

117043-3

글로벌코라판인  
고함량  
브로콜리게통  
육성  
최종보고서

2020

농림  
기술  
축산  
식품  
기획  
평가  
위원회

보안 과제( ), 일반 과제(0) / 공개(0), 비공개( )발간등록번호(0)  
농생명산업기술개발사업 2020년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003145-01

# Glucoraphanin 고함량 브로콜리 계통 육성

최종보고서

2020. 07. 06.

주관연구기관 / 세종대학교  
협동연구기관 / 아시아종묘

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “Glucoraphanin 고함량 브로콜리 계통 육성” (개발기간 : 2017. 4. 21 ~ 2019. 12. 31) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 7. 6.

주관연구기관명 : 세종대학교 산학협력단 (대표자) 백성욱 (인)  
협동연구기관명 : 농업회사법인아시아종묘(주) (대표자) 류경오 (인)  
참여기관명 : (대표자) (인)

주관연구책임자 : 이상협  
협동연구책임자 : 황병호  
참여기관책임자 :

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

### 보고서 요약서

과제고유번호	117043-3	해 당 단 계 연구 기 간	2017. 04. 01 ~ 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	Glucoraphanin 고함량 브로콜리 계통 육성			
연구책임자	이상협	해당단계 참여연구원 수	총: 46명 내부: 20명 외부: 20명	해당단계 연구개발비	정부: 608,000 천원 민간: 152,000 천원 계: 760,000 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 46명 내부: 20명 외부: 20명	총 연구개발비	정부: 608,000 천원 민간: 152,000 천원 계: 760,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	세종대학교 바이오산업자원공학			참여기업명: 농업회사법인아시아종묘(주)	
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	5	1									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

- 브로콜리의 GR 생합성에 관여하는 유전자를 선별하고, *MYB28* --> *MYB29* --> GR생합성 유전자 발현에 이르는 일련의 조절 기작을 밝힘.
- 브로콜리 발아 후 GR 함량 변이 분석을 통해서 발아 초기에는 GR 함량이 감소하다가, 본엽이 발생하면서 GR 함량이 증가한다는 사실을 규명하고, MeJA 와  $MgSO_4$  를 처리하여 GR 함량을 증가시키는 재배법도 개발함.
- 브로콜리 대상의 GR 정량분석법 개발을 위해서 브로콜리 추출물 전처리 기법 과 UV 230 nm 흡광도에서 HPLC를 활용한 GR 정량분석 기법을 확립함.
- *MYB28* sgRNA와 Cas9 복합체 (RNP) 를 원형질체에 도입해 GR 함량이 2배 이상 증가한 유전자편집 1 개체와 *MYB28*와 *AOP2* 가 도입된 유전자편집 vector 를 이용한 유전자편집 개체 중 GR 함량이 1.5 배 이상 증가한 유전자편집 6개 체를 확보함.
- 소포자 배양과 육성 프로그램 운영을 통해 400개 이상의 변이체를 확보하고 유전자편집 개체와 조합작성을 위해서 원예형질과 저장성이 우수한 12계통을 확보함.

보고서 면수: 106



## 요약문

연구의 목적 및 내용	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. RNP 와 Agro-transformation을 활용한 유전자편집 기술 개발</li> <li>2. <i>MYB28/AOP2</i> 대상의 유전자편집을 통한 글루코라파닌 (GR) 고함량 개체 개발</li> <li>3. 브로콜리 대상의 GR 생합성 기작 규명 및 GR 함량 증대 재배법 개발</li> <li>4. HPLC 기반의 GR 정량분석 기법 확립</li> <li>5. 전통육종 및 소포자 배양을 적용한 원예 형질 우수 계통 및 조합 육성</li> </ol>				
연구개발성과	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 브로콜리 생체 내에서의 GR 생합성 기작 규명 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 브로콜리의 GR 합성에 관여하는 GR 생합성 유전자를 선별하고, 두 전사조절자 (<i>MYB28</i>, <i>MYB29</i>)가 이들 GR 합성 유전자 발현을 조절한다고 밝힘.</li> <li>- 또한 Agro-infiltration에 의해서도 GR 생합성이 증가한다는 것을 발견하고, 이 경우는 <i>MYB29</i>에 의해서만 관련 유전자의 발현이 조절된다는 것을 밝힘.</li> </ul> </li> <li>2. <i>MYB28</i> 유전자 서열 변이에 따른 GR 생합성과의 관계 규명 <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>MYB28</i> 유전자 3 ‘말단 부분 서열이 GR 생합성 유전자 발현에 중요한 것으로 추정하고, 이들 서열 변이에 따라 GR 함량 변이를 실험적으로 증명함.</li> </ul> </li> <li>3. 브로콜리 발달 단계에 따른 GR 함량 변이 및 외부 화학물질 처리에 따른 GR 함량 증가 기법 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 브로콜리 발아 후 GR 함량 변화 분석을 통해서 발아 초기에는 GR 함량이 감소하다가, 본엽이 발생하면서 GR 함량이 증가한다는 사실을 규명함.</li> <li>- MeJA 와 MgSO<sub>4</sub> 를 처리하여 GR 함량을 증가시키는 재배법을 개발함.</li> </ul> </li> <li>4. 브로콜리 대상의 GR 정량분석법 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 브로콜리 추출물 확보를 위한 전처리 기법을 확립함.</li> <li>- UV 230 nm 흡광도 에서 HPLC를 활용한 GR 정량분석 기법을 확립함.</li> </ul> </li> <li>5. 브로콜리 원형질체와 explants를 대상으로 한 유전자편집 기반 기술 개발 과 이를 적용하여 GR 고함량 브로콜리 개체 확보 <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>MYB28</i>와 Cas9 복합체 (RNP)를 원형질체에 도입한 유전자편집 개체를 개발하고, 이중 GR 함량이 2배 이상 증가한 유전자편집 1개체를 확보함.</li> <li>- <i>MYB28</i>와 <i>AOP2</i> 유전자편집 binary vector 를 explants 에 transformation 한 유전자편집 개체를 개발하고, 이중 GR 함량이 1.5배 이상 증가한 유전자편집 6개체를 확보함.</li> </ul> </li> <li>6. 유전자편집 개체와 조합작성을 위한 원예형질이 우수한 계통(조합) 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 소포자 배양을 통해 400개 이상의 변이체 (육종 소재)를 확보함</li> <li>- 원예형질과 저장성이 우수한 12계통을 확보함.</li> <li>- 원예형질과 저장성이 우수한 10조합을 확보함.</li> </ul> </li> </ol>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. GR 고함량 모/부 계통을 이용한 GR 품종 육성을 통해서 국내 브로콜리 종자 시장의 95%를 장악한 일본계 종자를 대체하는 효과를 기대함.</li> <li>2. 현재 남미 위주의 저가 시장에 수출되는 브로콜리 종자를 북미, 유럽, 일본 등의 프리미엄 시장과 시장이 확대 중인 인도 및 중국 시장 진출을 추진할 계획임.</li> <li>3. 고기능성 신품종 보급을 통한 국내 프리미엄 브로콜리 시장을 개척하여 재배 농작물 선택에 어려움을 겪는 국내 농가에게 고수의 작물을 재배할 기회를 제공함.</li> <li>4. 본 과제를 통해 개발된 기능성분 함량증대 기술은 같은 십자화과 작물(배추, 무, 양배추, 콜라비, 케일)에도 적용이 가능함. 따라서 글로벌 십자화과 작물 대상의 기능성 고함량 품종을 개발을 통해 글로벌 시장 개척이 가능해지고, 이로 인한 매출 증대와 고가의 프리미엄 시장 개척을 통한 수익성 향상이라는 부수적 효과도 창출될 것으로 기대됨.</li> </ol>				
국문핵심어 (5개 이내)	브로콜리	글루코라파닌	유전자편집	계통 육성	크리스퍼캐스9
영문핵심어 (5개 이내)	Broccoli	Glucoraphanin	Genome Editing	Inbreeding Line Development	CRISPR/Cas9

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

## 〈 목 차 〉

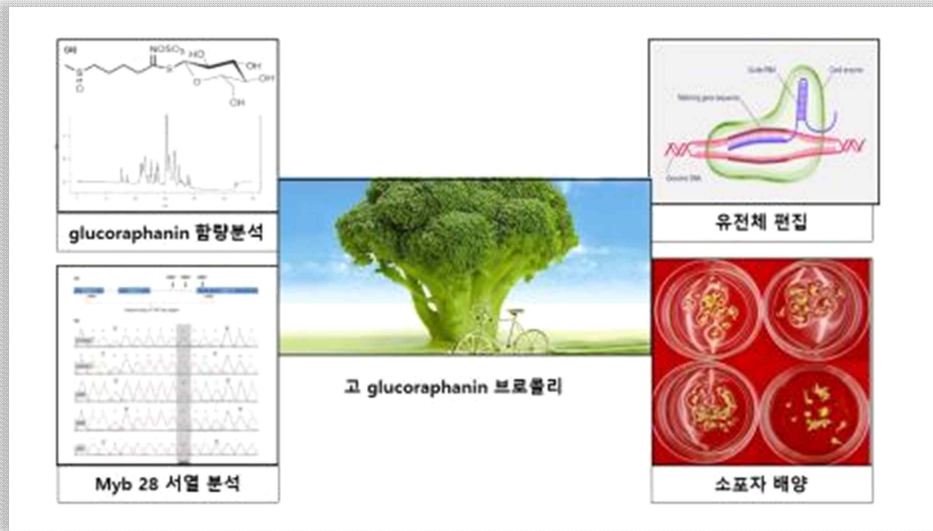
1. 연구개발과제의 개요 .....	6
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	15
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	97
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	101
붙임. 참고 문헌 .....	103

〈별첨〉 주관연구기관의 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

○ 항암 효능이 뛰어난 물질로 알려진 “설폰라판 “ 합성에 중요한 전구물질인 글루코라파닌 (GR) 이 풍부한 ” 고기능성 브로콜리 “ 품종 개발을 위한 육성 계통을 개발하고자 함.



[그림 1. 연구 개발 목표 및 주요 핵심기술 개요]

## 1-2. 연구개발의 필요성

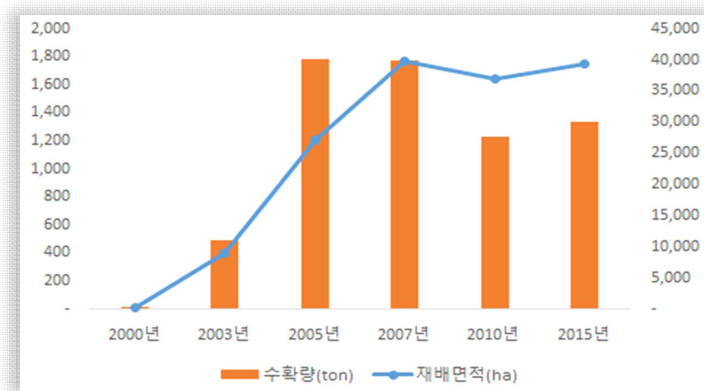
**고기능성 (고함량의 설폰라판/글루코라파닌) 브로콜리 품종 육성에 대한 현재의 기술수준 (아래 제시)이 선진국 대비 낮은 수준이므로, 이를 타개할 신규 기능성 품종육성 기술 개발이 필요하다.**

○ 국내 기술 수준 및 시장 현황

- CRISPR/Cas9 기반 유전체 편집 기술 현황
  - 유전자편집 (유전자 가위 혹은 CRISPR/Cas9) 기술을 적용해서 상추, 벼, 담배, 애기장대에서 목표형질을 발현 시켜서 연구 목적에 활용하는 수준이다.
  - 국내의 Toolgene(툴젠) 이 CRISPR/Cas9을 활용한 동식물 육종 분야에서 세계적인 수준의 원천 기술을 보유하고 있다.
  - CRISPR/Cas9을 활용한 유전체 편집은 그동안 지속적으로 논란이 되어 왔던 GMO (Genetically Modified Organisms, 유전자 변형 식물) 규제를 피해갈 수 있는 첨단 기술로 인식되고 있고, **육종 현장에 시급히 적용해야 할 중요 기술로 인식하는 추세이다.**
- 브로콜리 육종 기술 현황
  - 십자화과 채소에 대한 국내 육종 기술은 세계적인 수준이지만, 주로 전통적인 교배육종을 통해 상업 품종이 생산되고 있다.

- 특히 고순도 F<sub>1</sub> 종자 생산을 위해서 응성불임성을 이용한 채종방법이 선행되므로 우수한 응성불임 계통의 확보가 점점 중요해지는 상황이다.
- 현재까지 국내 브로콜리 품종 육성은 주로 외형적 특성 (돔형의 화퇴모양, 미세한 화퇴입자, 안토시아닌 착색 저항성, 굵은 줄기, 줄기 내부의 동공 발생 억제 등)을 개량하는 방향으로 진행되어 왔다.
- 해외에서는 십자화과 작물의 주요 기능성분 (셀포라판) 함량을 증대시킨 품종 육성에 대한 관심이 급증하는 추세이고, 2011년말 출시된 “베네포르테” 품종이 영국, 북미, 일본 등지의 프리미엄 시장을 개척하는 것이 큰 계기가 된 것 같다. 이러한 해외 선진 시장의 고기능성 브로콜리 품종육성 기술 수준의 발전 동향을 고려하면 국내 기술은 취약한 수준이다.
- 고기능성 품종을 요구하는 최근 소비자 동향을 고려하면 해외의 고기능성 품종의 국내로 유입되는 상황이 예견되므로, 이에 대한 대비로 기능성 성분의 함량을 증대시킨 신 품종 육성 기술 개발이 필요한 상황이다.
- 이와 더불어서 농가 소득 및 국민 보건 향상에 기여하기 위해서는 기능성 성분의 함량을 증대시킨 신 품종 육성이 필요하고 이에 따른 기술 개발이 필요한 상황이다.
- 하지만 전통 교배육종을 통한 품종 개발에는 막대한 비용과 시간이 필요하므로 유전체 편집기술 같은 첨단 기술을 적용하여 단기간에 계통 육성이 가능한 기술 개발이 절대적으로 필요한 상황이다.
- 국내에서 브로콜리 품종육성을 진행 중인 회사로는 아시아종묘(주), 조은종묘(주), 코레곤종묘(주) 등이 있다.
  - 아시아종묘(주)에서는 현재 조생종 ‘얼리유’, 중조생종 ‘에쿠스’, 만생종 ‘킹덤’, 등의 품종과 재배적응성이 뛰어난 ‘그린송’, 내서성이 우수한 ‘햇브로’ 등의 국내·외 재배 작형을 커버하는 품종 군을 육성하여 국내·외 시장을 개척하는 중이다.
  - 조은종묘(주)의 경우에는 ‘머쉬그린’, ‘슈퍼그린’, ‘알파그린’ 등 중생종 3품종을 개발하여 국내·외 시장 개발 중이다.
  - 코레곤종묘(주) 일본 Takii사의 브로콜리 품종 군을 수입하여 국내시장에서 대행판매를 하며 자체육성프로그램을 진행 중이나 아직 상업화한 자체개발 품종은 없는 실정이다.
- 브로콜리 작물 특성
  - 우리나라에는 1952년에 미군의 군납채소로 최초 도입되어 재배되기 시작하였고, 현재 국내에 유통되는 품종은 극조생부터 만생에 이르기까지 다양한 품종이 재배되고 있다.
  - 항산화물질로 알려진 글루코시놀레이트, 플라보노이드, 셀포라판 등이 다량 함유되어 있기 때문에, 미국 타임지가 선정한 10대 건강식품 중 하나로 선정되기도 하였으며, 이처럼 건강에 유익한 성분을 많이 함유하고 있다는 사실이 알려지므로 최근들어 소비가 지속적으로 증가하는 추세이다.
- 브로콜리 국내 재배면적 및 수확량 변화
  - 지역적으로 온도 및 품종에 따라 생태형 및 작형에도 차이가 크게 나타난다.

- 가장 온난한 제주지역에서는 10~11년도 5월, 전남 및 경남지역은 10~12월과 5~6월, 경북 및 충청지역은 5~6월과 9~11월, 그리고 강원지역은 6~11월까지 수확된다.
- 브로콜리는 온도 변화에 민감하여 연중 생산량이 불균일하고 이에 따른 가격 변동 폭이 심한 작물이다.
- 브로콜리가 대량 출하되는 5~6월경에는 가격이 폭락하지만, 여름철 고온기에는 생산량이 줄어들며, 화퇴형태 또한 브로콜리 고유의 모습이 아닌 부정형을 나타내고 병해 감염의 위험성도 높을 뿐만 아니라, 수확 후에도 고온에 의해 호흡량이 높아져 시들음과 황화가 빠르게 진행되기 때문에 가격이 높게 형성된다..
- 1995년 5ha에서 2007년 1,771ha을 최고점으로 하여 2009년 1,717ha, 2010년 1,639ha 등 재배면적은 현재까지 평균 1,750ha 수준을 유지하고 있다 (그림 2). 지역별로 보면 월동이 가능한 제주 지역이 전국 재배지의 75% 이상을 차지하고 그 다음으로 강원도 지역(고랭지)이 13%정도 차지하는 상황이다.
- 생산량은 1995년 160톤에서, 2006년 40,065톤으로 최고 생산량을 기록하였으나 그 후 봄철 이상저온, 여름 잦은 강우 등의 이상기온으로 인한 작황부진 및 병충해로 인하여 수확량은 2009년 25,647톤, 2010년 27,742톤으로 감소하였으며, 현재는 약 30,000톤/연 정도를 유지하고 있음.



[그림 2. 브로콜리 재배면적 및 수확량]

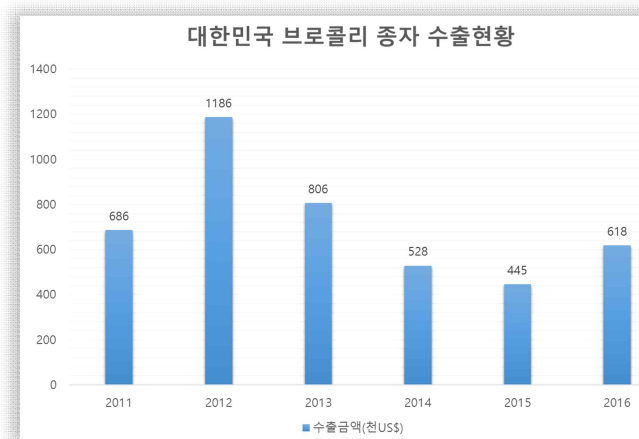
- 브로콜리 재배 특성상 고온의 하절기에 생산량이 급감하므로, 브로콜리 수입은 주로 하절기에 이루어지며, 2007년 11,336톤을 정점으로 2010년에는 7,365톤이었으며 대부분의 물량은 중국으로부터 도입하고 있고, 현재 약 13,000톤 정도가 수입되고 있는 것으로 추정된다. 수출은 미비한 상황이지만 대만, 일본, 싱가포르 등에 주로 수출되고 있다.
- 국내 브로콜리 시장 규모
  - 2016년 기준 국내 브로콜리 생산량은 30,000톤 규모이고 매년 주로 중국으로부터 10,000톤 정도가 수입되어 연간 40,000톤이 소비되고 있어 평균 가격으로 환산하면 1천 억원 규모의 시장을 형성하고 있는 상황이다.
  - 국내 브로콜리 종자 시장은 약 20억원 규모로 형성되어 있으며 95% 이상이 Sakata사

등의 일본수입종자들이 시장을 점유하고 있다.

- 따라서 이를 대체할 국내 품종 개발이 절실한 상황이지만, 영세한 국내 시장 규모로 국내회사의 투자가 미흡한 상황이지만 글로벌시장 까지 복합적으로 고려할 경우 고기능성 브로콜리 품종 개발에 대한 투자가 시급한 상황임.

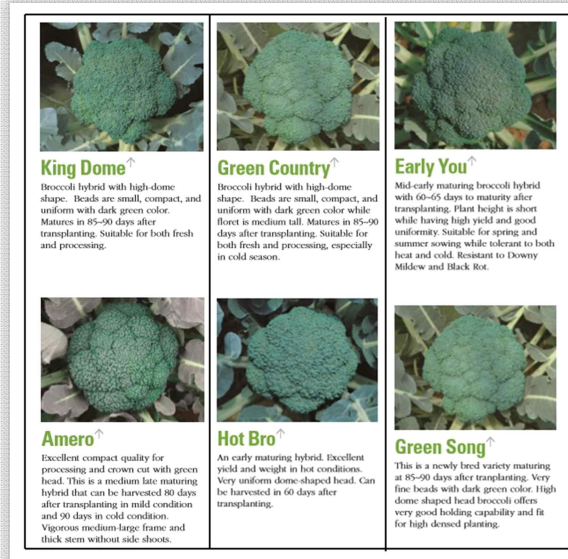
- 브로콜리 종자의 수출 현황

- 양배추, 무, 배추 등 국산 십자화과 작물의 종자 수출은 다른 작물들에 비해 활발하게 이루어지는 상황임.
- 하지만 브로콜리 종자 수출은 120만불 ( '12년) 정도로 정점을 이루었지만, 최근 들어 수출이 지속적으로 감소되면서 수출을 위한 새로운 품종 개발이 절실한 상황이다 (그림 3)

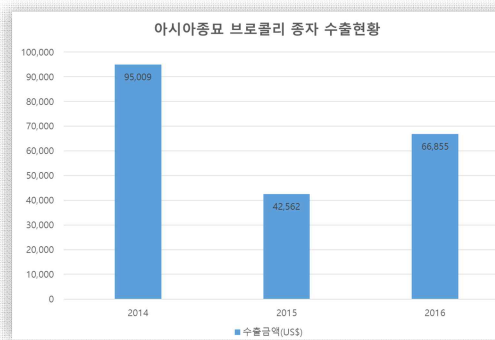


[그림 3. 한국의 브로콜리 종자 수출 현황 (2011-2016년 종자협회 브로콜리 종자수출통계)]

- 본 과제 참여기업인 아시아종묘(주)는 자체개발한 브로콜리 품종들을 현재 수출해 오고 있으며 지속적인 시장 확대를 위해서 활발한 시교활동 및 신품종 개발을 진행 중이다 (그림 4). 현재는 멕시코 등을 포함한 남미와 미주 시장, 중앙아시아와 중국 시장에 수출을 하고 있으며 인도, 베트남, 터키의 해외 지사와 사무소 등을 적극 활용하며 수출 증대에 매진하고 있다 (그림 5).



[그림 4. 아시아종묘(주)에서 수출중인 자체개발 브로콜리 품종군]



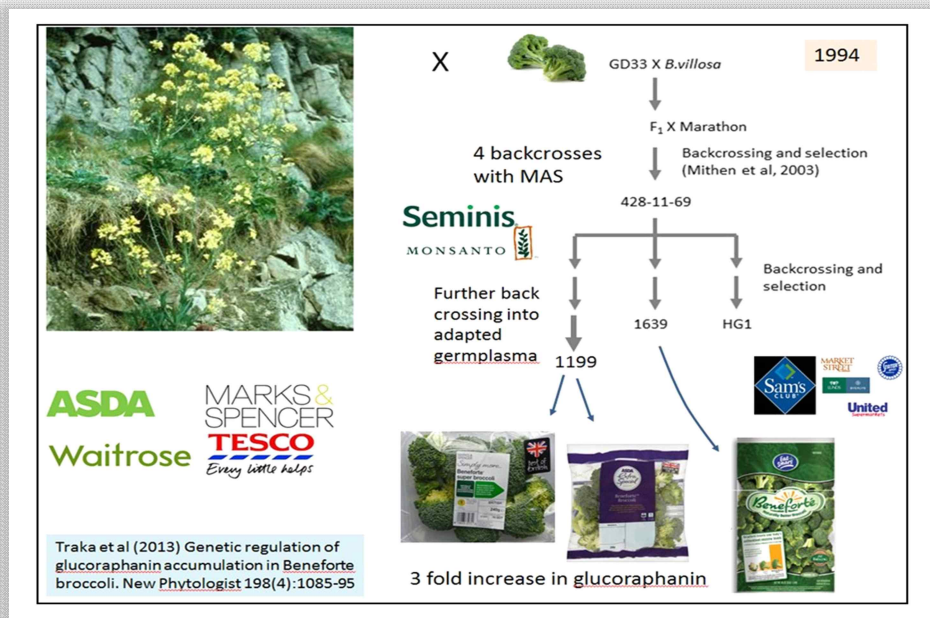
[그림 5. 아시아종묘(주)의 브로콜리 종자 수출 현황]

- 브로콜리 수입대체 및 수출 현황 개선 방안
  - 전세계 브로콜리 품종 시장은 일본 Sakata 사가 점유율 40-50%로 리딩하고 있다.
  - 농민과 농산물 유통 종사자들은 신품종의 위험부담 때문에 기존의 재배 품종을 바꾸려 하지 않경향이 강함. 따라서, 재배 농민과 농산물 유통의 특성상 현재 리딩 품종들을 단기간에 대체하기에는 어려움이 존재한다.
  - 따라서 시장 판도를 바꾸기 위해서, 기능성 물질을 풍부히 가진 고기능성 품종 육성이 필요한 상황이다.
  - 선진국에서는 GR 성분 함량이 증가된 ‘베네포르테’ 브로콜리를 개발하여 시장을 창출해 가는 과정에 있고, 이에 따라 기존의 일반 브로콜리 시장과 별개의 고기능성 프리미엄 시장이 태동하는 단계이다.
- 따라서, 본 연구팀은 최신 분자유종 기법인 유전자편집 기술을 적용하여 GR 함량이 증가된 계통을 육성하여 수입대체 및 수출용 브로콜리 신품종 개발에 활용하고자 한다.



○ 국외 기술 수준 및 시장 현황

- 전통육종 기술을 이용한 고품질 GR 브로콜리 개발 및 상품화
- 영국 식품연구소 (Institute of Food Research, Norwich Research Park, UK)의 Richard Mithen 교수는 야생종 브로콜리와 시판종의 교배육종을 통해 항암성분으로 알려진 glucosinolate 계열의 GR 함량이 일반 시판 품종보다 2~3배 이상 향상된 ‘베네포르테’ 품종을 개발 (’11년) 하여 세미나스를 통해 시장에 출시하였다 (그림 6).



[그림 6. GR 고품질 브로콜리 ‘베네포르테’ 육성 개요]

- ‘베네포르테’는 시장 출시 초기에 프리미엄 슈퍼마켓체인에서 기존 시판품종의 2배 가격에 판매가 시작되었고, 고기능성 식품 마케팅 전략을 통해 시장에 성공적으로 안착하였음. 현재에는 일반적인 대형유통업체에서도 판매가 활발하게 이루어지고 있으며, 북미, 아시아 지역의 프리미엄 시장에 진출하는 추세이다..
- 2012년도 영국의 일반 브로콜리 가격은 1파운드 /300 g 수준이었으나 고 GR함유 브로콜리 ‘베네포르테’는 2~2.5파운드/250 g 으로 일반 브로콜리에 비해 2배 이상의 가격으로 판매되었고 현재도 비슷한 가격 차이의 높은 가격으로 판매되고 있다.
- 시장 현황
  - 2010년대 브로콜리 최대 생산국은 중국으로서 전체 생산량의 45%정도를 차지하고 있으며, 그 뒤를 이어 인도(35%), 이탈리아(3%), 스페인(2.5%), 프랑스(1.5%) 등이 차지하고 있다 (FAO 2010).
  - 최대 생산국인 중국의 브로콜리 가격은 고품질의 일본의 3분의 1가격 수준으로 거래되고 있음. 미국은 일본의 2분의 1의 가격수준임. 중국과 미국 브로콜리에 대한 정보는 다음과 같음 (그림 7).



구분	품종형상 및 품종명	산지 및 작업	특성
중국			1  13`14cm/per (높이) 12`14cm/per (직경) 36개 또는 36개/광판지상자
	浙江省-山水·綠帶·機綠·梅綠 江蘇省-山水·綠帶·梅綠 福建省-綠帶·綠嶺·綠秀·馬拉松 山東省·綠嶺 河北省-山水·綠帶·綠嶺		
미국			
	Holtville:Coronado GreenBelt Captain Everest Marathon TriathlonSalinas SantaMaria:MarathonHeritage Legacy Liberty Patriot Crown Royal		

[그림 7. 중국과 북미 지역 브로콜리 품종 육종 현황]

- 1998년부터 일본의 브로콜리 시장이 크게 성장하면서 일본의 다양한 지역에서 브로콜리 재배되어 전 세계로 수출되고 있다. 이 당시 개발된 대표적인 품종은 다음과 같다 (그림 8).

품종	형태	특성
早生綠 (와세미도리)		내병성에 강하고, 초세가 왕성하여 육묘 및 재배가 용이한 조생종으로 형태, 크기, 맛 모두 최고의 품종임. 적지재배에서는 정식 후 55일에 직경 18cm, 중량 400g 정도의 대과로 품질이 양호한 다수확 품종임.
唐嶺 (토우레이)		병(혹부병, 흑반병)에 강하고, 건조와 다습에도 강한 생육 왕성한 중만생 품종임. 길가지가 많아 다수확 품종임.
綠嶺 (료쿠레이)		씨 뿌린 후 105일 전후에 수확 할 수 있는 중조생종 품종임. 재배 적응성이 강해 어느 작형에서도 품질이 좋은 브로콜리를 수확 할 수 있음. 병에 비교적 강하고, 뿌리의 번창이 좋기 때문에 다습, 건조에 강한 품종임.

[그림 8. 일본계 회사의 브로콜리 품종]

- 현재는 북중미(멕시코, 과테말라, 온두라스 등)쪽에서 브로콜리 시장이 크게 형성되어 있어 그 규모는 약 20 백만달러 정도로 추정되며, 역시 일본 Sakata사의 브로콜리가 시장을 선도하는 상황이다.

- 전세계 브로콜리 및 종자 시장 규모

- 브로콜리는 연간 2천만톤 이상 생산되고 있으며 약 200억달러의 시장이 형성되어 있다 (FAO 2015).

- 브로콜리 종자 시장 규모는 연간 1억달러 규모로 추산되면 중국이 가장 큰 브로콜리 재배 생산 국가이다.

- 영국을 시작으로 미국 일본 등 선진국에서는 고기능성 브로콜리 품종인 ‘베네포르테’가 신규 시장을 만들어가고 있으며 5 A DAY 캠페인 (하루에 5가지 색깔의 다양한 채소를 먹자는 보건운동) 등과 더불어 건강기능성 채소 시장이 새롭게 만들어지는 중이다.

- 이러한 건강기능성 채소 시장은 선진국뿐만 아니라 경제 발전이 급속도로 이루어지는 중국, 인도 등의 신흥국을 비롯하여 전 세계적인 흐름이 될 것으로 보이며 이에 따라 기능성 품종 개발은 중요한 목표로 대두하는 상황이다.

- 경쟁 기관 현황

- 세계 브로콜리 종자 시장의 최강자는 일본 종자회사인 Sakata 임. 현재 브로콜리 종자 판매액은 400억원 수준이며, 전 세계 시장의 40-50%를 점유하는 상황이다.

- 세미니스사가 2011년도 후반기에 시장에 출시한 GR 고품유 ‘Beneforte’ 브로콜리는 영국을 시작으로 미주 시장에서 선풍적인 인기를 끌고 있고, 이를 바탕으로 일본을 위시한 아시아 시장으로 확대 진출하는 상황이다.

- 국내 십자화과(브로콜리) 육종기술은 선진국 선도 기업에 버금가는 수준이므로, 고기능성 물질 함유 브로콜리 품종 육성을 통해서 국내 시장 보호 및 수출 확대 전략 추진이 필요한 상황이다.

○ 상기의 현황 분석을 통해서 아래와 같은 연구 개발의 중요성을 제시할 수 있다.

- 브로콜리 국내 종자 시장 규모는 영세하고, 사카다를 비롯한 일본 업체가 95% 이상 장악하는 상황이므로 이를 타개할 대책이 절실히 필요한 상황이다.

- 특히, 최근의 과채류 소비 증가와 건강에 유익한 농산물을 선호하는 추세를 감안하면, 브로콜리 관련 시장이 증가할 것으로 기대되므로, 이러한 시장 개척에 필요한 고기능성 품종 육성이 필요한 상황이다.

- 전 세계 브로콜리 종자 시장 규모는 1억불 정도이고, 일본계 업체가 40-50%를 장악하는 상황이다. 최근 들어 다국적 기업이 고기능성 품종을 출시하면서 프리미엄 시장이 태동하고 있고, 중국과 인도 등의 시장 규모가 커지면서 전반적으로 시장 규모가 확대되는 상황이므로, 신규 고기능성 프리미엄 시장에 필요한 고기능성 품종 육성이 필요한 상황이다.

- 브로콜리는 다른 채소작물과는 달리 지역 적응성이 뛰어나다. 그러므로, 우수한 품종을 개발하면 국내·외 시장 구분 없이 판매가 가능하다는 장점이 있다. 그리고 품종 육성에 오랜 시간이 걸린다는 단점이 있지만, 시장에 출시된 품종의 제품 수명 (product life

cycle)이 길다는 장점이 있으므로, 전반적으로 수익성이 높은 제품군이다. 따라서 브로콜리 제품 육성 역량이 부족한 국내 종자회사도 관련 기술을 축적하여 시장 개척이 필요한 상황이다.

- 지금까지 국내의 영세한 시장규모로 인해 브로콜리 품종 육성에 대한 투자가 미흡했지만, 국내뿐만 아니라 국외 시장의 동반 성장 가능성, 광범위한 지역 적응성, 프리미엄 시장의 태동 등의 관점에서 보면 적절한 투자를 통한 기술 개발을 진행하면 선진국 프리미엄 시장 진출이 가능할 것으로 여겨지므로 현재의 낮은 품종 육성 기술을 개선할 필요성이 크다.
- 브로콜리는 재배 특성상 품종 육성에 시간이 오래 걸린다. GR 함량이 높은 '베네포르테'는 야생종 브로콜리인 *Brassica villosa* 와 일반 브로콜리 계통간의 전통교배를 통해 개발된 것으로 20여년의 품종 육성 기간이 소요되었다. 따라서 기존의 전통적인 교배육종을 통해서 단기간에 선진국과의 기술 격차를 좁힐 수 없을 것으로 판단된다. 따라서 전통 교배육종을 대체할 방안이 필요하고, 본 과제에서는 최근에 개발된 유전자편집 기술을 적용하여 단기간에 (본 과제 수행 기간) 육종 계통을 개발하고자 한다.

### 1-3. 연구개발 범위

- 본 과제는 유전자편집 기술을 적용하여 GR 고함량 브로콜리 계통 육성에 필요한 관련 기술 개발을 본 과제의 연구개발 범위로 한정한다.
  - GR 성분분석 기법 확립 : HPLC 분석을 위한 브로콜리 전처리 추출물 확보 기술과 확보된 추출물을 이용한 HPLC 분석 기법을 확립하고, 본 분석법을 활용하여, GR 고함량 육종계통 및 교배조합 개체를 선발하는데 까지 본 과제의 연구 내용에 포함시킨다.
  - GR 생합성 기작 규명 : 글루코시놀레이트는 십자화과 작물의 대표적인 기능성 물질이고, GR는 브로콜리의 대표적인 기능성 물질이다. 하지만 브로콜리의 GR 생합성 경로에 관여하는 생합성 관련 유전자와 이들 유전자들의 발현을 조절하는 전사 조절자에 대한 심도 높은 이해가 부족한 상황이므로 브로콜리의 GR 생합성에 대한 기작 연구도 본 과제에서 추진한다.
  - 브로콜리 품종별 및 발달 단계별 GR 함량 분석 : 현재 시장 리딩 품종과 아시아종묘(주)에서 육성중인 품종(계통)과의 GR 함량 분석을 통한 적절한 육성 목표 제시와 브로콜리 발달 단계에 따른 GR 함량 분석을 통해서 품종 육성 프로그램 운영 시 적절한 GR 함량 분석 시기를 제시하는데 까지 본 과제의 연구 내용에 포함시킨다.
  - GR 함량 증대를 위한 효율적인 재배법 제시 : GR를 포함한 글루코시놀레이트는 황화합물 (Sulphur) 계열의 물질로, 주로 외부 스트레스에 대해 식물체를 보호하는 기작에 의해 생합성이 증대된다고 알려져 있다. 따라서 식물 스트레스에 관여하는 호르몬과 황화합물을 대상으로 GR 함량 증대를 위한 적절한 처리 방안을 제시하는데 까지 본 과제의 연구 내용에 포함시킨다.
  - MYB28 서열과 GR 생합성 관계 규명 : MYB28 유전자 서열 변이와 GR 생합성과의 관계 규명을 통해서 본 과제가 목표로 하는 MYB28 유전자 대상의 유전자편집을 통한 GR 함량 증대에 원론적인 데이터를 제시하는데 까지 본 과제의 연구 내용에 포함시킨다.

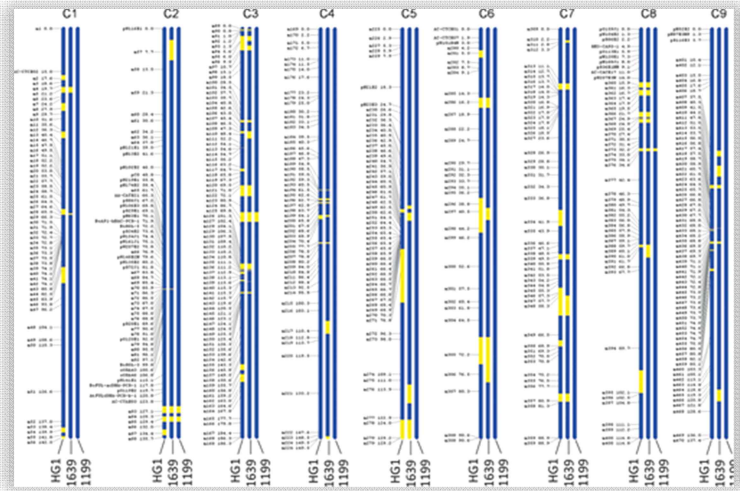
- **GR 고함량 조절 *MYB28* 특이 염기서열 분석** : GR 함량이 높은 개체와 낮은 개체 간에 존재하는 *MYB28* 염기서열의 상이성을 파악하고 이러한 서열 차이가 다양한 개체들 간에 공통적으로 존재하는 서열임을 확인함. 이런 염기서열을 대상으로 CRISPR/Cas9 기술을 적용하여 생산된 다양한 변이체로부터 GR 고함량 생산에 최적화된 *MYB28* 염기서열을 가진 개체를 선정하여 소포자 배양을 유도함.
- **유전체 편집 기술 적용을 통한 GR 고함량 개체 개발** : GR 고함량 브로콜리 개체 개발을 위하여 브로콜리 생체 내에서 GR 생합성이 최적화된 *MYB28* 염기서열 변이를 유도할 sgRNA 설계, 제작된 sgRNA를 이용한 효율적인 원형질체 형질전환 기법 확립과 재분화 기술을 확립하는데 까지 본 과제의 연구 내용에 포함시킨다.
- **소포자 배양 기술** : 유전체 편집을 통해 *MYB28* 염기서열이 변이된 개체들을 단기간에 고정시키기 위해서는 T<sub>0</sub> 개체에서 소포자를 분리해서 고정된 계통 ((Double haploid)으로 육성하는 소포자 배양기술이 필요할 뿐만 아니라, 기존 육종을 대상으로 단 기간에 다양한 특성을 가진 육종 계통을 육성 할 수 있으므로, 효율적인 브로콜리 소포자 배양 기술을 확립하는데 까지 본 과제의 연구 내용에 포함시킨다.
- **계통 육성 및 조합 작성** : 본 과제 목표를 성공적으로 달성하기 위해서, 세종대학교 연구진과 아시아종묘(주) 연구진 간에 유기적인 관계를 유지하여, 유전자편집용 시료를 아시아종묘(주)에서 적절히 제공하고, 이들 시료를 활용하여 생산된 유전자편집 개체를 아시아종묘(주)에서 육종 프로그램에 적절히 도입하고, 아시아종묘(주)가 육성하는 계통 및 조합을 세종대학교 연구진에 GR 함량 평가를 실시해서 제공한다. 따라서 본 과제는 GR 고함량 개체 선발이라는 본 과제 목표 달성에 필요한 유전자편집 및 전통 육종기술을 전반에 걸쳐 유기적인 협력 관계를 유지하는데 까지 본 과제의 연구 내용에 포함시킨다.

## 2 연구수행 내용 및 결과

### 2-1. 제1세부 연구 내용 및 결과

#### 1. 베네포르테 (GR 고함량) 품종의 GR 생합성 증가 배경: *MYB28* 염기서열 중심

- 선행 문헌 조사에서 의하면 GR 함량이 높은 *Brassica vilosa* 야생자원을 활용하여 GR 함량이 높은 *Brassica oleracea* cv. Beneforte 가 개발되었다.
- 이들 자원들을 활용한 QTL mapping 결과 브로콜리 2번 염색체에 말단 부분 (*MYB28* 유전자 영역 포함) 에 GR 함량을 조절하는 주요 인자가 있는 것으로 알려졌다 (그림 9).



[그림 9. GR 고합량 조절 연관지도. 노란색 부분은 *B villosa* 염색체가 육종 계통 (푸른색으로 표시) 에 도입된 부분을 나타냄 (출처: Traka et al.,)]

- 실제 브로콜리 육종계통 과 베네포르테 품종 간의 *MYB28* 염기 서열을 확보 분석하였다.
  - 먼저 *MYB28* 전장 염기서열을 확보하기 위하여, 발아 후 2주가 지난 브로콜리 육종계통과, Beneforte 품종에서 total RNA를 추출하여, cDNA합성 키트를 이용하여 cDNA를 합성하였다.
  - 확보된 cDNA에 아래 프라이머 조합을 이용하여 RT-PCR 을 실시하여 *MYB28* 전장 염기서열을 육종계통과 베네포르테 품종에서 확보하였다.
    - MYB28-FL-For: 5' -ATGTCAAGAAAGCCATGTTG-3'
    - MYB28-FL-Rev: 5' -TCATATGATATGCTTTCCGA-3'
- 확보된 염기서열을 바탕으로 *MYB28* 유전자에 다형성 서열이 존재하는지 여부를 확인하여 아래와 같은 결과를 확보하였다.
  - 7개의 SNP 서열과 9bp deletion이 발견되었다 (그림 10). 이러한 서열 변이에 의해서 GR 생합성에 관여하는 유전자의 발현 조절을 통해 GR 함량의 차이를 유도하는 것으로 추정된다.

MYB28-Br	ATGTCAAGAAAGCCATGTTGTGTCGGAGAAGGGCTGAAGAAAGGGGCATGGACCACCGAG	60
MYB28-Be	ATGTCAAGAAAGCCATGTTGTGTCGGAGAAGGGCTGAAGAAAGGGGCATGGACCACCGAG	60
	*****	
MYB28-Br	GAAGATAAGAAACTCATCTCTTACATCCATGAACATGGAGAAGGAGGCTGGCGTGACATT	120
MYB28-Be	GAAGATAAGAAACTCATCTCTTACATCCATGAACATGGAGAAGGAGGCTGGCGTGACATT	120
	*****	
MYB28-Br	CCTCAAAAAGCTGGATTGAAAAGGTGTGAAAGAGTTGTAGACTGCGATGGACTAACTAC	180
MYB28-Be	CCTCAAAAAGCTGGATTGAAAAGGTGTGAAAGAGTTGTAGACTGCGATGGACTAACTAC	180
	*****	
MYB28-Br	CTAAAACCTGAAATCAAAGAGGCGAGTTTAGTTTCAAGAGGAGGAACAGATTATCATCATG	240
MYB28-Be	CTAAAACCTGAAATCAAAGAGGCGAGTTTAGTTTCAAGAGGAGGAACAGATTATCATCATG	240
	*****	
MYB28-Br	CTTCATGCTTCTCGTGGAAACAAGTGGTGGTTCATAGCGAGACATTTACCTAGAAGAACA	300
MYB28-Be	CTTCATGCTTCTCGTGGAAACAAGTGGTGGTTCATAGCGAGACATTTACCTAGAAGAACA	300
	*****	
MYB28-Br	GACAATGAGATCAAGAACTACTGGAACACACATCTCAAGAAACGTTTGATCGAACAGGGT	360

MYB28-Be	GACAATGAGATCAAGAACTACTGGAACACACATCTCAAGAAACGTTTGATCGAACAGGGT *****	360
MYB28-Br MYB28-Be	ACTGATCCCGTGACTCACAAGCCACTAGCTTCTAATACAAACCCTACTGTACCTGAGAAT ACTGATCCCGTGACTCACAAGCCACTAGCTTCTAATACAAACCCTACTGTACCTGAGAAT *****	420 420
MYB28-Br MYB28-Be	TTGCATTCCTTAGATGCATCTAGTTCCGACAAGCAATACTCCCGGTCAAGCTCAATGCCT TTGCATTCCTTAGATGCATCTAGTTCCGACAAGCAATACTCCCGGTCAAGCTCAATGCCT *****	480 480
MYB28-Br MYB28-Be	TCCATGTCTTGACTCCTTCCTCCGGTTTCAACACGGTTTTTCGAGAATACCAGCAAAGAT TCCATGTCTTGACTCCTTCCTCCGGTTTCAACACGGTTTTTCGAGAATACCAGCAAAGAT *****	540 540
MYB28-Br MYB28-Be	GGGACACCAGTTCGTGAGGACGATTCTTGAGTCGCAAGAAACGTTTGAAGAAATCAAGT GGGACACCAGTTCGTGAGGACGATTCTTGAGTCGCAAGAAACGTTTGAAGAAATCAAGT *****	600 600
MYB28-Br MYB28-Be	TCTACATCAAGGCTTTTGAACAAAGTTGCGGCTAAGGCCACTTCCATGAAAGAAGCTTTG TCTACATCAAGGCTTTTGAACAAAGTTGCGGCTAAGGCCACTTCCATGAAA <b>A</b> AAGCTTTG *****	660 660
MYB28-Br MYB28-Be	TCTGCTTCCATGGAAGGTAGCTTGAATGCTAATACAAGCTTTTCCAATGGCTACTCTGAG TCTGCTTCCATGGAAGGTAGCTTGAATGCTAATA <b>T</b> AAGCTTTTCCAATGGCTACTCTGAG *****	720 720
MYB28-Br MYB28-Be	CAGATTCTCAATGAAGATGATAGTCCTAATGCATCCCTCATAAACACTCTCGCCGAGTTC CAGATTCTCAATGAAGATGATAGTCCTAATGCATCCCTCATAAACACTCTCGCCGAGTTC *****	780 780
MYB28-Br MYB28-Be	GATCCCTTCCTCCAAACAACGTTTTACCCTGAGAATGAAATGAATACTACTTCTGATCTC GATCCCTTCCTCCAAACAACGTTTTACCCTGAGAATGAAATGAATACTACTTCTGATCTC *****	840 840
MYB28-Br MYB28-Be	GATATAGATCAGGACTACTTCTCACATTTTCTCGAAAATTTCCGGCAGAGATGATGACCAC GATATAGATCAGGACTACTTCTCACATTTTCTCGAAAATTTCCGGC <b>ACCA</b> ----- <b>T</b> ***** *	900 891
MYB28-Br MYB28-Be	AATGAGGAGCACTACATGAATCATAACTATGGTCATGATCTTCTTATGTCCGATGTGTCC AATGAGGAGCACTACATGAATCATAACTATGGTCATG <b>G</b> TCTTCTTATGT <b>CCT</b> ATGTGTCC *****	960 951
MYB28-Br MYB28-Be	CAAGAAGTCTCATCAACTAGCGTTGATGATCAAGACAATACTAATGAGGGTTGGTCAAAT CAAGAAGTCTCATCAACTAGCGTTGATGATCAAGACAATACTAATGAGGGTTGGTCAAAT *****	1020 1011
MYB28-Br MYB28-Be	TATCTTCTTGACCATGCTGATTTTATACATGACATGGATTCTGATTCCTCGGAAAGCAT TATCTTCTTGACCATGCTGATTTTATACATGACATGGATTCTGATTCCTCGGAAAGCAT *****	1080 1071
MYB28-Br MYB28-Be	ATCATATGA                    1089 ATCATATGA                    1080 *****	

[그림 10. MYB28 염기서열 비교. MYB28-Br은 브로콜리 육종계통에서 나온 MYB28 염기서열, MYB28-Be은 브로콜리 베네포르테 품종에서 나온 MYB28 염기서열]

- 상기의 뉴클레오타이드서열 변이가 다른 육종 계통에서도 발견되는지 여부를 확인하기 위해 아시아종묘에서 육성하는 계통을 대상으로 MYB28 염기서열을 증폭한 후 염기서열 분석을 실시하여 아래와 같은 결과를 확보하였다.

- 아래 결과에 나타나는 것처럼 몇 가지 서열 변이가 육종계통에서 나타났지만, GR 함량이 높은 베네포르테 (MYB28-Be) 품종과 육종계통들 간에 특이적인 염기서열 변이는 오

직 9bp deletion인 것으로 나타났다 (그림 11).

MYB28-Br-4	ATGTCAAGAAAGCCATGTTGTGTCGGAGAAGGGCTGAAGAAAGGGGCATGGACCACCGAG	60
MYB28-Br-5	ATGTCAAGAAAGCCATGTTGTGTCGGAGAAGGGCTGAAGAAAGGGGCATGGACCACCGAG	60
MYB28-Be	ATGTCAAGAAAGCCATGTTGTGTCGGAGAAGGGCTGAAGAAAGGGGCATGGACCACCGAG	60
MYB28-Br-1	ATGTCAAGAAAGCCATGTTGTGTCGGAGAAGGGCTGAAGAAAGGGGCATGGACCACCGAG	60
MYB28-Br-2	ATGTCAAGAAAGCCATGTTGTGTCGGAGAAGGGCTGAAGAAAGGGGCATGGACCACCGAG	60
MYB28-Br-3	ATGTCAAGAAAGCCATGTTGTGTCGGAGAAGGGCTGAAGAAAGGGGCATGGACCACCGAG	60
	*****	
MYB28-Br-4	GAAGATAAGAAACTCATCTTACATCCATGAACATGGAGAAGGAGGCTGGCGGCACATT	120
MYB28-Br-5	GAAGATAAGAAACTCATCTTACATCCATGAACATGGAGAAGGAGGCTGGCGGCACATT	120
MYB28-Be	GAAGATAAGAAACTCATCTTACATCCATGAACATGGAGAAGGAGGCTGGCGTGACATT	120
MYB28-Br-1	GAAGATAAGAAACTCATCTTACATCCATGAACATGGAGAAGGAGGCTGGCGTGACATT	120
MYB28-Br-2	GAAGATAAGAAACTCATCTTACATCCATGAACATGGAGAAGGAGGCTGGCGTGACATT	120
MYB28-Br-3	GAAGATAAGAAACTCATCTTACATCCATGAACATGGAGAAGGAGGCTGGCGGCACATT	120
	*****	
MYB28-Br-4	CCTCAAAAAGCTGGATTGAAAAGGTGTGAAAAGAGTTGTAGACTGCGATGGACTAACTAC	180
MYB28-Br-5	CCTCAAAAAGCTGGATTGAAAAGGTGTGAAAAGAGTTGTAGACTGCGATGGACTAACTAC	180
MYB28-Be	CCTCAAAAAGCTGGATTGAAAAGGTGTGAAAAGAGTTGTAGACTGCGATGGACTAACTAC	180
MYB28-Br-1	CCTCAAAAAGCTGGATTGAAAAGGTGTGAAAAGAGTTGTAGACTGCGATGGACTAACTAC	180
MYB28-Br-2	CCTCAAAAAGCTGGATTGAAAAGGTGTGAAAAGAGTTGTAGACTGCGATGGACTAACTAC	180
MYB28-Br-3	CCTCAAAAAGCTGGATTGAAAAGGTGTGAAAAGAGTTGTAGACTGCGATGGACTAACTAC	180
	*****	
MYB28-Br-4	CTAAAACCTGAGATCAAAAAGGGCGAGTTTAGTTTCAGAGGAGGAACAGATTATCATCATG	240
MYB28-Br-5	CTAAAACCTGAGATCAAAAAGGGCGAGTTTAGTTTCAGAGGAGGAACAGATTATCATCATG	240
MYB28-Be	CTAAAACCTGAAATCAAAAAGGGCGAGTTTAGTTTCAGAGGAGGAACAGATTATCATCATG	240
MYB28-Br-1	CTAAAACCTGAAATCAAAAAGGGCGAGTTTAGTTTCAGAGGAGGAACAGATTATCATCATG	240
MYB28-Br-2	CTAAAACCTGAAATCAAAAAGGGCGAGTTTAGTTTCAGAGGAGGAACAGATTATCATCATG	240
MYB28-Br-3	CTAAAACCTGAAATCAAAAAGGGCGAGTTTAGTTTCAGAGGAGGAACAGATTATCATCATG	240
	*****	
MYB28-Br-4	CTTCATGCTTCTCGTGAAACAAGTGGTCCGGTCATAGCGAGACATTTACCTAGAAGAACA	300
MYB28-Br-5	CTTCATGCTTCTCGTGAAACAAGTGGTCCGGTCATAGCGAGACATTTACCTAGAAGAACA	300
MYB28-Be	CTTCATGCTTCTCGTGAAACAAGTGGTCCGGTCATAGCGAGACATTTACCTAGAAGAACA	300
MYB28-Br-1	CTTCATGCTTCTCGTGAAACAAGTGGTCCGGTCATAGCGAGACATTTACCTAGAAGAACA	300
MYB28-Br-2	CTTCATGCTTCTCGTGAAACAAGTGGTCCGGTCATAGCGAGACATTTACCTAGAAGAACA	300
MYB28-Br-3	CTTCATGCTTCTCGTGAAACAAGTGGTCCGGTCATAGCGAGACATTTACCTAGAAGAACA	300
	*****	
MYB28-Br-4	GACAATGAGATCAAAAACCTACTGGAACACACATCTCAAGAAGCGTTTGATTGAACAGGGT	360
MYB28-Br-5	GACAATGAGATCAAAAACCTACTGGAACACACATCTCAAGAAGCGTTTGATTGAACAGGGT	360
MYB28-Be	GACAATGAGATCAAGAACCTACTGGAACACACATCTCAAGAAGCGTTTGATCGAACAGGGT	360
MYB28-Br-1	GACAATGAGATCAAGAACCTACTGGAACACACATCTCAAGAAGCGTTTGATCGAACAGGGT	360
MYB28-Br-2	GACAATGAGATCAAGAACCTACTGGAACACACATCTCAAGAAGCGTTTGATCGAACAGGGT	360
MYB28-Br-3	GACAATGAGATCAAGAACCTACTGGAACACACATCTCAAGAAGCGTTTGATCGAACAGGGT	360
	*****	
MYB28-Br-4	ACTCATCCCCTGACTCACAAGCCACTAGCTTCTAATACAAACCCTACTGTACCTGAGAAT	420
MYB28-Br-5	ACTCATCCCCTGACTCACAAGCCACTAGCTTCTAATACAAACCCTACTGTACCTGAGAAT	420
MYB28-Be	ACTGATCCCGTACTCACAAGCCACTAGCTTCTAATACAAACCCTACTGTACCTGAGAAT	420
MYB28-Br-1	ACTGATCCCGTACTCACAAGCCACTAGCTTCTAATACAAACCCTACTGTACCTGAGAAT	420
MYB28-Br-2	ACTGATCCCGTACTCACAAGCCACTAGCTTCTAATACAAACCCTACTGTACCTGAGAAT	420
MYB28-Br-3	ACTGATCCCGTACTCACAAGCCACTAGCTTCTAATACAAACCCTACTGTACCTGAGAAT	420
	*** *****	
MYB28-Br-4	TTGCATTCCCTAGATGCATCTAGTAATCCGACAAGCAATACTCCCGGTCAAGCTCAATG	480
MYB28-Br-5	TTGCATTCCCTAGATGCATCTAGTAATCCGACAAGCAATACTCCCGGTCAAGCTCAATG	480
MYB28-Be	TTGCATTCCCTAGATGCATCTAG---TTCCGACAAGCAATACTCCCGGTCAAGCTCAATG	477
MYB28-Br-1	TTGCATTCCCTAGATGCATCTAG---TTCCGACAAGCAATACTCCCGGTCAAGCTCAATG	477
MYB28-Br-2	TTGCATTCCCTAGATGCATCTAG---TTCCGACAAGCAATACTCCCGGTCAAGCTCAATG	477
MYB28-Br-3	TTGCATTCCCTAGATGCATCTAG---TTCCGACAAGCAATACTCCCGGTCAAGCTCAATG	477
	*****	
MYB28-Br-4	CCTTCCATGTCTTGTACTCCTTCTCCGGTTTCAACACGGTTTTTCGAGAATACCAGCAAA	540
MYB28-Br-5	CCTTCCATGTCTTGTACTCCTTCTCCGGTTTCAACACGGTTTTTCGAGAATACCAGCAAA	540
MYB28-Be	CCTTCCATGTCTTGTACTCCTTCTCCGGTTTCAACACGGTTTTTCGAGAATACCAGCAAA	537
MYB28-Br-1	CCTTCCATGTCTTGTACTCCTTCTCCGGTTTCAACACGGTTTTTCGAGAATACCAGCAAA	537
MYB28-Br-2	CCTTCCATGTCTTGTACTCCTTCTCCGGTTTCAACACGGTTTTTCGAGAATACCAGCAAA	537
MYB28-Br-3	CCTTCCATGTCTTGTACTCCTTCTCCGGTTTCAACACGGTTTTTCGAGAATACCAGCAAA	537
	*****	



MYB28-Br-4	GATGGGACACCAGTTCGTGAGGACGATTCCTTGAGTCGCAAGAAACGTTTTAAGAAATCA	600
MYB28-Br-5	GATGGGACACCAGTTCGTGAGGACGATTCCTTGAGTCGCAAGAAACGTTTTAAGAAATCA	600
MYB28-Be	GATGGGACACCAGTTCGTGAGGACGATTCCTTGAGTCGCAAGAAACGTTTTAAGAAATCA	597
MYB28-Br-1	GATGGGACACCAGTTCGTGAGGACGATTCCTTGAGTCGCAAGAAACGTTTTAAGAAATCA	597
MYB28-Br-2	GATGGGACACCAGTTCGTGAGGACGATTCCTTGAGTCGCAAGAAACGTTTTAAGAAATCA	597
MYB28-Br-3	GATGGGACACCAGTTCGTGAGGACGATTCCTTGAGTCGCAAGAAACGTTTTAAGAAATCA	597
	*****	
MYB28-Br-4	AGTTCTACATCAAGGCTTTTGAACAAAGTTGCGGCTAAGGCCACTTCCATGAAAGAAGCT	660
MYB28-Br-5	AGTTCTACATCAAGGCTTTTGAACAAAGTTGCGGCTAAGGCCACTTCCATGAAAGAAGCT	660
MYB28-Be	AGTTCTACATCAAGGCTTTTGAACAAAGTTGCGGCTAAGGCCACTTCCATGAAAAAAGCT	657
MYB28-Br-1	AGTTCTACATCAAGGCTTTTGAACAAAGTTGCGGCTAAGGCCACTTCCATGAAAGAAGCT	657
MYB28-Br-2	AGTTCTACATCAAGGCTTTTGAACAAAGTTGCGGCTAAGGCCACTTCCATGAAAGAAGCT	657
MYB28-Br-3	AGTTCTACATCAAGGCTTTTGAACAAAGTTGCGGCTAAGGCCACTTCCATGAAAGAAGCT	657
	*****	
MYB28-Br-4	TTGTCTGCTTCCATGGAAGGTAGCTTGAATGCTAATAAAGCTTTTCCAATGGCTACTCT	720
MYB28-Br-5	TTGTCTGCTTCCATGGAAGGTAGCTTGAATGCTAATAAAGCTTTTCCAATGGCTACTCT	720
MYB28-Be	TTGTCTGCTTCCATGGAAGGTAGCTTGAATGCTAATAAAGCTTTTCCAATGGCTACTCT	717
MYB28-Br-1	TTGTCTGCTTCCATGGAAGGTAGCTTGAATGCTAATAAAGCTTTTCCAATGGCTACTCT	717
MYB28-Br-2	TTGTCTGCTTCCATGGAAGGTAGCTTGAATGCTAATAAAGCTTTTCCAATGGCTACTCT	717
MYB28-Br-3	TTGTCTGCTTCCATGGAAGGTAGCTTGAATGCTAATAAAGCTTTTCCAATGGCTACTCT	717
	*****	
MYB28-Br-4	GAGCAGATTCTCAATGAAGATGATAGTCTAATGCATCCCTCATAAACACTCTCGCCGAG	780
MYB28-Br-5	GAGCAGATTCTCAATGAAGATGATAGTCTAATGCATCCCTCATAAACACTCTCGCCGAG	780
MYB28-Be	GAGCAGATTCTCAATGAAGATGATAGTCTAATGCATCCCTCATAAACACTCTCGCCGAG	777
MYB28-Br-1	GAGCAGATTCTCAATGAAGATGATAGTCTAATGCATCCCTCATAAACACTCTCGCCGAG	777
MYB28-Br-2	GAGCAGATTCTCAATGAAGATGATAGTCTAATGCATCCCTCATAAACACTCTCGCCGAG	777
MYB28-Br-3	GAGCAGATTCTCAATGAAGATGATAGTCTAATGCATCCCTCATAAACACTCTCGCCGAG	777
	*****	
MYB28-Br-4	TTCGATCCCTTCTCCAAACAACGTTTTACCCTGAGAATGAGATGAATACTACTTCTGAT	840
MYB28-Br-5	TTCGATCCCTTCTCCAAACAACGTTTTACCCTGAGAATGAGATGAATACTACTTCTGAT	840
MYB28-Be	TTCGATCCCTTCTCCAAACAACGTTTTACCCTGAGAATGAAATGAATACTACTTCTGAT	837
MYB28-Br-1	TTCGATCCCTTCTCCAAACAACGTTTTACCCTGAGAATGAAATGAATACTACTTCTGAT	837
MYB28-Br-2	TTCGATCCCTTCTCCAAACAACGTTTTACCCTGAGAATGAAATGAATACTACTTCTGAT	837
MYB28-Br-3	TTCGATCCCTTCTCCAAACAACGTTTTACCCTGAGAATGAAATGAATACTACTTCTGAT	837
	*****	
MYB28-Br-4	CTCGGTATAGATCAGGACTACTTCTCACATTTTCTCGAAAAATTCGGCAACCATGATGAC	900
MYB28-Br-5	CTCGGTATAGATCAGGACTACTTCTCACATTTTCTCGAAAAATTCGGCAACCATGATGAC	900
MYB28-Be	CTCGATATAGATCAGGACTACTTCTCACATTTTCTCGAAAAATTCGGCAACCA-----	890
MYB28-Br-1	CTCGATATAGATCAGGACTACTTCTCACATTTTCTCGAAAAATTCGGCAGAGATGATGAC	897
MYB28-Br-2	CTCGATATAGATCAGGACTACTTCTCACATTTTCTCGAAAAATTCGGCAGAGATGATGAC	897
MYB28-Br-3	CTCGATATAGATCAGGACTACTTCTCACATTTTCTCGAAAAATTCGGCAGAGATGATGAC	897
	*** ***** *	
MYB28-Br-4	CATAATGAGGAGCACTACATGAATCATAACTATGGTCATGGTCTTCTTATGTCCTATGTG	960
MYB28-Br-5	CATAATGAGGAGCACTACATGAATCATAACTATGGTCATGGTCTTCTTATGTCCTATGTG	960
MYB28-Be	---TAATGAGGAGCACTACATGAATCATAACTATGGTCATGGTCTTCTTATGTCCTATGTG	948
MYB28-Br-1	CACAATGAGGAGCACTACATGAATCATAACTATGGTCATGATCTTCTTATGTCCTGATGTG	957
MYB28-Br-2	CACAATGAGGAGCACTACATGAATCATAACTATGGTCATGATCTTCTTATGTCCTGATGTG	957
MYB28-Br-3	CACAATGAGGAGCACTACATGAATCATAACTATGGTCATGATCTTCTTATGTCCTGATGTG	957
	*****	
MYB28-Br-4	TCCCAAGAAGTCTCATCAACTAGCGTTGATGATCAAGACAATACTAATGAGGGTTGGTCA	1020
MYB28-Br-5	TCCCAAGAAGTCTCATCAACTAGCGTTGATGATCAAGACAATACTAATGAGGGTTGGTCA	1020
MYB28-Be	TCCCAAGAAGTCTCATCAACTAGCGTTGATGATCAAGACAATACTAATGAGGGTTGGTCA	1008
MYB28-Br-1	TCCCAAGAAGTCTCATCAACTAGCGTTGATGATCAAGACAATACTAATGAGGGTTGGTCA	1017
MYB28-Br-2	TCCCAAGAAGTCTCATCAACTAGCGTTGATGATCAAGACAATACTAATGAGGGTTGGTCA	1017
MYB28-Br-3	TCCCAAGAAGTCTCATCAACTAGCGTTGATGATCAAGACAATACTAATGAGGGTTGGTCA	1017
	*****	
MYB28-Br-4	AATTATCTTCTTGACCATGCTGATTTTATACATGACATGGATTCTGATCCCTCGGAAAG	1080
MYB28-Br-5	AATTATCTTCTTGACCATGCTGATTTTATACATGACATGGATTCTGATCCCTCGGAAAG	1080
MYB28-Be	AATTATCTTCTTGACCATGCTGATTTTATACATGACATGGATTCTGATCCCTCGGAAAG	1068
MYB28-Br-1	AATTATCTTCTTGACCATGCTGATTTTATACATGACATGGATTCTGATCCCTCGGAAAG	1077
MYB28-Br-2	AATTATCTTCTTGACCATGCTGATTTTATACATGACATGGATTCTGATCCCTCGGAAAG	1077
MYB28-Br-3	AATTATCTTCTTGACCATGCTGATTTTATACATGACATGGATTCTGATCCCTCGGAAAG	1077
	*****	
MYB28-Br-4	CATCTCATATGA 1092	
MYB28-Br-5	CATCTCATATGA 1092	
MYB28-Be	CATATCATATGA 1080	
MYB28-Br-1	CATATCATATGA 1089	



```

MYB28-Br-2    CATATCATATGA 1089
MYB28-Br-3    CATCTCATATGA 1089
***          *****

```

[그림 11. MYB28 염기서열 비교. MYB28-Br-1에서 MYB28-Br-5은 브로콜리 육종계통에서 나온 MYB28 염기서열, MYB28-Be은 브로콜리 베네포르테 품종에서 나온 MYB28 염기서열]

- 육종 계통과 베네포르테 간의 MYB28 아미노산 서열 분석
  - MYB28 염기서열의 다형성을 심도 깊게 분석하기 위해서, 육종 계통과 베네포르테 간의 MYB28 아미노산 (aa) 서열을 비교한 결과, 아래처럼 5개 aa 서열변이와 3개의 aa deletion 이 발견되었다 (그림 12).

```

KD_MYB28    MSRKPCCVGEGLLKKGAWITTEEDKKLISYIHEHGEGGWFDIPQKAGLKRGGKSCRLRWITNY
BF_MYB28    MSRKPCCVGEGLLKKGAWITTEEDKKLISYIHEHGEGGWFDIPQKAGLKRGGKSCRLRWITNY
BF_MYB28Δ9bp MSRKPCCVGEGLLKKGAWITTEEDKKLISYIHEHGEGGWFDIPQKAGLKRGGKSCRLRWITNY
*****

KD_MYB28    LKPEIKRGEFSSEEEQIIIMLHASRGNKWSVIARHLPRRTONEIKNYWNTLKKRLIEQG
BF_MYB28    LKPEIKRGEFSSEEEQIIIMLHASRGNKWSVIARHLPRRTONEIKNYWNTLKKRLIEQG
BF_MYB28Δ9bp LKPEIKRGEFSSEEEQIIIMLHASRGNKWSVIARHLPRRTONEIKNYWNTLKKRLIEQG
*****

KD_MYB28    TDPVTHKPLASNTNPTVPENLHSLDASSSDKQYSRSSSMPMSCTPSSGFNTVFENTSKD
BF_MYB28    TDPVTHKPLASNTNPTVPENLHSLDASSSDKQYSRSSSMPMSCTPSSGFNTVFENTSKD
BF_MYB28Δ9bp TDPVTHKPLASNTNPTVPENLHSLDASSSDKQYSRSSSMPMSCTPSSGFNTVFENTSKD
*****

KD_MYB28    GTPVFEEDSLSRKKRLKKSSTSRLLNKVAAKATSMKEALSASMEGSLNANTSFNGYSE
BF_MYB28    GTPVFEEDSLSRKKRLKKSSTSRLLNKVAAKATSMKEALSASMEGSLNANTSFNGYSE
BF_MYB28Δ9bp GTPVFEEDSLSRKKRLKKSSTSRLLNKVAAKATSMKALSASMEGSLNANISFNGYSE
*****

KD_MYB28    QILNEDDSSNASLINTLAEPDFLQTTFPENEMNTTSOLDIQDQYFSHFLENFGFDGDH
BF_MYB28    QILNEDDSSNASLINTLAEPDFLQTTFPENEMNTTSOLDIQDQYFSHFLENFGFDGDH
BF_MYB28Δ9bp QILNEDDSSNASLINTLAEPDFLQTTFPENEMNTTSOLGIQDQYFSHFLENFGN---H
*****

KD_MYB28    NEEHYMNHNHVGHOLLMSDVSQEVSSSTSVDDQDNTNEGWSNVLLDHADFIHMDSDSLGH
BF_MYB28    NEEHYMNHNHVGHOLLMSDVSQEVSSSTSVDDQDNTNEGWSNVLLDHADFIHMDSDSLGH
BF_MYB28Δ9bp NEEHYMNHNHVGHLLMSVWSQEVSSSTSVDDQDNTNEGWSNVLLDHADFIHMDSDSLGH
*****

```

[그림 12. MYB28 아미노산서열 비교. KD\_MYB28은 브로콜리 육종계통에서 나온 MYB28 아미노산서열, BF\_MYB28와 BF\_MYB28Δ9bp은 F1인 베네포르테 품종 유래의 두 종류의 MYB28 아미노산서열]

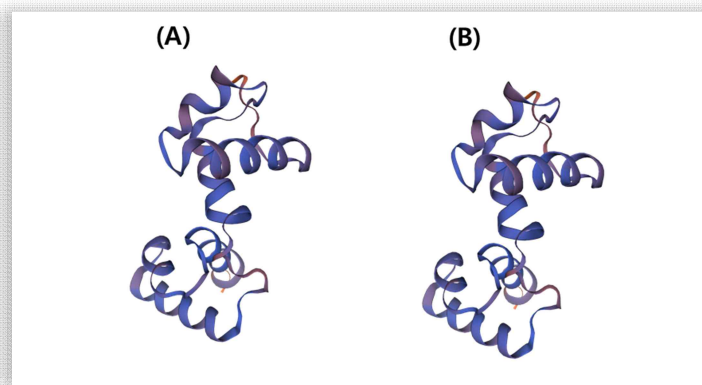
- MYB28 모티프 분석
  - 따라서 MYB28 유전자가 GR 생합성 유전자의 발현을 조절하는 전사조절자로 알려져 있으므로, 이들 서열 변이가 GR 생합성 유전자의 프로모터 부분에 결합하는 Binding domain 부분에 영향을 미치는지 여부를 확인하기 위해서 육종계통에서 발견된 MYB28 염기서열을 대상으로 domain과 motif 분석을 실시한 결과 아래와 같은 결과를 얻었다 (그림 13).
  - MYB 전사조절자에서 발견되는 DNA binding 도메인 (IPR015495)을 포함하여 DNA binding site (IPR017930, IPR001005) 이 발견되었다.
  - 하지만 베네포르테의 특이적인 9bp deletion이 나타나는 부위 (295 aa)에는 특이적인 domain이나 motif가 발견되지 않았다.



[그림 13. MYB28 도메인 분석. 브로콜리 육종계통에서 나온 MYB28 아미노산서열과 유사한 서열을 가진 특정 domain이나 motif를 선별한 결과]

○ MYB28 단백질 도메인 분석

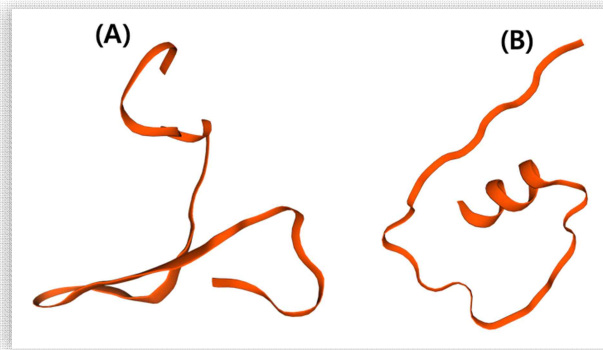
- 상기의 도메인 분석 결과를 따르면, 베네포르테에서 나타나는 9bp deletion에 의한 GR 생합성 연관 유전자 발현 조절과의 관계를 찾기가 힘들다.
- 하지만 MYB28 유전자가 전사 조절자이므로, 상기의 서열 차이가 MYB28 단백질의 4차 구조에 어떤 변화를 초래하는지 여부를 확인하기 위해서 *in silico* 단백질 구조 분석을 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 프로그램을 이용하여 실시하여 아래와 같은 결과를 확보하였다 (그림 14).
- 전체 aa를 활용한 단백질 구조 분석에서는 육종계통과 베네포르테 품종 간에 나타나는 aa 서열 차이가 전체적인 3차원 단백질 구조에는 거의 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.



[그림 14. MYB28 단백질 구조 분석. 브로콜리 육종계통 (A) 과 베네포르테 품종 (B) 에서 나온 MYB28 아미노산 전체 서열을 이용하여 *in silico* 단백질 3차원 구조 분석을 실시한 결과]

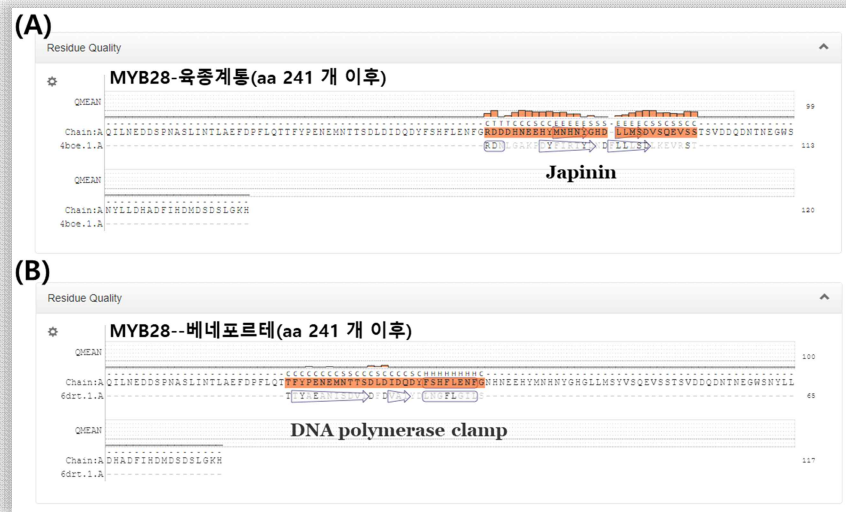
- 따라서, 전체 aa 서열을 이용한 도메인 분석에서 특이적인 domain이나 motif가 발견되지 않았던 aa 241개 이후 육종계통과 베네포르테 품종 유래의 aa 서열을 이용하여 *in silico* 단백질 구조 분석을 통해서 아래와 같은 결과를 확보하였다 (그림 15).

- 전체 aa 서열을 이용한 단백질 4차원 구조 분석에서는, 3개의 aa deletion에 의해서 단백질 구조 차이가 발견되었다 (*in silico* 분석에서). 특히 3개의 aa deletion 이 생긴 베네포르테 품종에서는 단백질 말단에 alpha-coil 구조가 발견되고 나머지 beta-sheet 구조 또한 Deletion 이 생기지 않은 육종 계통의 단백질 구조와는 확연한 차이를 보였다.
- 아마 이러한 단백질 구조 변화가 GR 생합성 연관 유전들의 promoter 서열에 결합하는 친화력 (affinity)를 조절하여 궁극적으로 GR 생합성 능력을 조절할 것으로 예상된다.



[그림 15. MYB28 단백질 구조 분석. 브로콜리 육종계통 (A) 과 베네포르테 품종 (B) 에서 나온 MYB28 아미노산 241개 이후의 아미노산 서열을 이용하여 *in silico* 단백질 3차원 구조 분석을 실시한 결과]

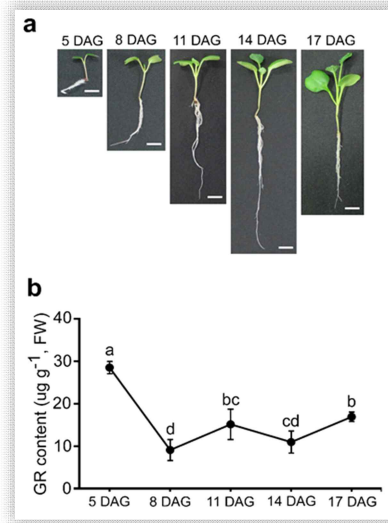
- 또한, 이들 aa 241개 이후의 서열만 따로 분리하여 motif (domain) 분석을 실시한 결과, 아래처럼 두 서열 (육종계통 과 베네포르테 품종)에서 다른 특정 motif가 발견되었다 (그림 16).
  - 육종계통 유래의 서열에서는 Japanin이라는 단백질과 유사한 motif가 발견되었다. 이 motif는 주로 dimer형태를 유지하는데 관여한다고 알려져 있다.
  - 이에 반해, 베네포르테 품종 유래의 서열에서는 DNA polymerase Clamp 라는 단백질 이 결합하는 서열과 유사한 motif가 발견되었다. 이 motif는 hetero dimer형성과 DNA polymerase가 RNA transcription시 DNA 서열에 binding하는 친화도를 수백~수천배 이상 강하게 결합시킨다고 알려져 있다.
  - 아마 이러한 아미노산 서열 변이가 GR 생합성에 관여하는 유전자들의 발현을 조절하여, 최종적으로 GR 생합성 능력을 조절할 가능성이 클 것으로 예상된다.
  - 따라서, genome editing (유전자 편집, GE)을 통해서 *MYB28* 유전자의 9bp deletion된 부위의 서열을 적절히 변화시키면 브로콜리 내 GR 함량을 증가시킬 가능성이 크다는 결론에 도달하였다.



[그림 16. MYB28 motif 분석. 브로콜리 육종계통 (A)과 베네포르테 품종 (B)에서 나온 MYB28 아미노산 241개 이후의 아미노산 서열을 이용하여 motif 분석을 실시한 결과]

## 2. MYB28 유전자 발현이 GR 함량에 미치는 영향 분석

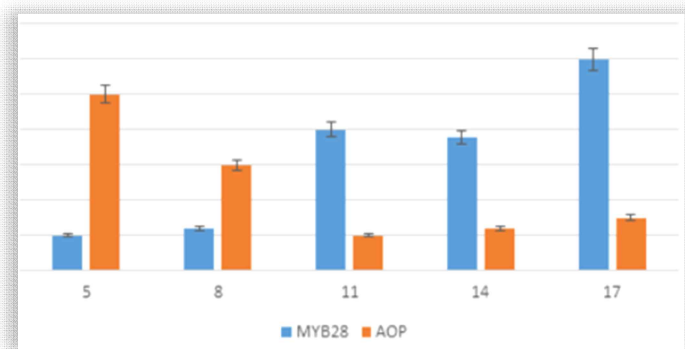
- 브로콜리 육종계통(킹덤 품종육성용 계통) 종자를 70% 에탄올에 3분 동안 침지시켜 표면 멸균 하고, 이어서 1.5 % 치아 염소산 나트륨에 15분 처리한 후, 증류수로 3회 세척하였다. 세척된 종자는 3% 수크로스 와 0.8% 한천을 함유된 1/2MS 배지에서 발아시켰다. 발아된 브로콜리 유묘는 다음 조건 [ $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  광 강도, 16 : 8h (광 : 암 주기), 23°C 조건] 의 식물 성장 상 에서 재배하였다.
- 상기의 조건에서 발아 후 5, 8, 11, 14, 17일 후 샘플을 수집하여 GR 함량 분석을 실시하여 아래와 같은 결과를 확보하였다 (그림 17).
  - 종자에서 첫 본엽이 나오기 이전 (발아 후 8일) 에는 GR 함량이 줄어드는 기존의 발표된 연구 결과와 일치하는 결과를 확보하였다
  - 하지만 본엽이 발생하는 11일 이후 17일까지 들쭉날쭉 하는 결과가 나왔지만, 전반적으로 GR 함량이 증가하는 경향을 보였다.
  - 이들 결과를 종합하면, 브로콜리 종자가 발아해서 본엽이 나오기 이전에는 GR을 분해해서 유묘에 영양분을 공급하는 기작이 활성화되고, 본엽이 발생하고 광합성 능력이 강화되면서 부터 GR 생합성 경로가 활성화 되는 것으로 추정된다.



[그림 17. 발달 단계에 따른 브로콜리 유묘의 이미지와 생체내 GR 함량. (a) 발달 시기별 브로콜리 유묘 이미지. (b) 발달 단계별 브로콜리 유묘의 GR 함량. X-축 및 Y-축은 브로콜리 생물중 (FW) 및 발달 단계 (발아 후 5, 8, 11, 14, 17일)별 GR 함량을 각각 나타낸다. 데이터는 세 번의 반복 실험을 통해 확보되었으며, 오차 막대는 표준 오차로 표시되었다. 통계 처리를 통해서 나타난 결과, 동일한 문자는  $P < 0.05$  수준에서 큰 차이가 없음을 나타낸다.]

- *MYB28*과 *AOP2* 유전자 발현 분석

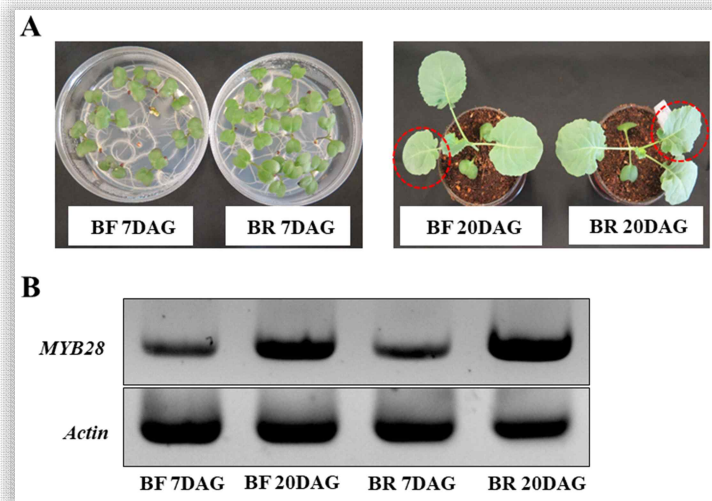
- GR 생합성 유전자의 발현을 조절하는 *MYB28* 유전자의 발현이 발아 후 11일 이후 17일까지 지속적으로 증가하였다 (그림 18).
- 하지만, 이와 반대로 생합성 GR을 분해한다고 알려진 *AOP2* 유전자의 발현이 발아 후 11일 이전에는 급격히 증가하였지만 시간이 지날수록 감소하는 경향을 보였다 (그림 18)
- 본 결과는, *MYB28* 유전자의 발현양과 GR 함량은 밀접한 관계에 있다는 것을 보여 주고 있다.



[그림 18. 브로콜리 유묘 발달 단계에 따른 *MYB28*, *AOP* 유전자 발현 분석. X-축 및 Y-축은 브로콜리 유묘의 발달 단계 (발아 후 5, 8, 11, 14, 17일) 와 유전자의 발현양을 상대적으로 나타낸다. 데이터는 세 번의 반복 실험을 통해 확보되었으며, 오차 막대는 표준 오차로 표시]

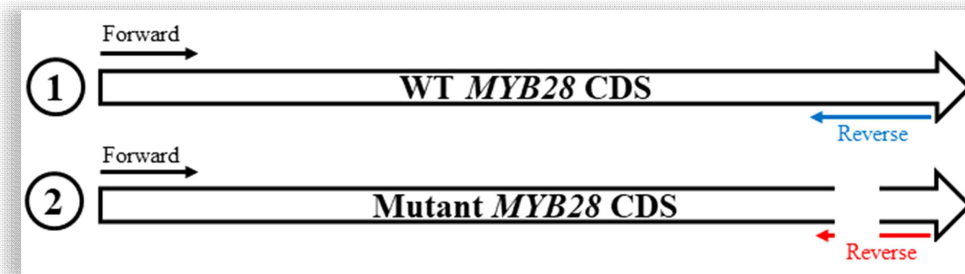


- 육종계통과 베네포르테 품종간의 *MYB28* 유전자 발현 양상 분석
  - 성장 시기별로 육종계통과 베네포르테 품종 (GR 고함량)간 *MYB28* 유전자의 발현정도를 분석하였다
  - 분석 결과 두 개체 모두 발아 후 시간이 지남에 따라 *MYB28* 유전자 발현이 증가하는 경향을 보였지만 육종계통과 베네포르테 품종 간의 발현 차이는 크게 나타나지 않았다. 두 개체 모두 발아 후 7일 (7DAG, day after germination) 보다는 20일 (20DAG) 의 앞에서 *MYB28* 유전자 발현이 증가됨을 확인하였다 (그림 19).



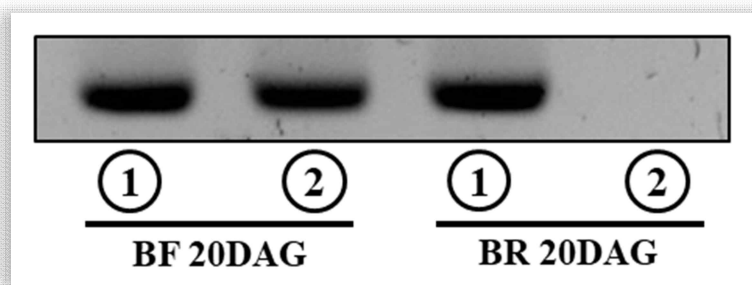
[그림 19. 베네포르테 품종(BF) 와 육종계통(BR) 간 *MYB28* 유전자 발현 양상 분석. DAG: Day after germination. A: total RNA 추출 전 시료; B: RT-PCR 증폭 결과]

- 육종계통과 베네포르테 품종 에서의 *MYB28* (WT *MYB28*)과 *MYB28* $\Delta$ 9bp (Mutant *MYB28*, 베네포르테에서 발견된 9bp deletion 서열) 유전자 발현 분석
  - 베네포르테 품종과 육종계통 간의 WT *MYB28* 유전자와 Mutant *MYB28* (*MYB28* $\Delta$ 9bp) 유전자의 발현 양상을 확인하기 위하여 그림 12에 나타난 것처럼 WT *MYB28*과 Mutant *MYB28* 두 유전자가 PCR 증폭이 가능하도록 primer를 설계하였다 (그림 20).



[그림 20. WT *MYB28* 유전자와 Mutant *MYB28* (*MYB28* $\Delta$ 9bp) 유전자의 발현 양상 분석을 위한 프라이머 디자인. 베네포르테 품종 유래의 *MYB28* 서열 (Mutant *MYB28* CDS)과 육종계통 유래의 *MYB28* 유전자 (WT *MYB28* CDS)를 증폭하기 위한 PCR 프라이머를 제작]

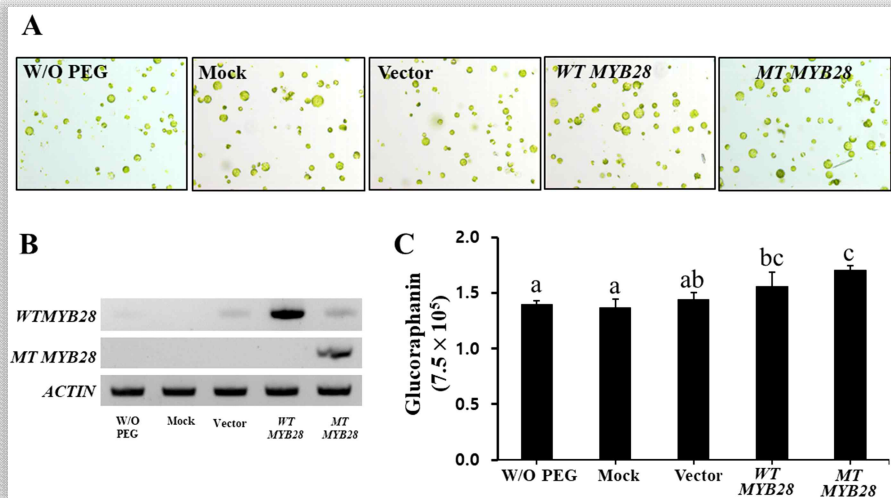
- 상기의 프라이머를 기반으로 RT-PCR을 실시한 결과 아래와 같은 결과를 확보하였다 (그림 21).
- 베네포르테 품종과 육종계통 모두 WT *MYB28* 유전자가 발아 후 20일 경에 충분히 발현 되는 것을 발견함. 특히 두 개체 간에 발현차이가 없다는 것이 발견되었다.
- 하지만 Mutant *MYB28* 유전자의 발현은 베네포르테 품종에서만 관찰되었다.
- 따라서 상기의 결과는, WT *MYB28* 유전자 발현이 GR 함량에 증가에 일정 부분 역할을 하고 있지만, 현재 품종의 GR 함량보다 많은 양의 GR 함량을 합성하고자 할 때에는 WT *MYB28* 유전자 발현을 증가시키는 것보다는 3 ‘말단 서열 변이가 유도된 Mutant *MYB28* 유전자 발현 증가가 훨씬 큰 역할을 하는 것으로 판단된다.



[그림 21. WT *MYB28* 과 Mutant *MYB28* (*MYB28*Δ9bp) 유전자 분석. WT *MYB28* CDS를 증폭하기 위한 프라이머 조합(1) 과 Mutant *MYB28* CDS 증폭하기 위한 프라이머 조합 (2)을 이용하여 베네포르테 (BF) 와 육종계통 (BR)에서 합성한 cDNA를 이용한 RT-PCR 결과]

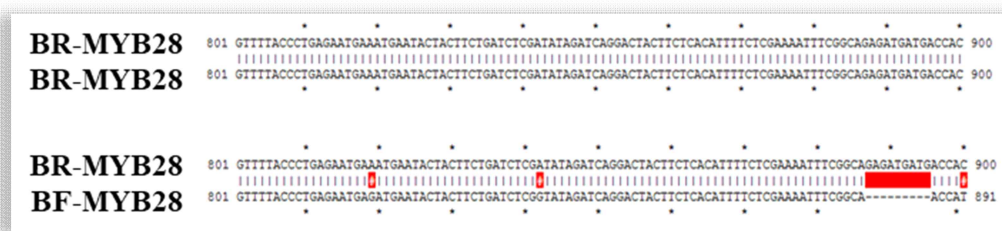
○ GR 생합성에서의 Mutant *MYB28* 유전자의 중요성 분석

- 그리고, 상기의 가설 (Mutant *MYB28* 유전자 발현 증가가 GR 함량에 큰 영향을 미침)을 확인하고자, mutant *MYB28* 유전자를 육종계통에서 추출한 원형질체 (protoplast)에 transient expression 시켜서 GR 함량이 증가하는지 여부를 검정하였다.
- 아래 그림에 나타나는 것처럼, WT *MYB28* 유전자가 과다 발현된 원형질체와 9bp deletion된 mutant *MYB28* 유전자를 과다 발현시킨 샘플 모두에서 GR 함량이 증가되는 결과를 보였지만, WT *MYB28* 보다 mutant *MYB28* 유전자가 과다 발현된 샘플에서의 GR 함량 증가가 크다는 것이 통계적으로 증명되었다 (그림 22).



[그림 22. WT *MYB28* 와 Mutant (MT) *MYB28* 유전자의 transient expression에 의한 GR 함량 분석. 브로콜리에서 추출한 protoplast에 무처리 (W/O PEG), PEG 만 처리 (MOCK), PEG와 empty vector를 처리 (Vector, 컨트롤 샘플로 활용), WT *MYB28* transient expression (WT *MYB28*), mutant *MYB28* transient expression (MT *MYB28*) (A), 각 처리별로 total RNA 추출, cDNA합성 후 RT-PCR 실시를 통한 *MYB28* 유전자 (WT *MYB28* 과 Mutant *MYB28*) 발현 분석 (B), 각 샘플 별로 GR 정량 분석 결과]

○ 상기의 실험 결과들을 종합적으로 고려하여 판단하면, 육종계통에서 유래한 *MYB28* (WT *MYB28*) 염기서열과 달리 GR 함량이 높은 베네포르테 품종에서만 특이적으로 발견되는 9bp deletion된 (Mutant *MYB28*, *MYB28*Δ9bp) 염기서열이 GR 함량 증가에 보다 중요한 역할을 하고, 육종계통의 GR 함량을 증가시키기 위해서는 WT *MYB28*을 대상으로 유전자편집 기법을 적용해서 *MYB28* 유전자 서열에 대해 다양한 변이체를 개발해야 한다는 것을 의미하고, 유전자편집 기술을 적용할 경우 이들 서열을 주 타겟으로 실시해야 한다는 결론을 도출하였다 (그림 23).



[그림 23. WT *MYB28*을 타겟으로 한 유전자 편집 기술 적용. 유전자 편집을 위한 sgRNA 영역이 9bp deletion 영역이고, 붉은색으로 표시됨]

### 3. 유전체편집을 위한 single guide RNA (sgRNA) 와 Cas9 recombinant protein 제작 및 mutagenesis 효율 평가

- 육종계통에 존재하는 WT *MYB28* 염기서열의 3' 말단 부근의 9bp 서열을 결손 시키기 위한

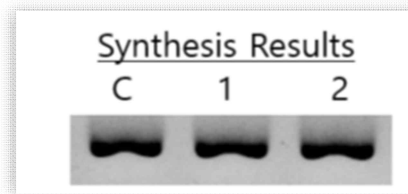


sgRNA를 아래와 같이 두 종류로 제작 하였다 (그림 24).



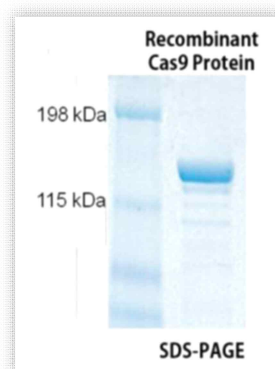
[그림 24. WT *MYB28* 유전자의 9bp 결손(붉은색으로 표시) flanking 서열을 타겟으로 한 유전자 편집 기술 적용을 위한 sgRNA 제작]

- 상기의 WT *MYB28* 염기서열을 툴젠에서 제공하는 sgRNA 제작 웹사이트에서 sgRNA를 제작하였다.
- WT *MYB28* 염기서열을 편집하기 위해서는 sgRNA와 NGG protospacer adjacent motif (PAM)이 있어야하기 때문에 그림 24 에 나타나는 것처럼, 2개의 sgRNA (sgRNA1과 sgRNA2) 영역을 설정하였다.
  - sgRNA1 ; 5' -TCACATTTTCATGAAAATTTTCGG-3'
  - sgRNA2 ; 5' -CAGAGATGATGACCACAATGAGG-3'
- 상기에서 선발된 sgRNA 후보들을 대상으로 브로콜리 유전체상에서 off-target 여부를 확인 하여, off-target 서열이 없음을 최종적으로 확인하였다.
- 합성된 sgRNA를 실제 gel 전기영동 방법으로 sgRNA quality를 검정하였다 (그림 25).



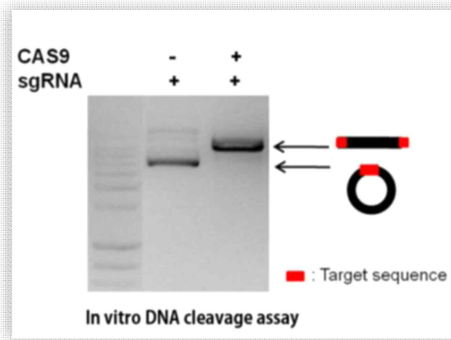
[그림 25. 합성된 sgRNA quality 검정]

- sgRNA와 complex를 형성하여 target sequence 부분의 DNA를 절단하는 Cas9 recombinant protein을 발현시킨 후, His-tag를 이용하여 정제 및 농축하여 아래처럼 SDS-PAGE법으로 정제 및 농축된 단백질을 확인하였다 (그림 26).



[그림 26. 합성된 Cas9 단백질 quality, quantity 검정]

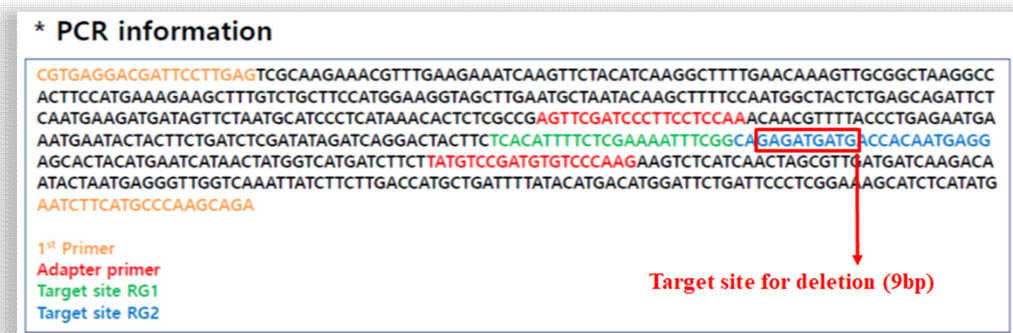
- 상기처럼 제작 합성된 sgRNA와 Cas9 단백질을 활용하여 Cas9 단백질이 제작된 sgRNA의 DNA 이중나선 구조를 절단하는지 여부를 테스트 하였다.
- Cas9 단백질 첨가에 의해 sgRNA 서열이 절단된 모습이 첫 번째 레인에 나타남을 확인하였다 (그림 27).



[그림 27. Cas9 단백질 cleavage activity 검정]

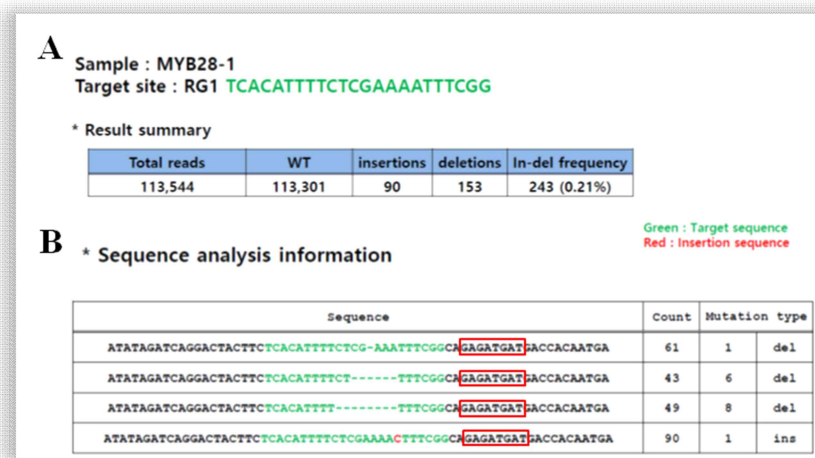
○ 두 종류의 sgRNA 유전자편집 효율 검정

- 상기에서 제작된 두 종류 sgRNA에서 유전자편집 효율이 우수한 sgRNA를 선발하기 위해서 브로콜리에서 분리된 원형질체에 PEG 처리를 통한 유전자편집을 직접 실시하였다.
- 이를 위해서 브로콜리에서 분리된 원형질체에 25 µg의 sgRNA1과 sgRNA2를 각각 동일한 양의 Cas9 protein (25 µg)과 함께 처리한 후, PEG 처리를 통한 transformation을 실시하였다.
- sgRNA1과 sgRNA2을 이용하여 transformed된 원형질체 (protoplast)로부터 genomic DNA를 추출하여 유전자 서열 변이가 발생할 것으로 예측되는 DAN 부분에서 1<sup>st</sup> primer를 설계하였다 (그림 28).
- 1<sup>st</sup> 프라이머 (primer) : Target sequencing 을 위한 프라이머로 For, Rev 프라이머를 이용하여 1<sup>st</sup> PCR 를 실시하여 대량의 amplicon 을 확보하였다.
- 1<sup>st</sup> 프라이머 (primer)를 이용하여 PCR amplification을 시킨 후 NGS sequencing을 실시하여 각 sgRNA별 유전자편집 효율과 어떤 부위에 어떤 서열로 변이가 발생하는지를 확인하였다.



[그림 28. sgRNA 유전자편집 효율 측정을 위한 target sequencing 개요. 1<sup>st</sup> PCR을 위한 1<sup>st</sup> 포워드(Forward) 와 리버스 (Reverse) 프라이머가 오렌지색으로 표시, sgRNA1과 sgRNA2의 목표 영역이 Target site RG1 (녹색)과 Target site RG1 (푸른색)으로 각각 표시]

- sgRNA1에 의한 *MYB28* 유전자 서열 변이 효율 분석
  - sgRNA1을 이용하여 유전자편집이 실시된 원형질체에서 *MYB28* 유전자를 대상으로 한 target sequencing을 실시한 결과 아래와 같은 결과를 확보하였다 (그림 29).
    - total reads (113,544)중에서 총 243개의 서열 변이가 나타나서 mutagenesis 효율은 0.21%로 나타났다
    - 서열 변이를 상세히 보면, insertion (염기서열의 삽입)은 90 reads, deletions (염기서열의 결손)은 153 reads가 발견되었다.
    - 하지만 본 과제가 목표로 하는 target 서열 (9bp)의 변이 (deletion, insertion, substitution)가 발견되지 않았다.
  - 서열 변이 효율 (0.21%) 가 낮고, 목표 영역 (9bp)에서의 서열변이가 발생하지 않은 것으로 보아 본 과제 수행을 위한 sgRNA로 사용할 수 없다는 것을 알게 되었다.



[그림 29. sgRNA1을 이용한 유전자편집 결과요약. A: sgRNA1이 목표로 하는 *MYB28* 유전자 내의 target site sequence 과 전체 sequencing 숫자와 유전자편집 결과 요약. B: *MYB28* 유전자 서열 변이 결과, 목표로 하는 9bp 염기서열 (붉은색 박스). Count는 sequencing 해서 read된 수, Mutation type은 deletion (del) 또는 insertion (ins)]

- sgRNA2에 의한 *MYB28* 유전자 서열 변이 효율 분석
  - sgRNA2을 이용하여 유전자편집이 실시된 원형질체에서 *MYB28* 유전자를 대상으로 한 target sequencing을 실시한 결과 아래와 같은 결과를 확보하였다 (그림 30).
    - total reads (52,387)중에서 총 15,476개의 서열 변이가 나타나서 mutagenesis 효율은 29.54%로 나타났다
    - 서열 변이를 상세히 보면, insertion (염기서열의 삽입)은 8,559 reads, deletions (염기서열의 결손)은 6,917 reads가 발견되었다.
    - sgRNA1에 비해 insertion은 약 95배, deletion의 경우 약 45배 높은 효율을 나타내는 것

으로 나타났고, 특히 목표로 하는 영역에서 다양한 서열 변이가 나타나는 것을 확인하였다.

Sample : MYB28-2  
Target site : RG2 CAGAGATGATGACCACAATGAGG

\* Result summary

Total reads	WT	insertions	deletions	In-del frequency
52,387	36,911	8,559	6,917	15,476 (29.54%)

[그림 30. sgRNA2을 이용한 유전자편집 결과요약. MYB28 유전자 내의 target site sequence 및 results summary]

- 목표 영역 (9bp) 전체가 정확히 deletion된 서열 변이는 발견되지 않았지만, target 9bp 영역을 포함한 목표 서열 및 목표 서열을 flanking 하는 서열들에서 변이가 생긴 다양한 mutant 서열을 그림 31, 32처럼 확인 할 수 있었다 (19종류의 deletion mutation). 목표 영역을 flanking하는 서열에서 1~5bp deletion된 서열 변이가 가장 많이 발생한 것 (4,365 read)으로 나타났다.
- 따라서, sgRNA2를 이용해서 유전자편집을 실시할 경우, 목표 영역을 flanking하는 영역에서 다양한 변이체들이 확보 될 것으로 예상되었다.

Sequence analysis information

Blue : Target sequence  
Red : Insertion sequence

Sequence	Count	Mutation type
CATTTTCTGAAAATTTGCGGAGATGATGACCAC-ATGAGGAGCACTACATGAATCATAAC	1062	1 del
CATTTTCTGAAAATTTGCGGAGATGATGAC--CAATGAGGAGCACTACATGAATCATAAC	1220	2 del
CATTTTCTGAAAATTTGCGGAGATGATG---ACAATGAGGAGCACTACATGAATCATAAC	608	3 del
CATTTTCTGAAAATTTGCGGAGATGATGA---AATGAGGAGCACTACATGAATCATAAC	631	4 del
CATTTTCTGAAAATTTGCGGAGATGATG----AATGAGGAGCACTACATGAATCATAAC	844	5 del
CATTTTCTGAAAATTTGCGGAGATGATG-----ATGAGGAGCACTACATGAATCATAAC	431	6 del
CATTTTCTGAAAATTTGCGGAGATGA-----AATGAGGAGCACTACATGAATCATAAC	256	7 del
CATTTTCTGAAAATTTGCGGAGATG-----AATGAGGAGCACTACATGAATCATAAC	574	8 del
CATTTTCTGAAAATTTGCGGAGATG-----ATGAGGAGCACTACATGAATCATAAC	302	9 del
CATTTTCTGAAAATTTGCGGAGAT-----ATGAGGAGCACTACATGAATCATAAC	132	10 del
CATTTTCTGAAAATTTGCGGAG-----AATGAGGAGCACTACATGAATCATAAC	245	11 del
CATTTTCTGAAAATTTGCGGAG-----ATGAGGAGCACTACATGAATCATAAC	326	12 del
CATTTTCTGAAAATTTGCGGAGA-----GAGGAGCACTACATGAATCATAAC	21	13 del
CATTTTCTGAAAATTTGCGGAG-----ATGAGGAGCACTACATGAATCATAAC	71	14 del
CATTTTCTGAAAATTTGCGGAGATGATGA-----TACATGAATCATAAC	60	16 del
CATTTTCTGAAAATTT-----CAATGAGGAGCACTACATGAATCATAAC	5	18 del
CATTTTCTGAAAATTTGCGGAGATGATGAC-----CATAAC	39	24 del
CATTTTCTGAAAATTTGCGGAGAGATGA-----TCATGATCTTCTT	23	39 del
TCTGATATAGATCAAGG-----AATGAGGAGCACTACAT	67	46 del

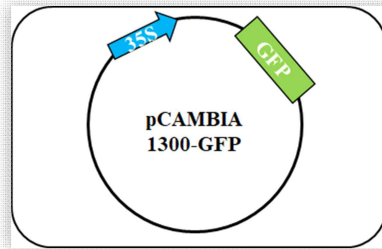
[그림 31. sgRNA2을 이용한 deletion 결과. Red box: mutation 시키고자 하는 목표 서열 (9bp). Count: read된 수; Mutant type: deletion (del)된 서열 수]





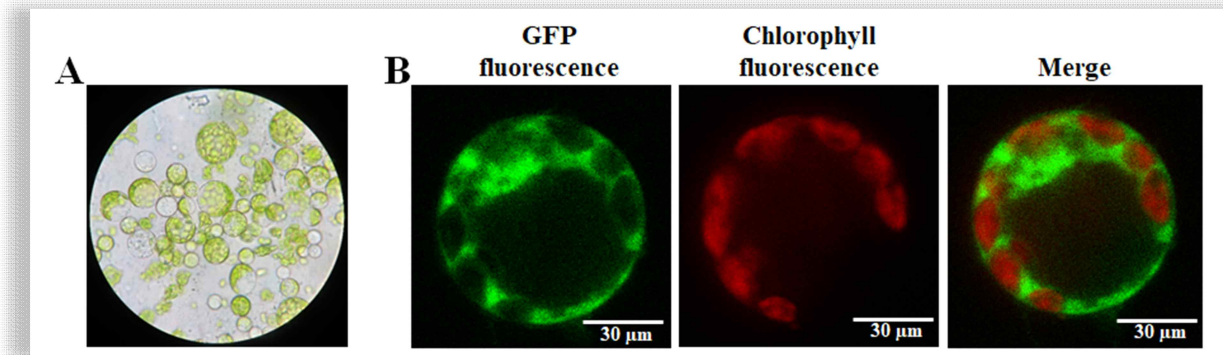
○ 브로콜리 원형질체 대상의 PEG transformation 조건 확립

- Binary vector에 GFP (Green Fluorescence Protein)를 도입한 construct를 제작하였다 (그림 33).



[그림 33. 브로콜리 원형질체 대상이 형질전환 테스트를 위한 GFP 도입 binary vector 모식도]

- GFP::vector construct를 기존 문헌 (Lee et al., 2019)에 제시된 transformation 방법을 적용하여 PEG 처리를 기반으로 한 transformation을 실시하였다. 아래 그림에 나타는 것처럼 기존 문헌에 제시된 방법을 추가 수정 없이 그대로 적용해도 무방하다는 결론을 얻었다 (그림 34).

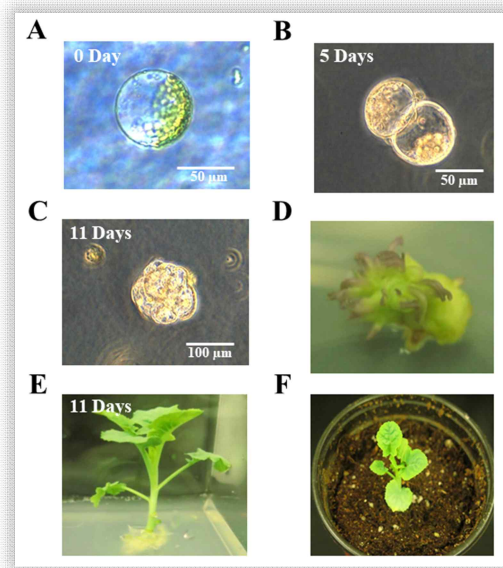


[그림 34. 브로콜리 원형질체 분리 및 GFP signal을 통한 PEG 처리를 통한 transformation 효율 확인. A: 발아 후 50일이 지난 잎 조직에서 분리된 원형질체; B: Confocal 현미경 관찰을 통해 확인된 GFP signal]

○ 브로콜리 재분화 조건 확립

- 원형질체를 재분화 시키는 조건은 식물의 종뿐만 아니라 같은 종에 속하는 식물체들도 germplasm이 달라짐에 따라 재분화 효율이 상당한 차이를 보이는 것으로 알려져 있다.
- 따라서, 본 과제에 이용되는 원형질체에 적합한 재분화 조건을 확립하기 위해서 재분화 효율에 영향을 미치는 다양한 요인들 [osmotic, carbon resource, salt, pH, vitamin, hormone (auxin, cytokinin, gibberellin) 등의 regeneration medium 조성 (단계별 6종의 medium), medium 교체시기, shooting/rooting medium 조건, 광조건 등]을 일차적으로 선별한 다음, 이들 요인들에 대해 최적화된 조건을 확립하는 작업을 진행하여 아래와 같은 재분화 조건을 확립하였다.
  - 1차 regeneration medium (1×B5 culture medium, 70 g/L D-mannitol, 20 g/L glucose, 0.25 mg/L 2,4-D, 1 mg/L NAA, 2 mg/L TDZ, 0.1 g/L MES, pH 5.8)에 브로콜리 원형질체를 치상한 후 10일간 25°C에서 암처리를 실시한다.
  - long day 조건에서 1주간 배양을 실시하면 아래에 제시되는 배지 조성에 순차적으로 치상해나간다

- 2차 regeneration medium (1×B5 culture medium, 40 g/L D-mannitol, 20 g/L sucrose, 0.25 mg/L 2,4-D, 0.2 mg/L NAA, 2 mg/L TDZ, 0.1 g/L MES, pH 5.8)
- shooting medium (1×MS culture medium, 30 g/L sucrose, 0.5 mg/L NAA, 2 mg/L TDZ, 0.1 g/L, 6 g/L agarose, pH 5.8)
- rooting medium (0.5×MS culture medium, 10 g/L sucrose, 6 g/L agarose, pH 5.8)
- 순화 후 토양 정식
- 상기의 조건으로 재분화를 실시한 결과, regeneration media에 치상한지 5일차부터 cell division이 발생되었고, 11일차에는 5-10개 정도의 multi-cell 덩어리 형태로 관찰되었다. 90일경에는 shooting 조직이 관찰되었고, 120일경에는 rooting medium 치상하여 150일경에는 완전히 재분화 된 개체로 성장되었다 (그림 35).

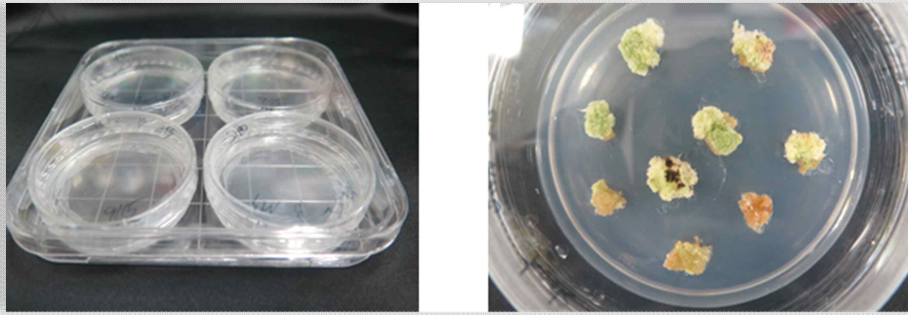


[그림 35. Broccoli protoplast regeneration. A: Double layer medium에 embedding되어진 protoplast; B: 5일차 two cell stage protoplast; C: 11일차 multi cell stage protoplast; D: shoot initiation stage (90일차); E: root initiation (120일차); F: full regenerated broccoli in soil (150일차)]

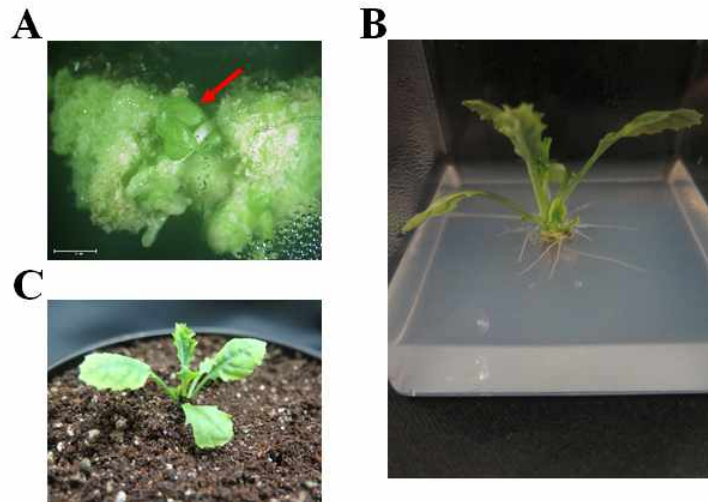
#### 4. MYB28를 타겟으로 한 RNP 기반의 유전자 편집 실시

- transformation 실시
  - sgRNA2 (25  $\mu$ g) 와 Cas9 protein (25  $\mu$ g)을 분리된 브로콜리 원형질체 ( $5 \times 10^5$ )에 PEG (40%) 와 함께 10 분간 처리 하였다.
- transformation 된 원형질체 배양 실시 (그림 36, 37)
  - 1차 regeneration medium (1×B5 culture medium, 70 g/L D-mannitol, 20 g/L glucose, 0.25 mg/L 2,4-D, 1 mg/L NAA, 2 mg/L TDZ, 0.1 g/L MES, pH 5.8)에 치상
  - 10일간 25°C 에서 암처리 후, long day 조건에서 1주간 배양
  - 2차 regeneration medium (1×B5 culture medium, 40 g/L D-mannitol, 20 g/L sucrose, 0.25 mg/L 2,4-D, 0.2 mg/L NAA, 2 mg/L TDZ, 0.1 g/L MES, pH 5.8)에서 배양
  - 90일 후 shooting medium (1×MS culture medium, 30 g/L sucrose, 0.5 mg/L NAA, 2 mg/L TDZ, 0.1 g/L, 6 g/L agarose, pH 5.8)에서 4주 배양

- rooting medium (0.5×MS culture medium, 10 g/L sucrose, 6 g/L agarose, pH 5.8)에서 4주 배양 후 rooting 조직이 충분한 크기로 형성된 개체는 토양에서 순화 처리를 실시하였다.



[그림 36. Broccoli protoplast regeneration. A (왼쪽): PEG transformation 후 1차 regeneration medium 조건에서 암처리된 protoplast; B (오른쪽): protoplast로부터 유도된 callus]

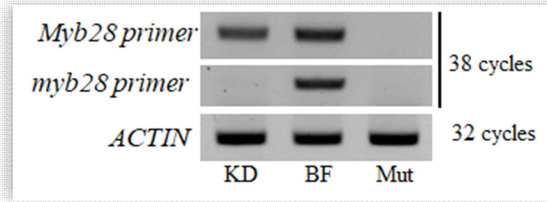


[그림 37. Broccoli protoplast regeneration. A: callus로 부터 shoot 유도 (붉은색 화살표 부분), B: root 유도, C: 토양 순화 처리]

○ 유전자 편집 개체의 *MYB28* 염기서열 변이 여부 확인

- 유전자편집을 통해 재분화된 개체를 대상으로 *MYB28* 서열 변이 여부 확인
- 변이가 발생하지 않는 서열을 검출할 수 있는 프라이머 조합 (*MYB28* primer) 과 9bp deletion을 검출할 수 있는 프라이머 조합 (*myb28* primer) 을 이용하여, 육종계통 (KD), 베네포르테 품종 (BF), 유전자편집 개체 #1SJB (Mut)에서 추출한 gDNA를 template로 사용 PCR 반응을 실시하였다 (그림 38).
  - PCR 증폭 결과, sgRNA2 를 활용해서 재분화된 유전자편집 개체 #1SJB는 목표로 하는 *MYB28* 영역에서 육종계통에서 나타나는 wild type 서열을 가지는 것이 아니라, 변이가 생긴 서열을 가진 것으로 나타났다. 그리고 서열 변이 또한 베네포르테에서 나타난 9bp deletion과는 다른 서열 변이가 생긴 것으로 판단되었다.





[그림 38. PCR 결과: 육종계통 (KD), 베네포르테 (BF), 유전자편집 개체 #1SJB (Mut)]

○ GR 고품량 *MYB28* 유전자편집 개체 선발

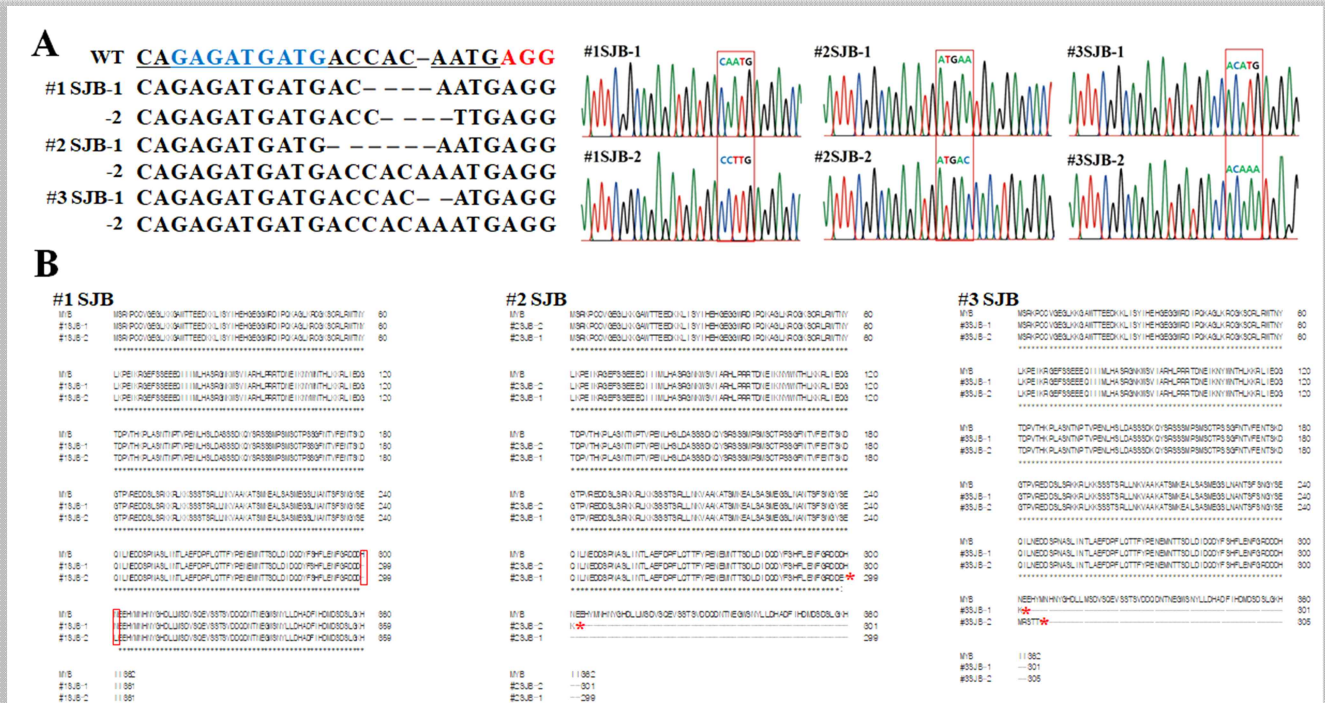
- 상기의 PCR 실험에서 유전자편집 실험이 성공적으로 실시된 것을 확인하였으므로 유전자편집 원형질체를 지속적으로 배양하여 재분화를 유도하였다.
- 그 결과로 유전자편집 실시 후 재분화 유도를 통해서 토양 순화를 완료한 3개체 (#1SJB, #2SJB, #3SJB)를 확보하였다 (그림 39)



[그림 39. sgRNA2 유전자편집 개체의 토양 순화 과정]

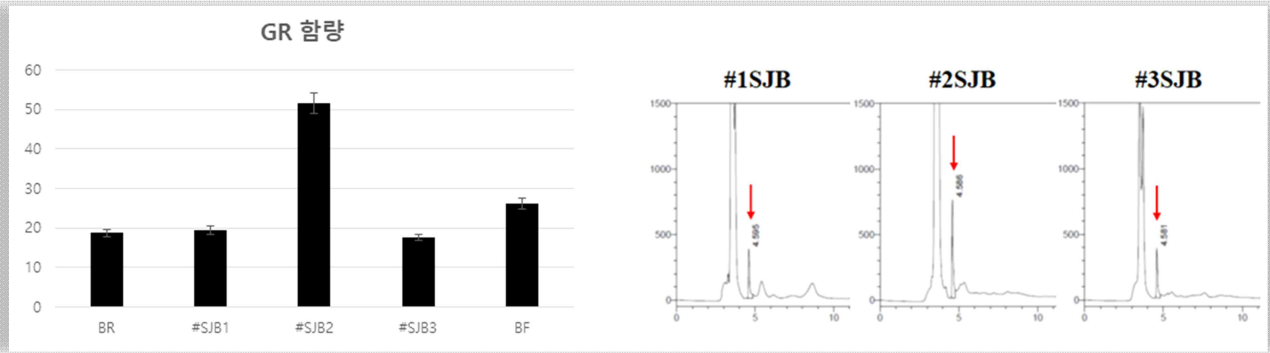
- *MYB28* 염기서열 변이 확인
  - 재분화 개체 (#1SJB, #2SJB, #3SJB)의 *MYB28* 유전자 편집 (서열 변이) 여부를 확인하기 위해 목표 영역 좌, 우측에서 primer (For: 5'-GTCTTGACTCCTTCCTC-3, Rev: 5'-TCATATGATATGCTTTCCGAGG-3')를 제작하였다
  - 재분화 개체 (#1SJB, #2SJB, #3SJB)로부터 추출한 gDNA를 template로 하여 상기의 프라이머를 조합을 이용하여 PCR를 실시하였고, 증폭된 DNA 단편을 TA-cloning vector에 삽입 하여 재분화 개체 (#1SJB, #2SJB, #3SJB) 별로, 9~10개의 single colony로부터 plasmid DNA (vector) 추출해서 염기서열 분석을 실시하여 *MYB28* 목표 영역을 flanking하는 염기서열을 확인 하였다 (그림 39A).
    - #1SJB에서는 *MYB28* 유전자 898~900위치의 CAC가 deletion (#1SJB-1)된 것과 899~901위치의 ACA가 deletion (#1SJB-2)된 것을 확인하였다.
    - #2SJB개체는, 896~901위치의 ACCAC가 deletion (#2SJB-1)된 것과 901위치에 A가 insertion (#2SJB-2)된 것을 확인하였다.
    - #3SJB개체는 901위치에 A가 deletion (#3SJB-1)된 것과 A가 insertion (#3SJB-2)된 것을 확인하였다.
- 단백질의 아미노산 서열을 비교한 결과 아래와 같았다 (그림 39B).
  - #1SJB-1은 His(299) 아미노산이 deletion 되었다.

- #1SJB-2은 His(299) 아미노산 deletion과 Asn(301)이 Leu로 치환된 것을 확인 하였다.
- #2SJB와 #3SJB의 경우 유전자 편집된 부분에서 조기종결 단백질 결과 확인 되었다.
  - #2SJB가 #3SJB에 비해 4개의 아미노산이 짧은 단백질서열의 결과를 나타냈다.



[그림 39. MYB28 유전자편집 재분화 개체의 MYB28 염기서열 과 아미노산 서열 분석결과. A: MYB28 유전자 편집 개체의 in/del 결과 및 sequencing spectrum 결과; B: MYB28 유전자 편집 개체의 아미노산 서열 분석 결과]

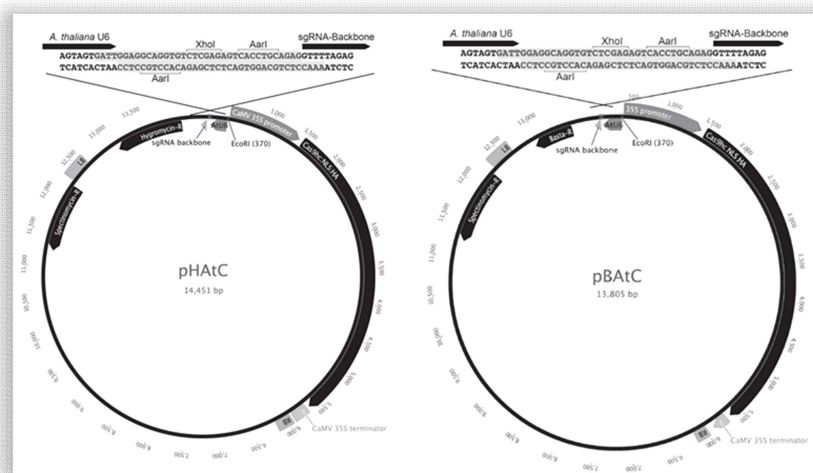
- 유전자편집 개체별 GR 함량 분석
  - 유전자편집 재분화 개체 (#1SJB, #2SJB, #3SJB), 이들과 생육 단계가 유사한 유전자편집 실험 재료로 이용한 육종계통 (BR), 베네포르테 품종 (BF)을 대상으로 GR 함량 분석을 실시 하였다.
    - 세 개의 유전자편집 개체 (#1SJB, #2SJB, #3SJB) 중에서, #2SJB 유전자편집 개체만이 GR 함량이 증가된 것으로 나타났다. 원래 실험재료 보다 2-3배 이상의 GR 함량을 보였다 (그림 34).
    - #2SJB 유전자편집 개체의 GR 함량은 현재 시판인 베네포르테 품종보다 약 2배 정도로 높아진 GR 함량을 보였다 (그림 40).



[그림 40. MYB28 유전자편집 개체 (#1SJB, #2SJB, #3SJB), 유전자편집 실험용 재료 (BR), 베네포르테 품종 (BF) 대상의 GR 함량 분석 결과]

### 5. Agrobacterium을 이용한 MYB28/AOP2 유전자편집

- CRISPR/Cas9을 이용한 원형질체 유전자편집의 재분화 효율이 예상보다 낮은 관계로 CRISPR/Cas9 발현 binary vector를 agrobacterium에 삽입시킨 후, 브로콜리 explant에 직접 transformation 시켜 글루코라파닌 함량이 증가된 개체를 확보하는 전략을 추가적으로 추진하였다.
  - 상기의 목적으로, 두 종류의 CRISPR/Cas9발현 binary vector (그림 41) 을 이용하여 원형질체 유전자편집 실험 때 사용된 MYB28 유전자를 타겟으로 하는 동일한 sgRNA가 발현되도록 설계된 binary vector를 제작하였다.
  - 이와 더불어서 브로콜리 생체 내에서 합성된 GR이 AOP2 단백질에 의해서 glucorapin으로 분해된다고 알려져있다. 따라서 AOP2 유전자의 발현을 억제하게 되면 궁극적으로 GR 함량을 추가적으로 증가시킨다는 가설을 확립했다. 따라서 AOP2 유전자를 타겟으로 하는 AOP2 sgRNA(5 ‘-GATGTAATGGTGAGAAGAA-3’)를 디자인해서 유전자편집용 CRISPR/Cas9발현 binary vector에 클로닝 하였다.



[그림 41. CRISPR/Cas9 발현용 binary vector map]

- stem과 cotyledon explant들을 이용하여 최적의 재분화 조건을 찾기 위해서 다양한 배지조건 하에서 callus 유도율, shooting 유도율, rooting 유도율들을 확인 후, 가장 효율이 높은

배지조성을 선발하였다.

- Callus 유도율 분석 결과 모든 배지조성 조건에서 100%의 캘러스 유도율을 나타냈다. 이와 더불어서 explants로 사용되는 stem과 cotyledon explant 사이에서도 차이가 전혀 없었다.
- shooting 유도율의 경우 0.025 mg/L IBA, 3.0 mg/L TDZ의 호르몬 조성에서 76%의 가장 높은 shooting 유도율을 보였다. 하지만 동일한 조건에서 cotyledon explant는 shooting 을 유도하지 못했다.

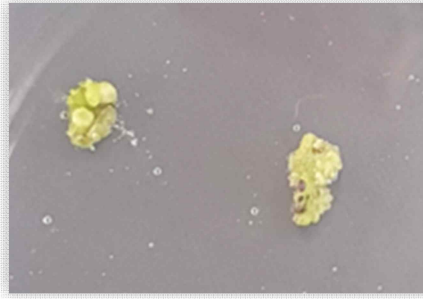
<표 2. 배지조성에 따른 callus 유도율>

Medium composition (basic composition: MS, 3% sucrose, 0.8% agar, pH 5.7) 단위: mg/L	Callus induction frequency (%)	
	Stem	Cotyledon
0.05 NAA, 2.0 Zeatin	100	100
0.01 IAA, 2.0 Zeatin	100	100
0.25 IBA, 2.0 Zeatin	100	100
0.05 NAA, 3.0 TDZ	100	100
0.01 IAA, 3.0 TDZ	100	100
0.25 IBA, 3.0 TDZ	100	100
0.05 NAA, 2.0 BAP	100	100
0.01 IAA, 2.0 BAP	100	100
0.25 IBA, 2.0 BAP	100	100
1.0 IAA, 5.0 BAP	100	100

<표 3. 배지조성에 따른 shoot 유도율>

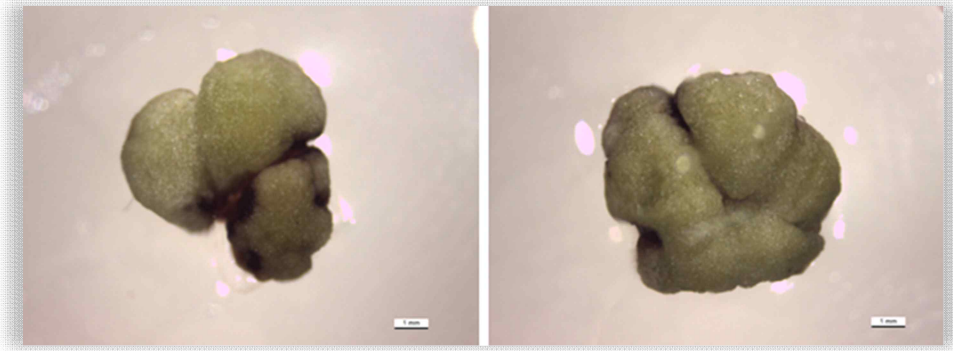
Medium composition (basic composition: MS, 3% sucrose, 0.8% agar, pH 5.7) 단위: mg/L	Shoot induction frequency (%)	
	Stem	Cotyledon
0.05 NAA, 2.0 Zeatin	0	0
0.01 IAA, 2.0 Zeatin	0	0
0.25 IBA, 2.0 Zeatin	0	0
0.05 NAA, 3.0 TDZ	0	0
0.01 IAA, 3.0 TDZ	0	0
0.25 IBA, 3.0 TDZ	76	0
0.05 NAA, 2.0 BAP	0	0
0.01 IAA, 2.0 BAP	0	0
0.25 IBA, 2.0 BAP	0	0
1.0 IAA, 5.0 BAP	0	0

- 상기의 MYB28 sgRNA 와 AOP2 sgRNA genome editing binary vector를 agrobacterium (GV1301 strain) 에 transformation 시킨 후 브로콜리의 stem explant를 Agro. cell에 침지 시킨 후, co-culturing medium (1×MS culture medium, 1.5% sucrose, 0.05 mg/L NAA, 2 mg/L TDZ, 6 g/L agarose, pH 5.8)에 3일간 25°C 조건에서 배양시켰다 (그림 42).



[그림 42. Agrobacterium과 co-culturing of broccoli cotyledon explants]

- Agro. cell과 co-culturing된 explant를 callus induction and selection medium으로 옮겨 callus 형성을 유도시킴. stem explant 조직에서 성공적으로 callus 유도가 잘 일어난다는 것을 발견하였다 (그림 43).



[그림 43. callus형태로 발달된 28일차 브로콜리 explants]

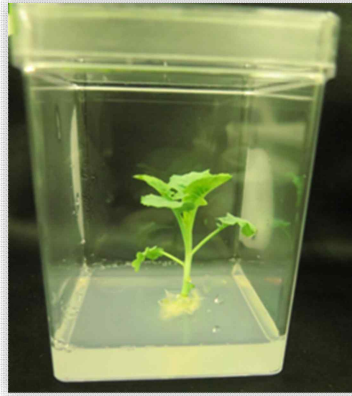
- 충분한 크기의 callus가 유도된 후 shooting (1×MS culture medium, 1.5% sucrose, 0.05 mg/L NAA, 2 mg/L TDZ, 400 ug/mL hygromycin or phosphinothricin 6 g/L agarose, pH 5.8) media 로 옮겨 shoot을 유도하였다 (그림 44).



[그림 44. 캘러스로부터 shoot 이 유도되는 모습]

- shooting 이 유도된 조직을 rooting medium (1×MS culture medium, 1.5% sucrose, 6 g/L agarose, pH 5.8)으로 옮겨 root을 유도하였다 (그림 45).





[그림 45. rooting 배지에서 뿌리가 발생하는 모습]

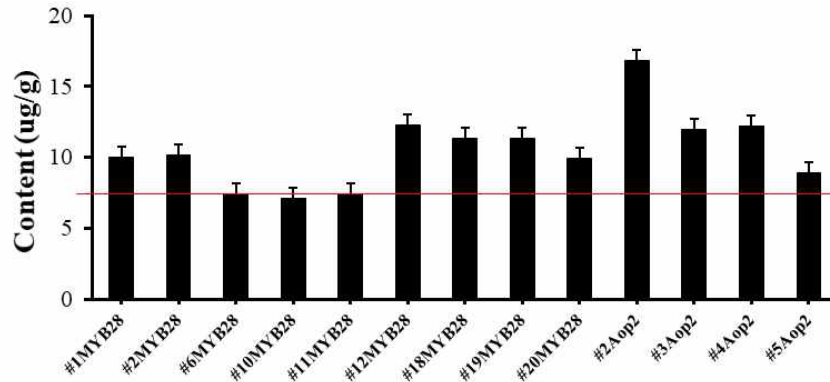
- rooting induction medium에서 충분히 뿌리조직의 유도를 확인 한 후, 토양순화 과정이 진행 중인 *MYB28* (27개체) *AOP2* (12개체) 유전자편집 재분화 개체를 확보하고 있다 (그림 46).
- 확보한 개체들은 아시아종묘 연구진에게 보내져 채종을 위한 저온처리를 진행하고 있다.



[그림 46. 토양 순화 중인 재분화 개체들]

○ *MYB28/AOP2* 유전자편집 개체 GR 함량 분석

- 유전자편집 T<sub>0</sub> 개체를 대상으로 GR 함량 분석을 실시하였다.
- 분석 결과 아래 그림에 나타난 것처럼, 2배 이상의 GR 함량이 증가된 1 개체가 발견되었다. 그리고 1.5배 정도 GR 함량이 증가된 개체도 5개체 정도 발견되었다 (그림 47).
- 이들 개체를 고정된 계통으로 세대 진전한 후에 좀 더 세부적인 분석을 추가적으로 시도할 계획이다. 다만, hetero인 상태에서 이 정도 함량 증가를 보인다면 고정된 계통에서는 GR 함량이 훨씬 증가될 것으로 예상된다. 뿐만 아니라, *AOP2* 유전자편집 개체와 *MYB28* 유전자편집 개체를 교배할 경우 GR 함량이 더 증가될 것으로 예상된다.



[그림 47. Agro 활용한 *MYB28/AOP2* 유전자편집 개체의 GR 함량 분석. 붉은색 선은 유전자편집에 사용된 브로콜리 개체의 GR 함량]

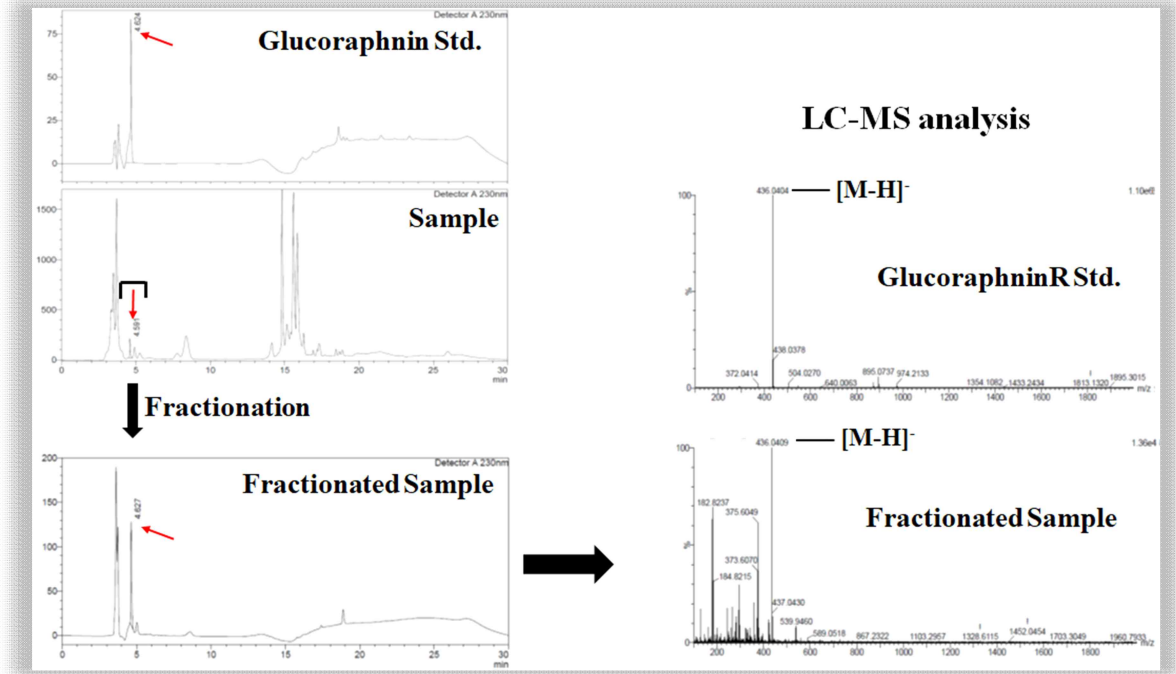
## 6. GR 함량 분석 조건 확립

### - HPLC 분석용 시료 준비법 확립

- 액체 질소에서 수집된 브로콜리 샘플을 모르타르를 사용하여 분쇄 하였다.
- 분쇄된 300 mg의 샘플에 1mL의 100% 메탄올 (MeOH)을 첨가하고 혼합한 후, 1시간 동안 초음파 처리 한 후, 55°C에서 16시간 동안 가열하였다.
- 상층액을 10분 동안 원심분리 (1,000×g) 로 분리한 다음, 0.45 μm PVDF 막을 통과시킨 후, 진공 농축기를 사용하여 용액을 증발시킨 후 최종적으로 120 μL MeOH로 녹인 추출물을 확보하였다.

### - HPLC 분석법 확립

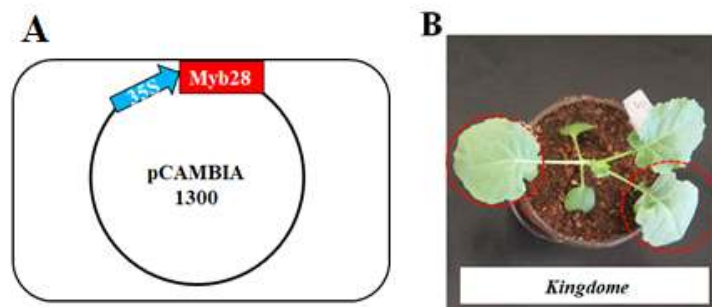
- 확보된 추출물 20 μL을 UV 흡광 검출기 (SPD-20A), 펌프 (LC-20AD), 통신 버스 모듈 (CBM-20A)과 자동 샘플러 (SIL-20AC)가 장착된 HPLC 시스템에 주입하였다.
- 주입된 샘플은 C<sub>18</sub> 3.9×300mm μ-Bondapak 컬럼 (Waters, MA, USA)을 통과시켰다.
- 상 분리는 두 개의 이동상 (A 및 B) 에 의해 수행되었다. A 이동상은 5 mM 테트라 메틸 암모늄 브로마이드 용액, B 이동상은 아세트니트릴 용액으로 구성되어있고, 주입된 추출물은 유속 0.8 mL/min을 유지 하도록 하였고,
- 추출, 분리는 다음 조건 (5분 동안 90% A를 유지한 후, 30% A로 감소시키고 10-20분 동안 유지 한 다음, 90 % A로 복원하고 25-30분 동안 유지) 에서 수행되었다. 흡광도 모니터링 을 위해 230 nm 고정 파장이 사용되었고, 사용된 시약은 HPLC 등급이고 글루코라파닌 (Cayman chemical, MI, USA)을 표준 물질로 사용하였다.
- 상기의 분석법을 활용하여 브로콜리 육종계통에서 GR 함량을 측정하였다 (그림 48).
  - 우선, HPLC chromatogram spectrum상에서 검출된 물질이 GR 인지 확인하기 위하여 standard GR과 같은 retention time대의 브로콜리 추출물의 분획물을 확보하였다.
  - 확보된 분획물을 대상으로 LC-MS를 실시하여 동일한 물질인지 여부를 확인하였다.
  - 확인 결과, GR (C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>S<sub>3</sub>)의 계산된 mass값은 437.0484 이고, standard GR 과 브로콜리 에서 검출된 GR peak 은 각각 436.0409와 436.0404 로 같은 값을 나타내는 것으로 보아서 동일한 물질임을 확인하였다. 즉 standard GR과 같은 retention time 에서 나타나는 peak 은 GR 이라는 의미이다.



[그림 48. standard GR과 broccoli GR의 HPLC 및 LC-MS 결과]

### 7. 브로콜리 GR 생합성 기작 분석

- wild type *MYB28*가 브로콜리 GR 생합성에 미치는 영향 (브로콜리에서의 GR 생합성 경로가 잘 알려지지 않았음을)을 알아보기 위해서, *MYB28* 유전자의 발현을 브로콜리 잎에 transiently expression 시킨 후 GR 생합성 연관 유전자의 발현 분석과 GR 함량 변화를 관찰하였다.
- 제작된 plasmid vector를 agrobacterium (GV1301 strain)에 transformation 시킨 후 *Agro.* cell의 농도를 1.5 O.D.로 조절하여 바늘이 없는 syringe를 이용해서 발아 후 3주가 지난 브로콜리 잎에 infiltration 시켰다 (그림 49).

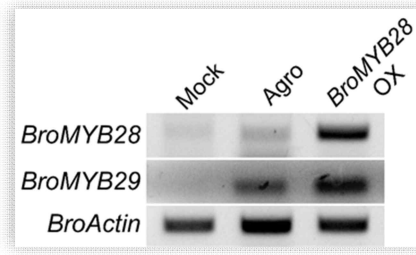


[그림 49. transient expression-용 vector와 infiltration에 사용된 브로콜리]

- Infiltration 된 브로콜리를 식물생장상 (25°C)에서 2일간 배양하여 시료를 sampling 하였다. 뿐만 아니라, 물만 infiltration 된 샘플 (Mock), *Agro* cell (empty vector included)만 infiltration 된 샘플 (*Agro*)들도 대조구로 같이 샘플링 되었다
- 먼저, 수집된 샘플에서 목적으로 하는 *MYB28* 유전자 발현 여부를 RT-PCR로 확인 한 결과 아래 그림처럼 *MYB28* transiently overexpressed 시킨 개체에서 수집된 샘플 (*BroMYB28 OX*)에서만 *MYB28* 유전자가 발현되었다. 하지만 *Agro*-infiltration과 Mock treated 샘플에서는

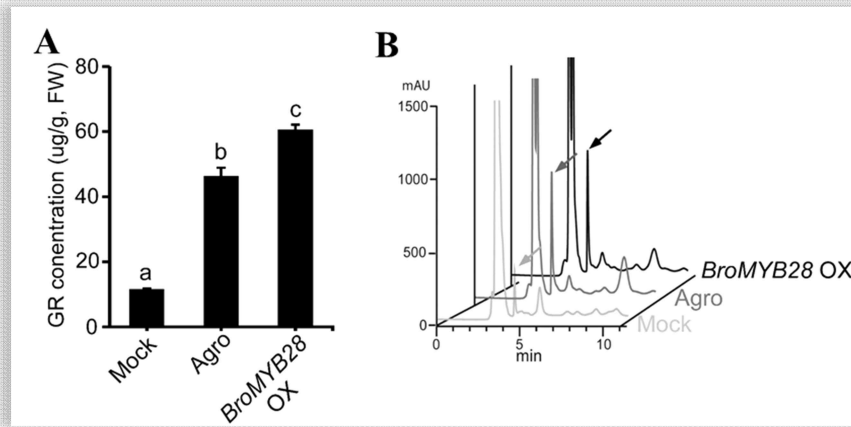


*MYB28* 유전자 발현이 관찰되지 않았다 (그림 50).



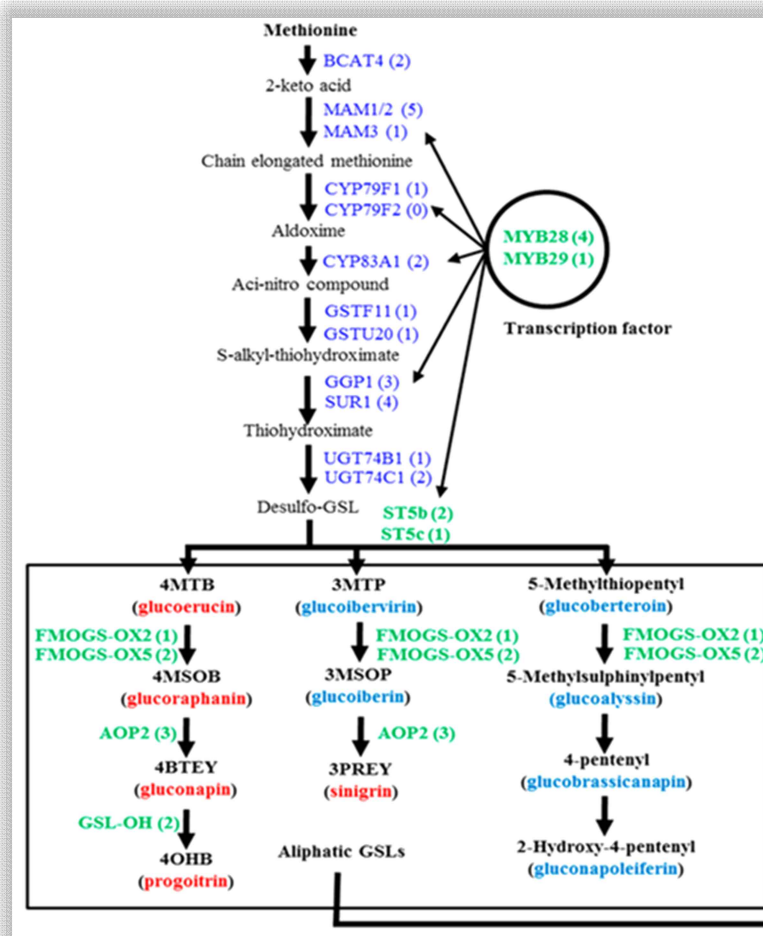
[그림 50. *MYB28*을 transient expression 시킨 샘플과 대조 샘플에서의 *MYB28* 발현 분석 결과]

- *Agro*. cell 비처리구 (Mock)를 제외한 *Agro*. cell 처리구 (Agro)와 wild type *MYB28* 유전자를 transient expression한 처리구 (*BroMYB28 OX*) 모두에서 고함량의 GR이 검출되었다.
- 이러한 결과로 우리는 아래 그림에 제시된 것처럼, 두 가지 결과를 도출할 수 있었다 (그림 51).
  - 브로콜리에서는 *Agro* infiltration 만으로도 GR 함량을 증가 시킬 수 있다.
  - *MYB28* 유전자가 발현할 경우 GR 함량을 증가 시킨다.



[그림 51. *MYB28* transient expression 실험 결과 A: GR 정량 분석 결과; B: 분석된 HPLC spectrum]

- 따라서 *Agro* infiltrated 와 *MYB28* transiently over-expressed 브로콜리 개체에서 GR 생합성에 관여하는 유전자들을 선별하고, 이들 유전자의 발현을 분석하기 위한 프라이머를 제작하였다 (표 4).
- 아래 표에 제시된 프라이머를 이용한 RT-PCR을 실시해서 GR 생합성에 관여하는 유전자들의 발현을 분석하였다.



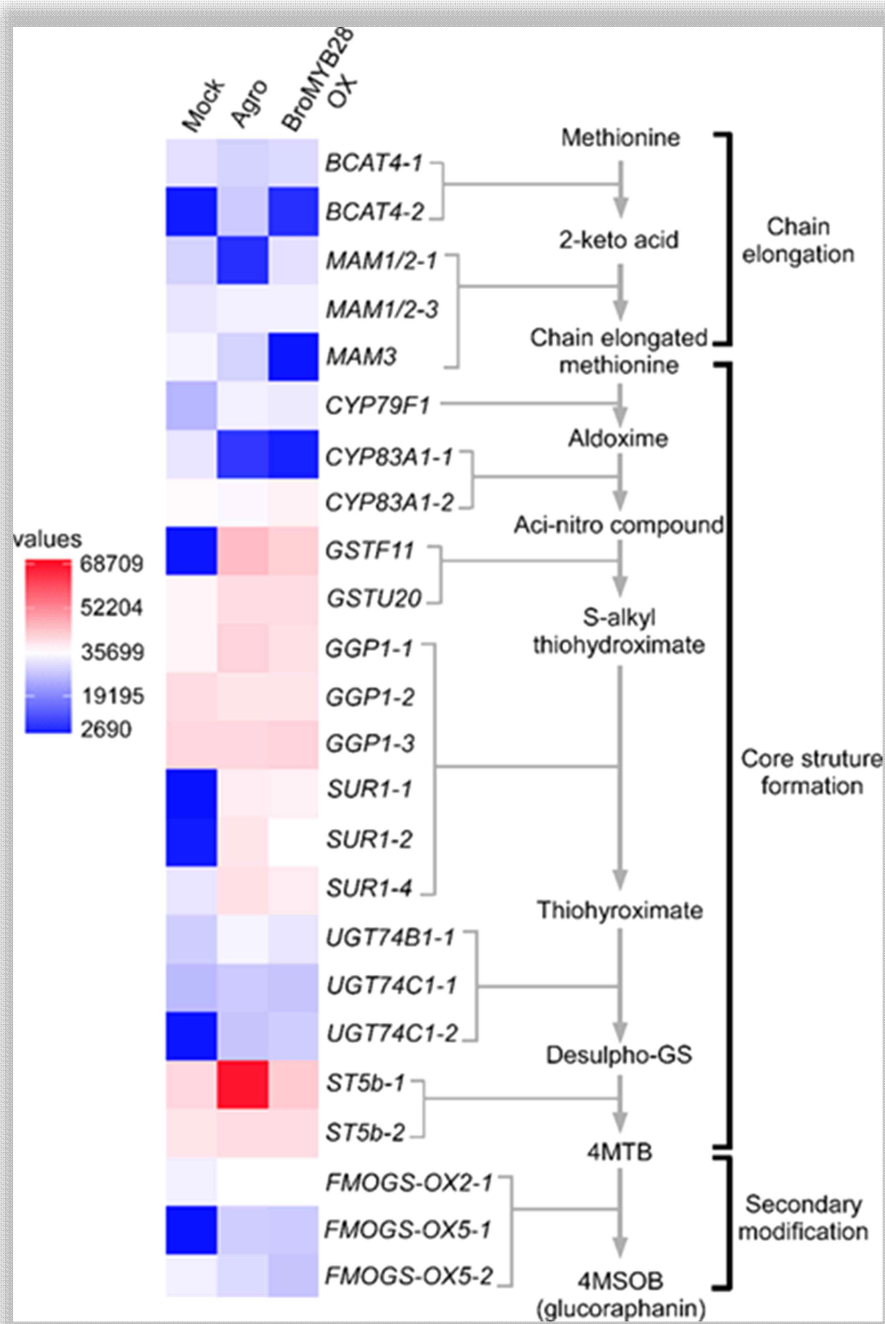
[그림 52. GR 생합성 경로 분석과 생합성 각 단계에 관여한 유전자가 제시됨 (출처: Robib et al., 2016)]

<표 4. GR 생합성 연관 유전자 발현 분석을 위한 프라이머 정보>

Gene name	Gene ID	프라이머 서열 (5' to 3')	온도(°C)	방향	크기(bp)
<i>BCAT4-1</i>	<i>Bol018130</i>	TACGCGAATGTGAAGTGGGA CCCCTTCTATCCTCGACCC	58	F R	987
<i>BCAT4-2</i>	<i>Bol026690</i>	TACGCGAATGTGAAGTGGGA CACCGTCCACCCCTTCTTAT	58	F R	996
<i>MAM1/2-1</i>	<i>Bol017071</i>	TGTTGCCAGTGTGGAAAGG TGAATGATACAGTTGGCTCCA	53	F R	970
<i>MAM1/2-3</i>	<i>Bol020646</i>	AATGATCCCTACCACCGTTCAAACA CTTGCGGCATGTTGATCTCC	58	F R	650
<i>MAM3</i>	<i>Bol016496</i>	CTACCGCCAACACAATCTC CGTCCGTAATCCTCTTTTCT	53	F R	504
<i>CYP79F1</i>	<i>Bol038222</i>	GAACCATCGGAGGCAATCAC AGGTGACGCTCTGGTTTGTA	57	F R	970
<i>CYP83A1-1</i>	<i>Bol040365</i>	ATGTCAACTTCACGAACCGG GTTAGGGCCCCACTCTTTCT	50	F R	953
<i>CYP83A1-2</i>	<i>Bol005188</i>	GGGGTTAACGTTTCGTCCTG GAGCCCAGTCATGACATCCA	56	F R	442
<i>GSTF11</i>	<i>Bol000843</i>	TTGGGCAGATAAAAGCAGGT	56	F	610

		GCAGCCATTTCCATAAGTTGC		R	
<i>GSTU20</i>	<i>Bol021558</i>	CTGGCCAAGCATGTTCTGTA TTCCTAAACTCAGCGGCGTA	56	F R	612
<i>GGP1-1</i>	<i>Bol033672</i>	TGTTTCTAGCAACTCCTGATTCA AGTTCTTGCAAATCGTCTCCA	56	F R	699
<i>GGP1-2</i>	<i>Bol018073</i>	TGTTTCTTGCAACTCCTGATTCA AAATTCTTGCAAATCGTCTCCAA	56	F R	700
<i>GGP1-3</i>	<i>Bol012989</i>	TGTTTCTAGCGACTCTTGATTCA AAATTCTTGCAAATCGTCTCCAA	56	F R	700
<i>SUR1-1</i>	<i>Bol038767</i>	TCCGCACCTGTATCGAGG CTCATCCAGTTCTTCACCCC	56	F R	1000
<i>SUR1-2</i>	<i>Bol038764</i>	CTTCCGTCTATCCTTGCTT CTGTATCTGTCTTCTTGGT	56	F R	360
<i>SUR1-4</i>	<i>Bol029775</i>	TGTTTCCC CGGTTAAA AACT AGTGGAAGGGTCAGGAGTTA	56	F R	923
<i>UGT74B1-1</i>	<i>Bol005786</i>	AATCCTTCAAGCTCAACGGC TCAAACACCTCACCACCTCA	52	F R	993
<i>UGT74C1-1</i>	<i>Bol006450</i>	CACACGAACACCCTCAAACC AGCCTTCACTCTAACCCTCAA	58	F R	989
<i>UGT74C1-2</i>	<i>Bol014127</i>	CCCTCACGCCAAGATCAAAG CGGTCTTCACTCTAACCCTCAA	54	F R	980
<i>ST5b-1</i>	<i>Bol026202</i>	CGTACCGAACCAAGACAAGA ACCATGTTCAAGCAAACCTGT	56	F R	1000
<i>ST5b-2</i>	<i>Bol026201</i>	GGACCAAACCAGGACGAGA ACCATGTTCAAGCAAACCTGT	56	F R	999
<i>FMOGS-OX2-1</i>	<i>Bol010993</i>	AGTCTCTCCGAACCAACCTC AACCACATTCTTCTGCGACC	52	F R	978
<i>FMOGS-OX5-1</i>	<i>Bol029100</i>	CATAGTCCACTCCAGCGTCT ACTTGCTCGGCTATCCAGTT	52	F R	993
<i>FMOGS-OX5-2</i>	<i>Bol031350</i>	AACCGTAGTCCACTCTAGCG CTGACCGACGACCAACAAGA	56	F R	970

- RT-PCR 분석 결과, *CYP79F1*, *GSTF11*, *GSTU20*, *GGP1-1*, *SUR1-1*, *SUR1-2*, *SUR1-4*, *ST5b-1*, *FMOGS-OX2-1*들의 발현이 GR 함량을 증가시키는 *Agro-infiltration*과 *MYB28* transiently over-expressed 처리구에서 증가하는 것을 확인하였다 (그림 53). 이 결과는 *MYB28* 유전자가 GR 생합성에 관련된 유전자의 발현을 조절하고 있을 가능성이 크다는 것을 시사하고 있다.

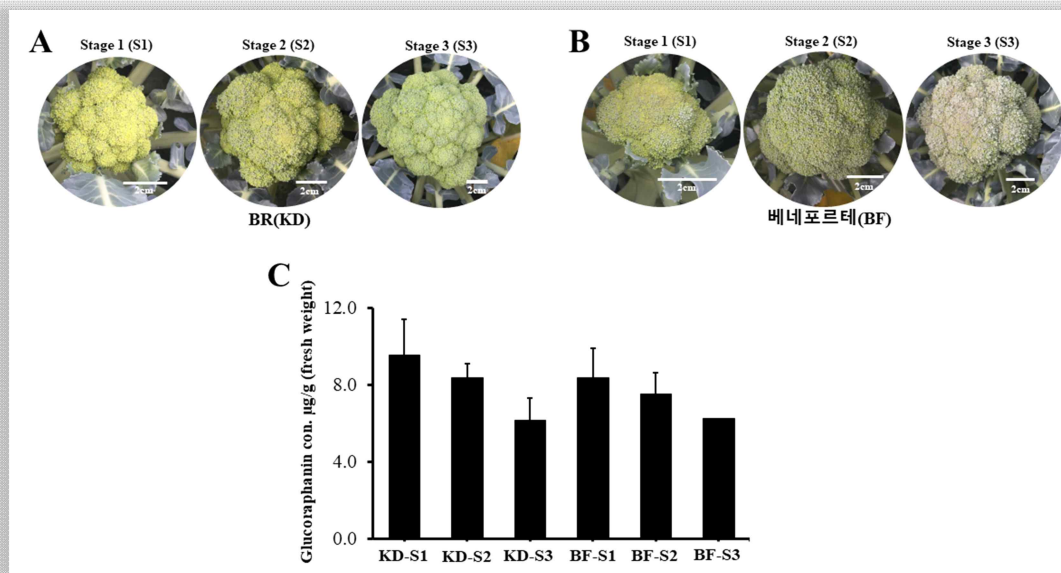


[그림 53. GR 생합성 관련 유전자 및 유전자들의 발현양상. GR 생합성 경로; B: RT-PCR 결과]

### 8. 브로콜리 화퇴 발달 단계별 GR 함량변화 분석

- 브로콜리 화퇴 성숙단계별 GR 함량변화를 알아보기 위해 베네포르테 (GR 고함량)와 아시아 종묘의 육성계통 중 GR 함량이 상대적으로 높은 육종계통(KD) 대상으로 GR 정량분석을 실시하였다.
  - 크기별로 stage1 (직경 3~4 cm), stage2 (직경 5~8 cm), stage3 (직경 9 cm 이상)로 나누어 sampling을 실시하였다.
  - 수집된 샘플에서 표준 프로토콜을 따라서 브로콜리 추출물을 확보하여서 HPLC로 정량분석을 실시하였다 (그림 54A, B).

- 두 개체 모두 화퇴 성숙초기 상대적으로 높은 함량을 보였으며, 성숙이 진행 될수록 낮은 함량을 나타냈다 (그림 54C).
- 또한, 베네포르테와 육종계통 (KD) 사이에 GR 함량 차이가 크게 발견되지 않았다. 이는 기존 알려진 정보 (GR 고함량 품종으로 알려진 베네포르테의 특성)와는 달랐다. 아마 재배 환경에 따라 GR 함량 변화가 크게 나타나므로, 추가적인 실험이 필요한 것으로 판단해서 추가적인 실험을 실시하였으나 동일한 결과를 확보하였다.



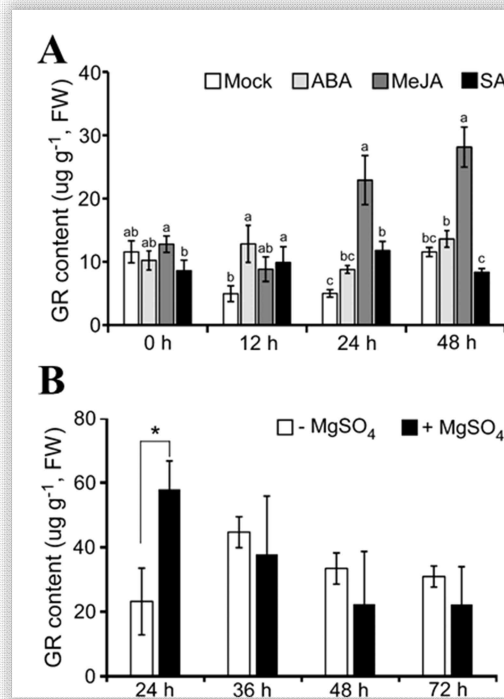
[그림 54. GR 함량분석 결과. A: 크기별 육종계통(KD) 시료; B: 크기별 베네포르테 시료; C: GR 정량분석 결과]

### 9. 브로콜리 생체 내 GR 함량에 영향을 미치는 요인 분석

- 브로콜리 유묘 발달 단계별 GR 함량 변화는 이미 분석하였기 때문에, 발달 단계 뿐만 아니라, 재배 현장에서 GR 함량을 증가시키는 효율적인 방법을 모색하기 위해서 다양한 화학물질을 처리 한 후 GR 함량에 미치는 영향을 분석하였다.
  - 대표적인 스트레스 관련 식물 호르몬으로 잘 알려진 abscisic acid (ABA), methyl jasmonate (MeJA), salicylic acid (SA)를 처리하였다
    - 호르몬 별로 다음의 농도로 (100 uM(ABA), 1 mM(MeJA), 1.5 mM(SA) 처리한 후 12시간, 24시간, 48시간의 간격으로 GR 함량 변화를 분석하였다 (그림 55A).
    - 분석한 결과, ABA와 SA 처리구 경우 대조구에 비해 GR 함량 차이가 발견되지 않았다. 하지만, MeJA처리 24시간 후 부터 GR 함량이 증가되었고, 이러한 효과는 48시간 이상 지속되는 것으로 나타났다.
    - 브로콜리 재배시, GR 함량을 늘리기 위해서는, MeJA를 처리하는 것이 효율적이라는 것을 본 실험 결과로부터 유추할 수 있다.
  - GR 생합성에 sulfur가 필수적이므로, sulfur 공급원을 처리할 경우 GR 생합성에 어떤 영향을 미치는지 여부를 관찰 하였다.
    - 일반 MS배지 (1/2 MS, 3% sucrose, 0.8% agar) 에서 7일차 브로콜리를 sulfur resource

인  $MgSO_4$  (1.5 mM) 가 추가로 첨가된 MS 배지로 이식 한 후 24시간, 36시간, 48시간, 72시간의 간격으로 sampling된 브로콜리 시료의 GR 함량변화를 분석한 결과, 처리 24시간에 glucoraphin 함량이 급격히 높아지는 경향을 보였다. 하지만 이러한 효과는 24시간 이후 점차 감소되는 경향을 보였다 (그림 55B).

- 만일 GR 함량을 증가하기 위해서 sulfur 공급원을 처리할 경우 24시간 단위로 처리하여야만 GR 함량 증가 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다.



[그림 55. 화학물질 처리에 의한 브로콜리 GR 함량 변화 분석. A: 스트레스 관련 식물 호르몬 처리 후 GR 함량분석 결과; B:  $MgSO_4$  처리 후 GR 함량분석 결과]

## 2-2. 제1협동 연구 내용 및 결과

### 1. CRISPR/Cas9 (유전자편집) 적용을 위한 Broccoli 계통 증식 및 제공

#### - 유전자편집용 시료 제공

- 유전자편집을 위한 원형질체 추출과 재분화 조건 확립을 위한 시료로 이용될 킹덤의 모계 1030(BN8920) 와 부계 1071(BN1282) 소재 제공을 위하여 표 5과 그림 56 과 같이 육묘와 seedling을 공동 연구진(세종대 연구팀)에 제공하였다. 초기에는 상토에서 육묘한 육묘를 세종대학교 연구진에 제공하였으나, 오염 문제가 발생하여 무균 상태의 seedling을 제공하기 위하여 종자를 소독하여 1/2 MS 배지에 치상하여 아래처럼 세종대학교 공동연구진에 제공하였다 (표 5, 그림 56).

- 계통별로 종자의 개수를 세어 70% EtOH와 1% NaClO (Sodium hypochlorite)로 소독 후 멸균수로 3회 이상 수세하여 치상

- MS를 반으로 줄인 구성에 Sucrose를 2% 첨가한 배지(pH 5.8)를 고압멸균기로 121℃, 20분간 멸균 후 Plant culture dish(SPL, 100\*40mm)에 50ml 씩 분주하여 소독된 종자를 치상.
- 종자가 치상된 petri dish는 25℃ 항온으로 유지되는 배양실에서 장일조건(明 16h/暗 8h)으로 배양하였다.
- 발아 시 오염이 발생하여 4% NaClO로 20분간 2회 반복 소독을 진행하였고, 추가로 발생할 수 있는 오염에 대비하여 가스 소독 과정을 추가하여 기내 배양을 진행하였다.

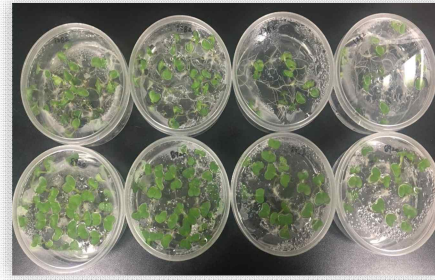
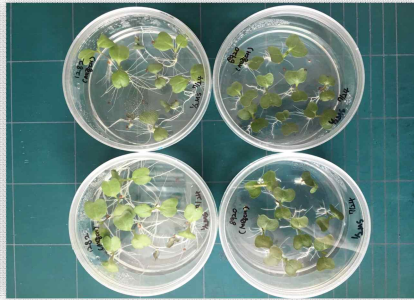
<표 5. 공동연구진(세종대 연구팀 및 생명공학연구원 연구팀)에 제공된 킱돔 모/부계 목록>

과종일	전달일	과종립(개)	수령기관 및 수령인	기타사항
17.04.25	17.05.01	모/부계 각 35립	세종대학교 연구진	상토 과종
17.05.09	17.05.18	“	세종대학교 연구진	상토 과종
17.05.18	17.05.31	“	세종대학교 연구진	상토 과종
17.05.31	17.06.14	“	세종대학교 연구진	상토 과종
17.06.09	17.06.21	“	세종대학교 연구진	상토 과종
17.06.19	17.06.27	“	세종대학교 연구진	상토 과종
17.06.30	17.07.12	“	세종대학교 연구진	상토 과종
17.07.11	17.07.12	“	세종대학교 연구진	충해발생이전 전달
17.07.24	17.08.02	모/부계 각 20립	세종대학교 연구진	소독 후 기내배양
17.08.23	17.09.01	“	세종대학교 연구진	소독 후 기내배양
17.09.07	17.09.13	“	세종대학교 연구진	소독 후 기내배양
17.09.29	17.10.11	“	세종대학교 연구진	소독 후 기내배양
17.10.13	17.10.30	“	세종대학교 연구진	소독 후 기내배양
17.10.23	17.11.13	“	세종대학교 연구진	소독 후 기내배양
17.11.03	17.11.21	“	세종대학교 연구진	소독 후 기내배양
17.11.17	17.11.29	“	세종대학교 연구진	소독 후 기내배양
18.02.12		100	세종대학교 연구진	
18.03.07	제외	70	세종대학교 연구진	오염 발생
18.04.19	18.04.26	50	세종대학교 연구진	4% NaClO 20min X 2회
18.05.09	18.05.14	120	세종대학교 연구진	4% NaClO 20min X 2회
18.06.18		60	세종대학교 연구진	
18.07.03		60	세종대학교 연구진	
18.08.10	시험 중	60	세종대학교 연구진	가스 소독





상토 파종 유묘



무균 기내 배양 유묘

[그림 56. 공동연구진(세종대 연구팀)에 제공된 킹돔 모/부계 유묘]

## 2. 소포자 배양 조건 확립, 개선 및 이를 활용한 계통 육성

- 소포자 배양 조건을 테스트 하였다. 소포자 배양시 중요한 조건에는 모본의 상태 (꽃가루의 활력), 배양배지의 조성 그리고 고온 처리 시 온도 조건이 있다.
- 본 연구를 위해 자사에서 브로콜리의 소포자 배양 시 효율이 높았던 배양배지 2종류 (control)와 3가지 고온처리 조건으로 노지에서 재배중인 킹돔의 부계 BN312를 대상으로 하여 배양 테스트를 3회 진행하여 보다 효율적인 소포자 배양 조건을 확립하고자 하였다.
  - 배양 배지는 하기 조성으로 만들어 AgNO<sub>3</sub> (Silver nitrate)와 생장호르몬 NAA (Naphthalene acetic acid), BAP(6-Benzylaminopurine)를 첨가하여 사용하였다.
  - AgNO<sub>3</sub>는 *B. oleracea*의 여러 형태 형에서 소포자 배양 시 첨가하면 사용하지 않은 경우에 비해 배아형성능력이 효과적으로 향상된다고 알려져 있다.
  - NLN은 열에 약해 배지 조제 시 고압멸균기로 멸균하지 않고 filter system(corning, 0.22 μm, sterilizing)을 이용하였다.

component	B1	B2
NLN MEDIUM	0.386 g	0.193 g
NLN VITAMIN MIXTURE	1.039 g	0.5195 g
CaNO <sub>3</sub>	0.5 g	0.25 g
Sucrose	130 g	130 g
	pH 5.8	
	Filtering	

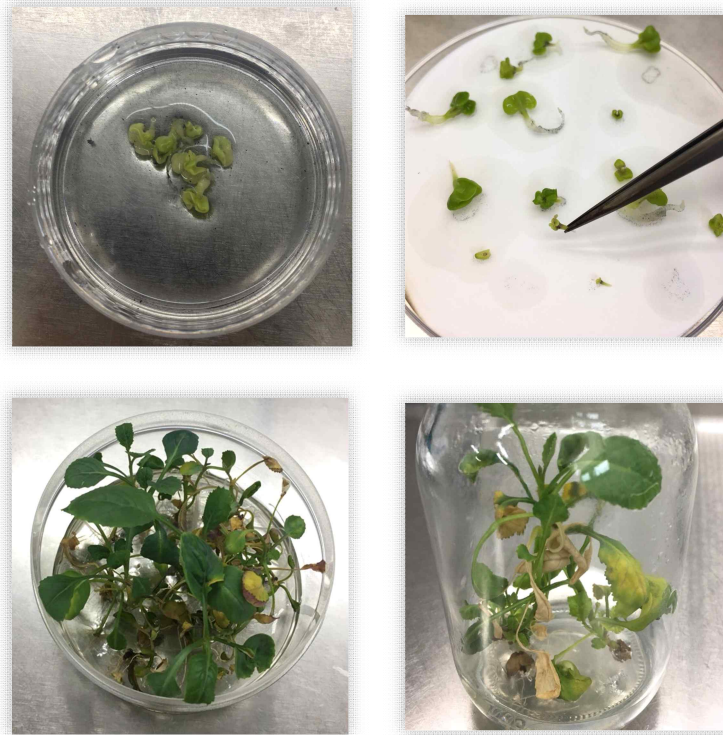
<표 6. 브로콜리 소포자 배양배지의 조성>



- 아래에 제시된 방법으로 브로콜리 소포자 배양을 실시하였다 (그림 57).
  - 샘플 채취 : 대상 모본에서 개화가 시작되면 적기의 sample을 채취
  - 샘플 소독 : sample은 다시 한 번 적기에 맞는 크기를 선별하여 거즈에 묶고 70% EtOH로 30초간 2회, 1% NaClO(Sodium hypochlorite)로 10분, 5분씩 2회 소독 후 멸균수로 3회 이상 수세.
  - 마쇄 및 분리 : 멸균된 막자사발을 이용하여 filtering 된 액체배지 소량과 함께 sample을 마쇄한 뒤 mesh로 조직을 걸러내어 원심분리(1000rpm, 3min, 3times)하여 소포자만을 분리.
  - 분주 및 고온처리 : 분리된 소포자액은 호르몬이 첨가된 배양배지에 activated charcoal과 함께 petri dish(60\*15mm)에 넣고 sealing하여 incubator에 넣어 고온처리
  - 배 발생 확인 : 고온처리 후 25℃ 항온배양기에 넣어 암배양한 뒤 10~14일 후부터 배 발생 확인.
  - 치상 : 배 발생이 확인되면 70 rpm shaker에서 5~7일간 더 배양한 뒤 MS2 기본배지에 치상.
  
- 소포자 배양의 적정 조건을 확립하였다 (표 7).
  - 30℃ 2일 처리구에서는 배 발생이 나타나지 않았다.
  - 32.5℃ 2일 처리구에서 가장 많은 배 발생을 보였다.
  - 소포자 배양의 결과는 같은 조건일지라도 계통별로 상이한 결과를 나타내지만 B1배지의 사용과 32.5℃ 1일의 고온처리 조건을 활용하면 배양조건 확립 및 빠른 시간 내에 다수의 배 획득에 도움이 될 것으로 판단된다.

〈표 7. 브로콜리 소포자 배양조건 검정 결과〉

처리조건	B1	배발생율(%)	B2	배발생율(%)
30℃ 2일	0 (250개 화퇴)	-	0 (250개 화퇴)	-
31℃ 1일	17 (250개 화퇴)	6.8	7 (250개 화퇴)	2.8
32.5℃ 1일	34 (250개 화퇴)	13.6	15 (250개 화퇴)	6.0
Total	51 (750개 화퇴)	6.8	22 (750개 화퇴)	2.9



[그림 57. 브로콜리 소포자 배양중 배 발생 및 치상 후 발근과정]

- 고정 계통 확립을 위한 소포자 배양 조건 개선
- 브로콜리의 소포자 배양 시 효율이 높다고 보고된 배양배지 2종에 새로운 조성의 1종을 추가하여 3종의 배양배지 시험을 진행하였다. 그리고 1차년도 브로콜리 배양 시험에서 우수한 효율을 나타낸 2가지 고온처리 조건을 사용하여 BN1044와 BN1047 계통을 대상으로 배양 시험을 진행하였다 (표 8).

<표 8. 브로콜리 소포자 배양에 사용한 배양배지의 조성>

COMPONENT	Medium Type 1	Medium Type 2	Medium Type 3
NLN MEDIUM	0.386 g	0.193 g	0.386 g
NLN VITAMIN MIXTURE	1.039 g	0.5195 g	1.039 g
CaNO <sub>3</sub>	0.5 g	0.25 g	0.5 g
Sucrose	130 g	130 g	100 g

\* 모든 조성의 배지는 pH 5.8로 최종 조정하여 Filtering을 통해 멸균 수행

- 각 배지는 상기 조성으로 제조하여 AgNO<sub>3</sub> (Silver nitrate) 와 생장호르몬 NAA (Naphthalene acetic acid), BAP (6-Benzylaminopurine) 를 특정 농도로 각각 첨가하여 사용하였다.
- AgNO<sub>3</sub>는 기 보고된 연구에서 *B. oleracea* 여러 계통의 배양 시 첨가 후 배아형성능력이 효과적으로 향상된다고 알려져 있다.

- 배양에 사용되는 NLN 배지는 열에 약하여 멸균을 위해 고압멸균기를 이용하지 않고 filter system(corning, 0.22  $\mu$ m, sterilizing)을 이용하여 멸균을 수행하였다.
- 추가로 시험한 Medium Type 3는 Type 1 배지에서 sucrose 함량을 줄여 제조한 후 평가를 진행하였다. 배양 효율 증대를 위해 배양액에 분리된 소포자와 함께 소포자 유래의 배아를 강화시키고 에틸렌 길항물질로서 작용하여 배 발생을 증가시킨다고 알려진 activated charcoal을 넣어 시험을 진행하였다. 배양 및 실험 진행은 전년도와 동일하게 다음에 조건으로 진행하였다.
- 소포자 배양 조건 개선 (2차년도)
  - 시료채취 : 대상 모본에서 개화가 시작되면 적기 (품종별로 약간씩 상이하지만 킹덤의 경우, 매일 개화 전 화퇴를 열어 화퇴 내 꽃잎이 1/2 ~ 1/3 크기 정도 발달된 것을 선별하여 같은 크기의 화퇴만 선발) 시료를 채취 (그림 58)
  - 소독 : 선별한 화퇴를 거즈에 묶고 70% EtOH로 30초간 2회, 1% NaClO (Sodium hypochlorite)로 10분, 5분씩 2회 소독 후 멸균수로 3회 이상 수세
  - 마쇄 및 분리 : 멸균된 막자사발을 이용하여 filtering된 액체배지 소량과 함께 sample을 마쇄한 뒤 mesh로 조직을 걸러내어 원심분리 (1000rpm, 3 min, 3 times)하여 소포자만을 분리
  - 분주 및 고온처리 : 분리된 소포자액은 호르몬이 첨가된 배양배지에 activated charcoal과 함께 petri dish (60×15mm)에 넣고 sealing하여 incubator에 넣어 고온처리
  - 배 발생 확인 : 고온처리 후 25°C 항온배양기에 넣어 암 배양한 뒤 10~14일 후부터 배 발생 확인
  - 치상 : 배 발생이 확인되면 70 rpm shaker에서 5~7일 간 배양한 뒤 MS2 기본배지에 치상



A. 적기의 시료 채취



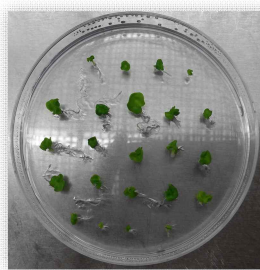
B. 소독



C. 소포자 분리



D. 배 발생 확인



E. 치상



F. 발근 확인

[그림 58. 브로콜리 소포자 배양 과정]

- 소포자 배양 결과 분석
  - 시험에 사용한 두 계통 BN1044와 BN1047의 배양시험으로부터 고효율의 브로콜리 소포자 배양 방법을 확인하였다.
  - 1차년도 결과를 참고하여 배 발생이 나타나지 않은 조건인 30°C 2일 조건을 제외하고, 31°C 1일와 32.5°C 1일 등 2가지 온도 조건에서 배지 구성에 따라 시험을 진행하였다 (표 9).
  - 열처리 온도 조건에서는 31°C 1일 처리구 보다 32.5°C 1일 처리구에서 32% 이상 많은 배의 발생을 보였다.
  - 배지의 종류 중에서는 Type 1 배지에서 가장 많은 배 발생이 나타났고, BN1044보다 BN1047이 보다 높은 배발생율을 보였다.

<표 9. 브로콜리 소포자 배양의 배지 조성 및 온도처리 조건별 발생 배 비교>

배양 배지 / 처리 조건	Medium Type 1		Medium Type 2		Medium Type 3		Total
	BN1044	BN1047	BN1044	BN1047	BN1044	BN1047	
31.0°C 1일	34	51	27	18	22	34	186
32.5°C 1일	31	47	34	31	41	62	246
Total	65	98	61	49	63	96	432

- 본 연구에서 가장 높은 배 발생률을 보인 실험 조건의 결과와 전년도 배양 결과를 단순 수치 비교를 하였을 때는 7.3 ~ 26.7%의 배 발생률 증가를 확인할 수 있었다 (최소 조건 34% → 41.3%, 최대 조건 14.6% → 41.3%)
- 계통별 비교에서 배 발생률이 증가한 것을 알 수 있었다. 또한 배 발생률뿐만 아니라 수치적 평가가 진행 중으로 이른 단계이긴 하나 정상 식물체로의 재 분화 개체 수도 증가하고 있음을 확인할 수 있었다.

<표 10. 브로콜리 소포자 배양을 통해 유기된 화뢰당 배 발생률>

	사용한 화뢰의 수	발생한 배의 수	배 발생률
BN1044	150	189	126%
BN1047	150	243	162%
Total	300	432	144%

- 순화 및 재분화가 이뤄진 개체들은 온 처리를 통해 개화 유도 진행 후, 다음 해 봄 교배시기에 맞추어 종자 증식을 진행하였다 (그림 59).



A. 순화



B. 저온처리

[그림 59. 소포자 유래 식물체의 토양 순화 및 저온처리]

- 소포자 배양 조건 개선 (3차년도)
  - 2차년도 확립된 고효율 배양 조건을 토대로 시험에 사용한 세 계통의 배양시험으로부터 다수의 개체를 확립할 수 있었다. 하지만 십자화과 작물의 소포자 배양에서 배양 전 저온전처리 (4℃ 1일) 과정이 배양효율 증대를 기대할 수 있다는 연구 결과 발견하여 적용하였다.
  - 저온전처리 (4℃ 1일) 샘플과 대조구를 추가하여 진행한 결과 다른 십자화과 작물의 배양 결과에서 배 발생률이 다소 증가한 것에 비해 브로콜리의 소포자 배양에서는 저온 전처리를 하지 않은 대조구에서 더 많은 수의 배가 발생하였다.
  - 하지만, BN1363에서만 저온 전처리 효과를 확인 할 수 있었다.
- 소포자 배양의 경우 동일한 조건에서 계통별 상이한 결과가 나타날 수 있기 때문에 2차년도 데이터를 기반으로 효율이 높았던 배양 배지 2종과 2차년도와 동일한 고온처리 조건으로 시험하였다.
  - BN1363은 전년도 배 발생률 수치와 유사하며 BN1004의 경우 다수의 배를 획득, 다수의 재분화 식물체를 얻을 수 있었다.
  - BN1300의 경우 배 발생률은 낮았으나 재분화율이 양호하며 발근 후 생장이 빨라 다수의 식물체를 획득할 수 있었다.
  - BN1363의 경우 배 발생률은 양호하였으나 재분화 과정에서 생육이 더디고 발근 후 활착진행이 다른 계통에 비해 느려 손실되는 개체가 많았다.
  - 그러나 시험한 3계통 중 순화율이 가장 좋았으며 재분화된 개체의 대부분이 토양순화를 거쳐 개화 유도를 위한 저온 처리 중에 있다.

본 연구 결과와 전년도 배양 결과를 비교하였을 때 배 발생률은 단순수치로 BN1004의 경우 높은 배 발생률과 재분화율을 보였으며 BN1363의 경우 재분화율은 낮은 편이었으나 재분화 이후 순화율이 가장 높아 다수의 정상 식물체를 획득할 수 있었다.



<표 11>. 브로콜리 소포자 배양의 배지 조성 및 온도처리 조건별 배 발생 비율

배양 배지 / 처리 조건	Medium Type 1			Medium Type 2			Total
	BN1004	BN1300	BN1363	BN1004	BN1300	BN1363	
31.0°C 1일	41	18	37	45	23	21	129
4°C 1일 → 31.0°C 1일	26	2	17	32	0	52	185
32.5°C 1일	38	21	39	48	28	15	119
4°C 1일 → 32.5°C 1일	28	3	11	26	7	44	189
Total	133	44	104	151	58	132	622



5/13



6/3



6/20



7/3

[그림 60. 소포자 유래 식물체의 재분화]

<표 12. 브로콜리 소포자 배양을 통해 유기된 화퇴립당 배 발생률 및 재분화율>

	사용한 화퇴립의 수	배 발생		재분화	
		개체수	배 발생률	개체수	재분화율
BN1004	120	284	236%	308	108.5%
BN1300	120	102	85%	54	52.9%
BN1363	180	236	131%	63	26.7%
Total	420	622	148%	425	68.3%

- 현재 순화가 먼저 이뤄진 51개체들의 경우 저온 처리를 통해 개화 유도가 진행 중이며, 이후 순차적으로 순화된 식물체를 포함하여 2020년도 봄 교배시기에 맞추어 종자 증식을 진행할 예정이다.



토양 순화(1주차-배양실)



토양 순화(2주차-배양실)



순화된 식물체 유리 온실 이식(3주차)

[그림 61. 소포자 유래 식물체의 토양 순화 및 저온처리]



### 소포자 배양 연구 종합 결과:

- 아시아종묘는 본 과제를 통해 브로콜리의 최적화된 소포자 배양 조건을 개발하고 구명하였다.
- 올해 2019년도 소포자 배양을 통해 토양순화까지 완료한 브로콜리 식물체가 140여개체이며, 현재 온실 하우스에서 순화 및 저온처리 중에 있다. 또한 재분화를 완료한 개체들은 420여개 개체 이상으로 지속적으로 발생된 배로부터 재분화 식물체를 획득하고 있다.
- 이 개체들은 2020년 3~4월 중에 종자 증식을 진행하여 2020년 가을 작기에 포장에 전개하여 특성 검정을 진행 후 특성이 우수한 개체를 선발 및 계통으로 활용하여 육종 소재로 활용할 것이다.



[그림 62. 2019년 봄 개화 식물체로부터 소포자 배양을 통해 유래된 식물체들]

### 3. 브로콜리 시판 품종 GR 함량 분석 및 원예특성 평가

#### ○ 1차년도 연구내용

- 현재 판매 중인 품종 들 중에서 세계적으로 시장점유율이 높은 Sakata사의 ‘Avenger’, 국내 인기 품종인 Bejo 사의 ‘Grace’, 제주도 우점 품종인 Sakata사의 ‘SK3-085’ 등의 품종들과 시장에서 경쟁하기 위하여 개발된 ‘킹덤’ 품종에다 GR 함량을 증가시키기 위해서 과제를 진행하고자 한다.
- 시장 리더 품종 (Avenger, Grace, SK3-085)과 킹덤 (F<sub>1</sub>, 모/부계) 과의 특성 평가를 위하여, 2017년 7월 17일 ‘킹덤’ F<sub>1</sub> (BN1028), ‘SK3-085’ (BN1043), ‘Grace’ (BN1044), ‘Avenger’ (BN1075), ‘Marathon’ (BN1088), ‘Beneforte B1199’ (BN1098)를 각각 105립씩 파종하여 4주간 육묘한 후, 8월 11일에 플라스틱필름하우스에 정식하여 재배하였음. 정식 후 2주 간격으로 3회 원예용 복합비료를 추비하였고, 저설관수 시스템을 적용하여 관수하였다. 11월 2일, 정식 후 80일 차에 각 품종의 특성을 조사하였다 (그림 63).



(플라스틱필름하우스 정식포장 준비)



(브로콜리 재배 전경)

[그림 63. 2017년 가을 작기 브로콜리 정식포장 준비 및 재배 전경]

<표 13. 브로콜리 주요 리딩 F<sub>1</sub> 품종과 ‘킹덤’ 특성 비교>

BN	화퇴형	화퇴색	화퇴크기 (mm)	화퇴중 (g)	상품성	화퇴경도	비고
1028	돔형	진녹	185/177	420	상	강	
1043	돔형	녹	173/165	390	상	중	
1044	돔형	녹	181/182	440	상	강	
1075	돔형	진녹	184/180	400	상	강	
1088	돔형	녹	178/167	340	중	중	안토시아닌 발생
1098	돔형	녹	176/153	260	하	약	

- 특성 평가 비교 결과

- BN1028은 아시아종묘의 ‘킹덤’ 품종으로 화퇴의 모양이 우수하고 초형은 입성으로 밀식 재배가 가능함. 화퇴입자가 작고 치밀하여 상품성이 우수하며, 화퇴색은 진록색이고 숙기는 80~85일 정도임. 화퇴경도가 단단하고, 포장 저장성이 매우 우수하여 인기가 많은 품종이다.
- BN1043은 Sakata의 ‘SK3-085’는 제주도의 월동작형의 리딩 품종으로 파종후 160일 전후에 수확 가능한 만생종 품종으로 초세는 중간정도이고 초형은 입성으로 구가 단단하고 입자는 작아 매우 우수하며, 제주에서 많이 재배 하는 품종이다.
- BN1044는 Bejo사의 ‘Grace’로 국내 내륙지방에서 많이 재배하는 품종으로 입자가 작고 치밀하며 납질이 많은 것이 특징이다.
- BN1075는 Sakata의 ‘Avenger’로 화퇴색은 진록색이고, 화퇴의 경도는 강이고 입자가 작고 외엽이 직립형으로 상품성이 우수하여 세계적으로 매우 널리 재배되는 우수 품종이다.
- BN1088은 Seminis의 ‘Marathon’으로 중앙 아메리카에서 많이 재배하는 품종으로 돔이 높고, 무게가 많이 나가나, 화퇴에서 안토시아닌이 발생하며, 중앙 아메리카와 국내의 재배기후의 차이로 중앙아메리카에서 재배 했을 때 보다 상품성이 떨어지는 경향이 있다.



- BN1098은 본 연구과제의 모티브가 되었다, 대비 품종으로 활용될 ‘Beneforte B1199’ 품종 (시판품종 Marathon 품종보다 2~3배 높은 GR 함량 보유) 으로 Seminis에서 판매하고 있는 품종이다. 주로 유럽에서 판매되는 품종으로 화뢰는 녹색을 나타낸다. 화뢰 모양은 우수하나 입자가 굵어 상품성은 떨어지는 편이지만 소화되 형태로 잘라서 포장한 후, 판매가 이루어지고 있다.
- 본 연구과제의 ‘킹덤’ (F<sub>1</sub>, 모/부계) 다른 품종 간의 GR 대조구로 재배하였다. (표 13, 그림 64).



BN1028



BN1043



BN1044



BN1075



BN1088



BN1098

[그림 64. 브로콜리 주요 F<sub>1</sub>의 품종 특성]

- ‘킹덤’의 모/부계의 특성을 검정하고, 그 종자를 증식하기 위하여 상기의 F<sub>1</sub> 재배방법과 동일하게 2017년 7월 17일 각각 파종하여 4주간 육묘한 후, 8월 11일에 플라스틱필름

하우스에 정식하여 재배하였고 그 특성들을 비교 분석하였다 (그림 65).

- 모계 (BN1312) 는 조생종으로 화뢰가 크며 입자가 작고 잎이 직립형이며, 부계 (BN1283) 는 숙기가 모계보다 늦고, 화뢰의 입자도 모계보다 크며, 화뢰의 경도가 단단하였고, 잎은 수평형적인 특성을 보였다. 서로 다른 특징의 계통을 교잡하여 현재 판매되고 있는 킹덤을 육성하였다.
- 또한 ‘Beneforte B1199’ 품종의 육성재료로 사용된 야생종 브로콜리 BN1096 (*Brassica oleracea*)과 BN1097 (*Brassica villosa*)의 종자를 각각 5립씩 충남대학교 유전자원소재은행으로부터 분양받아 동일한 조건으로 재배하여 종자를 수집하여 육성자원으로 활용하고자 재배 하였다(그림 66). 또한 이들 브로콜리 야생종 자원의 genomic DNA 추출과 cDNA 합성을 위한 재료를 세종대학교 연구팀에 제공하였다.

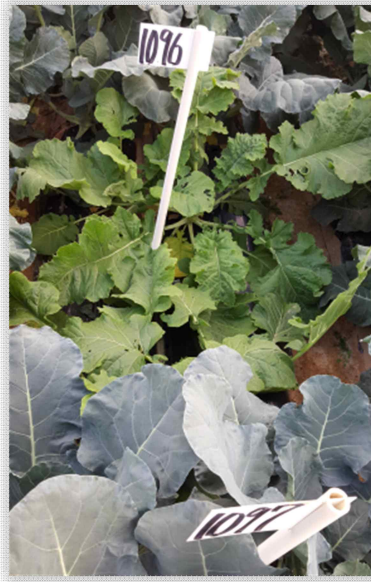


[그림 65. 킹덤 모계 (BN1312, 좌측)/부계 (BN1283, 우측) 특성 검정 후 준화처리를 위해 선발하여 이식한 모습]





BN1096



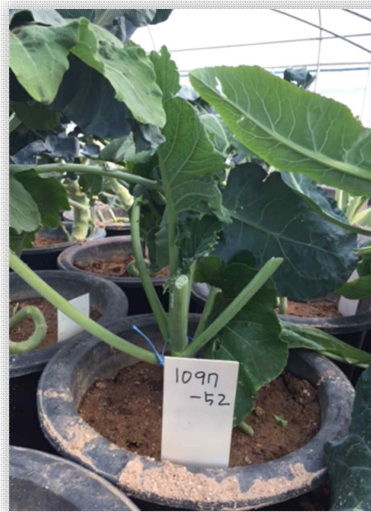
BN1097



BN1098



BN1096



BN1097



BN1098

[그림 66. 야생종 브로콜리 BN1096 (*Brassica oleracea*) 과 BN1097 (*Brassica villosa*), BN1098 ‘Beneforte B1199’의 종자 증식을 위한 준화처리 과정]

○ 2차년도 연구내용

- 연구 계통으로 이용되는 킹덤 및 베네포르테 품종의 원예 형질 재배 평가를 수행하였다. 작기에 따라 반복하여 각 품종의 원예 형질을 비교하였다 (그림 67, 68).
- 봄 작기에는 2018년 2월 27일 파종한 각 계통을 약 5주간 육묘하여 3월 27일에 플라스틱 필름하우스에 정식하였고, 가을 작기에는 7월 16일에 파종하여 8월 13일까지 약 4주간 육묘하여 정식하였다.
- 두 품종의 화퇴는 2018년 봄 작기와 가을 작기에 재배되어 평가 되었다.
- 킹덤 (봄-BN312, 가을-1143) 품종의 화퇴는 돛형의 연녹색을 띄었고, 상온 저장성이 높



았다.

- 베네포르테 (봄-296, 가을-1144) 품종은 구와 입자가 양호하게 성장하였으며, 숙기는 킹덤 품종에 비하여 3일 가량 빨랐다.
- 2018년도의 가을 작기는 예년과 동일한 시기로 파종 및 정식하였으나, 생육 초기 고온 및 생육 후기의 급작스러운 저온으로 인해 계통의 일반적인 숙기에 비하여 10일 가량 늦어졌다.



[그림 67. ‘킹덤 (BN312, 좌측)’ 및 ‘베네포르테 (BN296, 우측)’ 품종의 성숙 화퇴]







**킹덤 (BN1143)**



**베네포르테 (BN1144)**

[그림 68. ‘킹덤’ 및 ‘베네포르테’ 생육 비교 사진]

- 시장 선점 우수 Broccoli 품종들의 원예 형질 조사
  - 세계 리딩 품종들을 대상으로 국내 기후 및 환경에 적합한 계통을 확인하고 원예 형질을 평가하기 위하여 2회에 걸쳐 특성 평가를 수행하였다.
  - 국외 시장 고점유 계통인 세미니스의 어벤저, 베조의 그레이스 및 국내 상위 점유 품종인 사카타의 SK3-085, 그린매직의 생육 상태 및 원예 형질 평가를 진행하였다.
  - 봄 작기에는 2018년 2월 27일 파종한 각 계통을 약 5주간 육묘하여 3월 27일에 플라스틱 필름하우스에 정식하였다.
  - 가을 작기에는 7월 16일에 파종하여 8월 13일까지 약 4주간 육묘하여 정식하였다 (그림 69).



[그림 69. 2018년도 봄 작기 및 가을 작기 재배 전경]

- 정식 후 70일 이상 재배하여 브로콜리 품종의 원예 특성 조사를 수행하였다 (표 14, 그림 70).
- 세미니스의 어벤저(봄-BN251, 가을-BN1075)의 숙기는 타 계통 대비 약 10일 늦은 숙기를 보였다. 화뢰의 돔 형태 및 입자 크기는 상품성 상등급을 나타내었고, 화뢰는 진녹색을 띄었다. 화뢰의 성장이 진행됨에도 화뢰구가 깨지지 않는 우수성을 보였다.
- 베조의 그레이스(봄-BN244, 가을-BN1064)는 화뢰색은 연녹색이며, 성장기간에 따라 안토시아닌 착색이 발생하여 국내 재배 기후 및 재배 작기 선택에 따라 상품성이 다른 것을 확인하였다.
- 사카타의 SK3-085(243, 1063) 품종은 직립형의 입자가 굵은 화뢰를 갖는 특성을 나타내었다. 그린매직(245, 1065) 품종은 우수한 화뢰 모양을 갖추고 재배 밀식에 알맞은 초장을 나타내었다. 화뢰는 회록색을 띄며 타 품종에 비해 숙기가 빨랐다. 화뢰구의 성장이 진행되어도 입자의 크기가 균일하게 분포하였다.

<표 14. 브로콜리 주요 시장 선점 F<sub>1</sub> 품종들의 특성 비교>

품종 (판매회사)	재배시기 BN	화뢰색	화뢰크기 (mm)	화뢰중 (g)	상품성	비고
킹덤 (아시아종묘)	봄 BN132	진녹	175/153	400	상	
	가을 BN1143	진녹	190/173	430	상	
베네포르테 (Semini)	봄 BN296	녹	170/145	230	하	
	가을 BN1144	녹	173/155	250	중	
Avenger (Sakata)	봄 BN251	진녹	175/172	410	상	
	가을 BN1075	진녹	186/185	450	상	
Grace (Bejo)	봄 BN244	녹	163/160	390	중	
	가을 BN1064	녹	183/182	460	상	
SK-085 (Sakata)	봄 BN243	녹	165/162	440	중	
	가을 BN1063	진녹	187/186	480	상	
Green Magic (Sakata)	봄 BN245	녹	175/187	400	중	
	가을 BN1065	녹	179/190	420	상	



Avenger (Seminis)



Grace (Bejo)



SK3-085 (Sakata)



Green Magic (Sakata)

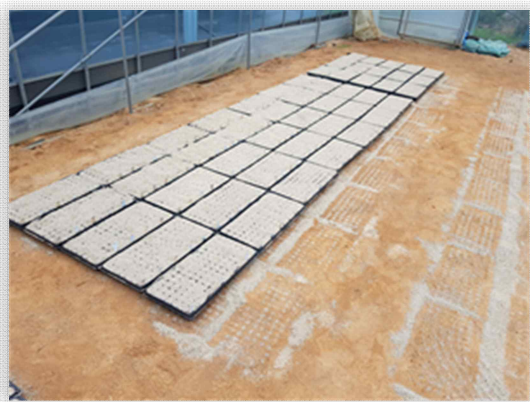


[그림 70. 우수 브로콜리 품종들의 원예 형질 평가]

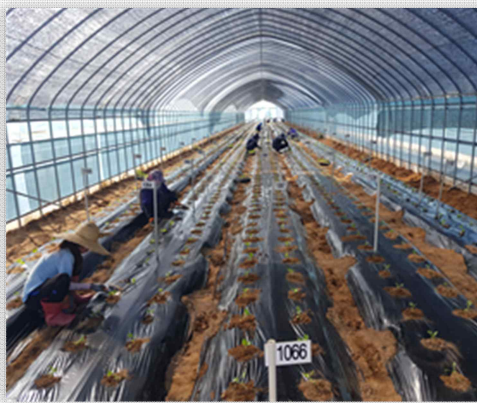


○ 3차년도 연구내용

- 수집유전자원 유래 우수 브로콜리 계통 확보를 위한 원예 형질 조사
- 우수 리딩 품종들을 대상으로 국내 기후 및 환경에 적합한 계통을 확인하고 원예 형질을 평가하기 위하여 2회에 걸쳐 특성 평가를 수행하였다.
- 전년도에는 국외 시장 고점유 품종인 세미니스의 어벤저, 베조의 그레이스 및 국내 상위 점유 품종인 사카타의 SK3-085, 그린매직의 생육 상태 및 원예 형질 평가를 진행하였고
- 올해는 사카타, 신젠타, 세미니스와 같은 메이저회사의 주요 품종 형질 평가를 진행하였다.
- 봄 작기에는 2018년 2월 8일 파종한 각 계통을 약 50일간 육묘하여 3월 28일에 플라스틱 필름하우스에 정식하였다 (그림 71).
- 가을 작기에는 7월 16일에 파종하여 8월 13일까지 약 28일간 육묘하여 정식하였다 (그림 72).



[그림 71. 브로콜리 2019년도 봄 작기 파종, 육묘, 정식 및 재배 전경]



[그림 72. 브로콜리 2019년도 가을 작기 파종, 육묘, 정식 및 재배 전경]

- 정식 후 70일 이상 재배하여 성숙한 주요 브로콜리 품종의 원예 특성 조사를 수행하였다.
- 사카타의 그린매직(가을-BN1084)은 화퇴모양과 입자가 우수하였고, 입성이 직립에 가까워 밀식재배가 가능할 것으로 보인다.
- VIPER(가을-BN1104)는 화퇴색과 모양 입자가 우수하였지만 숙기 이후에는 버드가 벌어져 저장성이 약한 것으로 판단된다.
- 중국에서 판매되는 희영문(가을-BN1133)과 희보춘(BN1134)는 세미니스의 어벤저보다 숙기가 빠르고 그린매직과 비슷한 형태를 보였으며, 균일성이 상당히 우수한 특성을 나타내었다. 또한 숙기가 지났음에도 화퇴의 형태가 깨지지 않고 계속 커짐에 있어 포장 저장성도 좋은 것으로 판단된다.
- 다끼의 TI-090(가을-BN1148)은 숙기가 정식 후 약60일정도 되며 화퇴의 입자가 우수한 특성을 나타내었으며, 숙기가 지난 후에는 입자가 커지는 특성을 보였다.
- 세미니스의 BC1691(가을-BN1158)은 화퇴모양과 입자가 우수하였으나 숙기가 지난 후에는 화퇴모양이 깨져서 상품성이 저하되는 특성을 보였다.



<표 15. 도입 브로콜리 주요 F1 품종들의 특성 비교>

품종 (판매회사)	재배시기 BN	화퇴색	화퇴크기 (mm)	화퇴중 (g)	상품성	비고
그린 매직 (아시아종묘)	가을 BN1084	녹	175/195	430	상	
VIPER (Sakata)	가을 BN1104	녹	180/182	450	중	입자우수, 저장성개량필요
희영문 (중국판매 Sakata)	가을 BN1133	녹	187/172	420	상	조생종 최근 중국 판매품종, 균일성 우수
희보춘 (중국판매 Sakata)	가을 BN1134	녹	181/175	430	상	조생종 최근 중국 판매품종, 저장성 우수
TI-090 (Takii)	가을 BN1148	진녹	183/182	460	상	화퇴입자 우수
BC1691 (Seminis)	가을 BN1158	녹	180/162	280	중	외형 및 입자 개선 필요



Green Magic (SAKATA)



VIPER (SAKATA)



희영문 (SAKATA)



희보춘 (SAKATA)





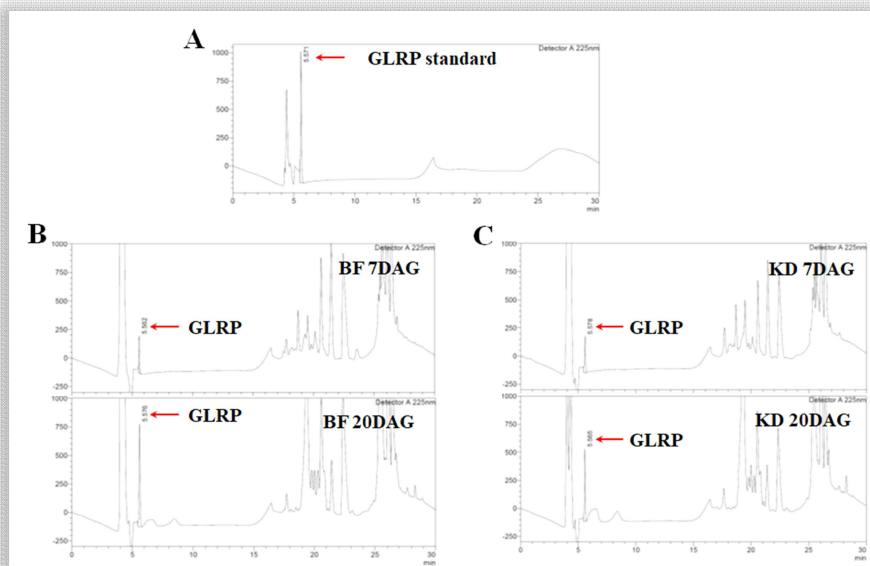
TI-090 (TAKII)

BC1691 (SEMINIS)

[그림 73. 우수 품종의 생육 상태 및 원예 형질 평가]

○ 브로콜리 품종 대상의 GR 함량 분석 (세종대학교 연구진 결과 제공)

- 본 과제 수행에서 확립된 HPLC 분석법을 통한 육종계통 (킹덤)과 베네포르테 품종 간의 GR 함량을 분석하였다.
- 베네포르테와 육종계통 간의 *MYB28* 유전자 발현 분석 실험에 이용된 것과 동일한 시료로부터 확보된 추출물을 대상으로 HPLC 분석을 실시하였다.
- *MYB28* 유전자 발현이 발아 후 7일 (7DAG) 보다 20일 (20DAG)에서 높은 결과와 동일하게, 두 품종 모두 7DAG에 비해 20DAG에서 높은 함량의 GR이 검출되었고, 예상 한 것처럼 베네포르테 품종이 육종계통보다 약 1.5배 정도 높은 함량의 GR을 함유하고 있는 것으로 확인되었다 (그림 74)



[그림 74. 베네포르테 품종과 육종계통 간 GR 함량 분석 A: GR standard HPLC spectrum; B: 베네포르테 GR 분석 HPLC spectrum; C: 육종계통 GR 분석 HPLC spectrum; GLRP: 글루코라파닌(GR)]

- 두 품종 간 *MYB28* 발현양상과 GR 분석 결과, GR 함량이 증가하는 시기와 *MYB28* 유전자의 발현이 증가하는 시기가 일치하는 결과를 확인하였고, mutant *MYB28* 유전자가 발현되는 베네포르테 품종이 그렇지 않은 육종계통에 비해 높은 함량의 GR을 함유하고 있는 사실로부터 mutant *MYB28* 유전자 발현이 GR 생합성 증가에 중요한 역할을 할 것 이라는 가설을 도출하였다.

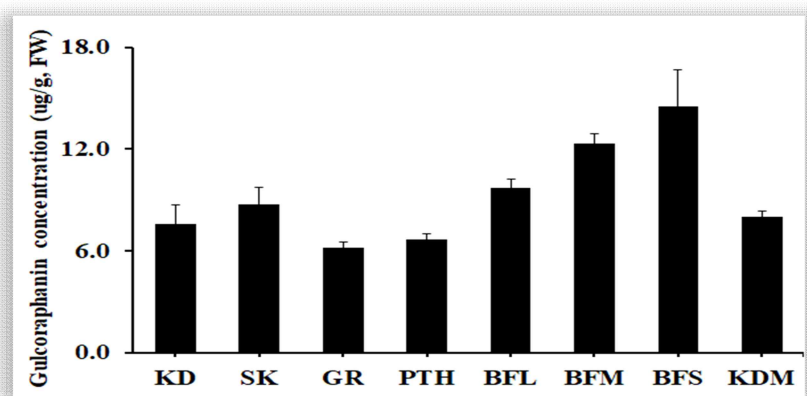
○ 브로콜리 품종(과 계통) GR 정량 분석

- 아시아종묘로부터 제공 받은 GR 정량 분석용 시료 (표 16)를 methanol 로 추출, 농축한 후 HPLC system을 활용하여 GR 함량을 정량분석 하였다.
  - standard GR를 일정비율로 희석해서, HPLC로 분리 (이동상: 5 mM Tetramethylammonium bromide과 100% Acetonitrile, flow rate: 0.8 ml/min) 한 후 UV absorbance (230 nm) 측정하여 검량선을 작성하였다.
  - 동결된 broccoli 화뢰 시료를 분쇄, 100% methanol 추출 용매로 현탁, sonication (1시간), 55°C 중탕처리 (1시간), filtering, 감압농축의 전처리과정을 거친 후 확보된 추출시료를 HPLC system으로 분리 정량분석 하였다. 각각의 시료는 3반복 추출 및 정량분석을 실시하였다.

<표 16. GR 함량 분석용 시료 리스트>

구분	ID	샘플 조직	샘플 번호
F <sub>1</sub>	KD	L	1028
품종	SK	L	1043
품종	GR	L	1044
품종	PTH	L	1075
베네포르테	BFL	L	1098
베네포르테	BFM	M	1098
베네포르테	BFS	S	1098
육종계통	KDM	L	1312

L: 수확기 sample size; M: 6~8cm sample size; S: 1~2cm



[그림 75. GR 정량분석 결과]

- GR 함량은 BFS (14.5 µg/g), BFM (12.3 µg/g), BFL (9.7 µg/g), SK (8.7 µg/g), KDM (8.0 µg/g), KD (7.6 µg/g), PTH (6.7 µg/g), GR (6.2 µg/g) 순으로 높은 함량이 검출되었다 (그림 75).
- 예상하였던 결과로, 베네포르테 품종이 다른 품종(계통)에 비해 약 1.5~2 배정도의 높은 GR 함량을 보였다.
- 재미있는 사실은, 크기가 작은 단계 즉 미숙 베네포르테 화뢰가 가장 높은 농도의 GR을 함유하고 있는 것으로 나타났고, 화뢰 성장 할수록 GR 함량이 낮아지는 경향을 보여서, GR 함량 증가가 화뢰의 크기 성장을 따라가지 못해서 전체 GR 농도가 희석되는 것으로 추정된다.
- 따라서, GR 고함량 브로콜리 육성 시, 브로콜리 화뢰 크기 또한 고려해야 할 육성 목표로 설정할 필요가 있을 것으로 판단된다.

#### 4. 유전자편집 개체와 교배조합 작성을 위한 계통 육성과 이들 대상의 조합력 및 특성 검증

##### ○ 1차년도 내용

- 본 과제로부터 육성되는 GR 고함량 계통과 교배하여 품종을 육성하기 위한 파트너 친의 육성과 이들의 교배 특성을 검증하기 위하여, 기존 육성된 계통들과 신규로 육성한 계통들을 양친의 특성을 고려하여 교배조합을 2017년 봄에 작성하였다.
- 이렇게 작성된 12개의 신조합 F<sub>1</sub>의 종자를 2017년 6월말 채종하여, 7월 17일 각각 파종하여 4주간 육묘한 후, 8월 11일에 플라스틱필름하우스에 정식하여 재배하고 그 특성을 검증하였다.
- 브로콜리 우수조합 5개를 선발하였으며 2017년도 6월13일부터 7월6일까지, 10월23일부터 11월3일까지 2회에 걸쳐 아시아종묘 이천연구소에서 해외 바이어들과 그 품질 가능성을 시험하였고, 현재 4개의 거래처에서 이들 5개 신조합의 재배 시험이 수행되었다.
- 2017년도 글루코시놀레이트 함량분석 결과를 토대로 고함량 계통간의 신조합을 작성하여 지속적으로 활용하고자 한다.
  - BN1010, BN1012, BN1014, BN1016, BN1017 5개 조합은 자사 필드데이에서 외국바이어가 우수하다고 생각되는 조합을 직접 선택하여 선발하였고, 현재 여러 나라에 시교중인 조합으로 시교결과에 따라 상품화 추진 여부를 결정할 예정이다.
  - BN1010 신조합은 브로콜리의 가식부위인 화뢰의 입자들을 조밀하게 개량하기위하여 양친이 모두 세밀한 입자들로 화뢰를 형성하는 양친을 교배한 조합으로 기존의 아시아종묘 판매품종들에 비해 화뢰입자가 작고 세밀한 특성을 보였다. 이 BN1010의 양친으로 사용된 고정계통들은 향후 본 연구과제의 결과로 창출되는 GR 고함량 계통들과 교배하여 신조합을 작성하여 GR 함량이 고함량이면서 화뢰입자도 세밀한(fine beads) 우수 품종 육성에 사용하고자 한다.
  - 2017년도 가을재배 시 베트남 N사의 바이어가 화뢰의 색상이 베트남 시장에서 선호되는 진녹색이고 화뢰의 입자가 고르고 균일하여 선발한 신조합인 BN1012는 경제성장 속도가 매우 빠르고, 앞으로 고품질 건강기능성 채소시장이 크게 형성될 가능성이 큰 신흥시장인 베트남에서 방문한 적극적인 바이어의 개발 노력으로 선발되었다. 특히, 하노이 및 호치민 근교의 고소득층 거주지에서는 한국의 프리미엄 시장과 같이 매우 활발

한 건강기능성 채소 시장이 형성될 수 있고 이를 아시아종묘와 함께 시장개발을 하고 싶다는 거래처의 적극적인 노력으로 본 과제에서 육성되는 GR 고품량 품종의 수출 시장 개발에 유용하게 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

- BN1014 신조합은 브로콜리의 화퇴형태가 돔형으로 우수한 특성을 보여 선발하였으며. 기존의 재배인 2017년 봄재배에서도 우수한 돔형을 보여 지속적인 관심을 가지고 그 특성을 평가해온 신조합으로 가을재배에서도 상용품종으로 적합한 돔 모양의 화퇴 형태가 나타나 선발하였다. 또한 봄재배와 가을재배에서 모두 동일한 형태의 특성을 보여 재배범위가 넓어 세계시장으로의 수출 가능성도 확인하였다. BN1014의 양친으로 사용된 계통들은 향후 본 연구과제 결과로 개발되는 GR 고품량 계통들과 신조합을 작성하여 GR 함량이 고품량 이면서 화퇴형이 우수한 돔형으로 재배 범위가 큰 수출용 우수 품종 육성에 사용할 계획이다.
- BN1016 신조합은 브로콜리의 화퇴형태가 돔형으로 특히 우수한 특성을 보여 선발하였다. BN1016의 양친으로 사용된 계통들은 향후 본 연구과제의 결과로 개발되는 GR 고품량 계통들과 신조합을 작성하여 GR 함량이 고품량 이면서 화퇴형이 돔형으로 우수한 신품종 육성에 사용하고자 한다.
- 브로콜리의 화퇴색에 대한 특성은 세계 시장별로 진녹색을 선호하는 시장과 연녹색을 선호하는 시장 등 매우 주관적으로 나타나는데 BN1017은 국내 가락시장의 경매인들이 선호하는 연녹색의 화퇴색으로 선발하였다.
- 브로콜리의 판매 확대를 위한 상용품종의 육종은 매우 탁월한 한가지의 특성, 예를 들어 고기능성 성분인 GR 함량이 높은 특성을 가지고 있더라도 기본적인 화퇴색, 돔형, 입자 크기, 병저항성 등 원예적인 특성도 갖추어야 판매가 가능한 것으로 판단된다.
- 따라서, 그림 76과 표 17와 같이 화퇴입자, 화퇴색, 돔형, 재배범위 등이 우수한 계통들을 고기능성 성분의 함량이 높은 계통과 교배하여 육성되는 신품종들은 다양한 특성을 요구하는 세계 브로콜리 시장에서 소비지별로 요구하는 맞춤형 품종으로 개량되어 그 시장을 적극적이고 성공적으로 개발하고 확대할 수 있을 것으로 예상된다.

<표 17. 브로콜리 우수 조합 선발 결과 (2017년)>

BN	계통명	비고
1010	564MS x JJ-1-51-51-51-51 [계통(E, Elite) E1 x 계통 E2]	화퇴입자 우수
1012	DS-11S MSBC4 x JJ-1-51-51-51-51 [계통 E3 x 계통 E2]	베트남 바이어 선발 우수조합 진녹색이고 입자 균일함
1014	NY564MS x 704-52S-51 [계통 E4 x 계통 E5]	봄재배/가을재배 모두 우수 돔형, 재배범위 우수
1016	NY564MS x JJ-1-51-51-51-53-51 [계통 E4 x 계통 E2]	돔형 우수
1017	DS-11MS x JJ-1-51-51-51-51 [계통 E6 x 계통 E2]	화퇴색 우수



[그림 76. 2017년도 가을재배시 선발된 5종의 브로콜리 우수조합들]

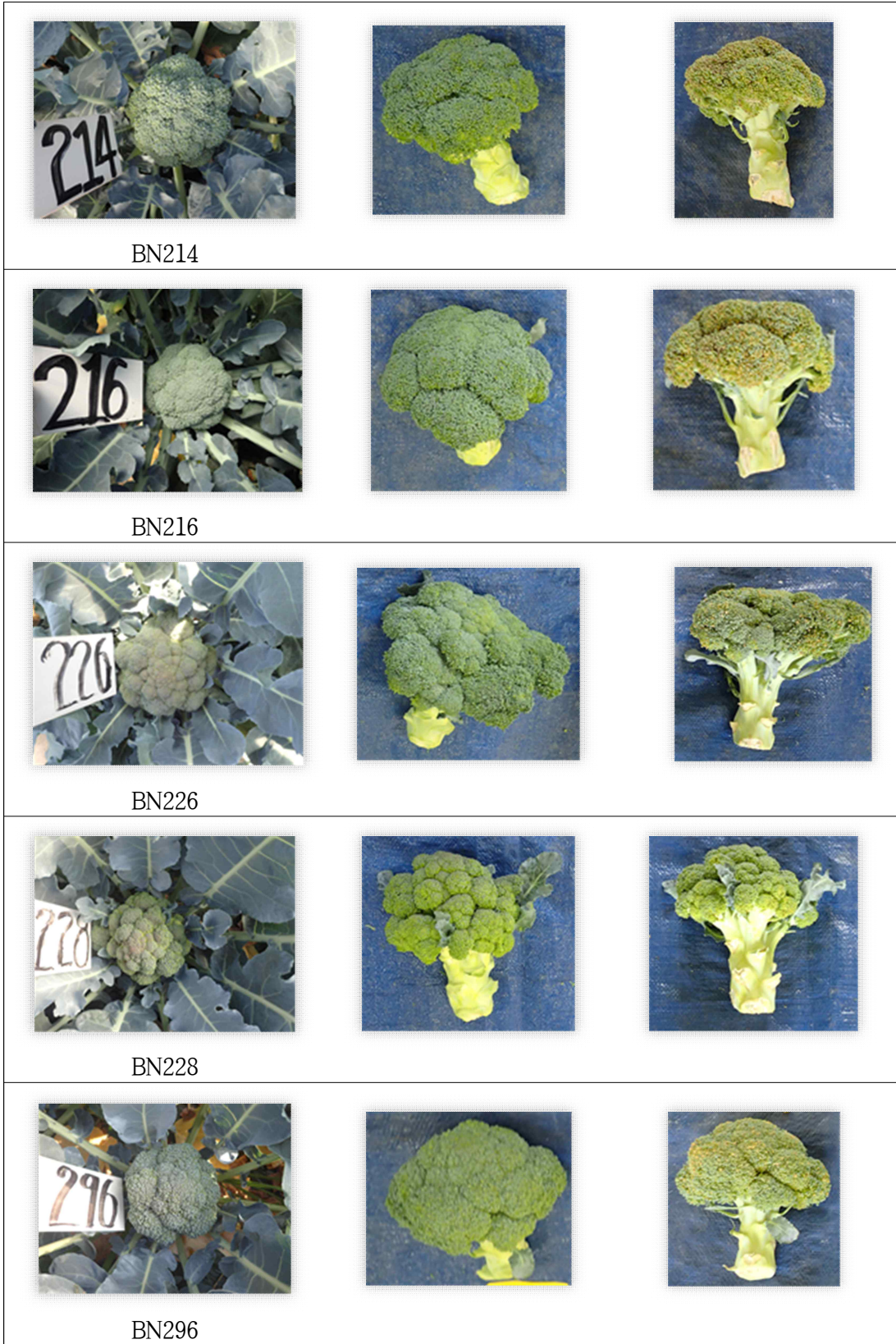
### ○ 2차년도 내용

- 브로콜리 우수조합 2개를 선발하였으며 2018년도 6월14일부터 26일까지 아시아종묘 이천연구소에서 해외 바이어들과 그 품질 가능성을 시험하였다 (그림 77, 표 18).
- 해외 거래처에서 신조합의 재배 시험이 수행되고 있다. BN214, BN216은 자사 필드데이에서 외국바이어가 우수하다고 생각되는 조합을 직접 선택하여 선발하였다. 이 계통들은 수확 후 화퇴의 상온 저장을 통해 황화 평가를 통해 브로콜리의 수확후 유통 저장성을 비교하였다.
- BN214 신조합은 브로콜리의 화퇴형태가 돛형으로 우수한 특성을 보여 선발하였으며. 2017년도 가을재배 등에서도 그 원예적 형질을 확인하였던 우수조합이었다. 이러한 BN214의 양친으로 사용된 고정계통들은 향후, 본 연구과제의 결과로 창출되는 GR 고품량 계통들과 교배하여 신조합을 작성하여 GR 함량이 고품량이면서 화퇴형이 돛형으로 우수한 수출용 품종 육성에 사용하고자 한다.
- BN216 신조합은 화퇴형태가 돛형으로 우수하고 2018년 봄재배와 가을재배에서 모두 동일한 형태의 화퇴형을 보여 그 재배범위가 우수한 것으로 판단되었다. 이는 2017년도 우수 선발조합인 BN1014 유사한 특성으로 그 재배범위가 넓어 세계시장으로의 수출 가능성이 클 것으로 기대된다.
- 2018년도 우수선발조합인 BN214와 BN216의 수확후 유통중의 저장성을 평가 비교하기 위하여 사용품종인 얼리유 (조생종, 아시아종묘 판매중인 상용품종, BN226), 킹돔 (중만생종, 아시아종묘 판매중인 상용품종, BN228), 베네포르테 (중만생, Seminis 판매중인 기능성 상용품종, BN296) 등을 공시하여 각 품종의 적정 수확기에 화퇴를 수확하고 동일한 저장조건이 23℃, 상대습도 70% 조건의 실내 저장실에서 시들음 정도와 황화 변화를 비교하였다. 그 결과, 선발된 우수조합 BN214와 BN216은 판매중인 3개 품종들과 비교하여 시들음 정도와 황화 정도가 차이가 없어 향후, 이들 우수조합의 양친들은 상용품종의 개발에 활용이 가능한 것으로 판단되었다.

<표 18. 브로콜리 우수선발조합 및 계통 선발(2018년)>

BN	계 통 명	원예적 특성 비교	수확후 유통 저장성 비교
214	NY564MS x JJ-2-51-51-51-51 [계통 E4 x 계통 E7]	덤형 우수	형태 유지 우수, 황화 중간
216	NY564MS x 704-13S-51 [계통 E4 x 계통 E8]	덤형 및 재배범위 우수	형태 유지 우수, 황화 중간
226	Early you	조생종 상용품종	형태 유지 우수, 황화 느낌
228	King dome	중만생 상용품종 덤형우수	형태 유지 우수, 황화 느낌
296	Beneforte	중만생 기능성 덤형개량 필요	형태 유지 우수, 황화 중간





[그림 77. 2018 브로콜리 우수조합 및 비교 품종과의 수확후 유통 저장성 비교]

○ 3차년도 내용

- GR 함량이 높아진 품종을 만들기 위해 육성한 계통들을 활용하여 조합을 작성하였다.
- 총 15개 조합을 작성 한 후 이들과 얼리유 (아시아종묘), 에쿠스 (아시아종묘), 그린매직 (사카다) 등 3개의 품종과 특성 비교를 실시하였다
- 화뢰의 크기, 무게, 입자의 크기, 입성, 안토시아닌 발현 유무 등을 비교 하였으며, 글루코시놀레이트 함량이 늘어나지는 않았지만, 품종 개발 가능성이 높을 것으로 판단되는 F<sub>1</sub> 조합들을 선발하였다.
- 선발된 조합을 대상으로 시고 포장을 아시아종묘 필드에 구축하였다.
- 2019년도 6월, 10월 아시아종묘 이천 연구소에서 해외 바이어 들과 특성 평가를 실시하여, 외국바이어가 우수하다고 생각되는 3개 조합 (BN1001, BN1016, BN1022)이 외국 바이어에 의해 직접 선발되었다. 현재 해외 거래처에서 신조합의 재배 시험이 진행 중이다.
- 선발된 조합들은 수확 후 화뢰의 상온 저장을 통한 황화 평가를 수행하였으며, 평가 결과도 현재 시판 품종들에 비해 상온 저장 능력이 부족하지 않음을 알 수 있었다.
- 조합에 사용된 계통들은 조합검정을 통해 실제로 유전자 편집된 개체와 조합작성을 통해 품종의 모/부계 계통으로 활용할 만큼의 우수한 계통이 완성되었다는 것을 이번 조합 검정을 통하여 확인 되었다.

<표 19. 브로콜리 우수 조합 및 계통 선발 (2019년)>

BN	계 통 명	특성	비고
1001	JJ-1-51MS x 692SP-1-51 [계통 E9 x 계통 E10]	돔형우수, 화뢰입자우수	형태 유지 우수, 황화 느낌
1022	564MS x 335A-9-51 [계통 E1 x 계통 E11]	화뢰입자우수 재배범위우수	형태 유지 중간, 황화 중간
1030	564MS x 692SP-4-51 [계통 E1 x 계통 E12]	화뢰입자우수	형태 유지 우수, 황화 중간
1069	Early you	조생종	형태 유지 우수, 황화 느낌
1070	Equus	중생종	형태 유지 우수, 황화 느낌
1084	Green magic	극조생종	형태 유지 우수, 황화 중간







BN1022



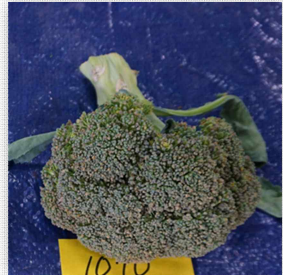
BN1030



BN1069



BN1070



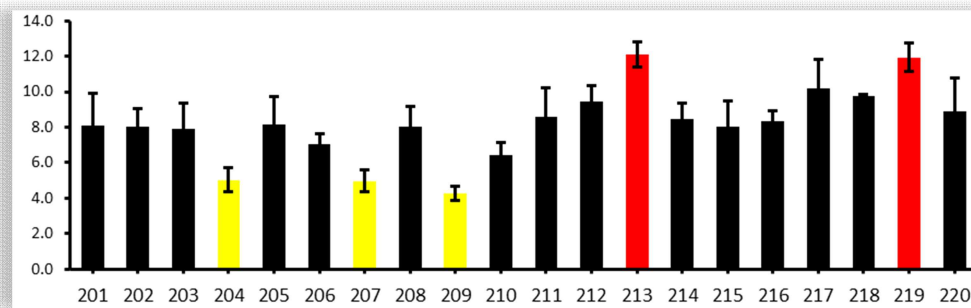
BN1084



[그림 78. 2019년도 선발 브로콜리 우수조합 및 계통 비교]

○ GR 고함량 품종 및 신조합 F<sub>1</sub> 선발 (세종대학교 연구진 제공 정보)

- 아시아종묘로부터 제공받은 품종 및 신조합 F<sub>1</sub> 을 대상으로 GR 함량 분석을 실시하였다 (그림 79).
- 수확기 (과종 후 112일차) 20종의 F<sub>1</sub> 개체의 화뢰(직경 10~15cm)를 채취하여 GR 함량분석을 실시하였다.
- 그 중 204, 207, 209 개체가 평균 이하로 가장 낮은 GR 함량을 보였다.
- 201, 202, 203, 205, 206, 208, 210, 211, 212, 214, 215, 216, 217, 218, 220 평균 내외의 GR 함량을 보였다.
- 2 (213, 219) 개체가 다른 개체들에 비해 높은 GR 함량을 보였다.



[그림 79. GR 함량분석 결과]

○ GR 함량 관련 조합력 검정을 통한 GR 고함량 조합 선발 (세종대학교 연구진 제공 정보)

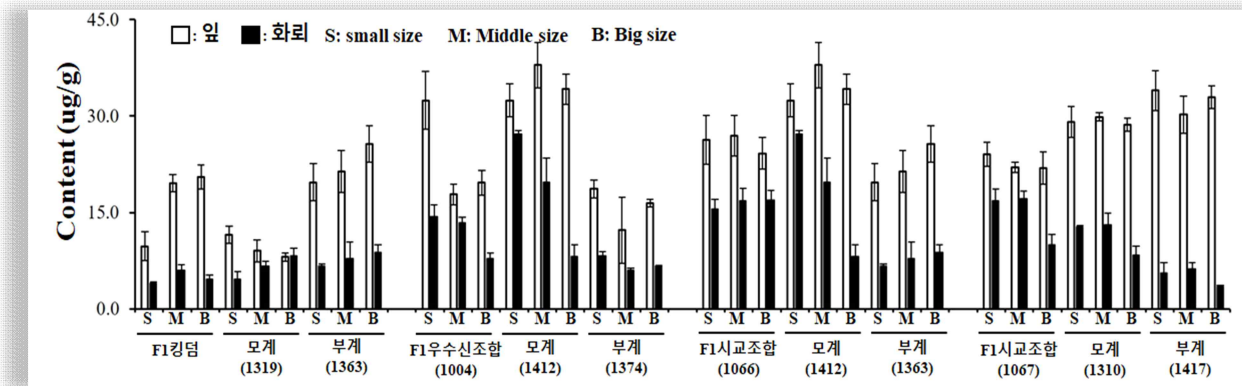
- 상기의 육종계통별 GR 함량 분석 결과를 바탕으로, GR 고함량 브로콜리 F<sub>1</sub> 육성을 위한 조합을 작성하여 포장 재배를 실시하였다.
- 포장재배에서 원예 특성이 우수한 3가지 시교 조합과 현재 아시아종묘의 리딩 품종이 킹덤을 비교조합으로 해서 네가지 조직 별 샘플 (small 사이즈, middle 사이즈, big 사이즈 화뢰 와 잎 조직: 모두 하나의 개체에서 샘플링)을 전달 받아 GR 함량 분석을 실시하였다 (그림 80, 81).
- 킹덤: F<sub>1</sub> 모계(1319), 부계(1363)
- 교배조합: 모계(1412), 부계(1374), F<sub>1</sub>(1004)
- 교배조합: 모계(1412), 부계(1363), F<sub>1</sub>(1006)
- 교배조합: 모계(1310), 부계(1417), F<sub>1</sub>(1067)



[그림 80. GR 분석에 사용된 샘플 모습]



- GR 함량 분석 결과 흥미로운 몇 가지 결과를 확보하였다.
- GR 함성은 일반적으로 잡종 강세가 나타나지 않고, 특정 계통들 (아래 그림 1310 \* 1417 조합)간에만 나타는 것으로 보인다. 따라서 조합 작성 시 GR 함량이 높은 계통을 양친으로 활용하는 것이 바람직 할 것으로 판단된다.
- 기존에 알려진 정보 (잎에서 GR이 생합성 되어서 화퇴로 이동된다고 알려져 있어서, 잎에서의 GR 함량이 높으면, 화퇴에서의 GR 함량도 높다)와 다른 결과가 아래 그림에서 나타났다. 즉 잎에서의 GR 함량이 높더라도, 화퇴의 GR 함량이 높다고 얘기할 수 없는 경우가 많이 관찰되었다. 따라서, GR 고함량 계통 육성 시 화퇴에서 GR 함량을 측정하여만 목표로 하는 개체를 개발할 것으로 판단된다.
- 3개의 선발된 조합이 모두 기존 시판 품종인 킹덤 보다 GR 함량이 높다고 밝혀졌다. 특히 1412 와 1363 계통 간의 교배에 의한 F<sub>1</sub> (1066) 개체는 화퇴 성숙 단계별로 GR 함량 감소가 발견되지 않아서 이들 조합을 킹덤 후속 품종으로 육성하는 것이 좋을 것 같다는 결론을 얻었다.



[그림 81. F<sub>1</sub>, 모계/부계 대상의 GR 함량 분석 결과]

## 5. 후속 연구 진행을 위한 엘리트 모/부계 계통 개발

- GR 고함량 브로콜리 품종을 개발하기 위해 엘리트 계통의 선발 및 개발을 진행하였다. 계통의 재배는 가을 작기 1번 진행하며 이때 형질 평가를 수행하였다 (표 20, 그림 82).
- 계통 선발을 통해 우수 계통의 화아 분화 과정을 거쳐 계통 유지 및 조합 작성에 활용하여 2019년 가을 작기 포장 특성 평가를 수행하였다.
  - 7월 16일 파종하여 8월 13일 정식을 진행하였고, 10월 초순부터 재배 상황에 맞춰 국립종자원에서 제시하는 조사방식에 근거하여 원예적 형질을 조사하였다.
  - 육종에 있어 중요하게 생각하는 화퇴의 크기, 무게, 입자의 크기, 입성, 안토시아닌 발현 등의 우수한 특성을 가지는 계통들을 조생종, 중생종, 만생종 각 숙기별로 선발하였다.
  - 또한 선발된 계통들은 글루코시놀레이트가 향상된 genome editing 개체와 품종 육성을 위한 신조합 육종 소재로 활용할 것이다.

<표 20. 2019년도 가을 재배 검정 후 선발한 브로콜리 우수계통의 특성 비교>

BN	계통명	숙기	화퇴 크기	화퇴중	입자 크기	안토시아닌	입성	비고
1202	JJ-1-51MS	조생	중	220	상	무	직립	우수
1216	1036-51-51-51	조생	중	230	상	무	반직립	우수
1217	1039-51-51-51	조생	대	235	상	무	반직립	
1225	692SP-1-51	조생	대	235	중	무	수평	우수
1231	1028-51-51	조생	대	210	상	무	직립	
1237	564MS	조생	대	240	상	무	반직립	우수
1244	1072-51-51	조생	대	260	상	무	반직립	
1260	jj1-51-51-51-54	중생	대	245	상	무	수평	
1268	1218-51-51	중생	대	250	중	무	반직립	
1271	129-52-52-51	중생	대	260	중	무	반직립	
1285	335A-9-51	중생	대	235	상	무	반직립	우수
1293	DS-7-51	중생	대	245	상	무	반직립	
1295	JJ-1-51-51	중생	중	235	중	무	직립	
1298	1283-51-51	중생	중	240	상	무	직립	
1299	1283-51-52	중생	대	275	상	무	반직립	
1343	JC01-51	만생	대	260	상	무	수평	
1346	692SP-1-51	만생	대	225	중	무	반직립	우수
1368	1042-51	만생	대	245	중	무	반직립	우수
1384	1057-51	만생	대	235	상	무	직립	
1393	1108-51	만생	대	230	중	무	수평	
1395	1114-51	만생	대	245	상	무	반직립	우수
1399	1165-51	만생	대	240	중	무	반직립	
1403	1153-51	만생	대	265	상	무	반직립	우수
1414	JJ24-52-51	만생	중	250	상	무	직립	





< 우수 계통 - 조생종 >





< 우수 계통 - 중생종 >



< 우수 계통 - 만생종 >

[그림 82. 2019년 가을재배 검정 후 선발된 브로콜리 숙기별 우수 계통]

6. 공동 연구를 위한 시료 생산 및 제공

○ 1차년도 내용

- 기본 실험재료인 ‘킹덤’ 과 그 모/부계 및 ‘베네포르테 B1199’ 등의 GR 함량 분석용 시료를 표 6.과 같이 화뢰의 형성 시기별, 수확 시기별, 기관 특이별 시료를 채취하여 공동연구진(세종대 연구팀)에 제공하였다.
  - 2017년 10월 25일 수확된 1차시료 제공
  - 2017년 11월 15일 수확된 2차시료 제공
  - 2017년 11월 20일 수확된 3차시료 제공
- 이들 시료들의 GR 함량 분석을 통해서 브로콜리 생체 내에서 GR 생합성 기작에 대한 이해가 증가 되었다.

<표 21. ‘킹덤’ 과 그 모/부계 및 ‘Beneforte B1199’의 글루코시놀레이트 분석 시료 목록>

BN	화뢰크기/ 조직	시료수 (2017.10.25.)	시료수 (2017.11.15.)	시료수 (2017.11.20.)	비고
1098	S	3			
	M	4			
	L	3	3		
	Stem1			3	
	Stem2			3	
	Leaf			3	
1028	L	3	3		
	Stem1			3	
	Stem2			3	
	Leaf			3	
1312	L	3	3		
	Stem1			3	
	Stem2			3	
	Leaf			3	
1283	L	0	3		
	Stem1			3	
	Stem2			3	
	Leaf			3	
1043	L	3	3		
1044	L	3	3		
1075	L	3	3		
1088	L	0	3		

○ 2차년도 내용

- 2 차년도에도 GR 함량 분석을 위해 계통 재배 및 시료 제공을 하였다.
- 기본 실험재료인 ‘킹덤’ 과 그 모/부계 및 ‘베네포르테 B1199’ 등의 GR 함량 분석용 시료를 화뢰의 성숙기에 따라 수확하여 공동연구진에게 제공하였다.
- 재배를 위해 파종은 2018.02.27. 105구 트레이에 상토를 이용하여 파종하였고,
- 플라스틱필름하우스에 2018.03.27. 정식하였다.
- 각 계통이 성숙된 날짜에 맞추어 2018.05.30., 2018.06.14.에 시료를 채취하여 지퍼백에 포장하였고, 공동연구진에게 전달하였다.
- 가을 작기에 재배된 계통에서는 조직별 글루코시놀레이트 함량 분석을 위해 줄기, 중륜, 엽육, 내엽, 외엽으로 나뉜 시료 분획을 -70℃에 급랭하여 공동 연구진에 전달하였다.



[그림 83. 실험 계통 수확 및 수확 계통의 형질 확인]

### ○ 3차년도 내용

- 3차년도에도 GR 함량 분석을 위해 계통 재배 및 시료 제공을 하였다.
- 기본 실험재료인 ‘킹덤’ 과 그 모/부계 시료를 화퇴의 성숙기에 따라 수확하여 공동연구진에게 제공하였다.
- 봄재배를 위해 파종은 2019.02.8. 105구 트레이에 상토를 이용하여 파종하였고, 플라스틱 필름하우스에 2018.03.28. 정식하였다.
- 각 계통이 성숙된 날짜에 맞추어 2019.10.15.에 채취한 시료를 동결건조 후 드라이아이스에 시료를 포장하여 2019.10.16.에 방문한 공동연구진에게 전달하였다.
- 가을재배 파종은 2019.07.16.에 진행하였고, 2019.08.13.에 플라스틱 필름하우스에 정식을 진행하였다.
- 가을 작기에 재배된 품종의 모/부계 계통에서는 조직별 GR 함량 분석을 위해 성숙기에 따라 크기를 대, 중, 소 세가지로 나누어 화퇴, 줄기, 뿌리, 가장 큰 엽으로 나뉜 시료 분획을 -70℃에 급랭하여 공동 연구진에 11월 말에 전달하였다.







[그림 84. 글루코시놀레이트 분석시료 제공을 위한 브로콜리 식물체들의 수확부위]

### 7. 유전자 편집 개체 세대 진전

- 유전자편집 개체 소포자배양 실시 및 세대진전
- 세종대로부터 제공받은 *MYB28* 염기서열 변이체 SJB#1, SJB#2, SJB#3 개체들과 발달 단계가 유사한 대조구인 F<sub>1</sub> 킹돔, 킹돔모계, 킹돔부계를 기내에서 배양하였다 (그림 85).

날짜	<i>MYB28</i> 유전자편집 개체들과 대조구의 기내 순화 과정	
2018.11.29	 <p>SJB#1</p>	 <p>SJB#2, SJB#3</p>
2018.12.02	 <p>SJB#1 ,SJB#2, SJB#3</p>	 <p>킹돔 (대조구)</p>

[그림 85. *MYB28* 유전자편집 개체 실내 순화]



- 실내 순화 과정이후 저온 처리를 위해 무가온 수막 하우스로 관련 개체들을 옮겨 재배하였다. 그리고 유전형 분석을 위한 시료 (잎)을 채취해서 세종대 연구진에 전달하였다 (그림 86).



[그림 86. 실외 저온처리시설로 옮긴 후, 유전형 분석을 위한 잎을 채취 (2018.12.17)]

- 2019년 2월 19일, MYB28 염기서열 변이체 SJB#1, SJB#2, SJB#3 개체들과 대조구인 F1 킹덤, 킹덤모계, 킹덤부계의 채종과 소포자배양을 실시하기 위하여 개화용 화분으로 이식하여 최종 저온처리를 실시하였다 (그림 87).

날짜	개화용 화분 이식 실시	
2019.02.19		
2019.03.18		

[그림 87. 생육 촉진과 개화유도를 위해 화분갈이 실시]

- 2019년 3월 18일, 저온처리 SJB#1 개체의 화퇴형성을 확인하였고, SJB#2, SJB#3 개체들은 화퇴형성이 시작되는 것을 확인하였다. 대조구인 F1 킹덤, 킹덤모계, 킹덤부계의 화퇴형성은 정상적인 것을 확인하였다 (그림 88).
- 2019년 4월 3일, 소형의 화퇴 형성이 확인된 저온처리 완료 개체들을 야간온도 10°C 이상으로 가온이 가능한 교배용 비닐하우스로 옮겨 개화를 유도하고, Bud-selfing을 이용한 자가채종을 준비하였다 (그림 88).





날짜	3개월의 무가온 저온 처리 실시
2019.03.31	
2019.04.03	

[그림 88. 무가온 수막하우스에서의 3개월 저온처리 후, 개화/교배 하우스로 옮김. 서열 변이체 및 대조 식물체에서 소형 화퇴가 관찰됨]

- 2019년 4월 17일, 저온처리 과정에서 형성된 화퇴들이 추대하여 화지를 정리하고 교배를 시작하였으며, 개화 순서에 따라 Bud-selfing을 통해 자가수분을 수행하였다. 아시아종묘 판매 품종인 F<sub>1</sub> 킹덤은 MS(웅성불임) 품종으로 개화시 화분이 발생하지 않는 것을 확인하였고, 대조군인 ‘Beneforte’ 역시 MS 판매 품종으로 화분 발생이 없음을 확인하였다. 킹덤의 모계/부계 및 유전자편집 개체들은 모두 화분이 정상적으로 발생하여 자가채종을 위한 Bud-selfing을 수행 하였다 (그림 89).

















- 2019년 4월 17일, 최초 교배를 시작으로 개화순서와 화분발생량 및 날씨상태 등을 고려하여 적합한 시기에 Bud-selfing을 수행하고 계속해서 종실 발달 상태를 점검하였다.

날짜	추대 과정과 교배 실시						
2019.04.17							
2019.04.22							
	F1킹덤 (MS)	모계 (유지친)	부계	베네포르테 (MS)	SJB#1	SJB#2	SJB#3

[그림 89. 개화 및 교배하우스에서 개화 상태 점검 및 교배 실시. 킹덤의 모계/부계 및 서열 변이체들은 개화시 화분발생이 정상적으로 이루어짐을 확인하고 Bus-selfing 을 실시함]

- 모/부계를 비롯하여 서열변이 개체들도 일반적으로 형성되는 브로콜리의 종실 형태를 갖추며 발달하는 것을 확인하면서 식물체를 관리하였고, 2개월 이상의 종자 성숙과정을 거쳐 종실을 수확하고 종자량을 확인하였다 (그림 89, 90).

날짜	교배후 종실이 발달하는 모습						
2019.05.07							
2019.06.13							
	모계(유지친)	부계	SJB#1	SJB#2	SJB#3		

[그림 90. 교배후 종실의 발달 및 성숙 과정]

- 2019년 6월 24일부터 교배 화지를 자르고, 자연건조 시킨 후 7월9일 종실을 열어 종자를 수

확하였다. 킹덤 모계의 경우, 종실당 7.3개의 종자가 수확되었고, 부계는 종실당 9.7개의 종자가 수확되어 기존의 종자생산량과 유사한 결과를 보였다. 유전자편집 개체들인 SJB#1, SJB#2, SJB#3은 같이 수분이후 종실의 발달은 정상적으로 이루어졌으나 종실내부에서 종자의 발달이 이루어지지 않아 종자를 얻지 못하였다 (그림 91, 표 17).

- 유전자편집 개체들과 동일한 생육단계, 성장조건, 저온처리 및 개화 조건을 거친 킹덤의 모/부계는 정상적인 종자형성을 보인 것을 감안하면, 유전자편집 개체들의 종실에서 종자가 발달하지 못한 것은 이들의 callus 유기, shooting, rooting 등 기내생육 동안 발생하는 여러 요인들이 부정적인 영향을 미친 것으로 추정되지만, 향후 상세히 구명되어야 할 필요가 있다.



[그림 91. 수확한SJB#1, SJB#2, SJB#3 (좌 --> 우)종실의 내부 모습, 종실 발달은 정상적이었으나 종자 미발달]

<표 22. 서열변이 개체들과 대조 개체들의 종자 수확량 비교>

구분	F1 킹덤	모계	부계	베네포르테	SJB#1	SJB#2	SJB#3
특성	상용품종 (MS)	계통 (유지친)	계통	대조구 (MS)	MYB28 유전자 편집	MYB28 유전자 편집	MYB28 유전자 편집
종립수	0	7.3 ± 0.6	9.7 ± 2.1	0	0	0	0

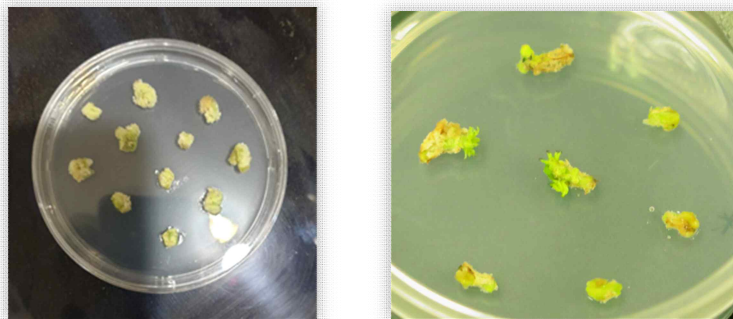
- 2017년 4월 본 연구를 시작하여 2년의 연구 기간을 거쳐 획득한 귀중한 서열 변이체 SJB#1, SJB#2, SJB#3 3개의 식물체 모두, 2019년 7월 9일에 종자 발생이 이루어지지 않음을 확인하고, 유전자편집 개체들의 영양번식을 통한 유지 및 증식을 위해 조직배양을 수행하였다.
- 아시아종묘의 교배하우스에서 유지 중이던 SJB#2의 모식물체를 세종대학교로 옮겨 줄기의 도관 분열조직을 채취하여 callus 유도 배지에 치상하였다
- SJB#3의 모식물체 조직은 채취하여 아시아종묘에서 callus 유도 배지에 치상하였다. (그림 92)





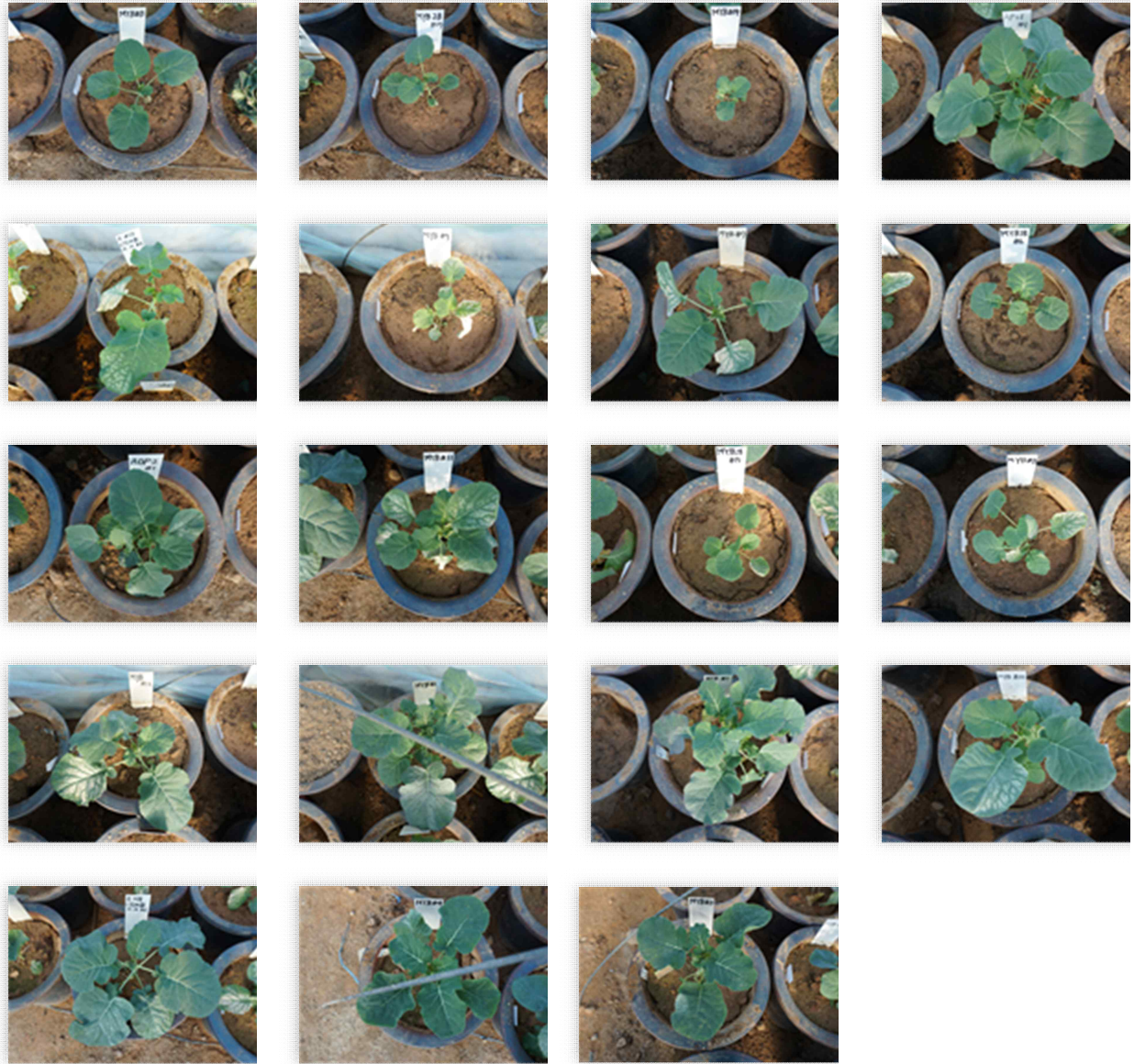
[그림 92. SJB#3의 분열조직 치상후 callus 유도]

- 2019년 11월 현재, SJB#2 유전자편집 식물체로부터 유래한 조직은 현재 callus 시기를 거쳐 shooting이 유도되는 단계에 있으므로 과제가 종료된 이후라도 육종재료로 이용하기 위하여 채종, 재배특성 검정, 교배 조합작성 및 품종 육성에 활용해갈 계획이다 (그림 93).



[그림 93. SJB#2의 분열조직 치상후 재분화]

- *MYB28* 유전자편집 개체(*Agro* 기술 적용) 토양 순화 및 저온처리
  - 세종대학교 연구진으로부터 2019년 12월 3일 (4개체), 2020년 1월 2일 (15개체), 2020년 2월 6일 (15개체) 2번에 걸쳐 총 34개체를 반입하였다.
  - 반입된 개체는 LMO 관리시설 규정에 의거 현재 격리되어 순화 및 저온처리가 이루어지고 있으며, 개화 후 교배시에도 꽃가루 오염 방지를 위해 격리되어 진행될 예정이다 (2020년 1월 현재) (그림 94).
  - 이들 34개의 유전자편집 개체들은 채종을 통해 종자를 획득 한 후, 고정된 계통 선발과 T-DNA 스크리닝을 통해 최종적으로 DNA-free 유전자편집 개체를 확보해서 육종 프로그램에 도입할 계획이다.



[그림 94. 유전자 편집개체들의 자가 채종을 위한 세종대연구팀 제공 브로콜리 유전자 편집 변이체들의 순화 및 저온처리 (2020. 1월 현재)]

## 8. 시교 검정

### - 브로콜리 필드데이 (2017년)

세르비아 Pr사(2017.06.13.)

베트남 N사(2017.07.03.)

필리핀 Pa사(2017.07.06.)

우즈베키스탄 Os사(2017.10.25.)

### - 브로콜리 필드데이 (2018)

중국 W사 (2018.06.14.)

중국 S사 (2018.06.15.)

인도 K사 (2018.06.21.)

방글라데시 S사 (2018.06.26.)

- 2018년도 봄작기 재배시 방문한 중국 W사, S사, 인도의 K사. 방글라데시의 S사 등과 각국에서 요구하는 브로콜리 품질 특성에 대해 협의하였다
  - 특히 본 과제의 연구로 개발되는 GR 상용품종들의 건강기능성 가치와 프리미엄 시장 개발 가능성에 대해 협의하였다.
  - 이들 중 특히 중국의 W사와 인도의 K사는 2017년도에 방문하고 같은 내용을 협의한 베트남 N사와 같이 앞으로 개발되는 GR 고품량 품종의 해당국 시장 개발과 확대에 MOU체결, 독점 계약 제안 등 매우 적극적으로 동참할 것임을 확인하였다.
- 브로콜리 필드데이 (2019)

베트남 V사 (2019.06.22.)

인도 K사 (2019.10.17.)

- 2019년도 봄작기와 가을작기 재배시 방문한 베트남 V사와 2018년도 방문후 재방문한 인도의 K사와 본 과제의 연구로 개발되는 GR 상용품종들의 수출에 대하여 협의하였다.
- 특히, 2018년도에 방문한 바 있는 인도의 K사는, 2019년도에 재방문하여 GR 고품량 브로콜리 품종의 수출에 대해 자신들과의 독점 계약 요청을 재차 상호확인 하였다.

## 9. 고기능성 신품종 브로콜리 개발의 교육 및 홍보

- 국내 브로콜리 주산지인 제주도의 애월읍 소재 브로콜리 종자 판매상들을 방문하여 ‘기능성 강화 브로콜리 품종의 시장 가능성’에 대해 의견을 나누고, 본 연구에서 진행하고 있는 ‘GR 고품량 브로콜리 품종 개발 연구’에 대하여 설명하였다.
- 2019년 8월 7일에는 ‘하귀농약사’를 방문하여 교육 및 의견을 나누었고, 8월 8일에는 ‘유일농약사’를 찾아 교육과 설명을 실시하였다. 두 곳의 종자 판매상 모두, 브로콜리의 건강기능성을 강화하여 향상된 성분 함량만큼 새로운 부가가치를 창출할 수 있다면 브로콜리의 판매와 보급에 긍정적인 영향을 줄 수 있다며 화답하였다 (그림 95).
- 2019년 8월8일 오전, 제주도농업기술원의 원예연구과 채소연구담당부서 팀원들을 대상으로 본 연구에서 진행하고 있는 ‘GR 고품량 브로콜리 품종 개발 연구’에 대하여 설명하고, 향후 브로콜리 육성 방향과 육종 실무에 관한 논의를 진행하였다. 아시아종묘에서는 2017년 12월에 제주도농업기술원 원예연구과의 고순보연구사 (064-760-7241)가 육성한 ‘뉴탐라그린’ 브로콜리 품종의 통상실시 계약을 체결하여 현재 판매종자를 생산하고



있어, 이 품종의 모/부계에 본연구의 ‘GR 함량 증대’ 기술을 적용할 수 있음을 제시하였고, 지속적인 교류를 통해 본 연구의 성과물을 상용화하는데 협업체 가기로 하였다(그림 95).

- 2019년 3월 21일 ~ 23일, 서울에서 개최된 ‘성공귀농-행복귀어 박람회’에 참가하여 브로콜리의 건강기능성과 본 연구에서 진행되는 고기능성 신품종 신품종 육종에 대해 일반인들에게 소개하였다.
- 2019년 9월 25일 ~ 27일, 대전에서 열린 ‘대전 국제 농업기술전’에 참가하여 인도의 K사, 이라크의 M사, 중국의 Y사 등에 브로콜리 수출을 위한 상담을 수행하였다.
- 2019년 10월 16일 ~ 18일, 김제에서 3회째를 맞는 ‘국제종자 박람회’에 참가하여 아르헨티나의 C사, 인도 P사, 브라질 A사 등에 고기능성 브로콜리 육종연구를 설명하고 수출 가능성을 타진하였다 (그림 95).

2019.08.07.~08 제주도 브로콜리 종자 판매상 - 신품종 브로콜리 개발 과정 교육 (제주시 애월읍 하귀농약사 및 애월농약사 2곳 방문 브로콜리 교육)
2019.08.08. 제주도농업기술원 원예연구과 채소연구담당부서 교육 (고순보연구사 외 2인)

[그림 95. 고기능성 브로콜리 품종 개발에 대한 홍보 및 교육 실시]

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 3-1. 목표

구분	내용
최종 목표	글루코라파닌 (GR) 고함량 계통 육성
세부 목표	<p>GR 생합성 기작 규명과 GR 합성에 영향을 미치는 외부 환경 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>MYB28</i> 발현 및 염기서열 변이와 GR 생합성 간의 관계 규명</li> <li>- 브로콜리 발달 단계별 GR 함량 변이 분석</li> <li>- 브로콜리 유묘 재배시 GR 함량에 영향을 미치는 화학물질 규명</li> </ul> <p>GR 정량분석 기법 확립 및 적용</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- HPLC 활용 GR 정량분석법 개발</li> <li>- 아시아종묘 육성 육종계통(및 품종) GR 함량 분석</li> </ul> <p>GR 함량 증대를 위한 <i>MYB28</i> 유전자편집 개체 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>MYB28</i> 염기서열 변이를 위한 sgRNA 개발</li> <li>- 개발된 RNP를 활용한 원형질체 형질전환 및 재분화 기법 확립</li> <li>- <i>MYB28</i> 염기서열 변이를 위한 Agro 기반의 binary vector 제작</li> <li>- Agro 기반의 <i>MYB28</i> 형질전환 및 재분화 기법 확립</li> <li>- 유전자편집 개체 개발 및 GR 함량 증가 유전자편집 개체 선발</li> </ul> <p>브로콜리 계통 육성 및 선발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 시판품종(타사)과 아시아종묘 계통(품종)들 간의 특성 및 GR 함량 평가</li> <li>- 브로콜리 소포자배양 기술 개선 및 적용을 통한 계통 육성/선발</li> <li>- 유전자편집 개체 채종 및 세대진전</li> <li>- GR 고함량 유전자편집체와 조합 작성을 위한 우수계통 육성/선발</li> </ul>

#### 3-2. 목표 달성여부

연구 개발 목표	연구개발내용	달성도
<i>MYB28</i> 발현 및 염기서열 변이와 GR 생합성 간의 관계 규명	<p><i>MYB28</i> 전사체량과 GR 함량 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>MYB28</i> 유전자를 브로콜리 잎에 transient 과발현 시킬 경우 GR 생합성이 증가됨을 밝혔다.</li> <li>- <i>MYB28</i>은 <i>MYB29</i> 유전자 발현을 증가시키고, 궁극적으로 GR 생합성에 관여하는 대부분의 유전자 발현을 증가시켜서, GR 함량을 증가시키는 것으로 밝혀졌다 (논문출간: DOI <a href="https://doi.org/10.1007/s11816-019-00591-8">https://doi.org/10.1007/s11816-019-00591-8</a>)</li> </ul> <p><i>MYB28</i> 염기서열 변이에 따른 GR 함량 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 베네포르테 품종(GR 고함량)과 브로콜리 육종계통들 간의 <i>MYB28</i> 서열을 분석한 결과 다수의 SNP과</li> </ul>	100%

	<p>Ins/Del 서열을 발견하였다.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 그중 3' 말단 부분에서 발견된 9bp (RNA polymerase clamp 단백질 결합서열과 유사한 서열) 결손(deletion)이 GR 생합성에 영향을 미치는 것으로 추정하였다.</li> <li>- 실제 MYB28 유전자와 MYB28Δ9bp (9bp deletion) 유전자를 브로콜리 앞에서 과다발현 시킬 경우 MYB28Δ9bp에서 MYB28 보다 더 많은 GR이 축적되는 결과를 확인하였다.</li> </ul>	
<p>브로콜리 발달 단계와 GR 생합성 간의 관계 규명</p>	<p>브로콜리 유묘 발달 단계에 따른 GR 함량 변이 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 발아 후 5, 8, 11, 14, 17 일 후 GR 함량 분석을 실시하였다. 다른 십자화과 작물처럼 발아 후 시간이 지날수록 GR 함량이 증가하였지만, 본엽이 발생한 이후에는 GR 함량이 증가하는 추세를 보였다. 이와 더불어 GR을 분해하는 AOP 유전자 발현이 발아 초기 증가하였다. 후기로 갈수록 감소하는 결과를 얻었고, MYB28 유전자는 이와 반대의 결과를 보였다 (논문 투고 후 minor revision 중)</li> </ul> <p>브로콜리 화퇴 발달 단계에 따른 GR 함량 변이 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 화퇴 발달이 진행될수록 (크기가 커질수록) GR 함량이 감소하는 경향을 대부분의 품종에서 보였다. 이는 GR 생합성이 줄어드는 것이 아니라, 화퇴 크기가 커질수록 합성된 GR 함량이 희석되는 결과인 것으로 추정한다. 따라서 GR 고함량 브로콜리 화퇴 출시를 위해서는 적절한 수확기 선정과 GR 함량 증가를 위한 적절한 화학물질 처리가 필요할 것으로 생각된다.</li> </ul>	<p>100%</p>
<p>브로콜리 유묘 재배시 GR 함량에 영향을 미치는 화학물질 규명</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- GR은 외부 스트레스에 의해 합성이 증가한다고 알려져 있다.</li> <li>- 따라서, 대표적인 스트레스 호르몬 (ABA, MeJA, SA)를 처리한 후 GR 함량 변화를 관찰하여, MeJA 처리에 의해 3배 이상의 GR 축적이 관찰되었고, 이러한 효과가 48시간 이상 지속되는 것으로 나타났다.</li> <li>- 뿐만 아니라, GR의 주요 구성 성분인 황화물(MgSO<sub>4</sub>)를 처리할 경우 3배 이상의 GR 축적이 24시간 이내 관찰되었고, 48시간 이내에 효과 사라졌다.</li> <li>- 이러한 결과는 최근 많은 각광을 받는 새싹브로콜리 재배에 중요한 정보를 제공할 것으로 판단된다.</li> </ul>	<p>100%</p>
<p>HPLC 활용 GR 정량분석법 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 브로콜리 추출물( HPLC 분석용 시료) 전처리 기법을 확립하였다.</li> <li>- UV 230 nm 흡광도에서 HPLC를 이용한 GR 정량분석 프로토콜을 확립하였다.</li> <li>- 상기 프로토콜을 적용하여, GR 후보물질로 생각되는 분획물을 대상으로 LC-MS 분석을 실시해서, 최</li> </ul>	<p>100%</p>

	<p>종적으로 GR 물질인 것을 확인하였다. 이는 개발한 프로토콜이 GR 정량분석에 적합하다는 것을 의미한다.</p>	
<p>아시아종묘 육성 육종계통(및 품종) GR 함량 분석</p>	<p>GR 정량분석을 타사 리딩 시판품종과 아시아종묘 육성 계통/품종에 적용하였다.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내외 리딩 품종의 GR 정량 분석을 실시한 결과 품종 간에 큰 차이를 보이지는 않았다.</li> <li>- 베네포르테 품종의 기존 품종 보다 2배 정도의 높은 GR 함량을 보였지만, 재배 시기와 재배 지역에 따라 상이한 결과를 보였다 (따라서 품종 육성 시 지속적인 GR 함량 측정이 필요할 것으로 판단된다)</li> <li>- 아시아종묘가 육성 중인 킹덤 품종이 베네포르테 품종과 유사한 GR 함량을 보였다. 그리고 높은 GR 함량을 보이는 계통도 선발되었다.</li> <li>- F1 개체 대상의 GR 함량 분석을 통해서, 대부분 잡종강세 효과가 발견되지 않았지만 몇몇 계통에서는 잡종 강세 현상이 발견되었다. 추후 체계적인 분석 작업이 추가적으로 진행된다면 고함량 GR 육성에 좋은 정보가 될 것으로 판단된다.</li> </ul>	100%
<p>MYB28 염기서열 변이를 위한 유전자 편집용 sgRNA 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 고함량 GR을 가진 브로콜리 개체에서 발견된 9bp deletion된 MYB28 서열을 타겟팅하는 두 개의 sgRNA를 제작하였다.</li> <li>- 제작된 2개의 sgRNA (sgRNA1, sgRNA2)를 브로콜리 원형질체에 유전자편집 기술을 적용하여 MYB28 서열 변이 여부를 sequencing을 통해서 확인하였다.</li> <li>- sgRNA2가 mutagenesis 효율 30% (sgRNA1: 0.2%) 로 높고, target 서열 부위에서 Ins/Del 변이가 발생하는 것을 확인하였다. 추후 모든 유전자편집은 sgRNA2를 기반으로 진행 되었다.</li> </ul>	100%
<p>개발된 RNP를 활용한 원형질체 형질전환 및 재분화 기법 확립</p>	<p>유전자편집을 위한 조건 확립을 실시하였다.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 선발된 sgRNA2와 Cas9 단백질 합성하여 확보하였다 (RNP 확보).</li> <li>- 브로콜리 유묘에서 원형질체를 효율적으로 분리하는 적절한 시기 (발아 후 50일) 와 분리법을 확립하였다.</li> <li>- RNP를 원형질체 안으로 PEG 처리를 통해 도입 (transformation) 시키는 방법에 대한 프로토콜을 확립하였다.</li> <li>- RNP에 의해 형질전환된 원형질체에서, callus, shoot, root 유도를 통해 완전히 재분화된 개체를 얻는 프로토콜을 확립하였다.</li> </ul>	100%
<p>MYB28 염기서열 변이를 위한 유전자 편집용 Agro 기반의 binary</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- sgRNA2 서열을 이용한 유전자편집용 binary vector construct 를 제작하였다.</li> <li>- 제작된 construct가 도입된 Agro를 브로콜리 explants에 형질전환하는 기법을 확립하였다.</li> </ul>	100%



vector 제작 및 유전자 편집 적용	- Explants transformants를 callus, shoot, root 유도를 통해 완전히 재분화된 개체를 얻는 프로토콜을 확립하였다.	
유전자편집 개체 개발 및 GR 함량 증가 유전자편집 개체 선발	- 원형질체 유래 유전자편집 개체 개발 (3개체). GR 정량 분석 결과 베네포르테 대비 2배 이상의 GR 함량이 증가된 1개체를 확보하였다. - Agro를 활용한 explants 유래 유전자 편집 개체 (총 39개체. MYB28 변이-27개체, AOP2 변이-12개체)를 확보하였다. GR 함량 분석 결과 GR 함량이 증가된 개체를 확보하였다.	100%
시판 품종(타사)과 아시아종묘 계통(품종)들 간의 특성 및 GR 함량 평가	- 아시아 종묘에서 재배, 수확 후 제공한 시료에서 GR 정량분석을 과제 수행 기간 동안 실시하였다. - 시판 품종 중에서는 베네포르테의 GR 함량이 제일 높았고, 아시아종묘의 킹덤 또한 베네포르테와 동일한 함량의 GR 수준을 보였다. - 아시아종묘가 육성중인 계통과 조합중에서 킹덤(베네포르테 품종)보다 GR 함량이 높은 것들이 발견되었다.	100%
브로콜리 소포자배양 기술 개선 및 적용을 통한 계통 육성/선발	- 소포자 배양 조건 (배지 조성 확립, 저온 처리 추가와 적정 처리 온도 확립)을 개선하였다. - 개선된 조건을 적용하여 <u>400 개 이상</u> 의 개체를 확보하였다.	100%
유전자편집 개체 채종 및 세대진전	- 세종대학교에 제공한 유전자편집 개체의 채종을 위한 저온 처리를 실시한 후 채종을 위한 재배를 진행 중이다.	100%
GR 고함량 유전자편집체와 조합 작성을 위한 우수계통 육성/선발	GR 고함량 품종 개발을 위한 원예 형질 우수 조합 및 계통을 개발하였다 - 화퇴 및 돔 형태가 우수하고, 지역적응성이 우수한 조, 중, 만생 숙기별 12계통을 선발하였다. - 화퇴 및 입자가 우수하고, 지역적응성이 우수하고, 수려한 돔형과 짙은 화퇴색을 가지고, 유통저장성이 우수한 특성을 가진 10개 조합을 선발하였다.	100%

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

- 목표 미달성 관련 내용은 아니지만, 과제 수행을 통해서 아래와 같은 아쉬운 점이 있다
  - 본 과제의 총 연구 기간은 33개월 (2017년 4월 1일 ~ 2019년 12월 31일)로 유전자편집을 적용하여 GR 함량이 높은 개체를 선발하고 선발된 개체를 대상으로, 춘화처리를 실시해서 고정된 계통으로 세대진전 시키기에도 부족하기 때문에, 고정된 계통이나 교배조합 작성에 활용하지 못한 점은 아쉽다.
- 하지만, 본 과제에서 확보된 GR 생합성 관련 정보와 개발된 다양한 유전자편집 개체, 육종 계통, 교배 조합을 활용한 후속 연구를 추진할 것이다. 이를 위해서 “신육종기술실용화사업단”에 본 과제의 후속 연구를 주제로 지원, 선정되어서 2020년 1월부터 동 사업단의 지원을 받아서 브로콜리, 양배추로 확대해서 GR 고함량 신품종 육성 연구를 지속적으로 수

행할 것이다.

#### 4. 연구결과의 활용 계획 등

##### ○ 실용화 사업화 추진 방안

- 본 과제 수행을 통해서 확보된 다양한 모/부 계통을 육성 계통 중에 GR 함량이 높다고 선발된 계통을 중심으로 교배 조합을 작성하여, 현재 시판 품종들보다 GR 함량인 높은 품종 개발을 추진한다. 이렇게 개발된 GR 고함량 품종을 마케팅 포인트로 활용하여, 국내 브로콜리 종자 시장의 95%를 장악한 일본계 종자를 대체하는 전략을 추진할 계획이다. 뿐만 아니라, 남미 중심의 저가 시장에 수출하는 현재의 브로콜리 종자 수출 전략을, 프리미엄 시장 (북미, 유럽, 일본 등)과 성장성이 높은 인도 및 중국 시장에 진출 하는 전략을 추구할 계획이다.

(과제 종료 후 3년 이내에 신규 2품종 출시 예정)

- 아시아종묘의 개발 품종인 ‘킹덤’의 부계친을 재료로 사용하여 개발된 GR 고함량 MYB28 유전자편집 개체를 부계친으로 활용하여 본 과제 수행을 통해 개발/선발된 모계친과 교배하여 바로 상용화가 가능한 ‘GR 고함량 킹덤 개량 품종’을 육성할 수 있으므로 과제 종료 후 최대한 단기간에 GR 고함량 품종 개발이 예상된다.
- 특히 아래 표에 제시된 것처럼 MYB28, AOP2 대상의 유전자편집 개체 (GR 고함량) 유래의 계통들과 우수한 원예형질을 바탕으로 선발된 계통 (선발된 12계통은 화퇴 입자, 돔 모양, 재배 범위, 화퇴색, 저장성 등이 개량된 계통 들로 내수 및 수출 품종 개발에 매우 효용성이 클 것으로 기대)을 활용한 신조합 작성을 통해서 ‘GR 함량이 높고 우수한 원예 특성을 가진 신품종을 개발할 것이다.

신품종 개발을 위한 육성조합			비고
유전자편집 계통 (GR 고함량)	원예특성 우수 계통	기대 특성	
MYB28/AOP2 대상의 유전자편집 계통	[E1 564MS]	GR고함량 및 화퇴입자 우수	
	[E2 JJ-1-51-51-51-51]	GR고함량 및 화퇴입자우수	
	[E3 DS-11S MSBC4]	GR고함량 및 진녹색화퇴, 높은 균일성	
	[E4 NY564MS]	GR고함량 및 돔형 우수	
	[E5 704-52S-51]	GR고함량 및 재배범위 우수	
	[E6 DS-11MS]	GR고함량 및 화퇴색 우수	
	[E7 JJ-2-51-51-51-51]	GR고함량 및 돔형 우수	
	[E8 704-13S-51]	GR고함량 및 재배범위우수	
	[E9 JJ-1-51MS]	GR고함량 및 돔형 우수	
	[E10 692SP-1-51]	GR고함량 및 화퇴입자우수	
	[E11 335A-9-51]	GR고함량 및 화퇴입자, 재배범위 우수	
	[E12 692SP-4-51]	GR고함량 및 화퇴입자우수	

MYB28 유전자편집 개체와 신조합 12종, AOP2 유전자편집 개체와 12종 등 총 24종의조합 작성을 통해서 GR 함량이 높고 원예 특성이 우수한 시판품종 2종 이상을 개발하고자 한다.

- 본 과제를 통해서 확립된 기능성분 함량증대 기술은 같은 십자화과 작물인 배추, 무, 양배추, 콜라비, 케일과 같은 작물에도 적용이 가능함. 따라서 십자화과 작물중 글로벌 작물은 기능성 함유 고품질 품종을 육성하여 글로벌 시장 개척으로 인한 매출 증대와 고가의 프리미엄 시장을 개척하여 관련 시장 전체를 확대하는 부수적 효과도 창출할 것으로 기대한다.

○ 논문 및 특허(지식재산권) 확보 방안

- *AOP2* 유전자편집을 통해서 GR 함량을 높이는 방법과 GR 고함량 브로콜리 개체에 대한 특허 출원을 추진할 계획이다.
- *MYB28*, *AOP2* 유전자편집을 통해서 GR 함량이 높아지는 것에 대한 연구 성과를 논문으로 투고할 계획이다.

○ 타 연구에의 응용

- 본 연구 결과를 바탕으로 “신육종기술실용화사업단 (2020)”에 지원하여, 선정되었다. 2020년 1월부터 동 사업단의 지원을 받아서 브로콜리를 대상으로 개발된 자원과, 브로콜리에서 GR 함량을 높이기 위해서 사용된 전략을 양배추로 확대적용해서 GR 고함량 브로콜리, 양배추를 품종 육성 연구를 지속적으로 수행할 것이다.
- 본 연구진은 네덜란드/영국/독일 연구진과 공동으로 “GR 고함량 십자화과 작물 분자유종 기반 시스템 구축”이라는 연구를 1년 (2017. 12. 01 ~ 2018. 11. 30) 동안 연구재단의 지원으로 수행 한 경험을 가지고 있다. 과제 수행 당시 현지 연구진이 추가적인 공동 연구에 대한 강한 의지를 보였고, 향후 개발될 GR 고함량 제품에 대한 추가적인 활용 방안 에 대한 공동 연구를 희망하였다. 따라서 개발된 제품의 다양한 활용 방안을 모색하는 국제 공동 연구를 추진할 계획이다.
- 브로콜리, 양배추, 콜라비, 콜리플라워, 케일 등은 동일한 유전적 배경을 가진 작물들이 다. 따라서 글루코시놀레이트 생합성 조절이라는 측면에서는, 동일한 유전자를 통해서 동일한 기작을 공유할 가능성이 크므로, 본 과제에서 개발된 기술을 적용할 경우 고기능성 물질인 GR 고함량 콜라비, 콜리플라워, 케일 등을 개발할 가능성이 크다. 따라서, 고기능성 GR 고함량 십자화과 작물 개발에 본 과제 결과가 직/간접적으로 활용될 것으로 기대한다.
- 본 과제 수행 결과로 개발된 브로콜리의 소포자 배양 기술은 다양한 변이체 창출에 기여할 것으로 예상된다. 특히 양배추, 컬리플라워, 콜라비 등과 같은 십자화과 채소들의 육종 소재 개발에 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

## 붙임. 참고문헌

- Babicki S, Arndt D, Marcu A, Grant JR, Maciejewski A, Wishart DS (2016) Heatmapper: Web-enable heat mapping for all. *Nucleic Acids Res* 44:W147-153
- Baskar V, Park SW (2015) Molecular characterization of BrMYB28 and BrMYB29 paralogous transcription factors involved in the regulation of aliphatic glucosinolate profiles in *B. oleracea* ssp. . *Plant Cell Physiol* 338:434-442
- Bellostas N, Kachlicki P, Sorensen JC, Sorensen H (2007) Glucosinolate profiling of seeds and sprouts of *B. oleracea* varieties used for food. *Sci Hort* 114:234-242
- Bhandari SR, Kwak JH (2015) Chemical Composition and Antioxidant Activity in Different Tissues of *Brassica* Vegetables. *Molecules* 20:1228-1243
- Borowski J, Szajdek A, Borowska EJ, Ciska E, Zielinski H (2008) Content of selected bioactive components and antioxidant properties of broccoli ( *L.*).*EurFoodResTechnol*.226:459-465
- Chen W, WangY, XuL, DongJ, Zhu X,YingJ, WangQ, FanL, LiC, LiuL(2019)Methyl jasmonate, salicylic acid and abscisic acid enhance the accumulation of glucosinolates and sulforaphane in radish ( *L.*) taproot. *Sci Hort* 250:159-167
- Chen Y, Yang X, He K, Liu M, Li J, Gao Z, et al. (2006) The MYB transcription factor family. *Plant Cell Physiol* 60:107-124
- Clossais-Besnard N, Larher F (1991) Physiological role of glucosinolates in *Brassica napus*: concentration and distribution pattern of glucosinolates among plant organs during a complete life cycle. *J Sci Food Agric* 56:25-38
- Eberhardt MV, Kobira K, Keck AS, Juvik JA and Jeffery EH (2005) Correlation analyses of phytochemical composition, chemical, and cellular measures of antioxidant activity of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). *J Agric Food Chem* 53:7421-7431
- Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56:5-51
- Faulkner K, Mithen R, Williamson G (1998) Selective increase of the potential anticarcinogen 4-methylsulphanylbutyl glucosinolate in broccoli. *Carcinogenesis* 19:605-609
- Frerigmann H, Gigolashvili T (2014) MYB34, MYB51, and MYB122 Distinctly Regulate Indolic Glucosinolate Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant*. 7:814-828
- Giamoustaris A, Mithen R (1996) Genetics of aliphatic glucosinolates. IV. Side-chain modification in *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet* 93:1006-1010
- Gigolashvili T, Yatusевич R, Berger B, Müller C, Flügge UI (2007) The R2R3-MYB transcription factor HAG1/MYB28 is a regulator of methionine-derived glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2007;51:247-261
- Gigolashvili T, Engqvist M, Yatusевич R, Müller C, Flügge UI (2008) HAG2/MYB76 and HAG3/MYB29 exert a specific and coordinated control on the regulation of aliphatic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 177:627-642
- Gorissen A, Kraut NU, de Visser R, de Vries M (2011) No *de novo* sulforaphane biosynthesis in broccoli seedlings. *Food Chem* 127:192-196
- Grubb CD, Abel S (2006) Glucosinolate metabolism and its control. *Plant Cell Physiol* 11:89-100
- Gu ZX, Guo QH, Gu YJ (2012) Factors influencing glucoraphanin and sulforaphane formation



- in *Brassica* plant: A review. *J Integr Agric* 11:1804-1816
- Guo L, Zhu Y, Wang F (2018) Calcium sulfate treatment enhances bioactive compounds and antioxidant capacity in broccoli sprouts during growth and storage. *Postharvest Biol Tec*. 139:12-19
- Guo R, Hou Q, Yuan G, Zhao Y, Wang Q (2014) Effect of 2, 4-epibrassinolide on main health promoting compounds in broccoli sprouts. *LWT Food Sci Technol* 58:287-292
- Halkier BA, Gershenzon J (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol* 57:303-333
- Hecht S (2000) Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug Metab Rev* 32:395-411
- Hirai MY, Sugiyama K, Sawada Y, Tohge T, Obayashi T, Suzuki A, Araki R, Sakurai N, Suzuki H, Aoki K, et al. (2007) Omics-based identification of Arabidopsis Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 6478-6483
- James D, Devaraj S, Bellur P, Lakkanna S, Vicini J, Boddupalli S (2012) Novel concepts of broccoli sulforaphanes and disease: induction of phase II antioxidant and detoxification enzymes by enhanced-glucoraphanin broccoli. 70:654-665
- Juge N, Mithen RF, Traka M (2007) Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64:1105-1127
- Kestwal RM, Lin JC, Bagal-Kestwal D, Chiang BH (2011) Glucosinolates fortification of cruciferous sprouts by sulfur supplementation during cultivation to enhance anti-cancer activity. *Food Chem* 126:1164-1171
- Khakimov B et al. (2015) Identification and genome organization of saponin pathway genes from a wild crucifer, and their use for transient production of saponins in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Journal* 84:478-490
- Kim HH, Kwon DY, Uddin MR, Bae H, Kim SJ, Kim YB, Sang UP (2013) Influence of auxins on glucosinolate biosynthesis in hairy root cultures of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Asian J Chem* 25:6099-6101
- Kim JK, Chu SM, Kim SJ, Lee DJ, Lee SY, Lim SH, Hwa SH, Kwon SJ, Cho HS (2010) Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*. *Food Chem* 119:423-428
- Kim Y, Li X, Kim SJ, Kim HH, Lee J, Kim H, et al. (2013) MYB transcription factors regulate glucosinolate biosynthesis in different organs of Chinese cabbage (ssp. ). 18:8682-8695
- Kushad MM, Cloyd R, Babadoost M (2004) Distribution of glucosinolates in ornamental cabbage and kale cultivars. *Sci Hortic* 101:215-221
- Lee JG, Bonnema G, Zhang N, Kwak JH, de Vos RC, Beekwilder (2013) Evaluation of Glucosinolate Variation in a Collection of Turnip (*Brassica rapa*) Germplasm by the Analysis of Intact and Desulfo Glucosinolates. *J Agric Food Chem* 61:3984-3993
- Lee JG, Kwak JH, Um YC, Lee SG, Jang YA, Choi CS (2012) Variation of Glucosinolate Contents among Domestic Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) Accessions. *Korean J Hortic Sci* 30:743-750
- Lee JH, Kim YC, Jung Y, Han JH, Zhang C, Yun CW, Lee S (2019) The overexpression of cucumber (*Cucumis sativus* L.) genes that encode the branched-chain amino acid transferase modulate flowering time in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Rep*: 25-35

- Lee MK, Chun JH, Byeon DH, Chung SO, Park SU, Park S, Arasu MV, Al-Dhabi NA, Lim YP, Kim SJ (2014) Variation of glucosinolates in 62 varieties of Chinese cabbage (*L. ssp.*) and their antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol* 58:93-101
- Leng C, Zhang Y, Wang M, Gu Z, Yang R (2019) Dynamic variation of glucosinolates and isothiocyanates in broccoli sprouts during hydrolysis. *Sci Hortic.* 255:128-133
- Liu AG, Juvik JA, Jeffery EH, Berman-Booty LD, Clinton SK, Erdman JW Jr (2014) Enhancement of broccoli indole glucosinolates by methyl jasmonate treatment and effects on prostate carcinogenesis. *J Med Food* 17:1177-1182
- Madloo P, Lema M, Francisco M, Soengas P (2019) Role of Major Glucosinolates in the Defense of Kale Against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. *Phytopathology* 109:1246-1256
- Miao H, Wang J, Cai C, Chang J, Zhao Y, Wang Q (2017) Accumulation of Glucosinolates in Broccoli. In: Mérillon JM, Ramawat K (eds) *Glucosinolates. Reference Series in Phytochemistry*. Springer, Cham
- Miao H, Wei J, Zhao Y, Yan H, Sun B, Huang J, et al. (2013) Glucose signalling positively regulates aliphatic glucosinolate biosynthesis. *64:1097-1109*
- Migocka M, Papierniak A (2011) Identification of suitable reference genes for studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators. *Mol Breeding* 28:343-357
- Mikkelsen MD, Olsen CE, Halkier BA (2010) Production of the cancer-preventive glucorphanin in tobacco. *Mol Plant* 3:751-759
- Mithen R, Faulkner K, Rose P, Williamson G, Marquez J (2003) Development of isothiocyanate-enriched broccoli, and its enhanced ability to induce phase 2 detoxification enzymes in mammalian cells. *Theor Appl Genet* 106:727-734
- Padilla G, Cartea ME, Velasco P, de Haro A, Ordas A (2006) Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa*. *Phytochemistry* 68:536-545
- Pérez-Balibrea S, Moreno DA, García-Viguera (2010) Glucosinolates in broccoli sprouts (*Brassica oleracea* var. *italica*) as conditioned by sulphate supply during germination. *J Food Sci.* 75:C673-C677
- Rangkadilok N, Nicolas ME, Bennett RN, Premier RR, Eagling DR, Taylor PWJ (2002) Determination of sinigrin and glucoraphanin in *Brassica* species using a simple extraction method combined with ion-pair HPLC analysis. *Sci Hort* 96:27-41
- Robin AHK, Yi GE, Laila R, Yang K, Park JI, Kim HR, Nou IS (2016) Expression Profiling of Glucosinolate Biosynthetic Genes in *Brassica oleracea* L. var. *capitata* Inbred Lines Reveals Their Association with Glucosinolate Content. *Molecules* 21:787
- Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, et al. (2017) ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 18:529
- Sarikamis G (2009) Glucosinolates in crucifers and their potential effects against cancer: review. *Can J Plant Sci* 89:953-959
- Schuster J, Knill T, Reichelt M, Gershenzon J, Binder S (2006) Branched-chain aminotransferase4 is part of the chain elongation pathway in the biosynthesis of methionine derived glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:2664- 2679

- Shapiro SL, Schwartz GE, Bonner G (1998) Effects on mindfulness-based stress reduction on medical and premedical studies. *J Behav Med.* 21:581-599
- Singh A (2017) Glucosinolates and Plant Defense. In: Mérillon JM, Ramawat K (eds) *Glucosinolates*. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham
- Sønderby IE, Geu-Flores F, Halkier B A (2010) Biosynthesis of glucosinolates—gene discovery and beyond. *15:283-290*
- Sønderby IE, Hansen BG, Bjarnholt N, Ticconi C, Halkier BA, Kliebenstein DJ (2007) A systems biology approach identifies a R2R3 MYB gene subfamily with distinct and overlapping functions in regulation of aliphatic glucosinolates. *PLoS One.* 2:e1322.
- Subramoni S, Nathoo N, Klimov E, Yun ZC (2014) responses to plant-derived signaling molecules. *Front Plant Sci* 5:322
- Sun B, Liu N, Zhao Y, Wang Q (2011) Variation of glucosinolates in three edible parts of Chinese kale (*Brassica alboglabra* Bailey) varieties. *Food Chem* 124:941-947
- Thiruvengadam M, Venkidasamy B, Kim SH, Chung IM (2016) Effects of abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid on the content of phytochemicals and their gene expression profiles and biological activity in turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapa*). *Plant Growth Regul* 80: 377-390
- Traka MH, Saha S, Huseby S, Kopriva S, Walley PG, et al (2013) Genetic regulation of glucoraphanin accumulation in Beneforte broccoli. *New Phytologist* 198:1085-1095
- Vanduchova A, Anzenbacher P, Anzenbacherova E (2019) Isothiocyanate from Broccoli, Sulforaphane, and Its Properties. *J Med Food.* 22:121-126
- Variyar PS, Banerjee A, Akkarakaran JJ, Suprasanna P (2014) Role of Glucosinolates in Plant Stress Tolerance. In: Ahmad P, Rasool S (eds) *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance: Volume 1-Biological Techniques*. Academic Press. Cambridge, UK
- Velasco P, Cartea ME, Gonzalez C, Vilar M, Ordas A (2007) Factors affecting the glucosinolate content of kale (*Brassica oleracea acephala* group). *J Agric Food Chem* 55:955-962
- Wang M, Zhang Y, Leng C, Wang P (2019) Glucosinolates metabolism and redox state of rocket (*Eruca sativa* Mill.) during germination. *J Food Process Preserv* 43:e14019
- Yang R, Guo L, Zhou Y, Shen C, Gu Z (2015) Calcium mitigates the stress caused by ZnSO<sub>4</sub> as a sulfur fertilizer and enhances the sulforaphane formation of broccoli sprouts. *Rsc Adv* 5:12563-12570
- Yi GE, Robin AH, Yang K, Park JI, Kang JG, Yang TJ, Nou IS (2015) Identification and expression analysis of glucosinolate biosynthetic genes and estimation of glucosinolate contents in edible organs of *Brassica oleracea* subspecies. *Molecules* 20:13089-13111
- Zhu Y, Wang F, Guo L (2019) Effect of jasmonic acid on glucosinolate metabolism in different organs of broccoli sprouts. *Emir J Food Agr* 31: 81-87

## <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.