

발간등록번호

11-1543000-001665-01

213003-04-4-CG100

원예종자 개발을 위한 육종 통합
지원 시스템 구축

농림축산식품부 · 해양수산부 · 농촌진흥청 · 산림청

원예종자 개발을 위한 육종 통합
지원 시스템 구축

(Construction of Breeding Supporting
System for Development of
Horticulture Seeds)

순천대학교

농림축산식품부 · 해양수산부 ·
농촌진흥청 · 산림청

제 출 문

농림축산식품부장관 . 해양수산부장관 . 농촌진흥청장 . 산림청장 귀하

이 보고서를 “원예 종자 개발을 위한 육종 통합 지원 시스템 구축” 프로젝트(제1세부 프로젝트 “원예작물의 유전체 활용 및 육종소재 발굴 시스템 구축”, 제1세부 위탁과제 “세포막 수용체 kinase의 인산화 연구를 통한 유용 원예작물 소재 개발”, 제2세부 프로젝트 “원예종자사업단 연구 성과 관리시스템 구축”)의 보고서로 제출합니다.

2017 년 3 월 27 일

프로젝트 연구기관명 : 순천대학교

총괄책임자 : 노 일 섭

제1세부 연구기관명 : 순천대학교

세부연구책임자 : 노 일 섭

제1세부 위탁 연구기관명 : 충남대학교

위탁연구책임자 : 오 만 호

제2세부 연구기관명 : 충남대학교

세부연구책임자 : 이 왕 희

제1세부 연구원:	강 종 구	정 미 영	김 회 택	압둘 카이움	마노하란 란지트쿠마르	사티시쿠마 나타라잔
	정 희 정	이 고 은	강 송 이	나스 우잘 쿠마르	아리프 하산 칸 로빈	사무감 아소크라츠
	홍 예 지	정 지 윤	오 윤 미	산티쿠말 타밀라산	비자야쿠마 할사발드하난	자히드 하산
	김 영 옥	황 인 덕	정 남 희	베라판 카파감	라일라 라우나크	코로수간 니베다
	한정숙현	정 승 연	나잘우딘 아메드	하우라다 쥬웰	스리고팔람 스리세스하람	고팔 사하
제1세부 위탁 연구원:	김 민 수	이 경 선	김 솔 잎	이 지 혜	이 연	연 지 옥
	곽 근 화					
제2세부 연구원:	심 준 용	모 성 진				

보고서 요약서

과제고유번호	213003-04-4-CG100	해 당 단 계 연구 기 간	42 개월	단 계 구 분	1/1
연구사업명	단 위 사 업 명	농식품기술개발 (R&D)			
	세 부 사 업 명	Golden Seed 프로젝트			
연구과제명	프로젝트명	원예종자 개발을 위한 육종 통합 지원 시스템 구축			
	세 부 프로젝트명	원예작물의 유전체 활용 및 육종소재 발굴 시스템 구축 (순천대학교/노일섭)			
		원예종자사업단 연구 성과 관리시스템 구축 (충남대학교/이왕희)			
연구책임자	노 일 섭	해당단계 참여 연구원 수	총: 81명 내부: 64명 외부: 17명	해당단계 연구개발비	정부: 2,791,224천원 민간: 0천원 계: 2,791,224천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 81명 내부: 64명 외부: 17명	총 연구개발비	정부: 2,791,224천원 민간: 0천원 계: 2,791,224천원
연구기관명 및 소속부서명	순천대학교 원예학과			참여기업명	
제 1 세 부 위 탁 연 구	연구기관명: 충남대학교			연구책임자: 오 만 호	

○ 연구개발 목표

- 원예작물의 유전체 정보를 이용한 비교 전사체 및 분자마커 개발시스템 구축
- Brassica류의 새로운 융성불임 소재 발굴 및 실용성 분석
- 세포막 수용체 kinase의 인산화 연구를 통한 신호전달 네트워크 해석
- 원예종자사업단 연구 성과 관리시스템 구축

○ 연구개발 결과

- 토마토의 유전체 해석을 통하여 토마토의 병 및 형질에 관련된 분자마커를 개발하였으며, 토마토의 총 51개의 유전자에 대한 66종의 DNA 마커(simple PCR, HRM, EP-1)를 개발함. 또한 개발된 마커를 이용해 실증실험을 수행하였으며, 현장에서 사용할 수 있는 MAS(marker assisted system)을 구축함.
- Brassica류의 유전체 해석을 통해 생물학적, 비생물학적 스트레스에 관련된 유전자를 동정하였으며, 발현분석을 통하여 중요 유전자를 선발하고, 검은 썩음병(Xcc) 저항성에 관련된 마커정보를 획득하였으며, Brassica류의 세포질융성불임(CMS), 시들음병, S-genotype, 노균병에 대해 총 8종의 마커(simple PCR, HRM)를 개발하였으며, 순도검정용 24 chip을 개발함.
- 양파의 유전체 해석을 통해 세포질융성불임과 융성회복친에 대해 4종, 노균병 저항성에 대해 1종의 마커를 개발하였으며, 순도검정용 24 SNP Chip 과 22 SSR 마커를 개발함.
- 국내에서 자생하는 갯무 239종의 유전자원을 수집하였으며, 갯무 유래의 새로운 CMS의 소재인 Ogura (160번)을 선발하였으며, 생물다양성 보존을 위한 DNA 바코딩 및 *nrITS* 법을 개발함.
- 양배추 (80개), 배추 (17개)의 LRR-RLKs의 유전자정보를 수집하여, 양배추(4개) 및 배추 (1개)의 자가 인산화관련 세포막 수용체 kinases (LRR-RLKs) 클론을 확보했으며, 기능을 밝힘.
- Web-server를 기반의 연구 성과의 수집 및 저장, DB화를 통한 연구 성과 정보 검색, 연구 성과 현황 표시를 통해 진행상황 모니터링이 가능한 User friendly interface 연구 성과 통합 관리시스템을 개발함.

보고서
면수 :
260

< 요약 문 >

과제번호	213003-04-4-CG100
-------------	-------------------

연구 제목	<p>프로젝트명: 원예종자 개발을 위한 육종 통합 지원 시스템 구축</p> <p>제1세부 프로젝트명: 원예작물의 유전체 활용 및 육종소재 발굴 시스템 구축</p> <p>제2세부 프로젝트명: 원예종자사업단 연구 성과 관리 시스템 구축</p>																																																																																																																																																																																																			
연구성과 목표 대비 실적	<p>- 정량적 연구성과 목표 대비 실적</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th rowspan="2">성과목표</th> <th colspan="2">품종개발</th> <th colspan="2">특허</th> <th colspan="2">논문</th> <th rowspan="2">분자마커</th> <th colspan="2">유전자원</th> <th rowspan="2">국내 매출액</th> <th rowspan="2">종자 수출액</th> <th rowspan="2">기술 이전</th> <th rowspan="2">성과 관리 시스템</th> <th rowspan="2">인력 양성</th> <th rowspan="2">기타 (학술발표)</th> </tr> <tr> <th>출원</th> <th>등록</th> <th>출원</th> <th>등록</th> <th>SCI</th> <th>비SCI</th> <th>수집</th> <th>등록</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">2013</td> <td>목표</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>1</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>실적</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>1</td> <td>9</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">2014</td> <td>목표</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>2</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>실적</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>6</td> <td>-</td> <td>11</td> <td>1</td> <td>25</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>14</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">2015</td> <td>목표</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>1</td> <td>-</td> <td>3</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>실적</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>5</td> <td>-</td> <td>13</td> <td>2</td> <td>48</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>6</td> <td>29</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">2016</td> <td>목표</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>5</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>3</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>실적</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>5</td> <td>2</td> <td>17</td> <td>10</td> <td>1</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>3</td> <td>26</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">계</td> <td>목표</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>2</td> <td>1</td> <td>10</td> <td>1</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>3</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>실적</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>16</td> <td>2</td> <td>41</td> <td>14</td> <td>83</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>1</td> <td>11</td> <td>71</td> </tr> <tr> <td>달성율(%)</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>800</td> <td>200</td> <td>410</td> <td>140</td> <td>8300</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>100</td> <td>360</td> <td>7100</td> </tr> </tbody> </table>	성과목표	품종개발		특허		논문		분자마커	유전자원		국내 매출액	종자 수출액	기술 이전	성과 관리 시스템	인력 양성	기타 (학술발표)	출원	등록	출원	등록	SCI	비SCI	수집	등록	2013	목표	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	실적	-	-	-	-	1	9	-	-	-	-	-	1	2	2	2014	목표	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	실적	-	-	6	-	11	1	25	-	-	-	-	-	-	14	2015	목표	-	-	1	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	실적	-	-	5	-	13	2	48	-	-	-	-	-	6	29	2016	목표	-	-	1	1	5	-	-	-	-	-	-	-	3	-	실적	-	-	5	2	17	10	1	-	-	-	-	-	3	26	계	목표	-	-	2	1	10	1	-	-	-	-	-	-	3	-	실적	-	-	16	2	41	14	83	-	-	-	-	1	11	71	달성율(%)	-	-	800	200	410	140	8300	-	-	-	-	-	100	360	7100
성과목표	품종개발		특허		논문		분자마커	유전자원		국내 매출액	종자 수출액							기술 이전	성과 관리 시스템	인력 양성	기타 (학술발표)																																																																																																																																																																															
	출원	등록	출원	등록	SCI	비SCI		수집	등록																																																																																																																																																																																											
2013	목표	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																																																																																																																																					
	실적	-	-	-	-	1	9	-	-	-	-	-	1	2	2																																																																																																																																																																																					
2014	목표	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																																																																																																																																					
	실적	-	-	6	-	11	1	25	-	-	-	-	-	-	14																																																																																																																																																																																					
2015	목표	-	-	1	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-																																																																																																																																																																																					
	실적	-	-	5	-	13	2	48	-	-	-	-	-	6	29																																																																																																																																																																																					
2016	목표	-	-	1	1	5	-	-	-	-	-	-	-	3	-																																																																																																																																																																																					
	실적	-	-	5	2	17	10	1	-	-	-	-	-	3	26																																																																																																																																																																																					
계	목표	-	-	2	1	10	1	-	-	-	-	-	-	3	-																																																																																																																																																																																					
	실적	-	-	16	2	41	14	83	-	-	-	-	1	11	71																																																																																																																																																																																					
달성율(%)	-	-	800	200	410	140	8300	-	-	-	-	-	100	360	7100																																																																																																																																																																																					
연구개발 목적 및 필요성	<ul style="list-style-type: none"> - 원예작물 육종에 있어 분자마커의 중요성이 크게 부각되고 있으며, 다국적 종자회사들을 중심으로 자체 분자마커 개발기술과 대용량 마커선발(High-throughput (HT)-MAS) 시스템 확립에 많은 투자가 이루어지고 있음. - 다국적 종자회사들은 첨단생명공학기술을 적극 활용하여 병해충 저항성 품종을 선발할 때 분자마커를 이용하여 선발 효율을 극대화시키고 육종연한을 단축하고 있음. - 육종 연한단축 및 신속하고 정확한 품종 개발을 위해서는 유전체, 발현체 등을 이용한 기반 육종 기술 확립이 필요한 실정임. - 본 연구과제는 원예작물의 유전체 정보를 이용한 비교 전사체 및 분자마커 개발시스템 구축과 Brassica류의 새로운 융성불임 소재 발굴 및 실용성 분석, 세포막 수용체 kinase의 인산화 신호전달 네트워크 해석을 목적으로 연구를 수행함. - 연구성과 정보 관리를 체계적으로 수행할 수 있도록 웹 DB 및 서버를 이용하여 사업단에서 사용 가능한 연구 성과관리 시스템을 구축위해 user friendly interface 기반 연구 성과 관리시스템을 구축하고 시스템의 가상 운영테스트를 수행함. 																																																																																																																																																																																																			
연구개발 내용 및 범위	<ul style="list-style-type: none"> ○ 원예작물의 유전체 정보를 이용한 분자마커 개발 시스템 구축 및 활용성 검토 <ul style="list-style-type: none"> - 원예작물(양배추, 양파, 토마토, 버섯, 백합, 감귤 등)의 마커개발 목표형질 설정 - DB분석, 문헌조사 및 기존 연구 자료를 바탕으로 핵심 유전자 염기서열 및 기능 정보를 수집 - 개발된 분자마커(SSR, SNP, InDel 등) 정보 수집 및 육종소재 활용성 검토 - 기존 개발된 마커정보를 기초한 신규 분자마커 탐색 및 개발 - 원예작물(양배추, 양파, 토마토, 버섯, 백합, 감귤 등)의 공개된 표준/비교 유전체, 전사체 등의 염기 정보 수집 및 활용성 검토 																																																																																																																																																																																																			

	<ul style="list-style-type: none"> ○ Brassica류의 새로운 응성불임 소재 발굴 및 실용성 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 자생 Brassica류(갯무, 냉이류, 애기장대 등) 종자 및 식물체 수집 - 수집된 식물재료의 화기구조 등 표현형 관찰 - 응성불임 유형 판별 마커를 이용한 수집된 소재의 응성불임성 유무 판별 - 응성불임 개체의 미토콘드리아 genome 분석 - 새로운 응성불임 개체의 계통화 및 활용성 개발 ○ 원예작물의 세포막 수용체 kinase의 인산화 신호전달 네트워크 해석 <ul style="list-style-type: none"> - 양배추와 배추의 BAK1 receptor kinase의 기능분석 - 원예작물의 응용소재 유전자 탐색 - BoBAK1등세포막 수용체 단백질의 인산화 sites 판별 및 기능분석 ○ 원예종자사업단 연구성과 관리 시스템 구축 <ul style="list-style-type: none"> - 연구성과정보 통합 관리 시스템 개발 - 사업단 연구성과 관리시스템을 통한 연구 진행상황 모니터링 - 연구평가를 위한 성과관리 모델 개발
<p>연구개발 결과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 토마토의 유전체 해석 및 형질관련 분자마커 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 토마토에서 발병하는 줄기마름병(Alternaria stem canker), 세균성점무늬병(Bacterial spot), 잎곰팡이병(Leaf mold), 풋마름병(Bacterial wilt), 근부위조병(Fusarium crown and root rot), 시들음병(Fusarium wilt), 흰가루병(Powdery mildew), 고구마선충뿌리혹병(Nematoda root knot), 역병(Late blight), 겹무늬병(Early blight), 세균성반점병(Bacterial speck), 갈색근부(뿌리썩음)병(Corky root rot), 토마토점무늬병(Gray leaf spot), 얼룩시들음병(TSWV), 담배모자이크바이러스(ToMV), 황화잎말림바이러스(TYLCV) 등에 대한 저항성과 이병성을 판별할 수 있는 저항성 유전자 DNA 마커를 개발하였으며, 토마토의 형질 중 다양한 대과종 과색, 과형(Fruit shape and size) 이나 화방수(Inflorescence branch number), 과실이 착과되는 차례가 유한인지 무한인지, 그리고 과실 숙기에 관여하는 fast & slow ripening(NOR) 유전자 등 관여하는 형질 특이적인 DNA 마커를 개발하였음. - 토마토의 유전체 해석을 통한 총 51개 유전자에 대한 66종의 마커(simple PCR, HRM, EP-1)를 개발함. - 개발된 마커를 이용해 실증실험을 수행하였으며, 현장에서 사용할 수 있는 MAS(marker assisted system)을 구축함. - 토마토의 순도검정용 48 chip을 개발하였으며, MABC용 384 chip을 구축함. - 개발된 마커들은 지적재산권을 확보하기 위해 10건의 특허출원(국제 2, 국내 10) 및 2건 특허등록(국내)을 실시함. ○ 양배추의 유전체 해석 및 형질관련 분자마커 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 저온스트레스(CBFs, TFs, GST), 내한성(bZIP, ANS, DFR, BoCRGs), 생물학적, 물리적 스트레스 저항성(WRKY, TIR-NBS-LRR, CBL, CCD, NCED, Alfin-like (AL), MADS-box, BZR TFs, CBF, BoSSI, BoBSMT1, SGT1, AQP, MYB, CRG), 카로티노이드(Brapa_ESTC 013161, Brapa_ESTC 025847, Brapa_ESTC 006452) 등에 대한 유전체 해석 및 관련된 유전자들을 동정하였으며, 발현분석을 통하여 중요 유전자를 선별함.

- 동정된 유전자들은 분자마커 개발 및 스트레스 저항성 품종 육종에 활용되고 있음.
- 양배추 transcriptome 분석을 통해 잡종강세와 관련된 후보 유전자를 동정함.
- 양배추의 검은 썩은병 (Xcc)은 9개의 염색체 중 7번을 제외한 8개 염색체에서 9개의 QTL이 존재하고, 13개의 검은썩음병에 관련된 마커의 프라이머 세트 획득함.
- 양배추의 세포질웅성불임(CMS), 시들음병, S-genotype, 노균병에 대해 총 8종의 마커(simple PCR, HRM)를 개발하였으며, 순도검정용 24 chip을 개발함.
- 개발된 마커는 국내특허출원(3건) 및 국제특허출원(1건)을 실시하여 지적재산권을 보호함.

○ 양파의 유전체 해석 및 형질 관련 분자마커 개발

- 양파의 유전체 해석 및 transcriptome 분석을 통하여 내한성에 관련된 6개 유전자와 내동성에 관련된 12개 유전자를 동정함.
- 개화관련(FT, Flowering locus T)유전자가 양파의 구 비대와 단맛에 관여하는 것을 밝힘.
- 양파에서 세포질웅성불임과 웅성회복친에 대해 4종의 마커(Simple PCR(2), HRM(1), PCR-QIAxcel(1))를 개발함.
- 양파 노균병 저항성에 대해 1종의 Simple PCR 마커를 개발함.
- 양파의 순도검정용 24 SNP Chip 과 22 SSR 마커를 개발함.

○ Brassica류의 새로운 웅성불임 소재 발굴 및 실용성 분석

- 국내에서 자생하는 갯무 239종의 유전자원을 수집하였으며, orf138 프라이머 세트를 이용하여 갯무 유래의 새로운 CMS의 소재인 Ogura (160번)을 선발함.
- 양배추에서 45S ribosomal DNA의 intergenic spacer 염기서열을 분석하여 기존에 밝혀져 있는 2 type의 IGS (intergenic spacer)뿐만 아니라 6가지의 다른 IGS을 동정함.
- 동정된 IGS 정보는 양배추 품종의 순도검정용 마커로 활용이 가능하며, 종자혼입을 쉽게 판별할 수 있음.
- 생물다양성 보존을 위한 DNA 바코딩(*rbcL*, *matK*, *rpoCl*, *atpB*, *psbA-trnH* (intergenic spacer) 및 *nrITS* (internal transcribed spacer))법을 개발함.
- 바코딩 중 ITS를 이용하여 *Boerhavia*(*B. repanda*, *B. erecta* and *B. verticillata*)의 다른 종들로부터 *B. diffusa*를 구별함.
- 유전체 정보 및 바코딩 정보들은 새로운 종들을 발견하는데도 유용할 뿐만 아니라 식물 계통(lineage)의 수집한 종들을 보증하는데도 활용이 가능함.

○ 원예작물의 세포막 수용체 kinase의 관한 인산화 신호전달 네트워크 해석

- 양배추(80개의 LRR-RLKs), 배추(17개의 LRR-RLKs)의 유전정보를 수집하여, 세포막 수용체 kinases (LRR-RLKs)의 클론 확보함.
- LRR-RLK 클론들 중 양배추의 BoLRR67, BoBRL1, BoBAK1, BoLRR22와 배추의 BrBAK1가 자가 인산화 뿐 아니라 transphosphorylation 측면에서 매우 흥미로운 단백질로 밝혀짐.
- Yeast-Two-Hybrid 기법을 활용하여 BAK1::RPK1 세포막 수용체 단백질 상호작용, FER::BAK1 상호작용 결과를 검증함.
- Carboxyl terminal domain은 BoBAK1(양배추)와 AtBAK1에서 모두 중요하며,

	<p>8, 17, 28 개의 아미노산을 deletion 하였을 때 <i>E.coli</i> 단백질들에 대한 trans-phosphorylation은 감소하고 있음을 확인함.</p> <p>○ 원예종자사업단 연구 성과 관리 시스템 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> - 연구 성과 정보관리를 지속적 및 안정적으로 수행할 수 있는 정보통합관리시스템 개발함. - 개발한 시스템을 이용한 연구 성과 관리를 통해 사업단 연구 진행 상황의 통합적 모니터링을 수행함. - 연구 성과 지표와 연계하여 사업단의 평가에 활용할 수 있는 성과관리 모델을 개발함. - 연구 성과 정보의 체계적인 수집 및 축적을 통해 추후 추적평가관리 시스템에 활용 가능한 정보를 제공함. 				
<p>연구개발 성과 및 활용계획 (기대효과)</p>	<p>○ 연구 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 원예작물의 유전체 해석 및 병저항성 및 형질에 대한 분자마커 개발 관련 SCI급·비SCI급 논문 55편을 투고함. - 개발된 분자 마커에 대해 국내·외 특허출원(16) 및 등록(2) 총 18건을 통해 지적재산권을 획득함. - 병저항성 및 형질관련 분자마커(CAPS, SSR, SCAR, Indel, SNP) 총 83종을 개발함. - 순도검정 및 세대 단축 여교배검정용 48 SNP칩을 개발함. - 다양한 육종 소재 개발 및 분자마커개발을 위한 다수의 유전자원(갯무 239종등)을 확보함. - 배추, 양배추 식물종에서 BAK1 receptor kinase의 기능을 규명함. - Web-server 기반의 연구 성과 수집 및 저장, DB화를 통한 연구성과 정보의 검색, 연구 성과 현황 표시를 통해 진행상황 모니터링이 가능한 User friendly interface 연구 성과 정보 통합관리 시스템을 개발함. <p>○ 성과 활용계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 첨단 육종기술 기반 확립으로 국제경쟁력이 있는 수출형 품종 개발과 수출확대 및 민간 육종역량이 강화됨. - 개발된 다양한 마커를 이용한 분자 서비스를 통하여 품종육성을 위한 육종연한 단축 및 육종효율 증대에 기여함. - 새로운 육종 소재 개발 및 지적재산권획득에 의해 종자에 대한 분쟁이 방지되며, 민간 종자회사의 우량 품종 개발 역량이 증대될 것임. - 연구 성과 정보통합관리 시스템을 이용하여 다양한 과제 및 연구 주체로부터 산출되는 연구 성과물의 통합적인 관리를 통해 사업단의 성과를 실시간으로 정리, 분석 및 평가할 수 있어 체계적이고 지속적인 연구 성과의 관리 및 사업단 내부 연구 주체에 대한 실시간 정보제공이 가능함. 				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	유전체/전사체	DB 구축	분자마커	용성불임	미토콘드리아 DNA

SUMMARY

	Code No.	213003-04-4-CG100
<p>Purpose & Contents</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Breeding of horticultural crops is crucial to shorten the breeding cycle to develop new vegetable varieties rapidly. For rapid and accurate breeding, it is necessary to establish breeding techniques using genome analysis and expression analysis. To do so, efficient molecular markers are the primary need. The importance of molecular markers in horticultural breeding has been greatly emphasized, and a lot of investment has been made in establishing a high-throughput (HT)-MAS system for developing molecular markers by multinational seed companies themselves. - Multinational seed companies maximize selection efficiency by using molecular markers and advanced biotechnological approaches and thus shorten breeding period with a vision to select for pest-resistant and quality traits. - This research project was primarily focused on sequencing the whole genome to conduct a comparative analysis to select out molecular markers that can detect the targeted genotypes of selected horticultural crops. One of the major focus of developing such markers that can essentially identify new male sterile lines from a given germplasm. - Another important window of the proposed research is understanding the signal transduction pathway of LRR-RLKs proteins including brassinosteroid hormone. Plants response to developmental and environmental signals is partly accomplished through membrane-localized receptor kinases that interact with other proteins to initiate a cascade of biochemical events resulting in altered cellular function. - However, the functions and interacting protein networks of the vast majority of this large family of signal transduction molecules remain unknown. Therefore, we are focusing on the diversification and amplification of signaling pathways using interdisciplinary approaches. - Recently, scientific and engineering technologies have been recognized as a standard of national competitiveness in Korea. Research and Development (R&D) has been extensively supported by national funding sources. - As a result, evaluation of research achievement is the key parameter to focus on management and application of research achievement rather than its production, expanding the use of research management system (or research information system) to effectively manage research achievements. 	

<p>Results</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Genome analysis and development of molecular markers related to quality traits in tomato <ul style="list-style-type: none"> - We have developed a resistance gene marker that can discriminate resistance and susceptible genotypes under dysplasia to gray leaf spot, TSWV, ToMV, and TYLCV, Bacterial spot, Leaf mold, Bacterial wilt, Fusarium crown and root rot, Fusarium wilt, Powdery mildew, Nematoda root knot, Late blight, Early blight, Bacterial speck, Corky root rot after extensive genomic analysis between resistant and susceptible cultivars. - Among the traits of tomatoes those were targeted to develop markers were a variety of fruit shape and size, number of inflorescence branches etc. Specific DNA markers developed were associated with fast or slow ripening (NOR) gene involved in fruits and vegetables. - A total of 66 markers (simple PCR, HRM, EP-1) related to 51 genes were developed by genome analysis of tomato. - Performed empirical experiments using the developed markers and built a MAS (marker assisted selection) that can be used in the field. - We developed a 48 chip for purity test of tomato and a 384 chip for MABC. - We have submitted a total of 12 patent applications for markers, 10 of them were domestic and two of them were international. From those applications, two domestic patents are already approved and we secured intellectual property rights. ○ Genome analysis and development of molecular markers related to quality traits in cabbage <ul style="list-style-type: none"> - Low temperature stress (CBFs, TFs, GST), cold tolerance (bZIP, ANS, DFR, BoCRGs), biological and physical stress resistance (WRKY, TIR-NBS-LRR, CBL, CCD, NCED, Alfin-like, MADS-box, BZR TFs, CBF, BoSSI, BoBSMT1, SGT1, AQP, MYB, CRG) carotenoids (Brapa_ESTC013161, Brapa_ESTC025847, Brapa_ESTC006452) related genes were identified through expression analysis and were used for developing molecular markers to utilize them in stress resistant breeding. - Cabbage transcriptome analysis was used to identify candidate genes associated with abiotic stress. - Black rot (Xcc) of cabbage has 9 QTLs on 8 chromosomes except chromosome 7. We developed 13 primer sets related to black rot disease. - We developed eight kinds of markers (simple PCR, HRM) for cytoplasmic male sterility (CMS), wilt disease, S-genotype, and downy mildew of cabbage and developed 24 chips for purity assay. - The developed markers acquired intellectual property rights by receiving three domestic patents and one international patent.
-----------------------	--

- **Genome analysis and development of molecular markers related to quality traits in onion**
 - On the basis of genome analysis and transcriptome analysis of onion, six genes related to cold tolerance and 12 genes related to freezing tolerance were identified.
 - The flowering locus T (FT) gene has been found to be involved in the bulb enlargement and sweetness in onion.
 - We have developed four markers (Simple PCR (2), HRM (1), PCR-QIAxcel (1)) for cytoplasmic male sterility and male fertility in onion.
 - We have developed a simple PCR marker for onion downy mildew resistance. We have also developed 24 SNP Chip and 22 SSR markers for purity test in onion.

- **Searching out of CMS germplasm and development of markers to identify CMS genotypes in Brassica**
 - We collected 239 genotypes of wild sources in Korea and selected for Ogura (160) type of CMS derived from Radish by using orf 138 primer set.
 - Analysis of the intergenic spacer sequence of 45S ribosomal DNA resulted in 6 different types of IGS in cabbage.
 - Identified IGS information can be used as markers to identify the purity of cabbage cultivars and also to identify hybridity of the cabbage varieties.
 - Developed DNA bar codes (rbcL, matK, rpoCl, atpB, psbA-trnH (intergenic spacer) and nrITS (internal transcribed spacer) to utilize them in biodiversity conservation.
 - During bar coding, ITS was used to distinguish *B. diffusa* from other species of *Boerhavia* (*B. repanda*, *B. erecta* and *B. verticillata*).
 - Genomic analysis and bar coding information was not only useful for discovering new species, but could also can be used to assure lineage of the collected species.

- **Analysis of phosphorylation signal transduction network for cell membrane receptor kinase of horticultural crops**
 - We collected genetic information of cabbage (80 LRR-RLKs), Chinese cabbage (17 LRR-RLKs) and then cloned DNA sequences related to cell membrane receptor kinases (LRR-RLKs).
 - Among the cloned LRR-RLK genes, BoLRR67, BoBRL1, BoBAK1, BoLRR22 and BrBAK1 of cabbage were found to be very important proteins in terms of transphosphorylation as well as autophosphorylation.
 - Yeast-Two-Hybrid technique was used to verify the BAK1 :: RPK1 and FER :: BAK1 cell membrane receptor protein interactions.
 - The carboxyl terminal domain is important for both BoBAK1 (cabbage) and AtBAK1, and the trans-phosphorylation of *E. coli* proteins is decreased when 8, 17, 28 amino acids are deleted.

	<p>○ Developing research management system for GSP horticulture Seed Center</p> <ul style="list-style-type: none"> - We developed a web-database and web-server based research information system with user friendly interface. The developed system can be used for storing project description and research achievements, searching them with various categories, acquiring specific information regarding project and achievements, and checking progress of GSP horticulture seed center based on statistical information of research achievements. - Additionally, user manual for both supervisor and researcher has been developed and distributed. Compared to the previous systems, this system is only focused on research achievements so the system has advantage of easy use, faster speed and GSP horticulture seed center-specific functions. - The system maintains secrecy of research achievements not only to outsiders of GSP horticulture seed center but also to intra-GSP researchers and also propels sharing research information between intra- and inter-GSP researchers. 				
<p>Achievements and expected outcome</p>	<p>○ Achievements</p> <ul style="list-style-type: none"> - We have published a total of 55 research articles in SCI and non-SCI journals. - We have applied for a total of 18 domestic and international patents. Two patents are already approved. - We have developed a total of 83 markers (CAPS, SSR, SCAR, Indel, SNP) related to disease resistance and quality traits and 48 SNP chips for purity test and MABC. Molecular markers developed enable us to provide service to companies or breeders both commercially and privately. <p>○ Expected outcome</p> <ul style="list-style-type: none"> - Establishment of cutting-edge breeding technology will strengthen the competitiveness of in disseminating the export-oriented varieties overseas and also strengthen the capacity of individual breeders and companies. - Use of molecular markers will enhance the shortening of breeding cycle and breeding efficiency of the breeders - Development of new breeding materials and acquisition of intellectual property rights will prevent disputes on seeds and increase the capacity of private seed companies to develop good varieties. - This system is expected to help an efficient management of research achievement of GSP horticulture center so that the center makes an excellent contribution to the field of seed industries and receives excellent scores in evaluation by government institutes. For the effective use of the developed system, i.e. real-time monitoring, it may be necessary to compose a program that introduce and encourage the use of system. 				
<p>Keywords</p>	<p>genome/ transcriptome</p>	<p>DB construction</p>	<p>molecular marker</p>	<p>male sterility</p>	<p>mitochondria DNA</p>

CONTENTS

Chapter 1. Research Overview	12
Section I. Research Objectives	12
Section II. Research Necessity	12
Chapter 2. Research Situations	14
Chapter 3. Research Methods and Results	20
Section I. Research Methods	20
Section II. Research Results	24
Chapter 4. Accomplishments and Contribution	233
Section I. Quantitative Accomplishments	233
Section II. Achievements	233
Chapter 5. Applications Plans of the Research Results	239
Chapter 6. Research Data Collected During the Research	254
Chapter 7. References	258

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	12
제 1 절 연구개발의 목적	12
제 2 절 연구개발의 필요성	12
제 2 장 국내외 기술개발 현황	14
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	20
제 1 절 연구개발 범위 및 내용	20
제 2 절 연구개발 결과	24
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	233
제 1 절 정량적 연구개발 성과목표 대비 실적	233
제 2 절 연차별 연구개발 목표, 내용 및 달성도	233
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	239
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 국내외 기술현황	254
제 7 장 참고문헌	258

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적

- 원예작물의 유전체 정보를 이용한 비교 전사체 및 분자마커 개발시스템 구축
- Brassica류의 새로운 옹성불임 소재 발굴 및 실용성 분석
- 원예작물의 세포막 수용체 kinase의 인산화 신호전달 네트워크 해석
- 원예종자사업단 연구 성과 관리 시스템 구축

제 2절 연구개발의 필요성

- 채소작물과 같은 시장 수명이 짧은 작물의 육종은 육종 연한단축이 매우 중요하며, 신속하고 정확한 품종 개발을 위해서는 유전체, 발현체 등을 이용한 기반 육종 기술 확립이 필요함
 - NGS (Next Generation Sequencing) 기술의 도입으로 유전체 정보량이 폭발적으로 증가함에 따라 초고속 분석능력과 대용량 정보 처리 능력이 중요시되고 있으며 유전체 기반 정보 활용 분야는 보건의료의 질 향상, 우수 농림수산물 생산, 신에너지 생산 등 그 활용범위가 확대되고 있음
- 유전체 연구를 통한 농림수산물부 분야의 산업 경쟁력 확보의 필요성 대두됨
 - 유전체 연구를 통해 생산된 유전체 정보, 유전자, 분자마커 등은 고품질 신품종 육성 및 육종효율 증진 등 고부가 산업창출의 기반을 제공하는 핵심 요소로 작용함
 - 농업생명공학기술의 선진화 및 국제적 경쟁력 제고를 위해 주요 작물에 대한 유전체 연구 기반 및 국내외 정보교류 네트워크 구축이 시급함
- 유전체 연구는 단일 생물계 중심에서 집단 또는 복합계에 대한 통합적인 연구로 추진되고 있어 유전체 정보의 생산·분석·활용 분야의 원천기술 개발이 필요함
 - 표준유전체 프로젝트 이외에도, 비교유전체 연구를 위한 유전체 부분해석 및 재해석이 전 세계적으로 다수 진행되고 있으며, 그 외에도 유전자지도 작성, 전사체, 유전체 및 분자표지 발굴 등의 관련 연구가 다수 진행되고 있음
- 원예작물 육종에 있어 분자마커의 중요성이 크게 부각되고 있으며, 다국적 종자회사들을 중심으로 자체 분자마커 개발기술과 대용량 마커선발(High-throughput(HT)-MAS) 시스템 확립에 많은 투자가 이루어지고 있으며, 다국적 종자회사들은 첨단생명공학기술을 적극 활용하여 병해충 저항성 품종 선별할 때 분자마커를 이용하여 선별 효율을 극대화시키고 육종연한을 단축하고 있다. 이러한 육종 연한단축 및 신속하고 정확한 품종 개발을 위해서는 유전체, 발현체 등을 이용한 기반 육종 기술 확립이 필요한 실정임

- 제한적인 개별 유전자들에 대한 조작 및 기능 분석 등에 대한 연구에 한계성이 분명하기 때문에 “기후변화 및 이상기상 대응을 위한 배추과 작물 환경스트레스 내성 기작 규명 및 유전자원 발굴”을 위해서는 외부 환경 변화에 따른 다양한 신호전달의 upstream components들에 대한 이해가 필수적임. 특히 흥미로운 단백질로서 고등식물의 세포막에 존재하는 Leucine-Rich Repeat Receptor-Like-Kinases (LRR-RLKs)는 extracellular domain, single transmembrane, cytoplasmic domain으로 구성되어 있으며, 세포막에 존재하는 신호전달의 가장 초기 단계의 단백질들(LRR-RLKs)의 post-translational modifications (PTMs), 즉, 수용체 단백질들의 kinase activity와 specificity를 변화시킴으로서 다양한 하위 신호전달 components의 전체적인 신호전달이 변화함
- 신 품종 개발 및 병, 환경저항성 식물의 발굴을 위해서는 병, 환경 저항성 신호전달의 초기 단계에서 많은 하위 신호 전달 관련 유전자들을 조절하는 세포막 수용체 kinase의 연구는 매우 중요함
- 장기간에 걸친 대규모의 사업에서는 연구 주체간의 성과 정보 공유가 필수적임에도 불구하고 사업단의 규모로 인해 원활하지 않은 경우가 있다. 이를 극복하기 위해, 연구 성과 정보를 연속적 및 안정적으로 관리할 수 있는 정보통합관리시스템의 구축이 필요하며, 이를 통해 사업단의 성과를 체계적이고 지속적으로 관리 가능함
- 대규모 연구개발은 그 효과가 장기간에 걸쳐 나타나며 투자결과를 예측하기가 어렵기 때문에 단기 연구 결과물뿐만 아니라 중/장기적인 연구 성과를 통한 2차적인 과급효과를 파악할 필요성이 있으며, 이를 위해 연구 성과 관리 시스템과 성과 지표를 연계한 성과관리 모델의 개발이 필요함

제 2 장 국내외 기술개발 현황

○ 유전체 연구 현황

- 표준유전체 프로젝트 이외에도, 비교유전체 연구를 위한 유전체 부분해석 및 재해석이 전 세계적으로 다수 진행되고 있으며, 그 외에도 유전자지도 작성, 전사체, 유전체 및 분자표지 발굴 등의 관련 연구가 다수 진행되고 있음

<원예작물 유전체 해독 현황>

자원 구분	품목	유전체 해독여부	집중 연구대상 또는 목표형질	근거
원예 작물	토마토	완료	병저항성(꽃마름병, 흰가루병), 내고온성, 내습성, 성분(당함량, 라이코핀, 비타민)	-세계 토마토 생산액 559억불 -종자수출 및 내수시장 확대 -UPOV, FTA 대응 -산업화 지원
	양배추	완료	병해충저항성(위황병, 배추좀나방, 뿌리혹병, 흑부병), 내열구, 칼슘 결핍저항성, 내한성, 내서성	-UPOV, FTA 대응 -산업화 지원 -종자수출 및 내수시장 확대
	양송이버섯	완료	다수성	-식용, 약용작물로 재배 -면역, 항암증진 효과 -산업화 지원
	양파	미추진	웅성불임성, 내추대성, 내병, 저장, 품질 및 성분(캐르세틴 등)	-UPOV, FTA 대응 -산업화 지원 -종자수출 및 내수시장 확대
	백합	미추진	조기개화, 바이러스 저항성	-FTA 대응, 산업화지원 -수출 유망작목
	표고버섯	진행중	다수성	-식용, 약용작물로 재배 -면역, 항암증진 효과 -산업화 지원
	감귤	완료	CTV 저항성, 왜성, 다배성, 무핵성, 웅성불임성	-UPOV 대응
	오렌지	완료		-내수시장 확대
병귤	진행중	-감귤종묘 국산화		

○ 토마토 유전체 연구 현황

- 토마토는 영양학적 가치가 알려지고 식생활이 서구화되면서 중동, 동유럽, 아프리카, 아시아 지역의 소비량이 두드러지게 증가하고 있는 추세임
- 2003년부터 시작된 국제 가지과유전체 컨소시엄을 통해 토마토 유전체 해독이 완료되었고, 2012년 5월 Nature에 발표되어 유전체 정보가 공개되어 이용 가능한 상황이며, 현재 13품종의 토마토 genome sequencing project가 완료 혹은 진행 중임. 질적 수준이 높은 유전체 연구정보의 보유와 고부가가치 작물군이라는 강점으로 토마토의 유전체 연구 분석에 대한 경쟁은 세계적으로 치열함. 따라서 기술적 우위를 통한 국제시장 선점을 위해서는 기술, 자본 집약적 연구가 필요함

○ 토마토 형질관련 분자마커 연구

- 주요 육종 목표는 과실 수량 및 숙성, 크기, 색깔, 가용성 고형물 함량과 같이 맛을 결정하는 요인과 병해충 저항성, 환경스트레스 저항성 등 재배 편의성에 집중하고 있음
- 위와 같이 중요한 육종형질은 오랜 기간 동안 유전적 연구와 유전자 연구가 진행되어 풍부한 문헌정보를 가지고 있으나 연구단계로 진입이 미비해 이를 효율적이고 실질적으로 육종에 적용을 위해서는 체계적인 정리가 필요한 단계임
- 치열한 종자시장에서 경쟁력을 확보하기 위해서는 유전체 정보를 이용한 신속한 형질관련 분자마커 개발이 필수적임. 현재까지 형질관련 분자마커 개발은 단일 유전자에 의해 조절되는 형질 중심으로 문헌정보를 이용하여 개발함. 세대단축을 위하여 여교잡 선발 (Marker-assisted backcrossing: MAB)을 위한 교배조합별 이용 가능한 genome-wide SNP 선발이 필요함. 유전체 기반의 육종 시스템을 구현하기 위해서는 육종소재에 대한 정확한 데이터베이스, 표준유전체 정보, 모든 유전자의 유전양상을 이해할 수 있는 초고밀도 유전지도가 필요함
- 작물에서 대용량 마커 정보가 기입된 유전체 전반의 특징을 나타내는 고밀도 유전자지도는 유용형질을 육종에 이용하는데 더 많은 정보 제공이 가능함. 현재 빠른 속도로 개발 및 발전하고 있는 re-sequencing 기술은 대용량 분자마커 개발을 가능하게 하고 있으며 이는 유전자 수준에서 마커 개발을 가능하게 함
- 육종산업에서 육종효율을 증대시키기 위해서는 육종연한의 단축이 필수적이며, 이에 유전체 정보와 결합된 유용유전자원의 추출과 이에 대한 분자마커 기술 개발이 핵심역량으로 부상하고 있음. 최근 급속히 증가되고 있는 유전체정보에 생물정보학(bioinformatics) 기술을 접목하여 지식 기반 육종에 적합한 고급 정보를 제공함으로써, 유전체 정보와 육종간의 상호 소통 및 활용이 원활하도록 지원하는 가교역할이 필요함
- 최근 개발된 NGS (next generation sequencing; 차세대 염기서열 분석) 기술의 발달로 저비용 분석이 가능해짐에 따라 많은 연구자들이 대규모의 SNP를 탐색하고 응용하기에 집중하고 있음
- 토마토 유전체염기서열 해독 완결 등 지노믹스 기술 및 분자육종기술 등 농업생명공학 및 융합기술 발전으로 농업을 고부가가치 산업으로 변화시킬 수 있는 새로운 기회가 전개됨. 토마토 대량 분자마커 기술 개발을 통한 토마토 산업의 활성화를 위해 유용 육종소재의 탐색 및 집단 양성, 분자마커 개발 시스템 구축, 목표형질과 관련된 유용 유전자를 분리하여 이를 바탕으로 효과적인 육종시스템의 구축이 필요함
- 유전체 해독 기술은 국제적 수준임에도 불구하고 분자마커개발은 문헌정보 혹은 개별 유전자 별로 진행되는 미비한 상태임

○ 양배추 유전체 연구 현황

- 양배추(*Brassica oleracea* L.)는 인간에게 유익한 여러 기능성물질들이 함유되어 있어 전 세계적으로 여러 아종의 형태들로 양배추의 소비가 점점 늘어나고 있음. 이에 육종을 위한 유전체 연구에 대한 관심과 차세대 유전체 분석 장치의 적용이 접목되어 양배추 분자육종 발전이 가시화되고 있음. 양배추 유전체 크기는 630~696 Mb 정도로 알려져 있으며 9개의 기본 염색체를 가지고 있음. 최근 중국의 Beijing Genome Institute와 캐나다 그룹에서 표준유전체 염기서열 해독이 끝나 논문을 작성하고 있는 중임

- 중국 BGI에서 Solexa-pipeline을 통해 whole genome sequencing으로 생산된 데이터와 NCBI에 등록된 454 데이터, BAC-end 데이터를 추가하여 총 539 Mb 정도의 assembly 된 염기정보를 얻어냈으며, 이는 양배추 전체 genome을 630 Mb로 봤을 때 약 85.5%에 해당하는 정보임. 이를 양배추 RNA-sequencing 데이터와 비교해 보았을 때 전체 gene space 지역의 약 98% 정도를 cover하고 있는 수준임
- 중국에서 양배추 유전체 연구가 진행되던 비슷한 시기에 캐나다 그룹에서도 다른 품종으로 유전체 연구가 진행되었음. 전체 sequence 정보는 BGI sequence 보다 작지만 (78% coverage) pseudo-chromosome 형태로 약 446 Mb 정도임

○ 양배추 형질관련 분자마커 연구

- 양배추 유전체의 해독이 거의 완성됨에 따라 분자유종 기술을 접목한 GAB (genomics assisted breeding), GWAS (genome wide association study) 등이 급속도로 진행되어 발전해 나가고 있음
- 검은썩음병, 뿌리혹병, 시들음병과 같은 양배추에 큰 피해를 입히는 병들과 여러 환경 스트레스 저항성, 소비자의 기호에 맞는 엽색에 관련된 형질 등에 관련된 연구 역시 진행이 되고 있으며, 유전체 해독이 완료된 만큼 많은 유전자원들의 resequencing과 함께 GWAS의 접목으로 대규모의 주요한 형질들의 연구가 이루어짐으로써 본격적인 분자유종의 발전이 이루어질 것임

○ 양파 유전체 연구 현황

- 양파(*Allium cepa* L.)는 종교적인 이유 등의 특별한 이유를 제외하고는 전 세계 모든 나라에서 소비되고 있는 중요한 채소작물임. 양파는 대부분의 *Allium*속 작물과 마찬가지로 8개의 기본 염색체를 가지고 있음. 양파는 매우 큰 염색체를 가지고 있는데 크기는 약 15,290 Mb이고 17.9 pg의 DNA를 1C nucleus를 가지고 있어 옥수수 유전체보다는 6배, 벼 유전체보다는 36배 그리고 애기장대 유전체보다 107배 큰 유전체를 가지고 있는 것이 특징임. 유전체의 크기가 크고 2년생 작물이며 자식열세가 매우 강하기 때문에 양파의 유전체 연구 및 유전자 지도 작성은 거의 연구가 이루어지지 않고 있음
- 1998년 최초로 양파의 유전자 지도가 보고되었는데 이 유전자 지도는 14개의 RAPD marker, 110개의 RFLP marker로 이루어진 low-density linkage map으로 12개의 linkage group으로 이루어져 있음. 이후 2001년에 128개의 EST sequence에 기초해서 26개의 SSCP marker를 추가하였음. 같은 연구그룹에서 2005년 11,008개의 EST sequence를 확보한 다음 그 중에서 벼의 유전자와 상동성이 높은 276개의 EST를 선별하여 104개의 SNP와 indel을 찾았고 46개의 SSR polymorphism을 찾아서 168개의 새로운 marker를 기존의 유전자 지도에 추가하였음. 완성된 유전자지도는 총 1,907 cM으로 14개의 linkage group으로 이루어져 있음. 비록 수차례 유전자지도가 업데이트 되었지만 아직까지 다른 작물의 유전자지도에 비하여 해상도가 크게 떨어진다고 볼 수 있음. 이후 양파 유전자지도에 위치된 EST와 유사한 벼의 유전자 위치를 비교한 결과 양파의 유전체와 벼의 유전체 사이에는 거의 colinearity가 없다는 사실이 발견되어, 양파 유전체 연구들 함에 있어 유전체 정보가 많이 축적된 벼의 유전체 정보를 이용하기 어렵게 되었음. 따라서 양파의 유전체 연구는 독립적으로 수행될 필요가 있음

○ 양파 형질관련 분자마커 연구

- 양파를 대상으로 한 유전연구는 다른 주요 작물에 비해서 크게 적은 편임. 형태적 특징과 병저항성에 대한 보고가 17건이 있었으며, 이들은 약(anther), 구, 잎, 종피의 색깔, 꽃대(dwarf scape), 웅성불임 회복유전에 관한 연구였음
- 양파는 2년생 작물이므로 임성조사 및 자식검정을 통해서 웅성불임의 종류를 판별하는데 4년에서 길게는 8년까지 소요되어 F1 품종 개발에 최대의 걸림돌이 되고 있음. 따라서 웅성불임의 종류를 쉽게 단기간 내에 판별할 수 있는 분자표지를 개발하려는 노력들이 꾸준히 이루어졌음. 특히, 전남대 김성길 교수 연구팀에서 단 한번의 PCR로 정상 및 2종류의 세포질을 판별할 수 있는 분자표지를 개발하여 웅성불임 종류를 판별하는 정확도와 효율을 높였음. 한편, 웅성불임을 회복시키는 회복유전자의 유전자형은 다양한 유지된 계통을 단기간 내에 개발하기 위해서는 반드시 필요한 과정으로 회복유전자(*Ms*)에 대한 분자표지로 연관된 RFLP marker와 SSCP marker가 개발되었으나 이는 계통에 대한 대량 육종을 하기에는 부적합함. 이후 이들 marker의 단점을 보완한 simple PCR marker가 개발되었음. 그러나 이들 분자표지들은 *Ms* locus와 약 1 cM 정도 떨어져 있지만 보다 신뢰성 있는 선발을 위해서는 다수의 보다 근접한 분자표지 개발이 필요함

○ 버섯 유전체 연구 현황

- 버섯에서는 영지버섯(*Ganoderma lucidum*), 양송이(*Agaricus bisporus*), 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*) (oyster mushroom) 등의 균주에 대하여 중국, 미국 및 유럽 국가에서 게놈 연구가 이미 진행 중에 있음. 그러나 한국에는 버섯에 대한 게놈 연구가 늦게 진행되고 있으며, 다른 나라와 더불어 한국 역시 게놈 정보를 신속히 획득할 필요가 있고, 이렇게 획득된 게놈 정보를 바탕으로 추후 유용 기능성 유전자의 연구 및 응용 연구 분야(바이오에탄올, 탈색 및 난분해 물질 분해 및 의약 용도 분야 등)에 대한 기술력을 선점할 수 있는 기틀을 마련할 필요가 있음
- 영지버섯에 대하여 중국의 Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College에서 38.73 Mb 혹은 43.12 Mb 정도의 게놈 연구를 진행 중에 있는 것으로 확인됨. 이 외에 양송이는 프랑스의 Université Henri Poincaré에서 게놈 연구를 진행 중에 있는 것으로 확인되며, 느타리버섯에 대하여는 중국의 University of Hong Kong에서 게놈 연구를 진행 중에 있는 것으로 확인됨

○ 버섯 형질관련 분자마커 연구

- 느타리버섯, 표고버섯, 양송이버섯, 치마버섯 등의 버섯균주에 대하여 SCAR 마커, RAPD 마커, Homokaryon/Heterokaryon 마커 등에 관하여 연구되었음

○ 감귤 유전체 연구 현황

- 감귤(*Citrus clementina*)은 2011년 1월에 229.25 Mb 정도의 'Clementine haploid' 유전체가 공개되었으며, 감귤보다 25.31 Mb 정도 더 큰 324.56 Mb 'Sweet orange diploid'(*Citrus sinensis*)의 유전체도 같은 시기에 공개되었음. 2012년 3월에는 중국에서 333.41 Mb 크기에 'Sweet orange doubled haploid'의 유전체가 공개되었음

○ 감귤 형질관련 분자마커 연구

- 감귤류에 대한 분자마커에 대한 주요연구로는 1996년과 2011년에 single dominant를 보이는 CTV(Citrus tristeza virus) 저항성 분자마커가 연구되었으며, 1995년에는 single dominant 형태의 왜성에 대한 분자마커가 연구되었음. 2008년, 2009년, 2011년에는 다배성에 대한 분자마커가 연구되었으며, 1999년과 2008년에는 single dominant 형태의 무핵성에 대한 분자마커가 연구되었음. 2003년에는 융성불임성에 대한 분자마커가 연구되었으며, 그 외에 QTL을 활용한 분자마커가 1994년에서 2005년 사이에 다수 연구되었음

○ 채소작물의 융성불임 연구

- 전 세계 채소종자 시장규모는 증가 추세로, 상업용 채소종자 시장은 2011년 약 5조 5천억 원으로 추정되며, 2020년에는 9조 6천억원까지 성장할 전망이다
- 중국과 인도 시장은 기존 재래종에서 교배종으로 급격하게 전환되는 추세로서 시장규모도 급증할 것으로 예상되는 등 아시아 채소종자 시장규모는 2011년 1조 8천억원의 신흥 시장으로 향후 가장 큰 시장으로 성장할 것으로 예상됨
- 현재 배추과 채소 작물의 육종은 자가불화합성(SI)에서 융성불임성(MS)으로 전환되고 있지만 융성불임 소재는 매우 국한되어 있고, 또한 기존 MS소재의 특허 문제 등이 발생할 수 있어 새로운 융성불임성 소재의 발굴은 매우 중요함

○ 수용체 단백질에 대한 연구

- 농업적으로 중요한 작물을 포함한 모든 식물들은 외부 환경의 변화에 적응하기 위하여 매우 복잡하고 다양한 신호전달 메커니즘을 통하여 연속적인 생장과 발달을 지속함
- 브라시노스테로이드(Brassinosteroids; BRs)는 동물의 스테로이드 호르몬과 구조적으로 유사한 식물 스테로이드 호르몬으로, 식물 세포분열 촉진, 식물의 생장과 발달, 광형태형성, 종자발아, 관다발형성, 다양한 비생물학적, 생물학적 스트레스 내성 등에 관여하는 스테로이드 호르몬임 (Clouse et al. 1996, Jiang et al. 2013; Wang et al. 2014; Zhang et al. 2014)
- Brassinosteroid Insensitive1 (BRI1) 은 세포막에 존재하는 BR 호르몬의 수용체로 Leucine-Rich-Repeat Receptor-Like-Kinase (LRR-RLK) family로 구분되는 단백질로서, BR 수용체인 BRI1 kinase는 Ser/Thr 수용체 kinase 일뿐 아니라 Tyrosine 아미노산 잔기에서도 인산화되는 dual specificity kinase 활성을 가지는 매우 흥미로운 LRR-RLKs family에 속하는 단백질임 (Clouse 2011, Gruszka 2013, Zhao et al. 2013, Oh et al. 2009)
- 쌍자엽 식물임과 동시에 모델 식물인 애기장대의 BRI1 유전자 및 단백질에 대한 연구에 집중되어 온 반면, 단자엽 식물이며 농업적으로 매우 중요한 작물인 벼의 BR 수용체 단백질, OSBRI1의 기능 및 특징 규명은 매우 빈약할 뿐 아니라 쌍자엽 식물과 단자엽 식물에서의 BRI1 단백질의 특징 규명에 대한 비교 연구 및 OsBRI1 단백질 engineering에 대한 기초 자료는 전무한 실정임

○ 연구 성과 관리 시스템 개발

- 1990년대부터 연구개발결과의 활용측면의 강조 및 연구과제를 통한 기술적 성과의 후속 연계와 실용화를 위한 성과관리체계의 확립방안 모색함 (오재건, 1996)
- 대부분 학술 중심이 아닌 행정중심의 성과 관리 시스템으로 비체계적으로 전개되는 지방 정부의 관리 장치를 통합하여 운영할 수 있는 전략적 성과 관리체제를 도입 하고, 실제 성과관리 시스템의 활용효과평가를 위해 정부출연연구기관에 도입 한 사례를 분석함 (이재원, 2002; 정양현 등, 2007)
- 국가연구개발사업의 성과물에 대한 효율적인관리와 연구성과의 적극적인 활용을 위한 선진국형 성과관리 시스템 방안을 모색함 (류범중, 2003)
- 최근 국가연구개발 사업의 관리를 위해 국가연구자 등록코드시스템을 통한 NITS 활성화 방안 및 창의적 기초연구성과를 위한 연구관리제도 개선방안이 제시됨 (이상화, 2010; 송충한 & 조현대 2010)
- 연구 성과 관리시스템으로 Research Information system이 대학기관에서 연구지원 목적으로 구축되었으며, information system에 대한 개념과 조직관리에 있어서 개인을 지원하기 위한 정보의 중요성과 관련 IT기술 및 소프트웨어에 관한 연구가 수행됨 (Checkland and Holwell 1997, Melone 1990, Nunamaker et al. 1990)

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 연구개발 범위 및 내용

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
토마토, 양배추, 양파 병 및 형질관련 마커 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 문헌을 통한 토마토 질병 검색 - NCBI를 통한 주요 유전자 검색 - 저항성과 이병성 샘플에 유전자 대입 - 시퀀싱을 통한 염기서열 확인 및 비교 - SNP site 확인 - SNP 후보 프라이머 제작 및 HRM 적용 시험 	토마토, 양배추, 양파 육종에 중요한 인자인 병 및 주요형질 관련 유전자들을 탐색하여 MAS에 적용시킬 수 있는 마커 개발과 HRM 시스템 확립 및 SNP chip개발을 위한 실증 시험
양배추 검은썩음병 저항성 유전자 탐색 및 분자마커 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 양배추 흑부병 저항성 QTL 검색 - 양배추 염색체 상의 QTL 영역 확인 - QTL 내 질병 관련 유전자 탐색 - 다양한 계통의 저항성, 이병성 실증시험 	양배추 검은썩음병과 관련된 QTL을 분석하여 특이적인 locus를 확인하고 관련 마커를 탐색하여 후보 유전자 수집 및 개발 마커에 대한 실증시험
양파 저온 저항성 관련 transcriptome 분석 및 분자마커 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 내한성 양파 3계통에 대한 ion leakage 실험 - 내한성이 강한 계통에 대한 RNA-seq 분석 및 transcriptome 분석 - 내한성 관련 유전자 탐색 및 발현분석 - 내한성 후보 유전자에 대한 실증시험 	양파 3계통 중 내한성이 강한 계통을 선별하기 위한 ion leakage실험 후, 내한성이 강한 36122 계통 확인 후 RNA-Seq을 수행하였으며, 내한성 관련 transcriptome 분석 및 유전자 선별
양파 구근형성/맛 관련 QTL 동정 및 분자 마커 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 양파 품질 검정용 QTL 동정 및 분자 마커 후보 유전자 선별 - 양파 조생종 36101 및 만생종 36122에 대한 광주기 차이 및 가뭄 스트레스 상에서 피루브산, 당 함량 HPLC 분석 - 후보 유전자들의 조생종 만생종에 대한 발현 분석 	이중반수체(double haploid) 양파 조생종 36101과 만생종 계통인 36122의 광주기 차이와 가뭄 스트레스에 대한 피루브산과 당 함량의 차이를 HPLC 분석을 통하여 확인하였으며, FT유전자들의 위 두 가지 대비 계통 사이의 발현 차이를 확인
양파 노균병 저항성 분자 마커 개발	<ul style="list-style-type: none"> - AFLP를 이용한 Pd resistance locus의 노균병 저항성, 이병성 계통에 대한 실증시험 	A. roylei로부터 도입된 노균병 저항성 유전자를 동정하여 A. cepa에 적용하기 위해 동정된 유전자 locus에 위치한 마커를 이용해 HRM 마커를 개발하여, 양파의 노균병 저항성/감수성 소재에 실증시험
배추에서 abiotic stress에 의해 유도된 BZR 전사인자 family의 특징 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 배추의 BZR 유전자 family 동정 및 분류 - 생물학적, 비생물학적 스트레스관련 후보 유전자의 발현 및 구조분석 	배추의 BZR 유전자 family로부터 스트레스 처리 후 발현분석을 통해 후보 유전자 선별
양파의 저온 특이적 microsatellite 마커 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 양파 데이터베이스에서 EST와 gDNA sequence 수집 및 확보 - SSR finding program을 이용한 primer 디자인 - 저온 처리 양파에서의 유전자 발현 분석 	양파의 저온 처리한 샘플로부터 저온관련 후보 유전자들을 발현 분석을 통해 선별한 후 이들의 유전자에 해당하는 부위에서 sequence 분석을 진행한다. 저온 내성을 나타내는 소재를 이용해 관련 분자 마커를 개발
양배추 transcriptome 분석에 의한 집중강세 관련 유전자 동정 및 발현 해석	<ul style="list-style-type: none"> - 문헌을 통한 양배추 집중강세 검색 - NCBI를 통한 주요 유전자 동정 - 집중강세 샘플에 유전자 대입 - qRT-PCR을 통한 발현양 확인 - RNA-seq을 통한 transcriptome 분석 	집중강세에 특이적인 발현양을 보이는 51개 유전자의 homologues를 찾아 qRT-PCR을 이용하여 발현 수준을 확인

<p>양배추의 저온 관련 bZIP 전사인자 동정 및 발현 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 배추의 bZIP 전사인자 분석 방법을 기초로 양배추의 bZIP family 분석 - 양배추의 119개 bZIP 후보 유전자들 중 아미노산 염기서열의 차이를 바탕으로 grouping 분석 - 저온 저항성(BN106) 및 이병성 (BN107) 계통에 대한 RT-PCR 및 qRT-PCR을 통한 후보 유전자의 확인 시험 	<p>저온 저항성 양배추 계통인 BN106에는 변화가 없고 이병성 계통인 BN107에서 높게 발현하는 3개의 유전자, Bol008071, Bol033132 및 Bol042729를 확인</p> <p>특히, Bol031132는 Bra020735와 저온에 반응하여 똑같은 발현 양상을 보이고, N-rich 영역을 가진 LCR을 가짐.</p> <p>N을 포함하는 영역을 가진 BolbZIP 단백질은 저온 스트레스 반응과 밀접한 관련성이 있음</p>
<p>양배추에서 스트레스에 대한 Alfin-like 전사인자의 동정 및 발현 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - BRAD database에서 배추의 15개 BrAL 확인, 애기장대를 기준으로 4개 군으로 분류 - In silico 기술을 이용하여 14개의 BrAL 유전자의 염색체 상 위치 확인 - 14개 후보 유전자의 기관 특이적인 발현분석 - 14개 후보 유전자의 비생물학적, 생물학적 스트레스에 대한 특이적인 발현 수준 분석 	<p>BrAL2, 3, 7, 9, 12, 13, 14 및 15 유전자들은 모든 비생물학적인 스트레스에서 높은 발현 수준을 보였고, BrAL2, 3, 4, 7, 9, 10, 13, 14 및 15 유전자들은 시들음병과 같은 생물학적 스트레스에도 높은 발현 수준을 나타냄,</p> <p>특히, BrAL2, 3, 7, 9, 13, 14 및 15 유전자들은 생물학적 스트레스와 비생물학적 스트레스에 공통적으로 발현 수준이 높은 것을 확인</p>
<p>양배추에서 뿌리혹병 발달동안 Methyl salicylic acid gene 발현 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 양배추의 뿌리혹병균 접종 방법 습득 - 뿌리혹 병균 접종 후 시간별 RNA 샘플링 - methyl salicylic acid genes 탐색 - 후보 유전자들에 대한 qRT-PCR을 통한 발현 분석 	<p>양배추에 뿌리혹 병균을 접종 하여 시간별 뿌리혹 발달 양상을 확인. 시간별 샘플링하여 methyl salicylic acid 유전자들의 발현 양상을 통해 뿌리혹병 관련 후보 유전자 선발</p>
<p>양배추에서 비생물학적 스트레스에 의 SGT1 유전자들의 동정 및 발현 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 양배추에 비생물학적 스트레스 처리 - 스트레스 관련 유전자 탐색 및 정보 확보 - RT-PCR을 통한 후보 유전자 확인 	<p>양배추에 비생물학적 스트레스를 처리 후 탐색한 관련 유전자들에 대해 발현 양상을 확인하여 후보 유전자를 탐색, 선발 가능</p>
<p>양배추에서 Cold관련 GST superfamily 유전자들의 Genome-wide 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 양배추의 데이터베이스를 이용한 cold 관련 GST superfamily 유전자들의 정보 확보 - GST 유전자들의 계통발생학적 분석 - RT-PCR을 이용한 관련 유전자 동정 	<p>Cold 관련 유전자들에 대해 계통발생학적 분석을 통해 그룹핑을 하고, 동정된 유전자들의 발현 분석을 통해 후보 유전자 선발하여, cold 관련 유전자들의 특성을 분석</p>
<p>양배추에서 Sinigrin 상호작용의 구조에 대한 Myrosinase의 molecular modeling</p>	<ul style="list-style-type: none"> - myrosinases의 모델 구조 구축 - 10 N-glycosylation 부위와 3개의 disulfide bridges를 확인 - 아미노산의 정제된 모델 확인 	<p>Myrosinase-sinigrin의 상호작용을 더 명백하게 이해하기 위해 Autodock Vina를 활용하여 결정적으로 중요한 아미노산의 정제된 모델을 확인. GLN207과 GLU427이라는 중요한 친핵제 잔기가 sinigrin과 수소결합을 형성하여 상호작용하는 것으로 확인</p> <p>20개의 염기가 myrosinase-sinigrin의 복합구조를 안정적이게 해주며, GLU207의 잔기가 수소결합의 안정성을 도와주는 중요한 단서임을 시뮬레이션을 통해 밝힘</p>
<p>양배추 아종의 식용부위에서 glucosinolate 함량과 생합성 유전자의 발현 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 양배추류의 아종에서 각 식용부위에 대해 glucosinolate 함량 분석 - HPLC 분석 - glucosinolate 생합성 pathway로부터 유전자 탐색 	<p>HPLC 분석을 통한 양배추류의 아종에서 식용부위에 대해 glucosinolate 함량을 분석하여 생합성 pathway에서 관련 유전자들에 대한 qRT-PCR 분석을 통해 발현 양상을 확인, 관련 후보 유전자 확인</p>

양배추에서 45S ribosomal DNA의 intergenic spacer 염기서열에 대한 다양성 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 다양한 양배추 소재 수집 - 45S ribosomal DNA intergenic spacer에 대한 정보 수집 - 타겟 region의 PCR 및 sequencing을 통한 sequence 확보 	수집된 양배추 계통들로부터 45S ribosomal DNA intergenic spacer에 대한 sequence 정보를 획득하여 계통들 간의 다양성 분석이 가능
배추의 비생물학적 스트레스 조건하에서 CBL 유전자의 발현 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 배추에서 CBL 단백질의 분류 및 저온, 건조, 염분에 대한 비생물학적 스트레스에 대한 유전자의 발현 패턴 분석 	배추에서 17개의 CBL 단백질을 선별하고 5개의 그룹으로 분류하여 비생물학적 스트레스에 반응하는 6개의 유전자 확인
배추에서 스트레스 관련 Aquaporin 유전자들에 대한 동정 및 스트레스 반응 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 배추의 데이터베이스로부터 스트레스 관련 유전자들의 동정 - 생물학적, 비 생물학적 스트레스들에 대해 선별된 유전자들의 발현 분석 - 스트레스에 대해 저항성 및 감수성인 개체 선별 	스트레스에 대해 저항성 및 감수성인 개체를 확보하여 선별된 유전자들의 발현 분석을 통해 스트레스 관련 후보 유전자 선별이 가능. 또한, 이들 유전자들로 스트레스 저항성 개체 선별
배추에서 생물학적, 비생물학적 스트레스에 대한 PDI gene family에 대한 동정 및 발현 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 배추의 transcriptome 분석에 의한 스트레스관련 유전자 정보 확보 - 배추 이외의 다른 작물에서 스트레스 관련 유전자 정보 확보 - 유전자 동정을 위한 primer 디자인 - RT-PCR/Sequencing 	스트레스 관련 PDI 유전자들에 대해 정보를 수집하여 스트레스 처리후 시간별 PDI 유전자들의 발현 패턴 분석
배추에서 생물학적, 비생물학적 스트레스에 대한 MYB transcription factor에 대한 동정 및 발현 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 배추의 MYB family 유전자 탐색 및 아미노산 차이에 따른 분류 - 생물학적, 비생물학적 스트레스 처리 후 MYB transcription factor의 qRT-PCR을 통한 발현 수준 확인 및 후보 유전자 선별 	배추의 염분, 가뭄, 저온 등 비생물학적 스트레스 및 병관련 생물학적 스트레스에 관련이 있는 MYB transcription factor 선별
Brassica류 작물의 DNA barcoding	<ul style="list-style-type: none"> - Brassica류 작물에 대한 색소체 유전자의 암호화된 영역(rpoB, rpoCl, rbcL, matK, and 23SrDNA)과 암호화되지 않은 영역(trnH-psbA, atpF-atpH and psbK-psb1)에 대한 식물종 간의 multilocus 바코딩 연구 	주요 바코딩 유전자들인 ITS, ITS 2, MATK, 및 RBCL 에 대한 계통분석을 실시하여 배추 속에 이용한 가능한 유전자를 선별
배추의 내한성 및 내동성 관련 유전자의 microarray 분석	<ul style="list-style-type: none"> - DH인 Chiifu와 Kenshin 배추 계통을 저온 처리 후 Br135K microarray 분석 	Chiifu 계통에서 PLATZ TFs family protein (Bra023280), MADS-box TFs family protein (Bra035685), BrWRKY33(Bra00064) 등 3개의 유전자, Kenshin에서 MYB-like TFs family protein (Bra012471), bHLH (BrICE2, Bra019794) 등 2개의 유전자 선별
배추 및 양배추에서 전체 지놈상에서 비생물학적 스트레스에 발현 반응을 보이는 carotenoid oxygenase 유전자의 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 흰배추 계통인 Kenshin과 속노란배추 계통인 Wheessen의 잎에서 루테인과 β-카로틴의 함량 분석(HPLC) - 배추 Br300K 올리고머 칩을 이용한 Kenshin과 Wheessen에 대한 전사체 분석 - RT-PCR을 통한 재검증 실험 	노란 색소에 특이적으로 발현한 유전자들 가운데, 흰 배추와 노란 배추간의 PI(probe intensity) 값의 차이가 10배 이상인 유전자를 분류하여, 노란 색소와 매우 밀접한 관련성을 가진 Brapa_ESTC013161 (A20/AN1-like zinc finger protein), Brapa_ESTC025847 [BIM1 (BES1-interacting MYC like protein1)], 및 Brapa_ESTC006452 [ZFP8(Zinc finger protein8)], 총 3개의 후보 유전자들을 선별
양파에서 Flowering Locus T homolog에 대한 동정	<ul style="list-style-type: none"> - 이용 소재 : 36101, 36122, santero - flowering locus 6 gene으로부터 3개의 유전자 cloning 및 sequencing - SNP 탐색 	양파에서 early and late type의 소재를 이용하여 개화 관련 6개의 유전자들로부터 3개의 FT1, FT5, FT6 유전자들에 대해 sequencing하여 SNP 확인, RT-PCR을 통해 homolog 유전자 선별

<p>양과에서 transcriptome 분석에 의한 shoot development 유전자들의 비교 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - RNA-seq - DEG(16), SNPs(90), SSRs(79) 유전자 선별 - qRT-PCR을 통해 발현 비교 	<p>양과의 RNA-seq데이터를 기반으로 기존에 보고된 non-redundant 데이터베이스를 통해 aligning을 수행, 총 92862개 유전자들이 동정되었고, 이 중 선별된 유전자들에 대해 발현 분석</p>
<p>갯무 유래 새로운 CMS 소재 탐색</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 239종 갯무 유전자원에서 유형 확인 - 특이적 ORF138 primer 제작 및 qDNA PCR 확인 - Ogura CMS와 다른 특이적 유형 탐색 - Ogura CMS와의 비교시험을 통한 마커 가능성 확인 	<p>국내 종묘회사에서 사용하는 Ogura CMS의 특허권 문제로 육종에서 이용이 어려운 문제를 해결하기 위해서 새로운 CMS소재 탐색 및 개발</p>
<p>원예작물의 세포막 수용체 kinase의 관한 인산화 신호전달 네트워크 해석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 300여개의 LRR-RLKs중 응용소재 가능성 유전자 screening - 단백질 분리, 효소 활성 분석, Western hybridization 	<p>양배추와 배추의 BAK1 receptor kinase의 기능분석</p>
	<ul style="list-style-type: none"> - 식물의 생장과 환경, 병저항성 유전자 탐색(RPK1, CEPR1 등) - CRR1a 유전자의 클로닝과 재조합 단백질의 특징 규명 	<p>원예작물 응용소재 탐색</p>
	<ul style="list-style-type: none"> - 인산화 sites의 기능분석 	<p>BoBAK1등세포막 수용체 단백질의 인산화 sites 판별 및 기능분석</p>
<p>원예종자사업단 연구성과 관리 시스템 구축</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 홈페이지 및 DB를 이용한 연구 성과 정보 통합관리 시스템 개발 및 운영 	<p>장기간 대규모의 연구 사업에서의 연구 성과 정보관리를 체계적으로 수행할 수 있는 정보 통합관리 시스템 개발</p>
	<ul style="list-style-type: none"> - 진도관리 시스템을 활용한 연구 진도관리 및 진행상황 모니터링 	<p>연구 성과 지표와 연계하여 사업단의 평가에 활용 가능한 성과관리 모델 개발</p>
	<ul style="list-style-type: none"> - 연구 성과관리 시스템을 바탕으로 한 사업단 성과관리 및 평가 	<p>연구 성과 정보의 체계적인 수집 및 축적을 통해 추후 중/장기적인 파급효과의 확인을 위한 추적평가관리 시스템에 활용 가능한 정보 제공</p>

제2절 연구개발 결과

1. 토마토 병 및 형질관련 SNP 마커 개발

가. 연구 요약

토마토에서 발병하는 주요 병해로는 줄기마름병(*Alternaria stem canker*), 세균성점무늬병(*Bacterial spot*), 잎곰팡이병(*Leaf mold*), 풋마름병(*Bacterial wilt*), 근부위조병(*Fusarium crown and root rot*), 시들음병(*Fusarium wilt*), 흰가루병(*Powdery mildew*), 고구마선충뿌리혹병(*Nematoda root knot*), 역병(*Late blight*), 겹무늬병(*Early blight*), 세균성반점병(*Bacterial speck*), 갈색근부(뿌리썩음)병(*Corky root rot*), 토마토점무늬병(*Gray leaf spot*), 얼룩시들음병(*TSWV*), 담배모자이크바이러스(*ToMV*), 황화잎말림바이러스(*TYLCV*) 등이 있으며, 이는 토마토의 품질 및 수확량을 크게 저하시키고 있어 문제가 되고 있는 질병이다. 또한 토마토를 육종하는 데 있어서, 다양한 대과종의 과색, 과형(*Fruit shape and size*)이나 화방수(*Inflorescence branch number*), 과실이 착과되는 차례가 유한 및 무한의 여부에 관한 특성은 중요한 형질인자로 작용한다. 특히, 수확한 토마토 과실이 장기적으로 저장 및 유지되는 토마토 작물의 육성을 위해서는 과실 숙기에 관여하는 *fast & slow ripening(NOR)* 유전자 등을 고려하여 육종을 해야 한다.

따라서 본 연구에서는 토마토 육종에 중요한 인자인 병 및 형태 관련 유전자들을 탐색하여 MAS(marker assisted system)에 적용시킬 수 있는 marker 및 SNP chip을 개발을 목표로 하였으며, 총 51개의 유전자 중 22개의 SNP를 확보하였고, 26개의 SNP는 탐색 중이며, 24개 조합의 SNP chip을 개발 중에 있다.

나. 연구 결과

1) 흰가루병(*Powdery mildew*) (*Oidium neolycopersici*) 저항성 SNP마커 개발

흰가루병 (*Oidium neolycopersici*)의 저항성 관련 QTL 2 영역이 토마토 염색체 12번에 위치하고 있음이 확인되었으며, Seifi 등(2014)은 RFLP 마커 (CT100)를 이용하여 QTL에 위치한 흰가루병 저항성 및 이병성 유전자를 보고하였다. HRM(High Resolution Melting)을 수행한 결과 흰가루병의 저항성과 이병성 간에 유전자형이 확실히 구분되는 것을 확인하였다.

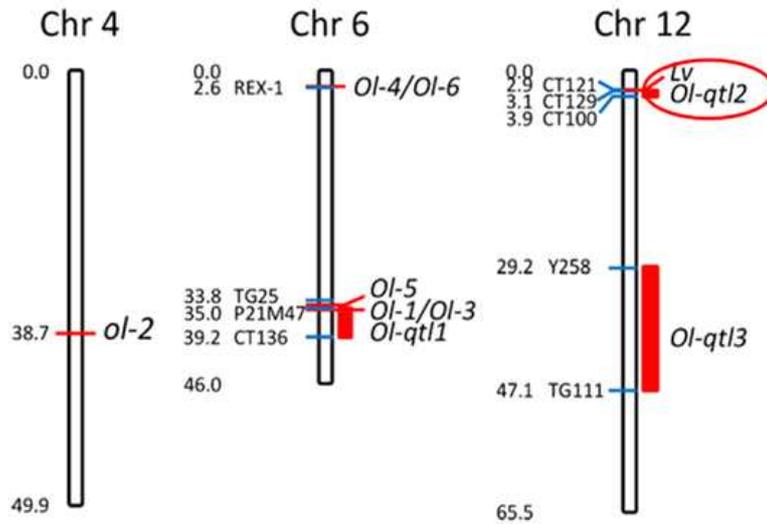


그림 1. 토마토의 4, 6, 12번 염색체 상에 위치하는 흰가루병 저항성 관련 마커(파란색 선) 및 흰가루병 저항성 유전자의 QTL 영역(빨간색 원)

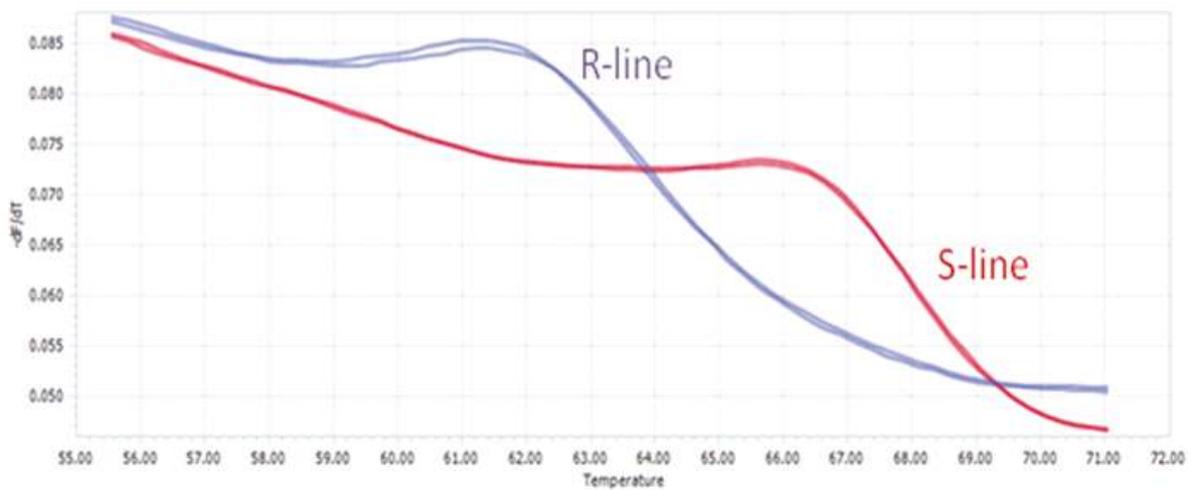


그림 2. 흰가루병 저항성 및 이병성 간의 HRM 수행 결과
R(Resistance)-저항성, S(Susceptible)-이병성

2) 역병(Late blight, *Phytophthora infestans*) 저항성 SNP 마커 개발

역병 저항성 관련 유전자인 *Ph-3* (GeneBank accession number: KJ563933)은 2,556 bp의 엑손으로 구성되어 있으며, Zang 등(2014)에 의해 보고된 851개의 aa의 아미노산 염기서열을 기초로 하여 2개의 SNP 영역을 확인하였다. *Ph-3* 유전자 정보를 통해 확인한 2개의 SNP 영역에서 2가지의 primer set를 제작한 후 probe를 사용하지 않고 HRM을 수행하였다. HRM 수행 조건으로는 95°C에서 10분을 수행한 후 95°C에서 20초, 55°C에서 20초 72°C에서 20초를 50회 반복한 다음, 95°C에서 60초와 40°C에서 100초에서 touch down을 통하여 primer를 결합시킨 후 80°C에서 4번 /°C로 데이터를 reading하여 분석하였다. HRM 수행한 결과, 본 실험에서 melting peak를 통하여 역병에 대한 저항성과 이병성 계통간의 유전자형을 구분할 수 있었다.

```

          424          434          444          890          900          910
          ↓           ↓           ↓           ↓           ↓           ↓
L3708   CCAATGGACCGGAGAAGACGA ········· GCAGATACATCGGAGGGGGATT
8-25    CCAATGGACCAGAGAAGACGA ········· GCAGATACATCGGAGGGGGATT
LA4084  CCAATGGACCAGAGAAGACGA ········· GCAGATACATAGGAGGGGGATT
          ***** *****
    
```

그림 3. 역병의 저항성과 이병성 간의 2개의 SNP 영역
(L3708 : 저항성 계통, LA4084 : 이병성 계통, 8-25 : 재조합 양친)

표 1. Ph3 유전자에 대한 HRM 수행을 위해 제작한 Primer 정보

Sl. No.	Gene name	Primer sequence		PCR Product size (bp)
		Forward	Reverse	
1	Ph3-1	Ph3-1 F	Ph3-1 R	159
2	Ph3-2	Ph3-2 F	Ph3-2 R	152

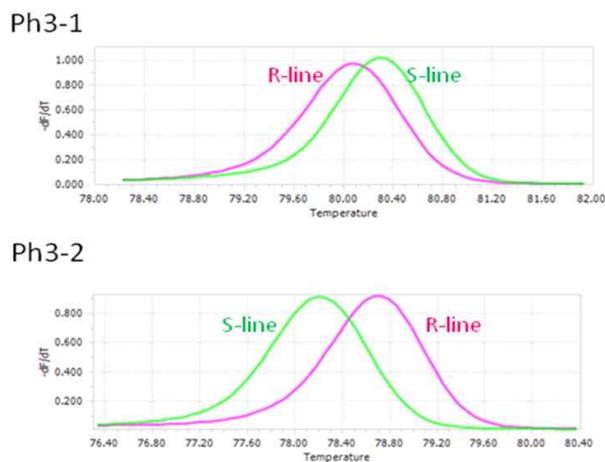


그림 4. Ph 3에 대한 HRM 수행 결과
R(Resistance)-저항성, S(Susceptible)-이병성

3) 토마토 잎곰팡이병(Leaf mold) (*Cladosporium fulvum*) 저항성 SNP마커 개발

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 보고된 *Lycopersicon hirsutum* (*Solanum habrochaites*)의 Cf4 저항성 유전자 클러스터 (AJ002235.1) 정보를 기반으로 하여 총 37,411 bp 내 Cf-4 유전자 및 Hcr9-4A, Hcr9-4B, Hcr9-4C, 그리고 Hcr9-4E와 같은 LRR 영역을 포함하는 유전자 정보를 확인하였다. 정확한 염색체 내 위치를 확인하고자 Cf-4 유전자 클러스터 내 아미노산 서열을 토마토 유전체 데이터베이스(<http://solgenomics.net/>)에서 BLAST 검색을 통해 토마토 유전체의 (SL2.40) 1번 염색체 상의 1,128,815 bp와 3,975,213 bp 사이에 Cf-4 유전자 클러스터를 확인하였다. 토마토 마커 데이터베이스를 활용하여 영역 내에 18개의 SNP 관련 primer 염기서열을 확인하였다(<http://marker.kazusa.or.jp/Tomato/>). 18개의 primer set에서 특이적으로 증폭하는지 여부를 확인하기 위하여 *Solanum lycopersicum* L. “Moneymaker” 토마토 계통에 대한 genomic DNA PCR을 수행하였고, 이에 선발된 primer set로 HRM PCR을 진행하여 저항성(R)과 이병성(S) 사이에 0.4°C의 Melting 값의 차이를 보이고 특이적인 primer set 1개를 선발하였다.

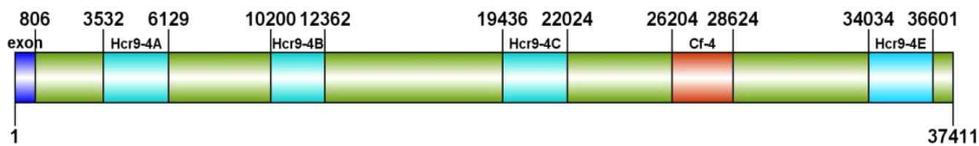


그림 5. 토마토 Cf4 저항성 유전자 클러스터 내 위치 확인(빨간색 화살표)

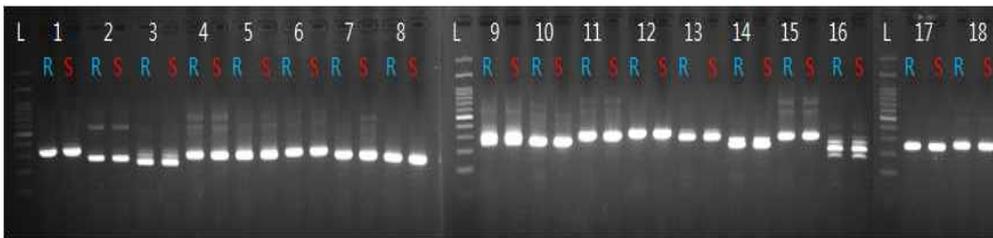


그림 6. 18개 프라이머 세트에 대한 genomic PCR 결과

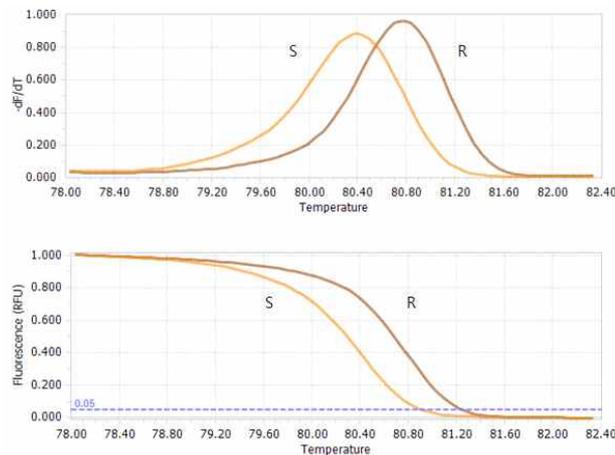


그림 7. 18개 프라이머 세트 중 저항성과 이병성 간의 차이를 보인 HRM PCR 결과

4) 풋마름병(Bacterial Wilt) (*Ralstonia solanacearum*) 저항성 SNP마커 개발

풋마름병 저항성에 관련된 주동 QTL이 밀집되어 있는 염색체 12번 영역에서 Forward-5'-CTT ATA GGC CCG CGA AAT GG-3' 및 Reverse-5'-TTC TCA GCT TGG ACA GGG TT-3'의 primer set를 이용하여 풋마름병에 이병성인 2계통과 저항성인 2계통의 gDNA를 이용하여 증폭한 PCR 산물을 cloning한 후 sequencing 하여 아래와 같은 저항성 및 이병성 계통의 염기서열을 분석하였다. 염기서열 중에서 3개의 SNP 영역과 1개의 deletion 및 2개의 insertion 영역을 확인하였다. HRM를 통하여 marker 검정을 수행하기 위해 각각의 3개의 SNP 및 2개의 insertion 영역을 기준으로 2개의 primer set과 4개의 probe를 제작하여 HRM 실험을 수행하였다. 그 결과 T/A의 SNP 영역을 제외한 3개의 probe 에서 풋마름병 이병성과 저항성 계통 간을 뚜렷하게 분리해 낼 수 있었다.

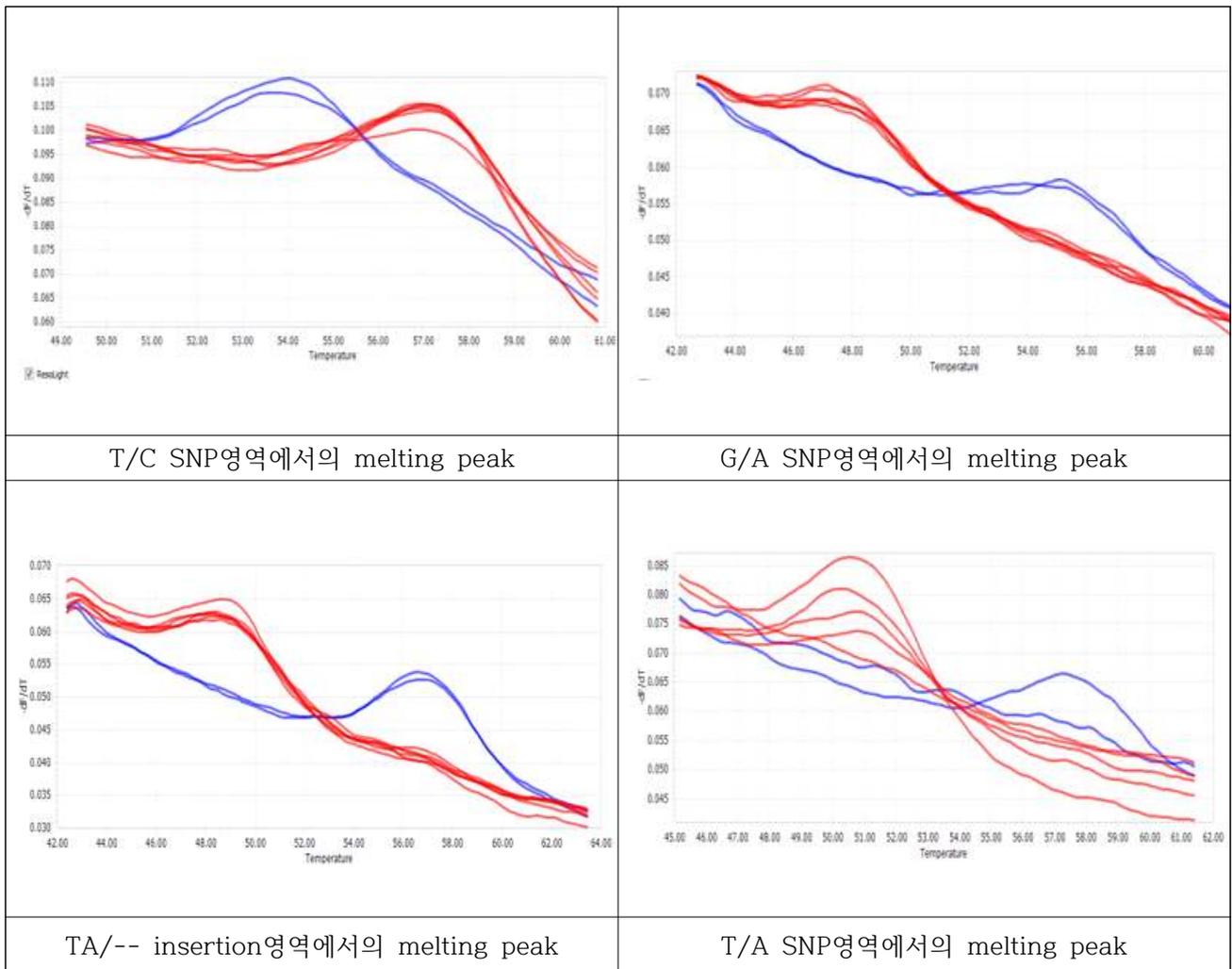


그림 8. 풋마름병 HRM 수행 결과 (빨간색 선: 이병성 계통, 파란색 선: 저항성 계통)

5) 토마토 과숙 억제(ripening inhibitor) 관련 유전자를 이용한 HRM용 마커 개발

토마토 과숙 억제(ripening inhibitor)와 관련된 RIN(normal ripening; AF448522)과 *rin*(ripening inhibitor; AF448523) 유전자의 염기서열을 분석하였을 때 RIN에서의 CDS 영역의 염기서열은 729 bp이었으며, *rin*에서의 CDS 영역의 염기서열은 1,194 bp으로 나타났다. 두 유전자를 비교해보면, *rin*에서 465 bp가 더 길었으며 1~644 bp(RIN에서 exon 7)까지 염기서열이 상동성이 높았고 그 이후에는 서로 다른 염기서열을 가지고 있었다. RIN 및 *rin* 유전자와 관련된 토마토 계통을 이용하여 RIN 유전자의 promotor 부분의 약 1.5kb와 각각의 intron 영역을 sequencing을 분석한 후 특이적인 SNP의 영역을 발견하지 못하였다. 그러므로 RIN와 *rin*의 염기가 다른 644 bp의 염기서열 이후의 genomic DNA 염기를 얻기 위해 RIN에서는 F(Forward)-5'-AAG TGT ACA ATA TAG ACA TGA ACA GCC TTC T-3' 및 R(Reverse)-5'-CCA TAC TCT TCT TGA CAA TAA ATA TAT CAC AAT-3'와 *rin*에서는 F-5'-GGA AGA ACT TGG TGT TAC CTT TC-3' 및 R-5'-CAA TTA AAG CAA CTT CAG CAT CAC-3'를 이용하여 cloning 및 sequencing을 수행하였다. Forward primer 1개와 Reverse primer 2개 및 probe 2개를 제작하여 HRM을 수행하였다. 그 결과 *rin* probe를 이용한 HRM 결과가 좋았으며, RIN 및 *rin*과 hetero를 확실하게 구분할 수 있었다.

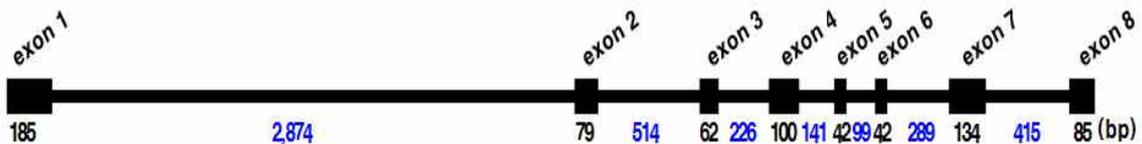


그림 9. 정상 RIN 유전자의 물리 구조

(파란색 숫자: intron size ; bp)

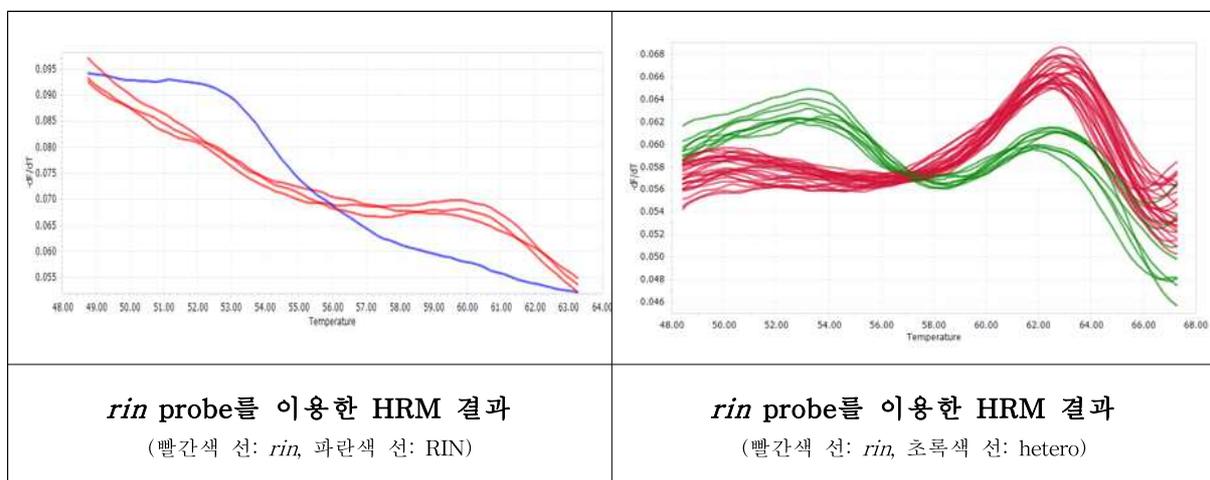


그림 10. *rin* 과 RIN 및 hetero 계통을 이용한 HRM 실험 결과

6) 토마토 근부위조병(*Fusarium crown and root rot*) 관련 유전자를 이용한 HRM용 마커 개발

토마토 근부위조병의 저항성에 관련된 유전자인 J3의 PCR-CAPS 마커인 F-5'-CGA GTG GTG CAG TTG AGA AG-3' 및 R-5'-TTG CCA AAG GTT GCA ATA CA-3'를 이용하여 J3에 저항성 및 이병성 계통의 gDNA를 가지고 sequencong 및 cloning을 수행하였다. 그 결과 아래와 같이 J3에 대한 저항성 및 이병성 계통 간에 SNP 및 deletion 부분과 insertion 영역들이 존재하고 있었다. 이 중 primer와 probe 제작에 적합한 영역을 디자인한 후 HRM을 수행한 결과, 토마토 근부위조병에 대하여 저항성 및 이병성, Hetero를 매우 뚜렷하게 구분할 수 있었다.

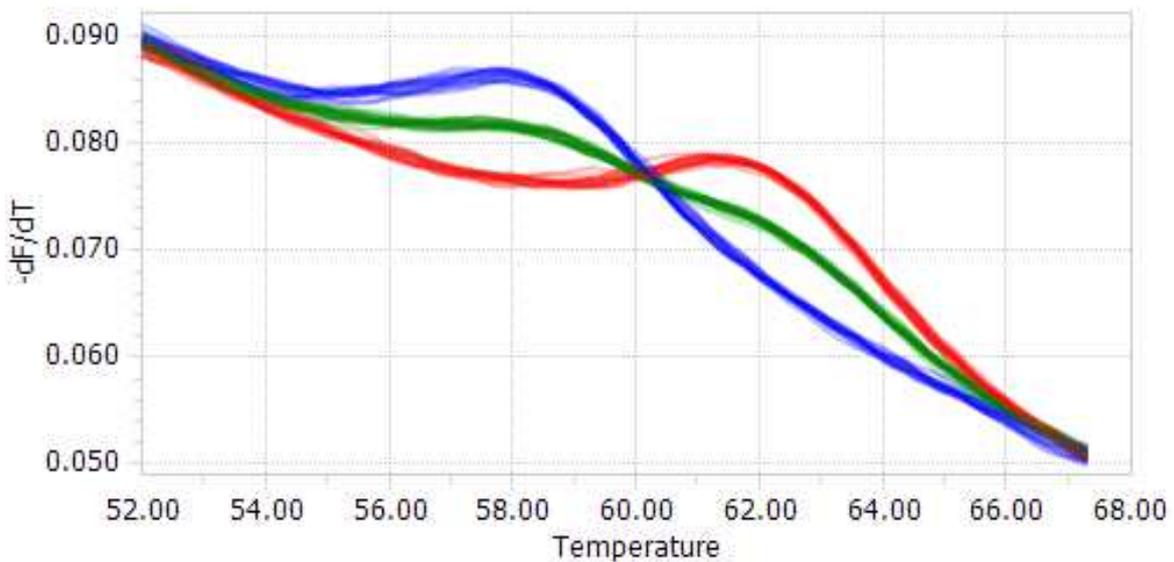


그림 11. J3에 대한 이병성, 저항성 및 hetero 샘플에 대한 HRM 수행 결과
(빨간색 선: 이병성, 파란색 선: 저항성, 초록색 선: Hetero)

7) 토마토 순도검정용 chip을 위한 assay 제작

토마토 순도검정용 chip을 위한 assay를 제작하기 위해 kazusa(<http://marker.kazusa.or.jp/>) 웹사이트로부터 아래와 같이 염기서열을 수집하였으며, 이중 assay 제작이 가능한 26개에 대해서 현재 제작중이다.

	Target Name	Type	Info	FLUIDIGM ASSAY ID	% GC	Design Rank
1	>1581_673	Sequence	...CTG[A/T]TTT...	GTA0115492	43%	High
2	>2503_859	Sequence	...ACG[C/T]GAG...	GTA0115485	49%	High
3	>3850_896	Sequence	...TCA[T/C]TTC...	GTA0115478	37%	High
4	>6172_1047	Sequence	...ATC[C/A]CCA...	GTA0115489	47%	High
5	>10197_766	Sequence	...GAC[A/G]TTA...	GTA0115486	40%	High
6	>8929_261	Sequence	...GCG[T/C]TAA...	GTA0115469	41%	High
7	>9234_127	Sequence	...CTA[C/T]CTT...	GTA0115491	46%	High
8	>1622_2500	Sequence	...AGC[T/C]ACA...	GTA0115471	41%	High
9	>5191_250	Sequence	...ATT[G/A]TTG...	GTA0115480	38%	High
10	>9503_532	Sequence	...CAT[T/C]TGT...	GTA0115490	50%	High
11	>9535_209	Sequence	...GGA[C/T]TGA...	GTA0115481	47%	High
12	>4199_1031	Sequence	...GTG[T/C]TGT...	GTA0115494	54%	High
13	>9455_255	Sequence	...TGT[A/T]GAG...	GTA0115470	39%	High
14	>13496_375	Sequence	...AAT[G/A]AGT...	GTA0115477	38%	High
15	>7273_256	Sequence	...ATA[T/C]CTT...	GTA0115479	48%	High
16	>3000_116	Sequence	...CAT[A/T]TCC...	GTA0115488	47%	High
17	>5821_1435	Sequence	...CTC[G/C]ACT...	GTA0115487	50%	High
18	>14321_154	Sequence	...CAA[T/C]AAT...	GTA0115473	25%	High
19	>9865_124	Sequence	...TCA[A/C]TCT...	GTA0115475	42%	High
20	>14109_151	Sequence	...TAA[C/T]GTT...	GTA0115483	38%	High
21	>4563_105	Sequence	...AAA[T/A]CAG...	GTA0115472	47%	High
22	>13536_438	Sequence	...ACA[C/G]TAA...	GTA0115484	30%	High
23	>8632_326	Sequence	...TAC[A/G]TGG...	GTA0115493	58%	High
24	>9881_1420	Sequence	...CCG[T/C]GAC...	GTA0115474	52%	High
25	>13470_755	Sequence	...CAT[C/T]ATG...	GTA0115476	35%	High
26	>5107_1099	Sequence	...CCG[C/T]GAT...	GTA0115482	51%	High

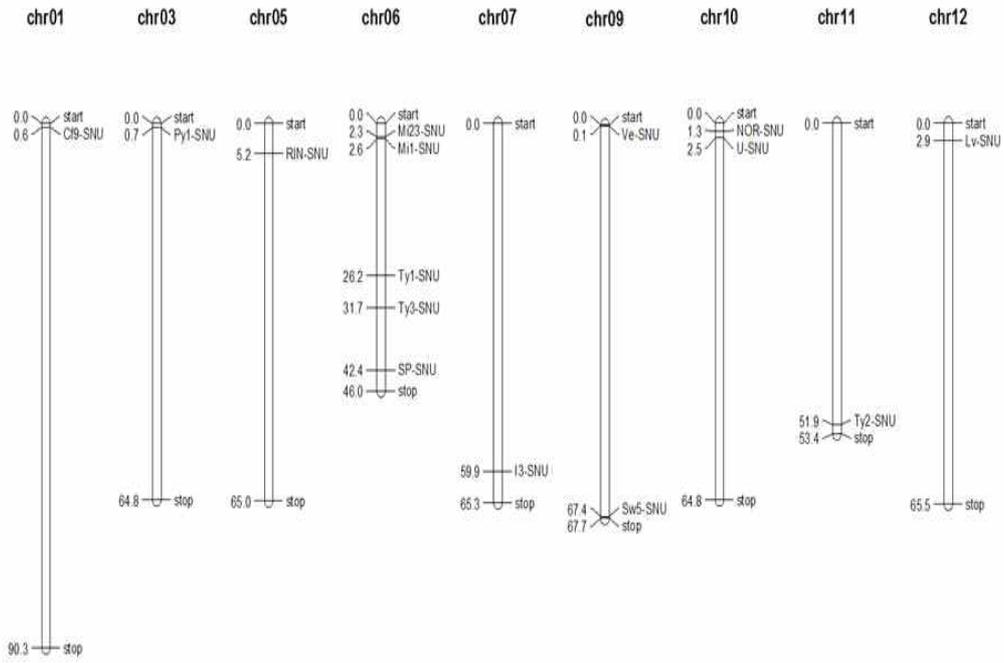


그림 12. 토마토 염색체 상에 질병과 형태에 관여하는 마커의 위치

표 2. 토마토 질병 및 형태 관련 연구 진행 상황

No.	병원균	분야	병원균	보고된 유전자	유전자	진행상황
1					Cf9	
2		잎곰팡이병 (Leaf mould)	<i>Cladosporium fulvum</i>	<i>Cf-1, Cf-2, Cf-4, Cf-5, Cf-9, Cf-ECP2</i>	Cf23	S,R 샘플이 없어 중단 (primer 제작완료)
3	곰팡이	시들음병 (<i>Fusarium wilt</i>)	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	<i>I, II, I2, I2C, I3</i>	I2	
4					I3	
5		흰가루병 (Powdery mildew)	<i>Leveillula taurica</i>	Lt (<i>Lv</i>)	Lv	
6		반신위조병, 반쪽시들음병 (<i>Verticilium wilt</i>)	<i>Verticilium dahliae</i>	V, Vd (<i>Ve-1</i>)	Ve	
7		갈색근부(뿌리썩음)병 (Corky root rot)	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	<i>Py-1</i>	Py1	
8	선충	고구마선충뿌리혹병 (Nematoda root knot)	<i>Meloidogyne incognita</i>	<i>Mi, Mi-1, Mi-2, Mi-3, Mi-9</i>	Mi1	
9					Mi23	
10	세균	세균성반점병(Bacterial speck)	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tomato(Pst)</i>	<i>Pto, Prf</i>	Pto	cloning 중
11		토마토반점위조바이러스 얼룩시들음병(TSWV)	<i>Tomato spotted wilt virus</i>	Sw-5	Sw5	
12		담배모자이크바이러스 (ToMV)	<i>Tomato mosaic virus</i>	<i>Tm-1, Tm-2(a)</i>	Tm2a	
13	바이러스	황화잎말림바이러스 (TYLCV)	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	<i>Ty-1(Q), twoother Q, Ty-2, Ty-3, Ty-4, Ty-5</i>	Ty1	
14					Ty2	
15					Ty3	
16					Ty5	
17	숙기	NOR(fast ipening), nor(non ripening)			NOR	
18		RIN(fast ripening), rin(ripening inhibitor)			RIN	cloning 중
19	화서	SP(self pruning), Indetermine(non-self pruning)			SP	
20	과체	U(non-green back), G(green back)			U	

8) 토마토 황화잎말림 바이러스(TVLCV, tomato yellow leaf curl virus) Ty-1/Ty-3 저항성 SNP마커 개발

토마토 황화잎말림 바이러스 (TYLCV, tomato yellow leaf curl virus)는 토마토 생산량을 저하시키는 주요 병해 중의 하나이다. Caro 등 (2015, Mol Breeding)에 의해 보고된 바로는 TYLCV는 *Solanum chilense*의 병원균에 의해 발생되며 이와 관련된 유전자는 Ty-1과 Ty-3로 이 유전자는 서로 대립유전자로 밝혀졌다. Ty-1/Ty-3의 유전자는 RNA-dependent RNA polymerase (RDR)에 속하며, DFDGD catalytic domain을 포함하고 있다. Ty-1/Ty-3의 저항성 유전자를 가지고 있는 line(계통)에서 3개의 특이적인 아미노산과 상호작용하고 있었으며, 이 3개의 아미노산의 SNP 위치에 대하여 HRM용 마커를 개발하였다. 그 결과 Ty-1/Ty-3 저항성과 이병성 간에 유전자형이 확실히 구분되는 것을 확인하였으며, 그 중 예상했던 위치와 가장 일치하는 A616V 최종적으로 선발하였다.

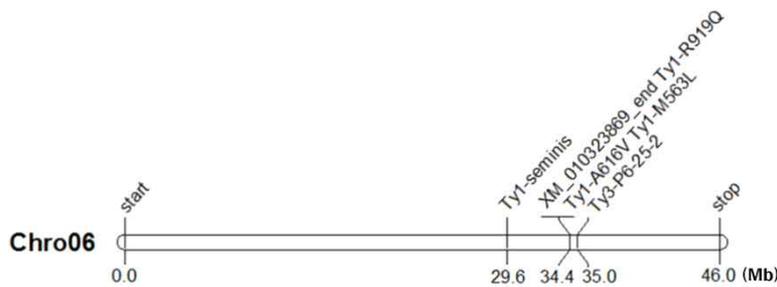


그림 13. 토마토의 Ty-1 및 Ty-3 기존 마커와 새롭게 개발한 3개 SNP 위치의 마커 영역

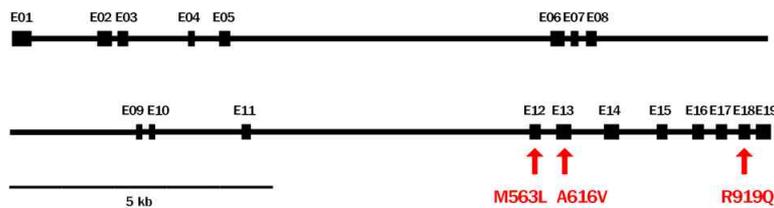


그림 14. Ty-1/Ty-3 유전자의 구조 및 3개의 SNP 위치 (굵은 네모: exon, 가는 선: intron)

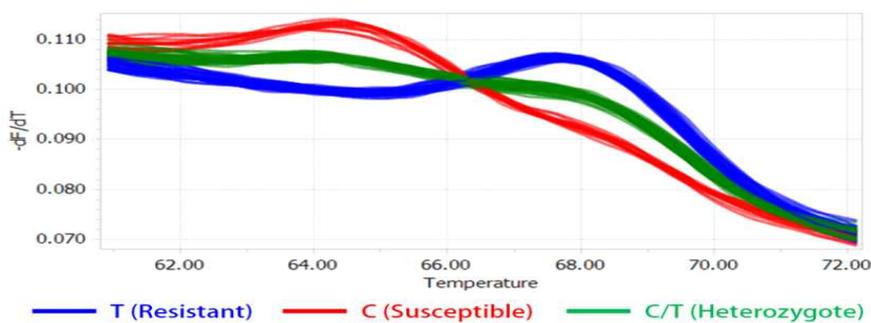


그림 15. A616V 위치의 HRM 테스트 결과

9) 토마토 근부위조병 (FORL, fusarium crown and root rot) J3 저항성 SNP마커 개발

토마토 근부위조병(FORL, fusarium crown and root rot)은 토마토 생산량을 저하시키는 주요 병해 중의 하나이다. GSP과제에 참여하고 있는 부산대학교 박영훈 교수가 육성시킨 RIL 및 F2 집단 분석을 통해 발견한 cLET-2-D4 저항성 영역의 SNP 위치를 이용하여 HRM 검정을 수행한 결과 근부위조병에 저항성과 이병성 라인 간의 유전자형을 확실히 구분할 수 있었다.



그림 16. 염색체 상의 J3-cLET-2-D4의 위치

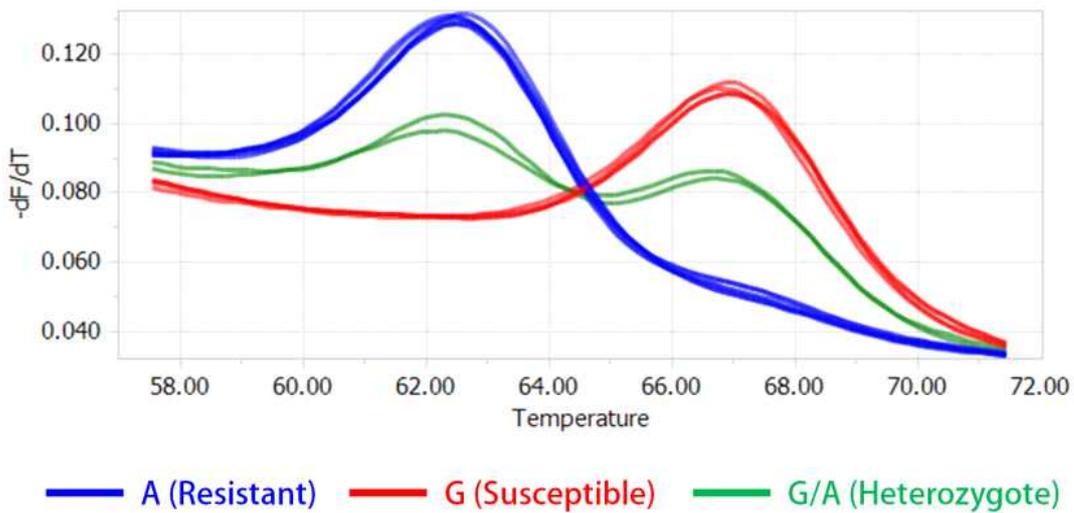


그림 17. J3-cLET-2-D4 위치의 HRM 테스트 결과

10) 토마토 응성불임성 판별 SNP마커 개발

토마토 응성불임성은 토마토 품종을 육성시키는데 중요한 요인 중 하나이다. 융단조직의 발달 및 퇴화에 관여하는 *Ms10³⁵* (Rick, 1948; Zamir *et al.*, 1980; Corral-Martínez *et al.*, 2011) 유전자가 보고되어 있으며, Jeong 등 (2014)이 융단조직의 발달뿐만 아니라, *Ms10³⁵*의 유전자가 mutation을 발생하여 응성불임을 유발한다고 보고하였다. *Ms10³⁵* 유전자를 가임과 응성불임을 보이는 계통의 genomic DNA sequencing 한 결과, *Ms10³⁵* 유전자의 2번째 인트론 부위에서 가임과 불임 간의 SNP를 찾았다. 발견된 SNP를 HRM 마커로 전환시켜 HRM 검정을 수행한 결과 가임과 불임을 확실히 구별할 수 있었다.

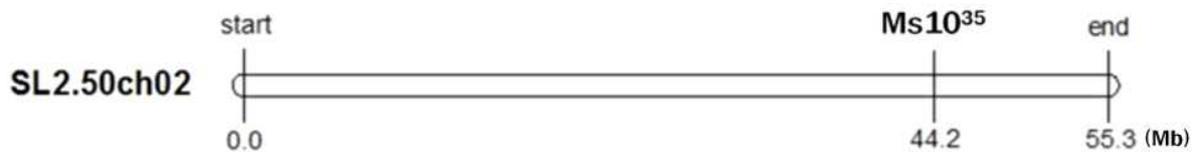


그림 18. 염색체 상의 *Ms10³⁵*의 위치

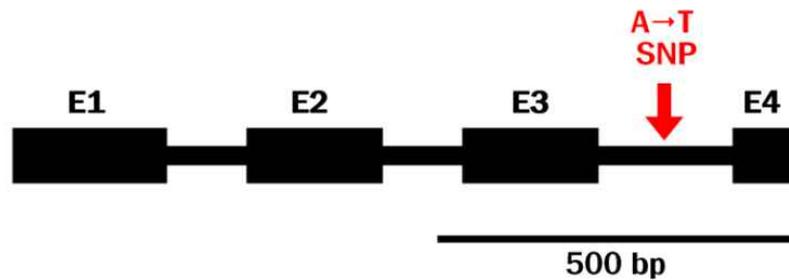


그림 19. *Ms10³⁵* 유전자의 구조 및 SNP 위치

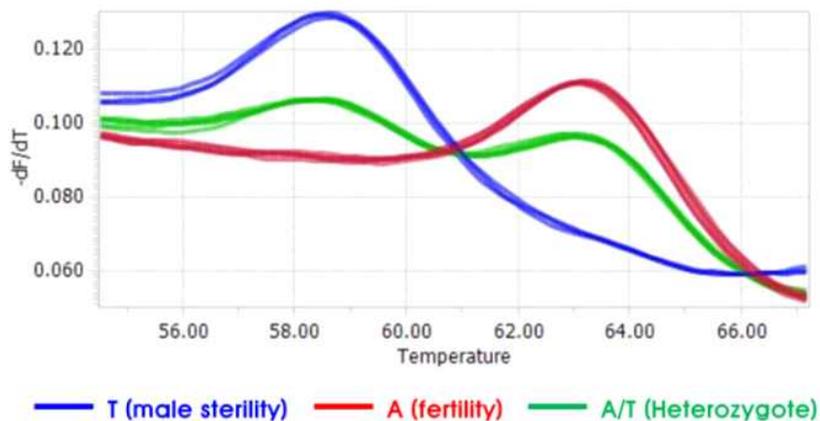


그림 20. *Ms10³⁵* 위치의 HRM 테스트 결과

11) 토마토 pink color 마커 개발

국내에서 대과종 토마토 육종하는 데 있어서 pink color의 선호도가 높다. Lin 등 (2014)에 의해 pink color 유전자가 mutation에 의하여 발현되는데 이는 MYB12 유전자의 start codon으로부터 -4,865 bp 영역 중 603 bp deletion 부분과 2번째 exon의 early stop이 생기는 'A' adding과 SNP가 관여한다고 보고하였다. 반면 본 연구팀은 2번째의 intron의 시작 부분의 SNP로 인한 mutation으로 pink color의 발현에 관한 새로운 위치를 발견하였으며 그 SNP를 검정할 수 있는 HRM에 적용시켜 확인한 결과 표현형과 유전자형의 개발한 마커와 완벽하게 일치하였다.



그림 21. 염색체 상의 MYB12의 위치

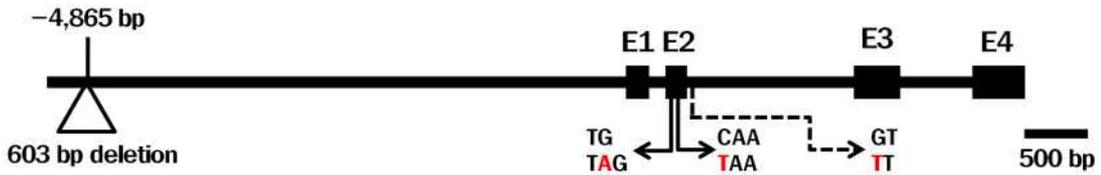


그림 22. MYB12 유전자의 구조 및 mutation의 위치

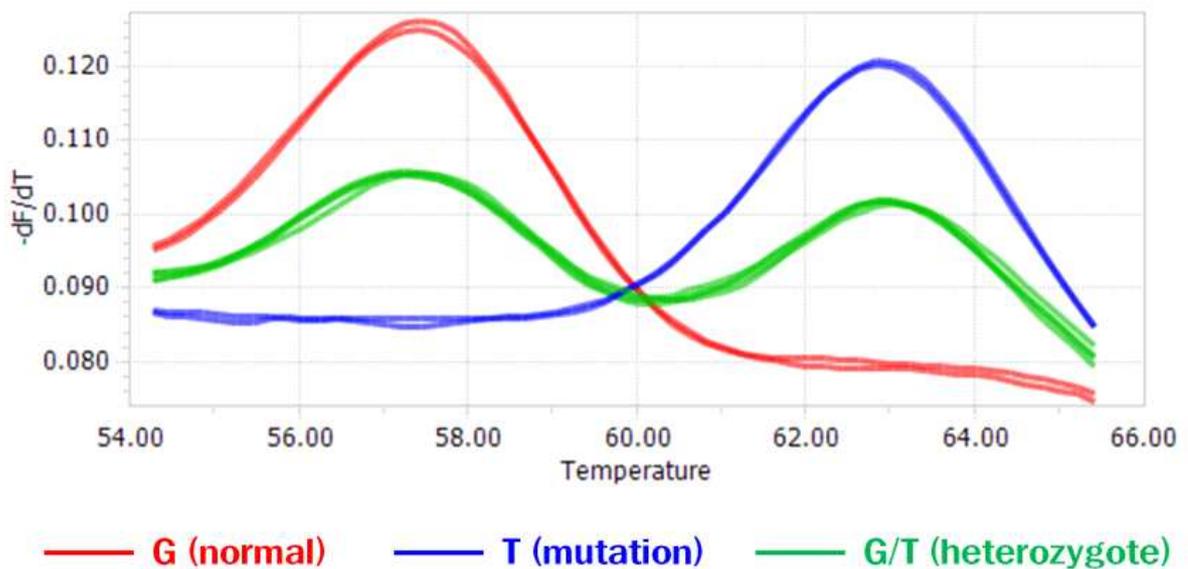


그림 23. MYB12 유전자의 2번째 인트론의 mutation 위치의 HRM 테스트 결과

12) 토마토 yellow color 마커 개발

토마토의 과색(fruit color)은 전체적인 색의 발현 pathway 중 carotenoid의 발현경로에 의해 좌우된다. 특히, *Psy1* 유전자의 기능 상실은 carotenoid 전체 양의 감소로 인해 과육의 색이 노란색을 나타나게 하는 원인이 된다. 본 연구에서는 토마토의 여러 계통을 이용하여 *Psy1* 유전자가 변이를 발생하지 않고 색을 발현시킬 때 정상적으로 작동하여 yellow color가 발현되는 토마토를 판별할 수 있는 마커를 개발하였다. 본연구팀은 가나종묘, 부농종묘로부터 노란색 토마토인 KNYH2 및 BUBNR과 'BUC47' (특허출원 번호: 10-2014-0175276)의 세 계통을 분양 받아 연구를 수행하였다. KNYH2 및 BUBNR과 BUC47 계통 간 교배에 의해 얻어진 F1에서 노란과색을 확인하였으며, 이러한 결과는 KNYH2와 BUBNR, BUC47계통은 *Psy1* mutation과 같은 allele type임을 추측할 수 있다. KNYH2와 BUBNR의 계통 특이적인 마커를 개발하기 위해 *Psy1* 유전자의 다형성을 검토하였다. 시퀀싱 결과 BUC47과 KNR3 (빨간색 과육색)는 *Psy1* 유전자의 start codon으로부터 -2,005 위치가 'G', -2,573 위치가 'T', KNYH2와 BUBNR은 -2,005 위치가 'G', -2,573 위치가 'C', TCR과 Heinz1706 (reference sequence)의 -2,005 위치가 'A', -2,573 위치가 'C'였다. 또한 여러 회사로부터 분양 받은 샘플에 대하여 2개의 마커의 validation 검정 결과 yellow color로 발현되었으며 이를 이용하여 노란색 토마토를 판별할 수 있을 것으로 기대된다.

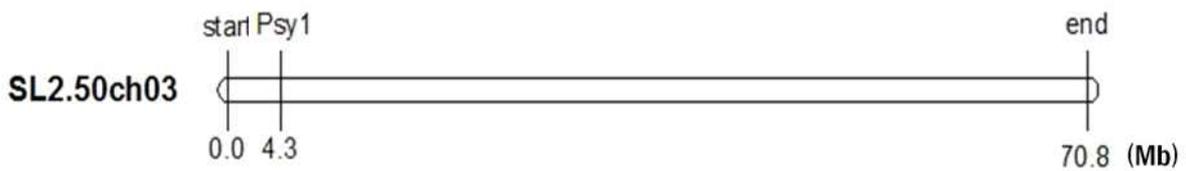


그림 24. 염색체 상의 *Psy1* 유전자의 위치



그림 25. *Psy1* 유전자의 구조 및 SNP의 위치

표 3. -2573 위치와 -2005 위치에서 각 계통들의 염기

Line Name	Psy1 mutation (기존 특허출원 위치)	-2,573 position	-2,005 position	Flesh fruit color
BUC47	Mutation	G	T	Yellow
KNR3	Normal	G	T	Red
KNYH2	Normal	G	C	Yellow
BUBNR	Normal	G	C	Yellow
TCR	Normal	A	C	Red
Heinz1706	Normal	A	C	-

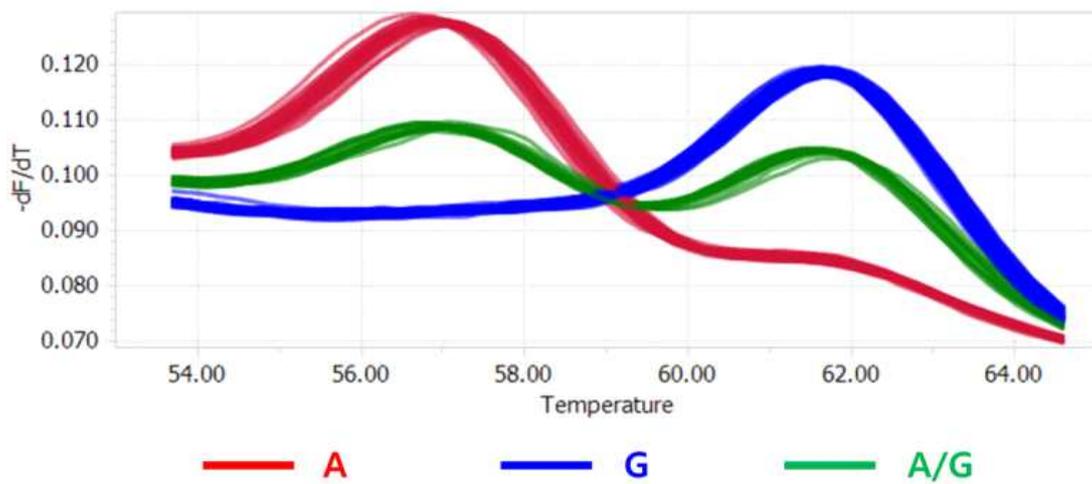


그림 26. 각 샘플의 -2,573 position 에서의 SNP

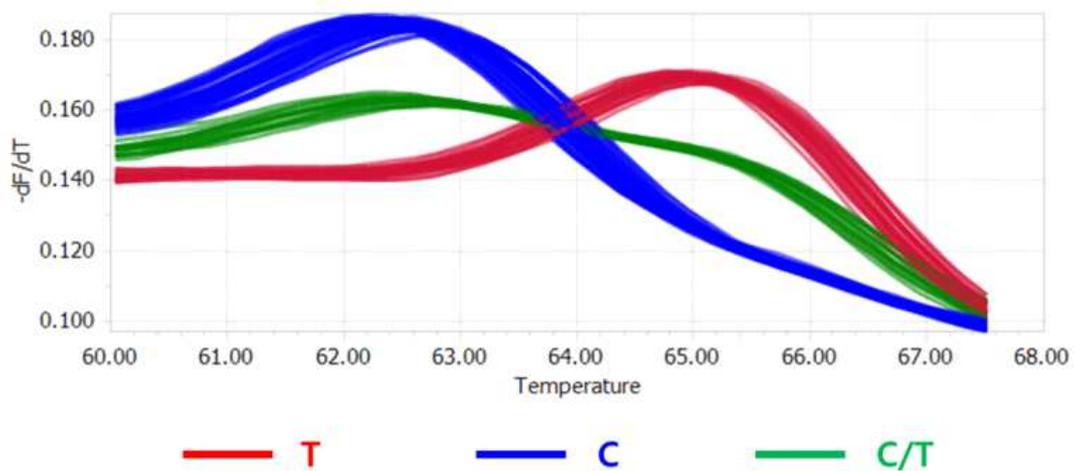


그림 27. 각 샘플의 -2,005 position 에서의 SNP

13) 토마토 여교잡세대 단축용 SNP마커 개발

여교잡(back cross)을 통해 토마토를 육종하는데 BC5, 6번의 세대를 거쳐야 목표형질이 고정된다. 이는 노동력, 비용 및 시간이 많이 소모되는 데 이를 절약할 수 있는 방법으로 384개 정도의 마커를 이용하여 유용형질 및 목표형질을 조기 선발할 수 있다. Shirasawa 등 (2013, DNA Res)에 의해 보고된 정보를 기반으로 현재 목표인 384개 마커 중 약 43%에 해당하는 165개의 마커를 개발하였다.

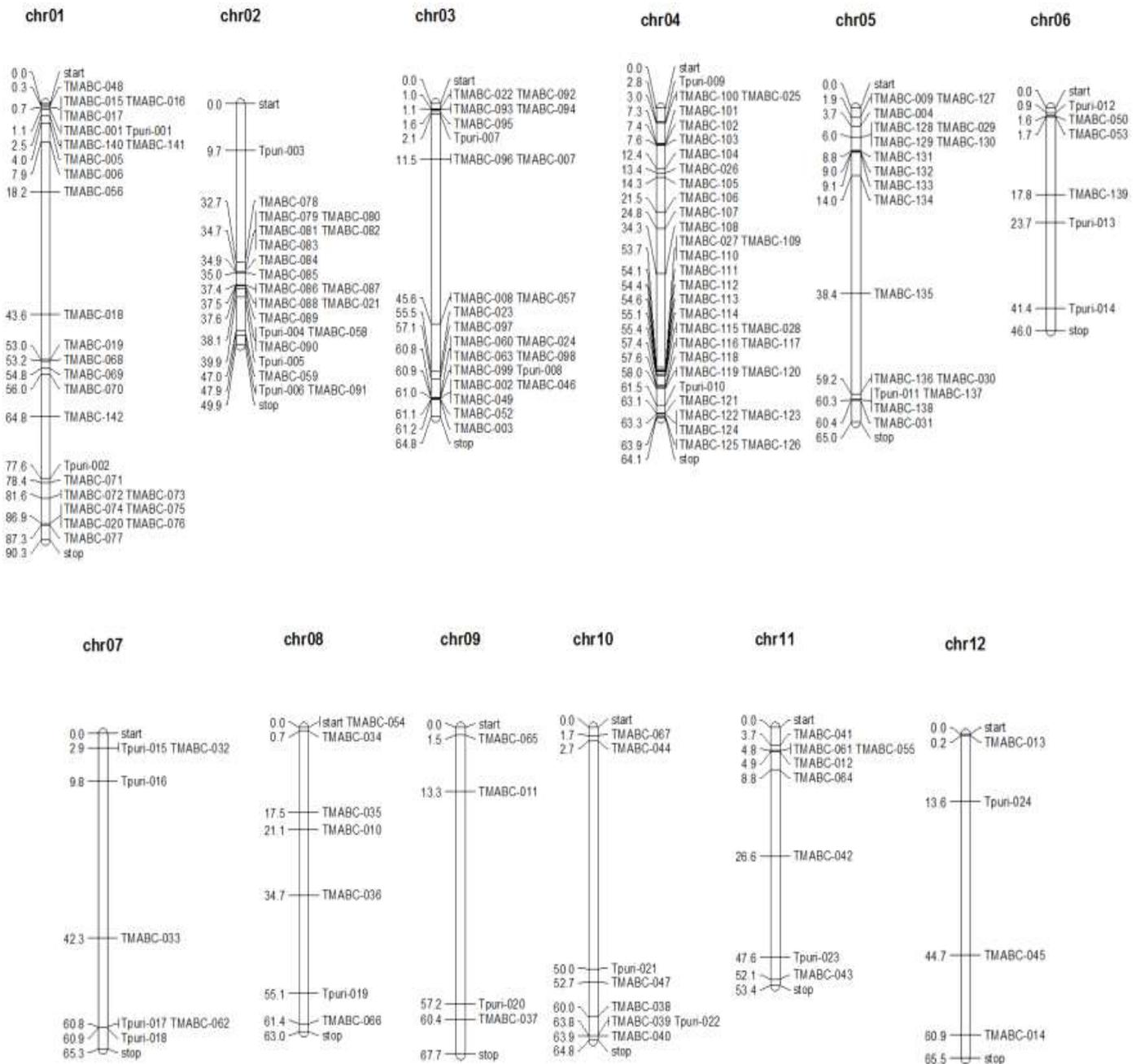


그림 28. 토마토 여교잡세대 단축용 SNP 마커 개발

14) 토마토 근부위조병 저항성 선발을 위한 HRM마커의 개발

근부위조병은 토마토의 생산량을 급격히 감소시키는 곰팡이병으로 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL)에 의해 발병한다. 본 연구에는 FORL 저항성 영역이 염색체 9번에 위치해 있는 것을 발견하였고 이를 분자마커를 개발하기 위하여 저항성 계통 'AV107-4' (*Solanum lycopersicum*) × 이병성 계통 'L3708' (*Solanum pimpinellifolium*)의 F2 집단을 사용하였다. 생물검정은 한국 FORL 계통인 KACC 40031을 사용하였으며, 근부위조병에 대하여 F2 집단에서는 단일우성유전을 보였다. 본 연구팀이 선발한 총 14개의 마커와 염색체 9번의 3.6~72.0 Mb를 포함하는 마커를 Tomato-EXPEN 2000 map과 SolCAP Tomato에 기초하여 개발하였다. 345개의 F2집단에 대하여 마커를 이용하여 유전자형을 검정하였으며 동시에 시판중인 토마토 품종에 대하여 저항성을 검정하였다. 또한 PCR-CAPS 마커인 PNU-D4는 염색체 9번의 6.1 Mb 위치에 있으며 저항성과 매우 높은 적중률을 보였으며, 이를 MAS를 위하여 HRM마커로 전환하여 분석하였다.



그림 29. 근부위조병 저항성 'AV107-4' 계통 및 이병성 'L3708' 계통의 발병 증상

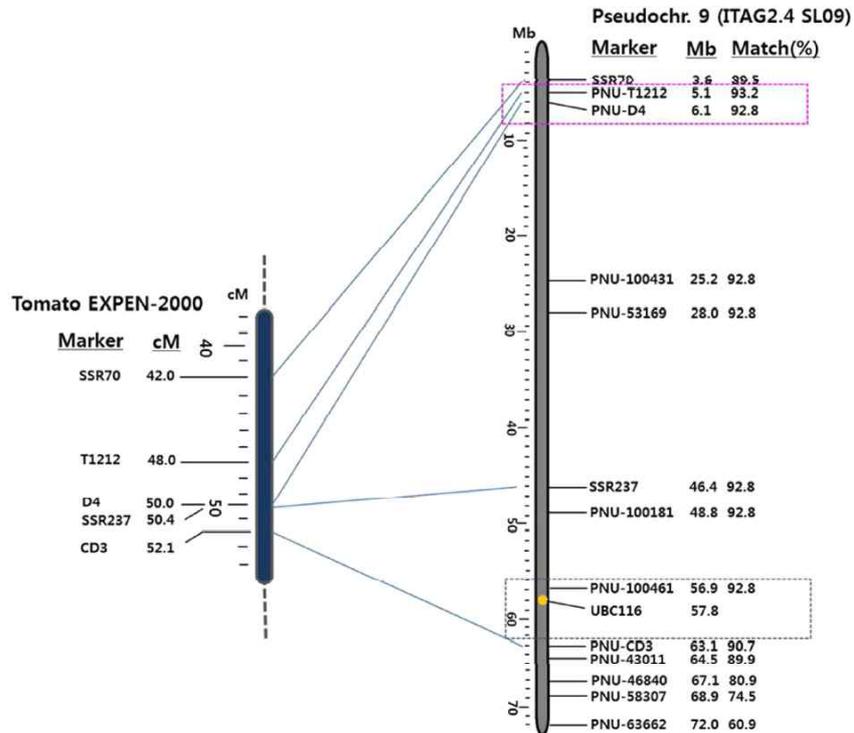


그림 30. 근부위조병 저항성에 연관된 14개 마커에 대한 물리적 위치

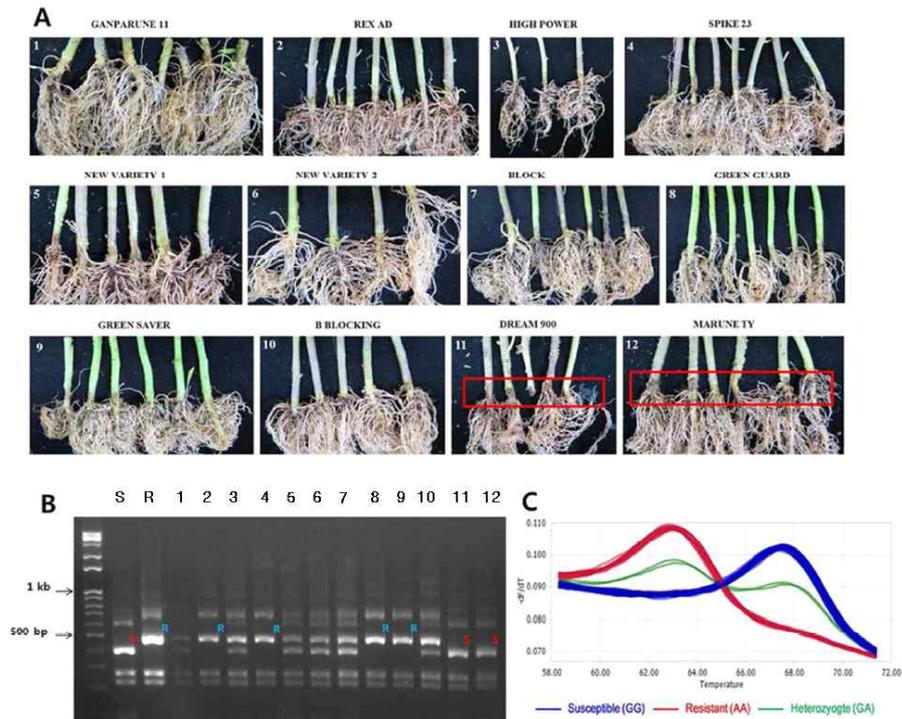


그림 31. (A) F1 품종의 근부위조병의 생물검정 결과

12개의 품종 중 10개의 품종은 저항성이었지만, 2품종 (#11과 12)는 이병성임. (B) PNU-D4 (CAPS) 마커의 결과 생물검정 결과와 완벽하게 일치하였지만, PNU-T1212의 경우는 50%만 일치하였음. (C) PNU-D4 마커를 high-resolution melting (HRM) 마커로 전환하여 근부위조병 저항성 및 이병성을 포함한 55개의 계통에 대한 검정 결과

15) 토마토 pink color 발현 및 유전자형 결정을 위한 분자마커개발

토마토의 과피색은 과실이 익어가면서 플라보노이드 성분인 나린제린 칼콘의 여부에 의해 나타나며, 핑크색 토마토는 나린제린 칼콘이 축적되지 않아 과피색이 없는 경우를 말한다. 토마토의 플라보노이드 성분은 *SIMYB12*의 유전자 발현 및 기능과 매우 연관성이 높다. 따라서 *SIMYB12*의 유전자는 핑크색 토마토의 표현형을 결정하는데 매우 유용한 유전자이다. 기존의 연구에서 *SIMYB12*의 유전자에서 603 bp 결실, 1 bp 염기 치환 (C > T), 1 bp 삽입 (TG > TAG)과 같은 3개의 변이가 보고된 바 있다. 3가지의 변이를 이용하여 핑크색 및 빨간색 표현형을 가지고 있는 47개의 토마토 품종에 대한 유전자형을 판별한 결과 “Prime Alexander” 품종이 핑크색 토마토인데도 불구하고 유전자형은 핑크색이 발현되지 않았다. 이는 표현형과 유전자형이 일치하지 않음을 시사한다. 본 연구팀은 “Prime Alexander” 품종의 자가수분에 의해 20개의 자식개체를 생산해 낸 후 *SIMYB12*의 규명된 3개의 변이 이외의 새로운 변이를 찾기 위하여 게놈 DNA와 CDS 영역을 cloning하여 염기서열을 비교하였다. 그 결과 2번째 인트론 영역에서 G > T의 염기서열 변이를 확인할 수 있었다. 이 SNP로 인해 2번째 엑손영역에서 7 bp의 deletion (GTAACAG)이 일어났으며, 이로 인하여 조기종결코돈이 생겼다. 새로 발견한 SNP는 자식세대의 표현형과 완벽하게 일치하였으며, 이는 육종에 있어 핑크색 토마토의 선발마커로 활용이 가능할 것이다.

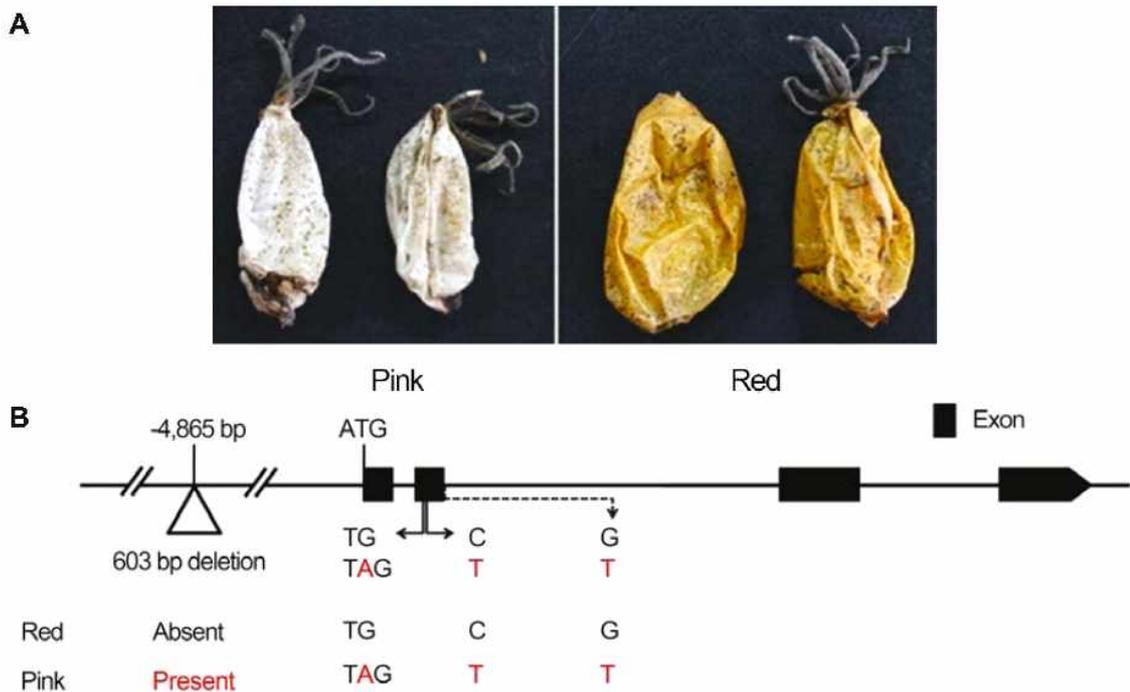


그림 32. (A) 핑크 및 빨강 토마토의 과피색, (B) *SIMYB12* 유전자의 구조 및 변이 영역

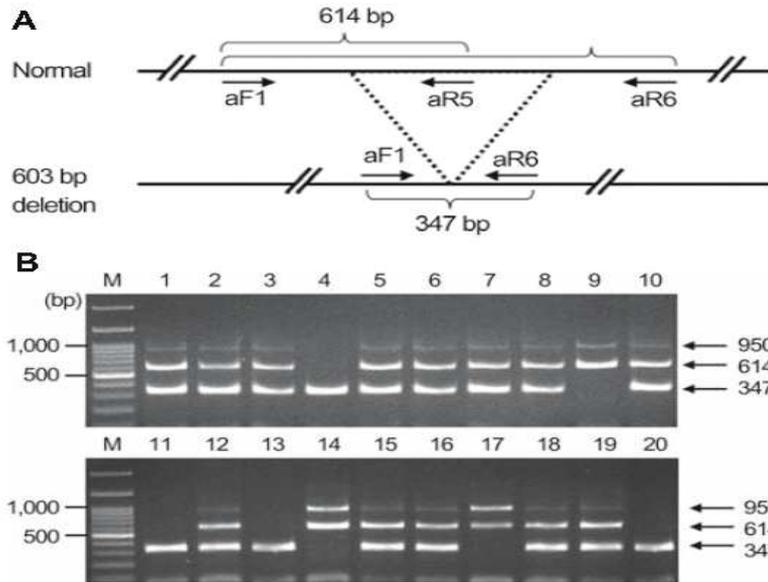


그림 33.. (A) 603 bp 결실을 판별할 수 있는 프라이머의 위치 (B) 20개의 자식개체에 대한 603 bp 판별 SCAR 마커의 결과

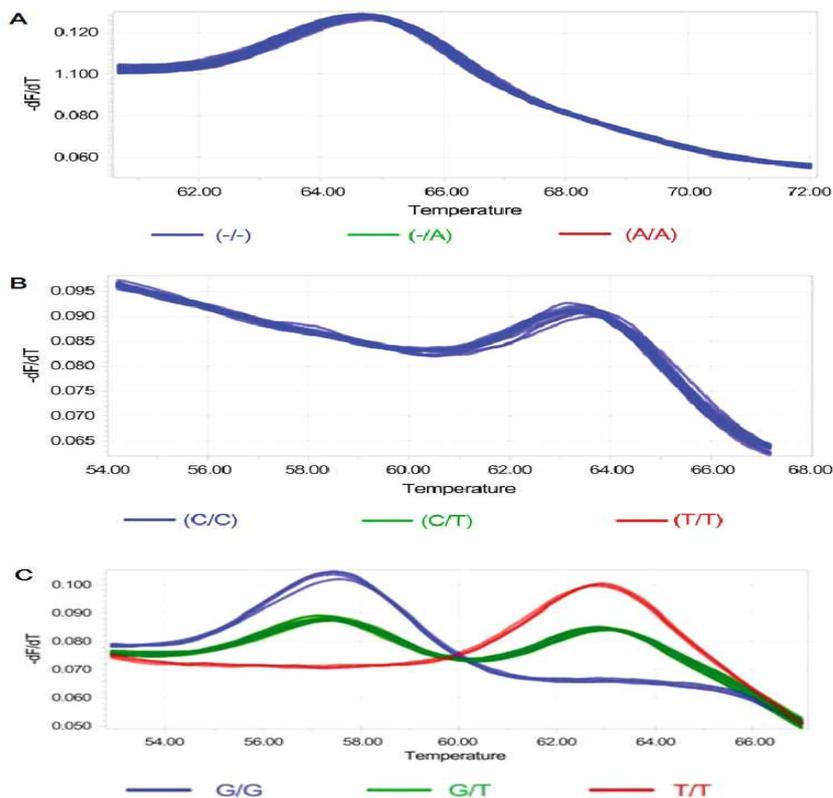


그림 34 Hybprobe를 이용한 HRM 방식으로 20개의 자식세대 개체에 대한 유전자형의 판별 (A) 2번째의 엑손의 1 bp 삽입 마커에 대한 HRM 커브, (B) 2번째 엑손의 SNP (C > T) 판별 마커에 대한 HRM 커브, (C) 2번째 인트론의 SNP (G > T) 판별 마커에 대한 HRM 커브.

16) *CYC-B* 유전자의 발현 분석에 의한 토마토 오렌지 과색 판별 마커개발

카로틴의 물질은 인간의 건강에 이롭게 작용하는 중요한 2차 대사산물이다. 또한 카로틴은 과실의 색깔에 관여하고 있어 주요 육종 특성 중 하나이다. 본 연구팀은 토마토 계통에 대한 과색의 표현형에 따른 유전자의 발현분석을 수행하였다. 그 결과, *CYC-B* 유전자는 과실이 익어가면서 증가하였으며, 5' 영역에서의 염기서열 변이를 확인하였다. 또한 *CYC-B* 유전자와 오렌지 과색은 매우 연관이 높음을 확인하였다. 선발된 4개의 SNPs는 *CYC-B* 유전자의 프로모터 영역에서 찾아내었으며, F2집단에서도 오렌지 과색을 정확하게 판별할 수 있었다. 본 연구에서 개발한 마커는 카로틴 함량이 높은 토마토를 육종하는 데 있어 매우 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

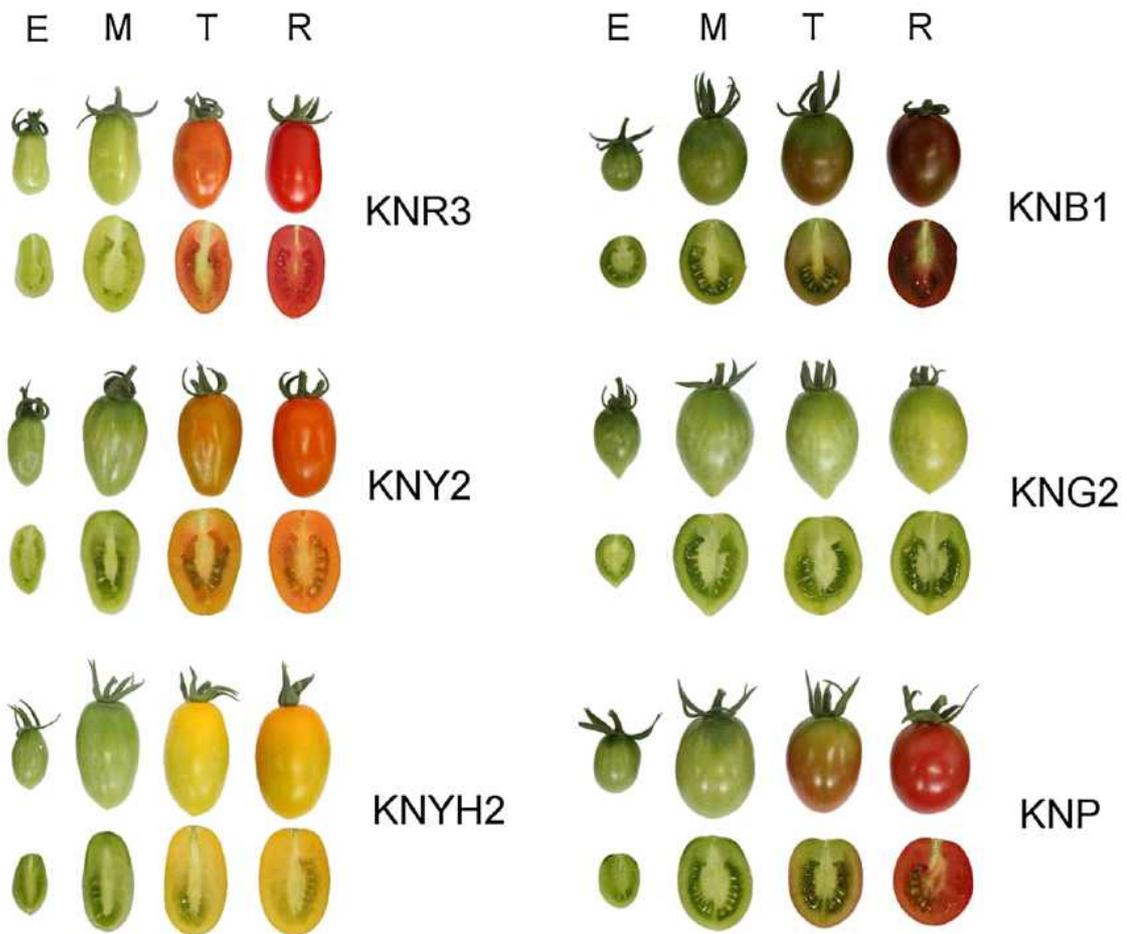


그림 35. 본 연구에 사용한 과실의 발달단계에 따른 토마토의 표현형
(E: early stage, M: mature stage, T: turning stage, R: ripe stage)

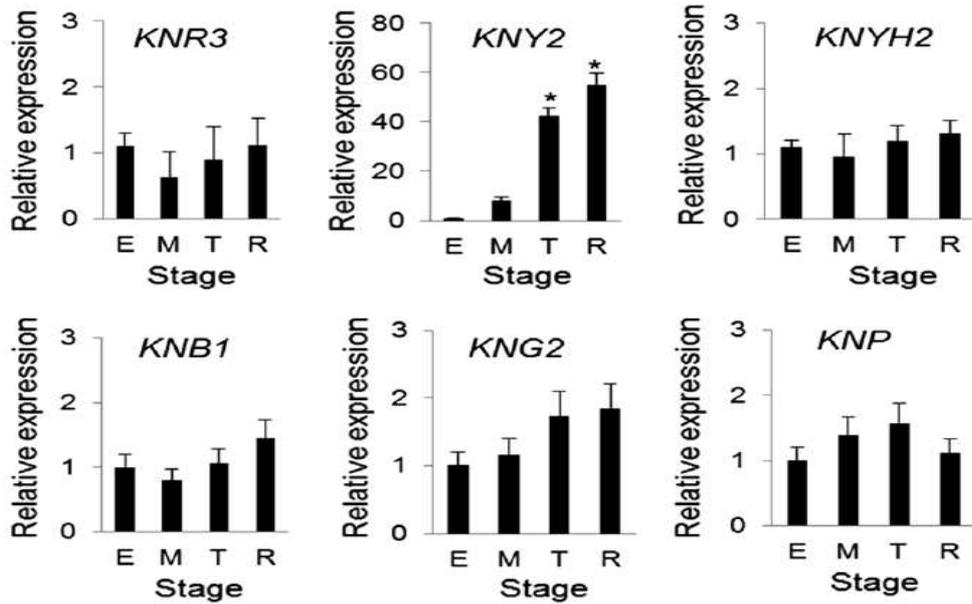


그림 36. 토마토 계통에 대한 과실의 발달단계에 따른 *CYC-B* 유전자의 발현 분석
(E: early stage, M: mature stage, T: turning stage, R: ripe stage)

표 4. KNY2와 KNR3의 교배에 F1 및 F2 세대에서 분리비 확인

	-77 position (SNP)	Number of plants	Color	Number of plants
F1 generation	T-G	5	Red	0
			Orange	5
F2 generation	T-T	54	Red	0
			Orange	54
	T-G	98	Red	0
			Orange	98
G-G	48	Red	48	
		Orange	0	

표 5. 토마토 계통에 대한 Phytoene, β -carotene, lycopene의 HPLC 결과

($\mu\text{g/g}$ fresh weight)

	Stage	Phytoene	Lycopene	β -carotene
KNR3	M	<0.01	0.03 \pm 0.02	0.90 \pm 0.38
	T	0.35 \pm 0.06	11.56 \pm 3.54*	3.09 \pm 1.55
	R	1.26 \pm 0.54	35.95 \pm 10.37*	4.32 \pm 1.59
KNY2	M	<0.01	0.02 \pm 0.02	1.19 \pm 0.55
	T	0.11 \pm 0.05	2.65 \pm 0.55	7.76 \pm 2.17*
	R	0.18 \pm 0.05	3.54 \pm 1.11	18.45 \pm 3.89*
KNYH2	M	0	<0.01	0.37 \pm 0.14
	T	0	0.04 \pm 0.03	0.39 \pm 0.05
	R	0	0.06 \pm 0.03	1.00 \pm 0.65
KNB1	M	<0.01	<0.01	0.72 \pm 0.51
	T	0.13 \pm 0.11	6.74 \pm 3.25*	1.62 \pm 0.66
	R	0.53 \pm 0.27	30.59 \pm 9.21*	2.73 \pm 1.13
KNG2	M	0	0	0.57 \pm 0.22
	T	0	0	0.56 \pm 0.11
	R	0	0.03 \pm 0.02	0.77 \pm 0.51

*유의성 정도 ($p < 0.05$)

2. 양배추 transcriptome 분석에 의한 잡종강세 관련 유전자 동정 및 발현해석

가. 연구 요약

다양한 F1 품종은 양친(Parent)의 다양한 인자의 영향을 받아 잡종강세(heterosis) 현상이 발생되어 생산량 및 발육을 촉진시킨다. 최근에 이를 이용하여 F1의 품종을 대량 생산하고 있는 추세이다. 그러나 국내의 양배추 잡종강세에 대한 분자생물학적 수준의 기초 연구는 매우 미비한 편으로 이에 대한 연구를 체계적으로 구축할 필요가 있다. 또한 최근 RNA sequencing 기술의 발달로 in-depth transcript profiling을 이용한 잡종강세 연구가 가능한 시점에 와 있다. 본 연구에서는 Illumina HiSeq 2000 platform을 기반으로 떡잎(cotyledon)과 어린 잎(young leaf)단계의 양배추-36 계통과 이에 대한 부모세대 및 34와 35-잡종계통에 대한 transcriptome 분석을 실시하였다.

약 4백만 개의 end read(100bp)를 양배추의 reference 유전체와 alignment하여 분석하였고, 45,758개 중 43,704개(95.51%)의 annotation 된 transcript를 적어도 1개의 sequence read로부터 확인하였다. 부모 세대(DGHP)와 잡종 세대 사이에 발현 차이를 보이는 1,931개와 1,667개의 transcript를 떡잎(cotyledon)과 어린 잎(young leaf)의 생육단계에서 발견하였다. 떡잎(cotyledon)과 어린 잎(young leaf)의 생육단계 모두에서 DGHP는 탄수화물과 아미노산 물질대사와 같은 과정의 pathway에 관련된 유전자들을 포함하고 있었는데, 두개의 pathway 상에 포함된 대부분의 주요 유전자들은 잡종세대에서 상향조절(up-regulate)이 되는 것을 확인하였다. 또한, DGHP에서 comparative transcriptome 분석을 통해 잡종강세와 관련된 후보 transcript 그룹을 찾았다. 이들 후보 groups은 잡종강세에 대한 분자적 메커니즘 연구에 기반이 될 것으로 기대된다.

나. 연구 결과

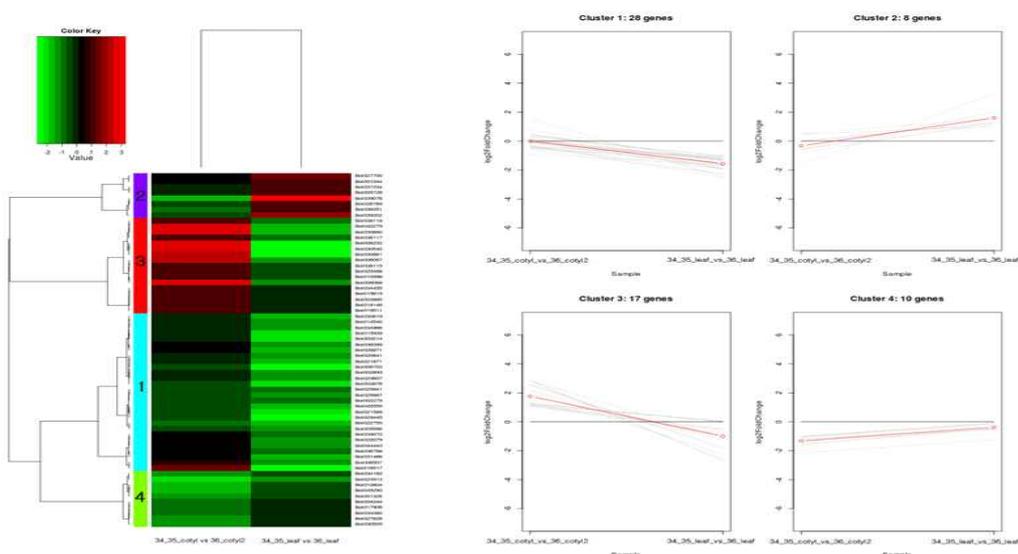


그림 37. 잡종강세에 대한 RNA-seq data의 유전자 발현에 따른 cluster 분류 및 cluster 내 분포도

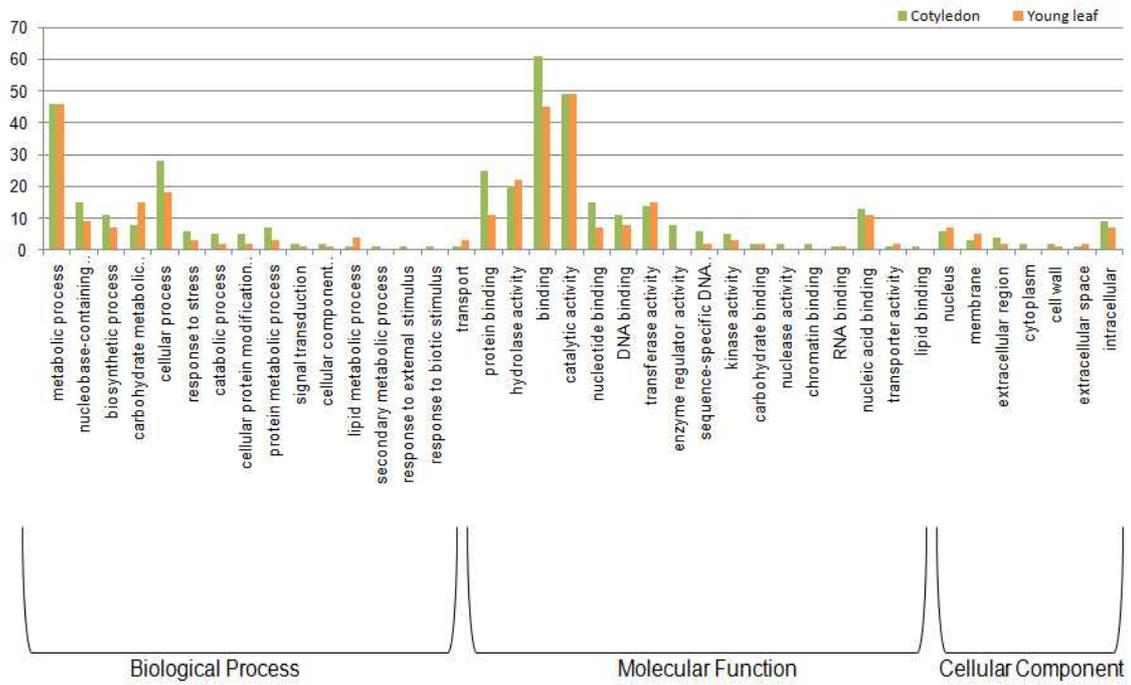


그림 38. 양배추 잠종세대와 부모세대의 transcriptome GO 분석표

Biological process, molecular function 및 cellular component의 3가지 주요 카테고리 요약, 이 중에 F1/MP의 떡잎과 어린잎에서 313개의 특이적으로 발현된($\geq 2 \log_2$ fold) CDS를 선별함.

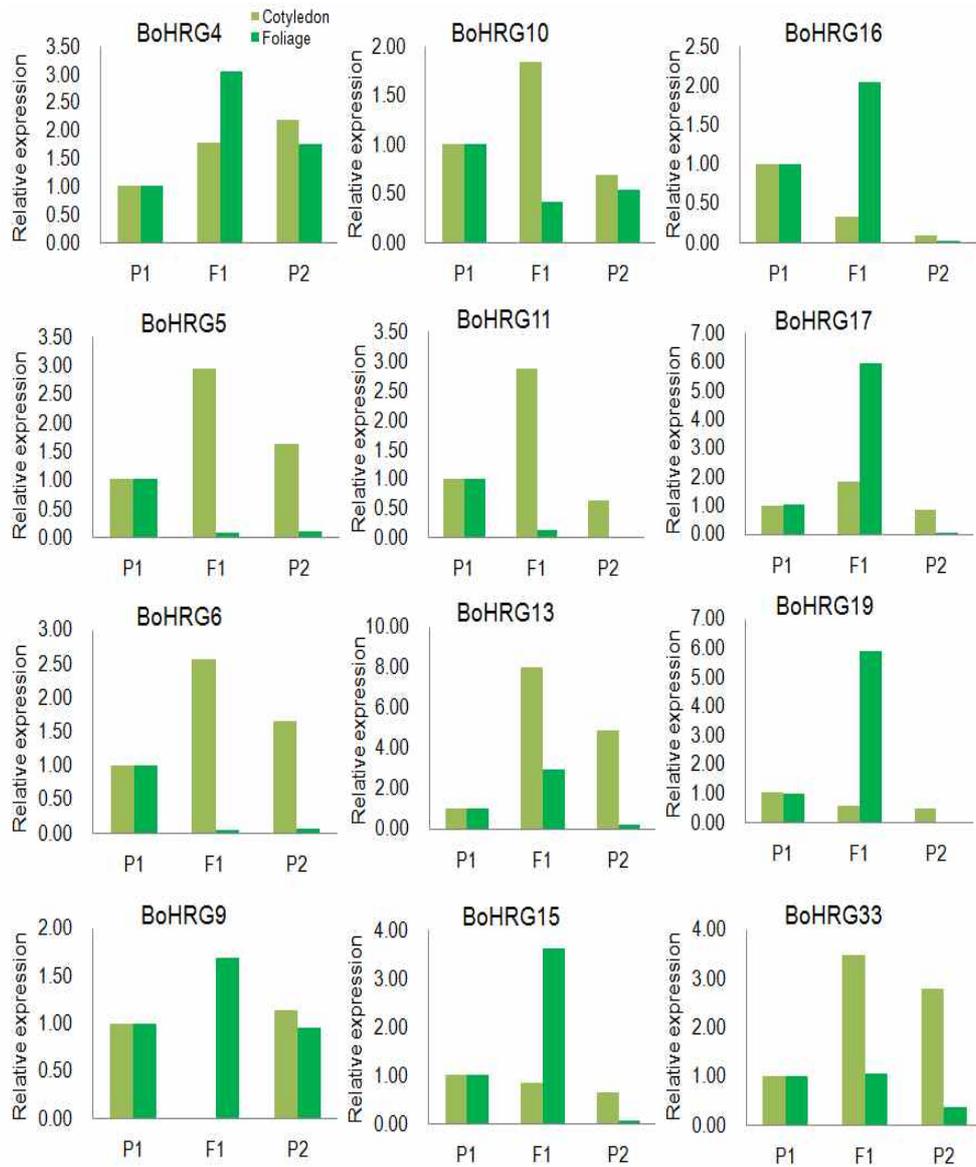


그림 39 RNA-seq의 DEGs (≥ 2 log₂fold) transcript로부터 선발된 12개의 BoHRG 유전자의 발현분석결과

잡종세대(F1)와 부모양친(P1와 P2)의 1, 2차 어린 잎(15d)과 떡잎(9d)에서 qRT-PCR 발현 분석 결과.

3. 양배추 검은썩음병 저항성 유전자 탐색 및 분자 마커 개발

가. 연구 요약

검은썩음병은 전 세계적으로 양배추 재배단지에서 발생하고 있으며 양배추의 수량 및 생장에 영향을 미쳐 경제적 손실이 발생하고 있다. 검은썩음병은 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc)균에 의해 발병하며 감염경로는 직접적인 접촉 및 침수, 종자에 의해 감염되는 병원균이다. 양배추에 감염이 일어나면 잎에서 V-모양의 병반이 관찰되고 생육후기에는 검정색으로 썩어 들어가는 병(disease)이다. 현재까지 Lee 등(2015), Kifuji 등(2013), Tonu 등(2013)에 의하여 흑부병저항성의 QTL(Quantitative Trait Loci)이 밝혀졌다. 본 연구에서는 양배추의 검은썩음병과 관련된 QTL을 종합하여 interval을 좁히고, 그와 관련된 유전자 계(family)를 탐색한 후 검은썩음병 저항성 관련 마커로서의 활용 가능성을 육종에 적용하여 검증하고자 한다.

기존의 연구결과들을 종합하여 검은썩음병 관련 QTL 영역에 위치한 마커 정보들을 탐색하고 BRAD의 양배추 유전 정보를 기반으로 9개 염색체 상에서의 위치를 확인하였다. 그 결과 양배추 염색체 7번을 제외한 1-9번 염색체에서 양배추의 검은썩음병에 관련된 저항성을 관찰하였다.

검은썩음병 마커 관련 유전정보를 정밀하게 분석한 결과, 총 13개의 주요 검은썩음병 관련 마커의 primer set를 이용하여 PCR을 통해 양배추 계통의 저항성 및 이병성 검증 시험을 실시하였고 클로닝 및 시퀀싱을 통해서 정확한 염기서열을 확인하였다(그림 23, 표 4). 확인된 염기 서열은 양배추 염색체 상의 정확한 위치와 저항성 및 이병성 간의 SNP 존재 여부를 확인한 후 검은썩음병의 후보유전자를 획득하기 위하여 연구를 수행하였다.

나. 연구 결과

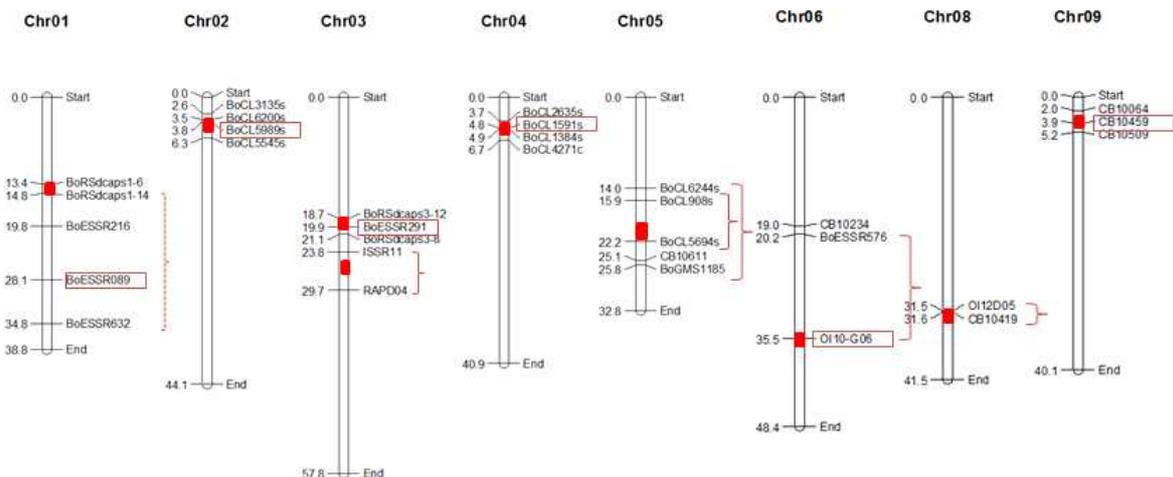


그림 40. 양배추 염색체 상에 검은썩음병 저항성 관련 SSR, SNP CAPS 마커 분포도

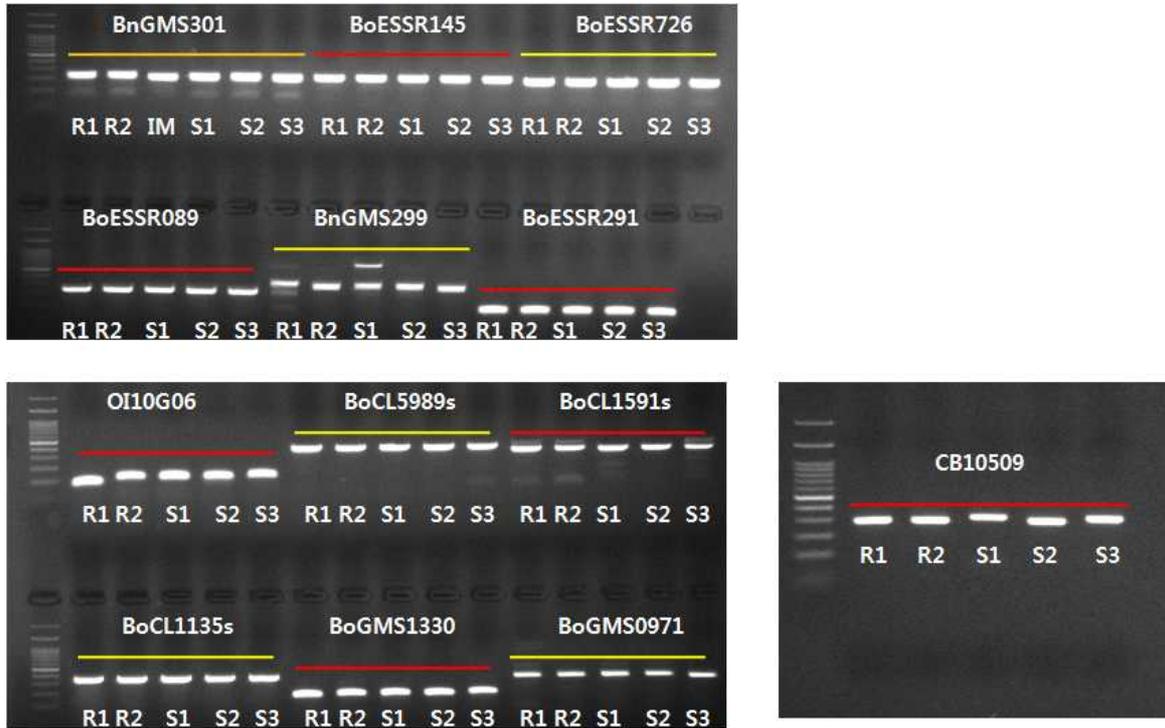


그림 41. 양배추 검은썩음병 관련 13개 마커의 PCR결과

4. 양배추 저온 관련 유전자의 탐색 및 transcriptome 특성 분석

가. 연구요약

양배추(*Brassica oleracea*)는 세계적으로 재배되는 작물 중 하나이지만 저온에 대해 감수성을 보이는 경우가 많다. 본 연구에서는 저온스트레스에 저항성을 보이는 계통과 민감성을 보이는 계통간의 RNA-seq. 분석을 통하여 저온에 반응하는 유전자들의 transcriptome 을 분석하였다.

본 연구는 저온스트레스에 반응하는 유전자를 분석하기 위해 저온스트레스에 저항성을 보이는 계통과 감수성을 보이는 계통을 선발하여 RNA sequencing을 수행하였다. 약 153,000,000개의 read를 assembly하여 unigene으로 생각되는 58,094개의 contig를 얻었다. 결과적으로 58,094개의 unigene은 평균적으로 978bp의 단편을 가지고 있었으며 500bp 이상의 단편의 contig는 23,404개였다. 가장 작은 길이는 200bp의 단편을 가지고 있었으며, 가장 긴 길이를 가지고 있는 contig의 길이는 15,158bp 였다. Blast 결과, 58,094개의 unigene들은 *Arabidopsis*, *Oryza*, *Brasica* 등 다른 식물체들과 61.54%의 유사성을 나타냈다. 300bp 이하의 길이의 unigene들은 blast hits에서 34.81%의 낮은 blast 비율을 보였지만, 길이가 길어질수록 높은 blast 비율을 보였다. 특히, 22,342개(38.45%)의 unigene들은 다른 database의 유전자들과 유사성을 보이지 않아 양배추 특이적인 유전자로 판단되었다. 34,756개의 unigene은 애기장대의 transcript와 유사하였고, 나머지 996개의 unigene도 *Oryza sativa*, *Oryza nivara*, *Brassica napus*, *Nicotiana sylvestris* 등의 transcript와 유사하였다. 양배추의 58,094개의 unigene은 다양한 cellular processes 과정에 관여하는 유전자들과 유사하였다. 그중 61.54%인 40,867개의 유전자는 biological process(BP), cellular component(CC), molecular function(MF)등 크게 세 종류의 Gene Ontology(GO) dataset으로 나누어졌다. 또한 스트레스와 관련성이 있는 6,726개의 unigene들은 스트레스에 반응 (SR), 환경적 자극에 반응(AS), 및 생물적 스트레스에 반응 (BS) 항목으로 각각 분류되었다. 58,094개의 unigene 중에서 0.51%인 302개의 unigene은 KEGG category 중에서 replication와 repair, transcription, lipid metabolism, amino acid metabolism, carbohydrate metabolism pathway와 관련성이 있었다. 양배추에서 저온 스트레스에 반응하는 유전자를 분석하기 위해 내한성(Bo106)과 저온에 대해 감수성을 보인 양배추 계통 (Bo107)을 저온반응실험에 사용하였다. 두 가지 계통의 발현양을 비교하였을 때 5,966개의 유전자의 발현양이 증가하였고, 6,282개의 유전자 발현양이 감소하였다. 또한 0℃ 처리하였을 때 Bo106에서는 5,498개의 유전자가 증가하였고 5,441개의 유전자의 발현양이 감소하였다. Bo107에 0℃ 처리하였을 때에는 3,033개의 유전자의 발현양이 증가하였고, 2,252개의 유전자의 발현양이 감소하였다. 발현양이 증가하거나 감소한 유전자를 분류하면 8개의 cluster로 나눌 수 있다. 발현양이 증가한 유전자는 빨간색으로 감소한 유전자는 녹색으로 표시하였다. 그룹 H에는 8,682개의 유전자가 분포되어 있어 가장 많은 유전자가 포함하고 있었다. 그 다음으로 그룹 C는 4,995개의 유전자를 포함하고 있었다. 저온에 대한 내한성 및 감수성에 관한 유전자를 분석하여 저온에 관련된 유전자를 선발한 후 이러한 내한성 유전자를 이용하여 육종에 응용함으로써 저온에 강한 품종개발에 이용할 수 있을 것이다.

나. 연구 결과

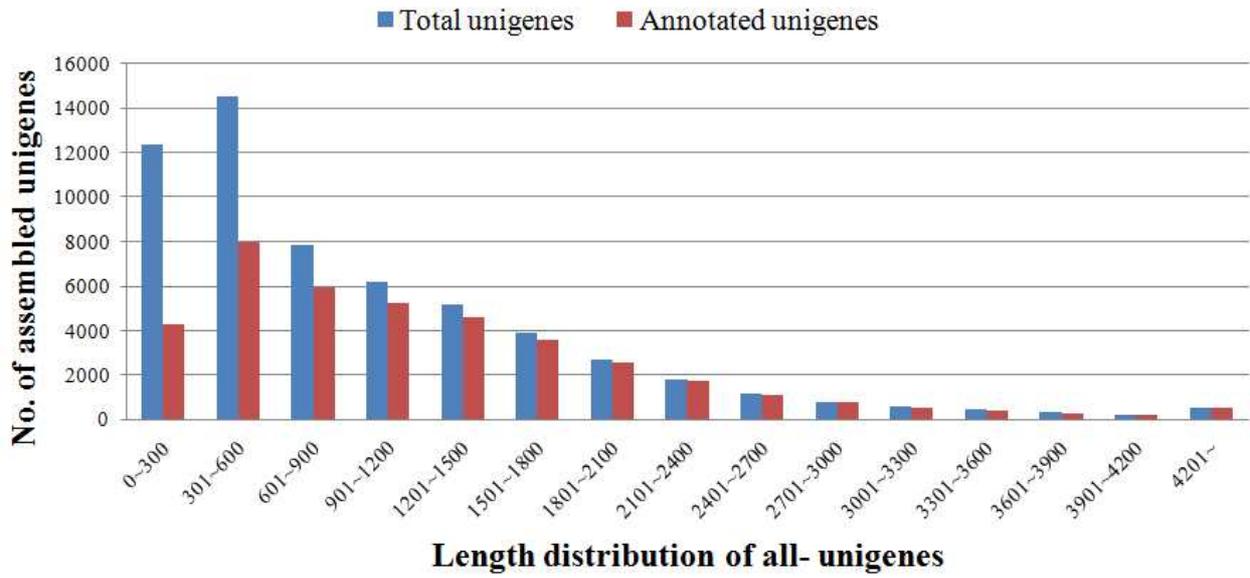


그림 42. Nucleotide의 길이에 따른 분포

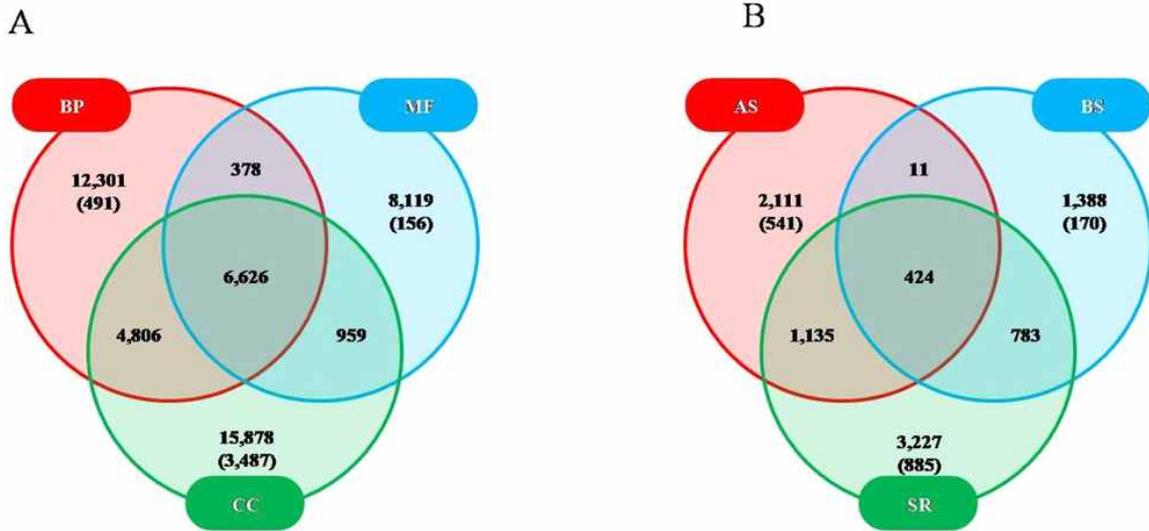


그림 43. 58,094개 unigene의 모식도

(MF: molecular function, CC: cellular component, BP: biological process)

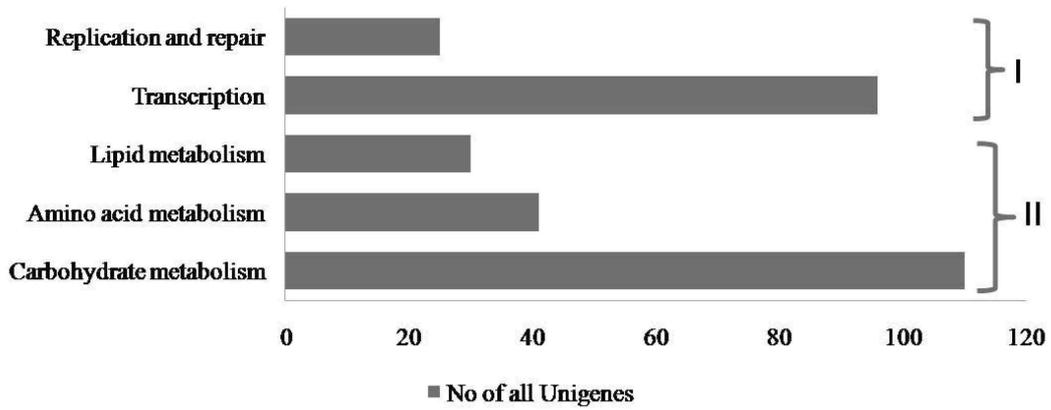


그림 44. KEGG category 중 6개의 그룹에 속한 302개의 unigene의 분류

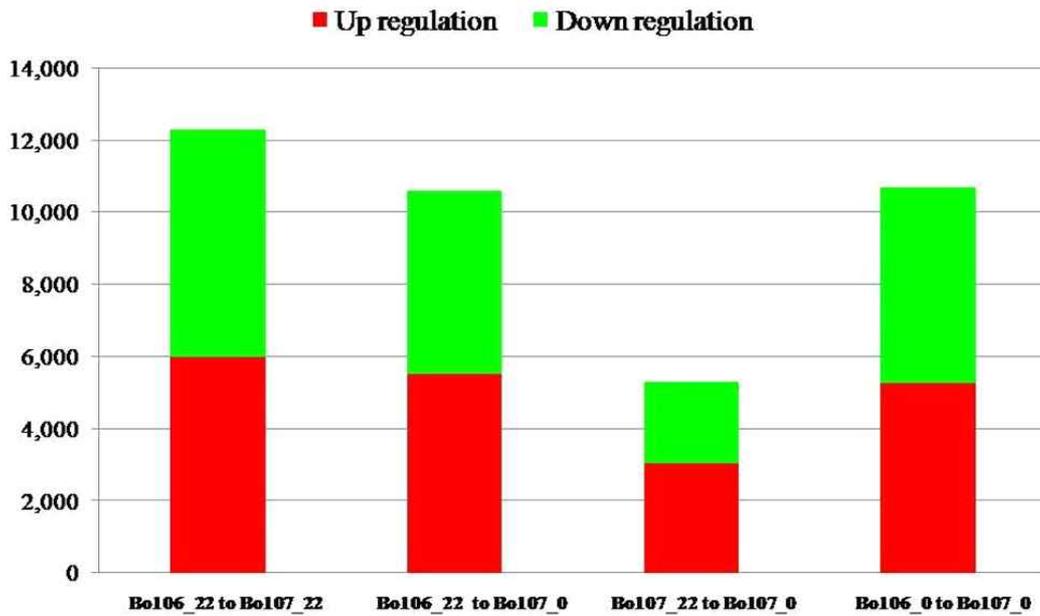


그림 45. 내한성계통과 저온에 감수성 계통에서 발현양의 변화가 있는 유전자의 개수

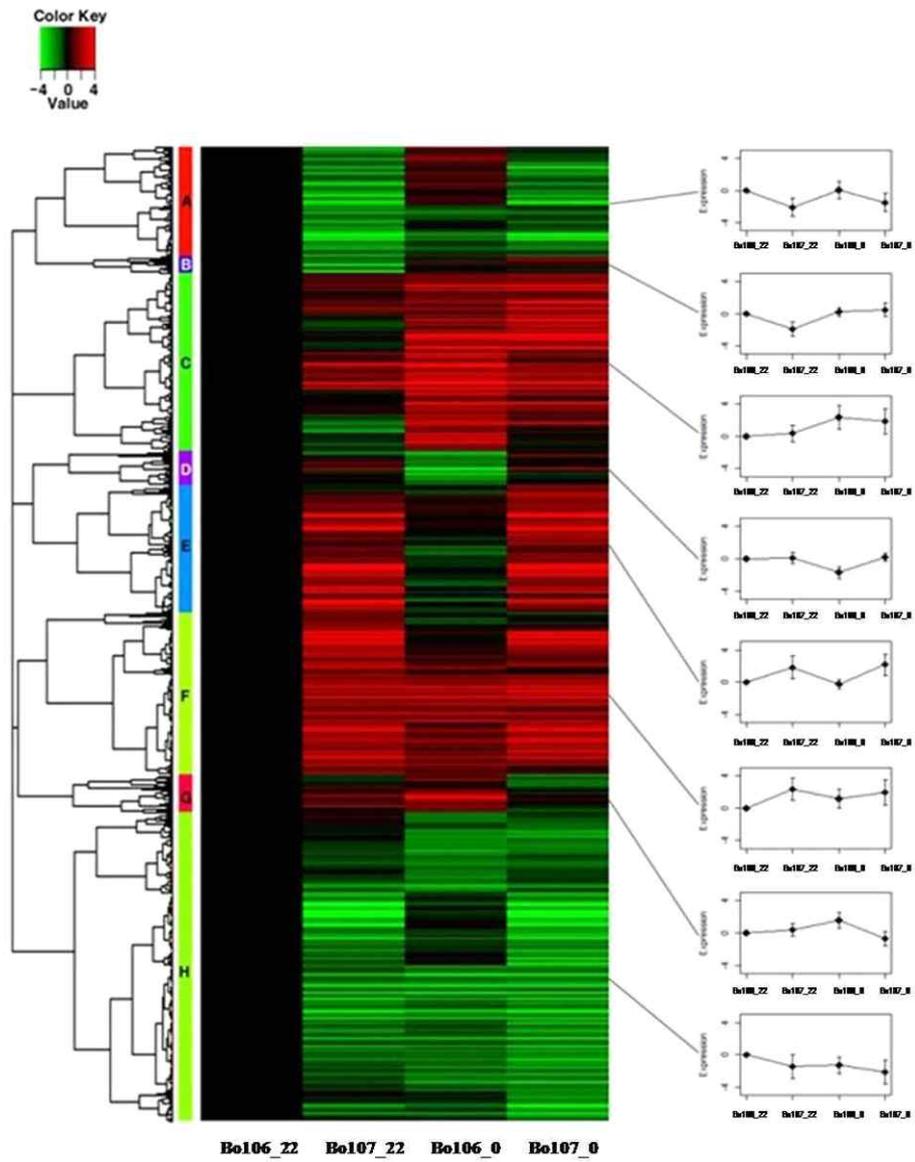


그림 46. 유전자 발현에 따른 8개의 cluster

5. 양배추의 CBFs 유전자의 기능 및 AP2/ERF 전사 인자에 대한 genome-wide 분석

가. 연구요약

양배추(*Brassica oleracea*)는 세계적으로 가장 인기 있는 채소 작물 중 하나이다. 현재까지 Brassica류 작물들은 식량자원으로서의 소비뿐만 아니라 진화 및 발생에 대한 연구자원으로서 활용되어 왔다. 양배추(*B. oleracea capitata*, line 02-12)에 대한 전체 게놈(genome-wide)은 최근에 완성되었고(<http://www.ocri-genomics.org/bolbase>), 애기 장대와 배추의 전체 게놈(genome-wide)의 염기서열 뿐만 아니라 양배추 전체 게놈(genome-wide)의 정보공유는 AP2/ERF TFs의 유전체비교 연구에 큰 도움을 주었다. 양배추의 AP2/ERF superfamily 유전자들에 대한 특징에 관한 연구를 통해 저온, 염분, 수분 및 ABA 등과 같은 환경적 스트레스에 대한 원인을 밝힐 수 있고 분자생물학적 메커니즘을 명확하게 할 수 있다. 또한 형질전환 기술을 이용하여 수많은 불리한 환경에 적응 할 수 있는 Brassica 작물을 육성 시킬 수 있을 것이다.

본 연구에서는 양배추의 genome database 내 AP2/ERF와 family에 속하는 226개의 전사인자(TFs)를 분리 동정하였으며, 염색체 상에서 총 226개 중 185개의 유전자를 확인하였다. 이들 TFs의 아미노산 서열을 계통분류학적으로 비교 분석하여 DREB, ERF, AP2, RAV 및 단일유전자(soloist)를 포함한 총 15개 군(clade)으로 분류하였고, 이들 15개의 군에서 가장 큰 범위에 속하는 DREB와 ERF family은 애기장대의 단백질과 높은 유사성을 가지는 5개의 CBF 유전자(*BoCBF1a*, *BoCBF1b*, *BoCBF2*, *BoCBF3*, *BoCBF4*)를 확보하였다. 이들 유전자들이 저온 조절 기작에 관여하여 다른 유전자들과 일정한 네트워크를 유지하며 상호 작용을 나타내는 것으로 확인하였다. 이에 대한 검증실험은 저온 저항성 및 감수성을 가진 (Bo106, Bo107) 양배추 계통에 환경적 스트레스(저온, 염분, 수분 및 ABA)를 처리하여 시간 별 CBF/DREB family 유전자의 발현 양상의 차이를 확인하였다.

나. 연구 결과

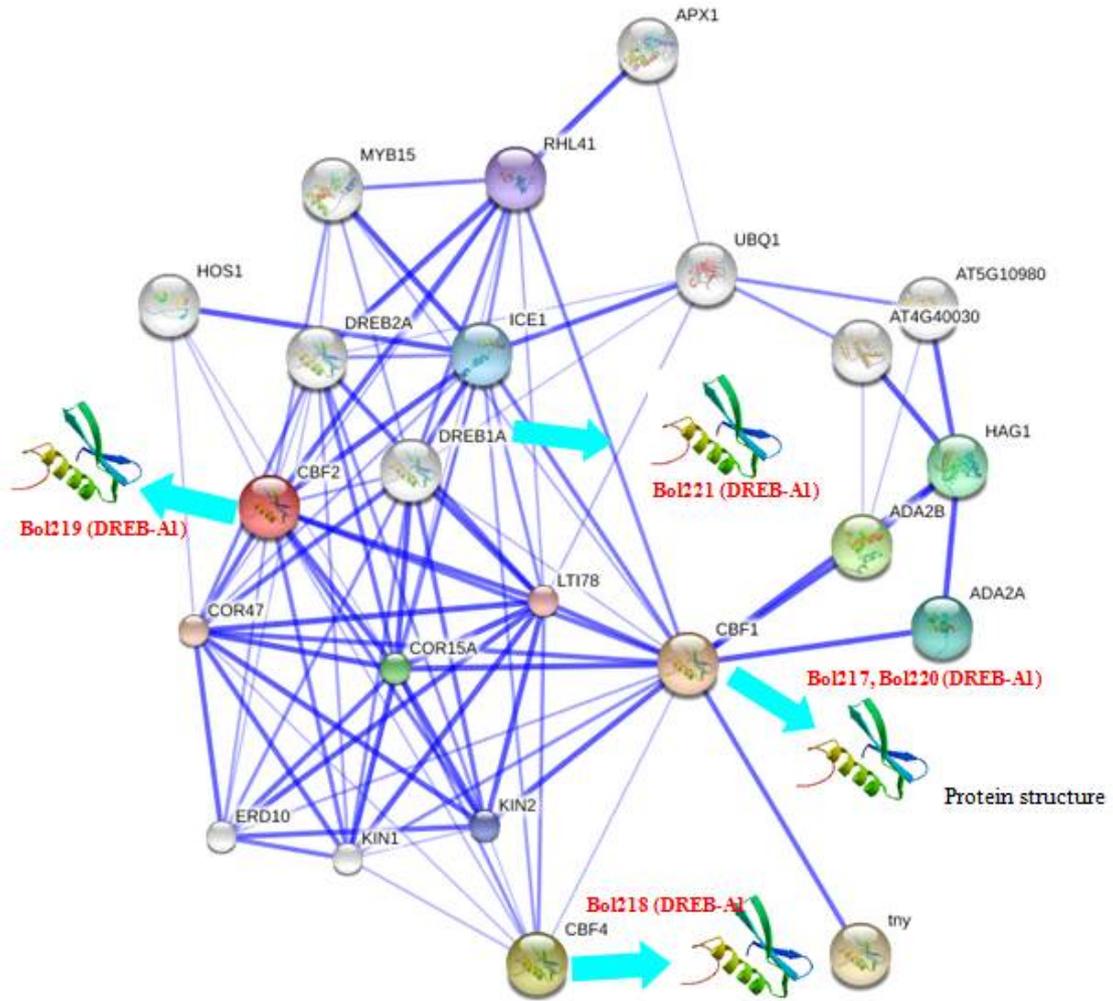


그림 47. 양배추와 찾아낸 5개의 *BoCBF* 유전자와 애기 장대의 관련 유전자 간의 상호 네트워크 분석

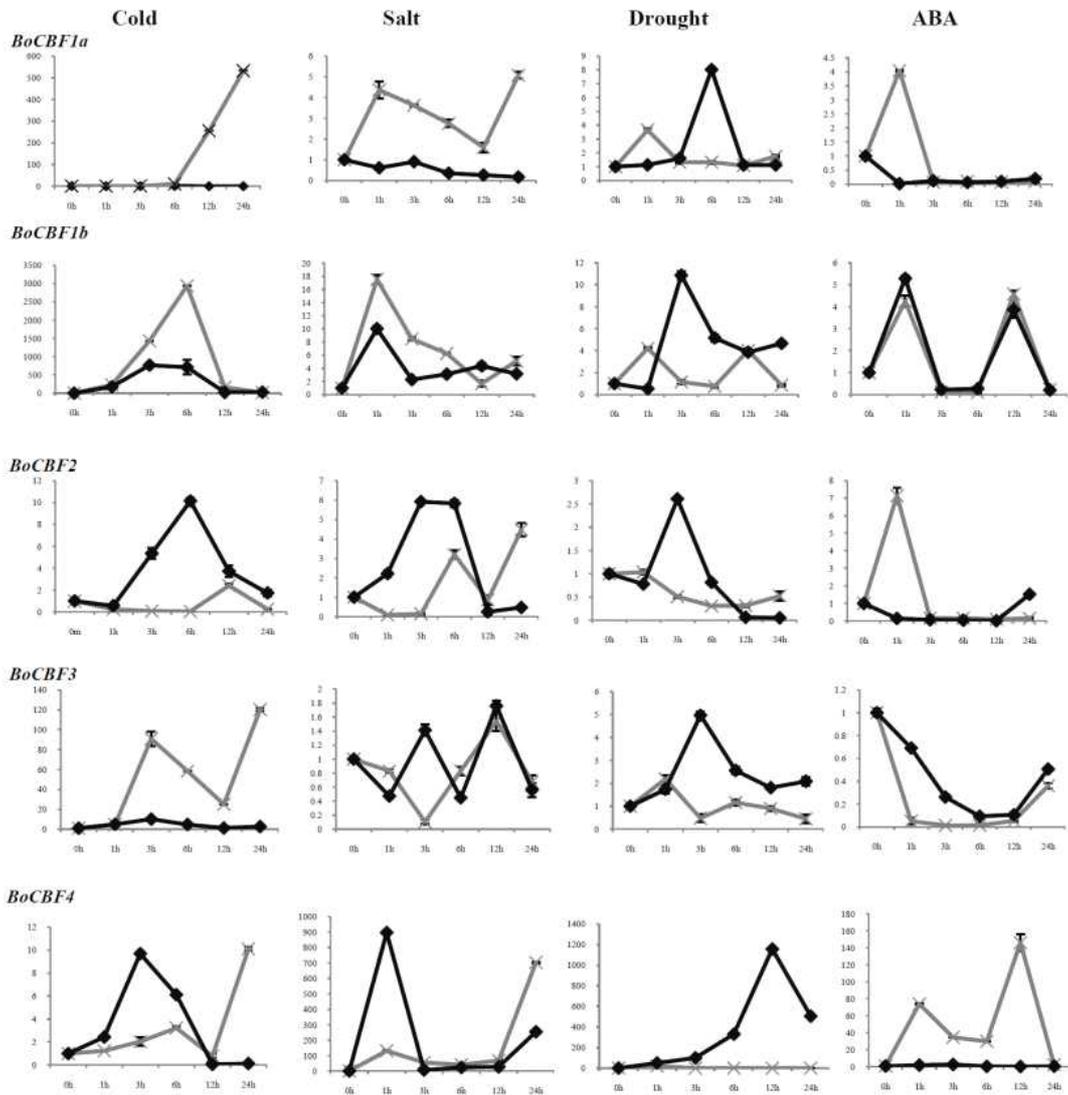


그림 48. 일정 기간 동안에 환경적 스트레스 처리에 따른 5가지 *BoCBF* 유전자 상대적 발현

6. 양배추 내한성/내동성 관련 유전자 동정 및 발현 분석

가. 연구요약

저온 및 동결에 관한 스트레스는 Brassica류 작물의 생산을 감소시키는 주요한 환경적인 원인 중 하나이다. 내한성과 내동성에 관련된 유전자를 찾아 저온 및 동결에 강한 품종을 육성시키는 것이 문제를 해결하는데 가장 효과적일 수 있다. 따라서 저온 처리로 유도된 전사체의 프로파일링 분석 기법은 내한성 및 내동성과 관련된 잠재적인 유전자들을 찾는데 효율적인 방법으로 제시되고 있으며, 본 연구에서는 배추(*Brassica rapa*)의 전체 genome에 대한 microarray 분석 데이터를 이용하여 높은 발현 수준을 나타내는 99개의 유전자를 찾아냈다. 이 데이터를 기초로 하여 Blast 분석을 통해 양배추(*Brassica oleracea*)에서 높은 상동성을 가지는 99개의 유전자를 확인하였다. 저온 처리에 반응하는 이들 유전자들의 발현에 대한 유효성 평가를 위하여, 저온 저항성 및 이병성 양배추 계통을 이용하여 양배추의 99개의 후보 유전자에 대한 RT-PCR 및 정량 PCR 분석을 실시하였다.

총 99개의 후보 유전자 중 43개의 유전자가 저온에 대하여 확실한 발현 차이를 보였으며, 이는 *BoCRGs*(*B. oleracea* cold response genes)로 정의하였다. 이들 중 18개의 *BoCRGs*는 저항성 양배추 계통에서 매우 높은 수준의 발현을 나타냈으며, 이는 microarray 발현 수준과 일치하는 결과이다. 게다가 18개 *BoCRGs* 가운데 12개는 4°C 처리 후에 저항성 및 감수성 간의 대조적인 발현 차이를 나타내는 것을 확인하였다. 또한 12개의 *BoCRGs* 중에 *BoCRG54, 56, 59, 62, 70, 72* 및 *99*는 저온 조절 경로 상에 상호 네트워크를 형성하는 것을 예측 모델을 통해 확인하였으며, 이러한 조절 네트워크 모델은 내한성 및 내동성 배추과 작물을 육성시키는데 유용한 자료가 될 것으로 사료된다.

양배추(*Brassica oleracea*)는 세계적으로 재배되는 작물중 하나이지만, 저온스트레스에 대해 감수성을 보이는 경우가 많다. 따라서 본 연구에서는 저온스트레스에 저항성을 보이는 계통과 민감성을 보이는 계통간의 RNA-seq.을 통하여 저온에 반응하는 유전자들의 transcriptome을 분석하였다. 이러한 연구에서 얻어진 결과물들은 저온에 강한 양배추의 분자 마커 개발 및 품종육성에 유용하게 사용할 수 있을 것이다.

나. 연구 결과

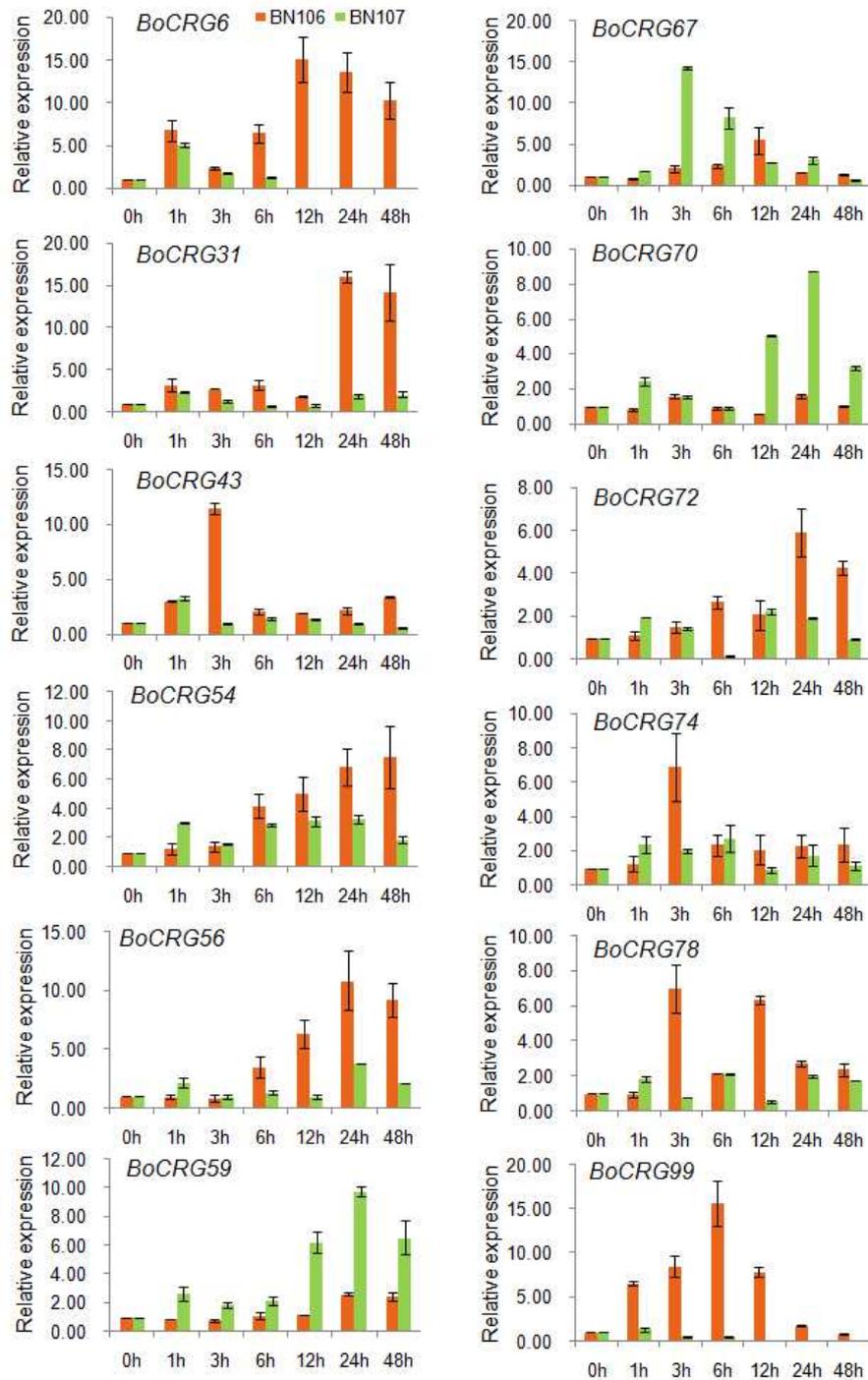


그림 49. 양배추의 저온 저항성 계통(BN106)과 이병성 계통(BN107)에서 4°C 저온 스트레스 처리 후 12개 *BoCRGs*의 발현 유형 분석 결과

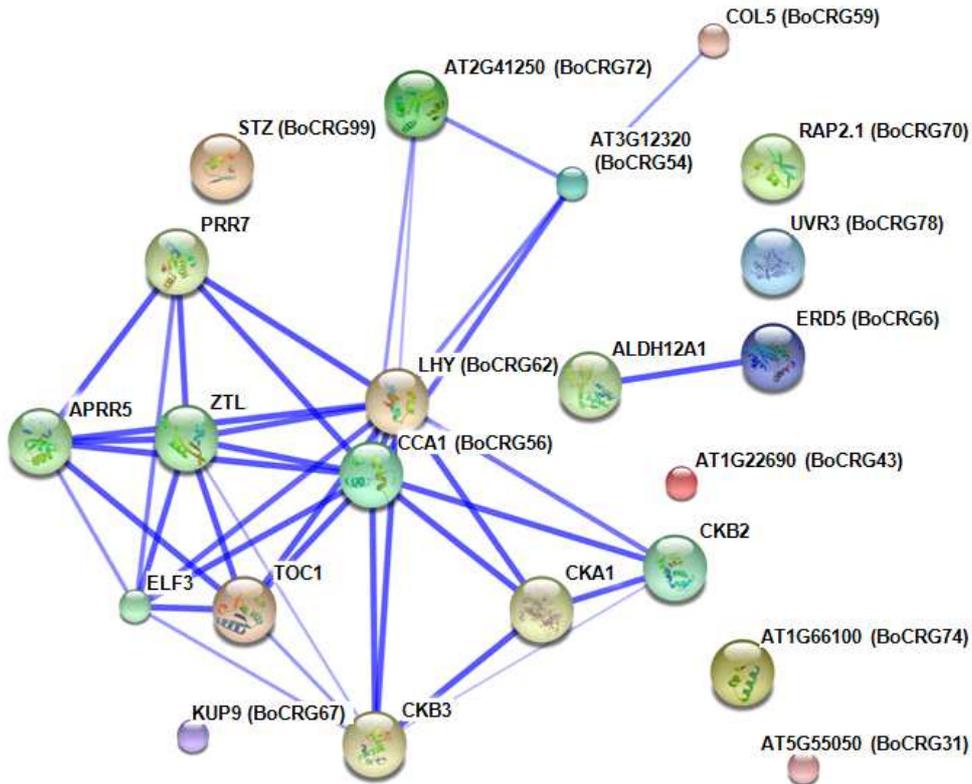


그림 50. 12개의 *BoCRGs*와 애기장대의 관련 유전자들과의 상호 네트워크 분석
BoCRG54, *56*, *59*, *62* 및 *72* 단백질들은 AT3G12320(unknown), 일주기성 시계(circadian clock)와 관련된 CCA1, zinc finger (B-box type) 계 COL5, LHY 및 애기장대의 HAD(haloacid dehalogenase-like) 가수분해효소 계 단백질(AT2G41250)과 높은 상동성을 보이며, 개화 유도 신호기작 (flowering induction signaling), 플라빈 단백질 계 크립토크롬 신호기작(cryptochrome signaling), 및 피토크롬 신호기작 (phytochrome signaling) 등 일주기성, 광주기성 생체리듬과 관련성이 높은 것으로 확인됨.

7. 양배추의 저온 관련 bZIP transcription factor 동정 및 발현 분석

가. 연구요약

bZIP 전사인자는 식물에서 주로 신호 전달에 있어서 중요한 기능을 한다. 특히, ABA (Abscisic acid) 관련된 스트레스 반응과 관련하여 bZIP 단백질이 잘 알려져 있다.

이전 연구에서 배추(*Brassica rapa*)의 136개의 bZIP 단백질을 확인하였으며, 이를 기초로 본 연구에서는 양배추에서 119개의 bZIP 추정 단백질을 찾았다.

양배추의 bZIP 그룹들을 애기장대(*AtbZIP*)와 배추(*BrbZIP*)의 전사인자 정보와 비교하여 아미노산 염기서열의 유사성을 근거로, 63개의 카테고리 분류하였다. 애기장대와 배추, 및 양배추의 bZIP 단백질들 간의 염기 서열 유사성은 똑같은 UARR과 LCRs 도메인 구조로 되어있으며, 이는 Q, D, P, N, S 및 G와 같은 6개의 아미노산을 가지고 있어 bZIP 단백질의 구조와 기능에 중요한 역할을 할 것으로 추측된다. 양배추 염색체 상의 위치를 확인해 본 결과, 4번 염색체에서 21%의 *BolbZIP* 유전자들이 분포하였고, 5번과 6번 염색체에서는 각각 6, 7%를 차지하고 있었다. 이는 이전 연구에서 배추의 9번 염색체에서 21% 다수 분포하는 것과는 상이한 결과이다. 저온 처리 후 유전자의 발현 양상은, 이전 배추의 발현 결과를 토대로 *BolbZIP* 유전자를 4개의 그룹으로 나누었으며, 저온 저항성 양배추 계통인 BN106에는 변화가 없고 이병성 계통인 BN107에서 높게 발현하는 3개의 유전자 즉, *Bol1008071*, *Bol1033132* 및 *Bol1042729*이 발현되었다. 또한 배추에서 저온에 반응하는 6개의 주요 *BrbZIP* 유전자들과 비교했을 때, 4개의 *BolbZIP* 유전자들은 저온 처리에 반응하여 비슷한 양상을 보였다.

특히, *Bol1031132*는 *Bra020735*와 저온에 반응하여 똑같은 발현 양상을 보였는데, 둘 다 N-rich 영역을 가진 LCR을 가지고 있었으며, 이 결과를 토대로 N을 포함하는 영역을 가진 *BolbZIP* 단백질은 저온 스트레스 반응과 밀접한 관련성이 있을 것으로 사료된다.

나. 연구 결과



그림 51. 저온에 반응하는 *BolbZIP*과 *BrbzZIP* 유전자들의 heat map

저온(4°C)과 동결(-2°C) 스트레스에 반응하는 *BolbZIP*과 *BrbzZIP* 유전자들의 발현 양상을 보여줌. Heat map은 qRT-PCR과 RT-PCR 결과를 토대로 작성함.

8. 양배추 노균병 저항성 SNP마커 개발

가. 연구 요약

양배추 노균병은 양배추의 생산력을 저하시키는 병해 중의 하나로, Farinhó 등 (2007, Euphytica)이 보고한 SCJ19/PagI 마커를 대량의 샘플을 신속 정확하게 선별하기 위해 HRM 마커로 전환하였다. 전환한 HRM 마커는 노균병 저항성과 이병성 간의 유전자형을 명확하게 구별할 수 있었다.

나. 연구 결과



그림 52. 염색체 상의 SCJ19/PagI의 위치

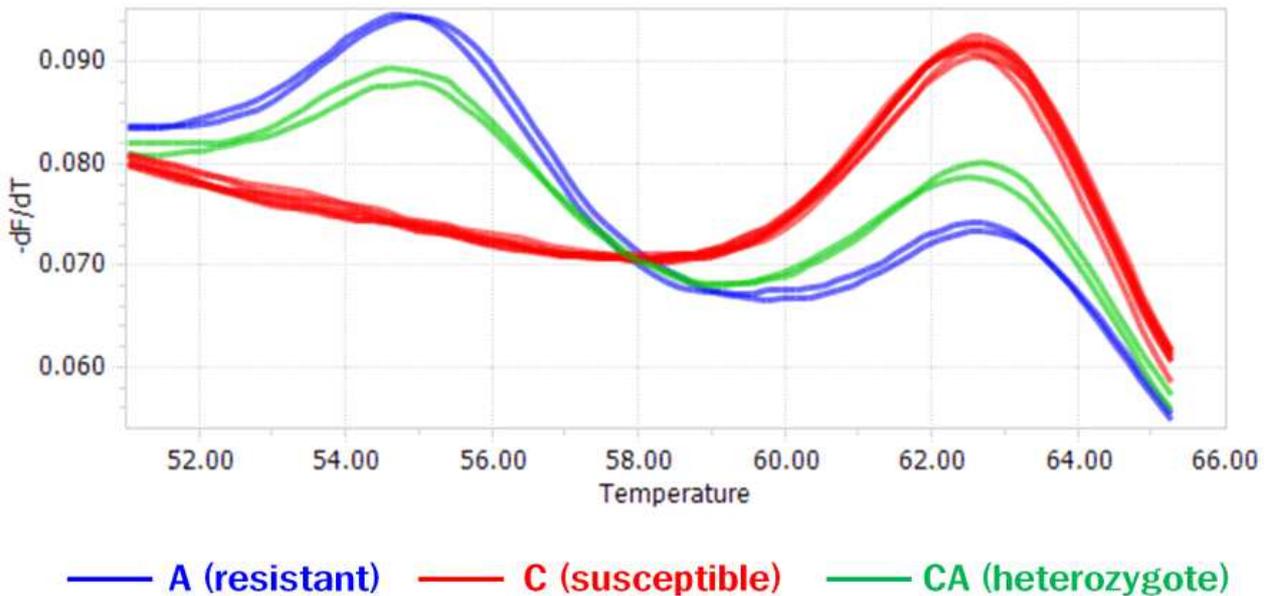


그림 53. 노균병 저항성 및 이병성 판별 위치의 HRM 테스트 결과

9. 양배추에서 스트레스에 대한 Alfin-like 전사인자의 동정 및 발현분석

가. 연구요약

양배추는 세계적으로 중요한 채소작물이다. 양배추의 yield 와 quality는 cold, salinity 및 drought와 같은 비생물학적 스트레스와 생물학적 스트레스에 많은 영향을 받는다. 식물 발달 과정에 관여하는 Alfin-like (AL) transcription factors (TFs)와 관련하여 *Medicago sativa* (alfalfa)에서 salt 스트레스 이외 환경스트레스가 식물에 미치는 영향에 관한 연구가 중요하다. 본 연구에서는 4개의 groups 으로 구분되는 12개의 AL TFs를 동정하였다. 일치하는 BoAL 유전자들은 기관 특이적 발현을 나타냈으며 9개의 *B. oleracea* chromosomes 중 6개의 chromosomes에 분포하고 있었다. 게다가 10 BoAL 유전자들은 cold, salinity, drought, 및 abscisic acid와 같은 비생물학적 스트레스에 significant하게 발현하였고 2 BoAL 유전자들은 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*이 접종 후 발현이 됨을 확인하였다. 12개의 BoAL 유전자들은 생물학적 스트레스와 비생물학적 스트레스에 모두 반응하는 것으로 나타났다. 높게 발현된 BoAL 유전자들은 Brassica crops에서 몇 가지 스트레스에 저항성을 나타내는 후보 유전자들과 같은 것으로 동정되었다. 이러한 본 연구의 결과들은 Brassica에서 functional genomics 연구를 위한 data sets을 제공하게 될 것이다.

나. 연구결과

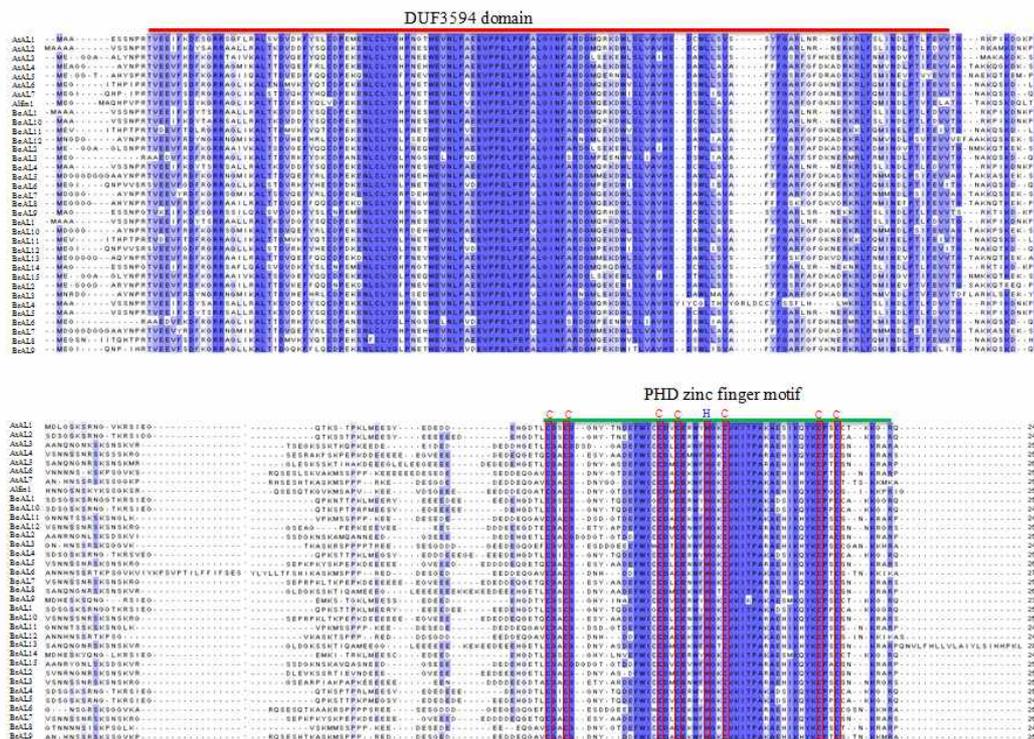


그림 54. *B. oleracea*, *B. rapa*, Alfalfa 및 *A. thaliana*의 Alfin-like proteins의 배열

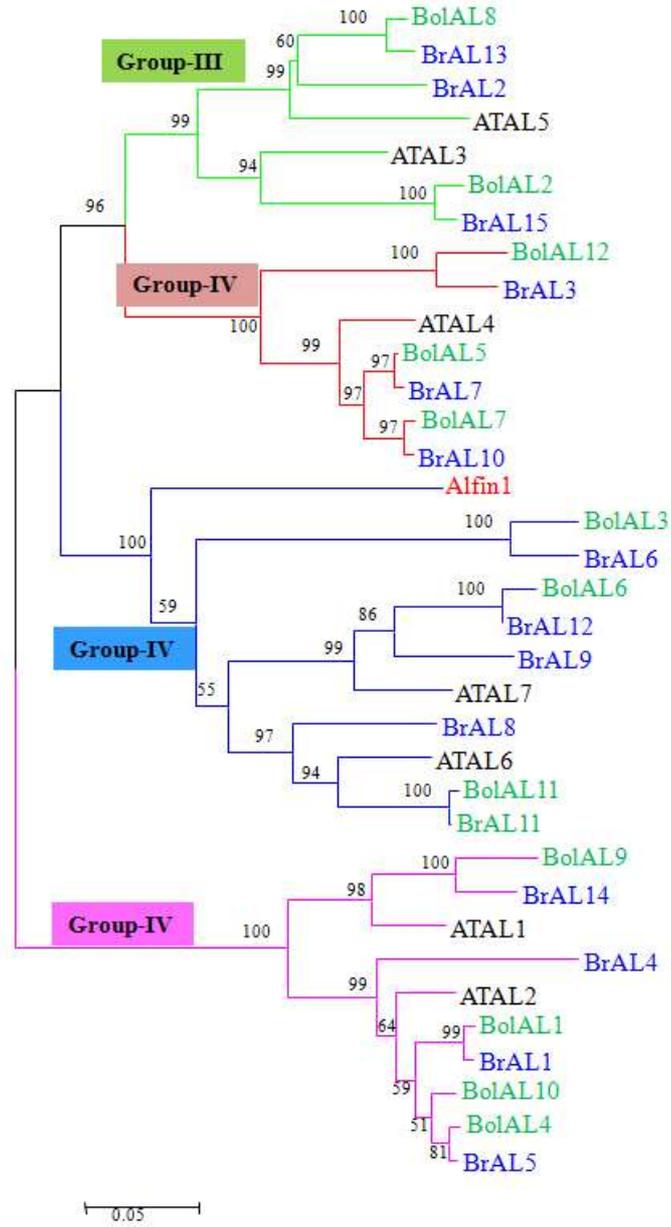


그림 55. *B. oleracea*, *B. rapa*, Alfalfa 및 *A. thaliana*의 Alfin-like 유전자들의 Phylogenetic tree

10. 양배추에서 뿌리혹병 발달 동안 Methyl salicylic acid gene 발현 분석

가. 연구요약

본 연구에서는 7개의 BoMES로부터 유전자 발현 분석을 통해 BoSSI와 BoBSMT1 유전자들이 동정되었다. 추가적으로, *P. brassicae*로부터 PbBSMT1 유전자는 병 접종 후의 안정성 확인과 발현 분석을 위해 이용되었다. BoSSI 유전자는 저항성 계통에서 *P. brassicae* 감염동안 up-regulated 되고 S(이병성) line(계통)에서는 down-regulated 되었다. 특히 숙주와 병원균에서 methyl transferase 유전자들은 down-regulated 되었지만 저항성 계통에서 유의성 있는 발현을 나타내진 않았다. 하지만, 감염된 이병성 계통의 뿌리에서는 PbBSMT1 유전자들이 높게 발현되었다. 따라서 본 연구에서는 양배추에서 methyl salicylate 유전자들이 후천적으로 저항성을 나타내는데 필요하다는 것을 밝혔다. 더욱이, methyl transferase의 발현은 MeSA의 생합성을 방해하기 위해 down-regulated 되어진다. 이러한 유전자들의 연구는 저항성 식물로의 발달을 위해 분자유종에서 가치 있는 연구가 될 것이다.

나. 연구결과

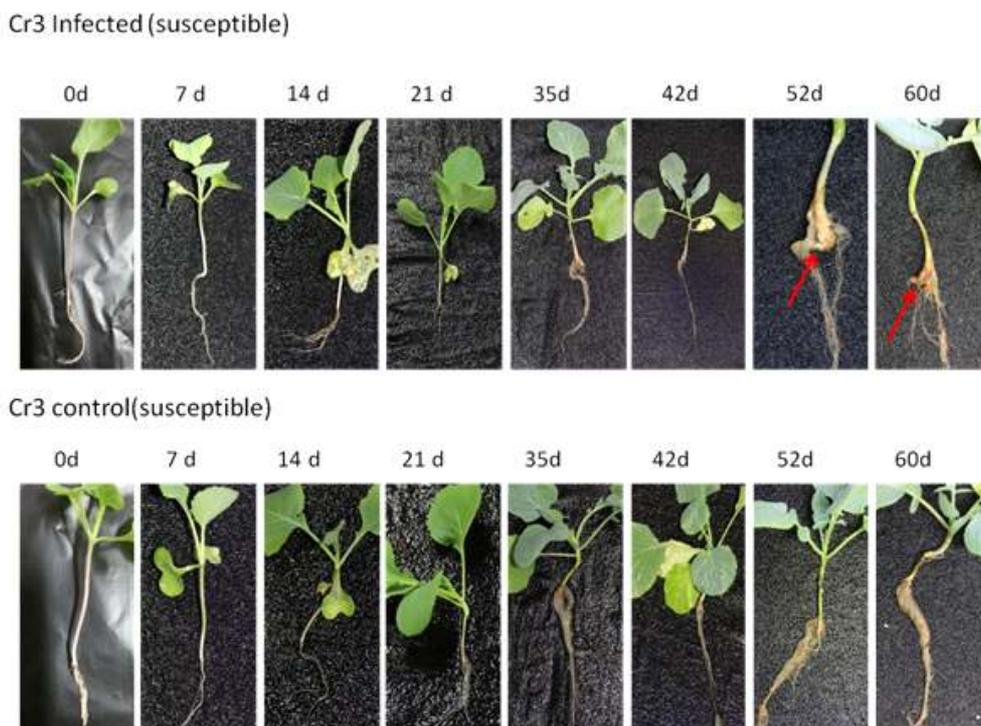


그림 56. 양배추에서 감수성 라인에 뿌리혹병원균 접종 후 시간별 뿌리혹 발달 상황

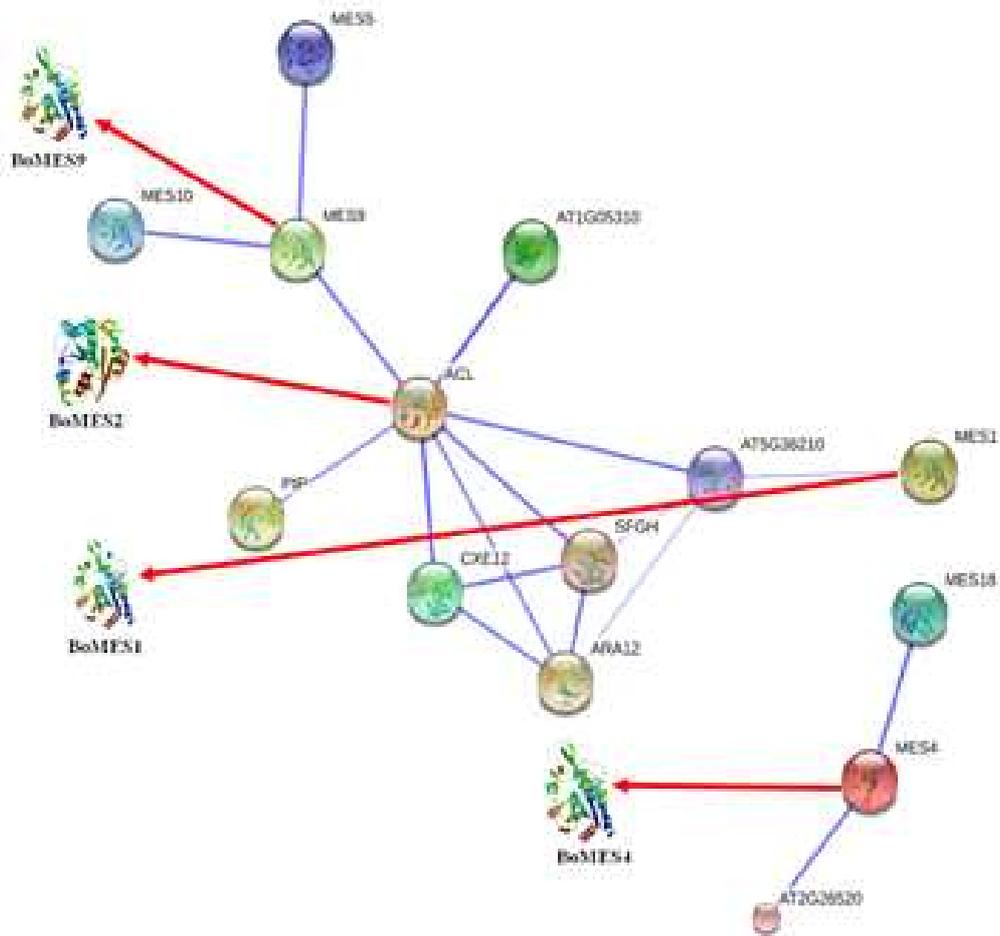


그림 57. BoMES protein과 애기장대의 protein의 상호작용

11. 양배추에서 비생물학적 스트레스에 의한 SGT1 유전자들의 동정 및 발현 분석

가. 연구요약

SGT1 유전자들은 다양한 생물학적, 비생물학적 스트레스에 대한 반응과 관련되어 있다. 양배추의 SGT1 유전자는 SKP1과 GCR2 두 개의 억제유전자의 상호작용으로 스트레스에 반응을 한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 다양한 분석을 통해 4개의 SGT1 유전자들을 동정하였다. Phylogenetic 분석에서, 이 유전자들은 BolSGT1a, BolSGT1b-1, BolSGT1b-2, 및 BolSGT1 그룹의 형태로 나타났다. 기능분석과 기관 특이적 발현 양상들은 스트레스 상태에서 BolSGT1 유전자들이 관여하는 것으로 나타났으며, 또한 BolSGT1 유전자들은 heat, cold, drought, salt, or ABA의 반응에서 발현의 변화가 유의성을 나타내었다. 상호 네트워크 분석은 발현 분석을 통해 확인하였다. 또한, BolSGT1a와 BolSGT1b 유전자들은 스트레스 상태에서 서로 강하게 연관되어 있음을 나타냈었다. 그러나 BolSGT1의 유전자는 스트레스에 미비하게 연관되어있어 co-regulator 없이 기능하는 스트레스 저항성 관련 유전자로 추정한다. 본 연구의 결과들은 BolSGT1 유전자들이 양배추의 비생물학적 스트레스 저항성을 향상시키기 위하여 목표유전자로 선발하였다.

나. 연구결과

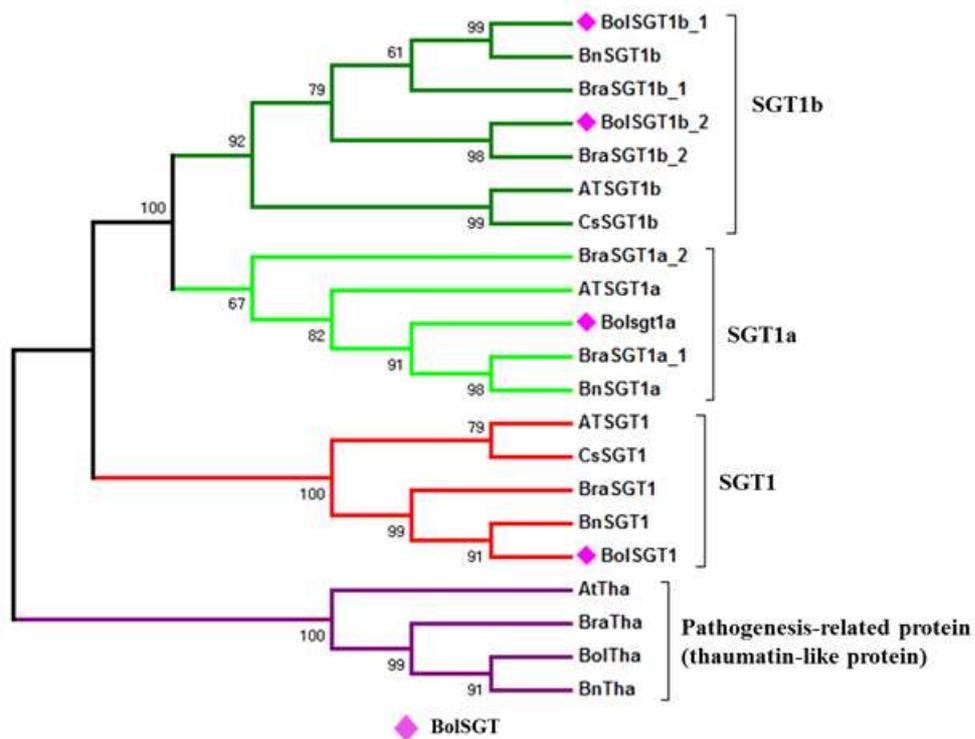


그림 58. Brassicaceae의 SGT1 proteins의 phylogenetic 분석

표 6. 본 연구에서 이용된 BolSGT1 유전자들의 sequence 특성

Name	Accession number	Nucleotide length (bp)	ORF (bp)	Chromosome number	Exon positions
<i>BolSGT1a</i>	Bol042107	1,879	1,032	C06	1-160 516-585 683-807 888-969 1056-1152 1227-1292 1369-1507 1587-1879
<i>BolSGT1b_1</i>	Bol006784	2,022	963	C09	1-160 406-475 553-677 776-893 990-1086 1177-1242 1326-1464 1566-1645 1915-2022
<i>BolSGT1b_2</i>	Bol025710	2,189	687	C03	1-108 968-1064 1148-1274 1388-1512 1697-1766 2030-2189
<i>BolSGT1</i>	Bol009238	2,178	1,947	C03	1-186 264-543 628-966 1037-2178

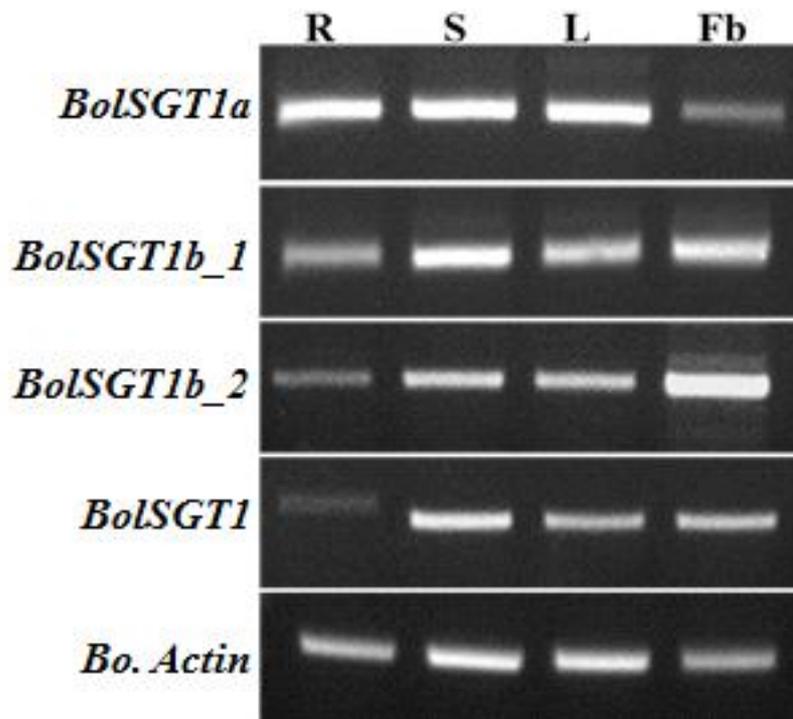


그림 59. BolSGT1 유전자들의 기관 특이적 발현 분석. R- Root, S-Stem, L-Leaf, Fb-Flower bud

12. 양배추에서 cold관련 GST superfamily 유전자들의 genome-wide 분석

가. 연구요약

식물은 고착생물로 저온 스트레스 조건에서 심각한 성장 및 발달 장애를 겪을 수 있다. 저온에서의 식물 내성은 신호전달 물질에 의해 저온관련 대사경로로 구동된다. 글루타치온 트랜스퍼라제 (GSTs, EC 2.5.1.18)는 특이하거나 다기능을 가진 공역 단백질과 상호작용을 하여 스트레스 반응과 산화적 손상에 대한 광범위한 저항성 메커니즘 역할을 한다. 일반적으로, 이 효소는 식물 고유에 있는 타우, 피, 람다 및 DHAR 클래스의 서열과 유사성에서 세분화 할 수 있다. 본 연구는 양배추에서 60개의 GST 유전자를 HMM 프로그램, 배추과 작물 유전체의 Blast 분석, *Bo106* (cold tolerant, CT)과 *Bo107* (cold susceptible, CS)에서 가상실험 및 발현분석으로 확인하였다. 진화적 분석에 기초하여 추정되는 1차, 2차 유전자를 분석하여 BoGST 유전자를 9가지로 분류하였다. 양배추의 GST와 애기장대의 GST 유전자 사이의 syntenic 영역은 Circos 소프트웨어를 사용하여 예측한 결과 양배추 유전체에는 확실히 종내 중복이 분명히 있음을 알 수 있었다. 본 연구팀은 염기서열의 기능과 위치 분석으로 GST 유전자가 저온 스트레스와 관련된 유전자임을 제안한다. BoGST 유전자의 기관별 표현형은 GST의 기관별 발현 양상이 다르다는 것을 알 수 있다. 저온 스트레스를 받는 동안 GST 관련 대부분의 유전자들이 CT와 CS 계통에서 6시간과 1시간대에 매우 높게 발현한다는 것을 알 수 있었다. 본 연구팀은 양배추 GST superfamily를 포괄적으로 분석하였으며, 이 유전자들이 저온 내성에 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다.

나. 연구결과

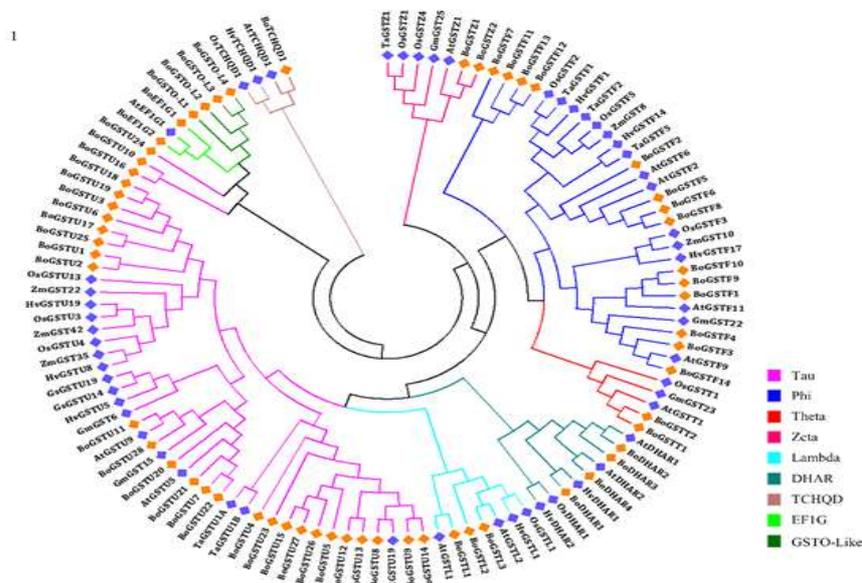


그림 60. 계통도를 활용하여 애기장대, 벼, 보리, 밀, 수수, 옥수수, 콩의 공개된 GST 단백질을 사용하여 양배추의 GST 단백질의 분류

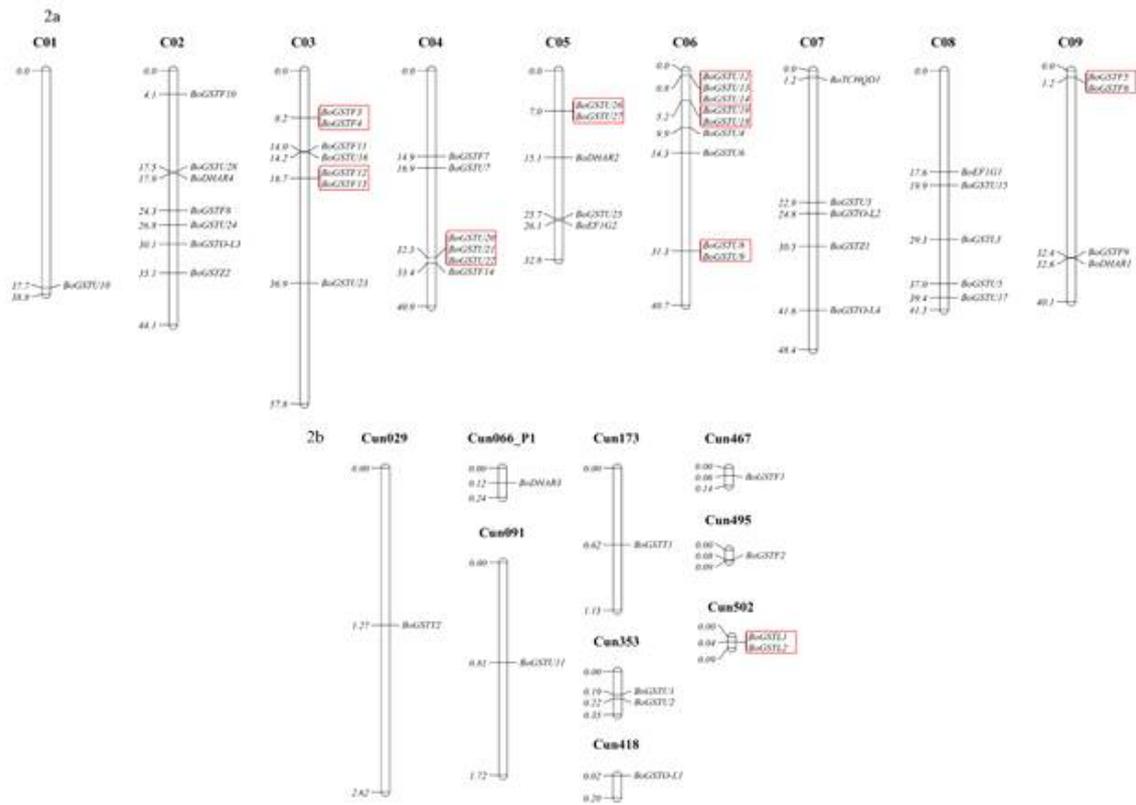


그림 61. 양배추 유전체에서 Mapchart 소프트웨어를 활용하여 GST 유전자를 분류함

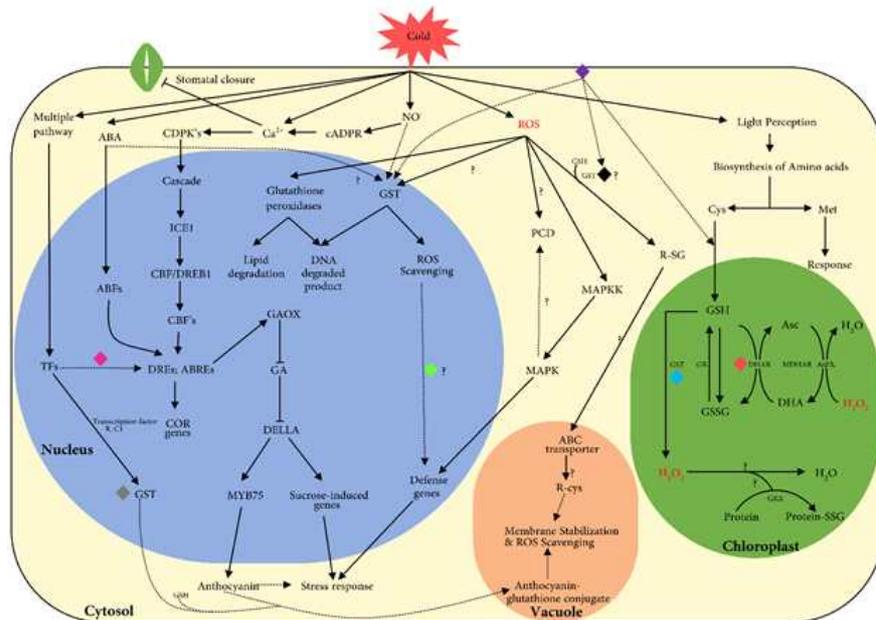


그림 62. 식물의 저온 경로에 관여하는 GST 유전자의 간략한 개요. 색깔이 있는다이아 몬드는 GST의 다른 역할을 나타냄. 잠재적인 단백질-단백질 상호 작용을 기 반으로 예측 가능한 역할을 붉은 선과 검은색 점선으로 표시하였다. GSH의 역할: 광학에서 저온 스트레스가 있는 동안 GST 유전자에 대한 경로를 나타 냄

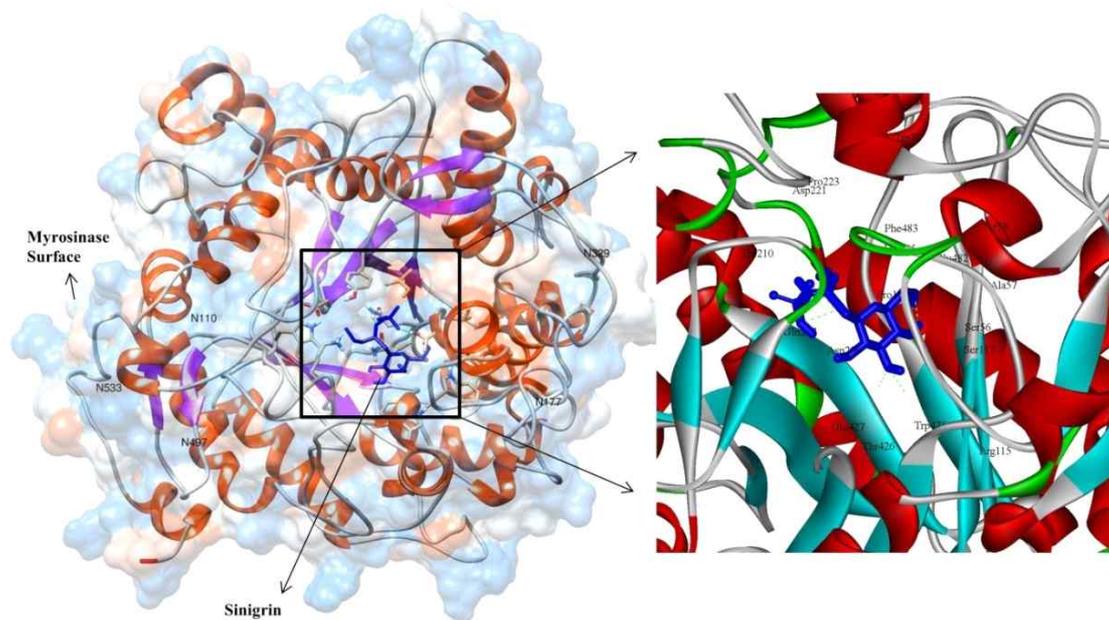


그림 64. myrosinase-sinigrin의 복합구조를 그래픽으로 묘사. Myrosinase 단백질의 도킹되는 곳을 확대하여 나타냄. 아미노산과 상호작용하는 곳은 검은색으로 나타냈으며, 녹색선은 수소결합, 파란색은 sinigrin을 표시함

표 7. 양배추의 MYR - sinigrin의 수소결합에 의한 상호작용 결과

S. No	Hydrogen Bond Interacting Residue	Hydrogen Bond Donor	Hydrogen Bond Acceptor	Hydrogen Bond Length (Å)	Number of Hydrogen Bonds
1	ARG115 *	ARG115:HH22	LIG1:O	2.36	1
2	SER117	SER117:HG	LIG1:O	1.7	1
3	GLN207 *	GLN207:HE21	LIG:O	2.10	1
4	T221	LIG1:HN	ASP221:OD1	2.27	1
5	GLU427 *	LIG1:H	GLU427:OE1	1.85	2
		LIG1:H	GLU427:OE2	2.34	-
6	LYS485	LYS485:HZ2	LIG1:O	2.43	2
		LYS485:HZ2	LIG1:O	2.41	-

Non-bonded interacted residues: TRP475, THR426, ASN206, PHE483, GLU482, SER56, ALA57, PRO161, TRP71, TYR58 AND PRO223

* Catalytic and nucleophile residues are highlighted in bold.

14. 양배추 아종의 식용부위에서 Glucosinolate 함량과 생합성 유전자의 발현 분석

가. 연구요약

글루코시놀레이트(Glucosinolates)는 곤충과 미생물의 공격으로부터 식물을 보호하는 항암 및 항산화와 관련된 생화학적 화합물이다. 글루코시놀레이트는 양배추 잎과 종자를 포함하여 모든 배추과 작물에 풍부하게 포함되어 있다. 본 연구팀은 양배추 아종에 관련하여 양배추, 케일, 콜라비, 콜리플라워에서 각각 3 품종을 이용하여 가식부위의 글루코시놀레이트 생합성 유전자를 확인하기 위해 RT-PCR로 발현 양상을 연구하였다. 또한, 글루코시놀레이트 함량을 알아보기 위해 HPLC로 전반적인 주요 글루코시놀레이트 함량을 연구하였다. RT-PCR 분석을 위해 81개의 유전자를 Bolbase에서 선별하였는데 그 중, 전사인자 관련 19점이 글루코시놀레이트 발현 양상에 확실하게 차이가 있었으며, 알리파틱과 인돌릭 관련 25점이 글루코시놀레이트 생합성 발현 양상에 관여되어 있을 것으로 확인할 수 있었다. 그 외에 브레이크다운 관련 몇몇 유전자도 관련이 있음을 확인하였다. 양배추 및 케일의 경우 가식부위는 잎이며 콜라비의 가식부위는 줄기, 콜리플라워의 경우 가식부위가 화퇴부위이기 때문에 각 기관별 다른 발현을 기대할 수 있었다. 콜라비의 경우 글루코시놀레이트 관련 유전자의 발현이 전체 81 중 8점의 유전자가 다른 아종(양배추, 케일, 콜리플라워)에 비교하여 현저하게 다른 발현 양상을 나타내었다. 콜라비의 경우 알리파틱 관련 유전자인 Bol036286 (MYB28)과 인돌릭 관련 유전자 Bol030761 (MYB51)만 발현하는 것을 알 수 있었다. 이 외에 다수의 전사인자가 다른 부위에서는 발현을 하지만 콜라비(줄기 부위)의 경우는 발현양이 현저히 미비하다는 것을 확인할 수 있었다. 결과적으로 글루코시놀레이트 생합성에서 모든 유전자의 발현이 필수적이지는 않다는 것을 알 수 있었다. HPLC 분석을 사용하여, 글루코시놀레이트 관련 물질 16 종류를 양배추 아종인 양배추, 콜라비, 케일, 콜리플라워, 네 종에서 식별하였다. 16 종류의 글루코시놀레이트 물질 중 9 종은 알리파틱 관련 물질, 4 종은 인돌릭 관련 물질, 1 종은 아로마틱 관련 물질을 확인하였다. 콜리플라워는 전체 글루코시놀레이트 16 종류에서 14 종류가 측정치가 높았다. 알리파틱 글루코시놀레이트 물질인 gluconapin은 콜리플라워에서만 측정할 수 있었다. 또한, 알리파틱 글루코시놀레이트 물질인 glucoiberberin과 glucobrassicinapin은 콜라비에서 높은 함량을 나타냈다. 인돌릭 관련 methoxyglucobrassicin과 아로마틱 관련 gluconasturtiin은 콜리플라워에서 높은 함량을 나타냈다. 본 연구는 향후 가식부위의 글루코시놀레이트 유전자 발현과 물질 함량에 관련하여 더 상세한 조사와 정확한 식별을 위해 기본적인 데이터로 활용할 수 있을 것이며, 나아가 육종 프로그램에서 글루코시놀레이트 관련 특이적인 분자마커 개발로 기능성 양배추를 개발하는데 도움이 될 것으로 기대한다.

나. 연구결과

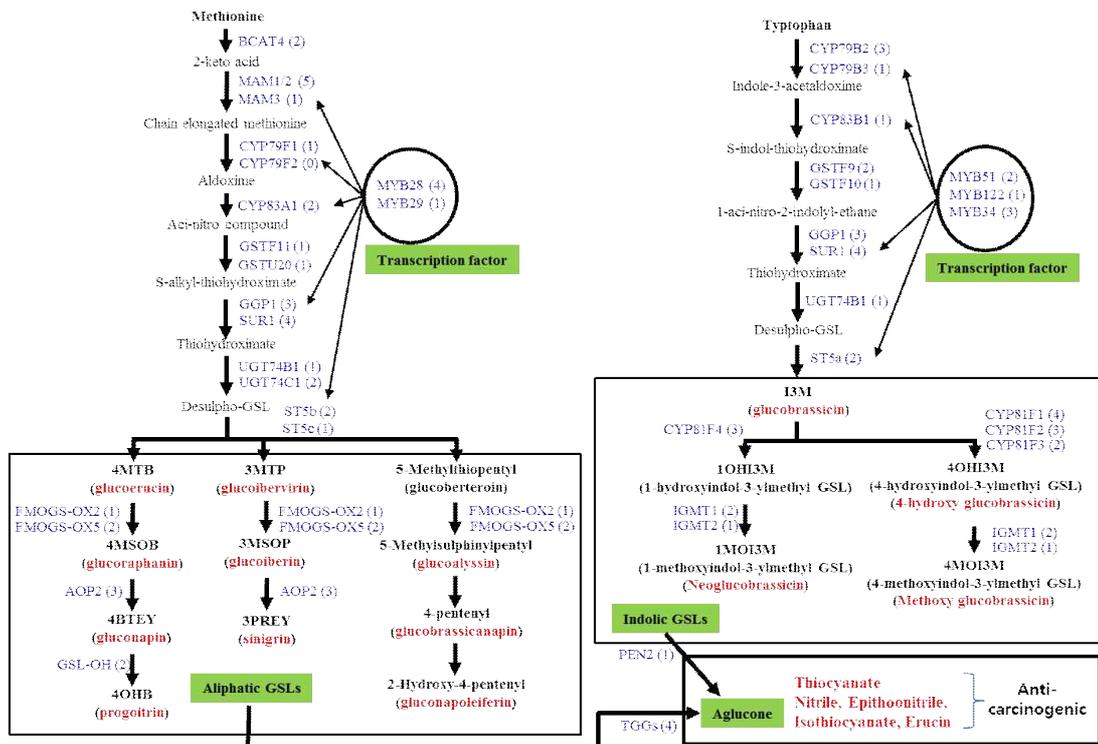


그림 65. 알리파틱과 인돌릭 글루코시놀레이트 생합성 경로. 파란색은 RT-PCR로 유전자 발현을 알아보았으며, 빨간색은 HPLC로 글루코시놀레이트 함량을 조사함

표 8. 양배추 아종, 양배추, 케일, 콜라비, 콜리플라워의 가식부위에서 글루코시놀레이트 함량을 확인하기 위한 샘플 정보

No.	Common Name	Genotype	Sampling Site/ Edible Organ	Scientific Name of the Genotype
1	Cabbage	White cabbage	Leaf	<i>B. oleracea</i> L. convar. <i>capitata</i> (L.) Alef. var. <i>alba</i> DC
2	Cabbage	Cabbage	Leaf	<i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> alba
3	Cabbage	Sprouting red cabbage	Leaf	<i>B. oleracea</i> <i>capitata</i> rubra
4	Kale	Curly kale Halffall	Leaf	<i>B. oleracea</i> <i>acephala</i>
5	Kale	Curly kale	Leaf	<i>B. oleracea</i> L. convar. <i>acephala</i>
6	Kale	Curly kale	Leaf	<i>B. oleracea</i> L. convar. <i>acephala</i>
7	Kohlrabi	Kohlrabi	Stem	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> Plenck
8	Kohlrabi	Kohlrabi	Stem	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i> Plenck
9	Kohlrabi	Kohlrabi	Stem	<i>B. oleracea</i> L. convar. <i>acephala</i> (DC) Alef. var. <i>g</i> <i>ongyodes</i>
10	Cauliflower	Cauliflower	Floret	<i>B. oleracea</i> L. convar. <i>botrytis</i>
11	Cauliflower	Cauliflower	Floret	<i>B. oleracea</i> L. convar. <i>botrytis</i>
12	Cauliflower	Cauliflower	Floret	<i>B. oleracea</i> L. convar. <i>botrytis</i>

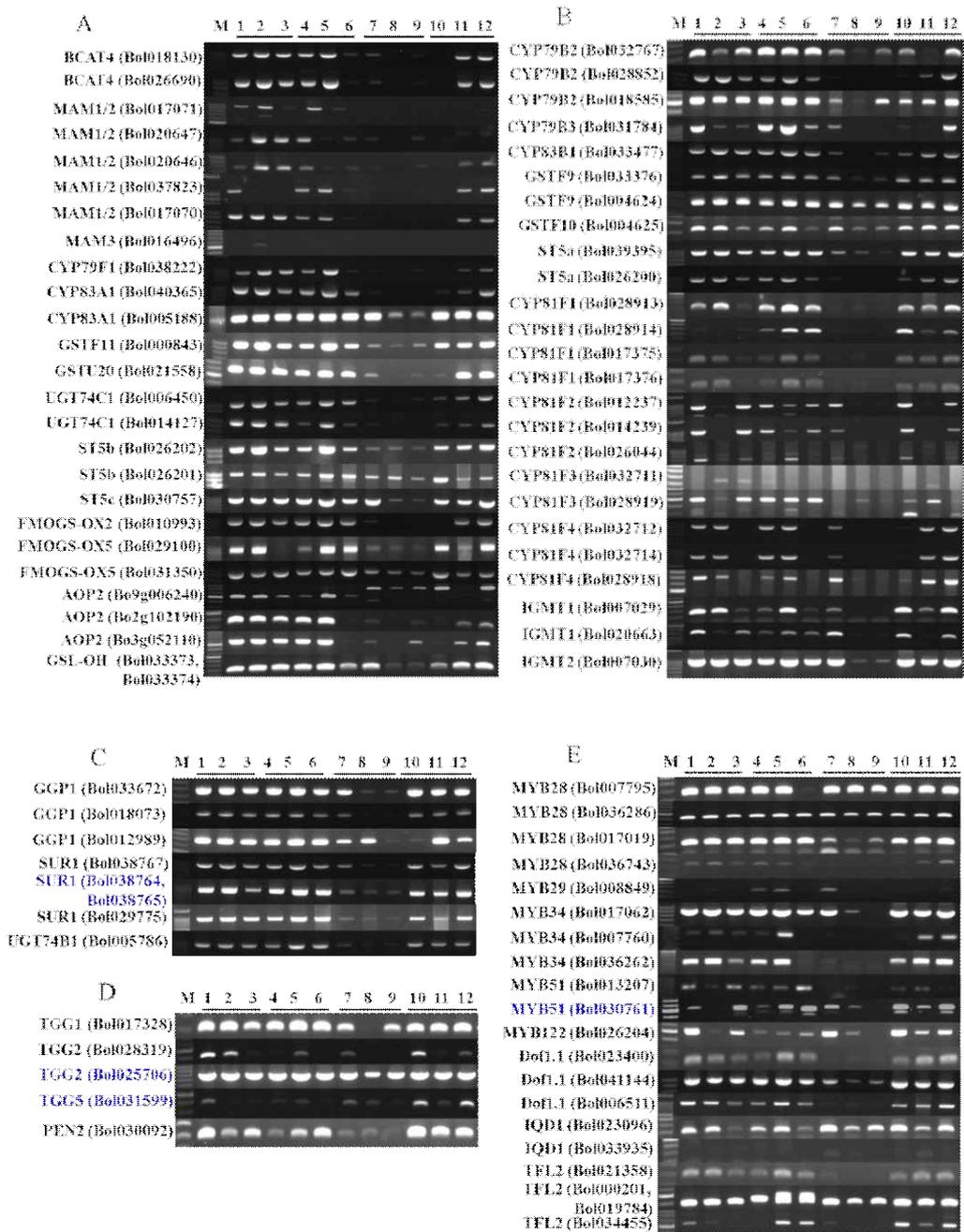


그림 66. 양배추 아종의 가식부위를 이용하여 RT-PCR 분석으로 발현양 확인. 1-3, 양배추, 4-6, 케일, 7-9, 콜라비; 10 ~ 12, 콜리플라워. (A) 알리파틱 글루코시놀레이트 관련 유전자, (B) 인돌릭 글루코시놀레이트 관련 유전자, (C) 알리파틱과 인돌릭 동시에 관여하는 유전자, (D) 브레이크 다운에 관여하는 유전자, (E) 글루코시놀레이트 생합성의 전자인자. 굵은 파란색은 예상되는 유전자의 크기와 상이한 결과를 나타냄

15. 양배추에서 45S ribosomal DNA의 intergenic spacer 염기서열에 대한 다양성 분석

가. 연구요약

식물의 ribosomal DNA는 매우 많은 copy 수와 다양한 염기서열을 가지고 있다. 그 중 ITS1 (internal transcribed spacer 1)과 ITS2 (internal transcribed spacer 2)는 다형성이 높아 이 부위를 이용하여 식물의 진화와 분류에 많이 이용되고 있다. 또한 rDNA의 IGS (intergenic spacer)도 많은 차이를 보이지만, IGS 영역은 변이가 너무 많아 확인하기 힘들기 때문에 많은 연구가 되어있지 않다. 하지만, 현재 NGS (next generation sequencing)와 bioinformatics의 발달로 그 동안 연구하기 힘든 많은 염기서열이 확인되고 있다. 45S는 18S, ITS1, 5.8S, ITS2, 25S로 구성되어 있다. 양배추의 45S 전체서열을 파이젠에서 분석하여 확인하였다. 본 연구는 다양한 양배추 품종에서 25S_end 부위의 염기서열(5'-ATT CAG CCC TTT GTC GCT AA-3')과 18S_start 부위의 염기서열(5'-ATG ACT ACT GGC AGG ATC AAC CAG-3')을 활용하여 PCR을 통해 증폭된 band 양상을 확인하였으며, 이를 TOPO_cloning vector에 삽입하여 IGS 서열을 확인하였다. Cloning은 45S IGS 관련 band를 purification kit를 사용하여 정제하였다. 유전자는 pCR® TOPO TA vector 에 삽입하고 plasmid purification kit를 사용하여 plasmid를 정제하였다. 정제된 plasmid는 Macrogen에 sequencing을 의뢰하여 확인하였다. 결과적으로 기존에 밝혀져 있는 2 type의 IGS 뿐만 아니라 6가지의 다른 IGS를 확인할 수 있었다. 6 type의 염기서열의 크기는 363 bp, 1,121 bp, 1,717 bp, 1,969 bp, 2,036 bp, 2,111 bp로 나타났다. 또한, 양친을 교배하여 F1의 표현형을 확인한 결과, 모두 유전되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 양배추 품종에 대한 순도검정용 마커로 활용할 수 있을 것이며, 종자혼입을 쉽게 판별할 수 있을 것이다.

나. 연구결과

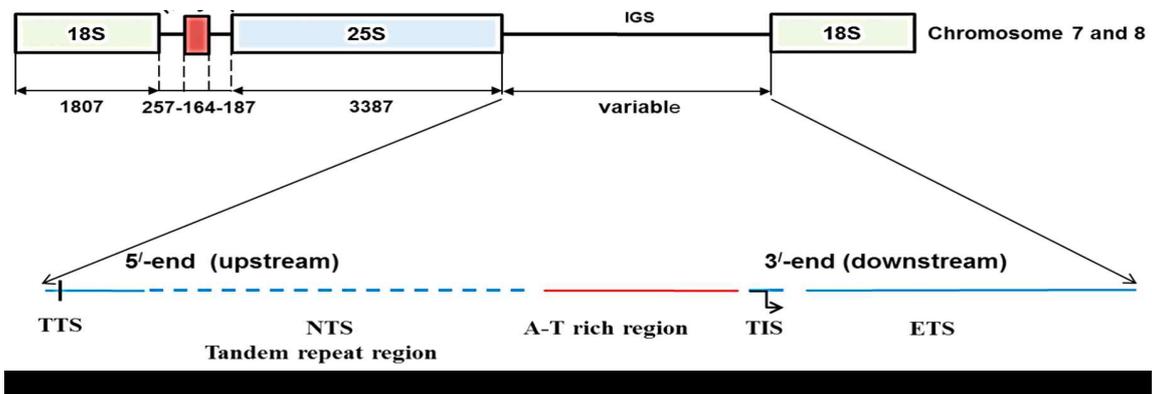


그림 67. 본 연구에서 양배추 리보솜 DNA 염기서열과 유전자의 주석. 25S와 18S rDNA의 서브 유닛 사이에 45S IGS 영역을 보여줌. TTS는 전사 종결 사이트, NTS는 비 전사 영역, TIS는 전사 개시 부위이며, ETS는 외부 전사 영역을 나타냄

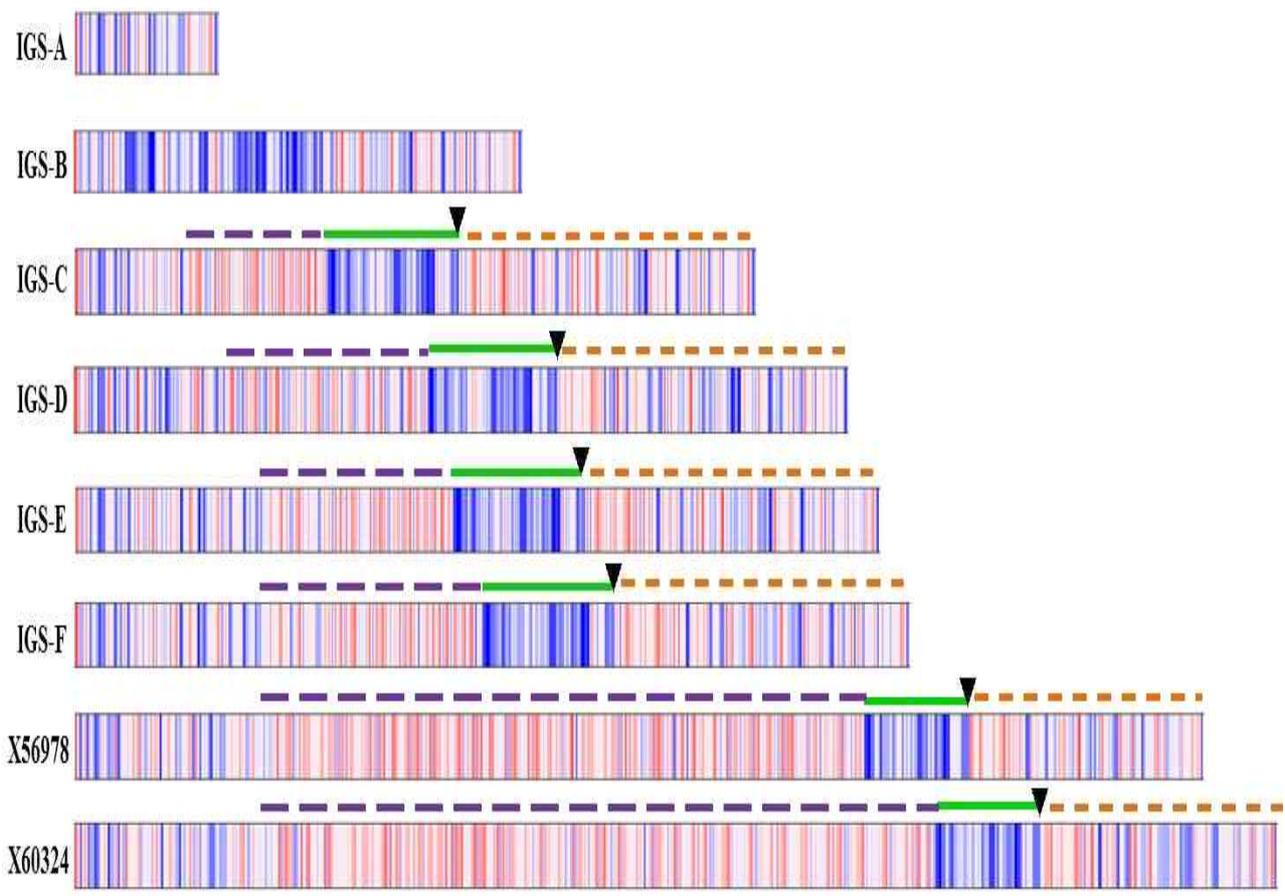


그림 68. 6 종류의 IGS의 주석 확인. 검은색 화살표는 양배추의 TIS 영역으로 염기서열은 TATATAAGGGG로 구성되어 있음. 그러나 D type은 TATATAAAGGG으로 조금 다르게 구성되어 있다. 보라색 점선은 tandem repeat 영역을 나타내고, 녹색선은 AT-rich 영역을 나타내며, 오렌지 점선은 ETS 영역을 나타낸다. 빨간색과 파란색 바는 GC와 AT 염기서열을 나타냄. A와 B 타입은 tandem repeats, TIS 및 ETS 영역이 없는 것으로 확인됨. 그러나 TTS 영역은 가지고 있었음

16. Glucosinolate 함량에 차이를 나타내는 양배추 계통간의 Glucosinolate 생합성 유전자의 발현 양상

가. 연구 요약

글루코시놀레이트는 병원균을 방어하는 식물의 생화학 구성 물질이다. 본 연구는 표현형이 서로 다른 양배추 4계통에 대해 48개의 글루코시놀레이트 생합성 유전자에 대한 발현분석을 qPCR을 통해 분석하였다. 양배추 계통별로 정량분석은 HPLC를 통하여 aliphatic, indolic 성분을 얻을 수 있었다. 글루코시놀레이트 관련된 유전자의 축적은 주성분을 분석한 결과를 바탕으로 관련유전자의 발현량을 분석하였다. 유전자형의 변화와 각각의 발현은 서로 다른 aliphatic, indolic 생합성 글루코시놀레이트 유전자가 관여한다는 결과를 나타냈다. 4계통의 양배추에서 aliphatic, indolic 글루코시놀레이트를 포함한 총 8종의 글루코시놀레이트가 동정되었다. 근연계통인 BN3383, BN4059, BN4072는 글루코라파닌의 성분을 함유하고 있지 않았다. 유전자발현 분석결과, ST5b유전자와 GSL-OH유전자간에 발현양상은 다르게 나타났으며, 세가지 aliphatic 글루코시놀레이트 화합물의 축적과 연관되어 있었다. 또한 BN4072는 MYB34(Bol017062)와 CYP81F1 유전자 발현과 높은 연관관계를 나타냈다. Dof1과 IQD1유전자는 아마도 글루코이루신의 생합성에 관련된 유전자를 억제시키고, BN3273, BN3383에 비하여 BN4059, BN4072 계통은 메티옥시 클루코브라시신의 물질이 고농도로 축적되어 있었다. BN3273는 비교적 높은 프로고이테린의 물질이 합성되었고 이는 GSL-OH유전자의 높은 발현 수준과 연관이 있었다. BN3383은 48개 중 12개의 유전자가 상당히 높은 발현수준을 보였지만 이는 총 글루코시놀레이트 함량이 비교적 낮음을 보여주었다. 유전자 발현 및 글루코시놀레이트 유전자형 변화와 함량축적의 이유는 아직도 많은 연구가 필요하다.

나. 연구 결과



그림 69. *B. oleracea capitata*의 4계통의 표현형

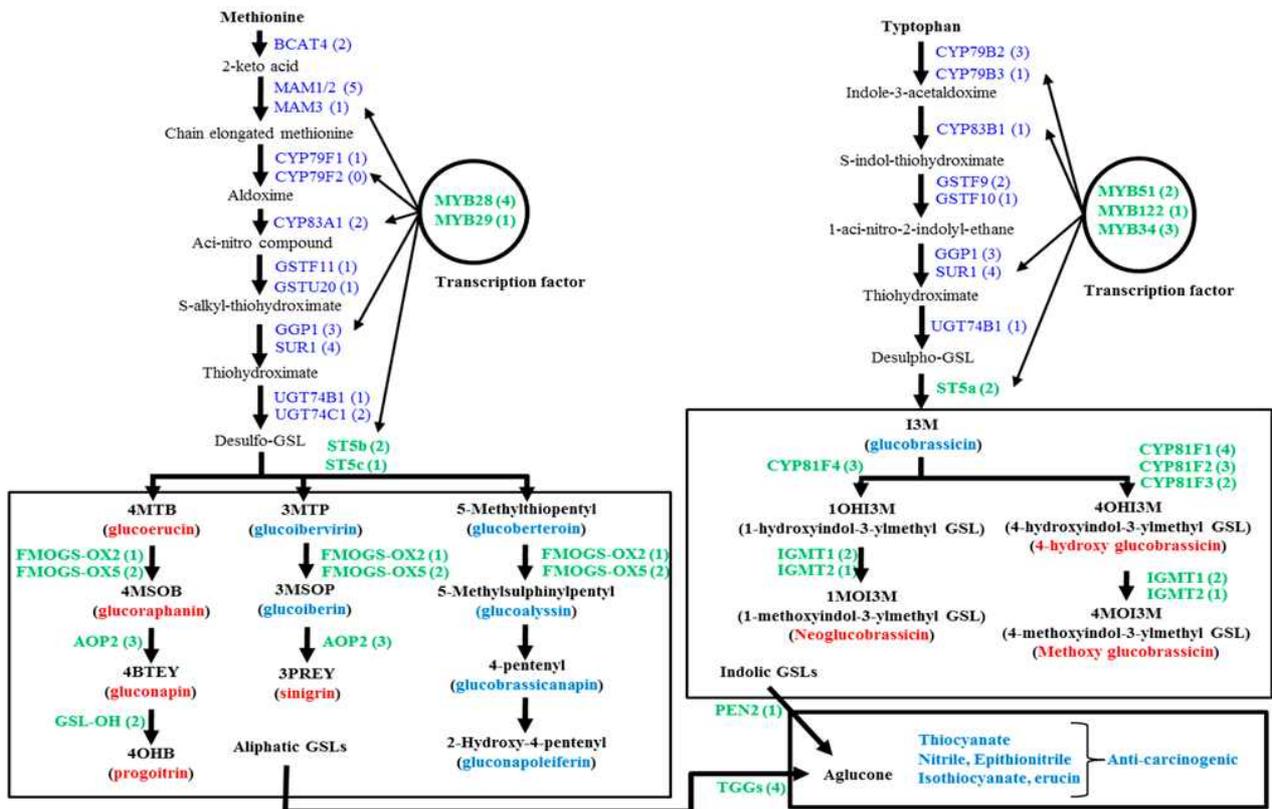


그림 70. *B. oleracea*의 글루코시놀레이트 생합성 경로 및 관련 유전자

HPLC를 통한 검출된 성분은 빨간색으로 표기, 초록색으로 표기해둔 것은 발현을 확인한 유전자를 말하며 괄호안에 숫자는 유전자 수를 의미한다.

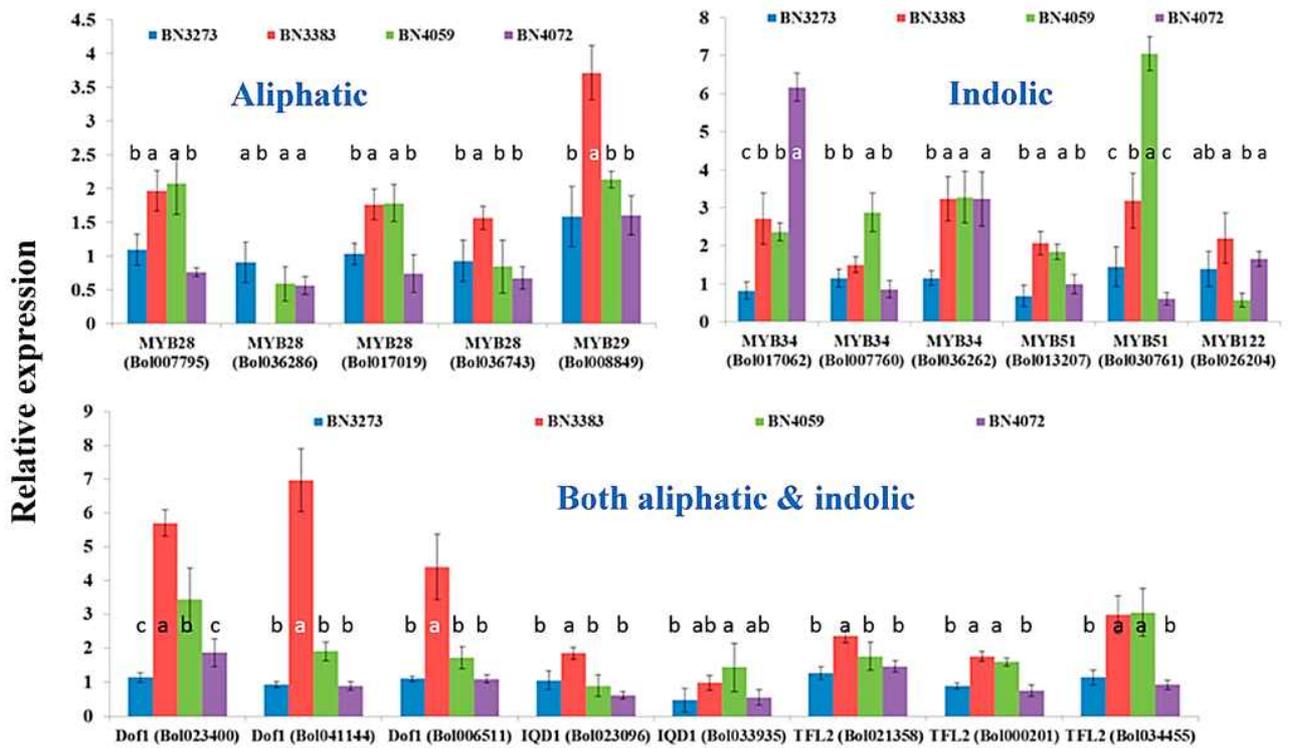


그림 71. *B. olerace*의 transcription factor 관련 유전자의 발현과 aliphatic, indolic의 글루코시놀레이트 생합성

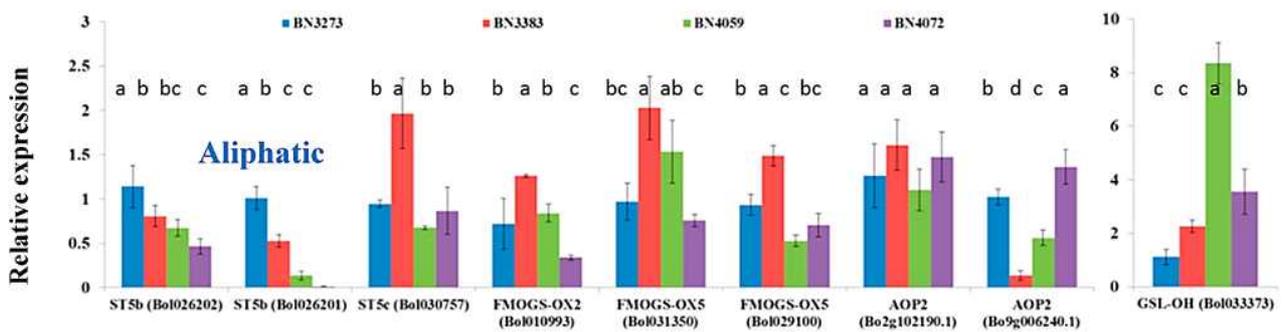


그림 72. 4개의 양배추 계통에서 aliphatic 글루코시놀레이트 생합성 관련 유전자의 발현

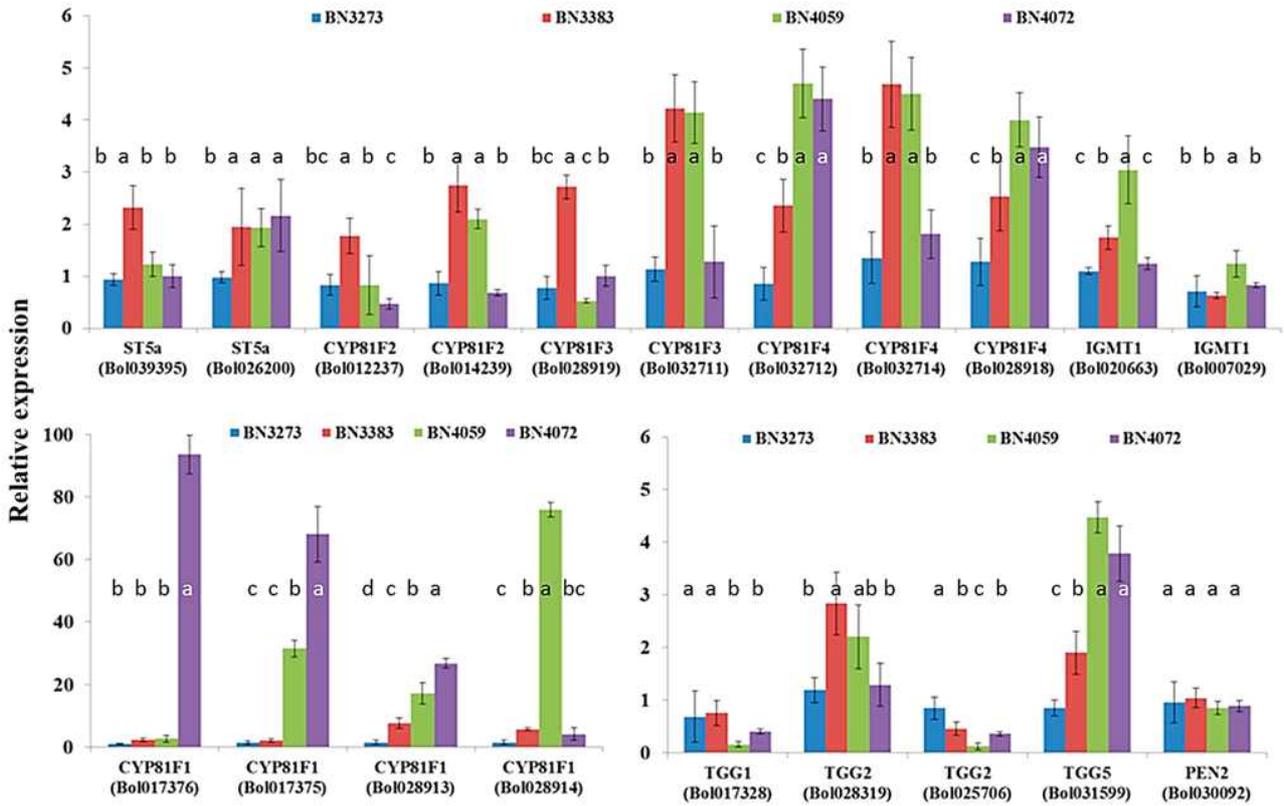


그림 73. 4개의 양배추 계통에서 indolic 글루코시놀레이트 분해관련 유전자의 발현

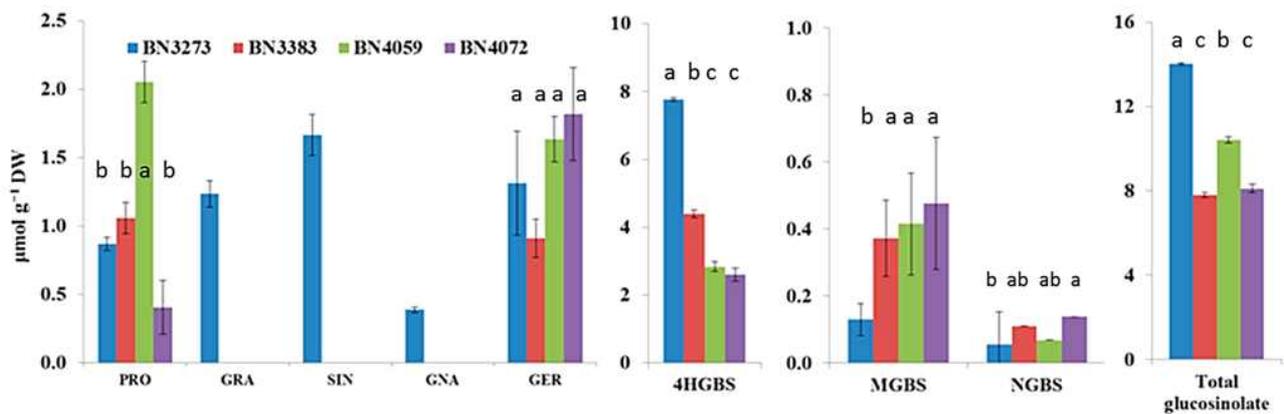


그림 74. 4계통 양배추의 aliphatic, indolic 글루코시놀레이트 성분

PRO:프로고이트린, GRA:글루코라파닌, SIN:시니그린, GNA:글루코나핀, GER:글루코인루신, 4HGBS:4-하이드록시-글루코브라시신, MGBS:메티옥시-글루코브라시신, NGBS:네오글루코프라시신.

표 9. *B. oleracea*의 alipatic 글루코시놀레이트 및 양배추 계통 transcription fator관련 유전자의 상대적인 발현 수준에 대한 주성분 분석.

PC: 중요한 성분, P: 구성요소, SD: 표준편차.

Variable	PC1	PC2	PC3
Progoitrin	0.18	-0.16	0.69
Glucoraphanin	-0.37	-0.38	-0.01
Sinigrin	-0.37	-0.38	-0.01
Gluconapin	-0.33	-0.33	-0.02
Glucoerucin	-0.11	0.40	0.37
MYB28 (Bol007795)	0.34	-0.29	0.36
MYB28 (Bol036286)	-0.36	-0.11	0.26
MYB28 (Bol017019)	0.33	-0.31	0.19
MYB28 (Bol036743)	0.22	-0.43	-0.27
MYB29 (Bol008849)	0.37	-0.20	-0.27
%variation explained	47.2	23.3	15.3
<i>p</i> (genotype)	<0.001	<0.001	0.001
Genotype	Mean PC Scores (\pm SD)		
BN3273	-2.92 \pm 0.43	-1.31 \pm 1.32	-0.03 \pm 0.31
BN3383	2.55 \pm 0.16	-0.85 \pm 0.27	-0.99 \pm 0.49
BN4059	1.24 \pm 0.29	0.06 \pm 0.52	1.66 \pm 0.90
BN4072	-0.87 \pm 0.16	2.01 \pm 0.66	-0.69 \pm 0.91

표 10. *B. oleracea*의 indolic 글루코시놀레이트 및 양배추 계통 transcription fator관련 유전자의 상대적인 발현 수준에 대한 주성분 분석

PC: 중요한 성분, P: 구성요소, SD: 표준편차.

Variable	PC1	PC2
4HGB5	-0.24	-0.29
MGB5	0.13	0.26
NGB5	-0.11	0.46
MYB34 (Bol017062)	-0.06	0.53
MYB34 (Bol007760)	0.52	-0.15
MYB34 (Bol036262)	0.31	0.43
MYB51 (Bol013207)	0.41	0.19
MYB51 (Bol030761)	0.54	-0.14
MYB122 (Bol015939)	-0.28	0.28
%variation explained	34.3	31.0
<i>p</i> (genotype)	<0.001	<0.001
Genotype	Mean PC Scores (\pm SD)	
BN3273	-1.71 \pm 0.23	-2.17 \pm 0.38
BN3383	0.25 \pm 0.20	0.86 \pm 0.51
BN4059	2.64 \pm 0.44	-0.63 \pm 0.23
BN4072	-1.17 \pm 0.17	1.94 \pm 0.81

표 11. *B. oleracea*의 alipatic 글루코시놀레이트 및 양배추 계통 관련 유전자의 상대적인 발현 수준에 대한 주성분 분석

PC: 중요한 성분, P: 구성요소, SD: 표준편차.

Variable	PC1	PC2	PC3
Progoitrin	-0.16	0.09	0.55
Glucoraphanin	0.42	-0.08	0.17
Sinigrin	0.42	-0.07	0.17
Gluconapin	0.42	-0.09	0.14
Glucoerucin	-0.07	-0.24	0.05
ST5b (Bo1026201)	0.34	0.09	0.12
ST5b (Bo1026202)	0.41	0.15	0.12
ST5c (Bo1030757)	0.03	0.41	-0.21
FMOGS-OX2 (Bo1010993)	0.01	0.44	0.18
FMOGS-OX5 (Bo1029100)	-0.13	0.40	0.18
FMOGS-OX5 (Bo1031350)	0.13	0.40	-0.21
AOP2 (Bo2g102190)	0.01	0.10	-0.52
AOP2 (Bo9g006240)	0.09	-0.42	-0.19
GSL-OH (Bo1033373)	-0.34	-0.09	0.35
%variation explained	36.3	31.8	17.1
<i>p</i> (genotype)	<0.001	<0.001	<0.001
Genotype	Mean PC Scores (\pm SD)		
BN3273	3.58 \pm 0.41	-0.69 \pm 0.61	0.57 \pm 0.74
BN3383	-0.32 \pm 0.35	3.29 \pm 0.55	-0.80 \pm 0.53
BN4059	-2.09 \pm 0.38	-0.46 \pm 0.18	1.88 \pm 0.75
BN4072	-1.17 \pm 0.28	-2.13 \pm 0.18	-1.65 \pm 0.95

17. *Plasmodiophora brassicae*에 감염 시 *Brassica oleracea* var. *capitata*에 대한 살리실산과 관련된 유전자의 발현

가. 연구 요약

Brassica oleracea var. *capitata* (cabbage)는 한국, 중국, 일본 등 아시아 국가에서 중요한 채소작물이다. 양배추의 뿌리혹병은 *Plasmodiophora brassicae*의 병원균에 의해 발생되며, 양배추의 생산에 큰 영향을 미친다. 뿌리혹이 발달하는 동안 methyl salicylate (MeSA)는 메틸화에 의해 살리실산에 합성된다. 또한, methyl salicylate esterase (MES)은 살리실산의 methyl salicylate (MeSA)로 전환에 중요한 역할을 한다. 뿌리 혹 발달 중 MES와 methyltransferases와의 상호 관계는 아직 밝혀지지 않았다. 이러한 관계를 조사하기 위해 뿌리 혹 발달 과정에서 이병성 양배추와 내병성 양배추를 이용하여 MES 유전자의 발현을 조사하였다. 그 결과 잠재적인 병원균의 침입에 대한 방어에 관여하는 유전자를 암호화하는 3개의 MES를 확인했다. SS1의 유전자가 *B. oleracea*에 P. Brassicae 감염 시 뿌리와 잎에 관여함을 발견했다. 이러한 결과로 SA 생합성은 식물체에 감염되지 않도록 억제한다는 결론을 내었다. 또한 *B. oleracea* BSMT 유전자는 MeSA 생합성 보다는 글리코실화에 관여하는 특징을 나타냈다. 본 연구 결과는 병원균 감염 시 MES 및 메틸화에 대한 유전자 기능과 상호작용에 대한 이해를 제공하며, MES 유전자가 뿌리 혹 병의 방어기작에 관여하는 유전자임을 알 수 있었다.

나. 연구 결과

표 12. 선택된 유전자의 위치와 영역 분석

Gene name	Locus ID	ORF (bp)	Chromosome	Protein	
				Domain	Domain position
BoMES1	Bol031679	789	Scaffold000053	Abhydrolase	10-253
BoMES2	Bol045801	792	C08	Abhydrolase	10-253
BoMES4_1	Bol012862	774	Scaffold000192	Abhydrolase	8-247
BoMES4_2	Bol031680	657	Scaffold000053	Abhydrolase	10-209
BoMES4_3	Bol031681	786	Scaffold000053	Abhydrolase	9-252
BoMES9_1	Bol018638	774	C07	Abhydrolase	6-248
BoMES9_2	Bol028953	774	C01	Abhydrolase	5-248
BoSS1	Bol022442	1959	C06	GT1_Glycogen_synthase	143-643
BoBSMT1	Bol010926	996	C03	Methyltransferase	6-331

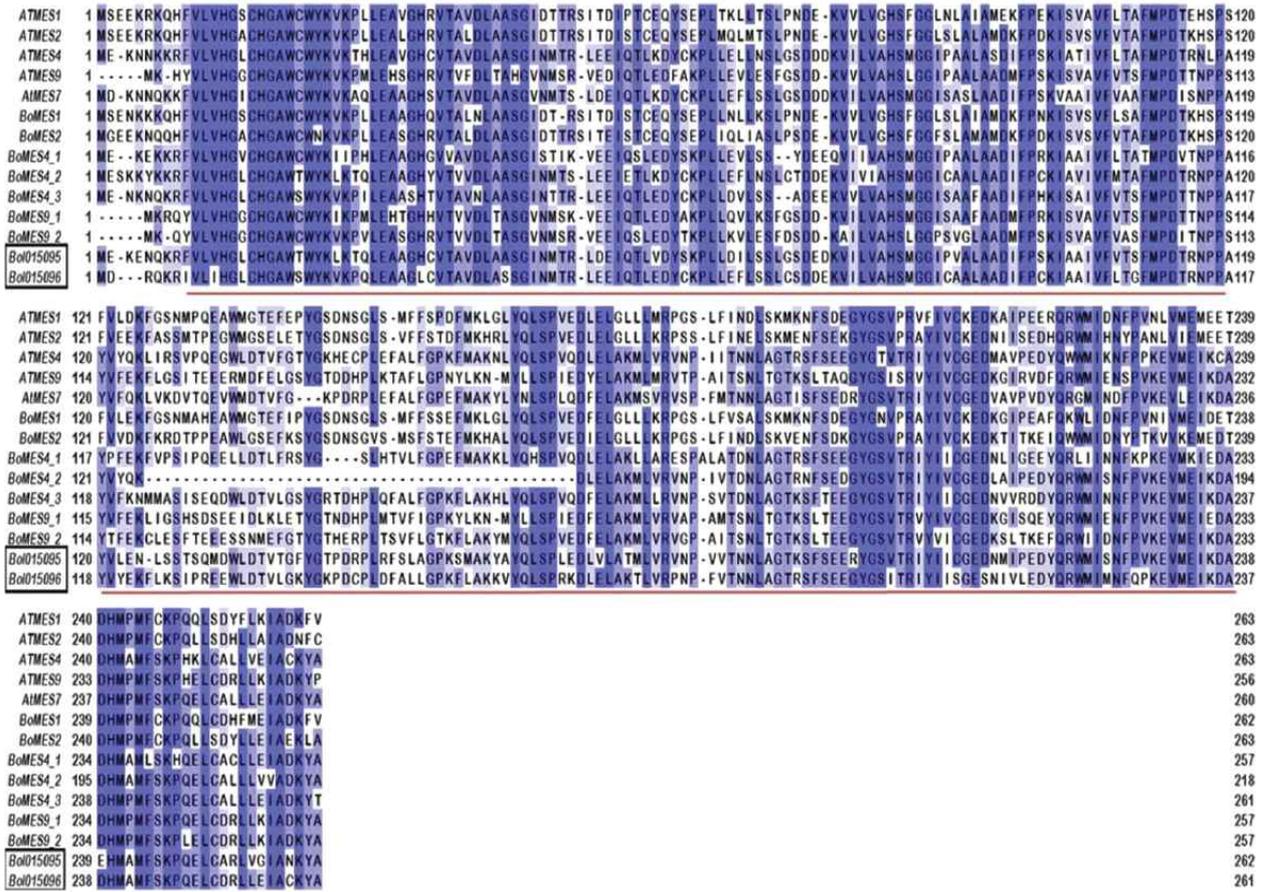


그림 75. *Brassica oleracea*의 methyl salicylate esterase (BoMES)와 애기장대 *thaliana* methyl salicylate esterase (AtMES)에서 유추된 아미노산 서열의 비교
 밑줄 친 시퀀스는 기능영역을 나타내며, 박스의 유전자는 발현분석을 수행하지 않았다.
 오른쪽의 숫자는 아미노산의 위치를 나타낸다. 동일한 아미노산은 어두운 배경으로 표시되었고 유사성이 있는 아미노산은 밝은색 배경으로 표시하였다.

표 13. salicylic acid (SA)와 관련된 단백질 유전자의 특징

Gene name	Protein length (aa)	Molecular weight (Da)	Theoretical pI	Instability index	Aliphatic index	Grand average of hydropathicity	N-glycosylation position	Protein stability	Subcellular localization
BoMES1	262	29334.8	5.58	35.16	82.60	-0.043	—	Stable	Chloroplast
BoMES2	263	29470.7	5.29	34.13	81.52	-0.176	—	Stable	Chloroplast
BoMES4_1	257	28567.0	5.13	40.59	100.62	0.047	—	Unstable	Chloroplast
BoMES4_2	218	24500.6	5.39	26.06	97.52	0.130	48, 149	Stable	Chloroplast
BoMES4_3	261	29300.6	5.35	31.29	90.04	-0.045	47, 180	Stable	Chloroplast
BoMES9_1	257	28912.4	5.48	36.67	85.29	-0.114	43, 182	Stable	Cytoplasmic
BoMES9_2	257	28708.0	5.23	40.49	84.51	-0.072	42, 182	Unstable	Chloroplast
BoSSI	652	71821.0	5.53	36.23	79.72	-0.234	19, 93, 187, 194, 627	Stable	Chloroplast
BoBSMT1	331	37865.6	5.09	43.40	80.63	-0.289	74, 91, 318	Unstable	Cytoplasmic

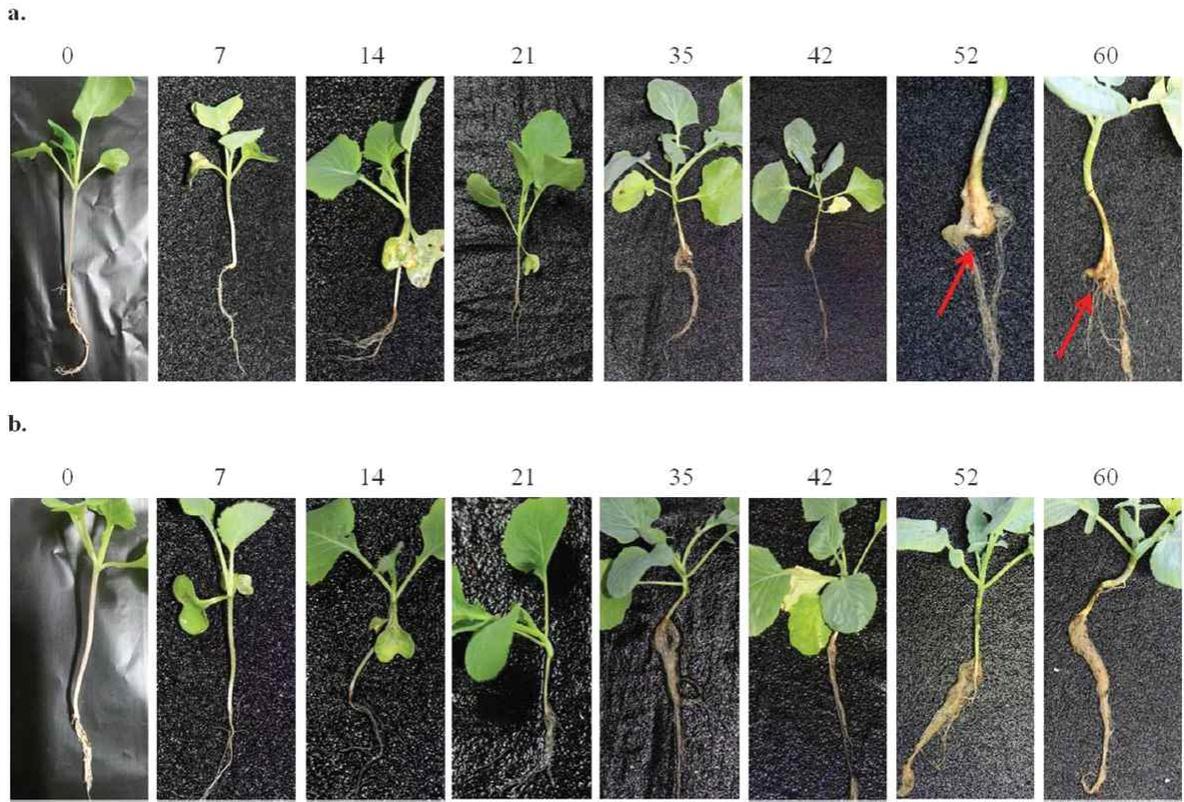


그림 76. (a) *Plasmodiophora brassicae*에 대해 감수성 품종(CR3)과 (b) 감염되지 않은 식물 0~60일간 뿌리 혹 발달 비교 화살표는 뿌리 혹 형성을 나타낸 것이다.

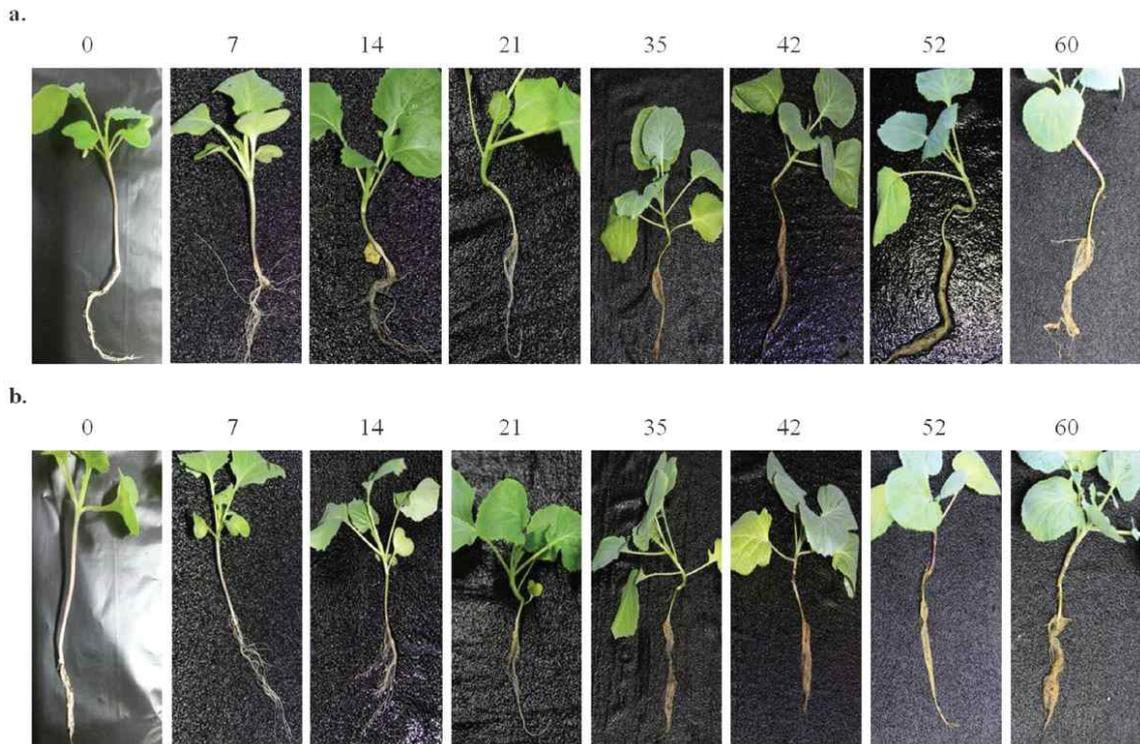


그림 77. (a) *Plasmodiophora brassicae* 감염 후 0~60일 동안의 *Brassica oleracea* 저항성 (CR4)계통과 (b) 동일한 기간 동안 감염되지 않은 계통간의 비교

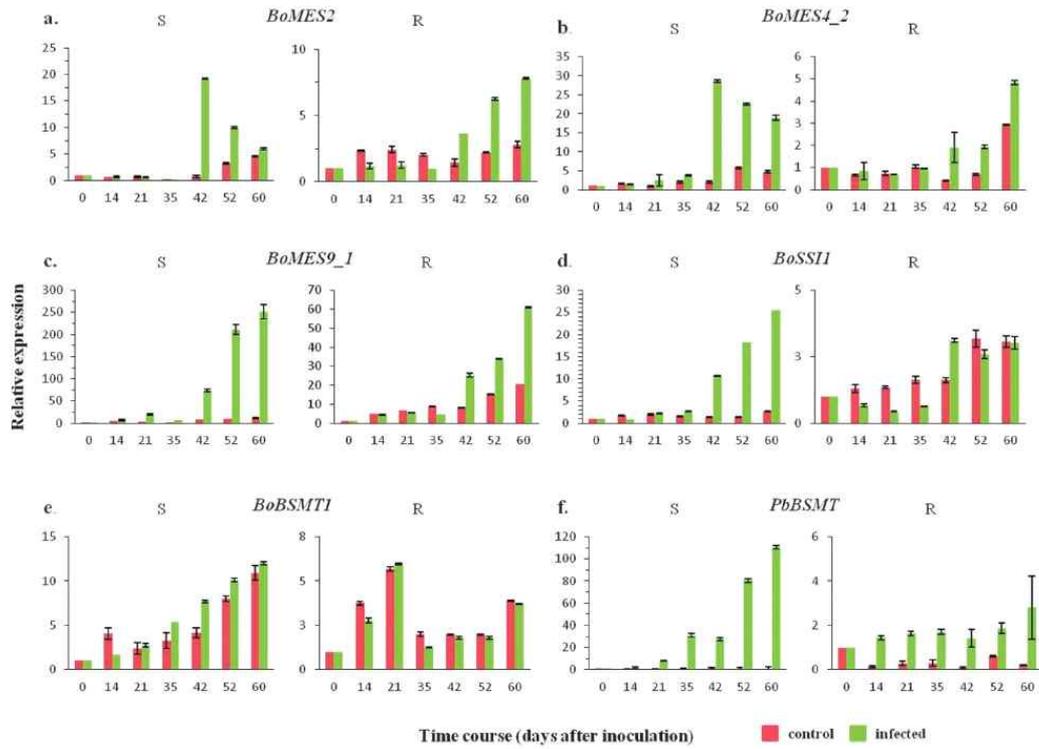


그림 78. *Plasmodiophora brassicae*에 감염된 *Brassica oleracea* 뿌리 샘플의 Real-time PCR 발현 분석

이 자료는 3반복 실험의 평균오차를 나타냈다. S, 감수성 계통; R, 저항성 계통.

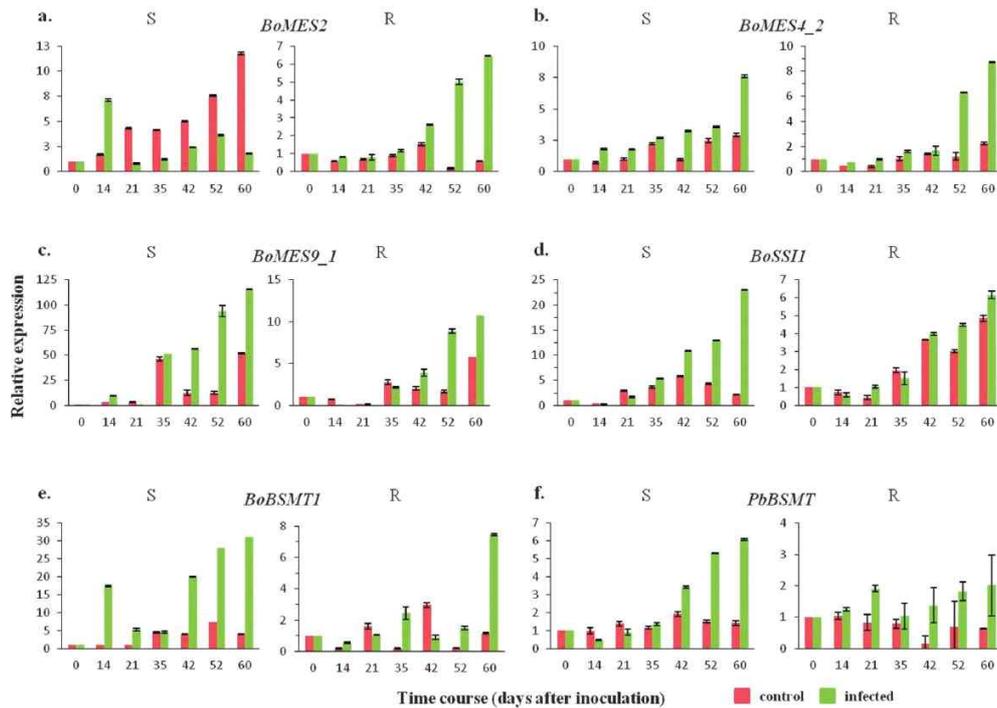


그림 79. *Plasmodiophora brassicae*에 감염된 *Brassica oleracea* 잎 샘플의 Real-time PCR 발현 분석.

이 자료는 3반복 실험의 평균오차를 나타냈다. S, 감수성 계통; R, 저항성 계통.

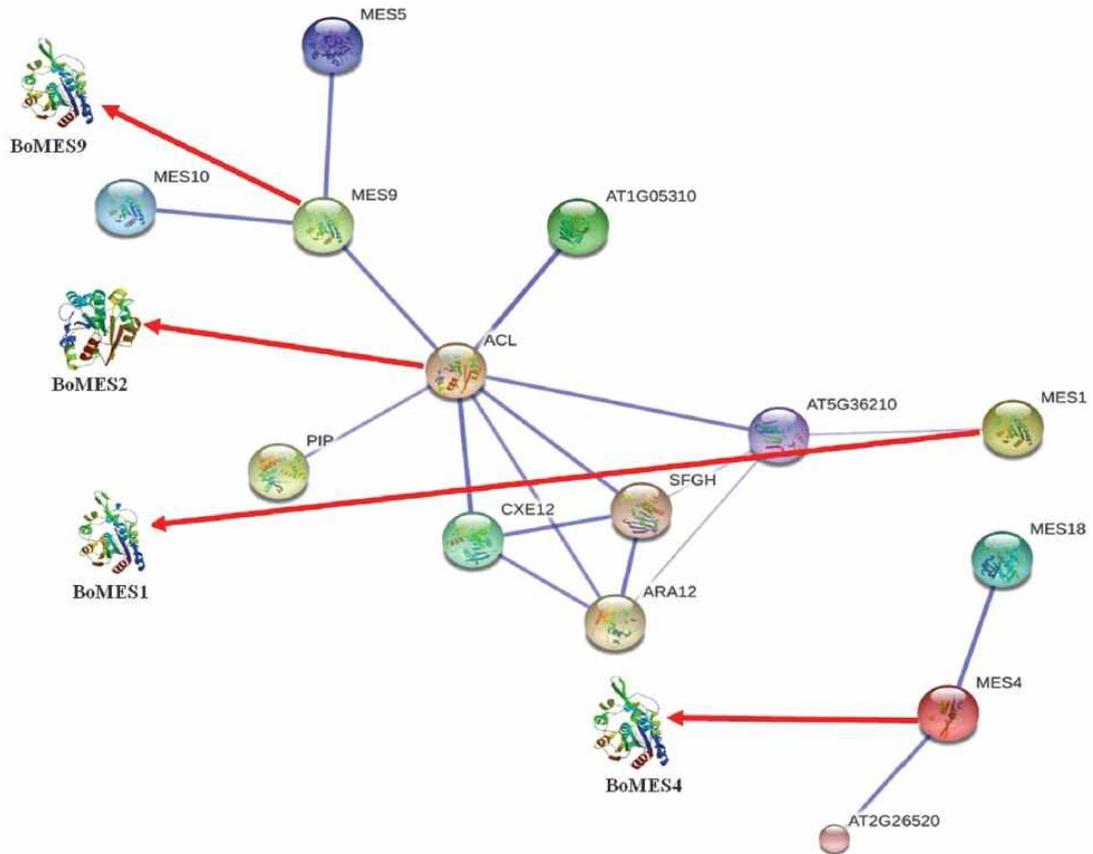


그림 80. *Brassica oleracea*의 methyl salicylate esterase (BoMES)와 애기장대의 관련된 유전자의 상호 작용 네트워크

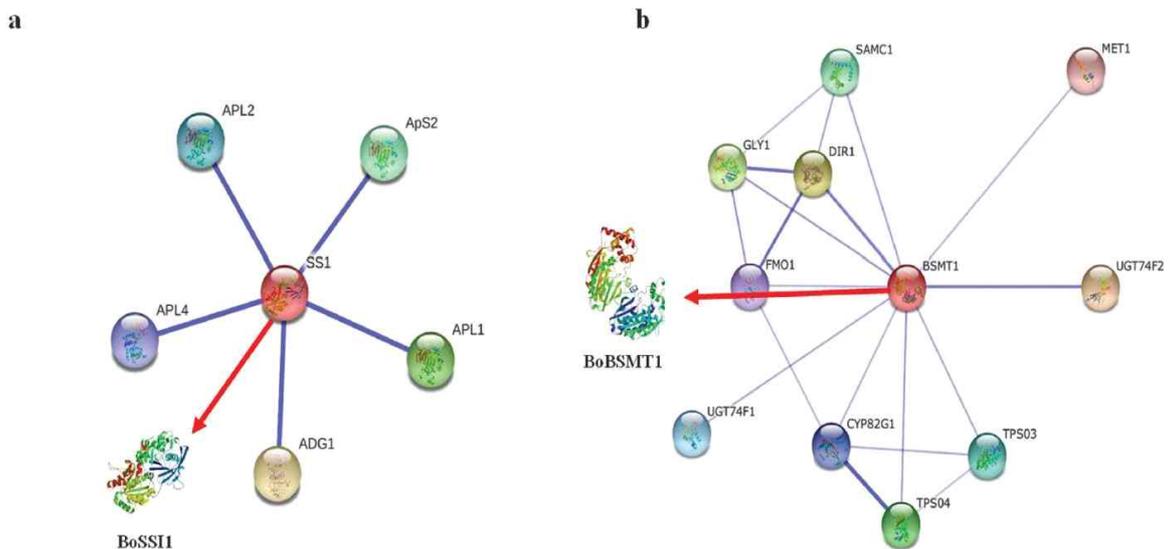


그림 81. (a) *Brassica oleracea*의 starch synthase 1 (BoSS1)와 (b) *B. oleracea*의 Sa와 BA methyltransferases1 (BoBSMT1)와 애기장대의 관련된 유전자의 상호 작용 네트워크

18. 배추의 내한성 관련 *bZIP* 전사인자의 transcriptome 분석

가. 연구요약

bZIP 전사인자는 식물에서 주로 신호 전달에 있어서 중요한 기능을 한다. 특히, ABA 관련된 스트레스 반응과 관련하여 *bZIP* 단백질이 잘 알려져 있다. 배추(*Brassica rapa*)에서는 지금까지 127개의 *bZIP* 단백질이 스트레스에 관한 신호전달의 매개체로 알려져 있다. 배추에서 새로운 *bZIP* 단백질의 *bZIP* 도메인에 위치해 있는 몇 개 유전자의 아미노산 정보를 바탕으로 BRAD (<http://brassicadb.org/brad/>)에서 BLAST 검색을 수행하였다.

기존에 알려진 127개에 다음과 같이 *Bra027885*, *Bra034913*, *Bra035464*, *Bra034925*, *Bra009426*, *Bra002090*, *Bra011648*, *Bra010504*, *Bra025743* 9개를 추가하여 총 136개의 *bZIP* 단백질을 이용하여 연구를 수행하였다. 기존에 알려진 특정한 기능을 하는 도메인이나 계통도(phylogenetic tree)를 사용하여 *bZIP* 단백질을 분류하는 기존 방법으로는 한계가 있었다. 따라서 *bZIP* 단백질을 분류하는데 새로운 방법을 통해 시도한 결과 *bZIP* 단백질의 도메인 탐색 중에 unique amino acid repeat regions (UARR)과 low complexity regions (LCRs)이 많은 *bZIP* 단백질에 존재한다는 사실을 발견하였다. 특히, UARR중에 glutamine (Q), aspartic acid (D), proline (P), asparagines (N), serine (S), glycine (G)-rich 도메인이 탐색되었고 이에 따라서 6개의 아미노산을 중심으로 *bZIP* 단백질을 transmembrane domain을 가지고 있는 단백질과 여러 가지의 LCR을 포함하는 단백질, LCR이 존재하지 않는 단백질 등 9개의 그룹으로 *bZIP* 단백질을 분류하였다.

저온에 반응하는 BrbZIP 유전자들을 분석하기 위해 Chiifu와 Kenshin 계통에 저온 처리 후 얻은 microarray 결과에서 136개의 BrbZIP 유전자 정보를 선별하여 재분석하였다. qRT-PCR을 통해 재검증한 결과, 53개의 유전자에서 특이적인 발현 양상이 나타났으며 그 중 27개의 유전자가 높은 발현 수준을 나타내는 유전자를 확인하였다. 특히, 6개의 유전자는 Chiifu의 계통에서는 발현의 변화가 거의 나타나지 않았지만 Kenshin의 계통에서는 이 유전자들의 발현에 반응을 나타냈다. 또한 6개의 유전자들은 LCR에 많은 아미노산 N을 포함하고 있었다. 따라서 그룹 4(N-rich domain)에 구성되어 있는 단백질들은 저온과 관련성이 있을 것으로 사료된다. 또한 배추의 *Bra000256*, *Bra004689*, 및 *Bra003320* 유전자와 애기 장대의 *AtbZIP34*와 *AtbZIP61* 유전자는 서로 상동성이 높게 나타났다. 결론적으로, 선발된 *Bra000256*, *Bra004689*, *Bra003320*은 서로 상호작용을 통해서 저온반응에 있어 중요한 기능을 수행할 것이라 사료된다.

나. 연구결과



그림 82. 저온 처리 후 배추에서 22개의 BrbZIP 유전자의 발현 양상 분석 결과

표 14. 저온 반응을 통해 선발된 bZIP 유전자

<i>Brassica rapa</i>			<i>Arabidopsis thaliana</i> homologue			
Gene ID	Amino acid length	Classified by thi paper	Gene ID (AtbZIP number)	Classified by this paper	Classified by Jakoby	Description
Bra000256	362	Group 11	AT2G42380 (AtbZIP34)	Group 4A	E	Vascular development
Bra003320	304	Group 11	AT3G58120 (AtbZIP61)	Group 4A	E	Up-regulated in cold deacclimation
Bra004689	306	Group 4B	AT2G42380 (AtbZIP34)	Group 4A	E	Vascular development
Bra011648	262	Group 5A	AT4G35900 (AtbZIP14)	Group 5A	A	Floral meristem identity
Bra020735	171	Group 11	AT3G30530 (AtbZIP42)	Group 11	S	
Bra023540	188	Group 4B	AT5G15830 (AtbZIP3)	Group 4A	S	Glucose-ABA interaction network

19. 배추의 생물학적, 비생물학적 스트레스 상에서 WRKY family 유전자의 동정 및 발현 분석

가. 연구요약

WRKY 단백질은 고등식물에서 식물의 성장과 대사 그리고 생물학적, 비생물학적인 스트레스에 관여하는 가장 비중 있는 전사인자 중 하나이다. 본 연구를 통해서 배추 WRKY 유전자는 다른 작물과 높은 상동성을 나타냈으며, 모든 배추의 WRKY (*BrWRKY*) 유전자와 스트레스 저항성간의 기능적 관련성을 분석하였다. 서로 대조적인 배추의 이중반수체(DH) 계통인 'Chiifu'와 'Kenshin'의 계통에 저온 처리 후 생성된 Br135K microarray 분석한 결과 차이가 뚜렷하고 높은 전사량 수준(transcript abundance level)을 보이는 41개의 BrWRKY 유전자를 동정하였다. 이들 후보 유전자들은 배추에서 저온, 염해, 그리고 가뭄 스트레스 뿐만 아니라 Brassica에 치명적이고 심각한 농작물 생산성의 저하를 가져오는 대표적인 질병인 무름병 (*Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*)과 시들음병(*Fusarium oxysporum f.sp. conglutinans*)을 처리한 후에 스트레스에 관여하는 유전자 및 발현 수준을 알아보았다.

배추에서 WRKY family에 속하는 총 145개의 유전자 중 45개의 유전자들은 다른 식물 종의 생물학적 스트레스, 특히 곰팡이병과 관련된 WRKY 단백질들과 높은 수준의 상동성을 나타냈다. 또한 생물학적, 비생물학적 스트레스에 특이적인 발현 수준을 보인 41개의 WRKY 유전자들을 선발하였다. 선발된 41개의 유전자 중, 22개의 유전자는 그룹 II로부터, 13개의 유전자는 그룹 III, 그리고 6개의 유전자는 그룹 I을 통해 확보하였다. 비생물학적 스트레스에 반응하는 유전자들의 발현 수준 결과에서 *BrWRKY40*, *BrWRKY49*, *BrWRKY57*, *BrWRKY97*, 그리고 *BrWRKY131* 유전자들은 염해와 가뭄 스트레스에 반응하는 것으로 확인되었고, *BrWRKY22* 유전자는 저온과 염해 스트레스에 연관성이 있는 것으로 판단된다. 생물학적 스트레스에 대한 반응 실험에서, 무름병 (*Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*)과 시들음병(*Fusarium oxysporum f.sp. conglutinans*)을 처리 한 후, 41개의 유전자 중 *BrWRKY4*, *BrWRKY65*, *BrWRKY72*, *BrWRKY79*, *BrWRKY97*, *BrWRKY109*, *BrWRKY133*, *BrWRKY141*의 8개 유전자가 대조군에 비해 비교적 높은 발현 수준을 보였으며, 특히, 이 중에서 *BrWRKY4*, *BrWRKY65*, *BrWRKY72*, *BrWRKY97*, *BrWRKY133*, *BrWRKY141* 유전자는 두 가지 질병에서 공통적으로 높은 발현 수준을 보였다. 위 실험을 통해서 배추에서 생물학적, 비생물학적 스트레스에 모두 관여하는 유전자는 *BrWRKY65*, *BrWRKY72*, *BrWRKY97*로 확인되었다.

따라서, 이러한 *BrWRKY* 유전자들은 생물학적, 비생물학적 스트레스에 저항성을 가지는 Brassica속 작물을 개발하는데 유용한 자원이 될 것이고, WRKY 유전자의 스트레스 저항성 메커니즘을 밝히는데 기반이 될 것으로 사료된다.

나. 연구 결과



그림 83. 서로 다른 온도 조건 처리 후 *B. rapa*에서 41개 *BrWRKY* 유전자의 Microarray 발현 분석

그림에서 C와 K는 각각 'Chiifu'와 'Kenshin' 두 동계교배라인(inbred line)을 나타내는데, 5가지 온도조건: control (C1&K1), 4°C (C2&K2), 0°C (C3&K3), -2°C (C4&K4), and -4°C (C5&K5)으로 처리하였다. 서로 다른 *BrWRKY* 그룹으로부터 다른 온도에서 반응하는 유전자들은 왼쪽에 표시했다. 오른쪽은 서로 다른 발현결과를 나타낸다.

표 15. 배추에서 생물학적, 비생물학적 스트레스에 모두 관여하는 WRKY 유전자

Gene name	abiotic stress			biotic stress	
	Cold	Salinity	Drought	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>conglutinans</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
BrWRKY4				●	●
BrWRKY7		●			
BrWRKY14		●			
BrWRKY17		●			
BrWRKY22	●	●			
BrWRKY26	●				
BrWRKY40		●			
BrWRKY42	●				
BrWRKY44	●				
BrWRKY49		●			
BrWRKY51			●		
BrWRKY57		●	●		
BrWRKY58		●			
BrWRKY59	●				
BrWRKY65	●	●	●	●	●
BrWRKY66	●		●		
BrWRKY72	●	●	●	●	●
BrWRKY77	●				
BrWRKY78	●				
BrWRKY79	●				●
BrWRKY92	●				
BrWRKY97		●	●	●	●
BrWRKY98			●		
BrWRKY104			●		
BrWRKY109	●		●		●
BrWRKY113		●	●		
BrWRKY116	●		●		
BrWRKY131			●		
BrWRKY133				●	●
BrWRKY141				●	●

20. 배추 내한성 및 내동성 관련 안토시아닌 합성(ANS) 유전자의 특징 및 유전자 발현 분석

가. 연구요약

플라보노이드는 식물의 생장과 환경과의 상호작용과 관련하여 다양한 역할을 한다. 또한 이 대사물질은 꽃과 잎의 색깔, 그에 따른 생성물 등을 공급하는 안토시아닌을 포함한 몇 개의 구조적인 그룹으로 나누어진다. 본 연구에서는 배추에서 안토시아닌 생합성 경로에 구조적인 유전자인 3개의 *BrANS* 유전자를 발견하였다. 또한 도메인 분석을 통해 2OG-Fe(II) oxygenase domain을 모두 포함하고 있으며 대부분 203~307의 아미노산에 위치해 있음을 확인하였다. 2OG-Fe(II) oxygenase domain은 진핵생물과 박테리아에 널리 포함되어 있는 단백질로 식물에서는 에틸렌, 지베렐린, 그리고 안토시아닌의 식물 호르몬 형성 및 플라본과 같은 색소체의 형성을 촉진하는 효소를 포함하는 것으로 알려져 있다.

본 연구는 배추의 3계통의 잎 전면부와 중앙 잎맥을 이용하여 *BrANS1*, *BrANS2*, *BrANS3* 유전자의 발현 여부를 조사하였다. 'Palgangbaechu'의 계통(완전한 적색)에서는 *BrANS1*, *BrANS2*, *BrANS3*의 유전자가 잎이나 중앙 잎맥 발현되는 것을 확인하였다. '8053'(부분적인 적색)에서는 *BrANS3* 유전자만 잎과 중앙 잎맥에서 발현되었다. 그리고 'Seoulbaechu'(녹색)에서는 *BrANS1*과 *BrANS3* 유전자가 잎과 중앙 잎맥에서 발현하는 것을 확인하였다. 또한, 배추 8개 이상의 계통에서도 위와 같은 유전자 발현 여부를 알아 보았다. 그 결과, 8개의 배추 계통에서 어두운 적색을 띄는 잎을 가진 8번의 계통에서 *BrANS1* 유전자의 발현이 높게 나타났으며, *BrANS3* 유전자가 모든 계통에서 발현되었고 특히 적색을 띄는 계통에서 높은 발현을 나타내는 것으로 확인되었다.

저온 스트레스와의 관련성을 알아보기 위해, 그림에서와 같이 시간 별로 4°C 저온 처리하여 'Palgangbaechu'(완전한 적색), '8053'(부분적인 적색), 그리고 'Seoulbaechu'(녹색)에서 *BrANS1*, *BrANS2*, *BrANS3* 유전자의 발현을 확인하였다. 그 결과, *BrANS* 유전자 가운데 *BrANS1*, *BrANS3*에서 비교적 '8053'(부분적인 적색)과 'Seoulbaechu'(녹색)에서 저온스트레스에 관한 발현수준이 낮았으며 'Palgangbaechu'(완전한 적색)에서 발현 수준이 높은 것으로 확인되었다. 또한 *BrANS2*에서는 적색을 띄는 'Palgangbaechu'와 녹색을 띄는 'Seoulbaechu'에서 저온 스트레스에 강하게 반응하는 것을 확인하였다. 특히, 'Palgangbaechu'는 *BrANS1*과 *BrANS3*에서 8시간 후에 발현 수준이 향상되었으며 *BrANS2*에서는 72시간 후에 저온의 발현 수준이 높은 것을 확인하였다.

*BrANS2*와 *BrANS3* 유전자는 -4°C에서 높은 전사량을 나타냈는데, 저온 스트레스 저항성을 가진 'Chiiffu'의 계통에서 *BrANS2*의 유전자는 대략 10배 이상의 높은 값을 보였고, *BrANS3*는 3배 이상의 높은 수준을 보였다. 결론적으로, *BrANS* 유전자는 안토시아닌 색소의 축적과 저온 스트레스에 대한 저항성에 밀접한 관련성이 있음을 시사한다.

나. 연구결과

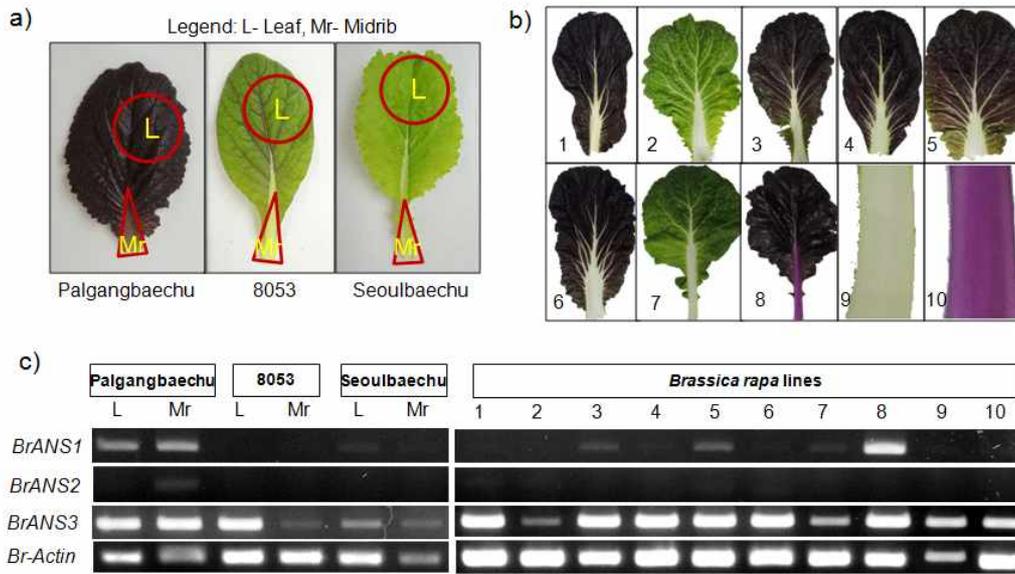


그림 84. 배추의 서로 다른 유전형에서 안토시아닌의 축적과 관련한 3개 BrANS 유전의 발현 분석
 a) 'Palgangbaechu', '8053', 'Seoulbaechu'의 잎 (L)과 중앙잎맥 (Mr), b) 1- 10 일반 배추 계통에서 수집한 잎, c) 4가지 BrANS 유전자의 RT-PCR 분석 결과

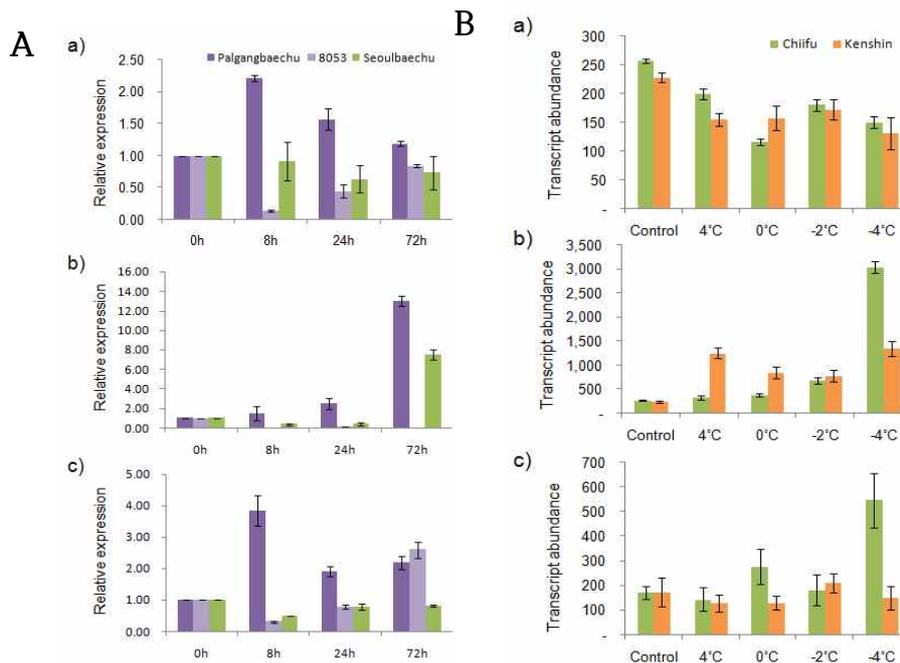


그림 85. A. 적색 계통인 'Palgangbaechu', 중간 적색 계통인 '8053' 그리고 녹색 계통인 'Seoulbaechu'에 저온 처리 후 a) *BrANS1*, b) *BrANS2* 및 c) *BrANS3* 유전자에 대한 발현 분석 결과
 B. 배추계통 'Chifu'와 'Kenshin'에 저온 처리 후 (4°C, 0°C, -2°C 및 -4°C) a) *BrANS1*, b) *BrANS2* 그리고 c) *BrANS3* 유전자에 대한 Microarray 발현 분석 결과

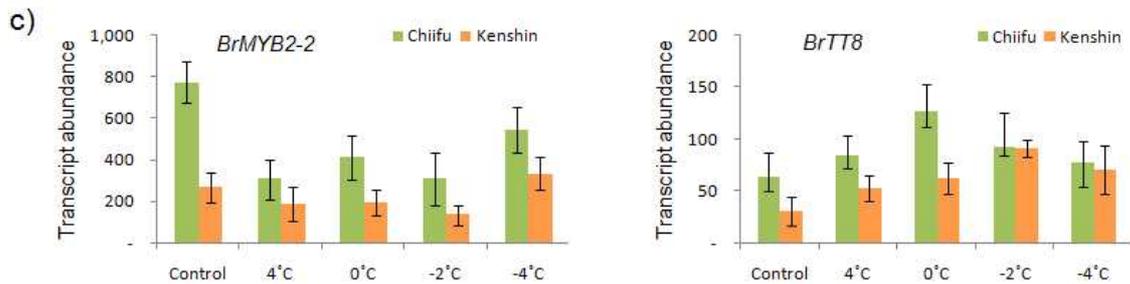
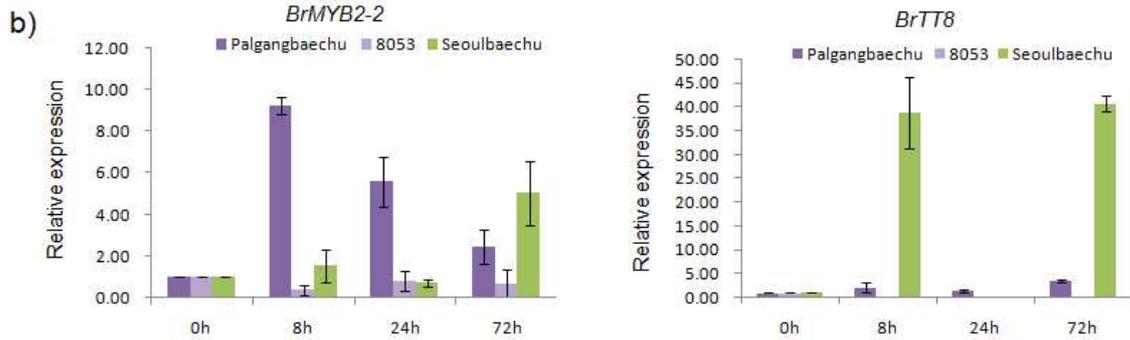
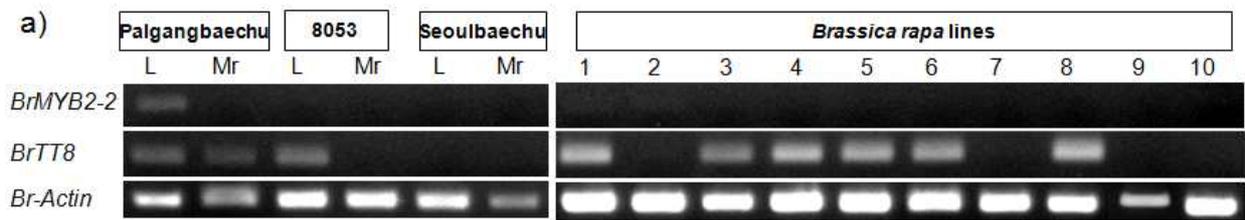


그림 86. 배추의 안토시아닌 생합성 경로에 관여하는 유전자들의 2가지 전사인자에 대한 발현 분석

a) 적색인 'Palgangbaechu'와 녹색인 'Seoulbaechu'에서 안토시아닌 축적과 관련된 *BrMYB2-2* 와 *BrTT8*에 대한 RT-PCR 분석결과, b) 적색인 'Palgangbaechu'와 녹색인 'Seoulbaechu'에서 저온 스트레스와 관련된 *BrMYB2-2* 와 *BrTT8*에 대한 정량 real-time PCR 분석결과, c) 'Chiifu'와 'Kenshin'에 저온 스트레스 처리(4°C, 0°C, -2°C 및 -4°C) 후에 *BrMYB2-2* 와 *BrTT8*의 Microarray 발현 분석결과

21. 배추의 내한성 및 내동성 관련 유전자의 microarray 분석

가. 연구 요약

식물은 가뭄, 저온, 고온 등 많은 스트레스에 노출되어 있으며 이러한 스트레스 중에 저온과 한발 스트레스는 매우 중요한 요소이며 이는 식물의 성장과 발달과 특히, 생산량과 밀접한 연관성이 있다. 이에 본 연구에서는 이중반수체(doubled haploid, DH)인 'Chiifu'와 'Kenshin' 배추 계통을 사용하여 각 4°C와 -2°C, -4°C 저온 및 냉동처리를 한 후 배추의 내한성 및 내동성과 관련한 유전자를 microarray 분석을 실시하였다.

저온 처리된 Chiifu와 Kenshin 두 가지의 서로 다른 DH 계통의 전사체 정보를 분석한 후 41,173개의 unigene으로부터 온 시퀀스 정보를 기반으로 하여 배추의 microarray (Br135K microarray) 분석을 완료하였다. 이 두 가지 DH 계통은 전해질 침출(electrolyte leakage) 측정 시 4°C에서 -2°C까지는 비슷한 패턴을 보이지만 -4°C이하에서는 큰 차이를 보였다. 저온 처리 후, Chiifu와 Kenshin 의 계통에서 저온과 관련된 유전자를 각각 885개와 858개를 선발하였다. 선발된 저온스트레스에 관여하는 유전자 중 134개와 56개의 유전자가 Chiifu와 Kenshin 각각의 계통에서 특이적인 발현차이를 나타냈다. 전사인자 들(TFs)은 다양한 특징적인 발현 수준을 보였는데, 'Chiifu' 계통의 전사인자들은 *BrMYB12*, *BrMYBL2*, *BrbHLHs*, *BrbHLH038*, *C2H2*, *WRKY*, *BrDREB19*, integrase-type 으로 저온 스트레스의 반응을 유도시키고, *bHLH*, cycling Dof 인자와 두 가지 유형의 Dof 전사인자들은 'Kenshin' 계통에 특이적으로 유도되는 것을 확인하였다. 결과적으로 배추의 저온 처리 시 일반적인 신호 경로와 다양한 전사 조절 기작들은 동시에 작동한다. 저온 처리 시 새롭게 개발한 Br135K oligomeric chip을 이용하여 배추 genome 상의 전사체 프로파일링에 매우 유용할 것으로 사료된다.

나. 연구 결과

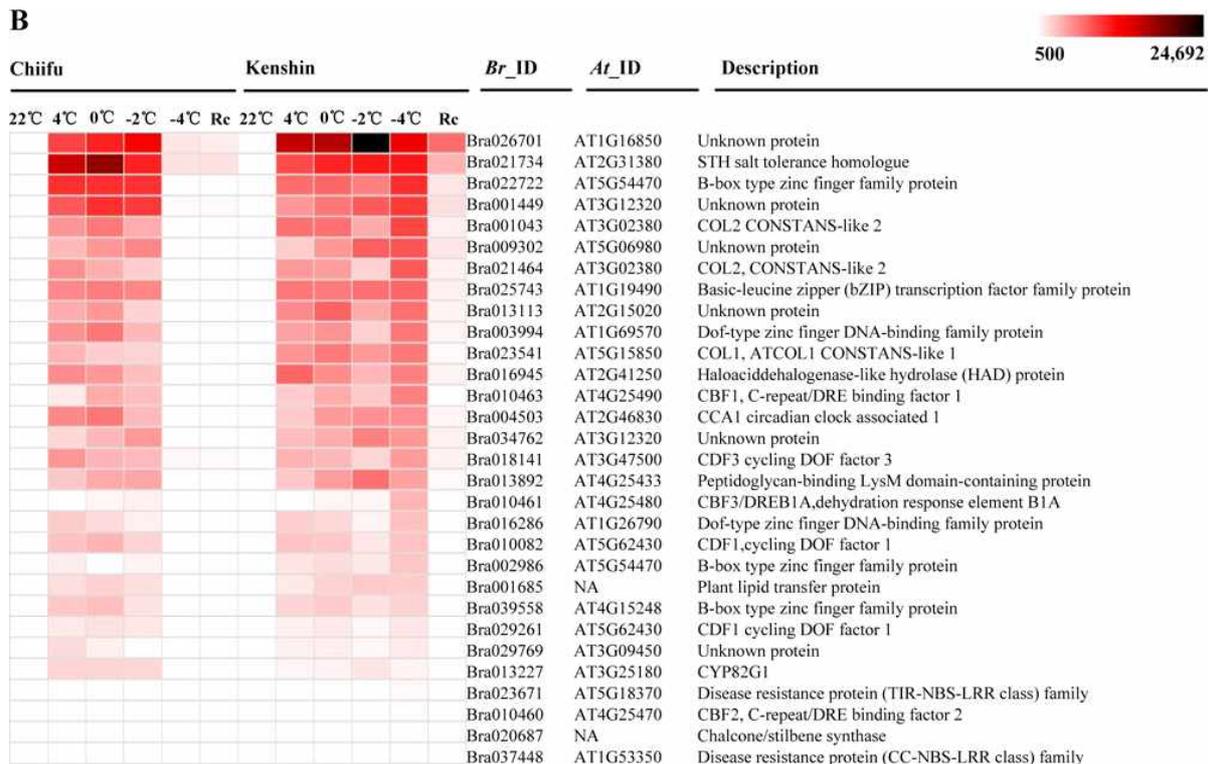
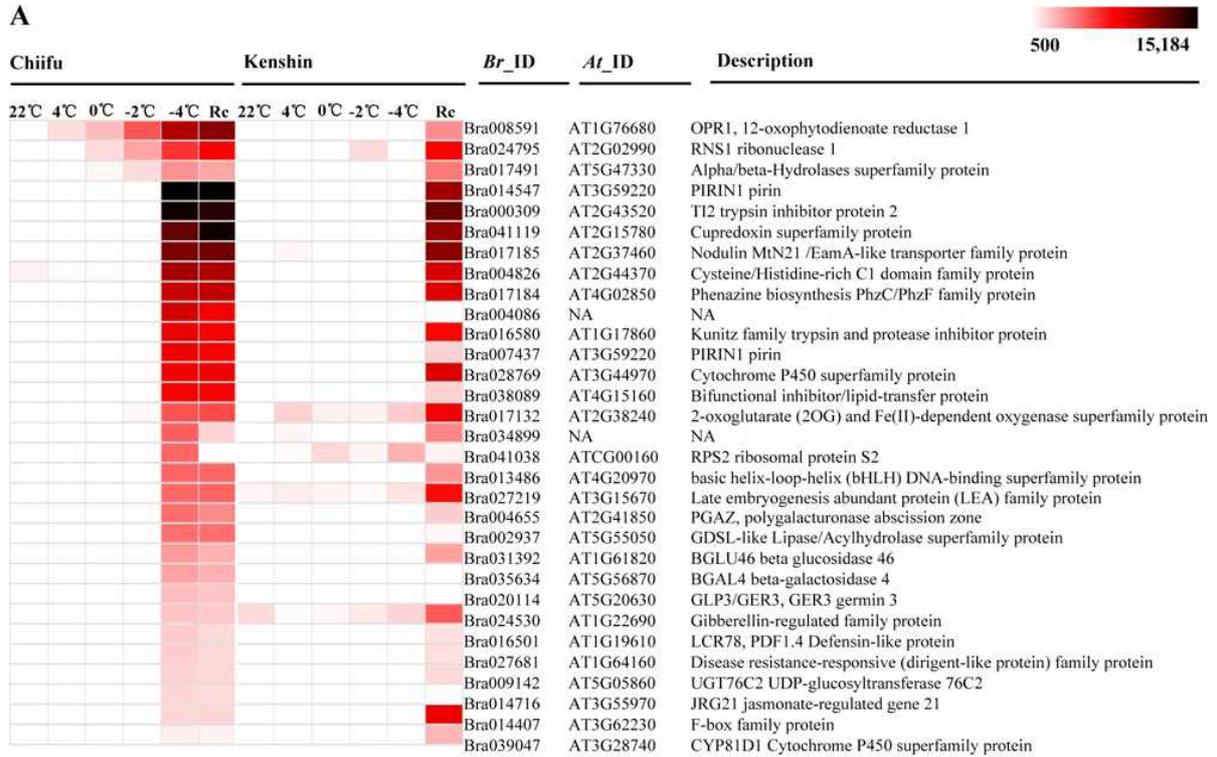


그림 87. Chiifu와 Kenshin에서 저온처리에 대한 유전자 발현양에 있어 상위 30개 유전자

A. Chiifu의 -4°C 처리구에서 강하게 발현하는 유전자. B. 저온에 대해 Kenshin에서 강하게 발현하는 유전자.

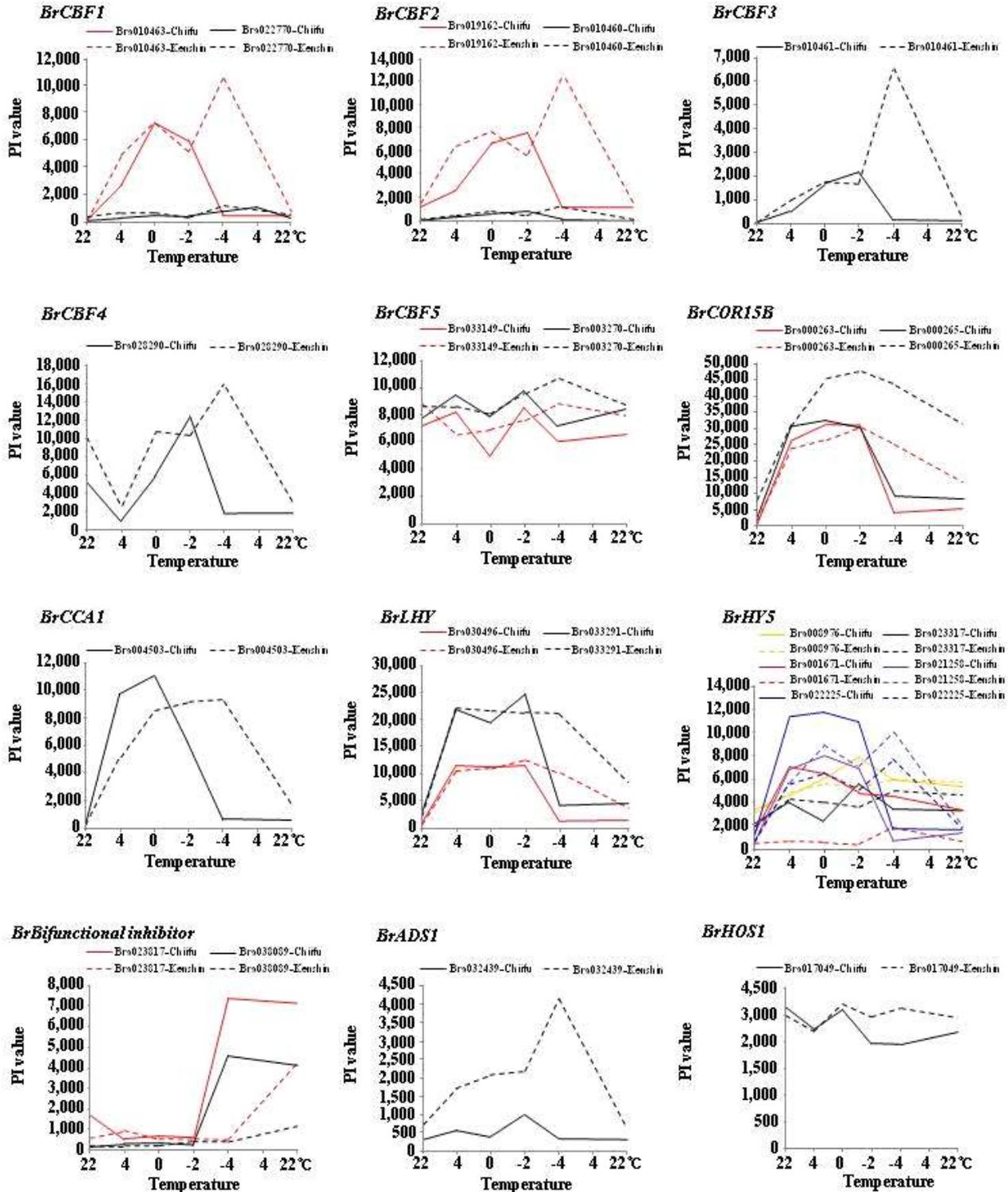


그림 88. 저온에 관련 있는 유전자들의 발현양상

22. 배추에서 비생물학적인 스트레스 조건 하에서의 CBL 유전자의 발현분석

가. 연구요약

배추(*Brassica rapa*)에서 여러 스트레스에 반응하는 유전자의 분석은 다양한 분야에서 연구되고 있다. 특히, 특정 domain을 가진 유전자를 분류하고 분석하는 작업은 유전자의 연구에 있어 한 축을 담당하고 있다. 따라서 본 연구에서는 배추에서 calcineurin B-like (CBL) 단백질들을 분류하고 저온, 가뭄, 염해 스트레스에서 이 유전자들의 발현패턴을 분석하였다. CBL 단백질은 일반적으로 4개의 EF-hand calcium binding motifs를 가지고 있는 단백질이다. 애기 장대에서는 10개 이상의 CBL 단백질이 존재하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 애기 장대에서 기존의 정보로 10개의 CBL 단백질을 BLAST 검색한 후 이를 비교하여 배추에서 CBL 단백질을 탐색 및 분석하였다. 배추에는 17개의 CBL 단백질이 존재하며, 이들 단백질과 애기장대 및 다른 식물에서 기존의 연구에서 보고된 CBL 유전자와의 정렬(alignment)을 통해 계통도를 작성하였다. 이들 단백질은 5개의 그룹으로 분류되었다.

BrCBL 단백질의 motif 검색을 하면 배추의 17개의 BrCBL 단백질 모두 4개의 EF motif를 가지고 있으며, 각 단백질의 EF motif 사이의 아미노산 서열에 차이가 있다. EF1과 EF2 사이에는 14개의 아미노산이 있으며 EF2와 EF3 사이에는 12개의 아미노산이 있고 EF3과 EF4 사이에는 21개의 아미노산이 존재하였다. 또한, 17개의 BrCBL 단백질은 10개의 잘 보존된 motif를 가지고 있었다. 각각의 CBL 유전자는 발현패턴이나 기능에 따라 유전자의 발현을 예측할 수 있다. 예를 들면, *AtCBL1*은 비생물학적 스트레스에 의해 발현되지만, *AtCBL2*, *AtCBL3*, *AtCBL9*, *AtCBL10*의 유전자는 비생물학적 스트레스에 의해 반응하지 않았다. 또한 CBL 유전자는 조직(tissue)에서 특이적으로 발현할 것으로 추측하여 비생물학적 스트레스뿐만 아니라 각 기관(Root, Stem, Leaf, Flower buds)에서 BrCBL 유전자의 발현패턴을 분석하였다. *BrCBL1-1*, *BrCBL1-2*, *BrCBL3-1*, *BrCBL4-1*, *BrCBL4-3*, *BrCBL8* 유전자는 모든 기관에서 높게 발현하였고, 다른 CBL 유전자는 Root와 Flower buds에서만 발현하였다. 결론적으로, 몇몇의 BrCBL 유전자는 기관 특이적으로 발현하는 것으로 확인하였다.

나. 연구결과

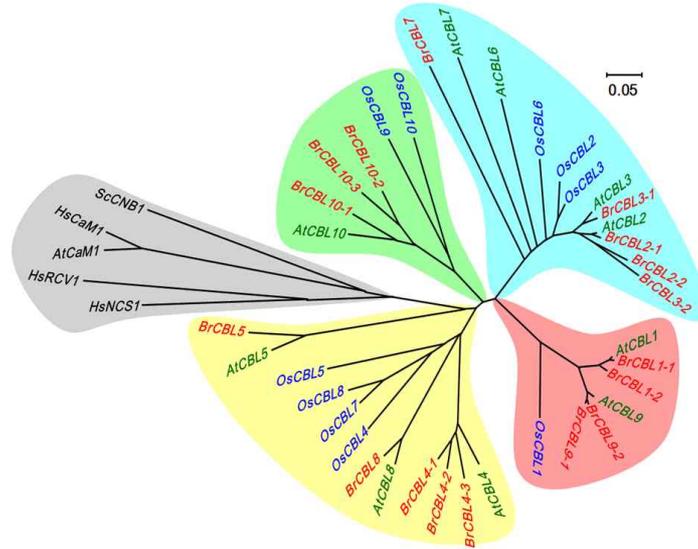


그림 89. 배추와 애기 장대의 *CalcineurinB-like* 유전자 간의 계통분석

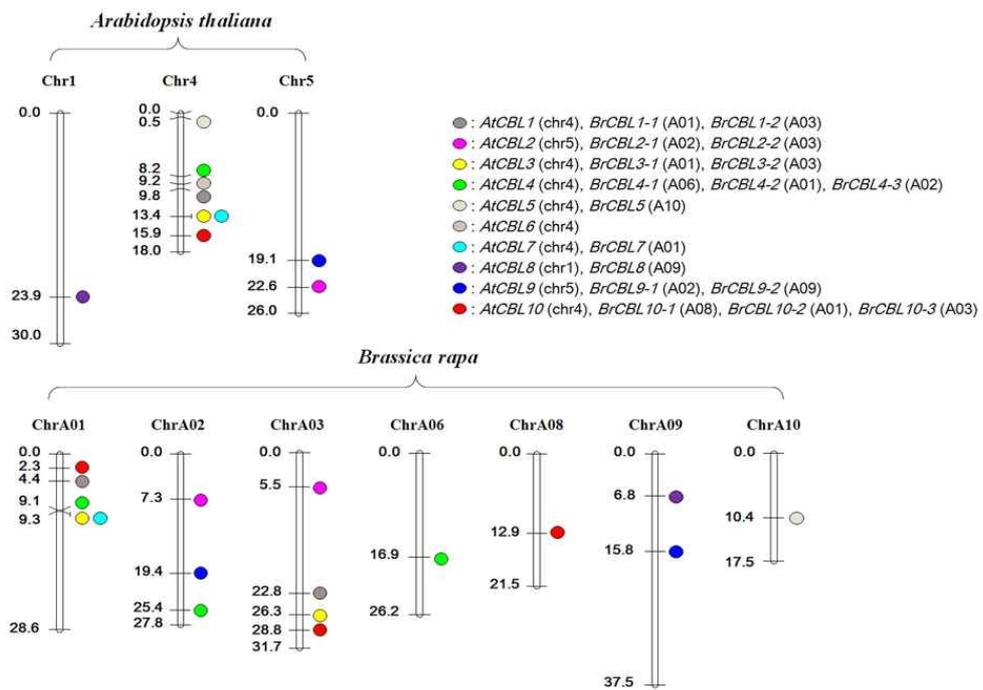


그림 90. 17개 CBL 유전자의 염색체 위치

23. 배추의 카로티노이드 유전자의 발현분석

가. 연구요약

배추(Chinese cabbage)의 흰색의 겉잎(outer leaf)과 대비되는 속잎(inner leaf)의 노란색은 루테인과 카로틴의 함량에 의존하는데, 본 연구에서는 흰배추 계통인 'Kenshin'과 속노란배추 계통인 'Wheessen'의 잎을 가지고 루테인과 β -카로틴 함량을 HPLC 분석을 통해 확인하였다. 흰배추 잎과 비교했을 때 속노란배추 잎에서 루테인과 β -카로틴의 함량이 각각 250배, 17배로 높은 수준임을 알 수 있었다. 이에 배추 잎에서 노란색과 관련된 유전자를 탐색하기 위하여 배추 Br300K oligomeric chip을 이용한 'Kenshin'과 'Wheessen'의 계통에 대한 전사체 분석을 실시하였다.

결과적으로 노란색 잎에서는 카로틴 합성(*BrPSY*, *BrPDS*, *BrCRTISO*, 및 *BrLCYE*)과 루테인 합성(*BrCYP97A3* and *BrHYDB*)에 관여하는 유전자들이 up-regulation 되었고, 카로틴 관련 유전자(*BrNCED3*, *BrNCED4*, 및 *BrNCED6*)는 down-regulation 되었다. Microarray 결과로 확인된 염기서열 ID값과 배추 유전자간의 orthologous 분석을 실시하여 카로틴 및 루테인 합성에 관련된 유전자들을 합성 그룹에 따라 분류하였고, RT-PCR을 통해서 재검증을 실시하였다. 또한 노란 배추와 흰 배추 간의 특이적으로 발현되는 유전자들을 분류하였고, 노란 색소와 관련된 유전자들 중 아직까지 알려지지 않은 유전자들의 비중이 높은 것을 확인하였다.

노란 색소에 특이적으로 발현한 유전자들 가운데 흰 배추와 노란 배추간의 PI(probe intensity) 값의 차이가 10배 이상인 유전자를 분류하여 노란 색소와 매우 밀접한 관련성을 가진 *Brapa_ESTC013161* (A20/AN1-like zinc finger protein), *Brapa_ESTC025847* [BIM1(BES1-interacting MYC like protein1)], 및 *Brapa_ESTC006452* [ZFP8(Zinc finger protein8)], 총 3개의 후보 유전자들을 선별하였다.

나. 연구결과

표 16. Kenshin과 Wheessen 서로 다른 두가지 계통에서 Lutein과 β -carotene의 함량

Cultivars	Lutein ($\mu\text{g/g}$ dry weight)	β -carotene ($\mu\text{g/g}$ dry weight)
Kenshin	0.19 \pm 0.08	0.69 \pm 0.08
Wheessen	47.49 \pm 1.59	12.00 \pm 0.61

표 17. 속노란 배추 잎에서 특이적으로 발현하는 전사인자

<i>B. rapa</i> SEQ_ID	TAIR7_cds ID	A_thaliana_homologue_Description	PI value		Fold Change (Y/W)
			White leaves	Yellow leaves	
Brapa_ESTC013161	AT1G51200	A20/AN1-like zinc finger protein	161	2674	16.6
Brapa_ESTC025847	AT5G08130	BIM1 (BES1-interacting Myc-like protein 1)	280	3517	12.5
Brapa_ESTC006452	AT2G41940	ZFP8 (ZINC FINGER PROTEIN 8)	269	3323	12.4
Brapa_ESTC024811	AT5G64810	WRKY51 (WRKY DNA-binding protein 51)	155	1002	6.5
Brapa_ESTC017689	AT1G51600	ZML2 (ZIM-LIKE 2)	472	3009	6.4
Brapa_ESTC017762	AT2G18328	DNA binding	401	2336	5.8
Brapa_ESTC004343	AT4G16420	ADA2B (PROPORZ1)	286	1593	5.6
Brapa_ESTC051029	AT1G49950	ATTRB1/TRB1 (TELOMERE REPEAT BINDING FACTOR 1)	396	1918	4.8
Brapa_ESTC047297	AT1G49950	ATTRB1/TRB1 (TELOMERE REPEAT BINDING FACTOR 1)	400	1902	4.8
Brapa_ESTC032962	AT4G31060	AP2 domain-containing transcription factor, putative	382	1582	4.1
Brapa_ESTC006124	AT5G64810	WRKY51 (WRKY DNA-binding protein 51)	312	1166	3.7
Brapa_ESTC001675	AT4G17810	Nucleic acid binding / transcription factor/ zinc ion binding	442	1601	3.6
Brapa_ESTC011816	AT3G51960	bZIP family transcription factor	309	1079	3.5
Brapa_ESTC037364	AT4G12020	WRKY19 (WRKY DNA-binding protein 19)	412	1394	3.4
Brapa_ESTC014402	AT2G40750	WRKY54 (WRKY DNA-binding protein 54)	322	1021	3.2
Brapa_ESTC035091	AT3G57600	AP2 domain-containing transcription factor, putative	455	1411	3.1
Brapa_ESTC011257	AT4G34680	GATA transcription factor 3, putative (GATA-3)	371	1095	3.0
Brapa_ESTC025927	AT3G17609	HYH (HY5-HOMOLOG)	392	1152	2.9
Brapa_ESTC035196	AT4G30410	Transcription factor	480	1248	2.6
Brapa_ESTC025999	AT3G50890	ATHB28 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN PROTEIN 28)	464	1189	2.6
Brapa_ESTC030153	AT1G79180	AtMYB63 (myb domain protein 63)	470	1023	2.2

24. 배추에서 내한성 및 내동성 관련 Dihydroflavonol 4-Reductase(*DFR*) 유전자 분석

가. 연구요약

플라보노이드 생합성 경로(flavonoid biosynthesis pathway)는 응용생물학, 유전학에서 근본적인 개념뿐만 아니라 유전자 조절을 이해하거나 전이 요소들의 특징을 밝혀내고 궁극적으로는 농업에서 내재성 식물과 자연적인 항산화물질의 생산을 위해 필수적인 과정이다. 또한 고등 식물의 주요 색소체로서 유색의 플라보노이드 계열 중 하나인 안토시아닌(anthocyanin)은 꽃이나 잎, 그리고 과실의 색깔(빨간색, 분홍색, 보라색, 파란색)을 발현시킨다. 특히, Dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*)은 플라보노이드 생합성 경로에서 매우 중요한 조절 효소로 최종산물인 안토시아닌과 프로안토시아닌idin(proanthocyanidin)을 생산하는 상위 경로에 해당한다.

본 연구에서는 배추의 12개의 *DFR* 유전자(*BrDFRs*)를 발견하였고, 유색과 무색의 배추 계통 내에서 안토시아닌 색소, 내한성 및 내동성과의 관련성을 조사하였다. 이들 *BrDFR* 유전자들의 염기 서열은 다른 종들의 *DFR* 유전자의 염기 서열과 비교했을 때 상당히 높은 상동성을 가지고 있었다. 특히 배추의 유색과 무색 계통 내에서 이들 유전자들에 대한 발현 실험 결과, *BrDFR8* 및 9 유전자가 안토시아닌 색소의 축적과 관련된 상호작용을 나타내는 것으로 확인하였다

또한 안토시아닌 색소의 축적과 강한 내한성을 동시에 가지는 유색 배추에서 *BrDFR* 2, 4, 8, 및 9 유전자들이 높은 반응을 나타내었다. *BrDFR1*, 3, 5, 6, 및 10 유전자들은 강한 내한성과 내동성에 상관없이 저온 및 동결 스트레스에 반응했다. *BrDFR* 유전자들은 *BrMYB2-2*, *BrTT8* 두 가지 전사인자에 의해 조절되는데, 내한성과 안토시아닌 생합성과 관련 있는 이들 유전자들이 Brassica에서 내한성 작물 개발과 색상에 대한 연구에 유용한 자원으로 활용이 가능할 것으로 사료된다. 또한, 식물체에서 전사 수준에서 환경적인 스트레스에 반응하고 안토시아닌 생합성을 조절하는 분자생물학적인 메커니즘을 연구하는데 도움이 될 것이다.

나. 연구결과

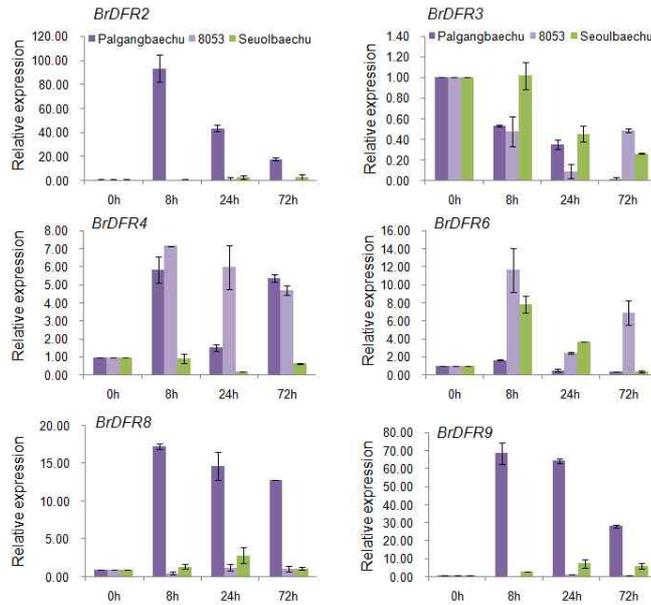


그림 93. 전체가 빨간색을 띄는 ‘팔강배추’, 부분적으로 빨간색을 띄는 ‘8053’, 및 초록색을 띄는 ‘서울배추’에 저온 처리 후에 시간 별 6개의 *BrDFR* 유전자의 발현 분석 결과
저온 처리 후 8시간 후에 *BrDFR2*, 4, 6, 8, 및 9 유전자의 발현 수준이 높게 나타났으며, 모두 ‘팔강배추’에서 높은 수준으로 발현되는 것을 확인함.

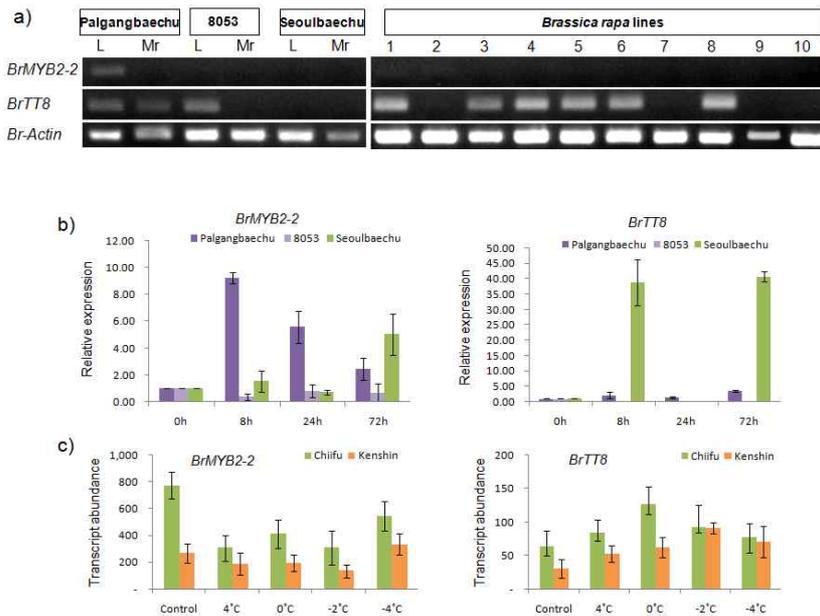


그림 94. 배추의 안토시아닌 생합성 경로에 관여하는 유전자들의 2가지 전사인자에 대한 발현 분석

a) 적색인 ‘Palgangbaechu’와 녹색인 ‘Seoulbaechu’에서 안토시아닌 축적과 관련된 *BrMYB2-2* 와 *BrTT8*에 대한 RT-PCR 분석결과, b) 적색인 ‘Palgangbaechu’와 녹색인 ‘Seoulbaechu’에서 저온 스트레스와 관련된 *BrMYB2-2* 와 *BrTT8*에 대한 정량 real-time PCR 분석결과, c) ‘Chiifu’와 ‘Kenshin’에 저온 스트레스 처리(4°C, 0°C, -2°C 및 -4°C) 후에 *BrMYB2-2* 와 *BrTT8*의 Microarray 발현 분석결과

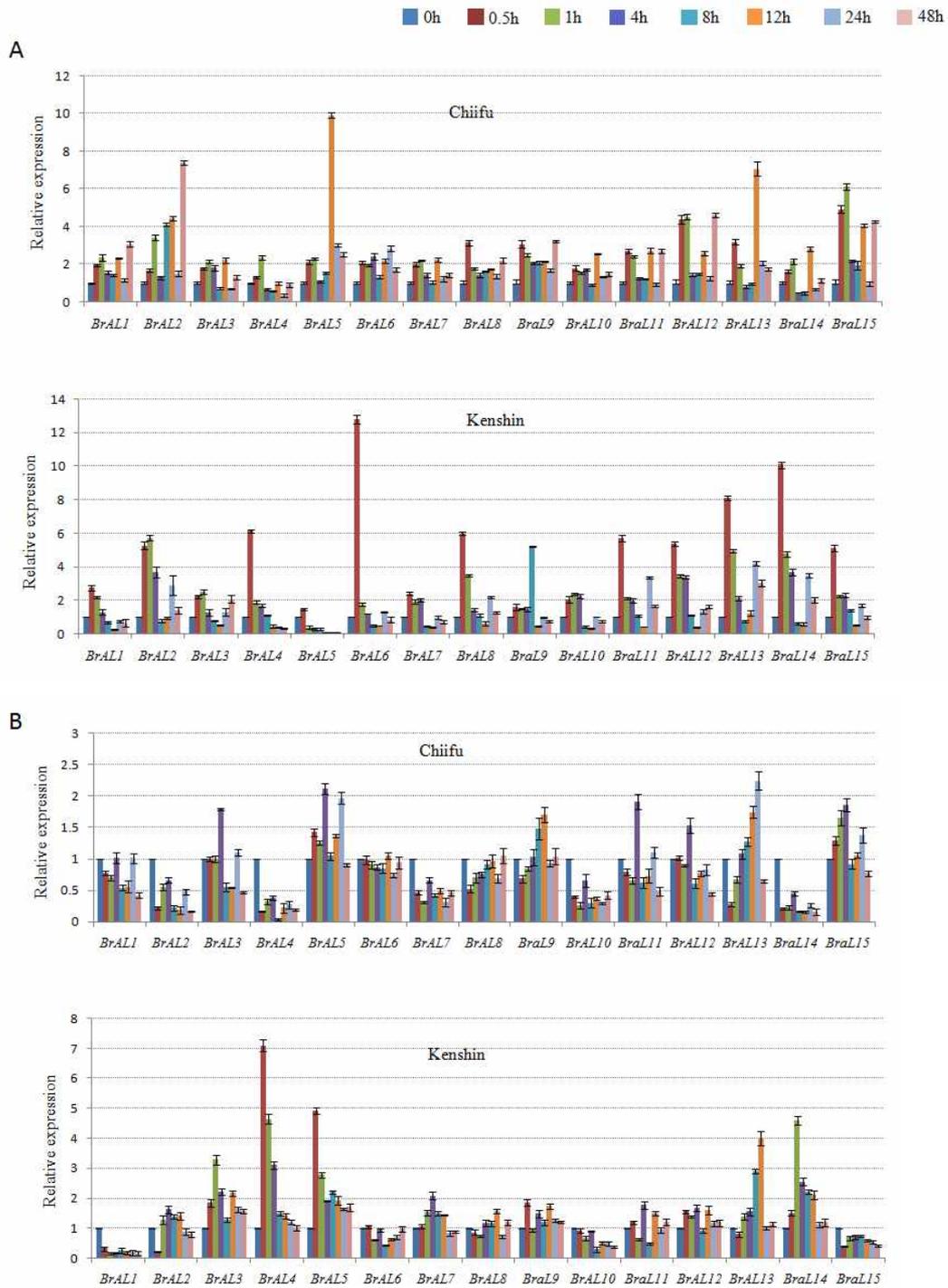
25. 배추의 스트레스 관련 Alfin-like 전사인자의 동정 및 발현분석

가. 연구요약

Alfin-like 전사인자 (AL-TFs) 는 식물에서 줄기의 발생, 뿌리와 뿌리털(root hair)의 신장과 발생을 포함하는 발달과정에 관여한다. 그러나 이들 TFs의 스트레스 저항성과 관련한 기능 및 조절기작에 대해서는 아직까지 밝혀진 바가 없다. 본 연구는 배추에서 AL TFs의 체계를 확립하기 위하여 AL TFs 관련 유전자의 분류, 염색체 상의 분포, 유전자의 중복성, 유전자 계통 분석 및 엑손-인트론 구조 차이와 단백질 도메인 구조 분석 등의 포괄적인 연구를 수행하였다. 또한, 배추 작물에서의 스트레스와 관련하여 생물학적인 스트레스로 배추의 대표적인 질병인 무름병 (*Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*)과 시들음병(*Fusarium oxysporum fsp. conglutinans*), 미생물학적 스트레스인 저온, 염분, 가뭄 조건을 처리한 후 AL TFs 관련 유전자들의 발현 패턴을 확인하였다.

본 연구에서는 BRAD database로부터 배추의 총 15개의 BrAL 유전자들을 찾아냈으며, 애기 장대의 분류 체계에 따라 총 4 개 군(group)으로 분류하였다. *In silico* 기술을 이용하여 14개의 BrAL 유전자가 10개의 배추 염색체 상에 위치하는 것을 확인하였다. 또한 9 개의 AL 유전자(*BrAL1* and *BrAL4*; *BrAL1* and *BrAL5*; *BrAL4* and *BrAL5*; *BrAL2* and *BrAL13*; *BrAL3* and *BrAL7*; *BrAL3* and *BrAL10*; *BrAL7* and *BrAL10*; *BrAL8* and *BrAL11*; *BrAL9* and *BrAL12*)에서 11개의 분절중복(segmental duplication, SDs)을 가지고 있는 것을 발견했다. 화기(floral organ)의 기관에서만 특이적으로 발현한 *BrAL8* 유전자를 제외한 모든 유전자가 모든 기관에서 발현하는 양상을 보였다. 특히, BrAL TFs 유전자들은 저온 스트레스 처리 후 Chiifu와 Kenshin에서 높은 발현 수준을 보였으며, *BrAL5*, *10*, 및 *15* 유전자를 제외한 나머지 유전자들은 염분 스트레스에 반응하여 높은 발현수준을 나타내었다. 또한, *BrAL2*, *3*, *4*, *5*, *7*, *9*, *12*, *13* 및 *14* 유전자들은 가뭄 스트레스에 반응하여 높은 수준의 발현 양상을 나타내었다. 또한 *BrAL2*, *3*, *7*, *9*, *12*, *13*, *14* 및 *15* 유전자들은 모든 미생물학적인 스트레스에서 높은 발현 수준을 보였으며 또한 *BrAL2*, *3*, *4*, *7*, *9*, *10*, *13*, *14* 및 *15* 유전자들은 시들음병과 같은 생물학적 스트레스에도 높은 발현 수준을 나타냈다. 결과적으로 *BrAL2*, *3*, *7*, *9*, *13*, *14* 및 *15* 유전자들은 생물학적인 스트레스와 미생물학적인 스트레스에 공통적으로 발현 수준이 높은 것을 확인하였다. 스트레스에 의해 유도된 BrAL TFs에 대한 체계적인 분석은 다른 배추속 작물들의 유전체 기능 연구와 스트레스 저항성 기작에 대한 조절 메커니즘을 밝히는데 도움이 될 것으로 사료된다.

나. 연구 결과



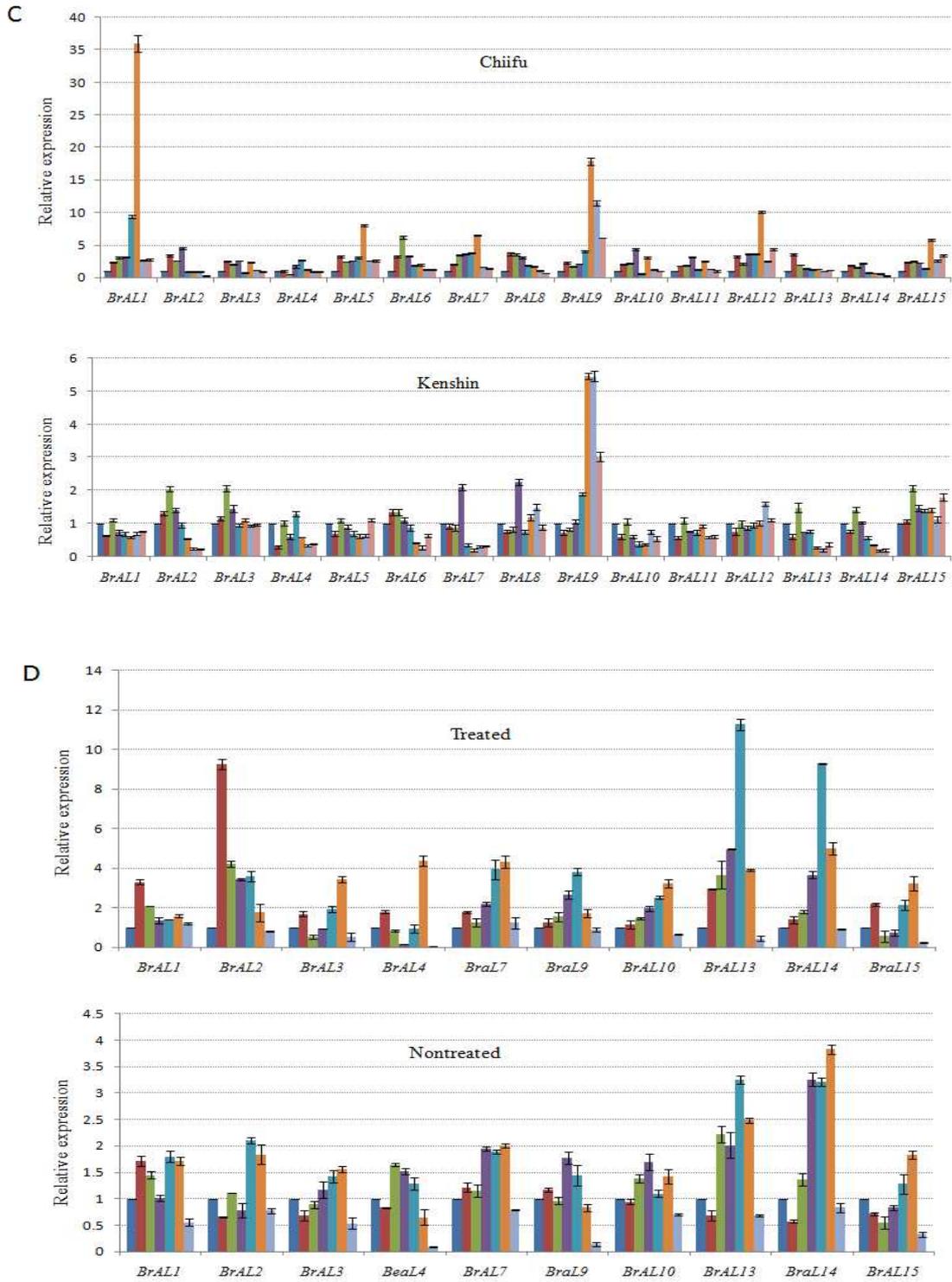


그림 95. 생물학적, 비생물학적인 스트레스 처리 후, qRT-PCR을 이용한 *BrAL* 유전자들의 발현 패턴 분석결과

(a) 염분, (b) 가뭄, (c) 저온, (d) 시들음병

26. 배추의 기관 발달과 스트레스 저항성에 관여하는 MADS-box family 유전자의 동정 및 발현분석

가. 연구요약

MADS-box 전사인자(TFs)는 다양한 식물의 성장과 발달뿐만 아니라 화기(floral organ)의 특이적인 발달에도 매우 중요한 역할을 한다. MADS-box 유전자의 스트레스 저항성과 관련한 기능에 대한 연구는 배추에서 연구 보고된 바가 없고 작물과 관련해서는 매우 한정되어 있다.

본 연구에서는 배추 전체 genome상에서 167 개의 MADS-box 유전자를 확인하였고, 단백질 motif 및 엑손-인트론 분석을 통해 type I (Ma, M β 및 My)과 type II (MIKC^c와 MIKC^{*})의 2가지 유형으로 분류하였다. Type II에 속하는 MIKC^c와 MIKC^{*}의 각 89개와 11개의 유전자를 이용하여 화기 및 조직에서의 발현 분석을 실시하였다. 또한, 배추에 저온 처리 후 실시한 microarray 분석 결과를 통해 Chiifu와 Kenshin, 즉 두 저온 대비 계통에서 특이적으로 반응하는 19개의 *BrMADS* 유전자를 발견하였다. 이들 유전자들 가운데, 13개의 *BrMADS* 유전자들은 두 저온 대비 계통에서 qPCR 실증 실험을 통해 저온에 특이적으로 발현되는 것을 확인하였다. 19개의 *BrMADS* 유전자들 중 8개는 가뭄에, 6개는 염분 스트레스에 특이적인 발현 양상을 나타냈다. 본 연구에서 배추에서 스트레스에 관여하는 유용한 MADS-box 유전자들을 발견하기 위해 광범위한 gene annotation과 transcriptome profiling 분석을 실시하였으며, 그 결과 스트레스 저항성 및 작물의 생장과 발달에 직접적인 영향을 미치는 후보 유전자들을 찾을 수 있었다.

나. 연구결과

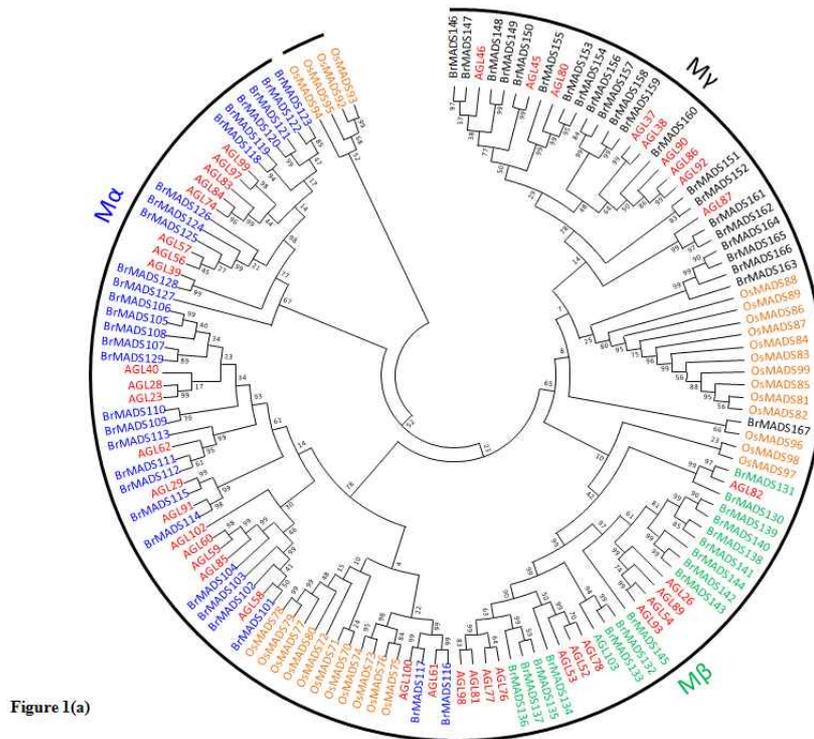


Figure 1(a)

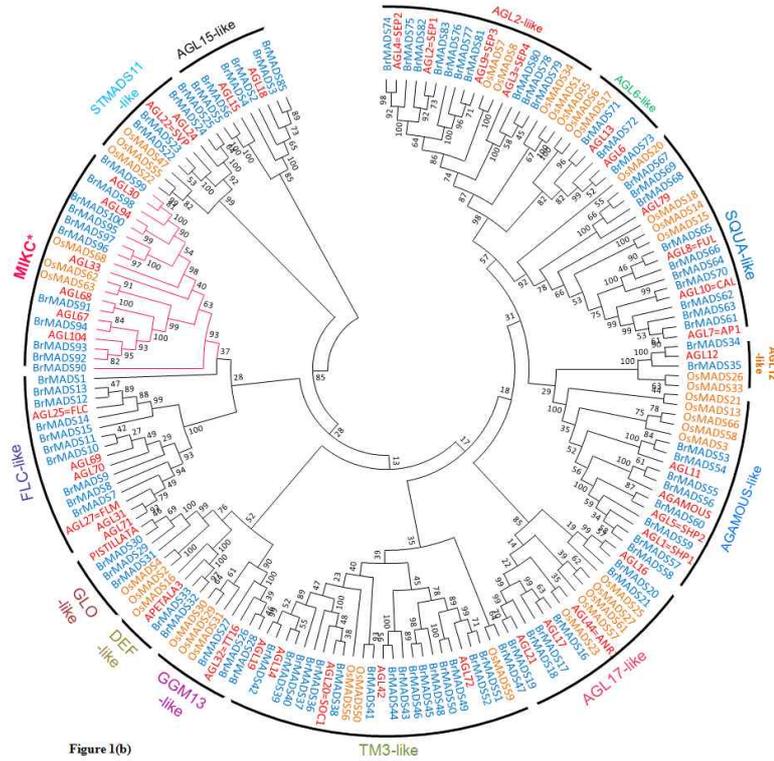


Figure 1(b)

그림 96. 배추와 애기장대 및 벼의 MADS-box 유전자의 계통학적 분석

- (a) 배추(67), 애기장대(43) 및 벼(28)의 총 138개의 type I에 속하는 MADS-box protein의 계통도
- (b) 배추(100), 애기장대(43) 및 벼(38)의 총 181개의 type II에 속하는 MADS-box protein의 계통도

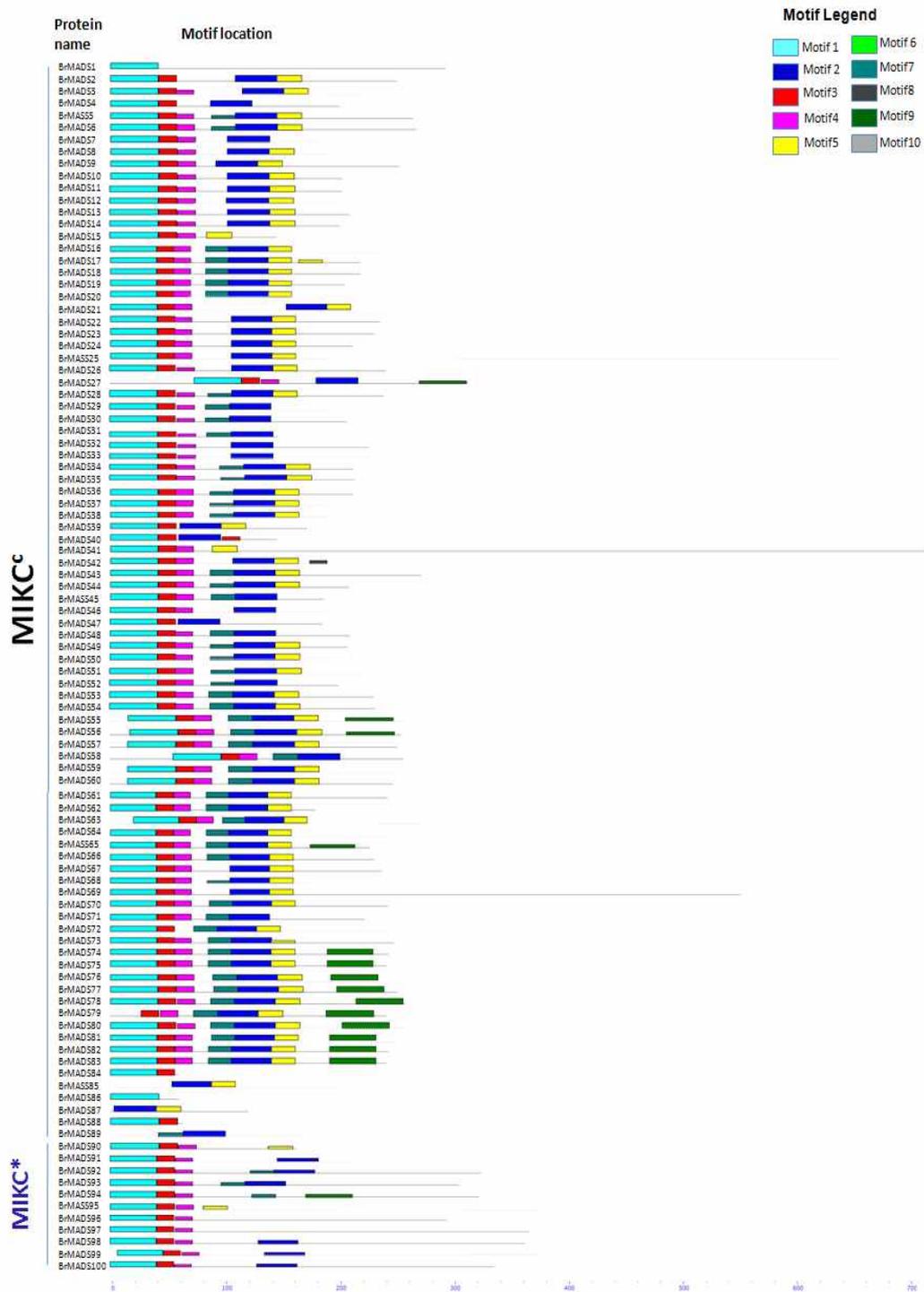


그림 97. 배추의 MADS-box type II에 속하는 MIKC^c와 MIKC^{*} 그룹의 MEME motif 분석결과

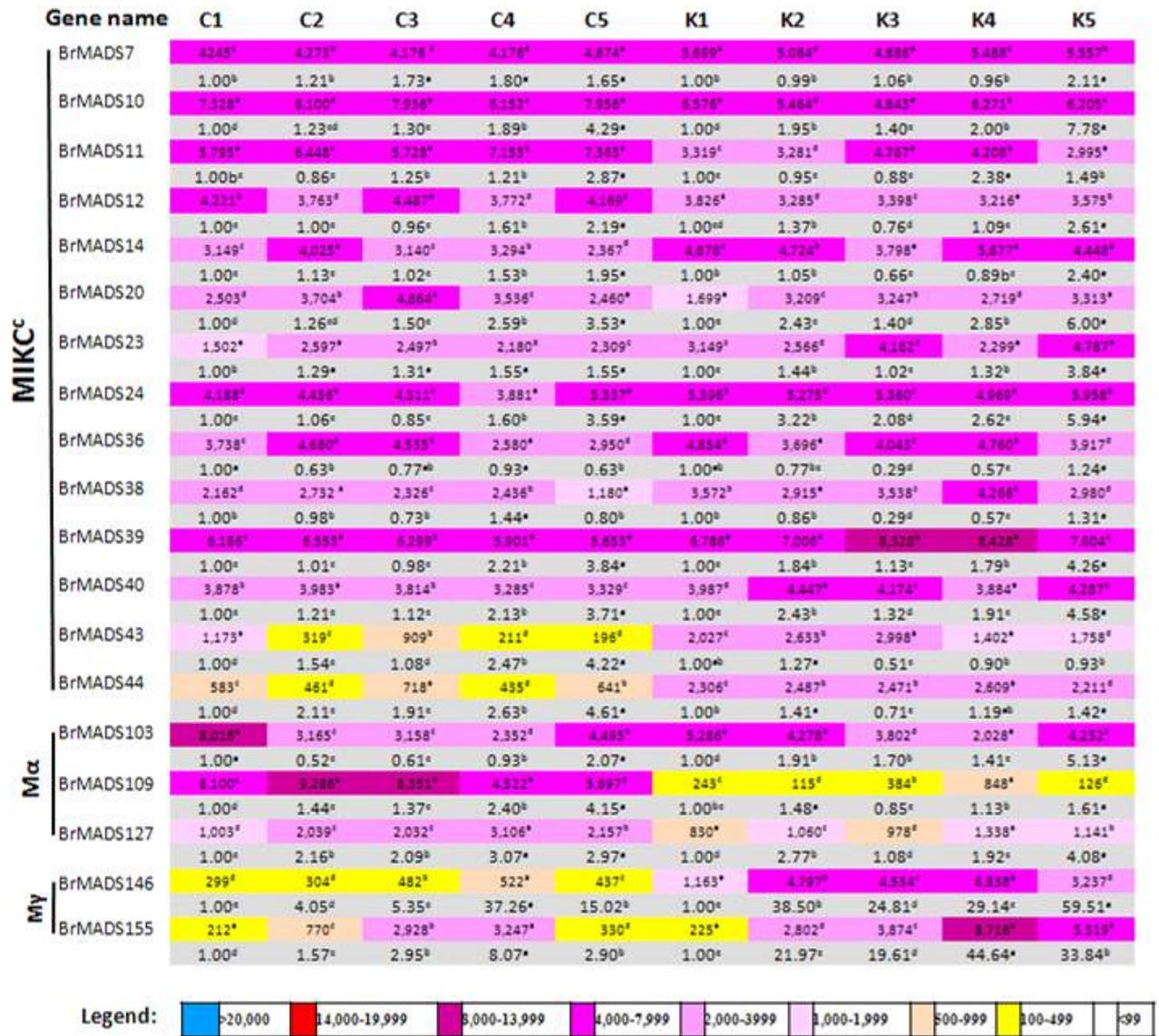


그림 98. 각 저온 처리 조건 별 배추의 19개 MADS-box 유전자들의 microarray (위)와 qPCR 발현 분석 (아래 회색) 결과

대조군 (C1&K1), 4°C (C2&K2), 0°C (C3&K3), -2°C (C4&K4), and -4°C (C5&K5)

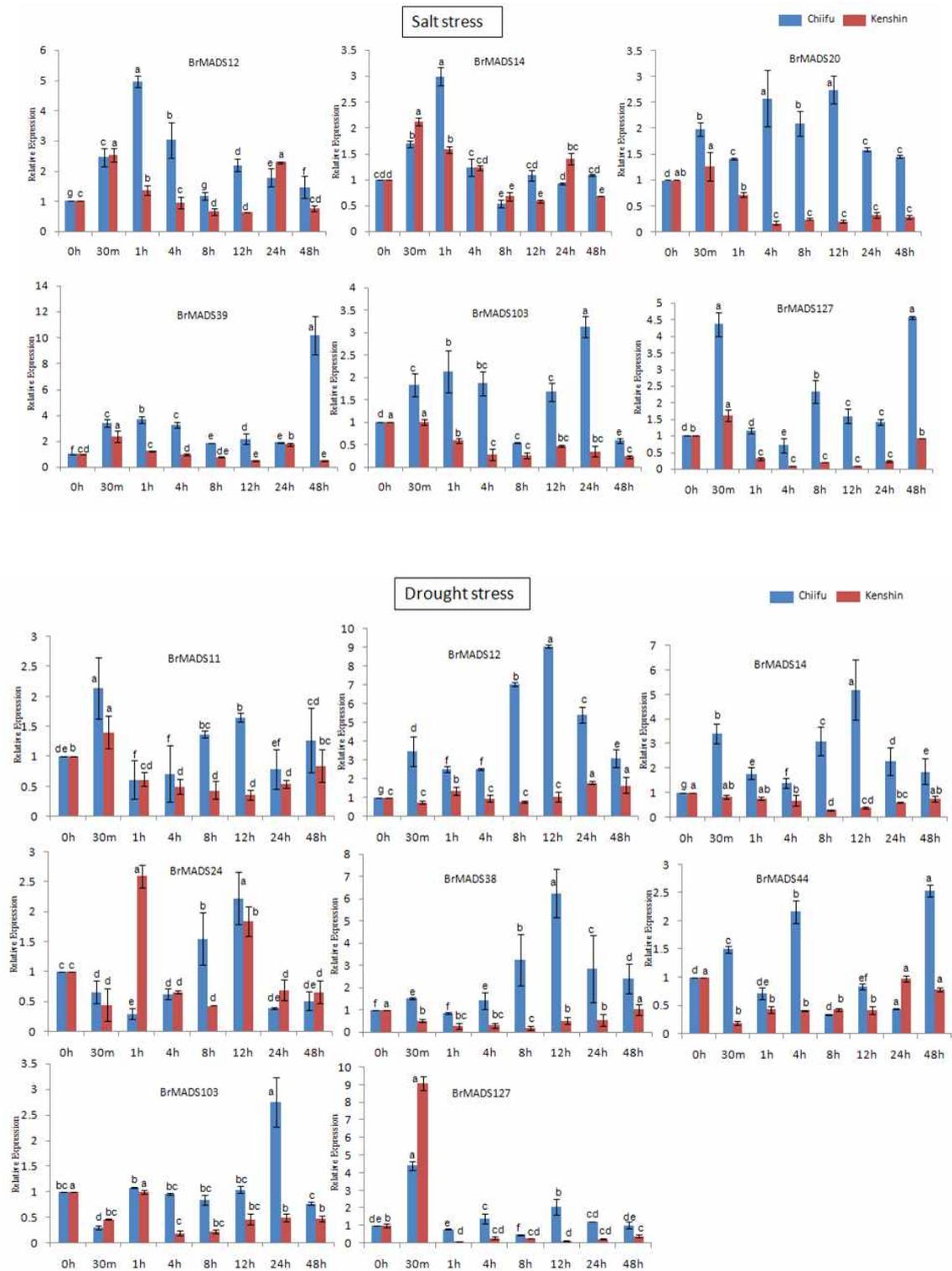


그림 99. Chiifu와 Kenshin에서 가뭄과 염분 스트레스에 특이적으로 발현하는 유전자

27. 배추에서 abiotic stress에 의해 유도된 BZR 전사인자 family의 특징 분석

가. 연구 요약

BRASSINAZOLE-RESISTANT(BZR) 전사인자(TFs)는 다른 식물에서 Brassinosteroid (BR) 신호 전달의 긍정적인 조절인자로 알려져 있다. BR은 다양한 성장 조절 역할 외에 여러 스트레스 내성 기능을 갖는 식물 특정 스테로이드 호르몬이다. BR 합성의 중요한 조절인자인 BZR TF가 스트레스 내성에 관련된 기능을 하는 것으로 알려져 있지만 BZR TF의 비생물적 스트레스 내성 관련 기능 연구는 지금까지 보고되지 않았다. 따라서 본 연구는 배추(BrBZR)의 전체 게놈에서 15 BZR TF를 동정하였고, 그것들에 대한 염기서열 분석과 비생물적 스트레스에 대한 발현분석에 의해 특징들을 조사하였다.

배추에서 15 BZR TF를 동정하였으며, *B. rapa* BZR (BrBZR) TFs로 명명하였다. 15 BrBZR의 예상 단편의 크기는 152 bp 에서 386bp 아미노산으로 구성되었으며, 예상된 Isoelectric point는 4.44 에서 9.48로 다양하였다. 단백질도메인구조를 분석한 결과, 13 BrBZR TFs 는 BZR TFs의 특징적인 'DUF822' 도메인을 갖고 있었다. 2 BrBZR TFs는 'DUF822'도메인이 결여되었지만 다른 구별된 BZR TFs 기능을 나타냈다. 또한 15 BrBZR TFs의 DNA 염기서열을 배추 전체게놈서열을 이용하여 결정하였다. 엑손과 인트론 분포의 분석은 유전자들의 가장 유사한 splicing 패턴을 나타낸 것으로 나타났다. 15 BrBZR와 NCBI 데이터베이스의 BLAST검색에서 얻어진 다른 종의 BZRs를 비교한 결과, 모든 15 BrBZR의 아미노산 서열은 애기장대 BZR TFs와 50-94%의 높은 유사성을 나타냈으며 그 중 12 BrBZR가 애기장대 BZR TFs와 80%이상의 유사성을 나타냈다. 15개의 BrBZR의 아미노산서열간의 유사성은 57-96%였으며, 11 BrBZR는 종내에서 80%이상의 유사성을 나타내어 그들의 서로 복제가능성을 시사한다.

그리고 NCBI에서 검색한 모든 애기 장대와 벼의 BZR TF 아미노산 서열, 그리고 배추의 15 BrBZR의 아미노산 서열을 서로 비교하여 유전적 계통도(NJ tree)를 작성하였다. 그 결과 애기 장대의 BZR 및 BZR-상동체 (BEH)의 근접 상동체인 것을 확인했다. 배추의 BrBZR TF(BrBZR1-1, BrBZR1-2)는 애기장대의 BZR1과 같은 그룹을 형성했으며, 배추의 BrBZR TF(BrBES1-1, BrBES1-2, BrBES1-3)는 BZR2 / BES1과 근접한 관계를 나타냈다. 또한 BrBZR TFs는 10개의 Motif가 동정되었는데, Motif 검색과 멀티 염기서열 정렬을 통해서 TFs는 비정형의 basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-결합 motif을 가지고 있었으며, 그것들은 motif 1에 위치해 있었다. 그리고 TFs harbor serine (S)-rich phosphorylation sites와 PEST 도메인은 motif 6와 motif 5의 중간부분에 위치해 있었다.

그리고 동정된 cis-elements는 비생물적 스트레스 반응 요소뿐만 아니라 빛과 일주기 생체조절, 병 저항성 그리고 종자개발에 관여하는 것; TC-rich repeats, TCA element, HSE element, ERE element, Box-W1 element, MBS element, LTR element, CGTCA motif, TGACG-motif, TGA element, ABRE, CE3, motif IIb, GARE-motif, P-box, SARE, AuxRR-core, GC-motif, WUN-motif and circadian 들을 포함하고 있었다.

BrBZR TFs의 기관 특이적 발현 패턴을 조사하기 위해 스트레스를 주지 않은 Chinese cabbage의 뿌리, 줄기, 잎, 꽃눈에서 mRNA추출한 후 cDNA를 합성하여 specific promoter를 사용하여 RT-PCR 분석을 수행하였다. BrBZR1-1, BrBZR1-2, BrBES1-1, BrBES1-2,

BrBEH1 및 BrBEH4-7는 모든 기관 어디에서나 발현하였으며, BrBEH2를 제외한 모든 TFs는 *B. rapa*의 꽃눈에서 발현했다. BrBEH 2는 어느 조직에서도 발현되지 않았다. 또한 꽃눈 발달과정의 6단계별로 조직을 채취하여 모든 BrBZR TFs의 발현을 조사하였다. 모든 TFs는 모든 단계에서 서로 다른 발현 양상을 나타냈는데, 흥미롭게도, BrBES1-1, BrBEH1, BrBEH3, BrBEH7 및 BrBEH8의 발현이 점차 성숙한 꽃눈으로 가면서 증가했다.

B. rapa(Chiifu, Kenshin)에 저온과 동결 스트레스 처리 후 15 BrBZR의 발현을 조사하였다. 그 결과 BrBEH TFs가 BrBZR1과 BrBES1 TFs보다 저온 또는 동결 스트레스에 대한 반응에서 더 높게 유도했다. 저온 스트레스에 더하여, 'Chiifu'의 염분, 가뭄, 그리고 ABA 반응에 대한 모든 BZR TFs의 발현을 조사 하였다. STRING 소프트웨어를 사용하여, 15 *B. rapa* BZR TFs의 기능과 물리적 상화작용을 애기장대 단백질과의 상호작용을 조사하였다. BrBZR1-1, BrBZR1-2, BrBEH10, BrBES1-1, BrBES1-2, and BrBES1-3는 애기장대의 BZR1과 BES1 단백질과 긴밀한 관계를 나타냈으며, brassinosteroid (BR) 신호 전달 네트워크에 관여하고 있었다.

배추에서 비정형 bHLH 도메인 조직을 가진 BrBZR TFs는 저온 스트레스에 대한 내성을 나타냈으며, 저온/동결 내성을 증가시키는 CBF 저온반응 경로를 조절하는 전사활성제와 같은 역할을 할 것이다.

나. 연구 결과

표 18. Brassica 데이터베이스에서 수집한 BZR 유전자

Gene name	Locus ID	Located chromosome number	ORF (bp)	Protein				Sub-cellular localization	No. of introns
				Length (aa)	BZR domain start-end (aa)	P ^I	MW (kDa)		
<i>BrBZR1-1</i>	Bra003772	A07	996	331	17-170	9.05	35.87	N	1
<i>BrBZR1-2</i>	Bra008378	A02	945	314	16-160	9.40	34.34	N	1
<i>BrBES1-1</i>	Bra010093	A06	1002	333	16-171	9.26	36.17	N	1
<i>BrBES1-2</i>	Bra011706	A01	1015	331	17-164	9.44	36.18	N	1
<i>BrBEH1-3</i>	Bra008177	A02	1161	386	81-223	9.41	42.53	N	2
<i>BrBEH1</i>	Bra012570	A03	879	292	2-153	8.72	31.41	N	1
<i>BrBEH2</i>	Bra012891	A03	924	307	2-155	7.57	33.06	N	1
<i>BrBEH3</i>	Bra013359	A01	675	224	None	4.99	24.04	EC	2
<i>BrBEH4</i>	Bra015868	A07	831	276	2-141	8.52	30.03	N	1
<i>BrBEH5</i>	Bra016508	A08	831	276	2-141	8.69	30.05	N	1
<i>BrBEH6</i>	Bra017782	A03	459	152	None	4.44	16.46	EC	0
<i>BrBEH7</i>	Bra020986	A08	912	303	9-152	8.63	33.09	N	1
<i>BrBEH8</i>	Bra025733	A06	942	313	14-169	9.16	33.73	N	1
<i>BrBEH9</i>	Bra031077	A09	857	285	15-166	9.48	30.74	N	1
<i>BrBEH10</i>	Bra035060	A07	636	211	7-111	5.43	22.41	N	1

Abbreviations: ORF, open reading frame; bp, base pair; aa, amino acid; kDa, kilo Dalton; P^I, iso-electric point; MW, molecular weight; N, nuclear; EC, extracellular.

^a Brassica database (<http://brassica.org/brad/index.php>).

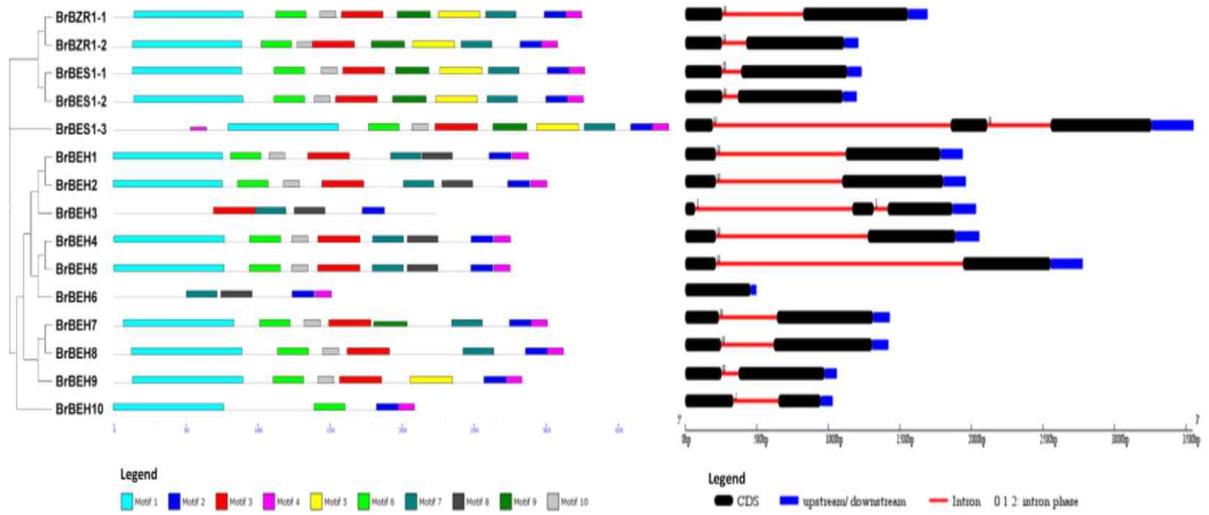


그림 100. *B. rapa* BZR 단백질내의 motif와 엑손 및 인트론의 분포

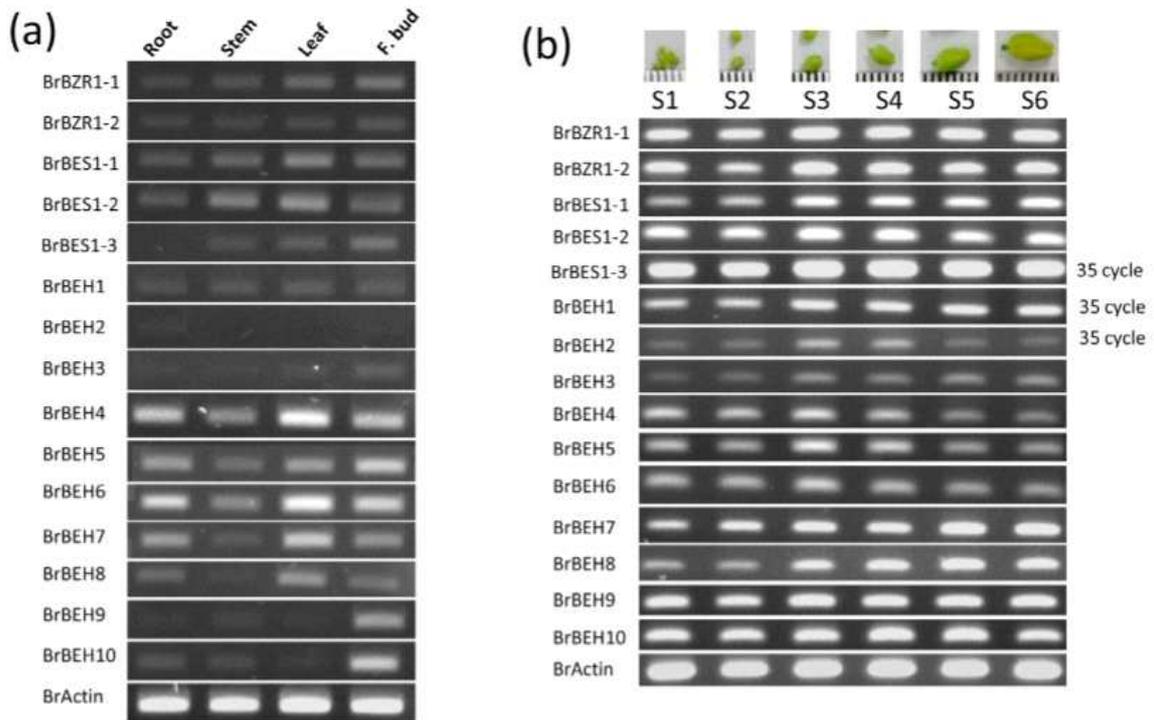


그림 101. *B. rapa* 식물체의 기관별, 꽃눈의 시기별 15 BZR TFs 유전자의 RT-PCR 발현

28. 배추에서 스트레스 관련 Aquaporin 유전자들에 대한 동정 및 스트레스 반응 분석

가. 연구요약

Aquaporin (AQP) proteins은 식물의 생체막을 통한 영양물질과 수분을 수송할 때 다양한 형태들로 존재하며, salt와 drought 스트레스에서 살아남기 위해 필수적인 것이다. 본 연구에서는 B. rapa database와 Br135K microarray dataset으로부터 59 BrAQP 유전자들을 동정하였다. 토마토와 애기장대의 AQPs와 배추의 BrAQPs의 Phylogenetic 분석한 결과, plasma membrane intrinsic proteins (PIPs), tonoplast intrinsic proteins (TIPs), NOD26-like intrinsic proteins (NIPs), and small basic intrinsic proteins (SIPs)을 포함하는 4개의 subfamilies 구분됨이 밝혀졌다.

AQP은 다른 식물 종들에서 스트레스와 관련되어 있고 homology를 보이는 AQP의 발현 분석을 위해 PIP subfamily 유전자들을 선발하였다. 모든 BrPIP 유전자들은 기관 특이적 발현양상을 나타냈다. 추가적으로, cold, salt, drought, water logging 스트레스 뿐만 아니라, ABA 처리, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Conglutinans* 감염에 반응하는 PIP subfamily 유전자들의 발현을 분석하였다. 22개의 BrPIP 유전자들 중 12개는 cold 처리에서 다른 양상의 발현을 나타냈다. 7개의 BrPIP 유전자들은 drought 스트레스에서 up-regulation을 나타냈고 17개의 BrPIP 유전자들은 salt 스트레스에서 반응하였다. 또한 18개의 BrPIP 유전자들은 ABA 처리에 의해 up-regulated 되었고 모든 BrPIP 유전자들은 water logging 스트레스에서 down-regulated 됨을 나타냈다. 4개의 BrPIP 유전자들은 *F. oxysporum* f. sp. *Conglutinans* 감염에 반응하는 것으로 나타났다. 결과적으로, 본 연구에서는 각 PIP 유전자의 스트레스관련 생물학적 기능들을 평가하기 위한 자료를 제공하고, 배추에서 AQP의 종합적인 분석을 나타내었다.

나. 연구 결과

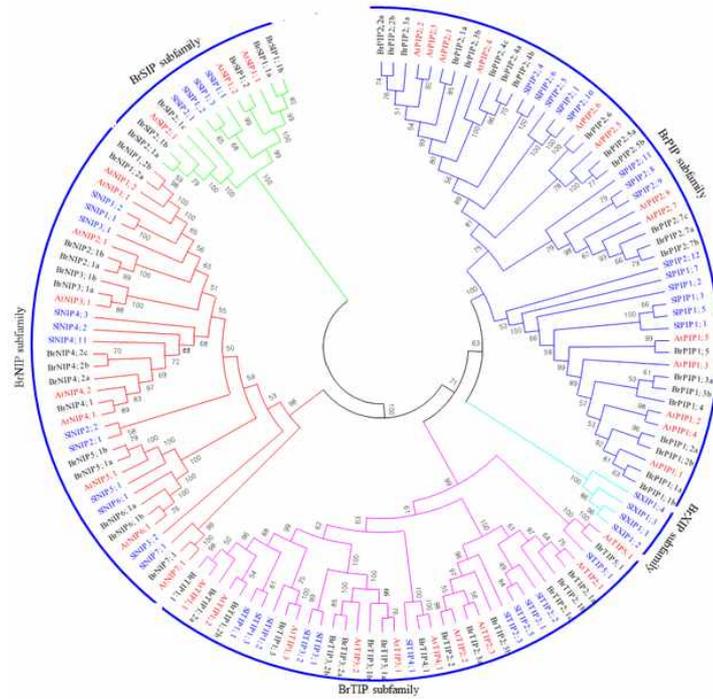


그림 102. 배추, 애기장대 및 토마토에서 Aquaporins protein의 Phylogenetic 분석

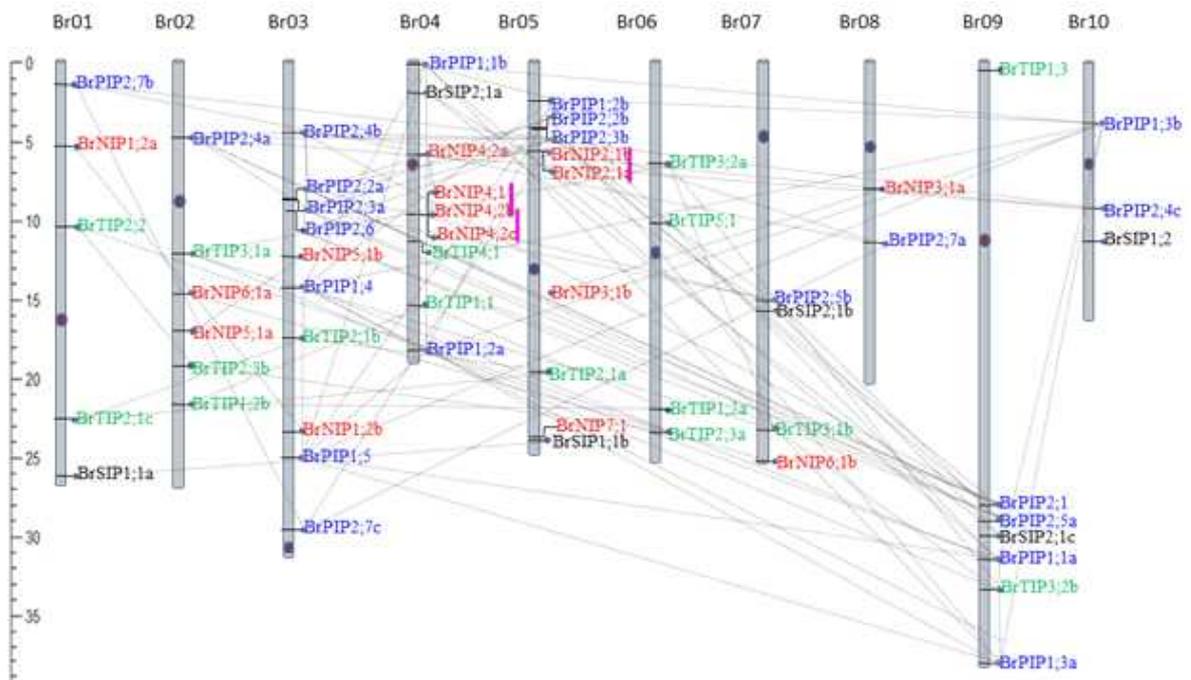


그림 103. 배추의 10개의 염색체상에서 Aquaporin 유전자들의 위치
PIP (Blue), NIP (Red), TIP (Green), SIP (Black)

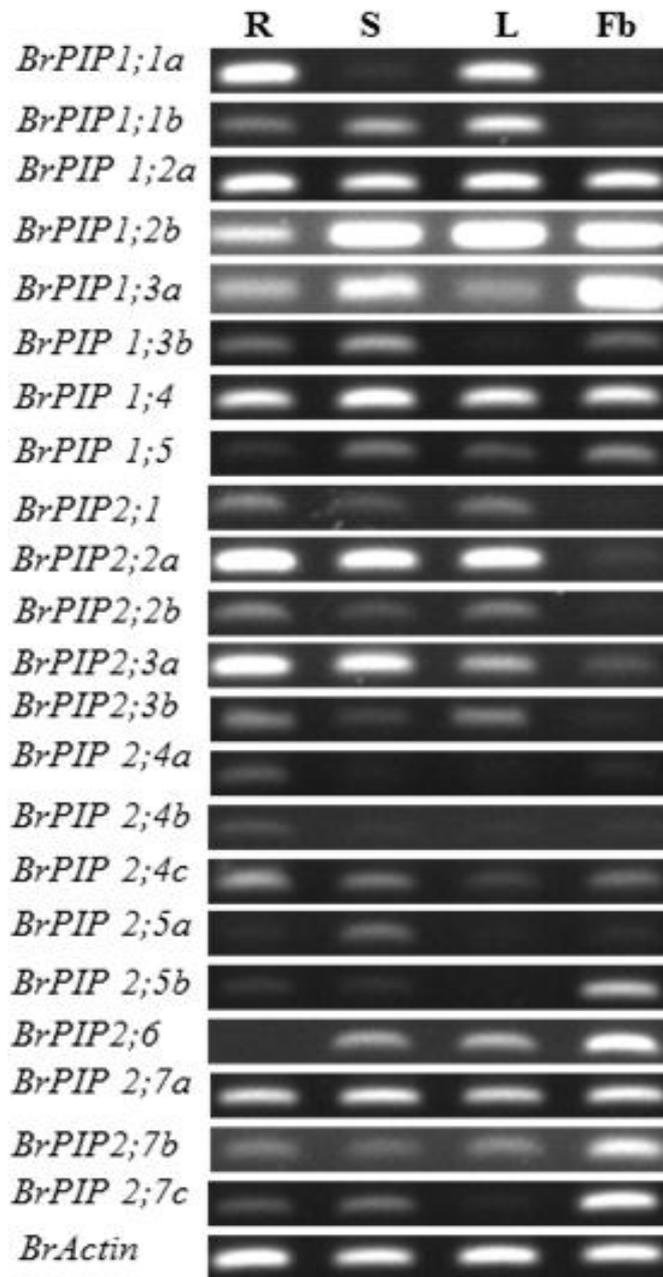


그림 104. 배추의 뿌리(R), 줄기(S), 잎(L), 꽃(Fb)에서 BrPIP 유전자들의 RT-PCR 분석을 통한 발현양상

29. 배추에서 생물학적, 비생물학적 스트레스에 대한 PDI gene family에 대한 동정 및 발현 분석

가. 연구요약

Protein disulfide isomerase (PDI)와 PDI-like proteins은 비생물학적 스트레스의 반응과 그물모양의 소포체에서 protein folding 동안 isomerization의 기능과 thioredoxin domains, catalyze protein disulfide bonding, misfolded proteins 집단의 억제 기능을 포함한다. 배추는 경제적으로 중요하고 영양학적 채소로 알려져 있지만 그것의 수확량은 다양한 생물학적, 비생물학적 스트레스에 의해 경제적인 손실을 발생시킨다.. 그러므로 이러한 작물들에서 생물학적 비생물학적 스트레스에 대해 내성을 나타내는 유전자들을 동정하는 것이 필요하다.

본 연구에서는 Br135K와 BRAD database로부터 20개의 PDI 유전자들을 동정하였다. 이러한 유전자들은 8 그룹으로 cluster를 이루고 있다. 20개의 PDI 유전자들 사이에 15 PDI 유전자들은 다양한 기관에서 편재하여 발현되어진다. 게다가 13 BrPDI 유전자들은 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* 감염으로 인해 up-regulation 되어졌다. 흥미롭게도, 5 BrPDI 유전자들은 생물학적, 비생물학적 스트레스에 양성 반응을 나타내었다. 본 연구에서 동정된 스트레스 반응 PDI 유전자들은 생물학적, 비생물학적 스트레스에 Brassica 작물에 저항성을 위한 분자 육종에 가능한 resource로 이용할 수 있다.. 본 연구의 결과들은 배추 작물의 분자 육종과 기능 유전체 연구를 위한 기초가 되며, 스트레스 반응에서 PDI 유전자들의 평가를 돕게 될 것이다.

나. 연구결과

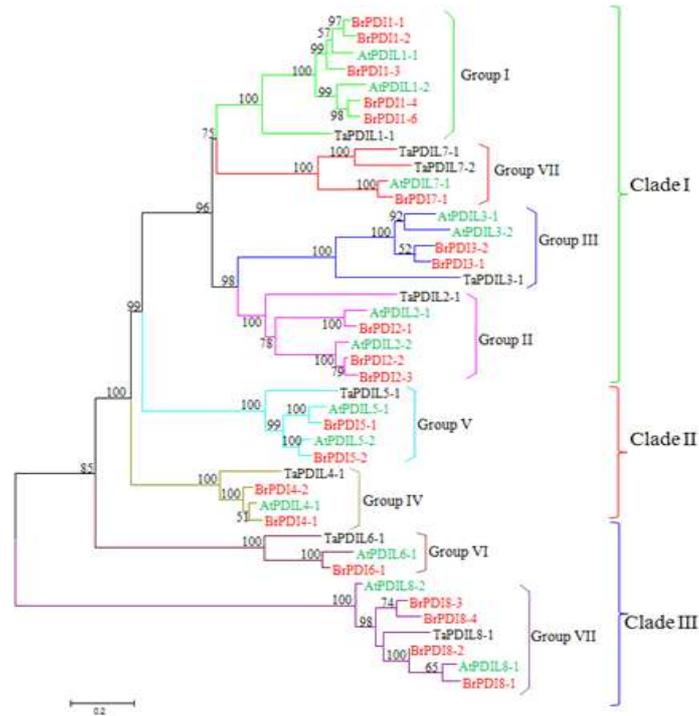


그림 105. 배추, 애기장대, 및 밀에서 동정된 PDI protein의 phylogenetic 분석

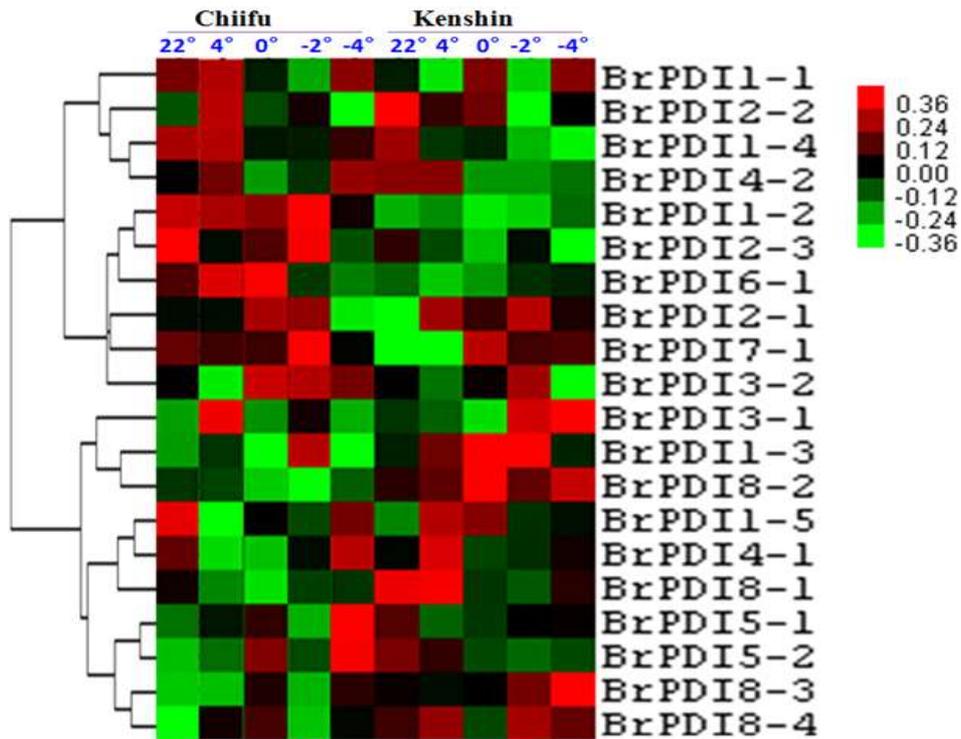
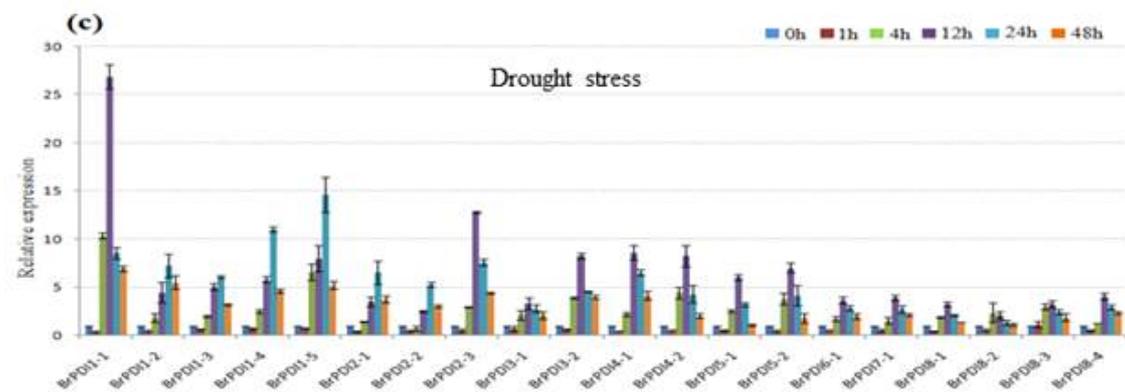
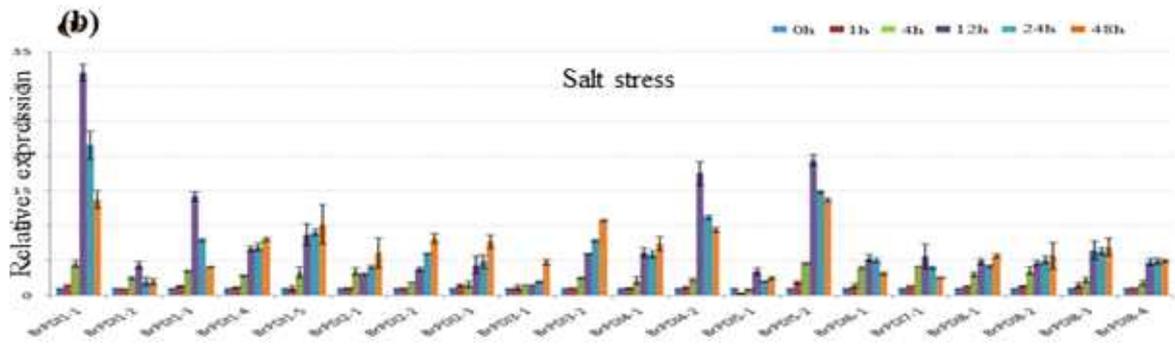
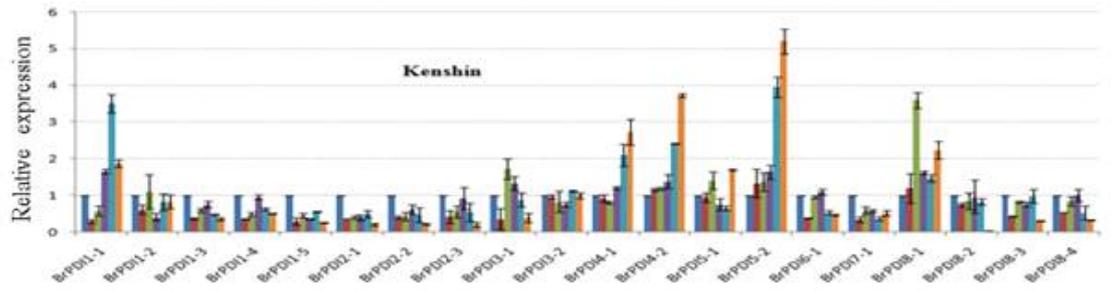
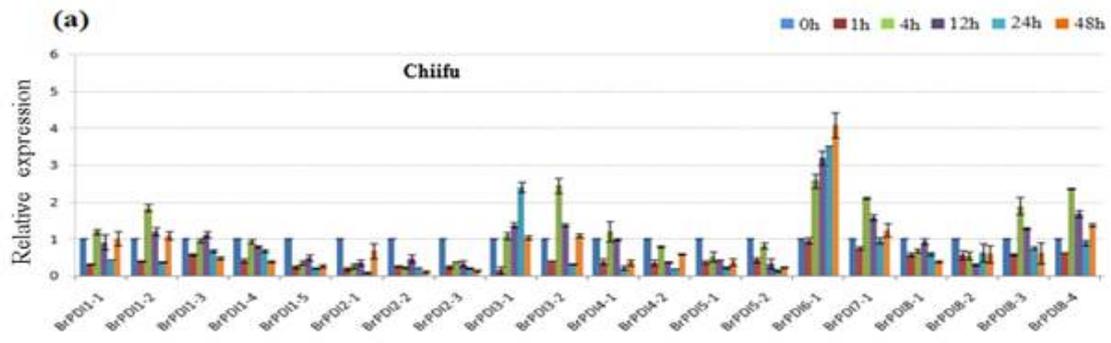


그림 106. 두 inbred lines chiifu와 Kenshin에서 내한성 과 내동성에 대한 배추의 20 PDI 유전자의 발현을 나타낸 microarray heat map 결과



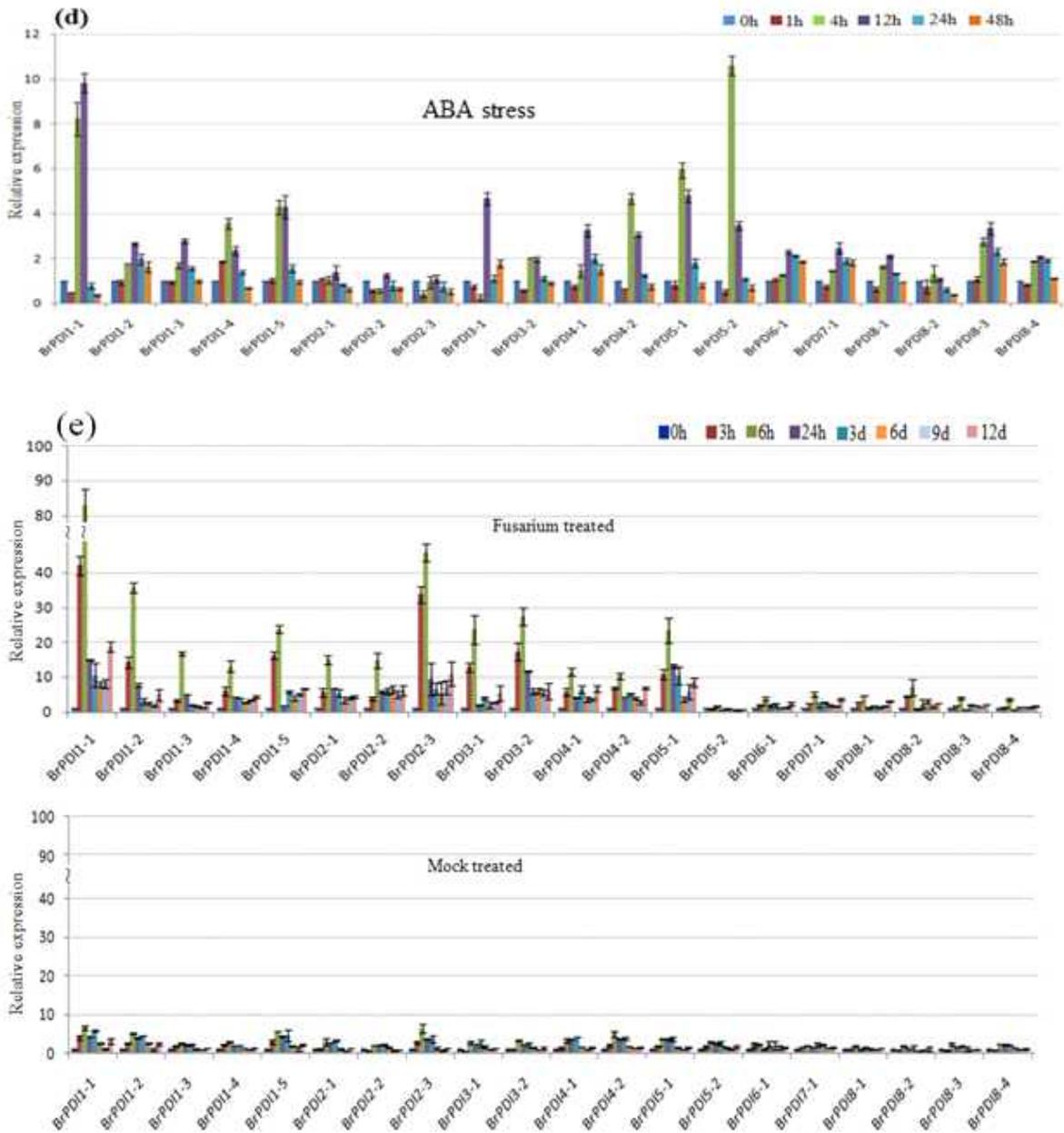


그림 107. *BrPDI* 유전자의 Real-time PCR 결과

(a) cold, (b) salinity, (c) drought (d) ABA and (e) *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*를 처리한 결과

30. 배추의 내한성 및 내동성 관련 유전자의 발현 및 특징의 profiling

가. 연구요약

배추 (*Brassica rapa*)는 전 세계적으로 매우 중요한 채소이다. 저온 및 냉동스트레스는 십자화과의 생산성을 제한하는 주요 환경요인이다. 본 연구에서 903개의 저온 스트레스 unigene들을 탐색하였으며, 특이한 전사체들은 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 의 gene ontology(GO)를 이용하여 기능적으로 분류 하였다. KEGG gene ontology와 structure domain data는 생물학적 데이터베이스로부터 unigene data set 를 얻을 수 있고 이는 *B. rapa*의 기능적 특성에 대한 폭넓은 견해를 제공한다. 먼저 발현 연구를 위해 겨울배추품종 "Nunnara"(chiifu)와 여름재배품종 "Asia alphain"(kenshin) 종자를 아시아 종묘로부터 수집하여 Avian Myeloblastosis Virus (AMV) one-step RT-PCR kit와 스트레스 반응 유전자 특이적인 primer를 이용하여 RT-PCR을 수행한 후 분석하였다.

먼저 투고된 database를 검색하여, 535개의 contigs와 368개의 singletons 포함해서 903개의 저온 스트레스 특이적 염기서열들을 선별하였으며 염기서열의 평균길이는 863bp였다. 그리고 32개의 unigenes은 Poly A/T의 염기말단을 갖고 있었다. 이것들은 *B. rapa* 고유의 염기서열이고 29종의 16,055개의 염기서열 중 15,026개의 염기서열과 93.5%의 상동성을 나타냈으며 나머지 1,029개는 다른 종(species)의 염기서열이었다. Venn diagram의 unigene 염기서열은 3개의 GO vocabularies 즉, 분자적 기능(MF), 생물학적 프로세스(BP), 세포 구성 요소(CC)로 구분되며 3개의 모든 vocabularies에서 염기서열의 553개가 상동성이 높았다. 그리고 생물학적 프로세스(BP)의 GO는 139개, 113개, 57개의 염기서열이 각각 스트레스 반응(SR), 비생물적 자극(AS), 생물적 자극(BS)에 유사성을 나타냈다. 또한 다른 종의 저온 스트레스 연구(BRAD:Barassica database)에서 알려진 113 AS unigenes으로부터 임의적으로 7개의 unigenes 염기서열을 선별하여 저온 및 동결 스트레스에 대한 유전자 발현양상을 real-time PCR을 한 후 분석하였다. BrCRG1, 3, 4, 5, 6 and 7 의 유전자는 식물체의 모든 기관에서 발현하였으나, BrCRG2 는 단지 뿌리와 꽃눈에서만 발현하였다. 이것을 통하여 BrCRG 유전자가 저온 및 동결 스트레스 조건하에서 특이적인 기관에 반응하는 기능 유전자라는 것을 알 수 있었다. 또한 BrCRG1, 2, 3, 5유전자는 동결내성에 관여하며, BrCRG4, 6 유전자는 저온내성에 관여하였다. 이러한 unigene 데이터 정보는 *B. rapa* 품종의 저온과 동결 저항성관련 유전자를 동정하고, *Brassica sp.*의 유전적 조작을 하는데 유용한 자원으로 이용 될 것이다.

나. 연구결과

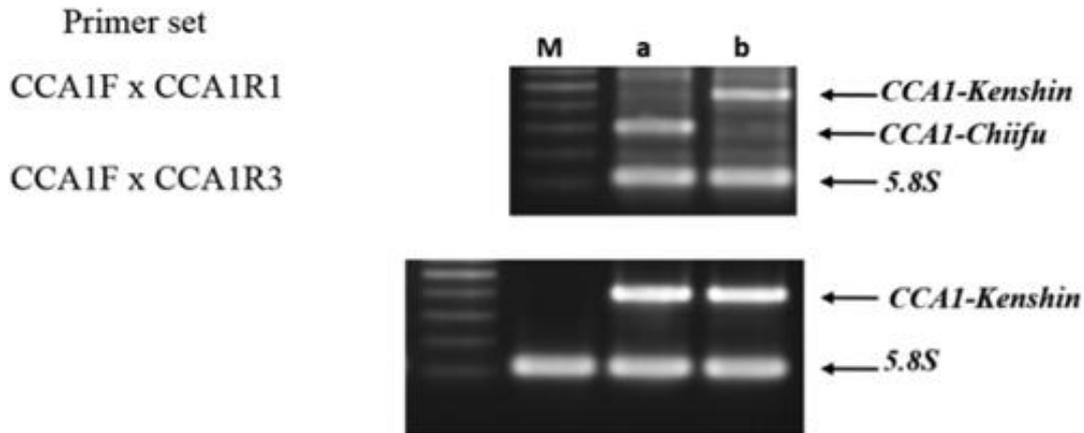


그림 108. *B. rapa* 품종((a) “D71Nunnara”; (b) “D73Asia alphain”)과 유전자 특이적 프라이머(CCA1F × CCA1R1; CCA1F × CCA1R3)를 이용한 Genomic PCR 반응

표 19. 903 unigene 선발을 위한 BLAST 검색에서 찾은 종과 저은 관련 유전자

Species	BLAST hits	Species	BLAST hits
<i>Arabidopsis thaliana</i>	3425	<i>Picea sitchensis</i>	101
<i>Glycine max</i>	1900	<i>Brassica rapa</i>	98
<i>Vitis vinifera</i>	1763	Unknown	65
<i>Arabidopsis lyrata</i>	1578	<i>Brassica napus</i>	64
<i>Populus trichocarpa</i>	1350	<i>Solanum lycopersicum</i>	61
<i>Oryza sativa</i>	1015	<i>Nicotiana tabacum</i>	61
<i>Ricinus communis</i>	780	<i>Gossypium hirsutum</i>	51
<i>Medicago truncatula</i>	684	<i>Solanum tuberosum</i>	47
<i>Brachypodium distachyon</i>	371	<i>Pisum sativum</i>	37
<i>Zea mays</i>	339	<i>Brassica oleracea</i>	33
<i>Sorghum bicolor</i>	337	<i>Silene latifolia</i>	31
<i>Hordeum vulgare</i>	271	<i>Arabidopsis halleri</i>	31
<i>Selaginella moellendorffii</i>	199	<i>Cucumis melo</i>	30
<i>Physcomitrella patens</i>	164	<i>Malus ×</i>	29
<i>Thellungiella halophila</i>	111	Others	1029

31. Genome-wide *Brassica rapa*의 식물 생장과 스트레스 저항성과 관련된 MADS-box 집단 유전자의 탐색 및 특징

가. 연구 요약

MADS-box 전사인자(TFs)는 식물 생육에 관여하는 중요한 요소이다. 현재 스트레스 저항성에 관련된 MADS-box 유전자들에 대한 연구는 매우 미비한 상태이고 *Brassica rapa*의 MADS-box에 대한 기능적인 연구는 보고되지 않았다. 따라서 본 연구는 MADS-box 유전자 집단을 획득하고 기관의 생육과 스트레스 저항성에 대한 역할을 밝혀내기 위하여 genome-wide 분석 및 *B. rapa*의 MADS-box 유전자발현과 특성에 대한 연구를 수행하였다. *B. rapa*의 whole-genome은 단백질 구조 및 엑손-인트론, 계통발생을 기초로 type I(M α , M β and M γ)과 type II(MIKCc and MIKC*)로 분류된 167개의 MADS-box 유전자로 밝혀졌다.

본 연구에서는 89MIKC와 11MIKC 유전자의 발현분석이 수행한 결과 꽃과 잎의 조직에 대한 발현 외에도 다른 단계에서 MADS-box 유전자의 발현이 확인되었다. 낮은 온도로 처리한 whole-genome의 마이크로어레이 데이터 세트로부터 19 BrMADS 유전자가 *B. rapa*의 두 개의 대조적인 자식계통에서 'variable transcript abundance' 발견되었다. 이것들 중에 13BrMADS 유전자가 더 유효나타났으며 다른 발현에 대해 qPCR 발현분석을 통하여 같은 두 개의 계통에서 추위에 대한 스트레스 반응에 대해 모니터링을 하였다. 게다가 19 BrMADS 유전자에 대해 내건성 및 내염성에 대하여 분석한 결과 8번과 6번의 유전자가 각각 건조와 염분에 의해 유도되는 것으로 밝혀졌다.

나. 연구 결과

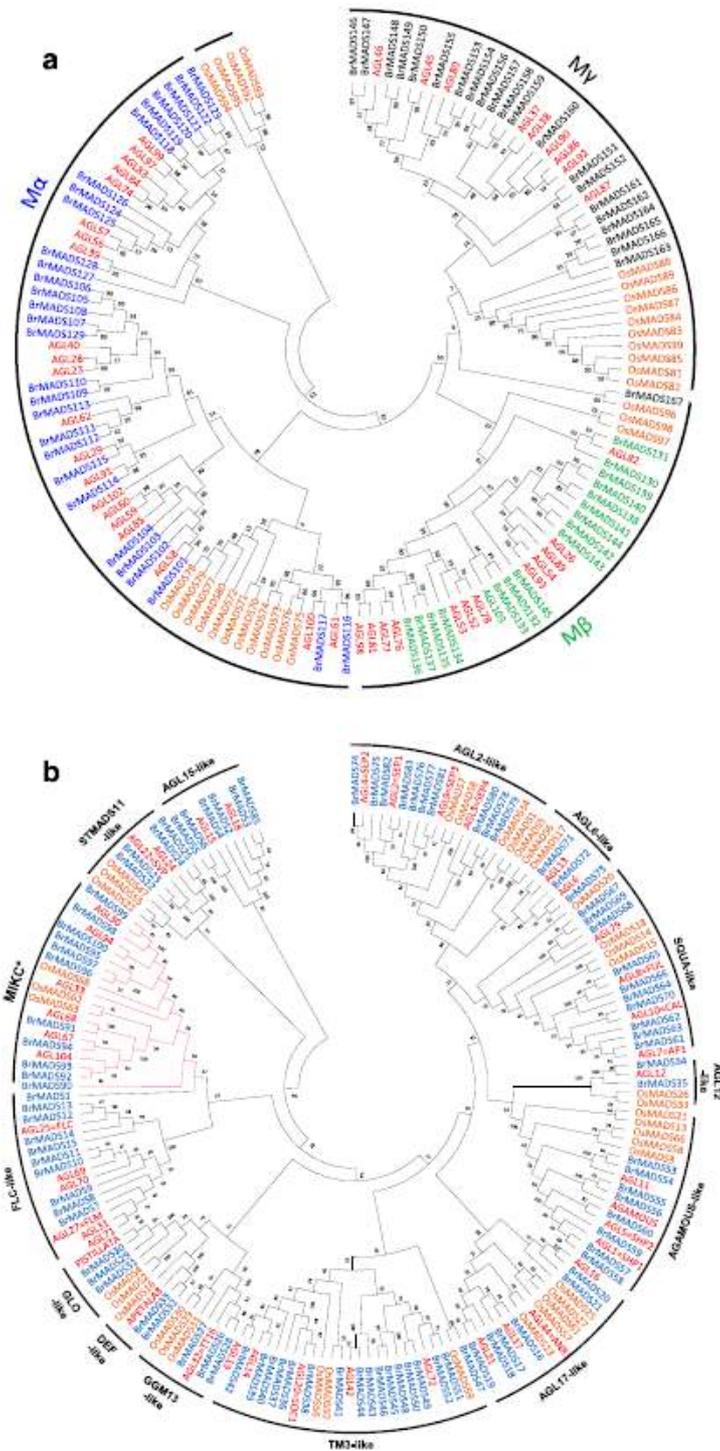


그림 109. MADS-box유전자를 이용한 *B. rapa*, *Arabidopsis*와 *Rice*의 neighbor-joining 계통도
 (a) *B.rapa* (67), *Arabidopsis* (43), *Rice* (28)의 type I 138 MADS-box 단백질에 대한 분석, (b)*B. rapa* (100), *Arabidopsis* (43), *rice* (38)의 type II 181 MADS-box 단백질에 대한 분석.

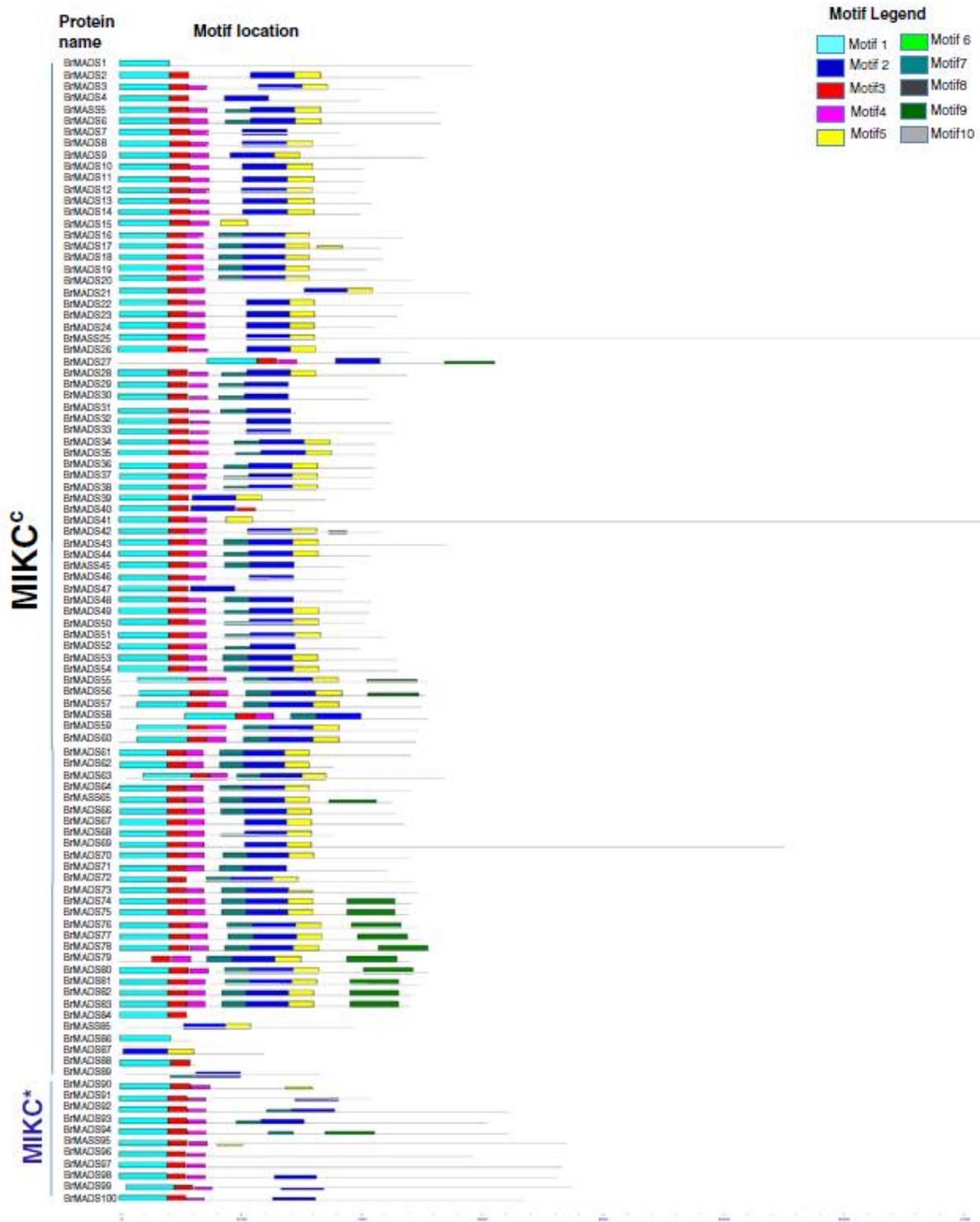


그림 110. MEME motif 탐색 도구를 이용한 MIKc와 MIKc* group에 대한 *B. rapa* type II MADS-box 단백질의 motif의 모식도

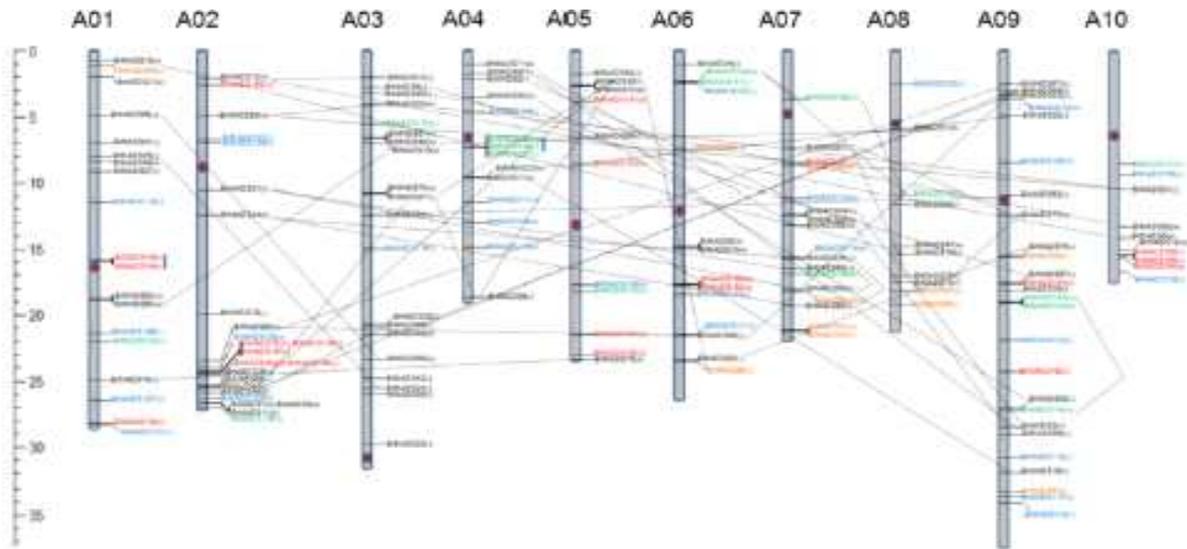


그림 111. 10개의 염색체상에서 *B. rapa* MADS-box genes의 위치

반복적인 크로모솜 숫자는 A01~A10으로 표기하였다. 다른 색의 유전자이름은 다른 그룹 (black: MIKCC, orange: MIKC*, blue: Ma, green: M β and red: M γ)으로 제시하였다. 각 유전자에 따른 positive(+)와 negative(-)표시는 반복 유전자의 forward와 reverse 방위로 제시하였다. 계놈의 중복된단편에 대한 유전자는 흑색 점 선으로 연결되었다. 나란히 중복된 유전자는 파랑색 수직선으로 나타내었다. 유전자 위치와 각 염색체 크기는 그림의 왼쪽의 눈금을 이용하여 예측할 수 있다.

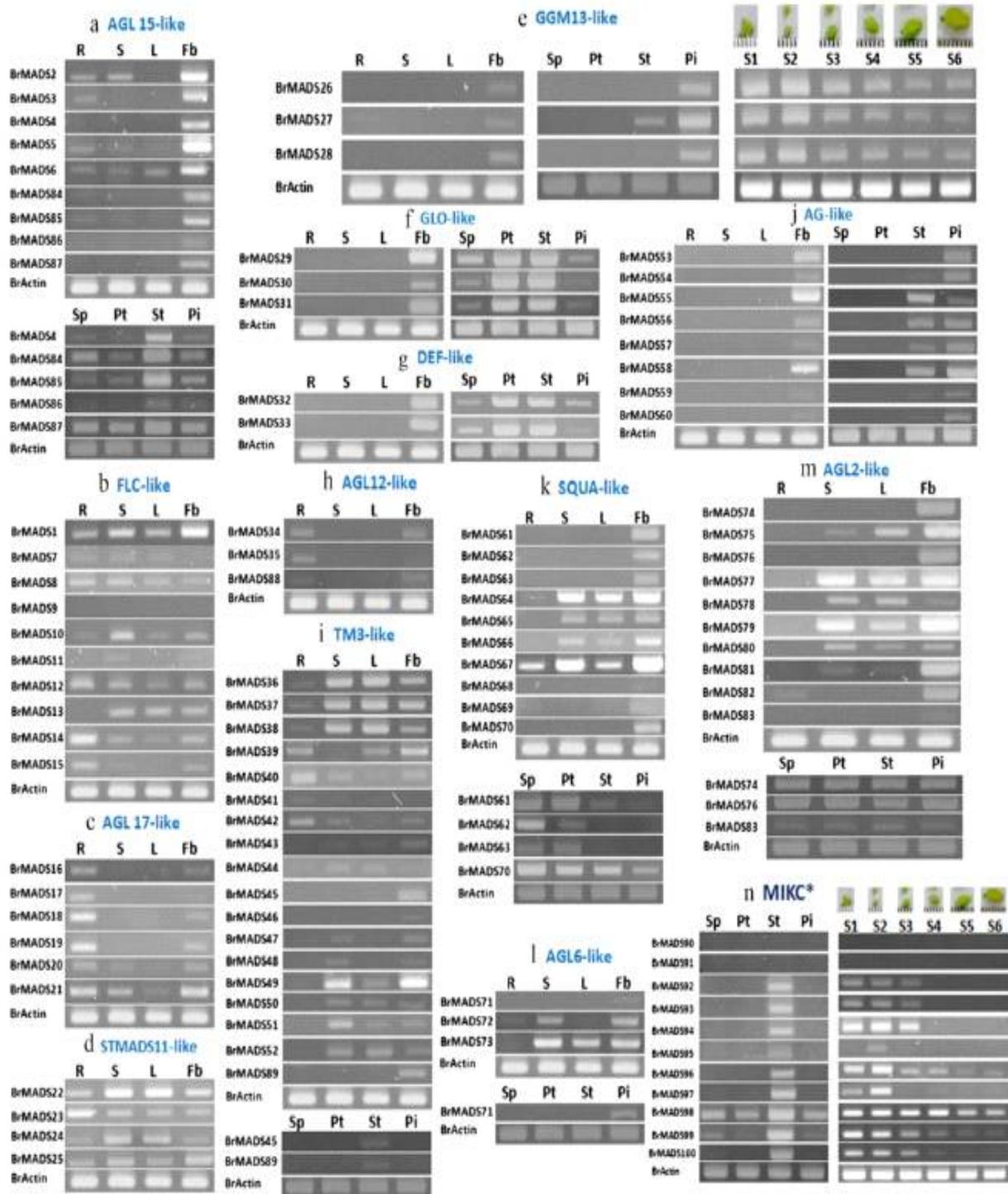


그림 112. 각 계통(a-n)에 따른 100 MIKC BrMADS의 기관 특이적인 발현 분석 뿌리(R), 줄기(S), 잎(L), 꽃눈(Fb), 꽃받침(sp), 꽃잎(pt), 수술(st), 암술(pi)과 *B. rapa*의 꽃 생장의 6 단계(유아~성숙은 S1~S6으로 표기)

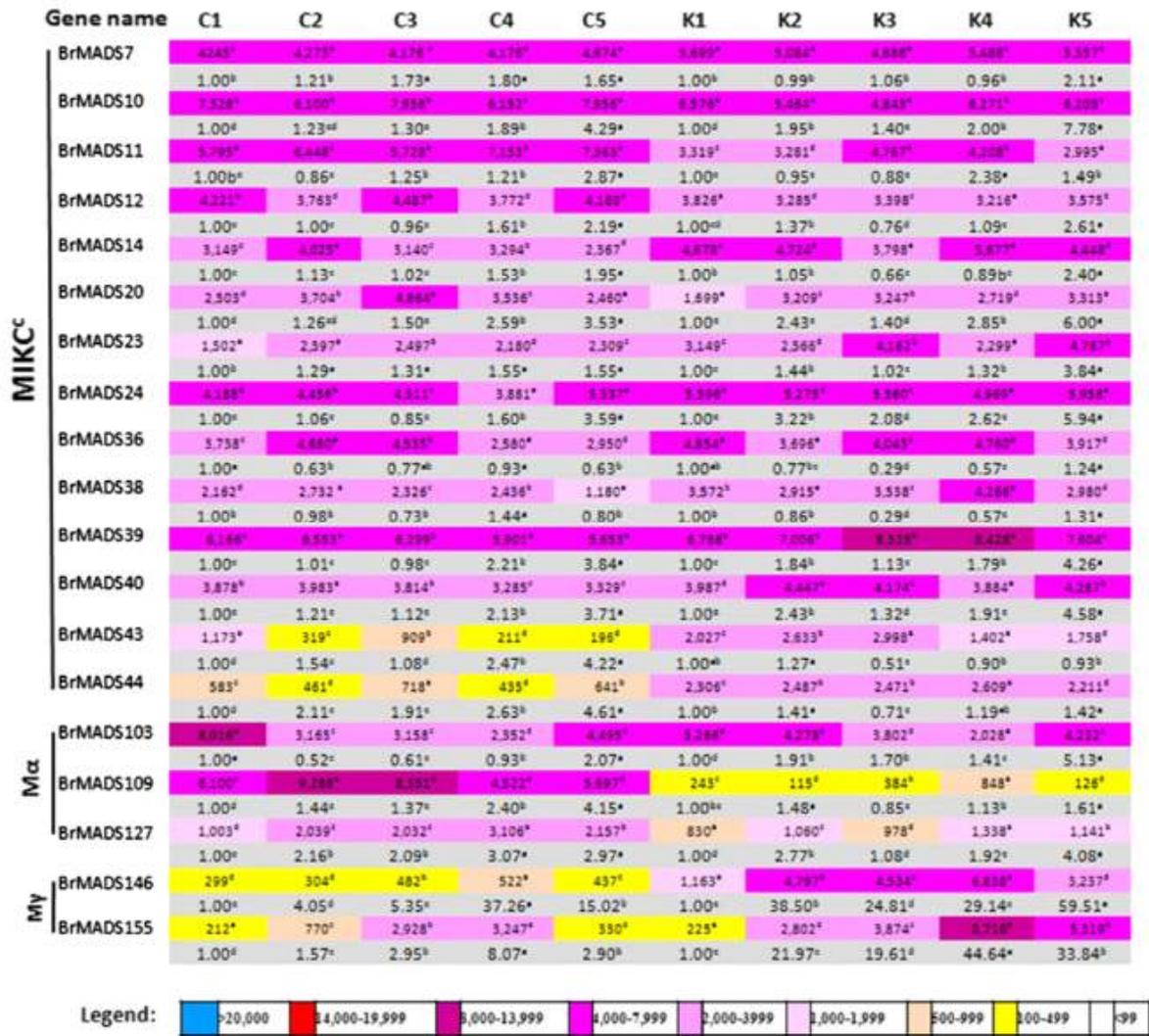


그림 113. *B. rapa*에 대한 각 19 MADS-box genes의 마이크로어레이 및 qPCR 발현 분석
MADS-box 그룹으로부터 다른 온도에 반응한 유전자는 왼쪽에 표기하였다. 마이크로어레이에
서 차이가 나는 발현을 제시한 color bar. 같은 글자로 표기된 값은 던컨의 다중 검정에 의하면
 $P < 0.05$ 로 다르지 않았다.

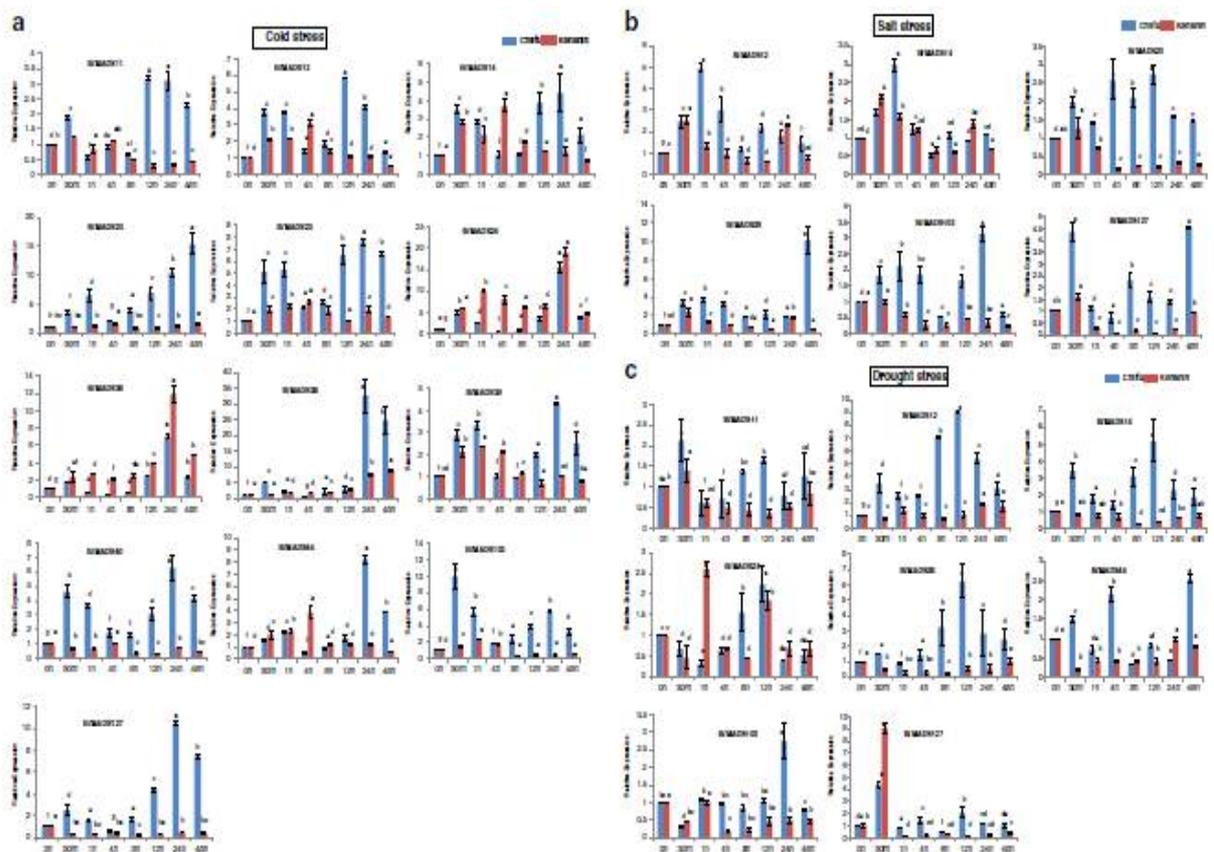


그림 114. *B. rapa* (a-c)에 추위, 염분 및 건조에 대한 스트레스 처리(0-48h) 후 MADS-box 유전자의 Real-time PCR 발현 분석

32. 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 생물학적, 비생물학적 스트레스에 대한 MYB transcription factor에 대한 동정 및 발현 분석

가. 연구 요약

MYB 단백질은 식물의 발육, 신진대사, 방어에 대한 반응 등 다양한 생물학적 과정을 조절 역할 하는 식물의 전사인자이다. 본 연구는 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 스트레스 저항성의 역할을 규명하기 위해 MYB 유전자의 포괄적인 계놈 동정, 특성 및 발현 분석을 수행하였다.

R2R3-MYB(256 유전자)와 MYB 관련 유전자(202) 등 배추 총 475개의 MYB 유전자를 확인했다. 배추 MYB 유전자는 염기서열의 특성, 계통 분류 및 단백질 모티프 구조 분석에 통하여 다른 작물의 MYB 유전자의 카테고리 (1R, 2R, 3R, 4R 및 5R)를 비교분석하였다. silico 기능분석을 통하여 다른 작물 종(species)과 다른 배추의 R2R3-MYB와 MYB 관련된 subfamilie을 포함한 11개의 MYB 유전자를 확인하였다. 본 연구팀은 77개의 MYB 유전자를 포함한 MYB 관련된 subfamily와 MYB-like 그룹 유전자를 보고했다. 저온 처리한 전체 계놈 마이크로 어레이 데이터를 이용한 발현 해석은 내한성이 다른 Chiifu와 Kenshin 두 배추의 계통 근친 사이에 11의 cluster 에 1R / 2R / 3R / 4R / 5R-MYB 유전자의 가변 전사 산물을 밝혔다. 상기의 검증 테스트에서는 27 Br MYB 유전자의 초기 반응 발현 패턴을 qRT-PCR을 사용하여 조사한 결과 MYB 관련 유전자는 R2R3-MYB 유전자보다 더 높은 발현양상을 보였다. 또한, R2R3-MYB에서 유도되는 염분, 건조 등의 발현 패턴과 일치하는 10개의 유전자를 확인했다. 11개의 R2R3-MYBs는 생물학적 스트레스에 대한 내성이 있는 10개의 *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* 및 1개의 변종 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *caratovororum*의 기능을 확인했다. 또한, 수술조직에서 발현된 9개의 R2R3-MYBs을 확인 하였고, 이 결과는 배추의 응성 불임 연구에 중요한 Key를 제공 할 수 있다. 본 연구는 성장 조절 기능 외에도 스트레스 내성 MYB 유전자의 개입을 이해하는데 유용할 것이다.

나. 연구 결과

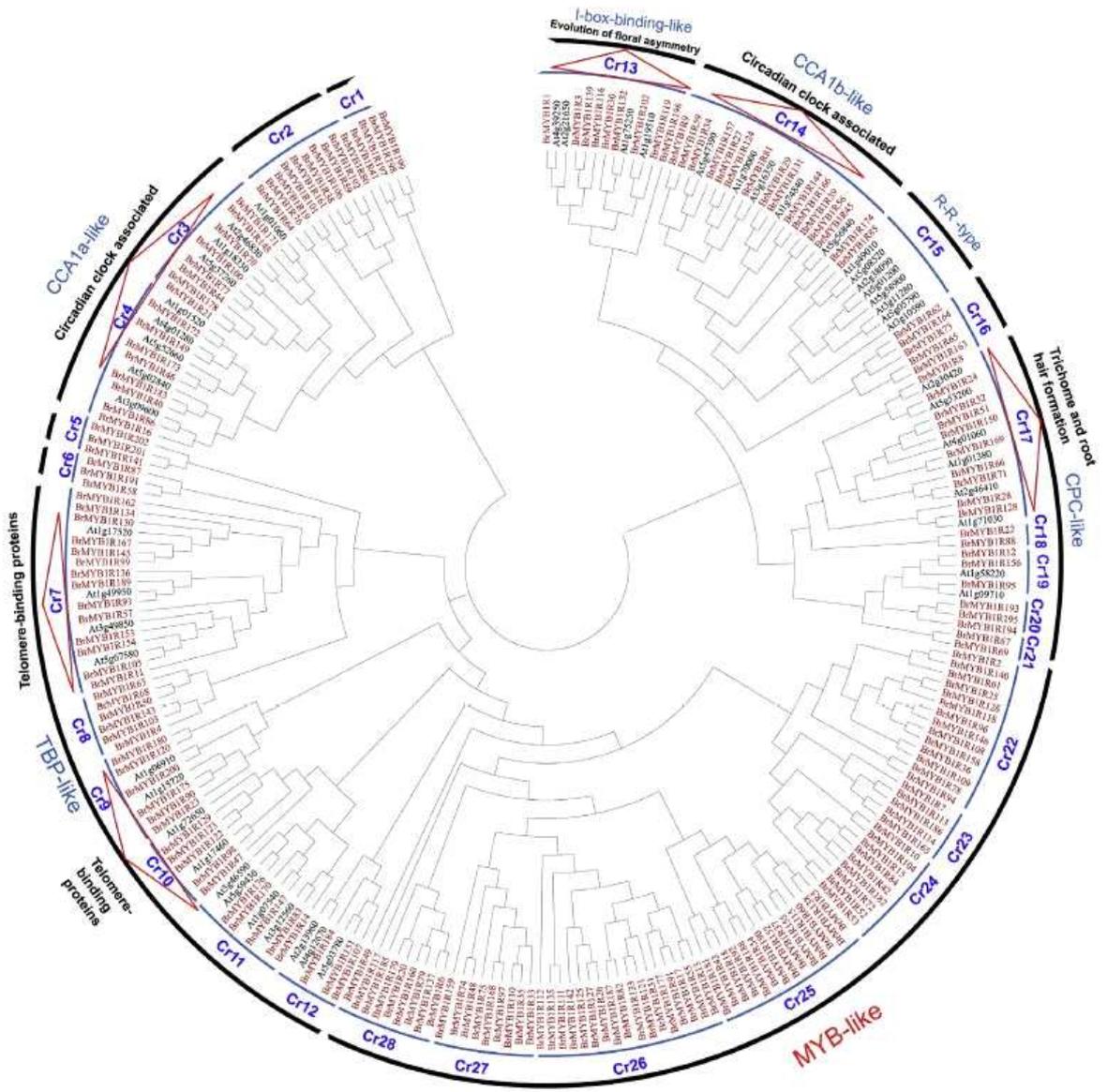


그림 115. 202 배추 MYB 연관성 단백질과 애기장대 44 MYB 관련 단백질의 아미노산 서열을 이용한 계통도

배추MYB 관련 단백질은 빨간색으로 표시하였다. 단백질은 28 하위 그룹으로 클러스터 된 각 그룹은 숫자(Cr28에 예를 들어, CR1)를 부여하였다. 두꺼운 검은색 원은 배추MYB 관련 단백질의 분포를 Zhang et al. (2012)의 기준으로 분류하여 나타냈다.

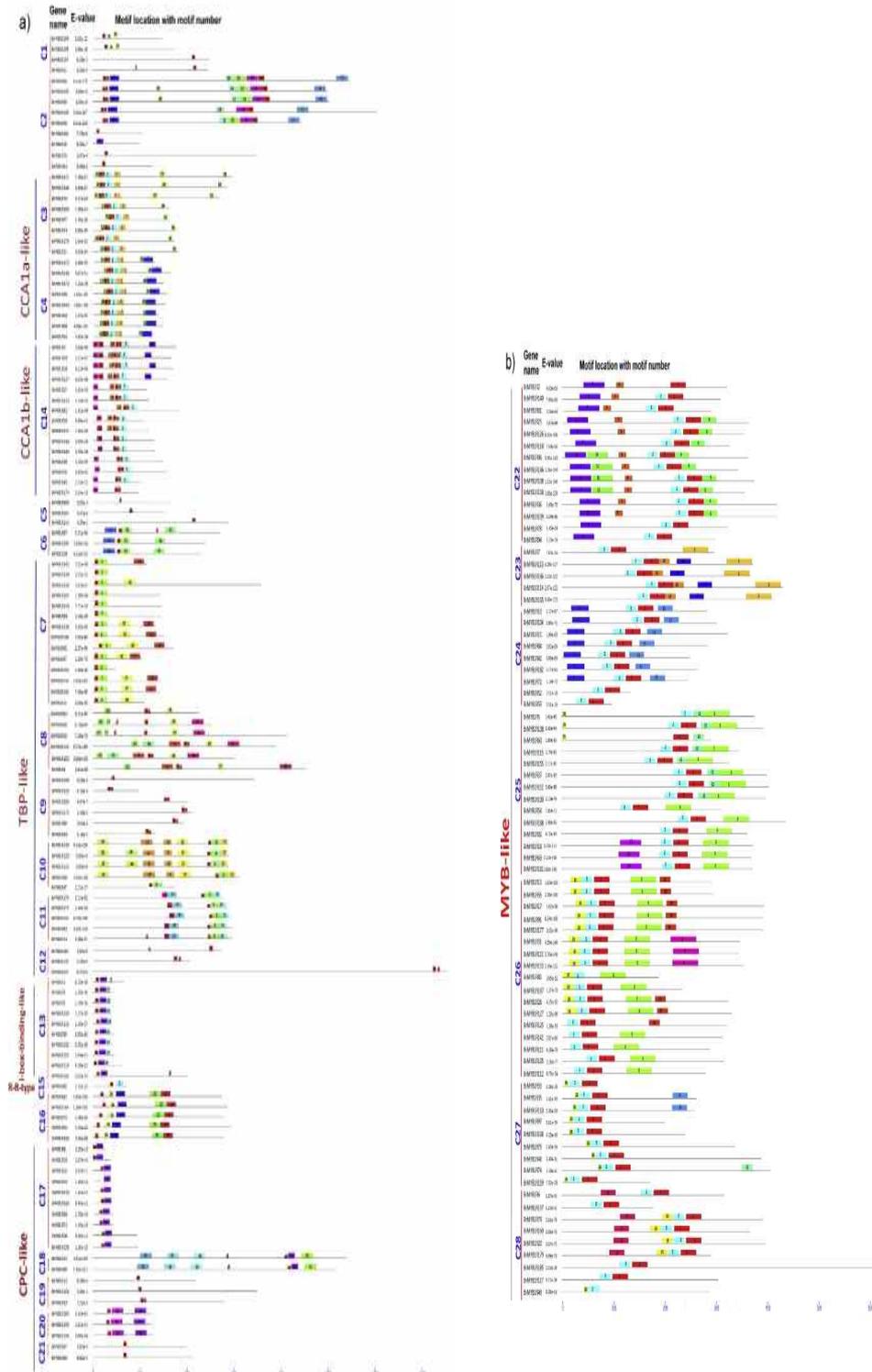


그림 116. MEME 모티브 검색 도구를 사용하여 202 배추MYB 관련 단백질 중 식별된 motif 도식

(a) 125 배추 MYB 관련 단백질 중 50 모티브 분포를 나타냈다. (CCA1-like, TBP-like, I-box-binding-like, R-R-type and CPC-like와 서브 그룹 Cr1부터 Cr21을 포함). (b) 77 MYB와 같은 단백질 중 20 모티브 분포를 나타냈다.(서브 그룹 Cr22부터Cr28). 모티브는 다양한 색상과 번호로 표시하였다.

표 20. *B. rapa*에서 125 MYB 관련 단백질 중 염기서열과 길이가 가장 일치하는 단백질

Motif no.	Motif width	Best possible match
1	14	WTEEEHDMFLEGVQ
2	30	VGTKTPTQJRSHAQKYFLRVQNNRRKHRP
3	41	KHGPWKWRITLKDPEFSSVLYNRSNVDLKDWRNISVMADW
4	29	TGDRWHNIAGRVPGRTAEEIERHWEMLVE
5	28	PPRPKRKPMHPYPQKAGKNAQMQLVHSM
6	41	YGTGRWRDIKLAFENHDHRTYVDLKDWRNLVHTAFIQPQ
7	42	DPYTSGHMQKLEKEMDPINFETVLLMRNLTVNLSNPDFEDHR
8	21	MTRRCSHCNGHNSRTPCTR
9	11	LYGRDWKKIAR
10	50	DRMILEAITNMKEPGSDRTSIFLYEENYHMPNPMKRLVSSRLKHLTAC
11	15	YKVRKPYTITKQREK
12	37	HPLARRRCIFWYSAIDYPWFAKMEFVDYLNHVGLG
13	50	TWLMIQMCTERQYPPADVAQVMDTAVTSLQPRCPQNPPIYREIQMCMGW
14	41	RSVDMVEALFNMNKAYLSLEGTASVAGLIAMMTDHYSVME
15	48	GLPTDLARPLAVGNRVAIHPKTRIEHDGKILTVDHNCNVLFDDLGV
16	22	IMLFGVRVVFPIRKCASMGNL
17	44	HEAAAAAQAVAEAEFAMAEAEAAKEAERAEAEAEAAQYAKA
18	50	ICLNNLPKALQETFKATFGRETTVKDKTWLKRRTMGLTNSCNVPTNL
19	50	VSLGKRVTVTRVSLGGSEIEVPYVSHVRRSRPRENIMALMECHSNCLEA
20	50	AQTRITPFSSTNQKPNPVTYKLVRVAGDGRVLPATDEEIFEVNETDMHNA
21	50	PRLTRLEWSVIKSSLGRPRRFSEFLQEEREKLLQYRESVRKHYTELRTG
22	48	MIRSHPRGVSFERRLSQETKDYKRIIRQHLDIETIRKLEEGYDSS
23	15	MPDFAQVYVNFISVF
24	29	QRRGEPVPELLDRVLMAGYWSQQQKGH
25	41	RTVMEAVSTILSGGIRIGVLVHGKVRDNDKTLHQTGISLD
26	50	YNCDYCKDITGKIRIKCAVCPDFDLCEVMYVGAETPHKCDHAYRVMG
27	38	PWLEQLRSLRVAELRREVQRDYDQSLSLQKVKKLEEE
28	28	PGSFPVLYPAYSPYYPFPVWPAGYV
29	50	QNAQMFPNQVSTNFSAFQIHENVNLCARDNLSILNDLNDMPPEVMKQMP
30	50	PTVRYAKIAMKMKDKTVRDVALRCRWMTKENGKRRKEDHSSRSKDKK
31	50	AAAAHAKIFADHEEREIQLSANIIDHQLKMKELKLPFAEJETIMMKEC
32	41	LSFYRDLKLLFTNAIVFFPTSSSEYMAAQQLRTLVSQKQMKK
33	28	ELVMDIDCMLNPLEYMPDGLRRQIDKC
34	49	HLCDNHCNHCSPCTVYFQCQKKEDVLLCSDCFHHAKFVAGHSCIDFV
35	21	GDGYASEDFVHGSSNRERKR
36	36	NVNHHLWLTEDFSSEERAAKRVKIPTRRYIEELSEND
37	29	NIMGSLKKHGSMDIPMQILLQVRELAEKQ
38	16	TAHQCRHKYEDLKRRF
39	28	STNPMMAQVAFLACIVGPTVAAACAWWA
40	50	NSQCNETNMFNEDHVHHDSSLQQPIPFSDVQNGCNVDQSNVTVPCNSA
41	50	MKAIGKLDRYRNPWLEMKIYQGQNKGLYNEECDRFMICMIHKVGYGNW
42	41	IYGMGNWAEVAEHVGTKTQQCLDHYRNYLDSPPFPLPDM
43	29	HVIPMHSDFWAFWNDIHECERRVFPQFFCG
44	15	GFCPYKKCMMVIEAE
45	45	KLRVLRISKRLEDERKRRKEFILERNLLYPNPFKEKLSQEEKIQC
46	50	KYMDNPEKTLTISDCQLVDGVDDEFARVFRFLDHWGIINYCATSQCHP
47	15	DVNNIETGRYPLPNY
48	50	VGMSQMQKQYKALLQKDLVVNGGGGERKRLNIAMQLRKCCHPYLFGQ
49	50	RFSWRYIIIDEAHRINKENSLSKTMRIFNTNYRLLITGTPLQNNLHELW
50	50	YQJAGLNLRLYENGINGLADEMGLGKTLQTISLLAYLHEYRGINGPH

표 21 *B. rapa*에서 77 MYB 관련 단백질 중 염기 서열과 길이가 가장 일치하는 단백질

Motif no.	Motif width	Best possible match
1	30	ATPKTIMKLMVDVGLTIYHVKSHLQKYRLH
2	21	PRMCWTPELHRRFVDAVNQLG
3	50	MQJTEALRMQMEVQKRLHEQLEVQRHLQLRIEAQGKYLQMMIEKACKTFG
4	41	RCCEYIEALEEERRKIDVFKRELPLCMELVNQAIEYCKKEI
5	50	DIHPSNESIDAIGDVITKPWLPPLGLKPPAVDGVMTLHRQGISNVPP
6	27	RRPPQTIPNNGNSQQQHFVVGGIWWP
7	34	RWEEELPSPEELIPLSQSLITPDLAMAFDIRPPN
8	50	YGNTTEQVLDHNFHHQNIENHYTANNAADTNIYLGKKRPNPSTGNDVRK
9	15	MKSNWMKSVQLWNQP
10	21	YFNRGMCVPGDSGLVLTDPK
11	41	TATDNLYGQSECSEQTTGECGPVLDQFLPKDSSTSNEEEE
12	21	GWQEKKLTPIEHITSLDLKTG
13	29	NGDSASDRLFASSPVPAHFFHPDCFASSP
14	28	PPPPYAPAVPIIHGHRPLHWVGHPTW
15	41	CANDEAATNASSASYSICFDASQDPQEICRRTYSNSNVTQL
16	29	QGFDAHDIHTHRPIRGIPLYQNRIFHH
17	21	GMEFARTESELASKVNPEYP
18	21	RKHLAREAEAANWTRKRHIY
19	21	HHHGMRARFMPKFPKRSMR
20	8	VRPYVRSK

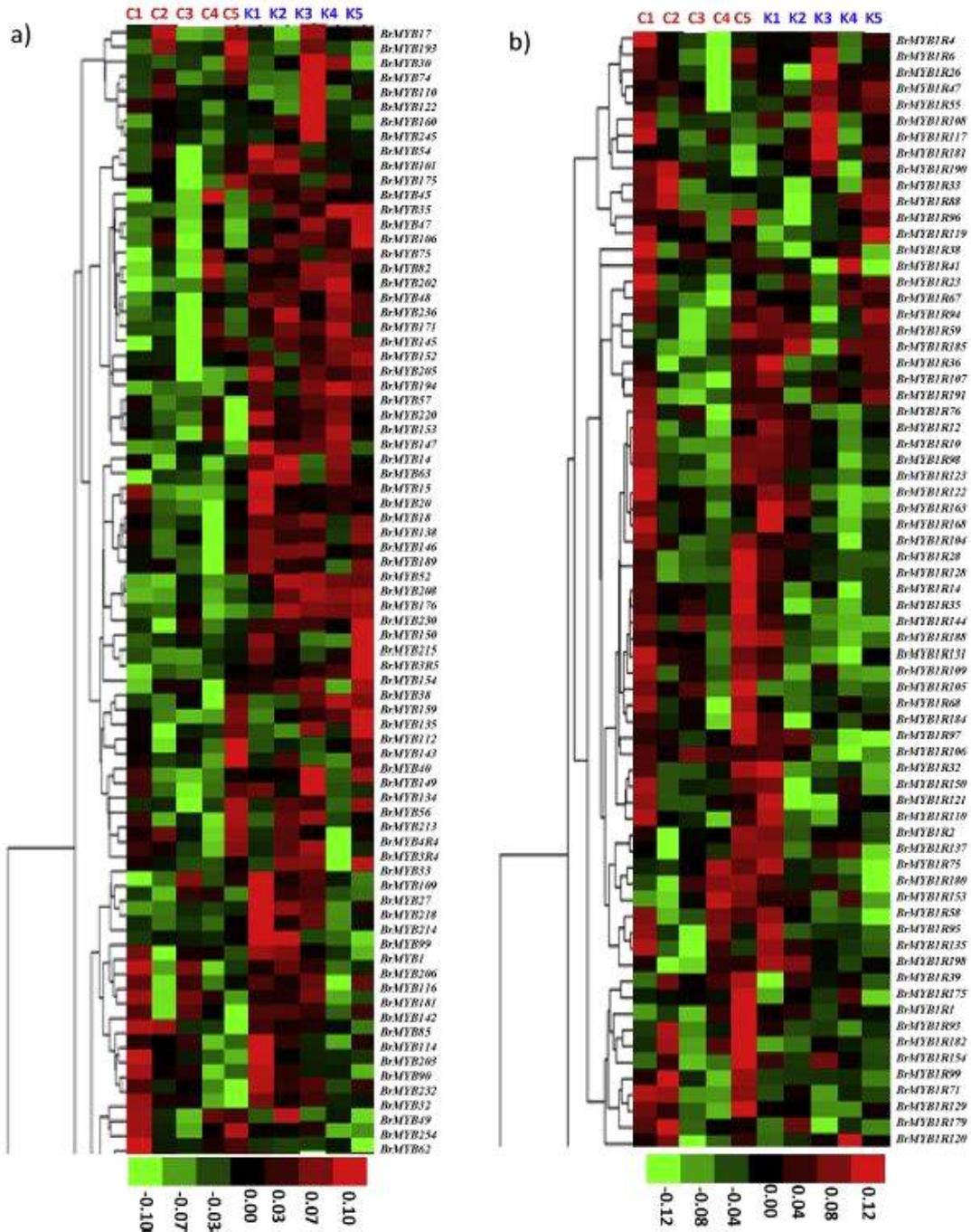


그림 117. 마이크로 어레이 발현의 열지도 및 배추에 대한 control (C1&K1), 4°C (C2&K2), 0°C (C3&K3), -2°C (C4&K4) 그리고 -4°C (C5&K5)에서 저온관련 MYB 유전자의 계층적 클러스터링

(a) 배추의 2R (R2R3), 3R (R1R2R3), 4R 과5R 발현양상. (b) 1R (MYB 관련) MYB 유전자 발현을 마이크로 어레이로 표현. 여기서 ‘C’와 ‘K’는 ‘Chiifu’ 와 ‘Kenshin’의 근연계통. 왼쪽에는 발현에 대한 유전자 이름으로 표시하고 오른쪽에는 발현 클러스터를 표시했다. 기본 값 색상은 마이크로 어레이의 차등발현을 나타냈다.

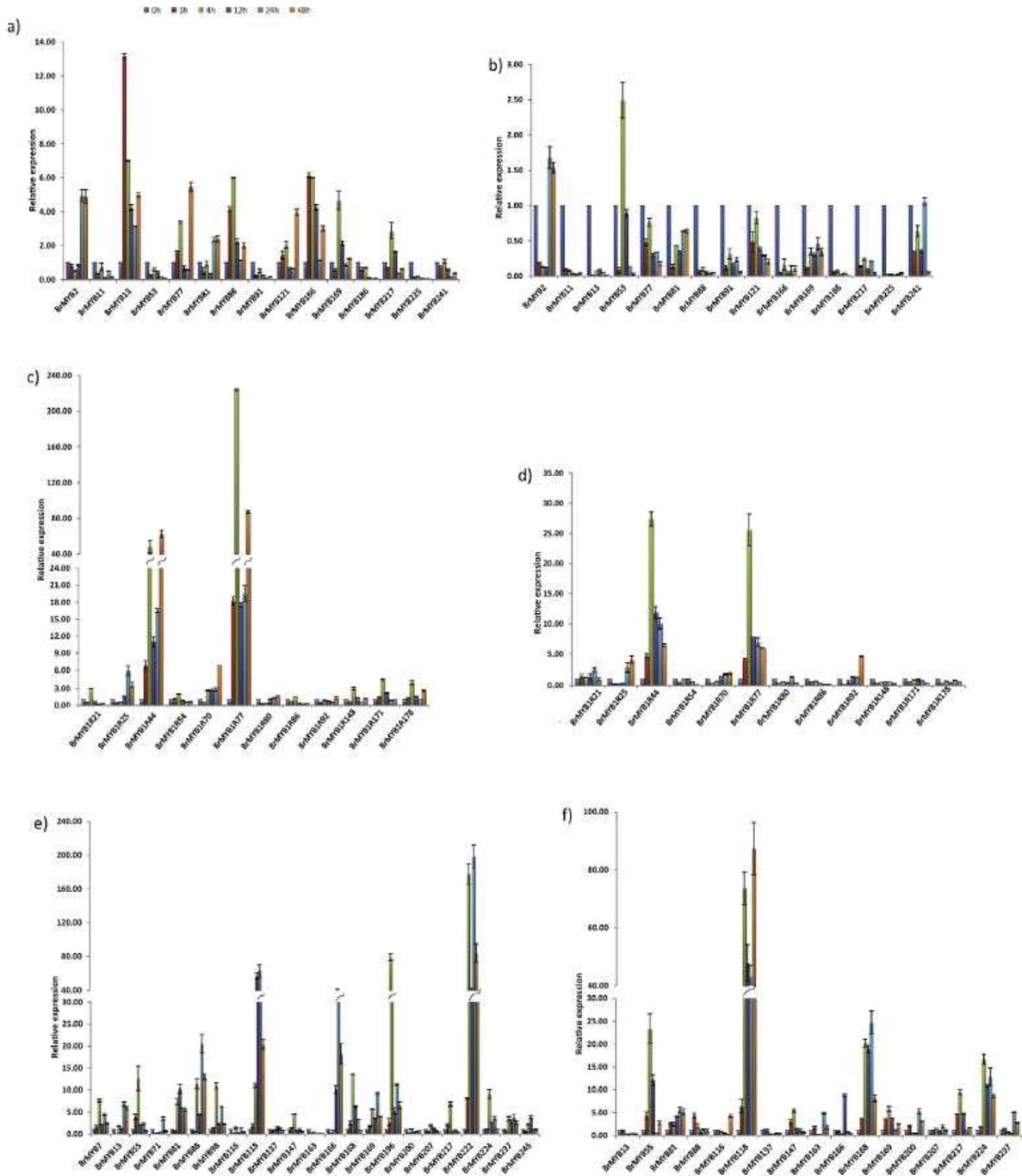


그림 118. 비생물적 스트레스에 대한 배추 MYB 유전자의 Real-time PCR 발현 분석
Chiifu와Kenshin의 근연계통에서 선택한 R2R3-MYB와 MYB 관련 유전자의 저온 스트레스에
대한 발현(a-d). 배추 Chiifu의 R2R3-MYB 유전자에 대한 (e) 염도와 (f) 건조 스트레스의
시간별 발현(0-48h). 오차 막대는 3반복 실험의 표준 오차를 나타냈다.

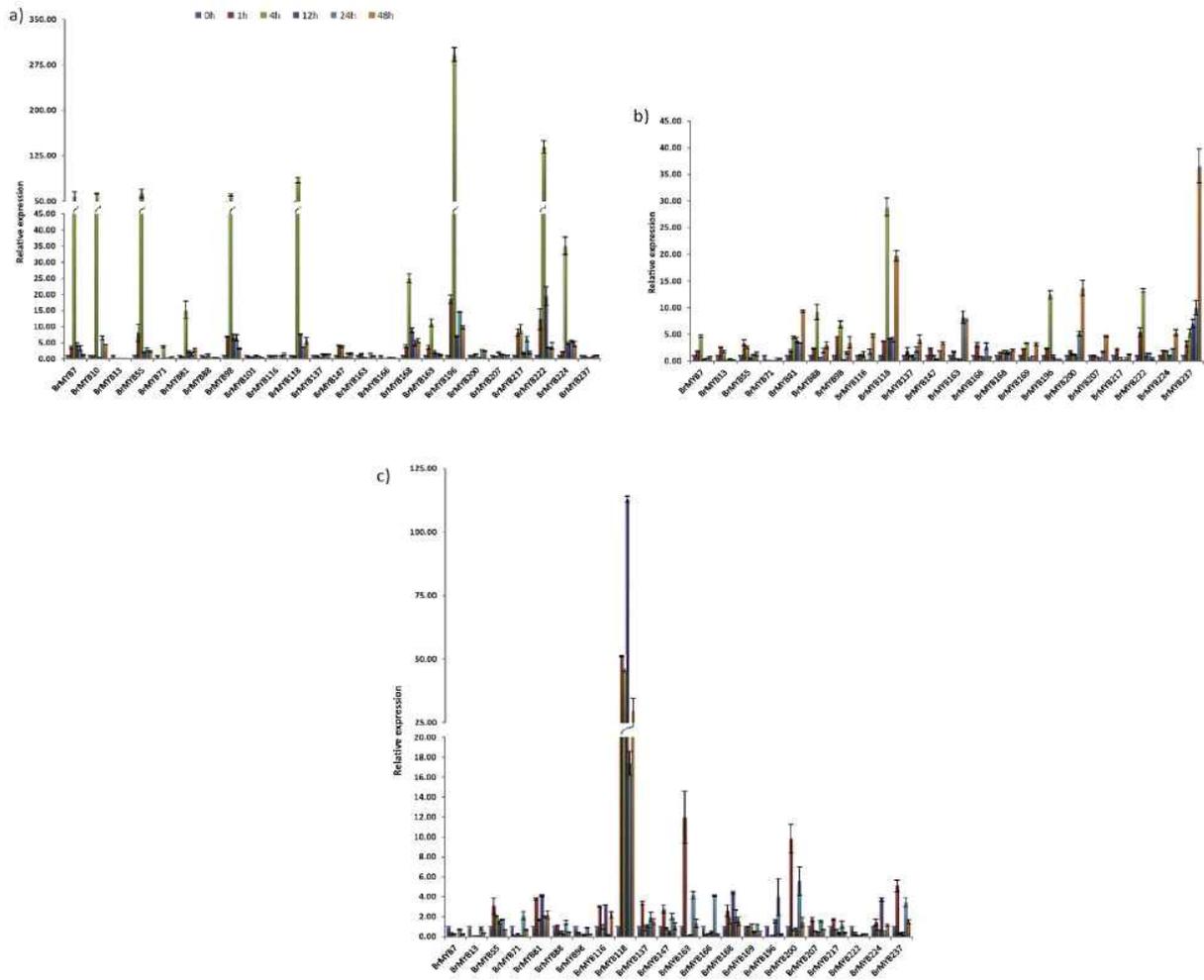


그림 119. 배추 Chiifu의 R2R3-MYB 유전자에 대한 (a) ABA, (b) JA 그리고 (c) SA의 Real-time PCR 발현 분석(0-48h), 차 막대는 3반복 실험의 표준 오차를 나타냄

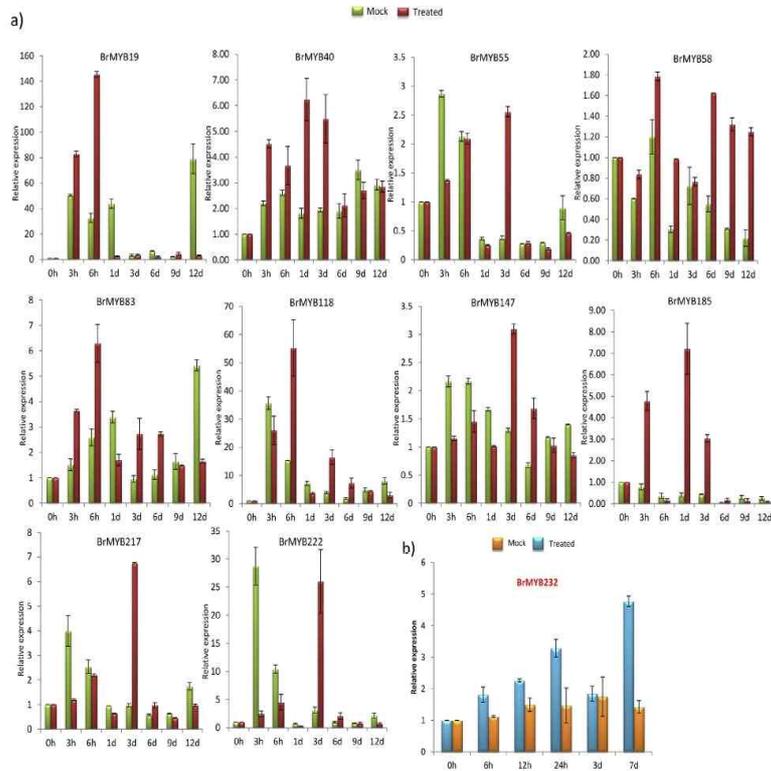


그림 120. (a) *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* (0e12 d) 와(b) *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (0e7 d) 감염 후 배추의 R2R3-MYB 유전자의 Real-time quantitative PCR 발현 분석, 오차 막대는 3반복 실험의 표준 오차를 나타냄

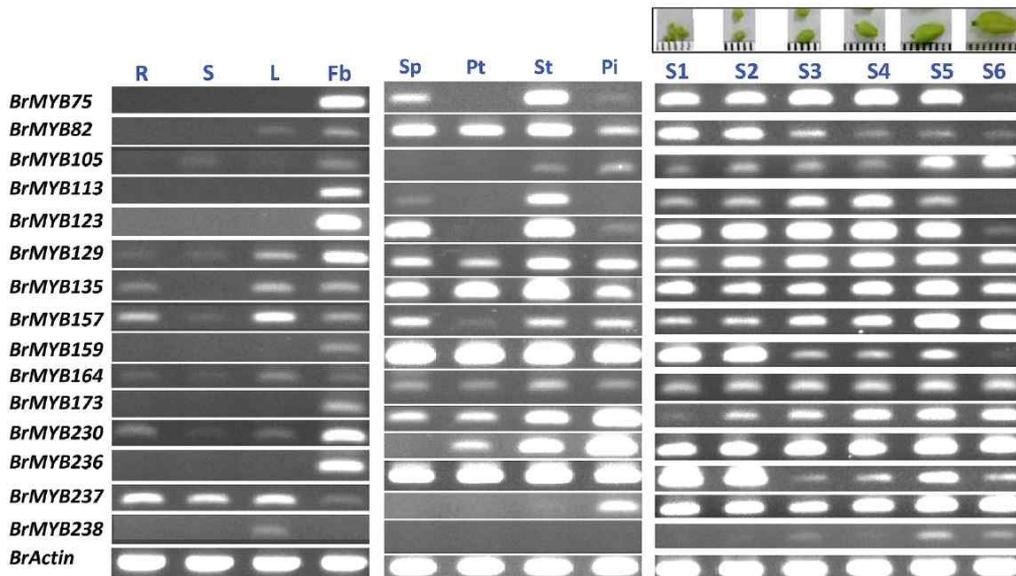


그림 121. 배추의 조직에 따른 15 R2R3-MYB 유전자의 RT-PCR 발현분석 1부터 14 발현 데이터에서 배추의 뿌리(R), 줄기(S), 잎(L), 꽃봉오리(Fb), 꽃받침 잎(Sp), 꽃잎(Pt), 수술(St), 암술(Pi)과 6개의 꽃 성장단계를 표시 (S1부터S6 상단에 꽃이 성숙되는 단계 사진 첨부). 유전자의 이름은 도면의 좌측에 표시하였다.

33. Brassica에서 ABA, SL 및 비생물학적 스트레스에 반응하는 Carotenoid oxygenase 유전자의 동정 및 발현 분석

가. 연구요약

Carotenoid oxygenase는 카로티노이드 물질대사에 직접 관여하는 효소로서 ABA(abscisic acid)나 norisopenoid, 및 SL(strigolactone)와 같은 식물 호르몬뿐만 아니라 꽃과 과실의 색소와 향을 결정하는 중요한 인자이다. 본 연구에서는 배추와 양배추에서 carotenoid oxygenase 유전자들이 ABA와 SL 합성을 포함하는 카로티노이드 물질대사 경로에서 어떤 역할을 하는지와 염분, 가뭄, 저온과 같은 비생물학적 스트레스에 반응하는 유전자들의 발현 양상을 알아보았다.

애기장대의 carotenoid oxygenase 유전자 분류기준을 토대로, BRAD 데이터 베이스를 활용하여 아미노산 염기 서열의 상동성을 기준으로 8개 군(clade)으로 분류하였다. CCD(carotenoid cleavage dioxygenase)1, 4, 7, 8, NCED(9'-cis-epoxycarotenoid oxygenase)2, 3, 5, 6, 9 에서 배추와 양배추 각각 15개와 14개의 후보유전자를 확인하였다.

배추에서 비생물학적인 스트레스(염분, 가뭄, 저온) 처리 후, 공통적으로 나타나는 유전자의 발현 양상은 *CCD1(Bra007826)*, *NCED2(Bra013298)*가 높은 수준을 나타냈으며, 양배추에서는 *CCD1(Bol044673)*, *CCD4(Bol009345)*, *Bol029878)*, *NCED6(Bol007451)*, *NCED9(Bol027485)*이 높은 발현 수준을 보였다. 이 결과에서 배추와 양배추에 공통적으로 비생물학적 스트레스에 작용하는 유전자 군은 *CCD1*인데, *CCD1*은 과실의 색과 염분 스트레스에 반응하는 유전자로 알려져 있다.

배추 및 양배추에 ABA와 SL의 식물 호르몬을 동시에 처리한 후 공통적으로 나타나는 유전자를 확인한 결과 배추에서는 *CCD1(Bra007825)*, *Bra007826)*, *CCD4(Bra020970)*, *Bra013378)*, *CCD8(Bra011384)*, *NCED2(Bra013298)*, *NCED9 (Bra008358)*이 높은 수준의 발현 양상을 보였으며, 양배추에서는 *CCD1(Bol014479)*, *CCD4(Bol009345)*, *NCED6(Bol007451)*이 높은 것으로 확인하였다. 이 결과에서 배추와 양배추에 공통적으로 식물호르몬에 반응하는 유전자 군은 *CCD1*과 *CCD4*이며, ABA와 SL과 모두에서 높은 반응을 보이는 것으로 비취볼 때 호르몬 반응과 밀접한 관련이 있을 것으로 사료된다.

전반적으로, *CCD1*과 4 유전자는 카로티노이드 생합성 경로에서 Norisopenoid 호르몬 합성에 주로 관여하며 *NCEDs* 유전자들은 ABA의 생합성에 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 연구결과에서 비생물학적 스트레스와 외부의 ABA와 SL 식물호르몬 처리 시에 높은 발현 수준을 나타냈으며 이는 비생물학적 스트레스, ABA 및 SL와 반응 시에 서로 상호작용을 통해 외부 반응에 관여하는 것으로 생각된다. 본 연구를 통해서 배추와 양배추에서 카로티노이드 생합성에 관여하는 유전자들을 확립하였고, 비생물학적 스트레스와 식물호르몬의 영향을 받는 주요 유전자들을 선발하여 추후 배추과 작물의 육종 연구에 도움이 될 것이다.

나. 연구결과

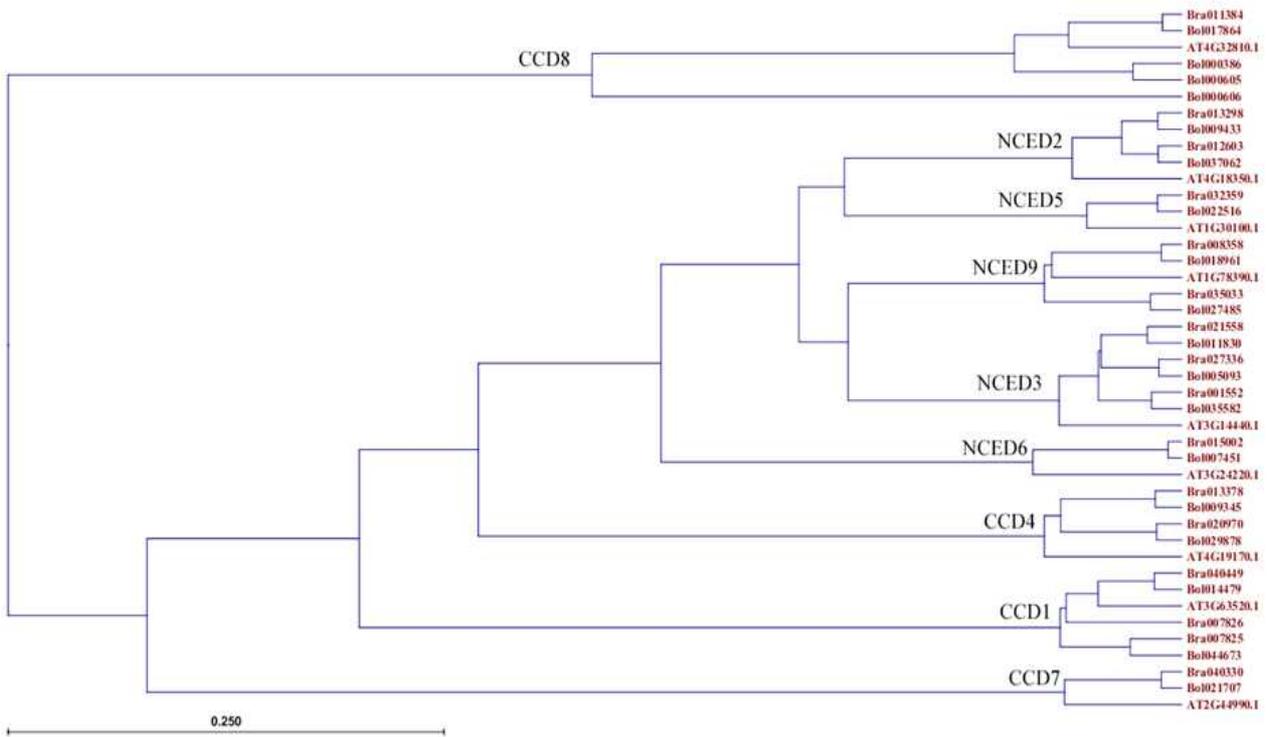


그림 122. 배추와 양배추의 carotenoid oxygenase 유전자 9개 그룹에 대한 계통도

표 22. 배추(A)와 양배추(B)에서 비생물학적 스트레스와 식물호르몬에 반응하는 carotenoid oxygenase 유전자
 노란색은 qRT-PCR 발현값(fold change)의 log2값 중 0.5이상인 유효 값을 나타냄.

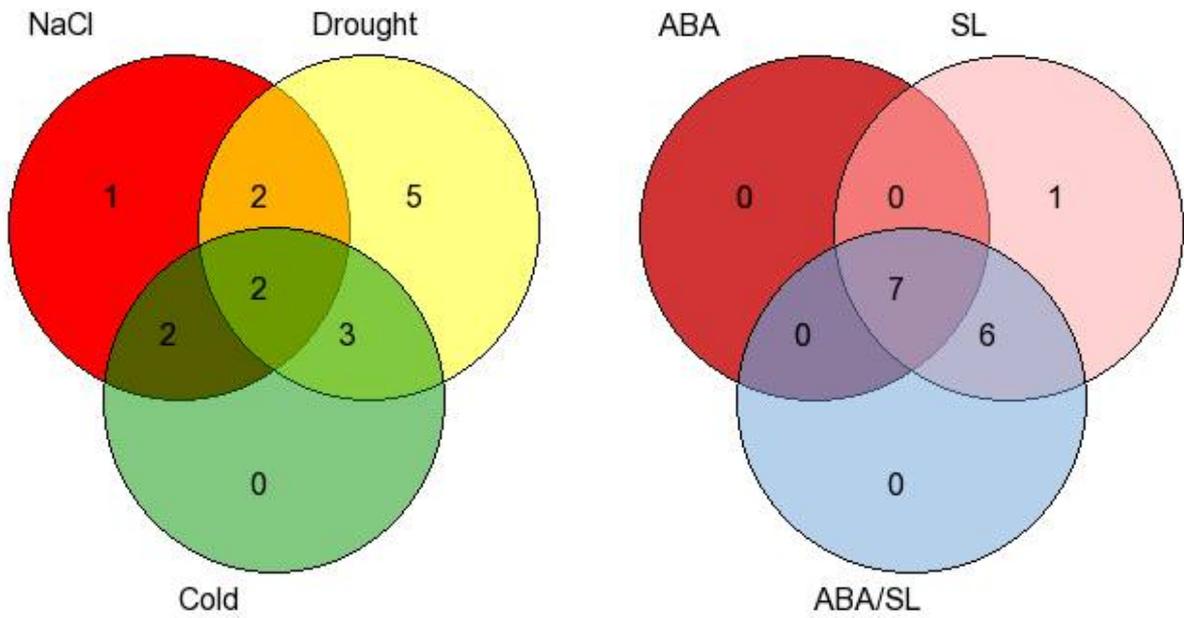
A

Clade	Gene name	NaCl	Drought	Cold	ABA	SL	ABA/SL
CCD1	Bra007825	0.34	0.84	0.70	1.00	2.28	1.56
	Bra007826	1.72	1.12	1.56	1.01	2.47	1.27
CCD4	Bra040449	0.38	0.81	1.62	-2.02	1.50	0.77
	Bra020970	0.50	0.18	1.68	0.62	1.90	1.05
CCD7	Bra013378	0.71	0.46	2.09	1.01	1.80	1.82
CCD8	Bra040330	0.43	0.62	0.11	0.47	0.58	0.42
NCED2	Bra011384	0.63	0.59	0.09	0.58	0.68	0.58
	Bra013298	1.33	1.20	0.76	1.92	0.72	1.03
NCED3	Bra012603	1.21	0.17	0.30	0.00	0.85	0.63
	Bra021558	0.93	2.36	0.25	0.11	0.98	0.76
NCED5	Bra027336	0.20	2.13	0.05	-1.23	0.97	0.68
NCED6	Bra032359	0.20	1.04	0.32	0.22	0.80	0.54
NCED9	Bra015002	0.15	1.05	1.92	0.42	1.47	1.93
	Bra035033	0.06	0.54	0.17	0.10	0.47	0.28
	Bra008358	0.23	0.80	0.07	0.78	0.82	1.53

B

Clade	Gene name	NaCl	Drought	Cold	ABA	SL	ABA/SL
CCD1	Bol014479	0.22	1.90	1.30	0.62	1.33	0.63
	Bol044673	1.06	2.08	1.04	0.65	-0.61	1.43
CCD4	Bol009345	1.34	2.10	1.51	0.67	1.57	0.77
	Bol029878	0.64	2.06	1.14	0.44	-0.75	1.33
CCD7	Bol021707	1.44	0.86	-0.03	0.68	0.29	-0.17
CCD8	Bol017864	0.29	0.72	-0.08	0.71	0.15	0.00
NCED2	Bol009433	2.69	0.86	0.10	0.98	-0.47	-0.21
	Bol037062	1.70	0.71	-0.50	1.58	1.03	0.02
NCED3	Bol005093	2.11	0.49	0.07	1.04	0.36	0.14
	Bol035582	1.49	2.68	0.32	1.35	0.08	-0.09
NCED5	Bol022516	2.38	2.08	-1.10	0.72	0.00	-0.05
NCED6	Bol007451	1.91	2.48	1.34	1.08	1.51	1.93
NCED9	Bol027485	1.99	2.15	1.14	1.40	0.35	1.27
	Bol018961	0.47	1.11	0.15	0.78	0.38	-0.08

A



B

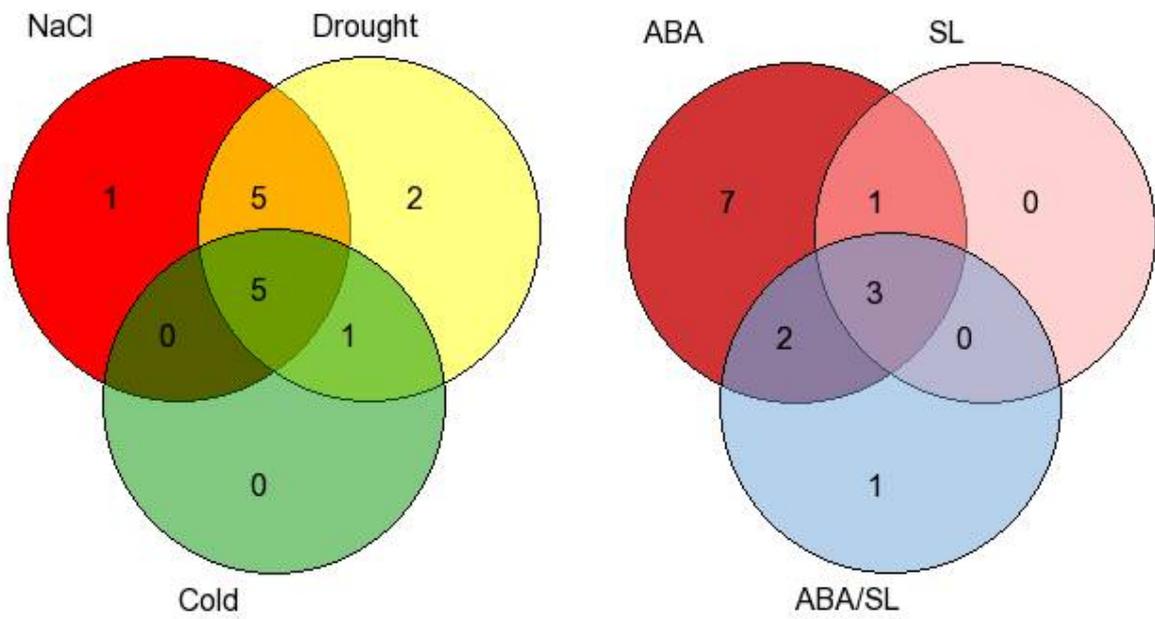


그림 123. 배추(A)와 양배추(B)에서 비생물학적 스트레스와 식물호르몬에 공통적으로 높은 발현 수준을 보이는 carotenoid oxygenase 유전자의 벤다이어그램 분석

34. 배추 및 양배추에서 전체 지놈상에서 비생물학적 스트레스에 발현 반응을 보이는 carotenoid oxygenase 유전자의 분석

가. 연구요약

carotenoid oxygenase는 carotenoid 물질대사에 관여하는 중요한 효소이다. carotenoid는 꽃과 열매의 색소 및 향에 영향을 미치는 중요한 품질 요소와 더불어 앱시스산(ABA)와 스트리고락톤(SL)과 같은 식물 호르몬의 주요 조절기이다. 앱시스산과 스트리고락톤 등과 같은 비생물학적 스트레스에 carotenoid oxygenase 유전자의 발현 반응 분석을 수행하여 비생물학적 스트레스와 carotenoid oxygenase 유전자 간의 상관관계를 *B. rapa*와 *B. oleracea*에서 알아보았다.

TAIR 데이터베이스로부터 carotenoid oxygenase 유전자를 선별하여 *B. rapa* ssp. *pekinensis* cv. *Chiifu* genome V1.5와 *B. oleracea* genome V1.0 데이터베이스에서 homologous 유전자들을 탐색하였다. 또한 SMAR 데이터베이스와 motif 스캔으로 염기서열을 동정하였다. 배추는 '지부', 양배추는 'ACS621'을 MS 배지에 15일 간 생육 후 NaCl, drought, cold, ABA, SL, ABA/SL를 1h, 3h, 6h, 12h 동안 처리한 후 qPCR로 유전자의 발현을 분석하였다. 배추과 데이터베이스로부터 carotenoid oxygenase (CCD)1, CCD4, CCC7, CCD8, NCED(9-cis-epoxycarotenoidoxygenase)2, NCED3, NCED5, NCED6, NCED9과 같은 carotenoid oxygenase 관련 유전자들을 동정하였다. carotenoid oxygenase 후보 유전자를 *B. rapa*에서는 15개, *B. oleracea*에서는 14개를 분리하였다. 비생물학적 스트레스 처리 조건 하에서, *B. rapa*와 *B. oleracea* 모두에서 CCD1과 CCD4는 스트레스 처리 후 3~6시간에서 가장 높은 발현을 보였으며, 12시간 전까지 감소하는 비슷한 경향을 보였다. NCED2, NCED6, NCED9는 ABA와 SL처리에 발현 반응을 보였다. 이와 같은 결과, 식물 호르몬 생합성 효소들은 carotenoid oxygenase 경로에 관여하며, *B. rapa*와 *B. oleracea*에서 비생물학적 스트레스 처리 조건하에서 활성화되어 다양한 전사 반응에 관여함을 확인하였다.

나. 연구결과

표 23. *B. rapa*와 *B. oleracea*의 carotenoid oxygenase 유전자

Gene name	AGI	Chr.	BraID	Chr.	Identify (%)	BolID	Chr.	Identify (%)	References
CCD1	AT3G63520.1	Chr3	Bra007825	A09	84	Bol014479	C04	81	Jaquinod and others (2007)
			Bra007826	A09	74	Bol044673	C08	81	
			Bra040449	A04	84				
CCD4	AT4G19170.1	Chr4	Bra020970	A08	84	Bol009345	C01	88	Ytterberg and others (2006)
			Bra013378	A01	89	Bol029878	C03	77	
CCD7	AT2G44990.1	Chr2	Bra040330	A04	89	Bol021707	C04	89	Ehrenreich and others (2007)
CCD8	AT4G32810.1	Chr4	Bra011384	A01	88	Bol017864	C01	89	Schwartz and others (2004)
NCED2	AT4G18350.1	Chr4	Bra013298	A01	79	Bol009433	C01	79	Tan and others (2003)
			Bra012603	A03	85	Bol037062	C06	84	
NCED3	AT3G14440.1	Chr3	Bra021558	A01	84	Bol005093	C05	85	Endo and others (2008)
			Bra027336	A05	84	Bol035582	C03	83	
NCED5	AT1G30100.1	Chr1	Bra032359	A09	90	Bol022516	C05	90	Tan and others (2003)
NCED6	AT3G24220.1	Chr3	Bra001552	A07	82	Bol007451	C08	81	Kim and others (2008)
NCED9	AT1G78390.1	Chr1	Bra035033	A07	80	Bol027485	C07	80	
			Bra008358	A02	73	Bol018961	C02	78	

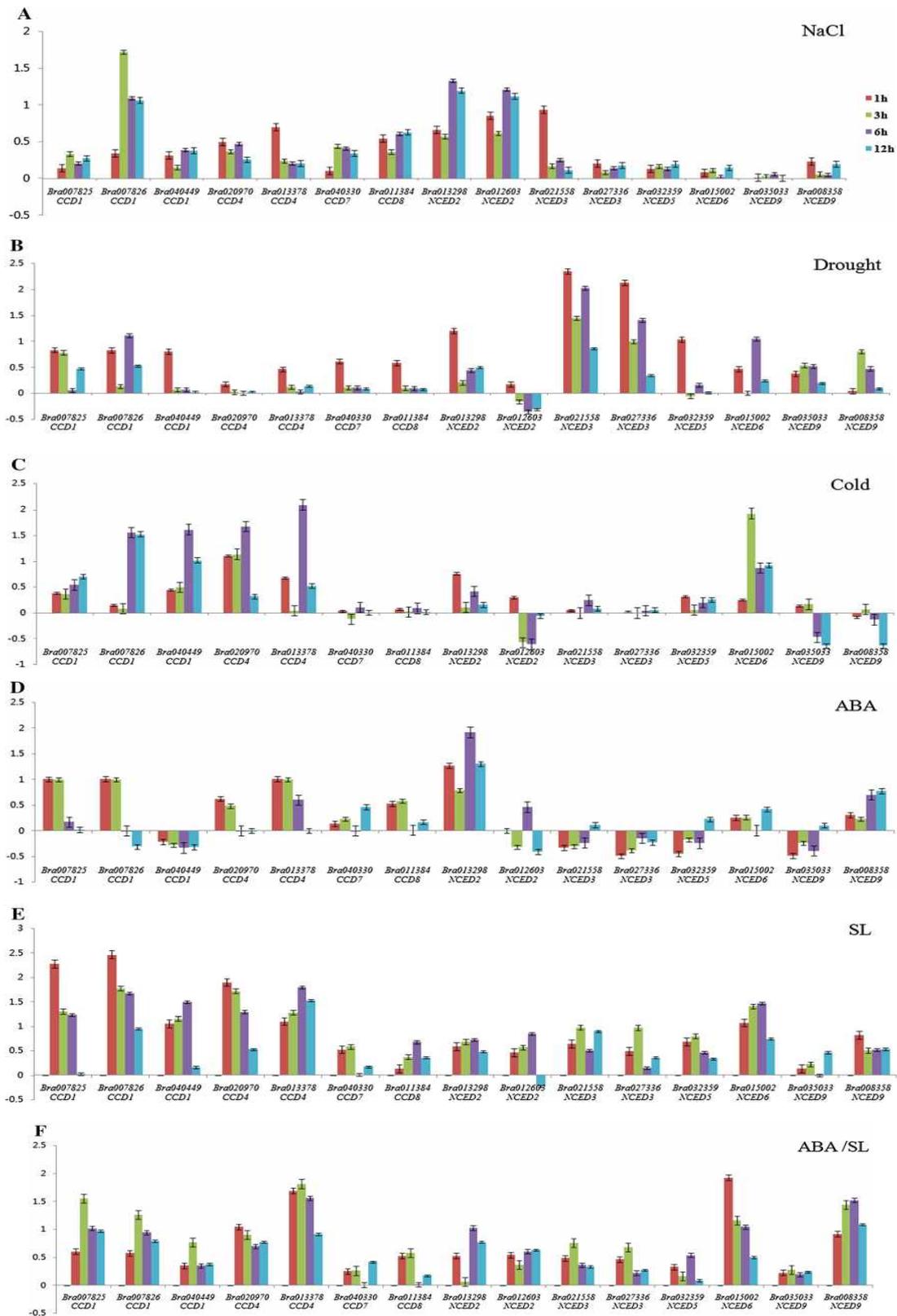


그림 124. 비생물학적 처리한 배추 샘플에 대한 배추 carotenoid oxygenase 유전자의 qPCR 결과

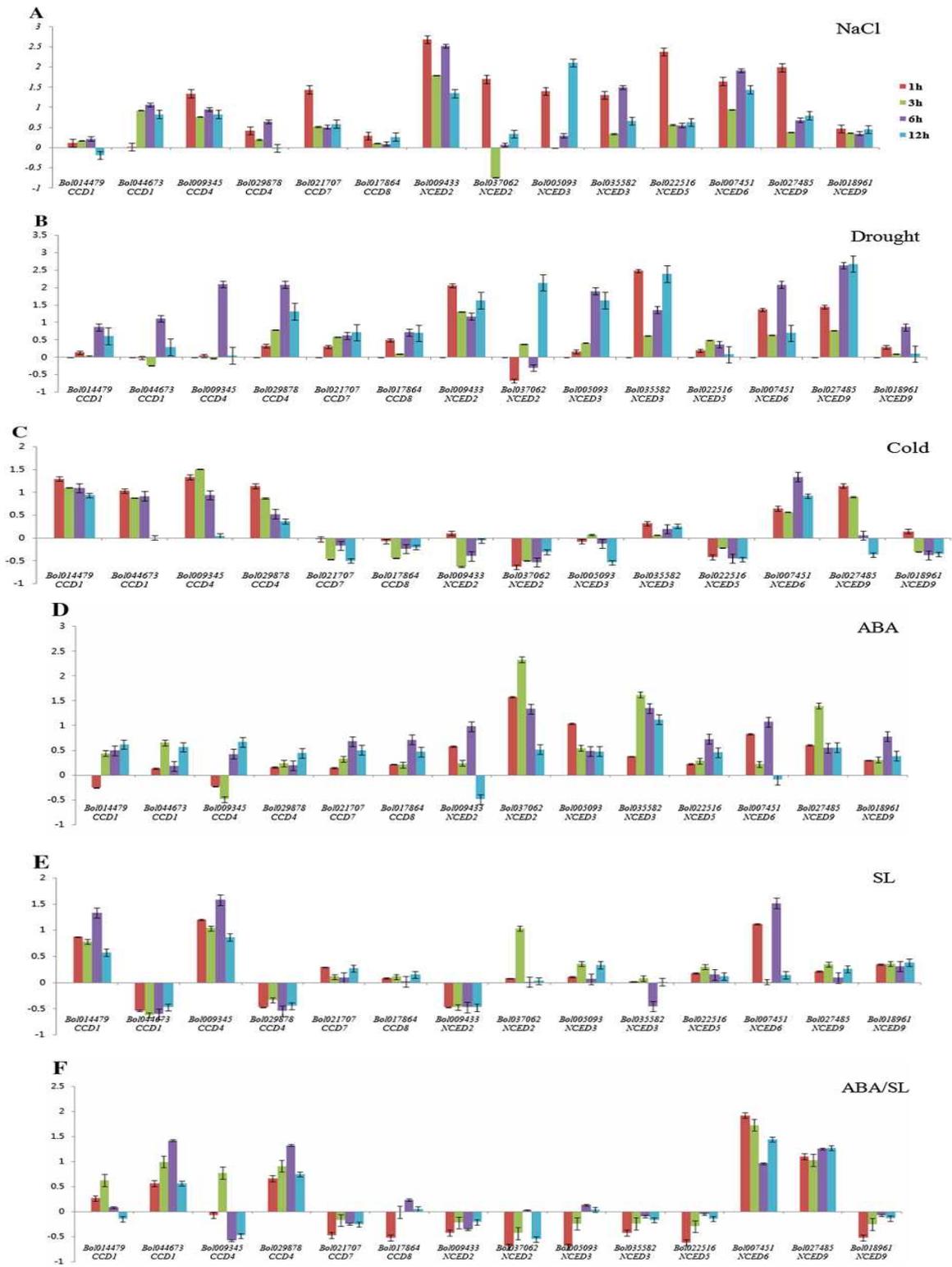


그림 125. 비생물학적 처리한 양배추 샘플에 대한 양배추 carotenoid oxygenase 유전자의 qPCR 결과

35. 양파 저온 저항성 관련 transcriptome 분석 및 분자 마커 개발

가. 연구 요약

Allium 계열의 채소류인 양파(*Allium cepa* L.)는 세계적인 작물로 생산과 교역 규모가 토마토, 수박, 고추 등과 함께 주요 채소작물에 속하며, 국내에서도 고추, 마늘과 함께 3대 조미채소일 뿐만 아니라 매우 중요한 월동 노지재배 작물이다. 하지만 우리나라에서는 대부분이 수입종자가 차지하고 있어 양파 생산에 투입된 경영비 중에서 종묘 비의 비중이 18.8%에 이르고 있다.

따라서 본 실험에서는 내한성이 강한 양파 품종개발과 이를 뒷받침 할 수 있는 내한성 관련 유전자를 발현 해석하여 양파의 우수 조합 선발용 분자마커를 개발하며 이를 통해 수입종자가 차지하고 있는 내수 시장을 우선 국산 품종으로 대처하고 중국, 유럽 등 해외시장 수출을 병행할 수 있는 종자를 개발하는 것이다.

우리나라에서 육성하는 중일형 품종이나 일부 단일형 품종의 재배지역이 매우 한정되어 있다. 따라서 내수 시장을 국산 품종으로 대처할 뿐만 아니라 해외시장에 수출하기 위해서는 내한성을 가진 양파의 육종이 필요하다. 본 실험에서는 조생종-내한성 약함, 중만생종-내한성 중간, 만생종-내한성 강한 3계통의 transcriptome을 분석하여 내한성에 관여하는 유전자를 선발하고자 한다.

양파 3가지 계통 '36101'(내한성 약함), '36114'(내한성 중간), '36122'(내한성 강함)의 초장 10~12 cm의 모종을 2013년 10월2일 농우바이오로부터 분양 받아 비닐하우스 (최저 온도 : -5°C, 최고온도 : 27°C)에서 재배하여 본 실험에 사용하였다. 양파를 지름 15cm인 포트에 1구씩 계통 당 10개씩 이식하여, 25°C, 2°C, -5°C, -10°C, -15°C, -20°C 각각 24시간 동안 저온 처리하였다. 저온처리는 양파의 본엽이 4~5매 정도 구가 형성되는 시기에 수행하였다. 25°C에서 일주일 경과 후 25°C와 2°C에서 24시간 처리 하고, 25°C와 2°C를 제외한 -5°C, -10°C, -15°C는 1시간 처리 후 각각의 24시간 동안 온도 처리를 하였다. 실험결과 '36122' 계통이 -5°C에서 다른 계통에 비해 전해질 용출이 적은 것으로 평가되어 내한성이 다른 계통에 비해 강한 것으로 사료된다. 표현형 또한 내한성이 강한 계통으로 평가되어 이 계통에 대한 transcriptome 분석을 위해 RNA sequencing을 실시하였다.(그림 25). 내한성이 강한 '36122' 계통을 중심으로 내한성 및 내동성 관련 transcript를 분석하여, 총 47개의 유전자를 선발하였으며, 유전자 발현에 대한 qRT-PCR 실증시험을 통해 내한성에 관련된 6개의 유전자, 내동성에 관련된 12개의 유전자를 확인하였다. 추후 선발된 유전자들을 다양한 계통의 내한성 양파 소재를 통해 재현성 검정을 실시하고 저온에 관련된 분자마커로 가능한 후보유전자를 확인하였다.

나. 연구결과

Sequence length distribution

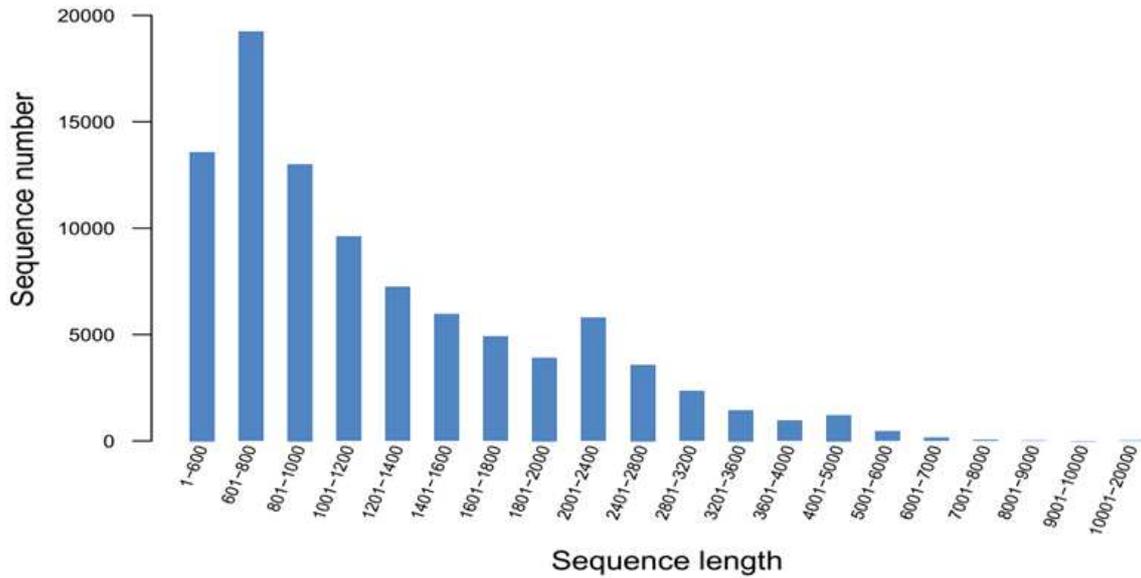


그림 126. 차세대 시퀀싱에 의해 얻어진 양과 계놈의 Nucleotide 길이에 따른 분포

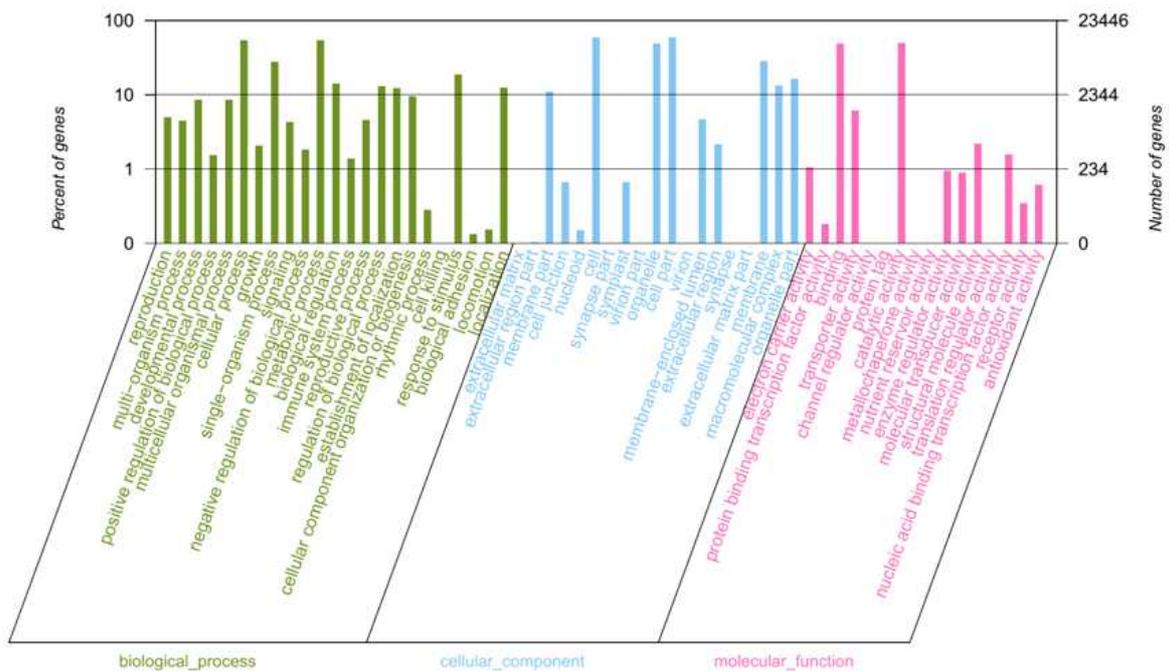


그림 127. 양과 내한성/내동성 transcriptome GO 분석

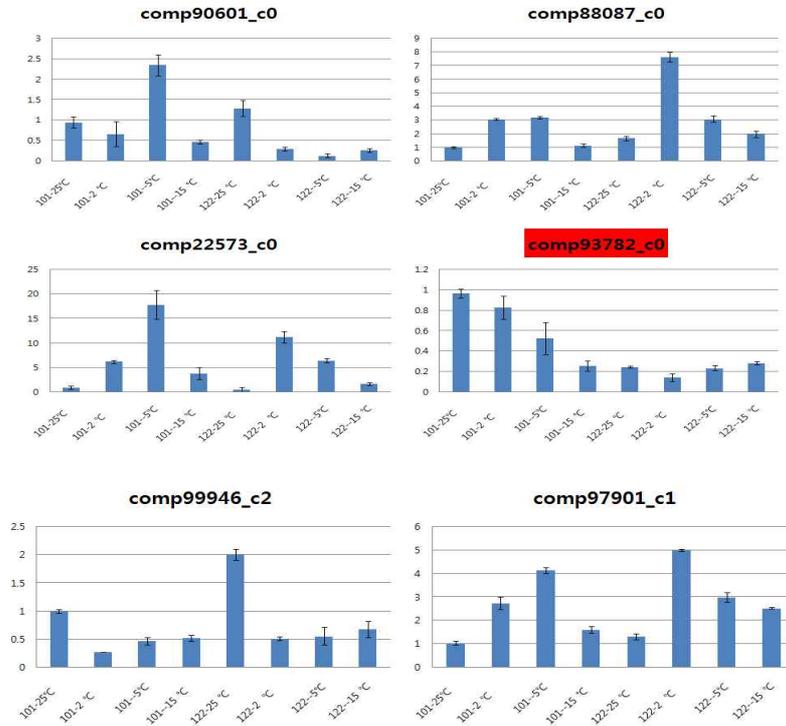


그림 128. 내한성관련 유전자의 발현분석결과

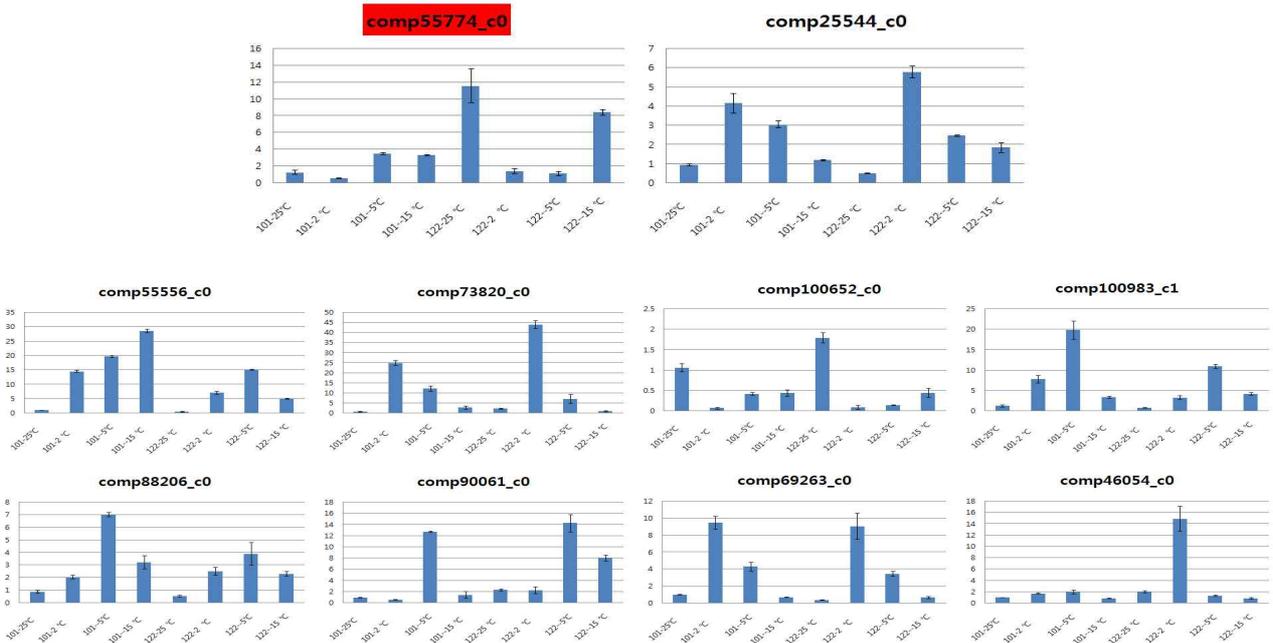


그림 129. 내한성/내동성관련 유전자의 발현분석결과

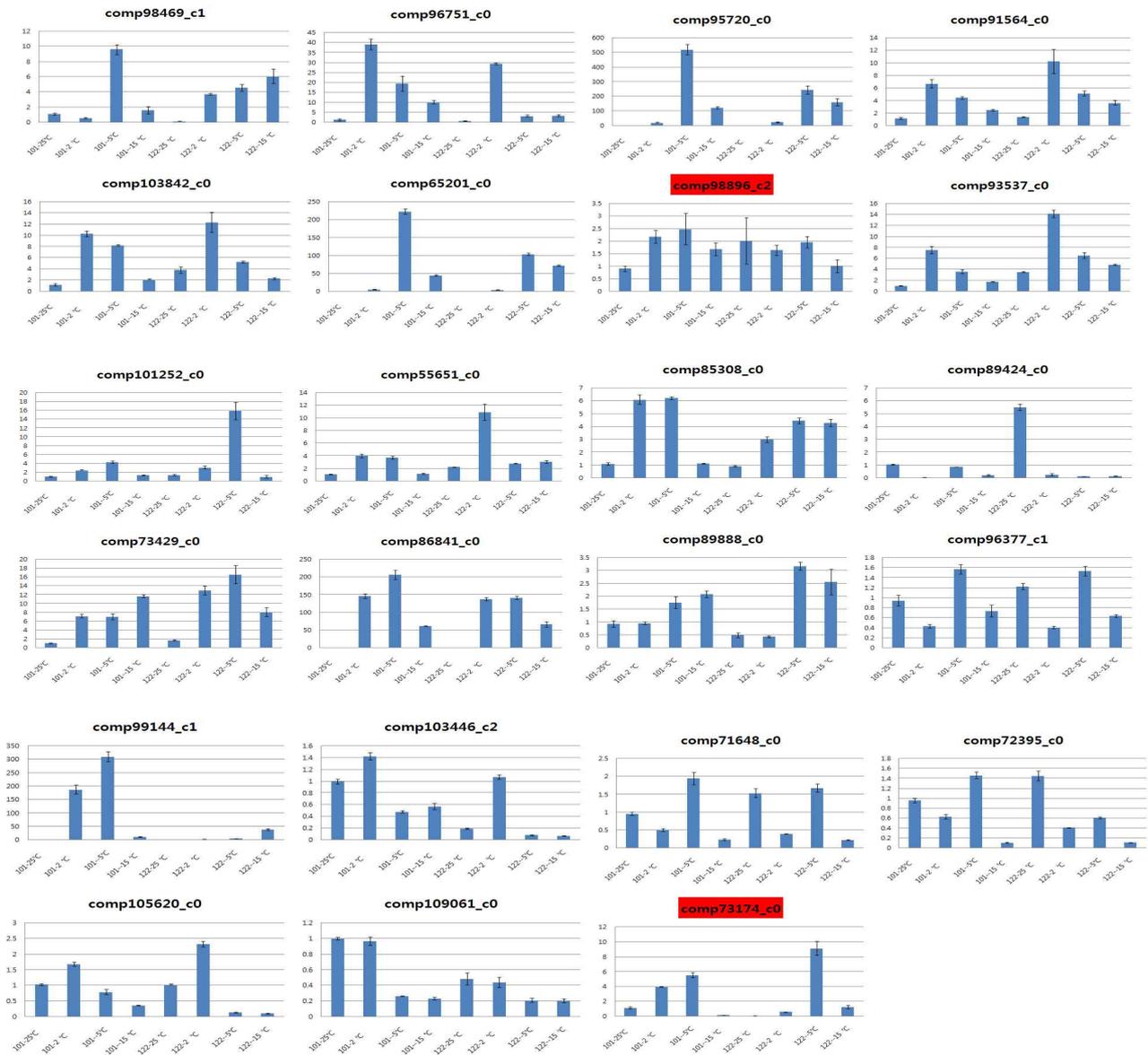


그림 130. 내동성 관련 유전자의 발현분석결과

36. 양파(*Allium cepa*) 구근형성/맛 관련 QTL 동정 및 분자 마커 개발

가. 연구요약

양파의 life cycle은 2년으로 겨울에 월동을 하여 봄에 꽃을 피우는 작물이다. 양파를 포함한 백합과 채소들은 예전부터 자극적이고 매운 풍미를 개선하려는 연구를 진행해 왔다. 일반적으로, 포도당, 과당, 및 자당은 주요한 양파의 구성 물질로 알려져 있는데, 양파의 탄수화물 구성은 매우 유전적인 요소를 가지고 있다. 그 중에서도 Alliinase로부터 생산된 피루브산(Pyruvic acid)은 풍미와 관련한 전구체(precursor)로서 하나의 좋은 지시자(indicator)로 알려져 왔고, 더 넓게는 양파의 매운맛을 결정하는데 사용되어 왔다. 또한, 양파에서 구근의 형성은 월동하는 과정에서 생성되는데 잎이 굽어지고 구근의 특징이 두드러진다. 꽃은 춘화처리(vernalisation) 후에 발생하며, 여기에 관여하는 3가지 유전자, *VRN1*, *VRN2*, 및 *FT (VRN3)*의 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 개화관련 유전자(*FT*, Flowering locus T)는 개화의 signal 분자 중 하나인 플로리겐(florigen)를 만드는데 개화 이외에 구근 형성에도 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 구근의 형성과 성장 과정에서 광주기와 온도는 매우 중요한 요소인데, 특히 구근을 형성하기 위해서는 광주기 유도는 필수적인 요소이다. 따라서 본 연구에서는 양파 조생종 계통인 '36101'과 만생종 계통인 '36122'의 두 가지 대비 계통 사이에 구근 형성과 관련 있는 *FT* 유전자의 발현 양상을 비교하였으며 *FT* 관련 유전자들의 길고 짧은 광주기 조건과 가뭄 스트레스 조건에서의 발현 차이를 분석하였다.

양파의 초기 영양 단계(vegetative stage, VS), 구형성 단계(bulb formation stage, BF), 구성숙 단계(bulb maturation, BM)의 3가지 단계별 조생종 계통인 '36101'과 만생종 계통인 '36122'의 피루브산과 당에 대한 HPLC(High Performance Liquid Chromatography) 함량 분석을 수행한 결과, 두 대비 계통 간의 각 단계별 피루브산, 당 함량에 대한 차이를 확인하였으나 비슷한 수준을 나타냈다. 두 대비 계통 간의 세 가지 단계별 잎과 구근조직에서의 *FT* 관련 유전자의 발현양상을 확인해 본 결과, 조생종인 '36101'과 만생종인 '36122'에서 잎과 구근조직 모두에서 *FT3*, *4*, *6* 유전자의 발현을 확인하였으며, 이 중 *FT3*와 *6*에서 높은 발현 수준을 보였다. 광주기에 따른 두 대비 계통 간의 *FT* 유전자의 발현 양상을 비교했을 때, 조생종인 '36101' 계통에서는 *FT1*, *2*, *3*, *4*, *5*, *6* 유전자에 의하여 단일조건 보다는 장일조건에서 상향조절(up-regulate)되는 것을 확인하였다. 이와는 반대로 만생종인 '36122'에서는 장일조건 보다 단일조건에서 *FT1*, *2*, *3*, *4*, *5*, *6* 유전자들이 상향조절 되는 것을 확인하였다.

길고 짧은 광주기 조건에서 각 일주별(0-4주) 두 양파 대비 계통의 피루브산과 당 함량의 차이를 나타내었다. 단일조건에서 4주간 처리한 결과는 만생종 계통인 '36122'이 조생종 계통인 '36101' 보다 피루브산 함량이 각각 2.61과 5.1 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ 로 거의 2배 정도의 차이를 보였다. 또한 당 함량은 1주일 처리 후부터 각각 24.45와 63.3 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ 로 2.5배 이상의 차이를 보이기 시작했으며 3주후에 18.13과 67 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ 로 3.6배 이상의 차이를 나타냈다. 이 결과로 볼 때 조생종은 피루브산과 당의 함량이 광주기에 영향을 크게 받지 않아 일정한 함량을 유지하는 것으로 보이며, 오히려 장일조건에서 당의 함량이 약간 증가하는 것으로 보인다. 이에 반해 만생종은 장일조건 보다는 단일조건에 영향을 받아 피루

브산과 당 함량이 높은 것으로 보이며 조생종과 만생종 간의 광주기 조건에 따른 차이가 있음을 확인하였다. 이는 앞서 광주기에 따른 FT 유전자의 발현 양상과 피루브산과 당 함량에 대한 유의성 있는 결과로 단맛과 같은 풍미와 FT 유전자의 관련성을 확인하였다.

나. 연구결과

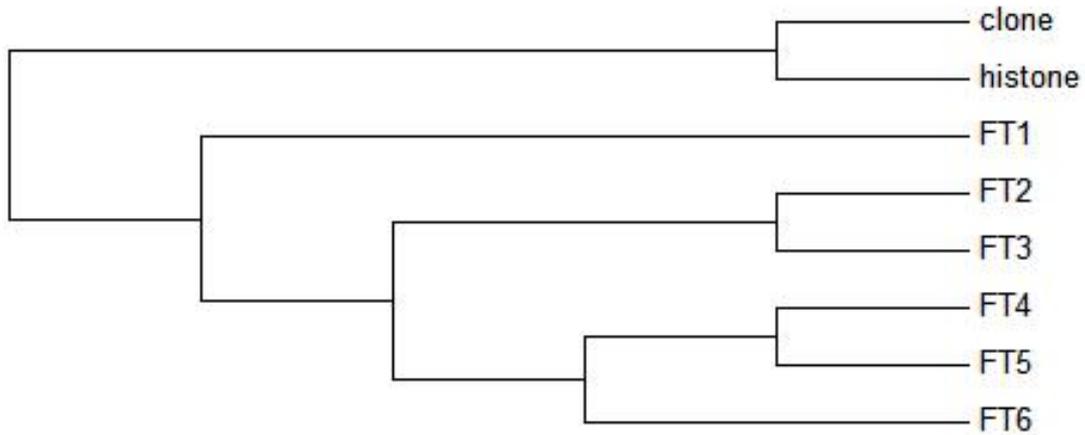


그림 131. 구근 형성과 관련한 특이적인 유전자의 계통 분석

표 24. 광주기 조건의 차이에 따른 두 양과 대비 계통의 피루브산 농도 변화

Conditions		Pyruvic acid ($\mu\text{mol mL}^{-1}$) \pm S.D				
Photoperiod conditions		0 week	1 st week	2 nd week	3 rd week	4 th week
Long	36101	3.7 ^a	3.17 ^a	3.44 ^a	3.47 ^a	3.63 ^a
		± 0.026	± 0.030	± 0.031	± 0.035	± 0.030
	36122	3.44 ^a	5.71 ^b	5.29 ^b	4.31 ^b	2.91 ^b
		± 0.002	± 0.002	± 0.002	± 0.004	± 0.001
Short	36101	3.7 ^a	3.21 ^a	2.98 ^a	2.91 ^a	2.61 ^a
		± 0.026	± 0.027	± 0.026	± 0.027	± 0.025
	36122	3.44 ^a	2.34 ^b	2.72 ^b	3.51 ^b	5.10 ^b
		± 0.002	± 0.001	± 0.004	± 0.002	± 0.002

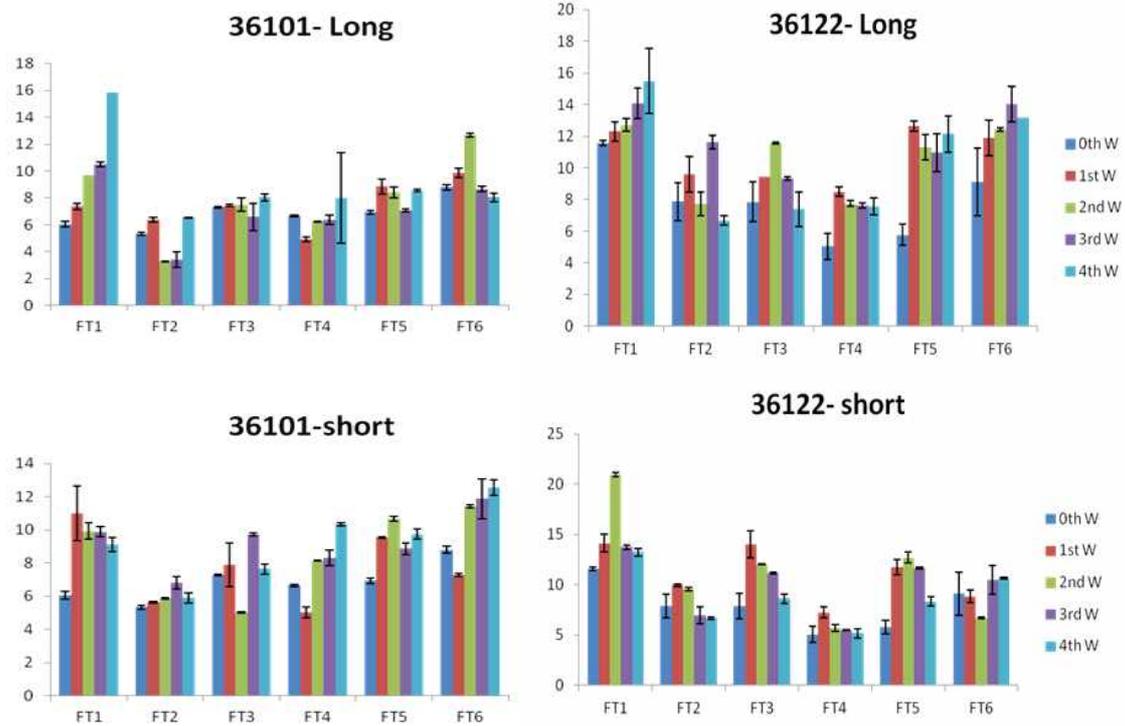


그림 132. 광주기에 따른 조생종 계통 36101과 만생종 계통 36122에 대한 FT 유전자의 발현 패턴 분석 결과

0-4주 동안 일주일 간격으로 긴 광주기(Long)와 짧은 광주기(short) 처리 후 FT1-6 유전자의 발현변화.

표 25. 광주기 조건의 차이에 따른 두 양파 대비 계통의 당 농도 변화

Conditions	Sugars (mg mL ⁻¹)±S.D																								
	0 week					1 st week					2 nd week					3 rd week					4 th week				
	a	b	c	d	total	a	b	c	d	total	a	b	c	d	total	a	b	c	d	total	a	b	c	d	total
Photoperiod long 36101	27.21	21.77	5.21	4.34	58.54	18.00	11.88	6.52	3.63	40.03	19.21	12.73	8.65	3.68	44.29	21.48	13.86	9.77	4.66	49.79	22.68	13.92	9.92	5.01	51.54
	±1.02	±1.61	±0.25	±1.62	±1.14	±0.10	±0.88	±2.50	±2.50	±2.07	±1.39	±0.64	±0.72	±0.50	±2.58	±1.64	±1.53	±1.34	±2.09	±1.80	±0.25	±1.03	±1.33	±0.24	±1.28
36122	8.5	2.9	4.5	35.2	51.1	8.4	3.5	2.8	37.8	52.5	9.6	4.1	2.6	38.3	54.6	10.3	3.6	2.2	38.2	54.3	8.4	3.5	2.8	38.2	54.3
	±1.86	±0.25	±1.59	±0.46	±1.90	±1.59	±0.46	±1.27	±0.80	±1.85	±2.61	±2.65	±1.46	±1.90	±1.62	±1.52	±1.26	±2.63	±1.42	±1.26	±1.59	±0.46	±1.27	±1.42	±1.26
Photoperiod Short 36101	27.21	21.77	5.21	4.34	58.54	12.48	6.46	3.10	2.41	24.45	12.60	6.47	2.38	2.67	24.13	9.37	5.17	1.29	2.30	18.13	12.48	6.46	3.10	2.30	18.13
	±1.02	±1.61	±0.25	±1.62	±1.14	±1.10	±0.91	±0.48	±0.38	±2.73	±1.65	±0.69	±0.94	±1.06	±2.04	±1.73	±0.92	±0.13	±0.58	±3.16	±1.10	±0.91	±0.48	±0.58	±3.16
36122	8.5	2.9	4.5	35.2	51.1	10.6	4.5	3.8	43.4	63.3	7.7	3.4	2.6	49.6	63.3	9.1	4.6	3.2	50.1	67.0	7.7	3.4	2.6	59.0	76.9
	±1.86	±0.25	±1.59	±0.46	±1.90	±1.22	±2.03	±2.38	±1.32	±1.63	±1.22	±2.03	±2.38	±1.32	±1.63	±0.52	±0.63	±0.45	±1.86	±1.45	±1.22	±2.03	±2.38	±0.52	±2.06

37. 양파 순도 검정용 24 Chip 개발

가. 연구요약

양파의 F1품종을 육종하기 위해서는 순도검정이 매우 중요한 작업 중의 하나이다. 본 연구는 양파의 순도를 검정하기 위해 일본 Kazusa DNA 연구소로부터 SNP를 포함한 염기서열을 받아 순도 검정용 24칩을 개발하였다.

개발한 24개의 assay는 여러 계통들에서 각각의 homo type 및 hetero type의 유전자형을 가지고 있었으며, 이는 양파의 순도 검정에 매우 유용하게 이용되어질 것으로 기대된다.

나. 연구 결과

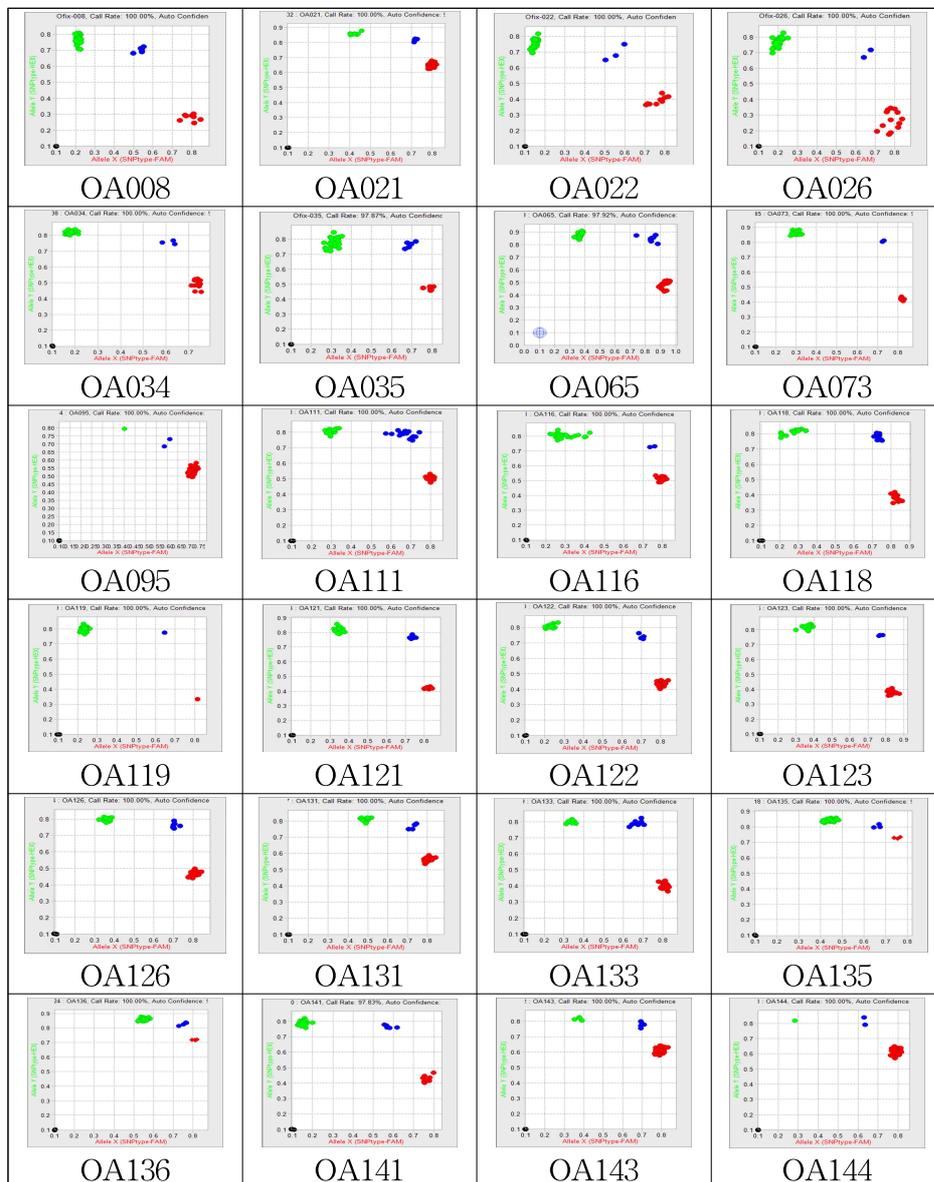


그림 133. 양파 24 assay에 대한 순도 검정 결과

39. 양파에서 transcriptome 분석에 의한 shoot development 유전자들의 비교 분석

가. 연구요약

양파 (*Allium cepa*)는 전 세계적으로 2번째로 가장 많이 재배하고 소비하는 작물이다. 양파는 월동형 작물로 겨울동안 저온 장애가 발생하게 되는데 이는 양파의 생산량을 저하시키는 원인 중 하나이다. 현재까지 보고된 양파의 저온에 관련된 연구는 미비한 상태이며 또한 저온에 대하여 양파의 유전자원이 확보되지 않고 있다.

본 연구팀은 저온(2°C)과 동결(-2°C와 -15°C)의 스트레스 처리 및 대조구(25°C)를 대조적인 *A. cepa* 계통을 이용해 RNA seq으로 총 452,194,370개의 고품질 read들을 분석하였다. *de novo* 어셈블리한 read들은 최종적으로 54,047 유전자들이 있었으며 평균 1,331 bp 길이였다. 유사성을 기초로 모든 유전자들을 Swiss-prot, KEGG, COG와 같은 보고된 non-redundant(NR) 데이터베이스를 통해 aligning을 수행하였다. 발현의 차이가 나는 유전자들 (differentially expressed genes, DEGs)들은 FPKM 방법을 이용하여 분석하였다. 전체적으로 모든 데이터베이스에서 발현의 차이가 나는 유전자들은 총 92,862개 있었으며, 이에 대한 GO와 KEGG 경로를 분석하였다. DEG에서 16개의 유전자, SNPs에서 90개의 유전자, SSRs에서 79개의 유전자들을 선발하였으며, qRT-PCR을 통해 이미 보고된 지상부 반응 관련 유전자들과의 발현을 비교하고 있는 중이다. 본 연구는 *Allium spp.* 으로부터 전사체 염기서열 정보를 생산하여, *Allium spp.*를 연구하는 데 있어, 중요한 유전자원으로 이용될 것으로 기대된다.

나. 연구결과

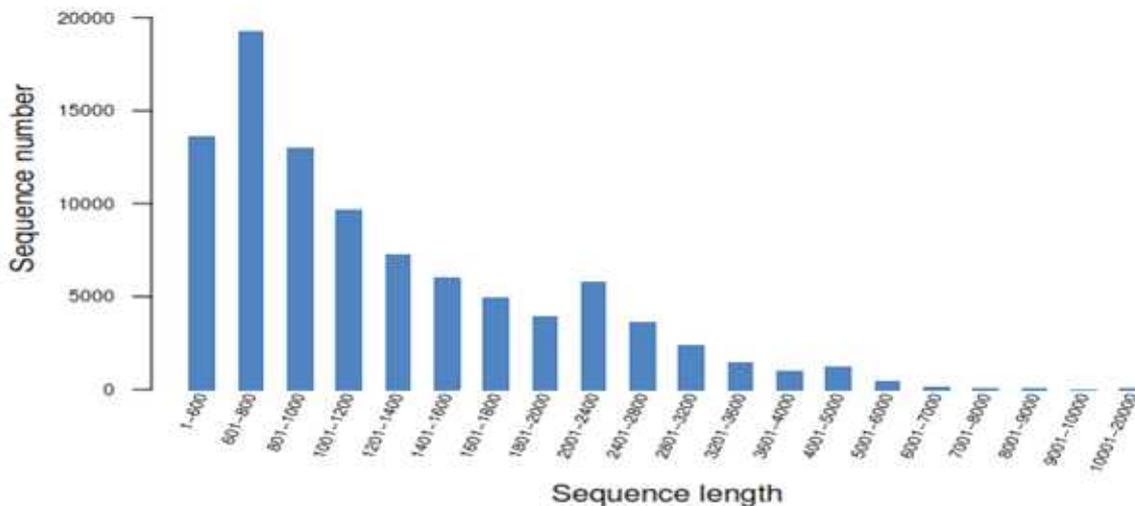


그림 135. RNA 시퀀싱을 통해 얻어진 read들의 길이에 따른 분포

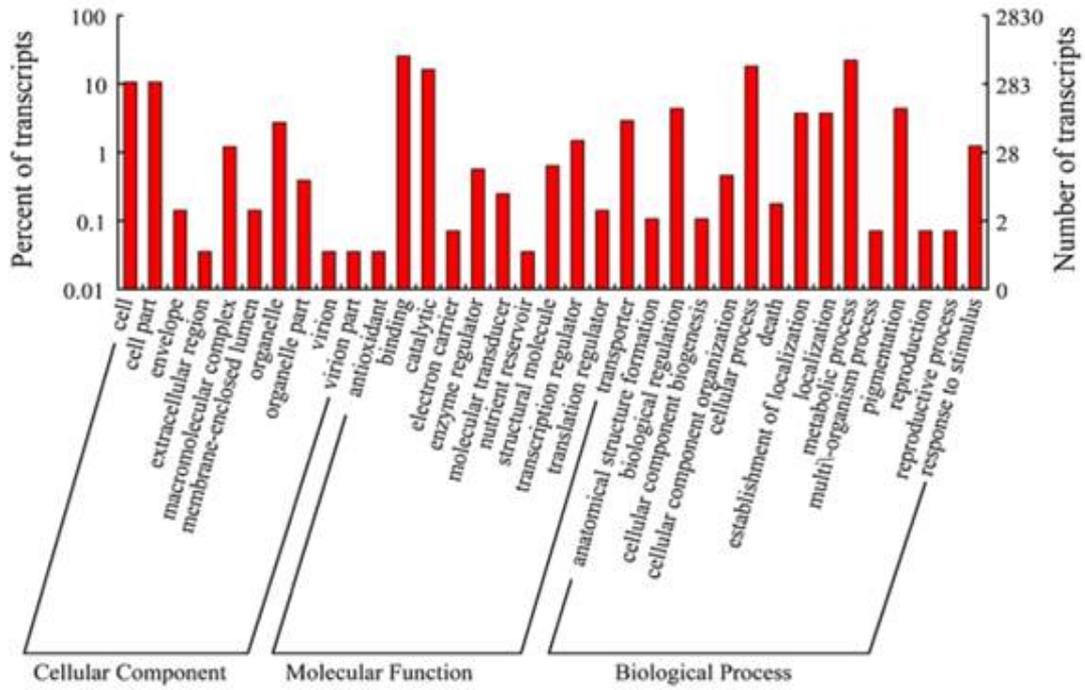


그림 136. Gene ontology(GO) 분석을 통한 *Allium cepa*의 전사체 분석 (지상부 발달 관련 유전자들을 cellular component, molecular functions, biological process로 구분)

40. 갯무 유래 새로운 CMS 소재 탐색

가. 연구요약

현재 배추과 작물을 육종하는 데 있어서 자가 수정(self-fertilization) 문제 해결 및 품종보호를 위해서는 CMS(cytoplasmic-male-sterile) 시스템을 이용하는 것이 유리하다. 최근 민간 종묘회사에서 많이 사용하고 있는 Ogura CMS는 특허권 문제로 인하여 육종에 직접 이용하기에는 상당한 부담이 되고 있다. 따라서 본 연구는 기존에 알려져 있던 Ogura CMS와 다른 유형을 나타내는 혹은 대체 가능한 CMS를 발굴한 후 육종에 적용하는 것을 연구목표로 하였다.

국내에서 자생하는 갯무 239종의 유전자원을 농업유전자원센터로부터 분양받아 새로운 타입의 CMS 유형이 존재하는지를 확인하였다. 우선 옹성 가임 식물체를 특이적으로 검출할 수 있는 Atp6-1, Ogura CMS 식물체를 이용하여 orf138의 특이적 primer set을 제작하였다. 제작한 primer set을 이용해 gDNA PCR을 수행한 결과, 78종의 갯무는 Atp6-1에 특이적으로 증폭되었으며 137종은 orf138에서, 23종은 Atp6-1와 orf138의 모두에서 특이적으로 증폭되었다. 또한, 미토콘드리아 염색체 상에 존재하는 Ogura의 Unique region-I, -II, -II 특이적 영역에서 각각 primer set을 제작하여 Atp6-1에서만 증폭된 종(Normal), orf138에서만 증폭된 종(Ogura), Atp6-1와 orf138 모두에서 증폭된 종(Normal & Ogura)을 각각 8종씩 선발하여 gDNA PCR를 수행하였다. 그 결과 Unique region-I, -II primer를 이용한 PCR 결과에서 Normal은 예상과 동일하게 증폭 산물이 검출되지 않았다. 그러나 Unique region-III의 3종(Normal)에서 증폭 산물이 확인되었고, 본 실험의 CMS가 일반적인 Ogura CMS와는 서로 다른 유형일 수 있다는 결론을 얻을 수 있었다. 또한, Atp6 유전자 근처 영역에서 새로운 atp6-new primer set을 제작한 후 gDNA PCR을 수행한 결과 Normal에서는 모두 증폭되었으나 Ogura와 Normal & Ogura에서는 증폭되지 않는 것을 확인하였다. 이는 Atp6-new primer set 이 옹성가임 및 옹성불임을 구분하는 마커로써 이용 가능성을 확인하였다.

전반적인 미토콘드리아 유전체를 확인하기 위해 Normal(10번), Ogura (34번) 및 새로운 Ogura (160번)의 미토콘드리아 전체 염기서열을 확인하였다. Normal(10번)은 242,969 bp로 기존의 NCBI에 등록되어 있는 KJ716484.1(244,054 bp)보다 약 1,000 bp의 적은 단편을 가지고 있었고 Ogura (34번)은 258,460 bp로 기존에 NCBI에 등록되어 있는 AB694744.1(258,426 bp)보다 34 bp가 더 큰 단편을 가지고 있었다. 새로운 Ogura (160번)은 258,457 bp로 34번보다 3 bp 적은 크기로 assembly를 완성하였다. 완성한 3가지 미토콘드리아 유전체의 전반적인 차이를 비교하기 위해 Blast 프로그램으로 확인해 본 결과, 10번, 34번 및 160번의 유전자는 각각 72, 78 및 78개의 엑손 영역을 가지고 있었다. 새로운 Ogura (160번)의 염기서열은 기존에 알려져 있는 갯무 Ogura CMS의 염기서열과 비교하였을 때 6개의 변이 영역이 존재하였으며, 변이영역을 이용하여 SNP마커를 개발할 수 있었다. 그리고 6개의 SNP는 nad1-trnUGA 및 trnUGG-trnCAA 영역에 집중적으로 분포되어 있었다. Normal(10번), Ogura(34번) 및 새로운 Ogura (160번)의 엽록체 전체 길이는 각각 153,370 bp, 153,444 bp 및 153,445 bp로 NCBI에 등록되어 있는 KJ716483.1(153,368 bp)와 비교하여 염기서열간의 차이를 확인하였다. 엽록체 염기서열 역시 34번과 160번은 매

우 유사하게 나타났는데, 10번과는 매우 다른 염기서열이라는 것을 확인하였다.

갯무 3종의 미토콘드리아와 엽록체 전체 유전체를 통해서, 차후 갯무 미토콘드리아 및 엽록체 염기서열에서 변이가 있는 곳을 활용하여 분자마커를 작성할 것이며, SNP의 진위 여부를 확인하여 HRM system으로 구분마커를 제작할 예정이다.

나. 연구결과

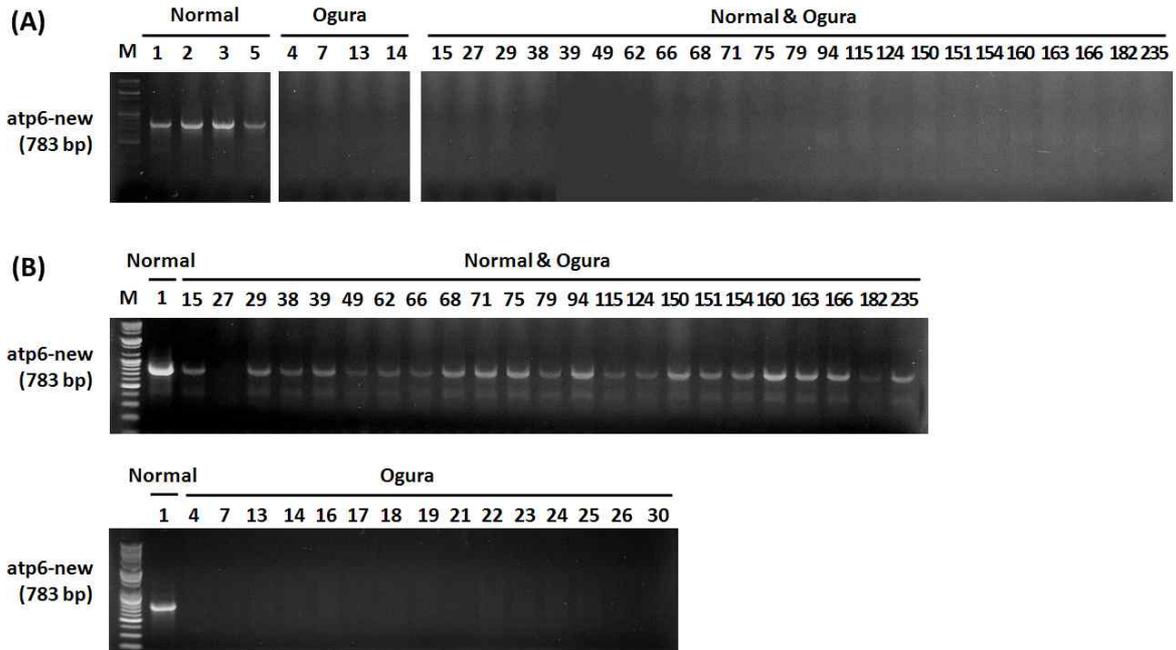


그림 137. atp6-new 프라이머 세트를 이용한 gDNA PCR 결과

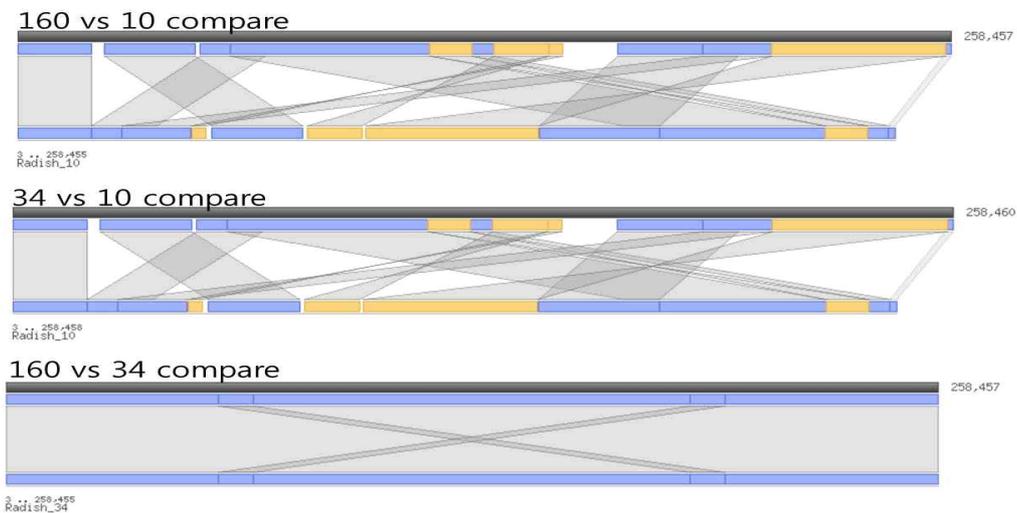


그림 138. Normal(10번), Ogura (34번) 및 새로운 Ogura (160번)의 미토콘드리아 전체 유전체 비교

41. 갓(*Brassica juncea*) 품종구분을 위한 ITS 영역 및 MITE Family 정보를 이용한 분자표지 개발

가. 연구 요약

갓(*Brassica juncea*; $2n = 4x = 36$, AABB genome, 1,068Mb)은 U's triangle의 배추와 흑겨자 사이의 복이배체 작물이다. 본 연구는 갓 15 품종의 ribosomal DNA ITS 영역과 MITE를 이용하여 갓의 유연관계 및 품종구분 분자표지를 확인하였다. Ribosomal DNA ITS 영역은 종 및 품종의 유연관계를 알아보는 연구로 많이 사용되고 있어서, 이를 이용하여 갓 15 품종의 유연관계를 알아보았다. 또한, MITE는 매우 많은 copy 수를 가지고 있고, 유전적으로 안정적이기 때문에 유전체 및 진화연구에 매우 적합한 재료이다.

MITE를 이용한 갓의 품종구분 분자표지를 확인하기 위해 MITE super-families 중 *Stowaway(BraSto)* 관련 70점, *Tourist(BraTo)* 관련 79점, *hAT(BrahAT)* 관련 6점, *Mutator(BraMu)* 관련 5점을 이용하여 품종구분 표지를 알아보았다. 총 160점의 분자표지 중 32점이 갓 15 품종에서 뚜렷한 다형성을 보였다. 특히, 흑갓은 표현형뿐만 아니라 유전자형도 매우 다르게 나타났다. 또한 8점의 MITE 분자표지를 활용하여 47점의 유전자원에서 다형성 및 품종구분 표지로서의 활용 가능성을 확인하였다. 이러한 다형성 표지들은 갓의 품종구분 및 품종 보호에 매우 유용하게 사용할 수 있을 것이라 기대한다.

나. 연구 결과

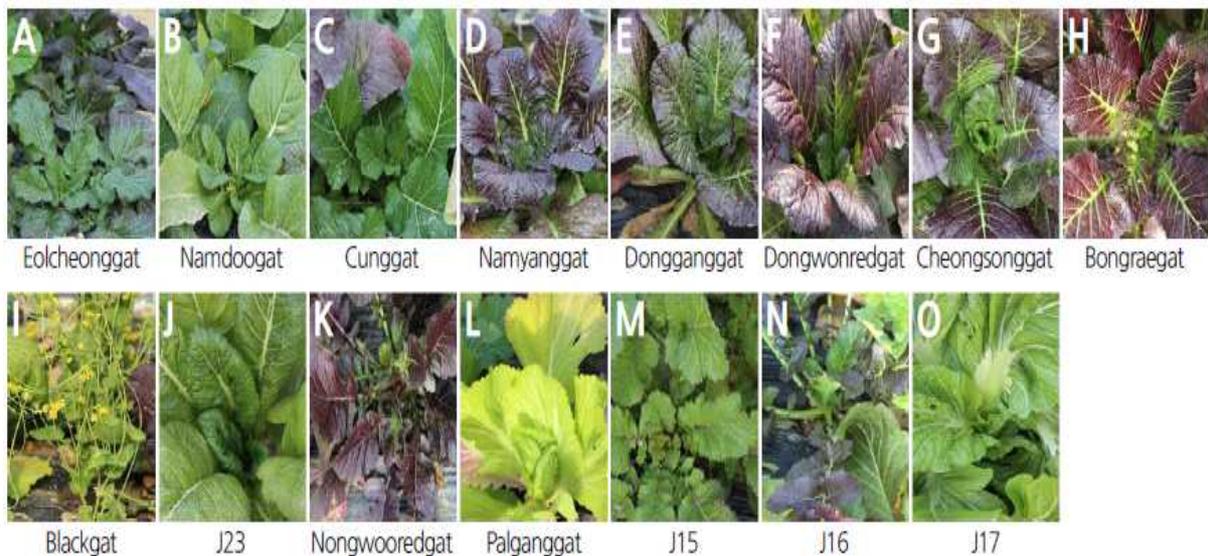


그림 140. 선발된 *B. juncea* 품종의 표현형

(A)얼청갓 (B)남도갓 (C)청갓 (D)남양갓 (E)동강갓 (F)동원적갓 (G)청송갓 (H)봉래갓 (I)흑갓 (J)23 (K)농우적갓 (L)팔강갓 (M)J15 (N)J16 (O)J17

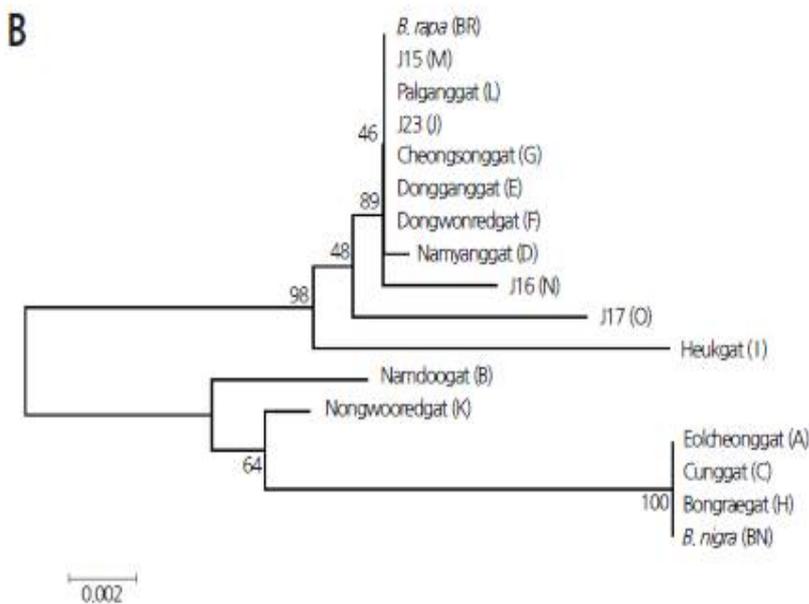
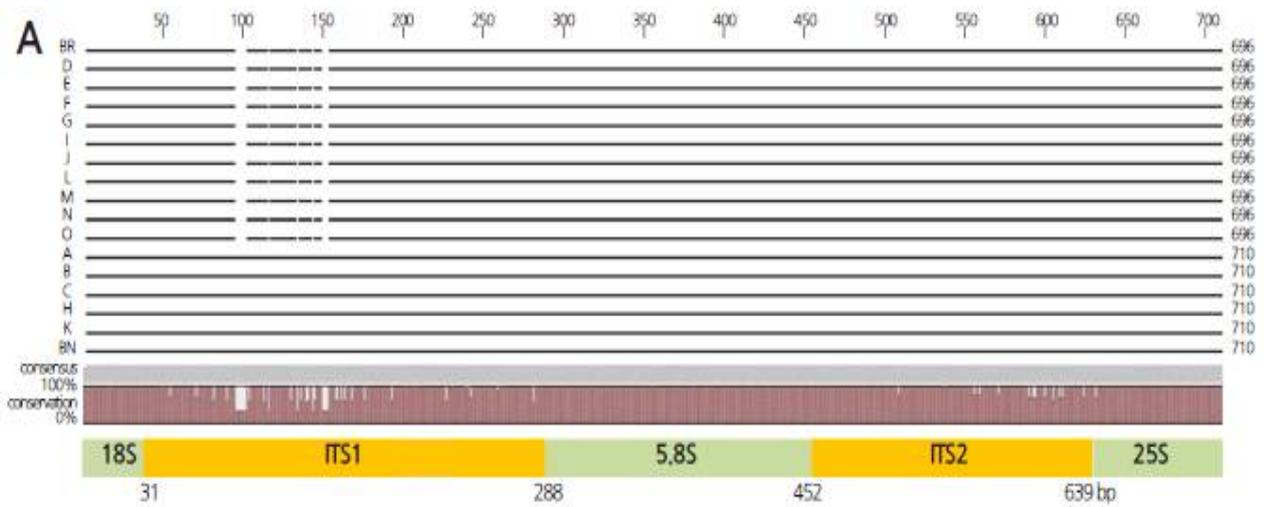


그림 141. *B. rapa*, *B. nigra*의 sequence와 선발된 15품종에 대한 ITS영역의 변이에 기초된 분류 (A) ITS sequence는 *B. rapa* (JN564039.1) 및 *B. nigra* (AF128102.1)의 공통시퀀스에 대하여 비교분석, (B) ITS영역의 염기서열을 이용한 갓 15품종 및 유전자원에 대한 계통도

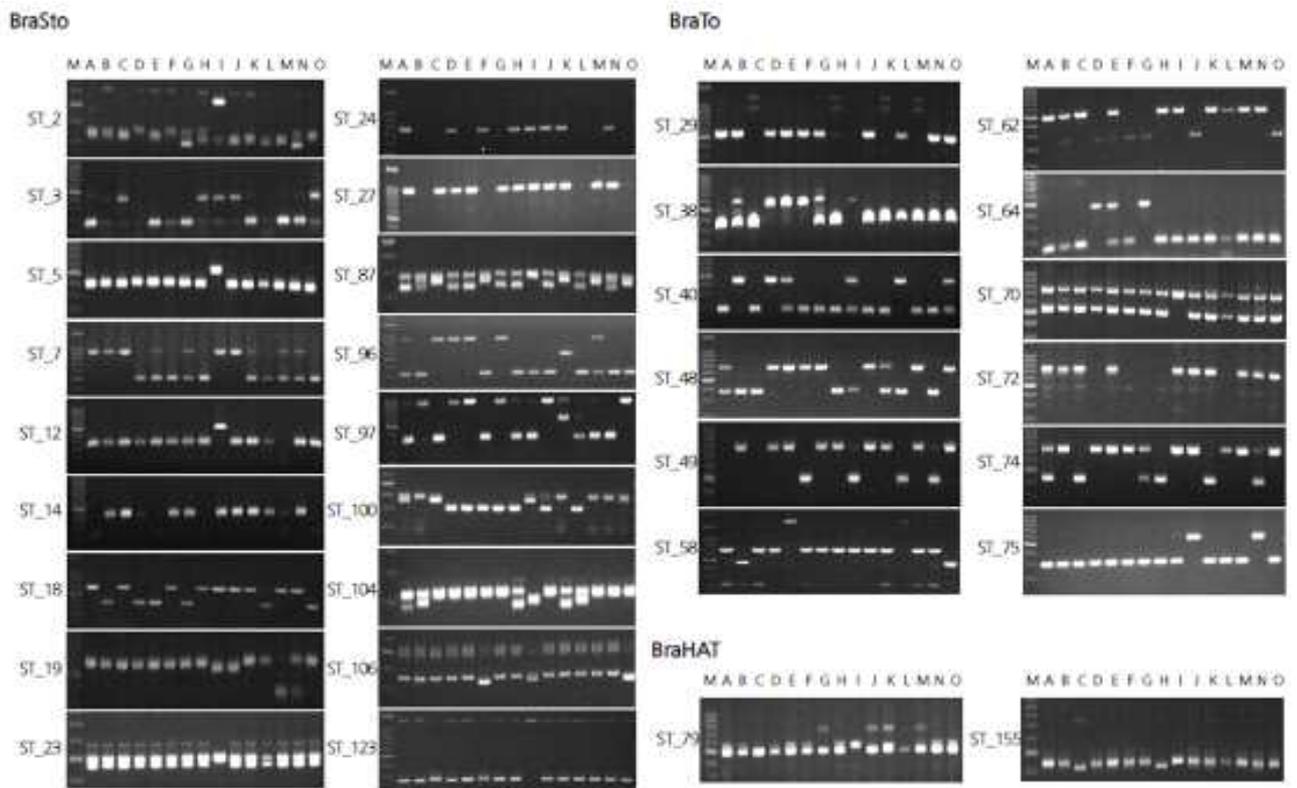


그림 142. 다형성은 MITE마커를 이용하여 갯 15 품종 및 유전자원에 대한 분석
 갯 15품종 및 유전자원에 대해 160개의 마커들 중에, 32개마커에서 다형성밴드가 증폭됨

표 26. *B. rapa* 및 *B. oleracea*집단을 바탕으로 분류한 MITE마커

MITE families	Sub-families	Total number of markers	Marker origin	
			<i>B. rapa</i>	<i>B. oleracea</i>
BraSto	BraSto-2	58	22(8)	36(6)
	BraSto-3	2	1(1)	1(0)
	BraSto-4	10	4(2)	6(1)
<hr/>				
MITE families	Sub-families	Total number of markers	Marker origin	
			<i>B. rapa</i>	<i>B. oleracea</i>
BraTo	BraTo-1	15	7(1)	8(0)
	BraTo-2	8	5(1)	3(0)
	BraTo-3	5	3(1)	2(0)
	BraTo-4	7	5(0)	2(0)
	BraTo-5	6	6(2)	
	BraTo-6	6	5(1)	1(0)
	BraTo-7	6	3(0)	3(0)
BraTo	BraTo-8	2		2(0)
	BraTo-9	10	9(5)	1(0)
	BraTo-10	5	3(1)	2(0)
	BraTo-11	1	1(1)	
	BraTo-12	3	1(1)	2(0)
	BraTo-13	5	1(0)	4(0)
BraHAT	BraHAT-1	4	2(0)	2(1)
	BraHAT-2	2	1(1)	1(0)
BraMu	BraMu-1	5	1(0)	4(0)
Total		160	80(24)	80(8)

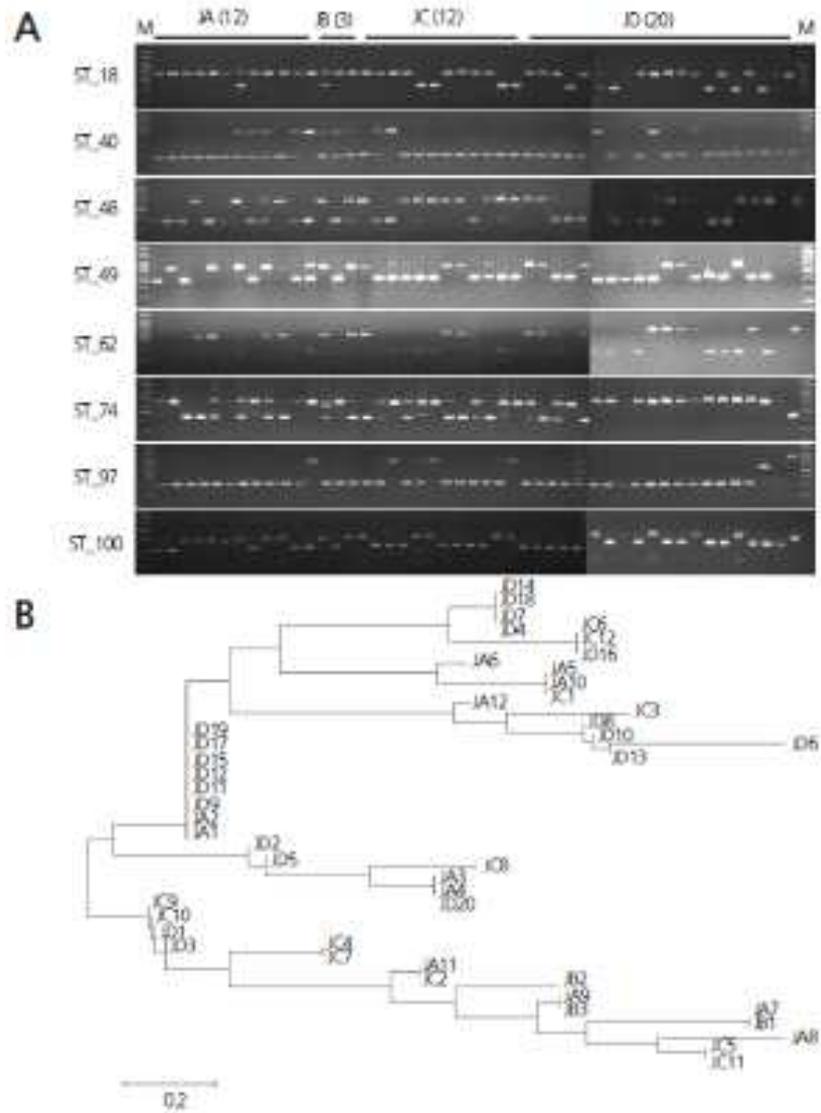


그림 143. MITE마커를 이용한 다형성 분석 및 계통도

(A) 선발된 MITE 마커들은 47개 유전자원에 대해 다형성을 나타냄 (B) 8개의 MITE마커를 이용한 계통도

42. 생물다양성 보존을 위한 DNA 바코딩의 실용성

가. 연구요약

DNA 바코딩은 형태학적인 단서 없이 종을 신속하게 동정할 수 있는 기술이다. 이 방법은 종의 범위를 정하거나 찾기 위해서 tag로써 작게 표준화된 DNA 단편들을 사용한다. 식물에서는 미토콘드리아 genome이 그 다양성과 복잡함 때문에 동물에서보다 매우 느리게 발전해 왔다. 일반적으로 최고의 식물 DNA 바코딩 영역을 포함하는 후보 마커들을 사용하는데 있어 일치점을 찾지는 못했지만, *rbcL*, *matK*, *psbA-trnH* 및 *ITS*와 같은 DNA 바코드들이 식물계에 계속 제시되어 왔었다. 그리고 최근에는 *trnE-trnT*, *trnT-psbD*, *ndhF-rpl32* 및 *rpl14-rpl16*와 같은 chloroplast intergenic spacer(IGS)가 재배종을 구분하는데 사용되고 있다. ITS2 영역은 *psbA-trnH*의 뒤를 이어 더 나은 중간 다양성을 보여줬다. ITS2 영역을 이끌어내는 몇 가지 분석들은 식물계의 모든 종들을 구별할 수 있다. 본 리뷰에서는 DNA 바코딩의 현재의 견해와 전망을 알아보았다.

rbcL, *matK*, *rpoCl*, *atpB*, *psbA-trnH*(intergenic spacer) 및 *nrITS* (internal transcribed spacer)와 같은 엽록체 genome으로부터 나온 DNA 바코드 후보들은 협죽도과(*Apocynaceae*)의 식물계를 통해서 평가해 왔다. 이러한 연구를 통해서 nrITS 영역이 다른 영역 보다 더 나은 바코드 후보임을 확인하였다. 특히 다른 후보들이 단지 1 % 다양성을 보인데 반하여, ITS2 영역은 *psbA-trnH* 영역의 뒤를 이어 4 %의 중간 다양성을 보였다.

매개변수(parameter)는 각각 속(genus)과 종(species) 내에 이종 간(inter-specific divergence)과 종간의 분류(intra-specific divergence)를 특징짓는데 사용된다. 이러한 동정(Identification)의 효율성은 BLAST1 method와 종 수준에서의 Distance method, 이 2가지 방법을 통해서 확인이 가능하다. ITS는 *C. auriculatum isolate*의 바깥그룹을 나타내는 minimum evolution method를 사용하여 *Cynanchum*의 17 종을 명확하게 구별하였다. 현재의 연구는 ITS2가 협죽도과(*Apocynaceae*)의 식물 종을 구분하는데 사용할 수 있다고 결론을 내렸다. 그러나 좀 더 많은 협죽도과(*Apocynaceae*) 종들에 대한 스크리닝이 필요하다. 두 번째로 제시된 *rbcL*, *matK*, *psbA-trnH* 및 *ITS2*와 같은 DNA 바코드들은 생강과(*Zingiberaceae*)의 식물 종들에 대하여 평가가 이루어졌는데, ITS2 영역이 *psbA-trnH*(0.8%)의 뒤를 이어 4%의 중간 다양성을 보였다. 이러한 분석은 ITS2 영역이 생강과(*Zingiberaceae*)의 모든 시험한 종들을 구별할 수 있다는 것을 보여준다. 생강과(*Zingiberaceae*)는 식물계에서 가장 큰 family 중 하나이기 때문에, DNA 바코드에 대한 평가는 위 결과들을 입증하기 위해 수많은 속(genus)에 포함되는 많은 수의 종(species)들에 대해서 실시되어야만 한다. BLAST와 Distance와 같은 동정(Identification) 방법들은 9개의 큰 속(genera)에 대하여 ITS2 유전자를 사용했는데, 생강과(*Zingiberaceae*)의 종들에 적용하였다.

또한, 제시한 바코드 후보들을 *Boerhavia*(*B. repanda*, *B. erecta* and *B. verticillata*)의 다른 종들로부터 *B. diffusa* 까지 의약적으로 중요한 종들을 구별하고 입증하는데 적용하였다. 이 사례에서, ITS는 다른 3가지 종들로부터 *B. diffusa*를 구별할 수 있었다. 따라서 이 연구에서는 DNA 바코딩이 약용식물을 구별하고 입증하는데 사용할 수 있다는 것을 명확하게 입증했다. 결론적으로, 여기서 제시한 정보들은 새로운 종들을 발견하

는데도 유용할 뿐만 아니라 식물 계통(lineage)의 수집한 종들을 보증하는데도 활용이 가능할 것이다.

나. 연구결과

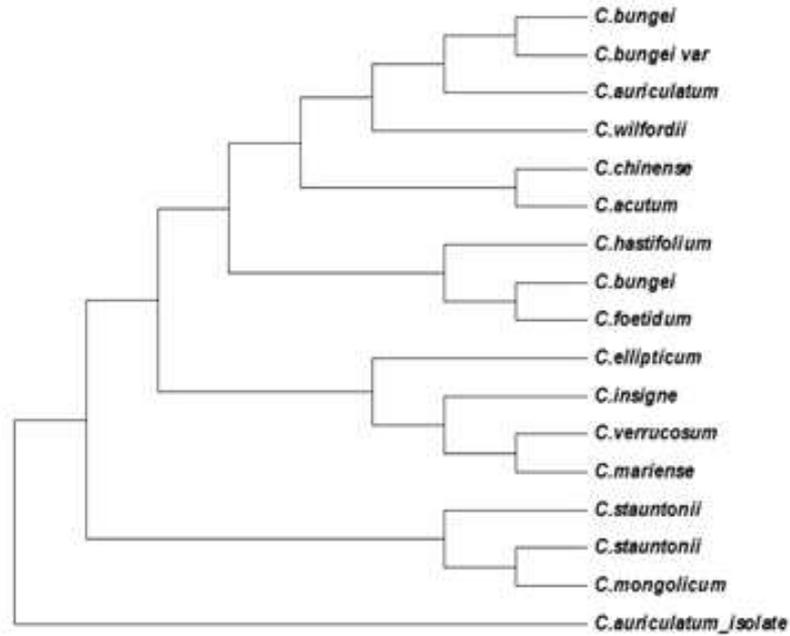


그림 144. ITS 유전자를 이용한 *Cyanchum*의 17종에 대한 MEM 계통도

표 27. 생강과(*Zingiberaceae*)에 대한 4개의 loci를 이용한 중간 다양성 분석

	Marker			
	psbA-trnH	ITS2	matK	rbcL
All inter-specific distance	0.037 ± 0.112	0.143 ± 0.431	0.0157 ± 0.0308	0.0110 ± 0.0202
Theta prime	0.019 ± 0.049	0.122 ± 0.146	0.0175 ± 0.0212	0.0018 ± 0.0116
Minimum inter-specific distance	0.013 ± 0.085	0.090 ± 0.208	0.003 ± 0.0260	0.0055 ± 0.0183
All intra-specific distance	0.012 ± 0.0812	0.088 ± 0.180	0.0164 ± 0.079	0.0029 ± 0.0057
Theta prime	0.009 ± 0.273	0.023 ± 0.098	0.010 ± 0.0352	0.002 ± 0.0037
Coalescent depth	0.081 ± 0.202	0.078 ± 1.876	0.044 ± 0.799	0.001 ± 0.0373

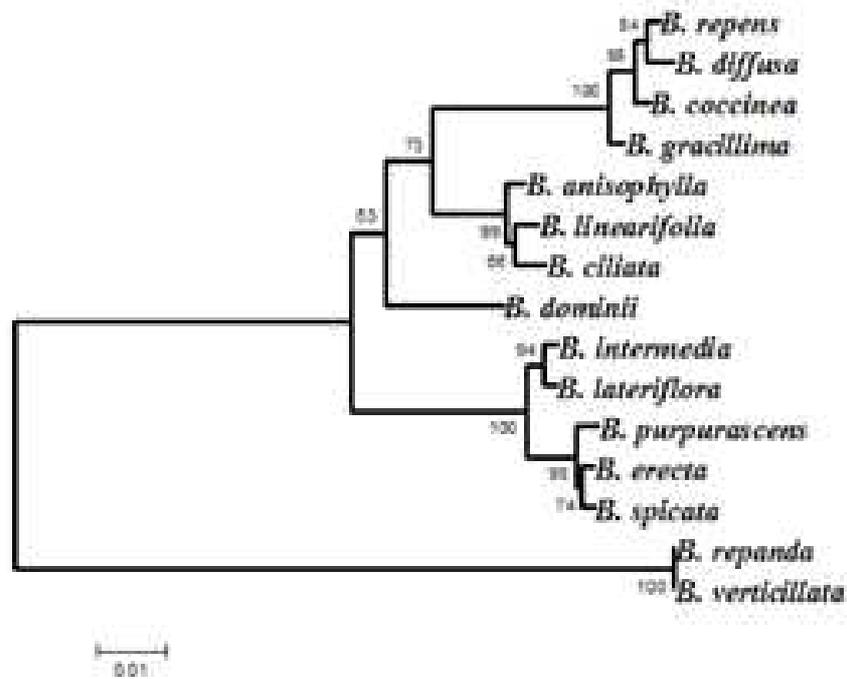


그림 145. ITS 유전자를 이용한 *Boerhavia*의 15종에 대한 MEM 계통도.

표 28. ITS 유전자를 이용한 생강과(*Zingiberaceae*) 9속의 동정에 대한 효율성

Genus	Length(bp)	Number of species	% of Variation	Method	% Success Identification
<i>Afromum</i>	605	53	0.3	BLAST1	89.0
				Distance	92.2
<i>Boesenbergia</i>	577	3	0.09	BLAST1	93.0
				Distance	89.6
<i>Curcuma</i>	602	9	0.09	BLAST1	93.0
				Distance	89.6
<i>Globba</i>	572	2	0.06	BLAST1	90.0
				Distance	97.6
<i>Haniffa</i>	575	2	0.0	BLAST1	100.0
				Distance	100.0
<i>Hedychium</i>	572	4	0.03	BLAST1	98.0
				Distance	97.0
<i>Kaempferia</i>	689	3	0.1	BLAST1	89.0
				Distance	93.3
<i>Roscoea</i>	569	5	0.04	BLAST1	95.0
				Distance	98.8
<i>Zingiber</i>	450	21	0.21	BLAST1	81.2
				Distance	88.3

43. Brassica류 작물의 DNA barcoding

가. 연구요약

DNA 바코딩 기술은 생물다양성, 종의 동정, 아직까지 밝혀지지 않는 영역에 대한 분류학적 연구에 매우 유용한 방법이다. 엽록체 유전자인 *rbcL*은 식물 바코딩에 있어서 중심적인 locus에서 발견되는 유전자로 *ITS*의 영역이 가지는 다양한 변수의 종간의 적용범위에 대해서 몇몇 결점을 가지고 있다. 예를 들어, 대부분의 분류군들은 종 내에서 0.79에서 13.89 %의 부정확한 동정이 이루어지고 있다. 엽록체 *trnL(UAA)* 인트론 부위는 종 동정에 있어서 잠재적인 후보인데, 마찬가지로 색소체 유전자인 *maturaseK(matK)*는 외떡잎식물에 속하는 잔디계열의 Poaceae, Joinvillaceae, Cyperaceae, 및 Smilacaceae의 진화론적 분류체계에 있어서 잠재적인 locus로서 평가 받고 있다. *matK* 유전자는 생강 계열인 Zingiberaceae family에 속하는 Thai *Boesenbergia* 계통학적인 분류와 유전적인 다양성에 대한 분자표지로서 사용되었다. *matK*와 *trnK*는 후추목(Piperales)에 속하는 식물의 분류에도 사용되었으며, 엽록체의 *psbA-trnH* intergenic spacer(IGS) 영역은 소철류(cycadales)와 같은 겉씨식물의 종 분류에도 사용되었다.

전반적으로, 색소체 유전자의 암호화된 영역(*rpoB*, *rpoC1*, *rbcL*, *matK*, and 23SrDNA)과 암호화되지 않은 영역(*trnH-psbA*, *atpF-atpH* and *psbK-psbI*)에 대한 식물종간의 다방면에 걸친 multilocus 바코딩 연구를 진행할 예정이다. *atpB*, *rpoC1*, *rbcL*, *matK*, *psbA-trnH*, *ITS* and *ITS2*와 같은 DNA 영역은 식물의 DNA 바코딩에 있어서 주요한 분류 시스템이다. 이들 영역을 통해 배추속의 작물을 동정하고 분류하는 종 체계를 확립하고자 주요 바코딩 유전자들인 *ITS*, *ITS 2*, *MATK*, 및 *RBCL*에 대한 계통분석을 실시하여 배추 속에 이용한 가능한 유전자를 선별작업을 진행할 예정이다.

나. 연구결과

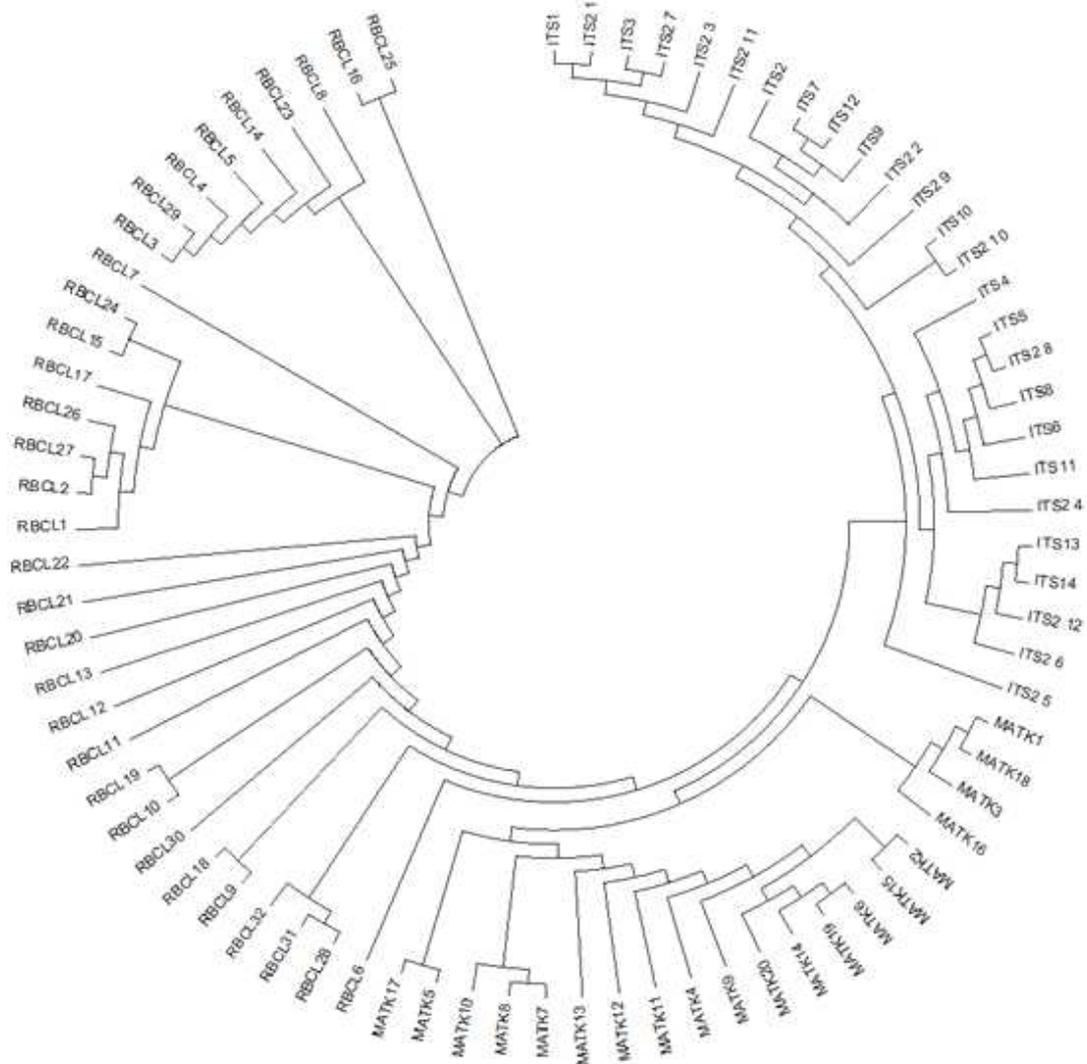


그림 146 주요 바코드 유전자인 *ITS*, *ITS 2*, *MATK*, 및 *RBCL* 에 대한 계통 분석 결과

106개의 배추속 잎 소재를 수집하여, gDNA를 추출하고 주요 바코드 유전자로 확인된 *atpB*, *rpoCl*, *rbcL*, *matK*, *psbA-trnH*, *ITS* and *ITS2* 관련 17개의 프라이머 셋을 이용하여 배추속 식물들의 종간 특이적인 염기 서열의 다양성을 확인하고자 한다.

44. 벼 Brassinosteroid Insensitive 1 Receptor Kinase의 기능에 관한 연구

가. 연구 요약

본 연구에서는 벼(*Oryza sativa*)의 BRI1 유전자를 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 BR 수용체 돌연변이체인 *bri1-5*에 형질전환 시킨 식물을 이용하여 표현형 및 BR에 대한 반응을 관찰하였다. OsBRI1 수용체 kinase를 post-translational modification 수준에서 수용체 kinase의 활성화 및 특이성을 규명함과 동시에 단자엽과 쌍자엽 식물에 존재하는 BR 수용체 단백질의 비교 분석을 활용한 기능탐색, 그리고 단백질 engineering 측면에서 기초 연구 자료를 확보하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

Flag-AtBRI1는 *in vitro*와 *in vivo*에서 Threonine 뿐만 아니라 Tyrosine 인산화가 강하게 일어난다는 연구 결과가 보고되었다. 본 연구의 *in vitro*와 *in vivo* 결과, Flag-OsBRI1 단백질의 Tyrosine 인산화는 일어나지 않고 Ser/Thr 인산화 반응만 감지되었다. 그렇기 때문에 이들 BR 수용체 단백질들의 kinase 활성화와 특이성 그리고 *in vivo*에서의 식물의 생장을 포함한 biotic/abiotic stresses 등 식물 생리적인 차이가 존재할 것으로 사료된다. OsBRI1를 애기장대의 BR insensitive 돌연 변이체인 *bri1-5* 돌연변이 식물체로 형질전환 시킨 결과, 모든 형질전환 식물체들은 정상 식물체로 회복되었다. 또한 pBES1 (인산화 BES1)과 BES1 (탈인산화 BES1) 단백질은 신호전달측면에서 활동적인 BES1 단백질이 현저히 증가하는 것으로 보아 OsBRI1 단백질에 의해 정상적인 BR 호르몬 신호전달이 일어나고 있음을 시사한다. 또한 애기장대와 벼 BRI1 단백질의 부분별 유사성 비교 결과, extracellular domain에 비하여 kinase domain에서 매우 높은 유사성을 보였다. 하지만 애기장대의 BRI1은 dual-specificity kinase 활성을 보인 반면에 벼 BRI1 단백질은 tyrosine 인산화는 일어나지 않은 것으로 보아 일부 아미노산 유사상의 차이가 kinase 활성화에 매우 결정적인 역할을 한다는 것을 시사한다. 아미노산 alignment를 기초한 계통수 분석 결과, 애기장대와 배추, 양배추, 그리고 유채와 한 그룹으로 구분되며, 단자엽 식물인 벼, 옥수수는 쌍자엽 식물과 구분되어 새로운 그룹을 형성한다. OsBRI1은 *Brachypodium* BRI1과 가장 근접한 유연 관계를 보이는데 애기장대 BRI1과 배추 및 양배추 BRI1의 단백질 분석 결과 이들 단백질들의 인산화는 dual-specificity kinase 활성을 보인다(data not shown). 이와 같은 연구 결과 등을 종합하여 쌍자엽과 단자엽 식물체의 BRI1 단백질의 활성화 등에 특이적으로 중요한 아미노산등을 비교 분석 한 후 단백질 공학 측면에서 응용 가능하게 함으로서 궁극적으로 작물 개량에 기여할 수 있을 것이다.

나. 연구 결과

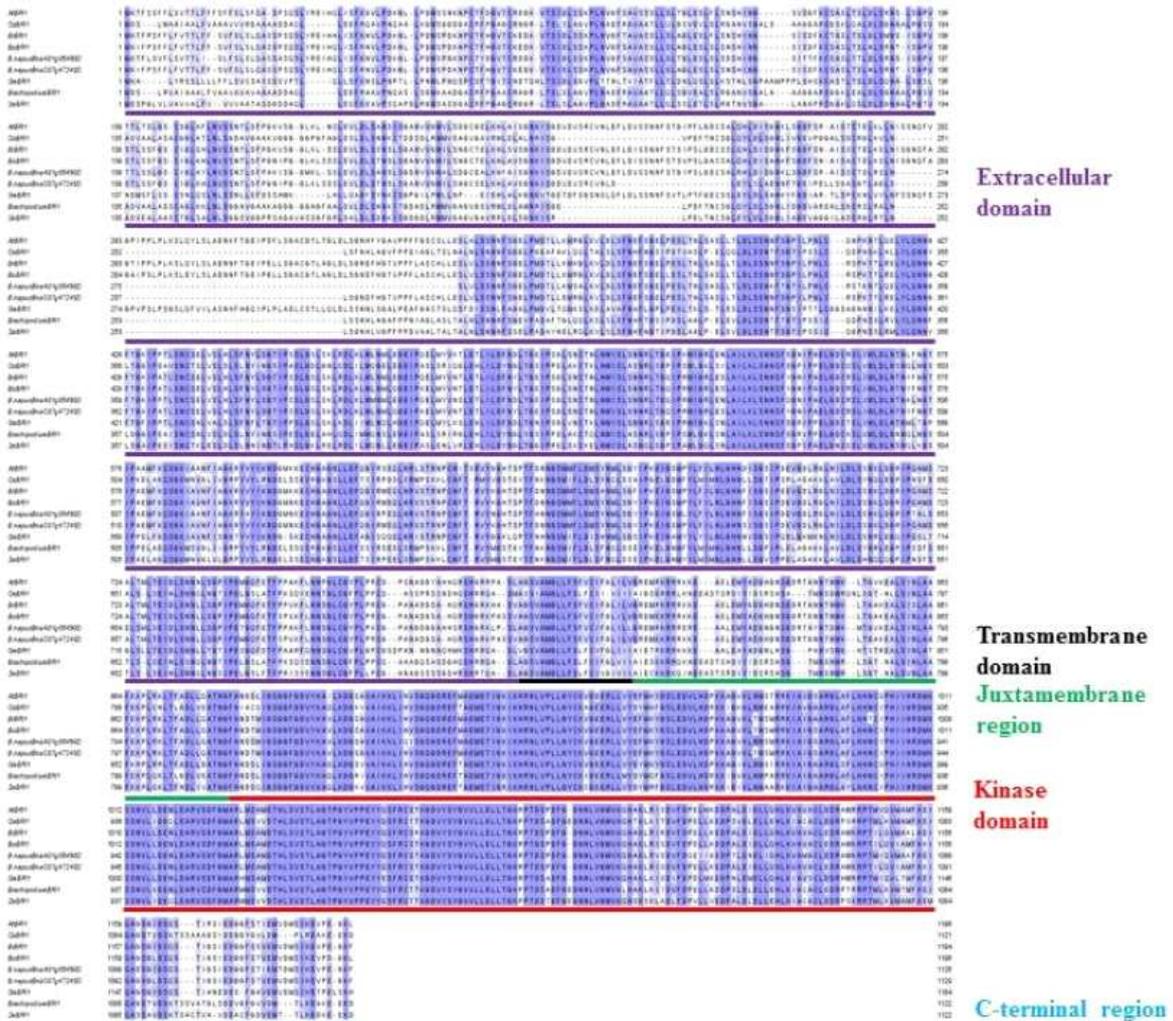


그림 147. BRI1 단백질의 아미노산 서열 정렬, 다양한 종으로부터에서 BRI1에서 추론된 OsBRI1 단백질의 다중정렬

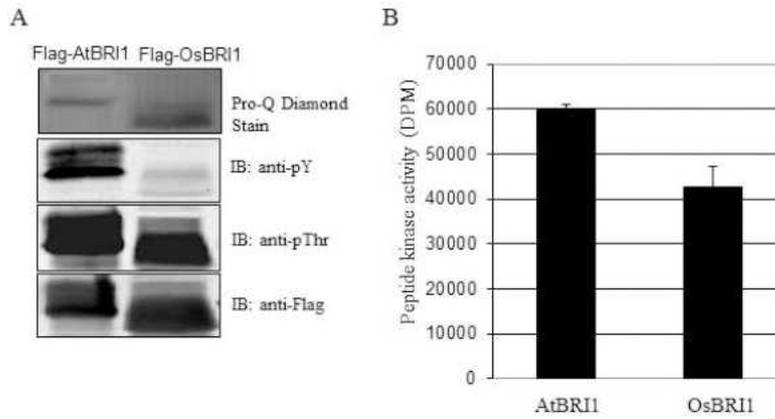


그림 148. Flag-AtBRI1 과 Flag-OsBRI1 는 시험관 내에서 트레오닌 및/ 또는 티로신 잔기에서 인산화과정

(A)일반 항체의 다양성을 이용하여, 인도의 다른 단계에서 수확된 세포로부터 정제된 Flag-BRI1 단백질의 면역 블롯 분석. ProQ 다이아몬드 인단백질 염색법으로 염색하면 모든 세린, 트레오닌 및 티로신 잔기에서 인산화를 보고했다. (B)BRI1 펩티드 키나아제 활성은 16 시간 유도로 정제 하였다. SP11 펩티드를 사용하고, 반응 혼합물을 실온에서 20 분 동안 배양 하였다.

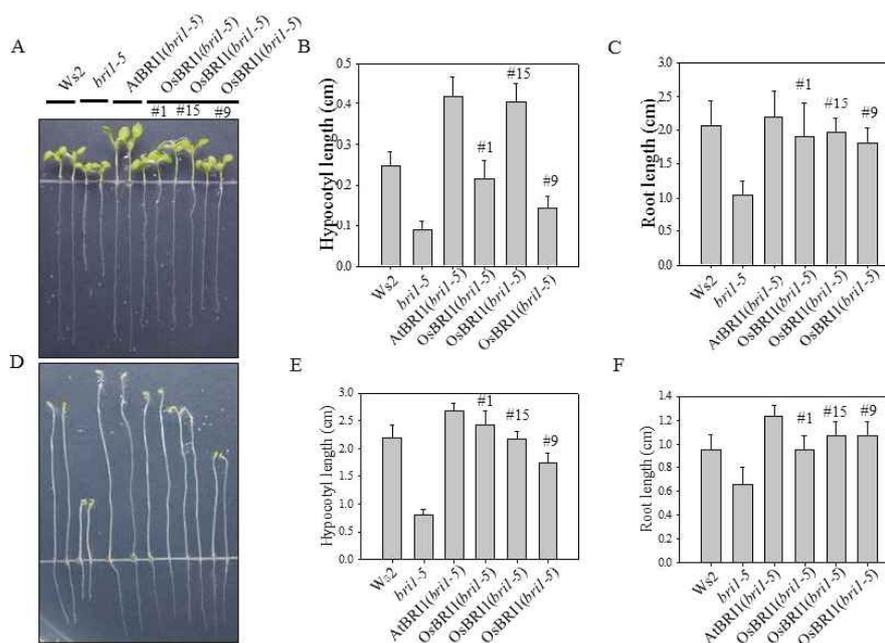


그림 149. WS2, *bri1-5*, AtBRI1와 3개의 독립적인 OsBRI1 형질전환 식물체(T3)에 대한 명(A)암(D) 조건에서 증식 7일 후에 배측과 뿌리 신장 조사 및 OsBRI1 유전자에 대한 발현분석 명조건(B와C), 암조건(E와F)

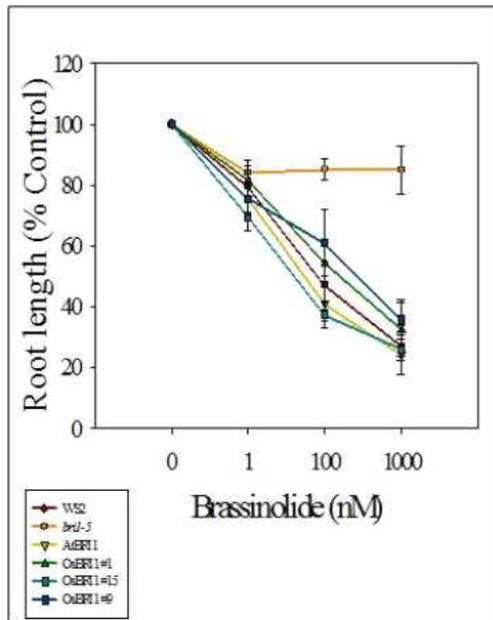


그림 150. 브라시놀라이드 처리와 뿌리 성장 억제 분석을 통한 BR 신호의 분석

7 일동안의 빛에서 성장중인 식물체의 뿌리 성장 억제에 대한 브라시놀라이드의 반응분석 결과, WS2, AtBRI1 및 3 개의 독립적인 OsBRI1 유전자 변형식물체는 *bri1-5* 돌연변이 식물체에 비해 뿌리생장이 억제되었다.

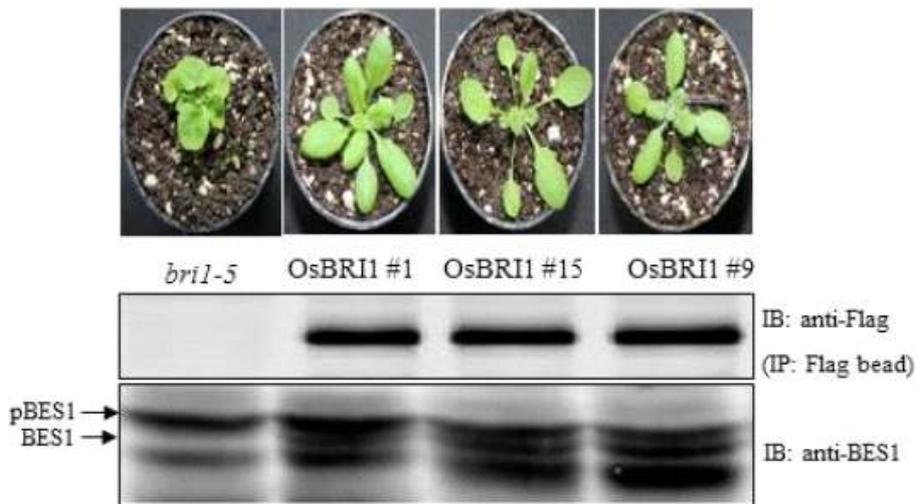


그림 151. OsBRI1 유전자에 의한 *bri1-5* 돌연변이 식물체 회복

3 개의 독립적인 OsBRI1 유전자 변형 식물체에서 OsBRI1-Flag 가 발현하였으며, 면역 블롯결과, anti-BES1 는 *bri1-5* 에 확인되지 않았지만 OsBRI1-Flag 를 발현하는 OsBRI1 돌연변이 식물체에서는 확인되었다.

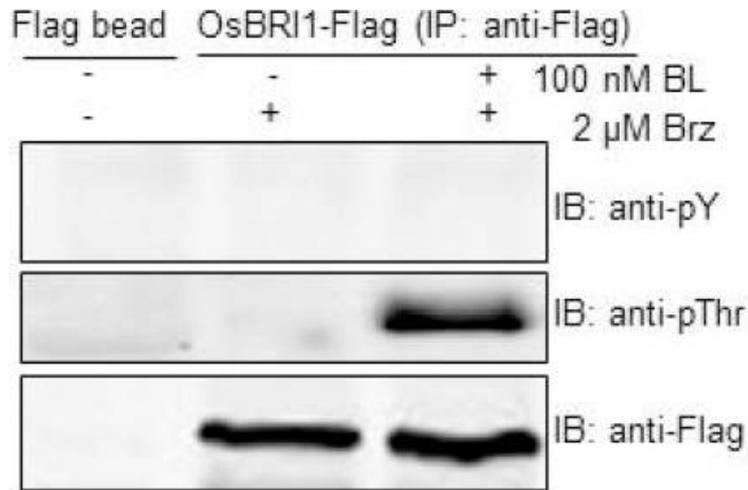


그림 152. BR 호르몬 신호전달 검증

OsBRI1 은 생체 내 트레오닌 잔기에서 인산화된다. 생체 내 트레오닌 잔기에 OsBRI1-Flag 인산화는 BL-의존하며, bri1-5 돌연변이 식물체에서 OsBRI1-Flag 를 발현하는 호모 접합성의 유전자 변형 식물은 BR 생합성 저해제 BRz 를 처리 한 후 100nM 의 BL 또는 용매로 11 일동안 하루에 90 분씩 처리했다. OsBRI1-Flag 단백질은 용해된 마이크로솜막과 면역블롯에 의해 나타난 것처럼 면역 침강되었다.

45. 배추, 양배추 식물 중에서 BAK1 유전자와 단백질 발현 클론 및 BAK1 truncation 클론 확보와 인산화 양상 분석

가. 연구 요약

Brassica로부터 mRNA를 분리하여 cDNA를 합성한 후 RT-PCR 기법을 활용하여 애기장대(245개의 LRR-RLKs), 양배추 (80개의 LRR-RLKs), 배추 (17개의 LRR-RLKs)의 유전 정보를 수집하여, 세포막 수용체 kinases (LRR-RLKs)의 클론 확보하였다. 또한, 전체 클론을 확보 후에 모든 클론들의 염기 서열을 분석하여 정확한 유전 정보 임을 확인하였다. 이들 전장의 클론들은 extracellular domain, transmembrane domain, cytoplasmic domain으로 구분할 수 있으며, 대장균에서 재조합 단백질을 발현한 후 분리하여 생화학적 특징을 규명하기 위하여 cytoplasmic domain 만을 다시 단백질 발현 벡터에 클로닝 후 BL21(DE3) 세포에 형질전환하여 인산화 양상 분석(autophosphorylation과 transphosphorylation)을 실시하였다. 확보한 LRR-RLK 클론들 중 벼와 애기장대의 BRI1의 pThr과 pTyr는 서로 다른 양상을 보였으며, 즉 AtBRI1은 Tyrosine residue(s)에서 인산화를 보인 반면에 OsBRI1에서는 Tyrosine 인산화가 전혀 감지되지 않았다. 확보한 70개의 LRR-RLK 클론들 중 55개의 클론들을 pFlag-Mac 단백질 발현 벡터에서 재조합 단백질들을 발현 시켜 kinases의 autophosphorylation과 transphosphorylation 양상을 인산화 특이 항체를 활용하여 분석한 결과를 그림 2에 나타내었다. 그림 2에서 보여주는 바와 같이 전체 55개 receptor kinases 중 pY(15 clones), pThr(16 clones), 그리고 pThr+pY (10 clones)에서 인산화가 일어났으며, 정상적인 단백질 발현은 42개의 클론에서 확인이 되었다. 이들 55개의 receptor kinases 중 특히 흥미로운 단백질은 양배추의 BoLRR67, BoBRL1, BoBAK1, BoLRR22이었고, 배추의 BrBAK1는 자가 인산화 뿐 아니라 transphosphorylation 측면에서 매우 흥미로운 단백질로 확인이 되었다.

따라서 본 연구 과제와 밀접하게 관련된 BoBAK1(양배추), 그리고 BrBAK1(배추)의 단백질 생화학적, 생리학적 연구에 집중함으로써 원예작물에서의 작물의 성장과 발달, 내병성 및 환경 스트레스 저항성과 관련한 innate immunity 그리고 programmed cell death 등의 신호전달 메커니즘에 대한 기능을 밝히고자 하였다.

나. 연구 결과

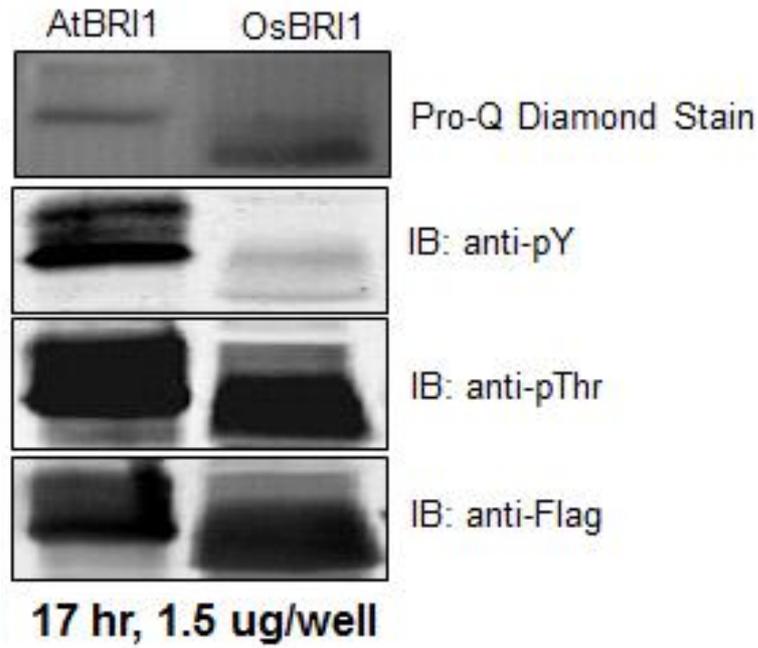


그림 153. 애기장대 BRI1과 OsBRI1의 인산화 양상 비교

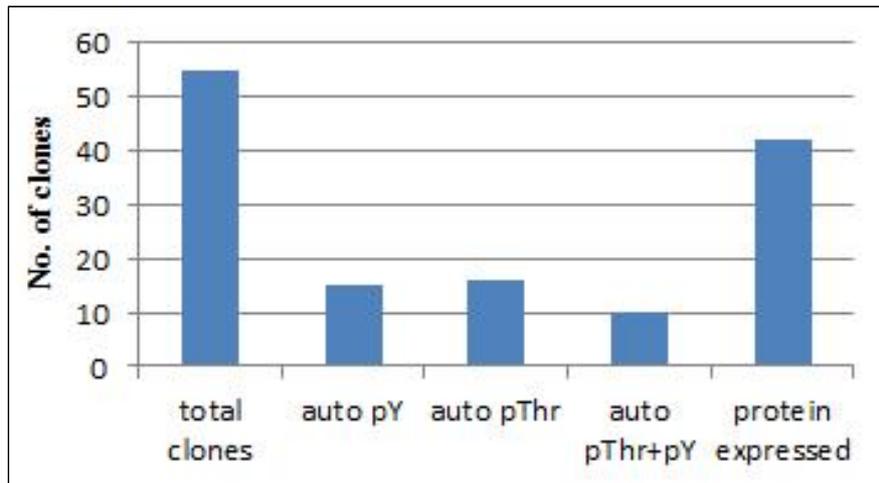


그림 154. 세포막 수용체의 autophosphorylation과 transphosphorylation 양상

46. *in vitro*에서 배추, 양배추 BAK1 수용체 키나제의 단백질 생화학적 분석

가. 연구 요약

애기장대와 양배추 간의 cytoplasmic domain의 많은 부분들이 동일한 서열임에도 carboxyl terminal 부위의 아미노산 서열은 큰 차이를 보였으며(-QNYNQPN TG-), 애기장대 BAK1뿐 아니라 BoBAK1(양배추), BrBAK1(배추)에서도 carboxyl terminal 부위에 PXXP domain이 서로 conserve 되어 있었다. 식물에서 이 domain에 대한 연구는 전무한 상태이며, 동물에서는 PXXP domain은 단백질-단백질 상호작용, 즉 SH3 domain를 포함하는 단백질들이 결합하는 부위로 보고되어 있다. 따라서 이에 대한 연구의 수행도 필요할 것으로 판단되었다. carboxyl terminal domain은 BoBAK1과 AtBAK1에서 모두 중요하며, 8, 17, 28 개의 아미노산을 deletion 하였을 때 *E.coli* 단백질들에 대한 transphosphorylation은 감소하고 있음을 확인 할 수 있었다. 또한 애기장대의 BAK1과의 아미노산 서열 비교를 활용하여 T255K로 돌연 변이 재조합 단백질에서는 transphosphorylation (pThr, pTyr)에 대한 kinase activity는 거의 사라지는 것을 확인하였으며, 따라서 BoBAK1의 T225 부위가 BoBAK1 kinase activity에 매우 중요한 부위일 것으로 판단되었다.

나. 연구 결과

		Cytoplasmic Domain
AtBAK1	I SFANTKL TPLPASPPPP I SPTPPSPAGSNR I TGA I AGGVAAGAALLFAVPA I ALA W WRR	251
BoBAK1	I SFANTKL TPLPASPPPPLSPTTPSPAGSNR I TGA I AGGVAAGAALLFAVPA I AL AL WRR	253
AtBAK1	KKPDHFFDVP AEEDPEVHLGQLKRFSLRELQVASDNFSNKN I LGRGGFGKVKYKGR LADG	311
BoBAK1	KT PE HFFDVP AEEDPEVHLGQLKRFSLRELQVASDNFSNKN I LGRGGFGKVKYKGR LADG	313
AtBAK1	TLVAVK R LKEERTOGGELQFQTEVEM I SMAVHRNLLRLRGFCMTP TERLLVYPYMAN GSV	371
BoBAK1	TLVAVK R LKEERTOGGELQFQTEVEM I SMAVHRNLLRLRGFCMTP TERLLVYPYMAN GSV	373
AtBAK1	ASCLRERPE SQPPLDWPQR I ALGSARGLAYLHDHCDPK I IHRD V KAA N I LLDE E FEAV	431
BoBAK1	ASCLRERPE SQPPLD W SKQR I ALGSARGLAYLHDHCDPK I IHRD V KAA N I LLDE D FEAV	433
AtBAK1	VGDFGLAKLMDYKD THVTT AVRGT I GHI APE YLST GK SS EKTDVFGYGVMLLEL I TGQRA	491
BoBAK1	VGDFGLAKLMDYKD THVTT AVRGT I GHI APE YLST GK SS EKTDVFGYGVMLLEL I TGQRA	493
AtBAK1	FDLARL ANDDV MLLDWVKGLLKEKKLEALVDV DLOGNY K DEEVEQL I QVALL CT QSSPM	551
BoBAK1	FDLARL ANDDV MLLDWVKGLLKEKKLEALVDV DLOGNY I DEEVEKL I QVALL CT QSSPM	553
AtBAK1	ERPKMSEVVRMLEGDGLAERWEEWQKEEMFRQDFNYPT HH PAVSGW I IGDST SQ IENE Y P	611
BoBAK1	ERPKMSEVVRMLEGDGLAERWEEWQKEEMFRQDFNY QNYNQPN TGML IGDST SH IENE Y P	613
AtBAK1	SGPR	615
BoBAK1	SGPR	617

그림 155. 애기장대와 양배추의 cytoplasmic domain 아미노산 서열 비교

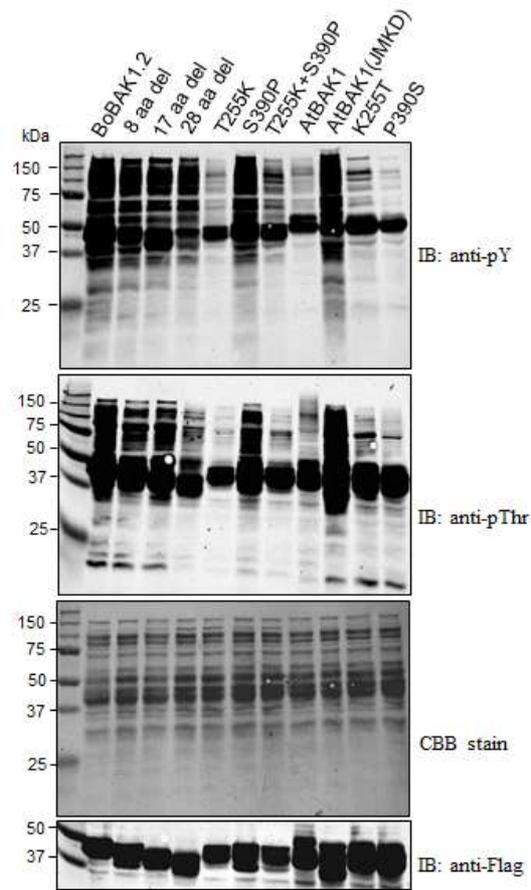


그림 156. BoBAK1에 대한 kinase activity 비교 분석

47. BAK1 kinase의 인산화 부위 판별과 BoBAK1의 auto-와 transphosphorylation 양상 분석

가. 연구 요약

인산화 부위의 판별과 관련해서 일반적인 생화학적 기법으로는 LC/MS/MS 접근법을 주로 활용하나 고가의 기기가 요구될 뿐 아니라 기기를 활용하는 전문가의 풍부한 경험을 통하여 시도할 수 있는 접근 방법으로, LC/MS/MS 방법으로 얻은 primary data를 기반으로 보다 분명한 검증을 위하여 phospho-specific antibodies를 GenScript (Piscataway, NJ, USA)로부터 확보하였다. Ser, Thr, Tyr residue(s) 들에서의 인산화 부위를 찾아 검증하였으며, 특히 흥미로운 인산화 부위 중 하나는 pT445 부위로 BoBAK1 kinase에 의한 대장균 단백질로의 transphosphorylation과 밀접한 상호 관계를 보여주었다. IPTG 첨가 후 배양 시간에 따른 재조합 BAK1 단백질의 auto- 와 transphosphorylation 활성은 매우 빠르게 증가하는 것으로 보아 kinase 활성이 매우 빠르게 증가함을 알 수 있었다. 이와 같은 연구 결과는 매우 흥미로운 결과로 *in vivo*에서의 BAK1의 역할과 기능을 이해하는데 매우 도움이 될 수 있는 생화학적인 자료이다.

나. 연구 결과

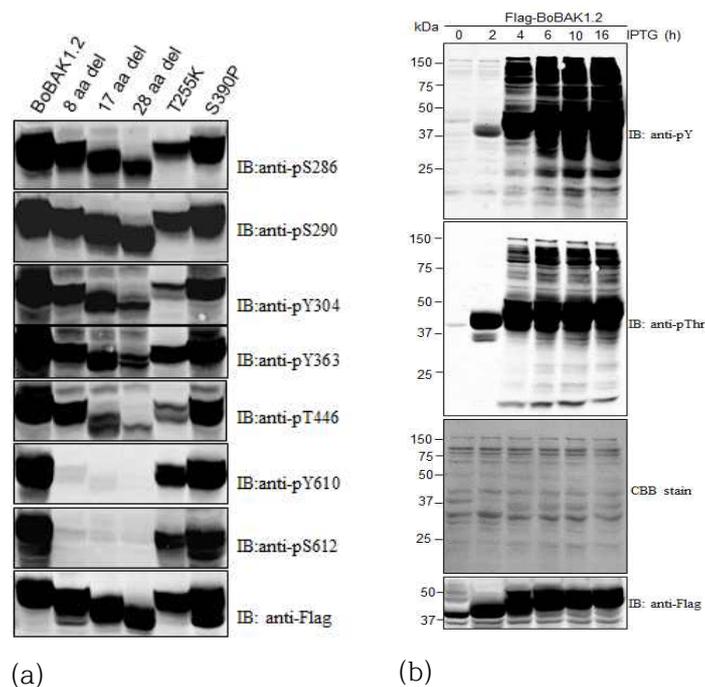


그림 157. *in vitro* 에서 BoBAK1의 인산화 sites 판별(a)과 BoBAK1의 auto-와 transphosphorylation 양상 분석

48. 원예종자사업단 연구 성과 관리 시스템 구축

가. 연구 요약

본 연구는 GSP 원예종자사업단의 연구 성과 정보에만 초점을 맞춰 사업단의 특성에 맞는 사업단 맞춤형 연구 성과 관리시스템을 구축하여 시스템의 접근성을 향상시키고 시스템 디자인을 기반으로 연구 성과의 수집, 지속적 저장, 연구 성과 정보의 획득, 연구 진행상황 모니터링을 수행할 수 있도록 연구 개발 범위를 설정하였다. 실제 연구 성과 관리시스템을 구축하기 위하여 기존의 성과관리 시스템 리뷰 및 연구자 대상 설문조사를 통해 시스템에 필요한 최적 구성요소 및 기능을 탐색하고, 시장조사를 바탕으로 예산 범위 내에서 기능성과 디자인을 동시에 충족하여 실제 시스템을 구현할 수 있는 전문 인력을 확보를 통해 연구 성과 관리시스템을 구축하고 사용자를 위한 매뉴얼을 개발하여 향후 사업단의 운영기반과 연동할 수 있는 시스템적 기반을 마련하였다.

기존 시스템 및 설문조사 분석 결과, 체계적인 분류 및 효율적인 검색이 시스템 사용자에게 있어서 가장 중요한 기능으로 파악되었고, 접속 시 시스템의 속도 저하로 인한 사용 불편이 문제점으로 지적되었다. 이를 해결하여 사용자의 이용률 및 접근성이 향상된 시스템 개발을 위해서 목적에 맞는 최적 기능과 명료한 인터페이스를 구성한다. 구성된 최적 기능과 인터페이스를 구현할 수 있는 전문 업체를 선정하여 실제 시스템의 구축 작업을 수행하였고, 운영 테스트를 통해서 오류 및 기능 개선 작업이 지속적으로 수행한 결과 웹 DB 및 서버를 기반으로 하여 연구 성과를 통합적으로 관리할 수 있는 시스템을 개발하였다. 또한, 연구 성과 관리시스템 사용자의 편의를 위해서 사용 매뉴얼을 개발 및 배포하고, 개발된 시스템을 사용 가능한 형태로 초기화 하여 사업단에 이전한다. 시스템의 주요 기능은 과제 및 성과 등록, 과제 및 성과 검색, 통계정보로 구성되어 있으며, 그 외에도 과제 확인 메뉴와 공지사항이 구현되었다. 구축된 시스템은 연구 주체별 과제 및 성과 정보의 저장이 가능하며, 다양한 분류체계별(품목, 과제, 성과유형, 성과년도 등)에 따른 정보의 검색, 연구 성과 정보 모니터링을 통한 실시간 연구진도 관리, 연구 성과의 목표대비 실적 통계 확인 및 연구 성과 정보의 저장을 통해서 향후 평가에 대비한 연구 성과의 관리가 가능하다.

개발된 시스템은 다양한 과제 및 연구 주체로부터 산출되는 연구 성과의 통합적인 관리를 통해 사업단의 성과를 실시간으로 정리, 분석 및 평가할 수 있어 체계적이고 지속적인 연구 성과의 관리 및 사업단 내부 연구 주체에 대한 실시간 정보제공에 활용하며, 연구 성과 관리를 기반으로 한 사업단 내부 평가 및 성과 feedback을 통해 향후 사업단의 연구 과제 기획, 선정, 예산배분 및 사업단 연구 진행 설계에 반영함으로써 효과적인 사업단 운영을 기대할 수 있다. 나아가, 연구 성과 관리를 통해 단기적 성과뿐만 아니라 연구 성과물의 중/장기적 활용 및 확산을 촉진을 위해 활용될 수 있으며, 추적평가에 대해 신뢰성 있는 연구 성과 정보를 제공함으로써 본 사업단에서의 연구개발이 종자산업에 미치는 효과와 더불어 신종자 개발의 사회/경제에 대한 파급 효과의 종합점검이 가능할 것으로 기대된다.

나. 연구 결과



그림 158. 연구 성과 관리시스템 기능 및 구성요소 tree 구조



그림 159. 연구 성과 관리시스템 로그인 화면 (연구 성과 관리시스템 접속 시의 최초 화면으로 사업단을 통해서 부여된 ID 및 패스워드를 사용하여 시스템에 접속함)



그림 160. 연구 성과 관리시스템의 메뉴 구성 및 디자인 내역

49. 국내·외 특허 출원

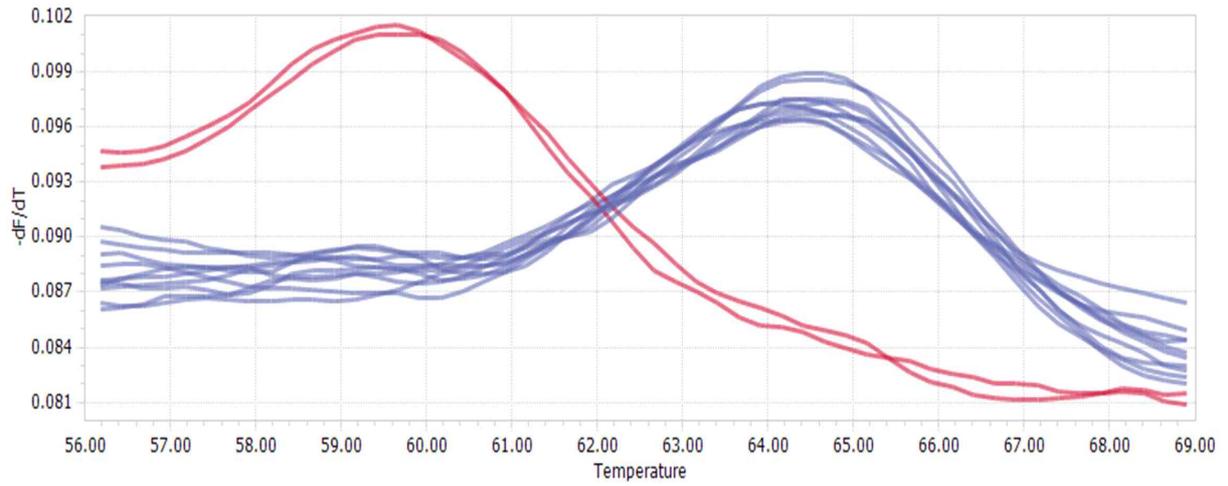
가. 국내 특허 출원

(1) 특허 제목 : 과채류의 노란 과색 판정방법

본 발명은 과채류의 과색 판정방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 과채류의 *PSYI*(phytoene synthase 1) 유전자에 위치한 단일염기다형(single nucleotide polymorphism, SNP)을 검정하여 DNA 표지인자를 개발하고, 이를 이용하여 과채류의 과색이 노란색임을 동정하는 것을 포함한 과채류의 노란 과색을 판정하는 방법에 관한 것이다. 카로티노이드(carotenoid)는 C40 이소플레노이드 화합물(isoprenoid compounds)을 가지는 유기분자로서, 주로 광합성 생물에서 합성되는 황색에서 홍색, 적색을 나타내는 범위에 있으며 식물에서는 엽록체(chloroplast)와 잡색체(chromoplast) 내에서 생합성되어 과실, 뿌리 등의 저장기관과 꽃과 같은 생식기관의 광합성 조직에 색을 부여한다. 카로티노이드의 종류는 β -카로틴(β -carotene; 당근, 인삼, 해조류, 갑각류 등의 주황색 색소), 라이코펜(lycopene, 토마토, 수박 등의 적색 색소), 푸코잔틴(fucoxanthin; 해조류의 황갈색 또는 갈색 색소), 루테인(lutein: 녹초, 시금치, 계란 등의 녹색 색소) 등이 있다. 이중 β -카로틴(β -carotene)은 인체 내에서 비타민 A의 전구체로서의 역할을 하며, 산화방지 효과와 유해산소 소거작용, 암세포 증식 및 발암 억제작용이 강하여 순환기 질환, 암 및 성인병 등을 예방하는 효능을 가진 것으로 알려져 있다. 이에 카로티노이드를 함유하는 과채류를 선호하는 소비가 지속적으로 증가하고 있으며, 이에 따라 과실의 형태, 색상 및 성분 등이 다양한 신품종의 개발 역시 지속적으로 증가하고 있는 실정이다. 그러나 과채류의 신품종의 개발에도 불구하고, 육종 소재의 유전적 유사성이 매우 높아 품종간 표현형이 큰 차이를 보이지 않으며, 특히 과채류의 과색의 경우 개체가 완전히 성숙해서 과실이 익을 때까지는 그 색을 알 수 없으므로 과색에 대한 분자표지(molecular marker) 개발을 이용한 품종 구분 기술의 정립이 필요한 실정이다.

이에 본 발명자들은 *PSYI* 유전자에 위치한 단일염기다형(SNP)을 검정하여 DNA 표지인자를 개발하고, 이를 이용하여 과채류의 색을 성숙단계에 이르기 전에 간단하고 정확하게 노란색 과색을 갖는 과채류를 선별 및 검정하는 방법을 개발하고자 노력한 결과, 본 발명을 완성하게 되었다.

본 발명의 하나의 목적은 *PSYI*(phytoene synthase 1)에 위치한 단일염기다형(SNP)을 검정하여 개발한 DNA 표지인자를 제공하는 것이고, 다른 하나의 목적은 상기 변이형 *PSYI*(phytoene synthase 1) DNA 표지인자를 이용하여 과채류의 과색이 노란색임을 판별하는 것을 포함하는 과채류를 노란 과색의 판정방법을 제공하는 것이다.



— *BUC47, BUC48*

— *BUC16, KNY2, BUC18, KNR3, BUC47, BUC48, BUC30, KNG2, BUC38, KNB1, KNP, BUC46*

그림 161. 각기 다른 색을 가지는 토마토 계통에 대한 *PSY1* 유전자의 단일염기다형성(SNP)을 이용하여 HRM 분석한 결과

(2) 특허 제목 : 양배추 리보솜 DNA의 IGS 부위를 이용한 일대잡종 종자 순도 검정방법

본 발명은 양배추 리보솜 DNA의 IGS 부위를 이용한 일대잡종 종자 순도 검정방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 다양한 양배추의 IGS 부위에 대하여 다형성을 나타내는 프라이머 세트를 이용하여 양배추 일대잡종(F1) 종자의 IGS 부위를 증폭시켜 양배추 일대잡종(F1) 품종이 순종인 것을 판별하는 것을 포함한 양배추 일대잡종(F1) 종자의 순도를 검정하는 방법에 관한 것이다.

현재 유통 중인 양배추는 대부분 양친의 교배를 통하여 생산된 일대잡종(F1) 품종들이다. 상기 일대잡종(F1) 품종에서 생산된 종자에 대해서는 양친간 교배의 성립여부, 즉 이형성(heterozygosity)을 검정하고 그 정도를 순도(%)로서 표시하는 순도검정을 실시하여야 한다. 종래 양배추 품종에 순도검정은 형태적 관찰에 의한 포장검정을 통해 이루어지는데, 이는 재배면적과 인력이 많이 소요될 뿐만 아니라, 양배추를 수확하여 양친과의 형태적 특성을 비교하기까지 상당한 시간이 소요되기 때문에 실효성이 떨어지며, 검정자의 주관적인 판단에 의하기 때문에 순도검정의 정확성이 떨어져 신뢰를 줄 수 없다는 문제가 있다.

종자식물의 45S 핵 리보솜 RNA 유전자(nuclear ribosomal DNA, nrDNA)는 18S, 5.8S 및 25S/26S/28S 암호화 유전자 클러스터와 각 유전자 사이에 상대적으로 변이가 많은 ITS1(internal transcribed spacer 1) 및 ITS2(internal transcribed spacer 2)를 포함하는 한 개의 45S 시스트론 단위로 구성된다. 각각의 45S 시스트론 단위는 다양한 크기의 IGS(intergenic spacers)로 나누어지며 종렬배열(tandem repeat)을 이루고 있다. 이중 ITS 부위 염기서열은 종(species) 특이적 특성을 갖고 있으므로 종 수준이나 종 이하 분류군 수준의 계통을 추론하기 위해 이용되어 왔다. 또한, IGS 부위 염기서열 역시 nrDNA의 여러 부위 중에서 변이가 심하여 계통학적으로 가까운 품종 간에도 많은 차이를 나타내며, 반복 염기서열이 있어 동일한 품종 사이에서도 생물 간에 차이를 나타내 속간, 종간 분류에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

이에 본 발명자들은 다양한 양배추의 45S nrDNA에 존재하는 IGS 부위의 염기서열을 확인할 수 있는 프라이머 세트를 설계하고, 이를 이용하여 다양한 양배추의 45S nrDNA의 IGS 부위를 증폭시켜 생성된 증폭 산물의 유전자 패턴을 확인함으로써 양배추 일대잡종(F1) 종자의 순도를 간단하고 정확하게 검정할 수 있음을 밝혀, 본 발명을 완성하게 되었다.

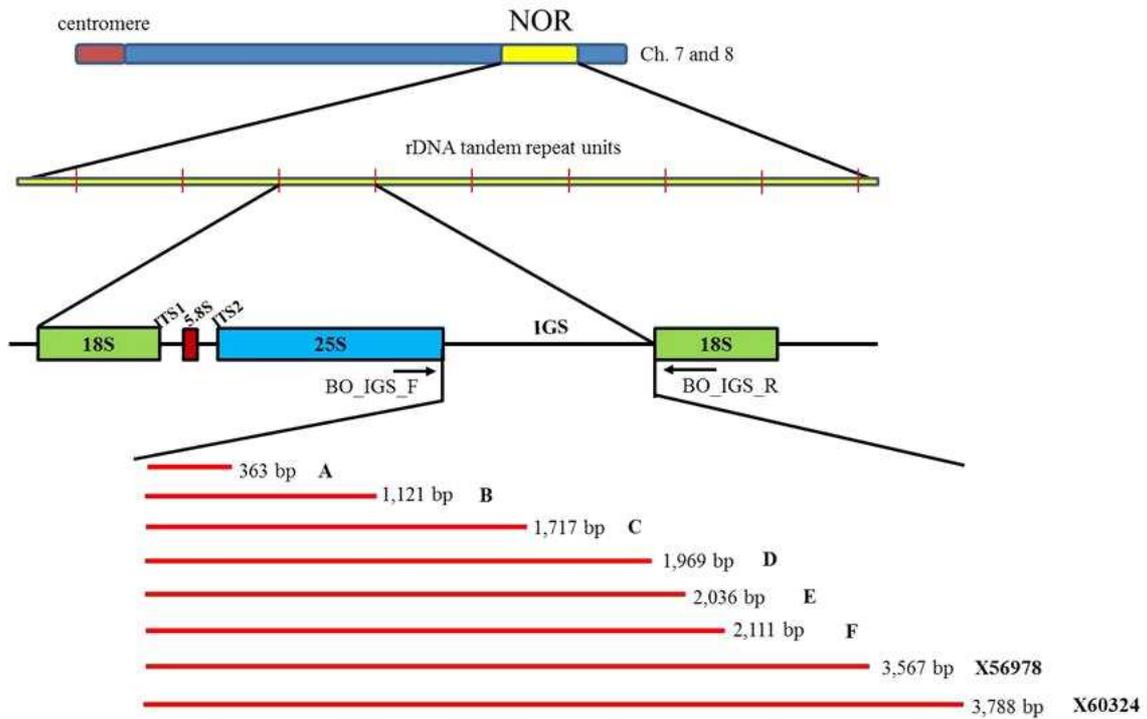


그림 162. 본 발명의 프라이머 세트를 이용한 양배추 품종의 IGS의 다양성을 확인한 모식도

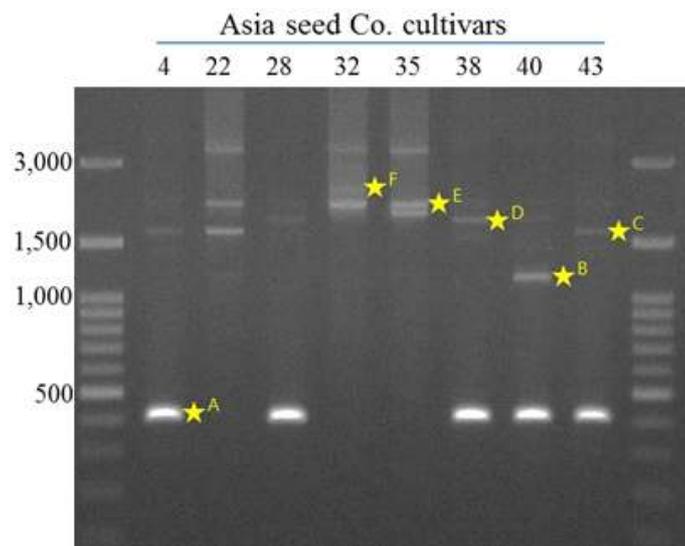


그림 163. 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 양배추 품종의 IGS 크기를 확인한 결과

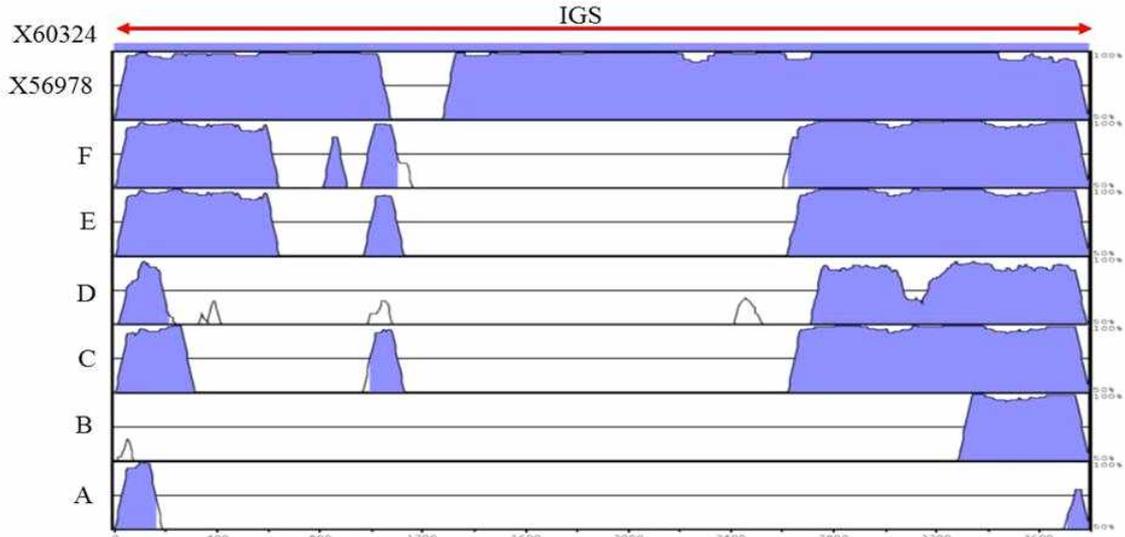


그림 164. 8개의 양배추 품종에 대한 IGS 간의 유사도를 확인하기 위해 mVISTA 프로그램을 사용하여 유사부위를 확인한 결과

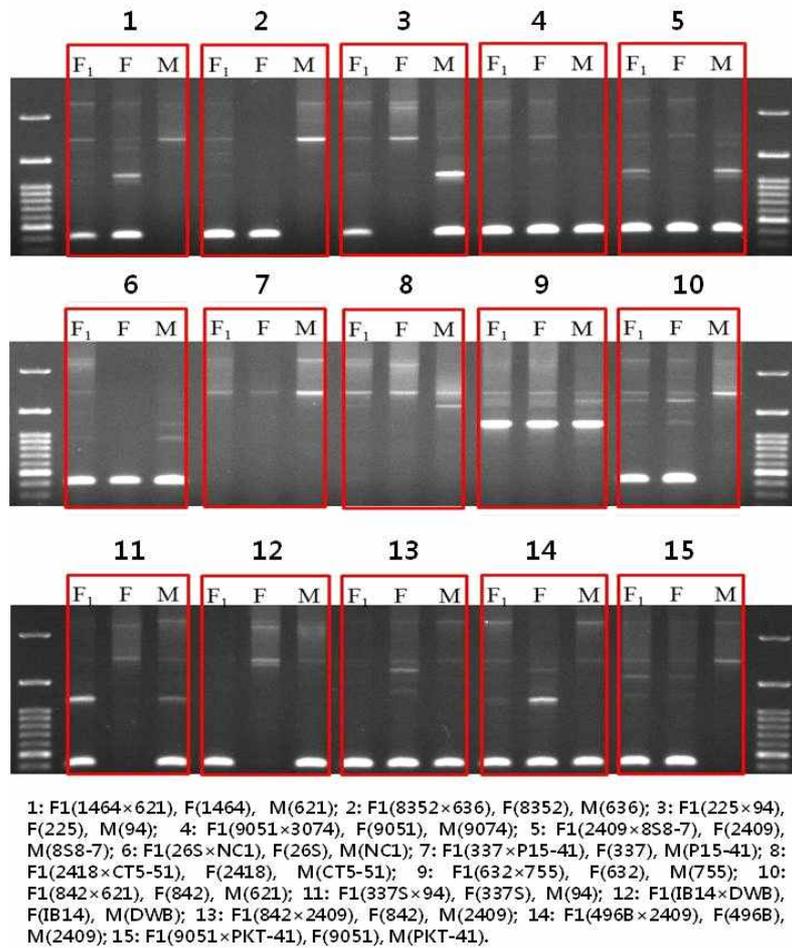


그림 165. 양배추 양친 30 계통(female(F) 15계통; male(M) 15계통)과 이들을 교배한 일대잡종 (F₁) 15 품종에 대해 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 IGS 유전자를 증폭한 결과

(3) 특허 제목 : 토마토 잎곰팡이병 저항성 선별용 분자마커 및 그를 이용한 선별방법

본 발명은 토마토 잎곰팡이병 저항성 선별용 분자마커 및 그를 이용한 선별방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 토마토 잎곰팡이병에 대한 *Cf-5* 저항성과 *Cf-5* 이병성 유전자간 특이적 단일염기다형성(single nucleotide polymorphisms, SNPs) 부위를 검출할 수 있는 프라이머 세트를 개발하였으며, 상기 프라이머 세트를 이용하여 토마토 잎곰팡이병 *Cf-5* 저항성과 *Cf-5* 이병성을 간단하고 정확하게 판별할 수 있는 선별방법에 관한 것이다.

최근 시설재배에 따른 연작으로 많은 농가에서는 잎곰팡이병에 의한 피해를 겪고 있으며, 이를 해결하기 위한 방법으로는 주로 살균제 처리에 의한 화학적 방제가 널리 이용되어 왔으나 인축에 대한 독성 및 환경오염 등에 대한 사회적 관심이 증가하고 친환경 농산물에 대한 수요가 증가함에 따라 비기주 작물을 재배하거나 잎곰팡이병균(*Cladosporium fulvum*, *Cf*) 저항성 유전자가 도입된 잎곰팡이병 저항성 토마토 품종을 재배하는 방법을 선호하고 있다.

잎곰팡이병의 저항성은 약 100년 전부터 *Cf* 저항성 유전자에 의해 결정된다고 보고되었으며, 이후 야생 토마토 근연종으로부터 *Cf* 저항성 유전자를 재배 품종에 도입해 왔다. 토마토 재배 품종에 도입된 *Cf* 저항성 유전자는 *Cf2*, *Cf4*, *Cf5*, *Cf6*, *Cf9*, *Cf11*이 있는데, *Cf2*, *Cf9*와 *Cf11*은 *S. pimpinellifolium*에서, *Cf5*는 *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*로부터, *Cf4*는 *Lycopersicon habrochaites*로부터 발견되어 잎곰팡이병 저항성 품종을 육성하는데 이용되고 있다.

이에 본 발명자들은 토마토 잎곰팡이병 *Cf-5* 저항성과 *Cf-5* 이병성을 구별할 수 있는 단일염기다형성(single nucleotide polymorphisms, SNPs) 마커를 개발하기 위해 노력한 결과, 토마토 잎곰팡이병 *Cf-5* 저항성과 *Cf-5* 이병성 유전자에서 특이적으로 차별화되어 나타나는 4개의 SNP 마커를 확인하고, 이 SNP 마커의 염기를 검출할 수 있는 프라이머 세트를 개발하였으며, 상기 프라이머 세트를 이용하여 토마토 잎곰팡이병 *Cf-5* 저항성과 *Cf-5* 이병성을 간단하고 정확하게 판별할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

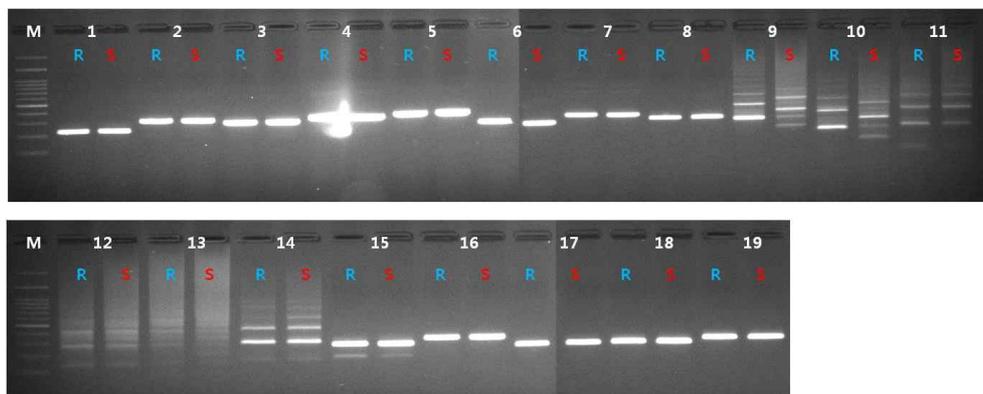


그림 166. *Cf-5* 저항성 토마토(R) 및 이병성 토마토(S)에 대해 19개의 SNP 관련 프라이머 세트를 이용하여 PCR분석한 결과

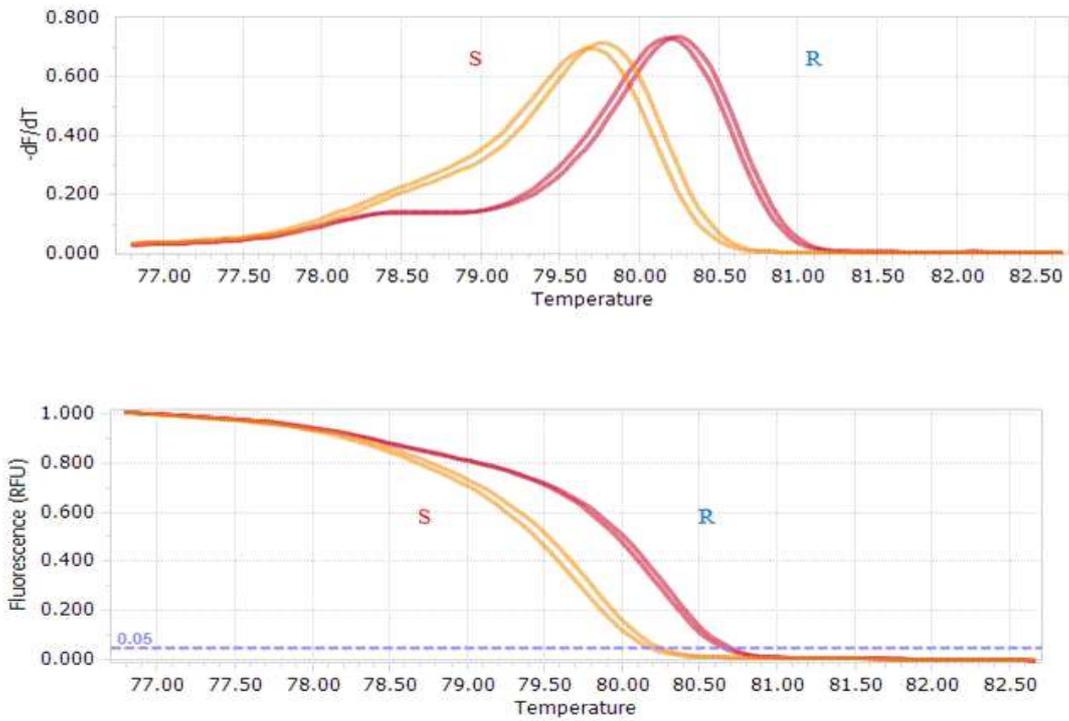


그림 167. *Cf-5* 저항성 (R) 및 이병성 (S) 토마토의 SNP마커를 이용한 HRM 분석결과

(4) 특허 제목: 토마토 흰가루병 저항성 또는 이병성 품종 선별용 분자마커 및 이를 이용한 토마토 흰가루병 저항성 또는 이병성 품종 선별방법

흰가루병은 토마토, 딸기, 오이, 참외, 호박, 수박, 장미, 작약 등 300 여종의 기주 식물에서 발병되며, 특히 시설 내에서 재배되는 여러 작물에서 광범위한 피해를 주고 있다. 토마토 흰가루병은 두가지 병원균 *Erysiphe cichoracearum* 및 *leveillula taurica*에 의하여 병징이 나타난다. 흰가루병에 대한 분자표지(molecular marker) 개발은 저항성 품종 육성에 있어 중요한 요소 중 하나이다. 이병성 품종과 저항성 품종 사이의 염기서열 차이(SNP)를 이용한다면, 근연관계에 있는 품종 간에도 구분이 가능한 분자표지를 개발할 수 있다. 본 연구에서는 토마토 염색체 12번(chr 12)의 QTL 영역에 위치한 유전자좌가 토마토 흰가루병 저항성에 관여한다는 것을 확인하였고, QTL 영역의 DNA 염기서열을 분석한 결과, 흰가루병 저항성을 부여하는 SNP 마커를 개발할 수 있었으며 토마토 흰가루병 저항성 및 이병성 품종을 용이하게 판별할 수 있었다.

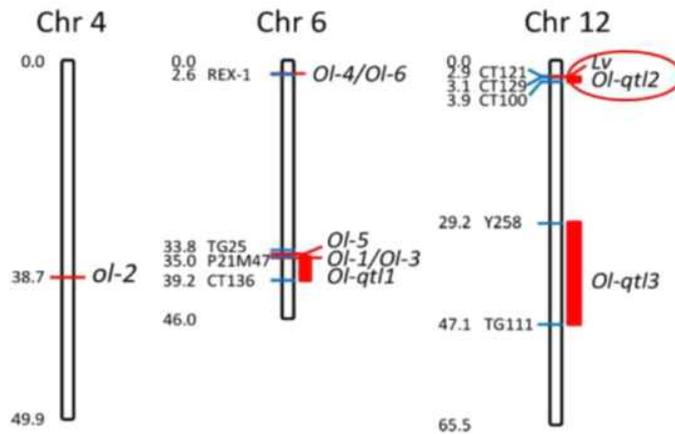


그림 168. 토마토 흰가루병 저항성 분자 표지의 위치

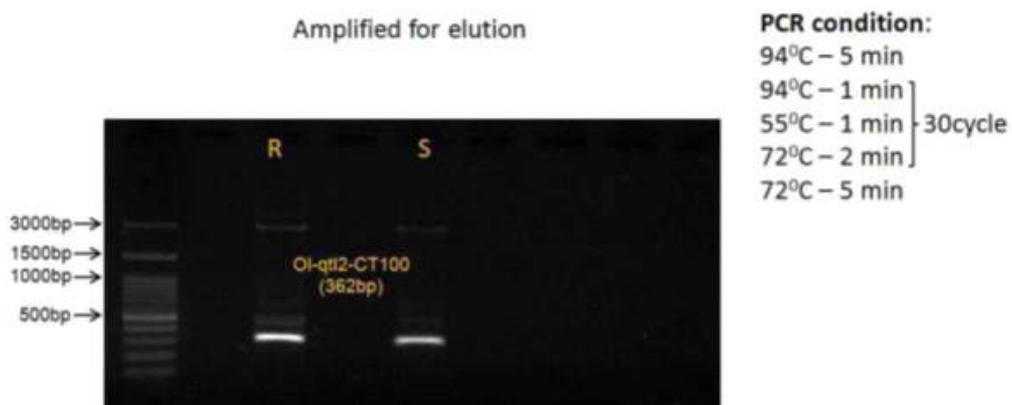


그림 169. Ol-qt2 영역에서 증폭된 PCR산물 및 PCR 조건

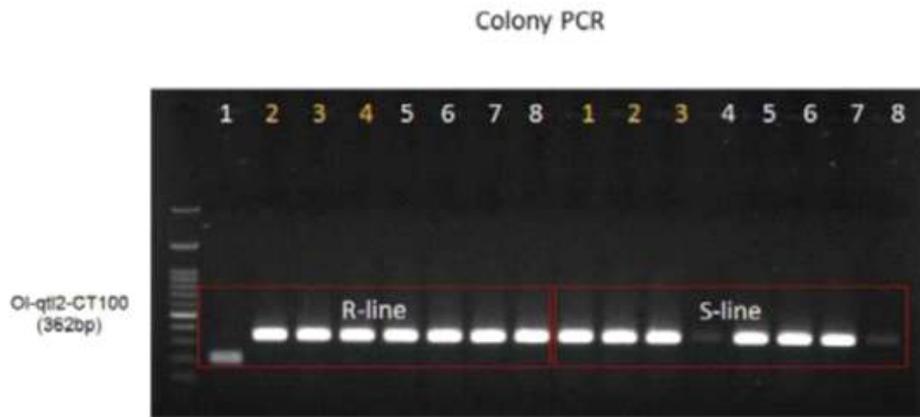


그림 170. OI-qt12 영역에서 증폭된 PCR산물의 cloning과정에서의 PCR산물

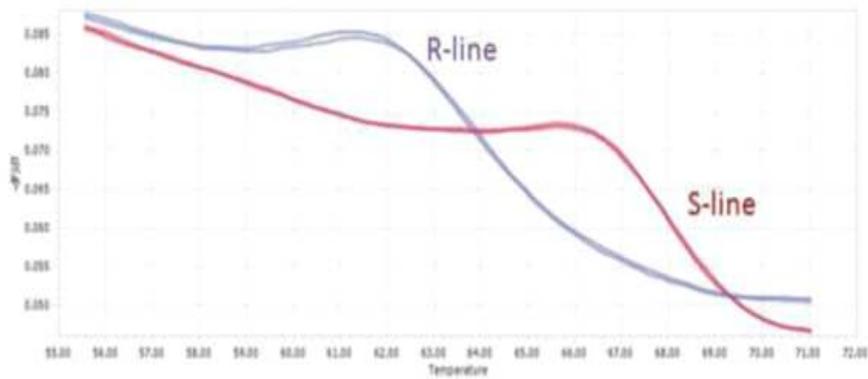


그림 171. 저항성 (R) 계통과 이병성 (S) 계통에서 확인된 SNP를 이용하여 HRM분석한 결과. 저항성 (R) 계통과 이병성 (S) 계통을 확실히 구분할 수 있는 SNP 마커를 개발함

(5) 특허 제목 : 양배추 시들음병 저항성 관련 마커를 표지하는 프라이머 세트 및 이를 이용한 저항성 양배추 품종 선별 방법

Fusarium oxysporum f. sp. *conglutinans*에 의해 발생하는 시들음병은 양배추의 연작지에 큰 피해를 주고 있다. 시들음병에 대한 양배추의 저항성은 A 타입(type) 저항성과 B 타입(type)의 저항성이 알려져 있는데, A 타입 저항성은 온도 등의 환경조건에 관계없이 저항성을 나타내는 단인자 우성 유전을 하는 반면에, B 타입 저항성은 다인자의 영향을 받아 25℃까지는 저항성을 나타내나 그 이상의 고온에서는 저항성을 나타내지 못하여 높은 시들음병 발생을 보여 실용성이 없어 국내·외에서는 A 타입 저항성 양배추 품종이 개발되어 사용되어져 왔다(Blank, 1937; Walker, 1930). 본 연구에서는 양배추 시들음병 저항성 품종과 감수성 품종을 판별할 수 있는 새로운 분자마커를 개발하기 위해 연구하던 중, 양배추 시들음병 저항성 유전자인 FocBo1의 염기서열을 분석하여 시들음병 저항성 품종과 감수성 품종에서 특이적으로 차별화되어 나타나는 새로운 InDel 마커를 확인하고, 상기 InDel 마커를 검출할 수 있는 프라이머 세트를 개발하였다. 개발된 프라이머 세트를 이용하여 양배추 시들음병 저항성 품종을 간단하고 정확하게 선별할 수 있음을 확인하였다.

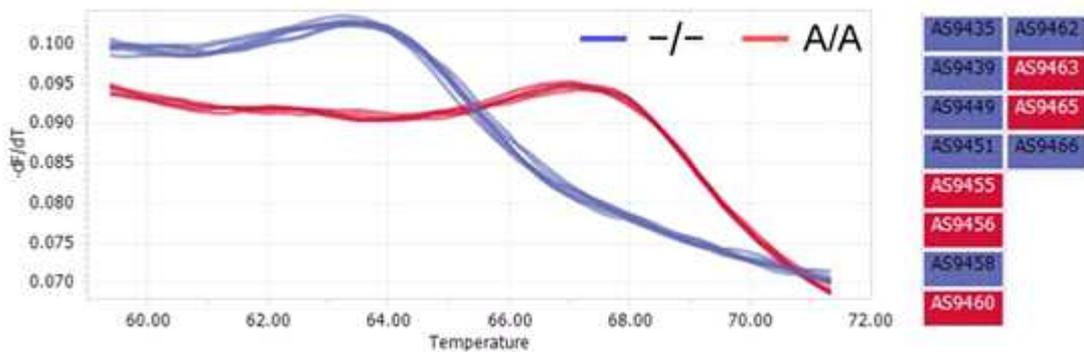


그림 172. 'A' adding을 이용한 HRM분석 결과

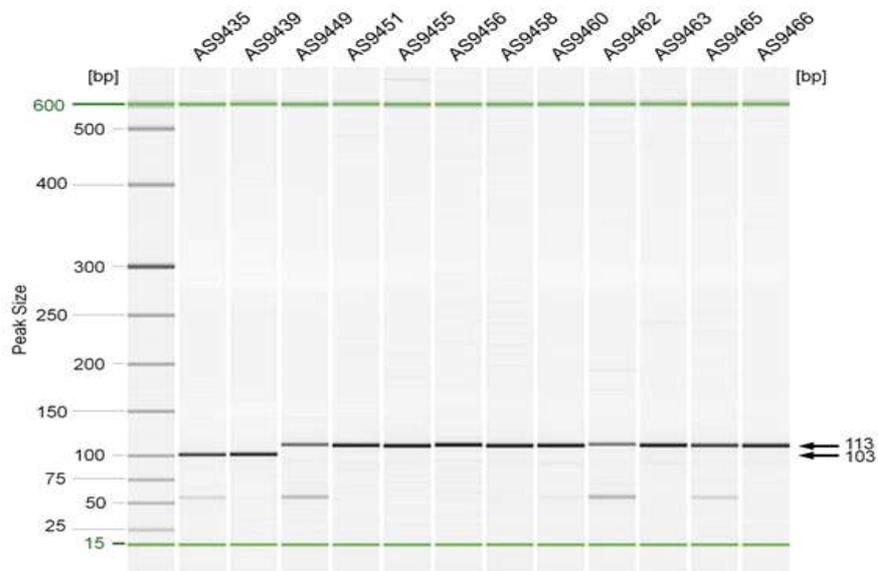


그림 173. 10bp deletion을 이용한 QIAxcel (Qiagen) 분석결과

(6) 특허 제목 : 갯무의 오구라 세포질적 응성 불임성을 부여하는 엽록체 유전자 및 이를 이용하여 제조된 갯무의 오구라 세포질적 응성 불임성 유전자형 판별용 마커 개발

세포질적 응성 불임성은 모계유전(maternal inheritance)으로 어느 가임계를 교배하더라도 100% 불임주가 나오기 때문에 응성 불임계의 유지가 쉽고 품종을 자체적으로 보호할 수 있으며, 잎이나 줄기와 같이 영양기관을 이용하는 작물에 적용하기 편리한 특성이 있다. 따라서 잡종 종자를 생산함에 있어 세포질적 응성 불임성과 응성 가임성을 판단하기 위한 연구가 계속되고 있다. 한편, 관행적 육종에서는 원하는 형질의 계통을 선발하기 위해 형태적 특성(예, 꽃의 색)의 변이에 따른 표지인자를 이용하였으나, 상당수의 형태적 표지인자는 환경에 따라서 변화될 가능성이 있을 뿐만 아니라 표지인자의 수가 극히 제한되어 있다는 단점이 있다. 이에 따라, 최근에는 DNA 염기서열 수준에서 나타나는 변이를 이용하여 분자마커(DNA 표지인자)를 개발하려는 연구가 진행되고 있다. 분자마커는 형태적 표지인자에 비교할 수 없을 정도로 식물체에 많이 존재하고 있고, 식물체의 기능이나 생리에 장애를 주지 않아 표지인자로 이용하는데 유리한 장점이 있다. 이에 본 발명자들은 갯무에서 세포질적 응성 불임성과 응성 가임성을 판별할 수 있는 새로운 분자마커를 개발하기 위해 연구하던 중, 세포질적 응성 불임성을 갖는 갯무와 세포질적 응성 가임성을 갖는 갯무에서 특이적으로 차별화되어 나타나는 새로운 엽록체 유전자 영역을 확인하고, 상기 엽록체 유전자 영역을 검출할 수 있는 분자마커를 개발하였으며, 상기 분자마커를 이용하여 세포질적 응성 불임성을 갖는 배추과 작물을 간단하고 정확하게 선별할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다. 새롭게 발견된 세포질적 응성 불임성 엽록체 유전자는 세포질적 응성 불임성을 갖는 배추과 작물의 잡종 종자를 생산하는데 매우 용이하게 이용될 수 있으며, 본 발명에 따른 분자마커 및 상기 분자마커를 이용한 선별방법은 중합효소연쇄반응(PCR)을 통해 배추과 작물이 완전히 성숙하기 전에 간단하고 정확하게 배추과 작물의 세포질적 표현형을 판별할 수 있으므로, 실제 세포질적 응성 불임성을 가지는 품종을 육종하거나, 세포질적 응성 불임성 품종을 분리하여 새로운 품종을 개발하는데 있어서 시간, 비용, 및 노동력을 절감시킬 수 있을 것으로 기대된다.

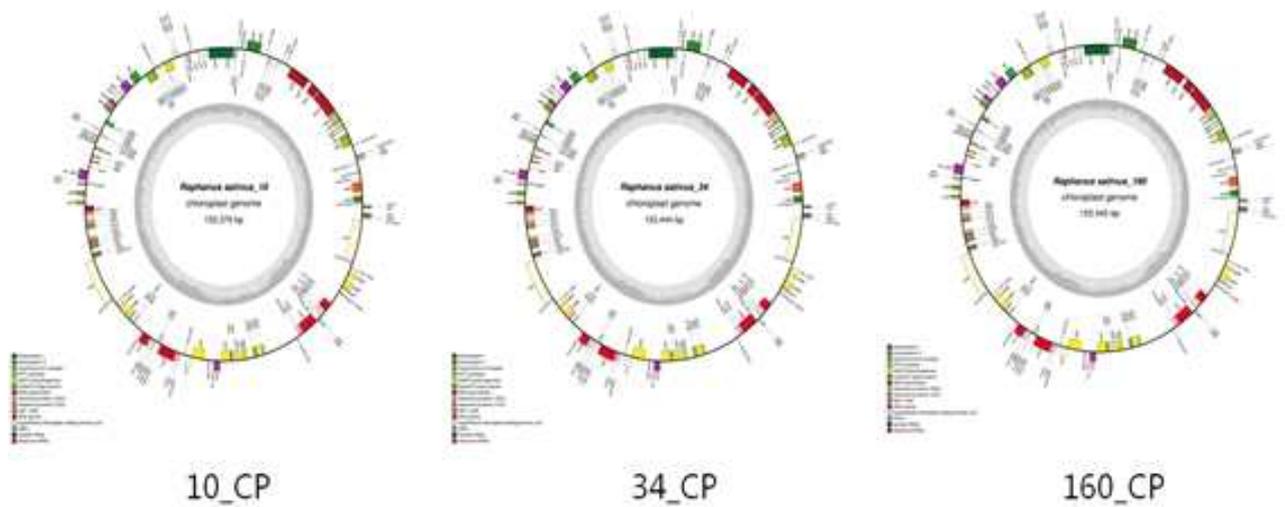


그림 174. 갯무 세포질적 응성 가임성 품종(10_CP)과 갯무 세포질적 응성 불임성 품종(34_CP 및 160_CP)로부터 분리한 엽록체 유전자의 염기서열을 라이브러리로 제작한 그림

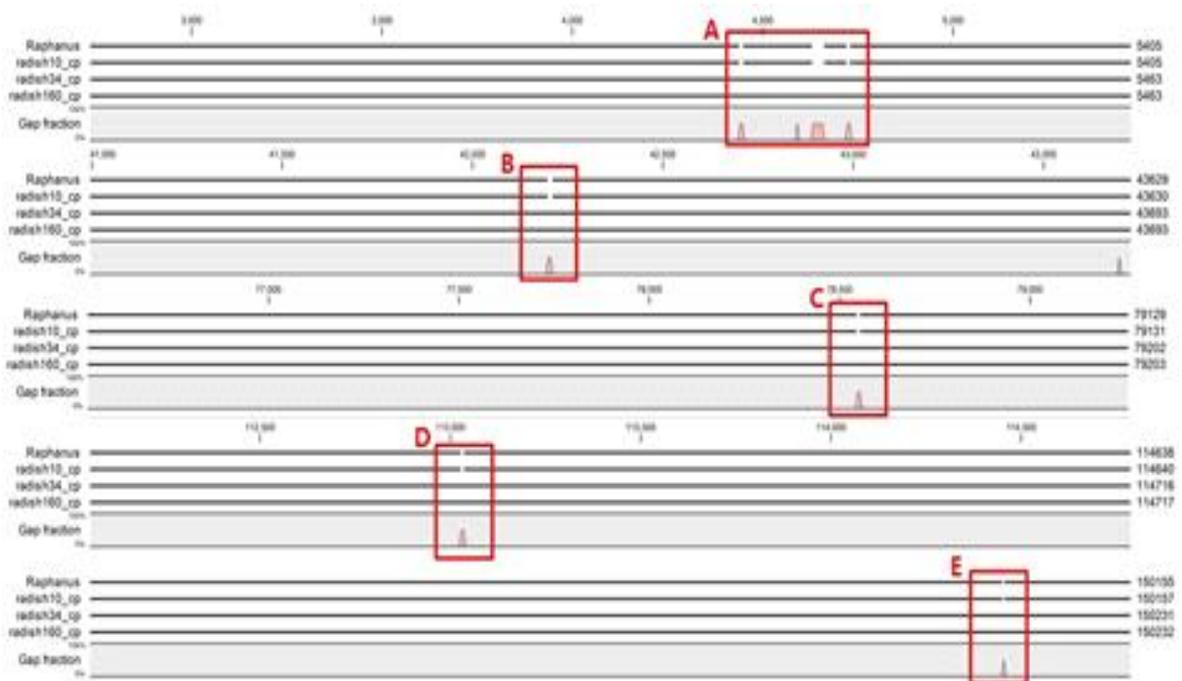
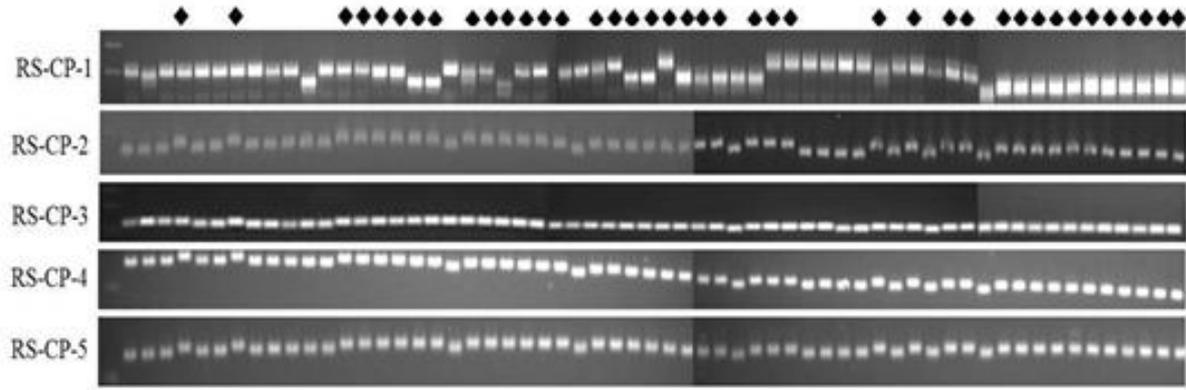


그림 175. 갯무 세포질적 응성 가임성 품종(KJ716483.1 및 10_CP)과 갯무 세포질적 응성 불임성 품종(34_CP 및 160_CP)로부터 분리한 엽록체 유전자의 염기서열의 차이를 정렬하여 비교한 그림



◆은 갯무의 세포질응성불임성 품종을 나타냄.

그림 176. 갯무 세포질적 응성 가임성 품종 20종과 갯무 세포질적 응성 불임성 품종 40종으로부터 분리한 엽록체 유전자를 PCR분석한 결과

(7) 특허 제목 : 핑크 과색을 나타내는 토마토의 유전자형 판별용 분자마커 및 이를 이용한 핑크 과색을 나타내는 토마토 선별방법

최근 토마토(*Solanum lycopersicum*)와 같은 과채류의 소비에서 과색은 소비자에게서 중요한 요소이다. 이러한 과색은 카로티노이드(carotenoid)와 플라보노이드(flavonoid) 등과 같은 식물 색소에 의해 결정된다. SIMYB12는 토마토에서 플라보노이드 생합성을 조절하는 전사인자로서 핑크 토마토 계통에서 발현이 억제된다고 알려져 있다(Ballester et al., 2010). 또한, 유전자 지도 작성, 분리 분석 및 VIGS(virus-induced gene silencing) 결과 SIMYB12 유전자는 염색체 1번(chromosome 1)의 y 유전자좌(locus)에 존재하며, 핑크 과실을 형성하는데 중요한 역할을 한다. 핑크색 토마토는 SIMYB12 유전자의 염색체 1번에서 상류 영역(시작코돈으로부터 -4,865bp)의 603bp 염기결실과 2번째 엑손 영역에서 두 개의 점 돌연변이(nonsense mutation; 염기 치환 C>T 및 1bp 삽입 TG>TAG)가 일어나 SIMYB12의 전사 억제와 정상보다 이른 종결코돈(stop codon)이 도입되어 표피에 나린제닌 칼콘(naringenin chalcone)의 축적을 감소시켜 생성된다(Lin et al., 2014). 그러나 실제 핑크 과색을 가지는 모든 토마토가 상기와 같은 SIMYB12 유전자에서 상류 영역의 603bp 염기결실 및 2번째 엑손 영역에서 두 개의 점 돌연변이를 나타내는 것이 아니므로 핑크 과색을 나타내는 토마토를 명확하게 선별하기는 어렵다. 이에 본 연구에서는 핑크 과색을 가지는 모든 토마토를 선별할 수 있는 새로운 분자마커를 개발하기 위해 연구하던 중 핑크 과색을 가지는 토마토의 SIMYB12 유전자에서 나타나는 새로운 변이영역을 동정하였으며, 새로운 변이영역을 검출할 수 있는 분자마커를 개발하였다. 이 분자마커를 이용하여 토마토의 SIMYB12 유전자형을 판별함으로써 핑크 과색을 나타내는 모든 토마토를 간단하고 정확하게 선별할 수 있었다.

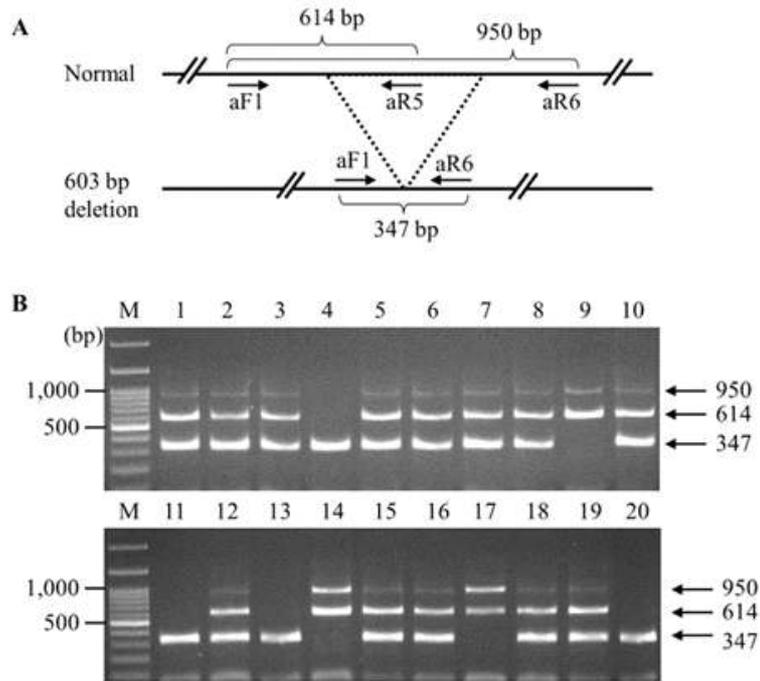


그림 177. sIMYB12 유전자의 promoter 영역에서 603bp deletion을 확인함. A. 603bp deletion 위치. B. 603bp deletion을 이용한 DNA 전기영동 결과

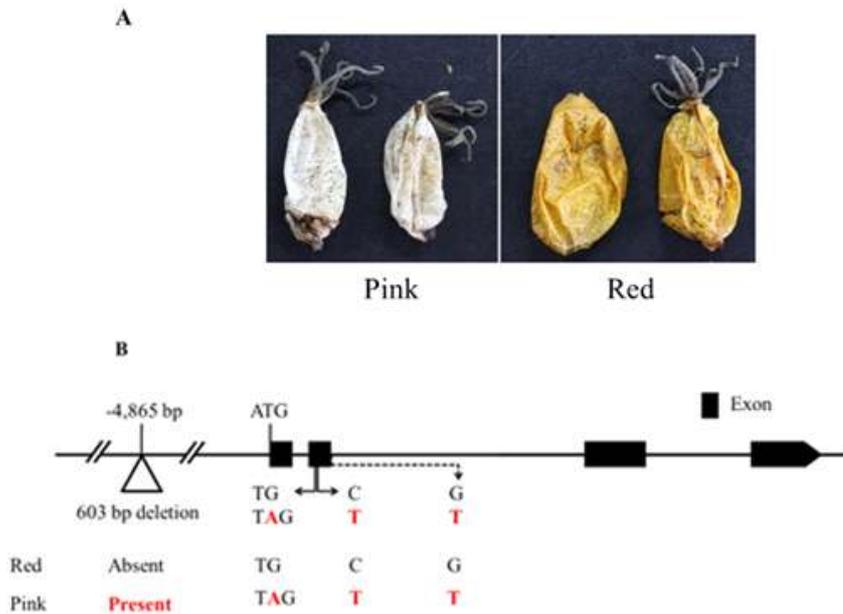


그림 178. 핑크와 레드칼라 토마토의 표현형과 핑크색은 sIMYB12 유전자상의 점돌연변이. A. 핑크와 레드칼라 토마토의 표현형. B. sIMYB12 유전자상의 돌연변이 위치

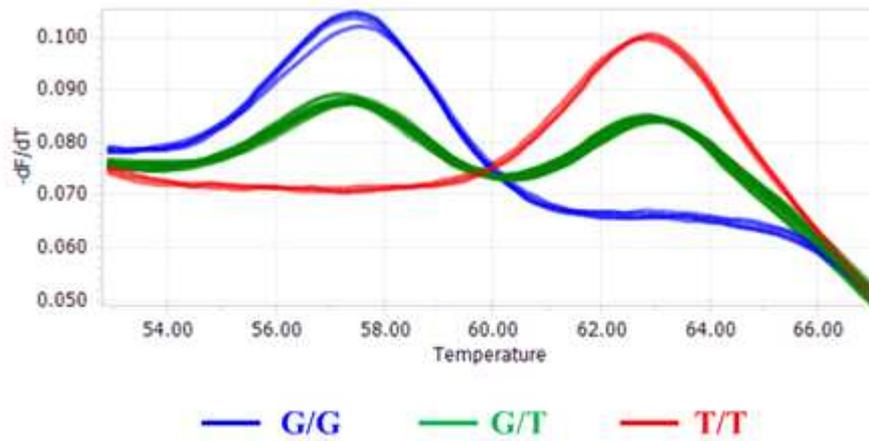


그림 179. 새롭게 확인된 sIMYB12 유전자상의 돌연변이 위치를 이용한 HRM 분석 결과

표 29. 표현형이 핑크칼라인 20개의 F2 line의 sIMYB12 유전자상의 돌연변이 위치 (4 positions)를 확인함

Accession	Phenotype	Genotype			
		603 bp deletion in the upstream region (-4,865 bp)	2nd exon 'A' insertion (TG>TAG)	2nd exon (C>T) nucleotide change	2nd intron (G > T) nucleotide change
1	Pink	H	-/-	C	T/G
2	Pink	H	-/-	C	T/G
3	Pink	H	-/-	C	T/G
4	Pink	D	-/-	C	G
5	Pink	H	-/-	C	T/G
6	Pink	H	-/-	C	T/G
7	Pink	H	-/-	C	T/G
8	Pink	H	-/-	C	T/G
9	Pink	N	-/-	C	T
10	Pink	H	-/-	C	T/G
11	Pink	D	-/-	C	G
12	Pink	H	-/-	C	T/G
13	Pink	D	-/-	C	G
14	Pink	N	-/-	C	T
15	Pink	H	-/-	C	T/G
16	Pink	H	-/-	C	T/G
17	Pink	N	-/-	C	T
18	Pink	H	-/-	C	T/G
19	Pink	H	-/-	C	T/G
20	Pink	D	-/-	C	G

N: normal, H: heterozygote, D: deletion, -/-: No insertion

(8) 특허 제목 : 노란 과색을 나타내는 토마토 판별용 분자마커 및 이를 이용한 노란 과색을 나타내는 토마토 선별방법

토마토의 과색은 주로 carotenoid의 성분에 의해 좌우된다. 특히, *PSY1* 유전자 기능의 상실은 carotenoid 전체 양의 감소로 인해 과육색이 노란색을 나타내는 원인이 된다. 본 연구에서는 토마토의 여러 계통을 이용하여 *PSY1* 유전자의 변이도 없고 이 유전자의 발현양도 정상이면서 노란 과색을 나타내는 토마토를 판별할 수 있는 분자마커를 개발하였다. *PSY1* 유전자의 CDS 염기서열이 정상이며 발현도 정상이지만 노란과색을 나타낸 KNYH2, BUBNR 계통은 가나종묘, 부농종묘로부터 분양받아 사용하였으며 *PSY1*의 mutation으로 인해 노란 과색을 나타낸 BUC47 (특허출원 번호: 10-2014-0175276) 계통은 부농종묘로부터 분양받아 사용하였다. KNYH2 및 BUBNR과 BUC47의 교배계통의 F1에서 노란과색을 확인하였으며 이러한 결과는 KNYH2와 BUBNR은 *PSY1* mutation과 같은 allele type으로 추측할 수 있다. KNYH2와 BUBNR 계통 특이적인 분자마커를 개발하기 위해 *PSY1* 유전자 근처의 다형성을 검토하였다. 시퀀싱 결과, BUC47과 KNR3 (빨간색 과육색)는 *PSY1* 유전자의 start codon으로부터 -2,005 위치가 'G', -2,573 위치가 'T', KNYH2와 BUBNR은 -2,005 위치가 'G', -2,573 위치가 'C', TCR와 Heinz1706 (reference sequence)은 -2,005 위치가 'A', -2,573 위치가 'C'였다. *PSY1*의 start codon으로부터 -2,573 위치와 -2,005 위치를 확실하게 하기 위해 우리나라의 농우바이오, 부농종묘, 가나종묘, 토마토생명공학연구소 등에서 무작위로 샘플을 채취하여 BUC47의 mutation 위치와 -2,573 및 -2,005 위치를 테스트한 결과, A/C, G/T pair를 가지고 있는 경우에는 과육이 노란색이 아니었으며, C/G pair를 가지고 있는 경우는 과육색이 노란색이었다. 이러한 결과는 이 두 위치가 토마토에서 노란과육색을 판별할 수 있는 유용한 분자마커임을 말해준다.

표 30. -2573위치와 -2005위치에서 각 계통들의 염기 및 토마토 과육색

Line Name	<i>PSY1</i> mutation (기존 특허출원 위치)	-2,573 position	-2,005 position	Flesh fruit color
BUC47	Mutation	G	T	Yellow
KNR3	Normal	G	T	Red
KNYH2	Normal	G	C	Yellow
BUBNR	Normal	G	C	Yellow
TCR	Normal	A	C	Red
Heinz1706	Normal	A	C	-

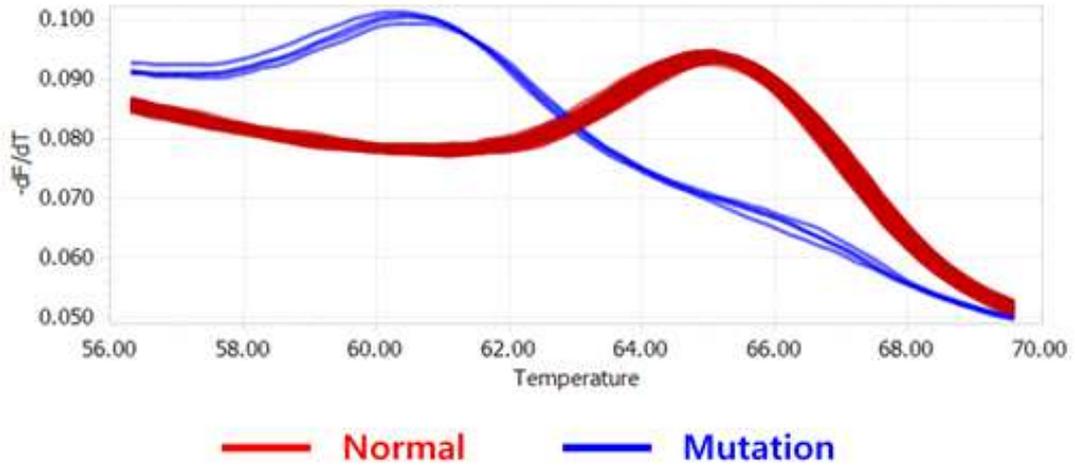


그림 180. *PSY1* mutation SNP를 이용한 HRM 분석결과

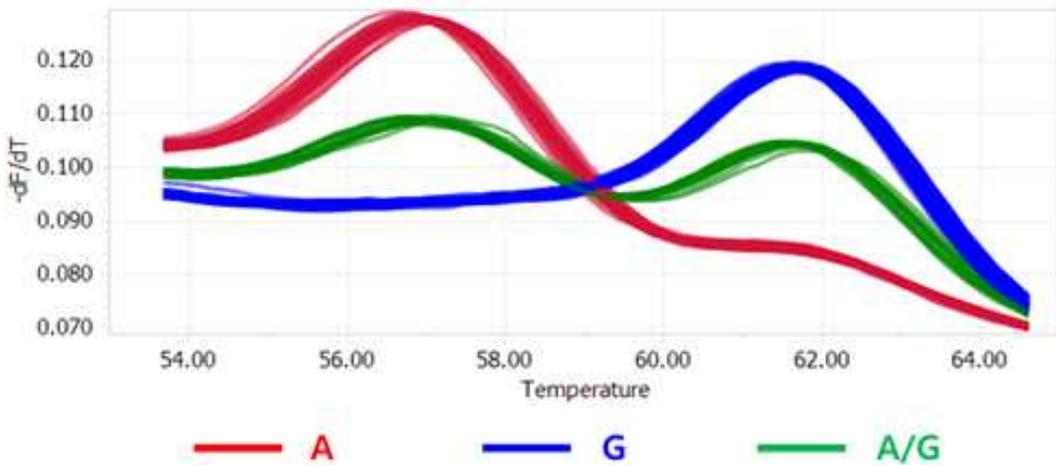


그림 181. 218 샘플의 -2,573 position에서의 SNP를 이용한 HRM 분석결과

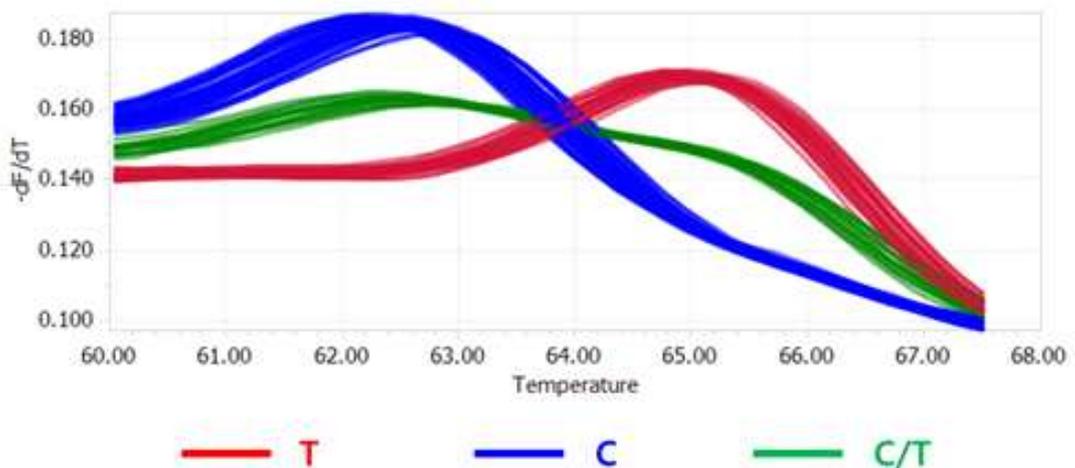


그림 182. 218 샘플의 -2,005 position에서의 SNP를 이용한 HRM 분석결과

표 31. 218개의 토마토 계통과 품종에 대한 마커 분석 결과 및 과육색

순번	라인/품종명	<i>PSY1</i> mutation (기존특허출원위치)	-2,573 position	-2,005 position	Flesh fruit color
1	농우바이오-1	Nomal	G	C	Yellow
2	농우바이오-2	Nomal	G	C	Yellow
3	농우바이오-3	Nomal	G	C	Yellow
4	부농종묘-1	Nomal	G	C	Yellow
5	부농종묘-2	Nomal	G	C	Yellow
6	부농종묘-3	Nomal	G	C	Yellow
7	부농종묘-4	Mutation	G	T	Yellow
8	부농종묘-5	Mutation	G	T	Yellow
9	부농종묘-6	Mutation	G	T	Yellow
10	부농종묘-7	Mutation	G	T	Yellow
11	부농종묘-8	Mutation	G	T	Yellow
12	부농종묘-9	Mutation	G	T	Yellow
13	가나종묘-1	Nomal	AG	CT	Red
14	가나종묘-2	Nomal	G	CT	Red
15	가나종묘-3	Nomal	A	C	Red
16	가나종묘-4	Nomal	G	C	Yellow
17	가나종묘-5	Nomal	G	C	Yellow
18	가나종묘-6	Nomal	A	C	Red
19	가나종묘-7	Nomal	G	T	Red
20	가나종묘-8	Nomal	G	T	Red
21	가나종묘-9	Nomal	A	C	Red
22	가나종묘-10	Nomal	A	C	Red
23	가나종묘-11	Nomal	A	C	Red
24	가나종묘-12	Nomal	G	T	Red
25	가나종묘-13	Nomal	A	C	Red
26	가나종묘-14	Nomal	A	C	Red
27	가나종묘-15	Nomal	A	C	Red
28	가나종묘-16	Nomal	G	T	Red
29	가나종묘-17	Nomal	G	T	Red
30	가나종묘-18	Nomal	G	T	Red
31	가나종묘-19	Nomal	G	T	Red
32	가나종묘-20	Nomal	A	C	Red
33	가나종묘-21	Nomal	A	C	Red
34	가나종묘-22	Nomal	A	C	Red

35	가나종묘-23	Nomal	A	C	Red
36	가나종묘-24	Nomal	G	T	Red
37	가나종묘-25	Nomal	G	T	Red
38	가나종묘-26	Nomal	G	C	Yellow
39	가나종묘-27	Nomal	A	C	Red
40	가나종묘-28	Nomal	G	T	Red
41	가나종묘-29	Nomal	A	C	Red
42	가나종묘-30	Nomal	A	C	Red
43	가나종묘-31	Nomal	A	C	Red
44	가나종묘-32	Nomal	A	C	Red
45	가나종묘-33	Nomal	A	C	Red
46	가나종묘-34	Nomal	G	T	Red
47	가나종묘-35	Nomal	A	C	Red
48	가나종묘-36	Nomal	A	C	Red
49	가나종묘-37	Nomal	G	T	Red
50	가나종묘-38	Nomal	A	C	Red
51	가나종묘-39	Nomal	G	T	Red
52	가나종묘-40	Nomal	G	C	Yellow
53	가나종묘-41	Nomal	G	C	Yellow
54	토마토생명공학연구소-1	Nomal	A	C	Red
55	토마토생명공학연구소-2	Nomal	A	C	Red
56	토마토생명공학연구소-3	Nomal	A	C	Red
57	토마토생명공학연구소-4	Nomal	A	C	Red
58	토마토생명공학연구소-5	Nomal	A	C	Red
59	토마토생명공학연구소-6	Nomal	A	C	Red
60	토마토생명공학연구소-7	Nomal	A	C	Red
61	토마토생명공학연구소-8	Nomal	A	C	Red
62	토마토생명공학연구소-9	Nomal	A	C	Red
63	토마토생명공학연구소-10	Nomal	A	C	Red
64	토마토생명공학연구소-11	Nomal	A	C	Red
65	토마토생명공학연구소-12	Nomal	A	C	Red
66	토마토생명공학연구소-13	Nomal	A	C	Red
67	토마토생명공학연구소-14	Nomal	A	C	Red
68	토마토생명공학연구소-15	Nomal	A	C	Red
69	토마토생명공학연구소-16	Nomal	A	C	Red
70	토마토생명공학연구소-17	Nomal	A	C	Red
71	토마토생명공학연구소-18	Nomal	A	C	Red
72	토마토생명공학연구소-19	Nomal	A	C	Red

73	토마토생명공학연구소-20	Nomal	A	C	Red
74	토마토생명공학연구소-21	Nomal	A	C	Red
75	토마토생명공학연구소-22	Nomal	A	C	Red
76	토마토생명공학연구소-23	Nomal	A	C	Red
77	토마토생명공학연구소-24	Nomal	A	C	Red
78	토마토생명공학연구소-25	Nomal	A	C	Red
79	토마토생명공학연구소-26	Nomal	A	C	Red
80	토마토생명공학연구소-27	Nomal	A	C	Red
81	토마토생명공학연구소-28	Nomal	G	T	Red
82	토마토생명공학연구소-29	Nomal	A	C	Red
83	토마토생명공학연구소-30	Nomal	A	C	Red
84	토마토생명공학연구소-31	Nomal	A	C	Red
85	토마토생명공학연구소-32	Nomal	A	C	Red
86	토마토생명공학연구소-33	Nomal	A	C	Red
87	토마토생명공학연구소-34	Nomal	A	C	Red
88	토마토생명공학연구소-35	Nomal	A	C	Red
89	토마토생명공학연구소-36	Nomal	A	C	Red
90	토마토생명공학연구소-37	Nomal	A	C	Red
91	토마토생명공학연구소-38	Nomal	A	C	Red
92	토마토생명공학연구소-39	Nomal	A	C	Red
93	토마토생명공학연구소-40	Nomal	A	C	Red
94	토마토생명공학연구소-41	Nomal	A	C	Red
95	토마토생명공학연구소-42	Nomal	A	C	Red
96	토마토생명공학연구소-43	Nomal	A	C	Red
97	토마토생명공학연구소-44	Nomal	A	C	Red
98	토마토생명공학연구소-45	Nomal	A	C	Red
99	토마토생명공학연구소-46	Nomal	A	C	Red
100	토마토생명공학연구소-47	Nomal	A	C	Red
101	토마토생명공학연구소-48	Nomal	A	C	Red
102	토마토생명공학연구소-49	Nomal	A	C	Red
103	토마토생명공학연구소-50	Nomal	A	C	Red
104	토마토생명공학연구소-51	Nomal	A	C	Red
105	토마토생명공학연구소-52	Nomal	A	C	Red
106	토마토생명공학연구소-53	Nomal	A	C	Red
107	토마토생명공학연구소-54	Nomal	G	T	Red
108	토마토생명공학연구소-55	Nomal	G	T	Red
109	토마토생명공학연구소-56	Nomal	A	C	Red
110	토마토생명공학연구소-57	Nomal	A	C	Red
111	토마토생명공학연구소-58	Nomal	A	C	Red
112	토마토생명공학연구소-59	Nomal	A	C	Red

113	토마토생명공학연구소-60	Nomal	A	C	Red
114	토마토생명공학연구소-61	Nomal	A	C	Red
115	토마토생명공학연구소-62	Nomal	A	C	Red
116	토마토생명공학연구소-63	Nomal	A	C	Red
117	토마토생명공학연구소-64	Nomal	A	C	Red
118	토마토생명공학연구소-65	Nomal	A	C	Red
119	토마토생명공학연구소-66	Nomal	A	C	Red
120	토마토생명공학연구소-67	Nomal	A	C	Red
121	토마토생명공학연구소-68	Nomal	A	C	Red
122	토마토생명공학연구소-69	Nomal	A	C	Red
123	토마토생명공학연구소-70	Nomal	A	C	Red
124	토마토생명공학연구소-71	Nomal	A	C	Red
125	토마토생명공학연구소-72	Nomal	A	C	Red
126	토마토생명공학연구소-73	Nomal	A	C	Red
127	토마토생명공학연구소-74	Nomal	A	C	Red
128	토마토생명공학연구소-75	Nomal	A	C	Red
129	토마토생명공학연구소-76	Nomal	A	C	Red
130	토마토생명공학연구소-77	Nomal	A	C	Red
131	토마토생명공학연구소-78	Nomal	A	C	Red
132	토마토생명공학연구소-79	Nomal	G	T	Red
133	토마토생명공학연구소-80	Nomal	G	T	Red
134	토마토생명공학연구소-81	Nomal	G	T	Red
135	토마토생명공학연구소-82	Nomal	G	T	Red
136	토마토생명공학연구소-83	Nomal	G	T	Red
137	토마토생명공학연구소-84	Nomal	G	T	Red
138	토마토생명공학연구소-85	Nomal	G	T	Red
139	토마토생명공학연구소-86	Nomal	G	T	Red
140	토마토생명공학연구소-87	Nomal	G	T	Red
141	토마토생명공학연구소-88	Nomal	G	C	Yellow
142	토마토생명공학연구소-89	Nomal	G	CT	Red
143	토마토생명공학연구소-90	Nomal	G	T	Red
144	토마토생명공학연구소-91	Nomal	G	T	Red
145	토마토생명공학연구소-92	Nomal	G	T	Red
146	토마토생명공학연구소-93	Nomal	A	C	Red
147	토마토생명공학연구소-94	Nomal	A	C	Red
148	토마토생명공학연구소-95	Nomal	A	C	Red
149	토마토생명공학연구소-96	Nomal	G	T	Red
150	토마토생명공학연구소-97	Nomal	G	T	Red
151	토마토생명공학연구소-98	Nomal	A	C	Red
152	토마토생명공학연구소-99	Nomal	A	C	Red

153	토마토생명공학연구소-100	Nomal	A	C	Red
154	토마토생명공학연구소-101	Nomal	A	C	Red
155	토마토생명공학연구소-102	Nomal	A	C	Red
156	토마토생명공학연구소-103	Nomal	AG	C	Red
157	토마토생명공학연구소-104	Nomal	AG	CT	Red
158	토마토생명공학연구소-105	Nomal	G	T	Red
159	토마토생명공학연구소-106	Nomal	G	CT	Red
160	토마토생명공학연구소-107	Nomal	G	C	Yellow
161	토마토생명공학연구소-108	Nomal	G	T	Red
162	토마토생명공학연구소-109	Nomal	G	T	Red
163	토마토생명공학연구소-110	Nomal	A	C	Red
164	토마토생명공학연구소-111	Nomal	A	C	Red
165	토마토생명공학연구소-112	Nomal	A	C	Red
166	토마토생명공학연구소-113	Nomal	A	C	Red
167	토마토생명공학연구소-114	Nomal	G	T	Red
168	토마토생명공학연구소-115	Nomal	AG	CT	Red
169	토마토생명공학연구소-116	Nomal	G	T	Red
170	토마토생명공학연구소-117	Nomal	G	T	Red
171	토마토생명공학연구소-118	Nomal	A	C	Red
172	토마토생명공학연구소-119	Nomal	G	T	Red
173	토마토생명공학연구소-120	Nomal	G	T	Red
174	토마토생명공학연구소-121	Nomal	G	T	Red
175	토마토생명공학연구소-122	Nomal	G	T	Red
176	토마토생명공학연구소-123	Nomal	A	C	Red
177	토마토생명공학연구소-124	Nomal	G	CT	Red
178	토마토생명공학연구소-125	Nomal	G	CT	Red
179	토마토생명공학연구소-126	Nomal	G	T	Red
180	토마토생명공학연구소-127	Nomal	G	T	Red
181	토마토생명공학연구소-128	Nomal	G	T	Red
182	토마토생명공학연구소-129	Nomal	G	T	Red
183	토마토생명공학연구소-130	Nomal	G	T	Red
184	토마토생명공학연구소-131	Nomal	G	T	Red
185	토마토생명공학연구소-132	Nomal	G	T	Red
186	토마토생명공학연구소-133	Nomal	A	C	Red
187	토마토생명공학연구소-134	Nomal	AG	CT	Red
188	토마토생명공학연구소-135	Nomal	G	T	Red
189	토마토생명공학연구소-136	Nomal	G	C	Yellow
190	토마토생명공학연구소-137	Nomal	A	C	Red
191	토마토생명공학연구소-138	Nomal	A	C	Red
192	토마토생명공학연구소-139	Nomal	A	C	Red

193	토마토생명공학연구소-140	Nomal	A	C	Red
194	토마토생명공학연구소-141	Nomal	A	C	Red
195	토마토생명공학연구소-142	Nomal	A	C	Red
196	토마토생명공학연구소-143	Nomal	A	C	Red
197	토마토생명공학연구소-144	Nomal	A	C	Red
198	토마토생명공학연구소-145	Nomal	A	C	Red
199	토마토생명공학연구소-146	Nomal	A	C	Red
200	토마토생명공학연구소-147	Nomal	A	C	Red
201	토마토생명공학연구소-148	Nomal	A	C	Red
202	토마토생명공학연구소-149	Nomal	AG	CT	Red
203	토마토생명공학연구소-150	Nomal	A	C	Red
204	토마토생명공학연구소-151	Nomal	A	C	Red
205	토마토생명공학연구소-152	Nomal	AG	CT	Red
206	토마토생명공학연구소-153	Nomal	A	C	Red
207	토마토생명공학연구소-154	Nomal	AG	CT	Red
208	토마토생명공학연구소-155	Nomal	A	C	Red
209	토마토생명공학연구소-156	Nomal	A	C	Red
210	토마토생명공학연구소-157	Nomal	A	C	Red
211	토마토생명공학연구소-158	Nomal	A	C	Red
212	토마토생명공학연구소-159	Nomal	G	T	Red
213	토마토생명공학연구소-160	Nomal	AG	CT	Red
214	토마토생명공학연구소-161	Nomal	A	C	Red
215	토마토생명공학연구소-162	Nomal	AG	CT	Red
216	토마토생명공학연구소-163	Nomal	G	T	Red
217	토마토생명공학연구소-164	Nomal	A	C	Red
218	토마토생명공학연구소-165	Nomal	A	C	Red

(9) 특허 제목 : 토마토의 핑크과색 유전자형을 판별하기 위한 분자마커 및 이를 이용하여 토마토의 핑크과색을 선별하는 방법

본 발명은 핑크 과색을 나타내는 토마토의 유전자형 판별용 분자마커 및 이를 이용한 핑크 과색을 나타내는 토마토 선별 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 토마토의 SIMYB12 유전자형을 판별할 수 있는 분자마커 및 상기 분자마커를 사용하여 SIMYB12 유전자의 변이를 확인함으로써 핑크 과색을 나타내는 토마토를 선별하는 방법에 관한 것이다. SIMYB12는 토마토에서 플라보노이드 생합성을 조절하는 전사인자로서, 핑크 토마토 계통에서 발현이 억제된다고 알려져 있다. 또한, 유전자 지도 작성, 분리 분석 및 VIGS(virus-induced gene silencing) 결과 SIMYB12 유전자는 염색체 1번(chromosome 1)의 y 유전자좌(locus)에 존재하며 핑크 과실을 형성하는데 중요한 역할을 한다. 보다 구체적으로 핑크색 토마토는 염색체 1번에서 SIMYB12 유전자의 상류 영역의 603bp 염기결실과 2번째 엑손 영역에서 두 개의 점 돌연변이(nonsense mutation; 염기 치환 C>T 및 1bp 삽입 TG>TAG)가 일어나 SIMYB12의 전사 억제와 정상보다 이른 종결코돈(stop codon)이 도입되어 표피에 나린제닌 칼콘(naringenin chalcone)의 축적을 감소시켜 생성된다. 그러나 실제 핑크 과색을 가지는 모든 토마토가 상기와 같은 SIMYB12 유전자에서 상류 영역의 603bp 염기결실 및 2번째 엑손 영역에서 두 개의 점 돌연변이를 나타내는 것이 아니므로 핑크 과색을 나타내는 토마토를 명확하게 선별하기는 어려운 문제가 있다.

본 발명에 있어서 상기 분자마커는 SIMYB12 유전자의 상류 영역의 603bp 염기결실, 2번째 엑손 영역에서 두 개의 점 돌연변이(nonsense mutation; 염기 치환 C>T 및 1bp 삽입 TG>TAG) 및/또는 SIMYB12 유전자의 1794번째 염기 및/또는 1851번째 염기 'G'가 'A'로 변이되는 것을 특징으로 한다. 상기 본 발명에 있어서 상기 SIMYB12 유전자의 상류 영역의 603bp 염기서열의 결실로 SIMBY12의 전사가 억제되거나 SIMYB12 유전자의 2번째 엑손 영역에서 두 개의 점 돌연변이(nonsense mutation; 염기 치환 C>T 및 1bp 삽입 TG>TAG) 및/또는 SIMYB12 유전자의 1794번째 염기 및/또는 1851번째 염기 'G'가 'A'로 변이될 때 토마토의 과색이 핑크색을 나타내었다. 따라서 본 발명의 분자마커는 핑크 과색을 나타내는 토마토의 SIMBY12 유전자형을 판별하고 핑크 과색을 나타내는 토마토를 선별하기 위한 키트로 이용될 수 있다.

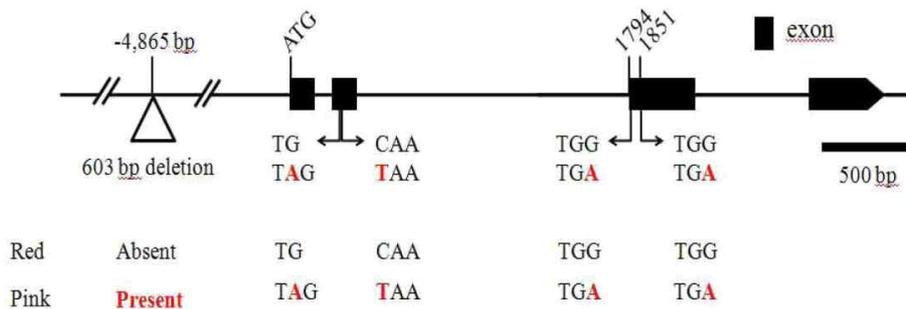
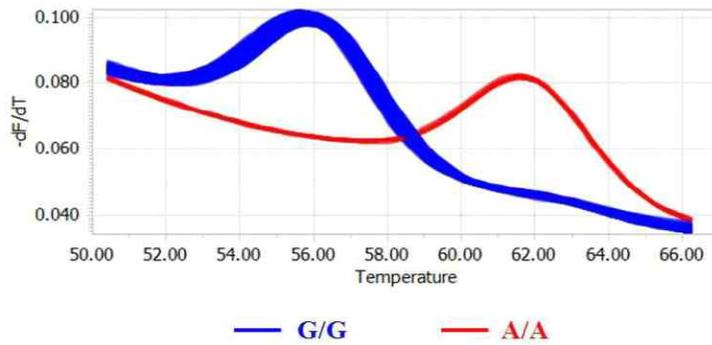


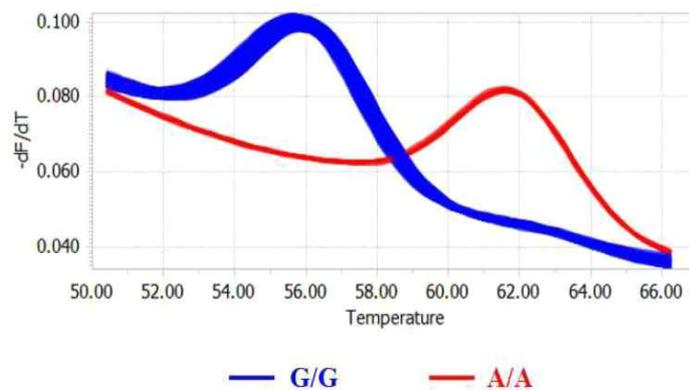
그림 183. 핑크 과색을 나타내는 토마토와 빨간 과색을 나타내는 토마토의 SIMYB12 유전자에서 603bp 결실과 SIMYB12 유전자의 엑손 영역에서의 점 돌연변이 위치 모식도



<1794 position(G to A) from 'ATG'>

Pink: A(61.5°C)
no pink: G(56°C)

그림 184. 핑크 과색을 나타내는 토마토의 표피로부터 분리한 SIMYB12 유전자를 주형으로 하고, 본 발명에 따라 제조된 프라이머 세트(서열번호 3 및 4)와 프로브 (서열번호 5)를 사용하여 HRM 분석을 통해 SIMYB12 유전자의 1794번째 염기의 유전자형을 확인한 그래프



<1794 position(Gto A) from 'ATG'>

Pink: A(61.5°C)
no pink: G(56°C)

그림 185. 핑크 과색을 나타내는 토마토의 표피로부터 분리한 SIMYB12 유전자를 주형으로 하고, 본 발명에 따라 제조된 프라이머 세트(서열번호 3 및 4)와 프로브 (서열번호 6)를 사용하여 HRM 분석을 통해 SIMYB12 유전자의 1851번째 염기의 유전자형을 확인한 그래프

표 32. 핑크색 표현형을 나타내는 토마토의 유전자형을 구분할 수 있는 4종류 판별마커 및 판별마커를 이용한 핑크색 표현형을 나타내는 토마토 86계통 및 품종의 유전자형

Line	Phenotype	Genotype				
		603 bp deletion in the upstream region (-4,865 bp)*	2nd exon 'A' insertion (TG>TAG)	2nd exon (C>T) nucleotide change	1794 position(G>A) nucleotide change	1861 position(G>A) nucleotide change
1	Pink	N	-/-	C/C	G/G	A/A
2	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
3	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
4	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
5	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
6	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
7	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
8	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
9	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
10	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
11	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
12	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
13	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
14	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
15	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
16	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
17	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
18	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
19	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
20	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
21	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
22	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
23	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
24	Pink	N	-/-	C/C	A/A	G/G
25	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
26	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
27	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
28	Pink	N	-/-	C/C	A/A	G/G
29	Pink	N	-/-	C/C	A/A	G/G
30	Pink	N	-/-	C/C	A/A	G/G
31	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
32	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
33	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
34	Pink	N	-/-	C/C	A/A	G/G
35	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
36	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
37	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
38	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
39	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
40	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
41	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
42	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
43	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G

44	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
45	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
46	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
47	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
48	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
49	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
50	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
51	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
52	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
53	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
54	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
55	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
56	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
57	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
58	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
59	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
60	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
61	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
62	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
63	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
64	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
65	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
66	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
67	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
68	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
69	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
70	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
71	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
72	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
73	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
74	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
75	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
76	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
77	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
78	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
79	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
80	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
81	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
82	Pink	N	A/A	C/C	G/G	G/G
83	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
84	Pink	D	-/-	C/C	G/G	G/G
85	Red	N	-/-	C/C	G/G	G/G
86	Red	N	-/-	C/C	G/G	G/G

N: 정상, H: 이형접합체(heterozygote), D: 결실, -/-: 삽입 없음

(10) 특허 제목 : 토마토의 초록 과색 판정 방법

본 발명은 토마토의 초록 과색 판정방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 토마토의 시료로부터 *PSY1*(phytoene synthase 1) 유전자의 변이 여부를 확인하고, *SGR*(stay green) 유전자를 암호화하는 아미노산 서열의 변이 여부를 확인 후, *SIMYB12* 유전자의 변이 여부를 확인하여 토마토의 초록 과색을 판정하는 방법에 관한 것이다. *PSY1* 유전자의 첫 번째 엑손에서 DNA 단편의 삽입 및 결실로 인해 기능이 상실되고, *SGR* 유전자 염기서열 중 371번째, 1,647번째 또는 1,679번째 염기가 변이되고, *SIMYB12* 유전자의 상류 영역의 603bp 염기가 결실되는 경우 토마토의 과색이 초록색임을 판정할 수 있었다. 상기 *SGR* 유전자 변이는 정상형 *SGR* 유전자 염기서열 중 371번째 염기 사이토신(C)이 티민(T)으로 치환되거나 1,647번째 염기 아데닌(A)이 티민(T)으로 치환되거나 1,679번째 염기 티민(T)이 사이토신(C)으로 치환되어 이루어질 수 있다. 이때, 상기 정상형 *SGR* 유전자 염기서열 중 371번째 염기, 1,647번째 염기 또는 1,679번째 염기는 토마토의 과색이 갈색 또는 초록색의 표현형을 나타내는 *SGR* 유전자의 단일염기다형(SNP)이었다.

이에 본 발명자들은 초록 과색의 표현 형질이 *PSY1*(phytoene synthase 1) 유전자, *SGR*(stay green) 유전자 및 *SIMYB12* 유전자간 염기서열의 변이 여부를 확인함으로써 토마토의 초록 과색을 판별할 수 있음을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

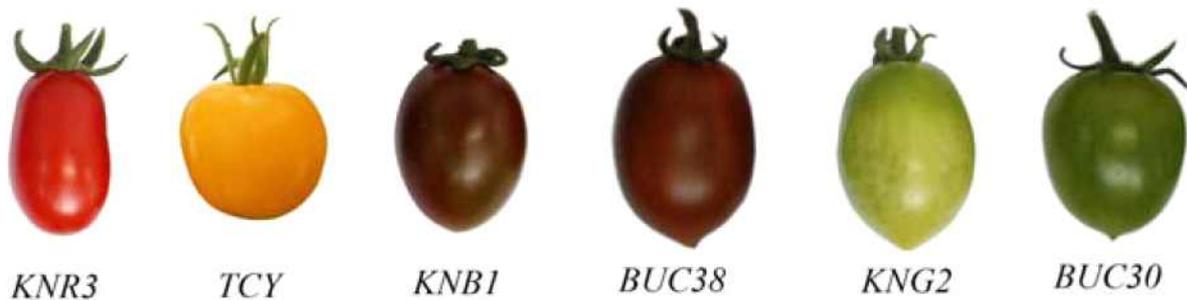
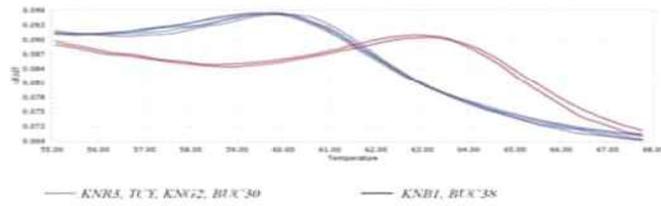
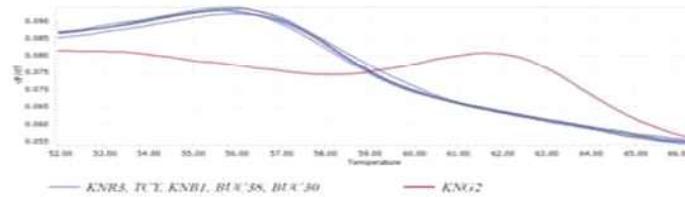


그림 186. 토마토 계통의 과색; 빨간색(KNR3), 노란색(TCY), 갈색(KNB1 및 BUC38) 및 초록색(KNG2 및 BUC30)

- 371 위치



- 1647 위치



- 1679 위치

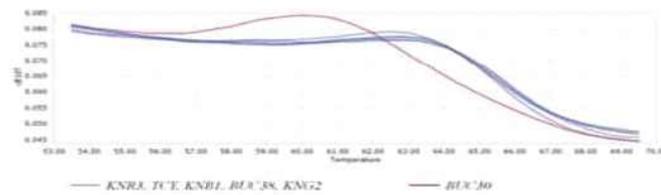


그림 187. 토마토 계통의 SGR 유전자간 단일염기 다형성(SNP)을 이용한 HRM 분석한 결과

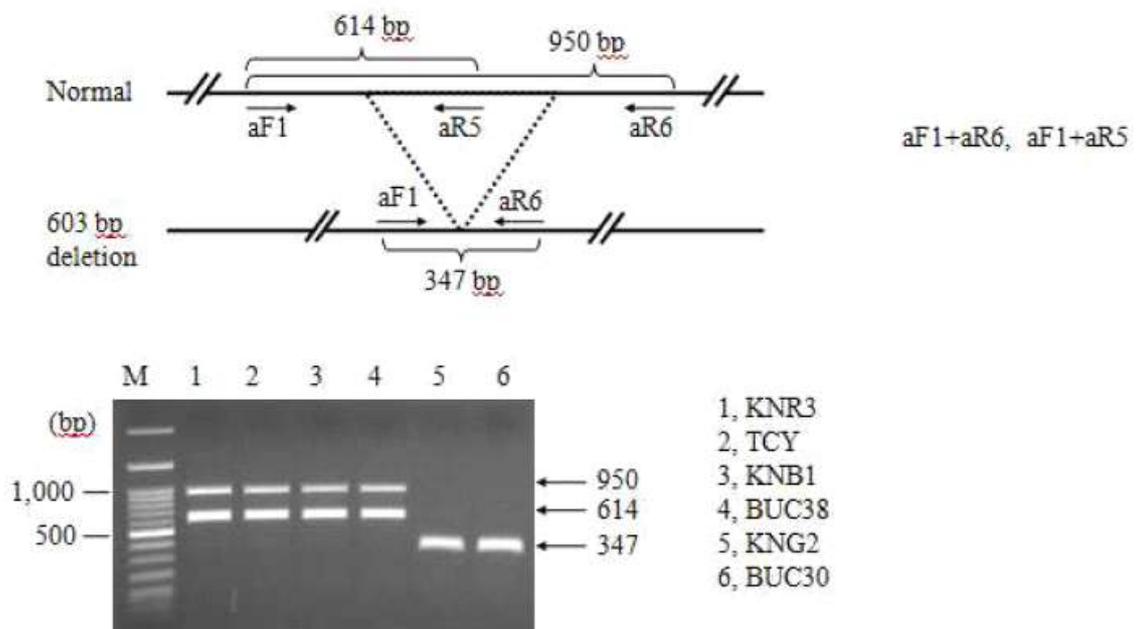


그림 188. SIMYB12 유전자의 상류영역에서 603bp 염기가 결실된 위치의 프라이머의 조합 및 토마토 계통의 SIMYB12 유전자의 PCR 증폭분석결과

(11) 특허 제목 : 토마토 핑크칼라 선별 방법

본 발명은 핑크 과색을 나타내는 토마토의 유전자형 판별용 프라이머 및 이를 이용한 핑크 과색을 나타내는 토마토 선별방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 토마토의 NW24 계통의 유전자형을 판별할 수 있는 프라이머 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함한 토마토 핑크 과색을 가지는 품종을 선별하기 위한 키트를 이용한 토마토 핑크 과색을 가지는 품종의 선별 방법에 관한 것이다. 토마토(*Solanum lycopersicum*)와 같은 과채류의 소비에서 과색은 소비자에게서 중요한 요인이다. 이러한 과색은 카로티노이드(carotenoid)와 플라보노이드(flavonoid) 등과 같은 식물 색소에 의해 결정된다. 플라보노이드 화합물 중 나린제닌 칼콘(naringenin chalcone)은 성숙단계에서 과실의 표피에 축적되어 노란 색소를 부여하는 색소로서, 가장 풍부한 플라보노이드이다. 나린제닌 칼콘(naringenin chalcone)이 결핍된 토마토 등의 과채류는 표피의 외관이 투명하여 핑크 과색을 나타낸다.

플라보노이드 합성 및 토마토 핑크 과색에 관여하는 유전자인 SIMYB12를 포함한 flanking 영역에서 서열번호 2 및 3으로 이루어진 프라이머 세트, 서열번호 4 및 5로 이루어진 프라이머 세트, 서열번호 6 및 7으로 이루어진 프라이머 세트, 서열번호 8 및 9로 이루어진 프라이머 세트를 디자인하여 증폭한 결과, 서열번호 2 및 3으로 이루어진 프라이머 세트와 서열번호 8 및 9로 이루어진 프라이머 세트에서는 핑크색 토마토 NW24 계통과 다른 계통간의 차이가 없이 모두 증폭되었다. 그러나 그 안쪽 영역인 서열번호 4와 5로 이루어진 프라이머 세트 및 서열번호 6과 7으로 이루어진 프라이머 세트에서는 NW24 계통에서만 증폭이 되지 않아 서열번호 4 및 5로 이루어진 프라이머 세트와 서열번호 6 및 7로 이루어진 프라이머 세트의 증폭 영역이 NW24 계통에서 결실되었음을 예상하였다. NW24 계통의 결실 예상 영역이 포함되도록 서열번호 10 및 11로 이루어진 프라이머 세트를 제작하였다.

이에 본 발명자들은 핑크 과색을 가지는 토마토의 새로운 유전자원인 NW24 계통을 확인하고, 상기 NW24 계통의 핑크 과색을 검출할 수 있는 분자마커를 개발하였으며 상기 분자마커를 이용하여 토마토 NW24 계통의 유전자형을 판별함으로써 NW24 계통의 유전자형을 가진 핑크 과색을 나타내는 토마토를 간단하고 정확하게 선별할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

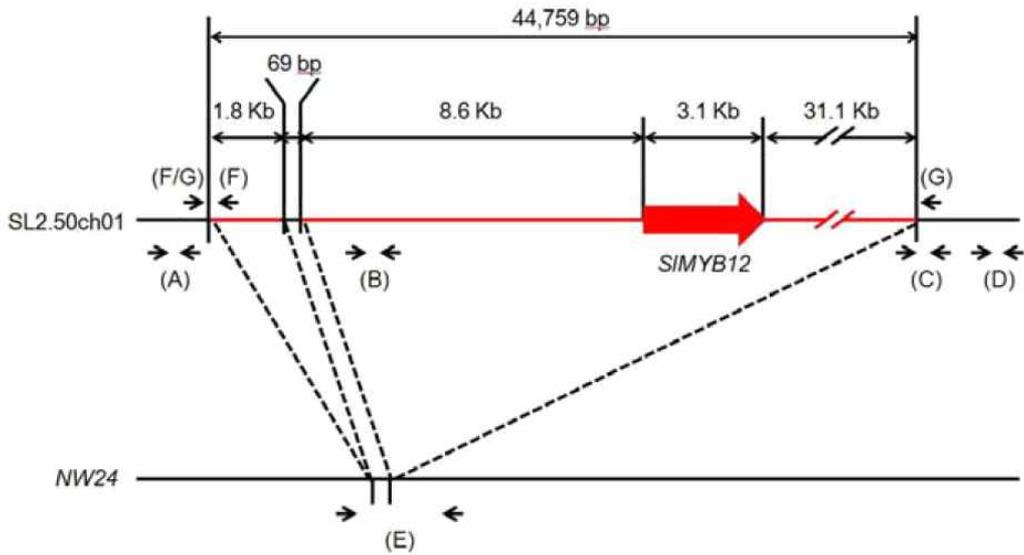


그림 189. 핑크 과색을 나타내는 토마토 NW24 계통의 *sIMYB12* 유전자에 대한 모식도 및 프라이머 위치

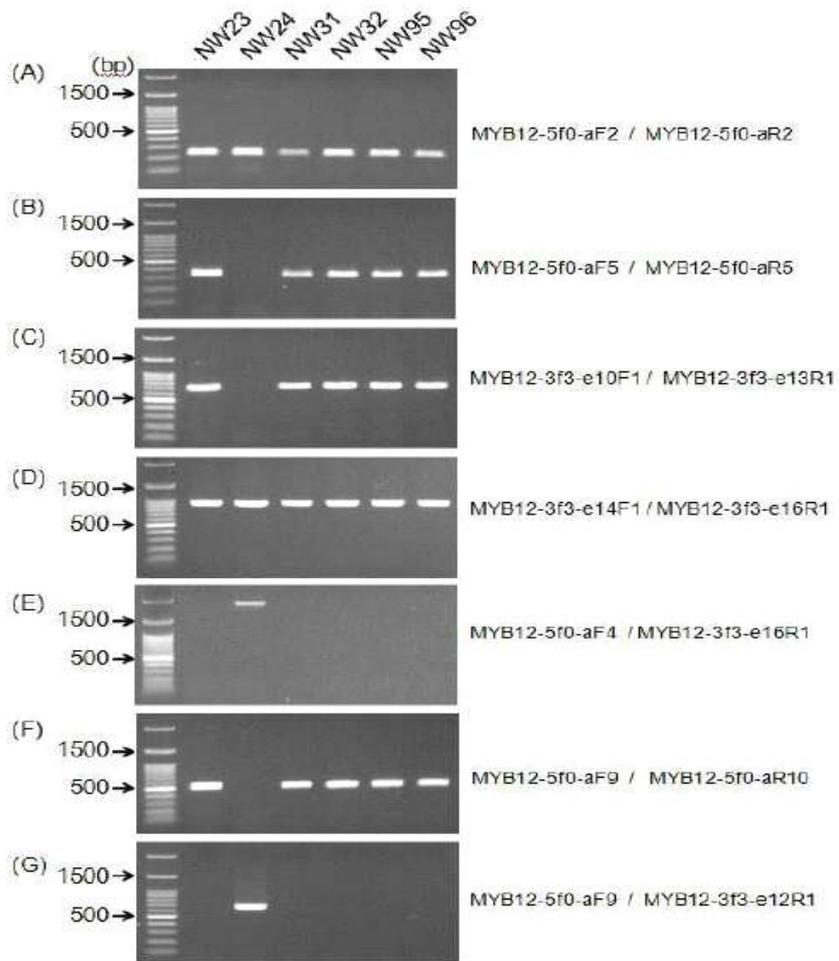


그림 190.. 토마토의 핑크 과색을 나타내는 NW24 계통의 gDNA를 *MYB12* 유전자를 이용하여 PCR 증폭한 결과

나. 국외 특허

(1) 특허 제목 : 과채류의 오렌지 과색 판정방법

본 발명은 과채류의 과색 판정방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 과채류의 *CYC-B* (chromoplast-specific lycopene β -cyclase) 유전자의 프로모터영역에 위치한 단일염기다형성 부위(single nucleotide polymorphisms, SNPs)의 검정으로부터 과채류의 과색이 오렌지색임을 판별하는 것을 포함한 과채류의 오렌지 과색을 판정하는 방법에 관한 것이다.

카로티노이드(carotenoid)는 C40 이소플레노이드 화합물(isoprenoid compounds)을 가지는 유기분자로서, 주로 광합성 생물에서 합성되는 황색에서 홍색, 적색을 나타내는 범위에 있으며 식물에서는 엽록체(chloroplast)와 잡색체(chromoplast) 내에서 생합성되어 과실, 뿌리 등의 저장기관과 꽃과 같은 생식기관의 광합성 조직에 색을 부여한다. 카로티노이드의 종류는 β -카로틴(β -carotene; 당근, 인삼, 해조류, 갑각류 등의 주황색 색소), 라이코펜(lycopene, 토마토, 수박 등의 적색 색소), 푸코잔틴(fucoxanthin; 해조류의 황갈색 또는 갈색 색소), 루테인(lutein; 녹초, 시금치, 계란 등의 녹색 색소) 등이 있다. 이중 β -카로틴(β -carotene)은 인체 내에서 비타민 A의 전구체로서의 역할을 하며, 산화방지 효과와 유해산소 소거작용, 암세포 증식 및 발암 억제작용이 강하여 순환기 질환, 암 및 성인병 등을 예방하는 효능을 가진 것으로 알려져 있다.

이에 카로티노이드를 함유하는 과채류의 소비가 지속적으로 증가하고 있으며, 이에 따라 과실의 형태, 색상 및 성분 등이 다양한 신품종의 개발 역시 지속적으로 증가하고 있는 실정이다. 그러나 과채류의 신품종의 개발에도 불구하고, 육종 소재의 유전적 유사성이 매우 높아 품종간 표현형이 큰 차이를 보이지 않으며 특히 과채류의 과색의 경우 개체가 완전히 성숙해서 과실이 익을 때까지는 그 색을 알 수 없으므로 과색에 대한 분자표지(molecular marker) 개발을 이용한 품종 구분 기술의 정립이 필요한 실정이다.

최근에는 토마토 꽃과 과실에서 *CYC-B*(chromoplast specific lycopene β -cyclase) 프로모터는 베타-카로틴(β -carotene) 또는 라이코펜(lycopene)의 발현을 조절하여 과실의 색을 조절할 수 있다고 보고되었다. 이에 본 발명자들은 *CYC-B* 유전자의 프로모터에 위치한 단일염기다형성 부위(SNPs)를 검정하여 과채류의 색을 성숙단계에 이르기 전에 간단하고 정확하게 오렌지색 과색을 갖는 과채류를 선별 및 검정하는 방법을 개발하고자 노력한 결과, 본 발명을 완성하게 되었다.

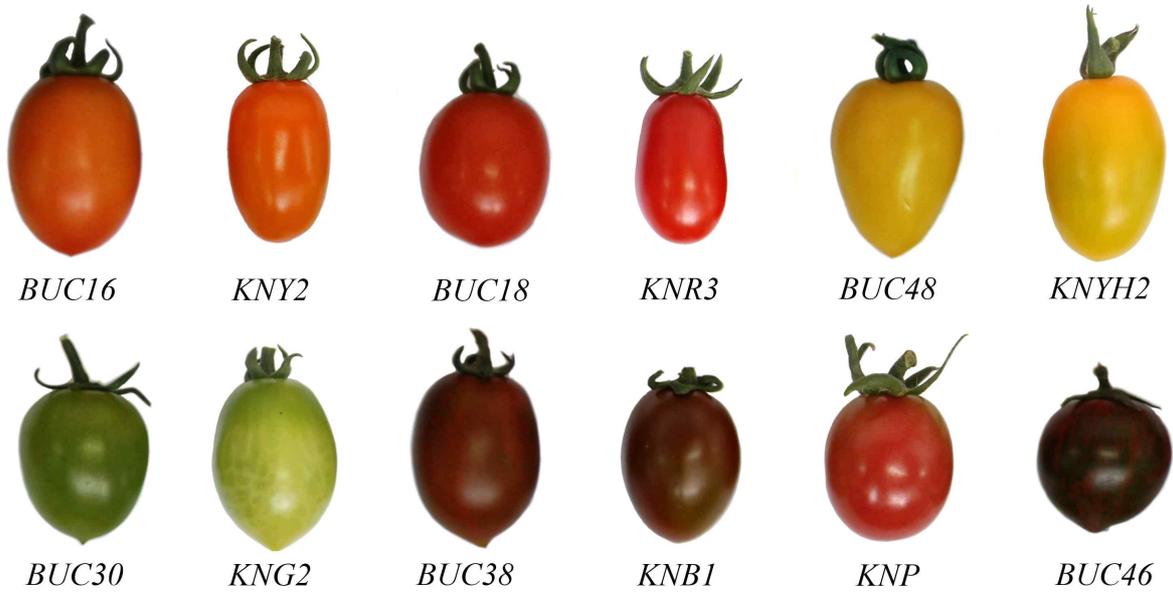


그림 191. 오렌지색(BUC16 및 KNY2), 적색(BUC18 및 KNR3), 노란색(BUC48 및 KNYH2), 녹색(BUC30 및 KNG2), 브라운색(BUC38, KNB1), 분홍색(KNP) 및 검정 및 녹색이 혼합된 혼합색 (BUC46)을 갖는 토마토 품종의 과색

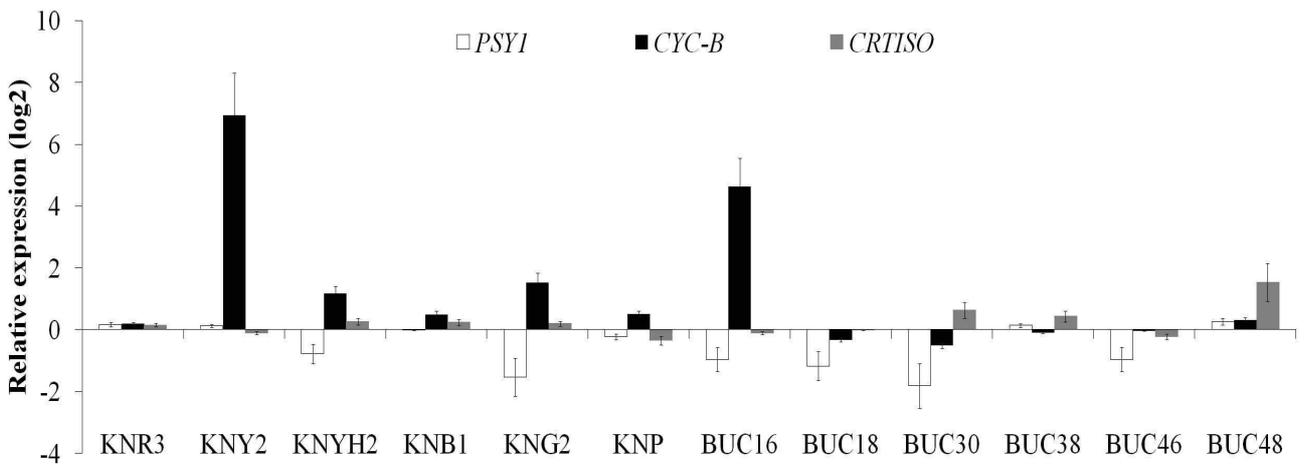


그림 192. 각기 다른 색을 가지는 토마토 품종으로부터 성숙단계(ripe stage, R)에서 수확된 과육으로부터 cDNA를 합성한 후 RT-qPCR 방법을 사용하여 *PSY1*, *CYC-B* 및 *CRTISO* 유전자의 발현을 확인한 결과

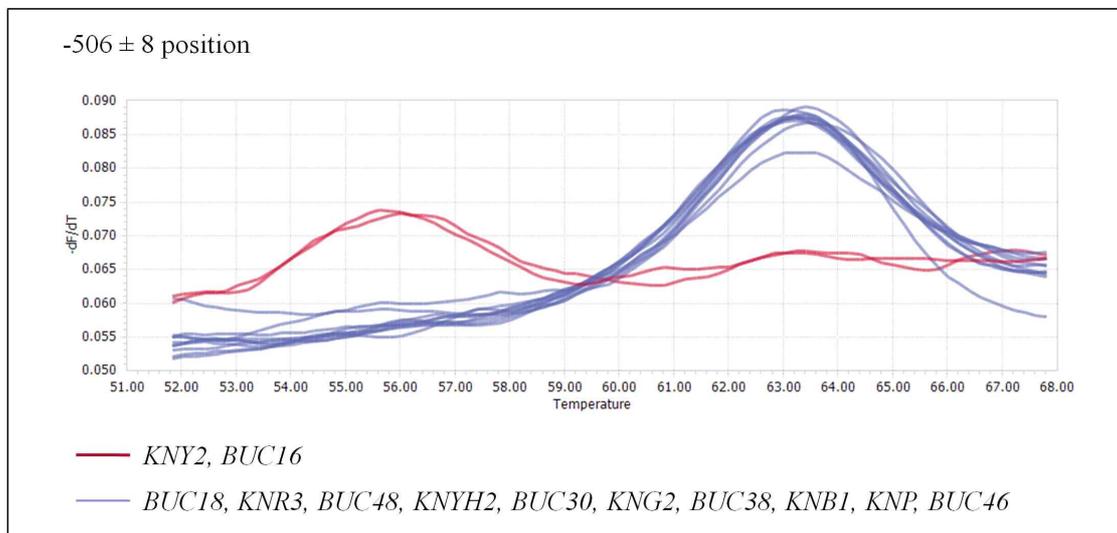
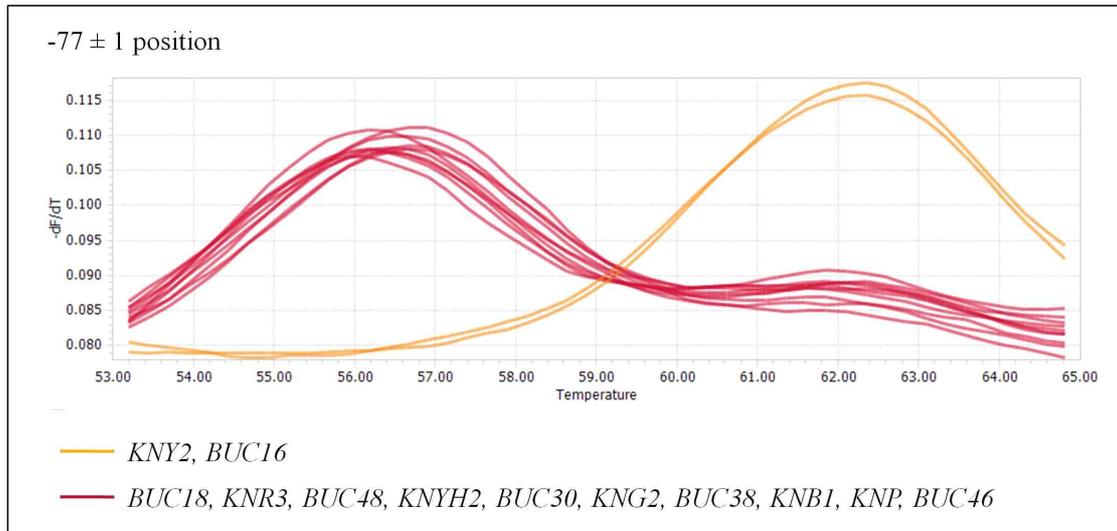


그림 193. 각기 다른 색을 가지는 토마토 품종의 *CYC-B* 프로모터영역 단일염기다형성(SNPs)를 이용한 HRM 분석 결과

(2) 특허 제목 : 과채류의 과색 판정방법

본 발명은 과채류의 과색 판정방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 과채류의 시료로부터 *PSYI*(phytoene synthase 1) 유전자의 정상 기능 유무를 확인하고, *SGRI*(stay green 1) 유전자 염기서열의 변이 여부를 확인하여 과채류의 과색이 초록색, 갈색, 노란색 또는 빨간색을 판정하는 과채류의 과색 판정 방법에 관한 것이다.

카로티노이드를 함유하는 과채류의 소비가 지속적으로 증가하고 있으며, 이에 따라 과실의 형태, 색상 및 성분 등이 다양한 신품종의 개발 역시 지속적으로 증가하고 있는 실정이다. 그러나 과채류의 신품종의 개발에도 불구하고 육종 소재의 유전적 유사성이 매우 높아 품종간 표현형이 큰 차이를 보이지 않으며, 특히 과채류의 과색의 경우 개체가 완전히 성숙해서 과실이 익을 때까지는 그 색을 알 수 없으므로 과색에 대한 분자표지(molecular marker)를 이용한 품종 구분 기술의 정립이 필요한 실정이다.

이에 본 발명자들은 과채류에서 초록, 갈색 또는 노란색 과색의 표현형질이 *SGRI*, *PSYI* 유전자상의 다형성, 즉 *SGRI*, *PSYI* 유전자 중 어떤 염기의 돌연변이에 의한 것인지 밝히고, *PSYI* 유전자 및 *SGRI* 유전자의 기능 유무에 따라 과채류의 과색을 판정할 수 있는 방법을 개발하고자 노력한 결과, 본 발명을 완성하게 되었다.

본 발명은 과채류의 시료로부터 *PSYI*(phytoene synthase 1) 유전자의 정상 기능 유무를 확인하고, *SGRI*(stay green 1) 유전자 염기서열의 변이 여부를 확인하여 과채류의 과색이 초록색, 갈색, 노란색 또는 빨간색임을 판정하는 방법을 제공하는 것이다.

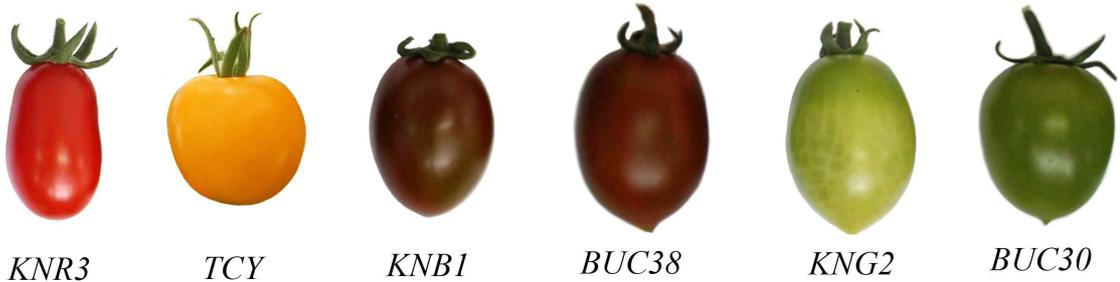


그림 194. 빨간색(*KNR3*), 노란색(*TCY*), 갈색(*KNB1* 및 *BUC38*) 및 초록색(*KNG2*, *BUC30*)을 갖는 토마토 계통의 과색

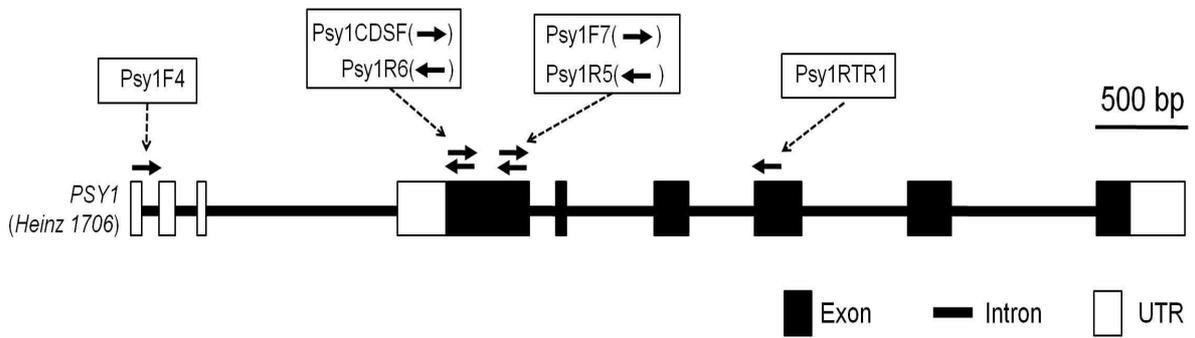


그림 195. *PSY1* 유전자 정보를 기반으로 합성한 프라이머의 위치에 대한 모식도

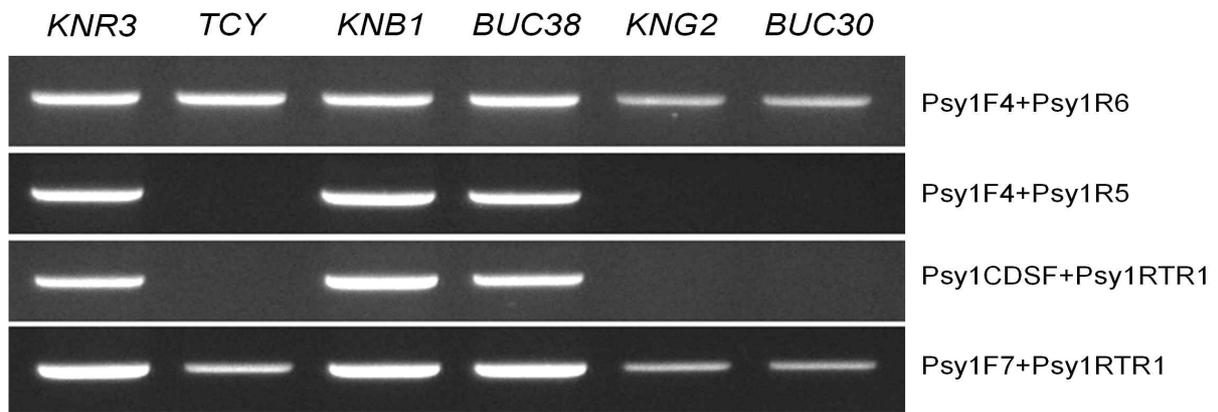


그림 196. 토마토 색깔별 *PSY1* 유전자의 특이적인 증폭산물

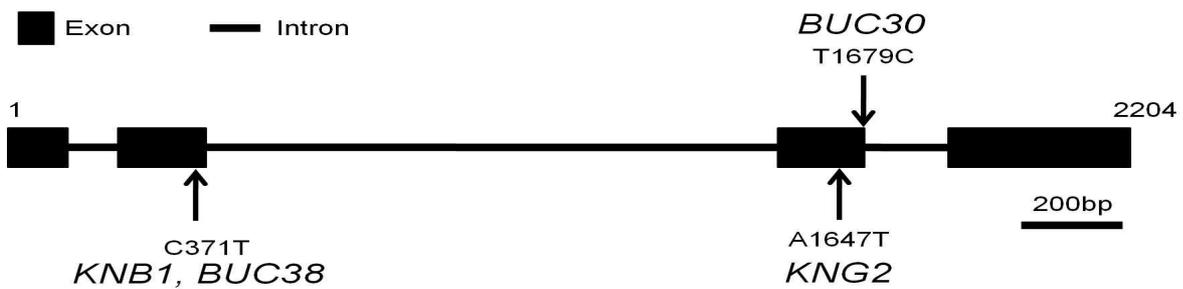


그림 197. 각기 다른 색을 가지는 토마토 계통의 *SGR1* 유전자의 SNP 위치 모식도

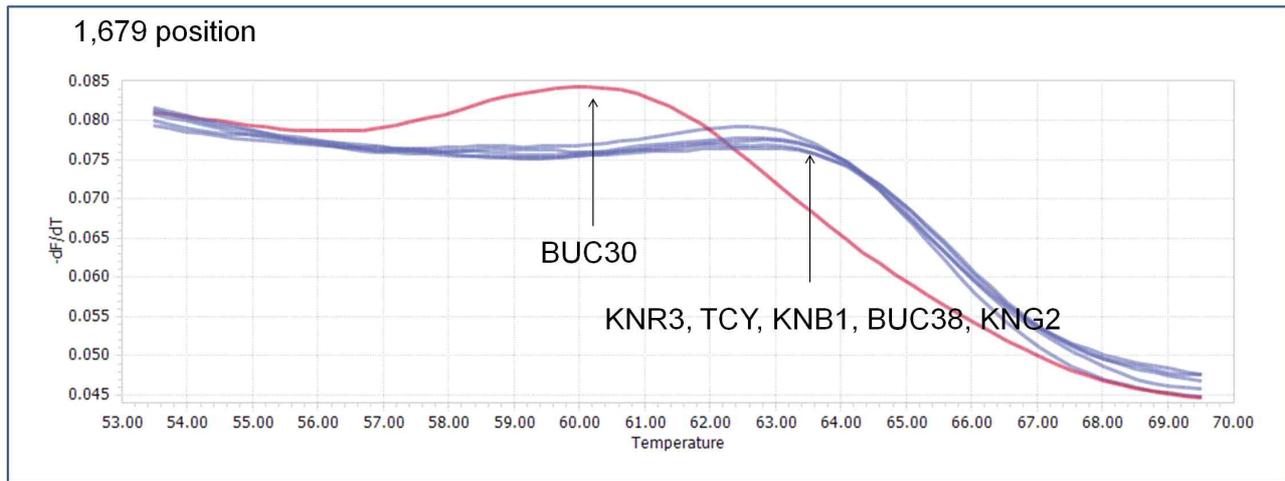
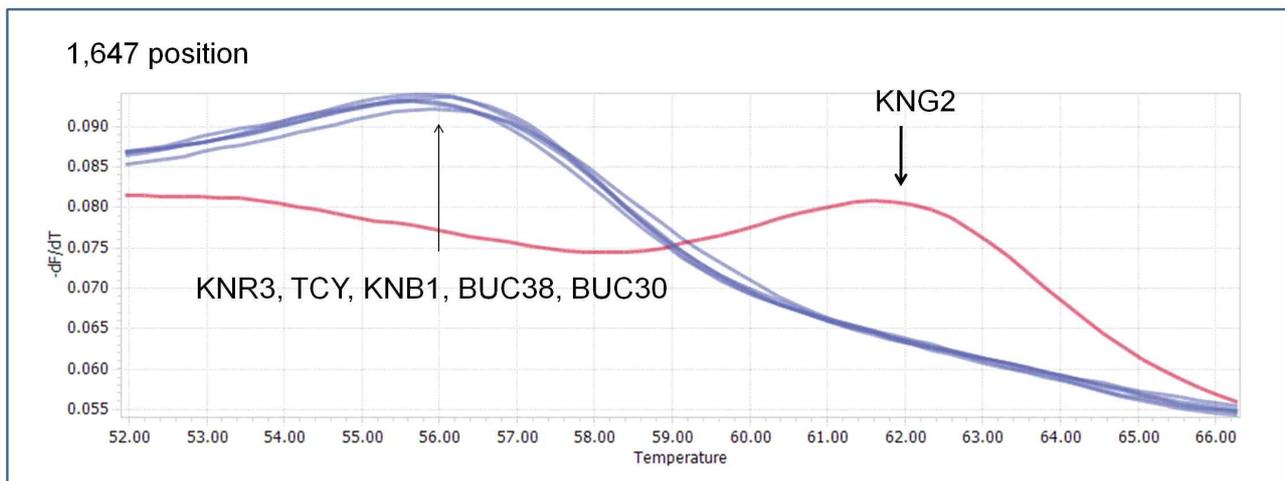
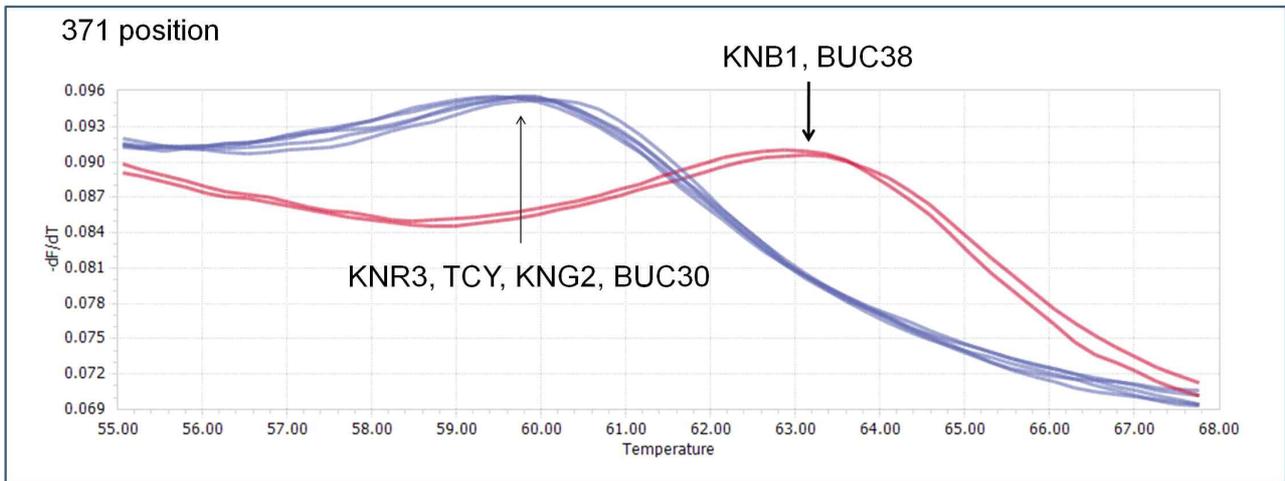


그림 198. 각기 다른 색을 가지는 토마토 계통에 대한 *SGR1* 유전자의 HRM 분석결과

(3) 특허 제목 : 양배추 자가불화합성 인자 ClassII의 조합순도 검정용 또는 유전자형 판별용 프라이머 세트 및 이를 이용한 순도 검정 또는 유전자형 판별 방법

본 발명은 양배추 자가불화합성 인자 ClassII의 조합순도 검정용 또는 ClassII의 유전자형 판별용 프라이머 세트, 그리고 이를 이용한 양배추 자가불화합성 인자 ClassII의 조합순도를 검정하는 방법 또는 ClassII의 유전자형을 판별하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 양배추의 자가불화합성 인자 ClassII의 SRK (S-locus receptor kinase) 유전자인 S2, S5 및 S15의 3개 인자의 조합 순도를 검정하고, SRK 유전자의 유전자형을 판별함으로써 동일한 유전자형의 자가불화합성 유전자를 가진 양배추 계통간의 교배로 인한 수분 및 수정 실패를 미연에 방지할 수 있는 양배추 자가불화합성 인자 ClassII의 조합순도 검정방법 및 유전자형 판별 방법에 관한 것이다.

자가불화합성은 동일한 자가불화합성 유전자를 가진 개체간에는 수분 및 수정이 이루어지지 않는 현상으로 자가수분으로 인한 후대의 약세 현상을 피하기 위한 식물체 고유 특성이다. 그러나 이러한 자가불화합성 현상은 꽃이 핀 후 꽃가루를 암술머리에 수분한 이후에만 알 수 있기 때문에 자가불화합성 판별은 육종 과정에 많은 어려움을 주고 있다. 따라서 양배추 품종 육성자가 자가불화합성 유전자형을 간편하게 알 수 있다면 교배 계획을 수립할 때 동일한 유전자형간의 교배를 피할 수 있으며 다른 유전자형 간의 교배로 보다 효율적인 육종계획을 수립하고 육종비용을 대폭 절감할 수 있다.

배추과 작물의 자가불화합성 인자형은 염기서열에 의해 classI과 classII로 나뉘는데 (Nasrallah et al., 1991), 일반적으로 class-I에 속하는 인자형이 class-II에 속하는 인자형보다 화분 쪽에서 우성인 것으로 밝혀져 있으며 classII 인자형은 활력이 약하거나 그 발현이 일정하지 못한 것으로 보고되었다.

이에 본 발명자들은 양배추 자가불화합성을 일으키는데 관련된 ClassII 그룹의 SRK 유전자가 오랜 기간을 통하여 많은 변이를 축적하고 있다는 사실에 착안하여 이들 유전자 정보를 이용하면 자가불화합성이 다른 계통을 판별할 수 있는 프라이머를 개발할 수 있음을 확인하여 이를 토대로 본 발명을 완성하였다.

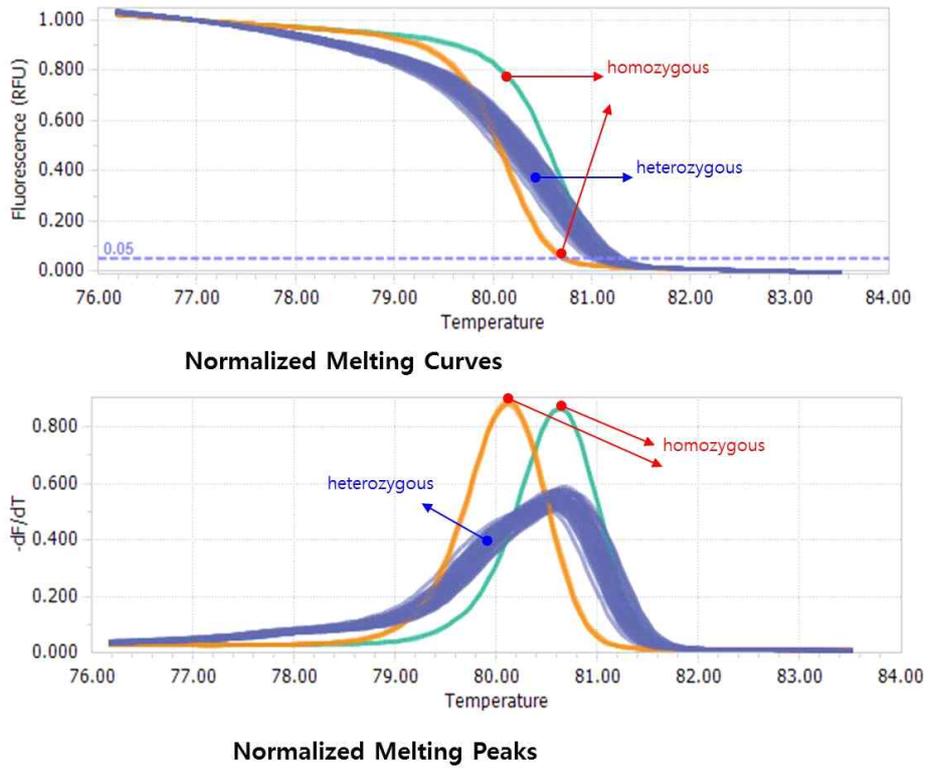


그림 199. 양배추 자가불화합성 인자 ClassII의 조합순도 검정용 프라이머 세트를 이용하여 증폭된 PCR 산물의 HRM (high resolution melting) 분석 결과

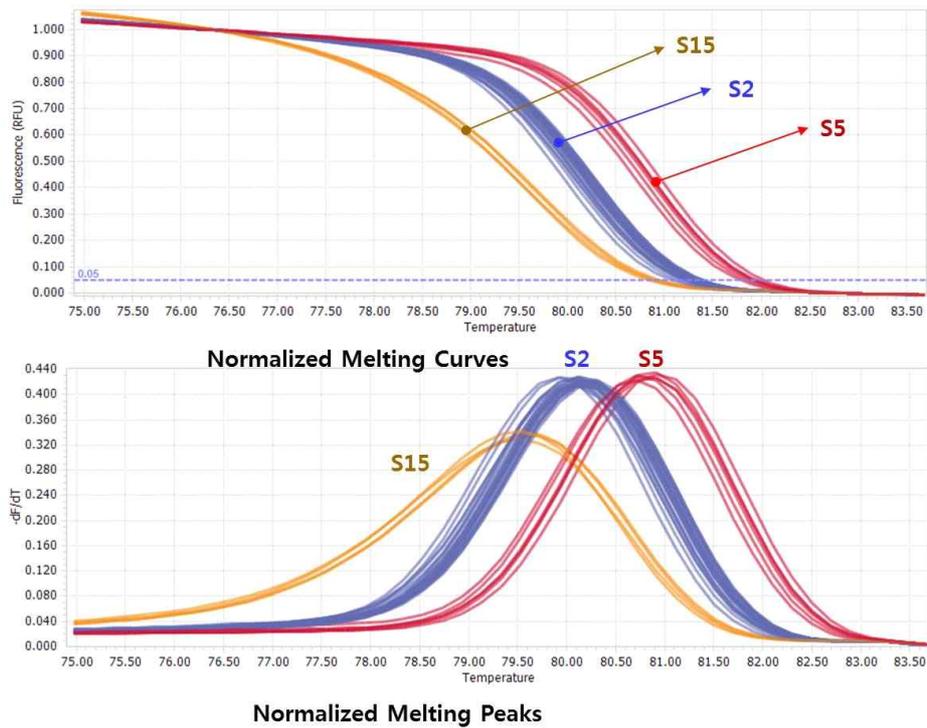


그림 200. 양배추 자가불화합성 인자 ClassII의 유전자형 판별용 프라이머 세트를 이용하여 증폭된 PCR 산물의 HRM 분석 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 정량적 연구개발 성과목표 대비 실적

성과목표	품종개발		특허		논문		분자 마커	유전자원		국내 매출액	종자 수출액	기술 이전	성과 관리 시스템	인력 양성	기타 (학 술발 표)
	출 원	등 록	출 원	등 록	SCI	비 SCI		수 집	등 록						
2013	목표	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	실적	-	-	-	-	1	9	-	-	-	-	-	1	2	2
2014	목표	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	실적	-	-	6	-	11	1	25	-	-	-	-	-	-	14
2015	목표	-	-	1	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	실적	-	-	5	-	13	2	48	-	-	-	-	-	6	29
2016	목표	-	-	1	1	5	-	-	-	-	-	-	-	3	-
	실적	-	-	5	2	17	10	1	-	-	-	-	-	3	26
계	목표	-	-	2	1	10	1	-	-	-	-	-	-	3	-
	실적	-	-	16	2	41	14	83	-	-	-	-	1	11	71
달성율(%)	-	-	800	200	410	140	8300	-	-	-	-	-	100	360	7100

제2절 연차별 연구개발 목표, 내용 및 달성도

구분 (연도)	세부프로젝트명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1차년도 (2013)	제 1 세부: 원예작물의 유전체 활용 및 육종소재 발굴 시스템 구축	1. 토마토 병 및 형질관련 SNP 마커 개발 (2차년도 계속)	- 각 질병에 대한 저항성과 이병성 간의 SNP 확인 후 HRM 시스템 적용을 위한 테스트 수행	50
		2. 양배추 transcriptome 분석에 의 한 잡종강세 관련 유전자 동정 및 발현해석 (2차년도 계속)	- 잡종강세에 특이적인 발현양을 보이는 51개 유전자의 상동성 분석 및 qRT-PCR을 이용 한 유전자 발현 수준을 확인	70
		3. 양배추 검은썩음병 저항성 유전자 탐색 및 분자마커 개발 (2차년도 계속)	- 양배추 검은썩음병과 관련된 QTL을 분석하 여 특이적인 locus를 확인하고 SSR을 탐색 하여 TNL family 수집 후 발현 분석	50
		4. 양과 저온 저항성 관련 transcriptome 분석 및 분자마커 개발 (2차년도 계속)	- 양과 3계통 중 내한성이 강한 계통을 선별하 기 위한 ion leakage 실험 후 내한성에 저항성과 이 병성 계통에 대한 RNA-seq 분석	50
		5. 풍미가 좋은 양과 검정용 QTL 동정 및 마커 개발 (2차년도 계속)	- 이중반수체(double haploid) 양과36101, 36114 및 36122 계통에 대한 피루브산, 당 성분의 HPLC 분 석	60
		6. 갯무 유래 새로운 CMS 소재 탐색 (2차년도 계속)	- 특이적 ORF138 primer 제작 및 qDNA PCR 을 통해 새로운 CMS 소재를 확인 및 Ogura 등 기존 알려진 CMS와의 차별성 검증	50

		7. 양배추 저온 관련 유전자의 탐색 및 transcriptome 특성 분석	- Bo106, Bo107 계통에 대한 RNA-seq 분석 결과에서 KEGG A-H의 8개 카테고리 중 저온 내성 관련 유전자를 포함하는 그룹 C의 4,965개 유전자 확보	100		
		8. 양배추의 CBFs 유전자의 기능분석 및 AP2/ERF 전사인자의 genome-wide 분석	- 에기 장대의 단백질 유사성이 높은 5개의 CBF 단백질 발현	100		
		9. 배추의 내한성 관련 bZIP 전사인자의 transcriptome 분석	- 배추 내한성 관련 bZIP 전사인자 중 특이적 발현수준을 보이는 <i>Bra000256</i> , <i>Bra004689</i> , <i>Bra003320</i> 유전자 선발	100		
		10. 배추의 생물학적, 비생물학적 스트레스 관련 WRKY family의 동정 및 유전자 발현 분석	- 배추 multiple 스트레스 관련 3가지 유전자 <i>BrWRKY65</i> , <i>BrWRKY72</i> , <i>BrWRKY97</i> 선발	100		
		11. 양배추의 고온 및 시들음병 관련 TIR-NBS-LRR 유전자의 동정 및 특성 분석	- 양배추 고온 및 시들음병에 반응하는 multiple stress 유전자 37가지 <i>Bo00713</i> , <i>Bo01684</i> , <i>Bo03822</i> 선발	100		
		12. 양배추 내한성 및 내동성 관련 안토시아닌 합성(ANS) 유전자의 특징 및 유전자 발현 분석	- 안토시아닌 축적과 저온 스트레스에 밀접한 관련성이 있는 <i>BrANS2</i> 와 <i>BrANS3</i> 유전자 선발	100		
		13. 배추의 내한성 및 내동성 관련 유전자의 microarray 분석	- Chifu에서 HLATZ TFs family protein(<i>Bra02380</i>), MADS-box TFs family protein (<i>Bra03385</i>), <i>BrWRKY33</i> , <i>Bra00069</i> 등 3개의 유전자 선발 - Kenshin에서 MYB-like TFs family protein (<i>Bra01247</i>), bHLH (<i>BrICE2</i> , <i>Bra019794</i>) 등 2개의 유전자 선발	100		
		14. 배추의 비생물학적 스트레스 조건 하에서 CBL 유전자의 발현 분석	- 배추에서 17개의 CBL 단백질을 확인하고 5개의 그룹으로 분류하여 비생물학적 스트레스에 반응하는 6개의 유전자 선발	100		
		15. 배추의 카로티노이드 유전자의 발현 분석	- <i>BrPSY</i> , <i>BrPDS</i> , <i>BrRUT2</i> , <i>BrCRTISO</i> 등 4개의 단백질은 α, β - carotene 생합성에 관여, <i>BrHYDB2</i> , <i>BrRUT5</i> , <i>BrRUT1</i> , <i>BrHYDB1</i> 단백질은 lutein과 zeaxanthin의 생합성에 관여함을 증명	100		
		16. 식물 다양성 보존을 위한 DNA 바코딩 기술의 활용	- 배추과 작물의 DNA 바코딩 기술 확립을 위해 약 150종간의 다형성 마커 선발	100		
		제 2 세부 : 원예종자사업단 연구 성과 관리 시스템 구축	1. 장기간 대규모의 연구 사업에서의 연구 성과 정보관리를 체계적으로 수행할 수 있는 정보 통합관리 시스템 개발	- 홈페이지 및 DB를 이용한 연구 성과 정보 통합 관리 시스템 개발 및 운영	100	
			2. 연구 성과 지표와 연계하여 사업단의 평가에 활용 가능한 성과관리 모델 개발	- 진도관리 시스템을 활용한 연구 진도관리 및 진행상황 모니터링	100	
			3. 연구 성과 정보의 체계적인 수집 및 축적을 통해 추후 중/장기적인 과급효과의 확인을 위한 추적평가관리 시스템에 활용 가능한 정보 제공	- 연구 성과관리 시스템을 바탕으로 한 사업단 성과관리 및 평가	100	
		2차년도 (2014)	제 1 세부: 원예작물의 유전체 활용 및 육종소재 발굴 시스템 구축	1. 토마토 병 및 형질관련 SNP 마커 개발 (3차년도 계속)	- HRM용 분자마커 제작 완료 및 여러 소재를 활용한 실증 실험 - 토마토 SNP 마커 관련 4개 특허 출원 완료 - Fluidigm(EP-1)용 DNA chip 개발 및 실용화 검토	90
				2. 양배추 transcriptome 분석에 의한 잡종강세 관련 유전자 동정 및 발현해석	- Real time-PCR 분석에 의한 관련 유전자 동정 완료 - 우량 F1 조합 작성을 위한 분자마커 개발 완료	100

		3. 양배추 검은썩음병 저항성 유전자 탐색 및 분자마커 개발 (3차년도 계속)	- 검은썩음병 관련 주요 9개의 QTL 영역 확인 및 관련 마커를 이용한 정확한 physical mapping 진행 - 검은썩음병에 관련된 유전자 및 소재 확보 후 실증 시험	70	
		4. 양과 저온 저항성 관련 transcriptome 분석 및 분자마커 개발 (3차년도 계속)	- 극조생 및 만생종을 이용한 온도처리별 RNA-seq 후 transcriptome 분석 완료 - 내한성/내동성 후보유전자 탐색 및 qRT-PCR 발현 시험	70	
		5. 양과 구근형성/맛 관련 QTL 동정 및 분자마커 개발	- 구근형성, 맛 관련 FT3, 4, 6 후보유전자 확보 - 구근형성 및 맛 관련 실증 시험을 통한 분자마커 개발	100	
		6. 갯무 유래 새로운 CMS 소재 탐색 (3차년도 계속)	- Ogura CMS와 다른 유형을 나타내는 CMS를 탐색 하여 계통에 대한 실증시험	60	
		7. 배추의 내한성/내동성 관련 DFR 유전자의 발현 분석	- 배추에서 저온처리에 반응하는 5개의 DFR 유전자, <i>BrDFR1</i> , <i>3</i> , <i>5</i> , <i>6</i> 및 <i>10</i> 유전자 선발 및 확인	100	
		8. 양배추의 내한성/내동성 관련 유전자 동정 및 발현 분석	- 내한성과 내동성에 반응하는 18개의 BoCRG 유전자들을 확인, 이들 중 <i>BoCRG54</i> , <i>56</i> , <i>59</i> , <i>62</i> , <i>70</i> , <i>72</i> 및 <i>99</i> 는 저온 조절 경로 상에 상호작용을 증명	100	
		9. 양배추의 bZIP transcription factor 분석	- 저온에 특이적으로 반응하는 양배추의 <i>BoBZIP3</i> 와 배추의 <i>BrbZIP5</i> 두 유전자 모두 N-rich 영역을 가진 LCR을 가지고 있어, N을 포함하는 영역을 가진 BolZIP 단백질은 저온 스트레스 반응과 밀접한 관련성 있음을 확인	100	
		10. Brassica에서 ABA, SL 및 비생물학적 스트레스에 반응하는 carotenoid oxygenase 유전자의 동정 및 발현분석	- 배추와 양배추에서 비생물학적, 호르몬 관련 5종의 stress에 관여하는 CCD1, 4 유전자 확인 및 상호 network 분석 완료	100	
		11. Brassica류 작물의 DNA barcoding (3차년도 계속)	- 주요 바코딩 유전자들인 <i>ITS</i> , <i>ITS 2</i> , <i>MATK</i> , 및 <i>RBCL</i> 에 대한 계통분석을 실시하여 배추 속에 이용한 가능한 유전자를 선발	40	
		12. 배추의 스트레스 관련 Alfin-like 전사인자의 동정 및 발현분석	- 양배추의 비생물학적, 생물학적 스트레스에 모두 관여하는 7개의 <i>BrAL2</i> , <i>3</i> , <i>7</i> , <i>9</i> , <i>13</i> , <i>14</i> 및 <i>15</i> 유전자 확인.	100	
		위탁: 세포막 수용체 kinase의 인산화 연구를 통한 유용 원예작물 소재 개발	1. 세포막 수용체 유전자들의 확보	- 양배추, 토마토로부터 DNA 추출하고 세포막 수용체 kinases (LRR-RLKs) 유전자들의 클로닝	100
			2. 세포막 수용체 단백질들의 재조합 단백질 클론 확보	- in vitro에서 재조합 단백질들의 특징 규명	100
3. 병저항성, 환경 저항성 유용 유전자 선별 및 확보 (3차년도 계속)	- in vitro에서 세포막 수용체 kinase의 인산화 유무 검증		70		
4. 세포막 수용체 kinase의 효소 활성 검증 (3차년도 계속)	- 응용가능한 수용체 kinase의 선별		60		
3차년도 (2015)	제 1세부: 원예작물의 유전체 활용 및 육종소재 발굴 시스템 구축	1. 토마토, 양배추, 양과 병 및 형질관련 마커 개발	- 질병 및 형질관련 SNP 확보 - 저항성 이병성 소재 확보 후 실증시험 - Fluidigm(EP-1)용 DNA chip개발 및 실용화 검토	100	
		2. 양배추 검은썩음병 저항성 유전자 탐색 및 분자마커 개발	- 검은썩음병 관련 주요 9개의 QTL영역 확인 및 관련 마커를 이용한 정확한 physical mapping - 검은썩음병에 관련된 유전자 및 소재 확보 후 실증시험 수행	100	
		3. 양배추 잠종강세 관련 유전자 동정 및 특징 분석 (4차년도 계속)	- 잠종강세에 특이적인 발현양을 보이는 51개 유전자의 homologues를 찾아 qRT-PCR을 이용하여 발현 수준을 확인 후 후보 유전자 선발	70	
		4. 배추에서 abiotic stress에 의해 유도된 BZR 전사인자 family의 특징 분석	- 배추의 BZR 유전자 family 동정 및 분류 - 생물학적, 비생물학적 스트레스관련 후보 유전자의 발현 및 구조분석	100	

	5. 양배추 뿌리혹병 분자마커 개발	- 균주 race별 감염된 양배추에 SSR 마커 개발 - 9개 QIL 영역 중 뿌리혹병 저항성과 이병성간의 비교분석 후 LRR 관련 유전자 선발	100
	6. 배추의 저온관련 BrbZIP전사인자의 분자적 구조 분석	- 배추의 저온 관련 BrbZIP 후보유전자 중 homo와 hetero type의 dimer를 형성하는 2개의 BrbZIP 단백질 발현 및 상호작용 확인	100
	7. 45S-IGS 분석에 의한 양배추 종 다양성 고찰	- 양배추 종 ITS 분석 - IGS cloning 및 sequencing	100
	8. 갯무 유래 새로운 CMS 소재 탐색	- 신규 CMS계통에 대한 엽록체 및 미토콘드리아 DNA 비교 분석 - 45S rDNA 및 IGS 분석	100
	9. 배추속 작물의 DNA barcoding	- 주요 바코딩 유전자들인 <i>ITS</i> , <i>ITS 2</i> , <i>MATK</i> 및 <i>RBCL</i> 에 대한 계통분석을 실시하여 배추 속에 이용한 가능한 유전자 선발	100
	10. 배추속 작물의 myrosinase-sinigrin의 <i>in silico</i> 분석	- 단백질 아미노산 염기서열의 구조 및 alignment 분석 - 단백질 상동성 모델링 - 단백질 모델 최적화 및 평가 - 모델 단백질의 docking 연구	100
	11. 양배추의 스트레스 저항성 관련 SGT1 유전자의 발현 분석	- 양배추의 SGT1 관련 유전자의 탐색 및 아미노산 구조 분석을 통한 분류 - 스트레스에 저항성과 이병성을 가진 양배추 계통에 유전자 발현시험	100
	12. 양과 저온 저항성 관련 transcriptome 분석 및 분자마커 개발(4차년도 계속)	- 극조생 및 만생종을 이용한 온도 처리별 RNA-seq. 분석완료 - RNA-seq.데이터의 온도 처리별 transcriptome 분석 - 내한성/내동성 관련 transcripts 분석 및 후보유전자에 대한 발현 분석	80
	13. 양과 노균병 저항성 분자 마커 개발(4차년도 계속)	- AFLP를 이용한 Pd resistance locus의 노균병 저항성, 이병성 계통에 대한 실증시험	90
	14. 양과 내분구형성 관련 분자마커 개발	- Santero 극조생 및 만생종에서 flowering locus 관련 6개 유전자 중 3개 유전자의 SNP 개발	100
	15. 양과의 저온 특이적 microsatellite 마커 개발	- 양과 데이터베이스에서 EST와 gDNA sequence 수집 및 확보 - SSR finding program을 이용한 primer 디자인 - 저온 처리 양과에서의 유전자 발현 분석	100
	16. 백합에서 스트레스에 반응하는 유전자의 동정 및 특징 분석(4차년도 계속)	- 스트레스 저항성 관련 EST(12개의 후보 유전자) 확보 - 신나팔에 <i>Botritis cinerea</i> 병 처리 후 후보유전자의 발현 분석	80
	17. 백합의 잠종강세관련 transcriptome 분석(4차년도 계속)	- RNA-seq. 분석완료 - 잠종강세 후보 유전자 선발 - 후보유전자의 발현 시험 - 강한 잠종강세를 보이는 계통에 대한 SNP 분자마커 선발	80
	18. 감귤 궤양병 저항성 분자마커 개발(4차년도 계속)	- WRKY22, GST1유전자의 궤양병 저항성 이병성 간의 SNP site 탐색	80
	19. 감귤 다배성관련 분자마커 개발(4차년도 계속)	- Psg-2, Msg-2 유전자의 다배성 및 단배성 선발가능 SNP 및 deletion site 탐색	80
위탁: 세포막 수용체	- 양배추와 배추의 BAK1 receptor kinase의 기능분석(4차년도 계속)	- BAK1 receptor kinase 유전자의 재조합 단백질의 생산과 Western blot 분석으로 auto-/transphosphorylation 분석	90

	kinase의 인산화 연구를 통한 유용 원예작물 소재 개발	- 원예작물의 응용소재 유전자 탐색	- 식물의 성장과 환경, 병저항성 유전자 탐색 (RPK1, CEP1 등)	100
		- BoBAK1 등 세포막 수용체 단백질의 인산화 sites 판별	- 인산화 sites의 기능분석	100
		- 단백질 상호작용에 관한 연구 (4차년도 계속)	- 단백질-단백질 상호작용을 통한 신호전달 메커니즘 해석	80
4차년도 (2016)	제 1세부: 원예작물의 유전체 활용 및 육종소재 발굴 시스템 구축	1. 토마토 병 및 형질관련 SNP 마커 개발	- 질병 및 형질관련 SNP 확보 - 저항성 이병성 소재 확보 후 실증시험 - Fluidigm(EP-1)용 DNA chip 개발 및 실용화 검토	100
		2. 핑크 토마토에서 과피색과 SIMYB12의 변이에 관한 분석	- 핑크 토마토에 대한 SIMYB12 유전자에 대한 sequence 비교분석 - 핑크/non-핑크 토마토의 비교분석	100
		3. 토마토 과육에서 CYC-B 발현과 관련된 오렌지 컬러에 대한 연구	- 오렌지 토마토에 대한 CYC-B 유전자의 sequence 비교분석 및 발현분석	100
		4. CMS <i>Brassica juncea</i> 와 <i>Brassica oleracea</i> 에서 수술의 호메오티 형질전환에 관련된 MADS-box에 관한 분석	- CMS <i>brassica juncea</i> 와 <i>brassica oleracea</i> 의 MADS-box 유전자들에 대한 발현 분석	100
		5. 양배추에서 스트레스에 대한 Alfin-like 전사인자의 동정 및 발현 분석	- BRAD database에서 배추의 15개 BrAL 확인, 애기장대를 기준으로 4개 군으로 분류 - In silico 기술을 이용하여 14개의 BrAL 유전자의 염색체 상 위치 확인 - 14개 후보 유전자의 기관 특이적인 발현분석 - 14개 후보 유전자의 비생물학적, 생물학적 스트레스에 대한 특이적인 발현 수준 분석	100
		6. 양배추에서 뿌리혹병 발달동안 Methyl salicylic acid gene 발현 분석	- 양배추의 뿌리혹병균 접종 방법 습득 - 뿌리혹 병균 접종 후 시간별 RNA 샘플링 - methyl salicylic acid genes 탐색 - 후보 유전자들에 대한 qRT-PCR을 통한 발현 분석	100
		7. 양배추에서 Cold관련 GST superfamily 유전자들의 Genome-wide 분석	- 양배추의 데이터베이스를 이용한 cold관련 GST superfamily 유전자들의 정보 확보 - GST 유전자들의 계통발생학적 분석 - RT-PCR을 이용한 관련 유전자 동정	100
		8. 양배추에서 methyl jasmonate와 salicylic acid 처리에 의한 glucosinolate 생합성과 유전자 발현에 대한 분석	- methyl jasmonate와 salicylic acid 처리구와 무처리구의 glucosinolate 함량 분석(HPLC) - RT-PCR을 이용한 발현 분석	100
		9. 양배추의 저온 관련 bZIP 전사인자 동정 및 발현 분석	- 배추의 bZIP 전사인자 분석 방법을 기초로 양배추의 bZIP family 분석 - 양배추의 119개 bZIP 후보 유전자들 중 아미노산 염기서열의 차이를 바탕으로 grouping 분석 - 저온 저항성(BN106) 및 이병성(BN107) 계통에 대한 RT-PCR 및 qRT-PCR을 통한 후보 유전자의 확인시험	100
		10. 양배추 잠종강세 관련 유전자 동정 및 특징 분석	- 잠종강세에 특이적인 발현양을 보이는 51개 유전자의 homologues를 찾아 qRT-PCR을 이용하여 발현 수준을 확인 후 후보 유전자 선별	100
		11. 배추에서 생물학적, 비생물학적 스트레스에 대한 MYB transcription factor에 대한 동정 및 발현 분석	- 배추의 MYB family 유전자 탐색 및 아미노산 차이에 따른 분류 - 생물학적, 비생물학적 스트레스 처리 후 MYB transcription factor의 qRT-PCR을 통한 발현 수준 확인 및 후보 유전자 선별	100
		12. 배추에서 스트레스 관련 Aquaporin 유전자들에 대한 동정 및 스트레스 반응 분석	- 배추의 데이터베이스로부터 스트레스 관련 유전자들의 동정 - 생물학적, 비 생물학적 스트레스들에 대해 선별된 유전자들의 발현 분석 - 스트레스에 대해 저항성 및 감수성인 개체 선별	100

	13. 배추에서 asparagine-rich 영역을 포함하는 BrbZIP 전사인자에 대한 분석	- 배추의 BrbZIP 전사인자에 대한 asparagine-rich 영역에 대한 비교 분석	100
	14. 배추에서 스트레스와 호르몬 반응 양상에 대한 TIFY gene family의 genome-wide 분석	- TIFY gene family에서 유전자 탐색 및 아미노산 정보 확보 - 스트레스와 호르몬 처리 후 TIFY 유전자의 발현 양상 확인 - 선발된 TIFY 유전자에 대한 다른 작물과의 비교를 통한 분석	100
	15. 배추에서 생물학적, 비생물학적 스트레스에 대한 PDI gene family에 대한 동정 및 발현 분석	- 배추의 transcriptome 분석에 의한 스트레스관련 유전자 정보 확보 - 배추이외의 다른 작물에서 스트레스 관련 유전자 정보 확보 - 유전자 동정을 위한 primer 디자인 - RT-PCR/Sequencing	100
	16. Brassica juncea에서 품종 구분을 위한 rDNA의 ITS 영역과 MITE families에 관한 분석	- Brassica juncea의 품종별 rDNA의 ITS 영역 비교분석 - Brassica juncea의 품종별 MITE families에 대한 유전자 분석	100
	17. 양파 분자 마커 개발 (노균병, 내분 구형성, 및 저온관련 등)	- AFLP를 이용한 Pd resistance locus의 노균병 저항성, 이병성 계통에 대한 실증시험 - Santero 극조생 및 만생종에서 flowering locus 관련 6개 유전자 중 3개 유전자의 SNP 탐색 - 양파 데이터베이스에서 EST와 gDNA sequence 수집 및 확보 - SSR finding program을 이용한 primer 디자인 - 저온 처리 양파에서의 유전자 발현 분석	100
	18. 백합에서 스트레스에 반응하는 유전자의 동정 및 특징 분석	- 스트레스 저항성 관련 EST(12개의 후보) 확보 - 신나팔에 Botritis cinerea 병 처리 후 후보유전자의 발현 분석	100
	19. 백합의 잠종강세관련 transcriptome 분석	- RNA-seq. 분석완료 - 잠종강세 후보 유전자 선발 - 후보유전자의 발현 시험 - 강한 잠종강세를 보이는 계통에 대한 SNP 분자마커 선발	100
위탁: 세포막 수용체 kinase의 인산화 연구를 통한 유용 원예작물 소재 개발	양배추와 배추의 BAK1, CEPR1, FER1 receptor kinase의 기능 분석	- BAK1 receptor kinase의 생화학적 특징 규명 및 형질전환 후 단백질 발현분석	100
	환경저항성 및 뿌리혹병 관련 원예작물의 응용소재 유전자 발굴	- 식물의 생장과 환경, 병저항성, 질소 transport 등 유전자 탐색 (RPK1, CEPR1 등)	100
	단백질 상호작용에 관한 연구	- CEPR1 단백질과 하위단백질의 상호작용을 통한 신호전달 메커니즘 해석	100
	BoBAK1, FER, CEPR1, receptor kinases 인산화 sites 기능분석	- BoBAK1 등 phospho-specific sites 관별 후 기능 분석	100

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

<특허 출원 및 등록>

○ 국내 특허출원

특허출원번호	특허 제목
10-2014-0175276, 2014	과채류의 노란 과색 판정 방법
10-2015-0016252, 2015	양배추 리보솜 DNA의 IGS 부위를 이용한 일대잡종 종자 순도 검정 방법
10-2015-0017924, 2015	토마토 잎곰팡이병 저항성 선별용 분자마커 및 그를 이용한 선별 방법
10-2015-0071246, 2015	토마토 흰가루병 저항성 또는 이병성 품종 선별용 분자마커 및 이를 이용한 토마토 흰가루병 저항성 또는 이병성 품종 선별 방법
10-2015-0111367, 2015	양배추 시들음병 저항성 관련 마커를 표지하는 프라이머 세트 및 이를 이용한 저항성 양배추 품종 선별 방법
10-2015-0189191, 2015	갯무의 오구라 세포질적 응성 불임성을 부여하는 엽록체 유전자 및 이를 이용하여 제조된 갯무의 오구라 세포질적 응성 불임성 유전자형 판별용 마커
10-2016-0000908, 2016	핑크 과색을 나타내는 토마토의 유전자형 판별용 분자마커 및 이를 이용한 핑크 과색을 나타내는 토마토 선별 방법
10-2016-0005532, 2016	노란 과색을 나타내는 토마토 판별용 분자마커 및 이를 이용한 노란 과색을 나타내는 토마토 선별 방법
10-2016-0074337, 2016	토마토의 핑크과색 유전자형을 판별하기 위한 분자마커 및 이를 이용한 토마토의 핑크 과색을 선별 방법
10-2016-0115729, 2016	토마토의 초록 과색 판정 방법
10-2016-0123712, 2016	토마토 핑크칼라 선별 방법
10-2016-7025808, 2016	과채류의 오렌지 과색 판정 방법
10-2016-7025811, 2016	양배추 자가불화합성 인자 Class II의 조합순도 검정용 또는 유전자형 판별용 프라이머 세트 및 이를 이용한 순도 검정 또는 유전자형 판별 방법

○ 국제 특허출원

특허출원번호	특허 제목
PCT/KR2014/012106, 2014	과채류의 오렌지 과색 판정방법
PCT/KR2015/001187, 2015	과채류의 과색 판정방법
PCT/KR2015/001820, 2015	양배추 자가불화합성인자 ClassII의 조합순도 검정용 또는 유전자형 판별용 프라이머 세트 및 이를 이용한 순도 검정 또는 유전자형 판별방법

○ 국내 특허등록

특허등록번호	특허 제목
10-1639136, 2016	과채류의 노란 과색 판정방법
10-1677714, 2016	토마토 흰가루병 저항성 또는 이병성 품종 선별용 분자마커 및 이를 이용한 토마토 흰가루병 저항성 또는 이병성 품종 선별방법

○ 특허증

- 과채류의 노란 과색 판정방법



- 토마토 흰가루병 저항성 또는 이병성 품종 선별용 분자마커 및 이를 이용한 토마토 흰가루병 저항성 또는 이병성 품종 선별방법

특허증
CERTIFICATE OF PATENT



특허 제 10-1677714 호
Patent Number

출원번호 제 10-2015-0071246 호
Application Number
출원일 2015년 05월 21일
Filing Date
등록일 2016년 11월 14일
Registration Date

발명의 명칭 Title of the Invention
토마토 흰가루병 저항성 또는 이병성 품종 선별용 분자마커 및 이를 이용한 토마토 흰가루병 저항성 또는 이병성 품종 선별방법

특허권자 Patentee
순천대학교 산학협력단(201371-*****)
전라남도 순천시 중앙로 255(매곡동)

발명자 Inventor
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.
This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.

2016년 11월 14일



특허청장
COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

최 동 규

<국내외 논문투고>

논문(국내외 전문학술지) 게재							
번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	Utility of DNA Barcoding for Plant Biodiversity Conservation	Plant Breeding and Biotechnology	Dhivya Selvaraj	4	대한민국	한국육종학회	비SCI
2	Development of Molecular Markers for Low Raffinose and Stachyose in Korean Soybean Cultivars	Plant Breeding and Biotechnology	Kiwoung, Yang	2	대한민국	한국육종학회	비SCI
3	Identification of Yellow Pigmentation Genes in <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>Perkinensis</i> Using Br300 Microarray	International Journal of Genomics	Hee-Jeong, Jung		미국	HINDAWI	SCIE
4	Genome-wide analysis of the distribution of AP2/ERF transcription factors reveals duplication and CBFs genes elucidate their potential function in <i>Brassica oleracea</i>	BMC Genomics	Senthil Kumar Thamilarasan	1	영국	BIOMED CENTRAL	SCIE
5	Ellagic Acid Normalizes Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization and Attenuates Inflammation-Mediated Cell Proliferation in Experimental Liver Cancer	Applied Biochemistry And Biotechnology	S. Srigopalram	8	미국	SPRINGER	SCI
6	Characterization of Dihydroflavonol 4-Reductase (DFR) Genes and their Association with Cold and Freezing Stress in <i>Brassica rapa</i>	Gene	Nasar Uddin Ahmed, Jong-In, Park,	1	네델란드	ELSEVIER	SCI
7	Genome-wide transcriptome analysis of two contrasting <i>Brassica rapa</i> doubled haploid lines under cold-stresses using Br135K oligomeric chip	PLOS one	Hee-Jeong, Jung, Xiangshu, Dong	8	미국	PLOS	SCI
8	Identification and expression analysis of WRKY family genes under biotic and abiotic stresses in <i>Brassica rapa</i> .	Molecular Genetics and Genomics	Abdul Kayum	2015	독일	SPRINGER	SCI
9	Transcriptome analysis of newly classified bZIP transcription factors of <i>Brassica rapa</i> in cold stress response	Genomics	Indeok, Hwang	3	미국	ELSEVIER	SCI
10	Response of NBS encoding resistance genes linked to both heat and fungal stress in <i>Brassica oleracea</i> .	Plant Physiology and Biochemistry	Young-Wook, Kim	2015	프랑스	ELSEVIER	SCI
11	Characterization and stress-induced expression analysis of Alfin-like transcription factors in <i>Brassica rapa</i>	Molecular Genetics and Genomics	Abdul Kayum		독일	SPRINGER	SCI
12	Anthocyanin biosynthesis for cold and freezing stress tolerance and desirable color in <i>Brassica rapa</i> .	Functional & Integrative Genomics	Nasar Uddin Ahmed, Jong-In, Park		독일	SPRINGER	SCI
13	Identification and expression analysis of cold and freezing stress responsive genes of <i>Brassica oleracea</i>	Gene	Nasar Uddin Ahmed, Hee-Jeong, Jung	2	네델란드	ELSEVIER	SCI
14	Genome-wide identification and characterization of MADS-box family genes related to organ development and stress resistance in <i>Brassica rapa</i>	BMC genomics	Gopal Saha, Jong-In, Park		영국	BIOMED CENTRAL	SCI

15	Molecular characterization of BZR transcription factor family and abiotic stress induced expression profiling in <i>Brassica rapa</i>	Plant Physiology and Biochemistry	Gopal Saha	2015	프랑스	ELSEVIER FRANCE-EDITIONS SCIENTIFIQUES MEDICALES ELSEVIER	SCI
16	Genome-Wide Classification and Abiotic Stress-Responsive Expression Profiling of Carotenoid Oxygenase Genes in <i>Brassica rapa</i> and <i>Brassica oleracea</i>	Journal of Plant Growth Regulation	Yonguk Kim		미국	SPRINGER	SCI
17	Functional analysis of the BRI1 receptor kinase by Thr-for-Ser substitution in a regulatory autophosphorylation site	Frontiers in Plant Science	Man-Ho Oh		스위스	Frontiers	SCIE
18	Identification and expression analysis of glucosinolate biosynthetic genes and estimation of glucosinolate contents in edible organs of <i>Brassica oleracea</i> subspecies	Molecules	Go-eun Yi	7	스위스	MDPI AG	SCIE
19	GDSL esterase/lipase gene family in <i>Brassica rapa</i> L. :genome-wide identification and expression analysis	Molecular genetics and genomics	Xiangshu Dong		독일	SPRINGER HEIDELBERG	SCI
20	Global Gene-Expression Analysis to Identify Differentially Expressed Genes Critical for the Heat Stress Response in <i>Brassica rapa</i>	PLOS one	Xiangshu Dong		미국	PUBLIC LIBRARY SCIENCE	SCI
21	Sequence-based unique DNA marker for simultaneous genotyping of all three β -conglycinin subunit genes in soybean	journal of applied botany and food quality	Kiwoung Yang	88	독일	DRUCKEREI LIDDY HALM	SCIE
22	Diversity and Inheritance of Intergenic Spacer Sequences of 45s Ribosomal DNA among Accessions of <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i>	International Journal of Molecular Sciences	Kiwoung Yang, Arif Hasan Khan Robin	16	스위스	MDPI AG	SCIE
23	Development of molecular marker to select resistant lines and to differentiate the races related to powdery mildew in melon(<i>Cucumis melo</i> L.)	Journal of Plant Biotechnology	Hoy-taek Kim		대한민국	Korean Society for Plant Biotechnology	비SCI
24	Molecular modeling of myrosinase from <i>Brassica oleracea</i> . A structural investigation of sinigrin interaction	Genes	Sathishkumar Natarajan		미국	ELSEVIER SCIENCE INC	SCI
25	Expression profiling and characterization of cold, freezing related genes from <i>Brassica rapa</i> cultivars	Israel Journal of Plant Sciences	Senthil Kumar Thamilarasan,		이스라엘	TAYLOR & FRANCIS LTD	SCI
26	The complete chloroplast genome of Korean popular Citrus hybrid Hallabong mandarin [(<i>Citrus unshiu</i> x <i>C. sinensis</i>) x <i>C. reticulata</i>] (<i>Rutaceae</i>)	mitochondrial DNA	Kiwoung Yang		영국	INFORMA HEALTHCARE	비SCI
27	Characterization and abiotic stress-responsive expression analysis of <i>SGTI</i> genes in <i>Brassica oleracea</i>	Genome	Ashokraj Shanmugam		네델란드	SPRINGER	SCI
28	MADS-Box Genes Are Associated with the Petaloidy/Sepaloidy of Stamens in Cytoplasmic Male Sterile Brassica	Plant Breed. Biotech(PBB)	Gopal Saha	1	대한민국	Korean Society of Breeding Science	비SCI
29	Molecular and functional characterization of FLOWERING LOCUS T homologs in <i>Allium cepa</i>	molecules	Ranjith Kumar Manoharan	2	스위스	MDPI AG	SCIE

30	Development of a high-resolution melting marker for selecting Fusarium crown and root rot resistance in tomato	Genome	Bichseam Kim	3	캐나다	CANADIAN SCIENCE PUBLISHING, NRC RESEARCH PRESS	SCI
31	Characterization and expression profiling of MYB transcription factors against stresses and during male organ development in Chinese cabbage (<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>)	Plant Physiology and Biochemistry	Gopal Saha	2016	프랑스	ELSEVIER FRANCE-EDITIONS SCIENTIFIQUES MEDICALES ELSEVIER	SCI
32	Identification of fungal races that cause powdery mildew in melon (<i>Cucumis melo</i> L.) and selection of resistant commercial melon cultivars against the identified races in Korea	Journal of Plant Biotechnology	Hoy-taek Kim		대한민국	Korean Society for Plant Biotechnology	비SCI
33	Functional analysis of the rice BRI1 receptor kinase	Journal of Plant Biotechnology	Jinouk Yeon		대한민국	Korean Society for Plant Biotechnology	비SCI
34	Identification and characterization of S-RNase genes in apple rootstock and the diversity of S-RNases in Malus species	Journal of Plant Biotechnology	Hoy-Taek Kim		대한민국	Korean Society for Plant Biotechnology	비SCI
35	Development of molecular markers for varietal identification of <i>Brassica juncea</i> on the basis of the polymorphic sequence of ITS regions and MITE families	Korean Journal of Horticultural Science & Technology	Kiwoung Yang	2	대한민국	KOREAN SOCIETY OF HORTICULTURAL SCIENCE	SCIE
36	Alfin-like transcription factor family: Characterization and expression profiling against stresses in Brassica oleracea.	Acta physiologiae plantarum	Md. Abdul Kayum	2016	독일	SPRINGER HEIDELBERG	SCIE
37	Expression Profiling of MLO Family Genes under Podosphaera xanthii Infection and Exogenous Application of Phytohormones in <i>Cucumis melo</i> L.	Journal of Life Science	Jewel Howlader	4	대한민국	생명과학회지	비SCI
38	Genome-Wide Identification and Characterization of bZIP Transcription Factors in Brassica oleracea under Cold Stress	biomed research international	Indeok Hwang		미국	HINDAWI PUBLISHING CORPORATION	SCIE
39	Parentage Confirmation of Korean Bred Pear Cultivars by Simple Sequence Repeat SSR Genotyping and S-Genotypes Analysis	Plant Breed. Biotech(PBB)	Hoy-Taek Kim	2	대한민국	Korean Society of Breeding Science	비SCI
40	Modification of Fatty Acid Profiles of Rapeseed (<i>Brassica napus</i> L.) Oil for Using as Food, Industrial Feed-stock and Biodiesel	Plant Breed. Biotech(PBB)	Ujjal Kumar Nath	2	대한민국	Korean Society of Breeding Science	비SCI
41	Research on Biotic and Abiotic Stress Related Genes Exploration and Prediction in <i>Brassica rapa</i> and <i>B. oleracea</i> : A Review	Plant Breed. Biotech(PBB)	Md. Abdul Kayum	2	대한민국	Korean Society of Breeding Science	비SCI

42	Characterization and Expression Analysis of Peroxidases and Glucan Synthase Like Genes in <i>Cucumis melo</i> L	Plant Breed. Biotech(PBB)	Jewel Howlader	2	대한민국	Korean Society of Breeding Science	비SCI
43	Identification of a new race and development of DNA markers associated with powdery mildew n melon	Plant Breed. Biotech(PBB)	Hoy-TaekKim	2	대한민국	Korean Society of Breeding Science	비SCI
44	Sequence Variation in SIMYB12 is Associated with Fruit Peel Color in Pink Tomato Cultivars	Horticulture Environment and Biotechnology	Karpagam Veerappan	3	대한민국	KOREAN SOC HORTICULTURAL SCIENCE	SCIE
45	Whole genome re-sequencing and characterization of powdery mildew disease associated allelic variation in melon	Plos one	Sathishkumar Natarajan		미국	PUBLIC LIBRARY SCIENCE	SCI
46	Expression Profiling of Glucosinolate Biosynthetic Genes in <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> Inbred Lines Reveals Their Association with Glucosinolate Content	Molecules	Arif Hasan Khan Robin	6	스위스	MDPI AG	SCIE
47	A Genome-wide analysis reveals stress and hormone responsive patterns of TIFY family genes in <i>Brassica rapa</i>	Frontiers in Plant Science	Gopal Saha	7	스위스	FRONTIERS RESEARCH FOUNDATION	SCIE
48	Expression of salicylic acid-related genes in <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> during <i>Plasmodiophora brassicae</i> infection	Genome	Ranjith Kumar Manoharan	6	캐나다	CANADIAN SCIENCE PUBLISHING, NRC RESEARCH PRESS	SCI
49	Confirmation of parentage of pear cultivar 'Niitaka' (<i>Pyrus pyrifolia</i>) based on Self-incompatibility haplotypes and Genotyping with SSR marker	Korean Journal of Horticultural Science & Technology	Hoy-Taek Kim	3	대한민국	KOREAN SOC HORTICULTURAL SCIENCE	SCIE
50	Glutathione transferases superfamily: Cold-inducible expression of distinct GST genes in <i>Brassica oleracea</i>	IJMS (International Journal of Molecular Sciences)	Harshavardhana n Vijayakumar	8	스위스	MDPI AG	SCIE
51	Orange color is associated with CYC-B expression in tomato fleshy fruit	Molecular Breeding	Indeok Hwang	4	네델란드	SPRINGER	SCI
52	De novo assembly and transcriptome analysis of bulb onion(<i>Allium cepa</i> L.) during cold acclimation using contrasting genotypes	PLOS one	Jeong Suk Hyeon Han	9	미국	PUBLIC LIBRARY SCIENCE	SCIE
53	Plant receptor kinases bind and phosphorylate 14-3-3 proteins	Genes & Genomics	Won Byoung Chae	11	대한민국	SPRINGER	SCIE
54	Genome-wide analysis of genes associated with bolting in heading type chinese cabbage	EUPHYTICA	Xiangshu Dong		네델란드	SPRINGER	SCI
55	Exogenous methyl jasmonate and salicylic acid induces subspecies-specific patterns of glucosinolate accumulation and gene expression in <i>Brassica oleracea</i> L.	Molecules	Go-Eun Yi,	10	스위스	MDPI AG	SCIE

<분자마커 개발>

번호	특성	보유건수	주요내용	활용년도
1	고구마선충뿌리혹병(토마토)	1	Mi1 gene, Hybe probe (HRM)	1차년도-현재
2		1	Mi23 gene, Hybe probe (HRM)	1차년도-현재
3	얼룩시들음병(토마토)	1	Sw5, Sw5b gene, Simple PCR	1차년도-현재
4	황화잎말림바이러스(토마토)	1	Ty1 gene, Hybe probe (HRM)	1차년도-현재
5		1	Ty2 gene, Simple PCR	1차년도-현재
6		1	Ty3, Ty3a gene, Simple PCR	1차년도-현재
7	과실숙기(토마토)	1	RIN gene, SCAR	1차년도-현재
8	세포질용성불임(양배추)	1	Ogura gene, Simple PCR	1차년도-현재
9		1	Polima gene, Simple PCR	1차년도-현재
10	역병(토마토)	1	Ph, Ph2, Ph3 gene, Hybe probe (HRM)	2차년도-현재
11	꽃마름병(토마토)	1	Bwr 12 gene, Hybe probe (HRM)	2차년도-현재
12	시들음병 (토마토)	1	I2 gene, Hybe probe (HRM)	2차년도-현재
13	반쪽시들음병 (토마토)	1	Ve gene, Hybe probe (HRM)	2차년도-현재
14	근부위조병(토마토)	1	J3 gene, Hybe probe (HRM)	2차년도-현재
15	갈색근부병 (토마토)	1	Py1 gene, Hybe probe (HRM)	2차년도-현재
16	흰가루병(토마토)	1	OI-2 gene, Hybe probe (HRM)	2차년도-현재
17		1	OI-5 gene, Hybe probe (HRM)	2차년도-현재
18		1	LV gene, Hybe probe (HRM)	2차년도-현재
19	담배모자이크바이러스(토마토)	1	Tm2a gene, Hybe probe (HRM)	2차년도-현재
20	황화잎말림바이러스 (토마토)	1	ty5 gene, Hybe probe (HRM)	2차년도-현재
21	화서 (토마토)	1	SP gene, Hybe probe (HRM)	2차년도-현재
22	심실수(토마토)	1	Lc gene, Product melting (HRM)	2차년도-현재
23	과실숙기 (토마토)	1	NOR gene, Hybe probe (HRM)	2차년도-현재
24	과색 (토마토)	1	U gene, Hybe probe (HRM)	2차년도-현재
25		1	PSY1 (r) gene, Hybe probe (HRM)	2차년도-현재
26		1	CYC-B gene, Hybe probe (HRM)	2차년도-현재
27		1	MYB12 (y), Hybe probe (HRM)	2차년도-현재
28		1	SGR gene, Hybe probe (HRM)	2차년도-현재

29	시들음병(양배추)	1	A adding, HRM	2차년도-현재
30		1	3' deletion, Simple PCR	2차년도-현재
31	S-genotype(양배추)	1	Class I, Simple PCR	2차년도-현재
32		1	Class II, Simple PCR	2차년도-현재
33	세포질응성불입(양파)	1	Orf725, Simple PCR	2차년도-현재
34	응성불입회복진(양파)	1	MS/ms (Jnurfl13), Simple PCR	2차년도-현재
35	세균성반점병(토마토)	1	Pto gene, Hybe probe (HRM)	3차년도-현재
36	근부위조병(토마토)	1	J3 gene, Hybe probe (HRM)	3차년도-현재
37	황화잎말림바이러스(토마토)	1	Ty1/Ty3 gene, Hybe probe.v2 (HRM)	3차년도-현재
38	시들음병 (토마토)	1	I3 gene, Hybe probe (HRM)	3차년도-현재
39	응성불입(토마토)	1	ps gene, Hybe probe (HRM)	3차년도-현재
40	과색 (토마토)	1	PSY1 (r) gene, Hybe probe (HRM)	3차년도-현재
41		1	PSY1 (r) gene, Hybe probe (HRM)	3차년도-현재
42		1	PSY1 (r) gene, PCR	3차년도-현재
43		1	MYB12 (y) gene, PCR	3차년도-현재
44		1	MYB12 (y) gene, Hybe probe (HRM)	3차년도-현재
45		1	MYB12 (y) gene, Hybe probe (HRM)	3차년도-현재
46		1	SGR gene, Hybe probe (HRM)	3차년도-현재
47		1	SGR gene, Hybe probe (HRM)	3차년도-현재
48		1	SGR gene, Hybe probe (HRM)	3차년도-현재
49		1	SGR gene, Hybe probe (HRM)	3차년도-현재
50	순도검정 (토마토)	1	24chip, Fluidigm EP1	3차년도-현재
51	시들음병 (토마토)	1	I2 gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
52	흰가루병(토마토)	1	Lv gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
53	담배모자이크바이러스(토마토)	1	Tm2a gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
54	꽃마름병(토마토)	1	Bw12 gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
55	역병(토마토)	1	Ph3 gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
56	흰가루병(토마토)	1	OI2 gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
57	고구마선충뿌리혹병(토마토)	1	Mi-Rex gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
58	근부위조병(토마토)	1	J3 gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재

59	세균성반점병(토마토)	1	Pto gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
60	갈색근부병(토마토)	1	Py1 gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
61	황화잎말림바이러스(토마토)	1	Ty1/3 gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
62		1	ty5 gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
63	화서 (토마토)	1	SP gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
64	U, G(토마토)	1	UG gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
65	GMS(토마토)	1	ps gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
66	Yellow(토마토)	1	PSY1 (1) gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
67	Yellow(토마토)	1	PSY1 (2) gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
68	Yellow(토마토)	1	PSY1 (3) gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
69	Orange(토마토)	1	CYC-B gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
70	Brown(토마토)	1	SGR (1) gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
71	Brown(토마토)	1	SGR (2) gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
72	Brown(토마토)	1	SGR (3) gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
73	Pink(토마토)	1	MYB12 (1) gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
74	Pink(토마토)	1	MYB12 (2) gene, Fluidigm EP1	3차년도-현재
75	노균병(양배추)	1	Hybe probe (HRM)	3차년도-현재
76	시들음병(양배추)	1	10bp deletion, Simple PCR	3차년도-현재
77	순도검정(양배추)	1	24chip, Fluidigm EP1	3차년도-현재
78	노균병(양파)	1	Pd, Simple PCR	3차년도-현재
79	세포질응성불입(양파)	1	Orf725, PCR-QIAxcel	3차년도-현재
80	응성불입회복친(양파)	1	MS/ms (Jnurfl3), Hybe probe (HRM)	3차년도-현재
81	순도검정(양파)	1	SNP, Fluidigm EP1	3차년도-현재
82		1	SSR, PCR-QIAxcel	3차년도-현재
83	줄기마름병(토마토)	1	Asc gene, Simple PCR	4차년도-현재

< 연구 인력양성 >

○ 연구인력 양성 성과

번호	분류	기준년도	인력양성 현황										
			학위별				성별		지역별				
1	학사 연구원 배출	2013	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
					2			2			1	1	
2	-	2014	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
3	석사 및 박사 연구원 배출	2015	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
			3	3			2	4				6	
4	학사 및 석사 연구원 배출	2016	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				1	2		2	1		2		1	

○ 연차별 인력양성 명부

연번	성명	전공	학위	비고
1	김희정	원예학	학사	1차년도
2	이고은	원예학	학사	1차년도
3	한정숙현	원예학	석사	3차년도
4	정승연	원예학	석사	3차년도
5	이고은	원예학	석사	3차년도
6	정희정	원예학	박사	3차년도
7	고팔사하	원예학	박사	3차년도
8	압둘카얌	원예학	박사	3차년도
9	하샷	원예학	석사	4차년도
10	연진옥	식물발달유전학	학사	4차년도
11	곽근화	식물발달유전학	학사	4차년도

<학술회의 발표>

연번	발표일	학회명	포스터 발표장소	포스터 제목
1	2014.01.13	Plant & Animal Genome XXII	SanDiego, 미국	Transcriptome Characterization and Sequencing Based Identification of Cold Responsive Genes in Cabbage
2	2014.01.13	Plant & Animal Genome XXII	SanDiego, 미국	Characterization of Anthocyanins Bio synthetic Genes and their Association with Cold Tolerance in <i>Brassica</i>
3	2014.05.28	한국원예학회	서울대학교 평창캠퍼스	Heterosis Associated Genes Exploration in <i>Brassica oleracea</i>
4	2014.05.28	한국원예학회	서울대학교 평창캠퍼스	Development of Cold Responsive Microsatellite Marker from Bulb Onion, <i>Allium cepa</i>
5	2014.05.28	한국원예학회	서울대학교 평창캠퍼스	Identification of Quantitative Trait Loci of Low Pungency in Bulb Onion (<i>Allium cepa</i>) Based on SSR and SNP Markers
6	2014.07.02	한국육종학회	라마다호텔, 제주도	Response of NBS encoding resistance genes linked to heat and fungal stress in <i>Brassica oleracea</i>
7	2014.07.02	한국육종학회	라마다호텔, 제주도	Variation of sugar accumulation and gene expression of transcription factors at different stages of <i>Allium cepa</i> under long and short photo period condition
8	2014.07.02	한국육종학회	라마다호텔, 제주도	Transcriptome-wide identification and profiling of novel miRNAs involved in cold stress in <i>Brassica oleracea</i>
9	2014.07.02	한국육종학회	라마다호텔, 제주도	Genome-wide identification AP2/ERF transcription factors and profiling of CBFs genes in abiotic stresses in <i>Brassica oleracea</i>
10	2014.07.02	한국육종학회	라마다호텔, 제주도	Microsatellite marker development of onion genetic purity test
11	2014.07.02	한국육종학회	라마다호텔, 제주도	Identification and Characterization Heterosis Associated Genes in <i>Brassica oleracea</i>
12	2014.07.02	한국육종학회	라마다호텔, 제주도	Transcriptome analysis and protein dimerization of newly classified Bzip transcription factors of <i>Brassica rapa</i> in cold stress response
13	2014.10.22	한국원예학회	창원컨벤션센터	Heterosis Related Transcriptome Analysis in <i>Brassica oleracea</i> by RNA-seq.
14	2014.10.22	한국원예학회	창원컨벤션센터	Genome-wide Classification and Expression Profiling of Carotenoid Oxygenase Genes with Abiotic Stress Responses in <i>Brassica rapa</i> and <i>Brassica oleracea</i>
15	2014.10.22	한국원예학회	창원컨벤션센터	Comparative Analysis of Sugar and Transcriptome Profiles of Two Isogenic Lines of <i>Allium cepa</i> under Drought and Photoperiod Conditions
16	2014.09.08	11th Conference of the European Foundation for Plant Pathology	크라코프, 폴란드	Isolation and structural analysis of <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> resistance genes in <i>Brassica oleracea</i> L.
17	2015.05.20	한국원예학회	농촌진흥청, 전주	Specific DNA Markers Selection Using Miniature Inverted-Repeat Transposable Element (MITE) Families in <i>Brassica juncea</i>
18	2015.05.20	한국원예학회	농촌진흥청, 전주	Genetic Characterization of Two Contrasting Bulb Onion Lines (<i>Allium cepa</i> L.) under Photoperiod and Drought Conditions
19	2015.05.20	한국원예학회	농촌진흥청, 전주	Microsatellite Marker Based Screening and Bioassay to Select for Qualitative Resistance Against <i>Leptosphaeria maculans</i> in Cabbage (<i>Brassica oleracea</i> L.)
20	2015.05.20	한국원예학회	농촌진흥청, 전주	Identification and Expression Analysis of Glucosinolate Biosynthetic Genes in <i>Brassica oleracea</i>

21	2015.05.20	한국원예학회	농촌진흥청, 전주	Genome Wide Characterization and Identification of Cold-inducible GST family in <i>Brassica oleracea</i>
22	2015.05.21	7th International Symposium on Edible Alliaceae	터키, 니테	TRANSCRIPTOME SEQUENCING AND DE NOVO ASSEMBLY OF BULB ONION DURING COLD AND FREEZING STRESS CONDITION USING CONTRASTING GENOTYPES
23	2015.06.18	(사)한국식물생명공학회	한국문화연수원, 공주	Molecular marker development and service of horticultural crops
24	2015.07.01	한국육종학회	백스코, 부산	Existence of qualitative resistance against blackleg disease in <i>Brassica oleracea</i> L. and detection of gene-specific single nucleotide polymorphism
25	2015.07.01	한국육종학회	백스코, 부산	Expression profiling of two contrasting bulb onion lines(<i>Allium cepa</i> L.) under Photoperiod and Drought Conditions
26	2015.07.01	한국육종학회	백스코, 부산	TIFY family genes in Chinese cabbage (<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>Pekinensis</i>): A Genome-wide analysis reveals their stress and hormone responsive patterns
27	2015.07.01	한국육종학회	백스코, 부산	De novo assembly and transcriptome analysis of bulb onion (<i>Allium cepa</i>) during cold acclimation using contrasting genotypes
28	2015.07.01	한국육종학회	백스코, 부산	Characterization of the aquaporin family genes and stress responsive expression profiling in <i>Brassica rapa</i>
29	2015.09.21	한국분자세포생물학회	코엑스, 서울	Functional analysis of the BRI1 receptor kinase by Thr-for-ser substitution in a regulatory autophosphorylation site
30	2015.10.28	한국원예학회	여수세계박람회장, 여수	Orange color is associated with CYC-B expression in tomato fleshy fruit
31	2015.10.28	한국원예학회	여수세계박람회장, 여수	RNA sequencing of two contrasting genotypes (<i>B. oleracea</i> var. <i>Capitata</i> L.) treated with Sinigrin and Epibrassinolide
32	2015.10.28	한국원예학회	여수세계박람회장, 여수	Progressive disease development at the seedlings with unknown blackleg disease resistance of cabbage lines (<i>Brassica oleracea</i> L.)
33	2015.10.28	한국원예학회	여수세계박람회장, 여수	bZIP transcription factors in <i>Brassica rapa</i> and <i>Brassica oleracea</i>
34	2015.10.28	한국원예학회	여수세계박람회장, 여수	Isolation and characterization of stress induced genes in Sinnapal lily (<i>Lilium formolongi</i>)
35	2015.10.28	한국원예학회	여수세계박람회장, 여수	Genome wide characterization of PDI Gene Family in Chinese cabbage (<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>) and expression profiling against abiotic and biotic stresses
36	2015.10.28	한국원예학회	여수세계박람회장, 여수	Molecular modeling of myrosinase from <i>Brassica oleracea</i> : A structural investigation of sinigrin interaction
37	2015.10.28	한국원예학회	여수세계박람회장, 여수	Cold - inducible Glutathione S -transferase superfamily genes in <i>Brassica oleracea</i> : In silico and expression analysis
38	2015.10.28	한국원예학회	여수세계박람회장, 여수	Identification and expression profiling of TIFY family genes involved in stress and phytohormone responses in Chinese cabbage (<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>)
39	2015.10.28	한국원예학회	여수세계박람회장, 여수	Identification of Turnip Mosaic Virus Resistant Gene in Chinese Cabbage (<i>Brassica rapa</i> L.)
40	2015.10.28	한국원예학회	여수세계박람회장, 여수	Evolutionary studies of Plasmodiophora brassicae based on variation in genomic structure in Korean <i>Brassica rapa</i> germplasm
41	2015.12.04	한국유전학회	한양대학교, 서울	Plant receptor kinases bind and phosphorylate 14-3-3 proteins
42	2016.01.11	Plant &Animal Genome XXIV	SanDiego, 미국	Role of Aquaporin gene family towards abiotic and biotic stress tolerance in <i>Brassica rapa</i>

43	2016.01.11	Plant &Animal Genome XXIV	SanDiego, 미국	Identification of new clubroot resistant locus in chinese cabbage (<i>Brassica rapa</i> L.) against <i>Plasmiodiophorabrassicaceae</i> pathotypes of Korea
44	2016.01.11	Plant &Animal Genome XXIV	SanDiego, 미국	Molecular characterization and stress induced expression profiling of TIFY family genes in Chinese cabbage (<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>)
45	2016.01.11	Plant &Animal Genome XXIV	SanDiego, 미국	Homo- and hetero-dimerization of BrbZIP transcription factors containing asparagine-rich region
46	2016.04.01	3rd Plant Genomics Congress: Asia	말레이시아, 쿠알라룸푸르	De novo assembly and transcriptome analysis of bulb onion (<i>Allium cepa</i> L.) during cold acclimation using contrasting genotypes
47	2016.05.25	한국원예학회	창원컨벤션센터, 창원	Comparative Genomics in Brassicaceae Family: Analysis of 434 Glutathione S-Transferases (<i>GST</i>) Genes and Their Evolutionary Analysis
48	2016.05.25	한국원예학회	창원컨벤션센터, 창원	De novo assembly and transcriptome analysis of bulb onion (<i>Allium cepa</i> L.) during cold acclimation using contrasting genotypes
49	2016.05.25	한국원예학회	창원컨벤션센터, 창원	Exploring Genetic Variation Between Hallabong and Suneat, Clade by Whole Genome Re-sequencing
50	2016.05.25	한국원예학회	창원컨벤션센터, 창원	Identification and Molecular Characterization of CDPK Genes in <i>Brassica oleracea</i>
51	2016.05.25	한국원예학회	창원컨벤션센터, 창원	Genotype-Specific Variations in Glucosinolate Biosynthesis and Gene Expression in Low and High Wax-Depositing <i>Brassica oleracea</i> L. <i>capitata</i> Subspecies
52	2016.06.29	한국육종학회	라마다플라자호텔, 청주	멜론 흰가루병 race동정 및 국내의 시판품종의 저항성 검정
53	2016.06.29	한국육종학회	라마다플라자호텔, 청주	양배추 시들음병 저항성 및 감수성 품종 구별용 분자 마커 개발
54	2016.06.29	한국육종학회	라마다플라자호텔, 청주	배추과 작물의 엽록체 유전체 서열을 활용한 중간 구분 InDel 마커 개발
55	2016.06.29	한국육종학회	라마다플라자호텔, 청주	Development of Cultivar-specific DNA Markers Based on Ty1-copia-like Retrotransposon-based Insertional Polymorphism in Pear (<i>Pyrus pyrifolia</i>)
56	2016.06.29	한국육종학회	라마다플라자호텔, 청주	Characterization and Stress-responsive Expression Profiling of MCM genes in Brassica
57	2016.06.29	한국육종학회	라마다플라자호텔, 청주	Genome wide Characterization and Expression Profiling of Aquaporin Gene Family in <i>Brassica rapa</i> for Responsiveness to Abiotic and Biotic Stresses
58	2016.06.29	한국육종학회	라마다플라자호텔, 청주	Role of Flowering Pathway Genes on Anthocyanin Biosynthesis and Accumulation in <i>Brassica rapa</i>
59	2016.06.29	한국육종학회	라마다플라자호텔, 청주	Leaf Developmental and Genotypic Variations in Wax Content, Composition and Expression of Wax Biosynthetic Genes in The Inbred Lines of <i>Brassica Oleracea</i> Var. <i>Capitata</i>
60	2016.06.29	한국육종학회	라마다플라자호텔, 청주	Comparative Phylogenomics to Elucidate The Effects of Whole Genome Triplication Event on glutathione trasferases Superfamily Genes in Braqssicaceae
61	2016.06.29	한국육종학회	라마다플라자호텔, 청주	Molecular Breeding for fruit Colar in Tomato
62	2016.06.29	한국육종학회	라마다플라자호텔, 청주	Bioinformatics Analysis for Transcription Factor Associated SSR Markers Developments and Characterization in Liliun Species

63	2016.06.29	한국육종학회	라마다플라자호텔, 청주	Identification and Characterization of the Causal Agent of Gummy Stem Blight (GSB) from Melon, Watermelon and Cucumber in Korea
64	2016.06.29	한국육종학회	라마다플라자호텔, 청주	Gene Identification, Expression Analysis and Breeding for Enhanced Glucosinolate Biosynthesis in Brassica
65	2016.06.29	한국육종학회	라마다플라자호텔, 청주	Identification, Molecular Cloning and Characterization of Stress-Induced Genes in Liliium formolongi
66	2016.06.29	한국육종학회	라마다플라자호텔, 청주	Development of Molecular Marker for Characterizing Early and Late Bolting Genotypes of <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>
67	2016.08.10	한국생물과학협회	삼육대학교 다니엘관, 서울	Calcium-dependent Protein Kinases (CDPKs) are not just Ser/Thr kinases
68	2016.09.12	13th Annual Solanaceae Conference	캘리포니아, 미국	Fruit peel color associated new single nucleotide polymorphisms in <i>SLMYB12</i> associated with fruit peel color of pink tomato lines
69	2016.10.01	Brassica 2016 Conference	멜버른, 오스트레일리아	A genome-wide analysis exhibits biotic and abiotic stress responsive patterns of Aquaporin family genes in <i>Brassica rapa</i>
70	2016.10.01	Brassica 2016 Conference	멜버른, 오스트레일리아	Identification of a new resistant locus in a Korean <i>Plasmodiophora brassicae</i> pathotype group in chinese cabbage (<i>Brassica rapa</i> L.) and development of the pathotype-specific markers
71	2016.10.01	Brassica 2016 Conference	멜버른, 오스트레일리아	Post-translational modification of receptor kinases in Brassica species

< 성과 활용 계획 >

- 원예작물의 유전체 해석을 통한 병저항성 및 형질에 대한 분자마커 개발 관련 SCI급·비SCI급 논문 55편을 투고했으며 개발된 분자 마커에 대해 국내·외 특허출원(16) 및 등록(2) 총 18건을 통해 지적 재산을 획득하였다. 이러한 지적재산권은 종자에 대한 분쟁을 방지하는 역할을 해 줄 것임
- 병저항성 및 형질관련 분자마커(CAPS, SSR, SCAR, Indel, SNP) 총 83종을 개발하였으며 순도검정 및 여교배검정용 SNP칩을 개발하였으며 개발된 다양한 마커를 이용한 분자 서비스를 통하여 품종육성을 위한 육종연한 단축 및 육종효율 증대에 기여함
- 다양한 육종 소재 개발 및 분자마커개발을 위한 다수의 유전자원(갯무 239종등)을 수집하였는데 수집한 유전자는 육종소재 개발을 위한 중간모본 육성에 활용할 것임
- 본 연구를 통하여 첨단 육종기술 기반 확립함으로 국제경쟁력이 있는 수출형 품종 개발과 수출확대 및 민간 육종역량이 강화됨

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 국내외 기술현황

<원예종자의 국내기술 현황>

○ 토마토

- 국내 토마토 품종 육성연한은 30여년에 지나지 않으며 내병성 육성 수준도 선진국회사의 수준에 비하여 낮다.
- 토마토 유전자원은 국립유전자원센터, 원예특작연구소, 민간종묘회사 등에서 많이 확보되어 있으나 계통화는 미진한 수준이다.
- 기술격차는 최근 3-5년 정도로 추격하였으며 국내 시장 점유율은 약 25~35% 수준이다.

○ 양배추

- 국내 양배추 육종 기술은 타 품목에 비해 연구기간이 짧은 상태로 품종 육성을 위한 기반을 어느 정도 갖춘 상태이다.
 - 1990년대 초부터 배추좁나방에 대한 내충성 품종이 육성되었으며 흥농종묘에서 개발한 Saint 품종은 현재도 중국, 인도에서 인기 품종이다.
 - 우리나라에서 육성된 품종은 50% 이상이 웅성불임성을 이용한 품종이다.
- 국내 양배추와 관련된 연구 인력은 10명 내외 수준이다.
 - 양배추는 배추과 작물로 배추, 브로콜리, 컬리플라워 등과 유사한 연구가 진행 될 수 있다.
 - 배추과 다른 작물에 비해 국내에서 양배추의 육종연구는 기간이 짧다.

○ 양파

- 국내 양파 품종 육성기술은 일본에 비해 크게 뒤쳐져 있으며, 품종 개발이 미미한 상황이다.
- 국내 종묘회사는 F1 품종을 출시하고 있지만, 웅성불임 회복 기작이 복잡한 CMS-T 세포질을 이용하고 있어 체계적인 양파분자육종 체계 확립에 걸림돌이 되고 있는 실정이다.
- 양파는 2년 1세대 타식성 작물로 품종 육성에는 장기간이 소요되고 연구가 어려워 투자가 미흡하다.

○ 벼

- 국내 벼 육종기술은 선진국 수준이나 인프라 부족으로 성장이 느리다.
- 유전자원은 중국, 일본, 유럽에 비해 빈약하여 많은 국산품종이 외국 도입품종에 비하여 품질 및 생산력이 낮다.
- 벼 육종은 정부와 민간 모두에서 이루어지고 있으나 민간의 경우 육종시설 및 인력이 영세한 실정이다.
- 임산벼 품종(중근) 개발
 - 현재까지 표고 45품종, 목이 2품종, 장수 1품종이 산림벼연구소, 국립산림과학원, 농촌진흥청, 전남농업기술원, 민간업체 등에서 개발되어 육성·보급되었으며, 이중 표고 13 품종이 국립산림품종관리센터에 품종보호 출원되었다.

- 버섯 육종기반의 국내 시장/기술개발 수준
 - 표고는 국립산림과학원과 산림버섯연구소에서 주로 품종육성과 종균보급이 이루어지고 있으며 일부 농업기술원, 민간업체의 개발품종은 보급실적이 저조한 상태이다.
 - 송이는 인공재배기술이 개발되지 않았으나 국립산림과학원, 경북 산림환경연구원에서 송이버섯의 인공증식 연구가 진행 중이다.
- 유전자원의 국내 시장/기술개발 수준
 - 중국, 일본, 유럽에 비해 임산버섯 유전자원의 수집 및 보존에 대한 전문기관이 부족하고 영세하며 체계적인 유전자원의 특성 및 계통분류 분석의 기초연구가 빈약한 수준이다. 특히 중국의 다양한 지역에서 새로운 품종 육성을 위한 적극적인 유전자원 도입이 필요하다.

○ 백합

- 선진국에 상당 수준 근접해있으며 중간교잡, 배수체 육종 등의 일부 백합 육종기술은 세계 최고 수준이다.
- 생명공학기법을 이용한 육종은 아직 낮은 수준이다.
- 보유 유전자원은 주로 상업화된 품종이며, 꽃의 크기가 크고 색이 화려하고 새로운 형태(종)를 갖는 유전자원은 빈약하다.
- 백합 육종 인력은 총 23명 수준이며 정부주도의 출원비율이 88%를 차지하고 있다.

○ 감귤

- 국내 기술수준은 일본의 70% 수준이며 선진국의 60% 수준이다.
 - 교배육종, 육종세대 단축 등 고전육종기술은 선진국 대비 70% 수준이지만 생명공학 활용기술은 선진국 대비 50% 수준이다.
 - 한국 5품종, 일본 230품종 수준이며 기타 스페인 330품종(오렌지포함), 아르헨티나 2품종, 호주 24품종, 미국 31품종, 칠레 18품종 등이다.
- 감귤 종묘 분야는 소수의 영세한 묘목 증식공급 업체에 의존하고 있어 품종육종 분야의 민간연구소 및 종묘업체는 전무한 실정이다.

< 원예종자의 해외 기술 현황 >

○ 토마토

- 토마토 해외 육성역사를 세대별로 구분하면 1세대는 수량성(1970년대 잡종품종 보급), 2세대는 환경적응성(1980년대), 3세대는 저장성 및 내병성(1990년대), 4세대는 과품질 위주의 성분육종(2000년대)으로 나눌 수 있다.
- 현재 토마토 유전체 염기서열 해독이 완료된 상태로, 채소 작물 중 가장 많은 분자마커가 개발되어 있다.
- 다국적기업에서는 이미 토마토 한 품종에 내병성 유전자 5~6점이 마커를 이용하여 고정되고 있으며, 몬산토, 신젠타 등 외국기업에서는 자국에서 개발된 마커를 이용한 토마토 육성을 하고 있다.

○ 양배추

- 내서성에 강하면서 뿌리혹병에 강한 양배추류에 대한 수요가 높으나 아직 이것을 충족시킬 품종개발은 이루어져 있지 않다.
- 해외 주요 업체에서 유전자원 보호 차원에서 MS활용 육성이 증가하고 있어 유전자원의 활용에 어려움이 커지고 있으며, 전통 육종 외에 소포자배양, 약배양 등 조직배양 기술이 앞서 있다.
- 내병성 품종 육성을 위해 주요 병에 대한 마커 활용이 활발하게 이루어지고 있으며 뿌리혹병과 흑부병에 내병성인 품종이 출시되고 있다.

○ 양파

- 양파 품종 육성에 앞서 있는 해외 기업은 글로벌 업체인 일본의 다끼이와 미국 몬산토이다.
 - 다끼이는 장일계, 단일계 양파 유전자원을 다양하게 보유하고 있으며, 양파 육성 기간이 100년에 가까워, 품종 수준이 최고 수준으로 종자 수출량 또한 세계 최대 규모이다.
 - 몬산토는 장일계, 단일계, 월동용 단일계, 열대용 단일계 등 유전자원을 가장 많이 보유하고 있다.

○ 버섯

- 중국은 일본 및 우리나라 기업들이 진출하여 버섯생산기술을 전수하는 단계이다. 팽이버섯과 새송이버섯의 시장규모가 향후 폭발적으로 증가할 것으로 예상되며 이에 따른 신품종을 개발하여 공급하는 전략이 필요하다.
- 유럽은 주로 양송이버섯 위주이며, 최근 국내기업의 시장 개척 노력으로 팽이버섯과 새송이버섯의 품종개발, 생산 및 유통기술 면에서는 탁월하나 기타 버섯에서는 아직 초보단계이다.
- 미국은 유럽과 마찬가지로, 최근 들어 새송이버섯의 생산기업이 늘어나고 있다. 또한 미국은 유전자 도입을 통한 버섯 개발기술을 보유(Penn State Univ.) 하고 있다.
- 표고재배 역사가 가장 오래된 중국은 1980년대까지 원목재배가 주를 이루어 왔으며, 1964년 상해 농업과학원 식용균연구소에서 톱밥재배법이 처음 개발되어 1978년부터 실용적 재배가 시작되었다.
- 일본의 표고 품종 개발 현황
 - 일본은 전통적으로 원목재배를 하였으나 1980년대 중반부터 톱밥재배가 보급되기 시작하였으며 1990년대 중반부터 급격히 증가하여 생표고 생산량을 기준으로 1995년 31.3%에서 2010년 80%이상으로 증가하였다.
 - 품종개발은 전문연구기관에서 수행되고 이에 따른 재배기술 개발은 재배농가와 함께 피드백 연구체계가 구축되어 운영되고 있다.
 - 최근 전통적인 방식의 원목재배는 건표고 생산 위주의 시장을 점유하고 있으나 중국산 건표고 수입은 이산화황 검출 등 안전성문제로 점차 자리를 잃고 있는 추세이다.

○ 백합

- 백합종구의 기술개발은 선진국에서 선점하고 있다. 대부분 민간 육종회사에서 담당하며 대

학과 연구소는 민간지원을 위한 기초 기술 개발을 하고 있다. 생명공학 연구는 대기업의 참여가 주도적으로 이루어지며 국가, 연구소 등과 협력연구가 주로 수행되고 있다.

○ 감귤

- 미국, 스페인, 호주 등 주요 선진국에서는 국가기관 외에 지자체 연구소, 대학, 민간, 생산자단체 등이 참여하여 품종육성을 진행하고 있다.
- 국가연구기관은 형질유전 분석, 유전체 연구, 내병성 인자 탐색 및 발굴 등을 담당하고, 민간과 생산자 단체는 상업화 품종개발과 보급을 담당하고 있다.
- 국가 R&D 규모는 감귤 내병성 품종개발 및 유전체 연구 등에 총 22억 달러를 투자하는 등 매년 30백만 달러에 이르고 있다(Florida Growers, 2012.2).
- 호주, 뉴질랜드 등 남반구 국가에서 아시아 지역에 대한 감귤 수출 정책을 적극적으로 추진하고 있어, 아시아 소비시장을 겨냥한 신품종 확보에 관심이 증대되고 있다.
- 주요 육종 목표는 수요의 다양화 추세에 따라 내병성 증진, 껍질벗김 용이, 고향기, 고당도 등으로 교배 및 돌연변이 육종, 세포융합, 배수성 육종, 형질전환 등이 동시에 수반되는 복합기술 적용으로 이루어지고 있다.
- 최근 이상기후 발생이 급증함에 따라 미국, 브라질, 호주 등에서는 내병, 내환경성 신품종 개발의 수요가 높다.

제 7 장 참고문헌

- Ballester AR, et al. (2010) Biochemical and molecular analysis of pink tomatoes: deregulated expression of the gene encoding transcription factor SIMYB12 leads to pink tomato fruit color. *Plant physiology* 152(1):71-84
- Blank LM (1937) Fusarium resistance in Wisconsin all seasons cabbage. *J Agric Res* 55(7):497-510
- Caro M, et al. (2015) Assessing the genetic variation of Ty-1 and Ty-3 alleles conferring resistance to tomato yellow leaf curl virus in a broad tomato germplasm. *Molecular Breeding* 35(6):132
- Checkland P, Holwell S (1998) *Information, Systems and Information System: Making sense of the filed*. Wiley (Hoboken, NJ, USA)
- Clouse SD, Langford M, McMorris TC (1996) A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol* 111:671-678
- Clouse SD (2011) Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *The Plant Cell* 23:1219-1230
- Corral M, Patricia FN, José M. SS (2011) Genetic, quantitative and microscopic evidence for fusion of haploid nuclei and growth of somatic calli in cultured ms1035 tomato anthers. *Euphytica* 178(2):215-228
- Gruszka D (2013) The brassinosteroid signaling pathway—new key players and interconnections with other signaling networks crucial for plant development and stress tolerance. *International Journal of Molecular Sciences* 14:8740-8774
- Jeong HJ, et al. (2014) Tomato Male sterile 1035 is essential for pollen development and meiosis in anthers. *Journal of experimental botany* 2014:eru389
- Jiang WB, Huang HY, Hu YW, Zhu SW, Wang ZY, Lin WH (2013) Brassinosteroid regulates seed size and shape in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 162:1965-1977
- Kifuji Y, et al. (2013) QTL analysis of black rot resistance in cabbage using newly developed EST-SNP markers. *Euphytica* 190(2):289-295

- Lee YH, Hong JK (2015) Differential defence responses of susceptible and resistant kimchi cabbage cultivars to anthracnose, black spot and black rot diseases. *Plant Pathology* 64(2):406-415
- Lin T, et al. (2014) Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nature genetics* 46(11):1220-1226
- Melone NP (1990) A Theoretical assessment of the use satisfaction construct in information systems research. *Management Science* 36:76-91
- Nasrallah JB, Takeshi N, Mikhail EN (1991) The self-incompatibility genes of Brassica: expression and use in genetic ablation of floral tissues. *Annual review of plant biology* 42(1):393-422
- Nunamaker JF (1990) Systems development in information systems research. *System Sciences* 3:631-640
- Oh MH, Wang X, Kota U, Goshe MB, Clouse SD, Huber SC (2009) Tyrosine phosphorylation of the BRI1 receptor kinase emerges as a component of brassinosteroid signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:658-663
- Rick C (1948) Genetics and development of nine male-sterile tomato mutants. *California Agriculture* 18(17):599-633
- Shirasawa K, et al. (2013) Genome-wide association studies using single nucleotide polymorphism markers developed by re-sequencing of the genomes of cultivated tomato. *DNA research* 20(6):593-603
- Seifi A, et al. (2014) Genetics and molecular mechanisms of resistance to powdery mildews in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives. *European Journal of Plant Pathology* 138(3): 641-665
- Tonu NN, et al. (2013) Comparison of Positions of QTLs Conferring Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica oleracea. *American Journal of Plant Sciences* 2013
- Walker JC (1930) Inheritance of Fusarium resistance in cabbage. *J Agric Res* 40(8):721-745

Wang M, Sun S, Wu C, Han T, Wang Q (2014) Isolation and Characterization of the Brassinosteroid Receptor Gene (GmBRI1) from Glycine max. International Journal of Molecular Sciences 15:3871-3888

Zamir D, Richard AJ, Nachum K (1980) Anther culture of male-sterile tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mutants. Plant Science Letters 17(3):353-361

Zhang C, Bai MY, Chong K (2014) Brassinosteroid-mediated regulation of agronomic traits in rice. Plant Cell Reports 33: 683-696

Zhang C, et al. (2014) The Ph-3 gene from *Solanum pimpinellifolium* encodes CC-NBS-LRR protein conferring resistance to *Phytophthora infestans*. Theoretical and applied genetics 127(6):1353-1364

Zhao J, Wu C, Yuan S, Yin L, Sun W, Zhao Q, Zhao B, Li X (2013) Kinase activity of OsBRI1 is essential for brassinosteroids to regulate rice growth and development. Plant Science 199:113-120

류범중 (2003) 국가 R&D 성과정보의 효율적인 관리 및 유통체제 구축에 관한 연구. 한국문헌정보학회지 37:223-240

송충한, 조현대 (2010) 창의적 기초 연구성과를 위한 연구관리제도 개선방안. 기술혁신학회지 11:656-679

이상화 (2010) 국가연구자등록코드시스템을 통한 NITS 활성화 방안 연구. 기술혁신학회지 113:28-43

이재원 (2002) 지방정부의 성과관리시스템 개발에 관한 연구-서울시와 경기도의 성과관리체제를 중심으로. 한국행정학보 36:215-230

정양현, 정규채, 방성식 (2007) 한국생산기술연구원의 BSC 도입사례 연구. Information systems review 9:283-309

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청에서 시행한 Golden Seed 프로젝트사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청에서 시행한 Golden Seed 프로젝트사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.