

(옆면)

(앞면)

117045-3

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( )발간등록번호( O )

농생명산업기술개발사업 2019년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003144-01

# 배추과 속간 교잡 신품종 개발 및 육종 체계 확립

최종보고서

2020. 07. 10.

주관연구기관 / 서울대학교

협동연구기관 / 삼육대학교

(주)바이오브리딩 연구소

## 농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

배추과 속간 교잡신품종개발육종육종체계확립

최종보고서

2019

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

<제출문>

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “배추과 속간 교잡 신품종 개발 및 육종 체계 확립”(개발기간 : 2017.04.21 ~ 2019.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020 . 2 . 14 .

주관연구기관명 : 서울대학교 (대표자) 허진희



협동연구기관명 : 삼육대학교 (대표자) 김현희



참여기관명 : (주)바이오브리딩연구소 (대표자) 이수성



주관연구책임자 : 허진희

협동연구책임자 : 김현희

참여기관책임자 : 이수성

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	117045-03	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.04.21. ~ 2019.12.31	단 계 구 분	(1)/(1)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	배추과 속간 교잡 신품종 개발 및 육종 체계 확립			
연구책임자	허진희	해당단계 참여연구원 수	총: 29명 내부:   명 외부: 29명	해당단계 연구개발비	정부: 800,000천원 민간: 200,000천원 계: 1,000,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 29명 내부:   명 외부: 29명	총 연구개발비	정부: 800,000천원 민간: 200,000천원 계: 1,000,000천원
연구기관명 및 소속부서명	서울대학교 산학협력단			참여기업명 (주)바이오브리딩 연구소	
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	4	2									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

- 본 과제를 통하여 여러 품종의 배추 및 무의 염기서열 분석 수행
- 배추 무 품종 간의 SNP 발굴 및 분자마커 개발
- 배추와 무의 조합별 교배시도를 통하여 속간교배 시 유용하게 사용할 수 있는 모/부  
본 품종 선별
- 속간교잡 시 반드시 수행되어야 할 미숙배 배양 및 소포자 배양기술 개선
- 속간교배장벽의 발생원인 및 속간교잡체의 불임성 원인탐색
- 속간교배를 통해 자색을 띠는 배무체의 품종화 성공 및 이차대사산물 분석을 통해 높  
은 상품가치 확인
- 효율적인 염색체 분석이 가능한 표지올리고 탐침 기술 개발 및 이를 통한 속간교배체  
를 확인할 수 있는 기술 확립

보고서 면수  
79면

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 배추과 속간 교잡을 통한 신품종 육성             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 배추 F1과 무 F1 간의 교배를 통한 배무채 신품종 개발</li> </ul> </li> <li>○ 배추과 작물의 안정적인 속간 교잡 육종 기술 확립             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 소포자 배양기술 개발</li> </ul> </li> <li>○ 배추과 작물 속간 교잡종의 유전체 및 전사체 구조 규명             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 속간 교잡종의 염색체 재배열 패턴 규명</li> <li>- 속간 교잡종의 유전자 발현 변화 양상 규명</li> <li>- 특정 표현형과 연관된 유전자 및 발현 조절 양상 규명</li> </ul> </li> <li>○ 배추과 작물의 교배장벽 원인 탐색             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 수정 전에 일어나는 불친화성 양상 분석</li> <li>- 수정 후에 발생하는 교배장벽 원인 분석</li> </ul> </li> <li>○ 배추과 속간 교배체 염색체 탐색 기술 개발             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 체세포유전학 기반 배추, 무, 양배추 유래 염색체 구분 기술 개발</li> <li>- 배추, 무, 양배추 유래 유전자를 구분할 수 있는 분자마커 개발</li> <li>- 배추과 작물 종속간 교배 분자유종 기반 기술 개발</li> </ul> </li> </ul>				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 배추과 속간 잡종 신품종</li> <li>○ 배추과 속간 잡종 소포자배양 기술 개선</li> <li>○ 배추과 속간 잡종 임성 회복 기술 확립</li> <li>○ 배추과 작물 교잡종의 유전체, 전사체 데이터베이스 구축</li> <li>○ 분자마커 개발 및 특허 출원</li> <li>○ 특정 형질 연관 유용 유전자 발굴 및 특허 출원</li> </ul>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 고부가가치 배추과 속간잡종 신품종 개발 - 시장 확대, 해외 수출</li> <li>○ 배추과 속간잡종 육종 체계 확립</li> <li>○ 배추과 육종에서 유용 유전자의 종속간 도입 가능성 제시</li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>배추과 작물</p>	<p>교잡종</p>	<p>유전체</p>	<p>전사체</p>	<p>체세포유전학</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Brassicaceae</p>	<p>Hybrid</p>	<p>Genome</p>	<p>Transcriptome</p>	<p>Cytogenetics</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	6
1-1. 연구개발 목적 .....	6
1-2. 연구개발의 필요성 .....	6
1-3. 연구개발 범위 .....	6
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	7
2-1. 서울대학교 .....	7
2-2. 삼육대학교 .....	22
2-3. 바이오브리딩 .....	32
2-4. 연구개발 추진전략·방법 .....	68
2-5. 연구개발 추진체계 .....	70
2-6. 추진일정 .....	71
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	74
3-1. 목표 .....	74
3-2. 목표 달성여부 .....	75
3-3. 목표 미달성 시 원인 및 차후 대책 .....	76
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	78
4-1. 연구개발 결과의 활용방안 .....	78
4-2. 기대성과 및 파급효과 .....	79
붙임. 참고 문헌 .....	79

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

본 연구는 배추과 주요 작물의 속간 교배를 통해 새로운 교잡종을 육성하고, 유용형질을 갖춘 고부가가치 신품종 개발을 목표로 한다. 이를 위해 배추과(Brassicaceae)에 속하는 배추(*Brassica rapa*)와 무(*Raphanus sativus*) 간의 속간 교잡종을 전통적인 교배육종을 통해 육성하고, 우수한 계통을 선발하여 신품종을 개발할 계획이다.

## 1-2. 연구개발의 필요성

배추와 무는 경제적으로 매우 중요한 채소작물들이지만 한정적인 유전자원으로 인해 새로운 특성을 갖는 품종을 개발하는 데 근본적 한계가 존재한다. 하지만 속간교배를 활용한다면 후대에서 유전적 거리에 비례한 다양한 변이를 얻을 수 있는 장점이 있으며, 유용 형질이나 유전자를 종간 교배장벽(hybridization barrier)을 넘어 타 종으로 도입할 수 있는 수단으로도 사용할 수 있다.

그러나 넓은 스펙트럼의 변이 창출이 가능한 장점에도 불구하고 일반적으로 종간 혹은 속간 교배(interspecific/intergeneric hybridization)는 자연적으로 잘 일어나지 않으며, 그 후대 역시 얻기가 매우 어렵다. 따라서 종·속간 교잡종 생산을 위해서는 인공수분과 함께 소포자 배양(microspore culture), 염색체 배가(chromosome doubling)와 같은 기술들을 필요로 한다. 또한 종·속간 교잡종은 흔히 유전적으로 불안정하거나 임성이 없는 문제점을 나타내기 때문에 상세한 원인 규명과 함께 이를 극복할 수 있는 기술의 개발이 필수적이다.

따라서 본 연구에서는 새로운 속간 교잡종 개발과 동시에 이러한 염색체 불안정성(chromosome instability)과 불임(infertility)의 원인을 유전체 수준에서 규명하고, 이를 극복할 수 있는 기술 개발을 수행할 예정이다.

## 1-3. 연구개발 범위

본 연구과제는 세 개의 세부과제로 구성되어 있다. 제1 세부과제(서울대학교)는 배추과 작물의 속간교배를 통해 얻어진 교잡종의 유전체를 분석하고, 양친과 비교하여 염색체 재배열(chromosome rearrangement) 양상 및 발현의 변화를 차세대 염기서열 분석법(next generation sequencing; NGS)을 통해 연구할 예정이다. 교배친의 유전체 정보를 기반으로 배추와 무 유래 유전자를 구분할 수 있는 분자마커를 개발하여 배추과 작물의 종·속간 교배 분자유종 기반을 구축한다. 동시에 교잡종에서 흔히 발생하는 교배장벽 현상을 수정 전/후(prezygotic/postzygotic) 단계로 구분하여 분석하고 그 원인을 규명할 계획이다. 제2 세부과제(삼육대학교)는 체세포유전학(cytogenetics) 기반의 FISH(fluorescent in situ hybridization)나 GISH(genome in situ hybridization) 기법을 사용하여 배추과 종·속간 교잡종의 염색체 조성 및 재배열 양상을 파악하고, 제1, 3 세부과제의 교잡종 소재들을 염색체 수준에서 분석 지원할 예정이다. 제3 세부과제(바이오브리딩)는 확보 중인 다양한 계통 및 F1 소재를 활용하여 배추과 작물의 새로운 속간 교잡종을 육성하고, 안정적인 후대 생산을 위한 소포자 배양 방법을 개발할 예정이다. 우수한 형질을 나타내는 교잡종은 특성 검정과 선발을 거쳐 신품종 육성 및 육종 소재 개발을 목표로 한다.

## 2. 연구수행 내용 및 결과

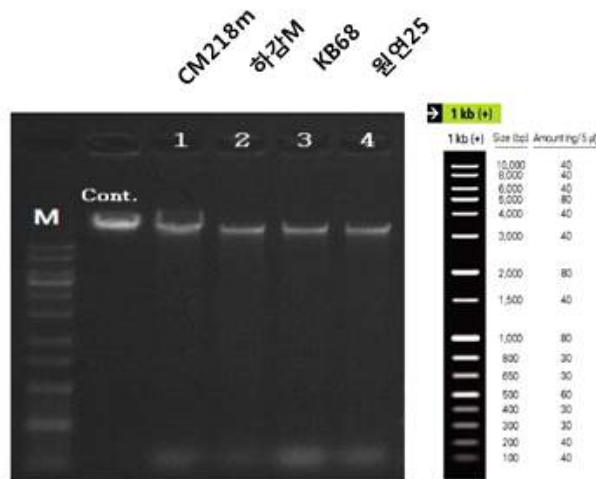
### 2-1. 서울대학교

#### □ 배추, 무, 순계 간 속간 교잡체 유전 특성 분석

◎ 신품종 개발을 위한 배추, 무 순계들의 유전체 정보 데이터 구축

○ 배추, 무 순계 유전체 정보 획득을 위한 genomic DNA 추출 및 시퀀싱 실시

- 배추 2종(CM218, 하감M)과 무 2종(원연, KB68)의 어린잎을 약 1g정도 액체질소에 넣어 마쇄 후 CTAB 방법을 통해 DNA 추출. Truseq DNA PCR-Free library를 수행하기 위해서 약 1ug 이상의 DNA를 얻었음 (그림 1)(표1).
- 배추 2계통 (CM218, 하감M)과 무 2계통 (원연, KB68)의 WGS수행 및 리드 필터링 수행
- 시퀀싱은 Illumina Hiseq 4000 플랫폼을 통해 수행되었음. 순계 배추인 CM218M과 하감M은 배추 유전체에 대하여 각각 64X, 81.38X 정도 시퀀싱이 이루어 졌으며, 순계 무인 KB68과 원연25은 무 유전체에 대하여 각각 57.77X, 51.84X정도 시퀀싱이 이루어짐 (표2). 각 리드들의 퀄리티 분석 후 높은 퀄리티를 가진 리드만을 선별하였으며, 평균적으로 15% 정도의 리드가 제거되었음 (표3).



<그림 1> 추출한 DNA 확인

<표 1> 추출한 DNA 정량

#	Sample Name	Conc. (ng/ul)	Final Volume (ul)	Total Amount (ug)
1	cm218m-13	198.134	16	3.170
2	hagamm-13	48.515	60	2.911
3	Kb68	48.269	59	2.848
4	wonyeon25	58.965	57	3.361



<표 2> 시퀀싱된 리드 정도

	Raw read depth	Filtered read depth
CM218M	64.65	50.80
HAGAMM	81.38	64.38
KB68	57.77	45.16
WONYEON25	51.84	41.04

<표 3> 각 리드정보 및 필터링 리드 결과

	Raw reads	Raw sequence length	q30 p60 reads	Sequence length	Filtered Reads	Filtered sequence length	Read %	Sequence %
CM218M-13_1	103,823,200	15,677,303,200	99,670,919	15,050,308,769	89,589,274	13,527,980,374	86.29	86.29
CM218M-13_2	103,823,200	15,677,303,200	91,349,376	11,327,322,624	89,589,274	11,109,069,976	86.29	70.86
HAGAMM-13_1	130,691,588	19,734,429,788	125,728,229	18,984,962,579	113,538,890	17,144,372,390	86.88	86.88
HAGAMM-13_2	130,691,588	19,734,429,788	115,687,476	14,345,247,024	113,538,890	14,078,822,360	86.88	71.34
KB68_1	101,113,602	15,268,153,902	97,572,115	14,733,389,365	86,810,792	13,108,429,592	85.85	85.85
KB68_2	101,113,602	15,268,153,902	88,206,879	10,937,652,996	86,810,792	10,764,538,208	85.85	70.50
WONYEON25_1	90,738,793	13,701,557,743	87,517,867	13,215,197,917	78,891,953	11,912,684,903	86.94	86.94
WONYEON25_2	90,738,793	13,701,557,743	80,267,820	9,953,209,680	78,891,953	9,782,602,172	86.94	71.40

○ NGS 유전체 분석을 통한 배추, 무 순계 유전체간의 SNP 정보 확보

- 필터링 된 리드를 bwa를 이용하여 맵핑한 후 GATK tool을 이용하여 polymorphism을 산출함.
- SNP/INDEL의 추가적인 필터링을 위하여 homozygous allele만 추출하였으며, 맵핑 리드가 10 이상으로 산출된 SNP/INDEL만 선별함 (그림2) (표4).
- 배추로 사용된 2종(CM218, 하감M)과 배추 표준유전체 간의 polymorphism은 각각 851,537 SNP, 및 259,338 INDEL (CM218), 1,339,715 SNP, 및 411,739 INDEL (하감M) 정도로 산출.
- 무로 사용된 2종(원연, KB68)과 무 표준유전체 간의 polymorphism은 각각 1,215,918 SNP, 418,963 INDEL (원연), 1,204,284 SNP, 413,094 INDEL (원연) 정도로 산출.
- 배추 순계 2종을 구별할 수 있는 SNP와 INDEL을 선별, 총 SNP는 1,543,478개, INDEL은 472,169개 확보.
- 무 순계 2종을 구별할 수 있는 SNP와 INDEL을 선별, 총 SNP는 371,492개, INDEL은 136,499개 확보.

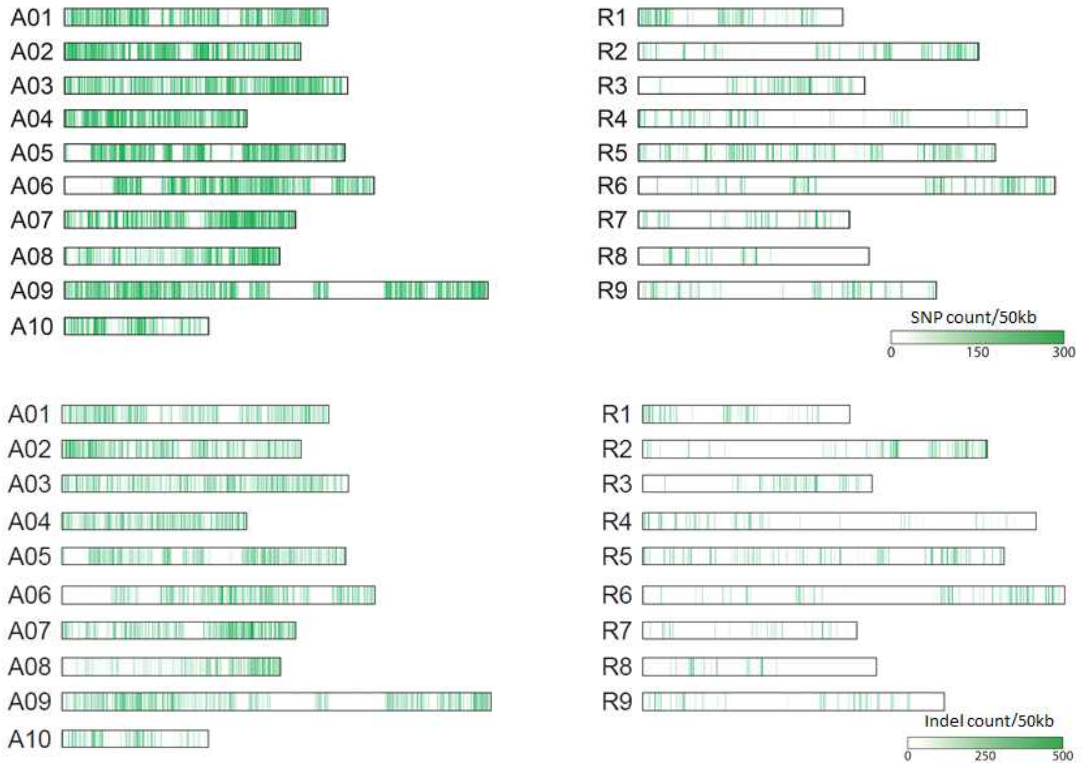
- 추출된 SNP와 INDEL을 유전체상에 50 kb window로 나누어 분포를 확인함.
- 배추 순계 간, 무 순계 간 polymorphism을 보이는 구역을 염색체에 분포시켜보았을 때 전체 크로모솜을 커버함.
- 유전적 거리 측정을 위하여 배추와 무의 3계통 간의 SNP를 대상으로 계통분석을 실시. MEGA7를 이용하여 계통분석을 실시하였으며, Maximum-likelihood 방법을 이용하여 계산함 (그림3).

<표 4> 배추 2종 및 무 2종의 SNP와 INDEL 및 표준유전체와의 비교

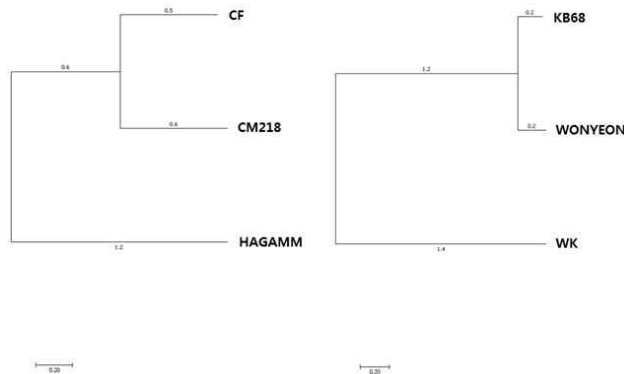
	CM vs. CF	CM vs. HG	HG vs. CF		KB vs. WK	KB vs. WY	WY vs. WK
A01	61,882	156,285	140,926	R1	117,758	39,329	115,103
A02	91,741	172,784	141,515	R2	160,261	50,274	158,773
A03	98,066	180,392	169,590	R3	99,312	36,515	93,949
A04	76,553	139,452	106,475	R4	145,335	35,952	143,421
A05	105,147	164,081	128,275	R5	147,455	75,424	145,470
A06	105,276	167,860	144,839	R6	227,376	52,840	221,608
A07	104,809	169,728	137,069	R7	102,291	27,535	110,893
A08	47,768	106,055	120,317	R8	90,284	17,591	92,332
A09	131,280	222,519	170,522	R9	125,846	36,032	122,735
A10	29,015	64,322	80,187	Total	1,215,918	371,492	1,204,284
Total	851,537	1,543,478	1,339,715				

	CM vs. CF	CM vs. HG	HG vs. CF		KB vs. WK	KB vs. WY	WY vs. WK
A01	20,713	48,470	43,163	R1	38,647	13,945	38,045
A02	27,286	52,425	43,564	R2	54,526	19,894	54,325
A03	30,412	57,879	54,988	R3	33,745	13,975	31,424
A04	21,743	40,463	31,546	R4	51,672	13,691	50,476
A05	31,189	48,853	38,832	R5	52,843	25,717	51,961
A06	29,407	49,362	44,299	R6	77,075	19,896	75,445
A07	32,701	51,629	40,345	R7	36,170	9,013	37,954
A08	14,956	31,764	35,269	R8	30,790	6,826	31,085
A09	41,273	70,362	54,218	R9	43,495	13,542	42,379
A10	9,658	20,962	25,515	Total	418,963	136,499	413,094
Total	259,338	472,169	411,739				



<그림2> 배추 2계통 및 무 2계통 간의 염색체 상 SNP/INDEL 분포



<그림3> 배추 2계통 및 표준유전체, 무2계통 및 표준유전체간의 유전적 상대적 거리 측정

- 배추, 무 순계들의 SNP 정보를 이용한 마커 제작
  - 1차년도에 이용했던 순계 계통 이외에 새로운 계통인 CR291M-64, 휘M-2 계통이 새롭게 교배조합으로 이용됨. 따라서 두 가지 계통에 대한 추가적인 유전체 분석이 요구되었음.
  - CR291M-64, 휘M-2 품종의 gDNA를 추출한 후 1차년도와 같은 방식으로 WGS를 실시하고 리드 필터링을 수행함(표 5).

<표 5> 시퀀싱 결과 및 필터링 결과

	Raw reads	Raw sequence length	Filtered reads	Filtered sequence length	Read %	Sequence %
CR291-1	121,712,579	18,378,599,429	108,629,329	15,121,002,942	89.25	82.28
CR291-2	121,712,579	18,378,599,429	108,629,329	14,785,376,837	89.25	80.45
Hwi-1	108,014,889	16,310,248,239	96,848,148	13,480,766,897	89.66	82.65
Hwi-2	108,014,889	16,310,248,239	96,848,148	13,170,253,694	89.66	80.75

- 시퀀싱한 순계 배추에 대한 SNP와 INDEL 분석을 수행함. 또한 표준유전체 배추의 유전체 정보가 업데이트됨(BrapaV3.0)에 따라 기존에 보유하고 있던 계통의 유전체 정보에 대해서도 새롭게 SNP와 INDEL 분석을 수행하였으며(표 6), 품종 간의 비교도 가능해짐.

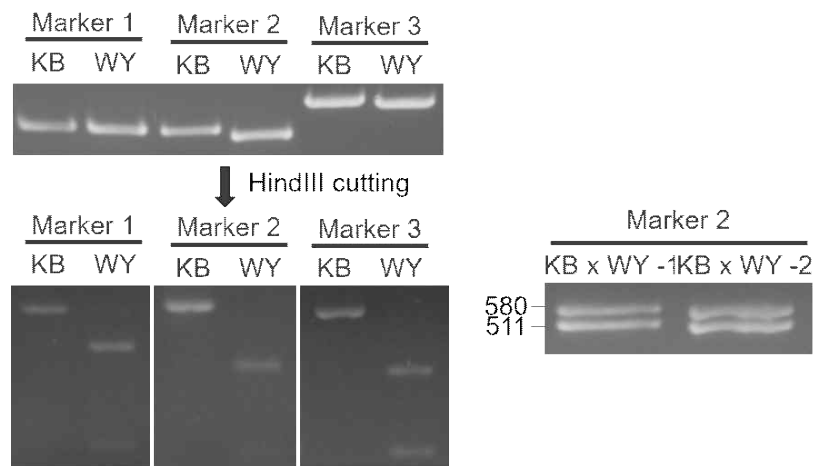
<표 6> 순계 배추 계통에 대한 polymorphism 분석 결과

계통	SNP				INDEL			
	CR291	휘M	CM218	하감M	CR291	휘M	CM218	하감M
A01	282,513	298,405	269,863	282,533	86,257	90,102	82,187	86,382
A02	367,719	381,924	357,975	375,187	105,433	109,429	103,075	108,183
A03	484,024	517,063	424,846	499,077	146,894	157,865	128,260	152,492
A04	234,865	245,405	234,706	235,911	69,131	71,831	68,827	68,898
A05	297,971	312,986	267,612	302,267	90,069	93,883	79,179	90,806
A06	287,229	298,530	253,338	289,805	88,939	92,098	77,337	89,423
A07	311,804	312,916	301,201	310,527	92,553	92,015	89,074	91,925
A08	325,386	338,917	251,144	335,121	93,601	98,093	73,390	97,207
A09	362,714	379,290	358,243	368,266	112,297	115,126	109,480	113,395
A10	203,259	215,710	133,844	203,856	59,265	62,511	41,631	59,624
<b>Total</b>	<b>3,157,484</b>	<b>3,301,146</b>	<b>2,852,772</b>	<b>3,202,550</b>	<b>944,439</b>	<b>982,953</b>	<b>852,440</b>	<b>958,335</b>

- 바이오브리딩 연구소에서 F1 배추를 모본으로, F1 무를 부분으로 하여 생산한 신배무체 (CR291M-64 × 휘M-2) × (KB-68-1 × 원연25-9-1) 28 개체를 대상으로, 집단이 균일한 지 그렇지 않은지를 판별할 수 있는 마커를 제작하기 위하여 부분인 F1 무의 유전형을 구분할 수 있는 마커를 제작함.
- KB-68과 원연-25 간의 SNP를 이용하여 cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) 마커 세 개를 제작하였음(표 7).
- 각 마커로 증폭한 PCR product를 HindIII 제한효소로 절단하였을 때 KB-68은 잘리지 않고 원연25는 잘리는 것을 확인하였으며, 부분인 KB-68-1 × 원연25-9-1 식물체에서는 hetero 유전형이 나타나는 것을 확인함. 또한 marker 2의 경우 enzyme cutting을 하지 않아도 KB-68과 원연-25 PCR 밴드 간 크기 차이가 있음을 확인함(그림 4).

<표 7> CAPS marker sequence

Primer	Sequence (5' to 3')	Tm	expected size (bp)	
			KB	WY
marker 1-F	GAGGCTTGCACATCAGTATGG	60.7	562	562
marker 1-R	CTTTTTGGGGATCTTTAGATGG	59.0		(414/148)
marker 2-F	CGTACATAGCAGCAACCATGAG	60.7	580	511
marker 2-R	AGTTGCCAGTTTTGACTTTTG	60.5		(366/150)
marker 3-F	ACCACATCCAGAACTCATTAC	58.9	786	786
marker 3-R	GCTTCGGCGTAAAACTCAAC	59.9		(261/525)



<그림 4> KB-68, 원연25, F1(부분)에서의 CAPS marker 확인

- 세 가지 마커를 이용하여 F1 신배무채 샘플의 KB-68과 원연25의 유전형을 구분하여 F1에서 KB-68과 원연25의 유전형이 혼재되어 있음을 확인함(표 8).

<표 8> 배추와 무 간 속간잡종 28개 sample의 genotype 결과

Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Marker 1	KB	WY	KB	KB	KB	KB	WY	WY	KB	KB	WY	WY	WY	WY	KB
Marker 2	KB	KB	WY	KB	WY	WY	WY	KB	KB	WY	WY	WY	WY	WY	WY
Marker 3	WY	KB	WY	WY	WY	KB	KB	WY	WY	WY	WY	KB	WY	KB	KB
Sample	16	17	19	20	21	22	23	24	25	26	28	29	30	31	32
Marker 1	WY	WY	WY	WY	WY	WY	KB	WY	KB	KB	KB	WY	WY	WY	KB
Marker 2	WY	WY	WY	WY	WY	KB	KB	KB	WY	KB	KB	WY	KB	WY	WY
Marker 3	KB	WY	KB	WY	KB	WY	KB	WY	KB	KB	WY	KB	KB	KB	KB

\*KB: KB-68 유전형 WY: 원연-25 유전형

#### □ 배추과 작물의 안정적인 속간 교잡 육종 기술 확립

◎ 배추, 무 순계 간 교배 실시, 교배 효율 측정

- 배추, 무 순계 간 교배, 바이오브리딩 보유 배추 2종, 무 2종 및 표준유전체에 이용된 지부, 원교39호 이용
  - 바이오브리딩에서 분양받은 순계 배추 2종과 순계 무 2종, 표준유전체 배추와 무를 수원 소재에 온실에서 재배함. 주간온도 24℃, 야간온도 18℃에서 자연채광 조건으로 재배함.
  - 바이오브리딩에서 순계 배추 2종 (CM218M-13, 하감M-50)과 순계 무 2종 (KB-68, 원연-25)을 분양 받아 재배 (그림5)



<그림 5> 과제 수행에 재료로 이용된 순계 배추와 순계 무

○ 순계 간 교배효율 측정 및 종자생산 효율 확인

- 재료 중 표준유전체 지부 배추, 원교 무의 종자 생산 효율 확인
- 표준유전체 지부 배추와 원교 무의 경우 뇌수분을 통해 직접 수분을 수행하였음. 자가수분한 꼬투리와 수정 후 생기는 꼬투리의 비율을 통계처리 하여 확인함.
- 표준유전체 지부 배추와 원교 무를 재료로 하여 속간교배를 실시한 꼬투리와 종자가 맺히는 꼬투리의 비율을 통계 처리함.
- 지부 배추의 경우 뇌수분을 통한 자가 수정률은 약 70% 정도이며, 원교 무의 경우 자가 수정률은 약 24%인 것을 확인 (표9)

<표 9> 표준유전체 배추와 무의 종자 생산 효율 확인

	교배시도 silique (개)	교배성공 silique (개)	교배성공률 (%)	정상종자 (개)	쪽정이 (개)	터진종자 (개)
지부	155	109	70.32	19	6	0
원교	226	51	22.56	51	28	1

- 표준유전체 배추와 무의 교배 효율을 측정한 결과 속간교배 성공률은 약 67%인 것으로 확인 (표10)

<표 10> 속간교배의 교배 효율 측정

교배시도 silique (개)	교배성공 silique (개)	교배성공률 (%)	획득종자 (립)	식물체 (개)
411	276	67.15	190	69

- 표준유전체인 지부 배추 14개체, 원교 무 19개체를 이용하여 배추를 모계, 무를 부계로 하여 속간교배를 실시하였음. 교배는 전부 뇌수분으로 실시됨.
- 개체 마다 각각 양친의 정보와 교배를 실시한 날짜를 명시하고 뇌수분한 암술의 개수와 수분이 되어 생성된 꼬투리의 개수를 확인하였음.
- 속간교배를 실시한지 약 30일 정도 되었을 때 꼬투리를 수확하였고, 표면을 에탄올을 이용하여 소독하고 클린벤치에서 꼬투리를 갈라 그 안쪽에 종자를 꺼내 1% MS 배지에 치상하였음.
- 종자를 꺼내어 정상적으로 자란 종자의 개수와 비정상적으로 자라 쪽정이 같은 모습의 종자도 전부 개수를 확인하였음. 전 실험에서 확인한 결과 쪽정이 종자에서도 간혹 발아를 하는 경우가 있어 쪽정이 종자도 전부 치상하였음.
- 교배를 시도한 암술의 개수와 수분이 되어 수확한 꼬투리의 개수를 이용하여 지부배추와

원교무의 교배성공률을 확인한 결과 76.8%인 것을 확인하였음. 자연적으로는 거의 이루어지지 않는 속간교잡을 생각하였을 때 인위적인 교잡으로 인한 76.8%의 교배성공률은 매우 높은 확률임을 확인 (표 11).

- 교배가 이루어진 꼬투리에서 정상종자의 개수는 37개, 미성숙종자는 284개, 총 321개의 종자를 얻었으며 수분이 된 꼬투리의 개수가 331개인 것을 확인하였을 때 꼬투리 1개당 성숙이나 미성숙의 종자가 적어도 1개는 존재한다는 것을 확인.
- 지부배추와 원교무의 속간교잡에서 얻은 종자의 개수는 321개, 그 중 발아한 종자는 116개 이었으며 완전한 식물체로 살아남은 개체 수는 82개임을 확인.

<표 11> 표준유전체 지부 배추와 원교 무의 속간교잡 효율

교배시도 암술 (개)	교배성공 꼬투리 (개)	교배성공율 (%)	정상종자 (개)	쪽정이 종자 (개)	발아성공 종자 (개)	생존 식물체 (개)
431	331	76.8	37	284	116	82

◎ 속간교배체의 배수화 여부 확인 및 이차대사산물 분석

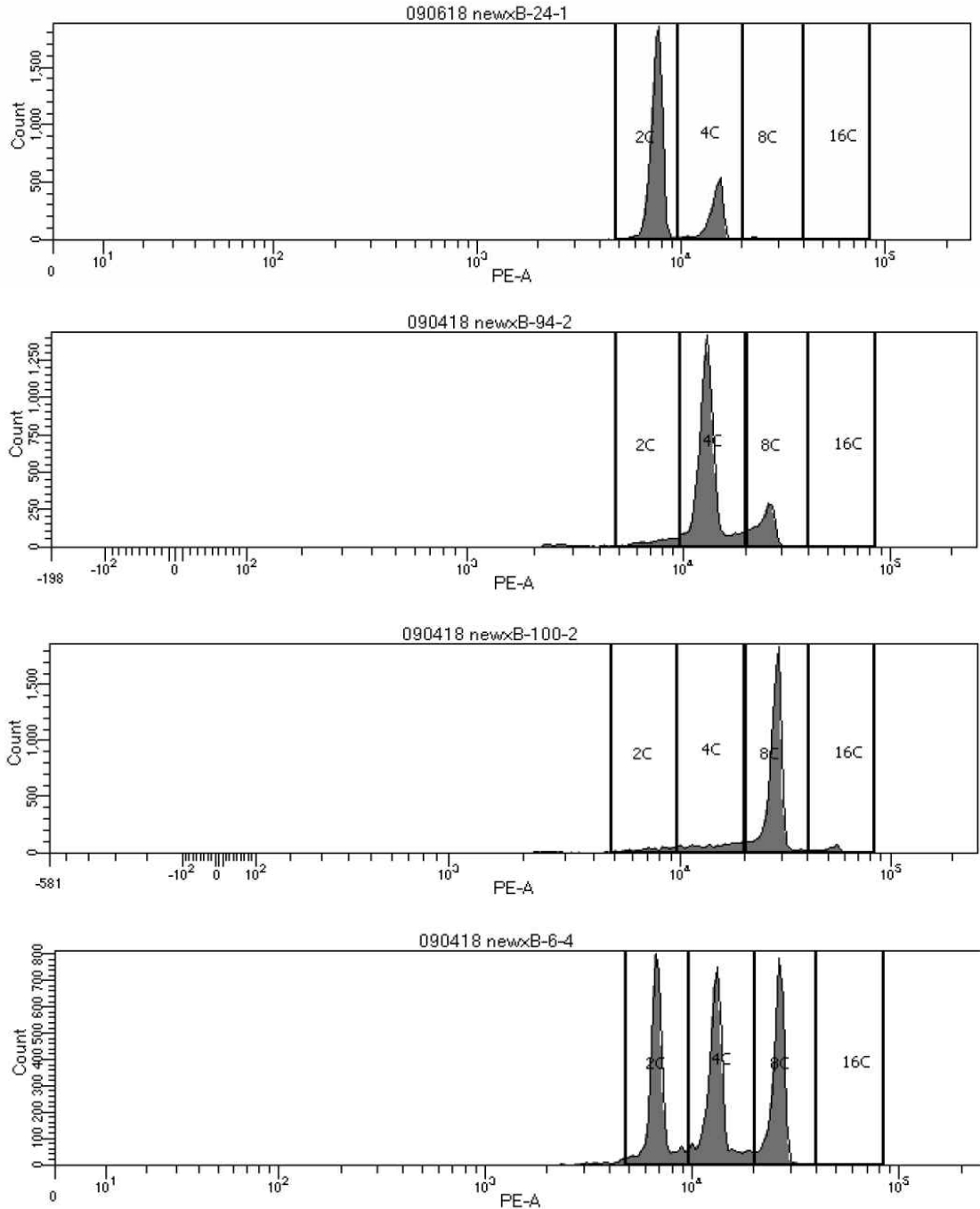
○ 유세포분석기를 이용한 속간교배체의 유전체 크기 비교와 배수화 여부 확인

- 총 85개의 유묘 중 72개의 새로 속간교잡 된 배무체에 0.3%의 콜히친을 솜에 적서 생장점에 처리하여 배수화를 일으키고 13개체는 대조군으로 콜히친처리를 하지 않음. 중간에 3개체는 고사하였음.
- 콜히친 처리가 완료된 식물체의 유엽을 Tris-MgCl<sub>2</sub> 버퍼와 함께 면도칼로 다져 세포를 추출하여 PI (Propidium Iodide)염색을 하여 유세포분석기(Flow Cytometry; FACS)를 이용하여 배수성을 검정함(그림 6).
- 배수성을 검정 결과 2배체 16개(콜히친 무처리구 12개), 4배체 27개, 8배체 21개 배수성이 다양한 개체 18개체를 확인함(표 12).

<표 12> 콜히친 처리와 무처리 배무체의 배수화 확인 및 개체 검정

콜히친 무처리	콜히친 처리			
	2배체 (개)	4배체 (개)	8배체 (개)	배수성 이상 (개)
12	4	27	21	18





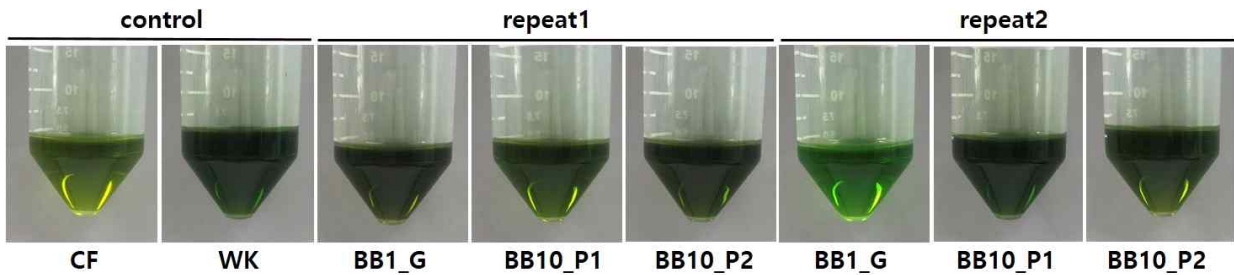
<그림 6> 유세포분석기를 이용한 배수성 확인

○ 속간교배체의 안토시아닌 성분 분석

- 품종 등록 중인 자색배무채(BB10)는 엽색이 진한 자색을 나타냄. 일반적으로 우리가 알고 있는 배무채의 엽색은 녹색이기 때문에 자색 배무채에는 안토시아닌 성분이 많을 것으로 예상됨.
- 지부 배추, 원교 무, BB1호 배무채(녹색), BB10호 배무채(자색)의 유엽과 성엽에서 안토시아닌을 추출함. 같은 양의 생체중의 잎을 액체질소를 이용하여 곱게 갈아준 후 색소 추출 버퍼를 넣어 색소를 추출함(그림 7).

- 지부 배추에서는 연한 녹색이 추출 되었으며 원교 무에서는 진한 녹색이 추출되었음. 녹색 배무채나 자색 배무채에서는 전부 녹색의 용액이 추출되었음을 확인. 진하기의 정도가 다르지만 녹색 배무채에서는 자색 배무채보다 옅은 색이 추출되었음을 확인.

\* 색소 추출 버퍼 : acetone:methanol:TDW:formicacid = 40:40:20:0.1, v/v/v/v

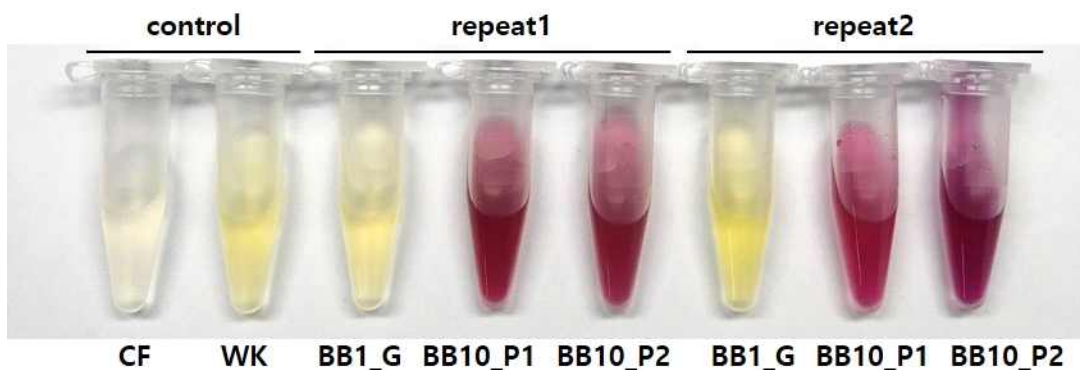


<그림 7> 배추, 무, 녹색과 자색 배무채에서 색소 추출

- 안토시아닌 추출과정에서 당을 떼어 내고 aglycone 형태의 안토시아닌으로 추출하였으며 여러 번의 농축을 걸쳐 최종 산물을 얻음(그림 8).
- 지부 배추에서는 육안으로 아무런 색소도 확인되지 않았으며 원교 무, 녹색 배무채에서는 노란색 색소가 추출되었음. 자색 배무채에서는 진한 붉은색의 색소가 추출되었음. 육안으로 확인하기에 확연히 다른 색소가 존재함을 확인.

\* 안토시아닌 추출 버퍼 : 0.1% formic acid in metanol (v/v)

\* aglycone 분해 용액 : 2N HCl in water = 1:1, v/v

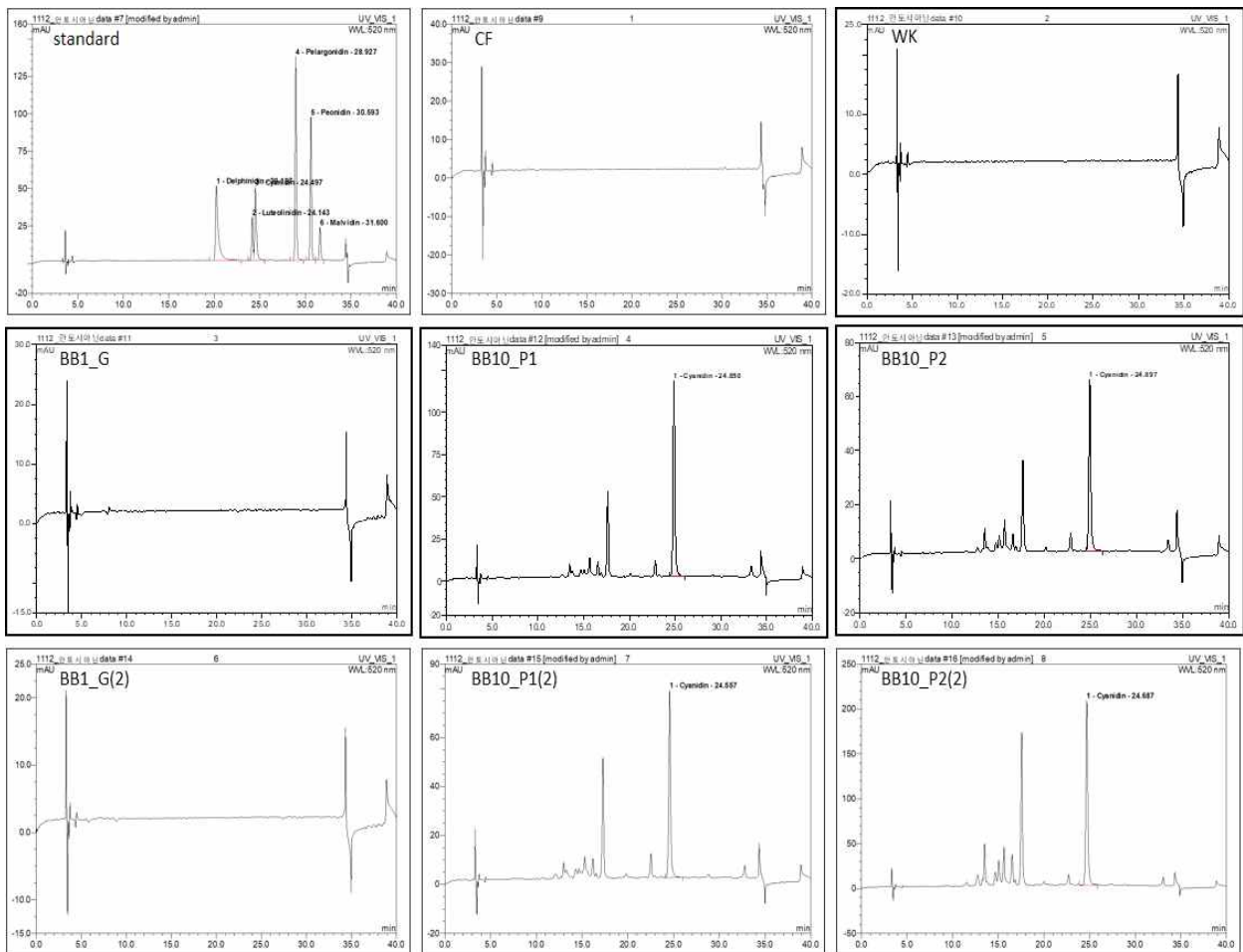


<그림 8> aglycone 형태의 안토시아닌 추출

- 자색 배무채에 붉은색의 색소가 존재함을 확인함. 붉은색은 안토시아닌 함량이 높을 것으로 예상되어 안토시아닌의 어떠한 성분이 존재하는지 서울대학교 농업생명과학대학 농생명과학공동기기원(NICEM)에 고성능 액체 크로마토그래피(High-performance liquid chromatography; HPLC) 분석을 의뢰함.
- 안토시아닌 성분 분석을 위한 분석기기로는 Ultimate3000 HPLC (Thermo Dionex, USA)를

사용하였고, 컬럼은 VDS C-18 column (4.6\*250,5um /VDSoptilab, Germany)을 사용하였으며 0.8mL/min의 flow, 10uL의 주입 양, 520nm, (190-800nm DAD scanning)의 UV를 이용하였음.

- 안토시아닌 분석에 사용한 표준품으로는 델피니딘(Delphinidin), 루테오리니딘(Luteolinidin), 시아니딘(Cyanidin), 펠라고니딘(Pelargonidin), 페오니딘(Peonidin), 말비딘(Malvidin)이 사용되었음.
- 분석 결과 지부 배추, 원교 무, 녹색 배무채에서는 안토시아닌 성분이 검출되지 않았으며 자색 배무채의 유엽, 성엽에서 모두 안토시아닌 성분이 높게 함유되어있음을 확인. 자색 배무채의 안토시아닌 주 성분은 시아니딘(cyanidin)인 것으로 확인(그림 9) (표 13).



<그림 9> 지부 배추, 원교 무, 녹색배무채(BB1), 자색배무채(BB10)의 안토시아닌 성분 분석

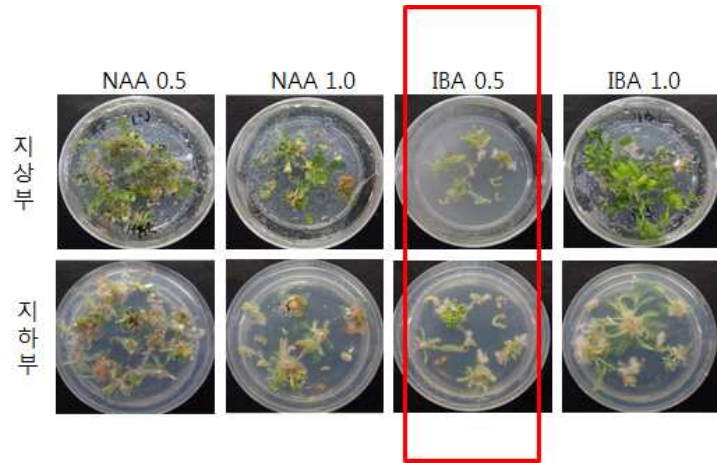
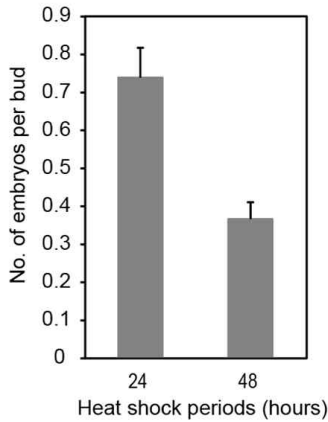
<표 13> 지부 배추, 원교 무, 녹색배무채(BB1), 자색배무채(BB10)의 안토시아닌 성분 정량

No.	Ret.Time (min)	Peak Name	Height (mAU)	Area (mAU*min)	Rel.Area (%)	Amount (mg/L)	Type
	20.20	Delphinidin	49.975	17.761	22.49	15.344	BMB*
	24.14	Luteolinidin	28.812	4.930	6.24	7.336	BM *
	24.50	Cyanidin	48.985	10.849	13.74	10.596	MB*
	28.93	Pelargonidin	136.259	24.490	31.02	18.899	BMB*
	30.59	Peonidin	95.743	16.725	21.18	10.483	BMB*
	31.60	Malvidin	21.998	4.207	5.33	8.778	bMB*
CF			0.000	0.000	0.00	0.000	
WK			0.000	0.000	0.00	0.000	
BB10_G			0.000	0.000	0.00	0.000	
BB10_P1	24.85	Cyanidin	115.713	28.029	100.00	27.376	BMB*
BB10_P2	24.90	Cyanidin	63.394	16.190	100.00	15.813	BMB*
BB1_G (2)			179.107	44.220	200.00	43.190	
BB10_P1 (2)	24.56	Cyanidin	76.631	18.206	100.00	17.782	BMB*
BB10_P2 (2)	24.69	Cyanidin	205.283	49.765	100.00	48.606	BMB*

◎ 배추과 작물의 육종기술 개선

○ 소포자 배양기술 개선을 위한 시험

- 소포자 배양을 위하여 배추과 작물 F1의 floral bud를 추출. (암술보다 꽃잎이 작을 때의 꽃봉오리 크기보다 작은 것 사용)
- 소포자 배양은 화아를 막자사발에 모아서 마쇄할 때 B5 배지에 sucrose 13%를 넣고 소포자 분리 후 NLN (Nitsch & Nitsch medium) 배지를 첨가하였음. 소포자의 농도는 배지 1ml 당 약 33,000이 배양될 정도로 함.
- 화아당 배 발생율을 최적화하기 위해 초기 heat shock 처리기간을 24시간과 48시간으로 나누어 실험함.
- 발근효율을 측정하기 위해 NAA와 IBA의 농도별 발근유도배지 제작(0.5~1.0mg · L-1).
- 소포자 배양 시 배 발생율과 heat shock 처리 상관관계 실험. 배양 시 초기 heat shock 처리 기간을 24시간, 48시간 처리. 소포자 배양 시 24시간의 heat shock 처리군에서 48시간 보다 2배 높은 화아당 배 발생율을 보임 (그림 10).
- 기존의 소포자 배양 시 식물체 재분화 배지 조성은 본 연구의 재료에는 적합하지 않음. 새롭게 제작한 발근 배지는 MS 배지에 각각 NAA와 IBA를 첨가하여 실시. NAA 첨가 배지에서는 발근이 되지 않은 반면 IBA 0.5 mg · L-1 첨가 배지에서는 발근 효율이 높았음 (그림 11).



<그림 10> 소포자 배양 시 heat shock 처리 시간에 따른 화아당 배 발생률

<그림 11> 배지 조성에 따른 발근효율 측정

◎ 배추과 작물의 교배장벽 원인 탐색

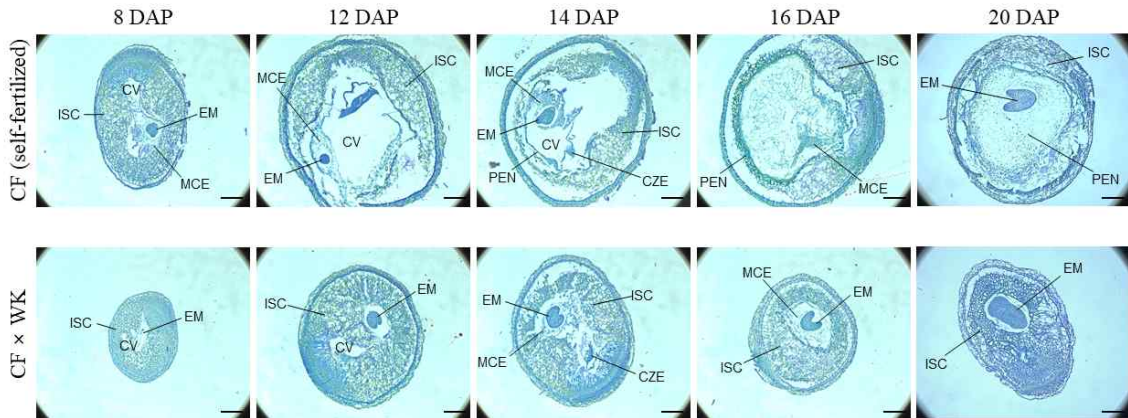
○ 속간교배 시 수정 전에 일어나는 불친화성 양상분석을 위한 화분관 신장 비교

- 속이 다른 속간교잡은 자연적으로 거의 이루어지지 않음. 그러나 인위적으로 속간교잡 시에는 순계 배추를 모계로 순계 무를 부계로 하여 속간교잡을 실시하였을 때만 교잡이 드물게 이루어지는 것을 확인함. 반대로 배추와 무를 정역교배하여 속간교잡을 실시하게 되면 교잡이 전혀 되지 않음.
- 속간교배 시 수정 전, 수분 시에 일어나는 불친화성의 양상을 분석하기 위해 화분관 신장을 관찰할 예정. 암술에 화분을 묻힌 후 다양한 시간대별로 암술을 세포 고정액인 FAA(Formaldehyde, Acetic Acid, Ethanol)용액에 담가 샘플링 하였음.

○ 속간교배 시 수정 후 단계별 종자발달 관찰 및 종자 치사 원인 분석

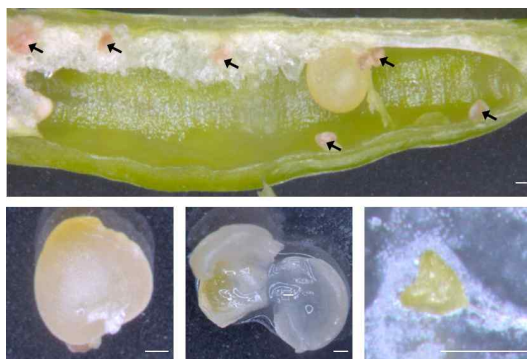
- 새로 합성된 속간교배체인 배무채는 수정 후 교배 장벽의 혼한 현상인 종자 치사를 보임. 신배무채 종자의 배유에서 발달적 결함을 찾기 위해, 본 연구에서는 Chiifu-401-42 (CF)를 종자친으로, Wonkyo10039 (WK)를 화분친으로 교배하여 신배무채를 합성하고 days after pollination (DAP) 별로 종자의 phenotype을 분석하였음.
- FAA solution (formaldehyde:alcohol:acetic acid, 2:10:1, v/v/v)에 종자를 고정하고 에탄올을 이용하여 탈수화 과정을 거친 후 파라핀으로 굳힘. 이후 마이크로톰을 이용해 섹션을 준비해준 후 Toluidine Blue O 용액을 이용해 샘플을 염색함.
- 지부배추의 경우, 시간이 지날수록 내종피(inner seed coat)의 두께가 점점 얇아졌고 중앙액포(central vacuole)의 크기가 커짐. 또한 12 DAP부터 micropylar endosperm이 cellularization되어 heart stage인 배를 둘러싸기 시작해 16 DAP에는 배유 전체가 cellularization됨. 반면, 새로 합성된 배무채는 시간이 지나도 내종피의 두께가 두꺼운 채로 유지되고 내부 공간이 좁음. 또한 배유가 12 DAP까지 거의 발달하지 않았고 그 이후

에는 periperal endosperm이 제대로 cellularization되지 않는 모습을 보임. 배의 발달속도 또한 배추보다 느리게 진행됨 (그림 12).

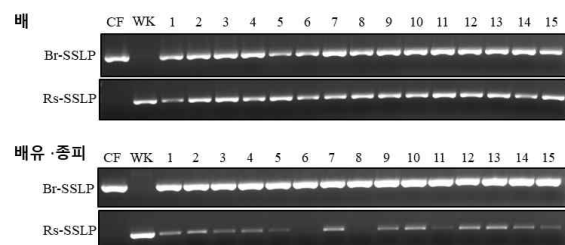


<그림 12> 자가수정한 배추(CF)와 배무채의 종자 발달 단계

- 위의 결과에서 새로 합성된 배무채는 비정상적인 배유 발달로 인한 수정 후 교배 장벽을 가지고 있는 것을 밝혀냄 (그림 13). 이러한 비정상적인 배유의 발달이 정세포가 수정하지 않았음에도 비정상적으로 발달하는 autonomous endosperm이 원인인지 알아보기 위해, 배추와 무의 DNA의 SNP를 이용하여 각각 특이적인 marker를 제작 후 sequence specific length polymorphism (SSLP) analysis를 진행함 (그림 14). Sample은 신배무채 종자가 14 DAP이후까지 자란 후 각각의 종자를 배와 그 이외의 부분인 배유와 종피로 나누어 15개의 종자를 샘플링함. 이 후, 배추 특이적인 Br-SSLP, 무에 특이적인 Rs-SSLP marker를 이용하여 신배무채의 배와 배유를 분석함. 그 결과 배는 모두 교배가 되어 배추와 무 특이적인 band를 모두 보였고 배유 또한 2개를 제외한 나머지에서 모두 배추와 무 특이적 band를 보였음. 무 특이적인 band가 나오지 않은 2개의 sample은 아마도 배유의 양이 적어 종피만 증폭되었을 것으로 보임. 따라서 새로 합성된 배무채는 정상적인 중복수정 과정은 거치지만 비정상적인 배유의 발달로 인한 수정 후 교배 장벽을 가지고 있는 것으로 보임. 그리고 이런 장벽을 극복하기 위해 현재 기내 배양(*in vitro* culture)을 통한 rescue과정이 진행 중에 있음.



<그림 13> 교배 14일차 꼬투리와 종자. 검은 화살표는 치사한 종자들을 나타냄



<그림 14> 배추(CF)와 무(WK)를 교배한 신배무채의 배와 배유의 SSLP analysis 결과

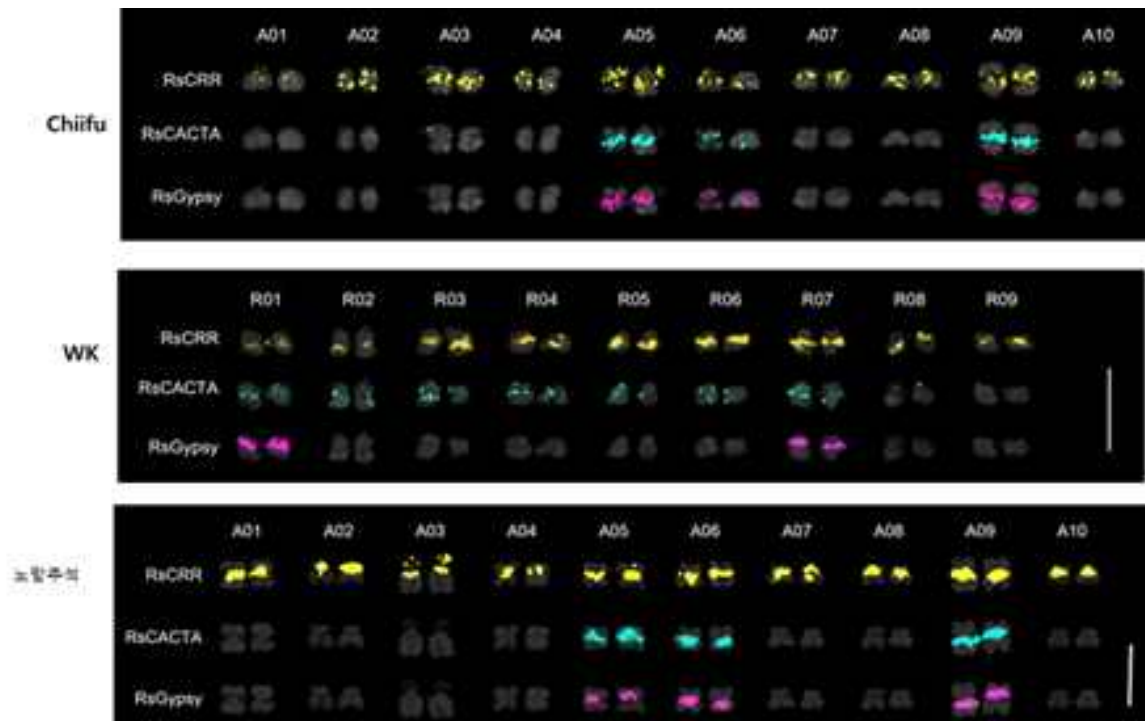
## 2-2. 삼육대학교

### □ 신품종의 유전적 안정화 확인을 위한 분자세포유전학적 탐색방법 개발 및 염색체 관찰 등을 통한 속간 교잡체 확인

#### ◎ 분자세포유전학적 기법을 통한 탐색방법 개발 및 속간교잡체 확인

##### ○ 속간교배체의 각 양친에 대한 염색체 수, 조성, FISH 핵형분석에 의한 각 염색체 동정

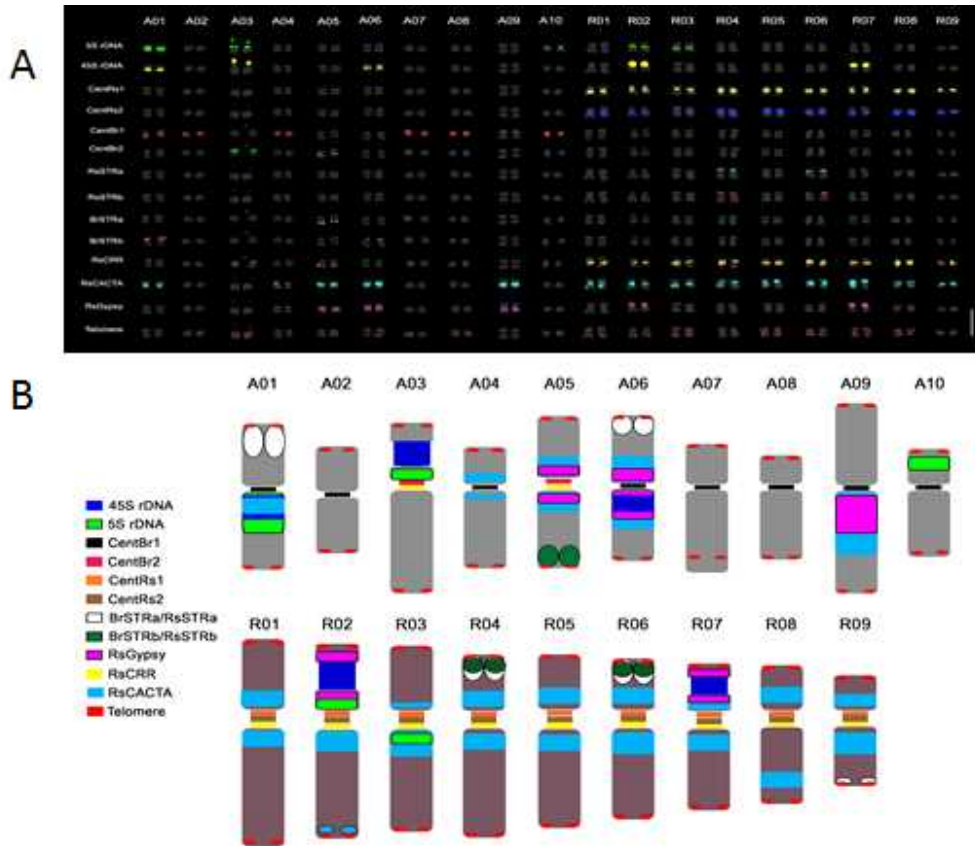
- 반복서열 탐침 발굴, probe-labelling, direct and indirect-FISH, PLOP-FISH
- 기존의 시퀀스를 이용하여 PCR을 이용하여 탐침부위를 증폭시켜 직접 혹은 간접으로 in situ hybridization를 했지만 빠르고 신속한 PLOP-FISH 기법은 원하는 부위의 탐침을 pre-labeled synthetic oligo probe (PLOP)로 디자인 한 후 hybridization을 하게 되면 기존의 2일 걸리던 과정이 30분정도로 빨라짐
- 배추, 무 유전체서열로부터 Repeat Explorer 프로그램을 이용, 각 종의 유전체 특이 반복서열 발굴
- 무의 특이적인 CRR, CACTA, Gypsy 부위의 탐침으로 배추와 무의 핵형분석 가능
- 시판품종의 배추 ‘노랑추석’ 품종도 배추 ‘지부’와 유사한 패턴을 보임 (그림15)
- 배추와 무를 구별하는 특이적인 탐침기술 확보



<그림 15> 배추(지부)와 무(원교)의 FISH 핵형분석

○ 속간교배체 BBI의 FISH 핵형분석에 의한 각 염색체 동정

- FISH 염색체 현미경상 이미지 분석, 염색체 조성 분석-배추와 무 유전체 서열분석 결과로부터 제공된 BAC 서열 및 transposable element를 체세포 중기 염색체와 감수분열 염색체에서 physical mapping (그림 16).



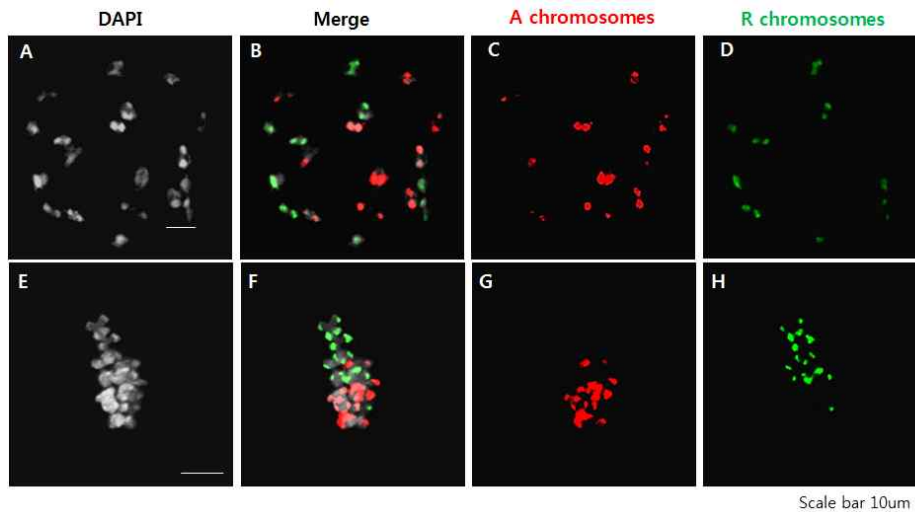
<그림 16> 배무채(BBI)의 FISH 핵형분석. (A) 배무채의 다양한 repeats FISH (B) 배무채의 idiogram

◎ 속간잡종 배무채 체세포 염색체 조성분석 및 속간잡종 배무채의 감수분열 양상 및 염색체 pairing 분석

○ 속간교배체 감수분열시 염색체 pairing 분석

- GISH염색체 현미경상 이미지분석, 염색체 조성 분석
- 배무채 내 배추와 무의 각 genome의 구분 및 감수분열 염색체 pairing 상황 확인 (그림 17)
- 새로 만든 4배체 배무채의 감수분열로 배추와 무의 GISH
- 기존 보고에서 유채와 밀등 이질배수체의 임성이 낮은 요인인 homoeologous pairing은 속간교배체 초기 세대의 감수분열시 극히 적은 비율임

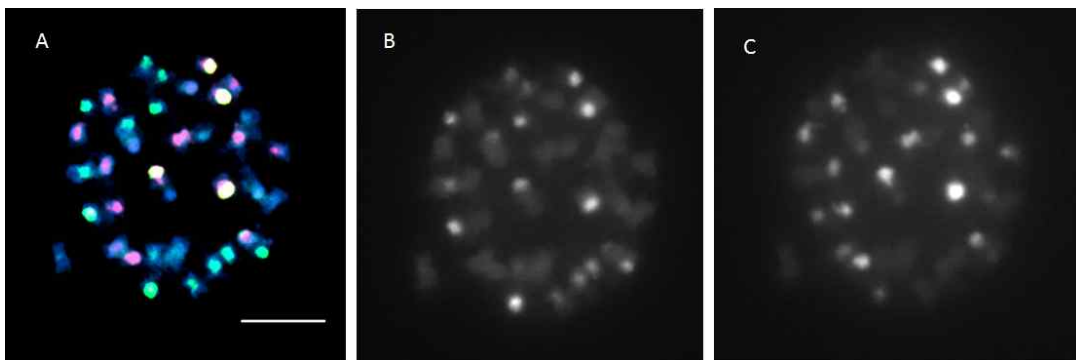




<그림 17> 지부x원교 배무체(AARR)의 감수분열 GISH (A-D) Diakinesis (E-F) Metaphase I

○ 속간 교배체에서 양친의 염색체 존재 유무 확인

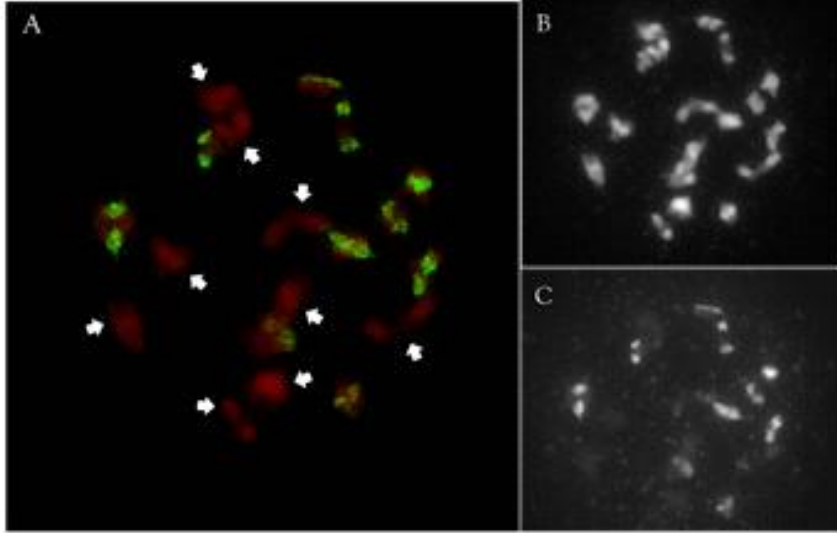
- 속간교배체 배무체와 배추과 갖의 교배에 의한 3개 유전체 잡종 #883, #977, #971 종자 확보 및 염색체 분석용 표본 제작.
- FISH 기법에 의해 3유전체 잡종교배체 #883과 #977의 3개 유전체 존재 확인.
- GISH 기법에 의해 속간교배체 #883과 #977의 3개 유전체 존재 확인 (그림 18).



<그림 18> #977의 체세포의 GISH. (A) 녹색은 배추, 붉은색은 무, 푸른색은 양배추임.

○ 속간 교배체의 배수체, 이수체 여부 확인 방법 확보

- 자색배무체 #971의 유전체 조성 확인을 위한 GISH분석 결과 배추염색체 20개, 무 염색체 18개를 가진  $2n=38$ 의 배무체임을 확인 (그림 19)
- 유전체 조성을 세밀하게 FISH분석하기 위해 배추 유전체 특이, 무 유전체 특이 DNA 반복 서열 발굴



<그림 19> #971 의 GISH. (A) 녹색은 10개 배추 이가염색체와 붉은색 9개 무 이가염색체(화살표)

○ 배추, 무의 FISH 핵형분석

- 주요 반복염기서열 탐침으로 ribosomal DNAs(45S rDNA, 5S rDNA), centromeric repeat 등을 이용 (표 14)

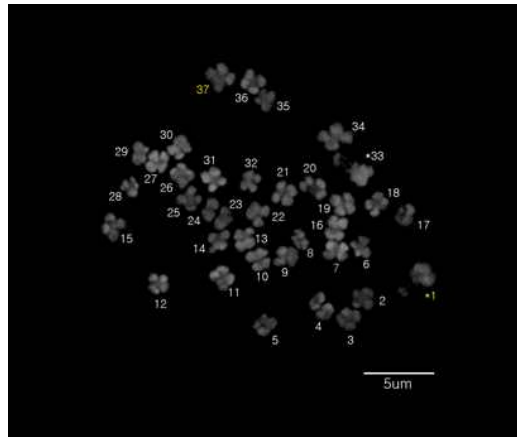
Probe	Chromosome	Hybridization Signal	Probe	Chromosome	Hybridization Signal
45S rDNA	1	Green	5S rDNA	2	Green
Centromeric repeat	3	Yellow	Centromeric repeat	4	Yellow
Centromeric repeat	5	Yellow	Centromeric repeat	6	Yellow
Centromeric repeat	7	Yellow	Centromeric repeat	8	Yellow
Centromeric repeat	9	Yellow	Centromeric repeat	10	Yellow
Centromeric repeat	11	Yellow	Centromeric repeat	12	Yellow
Centromeric repeat	13	Yellow	Centromeric repeat	14	Yellow
Centromeric repeat	15	Yellow	Centromeric repeat	16	Yellow
Centromeric repeat	17	Yellow	Centromeric repeat	18	Yellow
Centromeric repeat	19	Yellow	Centromeric repeat	20	Yellow

<표 14> 배추 특이, 무 특이 반복서열을 탐침으로 한 FISH 핵형분석

◎ 배추와 무 염색체를 이용하여 유전자 이입확인

○ 배무채 체세포 중기염색체 표본작성

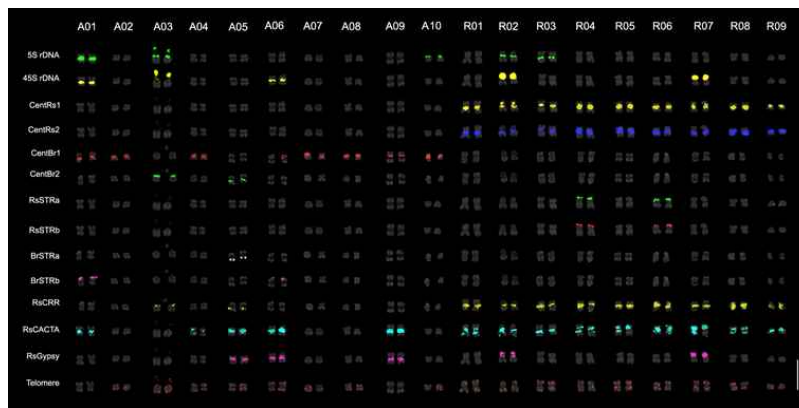
- 배무채 근단 및 화아 샘플 채취, 처리 및 중기 염색체 표본 작성 완료 (그림 20).



<그림 20> 분석 가능한 염색체 표본

○ 5S 및 45S rDNA 위치 및 분포를 통한 유전자 재배열 분석

- 5S 및 45S rDNA를 탐침으로 한 FISH 기법을 활용하여 배무채에서 위치 및 분포 확인 (그림 21).

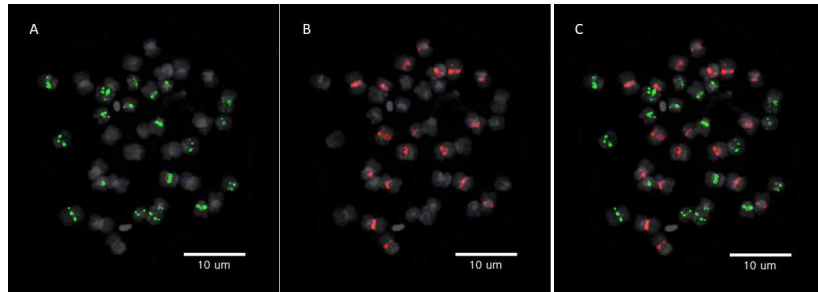


<그림 21> 배무채 중기 염색체에서 5S 및 45S rDNA 위치 및 분포

◎ 부모 간 유전체의 수와 조성을 확인 및 비교하고 변화를 확인하고 추적

○ 배무채 유전체 내 배추 및 무 염색체 존재 및 분포 확인

- FISH 염색체표본을 활용 속간잡종 배무채 유전체 내 배추 및 무 염색체 존재 및 조성 확인 (그림 22).



<그림 22> 배무채 중기 염색체 내 배추 및 무 염색체 존재 확인

◎ 기존의 배추와 무의 주요 반복염기서열의 탐침들을 통한 FISH를 이용하여 핵형분석

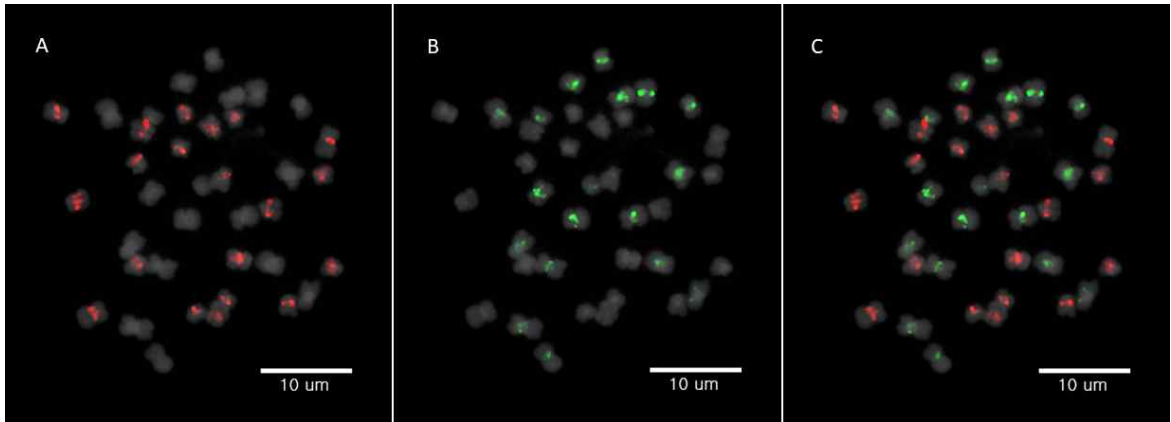
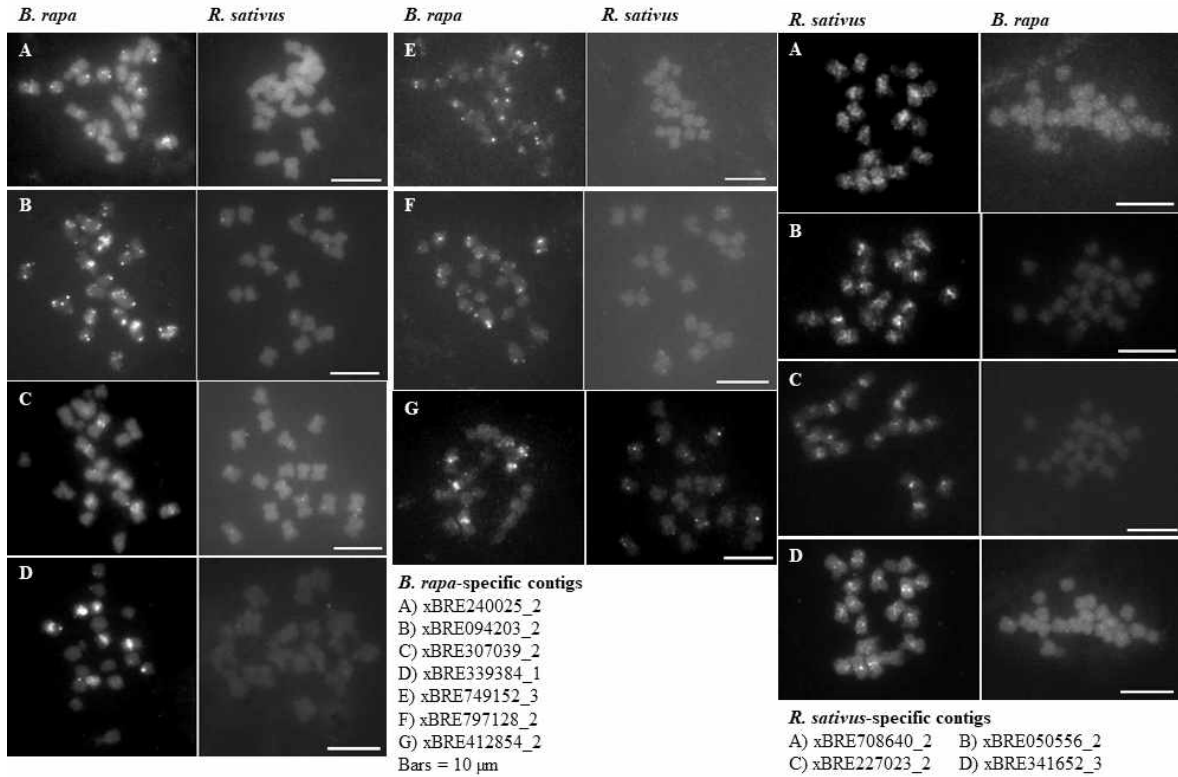
○ 배추 및 무 기존 주요 반복서열과 두 종 특이 반복서열 신규 발굴 및 이들을 탐침으로 한 FISH 염색체 핵형분석 (표 15)

- 배추 특이 및 무 특이 반복서열 포함 총 14종 반복서열 발굴 및 FISH 탐침으로 이용

- 14종 반복서열을 활용한 FISH 핵형분석 완료 (그림 23)

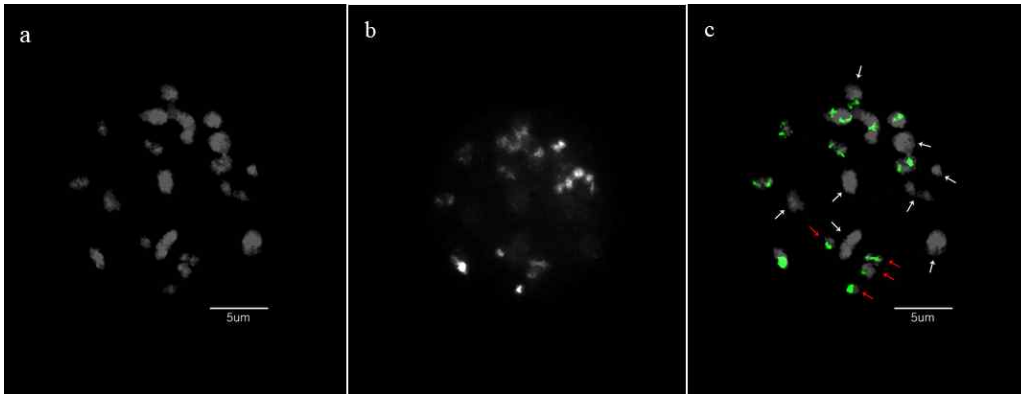
<표 15> 반복서열분석을 위한 생물정보기법으로 새로이 발굴된 배추 및 무 특이 반복서열

Element	Forward	Reverse	Label
5S rDNA	GATCCCATCAGAACTCC	GGTGCTTTAGTGCTGGTAT	FITC
45S rDNA	CACACCCGCCGTCGCTCTACCGA	ACTCGCCGTTACTAGGGGAA	Coumarin
CentRs1	GGAGTTGTGAGTAAGAAGATATCCC	CTTAGATCGTGGTTCATCCTAGT	Coumarin
CentRs2	AGATATCCCACCTTCTATCCAGA	CTTAGATCGTGGTTCATCTGGT	Cy5
CentBr1	ACCAGGATGAATCACTTTGTAAAG	TGGAACGACGAAGAAGCTGTGCTA	Texas red
CentBr2	ACCAGGATGAATCGCGATGTACA	TAGAATGACGAAGAAGTTGTCATA	FITC
RsSTRa	TGCTAATCCACTAATCTAGGCAGT	AGAGAAACGAAGACAACAGAGGT	FITC
RsSTRb	TGCTAATCCACTAATCTAGGCTGT	AGAGTAACGGAGACTACAAAAGT	Texas red
BrSTRa	GATCCTCCCCCTTACATATTGAATG	CAACTATGCAATAAAACAAAATTTTC	Texas red
BrSTRc	CCCTTACATATTATGAAGTTC	GTCGTATATTTTAAATTTTCTC	FITC
Rs-CRR	ACGAGTTTGCACTCTCTCTCT	CCGGCTGAATGGAGTGATGA	Cy3
Rs-Gypsy	TGGGTCTGACCTATCAGGGG	AATGAAGACCTGGCCGTGT	Coumarin
Rs-CACTA	CGACCCTATTATCCTCGGT	CACTCTCGGATTCGTCAG	FITC
Telomere	Oligoprobe: TTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGG		5 <sup>3</sup> -Cy3 modification



<그림 23> 배무채 내 배추 및 무 특이 반복서열의 분포

- ◎ 감수분열 염색체 pairing 패턴으로 염색체 재조합 양상 분석
- GISH에 의한 배무채 감수분열 염색체 조성 확인
  - GISH에 의한 속간잡종 사배체 감수분열 양상분석 (그림 24).

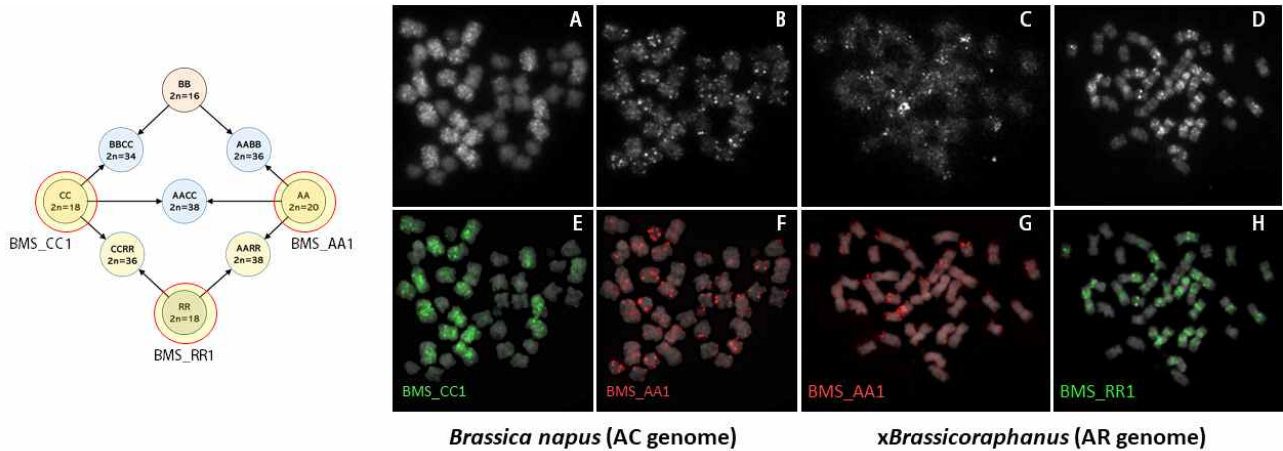


<그림 24> 감수분열 세포에서 배추 및 무 염색체 pairing 양상

- ◎ 교배체 동정을 위한 FISH 탐침 기술 개발 및 배추과 유전체 특이적 마커 개발
- 배추과 유전체 (배추, 양배추, 무) 특이적 microsatellite 마커 제작
  - 배추과 유전체 구별을 위한 GISH 방법은 매우 높은 시퀀스유사성을 가진 염색체 구별에 있어 다소 어려움이 있음. 특히 배추 1번, 2번 염색체와 양배추 1번, 2번 염색체간 시퀀스 유사성이 높아 구별하기 힘들.
  - 이를 위하여 배추과 유전체 (배추, 양배추, 무)를 특이적으로 잡을 수 있는 microsatellite 를 찾았으며, 이를 이용하여 probe 제작함 (표 16). 배추 (A 유전체), 양배추(C 유전체), 무 (R 유전체) 특이적으로 탐지 되는 것 교잡종(유채와 배무채)에서 확인함 (그림 25).

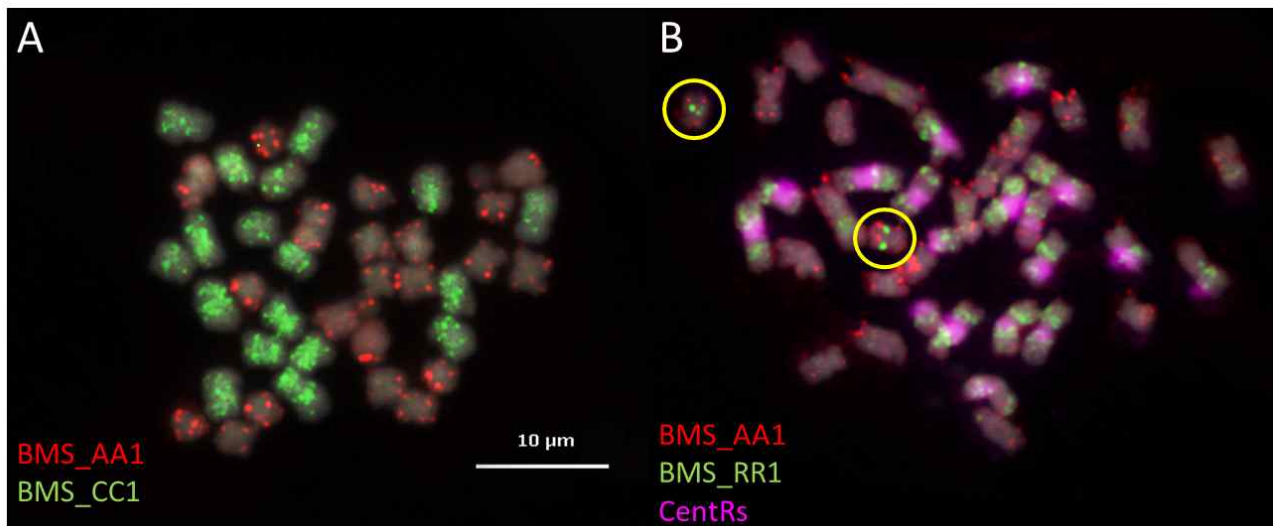
<표16> 배추과 종간 구별을 위한 Microsatellite probes제작 및 그 타겟특이성

Microsatellite probe	Specificity	AA	CC	RR
BMS_AA1	AA	+	-	-
BMS_CC1	CC	-	+	-
BMS_RR1	RR	-	-	+



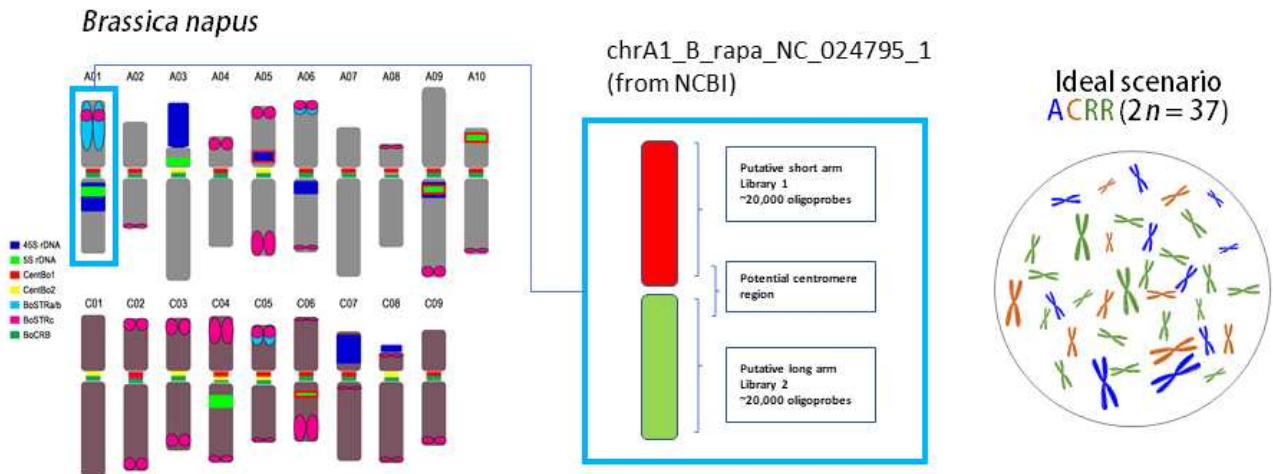
<그림 25> 유채와 배무채에서 배추과 유전체 특이적 microsatellite 마커 탐지.  
 왼쪽패널: 배추과 식물과 그 배수체. 오른쪽 패널: (A-B, E-F) 유채에서의 C 유전체(초록)과 A 유전체(빨강) 탐지. (C-D, G-H) 배무채에서의 A 유전체(빨강) 과 R 유전체(초록) 탐지

- 배추와 양배추가 합쳐진 종인 유채에서는 배추과 유전체 특이적 마커가 잘 분별되는 것을 확인함 (그림26). 배추와 무가 합쳐진 배무채에서도 마커가 잘 구분되나, 약간의 R 유전체 특이적 마커 신호가 A 유전체에서 검출됨.

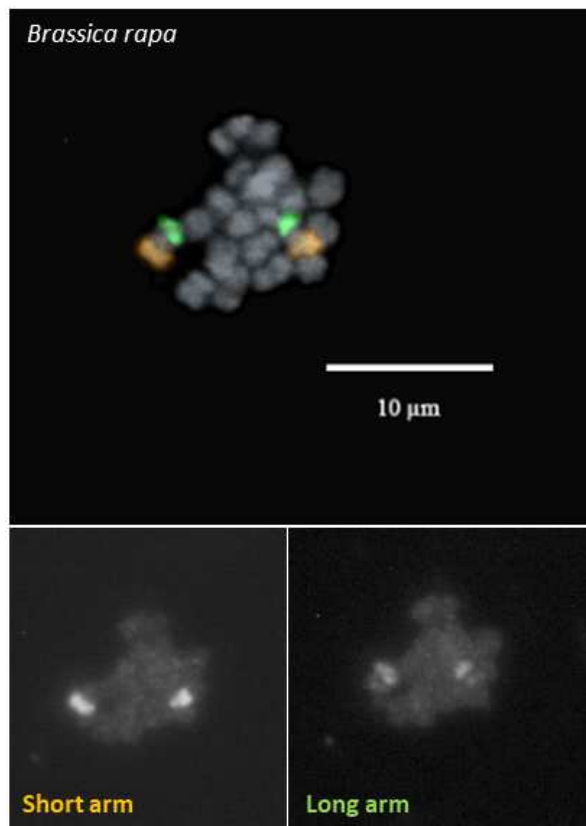


<그림 26> 유채와 배무채에서의 microsatellite 마커 간 분포.  
 (A) 유채에서의 A (초록)와 C (빨강) 유전체 특이적 microsatellite 마커 분포. 잘 나뉘어지는 것이 관찰됨. 약한 R 유전체 특이적 마커 신호가 A 유전체에서 검출됨 (노랑)

- A와 C유전체 구별을 위한 염색체 특이적 형광표지방법을 최적화함. 이 방식을 통해 4배체나 multiple 유전체를 가진 배추과 종에 대한 염색체 구별이 가능해짐 (그림27). 최적화된 올리고형광표지 검정을 위해 배추 1번 염색체의 short arm과 long arm을 빨강과 초록 형광으로 표지하였음 (그림28). 다른 염색체에 대한 더 많은 디자인을 통해 배추과 식물에서의 세포유전학적 분석에 유용하게 사용할 수 있음.



<그림 27> 배추 1번염색체 탐지를 위한 염색체 특이적 올리고표지 설계



<그림 28> 배추 1번 크로모솨의 arm 특이적 FISH 분석. 각각의 특정한 신호가 최적화된 방법대로 잘 검출되는 것을 확인



### 2-3. 바이오브리딩

#### □ 배추 1대 잡종과 무 1대 잡종간 교잡에 의한 신배무채 품종 육성

◎ 배추과 속간 교잡을 통한 신품종 육성

○ 배무채 신품종 육종을 위한 배추F1, 무F1 간 교배 집단 구축

- 연구 재료로 사용할 F1 배추 2 조합과 F1 무 2 조합 (표17) 에 대하여 배추를 모계로 무를 부계로 하여 교잡을 수행하였음. 그러나 무의 16모-137(계통 번호: 박달M-7x 태백M-48)이 화분이 없었음

<표 17> 새로운 배무채 개발을 위한 식물체 내역

모본 번호	계통 명	모본 수	비고
16모-135	C218M-13 x 하감M-50	2	배추
16모-136	CC507 x 볼M-68	2	배추
16모-137	박달M-7 x 태백M-48	2	무
16모-138	KB-68 x 월연 25-9	2	무

○ F1 품종 간 교잡에 의한 잡종배주의 배양

- 화분이 정상적으로 생성된 배추와 무의 F1을 이용하여 2조합을 속간교잡 하였으며 교잡 후 10일 내외에 수행한 배주 배양을 수행함 (표 18).
- 교배 조합별로 5-6회에 걸쳐 전체 546개의 배주를 배양하였으나 처음 배양한 5월 23일과 24일에 배양한 것에서 3개체와 1개체가 자랐을 뿐 그 이후의 배양에서는 전혀 배가 발달하지 않았음. 5월 23일 배양한 경우 4개체, 5월 24일 배양한 경우 3개체가 자랐지만 각각 1개체와 2개체가 중간에 고사하였으며 결국 3개체와 1개체를 획득하였음. 5월 24일 후에는 5월 30일에 배양하였는데 이때부터 지나친 고온으로 배주가 일찍 퇴화하여 식물로 자랄 수 있는 배주가 없었던 것으로 이해됨.

<표 18> F1 품종을 이용한 배주 배양 결과>

조합	배양 회수	배양 배주 수	플라스크 수	식물 수	비고
(C218M-13 x 하감M-50)x (KB-68 x 월연 25)	5	175	30	3 (5/23)	식물 생장 중
(CC507 x 볼M-68)x (KB-68 x 월연 25)	6	371	45	1 (5/24)	식물 생장 중
2조합	11회	546	75	4	-

※플라스크 수 : 종자 꼬투리 수와 동일

○ F1품종의 이용에 의한 새로운 배무채 계통 개발

- 배추와 무의 조합 별로 10립씩 petri-dish에 파종 함(표 19). 발아 직후인 7월 1일 인큐베이터로 petri-dish를 옮겨 저온처리 하였음. 배추의 경우 고온에 의한 탈 춘화 현상이 나타나지 않기 위하여 45일간의 저온처리가 필요한 것으로 알려져 있음. 따라서 인큐베이터의 어린모가 도장하지 않게 0℃ 내외로 관리하였음.
- 식물체를 비가림 온실에서 재배하였음. 9월 하순에 개화하기 시작하여 바로 속간 교잡에 사용하였음. 꽃이 피는 것과 동시에 무의 경우 화분용으로 이용할 꽃가지를 유산지 봉투로 씌워 다른 꽃가루의 혼합을 예방함. 배추의 꽃가지도 유산지 봉투를 씌워 그 속에서 꽃이 피기를 기다린 후 개화와 동시에 이미 핀 꽃은 모두 따버리고 3-5개의 꽃봉오리에 수분하였음. 수분한 꽃봉오리 수와 수분한 날짜를 기록하여 라벨을 그 화지에 매달아 두고 배추 배양에 이용하였음.
- 배추배양 배지는 과거에 이용하였던 B5배지 1L에 NAA, 2.4-D, BAP가 각각 0.1mL가 첨가된 B5M0(자체 기호)라는 고체배지를 이용함. 배지가 만들어지면 100mL 플라스크에 30ml 씩 넣어 응고시키고 한 플라스크에 한 종자꼬투리에서 채취한 배추만을 치상함. 따라서 <표10>의 플라스크 수는 꼬투리 수에 해당함.
- 정상식물로 분화되지 못하고 기형으로 분화한 식물체의 경우, 12월 6일부터 잎 부분을 0.5cm크기로 잘라 계대배양하여 정상식물로 분화시킴
- 1차 실험에서 배가 출현하지 못하는 것을 확인한 후 6월 29일 조합별로 10립씩 Petri-dish에 파종하였음. 배추 2조합과 무 2조합에, 배추 뿌리혹병에 강한 조합을 추가하였음

<표 19> 배추 배양용 모본 파종 내역

파종번호	계통 명	파종량	파종일	비고
17만하-261	C218M-13 x 하감M-50	10립	170629	배추. <u>OV용</u> . <u>직원통</u> . <u>봄용</u>
17만하-262	CC507 x 불M-68	10립	170629	배추. <u>OV용</u> . 양질 <u>가을용</u>
17만하-263	CR291-7M-64 x 휘M-2	10립	170629	배추. <u>OV용</u> . <u>가을용</u> 무모 및 내병성
17만하-264	박달M-7 x 태백 MC-48	10립	170629	무. <u>OV용</u> . 맛 무
17만하-265	KB-68 x 원연 25	10립	170629	무. <u>OV용</u> . 청피홍심

- 발아 직후 저온에서 춘화처리를 거치고 8월 16일 떡잎 상태의 모를 트레이에 이식하여 비가림 온실에서 재배하였음. 9월 하순에 개화하기 시작하여 곧바로 배추를 모본으로, 무를 부계로 교잡하였음(그림 29). 예비실험과 같이 무의 한 조합인 박달M-7 x 태백 MC-48 가 화분을 생산하지 않았음. 웅성불임성에 교잡된 조합이었는데 종자대장에 잘못 기재되어 나타난 것으로 추측됨.
- 배추의 암술과 무의 화분을 보호하여 속간교배를 실시하고 배추배양을 실시함.



<그림 29> 배추배양에 이용된 모본 (좌: 17만하-265, 청피홍심 무. 좌중: 17만하-263. 우중: 17만하-262 우: 17만하-261)

- 3개 조합의 337개 꼬투리에서 얻은 4027개의 배추를 배양하여 약 22.5%인 906개의 배추가 발아하였음(표 20). 조합별로 배 발생률에는 약간의 차이를 보임. CR291M-64x휘M-2 조합은 11.6%로 낮은 반면, CC507x볼M-68 조합은 31.2%로 높았음. 특히 후자의 경우 배추의 퇴화율이 상당히 낮았음.
- 배양된 배추의 대부분은 정상식물로 분화되지 못하고 기형 식물체 또는 캘러스로 분화됨. 기형 식물체의 경우는 잎을 이용한 계대배양을 통해 정상식물로 분화될 수 있으나, 캘러스의 재분화 방법은 추가적인 연구가 필요함.

<표20> 조합별 배추배양 결과

모본 번호	배추(모계)의 계통번호	배양 회수	Flask 수		배양 배추 수	배 발생 수	배 발생 배추 수	
			배양	오염			캘러스 발생	정상 식물수
17만하- 261	C218M-13x 하감M-50	20	63	3	596	137 (23.3%)	32	0
17만하- 262	CC507x 볼M-68	6	118	25	1891	590 (31.2%)	300	2
17만하- 263	CR291M-64x 휘M-2	9	156	8	1540	179 (11.6%)	46	15
3조합		35	337	36	4027	906 (22.5%)	378	17

※부계의 무는 모두 (KB-68 x 원연-25) (청피홍심 무)였다.

( )내의 %는 배양 배추 수에 대한 배 발생 배추 수 임

- CR291M-64x휘M-2와 CC507x불M-68을 모계로 사용한 경우에 적자색의 식물체를 얻을 수 있었음. 화분친으로 이용한 KB-68x원연 25 무의 적자색 잎과 줄기에서 유래한 것으로 추측됨 (그림 30, 31).



<그림 30> 조합별 배 발생 상태



<그림 31> (CR291M-64x휘M-2)x (KB-68x원연 25) 조합의 배 발생 형태

○ 속간잡종 종자의 성숙조합 발견

- 1년차 과제가 시작되자마자 6월 29일 배추 3개 조합과 무 2개 조합을 파종하였음. 싹이 나자마자 여름동안 6월 30일부터 8월 14일까지 45일간 저온처리 함. 9월부터 개화하기 시작하여 배추 3개 F1조합의 수술을 모두 따내고 무 꽃가루로 수분한 후 다른 화분이 못 오게 유산지 봉투를 씌움. 그런데 무의 한 조합은 불성불임으로 꽃가루가 없었음. 부득이 배추 3개 조합과 무 1조합의 전체 3개 속간교잡만 가능하였음 (원래 계획에는 1개 속간교잡만 하게 되어 있음). 이 3개 속간잡종의 교잡 후 10일경에 어린 배추를 배양하는데 기온이 낮아지고 일장이 짧아지는 가을이라 다소 늦은 14~15일경, 즉 2주 후에 미숙배추를 배양토록 함. 교잡과 배추배양을 가능한 한 많이 하도록 하였으며 차질이 안 생기도록 제때에 배양토록 노력함 (표 21).
- 배추배양담당자가 한 조합은 교잡 후 3주, 즉 21일이 자났는데도 많은 배추가 퇴화하지 않는 것을 확인함. 이를 통한 성숙종자를 확보가 가능하다고 판단됨.
- 배추 배양에 관한 결과를 확인한 결과 2017년 10월에 이미 약 2,000개 이상의 많은 배추가 배양됨(표 8). 치상한 배추의 많은 부분이 발아하는 것으로 판단됨(전년도 보고서 4,000개 배추배양→900개 배 획득). 따라서 배추배양을 중지하고 종자가 성숙하는지 그대로 두어보라고 하였으며, 교잡 후 37일이 지난 11월4일 꼬투리를 열어봄. 봄에는 교잡 후 30일 정도면 종자가 익지만 겨울이라 37일까지 둠.
- 종자꼬투리를 조사한 결과 배추의 두 조합 17만하-261x17만하-265 (C218M-13x하감M-50) x (KB-68-1x원연-25-9-1)과 17만하-262x17만하-265 (CC507x불M-68) x (KB-68-1x원연-25-9-1)은 종자 꼬투리의 형태만 남아있는데 반하여 17만하-263x17만하-265 (CR291-7M-64x휘M-2)x(KB-68-1x원연 25-9-1)은 모든 꼬투리가 자라고 있었으며 열었을 때 종자가 들어 있는 것을 확인함(그림 32). 속간잡종 종자가 성숙하는 배추의 한 조합 (CR291-7M-64x휘M-2)을 발견함.

<표 21> 배추와 무 간 속간잡종의 배추 배양 결과

배양일	조합	계통 번호	배양배주 수
2017. 10. 10-11. 7	17만하-261x 17만하265	(C218M-13x하감M-50)-1x (KB-68-1x원연 25)-1	438
	17만하-262x 17만하265	(CC507x불M-68)-1x (KB-68-1x원연 25)-1	926
	17만하-263x 17만하265	(CR291-7M-64x휘M-2)-1x (KB-68-1x원연 25)-1	1,072
계			2,436



<그림 32> 2017년 11월 6일 교잡 후 37일 된 12월 13일의 종자 꼬투리 모양

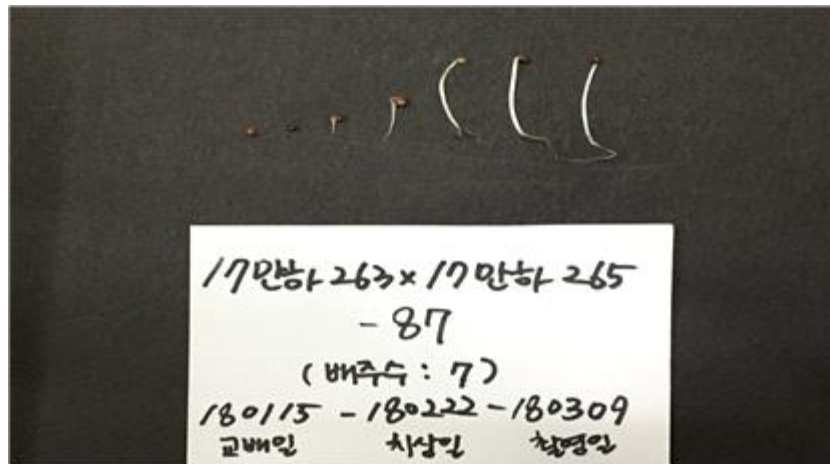
○ 자색을 나타내는 속간잡종의 성숙종자 유래 개체

- 이 꼬투리에서 따낸 종자를 말리지 않고 바로 Petri-dish에 파종하고 25℃ 암 조건에 둠 (11/4). 어떤 꼬투리는 11개정도의 종자가 일단 파종해 볼 수 있을 정도로 생존함. 전체 2개 화지의 11개 꼬투리에서 64개의 종자를 파종하였는데(5.8개종자 / 꼬투리) 발아가 고르지 않았으며 많이 늦었음. 생존한 11개 꼬투리를 구분하지 않고 전체 꼬투리 수와 종자수를 조사하였으며, 이 후부터는 꼬투리 별로 종자수를 헤아려 파종함(표 22, 그림 33).

<표 22> 속간잡종 성숙종자의 발아

성숙 종자 발아	꼬투리 번호	치상 배주 수	발아수	일 별 발아 수 (12월 13일 치상)					
				12/22 9일 째	12/26 13일 째	12/27 14일 째	12/28 15일 째	12/29 16일 째	01/02 19일 째
17만하 263 x 17만하 256  2017.12.13. 치상	1	7	6	5			1		
	2	7	7	4	1				2
	3	5	3	2				1	
	4	8	7	3		1		2	1
	5	9	7	2	1		1	1	2
	6	11	9	2	5		1		1
	7	1	1	1				1	
	8	2	1	1				1	
	9	7	5	5		2		2	1
	10	4	0	0					
	11	3	1	1	1				
계	11	64	47 (73%)	19	9	1	7	4	7

※17만하 263 x 17만하 256 :CR291-7M-64x회M-2



<그림 33> 속간잡종의 성숙종자 파종 후 발아상태

- 파종 후 9일째에 최초로 발아하였으며 19일째까지 발아함. 이를 2월 22일 치상하였는데 15일이 지난 3월 9일에도 가장 많이 자란 포기의 본 잎이 나오지 않았으며 바로 전날 발아한 것도 있었음. 발아가 늦은 원인이 속간잡종이기 때문인지, 또는 말리지 않고 꼬투리에서 따낸 종자를 바로 파종하였기 때문인지 판단하기 어려움. 전체적으로 48개체가 발아하여 75%의 발아율을 보임(1차). 그런데 발아한 식물체가 매우 연약한 것을 확인함. 48개체를 모두 흙으로 이식하였으나 1/4인 12개체가 죽고 결국 36개체만 생존함.
- 그 후 2차, 3차 등 12월 21일까지 6차례 파종. 전체 80꼬투리에서 432립의 종자를 교잡

후 37일~40일째에 파종. 평균 꼬투리 당 5.4립의 성숙종자를 파종한 것임. 그 중 313립이 발아하여 파종 립 수의 약 72%가 발아하였는데 모두 발아가 늦은 것을 확인함. 이 313개체 중 살아남은 것은 242주로, 많은 종자가 발아하였는데 모두 이상할 정도로 배축이 가늘고 약한 것을 확인함(그림 34). 혹시 반수체이기 때문인가 하여 본 엽 4장 때에 모두 콜히친을 생장점에 3일간 처리하였는데 그 후 자라는 모양이 비교적 튼튼한 것을 확인함. (그림 35).

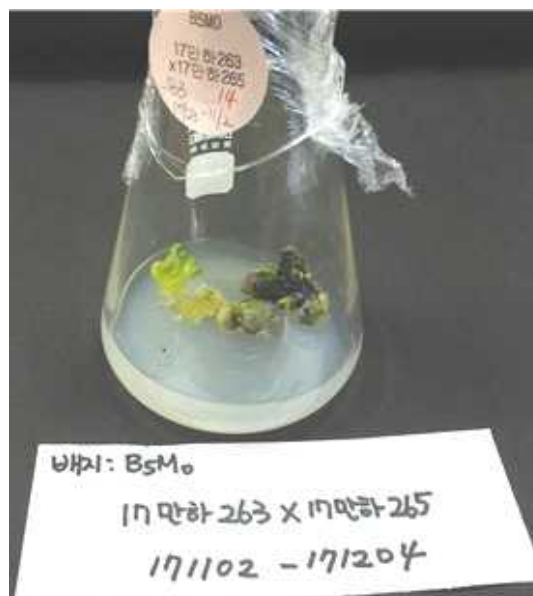


그림 34. 속간잡종모의 모습  
(본 엽이 2장 쯤 나오고 있는데도 모가 아주 약함.)



<그림 35> 속간잡종 성숙종자 식물의 colchicine 처리 후 식물체 모습

- 속간잡종 278개체(11/4 파종한 36개체 포함)의 모든 개체가 생장점 부근에 자색을 나타냄 (그림 34, 35). 이 조합의 어린 배주를 배양하였을 때는 초록색 식물과 자색식물이 같이 나타남 (그림 36). 배추는 양친이 모두 초록색인 F1이고 무는 양친이 자색형질을 가진 F1이었음.



<그림 36> 어린 배주배양에서 유도된 식물체

- 성숙종자 파종의 모든 개체가 어느 정도 자란 후 자세히 관찰하면 잎 모양이 다르고 자색정도의 차이를 확인함(그림 37) 서울대학교에서 1차로 파종한 것 중 28개체의 잎을 sample로 채취한 후 마커를 만들어 검정한 결과 개체간의 차이가 있음을 검정함(앞의 그림 4 및 표 8 참조).



<그림 37> 17만하-263x17만하-265(CR291M-64x휘M-2) x 만하 265(KB-68x원연-25)의 성숙종자 유래 개체의 잎 모습. 62번의 한 꼬투리에서 유래된 종자의 식물체

○ 처음 나타난 빨간색 꽃 속간잡종

- 지금까지 속간잡종은 모두 흰 꽃임. 무와 양배추 간 잡종인 무양채 및 잎이 진한 자색의 자색배무채도 꽃은 흰 색임. 하지만 이 시험의 잎이 자색인 개체가 흰색이 아니고 모두 자색과 유사한 표현형을 보임(그림 38).



<그림 38> 신 육성 속간잡종  
17만하-263x17만하-265 (CR291M-64x휘M-2) x (KB-68x원연 25)

○ 녹색표현형을 보이는 성숙종자 유래 개체

- 성숙된 종자가 발아할지 궁금하여 우선 급하게 식물체에서 따낸 꼬투리를 말리지 않고 바로 열어서 젖은 종자를 파종한 경우 300개체 이상이 모두 자색을 보이며 자색 꽃을 피우는 개체임을 확인함 (그림 36, 38).



- 일반 작물처럼 종자를 말려 조제하였는데 전체 276협에서 305립의 종자를 수확함(7월 중순까지).
- 1차로 8월 16일 127립을 파종하였는데 99립이 발아하여 약 78%의 발아율을 보임. 2차로 178립을 8월 29일 파종하였는데 155립이 발아하여 약 87%의 발아율을 보임. 전체 305립 중 254립이 발아하여 약 83%이 발아율을 보임. 이들은 종자를 말리지 않고 파종하였을 때처럼 발아가 많이 늦지 않았음.
- 1차의 99주 중 녹색체가 15주 있었으며 2차의 155주 중 10주가 확인됨 (그림 39). 전체 발아한 254주 중 25주, 약 10%가 녹색 주로 확인됨 (표 23). 녹색주가 자색 주보다 생장이 왕성함 (그림 40). 말리지 않은 종자는 모두 자색만 나타났는데 말린 후에는 약 10% 정도의 녹색주가 나타나는 것을 확인함.



<그림 39> 17만하-263x17만하-265의 마른 종자 파종에서 나타난 초록색 포기(왼쪽)와 자색포기(오른쪽)

<표 23> 성숙하여 말린 숙간잡종 (17만하-263x17만하-265)의 파종 결과

차수	파종 립 수	파종일	발아 수	자색 주	녹색 주	비고
1차	127	2018.8.16	99(78%)	84	15	연약하지 않음
2차	178	2018.8.29	155(87%)	145	10	연약하지 않음
계	305	-	254(83%)	229	25	

※생장점 부근에 조금이라도 자색이 있으면 자색주로 판정함



<그림 40> 배추의 녹색인 목색 주와 자색인 자색주의 성장상태

○ 배추의 다른 두 조합은 주로 흰꽃을 피우는 녹색체

- 배추의 3개 조합 중 속간잡종 종자가 성숙하지 않는 두 조합이 확인됨. 17만하-261 (C218M-13 x 하감M-50)과 17만하-262 (CC507 x 불M-68)은 17만하-263 (CR291M-64 x 휘M-2)과 동일한 무 17만하-265 (KB-68-1 x 원연-25-9-1)가 교잡되었는데 종자가 성숙하지 않음. 성숙종자가 발견되기 이전에 많은 량의 배추가 배양되었으므로(17만하-261= 438개, 17만하-262= 926개) 이들 중 일찍 배양하여 온실에서 서 자라는 개체가 있는데 대부분 녹색체였으며 흰 꽃이 피움 (그림 41).



<그림 41> 17만하-263 x 17만하-265의 자색 꽃(왼쪽)과 17만하-262 x 17만하-265의 흰 꽃(오른쪽)

○ 소포자 돌연변이 유도과 형질의 분리 (예비 시험 결과)

- 1년차 예비시험의 배주배양 중 16모-135 x 16모-138 { (C218M-13 x 하감M-50) x (KB-68 x 원연 25) } 에서 3개체, 16모-136 x 16모-138 { (CC507 x 불M-68) x (KB-68 x 원연 25) } 에서 1개체 등 4개체가 자라고 있다고 보고함.
- 2년차 시험을 진행하는 중 16모-136 x 16모-138 { (CC507 x 불M-68) x (KB-68 x 원연 25) } 의 한 개체는 중도에 죽고 16모-135 x 16모-138 { (C218M-13 x 하감M-50) x (KB-68 x

원연 25) } 의 3개체가 생존하여 소포자 돌연변이에 공시함. 이들 3주는 모두 초록색이었고 꽃이 흰 색임 (그림 42).



<그림 42> 배추와 무간 속간잡종 (16모 135 x 16모 138)-2의 개화모습

- 이 중 2번 개체 (16모 135 x 16모 138)-2가 소포자 배양이 잘 되었으며, 2018년 봄 2월에서 5월 말까지 소포자 돌연변이를 유도하여 배가 식물로 분화하여 21개체를 확보함 (표 24). 이들은 모계처럼 모두 줄기와 잎이 초록색을 나타내고 있으며 모두 흰 꽃임.

<표 24> 16모-135(배추 F1) x 16모-138(무 F1) 의 배추배양 유래 개체의 소포자 돌연변이 배양 결과 (181008)

구분	(16모 135 x 16모 138) - 1	(16모 135 x 16모 138) - 2	(16모 135 x 16모 138) - 3
소포자 돌연변이 배양 횟수	7	11	6
소포자 배 발생 수	1회 2개 2018. 4. 25	6회 381개 2018. 2. 22~2018. 5. 31	2회 13개 2018. 2. 26
순화 식물체 수	1	259	3
현존 식물체 수	1(녹색)	21(녹색)	2(녹색)

※ 16모 135 x 16모 138 : (C218M-13x하감M-50) x (KB-68-1x원연 25-9-1)

○ 속간잡종의 자가수정 종자 생산과 소포자 배 발생의 비상관성

- 종자를 말리지 않고 파종한 모든 개체가 자색을 나타냄. 1차로 2017년 11월 4일에 파종하여 자란 36개체가 꽃이 피기 시작하였는데 모두 지금까지 보지 못한 자색 꽃을 피움 (그림 38). Colchicine을 어린 모 때에 처리하였지만 혹시 화분이 생산 안 되는 포기가 있는지 관찰하였는데 모든 개체가 많은 화분을 생산함. 자가 수분 이후 개체에 따라 종자가 잘 열리는 개체가 있고 종자가 열리지 않은 개체를 확인함(표 25, 그림 42).

<표 25> 속간잡종의 성숙종자 1차 파종 식물의 착협 개체

총 개체 수	착협 주	고사 주	불임 주	기타
36	20	2	10	4



<그림 42> 속간잡종의 자가수분 후 열린 종자꼬투리

- 종자꼬투리가 열리는 개체만 소포자 돌연변이 유도용 소포자를 배양함(자가수정 종자가 열리지 않으면 소포자 배양도 안 되는 것으로 알고 있었음). 날마다 다른 포기의 소포자를 배양하였는데 처음에는 1차 파종한 36개체를 대상으로 배양하였지만 후기에는 꽃이 핀 2-4차의 포기들도 배양함. 전체 24개체(24회)의 소포자를 배양할 수 있었는데(돌연변이 제 NMU처리) 3 개체 (3회)를 제외한 21개체가 배를 생산함. 1차의 9개체 및 2-4차의 15개체를 배양하였는데 1차 파종의 9개체에서 7개체, 2-4차의 15개체에서 14개체가 배를 생산함.
- 소포자를 배양한 개체 중 17만하 263x265의 소포자 배양 유래 개체가 4개체 확인됨. 이들은 모두 자가수분 종자를 생산하지 않았으며 소포자 배양에 한 개체를 공시하였는데 배를 생산하지 않음(표 26).
- 20개의 배양접시 전체에서 배가 3개, 4개, 4개, 4개, 15개, 17개밖에 생산되지 않는 개체 6주가 확인됨. 다른 15주는 65개 이상 350개까지 상당히 많은 배가 출현함. 전체적으로 2,658개의 비교적 많은 배가 출현함. 자가수분 후 종자가 열리는 것을 조사한 결과 31개체가 종자 꼬투리를 달고 있는 것으로 판정됨 (그림 20). 이를 소포자 돌연변이의 배 출현과 비교하였는데 7주가 일치하였으며 배가 출현한 14개체는 자가수정의 종자꼬투리가 없는 것으로 나타남.

<표 26> 속간잡종의 성숙종자를 파종하여 얻은 개체 중 소포자 돌연변이유도시험의 배 발생과 착협과의 관계

개체 번호	배양일	Petri-dish 수	착 협 여부	발생 배수
(17만하 263 x 17만하 265)-1~16-12	180608	20	※	80
(17만하 263 x 17만하 265)-1~16-15	180608	20	※	-
(17만하 263 x 17만하 265)-1~16-17	180521	20	※	-
(17만하 263 x 17만하 265)-1~16-3	180522	19	※	100
(17만하 263 x 17만하 265)-1~16-30	180528	20	※	110
(17만하 263 x 17만하 265)-1~16-35	180524	20	Non	70
(17만하 263 x 17만하 265)-1~16-5	180522	19	※	320
(17만하 263 x 17만하 265)-1~16-7	180524	20	※	350
(17만하 263 x 17만하 265)-1~16-8	180521	20	※	65
(17만하 263 x 17만하 265)-17-1	180528	14	Non	15
(17만하 263 x 17만하 265)-21-1	180530	20	※	234
(17만하 263 x 17만하 265)-22-4	180530	20	Non	295
(17만하 263 x 17만하 265)-24-3	180604	20	Non	101
(17만하 263 x 17만하 265)-24-4	180530	20	Non	184
(17만하 263 x 17만하 265)-24-7	180530	20	Non	265
(17만하 263 x 17만하 265)-26-2	180601	20	Non	4
(17만하 263 x 17만하 265)-26-4	180601	20	Non	4
(17만하 263 x 17만하 265)-28-7	180601	20	Non	3
(17만하 263 x 17만하 265)-30-2	180601	20	Non	4
(17만하 263 x 17만하 265)-36-3	180627	20	Non	99
(17만하 263 x 17만하 265)-46-1	180620	19	Non	230
(17만하 263 x 17만하 265)-54-1	180627	20	Non	17
(17만하 263 x 17만하 265)-60-3	180604	20	Non	108
(17만하 263 x 17만하 265)-91-1 ov	180620	20	Non	-
계	5/21~6/27	480	-	2,658

※(17만하 263 x 17만하 265)-1~16-12: 1~16=종자꼬투리 번호. -12= 개체번호.

ov= ovule culture. 종자꼬투리 번호 46번-60번= 3차 파종 (2018. 01. 26)

청색: 순화 종료하여 온실에 소포자 유래 개체가 자라고 있는 것

○ 종자꼬투리의 종자 미발생

- 종자꼬투리가 달려있는 화지를 수확하여 일반식물과 마찬가지로 말려 조제하였는데 꼬투리 속에 종자가 발생하지 않음. 저온처리 하여 개화중인 속간잡종 식물체가 200주 이상 있으며 (그림 40), 식물체 간 교배를 통해 저온기임으로 자가 수정종자가 생기는 개체가 있을 것으로 기대한다.

○ 속간잡종의 소포자 돌연변이 유래 개체의 특성

- 소포자 돌연변이 유도 개체들은 배추 F1과 무 F1간의 교잡에 의한 개체의 후대이므로 일종의 F2 (속간잡종인 자색개체)를 배양한 것임. 일종의 F3에 해당함으로 특성이 분리하여 나타날 것이며 각각의 개체마다 다른 유전자를 가질 것으로 예상됨. 이 소포자 돌연변이 유래의 배 중 식물 순화에 성공하여 온실에 재배 중인 개체가 7개체(속간잡종) 유래 140 개체를 확보함(표 27). 자색식물을 소포자 배양한 것인데 16개체가 녹색이었으며 남은 124주가 자색을 나타내었다 (그림 43). 자색 주와 녹색 주의 비율이 성숙종자를 파종하였을 때는 254:25로서 약 10:1이었는데(성숙하여 말린 종자) 소포자 배양에서는 124: 16으로 대략 8:1로 자색주의 비율이 다소 준 것처럼 확인됨.

<표 27> 속간잡종의 성숙종자 유래 개체의 소포자 돌연변이 유도 식물의 개체 수

계통 명	개체번호	개체 수	자색 주	녹색 주
(17만하 263 x 17만하 265)	1~16-7	17	17	0
“	1~16-12	6	6	0
”	1~16-30	7	5	2
“	22-4	33	29	4
“	24-3	23	23	0
“	24-7	39	29	10
“	60-3	15	15	0
계	7 개체	140	124	16



<그림 43> 배추 F1조합과 무 F1조합(17만하-263x17만하-265)의 교잡 후 자색 주를 소포자 돌연변이한 개체 중 자색 주(왼쪽)와 초록색 주(오른쪽)

○ 생장점 부근의 자색과 자색 꽃 형질간의 연관성

- 자색을 나타낸 17만하-263x17만하-265 포기의 꽃은 모두 자색 꽃을 피움. 현재까지의 여러 상황을 종합해 보면 줄기 색(자색)과 꽃 색이 연관되어 있다고 판단됨. 잎은 완전히 초록색인데 엽맥만 자색인 포기도 처음으로 나타나서 그 꽃 색이 궁금하지만 일단 줄기 색과 꽃 색은 연관되어있는 것으로 추측됨. 줄기 색이 꽃 색의 유전 마커로 이용될 수 있다고 판단됨.

○ 속간교잡 종자가 영그는 표현형의 우성적 발현

- 속간잡종의 종자가 성숙하고 그들이 좀 늦지만 발아하는 한 조합(CR291M-64 x 휘M-2)을 보는 순간(12월 하순) 이 조합의 두 양친 CR291M-64과 휘M-2 중 어느 것 때문에 이런 현상이 나타났는지 궁금하였음. 배추의 3개 조합에 동일한 무가 교잡되었지만 다른 속간잡종은 종자가 성숙하지 않았으므로 무가 잡종종자를 성숙시키는 것 같지는 않음. 따라서 배추의 종자가 성숙하였던 (CR291M-64 x 휘M-2)과 그 양친 CR291M-64과 휘M-2, 그리고 이들 계통이 교잡된 각 두 조합 등 2개 순계 및 5개 조합을 2018년 1월 4일 무의 2계통과 함께 파종하였고, 무는 앞의 것과 동일한 KB-68x원연-25 및 계걸무를 파종함 (표 28).

<표 28> 종자성숙 속간잡종의 친 및 조합별 검정 (180103설계)

과종번호	계통 명	특징	비고
18과제-150	CR291M-64 x 휘M-2	F1	기존 조합 무모 및 내병성
151	CR291M-64	친	무모 및 내병성 계통
152	휘M-2	친	포피, 양질 계통
153	CR291M-40 x 휘M-2	F1	휘M-2 조합
154	휘M-2 x CR68M-107	F1	“
155	CR291M-64 x CR291M-96	F1	CR291M-64 조합
156	CR291M-180 x CR291M-64	F1	“
157	CR291M-126 x 경3B-1	F1	전혀 새로운 조합
158	KB-68 x 원연-25	무	무. 기존 F1조합
159	계걸무. 05-80-14B-1-1-1(⊗)	무	무. 신 순계

※ 배추 계통 및 조합 (2계통 6조합) 별 20화정도 재운 후 두 개의 무 조합 및 계통과 교잡.

※ 종자 성숙 후 수확 조제

- 처음과 동일하게 CR291M-64 x 휘M-2는 모든 종자꼬투리가 잘 열림. CR291M-64와 이 계통이 교잡된 2개 조합도 모두 꼬투리가 자라고 있었으며 꼬투리 속에 종자가 영금 (그림 44). 그러나 휘M-2와 이 계통이 교잡된 2개 조합은 모두 꼬투리가 교잡 후 15일경부터 자라지 않음. 일부 종자꼬투리가 달려있기는 하였지만 가늘고 짧아 (정확하게 측정하지는 않았음) 종자가 그 속에 있는 것 같지 않음. 대체로 CR291M-64의 순계 또는 3개의 F1 잡

종은 74% 이상 100%의 착협율을 보임. 그러나 휘M-2의 순계 및 이 계통이 교잡된 F1조합은 43% 미만의 착협율을 보임 (표 29).

<표 29> 종자성숙 속간잡종의 친 및 조합별 착협 상태

과종 번호	계통 명		부계 (교배 화 수/착협 수)		
			KB-68 x 원연-25	계걸무	계
18과제-150	CR291M-64 x 휘M-2	모계	17/16	36/36	53/52 (98%)
151	CR291M-64 -1	친	26/26	29/24	55/50 (91%)
152	휘M-2-14	친	25/6	34/9	59/15 (25%)
153	CR291M-40 x 휘M-2	부계	26/4	39/7	65/11 (17%)
154	휘M-2 x CR68M-107-4	모계	23/10	30/13	53/23 (43%)
155	CR291-7M-64 x CR291-7M-96	모계	24/24	26/26	50/50 (100%)
156	CR291-2M-180 x CR291-7M-64	부계	27/20	26/19	53/39 (74%)
157	CR291-7M-126 x 경3B-1	신 조합	25/23	23/14	48/37 (79%)
계	-	-	193/129	243/148	436/277 (64%)



<그림 44> 18과제-151(CR291M-64)의 착협 모습



- CR291M-64계통 때문에 종자꼬투리가 열린 것으로 판단됨. CR291M-64계통이 교잡된 3개 조합의 경우 모 또는 부계에 관계없이 속간잡종 종자가 모두 영그는 현상을 나타냄. CR291M-64 계통이 속간교잡에서 종자를 영글게 하는 우성의 성질을 가진 것으로 판단됨.
- 배추와 무간 속간교잡에 있어서 교잡 후 약 10일정도 자란 배추를 적출하여 배양하는 일이 쉽지 않음. 속간잡종을 육성하려는 많은 경우 배추배양에 실패하여 이것이 큰 부담으로 작용함.

○ CR291M-64의 성숙 종자 생산능력의 우성적 발현

- 배추 30 계통과 무 4 계통 (18모-1~34)을 2018년 6월 20일 1차로 파종함. CR291M-64가 속간잡종의 종자를 성숙시키므로 이와 함께 소포자 배양으로 얻은 계통(형제계통)에 대하여 그 성능을 알고자 함. CR291M-64 계통이 2008년에 04-33-3-1OP-13M-7 x VCS3M-291을 소포자 배양하여 2009년에 채종하였으므로 그때 CR291M-64과 같이 생산된 계통을 중심으로 파종함. 계통 당 10 알 씩 파종하였는데 10년 전에 채종된 것이므로 발아율이 아주 낮아 9 계통만 발아함. 발아한 계통은 모두 제웅 후 무와 교잡함.
- 국립원예특작과학원이 대만의 아시아채소연구개발센터(AVRDC)에서 배추 바이러스병(TuMV-4) 내병성 계통을 1980년대에 도입함. 유럽연합(EU)에서 배추 뿌리혹병의 표지 식물로 이용하는 4가지 식물 중 어떤 뿌리혹병균에도 이병되지 않는 완전한 내병성 재료를 가지고 있었음. 이 두 배추 계통을 교잡하여 바이러스 병에도 강하고 뿌리혹병에도 강한 계통을 육성하고자 모본용으로 기르고 있는 것 (원예20079 x ECD04)을 2004년에 두 포기 도입함(도입번호 04-33-3). 그리고 시기적으로 교배하기에는 좀 늦었으므로 자가수정되도록 봉투를 씌워 그대로 둠.
- 처음에 도입하여 자가수분된 04-33-3 (BR 079xECD-4)-1op는 2004년에 채종되었지만 발아 상태가 좋았으며(10입 중 7주 발아) 그중 5포기만 남기고 2주는 폐기함. 꽃이 필 때까지 관찰한 결과 5포기의 포기마다 특성이 다름. 각각의 개체마다 증식하면서 무 18모-29 (KB68 x 원연 25)-1와 교잡함. 그 결과 3번 개체가 한 알의 속간잡종을 생산함 (표 25). 이로써 CR291M-64의 조상이라 할 수 있는 계통이 무와의 속간잡종 종자를 생산하였음. 즉 CR291M-64의 성숙 종자 생산능력은 조상으로부터 이어진 것으로 판단됨. 이 계통 04-33-3 (BR 079x ECD-4)-1op 은 다른 계통 VCS3M-291과 교잡된 후 소포자 배양으로 CR291M-64가 육성된 것이므로 사실상 CR291M-64의 시조라 할 수 있는 계통임. 이후 04-33-3-1OP-13M-7xVCS3M-291을 CR291M로 개명함. 이를 소포자 배양에서 유래한 개체 번호를 뒤에 붙여주었으며, 소포자 배양에서 유래한 (04-33-3-1OP-13M-7 x VCS3M-291)-64는 CR291M-64가 됨. VCS3M-291이 교잡되기 이전의 04-33-3-1OP-13M-7는 앞의 도입번호 세 자리를 생략한 1OP-13M-7, 또는 ECD-13M-7로 표시함.
- 다음으로 속간잡종의 종자를 성숙하게 하는 계통으로 CR291M-5를 들 수 있으며 3종의 무 품종과 교잡함 (표 30). CR291M-96은 무의 18모-30(태백M-48 x 박달M7)-1 와 교잡되어 성숙 종자를 생산함. 18모-34 (CR291M-64)는 무려 8가지 무 조합, 계통 또는 품종과 교잡되어 성숙 종자를 생산함. 성숙 종자를 생산하는 계통은 다양한 무 계통 또는 F1 조

합과 교잡할 수 있음을 알 수 있으며, 전체적으로 4계통의 113개 화지에 교잡하여 257입의 종자를 생산함.

<표 30> CR291M-64 유사계통의 속간잡종 성숙 종자 생산(1차 파종)

교배번호	계통명	조제번호	화지 수	종자 수	비고
18모1-3 x 18모29-1	04-33-3 (BR 079xECD-4)-op-3 x(KB68x 원연 25)-1	19모-160	1	1	제응
18모16-1 x 18모29-1	CR291M-5-1 x (KB68x 원연 25)-1	19모-175	3	18	제응
18모16-1 x 18모30-1	CR291M-5-1 x (태백M-48x박달M7)-1	19모-172	1	11	제응
18모16-1 x 18모67-2	CR291M-5-1 x 冬도리 성호원-2	19모-173	1	3	제응
18모24-2 x 18모30-1	CR291M-96-2 x (태백M-48x박달M7)-1	19모-180	1	1	제응
18모34-1 x 18모29-1	CR291M-64-1 x (KB68x 원연 25)-1	19모-77	18	33	제응
18모34-1 x 18모30-1	CR291M-64-1 x (태백M-48x박달M7)-1	19모-48-2	15	34	제응
18모34-5 x 18모31-2	CR291M-64-5 x KB-68-5-2-1-10-2	19모-131-3	6	11	제응
18모34-4 x 18모32-3	CR291M-64-4 x 원연25-1-9-3	19모-119-1	17	27	제응
18모34-1 x 18모66-2	CR291M-64-1 x 무원교 39호-1-2	19모-73	4	5	제응
18모34-1 x 18모67-2	CR291M-64-1 x 冬도리 성호원-2	19모-41-1	24	86	제응
18모34-2 x 18모69-1	CR291M-64-2-2 x 早太리 聖護院 -1	19모-66-1	19	38	제응
18모34-2 x 18모70-1	CR291M-64-2 x 40일 무. 06-80-62-2-1-1	19모-67-2	3	7	제응
계	배추 4, 무8	-	113	275	

- 1차 파종에서 받아율이 좋지 않았음. 재파종할 종자가 없으므로 1차 파종에서 받아한 계통, 그 계통과 교잡된 F1, F1의 상대 친, 그리고 일본에서 속간잡종의 성숙 종자가 얻어진다고 보고된 배추와 무 (양친), 한국의 순무(강화도에서 수집), 그리고 무 5 계통 등 38 계통 (18모-35-72)을 가장 최근의 종자로 2018년 7월 3일 (약 2주 후) 파종함 (표 31). 먼저 CR291M-64는 파종된 3개 F1 조합 모두 성숙 종자를 생산함 (표 31). 이를 통해 속간잡종의 성숙 종자를 생산하는 CR291M-64의 능력이 우성이라는 사실을 밝힘. 세계 최초로 속간잡종의 성숙 종자를 생산하는 우성 계통을 발견한 것임.
- CR291M-66, CR291M-96 x CR291M-180 및 CR경M-90 x CR291M-126도 무와의 속간교잡에서 성숙 종자를 생산하였음. 그러나 각각의 계통은 CR291M-66를 제외하고 4개의 계통

모두, 즉 CR291M-96, CR291M-180, CR경M-90, CR291M-126 는 성숙 종자를 생산하지 못함. 이는 제웅 후 교잡하는 과정에서 문제가 발생한 것으로 사료됨.

- 우리 강화도에서 수집한 순무도 3개의 무 품종 또는 F1 조합과 교잡되어 성숙 종자를 생산함. 이 역시 다양한 무 품종과 교잡될 수 있음을 나타내고 있다. 일본에서 속간잡종의 성숙 종자가 생산된다는 순무와 무 (Tonosaki et al 2013)와의 교잡에서도 역시 성숙 종자를 생산함 (순무, 聖護院大丸蕪-1 x 동도리 성호원)-1. 이로써 속간잡종의 종자가 성숙하는 배추류의 F1 조합 5개, 계통 3개를 확보함.

<표 31> CR291M-64 유사계통의 속간잡종 성숙 종자 생산 (2차 파종)

교배번호	계통명	조제번호	화지 수	종자 수	비고
18모36-2x 18모29-1	(CR291M-64xC218M-13)-2 x (KB68 x 원연 25)-1	19모-241	2	7	제웅
18모36-2 x 18모30-1	(CR291M-64xC218M-13)-2 x (태백M-48x박달M-7)-1	19모-243	3	12	제웅
18모37-1 x 18모29-1	(CR291M-64x경3B-1)-1 x (KB68x 원연 25)-1	19모-246	1	2	제웅
18모37-2 x 18모30-3	(CR291M-64x경3B-1)-2 x (태백M-48x박달M7)-3	19모-247	1	14	제웅
18모38-2 x 18모30-3	(CR291M-64x그린M-2)-2 x (태백M-48x박달M7)-3	19모-249	1	1	제웅
18모42-2x 18모29-1	CR291M-66-2 x (KB68 x 원연 25)-1	19모-252	1	1	제웅
18모46-1 x 18모30-2	(CR291M-96xCR291M-180)-1 x (태백M-48 x 박달M-7)-2	19모-257	1	1	제웅
18모56-1 x 18모30-1	(CR경M-90xCR291M-126)-1 x (태백M-48 x 박달M-7)-1	19모-261	1	2	제웅
18모68-1 x 18모67-1	(순무)聖護院大丸蕪-1 x 동도리 성호원-1	19모-270	1	1	제웅
18모72-1 x 18모31-2	2순-50-1 x KB-68-5-2-1-10-2	19모-289	1	3	제웅
18모72-2 x 18모30-1	2순-50-2 x (태백M-48-2x박달M7-3-1)-1	19모-290	1	1	제웅
18모72-1 x 18모67-2	2순-50-1 x 동도리 성호원-2	19모-291	1	8	제웅
계	12 조합		15	53	

○ CR291M-64 x 휘 M-2 교배에서 CR291M-64의 경모 개체 발생

- 속간잡종의 조합 3개를 무 한 계통과 함께 2018년 8월 16일에 파종함 (표 32). 파종번호 18모-201 { (CR291M-64x휘 M-2)-1 x (KB-68x원연 25)-1 } 은 성숙한 속간잡종 종자를 일반 작물처럼 말려 조제하고 파종한 것임. 전체 276 협에서 305입의 종자를 수확하였으며 이들을 모두 파종함. 속간잡종 배추x 무 (CR291M-64x휘 M-2)-1 x (KB-68x원연 25)-1 조

합은 배주 배양도 충분히 되어있고 성숙한 종자를 말리지 않고 파종하여 254주가 받아함. 그중 25주, 약 10%가 녹색 주로 확인됨. 혹시 녹색 주는 염색체가 이미 2배로 늘어난 이질4배체(복2배체)이고 자색 체는 이질2배체(반수체)인가 하는 의문이 생김. 말리지 않은 종자는 모두 자색만 나타났는데 말린 후에는 약 10% 정도의 녹색 주가 나타나고 이 녹색 주가 세력이 왕성하여 의문을 가지지 않을 수 없음. 이후 마커검정을 통해 녹색개체들은 자가수정 혹은 일종의 경모 개체(matromorphic plants, matroclinal diploid), 무배생식(apomixis), 위수정(pseudogamy), 처녀생식(parthenogenei)에 의한 것으로 추정되며, 자색체는 CR291M-64와 무의 F1으로 판단됨. 경모 개체는 난세포의 염색체가 화분의 영향을 받아 2 배체로 된 것이 아님. 국립원예특작과학원의 초창기 1950년대에는 감수분열이 끝난 난세포가 주변 화분의 영향을 받아 2배체로 되었다고 생각하였지만, 1978년 대만에 있는 아시아채소연구개발센터 (AVRDC)에서 연구하여 발표한 내용을 보면 ‘경모 개체’라는 것이 반수체의 난세포에서 유래되어 어느 시기에 염색체가 2배로 늘어난 순계가 아니고 주변의 다른 2n 조직에서 유래하였다는 것으로 밝혀짐 (Opena and Lo, 1978). 만일 모본의 유전자 조성이 잡다하면 (heterogeneous) 얻어진 경모 개체의 후대는 형질이 분리할 것이며 만일 순계였다면 (homogeneous) 동일 유전자 조성이 유지될 것임. 이 시험에 이용된 CR291M-64는 소포자 배양으로 얻은 순계이므로 초록색을 보인 개체의 형질이 분리하지 않고 모두 동일하였던 것이다. 이러한 경모 개체에 대한 사실과 CR291M-64의 내력을 알고 있었으므로 이 계통 CR291M-64를 순계를 파종한 것처럼 주변에 있는 각종 무와 교잡함(표 33). 이 경모 개체의 초기 초세가 잡종보다 강하게 나타난 사실, 즉 자식열세가 극단적으로 나타나는 순계 (inbred)인데 배추x무의 속간잡종보다 초기 세력이 강하다는 것을 확인함.

<표 32> 3차년도 시험용 파종 대장 (파종일: 180816)

파종번호	모본 번호	구분	계통 명	조제번호	파종 량
18모-201	17만하263-1x 17만하 265-1	배추x무 속간잡종	(CR291M-64x휘 M-2)-1 x (KB-68x원연 25)-1	18만하-99 등	305입
202	18과제157-1x 18과제159-1	배추x무 속간잡종	(CR291M-126x경3B-1)-1 x 계걸무.05-80-14B-1-1	18과제- 44	2입
203	18과제151-1x 18과제 267-2	배추x 순무	CR291M-64-1-1 x 聖護院大丸蕪- 2	18과제- 71-73	5입 36/6
204	16무모-706-1	CR대근	07-80-209-1-1(⊗) 앞이 크고 많은 계통 입	17무모-6	5입

<표 33> CR291M-64 유사 계통의 속간잡종 성숙 종자 생산

교배번호	계통명	조제번호	화지 수	종자 수	비고
18모201 x 18무추1-1	CR291M-64-1x 16-80-101-4(태백M33) -1	19모-454	1	8	8.0
18모201 x 18무추8-1	CR291M-64-1 x 원연 28-1	19모-316	2	7	
18모201 x 18무추10-2	CR291M-64-1x 상아백-97-1-1(⊗)RP-2	19모-424	3	12	
18모201 x 18무추13-1	CR291M-64-1 x 40일8 62-2- 1-1	19모-456	1	4	
18모201 x 18무추15-1	CR291M-64-1 x 07-80-200-1-2(冬도리大藏(백수)-1	19모-457	1	2	
18모201 x 18무추17-1	CR291M-64-1x 07-80-202-1-1(신미대근)	19모-297	2	9	
18모201 x 18무추26-1	CR291M-64-1 x (태백 MC35. 40902-1)-1	19모-301	2	11	
18모201 x 18무추27-1	CR291M-64-1 x 12-80-60-1(태백MC60,40901) -1	19모-391	1	6	
18모201 x 18모29-1	CR291M-64-1 x (KB68-1x 원연 25-9-1)-1	19모-315	33	214	6.5
18모201 x 18무추34-2	CR291M-64-1 x 16-80-102-1(태백M 35. 40902.)-2	19모-488	3	14	
18모201 x 18무추36-1	CR291M-64-1 x 16-80-104-2(태백 MC93. 42915.)-1	19모-299	3	32	10.1
18모201 x 18무추41-2	CR291M-64-1 x KB-68-4-1-5-2-1-4-1-1-1-2	19모-300	2	4	
18모201 x 18무추46-3	CR291M-64-1 x KB68(S6)-4-2-1-2-1-2-1-1-3-3	19모-347	3	7	
18모201x 18무추49-1	CR291M-64-1 x 로컬푸드김동수 - 1-1	19모-386	1	1	
18모201 x 18무추50-2	CR291M-64-1 x 로컬푸드김동수 - 2-2	19모-390	2	3	
18모201 x 18무추51-1	CR291M-64-1 x 13-80-67-1(정선만당홍)-1	19모-348	2	7	
18모201 x 18무추52-1	CR291M-64-1 x 13-80-67-2(장선만당홍)-1	19모-343	3	17	
18모201 x 18무추62-1	CR291M-64-1 x 유현-5-1-2(BC6)-1	19모-334	1	4	
18모201 x 18무추65-3	CR291M-64-1 x 원연(25-2x-1)-1-2-3-1-3-3	19모-341	2	20	10.0
18모201 x 18무추77-2	CR291M-64-1 x 14-80-71-1-1(원연 도입)-2	19모-462	1	2	
18모201 x 18무추79-2	CR291M-64-1 x 원연 27-1(11-80-27-1)-2	19모-414	2	3	
18모201 x 18무추81-3	CR291M-64-1x 원연24-1(11-80-24-1)-3	19모-463	2	5	
18모201 x 18무추83-1	CR291M-64-1 x 원연 28-3-13-1	19모-418	1	3	
18모201 x 18무추92-1	CR291M-64-1 x R-25번계-1-2-1	19모-337	2	4	
18모201 x 18모204-2	CR291M-64-1x 07-80-209-1-1(CR대근)	19모-295	31	299	9.6
계	무 25계통	-	107	698	-
18모203 x 18모29-1	(CR291M-64 x 聖護院大丸蕪-2)-1x (KB68-1x 원연 25-9-1)-1	19모-529	6	36	

- CR291M-64x휘M-2의 채종방법을 달리한 F1 조합을 파종하여 다시 마커 검정을 2016년에 채종한 것을 중심으로 수행함(표 34). 동일 망실에 넣은 두 개체(CR291M-64와 휘M-2)를 비교하였는데 휘M-2 계통은 3주가 모두 자가수정되는 것을 확인함. 상대였던 CR291M-64는 3주 중 1주가 자가수정된 개체였고 다른 2주는 상대와 교잡된 F1이었음. 이 CR291M-64계통을 손으로 꽃이 피었을 때 교잡하고 유산지 봉투를 씌운 것은 (FC) 같은 포기였지만 한 화지는 모계의 자가수정된 포기가 1주 있었고 다른 화지는 3주 모두 교잡된 잡종만 발견됨. 꽃봉오리 때 자가수분하고 유산지 봉투를 씌운 것은 모두 예상과 같은 자가수정임. 이로써 두 계통 모두 자가불화합성이 상당히 약하다는 사실을 확인함. 이들을 F1 품종의 친으로 이용할 경우 자가불화합성이 강한 한쪽 친에서 채종하여야 하는, 마치 세포질 응성불임성(CMS)을 이용하는 경우처럼 채종하여야 하는 문제가 발생함.
- 모본이 소포자 배양 유래의 동일 계통이므로 부계로 이용된 무의 성숙 모본 순서대로 배열함(표 20). 우선 CR291M-64 계통이 25개 무 계통과 교잡하여 성숙 종자를 생산함. 배추 계통 CR291M-64가 속간잡종의 성숙 종자를 생산하게 한다는 사실이 표 17의 것과 같이 확인된 것이다. 그리고 무의 계통에 따라 화지당 1입밖에 생산하지 못한 무 계통도 있지만 10입 이상의 성숙 종자를 생산한 계통도 있었다. 그중 무의 CR대근 (도입번호 07-80-209) 과 교잡에서 모본의 31화지 (여러 개체)에서 299입의 종자를 생산하여 가장 많은 성숙 종자를 확보하였으며 다음이 (KB68 x 원연 25)-1과 교잡에서 214입의 성숙 종자를 생산함.
- 파종번호 18모-202 (R291M-126x경3B-1)-1 x 계절무 05-80-14B-1는 2립으로 종자 수가 적지만 소포자 돌연변이를 유도하고자 파종함. 그러나 소포자 배양이 잘 안 되어 식물을 얻지 못하였고 자가수정된 종자는 10화지 205화에 수분하여 513입을 채종함. 속간잡종인데 두 포기 모두 화분이 잘 나오고 자가수정도 잘 되어 교배화 (205화) 당 2.5립, 종자 꼬투리 (111) 당 4.6립의 종자가 생산됨.
- 파종번호 18모-203의 CR291M-64 x 聖護院大丸蕪- 2 은 무와 교잡하기 위하여 파종한 것임. 무와 교잡하여 성숙 종자가 열리는 배추 계통과 일본에서 성숙 종자가 생기는 것으로 알려진 순무의 계통 간 잡종임. 여기에 무 (KB-68x원연 25)-1을 교잡하였으며, 전체 6 화지에서 36립을 채종함. 파종번호 18모-204는 무로서 배추와 속간교잡에 이용코자 파종한 것임 (표 32 참조).

<표 34> 배추 마커 검정을 위한 (재파 배무채 과제용) (과종기190307)

과종번호	모본번호	계통 명	조제번호	마커 검정결과	채종 량	비고
19과제 -355	15모 732 x 15모 711	휘M-2x CR291-7M-64	16망- 163	3주모두 휘M-2	1ml	87망
19과제 -358	15모 711x 15모 732	CR291-7M-64x 휘M-2	16모- 164	2잡종 1CR291	235ml	87망
19과제 -356	15모 711x 15모 732	CR291-7M-64x 휘M-2	16모- 473	2잡종 1CR291	2ml	FC
19과제 -357	15모 711x 15모 732	CR291-7M-64x 휘M-2	16모- 474	3잡종	79	FC
19과제 -359	15모 732⊗	휘M-2	16모- 307	3주모두 휘M-2	14	BS
19과제 -360	15모 711⊗	CR291-7M-64	16모- 335	3주모두 CR291M	250	BS

- 속간잡종의 종자가 성숙하는 성질이 어느 친 때문인지 알고자 파종하였음. 종자 꼬투리는 잘 열렸으나 그 속에 종자가 없는 현상을 보임. 아마 고온 때문이 아닐까 하고 추측한 계통을 2018년 9월 4일 (표 35) 과종번호 18과제 300~309까지 파종함. 18과제-308과 18과제-309는 부계로 이용할 무의 조합 또는 계통임. 위에서 본 것과 같이 이 시험에서도 과종번호 300번은 CR291M-64가 자가수정된 종자라고 생각됨.
- 교잡 결과 (표 35) 18과제-300 (CR291M-64x휘M-2), 18과제-303 (CR291M-40x휘M-2), 18과제-305 (CR291M-64xCR291M-96) 18과제-307 (CR291M-126x경3B-1) 등 4개 조합이 성숙 종자를 생산함. 18과제-301(CR291M-64-1)은 이미 앞에서 많은 무와 교잡하고 있었으므로, 18과제-306 (CR291M-180x CR291M-64)은 비록 상반 교잡이지만 모두 후대 종자가 많이 생산됨을 확인함. 그러므로 실질적으로 종자를 생산하지 못한 것은 18과제-302 (휘M-2)와 18과제-304 (휘M-2 x CR68M-107) 라고 할 수 있음. 이 시험을 통하여 배추와 무간 속간잡종의 성숙 종자가 생기는 것은 CR291M-64 때문이라는 사실을 알 수 있음.

<표 35> 속간잡종의 종자성숙 관계 시험 파종 대장 (180904)

파종번호	모본번호	계통 명	조제번호	속간잡종 성숙종자량	비고 (308과 교잡)
18과제- 300	15모 711-11 x 15모 732-11	CR291M-64x 휘M-2	16망- 164	2/2	0
301	16모 079- 01	CR291M-64-1(⊗)	17모- 278	아주 많음	0
302	14모 556-14 x	휘M-2-14 ⊗	15망-18	-	
303	15모 748-10 x 15모 732-10	CR291M-40x 휘M-2	16망-60	1/1	0
304	14모 556-13 x 14모 592-04	휘M-23 x CR68M-107	15망- 235	-	
305	15모 711-56 x 15모 714-13	CR291-7M-64x CR291-7M-96	16망- 139	6/2	0
306	15모 717-12 x 15모 711-10	CR291M-180x CR291M-64	16망-42	(192/4)	
307	15모 716-11 x 15모 884-12	CR291M-126x 경3B-1	16망- 147	2/1	0
308	15무모 559 x 564	KB-68-1x 원연 25-9-1	16망- 483	-	무 조합
309	16무모-707-1-1	계절무. 05-80-14B-1(⊗)	17무모 275	-	무 계통

※18과제-308= (KB-68x원연 25)-1

- 앞의 표 31에서 2016년에 생산된 종자를 중심으로 CR291M-64와 함께 소포자 배양에서 유래한 계통의 F1과 그 양친계통을 주로 검정함. 그런데 2007년과 2009년에 생산된 유사 계통을 검정코자 18과제-311부터 352 (42 계통 또는 조합)까지 파종하였는데 받아율이 아주 좋지 않아 겨우 21 계통 또는 조합이 받아들임. 그중 무와 교잡하여 성숙 종자를 생산한 계통 또는 조합이 불과 9 조합임 (표 36).
- 13M-33, 13M-72, 경1M-31등의 계통이 ECD13M-7-1과 교잡되어 속간잡종의 성숙 종자를 생산함. 계통 CR291M-64가 ECD13M-7-1 x 3M-291의 소포자 배양에서 유래한 것임. 같은 해 2009년에 13M-72 x ECD13M-7-1과 경1M-31 x ECD13M-7-1 의 소포자 배양 유래 계통이 각각 59개와 108개 있으며, 13M-33은 ECD13M-7-1과 교잡되지 않았으나 필요하면 내년 (2020) 에 소포자 배양에 공시할 수 있음. 그리고 CR291M-64의 origin이라할 수 있는 04-33-3 (BR 079xECD-4)의 5 계통을 증식하였으므로 각각을 검정하여 성숙 종자가 생산되는 계통을 찾고 이를 이용하여 다양한 성숙 종자가 생기는 계통을 육성할 수 있을 것으로 판단됨.



<표 36> CR291M-64 유사 계통의 속간잡종 성숙 종자 생산

교배번호	계통명	조제번호	화지수	종자수	비고
19과제 314-2 x 18모 29-1	ECD13M-1x3M-291-4-2 x (KB-68-1 x 원연 25)-1	19과제-8	1	22	모두 제응
19과제 315-2 x 18모 29-1	ECD13M-1x13M-33-2-2 x (KB-68-1 x 원연 25)-1	19과제-9	3	28	
19과제 316-2 x 18모 29-1	(ECD13M-7-1x13M-72-4)-2 x (KB-68-1 x 원연 25)-1	19과제-12	5	108	
19과제 318-1 x 18모 29-1	(ECD13M-7-1x경1M-31)-1 x (KB-68-1 x 원연 25)-1	19과제-18	4	18	
19과제 339-2 x 18모 29-1	(lop-13M-7x3M-291)-1M-2 x (KB-68-1 x 원연 25-9-1)-1	19과제-26	1	18	
19과제 340-1 x 18모 29-1	(lop-13M-7x3M-291)-1M-10 x (KB-68 x 원연 25)-1	19과제-27	1	13	
19과제 343-3 x 18모 29-1	(CR291M-64xCR291M-180)-3 x (KB-68 x 원연 25)-1	19과제-31	4	192	
19과제 344-2 x 18모 29-1	(CR291M-64x휘M-2)-2 x (KB-68 x 원연 25)-1	19과제-23	5	73	
19과제 348-2 x 18모 29-1	(CR291M-96xC218-5M-13)-2 x (KB-68-1 x 원연 25)-1	19과제-7	1	7	
계	9조합	-	25	479	

○ 배주 배양과 성숙종자 관련 연구

- 배추와 무간 속간잡종을 얻기 위하여 교잡 후 약 10일이 지난 어린 배추를 배양함(성숙 종자는 교잡 후 30일-35일경에 수확함). 어린 배추를 배양하지 않으면 속간잡종을 얻지 못하는 경우가 많기 때문임. 본 시험에서도 배추의 F1 3종류를 파종하여 어린 배추를 배양함. 다른 두 조합, (C218M-13x하감M-50) x (KB-68x원연-25)와 (CC507x불M-68) x (KB-68x원연-25)은 배추가 자라지 못하고 중간에 퇴화하여 어린 배추를 배양하여야 함. 한 조합, (CR291M-64x휘M-2) x (KB-68x원연-25)은 성숙 종자를 생산함. 모두 동일 무 조합 (KB-68 x 원연-25) 이 교잡되었는데 배추의 조합에 따라 이처럼 다르게 나타남. 배추의 순계 또는 계통이 아니면서, 즉 일대잡종(F1)이면서 속간잡종 종자가 영글음. 이것은 세계 최초의 발견으로, 이에 몰두하여 속간잡종 육성 연구를 진행함.
- 성숙 종자에 관련된 연구를 진행하면서 한편으로 배주 배양을 계획서에 맞게 진행하였음 (표 37). 먼저 배양한 배주 수 대비 싹이 난 배주 수가 47%라는 아주 좋은 결과를 보임. 그런데 배로 발달한 배주 수가 너무 많아 일부만 길렀는데 많은 경우 식물로 자라지 못하고 캘러스 (callus)로 발생함. 식물로 자란 것 중 약 15%, 29개체를 확보함. 앞으로 캘러스 발달을 식물 발달로 바꾸기 위한 연구가 필요함.

<표 37> 어린 배주 배양(191231까지) 결과

조합 명	계통명	배양 배주 수	배발생 배주수 합계	캘러스 합계	식물체 합계	순화	생존 식물 체	식물 체 수
17만하261 x 17만하 265	{(C218M-13x 하감M-50) x (KB-68 x 원연25)}	1224 (605)	506 (41%)	115	17	5	2(3)	3
17만하262 x 17만하 265	{(CC507x 불M-68) x (KB-68 x 원연25)}	2175 (1,668)	947 (44%)	922	23	9	6(2)	1
17만하263 x 17만하 265	{(CR291M-64x 휘M-2) x (KB-68 x 원연25)}	1379 (1,072)	802 (58%)	92	157	59	24(9)	25
계	3조합	4,778 (3,345)	2,255 (47%)	1,129	197	73	32(14)	29

※배양 배주 수의 ( ) 내는 2017의 배양 결과임 (1년 차 계획 보고서 참조)

※생존 식물체 수의 ( ) 내는 순화 후 온실에서 재배하는 식물체 수임

※기타 모든 수는 2018년에 수행한 내용임

○ 소포자 돌연변이 연구

- 소포자 돌연변이유도의 약 140여 개체가 후대 종자를 생산하지 못함. 약 20~30개체 중 안정된 계통이 1주 정도 있을 것으로 생각하였으나(과거의 경험) 예상과 다르게 140여 개체 중에 안정된 계통이 없음. 3년 차에도 2년 차에서 종자가 생기지 않은 140여 개체를 그대로 두었으나 전혀 종자가 생산되지 않음. 2018년 여름에 온실에 두었던 소포자 배양 유래의 개체를 2019년 12월 30일까지 보존하면서 자가수정되게 노력하였으나 후대 종자는 생기지 않음.
- 2018년 말에 혹시 돌연변이가 충분히 일어나지 못하였기 때문인가 생각하여 어린 배주 배양으로 얻은 개체를 돌연변이제 NMU의 0.01  $\mu$ M의 두 배, 다시 이것을 두 배로 처리하였음 (NMU 0.01  $\mu$ M, NMU 0.02  $\mu$ M, NMU 0.04  $\mu$ M로 처리). NMU 처리 별 개체에 따라 처리 농도가 높아짐에 따라 오히려 배 발생이 많아지는 개체도 있음. 그러나 대체로 무처리 100일 때 NMU 0.01  $\mu$ M 처리 70.4%, NMU 0.02  $\mu$ M 처리 61.9%, NMU 0.04  $\mu$ M 처리 때 45.0%를 나타냄. 각 처리마다 약 30주 정도씩 자가수분하였는데 어떤 NMU 농도에서도 후대 종자는 생기지 않음 (표 38).

<표 38> 어린 배주 배양으로 얻은 개체의 NMU 농도 별 획득 배수

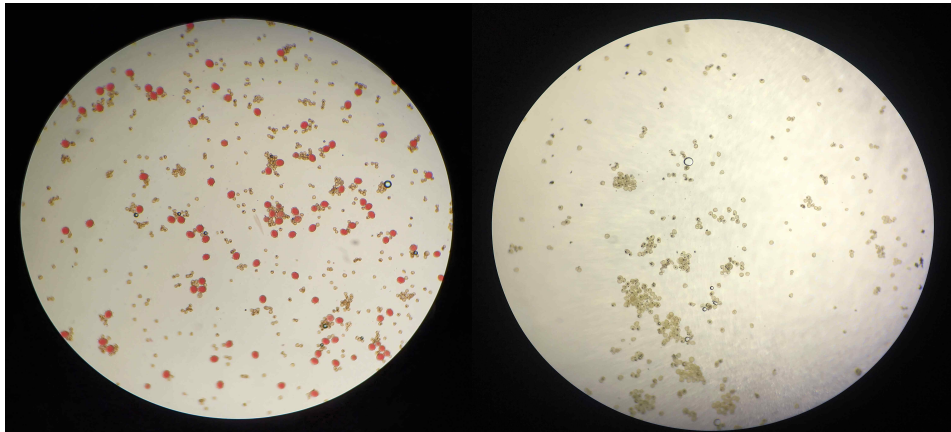
교배번호	배양회수	NMU 무처리	NMU 0.01처리	NMU 0.02처리	NMU 0.04처리	계
(17만하 261 x 17만하 265)-ov-16-3	5	6	20	1	7	34
(17만하 263 x 17만하 265)-ov-A4-1	5	50	51	31	23	155
(17만하 263 x 17만하 265)-ov-54-4	1	5	1	2	0	8
(17만하 263 x 17만하 265)-ov-54-5	1	8	7	6	2	23
(17만하 263 x 17만하 265)-ov-91-4	1	22	4	6	13	45
(17만하 263 x 17만하 265)-ov-153-2	2	2440	1605	1295	779	6119
(17만하 263 x 17만하 265)-ov-210-1	3	789	644	722	686	2841
계	18	3320	2332	2063	1510	9225
100분 율(%)		100	70.4	61.9	45	

- 왜 소포자 돌연변이유도의 효과가 없는지 현재로서는 설명하기 어려운 점이 있음. 잡종 (CR291M-64x 휘M-2)이라고 하지만 사실은 CR291M-64의 순계라는 것이 밝혀짐. ‘처음 이 과제를 설계할 때 지금까지의 모든 순계가 자가수정도 안되고 소포자 돌연변이도 안되어 배추와 무를 1대잡종으로 하였다’ 라고 함. 그런데 속간잡종 종자가 성숙하는 현상을 보고 그에 열중하면서 주로 CR291M-64의 연구에 몰두한 면이 있지만 이 순계 CR291M-64와 (KB-68 x 원연25)의 속간잡종이 소포자 돌연변이에 공시되어 배양이 아주 잘 되었음. 그 유래 개체가 전혀 후대를 생산하지 않았다는 것임. 즉 순계 간의 속간잡종이 소포자 돌연변이가 안되었다고 하였는데 이 시험에서는 잘 된다는 것으로 확인됨. 그리고 특히 무는 1대잡종(F1)인데 개체 간 차이 없이 후대의 자가수정 종자가 발생하지 않음. 그뿐만 아니라 배추의 F1 조합 (C218M-13x 하감M-50) 에서도 소포자 돌연변이 유래 20개체 이상이 자가수정 종자를 생산하지 못한 것임. 비록 안정된 계통은 아니더라도 자가수정 되어 후대를 생산하는 개체가 있어야 하는데 전혀 자가수정된 종자를 생산하지 못함. 다행히 앞의 표 31, 표 31, 표 33, 표 36에서 배추와 무의 각기 다른 계통 간 조합이 약 60개 정도 확보하였으며, 이들을 소포자 돌연변이에 공시하여 검정하면 그중에는 안정된 계통이 육성될 수 있을 것이라 판단됨.

○ 화분 염색과 자가수정 종자 생산

- 서울대학교에서 배추 지부와 무 원교 39호 간 속간잡종을 육성함. 이 잡종은 자가수정 종자도 안 생기고 소포자 돌연변이도 유도되지 않음. 화분이 어느 정도 생산된다고 생각하였는데 이상하다고 생각하면서 화분을 아세트카민(aceto-carmin)으로 염색하여 검정함. 놀랍게도 아세트카민에 염색되는 화분이 하나도 없는 것을 확인함. 그리고 현미경 밑에서

자세히 관찰해보니 화분이 모두 약간씩 일그러져 있는 것을 확인할 수 있었음. 그 이야기를 듣고 우리도 화분을 관찰함 (그림 45).



<그림 45> 털 없는 배무채 M-19(왼쪽)과 무양채 819(오른 쪽)의 화분 검정

- 앞에서 이야기한 바와 같이 개체에 따라 다르지만 대체로 화분이 충분히 생산된다고 생각한 개체를 자가수정하였는데 자가수정 종자가 전혀 생산되지 않음. 따라서 소포자 돌연변이유도에서 생산된 266개체 중 144개체의 화분을 관찰하였는데 (표 39) 건전한 화분율이 개체마다 다르다는 것을 확인함. 어떤 개체는 90% 이상의 화분이 염색되었으며 어떤 개체는 거의 염색되지 않는 것도 있었음. 하지만 어느 개체를 막론하고 자가수정 종자는 생기지 않음.
- 우장춘의 학위논문을 보면 배추와 양배추 간 중간잡종 4개체를 얻음(U, 1935). 이 4개체의 임실율이 모두 다르게 나타났으며 화분을 아세트카민으로 염색하여 관찰한 결과 임실율과 아주 잘 일치하였음. 그런데 우리 시험에서 화분 염색율과 자가수정 종자의 생산과는 조그마한 관련성도 없는 것으로 나타남.

<표 39> 화분관찰 내용

계통명	전 개체 수	화분관찰 개체 수	관찰 결과(%)
(16모 135 x 16모 138)-2-MN	12	12	7.9~ 90이상,
(16모 135 x 16모 138)-2-MN	8	4	2.3~비 검정
(17만하 261 x 17만하 265)-OV	1	1	81.5
(17만하 262 x 17만하 265)-OV.	2	2	0.0~ 2.2
(17만하 263 x 17만하 265)-OV.	50	45	0~ 89.28 79이상 3개
(17만하 263 x 17만하 265)-1~16-7-MN..	21	7	12~31.5
(17만하 263 x 17만하 265)-1~16-30-MN	7	2	0.0~29.98
(17만하 263 x 17만하 265)-21-1-MN	8	3	1.2~40.0
(17만하 263 x 17만하 265)-22-4-MN	46	16	5.3~75.8

(17만하 263 x 17만하 265)-24-3-MN	23	18	7.8~ 31
(17만하 263 x 17만하 265)-24-7-MN	38	9	3.1~50.0
(17만하 263 x 17만하 265)-28-7-MN	2	2	2.6~41.0
(17만하 263 x 17만하 265)-46-1-MN	5	5	0.8~4.3
(17만하 263 x 17만하 265)-60-3-MN	27	8	3.3~90이상
18NB 3/4	4	3	1.7~25.9
털없는 배무채-M 3/8	8	3	14.6~42.6
18모 201	1	1	5.4
17무모 823-2	1	1	8.6
11무양채 819	2	2	1.3~3.1
계	266	144	0.0~90.0 이상

○ 글루코시노레이트 (Glucosinolate) 분석

- 항균과 항암 성분으로 알려진 이소지오시아네이트(isothiocyanate)가 배무채에서 많다고 알려져 있음(Lim et al, 2009). 이 물질은 배무채에 들어있는 글루코시노레이트가 인간의 침 또는 식물의 상처난 부위에서 생기는 미로시네이스(myrosinase)라는 효소에 의해 생김. 배무채에 isothiocyanate는 무에서 온 것으로 파악됨. 우선 배무채의 품종등록용을 대상으로 분석하면서 앞으로 isothiocyanate가 많은 배무채 품종을 육성코자 무도 같이 분석함 (표 40). 배무채의 경우 태백 무보다 대체로 낮게 나타났는데 이는 태백 무의 함량이 높은 계통 5개를 추린 것으로 태백 무 자체보다 높다고 생각됨 (표 41).

<표 40> 배무채의 Glucosinolate 계 분석 (계통별 14종 분석의 일부)

과종 번호	계통 명	Total		Glucoraphasatin	
		잎	뿌리	잎	뿌리
18BR추-2 11	{비비#5x(흑오백x자색무)- 1}-2WF-1-29 ⊗	7440.3	19453.7	2344.6	7624.1
212	{비비#5x(흑오백x자색무-1 }-2WF-1-30 ⊗	6355.9	12779.8	3018.2	6287.8
233	(BB#50xBB#5)-1-2M-85⊗	6601.2	16632.8	2416.1	9785.7
277	{(CR291M-64x성호원)-16x BB#5}-1⊗	7513.6	13356.6	4289.7	7908.7
278	{(CT7XBB#12)-1(BC2)- 2 x BB#12- 1} -1 ⊗	4893.6	18086.5	4019.6	10816.5
290	자색(1~8)성숙-2⊗	6648.5	23327.1	1461.9	12712.6
294	무양채M2-2	9180.5	39788.9	5341.6	31486.9

※Glucoraphasatin: Glucosinolate (isothiocyanate)의 일종

<표 41> 무 계통의 Glucosinolate 계통 분석( 계통별 8-14종 분석)

	품종명	Total		Glucoraphasatin	
		잎	뿌리	잎	뿌리
18무추-1	태백M 33	12628.9	25428.4	10883.9	22896.1
2	태백M 33 x태백35	5305.2	14916.9	1662.4	12795.9
8	원연28	8892.2	14001.1	7649.2	11686.1
15	冬도리 대장	4664.8	24400.1	4139.9	23243.2
17	신미대근	10061.9	43458.1	8314.4	38921.3
20	冬도리대장x 원연28	4085.3	19742.3	3588.9	17604.8
23	태백M42902-1	6952.0	26443.5	5881.1	23342.8
27	태배M-40901	9499.3	27358.2	8296.5	23342.8
34	태백35 (태백40902)	4850.1	29492.7	3575.8	25737.2
35	태백M-35x태백M-42902	4107.1	18421.0	3252.1	15929.9
36	태백M-42915	12020.8	34337.8	10183.9	29560.7
43	KB-68-4-1-5...	2556.9	12912.4	1616.7	10313.1
54	KB-68x (원연(25)-1	2468.4	10302.1	1647.6	8342.3
62	유현5-1-2(BC6)	3678.3	19400.2	2919.9	16402.7
70	유현 5-1-1 x원연5-2	1917.1	12279.0	1433.7	10636.9
71	원연5-1	3773.1	8840.1	2848.7	7210.9
80	원연24x원연5	1387.3	11784.8	608.6	10085.1
87	HCMS 27-3x 원연5-1	2796.0	15322.1	2102.5	13367.4
88	27번계-3	3814.4	15755.3	2590.7	13284.3

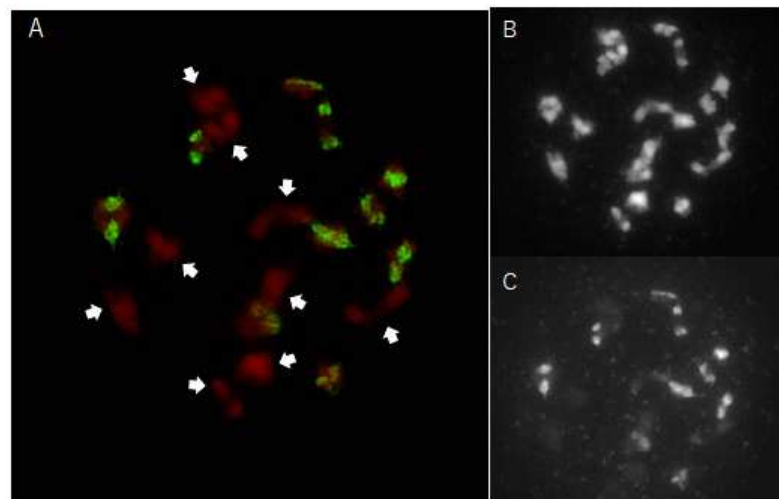
※Glucoraphasatin: isothiocyanate의 일종

- 전체 14종의 Glucosinolate (isothiocyanate)를 분석하였는데 그중 전체 함량과 대체로 많이 함유된 Glucoraphasatin 만 표에 실음. 배무채의 경우 최근에 육성된 자색비비10호(과종번호 18BR추-290)가 전체 양과 glucoraphasatin의 양에서 대체로 많은 것으로 나타남. 그런데 뜻밖에 중국 우한에서 육성한 무와 양배추 간 잡종을 도입하여 우리 연구실에서 소포자 배양으로 순계 화학 무양채M-2가 전체 양에서 다른 배무채 보다 1.5-3.0 배 이상 많은 것으로 나타남. Glucoraphasatin의 경우 자색비비10호보다 2.5배 많고 가장 적은 것보다 5배가 많은 것으로 나타남. 아주 뜻밖이며 앞으로 이와 배무채를 교잡하여 glucoraphasatin이 많은 품종을 육성할 수 있었으면 함.
- 배무채가 Glucosinolate를 다량으로 가지는 것은 비비1호를 육성할 때 이용한 ‘태백’ 무 때문이라고 함. 태백 무를 소포자 배양으로 많은 순계를 육성하고 그들을 비교한 논문 에 따라 (Han et al. 2018) Glucosinolate가 특히 많은 계통을 도입함 (표 41). 우선 태백 유래 5 계통의 Glucosinolate 함량이 대체로 다른 무 계통보다 높음. 신미대근(辛味大根)이

라는 일본에서 도입한 무가 태백 무의 가장 높은 Glucosinolate 함량보다 더 높음. Glucosinolate 함량이 높은 계통끼리 교잡한 1대잡종(F1)의 Glucosinolate가 양친의 것보다 낮거나 낮은 친보다 약간 높은 경향을 나타냄. 배무채의 1대 잡종(F1)이 현재는 없지만 앞으로 육성될 경우 이 점을 참고하여야 함.

○ 자색비비10호 염색체 조성

- 2018년에 등록된 자색비비10호에 대한 염색체 조성을 확인함 (그림 46). 비비1호가 두 번 교잡되었으며, 갓(mustard, *B. juncea*)에 무를 교잡한 것이므로 갓의 염색체 특히 B genome의 염색체가 포함되어 있는지 GISH를 통해 확인하여 본 결과, 배추와 무의 염색체로 구성되었음.



<그림 46> 자색비비10호의 염색체 조성

(A) 무 염색체를 Block하고 배추를 녹색으로 염색한 GISH 사진.

(B) DAPI 로 염색한 자색비비10호의 염색체 19쌍. (C) 배추의 염색체만 보이게 한 것

○ 자색비비10호의 뿌리 모양

- 자색비비10호의 뿌리 모양이 이용 가능한 모양이라고 발표함. 뿌리 모양이 세대가 경과되어도 변하지 않고 유지되는지, 그리고 다른 환경에서 자라도 큰 변화가 없는지 시험함. 비가림의 망실에 8월 13일과 8월 23일의 두 번 파종한 후 (그림 47과 48) 11월 27일 수확함. 그 결과 모양은 모두 일정하지만, 일찍 파종하면 뿌리가 커지는 경향이 있고 늦게 파종하면 다소 작아지는 경향을 확인함. 일찍 파종한 것은 형성층 부위가 세어지는 (경질화) 표현형을 보임. 이렇게 세어지는 현상이 무에는 없는 특성이므로 (무는 오래 두어도 세어지지 않음) 아마도 갓에서, 또는 배무채의 비비1호에서 유래하였을 가능성이 존재함.



<그림 47> 8월 13일 파종한 자색비비10호의 뿌리 모양



<그림 48> 8월 23일 파종한 자색비비10호의 뿌리 모양

○ 새롭게 육성된 무양채의 꽃

- 배무채를 연구하면서 곁에 있는 양배추와 무도 교잡하여 무양채를 만듦. 태백 무 유래의 glucosinolate가 많은 계통에 ‘신람’이라는 양배추를 교잡하여 성숙 종자를 2입 생산함. 이를 재배하여 꽃은 피웠는데, 꽃잎의 색이 양배추의 노란 색은 보이지 않고, 무를 닮아 분홍색이 있는 흰 꽃이었음. 꽃잎 4장이 십자 모양을 나타낼 것으로 생각했는데 우선 4장이 아니고 6장이었으며 모양이 십자가가 아님. (그림 49). 자가수정 종자가 생기는 것 같이 꼬투리가 발달함.





<그림 49> 태백 무에 신람 양배추를 교잡하여 만든 무양채의 꽃 모양

◎ 기존 품종의 사업화

○ 기존 배무채 품종의 대외적인 판촉활동 실시

- 배무채 비비1호, 비비5호, 비비10호의 사업화를 위하여 한국원예학회(인천 송도), 국제종자박람회(전북 김제), 아시아종자협회(APSA) 회의 때 회사 부스를 개설하고 방문객의 접견 및 배무채의 가치를 설명함 (그림 50).
- 2017년 10월 19일 배무채가 재식된 포장을 공개하고 외부인사 22명을 초청하여 배무채의 맛, 특징 등을 설명하고 배무채를 이용한 요리를 제공함 (그림 50).



<그림 50> 배무채 포장 공개 및 현장 품평회

- 2017년 10월 11~14일간 개최된 한국원예학회에서 배무채 부스를 설치함 (그림 51).
- 2017년 10월 26~28일간 개최된 제1회 국제종자박람회에서 배무채 부스를 설치함 (그림 52).
- 2017년 12월 5~7일간 개최된 생명산업과학기술대전에서 배무채 부스를 설치함 (그림 53).



<그림 51> 한국원예학회의 배무채 부스



<그림 52> 국제종자박람회의 배무채 부스



<그림 53> 생명산업과학기술대전의 배무채 부스

○ 국내 홍보 및 판매 준비 (대상그룹)

- 대상그룹 식품 브랜드인 청정원과 종가집을 통해 배무채 김치의 가공 식품과 건강보조식품 형태의 기능성 식품 개발, 판매, 연구 진행 중
- 초록마을(대상그룹계열사)을 통한 전국 각 지점에 배무채 쌈채소용, 샐러드용 등 생채 및 시래기 시제품 개발 및 납품 협의 중

○ 국내 홍보 및 판매 준비 (샤브샤브 체인 본점)

- 채선당, 쌈주머니 등 전국 체인망의 샤브샤브 본사와 배무채(중채) 상품화 개발 중

○ 국내 홍보 및 판매 준비 (시래기 국밥 체인 본점)

- 배무채 건조 시래기 국밥 체인점 상품 브랜드 개발 (현재 배무채 시래기를 활용한 메뉴 개발)

○ 국내 홍보 및 판매 준비 (농업회사법인 미래원)

- 국내 최대 식물공장, 시설재배하우스 등을 보유하고 있으며 새싹채소, 베이비채소, 쌈채소 등 샐러드 채소를 전국 백화점, 마트에 납품하는 국내 최대 유통회사
- 배무채 종자를 활용한 베이비채소, 쌈채소 재배 유통을 계획 중이며 현재 제품 테스트 중
- 베이비채소 생산에 따른 종자 공급은 농자재 대리점을 통한 종자 공급량 대비 대량 소비 공급 요구

○ 국내 홍보 및 판매 준비 (전국 농자재상 배무채 종자납품)

- 현재 각 지역별 대표 농자재상 배무채 종자 납품 계약 진행 중

○ 국내 홍보 및 판매 준비 (예산농원)

- 사과즙, 배즙 등 녹즙 전문 회사이며 건강보조 기능식품으로 녹즙용 및 건조기능성 상품 개발 연구 중

- 해외 홍보 및 판매현황 (일본 종자전문기업 아타리아 농원)
  - 2018년 MOU, NDA 체결(그림 54)
  - 배무채 시험재배 및 일본 유통계약 체결 (2018.2)
  - 배무채 테스트 1, 2차 재배 성공 후 성분분석 진행 중이며 2019년 본격적인 배무채 일본 수출 준비 중 (일본 내 배무채 유통을 위한 일본 내 상품등록 절차 검토)
  - 일본 대형마트 납품 코드를 가지고 있으며 현재도 납품을 진행 중인 회사로 수출량의 기대 효과가 높은 계약건
  
- 해외 홍보 및 판매현황 (세르비아 슈페리어)
  - 세르비아 현지 파프리카 외 다양한 채소 종자 재배 규모가 가장 큰 회사로써 재배 종자의 80%를 인근 유럽 국가(러시아 포함)에 수출하고 있음
  - 세르비아 내 대형 마트 및 내수 시장에도 채소 공급 비율이 가장 높은 업체
  - 세르비아 현지에서 배무채 유통을 위해 바이오브리딩과 독점유통계약체결 (2018.10.26.) (그림 55)
  - 현지 시장 점유율이 가장 높은 업체로 여겨지고 있으며, 향후 세르비아 인근 유럽지역까지 배무채 시장을 확대시킬 가능성이 높음
  
- 해외 홍보 및 판매현황 (일본 북오사카농업협동조합)
  - 5월 오사카 아그리월드 시 부스 방문
  - 배무채 종자에 대해 관심을 보였으며, 자체 농장에서 Test를 해 보기를 원함
  - 6월 배무채 종자 샘플 공급 후 테스트 진행
  - 현재 테스트 data report 기다리는 중
  
- 해외 홍보 및 판매현황 (일본 Kamatsuka Farm 농원)
  - 일본 아타리아 농원과 비슷한 규모의 농원
  - 일반/자색 두 종류의 배무채를 직접 재배 Test 요청
  - Test 후 일본 농협 및 농업전문 마트 등에 판매/납품 해보고자 함
  - 6월 시범 재배용으로 일반 배무채 샘플 테스트 진행 중
  
- 해외 홍보 및 판매현황 (필리핀 Advanced Agrisolutions Philippines Corporation)
  - 국제종자박람회 미팅업체
  - 필리핀 내 대규모 농장 조성 예정이며 기존 농약 판매 위주 사업에서 종자 판매를 통한 농업기업으로의 확장을 계획하고 있음
  - 배무채의 기능성 성분(항암, 항염 등)에 대한 관심이 높음
  - 필리핀 기후 조건 하에서 재배테스트 원함

○ 국. 내외 전시회 참가 및 영업활동

- 국내 및 해외 농업관련 전시 참여로 B2B, B2C 등 다양한 바이어와 상담 및 홍보 계약 (유통 독점계약)
- 농업전문 전시회에서 배무채 시식 및 중채, 성채 생물을 전시, 바이어 및 일반 농업인에게 홍보
- 전시를 통한 신제품 개발 상담 (건강보조식품 개발 건)
- 전시를 통한 배무채 종자를 대형육묘업자, 농업인들에게 홍보 판매
- 해외 바이어 : 현지 기후 및 환경 조건에 따른 재배 Test를 위한 샘플 제공 후 Test 진행 및 결과에 대한 data 및 report 공유
- 한국원예학회(대전) 배무채 BB1호.BB5호 홍보
- 대한민국도시농업박람회(화성) 배무채 BB1호, BB5호 홍보 및 판매
- 국제종자박람회(김제) 배무채 BB1호. BB5호. 자색BB10호 홍보 및 판매 (그림 56)
- 국제농기계박람회(전안) 배무채 BB1호. BB5호. 자색BB10호 홍보 및 판매



<그림 54> 오믹시스 대표(왼편)와 일본 아탈리아 사와 MOU 체결(2018년)



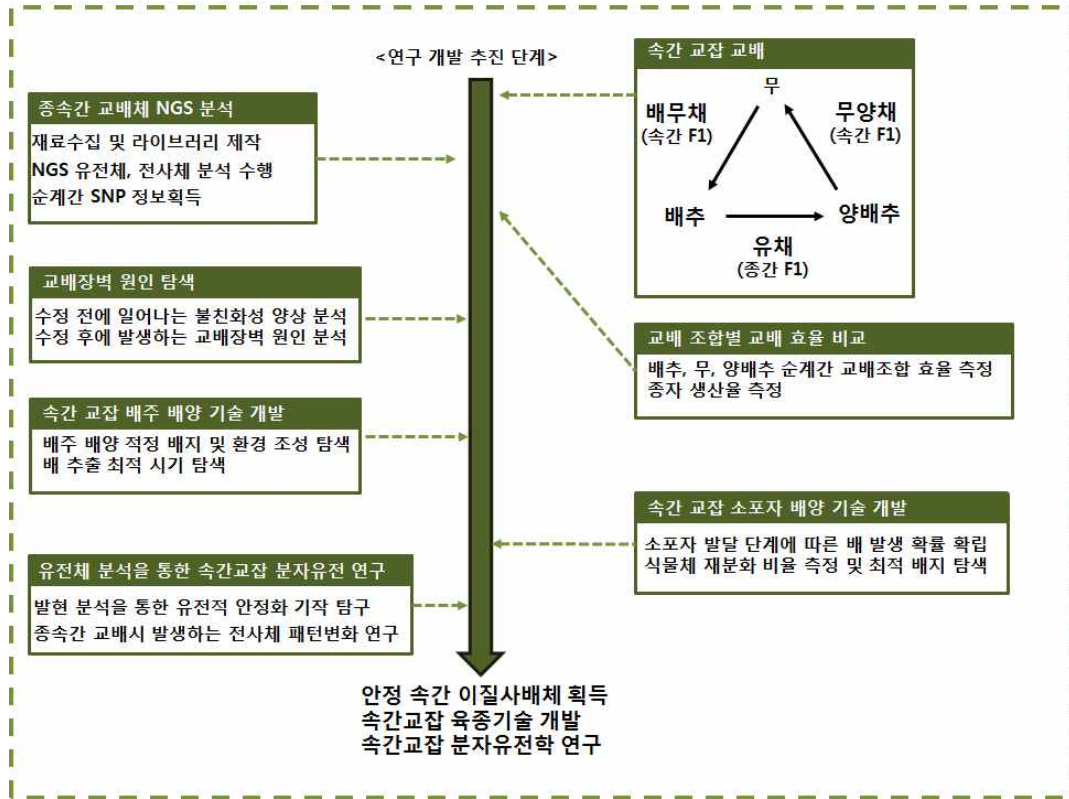
<그림 55> 오믹시스와 세르비아 Superior 사와 독점 유통계약 체결



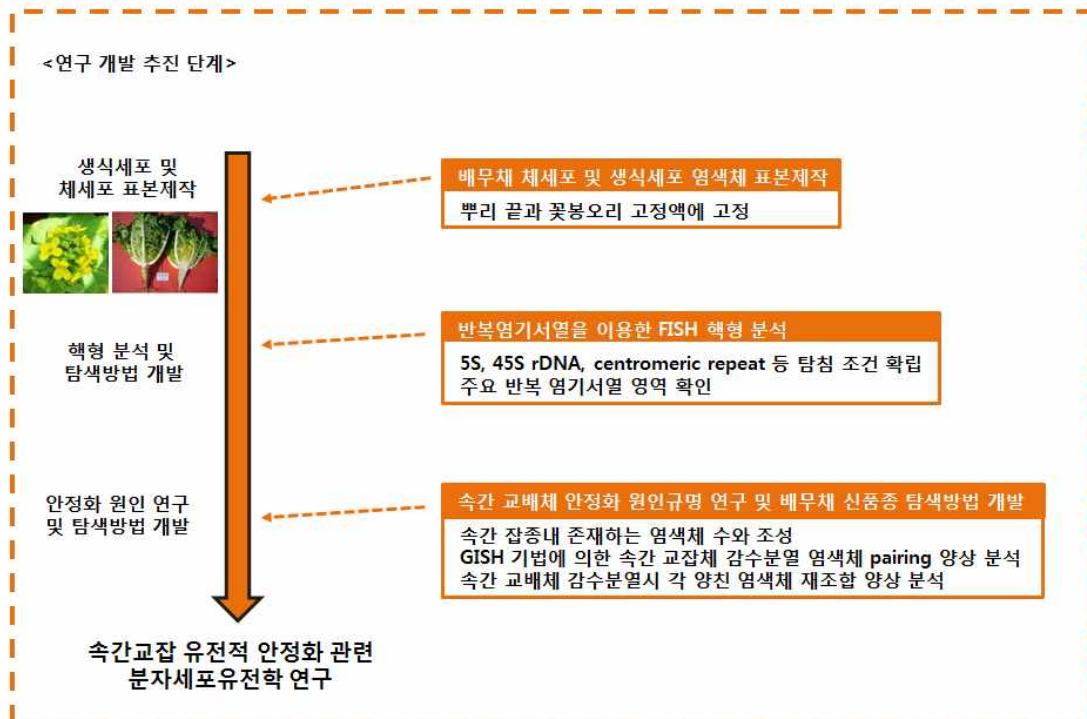
<그림 56> 국제 종자박람회(전북 김제)의 배무채

## 2-4. 연구개발 추진전략·방법

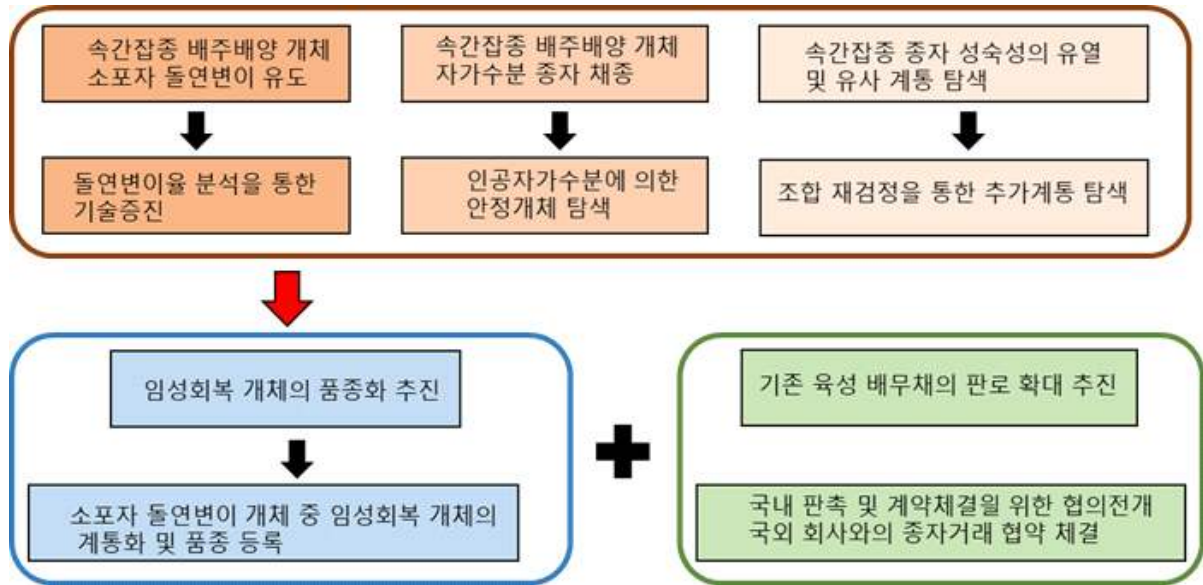
서울대학교(제1세부)



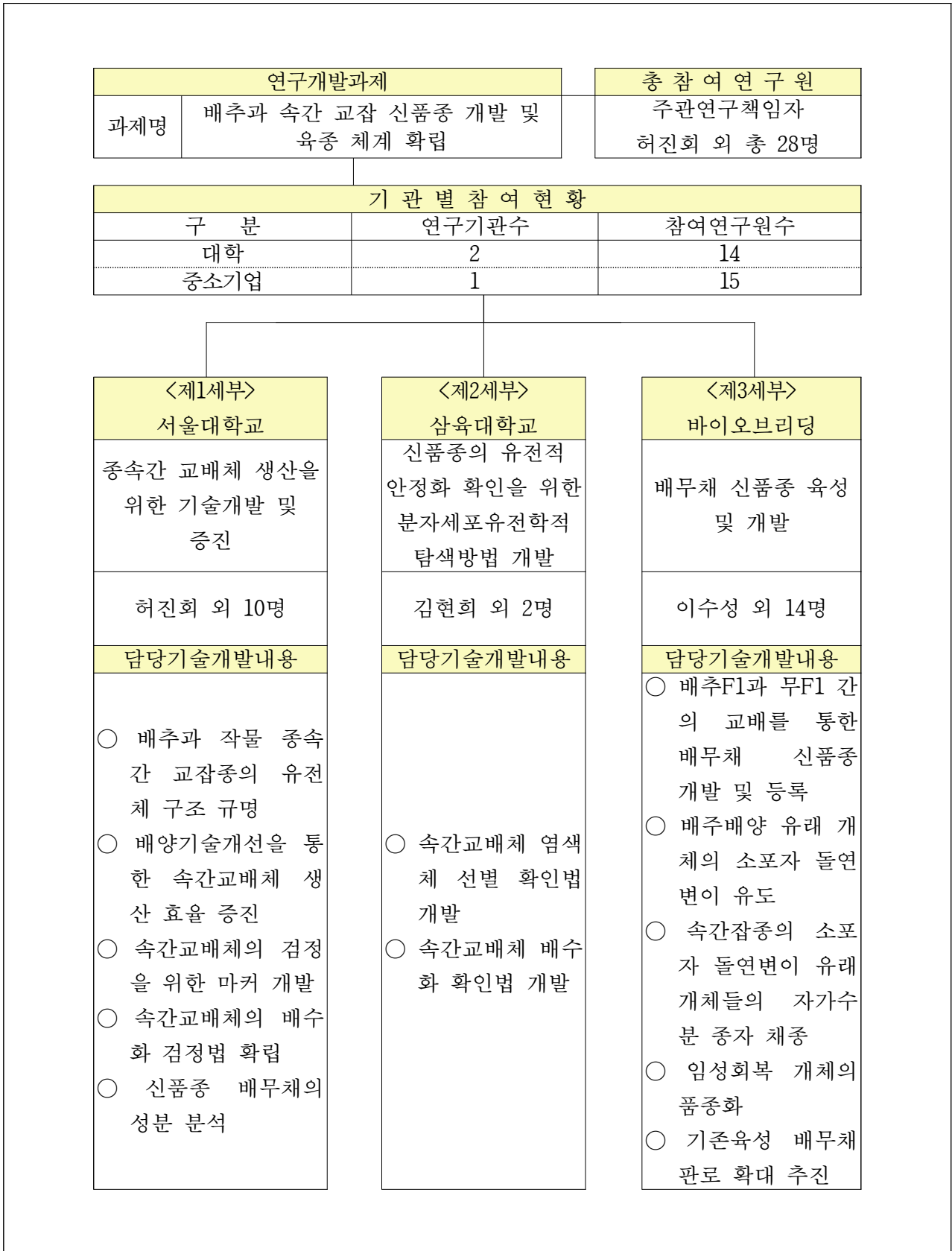
삼육대학교(제2세부)



바이오브리딩 (제3세부)



## 2-5. 연구개발 추진체계



## 2-6. 추진일정

1차년도															연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	숙간 교배를 위한 농장 관리 및 종자 과중				■	■	■	■							15,000	허진희 (서울대)
2	숙간 교배체 춘화처리 및 재배						■	■	■	■	■	■			15,000	허진희 (서울대)
3	숙간 교배체 교배											■	■	■	25,000	허진희 (서울대)
3	교배 조합 정보 및 자가수정율 데이터 확보											■	■	■	10,000	허진희 (서울대)
4	배추, 무, 순계 genomic DNA, mRNA 추출 및 시퀀싱								■	■	■	■	■		35,000	허진희 (서울대)
5	NGS 유전체 분석											■	■	■	20,000	허진희 (서울대)
6	샘플 확보 (종자, 화아)				■	■	■	■	■						500	김현희 (삼육대)
7	체세포 염색체 표본 제작					■	■	■	■	■	■	■	■	■	7,000	김현희 (삼육대)
8	감수분열 염색체 표본 제작						■	■	■	■	■	■	■	■	7,000	김현희 (삼육대)
9	FISH 및 GISH기법 최적화					■	■	■	■						2,500	김현희 (삼육대)
10	체세포 염색체수, 조성분석 (FISH 기법적용)						■	■	■	■	■	■	■	■	22,000	김현희 (삼육대)
11	감수분열 염색체 pairing 및 재조합양상분석 (GISH기법적용)						■	■	■	■	■	■	■	■	21,000	김현희 (삼육대)
12	배추와 무 순계 집단 구축				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	35,000	이수성 (바이오브리 딩)
13	배추 무 순계 집단 춘화처리 및 교배						■	■	■	■	■	■	■	■	25,000	이수성 (바이오브리 딩)
14	배추, 무 F1 집단 구축								■	■	■	■	■	■	35,000	이수성 (바이오브리 딩)
15	배추, 무 F1 춘화처리 및 교배											■	■	■	25,000	이수성 (바이오브리 딩)



2차년도													
1	SNP를 이용한 순계 배추와 순계 무의 마커 개발											400	허진희 (서울대)
2	마커 검정을 통한 순계 배추와 순계 무의 유전형 분석											1,100	허진희 (서울대)
3	배추와 무의 속간교배 및 농장 관리											1,800	허진희 (서울대)
3	배추와 무의 속간교배체 배추배양 및 제배											2,200	허진희 (서울대)
4	속간교배체에 대한 콜히친 및 춘화처리											1,000	허진희 (서울대)
5	속간교배체 배수화 검정											1,000	허진희 (서울대)
6	신품종 배무체의 안토시아닌 성분분석											2,000	허진희 (서울대)
7	교배장벽 파악을 위한 화분관 신장 관찰											1,400	허진희 (서울대)
8	샘플 확보 및 처리 (종자, 화아)											500	김현희 (삼육대)
9	체세포염색체 표본제작											4,000	김현희 (삼육대)
10	감수분열염색체 표본제작											4,000	김현희 (삼육대)
11	FISH 및 GISH 실험 (유전체 특이 반복서열 탐침활용)											4,000	김현희 (삼육대)
12	체세포염색체수, 조성분석 (FISH 염색체상)											18,000	김현희 (삼육대)
13	감수분열염색체 pairing 및 재조합양상분석 (GISH염색체상)											18,000	김현희 (삼육대)
14	결과종합 및 보고서 작성											500	김현희 (삼육대)
15	배추배양 유래 식물의 관리											35,500	㈜바이오브리딩연구소
16	개화기 화분 유무 조사											20,000	㈜바이오브리딩연구소
17	화분 발생 개체의증자생산검정											40,000	㈜바이오브리딩연구소
18	소포자 돌연변이유도 및 관리											80,000	㈜바이오브리딩연구소

3차년도												
1	자색 배무채 샘플 확보 및 DNA 추출	██████████										허진희 (서울대)
2	임성회복 속간교잡체 샘플 확보 및 DNA 추출	██████████										허진희 (서울대)
3	배무채 샘플에 대한 차세대 염기서열 분석 실시				██████████							허진희 (서울대)
3	품종 특이적 분자마커 개발 및 검정					██████████						허진희 (서울대)
4	임성회복 개체의 임성 관련 형질 분석	██████████										허진희 (서울대)
5	임성회복 개체의 이차대사산물 성분 분석	██████████										허진희 (서울대)
5	결과종합 및 보고서 작성								██████████			허진희 (서울대)
6	샘플 확보 및 처리 (종자, 화아)	██████████										김현희 (삼육대)
7	체세포염색체 표본제작		██████████									김현희 (삼육대)
8	감수분열염색체 표본제작			██████████								김현희 (삼육대)
9	단일서열 올리고탐침 개발			██████████								김현희 (삼육대)
10	염색체 페인팅실험				██████████							김현희 (삼육대)
11	속간 잡종 사배체 염색체 조성 및 행동양상 분석				██████████							김현희 (삼육대)
12	결과종합 및 보고서 작성									██████████		김현희 (삼육대)
13	배주배양 유래 개체의 소포자 돌연변이 유도	██████████										(주)바이오브리딩연구소
14	소포자 돌연변이 개체의 자가수분 종자 채종	██████████										(주)바이오브리딩연구소
15	임성회복 개체의 품종화 추진			██████████								(주)바이오브리딩연구소
16	속간잡종 종자 성숙성의 우열 및 유사 계통 탐색	██████████										(주)바이오브리딩연구소
17	기존 육성 배무채의 판로 확대 추진	██████████										(주)바이오브리딩연구소

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

<연구개발 최종목표>

- 배추 1대잡종과 무 1대잡종 간 교잡에 의한 신배무채 품종 육성
  - 고품질 신채소 시장 확대
- 배추과 순계 간 속간 교잡체 유전 특성 분석
  - 배추, 무, 양배추 순계를 이용한 속간 교잡
- 배추과 작물 안정적인 속간 교잡 육종 기술 확립
  - 배추배양, 소포자배양기술 개선
- 배추과 작물의 교배장벽 원인 탐색
- 염색체 관찰 등을 통한 속간 교잡체 확인, 임성 예측 기술 개발
  - 배추과 속간교잡 육종 효율화

<연구성과>

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍 보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												S C I	비 S C I							
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10	10	20	10		5	5							20	20					
최종목표	2	1	1	1		1	11				4			8	5					
1 차 년 도	목 표													2	1					
	실 적													0	0					
2 차 년 도	목 표	1										2		3	2					
	실 적	1				3						0		10	3		7			
3 차 년 도	목 표	1	1	1	1	4.5 7	1	1				2		3	2					
	실 적											1	1	7	4					

4차년도	목표																		
	실적	1											2						
5차년도	목표																		
	실적																		
소계	목표	2	1	1	1	4.5	1	1					4			8		5	
	실적	2	0	0	0	0	3	0					3	1		17		3	7
종료 1차년도								1											
종료 2차년도			1					1											
종료 3차년도								1											
종료 4차년도								2											
종료 5차년도								5											
소계			1					10											
합계		2	2	1	1	4.5	1	11					4			8		5	

### 3-2. 목표 달성여부

○ 배추 1대잡종과 무 1대잡종 간 교잡에 의한 신배무채 품종 육성

- 속간교잡 육종을 위한 기초재료의 특성 확인 완료
- 속간교배체의 이차대사산물 성분분석 완료
- 배추 3개 및 무 1개의 F1 조합에서 얻은 어린 배주를 배양하여 약 900개의 배 생산
- 900개 배주 유래 식물 중 우선 3개체를 소포자 돌연변이 유도 완료
- 속간잡종의 소포자 돌연변이 유래 개체의 자가수분 종자 채종
- 배추와 무간 속간잡종의 어린배주 유래 배의 식물체 제작
- 속간잡종 개체의 성숙 종자 이용 체계 확립
- 배추 CR291M-64x휘M-2 조합이 속간잡종 성숙 종자 생산
- 속간 교잡체의 종자를 성숙하게 하는 CR291M-64 계통 선발
- 17만하-263x17만하-265 (CR291M-64x휘M-2) x (KB-68x원연 25) 집단 제작 완료
- 속간잡종 종자 성숙성의 우열 및 유사 계통 탐색
- 기존 육성 배무채의 판로 확대 추진
- 기존 배무채 사업화의 일환으로 현장 부스를 개설하고 포장을 공개하였으며, 일본 수출 방법 모색 중

○ 배추과 순계 간 속간교잡체 유전 특성 분석

- 배추, 무 순계 유전체 정보 획득을 위한 genomic DNA 추출 및 시퀀싱 실시
- NGS 유전체 분석을 통한 배추, 무 순계 유전체간의 SNP/INDEL 정보 확보
- 배추, 무 순계들의 SNP 정보를 이용한 마커 제작

○ 배추과 작물 안정적인 속간 교잡 육종 기술 확립

- 배추, 무 순계 간 교배 실시, 교배 효율 측정
- 순계 간 교배효율 측정 및 종자생산 효율 확인
- 배추과 작물의 소포자 배양 최적화 조건 확립
- 유세포분석기를 이용한 속간교배체의 유전체 크기 비교와 배수화 여부 확인

○ 배추과 작물의 교배장벽 원인 탐색

- 속간교배 시 수정 전에 일어나는 불친화성 양상분석을 위한 화분관 신장 비교
- 속간교배 시 수정 전·후의 발달과정 분석 완료
- 속간교배 시 수정 후 단계별 종자발달 관찰 및 종자 치상의 원인 분석
- 새로 합성된 배무체의 배유와 배 조직 유전조성을 탐지할 수 있는 분자마커 개발 및 검증 완료

○ 염색체 관찰 등을 통한 속간 교잡체 확인, 임성 예측 기술 개발

- 속간잡종교배체 유전체 조성 확인을 위한 체세포 및 감수분열 염색체 표본 제작
- FISH 및 GISH분석에 의한 속간 잡종교배체 염색체 조성 확인
- 속간 교배체 유전체 정밀분석을 위한 배추 및 무 유전체 특이 DNA반복서열 발굴
- 배무체 근단 및 화아 샘플 채취, 처리 및 중기 염색체 표본 작성 완료 확인
- 5S 및 45S rDNA를 탐침으로 한 FISH 기법을 활용하여 배무체에서 위치 및 분포 확인
- FISH 염색체표본을 활용 배무체 유전체 내 배추 및 무 염색체 존재 및 조성 확인
- 배추 특이 및 무 특이 반복서열 포함 총 14종 반복서열 발굴 및 FISH 탐침으로 이용
- 14종 반복서열을 활용한 FISH 핵형분석 완료
- GISH에 의한 배추, 무, 양배추의 3가지 계통 조성 확인
- 고효율 FISH 분석을 할 수 있는 PLOP 탐침의 개발
- 올리고탐침을 이용한 chromosome painting 기법 적용
- 이배체 및 속간잡종 사배체의 유전체 내 서열 조성 비교

### 3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

○ 품종등록

- 자색배무체 품종 등록 시 과제번호 누락되어 사사가 이루어지지 않음. 연구개발 중 만들어진 또 다른 품종인 순계라인 자색순무에 대한 품종 등록이 현재 진행중임.
- 현재 속간 교잡을 통한 임성회복개체를 확보하지 못한 상태이지만, 후속 연구로 임성회복

가능성이 높은 다양한 계통과 품종의 배추와 무 종자를 선별하여 육성 중에 있음.

배추: 3M-291 x C218-5M-1-2, 지부, 하감M50, CR291M-64, 노랑추석배추, 왕맛배추 등

무 : 태백MC60 x 태백M35, kb68-4, 원연25-2, 진주대평무, 청운무 등

○ 특허 등록

- 현재 속간교배체의 유전형 검정 마커에 대한 특허 1건과 속간교배에 유리한 배추품종의 유전형 검정 마커에 대한 특허 1건이 출원된 상태이며(총 2건), 추후 절차에 따라 특허 등록을 완료할 예정임.

○ 기술이전

- 품종보호출원중인 동형접합의 자색 순무 품종을 강화군 농업과학기술센터에 기술이전 진행중이며, 2020년 내 계약 체결 예정

## 4. 연구결과의 활용 계획 등

### 4-1. 연구개발 결과의 활용방안

#### <제1세부 서울대학교>

- 속간교잡 육종을 위한 소포자 배양, 배주배양 최적화 조건 확립을 통한 기초 육종 정보를 제공
- 속간교잡 내 육종 간 기초정보를 제공함으로써 이후 국내 속간교잡육종 발전의 토대 마련
- 속간교잡 육종기술의 원천기술 확보를 통한 국내 육종기술의 선진화
- 속간교잡체 염색체 확인을 위한 분자마커 개발을 통한 배추과 내 다른 속간교잡 관련 분자마커로 활용
- 배추과 이질배수체의 안정화 기작 이해
- 속간교잡에 관한 분자생물학적 연구를 위한 기초 정보 및 메커니즘을 밝히는 연구에 유용한 정보로 활용

#### <제2세부 삼육 대학교>

- FISH 핵형분석으로 속간 및 중간 잡종식물인 배무채 유전체의 염색체 구성에 대한 기초정보를 제공
- 배추, 무, 배무채 서열분석으로부터 추가적으로 선별된 특이 반복서열의 염색체 내 위치 및 분포를 밝힐 수 있는 바탕이 마련
- 유전체서열분석 결과에서 선별되는 특정 단일서열과 특정 유전자의 physical mapping 토대 마련
- Genome sequence assembly시 명확치 않은 특정 서열 및 유전자 간 순서와 거리를 확인하기 위한 FISH 기술과 이를 위한 체세포 및 감수분열 염색체 backbone 마련
- 배무채 육종 및 개발을 위한 유전체 구성에 대한 기초정보를 제공
- 기타 다른 주요 속간 및 중간 잡종식물의 육종을 위한 기반자료 제공
- 배무채 연구를 위한 배추, 무의 염색체를 기반으로 하는 비교 연구 자료는 배추, 무 육종에 필요한 유용한 분자세포유전학적 정보로 활용
- 배추, 무 염색체 특이 repeat 및 단일서열의 마커는 배추와 무의 유전체 조성 및 육종 연구에 유용하게 활용됨
- 속간잡종 배무채의 유전체 분석에 FISH 및 GISH 기술의 접목은 기타 주요작물의 유전체서열 분석 연구의 완성도를 높이는데 활용됨

#### <제3세부 바이오브리딩>

- 배무채 품종 다양화

- 기존에 존재하지 않는 새로운 신품종 도입을 통한 채소 시장의 확대
- 속간교잡을 이용한 유전자원 활용 극대화 및 기존육종에 적용을 통한 발전
- 고품질 채소 개발, 해외 시장 개척
- 국내의 속간교잡 육종기술 및 유전자원의 원천기술 확보

## 4.2. 기대성과 및 파급효과

- 속간 이질배수체의 안정화 기술 확보를 통한 육종기술의 진보
- 한정된 유전자원을 사용하는 전통 육종법의 한계를 극복
- 잡종의 이점 활용, 유용 유전자 도입 등 유전자원의 활용을 극대화 할 수 있는 원연 간 교잡 기술의 확보
- 배무채 품종 개선과 다양화를 통한 시장 확대
- 품종화에 성공한 ‘배무채’의 이론적 기반을 제공, 향후 육종, 채종 등의 기반 기술 마련
- 우리나라 배추과 육종 수준을 과시함으로써 새로운 수요를 창출함
- 속간 교잡 안정화 기술 확립으로 배추과 신품종 육성의 토대 마련

## 붙임. 참고문헌

- Han N, Na H, Kim J (2018) Identification and variation of major aliphatic glucosinolates in doubled haploid lines of radish (*Raphanus sativus* L.) Hort. Environ. Biotech. 36(2):302-311
- Lim S, Lee J, Kim JK (2009) Analysis of isothiocyanates in newly generated vegetables, Baemuchae (*xBrassicoraphanus*) as affected by growth. Int. J. Food Sci. Tech. 44: 1401-1407
- Opena RT, Lo SH (1978) Derivation of matroclinal diploids in Chinese cabbage and evaluation of their significance in breeding. J. Am. Soc. Hort. Sci. 103(6): 820-823
- U N (1935) Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. Jpn. J. Bot. 7, 389-452



## <뒷면지>

### 주 의

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