com>)에서 확인하였다.

분자생물학적 동정으로는 Genomic DNA Extraction Kit(intron Biotechnology, Korea)를 이용하여 추출하였고, 16S rDNA 유전자는 universal primer set인 27F/ 1492R primer를 이용해 증폭하였다. PCR 결과물을 (주)마크로젠에 sequencing 의뢰 결과를 NCBI의 BLAST를 이용하여 DNA 데이터베이스와 유사한 염기서열을 비교하여 분석하였다.

### (4) 길항균의 생물검정

온실 내 뿌리혹병에 대한 길항력 검정은 생물학적 방제의 특성에 근거하여 치료적 효과보다 예방적인 효과를 알아보기 위한 생물검정으로 실시하였다. 배추품종은 배추 육종가들 사이에 감수성 품종으로 알려진 춘정을 사용하였고 종자는 종자표면에 처리되어있는 종자소독제를 표면소독액(NaOCl 1%)로 씻어내어 과중하였다.과중 후 7일이 지나 pot에 정식할 때 Nutrient Broth 배지에 2일 배양한 길항세균을  $1 \times 10^4$ cfu/ml 농도로 맞춰 관주 처리해준다. 다시 7일 후 B2병원균  $1 \times 10^7$ spore/ml의 농도로 접종해준 후  $25 \pm 5^\circ$  C의 온실 내에서 7주간 재배하였다. 이 실험 후에 뿌리혹 무게를 측정하였다.

Table 11. Important pathogens used and their Characteristics for antifungal activities of selected bacteria

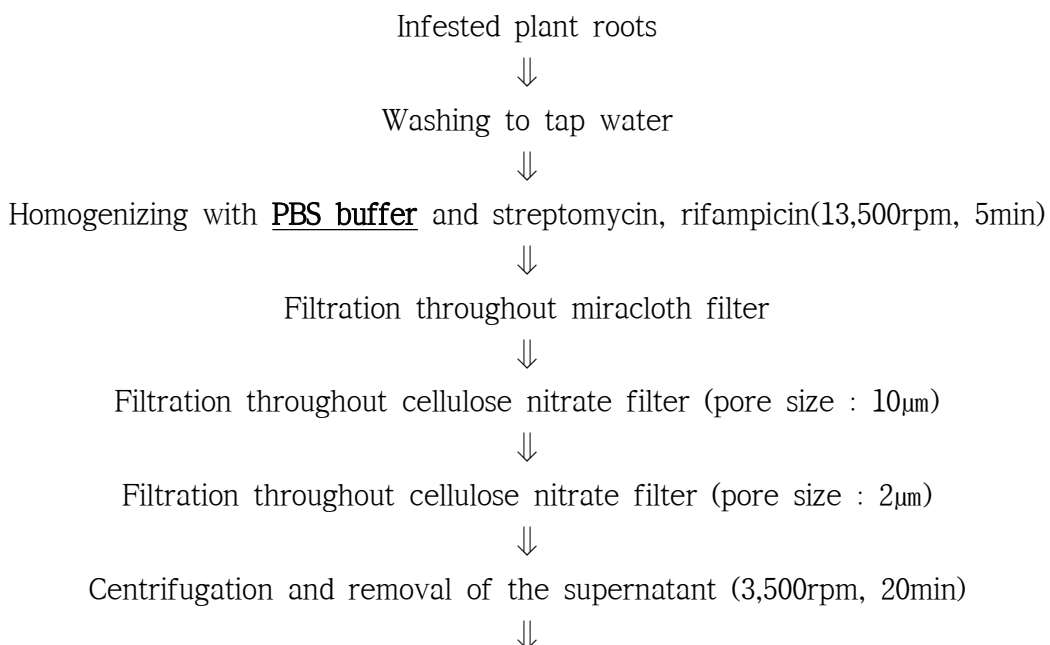
Pathogen	Source	Characteristics
<i>Botrytis cinerea</i>	Tomato	Gray mold
<i>Fusarium oxysporum</i>	Strawberry	Fusarium wilt
<i>Rhizoctonia solani</i>	Rice	Rice sheath blight
<i>Sclerotium rolfsii</i> 40832	Apple	Southern stem and root rot
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Pepper	Sclerotinia rot

아. 순수한 휴면포자의 분리방법

휴면포자의 순수한 분리를 위해 발병한 뿌리혹을 흐르는 물에 여러 차례 씻어내 배추뿌리표면에 남아있는 상토와 불순물을 최대한 제거해준다. 뿌리를 잘게 자르고 시험관에 넣고 Homogenizer(IKA, 25 $\mu$ m)로 갈아준다. 이렇게 뿌리 속에 존재하고 있던 *P.brassicae* 포자를 8겹의 거즈로 걸러 토양 잔여물 및 식물 잔재를 거르고 또한 더 작은 불순물을 거르기 위해 20 $\mu$ m, 11 $\mu$ m cellulose nitrate filter를 각각 여러 차례 반복하여 사용하여 걸러주었다. 이 과정에서 Hemocytometer를 이용하여 단계별로 포자의 농도를 확인해보았다.

걸러진 휴면포자현탁액을 13,000rpm에서 20분간 원심분리하여 washing하는 과정을 3번 반복하였다. 최종적으로 수거된 pellet을 다음 실험까지 -20 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하였다.

또한 세균 없이 휴면포자만을 순수하게 분리하기 위하여 Fig. 9의 굵게 표시된 PBS buffer에 3가지 항생제 streptomycin, vancomycin, chloramphenicol을 넣어 실험을 실시하였고, 3단계의 filtration 과정을 통해 포자수거를 하였다. 최종 filtration단계 후 걸러진 휴면포자현탁액을 배지에 도말하여 세균의 존재여부를 확인하였고, 최적의 항생제 사용 농도를 찾기 위해 항생제 농도를 줄여가며 실험을 실시하였다.



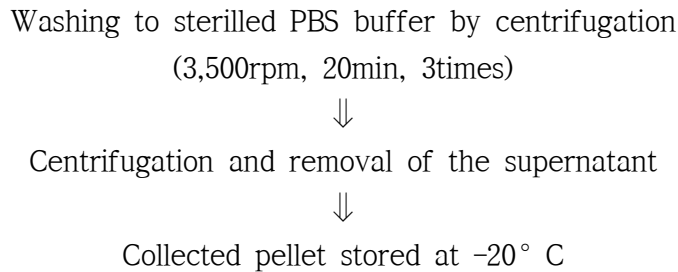
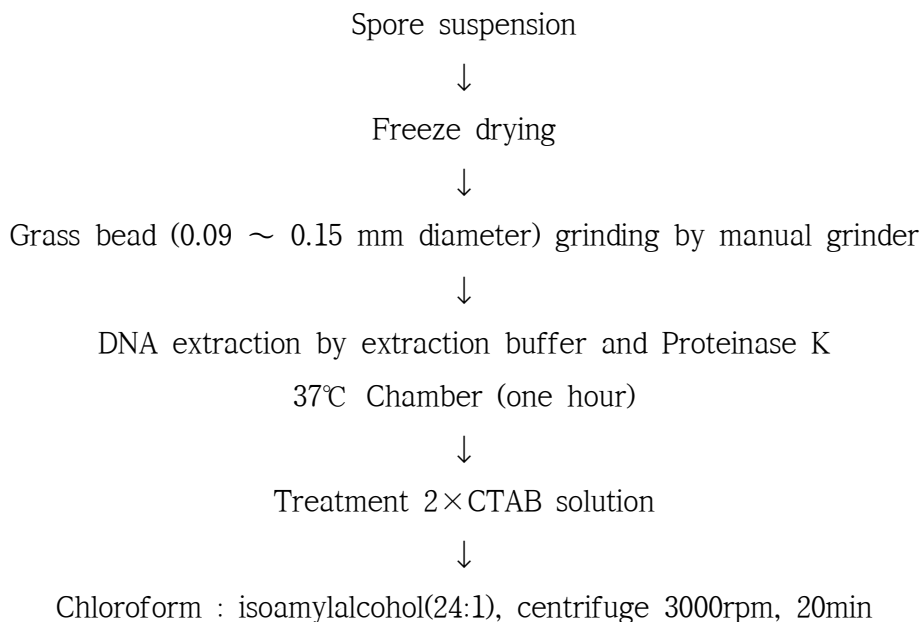


Fig. 9. Diagram of Spore collection method.

#### 자. Genomic DNA의 분리

배추 뿌리혹을 멸균된 메스로 잘라내어 포자의 농도를  $10^7$ spore/l로 맞춘뒤 2ml ependorf-tube로 옮긴 후 3000rpm, 25분 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액은 버리는 과정을 2회 반복하여 pellet을 약 400 $\mu$ l 정도로 정량하여 회수된 포자현탁액을 Williams(1966), Ito(1997)에 의해 기존에 사용되어오던 방법과 Doyle and Doyle(1990)의 CTAB방법을 균의 특성에 맞게 수정하여 사용하였다(최, 2010).

3000rpm에서 25분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 동결건조 하였다. 동결건조된 포자를 멸균된 이쭉시개를 이용하여 잘게 마쇄한 다음 400 $\mu$ l의 extraction buffer [200mM Tris-HCl (pH 8.0), 200mM NaCl, 30mM EDTA, 0.5% SDS]와 Proteinase K (50 $\mu$ g)와 Galsbead(0.15~0.50 mm)를 첨가하여, 37°C 에서 1시간 이상 강하게 진탕하였다. 이어서 400 $\mu$ l의 2 $\times$ CTAB solution [2% CTAB (w/v), 100mM Tris-HCl (pH 8.0), 20mM EDTA (pH 8.0), 1.4M NaCl, 1% PVP(polyvinylpyrrolidone)]을 첨가하여 잘 섞어주었다. 그 후 600 $\mu$ l의 chloroform : isoamylalcohol(24:1)을 첨가하여 13,000g에서 20분간 원심분리 한 다음 상층액을 새로운 1.5ml tube에 넣어준다(Fig. 10).



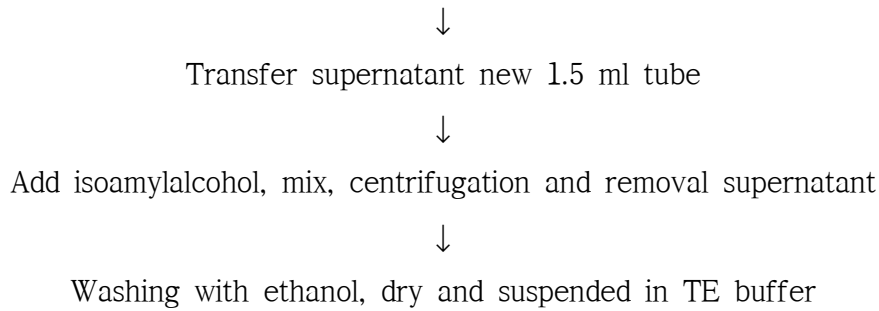


Fig. 10. Schematic diagram of DNA extraction method for *P. brassicae*.

얻어진 상등액의 0.7 비율의 isopropanol을 첨가하고 -20℃에서 20분간 방치한 후 13,000g에서 20분간 원심분리 하였다. 가라앉은 DNA는 차가운 100% ethanol을 이용하여 Washing 후 건조하고 50µl의 TE buffer에 녹인 후 5µl(10mg/ml)의 RNase를 첨가한 뒤 0.8% agarose gel에 전기영동하여 DNA를 확인 및 정량하였다.

#### 차. 개발된 Primer의 활용

개발된 primer의 개량을 통해 보다 직접적이고 효율적으로 종자회사나 연구자들에게 더 많은 자료와 정보를 제공하고자 본 실험실에서 개발한 specific primer set (ITS1)의 재검정을 다른 주요 식물병원균의 DNA와 PCR을 통해 이 primer가 종특이적으로 뿌리혹병 DNA를 찾는지 분석해보았다. 그리고 어느 정도의 농도까지 detection할 수 있는지 휴면포자를  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$ spore/l 농도로 DNA를 뽑아 PCR 후 전기영동을 수행해보았다. PCR조건(Table 12)은 최 등(2010)에서 참조하였다.

뿌리혹 채집하면서 같이 채집한 토양과 뿌리혹병 발병하지 않은 토양을 0.2g씩 재어서 Nucleospin Soil Kit를 이용하여 토양 DNA를 뽑았다. 그 토양의 DNA를 가지고 ITS1를 이용해 PCR을 실시하였다.

Table 12. PCR condition used for this study(최, 2010)

Primer	Initial denature	Step cycle			Final extension
		denature	annealing	extension cycles	
ITS1	94℃/ 5min	94℃/ 30sec	65℃/ 20sec	72℃/ 20sec	35 72℃/ 5min

#### 카. RAPD를 이용한 Race간 유전적 차이비교

국내에서 뿌리혹병균(*P.brassicae*)의 유전적인 특성을 알아보려고 random primer를 이용하여 충남대학교 식물병리학 실험실내에서 보유하고 있는 여러 race에 대한 random amplified polymorphic DNA(RAPD) 분석을 실시하였다. 단포자 분리에 의해 얻어진 뿌리혹병균의 race들 간의 유전적인 차이나 특성을 DNA수준에서 알아보려고 RAPD분석을 실시하였다. 목표는 지금

까지 race판별을 위해 많은 시간과 노동력을 소비했는데 이 방법으로 간편한 race 판별이 된다면 가장 적은 노력을 사용하게 될 것이다. 따라서 20여 개의 nucleotide로 구성되어 재현성이 높고, 다양한 생물종의 분류에 이용할 수 있는 것으로 알려진 URP(Universal rice primer)를 활용하여 PCR을 실시하였다.

다양한 생물 종의 구분에 이용되고 있는 URP primer set와 Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus(ERIC) 그리고 Repetitive Extragenic Palindromic(REP) primer(Table 14)를 사용하였다. 허(2004)의 연구에서 URP-3, URP-6이 가장 용이하게 나타났으므로 URP-3, URP-6을 포함하여 5개의 primer를 이용하여 분석하였다. 그리고 OPA 또한 이전의 연구에서 이용 가능성을 보았기에 같이 분석하여 보았다. OPA primer 중 일부만을 사용하여 분석하였다(Table 13). DNA의 농도는 DNA 20ng로 맞춰 사용하였고, PCR조건은 Table 15와 같다.

Table 13. List of OPA primer sets used in this study

Primer	Sequence (5' - 3')
OPA-01	5'-CAGGCCCTTC-3'
OPA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'
OPA-03	5'-AGTCAGCCAC-3'
OPA-04	5'-AGTCAGCCAC-3'
OPA-05	5'-AGGGGTCTTG-3'
OPA-06	5'-GGTCCCTGAC-3'

Table 14. List of URP, REP, ERIC primer sets used in this study



Primer	Sequence (5' - 3')
URP1	
URP2	5'-GTGTGCGATCAGTTGCTGGG-3'
URP3	5'-CCCAGCAACTGATCGCACAC-3'
URP4	5'-AGGACTCGATAACAGGCTCC-3'
URP5	5'-GGCAAGCTGGTGGGAGGTAC-3'
URP6	5'-ATGTGTGCGATCAGTTGCTG-3'
URP7	5'-TACATCGCAAGTGACACAGG-3'
URP8	5'-AATGTGGGCAAGCTGGTGGT-3'
URP9	5'-GATGTGTTCTTGGAGCCTGT-3'
URP10	5'-GGACAAGAAGAGGATGTGGA-3'
URP11	5'-TACACGTCTCGATCTACAGG-3'
URP12	5'-AAGAGGCATTCTACCACCAC-3'
REP1R-	5' -IIICGICGICATCIGGC-3'
REP I	
REP2-I	5' -IIICGNCGNCAATCNGGC-3'
ERIC1R	5' -ATGTAAGCTCCTGGGGATTTCGC-3'
ERIC ERIC2	5' -AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'

Table 15. PCR condition used for RAPD analysis

Primer	Initial denature	Stepcycle				Final extension
		denature	annealing	extension	cycles	
URPset	94°C/4min	94°C/1min	55°C/1min	72°C/2min	35	72°C/7min
REP	94°C/5min	94°C/1min	40°C/5min	65°C/5min	35	65°C/15min
ERIC	94°C/5min	94°C/1min	52°C/5min	65°C/5min	35	65°C/15min
OPA-7	94°C/5min	94°C/1min	35°C/1min	75°C/3min	40	72°C/5min

#### 다. 뿌리혹 저장조건 분석

최적의 저장온도조건을 알아보기 위하여 지난 해에 일차적으로 다양한 온도에서 뿌리혹을 저장해 보았다. 실험에 쓰인 온도조건은  $-70^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ 로 4가지로 구분하였다. 이 결과로  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 가장 높은 저장효율을 보였고  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 장기적으로 보관하였을 때 그 발병도가 어떻게 변화하는지 실험하였다. 저장한 뿌리혹의 병원성을 확인하기 위해서 저장 후 3개월 단위로 포자를 모아 접종실험을 하였다. 병원성이 지속적으로 나타나는지에 대한 검정을 위해 7일 정도 기른 감수성 품종인 춘정 유묘에 현탁액 접종하여  $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 의 온실에서 8주간 키운 후 혹의 형성 유무를 통해 병원성 지속여부를 확인하였다.

#### 파. 뿌리혹병의 실내 검정을 위한 조직배양

뿌리혹병원균의 race 동정은 시간이 오래 걸린다는 단점이 있다. 이러한 점을 개선하기 위해 배추를 직접 조직배양하여 접종함으로써 실험기간을 단축시키고자 본 실험을 진행하였다.

배추 종자를 plant media에서 발아시키고 발아된 유묘의 줄기를 잘라 MS 3% Sucrose 1D배지에서 배양하여 켈러스의 생성 유무를 확인하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 국내주요 배추 재배지역의 race 판별 및 레이스 분포지도

연구 첫해인 2014년도에는 일차적으로 국내에서 배추 뿌리혹병 발생이 가장 심한 지역으로 알려진 충남 아산지역, 청양, 서산, 대전광역시 유성구, 강원도 평창지역의 포장에서 채집한 배추뿌리혹들로부터 단포자 분리 접종한 다음 Williams 판별품종에 재접종하여 그 race를 동정하였다.

연구가 시작된 기간이 짧아 현재 그 분석이 진행 중에 있지만 아산 배방지역에서 채집한 혹 B1내에 존재하는 일부의 race는 병원성 강약에 따라 동정이 되었다. B1혹내에 존재하는 병원균은 실험에 사용된 대부분의 품종에 약한 병원성을 지녔지만 현재까지 동정된 race는 강병원성을 지닌 race가 대부분이었다. 본 실험에서 race 4와 race 11이 동시에 B1혹내에 동시에 중복하여 존재하고 있음을 확인하였다.

이전 장(2006)의 연구에서는 배추를 많이 키우는 우리나라의 특성상 대부분 Cabbage 계통에서 발병하는 race 1, 4, 9, 11이 주로 밝혀졌는데 현재까지의 결과(Table 16, Fig. 11)로 보아 장(2006)의 연구와 일치하는 것으로 보인다.

실험이 계속되는 특성상 금년에 계속해서 모든 race 동정이 밝혀지고 나면 각 지역의 우점하고 있는 race와 지역 간, 그리고 포장사이에 다른 race가 존재하는지에 대한 더 많은 정보를 얻을 수 있게 될 것이다.

한편 이전 양(2012)의 연구처럼 서로 다른 race간의 혼재로 인해 새로운 race가 생성될 수도 있는 가능성이 있고 새로이 육종된 배추·무 품종의 재배로 인해 Rutabaga 계통에도 침입가능한 병원균이 있을 수도 있어 지속적으로 연구 분석할 필요가 있다고 본다.

또한 추후 연구를 통해 우리나라 자체 실정에 맞는 특정한 품종으로 그 판별체계를 만들어 race를 판별함으로써 정확한 race와 병원성의 차이를 확인할 필요성도 있다.

그러나 이 연구에서 얻어졌거나 분리되고 있는 race들 외에 현재 충남대학교 식물병리학 실험실에서 단포자 분리를 통해 얻어진 순수 race들은 9개에 달하며 이는 Table 19과 같다. 이들은 2015년에 뿌리혹의 대량 증식 후 각 종자 회사에 손쉬운 병원성 검정을 위해 분양되어질

예정이다.









Differential variety Race and reaction	Jersey Queen (WCD1)	Badger Shipper (WCD2)	Laurentian (WCD3)	Wilhelmsburger (WCD4)
Race 4				
Reaction	+	+	+	+
Race 11				
Reaction	-	+	+	+

Fig. 11. Race 4, race 11 were classified by Williams' differential set.

+ : susceptible reaction, - : resistant reaction

Table 16. Many races of *P. brassicae* identified from identical gall collected in the field of Asan(B1, B2), Pyeongchang(D2) area

Race Isolate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Total
B1				10					1		3						14
B2	2			3					1		5						11
D2	1			5					1		2						9

2015년도에는 국내에서 배추 뿌리혹병 발생이 심한 지역인 강원 평창, 충남 배방지역의 포장에서 채집한 배추뿌리혹으로부터 추가로 단포자집중한 균주를 WCD(Williams' Clubroot Differential Set)에 재집중하여 race 판별표(Table 1)를 이용하여 race를 동정하였다.

충남에서 뿌리혹병의 피해가 가장 심하고 뿌리혹병균의 병원성이 가장 강한 것으로 알려진 배방지역의 2개의 포장에서 race 1이 2균주, race 4가 13균주, race 9이 2균주 race 11가 8균주 4개의 race가 판별되어 배방 지역의 두 포장의 경우 race 1이 있고 없고의 차이가 있는 것을 확인할 수 있었다. D2병원균 또한 race 1, race 4, race 9, race 11 4개의 race가 판별되었다. 경기도에서 가장 먼저 채집된 연천지역의 race를 판별하였는데 아산, 평창의 race와는 다른 분포를 나타내었다. 다른 두 지역에서는 판별되지 않았던 race 5, race 8, race 16이 판별되었고 특히 race 9의 우점이 특징적이었다(Table 17).

각 지역별로 다른 race 분포를 가지고 지역 내에서도 다른 포장의 race를 가지기 때문에 수집지역 뿌리혹병균 race 분포지도를 그릴 수 있다. 또한 각 지역 race 분석과 시판 품종에 대한 저항성 검정 결과를 토대로 시판되고 있는 품종 또는 육종되고 있는 품종에 저항성 품종을 선발하고 농가와 연구기관 등에 도움을 줄 수 있다.

Table 17. Number of *P. brassicae* races obtained from major kimchi cabbage growing areas

Isolate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Total
Asan B1				10					1		3						14
B2	2			3					1		5						11
Pyeongchang D																	
1																	
D2	1			5					1		2						9
Yeonchun					5			5	29							4	43

2016년도 과제에는 국내에서 배추 뿌리혹병 발생이 심한 지역인 강원도 평창, 정선, 영월, 홍천 춘천, 철원과 경기도 연천, 포천, 동두천, 가평, 여주, 화성, 평택 포장에서 채집한 배추뿌리혹으로부터 추가로 단포자접종한 균주를 WCD(Williams' Clubroot Differential Set)에 재접종하여 race 판별표(Table 1)를 이용하여 race를 동정하였다.

그 결과 다양한 race들이 동정되었으며(Table 18), 각 지역별로 다른 race 분포를 가지고 지역 내에서도 포장마다 다른 race 분포를 보였다(Fig. 12, 13). 이러한 뿌리혹병 race 분포지도를 제작함으로써 인해서 시판되고 있는 품종 또는 육종되고 있는 품종에 저항성 품종을 선발하고 농가와 연구기관 등에 도움을 줄 수 있다.

Table 18. Number of *P. brassicae* races obtained from major kimchi cabbage growing areas

Isolate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Total
연천				4	2				2								8
포천				3	1				2								6
경 동두천									3								3
기 가평				3	1			1	2								7
도 여주								2	4								6
화성	3								2								5
평택	3			3					1								7
철원				5					4								9
강 춘천				4				1	2								7
원 홍천				3				2									5
도 평창	3			2					2		2						9
정선				1				1			2						4
영월				2				1			1						4

Table 19. *P. brassicae* races were possessed in Plant Pathology lab of Chungnam National University

race	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Total race
	○		○	○	○			○	○		○		○	○		○	10

위의 결과를 토대로 국내에서 배추 주산단지인 강원도를 비롯한 경기도와 충남을 중심으로 race의 분포지도를 작성한 결과, race 1, 4, 9, 11 등 병원성이 비교적 강하고 판별품종 3~4개를 감염시킬 수 있는 race가 우점적으로 존재하는 것이 밝혀졌다(Fig. 12, 13). 그러나 그 특징은 순무계열에 속하는 Laurentian, Wilhelmsburger 등 판별품종에 발병하는 race가 대부분이었으며 양배추 계열에 감염하는 race는 상대적으로 적었다. 이 계통 race는 예비실험에서도 배추, 무, 순무 등을 주로 침해하는 반면 양배추 등에는 발병하지 못하거나 약한 병원성을 보였

는데 이는 배추와 무를 오랜 세월동안 재배해 온 우리나라의 재배특성과도 연관이 있는 것으로 판단된다.

강원도에서 채집하여 race를 재분류한 뿌리는 충남대학교 응용생물학과 식물병리학실험실에 보관중에 있다(Fig. 14).



Fig. 12. Distribution map of *Plasmodiophora brassicae* race according to regions in Korea.

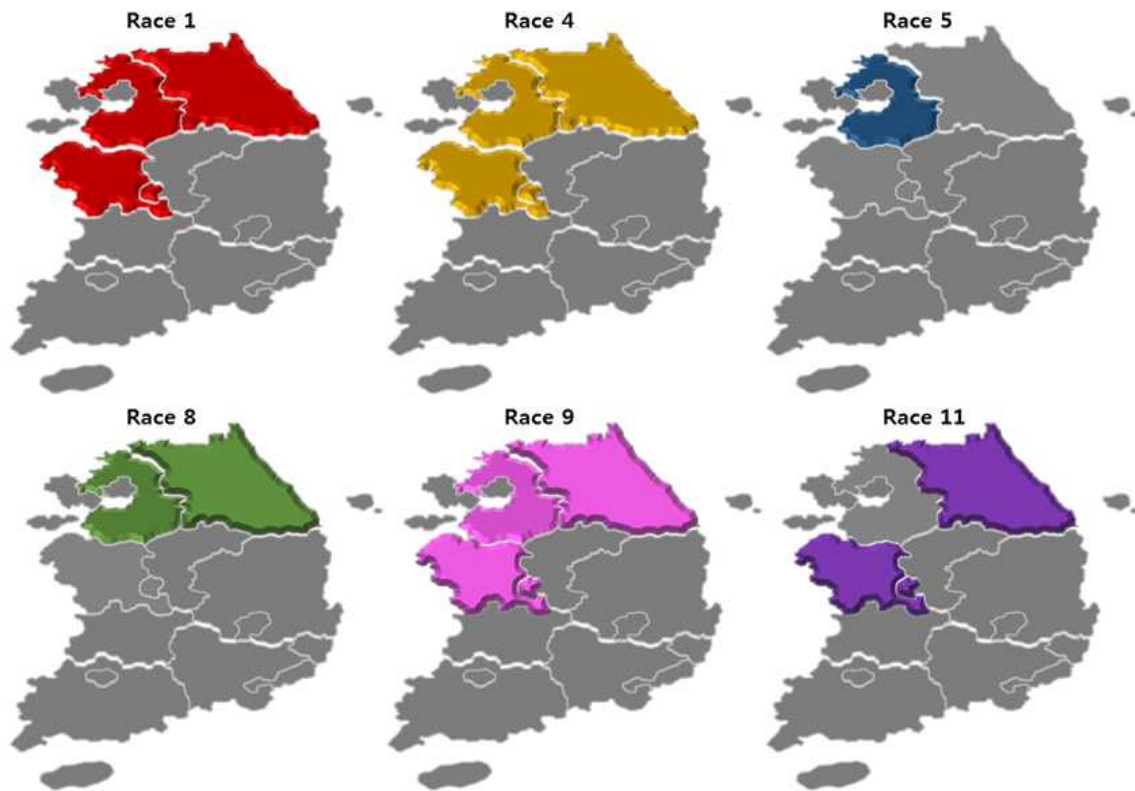


Fig. 13. Regional distribution map of *Plasmodiophora brassicae* race in Korea.

	Race 1	Race 4	Race 5	Race 8	Race 9	Race 11
1	화성(HS-3)	포천(PO-2)	연천(YC-8)	가평(GP-10)	동두천(DD-9)	평창(PY-3)
2	화성(HS-3)	포천(PO-2)	연천(YC-8)	여주(YJ-5)	동두천(DD-9)	평창(PY-3)
3	화성(HS-3)	가평(GP-7)	포천(PO-6)	춘천(CC-2)	연천(YC-2)	정선(JS-2)
4	평택(PT-4)	가평(GP-7)	포천(PO-6)	춘천(CC-2)	연천(YC-2)	정선(JS-2)
5	평택(PT-4)	철원(CW-9)	가평(GP-4)	홍천(HC-4)	화성(HS-10)	영월(YW-7)
6	평택(PT-4)	홍천(HC-10)	가평(GP-4)	홍천(HC-4)	화성(HS-10)	영월(YW-7)
7	평창(PY-6)	정선(JS-5)		정선(JS-1)	철원(CW-5)	
8	평창(PY-6)	정선(JS-5)		정선(JS-1)	철원(CW-5)	
9	평창(PY-6)	영월(YW-1)		영월(YW-8)	평창(PY-1)	
10	평창(PY-6)	영월(YW-1)		영월(YW-8)	평창(PY-1)	

Fig. 14. *P. brassicae* races were possessed in Plant Pathology lab of Chungnam National University

나. 발병도 기준

다수의 표본을 대상으로 비교 분석한 결과 배추에서는 여섯단계로 구분이 가능하였으며(Table 7, Fig. 15), 배추보다는 상대적으로 덜 민감한 무에서는 세단계로 구분이 가능하였다(Table 8, Fig. 16) 이 자료들은 병징을 특징적인 부분만 세분화하여 구분하기 쉽도록 만들었다.

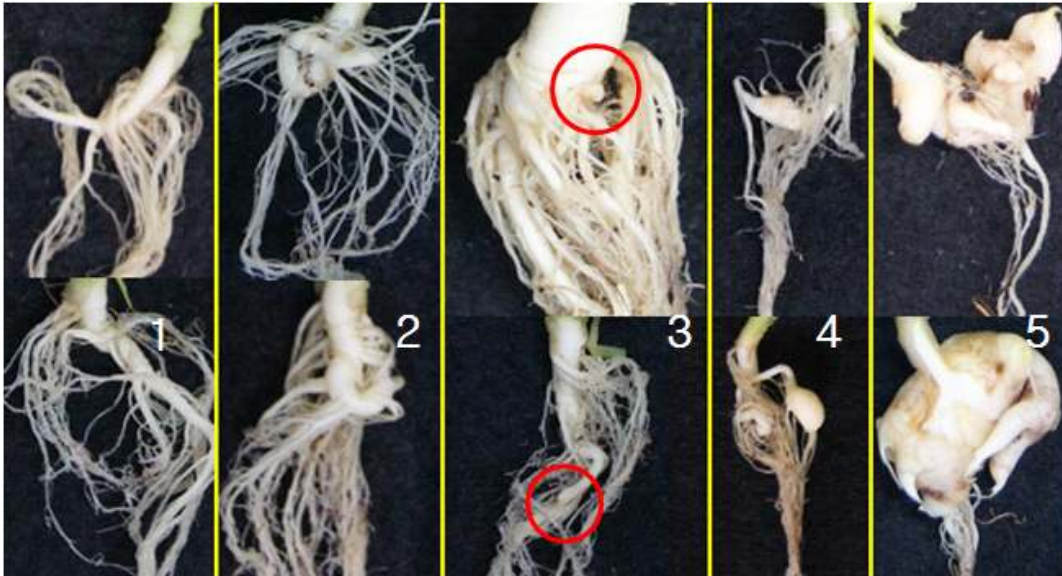


Fig. 15. Symptoms of kimchi cabbage clubroots classified by disease severity grades.



Fig. 16. Symptoms of radish clubroots classified by disease severity grades.

#### 다. 시판 배추·무품종의 뿌리혹병 포장균주에 대한 저항성 검정

2014년도 국내에 많은 배추, 무품종이 있는데 그중에는 탐스런배추와 휘파람골드, 불암플러스, CR맛배추와 같이 뿌리혹병에 저항성을 가진 품종으로 시판되고 있다.

품종에 대한 저항성 뿌리혹병의 지역 간 포장간의 병원성의 차이를 알아보기 위하여 우선 8개의 품종과 4개의 병원균을 가지고 실험하였다. 이후 3개의 품종이 추가되었다. 각 품종별로 10



개체씩 과중하여 병원균을 접종하였다(Table 20). 각 종자는 정확한 실험을 위하여 종자표면에 처리되어있는 종자소독제를 표면소독액(NaOCl 1%)로 씻어내어 과중하였다. 4개의 병원균은 오염을 피하기 위해 간격을 넓게 두고 실험을 진행하였다. 배추는 25±5℃에서 약 8주간 재배되었다.

대표적인 감수성 품종으로 알려진 춘정이 가장 많은 발병율을 보일 것이라 예상하였으나, 그보다 불암플러스와 가을맛배추가 더 높은 발병율을 보였다. 불암플러스가 뿌리혹병 저항성 품종으로 시판되는 품종인데, 처음 시판될 때와 달리 국내 병원균의 변이가 생기고 저항성 품종에 대항할 수 있어졌기 때문에 저항성 품종을 육성을 최소 4~5년에 한 번은 검정을 해보아야한다. 그리고 CR맛배추는 대표적인 저항성 품종으로 B2 병원균을 제외한

D1, D2, B1 병원균에 대해 발병율이 가장 낮았다. 아주 특이한 점은 아산 2(B2)병원균은 모든 배추품종에 뿌리혹을 만들고 그 크기 또한 매우 컸다. 저항성이라 알려진 CR맛 배추도 아산 2(B2)병원균에서 거의 90%에 달하는 발병율을 보였다(Fig. 17-20).

현재까지 이 결과로 보아 B2병원균이 거의 모든 품종에 병을 일으키는 것으로 보아(Fig. 20) 뿌리혹병에 대한 저항성품종을 육성하거나 병저항성 검정을 할 때 실험병원균으로 적절할 것으로 예상된다. 그리고 국내 주요 배추재배지역의 뿌리혹을 지속적으로 채집해서 다양한 병원성을 가진 균을 확보해야 하고, 국내 배추, 무품종들을 저항성 검정실험 또한 꾸준히 실험해야 한다.

Table 20. Kimchi cabbage cultivars were inoculated using galls from Asan and Pyeongchang area.

	Cabbage cultivar	D1	D2	B1	B2
1	CRMatt	+	+	-	++++
2	BulamNo.3	+++	++	-	++++
3	Gaulmatt	++++	-	+++	++++
4	Chungwang	++	+++	-	++++
5	Tamsrun	+++	++	-	++++
6	Chunjeong	++	+	++	++++
7	Alchandeul	++	++	+	++++
8	Bulamplus	+++	+	+++	++++
9	Huiparamgold		+		++++
10	Hwangbok		++		++++
	Norangbom		+		++++

-; 0, +; 1 - 2, ++; 3 - 5 +++; 6 - 8, ++++; 9 - 10 galls were formed among 10 samples

위의 검정 결과로 보아 시판 배추 품종 간에는 저항성에 커다란 차이가 있음을 알 수 있고 특히 균주에 따라 병원성에 엄청난 차이가 나타남으로써 배추의 안정적인 다수확을 위해서는 주요 race분포지도의 작성이 반드시 필요하다고 생각되어 추후 좀 더 연구가 진척된다면 그 결과를 토대로 하여 연구자 및 종자회사와 농민들을 위해 race 분포지도 작성 연구도 병행하여 실시할 예정이다.



Fig. 17. Clubroot symptoms on cv. CRmatt (A), Gaulmatt (B) of Kimchi cabbage inoculated by D1 isolate.



Fig. 18. Symptoms on cv. Bulam plus (A), Gaulmatt (B) of Kimchi cabbage inoculated by D2 isolate.

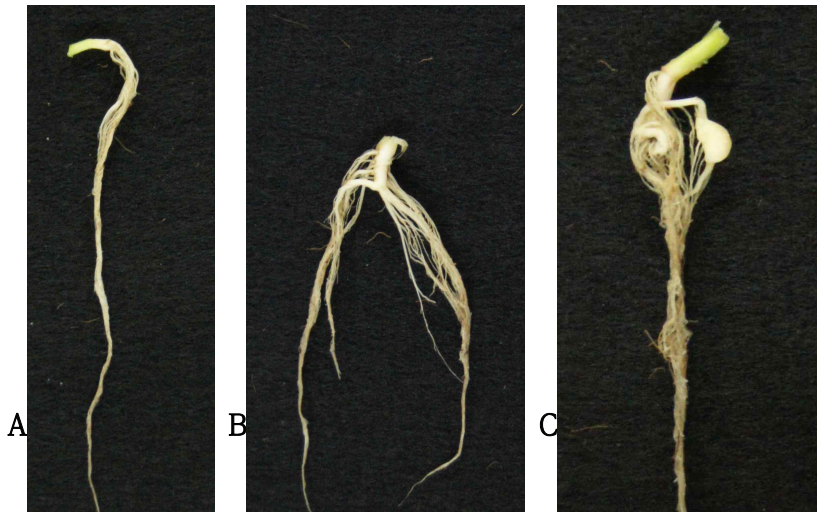


Fig. 19. Clubroot symptoms on cv. CRmatt (A), Bulam plus (B), Gaulmatt (C) of Kimchi cabbage inoculated by B1 isolate.



Fig. 20. Inoculated with asan 2(B2) isolate cv. CRmatt, Huangboc, Norangbom, Tamsrun.

무는 뿌리부분을 먹는 채소로 배추의 지상부를 먹는 것과는 다르다. 그렇기 때문에 두 작물 모두 지상부가 시들해지기는 하지만 특징적인 뿌리혹병의 병징인 뿌리가 비대해지고 커지는 부분에서 병징과 구분하기 어렵다. 그러나 무 이번실험에서 무뿌리혹병으로 무의 뿌리가 분지 되어서 상품성이 떨어지고 흙이 두드러지게 나타나는 그 병징이 확실히 나타나는 증상을 grade 를 설정하고 이번 실험을 진행하였다. 무종자 또한 파종할 때 종자표면에 처리되어있는 종자소 독제를 제거하고 파종하였다. 무는  $25 \pm 5^\circ\text{C}$  에서 약 8주간 재배되었다.

아래의 발병도 그래프를 보면 국보무와 멧진맛깎무는 B2병원균에 대해 저항성 품종으로 확인 되었다. 그러나 멧진맛깎무는 D2병원균에는 감수성을 보여 다른 품종들과는 다른 양상을 띄고 있다(Fig. 21). 서동무, 금봉무는 B2 병원균에 매우 약한 감수성인 것으로 보여진다(Fig. 22). 금봉무의 특이한 점은 D2병원균에 다른 품종들은 최소 10%이상 발병하였는데 금봉무는 전혀 발병하지 않았다는 점이다. 나중에 추가된 배추와 무품종은 4가지의 병원균 모두에 적용해 비교해 볼 것이다. 이렇게 4가지의 병원균, 7가지의 품종을 가지고 실험하였을 때 그 병원균의 병

원성과 각 품종의 저항성이 각기 다르다는 것은 흥미로운 연구결과이다. 이 연구를 기초로 하여 더 나아가 또 다른 특성을 지니는지 알아보아야한다.

금년에는 이들 각각 배추와 무 11개, 7개의 품종 외에 최근에 얻은 정보를 활용하여 최근 시판이 시작된 뿌리혹병 저항성 품종들을 추가하여 분석할 예정이기 때문에 앞으로는 더 폭넓고 유용한 정보를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

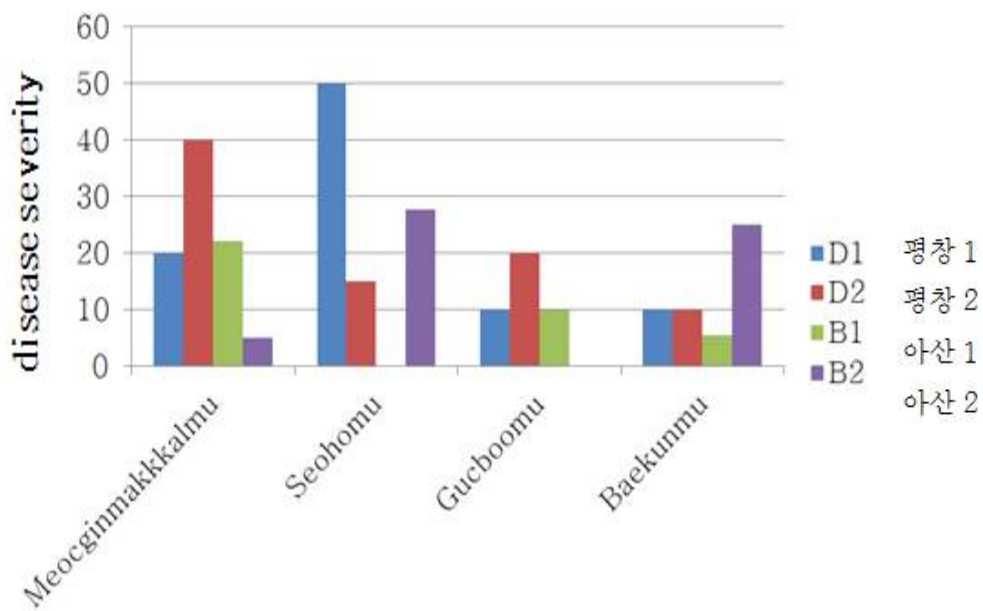


Fig. 21. Disease severity by D1, D2, B1, B2 isolates on each four radish cultivar cultivated in greenhouse.

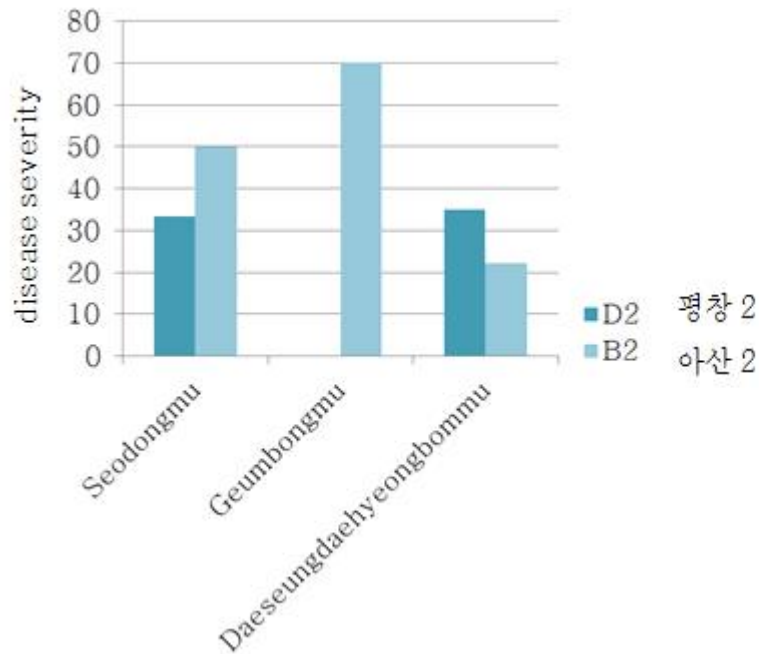


Fig. 22. Disease severity of D2, B2 isolate on three radish cultivars, Seodongmu, Geumbongmu, Daeseungdaehyeongbommu cultivated in greenhouse.

2015년도 실험에 사용된 배추 뿌리혹병 발생이 심한 주요 지역인 충남 아산(B), 강원 평창(D) 지역의 포장병원균 B1, B2, D1, D2를 이용하여 11개의 국내에서 시판되는 배추품종에 대한 병원성 분석을 10개체씩 2반복으로 실험하였으며 접종 8주 후 발병도를 측정하였다. 실험에 사용된 배추 품종 중 탐스런배추와 휘파람골드, 불암플러스, CR맛 배추 등은 뿌리혹병에 저항성을 가진 품종으로 시판되고 있는데, 배추 뿌리혹병 저항성은 *Crr1*, *Crr2*, *Crr3* 유전자를 지닌 것으로 추정되는 일본 품종 ‘CR Shiniki(Takii Seed Company, Kyoto)으로부터 유래되었다. 이러한 품종들을 뿌리혹병균의 병원성 분석과 식물의 저항성 반응 여부를 확인할 수 있다고 판단하여 사용하였다.(Fig. 26-39).

그 결과 4개의 서로 다른 포장에서 얻어진 병원균에서는 품종별로 다른 양상의 발병도를 나타내었고 그 중에서 B2병원균이 모든 품종에 뿌리혹을 발생시켜 품종저항성이 사라진 것을 알 수 있었다.

B2병원균은 시험한 11개의 배추품종에 모두 높은 발병도를 보이고 다른 3개의 병원균은 40%를 밑도는 낮은 발병도를 보여주고 있다. 뿌리혹병 저항성 품종이라고 알려진 탐스런 배추, 휘파람골드, 불암플러스 그리고 CR맛 배추에서 B2병원균의 발병도는 약간씩 차이가 있지만 모두 이병지수 4, 5의 큰 혹이 생성되었으나(Fig. 23A) 타 연구기관에서 저항성품종이라고 했던 품종인 김금3호대백채와 천하장군 두 개의 품종은 Fig. 23B에서처럼 뿌리혹이 거의 생성되지 않은 모습을 가졌고 이를 보아 B2병원균에 강한 저항성을 가지고 있음을 확인하였다.

D1포장 병원균의 경우에 보면 일부 Fig. 21A과 같이 일부의 뿌리에서 혹을 생성시켰으나, 전반적으로 Fig. 24B에서처럼 대부분의 품종에 저항성반응이 있다. 전반적으로 저항성 반응이 있

기 때문에 이 병원균으로 시판 배추품종에 저항성분석에 이용하기에는 어려움이 있어보인다.

D2과 B1포장 병원균의 경우에는 많은 품종에서 Fig. 25과 같은 병징을 보여 주고 있다. 이는 뿌리의 꼬임 증상과 아주 작은 혹을 생성시키기는 하나 B2포장 병원균만큼 영향력이 있지는 않았다. B2병원균 접종 처리구에서 보면 거의 아주 낮은 발병도를 보여주고 있다. 오히려 D1병원균이 상대적으로 높은 발병도를 나타내고 있다. 이것으로 보아 B2병원균은 배추품종의 감수성 저항성을 분석하는데 유용한 병원균으로 보인다.

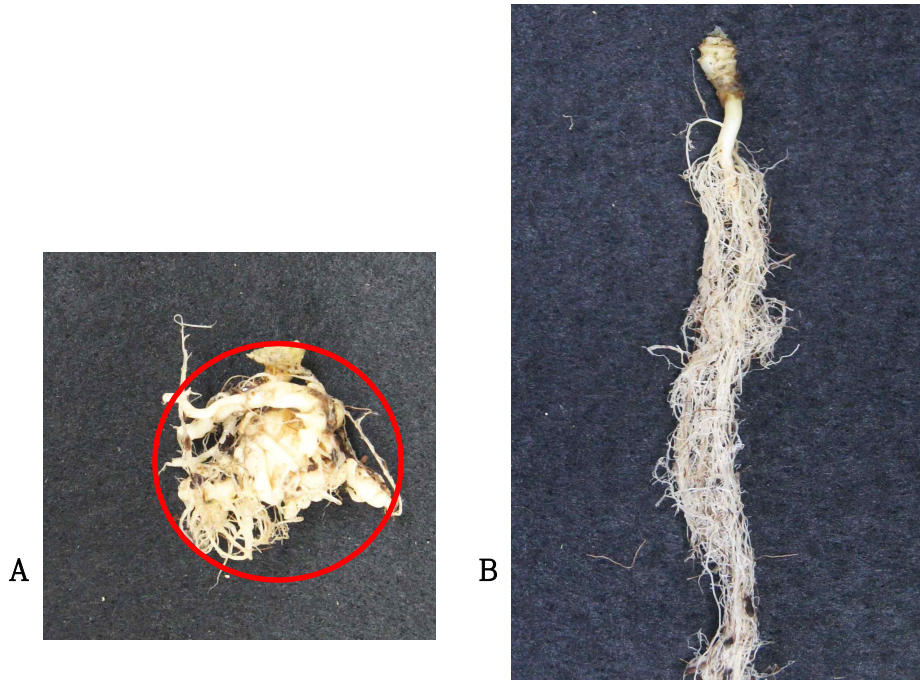


Fig. 23. Symptoms caused by B2 isolate on cv. Gaulmat(A), Gimgeum No.3 daebaekchae(B)

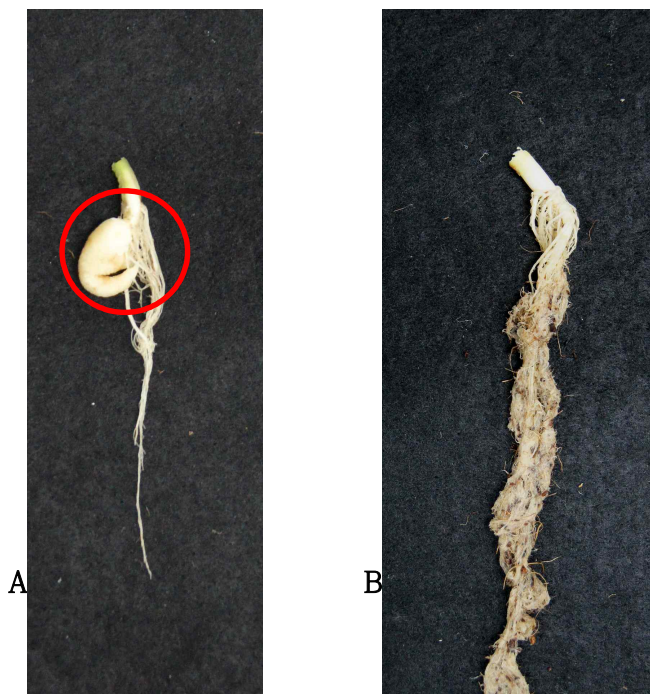


Fig. 24. Symptoms caused by D1 isolate on cv. BulamNo.3 (A), Chunjeong (B)



Fig. 25. Symptoms caused by B1(A), D2(B) isolate on cv. Bulamplus.

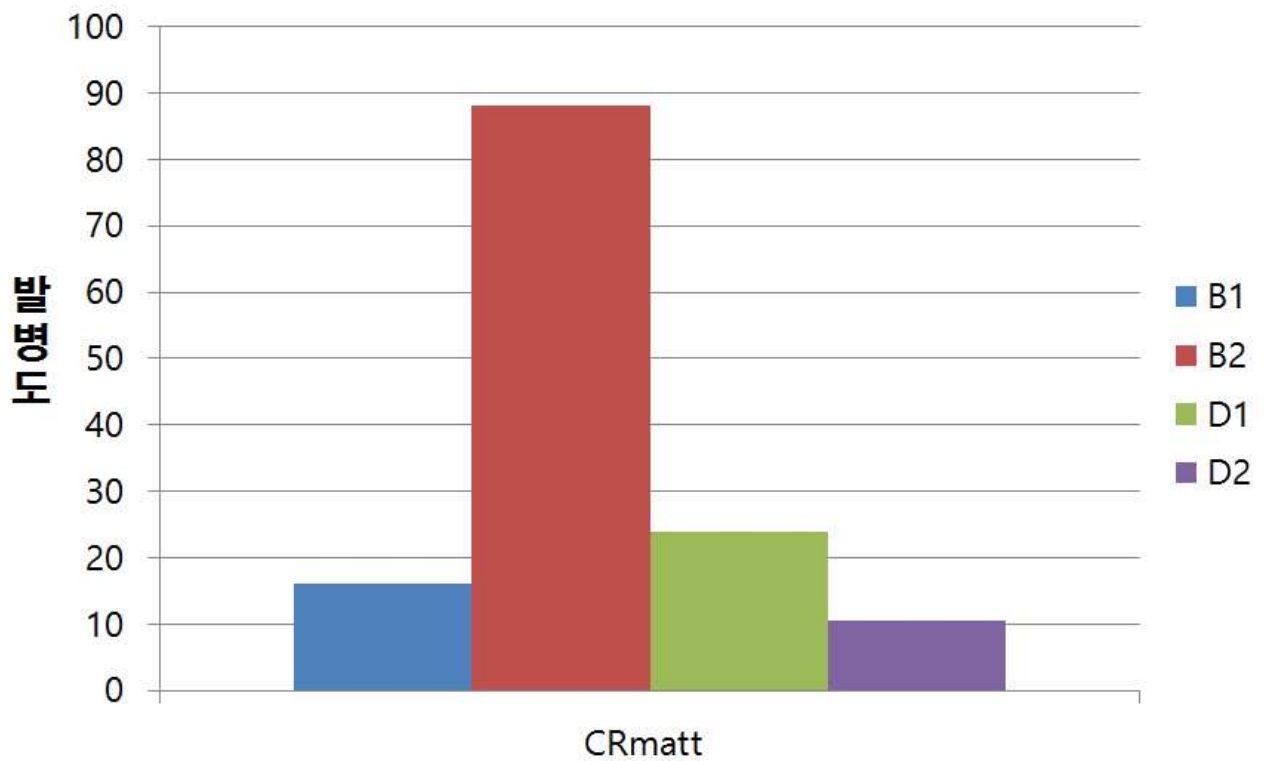


Fig. 26. Disease severity by D1, D2, B1, B2 isolates on CRmatt cultivated in greenhouse.

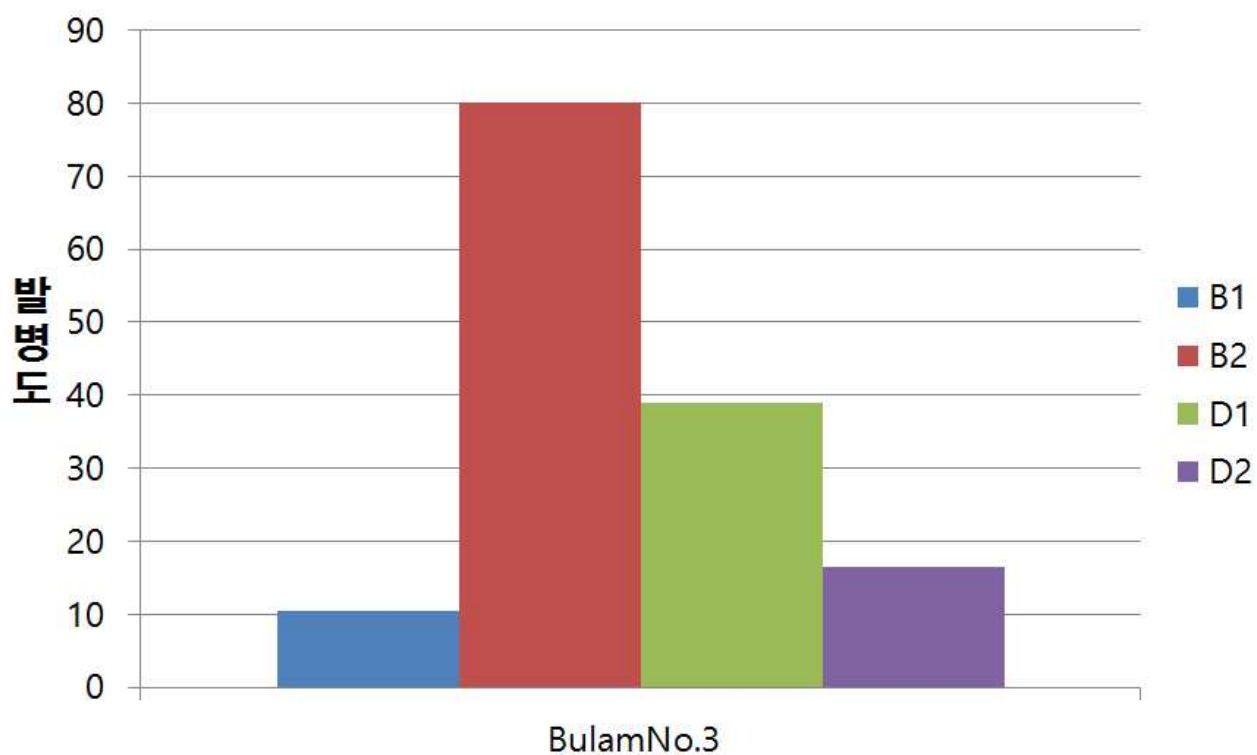


Fig. 27. Disease severity by D1, D2, B1, B2 isolates on BulamNo.3 cultivated in greenhouse.

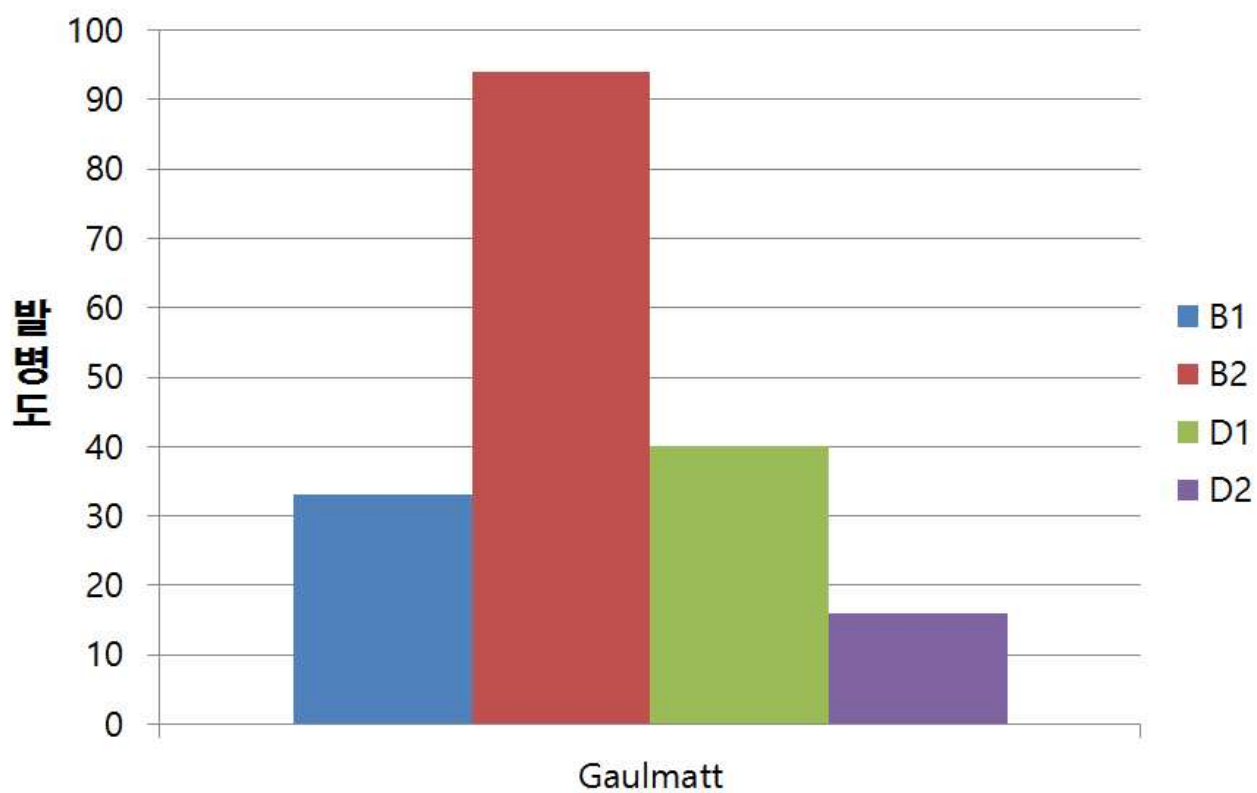


Fig. 28. Disease severity by D1, D2, B1, B2 isolates on Gaulmatt cultivated in greenhouse.



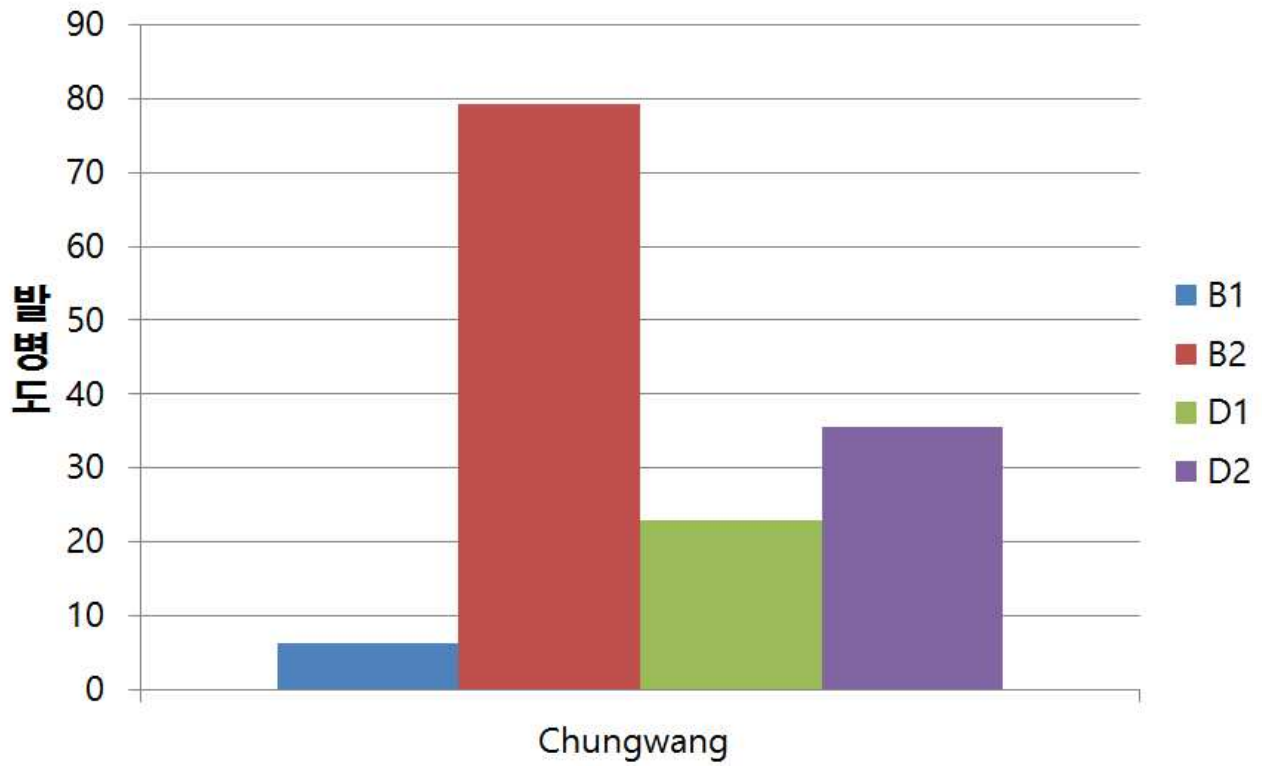


Fig. 29. Disease severity by D1, D2, B1, B2 isolates on Chungwang cultivated in greenhouse.

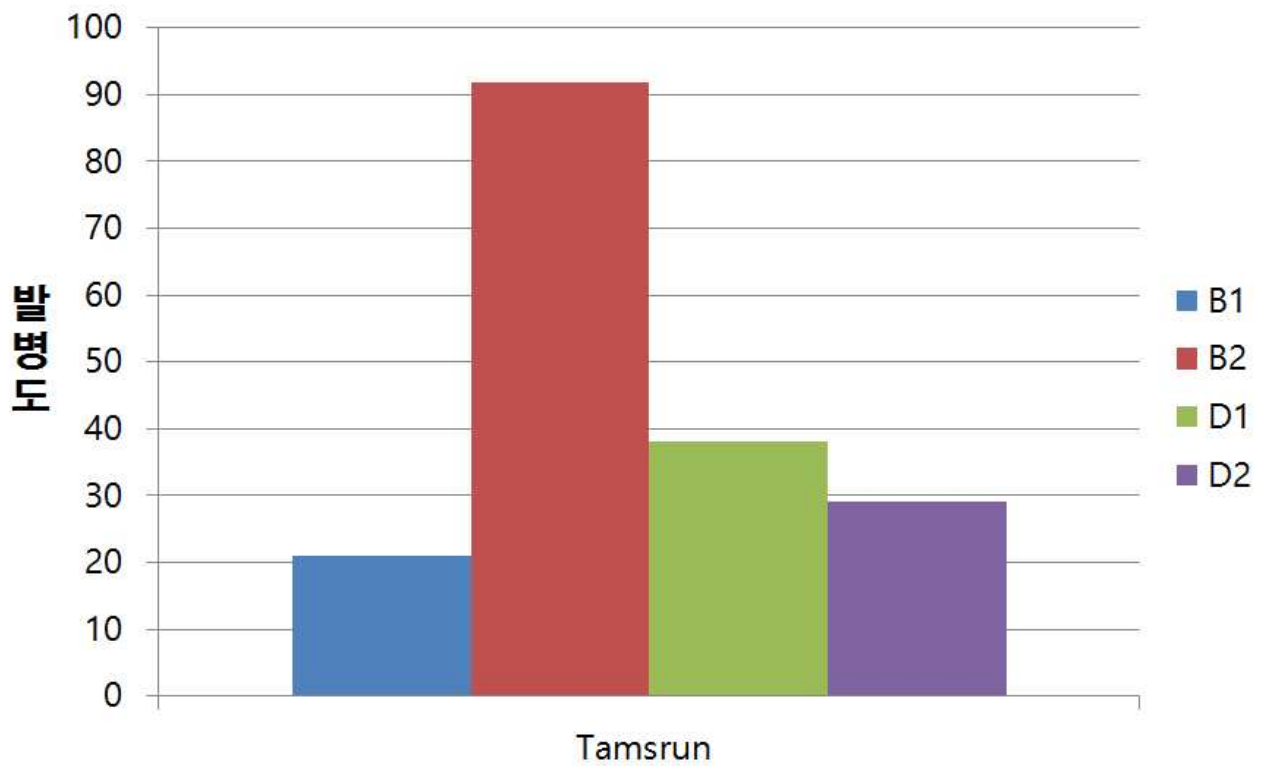


Fig. 30. Disease severity by D1, D2, B1, B2 isolates on Tamsrun cultivated in greenhouse.

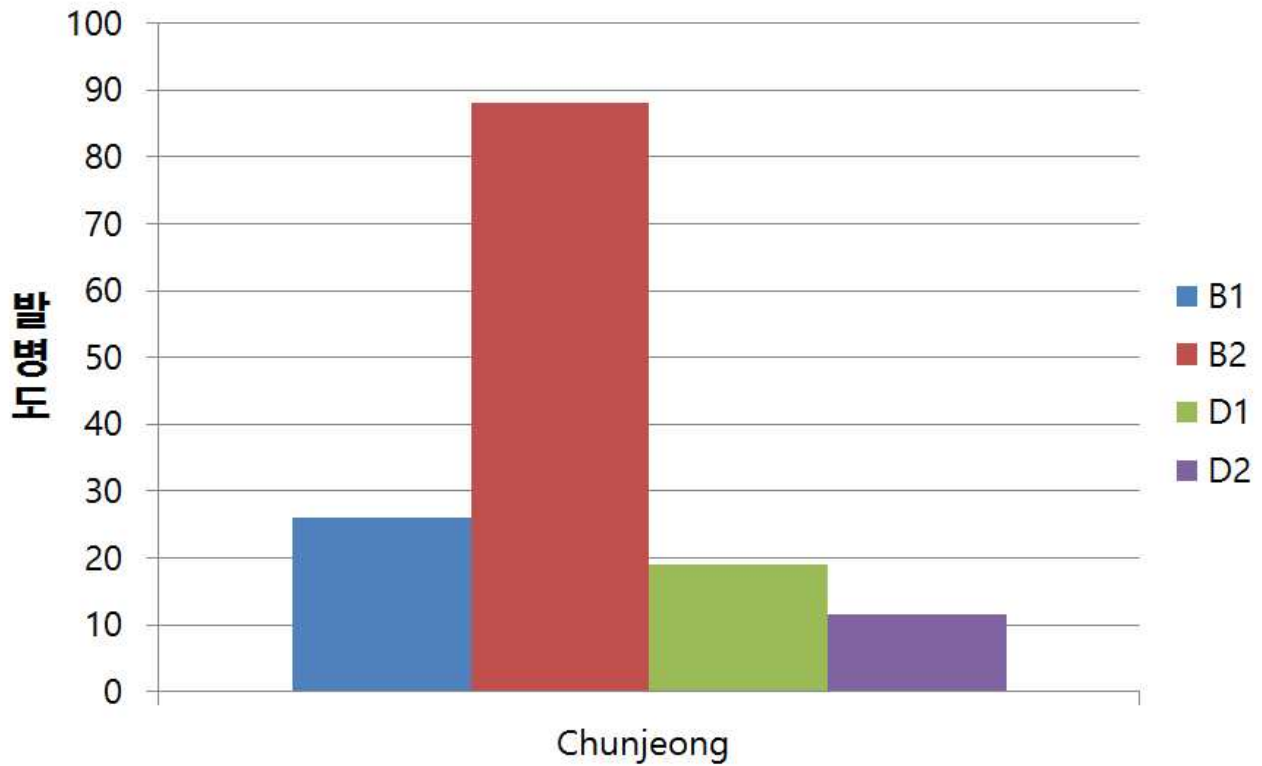


Fig. 31. Disease severity by D1, D2, B1, B2 isolates on Chunjeong cultivated in greenhouse.

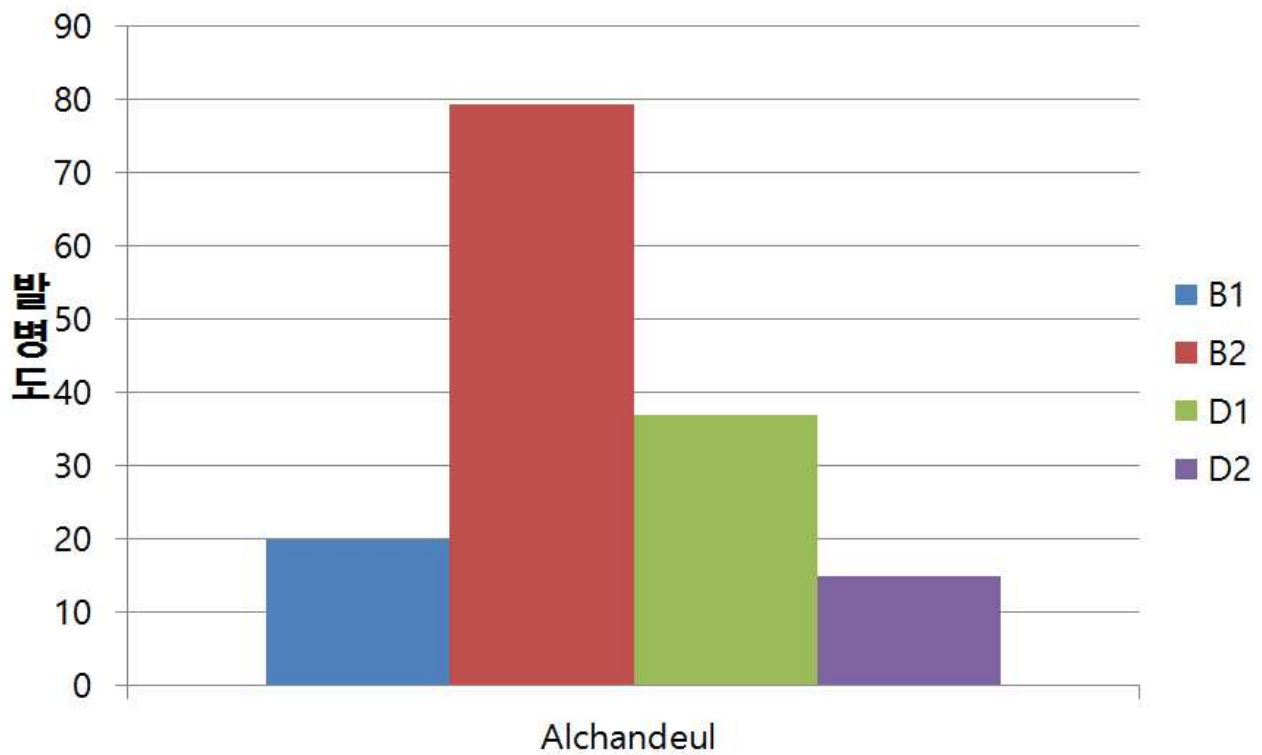


Fig. 32. Disease severity by D1, D2, B1, B2 isolates on Alchandeul cultivated in greenhouse.

Fig. 33. Disease severity by D1, D2, B1, B2 isolates on Huiparamgold cultivated in greenhouse.

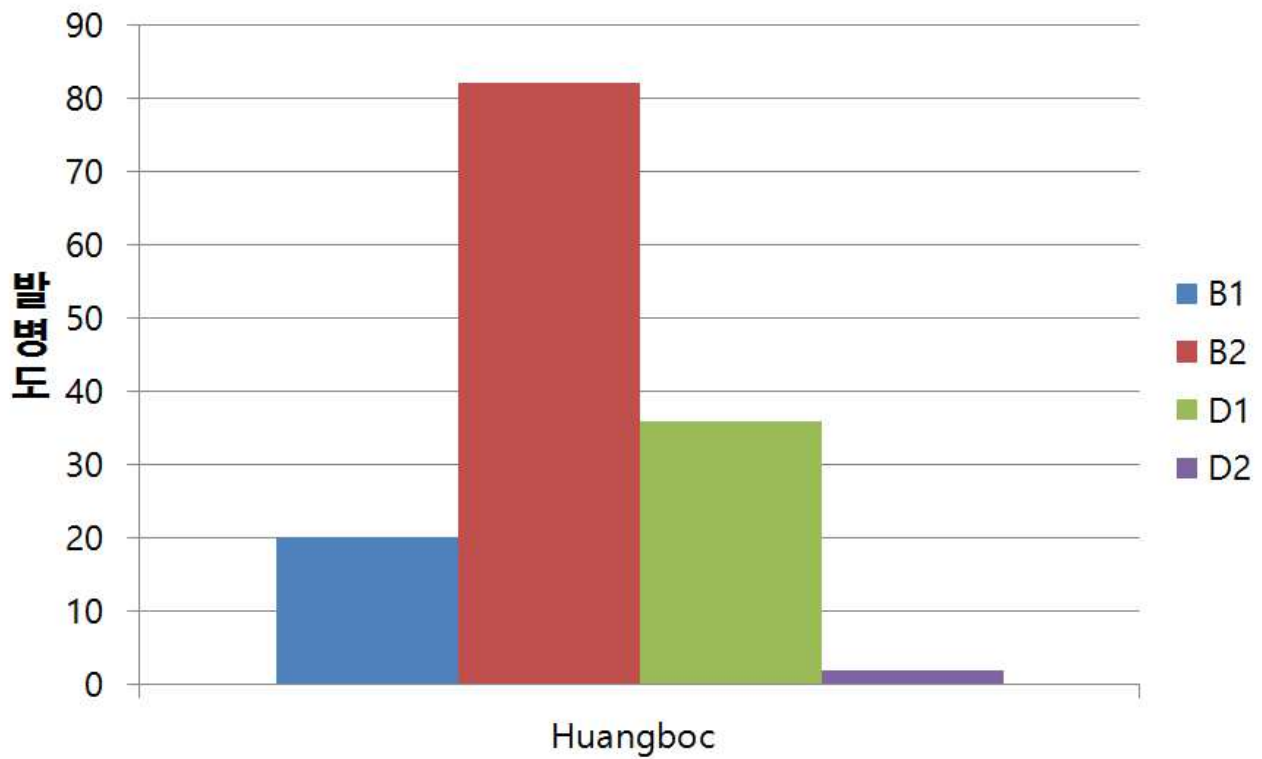
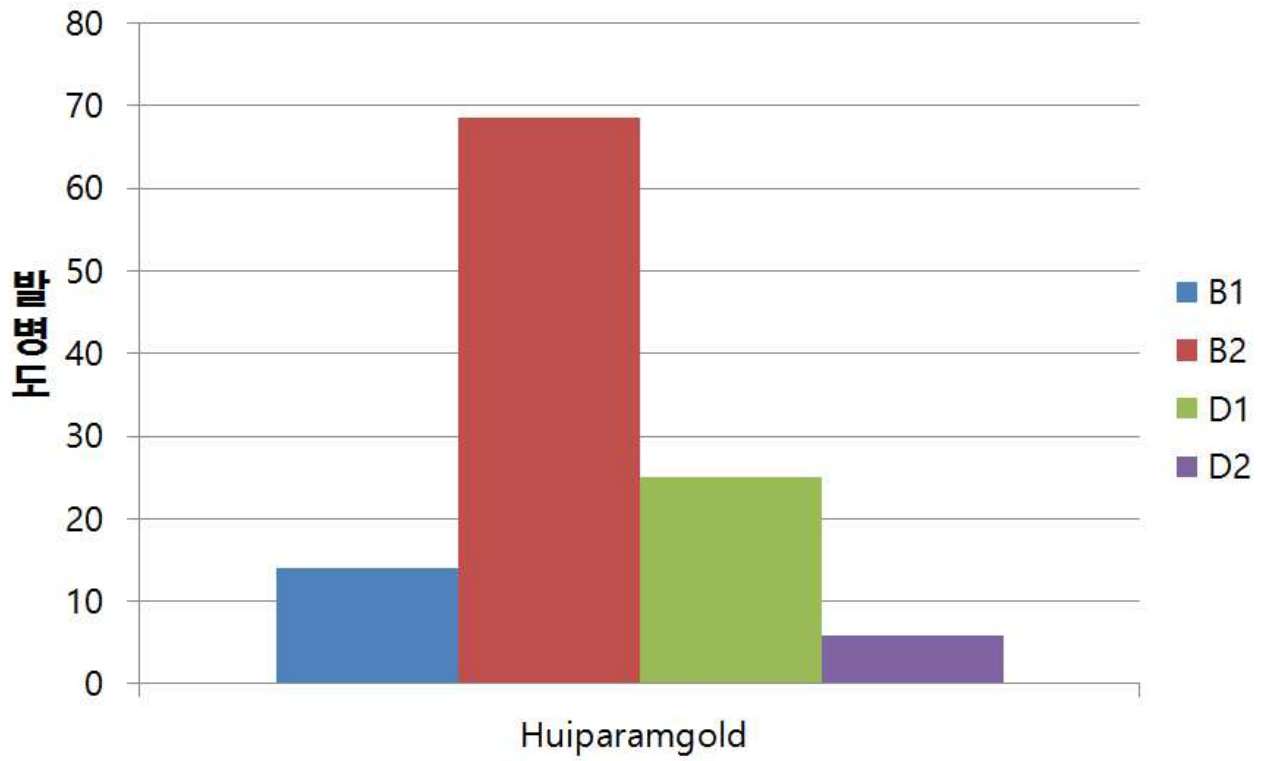


Fig. 34. Disease severity by D1, D2, B1, B2 isolates on Huangboc cultivated in greenhouse.

Fig. 35. Disease severity by D1, D2, B1, B2 isolates on Norangbom cultivated in greenhouse.

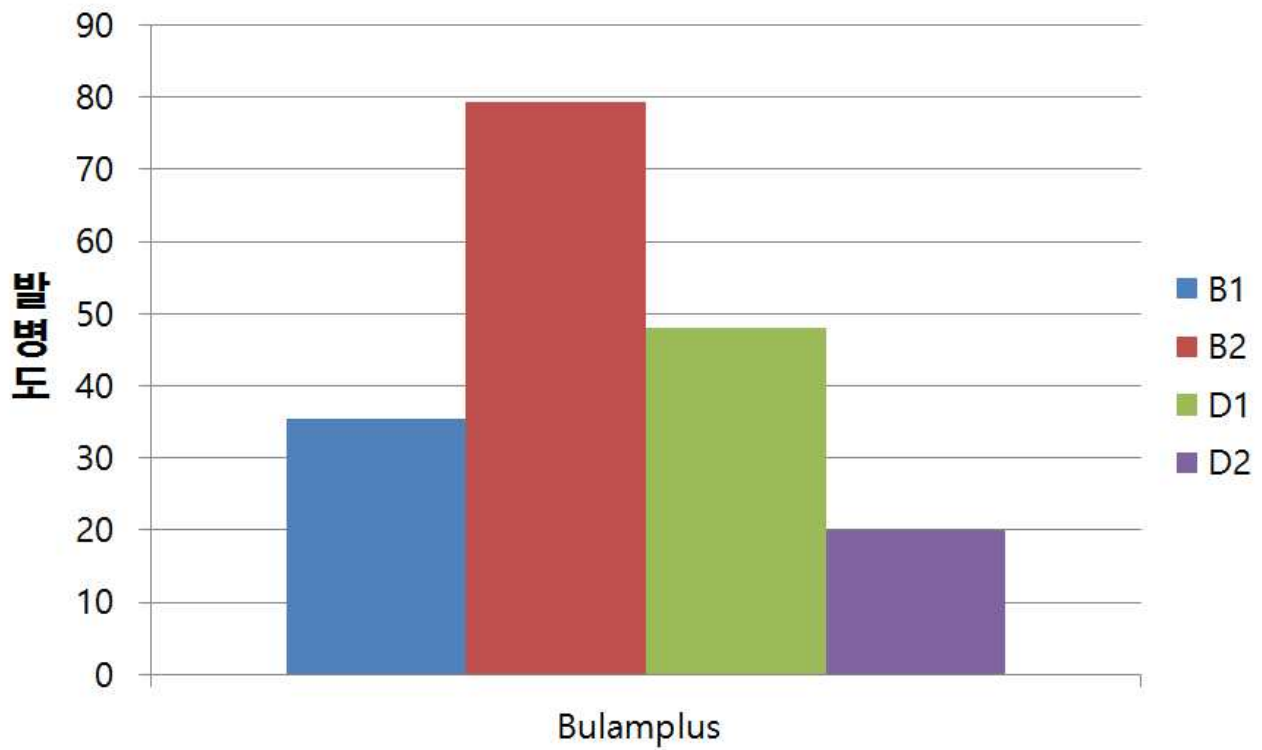
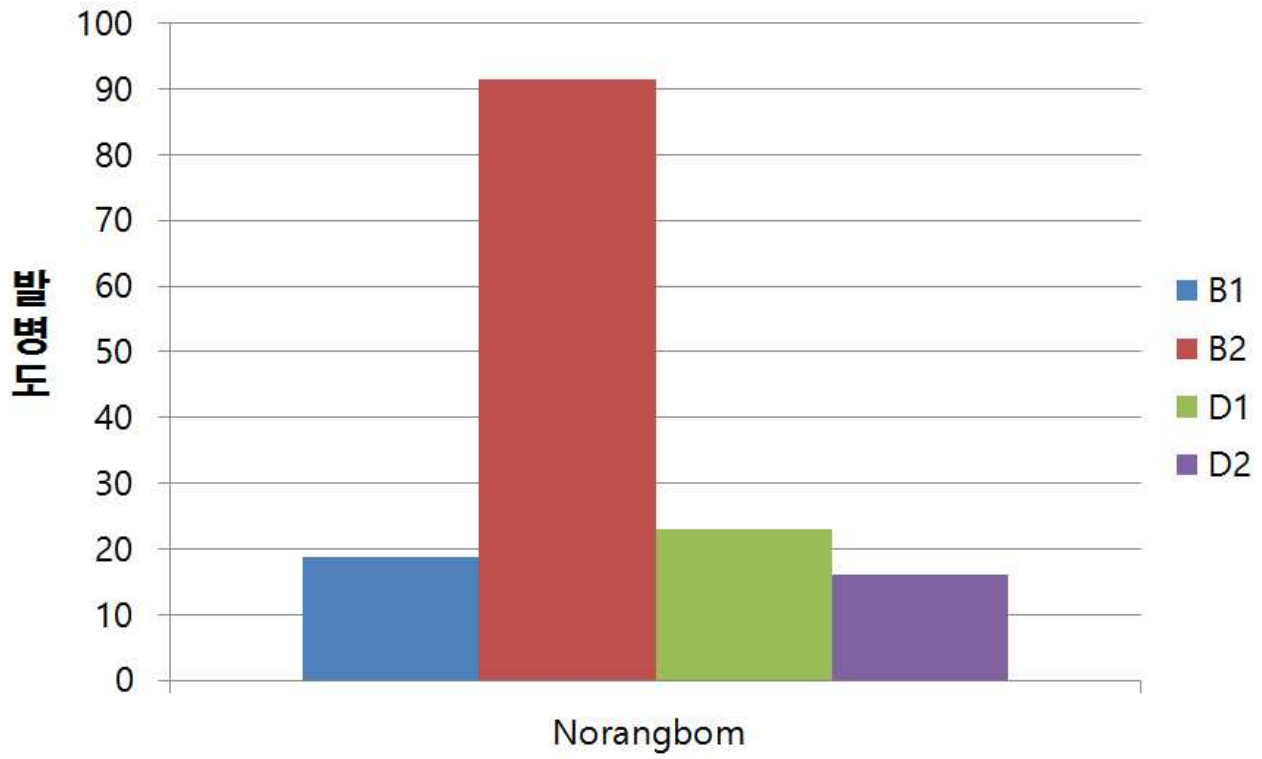
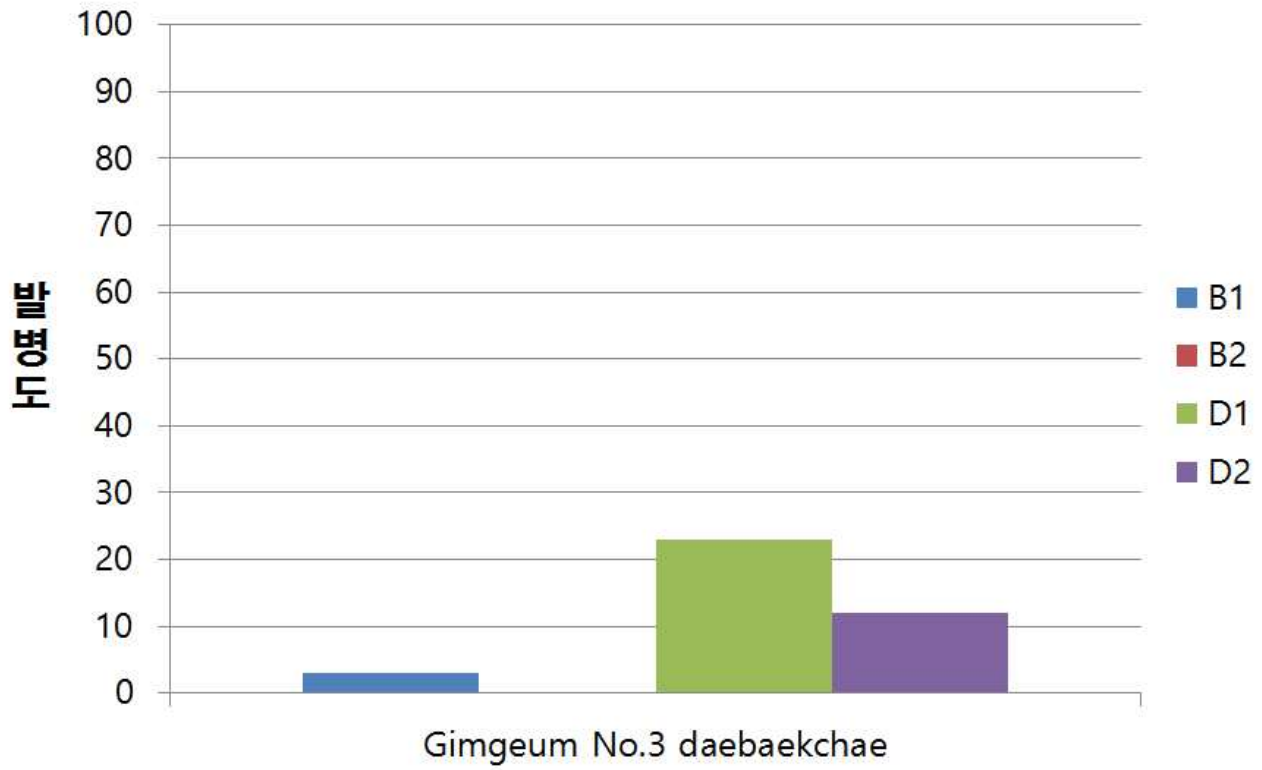


Fig. 36. Disease severity by D1, D2, B1, B2 isolates on Bulamplus cultivated in greenhouse.

Fig. 38. Disease severity by D1, D2, B1, B2 isolates on Gimgeum No.3 daebaekchae cultivated



in greenhouse.

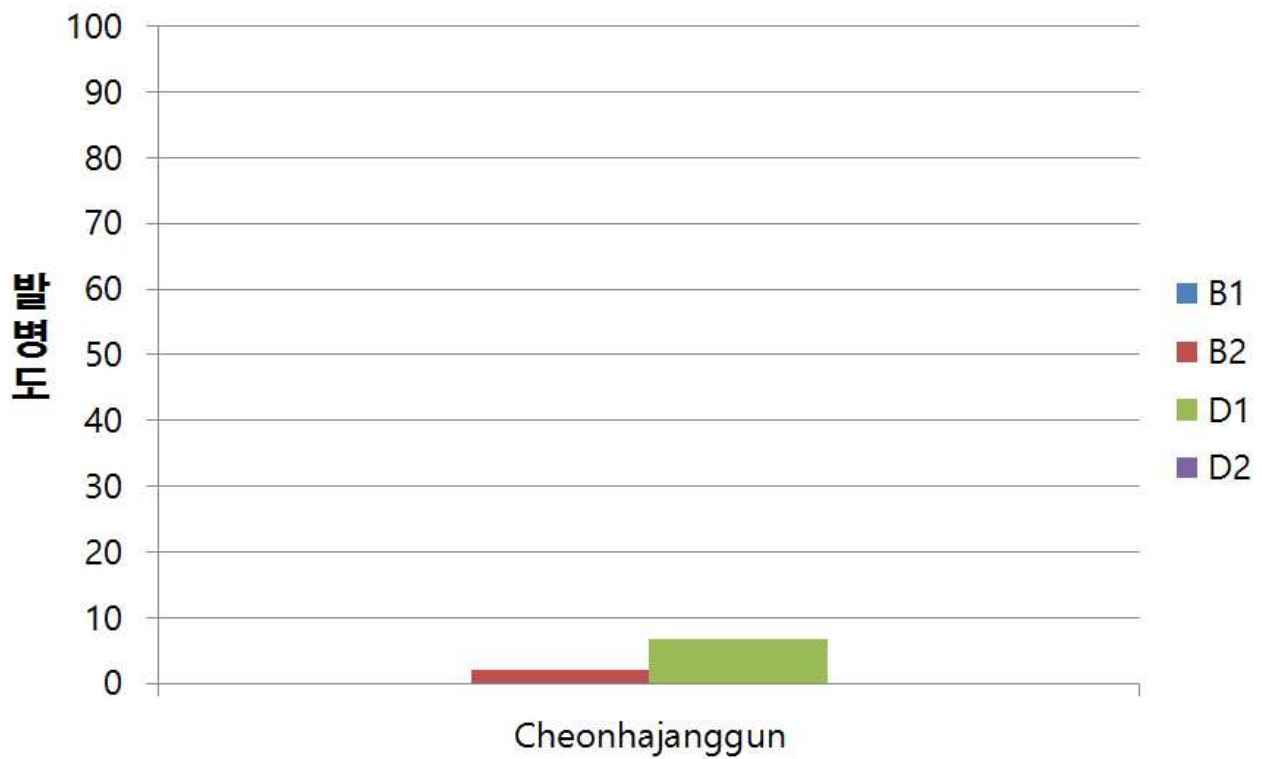


Fig. 39. Disease severity by D1, D2, B1, B2 isolates on Cheonhajanggun cultivated in greenhouse.

무 실험 결과는 배추와는 약간 다른 양상을 보여준다. 배추에서는 B2병원균의 강병원성에 거

의 모든 품종 저항성이 무너진 것을 확인하였지만 이것과는 다르게 무에서는 B2병원균이 약병원성을 나타내며 품종 저항성이 다른 양상을 나타내었다(Fig. 40). 특히 향수무라는 무품종에 4개의 병원균 모두 강병원성을 나타내는 것을 볼 수 있었다. 이로 보아 향수무품종이 감수성 무 품종임을 확인하였다.

뿌리혹병원균에 대하여 무는 배추보다 저항성이 높다고 보고되었지만(Akaba, 2009) 이번 분석으로 인해 배추에 강병원성 병원균이 무에서는 높은 병원성을 띄지 못할 수 있다는 것을 증명하였다. 다른 가능성은 병원균을 채집할 때 배추뿌리혹을 수집하였기 때문에 무뿌리혹병과는 유전적으로 병원성의 발현이 차이가 있을 수 있다는 가능성이 있다.

포장군주를 활용한 시판 주요 품종들에 대한 저항성 분석결과 배추는 병원균의 race에 좀더 밀접하게 연관되어 있는 반면 무는 병원균의 race보다는 무 자체의 품종 저항성과 더 밀접하게 관련되어 있는 것으로 판단되어졌다.

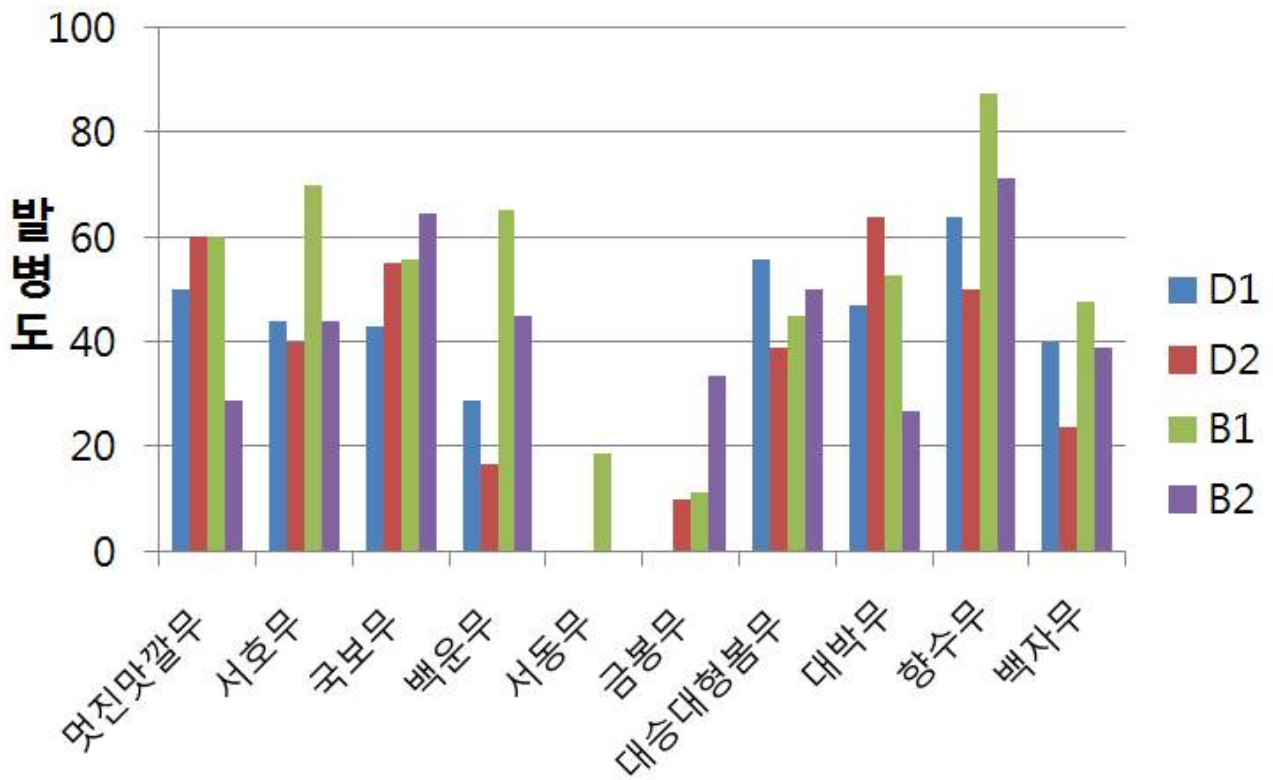


Fig. 40. Disease severity by D1, D2, B1, B2 isolates on each 10 radish cultivar cultivated in greenhouse.

2016년도에는 가장 강력한 병원성을 보인 B2병원균을 이용하여 탐스런배추와 휘파람골드, 불암플러스, CR맛 배추 품종을 추가하여와 시판품종의 뿌리혹병의 저항성 검정을 실시하였다 (Fig. 41, 42).

B2 병원균은 시험한 24개의 배추품종에서 모두 높은 이병도를 나타냈으며, 신통노랑, 제일참

진노랑, 휘모리, 씨알가을알과, 가을전설, 참노랑, 대통, 챔피언노랑은 64~68%이었고, 90% 이상 이병도를 보인 시판품종으로는 탐스런 배추, CR맛 배추, 휘과람골드, 춘정, 새벽이슬, 천고마비로 높은 이병도를 보였다.

시판되고 있는 무 품종의 뿌리혹병 B2병원균에 대한 저항성 검정 결과, 28~72%의 이병도를 나타냈으며, 이병도가 가장 낮았던 금봉무(28%)을 제외한 14개 무 품종은 40% 이상의 높은 이병도를 보였다(Fig. 43).

뿌리혹병균에 대하여 무는 배추보다 저항성이 높다고 보고되었지만(Akaba, 2009) 이번 분석으로 인해 배추에 강병원성 병원균이 무에서는 높은 병원성이 나타나지 않았다. 다른 가능성은 병원균을 채집할 때 배추뿌리혹을 수집하였기 때문에 무뿌리혹병과는 유전적으로 병원성의 발현이 차이가 있을 수 있다는 가능성이 있다.

포장균주를 활용한 시판 주요 품종들에 대한 저항성 분석결과 배추는 병원균의 race에 좀 더 밀접하게 연관되어 있는 반면 무는 병원균의 race보다는 무 자체의 품종 저항성과 더 밀접하게 관련되어 있는 것으로 판단되어졌다.

본 연구의 주요 목적 중 하나인 국내에 시판중인 배추와 무 품종들에 대한 뿌리혹병 저항성 정도를 병원성이 매우 강했던 자연 상태의 뿌리혹을 활용하여 분석하였다. 대부분의 시판 품종들은 감수성이었으나 품종간에는 저항성에 커다란 차이가 있었다. 천하장군은 아주 강 저항성이었으며, 가을전설과 신통노랑, 제일참진노랑, 휘모리, 씨알가을알과, 참노랑, 대통, 챔피언노랑 등은 비교적 저항성을 보였지만, 탐스런 배추, CR맛배추, 휘과람골드, 춘정을 비롯한 나머지 품종들은 매우 뿌리혹병에 약하였다. 특히 저항성 품종으로 개발되었던 CR맛배추는 구내의 뿌리혹병균주들에 대해 너무도 감수성이 밝혀졌다. 현재는 비록 저항성일지라도 원래 하등미생물인 뿌리혹병의 특성상 race의 변화가 지속적으로 일어날 가능성이 크기 때문에 이러한 저항성이 어느 기간 동안 유지될지는 확인하기 어렵다고 본다.

상대적으로 뿌리혹병에 상대적으로 강한 무의 경우도 금봉무는 저항성을 보였으나, 청운플러스무, 명산무, 향수무 등은 감수성을 나타내 품종 간에 저항성 차이가 존재하였다. 따라서 당분간은 우리나라 북부지역인 강원도나 경기도, 충남 지역에서는 위의 내용을 참고하여 재배 품종을 선택하거나 육종시 고려하면 유용할 것으로 판단된다. 특히 배추는 품종별로 주요 race에 대한 저항성 정도도 분석하여 각 품종의 저항성 특성을 규명하였기에 추후 육종에도 유용한 자료로 활용 될 것이다.



Fig. 41. Symptoms caused by B2 isolate on cv. Sintongnorang(A), Gauljeonseol(B), Hwimori(C), Jincheong(D), CRmatt(E), Gaulmatt(F), Huiparamgold(G)



이병도(%)

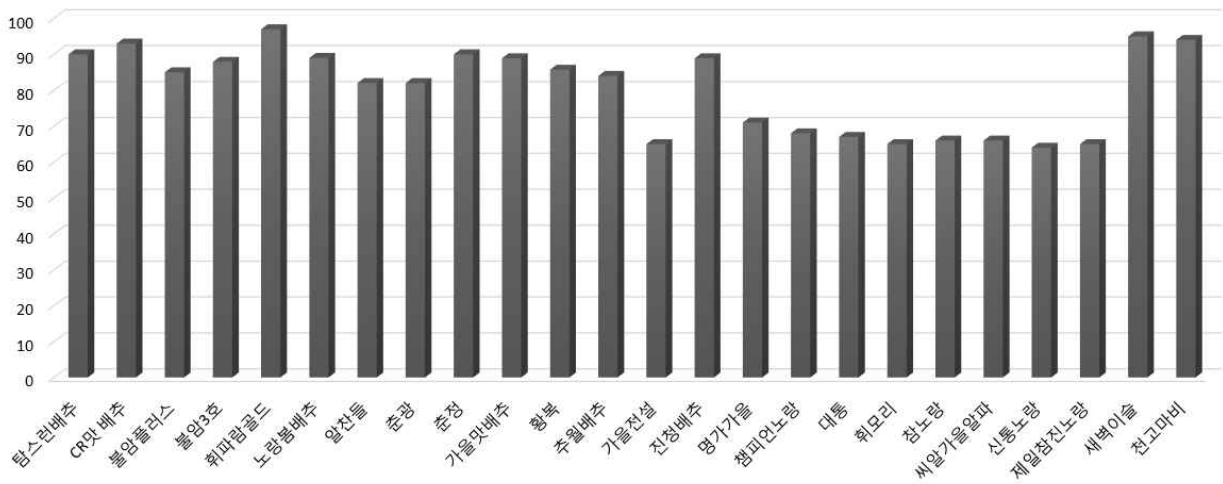


Fig. 42. Disease severity by B2 isolates on each 15 kimchi cabbage cultivar cultivated in greenhouse.

이병도(%)

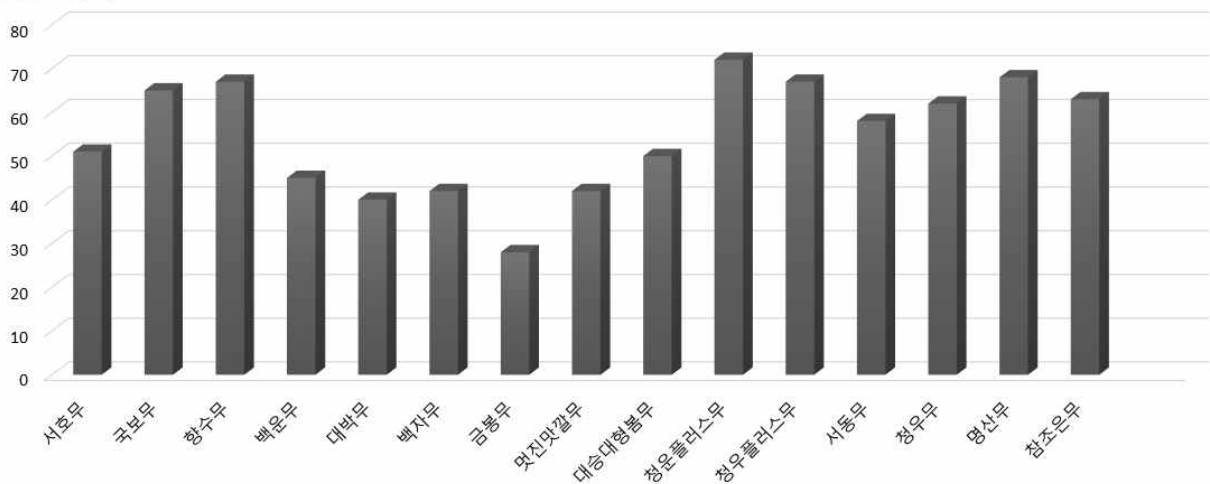


Fig. 43. Disease severity by B2 isolates on each 15 radish cultivar cultivated in greenhouse.

라. 시판 배추품종의 뿌리혹병 각 race에 대한 저항성 검정

배추에서 강병원성으로 확인된 B2포장 병원균에서 단포자 분리로 race 판별된 race 1, 4, 9, 11이 각각 11개의 배추 품종에 대해 어떠한 병원성 특징을 나타내는지 알아보기 위해 접종실험을 실시하였다.

이 실험은 단포자 접종으로 얻은 race를 기초로 하여 실험하였기 때문에 뿌리혹 전체를 마쇄해 접종한 처리구보다는 발병도가 낮았지만 품종별로 뿌리크기에 차이를 보였고 작은 혹을 발생시켰다.

분석 결과 race 1의 발병도가 전반적으로 race 4, 9, 11보다 낮았다(Fig. 44-48). Race 1에서 불암3호와 황복배추 두 품종이 상대적으로 높은 발병도를 보였으나 race 4, 9, 11의 발병도보다 낮았다. Race 4, 9, 11은 11개의 배추 품종에 50%이하의 비슷한 발병도를 나타냈다.

Race 11에 저항성 품종으로 시판되고 있는 CR맛 배추는 race 9를 제외한 3개의 race에 30% 정도로 낮은 발병도를 보이는 저항성 반응을 나타냈으며, 그 이외에 저항성 품종으로 알려진 불암플러스, 탐스런 배추, 휘파람골드도 각 race마다 발병도의 차이가 있었다. 또한 race 1과 race 11은 위의 3개의 품종들에 대해 상대적으로 매우 낮은 발병도를 보여주고 race 4에서는 불암플러스 품종이 11개의 품종 중에서 높은 발병도를 보였다.

Race 4는 판별품종 4개 모두에 병을 일으키는 병원균으로 국내 배추나 무 뿌리혹병을 일으키는 주요 인자로 생각되지만 본 연구결과에서도 race 1보다 강한 병원성을 보유하고 있었고 역시 품종에 따라 병원성에 약간씩의 차이를 나타냈다.

한편, 4개의 모든 race에 대해 상대적으로 매우 낮은 발병도를 보이는 휘파람골드는 저항성 품종으로 확인되었다.

단포자 접종으로 race를 판별한 B2포장 병원균의 4개 race는 각 품종에 따라 발병도가 달랐기 때문에 race판별을 위해서 우리나라의 실정에 맞는 특정 품종으로 판별체계를 만들어 race를 판별하는 것이 국내 균주를 대상으로 정확한 race와 병원성의 차이를 확인하는데 보다 유용하리라 사료된다.

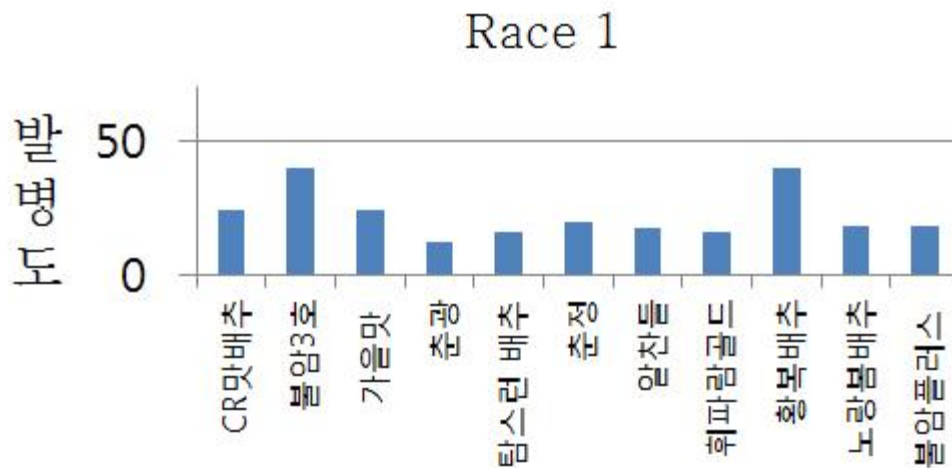


Fig. 44. Disease severity by race 1 isolate on eleven commercial cabbage cultivar cultivated in greenhouse.

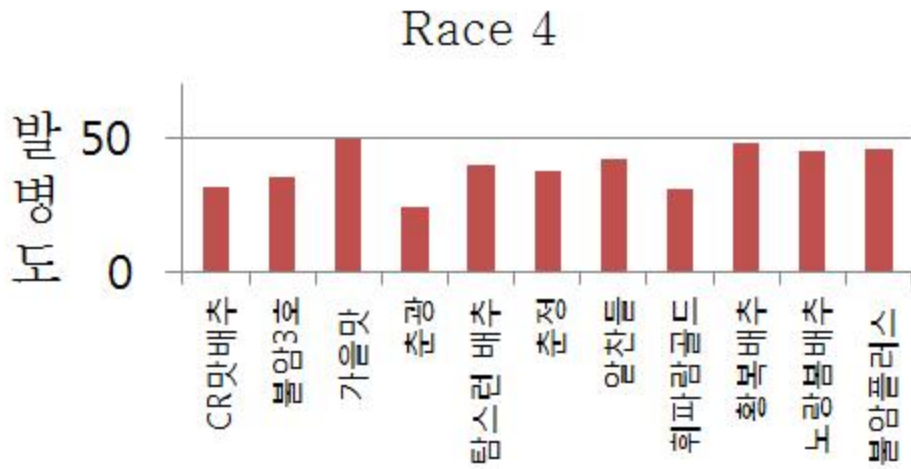


Fig. 45. Disease severity by race 4 isolate on eleven commercial cabbage cultivar cultivated in greenhouse.

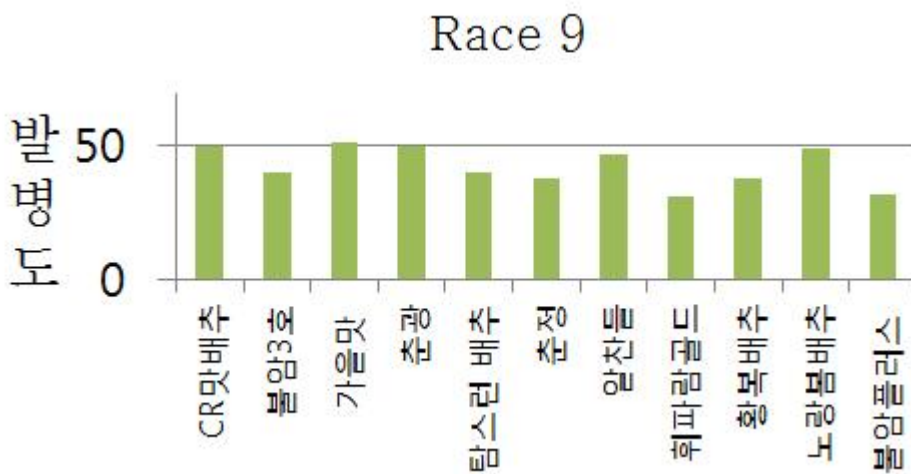


Fig. 46. Disease severity by race 9 isolate on eleven commercial cabbage cultivar cultivated in greenhouse.

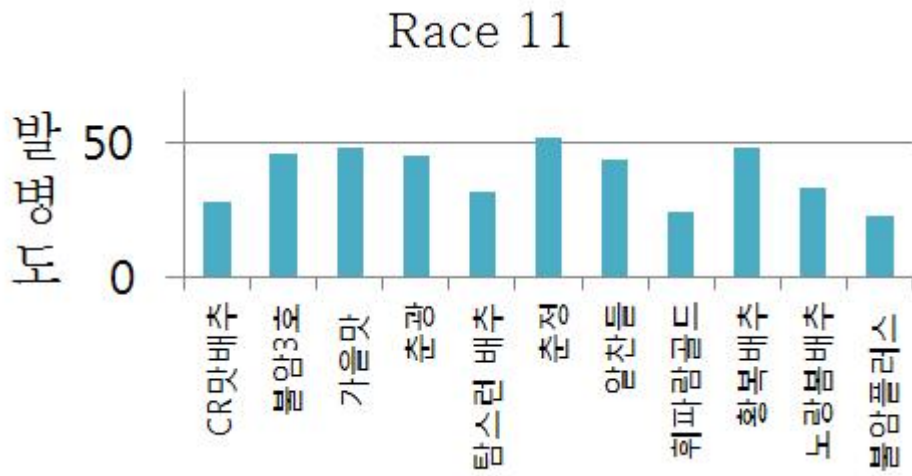


Fig. 47. Disease severity by race 11 isolate on eleven commercial cabbage cultivar cultivated in greenhouse.

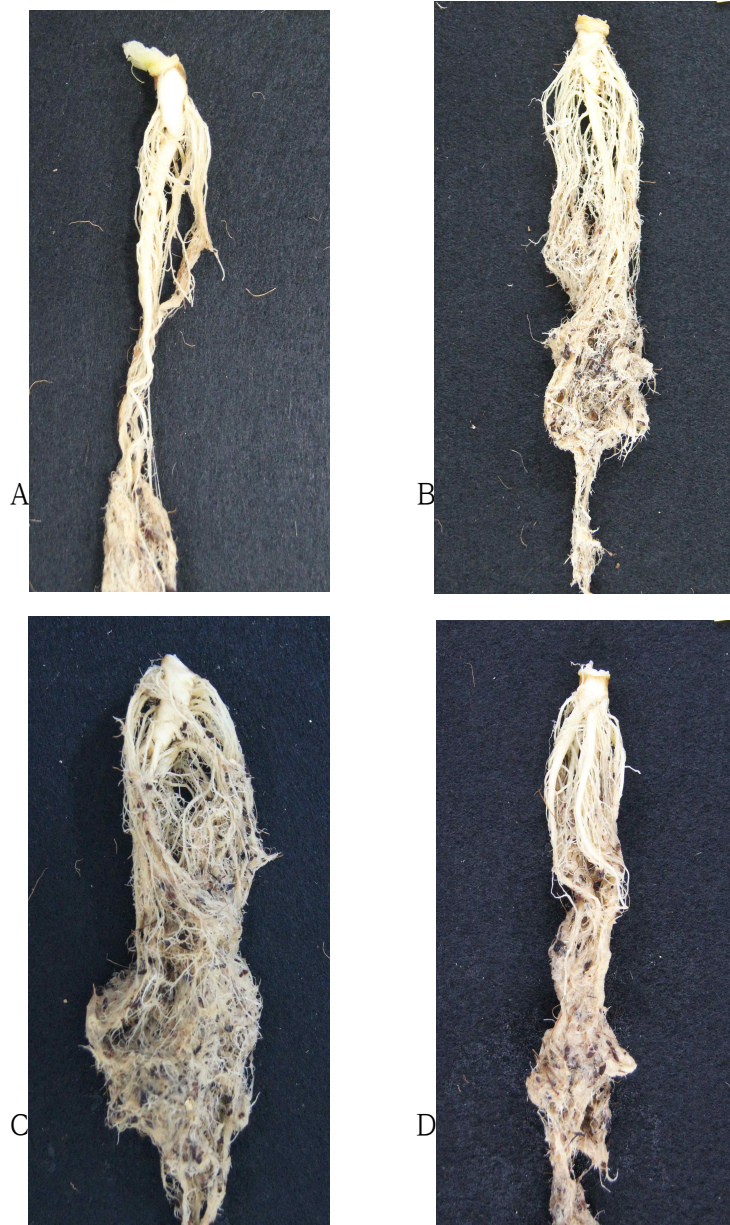


Fig. 48. Disease severity by Race 1(A), 4(B), 9(C), 11(D) isolates on cv. Bulamplus.

#### 마. 혼합된 race에 대한 뿌리혹병 저항성 분석

이전 연구에서 단포자 균주만을 접종한 것보다 단포자 접종균주와 현탁액 접종균주를 혼합하여 접종한 것이 더 심한 병징을 나타낸다는 보고가 있었다(양, 2012). 먼저 race혼합 처리구를 실험하기 위해서 병원균들의 병원성을 비교해 보았는데 B2병원균과 B1병원균의 race는 race 1이 있고 없고의 차이에서 배추에 대한 병원성 차이가 매우 많이 나는 것을 확인하였다. 이러한 이유로 race 1을 다른 race에 혼합하여 접종하였을 때 병원성이 증가한다는 것을 확인하고자 실험하였다. 본 실험의 결과 race 4, 9, 11에 race 1을 추가하여 혼합접종 할 때 거의 모든 처리구에서 발병도가 상승하는 것을 볼 수 있다(Fig. 49, 50). Race 4와 race 1의 혼합을 볼 때 불암3호 품종에서는 10%가 넘는 상승률을 보여주고 심지어는 race 9와 race 1의 혼합일 때는 race 9 단독일 경우보다 20%이상의 발병도가 증가하였다. 불암3호 품종에서는 휘과람골드 품

중보다 race를 혼합하였을 때 그 상승률이 더 크고 차이가 많이 났다. 이것으로 보아 같은 농도의 병원균일지라도 병원성 특성이 다른 병원균들을 혼합하였을 때 그 병원성이 증가한다는 것을 알 수 있다. 그리고 두 품종에서도 race 단독으로 접종하였을 때는 불암3호에서 발병도가 낮지만 두가지 race를 혼합하였을 때의 발병도는 불암3호가 더 높았다. 이는 단일 race에는 불암3호가 상대적으로 더 저항성일지라도 혼합된 race에는 감수성 품종임을 알 수 있다.

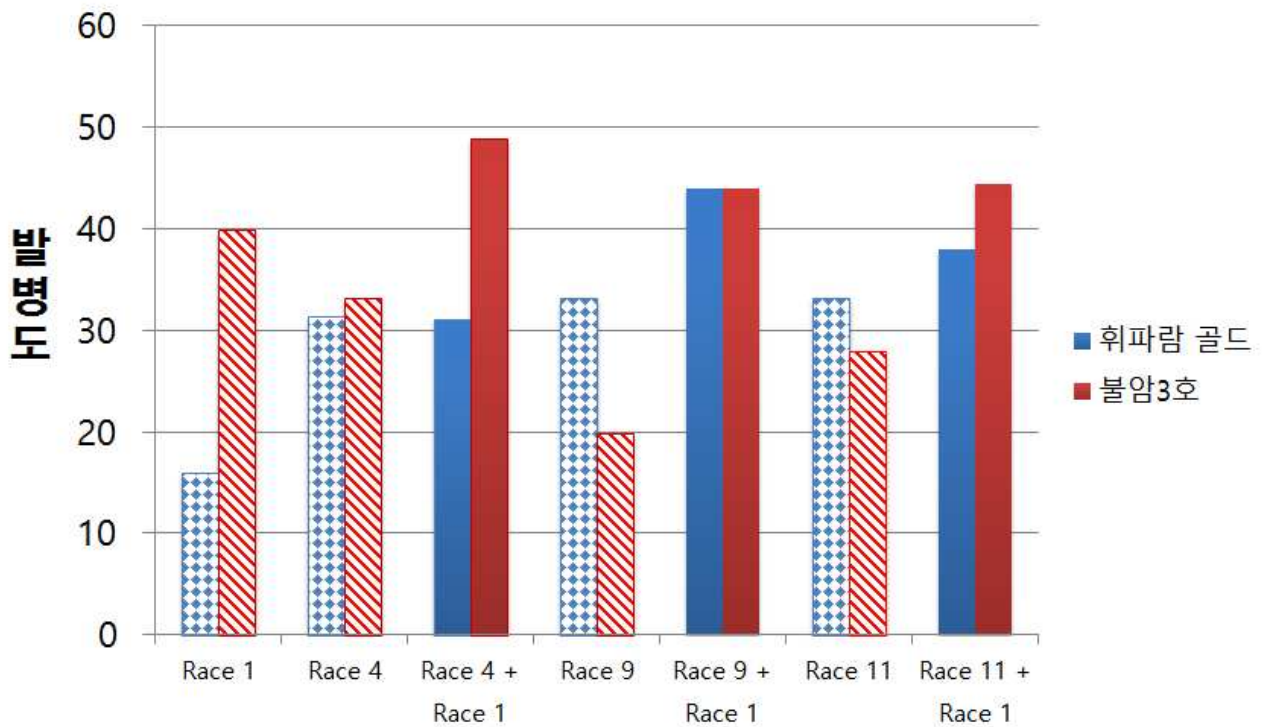


Fig. 49. Change of virulence on two cultivars by each *P. brassicae* race co-inoculation with race 1 cultivated in greenhouse.



Fig. 50. Symptom by co-inoculated *P. brassicae* races depending on pathogenicity observed on cv. Huiparamgold .

#### 바. 뿌리혹병 발생관련 pectin 및 pectinase 정량 분석

Pectinase는 식물체 뿌리 세포벽의 중요한 구성성분인 pectin을 분해하는 효소이다. 뿌리혹병이 감염됨에 따라 식물체 내에서 pectinase의 양이 변화하는지와 노지포장에서 수집한 식물체와 온실 내에서 인공 접종된 식물체에서 어떻게 다른 양상을 보여주는지 알아보려고 실험을 진행하였다.

뿌리혹병에 걸린 식물체 뿌리에서 pectinase가 건전뿌리에 비해 상대적으로 더 많이 검출되었다(Fig. 51). Pectinase 효소역가 평균값이 수집한 뿌리에서는 뿌리혹병 발병여부에 따라서 발병 뿌리 값 25.68과 건전뿌리 값 18.62의 값으로 7U/g의 차이가 나타났다. 수집된 모든 뿌리에서 고루 7-8U/g의 차이가 나는 것으로 보아 발병한 뿌리혹에서 pectinase의 생성이 증가했기 때문에 pectinase가 뿌리혹의 형성과 관련이 있다고 판단된다.

인공 접종한 배추뿌리에서도 수집한 뿌리혹만큼 높은 증가는 아니지만 평균적으로 4U/g 상승한 결과를 보여준다. 수집뿌리혹과 인공접종한 뿌리혹의 결과가 차이가 나는지 추가 분석이 더 필요하지만, pectinase의 생성량에 차이가 분명히 발생하므로 병발생에는 pectinase가 관여하는 것으로 볼 수 있다.

이로써 건전뿌리에 비해 병든뿌리에서 pectinase 활성이 훨씬 더 많이 나타남으로써 병원균간의 pectin 함량을 비교분석하므로써 추후 보다 손쉽게 뿌리혹병균의 병원성과 배추 품종들의 뿌리혹병 저항성 정도를 어느 정도 예측할 수 있는 하나의 시도가 될 수 있다.

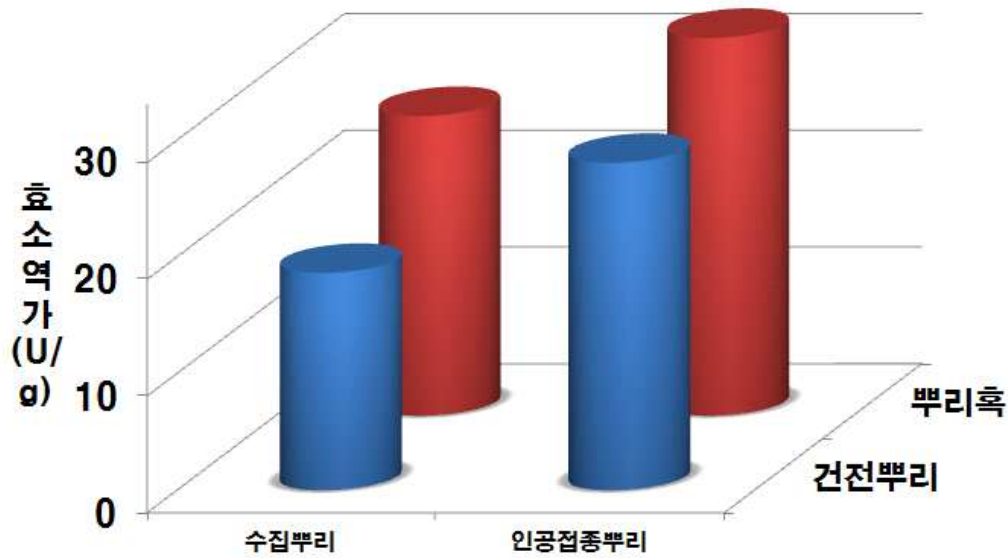


Fig. 51. Comparison of enzyme activity of pectinase between cabbage roots.

Pectin은 식물체 뿌리의 중요한 구성성분이다. Pectin의 함량에 따라 노지포장에서 채집한 식물체와 온실 내에서 인공 접종된 식물체에서 뿌리혹병이 발생하는데 어떤 영향을 주는지 알아보기 위한 실험을 진행하였다. 결과는 뿌리혹병에 감수성인 배추 품종의 뿌리에서 pectin의 함량이 상대적으로 더 많이 검출되었고, 저항성인 배추 품종의 뿌리에서는 pectin의 함량이 적게 검출된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 52).

이를 토대로, 뿌리 내 pectin 함량을 비교분석함으로써 보다 손쉽게 배추 품종을 개발하는데 있어서 뿌리혹병 저항성 정도를 예측할 수 있는 하나의 지표가 될 수 있으리라 판단된다.

배추나 무 품종의 뿌리혹병 저항성을 분석해내는 일은 많은 시간이 걸리고 환경의 영향 등으로 인해 정확한 측정자체가 매우 어렵다. 식물의 세포벽 주요 구성성분이며 펙틴 분해 세균에 감염될 경우 짓무르고 흑이 커지거나 냄새가 나는 등의 특성에 근거하여 배추도 역시 뿌리혹병에 감염되며 흑이 커지고 짓무르는 점을 고려하여 전 년차 실험에서 균의 침입을 받았을 경우 펙틴의 함량과 펙티나아제의 활성을 비교 분석해 보았다. 기대했던 대로 감염 시 펙티나아제의 활성이 크게 증가하였기 때문에 이를 근거로 세포를 보호하는 물질인 펙틴의 함량이 병 저항성과도 관련이 있을 거라 판단하였다. 저항성 품종 검정에서 저항성을 보였던 품종과 감수성인 품종의 뿌리를 취해 체내 펙틴 함량을 비교하였을 때 역시 예상한 바와 같이 저항성 품종은 펙틴 함량이 낮고 감수성인 품종의 경우는 함량이 높았다.

펙틴 함량 분석은 상당히 쉽기 때문에 따라서 이 방법은 활용한다면 분명히 아주 손쉽게 품종의 저항성 여부를 판단해 낼 수 있을 것으로 사료된다.



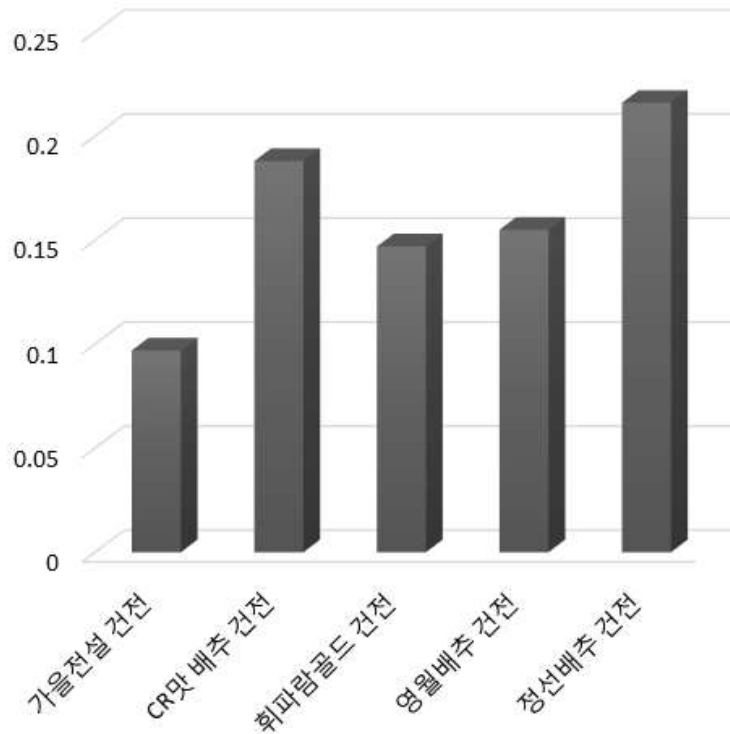


Fig. 52. Comparison of enzyme activity of pectin between cabbage roots.

#### 사. RAPD 분석을 이용한 race별 유전적 다양성 분석

기존의 race 검정방법은 단포자점종과 판별품종점종의 두 가지 과정을 모두 거쳐야 하기 때문에 매우 오랜 시간과 노동력이 든다. 그리고 실험자가 육안으로 보고 판단해야 하는 부분이 있어서 오류의 가능성과 숙련된 테크닉이 요구된다. 이 때문에 다른 분석방법이 필요하다. RAPD 방법이 있는데 여기에는 다양한 생물종의 분류에 이용되는 것으로 알려진 URP(Universal rice primer) 등 여러 primer가 있다.

URP primer 1~12와 OPA일부를 예비실험해 보았을 때 URP-1, URP-2, URP-3, URP-6, URP-8에서만 분석이 가능할 만한 밴드를 생성하여 나머지 primer는 제외하고(Fig. 53) 5가지의 primer와 REP, ERIC primer를 사용하였다. 이전 허(2004)의 연구에서는 URP-3과 URP-6만을 가지고 연구하였으나 본 연구에서는 primer의 폭을 넓혀서 많은 분석을 해보았다. B2병원균에서 분리한 race 1, 4, 9, 11의 DNA를 분리하여 RAPD 분석을 수행하였다. 그 결과, 동일 포장 내의 다른 race에서는 독특한 band 양상이 나타났다(Fig. 54-58). 본 연구에서 추가되는 URP-1, URP-2, URP-8 primer의 뿌리혹병원균의 RAPD분석 가능성이 있음을 보여준다. 이것으로 보아 Williams의 race 판별로 얻어진 동일 포장의 race는 primer별로 그 유전적 차이가 거의 나지 않고 유사하게 나타나 기존의 병원균의 race 동정 방법을 개선할 수 있도록 할 특정 primer를 이용한 race 판별의 가능성을 보여준다. 두 개의 primer를 활용하여 분석한 RAPD분석 결과를 바탕으로 계통분석을 실시하였다. 기대했던바와 같이 다른 포장의 동일 race와 Dendrogram 분석해본 결과 동일 race간에는 같은 그룹에 속하는 것을 보여주었다(Fig. 59). 이는 이 RAPD 분석만 잘 활용한다면 1차적인 race 분석이 어느정도까지는 가능하다는 것을 의미하기 때문에

뿌리혹병균의 손쉬운 race 분석에 기대를 갖게 하는 하나의 획기적인 결과라 사료된다. 최종적으로 동일 race 간에 같은 그룹에 속하는 것으로 보아 RAPD로 race판별의 가능성을 보여주었다. 조금 더 발전시키고 분석해 본다면 간편하고 용이한 race 판별을 할 수 있을 것이다.

순환물기생자이며 균류 중 가장 하등미생물에 속하는 배추뿌리혹병균(*Plamodiophora brassicae*)은 순수분리를 위해 인공배양이 되지 않기 때문에 반드시 살아 있는 기주세포에 균류 포자 중 가장 작은 크기의 포자 단 한 개만을 접종해서 그것도 방어벽이 가장 발달한 부위인 뿌리에 감염시켜야 하는 어려움 때문에 그 성공확률이 2~3%밖에 되지 않는다.

이런 난관을 무릅쓰고 감염이 성공되었다 하더라도 이 당시의 혹 내에 있는 포자수가 너무 적어 4개의 race 분석용 판별품종을 감염시킬 수가 없어 2차 접종을 다시 해야만 한다. 그 결과로 형성된 혹을 판별품종에 접종한 이후에야 비로소 형성된 혹 여부를 기초로 레이스를 판정하게 되는 것이 기존의 race 분석방법이다. 이를 획기적으로 개선하고자한 실험이 분자생물학 기법을 활용하는 방법이었고 그 중에서도 RAPD 방법이 있다. 여러 primer 중에서도 URP-, OPA- primer들이 다른 primer들에 비해 상대적으로 레이스 간의 차이를 잘 구분해낼 수 있었다. 이는 추후 기존의 레이스 판별법을 대폭 개선하여 신속정확하게 레이스를 판별해 낼 수 있는 매우 유용한 기법으로 판단된다.

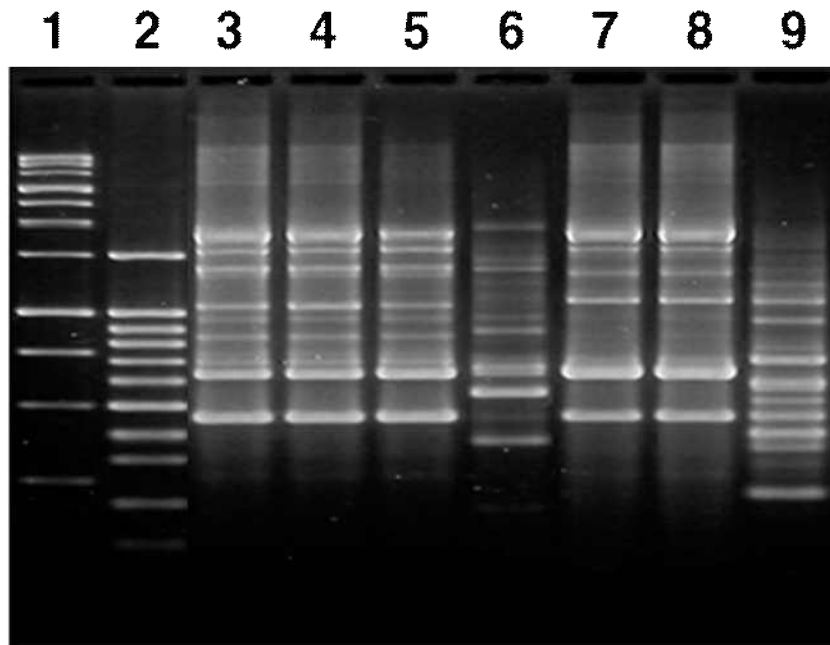


Fig. 53. Random amplified polymorphic DNA patterns of genomic DNA amplified with primer OPA-7 from *P. brassicae*. The lanes contain DNA from isolate : (M) 100bp ladder, (1) race 1, (2) race 4, (3) race 9, (4) race 11, (5) Negative control.

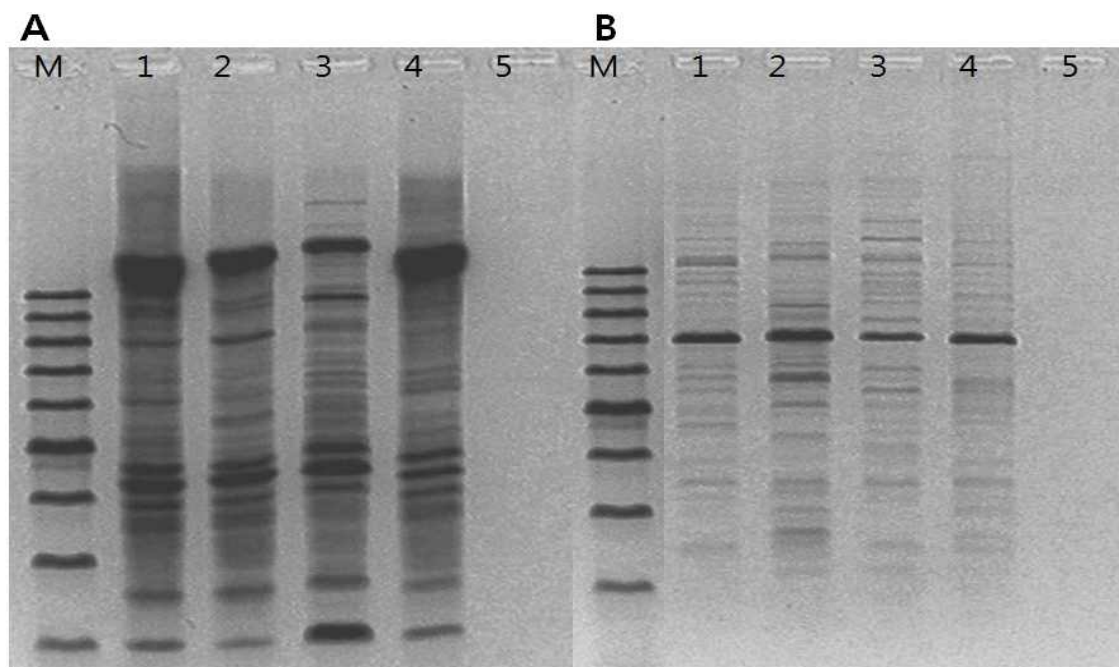


Fig. 54. Random amplified polymorphic DNA patterns of genomic DNA amplified with primer URP-10(A), URP-11(B) from *P. brassicae*. The lanes contain DNA from isolate : (M) 100bp ladder, (1) race 1, (2) race 4 , (3) race 9, (4) race 11, (5) Negative control.

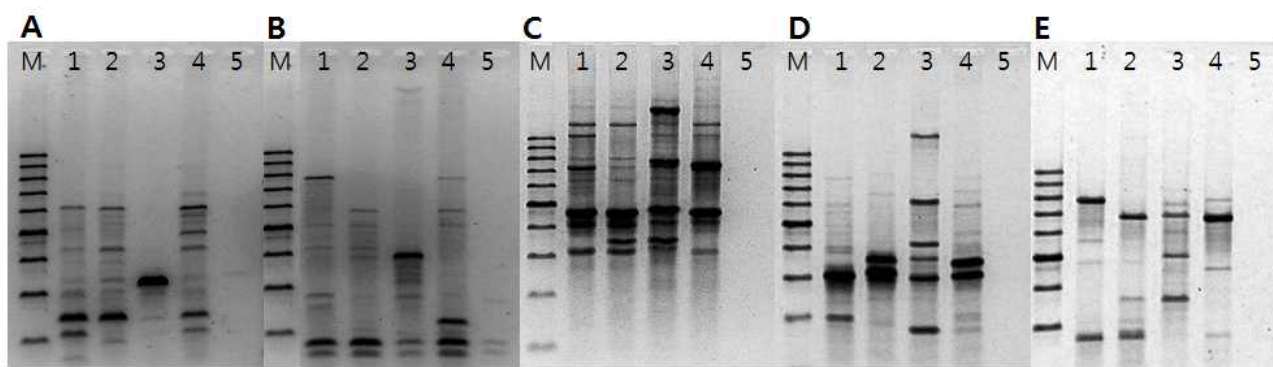


Fig. 55. Random amplified polymorphic DNA patterns of genomic DNA amplified with primer URP-1(A), URP-2(B), URP-3(C), URP-6(D), URP-8(E) from *P. brassicae*. The lanes contain DNA from isolate : (M) 100bp ladder, (1) race 1, (2) race 4 , (3) race 9, (4) race 11, (5) Negative control.

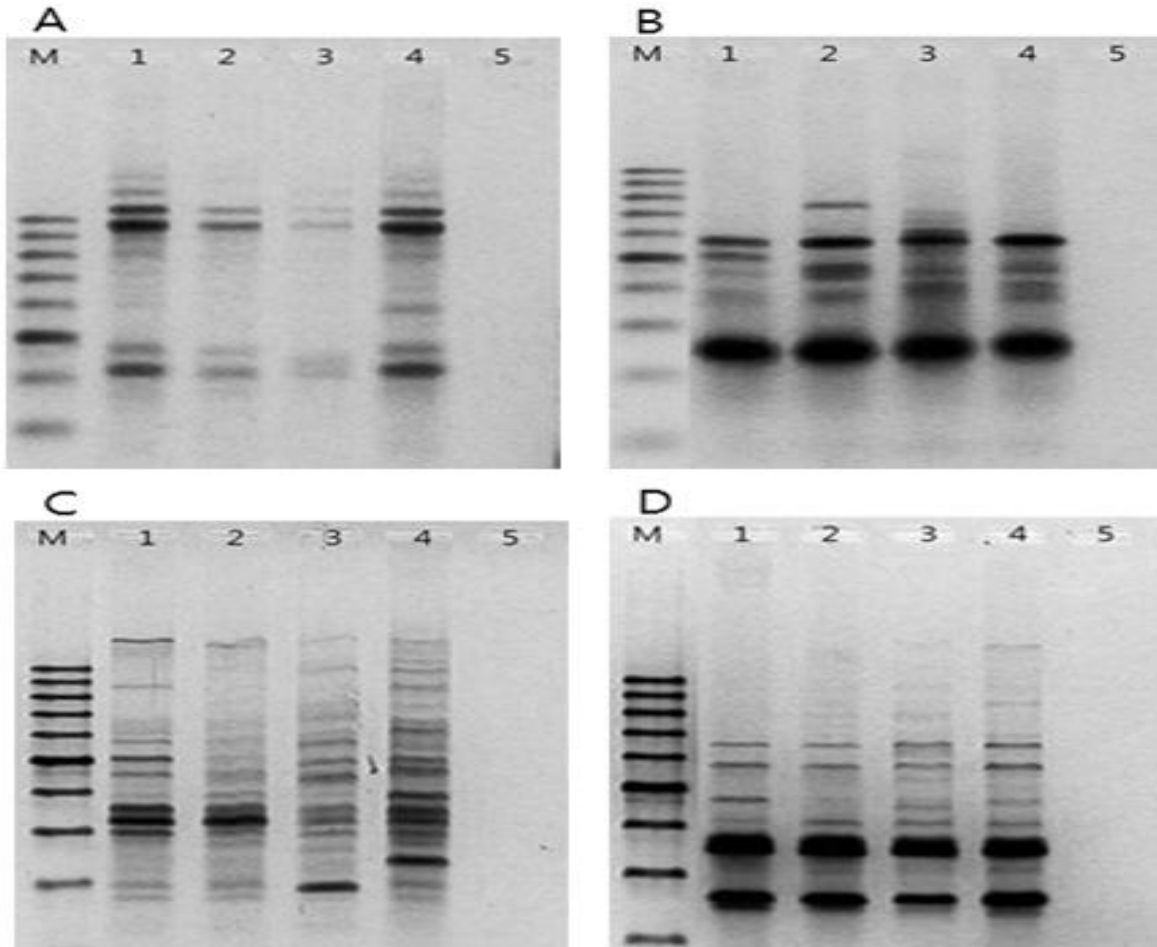


Fig. 56. Random amplified polymorphic DNA patterns of genomic DNA amplified with primer URP-4(A), URP-5(B), URP-7(C), URP-9(D) from *P. brassicae*. The lanes contain DNA from isolate : (M) 100bp ladder, (1) race 1, (2) race 4 , (3) race 9, (4) race 11, (5) Negative control.

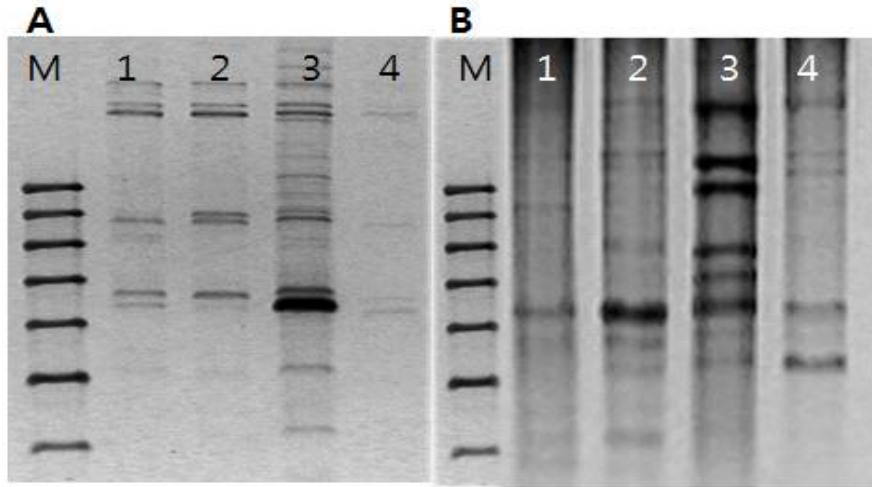


Fig. 57. Random amplified polymorphic DNA patterns of genomic DNA amplified with primer REP (A), ERIC (B) from *P. brassicae*. The lanes contain DNA from isolate : (M) 100bp ladder, (1) race 1, (2) race 4, (3) race 9, (4) race 11.

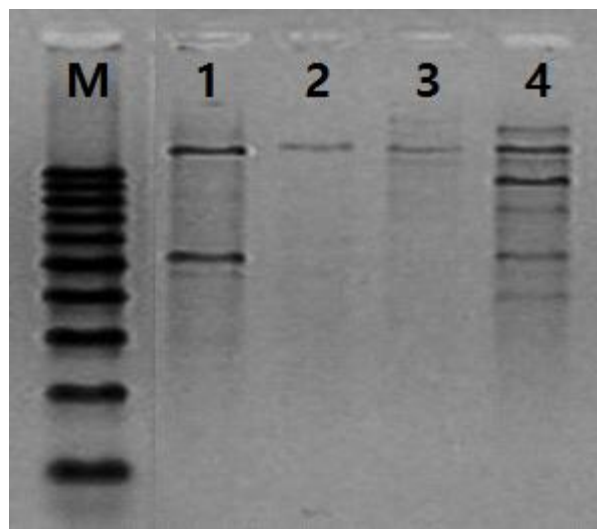


Fig. 58. Random amplified polymorphic DNA patterns of genomic DNA amplified with primer from Box1AR *P. brassicae*. The lanes contain DNA from isolate : (M) 100bp ladder, (1) race 1, (2) race 4, (3) race 9, (4) race 11.

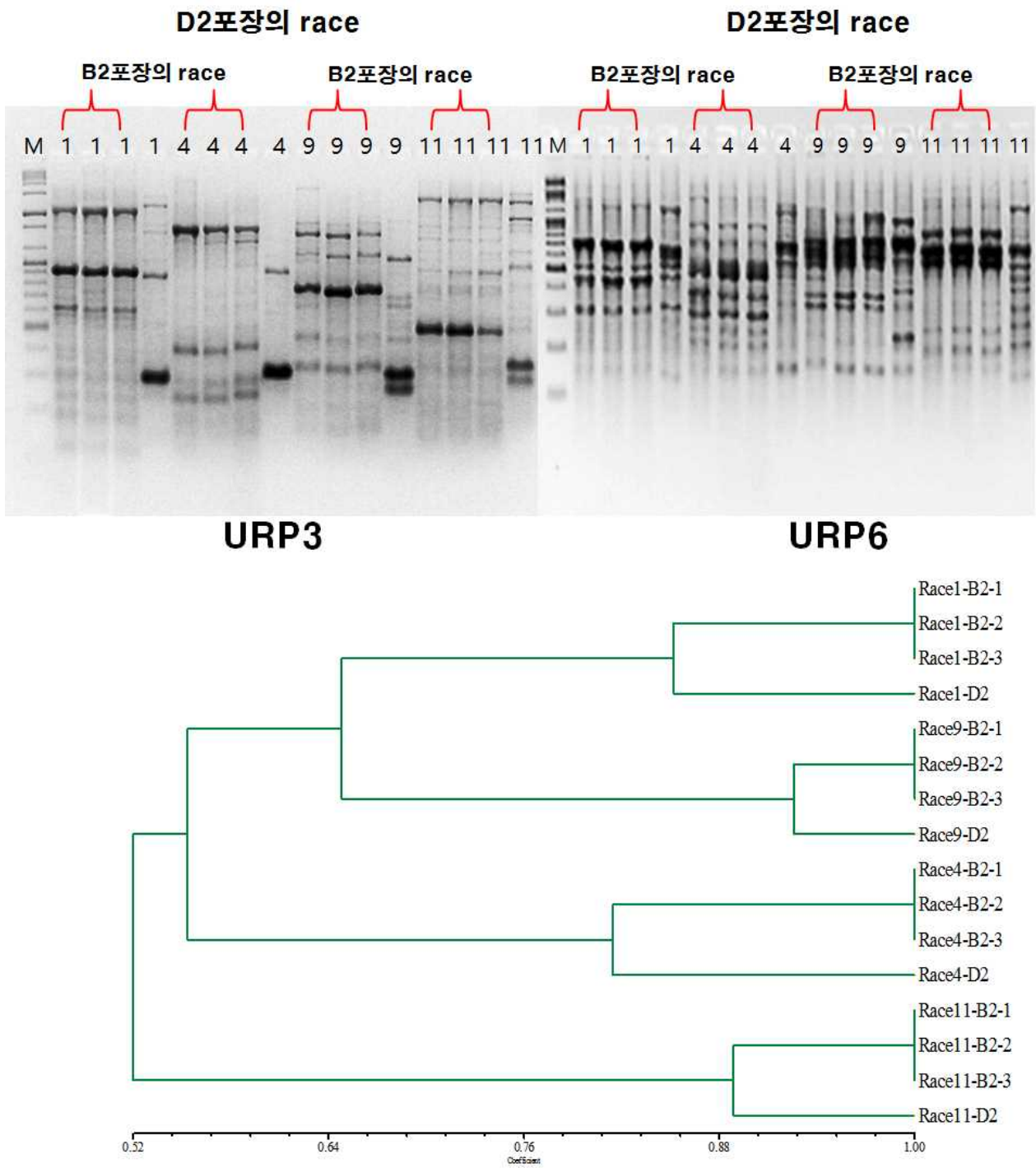


Fig. 59. Random amplified polymorphic DNA patterns and dendrogram for genetic diversity of *P. brassicae* isolates in the single gall with different collection sites was originated from URP-3, URP-6 using UPGMA

#### 아. 최적의 뿌리혹 저장조건 개선

현재 뿌리혹병 연구자들이 흔히 사용하는 뿌리혹 저장방법은 약 140년 전에 Woronin이 고안했던 방법이다. 이 방법은 뿌리혹을 그대로  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 저장하는 것으로 오래전부터 사용되었다는 이유만으로 검증과정 없이 사용되어왔다.

6가지의 저장 조건과 4가지의 온도 조건으로 총 24개의 조건하에서 뿌리혹을 저장하였고, 3개월마다 저장 온도, 조건별로  $10^6$ - $10^7$ spore/ml의 포자현탁액을 감수성 품종에 접종하고 품종에서의 발병 여부로 병원성을 검정하였다(Fig. 60).

그 결과  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 저장한 뿌리혹이 가장 오래 병원성을 유지하는 것을 확인하였다(Fig. 61, 63). Woronin이 사용했던  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 저장하는 것 역시 상대적으로 좋은 효과를 보았으나  $-70^{\circ}\text{C}$ 와 비교하였을 때 저장 후 병원성이 감소하였고 특히 12개월이 지나서는 발병률이 50%에 그쳤다.

$-70^{\circ}\text{C}$ 에서 저장한 6가지 저장법 중에서는 뿌리혹을 그대로 저장하는 것과 뿌리혹을 갈아 균질화한 후 8겹의 거즈로 거른 것이 가장 오래 병원성을 유지하였다(Fig. 62).  $-20^{\circ}\text{C}$  저장에서는 뿌리혹을 균질화하여 8겹의 거즈에 거른 것이 효과적이었다.

Dovos *et al.* (2005)은 병원균이 2차 감염 과정을 거치지 않으면 뿌리혹병 특유의 병징을 확인할 수 없다고 하였고, Feng *et al.* (2011)의 연구에서는 배추 삼출물이 존재할 때 삼출물이 없을 때보다 뿌리혹병균의 휴면포자가 유주자로 발아가 많이 이루어진다고 보고하였다. 이는 2차 감염과 밀접한 관계가 있는 유주자의 발아에 배추의 삼출물이 영향을 미친다고 유추할 수 있다.

혹을 갈아서 저장한 것보다 배추뿌리혹을 그대로 저장한 것이 병원성 오래 지속되는 이유는 2차 감염을 하는 유주자의 발아에 영향을 주는 배추 삼출물이 혹을 균질화하면서 배추 세포 내에 있던 휴면포자가 밖으로 나출되면서 배추 삼출물역시 병원균과 함께 존재하고 그 영향으로 휴면포자가 많이 발아하게 되고, 발아한 유주자는 굉장히 약한 상태로 외부자극에 의해 생리, 성장 기능 등에 영향을 받아 죽거나 병원성에 영향을 줄 것이다.

뿌리혹을 균질화한 후 거즈에 거른 것에 다시 건전 배추를 갈아 넣어 저장한 결과 역시 다른 조건보다는 병원성이 감소하였는데, 이 역시 배추 삼출물의 영향에 의한 것으로 생각된다.

김 (2000)은 병원균이 2차 감염 과정을 거치지 않으면 뿌리혹병 특유의 병징을 확인할 수 없다고 하였고, Feng 등 (2011)의 연구에서는 배추 삼출물이 존재할 때 삼출물이 없을 때보다 뿌리혹병균의 휴면포자가 유주자로 발아가 많이 이루어진다고 보고하였다. 이는 2차 감염과 밀접한 관계가 있는 유주자의 발아에 배추의 삼출물이 영향을 미친다고 유추할 수 있다.

2차 감염을 하는 유주자의 발아에 영향을 주는 배추 삼출물이 혹을 균질화하면서 배추 세포 내에 있던 휴면포자가 밖으로 나출되면서 배추 삼출물 역시 병원균과 함께 존재하고 그 영향으로 휴면포자가 많이 발아하게 되고, 발아한 유주자는 굉장히 약한 상태로 외부자극에 의해 생리, 성장 기능 등에 영향을 받아 죽거나 병원성에 영향을 주었을 것으로 판단된다. 또한 뿌리혹을 갈고 균질화한 것을 현미경상에서 관찰하면 휴면포자가 작게 균질화된 식물체 조직에 밀접하게 붙어있는 것을 볼 수 있었는데, 이것이 인위적을 넣어준 배추조직 마쇄한 것을 넣어주는 것보다 장기간 저장하는데 더 효과적임을 확인할 수 있었다.

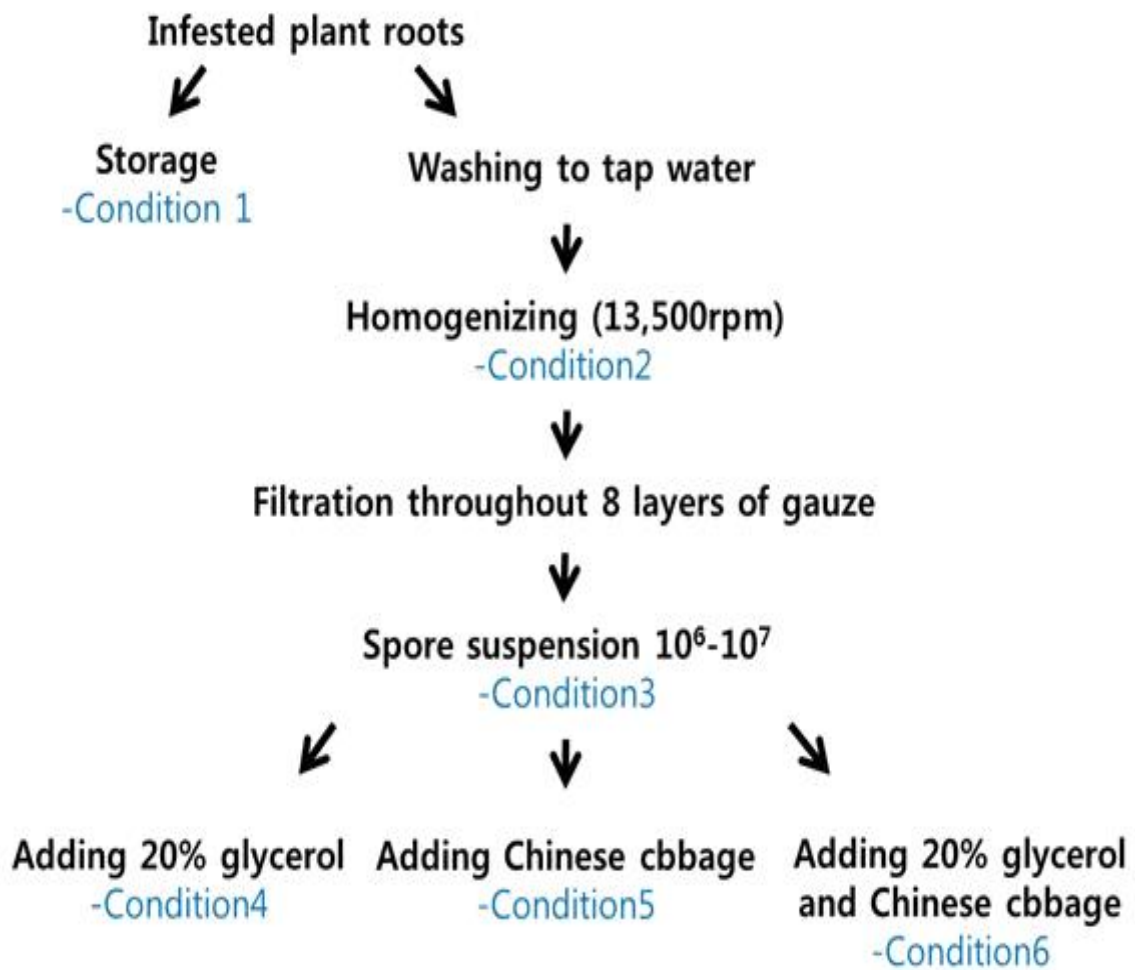


Fig. 60. Schematic diagram of clubroot gall storage conditions tested in this research to find optimal storage condition.



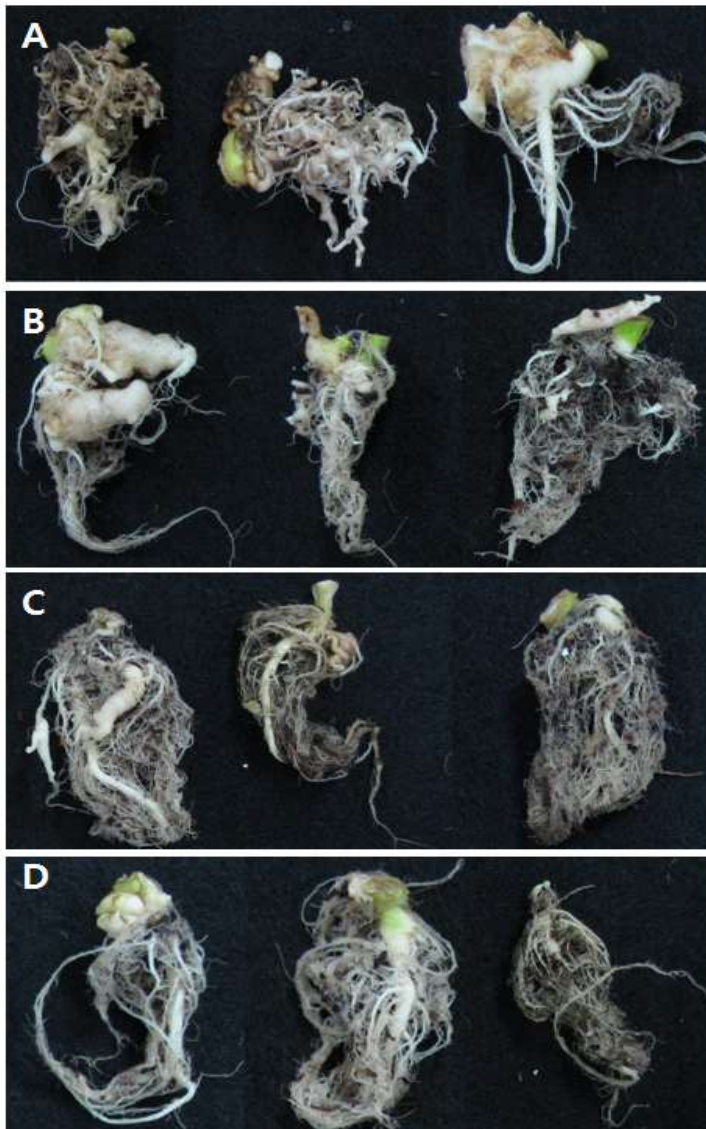


Fig. 61. Test for effectiveness of storage conditions invented in this research. The spore suspension filtered from homogenized clubroot gall was used as a material for the test. The suspension was stored under specified temperature for certain period. The suspensions stored under designed conditions were used as inoculum to test its pathogenicity maintenance.

(A : Stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ , storage after 3 months, B : Stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ , after 21 months, C : Stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ , after 3 months, D : Stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ , after 21 months)

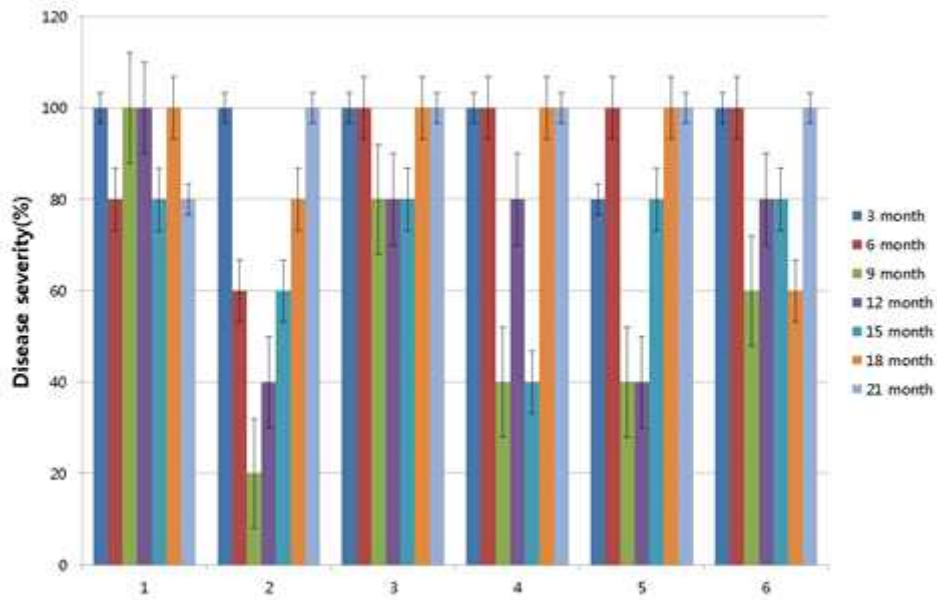


Fig. 62. Difference in disease severity depending on storage condition when the clubroot stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  (1. whole gall, 2. homogenizing 3. homogenizing and filtration with 8 layers of gauze, 4. Condition 3 + adding 20% glycerol 5. Condition 3 + adding disease free Chinese cabbage root, 6. Condition 3 + adding 20% glycerol + disease free Chinese cabbage root).

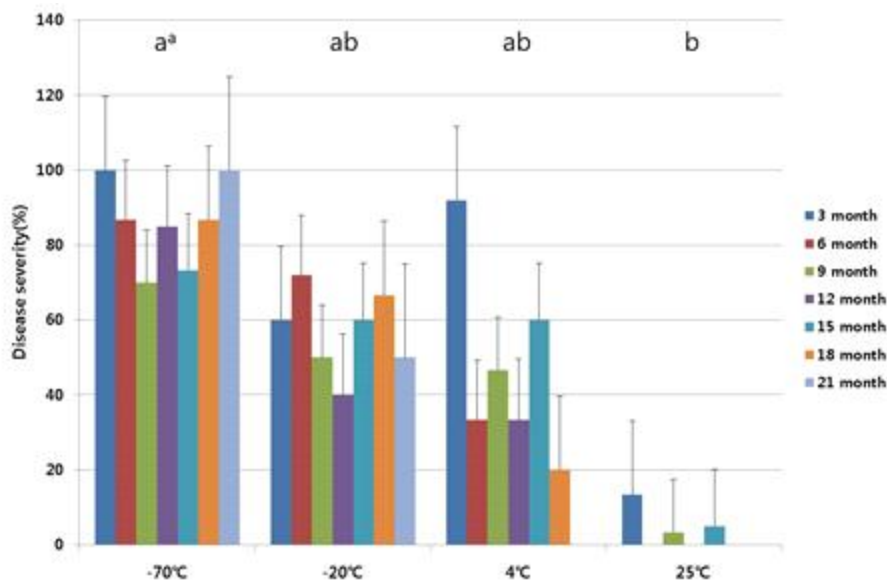


Fig. 63. Comparison of disease severity difference of the clubroot gall depending on storage temperature conditions (whole gall).

<sup>a</sup>Values followed by the same letter do not differ significantly at  $p > 0.05$  according to Duncan's multiple range test.

## 자. 배추뿌리혹병의 생물학적 방제

### (1) 길항세균의 분리 및 길항력 검정

발병에 따른 피해가 심해짐에 따라 여러 가지 방제법들이 대두되었지만 현재까지 화학적 방제제 이외의 효과적인 방제법이 개발되지 못하고 있는 실정이다. 그러나 화학적 방제의 여러 가지 단점이 대두되면서 이를 대체할 수 있는 생물적 방제의 필요성이 증가되고 있기에 이를 위한 기본재료인 길항세균의 선별을 시도하였다.

뿌리혹병의 생물학적 방제제로 사용할 길항세균을 분리하기 위하여 산의 토양과 건전한 배추의 식물체내에서 세균을 분리한 결과 토양으로부터 32개의 균주, 식물체로부터 25개의 균주 총 57개를 확보하였다. 우선 선별과정인 주요 식물병원균과의 대치배양으로 토양으로부터 분리된 4개의 균주(S7, S9, S10, S11)를 선별하였다. 배추 내에서 분리한 세균은 토양분리세균과 비교해 활성이 좋지않아 배제되었다.

Fig. 64을 보면 몇 개의 세균이 곰팡이를 억제하는 저지원을 형성하였다. 이것으로 보아 이 세균들이 곰팡이에 대한 억제력이 있다는 것을 알 수 있다.

이렇게 선별된 4개의 균주(Fig. 65)는 5개의 주요 식물병원균과 대치배양을 함으로써 전반적으로 길항력이 있음을 확인하였고(Table 21, Fig. 67), 병원균의 균사를 억제하는 모습을 현미경으로 찍었다(Fig. 66).

추후의 직접적인 뿌리혹병에 대한 방제 실험에서 이 4가지의 세균을 적용해 볼 것이다. 이 세균들 중 온실 실험으로 뿌리혹병을 억제하는 효과가 좋은 균이 발견된다면 먼저 동정한 후에, 그 균에서 어떤 물질이 그런 역할을 하는지 알아볼 것이고, 식물에 대한 병원성 여부, 생육 특성을 밝히고 세균의 길항력을 극대화시킬 수 있는 세균배양배지나 조건을 찾아 볼 예정이다.

최종적으로는 화학적방제제를 대체할 수 있는 미생물제의 제형화가 실험목적이다.

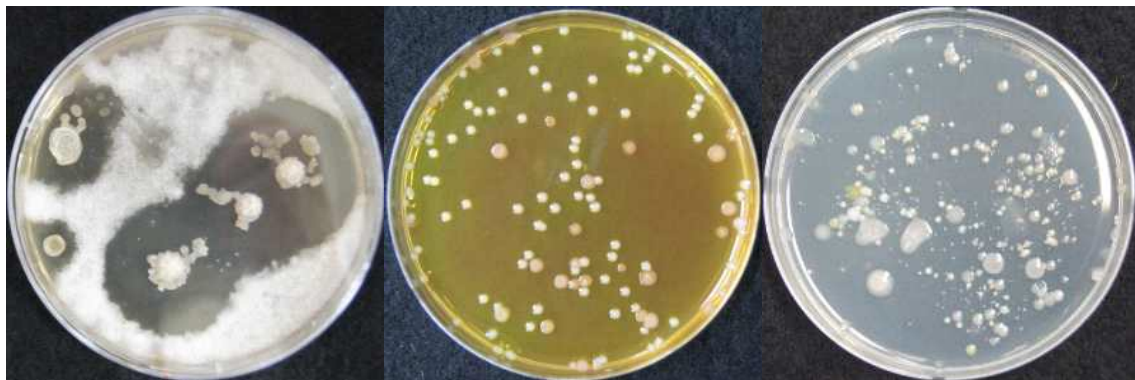


Fig. 64. Antimicrobial activity tests of bacteria obtained from soil and kimchi cabbage root.

S7

S9



S10

S11

Fig. 65. Bacterial colony morphology of S7, S9, S10, S11 on NA media.

Table 21. Antifungal activity of four bacteria against major plant pathogens by opposite culture on PDA media

Isolate	Isolated site	Pathogen									
		<i>B.cinerea</i>		<i>F.oxysporum</i>		<i>R.solani</i>		<i>S.rolfsii</i>		<i>S.sclerotiorum</i>	
		inhibition zone (mm)	inhibition severity (%)	inhibition zone (mm)	inhibition severity (%)	inhibition zone (mm)	inhibition severity (%)	inhibition zone (mm)	inhibition severity (%)	inhibition zone (mm)	inhibition severity (%)
S7	Soil	17	67.9	18	14.2	18	68.9	46	20.6	23	60.3
S9		18	66.0	16	23.8	22	62.0	21	63.7	22	62.0
S10		18	66.0	15	28.5	22	62.0	20	65.5	19.5	66.3
S11		19	64.1	16	23.8	23	60.3	19	67.2	22	62.0

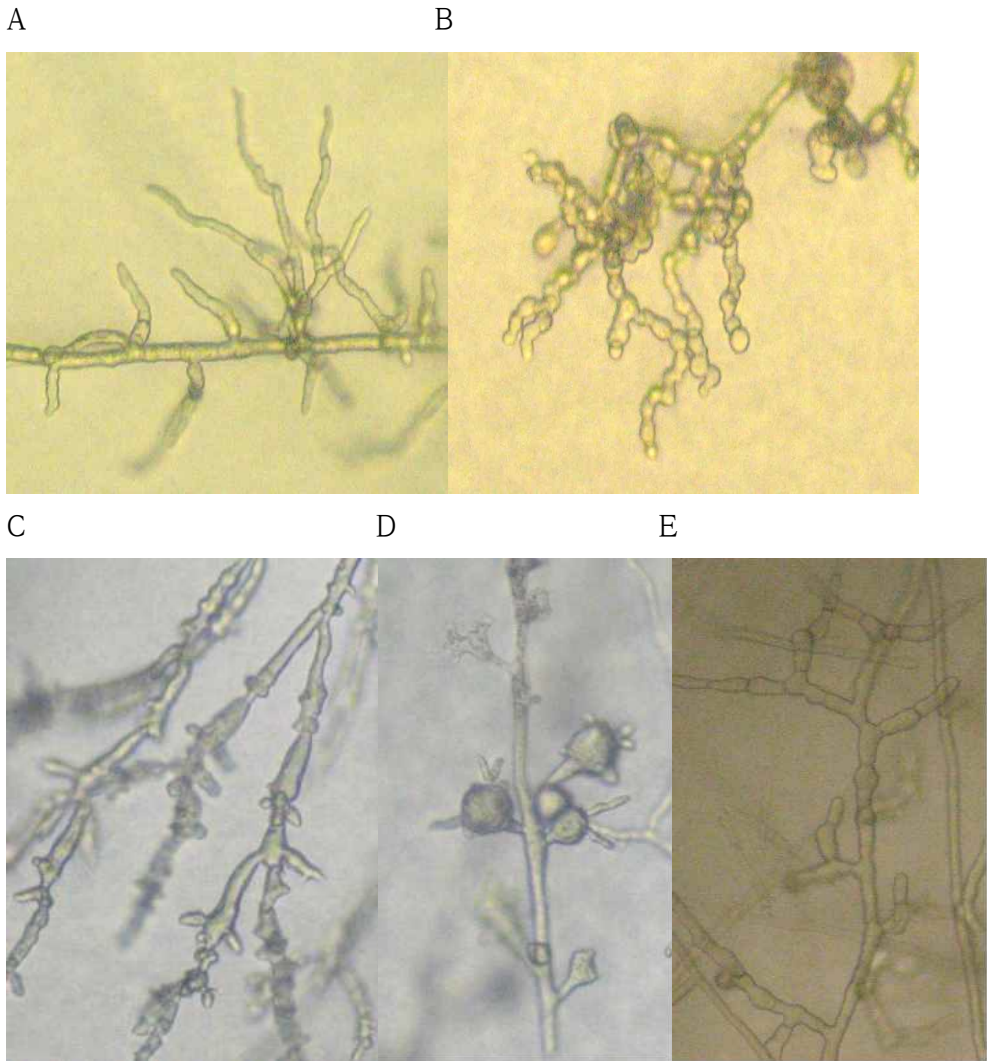


Fig. 66. Shapes of irregular mycelia of plant pathogenic fungi in opposite culture with S7 bacteria PDA media.

A: Inhibition of mycelial growth, B~E: Swelling.

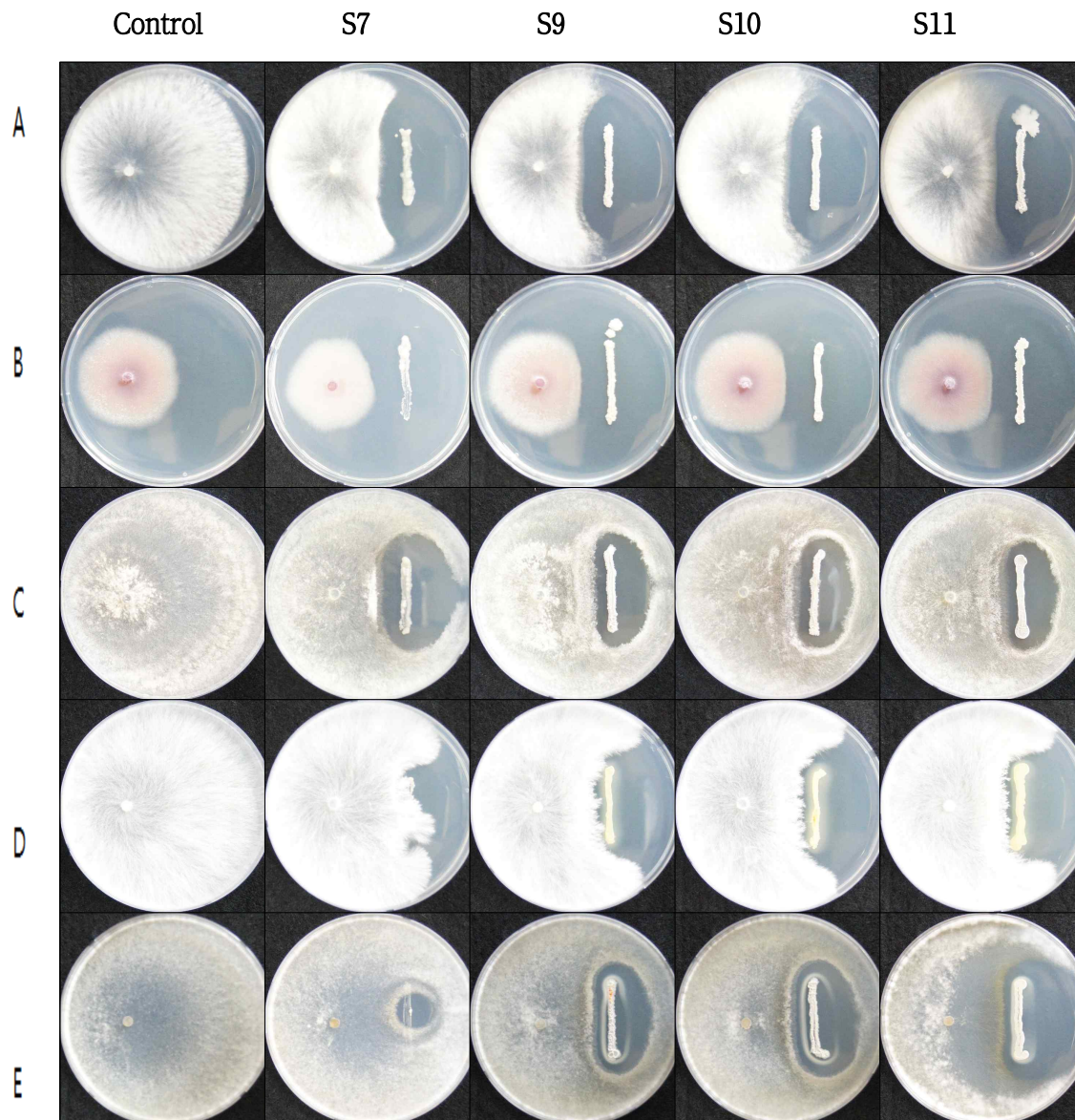


Fig. 67. Antifungal activity of selected bacteria against important plant pathogens having distinct characteristics on PDA.

(A; *B.cinerea*, B; *F.oxysporum*, C; *R.solani*, D; *S.rolfsii*, E; *S.sclerotiorum*)

## (2) 길항세균의 동정

뿌리혹병은 화학적 방제(Chang 등, 2000; Cheah과 Page, 1995; Oh 등, 1997)는 농약살포의 살포횟수가 증가함에 따라 병원균의 약제 저항성 증가, 토양 환경오염, 토양 생태계의 혼란을 야기하는 등의 문제가 제기되면서 길항균을 이용한 뿌리혹병 방제에 대한 연구가 필요하다.

배추뿌리혹병의 생물학적 방제를 위해서 토양에서 분리된 길항세균을 작년에 실시하지 못했던 *Phytophthora capsici*과의 대치배양실험을 추가적으로 실시한 결과 고추역병균에도 길항력을 가지고 있는 것으로 확인하였고(Fig. 68) S11 isolate(Fig. 69)도 길항력이 높았지만 가장 강한 길항세균은 J4 isolate였다.

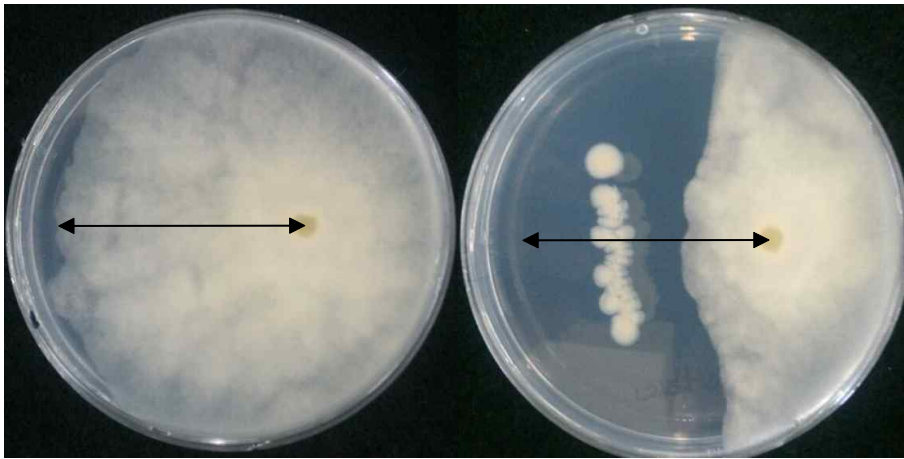


Fig. 68. Antifungal activity of selected bacteria(J4 isolate) against *Phytophthora capsici* having distinct characteristics on PDA.



Fig. 69. Antifungal activity of selected bacteria(S11 isolate) against *Botrytis cinerea* having distinct characteristics on PDA.

길항세균을 동정하기 위해서 형태적·생화학적 특성을 분석하고 분자생물학적 분석까지 실시하였다. 먼저 NA 배지상에서 colony의 형태를 관찰하고(Fig. 70) 그람염색을 통해 그람양성의 형태를 확인하였다. 이(2010)의 연구에서 보면 *Bacillus* sp.의 Scanning Electron Microscope(SEM)모습은 Fig. 71과 동일하게 생겼다. 16S rDNA 유전자를 분석한 결과 S7길항세균만 *Paenibacillus*속으로만 분석되고(Fig. 73) 나머지 4개의 길항세균들도 *Bacillus*속 내에서 정확하지 않게 분석되었다(Fig. 74). 이렇기 때문에 정확한 세균의 동정을 위해 *gyrA* 유전자의 염기서열 분석(김영숙, 2005; Nam *et al.*, 2009; 이동국, 2010)을 추가로 해야 할 필요가 있다.



Fig. 70. Bacterial colony morphology of S7(*Paenibacillus* sp.), S10(*Bacillus* sp.) on NA media.



Fig. 71. Observation of *Bacillus amyloliquefaciens* on surface of NA medium by Scanning Electron Microscope(SEM)



이 결과로 *Bacillus*속과 *Paenibacillus*속 세균을 동정하는 API 50 CHB kit와 API 20E를 사용하여 생화학적 동정을 한 결과 S7은 *Paenibacillus macerans*로 나머지 4개의 세균은 *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*로 유사종 두 종의 세균으로 동정되었다(Fig. 74, 75). S7길항세균은 16S rDNA 시퀀스 분석을 통해 얻어진 phylogenetic tree 결과로 보아 생화학적 분석으로 얻어진 *P. macerans*군과의 유사도가 차이가 많이 나기 때문에 꼭 추가적인 동정이 필요하다(Fig. 71, 72).

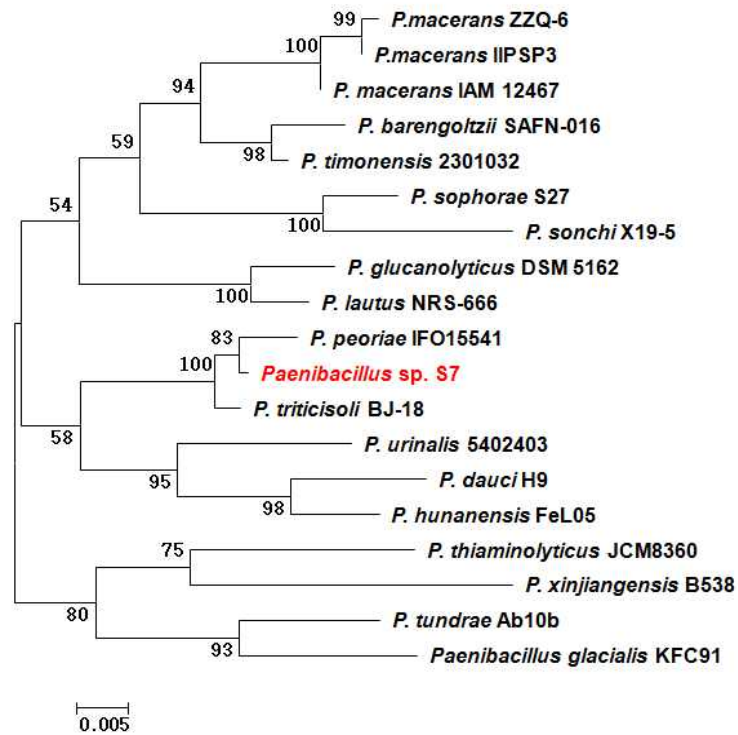


Fig. 72. gene sequence comparison showing the position of S7 solate among related species of the genus *Paenibacillus* phylogenetic tree based on 16S rDNA.

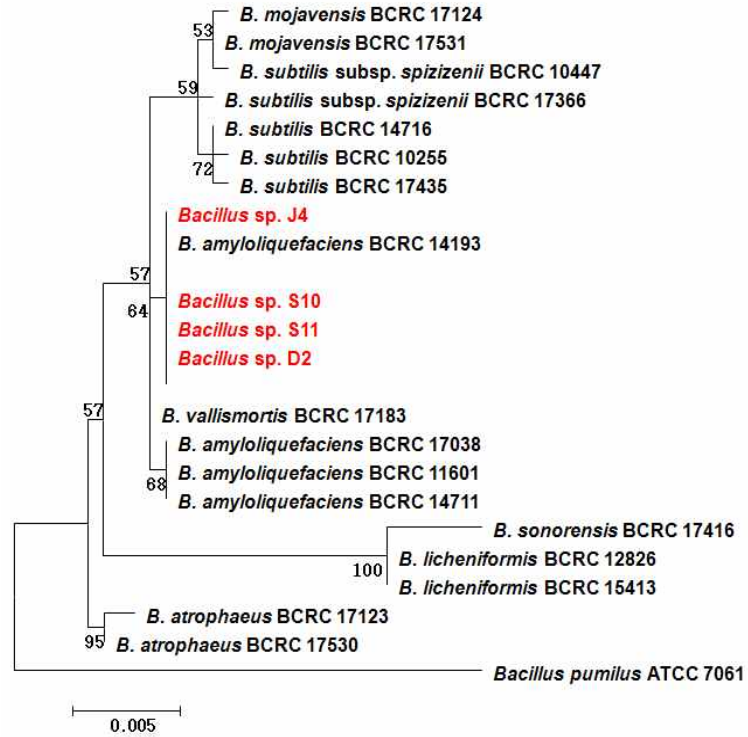


Fig. 73. gene sequence comparison showing the position of S10, S11, D2, J4 isolate among related species of the genus *Bacillus* phylogenetic tree based on 16S rDNA.



Fig. 74. Biochemical and physiological characteristics using API 50 CHB(A), API 20 NE kit(B) of S10(*Bacillus* sp.) and analysis(C).



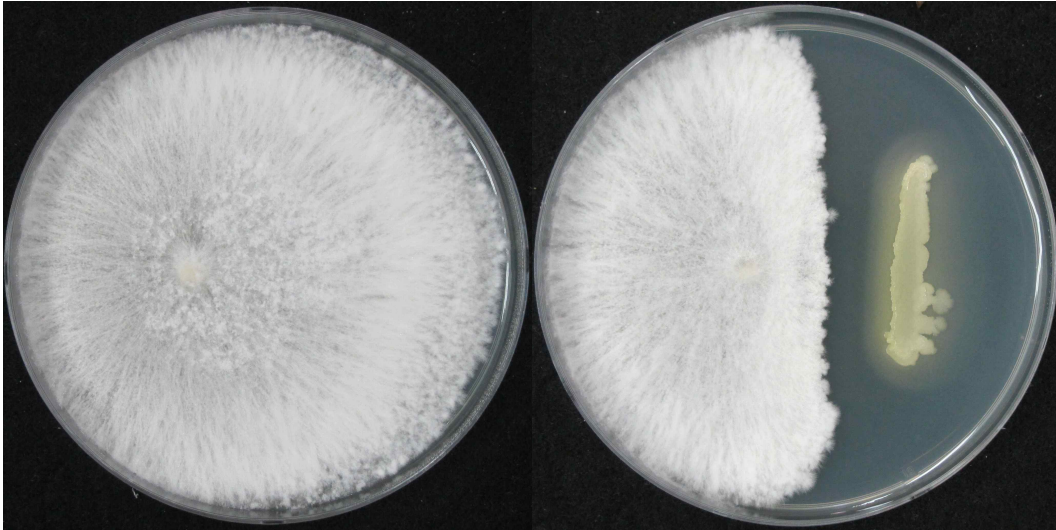


Fig. 77. Antifungal activity of selected bacteria(TL4 isolate) against *Sclerotium rolfsii* having distinct characteristics on PDA.



Fig. 78. Antifungal activity of selected bacteria(TL1 isolate) against *Rhizoctonia solani* having distinct characteristics on PDA.

길항세균을 동정하기 위해서 형태적·생화학적 특성을 분석하고 분자생물학적 분석까지 실시하였다. 먼저 NA 배지상에서 colony의 형태를 관찰하고 그람염색을 통해 그람양성의 형태를 확인하였다(Fig. 79, 80). 16S rDNA, GyrB 유전자를 분석한 결과 TL1, TL4 길항세균 모두 *Bacillus amyloliquefaciens*속으로 분석되었다(Fig. 81).

이 결과로 *Bacillus*속 세균을 동정하는 API 50 CHB kit를 사용하여 생화학적 동정을 실시한 결과 TL1, TL4 모두 *B. subtilis/amyloliquefaciens*로 유사종 두 종의 세균으로 동정되었다(Fig. 82). 이들 분자생물학적, 생화학적 동정을 토대로 TL1과 TL4 길항세균을 *B. amyloliquefaciens*로 최

종 동정하였다.



Fig. 79. Bacterial colony morphology of TL4(*Bacillus amyloliquefaciens*) on NA media.

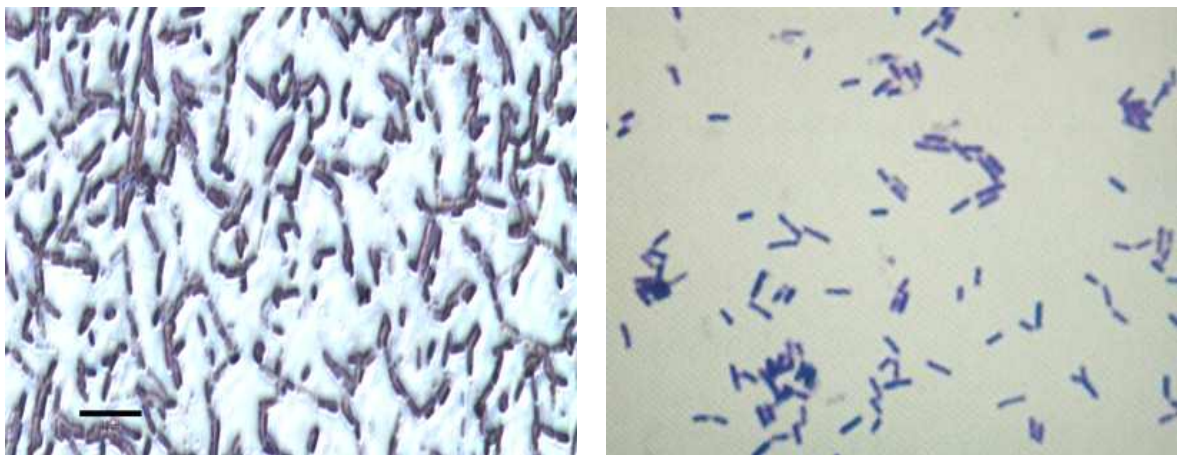


Fig. 80. Morphological observation of *Bacillus amyloliquefaciens* by Gram staining.



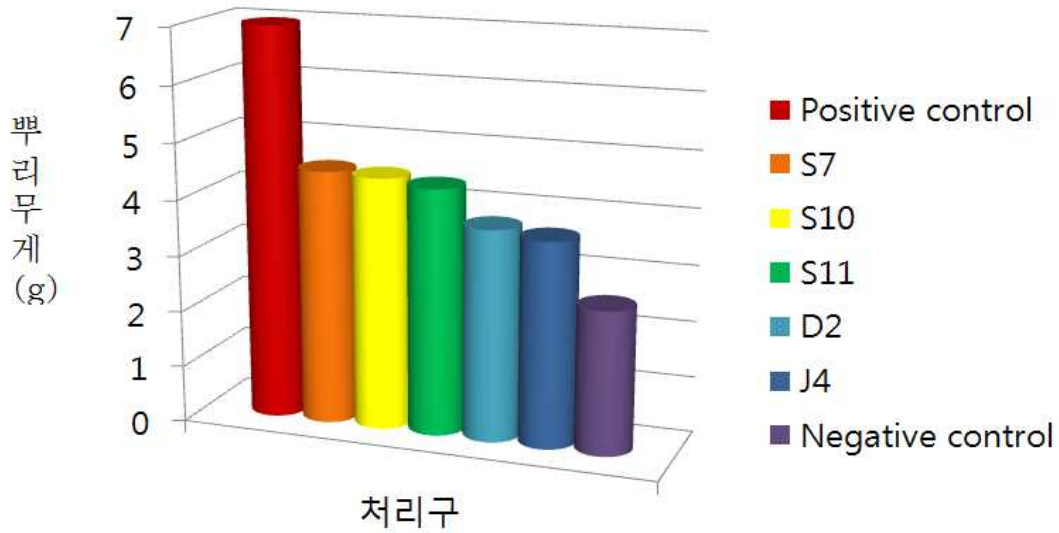


Fig. 83. Effects of antagonistic bacteria treatment on root weight.

뿌리혹병은 뿌리를 비대하고 무겁게 만드는 병이기 때문에 그 무게를 측정해서 비교해본 결과 길항세균 J4가 가장 작았다. 건전식물체의 무게와 비교하였을 때 약 70%의 차이가 발생하였다. 이 실험은 생물학적 방제제에 많이 이용되는 농도  $10^8$ cfu/ml로 처리하지 않고 길항세균의 농도를 대폭 낮춘  $1 \times 10^4$ cfu/ml로 처리해 매우 저농도에서 실험된 점임을 감안할 때 유용길항세균 무처리구에 비해 뿌리혹크기가 70%이상이 감소되는 결과를 보여 뿌리혹무게의 억제력은 시판 중인 농약의 방제효과에 버금갈 정도로 매우 높았다(Fig. 84, 85). 추가적으로 실험한 후에 농업현장에서 뿌리혹병에 대한 예방적 방제제로써 활용한다면 기대 이상의 큰 방제효과를 거둘 수 있을 것으로 판단되며 생물학적 방제제로서 높은 개발 가능성이 기대된다.

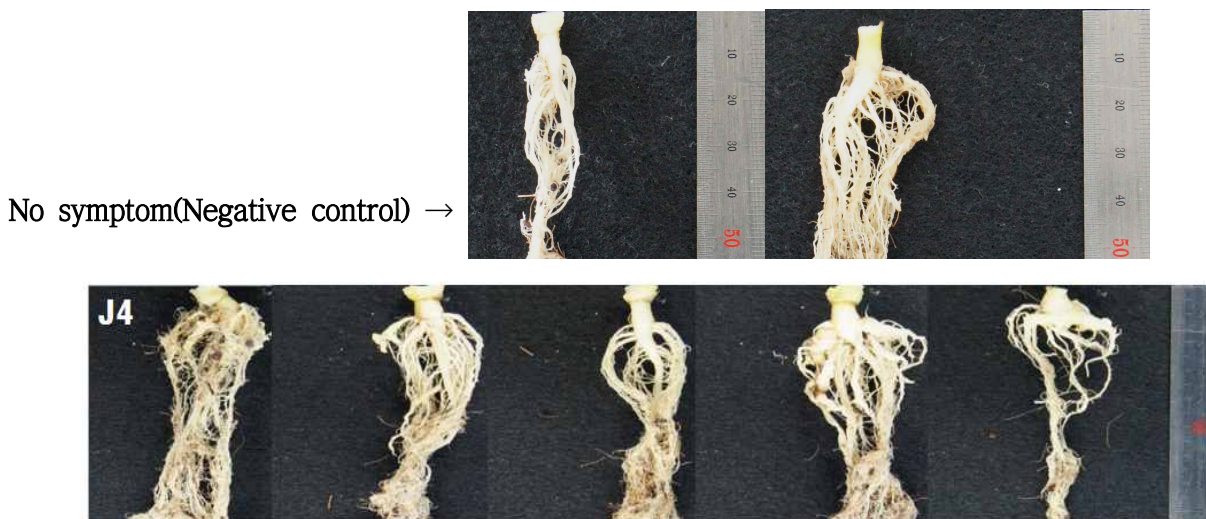


Fig. 84. Control effect of J4 isolate which showed the most effective control efficacy against *P. brassicae* on kimchi cabbage root, 7 weeks after artificial inoculation.



Fig. 85. Control effect of S7, S10, S11, D2 isolate against *P. brassicae* on kimchi cabbage root, 7 weeks after artificial inoculation.



2016년 추가 실험에서는 순환물 기생체인 뿌리혹병균에 대한 실내 길항력 검정실험으로 3개의 식물병원균과의 대치배양으로 2개의 길항세균이 선발되었고, 작년 효과를 보였던 J4 isolate를 추가하여 총 3개의 길항세균을 가지고 PGPR으로서의 기능과 온실 내 예방적 방제차원에서 생물검정을 실시한 결과를 엽수, 엽장, 엽폭, 뿌리혹의 무게를 측정하여 비교하였다(Fig. 86-93).

PGPR 기능으로서 식물체 잎의 수, 길이, 너비를 비교한 결과, TL4가 가장 식물체 생장을 촉진시키는 것으로 확인됐으며 TL1의 경우 J4와 비슷한 결과를 보였다. 뿌리혹병은 뿌리를 비대하고 무겁게 만드는 병이기 때문에 그 무게를 측정해서 비교해본 결과, 병원균을 처리하지 않은 negative control의 뿌리무게와 길항세균을 처리한 길항세균 모두는 병원균을 처리한 positive control에 비해 뿌리무게가 낮게 나타났으며, 그 중 TL4 길항세균은 PGPR의 기능 뿐만 아니라 다른 길항세균에 비해 월등한 길항능력을 가진 것으로 판단된다.

또한 기존의 생물학적 방제제에 많이 이용되는 농도로 실험된 점임을 감안할 때 병원균을 처리한 처리구에 비해 뿌리혹크기가 50%이상이 감소되는 결과를 보여 뿌리혹무게의 억제력은 시판 중인 농약의 방제효과에 버금갈 정도로 매우 높았으며, 추후 농업현장에서 뿌리혹병에 대한 예방적 방제제로써 활용한다면 기대 이상의 큰 방제효과를 거둘 수 있을 것으로 기대된다.

No symptom(Negative control) →



J4→



TL1→



TL4→

Fig. 86. Control effect of J4, TL1, TL4 isolate against *P. brassicae* on kimchi cabbage root, 7 weeks after artificial inoculation.

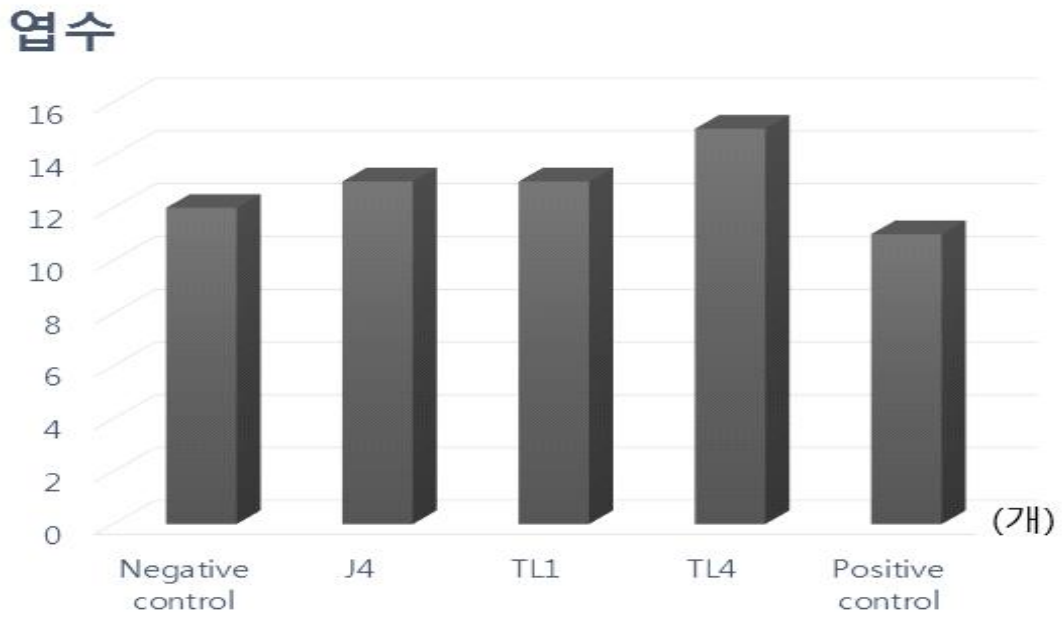


Fig. 87. Effects of antagonistic bacteria treatment on leaf number.  
 Negative control; non-treated *P. brassicae*, Positive control; treated *P. brassicae*.

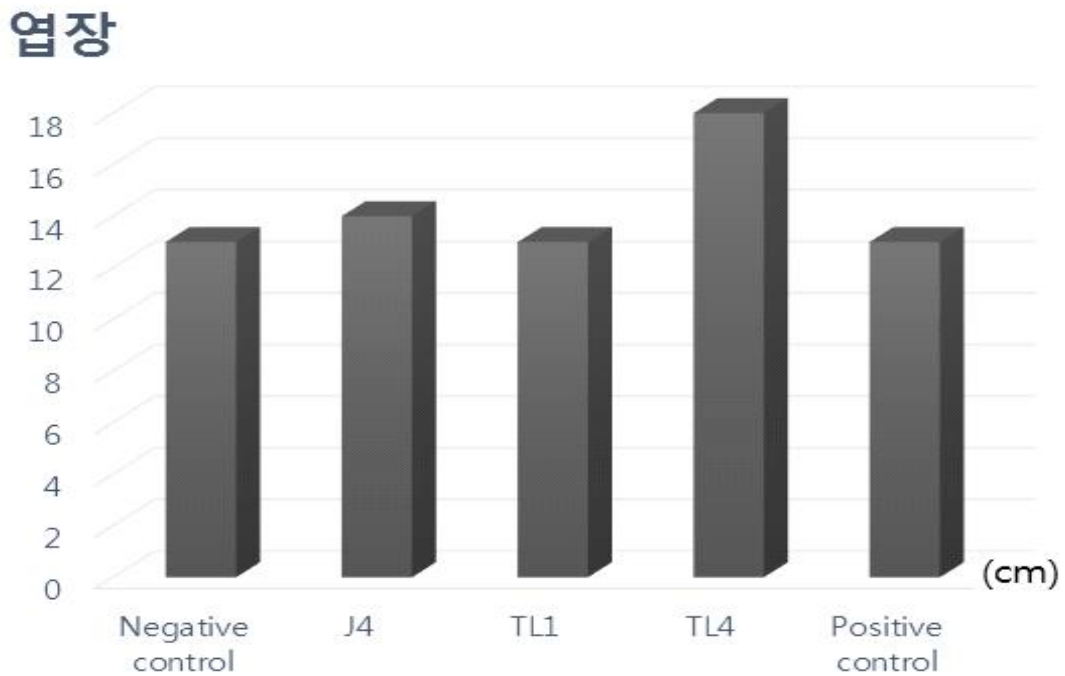


Fig. 88. Effects of antagonistic bacteria treatment on leaf length.  
 Negative control; non-treated *P. brassicae*, Positive control; treated *P. brassicae*.

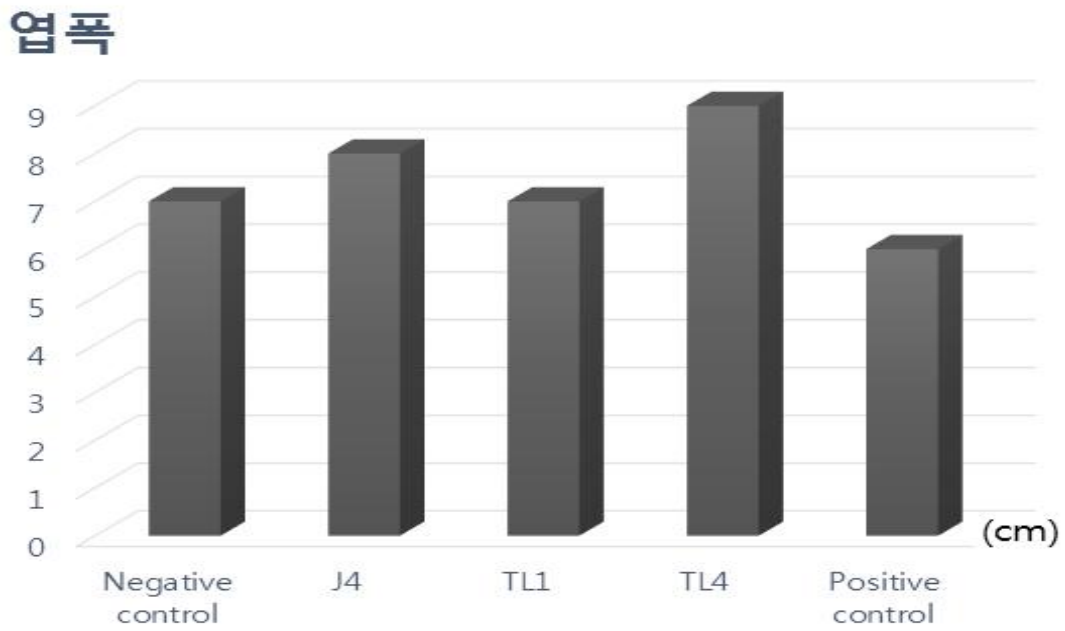


Fig. 89. Effects of antagonistic bacteria treatment on leaf width.  
 Negative control; non-treated *P. brassicae*, Positive control; treated *P. brassicae*.

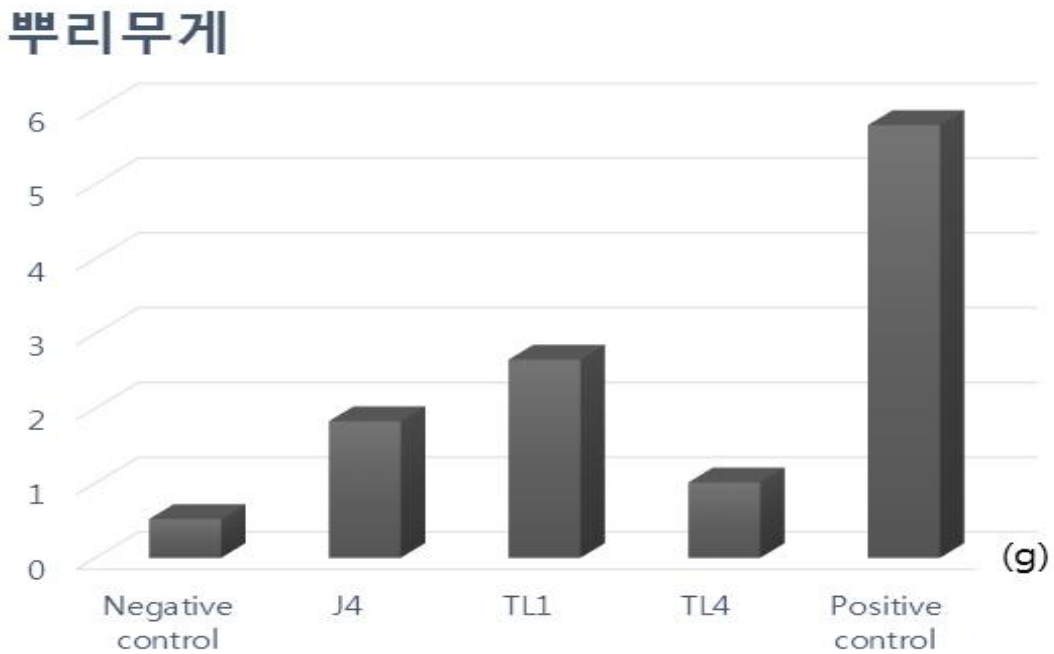


Fig. 90. Effects of antagonistic bacteria treatment on root weight.  
 Negative control; non-treated *P. brassicae*, Positive control; treated *P. brassicae*.

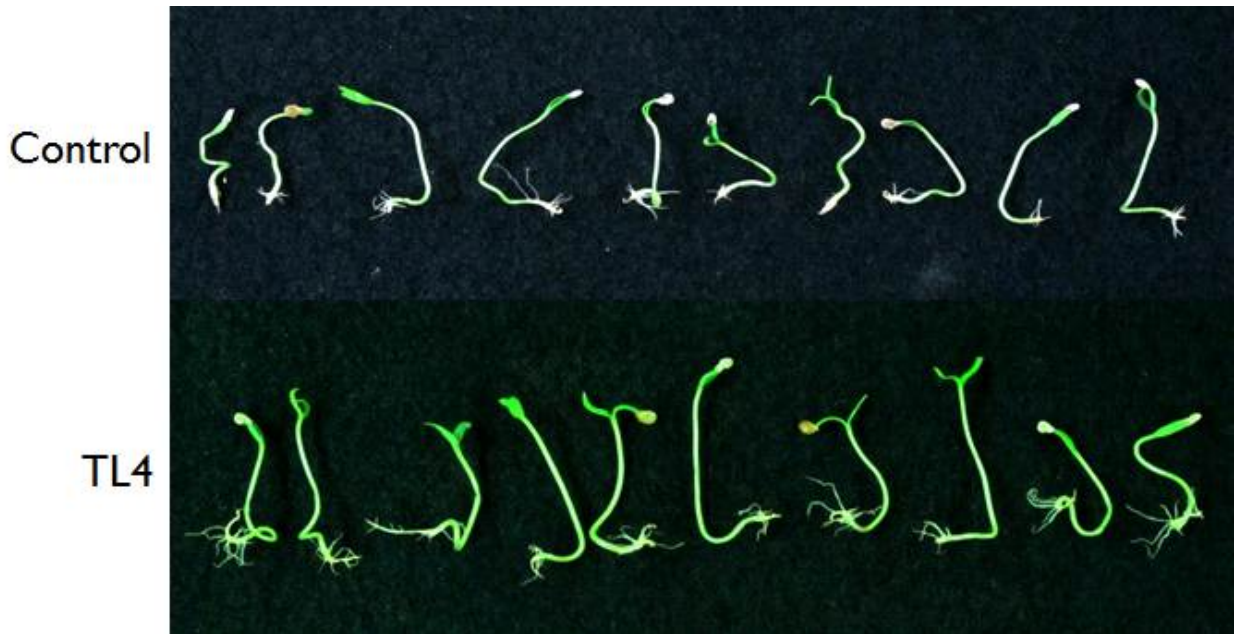


Fig. 91. Growth comparison between no-inoculation and inoculation(TL4 isolate) in tomato



Fig. 92. Plant Growth promoting effect on tomato by antagonistic bacteria TL4.



Fig. 93. Growth comparison of no-inoculation and antagonistic bacteria(J4, TL1, TL4 isolate) treatment in kimchi cabbage.

PGPR 능력이 가장 좋았던 TL4 최적 배양조건을 알아보려고 최적 배지, 최적 온도, 최적의 pH와 같은 실험을 실시하였다(Fig. 94-96).

최적의 배지를 알아보려고 LB, TSB, MS, NB 배지를 이용하여 cfu값을 측정한 결과, LB배지에서 가장 높은 cfu값을 나타냈으며, 높은 cfu 값을 나타냈던 LB 배지에서 최적 온도 조건과 최적의 pH값을 구하였다. 최적 온도를 알아보려고 30, 33, 37°C 중 37°C에서 높은 cfu 값을 나타냈으며, pH값은 pH7에서 높은 cfu 값을 얻을 수 있었다.

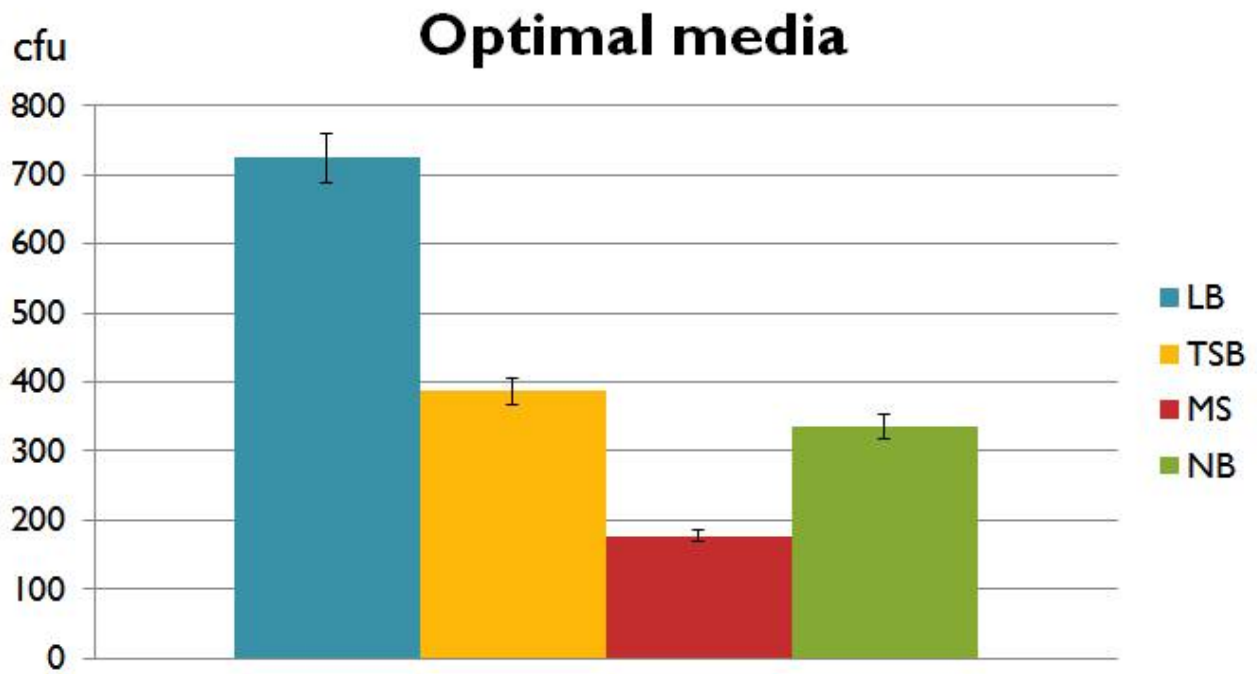


Fig. 94. Average of CFU counted on NA media.

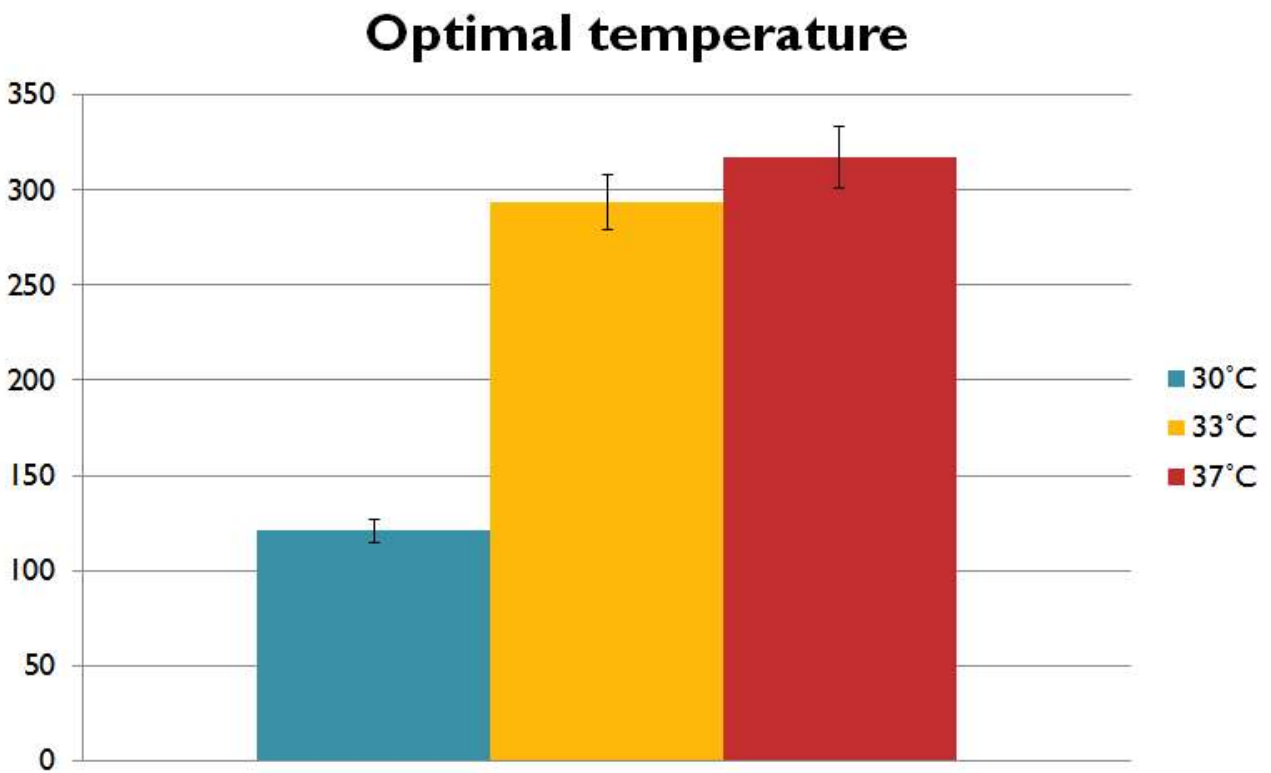


Fig. 95. Optimal temperature for TL4 isolate on LB media

## Optimal pH

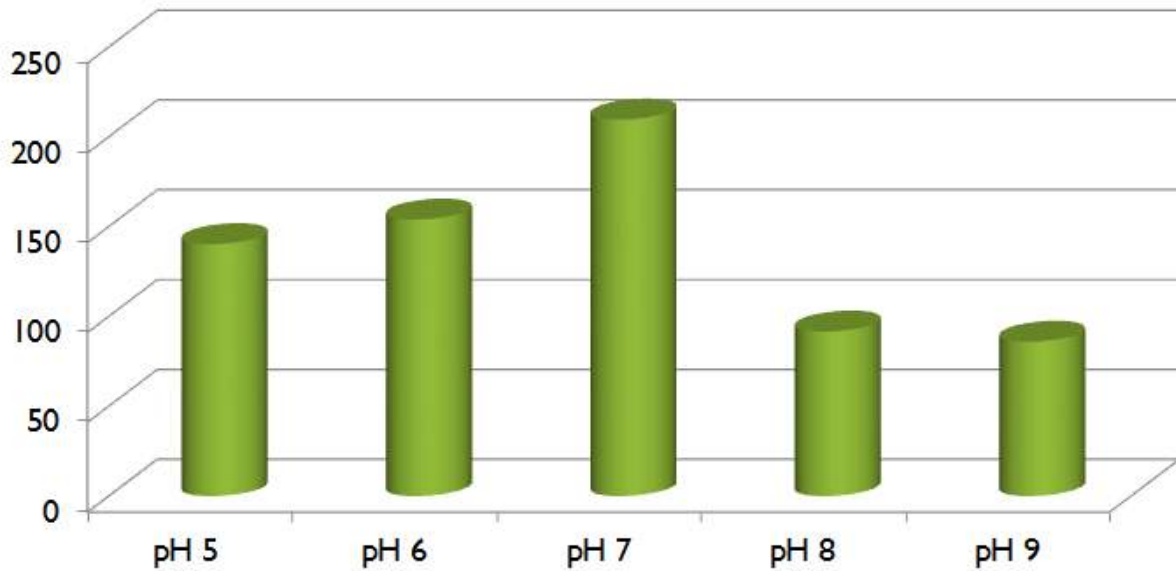


Fig. 96. Optimal pH for TL4 isolate on LB media and 37°C.

### 차. 순수포자의 대량획득 방법 개발

과거에는 뿌리혹병균을 4~5겹의 거즈로 걸러주고 사이즈가 조금 큰 50 $\mu$ m filter를 사용하고 그 후 바로 washing을 하여 과정이 매우 짧았지만, 그만큼 상토나 식물체의 잔재물이 많아 DNA를 분리할 때 오염이 많이 생성되었다.

사실 뿌리혹병균 *Plasmodiophora brassicae*는 병원균의 특성상 순수한 포자를 수거하기 매우 어려워서 많은 연구자들에게 해결해야 할 과제를 주고있다. 때문에 해결점을 찾고자 순수한 뿌리혹병균 포자의 대량획득 방법을 개발하기 위해 거즈와 20 $\mu$ m + 11 $\mu$ m 두 가지 사이즈의 Cellulose nitrate filter를 3번 반복해 이용한 방법을 수행한 결과 현미경 상에서 토양 잔여물 및 식물체 조직이 대부분 제거된 것을 확인할 수 있었다(Table 22).

단계별로 분리된 포자수를 측정해 본 결과 filtration법으로 단계가 지날수록 포자의 농도는 줄어들었지만 분리되는 포자수를 측정한 결과 filtration법에서는  $1 \times 10^7$  spores/ml로 DNA 분리에 충분한 많은 양의 포자를 수거할 수 있었다(Fig. 97). Filtration법은 순수분리의 문제점을 크게 개선함으로써 이후 뿌리혹병균의 분자생물학 연구에 매우 유용할 수 있음을 보여주었다.

A

B



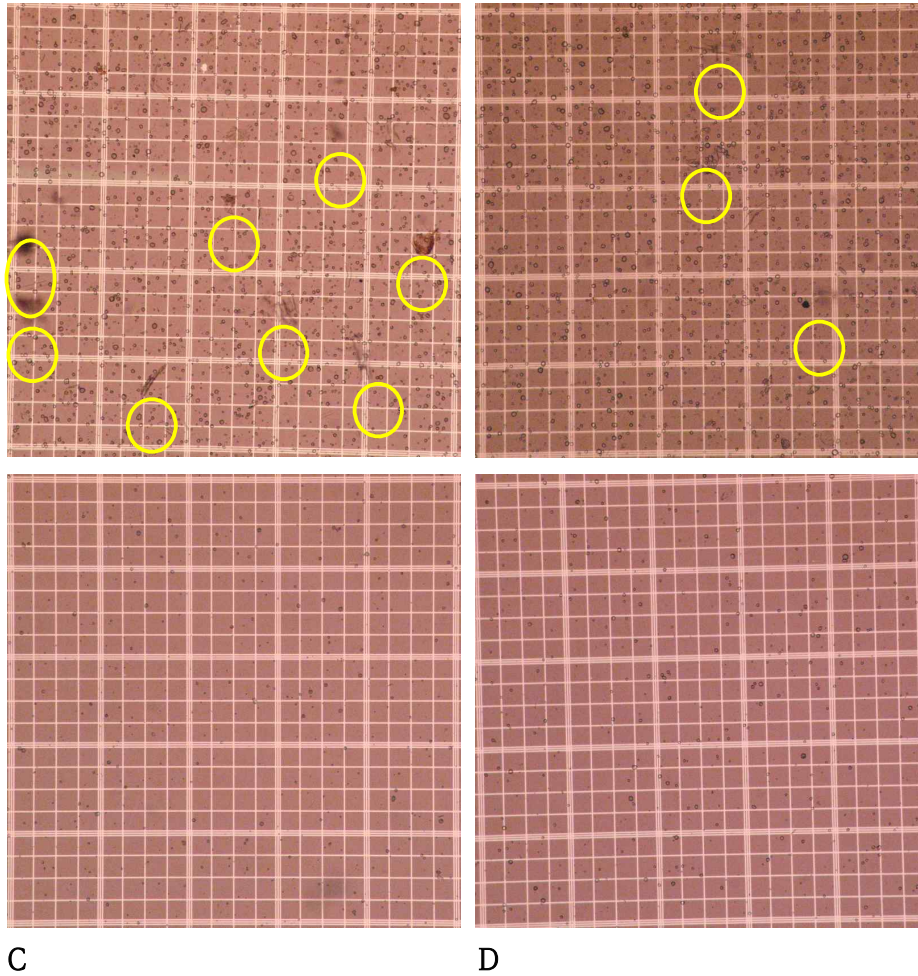


Fig. 97. Comparison of spore suspension purity between four extraction methods by microscopic observation after grinding Homogenizer A, Gauze filtration B, Gauze + 20 $\mu$ m cellulose nitrate filter C, Gauze + 20 $\mu$ m, 11 $\mu$ m cellulose nitrate filter D. Plant cell debris are in circle(O) of A and B. C and D show pure spores that debris were removed.

Table 22. The amount of resting spores of *P. brassicae* recovered by the different collecting methods.

Method	Number of resting spore (spore / ml)
Gauze	$3.9 \times 10^7$
Gauze+ 20 $\mu$ m cellulose nitrate filter	$1.4 \times 10^7$
Gauze+20 $\mu$ m + 11 $\mu$ m cellulose nitrate filter 3 times	$1.0 \times 10^7$

이전 연구에서 사용된 Gauze와 Sucrose를 이용한 방법(Castlebyry et al., 1994)과 비교 시 이 물질들이 많이 제거된 순수한 포자를 수거할 수 있었으며(Fig. 98), sucrose를 제거하는 과정을 거치지 않아, 보다 단순하고 시간이 적게 걸리는 Filtration법이 유용할 것으로 판단된다.

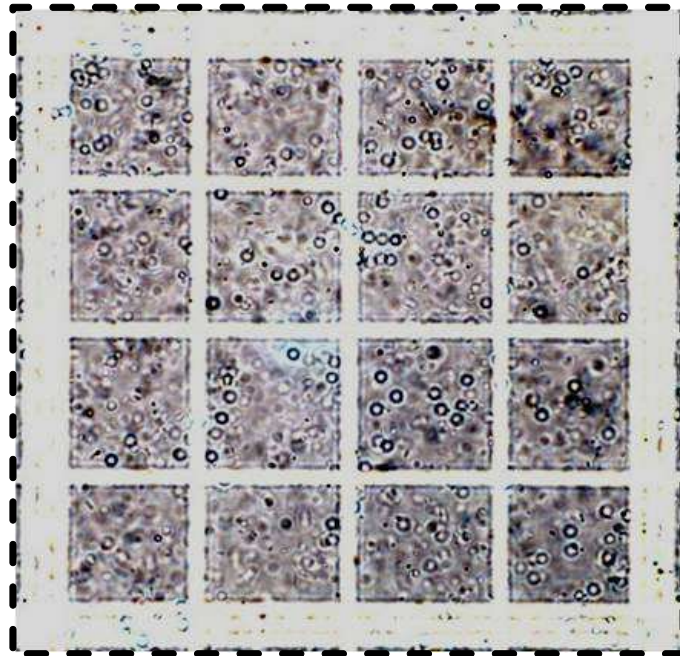


Fig. 98. Spore suspension purity between four extraction methods using gauze + cellulose nitrate filter.

세균 없이 휴면포자만을 순수하게 분리하기 위하여 Fig. 5의 굵게 표시된 PBS buffer에 3가지 항생제 streptomycin, vancomycin, chloramphenicol을 넣어 실험을 실시하였고, 3단계의 filtration 과정을 통해 포자수거를 하였다. 최종 filtration단계 후 걸러진 휴면포자현탁액을 배지에 도말하여 세균의 존재여부를 확인하였고, 최적의 항생제 사용 농도를 찾기 위해 항생제 농도를 줄여가며 실험을 실시하였다(Fig. 99, 100).



Fig. 99. Medium without antibiotics(left) and antibiotic-treated medium(right).



Fig. 100. Suspended spore suspension using medium according to antibiotic concentration. left; 40%, middle; 60%, right; 80%

카. 정확한 뿌리혹병균 동정을 위한 종특이적 primer의 성능 검정

본 실험실에서 개발한 specific primer set (ITS1-1, ITS1-2)의 성능 재검정을 위해 다른 식물 주요 병원균의 DNA와 함께 PCR을 해보았을 때 아래의 사진처럼 뿌리혹병균에 대해서만 종특이적으로 증폭되는 것으로 확인되었다(Fig. 101). 여전히 이 primer는 뿌리혹병균을 탐지하는데 아주 유용하다고 판단되었기 때문에 추후 race 검정이 되기 전 단계까지의 뿌리혹병균 종정을 위해서는 사용이 가능하다고 보여진다. 추가적으로 뿌리혹병균 포자의 농도가  $10^2$ spore/ml 일 때까지 탐지할 수 있었다(Fig. 102).



Fig. 101. The specificity test of *P. brassicae* specific primer set(ITS1-1, ITS1-2).

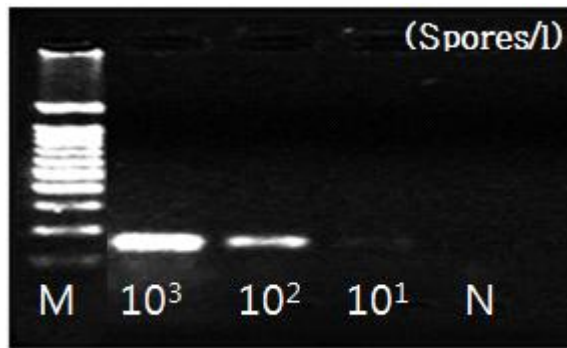


Fig. 102. The PCR sensitivity test of *P. brassicae* specific primer set (ITS1-1, ITS1-2).

또한 quantitative real-time PCR 검정을 위해 포자현탁액을  $10^0 \sim 10^6$  spores/ml로 조정 한 후 DNA를 분리한 것을 ITS1-1/ITS1-2를 이용하여 quantitative real-time PCR을 수행했을 때  $10^2$  spores/ml까지 검출이 가능하였다(Fig. 103). 이는 기존의 Wallenhammar 등(2012)에 의해 개발된 real-time PCR용 프라이머의 민감도  $500 \text{ resting spores/g}^{-1}$  soil 보다 높은 민감도를 보였으며, 또한 희석된 DNA의 threshold cycle 값에 의해 작성된 standard curve 값을 통해 여러 샘플 간의 DNA 농도에 대한 상대적인 정량이 가능하였다. 본 결과를 토대로 Real-time PCR에서 SYBR Green을 활용한 균주 특이적인 quantitative real-time PCR 검정이 가능할 것으로 사료된다.

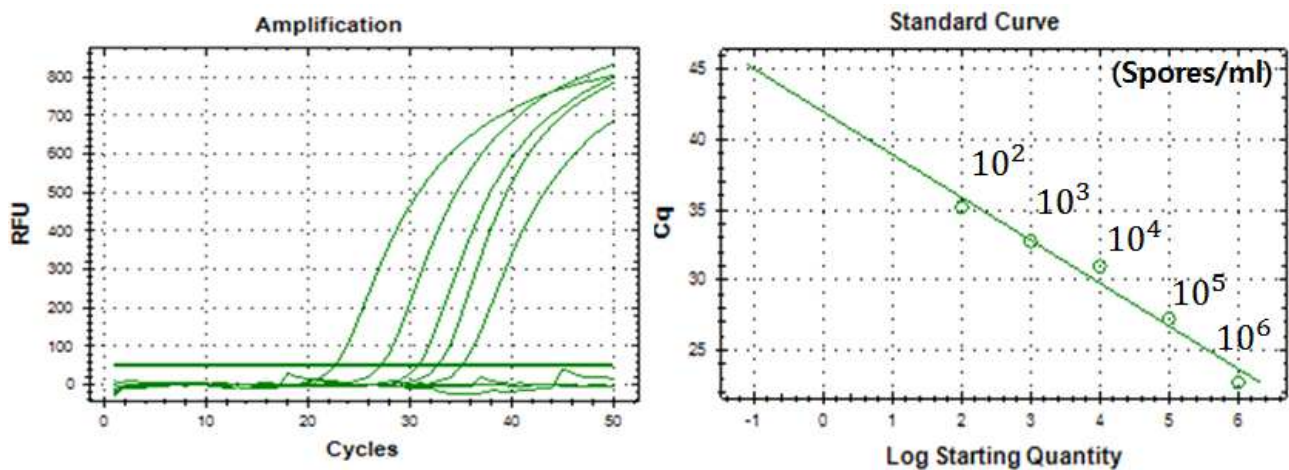


Fig. 103. Sensitivity of primer set ITS1-1/ITS1-2 for *Plasmodiophora brassicae* on quantitative real-time PCR using SYBR Green.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구목표의 달성도

#### 1. 제1세부 과제: 배추 유전자원 수집 및 육종재료 신속작성 기술

- 가. 1차년도: 국외자원 28점 수집(광저우 17점, 베이징 11점), 소포자 배양 서비스 실시(6개 종묘회사 20종 100점 서비스 실시 결과 1,466점 순화, 1,094점 분양 완료), 유전자원 분양 8건
- 나. 2차년도: 국외자원 11점 수집(미국 3점, 이스라엘 3점, 중국 5점), 소포자 배양 서비스 실시(5개 종묘회사 30종 150점 서비스 실시 결과 배상체 1,641점 순화, 1,578점 분양 완료), DH 계통 10개 개발, SCI논문 출간, 유전자원 분양 9건, 신품종 ‘원교20042호’ 출원
- 다. 3차년도: 국외자원 14점 수집(일본 14점), 소포자 배양 서비스 실시(2개 종묘회사 10종 50점 서비스 실시 결과 배상체 77점 순화, 70점 분양 완료), DH 계통 5개 개발, 소포자배양 기술이전, 유전자원 분양 5건, 신품종 ‘원교20040호’ 출원
- 라. 4차년도: 국외자원 8점 수집(미국 1점, 일본 7점), 소포자 배양 서비스 실시(4개 종묘회사 39종 195점 서비스 실시 결과 3,957점 순화, 3,190점 분양 완료), 비SCI논문 출간, 유전자원 분양 6건, 신품종 ‘원교20045호’ 출원

#### 2. 제2세부 과제: 글루코시놀레이트 고함유 배추 육종 지원을 위한 실용적 분자표지 개발

- 가. 1차년도: 글루코시놀레이트 함량 조사를 위하여 배추 유전자원 확보 및 글루코시놀레이트 분석 시스템구축 후 배추 60종에서 글루코시놀레이트 함량 조사
- 나. 2차년도: 1차년도 후보군 배추 계통을 선발 후 재배 시기별로 글루코시놀레이트분석 재실시 후 검증과정을 거쳐 분자표지 개발용 2 계통을 선발
- 다. 3차년도: 분자표지 개발용 배추 2 계통을 이용하여 유전체분석을 통하여 글루코시놀레이트 생합성 유전자 관련 primer 확보
- 라. 4차년도: 여러 실험적 근거를 통해 47번 SNP 분자마커가 글루코시놀레이트 함량 예측에 가장 근접하게 활용될 수 있으리라 판단됨. 4년 과제를 통하여 글루코시놀레이트 함량 예측 가능한 분자마커를 개발하여 목표를 달성함

#### 3. 제3세부 과제: 분자 및 유전체육종 효율화 시스템 개발

- 가. 1차년도:
  - (1) MABC 시스템 구축 (여교배 선발효율화 위한 Marker Assisted Backcrossing): 계통별 유전체 재분석 및 유전체 구조 분석을 위한 대량의 SNP 확보
  - (2) 내병성 형질 MAS 용 마커 개발: 뿌리혹병, 노균병, 바이러스 저항성 식물자원을 확보하였고, 뿌리혹병 연구를 위하여 뿌리혹병원균 지역균주 및 단포자유래 뿌리혹병 균주 확보

및 증식을 하였음. 한국, 일본, 중국에서 확보한 저항성계통의 내병성 평가로 뿌리혹병 내병성 검정을 위한 지표를 확립하였음.

나. 2차년도:

- (1) MABC 시스템 구축: 대용량 프라이머 디자인을 수행하였고, 2년차에는 *In-silico* 상에서 예측된 SNP를 선발(물리적 거리 1Mb, unigene set, MAF기준)하여 HRM 방법으로 SNP를 실험으로 검증(SNP validation).
- (2) 내병성 형질 MAS 용 마커 개발: 기 보고된 내병성 형질 연관 분자마커 정보 수집 및 분석에 적용, 표현형과 저항성 형질 연관 분자 마커와의 연관성 분석을 하고자 하였음. 기 보고된 내병성 형질 연관 분자마커로 마커검정하여 마커개발에 사용한 계통 특이적 마커가 아니라 유전자원 전체에 적용 가능한 범용마커를 선발하였음.

다. 3차년도:

- (1) MABC 시스템 구축: 분석 효율성이 높은 바이오막의 fluidigm 방법으로 SNP validation 및 선발. 일부 마커로 종묘회사에서 분양받은 교배집단에서 목적형질의 고정을 위해 세대진전하는 과정에서 MABC 검정을 수행하여 선발을 지원하였음.
- (2) 내병성 형질 MAS 용 마커 개발: 범용성이 적용 되지 않는 마커에 대한 개선을 수행하였고, 확보한 뿌리혹병 저항성 자원을 이용하여 저항성 형질과 연관한 마커를 개발하였음.

라. 4차년도:

- (1) 종묘회사에서 분양받은 내혼계 자원 및 교배조합(F<sub>1</sub>)을 이용하여 각 SNP 마커에 대한 효율성을 검정하고 순도검정을 위한 마커 셋트를 선발 하였음.
- (2) 내병성 형질 MAS 용 마커 개발: 저항성 bi-parents를 이용한 QTL 결과 및 182점의 natural population을 이용한 GWAS결과에서 후보유전자를 선발하고 validation 하였음.

#### 4. 제4세부 과제: 시판 및 수출용 배추와 무 뿌리혹병 검정기술 개발

가. 2차년도 : 계획대로 대전, 충남 및 기타 지역에서 배추 뿌리혹을 수집하여 그들의 race를 분석하였다. 수집한 균주를 활용하여 주요 국내 시판 배추와 무 품종들의 병 저항성을 검정하였다. 배추를 비롯한 작물의 근권에서 생물적 방제용 길항미생물을 수집, 항균 특성을 분석하였다.

나. 3차년도 : 계획에 따라 경기도 지역을 중심으로 뿌리혹을 수집, race를 분석하고 수종의 순수 race 균주를 확보하여 그 특성을 분석하였으며 배추와 무 품종에 대한 저항성 검정을 추가로 실시하였다. 효과적인 접종을 위한 뿌리혹 최적 저장기술을 대폭 개선하였다. 선발된 길항균의 기능극대화를 위한 동정과 특성분석을 수행하였고 병 방제 효과를 1차로 검정하였다.

다. 4차년도 : 강원도 지역의 race를 분석하여 그 결과까지 종합해 race 분포지도를 차질없이 작성하였다. 또한 품종을 추가하여 품종들의 저항성 정도를 분석하였다. 식물체 세포벽 구성분에 근거한 새로운 저항성 판정방법을 개발하였다. 여러 면을 고려하여 근권이 아닌 내

생균을 활용한 생물적 방제와 함께 생육촉진효과까지 검정하였다.

## 제 2절. 관련 분야에의 기여도

### 1. 제1세부 과제: 배추 유전자원 수집 및 육종재료 신속작성 기술

고부가가치 소재의 지속적 개발 및 공급으로 배추 품종 육성의 활력을 제고하여 유전자원의 풀 확대로 1인 육종의 한계를 극복하는데 기여하였다. 또한, 민간 회사 육종 담당자와 긴밀한 협력을 통해 육종 목표를 설정하여 그에 해당하는 유전자원의 소포자 배양 서비스 실시 및 기술이전을 통해 국내 종묘회사의 품종 육성 재료의 부가가치가 향상되는데 도움이 되었다.

### 2. 제2세부 과제: 글루코시놀레이트 고함유 배추 육종 지원을 위한 실용적 분자표지 개발

글루코시놀레이트 (Glucosinolates, GSLs)는 십자화과 채소(겨자, 양배추, 케일, 콜리플라워, 배추, 브로콜리 등)에 공통으로 들어있는 이차대사산물로서, 최근 GSLs는 항암효과, 항산화, 항균력 때문에 많은 주목을 받고 있다. 특히 배추는 아시아에서 가장 많이 소비되는 채소 중에 하나이며, 김치의 원료인 배추에 암을 예방하는 기능성 물질, 즉 글루코시놀레이트가 다량으로 존재하는 것이 확인됐다. 농촌진흥청은 국내 배추 23품종에 대해 성분 분석을 실시한 결과, 강력한 항암작용을 하는 것으로 알려진 ‘글루코시놀레이트(glucosinolate)’ 14종이 함유돼 있는 것을 확인했다. 이에 글루코시놀레이트 함량 예측 가능한 분자마커 개발은 육종가들에게 유익하게 활용될 것으로 판단된다.

### 3. 제3세부 과제: 분자 및 유전체육종 효율화 시스템 개발

육종에서 우수형질 도입을 위해 보편적으로 여교배를 사용한다. 육종 목표로 하는 형질 도입을 위해 교배 후에 목적형질 부분 이외에 유전체를 회복친과 가장 유사하게 만들기 위해 하는 여교배에서 회복친과 유사한 계통 선발을 하는 과정은 시간과 노동력을 필요로 함으로 여교배에서 경험에 의한 육종을 분자표지를 이용하여 선발의 효율을 높이고자 하였다. 또한 내병성 형질 개체 선발을 돕고자 마커 도움 선발(marker assisted selection)을 위한 ‘내병성 형질 연관 마커 개발’을 하였다. 이에 본 과제의 결과물은 육종에서 목적형질(내병성) 및 회복친의 background 회복에 활용될 수 있을 것으로 판단한다.

[위탁과제]

1. 배추 붕소결핍증이 잘 발생하는 계통과 잘 발생하지 않는 계통을 선발한 것은 앞으로 배추 붕소결핍증의 유전연구 및 생리 연구의 귀중한 자료가 될 것이다.
2. 배추 붕소결핍증 발생과 배추 체내 붕소 및 석회함량과의 관계구명을 위한 시도는 앞으로 붕소결핍증 발생과 성분흡수와의 관계를 구명하는 좋은 예가 될 것이다.

### 4. 제4세부 과제: 시판 및 수출용 배추와 무 뿌리혹병 검정기술 개발

- 가. race 분포지도가 1차 작성되었으므로 재배 작물의 선정이나 품종 선택을 통해 병 발생을 사전에 감소시킬 수 있다.
- 나. 뿌리혹병균의 순수 race 균주들을 확보하였으므로 분양을 통해 관련 회사나 연구기관의 병 연구에 기여할 수 있다.
- 다. 병원균의 병원성 증대 원인을 규명하였기에 관련 학문의 발전에 기여할 것이다.
- 라. 새로운 병 저항성 검정방법이 개발되어 추후 회사차원에서도 손쉽게 품종검정이 가능할 것이다.
- 마. 세균 오염 없는 순수 포자획득 방법을 개선하여 추후 DNA 관련 첨단 학문연구에 활용되리라 본다.
- 바. 뿌리혹의 최적 장기 저장조건을 대폭 개선하였기에 관련 연구와 실험에 매우 유용하리라 판단된다.



## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1 절. 제1세부 과제: 배추 유전자원 수집 및 육종재료 신속작성 기술

#### 1. 연구개발 성과

성과목표	품종개발		특허		논문		분자 마커 개발	유전자원		DH 계통 개발	유전 자원 분양	기술 이전	소포자 배양 서비스	홍보
	출원	등록	출원	등록	SCI	비 SCI		수 집	등 록					
최종목표	3				1	2		40	75	3	10	1	450	
1차 년도	목표							10	20				100	
	실적							28	20		8		100	2
2차 년도	목표	1				1		10	20	1			100	
	실적	1				1		11		14	9		150	
3차 년도	목표	1				1		10	20	1	5	1	100	
	실적	1						14	10	1	5	1	50	2
4차 년도	목표	1					1	10	15	1	5		150	
	실적	1					1	8	60		6		195	3
계	목표	3				1	2	40	75	3	10	1	450	
	실적	3				1	1	61	90	15	28	1	495	7

#### 가. 품종 개발

품종보호 출원									
구 분	품종 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기 타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
	‘원교20042호’	대한민국	박수형	2014.11. 27.	출원 2014-582				
	‘원교20040호’	대한민국	박수형	2015.05. 19.	출원 2015-397				
	‘원교20045호’	대한민국	박수형	2016.09. 08.	출원 2016-440				

민원인을 가족같이, 민원을 내일같이  
 불거된 내용에 피문이 없으시면 담당자에게 문의하시기 바랍니다.  
 담당자: 김민지 전화: (054) 912-0118 FAX: (054) 912-0210  
 인터넷 홈페이지: www.seed.go.kr  
 [740]-[220] 경상북도 김천시 혁신8로 119

품종보호출원번호 통지서  
 출원일자: 2014.11.27 품종보호 출원번호: 출원 2014-582  
 품종명칭 출원번호: 명칭 2014-1675

작 품 명: 배추  
 품종 명칭: 원교20042호  
 출 원 인: 농촌진흥청  
 주 소: 경기도 수원시 권선구 주원로 126농촌진흥청사

2014년11월27일

국립종자원



민원인을 가족같이, 민원을 내일같이  
 불거된 내용에 피문이 없으시면 담당자에게 문의하시기 바랍니다.  
 담당자: 김민지 전화: (054) 912-0118 FAX: (054) 912-0210  
 인터넷 홈페이지: www.seed.go.kr  
 [740]-[220] 경상북도 김천시 혁신8로 119

품종보호출원번호 통지서  
 출원일자: 2015.5.19 품종보호 출원번호: 출원 2015-287  
 품종명칭 출원번호: 명칭 2015-874

작 품 명: 순무  
 품종 명칭: 원교20040호  
 출 원 인: 농촌진흥청  
 주 소: 전라북도 전주시 완산구 농생명로 300농촌진흥청사

2015년08월19일

국립종자원



민원인을 가족같이, 민원을 내일같이  
 불거된 내용에 피문이 없으시면 담당자에게 문의하시기 바랍니다.  
 담당자: 김지용 전화: (054) 912-0118 FAX: (054) 912-0210  
 인터넷 홈페이지: www.seed.go.kr  
 [330]-[330] 경상북도 김천시 혁신8로 119

품종보호출원번호 통지서  
 출원일자: 2016.9.8 품종보호 출원번호: 출원 2016-440  
 품종명칭 출원번호: 명칭 2016-958

작 품 명: 배추  
 품종 명칭: 원교20045호  
 출 원 인: 농촌진흥청  
 주 소: 전라북도 전주시 완산구 농생명로 300농촌진흥청사

2016년09월08일

국립종자원



나. 논문(SCI & 비SCI)

1. Suhyoung Park, Mariadhas Valan Arasu, Min-Ki Lee, Jin-Hyuk Chun, Jeong Min Seo, Naif Abdullah Al-Dhabi, Sun-Ju Kim (2014. 9.) Analysis and metabolite profiling of glucosinolates, anthocyanins and free amino acids in inbred lines of green and red cabbage (*Brassica oleracea* L.). LWT - Food Science and Technology. 58(1): 203-213. (SCI)
2. Ha-Young Jang, Myeong-Whoon Seo, Min Young Park, Moo-Kyoung Yoon, Jung-Soo Lee, and Suhyoung Park. (2016. 6. 31.) Developing Inbred Lines of ‘Wonkyo20042ho’ Bearing Thin Leaves and Small Sized Head in Kimchi Cabbage (Chinese Cabbage) (*Brassica rapa* L.). (비 SCI)

다. 유전자원

유전자원 등록						
번호	특성	수집	등록			기 타
			등록인	등록일	등록번호	
1	13-FC107(DH line)	소포자 배양 유래	박수형	14.03.24.	K243822	채소과-528 (2014. 3. 24.)
2	13-FC109(DH line)	소포자 배양 유래	박수형	14.03.24.	K243823	채소과-528 (2014. 3. 24.)
3	13-FC110(DH line)	소포자 배양 유래	박수형	14.03.24.	K243824	채소과-528 (2014. 3. 24.)
4	13-FC112(DH line)	소포자 배양 유래	박수형	14.03.24.	K243825	채소과-528 (2014. 3. 24.)
5	13-FC113(DH line)	소포자 배양 유래	박수형	14.03.24.	K243826	채소과-528 (2014. 3. 24.)
6	13-FC118(DH line)	소포자 배양 유래	박수형	14.03.24.	K243827	채소과-528 (2014. 3. 24.)
7	13-FC119(DH line)	소포자 배양	박수형	14.03.24.	K243828	채소과-528

		유래				(2014. 3. 24.)
8	13-FC120(DH line)	소포자 배양 유래	박수형	14.03.24.	K243829	채소과-528 (2014. 3. 24.)
9	13-FC123(DH line)	소포자 배양 유래	박수형	14.03.24.	K243830	채소과-528 (2014. 3. 24.)
10	13-FC125(DH line)	소포자 배양 유래	박수형	14.03.24.	K243831	채소과-528 (2014. 3. 24.)
11	역달걀형 잎모양	(육성 DH line)	합인기	14.04.04.	K243618	미래농업연구과 -1283(14.03.25)
12	잎 색깔: 회록색	(육성 DH line)	합인기	14.04.04.	K243619	미래농업연구과 -1283(14.03.25)
13	고쟁이선단 돌기형	(육성 DH line)	합인기	14.04.04.	K243620	미래농업연구과 -1283(14.03.25)
14	구속색: 진노랑	(육성 DH line)	합인기	14.04.04.	K243621	미래농업연구과 -1283(14.03.25)
15	잎 색깔: 회록색	(육성 DH line)	합인기	14.04.04.	K243622	미래농업연구과 -1283(14.03.25)
16	잎 색깔: 황록색	(육성 DH line)	합인기	14.04.04.	K243623	미래농업연구과 -1283(14.03.25)
17	좁은달걀형잎모양	(육성 DH line)	합인기	14.04.04.	K243624	미래농업연구과 -1283(14.03.25)
18	구속색: 진노랑	(육성 DH line)	합인기	14.04.04.	K243625	미래농업연구과 -1283(14.03.25)
19	구단단정도: 강	(육성 DH line)	합인기	14.04.04.	K243626	미래농업연구과 -1283(14.03.25)
20	결구잎 겹침: 약	(육성 DH line)	합인기	14.04.04.	K243627	미래농업연구과 -1283(14.03.25)
21	12-BK7-11	육성계통	박수형	15.11.12	K251938	채소과-1871 (2015. 7. 15.)
22	12-BK9-2	육성계통	박수형	15.11.12	K251939	채소과-1871 (2015. 7. 15.)
23	12-BK11-2	육성계통	박수형	15.11.12	K251940	채소과-1871 (2015. 7. 15.)
24	12-BK15-1	육성계통	박수형	15.11.12	K251941	채소과-1871 (2015. 7. 15.)
25	11-CFF279-4	소포자 배양 유래	박수형	15.11.12	K251942	채소과-1871 (2015. 7. 15.)
26	11-CFF279-8	소포자 배양 유래	박수형	15.11.12	K251943	채소과-1871 (2015. 7. 15.)
27	11-CFF295-8	소포자 배양 유래	박수형	15.11.12	K251944	채소과-1871 (2015. 7. 15.)

28	11-CFF295-18	소포자 배양 유래	박수형	15.11.12	K251945	채소과-1871 (2015. 7. 15.)
29	11-CFF295-20	소포자 배양 유래	박수형	15.11.12	K251946	채소과-1871 (2015. 7. 15.)
30	11-CFF295-29	소포자 배양 유래	박수형	15.11.12.	K251947	채소과-1871 (2015. 7. 15.)
31	CNC15017	(육성 DH line)	함인기	16.03.10.	BP1234284	KCTC 2016-2-0004
32	CNC15021	(육성 DH line)	함인기	16.03.10.	BP1234285	KCTC 2016-2-0004
33	CNC15022	(육성 DH line)	함인기	16.03.10.	BP1234286	KCTC 2016-2-0004
34	CNC15023	(육성 DH line)	함인기	16.03.10.	BP1234287	KCTC 2016-2-0004
35	CNC15025	(육성 DH line)	함인기	16.03.10.	BP1234288	KCTC 2016-2-0004
36	CNC15026	(육성 DH line)	함인기	16.03.10.	BP1234289	KCTC 2016-2-0004
37	CNC15027	(육성 DH line)	함인기	16.03.10.	BP1234290	KCTC 2016-2-0004
38	CNC15030	(육성 DH line)	함인기	16.03.10.	BP1234291	KCTC 2016-2-0004
39	CNC15031	(육성 DH line)	함인기	16.03.10.	BP1234292	KCTC 2016-2-0004
40	CNC15033	(육성 DH line)	함인기	16.03.10.	BP1234293	KCTC 2016-2-0004
41	CNC15034	(육성 DH line)	함인기	16.03.10.	BP1234294	KCTC 2016-2-0004
42	CNC15035	(육성 DH line)	함인기	16.03.10.	BP1234295	KCTC 2016-2-0004
43	CNC15037	(육성 DH line)	함인기	16.03.10.	BP1234296	KCTC 2016-2-0004
44	CNC15038	(육성 DH line)	함인기	16.03.10.	BP1234297	KCTC 2016-2-0004
45	CNC15039	(육성 DH line)	함인기	16.03.10.	BP1234298	KCTC 2016-2-0004
46	CNC15041	(육성 DH line)	함인기	16.03.10.	BP1234299	KCTC 2016-2-0004
47	CNC15042	(육성 DH line)	함인기	16.03.10.	BP1234300	KCTC

						2016-2-0004
48	CNC15043	(육성 DH line)	함인기	16.03.10.	BP1234301	KCTC 2016-2-0004
49	CNC15044	(육성 DH line)	함인기	16.03.10.	BP1234302	KCTC 2016-2-0004
50	CNC15048	(육성 DH line)	함인기	16.03.10.	BP1234303	KCTC 2016-2-0004
51	2713701	(육성 DH line)	함인기	16.12.20.	BP1295272	KCTC 2016-00763
52	2713702	(육성 DH line)	함인기	16.12.20.	BP1295273	KCTC 2016-00763
53	2713803	(육성 DH line)	함인기	16.12.20.	BP1295274	KCTC 2016-00763
54	2714311	(육성 DH line)	함인기	16.12.20.	BP1295275	KCTC 2016-00763
55	2714317	(육성 DH line)	함인기	16.12.20.	BP1295276	KCTC 2016-00763
56	2714340	(육성 DH line)	함인기	16.12.20.	BP1295277	KCTC 2016-00763
57	2714345	(육성 DH line)	함인기	16.12.20.	BP1295278	KCTC 2016-00763
58	2714817	(육성 DH line)	함인기	16.12.20.	BP1295279	KCTC 2016-00763
59	2716435	(육성 DH line)	함인기	16.12.20.	BP1295280	KCTC 2016-00763
60	2725904	(육성 DH line)	함인기	16.12.20.	BP1295281	KCTC 2016-00763
61	Taiwan kuai cai	도입품종	박수형	16.12.28.	K261232	채 소 과 -2966(16.12.09.)
62	Kang re 50 tian xiayang baicai	도입품종	박수형	16.12.28.	K261233	채 소 과 -2966(16.12.09.)
63	Chun jian baicai 902	도입품종	박수형	16.12.28.	K261234	채 소 과 -2966(16.12.09.)
64	Yangchun jieqiu baicai	도입품종	박수형	16.12.28.	K261235	채 소 과 -2966(16.12.09.)
65	Riben xiayang kang re 45 tian	도입품종	박수형	16.12.28.	K261236	채 소 과 -2966(16.12.09.)
66	Qiu lu 55	도입품종	박수형	16.12.28.	K261237	채 소 과 -2966(16.12.09.)

67	Siji huangguan	도입품중	박수형	16.12.28.	K261238	채 소 과 -2966(16.12.09.)
68	Hetong shengxia	도입품중	박수형	16.12.28.	K261239	채 소 과 -2966(16.12.09.)
69	Jinchuntong	도입품중	박수형	16.12.28.	K261240	채 소 과 -2966(16.12.09.)
70	Jipin xiayang	도입품중	박수형	16.12.28.	K261241	채 소 과 -2966(16.12.09.)
71	Fuwa	도입품중	박수형	16.12.28.	K261242	채 소 과 -2966(16.12.09.)
72	Tiandi kuai cai	도입품중	박수형	16.12.28.	K261243	채 소 과 -2966(16.12.09.)
73	Jingpin 536 tian kuai cai	도입품중	박수형	16.12.28.	K261244	채 소 과 -2966(16.12.09.)
74	Lu guan wang	도입품중	박수형	16.12.28.	K261245	채 소 과 -2966(16.12.09.)
75	Jin lu 301	도입품중	박수형	16.12.28.	K261246	채 소 과 -2966(16.12.09.)
76	Tian cui xiao baicai	도입품중	박수형	16.12.28.	K261247	채 소 과 -2966(16.12.09.)
77	Michihli	도입품중	박수형	16.12.28.	K261248	채 소 과 -2966(16.12.09.)
78	Yamagataseisai	도입품중	박수형	16.12.28.	K261249	채 소 과 -2966(16.12.09.)
79	Choki shukaku hanasai	도입품중	박수형	16.12.28.	K261250	채 소 과 -2966(16.12.09.)
80	Chidjimi setsuna	도입품중	박수형	16.12.28.	K261251	채 소 과 -2966(16.12.09.)
81	Sayo shu 85-nichi	도입품중	박수형	16.12.28.	K261252	채 소 과 -2966(16.12.09.)
82	Sayo shu 70-nichi	도입품중	박수형	16.12.28.	K261253	채 소 과 -2966(16.12.09.)
83	Shin Hakuho	도입품중	박수형	16.12.28.	K261254	채 소 과 -2966(16.12.09.)
84	De ki gen 90	도입품중	박수형	16.12.28.	K261255	채 소 과 -2966(16.12.09.)
85	Harutoki yoto	도입품중	박수형	16.12.28.	K261256	채 소 과 -2966(16.12.09.)
86	De ki gen 70	도입품중	박수형	16.12.28.	K261257	채 소 과 -2966(16.12.09.)

87	De ki gen 65	도입품종	박수형	16.12.28.	K261258	채 소 과 -2966(16.12.09.)
88	De ki gen 75	도입품종	박수형	16.12.28.	K261259	채 소 과 -2966(16.12.09.)
89	Kyoryoku 60-nichi	도입품종	박수형	16.12.28.	K261260	채 소 과 -2966(16.12.09.)
90	Aya to hakusai	도입품종	박수형	16.12.28.	K261261	채 소 과 -2966(16.12.09.)

라. DH계통개발

구분	계통명	계통특성	분양처	기타
1	원교20034호	고순도 DH inbred, 내병성	고랭지농업연구 소	채소과-1762(14.10.13.)
2	원교20035호	고순도 DH inbred, 고품질	고랭지농업연구 소	채소과-1762(14.10.13.)
3	원교20037호	고순도 DH inbred, 고품질	고랭지농업연구 소	채소과-1762(14.10.13.)
4	원교20038호	고순도 DH inbred, 고품질	고랭지농업연구 소	채소과-1762(14.10.13.)
5	원교20039호	고순도 DH inbred, 조숙성	고랭지농업연구 소	채소과-1762(14.10.13.)
6	원교20041호	고순도 DH inbred, 고품질	고랭지농업연구 소	채소과-1762(14.10.13.)
7	원교20042호	고순도 DH inbred, 고품질	고랭지농업연구 소	채소과-1762(14.10.13.)
8	원교20043호	고순도 DH inbred, 고품질	고랭지농업연구 소	채소과-1762(14.10.13.)
9	원교20044호	고순도 DH inbred, 주황내엽	고랭지농업연구 소	채소과-1762(14.10.13.)
10	원교20045호	고순도 DH inbred, 고품질	고랭지농업연구 소	채소과-1762(14.10.13.)
11	원교20044호	고순도 DH inbred, 주황내엽	이마트	채 소 과 - 3 0 (2015.01.06.)
12	원교20037호	고순도 DH inbred, 기능성	이마트	채 소 과 - 3 0 (2015.01.06.)
13	원교20039호	고순도 DH inbred, 조숙성	이마트	채 소 과 - 3 0 (2015.01.06.)
14	원교20042호	고순도 DH inbred, 고품질	이마트	채 소 과 - 3 0 (2015.01.06.)
15	15-FK47	고순도 DH inbred, 내병성	바이오브리딩	채소과-2988 (2015. 11. 30.)

마. 유전자원분양

구분	공문번호	분양내용	분양처	기타
1	채소과-1536	배추 1점	윤형구	2013.08.12.
2	채소과-1627	배추 1점	고삼석	2013.08.20.
3	채소과-1791	배추 5점	충남대	2013.09.11.
4	채소과-1992	배추 9점	배추와육중	2013.10.18.
5	채소과-2007	배추과 13점	삼성종묘	2013.10.21.

6	채소과-2061	배추과 9점	바이오브리딩	2013.10.30.
7	채소과-194	배추과 4점	심창기	2014.01.29
8	채소과-408	배추 2점	충남대	2014.03.06
9	채소과-800	배추 2점	충남대	2014.05.08
10	채소과-710	배추과 1점	서울대	2014.04.24.
11	채소과-1115	배추과 2점	대일바이오	2014.06.30.
12	채소과-1262	배추과 2점	서울대	2014.07.16.
13	채소과-1535	배추 15점	충남대	2014.09.02.
14	채소과-1567	배추과 2점	서울대	2014.09.05.
15	채소과-1763	배추 12점	충남대	2014.10.13.
16	채소과-30	시험재배용 배추 2 점	이마트	2015.01.06
17	채소과-213	배추과 3점	농협종묘	2015.01.26.
18	채소과-1396	배추과 6점	서울대	2015.06.03.
19	채소과-2988	배추과 5점	바이오브리딩	2015.11.30.
20	채소과-3155	배추 5점	충남대	2015.12.18
21	채소과-52	배추과 3점	대일바이오	2016.01.06.
22	채소과-51	배추 6점	코레곤종묘	2016.01.06.
23	채소과-906	배추 5점	충남대	2016.04.08.
24	채소과-1095	배추과 1점	서울대	2016.04.27.
25	채소과-2246	배추 2점	충남대	2016.09.12.
26	채소과-2360	배추 2점, 배추과 2점	장종수	2016.09.28.
27	채소과-2633	배추과 8점	네오씨드	2016.10.31.
28	채소과-2862	배추과 2점	대일바이오	2016.11.28.

바. 기술이전

번호	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)
	무상기술이전	배추과 채소 소포자 배양	현대종묘	2015.08.04	0





## 2 절. 제2세부 과제: 글루코시놀레이트 고함유 배추 육종 지원을 위한 실용적 분자표지 개발

### 1. 연구개발 성과

성과목표	품종개발			특허		논문		분자 마커 개발	유전자원		국내 매출액	종자 수출액	기술 이전	마케팅 전략 구립 보고서	인력 양성
	생산수입 판매신고	출원	등록	출원	등록	SCI	비 SCI		수 집	등 록					
최종목표						4									5
1차년도	목표					1									1
	실적					1									1
2차년도	목표					1									1
	실적					1									1
3차년도	목표					1									1
	실적					1									5
4차년도	목표					1									1
	실적					1		2							3
합 계						4									10

### 가. 논문

1. Jae Kwang Kim, Sang Un Park (2016.4.28) Current results on the potential health benefits of lutein. EXCLI Journal. 15: 308-314
2. Haeng Hoon Kim, Sun Ju Bong, Naif Abdullah Al-Dhabi, Mariadhas Valan Arasu, Sang Un Park (2015.7.31) Variation in Amino Acid Contents of Pale Green and Purple Kohlrabis (*Brassica oleracea* var. gongylodes). Asian Journal of Chemistry. 27(7): 2675-2677
3. Yeon Bok Kim, Md. Romij Uddin, Min Ki Lee, Sun-Ju Kim, Haeng Hoon Kim, Eunsook Chung, Jai-Heon Lee, Sang Un Park (2014.1.15) Accumulation of Free Amino Acids in Different Organs of Green and Red Mustard Cultivars. Asian Journal of Chemistry. 26(2): 396-398
4. Xiaohua Li, Yeon Bok Kim, Md Romij Uddin, Sanghyun Lee, Sun-Ju Kim, Sang Un Park (2013.9.11) Influence of Light on the Free Amino Acid Content and  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Synthesis in *Brassica juncea* Seedlings. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 61(36): 8624-8631

## 나. 인력양성

번호	기관명	성명	학위	년도	학교
1	충남대학교	김연복	박사 후 연구원	2015	충남대학교
2	충남대학교	김연정	박사 후 연구원	2015	충남대학교
3	충남대학교	전진	연구교수	2017	충남대학교
4	충남대학교	팜안투안	박사	2013	충남대학교
5	충남대학교	조세성	박사	2017	충남대학교
6	충남대학교	박우태	박사	2015	충남대학교
7	충남대학교	권도연	석사	2014	충남대학교
8	충남대학교	Thanislas BastinBaskar	석사	2005	Loyola college
9	충남대학교	박윤지	석사	2015	충남대학교
10	충남대학교	여선경	석사	2016	충남대학교
11	충남대학교	봉선주	석사	2016	충남대학교
12	충남대학교	박창하	석사	2016	충남대학교
13	충남대학교	DOMNHCUONG	석사	2011	Thai Nguyen Univ
14	충남대학교	김남수	학사	2017	충남대학교
15	충남대학교	여현지	학사	2017	충남대학교
16	충남대학교	이호용	학사	2017	충남대학교
17	충남대학교	신수진	학부		충남대학교
18	충남대학교	박예은	학부		충남대학교

## 2. 성과활용 계획

### 가. 실용화, 산업화 계획(기술실시 등)

- 알리페틱 글루코시놀레이트 고함유 배추 육종 지원을 위한 실용적 분자표지가 개발되었으며 글루코시놀레이트 고함유 배추 육종을 시도하는 기업체나 육종가에게 기술이전이나 공동연구를 통하여 현실화 노력을 할 계획임

### 나. 교육, 지도, 홍보 등 기술확산 계획 등

- 글루코시놀레이트 고함유 배추 육종에 관심 있는 산업체에 기술지도 또는 지원으로 공동

연구 추진

**다. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등**

- 논문 : 배추과 작물 분자마커개발 및 유전체에 관련 기초 자료로 활용. 결과로 도출된 논문은 학문별 상위 10%에 해당하는 Food Chemistry에 투고 중임
- 특허 : 알리페틱 글루코시놀레이트 생합성 관련 실용적 분자표지에 관한 내용 특허 시도

**라. 인력 양성**

- 배추 분자마커개발 및 유전체에 관련 대학원생을 배출하여 관련 산업에 필요한 인력양성

**마. 세부과제간 협력**

- 세부과제간 협력을 강화하여 추후 축적기술을 육종가에게 보급을 확대할 계획임

**3 절. 제3세부 과제: 분자 및 유전체육종 효율화 시스템 개발**

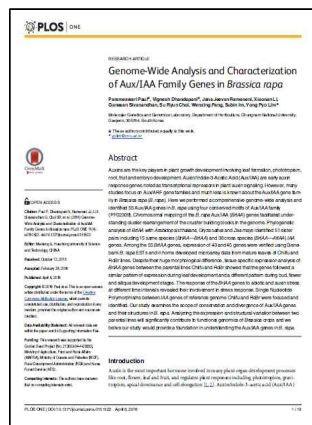
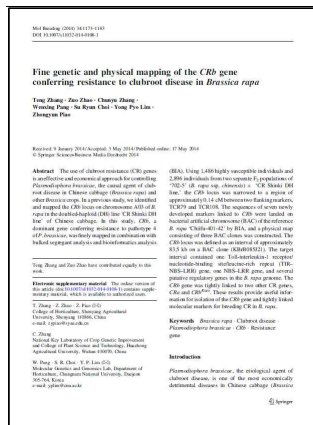
**1. 연구개발 성과**

성과목표	품종개발			특허		논문		분자마커개발	유전자원		국내매출액	종자수출액	기술이전	마케팅전략 수립 보고서	인력양성
	생산수입판매신고	출원	등록	출원	등록	SCI	비SCI		수집	등록					
최종목표				1		2	1	1		6					
1차년도	목표									3					
	실적							1	4						
2차년도	목표						1	1		3					
	실적					1		1		6					
3차년도	목표			1		1									
	실적			1				1	3				1		
4차년도	목표					1									
	실적					1(1)		1							
합계	실적			1		2(1)		4	7	6			1		

성과목표	DB구축	DH계통개발	자원분양	서비스			
				성분분석	분자마커	병리검정	표현형검정
최종목표							
1차년도	목표						
	실적						
2차년도	목표						
	실적			15		4,822	
3차년도	목표						
	실적			22		3,299	
4차년도	목표						
	실적			29	10	18,066	
합계	실적			66	10	26,187	

가. 논문

1. Teng Zhang, Zuo Zhao, Chunyu Zhang, Wenxing Pang, Su Ryun Choi, Yong Pyo Lim Email author, Zhongyun Piao (2014.5.17.) Fine genetic and physical mapping of the *CRb* gene conferring resistance to clubroot disease in *Brassica rapa*. Mol Breeding. 34:1173–1183
2. Parameswari Paul, Vignesh Dhandapani, Jana Jeevan Rameneni, Xiaonan Li, Ganesan Sivanandhan, Su Ryun Choi, Wenxing Pang, Subin Im, Yong Pyo Lim (2016.4.6.) Genome-Wide Analysis and Characterization of Aux/IAA Family Genes in *Brassica rapa*. PLOS ONE 11(4): e0151522



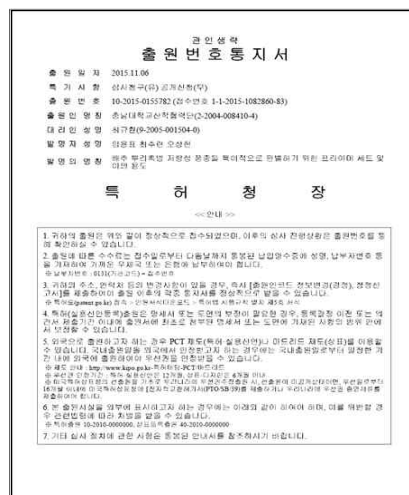
나. 분자마커 개발

분자마커 개발					
번호	특성	보유 건수	주요내용	비고	
1	뿌리혹병 저항성	1	배추 뿌리혹병 저항성품종을 특이적으로 판별하기 위한 프라이머 세트 (GSP-2, GSP-3)		
2	뿌리혹병 저항성	1	배추 뿌리혹병 저항성품종을 특이적으로 판별하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도	논문제출, 특허출원, 기술이전 완료	
3	여교배 (Marker Assisted Backcrossing, MAB) 선발용 분자 표지 세트	1	배추 내흔계통 유전체 정보에서 빈도가 높은 SNP를 일정 물리적 거리별 선발한 마커 세트	기술이전 완료, 특허출원(준비중)	
4	뿌리혹병 저항성	1	배추 뿌리혹병 저항성품종을 특이적으로 판별하기 위한 프라이머 세트	특허출원(준비중)	

라. 특허 성과

지식재산권[발명특허, 실용신안, 의장, 상표, 규격] 등으로 구분하고, 세부적으로 전부(건별로)기록하며, 국외인 경우 반드시 국명을 기록합니다

구분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
발명특허	배추 뿌리혹병 저항성 품종을 특이적으로 판별하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도	대한민국	임용표, 최수련, 오상헌.	2015.11.06	10-2015-0155782				



<특허출원 증빙자료: 특허출원번호 통지서>

마. 사업화 현황

(1) 기술거래

기술이전					
번호	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)
1	특허권 및 노하우기술	1. 배추 뿌리혹병 저항성품종을 특이적으로 판별하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도 (특허출원 제10-2015-0155782호) 2. 여교배 (Marker Assisted Backcrossing, MAB) 선발용 분자 표지 세트	농업기술 실용화재단	2015.12.29	

## 기술이전계약서

< 기술의 명칭 >

1. 배추 재배작형 최적성질유전 특이적으로 판별하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도(특허출원 제10-2015-0158722호)
2. 배추속 작물의 개화시기 판별용 초성분(특허등록 제10-2013-0081704호)
3. 배추에서 알부코시놀레이트 고품양 판별용 마커
4. 마코배 (Marker Assisted Backcrossing, MAB) 선발용 분자 표지 세트

2015. 12. 29

**기술공급자 : 충남대학교 산학협력단**

**실시자 : 농업기술실용화재단**

<기술이전계약서>

### 바. DH 계통 개발/자원 분양

○ DH계통 개발 46건 (46계통 개발)

DH계통개발				
구분	계통명	계통특성	분양처	기타
1	CNU_11373-DH1	CR Ryutoku (CRb hetero), F1		2년차
2	CNU_11373-DH2	CR Ryutoku (CRb hetero), F1		2년차
3	CNU_11373-DH3	CR Ryutoku (CRb hetero), F1		2년차
4	CNU_11373-DH4	CR Ryutoku (CRb hetero), F1		2년차
5	CNU_11373-DH5	CR Ryutoku (CRb hetero), F1		2년차
6	CNU_11373-DH6	CR Ryutoku (CRb hetero), F1		2년차
7	CNU_11373-DH7	CR Ryutoku (CRb hetero), F1		2년차
8	CNU_11373-DH8	CR Ryutoku (CRb hetero), F1		2년차
9	CNU_11373-DH9	CR Ryutoku (CRb hetero), F1		2년차
10	CNU_11373-DH10	CR Ryutoku (CRb hetero), F1		2년차
11	CNU_11146-DH1	소구형 배추 소포자 배양 계통, F1		2년차
12	CNU_11146-DH2	소구형 배추 소포자 배양 계통, F1		2년차
13	CNU_11146-DH3	소구형 배추 소포자 배양 계통, F1		2년차
14	CNU_11375-DH1	SCR Hiroki (Unknown CR), F1		2년차
15	CNU_11375-DH2	SCR Hiroki (Unknown CR), F1		2년차
	2년차 소계	15 계통		
1	CNU_11375-DH3	SCR Hiroki (Unknown CR), F1		3년차
2	CNU_11375-DH4	SCR Hiroki (Unknown CR), F1		3년차

3	CNU_11375-DH5	SCR Hiroki (Unknown CR), F1		3년차
4	CNU_11375-DH6	SCR Hiroki (Unknown CR), F1		3년차
5	CNU_11375-DH7	SCR Hiroki (Unknown CR), F1		3년차
6	CNU_11375-DH8	SCR Hiroki (Unknown CR), F1		3년차
7	CNU_11375-DH9	SCR Hiroki (Unknown CR), F1		3년차
8	CNU_11375-DH10	SCR Hiroki (Unknown CR), F1		3년차
9	CNU_11375-DH11	SCR Hiroki (Unknown CR), F1		3년차
10	636-1	덕고CR 5, F1		3년차
11	636-12	덕고CR 5, F1		3년차
12	636-2	덕고CR 5, F1		3년차
13	636-3	덕고CR 5, F1		3년차
14	636-5	덕고CR 5, F1		3년차
15	636-7	덕고CR 5, F1		3년차
16	638-1	덕고CR 117, F1		3년차
17	638-15	덕고CR 117, F1		3년차
18	638-2	덕고CR 117, F1		3년차
19	638-7	덕고CR 117, F1		3년차
20	639-1	덕고CR 1016, F1		3년차
21	639-2	덕고CR 1016, F1		3년차
22	639-8	덕고CR 1016, F1		3년차
	3년차 소계	22 계통		
1	CNU_160009	덕고CR5-DH1		4년차
2	CNU_160010	덕고CR5-DH2		4년차
3	CNU_160022	덕고CR5-DH7		4년차
4	CNU_160012	덕고CR5-DH4		4년차
5	CNU_160013	덕고CR5-DH5		4년차
6	CNU_160023	덕고CR5-DH8		4년차
7	CNU_160024	덕고CR5-DH9		4년차
8	CNU_160014	덕고CR5-DH6		4년차
9	CNU_160025	덕고CR5-DH10		4년차
10	CNU_160026	덕고CR5-DH11		4년차
11	CNU_160027	덕고CR95-DH1		4년차
12	CNU_160028	덕고CR95-DH2		4년차
13	CNU_160030	덕고CR117-DH6		4년차

14	CNU_160031	덕고CR117-DH7		4년차
15	CNU_160032	덕고CR117-DH8		4년차
16	CNU_160034	덕고CR117-DH10		4년차
17	CNU_160019	덕고CR1016-DH1		4년차
18	CNU_160020	덕고CR1016-DH2		4년차
19	CNU_160035	덕고CR1016-DH4		4년차
20	CNU_160036	덕고CR1016-DH5		4년차
21	CNU_160037	덕고CR1016-DH6		4년차
22	CNU_160021	덕고CR1016-DH3		4년차
23	CNU_160033	덕고CR117-DH9		4년차
24	CNU_140064	CNU_11375-DH2		4년차
25	CNU_140065	CNU_11375-DH3		4년차
26	CNU_140066	CNU_11375-DH4		4년차
27	CNU_150001	CNU_11375-DH5		4년차
28	CNU_150002	CNU_11375-DH6		4년차
29	CNU_150005	CNU_11375-DH9		4년차
	4년차 소계	29 계통		
	합 계	66 계통		

○ 자원분양 10건 (10계통)

자원분양				
구분	계통명	계통특성	분양처	기타
1	CNU_150004	뿌리혹병 저항성 DH계통	코레곤종묘	4년차
2	CNU_160015	뿌리혹병 저항성 DH계통	대일바이오종묘	4년차
3	CNU_160016	뿌리혹병 저항성 DH계통	대일바이오종묘	4년차
4	CNU_160017	뿌리혹병 저항성 DH계통	대일바이오종묘	4년차
5	CNU_160018	뿌리혹병 저항성 DH계통	대일바이오종묘	4년차
6	CNU_160029	뿌리혹병 저항성 DH계통	대일바이오종묘	4년차
7	CNU_160030	뿌리혹병 저항성 DH계통	대일바이오종묘	4년차
8	CNU_160032	뿌리혹병 저항성 DH계통	대일바이오종묘	4년차
9	CNU_160033	뿌리혹병 저항성 DH계통	대일바이오종묘	4년차
10	CNU_160034	뿌리혹병 저항성 DH계통	대일바이오종묘	4년차

라. 특허 성과 사. 유전자원 수집 및 등록

○ 유전자원 수집 4건, 유전자원 등록 6건







<유전자원 기탁 필증 및 기탁 목록>

아. 분자마커 분석서비스

- 분석 서비스 총 22,888건

서비스(성분분석, 분자마커, 병리검정, 표현형검정)					
번호	서비스 종류	점 수	주요내용	년차	기타
1	분자마커 검정, (주)코레곤,	848	시료 106점 대상, 뿌리혹병 저항성 마커 8종	2년차	기반과제 공통서비스
2	분자마커 검정, 농업회사법인한국종묘(주)	1440	시료 120점 대상, 뿌리혹병 저항성 형질 8종, 노균병 2종, TuMV 2종	2년차	기반과제 공통서비스
3	분자마커 검정, 현대종묘(주)	400	시료 200점 대상, 뿌리혹병 저항성 마커 2종	2년차	기반과제 공통서비스
4	분자마커 검정, 농협종묘센터	462	시료 BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub> 집단 11개체 대상, MAB 마커 42종	2년차	공동연구
5	분자마커 검정, 농협종묘센터	1672	시료 BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub> 집단 38개체 대상, MAB 마커 44종	2년차	공동연구
	소 계	4,822			
1	분자마커 검정, (주)코레곤,	396	시료 33점 대상, 뿌리혹병, 노균병, 바이러스 저항성 마커 12종	3년차	기반과제 공통서비스
2	분자마커 검정, 농업회사법인한국종묘(주)	532	시료 71점 대상, 뿌리혹병, 노균병, TuMV 저항성 마커 12종	3년차	기반과제 공통서비스
3	분자마커 검정, 농업회사법인한국종묘(주)	2,371	시료 BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub> 집단 277개체 대상, MAB 마커	3년차	공동연구
	소 계	3,299			
1	분자마커 검정, (주)코레곤	1,500	순도검정	4년차	기반과제 공통서비스
2	분자마커 검정, 농업회사법인한국종묘(주)	2,052	시료 1026점 대상, 뿌리혹병 저항성 마커 2종 이용 MAS	4년차	기반과제 공통서비스
3	분자마커 검정, 농업회사법인한국종묘(주)	100	시료 10점 대상, 뿌리혹병 저항성 마커 10종 이용 MAS	4년차	기반과제 공통서비스
4	분자마커 검정, 농업회사법인한국종묘(주)	10,374	시료 57점 대상, MABC	4년차	공동연구
5	분자마커 검정, (주)코레곤	3,640	시료 20점 대상, MABC	4년차	공동연구
6	분자마커 검정, 한국종묘(주)	400	시료 400점 대상, MS마커 1종이용, MAS	4년차	기반과제 공통서비스
	소 계	18,066			
	합 계	26,187			

## 2절 성과활용 계획

### 1. 실용화·산업화 계획(기술실시)

- 육종시 뿌리혹병 저항성 분자마커 활용은 개체선발에 효율성을 높일 수 있으며, 여러 유전자좌의 집적은 품종의 경쟁력을 높일 수 있다.
- 연구결과 얻어진 정보는 자체 유전 및 육종연구의 기초정보로 활용하며 신품종 육성의 재료로 이용될 것임.

### 2. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획

가. 논문게재 2건 및 1건 저널제출 후 심사 중이며, 특허실적 1건, 분자마커 개발 4건, 유전자원 수집 7건, 유전자원 등록 6건, 기술이전 1건, DH계통 개발 66건, 자원분양 10건, 분자마커 분석 서비스 26,187건에 달하는 실적을 냈다. 개발된 정보들은 연구자 및 육종가들에게 실용화 될 수 있도록 분석 서비스를 제공 혹은 농업실용화재단에 정보를 이관하여 서비스 받을 수 있도록 하여 배추 분자유종체계가 활성화될 수 있도록 지원할 것이다.

## 4 절. 제4세부 과제: 시판 및 수출용 배추와 무 뿌리혹병 검정기술 개발

### 1. 연구개발 성과

성과목표	품종개발			특허		논문		분자 마커 개발	유전자원		국내 매출액	종자 수출액	기술 이전 (추가)	균주분 양(추가)	인력 양성( 추가)
	생산수 입판매 신고	출원	등록	출원	등록	SCI	비 SCI		수 집	등 록					
최종목표						1	2		33	40			0	0	0
1차년도	목표														
	실적														
2차년도	목표								3	3					
	실적								4	4					
3차년도	목표						1		15	15					
	실적						1		86	25					
4차년도	목표					1	1		15	22					
	실적					(1)	0		76	25			1	5	1
5차년도	목표														
	실적														
합 계						(1)	1		166	54			1	5	1

### 가. 논문

1. 양슬기, 박주영, 서문원, 김홍기(2015.12.28). 배추뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*)의 인공접종을 위한 효율적인 저장조건. *The Korean Journal of Mycology*. 43(4) : 286-289

### 나. 인력양성

번호	기관명	성명	학위	년도	학교
1	충남대학교	박주영	석사	2016	충남대학교

## 2. 성과활용 계획

### 가. 실용화, 산업화 계획(기술실시 등)

- 병저항성 육종 업체나 육종가에게 실질적으로 활용가능한 서비스 지원을 할 계획임.

### 나. 교육, 지도, 홍보 등 기술확산 계획 등

- 병원균 race 분포지도를 기초로 지역별 최적 작물이나 품종 선택에 이용
- 보다 손쉽고 빠른 저항성 판정기법은 종자 회사나 연구기관에서 유용하게 활용될 수 있음
- 토양 내 병원균 탐색 기법은 매우 가치가 있어 농가현장 및 연구기관에 제공할 예정임
- 생물학적 방제기법 및 선발된 유용균주는 기술이전 및 분양을 통해 농가나 관련회사에 유용한 자료로 사용이 가능함
- 분리·동정 후 증식된 주요 race들은 회사나 기관에 분양할 예정

### 다. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

- 논문 : 뿌리혹병 관련 기초 자료로 활용하여 추후 논문을 완성하여 투고할 예정임.

### 라. 인력 양성

- 뿌리혹병의 특성 및 방제, 병 저항성 실험에 관련 대학원생을 배출하여 관련 산업에 필요한 인력양성

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1 절. 제1세부 과제: 배추 유전자원 수집 및 육종재료 신속작성 기술

#### 1. 제1세부 과제: 배추 유전자원 수집 및 육종재료 신속작성 기술

전 세계적으로 상업화된 매우 다양한 배추 품종들이 개발되었으며, 특히 배추과 작물과 유전적으로 상당히 유사한 애기장대 풀을 이용한 유전 및 생리 관련 연구가 많이 수행되었다. 최근 연구 진행 중인 Multi-national Brassica Genome Project 등 유전자 염기서열 분석 관련 연구가 활발하게 진행되었고, 또한 이러한 연구 결과를 육종에 활용하기 위한 마커 개발 등 실용화를 위한 연구가 다방면에서 수행되고 있었다(Brassica 2008 International Symposium). 또한, 품종보호를 위한 응성불임 자원의 개발 관련 연구가 1970년대부터 미국의 Cornell 대학교, 프랑스 Inra 연구소 등에서 활발하게 이루어졌으며, 무의 원형질을 도입한 다양한 응성불임 배추, 양배추, 브로콜리 등을 개발하여 특허를 보유하고 있다. 배추과 채소의 뿌리에 발생하는 뿌리혹병 또한 전 세계적으로 문제가 되고 있으며, 특히 일본의 경우 배추의 뿌리혹병으로 인하여 현재는 저항성 품종이 아니면 재배가 어려운 실정이다. 그리하여 일본야채다업시험장에서는 배추의 뿌리혹병에 저항성인 *Crr1* 유전자 클로닝, *Crr2*, *3*, *4* 유전자 연관 분자표지 개발, 형질전환 등 다방면으로 뿌리혹병에 완전히 저항성인 배추를 개발하고자 노력하고 있었다(2007, Nature).

### 2 절. 제2세부 과제: 글루코시놀레이트 고함유 배추 육종 지원을 위한 실용적 분자표지 개발

#### 1. 배추과 작물의 유전체연구 및 응용연구

2011년 배추의 전체 유전체가 국내 연구진이 참여한 국제컨소시엄에 의해 세계 최초로 완전히 해독됐다. 중국 소채화훼연구소와 영국 JIC연구소 등과 함께 배추의 10개 염색체와 DNA 염기서열을 완전 해독하는 데 성공했으며, 배추 유전체 해독 연구논문은 세계적인 학술지인 ‘네이처 제네틱스(Nature Genetics)’ 10월호에 <배추과 작물인 배추의 유전체 해독>이라는 제목으로 게재되었다.

사실 배추 유전체 분야도 중국이 우위를 지키고 있으며, 따라서 배추 기능유전체학도 중국 소채화훼연구소를 중심으로 여러 대학과 연구기관에서 활발히 진행 중에 있다. 배추 genome 해독 결과 배추는 총 4만1000여개의 유전자를 가지고 있으며, 이 가운데 약 1000개의 유전자군은 배추에만 존재하는 것으로 확인됐다. 특히 배추에 다량 함유돼 있는 항암성분인 글루코시놀레이트의 생합성에 참여하는 모든 유전자가 해독 과정에서 밝혀져, 앞으로 글루코시놀레이트 함량 예측 가능한 분자마커 개발에 큰 도움이 될 것으로 판단됨

### 3 절. 제3세부 과제: 분자 및 유전체육종 효율화 시스템 개발

*Plasmodiophora brassicae*는 토양내 미생물로 다양한 십자화과 작물에서 뿌리혹병(clubroot)을 야기하며 전세계에서 생산량에 영향을 준다. 십자화과에서 뿌리혹병에 관한 genetic mapping에 관한 연구는 광범위하게 진행되고 있다.

모델 식물인 *Arabidopsis thaliana*에서 1996년에 Fuchs and Sacristán가 *RPBI*가 뿌리혹병 저항

성 형질과 연관 있다고 보고한 것을 시작으로 *Pb-At5.1*, *Pb-AT5.2*, *Pb-At4*, *Pb-At1*로 4개의 유전자좌가 추가로 밝혀졌다(Jubault et al., 2008).

십자화과에 속하는 이배체 작물에서 A 지놈에 속한 *Brassica rapa*의 경우 내병성에 대한 유전 연구가 가장 활발히 되어 있어 지금까지 11개의 유전자좌(*CRa*, *CRaki*, *Crr1*, *Crr2*, *Crr3*, *Crr4*, *CRb*, *CRc*, *CRk*, *PbBa 3.1*, *PbBa 3.3*)가 5개의 염색체에(A1, A2, A3, A6, A8) 위치한다고 보고되었다(Suwabe et al., 2003; Hirai et al., 2004; Sakamoto et al., 2003; Matsumoto et al., 1998; Piao et al., 2004; Sakamoto et al., 2008; Kato et al., 2012; Chen et al., 2013; Chu et al., 2014; Suwabe et al., 2006; Suwabe et al., 2013). C 지놈인 *Brassica oleracea*의 경우 저항성 형질에 연관한 유전자좌(*CR2a*, *CR2b*, *Pb3*, *Pb4*, *PbBo1*, *Pb-Bd*(Anju1), *CRQTL-YC*, *CRQTL-GN\_1*, *CRQTL-GN\_2*)가 보고되었다(Landry et al., 1992; Grandclément and Thomas, 1996; Voorrips et al., 1997; Rocherieux et al., 2004; Nagaoka et al., 2010; Lee et al., 2016). 이배체인 A지놈과 C지놈의 합성으로 생성된 AC 지놈인 *Brassica napus*는 작물의 시장성이 매우 큰 작물 중 하나로, 2000년에 dominant gene *Pb-Bn1*과 두 개의 QTLs이 보고되었고(Manzanares-Dauleux et al., 2000), Werner 등 (2008)이 추가로

19개의 QTLs이 8개의 염색체 상에 위치한다고 보고하였다. 최근 뿌리혹병에 대한 피해의 심각성으로 인해 캐나다, 중국 및 영국에서 활발히 연구가 진행 중이다. 배추과 작물에서 내병성 기작에 대한 관심으로 2015년에는 뿌리혹병을 야기하는 매생물인 *Plasmodiophora brassicae*의 유전체 해독 연구결과가 보고되었다(Arne et al., Scientific reports). 병원균의 발달 단계에 따른 특정 transcriptomes을 분석하여 약 25.5 Mb 게놈 초안을 제시하였다. 다른 활물기생 병원균처럼 Plasmodiophorids는 대사 경로가 감소함을 나타냈고 auxin 및 jasmonic acid에 영향을 줄 수 있는 단백질 (PbGH3)에 대하여 보고하였다. Plasmodiophorids의 휴면 포자의 세포 벽에는 chitin이 포함 되어 있고, 만약 이 물질이 인식된다면 식물에게 방어 기작을 야기한다. 흥미롭게도 chitin연관 효소들이 특정 family를 형성 하였고 carbohydrate/chitin binding (CBM18)도 메인이 secretome에 풍부하였다. 식물계와 식물계를 포함한 대형군으로 분열 전에 존재했던 두 개 family에 해당되는 chitin 합성효소는 chitin 생합성이 고대 진핵생물계의 특징이었음을 시사하였다. 이러한 정보는 식물과 미생물의 공격과 방어기작을 연구하는데 있어 유용한 정보가 될 것이다.

#### 4절. 제4세부 과제: 시판 및 수출용 배추와 무 뿌리혹병 검정기술 개발

1. 병원균이 가장 하등군류이며 순활물기생자인 뿌리혹병균인 관계로 좀 더 진전된 연구와 실험을 위해서 균의 근본적인 생활환 분석이 실시되고 있다.
2. 여러 나라에서 배추, 양배추, 무, 유채의 내병성 육종을 위해 가장 문제가 큰 자국 내 뿌리혹병균의 race 분석에 심혈을 기울이고 있다.
3. 보다 진일보한 연구를 위해서는 다량의 순수 DNA 획득이 필수적인데 현재의 방법으로는 기대에 미치지 못하고 있어 많은 연구자들이 공동으로 기법개발에 힘쓰고 있다.
4. 일부의 연구자들이 극소수의 특정 race에 대해서 전체 염기서열을 분석했거나 분석 중에 있다.
5. 병원균들은 독일의 작은 지리적 영역에만 국한되지 않고 넓게 분포되어 있음을 밝힌바 있다.
6. 식물병의 생물학적 방제는 세계적 추세이다.

## 제 7 장   참고문헌

### 1 절. 제1세부 과제: 배추 유전자원 수집 및 육종재료 신속작성 기술

- Baillie, A.M.R., D.J. Epp, D. Hutcheson, W.A. Keller. 1992. In vitro culture of isolated microspore and regeneration of plants in *Brassica campestris*. Plant Cell Reports 11: 234-237.
- Cao, M.Q., Y. Li, F. Liu, C. Dore. 1994. Embryogenesis and plant regeneration of pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) via in vitro isolated microspore culture. Plant Cell Reports 13:447-450.
- Dias, J.C.S. 1999. Effect of activated charcoal on *Brassica oleracea* microspore culture embryogenesis. Euphytica 108: 65-69.
- Ferrie, A.M.R., W.A. Keller. 1995. Microspore culture for haploid plant production, p. 155-164. In: O.L. Gamborg and G.C. Phillips (eds.). Plant Cell Tiss. Org. Cult.: Fundamental method. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Ferrie, A.M.R., D.J. Epp, W.A. Keller. 1995. Evaluation of *Brassica rapa* L. genotype for microspore culture response and identification of a highly embryogenic line. Plant Cell Reports 14:580-584.
- Hong, S.Y., S.S. Lee. 1995. Microspore culture of *x Brassicoraphanus*. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 36:453-459.
- Kim, Y.H., S.S., Lee. 1997. Microspore culture of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) and Korean turnip (*B. campestris* ssp. *rapa*). J. Kor. Soc. Hort. Sci. 38:368-371.
- Lee, S.S., S.C. Nam. 1995. Microspore culture of Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italic*). J. Kor. Soc. Hort. Sci. 36: 636-640.
- Lee, S.S., A.J., Kim. 2000. Effect of cultural vessel, plant growth regulator, illuminating and shaking on embryo induction and growth in microspore culture of heading Chinese cabbage. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 41:16-20.
- Lee, S.S., H.B Suh, W.J., Choi. 2001. Population improvement for multi-resistance to turnip mosaic virus and clubroot disease by recurrent selection in Chinese cabbage. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 42:685-688.
- Lichter, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. Z. Pflanzenphysiol. 105:427-434.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15:473-497.
- Na, H.Y., S.H. Park, G.Y. Hwang, M.K. Yoon, C.H. Chun. 2009. Medium, AgNO<sub>3</sub>, Activated Charcoal and NAA Effects on Microspore Culture in *Brassica rapa*. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 27(4), 657-661.
- Prem, D., K. Gupta, G. Sarkar, and A. Agnihotri. 2008. Activated charcoal induced high frequency microspore embryogenesis and efficient doubled haploid production in *Brassica juncea*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 93:269-282.
- Sato, T., T. Nishio, and M. Hirai. 1989. Plant regeneration from isolated microspore cultures of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*). Plant Cell Reports 8:486-488.
- Seo, M.S., S.H. Sohn, B.S. Park, H.C. Ko, M. Jin. 2014. Efficiency of microspore embryogenesis in *Brassica rapa* using different genotypes and culture conditions. J. Plant Biotechnol. 41, 116-122.



<배추 뿌리혹병 저항성 품종 육종 관련>

- Braselton, J.P. 1995. Current status of the plasmodiophorids. *Crit. Rev. Microbiol.* 21: 263-275.
- Cao, M.Q., Y. Li, F. Liu, and C. Dore. 1994. Embryogenesis and plant regeneration of pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) via in vitro isolated microspore culture. *Plant Cell Rep.* 13: 447-450.
- Castlebury, L.A. and L.L. Domier. 1998. Small subunit ribosomal RNA gene phylogeny of *Plasmodiophora brassicae*. *Mycologia.* 90: 102-107.
- Cheah, L.H., S. Veerakone, and G. Kent. 2000. Biological control of clubroot on cauliflower with *Trichoderma* and *Streptomyces*. *Spp. Organics and Biocontrol.* 53: 18-21.
- Datnoff, L.E., T.K. Kroll, and G.H. Lacy. 1987. Efficacy of chlorine for decontaminating water infected with resting spores of *Plasmodiophora brassicae*. *Plant Disease.* 71: 734-736.
- Down, G.J., L.J. Grenville, and M.J. Clarkson. 2002. Phylogenetic analysis of *Spongospora* and implications for the taxonomic status of the plasmodiophorids. *Mycological Research.* 106: 1060-1065.
- Kang, W.J., M.K. Yoon, D.H. Kim, J.S. Kim, J.S. Harn, and Y.H. Om. 2000. Classification and selection for resistance to clubroot in Cruciferous vegetables. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 18: 187. (Abstr.)
- Kim, A.R., H.M. Lim, S.H. Park, H.S. Ji, U.H. Yoon, T.H. Kim, J.I. Cho, C.K. Kim, and G.S. Lee. 2014. Molecular characterization of a putatively stress-related gene *BrTSR53* isolated from Chinese cabbage (*Brassica rapa*). *Kor. J. Breed. Sci.* 46: 143-151.
- Kim, S.J., J.H. Kwak, K.R. Do, and H.Y. Na. 2013. Developmental stage and density of microspore by flower structure in Broccoli lines. *Kor. J. Breed. Sci.* 45: 19-25.
- Korea Meteorological Administration. 2015. Surface observational data. KMA, Seoul.
- Korea Seed Association. 2015. Export status of vegetable for 2014. KOSA, Seongnam.
- Ku, J.H., M.T. Kim, B.Y. Son, J.S. Lee, J.T. Kim, J.J. Hwang, S.B. Baek, J.K. Moon, and Y.U. Kwon. 2012. Change of Seed Yield, Germination Rate and Hard Seed Rate with Harvest Time in Hairy Vetch (*Vicia villosa* Roth). *J. Kor. Grassl. Forage Sci.* 32: 157-164.
- Lichter, R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Z. Pflanzenphysiol.* 105: 427-434.
- Ministry for Agriculture, Food and Rural Affairs. 2015. The statistics of vegetable production. MAFRA, Government Complex-Sejong. p.308.
- Nitsch, N. and J.P. Nitsch. 1967. The induction of flowering in vitro in stem segments of *Plumbago indica* L. I.&II. The production of vegetative buds. *Planta.* 72: 355-384.
- Park, S.H., M.K. Yoon, and Y.P. Lim. 2011. Development of clubroot race4 resistant inbreds using conventional breeding and microspore culture method in Chinese cabbage. *CNU J. Agri. Sci.* 38: 613-618.
- The International Union for the Protection of New Varieties of Plants. 2003. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability (Chinese Cabbage). UPOV, Geneva. p. 7-21.
- Van de Peer, Y., S.L. Baldauf, W.F. Doolittle, and A. Meyer. 2000. An updated and comprehensive rRNA phylogeny (crown) of eukaryotes based on rate-calibrated evolutionary distances. *J. Mol. Evol.* 51: 565-576.
- Yeoung, Y.R., J.H. Kim, B.S. Kim, J.Y. Jeon, and C.S. Yoon. 2003. Effects of beneficial antagonists (*Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., and *Trichoderma* sp.) on control of club root of Chinese cabbage. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 21: 194-198.

## 2 절. 제2세부 과제: 글루코시놀레이트 고함유 배추 육종 지원을 위한 실용적 분자표지 개발

- Akula R, Ravishankar, Gokare Aswathanarayana (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants 6: 1720-1731.
- Celenza JL, Quiel JA, Smolen GA, Merrikk H, Silvestro AR, Normanly J, and Bender J (2005) The Arabidopsis ATR1 Myb transcription factor controls indolic glucosinolate homeostasis. Plant Physiol 137: 253-262
- Fahey JW, Zhang Y, Talalay P (1997) Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. Pro Natl Acad Sci USA 94:10367-103
- Gigolashvili T, Berger B, Mock HP, Muller C, Weisshaar B, and Flugge UI (2007) The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 50:886-901
- Grubb CD and Abel S (2006) Glucosinolate metabolism and its control. Trends Plant Sci 11:89-100
- Halkier BA and Gershenzon J (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. Annu Rev Plant Biol 57:303-333
- Hirai MY, Sugiyama K, Sawada Y, Tohge T, Obayashi T, Suzuki A, Araki R, Sakurai N, Suzuki H, Aoki K, Goda H, Nishizawa OI, Shibata D, and Saito K (2007) Omics-based identification of Arabidopsis Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA 104:6478-6483
- Levy M, Wang Q, Kaspi R, Parrella MP, and Abel S (2005) Arabidopsis IQD1, a novel calmodulin-binding nuclear protein, stimulates glucosinolate accumulation and plant defense. Plant J 43: 79-96
- Manici LM, Lazzeri L, Palmieri S (1997) In vitro fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. J Agri Food Chem 45: 2768-2773
- Mari M, Iori R, Leoni O, Marchi A (1993) In vitro activity of glucosinolate-derived isothiocyanates against postharvest fruit pathogens. Ann Appl Biol 123: 155-16
- Malitsky S, Blum E, Less H, Venger I, Elbaz M, Morin S, Eshed Y, and Aharoni A (2008) The transcript and metabolite networks affected by the two clades of Arabidopsis glucosinolate biosynthesis regulators. Plant Physiol 148:2021-2049
- Mithen, Richard (2001) Glucosinolates-biochemistry, genetics and biological activity. Plant Growth Regulation 34: 91-103.
- Pedras MSC, Okanga FI, Zaharia IL, Khan AQ (2000) Phytoalexins from crucifers: synthesis, biosynthesis, and biotransformation. Phytochemistry 53: 161-176

- Radojčić Redovniković I, Glivetić, Tatjana, Delonga, Karmela, Vorkapić-Furač, Jasna (2008) Glucosinolates and their potential role in plant. *Glucosinolates and their potential role in plant* 110: 297-309.
- Skirycz, A, Reichelt M, Burow M, Birkemeyer C, Rolcik J, Kopka J, Zanon MI, Gershenzon J, Strnad M, Szopa J, Mueller-Roeber B, Witt I (2006) DOF transcription factor AtDof1.1 (OBP2) is part of a regulatory network controlling glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 47:10-24
- Sønderby IE, Hansen BG, Bjarnholt N, Ticconi C, Halkier BA, and Kliebenstein DJ (2007) A systems biology approach identifies a R2R3 MYB gene subfamily with distinct and overlapping functions in regulation of aliphatic glucosinolates. *PLoS ONE* 2: e1322
- Sønderby IE, Geu-Flores, Fernando, Halkier, Barbara A (2010) Biosynthesis of glucosinolates—gene discovery and beyond. *Biosynthesis of glucosinolates—gene discovery and beyond* 15: 283-290.
- Talalay P, Fahey JW (2001) Phytochemicals from Cruciferous Plants Protect against Cancer by Modulating Carcinogen Metabolism. *JNutr* 131:3027S-3033S
- Underhill EW, Wetter LR, and Chisholm MD (1973) Biosynthesis of glucosinolates. *Biochem Soc Symp* 38:303-326
- Verhoeven DT, Goldbohm RA, van Poppel G, Verhagen H, van den Brandt PA (1996) Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5:733-748
- Witstock U and Halkier BA (2002) Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends Plant Sci* 7:263-270
- Zang Y-X, Kim HU, Kim JA, Lim M-H, Jin M, Lee SC, Kwon S-J, Lee S-I, Park T-H, Mun J-W, Seol Y-J, Hong S-B, Park B-S (2009) Genome-wide identification of glucosinolate synthesis genes in *Brassica rapa*. *FEBS J* 276:3559-3574

### 3 절. 제3세부 과제: 분자 및 유전체육종 효율화 시스템 개발

- 1) Chung H, Jeong YM, Mun YH, Lee SS, Chung WH, Yu HJ (2014) Construction of a genetic map based on high-throughput SNP genotyping and genetic mapping of a TuMV resistance locus in *Brassica rapa*. *Mol. Genet. Genomics* 289:149-160.
- 2) Chu M, Song T, Falk KC, Zhang X, Liu X, Chang A, et al.(2014) Fine mapping of *Rcr1* and analyses of its effect on transcriptome patterns during infection by *Plasmodiophora brassicae*. *BMC Genomics* 15:1166.
- 3) Chen J, Jing J, Zhan Z, Zhang T, Zhang C, Piao Z (2013) Identification of Novel QTLs for Isolate-Specific Partial Resistance to *Plasmodiophora brassicae* in *Brassica rapa*. *PLoS One* 8(12): e85307.
- 4) Hatakeyama K, Suwabe K, Tomita RN, Kato T, Nunome T, Fukuoka H, Matsumoto S (2013) Identification and Characterization of *Crr1a*, a Gene for Resistance to Clubroot Disease

- (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. PLoS One. 2013;8(1):e54745.
- 5) Hayashida N, Takabatake Y, Nakazawa N, Aruga D, Nakanishi H, Taguchi G, Sakamoto K, Matsumoto E (2008) Construction of a practical SCAR marker linked to clubroot resistance in Chinese cabbage, with intensive analysis of *HC352b* genes. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. 77:150-154.
  - 6) Hirai M, Harada T, Kubo N, Tsukada M, Suwabe K, Matsumoto S (2004) A novel locus for clubroot resistance in *Brassica rapa* and its linkage markers. Theor. Appl. Genet. 108:639-643.
  - 7) Jin M, Lee SS, Lin K, Jung SK, Seo MS, Sohn SH, Park BS, Bonnema G (2014) Identification and mapping of a novel dominant resistance gene, *TuRB07* to Turnip mosaic virus in *Brassica rapa*. Theor. Appl. Genet., 127:509-519.
  - 8) Kato T, Hatakeyama K, Fukino N and Matsumoto S (2012) Identificaiton of a clubroot resistance locus conferring resistance to a *Plasmodiophora brassicae* classified into pathotype group 3 in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.). Breeding Sci. 62: 282-287.
  - 9) Kato T, Hatakeyama K, Fukino N and Matsumoto S (2013) Fine mapping of the clubroot resistance gene CR band development of a useful selectable marker in *Brassica rapa*. Mol Breeding 63: 116-124.
  - 10) Kuginuki Y, Ajisaka H, Yui M, Yoshikawa H, Hida K, Hirai M (1997) RAPD markers linked to a clubroot-resistance locus in *Brassica rapa* L. Euphytica 98:149-154.
  - 11) Kim S, Song YH, Lee JY, Choi SR, Dhandapani V, Jang CS, Lim YP, Han T (2011) Identification of the BrRHP1 locus that confers resistance to downy mildew in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) and development of linked molecular markers. Theor Appl Genet 123 (7):1183-1192.
  - 12) Landry BS, Hubert N, Crete R, Chang S, Lincoln SE and Etoh T (1992) A genetic map for *Brassica oleracea* based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and mapping of resistance genes to race2 of *Plasmodiophora brassicae* (Woronin). Genome 35, 409-420.
  - 13) Lee J, Izzah NK, Choi BS, Joh HJ, Lee SC, Perumal S et al. (2016) Genotyping-by-sequencing map permits identification of clubroot resistance QTLs and revision of the reference genome assembly in cabbage(*Brassica oleracea* L.). DNA Res. 23, 29-41.
  - 14) Manzanares-Dauleux MJ, Delourme R, Baron F and Thomas G (2000) Mapping of one major gene and of QTLs involved in resistance to clubroot in *Brassica napus*. Theor. Appl. Genet. 101, 885-891.
  - 15) Matsumoto E (2012) Identificaiton of a clubroot resistance locus conferring resistance to a *Plasmodiophora brassicae* classified into pathotype group 3 in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.). Breeding Sci. 62: 282-287.
  - 16) Matsumoto E, Hayashida N, Sakamoto K, Ohi M, (2005) Behavior of DNA markers linked to a clubroot resistance gene in segregating populations of Chinese cabbage (*Brassica rapa* spp. *pekinensis*). Engei Gakkai zasshi 74(5):367-373.

- 17) Matsumoto E, Yasui C, Ohi M, Tsukada M (1998) Linkage analysis of RFLP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Euphytica* 104 (2):79–86.
- 18) Nagaoka T, Doullah MA, Matsumoto S, Kawasaki S, Ishikawa T, Hori H et al. (2010) Identification of QTLs that control clubroot resistance in *Brassica oleracea* and comparative analysis of clubroot resistance genes between *B. rapa* and *B. oleracea*. *Theor. Appl. Genet.* 120, 1335–1346.
- 19) Piao ZY, Deng YQ, Choi SR, Park YJ, Lim YP (2004) SCAR and CAPS mapping of CRb, a gene conferring resistance to *Plasmodiophora brassicae* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Theor Appl Genet* 108:1458–1465.
- 20) Rusholme R. L. , Erin E. Higgins, John A. Walsh and Derek J. Lydiate (2007) Genetic control of broad-spectrum resistance to turnip mosaic virus in *Brassica rapa* (Chinese cabbage). *J gen virol.*, 88, 3177–3186.
- 21) Rocherieux J, Glory P, Giboulot A, Boury S, Barbeyron G, Thomas G et al. (2004) Isolate-specific and broad-spectrum QTLs are involved in the control of clubroot in *Brassica oleracea*. *Theor. Appl. Genet.* 108, 1555–1563.
- 22) Saito M, Kubo N, Matsumoto S, Suwabe K, Tsukada M, Hirai M (2006) Fine mapping of the clubroot resistance gene, *Crr3*, in *Brassica rapa*. *Theor Appl Genet* 114:81–91.
- 23) Sakamoto K, Saito A, Hayashida N, Taguchi G, Matsumoto E (2008) Mapping of isolate-specific QTL for clubroot resistance in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.ssp. *pekinensis*). *Theor Appl Genet* 117:759–767.
- 24) Suwabe K, Tsukazaki H, Iketani H, Hatakeyama K, Kondo M, Fujimura M, Nunome T, Fukuoka H, Hirai M, Matsumoto S (2006) Simple sequence repeat-based comparative genomics between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*: the genetic origin of clubroot resistance. *Genetics* 173:309–319.
- 25) Suwabe K, Tsukazaki H, Iketani H, Hatakeyama K, Fujimura M, Nunome T, Fukuoka H, Matsumoto S, rai M (2003) Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. *Theor Appl Genet* 107:997–1002.
- 26) Ueno H, Matsumoto E, Aruga D, Kitagawa S, Matsumura E, Hayashida N (2012) Molecular characterization of the CRa gene conferring clubroot resistance in *Brassica rapa*. *Plant Mol Biol* 80(6):621–9.
- 27) Voorrips RE, Jongerius MC and Kanne HJ (1997) Mapping of two genes for resistance to clubroot(*Plasmodiophora brassicae*) in a population of doubled haploid lines of Brassicaoleracea by means of RFLP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 94, 75–82.
- 28) Wang Y, Sun S, Liu B, Wang H, Deng J, Liao Y, Wang Q, Cheng F, Wang X, Wu J (2011) A sequence-based genetic linkage map as a reference for *Brassica rapa* pseudo chromosome assembly. *BMC Genomics* 12:239.
- 29) Werner S, Diederichsen E, Frauen M, Schondelmaier J and Jung C (2008). Genetic mapping of clubroot resistance genes in oilseed rape. *Theor. Appl. Genet.* 116, 363–372.
- 30) Yu S, Zhang F, Yu R, Zou Y, Qi J, Zhao X, Yu Y, Zhang D, Li L (2009) Genetic mapping

and localization of a major QTL for seedling resistance to downy mildew in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). Mol Breeding 23:573-590.

- 31) Zhang T and Zhao Z, Zhang C, Pang W, Choi SR, Lim YP, Piao Z (2014) Fine genetic and physical mapping of the CRb gene conferring resistance to clubroot disease in *Brassica rapa*. Mol Breeding 34:1173-1183.

#### 4절 . 제4세부 과제: 시판 및 수출용 배추와 무 뿌리혹병 검정기술 개발

Akaba, M., Kaneko, Y., Hatakeyama, K., Ishida M., Bang, S. W. and Matsuzawa, Y. 2009. Identification and evaluation of clubroot resistance of radish chromosome using a *Brassica napus*-*Raphanus sativus* monosomic addition line. Breeding Science 59: 203-206

Braselton, J. P. 1995. Current Status of the Plasmodiophorids. Critical Reviews in Microbiology 21(4): 263-275

Castlebyry LA, Maddox JV, Glawe DA. 1994. A technique for the extraction and purification of viable *Plasmodiophora brassicae* resting spores from host root tissue. Mycologia 86: 458-460.

Chang, S. W., Hong, S. S., Kim, S. K., Kim, H. D. and Yi, E. S. 2000. Improvement of control effect by change of chemical application method on clubroot disease of Chinese cabbage caused by *Plasmodiophora brassicae* in field. Res. Plant Dis. 6: 39-42. (In Korean)

Cheah, L.H. and B.B.C. Page. 1995. *Trichoderma* spp. for potential biocontrol of clubroot of vegetable brassicas. Proc. 50th New Zealand Plant Prot. Conf. p. 150-153.

Cheah, L. H., Veerakone, S. and Kent G. 2000. Biological control of clubroot on cauliflower with *Trichoderma* and *Streptomyces* spp. New Zealand Plant Protection 53: 18-21.

Cho, W. D., Kim, W. G. and Takahashi, K. 2003. Occurrence of clubroot in cruciferous vegetable crops and races of the pathogen in Korea. The Plant Pathology Journal 19: 64-68.

Devos, S., Vissenberg, K, Verbelen J-P. and Prinsen, E. 2005. Infection of Chinese cabbage by *Plasmodiophora brassicae* leads to a stimulation of plant growth: impacts on cell wall metabolism and hormonal balance. New Phytologist 166: 241.

Dekhuijzen, H. M. and Overeem, J. C. 1971. The role of cytokinins in clubroot formation. Physiological Plant Pathology 1: 151-1.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12, 13-5.

Feng, J., Hwang, R., Hwang S-F., Stephen, E. S., Bruce, D. G., Qi-Xing, Z., Peng, G. 2011. Molecular characterization of a serine protease Pro1 from *Plasmodiophora brassicae* that stimulates resting spore germination. Molecular Plant Pathology 11: 503-512.

Ingram, D. S. and Tommerup, I.C. 1972. The life history of *Plasmodiophora brassicae* Woron. Proc. R. Soc. Lond. B. 180: 103-112.

Ito, S., Maechara, T., Tanaka, S., Kameya-Iwaki, M., Yano, S. and Kishi, F. 1997. Cloning of

- single-copy DNA sequence unique to *Plasmodiophora brassicae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50:289-300.
- Kageyama, K., Kamimura, Y. and Hyakumachi, M. 1995. A simple inoculation method with a single resting spore of *Plasmodiophora brassicae*. *Phytopathological Society of Japan* 61: 415-418.
- Kageyama K, Asano T, 2009. Life cycle of *Plasmodiophora brassicae*. *Journal of Plant Growth Regulation* 28, 203-11.
- Ludwig-Müller, J. 1999. *Plasmodiophora brassicae*, the causal agent of clubroot disease: a review on molecular and biochemical events in pathogenesis. *Journal of Plant Disease and Protection* 106(2): 109-127.
- Nam, Myeon Hyeon., Park, Myung Soo., Kim, Hong Gi., Yoo, Sung Joon (2009). Biological Control of Strawberry Fusarium Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* Using *Bacillus velezensis* BS87 and RK1 Formulation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 520-524.
- Oh, J. H., Cho, J. H., Kim, B. G., Chae, J. C., Chung, G. U., Hwang, C. H. and Kim, D. W. 1997.
- Siemens, J., Nagel, M., Ludwig-Müller, J. and Sacristán M. D. 2002. The Interaction of *Plasmodiophora brassicae* and *Arabidopsis thaliana*: parameters for disease quantification and screening of mutant lines. *J. Phytopathology* 150: 592-605
- Voorrips, R. E. 1996. Production, Characterization and interaction of single-spore isolates of *Plasmodiophora brassicae*. *European Journal of Plant Pathology* 102: 377-383.
- Wallenhammar, A. C. 1996. Prevalance of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central sweden and factors influencing soil infestation levels. *Plant Pathology* 45: 710-719.
- Wallenhammar, A. C. 2012. In-field distribution of *Plasmodiophora brassicae* measured using quantitative Real-time PCR. *Plant Pathology* 61: 16-28.
- Williams, J.G.K., A.R. Kugelik, K.J. Livak, J.A. Rafolski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6351-6355.
- Williams, J.G.K., M.K. Hanafey, J.A. Rafolski, and S.V. Tingey. 1993. Genetics analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Method Enzymol.* 218, 704-4740.
- Williams, P. H. 1966. A system for the determination of race of *Plasmodiophora brassicae* that infect cabbage and rutabaga. *Phytopathology* 56: 624-626.
- Woronin, M. 1877. *Trudy St Petersburg Obshch Est Otd Bot* 8: 169.
- 박수형, 윤무경 2009. 뿌리혹병 race 4 저항성 배추 계통 육성. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology* 27 : 67.
- 김영국. 2014. Development of integrated diagnostic system for clubroot using bioassay and molecular biological methods. 충남대학교 대학원 석사학위 청구논문.
- 김영숙. 2005. 항진균성 항생물질을 생산하는 *Bacillus atrophaeus* CNU 05-1 균주의 잿빛곰팡이 병 생물학적 방제활성에 관한 연구. 충남대학교 대학원 박사학위 청구논문.
- 농촌진흥청 2001. 십자화과 채소의 뿌리혹병 발생 생태 및 병제 대책 연구 대형 공동과제 완결

보고서 111.

박주영. 2016. 국내 배추뿌리혹병균의 병 발생특성 분석 및 생물학적 방제요인 탐색. 충남대학교 대학원석사학위 논문.

양슬기. 2012. 국내 배추뿌리혹병균의 지역별 race와 새로운 race의 생성 특성 및 균주의 최적 저장조건연구. 충남대학교 대학원 석사학위논문.

이동국. 2010. 식물내생세균 *Bacillus amyloliquefaciens* CP1을 이용한 딸기 탄저병의 생물학적 방제. 충남대학교 대학원 석사학위 청구논문.

장세정. 2006. 배추 무사마귀병균의 2단계 접종을 통한 새로운 단포자 균주 분리법과 병원균의 감염 양상 분석. 충남대학교 대학원 농학석사학위논문.

조광수, 한영한, 이정태, 허은주, 양태진, 우종규. 2002. 고랭지 지역 배추 무사마귀병원균의 생리형 분화와 저항성 품종 선발. *Korean J. Breed.* 34(3) : 168-173

최진수. 2010 배추 뿌리혹병균 *Plasmodiophora brassicae*의 종특이적 Primer 개발과 휴면포자의 순수분리 방법 개선 및 대량증식 체계 확립. 충남대학교 대학원 농학석사 학위 논문.

함수상, 김종태, 한광섭, 김병련, 김홍규, 남윤규, 유승현. 2012. *Flavobacterium hercynium* EPB-C313 균주를 이용한 배추 뿌리혹병 생물적 방제. *식물병연구* 18(3): 210-216.

허승환. 2004. 국내 배추무사마귀병균(*Plasmodiophora brassicae*)의 변이특성 분석. 충남대학교 대학원 농학석사 학위 논문.

통계청 2011. 국가 통계 포털 [http://kosis.kr/abroad/abroad\\_01List.jsp](http://kosis.kr/abroad/abroad_01List.jsp).



## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청에서 시행한 Golden Seed 프로젝트 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청에서 시행한 Golden Seed 프로젝트 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.