

315025-3

보안과제(), 일반과제(○) / 공개(○), 비공개() 발간등록번호(○)
농생명산업기술개발사업 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-002379-01

방사선을 이용한 유용 돌연변이 육종 및 산업화 최종보고서

2018.11.14.

주관연구기관 / 한국원자력연구원
협동연구기관 / 제주대학교

(주)시드피아

바보난농원

(주)바이오플러스

전남대학교

방사선을 이용한 유용 돌연변이 육종 및 산업화
최종보고서

2018

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “방사선을 이용한 유용 돌연변이 육종 및 산업화”(개발기간 : 2015.08.14.~ 2018.08.13.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 11. 14.

주관연구기관명 : 한국원자력연구원장
협동연구기관명 : 제주대학교 산학협력단장
(주)시드피아 대표이사
바보난농원 대표이사
(주)바이오플러스 대표이사
전남대학교 산학협력단장



주관연구책임자 : 강시용
협동연구책임자 : 이효연
협동연구책임자 : 조유현
협동연구책임자 : 강경원
협동연구책임자 : 이강섭
협동연구책임자 : 하보근

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라
보고서 열람에 동의 합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	315025-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2015.08.14.~ 2018.08.13	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단 계)
연구사업명	단 위 사 업				
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	방사선을 이용한 유용 돌연변이 육종 및 산업화			
연구책임자	강시용	해당단계 참여연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 천원 민간: 천원 계: 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 84 명 내부: 48 명 외부: 36 명	총 연구개발비	정부: 1,500,000천원 민간: 198,000천원 계: 1,698,000천원
연구기관명 및 소속부서명	한국원자력연구원 첨단방사선연구소 방사선육종연구실			참여기업명: (주)시드피아 바보난농원 (주)바이오플러스	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유					

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다) 보고서 면수 : 173P

<요약문>

연구의 목적 및 내용	<p>○ (연구목적) 첨단 방사선 돌연변이 육종기술을 이용한 식량, 원예작물의 고부가가치 신품종 및 신 유전자원 개발과 국내외 산업화 추진하고, 산·학·연 협력 연구 및 방사선육종 기술 지원 체계를 구축함으로써 국내 농업 및 종자산업 발전에 기여함.</p> <p>○ (연구내용) 방사선육종은 다양한 생물자원의 고부가가치 유전자원 창출이 가능하며, 산·학·연 협력 연구체계를 구축하여 개발 품목의 산업화를 촉진하고자 함. 본 과제는 방사선육종 전담조직이 있는 원자력연구원이 주관하여, 산업체와 대학에서 5개 협동과제를 방사선육종 기술 개발 및 지원 분야와 품목별 품종개발 및 산업화 등 2개 핵심 분야를 추진하였음. ①제1세부과제에서는 고품질 고추 육종을 위한 잡종강세, 과실숙성 지연을 타겟으로 고추 돌연변이 pool 구축, 협동과제의 연구개발 작물인 보이젠베리와 석곡 난에 대한 기능성(황산화물질) 검정 지원, 산·학·연 방사선조사 기술지원을 수행함. ②제1협동과제에서는 감마선 처리에 의한 고품질 들잔디 품종을 개발하고, 우수 돌연변이 계통의 품종화와 들잔디의 유전자 pool 구축 및 조사, 변이체 추적에 위한 분자마커를 개발함. ③제2협동과제에서는 벼 돌연변이자원 계통 육성을 통한 신품종 고식미 및 향미 신품종 개발, 분자마커 개발을 통한 유용자원 선발 평가와 유전체 정보기반 DNA profiling, 개발품종의 농가실증, 시장성 평가 및 유통업체와 연계를 통한 지역특산 브랜드 제품 사업화를 추진함. ④제3협동과제에서는 방사선 돌연변이 기술을 이용한 관상성이 높은 엽예품 및 기능성 석곡 난 품종을 개발하기 위한 방사선 조사조건 및 대량배양기술을 개발하여 품종화를 추진하고, 기존 개발 돌연변이 심비디움 난의 상품화 및 수출화를 추진함. ⑤제4협동과제에서는 국내 신규 도입 보이젠베리의 돌연변이 계통의 특성검정, 생산력 검정을 통한 품종화와 대량증식 및 재배기술을 확립하고, 기능성 및 생산성이 우수한 블랙베리 돌연변이 신품종의 건강보조식품 개발과 묘목 해외 수출을 추진함. ⑥제5협동과제에서는 보이젠베리와 석곡 난 돌</p>
-------------------	---

	<p>연변이 신품종 조기선발 및 품종 지원을 위한 신규 분자마커 시스템을 개발함을 목표로 한다.</p>
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ (제1세부) 하바네로 및 유월초의 돌연변이 후대에서 개화, 착과 및 응성불임 등의 유용 변이체를 선발하였으며, 대규모 TILLING 집단에서 유용 유전자를 효율적으로 선발하는 체계를 구축하였음. 3협동과 4협동의 보이젠베리 및 석곡의 돌연변이 육성 계통에서 유용 물질을 분석을 통한 육종 선발 및 소재 개발을 지원하였음. 산학연 연구자에게 176건의 감마선조사 및 자문을 실시하였음. ○ (제1협동) 감마선 처리에 의한 고품질 들잔디 2 품종을 개발하여 품종화를 위하여 2건의 품종보호 출원을 수행하였으며, 들잔디의 유전자 pool을 구축하여 대조구 및 변이체간 대량의 DNA SNP 및 In/Del을 확보하였음. ○ (제2협동) 돌연변이 고세대에서 “천수향큰눈찰1세”, 골든퀸2호 및 스위트드림 1세 등의 신품종을 개발하여 지식재산권을 출원 등록하였고, 기존 개발품종인 “골든퀸2호”를 경기 연천, 전남 신안에서 지역특화 브랜드미로 생산·판매하여 상품화를 달성함. 또한, 다양한 형질을 보유한 돌연변이 육종 소재를 선발 양성하였고, 주요 유망 44계통에 대하여 유전체 재분석을 실시하여, Haplotype 분석으로 각 유전자 별 신규 Allele Target 마커 세트 개발 완료함. ○ (제3협동) 수집한 관상용 및 기능성 석곡 유전자원의 방사선 조사 및 조직배양 조건을 확립하고 유망 돌연변이 계통을 선발하여 품종보호권 출원 등록하였으며, 돌연변이 난 신품종의 증식 재배관리, 기술개발, 농가보급과 국내 판매 및 해외 수출을 추진하였음. ○ (제4협동) 가시없는 블랙베리의 근맹아를 이용한 다경유도와 절간배양을 통한 식물체 증식 조건의 확립과, 방사선처리에 의하여 유도된 보이젠베리 변이 계통의 생육 및 품질 특성 검정을 통하여 품종화를 위한 유망 계통을 선발하였음. 또한, 블랙베리 과실과 동식물을 원료로 하는 건강식품 개발하여 상품화를 추진하였음. ○ (제5협동) 보이젠베리 돌연변이 집단 품종구분용 SNP 마커 탐색 및 KASP genotyping assay 개발하였고, 석곡 돌연변이 집단 품종구분용 SNP 마커 탐색 및 KASP genotyping assay 개발하였음. ○ 본 연구를 통하여 논문 SCI 9건, 비 SCI 9건, 학회발표 25건, 품종보호권 및 특허권 출원 10건, 품종등록 2건, 기술이전 2건 및 자체사업화 5건, 수출 2건 및 방사선조사지원 176건 등을 달성하였음.
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개발 신품종은 품종보호권 및 특허 등록 후 공공기간은 민간기업, 지자체에 이전 또는 무상으로 농민에게 보급하여 실용화하고, 참여 산업체가 개발한 기술 및 품종은 자체 사업화 또는 타 업체에 매각하여 산업화를 추진함. ○ 연구성과 중 벼 신품종 “골든퀸2호”의 경우 지역특화 브랜드화로 3차년도 기준 연매출 10억 원을 달성하였으며, 향후 3년 확대재배시 400억원의 매출이 예상된다. 난 신품종 농가재배 및 국내 상품화와 스웨덴 및 대만 수출을 달성함. ○ 연구성과 활용계획: 고추 육종·기능유전체학 연구용 소재 발굴 및 활용, 잔디 신품종 농가 및 영농조합 대상 기술이전, 지자체와의 협력 사업을 통한 벼

	<p>신품종 재배면적 확대(매출 400억 원 목표), 난 업에 신품종 활용 수입 대체 및 수출, 베리류 신품종 및 대량생산체계 활용 농가보급 확대 및 베리류 산업의 다양화</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 또한 확보된 유용 돌연변이 유전자원, 유전자 및 기능성 소재 등은 후속 연구개발을 통하여 지속적인 품종개발 및 실용화를 추진할 계획임. ○ 산학연 협력에 의한 돌연변이육종 연구는 본 연구를 통하여 작물 신품종 및 유용 유전자원 개발 실용화에 효과적인 것으로 판명되어 앞으로 더 규모가 큰 돌연변이육종연구단 등의 사업 추진이 기대됨. 				
국문핵심어 (5개 이내)	방사선육종	돌연변이	신품종	식물유전자원	분자마커
영문핵심어 (5개 이내)	Radiation Breeding	Mutation	New Variety	Plant genetic resources	Molecular marker

〈 목 차 〉

제1장. 연구개발과제의 개요	6
제1절. 연구개발 목적	6
제2절. 연구개발 필요성	7
제3절. 연구개발 범위 및 내용	10
제2장. 연구수행 내용 및 결과	22
제1절. 세부·협동과제별 연구수행 내용 및 결과	22
제2절. 연구개발 성과	160
제3절. 연구성과의 파급효과	164
제3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	169
제1절. 목표	169
제2절. 목표 달성여부	170
제3절. 목표 미 달성시 원인 및 차후대책	172
제4장. 연구결과의 활용 계획 등	173
제1절. 연구성과의 활용분야 및 방안	173
제2절. 추가연구의 필요성 및 타 연구에의 응용	174
제3절. 기술이전 및 사업화 추진방안	174

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

제1장. 연구개발과제의 개요

제1절. 연구개발 목적

1. 최종목표

가. 정성적 목표

- 방사선 돌연변이 육종기술을 이용한 작물의 신품종 개발
- 방사선 돌연변이 작물의 국내외 보급 실용화로 산업화 추진
- 산·학·연 협력연구 체계 구축 및 기술 지원에 의한 방사선 육종 저변 확대
- 첨단 방사선 기술, BT 및 육종기술 등 융복합 기술개발로 신 유전자원 창출

나. 정량적 목표

- 논문 SCI 6건, 비 SCI 8건, 학회발표 14건
- 품종보호권 및 특허권 11건 (신품종 벼, 들잔디, 석곡, 심비디움, 블랙베리, 보이젠베리, 신규 돌연변이 품종 판별 마커 등)
- 제품화, 매출창출 및 고용창출 11건
- 산·학·연 방사선조사지원 150건
- 인력양성 1건
- 정책 활용 및 홍보전시 6건
- 신규 유용 유전자원 개발: 고추, 벼, 들잔디, 석곡, 보이젠베리, 블랙베리 등 100점

2. 세부/협동 과제별 주요목표 및 주요내용

- 유용 돌연변이자원 창출 및 방사선육종 기술지원을 통한 방사선 육종 기반 확립
- 고추 육종소재 발굴을 위한 돌연변이 집단 작성 및 유용 유전자원 pool 구축
- 기능성 품종 상업화를 위한 협동과제(보이젠베리, 석곡) 기능성(항산화물질) 검정 지원
- 방사선 육종 산업 저변 확대를 위한 산·학·연 방사선조사 기술지원
- 기존에 국내 수집 잔디 500점 중에서 ^{60}Co 감마선으로 유도된 왜성 및 녹기유지 가능성이 보이는 잔디를 1차 선별하여 특성검정 수행, 우수개체는 시험포에서 보존과 증식
- 잔디 돌연변이체의 유전학적 분석의 기초 확립을 위한 한국 들잔디의 NGS (Next Generation Sequencing) 분석 및 돌연변이체 계통의 PCR-based marker 분석
- 왜성 및 녹기유지의 형질을 보이는 잔디 돌연변이체 계통의 품종등록 특성자료준비 및 품종 출원
- 저아밀로스 벼 계통의 돌연변이 처리, 선발 및 평가
- 유용 벼 변이자원 및 선발된 신행질 계통을 이용한 중간모본 육성과 품종후보 고세대 계통 농가실증을 통한 재배우수성, 미질, 내재해성 등 실용 재배 가능성 평가
- 신규 벼 품종 유통 시 발생할 수 있는 혼입 및 진위 판별을 위한 정보제공을 목적으로 유용 분자 표지 및 바이오 마커를 개발

- 개발 벼 신품종의 생산, 가공 및 판매 시스템 구축하여 안정적 시장 공급 체계를 통하여 최종 소비자에게 제공
- 돌연변이 기술을 이용한 관상성이 높은 엽예품 및 기능성 식곡 난 품종 개발
- 돌연변이 심비디움 난 신품종 및 유망계통의 국내외 상품 수출화
- 보이젠베리의 방사선 돌연변이 육종을 통한 우수 계통 선발과 특성검정, 생산력 검정 및 대량생산체계 확립 : 당도 8-10 brix 이상, 평당 수확량 6-7kg 이상, 묘목 1000주 이상
- 기능성 및 생산력이 우수한 방사선 돌연변이 신품종 블랙베리의 건강보조식품 개발과 해외 수출을 통한 산업화 : 건강보조식품 5000 box 이상, 묘목 1만주 이상
- 돌연변이 신품종 보이젠베리 및 식곡 난 특이 분자마커 개발

3. 연구개발의 목표와 성격

- 본 과제는 돌연변이육종에 의한 신품종 개발과 함께 개발 품종의 산업화를 주요 목적으로 하고 있으며, 산·학·연 협력 연구 체계를 구축하고 동시에 방사선 육종기술을 지원하여 방사선육종의 저변 확대를 도모하고자 함.
- 제한된 연구기간 내에 이러한 목표를 달성하기 위하여 국내 유일의 방사선육종 전담 연구조직이 있는 원자력연구원 첨단방사선연구소를 주관기관으로 하고, 그동안 돌연변이육종 분야에 상당한 선행 연구실적 및 품목별 전문성을 확보하고 있는 대학 및 산업체를 엄선하여 연구팀을 구성하였음.
- 본 연구를 통하여 몇몇 품목의 돌연변이 품종 개발 및 실용화 모델을 제시하여 앞으로 많은 육종가 및 연구자가 다양한 품목에서 돌연변이육종을 적용할 수 있도록 저변 확대에 기여하고, 첨단 방사선육종 및 BT 등 융복합 기술개발에 의한 다양한 신 유전자원 창출하여 제공할 수 있는 기반을 구축하고자 함.

제2절. 연구개발의 필요성

1. 방사선을 이용한 돌연변이 육종에 의한 국내 신 유전자원 개발의 필요성

- 최근 국제적으로 WTO 및 FTA 타결에 따른 농산물 시장 개방화, 우리 종묘회사의 해외 매각, 기후변화 심각화와 국제식물신품종보호동맹(UPOV) 가입에 따른 종자 지적재산권 강화 추세에 따라 국가 간 신품종 및 유전자원 확보 경쟁이 치열해지고 있어 국내 농업 및 생명공학의 발전을 위하여 국산 신품종 및 유전자원 개발이 필요한 상황임.
- 정부는 국내 종자산업을 신성장동력 산업으로 육성하기 위하여 『2020 종자사업 육성대책』 수립하고 다양한 사업을 추진중에 있는데, 낙후한 국내 방사선육종을 활성화하기 위하여 원자력연구원 정읍 첨단방사선연구소 내에 『방사선육종연구센터』를 설립하였음. 또한 김제에 종자업체 집적화를 위한 민간육종연구단지를 조성 중에 있으며, 국제 경쟁력 있는 종자 개발을 위한 골든시드프로젝트(GSP) 도 추진 중에 있음.
- 최근에는 융복합 기술 개발에 의한 창조경제 활성화를 위하여 부처간 협업이 강조되고 있는데, 방사선기술 이용 농·식품 분야의 신산업 창출을 위해서 미래부의 방사선융합기술 분야 연구성과·인프라와 농식품부의 산업화연구를 연계한 양 부처 협업 및 상호 교류 협력을

위한 업무협약(MOU) 체결함(2014.12.30.)

- 돌연변이육종이란 자연상태에서는 돌연변이가 매우 낮은 빈도(1×10^{-6})로 발생하기 때문에 방사선이나 화학물질을 종자나 식물체에 처리하여 식물체 자체가 가지고 있는 염색체나 유전자의 변이를 일으켜 유전자의 재조합 과정을 거치지 않고 유전형질을 개량하는 것을 말하며, 교배육종과 함께 전통육종 방법의 하나임.
- 방사선을 이용한 돌연변이 육종 기술은 1928년 방사선이 식물에 돌연변이가 일으키는 것이 밝혀진 이후 발전하였으며, 그 후 전 세계적으로 많은 돌연변이 품종이 개발되어 안전하게 이용되고 있음.

2. 방사선 돌연변이 육종의 장점

- 기존 유망 품종의 1~2개 단점형질을 개량하는데 뛰어나며, 소수의 자체 유전자의 교정 및 변화에 의한 유전자편집 육종기술과 유사한 육종 효과
 - 기존 유망품종 단점형질 개량 : 추청벼→원청벼 (단간, 내도복성 양질미, 원자력연)
 - 재래종 개량 : 생동찰벼 → 녹원찰벼 (국내 일부 재배 극만생종을 조생화 및 단간화로 전국적으로 안전재배 가능하게 한 녹색 찹쌀 현미, 원자력연)
 - 특이 성분 개량 : 일품벼 → 고아미2호 (기능성 다이어트쌀, 농진청), 서농8호(기능성GABA 함유 거대배아미, 서울대)
- 일년생, 영년생, 종자번식 및 영양번식 등 다양한 식물과 종자, 삽수체, 조직배양체, 화분, 식물체 등 다양한 식물 재료에 적용이 가능함.
 - 교잡육종이 불가능하거나 GMO 육종기술이 미 확립 된 식물 육종도 가능
- 외국도입 식물 및 자생식물 등의 품종 개발에 기여
- 체세포 변이에 의한 화훼류 및 목본류 등 영양번식 식물의 품종개발에 유리
 - 난류 잎 무늬 돌연변이 품종들 (바보난농원)
 - 분재용 왜성 품종 “꼬마” 무궁화 (원자력연)
- 육종소재 확충으로 교배육종에 기여
 - Calose 76: Calose의 방사선 돌연변이 품종으로 미국, 호주 및 이집트에서 현재 주요 품종의 육성시 교배모본으로 이용
 - 채소류: 방사선조사에 의해 선발한 응성불임체를 교배모본으로 활용
- GMO와 달리 안전성 논란에 문제가 없으며, GMO 개발에 기여할 수 있음.
 - 교배육종 품종과 같이 안전성 검정없이 품종 등록 및 생산 이용이 자유로움.
 - GMO를 돌연변이 육종으로 불임화하여 환경위해성 문제 해결 (제주대, 유전자변형 잔디의 불임화 연구 등)
- 돌연변이체는 신규 유전자의 탐색 및 유전자의 기능을 밝히는 기능유전체 연구에 기여 가능함.
- 이상과 돌연변이육종 기술은 많은 장점을 가지고 있어, 특히 민간육종가 들이 손쉽게 적용할 수 있는 육종 방법이며, 최근 국내에서도 돌연변이 품종 개발이 증가하고 있으나, 실용화 실적은 미흡하여 다양한 품목의 산업화를 촉진할 수 있는 연구개발이 필요함.

3. 본 과제 연구개발 품목별 필요성

- 국내 상업 육종에서 채소 종자 분야는 가장 높은 비중을 차지하며 경쟁력 강화 및 수출 확

대를 위해서는 신규 유전자원 및 육종소재 확보 전략 개발이 매우 중요하나 이를 위해 방사선 돌연변이 육종기술이 적용된 사례는 많지 않음.

- 국내 채소 중에서 고추는 가장 생산액이 많고 국내 육종기술 수준도 높아 종자 수출 확대가 기대되고 있으나, 기존 수집 유전자원의 한계로 차별화된 특성을 지니는 신규 유전자원 개발의 필요성이 있음.
- 국민소득이 증가함에 따라 스포츠 및 공원 시설 등의 확대로 최근 잔디의 수요가 증가하고 있어, 국내 잔디 매출액은 1,000억 원 정도이며 해외의 잔디산업 시장 규모는 최소 50조 최대 100조원 이상임(산림청 2013년 잔디연구동향). 이러한 잔디는 벼농사 대비 약 2~3배 이상의 고소득 경제작물임에도 불구하고, 경영실태와 같은 기초조사와 신품종화에 관한 연구 지원과, 재배농가들에 대한 행정 및 산업적 지원이 부족한 상황임. 따라서 소비자의 요구에 맞는 환경스트레스 내성 및 왜성 등의 관리가 편리한 고품질 잔디품종을 개발하여 실용화할 수 있는 연구가 필요한 실정임.
- 쌀은 핵심 식량작물 중 하나로 국가 경제전반과 농촌사회 유지 및 안보 등에 미치는 영향이 대단히 크며, 변화하는 소비자 욕구를 충족하기 위한 다양한 기능성 벼 품종육성과 새로운 유전자원의 창출이 요구됨.
 - 최근 30년 동안 벼 등숙기의 폭우가 잦아져 품질 저하로 유백미, 동할미, 무배미 등의 증가로 완전미가 현저하게 감소하여 상품으로서 가치를 잃고 식미가 매우 불량해짐.
 - 또한 최근 식문화의 발달로 인해 우수한 식미를 가진 쌀에 대한 소비자의 욕구가 높아지고 있음.
 - 유용 형질을 야생종으로부터 교배를 통해 도입하는 것만으로는 시장 환경의 빠른 변화와 다양한 요구에 대응하기에 미흡한 면이 있으며, 이를 해결하기 위해 지속적인 돌연변이 집단을 작성하고, 작성된 돌연변이 자원 중에서 유용한 특성을 가진 자원을 평가하여 신품종으로 도입할 필요가 있음.
- 돌연변이 난 육종연구는 2005년부터 시작되어 심비디움 3품종, 덴드로비움 4품종이 육성되어 있음. 돌연변이 난 육종은 교잡육종보다 시간과 비용 면에서 효율적임. 특히 교잡육종이 7-10년 소요되는데 비하여, 돌연변이 육종은 4-5년 만에 엽예품 신품종을 만들 수 있어 효과적이고 편리한 기술임.
 - 이제까지 돌연변이 육종에 이용된 주요 선원은 감마선이었지만, 다양한 방사선(양성자빔)을 이용하여 육종 효율화를 도모하는 것이 필요함.
- 최근에 국내에 다양한 베리 품목이 도입되어 재배가 이루어지고 있지만, 국산 품종이 개발되어 재배되는 경우가 거의 없어, 국내 기후에 적합하고 소비자 수요에 적합한 품종 개발 보급이 시급한 실정임.
 - 특히, 보이젠베리(boysenberry, *Rubus ursinus*)는 블랙베리, 라즈베리와 로건베리를 중간 교잡한 덩굴성 검은색의 나무딸기로써 독특한 레드와인색과 풍미로 인해 뉴질랜드, 호주, 미국 등지에서 상업적으로 많이 재배되고 있음. 최근 고유한 맛과 지각작용 증진, 신경세포 보호효과, 간 보호작용 및 항당뇨 등에 좋은 효과를 가진다고 알려져 미국, 유럽 및 일본에서 소비가 급격히 증가되고 있음.



<보이젠베리 이용 식품, 주류, 화장품 상용화제품들>

- 방사선 돌연변이육종을 통해 외국 도입 보이젠베리 및 블랙베리 신품종을 개발하고, 대량생산 체계를 구축함으로써 우수한 묘목의 공급을 신속히 보급으로써 농가 소득 증대 및 식의약품 가공산업 발전에 기여할 수 있고, 수출화를 추진할 필요성이 있음.
- 현재 우리나라는 국제식물신품종보호동맹(UPOV) 가입으로 육종가가 개발한 신품종에 대한 지적 재산권 보호 조치 강화 및 상품성 향상과 소비자에 대한 신뢰성을 증대시키기 위하여 수입 원예품종과 국산 원예품종의 판별체계 구축이 필요한 실정임. 특히 보이젠베리와 석곡은 영양변식으로 쉽게 증식이 되는 관계로 육종가의 품종보호권 강화를 위해서는 신속하고 조기에 품종 판별이 가능한 분자표지 마커 개발 및 분석기술 정립이 요구됨.
- 중국 연구진은 석곡의 EST library를 이용하여 300여개의 SSR 분자표지를 개발하였으며 이를 이용한 속곡 유전자원간의 유전적 유연관계 분석 및 유전자지도 작성 연구 등을 활발하게 진행 중임.
- 국내에서는 토마토, 복숭아, 오이, 블루베리 등의 원예작물 품종 식별을 위하여 SSR과 SNP를 이용한 분자표지 개발 및 데이터베이스 구축 작업이 진행되고 있으나 아직까지 보이젠베리와 석곡에 대한 연구는 전무한 실정
- 이상과 같이 국가 종자산업 발전 전략에 발맞춰 새로운 수요 및 시대변화에 능동적으로 대응하기 위해서는 첨단 돌연변이 육종기술을 발전 적용시켜 국내 연구개발 능력을 세계적인 수준으로 향상시킴과 동시에 수요에 부응하는 작물의 품종개발과 산업화가 절실히 필요함.

제3절. 연구개발 범위 및 내용

1. 세부·협동과제별 연구개발의 목표 및 내용

가. (제1세부) 유용 돌연변이 자원 창출 및 방사선육종 기술지원(한국원자력연구원)

선행연구 및 기반 구축

○ 국내 유일의 방사선육종 전담 연구조직

- 본 과제 주관기관인 한국원자력연구원 첨단방사선연구소 방사선육종연구팀은 국내 유일의 방사선육종 전담연구조직으로 방사선육종에 필요한 감마선조사 시설 및 시험포장 등 다양한 시설을 보유하고 있음.



<첨단방사선연구소 조감도 및 감마선조사시설>

○ 방사선육종연구센터 설립

방사선육종연구센터 설립 개요

- ❖ 관련근거 : "2020 종자산업 육성대책" (2009. 10)
- ❖ 사업기간 : 2010~2013(4년)
- ❖ 총사업비 : 132억 원 (국비-농식품부 일반/농특회계)
- ❖ 준공식 : 2013. 11.18 (농식품부, 미래부 공동주최)
- ❖ 기대효과 : 국가 종자산업 육성 및 방사선 육종연구 활성화, 국내 산학연 방사선육종 연구개발 및 실용화 지원
- ❖ 운영계획 : 「방사선육종연구센터」를 국내 돌연변이 육종 연구개발의 핵심 거점화
 - 미래부-농식품부 공동기획과제 발굴·지원 및 농식품부 「종자산업진흥센터」 지정 추진 (2015)
 - 김제 민간육종연구단지(시드벨리) 입주업체 지원 및 전북 종자삼각벨트 구축 참여 등

❖ 센터 역할

- 유용돌연변이 자원개발 보급
- 산학연 네트워킹 프로그램
- 첨단 방사선육종 기술개발
- 산학연 연구개발 지원
- 전문인력 양성 민간육종가 교육

❖ 종자 삼각벨트 구축 (농식품부안)

- 기업 자원의 중심 역할 (기간연계 One-Stop 지원)
- 육종 보조 연구시설 지원
- 해피시밀 인증 지원
- 종자 전문인력 양성
- 농촌진흥청
 - 첨단 AGO 기술 지원
 - 재배 병리 기술 지원
 - 산학-연 공동연구
- 방사선육종연구센터
 - 다양한 육종소재 공급
 - 방사선 육종 품종개발
 - 방사선 활용 기술 지원

❖ 기대 효과

- 2020년 육종기술 수준 세계 5위, 개발 품종수 세계 8위권 진입, 경제적 효과 : 1.5조원/년

○ 기능성 물질 분석시스템 구축

- 첨단방사선연구소 방사선육종연구팀에는 기능성물질을 분리 동정하고 동물 및 세포 실험을 할 수 있는 중앙기기분석실 시설과 연구인력을 보유하고 있음.

□ 연구개발 목표 및 내용

- 고추 육종소재 발굴을 위한 돌연변이 집단 작성 및 유용 유전자원 pool 구축
 - 효율적인 방사선 돌연변이 유기를 위해 고추 방사선원 및 선량별 방사선 감수성 분석
 - 5,000계통 이상을 포함하는 대규모 돌연변이 집단(M1, M2) 육성 및 종자·DNA 확보
 - 계통별 형태·생리적 특성 검정을 통해 유전자원 pool 데이터베이스화
 - 고추 타겟 유전자 돌연변이체 선발을 위한 TILLING 체계 구축
 - 표현형·유전형 검정을 통한 유용 변이체(개화·착과 특성, 과실 형태) 선발 및 육종 소재화
- 기능성 품종 상업화를 위한 3·4 협동과제(보이젠베리, 석곡) 기능성(항산화물질) 검정 지원

- 제4협동과제에서 개발된 보이센베리 신품종의 항산화(C3G, 폴리페놀 등) 효능분석
- 가장 항산화 효능이 높은 보이센베리 계통에서 대표적 안토시아닌 및 플라보노이드 함유 여부 분석 후 항산화 유도 주요 성분 결정 및 정량 분석
- 제3협동과제에서 개발된 석곡 품종에서 항산화 성분 함유 여부 분석 및 대표적 항산화 성분에 대한 정량 분석
- 방사선 육종 산업 저변 확대를 위한 산·학·연 방사선조사 기술지원
 - 산·학·연 대상 총 150 건의 감마선 조사 지원

□ 최종 목표

- 정성적 목표
 - 고추 육종소재 발굴을 위한 돌연변이 집단 작성 및 유용 유전자원 pool 구축
 - 기능성 품종 상업화를 위한 협동과제(보이센베리, 석곡) 기능성(항산화물질) 검정 지원
 - 방사선 육종 산업 저변 확대를 위한 산·학·연 방사선조사 기술지원
- 정량적 목표
 - 논문 : SCI 2건, 비 SCI 2건, 학회발표 3건
 - 특허 : 1건
 - 방사선조사 기술지원 : 150건
 - 정책 건의 : 1건

나. (제1협동) 감마선 처리에 의한 고품질 들잔디 품종개발 (제주대학교)

□ 선행연구결과

- 본 연구팀은 잔디 연구에서 국내뿐만 아니라 전 세계적으로도 충분한 경쟁력을 갖추고 있으며, 들잔디 재분화 및 형질전환에서는 가장 선도 그룹이라 할 수 있음.
- 잔디연구 관련 기술특허와 품종특허 및 논문들을 다수 발표하였으며, 특히 돌연변이 육종에 대한 노하우와 특허 등을 보유하고 있어 방사선 돌연변이 기술을 이용한 본 연구를 충실하게 수행할 수 있을 것으로 사료됨.
- 또한 본 연구팀은 수년간 자체 개발한 제초제 저항성 들잔디의 환경위해성평가를 수행하였으며 현재 심사 중에 있으며 심사 완료시 국내 최초의 GM 품종이 될 수 있을 것으로 기대됨.

◆ 수분/수정시기 방사선 조사를 통한 돌연변이육종

- 본 연구팀은 수분/수정시기 방사선 조사를 통한 다양한 돌연변이 식물체를 개발하고 관련 특허등록 및 논문을 발표함(Breeding Science 등 논문 3건, 특허 5건).

◆ 환경스트레스 내성 잔디의 개발

- 본 연구팀은 다양한 환경스트레스 내성 잔디를 개발 특허등록 및 논문을 발표함.(Planta 등 논문 2건, 특허 2건, Transgenic zoysiagrass with reduced shade avoidance (2006). 미국 (7,045,680 B2) 등록)

◆ 효과적인 잡초방제를 위한 제초제저항성 들잔디의 개발

○ 생명공학 기술을 이용한 들잔디에 대한 연구는 형질전환이 어려운 이유로 세계적으로 많은 연구가 진행되어 있지 않다. 그러나 최근 본 연구진에 의해 개발된 형질전환 기술에 대한 특허가 (한국, 특허등록, 제0490281호; 일본, 특허등록, 제3659346호; 미국, 특허등록, 7,045,680 B2)등록되고 제초제 저항성 들잔디의 개발에 관한 논문 (Toyama et al. 2003)이 발표된 이후, 본 연구팀을 중심으로 들잔디를 이용한 형질전환 잔디 개발에 대한 연구가 활발하게 진행(논문 3건, 특허 5건)

◆ 제초제 저항성 형질전환 들잔디의(JG21) 환경위해성 평가

○ 본 연구팀은 2002년부터 개발된 제초제 저항성 들잔디의 포장에서의 특성을 평가/검증해 왔으며, 또한 상업적 재배 승인을 위한 다양한 환경위해성 평가 실험을 수행하여 그 결과를 환경위해성 평가실험 관련 전문 논문인 미국원예학회의 국제학술지 Journal of Environmental Quality 37 : 207-218 (2008)에 발표하였다. 이들 결과를 바탕으로 상업적 재배 승인을 위한 환경위해성 2015년 현재 평가심사 중임(논문 5건)

□ 연구개발 목표 및 내용

○ 본 연구는 국내에서 자생하는 난지형 잔디(들잔디, 금잔디 등)를 대상으로 방사선 돌연변이 처리에 의해 환경스트레스 저항성 및 왜성 등의 고품질 신품종 잔디를 개발하고, 최종적으로 산업화 시키는 것을 목표로 함.

○ 세부적으로는 1)우수 돌연변이 계통의 품종화와 2)들잔디의 NGS 분석 및 방사선 돌연변이체의 마커 개발을 수행하여 3) 최종적으로 감마선 처리에 의한 고품질 들잔디 품종 개발

○ 유용형질을 보유한 우량 변이 개체의 특성검정과 선발

- 유망 개체 선발 : 들잔디는 기존에 6지역(제주도와 전라남북도, 경상남북도, 충청북도의 섬 20지역, 산16지역, 총 500점이상)에서 수집한 잔디 중에서 ⁶⁰Co 감마선으로 유도된 왜성 및 환경스트레스 내성(녹기연장)의 가능성이 보이는 개체를 선발함.

- 왜성 형질의 특성검정 : 종자산업법에서 규정된 ‘잔디 특성조사요령’ 기준에 의해 기초형질에 대한 형태적 특성평가 수행 후 선발함.

- 녹기연장 형질의 특성검정: 국내에서 들잔디는 11월 이후에도 녹기 연장이 된다면 상업적으로 큰 가치가 있어, 약 10°C에서 0°C의 저온 등 환경스트레스 처리 후 저온에 내성이 있는 개체를 중심으로 선발함.

○ 들잔디 변이체 증식

- 확보된 들잔디 변이체는 각 개체별로 pot에 이식하여 온실에서 보존 및 증식함.

- 선발된 우수 개체는 증식을 위해 시험포에서 시험구당 면적 1m×1m으로 보존 및 증식함.

○ 들잔디 NGS 분석

- 들잔디 유전자 pool 분석: 변이체 마커의 개발을 위한 유전학적 분석의 기초 확립을 위해 들잔디 NGS 분석을 통해 DNA pool을 확보함.

- NGS 분석은 들잔디 수집종 중에서 변이체의 대조구로 사용되는 것으로 수행하며, 기존

보고가 없으므로 들잔디 genome 신규 분석을 수행하기 위해서 genomic DNA 추출 후에 NGS용 library를 작성하여 신규 genome de novo assembly, genome DNA resequencing 등으로 genome DNA sequencing으로 수행함.

○ 변이체 마커 개발: 들잔디 NGS 분석 결과를 바탕으로 변이체의 형질과 관련된 후보 유전자의 염기서열을 확보하고, 대조구와 변이체간의 염기서열 차이를 분석하여 변이체 마커개발을 위해서 후보 유전자 염기서열을 바탕으로 SNP 등과 같은 PCR-based 유전학적 분석을 수행함. 개발된 변이체 마커는 품종 출원 및 등록시 대조구와 변이체간의 판별하는 중요한 요소로 이용함.

○ 품종 출원 및 등록

- 왜성 및 녹기유지 등의 형질을 보이는 잔디 돌연변이체 계통은 품종 등록을 위해서 ‘품종등록 특성자료’ 준비 및 품종 출원을 수행함.

- 대조구와 변이체간의 마커를 이용하여 품종 출원 및 등록에 이용함.

□ 최종목표

○ 정성적 목표

- 국내에서 자생하는 난지형 잔디(들잔디, 금잔디 등)를 대상으로 방사선 돌연변이 처리에 의해 환경스트레스 저항성 및 왜성 등의 고품질 신품종 잔디를 개발하고, 최종적으로 산업화 시키는 것을 목표로 함.

○ 정량적 목표

- 논문: SCI 2건, 비SCI 2건, 학회발표 3건,

- 품종(특허): 1건

다. (제2협동) 벼 돌연변이 자원활용 신품종 개발 및 브랜드 제품 사업화 (시드피아)

□ 선행연구결과

◆ 유용 돌연변이 자원 선발

○ 유용 토종유전자원과 기존의 특수미 계통과의 교배조합 작성 및 돌연변이 유기

- 선발된 유용 유전자원의 농업특성 개량을 위한 돌연변이 처리(한국원자력연구원)

○ Waxyb 돌연변이 자원을 활용한, 복합 가공 우수 품종육성 및 단간형의 식미 특성이 개선된 벼 신품종 “진상”벼 개발

◆ 신규 유전자원 유용형질 고정을 위한 세대진전 및 계통선발

○ 선발자원의 교배후대 및 돌연변이체 특성평가, 계통선발

- 교배후대계통의 농업특성 평가 및 후대계통의 이화학적 특성 평가

◆ 신품종의 특허 방어를 위한 분자 마커 시스템 개발

○ 신품종의 DNA profiling

- 선행연구에서 연구진이 출원한 품종의 DNA profiling

- 유통되는 품종과 구분할 수 있는 마커 개발(3개의 마커로 기존 품종과 구분 가능)

◆ 신품종의 지역 적응성 시험 및 생산력 검정

○ 유색 및 유향 계통의 돼지찰벼 고세대 계통의 친환경재배 재배적성 평가 및 생산력 검정

○ 연차별 역적응성 시험

- 지역적응성 평가 및 친환경 재배적성평가 및 우량계통에 대한 시제품 제작

◆ 신제품의 브랜드 개발 및 사업화

○ “진상”벼 브랜드화

- “진상”벼의 농가 계약재배를 통한 대량생산 브랜드 상품화. 2015년 기준 3,000톤 이상 생산, 매출액 기준 약 80억원
- 가공업체, 농협 및 자치단체 연계를 통해 ‘당진 해나루 진상미’, (주)경성미가 ‘자채쌀 진상미’, ‘수라청 진상미’ 등 브랜드화

○ “진상”벼 홍보 및 사업 확대 성공사례

- 생산자 단체와의 원종포장 견학 및 품종별 시식평가회를 통한 대단위 재배
- 국내대형마트 통한 판매 및 고급형 소량 즉석 현미 상품의 백화점 판매 증
- 진상벼는 기존의 추청 품종을 대체, 약 6억9천만원의 농가소득 증대효과를 이룰 수 있어 지역농가 소득 증대 및 지역경제 활성화에 기여하고 있음

◆ 품종등록 2건, 품종출원 7건, 언론홍보, 상품화 등 다수의 선행 실적을 보유

□ 연구개발 목표 및 내용

◆ 벼 돌연변이자원 개발육성

○ 저아밀로스 계통의 돌연변이 처리

- 저아밀로스 계통의 적정 방사선 선량을 조사, M1 종자를 세대 진전 시켜 M2 종자에서 재현기를 이용하여 영을 제거후 변이체 선별함
- M2 현미의 배유 변이체를 입형특성에 따라 분류 한뒤 중간모본육성 재료 차세대 품종후보계통으로 이용함

◆ 벼 돌연변이 유기자원의 선발평가 및 분자마커를 이용한 유용자원 선발 평가

○ 유용변이자원 및 선발된 신형질 계통을 이용한 중간모본 육성

○ DNA마커 이용 돌연변이 형질 조기이전

- 최근 MutMap 기법을 이용 SNP index를 이용하여 마커 개발

○ 돌연변이체 특이 마커 효율적 선발 전략

- 원품종과 돌연변이 bulk의 SNP calling을 통해 공통적으로 발견되는 SNP 부위를 탐색, 후보 유전자를 정밀하게 추정

◆ 주요후보 품종의 지식재산권 확보를 위한 유전체 정보, DNA profiling

○ 품종의 지식재산권 확보를 위한 DNA profile

○ 특허 및 품종보호출원

◆ 미질/수량 농가실증 시험 및 대 농민 품종 반응 현장 시험

○ 돌연변이자원 활용 품종후보 고세대 계통 농가실증/시험

- 우수 후보 품종의 대하여 난괴법 3반복으로 기후환경이 다양한 다수 지역에서 농가실증 시험을 통해 재배우수성, 미질, 내재해성에 대하여 평가
- 다양한 환경에서 균일성 및 출수기, 간장, 수장, 포기당 이삭수 등의 기본농업형질을 대조 품종과 비교하여 종합적으로 재배안정성 및 균일성 확인
- 생산력시험을 통해 출수기 기본 농업형질이 분리 되는 계통을 제외
- 기본농업형질이 안정적으로 나타나는 계통을 선발

◆ 시장성 평가 및 유통업체와 연계 지역특산 브랜드 제품 사업화

- 생산, 가공, 판매 시스템 구축: 제품 사업화를 효과적으로 달성하기 위해 추진 단위를 4단 위로 나누어 사업화 추진

- 지역특산 브랜드 쌀 사업화
 - 시식평가 및 소비자 선호도 평가를 통하여 사업화 및 수출화 가능성 파악
 - 시제품을 이용하여 시장 반응 조사를 하고, 기존 협력 관계에 있는 판매·가공 업체에 사업화 타당성 조사함.
 - 사업화 희망 지역 판매·가공업체를 대상으로 기술이전을 통한 사업화를 실시함

□ 최종 목표

- 정성적 목표
 - 벼 육성계통 및 저아밀로스 고세대 계통에 대하여 방사선 처리
 - 종실 돌연변이체를 선발 및 유용형질을 분석 평가에 중간모본용 계통 육성
 - 기존 선발된 신행질 계통 중에 최종 선발 유망계통의 품종 출원 등록
 - 농가실증 시험을 수행하는 한편 품종의 지식재산권 확보를 위한 DNA profiling
 - 생산 가공 판매 시스템 구축을 통한 신품종 종자 산업화
 - 해외시장 수요조사에 의해 중국 등 쌀 가공식품 수출 가능성 추진
- 정량적 목표
 - 논문 : 비 SCI 1건, 학회발표 2건
 - 품종(특허) : 3건
 - 기술이전/자체사업화 : 2건

라. (제3협동) 방사선을 이용한 석곡 및 심비디움 난 개발 및 변이 품종 상품화 (바보난농원)

□ 선행연구결과

- 방사선 돌연변이 난 신품종 육종 7품종 육성
 - 로얄골드(출원2009-262), 로얄프레젠티(출원2009-263), 상작(출원2010-372), 대관(출원2010-373), 황용금(출원2012-599), 로얄드림(출원2013-101), 상금(출원2013-102)
- 방사선 돌연변이 난 신품종 농가보급 및 상품 생산 판매

□ 연구개발 목표 및 내용

- 돌연변이 기술을 이용한 관상성이 높은 엽예품 및 기능성 석곡 난 품종 개발
 - 기능성 석곡 유전자원 수집 및 변이 계통 양성
 - 석곡 변이 육종을 위한 방사선 처리 조건 확립 (감마선 및 양성자 빔 처리)
 - 우주선 탑재 석곡 유망 변이계통의 양성 및 품종화
 - 난 유망 변이계통의 기능성 검정(주관과제) 및 분자마커(5협동) 분석용 시료 제공
 - 선발된 돌연변이 난의 조직배양 및 증식기술 개발
 - 돌연변이 유망계통 선발 및 품종보호권 출원
 - 돌연변이 난품종을 이용한 교배육종
- 돌연변이 심비디움 난 신품종 및 유망계통의 국내외 상품 수출화
 - 심비디움 돌연변이 난의 관리 및 대량증식 기술개발
 - 잎무늬 돌연변이 난의 해외 시장 반응 조사
 - 돌연변이 난 품종의 시범수출 및 농가보급
 - 돌연변이 난 품종의 국내 상품화 및 수출화

□ 최종 목표

- 정성적 목표
 - 관상용 잎변이 및 기능성 석곡 난 품종개발
 - 돌연변이 난 신품종 및 유망 계통의 수출 상품화
- 정량적 목표
 - 논문 : 학회발표 2건
 - 품종(특허) : 3건
 - 기술이전(자체사업화) : 2건

마. (제4협동) 보이젠베리 및 블랙베리 돌연변이 신품종 개발 및 산업화 (바이오플러스)

□ 선행연구결과

- 보이젠베리의 선행 연구를 통한 돌연변이 우수 계통 확보
- 방사선 돌연변이를 이용한 블랙베리(*Rubus fruticosus*) 신품종 ‘메이플’ 개발
 - 가시가 없고, 부분자보다 과실크기 및 수량이 3~5배 높으며, C3G함량이 오디, 블루베리보다 높아 기능성 가공식품용으로 유망
 - 기존 블랙베리 품종(V3) 보다 당도가 높고 수량성이 높음
- 블랙베리 신품종 ‘메이플’ 농가보급에 의한 특산산업화 지원
 - 정읍시 특산산업화를 위한 대단위 재배단지 조성(정읍시농업기술센터)을 위한 묘목 보급 (‘12년 8천주, ‘13년 5만주, ‘14년 5만주, 총 12ha 재배단지 조성 완료)
 - 블랙베리 대량증식 기술 개발 및 신품종 육종 (정읍시 지원 과제 수행, ‘12~‘13년)
 - 블랙베리 재배농가 재배기술 컨설팅 실시 등

□ 연구개발 목표 및 내용

- 보이젠베리의 방사선 돌연변이 육종을 통한 우수 계통 선발과 특성검정, 생산력 검정 및 대량생산체계 확립
 - 2012년부터 수행한 선행연구결과에 의해 현재 확보된 5계통의 검증
 - 우수 유망품종 5계통 선발 재배법확립, 최종 2계통 선발
 - 최종 유망품종 2계통 선발 후 조직배양을 통한 대량생산, 최적 순화법 보급체계구축
 - 품종보호권 출원
- 기능성 및 생산력이 우수한 방사선 돌연변이 블랙베리의 건강보조식품 개발과 해외 수출
 - 선행연구로 개발된 신품종 블랙베리의 유망계통 선발
 - 대량증식체계, 재배법 개발 및 실용화확립
 - 중국내 시장조사, 현지 적응 시험포 및 실증포 조성 및 운영
 - 중국내 묘목의 대량증식, 보급 및 건강보조식품 개발

□ 최종 목표

- 정성적 목표
 - 보이젠베리 품종화 및 대량생산체계 확립

- 블랙베리 돌연변이 품종 수출 상품화
- 정량적 목표
 - 논문 : 비 SCI 1건, 학회발표 2건
 - 품종(특허) : 3건
 - 기술이전(자체사업화) : 1건

바. (제5협동) 체세포 변이 원예작물 신품종의 특이 분자마커 개발 (전남대학교)

선행연구결과

- 본 연구책임자는 감마선유래 블랙베리 (*Rubus fruticosus* L.) 돌연변이 선발 계통들에 대해 inter-simple sequence repeats (ISSRs) 및 AFLP 분자표지 마커를 이용하여 유전적 다양성 및 변이 조사 실시
- 본 연구책임자는 농업적으로 중요한 종실 지방산 함량관련 유전자, biotic stress 및 abiotic stress 관련 QTL 탐색 및 그에 밀접하게 연관된 SSR/SNP 분자표지마커 탐색 후 High-throughput screening 분석방법 개발

연구개발 목표 및 내용

- 돌연변이 신품종 석곡 난 특이 분자마커 개발
 - 바보난농원에서 육성된 석곡 돌연변이 집단 및 유전자원 확보
 - 확보된 돌연변이 집단 및 유전자원을 대상으로 SSR 분자마커 fingerprinting 실시
 - DNA fingerprinting 기반 돌연변이 특이 분자마커 개발
- 돌연변이 신품종 보인센베리 특이 분자마커 개발
 - 바이오플러스에서 육성된 보인센베리 돌연변이 집단 및 유전자원 확보
 - 보인센베리 유전체 적용 가능한 SSR 분자마커 개발 및 활용성 검토
 - 돌연변이 집단 및 유전자원 대상으로 SSR 분자마커 fingerprinting 실시
 - DNA fingerprinting 기반 돌연변이 특이 분자마커 개발

최종 목표

- 정성적 목표
 - 돌연변이 신품종 보인센베리 특이 분자마커 개발
 - 돌연변이 신품종 석곡 특이 분자마커 개발
- 정량적 목표
 - 논문 : SCI 2건, 비 SCI 2건, 학회발표 2건

2. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

연차별	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도 (2015)	<ul style="list-style-type: none"> • 돌연변이 유전자원 pool 개발 및 기능성 검정을 위한 기반 확보 • 산학연 방사선육종 기술 지원 체계 구축 	<ul style="list-style-type: none"> • 고추의 방사선육종을 위한 적정 감마선량 결정 및 M1 집단 육성 • 보이젠베리 유망 계통별 항산화 효능 분석 • 방사선조사지원 40건 및 방사선육종 기술 자문 실시 등
	<ul style="list-style-type: none"> • 왜성 및 녹기유지 등의 가능성을 보이는 잔디 돌연변이체의 형질 특성검정과 선발 • 잔디 돌연변이체의 증식을 위한 시험포 운영 	<ul style="list-style-type: none"> • 기존에 6지역(제주도와 전라남북도, 경상남북도, 충청북도의 섬 20지역, 산16지역)에서 수집한 잔디 중에서 60Co 감마선으로 유도된 왜성 및 녹기유지 가능성이 보이는 잔디를 1차 선별하여 특성검정 수행 <ul style="list-style-type: none"> - 왜성 계통: 종자산업법에서 규정된 '잔디 특성조사요령' 기준에 의해 기초형질에 대한 형태적 특성평가 수행 후 선발 - 녹기연장 계통: 저온과 건조 등의 환경스트레스 처리 후 선발 • 확보된 잔디 영양체는 pot에 이식하여 제주대학교 내 온실에서 보존 및 증식 • 선발된 우수라인은 제주대학교 내 포장에 이식하여 보존 (시험구당 면적 1m×1m)
	<ul style="list-style-type: none"> • 벼 돌연변이자원 육성 및 신형질 계통 개발 • 변이활용 품종후보 고세대 계통 농가실증/시험 • 지역 특산 브랜드 쌀 제품 사업화 	<ul style="list-style-type: none"> • 저아밀로스미 계통 방사선(이온빔)조사, 창성 • 변이자원 평가 및 신형질 자원 탐색 • 유용 변이자원 활용 인공교배 • DNA마커 이용 돌연변이 형질 조기이전 • 변이활용 고세대 계통 미질분석 • 대 농민 품종 반응 현장 시험 • 주요후보 품종의 지식재산권 확보를 위한 DNA profiling 구축 • 시식평가 및 소비자 선호도 평가
	<ul style="list-style-type: none"> • 돌연변이 기술을 이용한 관상성이 높은 엽예품 및 기능성 석곡 난 품종 개발 • 돌연변이 심비디움 난 신품종 및 유망계통의 국내외 상품 수출화 	<ul style="list-style-type: none"> • 기능성 석곡 유전자원 수집 및 변이 계통 양성 • 석곡 변이 육종을 위한 방사선 처리 조건 확립 (감마선 및 양성자 빔 처리) • 돌연변이 난의 조직배양 및 증식 • 우주선 탑재 석곡 유망 변이계통의 양성 • 심비디움 돌연변이 난의 관리 및 대량증식 기술개발 • 잎무늬 돌연변이 난의 순화 및 재배
	<ul style="list-style-type: none"> • 보이젠베리 품종의 식생조사 및 조직배양체계 개발 • 블랙베리 건강보조식품 개발 및 중국 실증포 조성 	<ul style="list-style-type: none"> • 2012년부터 수행한 선행 연구결과로 확보된 가지 없는 보이젠베리 계통의 식생 조사 • 보이젠베리의 돌연변이체 유망 계통 조사 • 선발된 유망품종 조직배양체계 개발 • 블랙베리를 이용한 건강보조식품 개발 • 블랙베리의 묘목 대량증식 • 해외 수출을 위한 중국내 실증포 조성
	<ul style="list-style-type: none"> • 보이젠베리 및 석곡 유전체 적용 가능 SSR분자표지 마커 탐지 	<ul style="list-style-type: none"> • 바보난농원에서 육성된 석곡 돌연변이 집단 및 유전자원 확보 • 바이오플러스에서 육성된 보이젠베리 돌연변이 집단 및 유전자원 확보 • 표준/비교유전체, 전사체 등의 염기 정보를 이용해 개발된 분자표지마커에 기초한 신규 분자마커 탐색 및 개발
	<ul style="list-style-type: none"> • 돌연변이 유전자원 pool 작성 및 유망계통 기능성 성분 정성·정량 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 고추 대규모 M2 집단(5,000계통) 육성 및 특성검정 • 보이젠베리 항산화 기능성 품종의 항산화 물질 동정 및 정량화
2차년도 (2016)		

	<ul style="list-style-type: none"> • 산학연 방사선육종 기술 지원 체계 구축 • 잔디 돌연변이체 분석을 위한 한국잔디의 유전자 pool 조사 • 잔디 돌연변이체의 유전학적 분석 • 한국잔디 돌연변이 유망계통의 선발과 증식 	<ul style="list-style-type: none"> • 방사선조사지원 50건 및 돌연변이육종 협의체 운영 지원 등 • 잔디 돌연변이체의 유전학적 분석의 기초 확립을 위한 한국 잔디의 NGS (Next Generation Sequencing) 분석 • 한국잔디의 NGS 분석관련 자료를 바탕으로 돌연변이체 계통의 PCR-based marker 분석 • 왜성 및 녹기유지 등의 특성을 보이는 잔디 돌연변이체 계통 선발과 증식 계속
	<ul style="list-style-type: none"> • 벼 돌연변이자원 활용중간모본육성 및 유용계통 개발 • 변이활용 품종후보 고세대 계통 농가실증/시험 • 지역특산브랜드 쌀 제품 사업화 	<ul style="list-style-type: none"> • 변이자원 평가 및 신행질 자원 선발 • 유용 변이자원 활용 인공교배 및 유용계통 선발 • DNA마커 이용 돌연변이 형질 조기이전 • 유용 돌연변이 관련 유전자 분석 • 미질분석 • 수량성 등 농가실증 시험 • 주요후보 품종의 지식재산권 확보를 위한 DNA profiling • 시장 반응조사 • 생산, 가공, 판매 시스템 구축
	<ul style="list-style-type: none"> • 돌연변이 기술을 이용한 관상성이 높은 엽예품 및 기능성 석곡 난 품종 개발 • 돌연변이 심비디움 난 신품종 및 유망계통의 국내외 상품 수출화 	<ul style="list-style-type: none"> • 난 돌연변이 계통 선발 • 선발된 계통의 생육특성 및 성분분석) • 선발된 돌연변이 난의 조직배양 및 증식 • 돌연변이 난 품종의 시범 수출 <ul style="list-style-type: none"> - 현지 업체와의 재배 컨설팅 • 돌연변이 난 품종의 농가보급 및 재배 관리 컨설팅
	<ul style="list-style-type: none"> • 보이젠베리 신품종 유망 계통의 선발, 특성 검정 및 대량증식체계 확보 • 블랙베리 건강보조식품 및 묘목 판매 	<ul style="list-style-type: none"> • 우수 유망 품종 2계통 선발 • 내병성, 다수확, 고품질을 위한 유망 계통선발 • 조직배양을 통한 대량증식체계 및 재배법 확립 • 블랙베리를 이용한 건강보조식품 판매 • 건강보조식품의 기호도 조사 및 홍보 • 블랙베리의 묘목 증식 및 중국 판매 추진
	<ul style="list-style-type: none"> • 보이젠베리 및 석곡 돌연변이 계통 및 유전자원 대상 DNA fingerprinting 	<ul style="list-style-type: none"> • 석곡 돌연변이 집단 및 유전자원 대상 DNA fingerprinting 실시 • 석곡 돌연변이 집단 및 유전자원간의 유전적 유연관계 분석 • 보이젠베리 돌연변이 집단 및 유전자원 대상 DNA fingerprinting 실시 • 보이젠베리 돌연변이 집단 및 유전자원간의 유전적 유연관계 분석
3차년도 (2017)	<ul style="list-style-type: none"> • 유용 돌연변이자원 확보 및 기능성 분석을 통한 유망 계통 산업화 추진 	<ul style="list-style-type: none"> • 고추 유망특성 보유 돌연변이자원 확보 및 후대 검정을 통한 육종 소재화 • 석곡 유망 품종의 항산화 효능 분석 및 항산화 성분 동정 • 방사선조사지원 60건 및 돌연변이육종 교육과정 운영
	<ul style="list-style-type: none"> • 우수 잔디 돌연변이체 선발계통의 품종 등록 	<ul style="list-style-type: none"> • 왜성 및 녹기유지의 형질을 보이는 잔디 돌연변이체 계통의 품종등록 준비 - '품종등록 특성자료' 준비 및 품종 출원
	<ul style="list-style-type: none"> • 벼 돌연변이자원 활용중간모본육성 및 	<ul style="list-style-type: none"> • 유용계통 방사선 조사

<ul style="list-style-type: none"> 유용계통 개발 • 변이활용 차세대 품종후보 고세대 계통 시험 • 지역특산 브랜드 쌀 제품 사업화 	<ul style="list-style-type: none"> • 유용 변이자원 평가 및 신행질 자원 선발 • 인공교배 및 유용계통 선발 • 미질분석, 수량성 등 시험 • 대 농민 품종 반응 현장 시험 • 차세대 후보 품종의 지식재산권 확보를 위한 DNA profiling 실용화 • 시장 반응조사 및 브랜드 개발 • 생산, 가공, 판매 시스템 활용 • 유통업체 연계 브랜드 제품 사업화
<ul style="list-style-type: none"> • 돌연변이 기술을 이용한 관상성이 높은 엽예품 및 기능성 석곡 난 품종 개발 • 돌연변이 심비디움 난 신품종 및 유망계통의 국내외 상품 수출화 	<ul style="list-style-type: none"> • 난 돌연변이 유망계통 선발 및 품종보호권 출원 • 돌연변이 난품종을 이용한 교배육종 • 선발된 돌연변이 난의 조직배양 및 증식 • 돌연변이 난 품종의 국내 상품화 및 수출화
<ul style="list-style-type: none"> • 보이젠베리 품종 실용화 및 대량생산 체계 확립 • 블랙베리의 실용화 	<ul style="list-style-type: none"> • 묘목의 대량 증식, 순화 및 재배법 확립 • 순화묘 1000주 이상 • 품종보호권 확보 • 건강보조식품 판매(5000천 Box) • 신품종 묘목 판매 (1만주)
<ul style="list-style-type: none"> • 보이젠베리 및 석곡 신규 돌연변이 특이 분자표지마커 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • 석곡 신규 돌연변이 특이 SSR 분자표지마커 개발 • 보인센베리 신규 돌연변이 특이 SSR 분자표지마커 개발

제2장. 연구수행 내용 및 결과

제1절. 세부·협동과제별 연구수행 내용 및 결과

1. (1세부) 고추 유용돌연변이 자원 창출 및 방사선육종 기술지원 (원자력연/강시용)

가. 연구목적 및 배경

□ 연구목적

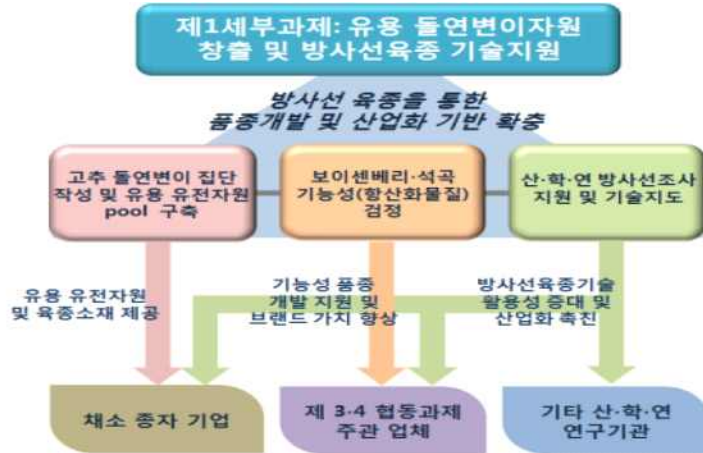
- 제1세부과제에서는 고추 육종소재 발굴을 위한 돌연변이 집단 작성 및 유전분석 체계화를 통해 고추 방사선 돌연변이 육종 기반을 구축하고 유용 유전자원을 발굴한다. 또한 3, 4 협동과제에서 개발하는 기능성 품종(보이젠베리, 석곡)의 상업화를 위해 기능성(항산화물질) 검정을 지원한다. 마지막으로 산·학·연 방사선조사 기술지원을 통해 방사선 육종 산업 저변 확대를 도모한다.

□ 연구배경

- 고추 방사선 돌연변이 육종 기반 구축: 고추는 생산량 기준 세계 7위, 판매액 기준 국내 1~2위에 해당하는 주요 채소작물이며 2014년 전체 열매서열이 해독되는 등 우리나라를 중심으로 기능 유전체학 연구가 진행되고 있다. 하지만 형질전환이 불가능하다는 점, 같은 가지과 작물인 토마토에 비해 유전체가 크고 경제적 중요성이 떨어진다는 점 등으로 인해 기능 유전체학 및 육종 연구를 위한 소재 개발이 더디게 진행되어 온 측면이 있다. 특히 방사선 돌연변이 육종에 의한 유전자원 개발은 1970~80년대 이후 거의 보고되지 않았다. 따라서 본 과제에서는 유전체학과 접목될 수 있는 고추 방사선 돌연변이 육종 기반을 구축하고자 하였다.
- 기능성 물질 분석을 통한 개발 품종 가치 향상: 3 협동과제에서 품종 개발을 추진하는 석곡의 경우 약리 효능이 있어 지상부 전체를 한약재로 이용하고 있으며, 4 협동과제에서 육종 연구를 진행하는 보이젠베리의 경우 신경세포보호효과, 간 보호작용 및 항당뇨 등에 좋은 효과를 가진다고 알려져 미국, 유럽 및 일본에서 소비가 급격히 증가되고 있다. 따라서 석곡 및 보이젠베리에서의 항산화물질 등 기능성성분에 대한 정량적, 정성적 분석은 품종의 우수성에 대한 객관적 지표를 제시하여 품종의 가치를 향상시키는 데 기여할 수 있다.
- 산·학·연 방사선조사 기술지원: 방사선육종연구센터는 정책적으로 완주 농촌진흥청, 김제 민간육종연구단지와 함께 종자산업 삼각벨트를 이루며 방사선 돌연변이 유기를 통한 유전자원 개발을 지원하는 임무를 지니고 있다. 특히 영양변식작물을 다루는 민간육종가에게 방사선을 통한 변이 유기는 신품종 개발을 위한 매우 효과적인 접근방법이 될 수 있다. 따라서 대외 방사선조사 기술지원은 방사선 돌연변이 육종으로의 접근이 어려웠던 민간육종가에게 많은 기회를 제공하여 변이 창성을 통한 신품종 개발에 기여할 수 있다.

나. 연구개발 추진 방법 및 추진 체계

- 고추 육종소재 발굴을 위한 돌연변이 집단 작성 및 유용 유전자원 pool 구축
 - 국내 재래종으로서 매우 빠른 숙기를 지니고 있으면서도 과향이 우수한 유월초(*Capsicum annuum*), 월등한 매운 맛을 바탕으로 중남미에 광범위한 시장을 형성하고 있으며 국내 민간종자회사에서의 활용도가 증가하고 있는 하바네로(*Capsicum chinense*) 등 2개 품종을 대상으로 연구 진행 및 돌연변이 집단 작성
 - 효과적인 돌연변이 유기를 위해 감마선, 양성자빔을 선량별로 처리하고 발아율, 생장률 분석을 통해 방사선 감수성을 확인하여 기존 이론을 배경으로 이상적 조사선량 결정
 - 두 개 고추 품종에 대해 각각 3,000계통 이상의 M₁ 집단을 육성하고 single seed decendant 방식으로 M₂ 집단 전개(총 5,000계통 이상)
 - M₂ 계통 표현형 조사(초세, 개화, 착과, 과실 형태 관련 특성) 및 데이터베이스화
 - M₂ 각 계통의 DNA 추출 후 TILLING 체계 확립: fragment analyzer를 활용한 TILLING 체계 확립 후 과실성숙 관련 유전자에 대한 돌연변이 계통 선별
 - 분자마커 적용 및 표현형 검정을 통해 음성불임 계통 선발
- 기능성 품종 상업화를 위한 협동과제(보이젠베리, 석곡) 기능성(항산화물질) 검정 지원
 - 제3·4협동과제 개발 품종의 가치 향상 및 상업화를 위한 기능성 분석 지원
 - 제4협동과제에서 보이젠베리 신품종에 대해 우선적으로 기능성 분석을 추진하며 이후 제3세부과제 석곡 신품종에 대해 지원
 - 보이젠베리 및 석곡에서 신규 개발 우수 계통(5계통 이상)에 대해 항산화 효능에 대한 assay를 수행, 가장 항산화 효능이 우수한 계통 선발
 - 항산화 효능 우수 계통에서 대표적 항산화성분(C3G, polyphenol, anthocyanin 외 다양한 flavonoid 류) 분석을 통해 항산화 효능 유도 성분 결정 후 원품종 및 기타 작물과의 함량 비교 수행
- 방사선 육종 산업 저변 확대를 위한 산·학·연 방사선조사 기술지원
 - 산·학·연 대상 총 150건의 감마선 조사 지원(1차년도 40건, 2차년도 50건, 3차년도 60건)
 - 협동과제별 방사선 조사 의뢰 육종가 대상 방사선 육종 기술 자문 및 현구협의체 운영 지원 등



다. 연구 추진 일정

구분 (연차)	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> 고추의 방사선육종을 위한 적정 감마선량 결정 및 M₁ 집단 육성(6,000 계통) 	<ul style="list-style-type: none"> 유월초 종자를 대상으로 감마선·탄소중이온빔·양성자빔 등 3가지 선원에 대한 선량별 생존율, 초장을 측정하고 이를 토대로 LD50, RD50, 방사선육종을 위한 적정 선량을 결정함. 유월초 종자에 감마선 100 Gy 또는 탄소중이온빔 20 Gy를 조사하여 대규모 M₁ 집단을 작성하고 세대를 진전하여 얻은 M₂ 집단 계통에 대한 표현형 조사 및 DNA 추출을 진행함. 유전자형 기반 돌연변이 유전자원 선발 체계의 핵심기술인 TILLING을 모세관 전기영동 시스템을 기반으로 확립하려는 목적으로 최적 실험조건 결정을 위한 기초 실험을 수행함. 또한 종자회사 자문 및 문헌조사를 통해 TILLING 타겟 유전자를 결정하고 고추에서의 해당 유전자 서열을 확보함. 	<ul style="list-style-type: none"> 유월초에 감마선·탄소중이온빔·양성자빔을 각각 처리 시 각 선원별 LD50 값은 140, 35, 330 Gy, RD50 값은 80, 32, 330 Gy, 방사선육종을 위한 적정 선량은 80-100, 25, 180-240 Gy로 확인되었음. 총 2,084 계통의 유월초 M₂ 집단(감마선조사 1,930 계통, 탄소이온빔 조사 154 계통)을 육성하여 돌연변이 표현형을 데이터베이스화 하였으며 이를 바탕으로 선원별 돌연변이 유기 효율을 확인하고 돌연변이 유전자원(총 45가지 돌연변이 특성)을 확보하였음. 총 3,000 계통의 유월초 M₁ 집단을 추가 작성하였음. 모세관 전기영동 기반 TILLING 관련 가수분해 효소 종류 및 농도, DNA pooling depth, heteroduplex 형성 등에 대한 조건을 확립하였으며 TILLING 타겟용 유전자 10개에 대해 서열을 확보하였음.
	<ul style="list-style-type: none"> 보이젠베리 유망 계통별 항산화 효능 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 제3협동과제에서 개발한 보이젠베리와 블랙베리 간 교배 계통과 기존 블랙베리 개발 품종 간 안토시아닌 구성 성분 차이를 LC-MS를 이용해 분석함. 제3협동과제에서 개발한 기존 블랙베리 5품종(V-3, V-9, 메이플, B201, MNU32)을 대상으로 수확시기별 안토시아닌, 미네랄, 폴리페놀, 플라보노이드, 에르가산, 지방산 함량 및 당도, pH 분석을 수행함. 	<ul style="list-style-type: none"> 보이젠베리-블랙베리 교배종에서는 cyanidin-3-O-sophoroside (M+ m/z 611)와 기존 블랙베리 품종의 주요 안토시아닌 cyanidin -3-O-glucoside (M+ m/z 449)가 거의 5.5:4.5 비율로 함유되어 있음을 구명함. 블랙베리 안토시아닌은 완숙과(검은색)에서 크게 증가하며, 에르가산은 미숙과(적색)에서 가장 높고, 완숙과에서 감소하는 경향을 확인함. 블랙베리 품종 중 기존 개발 품종인 메이플과 신규 개발 품종인 B201 (흑정)이 다른 품종에 비해 안토시아닌, 폴리페놀, 플라보노이드 등 기능성 성분 함량 및 항산화 활성이 유의미하게 높음을 확인함.
	<ul style="list-style-type: none"> 방사선조사지원 40건 및 돌연변이육종 교육과정 운영 	<ul style="list-style-type: none"> 국공립 육종 연구 기관 및 민간 종묘업체 육종연구가를 대상으로 시료 준비, 적정 조사 선량 결정, 예비실험 및 돌연변이 집단 육성 과정 등에 대해 	<ul style="list-style-type: none"> 방사선육종 기술자문 및 조사지원 41건 (당월 조사 예정 5건 포함) 총 20명이 참가한 교육과정을 2015년 8월 24~28일 동안 첨단방사선연구소 방사선육종연구센터에서

		<p>자문하고 방사선 조사를 지원함.</p> <ul style="list-style-type: none"> 국공립 육종 연구 기관 및 민간 중요 업체 육종연구가를 대상으로 돌연변이 육종 이론 및 실습 교육, 시설 견학 등을 포함하는 5일 과정의 돌연변이 육종기술 교육 과정을 운영함. 	<p>운영하였음.</p>
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> 고추 대규모 M₂ 집단 (총 5,000 계통) 육성, 특성 검정 및 TILLING 체계 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 고추 유월초 및 하바네로 대규모 M₂ 집단 육성 모세관 전기영동 기반 TILLING 분석 체계 세부 조건 확립 및 M₂ 집단 대상 적용을 통한 돌연변이체 발굴 	<ul style="list-style-type: none"> 고추 재래종인 유월초(<i>C.annuum</i>) M₂ 집단 종자 추가 확보(감마선 100, 110 Gy 조사 유래 총 2,396 계통) 및 육성 진행(전년도 육성 2,084 계통 포함하여 총 4,490 계통의 M₂ 확보) 고추 도입종인 하바네로(<i>C.chinense</i>) 종자 증식 및 M₁ 돌연변이 집단 1,666 개체 육성 진행(65, 70, 80 Gy 조사 유래) Fragment analyzer 기반 TILLING 분석 체계 최적화를 위한 세부 분석 조건(Heteroduplex 형성 조건, DNA 증폭산물 농도, 효소 양, 증폭산물 길이, pooling depth) 최종 확립 유월초 돌연변이 집단(총 2,615 개체)을 대상으로 TILLING 분석을 수행하여 과색 관련 유전자(CCS) 변이체 확보
	<ul style="list-style-type: none"> 보이센베리 유망 계통별 항산화 효능 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 제4협동과제에서 개발한 방사선조사유래 보이센베리 계통과 원품종간 과실 품질(당도, 산도, pH) 및 기능성 성분(안토시아닌, 에르가산, 지방산, 미네랄) 함량 차이를 분석 보이센베리 분석 결과를 토대로 기능성 성분 고품종 우수 계통 선발 3협동과제 개발 석곡계통에 대한 기능성 분석 추진 	<ul style="list-style-type: none"> 제4협동과제에서 육성한 11 계통을 대상으로 실시 과실품질로 원품종과 돌연변이 계통간에 당도가 향상된 1계통(BSA-119) 선발 미네랄 분석결과 주요 칼륨 함량이 증대된 1계통(BSB-127) 선발 지방산분석결과 모든 계통에서 불포화지방산이 90% 이상으로 우수함 에르가산은 BSB-127계통이 타 계통에 비해 우수함 안토시아닌 분석결과 4개 계통(BSA-036, BSA-078, BSA-101, BSB-127)에서 원품종에 비해 안토시아닌이 증가함. 기능성 성분 결과 BSB-127 계통이 미네랄, 에르가산, 안토시아닌이 모두 우수한 계통으로 선발됨. 3협동과제 개발 주요 석곡 품종에 대한 기능성 성분을 분석하여 주요 물질이 polysaccharide류 물질임을 확인함.
	<ul style="list-style-type: none"> 방사선조사지원 50건 및 돌연변이육종 협의체 운영 지원 	<ul style="list-style-type: none"> 민간 돌연변이 육종 협의체인 방사선육종 생산자연협회 대상 방사선육종기술 자문 및 감마선 조사 지원 민간 육종가 및 국공립 연구기관 연구원 대상 감마선 조사 지원 	<ul style="list-style-type: none"> 방사선육종생산자연협회 대상 기술자문 및 감마선 조사 지원 4회 수행 민간 육종가 및 국공립 연구기관 연구원 대상 감마선 조사 지원 총 74건 수행
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> 하바네로 M₂ 집단 육성 및미토콘드리아 DNA 돌연변이체 선별 체계 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 고추 하바네로 M₂ 집단 육성 및 표현형 검정 미토콘드리아 DNA 돌연변이체 선별을 위한 분자마커 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 고추 도입종인 하바네로(<i>C.chinense</i>) M₂ 돌연변이 집단 1,585 계통 육성 진행(60, 65, 70, 80, 90 Gy 조사 유래) 하바네로 조숙 및 응성불임 계통 선발 미토콘드리아 구조 변이 분석을 위한 분자마커 20개 개발 및 고추 유전자원 96개 대상 분석 미토콘드리아 구조 변이 분석을 효율적으로 수행할 수 있는 multiplex-PCR 기반 분자표지 체계 구축
	<ul style="list-style-type: none"> 석곡 유망 계통의 기능성 성분 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 제 4협동과제에서 개발한 석곡 돌연변이 계통과 국내 시판되는 수입 한약재 대상으로 열수와 에탄올 추출물의 총페놀, 총플라보노이드 함량을 분석함 석곡 돌연변이 계통간 유효성분의 조 	<ul style="list-style-type: none"> 석곡 돌연변이 7계통과 수입한약재 2종의 총페놀 및 총플라보노이드 함량은 모두 환초 석곡 계통이 다른 계통과 수입한약재와 비교하여 높은 함량을 나타냄. 추출용매에 따른 성분 함량은 열수추출이 에탄올

		성 차이를 구명하기 위해 LC-MS분석 실시	추출과 비교하여 모든 계통에서 높은 기능성 성분 함량을 보임 • 석곡 돌연변이 계통간 LC-MS 분석 결과, 총 28개 성분이 검출되었고, 서로 다른 종간에 성분함량 조성의 차이가 크게 나타났고, 같은 종내 계통간의 변이는 거의 없음.
	• 방사선조사지원 60건 및 돌연변이육종 협의체 운영 지원	• 민간 돌연변이 육종 협의체인 방사선육종 생산자연협회 대상 방사선육종 기술 자문 및 감마선 조사 지원 • 민간 육종가 및 국공립 연구기관 연구원 대상 감마선 조사 지원	• 방사선육종생산자연협회 대상 기술자문 및 감마선 조사 지원 4회 수행 • 민간 육종가 및 국공립 연구기관 연구원 대상 감마선 조사 지원 총 61건 수행

라. 연구개발 내용 및 결과

(1) 고추 육종소재 발굴을 위한 돌연변이 집단 작성 및 유용 유전자원 pool 구축

(가) 고추 대규모 방사선 돌연변이 집단 구축 및 유전자원 선별

○ 고추 방사선 감수성 조사 및 적정 선량 결정

- 본 연구에서는 두 가지 고추 품종에 대한 돌연변이 집단을 작성하고 이를 활용하여 표현형 분석, 유용 유전자원 선별, TILLING 체계 구축 등을 진행하고자 하였다. 국내 재래종으로 숙기가 빠르고 좁은 공간에서도 재배가 가능하면서도 우수한 과실 맛과 신미를 가지고 있는 유월초(*C.annuum* L.; 그림 1a)에 대해서는 유전자원 라이브러리 구축 및 TILLING을 위한 대규모 집단을 작성하고자 하였다. 멕시코 유래 품종으로 매우 강한 신미를 가지면서 전 세계적으로 널리 이용되어 상업적 가치가 높은 하바네로에 대해서는 조숙성, 응성불임성 등 육종적으로 유용한 특성을 지니고 있는 계통을 선별하는 등 유전자원 육성 목적으로 집단을 작성하고자 하였다(*C.chinense* L; 그림 1-1b).

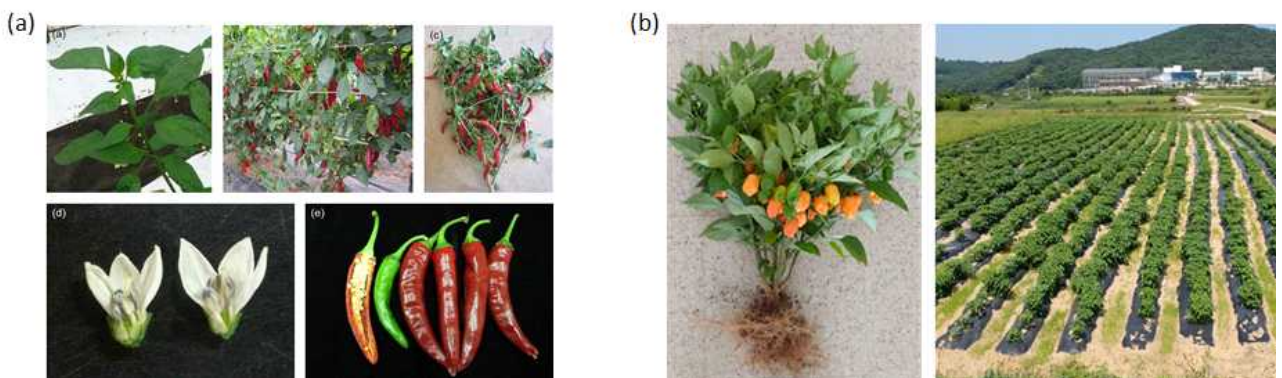


그림 1-1. 돌연변이 집단 육성에 활용된 원품종들. (a) 한국재래종 유월초 (b) 멕시코 도입종 하바네로

- 효율적인 방사선돌연변이 유기를 위한 선원별 적정 선량을 결정하기 위하여 우선적으로 기본 돌연변이 집단 작성 대상 고추 품종인 유월초의 방사선원·선량별 방사선 감수성을 조사하였다. 감마선의 경우 한국원자력연구원 첨단방사선연구소의 60^{Co} 선원을 이용하여 50-350 Gy(50 Gy 간격)의 선량으로, 중이온빔의 일종인 탄소이온빔의 경우 일본 JAEA 다카사키 연구소의 220 MeV (LET = 107 KeV/μm) 빔을 5-60 Gy(30Gy 까지 5 Gy 간

격, 이후 10 Gy 간격)의 선량으로, 양성자빔의 경우 한국원자력연구원의 45 MeV 빔을 50-500 Gy(50 Gy 간격)으로 각각 유월초 종자(실험군 별 50립, 2반복)에 조사하였다. 조사가 완료된 종자는 50공 트레이에서 받아시켜 생존율을 측정하고 50일 간 재배한 후 초장을 측정하였다. 이를 바탕으로 방사선을 조사하지 않은 유월초 종자를 대조군으로 하여 선원별로 대조군 대비 선량별 받아들 및 초장 그래프를 작성하였다.

- 그 결과 생존율이 50%가 되는 선량인 LD50은 감마선, 탄소이온빔, 양성자빔에서 각각 140, 35, 330 Gy인 것으로 확인되었으며 생장률이 50%가 되는 선량인 RD50은 각각 80, 32, 330 Gy인 것으로 나타났다(그림 2a). Yamaguchi 등(1988)은 감마선에 대한 고추의 LD50 및 RD50이 각각 170, 140-150 Gy인 것으로 보고한 바 있으므로 본 연구에서 확인된 값과 다소 차이를 보였다. Yamaguchi 등(2009)은 선량-생존율 그래프에서 급격히 생존율이 감소하는 지점의 선량에서 돌연변이 효율이 가장 높게 나타난다고 보고한 바 있으므로 돌연변이 효율이 높은 선량은 감마선, 탄소이온빔, 양성자빔에서 각각 100~150, 30~40, 300 Gy로 추정되었다 (그림 1-2). 한편, Himeda 등은 실제적인 돌연변이 육종에 있어서는 돌연변이 효율 뿐 아니라 돌연변이 계통의 임성이 함께 고려되어야 하므로 최고 돌연변이 효율을 나타내는 선량의 60~80%가 적절하다고 보고한 바 있는데 이를 기반으로 할 경우 감마선, 탄소이온빔, 양성자빔에서 돌연변이 육종에 적합한 선량은 각각 80-100, 25, 180~240 Gy일 것으로 추정해 볼 수 있다. 방사선에 대한 감수성은 같은 종내에서도 품종에 따라 다수 다르게 나타날 수 있다는 한계점이 있으나, 중이온빔 및 양성자빔에서 최초로 고추의 감수성 분석이 이루어졌다는 점, 국내 육종 소재로 많이 활용되는 신미 건고추에서 분석이 이루어졌다는 점 등에서 본 연구는 의미를 갖는다.

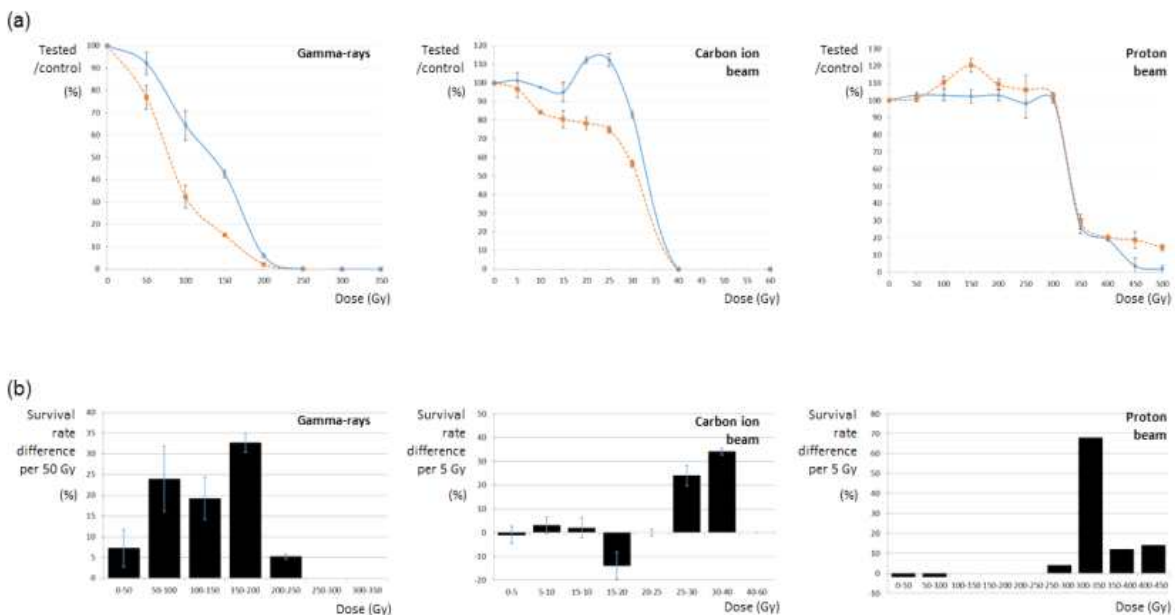


그림 1-2. (a) 방사선원별 선량-생존율, 선량-초장 그래프 (b) 방사선원별 선량 구간별 생존율 변동 폭을 나타낸 그래프

- 하바네로에서도 위와 유사한 방식(선량 별 종자 대상 조사 후 1달 뒤 생존율 조사)으로 감마선 선량에 대한 감수성을 조사하여 적정 선량을 조사하였는데 LD50 값은 약 83 Gy로 확인되었으며 감마선 이용 방사선육종을 위한 적정 선량은 50 Gy 정도인 것으로 파악되었다(그림 1-3).

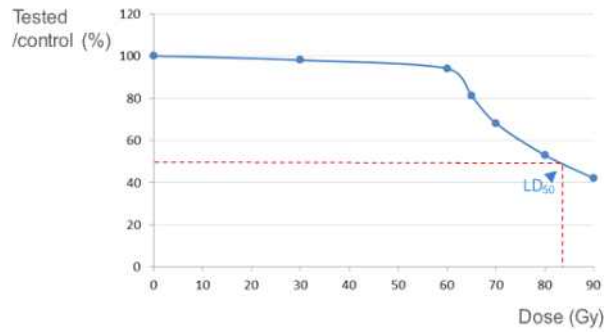


그림 1-3. 감마선 조사 선량에 따른 하바네로 생존율

○ 고추 돌연변이 집단 작성 및 유전자원 선발

- 유월초의 경우 1-2차년도, 하바네로의 경우 2-3차년도에 걸쳐 각각 돌연변이 M2 집단을 육성하였다. 유월초에서는 1차년도까지 60^Co 선원 유래 100Gy 감마선을, 일본 JAEA 다카사키연구소에서 20Gy의 220MeV (LET = 107 KeV/μm)의 탄소이온빔을 각각 유월초 종자에 조사하여 M₁ 집단을 작성한 후 방임수분하여 감마선 조사 계통 중 총 1,866 계통, 탄소중이온빔 조사 계통 중 총 154 계통에서 M₂ 종자를 확보하였다. 이후 각 M₂ 계통 당 3개의 개체를 파종하여 재배하며 표현형을 관찰하였다. 감마선 조사의 경우 총 2차에 걸쳐 이루어졌으므로 각 조사에 의해 작성된 집단을 별도로 관리하였다. 2차년도에는 추가적으로 100Gy와 110Gy의 감마선을 각각 종자에 처리하였다. 이후 M₁ 집단을 육성하고 종자를 채종하여 100Gy 조사 집단의 경우 1,942 계통, 110Gy 조사 집단의 경우 454 계통 등 총 2,396 계통의 M₂ 종자를 확보하였다. 하바네로의 경우에는 높은 변이율(비교적 높은 선량)과 육종적 활용성(비교적 낮은 선량)을 동시에 고려하여 65Gy, 70Gy, 80Gy의 감마선을 나눠 조사하여 각 선량별 617, 692, 357개(총 1,666 계통)의 M₁ 계통을 2차년도에 노지에서 육성하였고 각 계통으로부터 M₂ 종자를 확보하였다. 이 중 발아가 되는 1,585 계통에 대해 3차년도에 M₂ 집단을 육성하였다.

표 1-1. M2 집단 육성 결과

품종명	선원	선량(Gy)	계통 수	총 계통 수
유월초	탄소이온빔	20	154	M ₂ 총 4,490 계통
	감마선	100	3,882	

		110	454	
		60	76	
		65	534	
하바네로	감마선	70	644	M ₁ 총 1,585 계통
		80	306	
		90	25	

○ 유월초 M₂ 집단 변이율 분석

- 1차년에 육성한 유월초 M₂ 돌연변이 집단(2,084 계통)에서 생존율, 성장 저하(semi-dwarf 이하), 웅성불임성을 분석하였다. 각 계통 당 3개의 개체에 대해 조사를 진행하였다. 집단별 개체들의 생존율(과중 후 50일 기준)은 감마선 1차 조사 집단에서 82.1%, 감마선 2차 조사 집단에서 82.2%, 탄소중이온빔 조사 집단에서 86.8%로 나타나 탄소중이온빔 조사 집단에서의 발아율이 다소 높은 것으로 파악되었다. 반면, 과중 60일 후 성장 저하 개체(대조군 대비 2/3 이하)의 비율을 조사한 결과 감마선 1차 조사 집단에서 4.8%, 감마선 2차 조사 집단에서 7.5%, 탄소중이온빔 조사 집단에서 12.2%인 것으로 나타나 탄소중이온빔 조사 집단에서의 돌연변이 효과가 더 큰 것으로 나타났다(그림 1-4a). 약을 육안으로 관찰하여 파악한 웅성불임 비율 역시 감마선 1차 조사 집단에서 0.91%, 감마선 2차 조사 집단에서 0.95%, 탄소중이온빔 조사집단에서 1.95%인 것으로 나타나 탄소중이온빔 조사 집단에서의 돌연변이 효과가 큰 것으로 나타났다(그림 1-4b). Yamaguchi 등 (2009)은 M₁ 세대에서 나타나는 불량 특성(치사, 불임 등) 대비 유전 가능 돌연변이 특성 비율인 ‘돌연변이 효율’을 벼에서 연구한 결과 중이온빔 조사 집단의 돌연변이 효율이 감마선 조사 집단의 효율에 비해 유의미하게 높은 것을 확인하였다. 본 연구에서도 M₁ 세대에서 확인된 탄소중이온빔 20 Gy의 치사율이 감마선 100 Gy의 치사율에 비해 다소 낮음에도 불구하고 M₂ 세대에서 특정 돌연변이 특성을 나타내는 개체 비율은 탄소중이온빔 조사 집단에서 오히려 높게 나타났으므로 탄소중이온빔의 돌연변이 효율이 더 높음을 확인할 수 있었다.

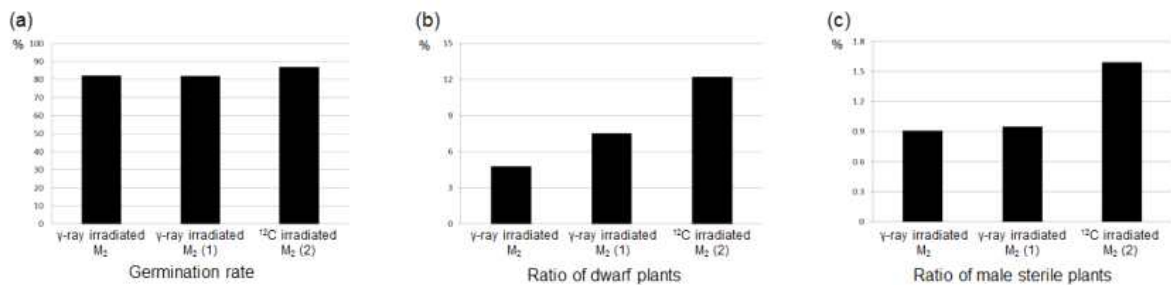


그림 1-4. (a) 방사선원별 돌연변이 집단(M₂ 세대)에서의 생존율 (b) 방사선원별 돌연변이 집단(M₂ 세대)에서의 성장 저하 개체 비율 (c) 방사선원별 돌연변이 집단(M₂ 세대)에서의 웅성불임 개체 비율

- 1차년도 육성한 유월초 M₂ 집단(2,084계통) 각 개체들을 재배하며 표현형을 조사하여 돌연변이 특성을 나타내는 계통들을 선별하고 데이터베이스화 하였다(그림 1-5, 표 1-2).

그 결과 총 45가지의 돌연변이 특성이 확인되었으며 이들 돌연변이 특성은 발달 및 구조, 잎, 꽃, 과실 등 4가지 항목 관련 돌연변이로 분류되었다. 이 중 옹성불임성, 단일가지 다수 과실 착과, 유한화서형, 무한영양생장, 과실 숙기 및 형태 변화 등 농업적 활용이나 기능유전체학 연구에 있어 활용 가치가 높을 것으로 예측되는 개체들의 경우 표현형 재확인 및 유전 양상 분석을 위해 후대 집단을 육성 중이다. 한편 이들 M₂ 계통들로부터 총 1,569 M₃ 계통들에 대한 종자를 확보하였다. 또한 본 연구 개발 M₂ 계통 및 이전 연구를 통해 개발한 414개의 M₃ 계통을 포함하는 총 2,498개의 돌연변이 계통의 잎에서 DNA를 각각 추출하여 유전자형 기반 돌연변이 육종(reverse genetics)의 기반을 구축하였다.



그림 1-5. 대표적 돌연변이 계통 표현형. (a) 극심한 단간 식물체 (b) 얼룩덜룩한 엽색 (c) 길고 좁은 잎 형태 (d) 주글주글하고 말린 잎 형태 (e) 수술의 꽃잎화 (f) 옹성불임 (g) 암술이상 (h) 유한화서 (i) 과실형태 변화 (j) 과탁형태 변화 (k) 착과방향 변화 (l) 단일가지 다수 과실 착과

표 1-2. 돌연변이 특성 분류 및 집단별 돌연변이 개체 분포

Phenotype categories			γ -ray irradiated M ₂ (2)	γ -ray irradiated M ₂ (1)	¹² C-beam irradiated M ₂
Development and plant architecture	Development	Semi-dwarf	154	98	49
		Extreme dwarf	4	4	1
		Indeterminate inflorescence	2	2	3
		Vegetative development only	-	-	1
	Architecture	Early branching	4	-	-
		Spreading type	2	-	-
		Asymmetric leaf formation	2	-	-
	Many leaves from a single node	-	1	-	
Leaf	Characteristics of cotyledons	One cotyledon	1	-	-
		Three cotyledons	-	1	-
		Cotyledon only	1	1	-
	Pigmentation	Pale green	6	9	5
		Pale green in leaf tip	1	2	-
		Dark green	1	1	-
		Dark spots	1	-	-

		Variegated	2	2	-	
		Mottled	1	1	-	
	Size and shape	Curled	3	2	2	
		Rough surface	3	4	2	
		Wrinkled	-	-	1	
		Many fused-leaves	3	1	-	
		Long petiole	2	1	-	
		Longer	3	4	-	
		Very narrow	-	2	-	
		Thick	1	-	-	
flower	Flowering	Late flowering	1	-	4	
		Early flowering	5	4	-	
		No flower	1	2	-	
		Clustered floral buds	2	1	1	
	Size and shape	Small	1	1	2	
		Petaloid stamen	2	-	1	
		Malformed stamen	-	-	1	
		Malformed pistil	1	-	-	
		Higher number of stamens	-	1	-	
		Higher number of pistils	-	1	-	
		Fused flower	-	2	-	
		Yellow flower stalk	1	1	-	
	Yellow anther	-	1	-		
	Male sterility	Male sterile	10	7	4	
	fruit	Fruit setting and ripening	Earlier fruit set	-	-	1
			Up-oriented fruit	1	2	-
Notable parthenocarpy			-	3	-	
Early ripening			-	1	-	
No ripening			1	1	1	
Size and shape		Cup-shaped fruit-receptacle	-	2	-	
		Smaller	7	2	-	
		Conical shape	3	1	1	
		Long	3	1	1	
		Very small and round	1	-	-	
		Large (blocky)	1	-	-	
Pigmentation		Orange	1	2	-	

- 2차년도에 육성한 유월초 M₂ 2,406 개체(100 또는 110 Gy 조사)에서는 주로 과실성숙 지연(꽃고추용으로 활용성이 높은 육종소재 개발) 및 개화지연(토마토 잡종강세 향상 유전자의 특성으로 알려져 있음) 표현형을 보이는 개체에 대한 특성 조사가 이루어졌는데 과실성숙 및 개화가 가장 늦은 5 계통 및 7계통을 각각 선발하여 후대 검정을 위한 자가수정 및 원품종과의 교배를 수행하였다.
- 하바네로의 경우 2차년도에 65Gy 조사 617 계통, 70Gy 조사 692 계통, 80Gy 조사 357 계통 등 M₁ 총 1,666개 계통을 육성하고 각각의 M₂ 종자를 확보하였다. 3차년도에는 생존율 검정 과정에서 육성하였던 60Gy, 90Gy 조사 일부 계통과 함께 전년도 확보한 M₂ 종자를 파종하여 이 중 생존한 M₂ 계통 총 1,585 개체(60Gy 76 계통, 65Gy 534 계통, 70Gy 644 계통, 80Gy 306 계통, 90Gy 25 계통)를 육성하여 표현형 관찰 중에 있다. 2차년도 M₁ 세대에서는 불임으로 나타난 계통 10계통을 선발하여 세포질 융성불임 여부를 확인하기 위해 검정교배를 실시하고 있다. 3차년도 M₂ 세대에서는 현재 빠른 숙성을 나타내는 계통들과 융성불임 계통들을 선발하기 위한 표현형 조사를 진행하고 있다. 하바네로는 만생종이며 융성불임 이용 육종이 이루어지지 않아 종자업계에서 조숙성 및 융성불임 보유 특성을 필요로 하고 있으므로 이러한 특성을 보유한 계통들이 발굴될 경우 상업적 활용도가 매우 클 것으로 예측된다.

(나) 유전자형 기반 돌연변이 계통 선별을 위한 TILLING 및 세포질 마커검정 체계 구축

○ 효율적 TILLING 체계 구축을 위한 조건 정립

- 다수 생물종의 전체 염기서열 분석이 완료되고 기능유전체학을 통한 유전체 기능 관련 정보가 축적됨에 따라 특정 유전자 돌연변이 계통을 선별한 후 표현형을 확인하여 유용 소재로서 활용하는 방식인 ‘reverse genetics’ 접근 방식이 활발히 연구되고 있다. 특히 가지과의 모델 식물인 토마토의 유전체 분석 및 기능유전체학 연구가 활성화되고 고추 전체 염기서열 분석이 완료됨에 따라 고추 육종 연구에 있어서 이러한 정보를 활용할 수 있는 돌연변이 육종 체계 확립이 요구되고 있다. 따라서 본 연구에서는 돌연변이 집단에서의 유전형 분석을 통해 특정 유전자 돌연변이 개체를 선별해 내기 위한 핵심기술인 TILLING (Target Induced Local Lesion In Genome) 기술을 확립하기 위한 연구를 진행하고자 하였다. 특히 많은 단계를 거치며 형광 표지 및 아크릴아마이드겔을 이용해야 하는 기존 방식에 비해 실험 절차가 적으며 시간 및 노동력 측면에서 유리한 모세관 전기영동(capillary electrophoresis) 방식에 기반 한 체계를 구축하고자 하였다. TILLING에서는 돌연변이 개체들의 DNA를 pooling하고 타겟유전자 서열을 증폭하고 돌연변이 발생 서열과 정상 서열 간 heteroduplex 형성을 유도한 후 서열 간 mismatch가 일어난 부분만 특이적으로 절단하는 가수분해 효소를 처리하고 증폭 서열 상 절단이 일어났는지 확인함으로써 pool 내에 타겟 유전자 돌연변이 계통이 존재하는지를 확인하게 된다. 돌연변이 유전자 절편이 섞여 있는 DNA pool을 구현하기 위하여 이미 양 계통 간 변이 염기서열 위치를 알고 있는 고추 ‘CM334’ 계통 및 ‘Yolo Wonder’ 계통의 capsanthin-capsorubin (CCS) 유전자 절편을 재료로 이용하였으며 적정 가수분해 효소 종류 및 농도, 적정 heterocuplex 형성 조건, 증폭산물 적정 길이, 최대 샘플 pooling depth 등의 조건을 결정하고자 하였다(그림 1-6).
- CM334 및 Yolo Wonder 양 계통의 CCS 유전자 공통서열에서 디자인한 프라이머 조합들을 활용하여 중간에 양 계통 간 SNP를 한 개 이상 포함하는 4가지 길이(1,872, 1,363, 1,038, 672 bp)의 PCR 산물을 증폭하였다(그림 1-7). 이들을 다양한 비율로 pooling 한 뒤 Advanced Analytical 사의 Cell, Integrated DNA Technologies 사의 Surveyor® 가수분해 효소로 반응시키고 아가로스겔 전기영동 및 fragment analyzer (모세관 전기영동 기체)를 이용한 분석을 통하여 반응산물 유무와 길이를 확인하였다.

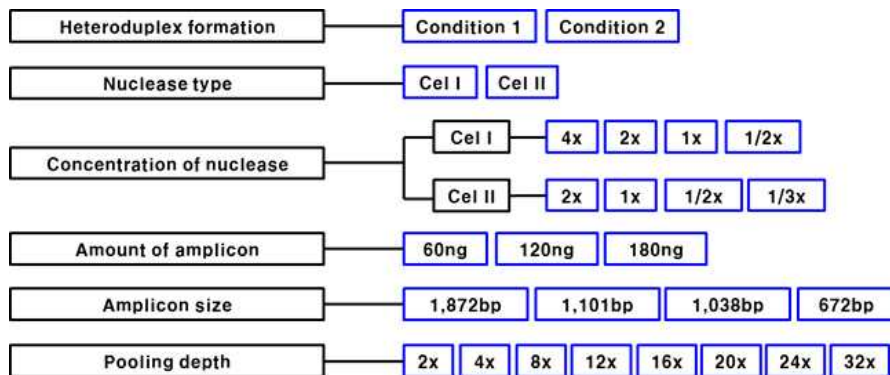


그림 1-6. 효율적 TILLING 체계 구축을 위해 비교 평가된 조건들

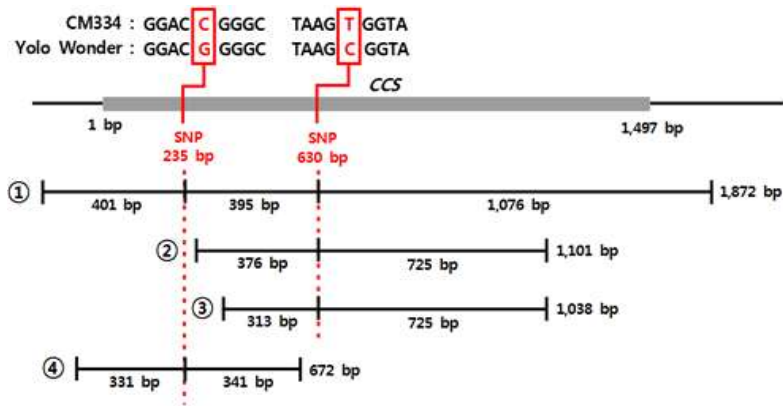


그림 1-7. 예비 실험 시 이용된 *CCS* 유전자 상 CM334 및 Yolo Wonder 두 계통 간 SNP

- 비교 분석 결과 온도를 고온에서 저온으로 일정한 속도로 지속적으로 감소시키는 조건 2보다 10도로 이루어지는 온도 구간 별로 온도를 일정한 속도로 감소시키다가 멈추는 과정을 반복하는 조건 1에서 heteroduplex를 형성할 경우 더 민감하게 반응산물을 확인할 수 있는 것으로 나타났다(그림 1-8). 내부가수분해효소 종류에 있어서는 기존에 많이 이용되어 오던 CelI에 비해 CelIII(Surveyor[®])의 효율이 우수한 것으로 확인되었다(그림 1-9). 특히 CelIII의 경우 매우 낮은 효소 농도(매뉴얼 권장 농도의 1/3)에서도 증폭산물을 잘 절단하는 것으로 나타나 경제적인 활용이 가능할 것으로 판단되었다. 증폭산물의 양에 있어서는 180 ng까지 양을 높였을 때 다른 조건들에 비해 반응 산물이 뚜렷하게 나타나는 것으로 보아 많은 양의 증폭산물을 얻는 것이 TILLING의 효율성을 높이기 위한 선결 조건임을 확인하였다(그림 1-10). 증폭산물의 길이에 있어서는 짧은 증폭산물일수록 더 민감한 결과를 얻을 수 있는 것으로 나타났는데, 1,872 bp의 경우 1:7의 비율로 양친의 DNA를 혼합한 경우, 672 bp의 경우 1:31의 비율로 양친의 DNA를 혼합한 경우에 이르기까지 반응산물을 확인할 수 있는 것으로 나타났다(그림 1-11). 이는 이형접합체를 확인할 수 있어야 하는 실제 TILLING에서는 1,872 bp의 경우 4x DNA pooling, 672 bp의 경우 16x DNA pooling이 가능함을 의미한다. 결론적으로, 180ng의 증폭산물을 얻어조건 1에 따라 heteroduplex를 형성하고 1/3x의 CelIII로 증폭산물을 절단할 경우 1,872 bp 산물의 경우 4x, 672 bp 산물의 경우 16x의 DNA pool에서 이형접합체 또는 동형접합체의 돌연변이체 유전자를 탐색할 수 있는 것으로 확인되었다.

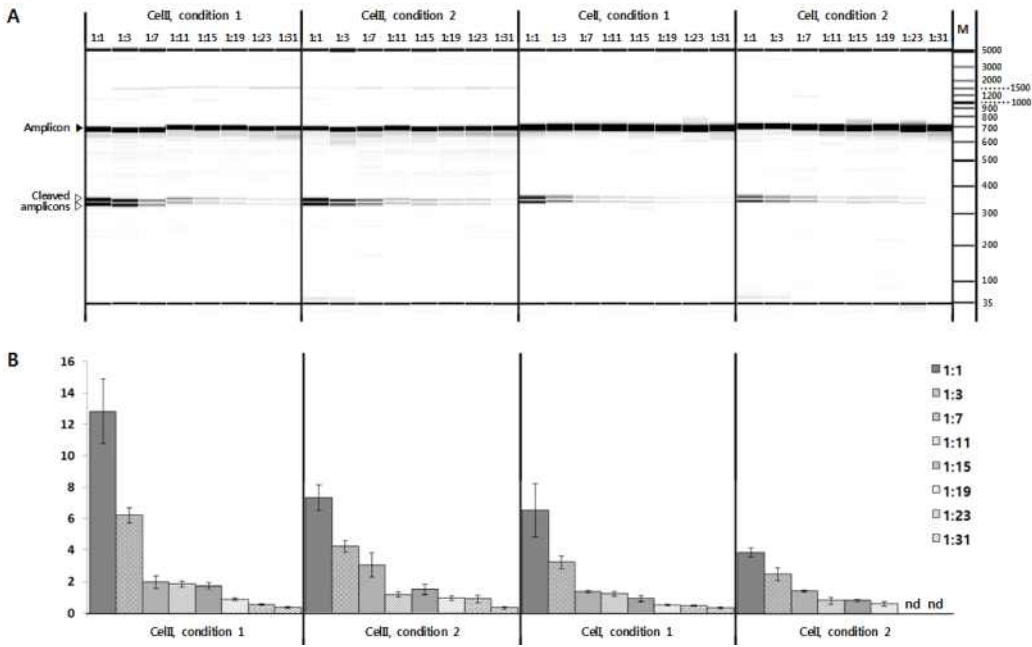


그림 1-8. heteroduplex 형성 조건에 따른 반응 결과

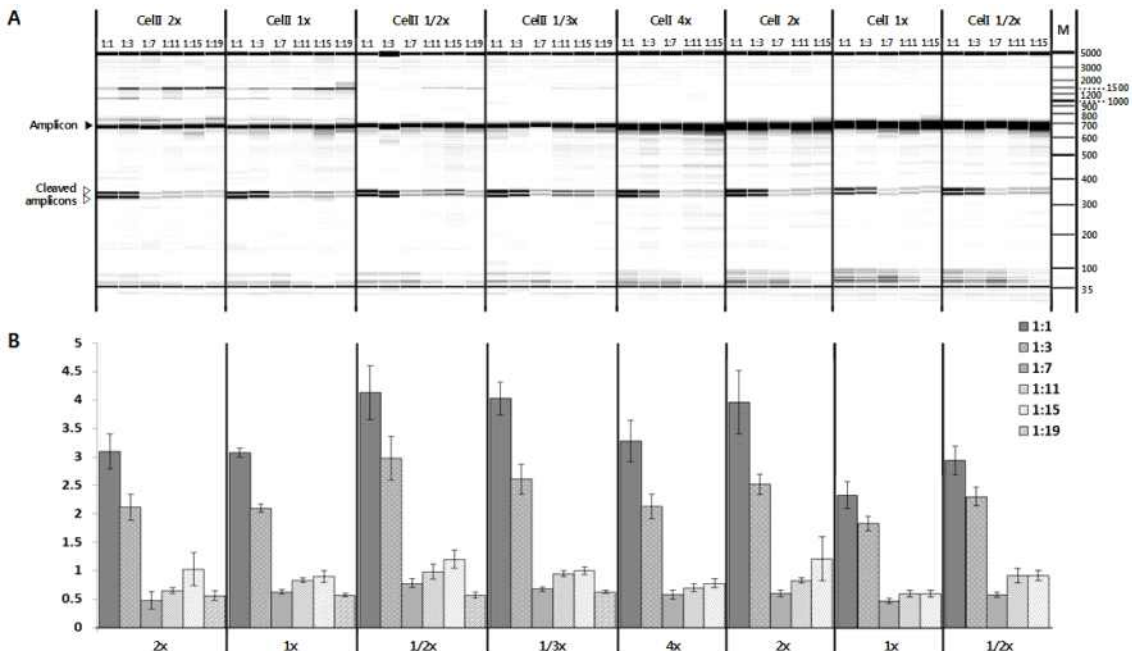


그림 1-9. 내부가수분해 종류 및 농도에 따른 반응 결과

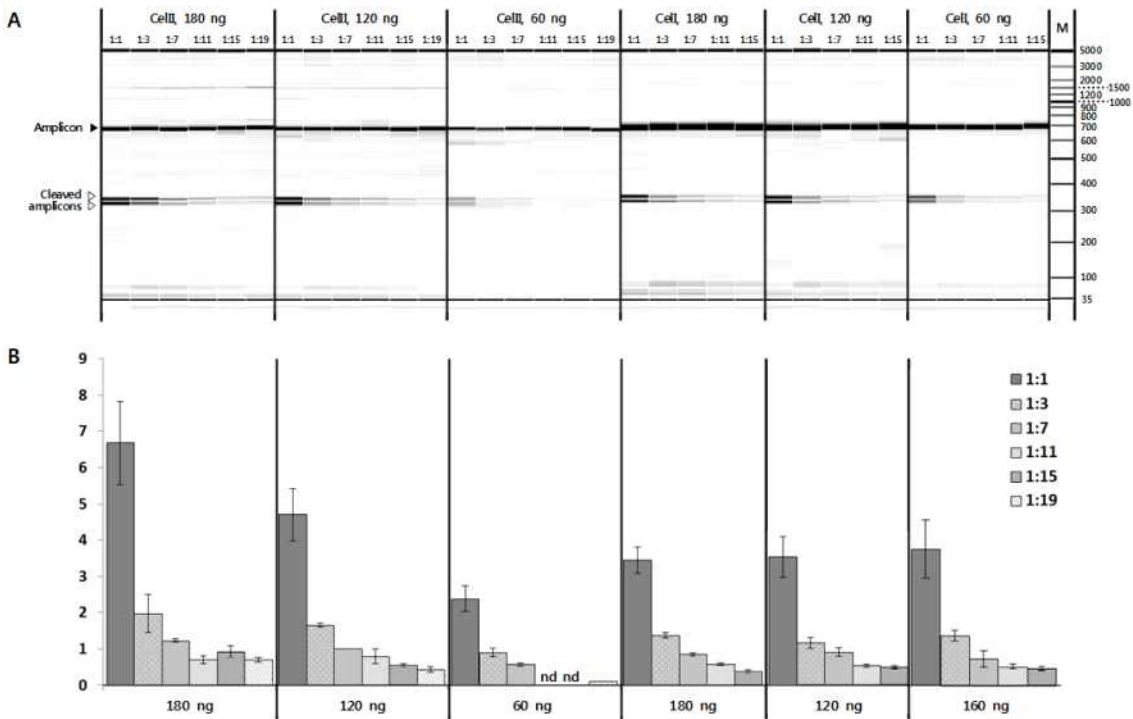


그림 1-10. 증폭산물 양에 따른 반응결과

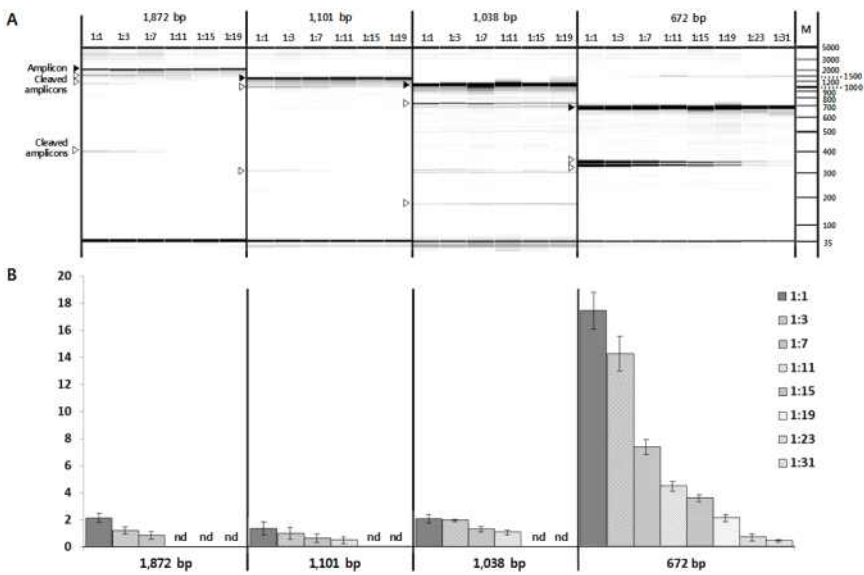


그림 1-11. 증폭산물 길이 및 DNA pooling depth에 따른 반응 결과

○ 정립된 TILLING 체계를 활용한 고추 돌연변이체 탐색

- 1차년도 육성한 유월초 M₂ 및 M₃ 집단 개체에서 추출한 DNA pool(2,615 개체, 4X pooling)을 대상으로 확립한 TILLING 체계를 적용하여 과색 관련 유전자인 CCS 유전자 대상 분석을 수행하였다. 그 결과 절단산물이 확인된 1개의 pool을 확인할 수 있었으며 이 DNA pool을 이루는 각 개체에 대해 분석하여 절단산물을 나타내는 1개의 개체를 찾아낼 수 있었다(그림 1-12a). 이 개체는 다른 길이의 증폭과 pooling depth를 가정하고 분석을 실시하였을 때에도 선별되는 것으로 나타났다(그림 1-12b). 선발 개체에서 염기서

열을 분석한 결과 *CCS* 유전자 시작 코돈에 돌연변이가 일어나 단백질의 기능이 떨어지거나 없어질 것으로 예측이 되었다(그림 1-13). 해당 돌연변이 개체는 이형접합성이었기에 같은 M_2 family에 속하는 동형접합성 돌연변이체의 표현형을 분석해 본 결과 과실이 옅은 주황색으로 변하는 것을 확인할 수 있었는데 이는 *CCS* 유전자가 고추의 붉은 색소인 capsanthin과 capsorubin 합성의 최종단계에 관여하는 유전자이기 때문이다(그림 1-14).

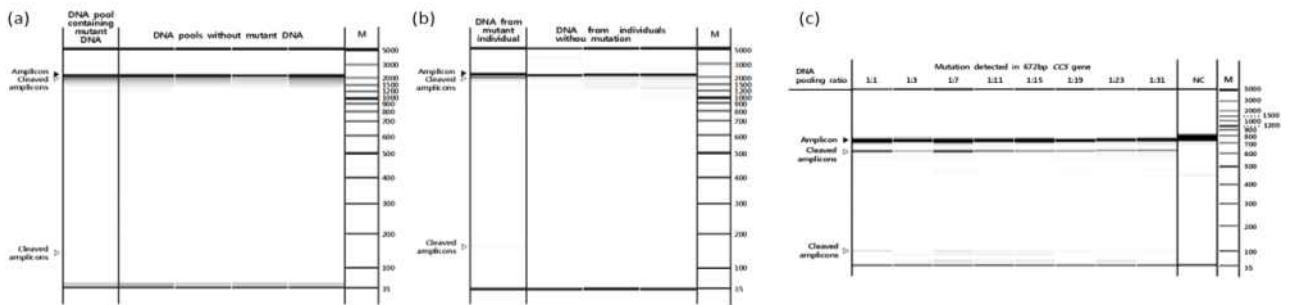


그림 1-12. 확립 TILLING 체계를 이용한 *CCS* 유전자 돌연변이체 선발. (a) 4x DNA pool 중 돌연변이체 포함 DNA pool 선발 (b) 선발 DNA pool에서 돌연변이 개체 선발 (c) 672 bp 증폭산물을 이용하여 다양한 pooling depth를 가정한 후 해당 돌연변이체를 찾아본 결과

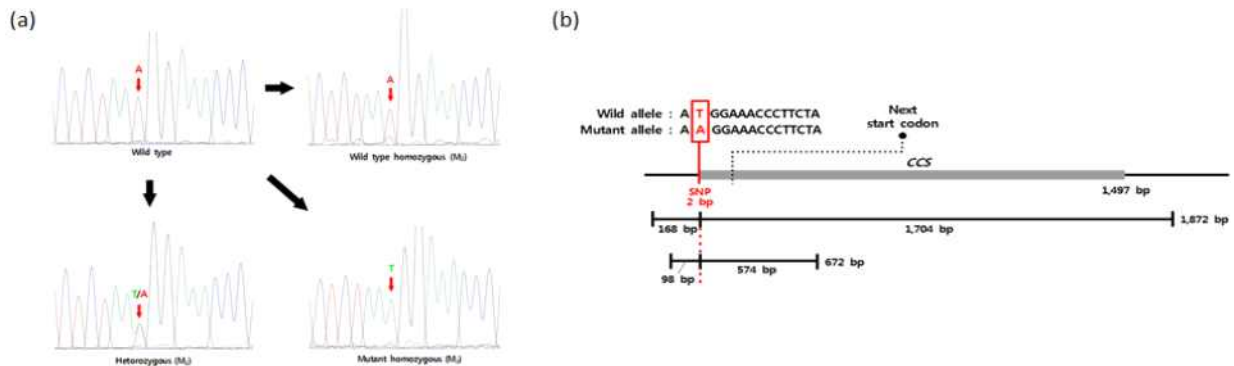


그림 1-13. 선발 돌연변이체에서의 돌연변이 위치 구명 (a) 돌연변이 발생 염기서열 위치 (b) *CCS* 유전자 상에서의 돌연변이 위치



그림 1-14. 선발 돌연변이체와 같은 M_2 family에 속하는 이형접합성 돌연변이 개체의 표현형

○ 미토콘드리아 변이 분석용 분자표지 개발

- 돌연변이 주요 목적 형질 중 하나인 세포질 응성불임은 미토콘드리아 DNA의 구조적 변이에 의해 발생하는 것으로 알려져 있으므로 미토콘드리아 DNA 구조적 변이를 탐색하기 위한 분자표지를 개발하고자 하였다. 기존에 보고된 고추 두 계통의 미토콘드리아 유전체 서열 간 보존되어 있는 syntenic sequence block의 경계부와 양 계통 특이적인 서열 중 핵 DNA(핵에도 일부 미토콘드리아 유래 DNA가 있음)가 아닌 미토콘드리아 DNA에만 특이적으로 존재하고 있는 서열을 CM334 전체 유전체 대상 BLAST 분석을 통하여 선별하고 이로부터 미토콘드리아 특이적 SCAR 마커 개발용 프라이머를 디자인하였다(그림 1-15). 이후 12개 계통에 시험적용하여 단일 PCR 산물을 증폭시키는 프라이머 조합 20개를 선별하였다(그림 1-16).

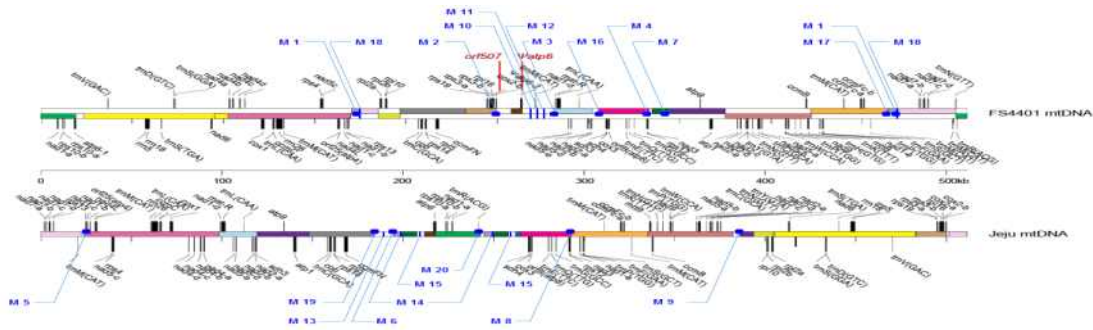


그림 1-15. 개발된 20개 분자표지의 미토콘드리아 유전체 상 위치

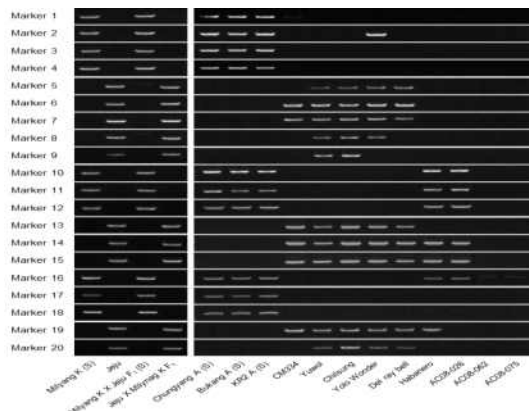


그림 1-16. 개발된 20개 분자표지를 12개 유전자원 및 응성불임/가임 계통에 적용한 결과

- 개발한 20개의 분자표지를 서울대학교에서 분양받은 다양한 고추 유전자원에 적용하였다. 먼저 가장 널리 재배되는 재배종인 *C. annuum* 종에 속하는 고추 유전자원 96개에 적용한 결과 대부분의 경우 확실한 증폭 또는 미증폭 양상을 나타내었으나 일부 경우에는 매우 약한 증폭 양상을 나타내었다. 이는 일반적으로 식물 미토콘드리아 유전체는 주된 유전체 외에도 적은 수의 하위 유전체 분자(subgenomic molecule)를 가진다는 특성에 의한 것으로 판단된다. 이러한 증폭의 경우 확실한 증폭을 보이는 경우와 비교할 때 그 증폭양에서 명확한 차이를 보였으며, 완전히 증폭되지 않은 경우와의 구별 가능성은 중합효소연쇄반응 효율이나 겔 상에서의 해상도에 따라 다를 것으로 예상되었으므로 mitotype 분류 과정에 있어서는 완전히 증폭되지 않은 경우와 동일하게 취급하였다. 분자표지 20개의 적용

결과를 종합해 볼 때 96개의 유전자원을 총 15개의 mitotype으로 분류할 수 있었다. 이 중 group 1, group 4, group 8, group 12, group 13으로 정의한 분류군에는 3개 이상의 유전자원이 포함되어 있었다(표 3). 이들 다섯 개 주요 분류군은 marker 1, marker 2, marker 3, marker 6 조합 등 4개 분자표지로 이루어진 조합만으로도 분류가 가능하였다

표 1-3. Mitotype 별 분자표지 적용결과 및 포함 유전자원 수

Classification using 20 markers	Classification using a multiplex marker	Mitotyping markers																			No. germplasms		
		1 ²	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		20	
Group 1	Type 1	Y ³	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	13	
Group 2		Y	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	Y	N	N	2
Group 3		Y	N	N	N	N	N	N	N	N	Y	Y	Y	N	Y	Y	N	N	N	N	N	N	1
Group 4	type 2	N	Y	N	N	Y	Y	Y	Y	N	N	N	N	Y	Y	Y	N	N	N	Y	Y	23	
Group 5		N	Y	N	N	Y	Y	Y	Y	N	N	N	N	Y	Y	Y	N	N	N	Y	N	1	
Group 6		N	Y	N	N	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	N	Y	Y	1	
Group 7		N	Y	N	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	N	Y	Y	1	
Group 8	type 3	N	N	N	N	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	N	Y	Y	Y	N	N	N	Y	Y	39	
Group 9		N	N	N	N	Y	Y	Y	N	N	N	N	N	Y	Y	Y	N	N	N	Y	Y	2	
Group 10		N	N	N	N	Y	Y	Y	Y	N	N	N	N	Y	Y	Y	N	N	N	Y	Y	2	
Group 11		N	N	N	N	Y	Y	Y	Y	Y	N	N	N	Y	Y	Y	N	N	N	Y	N	2	
Group 12	type 4	Y	Y	Y	Y	N	N	N	N	N	Y	Y	Y	N	N	N	Y	Y	Y	N	N	4	
Group 13	type 5	N	N	N	N	N	N	Y	N	N	N	N	N	N	Y	Y	N	N	N	N	N	3	
Group 14		N	N	N	N	Y	N	Y	Y	N	N	N	N	Y	Y	Y	N	N	N	Y	Y	1	
Group 15		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	1

²밑줄이 있는 분자표지의 경우 FS4401 서열로부터, 밑줄이 없는 분자표지의 경우 Jeju-Jaerae 서열로부터 디자인되었음.

³많은 양의 증폭산물이 된 경우 Y, 매우 적은 양이 증폭되었거나 전혀 증폭되지 않은 경우 N으로 표기함.

- 20개의 분자표지를 *C.annuum* 외의 일부 고추 재배종인 *C.frutescens*, *C.chinense*, *C.baccatum*에 속해 있는 유전자원 48개(종 별 16개)에도 적용하여 보았다. 그 결과 한 개 이상의 유전자원에서 확실한 증폭이 일어나는 분자표지 대부분의 경우 다른 많은 유전자원에서도 약한 증폭이 발생되며, 명확한 증폭이 일어나는 경우와 구별하기 힘든 정도의 증폭이 일어나는 경우도 많아 mitotype 분석에 활용하기 어려울 것으로 판단되었다. 하지만 marker 10-12, marker 14-15 등 일부 분자표지의 경우 다수의 *C.frutescens* 또는 *C.chinense* 유전자원에서는 확실한 증폭 양상을 나타내어 유전자원 유래 및 유연관계 분석에 이용될 가능성이 있을 것으로 판단되었다.
- 위에서 기술하였듯이 중합효소연쇄반응 결과를 고려할 때 몇 가지 조합으로 이루어진 분자표지 4개만으로도 *C.annuum* 유전자원 96개 중 3개 이상의 유전자원을 포함하는 group 1, group 4, group 8, group 12, group 13 분류군을 상호 간 분리해 낼 수 있다. 실용적 활용에 있어 분자표지 4개를 모두 적용할 경우 많은 시간과 노동력이 소모되므로 본 발명에서는 분자표지 4개를 한 번의 중합효소연쇄반응으로 분석할 수 있는 다중 중합효소연쇄반응 체계를 개발하고자 하였다. 중합효소연쇄반응에서의 DNA 증폭의 명확성 등을 고려하여 marker 1, marker 2, marker 3, marker 6을 다중 중합효소연쇄반응 체계에 활

데 유용하게 활용될 수 있다. 3차년도에 육성한 하바네로 집단에서 DNA 추출을 계획하고 있으며 이것이 완료될 경우 개발 분자표지 체계 적용을 통해 미토콘드리아 구조 변이가 발생한 개체를 탐색할 수 있다. 기존 연구를 통해 미토콘드리아 구조 유지 체계의 붕괴가 세포질 응성불임을 일으킬 수 있음이 밝혀진 바 있으므로 이러한 탐색을 통해 세포질 응성불임을 나타내거나 향후 세대 진전을 통해 세포질 응성불임이 발생할 가능성이 높은 계통을 선발할 수 있을 것으로 예측된다.

(2) 협동과제 개발 품종의 가치 향상 및 산업화를 위해 기능성 분석 지원

(가) 4협동과제 보이젠베리 및 블랙베리 육성계통의 기능성 성분 분석 지원

- 보이젠베리(*Rubus ursinus*)는 이종교배(로진베리×블랙베리)로 육성된 나무딸기로 *Rubus*속의 다른 품종의 열매보다 풍미가 풍부함. 특히 냉동시키거나 농축하여도 맛이 유지되는 특징이 있어 생과를 이용한 주스 또는 와인, 냉동 건조된 보이젠베리 분말을 뮤즐리 및 시리얼 등 다양한 식품에 이용되고 있다.
- 국내 기후에서 월동이 가능한 보이젠베리 품종을 육성하고자 블랙베리와 보이젠베리를 교배하여 육성한 BS_Hybrid 계통은 당도가 낮고, 기형과율이 높아 과실수량이 떨어지며, 이를 개선하고자 삼수체 및 배양체에 감마선을 20~80 Gy 처리하여 과실수량과 병 저항성이 증대된 9 계통을 제4협동과제(바이오플러스)에서 육성하였다.
- 육성된 돌연변이 계통의 과실품질(당도, 산도, pH) 및 기능성 성분(미네랄, 에르가산, 안토시아닌, 지방산)을 분석하여 유망 보이젠베리 계통 선발에 활용함.
- 보이젠베리 안토시아닌 함량 분석
 - 과실의 안토시아닌 추출은 보이젠베리 돌연변이 계통의 완숙 과실을 수확한 후 동결 건조한 시료 1 g에 메탄올/염산(99:1, v/v) 5 mL 용매를 이용, 상온에서 2시간 동안 추출하였다. 이렇게 추출된 추출액 1.5 mL를 0.45 μ m membrane filter 필터로 여과하고 UPLC-MS 분석을 하였다.
 - 추출액의 UPLC-MS를 이용한 분석 조건은 Table 1-4에 요약되어 있다. 분석에 이용된 컬럼은 Poroshell 120 SB-C18 column (150 × 4.6 mm i.d., 2.7 μ m particle size, Agilent Technologies, U.S.A), C18 guard column (4 × 3 mm i.d.; 3 μ m particle size, phenomenex, U.S.A)을 Agilent Technologies 1260 series UPLC, Agilent Technologies 380 ELSD and Agilent Technologies 6130 Quadrupole mass spectrometry (Agilent Technologies, U.S.A) HPLC system (CBM-20A, Shimadzu Co. Ltd., Japan)에 장착하여 사용하였다. 이동상 A에는 0.01%, v/v, trifluoroacetic acid가 첨가된 distilled deionized water를 이동상 B에는 0.1%, v/v, trifluoroacetic acid가 첨가된 acetonitrile을 이용하였다. 분석시간은 0-3분까지 이동상 B를 5%, 3-28분까지 이동상 B를 100%, 28-35분까지 이동상 B를 100%로 유지하면서 유속 0.5 ml/min으로 실시하였다. 시료주입량은 10 μ l로 하였다.
 - 보이젠베리 돌연변이 계통과 블랙베리 개발 품종간의 안토시아닌 구성 성분 차이를 분석한 결과(Fig. 1-19), 보이젠베리 돌연변이 계통의 주요 안토시아닌 성분은 cyanidin-3-O-sophoroside (M^+ m/z 611)와 기존 블랙베리 품종의 주요 안토시아닌인

cyanidin-3-O- glucoside (M^+ m/z 449)가 거의 5.5:4.5 비율로 함유되어 있었다(Fig. 1-19).

- 보이젠베리 계통간 안토시아닌 함량을 비교하면 BSA-036, BSA-078, BSA-101, BSB-127 계통에서 원품종인 BS_Hybrid 보다 안토시아닌이 함량이 증가하였으며, 특히 BSA-078, BSA-101 계통의 안토시아닌 함량이 약 20% 증가하여 가장 높았다.

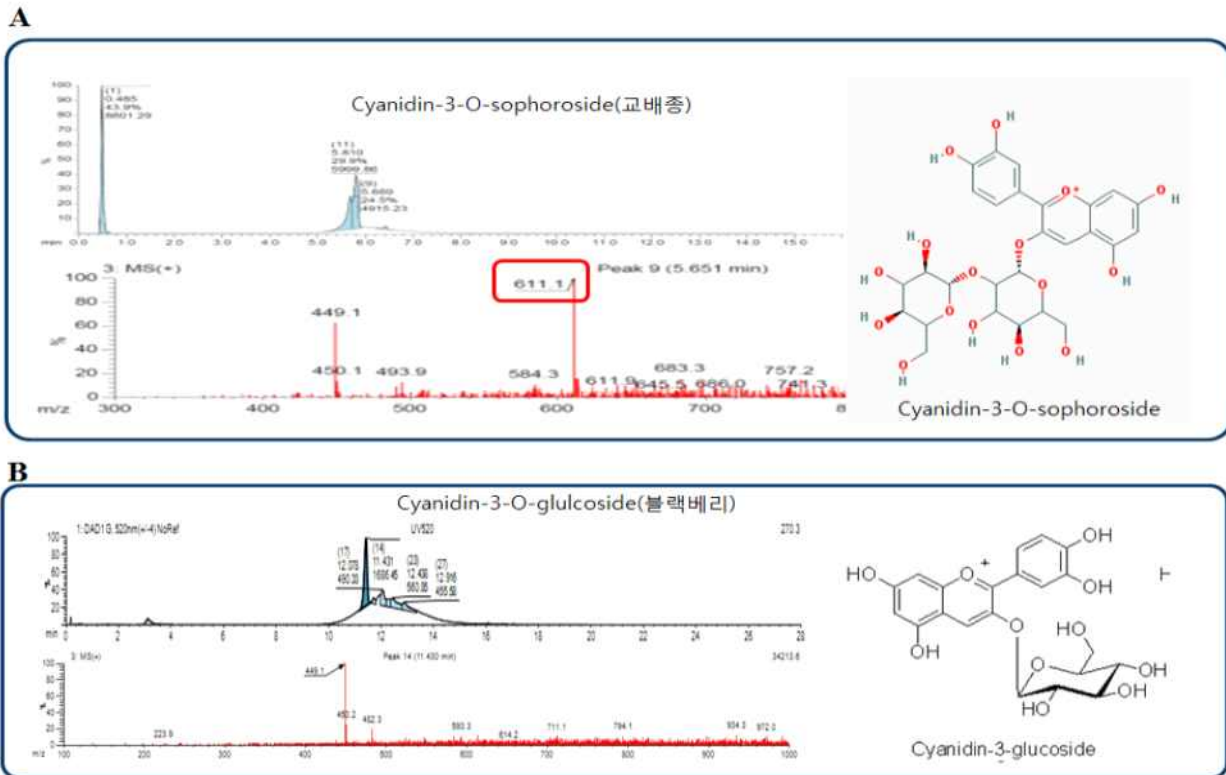


Fig. 1-19. HPLC-MS profiles of anthocyanin content in boyzenberry and blackberry cultivars at the ripened stage. A: V-9×R. parvifolius B: B201 (Blackberry).

Table 1-4. Analytical conditions of HPLC-MS for analysis of anthocyanin contents

Parameters	Conditions		
Column	Poroshell 120 SB-C18 column (150 × 4.6 mm i.d., 2.7 μm particle size, Agilent Technologies, U.S.A)		
Flow rate	0.5 ml/min		
Injection volume	10 μl		
Run time	35 min		
Gradient	Time (min)	% A ^{z)}	% B ^{y)}
	0-3	95	5
	3-28	95-0	5-100
	28-35	0	100
UV detection	515 nm		

^{z)} 0.1%, v/v, trifluoroacetic acid with distilled deionized water, ^{y)}0.1%, v/v, trifluoroacetic acid with acetonitrile.

Table 1-5. Anthocyanin content of fruit for hybrid boysenberry genotypes.

(mg · 100 g⁻¹)

Line	Cy-3-O-Sop	Cy-3-O-Glu	Total anthocyanin
Boysenberry	48.3±08.9de	177.4±8.7g	225.7±0.2g
Blackberry	-f	184.0±2.0g	184.0±2.0h
BS_Hybrid	72.6±12.4bc	309.4±6.6d	382.0±5.8d
BSA-036	82.3±14.0b	344.6±7.8bc	426.9±6.3c
BSA-065	56.5±09.5c	205.4±8.9f	261.9±0.7f
BSA-078	107.5±19.2a	360.5±16.2ab	467.9±3.0a
BSA-101	91.2±15.8ab	373.7±09.1a	464.9±6.7a
BSA-119	71.2±12.3bc	273.3±08.6e	344.4±3.7e
BSA-144	33.6±05.7e	118.3±03.4h	152.0±2.3i
BSB-032	40.4±06.9de	95.2±03.5i	135.5±3.4j
BSB-127	85.9±14.4b	353.4±08.2b	439.3±6.2b

Cy-3-O-Sop: Cyanidin-3-O-sophoroside (M⁺ m/z 611), Cy-3-O-Glu: Cyanidin-3-O-glucoside (M⁺ m/z 449) -: Not detected, Mean separation within columns by Duncan's multiple range tests (P ≤0.05, n=3).

○ 보이젠베리 과실 품질 관련 성분 분석

- 보이젠베리 돌연변이 계통간 pH, 당도, 산도를 측정된 결과(Table 1-6), pH와 산도는 계통간 차이가 없고, 당도는 BSA-119, BSA-114 계통이 원품종 보다 당도가 높았다. 당도는 환경에 영향을 크게 받으며, 모든 계통의 산도가 균일한 점을 감안할 때 추가적인 연구가 필요하다.
- 미네랄 함량을 분석한 결과(Table 1-7), 모든 계통에서 칼륨이 가장 많고 칼슘, 마그네슘, 나트륨, 철분, 아연순으로 함유되어 있으며, 계통간의 차이는 BSB-127 계통에서 칼륨 함량이 원품종에 비해 증가하였다. 칼슘과 마그네슘 함량은 원품종인BS_PI와 블랙베리(V3) 계통이 돌연변이 육성 계통보다 높으며, 보이젠베리의 미네랄 함량은 기존에 개발된 블랙베리(메이플, 정향, V3)와 비교하여 칼륨, 칼슘 함량이 높다.
- 지방산 함량을 분석한 결과(Table 1-8), palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid가 주요 지방산으로 검출되었고, 불포화지방산(UFA)인 oleic acid, linoleic acid, linolenic acid가 전체 90%이상 함유하였다. 지방산 조성의 계통간의 유의적인 차이는 인정되지 않았다. 보이젠베리 돌연변이 계통과 블랙베리 품종간의 지방산 조성 또한 유의적 차이가 없으며, 고혈압, 동맥경화예방, 항산화에 유용한 불포화 지방산 함량이 90%내외로 높아 국내/외 연구 결과와 동일하였다.
- 보이젠베리 돌연변이 계통의 완숙과에 에르가산 함량은 BSB-127 계통만 원품종보다 높고, 다른 돌연변이 계통은 모두 원품종보다 낮았다(Fig. 1-21).
- 기능성 성분 결과를 종합하면 BSB-127 계통이 미네랄, 에르가산, 안토시아닌이 모두 우수한 계통으로 추후 기능성 소재 활용이 기대된다.

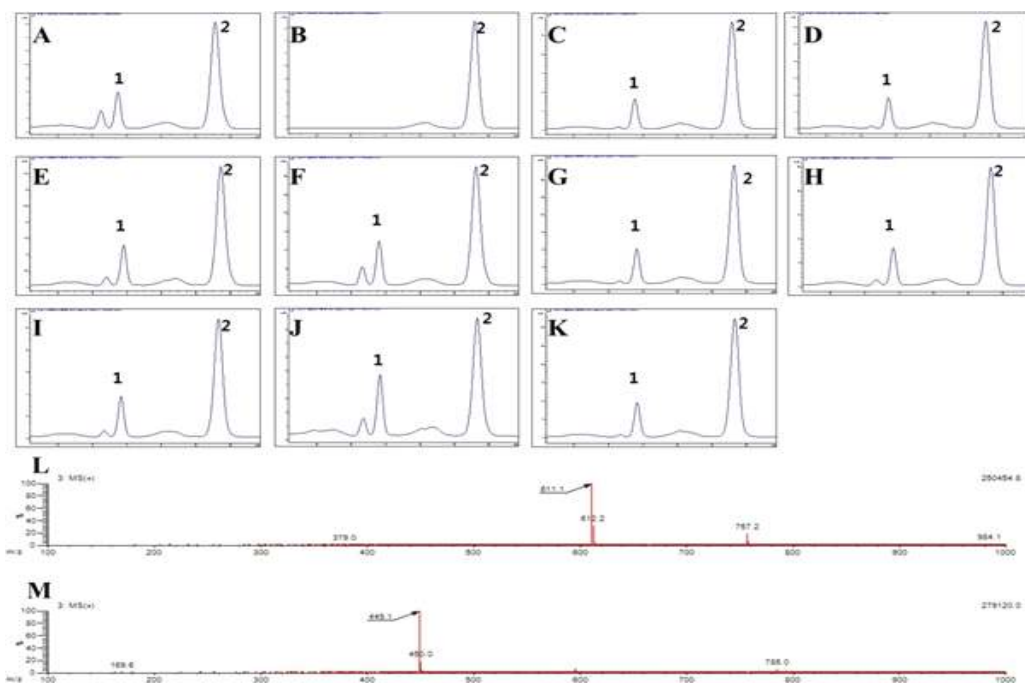


Fig. 1-20. HPLC chromatogram and mass spectrum. A: BS_PI, B: Blackberry (V3), C: BS_Hybrid, D: BSA-036, E: BSA-065, F: BSA-078, G: BSA-101, H: BSA-119, I: BSA-144, J: BSB-032, K: BSB-127. L: Mass spectrum of Cyanidin-3-O-sophoroside (M^+ m/z 611), M: Mass spectrum of Cyanidin-3-O-glucoside (M^+ m/z 449) Peak No. 1: Cyanidin-3-O-sophoroside, Peak No. 2: Cyanidin-3-O-glucoside.

Table 1-6. The hydrogen exponent, sugars content and titratable acidity of fruit for hybrid boysenberry genotypes.

계통	pH	당도(°Brix)	산도 (%)
BS_PI	3.7±0.1a	7.6±0.1b	1.8±0.2a
Blackberry (V3)	3.6±0.0a	7.4±0.2bc	1.7±0.0a
BS_Hybrid	3.8±0.2a	6.0±0.3d	1.5±0.3a
BSA-036	3.6±0.1a	6.1±0.2d	1.5±0.3a
BSA-065	3.8±0.0a	6.3±0.2d	1.6±0.3a
BSA-078	3.7±0.1a	6.2±0.2d	1.5±0.3a
BSA-101	3.6±0.1a	5.9±0.1d	1.8±0.2a
BSA-119	3.6±0.0a	8.8±0.1a	1.5±0.3a
BSA-144	3.6±0.0a	7.1±0.3c	1.6±0.3a
BSB-032	3.6±0.1a	6.1±0.2d	1.7±0.2a
BSB-127	3.5±0.1a	6.2±0.2d	1.8±0.2a

Mean separation within columns by Duncan's multiple range tests ($P \leq 0.05$, $n=3$).

Table 1-7. Mineral content of fruit in hybrid boysenberry genotypes (mg · 100 g⁻¹).

Line	Ca	Mg	K	Na	Fe	Zn
BS_PI	22.88a	18.14a	181.70b	3.03a	0.57a	0.39a
Blackberry (V3)	23.03a	16.97a	123.60g	1.45b	0.34a	0.17a
BS_Hybrid	19.47b	8.91c	111.80h	0.99b	0.27a	0.21a
BSA-036	17.45b	14.20b	144.80e	0.65b	0.37a	0.31a
BSA-065	19.68b	15.30b	145.62e	1.24b	0.29a	0.33a
BSA-078	18.69b	13.98b	145.96e	0.94b	0.33a	0.31a
BSA-101	18.66b	14.52b	136.94f	0.97b	0.60a	0.31a
BSA-119	19.42b	15.25b	148.55e	1.10b	0.25a	0.19a
BSA-144	19.74b	14.72b	164.58d	1.26b	0.29a	0.20a
BSB-032	18.47b	13.97b	174.82c	1.53b	0.29a	0.18a
BSB-127	19.60b	13.97b	193.40a	1.63b	0.32a	0.28a

Mean separation within columns by Duncan's multiple range tests ($P \leq 0.05$, $n=3$).

Table 1-8. Fatty acid composition of fruit in hybrid boysenberry genotypes.

(%)

Line	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	SFA	UFA
BS_PI	6.70a	2.32c	10.55a	67.61a	12.83b	9.02a	90.98a
Blackberry (V3)	6.74a	1.48f	10.66a	67.19a	13.94a	8.22a	91.79a
BS_Hybrid	6.75a	2.06d	10.42a	66.51a	14.27a	8.81a	91.20a
BSA-036	6.32a	3.01a	10.93a	65.00b	14.76a	9.33a	90.68a
BSA-065	6.39a	2.52a	10.79a	66.87a	13.44a	8.91a	91.10a
BSA-078	6.28a	2.85a	10.43a	66.57a	13.89a	9.12a	90.88a
BSA-101	6.56a	1.92e	11.02a	66.98a	13.54a	8.47a	91.53a
BSA-119	6.06a	1.86e	10.12a	67.52a	14.45a	7.92a	92.08a
BSA-144	6.56a	2.44b	10.99a	65.99a	14.03a	9.00a	91.01a
BSB-032	6.47a	2.60a	10.97a	66.49a	13.48a	9.07a	90.94a
BSB-127	6.67a	2.23c	10.44a	66.68a	13.99a	8.90a	91.11a

C16:0 = palmitic acid, C18:0 = stearic acid, C18:1 = oleic acid, C18:2 = linoleic acid, C18:3 = α -linolenic acid. *SFA = saturated fatty acid, **UFA = unsaturated fatty acid. Mean separation within columns by Duncan's multiple range tests ($P \leq 0.05$, $n=3$).

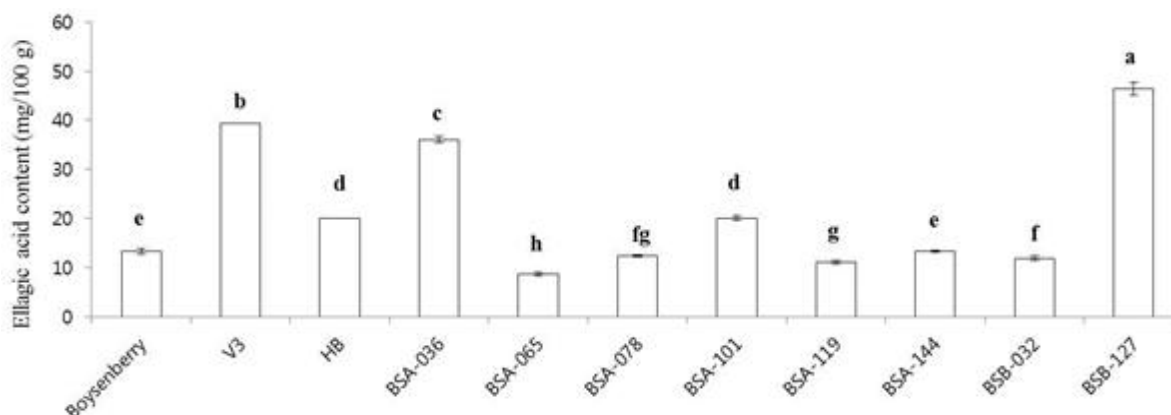


Fig. 1-21. Ellagic acid content in hybrid boysenberry genotypes. The letters above each point indicate a significant difference at the 5% level (Duncan's multiple range tests, $n=3$).

○ 수확시기별 블랙베리 기능성 성분 함량 분석

- 기존 개발된 블랙베리의 기능성 식품 제조 활용을 극대화하고자 방사선 돌연변이 5품종 (V-3, V-9, 메이플, B201, MNU32)을 대상으로 수확시기별 (미숙기, 등숙기, 완숙기) Hydrogen exponent (pH), 당도, 산도, 미네랄 (K, Ca, Fe), Total flavonoids, Total phenolic content, 안토시아닌, 에르가산 함량을 분석하였다(Table 1-9, Fig. 1-22).
- pH와 당도는 각각 pH meter (Docu-pH meter, Sartorius Inc, Germany), hand-held refractometer (Atago PR-101 α; Atago USA Inc.)를 이용하여 측정하였으며, 산도는 AOAC (1995)법(AOAC International, Rockville, MD, USA)에 준하여 실시하였다.
- 수확시기별 유망 블랙베리 품종의 pH, 당도, 산도를 측정한 결과는 Table 1-10과 같다. pH는 모든 품종에서 등숙기에 가장 낮았으며, 품종간에는 완숙기에 MNU32 계통의 pH가 타 품종에 비해 유의적으로 높았다. 당도 (soluble solids content)는 미숙기에 측정이 불가능하였으며, 등숙기와 완숙기간에는 등숙이 진행될수록 높아지는 경향이다. 완숙기 품종간 당도는 5-8 °Brix로 MNU32 계통이 완숙과의 당도가 타 품종에 비해 낮았다. 산도 (Titratable acidity %)는 모든 품종에서 등숙기에 가장 높았으며, 품종간에는 MNU32가 완숙기에 타 품종과 비교하여 높은 산도를 나타내었다.
- 미네랄 함량은 AOAC (1995)법 (AOAC International, Rockville, MD, USA)에 준하여 실시하였다(Table 11). 주요 미네랄은 모든 품종에서 칼륨, 철분, 칼슘이며, 미숙기와 등숙기에는 칼륨함량이 가장 높았고, 완숙기에는 칼륨과 칼슘의 함유량이 12 mg/100 g⁻¹ 내외로 높은 경향이였다. 칼륨의 경우 등숙기에 16 mg/100 g⁻¹ 내외로 가장 높았으며, 칼슘은 등숙기에 가장 높았다. 철분은 등숙기에서 완숙기에 사이로 3 mg/100 g⁻¹ 내외로 미숙기 보다 높았다. 이는 과육에 종자가 형성되면서 종자의 주요성분인 칼슘과 철분 함량의 증가로 판단된다.

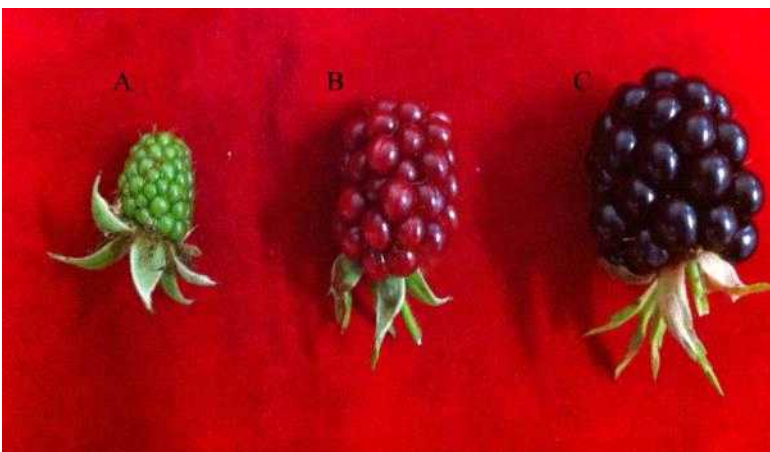


Fig. 1-22. Profile of fruit maturation stages. A: Immature stage, B: Intermediate, C: Ripened stage.

Table 1-9. Origin of blackberry lines used in this study

Lines	Origin	Mutagen type
V-3 ^{z)}	Super (New Zealand)	Somaclonal variation
Maple	V-3	Gamma-ray 80 Gy (10-1252077 ^{y)})
V-9 ^{z)}	Super (New Zealand)	Somaclonal variation
B201	V-9	Gamma-ray 80 Gy (2015-750 ^{x)})
MNU-32 ^{z)}	V-9	<i>N</i> -methyl- <i>N'</i> -nitrosourea

^{z)} Breeding line y)Korea patent number, x)Korea seed and variety service application number.

Table 1-10. Changes in hydrogen exponent, sugars content and titratable acidity of fruit development for blackberry lines

Lines	Hydrogen exponent			Soluble solids content (°Brix)			Titratable acidity
	Immature	Intermediate	Ripened	Immature	Intermediate	Ripened	
V-3	4.1a ^{z)}	3.1a	3.8a	- ^{y)}	3.4c	8.0a	1.4c
Maple	4.2a	3.0a	3.7a	-	3.2c	8.1a	1.3c
V-9	4.1a	2.9a	3.7a	-	2.9c	8.0a	1.5c
B201	4.0a	3.0a	3.7a	-	3.1c	8.0a	1.4c
MNU32	4.1a	3.1a	3.4b	-	3.2c	5.0b	1.6c

^{z)}The letters above each point indicate a significant difference at the 5% level (Duncan's multiple range tests), ^{y)}Measurement

Table 1-11. Mineral content of fruit development in blackberry lines

Lines	Potassium			Calcium			mg/100 g ⁻¹	
	Immature	Intermediate	Ripened	Immature	Intermediate	Ripened	Immature	Intermediate
V-3	14.2b ^{z)}	16.5a	12.5c	9.2b	9.4b	12.6a	1.3b	3.4c
Maple	15.0b	16.1a	12.0c	9.4b	9.4b	12.7a	1.0b	3.4c
V-9	14.6b	16.5a	11.9c	9.6b	9.6b	13.2a	1.2b	3.4c
B201	14.4b	16.4a	12.3c	9.4b	9.4b	12.5a	1.1b	3.4c
MNU32	14.5b	16.7a	12.4c	9.1b	9.4b	12.9a	1.2b	3.4c

^{z)}The letters above each point indicate a significant difference at the 5% level (Duncan's multiple range tests).

- 블랙베리 과실의 안토시아닌 추출은 과실을 수확한 후 동결 건조하여 시료 1 g에 메탄올/염산(99:1, v/v) 5 mL을 용매로 이용, 4°C에서 48시간 동안 추출한 후 추출액 1.5 mL를 취하여 0.45 μ m membrane filter 필터로 여과하고 UPLC-MS 분석을 하였다.
- 추출액의 UPLC-MS를 이용한 기기분석 조건은 Table 1-12에 요약되어 있다. 컬럼은 HSS T3 column (2.1 \times 100 mm, 1.8 μ m, Waters Inc., USA)을 ultraviolet (UV)-detector (SPD-M30A, Shimadzu), auto sample injector, column oven을 가진 UPLC system (CBM-20A, Shimadzu Co. Ltd., Japan)에 장착하여 사용하였다. 이동상 A에는 0.1%, v/v, trifluoroacetic acid가 첨가된 distilled deionized water를 이동상 B에는 0.1%, v/v, trifluoroacetic acid가 첨가된 acetonitrile을 이용하였다. 분석시간은 0-1분까지 이동상 B를 10%, 1-6분까지 이동상 B를 10-20%, 6-8분까지 이동상 B를 20-95%, 8-10분까지 이동상 B를 95-5%로 유지하면서 유속 0.5 ml/min으로 실시하였다. UV는 520 nm 파장에서 측정하였고, 시료주입량은 10 μ l로 하였다.
- 수확시기별 안토시아닌 함량은 Table 1-13과 같다. 미숙기에는 안토시아닌이 검출되지 않았으며, 등숙기와 완숙기에 각각 4가지 (cyanidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-xyloside, cyanidin-3-O-malonylglucoside, cyanidin-3-O-dioxalylglucoside) 안토시아닌이 검출되었다(Fig. 1-5, Fig. 1-6).
- 등숙기에는 cyanidin-3-O-dioxalylglucoside 함량이 모든 품종에서 가장 높았으며, cyanidin-3-O-glucoside > cyanidin-3-O-xyloside > cyanidin-3-O-malonylglucoside 순으로 높은 경향이였다. 품종간의 총안토시아닌 (ACN) 함량은 V-3, Mayple, B201 계통이 V-9과 MNU32 계통보다 높은 경향이였다.
- 완숙기에는 Cyanidin-3-O-glucoside 함량이 블랙베리의 주요 안토시아닌 (70% 이상)이며, 품종간에는 B201 (335.6 mg/100 g)이 가장 높고, Maple (320.2 mg/100 g) > V-3 (191.0 mg/100 g) \geq V-9 (187.2 mg/100 g) > MNU32 (92.3 mg/100 g)순이다.
- 완숙기 총안토시아닌(ACN) 함량은 191.6-558.2 mg/100 g으로 5 계통의 평균은 385.8 mg/100 g이었다. Maple과 B201 계통은 총안토시아닌 함량이 타 품종에 비해 유의성 있게 높아 고기능성 소재로 개발이 기대된다.
- 수확시기별 총페놀 함량 및 총플라보노이드 함량은 각각 Zhishen et al. (1999)과 Slinkard and Singleton (1977)의 방법으로 수행하였으며, 결과는 Fig. 1-23과 같다.
- 수확시기별 블랙베리 유망 계통의 총페놀함량(Fig. 1-23A)은 완숙기에 가장 높았으며, 완숙기에 계통간 차이는 Maple, V-9, B201 계통이 V-3와 MNU32 계통보다 높았다. 총플라보노이드 함량을 측정한 결과 (Fig. 1-23-B), 총페놀 함량과 동일한 경향으로 완숙기에 가장 높은 함량을 나타내었으며, 완숙기에 V-3, Maple, V-9, B201 계통의 총플라보노이드 함량이 MNU32보다 높게 나타났다.

Table 1-12. Analytical conditions of UPLC for analysis of anthocyanin contents

Parameters	Conditions		
Column	HSS T3 column (2.1 × 100 mm, 1.8 μm, Waters Inc., USA)		
Flow rate	0.5 ml/min		
Injection volume	10 μl		
Run time	10 min		
Gradient	Time (min)	% A ^{z)}	% B ^{y)}
	0-1	90	10
	1-6	90-80	10-20
	6-8	80-5	20-95
	8-10	5-95	95-5
UV detection	520 nm		

^{z)} 0.1%, v/v, trifluoroacetic acid with distilled deionized water, ^{y)}0.1%, v/v, trifluoroacetic acid with acetonitrile.

Table 13. Changes in anthocyanin content of fruit development for blackberry lines

Lines	Cy-3-Glu ^{z)}		Cy-3-Xyl ^{y)}		Cy-3-Mglu ^{x)}		Cy-3-Dioxglu ^{w)}		ACN ^{v)}	
	I ^{u)}	R ^{t)}	I	R	I	R	I	R	I	R
V-3	18.7d ^{s)}	191b	3.3d	29.3b	3.5c	10.0b	25.6d	36.0b	57.5d	314.0b
Mayple	17.7d	320a	3.2d	44.8a	3.3c	20.2a	24.2d	101.6a	55.2d	537.7a
V-9	7.4e	187b	2.0e	30.0b	1.7d	9.9b	14.2e	36.7b	30.7e	327.5b
B201	18.2d	335.6a	3.2d	47.1a	3.4c	20.9a	24.8d	107.5a	58.7d	558.2a
MNU32	7.5e	92.3c	2.0e	12.1c	1.8d	5.7b	14.6e	16.9c	31.5e	191.6c

^{z)}Cy3glu: cyanidin-3-O-glucoside, ^{y)}Cy3xyl: cyanidin-3-O-xyloside, ^{x)}Cy3Mglu: cyanidin-3-O-malonylglucoside, ^{w)}Cy3Dioxglu: cyanidin-3-O-dioxalylglucoside, ^{v)}ACN: Individual compounds presented as percentage of total peak area monitored at 520 nm. ^{u)}Intermediate stage, ^{t)}Ripened stage, ^{s)}The letters above each point indicate a significant difference at the 5% level (Duncan's multiple range tests).

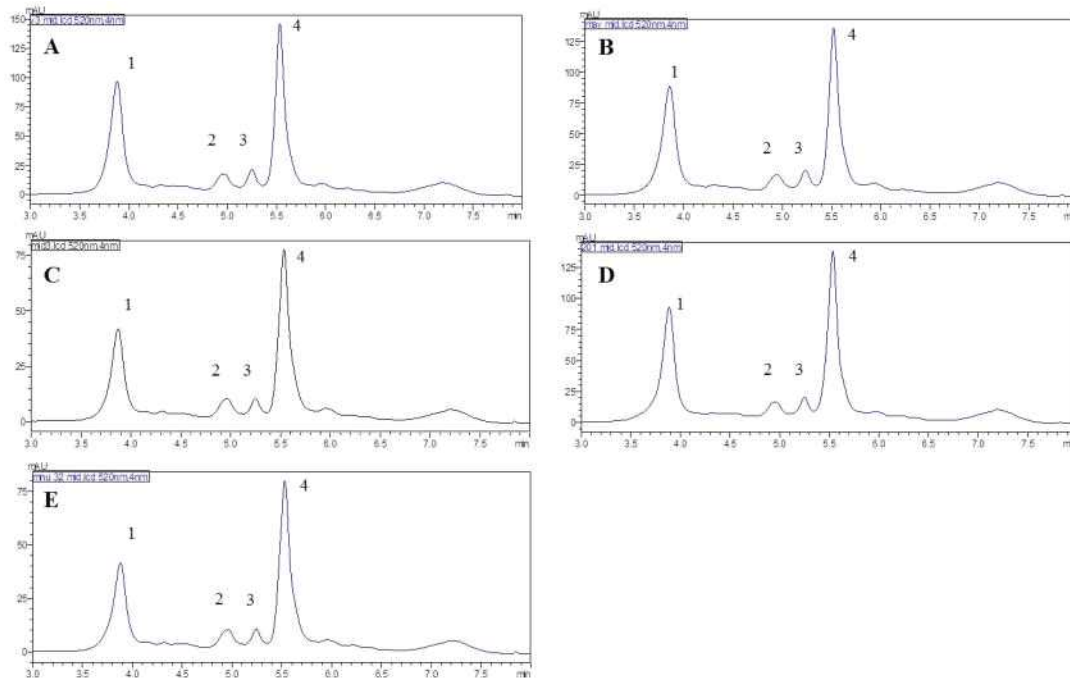


Fig. 1-23. UPLC profiles of anthocyanin content in novel blackberry cultivars at the intermediate stage. A: V-3, B: Maple, C: V-9, D: B201, E: MNU32. Peak 1: Cyanidin-3-O-glucoside, Peak 2: Cyanidin-3-O-xyloside, Peak 3: Cyanidin-3-O-malonylglucoside, Peak 4: Cyanidin-3-O-dioxalylglucoside.

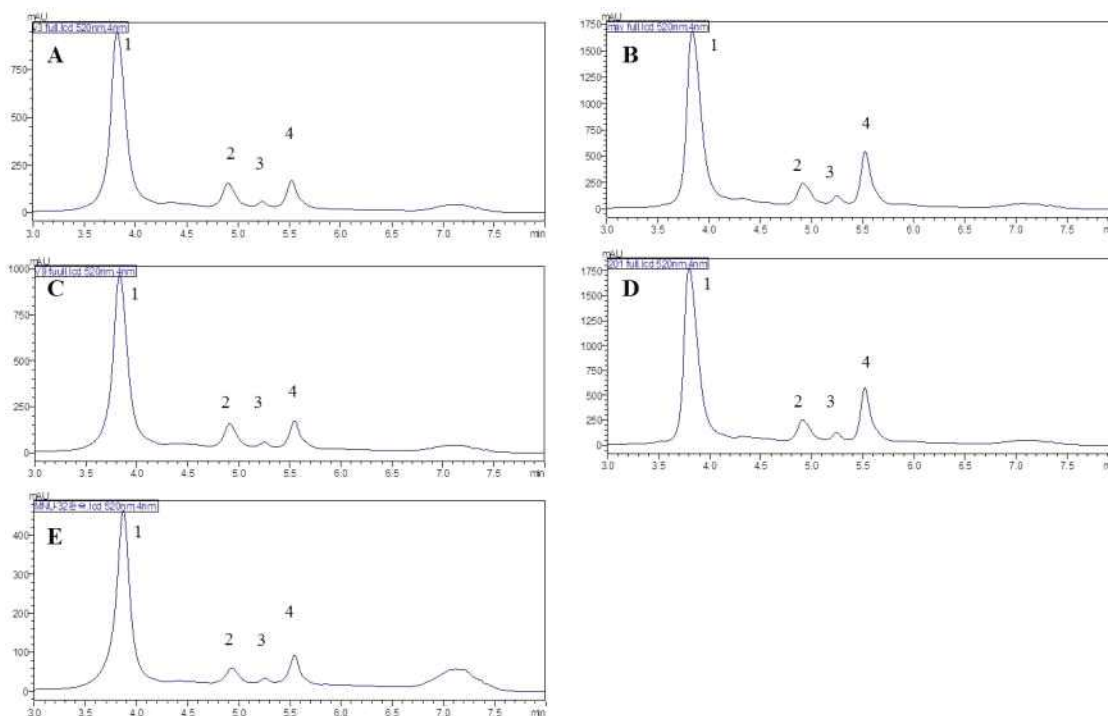


Fig. 1-24. UPLC profiles of anthocyanin content in novel blackberry cultivars at the ripened stage. A: V-3, B: Maple, C: V-9, D: B201, E: MNU32. Peak 1: Cyanidin-3-O-glucoside, Peak 2: Cyanidin-3-O-xyloside, Peak 3: Cyanidin-3-O-malonylglucoside, Peak 4: Cyanidin-3-O-dioxalylglucoside.

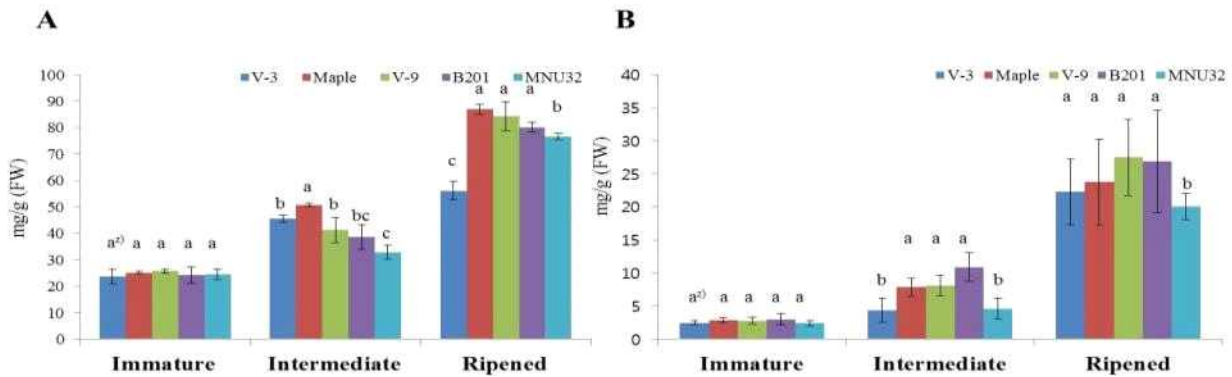


Fig. 1-25. Total phenolic content and total flavonoid content in novel blackberry cultivars. A: Total phenolic content (mg/g), B: Total flavonoid content (mg/g). ²⁾The letters above each point indicate a significant difference at the 5% level (Duncan's multiple range tests).

- 복분자의 주요 기능성 성분인 에르가산(Ellagic acid) 함량을 유망 블랙베리 계통의 수확 시기별 함량의 변화를 분석 하였다 (Table 1-15). 수확시기별로 과실을 수확한 후 동결 건조하여 water and methanol (37.5:63.5); 10 mL of 1.2 mol/L HCl을 용매로 이용, 80°C 에서 16시간 동안 추출 하였다. 추출액을 0.45 μ m membrane filter 필터로 여과하고 UPLC-MS 분석을 하였다.
- 추출액의 UPLC-MS를 이용한 기기분석 조건은 Table 1-14에 요약되어 있다. 분석에 사용된 컬럼은 HSS T3 column (2.1 \times 100 mm, 1.8 μ m, Waters Inc., USA)를 사용하였고, ultraviolet (UV)-detector (SPD-M30A, Shimadzu), auto sample injector, column oven을 가진 UPLC system (CBM-20A, Shimadzu Co. Ltd., Japan)을 사용하였다.
- 수확시기별 에르가산을 분석한 결과(Table 1-15, Fig. 1-26, Fig. 1-27), 모든 품종에서 과실이 등숙될수록 에르가산의 함량은 감소하였다. 계통간 차이로 미숙기에서는 차이가 없으며, 등숙기와 완숙기에서는 MNU32 계통의 함량이 타 계통과 비교하여 높은 경향이 있었다.

Table 1-14. Analytical conditions of UPLC for analysis of eallagic acid

Parameters	Conditions		
Column	HSS T3 column (2.1 × 100 mm, 1.8 μm, Waters Inc., USA)		
Flow rate	0.5 ml/min		
Injection volume	10 μl		
Run time	27 min		
Gradient	Time (min)	% A ^{z)}	% B ^{y)}
	0-3	90-80	10-20
	3-6	80-70	20-30
	6-9	70-50	30-50
	9-15	50-40	50-60
	15-18	40-30	60-70
	18-21	30-50	70-50
	21-24	50-70	50-30
	24-27	70-100	30-0
UV detection	254 nm		

^{z)} 0.1%, v/v, trifluoroacetic acid with distilled deionized water, ^{y)}0.1%, v/v, trifluoroacetic acid with acetonitrile.

Table 15. Ellagic acid content in blackberry lines at different ripening stage

Lines	Ellagic acid (mg/100g)		
	Immature	Intermediate	Ripened
V-3	80.1a ^{z)}	50.0c	47.0c
Maple	81.5a	40.1d	35.2e
V-9	80.6a	51.5c	28.8f
B201	78.6a	54.3c	42.5d
MNU32	82.3a	65.1b	41.8d

^{z)}The letters above each point indicate a significant difference at the 5% level (Duncan's multiple range tests).

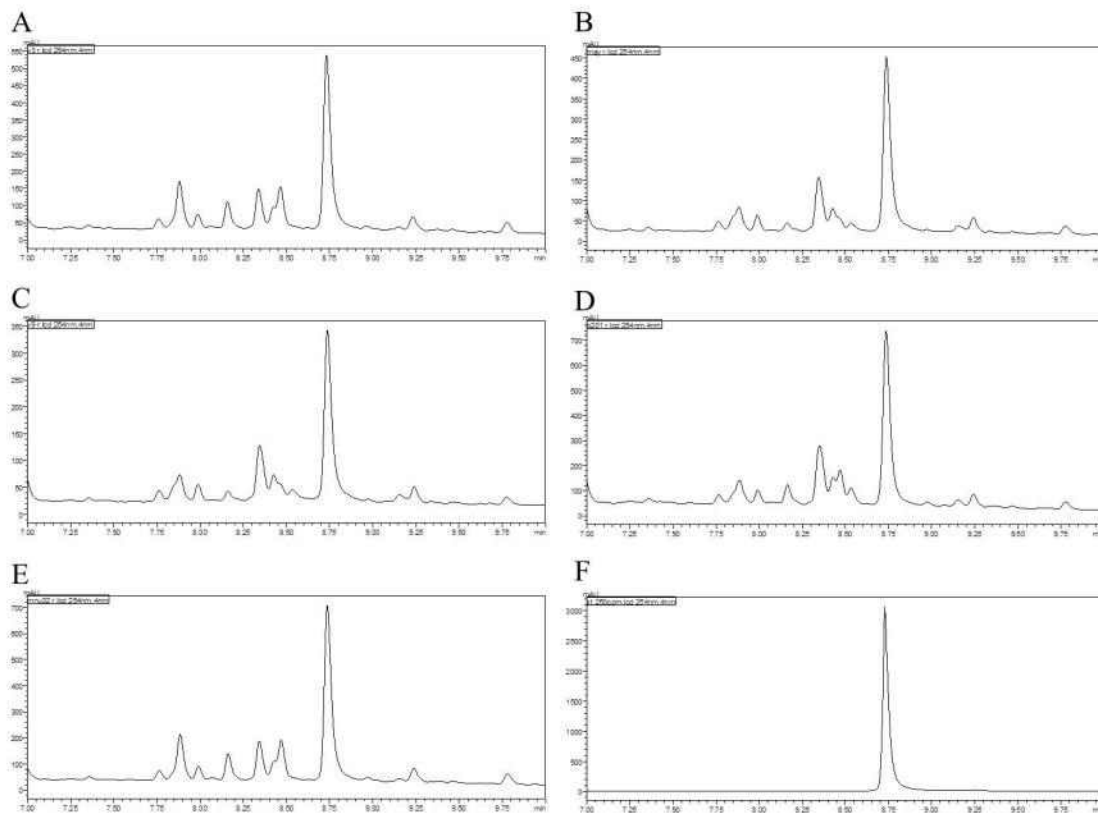


Fig. 1-26. HPLC profiles of ellagic acid content in novel blackberry lines at the ripened stage. A: V-3, B: Maple, C: V-9, D: B201, E: MNU32, F: Standard (100 ppm).

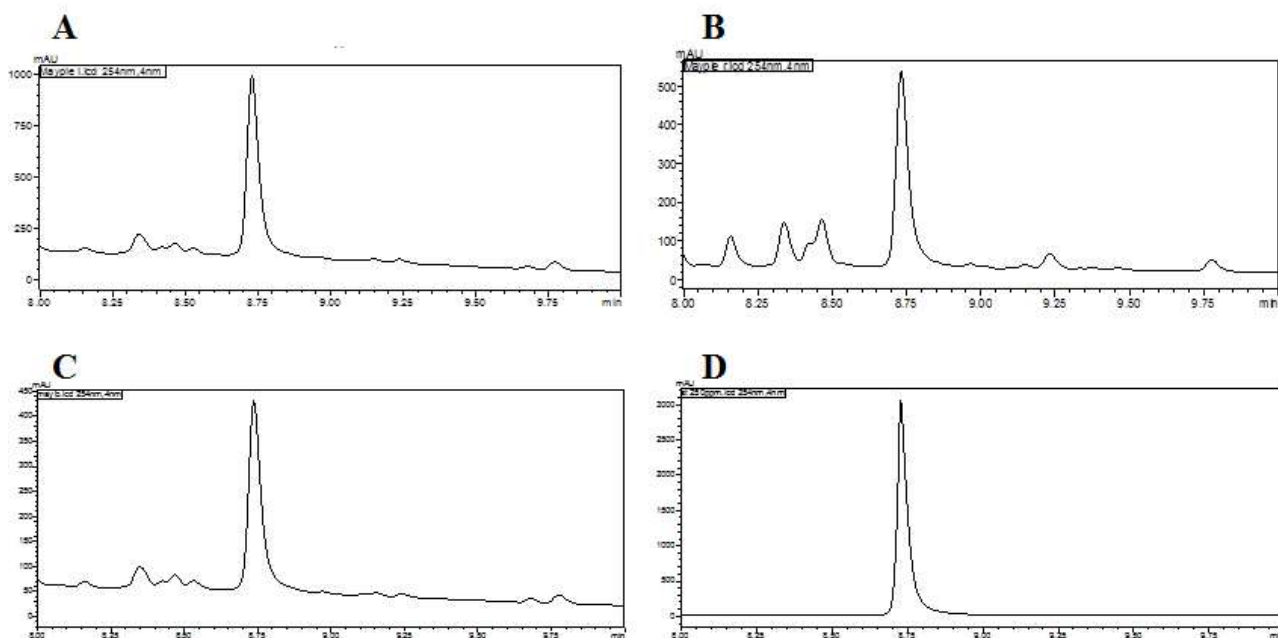


Fig. 1-27. HPLC profiles of ellagic acid content in Mayple at the different harvest stage. A: Immature stage, B: Intermediate stage, C: Ripened stage, D: Standard (100 ppm).

- 항산화 활성을 측정한 결과(Fig. 28), 미숙기와 등숙기에는 항산화 활성의 차이가 없으며, 완숙기에 항산화 활성이 급격히 증가하였다. 계통간 항산화 활성의 차이는 메이플과 B201 계통이 완숙과에서 다른 계통과 비교하여 높은 활성을 나타내었다.

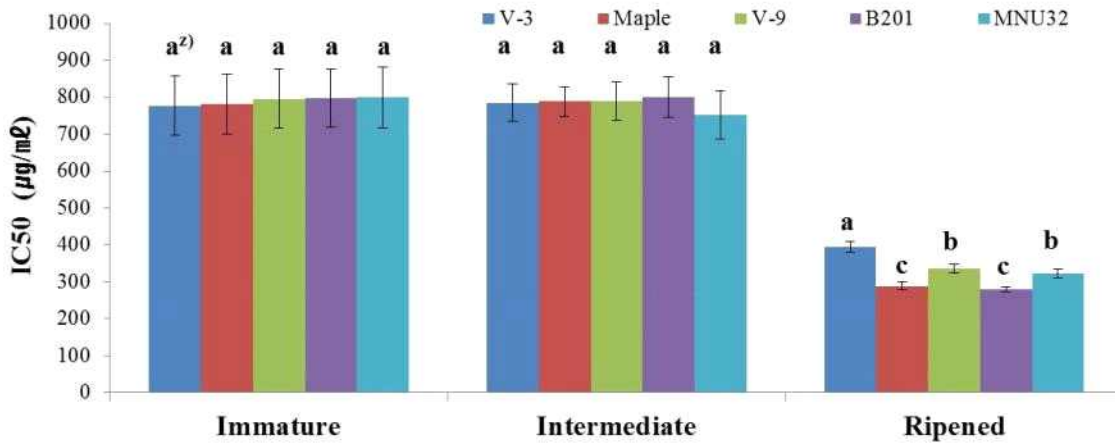


Fig. 1-28. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities of novel blackberry lines at different stages of development. ²⁾The letters above each point indicate a significant difference at the 5% level (Duncan's multiple range tests).

- 항산화 활성과 성분간에 상관분석을 실시한 결과(Table 16), 총페놀함량, 총플라보노이드 함량과 항산화 활성간에 $p \leq 0.01$ 수준으로 정의 상관 관계를 나타내었고, Cyanidin-3-O-malonylglucoside, Cyanidin-3-O-dioxyalylglucoside, Total anthocyanin 함량과 항산화 활성간에는 $p \leq 0.05$ 수준으로 정의 상관관계가 나타났다.

Table 1-16. Correlation analysis between chemical content and antioxidant activity in blackberry fruit

Trait	<i>p</i> -value ^{z)}	R ²
Total phenolic content	**	0.716
Total flavonoid content	**	0.647
Cyanidin-3-O-malonylglucoside	*	0.552
Cyanidin-3-O-dioxyalylglucoside	*	0.562
Total anthocyanin (ACNy)	*	0.530

^{z)}: $p \leq 0.05$, ^{**)}: $p \leq 0.01$, ^{y)}ACN: Individual compounds presented as percentage of total peak area monitored at 520 nm.

- 블랙베리 과실(종자포함)의 지방산 함량을 분석한 결과(Table 17, Table 18, Fig. 29), 보이젠베리와 동일한 5가지 지방산이 주요 지방산으로 검출되었다. 특히 블랙베리 과육에는 리놀레산(linoleic acid)이 전체 지방산 중 65% 내외로 함유되어 있으며, 리놀렌산(Linolenic acid)가 15% 내외로 함유되어 있다. 이러한 불포화 지방산은 고혈압, 동맥경화 예방, 항산화 등 우리 인체에 유용한 성분이다.

Table 1-17. Components detected in ethanol extract of fruit of blackberry

No.	RT*	Name of the compound	Molecular formula	MW
1	14.4	Hexadecanoic acid (Palmitic acid 16:0)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256
2	16.3	Octadecanoic acid (Stearic acid 18:0)	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	284
3	17.0	cis-9-Octadecenoic acid (Oleic acid 18:1-cis n9)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282
4	18.2	cis-9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester (Linoleic acid 18:2 n6)	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280
5	19.6	9,12,15-Octadecatrienoic acid (alpha-linolenic acid 18:3 n3)	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278

Table 1-18. Fatty acid composition of different blackberry cultivars

	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	(%)
V-3	6.9	1.1	10.8	66.2	15.0	
Maple	7.1	2.1	10.9	63.9	16.1	
V-9	6.2	2.1	11.0	63.9	16.8	
B201	7.7	1.5	10.3	65.7	14.8	
MNU32	6.2	0.7	11.2	66.6	15.3	

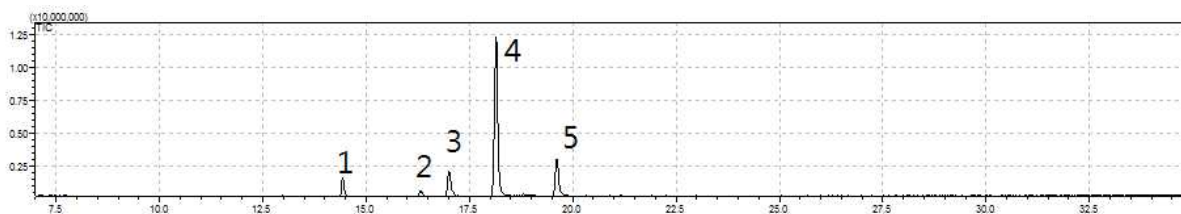


Fig. 1-29. GC-MS profiles of fatty acid in blackberry cultivar. 1: Palmitic acid, 2: Stearic acid, 3: Oleic acid, 4: Linoleic acid, 5: alpha-Linolenic acid.

(나) 석곡 육성계통의 기능성 성분 분석 지원

- 석곡(*Dendrobium*)은 난초과(*Orchidaceae*)로 오래된 나무의 줄기, 숲 속의 바위 또는 계곡 절벽에 붙어 자라는 상록성 여러해살이풀이다. 세계적으로 우리나라를 비롯하여 일본, 중국 남부, 대만, 부탄, 인도 북동부, 미얀마, 네팔, 베트남 북부 등지에 분포하며, 국내 자생지는 제주도, 전남, 등지에서 확인되고 멸종위기 식물로 관리되고 있다.
- 특히 석곡은 관상용뿐만 아니라 개화기 이전의 지상부 전체를 한약재 석곡(石斛; *Dendrobii Herba*)으로 위장기능 강화, 허열 치료 등에 이용하며, 국내에서 석곡으로 유통되는 약재는 전량 해외에서 수입한다. 이에 제 3세부과제(바보난농원)에서 육성한 계통의 약용 활용 가치를 확인하여 신규 약용유전자원을 육성하고자 석곡의 대표적 기능성 성분(플라보노이드, 페놀릭 성분 등)을 분석하였다.
- 총페놀 및 총플라보노이드 함량 분석
 - 돌연변이 육종기술을 적용하여 육성한 철피석곡(*D. candidum*) 3계통, 환초석곡(*D. loddigesii*) 2계통, 석곡(*D. moniliforme*) 2 계통을 포함한 총 7 계통(Table 19)의 잎을 물과 에탄올로 추출하여 총페놀 및 총플라보노이드 함량을 분석한 결과 (Fig. 1-30), 환초석곡이 다른 종과 비교하여 총페놀 및 총플라보노이드 함량이 높게 나타났다. 추출 용매별로는 극성용매인 물 추출물이 비극성 추출물인 에탄올 보다 높은 함량을 나타내었다.
 - 돌연변이 7계통의 줄기와 국내에서 주로 유통되는 인도네시아 수입 석곡 한약재 2종을 대상으로 총페놀 및 총플라보노이드 함량을 분석한 결과 (Fig. 1-31), 잎과 유사한 경향으로 환초석곡이 다른 종에 비해 높은 함량을 나타내었다.
- 석곡돌연변이 계통의 UPLC-MS 분석
 - 석곡 돌연변이 7계통의 유용성분 조성의 차이를 구명하고자 UPLC-MS 분석을 실시한 결과(Table 1-20, Fig. 1-32), 총 28개 성분이 검출되었으며, 종간 성분 조성의 차이는 크게 나타났고, 반면에 동일 종내 계통간에는 성분 조성의 차이가 일부 미량성분에서만 검출되었다.
 - 철피석곡(*D. candidum*)의 주요 성분은 Rutin(611 m/z), Apigenin-6,8-di-c-b- D-glucoside (595 m/z), Diosmetin-6,8-di-C-glucoside(625 m/z), Neoeriocitrin (597 m/z)이 주요 성분으로 확인되었다.
 - 환초석곡(*D. loddigesii*)의 주요성분은 Apigenin-6,8-di-c-b-D-glucoside(595 m/z), Unknown(347 m/z), Quercetin-acetylhexoside(507 m/z) 성분이다.
 - 석곡(*D. moniliforme*)의 주요 성분은 Rutin(611 m/z), Narirutin(581 m/z), Naringin(581 m/z), Didymnin(595 m/z)이었다.

Table 1-19. Origin of blackberry lines used in this study

No.	Name	Section	Origin	Treatment	Mutated Characteristics
1	Cheolpi1	<i>D. candidum</i>	China (Breeding line)	Somaclonal variation	Green-purple leaf and stem
2	Cheolpi2	<i>D. candidum</i>	China (Breeding line)	Somaclonal variation	-
3	Cheolpi3	<i>D. candidum</i>	China (Breeding line)	Somaclonal variation	Green flower
4	Hwancho1	<i>D. loddigesii</i>	China (Breeding line)	-	-
5	Hwancho2	<i>D. loddigesii</i>	Hwancho1(Breeding line)	Gamma-ray 50 Gy	Leaf edge lined
6	Jindo	<i>D. moniliforme</i>	Korea (Breeding line)	Somaclonal variation	Dwarf
7	Uju	<i>D. moniliforme</i>	Jindo (Breeding line)	Aerospace mutagenesis	Dwarf, Leaf edge
8	Miryung	-	Indonesia	Imported medicine material	
9	Bibongcho	-	Indonesia	Imported medicine material	

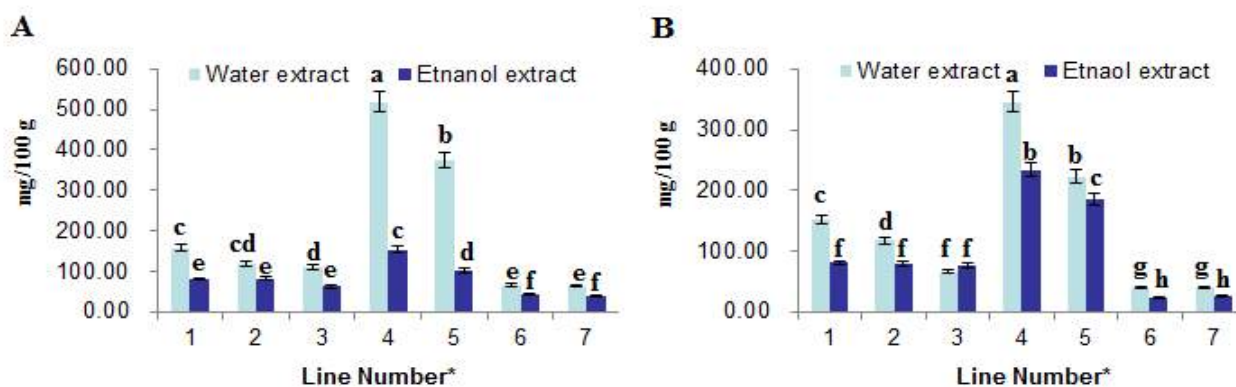


Fig. 1-30. Total phenolic content and total flavonoid content in leaves of *Dendrobium* mutant lines. A: Total phenolic content (mg/g), B: Total flavonoid content (mg/g). ^{z)}The letters above each point indicate a significant difference at the 5% level (Duncan's multiple range tests). *Line number listed in Table 1-19.

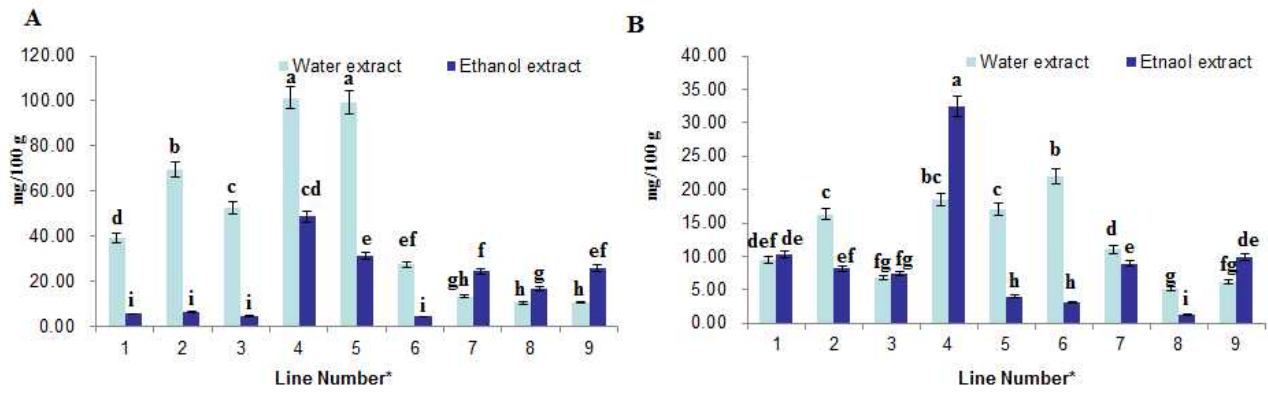


Fig. 1-31. Total phenolic content and total flavonoid content in stem of *Dendrobium* mutant lines. A: Total phenolic content (mg/g), B: Total flavonoid content (mg/g). ²⁾The letters above each point indicate a significant difference at the 5% level (Duncan's multiple range tests). Line number listed in Table 1-19.

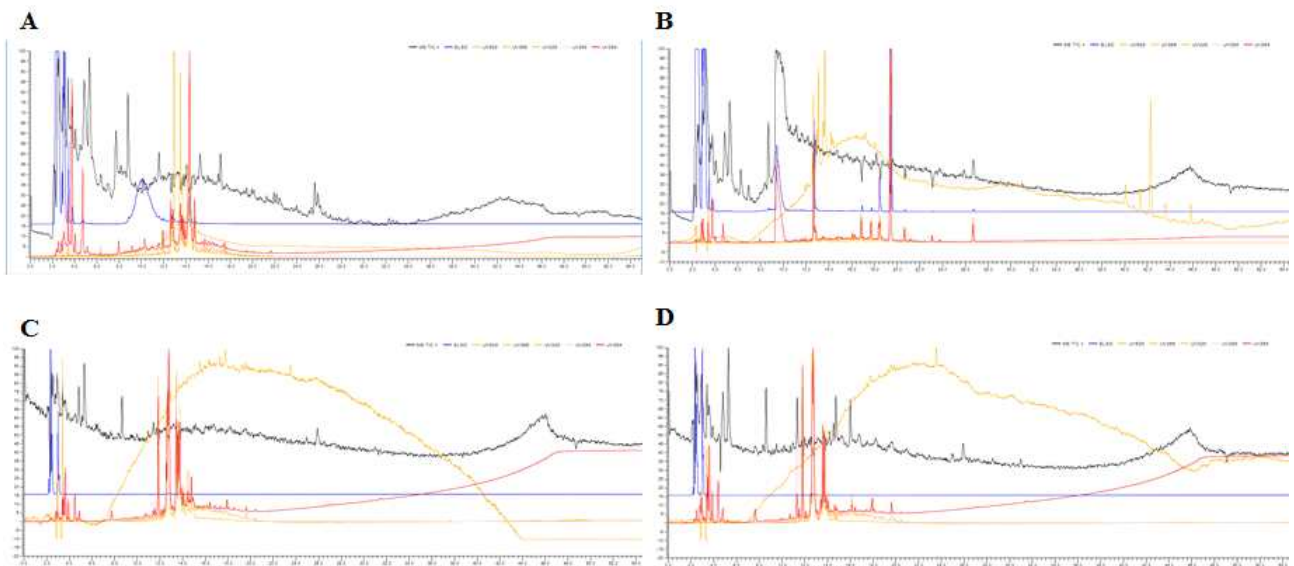


Fig. 1-32. UPLC-MS profiles of *Dendrobium* mutant. A: *Dendrobium candidum*, B: *Dendrobium loddigesii*, C: *Dendrobium moniliforme* (Jindo), D: *Dendrobium moniliforme* (Uju)

Table 1-20. Functional compound composition of Dendrobium mutant lines by UPLC-MS

No.	RT* (min)	[M-H] ⁺ (m/z)	Tentative identification	Line number**						
				1	2	3	4	5	6	7
1	3.14	487	7-[(4-O- -d-glucopyranosyl-d-glucopyranosyl)ox yl]	+	+	+	-	-	-	-
2	3.76	268	Adenosine	+	+	+	+	+	+	+
3	3.80	268	Adenosine	+	+	+	-	-	-	-
4	4.75	294	Fructose-isoleucine or its isomers	+	+	+	-	+	-	-
5	4.86	294	Fructose-isoleucine or its isomers	+	+	+	+	+	-	-
6	4.88	577	Unknown	-	-	-	-	-	+	+
7	5.31	294	Fructose-isoleucine or its isomers	+	+	+	+	+	-	-
8	11.33	611	Hesperidin	-	-	-	-	-	-	+
9	11.95	611	Rutin	+	+	+	-	-	+	+
10	12.42	595	Apigenin-6,8-di-c-b-D-glucoside	-	-	-	-	+	-	-
11	12.67	595	Apigenin-6,8-di-c-b-D-glucoside or its isomers	+	+	+	+	+	+	-
12	12.70	581	Narirutin	-	-	-	-	-	+	+
13	12.79	581	Naringin	-	-	-	-	-	+	+
14	12.95	625	Diosmetin 6,8-di-C-glucoside	+	+	+	-	-	-	-
15	13.13	755	Brutieridin	-	+	+	-	-	-	-
16	13.44	565	Apigenin-6-c-b-D-xyloside-8-c-b-D-g lucoside	-	-	-	-	-	+	+
17	13.52	565	Isoschaoside	+	+	+	-	-	-	-
18	13.60	595	Didymin	-	-	-	-	-	+	+
19	13.67	565	Schaoside	+	-	-	+	-	-	-
20	13.75	595	Didymin or its isomers	+	+	+	-	-	+	+
21	13.93	595	Poncirin	+	+	+	-	-	-	-
22	14.14	579	Vitexin-2"-o-rhamnoside	+	+	-	-	-	-	-
23	14.35	579	Vitexin-2"-o-rhamnoside or its isomers	+	+	-	-	-	-	-
24	14.42	597	Neoeriocitrin	+	+	+	-	-	-	-
25	14.75	609	Diosmetin 7-O-neohesperidoside	+	+	+	-	-	-	+
26	16.60	593	Unknown	+	+	+	-	-	-	-
27	18.41	347	Unknown	-	-	-	+	+	-	-
28	19.40	507	Quercetin-acetylhexoside	-	-	-	+	+	-	-

*RT: Retention time, **Line number listed in Table 19.

(3) 방사선 육종 산업 저변 확대를 위한 산·학·연 방사선조사 기술지원

○ 산·학·연 방사선조사 및 기술 자문

- 본 과제에서는 방사선육종 저변 확대와 상업 품종 개발 지원을 위해 국공립 육종 연구 기관 및 민간 종묘업체를 대상으로 방사선육종 기술 자문 및 방사선 조사지원을 수행하였다. 각 신청자 별 시료 준비, 적정 조사 선량 결정, 예비실험 및 돌연변이 집단 육성 과정 등에 대해 자문하였으며 총 176 건(1차년도 41건, 2차년도 74건, 3차년도 61건)의 방사선 조사를 지원하거나 접수하였다. 특히 본 연구팀에서 매년 운영하는 돌연변이 육종기술 전문가 과정 수료생들을 중심으로 자발적으로 조직된 민간육종가생산자 연합회(현재 115명 활동)에서는 각종 민간 종자업체 소속 육종가 및 육종연구 관련 국가기관 연구자들이 방사선 돌연변이 육종 관련 정보를 공유하고 산업적 응용을 시도하고 있는데 본 연구팀에서는 1년 2차례의 교육과정과 연 4차례의 조사 지원을 통해 이들의 활동을 지원하고 있다.

표 1-21. 1차년도 방사선 조사 및 기술 자문 내역

방사선 조사 및 기술자문 의뢰일	신청자(기관)	방사선 육종 대상 작물
2015. 8. 17.	충남대학교 농학과 박상언 교수	메밀
2015. 8. 17.	(주)바이오플러스	황금복분자
2015. 8. 24.	충북농업기술원	마늘
2015. 8. 24.	동산농원	국화
2015. 8. 24.	풀꽃나라	백합
2015. 8. 24.	강산난원	호접란
2015. 8. 24.	개인육종가(박순애)	알스트로메리아,복주머니,옥살리스
2015. 8. 24.	함평군농업기술센터	국화
2015. 8. 24.	곡성군농업기술센터	토란
2015. 8. 24.	(사)한국생약협회약용작물팀	삼주
2015. 8. 24.	강원도농업기술연구원	콩
2015. 8. 24.	해남군농업기술센터	동백
2015. 8. 26.	민간육종가협의회	군자란
2015. 9. 16.	바보난농원	심비디움
2015. 9. 20.	거기난원	다육식물
2015. 9. 9.	선운동백연구회	난초
2015. 10. 22.	겨울꽃	솔나리,용담,노랑당나리
2015. 10. 22.	부산 스타다육	다육식물,선인장
2015. 10. 22.	개인육종가(박희성)	동백
2015. 10. 22.	마이크로플랜츠	씨감자
2015. 10. 22.	호자원 다육식물	엽자
2015. 10. 22.	(주)솔원	금송,방울철쭉,칠자화,미국단풍
2015. 10. 22.	형제다육농원	아케베리아
2015. 11. 23	바보난농원	난
2016. 1. 28.	개인육종가(윤득수)	방울토마토, 수박, 멜론 등
2016. 1. 28.	개인육종가(류상걸)	벼
2016. 2. 15.	(주)마이크로플랜츠	씨감자, 민들레, 감
2016. 2. 22.	스타다육	에케베리아, 아가보이테스
2016. 3. 21.	(주)바이오플러스	석곡, 등나무, 돼지감자
2016. 3. 22.	개인육종가(하영석)	난초
2016. 3. 24.	개인육종가(윤태영)	난

2016. 3. 24.	뜰안의 행복	붉은 인동
2016. 3. 24.	최고자연	이끼류, 붓꽃, 구절초 등
2016. 3. 24.	개인육종가(정해용)	자란, 오렌지, 구아바 등
2016. 3. 25.	수림농장	동백, 유자
2016. 3. 25.	개인육종가(윤득수)	감자
2016. 6. 22.	국립수목원	비비추
2016. 6. 23.	개인육종가(윤득수)	감자
2016. 6. 23.	뜰안의 행복	인동
2016. 6. 23.	바보난농원	난, 석곡
2016. 6. 23.	풀꽃나라	백합

표 1-22. 2차년도 방사선 조사 및 기술 자문 내역

방사선 조사 및 기술자문 의뢰일	신청자(기관)	방사선 육종 대상 작물
2016. 8. 30.	우리종묘	배추
2016. 8. 30.	개인육종가(우태호)	옥수수
2016. 8. 30.	개인육종가(이종심)	잔대
2016. 8. 30.	개인육종가(한경표)	개발선인장, 금진수
2016. 8. 30.	개인육종가(변동원)	다육
2016. 8. 30.	경남농업기술원	장미
2016. 8. 30.	세종대학교(권만정)	상추, 무
2016. 8. 30.	세종대학교(홍소연)	무
2016. 8. 30.	세종대학교(이선미)	무
2016. 8. 30.	우리꽃	능소화
2016. 8. 30.	햇빛존다육	다육
2016. 8. 30.	공주대학교(안갑선)	인동, 구절초, 아로니아, 쫄레, 블랙크린트, 홍여
2016. 8. 30.	공주대학교(홍금선)	클래마티스, 다육, 붉은인동, 범부채, 매발톱
2016. 8. 30.	서김제 다육농장	다육식물
2016. 8. 30.	서하원예육종연구소	스토케시아, 집시꽃
2016. 8. 31.	전남대학교(황혜선)	수국
2016. 8. 31.	부덕농원	다육식물
2016. 8. 31.	백운농원	아로니아, 인삼
2016. 8. 31.	거기난원	난
2016. 8. 31.	바보난농원	동양란
2016. 9. 1.	개인육종가(이용대)	해바라기
2016. 9. 8.	홉앤호프(주)	홉
2016. 10. 10.	순천대학교(배창후)	완두콩
2016. 10. 11.	개인육종가(이하범)	천일홍
2016. 10. 14.	서김제 다육농장	다육식물
2016. 10. 12.	경상대학교(심상인)	퀴노아
2016.10.14.	햇빛존 다육농장	방울봉낭, 다육식물
2016. 10. 27.	세종대학교(홍소연)	무
2016. 11. 8.	국립농업과학원	밀
2016. 11. 8.	호자원다육식물	방울복랑, 라울, 문기디리스, 아메치스, 홍상, 누브루, 부다템틀, 홍미임
2016.11.10.	왕관농원	개발선인장
2016. 11. 10.	풀꽃나라	다육식물
2016. 11. 10.	호남식물병원	복숭아
2016. 11. 11.	마고플랜즈	감자, 먹시감, 민들레, 쌍복감
2016. 11. 11.	개인육종가(이태규)	동백
2016. 11. 23.	바보난농원	동양란, 철피석곡
2016. 12. 22.	세종대학교(홍소연)	무
2017. 1. 18.	국립농업과학원	밀
2017. 2. 15.	나무이야기 식물원	동백나무
2017. 2. 16.	풀꽃나라	다육식물
2017. 2. 16.	호자원다육식물	다육식물
2017. 2. 16.	(주)마고플랜즈	감자, 민들레, 으름
2017. 2. 21.	한국생명공학연구원	알팔파
2017. 2. 22.	국립농업과학원	밀
2017. 2. 22.	개인육종가(하영석)	난초
2017. 2. 22.	(주)솔원	헤오라비란, 무궁화, 꿀장미, 자원자두, 방울철쭉, 보리수
2017. 3. 8.	경기농장	알스트로메리아
2017. 3. 9.	나무이야기 식물원	동백나무

2017. 3. 9.	(주)솔원	노랑만병초, 울릉도만병초, 해오라비란
2017. 3. 10.	수립농장	동백, 유자
2017. 3. 10.	(주)마고플랜츠	민들레, 다래나무, 아로니아, 보리수
2017. 3. 10.	한빛농장	글로리오사, 부비르디아
2017. 3. 10.	개인육종가(김두용)	방풍
2017. 3. 10.	개인육종가(송희섭)	맥문동
2017. 3. 10.	서하원예육종연구소	칸나, 송엽국, 프테리스, 사랑초, 솔채꽃
2017. 3. 10.	호자원다육식물	엽자, 에케베리아
2017. 3. 10.	개인육종가(김남기)	다육식물
2017. 3. 10.	풀꽃나라	와송, 인삼
2017. 3. 14.	국립식량과학원	밀
2017. 4. 10.	경기농장	알스트로메리아
2017. 4. 10.	한빛농장	부바르디아, 글로리오사, 홀리후크시아
2017. 4. 10.	호자원다육식물(강석정)	크라슐라, 에케베리아
2017. 4. 10.	왕관농원	개발선인장, 꽃베로니아
2017. 4. 10.	식생원	더덕, 민들레
2017. 4. 10.	서하원예육종연구소	칸나, 사랑초, 송엽국, 솔채꽃, 꿀꿀
2017. 4. 10.	풀꽃나라	와송, 다육이
2017. 4. 11.	개인육종가(김태수)	황근
2017. 4. 12.	지운식물원	동백
2017. 4. 12.	나무이야기 식물원	철쭉묘목
2017. 4. 12.	전북농업기술원	한국춘란
2017. 4. 12.	개인육종가(하영석)	난초
2017. 4. 12.	동국대학교	닥나무
2017. 4. 12.	프로방스	다육식물, 별씨
2017. 4. 13.	이웃아저씨농장	슈퍼도라지, 산도라지

표 1-23. 3차년도 방사선 조사 및 기술 자문 내역

방사선 조사 및 기술자문 의뢰일	신청자(기관)	방사선 육종 대상 작물
2017.8.31.	풀꽃나라	다육식물
2017.8.31.	호자원 다육식물	크라슐라 와나타
2017.8.31.	수원농생명과학고	하월시아, Lithops
2017.8.31.	한국방송	다육선인장
2017.8.31.	서울대학교	옥수수, 벼
2017.8.31.	용인다육식물연구회	아드로 미티스
2017.8.31.	엘리스팜	Haworthia
2017.8.31.	삼척시 농업기술센터	콩, 수수
2017.8.31.	안암난연구소	한국춘란, 황금고사리, 하월시아
2017.8.31.	개인육종가(박종애)	다육식물
2017.8.31.	용인다육연구회	다육식물
2017.8.31.	개인육종가(오세기)	방울복랑, 백종, moonstolk
2017.8.31.	(주)휴앤호프	홉
2017.8.31.	충남대학교	노루귀
2017.8.31.	한남대학교	하월시아
2017.8.31.	동국대학교	방울복랑, 라울, 춘맹, 호빗, 아메치스, 화이트그리니
2017.9.11.	충남농업기술원	국화, 백합, 프리지아, 까마중
2017.9.11.	전북농업기술원	안개초
2017.9.12.	한빛농장	글로리오사, 홀리후크시아
2017.9.13.	서하원예육종연구소	고사리, 송엽국
2017.12.13.	개인육종가(황금선)	홀리후크시아, 글로리오사, 루버스
2017.12.15.	개인육종가(김병식)	으름, 감, 열매마
2017.12.15.	개인육종가(김연준)	Lithops
2017.12.20.	개인육종가(안수상)	유자
2017.12.20.	한국방송 영상제작국	다육식물
2017.12.20.	한남대학교	다육식물

2017.12.21.	호남식물병원	방풍, 석산, 동백
2017.12.23.	개인육종가(박성기)	국화, 해바라기, 부바드리아
2018.2.27.	개인육종가(성순경)	군자란
2018.3.3.	한국방송 영상제작국	다육식물
2018.3.12.	개인육종가(황금선)	글로리오사, 홀리후크시아
2018.3.12.	서하원예육종연구소	고사리, 송엽국
2018.3.12.	수원농생명과학고	Lithops, 하월시아
2018.3.13.	국립원예특작과학원	딸기
2018.4.2.	개인육종가(황금선)	글로리오사, 부바르디아
2018.4.3.	식생원	감자, 유실수, 으름, 다래
2018.4.4.	호자원(이명석)	국화, 수박씨
2018.4.4.	(주)비티앤지	춘란, 다육식물
2018.4.11.	한국방송 영상제작국	수련
2018.4.11.	스타다육	하월시아, 립스틱, 복랑
2018.4.12.	한남대학교	다육식물
2018.4.12.	개인육종가(강석정)	Crassula ovata
2018.4.12.	개인육종가(송희섭)	동백, 무궁화
2018.4.17.	(주)시드피아	벼
2018.4.26.	권농종묘(주)	Wild Rocket, Rucola
2018.5.8.	전북농업기술원	케나프, 벼
2018.5.8.	국립원예특작과학원	딸기
2018.5.16.	서하원예육종연구소	다육식물, 사랑초
2018.5.20.	개인육종가(김혜경)	군자란, 카라, 스파이더릴리, 아마릴리스, 산수국, 밭티시아
2018.5.21.	한국방송 영상제작국	다육식물
2018.5.21.	(주)비티앤지	춘란, 다육식물
2018.5.21.	식생원	감자, 유실수, 으름, 다래
2018.5.21.	개인육종가(이용태)	해바라기
2018.5.21.	호자원(이명석)	국화, 수박, 옥수수
2018.5.28.	(주)휴앤호프	홉
2018.5.28.	수원농생명과학고	다육식물, 바나나
2018.5.29.	호자원	크라슐라 오바타
2018.5.29.	스타다육	하월시아, 립스틱, 복랑
2018.6.7.	국립수목원	자생식물
2018.7.16.	권농종묘(주)	Wild Rocket, Rucola



그림 1-33. 방사선육종생산자연협회 모바일 밴드

2. (1협동) 감마선처리에 의한 고품질 들잔디 품종개발(제주대/이효연)

가. 연구목적 및 배경

연구목적

- 제1협동 과제에서는 감마선 처리에 의한 고품질 들잔디 품종을 개발하고, 우수 돌연변이 계통의 품종화와 들잔디의 유전자 pool구축 및 조사, 변이체의 대량 분자마커를 발굴한다.

연구배경

- 국민소득이 증가함에 따라 스포츠 및 공원 시설 등의 확대로 최근 잔디의 수요가 증가하고 있어, 국내 잔디 시장규모는 약 1.3조원 정도이며 해외의 잔디산업 시장 규모는 약 50~100조원 이상이다(산림청 2015년). 이러한 잔디는 벼농사 대비 약 2~3배 이상의 고소득 경제작물임에도 불구하고, 경영실패와 같은 기초조사와 신품종화에 관한 연구 지원과, 재배농가들에 대한 행정 및 산업적 지원이 부족한 상황이다. 따라서 소비자의 요구에 맞는 환경스트레스 내성 및 왜성 등의 관리가 편리한 고품질 잔디품종을 개발하여 실용화할 수 있는 연구가 필요한 실정이다.

나. 연구개발 추진 방법 및 추진 체계

- 방사선을 이용하여 관리하기 편리한 왜성형질의 잔디 및 기후변화에 대응할 수 있는 노화지연(녹기 연장) 등의 특성을 가진 들잔디 개발에 초점을 두어 연구를 추진
- 국내에서 수집한 잔디의 방사선 돌연변이 신품종 개발
 - 특성조사: 국내 6지역(제주도와 전라남북도, 경상남북도, 충청북도의 섬 20지역, 산16지역, 총 500점이상) 수집 잔디를 감마선으로 유도, 왜성 및 녹기유지 가능성이 보이는 잔디를 선별, 특성검정 및 선발
 - 변이체 증식: 선발된 잔디 돌연변이체는 온실과 시험포에서 증식 및 보존
- 돌연변이 계통의 품종 출원
 - 왜성 및 녹기유지 등의 형질을 보이는 잔디 돌연변이체 계통은 품종 등록을 위해서 ‘품종등록 특성자료’ 준비 및 품종 출원
- 들잔디의 유전자 pool 조사 및 변이체의 분자마커 발굴
 - 잔디 돌연변이체의 유전학적 분석을 위하여 대조구의 NGS 분석을 수행 대조구 한국잔디의 유전자 pool 확보
 - 대조구의 NGS 분석 결과를 바탕으로 잔디 돌연변이체의 NGS 분석을 수행하여 대량의 분자마커 발굴



<연구개발의 추진전략 및 방법>

다. 연구 추진 일정

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> 왜성 및 녹기연장 등의 가능성을 보이는 잔디 변이체의 형질 특성검정과 선발 	<ul style="list-style-type: none"> 기존에 남한 전지역(주요 산20곳, 서·남·동해안 도서27곳, 총 595점)에서 수집한 잔디 중에서 ⁶⁰Co 감마선으로 유도된 왜성 및 녹기유지 가능성이 보이는 잔디 변이체를 1차 선별하여 특성검정 수행 <ul style="list-style-type: none"> 왜성: 종자산업법에서 규정된 '잔디 특성조사요령' 기준에 의해 기초형질에 대한 형태적 특성평가 수행 후 선발 녹기연장: 저온 등 환경스트레스 처리 후 선발 	<ul style="list-style-type: none"> 왜성 잔디 1차 선발 <ul style="list-style-type: none"> 선발 장소 : 비닐온실 초장 범위 : 대조구에 비해 40 - 60%까지 초장이 작은 잔디 왜성 선발 : 잔디 돌연변이체 28개 체 중 대조구에 비해 초장이 작은 잔디 3개체 선발 녹기 연장 잔디 1차 선발 <ul style="list-style-type: none"> 선발 장소 : 포장 저온 범위 : 10월 중순(최저 기온 10도 이하)부터 1월 말(최저 기온 0도 이하)까지 녹기연장 가능성을 보이는 잔디 녹기연장 잔디 선발 : 잔디 돌연변이체 28개체 중 대조구에 비해 녹기 유지되는 잔디 1개체 선발
	<ul style="list-style-type: none"> 잔디 변이체의 증식을 위한 시험포 운영 	<ul style="list-style-type: none"> 확보된 잔디 영양체는 화분에 이식하여 제주대학교 내 온실에서 보존 및 증식 선발된 우수라인은 제주대학교 내 포장에 이식하여 보존 (시험구당 면적 1m×1m) 	<ul style="list-style-type: none"> 잔디 변이체 보존 및 증식, 선발 <ul style="list-style-type: none"> 비닐온실 : 대조구 2개 및 변이체 28개의 잔디 영양체는 화분에 이식에서 잔디 증식 및 보존 시험포 : 1차 선발된 왜성 3개체 및 녹기연장 1개체 잔디는 시험구당 면적 2m×2m 포장에 이식
	<ul style="list-style-type: none"> 들잔디의 유전자 pool 조사 (2차년도 계획 중일부 준비) 	<ul style="list-style-type: none"> 잔디 변이체의 유전학적 분석의 기초 확립을 위한 한국 들잔디의 NGS 분석 	<ul style="list-style-type: none"> 한국 들잔디의 NGS 분석 <ul style="list-style-type: none"> 분석 기준 : 잔디 변이체의 유전학적 분석의 기초확립을 위하여 동정된 들잔디의 NGS 분석 분석 방법: 외부형태적방법으로 잔디 동정, 분자생물학적 동정, 잔디의 삼목 및 증식, NGS 분석

			<ul style="list-style-type: none"> - 외부형태적 잔디 동정 : '외부형태적 방법 (Yang et al, 1995)'으로 들잔디 동정 - 분자생물학적 동정 : 'DNA 바코드 분석(Yao et al. 2010)'을 수행하여 들잔디 동정 - 잔디 삼목 및 증식 : 외부형태적 및 분자생물학적 동정 후 확인된 들잔디는 화분에 삼목 및 증식 - NGS 분석 : 증식된 들잔디로부터 genomic DNA 30-40ug 추출 후 서울대학교 농생명과학공동기기원(NICEM)에 의뢰하여 NGS용 library 작성하여 NGS 염기서열 분석중이며, 2차년도까지 분석 완료 예정
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> • 왜성 및 녹기 연장 잔디의 2차 선발 	<ul style="list-style-type: none"> • '잔디 특성조사요령' 기준에 의해 왜성 선발 • '기상청 기상자료개방포털'의 기온자료 참고하여 녹기연장 2차 선발 	<ul style="list-style-type: none"> • 왜성 및 녹기연장 잔디 2라인 선발 • 품종출원서 작성 및 2라인 출원완료
	<ul style="list-style-type: none"> • 분자생물학 기법을 이용한 돌연변이체의 동정 	<ul style="list-style-type: none"> • DNA 바코드 분석을 이용한 대조구 및 잔디 돌연변이체의 동정 	<ul style="list-style-type: none"> • 대조구는 들잔디와 갯잔디의 교잡종으로 동정 • 왜성 및 녹기연장 형질의 2라인은 각 들잔디, 들잔디와 갯잔디의 교배종으로 동정됨
	<ul style="list-style-type: none"> • 잔디 NGS 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 잔디 돌연변이체의 유전학적 분석의 기초확립을 위한 들잔디의 NGS 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • NGS 분석을 위해 library 작성, De novo assembly, annotation을 수행한 결과 50,140개의 gene set을 확립
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> • 변이체 잔디의 NGS 분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 변이체 잔디의 NGS 분석 및 resequencing data를 이용한 SNP, In/Del 선발 	<ul style="list-style-type: none"> • 저온 관련 염기서열 구간의 SNP, In/Del 확보하였으며, 특히 저온관련 유전자 및 프로모터 구간의 In/Del을 확보하였음
	<ul style="list-style-type: none"> • 품종 재배심사 	<ul style="list-style-type: none"> • 품종보호 등록을 위한 품종 재배심사 	<ul style="list-style-type: none"> • 품종보호 출원 후 품종보호 등록을 위하여 출원품종 2라인 및 대조구를 각각 60개체씩 삼목 증식하여 산림청 품종재배심사과에 재배심사를 위하여 제출완료하였음

마. 연구개발 내용 및 결과

(1) 1차년도 연구내용 및 결과

(가) 감마선 처리에 의해 유도된 왜성 및 녹기연장 형질을 보이는 잔디 변이체 선발

① 잔디 재료

- 2011~2014년 남한 전지역(주요 산 20곳, 서·남·동해안 도서 27곳, 총 595점)에서 수집한 잔디 중에서 ⁶⁰Co 감마선으로 유도된 왜성 및 녹기연장 가능성이 보이는 난지형 잔디(들잔디, 갯잔디, 금잔디)를 1차 선발

② 왜성 형질 1차 선발

- 선발 기준 : 산림청 국립산림품종관리센터의 종자산업법에서 규정된 '잔디 특성조사요령' 기준에 의해 기초형질에 대한 형태적 특성평가 수행 후 대조구에 비해 40 - 60%까지 초장이 작은 잔디 선발
- 왜성 선발 : 비닐온실의 화분안에서 재배 중인 잔디 돌연변이체 28개체 중 대조구(제주 고산지역 수집잔디 C1, 제주 한림지역 수집잔디C2)에 비해 초장이 작은 잔디 변이체 3개체(1,4,8번) 선발

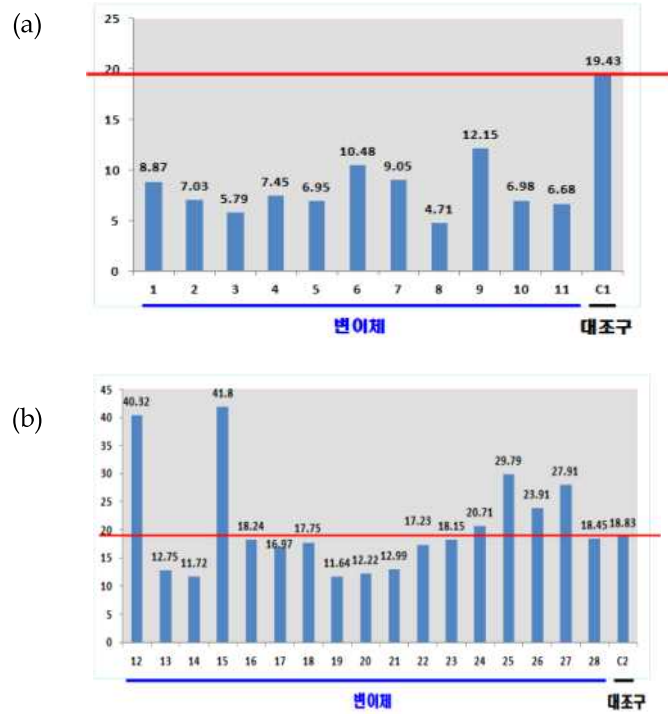


그림 2-1. 대조구 및 변이체 잔디의 초장 형태적 특성평가: (a) 대조구(C1) 및 잔디 변이체(1-11번), (b) 대조구(C2) 및 잔디 변이체(12-28번)의 초장 비교

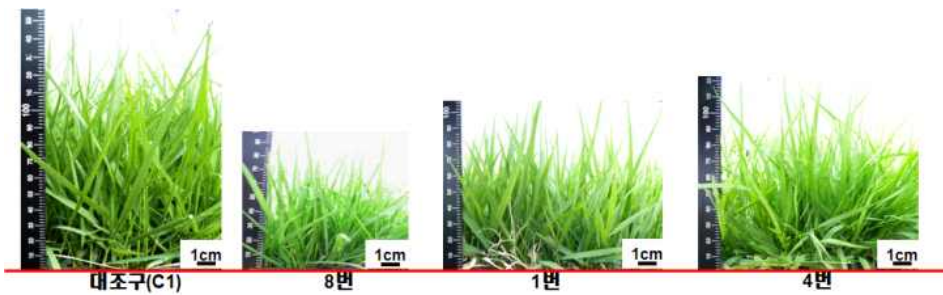


그림 2-2. 비닐온실 화분 측면의 대조구 잔디(C1) 및 잔디 변이체(1,4,8번) 초장 비교

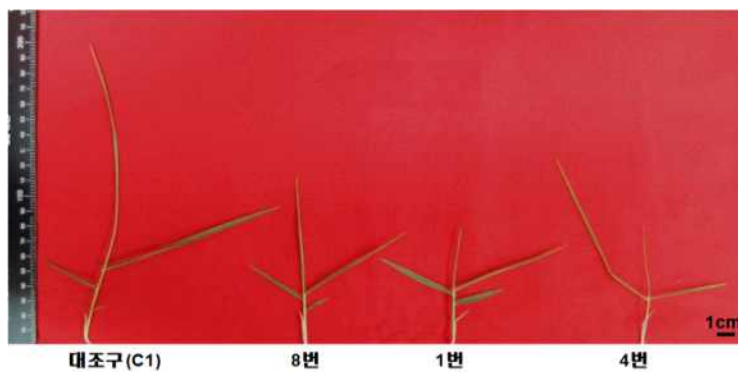


그림 2-3. 대조구 잔디(C1) 및 잔디 변이체(1,4,8번)의 초장 비교

③ 녹기연장 가능성을 보이는 잔디 선발

- 선발 기준 : '기상청 기상자료개방포털'의 기온자료를 참고하여, 포장에서 10월 중순(최저 기온 10

도 이하)부터 1월 말(최저 기온 0도 이하)까지 대조구에 비해 저온에서 자연선했된 녹기연장 가능성을 보이는 잔디 변이체 선발

- 녹기연장 선발 : 1m×1m 포장에서 재배 중인 잔디 돌연변이체 28개체 중 대조구에 비해 녹기 연장 가능성이 보이는 잔디 1개체 선발



그림 2-4. 대조구 잔디(노화된 들잔디) 및 녹기연장 돌연변이체(한라그린9)의 녹기 연장 비교

(나) 잔디 변이체의 보존 및 증식

① 비닐온실

- 대조구 2개 및 변이체 28개의 잔디 영양체는 화분에 이식에서 잔디 보존 및 증식



그림 2-5. 비닐온실 화분에서 대조구 및 잔디변이체의 보존 및 증식

② 시험포장

- 1차 선발된 왜성 및 녹기연장 가능성을 보이는 왜성 3개체 및 녹기연장 1개체 잔디 변이체는 시험구당 면적 2m×2m 포장에 이식하여 제주대학교 내에서 보존 및 증식 수행중이며, 왜성 및 녹기연장 잔디 변이체는 2차 선발 예정



그림 2-6. 시험포장에서 대조구 및 잔디변이체의 보존 및 증식

(2) 2차년도 연구내용 및 결과

(가) 왜성 및 녹기 연장 잔디의 2차 선발

① 왜성 잔디의 2차 선발

- 잔디는 잦은 예초에 따른 노동력이 발생하기 때문에 관리비용 절감을 위한 왜성 잔디 개발 요구됨. 잔디 변이체 28개 중에서 온실 화분에서 1차 선발된 왜성 형질 잔디 3라인을 시험포장에 이식하여 선발함. 선발기준은 '잔디 특성 조사요령'에 의해 잔디 대조구 대비 40 - 60%까지 초장이 작은 잔디 '한라그린8' 및 '한라그린9'를 선발하며, 특히 제주대에서 개발하여 품종보호등록된 왜성형질의 '한라그린1' 및 '한라그린2'와 초장을 비교 분석 하였음.
- 선발 결과 잔디 변이체 2라인 '한라그린8' 및 '한라그린9'을 선발하였으며, 대조구에 비해 한라그린8은 50%, 한라그린9는 50-60% 정도 작은 초장을 보임을 확인함. 또한, 왜성형질의 '한라그린1' 및 '한라그린2'와 비교시 한라그린8' 및 '한라그린9'의 초장 및 엽신(잎) 길이가 유사함을 확인 하였음.

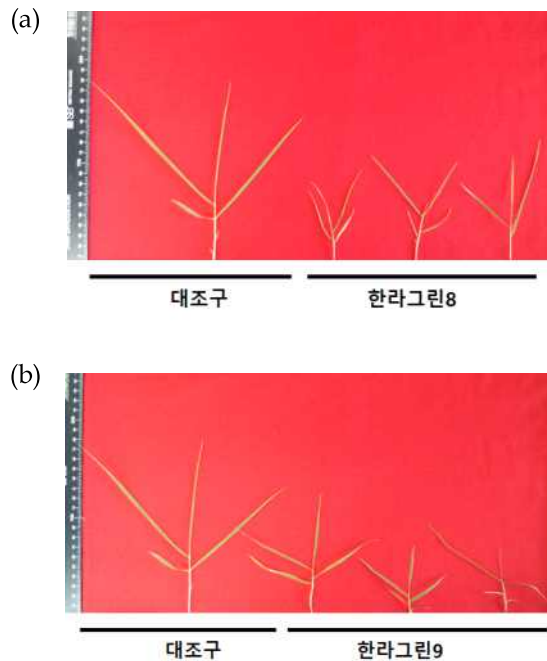


그림 2-7. 대조구 및 잔디변이체 '한라그린8'(a) 및 '한라그린9'(b)의 초장 비교

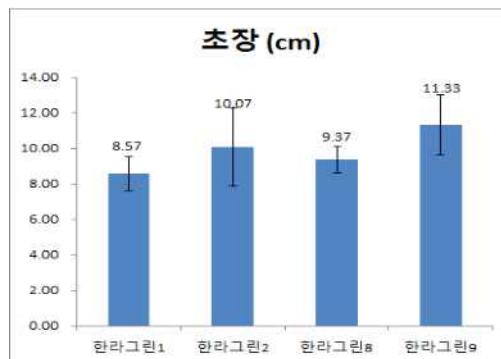


그림 2-8. 잔디 변이체의 초장 비교

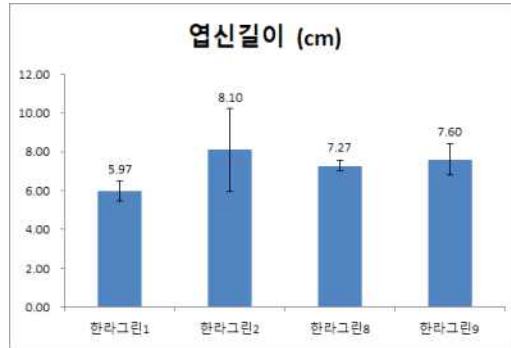


그림 2-9. 잔디 변이체의 엽신 길이 비교

② 녹기연장 잔디의 선발

- 한국들잔디는 건조 및 여름의 고온, 염분에 강한 장점이 있으나, 저온에 약하여 10월부터 잎이 녹색에서 황색으로 변하여 가을부터 겨울기간동안 녹기를 유지하지 못하고 노화되는 단점이 있음. 저온의 환경스트레스 내성(녹기 연장) 잔디 개발이 필요함. '기상청 기상자료개방포털'의 기온자료 참고, 포장에서 10월 중순(최저 10도 이하)부터 2월 말(최저 0도 이하)의 저온에서 대조구 대비 저온에서 녹기연장 보이는 잔디 선발함. 녹기연장은 저온기간동안 엽록소 함량을 측정하여 분석하였으며, 엽록소 함량이 높은 것은 녹기연장되어 잎에 녹색의 엽록소가 남아 있음을 의미함.
- 선발한 결과 잔디 변이체 28개 중에서 1라인(한라그린9)는 2015년 10월부터 2016년 2월까지 저온기간동안 선발되었으며, 왜성 및 녹기연장을 보이는 잔디를 선발하기 위해서 왜성형질을 보였던 1라인(한라그린8)을 추가로 선발함. 대조구로 사용된 잔디는 우리나라에서 많이 사용되는 들잔디 야지 품종과 연구소에서 품종보호등록된 왜성 잔디인 '한라그린1' 및 '한라그린2'를 기준으로 하였음. 기존 품종보호등록된 '한라그린1' 및 '한라그린2' 잔디보다 본 과제에서 선발된 '한라그린8' 및 '한라그린9'는 대조구에 비해 왜성 및 노화지연(녹기연장)을 보임을 확인하였음. 최종 선발된 '한라그린8' 및 '한라그린9'는 품종보호출원 되었음(출원번호: 2017-21, 2017-22)





그림 2-10. 대조구 및 변이체 ‘한라그린8’ 및 ‘한라그린9’의 노화지연(녹기연장) 비교: 포장(a), 확대(b)

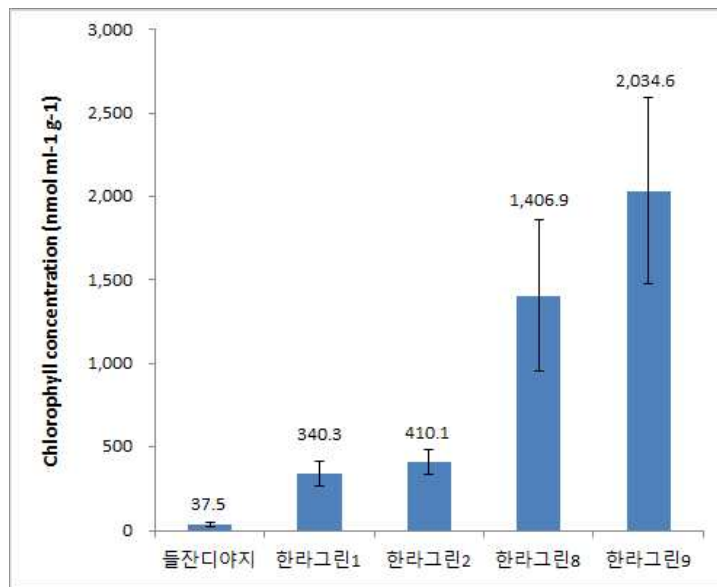


그림 2-11. 대조구 및 변이체 ‘한라그린8’ 및 ‘한라그린9’의 노화지연(녹기연장) 측정을 위한 엽록소 함량 비교 분석

(나) 분자생물학 기법을 이용한 들연변이체의 동정

① DNA 바코드 분석에 의한 잔디 변이체의 동정

- 분자생물학적 방법을 이용한 변이체 분류·동정을 수행하기 위하여 수집된 들잔디 및 갯잔디를 재료로 분류·동정이 가능한지 DNA 바코드 분석을 수행함. DNA 바코드 분석은 genomic DNA 추출 후 핵내 ITS 구간 증폭, 염기서열 분석, ITS CAPS 마커 분석을 이용하여 들잔디 및 갯잔디, 들잔디와 갯잔디의 교잡종으로 분류·동정함. 이 결과를 바탕으로 대조구 및 잔디 들연변이체의 분류 및 동정도 ITS DNA 바코드 분석 및 ITS CAPS 마커 분석을 이용하여 분류 동정함. 변이체의 부모세대인 고산지역 잔디(대조구) 및 변이체 잔디 동정을 수행함.
- 분석 결과 수집된 들잔디 및 갯잔디를 재료로 분류·동정이 가능한지 ITS DNA 바코드 구간 증폭, 염기서열 분석, ITS CAPS 마커 분석을 이용하여 들잔디(약 653bp), 들잔디와 갯잔디의 교배종(약 653, 480bp), 갯잔디(480bp)으로 밴드 차이를 확인하여 들잔디, 갯잔디, 들잔디와 갯잔디의 교잡종의 분류·동정이 가능함을 확인함. 이 결과는 SCIE급 논문에 투고하여 2017년 6월 게재 예정임. 이를 바탕으로 대조구 및 변이체의 분류·동정을 수행한 결과, 대조구는 들잔디와 갯잔디의 교잡종 동정, 왜성 및 녹기연장 형질의 2라인인 ‘한라그린8’ 및 ‘한라그린9’는 각 들잔디와 갯잔디의 교잡종 및 들잔디로 동정됨.

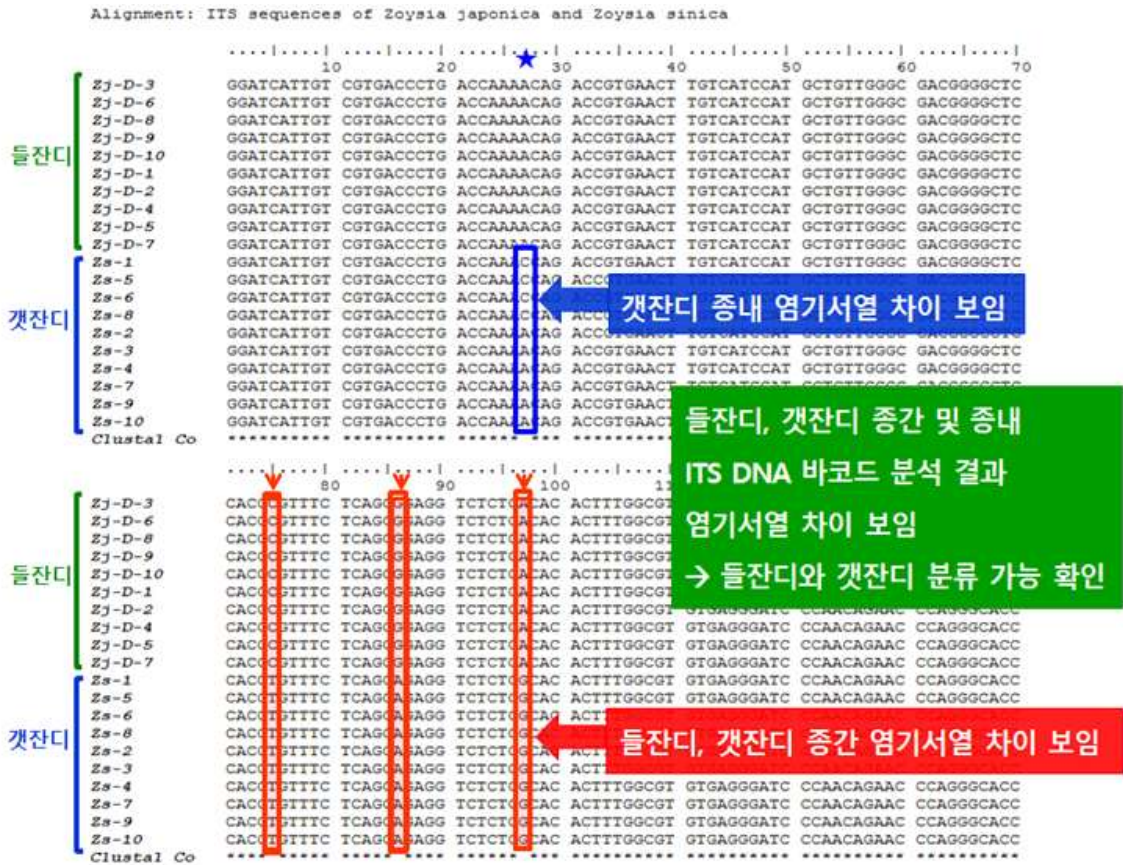


그림 2-12. ITS DNA 바코드 분석을 통한 들잔디 및 갯잔디간 분류·동정

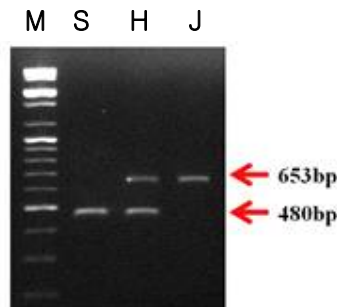


그림 2-13. ITS CAPS 마커 분석을 통한 들잔디 및 갯잔디간 분류·동정. 들잔디(J), 갯잔디(S), 들잔디와 갯잔디의 교배종(H)

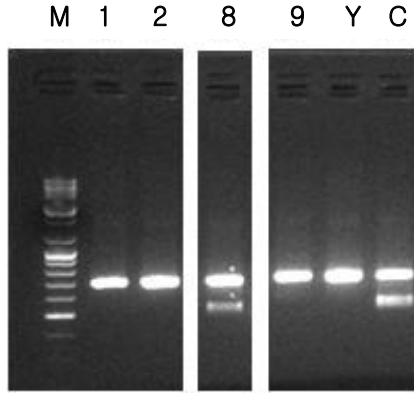


그림 2-14. 대조구 및 변이체의 분자생물학적 분류 및 동정: '한라그린1'(1) 및 '한라그린2'(2), 들잔디 야지(Y), '한라그린9'(9)는 들잔디로 동정, '한라그린8'(8)은 들잔디와 갯잔디의 교잡종으로 동정

(다) 잔디 NGS 분석

① 잔디 NGS 분석

- 잔디 변이체의 유전학적 분석의 기초확립을 위하여 들잔디의 NGS 분석을 수행함. NGS 분석은 잔디 잎 표면의 털 유무를 이용한 외부형태적방법으로 잔디 동정, DNA 바코드 분석에 의한 분자생물학적 동정, 동정 완료된 들잔디의 삼목 및 증식, 들잔디 NGS 분석용 긴서열 Pac bio library 작성, De novo assembly, contig 작성, annotation 등을 통하여 들잔디 NGS를 분석하였음. NGS는 특별한 기술 및 고가장비가 필요하기 때문에, 긴서열 Pac bio library의 작성이 가능한 서울대학교 농생명과학공동기기원에 의뢰하여 분석하였으며, NGS 분석 소요 시간은 2년 예상되므로 2015년 1차년도부터 2017년 2차년도까지 수행함.
- 분석 결과, 들잔디 NGS로 사용된 잔디는 잎 표면의 털이 존재하였으며(그림 15), ITS DNA 바코드 분석에서 들잔디로 동정되었음(그림 14). 들잔디를 증식하여 genomic DNA 약 40ug을 추출하여, Pac bio library 작성 후 De novo assembly를 통하여 1,350개의 contig를 확보하였으며, annotation 수행결과 50,140개의 gene set을 확보하였음.

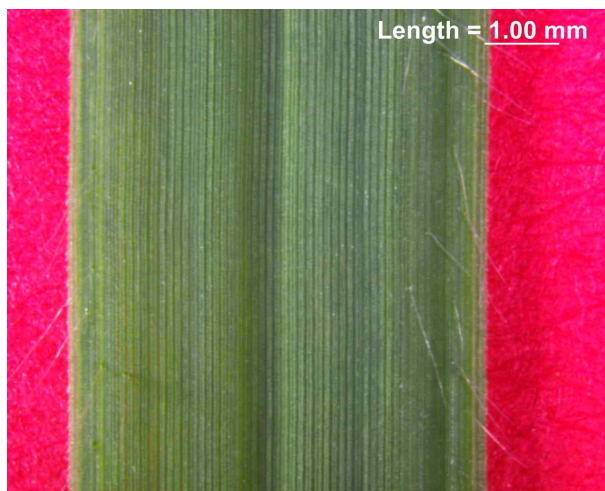


그림 2-15. 들잔디 NGS로 사용되는 들잔디의 외부형태학적 분석. 잎표면의 털 존재하여 들잔디로 동정 확인.

표2-1. 들잔디 NGS assembly 및 annotation 결과

항 목	결 과
Contig	1,350
Total (bp)	373,429,196
Average length (bp)	276,614.2
Maximum length (bp)	17,601,860
N50 length (bp)	3,962,554
G+C content (%)	44.17
annotation	50,140 gene

Contigs : assembly contig수

Average length : gene set contig의 평균 길이

Maximum length : gene set contig중 가장 긴 contig 길이

N50 length : 가장 긴 contig부터 차례로 엮기 수를 전부 더했을 때 중간이 되는 contig의 길이

GC content : GC 비율

annotation 수행결과 50,140개의 gene set을 확보

(3) 3차년도 연구내용 및 결과

(가) 변이체 NGS 분석 및 대량 분자마커 발굴

- 2차년도의 NGS resequencing data를 이용하여 녹기연장을 보이는 변이체 한라그린9번을 재료로 NGS 수행하였으며, 저온관련 기존 우수 논문들을 참고하여 저온관련 유전자 및 유전자이외의 구간을 선별하여 활용하였음. 그 결과 저온 스트레스 저항성 관련 유전자 및 유전자 이외의 엮기서열 구간을 중심으로 SNP, In/Del을 선발함.
- 1404bp 구간의 SNP 및 116개의 In/Del를 확보하였으며, 특히 유전자 및 유전자 이외의 구간의 In/Del 및 SNP의 결과, 저온저항성과 관련성이 높은 *CBF3*(*C-repeat/dehydration responsive element 3*) 유전자 및 프로모터 (CRT/DRE) 부분에 녹기연장의 형질인 한라그린9번 엮기서열에 차이가 있는 등의 대량의 분자마커 SNP를 확보하였음.

Gene symbol	Gene full name	TAIR ID or AccessionNo.
COR15a	cold-responsive	At2G42540
COR78	cold-responsive	At5G52310
COR6.6	cold-responsive	at5G15970
COR47	cold-responsive	At1G20440
KIN	cold-induced	At5g15960
LTI	Low temperature induced	AT3G46750
CBF1	dehydration-responsive elements binding factors 1	A4g25490
CBF2	dehydration-responsive elements binding factors 2	A4g25470
CBF3	dehydration-responsive elements binding factors 3	A4g25480
ICE1	Inducer of CBF expression 1	AT3G26744
ICE2	Inducer of CBF expression 2	AT1G12860
LEA	late embryogenesis abundant proteins	At3g02480
CSP	cold shock protein	AT4G36020
CSP	cold shock protein	AT2G17870
C2H2 zinc finger	C2H2 zinc finger	At1g25250
ACBP	Acyl-CoA-binding protein	AT5G53470
ACBP	Acyl-CoA-binding protein	AT4G27780
ACBP	Acyl-CoA-binding protein	AT3G05420
ACBP	Acyl-CoA-binding protein	AT5G27630
ACBP	Acyl-CoA-binding protein	AT1G31812
Thp1	Thermal Hysteresis Protein(Chonstoneura fumiferana 열충격 단백질) Synthetic construct PR-5/thermal hysteresis protein fusion protein gene	AF284215
PR	pathogen related proteins	AT2G14610
β-1.3-glucanase	β-1.3-glucanase	AT5G42100
β-1.3-glucanase 1	β-1.3-glucanase	AT3G52720
β-1.3-glucanase 2	β-1.3-glucanase	AT3G52760
β-1.3-glucanase 3	β-1.3-glucanase	AT3G52740
β-1.3-glucanase 4	β-1.3-glucanase	AT5G20330
β-1.3-glucanase 5	β-1.3-glucanase	AT5G20340
thaumatin-like proteins 3	thaumatin-like proteins	AT1G75030

Gene symbol	Gene full name	TAIR ID or AccessionNo.
CAMTA 1	calmodulin binding transcriptional activators 1	AT5G09410
CAMTA 3	calmodulin binding transcriptional activators 3	AT2G22300
Calmodulin binding protein	Calmodulin binding protein	At1g67310
ESK1	eskimo1	AT3G53990
CSD1	Cu/Zn SODs 1 (copper/zinc superoxide dismutase 1)	AT1G08830
CSD2	Cu/Zn SODs 2 (copper/zinc superoxide dismutase 2)	AT2G26190
CIGR1	chitin-inducible gibberellins-responsive 1, zoyisa japonica	XM_003460780
LAS	Lateral suppressor	AT1G55580
MOC1	monoculm 1, Oryza sativa (japonica cultivar-group) MOC1	Ay242058
TCP 24	TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, and PCF (TCP) 24	AT1G00210
TCP 18	TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, and PCF (TCP) 18	AT3G18550
TCP 15	TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, and PCF (TCP) 15	AT1G69690
TCP 13	TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, and PCF (TCP) 13	AT3G02150
TCP 12	TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, and PCF (TCP) 12	AT1G68800
PPR	Pentatricopeptide repeat proteins	At5g11310
RF-1	Fertility restorer (Oryza sativa Indica Group RF-1 gene for fertility restorer)	AB110443
CBL 1	Calineurin B-like protein 1	AT4G17615
CBL 2	Calineurin B-like protein 2	AT5G55990
CBL 3	Calineurin B-like protein 3	AT4G26570
CBL 5	Calineurin B-like protein 5	AT4G01420
CBL 6	Calineurin B-like protein 6	AT4G16350
CBL 7	Calineurin B-like protein 7	AT4G26560
CBL 8	Calineurin B-like protein 8	AT1G64480
CBL 9	Calineurin B-like protein 9	AT5G47100
CBL 10	Calineurin B-like protein 10	AT4G33000
CIK10	Calineurin B-likeprotein interacting protein kinase 10	AT5G58380
GA20ox	GA 20-oxidase	A4g25420
GA20ox	GA 20-oxidase	At5g07200
GA3ox	GA3-oxidase	At1g15550
GA2ox	GA 2-oxidase	At1g30040
Wes120	Triticum aestivum cold acclimation protein WCS120	M93342
Wcor410	Triticum aestivum cold acclimation protein WCOR410	L29152
Wcor14	cold-responsive protein COR14a [Triticum aestivum]	AF207545
WCOR413-pm	Triticum aestivum cold acclimation protein WCOR413	U78216.1
WCOR413-pm	Oryza sativa (japonica cultivar-group) cold acclimation protein WCOR413-like protein	AF283006
WCOR413-pm	*Arabidopsis thaliana cold acclimation protein WCOR413-like protein	
alpha "		
WCOR413-tm	Triticum aestivum cold acclimation protein COR413-TM1	AY181206
WCOR413-tm	Oryza sativa (japonica cultivar-group) cold acclimation protein COR413-TM1	AY181210

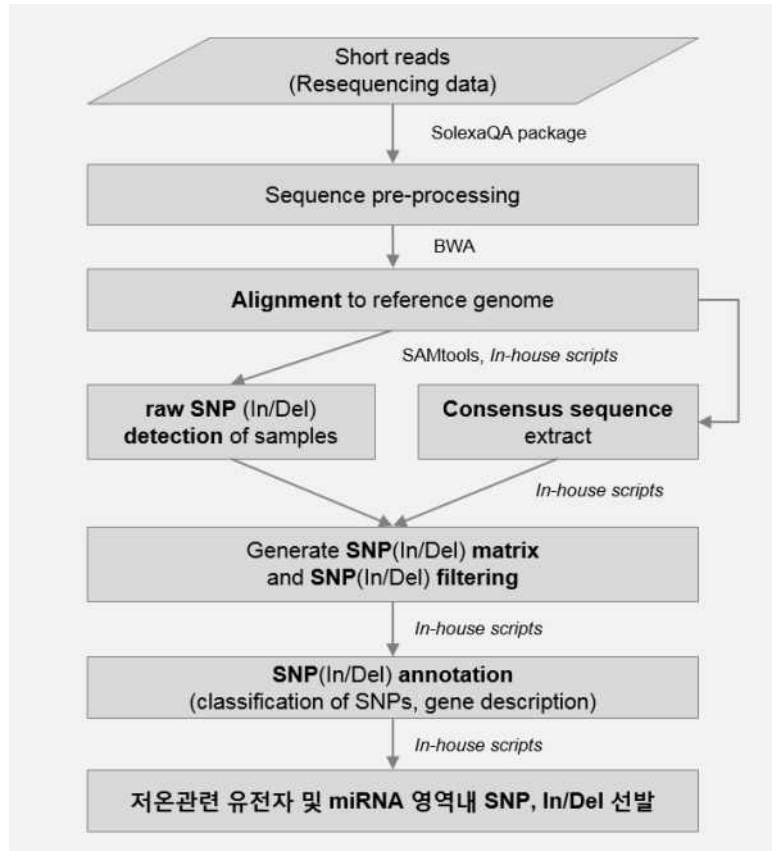
<참고문헌 자료조사에 의한 저온관련 유전자 및 유전자 이외의 구간 선별>

Gene symbol	Gene full name	TAIR ID or AccessionNo.
CAMTA 1	calmodulin binding transcriptional activators 1	AT5G09410
CAMTA 3	calmodulin binding transcriptional activators 3	AT2G22300
Calmodulin binding protein	Calmodulin binding protein	At1g67310
ESK1	eskimo1	AT3G53990
CSD1	Cu/Zn SODs 1 (copper/zinc superoxide dismutase 1)	AT1G08830
CSD2	Cu/Zn SODs 2 (copper/zinc superoxide dismutase 2)	AT2G26190
CIGR1	chitin-inducible gibberellins-responsive 1, zoyisa japonica	XM_003460780
LAS	Lateral suppressor	AT1G55580
MOC1	monoculm 1, Oryza sativa (japonica cultivar-group) MOC1	Ay242058
TCP 24	TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, and PCF (TCP) 24	AT1G00210
TCP 18	TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, and PCF (TCP) 18	AT3G18550
TCP 15	TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, and PCF (TCP) 15	AT1G69690
TCP 13	TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, and PCF (TCP) 13	AT3G02150
TCP 12	TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, and PCF (TCP) 12	AT1G68800
PPR	Pentatricopeptide repeat proteins	At5g11310
RF-1	Fertility restorer (Oryza sativa Indica Group RF-1 gene for fertility restorer)	AB110443
CBL 1	Calineurin B-like protein 1	AT4G17615
CBL 2	Calineurin B-like protein 2	AT5G55990
CBL 3	Calineurin B-like protein 3	AT4G26570
CBL 5	Calineurin B-like protein 5	AT4G01420
CBL 6	Calineurin B-like protein 6	AT4G16350
CBL 7	Calineurin B-like protein 7	AT4G26560
CBL 8	Calineurin B-like protein 8	AT1G64480
CBL 9	Calineurin B-like protein 9	AT5G47100
CBL 10	Calineurin B-like protein 10	AT4G33000
CIK10	Calineurin B-likeprotein interacting protein kinase 10	AT5G58380
GA20ox	GA 20-oxidase	A4g25420
GA20ox	GA 20-oxidase	At5g07200
GA3ox	GA3-oxidase	At1g15550
GA2ox	GA 2-oxidase	At1g30040
Wes120	Triticum aestivum cold acclimation protein WCS120	M93342
Wcor410	Triticum aestivum cold acclimation protein WCOR410	L29152
Wcor14	cold-responsive protein COR14a [Triticum aestivum]	AF207545
WCOR413-pm	Triticum aestivum cold acclimation protein WCOR413	U78216.1
WCOR413-pm	Oryza sativa (japonica cultivar-group) cold acclimation protein WCOR413-like protein	AF283006
WCOR413-pm	*Arabidopsis thaliana cold acclimation protein WCOR413-like protein	
alpha "		
WCOR413-tm	Triticum aestivum cold acclimation protein COR413-TM1	AY181206
WCOR413-tm	Oryza sativa (japonica cultivar-group) cold acclimation protein COR413-TM1	AY181210

Gene symbol	Gene full name	TAIR ID or AccessionNo.
WCOR413-tm	arabidopsis unknown	At1g7395
Msor COR413	Rhizoctonia gaters cold acclimation protein WCOR413	AY05729
AD21		AT3G01990
H5FC1		AT3G2420
MYB73		AT4G37260
CF21		AT5G09490
CF31		AT5G53290
ANAC082		AT3G49520
ARR5		AT4G14860
WRKY22		AT4G01150
ERF6		AT4G17490
CF22		AT4G02170
ATH2C		AT4G16780
ZF		AT4G29190
RAV1		AT1G13260
CF21		AT2G4040
ERF11		AT1G02870
WRKY40		AT1G08040
DAT10		AT1G02770
ZAT12		AT5G5820
DOP1.1		AT1G08790
CP1		AT5G37290
CF31		AT4G25490
DOP1.10		AT1G08970
WRKY33		AT2G38470
MYB7		AT2G54720
ERF5		AT5G47230
DEAR1		AT3G50260
MYB4		AT5G67300
H0E1	Protein HIGH EXPRESSION OF COLDINDUCIBLE RESPONSE GENE 1, RING finger protein H0E1, RING-type E1 ubiquitin transferase H0E1	At2g39810

Gene symbol	Gene full name	TAIR ID or AccessionNo.
CRT/DRE	C-repeat/dehydration responsive element	At4g25490
CRT/DRE	C-repeat/dehydration responsive element	At4g25470
CRT/DRE	C-repeat/dehydration responsive element	At4g25480
RD29A	responsive to dehydration 29 A	D13044
RD29B	responsive to dehydration 29 B	D13044
KIN	cold-induced	At5g15960
LTI	lowtemperature induced	AT3G46750
COR15a	cold-responsive	At2G42540
COR78	cold-responsive	At5G52310
COR6.6	cold-responsive	at5G15970
COR47	cold-responsive	At1G20440

<참고문헌 자료조사에 의한 저온관련 유전자 및 유전자 이외의 구간 선별>



<NGS 이용한 저온관련 유전자 및 유전자 이외의 구간 SNP, In/Del 선발>

제공받은 Gene 정보										
H9	H9_Depth	Genic_Inter	Transcript.f	Feature	Description	Flanking_s	Target_gen	gene_descr	gene_other	gene_full_name
+3TAG	7 7	Intergenic				TGCTTGCCC	promoter	CRT/DRE	CBF3	prom(C-repeat/dehydration responsive element
							promoter	CRT/DRE	CBF1	prom(C-repeat/dehydration responsive element
							promoter	CRT/DRE	CBF2	prom(C-repeat/dehydration responsive element
+1A/*	11 12	Intergenic				TGGGAGAC	promoter	CRT/DRE	CBF3	prom(C-repeat/dehydration responsive element
							promoter	CRT/DRE	CBF1	prom(C-repeat/dehydration responsive element
							promoter	CRT/DRE	CBF2	prom(C-repeat/dehydration responsive element
+1C	3 3	Intergenic				TTTGCATAC	promoter	CRT/DRE	CBF3	prom(C-repeat/dehydration responsive element
							promoter	CRT/DRE	CBF1	prom(C-repeat/dehydration responsive element
							promoter	CRT/DRE	CBF2	prom(C-repeat/dehydration responsive element

제공받은 Gene 정보									
H9	H9_Depth	Genic_Inter	Transcript. Feature	Description	Flanking_s	Target_gen	gene_descr	gene_other	gene_full_name
T	5 5	g39371	g39371.t1:e exon	dehydration	CAGAGCA	gene	CBF3		
						gene	CBF1	DREB1b	
						gene	CBF2	DREB1c	
G	3 3	g39371	g39371.t1:e exon	dehydration	GAGCCTGC	gene	CBF3		
						gene	CBF1	DREB1b	
						gene	CBF2	DREB1c	

<NGS 이용한 저온관련 유전자 및 프로모터 구간의 SNP 및 In/Del 확인하여 대량 SNP 발굴>

(나) 2차년도 품종 출원된 잔디의 재배심사를 위한 제출

- 왜성 및 녹기연장 형질 2라인(한라그린8 및 9)의 품종보호등록 재배심사를 위한 잔디 대조구(3라인) 및 출원품종(2라인) 각 1라인당 60개씩 총 300개체 삼목 및 증식
- 품종재배심사과에 제출할 잔디를 삼목 및 증식하여 산림청 국립산림품종관리센터 품종재배심사에 증식된 잔디 제출완료

3. (2협동) 벼 돌연변이 자원활용 신품종 개발 및 브랜드제품 사업화 (시드피아/조유현)

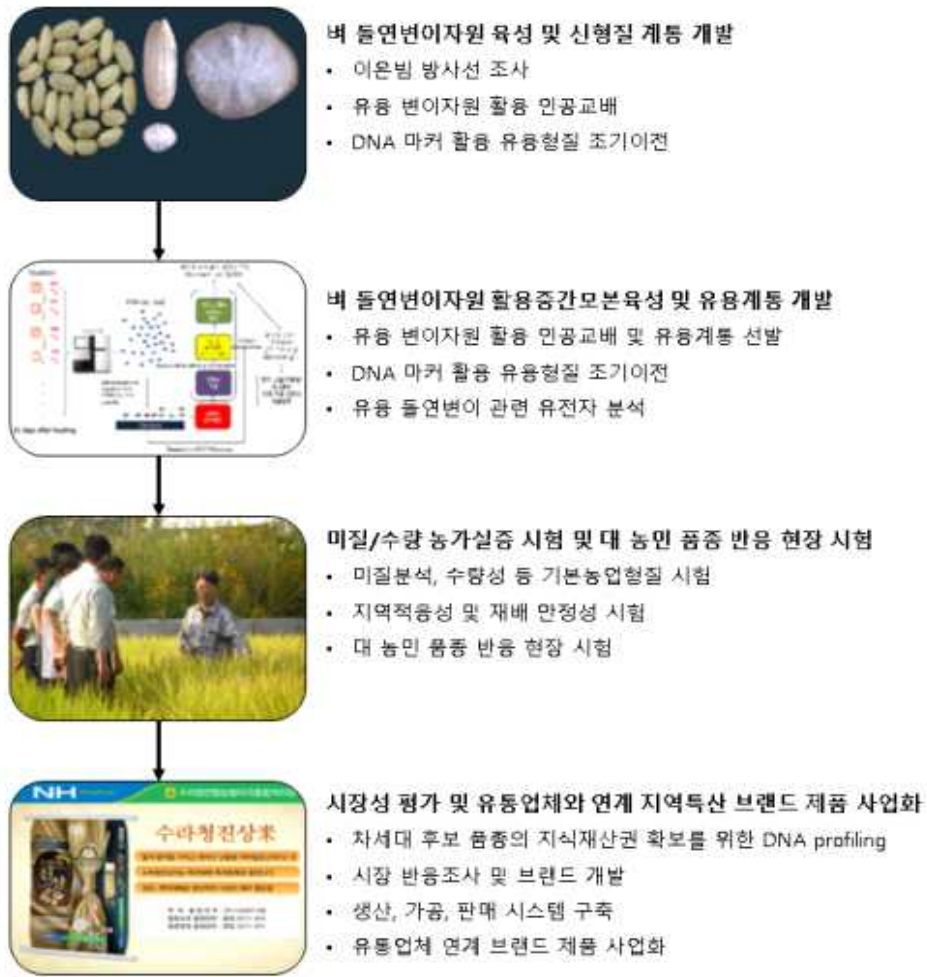
가. 연구목적 및 배경

- 쌀은 핵심 식량작물 중 하나로 국가 경제전반과 농촌사회 유지 및 안보 등에 미치는 영향이 대단히 크며, 변화하는 소비자 욕구를 충족하기 위한 다양한 기능성 벼 품종육성과 새로운 유전자원의 창출이 요구됨.
- 또한 최근 식문화의 발달로 인해 우수한 식미를 가진 쌀에 대한 소비자의 욕구가 높아지고 있음.
- 유용 형질을 야생종으로부터 교배를 통해 도입하는 것만으로는 시장 환경의 빠른 변화와 다양한 요구에 대응하기에 미흡한 면이 있으며, 이를 해결하기 위해 지속적인 돌연변이 집단을 작성하고, 작성된 돌연변이 자원 중에서 유용한 특성을 가진 자원을 평가하여 신품종으로 도입할 필요가 있음.
- 최근 국내 쌀 소비가 지속적으로 감소하고 있으며, 2009년 1인당 쌀 소비량이 74.0kg에서 2017년 61.8kg으로 감소하였으며, 30년전 ('88년 122.2kg)에 비해 절반 수준임.
- 쌀 산업의 위기를 극복하기 위해서는 소비자 선호와 기호도가 높은 최고품질의 품종 개발 및 이를 이용한 제품개발 필요.

나. 연구개발 추진 방법 및 추진 체계

- 벼 돌연변이자원 개발육성
 - 돌연변이원을 처리한 저아밀로스 변이자원(배, 배유변이) 창성 및 선발 평가
 - 기 확보된 배, 배유 변이 신품질 자원 활용 인공교배 및 세대진전, 선발
- 분자마커를 이용한 벼 돌연변이 유기자원의 선발평가
 - 인공교배를 통한 신품질 계통의 유용자원 선발
 - 미질 및 기능성 성분 관련 특성평가(순천향대 이영상 교수 협력)
 - 포장재배 시험, 재배특성 평가(변이활용 품종유망 계통)
 - DNA마커 이용 돌연변이형질 조기이전
- 미질/수량 농가실증 시험 및 대 농민 품종 반응 현장 시험(품종유망 계통)
 - 육성된 우수계통의 수량성, 지역적응성 평가(생산단체 연계)
- 주요후보 품종의 지식재산권 확보를 위한 유전체 정보 profiling(공주대학교 박용진 교수 협력)
 - 개발 신품종의 DNA profiling, 유전체 정보 등을 통해 국내외 개발 품종과 구분할 수 있는 기술을 확보하여 국내 유사품종 유통의 문제점 해결
- 시장성 평가 및 유통업체와 연계 지역특산 브랜드 제품 사업화(향저아밀로스미)
 - 시식평가 및 시장성 평가(가공판매업체 연계)
 - 생산, 가공, 판매 시스템 구축(경기, 충청지역 중심으로)
 - 유통업체와 연계 브랜드 제품 사업화(팜스코리아, 농협 등)

<연구개발의 추진체계>



다. 연구 추진일정

		2차년도											
일련 번호	연구내용	추진 일정											
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7
1	• 벼 들연변이자원 육성 및 신행질(배, 배유변이) 계통 개발												
2	• 변이활용 품종후보 고세대 계통 농가실증/시험(팝콘향 저아밀로스미, 눈큰저아밀로스미 등)												

2차년도													
일련 번호	연구내용	추진 일정											
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7
1	벼 돌연변이자원(배, 배유변이체) 활용 중간모본육성 및 유용계통 개발												
2	변이활용 품종후보 고세대 계통 농가실증/시험												
3	지역특산 브랜드 쌀 제품 사업화(약한 팝콘향의 저아밀 로스미 중조생 품종)												

3차년도													
일련 번호	연구내용	추진 일정											
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7
1	벼 돌연변이자원 활용 중간 모본육성 및 유용계통 개발												
2	변이활용 차세대 품종후보 고세대 계통시험												
3	지역특산 브랜드 쌀 제품 사업화(약한 팝콘향의 저아밀 로스미 중조생 품종 지역특화 브랜드 육성)												

마. 연구개발 내용 및 결과

(1) 저아밀로스미 계통 방사선(이온빔)조사 및 돌연변이집단 창성

(가) 저아밀로스미 계통의 방사선 조사를 통한 돌연변이 유기

- 돌연변이 유기를 위한 시험재료의 모본인 JCH33M-15-1-9-1은 고시히카리 유래 저아밀로스 단간종으로 내도복성 및 고양식미의 특성을 가지고 있으며 아밀로스 함량이 11.9%로 저아밀로스 품종임.
- 벼 종자 돌연변이 유기하기 적합한 방사선 조사량인 300gray의 γ -ray를 JCH33M-15-1-9-1 계통 5,000립에 조사하여 M₁종자라 하였고 2015년 4월 11일 M₁종자를 침종하고 48시간동안 최아시킨 M₁종자를 2015년 4월 14일 파종함.



그림 3-1. 돌연변이 처리종자의 파종과 유묘사진

- M₁ 변이체 초기선발을 위하여 초기 생육에서 shooting은 하지만 발근하지 못하고 고사한

개체, 유묘생육 중 고사한 개체 및 이식된 개체수를 조사함.

- 방사선 조사된 5,000립중 발아하지 못한 147립을 제외한 4,853립을 파종하여 초기 생육에서 발아는 하지만 발근하지 못하고 고사한 2,133개체, 유묘생육 중 고사한 189개체를 제외한 2,531개체를 포장에 전개함.

표 3-1. 방사선 조사에 따른 저아밀로스벼 생존율

	미발아립	발아 후 미발근	유묘 생육 중 고사	정상	합계 (%)
개체수	147 (2.94%)	2,133 (42.66%)	189 (3.78%)	2,531 (50.62%)	5,000 100

(2) 변이자원 평가 및 신행질 자원 탐색

(가) 돌연변이 선발 및 평가

○ 돌연변이 처리 후 파종을 마친 M₁ 계통의 시험포장 이식

- 파종 후 40일 성장된 유묘를 2016년 5월 24일 30×15cm의 재식간격으로 1주 1본 식재하여 농촌진흥청 벼 표준 재배법에 준해 재배 및 관리 실시함.



그림 3-2. 이앙 후 포장 관리 및 신행질 자원 탐색

○ 돌연변이 선발/평가

- 2015년 추계에 변이계통을 수확하여 선발 효율을 높이기 위하여 불임이 발생한 개체만 수확하였고 불임이 일어나지 않은 정상적인 개체나 완전 불임 개체는 수확에서 제외 시킴.
- 정식된 2,531개체를 포장에 정식 후 관행재배법에 의해 재배하여 정상적인 임성을 보인 개체와 완전 불임 개체를 제외하고 20%~95%의 불일성을 보인 개체 2,146개체를 선발함.

표 3-2. 방사선 조사에 따른 M₂ 종자 불임률

	정상	20%	40%	60%	80%	95%	완전불임	합계(%)
개체수	261 (10.31%)	326 (12.88%)	391 (15.45%)	685 (27.06%)	592 (23.39%)	152 (6.01%)	124 (4.90%)	2,531 100

- 감마선 처리에 의해 돌연변이 유기로 인해 정상임성을 가진 개체비율은 10.3%로 나타났고 완전 불임이거나 불완전한 임성을 보인 개체 비율은 89.7%로 조사됨.



그림 3-3. 돌연변이치리에 발생한 불임개체

- 돌연변이 유기율이 가장 높은 범위의 불임률인 40~60%의 불임률을 보인 개체는 42.51% 나타나 γ -ray 처리에 의한 돌연변이 유기가 효과적인 것으로 조사 됨.
- 선발된 M₂ 종자 2,146 계통을 2016년 5월 27일 단립계통육종법(Single Seed Descent, SSD)을 이용하여 정식하고 2016년 추계에 배유돌연변이체 선발 예정임.
- 1차년도 연구성으로 확보된 저아밀로스벼 돌연변이 M₂집단(2,531계통)에 대하여 배 및 배유 변이체 선발을 위하여 경기도 수원시 호매실동 답에서 재식거리는 30cm×15cm, 1주 1본으로 이앙하고 시비량은 농촌진흥청 표준재배법에 준하여 재배함. 2016년 추계에 M₃ 집단 돌연변이체 선발을 위해 쌍용 SY88-TH의 현미기를 이용하여 제현시키고 현미상태에서 달관조사를 실시하여 기형립, 불완전립 등의 이형개체를 제외한 돌연변이 개체를 선발함.
- 선발 결과 2,531계통의 M₂집단에서 발생한 M₃ 배·배유 돌연변이 개체는 62계통(2.45%)임. 선발된 형질은 Middle Giant Embryo(ge_M) 3계통, Large Giant Embryo(ge_Lg) 2계통, Waxy(wx) 3계통, 소립 3계통, Chalky 41계통을 포함한 62계통의 M₃집단을 선발 2017년 하계에 시험답에 전개하고 M₄집단 수확예정임.

표 3-3. 돌연변이 처리에 의해 선발된 배유 돌연변이체 개체수

	ge_M	ge_Lg	wx	소립	chalky	기타	종합
개체수	3	2	3	3	41	10	62



그림 3-4. 돌연변이 처리에 의해 선발된 배유 돌연변이체 형태

- 변이형질이 안정된 M₄집단 62계통의 배유·입형특성의 생육특성을 농촌진흥청 연구조사 기준에 준하여 모본으로 사용한 저아밀로스 계통을 대비구로 하여 10주를 1반복으로 하여 3반복으로 간장, 출수기, 수장 등의 대표적 생육특성을 조사함.

- 변이모본인 저아밀로스 계통의 출수기는 8월 10일이며 M4 집단 대부분은 ± 5 일 내에서 출수하였고 배유특성별로 ge_M, ge_Lg, wx로 분류된 계통들은 다소 출수기가 늦은 경향을 보였으며 가장 많은 계통수를 차지하는 chalky 계통은 출수기가 앞당겨지는 경향을 보임.
- 벼의 간장 및 수장은 대부분 단간화되거나 짧아지는 경향의 특성을 보였으며 이와 같은 변이 집단의 출수기 변화, 간장 및 수장의 감소는 일반적인 돌연변이 특성으로 알려짐.
- M₄ 집단에서 신소재로 활용가능성이 높은 것으로 예상되는 거대배, 분상질 계통의 배유 돌연변이체를 15계통을 선발하 2018년 춘계에 시험포장에 정식하였으며 지속적인 선발을 수행하여 중간모본으로 활용예정.

(3) 유용 변이자원 활용 인공교배

(가) 방사선 처리에 의해 확보된 변이 고세대 계통 교배모본선발

- 2012년 γ -ray 처리 후 세대진전을 통해 선발된 배유돌연변이 고세대 자원은 20계통으로 고아밀로스 돌연변이, Waxy 유전자 돌연변이, 거대배(Giant embryo)돌연변이의 배유 특성을 가짐.
- 선발 된 계통을 SEM계통이라 명명하고 신품종을 육성하기 위한 중간모본으로 이용하여 2016년 하계에 차세대 신품종육종에 활용예정.



wx 변이체

거대배 변이체

중장립 변이체

고도심백 변이체

그림 3-5. 선발된 SEM 계통의 배유 돌연변이 종류



SEM-01



SEM-02



SEM-03



SEM-04



SEM-05



SEM-06



SEM-07



SEM-08



SEM-09



SEM-10



SEM-11



SEM-12



SEM-13



SEM-14



SEM-15



SEM-16



SEM-17



SEM-18



SEM-19



SEM-20

그림 3-6. SEM 계통의 식물체 사진

(나) 변이 고세대 계통 중간모본 선발집단 작성

○ 변이 고세대 계통을 모본으로하는 SEM Cross(SC) 계통 조합 작성

- 2015년 추계에 선발된 SEM 20계통을 2016년 시험답에 정식했으며 같은 해 하계에 교배친으로 활용하여 신품종 육성에 이용될 중간모본 후보 F₁계통조합 작성.
- 1차년도 연구결과인 변이 고세대 SEM계통을 교배친으로 사용하여 2016년 하계에 교배를 실시하고 신품종 육성을 위한 중간모본 육성에 활용함 F₁ 종자를 2017년 하계에 시험답에 전개하여 형질평가 및 선발 실시



그림 3-7. 2016년 하계에 SEM 계통을 이용한 교배조합 작성

- 2016년 하계에 SEM 계통을 이용하여 3개의 교배조합을 작성했으며 2017년 하계에 28개 교배조합을 작성하여 포장에 정식하여 선발 수행 진행중.

표 3-4. SEM 계통을 활용한 중간모본 육성

번호	계통명	교배일	출수기	배유특성
	17-SCF ₁ -1	16.08.11.	8/13	고도분질
	17-SCF ₁ -2	16.08.09.	8/9	저아밀로스
	17-SCF ₁ -3	16.08.09.	8/15	저아밀로스
	17-SCF ₂ -1	-	8/11	메벼, 고도분질
	17-SCF ₂ -2	-	8/9	분리중
	17-SCF ₂ -3	-	8/9	분리중
	18-SCF ₁ -1		8/11	ge_M
	18-SCF ₁ -2		8/11	고도심백
	18-SCF ₁ -3		8/11	고도심백
	18-SCF ₁ -4		8/11	ge_M
	18-SCF ₁ -5		8/11	고식이섭유계통
	18-SCF ₁ -6		8/11	고도심백
	18-SCF ₁ -7		8/11	분상질
	18-SCF ₁ -8		8/11	ge_M
	18-SCF ₁ -9		8/11	wx
	18-SCF ₁ -10		8/11	wx 당미
	18-SCF ₁ -11		8/14	wx

	18-SCF ₁ -12		8/14	ge_M
	18-SCF ₁ -13		8/14	ge_Lg
	18-SCF ₁ -14		8/14	고도심백
	18-SCF ₁ -15		8/14	분상질
	18-SCF ₁ -16		8/14	고도분질
	18-SCF ₁ -17		8/14	ge_M
	18-SCF ₁ -18		8/14	저단백질
	18-SCF ₁ -19		8/14	저단백질, 고식이섭유
	18-SCF ₁ -20		8/14	고식이섭유
	18-SCF ₁ -21		8/18	wx
	18-SCF ₁ -22		8/18	wx
	18-SCF ₁ -23		8/18	wx
	18-SCF ₁ -24		8/18	분상질, 단맛
	18-SCF ₁ -25		8/18	wx
	18-SCF ₁ -26		8/18	wx, ge_M
	18-SCF ₁ -27		8/18	wx, 고식이섭유
	18-SCF ₁ -28		8/18	wx, 고식이섭유

(4) 주요후보 품종의 지식재산권 확보를 위한 DNA profiling 구축

(가) NGS 분석 기법을 이용한 DNA re-sequencing

○ 주요 re-sequencing 후보품종의 포장재배

- 주요후보품종 44점(1차년도 40점, 2차년도 4점)의 유전체 재분석을 진하기 위해 포장재배를 수행함.

표 3-5. 고세대 후보품종 리스트

No.	Sequence ID	Variety No.	Generation No.	Crossing Combination
1	SEP98000	JS-6	JS3-10-31-5-1-3-1-1-1-B	주남벼XJ-43(추청*F ₂ -2)향미
2	SEP98001	JS-7	JS57-10-39-12-8-3-5-1-1	주남벼/J-42(추청*F ₂ -2)XYumechukusi
3	SEP98002	JS-8	JS56-7-34-12-7-3-1-1-1	주남벼/J-42(추청*F ₂ -2)X06-증식-16(추청*F ₂ -2)
4	SEP98003	JS-10	JS7-12-99-10-6-1-1-3-1-1-1-B	주남/J-43(추청*F ₂ -2)<우>X(진상)Dull<상>
5	SEP98004	JS-15	JS9-3-73-15-5-1-5-3-1-1-1-B	주남/J-43(추청*F ₂ -2)<우>X(진상)Dull<상>
6	SEP98005	JS-14	JS7-3-69-12-6-2-4-7-1-1-1-B	주남/J-43(추청*F ₂ -2)<우>X(진상)Dull<상>
7	SEP98006	JS-27	JS20-4-65-9-5-4-3-1-1-1-B	주남/대립1호X06-F1-85(주남/YJ*DawDam)
8	SEP98007	JS-33	JS46-7-74-17-5-2-1-1-1-1-B	주남벼XJ-25(Sigahabutae/DawDam)
9	SEP98008	JS-34	JS26-7-63-6-7-9-1-1-1-1-B	주남/J-43(추청*F ₂ -2)XJ-104(거대배찰)
10	SEP98009	JS-3	JS11-5-81-12-7-3-1-1-1-1-B	화영벼XA-31-1(당미)
11	SEP98010	JS-9	JS5-12-63-11-5-7-1-3-1-1-1-B	주남/J-43(추청*F ₂ -2)<우>X(진상)Dull<상>
12	SEP98011	JS-16	JS9-3-73-15-5-1-5-3-1-1-1-B	주남/J-43(추청*F ₂ -2)<우>X(진상)Dull<상>
13	SEP98012	JS-19	JS7-7-54-15-6-3-1-3-1-1-1-B	주남/J-43(추청*F ₂ -2)<우>X(진상)Dull<상>
14	SEP98013	JS-11	JS7-12-47-17-15-7-2-5-1-1-1-B	주남/J-43(추청*F ₂ -2)<우>X(진상)Dull<상>
15	SEP98014	유메고코	-	-

		치		
16	SEP98015	JS-1	-	-
17	SEP98016	진상벼	-	-
18	SEP98017	팔굉	-	-
19	SEP98018	진흥	-	-
20	SEP98019	밀성	-	-
21	SEP98020	유신	-	-
22	SEP98021	셋별벼	-	-
23	SEP98022	밀양 42호	-	-
24	SEP98023	도봉	-	-
25	SEP98024	설악벼	-	-
26	SEP98025	삼남벼	-	-
27	SEP98026	섬진벼	-	-
28	SEP98027	영덕	-	-
29	SEP98028	서해	-	-
30	SEP98029	미면	-	-
31	SEP98030	MS11	-	-
32	SEP98031	고시히카리	-	-
33	SEP98032	소백벼	-	-
34	SEP98033	상주벼	-	-
35	SEP98034	삼천벼	-	-
36	SEP98035	문장벼	-	-
37	SEP98036	태봉벼	-	-
38	SEP98037	둔내벼	-	-
39	SEP98038	새상주	-	-
40	SEP98039	만추벼	-	-
41	SEP98040			
42	SEP98041			
43	SEP98042			
44	SEP98043			

- 주요후보품종의 유전체 재분석 자원에 대해 1주 DNA 추출용 Sampling 자원의 종자 파종
- 혼종 방지를 위해 15 x 30 cm 재식밀도로 1품종당 1주 1분으로 총 20주에 대해 1 Line으로 포장이양.
- 당해연도 1 Line 중 10-19주는 이삭상태로 수확, 1 Line은 종자용 기본 식물로 종자활용(반영구 보존).
- 유묘기에 bulk로 sampling 한 자원은 그해 동일 자원 종자를 이용하여 파종함.

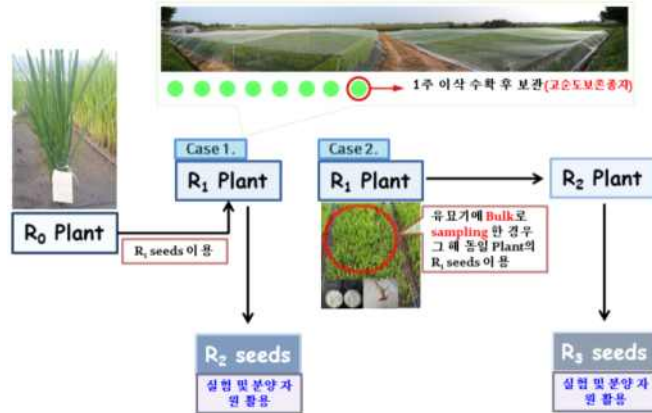


그림 3-8. 주요후보품종의 유전체재분석을 위한 시료육성 모식도

(나) 주요 후보품종의 유전체 재분석

○ 연구방법

- 주요후보품종의 전체 게놈(whole genome)에 대한 유전체재분석을 수행하였으며, 염색체(chromosome) 각각에 대한 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 및 Insertion, Deletion 영역을 분석함.

- 유전체 재분석 방법을 보면,

① 시료 샘플링 : 실험포장에서 1주 1본으로 재배된 잎을 샘플링하여 동결 건조 후 genomic DNA를 DNeasy® Plant Mini Kit(QIAGEN)를 이용하여 추출.

② g-DNA 정량 : 샘플링된 g-DNA 농도는 최소 30ng/μl가 되게 함.

③ DNA QC(Quality Control) :

- Fluorescence 농도 측정 : Quant-iT BR assay kit (Q32850, Invitrogen)의 프로토콜에 따라 시료를 희석한 후 Qubit machine(Invitrogen)을 이용하여 ds_DNA의 농도를 측정.
- UV 농도 측정 : Tecan F200(Tecan, Switzerland) 장비를 사용하여 OD 측정.
- 전기영동: 0.7% agarose gel에 Fluorescence 기준DNA 30ng loading하여 확인.
- Trinean Xpose(Trinean, Belgium) : Xpose 장비를 이용하여 ds_DNA 농도, OD값, Sample impurity를 측정.

④ Sequencing : library construction과정을 거쳐 HiSeq 2500(Illumina)을 이용하여 short read sequence 생산.

⑤ Data mapping 및 assembly : BWA, samtools, snpEff등의 BioTool을 이용하여 Mapping, Sequencing Depth 및 Coverage 확인, Variant Calling을 하여 fastq형식의 RawData 파일을 생성함.

- 유전체 재분석 결과를 이용한 SNP 및 In/Del 영역 확인.

① Data Analysis : 생성된 fastq형식의 파일을 이용하여 Data calling 및 annotation을 수행함 .

② Filtering 단계 : mapping 및 calling된 fastq 파일의 정확도(accuracy)확인과 sequencing에 이용된 adaptor, Low quality reads를 제거함. Cutadapt, sickle tool이용함.

③ Mapping 및 Sorting 단계 : Read를 Genome에 붙이는 과정. BWA, Bowtie, GMAP

tool 이용함.

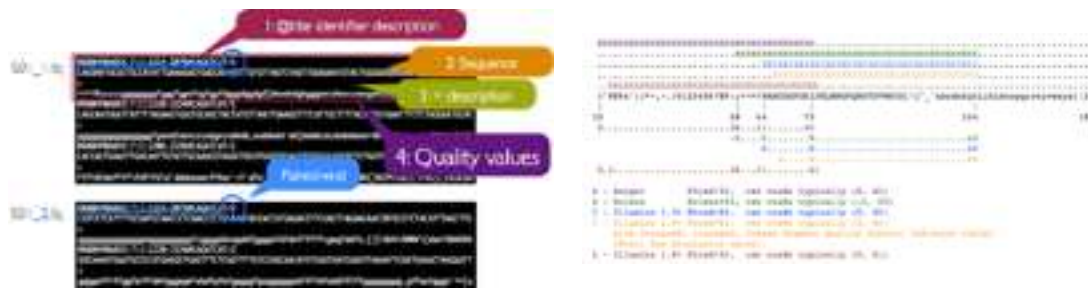


그림 3-9. fastq 파일의 형태

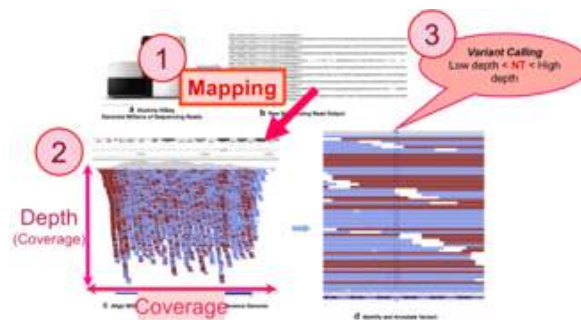
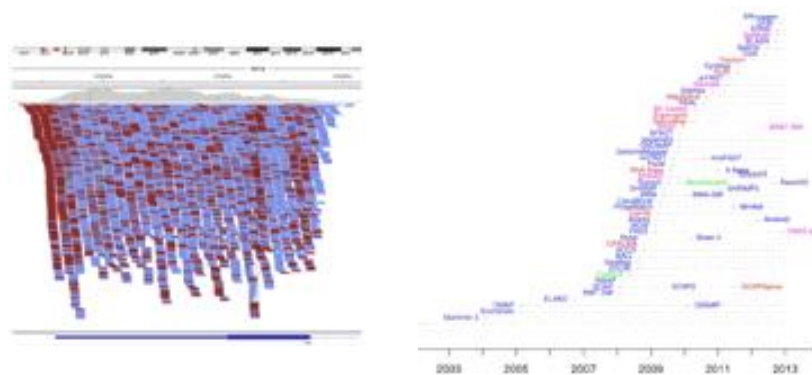


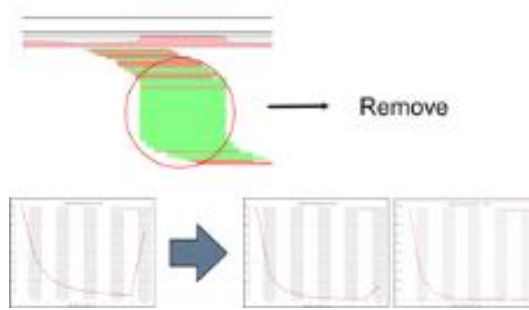
그림 3-10. 유전체 재분석 process



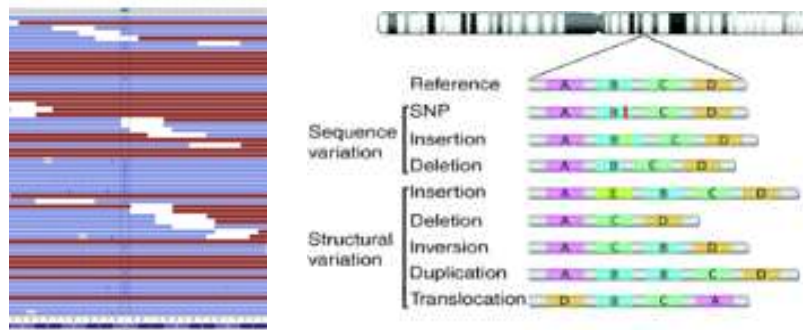
그림 9. Analysis Process



① Remove Duplication 단계 : 같은 sequence의 read가 중복되어 mapping되어 있을 경우 제거를 하는 단계. Samtools이용.



⑤ Variant Calling 단계 : Mapping 결과를 해석하여 SNP(Single Nucleotide Polymorphism)영역을 찾는 작업. Variant 종류는 SNP, Insertion(유전자 삽입), Deletion(유전자 결손)임. Samtools, GATK tool 이용.



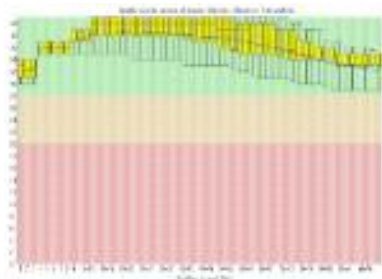
⑥ Variant Annotation 단계 : Variant에 대한 추가 정보 수집. 요구사항은 VCF분석에 사용한 Reference의 Variant정보가 있어야 함.

⑦ 벼의 유전체 염기서열인 IRSGP 1.0(International Rice Genome Sequencing Project)과 비교하여 각 염색체 상대적인 단일염기다형성 수를 측정함 .

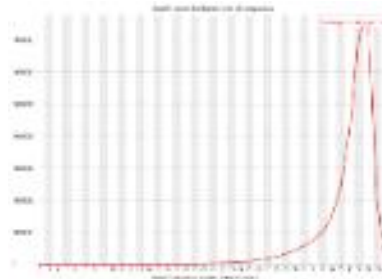
○ 연구결과

- 주요후보품종의 유전체재분석 결과 sequencing quality에 따라 sequencing 간 생성된 read가 정확하게 만들어진 것인지 판단하여, 생산된 결과가 유효한 정보인지를 파악함.

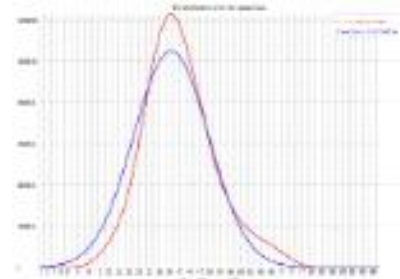
- 주요후보품종 44점(SEP98000, SEP98001, SEP98002, SEP98003, SEP98004, SEP98005, SEP98006, SEP98007, SEP98008, SEP98009, SEP98010, SEP98011, SEP98012, SEP98013, SEP98014, SEP98015, SEP98016, SEP98017, SEP98018, SEP98019, SEP98020, SEP98021, SEP98022, SEP98023, SEP98024, SEP98025, SEP98026, SEP98000, SEP98000, SEP98000, SEP98000, SEP98000, SEP98000, SEP98000, SEP98027, SEP98028, SEP98029, SEP98030, SEP98031, SEP98032, SEP98033, SEP98034, SEP98035, SEP98036, SEP98037, SEP98038, SEP98039, SEP98040, SEP98041, SEP98042, SEP98043)의 유전체 재분석 결과 5'- 3'과 3'- 5'방향으로 생산된 read는 각 position 별로 평균적으로 30-40 이상의 quality score를 보이며, 전체 quality score의 최빈값은 37-38 근처로 매우 양호한 수준임. 전체적으로 높은 sequence quality 를 보이는 것으로 판단됨. 또한 GC content 비율의 최빈값은 40-41 근처로서 theoretical distribution을 비교적 잘 근사하는 것으로 보임.



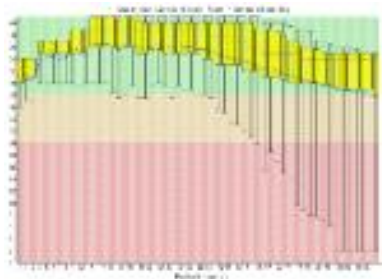
base sequence quality



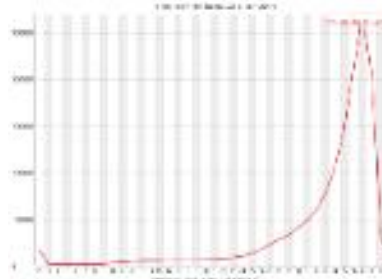
sequence quality scores



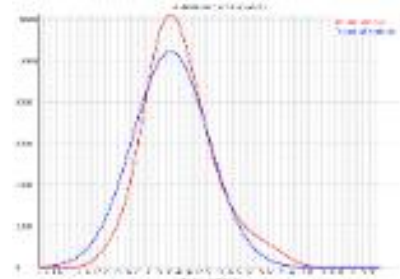
sequence GC content



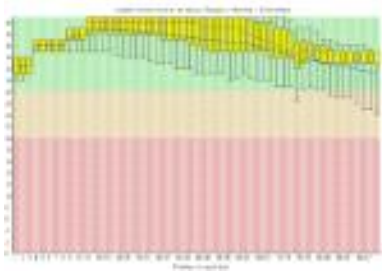
base sequence quality



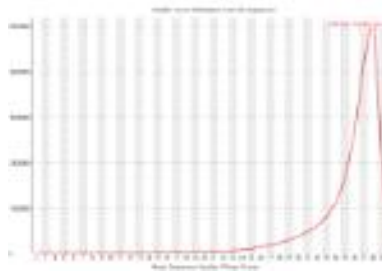
sequence quality scores



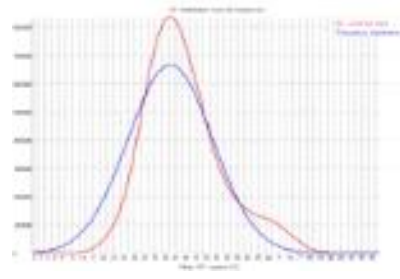
sequence GC content



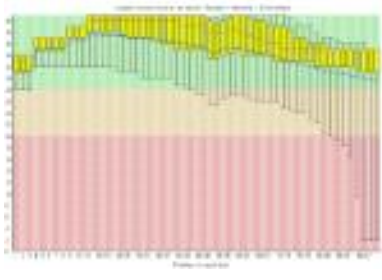
base sequence quality



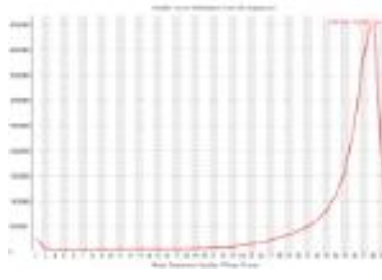
sequence quality scores



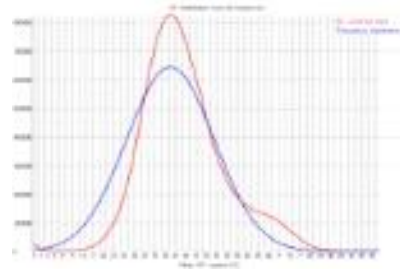
sequence GC content



base sequence quality



sequence quality scores



sequence GC content

그림 3-10. SEP98000~SEP98039.fastq sequence quality

- 앞선 결과를 바탕으로, 1차년도에 실시한 40여점의 주요후보품종의 유전체재분석 결과 정리하면 다음과 같음. Sequence read는 60,481,537개이며, Mapping rate는 98.06%로 나타남. 평균 Coverage는 14.2X이며, SNP의 total 개수는 618,212, InDel의 total 개수는 84,080으로 나타남.
- 2차년도에 주요 후보품종의 유전체 재분석(DNA Re-sequencing)을 4점을 추가로 실시했

으며 1차년도에 분석이 완료된 40점과 합쳐 44점에 대해 Haplotype 분석으로 유용 돌연변이 관련 유전자 분석함

- Sequence read는 100,493,723개이며, Mapping rate는 98.05%로 나타남. 평균 Coverage는 10.3X이며, SNP의 total 개수(missing data 포함)는 14,286,770, InDel의 total 개수는 2,946,589으로 나타남.

표 3-6. 주요후보품종의 유전체재분석 결과 정리

No.	Accession No.	Sequence read	Mapping rate(%)	Mean depth	Mean depth in gene region	SNP	InDel
1차년도	40	60,481,537	98.06	14.2X	13.6X	618,212	84,080
2차년도*	4	100,493,723	98.05	10.3X	10.02X	14,286,770	2,946,589

* missing data 포함

(5) DNA마커 이용 돌연변이 형질 조기이전

(가) NGS 분석 기법을 이용한 DNA re-sequencing

○ 배유 돌연변이 개체의 조기선발을 위해 변이판별마커의 개발 및 이용

- 배유 관련 유전자의 특이 대립유전자(allele) 분석 및 정리
- 배유 관련 유전자는 GBSS, WX, GBSSII, SS1, SS2, SS3, SBE1, PUL 유전자에 대해 특이 대립유전자를 분석함

표 3-7. 벼 배유관련 유전자 리스트

No.	Gene ID	Gene name	Position	Transcript variants	Description
1	Os06g0133000	GBSS, WX	chr06:1765622..1770653 (+ strand)	Os06t0133000-01 Os06t0133000-02	Granule-bound starch synthase I
2	Os07g0412100	GBSSII	chr07:12916883..12924202 (- strand)	Os07t0412100-01 Os07t0412100-02	
3	Os06g0160700	SS1	chr06:3079296..3086808 (- strand)	Os06t0160700-01	Starch synthase
4	Os02g0744700	SS2	chr02:31233292..31238210 (- strand)	Os02t0744700-01 Os02t0744700-02	
5	Os08g0191433	SS3	chr08:5353697..5363276 (+ strand)	Os08t0191433-01	
6	Os06g0726400	SBE1	chr06:30897378..30905803 (- strand)	Os06t0726400-01 Os06t0726400-02 Os06t0726400-03 Os06t0726400-04	starch branching enzyme1
7	Os04g0164900	PUL	chr04:4408357..4418889 (+ strand)	Os04t0164900-01	Similar to Starch debranching enzyme

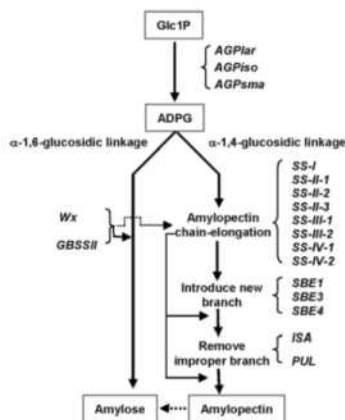


그림 3-11. 벼 배유관련 유전자의 생합성 경로(Tian et al. 2009. PNAS)

- 유전자의 특이 대립유전자 분석 방법 :

- ㉠ <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/> 사이트 접속
- ㉡ GBrowse를 통한 유전자 Gene structure 정보 검색
 - chromosome 영역을 알고 있을 경우 해당
 - ☞ 연관 유전자 영역 예시 : chr08:20379823..20385975
- ㉢ 검색된 유전자의 Gene structure 정보를 통해 5'-UTR, intron, exon, 3'-UTR 영역의 position 정보를 기록함.
- ㉣ 유전체 정보인 Variant Calling Data(VCF) 파일에서 분석될 해당유전자의 전체 position 영역을 sorting 함.
 - 해당 position이 chromosome 8번에 20379823에서20385975일 경우
 - ☞ 서버이용 : `python /data/soft/selectvcf_chr.py data/newdata/SNPcalling/bam/RWG-ALL.dedup.AddrG.realn.vcf output-filename 20379823 20385975 chr08`
- ㉤ 해당 유전자 영역이 sorting되어 나온 파일은 숫자열로서 문자열(sequence)로 변환함
 - `python /data/soft/vcf-snp_haplotype.py input-filename output-filename_Hap`
- ㉥ 변환되어진 파일에서 reference sequence와 다른 alternative sequence에 대해 구분
- ㉦ 해당 유전자 내 각 position을 길이(base pare)로 변환함.
 - (해당 SNP position - Haplotype 분석을 하는 Gene의 시작 position) + 1의 계산식 적용
- ㉧ ㉣의 순서에서 각 영역별로 fasta형식의 sequence 데이터를 복사함
- ㉨ Geneious 프로그램을 이용하여 신규 sequence명으로 파일을 만들고, 각 영역별로 복사해온 sequence를 저장함.
- ㉩ 전체 해당 gene 영역의 sequence와 exon 영역의 sequence를 alignment함.
- ㉪ Alignment 되어진 파일을 통해 exon 영역의 sequece를 count할 수 있으며, 앞서 준비한 해당 유전자의 sorting 및 길이로 변환된 파일에서 Haplotype 분석 실시함.

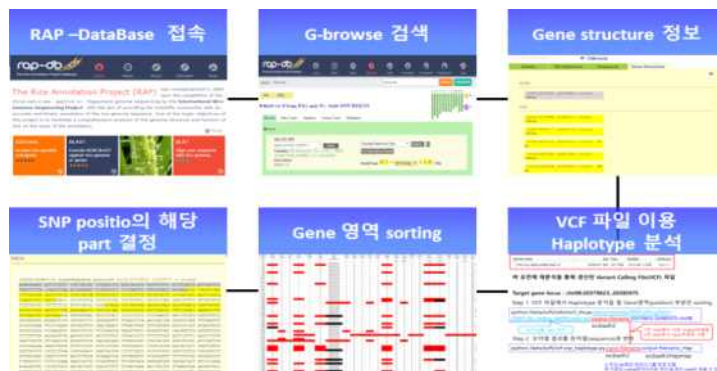
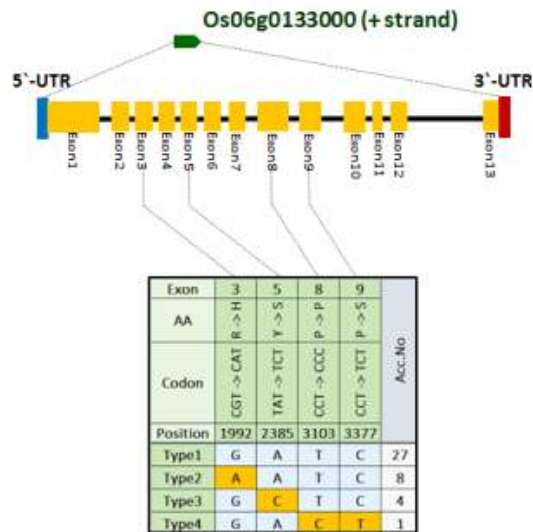


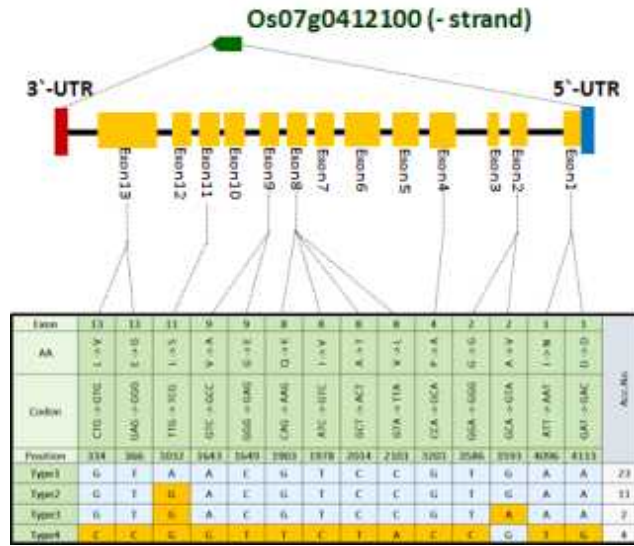
그림 3-12. 유전체 정보이용 Haplotype분석 모식도

- 1차년도 벼 배유 관련 유전자 Haplotype 분석
 - GBSS, wx 유전자(Os06g0133000) Haplotype 분석



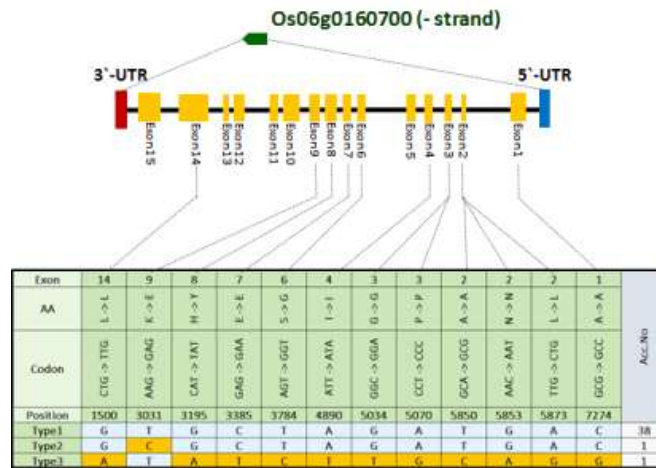
- 본 GBSS 및 wx 유전자에 대해 40개 주요후보품종이 총 4개의 haplotype으로 구분되었으며, type1에서 27개의 주요후보품종이 표준유전체와 동일한 allele을 가지고 있었음. 이는 GBSS 및 wx 유전자의 특이 allele을 가지고 있지 않는 것으로 평가 됨.
- Type2의 경우 exon3번에서 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 변이된 allele을 가지고 있었으며, 코딩 서열 중 Arginine에서 Histidine으로 아미노산이 변화를 일으키는 염기치환(non-synonymous substitution)을 보였음.
- Type 3의 경우 exon5번에서 아데닌(A)이 사이토신(C)의 allele을 가지고 있었으며, Tryosine에서 Serine으로 아미노산이 변화를 일으키는 염기치환을 보였음.
- Type4에서는 exon8번에서 티민(T)이 사이토신(C)의 allele을 가지고 있었으나, 아미노산이 변화를 일으키지 않는 동의치환(synonymous)을 보였음. exon9번에서 사이토신(C)이 티민(T)의 allele을 가지고 있었으며, Proline에서 Serine으로 아미노산이 변화를 일으키는 염기치환을 보였음.
- 각 Type별 allele들은 향후 GBSS 및 wx 유전자의 특이 마커로 개발 가능하며, 이는 주요후보품종의 미질특이 마커로 활용 가능할 것으로 예상됨.

- GBSS II 유전자(Os07g0412100) Haplotype 분석



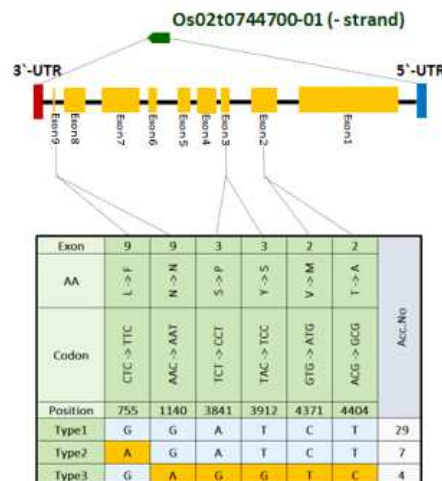
- 본 GBSS II 유전자에 대해 40개 주요후보품종이 총 4개의 haplotype으로 구분되었으며, type1에서 23개의 주요후보품종이 표준유전체와 동일한 allele을 가지고 있었음. 이는 GBSS II 유전자의 특이 allele을 가지고 있지 않는 것으로 평가 됨.
- Type2의 경우 exon11번에서 아데닌(A)이 구아닌(G)으로 변이된 allele을 가지고 있었으며, 코딩 서열 중 Leucine에서 Serine으로 아미노산이 변화를 일으키는 염기치환 (non-synonymous substitution)을 보였음.
- Type 3의 경우 exon11번에서 아데닌(A)이 구아닌(G)으로 변이된 allele을 가지고 있었으며, 코딩 서열 중 Leucine에서 Serine으로 아미노산이 변화를 일으키는 염기치환 (non-synonymous substitution)을 보였음. exon2번에서 구아닌(G)이 아데닌(A)의 allele을 가지고 있었으며, Alanine에서 Valine으로 염기치환을 보였음.
- Type4에서는 exon13번에서 구아닌(G)이 사이토신(C)으로, 티민(T)이 사이토신(C)의 allele을 가지고 있었으며, Leucine이 Valine으로 아미노산 변화를 일으키는 염기치환을 보였음
- 각 Type별 allele들은 향후 GBSS II 유전자의 특이 마커로 개발 가능하며, 이는 주요 후보품종의 미질특이 마커로 활용 가능할 것으로 예상됨.

- SS1 유전자(Os06g0160700) Haplotype 분석



- 본 SS1 유전자에 대해 40개 주요후보품종이 총 3개의 haplotype으로 구분되었으며, type1에서 38개의 주요후보품종이 표준유전체와 동일한 allele을 가지고 있었음. 이는 SS1 유전자의 특이 allele을 가지고 있지 않는 것으로 평가 됨.
- Type2의 경우 exon9번에서 티민(T)이 사이토신(C)으로 변이된 allele을 가지고 있었으며, 코딩 서열 중 Lysine에서 Glutamic acid으로 아미노산이 변화를 일으키는 염기치환 (non-synonymous substitution)을 보였음.
- Type 3의 경우 exon8번에서 구아닌(G)이 아데닌(A)의 allele을 가지고 있었으며, Histidine이 Tyrosine으로 아미노산 변화를 일으키는 염기치환을 보였음.
- 각 Type별 allele들은 향후 SS1 유전자의 특이 마커로 개발 가능하며, 이는 주요후보 품종의 미질특이 마커로 활용 가능할 것으로 예상됨.

- SS2 유전자(Os02t0744700-01) Haplotype 분석

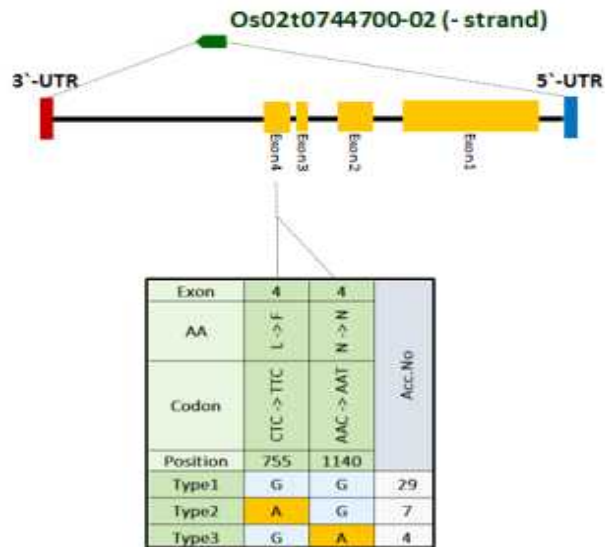


- 본 SS2 유전자(Os02t0744700-01)에 대해 40개 주요후보품종이 총 3개의 haplotype으

로 구분되었으며, type1에서 29개의 주요후보품종이 표준유전체와 동일한 allele을 가지고 있었음. 이는 SS2 유전자의 특이 allele을 가지고 있지 않는 것으로 평가 됨.

- Type2의 경우 exon9번에서 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 변이된 allele을 가지고 있었으며, 코딩 서열 중 Leucine에서 Phenyl alanine으로 아미노산이 변화를 일으키는 염기치환(non-synonymous substitution)을 보였음.
- Type3의 경우 exon3번에서 아데닌(A)이 구아닌(G)으로 변이된 allele을 가지고 있었으며, 코딩 서열 중 Serine에서 Proline으로 아미노산이 변화를 일으키는 염기치환(non-synonymous substitution)을 보였음.
- 각 Type별 allele들은 향후 SS2 유전자의 특이 마커로 개발 가능하며, 이는 주요후보 품종의 미질특이 마커로 활용 가능할 것으로 예상됨.

- SS2 유전자(Os02t0744700-2) Haplotype 분석

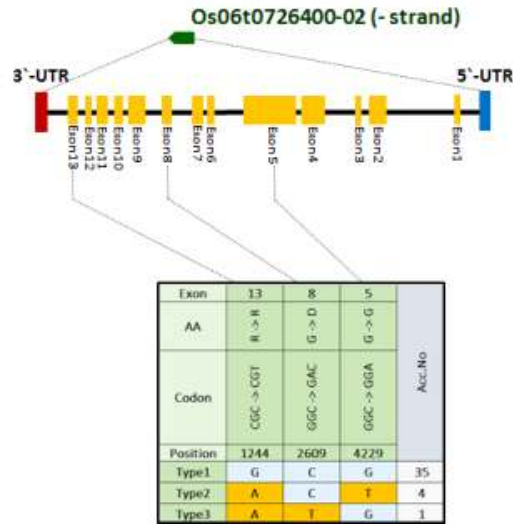


- 본 SS2 유전자(Os02t0744700-2)에 대해 40개 주요후보품종이 총 3개의 haplotype으로 구분되었으며, type1에서 29개의 주요후보품종이 표준유전체와 동일한 allele을 가지고 있었음. 이는 SS3 유전자의 특이 allele을 가지고 있지 않는 것으로 평가 됨.
- Type2의 경우 exon4번에서 구아닌(G)이 아데닌(A)으로 변이된 allele을 가지고 있었으며, 코딩 서열 중 Leucine에서 Phenyl alanine으로 아미노산이 변화를 일으키는 염기치환(non-synonymous substitution)을 보였음.
- 앞서 보여진 Os02t0744700 - 01 유전자의 isoform과는 다른 결과를 보였음.
- 각 Type별 allele들은 향후 SS2 유전자의 특이 마커로 개발 가능하며, 이는 주요후보 품종의 미질특이 마커로 활용 가능할 것으로 예상됨.

- SS3 유전자(Os08g0191433) Haplotype 분석

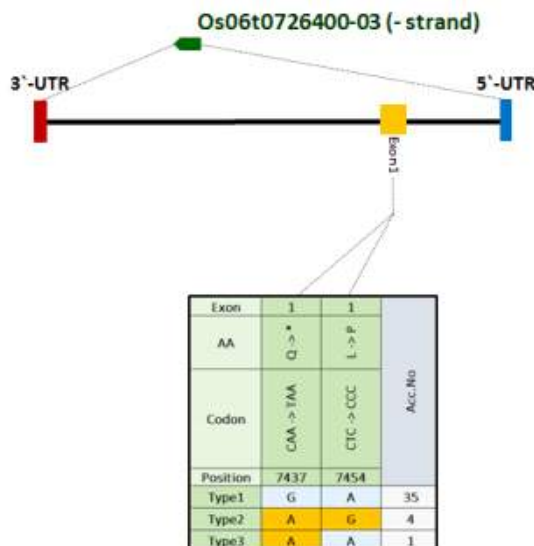
서열 중 Glycine에서 Aspartic acid로 아미노산이 변화를 일으키는 염기치환 (non-synonymous substitution)을 보였음.

- SBE1 유전자(Os06t0726400-02) Haplotype 분석



- 본 SBE1 유전자(Os06t0726400-02)에 대해 40개 주요후보품종이 총 3개의 haplotype으로 구분되었으며, type1에서 35개의 주요후보품종이 표준유전체와 동일한 allele을 가지고 있었음. 이는 SBE1 유전자의 특이 allele을 가지고 있지 않는 것으로 평가 됨.
- Type3의 경우 exon9번에서 사이토신(C)이 티민(T)의 allele을 가지고 있었으며, 코딩 서열 중 Glycine에서 Aspartic acid로 아미노산이 변화를 일으키는 염기치환 (non-synonymous substitution)을 보였음.

- SBE1 유전자(Os06t0726400-03) Haplotype 분석

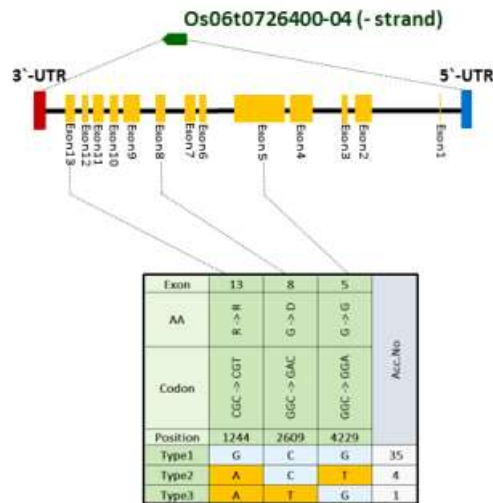


- 본 SBE1 유전자(Os06t0726400-03)에 대해 40개 주요후보품종이 총 3개의 haplotype으로

로 구분되었으며, type1에서 35개의 주요후보품종이 표준유전체와 동일한 allele을 가지고 있었음. 이는 SBE1 유전자의 특이 allele을 가지고 있지 않는 것으로 평가 됨.

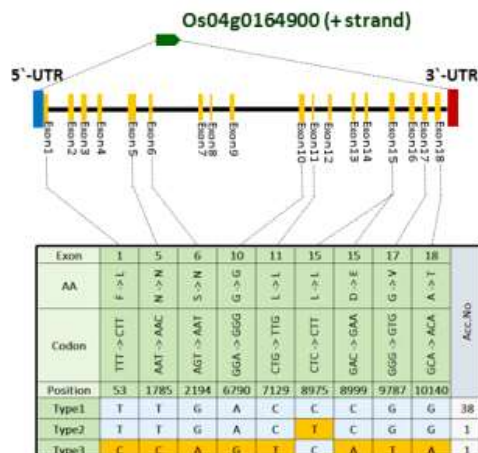
- Type2의 경우 exon1번에서 구아닌(G)이 아데닌(A)의 allele을 가지고 있었으며, 코딩 서열 중 Glutamine에서 Stop codon으로 변화하였으며, exon1번에 다른 위치에 있는 아데닌(A)이 구아닌(G)의 allele을 가지고 있었으며, 이로 인해 Leucine에서 Proline으로 아미노산이 변화를 일으키는 염기치환(non-synonymous substitution)을 보였음.
- Type3의 경우 exon1번에서 구아닌(G)이 아데닌(A)의 allele을 가지고 있었으며, 코딩 서열 중 Glutamine에서 Stop codon으로 변화를 보였음.

- SBE1 유전자(Os06t0726400-04) Haplotype 분석

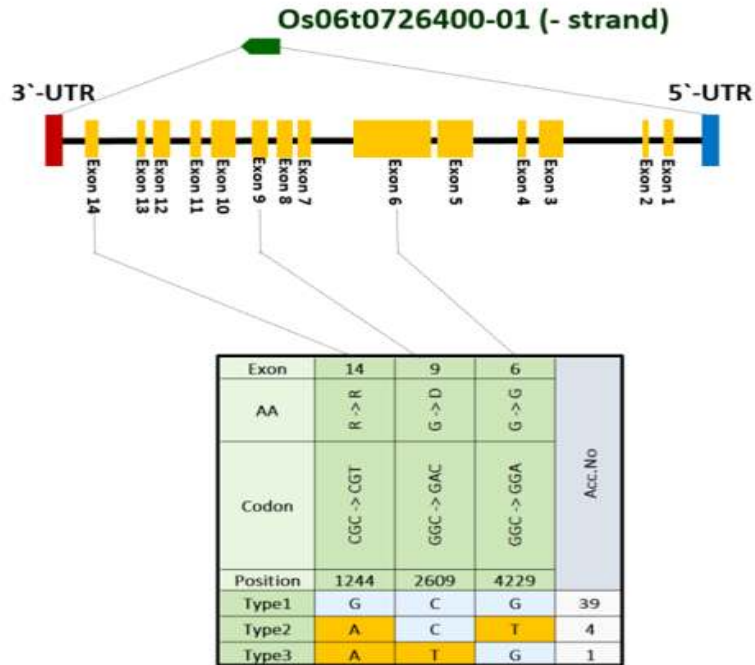


- 본 SBE1 유전자(Os06t0726400-04)에 대해 40개 주요후보품종이 총 3개의 haplotype으로 구분되었으며, type1에서 35개의 주요후보품종이 표준유전체와 동일한 allele을 가지고 있었음. 이는 Os06t0726400-01 유전자와 동일한 결과를 나타내었음.
- SBE1 유전자의 경우 4개의 isoform이 존재하였으며, 서로 같거나 다른 결과가 나타남.

- PUL 유전자(Os04g0164900) Haplotype 분석

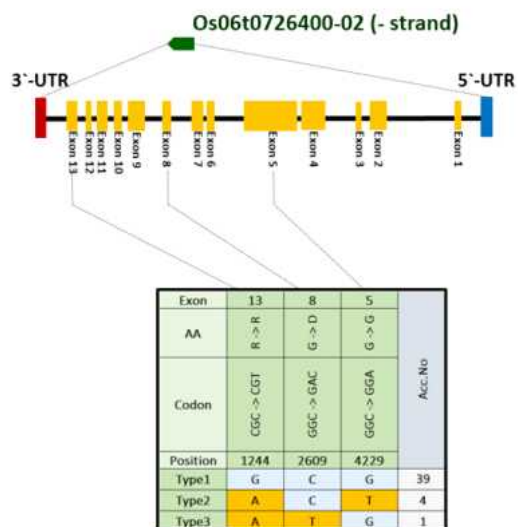


- SBE1 유전자(Os06t0726400-01) Haplotype 분석



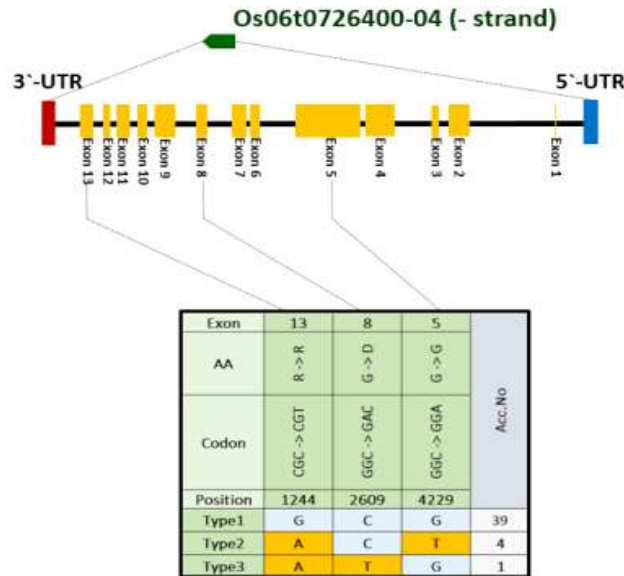
- 본 SBE1 유전자(Os06t0726400-01)에 대해 44개 주요후보품종이 총 3개의 haplotype으로 구분되었으며, type1에서 39개의 주요후보품종이 표준유전체와 동일한 allele을 가지고 있었음. 이는 SBE1 유전자의 특이 allele을 가지고 있지 않는 것으로 평가 됨.
- Type3의 경우 exon9번에서 사이토신(C)이 티민(T)의 allele을 가지고 있었으며, 코딩 서열 중 Glycine에서 Aspartic acid로 아미노산이 변화를 일으키는 염기치환 (non-synonymous substitution)을 보였음.

- SBE1 유전자(Os06t0726400-02) Haplotype 분석



- 본 SBE1 유전자(Os06t0726400-02)에 대해 44개 주요후보품종이 총 3개의 haplotype으로 구분되었으며, type1에서 39개의 주요후보품종이 표준유전체와 동일한 allele을 가지고 있었음. 이는 SBE1 유전자의 특이 allele을 가지고 있지 않는 것으로 평가 됨.
- Type3의 경우 exon9번에서 사이토신(C)이 티민(T)의 allele을 가지고 있었으며, 코딩 서열 중 Glycine에서 Aspartic acid로 아미노산이 변화를 일으키는 염기치환(non-synonymous substitution)을 보였음.

- SBE1 유전자(Os06t0726400-03) Haplotype 분석

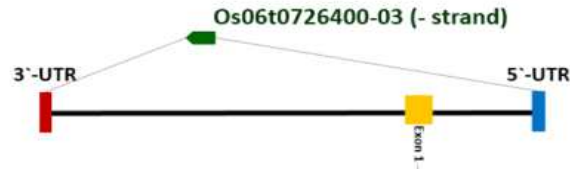


- 본 SBE1 유전자(Os06t0726400-03)에 대해 44개 주요후보품종이 총 3개의 haplotype으로 구분되었으며, type1에서 39개의 주요후보품종이 표준유전체와 동일한 allele을 가지고 있었음. 이는 SBE1 유전자의 특이 allele을 가지고 있지 않는 것으로 평가 됨.
- Type2의 경우 exon1번에서 구아닌(G)이 아데닌(A)의 allele을 가지고 있었으며, 코딩 서열 중 Glutamine에서 Stop codon으로 변화하였으며, exon1번에 다른 위치에 있는 아데닌(A)이 구아닌(G)의 allele을 가지고 있었으며, 이로 인해 Leucine에서 Proline으로 아미노산이 변화를 일으키는 염기치환(non-synonymous substitution)을 보였음.
- Type3의 경우 exon1번에서 구아닌(G)이 아데닌(A)의 allele을 가지고 있었으며, 코딩 서열 중 Glutamine에서 Stop codon으로 변화를 보였음.

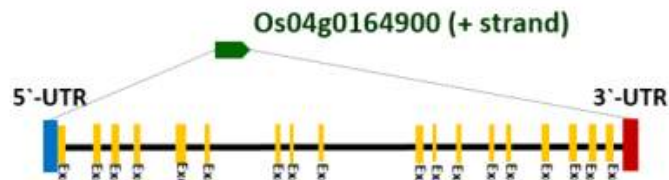
- SBE1 유전자(Os06t0726400-04) Haplotype 분석

- 본 SBE1 유전자(Os06t0726400-04)에 대해 44개 주요후보품종이 총 3개의 haplotype으로 구분되었으며, type1에서 39개의 주요후보품종이 표준유전체와 동일한 allele을 가지고 있었음. 이는 Os06t0726400-01 유전자와 동일한 결과를 나타내었음.
- SBE1 유전자의 경우 4개의 isoform이 존재하였으며, 서로 같거나 다른 결과가 나타남.

- PUL 유전자(Os04g0164900) Haplotype 분석



Exon	1	1	Acc.No
AA	Q->*	L->P	
Codon	CAA->TAA	CTC->CCC	
Position	7437	7454	
Type1	G	A	39
Type2	A	G	4
Type3	A	A	1



Exon	1	5	6	10	11	15	15	17	18	Acc.No
AA	F->L	N->N	S->N	G->G	L->L	L->L	D->E	G->V	T->A	
Codon	TTT->CTT	AAT->AAC	AGT->AAT	GGA->GGG	CTG->TTG	CTC->CTT	GAC->GAA	GGG->GTG	GCA->ACA	
Position	53	1785	2194	6790	7129	8975	8999	9787	10140	
Type1	T	T	G	A	C	C	C	G	G	42
Type2	T	T	G	A	C	T	C	G	G	1
Type3	C	C	A	G	T	C	A	T	A	1

- 본 PUL 유전자에 대해 44개 주요후보품종이 총 3개의 haplotype으로 구분되었으며, type1에서 42개의 주요후보품종이 표준유전체와 동일한 allele을 가지고 있었음. 이는 PUL 유전자의 특이 allele을 가지고 있지 않는 것으로 평가 됨.
- Type3의 경우 exon1번에서 티민(T)이 사이토신(C)의 allele을 가지고 있었으며, 코딩 서열 중 Phenyl alanine에서 Leucine으로 아미노산이 변화를 일으키는 염기치환 (non-synonymous substitution)을 보였음.

○ 유용유전자 확보 및 allele 조합을 이용한 신규 분자마커 개발

- 신규 분자마커 개발개요

① Geneious 프로그램을 이용하여 allele의 position에서 ± 5bp정도의 영역을 선택함

② Design New Primers를 누르고 Included Region 설정값은 해당 allele의 position을 기준으로 ± 1,000bp정도로 설정, Target Region 설정값은 ± 5bp정도로 설정

- Included Region의 설정값을 ± 1,000bp로 설정하는 이유는 해당 allele과 너무 가까운 position일 때 primer design을 하면 product size에 제한으로 여러개의 primer를 design

할 수 없음

- Target Region에 $\pm 5bp$ 정도 여유를 두는 이유는 primer가 해당 allele 부위를 합성할 때 일부분을 생략할 경우를 대비하기 위함

© Design된 primer를 *.csv 확장자로 저장함



그림 3-13. 신규마커 개발 모식도

- 벼 배유 관련 allele 조합을 이용한 신규 분자마커 개발
 - 벼 배유 관련 유전자 Haplotype 분석을 통한 각 유전자 별 신규 allele target 마커 세트 개발 완료함. 본 개발 마커는 벼 배유 및 미질 관련 자원과 배유 돌연변이 개체의 조기선발을 위해 변이 관별마커로 활용함.

표 8. 유용유전자 확보 및 allele 조합을 이용한 신규 분자마커 개발 리스트

Name	Type	Sequence	Minimum	Maximum	Length	Direction	Product Size
Os06g01330 00 - R	primer_bind _reverse	CGCTGGTATCCC AAGCGT	1,804	1,821	18	reverse	281
Os07g04121 00 - R	primer_bind _reverse	CGCTGGTATCCC AAGCGT	1,804	1,821	18	reverse	242
Os06g01607 00 - R	primer_bind _reverse	CGCTGGTATCCC AAGCGT	1,804	1,821	18	reverse	218
Os02g07447 00 - R	primer_bind _reverse	CGCTGGTATCCC AAGCGT	1,804	1,821	18	reverse	274
Os08g01914 33 - R	primer_bind _reverse	CGCTGGTATCCC AAGCGT	1,804	1,821	18	reverse	280
Os06g07264 00 - R	primer_bind _reverse	CGCTGGTATCCC AAGCGT	1,804	1,821	18	reverse	246
Os04g01649 00 - R	primer_bind _reverse	CGCTGGTATCCC AAGCGT	1,804	1,821	18	reverse	253
Os06g01330 00 - F	primer_bind	GTGACGTCCTC GGTGGC	1,604	1,620	17	forward	218
Os07g04121 00 - F	primer_bind	CCTGGAGCAAG ACCGGC	1,580	1,596	17	forward	242
Os06g01607 00 - F	primer_bind	GCCCCCTGGAG CAAGAC	1,576	1,592	17	forward	246
Os02g07447 00 - F	primer_bind	CGAGATGGCCC CCTGGA	1,569	1,585	17	forward	253
Os08g01914 33 - F	primer_bind	GAACGTCGTGT TCGTGG	1,548	1,565	18	forward	274
Os06g07264 00 - F	primer_bind	CGGCATGAACG TCGTGTT	1,542	1,559	18	forward	280
Os04g01649 00 - F	primer_bind	CCGGCATGAAC GTCGTGT	1,541	1,558	18	forward	281

(6) 변이활용 고세대 계통 특성분석

(가) 변이활용 고세대 계통의 영양성분 분석 및 품종판별 마커 개발

- 벼 품종의 사업화를 위해서는 양곡 관리법에 의거하여 품종 정보와 영양성분 표기가 요구 됨으로 사업화 대상 품종에 대하여 영양성분 및 품종 판별 마커 분석을 수행함
 - 품종보호권 출원 후보 10계통에 대하여 14개(수분, 회분, 지방, 단백질, 탄수화물, 칼로리, 불용성 식이섬유, 수용성 식이섬유, Ca, P, K, Fe, Na, Mg) 항목에 대하여 실용화재단 농식품 분석팀에 영양성분 분석을 의뢰하여 수행함.

표 9. 품종보호권 출원 후보 10계통에 대한 영양성분 분석 결과

	15-JS-10	15-JS-4	15-JS-12	15-JS-9	15-JS-9	15-JS-2	15-JS-30	15-JS-19	15-JS-22	15-JS-6
수분(g/100g)	11.38	12.57	15.57	13.06	13.08	12.18	12.54	11.93	11	11.47
회분(g/100g)	0.56	0.35	0.28	0.3	0.91	1.3	0.94	0.36	1.2	0.41
조지방(g/100g)	0.52	0.27	0.44	0.21	1.6	2.87	3.48	0.58	2.98	0.47
조단백질(g/100g)	6.02	5.69	5.28	5.01	5.68	6.56	6.38	5.73	5.69	4.89

탄수화물(g/100g)	81.53	81.12	78.44	81.41	78.73	77.09	76.66	81.41	79.13	82.76	
칼로리(kcal)	363.55	358.49	347.29	356.56	359.74	367.02	369.74	362.44	372.98	363.83	
Ca(mg/100g)	9.64	9.42	9.41	9.25	12.08	16.61	8.16	15.45	16.11	10.62	
P(mg/100g)	105.64	73.56	80.88	73.59	215.66	287.89	67.84	265.68	265.05	90.91	
K(mg/100g)	113.41	86.63	88.76	88.43	232.11	302.65	92.13	338.42	336.55	99.79	
Fe(mg/100g)	3.93	2.15	1.66	1.08	1.66	2.04	1.19	1.39	1.81	1.03	
Na(mg/100g)	19.01	12.47	10.33	9.33	6.38	4.4	8.8	11.15	11.22	8.93	
Mg(mg/100g)	35.16	18.26	25.12	17.93	76.15	104.95	21.47	99.12	98.09	26.99	
식이섬유 (g/100g)	IDF	1.75	1.57	1.41	1.23	3.22	10.62	11.28	1.4	6.29	1.4
	SDF	0.5	0.45	0.41	0.32	0.52	0.29	0.55	0.28	0.53	0.26
	TDF	2.25	2.02	1.82	1.55	3.74	10.91	11.83	1.68	6.82	1.66

○ 변이고세대 계통 사업화를 위한 품종판별 마커 개발

- 양곡 관리법에 의하면 쌀 제품 포장지에 품종을 표기하기 위해서는 공인 검사기관의 벼 품종 검정이 필요로 하며 따라서 변이고세대 계통의 사업화를 위해서는 신규 개발된 신 품종에 대해 112개의 마커를 이용하여 보다 정밀한 시험을 거쳐 품종판별 마커 DB화가 필요함.
- 품종검정은 국립농산물품질 관리원의 ‘벼(쌀) 품종 검정 매뉴얼’에 의거하여 농업기술 실용화재단 농식품 분석팀에 품종검정시험과 신품종DB등록시험을 의뢰하여 분석했으며 사업화 대상 품종인 ‘골든퀸2호’에 대한 품종 판별 마커DB 구축완료.

표 10. 벼 품종검정 시험에 이용되는 다중 PCR법 혼합 프라이머 조성표

구분	Set 1			Set 2		
	마커명	Size(bp)	농도(pmol/uL)	마커명	Size(bp)	농도(pmol/uL)
1	DK601	701	1.5	DK1361	712	15
2	DK34	600	1.5	DK1123	632	22
3	DK63	514	3	Dk2708	539	30
4	DK17(1)	472	3	DK600	429	9
5	DK2171	406	4	DK560	341	3
6	DK1412	314	4	DK2401	286	8
7	DK50	229	20	DK2511	222	3
8	DK2394	180	5			

(7) 변이 고세대 계통의 지식재산권 출원

(가) 고양식미 저아밀로스 향미 벼 신품종 ‘골든퀸2호’

- ‘골든퀸2호’ 품종은 소득향상과 함께 미래 식문화 변화에 따른 우수한 향 특성이 가미된 세계 최고수준의 자포니카 고기능성 양질미 품종개발을 목적으로 육성하였다. 우선 향 특성의 유전자원을 수집, 평가하여 방향성이 강하면서 우수하고 국제적으로 품종육성에 사용되지 않은 잡초성 재래자원을 선발하였다. 약한 정도의 향 특성을 양식미 자포니카 형으로 창출하기 위해 유메추쿠시 벼에 향 특성 재래수집 자원을 인공교배 후 수정란에 MNU 처리하여 약한 정도의 향 특성을 갖는 MLAR-53 (mutant low aromatic rice) 계통을 선발하여 다시 추청벼에 인공교배한 후, 약한 정도의 향 특성을 갖는 안정적 계통

을 육성하였다. 1999년 동계 단간다수의 주남벼를 모본으로 저항 계통을 교배하여 고정시킨 후 2004년 하계에 양식미적 저아밀로스 특성을 갖는 선발계통과 교배하여 F₁ 종자를 수확하였다. 상기 F₁ 종자를 계통육종법에 따라 세대를 진전시키면서 현미 외관품위 우수, 재배특성 양호 및 저항 및 저아밀로스미 특성을 갖는 JS5-12-63-11-5-7-1-3-1-1-1-B-B-1를 선발하였다. 공시 결과 재배특성, 지역적응성, 가공적성 및 생산력 검정에서 양호하여 SP-E007로 계통명을 부여하고 품종보호출원 함. ‘골든퀸2호’의 육성과정은 그림 00와 같다.



그림 3-14. 고양식미 저아밀로스 향미 벼 신품종 ‘골든퀸2호’ 육성 계보도

○ ‘골든퀸2호’의 기본농업형질 및 종실특성

- ‘골든퀸2호’은 간장 69.2cm, 출수기가 8월8일인 중조생종이며 이삭길이는 19.2cm임 현미 천립중은 22.72g임

표 3-11. 골든퀸2호의 기본농업형질 특성

구분	간장(cm)	수장(cm)	출수기	수량성 (kg/10a)	현미 천립중(g)
추청	80.85	19.53	8/18	516	21.17
골든퀸 2호	69.23	19.22	8/8	528	22.72

- 골든퀸 2호는 4정도의 투명도를 보였고, 아밀로스 함량이 12.0% 수준으로 대조품종에 비해 낮고, 현미 단백질함량은 6.4%로 대조품종과 유사하였음 토요식미치는 83 수준으로 대조품종의 76 보다 높아 밥맛이 대단히 우수한 것으로 나타남.

표 3-12. 골든퀸3호의 종실특성

구분	투명도 (1-9)	심/복백 (0-9)	아밀로스함량 (현미, %)	단백질함량 (현미, %)	단백질함량 (백미, %)	도요식미값
추청	1	0/1	18.2	6.3	5.6	76
골든퀸 2호	4	-	12.0	6.4	5.9	83

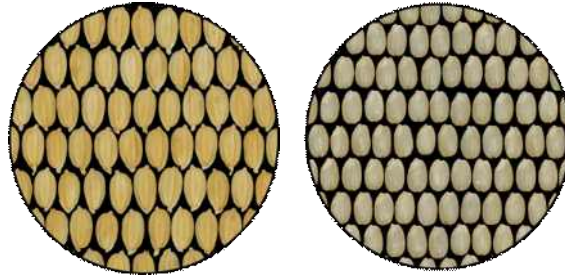


그림 3-15. 골든퀀2호의 식물체와 종실 사진(정조,현미)

(나) 당질미 품종인 신품종 벼 ‘스위트드림1세’

- ‘스위트드림1세’는 밥쌀용 쌀 소비 감소와 쌀 재고량 증가로 인한 쌀 산업 위기를 수요가 증가하고 있는 가공용 쌀 재배로 극복하고 소비자 요구에 다양성을 제공하고 당질미를 활용한 다양한 가공적성 쌀 품종을 공급하기 위하여 육성되었다. 2002년 중국 길림성 수집 조생찰(KNUR42225) 계통의 돌연변이 유기를 위해 수정란에 MNU 처리하고 Waxy 특성의 sugary변이체 KNUR42225M(1132)-79-12-3-1 계통을 선발했다. 2007년 하계에 화영벼를 모본으로 Waxy 특성의 sugary 변이체 KNUR42225M(1132)-79-12-3-1을 부분으로 교배하여 2008년 하계에 F1을 과종했다. 상기 F1 종자를 계통육종법에 따라 세대를 진전시키면서 초형이 우수, 재배특성 양호 및 sugary특성을 갖는 JS12-5-81-12-7-3-1-1-B-B를 선발하였다. 공시 결과 재배특성, 지역적응성, 가공적성 및 생산력 검정에서 양호하여 SP47로 계통명을 부여하고 품종보호출원 함.

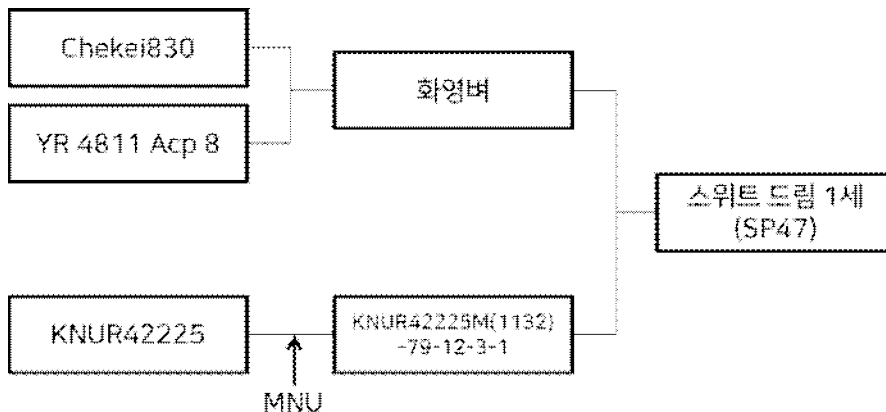


그림 3-16. 당질미 품종인 신품종 벼 ‘스위트드림1세’ 육성 계보도

- ‘스위트드림1세’의 기본농업형질 및 종실특성
 - ‘스위트드림1세’은 간장 79.2cm, 출수기가 8월19일인 중만생종이며 이삭길이는 19.5cm임 현미 천립중은 18.99g임

표 3-13. 스위트드림1세의 기본농업형질 특성

구분	간장(cm)	수장(cm)	출수기	수량성 (kg/10a)	현미 천립중(g)
추청	80.70	19.40	8/18	529	21.13
골든퀸 2호	79.20	19.50	8/19	418	18.99

- 스위트 드림 1세는 찹쌀의 당질미로 9정도의 투명도를 보였고, 현미 100g당 총식이섬유 함량은 10.91g 수준으로 대조품종(1.82g)에 비해 매우 높고, 현미 단백질함량에서도 7.5%로 대조품종(6.3)보다 높음 총 유리당 함량에서는 5.5% 수준으로 대조품종의 1.7% 보다 매우 높았음.

표 3-14. 스위트드림1세의 종실특성

구분	투명도 (1-9)	아밀로스함량 (현미, %)	단백질함량 (현미, %)	식이섬유함량 (g/100g)	총유리당함량 (%)
추청	1	18.4	6.3	1.82	1.7
스위트 드림1세	9	-	7.5	10.91	5.5

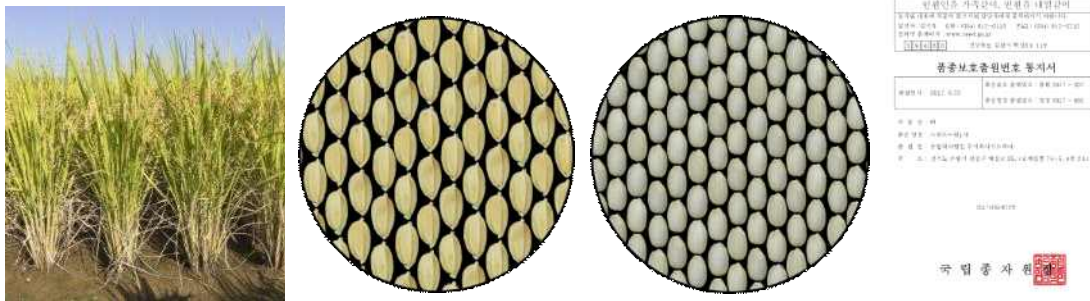


그림 3-17. 스위트드림1세의 식물체와 종실 사진(정조,현미)

(다) 건강기능성 벼 품종 ‘천수향큰눈찰1세’

- ‘천수향 큰눈찰 1세’는 식문화 변화에 따른 소비자 기호 다양성 및 건강 기능성미에 부합하는 품종소재의 개발을 목적으로 육성함. 건강 기능성미 계통을 육성하고자 공주대학교 식물자원학과 보유의 중국 길림성 수집자원 찰벼 계통인 KNU0090217에 2000년 3월 감마선 250Gray 조사에 의해 변이체에서 선발된 큰눈특성의 JSEM312-26-15-6-1-1 계통을 선발하여 단간 다수의 주남벼를 모본으로 기 개발된 J-43을 부분으로 하여 인공교배에 의해 고정계통인 HJ-11을 육성 2007년부터 F₂ 종자를 계통육종법에 따라 세대를 진전시키면서 현미 외관품위, 재배특성 양호한 JS26-9-63-6-5-3-1-1-1-B-B를 선발함. 선발된 계통에 대해 SPEM-09로 계통명을 부여하고, 2015년 ~ 2016년에 난괴법 3반복으로 생산력검정을 수행하고, 농가 실증시험을 수행한 결과 품종의 균일성과 재배안정성을 확인하여 ‘천수향큰눈찰1세’라고 명명
- ‘천수향큰눈찰1세’의 기본농업형질 및 종실특성
 - ‘천수향 큰눈찰 1세’ 중부지역 보통기 재배에서 8월 20일경에 출수하는 중만생종으로 간

장이 63.2cm이며 주당수수 13.4개 정도이며. 현미천립중은 19.85g, 장폭비 1.73로 단원형으로 현미 수량은 476kg/10a로 진상벼 대비 88% 수준임

- ‘천수향 큰눈찰 1세’는 total tocopherol, total vitamin E, Squalene 및 total phytosterol이 많이 함유되어 있어 건강 기능성미에 부합함

표 3-15. 천수향 큰눈찰 1세 Phytosterol 함량표

구분	천수향 큰눈찰 1세(μg/g)	진상벼(μg/g)
α-tocopherol	33.81	18.46
γ-tocopherol	0.75	1.44
total tocopherol	34.56	19.90
α-tocotrienol	17.80	12.27
γ-tocotrienol	11.84	16.08
total tocotrienol	29.64	28.35
total vitamin E	64.19	48.26
Squalene	54.83	40.77
Campesterol	80.71	60.70
Stigmasterol	113.48	82.06
β-sitosterol	343.83	252.29
total phytosterol	538.02	395.05

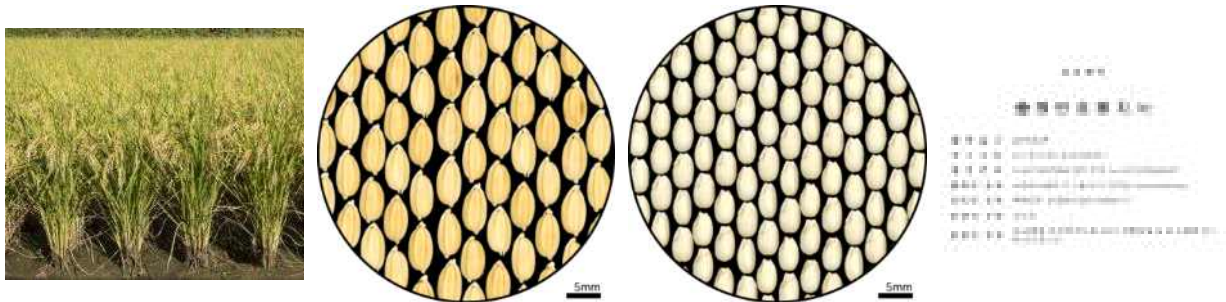


그림 3-18. ‘천수향 큰눈찰1 세’의 식물체 종실 사진

(8) 지역특산 브랜드 쌀 제품 사업화

(가) 대 농민 품종 반응 현장 시험

- 돌연변이 처리로 육성된 우수계통인 ‘JS-10(골든퀸2호)’의 대농민 품종 시험을 2015년 하계에 경남 함양군과 경기도 연천군에서 수행하고 기본 농업형질을 조사함.
- 대농민 품종 시험 결과 출수기는 8월8일로 중조생의 특성을 보였고 간장은 69.95cm의 단간종이며 평균 수량성(520kg/10a)으로 추정벼(518kg/10a)와 유사했지만 향 특성을 갖는 최고 양식미로 평가 받음

표 3-16. JS-10(골든퀸2호)의 기본 농업형질 조사내용

	출수기	간장(cm)	수장(cm)	포기당 이삭수(No.)	수량성 (kg/10a)
경기 연천	8/9	70.3	20.1	13	518
경남 함양	8/7	69.6	19.5	14	522



그림 3-18. 2015년 경남 함양 및 경기도 연천 JS-15 시험재배포장 전경

- 경기도 연천군에서 우수한 평가를 받아 연천농협과 2016년 400톤 규모로 재배계약을 체결하고 사업화 실시 예정임.



그림 3-19. 경기도 연천군에서 실시한 골든퀸2호 재배교육 (2016.04)

- 전남 신안군에서 월드그린과 공동으로 지역특화 브랜드사업 추진하여 대상품종으로 선발되어 2017년 품종 보급을 실시 했으며 고품질 쌀 생산을 위해 재배 농민대상으로 재배교육 및 현장지도 실시



그림 3-20. 경기도 신안군에서 실시한 골든퀸2호 재배교육 및 현장지도 (2017.08)

(나) 수량성 등 농가실증 시험

- 골든퀸2호의 실제 재배농민들을 대상으로 농가실증 시험을 위하여 1차년도 현장시험을 진행하여 우수한 평가를 받았던 경기도 연천 지역에서 농가 실증 시험을 실시함
- 경기도 연천 지역에서 5월20일 포장에 정식하고 농촌진흥청 표준재배법에 준해 재배하였고 시험결과 출수기는 8월 9일경으로 조사 되었고 수량성은 515kg/10a로 나타났다.

표 3-17. 2016년 ‘골든퀸2호’ 기본농업형질 조사내용

	출수기	간장(cm)	수장(cm)	포기당 이삭 수(No.)	수량성 (kg/10a)
경기도 연천	8/9	69.8	19.7	13	515

(다) 시식평가 및 소비자 선호도 평가

- 골든퀸2호의 사업화를 추진에 앞서 사전에 골든퀸2호에 대한 소비자 선호도와 상품성의 평가가 요구되므로 시식행사와 박람회 참가를 통하여 소비자반응을 평가함.
- 경기도 이천시에서 ‘밥맛 시식회’에 참가하였고 서울대학교 문정훈 교수의 OpenLab 행사를 공동으로 진행하여 시식 테스트를 수행함.
- 경기도 이천에서 실시한 ‘밥맛 시식회’에 참가하여 총 100명을 대상으로 ‘추청’, ‘고시히카리’, ‘골든퀸2호’에 대한 종합식미 선호도 평가 결과 83명이 골든퀸2호를 양식미로 알려진 ‘추청(2명)’과 ‘고시히카리(15명)’보다 선호 하는 것으로 나타남.



그림 3-21. 경기도 이천에서 실시된 골든퀸2호 밥맛시식회

- 서울대학교 문정훈 교수의 OpenLab 행사를 공동으로 진행하여 관련 업계 전문가를 대상으로 쌀 선호도를 조사하기 위한 시식 테스트를 수행하였고 전문 패널의 평가 결과 90% 이상의 선호하는 것으로 조사 되었음.

<골든퀸2호 쌀 선호도 조사결과>

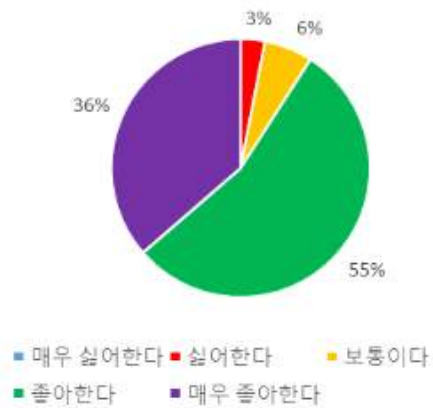


그림 3-22. 서울대 OpenLab 행사에서 전문 패널을 대상으로 실시한 쌀선호도 조사결과

- 외식산업 전문 바이어 상담과 소비자 대상 시식행사 진행을 위한 ‘2016국제외식산업식자재박람회’에 참가함.
- 2016국제외식산업식자재박람회에 참가하여 골든퀸2호 시제품에 대하여 대형 유통업체 및 요식업 관련 바이어와 상담과 동시에 시식 행사 진행하여 일반 소비자와 바이어 모두에게 상품성이 우수하여 사업화가능 한 품종으로 평가됨.



그림 3-23. 2016 국제외식산업식자재박람회 시드피아 부스

- ‘골든퀸2호’의 밥맛에 대하여 소비자 선호도를 평가 하기 위하여 세계한상대회 2016, 2016 광주국제식품전 등의 박람회 참가하여 관람객을 대상으로 시식평가 진행함.
- 소비자 선호도 조사결과 기존에 이용하는 쌀과 밥맛과 향기를 비교 시 90%이상의 소비자가 선호하는 것으로 나타남



그림 3-24. '골든퀸2호' 시식평가 및 평가 결과

(라) 시식평가 및 소비자 선호도 평가

- 골든퀸2호의 시장경쟁력 유무 파악을 위해 기존 육성품종과 비교하여 관능 평가를 수행함. 양식미로 알려진 추청벼외 3개 품종과 비교해 남녀 20명을 패널로 선정, 대조 시료로 추청벼를 선정, 골7점 척도법으로 -3~+3까지 대조시료 대비 특성별 강도와 기호도를 표기하도록 하여 조사를 실시함.
- 윤기와 밥알의 완전도와 경도에서 히토메보레, 골든퀸3의 기호도가 높았으며, 전반적 기호도는 골든퀸2가 가장 높은 값을 나타냈고 국내 유통중인 양식미들과 밥맛을 비교했을 때 전반적으로 우위에 있어 시장경쟁력이 높은 것으로 추정됨

표 3-18. 품종별 취반미의 식미평가(기호도)

시료명	외관			향과 맛		텍스처			전반적 기호도
	색	윤기	밥알의 완전도	향	맛	경도	씹힘성	점착성	
추청벼*	0.00±0.00 ^{**}	0.00±0.00 ^{cd}	0.00±0.00 ^d	0.00±0.00 ^{bc}	0.00±0.00	0.00±0.00 ^{cd}	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00	0.36±1.04 ^c
고품벼	0.15±1.14 ^b	0.20±1.24 ^{bc}	0.30±0.73 ^{bcd}	0.50±0.95 ^{ab}	0.25±1.33	0.40±0.99 ^{bcd}	0.30±0.98 ^{ab}	0.25±1.12	0.30±1.08 ^{bc}
골든퀸2	-0.15±0.88^{bc}	0.80±1.01^{ab}	1.15±0.93^a	-0.10±1.52^{bc}	0.60±1.31	1.30±1.22^a	0.20±1.28^{ab}	0.60±1.23	1.00±1.08^a
일품벼	-0.40±1.05 ^{bc}	0.00±1.45 ^{cd}	0.25±1.55 ^{cd}	0.75±1.12 ^{ab}	-0.05±1.19	0.10±1.33 ^{bcd}	0.10±1.25 ^{ab}	0.15±1.57	0.05±1.10 ^d
하이아미	0.10±1.02 ^b	0.15±1.35 ^b	-1.05±1.08 ^e	-0.15±1.27 ^{bc}	0.05±1.05	0.00±1.17 ^{cd}	-0.25±1.25 ^b	0.05±1.36	-0.50±1.24 ^f
히토메보레	1.35±0.99 ^a	1.00±0.97 ^a	1.05±0.83 ^{abc}	0.05±1.28 ^{bc}	0.25±1.37	0.85±0.88 ^{ab}	0.85±0.93 ^{ab}	0.60±1.43	0.80±1.15 ^{bc}

* 추청벼는 기준 시료임

** Values with different superscripts in the same column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

(마) 생산, 가공, 판매 시스템 구축

- 시드피아에서 개발된 신규 품종의 사업화를 위해 재배자·생산자·개발자사 상호 Win-Win 할 수 있는 사업시스템을 구축함. 개발된 품종은 주로 지역농협과 기술실시 계약을 체결하고 해당 농협 등과 지역 내 농가와 계약재배 실시함. 해당농협은 시드피아의 보급종자를 유상으로 재배농가에 보급하고 재배농가는 생산된 조곡을 농협에 수매. 농협은 계약수매한 조곡을 가공하여 직접 또는 유통업체에 판매하고 판매금액의 일부를 실시료로 시드피아에 지급. 재배농민은 일반 품종대비 높은 수매가로 농협에 판매를 할 수 있어 농가 소득 증대를 가져오며 지역 농협은 최고급 쌀로 판매하여 경제성 향상이 가능함.
- 2016년 경기도 연천지역에서 400톤이 재배되어 자체브랜드를 이용하여 현재 3,500원/kg 가격으로 판매 되고 있음. 계약재배 지역 추가로 2018년 전남 신안군에서 골든퀸2호를 재배하여 지역특화 브랜드 제품을 출시, 충북 괴산 및 경남 밀양에서 2018년 추계에 3,000톤

규모로 재배 예정임

- 2018년 골든퀸2호 예상 수확량(조곡기준) 3,000톤일 때 판매액은 6,000백만원으로 예상되며 지역특화품종으로 보급하고 매년 재배면적을 2배씩 확대하여 향후 5년내 재배 면적을 4,000ha 규모로 확대해 재배수량 20,000여톤 이상 달성



그림 3-25. 경기도 연천농협에서 출시한 ‘골든퀸2호’ 브랜드 패키지 디자인

[신안] 고품질 친환경 브랜드 쌀 '섬섬옥미' "없어서 못판다".재배면적 357ha까지 확대

지난해 대도시 고소득 소비층 겨냥해 팔금면에 109ha를 시범재배 했던 특수미 '골든퀸 2호, 진상 2호'가 소비자의 반응이 좋아 조기 품질

박정아 기자 | 승인 2018.05.31 19:24

[한국농어촌방송=나복진박정아 기자] 신안군의 고품질 친환경 브랜드 쌀인 '섬섬옥미'가 생산량을 확대한다.



사민-신안군

신안군은 지난해 대도시 고소득 소비층을 겨냥해서 팔금면에 109ha를 시범재배 했던 특수미 '골든퀸 2호, 진상 2호'가 소비자의 반응이 좋아 조기 품질돼 올해에는 지도읍을 포함해 357ha까지 재배면적을 늘렸다고 31일 밝혔다.

이를 위해 신안군은 전년 10월부터 올해 2월까지 6차례에 걸쳐 참여농가 150명을 대상으로 사업설명회와 육묘, 이앙 등 비배관리 교육을 했다.



그림 3-26. 경기도 신안군에서 출시한 ‘골든퀸2호’ 제품 및 보도자료

4. (3협동) 방사선을 이용한 석곡 및 심비디움 난 개발 및 변이품종 상품화(바보난농원/강경원)

가. 연구목적

○ 연구목적

- 돌연변이 기술을 이용한 관상성이 높은 엽예품 및 기능성 석곡 난 품종 개발

- 돌연변이 심비디움 난 신품종 및 유망계통의 국내외 상품 수출화

○ 연구 배경 및 필요성

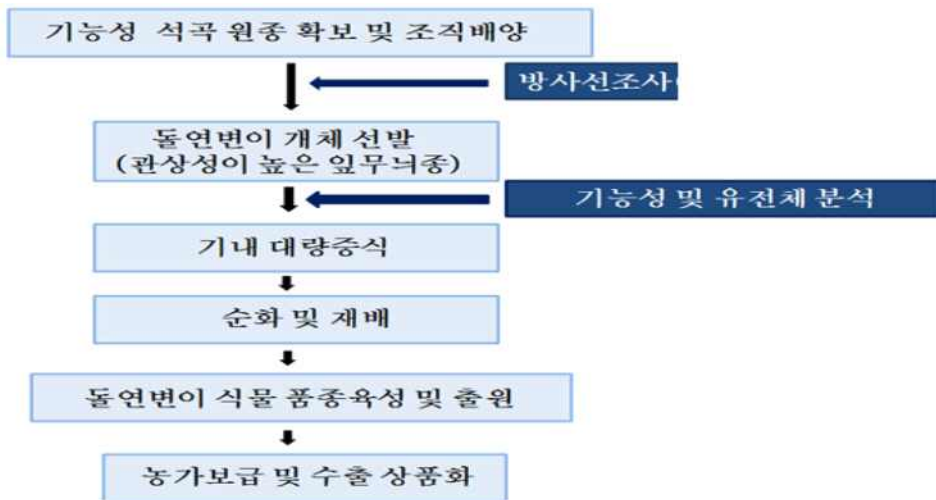
- 돌연변이 난 육종연구는 2005년부터 시작되어 심비디움 3품종, 텐드로비움 4품종이 육성되어 있음. 돌연변이 난 육종은 교잡육종보다 시간과 비용면에서 효율적임. 특히 교잡육종이 7-10년 소요되는데 비하여 돌연변이 육종은 4-5년 만에 엽예품 신품종을 만들 수 있어 효과적이고 편리한 기술임.
- 돌연변이 엽예품 난을 주로 육종하였다면 향후 화예품 난 육종을 위해 방사선을 조사하여 화색이 변화된 신품종 육성이 필요함.

나. 연구개발 추진 방법 및 추진 체계

□ 연구개발의 추진방법

- 유망한 기능성 식곡을 재배 관리하고 종자를 양성하여 기내 조직배양 및 증식
- 선발된 돌연변이 난을 조직배양을 통한 대량증식 체계 구축
- 선발된 돌연변이 난을 주관 기관 및 타 협동과제와의 협력을 통해서 유망계통의 기능성 및 유전체 분석(1세부, 5협동 협력)
- 돌연변이 난의 순화 및 재배 관리
- 돌연변이 난의 품종보호출원
- 돌연변이 난 품종의 농가보급 및 재배 컨설팅
- 돌연변이 난 품종의 도매시장 판매 및 시범수출

□ 추진체계



다. 연구 추진일정

년도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
----	----------	----------

1차년도 (‘15.8~‘16.8)	○ 돌연변이 기술을 이용한 관상성이 높은 엽예품 및 기능성 석곡 난 품종 개발	-기능성 석곡 유전자원 수집 및 변이 계통 양성 - 석곡 변이 육종을 위한 방사선 처리 조건 확립 - 돌연변이 난의 조직배양 및 증식 - 우주선 탑재 석곡 유망 변이계통의 양성
	○ 돌연변이 심비디움 난 신품종 및 유명 계통의 국내외 상품 수출화	-심비디움 돌연변이 난의 관리 및 대량증식 기술 개발 -잎무늬 돌연변이 난의 순화 및 재배
2차년도 (‘16.8~‘17.8)	○ 돌연변이 기술을 이용한 관상성이 높은 엽예품 및 기능성 석곡 난 품종 개발	-난 돌연변이 계통 선발 -선발된 계통의 생육특성 및 성분분석 -기능성 석곡 중 유효성분이 높은 식물체 선발 -선발된 돌연변이 난의 조직배양 및 증식
	○ 돌연변이 심비디움 난 신품종 및 유망 계통의 국내외 상품 수출화	-돌연변이 난 품종의 시범 수출 -돌연변이 난 품종의 농가 보급 및 재배 관리 컨설팅
3차년도 (‘17.8~‘18.8)	○ 돌연변이 기술을 이용한 관상성이 높은 엽예품 및 기능성 석곡 난 품종 개발	-난 돌연변이 유망계통 선발 및 품종 출원 -돌연변이 난품종을 이용한 교배육종 -우수한 기능성 석곡 기내조직 배양, 증식 재배 -선발된 돌연변이 난의 조직배양 및 증식
	○ 돌연변이 심비디움 난 신품종 및 유명 계통의 국내외 상품 수출화	-선발된 돌연변이 난의 조직배양 및 증식 -돌연변이 난 품종의 국내 상품화 및 수출화

라. 연구개발 내용 및 결과

(1) 1차년도 연구내용 및 결과

- 돌연변이 기술을 이용한 관상성이 높은 엽예품 및 기능성 석곡 난 품종 개발
- (가) 기능성 석곡 유전자원 수집



금채 석곡



황초 석곡



환초 석곡



철피 석곡

그림 4-1. 수집한 석곡 유전자원

(나) 석곡 변이계통 양성

- 변이계통을 양성하기 위해 기내 파종된 석곡 마더 플라스크를 방사선 처리



파종 후 30Gy



PLB형성 후 30Gy



변이체 양성

그림 4-2. 석곡 방사선 처리를 통한 변이체 양성

(다) 우주선 탑재 석곡 유용변이 계통 양성

- 온실에서 재배한 세경석곡을 교배하여 수확한 종자를 2006년 9월 중국 우주선 쓰젠 8호에 탑재한 후 회수하여 하이포넥스 배지에 파종
- 2007년 11월 식물체 정식배지에서 속 및 무늬 석곡을 선발하여 4개월 간격으로 기내 삼목하여 증식하였음
- 2015년 1월 증식된 속빛무늬 세경석곡을 온실에서 수태로 플러그관에 식재하여 묘를 순화. 재배관리 온도는 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도는 60-80%, 광량은 8,000-10,000 lux에서 재배하였음
- 2016년 재배 및 무늬의 안정성 특성 조사



그림 4-3. 선발 변이체 무늬 안정성 특성 조사

(마) 돌연변이 난의 조직배양 및 증식

- 첼피 석곡 변이계통 생장점 배양 및 증식



첼피색과 속빛무늬 석곡



생장점 배양

그림 4-4. 첼피 석곡 변이계통 모습 및 생장점 배양 과정

(바) 돌연변이 심비디움 난 신품종 및 유망계통의 국내외 상품 수출화

- 심비디움 돌연변이 난 기내 대량증식 : 심비디움 돌연변이 난을 500ml 삼각플라스크 83 병 기내 대량증식
- 3g 하이포넥스 + 2g 펩톤 + 0.5g 착콜 + 30g 바나나 + 10g 사과 + 20g 감자 + 30g 설탕 + 8g agar + pH 5.6



속빛 무늬



단엽 개체

그림 4-5. 속빛 무늬 및 단엽 변이체

(바) 돌연변이 난의 순화 및 재배

- 기내에서 증식된 돌연변이 심비디움 유묘를 128구 플러그에 수태로 3800주를 식재하여 온실에서 순화하였음. 2주에 한번 하이포넥스 1000배액을 엽면살포하고 벤레이트 살균제 1000배액 살포하였음



속줄 무늬



갓줄 무늬



갓줄 무늬

그림 4-6. 선발 변이체 순화 및 재배

(2) 2차년도 연구내용 및 결과

○ 돌연변이 기술을 이용한 관상성이 높은 엽예품 및 기능성 석곡 난 품종 개발

(가) 난 돌연변이 계통 선발

- 돌연변이 난 계통선발을 위해 난을 조직배양 한 후 기내 증식 된 PLB에 방사선을 10, 30, 50, 70, 100 Gy를 처리하여 돌연변이 계통을 선발 하였는데 방사선 육종을 위한 적정 선량은 30-70 Gy로 확인되었음



석곡 돌연변이



석곡 돌연변이 재배



정상/돌연변이 선발



돌연변이 재배

그림 4-7. 석곡 돌연변이 계통 재배 및 선발 과정

(나) 선발된 계통의 생육특성 및 성분분석

- 돌연변이 난의 생육은 조직배양 후 온실에서 수태에 식재하여 온도 22℃, 습도 70-80%, 광량은 8,000 Lux에서 재배하였으며 2주 간격으로 살충제와 살균제를 살포 하고, Hyponex 1000배액을 2주 간격으로 시비하며 순화 재배 하였음. 잎이 무지인 식물체는 생육이 순조로웠으며 갓줄무늬 및 속빛무늬 품종은 무지인 식물체에 비해 생육이 약 30% 정도 더디게 성장 하였음. 성분분석은 제1세부 과제 원자력연구원 첨단방사선연구소에 식물체 성분분석 의뢰를 했음. 제5협동과제 석곡 유전자원에 GBS 분석을 위한

DNA 추출을 의뢰하였음



그림 4-8. 선발된 석곡 계통의 모습

(다) 기능성 석곡 중 유효성분이 높은 식물체를 선발

- 기능성 석곡 중 유효성분이 높은 식물체를 선발하여 기내증식 중에 있으며 제1세부 과제 원자력연구원 첨단방사선연구소에 식물체 성분분석 의뢰를 했음



그림 4-9. 기능성 석곡 유전자원

- 철피 석곡 중 유효성분이 높은 식물체를 선발하여 성장점 배양 후 증식배지에서 대량 번식 하고 있음
 - 성장점 배지는 MS배지에 Kinetin 0.3 ppm, NAA 0.1 ppm, Sugar 30g, Gelite 5g, PH 5.6
 - 증식배지는 Hyponex(NPK:6-6.5-19) 3g, Peptone 2g, Charcoal 0.5g, Banana 50g, Apple 50g, Potato 30g, Gelite 5g, PH 5.6

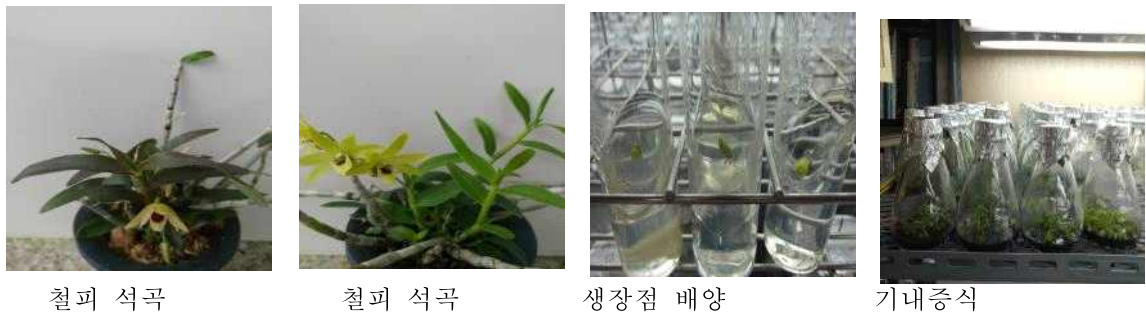


그림 4-10. 철피 석곡 표현형 및 배양·증식 과정

(라) 선발된 돌연변이 난의 조직배양 및 증식

- 관상성이 높은 옆예품 및 기능성 식곡, 우주선 탑재 속빛 무늬, 갓줄 무늬 식곡, 돌연변이 심비디움 난 신품종을 조직배양 및 증식하고 있음



우주 식곡

단엽 중투

속빛 무늬

갓줄 무늬

그림 4-11. 우주식곡 조직배양

(마) 돌연변이 난 품종의 시범 수출

- 돌연변이 난 수출



단엽중

속빛 무늬

그림 4-12. 돌연변이 난 계통 수출 신고필증 및 대량 재배 모습

(바) 돌연변이 난 품종의 농가 보급 및 재배관리 컨설팅

- 돌연변이 난 품종을 농가에 보급하여 재배관리 컨설팅을 하고 있음



단엽종



배양 유묘



순화

그림 4-13. 농가보급을 위한 배양 및 순화 과정

(3) 3차년도 연구내용 및 결과

○ 돌연변이 기술을 이용한 관상성이 높은 엽예품 및 기능성 석곡 난 품종 개발

(가) 난 돌연변이 유망계통 선발 및 품종 출원

- 난 돌연변이 유망계통 선발 : 방사선을 30Gy, 50Gy, 70Gy 조사 후 증식 된 난 조직에 방사선을 재조사하여 돌연변이 계통 선발 (방사선을 난 조직에 1차 처리 시 50Gy이상 조사하면 난 조직이 고사하고 계대 배양을 계속해도 정상적인 식물체의 발생이 어려우며 유묘의 순화 재배 시 고사율이 높으므로 10~30Gy를 2회 이상 재처리하면 돌연변이 개체의 출현율도 높고 정상적인 식물체로 순화 및 재배가 용이함)



(돌연변이 유묘 선발)

- 품종 출원 : 품종명 - 춘보

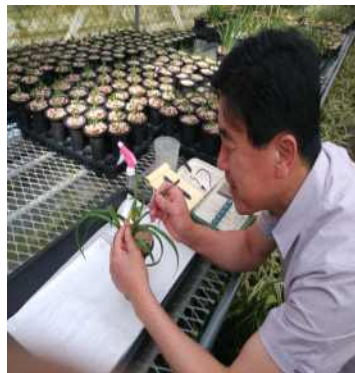
출원번호 - 2018-377 (국립종자원)



(출원 품종)

(나) 돌연변이 난품종을 이용한 교배육종

돌연변이 된 춘란 단엽 두화 품종을 교배하여 식물체의 크기가 작고 옆 폭이 넓으며 잎 끝이 둥근 단엽 품종을 기내 배양하여 식물체를 육성함.



(돌연변이 품종을 이용한 식물체 육성)

(다) 우수한 기능성 석곡 기내조직 배양, 증식 재배

철피 석곡의 성장점을 채취하여 대량증식 후 유묘를 온실에서 순화 및 재배 (유묘는 수태를 사용하여 플러그 판에 순화하였으며 1주일 후 하이포넥스 2000배를 살포하고 2주 간격으로 살균제와 살충제를 살포하였음. 6개월 후 2치 포트에 이식하여 50구 연결판에서 재배함)



(철피석곡 조직배양 증식 재배)

- 선발된 돌연변이 난의 조직배양 및 증식

심비디움 라이좁 증식 배지는 MS배지에 NAA 2ppm, Sugar 30g, Gelite 5g, PH 5.6

식물체 유기 배지는 MS배지에 BA 3ppm, NAA 0.5ppm, Sugar 30g, Gelite 5g, PH 5.6

식물체 정식 배지는 MS배지에 차콜 0.5g, NAA 0.2ppm, ugar 30g, Gelite 5g, PH 5.6



* 동양란 재배 농가에 돌연변이 난 분양 (동양란 단엽종, 철평석곡)

* 대만 동양란 재배농가에 유묘 수출 (심비디움, 철평석곡)

(돌연변이 난 조직 증식 배양)

○ 돌연변이 심비디움 난 신품종 및 유명 계통의 국내외 상품 수출화

5. (4협동) 보이젠베리 신품종 개발 및 블랙베리 신품종의 산업화(바이오플러스/이강섭)

가. 연구목적

- 보이젠베리의 방사선 돌연변이 육종을 통한 우수 계통 선발과 특성검정, 생산력 검정 및 대량생산체계 확립
 - 보이젠베리의 방사선 돌연변이 육종을 통한 우수 계통 선발과 특성검정, 생산력 검정 및 대량생산체계 확립 : 당도 8-10 brix 이상, 평당 수확량 6-7kg 이상, 묘목 1000주 이상
- 기능성 및 생산력이 우수한 방사선 돌연변이 블랙베리의 건강식품 개발과 해외 수출
 - 기능성 및 생산력이 우수한 방사선 돌연변이 신품종 블랙베리의 건강식품 개발과 해외 수출을 통한 산업화 : 건강식품 5000 box 이상, 묘목 1만주 이상

나. 연구개발 추진 방법 및 체계

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도 (2015)	<ul style="list-style-type: none"> • 보이젠베리 품종의 식생조사 및 조직배양체계 개발 • 블랙베리 건강식품 개발 및 중국 실증포 조성 	<ul style="list-style-type: none"> • 2012년부터 수행한 선행 연구결과로 확보된 가지 없는 보이젠베리 계통의 식생 조사 • 2012년부터 수행연구로 보이젠베리 2만여개의 조직배양체를 가지고 ⁶⁰Co감마선을 80Gy, 60Gy, 40Gy, 20Gy의 각각의 선량으로 조사, 1차로 내한성과 내병성이 강하고 생육이 좋은 계통을 선발. • 보이젠베리의 돌연변이체 유망 계통 조사 • 유망품종 보이젠베리의 조직배양체계 개발(배지, 식물생장조절물질 등) • 블랙베리를 이용한 건강식품 개발 • 블랙베리의 묘목 대량증식 • 해외 수출을 위한 중국내 실증포 조성
2차년도 (2016)	<ul style="list-style-type: none"> • 보이젠베리 신규 유망 계통의 선발, 특성검정 및 대량증식체계 확보 • 블랙베리 건강식품 및 묘목 판매 	<ul style="list-style-type: none"> • 내한성과 내병성이 강하고 생육이 좋은 2 계통을 선발. • 조직배양을 통한 대량증식체계, 순화법 및 최적의 재배법 확립 • 블랙베리를 이용한 건강식품 판매 • 건강식품의 기호도 조사 및 홍보 • 중국주재 한국인경영 농장 중국농가 및 음료회사, 총서기 등 관련자들에게 시음회 등과 같은 홍보 수행 • 블랙베리의 묘목 증식 및 중국 판매 추진
3차년도 (2017)	<ul style="list-style-type: none"> • 보이젠베리 품종 실용화 및 대량생산 체계확립 • 블랙베리의 실용화 	<ul style="list-style-type: none"> • 묘목의 대량 증식, 순화 및 재배법 확립 • 순화묘 1000주 이상 • 품종보호권 확보 • 건강식품 판매(5000천 Box) • 신품종 묘목 판매 (1만주)

다. 연구 추진일정

세부과제 및 주요내용	연 도		
	2015년 (1차년도)	2016년 (2차년도)	2017년 (3차년도)
○ 보이젠베리의 방사선 돌연변이 육종을 통한 우수 계통 선발과 특성검정, 생산력 검정 및 대량생산 체계 확립			
- 보이젠베리 품종을 이용한 돌연변이 유망 품종 검정			
방사선 돌연변이체 대량 유도 후 유망 5개 계통 선발			
- 보이젠베리 신규 유망 계통의 선발 및 특성 검정			
우수 2개 계통 선발			
보이젠베리 유망계통의 선발 및 재배법 개발			
보이젠베리 계통의 배양체 조직배양 시스템 개발			
보이젠베리 신품종 대량생산 체계 개발			

세부과제 및 주요내용	연 도		
	2015년 (1차년도)	2016년 (2차년도)	2017년 (3차년도)
- 보이젠베리 품종 실용화 및 대량생산 체계확립			
묘목의 대량 증식 및 보급			
품종보호권 확보			
○ 기능성 및 생산력이 우수한 방사선 돌연변이 신품종 블랙베리의 건강식품개발과 해외 수출.			
- 블랙베리 건강 보조식품 개발			
건강식품 성분 분석 및 기호도 조사			
건강식품 홍보 및 판매			
- 블랙베리 묘목의 대량생산에 의한 판매 활성화, 보급			
중국내 시험포 및 실증포 운영			
블랙베리 묘목 수출			

마. 연구개발 내용 및 결과

(1) 1차년도 결과

(가) 방사선 돌연변이 육종을 통한 우수 계통 선발과 특성검정, 생산력 검정 및 대량생산체계 확립

- 보이젠베리 배양체의 방사선에 대한 감수성을 평가, 돌연변이 유도를 위해 확보된 2만여 개의 조직배양체를 가지고 60Co감마선을 80Gy, 60Gy, 40Gy, 20Gy의 각각의 선량을 처리하여 형태적변이 구분 및 내한성과 내병성이 강하고 생육이 좋은 계통을 선발



<그림 5-1. 보이젠베리 우수 유망계통 선발>



control

20Gy

40Gy

60Gy

<그림 5-2. 보이젠베리 조직배양개체에 방사선조사>

- 육성한 보이젠베리 변이체를 대상으로 우량 신품종 육성을 위한 계통선발 및 평가에 활용하고자 과실 특성을 6월~8월 평가(개화 및 결실 시기)
- 고품질, 다수확성 보이젠베리 육종의 유전자원 소재로서 활용이 가능한 신품종 보이젠베리를 선발
- 유망품종 보이젠베리의 조직배양을 통한 대량생산 체계 구축을 위한 최적의 배지와 식물생장조절물질 조건 규명(MS medium + 1 mg/L BA)



그림 5-3. 보이젠베리의 휴면아를 이용한 조직배양 체계

(나) 기능성 및 생산력이 우수한 방사선 돌연변이 블랙베리의 건강식품 개발과 해외 수출

- 블랙베리의 안정적인 묘목 증식 및 생산 체계확립을 위해 조직배양법과 순화를 통한 대량증식체계 구축



그림 5-4. 블랙베리 조직배양을 통한 순화 및 출하

- 블랙베리 열매를 주원료로 한 건강식품 개발을 위한 원재료의 성분분석과 기호도 향상

을 위한 재료 구성비율의 적정화 연구 및 포장디자인에 의한 제품의 가치 향상

블랙베리	엘더베리	오디	가시오가피	기타
50%	10%	25%	10%	5%



그림 5-5. 블랙베리를 이용한 건강식품 개발 제품



그림 5-6. 블랙베리 신제품 상품 디자인 시안

- 해외 수출을 위한 중국내 실증포에 안정적인 식재를 위한 묘목 생산.



그림 5-7. 중국내 블랙베리 실증포

(2) 2차년도 연구내용 및 결과

(가) 보이젠베리 신규 유망 계통의 선발, 특성검정 및 대량증식체계 확보

① 보이젠베리의 신규 유망 계통의 선발

- 보이젠베리 배양체의 방사선에 대한 감수성을 평가하여 돌연변이 유도에 적정 선량을 처리하여 육성한 보이젠베리 변이체를 대상으로 우량 신품종 육성을 위한 계통선발 및 평가에 활용

하고자함.










- 선발된 보이젠베리의 선발라인은 BSA-036, BSA-065, BSA-078, BSA-101, BSA-119, BSA-144, BSB-032, BSB-127의 8라인은 선발관리번호를 분리하여 관리.
- 선발된 계통 중 BSA-036 (BS-A), BSA-065 (BS-B), BSA-078 (BS-C), BSA-101 (BS-D), BSA-119 (BS-E), BSA-144 (BS-F)는 ⁶⁰Co 감마선을 20Gy의 선량으로 조사하여 선발된 계통.
- BSB-032 (BS-G), BSB-127 (BS-H)은 ⁶⁰Co 감마선을 40Gy의 선량으로 조사하여 선발된 계통으로 현재 재배검정으로 생육특성을 조사진행.

표 5-2. 선발된 보이젠베리 계통 관리

Lines	선발라인	선발관리
보이젠베리 (도입 보이젠베리)		
후대모본 (×) (교잡보이젠베리)	모본	
보이젠베리×블랙베리 교배종 F1-1	BSA-036	BS A
보이젠베리×블랙베리 교배종F1-2	BSA-065	BS B
후대 1	BSA-078	BS C
후대 2	BSA-101	BS D
후대 3	BSA-119	BS E
후대 4	BSA-144	BS F
후대 5	BSB-032	BS G
후대 6	BSB-127	BS H

- 이를 바탕으로 고품질, 다수확성 보이젠베리 육종의 유전자원 소재로서 활용이 가능한 신품종 보이젠베리를 재배실험 진행 중으로 과실의 특성을 개화 및 결실 시기에 따른 매년 6월~8월 평가예정 중으로 재배검정을 통해 과제의 대량증식, 순화 및 재배법확립에 최상의 계통을 선발.

표 5-3. 보이젠베리 우수 유망계통 선발

control	BS A	BS B	BS C	BS D	BS E	BS F	BS G	BS H
								
1차 선발	○		△	△	○	○	○	○
2차 선발	△				○	○	○	○

○: 매우 양호 △: 비교적 양호

- 선발된 8계통 라인 중 내한성과 내병성이 강하고 생육이 좋은 5계통을 선발하였으며 집중적으로 조직배양을 통한 증식체계 확립.

- 선발된 5계통 보이젠베리의 특성상 개화기 등의 식물체 특성 조사와 최종 제품을 위한 당도와 같은 과실의 특성 검증은 6~8월에 수행 예정.

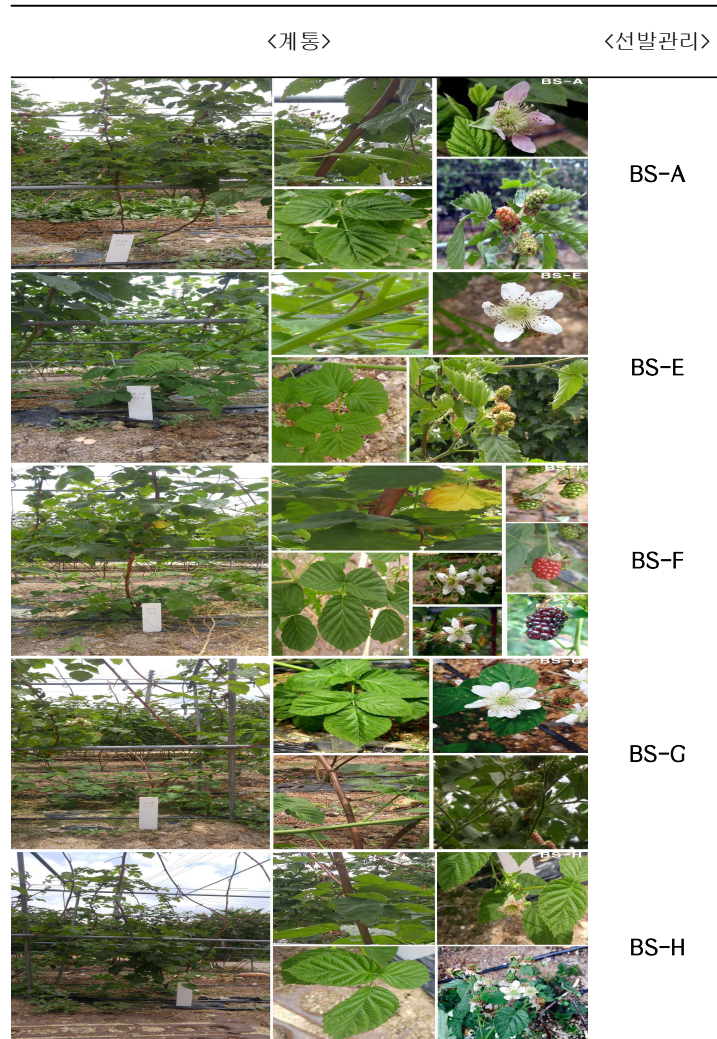


그림 5-8. 선발된 5계통의 보이젠베리

- 과제 1차년도 수행 중 과실의 영양성분을 분석하였으며, 과제 2차년도에서 과실이 성숙되는 7, 8월경에 반복적으로 분석을 하여 최종결정을 하고자, 후보군으로 현재 5계통을 조직배양을 수행하여 대량증식 체계를 확립.

(나) 보이젠베리 선발계통의 조직배양 체계 확립

① 보이젠베리의 선발계통의 휴면아를 이용한 조직배양

- 1년차에 수행했던 선발된 변이계통의 보이젠베리 휴면아를 이용하여 다양한 배지, 식물 성장조절물질 및 다양한 배양방법을 이용함으로써 안정적이고 최적화된 조건탐색하고자 수행
- 식물재료는 본 과제를 위한 계절적 영향으로 본사 농장에 식재되어있는 선발된 계통의 보이젠베리휴면아를 배양(Dormant bud culture)하였다. 재료를 채취하여 흐르는 물에 세척 후 70% 에탄올 1분간, 1% NaOCl₂ 용액에 15분간 침적하여, 표면살균 후 멸균수로 3

회 이상 세척하여 사용

- 배양 조건으로는 0.5, 1, 3 mg/L BA, kinetin, 2iP가 첨가된 MS, SH, B5배지에 치상 후, 25°C, 40 μ mol m⁻²s⁻¹ 16/8시간 광주기 조건에서 5주간 명배양 수행.
- 다경유도에 적합한 조건으로는 1 mg/L BA가 첨가된 MS배지에서 가장 높은 형성률을 나타내었으며, 발근유도에 적합한 조건은 무기염류가 1/2로 감소된 각각의 1/2MS, 1/2SH, 1/2B5에 다양한 농도의 IBA가 첨가된 조건에 유식물체를 치상한바, 1/2SH배지의 조건에서 가장 양호.

표 5-5. Effect of plant growth regulators on shoot regeneration from bud explants of boysenberry (*R. fruticosus* L.×*R. parvifolius* L.)

Medium	PGRs	PGRs Conc. (mg/L)		
		0.5	1	3
MS	BAP	11.1	58.9	2.2
	KIN	0	11.1	0.9
	2iP	2.3	15.7	2.1
SH	BAP	10.2	53.1	2.1
	KIN	1.2	12.5	1.2
	2iP	2.4	13.7	2.1
B5	BAP	1.7	24.5	2.1
	KIN	0.8	11.8	0.7
	2iP	2.1	0.4	1.2

BAP ; 6-Benzylaminopurine, KIN ; Kinetin(N6-Furfuryladenine),
2iP ; 6-(γ, γ -Dimethylallylamino)purine

- 기내증식중인 개체를 배양병에서 키운 후 정단부위는 지속적인 세포주(cell line)로 유지하고자 1/2SH배지에 계대배양하여 증식하였으며, 기부 첫 마디를 제외한 나머지 마디를 통한 다경유도를 하여 대량증식 체계 확립.
- 1차 선발된 5계통 중 total amino acid, total anthocyanine, total flavonoid, total phenol, vitamin C, ellagic acid를 기준하여 BS-E, BS-F, BS-G, BS-H 계통을 선발하여 중점적으로 조직배양을 통한 대량증식 및 최적화된 순화재배법을 완료함.

② 다양한 조직배양 방법체계 개발

- 조직배양 체계의 확립을 다양하게 하고자 기존의 고체배지를 이용한 방법뿐만 아니라 액체배지를 이용하여 증식체계를 확립하고자 수행
- 액체배양을 수행하면서 지지물로 기존의 한천이 아닌 탈지면과 거즈를 이용하여 증식한 바 배양 일수의 단축 및 증식률이 계통에 따라서 약 30~50% 가량 향상.
- 보이젠베리 조직배양묘의 순화는 기내에서 유도된 다경(multiple shoot)의 소식물체의 유도 증식을 위해 마디배양(node culture)을 수행하여, 다수의 소식물체(plantlet)을 배양하여 유도하였음.

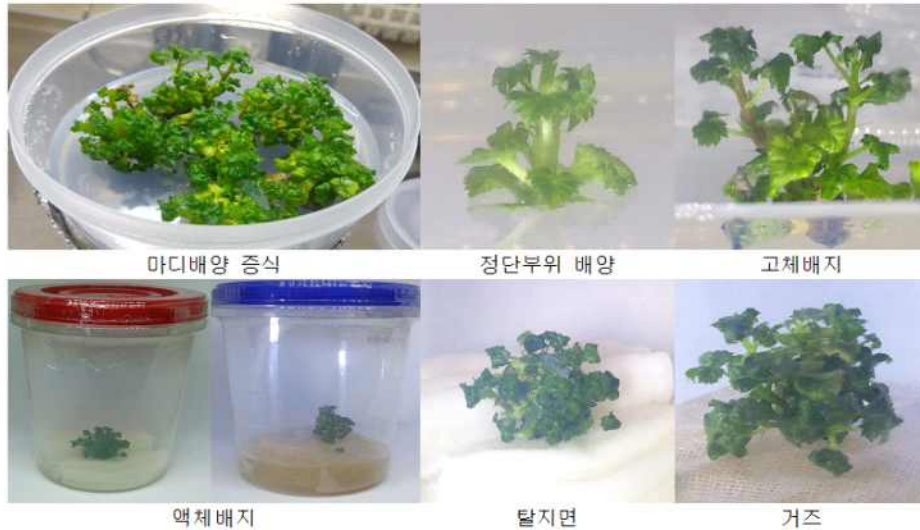


그림 5-9. Breidge culture 방법을 이용한 배양체계 개발

③ 보이젠베리의 소식물체의 순화체계 확립

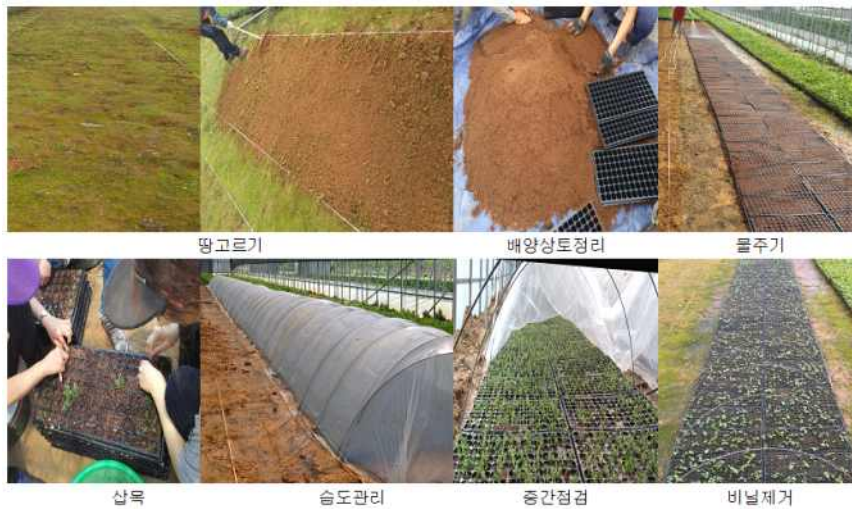


그림 5-10. 조직배양 묘의 최적순화 체계

- 신초와 뿌리가 잘 발달된 유식물체를 모래, 토양, 그리고 버뮤클라이트가 혼합된 토양 (1:1:1, vol)과 배양 상토에 이식하여 약 6주간 온도와 채광비율을 조절하면서 안정적인 순화를 유도하였던바 혼합토양에 삽목한 경우보다 배양상토에서는 삽목한 경우 높은 발근율과 안정된 성장을 함.
- 순화된 식물체를 이식하였을 경우 약 90%의 생존율을 나타내었으며, 안정적으로 토양에 뿌리가 활착하여 순화됨을 확인 할 수 있어서 향후 대량증식체계를 확립 할 수 있음.
- 이후 재배농장에서 정상적으로 성장함을 확인 할 수 있었다. 이상의 결과를 통하여 돌연변이 육종을 통한 보이젠베리 묘목의 대량생산이 가능하고 관련 과수농가에 원활한 공급이 가능하며 농가소득에도 기여할 것으로 예상.

(다) 블랙베리 묘목과 건강식품의 생산 및 판매

① 블랙베리 묘목

- 중국내 실증포 운영

- 기능성 및 생산력이 우수한 방사선 돌연변이 블랙베리 묘목의 우수성을 홍보하기 위해 운영
- 중국 수출을 위해 중국내에 실증포를 운영 중이며 안정적인 과실을 수확할 수 있어, 중국내에서 블랙베리 신품종의 우수성을 재배법, 열매의 특징, 생산량 등을 통하여 알릴 수 있음



그림 5-11. 중국 실증포

- 블랙베리 묘목 생산

- 블랙베리 묘목의 대량증식을 위해, 조직배양과 순화를 통한 대량생산 체계 확립.
- 중국내에서 묘목을 생산하기로 결정하고 중국내 조직배양시설은 확보하여 조직배양 시험중
- 순화시설은 중국 측 파트너와 협의 중

② 블랙베리 건강식품 시제품생산

- 블랙베리의 제품화

- 블랙베리를 함유한 건강식품을 1년차에 시행했던 시작품의 실패 결과를 토대로 동·식물을 원료로 다양한 레시피의 기호도, 원가 등을 분석하여 시제품 1000박스를 생산하여 시장조사 중

- 시제품 생산

- 1년차 시작품(트리플베리)

표 5-6. 시제품 트리플베리


트리플베리	원료명	함량(고형분)
	블랙베리	65%(3%이상)
	가시오갈피농축액	5%(3%이상)
	아로니아베리	10%(3%이상)
	엘더베리	20%(3%이상)
	발효스테비아	0,01%미만
	계	100%

표 5-7. 시제품 황제어보 오메가 제품

황제어보	원료명	함량(고형분)
	철갑상어	60%(3%이상)
	오가피	20%(3%이상)
	두충	2%(3%이상)
	당귀	2%(3%이상)
	계피	2%(3%이상)
	백작약	2%(3%이상)
	천궁	2%(3%이상)
	숙지황	2%(3%이상)
	황기	2%(3%이상)
	백출	2%(3%이상)
	감초	각 0.8%(3%이상)
	산사, 진피, 맥아	
	계	100%

- 트리플베리와 황제어보 제품을 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3으로 섞어 지인들 20명에게 시음회를 거쳐 가장 선호하는 비율인 5:5로 시제품을 만들었음
- 개발비 절약을 위해 1년차에 만들어 놓은 파우치, 내박스, 카톤박스, 외박스 등은 트리플베리 제품 것을 사용하여 시제품 생산



그림 5-12. 시제품 포장 및 대량생산

- 동·식물을 원료로 다양한 레시피의 기호도, 원가 등을 분석하여 시제품 1000박스를 생산하여 시장조사 중
- 포장 디자인은 전문기관에 의뢰하여 진행 중이나 3년차에도 디자인비용을 더 들여서 시장에서의 경쟁력을 갖출 계획
- 시장조사 결과를 취합하여 본제품 생산 시 참고하여 3년차에 약 500박스를 더 만들어 유통회사와 검토한 후 본 제품을 생산할 계획

(3) 3차년도 연구내용 및 결과

(가) 보이젠베리 신규 유망 계통의 선발, 특성검정 및 대량증식체계 확보

① 보이젠베리의 신규 유망 계통의 선발

- 5계통의 조직배양을 수행하여 대량증식체계를 확립하였으며, 식물체의 특성조사 및 실험

증재배를 통해 2계통을 선발하여 조직배양을 수행하여 순화를 하였음.



그림5-13. 순화한 보이젠베리 2계통

- 순화한 2계통을 실증포를 조성하여 실증재배를 통한 식물체의 특성조사를 수행하여 내한성과 내병성이 강하고 생육이 좋은 계통으로 BS-G 계통을 선발하여 품종출원 및 등록을 할 예정임

BS-G



BS-F



그림 5-14. 실증포에 재배중인 2계통

(나) 보이젠베리 선발계통의 조직배양 체계확립

① 가지없는 블랙베리의 근맹아를 이용한 다경유도와 절간배양을 통한 식물체 증식 조건의 확립(논문)

- 본 연구에 사용한 식물체는 *Rubus fruticosus* L. cv. BB21은 *Rubus fruticosus* L. × *R. parvifolius* L. 교잡 블랙베리 V3품종에서 방사선을 처리하여 돌연변이로 선발 육종된 V9개체 중 다시 방사선을 처리하여 선발육종 된 품종이다. 이러한 우량계통의 신속한

증식을 이루기 위하여 조직 배양을 통한 효과적인 방법을 구명하고자 배지 및 성장조절 물질 등의 처리에 따른 안정적인 생산을 위해 본 연구가 수행되었다. 땅속에서 채집된 근맹아 절편체를 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L BAP가 첨가된 MS와 1/2MS 배지에 치상하여 6주간 배양한 후, 다경의 형성률을 조사하였다. 형성된 다경으로부터 산업적으로 이용하기 위한 안정된 생산을 위하여, 신초의 잎을 제거한 후 절간배양을 수행하여 다수의 소 식물체를 증식하고자 여러종류의 배지 즉, AD (Anderson 1980), B5 (Gamborg 1968), MS (Murashige and Skoog 1962), SH (Schenk and Hildebrandt 1972), QL (Quoirin and Lepoivre 1977), WPM (Lloyd and McCown 1981)배지와 상기의 각각의 동일배지의 무기염류의 수준을 절반으로 한 1/2배지에 배양하였다. 초기의 생육(30일간 배양 시)에 있어서 생장은 배지 간에 차이를 나타내어 1/2AD, 1/2QL 배지에서 가장 양호한 초장을 나타내었으며, 절간수도 약 3.8, 4.4개를 나타내었으며, 뿌리, 생중량 다경유도 모두 양호하였다. 90일간 배양한 경우에는 MS배지가 초장이 가장 양호하였으며 AD, SH 순으로 양호한 결과를 나타내었다. 식물체의 토양 순화는 신초와 뿌리가 잘 발달된 정상적인 식물체를 모래, 토양, 그리고 버뮤클라이트가 혼합된 토양 (1:1:1, v/v)에 각각 직접 이식하여 실시한 결과, 식물체의 발근율과 생존률(약98%)을 나타내었다. 이상의 결과를 통하여 블랙베리 묘목의 대량생산이 가능하여 농가에 원활한 공급이 가능할 것으로 예상된다.

② 보이젠베리의 방사선처리에 의하여 유도된 변이 계통 열매의 안토시아닌 및 당도 조사 (포스터 논문발표)

- 가시없는 보이젠베리의 조직배양묘에 ^{60}Co 감마선을 조사하여 돌연변이 육종을 통하여 신품종 개발을 하고, 생산성이 우수한 묘목을 농가에 보급하고자 하였다.
- 배양조건으로는 보이젠베리의 휴면아를 채취하여 MS배지에 BAP가 첨가된 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L 의 조건에서 수행하였으며 유도된 배양묘에 ^{60}Co 감마선을 20Gy, 40Gy, 60Gy, 80Gy로 조사하여 1차적으로 형태적 변이를 중심으로 선발하였다.
- 선발된 Line열매의 묘를 순화를 거쳐 포장에 정식 1년 후 각각의 Line열매 별로 열매를 수확하여 생산량 및 anthocyanin과 sugar의 함량을 조사하였다.
- Sugar의 함량은 BSE Line열매에서 8.8 ± 0.1 (°Brix)로서 제일 높았고, BSD의 경우 5.9 ± 0.1 (°Brix)로서 제일 낮게 나타났다.
- Anthocyanin의 함량은 BSC Line열매에서 467.9 ± 0.1 (mg/100g)로서 높았다.
- 변이 Line열매 별로 식물체를 유도하여 농가에 보급하기 위해서는 기능성 그리고 생산성을 고려하여야 하므로 열매의 생산성이 양호한 BSF Line열매의 묘를 대량생산하고 이를 대량으로 재배하여 농가소득의 극대화를 위한 기초자료로 활용하고자 한다.

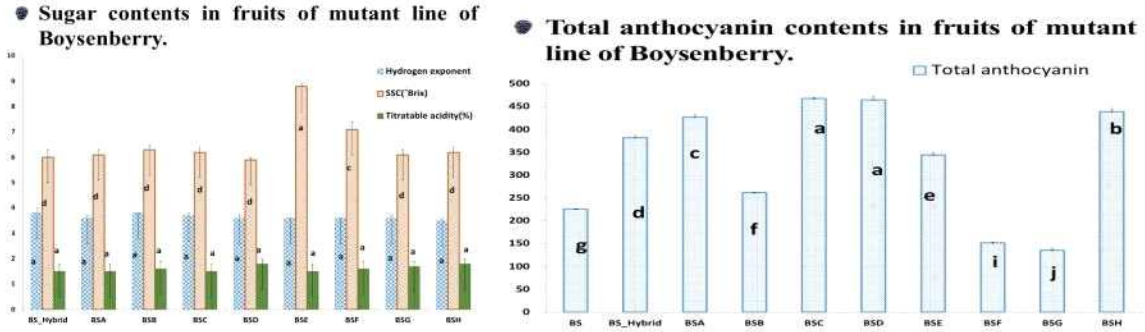


그림 5-15. 안토시아닌함량 및 당도 그래프

③방사선처리에 의하여 유도된 보이젠베리의 절간 배양을 통한 식물체 재생(포스터발표)
 - 가시없는 보이젠베리의 조직배양묘에 ⁶⁰Co감마선을 조사하여 돌연변이 육종을 통하여
 신품종 개발을 하고, 생산성이 우수한 묘목을 농가에 보급하고자 하였다.
 배양조건으로는 MS, SH 배지에 싸이토키닌류(BAP, Kinetin, 2iP) 0.5, 1, 3 mg/L가 첨
 가된 조건에서 수행하였으며, 다경유도에 적합한 조건으로는 BA가 첨가된 MS배지에서
 높은 형성률을 나타냈으며, 신초의 수, 신초의 길이는 2.0mg/L Kinetin 단독처리구에서
 2.42cm±0.1로 가장 길게 나타났다.

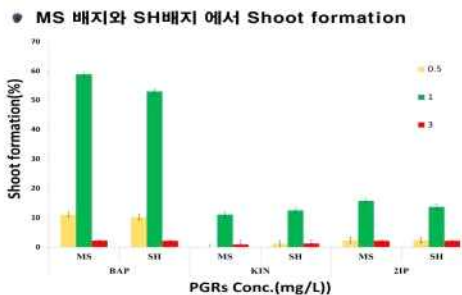


그림 5-16. MS배지와 SH배지에서 Shoot formation

소식물체의 발근 및 순화(Rooting & Acclimation)



그림 5-17. 소식물체의 발근 및 순화

● Effects of plant growth regulator on the shoot number and shoot length.

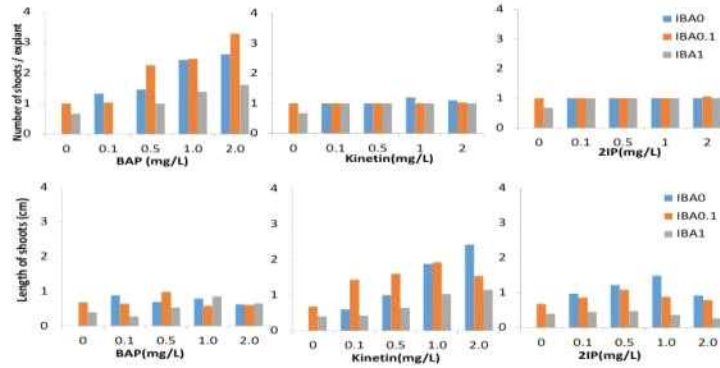


그림 5-18. 호르몬처리구별 shoot length 와 shoot number

(다) 블랙베리 묘목과 건강식품의 생산 및 판매

① 블랙베리 묘목

- 중국내 실증포 운영

- 기능성 및 생산력이 우수한 방사선 돌연변이 블랙베리 묘목의 우수성을 홍보하기 위해 운영
- 지주를 대나무로 하였던 것을 하우스용 쇠파이프로 교체하여 안정적인 과실을 수확할 수 있도록 함.



그림 5-19. 중국 블랙베리 실증포

- 블랙베리 묘목 생산

- 블랙베리 묘목의 대량증식을 위해, 조직배양과 순화를 통한 대량생산 체계 확립.
- 중국내에서 묘목을 생산하기로 결정하고 중국내 조직배양시설은 확보하여 조직배양 시험 중
- 순화시설은 중국 측 파트너와 협의 중

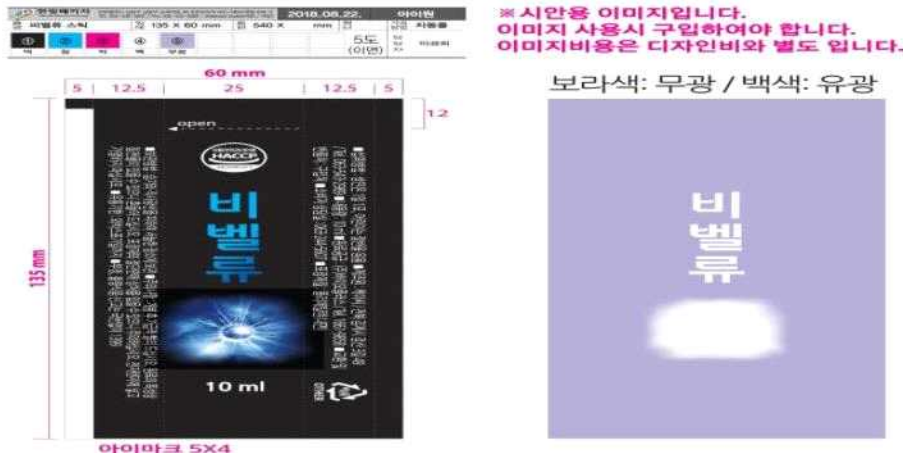
② 블랙베리 건강식품 시제품 및 본제품 생산

① 시제품

- 블랙베리를 함유한 건강식품을 2년차에 시행했던 시작품의 결과를 토대로 곤충과 식물을 원료로 다양한 레시피의 기호도, 원가 등을 분석하여 시제품 500박스를 생산하여 시장조사 완료
- 개발비 절약을 위해 1년차에 만들어 놓은 파우치, 내박스, 카톤박스, 외박스 등은 트리플베리 제품 것을 사용하여 시제품 생산

② 본제품

- 본제품은 금액을 더 투자하여 디자인 변경을 하였고 제품이름을 비벨류(B. value)로 정함.



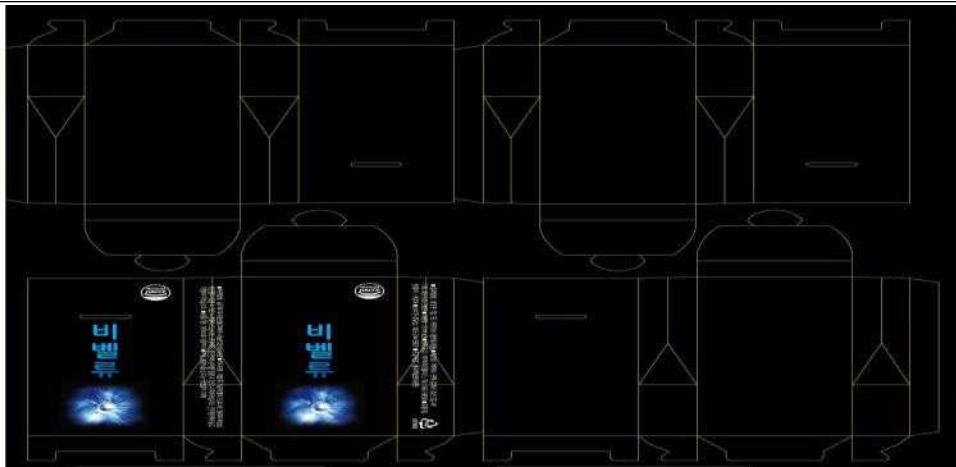


그림 5-20. 시제품 비벨류

표 5-7. 본제품 비벨류 제품

원료명	함량(고형분)	비고(원산지 등)
쌍별귀뚜라미	3%	국내산, 전체사용
블랙베리열매	6%	국내산, 열매사용
오갈피나무	2%(10%이상)	국내산, 줄기
기타(참뿌리, 사철쭉지상부, 벌꿀:이상 국내산, 헛개나무열매, 감초, 구기자, 작약:이상 수입산)		

- 추출가공식품으로 쌍별귀뚜라미함량과 블랙베리열매의 함량을 다르게하여 지인들 20명에게 시음회를 거쳐 가장 선호하는 비율인 1:2로 제품을 만들었음.
- 동·식물을 원료로 다양한 레시피의 기호도, 원가 등을 분석하여 시제품 500박스를 생산하여 적당한 비율로 시장조사를 하였음.
- 포장 디자인은 전문기관에 의뢰하여 진행 중이나 3년차에도 디자인비용을 더 들여서 시장에서의 경쟁력을 갖출 계획.
- 시장조사 결과를 취합하여 유통회사와 검토한 후 본 제품 1000박스를 더 생산하여 본 제품을 생산

6. (5협동) 체세포 변이 원예작물 신품종의 특이 분자마커 개발(전남대/하보근)

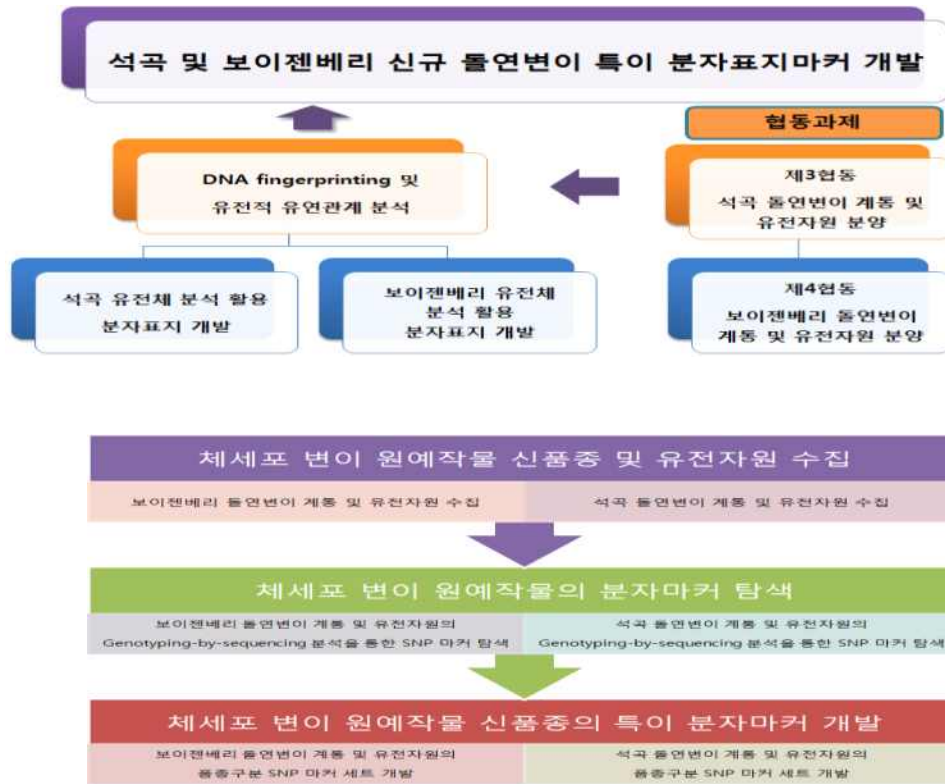
가. 연구목적 및 배경

- 국제식물신품종보호동맹(UPOV) 가입으로 육종가가 개발한 신품종에 대한 지적 재산권 보호 조치 강화 및 상품성 향상과 소비자에 대한 신뢰성을 증대시키기 위하여 보이젠베리와 석곡 난 돌연변이 신품종 조기선발 및 품종 지원을 위한 신규 분자마커 시스템 개발이 필요함
 - 중국 연구진은 석곡의 EST library를 이용하여 300여개의 SSR 분자표지를 개발하였으며 이를 이용한 속곡 유전자원간의 유전적 유연관계 분석 및 유전자지도 작성 연구 등을 활발하게 진행 중임.
 - 국내에서는 토마토, 복숭아, 오이, 블루베리 등의 원예작물 품종 식별을 위하여 SSR과 SNP를 이용한 분자표지 개발 및 데이터베이스 구축 작업이 진행되고 있으나 아직까지 보이젠베리와 석곡에 대한 연구는 전무한 실정
 - 현재까지 국내 석곡(*Dendrobium*)의 품종보호권 현황은 출원 60건, 등록 29건으로 석곡의 돌연변이 신품종 개발시 기존 품종과의 구별성 판별을 위한 분자표지 개발이 필요한 실정임

나. 연구개발 추진 방법 및 추진 체계

- 보이젠베리 돌연변이 계통 및 유전자원의 확보
 - 제 4협동 과제의 바이오플러스에서 개발 중인 보이젠베리 돌연변이 계통 및 수집한 유전자원을 활용할 계획임
- 석곡 돌연변이 계통 및 유전자원의 확보
 - 제 3협동 과제의 바보난농원에서 개발 중인 석곡 돌연변이 계통 및 수집한 유전자원을 활용할 계획임
- 보이젠베리 유전체 분석 활용 분자표지마커 개발
 - 보이젠베리(*Boysenberry*, *Rubus ursinus* Chamisso and Schlenhtendal)는 Blackberries (*Rubus* sp. L.)와 red raspberries (*R. idaeus* L. and *R. strigosus* Michx)와 같은 *Rubus* 종에 속하며 기존의 *Rubus* 종으로부터 100여개의 SSR 마커가 개발되었고, 이를 활용하여 보이젠베리 돌연변이 계통 및 유전자원들의 PCR 증폭 가능여부를 확인한 후 DNA fingerprinting 분석에 활용할 예정임
 - 차세대염기서열분석 방법 중에 저렴한 비용으로 게놈 분석이 가능한 Genotyping-by Sequencing (GBS) 분석 기술을 활용하여 다량의 genome-wide SNP 변이를 탐색할 수 있으며, 이를 활용하여 특정 품종 구분용 마커 확보 가능
 - 품종구분 SNP 마커 세트는 각 SNP loci를 high-throughput SNP genotyping 방식으로 변경을 할 예정이며 이를 위해 real-time PCR 기기를 이용하는 allele-specific primer 방식이나 TaqMan 방식 등으로 개발 추진
- 석곡 유전체 분석 활용 분자표지마커 개발
 - 보이젠베리와 마찬가지로 Genotyping-by Sequencing 분석 기술을 활용하여 다량의 genome-wide SNP 변이 탐색 후, 이를 활용하여 특정 품종 구분용 마커 확보 가능
 - 석곡 품종구분 SNP 마커 세트도 high-throughput SNP genotyping을 위해 allele-specific

primer 방식이나 TaqMan 방식 등으로 개발 추진



<제5협동 연구 계획 요약도>

다. 연구 추진 주요내용

- SSR 마커이용 보이젠베리 돌연변이 집단 유전적 근연관계 분석
 - 103개 SSR 마커 세트를 이용하여 보이젠베리 유전자원간의 공통 SSR마커 대립유전자 함유 빈도를 이용한 유전적 거리 분석
- 보이젠베리 돌연변이 집단 품종구분용 SNP 마커 세트 개발
 - Genotyping-by-sequencing (GBS) 분석에 의해 SNP 마커 개발
 - High-throughput SNP genotyping을 위해 real-time PCR 기기를 이용하는 Allele-specific primer 방식인 KASP genotyping assay 개발
- 석곡 돌연변이 집단 품종구분용 SNP 마커 세트 개발
 - 석곡 돌연변이 및 유전자원 GBS 분석을 통한 SNP 마커 탐색
 - 석곡 돌연변이 및 유전자원간 근연관계 분석
 - 석곡 돌연변이 및 유전자원 품종구분용 SNP 마커 선발
 - 선발된 SNP 마커 세트를 이용하여 High-throughput SNP genotyping system 개발

라. 연구개발 내용 및 결과

(1) 1차년도 연구내용 및 결과

(가) 보이젠베리 돌연변이 집단 및 유전자원 확보

① 보이젠베리 돌연변이 집단 확보

- 바이오플러스에서 육성된 보이젠베리 돌연변이 집단 및 유전자원 10점 확보하였으며, 보이젠베리

도입종은 줄기에 가시가 있는게 특징이나 보이젠베리와 블랙베리 V3와 교잡종은 가시가 없는 게 특징임. 이를 이용하여 감마선 20Gy와 40Gy를 조사하여 농업적으로 형질이 우수한 8계통의 돌연변이체를 바이오플러스에서 선발하였음.

Table 6-1. Origin of boysenberry genotypes used in this study

No.	Line	Origin	Treatment	Stem Spiny
1	BS_PI	Boysenberry from Japan		Spiny
2	BS_Hybrid	Cross breeding	Blackberry(V3)×Boysenberry	Thornless
3	BSA-036	Hybrid Boysenberry	Gamma-ray 20 Gy	Thornless
4	BSA-065	Hybrid Boysenberry	Gamma-ray 20 Gy	Thornless
5	BSA-078	Hybrid Boysenberry	Gamma-ray 20 Gy	Thornless
6	BSA-101	Hybrid Boysenberry	Gamma-ray 20 Gy	Thornless
7	BSA-119	Hybrid Boysenberry	Gamma-ray 20 Gy	Thornless
8	BSA-144	Hybrid Boysenberry	Gamma-ray 20 Gy	Thornless
9	BSB-032	Hybrid Boysenberry	Gamma-ray 40 Gy	Thornless
10	BSB-127	Hybrid Boysenberry	Gamma-ray 40 Gy	Thornless



Figure 6-1. boysenberry genotypes used in this study. 1) BS_PI 2) BS_Hybrid 3) BSA-078

(나) SSR 마커 이용 보이젠베리 유전관계 분석

① 보이젠베리 Genome 변이 탐색을 위한 SSR 프라이머 제작

- 블랙베리와 레드 라즈베리에서 이용된 SSR 마커 중 103개의 SSR마커를 선발하여 제작하였음. 그 중에서 53 SSR 마커는 블랙베리와 레드 라즈베리 게놈 라이브러리에서 개발되었으며, 나머지 50 SSR 마커는 EST 라이브러리에서 파생된 것임.
- 10개의 보이젠베리 유전자원에 103개의 SSR 마커의 DNA fingerprinting를 실시한 결과

모두 PCR product를 증폭하여 100% transferability를 보였음

- 103개의 SSR 마커 중에 11개의 SSR마커에서 보이젠베리 유전자원에 다양성이 있는 대립유전자를 보였음. 본 연구에서 EST-SSR 마커의 다형성 비율이 대략 게놈-SSR 마커보다 4.7 배 높았으며 블랙베리에서 추출한 EST-SST 마커가 가장 높은 다형성 비율 (26.3 %)을 보였음

Table 6-2. Amplification profiles for 103 SSR markers tested in 10 boysenberry genotypes

Type of SSR markers	Primer pairs tested	Amplification success (%)	No. polymorphic markers	Ratio of polymorphic markers (%)	References
Genomic SSR of blackberry	4	100	0	0	Castro et al. (2013)
Genomic SSR of blackberry and red raspberry	10	100	1	10	Castillo et al. (2010)
Genomic SSR of red raspberry	39	100	1	2.6	Graham et al. (2004)
EST SSR of blackberry	19	100	5	26.3	Lewers et al. (2008)
EST SSR of red raspberry	23	100	3	13.0	Woodhead et al. (2008)
EST SSR of red raspberry	8	100	1	12.5	Graham et al. (2004)
Total	103	100	11	10.7	

- 11개 SSR마커의 다양성을 분석한 결과 평균 PIC값은 0.359로 SSR마커 RH_MEa0007aB01와 RH_MEa14bF07에서 가장 높은 PIC값인 0.58를 보였음. 평균 대립유전자 수는 1.909로 1.5에서부터 2.0까지의 범위를 보였으며, gene diversity는 1.220 (ERubLR_SQ01_N03)에서 1.584 (RH_MEa14bF07)를 보였음. 최대의 gene diversity(0.640)와 PIC(0.580) 값을 보유하고 있는 SSR 마커는 블랙베리 EST 라이브러리에서 개발된 RH_MEa0007aB01와 RH_MEa14bF07이었음.

Table 6-3. Characteristics of 11 SSR markers showing polymorphisms in 10 boysenberry genotypes.

No.	Marker name	Type of SSR	Na ^z	Ne ^v	GD ^x	PIC ^w
1	RH_MEa0007aB01	EST SSR of blackberry	2.000	1.458	0.640	0.580
2	RH_MEa12cE03	EST SSR of blackberry	2.000	1.220	0.340	0.310
3	RH_MEa14bF07	EST SSR of blackberry	2.000	1.584	0.640	0.580
4	RH_MEa15aD04	EST SSR of blackberry	2.000	1.395	0.580	0.540
5	RH_MEa13cF08	EST SSR of blackberry	2.000	1.490	0.180	0.160
6	ERubLR_SQ01_N03	EST SSR of red raspberry	2.000	1.220	0.180	0.164
7	ERubLR_SQ053_H01	EST SSR of red raspberry	1.500	1.500	0.420	0.330
8	ERubLR_SQ191_A05	EST SSR of red raspberry	2.000	1.345	0.620	0.540
9	RubfruitG7	EST SSR of red raspberry	2.000	1.490	0.180	0.164
10	Rubusr43a	Genomic SSR of red raspberry	2.000	1.571	0.380	0.310

11	RiM019	Genomic blackberry and red raspberry	SSR	of	1.500	1.362	0.320	0.270
Mean					1.909	1.421	0.407	0.359

²Na: Observed number of alleles, ³Ne: Effective number of alleles,

^xGD: Genediversity, ^wPIC: Polymorphism information content

- 높은 PIC 값을 나타내는 8 가지 EST-SSR 마커의 유전적 기능을 추정하기 위하여 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에서 비 중복 GenBank 데이터베이스에 대해 BLAST를 사용하여 결정하였음. 8개의 EST 염기서열이 다음과 같은 유전자들과 상동성을 보였음 (E3 ubiquitin-protein ligase, chlorophyll a-b binding protein, zeta-carotene desaturase protein, allergen Pru av1-like, xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 8, RING-H2 finger protein)

Table 6-4. Putative function of EST-SSR markers showing polymorphisms in 10 Boysenberry genotypes.

No.	Marker name	GenBank accession no.	Homology	E-value
1	RH_MEa0007aB01	FF683655	<i>Fragaria vesca</i> subsp. vesca E3 ubiquitin-protein ligase SIS3	1e-155
2	RH_MEa12cE03	FF68428	<i>Fragaria vesca</i> subsp. vesca uncharacterized LOC101302468	1e-119
3	RH_MEa14bF07	FF684762	<i>Fragaria vesca</i> subsp. vesca chlorophyll a-b binding protein of LHCII type 1-like	0.0
4	RH_MEa15aD04	FF684949	<i>Fragaria x ananassa</i> zeta-carotene desaturase protein (zds)	0.0
5	RH_MEa13cF08	FF684532	<i>Fragaria vesca</i> subsp. vesca ranBP2-type zinc finger protein At1g67325	2e-31
6	ERubLR_SQ01_N03	EX567290	<i>Fragaria vesca</i> subsp. vesca major allergen Pru av 1-like (LOC101298594)	3e-121
7	ERubLR_SQ053_H01	EX567274	<i>Rosa x borboniana</i> xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 8 (XTH8)	1e-78
8	ERubLR_SQ191_A05	EX567282	<i>Prunus mume</i> RING-H2 finger protein ATL20-like	6e-40

② 보이젠베리 유전자원 대상 DNA fingerprinting 실시 및 근연관계 분석

- 11개의 SSR마커에서 얻은 27개의 polymorphic loci를 이용하여 genetic distance matrix를 계산한 후 NTSYS를 이용하여 UPGMA 방식으로 유전적인 다양성을 조사하였음. 보이젠베리 유전자원간의 유전적 거리는 0부터 0.898로 평균 0.268의 값을 보였으며 BSA-119, BSA-114와 BSB-127간에는 유전적인 차이를 보이지 않았음. BS_Hybrid와 BSA-036은 가장 유전적 거리가 멀었음.

Table 6-5. Matrix of Nei's (1978) genetic distances between boysenberry genotype.

Line No. ^z	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.000									
2	0.160	0.000								
3	0.898	0.898	0.000							
4	0.463	0.463	0.588	0.000						
5	0.406	0.406	0.523	0.205	0.000					

6	0.588	0.588	0.588	0.251	0.205	0.000				
7	0.588	0.588	0.463	0.351	0.118	0.077	0.000			
8	0.588	0.588	0.463	0.351	0.118	0.077	0.000	0.000		
9	0.731	0.731	0.588	0.463	0.205	0.160	0.077	0.077	0.000	
10	0.588	0.588	0.463	0.351	0.118	0.077	0.000	0.000	0.077	0.000

⁴Line No.: Line number is listed in Table 1-1.

- SSR 마커의 클러스터 분석에 따르면, 감마선 처리 그룹(BSA-036, BSA-065, BSA-078, BSB-032, BSA-101, BSB-127, BSA-119, BSA-144)과 비처리 그룹(BS_PI, BS_Hybrid)으로 나누어졌으나 감마선 처리 내에서의 뚜렷한 구별은 보이지 않았음

(2) 2차년도 연구내용 및 결과

(가) 보이젠베리 돌연변이 집단 및 유전자원간 SNP 변이 탐색

- ① 보이젠베리 돌연변이 집단 및 유전자원 대상 genotyping-by-sequencing(GBS) 분석 실시
 - 보이젠베리 9계통(BS_PI, BS_Hybrid, BSA036, BSA065, BSA078, BSA101, BSA119, BSA144, BSB032) 및 블랙베리 5계통(V3, V7, Maple, Heukjinju, Heukgwang)의 DNA에 ApeK1(GCWGC) 제한효소를 처리한 후 GBS library 제작하였으며 Illumina Hiseq 2000 플랫폼으로 short reads를 생산하여 quality trimming 후 de novo assembly를 수행하였음. k-mer=31으로 수행한 assembled contig 결과를 레퍼런스로 사용하여cleaned reads를 BWA 프로그램으로 mapping을 수행하여 샘플간의 SNP와 Indel을 탐색하였음.

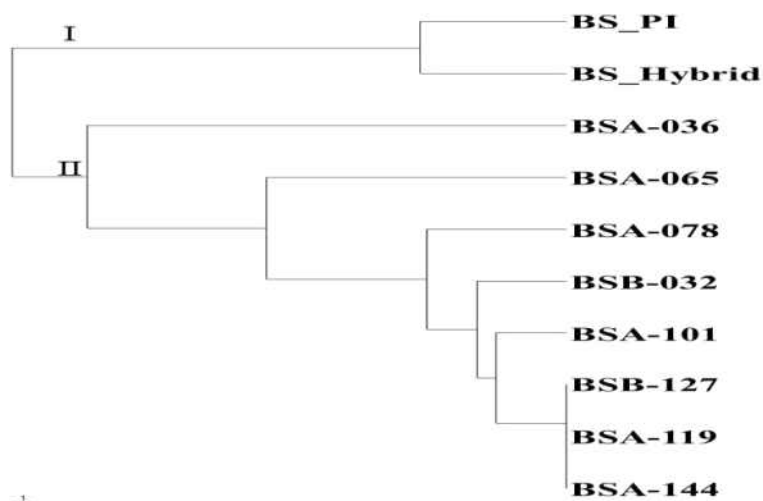


Figure 6-2. Phylogenetic tree based on boysenberry genotypes of 11 polymorphic SSR markers

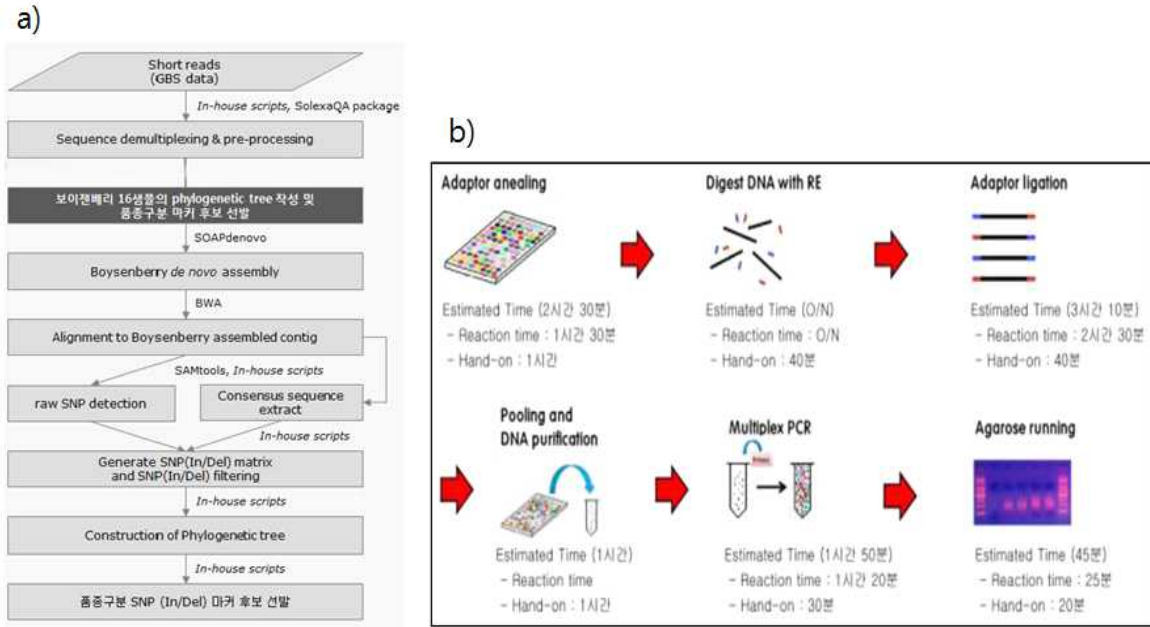


Figure 6-3. (a) GBS procedure (b) Construction of GBS library

- 보이젠베리 및 블랙베리 유전자원 14계통의 GBS 결과 개체당 평균 3.7 million reads로 총 5.9G bp의 염기서열을 해독하였음. Adapter 염기서열, low-quality reads, 바코드 염기서열을 제거한 read length은 약 3.7G bp로 총염기서열의 86.4%이었으며 개체당 116,380,840 ~ 509,806,521 bp 범위에 평균 228,087,333 bp를 확보하였음. *De novo* assembled contigs에 mapped된 reads는 개체당 평균 457,373으로 평균 1,682,345 bp의 염기서열이 contigs에 mapping이 완료되었음.

Table 6-6. Overview of the GBS sequence data and alignment to the reference sequence

	Total	Average/Plant
Total raw reads	58,819,606	3,676,225
Trimmed reads	50,831,040	3,176,940
Total length of raw reads (bp)	5,940,780,206	371,298,763
Total length of trimmed reads (bp)	3,649,397,325	228,087,333
Mapped reads on assembled contigs	6,403,221	457,373
No. of mapped regions	260,548	16,284
Total length of mapped regions (bp)	26,917,524	1,682,345

- 각 샘플의 raw SNP를 이용하여 보이젠베리 및 블랙베리 14 계통간의 union SNP matrix를 작성하여, 필터 기준을 통과한 SNP들은 homozygous SNP와 heterozygous SNP로 구분하여 분석하였음. Homozygous SNP는 read depth에서 90% 이상의 동일한 염기서열을

보이는 것을 기준으로 하였으며 heterzyous SNP는 40%~60%의 두 개 염기서열이 공존할 때로 구분하였음.

- 탐색된 총 SNP는 19,634개로 11,328이 homozygous SNP이고 8,306이 heterozyous SNP로 구분되었음. 보이젠베리 BSA144 계통이 가장 많은 3,186개의 SNP를 보였으며 블랙베리 흑광이 가장 적은 502개의 SNP를 보였음. 이 결과는 GBS trimmed reads의 총 길이 결과와 일치하며, 보이젠베리 BSA144 계통이 가장 많은 trimmed read를 가지며, 블랙베리 흑광이 가장 적은 trimmed read를 보였음.
- 보이젠베리 및 블랙베리 유전자원간 InDel변이도 탐색되었는데 총 389개의 InDel 변이가 탐색되었으며 homozygous InDel이 292개, heterozygous InDel이 97개로 이루어져 있음. 그리고 이 InDel 수는 SNP 변이보다 적은 수치로 나타남. InDel도 SNP변이와 마찬가지로 보이젠베리 BSA144 계통이 가장 많은 75개의 InDel를 보였으며 블랙베리 흑광이 가장 적은 6개의 InDel를 보였음.

Table 6-7. Summary of SNPs and InDels detected among the *Rubus*genotypes

Line name	Total nos. of detected SNPs	No. of homozygous SNPs*	No. of heterozygous SNPs**	Total detected InDels	No. of homozygous InDels*	No. of heterozygous InDels**
1. BS_PI	1,607	994	613	36	24	12
2. BS_Hybrid	1,895	1,190	705	51	43	8
3. BSA036	1,024	706	318	23	18	5
4. BSA065	1,282	807	475	18	12	6
5. BSA078	1,663	692	971	22	19	3
6. BSA101	1,759	1,033	726	41	25	16
7. BSA119	1,268	704	564	27	22	5
8. BSA144	3,186	1,362	1,824	75	50	25
9. BSB032	838	545	293	19	15	4
10. V3	1,378	891	487	19	15	4
11. V7	551	387	164	7	6	1
12. Maple	1,554	884	670	24	20	4
13. Heukjinju	1,127	774	353	21	17	4
14. Heukgwang	502	359	143	6	6	0
Total	19,634	11,328	8,306	389	292	97
Average/plant	1,402.4	809.1	593.3	27.8	20.9	6.9

*Read depth \geq 90%, **40% \leq read depth \leq 60%

② 보이젠베리 돌연변이 집단 및 유전자원간의 유전적 유연관계 분석

- 보이젠베리 및 블랙베리 유전자원간 탐색된 union SNP marix loci인 16,726개를 이용하여 missing rate < 30% 이하로 필터링을 거쳐 1,504개의 union SNP loci를 선발하였음. 선발된 1,504개의 union SNP loci를 Neighbor-Joining 방법을 이용하여 진화적인 역사를 추론하였으며, MEGA6를 이용하여 유전적인 분석을 완료하였음.

- 보이젠베리와 블랙베리의 클러스터 분석에 따르면 *Rubus* 유전자형은 3 개의 관련 그룹과 2 개의 독립적인 그룹으로 나뉜다. 제 1 그룹은 블랙베리 유전자원 V3와 블랙베리 돌연변이 라인 (흑진주, Maple, V7, 흑광)으로 구성되었으며, 그룹 II는 4 개의 *Rubus* 교배 돌연변이체 (BSB032, BSA119, BSA101 및 BSA144)를 함유 하였음. 그룹 III에는 보이젠 베리 원품종 BS_PI, BS_Hybrid 및 BSA036이 포함되어있었음. 그러나 2 개의 *Rubus* 잡종 돌연변이 계통 (BSA065 및 BSA078)은 어떤 군에도 속하지 않았음.

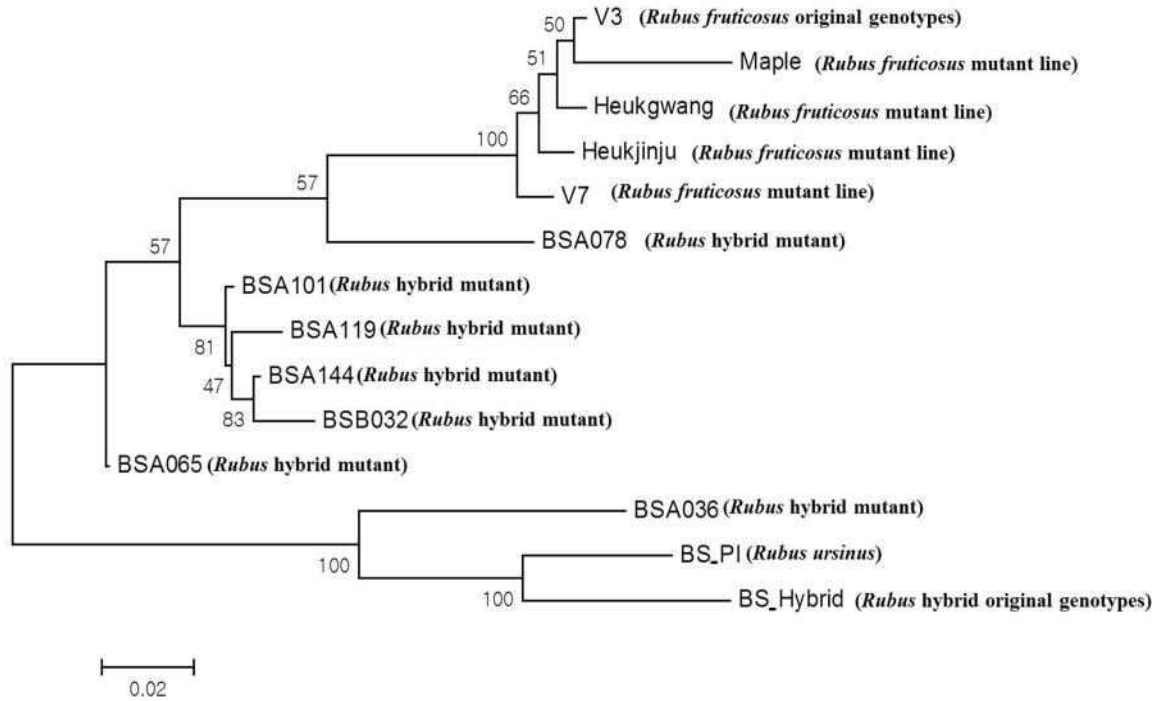


Figure 6-8. Neighbor-joining dendrogram based on a pairwise distance matrix, which shows how the 14 *Rubus* line accessions obtained from 1,504 SNPs were grouped.

(나) 보이젠베리 돌연변이 집단 및 유전자원간의 품종 구분 SNP genotyping system 개발

① 보이젠베리 품종구분 KASP genotyping assay 개발

- 품종구분용 SNP 마커를 선발하기 위해 missing data=0%으로 필터 과정을 거쳐 108개의 SNP loci를 선발하였음. 이를 이용하여 개체 간의 염기서열을 비교하여 품종구분용 마커 세트 후보 좌로 유력한 25개의 SNP loci를 선발하였으며 이를 활용하여 KASP genotyping assay로 변환된 것은 총 6개의 SNP loci이었음.
- 6개의 SNP마커 세트에서 442304 마커는 블랙베리 돌연변이 라인에서 모두 C 대립유전자가 나타났으며 보이젠베리에서는 T와 Y의 대립유전자를 보여 블랙베리와 보이젠베리 판별 마커로서 활용가능성이 높았음. 또한, 442304 및 427156 마커를 사용하여 BSA036을 구별하고, 536540 마커 세트를 사용하여 가시가 있는 BS_PI 품종을 구별하였음.

Table 6-8. New, validated KASP markers for the *Rubus* genotypes used in this study.

No.	ID	Refer ence allele	Expected alleles													
			1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	354992	A	W†	W	T	T	W	T	T	T	T	T	T	T	T	T
2	366042	T	Y	T	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
3	426936	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	Y	Y	Y	Y	C
4	427156	A	A	A	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
5	442304	C	Y	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	C	C	C	C	C
6	536540	G	C	S	G	G	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G

*Line No.: Line number is listed in Table 2-2 † W: A or T; Y: C or T; S: G or C

- KASP genotyping assay은 SNP 유전자형 분석을 위해 대립 형질 특이적 oligo 확장과 형광공명에너지전달(FRET)을 기반으로 샘플 DNA는 2 개의 대립형 특정 포워드 프라이머, 하나의 공통 리버스 및 마스터 믹스로 증폭됨. 각 대립 유전자 특이적 프라이머는 마스터 믹스에서 보편적인 FRET 카세트와 상응하는 5 '말단에 독특한 꼬리 서열을 포함하여 하나는 FAM 염료로 표지하고 다른 하나는 HEX 염료로 표지하여 각각의 형광 발광 농도로 SNP 대립유전자를 탐색함. 그림 2-3과 같이 각각의 대립유전자의 판별이 FAM, HEX, Hetero로 확연히 구분할 수 있었으며, 이를 활용한 쉽고 빠르며 정확한 Rubus 종의 품종 판별이 가능하였음.

Table 6-9. Sequences for the new validated KASP assays, which were obtained from LGC Genomics

ID	Primer	Sequence	SNP allele
354992	Primer_AlleleFAM	AAGGGCTACGAGCAGTGCATCA	A
	Primer_AlleleHEX	AAGGGCTACGAGCAGTGCATCT	T
	Primer_Common	CCAGATTCATTGCATCATAGGCCTT	
366042	Primer_AlleleFAM	GAAGGCTACTCTTCTTGCTGATGTTA	T
	Primer_AlleleHEX	AAGGCTACTCTTCTTGCTGATGTTG	C
	Primer_Common	CCATGACAATTGCCCAAGAGCAA	
426936	Primer_AlleleFAM	CATCAACAGATTTCTTGTACTCTGGC	C
	Primer_AlleleHEX	CATCAACAGATTTCTTGTACTCTGGT	T
	Primer_Common	GAACCAACCAGGGTACTTATGAGCTT	
427156	Primer_AlleleFAM	CTGCCACTGTGCTTCTT	A
	Primer_AlleleHEX	GCTCTGCCACTGTGCTTCTC	G
	Primer_Common	CAGCGTGGACTAGCTCTGCCAT	
442304	Primer_AlleleFAM	GCACTATTTAACGCCTCAAAGCAC	C
	Primer_AlleleHEX	GCACTATTTAACGCCTCAAAGCAT	T
	Primer_Common	CACTGTATTCCTTGAGACCTCTGTTTTA	
536540	Primer_AlleleFAM	CCTCACCATCTCCCACCGG	G
	Primer_AlleleHEX	CCTCACCATCTCCCACCGC	C
	Primer_Common	GCTTGAGGAGAAGGACTTGAGAT	

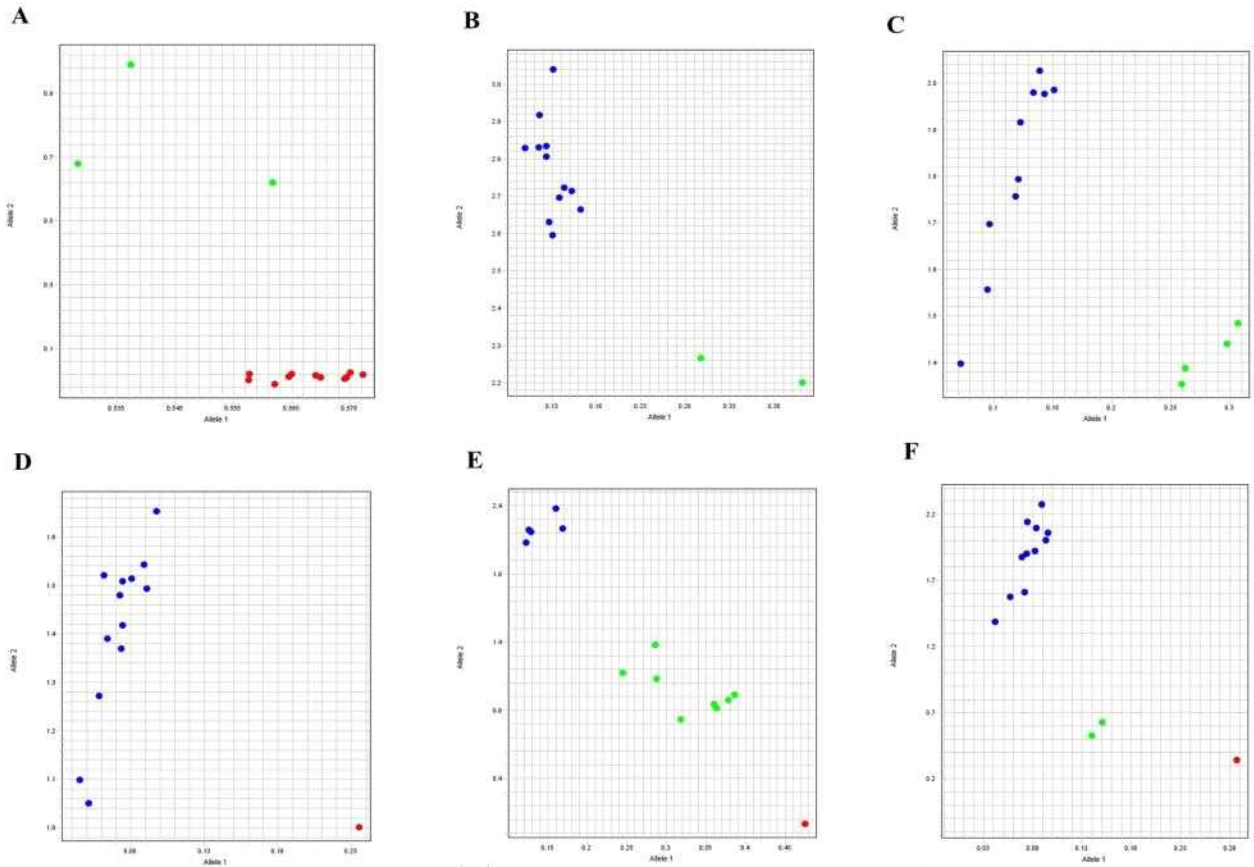


Figure 6-10. Genotyping results for the *Rubus* mutant lines after using the KASP assay technique. The scatter plots with axes x and y represent allele discrimination of the genotypes. The red and blue dots represent the homozygous alleles and the green dots represent the heterozygous alleles. A: 354992, B: 366042 C: 426936, D: 427156, E: 442304, and F: 536540.

(3) 3차년도 연구내용 및 결과

(가) 석곡 돌연변이 집단 및 유전자원 확보

① 석곡 돌연변이 유전자원 수집

- 바보난농원에서 도입 및 돌연변이 육성한 7점의 유전자원 분양 및 한국원자력연구원에서 보유한 석곡 유전자원 11점을 분양 완료하였음. 철포석곡은 조직배양을 통한 돌연변이 계통 선발로 꽃색 및 잎색에서 돌연변이를 보임. 환초석곡 돌연변이는 환초석곡에 감마선 50Gy 조사에 의해 엽선에 줄이 간 특징을 보이며, 우주석곡은 진도석곡에 우주선을 조사하여 잎모양 돌연변이 특징을 보임.

Table 6-10. Origin of *Dendrobium* genotypes used in this study.

No.	Cultivar or line names	Section	Origin	Treatment	Mutated Characteristics
1	Cheolpi1	<i>D. candidum</i>	China (Breeding line)	Somaclonal variation	Green-purple leaf and stem
2	Cheolpi2	<i>D. candidum</i>	China (Breeding line)	Somaclonal variation	-

3	Cheolpi3	<i>D. candidum</i>	China	(Breeding line)	Somaclonal variation		Green flower
4	Hwancho1	<i>D. loddigesii</i>	China	(Breeding line)	-		-
5	Hwancho mutant	<i>D. loddigesii</i>	Hwancho1	(Breeding line)	Gamma-ray Gy	50	Leaf edge lined
6	Jindo	<i>D. moniliforme</i>	Korea	(Breeding line)	Somaclonal variation		Dwarf
7	Uju	<i>D. moniliforme</i>	Jindo	(Breeding line)	Aerospace mutagenesis		Dwarf, Leaf edge
8	Keumseong	<i>D. moniliforme</i>	Korea	(Cultivar)	-		
9	Keumseokgok	<i>D. speciosum</i>	Korea	(Cultivar)	-		
10	Keumchae	<i>D. nobile</i>	Korea	(Cultivar)	-		
11	Royeol	<i>D.hybrid</i>	Korea	(Cultivar)	-		
12	Baekun	<i>D.hybrid</i>	Korea	(Cultivar)	-		
13	Sakurahime	<i>D. hybrid</i>	Japan	(Cultivar)	-		
14	Seolhwa	<i>D. hybrid</i>	Korea	(Cultivar)	Sakurahime x Chonsim, gamma-ray 30 Gy		Leaf edge lined
15	Sodudo	<i>D.hybrid</i>	Korea	(Cultivar)	-		
16	Cheonsim	<i>D. moniliforme</i>	China	(Cultivar)	-		
17	Hwangyong	<i>D. hybrid</i>	Korea	(Cultivar)	-		
18	Huimangbong	<i>D.hybrid</i>	Korea	(Cultivar)	-		



Figure 6-11. Leaf profile of *Dendrobium* mutant lines used in this study. A: Cheolpil, B: Cheolpi2, C: Cheolpi3, D: Hwancho1, E: Hwancho mutant, F: Jindo, G: Uju

(나) 석곡 돌연변이 집단 및 유전자원이용 SNP마커 개발

① 석곡 돌연변이 유전자원 GBS 분석

- 석곡 유전자원의 품종구분 마커 개발을 위하여 18점의 유전자원에 대하여 DNA 추출을 완료하였으며, GBS 분석을 위해 DNA에 ApeK1(GCWGC) 제한효소를 처리한 후 GBS library 제작하였으며 Illumina Hiseq 2000 플랫폼으로 short reads를 생산하여 quality trimming 후 cleaned reads를 BWA 프로그램으로 *Dendrobium officinale* (Yan et al., 2015)의 게놈을 reference로 이용하여 mapping을 수행하여 샘플간의 SNP와 Indel을 탐색하였음.
- 총 7.3Gb의 염기서열을 sequencing하였으며 평균적으로 각 유전자형 당 406.0 Mb 염기서열이 sequencing되었음. 낮은 품질의 염기서열을 제거한 후 67,669,394 개의 깨끗한 reads를 얻었으며, 전체 염기서열의 길이는 134 ~ 756 Mbp로 평균 305 Mbp이었음. *D. officinale* (버전 2)의 새롭게 조립된 게놈서열(1.4 Gb)을 reference로 모든 유전자형에서 38,168,915 개가 mapped되었으며 샘플 당 평균 2,120,495개의 reads이었음. 평균적으로 필터링 된 reads의 57.6 %가 reference 게놈에 mapping되었으며, 매핑 된 영역의 전체 길이는 124.5 Mb였고 샘플 당 평균 6.9 Mb였으며 reference 게놈의 약 0.48 %를 차지하였음.

Table 6-11. Summary of GBS sequence data and alignment to the reference genome sequence.

	Total	Average/Plant
Raw data		
Reads	72,369,930	4,020,552
Bases (bp)	7,309,362,930	406,075,718
After trimming		
Reads	67,669,394	3,759,411
Bases (bp)	5,496,353,577	305,352,977
Mapped reads on reference genome		
Reads	38,168,915	2,120,495
Bases (bp)	124,456,408	6,914,245
Reference genome coverage (%)		0.48

Reference genome sequence: Yan et al. (2015)

② 석곡 돌연변이 유전자원 SNP 탐색

- 18개의 유전자원에서 SNP를 확인하기 위해 각 유전자원에 대한 공통 SNP를 표본 간의 통합된 SNP 매트릭스 위치에서 먼저 선택하여 총 517,660개의 SNP를 탐색하였음. 그중에서 443,305개는 대부분 동형 집합체 SNP였고 74,355개의 이형 집합 SNP가 있었음. 실화에서 가장 높은 43,478 SNP가 존재하였으며 환초석곡1에서는 가장 적은 9,611 SNP가 탐색되어 개체당 평균 28,758 SNP를 보였음. 동형집합체 SNP는 유전자원 당 평균 24,628 SNP로 9,514에서 37,015의 범위였으며, 이형집합 SNP는 97에서 11,572로 유전자원 당 평균 4,131개의 SNP를 보였음. 총 161,471 개의 union SNP 중, 55,176개의 union SNP가 유전자 사이의 영역에 위치하고, 90,785개의 union 유전자와 SNP가 유전 영역에서 검출되었음. genic 지역의 union loci SNP 중 59,588개가 15,449개의 유전자를 포함하는 CDS 변형으로 나타났음.

Table 6-12. Summary of single nucleotide polymorphisms (SNPs) induced in *Dendrobium* genotypes

Sample No.	SNPs	Homoz	Heterozy	Classified loci	Intergenic	Genic	CDS	Intron	Genes
		ygous SNPs	gous SNPs						
Cheolpi1	28,747	17,262	11,485	25,794	10,380	15,414	9,716	5,713	7,139
Cheolpi2	27,102	15,530	11,572	24,126	9,794	14,332	9,312	5,036	6,512
Cheolpi3	26,376	16,152	10,224	23,419	9,746	13,673	9,071	4,618	6,377
Hwancho1	9,611	9,514	97	9,252	1,189	8,063	6,909	1,161	2,829
Hwancho mutant	14,303	13,999	304	13,789	1,761	12,028	10,205	1,830	3,894
Jindo	25,878	23,864	2,014	23,826	8,070	15,756	10,625	5,142	6,426
Uju	38,535	37,015	1,520	35,350	12,275	23,075	15,367	7,725	7,983
Keumseong	41,709	35,288	6,421	38,473	13,287	25,186	16,663	8,543	8,439
Keumseokgok	27,695	26,071	1,624	25,532	8,514	17,018	11,466	5,562	6,563
Keumchae	31,843	29,430	2,413	29,413	9,313	20,100	13,867	6,244	7,363
Royeol	26,637	25,225	1,412	24,506	8,235	16,271	11,003	5,285	6,446
Baekun	28,150	26,519	1,631	25,853	8,635	17,218	11,530	5,699	6,732
Sakurahime	24,466	20,853	3,613	22,448	7,542	14,906	10,251	4,665	6,144
Seolhwa	43,478	36,982	6,496	39,668	14,589	25,079	16,612	8,490	8,486
Sodudo	25,021	23,720	1,301	23,148	7,328	15,820	11,091	4,746	6,301
Cheonsim	30,420	26,108	4,312	28,146	9,280	18,866	12,862	6,014	7,129

Hwangyong	38,872	34,432	4,440	35,841	12,294	23,547	15,649	7,926	8,243
Huimangbong	28,817	25,341	3,476	26,691	8,753	17,938	12,200	5,751	6,857
Total	517,660	443,305	74,355	475,275	160,985	314,290	214,399	100,150	119,863
Unionloci	161,471	-	-	145,961	55,176	90,785	59,588	31,279	15,449

- 검출된 union loci SNP는 뉴클레오타이드 치환에 근거한 transition (A↔G와 C↔T)와 transversion (A↔C, A↔T, C↔G, G↔T)의 두 그룹으로 나누어짐. 161,471개의 union SNP 중 92,307개(57%)는 transition이었으며, 69,164개(43%)는 transversion형이었음. A → G는 21,585 (13.4 %), C → T는 24,645 (15.3 %), G → A는 24,444 (15.1 %), 그리고 T → C는 21,633 (13.4 %)이었음. Transversion에서 C↔G 변이가 11,979건(7.4%)으로 가장 빈도가 낮았음.

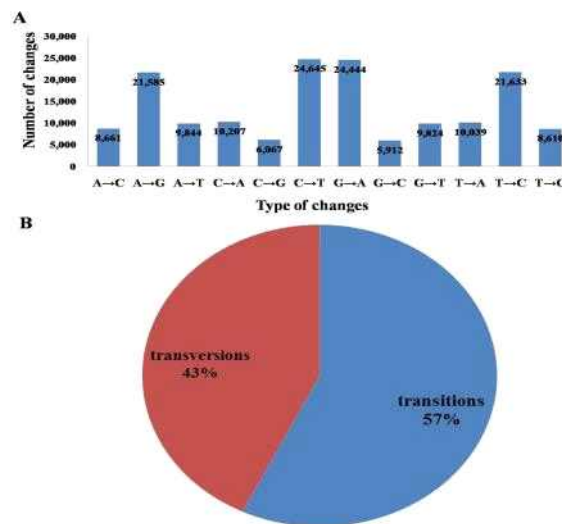


Figure 6-12. Number of nucleotide substitutions (A) and observed percentage transition and transversion (B) in *Dendrobium* genotypes.

- 다형성을 보이는 SNP마커에 존재하는 유전자의 기능을 GO 기능분석으로 추론하였으며, 총 13,561개의 고유 유전자가 분류되었음. 생물학적 과정(BP), 세포 성분(CC), 분자 기능(MF)의 3 가지 주요 범주로 분류된 다형성 SNP를 이용하여 유전자 ontology의 기능적 분류(GO) 분석을 수행 하였을 때, 가장 큰 그룹인 BP는 cellular aromatic compound metabolic (27.6%), nucleobase-containing compound metabolic process (24.6%), protein metabolic process (22.9%), protein transport (18.0%) 순이었음. Intracellular membrane-bounded organelle (65.5%), cytoplasm (51.8%) 및 integral component of membrane (12.7%)은 모든 다형성 SNP에서 가장 많은 분포를 보였음. MF에는 nucleic acid binding (15.3%), cation binding (13.9%), nucleotide binding (13.5%)이 포함되었음.

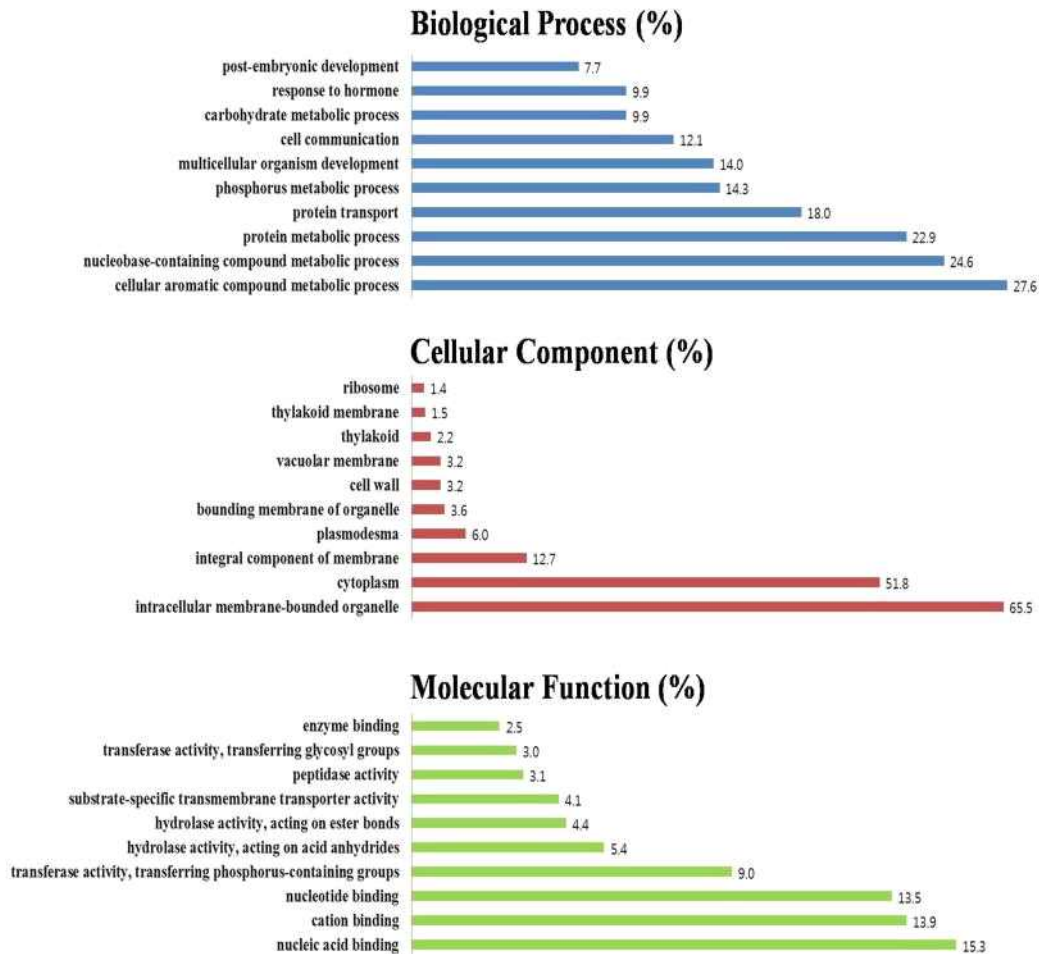


Figure 6-13. Histogram of GO terms of union SNPs in *Dendrobium* genotypes.

- *Dendrobium* genotypes 사이의 maximum composite likelihood method 방법을 기반으로 클러스터 분석을 수행하였고 유전 관계에 대한 Neighbor-joining 방법을 사용하여 37,721 개의 SNP로 dendrogram을 생성하였음. 클러스터 분석에 따르면 *Dendrobium* 유전자원은 7개의 연관그룹과 3개의 독립적인 그룹으로 나눌 수 있었음. 제 1군은 *D. loddigesii* 원래 유전자형(환초석곡1)과 *D. loddigesii* 돌연변이체(환초석곡 돌연변이)로 구성되었음. 그룹 II는 3개의 *D. candidum* 돌연변이 계통(철피석곡 1, 2, 및 3); III 군은 *D. moniliforme* 품종(금성과 천식)을 포함하였음. 그룹 IV는 두 종류의 품종(황용과 희망봉)으로 구성되었음. Group V는 *D. speciosum* (금석곡)과 *D. Hybrid* (소두도)로 구성되어 있음. 그룹 VI는 로열과 백운으로 구성되어 있음. 제 7 그룹은 *D. moniliforme* 육종 라인 (진도와 우주)으로 구성되었음. *D. Hybrid* 원종 (사쿠라 히메), *D. Hybrid* 품종 (설화), 금채 재배 품종 (*D. nobile*)은 어느 집단에도 속하지 않았음.

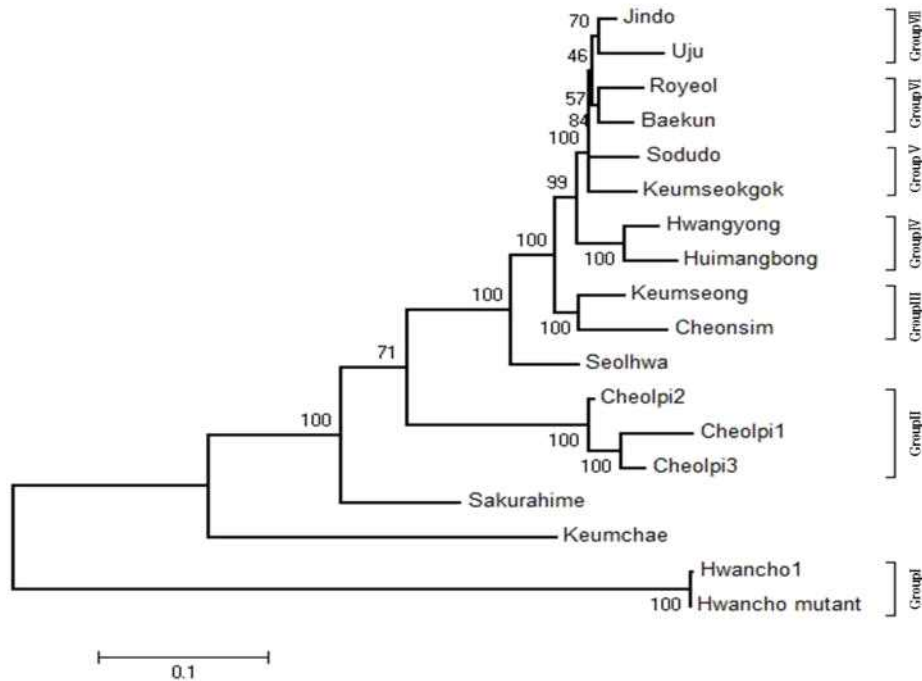


Figure 6-14. Neighbor-joining dendrograms based on pairwise distance matrix representing the grouping of the 18 *Dendrobium* genotypes obtained from 37,721 SNPs from GBS.

(다) 석곡 돌연변이 집단 및 유전자원 판별 SNP genotyping system 개발

① 석곡 돌연변이 유전자원 판별 KASP genotyping assay 개발

- 10개의 SNP마커를 이용하여 *Dendrobium* 유전자형 판별을 시도하였으며, scaffold22와 scaffold5616 마커 세트는 *D. candidum* 라인을 구분하는데 효과적이었음. 또한, scaffold79와 scaffold6896 마커 세트는 *D. loddigesii*를 구분하는데 사용되었고, scaffold 102와 scaffold 6919 마커 세트는 *D. nobile* 품종(금채)을 구분하는데 사용되었음. scaffold218 marker set은 환초석곡1(*D. loddigesii*) 계통에서만 다른 대립유전자가 확인되었음. 이들 10개의 SNP마커를 KASP genotyping assay로 전환하기 위하여 allele-specific forward primer와 common reverse primer를 제작하였음. Real-time PCR를 이용하여 18점의 *Dendrobium* 유전자원의 SNP genotyping를 확인한 결과, 각 대립유전자간에 분명하게 분리되어 있었고 각 그룹의 점들이 서로 가깝게 모여 있어 효과적으로 품종의 구별이 확인되었음.

Table 6-13. New validated KASP markers for *Dendrobium* genotypes.

ID	Reference allele	Expected alleles																	
		1 [†]	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
scaffold1*	T	K [‡]	K	K	n	n	G	G	G	G	T	G	G	T	K	G	G	G	G
scaffold22	A	R	R	R	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
scaffold79	C	C	C	C	T	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
scaffold102	G	G	G	G	G	G	G	G	R	G	A	G	G	G	G	G	R	G	G
scaffold218	C	C	C	C	T	Y	C	C	C	C	C	C	Y	C	C	C	C	C	C

scaffold1003	A	W	W	W	A	A	T	T	W	T	A	T	T	A	W	T	T	W	W
scaffold1789	C	Y	Y	Y	C	C	T	T	T	T	C	T	T	Y	Y	T	Y	T	T
scaffold5616	A	R	R	R	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
scaffold6896	C	C	C	C	T	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
scaffold6919	G	G	G	G	G	G	G	G	R	G	A	G	G	G	G	G	R	G	G

*Primer sequence listed in Table S2, † Line numbers listed in Table 3-1, ‡ K: G or T, Y: C or T, R: A or G, W: A or T

Table 6-14. Sequences for the new validated KASP assays, which were obtained from LGC Genomics

ID	Primer	Sequence	SNP allele
scaffold1	Primer_AlleleFAM	TTCTTCTATTATTTTTGGAGTTGCTGCA	T
	Primer_AlleleHEX	CTTCTATTATTTTTGGAGTTGCTGCC	G
	Primer_Common	TCTTTTGGGCTGTTCAAGCTTCATTCTAT	
scaffold22	Primer_AlleleFAM	CGACAAGTTTGGGGAGGAAGGT	A
	Primer_AlleleHEX	GACAAGTTTGGGGAGGAAGGC	G
	Primer_Common	GTTCTCCGCTCACCCCTGATT	
scaffold79	Primer_AlleleFAM	ATGTTGTTTCATTTTCTCCAGAGGAAAG	C
	Primer_AlleleHEX	TATGTTGTTTCATTTTCTCCAGAGGAAAA	T
	Primer_Common	CCTCGTCACTTGTTAGAAATGCTTCTTT	
scaffold102	Primer_AlleleFAM	AACCAGTCTTGTTTAATGATACCATCC	G
	Primer_AlleleHEX	GAACCAGTCTTGTTTAATGATACCATCT	A
	Primer_Common	CATCTTGATTACCATAAGCAATGTTGGCAT	
scaffold218	Primer_AlleleFAM	CCACAAAGTAAACCTGCAAGAAGAG	C
	Primer_AlleleHEX	AACCACAAAGTAAACCTGCAAGAAGAA	T
	Primer_Common	TTATGTGAATGATTGGAATGGGAGGCAAT	
scaffold1003	Primer_AlleleFAM	CTTCATCATCTTCATATTTAAGAGAATGA	A
	Primer_AlleleHEX	CTCTTCATCATCTTCATATTTAAGAGAATGT	T
	Primer_Common	CATTCTCCAGGATCGTAAGGAGCTT	
scaffold1789	Primer_AlleleFAM	CGTCTGATCAACAGGAACACC	C
	Primer_AlleleHEX	ACTCGTCTGATCAACAGGAACACT	T
	Primer_Common	AGAAGACTTGGCTTTTCTTGGTAGGAAT	
scaffold5616	Primer_AlleleFAM	CAATTCCATGATCAAGACTGGCCTT	A
	Primer_AlleleHEX	AATTCCATGATCAAGACTGGCCTC	G
	Primer_Common	CAGTAAGCAGCGAAGTATAAGTGTTCAAA	
scaffold6896	Primer_AlleleFAM	CAACAACCGTGACAGAGTTTGTG	C
	Primer_AlleleHEX	GCAACAACCGTGACAGAGTTTGTGTA	T
	Primer_Common	ACTGCACCGGGAGGGAATTAACAAT	
scaffold6919	Primer_AlleleFAM	CTTCCATTTTCATCAAACAGCCGC	G
	Primer_AlleleHEX	CTCTTCCATTTTCATCAAACAGCCGT	A
	Primer_Common	GCAGTTCATGGCAGGTCAGAGGAA	

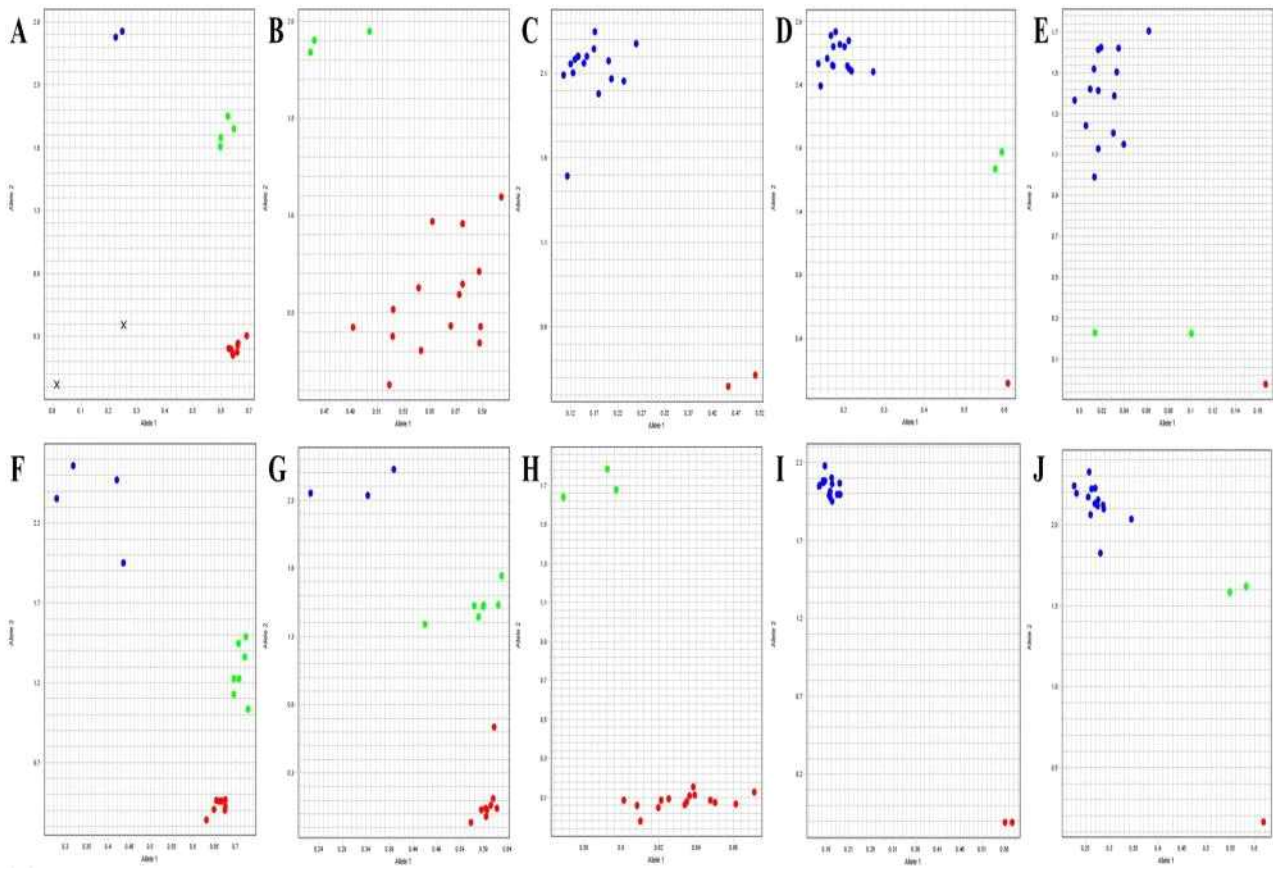


Figure 6-15. Genotyping results of *Dendrobium* mutant lines by KASP assay. The scatter plot with axes x and y represents allele discrimination of genotypes. The red and blue dots represent the homozygous alleles. The green dots represent the heterozygous alleles. A: scaffold1, B: scaffold22 C: scaffold79, D: scaffold102, E: scaffold218, F: scaffold1003, G: scaffold1789, H: scaffold5616. I: scaffold6896, J: scaffold6919.

제2절. 연구개발 성과

1. 국내외 논문게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	코드번호		C-06-01		등록번호
					국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	
1	Construction of Mutation Populations by Gamma-ray and Carbon Beam Irradiation in Chili Pepper (<i>Capsicum annuum</i> L.)	Horticulture, Environment, and Biotechnology	조영득/ 강시용	57	대한민국	한국원예학회	SCI	2017.12.31.	
2	Optimization of TILLING system based on capillary electrophoresis for targeted selection of pepper gene mutants	Horticulture, Environment, and Biotechnology	강한솔/ 강시용	59	대한민국	한국원예학회	SCI	2018.6.31.	
3	Molecular Identification of <i>Zoysia japonica</i> and <i>Zoysia sinica</i> (<i>Zoysia</i> Species) Based on ITS Sequences Analyses and CAPS	원예과학기술지	양대화/ 이효연	35권3호	원예과학기술지	한국원예학회	SCI	2017.6.3	
4	IN VITRO PROPAGATION OF CYMBIDIUM HYBRID	Propagation of Ornamental Plants	김두환/ 강경원	2	불가리아	Sejani Publisher	SCI	2017.7	
5	In vitro propagation of <i>Cymbidium goeringii</i> Reichenbach fil. through direct adventitious shoot regeneration	Physiology and Molecular Biology of Plants	박한용/ 강경원	2	미국	Springer India	SCI	2018.3	
6	Effects of proton beam irradiation on seed germination and growth of soybean (<i>Glycine max</i> L. Merr.)	Journal of the Korean Physical Society	임주현/ 하보근	71	한국	The Korean Physical Society	SCI	2017.12.1.	
7	Genotyping-by-sequencing based single nucleotide polymorphisms enabled Kompetitive Allele Specific PCR marker development in mutant <i>Rubus</i> genotypes	Electronic Journal of Biotechnology	류재혁/ 하보근	35	칠레	Universidad Católica de Valparaíso	SCI	2018.9.5.	
8	Molecular characterization of proton beam-induced mutations in soybean using genotyping-by-sequencing	Molecular Genetics and Genomics	김운지/ 하보근	293	독일	Springer	SCI	2018.10.1.	
9	Identification of gamma ray irradiation induced mutations in membrane transport genes in rice population.	Genes & Genet. Syst.	황정은/ 강시용	12(3)	일본	The Genetics Society of Japan	SCI	2016.9.1	
10	Comparison of phytochemicals and antioxidant activity in blackberry (<i>Rubus fruticosus</i> L.) fruits of mutant lines at the different harvest time.	Plant Breeding and Biotechnology	류재혁/ 강시용	4(2)	대한민국	한국육종학회	비SCI	2016.5.31.	
11	Fruit Quality and Chemical Contents of Hybrid Boysenberry (<i>Rubus ursinus</i>) Lines Developed by Hybridization and Gamma Irradiation	Plant Breeding and Biotechnology	류재혁/ 강시용	5(3)	대한민국	한국육종학회	비SCI	2017.9.1.	
12	Rapid metabolic discrimination between <i>Zoysia japonica</i> and <i>Zoysia sinica</i> based on multivariate analysis of FT-IR spectroscopy	한국식물생명공학회지 (Journal of Plant Biotechnology)	양대화/ 이효연	43(2)	대한민국	한국식물생명공학회	비SCI	2016.6.30.	
13	Dwarf <i>Zoysiagrass</i> (<i>Zoysia japonica</i>) Cultivar "Halla Green 1" Developed Through Mutation Breeding	한국육종학회지	양대화/ 이효연	48(4)	한국육종학회지	한국육종학회	비SCI	2016.12.3.	
14	Development of Dwarf Type Cultivar 'HallaGreen2' in <i>Zoysia japonica</i> Steud.	한국육종학회지	송인자/ 이효연	49(1)	한국육종학회지	한국육종학회	비SCI	2017.3.30	

15	비핵심집단의 마그네슘 함량 관련 통합 전장유전체 분석	한국육종학회지	허은범/ 조유현	3	대한민국	한국육종학회	비SCI	2017.9.01	
16	가시없는 블랙베리의 근맥아를 이용한 다경유도와 절간배양을 통한 식물체 증식 조건의 확립	한국식물생명공학회지(Journal of Plant Biotechnology)	이강섭	45(2)	대한민국	식물생명공학회	비SCI	2018.06.30.	
17	Biochemical Responses of Soybean (Glycine max L. Merr.) to Proton Beam Irradiation	Plant Breeding and Biotechnology	임주현/ 하보근	5	한국	한국육종학회	비SCI	2017.06.01	
18	Study of transferability of Rubus microsaterllite markers to hybrid boysenberry	Plant breeding and biotechnology	류재혁/ 하보근	5	한국	한국육종학회	비SCI	2017.12.01	

2. 국내 및 국제학술회의 발표

			코드번호	C-06-02	
No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2016년도 (사)한국방사선산업학회 학술발표대회	강한술 외	2016.10.6.	제주대학교	대한민국
2	한국자원식물학회 춘계학술대회	류재혁 외	2016.4.28.	제주 상호원	대한민국
3	한국원예학회 춘계학술발표회	조영득 외	2016.5.26.	창원 컨벤션센터	대한민국
4	2017 한국원예학회 정기총회 및 제106차 춘계학술발표회	강한술 외	2017.5.25.	대전 컨벤션센터	대한민국
5	한국식물생명공학회 학술발표대회	강시용 외	2017.6.8.	대전호텔인터시티	대한민국
6	한국원예학회 춘계학술발표회	조영득 외	2018.5.23.	대전 컨벤션센터	대한민국
7	PAG Asia 2018	조영득 외	2018.5.31.	서울 콘래드호텔	대한민국
8	2015 International Symposium on Plant Sciences & the Annual Conference of the Korean Society of Plant Biologists	양대화 외	2015.11.5.	충남대학교	대한민국
9	한국방사선산업학회 정기학술발표대회	양대화 외	2016.10.05. - 2016.10.07.	제주도 제주대학교	대한민국
10	한국자원식물학회 춘계 학술대회	양대화 외	2017.4.21. - 2017.4.22.	인천 국립생물자원관	대한민국
11	한국자원식물학회 춘계 학술대회	양대화외	2017.4.21. - 2017.4.22.	인천 국립생물자원관	대한민국
12	2016 한국육종학회-차세대BG21사업단-GSP사업단 공동심포지엄	이원도의	2016.6.29	청주 라마다플라자호텔	대한민국
13	2017 한국육종학회-차세대BG21사업단-GSP사업단 공동심포지엄	이원도의	2017.7.6.	대구시 엑스코	대한민국
14	방사선을 이용한 소형 심비디움 속빛무늬 잎 돌연변이 품종 육성	강경원의	2017.7.5	대구 엑스코	대한민국
15	Direct adventitious shoot regeneration from rhizome explants of Cymbidium goeringii Reichenbach fil.	강경원 외	2018.3.7	그랜드엠버서더호텔	대한민국
16	한국원예학회 정기총회 및 제 104차 춘계학술발표회	조란 외 4명	2016.5.25	창원컨벤션센터(CECO)	대한민국
17	한국원예학회 정기총회 및 제 104차 춘계학술발표회	김효진 외 4명	2016.5.25	창원컨벤션센터(CECO)	대한민국
18	한국식물생명공학회 정기학술발표대회	김효진 외	2017.6.8.	대전 호텔인터시티	대한민국
19	한국식물생명공학회 정기학술발표대회	이강섭외 6명	2018.5.31.	여주엑스포 컨벤션센터 (전남 여주시)	대한민국
20	한국식물생명공학회 정기학술발표대회	이강섭외 6명	2018.5.31.	여주엑스포 컨벤션센터 (전남 여주시)	대한민국
21	2016년 한국육종학회 심포지엄	김운지 외 6명	2016.6.30	청주 라마다플라자호텔	대한민국
22	2017년 한국육종학회 심포지엄	임주현 외 7명	2017.7.5.	대구 엑스코	대한민국
23	제3회 국제난심포지엄	임주현 외 7명	2018.3.7.	서울 그랜드엠버서더호텔	대한민국
24	2018년 한국육종학회 심포지엄	류재혁 외 6명	2018.7.12.	제주 라마다플라자호텔	대한민국
25	2018년 한국육종학회 심포지엄	류재혁 외 7명	2018.7.12.	제주 라마다플라자호텔	대한민국

3. 생명자원(생물자원)/화학물

		코드번호		C-06-03
No	생명자원(생물자원)/화학물명	등록/기탁번호	등록/기탁기관	발생년도

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

			코드번호		C-06-04				
No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	(특허) “카프시쿰 아늑 미토콘드리아 DNA 유형 분류용 마커, 프라이머 세트 및 이를 이용한 분류방법”	대한민국	한국원자력연구원	2018.8.7.	10-2018-0092111				100%
2	잔디 품종보호권 “한라그린8”	대한민국	제주대학교 산학협력단장 (양대화 외 9인)	2017.7.10.	2017-21				100%
3	잔디 품종보호권 “한라그린9”	대한민국	제주대학교 산학협력단장 (양대화 외 9인)	2017.7.10.	2017-22				100%
4	벼 품종보호권 “골든퀸2호”	대한민국	조유현 (시드피아)	2016.3.29	출원2016-242	국립종자원장	2018.6.25 (결정일)	7304	70%
5	품종보호권 벼 “스위트드림1세”	대한민국	조유현 (시드피아)	2017.5.22.	출원-2017 -302				100%
6	(특허) “벼 신제품 천수향 큰눈찰 1세의 육종방법 및 벼 신제품 천수향 큰눈찰 1세”	대한민국	조유현 (시드피아)	2017.6.7.	10-2017-0070940				100%
7	난 품종보호권 “로얄스타”	대한민국	강경원 (바보난농원)	2016.6.16.	2016-317				100%
8	난 품종보호권 “수양”	대한민국	강경원 (바보난농원)	2017.5.30.	2017-308				100%
9	난 품종보호권 “춘보”	대한민국	강경원 (바보난농원)	2018.7.19.	2018-377				100%
10	(특허) “교잡블랙베리의 근맹아 절편체로부터 다경유도를 통한 식물체의 대량증식”	대한민국	(주)바이오플러스	2018.7.27.	10-2018-0086998				50%
11	블랙베리 품종보호권 “흑정”	대한민국	(주)바이오플러스	2015.12.28	2015-750	국립종자원장	2018.8.3	7331	30%

5. 전문연구 인력양성

			코드번호		C-06-06			현황						
No	분류	기준년도	학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1		2015~2018	0	1	0	2	1	2	2	0	0	1	0	

6. 산업기술 인력양성

				코드번호		C-06-07	
No	프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원	

7. 기술거래(이전) 등 (자체실시 등 기술)

				코드번호		C-06-08	
No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황	
1	직접(노하우)	블랙베리신품종의 열매를 포함하여 배합비율에 따라 건강식품을 개발하는 노하우	(주)바이오플러스	2017.07.05	1,960,000		
2	직접(노하우)	블랙베리를 함유한 동식물을 원료로 하는 건강식품	(주)바이오플러스	2018.07.02.	-		
3	직접(품종)	골든퀸2호 품종보호권 자체 실시	(주)시드피아	2016.6.29			
4	직접(품종)	방사선 돌연변이 난 자체 실시	바보난농원	2017.7.3			

8. 사업화 투자실적

					코드번호		C-06-09	
No	추가 R&D 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자자금 성격			
			50,000,000원	50,000,000원	4) 투자유치			

9. 사업화 현황

(단위 : 명, 년)

										코드번호		C-06-10	
No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생년도	기술 수명			
							국내	국외					
1	자기실시	신품종 재배계약 체결	국내	골든퀸2호 재배계약	골든퀸2호 재배계약	연천농협	800,000,000원		2017				
2	자기실시	신품종 재배계약 체결	국내	골든퀸2호 재배계약	골든퀸2호 재배계약	월드그린	1,000,000,000원		2018				
3	제품화	신제품개발	국내	속빛무늬 품종	품종 개발 및 대량생산	바보난농원	3,000,000원		2017				
4	제품화	신제품개발	국내	난 신품종	품종 개발 및 대량생산	바보난농원	12,000,000원		2018				
5	제품화	신제품개발	국내	블랙베리함유 건강기능성 식품“트리플베리”	제품 개발, 생산 및 시장조사	바이오플러스			2017				
6	제품화	신제품개발	국내	건강식품(소과황제어보)	제품 개발, 생산 및 시장조사	바이오플러스			2018				
7	제품화	신제품개발	국내	건강식품(블랙베리, 곤충 추출물 함유)	제품 개발, 생산 및 시장조사	바이오플러스			2018				
8	수출	제품수출	스웨덴	석곡 및 심비디움 개발품종 수출	Sederea Japonica 외 4종 각 100주씩 총 500주	바보난농원	5,000,000원		2017.6.13.				
9	수출	제품수출	대만	석곡 및 심비디움 개발품종 수출	Cymbidium ssp, 200주 Dendrobium ssp, 100주	바보난농원	3,349,770원		2018.7.27				

10. 표준화

					코드번호	C-06-11	
No	수행기관명	표준화 주제	표준화 기구	표준화 단계	관련번호	제출(제택)일	국가

11. 기술요약정보

				코드번호	C-06-12
연도	기술명	요약내용	기술완성도	등록번호	

12. 보고서 원문

			코드번호	C-06-13
연도	보고서 구분	발간일	등록번호	

13. 기타

산학연 방사선조사 지원

연도	지원 기관	건수	내용
1차년도	충남대 박상인 교수 외	41건	감마선조사(무상) 및 자문
2차년도	우리중요 외	74건	감마선조사(무상) 및 자문
3차년도	풀꽃나라	61건	감마선조사(무상) 및 자문
총		176건	

정책 반영 (후속과제 기획 및 수행)

사업명 (지원부처)	과제명 (참여기관)	과제기간 (총연구비)	주요 연구내용
방사선기술개발사업(과기정통부)	고기능성 식물자원 및 양성자빔 육종 기술개발 (원자력연 주관, 고려대, 경희대, 전남대 참여)	2017.5~2021.12.31. (80억원)	-해외 신규도입 작물의 방사선육종 -방사선육종자원을 이용한 기능성 소재 개발 -양성자빔 육종기술 개발 및 신규 유전자원 개발 등

제3절. 연구성과의 파급효과

1. 기술적 성과

- 고추 돌연변이 육종을 위한 유전자원 pool 및 유전자 스크리닝 체계가 구축되었으므로 기능유전체학 연구 및 품종개발에 필요한 소재를 필요에 따라 지속적으로 공급할 수 있

는 기반이 마련되었음. 고추 방사선 돌연변이 육종에 있어서 유전체 정보를 활용한 변이체 선발에 적합한 집단 및 스크리닝 체계가 구축된 사례는 전 세계적으로 없으므로 이 분야에 있어서의 기술적 우위를 점할 수 있음.

- 녹기 연장 잔디 품종 육성 개발을 위해 확립한 방사선 돌연변이 육종기술, NGS 및 마커 개발기술은 잔디 뿐 아니라 고부가가치 타 경제작물에도 적용 가능하며 기후변화에 대응할 수 있는 기능성 작물 생산에 매우 효과적일 것으로 기대됨.
- 고품질 벼 품종 육성 과정 중 고세대 계통의 DNA resequencing을 실시하고 벼 배유 관련 유전자 haplotype을 분석하여 각 유전자 별 신규 allele target 마커 세트를 개발하였음. 품종 개발 기술에 있어서는 세계적 양식미로 평가 받고 있는 일본의 고시히까리 품종 수준의 밥맛을 능가하는 품종 개발 및 보급으로 외래 도입품종 대체를 가능하게 하였음.
- 돌연변이 난 품종 개발 과정을 통해 고선량 단일조사에 비해 저선량 재처리를 수행할 경우 돌연변이 개체의 출현율도 높고 유묘도 순화 과정 중 안정적으로 뿌리가 활착하여 건전한 식물체로 생육될 수 있음을 발견하였으므로 추후 영양번식 작물의 효율적 육종에 응용할 수 있음. 교배 육종 방법으로 난을 육종할 경우 8~10년이 소요되고 그에 따라 고비용이 발생하므로 육성 기간을 4~6년으로 줄일 수 있는 방사선 육종 기술은 막대한 시간과 비용을 절감하며 육종 효율은 높일 수 있어 난 육종 최적의 기술이라고 볼 수 있음.
- 보이젠베리 묘목 대량증식을 위해 근맹아 절편체로부터 다경유도 등의 기술을 개발하여 조직배양과 순화를 통한 대량생산체계를 확립하였으므로 개발 건강제품 대량생산을 통한 수익 창출의 기반을 마련하였음.
- GBS 및 KASP 유전자형 검정 체계를 활용한 신속·정확한 품종 판별 체계는 본 과제에서 연구된 보이젠베리 및 석곡 뿐만 아니라 다양한 작물에 보편적으로 적용되어 육종가의 품종보호권 강화 증진에 기여할 수 있음.

2. 경제적성과

- 고추 유전자원 pool 및 스크리닝 체계가 구축되었으므로 향후 종자회사의 필요에 따라 육종 소재를 공급할 수 있는 기반을 마련하였음. 특히 유월초의 다양한 화기 변이체는 고추 작형 변화를 위한 육종 소재로 활용될 가능성이 있으며 전 세계적으로 매우 큰 수요가 있는 하바네로에서 조숙 계통 및 옹성불임 계통을 선발하여 검정 중에 있으므로 이들이 품종 개발에 활용될 경우 큰 경제적 효과를 창출할 가능성이 있음.
- 녹기연장 및 해성 잔디 품종에 의한 기후변화의 대응과 예초 따른 노동력 절감효과가 예상됨. 특히 미국의 잔디 시장규모는 약 30조원에 이르며, 국내의 경우 약 1,000억 원에 이르므로 개발 품종을 이용하여 수요자의 기호에 맞는 잔디를 생산할 경우 경제적 파급효과가 클 것으로 예상됨.
- 연구개발 성과 품종인 ‘골든퀸2호’ 지역특화 브랜드화 추진으로 3차년도 연매출 10억 원을 달성하였으며 지자체와의 협력 사업을 추진하고 있는데 향후 이를 통해 재배면적을 확대하여 연간 20,000여톤 재배 시 매출액 400억 원 달성가능함.
- 동양계 심비디움 난초는 중국, 대만 등지에서 수입이 되어 국내 동양란 시장의 90% 이상을 점유하고 있어 종묘의 해외 의존도가 높고 막대한 외화가 유출되고 있는 실정이

므로 국내에서 돌연변이 기술을 이용하여 관상성 높은 엽예품 난 품종 개발을 개발하여 빠른 시간 안에 신품종을 농가에 보급하고 재배기술을 이전함. 새로운 신품종 개발을 통하여 난 종묘의 수입에 대처하고 국내 농가에 바이러스가 없으며 재배 관리가 용이하고 저온에 강하며 초세가 안정되어 단위 면적 당 집약적으로 재배가 가능한 영리 품종을 보급하고 소득증대에 기여하였음. 뿐만 아니라 돌연변이 난 신품종을 동양란 최대 수출국인 대만에 수출하고 검역이 까다로운 유럽국가인 스웨덴에 수출하여 한국 난 종묘의 수출 가능성을 개척하였음.

- 보이젠베리를 이용한 건강식품을 제품화하여 2018년 1억, 2019년 및 2020년 10억 썩의 매출을 예상하고 있음.
- GBS 및 KASP 유전자형 검정 체계를 적용하여 보이젠베리 및 석곡 품종 판별 시 품종 판별 시간에 있어서는 60%, 정확도에 있어서는 90%의 향상이 가능하여 이에 해당하는 경제적 수익 창출이 가능함. 또한 이들 작목에 대해 기능성 물질 분석이 이루어졌으므로 객관적 지표 제시를 통한 품종의 가치 향상이 가능함.
- 산·학·연을 대상으로 수행한 방사선 조사 지원을 통하여 육종가들의 신품종 개발 효율 증대를 기대할 수 있음. 특히 조사의 절반 이상을 차지하는 영양변식 작물 육종가들의 경우 교배육종을 통한 변이 창출이 어렵다는 작목의 특성 상 방사선 돌연변이 기법이 신규 특성 개발에 매우 큰 역할을 할 수 있음.

3. 사업화 성과 및 매출실적

시드피아 (2협동과제)

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	10억원	
			향후 3년간 매출	400억원	
		관련제품	개발후 현재까지	억원	
			향후 3년간 매출	억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.05% 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : 0.5% 국외 : %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			위

바보난농원 (3협동과제)

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.5억원	
			향후 3년간 매출	7억원	
		관련제품	개발후 현재까지	억원	
			향후 3년간 매출	억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.01% 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : 0.07% 국외 : %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			12위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			8위

□ 바이오플러스 (4협동과제)

○ 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2019 ~ 2021			
	소요예산(백만원)	12억원			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0.5억원	7억원	30억원	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0.01	0.07	0.3
국외				0.01	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0.5	7	30	
	수 출		2	5	

제3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제1절. 목표

1. 정성적 목표

1세부과제(한국원자력연구원)

- 고추 육종소재 발굴을 위한 돌연변이 집단 작성 및 유전분석 체계화를 통한 유용 유전자원 발굴
- 기능성 품종 상업화를 위한 협동과제(보이젠베리, 석곡) 기능성(항산화물질) 검정 지원
- 방사선 육종 산업 저변 확대를 위한 산·학·연 방사선조사 기술지원

1협동과제(제주대학교)

- 국내에서 자생하는 난지형 잔디(들잔디, 금잔디 등)를 대상으로 방사선 돌연변이 처리에 의해 환경스트레스 저항성 및 왜성 등의 고품질 신품종 잔디를 개발하고, 최종적으로 산업화 추진

2협동과제(시드피아)

- 종실 돌연변이체 선발 및 유용형질 분석 평가를 통한 중간모본용 계통 육성
- 기존 선발된 신행질 계통 중 최종 선발 유망계통의 품종 출원 등록
- 농가실증 시험을 수행하는 한편 품종의 지식재산권 확보를 위한 DNA profiling
- 생산 가공 판매 시스템 구축을 통한 신품종 종자 산업화

3협동과제(바보난농원)

- 관상용 잎변이 및 기능성 석곡 난 품종개발
- 돌연변이 난 신품종 및 유망 계통의 수출 상품화

4협동과제(바이오플러스)

- 보이젠베리 품종화 및 대량생산체계 확립
- 블랙베리 돌연변이 품종 수출 상품화

5협동과제(전남대학교)

- 돌연변이 신품종 보이젠베리 특이 분자마커 개발
- 돌연변이 신품종 석곡 특이 분자마커 개발

2. 정량적 목표

성과목표	사업화지표								연구기반지표								
	지식 재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	출원	등록		제품화	수출액	매출창출	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보 전시	
										SCI	비 SCI						
최종목표	9	2		5		3	3			6	8	14		1	1	5	
1차년도	2										2	4				1	40
2차년도	3			2		1	1			3	2	5				2	50
3차년도	4	2		3		2	2			3	4	5		1	1	2	60
소 계	9	2		5		3	3			6	8	14		1	1	5	150

제2절. 목표 달성여부

1. 정성적 목표 달성 여부

□ 1세부과제(한국원자력연구원)

- 고추 육종소재 발굴을 위한 돌연변이 집단 작성 및 유전분석 체계화를 통한 유용 유전자원 발굴: 기존 목표(M₂ 총 5,000계통) 이상의 집단을 육성하였으며(유월초, 하바네로 총 6,075 계통) 표현형 분석을 수행하여 응성불임, 착과 형태 변이 등 육종 소재로 활용될 수 있는 유용 유전자원들을 발굴하였음. 또한 모세관 전기영동 기반 고효율 TILLING 체계를 구축하여 타겟 유전자 돌연변이체를 지속적으로 발굴할 수 있도록 하였으며 미토콘드리아 DNA 변이를 효율적으로 판별하기 위한 분자표지 체계를 확립하였음(달성도: 100%)
- 기능성 품종 상업화를 위한 협동과제(보이센베리, 석곡) 기능성(항산화물질) 검정 지원: 보이센베리(9 계통) 및 블랙베리(5 계통), 석곡(7 계통) 돌연변이 육종 유망계통에서 플라보노이드, 안토시아닌, 페놀릭 성분 등 항산화물질을 정량·정성분석하고 그 외에도 당도, 유기산, 무기물 함량 등을 분석하였음(달성도 100%)
- 방사선 육종 산업 저변 확대를 위한 산·학·연 방사선조사 기술지원: 총 목표 회수인 150건을 상회하여 176건을 달성하였음(달성도 117%)

□ 1협동과제(제주대학교)

- 국내에서 자생하는 난지형 잔디(들잔디, 금잔디 등)를 대상으로 방사선 돌연변이 처리에 의해 환경스트레스 저항성 및 왜성 등의 고품질 신품종 잔디를 개발하고, 최종적으로 산업화 추진: 왜성 및 녹기 연장 특성을 지녀 산업화가 유망한 2개 품종을 개발하여 국립 산림품종관리센터에 품종보호권을 출원하였으며, 들잔디와 깃잔디 교잡종을 동정하는 분자표지를 개발하고 NGS 분석을 통해 변이체 특이 분자표지를 다수 발굴하는 등 산업화 시의 활용 효율을 증진시

키기 위한 분자유전학적 분석을 완료하였음(달성도 100%)

□ 2협동과제(시드피아)

- 종실 돌연변이체 선발 및 유용형질 분석 평가를 통한 중간모본용 계통 육성: M₂ 2,146 계통을 대상으로 표현형을 조사하여 배유돌연변이체를 선발하고 M₃, M₄ 세대에서 지속적으로 선발하여 최종적으로 15계통을 확보하였음. 또한 세대 별 선발 변이계통 간 교배를 통해 F₁, F₂ 계통을 창성하였음(달성도 100%)
- 기존 선발된 신형질 계통 중 최종 선발 유망계통의 품종 출원 등록: 최종 선발 유망 품종 3개에 대해 품종보호권 또는 특허를 각각 출원하였음(달성도 100%)
- 농가실증 시험을 수행하는 한편 품종의 지식재산권 확보를 위한 DNA profiling: 경기도 연천(골든퀸2호 400톤), 경남 함양, 전남 신안군에서 농가재배를 실시하였으며, 주요 계통 20점에 대해 DNA profiling DB를 구축하였음(달성도 100%)
- 생산 가공 판매 시스템 구축을 통한 신품종 종자 산업화: 경기도 연천농협과의 재배 판매 시스템 구축, 2개 지자체에서의 지역특화 브랜드 제품화, 백화점 및 대형 마트 입점을 통해 산업화를 달성하고 수익을 창출하였음(달성도 100%)

□ 3협동과제(바보난농원)

- 관상용 잎면이 및 기능성 석곡 난 품종개발: 관상성이 높은 심비디움 1품종(춘보), 석곡 2품종(로열스타, 수양) 3품종을 개발하고 국립종자원에 품종 보호 출원함(달성도 100%)
- 돌연변이 난 신품종 및 유망 계통의 수출 상품화: 난 재배 농가 분양 및 자체 사업화를 수행하고 식물검역이 까다로운 스웨덴과 동양란 수출 중주국인 대만에 수출하였음(달성도 100%)

□ 4협동과제(바이오플러스)

- 보이젠베리 품종화 및 대량생산체계 확립: 내한성과 내병성이 강하고 생육이 좋은 계통 선발하여 과실검정 후 2계통 선발한 것에서 실증 포장하여 우수한 한 계통을 선정하였으며 과실의 성분분석을 통해 선발한 2계통을 집중적으로 대량증식·조직배양법으로 기내증식 하였음. 또한 조직배양과 순화를 통한 대량생산 체계를 확립하였음(달성도 100%)
- 블랙베리 돌연변이 품종 수출 상품화: 블랙베리 신품종 “흑정” 품종 등록, 중국내에서 묘목생산 및 조직배양시설 확보하여 순화 및 조직배양을 실행하였으며, 블랙베리와 곤충을 배합하여 건강식품 (비벌류)제품을 생산하였음(달성도 100%)

□ 5협동과제(전남대학교)

- 돌연변이 신품종 보이젠베리 특이 분자마커 개발: 보이젠베리 9계통과 블랙베리 5계통에 대해 GBS 분석을 실시하여 SNP 총 19,634개, InDel 총 389개를 확보하였고 union SNP matrix에서 1,504개 SNP를 선발한 후 계통분석을 하여 최종적으로 6개의 SNP 마커를 선발하였음. 이들에 대해 효율적 마커검정이 가능한 KASP genotyping assay로 전환하였음(달성도 100%)
- 돌연변이 신품종 석곡 특이 분자마커 개발: 석곡 유전자원 및 육성계통 18계통 대상 GBS 분석을 실시하여 총 517,660개의 SNP를 확보하였고 union SNP matrix에서 37,721개 SNP를 선발한 후 계통분석을 하여 최종적으로 10개의 SNP 마커를 선발하였음. 이들에 대해 효율적 마커검정이 가능한 KASP genotyping assay로 전환하였음(달성도 100%)

2. 정량적 목표 달성 여부

성과목표	사업화지표								연구기반지표								
	지식 재산권		기술이전	사업화				기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)	
	출원	등록		제품화	수출액	매출 창출	고용 창출		투자 유치	논문				학술 발표	정책 활용		홍보 전시
			SCI					비 SCI									
최종목표	9	2		5		3	3			6	8	14		1	1	5	150
1차년도	목표	2									2	4				1	40
	실적	2		1			2	1			2	7				7	41
2차년도	목표	3			2		1	1			3	2	5			2	50
	실적	5		2	2	1	1				3	3	10	1	1	4	74
3차년도	목표	4	2		3		2	2			3	4	5	1	1	2	60
	실적	3	2	1	3	1	2				6	4	8				61
소계	10	2	4	5	2	3	2	1		9	9	25		1	1	11	176
달성도 (%)	111	100	초과 성과	100	초과 성과	100	67	초과 성과		150	113	179		100	100	220	117

제3절. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

1. 정량적 성과 목표 달성

- 과제 기간내에 국립종자원에서 돌연변이품종의 재배심사 기간을 1년에서 2년으로 연장하여 v 품종등록에 어려움이 예상되었으나, 2018년 여름에 벼 신품종 “골든퀴2호”와 블랙베리 신품종 “흑정”의 품종보호권 등록이 확정되어 목표 달성하였음.
- 다른 품종보호권 출원 품종들은 2019년부터 품종 등록이 이루어질 예정임.

2. 본 연구중에 개발된 품종 및 돌연변이 자원들의 후속대책

- 본 연구를 통하여 개발된 신품종들은 지적재산권 확보 후에 기술이전 및 자체 실시로 산업화를 지속적으로 추진함.
- 또한 확보된 유용 돌연변이 유전자원 등은 후속 연구개발을 통하여 지속적인 품종개발 및 실용화를 추진할 계획임.

제4장. 연구결과의 활용 계획 등

제1절. 연구성과의 활용 분야 및 방안

- 고추 유월초 개화 및 착과 관련 변이체는 다른 작형의 고추 품종을 육성하기 위한 육종 소재로, 웅성불임 및 조기성숙 하바네로 변이체는 수출용 하바네로 상업육종을 위한 육종 소재로 활용될 가능성이 있음.
- 고추 대규모 돌연변이 집단 및 돌연변이 유전자 고효율 스크리닝 체계는 고추 기능유전체학을 위한 소재 선발에 유용하게 활용될 수 있음.
- 본 과제에서 최적화한 고효율 TILLING 체계는 고추 뿐 아니라 타작물의 돌연변이 집단에서 원하는 유전자 돌연변이체를 선발하는 데 활용할 수 있음.
- 본 과제 개발 잔디는 녹기연장 및 왜성의 특성을 가지고 있으므로 기후변화의 대응과 예초 따른 노동력 절감효과가 예상되어, 농가 및 영농조합에 기술이전하여 농가소득에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대됨.
- 본 과제 수행동안 확립한 방사선 돌연변이 육종기술, NGS 분석 결과 및 변이체 대량 분자마커는 타 잔디뿐만 아니라 고부가가치 타 경제작물에도 적용 가능할 것으로 기대됨.
- 연구성과로 개발된 대규모 벼 돌연변이 집단을 활용하여 중간모본 개발 연구 지속 수행 가능
- 벼 배유특성 판별 마커 개발로 형질 조기 이전 가능
- 연구결과로 발생한 벼 품종들에 대하여 가공적성 평가를 수행하여 가공식품 개발 추진
- 돌연변이 기술을 이용한 관상성이 높은 엽예품 개발은 대만, 중국, 일본 등에서 수입되는 난종묘의 수입 대체와 예술성이 높고 부가가치가 높은 난 묘를 개발하여 농가에 보급하고 재배 기술을 이전하여 농가소득 증대에 기여함
- 돌연변이 석곡난을 이용하여 기능성 화장품 및 식품 등에 개발 가능성이 보임
- 양재동 화훼 공판장에서 한국 춘란을 경매 제도를 통하여 공정하고 투명한 유통 질서를 확립하여 최근 한국 춘란의 인기가 크게 증가하였으며 고가품종의 낙찰율이 높고 애란인들이 증가하여 투자가 활발하게 이루어져 본 연구에서 개발된 난 신품종은 시장성이 밝음
- 새로운 유전자원으로서 보이젠베리, 블랙베리 우수 유망 품종의 안정적인 대량생산체계 확립으로 농가보급으로 베리류 산업의 다양화와 농가소득 창출
- 다양한 국내 베리류 산업관련 농가의 새로운 대체작물 확보로 인한 경쟁력확보
- 돌연변이 육종을 통한 가시 없는 보이젠베리의 우수 유망 품종 개발 및 품종보호권 확보
- 선행연구 결과로 확보된 새로운 품종의 블랙베리를 이용한 산업화 및 수출화로 인한 경쟁력 확보(중국내 실증포를 운영하며, 중국 주재 한국인 경영농장이나, 중국농가 그리고 음료회사, 충서기 등과 같은 관련자들에게 시음회 등을 통하여 홍보)
- 신품종 블랙베리를 통한 다양한 건강식품개발

제2절. 추가 연구의 필요성 및 타 연구에의 응용

- 유월초 및 하바네로 유용 변이체에 대해 유전 시 안정성 여부를 검정하고 원인유전자를 구명하기 위한 집단 작성을 수행할 필요가 있음. 특히 NGS를 활용한 고효율 원인유전자 구명체계를 구축할 경우 고추 뿐 아니라 타작물에서의 원인 유전자 구명 연구에도 활용할 수 있음.
- 본 과제 수행동안 확보한 NGS 분석 결과 및 변이체 대량 분자마커는 추후 다른 품종별 저온 저항성 잔디와 비교 분석의 필요가 있으며, 품종별 활용 가치가 클것으로 기대됨
- 배유변이 돌연변이 집단을 이용하여 신품종 개발연구 수행
- 한국 춘란 및 동양계 심비디움은 한국, 중국, 일본, 대만, 태국, 베트남, 인도네시아에서 많은 애란인들의 관심을 받고 있어 예술성이 높은 새로운 돌연변이 신품종개발은 지속적으로 요구됨

제3절. 기술이전 및 산업화 추진방안

- 3차년도 연구를 통해 고추 하바네로 양성불임체를 최종 선발하였고, 차년도에 안정적 유전을 확인할 경우 특허 출원을 진행할 계획이며 차후 수출용 하바네로 품종 육성에 관심을 보이는 종자기업을 대상으로 기술이전을 추진할 계획임.
- 현재 잔디 변이체의 품종보호 출원 2건(한라그린 8, 한라그린 9)은 절차에 따라 산림청 품종보호 재배심사팀에서 심사중이며, 2-3년간 심사 한 후, 최종 품종보호 등록이 되면, 제주대학교 산학협력단을 통하여 영농조합에 기술이전 수행 예정
- 개발 난 품종인 ‘로열스타’ ‘수양’, ‘춘보’의 경우 국립종자원에 품종등록하고 조직배양을 통해 대량생산하여 난 재배 농가에 종묘를 보급하며 바보난농원 자체 돌연변이 엽예품 난 상품을 개발하여 선물용 난 시장에 판매 확대 추진함. 이를 위해 농업관련 잡지 및 난 전시회에 적극 참여하여 재배 농가에 돌연변이 신품종을 홍보하고 재배 기술을 지도하며 국내 선물용 난 상품화를 적극 추진함. 개발된 신품종으로 2019년 ~ 2021년 3년간 약 7억원, 2023년까지 약 30억원 매출을 달성하고자 함. 뿐만 아니라 새롭게 양성중인 동양란 계통(20계통)을 균일하고 안전성 높은 품종으로 개발하여 2021년 품종출원 후 실용화 추진할 계획임(신품종 육성 기획→우수 난 모본 확보→종자 및 생장점 배양→방사선 조사(재처리 기술)→우수 돌연변이 개체 선발 및 양성→품종 등록→재배관리 및 개화조절→ 농가 보급 및 수출)
- 시드피아에서 개발된 신규 품종의 사업화를 위해 재배자·생산자·개발자사 상호 Win-Win할 수 있는 사업시스템을 구축함. 개발된 품종은 주로 지역농협과 기술실시 계약을 체결하고 해당 농협 등과 지역 내 농가와 계약재배 실시함. 해당농협은 시드피아의 보급종자를 유상으로 재배농가에 보급하고 재배농가는 생산된 조곡을 농협에 수매. 농협은 계약 수매한 조곡을 가공하여 직접 또는 유통업체에 판매하고 판매금액의 일부를 실시료로 시드피아에 지급. 재배농민은 일반 품종대비 높은 수매가로 농협에 판매를 할 수 있어 농가소득 증대를 가져오며 지역 농협은 최고급 쌀로 판매하여 경제성 향상이 가능함.
 - 2016년 경기도 연천지역에서 400톤이 재배되어 자체브랜드를 이용하여 현재 3,500원/kg 가격으로 판매 되고 있음. 계약재배 지역 추가로 2018년 전남 신안군에서 골든퀀2호를 재

배하여 지역특화 브랜드 제품을 출시, 충북 괴산 및 경남 밀양에서 2018년 추계에 3,000톤 규모로 재배 예정임

- 2018년 골든퀸2호 예상 수확량(조곡기준) 3,000톤일 때 판매액은 6,000백만원으로 예상되며 지역특화품종으로 보급하고 매년 재배면적을 2배씩 확대하여 향후 5년내 재배 면적을 4,000ha 규모로 확대해 재배수량 20,000여톤 이상 달성

○ 보이젠베리의 경우 돌연변이체를 대량유도 한 후 5계통의 조직배양을 수행하여 조직배양체계를 확립하였으며, 식물체의 특성조사 및 실증재배를 통해 2계통을 선발한 후 대량증식체계를 구축하여 각각 1000주 씩을 수행하여 순화를 하였음. 순화한 2계통의 실증포를 조성하여 실증재배를 통한 식물체의 특성조사를 수행하여 내한성과 내병성이 강하고 생육이 좋은 계통으로 BS-G 1계통을 최종 선발하여 2019년도에 품종출원 및 등록을 할 예정임.

<뒷면지>

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.