

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000945-01

분자육종을 이용한 환경내성 한국잔디 20계통
육성 및 품종출원

(Development of 20 Varieties and Registration of Environmental
Stress Tolerant Zoysiagrass using Molecular Breeding System)

농업회사법인(주)에프앤피

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “분자육종을 이용한 환경내성 한국잔디20계통 육성 및 품종출원” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 4 월 30 일

주관연구기관명 : (주)에프엔피

주관연구책임자 : 김 신 제

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 허 진 회

요 약 문

I. 제 목

“ 분자육종을 이용한 환경내성 한국잔디 20계통 육성 및 품종 출원 ”

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발 목표

가. 제 1세부과제: 환경내성 한국잔디의 계통육성 및 품종 출원

- 환경내성(녹색기간 연장, 고온 및 건조 내성) 한국잔디 20개 이상 계통육성 및 특성규명
- 그린조아를 이용한 육성 계통의 재배특성 분석 및 대량재배 체계 확립
- 환경내성 한국잔디 중간교배 계통의 유전적 특성분석
- 우수 환경내성 계통 특이 분자마커 개발
- 한국잔디 10 계통 이상 신품종 특허 출원 및 품종보호 출원
- 현지 적응성 실험을 통한 해외용 한국잔디의 선발로 세계화

나. 제 1협동과제: 환경내성 잔디의 유전기작 연구

- 환경내성 변이체 (포복경 착색 변이체) 및 야생형 잔디의 계놈 분석
- 착색 변이체의 안토시아닌 생합성 경로 분석
- 착색 변이체의 유전자 발현 분석
- 안토시아닌 생성에 대한 후생유전학적 영향 연구

2. 연구개발 필요성

- 한국잔디류의 계통 간 유전학적 분류기준이 명확하지 않아 객관적 자료보다는 연구자들의 주관적인 판단에 따른 선발이 관행적으로 이루어졌고 유전자원의 수집과정과 육종과정에서의 정확한 계통구분이 불분명함
- 따라서 한국잔디류 계통 분류 및 유전학적 연구가 요구되며 계통간의 분자유전학적 유연관계의 규명이 필요함
- 다양한 분자마커를 이용한 잔디의 육성은 생력화와 단기간 신품종 육성이 가능하므로 분자육종을 통한 다양한 육종의 목적에 맞는 계통육성의 기반 마련이 필요함
- 한국잔디는 해외 잔디품종보다 여름 휴면이 없는 장점을 가지고 있으나 초록기간이 4월 말 5월초부터 9월말 10월초까지로 짧은 단점을 가지고 있음
- 그러므로 한국잔디의 고부가가치화를 산업적 가치로 높이기 위해서는 환경내성이 높아 초록기간을 연장시킬 수 있는 품종의 개발이 시급함
- 본 연구진은 초록기간이 길고 내열 및 내건성을 나타내는 한국잔디 (품종명 : 그린조아) 개발에 성공하였음
- 그린조아는 녹색포복경을 갖는 특징을 가지고 있으며 그린조아 잔디의 유전학적 기작을 규명하고 다양한 계통을 선발하여 환경변화 대응 및 녹화에 필요한 새로운 품종을 개발하고자 함

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 제 1세부 과제: 환경내성 한국잔디의 계통육성 및 품종 출원

가. 환경내성 한국잔디 후보 계통 육성 및 특성분석

- 환경내성 녹색 포복경 한국잔디 (그린조아, Greenzoo)와 한국잔디 야지와 중지를 종내 교배하여 RIL 육성
- 육성된 계통과 한국잔디 (중지)의 녹색기간과 관련이 있는 엽록소 함량 및 내한성 등 생리적 특성, 형태적, 특성 등을 조사
- 육성 계통의 특성에 따라 선발된 개체 고정

나. 환경내성 (내열 및 내건성) 후보 계통의 환경내성 검정 및 재배특성 분석

- 각 계통의 특성에 따른 재배방법 개발
- 선발된 후보 계통의 환경내성 특성 분석
- 각 계통의 대량증식 포장 조건 확립

다. 한국잔디류의 계통에 따른 특성 분석 및 대량생산 체계 확립

- 각 계통의 특성에 따른 특성 분석
- 한국잔디류의 각 계통의 특성에 따른 재배방법 개발
- 각 계통의 대량증식 포장 조건 확립
- 환경내성 녹색 포복경 우수계통의 선발 및 10계통 이상 특허 출원

라. 환경내성 한국잔디 우수계통의 해외 현지 적응성 검정

- 후보 계통의 몽골 (3개 지역 이상), 중국 (2개 지역 이상), 미국 (2개 지역 이상) 현지적응성 실험

마. 환경내성 한국잔디특이 유전자 마커 개발

- 환경내성 한국잔디 특이 분자마커 개발
- 고정 계통 특이 분자마커 20개 이상 개발

바. 환경내성 한국잔디 우수계통의 재배특성 검정, 특허 및 품종보호 출원

- 우량계통의 국내 및 해외적응성 실험 계속
- 환경내성 우수계통 선발 및 10계통 이상 특허 및 품종보호 출원

2. 제 1협동과제: 환경내성 잔디의 유전기작 연구

가. 포복경 착색 변이체 및 야생형 잔디의 계놈 분석

- 포복경 착색 변이체와 야생형 잔디의 계놈 구조 비교
- 착색 변이체와 야생형 잔디 간의 유전적 다형성 (polymorphism) 유무 조사
- 정밀한 계놈 분석을 위한 DNA 라이브러리 작성

나. 착색 변이체의 안토시아닌 생합성 경로 분석

- 안토시아닌 생합성 관련 유전자 탐색
- 잔디의 안토시아닌 생합성 후보 유전자 선정
- 잔디의 안토시아닌 합성 유전자 분리를 위한 cDNA 라이브러리 구축

다. 착색 변이체의 유전자 발현 분석

- Differential Display 기법을 이용한 차등 발현 유전자 탐색
- Subtractive Hybridization 기법을 이용한 차등 발현 유전자 라이브러리 구축
- 착색 변이체와 야생형 간의 후보 유전자 발현 차이 조사

라. 안토시아닌 생성에 대한 후생유전학적 영향 연구

- 차등 발현 유전자 간의 염기서열 차이 조사
- 차등 발현 유전자의 DNA 메틸화 수준 분석
- 잔디의 small RNA 라이브러리 구축 및 서열 분석
- small RNA와 차등 발현 유전자 간의 연관성 연구

IV. 연구개발결과

1. 제 1세부과제: 환경내성 한국잔디의 계통육성 및 품종 출원

가. 환경내성 한국잔디 후보 계통 육성 및 특성분석

- 녹색 포복경 한국잔디의 계통 선발을 위해 그린조아 잔디의 계통 고정 (10계통 이상)과 그린조아와 들잔디(중지)와 교배를 통한 중간 recombinant inbred line (RIL)을 육성하여 제 1협동과제에 유전학적 특성 규명의 재료로 공급함
- RIL라인의 생리적(내한성 및 녹색기간), 형태학적 및 재배특성 등을 분석하여 각 육성 계통의 특성에 따라 선발된 개체를 20계통 이상 고정함
- 녹색 포복경(그린조아)와 한국잔디 중지와 생육특성 (녹색기간 등)을 비교하기 위해 (주)에프앤피의 포장 (하우스 및 노지)에서 재배하면서 종자 수확, 계통 특성조사 그리고 고정계통을 선발함

나. 환경내성 (내열 및 내건성) 후보 계통의 환경내성 검정 및 재배특성 분석

- 선발 후보계통의 환경내성 특성결과를 이용하여 계통의 특성에 따라 라인을 고정함
- 고정된 각각의 환경내성 육성 계통을 이용하여 재배방법을 개발하고 대량증식 조건을 및 포장 조건 확립함
- 선발 후보계통의 환경내성 특성결과 및 대량증식 결과를 종합하여 우수계통의 선발 및 계통의 특허 출원함

다. 환경내성 한국잔디의 종내 및 중간교배 육성 계통의 재배특성 분석 및 대량 생산체계 확립

- 한국잔디류의 형태 및 생리학적 유연관계와 특성 규명을 위해 종내 교배 집단의 특성을 검정함
- 또한 이들 육성 계통을 이용한 재배, 형태적, 유전적인 특성을 검정하여 30계통 이상의 우수 품종을 선발하였으며, 이중 10계통을 품종보호출원 하였음
- 한국잔디의 세계화를 위해 해외 현지적응성 검정을 위한 대량 생산체계 확립 및 대량재배를 실시함

라. 환경내성 한국잔디 계통의 유전 양상 분석 및 특이 유전자 마커 개발

- 환경내성 한국잔디 국내용 30계통의 분자유전학적 특성 분석
- 또한 분석된 유전적 결과와 형태, 재배적 결과를 종합하여 최종 선발된 환경내성 우수계통 간 유전학적 특성을 규명함
- 선발계통의 산업화 및 세계화를 위한 고정 계통의 품종 특이 분자 마커를 개발하여 품종보호 출원에 활용할 수 있도록 함

마. 환경내성 한국잔디 우수계통의 해외 현지 적응성 검정

- 육성된 환경내성 후보 계통의 해외 현지 적응성 실험을 건조 또는 사막화가 진행 중인 지역에서 재배실험을 수행함
- 몽골지역에서는 울란바타르 근교지역에서 수행한 결과 내음성과 내한성이 약하여 선발

라인 없음

바. 환경내성 한국잔디 우수계통의 재배특성 검정, 특허 및 품종보호 출원

- 선발된 우수계통은 2년간의 국내 및 해외적응성 결과와 유전학적 특성 분석 (제 1세부과제 및 제 1협동과제)을 종합하여 최종 30계통 선발
- 국내용 우수계통 최종선발 30계통 중 10계통을 품종보호출원함
- 품종개발에 활용된 유용유전자원인 그린조아 품종을 특허출원함

2. 제 1협동과제: 환경내성 잔디의 유전기작 연구

가. 야생형(중지)과 환경내성 변이체 (그린조아)의 전사라이브러리 작성 및 분석

- 환경내성 변이체 잔디는 기내배양 중 분리된 변이체로서, 포복경의 안토시아닌 함량이 매우 낮은 특징을 갖고 있음
- 이러한 포복경 착색 변이를 갖는 개체는 엽밀도가 낮은 재식 상태에서도 연한 녹색을 띠어 훨씬 부드러운 미관을 나타내며, 고온과 같은 스트레스 환경에서도 매우 왕성한 생육을 보임
- 따라서 환경내성 변이체 잔디는 유전적으로는 야생형과 큰 차이는 없으나, 주요 유전자들의 발현에는 차이를 보임
- 이를 위하여 야생형과 환경내성 변이체 잔디의 주요 조직(잎, 줄기, 포복경, 뿌리, 화기 등)에서 mRNA를 분리하고, cDNA를 합성하여 Expressed Sequence Tag(EST) 라이브러리를 작성
- 라이브러리의 각각 cDNA를 염기서열을 분석하여 잔디에서 발현되는 유전자들을 동정하고, 유전자의 보존 정도와 변이를 다른 종과 비교 분석
- 이 라이브러리는 또한 차후 subtraction 방법을 통해 차등적으로 발현되는 유전자를 동정하기 위해 사용함
- 또한 잔디의 유전체에 대한 연구는 거의 이루어져 있지 않은 실정으로, 벼나 옥수수 등 같은 과(grass family; Poaceae)의 주요 작물들과의 비교 연구를 통해 많은 유용 정보들을 얻을 수 있을 것으로 기대됨
- 약 4,000개의 EST를 동정하고 데이터베이스를 구축
- EST 데이터베이스 내 발현유전자들의 기능을 예측하고, 이를 기능적 카테고리(functional category)로 분류하여 잔디의 생리 및 발달의 분자생물학적 연구에 활용

나. 환경내성 변이체 잔디의 포복경 착색과 관련된 유전경로 탐색

- 야생형과는 달리 환경내성 변이체 잔디의 포복경은 안토시아닌의 축적이 이루어지지 않아 연한 녹색을 띠
- 안토시아닌 생합성 경로는 phenylalanine과 Malonyl coA와 같은 주요 아미노산 및 cofactor 합성과 밀접한 연관을 갖고 있음
- 또한 안토시아닌 착색은 세포의 pH 및 액포 (vacuole)로의 수송 (trafficking) 등 다른 요소의 영향을 받기도 함
- 따라서 안토시아닌 생합성 이외의 다른 요인에 의하여 포복경 착색이 조절될 가능성을 배제할 수 없으며, 이를 위하여 전체 유전자의 발현 양상을 변이체와 야생형 간에 비교 분석
- 아직 잔디에서 안토시아닌 생합성 경로나 유전자에 대한 연구가 미흡한 실정

- 제작한 EST 데이터베이스에서 안토시아닌 합성과 관련된 유전자들을 우선적으로 분류하고, 잔디에서의 안토시아닌 생합성 경로 제시
- 다. 포복경 착색 관련 후보 유전자의 기능 연구 및 발현 분석
 - 안토시아닌 합성에 관련된 유전자의 기능 연구를 통해 포복경 착색 기작 규명
 - 2차년도에서 동정한 안토시아닌 생합성 경로 유전자 및 이에 직·간접적으로 영향을 미치는 유전자들을 후보 유전자로 선정
 - 야생형과 포복경 착색 변이체 잔디에서 차등적으로 발현되는 유전자(differentially expressed gene; DEG)들을 subtraction library screening 방법 통해 동정
 - 후보유전자들 및 DEG의 차등적 발현 양상을 야생형과 포복경 착색 변이체 사이에서 비교 분석
 - 후보유전자들의 발현 양상에 차이가 없을 경우, 각 유전자들의 염기서열 비교를 통해 돌연변이 유무 확인
 - 이 연구를 통해 포복경 착색 변이에 영향을 미치는 후생유전학적 요소들을 규명
- 라. 야생형 (중지)과 변이체 (그린조아)의 유전적 상이성 규명
 - 야생형과 포복경 착색 변이체 사이에서 안토시아닌 생합성 관련 유전자의 서열 차이 유무 규명
 - 보다 전체적인 유전자 발현 양상을 규명하기 위하여 야생형과 변이체 간의 전사체(transcriptome)를 분석
 - 잔디의 유전자 염기서열이 전체적으로 벼의 그것과 매우 유사하다면, 미국 Affymetrix사의 Rice Genome Array를 사용하여 잔디의 유전자 발현 양상 연구 가능
 - 차등적으로 발현되는 유전자들의 기능 및 발현 기작 연구
 - 지속적인 EST 라이브러리 구축을 통해 얻어진 유전자들을 벼나 옥수수의 유전체와 비교 분석하여 잔디의 진화적 특성 연구
- 마. 잔디 유전체의 후생유전학적 연구
 - 포복경 착색 변이체 잔디는 기내배양 중 분리된 변이체로서, 유전형이 야생형과 거의 동일할 것으로 기대
 - 따라서 주요 유전자, 특히 안토시아닌 합성에 관련된 유전자들의 발현이 야생형과 변이체 간에 차등적으로 나타난다면 이는 후생유전학적 요인에 의한 것으로 추측
 - 식물의 안토시아닌 합성에는 paramutation 및 DNA methylation과 같은 후생유전학(epigenetics)적 현상이 많은 영향을 미치는 것으로 보고 (Hollick et al., 1997; Jorgensen 1990; Martienssen, 1996; Ronchi et al., 1995)
 - 후생유전학적 현상은 DNA 염기서열의 변화 없이 표현형이나 유전자의 발현이 변하는 현상으로서, DNA 메틸화나 히스톤 단백질의 변형, RNA 간섭 등이 주요한 요인
 - 특히 DNA 메틸화는 유전자의 발현 및 억제를 조절하는 기작으로서 동, 식물의 분화, 발달 및 암과 같은 질병의 발생에 매우 중요한 역할
 - 따라서 변이체 잔디 계놈의 DNA 메틸화 수준을 분석하고, siRNA나 miRNA와 같은 간섭인자들을 동정하여 야생형과의 비교 연구를 수행
 - 차등적으로 발현되는 후보 유전자들의 DNA 메틸화 수준을 분석(bisulfite sequencing)
 - 이러한 유전자들의 DNA 메틸화에 의하여 발현이 억제되는 기작 연구
 - 궁극적으로 포복경 착색 변이체에서 안토시아닌 합성 억제되는 원인 및 관련 기작규명

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 1-4차년도에 걸쳐 종합하여 우수특성을 가진 30계통을 선발하였음
- 우수 10계통은 특허 및 품종보호출원에 들어갔으며, 현재 심사 중에 있음
- 10계통은 등록 후 기술이전 등을 실시하여 농가소득 향상을 위한 자원으로 활용될 수 있을 것임
- 생산된 신품종은 다양한 수요를 충족시켜 골프장, 학교운동장, 공원녹화, 주택녹지, 산소 등에 폭넓게 활용 가능함
- 특이계통의 식별 분자마커는 생산자 이력제 및 지적재산권 주장을 위한 근거로 활용될 수 있을 것임
- 환경스트레스저항성(녹기연장) 한국잔디 신품종 육성 및 대량증식을 통한 농가보급으로 소득 향상에 기여
- 지속적인 신품종 잔디개발로 수요자의 요구도에 맞는 고품질 한국잔디 개발 및 실용화
- 잔디의 재배 및 수요 증가에 따른 녹지조경 공간의 증가로 온난화 및 탄소배출 가스의 감소

CONTENTS

Chapter 1. Research Outlines	
1. Objectives	10
2. Justification	12
3. Main contents and scopes	13
Chapter 2. Domestic and Global Status of the R&D Related to the Project	21
Chapter 3. Research Contents and Results	
1. Section 1: Development of 20 Varieties and Registration of Environmental Stress Tolerant Zoysiagrass	30
2. Section 2: Genetic Mechanism of Environmental Stress Tolerant Zoysiagrass	105
Chapter 4. Research Achievement	142
Chapter 5. Utilization of Research Outcomes	144
Chapter 6. References	147

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	
제 1 절	연구개발의 목표 및 주요내용	10
제 2 절	연구개발의 필요성	12
제 3 절	연구내용 및 범위	13
제 2 장	국내외 기술개발 현황	
제 1 절	국외 기술개발 현황	21
제 2 절	국내 기술개발 동향	24
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	
제 1세부	환경내성 한국잔디의 계통육성 및 품종 출원	
제 1 절	환경내성 한국잔디 후보 계통 육성 및 특성분석	30
제 2 절	환경내성 (내열 및 내건성) 후보 계통의 환경내성 검정 및 재배특성 분석	43
제 3 절	한국잔디류의 계통에 따른 특성 분석 및 대량생산 체계 확립	59
제 4 절	환경내성 한국잔디 우수계통의 해외 현지 적응성 검정	66
제 5 절	환경내성 한국잔디특이 유전자 마커 개발	71
제 6 절	환경내성 한국잔디 우수계통의 재배특성 검정, 특허 및 품종보호 출원	89
제 1협동	환경내성 잔디의 유전기작	
제 1 절	포복경 착색 변이체 및 야생형 잔디의 계놈 분석	105
제 2 절	착색 변이체의 안토시아닌 생합성 경로 분석	118
제 3 절	착색 변이체의 유전자 발현 분석	122
제 4 절	안토시아닌 생성에 대한 후생유전학적 영향 연구	138
제 4 장	목표달성도	142
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	144
제 6 장	참고문헌	147

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목표 및 주요내용

1. 연구개발 목표

가. 제 1세부과제: 환경내성 한국잔디의 계통육성 및 품종 출원

- 환경내성(녹색기간 연장, 고온 및 건조 내성) 한국잔디 10개 이상 계통육성 및 특성규명
- 그린조아를 이용한 육성 계통의 재배특성 분석 및 대량재배 체계 확립
- 환경내성 한국잔디 중간교배 계통의 유전적 특성분석
- 우수 환경내성 계통 특이 분자마커 개발
- 한국잔디 20 계통 이상 신품종 국제특허 출원 및 품종보호 출원
- 현지 적응성 실험을 통한 해외용 한국잔디의 선발로 세계화

나. 제 1협동과제: 환경내성 잔디의 유전기작 연구

- 환경내성 변이체 (포복경 착색 변이체) 및 야생형 잔디의 계능 분석
- 착색 변이체의 안토시아닌 생합성 경로 분석
- 착색 변이체의 유전자 발현 분석
- 안토시아닌 생성에 대한 후생유전학적 영향 연구

2. 연구개발 주요내용

가. 제 1세부 과제: 환경내성 한국잔디의 계통육성 및 품종 출원

(1) 환경내성 한국잔디 후보 계통 육성 및 특성분석

- 환경내성 녹색 포복경 한국잔디 (그린조아, Greenzoa)와 한국잔디 야지와 중지를 종내 교배하여 RIL 육성
- 육성된 계통과 한국잔디 (중지)의 녹색기간과 관련이 있는 엽록소 함량 및 내한성 등 생리적 특성, 형태적, 특성 등을 조사
- 육성 계통의 특성에 따라 선발된 개체 고정

(2) 환경내성 (내열 및 내건성) 후보 계통의 환경내성 검정 및 재배특성 분석

- 각 계통의 특성에 따른 재배방법 개발
- 선발된 후보 계통의 환경내성 특성 분석
- 각 계통의 대량증식 포장 조건 확립

(3) 한국잔디류의 계통에 따른 특성 분석 및 대량생산 체계 확립

- 각 계통의 특성에 따른 특성 분석
- 한국잔디류의 각 계통의 특성에 따른 재배방법 개발
- 각 계통의 대량증식 포장 조건 확립

- 환경내성 녹색 포복경 우수계통의 선발 및 10계통 이상 특허 출원
- (4) 환경내성 한국잔디 우수계통의 해외 현지 적응성 검정
 - 후보 계통의 몽골 (3개 지역 이상), 중국 (2개 지역 이상), 미국 (2개 지역 이상) 현지적응성 실험
 - 환경내성 우수계통의 선발 및 5계통 이상 특허 출원
- (5) 환경내성 한국잔디특이 유전자 마커 개발
 - 환경내성 한국잔디 특이 분자마커 개발
 - 고정 계통 특이 분자마커 20개 이상 개발
- (6) 환경내성 한국잔디 우수계통의 재배특성 검정, 특허 및 품종보호 출원
 - 우량계통의 국내 및 해외적응성 실험 계속
 - 환경내성 우수계통 선발 및 10계통 이상 특허 및 품종보호 출원
 - 해외 현지 적응성 실험을 통해 해외수출용 우수 5계통 이상 선발

나. 제 1협동과제: 환경내성 잔디의 유전기작 연구

- (1) 포복경 착색 변이체 및 야생형 잔디의 게놈 분석
 - 포복경 착색 변이체와 야생형 잔디의 게놈 구조 비교
 - 착색 변이체와 야생형 잔디 간의 유전적 다형성 (polymorphism) 유무 조사
 - 정밀한 게놈 분석을 위한 DNA 라이브러리 작성
- (2) 착색 변이체의 안토시아닌 생합성 경로 분석
 - 안토시아닌 생합성 관련 유전자 탐색
 - 잔디의 안토시아닌 생합성 후보 유전자 선정
 - 잔디의 안토시아닌 합성 유전자 분리를 위한 cDNA 라이브러리 구축
- (3) 착색 변이체의 유전자 발현 분석
 - Differential Display 기법을 이용한 차등 발현 유전자 탐색
 - Subtractive Hybridization 기법을 이용한 차등 발현 유전자 라이브러리 구축
 - 착색 변이체와 야생형 간의 후보 유전자 발현 차이 조사
- (4) 안토시아닌 생성에 대한 후생유전학적 영향 연구
 - 차등 발현 유전자 간의 염기서열 차이 조사
 - 차등 발현 유전자의 DNA 메틸화 수준 분석
 - 잔디의 small RNA 라이브러리 구축 및 서열 분석
 - small RNA와 차등 발현 유전자 간의 연관성 연구

제 2 절 연구개발의 필요성

- 한국잔디류의 계통 간 유전학적 분류기준이 명확하지 않아 객관적 자료보다는 연구자들의 주관적인 판단에 따른 선발이 관행적으로 이루어졌고 유전자원의 수집과정과 육종과정에서의 정확한 계통구분이 불분명함
- 따라서 한국잔디류 계통 분류 및 유전학적 연구가 요구되며 계통간의 분자유전학적 유연관계의 규명이 필요함
- 다양한 분자마커를 이용한 잔디의 육성은 생력화와 단기간 신품종 육성이 가능하므로 분자유종을 통한 다양한 육종의 목적에 맞는 계통육성의 기반 마련이 필요함
- 한국잔디는 해외 잔디품종보다 여름 휴면이 없는 장점을 가지고 있으나 초록기간이 4월 말 5월초부터 9월 말 10월초까지로 짧은 단점을 가지고 있음
- 그러므로 한국잔디의 고부가가치화를 산업적 가치로 높이기 위해서는 환경내성이 높아 초록기간을 연장시킬 수 있는 품종의 개발이 시급함
- 본 연구진은 초록기간이 길고 내열 및 내건성을 나타내는 한국잔디 (품종명 : 그린조아) 개발에 성공하였음
- 그린조아는 녹색포복경을 갖는 특징을 가지고 있으며 그린조아 잔디의 유전학적 기작을 규명하고 다양한 계통을 선발하여 환경변화 대응 및 녹화에 필요한 새로운 품종을 개발하고자 함

제 3 절 연구내용 및 범위

1. 연구개발 내용 및 범위

가. 제 1세부과제: 환경내성 한국잔디의 계통육성 및 품종 출원

(1) 환경내성 한국잔디 후보 계통 육성 및 특성분석

- 녹색 포복경 한국잔디의 계통 선발을 위해 그린조아 잔디의 계통 고정 (10계통 이상, 그림 1)과 그린조아와 들잔디 (중지)와 교배를 통한 중간 recombinant inbred line (RIL)을 육성하여 제 1협동과제에 유전학적 특성 규명의 재료로 공급하고자 함 (그림 2)
- RIL라인의 생리적 (내한성 및 녹색기간), 형태학적 및 재배특성 등을 분석하여 각 육성 계통의 특성에 따라 선발된 개체를 각각 10계통 이상 고정하고자 함 (그림 3)
- 녹색 포복경 (그린조아)와 한국잔디 중지와 생육특성 (녹색기간, 내열 등)을 비교하기 위해 (주)에프앤피의 포장 (하우스 및 노지)에서 재배하면서 종자 수확, 계통 특성조사 그리고 고정계통을 선발하고자 함

(2) 환경내성 (내열 및 내건성) 후보 계통의 환경내성 검정 및 재배특성 분석

- 선발 후보계통의 환경내성 특성결과를 이용하여 계통특성에 따라 라인을 고정하고자 함
- 고정된 각각의 환경내성 육성 계통을 이용하여 재배방법을 개발하고 대량증식 조건을 및 포장 조건 확립하고자 함
- 선발 후보계통의 환경내성 특성결과 및 대량증식 결과를 종합하여 우수계통의 선발 및 계통의 특허 출원

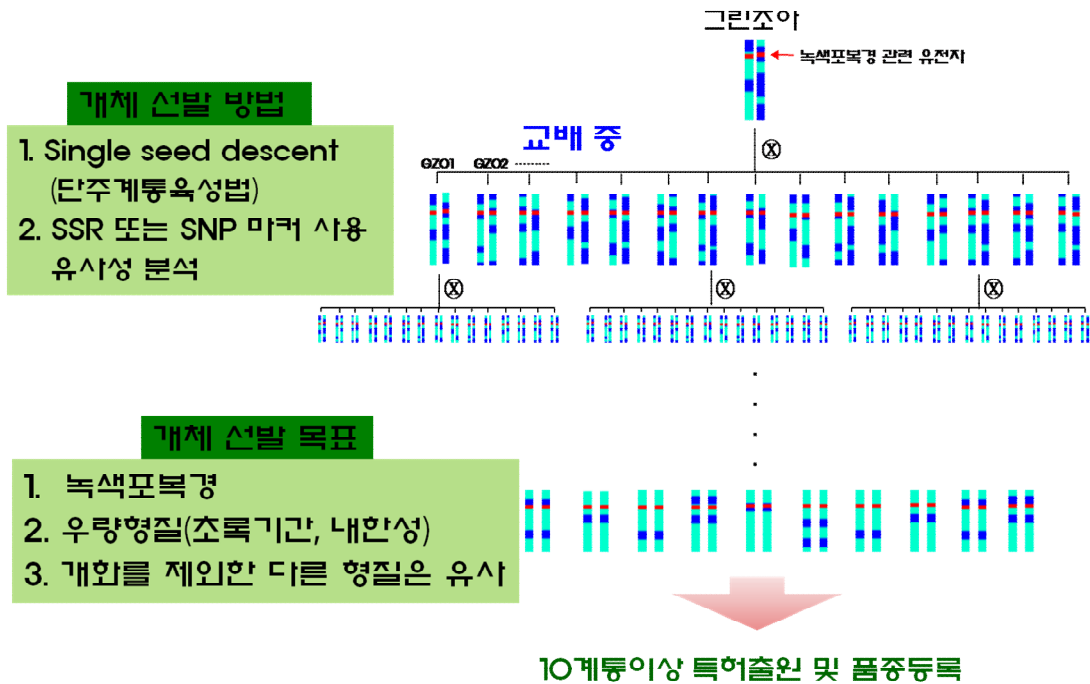


그림 1. 그린조아 잔디를 이용한 환경내성 계통육성 및 계통의 유전형 모식도

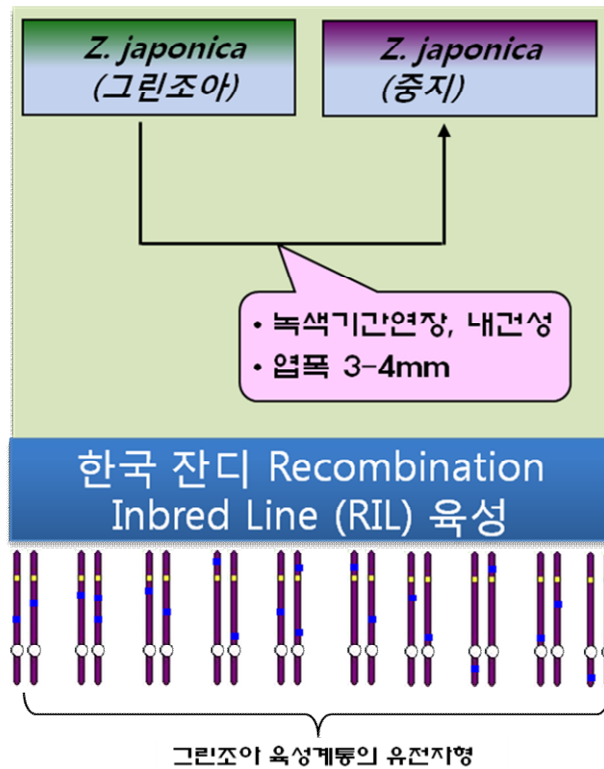


그림 2. 그린조아 잔디를 이용한 환경내성 한국형잔디의 계통육성 및 계통의 유전형모식도

(3) 환경내성 한국잔디의 종내 및 종간교배 육성 계통의 재배특성 분석 및 대량 생산체계 확립

- 한국잔디류의 형태 및 생리학적 유연관계와 특성 규명을 위해 종내 교배 집단의 특성을 검정하고 함 (그림 3)
- 또한 이들 육성 계통을 이용한 재배, 형태적, 유전적인 특성을 검정하여 20계통 이상의 우수 품종을 선발하여 국제특허 및 품종등록 하고자 함
- 한국잔디의 세계화를 위해 해외 현지적응성 검정을 위한 대량 생산체계 확립 및 대량 재배를 실시하고자 함

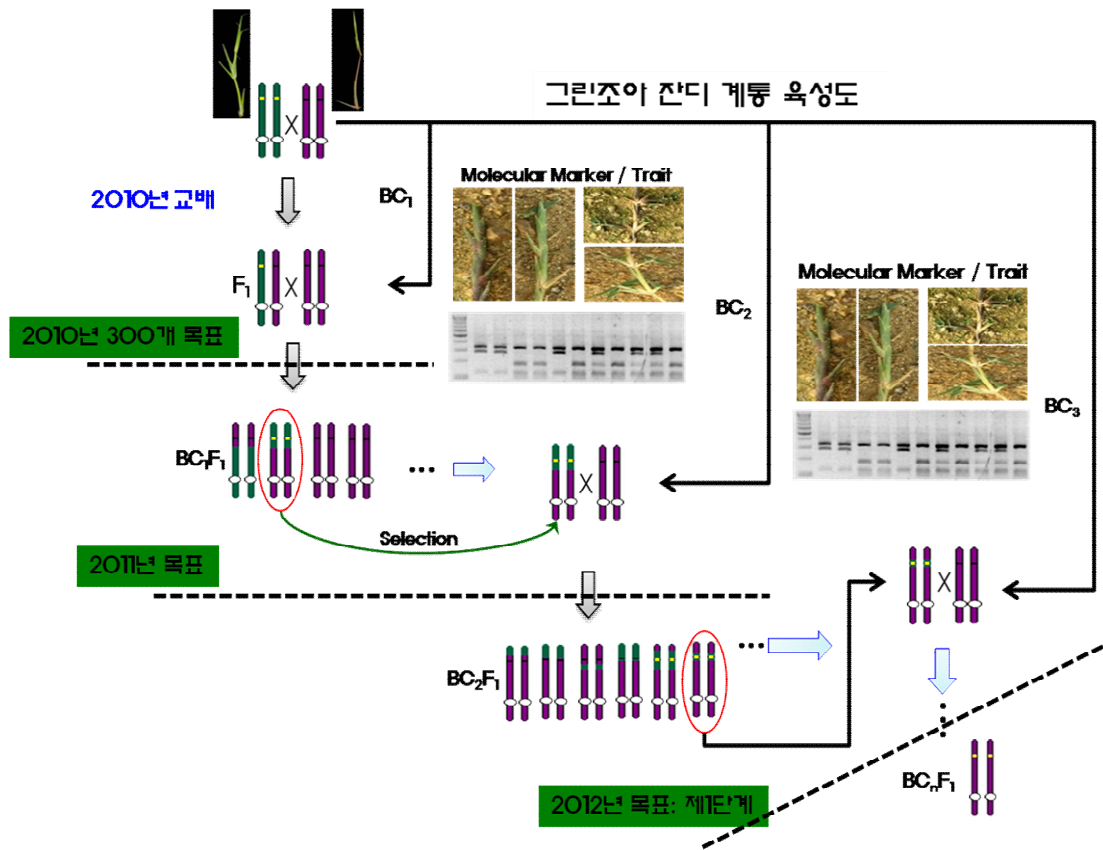


그림 3. 환경내성 한국잔디류의 형질고정을 위한 추진전략 및 계통육성 모식도

(4) 환경내성 한국잔디 계통의 유전 양상 분석 및 특이 유전자 마커 개발

- 환경내성 한국잔디 국내용 15계통 및 해외용 5계통 이상의 유전적 특성 규명하고자 함
- 또한 분석된 유전적 결과와 형태, 재배적 결과를 종합하여 최종 선발된 환경내성 우수 계통 간 유전학적 특성이 규명될 것임
- 선발계통의 산업화 및 세계화를 위한 고정 계통의 품종 특이 분자 마커를 개발하여 품종보호 출원에 활용할 수 있도록 함 (그림 4)

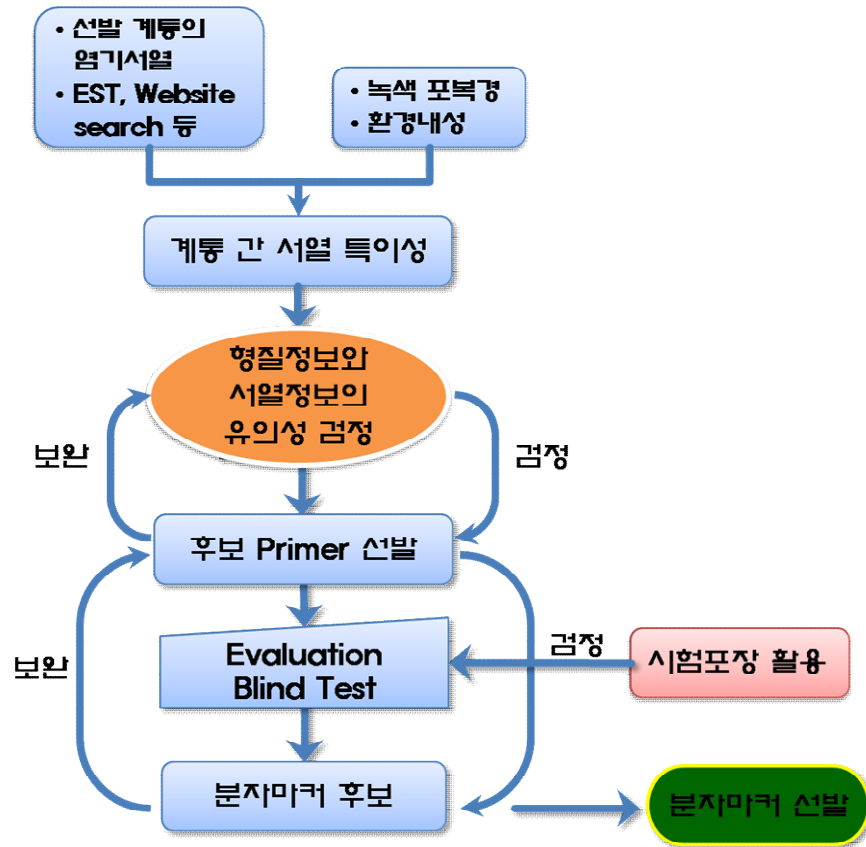


그림 4. 한국 잔디류의 분지육종 체계 확립을 위한 분자표지 개발 모식도

(5) 환경내성 한국잔디 우수계통의 해외 현지 적응성 검정

- 육성된 환경내성 후보 계통의 해외 현지 적응성 실험을 건조 또는 사막화가 진행 중인 지역에서 재배실험을 수행하고자 함
- 몽골지역에서는 울란바타르 근교를 중심으로 3개 지역 이상에서 수행하며, 우수라인 10계통 이상을 이용하여 검증하고자 함 (그림 5)
- 중국에서는 우리나라 및 동아시아의 황사발원지 중의 하나인 쿠부치사막 지역을 비롯하여 2개 지역 이상에서 수행하고자 함
- 미국의 경우 한국잔디류가 초기에 해안지역에 적응된 점과 내륙지역의 건조지역인 Texas 등을 대상으로 2개 지역 이상에서 수행하고자 함



그림 5. 우리나라를 비롯한 동아시아의 황사피해의 발원지중의 하나인 몽골 지역의 고비사막 주변의 해외 현지 적응성 실험 포장에서 생육중인 유채와 잔디. 건조내성이 우수한 계통을 선발하여 이미 조성된 현지 포장에서 현지 적응성 실험을 수행하고자 함

(6) 환경내성 한국잔디 우수계통의 재배특성 검정, 특허 및 품종보호 출원

- 선발 후보계통의 국내에서의 재배특성 검정 및 해외적응성 실험 결과를 종합하여 우수계통을 선발하고자 함
- 우수계통의 선발은 2년간의 국내 및 해외적응성 결과와 유전학적 특성 분석 (제 1세 부과제 및 제 1협동과제)을 종합하여 실시하고자 함
- 국내용 우수계통 선발은 15계통 이상을 특허 및 품종보호 출원하고자 함
- 또한 해외용 우수계통은 5계통 이상을 선발하여 국제특허 및 품종보호 출원

나. 제 1협동과제: 환경내성 잔디의 유전기작 연구

(1) 야생형(중지)과 환경내성 변이체 (그린조아)의 전사라이브러리 작성 및 분석

- 환경내성 변이체 잔디는 기내배양 중 분리된 변이체로서, 포복경의 안토시아닌 함량이 매우 낮은 특징을 갖고 있음
- 이러한 포복경 착색 변이를 갖는 개체는 엽밀도가 낮은 재식 상태에서도 연한 녹색을 띠어 훨씬 부드러운 미관을 나타내며, 고온과 같은 스트레스 환경에서도 매우 왕성한 생육을 보임
- 따라서 환경내성 변이체 잔디는 유전적으로는 야생형과 큰 차이는 없으나, 주요 유전자들의 발현에는 차이를 보일 것으로 예상됨
- 이를 위하여 야생형과 환경내성 변이체 잔디의 주요 조직(잎, 줄기, 포복경, 뿌리, 화기 등)에서 mRNA를 분리하고, cDNA를 합성하여 Expressed Sequence Tag(EST) 라

이브러리를 작성하고자 함

- 라이브러리의 각각 cDNA를 염기서열을 분석하여 잔디에서 발현되는 유전자들을 동정하고, 유전자의 보존 정도와 변이를 다른 종과 비교 분석할 예정
 - 이 라이브러리는 또한 차후 subtraction 방법을 통해 차등적으로 발현되는 유전자를 동정하기 위해 사용될 예정임
 - 또한 잔디의 유전체에 대한 연구는 거의 이루어져 있지 않은 실정으로, 벼나 옥수수 등 같은 과(grass family; Poaceae)의 주요 작물들과의 비교 연구를 통해 많은 유용 정보들을 얻을 수 있을 것으로 기대됨
 - 1차년도에는 약 4,000개의 EST를 동정하고 데이터베이스를 구축
 - EST 데이터베이스 내 발현유전자들의 기능을 예측하고, 이를 기능적 카테고리(functional category)로 분류하여 잔디의 생리 및 발달의 분자생물학적 연구에 활용
 - 이러한 EST 데이터베이스는 과제 수행 기간 중 지속적으로 확대해 나갈 예정(최종 목표는 30,000개 이상)
- (2) 환경내성 변이체 잔디의 포복경 착색과 관련된 유전경로 탐색
- 야생형과는 달리 환경내성 변이체 잔디의 포복경은 안토시아닌의 축적이 이루어지지 않아 연한 녹색을 띠
 - 안토시아닌 생합성 경로는 phenylalanine과 Malonyl coA와 같은 주요 아미노산 및 cofactor 합성과 밀접한 연관을 갖고 있음
 - 또한 안토시아닌 착색은 세포의 pH 및 액포 (vacuole)로의 수송 (trafficking) 등 다른 요소의 영향을 받기도 함
 - 따라서 안토시아닌 생합성 이외의 다른 요인에 의하여 포복경 착색이 조절될 가능성을 배제할 수 없으며, 이를 위하여 전체 유전자의 발현 양상을 변이체와 야생형 간에 비교 분석하는 것이 요구됨
 - 아직 잔디에서 안토시아닌 생합성 경로나 유전자에 대한 연구가 미흡한 실정
 - 따라서 1차년도에 제작한 EST 데이터베이스에서 안토시아닌 합성과 관련된 유전자들을 우선적으로 분류하고, 잔디에서의 안토시아닌 생합성 경로 제시
- (3) 포복경 착색 관련 후보 유전자의 기능 연구 및 발현 분석
- 안토시아닌 합성에 관련된 유전자의 기능 연구를 통해 포복경 착색 기작 규명
 - 2차년도에서 동정한 안토시아닌 생합성 경로 유전자 및 이에 직·간접적으로 영향을 미치는 유전자들을 후보 유전자로 선정
 - 야생형과 포복경 착색 변이체 잔디에서 차등적으로 발현되는 유전자(differentially expressed gene; DEG)들을 subtraction library screening 방법 통해 동정
 - 후보유전자들 및 DEG의 차등적 발현 양상을 야생형과 포복경 착색 변이체 사이에서 비교 분석
 - 후보유전자들의 발현 양상에 차이가 없을 경우, 각 유전자들의 염기서열 비교를 통해

돌연변이 유무 확인

- 후보유전자들의 발현 양상에 차이가 있을 경우, 프로모터 부위로 연구 범위 확대
- 이 연구를 통해 포복경 착색 변이에 영향을 미치는 후생유전학적 요소들을 규명할 수 있을 것으로 기대 (그림 6)

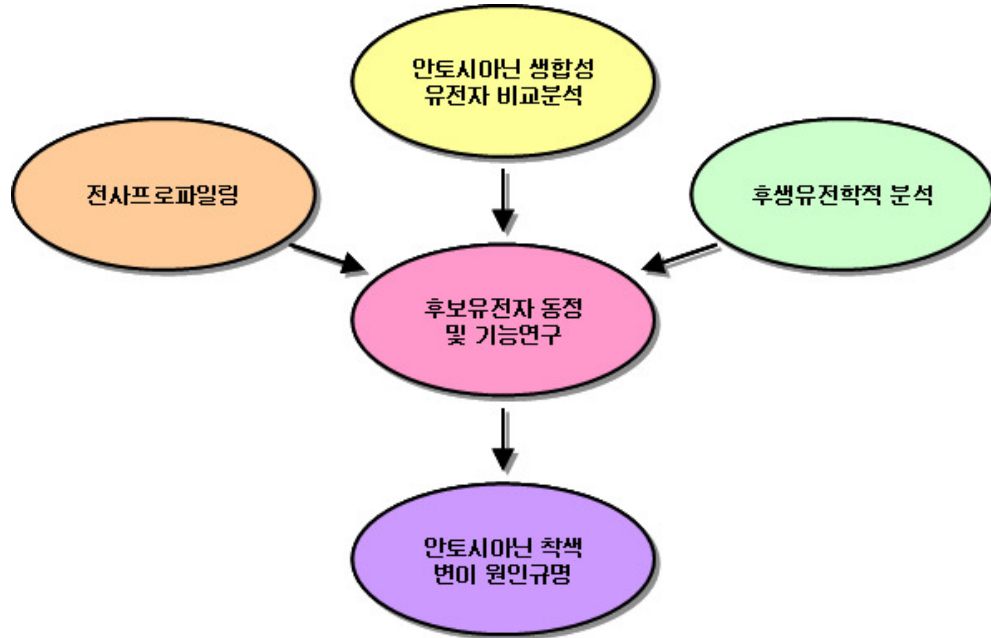


그림 6. 그린조아 잔디의 안토시아닌 착색 변이 기작의 원인규명을 위한 연구체계도

(4) 야생형 (중지)과 변이체 (그린조아)의 유전적 상이성 규명

- 야생형과 포복경 착색 변이체 사이에서 안토시아닌 생합성 관련 유전자의 서열 차이 유무 규명
- 보다 전체적인 유전자 발현 양상을 규명하기 위하여 야생형과 변이체 간의 전사체 (transcriptome)를 분석
- 잔디의 유전자 염기서열이 전체적으로 벼의 그것과 매우 유사하다면, 미국 Affymetrix 사의 Rice Genome Array를 사용하여 잔디의 유전자 발현 양상 연구 가능
- 차등적으로 발현되는 유전자들의 기능 및 발현 기작 연구
- 지속적인 EST 라이브러리 구축을 통해 얻어진 유전자들을 벼나 옥수수의 유전체와 비교 분석하여 잔디의 진화적 특성 연구

(5) 잔디 유전체의 후생유전학적 연구

- 포복경 착색 변이체 잔디는 기내배양 중 분리된 변이체로서, 유전형이 야생형과 거의 동일할 것으로 기대

- 따라서 주요 유전자, 특히 안토시아닌 합성에 관련된 유전자들의 발현이 야생형과 변이체 간에 차등적으로 나타난다면 이는 후생유전학적 요인에 의한 것으로 추측됨
- 식물의 안토시아닌 합성에는 paramutation 및 DNA methylation과 같은 후생유전학 (epigenetics)적 현상이 많은 영향을 미치는 것으로 보고 (Hollick et al., 1997; Jorgensen 1990; Martienssen, 1996; Ronchi et al., 1995)
- 후생유전학적 현상은 DNA 염기서열의 변화 없이 표현형이나 유전자의 발현이 변하는 현상으로서, DNA 메틸화나 히스톤 단백질의 변형, RNA 간섭 등이 주요한 요인
- 특히 DNA 메틸화는 유전자의 발현 및 억제를 조절하는 기작으로서 동, 식물의 분화, 발달 및 암과 같은 질병의 발생에 매우 중요한 역할
- 따라서 변이체 잔디 계놈의 DNA 메틸화 수준을 분석하고, siRNA나 miRNA와 같은 간섭인자들을 동정하여 야생형과의 비교 연구를 수행하고자 함
- 차등적으로 발현되는 후보 유전자들의 DNA 메틸화 수준을 분석(bisulfite sequencing)
- 이러한 유전자들의 DNA 메틸화에 의하여 발현이 억제되는 기작 연구
- 궁극적으로 포복경 착색 변이체에서 안토시아닌 합성이 억제되는 원인 및 관련 기작 규명

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 기술개발 현황

1. 해외에서 육종 상용화되고 있는 대표적 한국형 잔디 품종

가. 마이어 (Meyer, US)

- 한국잔디 중엽계통의 마이어는 Dr. Ian Forbes에 의해 1951년 한국잔디 중에서 선발되었음
- 마이어는 종자 충실도가 낮고 경제성이 없어 주로 스프리깅, 점때, 평때 같은 무성번식 방법으로 생산, 시공되고 있음 (www.super-sod.com/seed-zz.html)

나. 제니스 (Zenith, US)

- 한국잔디 신품종 ‘제니스’는 종자형 품종이며, 종자는 3개 모본의 자연교잡에 의해 생산되는 합성 품종임
- 3개의 모본은 연녹색의 꽃, 우수한 질감, 색깔, 병저항성, 내건성, 휴면기간, 휴면기간의 색깔의 균일성 등의 특성을 가짐
- 내한성이 우수하여 고속도로변이나 시공비용이 적은 곳에 사용됨 (Engelke et al., 1989; NTEP, 1994; Taliaferro et al., 1993; Samudio, 1996).
- 종자형 품종으로 육성되었기 때문에 잔디밭 조성비용이 저렴함

다. 티프이글 (Tifeagle, US)

- 퍼팅 그린용 잔디 신품종 ‘티프이글’은 미국 농무부 농업연구국(USDA-ARS)의 유전학자 Wayne W. Hanna에 의해 개발된 버뮤다그래스 품종임
- 낮은 깎기의 높이에도 높은 밀도 유지가 가능하여 잡초 침입이 적고 해충에 강함

라. 미야코 (Miyako, JP)

- 한국잔디의 rofidva종인 ‘미야코’는 광엽 한국잔디와 세엽 한국잔디의 교잡종으로 다이세이건설 관련회사인 Japan Turf가 개발하였음
- 1995년에 품종등록 되었으며 미국의 잔디품종검정 프로그램에서 검정시험 시행

마. 스프링스 (Springs, JP)

- 1970년 크리핑 벤트그래스 ‘Penncross’에 감마선을 조사하고, 1972년에 64개체를 선발하여 1977년에 최종적으로 No. 12를 선발하고 ‘springs’로 등록
- 일본에서 식물특허제도가 시행된 이후 개발된 1호 잔디 품종임
- 스프링스는 Penncross에 비해 엽폭이 좁고, 절간은 약간 짧고 줄기가 가늘기 때문에 밀도가 높은 잔디밭을 형성함 (<http://rose0.knu.ac.kr/%7EZ9921054/jan%20gaebal.htm>)

표 1. 한국형 잔디의 미국 특허등록 건수

국가	공개번호	발명의 명칭	IPC	등록/ 공개번호	출원인(영문)
US		Turfgrass cultivars of <i>Zoysia sinica</i>	A01H5/00	05977450	Jacklin Seed Company
US		Turfgrass cultivars of <i>agrostis idahoensis</i>	A01H5/10	05981853	Jacklin Seed Company
US		Grass and method of introducing endophytic fungi into a grass	A01H17/06	05880343	Mayekawa Manufacturing Co., Ltd.
US		Glyphosate-resistant plants	A01H5/00	07045684	Mertec, LLC
US		Royal zoysiagrass	A01H5/00	PP014395	The Texas A&M University System
US		Zorro zoysiagrass	A01H5/00	PP014130	The Texas A&M University System
US		Zoysiagrass plant named 'Serene'	A01H5/00	PP014175	
US		Zoysiagrass plant named 'Marion'	A01H5/00	PP014147	
US		Salt-tolerant transgenic turfgrass	C12N15/29	06791012	Rutgers The State University of New Jersey
US	20020052923	Zoysiagrass plant 'Himeno'	A01H5/00	PP013267	Zoysian Japan Co., Ltd.
US		Manilagrass with green leaves in winter and eragrostoidae plant produced therefrom	A01H5/00	06583339	Kaisui Chemical Industry Co., Ltd.
US		Zoysiagrass plant named 'Zeon'	A01H5/00	PP013166	Bladerunner Farms
US		Zoysiagrass plant named 'JaMur'	A01H5/00	PP013178	Bladerunner Farms
US		Zoysiagrass plant named 'Shadow Turf' & '2019'	A01H5/00	PP020266	
US	20050150024	Non-toxic endophytes, plants injected therewith and methods for injecting plants	A01H5/00	07465855	The Board of Trustees of the University of Arkansas
US	20040210583	Genes encoding plant protease-resistant pesticidal proteins and method of their use	A01H5/00	07462760	Pioneer Hi-Bred International, Inc., E.I. duPont de Nemours and Company
US		Zoysiagrass plant named '6136' & '2019'	A01H5/00	PP017808	
US	20050114273	Zoysiagrass plant 'TM9' & '2019'	A01H5/00	PP017514	Toyota Jidosha Kabushiki Kaisha
US	20050132714	Zoysiagrass plant named 'BM230' & '2019'	A01H5/00	PP016982	
US		Zoysiagrass plant named 'Southern Gem'	A01H5/00	PP015218	
US	20050022223	Zoysiagrass plant named 'Z-89' & '2019'	A01H5/00	PP016488	

2. 국외 한국잔디의 육종 현황

- 육종에 의한 새로운 품종개발은 생육속도, 짧은 휴면기간, 녹색기간 연장, 내담압성 등 다양한 형질을 목표로 수행되어 왔으며, 주로 우리나라 및 미국, 일본에서 연구됨
- 미국의 경우, 농무성(USDA)에서 운영하는 National Turfgrass Evaluation Program (NTEP)과 종자회사 (Scotts, Jacklin Seed, Patten Seed, Turfgrass Germplasm Service, FL, Scoot 등) 및 대학 (Texas A&M, Purdue, U of Gorgia, UC Riverside, Southern Illinois 등)에서 유전자원의 수집 및 품종 개발을 주도하고 있으며, 최근에는 각 주 (Alabama, Georgia, California 등)마다 잔디의 품종 개발 및 관리를 담당하는 연구소 또는 협회가 있어 체계적 연구 및 산업적인 관리를 담당하고 있음
- 미국에서 한국잔디류 계통인 Z11 등 영양번식 품종과 Sunrise, Zenith 등과 같은 종자번식 품종들이 보급되었음 (Taliaferro et al, 1993; Emmons, 1995)
- 일본의 경우, Japan Turfgrass 연구소에서 교배육종 (*Z. japonica* X *Z. matrella*)에 의해 개발한 Miyako를 비롯하여 1990년대 조직배양기술의 발달로 형질전환을 위한 embryogenic callus 및 대량증식, 형질전환을 시도하여 내병성과 제초제 내성 잔디개발을 시도하였음 (Fukuoka, 1992; Kim et al, 1996; Ju et al, 1997)
- 이와 같이 잔디의 육종은 형질전환 연구 및 DNA marker를 이용한 유전자지도작성 등

분자생물학적 육종을 통하여 한국잔디류의 녹색기간 연장, 생육속도, 세엽, 내서성, 내염성 그리고 low maintenance형 잔디 개발에 대학, 국가연구소 및 기업연구소에서 품종개발을 주도하고 있음

3. 국외 제품생산 및 시장 현황

- 전 세계의 잔디산업은 700-800조 이상으로 파악되고 있으며, 특히 미국의 잔디산업은 옥수수 다음으로 큰 시장을 형성하고 있음 (미국 석유시장의 6.7배 이상)
- 따라서, 한국잔디의 세계화를 통한 시장성장 잠재력은 매우 높으며, 경쟁력 있는 잔디 개발로 세계시장에 진출하고자 협회 및 관련 산업계에서 투자하고 있는 추세임
- 또한, 잔디시장에서 경제성을 고려하여 규모화 및 생산관리의 기계화 등 획기적인 잔디 생산기술의 개발이 적극적으로 추진되고 있음

제 2 절 국내 기술개발 동향

1. 한국 잔디류 특허분석 결과

- 한국잔디의 신제품등록은 2010년 2월 까지 공개된 잔디관련 특허 출원 및 등록 기술을 대상으로 잔디 신제품 등록에 대한 기술을 대상으로 조사·분석하였음
- 공간적 범위는 US, EU, JP (일본), KR (한국), PCT (국제특허)등 특허청에 공개된 국내 (30건)를 중심으로 분석하였음 (www.kipris.or.kr)
- 분석을 위한 주요 검색어는 잔디육종 (206건), 잔디신제품 (30건), 한국형 잔디 (24건), 잔디 (6418건)의 관련 특허 중 육종에 관한 잔디신제품 및 한국형잔디를 중심으로 분석을 진행하였음, 기타 잔디육종 및 기타의 특허 대부분은 한국잔디류 육종 이외의 생산과 인조 잔디 등과 토양분석 등에 관련된 부분으로 제외함
- 국내잔디품종 등록을 보면 교배를 통한 신제품 개발이 93%로 주를 이루고 있으며, 일부 형질전환을 통한 잔디 개발(3%)이 진행되어짐을 알 수 있음 (그림 1)

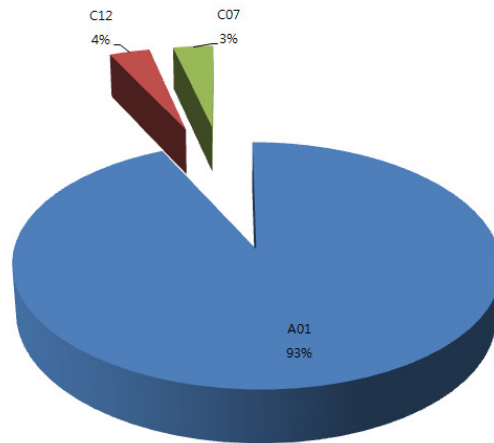


그림 1. 국내 신제품 잔디개발 기술 분석 (특허청 특허 분석시스템 PIAS - II)
 국내잔디품종 등록을 보면 교배를 통한 신제품 개발이 93%로 주를 이루고 있으며,
 일부 형질전환을 통한 잔디 개발 (3%)이 진행되어짐을 알 수 있음

- 국내 최초의 한국잔디류 신제품 특허등록은 삼성 에버랜드에서 육종한 안양증지를 특허 등록한 이후 10건의 품종을 등록 하였으며, 단국대의 왕포아풀 (8건), 오오츠 스포츠 잔디연구소 (3), 고려대 (2종), 농심 (1종) 포항공대와 제주대에서 각각 1종씩을 등록하였음 (그림 2)

표 2. 국내 잔디 신제품 특허등록 현황

No	출원번호	제목	발명자	출원인	IPC 코드
1	KR1998-0022500	잔디 신제품 안양증지	신홍균	삼성에버랜드	A01H 5/00 (2006.01)
2	KR2000-0072162	잔디 신제품 베네스트 포	임선형	삼성에버랜드	A01H 5/00 (2006.01)
3	KR2000-0072163	잔디 신제품 베네스트 파이브	임선형	삼성에버랜드	A01H 5/00 (2006.01)
4	KR2000-0072160	잔디 신제품 베네스트 투	임선형	삼성에버랜드	A01H 5/00 (2006.01)
5	KR2000-0072159	잔디 신제품 베네스트 원 및 동래고려지 특이 S T S 마커	임선형	삼성에버랜드	A01H 5/00 (2006.01)
6	KR2000-0072161	잔디 신제품 베네스트 쓰리	임선형	삼성에버랜드	A01H 5/00 (2006.01)
7	KR2000-0072164	잔디 신제품 베네스트 식스	임선형	삼성에버랜드	A01H 5/00 (2006.01)
8	KR2000-0072165	잔디 신제품 베네스트 세븐	임선형	삼성에버랜드	A01H 5/00 (2006.01)
9	KR2001-0030714	발아율이 향상된 잔디종자 및 그 제조방법	태현숙	삼성에버랜드	A01C 1/00 (2006.01)
10	KR2008-0095742	녹색 연장의 특성을 지닌 세엽 한국잔디 '그리에버'	신홍균	삼성에버랜드	A01H 5/00 (2006.01)
11	KR2003-0021084	잔디 신제품 화순 왕포아잔디	심상렬	단국대학교	A01H 5/00 (2006.01)
12	KR2001-0029572	잔디 신제품 푸른돌 왕포아잔디	심상렬	단국대학교	A01H 5/00 (2006.01)
13	KR2005-0123117	잔디 신제품 청송 왕포아잔디	심상렬	단국대학교	A01H 5/00 (2006.01)
14	KR2005-0123145	잔디 신제품 인제 왕포아잔디	심상렬	단국대학교	A01H 5/00 (2006.01)
15	KR2001-0029571	잔디 신제품 세원 왕포아잔디	심상렬	단국대학교	A01H 5/00 (2006.01)
16	KR2003-0021083	잔디 신제품 동강 왕포아잔디	심상렬	단국대학교	A01H 5/00 (2006.01)
17	KR2005-0010328	잔디 신제품 금산 왕포아잔디	심상렬	단국대학교	A01H 5/00 (2006.01)
18	KR2007-0015652	잔디 신제품 공주 왕포아잔디	심상렬	단국대학교	A01H 5/00 (2006.01)
19	KR2003-0072018	잔디 신제품 세늬	최준수	양근모	A01H 5/00 (2006.01)
20	KR2005-0110051	잔디 신제품 밀룩	최준수	양근모	A01H 5/00 (2006.01)
21	KR2008-0062481	잔디 신제품 일등증지, 일등증지 특이 S T S 마커 및 특이 DNA 표지	서용원	농심	A01H 5/00 (2006.01)
22	KR2001-0060811	조직배양에 의한 들잔디 식물체의 효율적인 재분화 방법	임응표	이효연	A01H 4/00 (2006.01)
23	KR2001-0075348	잎줄기 드레싱을 이용한 잔디 시공방법	김두환	(주)오유오 스포츠잔디연구소	A01G 1/00 (2006.01)
24	KR2000-0000724	벼루다 그래스류 신제품 경우	김두환	김두환	A01H 5/00 (2006.01)

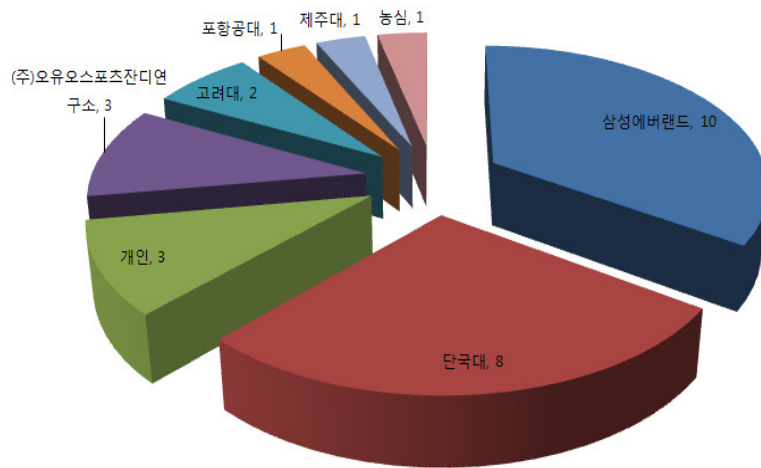


그림 2. 국내 잔디신제품 출원인 분석 결과 (특허청 특허 분석시스템 PIAS - II)

- 한국잔디의 신제품 특허 등록 건수를 보면, 2002년 월드컵을 기준으로 운동장 및 조경용으로 개발되어 2000년 (9건)을 기준으로 증가하였으며, 월드컵이후 한지형 잔디에 대한 관심고조로 2006년 까지 등록 건수가 줄어들음 (그림 3)
- 2007년 이후 한국잔디 중 한지형 잔디인 자생 왕포아풀 (켄터키 블루그래스 계통)을 개량한 품종이 늘어나고 있는 추세임 (한국잔디학회, 2005)



그림 3. 한국잔디 신제품 중 특허출원 신장률

- 켄터키 블루그래스 계통의 신제품 ‘동강’, ‘화순’, ‘공주’, ‘금산’ 등은 한지형 잔디로서 녹색 기간이 길과 개체 밀도가 높고, 색상이 우수함.
- 특히 우리나라 환경에 오랜 기간 동안 적응되어 도입종에 비해 내병성, 내건성, 내건성이 강함
- 종합적으로 국내 잔디관련 산업특허의 출원과 등록은 미미한 실정임
- 2002년 신제품의 보호와 권리에 관한 국제협약 UPOV (International Union For The Protection Of New Varieties of Plant) 제도의 실행으로 신제품 육성촉진, 육종가의 권리보호, 해외진출용이, 외국의 출원동향 파악 등이 가능하게 됨
- 2007년부터 이 협약의 영향으로 외국에서 수입된 잔디인 ‘제니스’, ‘미야코’ 등을 국내에서 생산 판매할 경우 로열티를 지불해야함

2. 국내 제품 및 시장 분석

본 잔디산업에 대한 자료는 한국잔디학회지에서 보고된 ‘미국 플로리다주의 잔디산업기여도와 한국잔디 산업의 현황 및 전망’ (2001)과 ‘한국의 잔디 생산현황’(2006)을 근거로 최근의 통계 및 신문에 게재된 자료를 토대로 작성하였음

가. 생산 및 시장현황

(1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 국내 잔디시장 규모는 잔디생산판매가 1,425억 원, 경기장 시공 250억 원, 옥상, 정원묘지시

공 292억 원, 관리비 1,600억 원, 대중 골프장 및 동계운영 530억 원 및 기타를 포함하여 연간 총 6,577억 원에 달하는 것으로 추정하고 있음 (표 3)

- 재배면적은 2000년 이후로 2001년 5,000Km²에서부터 점차 증가하여 2006년에는 24,000Km² 로 증가하였음 (그림 4)
- 국내 잔디산업은 2002년 월드컵이후 급성장하여 통계청 자료를 살펴보면 통계수치상 2002년 80억 원에 불과했던 국내 잔디생산액이 2007년에는 270억 원 규모로 급격히 증가함
- 현재 잔디산업은 전남지역이 주도하고 있으며, 경남에서도 진주시, 사천시, 거창군 등지에서 생산하고 있고 이를 산업화할 계획인 것으로 알려져 있음
- 학계는 한지형 잔디 생산 부가가치(2006년 기준)는 한국잔디 생산이나 벼농사보다 2배 정도 높은 것으로 분석하고 있음
- 이와 함께 잔디생산 특허기술이 늘고 있고 산업화가 가속화되고 있음 (남해신문 2009년 11월 3일)

표 3. 국내 잔디시장 규모

구 분	세부항목	현시장규모(억원)
잔디생산 판매	도로사면	1,000
	골프장	205
	공원	220
경기장 시공	축구장	150
	학교운동장	100
옥상, 정원, 묘지시공	옥상조경	70
	정원	120
	묘지	102
관리 및 자문	골프장	1,500
	축구장	100
대중 골프장 및 동계 운영	골프장 및 골프연습장	400
	축구 빌리지	130
유기질 및 미생물체제	관리	1820
계		6,577

- 출처: 잔디나라 <http://blog.daum.net/zanddinara>

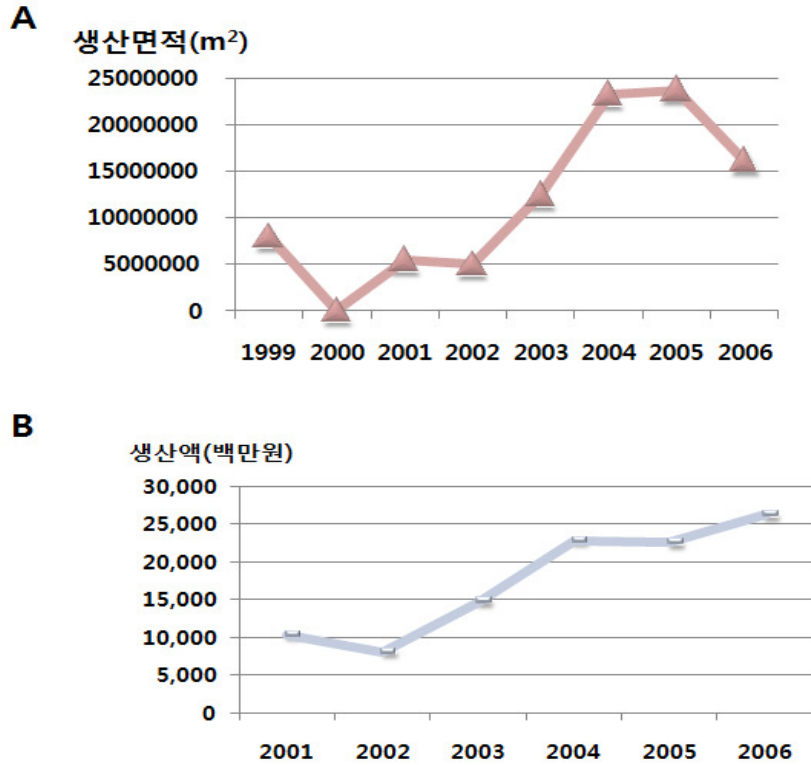


그림 4. 연도별 국내 잔디 재배면적 및 시장 변화. A, 국내 잔디 생산면적 변화표. B, 연도별 국내 잔디시장 변화 (출처: 통계청)

(2) 국내 유통 중인 한국형 잔디 품종

- 국내에 많이 이용되는 잔디는 3종류 이며, 들잔디로 구성된 운동장이 10,345개소로 대부분을 차지하였으나 2002년 월드컵이후로 새로이 조성되는 스포츠용 운동장 및 골프장 조성 시 사용기간 연장에 따른 요구로 한지형 잔디식재가 증가하고 있음 (1999)
- 수집된 국내외 한국잔디류를 재료로 인위적인 종내 및 종간 교잡종이 개발되어 연구에 이용되었고, 분양된 상기 재료와 추가로 수집된 자생 잔디를 이용하여 건국대학교, 단국대학교, 잔디환경연구소 등에서 한국잔디 신품종 건희, 세늬(Senock), 밀록 등의 품종을 개발하여 상업화되고 있음
- 잔디의 주요 소비처인 골프장은 2001년 150개에서 2009년 370개소로 증가하였으며 2010년도 역시 57개소가 개장 예정 중에 있음
- 골프장 잔디산업 종사자수는 골프장의 경우 계약직 종사자 포함 18홀 골프장 하나당 15~20명(10~20명 내외 일용직)으로 이를 2009년 영업 중인 370개소로 환산하면 3700 - 7400여명에 이르는 것으로 추정됨.
- 골프장 한곳 18홀 기준)이 잔디 관련 제품 구입 및 서비스 활동에 연간 지출 비용은 평균 15-20억 원(인건비 포함)으로 추정되며 이를 370개소로 환산하면 5,550- 7,400억 원을 지출하는 것으로 추정됨 출처; 한국잔디학회지 2001)

- 운동체육시설 중 하나인 월드컵 경기장 1곳의 평균 관리비가 1면당 8천~1억 원 내외이며, 각종운동장이 평균 5천만 원(인건비 포함)을 유지 관리비로 지출하고 있으며, 이를 10,000여개의 축구장 및 운동장으로 환산하면 연간 약 50억 원을 관리비로 지출하는 것으로 추정됨 (출처; 한국잔디학회지 2001)
- 현재 잔디 중 한지형 잔디생산의 부가가치는 한국잔디 생산 및 벼농사를 짓는 것보다 2배 정도 높으며 특히 웰빙 및 친환경의 열풍으로 도심구조가 조경 환경으로 바뀌고 있는 추세이며 관공서 및 지자체에서도 주차장, 옥상 등 시멘트에서 잔디로 바꾸고 있는 추세임

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

[1 세부: 환경내성 한국잔디의 계통육성 및 품종출원]

제 1절 환경내성 한국잔디 후보 계통 육성 및 특성분석

1. 녹색 포복경 선발 개체(그린조아)와 중지 생육 포장 조성 및 선발 개체의 특성 조사
 가. 환경내성 및 녹색기간 관련 생육 특성

- 그린조아의 환경내성 관련 생육 특성을 조사하기 위해 하우스와 노지 증식포장에서 재배 하면서 생육특성을 조사하였음
- 생육특성은 형태적 특성과 녹색기간과 관련이 있는 신초의 발생 시기 등을 조사하였으며, 그 결과는 표 1와 그림 1~3과 같음

표 1. 그린조아와 중지의 생육특성 비교

2011년 4월 20일, n=21~40

특성 조사	WT(중지)	그린조아
식물체 길이	16.63±1.5cm	13.87±0.8cm
절간 길이	5.76±0.2cm	3.21±0.2cm
엽초 길이	3.37±0.2cm	7.37±0.6cm
엽신 길이	6.03±0.7cm	6.60±1.0cm
엽신 너비	0.46±0.0cm	0.44±0.0cm
기엽 길이	2.50±0.3cm	5.04±0.3cm
기엽 넓이	0.15±0.0cm	0.21±0.0cm
화서 길이	5.26±0.3cm	4.5±0.4cm
화서 너비	0.29±0.0cm	0.31±0.0cm
이삭 길이	1.21±0.0cm	1.29±0.1cm
이삭 수	56.71±0.7개	53.86±1.3개
분얼경 수	2.90±0.1개	3.48±0.3개

- 녹색기간과 밀접한 관련이 있는 신초의 발생은 그린조아가 대조구인 중지에 비해 약 20-23일 정도 빠른 것으로 나타났음 (그림 1)
- 신초의 발생조사는 2010년 3월 중평군의 재배포장(N36, S127)에서 수행하였음

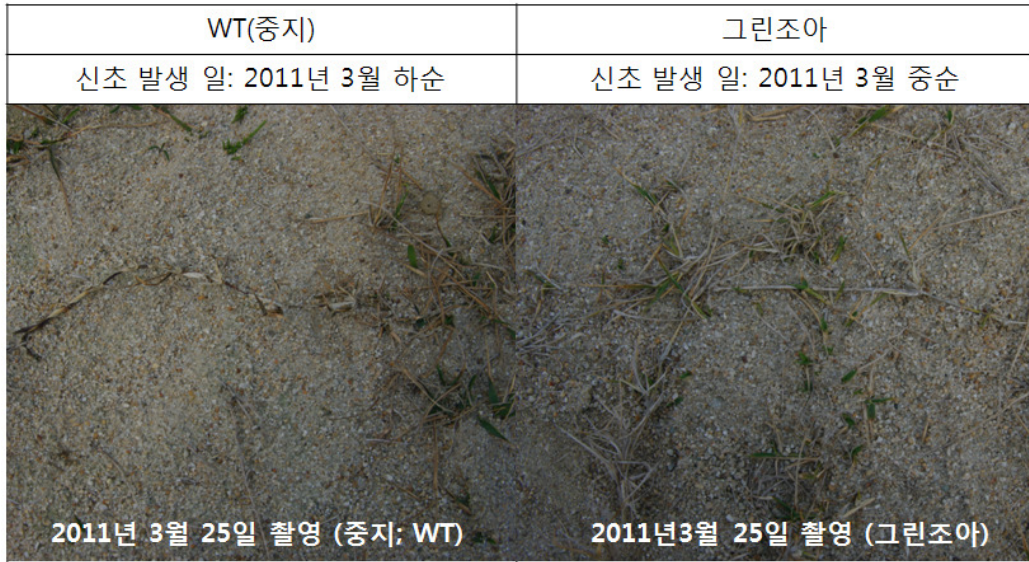


그림 1. 그린조아와 중지의 생육특성-신초발생 시기

- 녹색기간과 밀접한 관련이 있는 지상부 포복경의 발생에서도 그린조아가 대조구인 중지에 비해 약 20-22일 정도 빠른 것으로 나타났음 (그림 2)
- 지상부포복경의 발생조사는 2010년 4월 중평균의 재배포장(N36, S127)에서 수행하였음



그림 2. 그린조아와 중지의 생육특성-지상부 포복경의 발생

- 개화시기는 오히려 대조구가 그린조아에 비해 약 5-7일 정도 빠른 것으로 나타났음 (그림 3)
- 개화시기 조사는 2010년 4월 중평균의 재배포장(N36, S127)에서 수행하였음

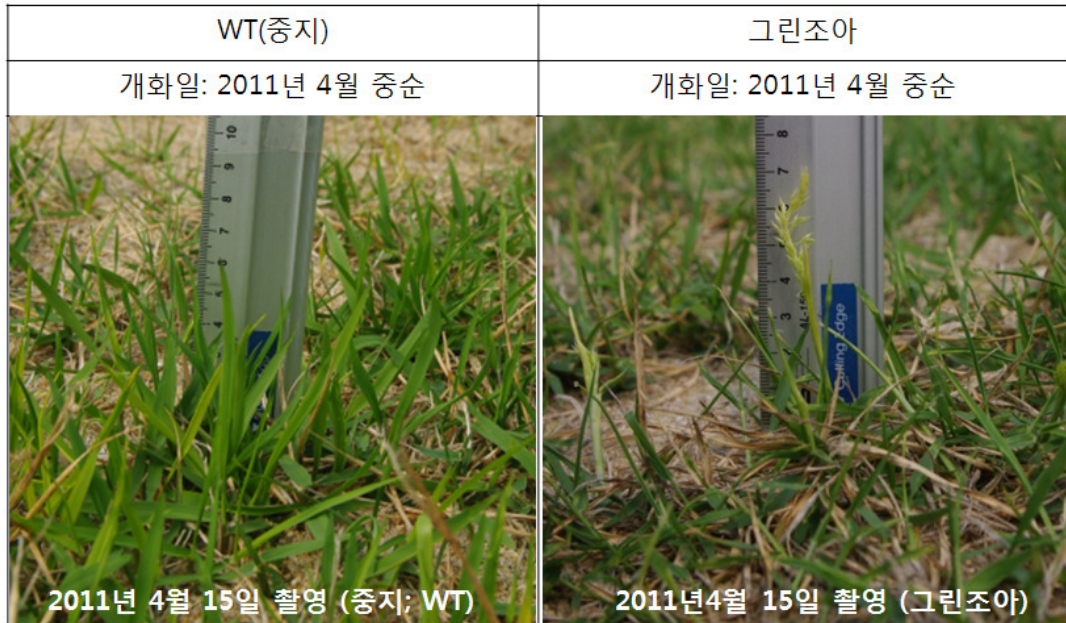


그림 3. 그린조아와 중지의 생육특성-개화시기

나. 형태적 생육 특성

- 그린조아와 대조구인 중지의 생육특성 비교조사에서 지상부 포복경(신초)의 마디길이는 그린조아가 약 4-6mm 정도 짧았음 (그림 4)

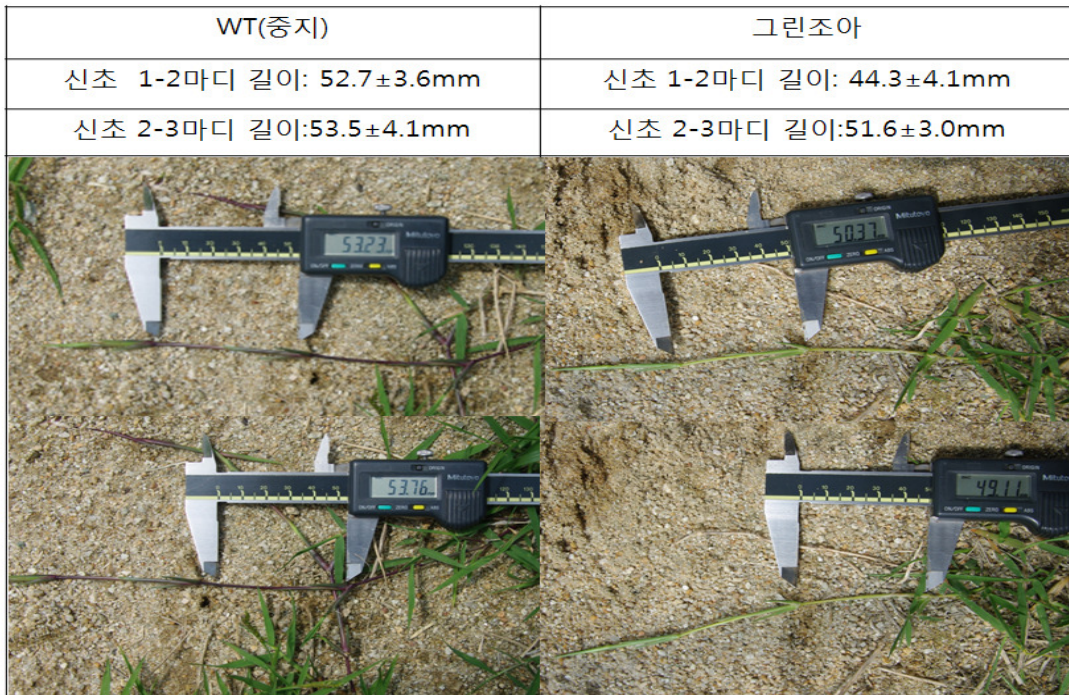


그림 4. 그린조아와 중지의 생육특성-지상부 포복경의 절간길이

- 그린조아와 대조구인 중지의 생육특성 비교조사에서 화서의 길이는 그린조아와 중지 사

이에 큰 유의차가 없었음 (그림 5)

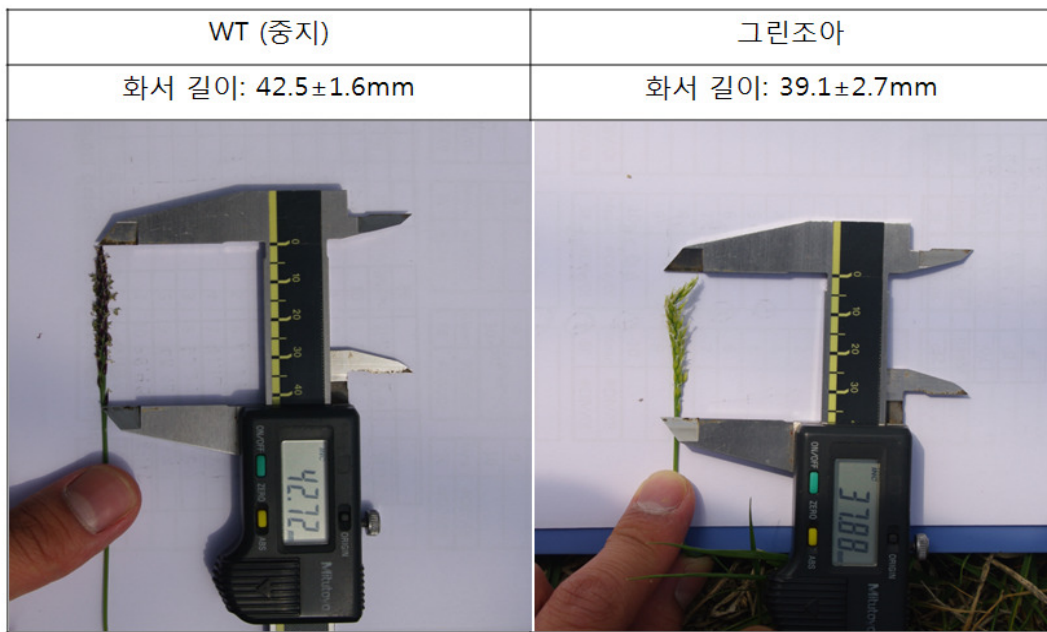


그림 5. 그린조아와 중지의 생육특성-화서의 길이(계속)

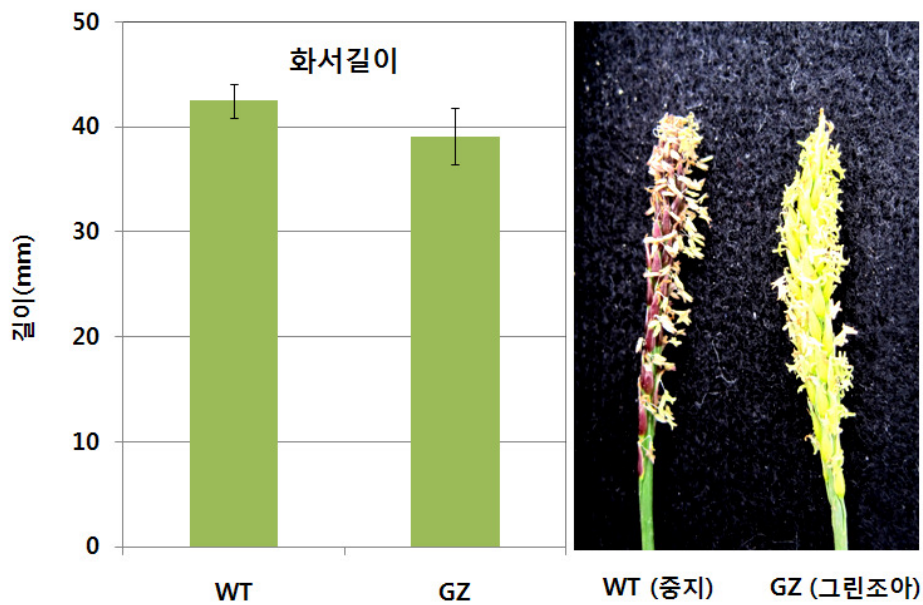


그림 6. 그린조아와 중지의 생육특성-화서의 길이

2. 녹색 포복경 한국잔디 그린조아와 중지의 교배

- 그린조아와 중지 (한국 들잔디 대조구)를 망실하우스에서 정식하여 증식하고, 개화시기에 개화된 개체는 봉지를 쉬워 자연수분을 최대한 억제하면서 교배함 (그림 7, 8)



WT (중지)

GZ (그린조아)

그림 7. 한국 들잔디 대조구 (중지)와 녹색 포복경 그린조아

- 각각의 교배 조합에 따라 수분 후, 봉지를 쉬워 종자가 성숙될 때까지 유지하고, 종자가 완전히 성숙한 후 각 개체별로 수확
- 그린조아와 중지의 교배조합 및 F1종자 수확은 그림 9와 같음

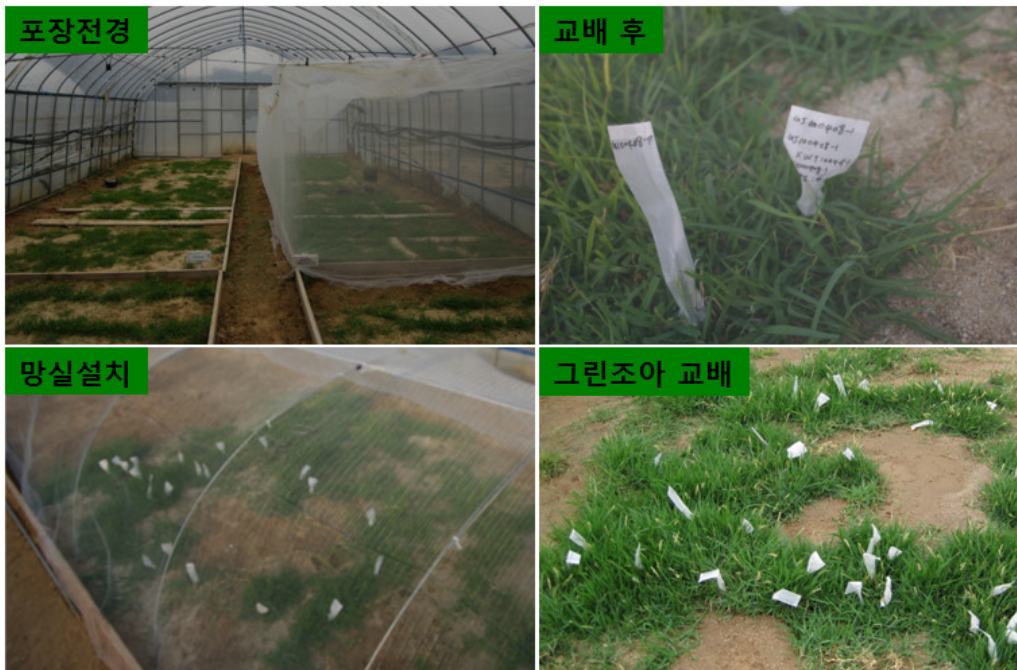


그림 8. 그린조아와 중지(한국들잔디 대조구)의 교배를 위한 망실하우스 및 교배

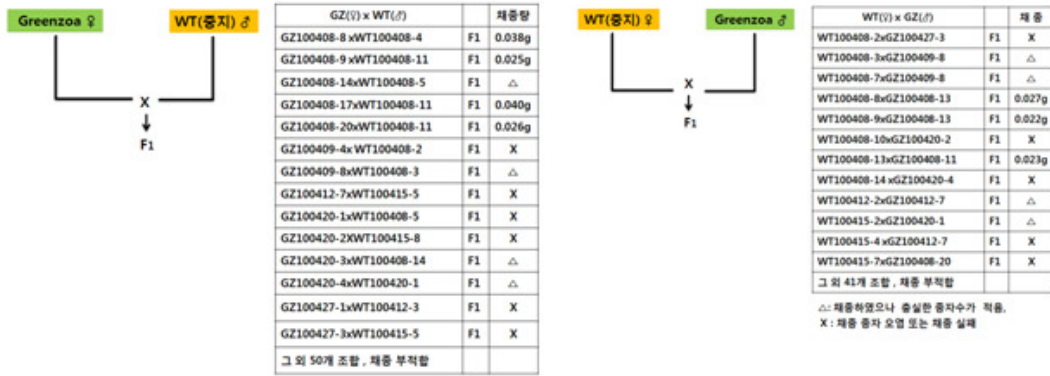


그림 9. 그린조아×중지, 중지×그린조아 교배 조합 및 F1 종자 채중

- 그린조아와 중지의 교배 조합하여 중지모계 3개체, 그린조아 모계 4개체의 F1 종자를 40~60립 수확하였음 (그림 10)
- 또한, 그린조아와 중지의 자가 수정 F1종자를 수확하여 교배종자와의 형태적 특성 및 계통육성의 시료로 확보함 (그림 11)



그림 10. 그린조아와 중지 교배조합으로 선발된 교배조합 및 F1종자 수확



그림 11. 그린조아와 중지의 자가수정 F1종자의 수확

- 그린조아와 중지의 교배조합으로 수확한 7개체를 각각 10립씩 2회 파종하였으며, 그린조아와 중지의 자가 교배 종자 또한 파종하여 받아낸 4개체를 정식하였음 (표 2)

표 2. 한국 들잔디 대조구(중지)와 녹색 포복경 그린조아의 교배 및 자가수정 종자의 받아결과

번호	교배명	교배내용	세대	받아개체		
				파종일 (11.11.07)	파종일 (12.02.18)	소계
1	GJ1	GJ100408-12	selfing		1	1
2	GJ2	GJ100408-18	selfing	3		3
3	GJ3	GJ100409-2	selfing	1	1	2
4	G×W1	GJ100408-9×WT10040008-11	F1			0
5	G×W2	GJ100408-17×WT100408-11	F1	1		1
6	G×W3	GJ100408-8×WT100408-4	F1	2		2
7	G×W4	GJ100408-20×WT100408-11	F1	2	4	6
8	W×G1	WT100408-13×GJ100408-11	F1			0
9	W×G2	WT100408-9×GJ100408-13	F1			0
10	W×G3	WT100408-8×GJ100408-13	F1	3	2	5
11	WT1	WT100512-3	selfing	1		1
12	WT2	WT100412-3	selfing		2	2
13	WT3	WT100415-8	selfing	1		1
14	WT4	WT100512-1	selfing			0

- 그린조아와 중지의 교배조합으로 수확한 7개체를 포복경을 확인한 결과, 그린조아를 모계로 교배한 경우 녹색포복경의 형질을 유지하였으나, 한국 들잔디를 모계로 교배할 경우 모계의 붉은색 형질을 나타내었음 (그림 12)

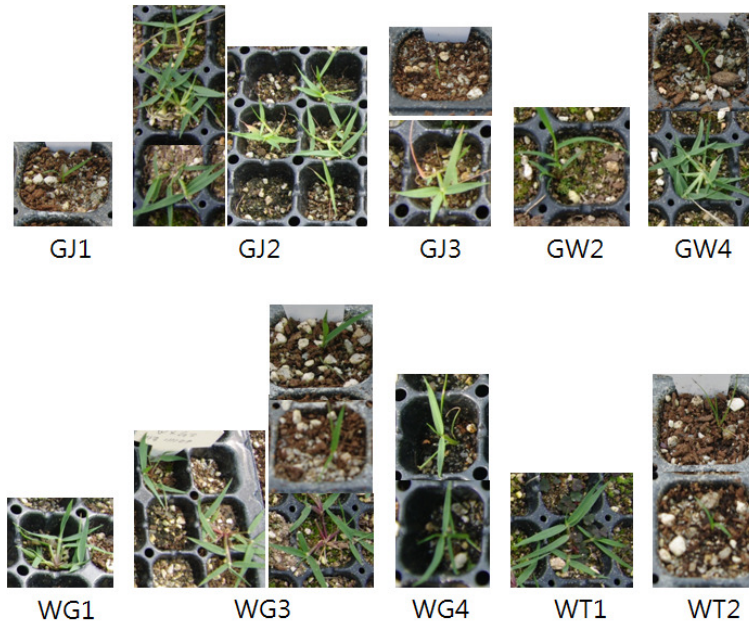


그림 12. 그린조아와 중지 교배의 F1 종자의 발아 및 농업특성

- 환경내성개체인 그린조아의 형질고정을 위하여 중지와 그린조아의 교배 F1세대와 역교배를 하여 28개 조합 중 1개의 조합에서 채종함(그림 13)

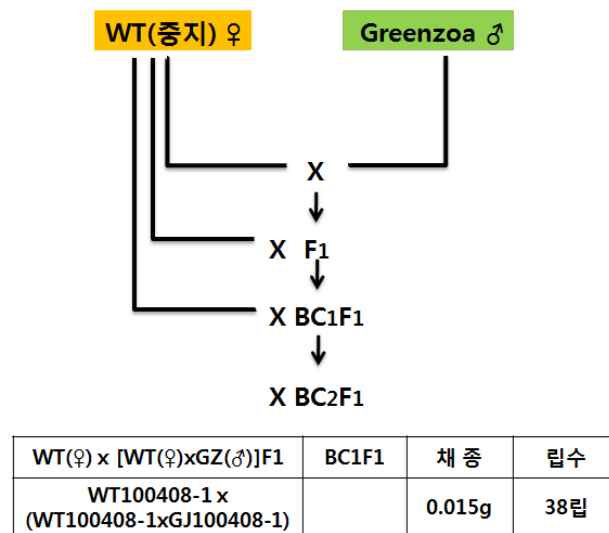


그림 13. 그린조아와 중지 교배의 F1 종자의 세대고정을 위한 backcross 및 종자 수확

다. RIL육성을 위한 F1 종자 파종 및 선발

- 그린조아와 중지를 교배하여 수확한 종자를 상토에 파종하여 발아시킨 후, 육성포장에 정식하여 재배하면서 녹색포복경 개체를 선발하였음(그림 14)
- 생육포장에서 총 26개체를 선발하였으나 11개체 고사하여 녹색포복경을 갖는 10개체를 육성함(표 3)

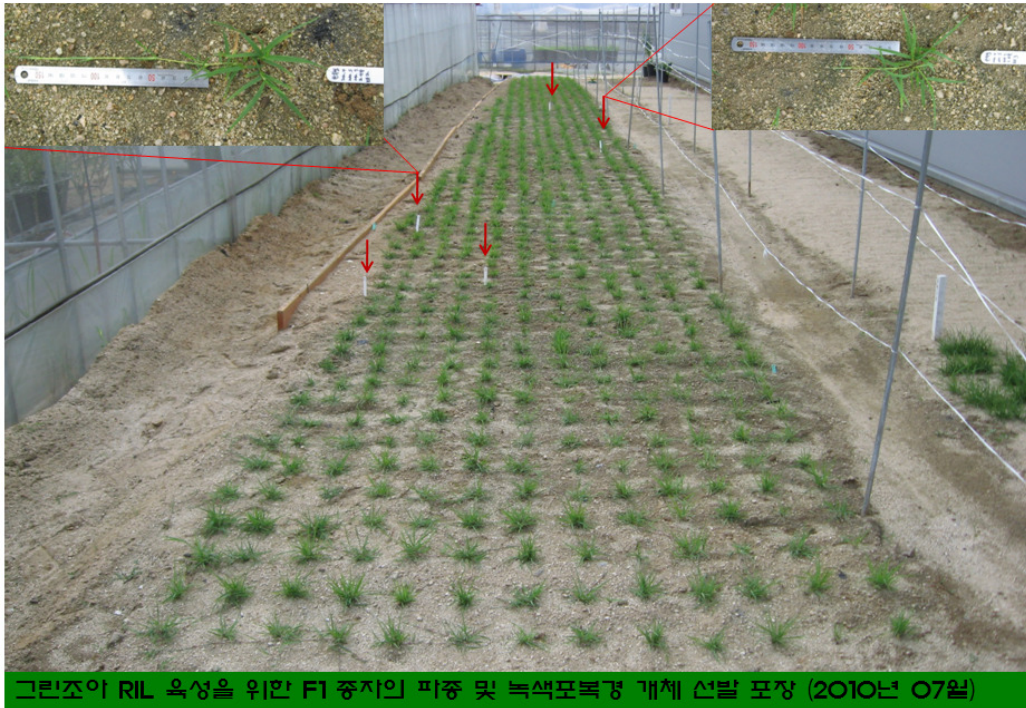


그림 14. 그린조아 F1 개체로부터 녹색포복경을 갖는 개체를 선발하기 위한 포장에 5,760여립의 종자를 파종하여 생육 특성을 조사 (붉은색 화살표; 선발 개체)

표 3. 그린조아와 중지 F1 종자를 이용한 녹색포복경 선발후보 개체

선발번호	포복경색	비고
GZK02	녹색	고사
GZK03	녹색	
GZK04	녹색	
GZK05	녹색	
GZK06	녹색	
GZK07	녹색	
GZK08	녹색	
GZK09	녹색	고사
GZK10	녹색	
GZK11	녹색	
GZK12	녹색	
GZK13	녹색	고사
GZK14	녹색	고사
GZK15	녹색	고사
GZK16	녹색	고사
GZK17	녹색	고사
GZK18	녹색	고사
GZK19	녹색	
CR01	녹색자주색혼합	
CR02	녹색자주색혼합	
CR03	녹색자주색혼합	
CR04	녹색자주색혼합	고사
CR05	녹색자주색혼합	
CR06	녹색자주색혼합	고사
CR07	녹색자주색혼합	
계	총 26개체 선발 중 15개체 육성	

○ 선발된 10개체의 생육특성을 조사함 (그림 15, 16)

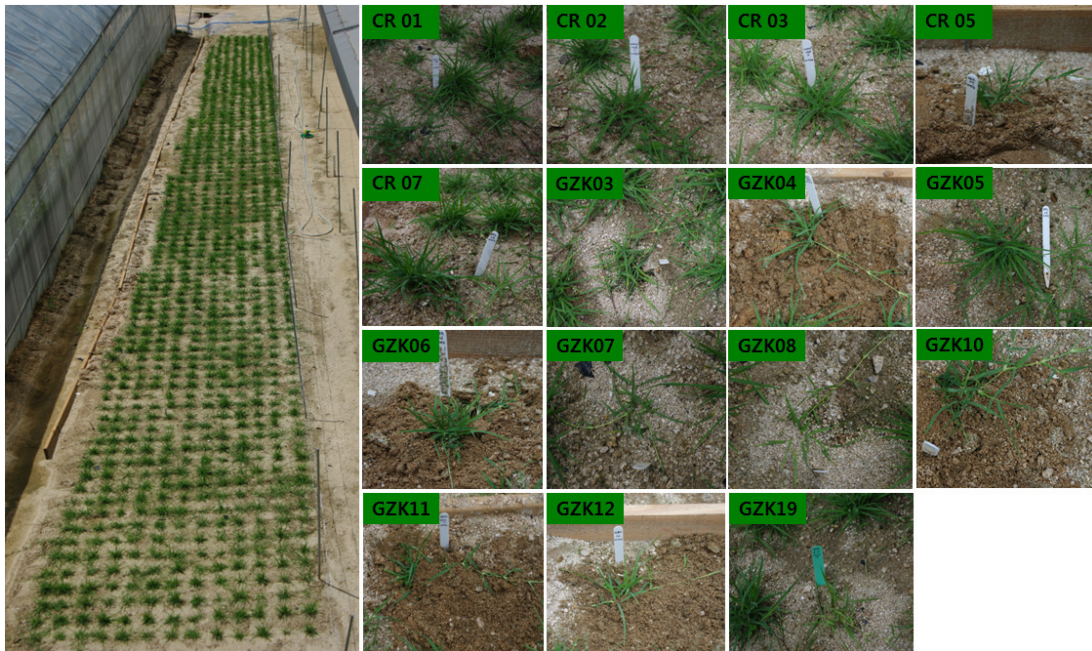


그림 15. 녹색 포복경 개체 선발을 위한 생육특성조사

번호	진디명	사진	엽신(잎길이) (mm)	일폭 (mm)	일색	포복경색	절간길이 (mm)	번호	진디명	사진	엽신(잎길이) (mm)	일폭 (mm)	일색	포복경색	절간길이 (mm)
1	GZK		83.3	5.8	중간녹색	녹색	28.9	8	GZK #10		86.5	5.0	중간녹색	밝은녹색	50.6
2	GZK #3		87.3	5.7	중간녹색	녹색	42.2	9	GZK #11		111.3	4.8	중간녹색	녹색	34.5
3	GZK #4		99.0	5.0	중간녹색	녹색	26.5	10	GZK #12		104.0	5.2	중간녹색	녹색	25.5
4	GZK #5		112.6	4.9	중간녹색	녹색	48.5	11	K#2		90.5	4.9	중간녹색	녹색	47.6
5	GZK #7		81.5	4.8	중간녹색	녹색	43.5	12	K#3		91.5	5.0	중간녹색	녹색	50.0
6	GZK #8		95.6	5.3	중간녹색	밝은녹색	36.1	13	WT-3		100.4	4.5	중간녹색	붉은색	32.6
7	GZK #9		100.2	3.8	중간녹색	밝은녹색	43.1	14	WT-7		100.0	4.4	중간녹색	붉은색	35.0

그림 16. 그린조아와 중지 교배 조합으로부터 선발된 개체의 특성.

- 선발된 녹색 포복경 개체(그린조아)를 자가 수정한 F1종자 3,000립을 파종하여 발아시킨 후, 육성포장에 정식하여 분리육종을 하여, 붉은색 포복경을 갖는 개체를 선발하였음 (그림 17)
- 발아된 그린조아 F1 개체 중 붉은색 포복경을 갖는 개체는 8개체로 0.3% 포복경 회귀성을 보였음 (그림 18)



그림 17. 그린조아 자가수정 F1 개체로부터 붉은색 포복경을 갖는 개체(화살표)를 선발하기 위한 포장에 3,000 여립의 종자를 파종하여 생육 특성을 조사 (파종; 2012년 2월3일, 정식; 2012년 4월 17일, ①; GZR08-20120425, ②; GZR14-20120425, ③; GZR15-20120425, ④; GZR21-20120425, ⑤; GZR36-20120425, ⑥; GZR41-20120425, ⑦; GZR58-20120425, ⑧; GZR63-20120425)

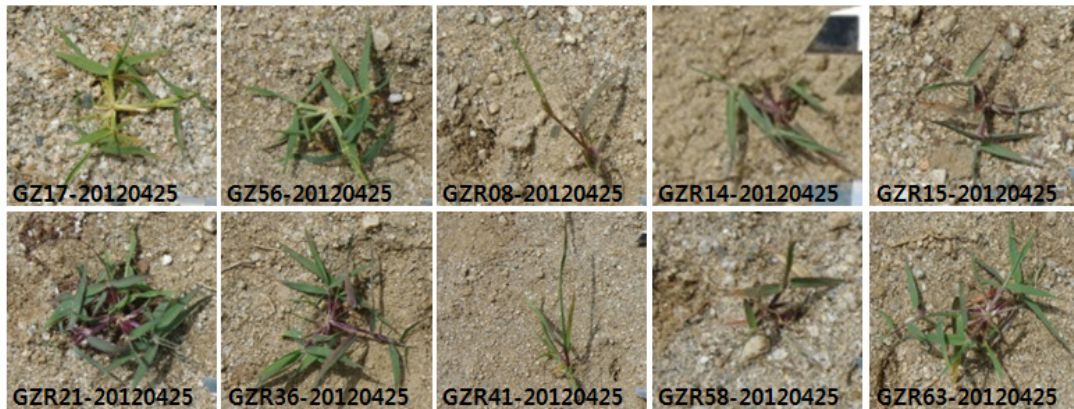


그림 18. 그린조아 자가수정 종자 중 붉은색 포복경 개체 선발
(녹색 포복경; GZ17-20120425, GZ56-20120425, 붉은색 포복경; GZR08-20120425, GZR14-20120425, GZR15-20120425, GZR21-20120425, GZR36-20120425, GZR41-20120425, GZR58-20120425, GZR63-20120425)

라. 교배 계통의 세대진전 및 육성

○ 계통 육성을 위한 교배 및 세대육성 과정은 당초 계획에 따라 중간(그린조아와 중지)를

정역교배 하였음

○ 교배 일정 및 결과를 종합하여 표 4, 5와 그림 19에 정리하였음

표 4. 한국형 들잔디 육성을 위한 교배 및 수확 일정

일 정	내용
2012년 05월	○ 그린조아와 중지 교배
2012년 07월	○ 교배조합(정 및 역교배)별 종자 채종 - 모본이 그린조아인 종자는 평균 47.8립, 평균 생체중 0.034g 채종 - 모본이 중지인 종자는 평균 38.3립, 평균 생체중 0.023g 채종
2012년 08월	○ 후세대 검정 - 교배종자 92개의 개체별 40립씩 파종
2012년 10월	○ 교배조합별 종자 발아율 확인 - 모본이 그린조아인 58개체 중 38개체 발아하여 65.5%발아 - 모본이 중지인 34개체 중 9개체 발아하여 26.5%의 발아율
2013년 3월	○ 생육 특성 조사 - 엽신 길이와 엽폭을 측정 - 엽 색도 분석 - 포복경의 색과 포복경 수를 조사

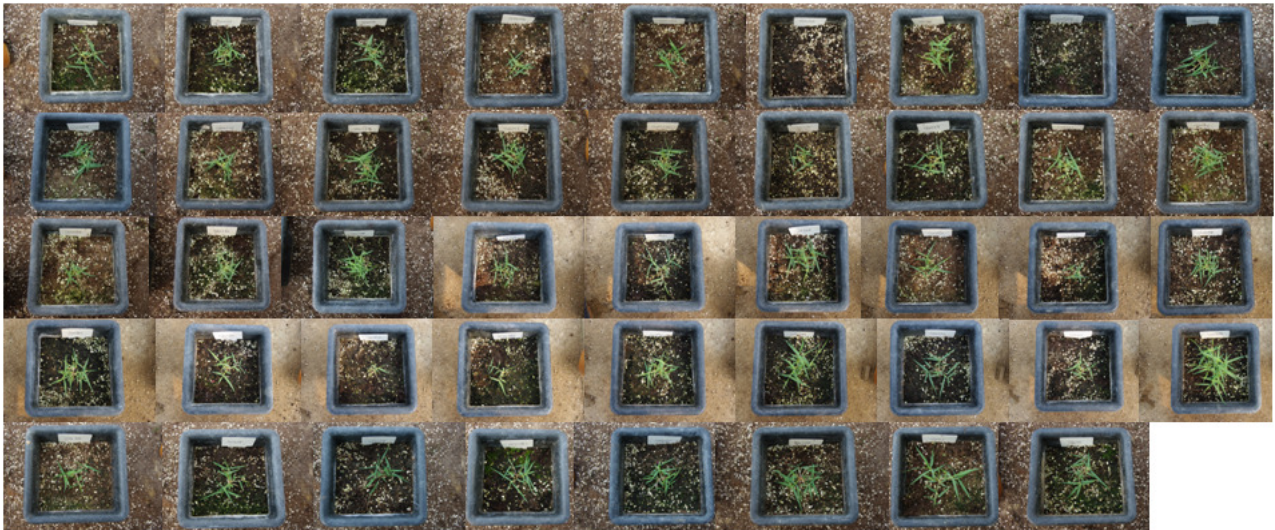


그림 19. 교배종자의 생육 특성 조사를 위해 발아 후 선발한 생육사진.

표 5. 녹색 포복경 계통의 육성과 세대진전을 위한 교배 후대의 생육특성조사 결과

번호	선발번호	발아율(%)	엽길이(mm)	엽폭(mm)	잎색(G)	포복경색	포복경수	녹병발생
1	GW101	7.5	45.26	3.3	173	녹색	1	무
2	GW103	25	53.26	3.4	189	녹색	1	무
3	GW105	2.5	36.48	3.6	172	녹색	1	무
4	GW106	2.5	29.78	4.1	159	녹색	1	무
5	GW110	2.5	35.32	2.9	153	붉은색	1	무
6	GW114	5	고사		0		0	무
7	GW116	12.5	38.48	4.3	159	붉은색	1	무
8	GW117	7.5	고사		0		0	무
9	GW118	2.5	52.59	3.7	191	녹색	1	유
10	GW119	7.5	44.42	3	167	녹색	1	무
11	GW121	2.5	35.19	4.2	171	녹색	0	무
12	GW122	2.5	36.23	4.3	194	붉은색	1	무
13	GW124	2.5	35.49	3.4	202	녹색	1	무
14	GW125	2.5	36.27	3.5	165	녹색	0	무
15	GW129	7.5	42.7	3.7	192	녹색	0	유
16	GW131	10	48.5	3.4	194	녹색	1	무
17	GW134	5	42.6	4.5	196	녹색	1	무
18	GW135	2.5	32.82	3.5	190	녹색	0	무
19	GW136	2.5	36.45	3.4	206	녹색	2	무
20	GW138	2.5	42.54	3.4	211	녹색	3	유
21	GW139	12.5	40.29	3.3	190	녹색	0	무
22	GW140	25	48.62	4.3	182	붉은색	1	무
23	GW163	2.5	42.55	3.4	180	녹색	1	유
24	GW172	10	44.05	3.2	165	녹색	0	무
25	GW173	2.5	31.62	4.3	185	녹색	0	무
26	GW178	2.5	32.97	4.2	195	녹색	1	무
27	GW182	2.5	41.15	4.2	190	녹색	1	무
28	GW184	20	27.98	3	184	녹색	0	무
29	GW185	7.5	44.57	3.4	200	녹색	1	무
30	GW186	2.5	36.94	4	193	녹색	1	무
31	GW191	5	39.54	3.3	172	녹색	1	무
32	GW199	7.5	50.77	4.8	207	녹색	1	무
33	GW201	2.5	43.22	4	125	붉은색	0	무
34	GW202	5	21.79	4.5	144	녹색	0	무
35	GW211	10	33.2	4	162	녹색	0	무
36	GW219	15	56.78	4.5	194	붉은색	2	무
37	WG113	5	38.33	2.8	169	붉은색	1	무
38	WG115	5	36.96	3.6	151	붉은색	1	무
39	WG117	2.5	39.12	3.8	151	붉은색	0	무
40	WG138	2.5	52.66	4.5	211	붉은색	1	무
41	WG141	2.5	35.88	4	181	붉은색	2	무
42	WG157	5	50.3	4.8	172	붉은색	1	무
43	WG164	5	48.67	5.4	177	붉은색	0	무
44	WG166	2.5	56.29	3.8	177	붉은색	0	무

제 2 절. 환경내성(내열 및 내건성) 후보 계통의 환경내성 검정 및 재배특성 분석

1. 선발된 후보 계통의 환경 내성 특성 분석

- 선발된 녹색 포복경 개체 그린조아는 녹색기간 및 환경내성과 관련된 생육 특성을 조사한 결과, 10월 초 또는 중순까지 녹색기간을 유지하는 한국형 들잔디나 벤틀그라스보다 녹색기간이 11월 초순까지 녹색기간이 연장됨을 볼 수 있었음 (그림 20, 표 6)



그림 20. 그린조아의 증식포장에서의 녹색기간 연장 실험. A; 정식포장, B; 하우스 내 증식포장

표 6. 그린조아와 한국형 들잔디의 녹색기간 조사

품 종	녹색기간 (녹색율100%)	낙엽기	비고
그린조아	4월중순~11월중순	11월말~12월초	
한국형들잔디	4월말~11월중순	11월중순~11월말	
벤틀그라스	4월말~6월중순, 7월중순~11월초순	10월중순~11월초	하고현상

2. 육성계통의 지역별 생육 특성 조사

- 육성 계통의 생육 특성은 중부와 남부지역으로 구분하여 2곳에서 진행하였음
- 중부지역은 충북 증평에서 남부지역은 전남 장성에서 그린조아와 대조구 중지의 생육특성을 비교 조사하였음

가. 지역별 생육 특성 조사

- 남부지역(전남 장성) 2012년 6월 2일 그린조아 이식 후 환경 적응성 및 생육조사를 위해 매달 현장 조사함
- 중부지역(충북 증평) 총 11차례 조사를 실시하였으며(표 7) 조사지역의 기후는 그림 21와 같음
- 분석 방법은 1회 조사 시기에 남부지역(전남 장성)의 그린조아와 일반중지에서 각각 10개 샘플을 채취해 형태적 및 생리적 특성을 비교함
- 남부지역(전남 장성) 그린조아와 일반중지의 정단부에서 5번째 절간 새 엽의 엽신 길이와 폭을 비교한 결과, 그린조아 엽신의 길이는 중지에 비해 짧았으나 엽폭은 그린조아와 중지간의 큰 유의차는 없었음 (그림 22)
- 정단부에서 4-5번째 절간의 길이를 비교한 결과, 그린조아의 절간이 일반중지에 비해 현저히 짧게 나타났음 (그림 23)
- 그린조아 엽신의 길이가 중지에 비해 짧게 나타났으나 절간이 짧은 그린조아는 촘촘히 새 엽들이 발생하여 녹색도나 피복율이 높은 시각적 효과를 보였음 (그림 24)

표 7. 남부지역과 중부지역에서의 그린조아와 일반중지의 특이사항

지역	조사	조사일자	특이사항
남부지역 (전남 장성)	이식	2012년 06월 02일	그린조아 이식
	1차	2012년 07월 12일	가뭄으로 인한 그린조아 생육저조
	2차	2012년 08월 14일	장마로 인한 그린조아 생육저조
	3차	2012년 09월 22일	그린조아 번식력, 생육상태 양호
	4차	2012년 10월 04일	그린조아 밀도 및 피복율 우수
	5차	2012년 10월 20일	그린조아 황화현상 발견
	6차	2012년 10월 26일	그린조아 휴면 시작
	7차	2012년 11월 02일	첫서리 후 그린조아 황화현상 확인
중부지역 (충북 증평)	1차	2012년 08월 20일	그린조아 녹병발병 후 회복력 확인
	2차	2012년 08월 27일	그린조아 녹색밀도, 피복력 우수
	3차	2012년 09월 03일	그린조아 생육상태 양호
	4차	2012년 09월 10일	그린조아 생육상태 양호
	5차	2012년 09월 24일	그린조아 생육상태 양호
	6차	2012년 10월 09일	일반잔디(중지) 황화현상 시작
	7차	2012년 10월 15일	일반잔디(중지) 휴면상태
	8차	2012년 10월 23일	첫서리 후 그린조아 황화현상 확인
	9차	2012년 10월 30일	그린조아 녹색기간 확인
	10차	2012년 11월 07일	그린조아 휴면상태 진행
	11차	2012년 11월 08일	그린조아 황화현상 80%진행 중

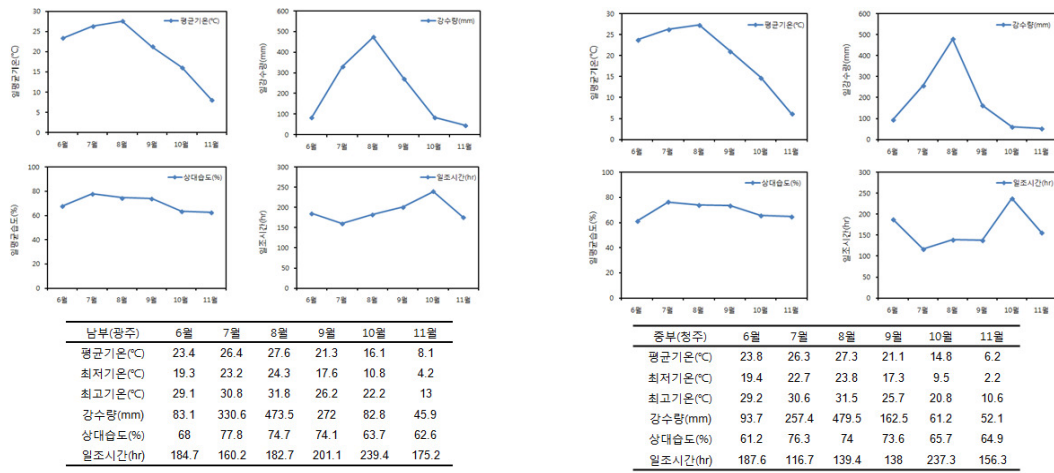


그림 21. 한국잔디의 지역별생육특성조사 지역의 기온변화

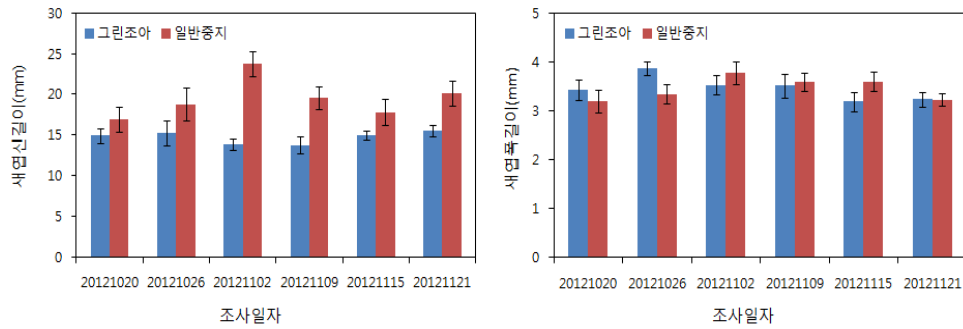


그림 22. 남부지역(전남 장성)에서 그린조아와 일반중지의 정단부로부터 5번째 절간 새엽의 엽신길이를 폭 비교



그림 23. 남부지역(전남 장성) 그린조아와 일반중지의 정단부에서 5번째 절간 새엽 생육사진

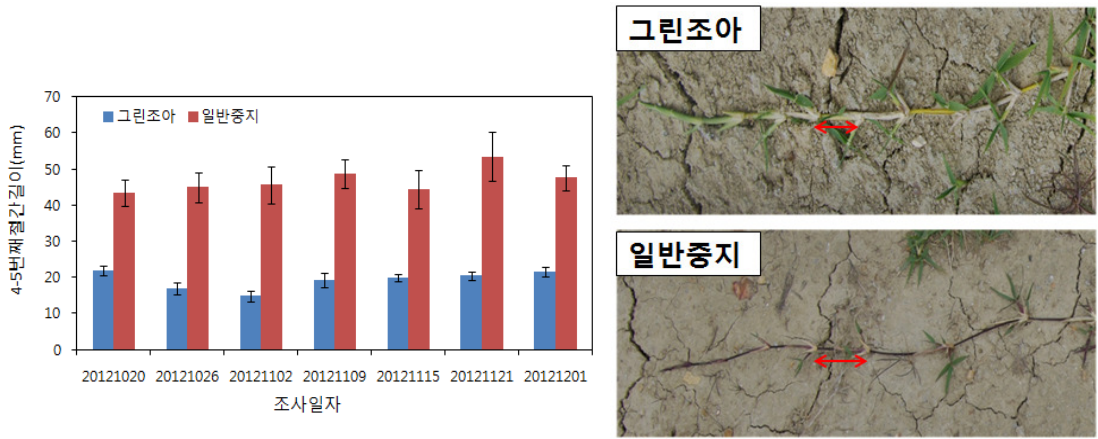


그림 24. 남부지역(전남 장성)에서 그린조아와 일반중지의 정단부로부터 4-5번째 절간길이(좌) 및 사진(우)

○ 남부지역(전남 장성)그린조아와 일반중지의 포복경(런너) 길이 및 한 개의 포복경(런너) 내 절간개수 비교한 결과, 그린조아의 포복경길이는 일반중지에 비해 짧게 나타났으나 한 개의 포복경내 절간의 개수는 그린조아가 높게 나타남(그림 25, 26)

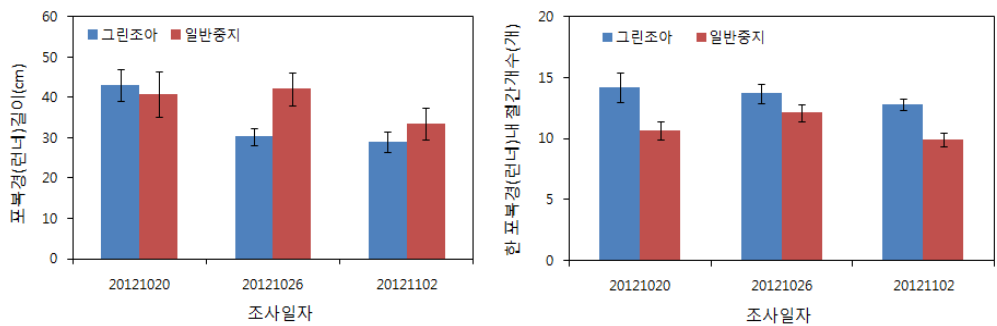


그림 25. 남부지방(전남 장성) 그린조아와 일반중지의 포복경 길이 및 포복경내 절간개수 비교

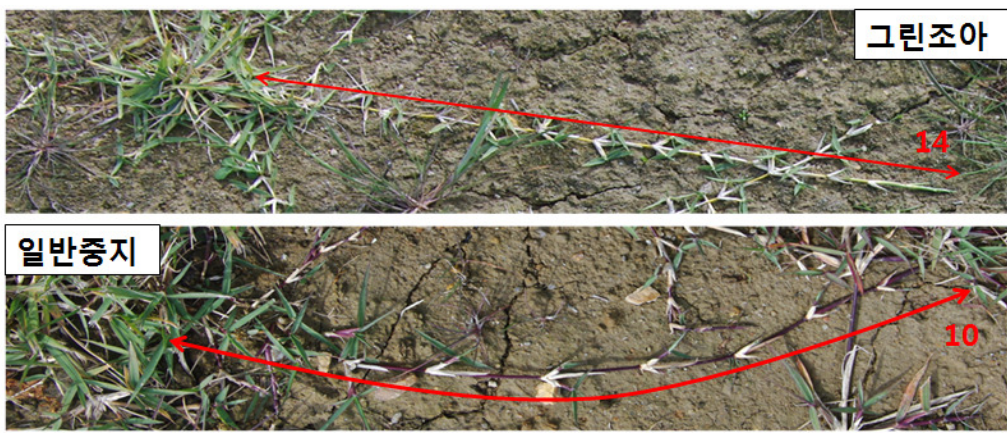


그림 26. 남부지방(전남 장성) 그린조아와 일반중지의 포복경길이 및 포복경내 절간개수

나. 시기별 생육 특성 조사

○ 남부지역(전남 장성)에서 시기별 그린조아와 일반중지의 생육특성을 비교(그림 27)

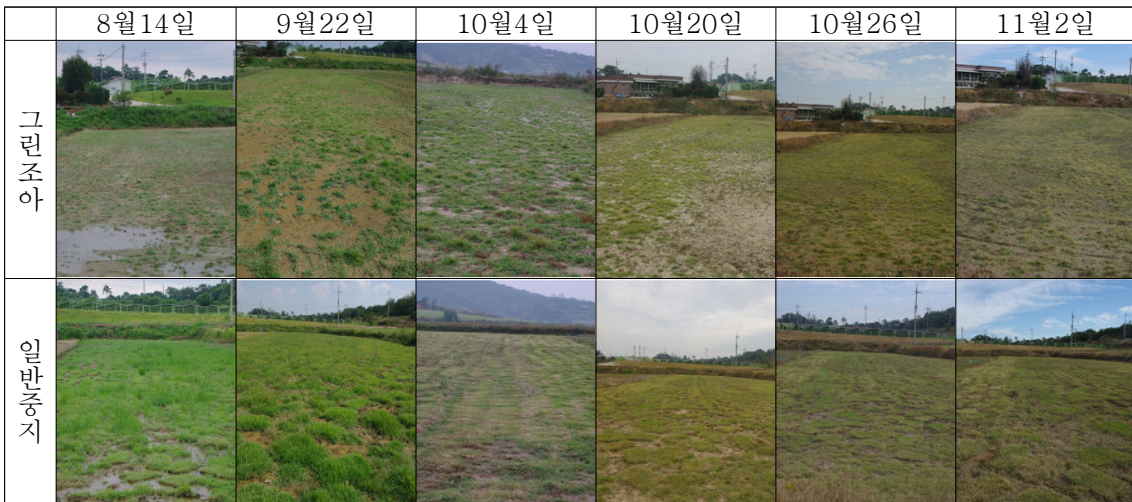


그림 27. 남부지역(전남 장성) 그린조아와 일반중지 생육사진

○ 중부지역(충북 증평) 녹색기간 연장 실험 생육확인 함(그림 28, 29)

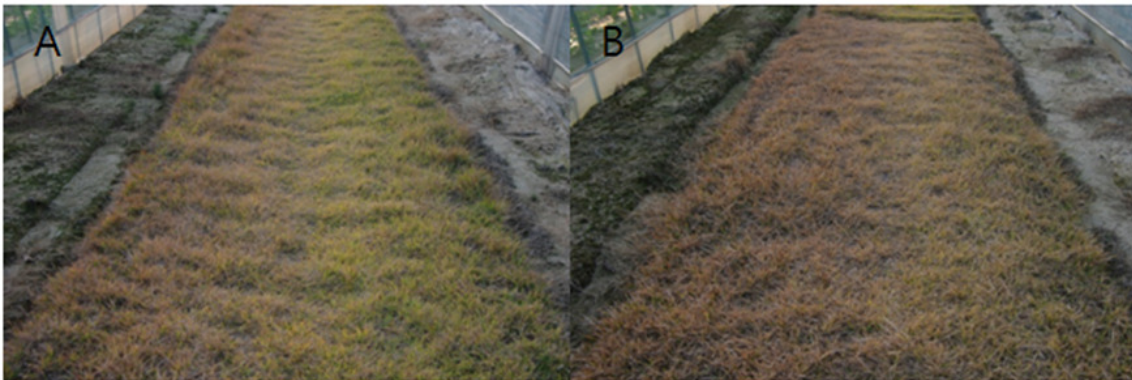


그림 28. 2012년 10월 30일 녹색기간 연장 실험구(A; 그린조아, B; 일반중지)



그림 29. 중부지역(충북 증평)에서 시기별(4월 26일부터 10월 30일까지) 생육

다. 내재해성 특성 조사

- 그린조아의 내재해 특성은 (1) 저온 저항성, (2) 녹병 저항성 그리고 (3) 내답압성을 조사
- 그린조아와 대조구 중지의 내재해성 첫 번째 특성으로 저온에 대한 저항성을 조사
- 저온 저항성 표지인자로 엽록소 함량을 분석하여 정량적인 특성을 조사
- 내재해성 두 번째는 내병성으로 인자로는 녹병에 대한 감염 및 회복 기간을 측정
- 내병성 측정은 녹병 발생지수(disease index, DI)를 이용하여 비교
- 내재해성 세 번째 인자는 내답압성으로, 내답압성 인자로는 cellulose 함량을 분석하였음

(1) 녹색기간(엽록소 함량 변화) 특성 조사(그림 30, 31)

- 첫 서리가 내리기 전 2012년 10월 20일부터 첫서리가 내린 후 2012년 11월 9일까지 매주 조사함
- 남부지역의 그린조아와 일반잔디(중지) 각 10개 샘플에서 본엽과 런너의 정단부에서 5번째 절간의 엽을 채집하여 엽록소함량을 측정함
- 본엽의 엽록소 함량을 측정한 결과 일반중지에 비해 그린조아의 엽록소가 소량 줄어들음
- 본엽에서 엽록소함량의 차이가 나는 이유는 잔디가 자란 시기가 다르고 중지의 경우 깎아주는 관리를 통해 생육을 좋게 함
- 5번째 절간엽의 엽록소 함량을 측정한 결과 첫서리가 내린 후 그린조아의 엽록소함량이 중지에 비해 높게 나타남
- 식재시기와 장소가 같은 생육조건에서 자라는 새엽의 엽록소 함량이 그린조아에서 높은 것은 그린조아가 저온에 대한 저항성이 높음을 나타내는 것임



그림 30. 그린조아와 일반잔디(중지)의 엽록소함량측정을 위한 본엽과 5번째 절간새엽의 채집

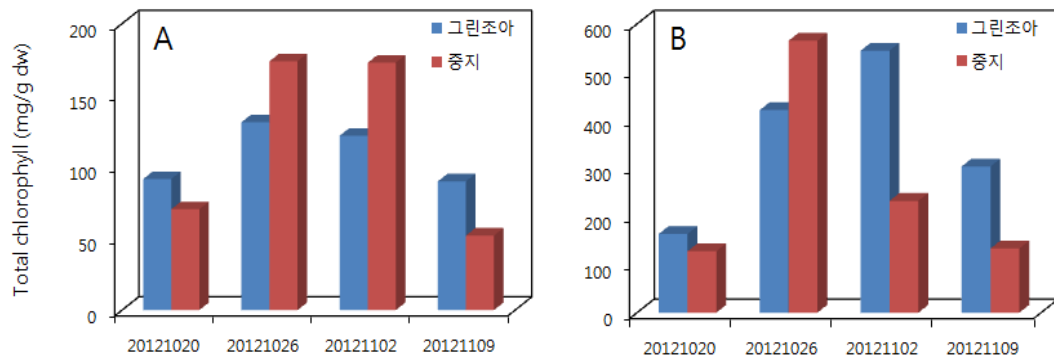


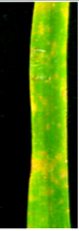
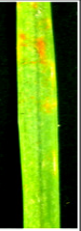
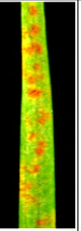
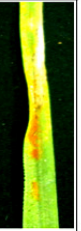


그림 31. 그린조아와 일반잔디(중지)의 Total chlorophyll함량 비교(A; 본엽, B; 5번째 절간 새엽)

(2) 내병성 생육 특성 조사 (그림 32~34)

- 2012년 8월 6일 중부지역 그린조아 증식포장 내 녹병발병 확인 함
- 증식포장을 20구역으로 나누어 한 구역 당 5엽씩 선발하여 총 100엽의 이병엽률(%)을 조사함
- 그린조아 구역은 23%의 발병률이 나타났고 일반잔디(중지)의 경우 67%의 높은 발병률을 나타냄
- 녹병 발생 후 8월17일 잔디를 깎아 주어 3차례 회복율을 조사함
- 그린조아가 엽신의 길이나 엽수에서 일반 잔디(중지)에 비해 높게 나타나 병저항성이 높음을 알 수 있음

DI	H	D1	D2	D3	D4	D5
Symptom						
Description	무병	병반 ~5% 진행	병반 ~15% + 탈색 ~5%	병반 ~40% + 탈색 ~15%	병반 ~60% + 탈색 ~40%	병반 70%~ + 탈색 50%~

DI	Description
H	잎의 색깔은 연녹색 또는 짙은 녹색으로 윤기를 띤
D1	잎에 1mm 미만의 작은 병반이 5% 미만으로 출현
D2	잎에 1~3mm의 병반이 15% 미만으로 출현 및 탈색이 5% 미만 진행
D3	병반이 잎 전체에 40% 까지 분포하고 탈색은 15% 진행
D4	병반이 진한 주황색을 띠며 잎 전체에 60% 까지 분포하고 탈색은 40% 진행
D5	병반은 70% 이상, 탈색은 50% 이상 진행되고 잎의 형태의 손상 시작

그림 32. 잔디의 녹병발병지수(disease index, DI)를 그린조아와 일반잔디(중지)의 녹병발병 및 회복단계별 특성조사를 위한 지표로 사용

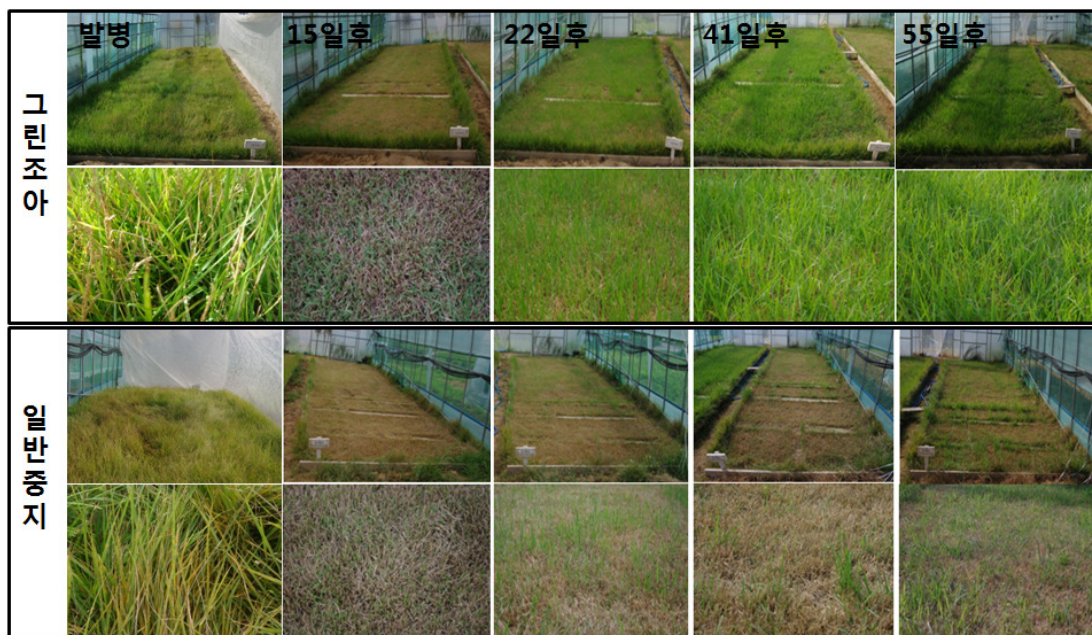


그림 33. 그린조아와 일반잔디(중지)의 녹병발병 및 회복단계별 특성

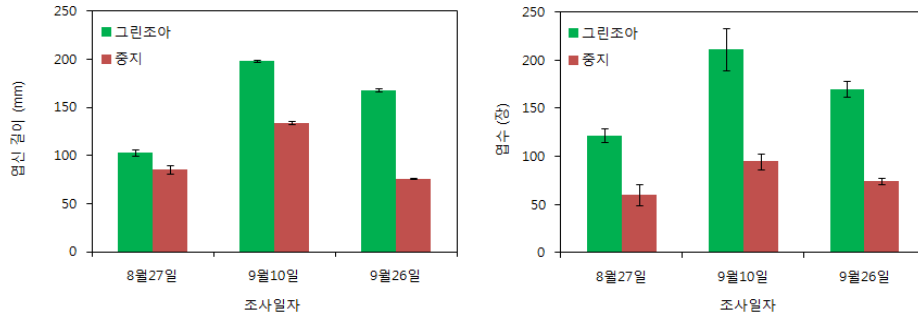


그림 34. 그린조아와 일반잔디(중지)의 녹병회복을 조사

(3) 내답압성(셀룰로오스) 생육 특성 조사(그림 35)

- 남부지역(전남 장성) 그린조아와 일반잔디(중지)의 런너 정단부에서 4-5번째 절간 런너를 채집함
- 채집된 시료의 cellulose 함량분석은 황산법을 이용하였음
- 그린조아의 런너가 일반잔디(중지)에 비해 cellulose 함량이 높게 나타남
- Cellulose 함량이 높다는 것은 런너의 단단함과 답압에 강한 특성을 나타낼 것으로 판단함

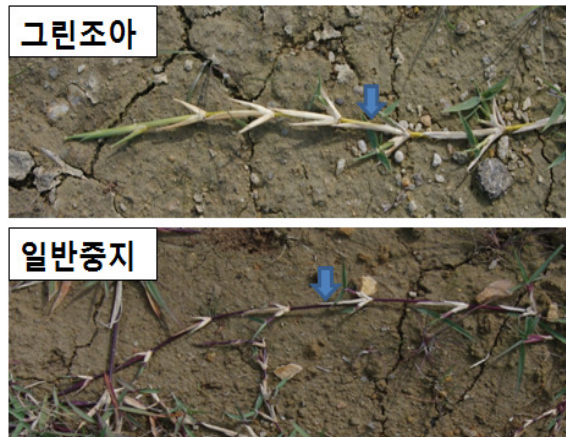
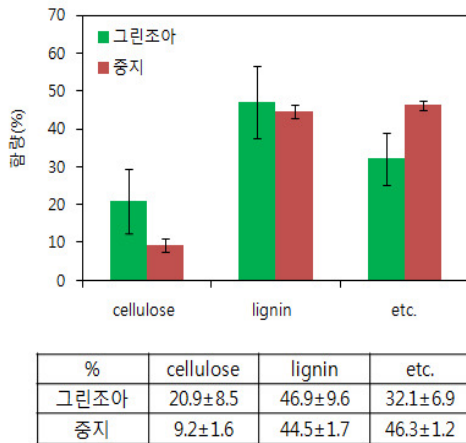


그림 35. 남부지역 그린조아와 일반중지의 포복경의 cellulose 함량(좌)과 포복경 채집 부위(우)

라. 생육기 특성

- 신초가 나오는 시기의 생육포장 사진을 확인하였음
- 2014년 4월 10일 그린조아와 일반중지의 생육포장에서 신초를 확인한 반면 2013년에는 4월 19일 신초를 확인하였음 (그림 36)
- 2013년에 비해 2014년도의 평균 기온이 높아짐에 따라 신초 나오는 시기가 빨라짐



그림 36. 2013, 2014년 신초 발생시기 비교(A, B; 2013년 포장 및 신초, C, D; 2014년 포장 및 신초)

- 최고기온 25.8℃의 2014년 4월 25일 그린조아와 일반증지의 이삭대 확인함 (그림 37)
- 그린조아는 화서를 확인하였으며 일반증지에서는 확인하지 못함
- 일반증지에 비해 그린조아의 화서가 일찍 올라옴은 녹색기간의 연장선이 빠름
- 2013년 5월2일의 생육조사에서도 일반증지에 비해 그린조아의 화서가 빠름 (그림 38)

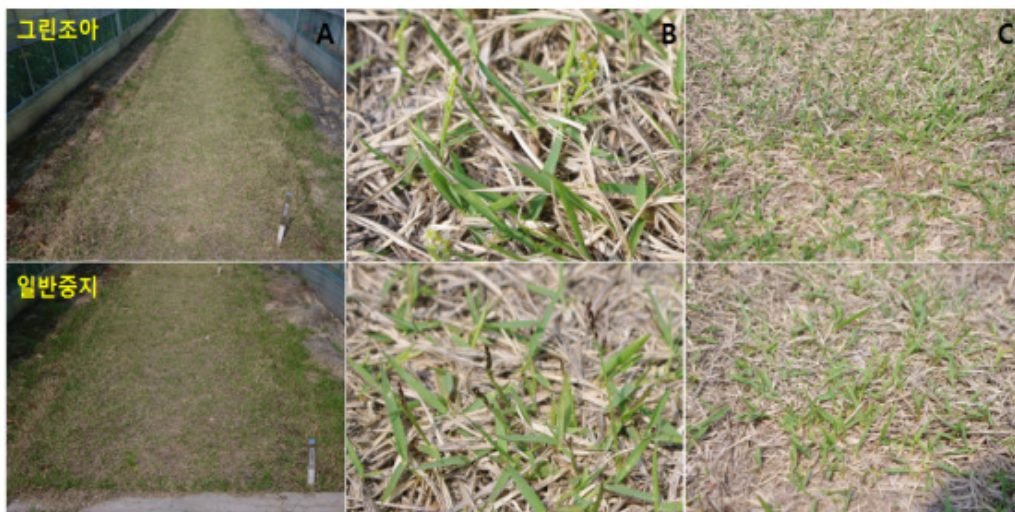


그림 37. 2014년 4월25일 화서가 나오는 시기 비교(A;생육포장, B; 이삭대, C; 엽신)



그림 38. 2013년 5월2일 화서가 올라오는 시기 비교(A;생육포장, B; 그린조아 화서, C; 일반증지 화서)

마. 내한성

- 중부지역(충북 증평)에서 그린조아와 더그린, 대조구 중지의 녹색기간 연장 특성을 조사 하였음
- 2013년 12월 16일 나흘째 내린 눈 속에 더그린과 그린조아 식재구역에서 녹색엽을 확인 하였으나 중지의 경우 확인할 수 없었음 (그림 39)
- 2013년 12월 16일 평균 -2.6°C 최저기온 -6.5°C 을 나타내는 시점에서조차 녹색엽을 유지하고 있는 특성을 확인하였다는 것은 강한 내한성을 가지고 있다고 생각됨



그림 39. 중부지역(충북 증평)에서 2013년 12월 16일 녹색엽 확인

바. 내답압성

- 1차년도 정역교배를 통한 선발10개체의 런너 정단부에서 4-5번째 절간 런너를 채집함
- 채집된 시료의 cellulose 함량분석은 황산법을 이용하였음
- 1차년도 선발된 10계통의 각기 다른 cellulose 함량을 나타내고 있음(그림 40)
- 각 계통별 cellulose 함량의 차이를 통해 추후 특성에 따른 라인선발 등 실용이 가능함
- Cellulose 함량이 높다는 것은 런너의 단단함과 답압에 강한 특성을 나타낼 것으로 판단함

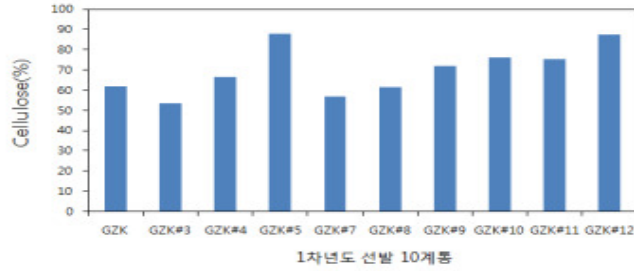


그림 40. 1차년도 정역교배를 통한 선발10개체 cellulose함량

3. 우수 계통 환경적응성 및 특성 조사

가. 번식률 (피복율)

- 1차년도 정역교배 10개 라인의 실험구역에 이식 후 피복정도를 확인함
- 12년 7월 2일 이식 후 12년 8월 20일 피복율, 13년 9월 24일 피복율을 비교 확인한 결과
- 2차년도 정역교배 20개 라인을 13년 5월 실험구역에 이식 후 번식율을 확인함(그림 8)
- 40cm*40cm구역 내 피복율을 지수로 변환하여 선발 20계통의 번식률을 확인하였음
- 이식 11개월 후 14년 4월 말 60%이상의 피복율을 보인 우수한 5계통을 선발하였음

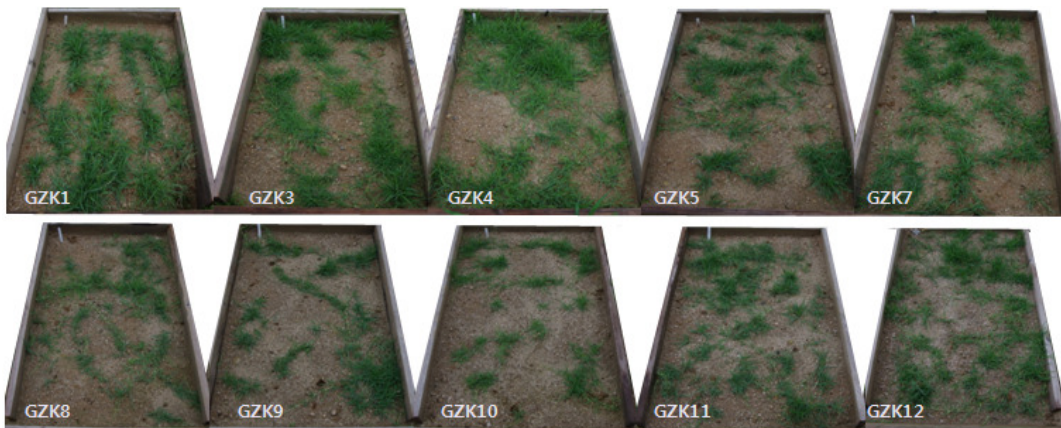


그림 41. 1차년도 정역교배 10개 라인의 피복정도(12년 8월 말)

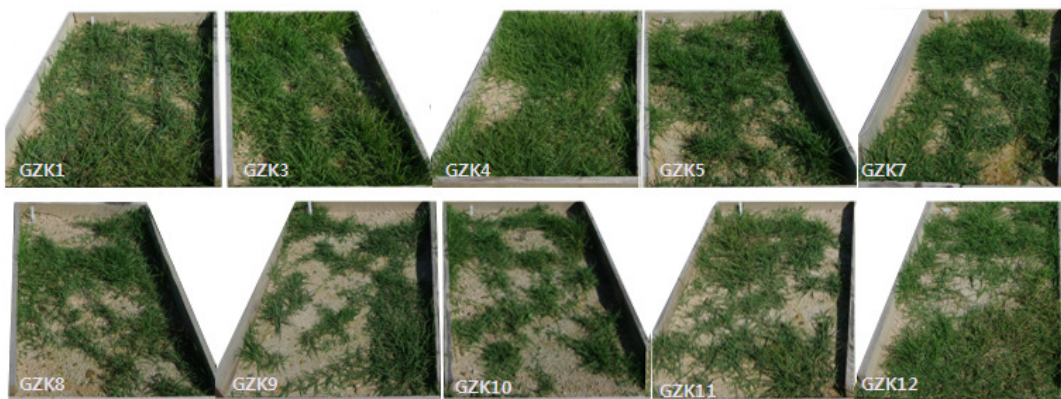


그림 42. 1차년도 정역교배 10개 라인의 피복정도(13년 9월 말)

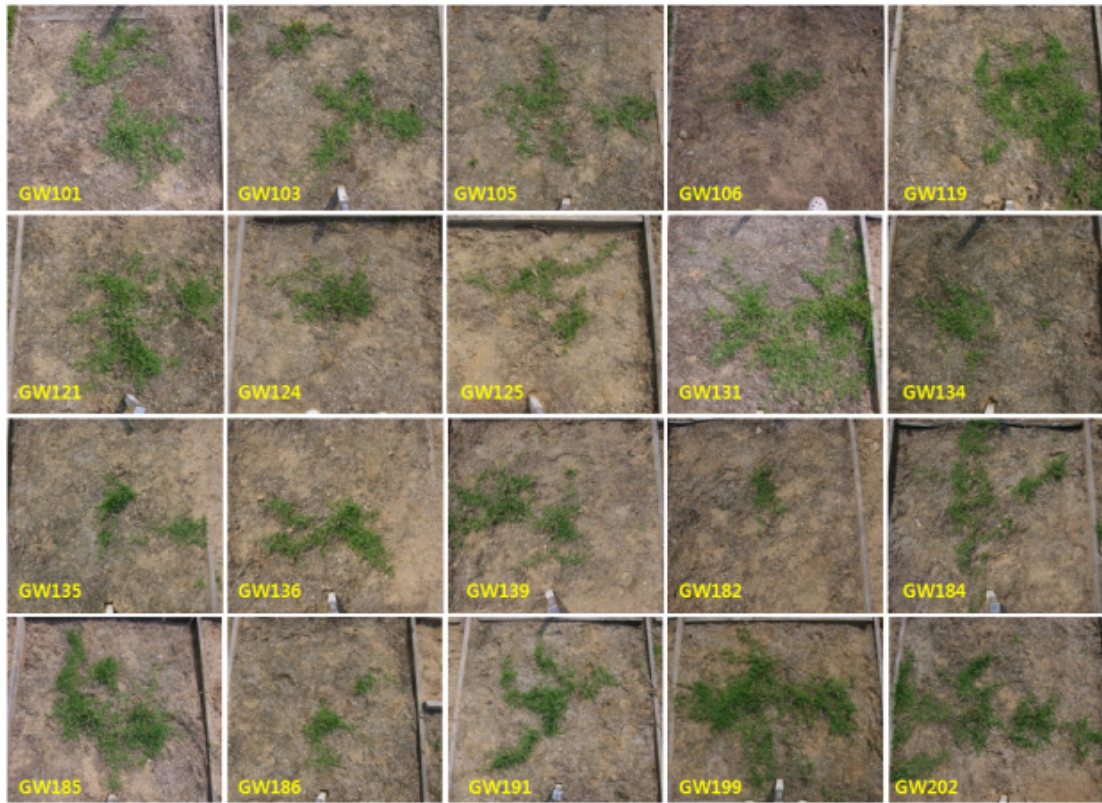


그림 43. 2차년도 정역교배 20개 라인의 피복정도(14년 4월 말)

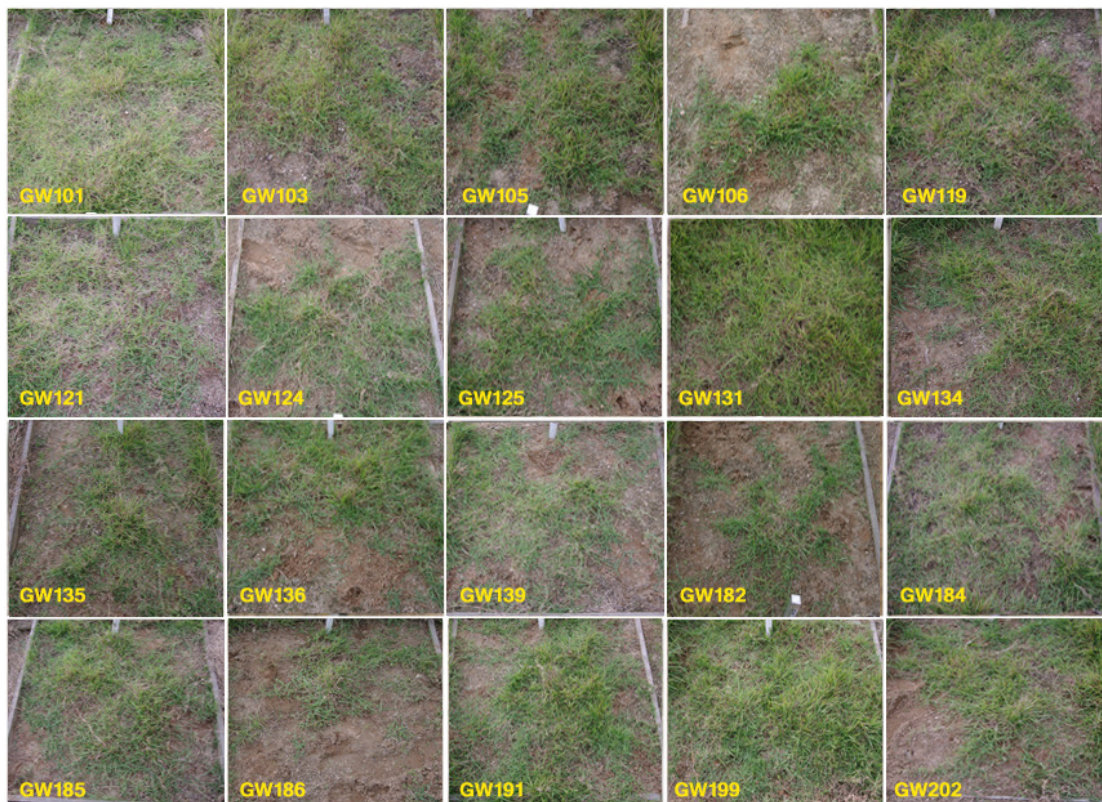


그림 44. 2차년도 정역교배 20개 라인의 피복정도(14년 9월 말)

나. 녹색기간(엽록소 함량 변화)특성 조사

- 1차년도 선발 20개 라인의 휴면 후 신초가 나오는 시점인 2013년 4월 11일과 2014년 4월 8일의 녹색정도를 알아보기 위하여 엽을 채집하여 chlorophyll-a값을 측정함 (그림 45)
- 2013년 4월 11일 평균기온 6.6℃, 최고기온 12.5℃을 나타냈으며 2014년 4월8일 평균기온 12.9℃, 최고기온22.1℃을 나타냄
- 2014년의 기온이 일찍 높아짐에 따라 신초가 나오는 시점이 빨라졌으며 chlorophyll-a의 값도 작년에 비해 높게 나타남

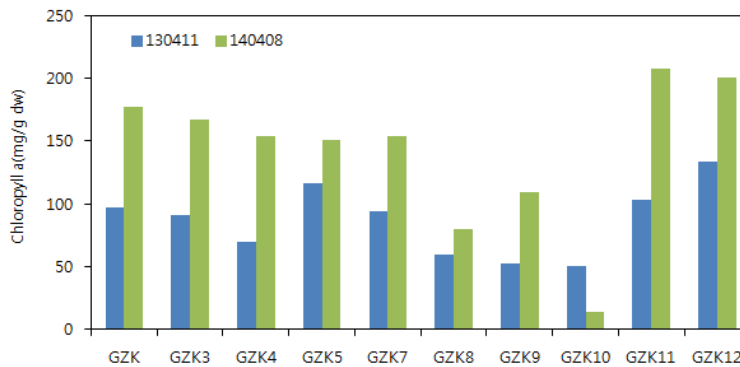


그림 45. 1차년도 종내교배 계통 선발 10라인의 chlorophyll-a 분석

- 2차년도 중간 정역교배 계통 선발 20라인의 2013년 4월 11일, 2014년 4월 8일 녹색정도를 알아보기 위하여 엽을 채집하여 chlorophyll-a의 값을 측정함
- 2013년도 샘플은 하우스 내에서 생육중인 초기 생육시점의 엽을 채집하였으며, 2014년도 샘플은 13년 5월 10일 하우스 내 생육중인 계통을 실험구역에 이식 후 노지에서 생육중인 신초가 나오는 시점 14년 4월 8일에 엽을 채집함
- 2013년도 4월 하우스 내 평균 온도는 20℃~23℃를 나타냈으며, 2014년 4월 노지의 평균 기온은 12.9℃를 나타냄
- 초기 생육 시 엽의 엽록소 함량과 노지 이식 후 환경적응을 하여 일년 후 신초가 나오는 시점의 엽록소함량의 차이를 보임 (그림 46)
- 엽록소함량을 통해 각 라인별 우수계통 후보 특성을 조사함

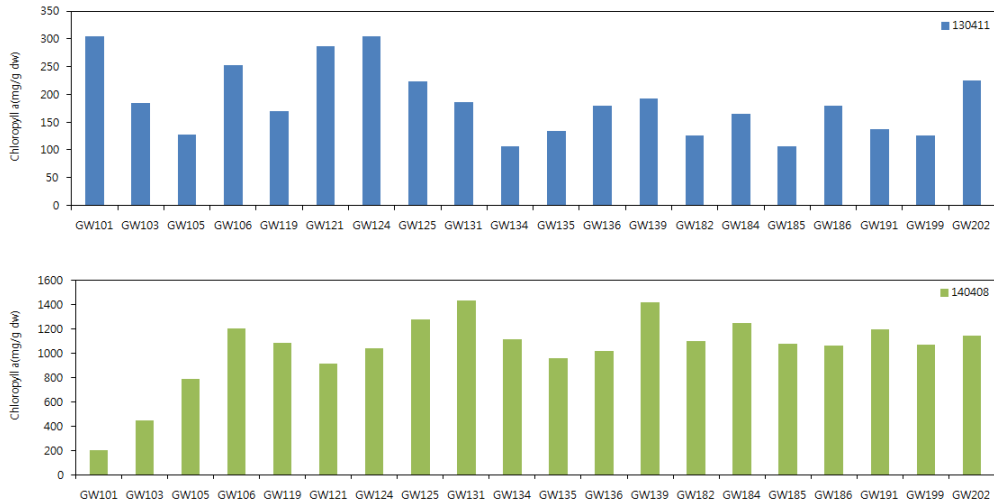


그림 46. 2차년도 중간 정역교배 계통 선발 20라인의 chlorophyll-a 분석(위;2013년도, 아래;2014년도)

- 그린조아 및 더그린을 포함한 1-2차년도 최종선발 32계통 및 대조구 일반중지와 제니스를 포함하여 엽록소함량을 비교 측정함
- 신초가 나오는 시기 4월 8일에 엽을 채집하여 비교한 결과 일반중지의 엽록소함량이 확연히 낮았으며 선발계통 중 2계통이 일반중지와 비슷한 낮은 엽록소함량을 나타냄 (그림 47, 48)
- 그린조아와 비교하여 초기 엽록소함량이 높은 4계통을 우수형질로 특성을 확인함

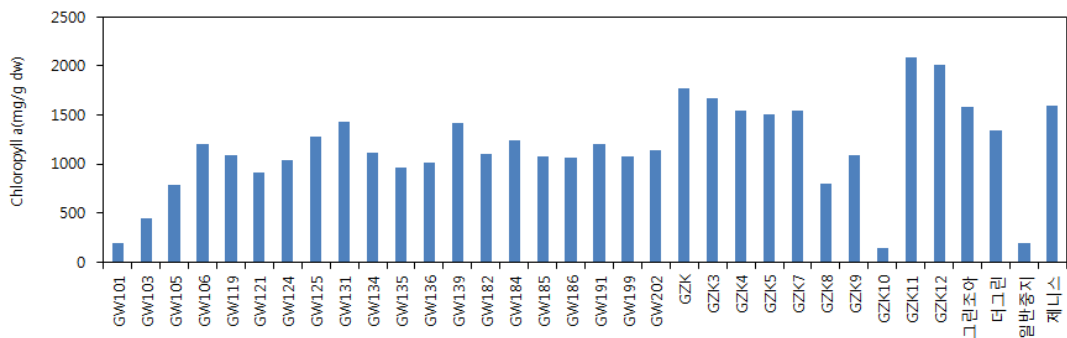


그림 47. 1-2차년도 선발 32계통 및 대조구 2계통의 엽록소함량

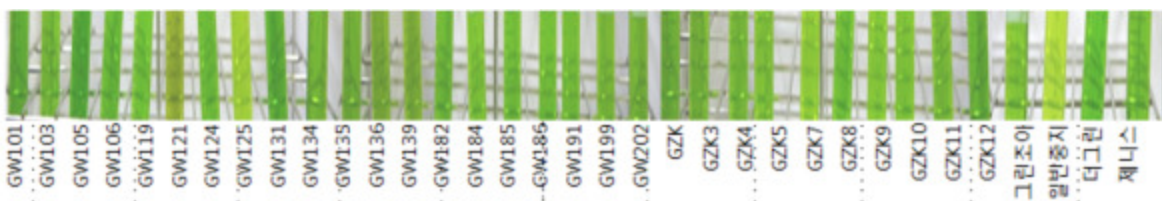


그림 48. 1-2차년도 선발 32계통 및 대조구 2계통의 엽록소 추출 후 녹색정도

- 가을철 휴면기에 들어가는 시점의 녹색 정도를 알아보기 위하여 9월초, 9월말, 10월 중순, 11월 중순의 시기별 엽을 채집하여 엽록소함량을 측정, 비교한 결과 그린조아와 더그린 시기별 엽록소함량이 가장 높았으며, 다른 계통들 또한 대조구 중지에 비해 높은 엽록소 함량을 나타냄 (그림 49)
- 11월 중순경 모든 계통의 엽록소 함량이 낮아 휴면기에 들어갔으며, 휴면기에 들어가기 전 10월 중순의 엽록소함량을 비교하여 대조구 중지보다 높은 엽록소 함량을 지닌 계통을 선발하였음

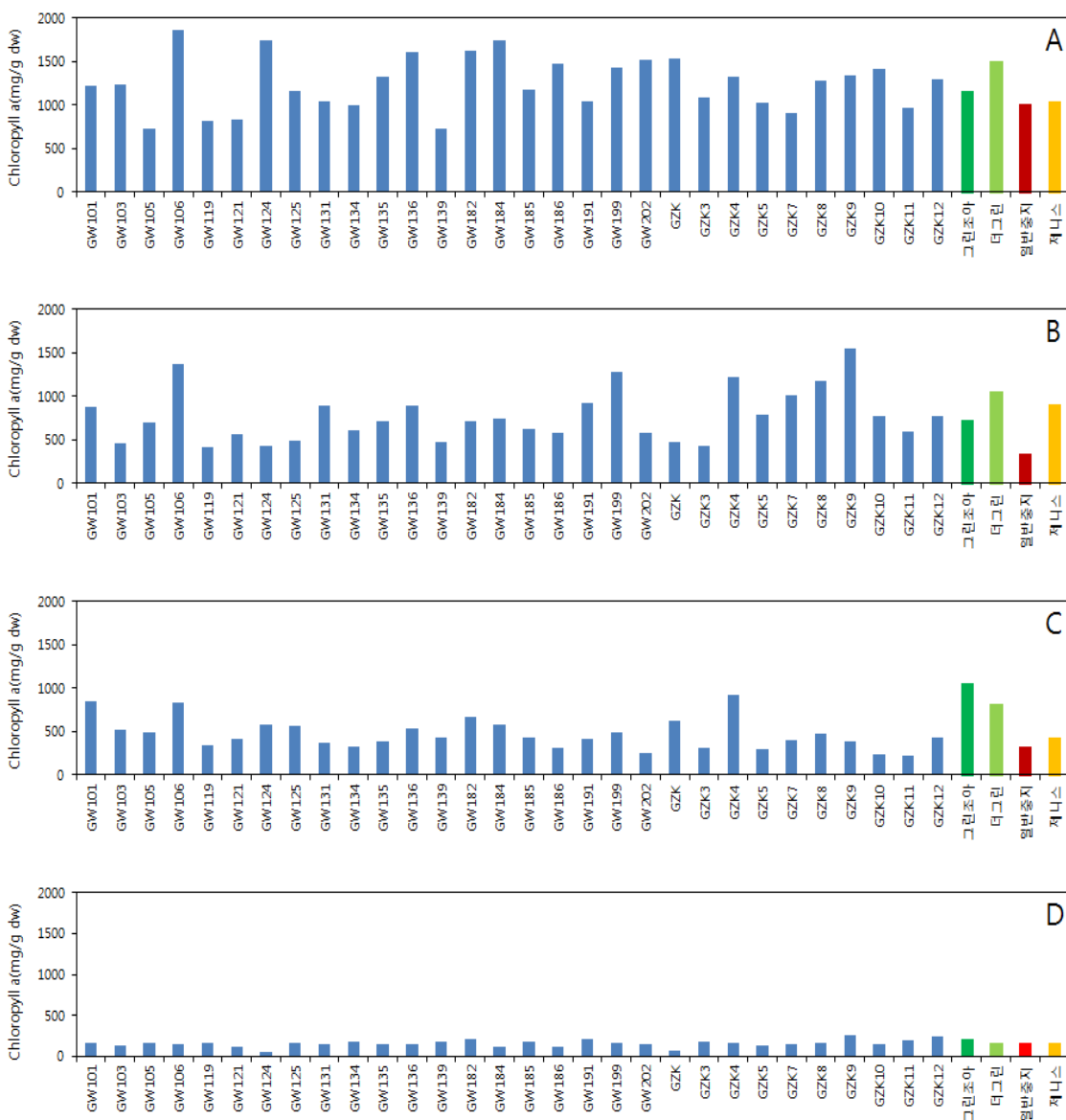


그림 49. 1-2차년도 선발 32계통 및 대조구 2계통의 휴면기 녹색정도(A;9월초, B; 9월말, C;10월중순, E;11월중순)

제 3 절. 환경내성 한국잔디의 유전체 연구용 집단 육성 및 대량생산 체계 확립

1. 각 계통의 대량증식 포장 조건 확립

- 녹색 포복경 한국잔디(그린조아)의 대량 재배법 및 특성 조사를 위한 증식포장과 정식포장을 조성하여, 국내 품종과 비교 시험 재배함 (그림 50)

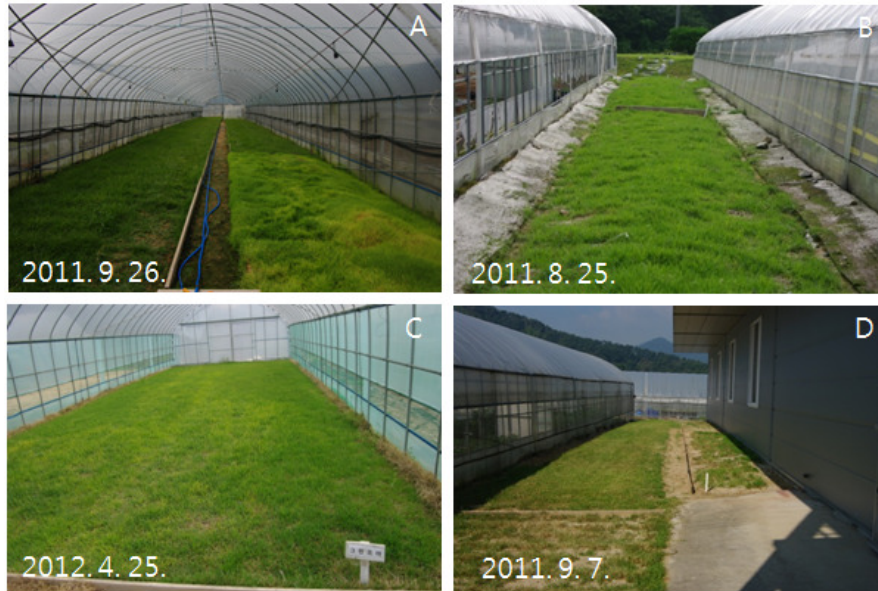


그림 50. 그린조아의 생육특성과 대량재배법 개발을 위한 증식 및 정식 포장. A, C; 증식포장, B, D; 정식포장

- 환경내성 녹색 포복경 한국잔디(그린조아)와 한국형 들잔디 모두 4월 중순부터 개화하여, 1차년도에 그린조아 개화 시기가 들잔디에 비해 약 5일 정도 늦는 결과와 상이하게 나타났다
- 또한 그린조아의 개화는 한국형 들잔디에 비해 정식포장 전체 재배지가 균일한 시기에 개화되었음 (그림 51)

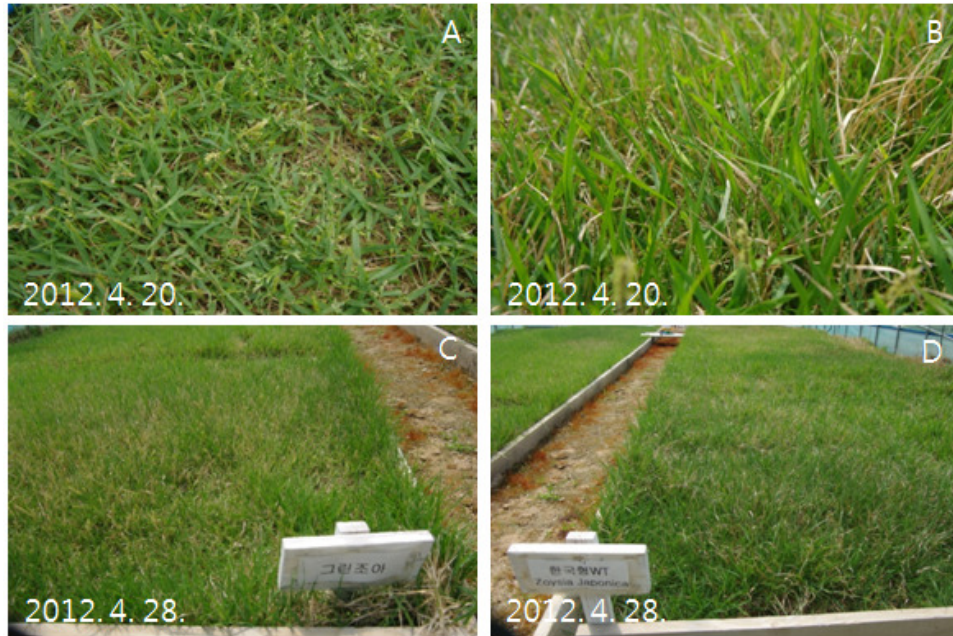


그림 51. 그린조아의 생육특성 - 개화시기. A, C; 녹색포복경 그린조아, B, D; 한국 들잔디

2. 그린조아의 종자처리를 활용한 잔디재배기술의 확립

- 녹색포복경 한국잔디의 대량재배법을 정립하기 위해 그린조아 종자 처리에 따른 발아율을 조사하였음
- 그린조아 발아를 위해 종자정선을 다음과 같이 실행하였음. 메틸알코올과 증류수를 동량 혼합하여 침지되는 종자를 정선하고 건조하였음
- 정선한 그린조아 종자는 발아촉진을 위해 약액 (33% NaOH)을 이용하여 종자연피를 하거나 침지하는 방법을 사용하였음. 또는 gibberellin를 처리하여 발아촉진 하였음
- 그린조아의 발아율은 침지<중피연화<gibberellin 처리 순으로 발아율이 높아졌으나 5~10%의 발아율 차이를 나타내어 약액을 활용한 발아촉진으로 대량증식포장에 적용하였음 (표 8)
- 잔디재배기술로 적용할 종자는 약액처리와 비처리구의 생육특성을 비교하였음 (그림 52)

표 8. 녹색 포복경 그린조아의 종자처리에 따른 발아율 조사 (과중일 2012년 2월 3일, 과중수; 1000립)

종자처리	발아수	발아율	비고
침지 처리	784	78%	모래:상토 (3:1)
약액 처리	826	82%	모래:상토 (3:1)
GA 처리	869	87%	모래:상토 (3:1)

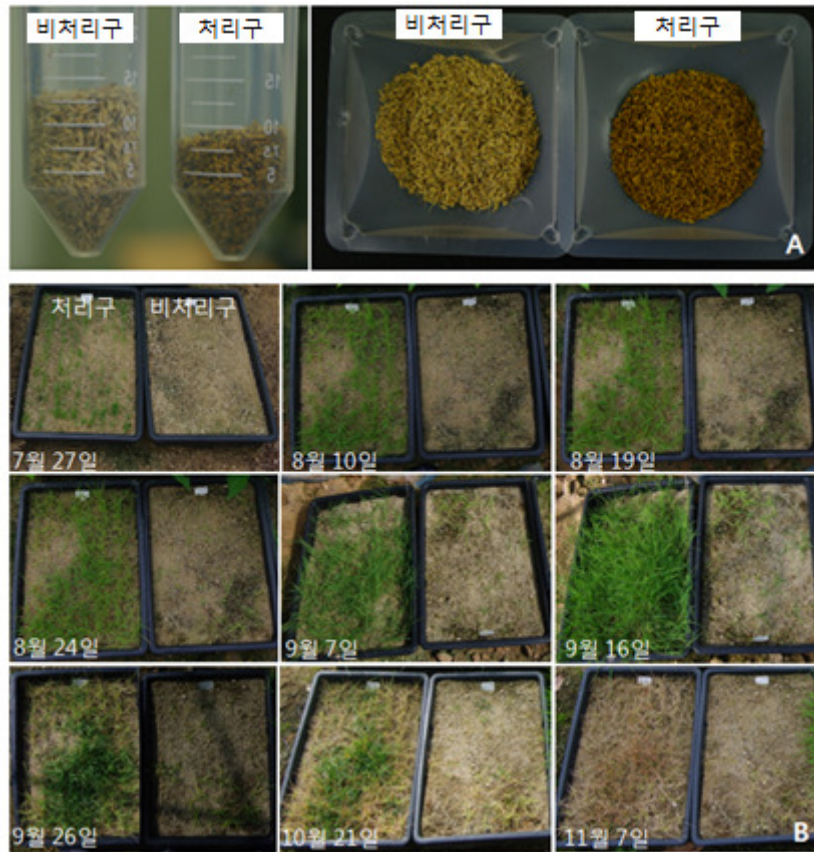


그림 52. 그린조아의 종자처리를 활용한 잔디재배기술의 확립. A; 약액을 처리한 종자, B; 종자처리구와 비처리구의 생육특성비교 (2011년 7월 1일 과중).

3. 대량증식 포장 조성 및 과제 간 연계

- 녹색 포복경 한국잔디의 대량재배법 및 특성 조사를 위한 증식포장을 조성하여, 국내 품종과 비교 시험재배 실시함 (그림 53)

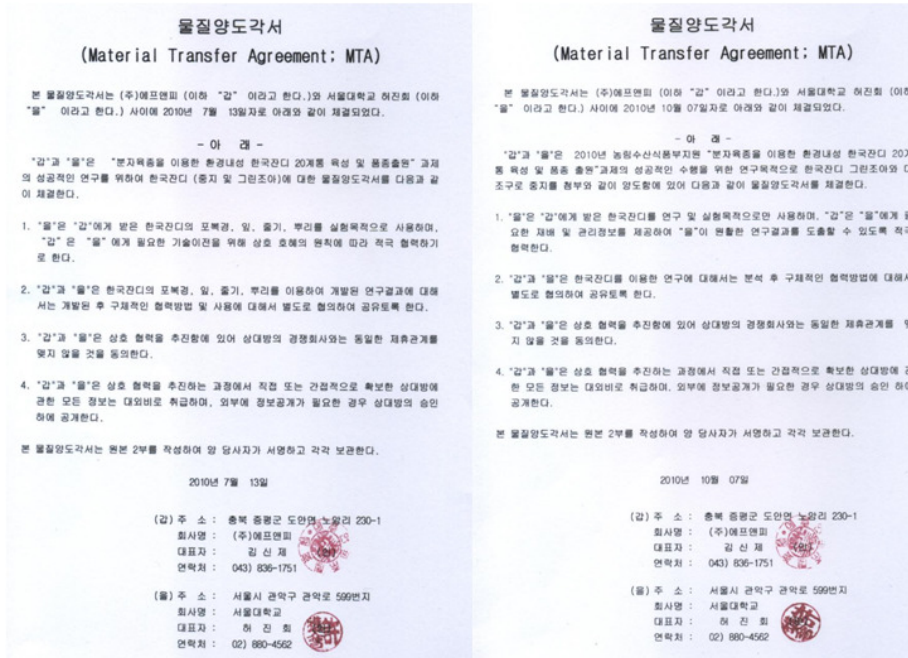


그림 55. 세부과제와 협동과제 간 공시시료의 공유에 대한 물질양도각서

4. 특허출원 및 기술이전

- 1, 2차년도의 결과를 종합하여 녹색 포복경을 갖는 그린조아를 특허출원 하였음(그림 56)
- 또한, 장성잔디영농조합과 기술이전 계약을 체결하고, 생육특성 검정 및 현지적응성과 증식을 위해 공동으로 포장실험을 진행함 (그림 57~59)

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2012.01.13
 특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
 출원번호 10-2012-0004349 (접수번호 1-1-2012-0034713-83)
 출원인명칭 주식회사 에프앤피(1-2002-048272-8)
 대리인성명 특허법인 총정(9-2011-100161-1)
 발명자성명 김신제 윤길영 이순봉 장미소
 발명의명칭 잔디 신종 그린조아

특 허 청 장

그림 56. 그린조아의 특허출원 통지서

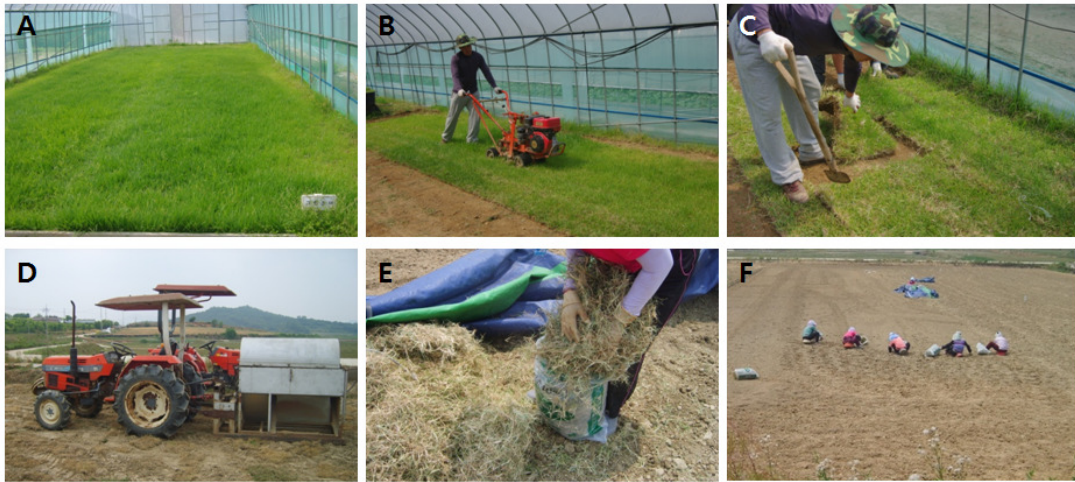


그림 57. 그린조아의 생육특성과 대량재배법 개발을 위한 증식 포장 실험. A ; 그린조아 소포장 재배, B ; 뗏장 절단기 C; 잔디 뗏장 수확, D ; 잔디 포복경 쇄절기, E ; 절단된 포복경, F ; 대포장 이식, (2012. 06. 02)

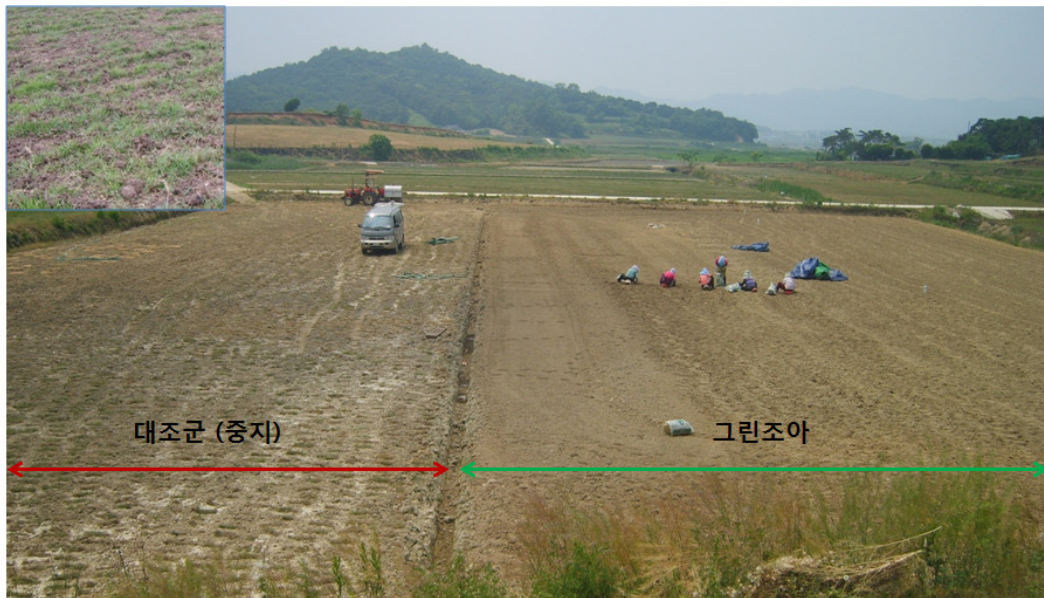


그림 58. 그린조아와 대조군(중지)의 생육특성 조사 포장, 150m²(전남 삼서면)

계 약 서

㈜에프엔피(대표이사 김신제, 이하 “갑”이라 함)과 장성삼서잔디생산자영농조합법인(대표이사 김병탁, 이하 “을”이라 함)은 다음과 같이 그린조아의 매매와 관련된 기본적 사항을 정하기 위하여 다음과 같이 계약을 체결한다.

제1조 【계약의 목적】

본 계약은 “갑”과 “을”이 상호간 이익의 증진과 발전을 위하여 “갑”이 개발한 잔디인 상품명:그린조아, 일반명: 삼서장수잔디를 “을”에게 매도함에 있어 필요한 기본적인 사항을 규정하고, 상호 신의에 따라 본 계약을 성실히 수행하고자 함에 그 목적이 있다.

제2조 【계약 목적물의 품질】



본 계약에 따라 공급되는 그린조아와 관련하여 “갑”은 “을”에게 아래의 사항들을 보증한다.

- (1) 생육기간 : 통상적인 일반 잔디(중지)에 비해 생육 전후 녹색기간을 14일 이상 유지
- (2) 번식력 : 통상적인 일반 잔디(중지)에 비해 최소 10% 이상의 번식력 확보
- (3) 대표적특성 : 지상부 포복경과 중피가 초록임.

그림 59. 국내 잔디영농조합과 체결한 기술이전 계약서

제 4 절. 환경내성 한국잔디 우수계통의 해외 현지 적응성 검증

1. 해외 유전자원의 확보

- 한국 들잔디의 현지적응성 실험을 위한 생육특성 조사에서 대조구로 활용할 수 있는 해외 유전자원을 수집하여 육성함(표 9, 그림 60~62)
- 1차년도에 확보한 해외유전자원 11개체 외에 2차 년도에는 몽골 자브항 도노이계곡 (1,700m)에서 몽골 잔디 1개체를 수집함(2012년 3월 16일, 그림 63)

표 9. 해외 유전자원 확보 개체

수집 지역	개체 수	비 고
몽골 서부	5	2010-2011 (4), 2012 (1)
미국 남부	3	2010-2011
필리핀 북부	4	2010-2011

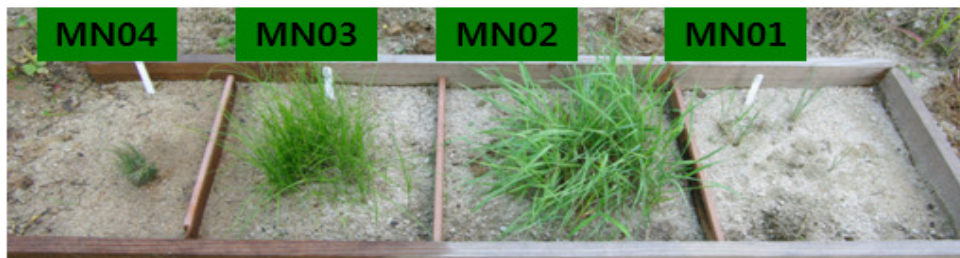


그림 60. 해외 유전자원-몽골 서부지역 수집 중



그림 61. 해외 유전자원-미국 남부지역 수집 중

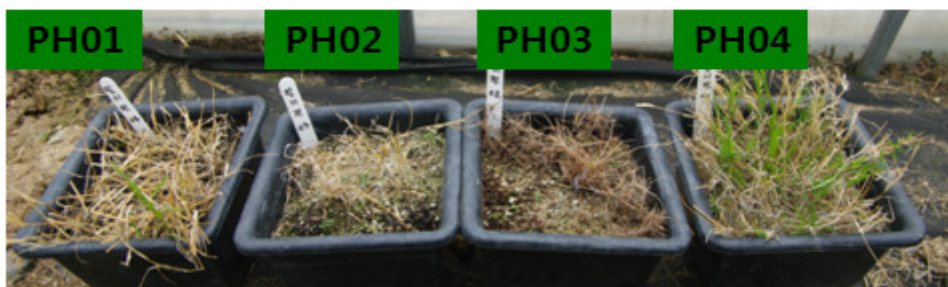


그림 62. 해외 유전자원-필리핀 북부지역 수집 중



그림 63. 몽골 자브항 도노이 계곡에서 수집한 잔디 해외유전자원.

- 미국에서 도입한 잔디 11월에 고사 확인
- 필리핀 도입 개체는 국내 기후에 잘 적응하고 생육 상태는 우수하나 꽃대 형성과 개화가 이루어지지 않아 교배 조합 작성이 어려움 (그림 64)
- 따라서 해외 도입 개체를 이용한 유용형질 도입은 일장 및 온도 등을 조절하여 개화를 유도하는 실험을 지속적으로 수행하고자 하였음
- 해외 도입 개체 중 몽골에서 도입한 몽골 울리아스테는 2013년 1월 31일 신초의 녹색을 확인하였고 3월 26일 100% 녹색엽을 확인함, 반면 기온이 높아짐에 따라 2014년에는 3월 26일 화서를 확인하였으며 4월 21일 종자를 확인하여 채종함 (그림 65)
- 몽골 울리아스테의 화서가 나오는 시기, 종자가 맺혀지는 시기가 다른 잔디품종에 비해 빨라 교배의 어려움이 있음 (그림 66)

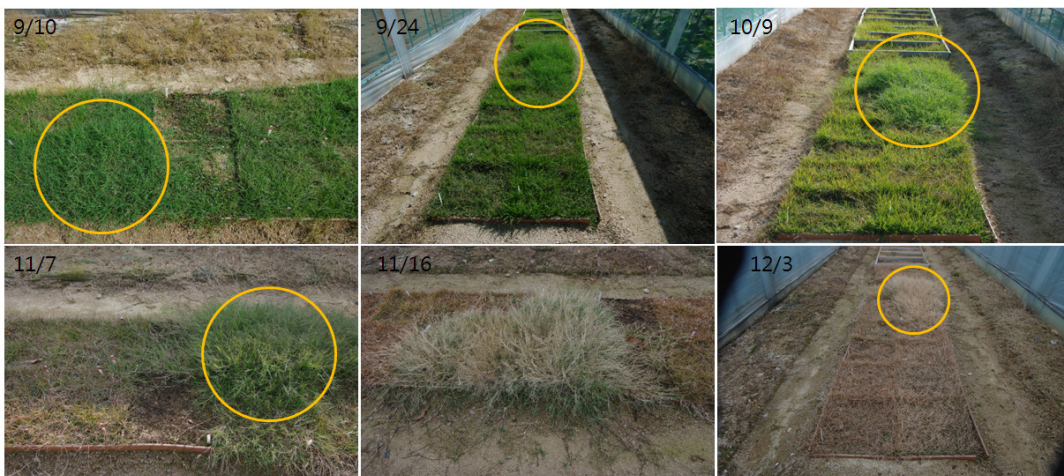


그림 64. 필리핀 도입 잔디(노란색 원)의 시기별 생육.



그림 65. 몽골100918 생육사진(A), 몽골 울리아스테 생육사진(B)과 화서사진(C).

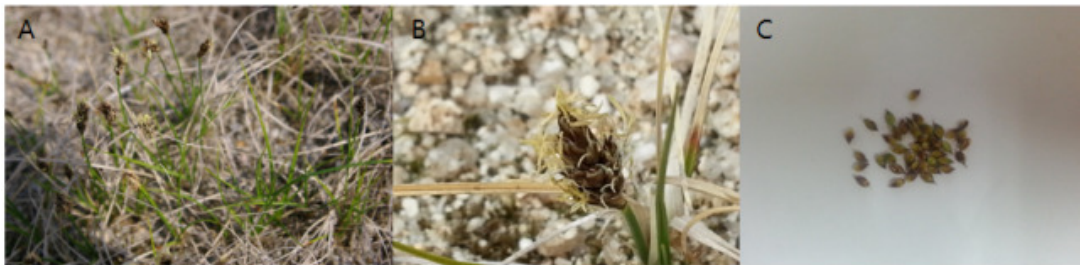


그림 66. 몽골 울리아스테 생육사진(A), 화서(B), 2013년 채종종자(C).

2. 녹색 포복경 선발개체의 해외 현지적응성 검정

- 한국잔디는 현장에서 요구되는 환경내성이 우수함에도 불구하고 녹색기간이 짧아 세계적 품종을 확대되지 못하고 있는 실정임
- 최근, 기후변화에 의한 온난화와 황사 등 환경에 대한 세계적 관심과 국민생활의 변화로 녹색도시의 요구도가 증가함에 따라 환경변화 대응 및 국토 및 도시 녹화에 필요한 다양한 형질의 잔디 수요가 증가하고 있음
- 선발된 환경내성 후보 계통의 해외 현지 적응성 실험을 건조 또는 사막화가 진행 중인 지역에서 재배실험을 수행하고자 함
- 이를 위하여 몽골지역의 울란바타르 근교에서 검증하고자 함
- 해외 지역 적응성 검정은 내재해성 잔디의 육구도가 높고 기후가 열악한 몽골에서 집중 조사하여 몽골에서 뿐만 아니라 중국 등 주변국에 보급할 수 있는 자료를 확보하고자 함
- 선발된 그린조아와 더그린, 대조구 중지의 해외현지 적응성검정을 위해 뗏장을 준비함

(그림 67)

- 14년 5월 22일 잔디(*Zoysia japonica* Steud.) 뗏장 15장을 검역 실시하였으며, 5월 29일 몽골 울란바타르 지역에서 현지적응성 검정을 실시함(그림 68)
- 몽골의 기후는 건성 냉대기후(Boreal Realm)이며, 지리적 위치, 지표구조, 높은 해발고도, 기류의 방향 등에 상응하여 전체적으로 극단적인 대륙성기후를 보이면서도 지역마다 상당한 차이가 있음
- 가뭄, 예측 불가능한 저온과 바람 등으로 인해 작물의 생육기간이 짧아져 생산성이 매우 낮음
- 2009년 ~ 2012년 4년간 몽골 지역의 파종기 (5월 ~ 6월) 의 5월의 평균 최저온도는 -4도, 최고온도는 약 15~20도로 일교차가 매우 크며, 평균온도는 연간 5월 썩씨 10도, 6월 썩씨 16도 정도로 년차간 변이가 크지 않음
- 몽골의 강수량은 매우 적으나 5월 중순 경에는 비와 눈이 자주 오며 연평균 강수량은 208mm로 매우 적은 편임
- 울란바타르 지역에 정식한 그린조아, 더그린, 중지 뗏장 15장은 최저기온이 영하로 내려가고, 눈과 비가 자주 오는 기후의 영향으로 생육하지 못하고 고사하였음

표 10. 몽골 울란바타르지역의 평균기온

2011년	1월	2월	3월	4월	5월	6월	7월	8월	9월	10월	11월	12월
최고기온	-6.1	-3.7	13.2	18.3	20.2	30.3	29.8	31.9	23.9	19.4	5.1	3.9
최저기온	-35.6	-34.4	-34.7	-14.7	-4.6	-1.2	4.8	2.1	-9.3	-15.9	-34.7	-39.5

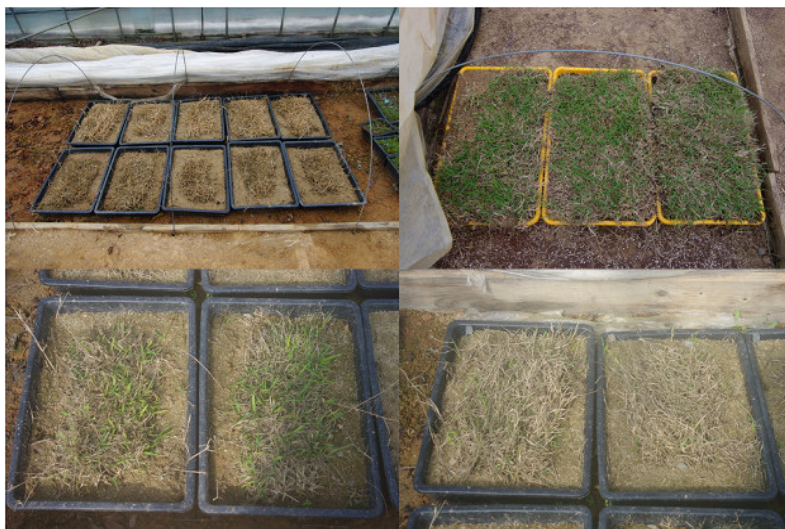


그림 67. 몽골적응성 실험을 위한 뗏장조성 (그린조아, 일반중지, 더그린)


※ Attachment

Republic of Korea
Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs
Animal and Plant Quarantine Agency

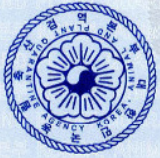
PHYTOSANITARY CERTIFICATE

Animal and Plant Quarantine Agency of Cheongju D.O. No :22-14000352

No	PLANT NAME Botanical Name of Plants	Quantity	UNIT
001	Water melon seedling Citrullus vulgaris Schrad.	700	pc(s)
002	Chinese cabbage seedling Brassica campestris ssp. napus var. pekinensis Makino	4,400	pc(s)
003	Lettuce seedling Lactuca sativa L.	1,500	pc(s)
004	green Onion seedling Allium cepa L.	3,400	pc(s)
005	Grass Zoysia japonica steud	15	pc(s)



농림축산



Place of issue : CHEONGJU, KOREA

Name of authorized officer : KIM KYOUNG BUM

Date : May . 22. 2014 (Signature) 김경범

※ No financial liability with respect to this certificate shall attach to the Animal and Plant Quarantine Agency or to any of its officers or representatives.

- 2 -

그림 68. 해외적응성실험을 위한 잔디뗏장 검역서

제 5 절. 환경내성 한국잔디 계통의 유전 양상 분석 및 특이 유전자 마커 개발

1. 녹색 포복경 잔디와 들잔디의 종내 교배조합 계통의 분자생물학적 특성 분석

가. RAPD를 이용한 계통간 다형성 프라이머 선발

- 그린조아, 제니스, 메이어, wild type 네 종류의 DNA에 대하여 operon 및 UBC primer를 사용한 RAPD 다형성 분석을 함
- PCR 반응 조성물은 주형 DNA 50ng, 10×PCR 버퍼 (3.5mM MgCl₂ 포함), dNTPs 200μM, taq DNA 중합효소 2 Unit, UBC 프라이머 20μM를 혼합하고 증류수(D.W.)로 총 부피를 20μl로 조정하여 반응액을 조성함
- PCR 반응액을 94℃에서 4분간 변성시킨 후, 94℃에서 1분, 35℃에서 1분, 72℃에서 1분 30초를 한 사이클로 하여 총 45회 반복 실시한 후, 72℃에서 10분간 반응시켜 합성하였고 1.5% 아가로스젤 상에서 전기영동하여 DNA의 밴드양상을 확인하였음
- 1차 screening 결과 그린조아에서 다형성을 보이는 operon primer 50개, UBC primer 133개 선발하여 2차 확인 (그림 69)
- 1차 screening 과정에서 PCR 증폭 실패한 프라이머를 재반응한 결과 선발된 프라이머와 2차 확인에서 선발된 프라이머를 모아서 3차 확인 (그림 70)한 결과 최종 6개의 프라이머 (148, 164, 375, 643, K19, R07)를 선발하였음

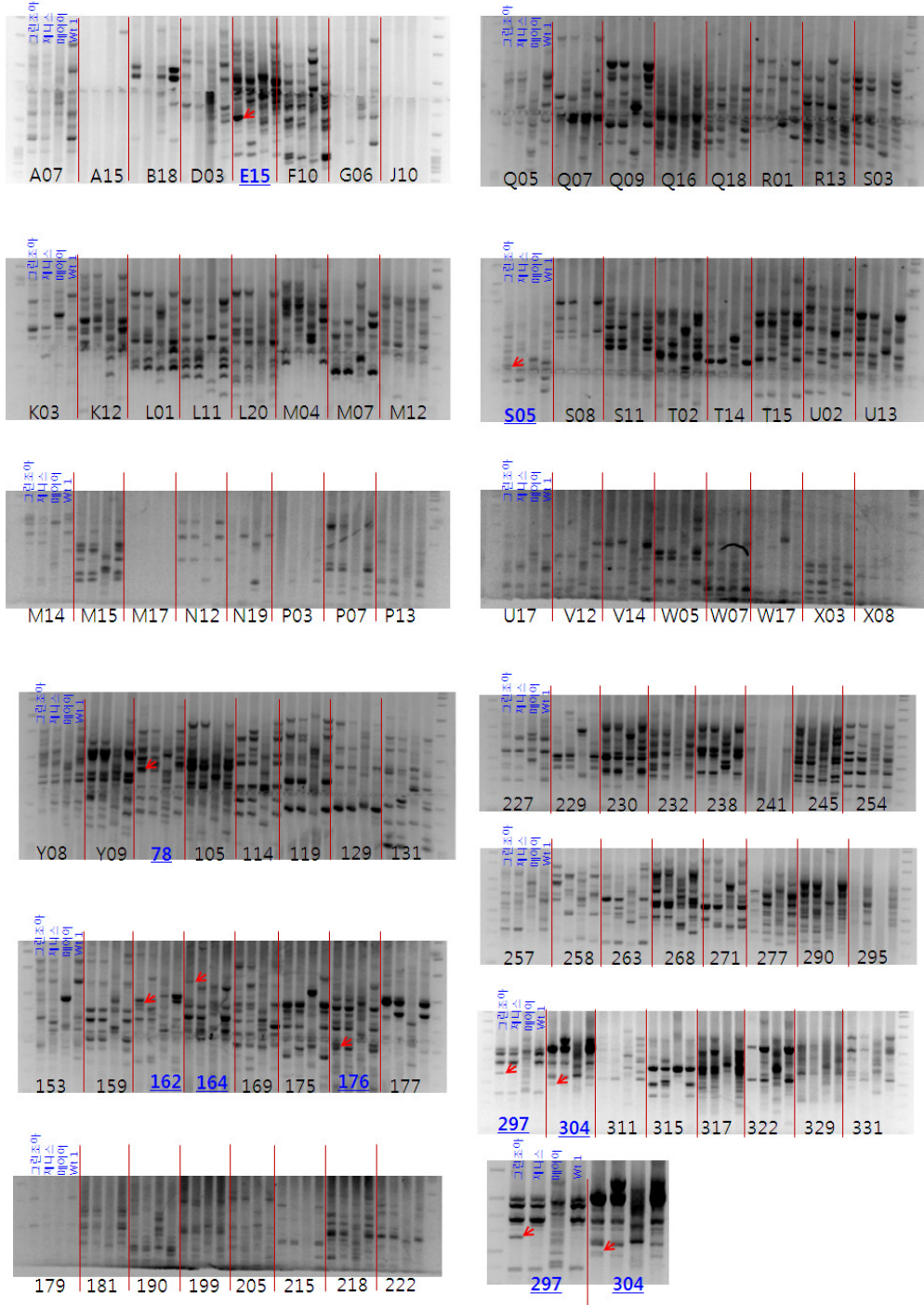


그림 69. 녹색포복경 잔디 그린조아에 대한 RAPD 2차 확인 결과.

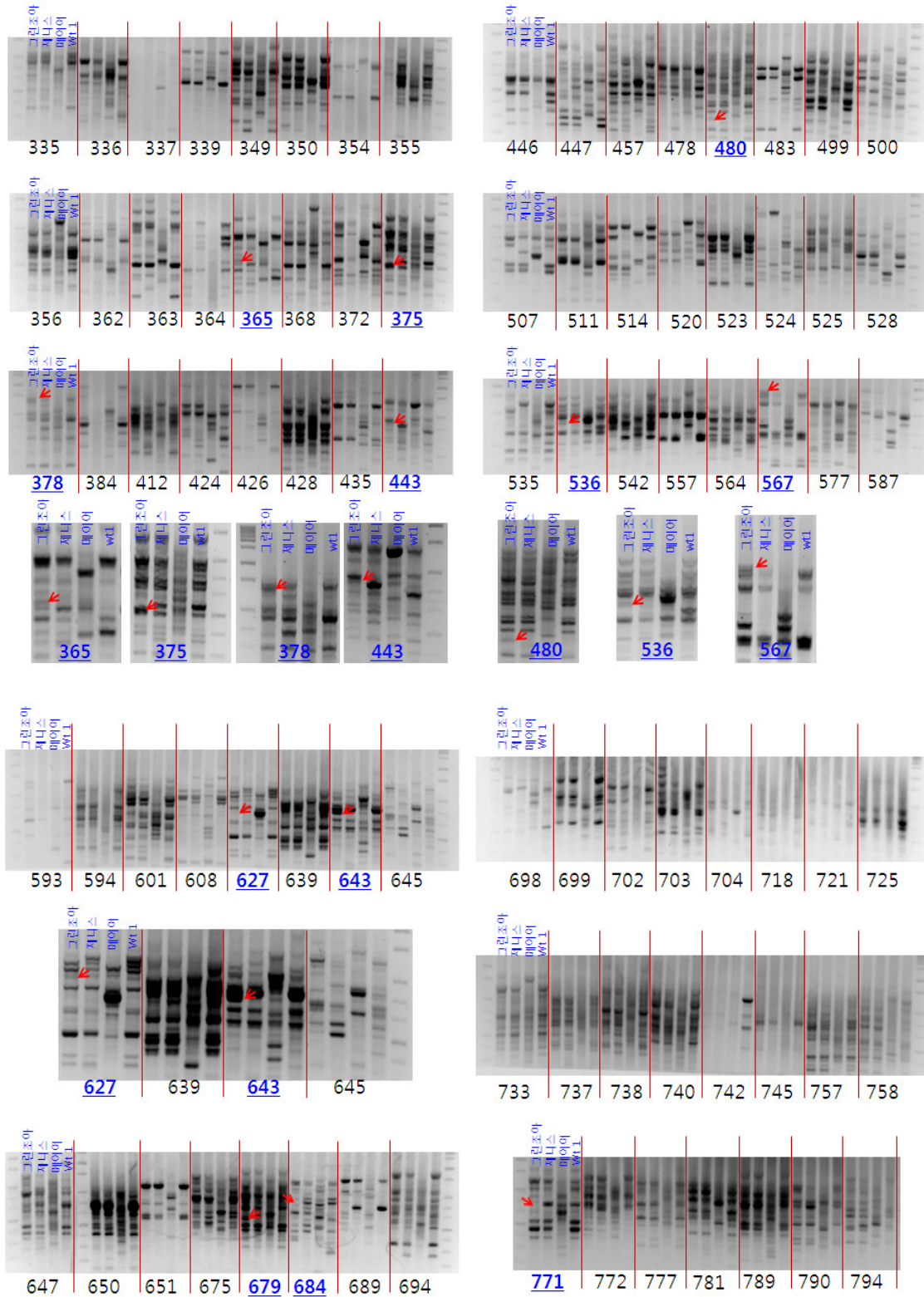


그림 70. Continue (그린조아 RAPD 2차 확인 결과)

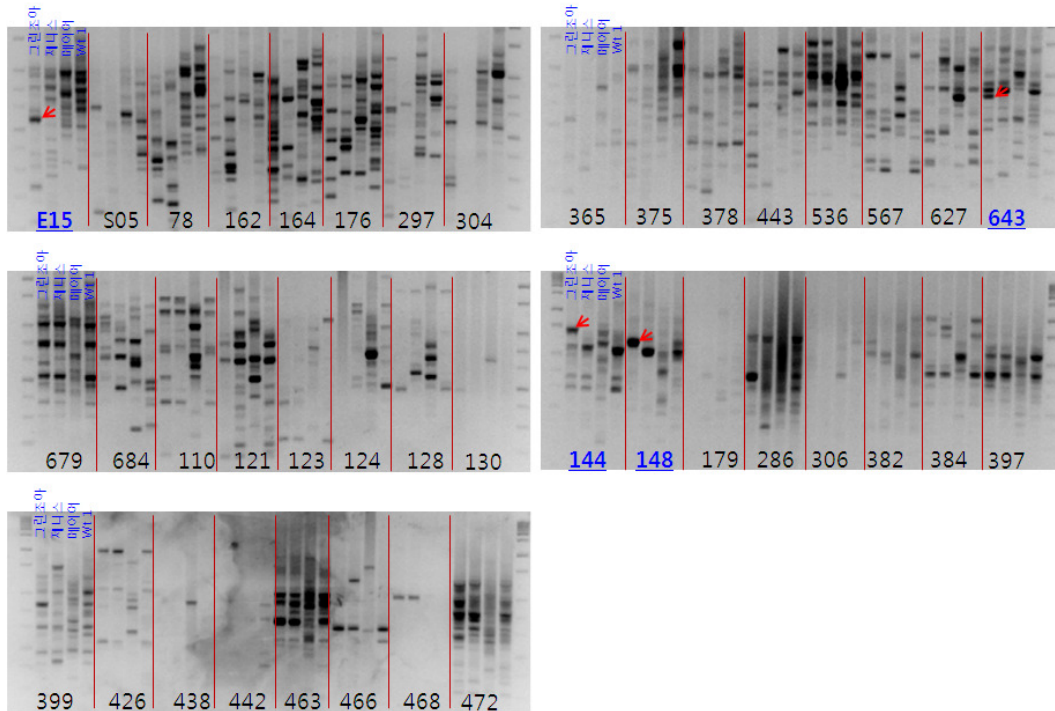


그림 70. 그린조아 RAPD 선발 프라이머 3차 확인

- 선발 프라이머 (148, 164, 375, 643, K19, R07)를 사용하여 그린조아 선발 12개체 (GZK01-12)와 포복경이 녹색빛을 띠다가 붉은 색으로 변하는 개체 3개체 (green-red, GR01-03), 포복경이 붉은 색인 대조구 (control red, CR01-03), 그린조아 대조구, 체니스 대조구 총 20개체에 대하여 개체별로 확인하였음
- 각 프라이머에 대한 RAPD 밴드 패턴을 분석한 결과 그린조아 선발개체에서 그린조아 대조구의 밴드 패턴을 보이는 경우가 많았으며 GR01-03 개체에서도 그린조아 대조구의 밴드 패턴이 일부 확인되었음. 그러나 CR01-03 개체에서는 그린조아 대조구의 밴드패턴이 확인되지 않았음(그림 71)
- 각 프라이머에서 증폭된 그린조아 특이밴드의 염기서열을 확보하였음. 그러나 Blast search 결과 잔디의 염기서열과 homology를 보이지 않음(표 11)

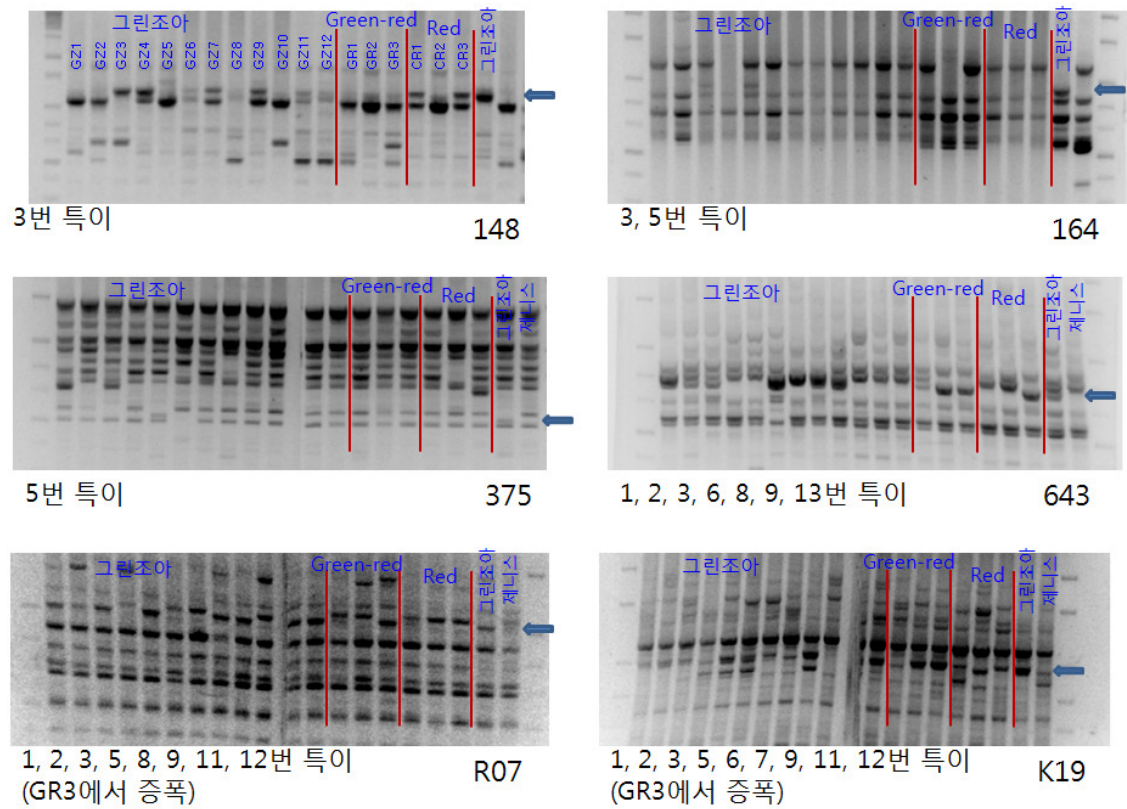


그림 71. 그린조아 RAPD 선발 프라이머의 개체별 확인 (화살표는 그린조아 대조구에서 증폭된 특이밴드임)

표 11. 그린조아 RAPD 선발 프라이머의 개체별 분석 결과 (노란색 박스는 그린조아 대조구의 밴드패턴을 보이는 개체이며 붉은 색 'O'은 염기서열이 확보된 특이밴드임)

Primer	GZ K01	GZ K02	GZ K03	GZ K04	GZ K05	GZ K06	GZ K07	GZ K08	GZ K09	GZ K10	GZ K11	GZ K12	GR 01	GR 02	GR 03	CR 01	CR 02	CR 03	그린조아	제니스	메이 어	WT
148	148-1250		O																O			
	148-1000																				O	
164	164-980			O		O																O
	164-900																					O
375	375-510					O																O
643	643-800	O	O	O		O	O	O	O	O			O						O	O		O
	643-780	O	O	O			O		O	O			O	O					O	O		O
K19	K19-1000	O	O	O		O	O	O		O		O	O	O					O	O		O
	K19-999	O	O	O		O	O	O	O	O		O	O	O					O	O		O
R07	R07-1005				O		O	O					O	O						O		O
	R07-1000	O	O	O		O		O	O		O	O			O				O	O		O

○ 확보된 염기서열을 이용하여 20-mer 이상의 안정적인 프라이머를 제작하였으며 이를 사용하여 26개의 다양한 샘플을 DNA 분석하였음. PCR 반응 조성물은 주형 DNA 100ng,

10 × PCR 버퍼 (1.5mM MgCl₂ 포함), dNTPs 200μM, taq DNA 중합효소 2 Unit, 프라이머 쌍 각 10μM를 혼합하고 증류수 (D.W.)로 총 부피를 25μl로 조성하였음

- PCR 반응액을 94°C에서 4분간 변성시킨 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분을 한 사이클로 하여 총 30회 반복 실시한 후, 72°C에서 10분간 반응시켜 합성하였으며 1.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하여 분석하였음
- UBC 375번과 UBC 643번에서 유래된 프라이머 (375-F/R, 643-F/R)를 이용하여 잔디 포장에서 채취한 샘플들을 분석한 결과 그린조아 및 더그린 잔디를 선별할 수 있는 분자 마커로서의 가능성이 확인되었음(그림 72, 표 12)

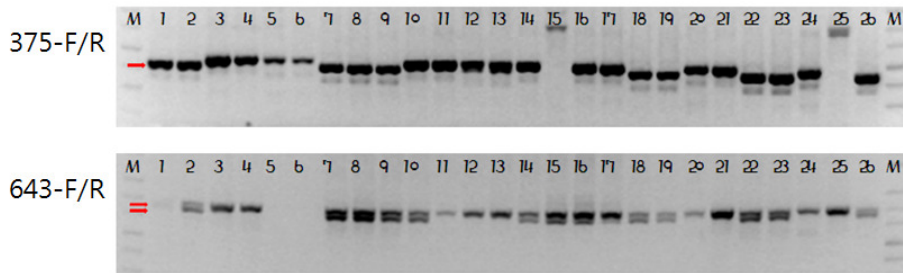


그림 72. RAPD 유래 375F/R, 643-F/R 프라이머를 이용한 잔디 개체 스크리닝 (붉은 화살표는 그린조아 특이밴드 위치임)

표 12. RAPD 유래 375F/R, 643-F/R 프라이머를 이용한 잔디 개체의 밴드패턴 분석 (노란 박스는 그린조아 밴드패턴을 나타냄)

번호	샘플명	UBC375 유래 품종특이마커		UBC643 유래 품종특이마커	
		453bp	약 500bp	761bp	817bp
1	그린조아	○		○	○
2	그린조아	○		○	○
3	제니스		○		○
4	제니스		○		○
5	세녹		○		
6	T1 Meyer		○		
7	그린조아	○		○	○
8	그린조아	○		○	○
9	그린조아	○		○	○
10	제니스 (추정)		○	○	○
11	제니스		○		○
12	줄지	○	○		○
13	줄지	○	○		○
14	한국형 K#2		○	○	○
15	한국형 wt-7			○	○
16	한국형 K#3		○	○	○
17	한국형 wt-3		○	○	○
18	더그린02	○		○	○
19	더그린02	○		○	○
20	홀잔디		○		○
21	홀잔디		○		○
22	그린조아	○		○	○
23	그린조아	○		○	○
24	한국형 wt		○		○
25	한국형 wt				○
26	그린조아	○		○	○

나. 계통 특이 분자표지 분석

- 1차 년도에 종내 교배를 통해 획득한 종자로부터 선발한 개체와 2차 년도에 중간 정역교배조합으로부터 선발한 개체를 그린조아 특이 분자표지로 분석하였음
- 분석에 사용된 분자표지는 1년차에 RAPD에 의해 선발된 random primer를 SCAR 마커로 전환한 것으로 375-GZ, 643-GZ 그리고 148-GZ 총 3종임(그림 73)
- 종내교배를 통해 선발한 13계통(1-01~13)은 1차 년도에 표현형(녹색 포복경)에 따라 선발하였으며 현재 녹색 포복경을 유지한 상태임. 대조구로 붉은 색 포복경의 한국형 잔디(1-14~19)와 해외에서 수집 후 선발한 도입종(1-20~22)을 함께 분석하였음
- 2차 년도에 중간 정역교배 후대 43라인(2-01~43)을 1차적으로 표현형(녹색 포복경)에 따라 선발한 후, 특이 분자표지로 분석하였음

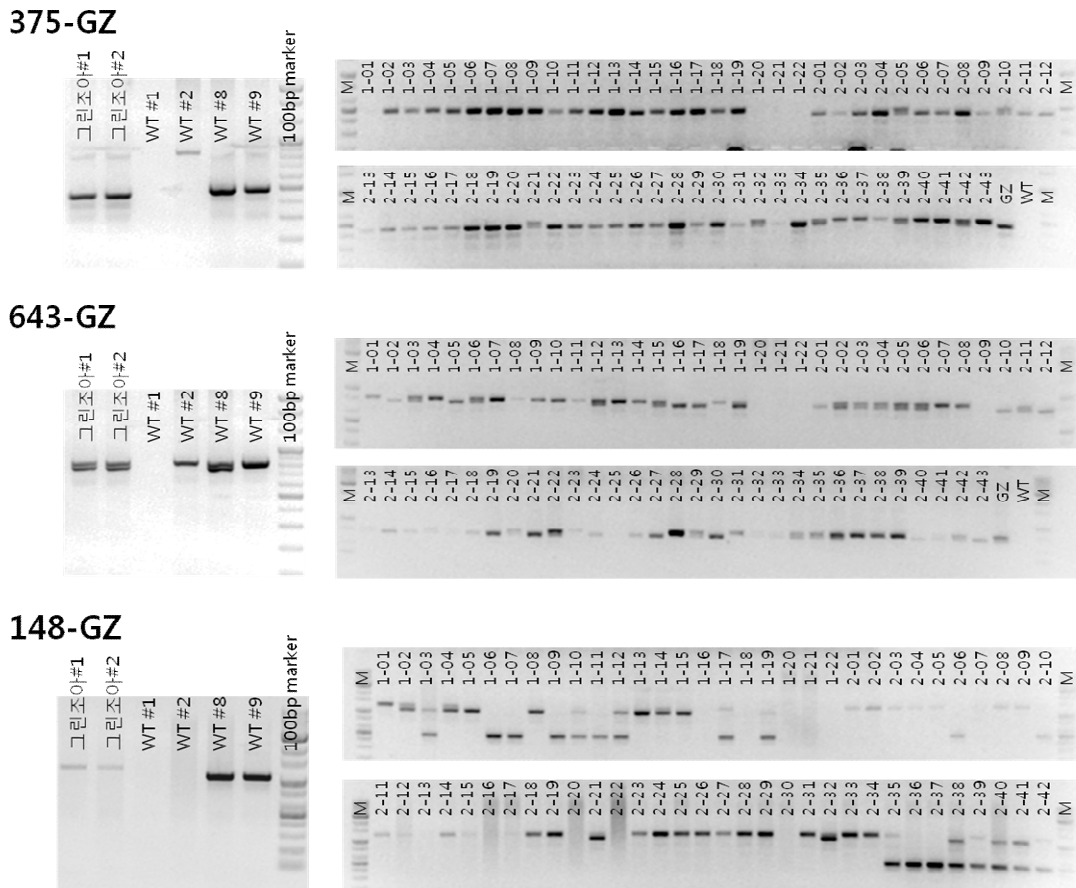


그림 73. 개발된 그린조아 특이 분자마커인 녹색 포복경 특이 SCAR 마커 분석결과

- 분자표지 분석 결과 중간교배 계통 (녹색, 1-01~09, 1-11) 및 대조구 (붉은 색, 1-10, 1-12~19)는 그린조아 특이 SCAR 마커 중 375-GZ 특이밴드를 모두 가지고 있지 않으며 643-GZ와 148-GZ 특이밴드를 일부 가지고 있음(그림 74)
- 따라서, 이들 계통은 그린조아와 동일종이 아닌 것으로 판단되며, 추가적인 분자표지를

선발하여 녹색 포복경 특이 분자표지를 개발하는데 활용하고자 함

- 또한 그린조아는 상이한 녹색 포복경 품종으로 이들을 구분할 품종 특이마커를 개발하고자 함

No.	Sample	375-GZ		643-GZ		148-GZ		
		450bp	500bp	760bp	820bp	500bp	1000bp	1250bp
Cont.	그린조아	○	-	○	○	-	-	○
	WT 8	-	○	○	○	-	○	-
	WT 9	-	○	-	○	-	○	-
1-01	GZK	-	○	-	○	-	-	○
1-02	GZK-3	-	○	○	-	-	○	○
1-03	GZK-4	-	○	○	○	○	○	-
1-04	GZK-5	-	○	-	○	-	○	○
1-05	GZK-7	-	○	○	-	-	○	-
1-06	GZK-8	-	○	○	○	○	-	-
1-07	GZK-9	-	○	-	○	○	-	-
1-08	GZK-10	-	○	-	○	-	○	-
1-09	GZK-11	-	○	-	○	○	-	-
1-10	K-3	-	○	-	○	○	○	○
1-11	GZK-12	-	○	-	○	○	-	-
1-12	K-2	-	○	○	○	○	○	-
1-13	K-3	-	○	-	○	-	○	-
1-14	WT-3	-	○	-	○	-	○	○
1-15	WT-7	-	○	○	○	-	○	-
1-16	Control red 1	-	○	○	-	-	-	-
1-17	Control red 2	-	○	○	-	○	-	○
1-18	Green red 1	-	○	-	○	-	-	-
1-19	Green red 3	-	○	○	○	○	○	-
1-20	선발2010	-	-	-	-	-	-	-
1-21	몽골1009182-G	-	-	-	-	-	-	-
1-22	몽골기상청-울리 마스테	-	-	-	-	-	-	-

그림 74. 그린조아 특이 분자표지를 이용한 종내교배 계통 progeny의 분석 결과

- 중간 정역교배 후대9 (2-01~43)의 분석결과 643-GZ 마커의 경우, 대조구 중지에서 다형성을 보이므로 유전적 안정성을 확인할 수 없으며 교잡여부를 판단하기 어려움
- 그러나 다른 2개의 마커, 375-GZ와 148-GZ 마커에서 hetero 타입이거나 148-GZ마커의 delition이 일어난 것으로 추측되는 개체9 (148-GZ의 500bp)를 확인하였으며 이들은 모두 표현형이 붉은색임을 확인하였음 (그림 75)
- 따라서 동일한 교배번호 안에서 복수의 개체를 3종의 그린조아 특이 SCAR 마커로 추가 분석하여 마커의 유용성을 검증할 것임. 또한 그린조아 특이 SCAR 마커 외에 잔디의 교잡여부를 판단할 수 있도록 RAPD 및 RAPD 유래 분자마커를 분석함
- 1, 2년차의 종내 및 중간 교배종 후대집단의 표현형 분석 데이터와 제 1협동 과제에서 발굴한 후보 유전자의 연관마커를 탐색하여 녹색 포복경 및 안토시아닌 발현과 관련된 마커 개발 및 분석을 진행함

No.	Sample	375-GZ		643-GZ		148-GZ		
		450bp	500bp	760bp	820bp	500bp	1000bp	1250bp
Cont.	그린조아	○	-	○	○	-	-	○
	WT 8	-	○	○	○	-	○	-
	WT 9	-	○	-	○	-	○	-
2-01	GW 101	○	-	○	-	-	-	○
2-02	GW 103	○	-	○	○	-	-	○
2-03	GW 105	○	-	○	○	-	-	○
2-04	GW 106	○	-	○	○	-	-	○
2-05	GW 110	○	○	○	○	-	-	○
2-06	GW 116	○	-	○	○	○	-	-
2-07	GW 118	○	-	-	○	-	-	-
2-08	GW 119	○	-	-	○	-	-	○
2-09	GW 121	○	-	-	-	-	-	○
2-10	GW 122	○	○	○	-	○	-	○
2-11	GW 123	○	-	○	○	-	-	○
2-12	GW 124	○	-	○	-	-	-	○
2-13	GW 125	○	-	○	○	-	-	○
2-14	GW 129	○	-	○	-	-	-	○
2-15	GW 131	○	-	○	-	-	-	○
2-16	GW 134	○	-	○	○	-	-	-
2-17	GW 135	○	-	○	○	-	-	○
2-18	GW 136	○	-	○	-	-	-	○
2-19	GW 138	○	-	○	-	-	-	○
2-20	GW 139	○	-	○	○	-	-	-
2-21	GW 140	○	○	○	-	-	○	○
2-22	GW 163	○	-	○	○	-	-	-
2-23	GW 172	○	-	-	○	-	-	○
2-24	GW 173	○	-	○	-	-	-	○
2-25	GW 178	○	-	-	-	-	-	○
2-26	GW 182	○	-	○	-	-	-	○
2-27	GW 184	○	-	○	-	-	-	○
2-28	GW 185	○	-	-	○	-	-	○
2-29	GW 186	○	-	○	○	-	-	○
2-30	GW 191	○	-	○	-	-	-	-
2-31	GW 199	○	-	-	○	-	-	○
2-32	GW 201	○	○	○	○	-	○	○
2-33	GW 202	○	-	○	○	-	-	○
2-34	GW 211	○	-	○	○	-	-	○
2-35	GW 219	○	○	○	○	○	-	○
2-36	WG 113	-	○	○	○	○	-	-
2-37	WG 115	-	○	-	○	○	-	-
2-38	WG 117	-	○	-	○	○	○	-
2-39	WG 138	○	○	-	○	○	-	○
2-40	WG 146	-	○	○	-	○	○	-
2-41	WG 157	-	○	○	○	○	○	-
2-42	WG 164	○	○	○	○	○	-	○
2-43	WG 166	-	○	○	-	○	-	-

붉은색잔디

그림 75. 그린조아 특이분자표지를 이용한 중간 정역교배 계통 progeny의 분석결과

2. 그린조아 특이마커 분석

- 1차년도에 종내교배를 통해 선발한 10계통과 2차년도에 중간 정역교배조합으로부터 선발한 20계통을 그린조아 특이 분자표지(그림 76)로 분석한 결과 기존개발계통인 그린조아와 동일한 패턴을 확인할 수 없었음(표 13)

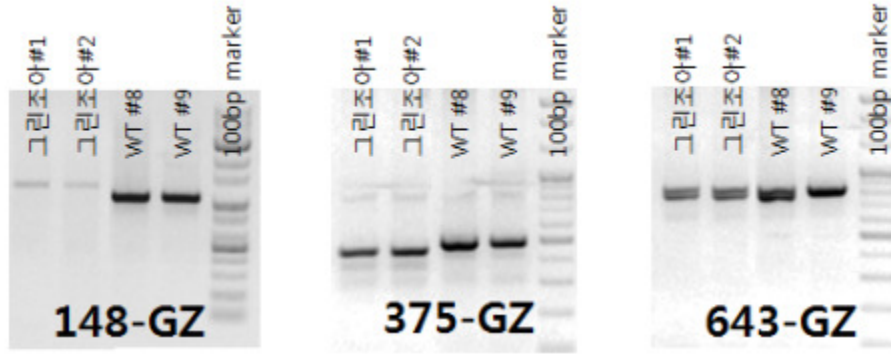


그림 76. 그린조아 특이 SCAR 마커 3종 (148-GZ, 375-GZ, 643-GZ)

- 148-GZ, 375-GZ, 643-GZ 3개 마커, 7개의 밴드패턴을 분석하여 유연관계를 분석한 결과 그림 16과 같은 덴드로그램을 확인하였음. 유연관계 분석은 XLSTAT의 AHC(Agglomerative hierarchical clustering) 프로그램을 이용하였으며 Agglomeration method는 Unweighted pair-group average 방법을 이용하였음(그림 77)
- 종내 교배조합으로부터 선발된 10계통(GZK 시리즈)은 그린조아 및 더그린과 18%의 similarity를 보였음. 기존 그린조아 및 더그린과는 확연히 구분되어 신품종으로 등록가능성이 확인되었음. 그러나 GZK-5번 계통은 WT-3과, GZK-10번 계통은 WT-9과, GZK-4번 계통은 Control red 3과마커 패턴이 동일하였으며 GZK-9, GZK-11, GZK-12번 3계통이 또한 동일한 마커패턴을 보임으로써 이들 간의 유전적 다형성 확보가 필요함
- 중간 교배조합으로부터 선발된 20계통(GW 시리즈)은 60% 이상의 similarity를 보였으며 유사도 지수 0.75에서 5개의 그룹으로 분류되었음. 그 중 가장 큰 그룹으로 GW202, GW186, GW135, GW134, GW125, GW106, GW105, GW103 총 8계통이 속한 그룹은 그린조아 및 더그린과 동일한 마커 패턴을 확인하였음. 따라서 이들이 신규 품종인가를 규명하기 위하여 RAPD를 이용한 유전적 다형성 분석이 요구됨

표 13. 종내 및 종간 교배조합으로부터 선발된 30계통에 대한 그린조아 특이분자표지 분석 결과

연차	No.	Sample	375-GZ		643-GZ		148-GZ		
			450bp	500bp	760bp	820bp	500bp	1000bp	1250bp
Cont.	1	그린조아	O	-	O	O	-	-	O
	2	더그린	O	-	O	O	-	-	O
	3	WT-3	-	O	-	O	-	O	O
	4	WT-8	-	O	O	O	-	O	-
	5	WT-9	-	O	-	O	-	O	-
	6	Control red 2	-	O	O	-	O	-	O
	7	Green red 3	-	O	O	O	O	O	-
1차년 도	1	GZK	-	O	-	O	-	-	O
	2	GZK-3	-	O	O	-	-	O	O
	3	GZK-4	-	O	O	O	O	O	-
	4	GZK-5	-	O		O	-	O	O
	5	GZK-7	-	O	O	-	-	O	-
	6	GZK-8	-	O	O	O	O	-	-
	7	GZK-9	-	O	-	O	O	-	-
	8	GZK-10	-	O	-	O	-	O	-
	9	GZK-11	-	O	-	O	O	-	-
	10	GZK-12	-	O	-	O	O	-	-
2차년 도	1	GW 101	O	-	O	-	-	-	O
	2	GW 103	O	-	O	O	-	-	O
	3	GW 105	O	-	O	O	-	-	O
	4	GW 106	O	-	O	O	-	-	O
	5	GW 119	O	-	-	O	-	-	O
	6	GW 121	O	-	-	-	-	-	O
	7	GW 124	O	-	O	-	-	-	O
	8	GW 125	O	-	O	O	-	-	O
	9	GW 131	O	-	O	-	-	-	O
	10	GW 134	O	-	O	O	-	-	O
	11	GW 135	O	-	O	O	-	-	O
	12	GW 136	O	-	O	-	-	-	O
	13	GW 139	O	-	O	O	O	-	O
	14	GW 182	O	-	O	-	-	-	O
	15	GW 184	O	-	O	-	-	-	O
	16	GW 185	O	-	-	O	-	-	O
	17	GW 186	O	-	O	O	-	-	O
	18	GW 191	O	-	O	-	-	-	O
	19	GW 199	O	-	-	O	-	-	O
	20	GW 202	O	-	O	O	-	-	O

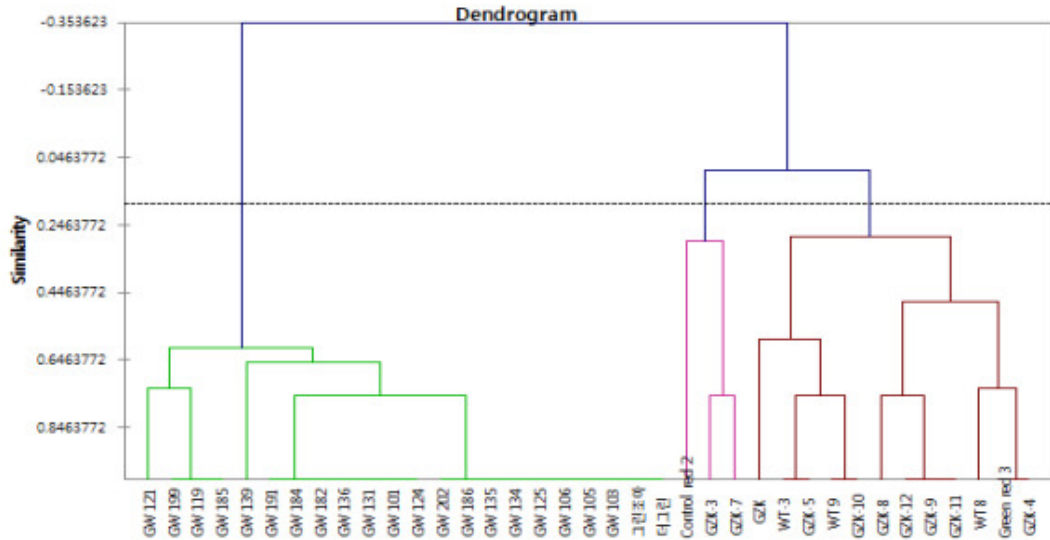


그림 77. 그린조아 특이 148-GZ, 375-GZ, 643-GZ 3개 마커, 7개의 밴드패턴을 분석한 후 XLSTAT의 AHC(Agglomerative hierarchical clustering) 프로그램을 이용하여 유연관계 분석

3. RAPD를 이용한 중간 교배조합 선발계통의 유전적 다형성 분석

- 중간 교배조합 선발계통의 경우 그린조아 특이 마커와 동일한 패턴을 보이는 계통이 다수이기 때문에 이들 간의 유전적 다형성 확보가 요구됨. 따라서 선발된 20계통 및 대조구 그린조아, 제니스를 이용하여 RAPD를 수행하였음
- RAPD에 사용된 프라이머는 그린조아와 제니스 잔디에서 다형성을 보유한 11개 프라이머를 사용하였음(표 14)
- 11개 프라이머의 RAPD 분석 결과 평균 7.2개의 밴드가 증폭되었으며, 모든 프라이머에서 다형성을 확인하였음(그림 78). RAPD에 의해 증폭된 모든 밴드를 scoring하여 유연관계 분석을 수행하였음
- 유연관계 분석은 위에서 언급한 것과 같이 XLSTAT의 AHC(Agglomerative hierarchical clustering) 프로그램을 이용하였으며 Agglomeration method는 Unweighted pair-group average 방법을 이용하였음
- 유연관계를 분석한 결과 그림 5와 같이 유사도 지수 0.68에서 제니스를 제외한 선발 계통이 5개의 그룹으로 분류되었음(그림 79). GW121, GW124, GW101, GW136, GW185, GW186, GW184, GW119, GW182, GW134, GW125, GW135 총 12계통이 그린조아와 같은 그룹으로 분석되었으나 유사도 0.68~0.90 수준으로 계통간 구분이 가능함
- 다형성을 보이는 특이밴드를 SCAR 마커로 전환할 경우 그림 5와 같이 유사도 0.50~0.87 수준으로 계통구분이 가능할 것으로 판단되어 마커전환 중에 있음(그림 80)

표 14. 중간 교배조합 선발계통의 다형성 분석에 사용된 프라이머 목록

No.	primer name	sequence
1	A-01	5'-CAGGCCCTTC-3'
2	A-02	5'-TGCCGAGCTG-3'
3	A-05	5'-AGGGGTCTTG-3'
4	A-11	5'-CAATCGCCGT-3'
5	A-13	5'-CAGCACCCAC-3'
6	B-05	5'-TGCGCCCTTC-3'
7	B-08	5'-GTCCACACGG-3'
8	B-09	5'-TGGGGGACTC-3'
9	B-10	5'-CTGCTGGGAC-3'
10	B-18	5'-CCACAGCAGT-3'
11	D-03	5'-GTCGCCGTCA-3'

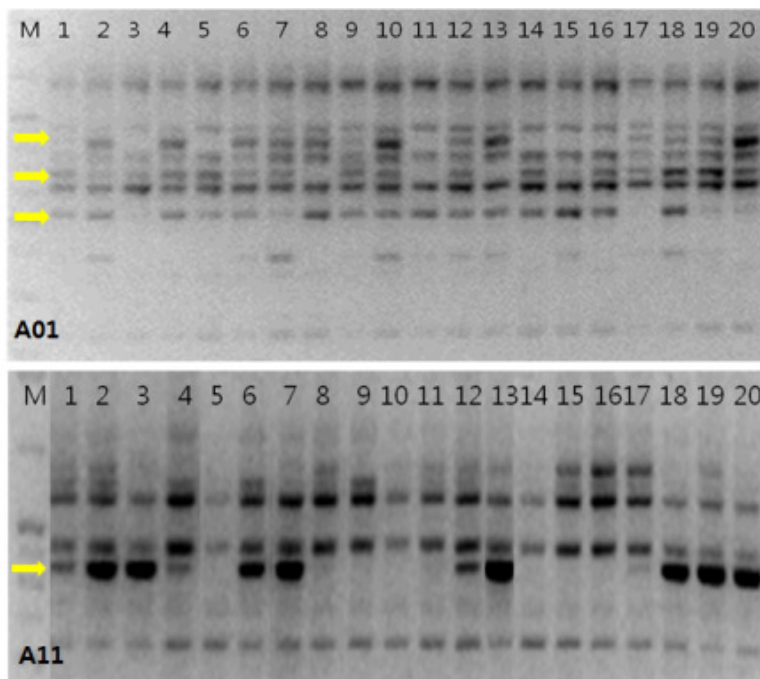


그림 78. 중간 교배조합 선발 20계통의 RAPD 분석 결과. 1~20번은 선발 20계통을 나타내며 화살표는 다형성을 보이는 특이밴드를 나타냄

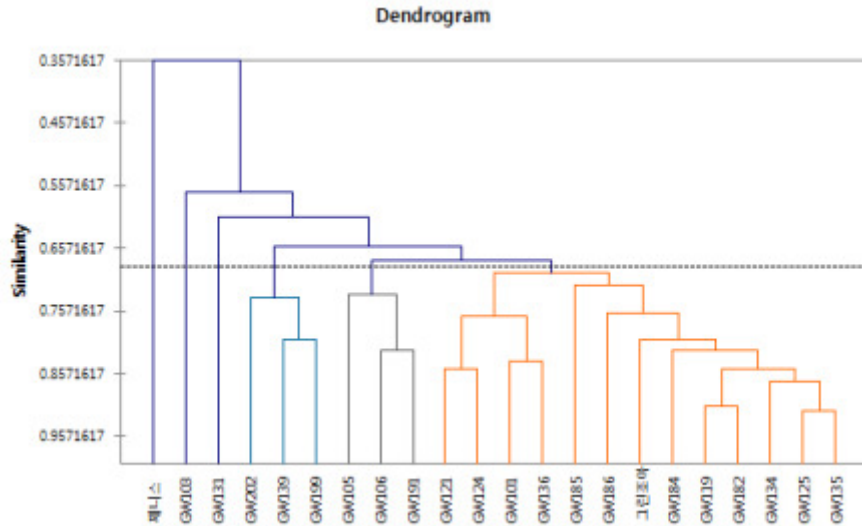


그림 79. 중간 교배조합 선발 20계통의 RAPD를 이용한 유연관계 분석

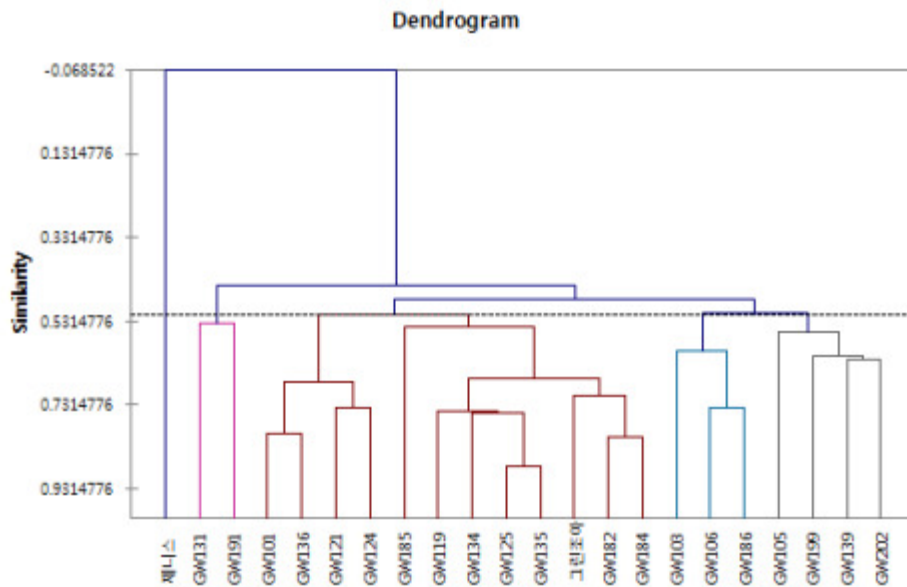


그림 80. 그린조아 특이 마커를 포함하여 RAPD에서 유래된 다형성 밴드를 이용하여 유사도 분석한 결과 유사도지수 0.87이상에서 모든 계통의 구분이 가능함

4. 녹색발현 유전자 연관 마커 개발

- 1, 2년차의 종내 및 중간 교배조합으로부터 선발된 30계통의 표현형 분석 데이터와 제 1 협동 과제에서 발굴한 후보 유전자의 연관 마커를 탐색하여 녹색 포복경 및 안토시아닌 발현과 관련된 마커 개발 및 분석을 진행하고자 함
- 안토시아닌 착색에 영향을 미치는 것으로 보고된 유전자 중 제1협동과제 연구결과 그린 조아와 중지간의 발현에서 차이가 큰 F3H, DFR, ANS, UFGT gene을 NCBI에서 search 하여 alignment한 후 F3H, UFGT gene에 연관된 프라이머를 작성하였음 (그림 81)

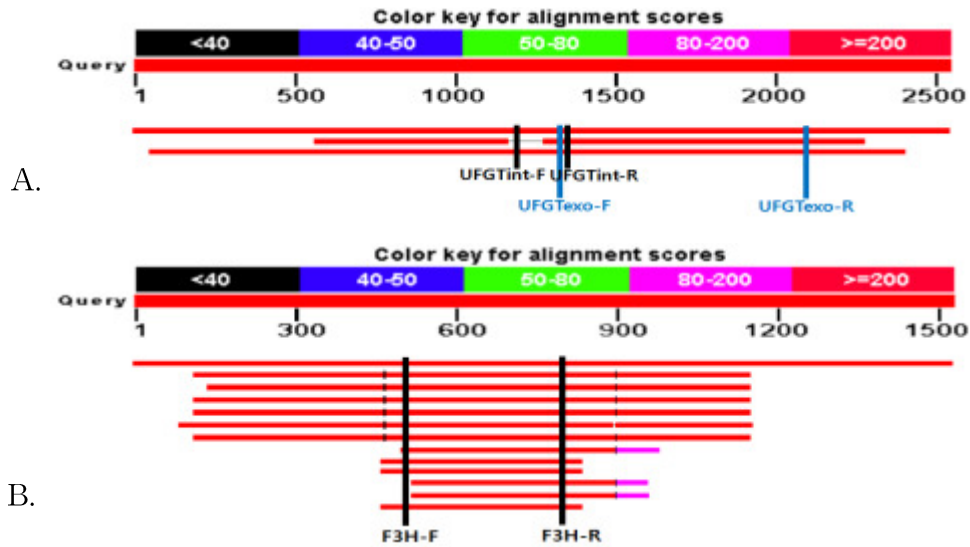


그림 81. NCBI에서 UFGT(A), F3H(B) gene을 검색하여 alignment한 후 제작된 프라이머의 위치

- 그린조아, 일반중지, 더그린, 제니스 잔디 계통에 대하여 다형성 여부를 분석한 결과 F3H는 단일밴드가 증폭되었으나 다형성을 보이지 않았음. UFGTint 프라이머의 경우 런너가 녹색을 띄는 그린조아와 붉은색을 띄는 일반중지에서 다형성을 보이지 않았으나, UFGTexo 프라이머에서 런너가 붉은색을 띄는 일반중지만이 다형성을 보유함을 확인하였음 (그림 82)
- 추후 잔디의 분리세대에서 표현형과 색 발현 유전자 연관 마커의 크로스체킹을 수행할 것이며, 협동과제 연구결과에서 도출된 또다른 잔디의 착색에 관여하는 안토시아닌 생합성 유전자 (DFR, ANS 등)를 이용한 유전자마커를 개발 및 검정할 계획임

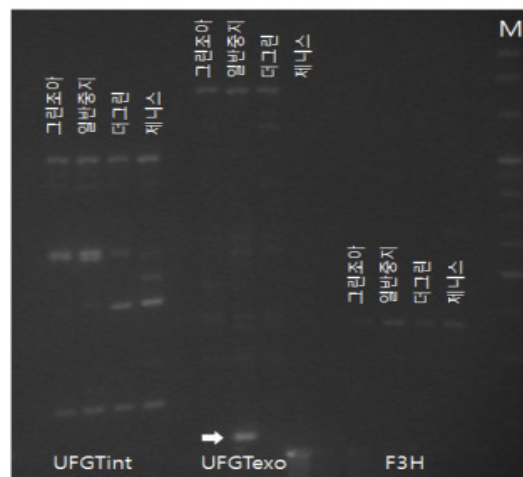


그림 82. F3H, UFGT gene으로부터 제작된 프라이머의 계통간 다형성 확인

5. RAPD분석을 통한 유전적 다양성 분석

- 1차년도 종내교배선발 10계통과 2차년도 종간교배선발 20계통의 유전적 변이를 알아보기 위하여 RAPD분석을 하였음
- PCR 반응 조성물은 주형 DNA 100ng, 10×PCR 버퍼 (1.5mM MgCl₂ 포함), dNTPs 200 μM, taq DNA 중합효소 2 Unit, 프라이머쌍 각 10μM를 혼합하고 증류수 (D.W.)로 총 부피를 25μl로 조성하였음
- PCR 반응액을 94℃에서 4분간 변성시킨 후, 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분을 한 사이클로 하여 총 30회 반복 실시한 후, 72℃에서 10분간 반응시켜 합성하였으며 2% 아가로스 겔 상에서 전기영동하여 분석하였음
- 120개의 RAPD primer를 사용하여 우수계통 및 품종을 대상으로 PCR을 수행한 결과, polymorphism을 나타내는 37개의 primer를 1차적으로 선발하였음
- 1차로 선발된 primer중 재현성이 있으면서 polymorphism이 높은 primer를 탐색한 결과 최종적으로 25개를 선발하였음(그림 83)
- 최종 선발된 프라이머를 이용하여 32계통의 유전분석을 수행한 결과, 증폭된 총 band수는 216개이었고, 증폭된 DNA 단편 크기의 범위는 100 ~ 3,000 bp이었음
- 각 primer에 의해 증폭된 DNA 단편의 수는 최소 2개에서 최대 16개로 다양하였으며, primer 한 개당 평균 8.6개의 DNA 단편이 증폭되었음

No	Primer	A04-500	A06-600	B09-680	C01-520	C02-700	C08-550	E15-550	B02-900	B09-950	A13-580	A14-550	B10-450	B10-480	C04-700	C05-600	C06-1200	C18-540	C20-880	C02-650	C02-600	C02-400	C08-1200	C08-800	Z01-1200	Z02-800	D05-1200	F13-980	E10-500	E11-340	Z07-1400	Z12-1000			
1	총계	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o		
2	GW101	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
3	GW102	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
4	GW103	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
5	GW104	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
6	GW105	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
7	GW106	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
8	GW107	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
9	GW108	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
10	GW109	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
11	GW110	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
12	GW111	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
13	GW112	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
14	GW113	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
15	GW114	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
16	GW115	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
17	GW116	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
18	GW117	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
19	GW118	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
20	GW119	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
21	GW120	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
22	GW121	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
23	GW122	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
24	GW123	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
25	GW124	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
26	GW125	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
27	GW126	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
28	GW127	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
29	GW128	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
30	GW129	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
31	GW130	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
32	GW131	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
33	GW132	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o

그림 83. 종내 및 종간 교배조합으로부터 선발된 32계통에 대한 분자표지 분석 결과

- 7개 primer(A04, A06, B09, C01, C02, C08, E15)를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 2차년도 종간교배 20계통에서 그린조아와 같이 grouping이 되었음(그림 84)
- 2개 primer(B02, B09)를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 1차년도 종내교배 10계통에서 중지와 같이 grouping이 되었음(그림 85)
- 또한 20개 primer(A13, A14, B03, B10, C01, C02, C04, C05, C06, C08, C18, C20, D01, D02, D05, D13, E10, E11, Z07, Z12)를 이용하여 PCR을 수행한 결과, GW124, GW125, GW131, GW134, GW184, GW185, GW186, GW191, GW199, GW202, GZK, GZK3,

GZK4, GZK5, GZK7, GZK8, GZK9, GZK10, GZK11, GZK12 총 20계통에서 특이적인 밴드를 나타냈으며, GW124, GW131, GW191, GZK, GZK3, GZK7 5계통에서는 특이적인 단일밴드를 나타내었음(그림 86)

- 상기의 데이터를 이용하여 계통특이 RAPD 마커를 확보하였으며, 이는 품종구분이 가능하므로 품종특허의 근거로 제시함

No.	계통 번호	A04-500	A06-600	B09-680	C01-520	C02-700	C08-550	E15-550	A13-580	A13-450	C05-600	C06-1200	C18-540	C20-980	D01-1200	D05-320	D13-980	E11-340	Z07-1400
1	종지	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	x	x
2	그린프아	o	o	o	o	o	o	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3	GW101	o	o	o	o	o	o	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
4	GW103	o	o	o	o	o	o	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
5	GW105	o	o	o	o	o	o	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
6	GW106	o	o	o	o	o	o	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
7	GW119	o	o	o	o	o	o	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
8	GW121	o	o	o	o	o	o	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
9	GW124	o	o	o	o	o	o	o	x	x	o	o	x	x	x	o	x	x	x
10	GW125	o	o	o	o	o	o	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o
11	GW131	o	o	o	o	o	o	o	x	o	x	x	x	x	x	x	o	x	x
12	GW134	o	o	o	o	o	o	o	x	x	x	x	x	x	o	x	x	x	x
13	GW135	o	o	o	o	o	o	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
14	GW136	o	o	o	o	o	o	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
15	GW139	o	o	o	o	o	o	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
16	GW182	o	o	o	o	o	o	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
17	GW184	o	o	o	o	o	o	o	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
18	GW185	o	o	o	o	o	o	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o
19	GW186	o	o	o	o	o	o	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	o
20	GW191	o	o	o	o	o	o	o	x	x	x	x	o	o	x	x	x	o	x
21	GW199	o	o	o	o	o	o	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	x
22	GW202	o	o	o	o	o	o	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	x
23	GZK	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	x	x	x	x	x	x	x	x
24	GZK3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	x	x	x	o	x	x	x	x
25	GZK4	x	x	x	x	x	x	x	o	x	x	x	x	o	x	x	x	x	x
26	GZK5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	x	x	o	x	x	x	x	o
27	GZK7	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	x	x	x	o	x	x	x	x
28	GZK8	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	x	x	x	x	x
29	GZK9	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	x	x	x	x	x	x	x	x
30	GZK10	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	x	o	x	x	x	x	x	x
31	GZK11	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	x	x	x	x	x	x	x	x
32	GZK12	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

그림 84. 종내 교배조합으로부터 선발된 32계통에 대한 분자표지 분석 결과

No.	계통 번호	A14-520	A13-580	B09-450	B10-480	C01-950	C02-600	C02-400	C04-700	C05-600	C08-1200	C08-900	C20-980	D01-1200	D02-800	E10-500	Z07-1400	Z12-1000	B02-900	B09-950	
1	종지	o	x	x	x	x	x	x	o	x	o	o	x	x	x	x	x	x	x	x	o
2	그린프아	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
3	GW101	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
4	GW103	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
5	GW105	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
6	GW106	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
7	GW119	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
8	GW121	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
9	GW124	x	x	x	x	x	x	x	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
10	GW125	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	x	x	x	x
11	GW131	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
12	GW134	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	x	x	x	x	x	x
13	GW135	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
14	GW136	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
15	GW139	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
16	GW182	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
17	GW184	x	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
18	GW185	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	x	x	x
19	GW186	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	x	x	x
20	GW191	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	x	x	x	x	x	x	x
21	GW199	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
22	GW202	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
23	GZK	x	x	x	x	o	o	x	o	x	x	x	x	x	x	o	x	x	o	o	o
24	GZK3	x	x	x	x	x	x	x	o	x	x	x	x	x	o	x	x	x	o	o	o
25	GZK4	x	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	x	x	x	x	x	o	o	o
26	GZK5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	x	x	o	o	o
27	GZK7	x	x	o	o	x	x	o	x	o	x	o	x	o	x	x	x	x	o	o	o
28	GZK8	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	o	o
29	GZK9	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	o	o
30	GZK10	o	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	x	x	x	x	x	o	o	o
31	GZK11	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	o	o	o
32	GZK12	o	x	x	x	x	x	o	x	x	x	o	x	x	x	x	x	x	o	o	o

그림 85. 중간 교배조합으로부터 선발된 32계통에 대한 분자표지 분석 결과

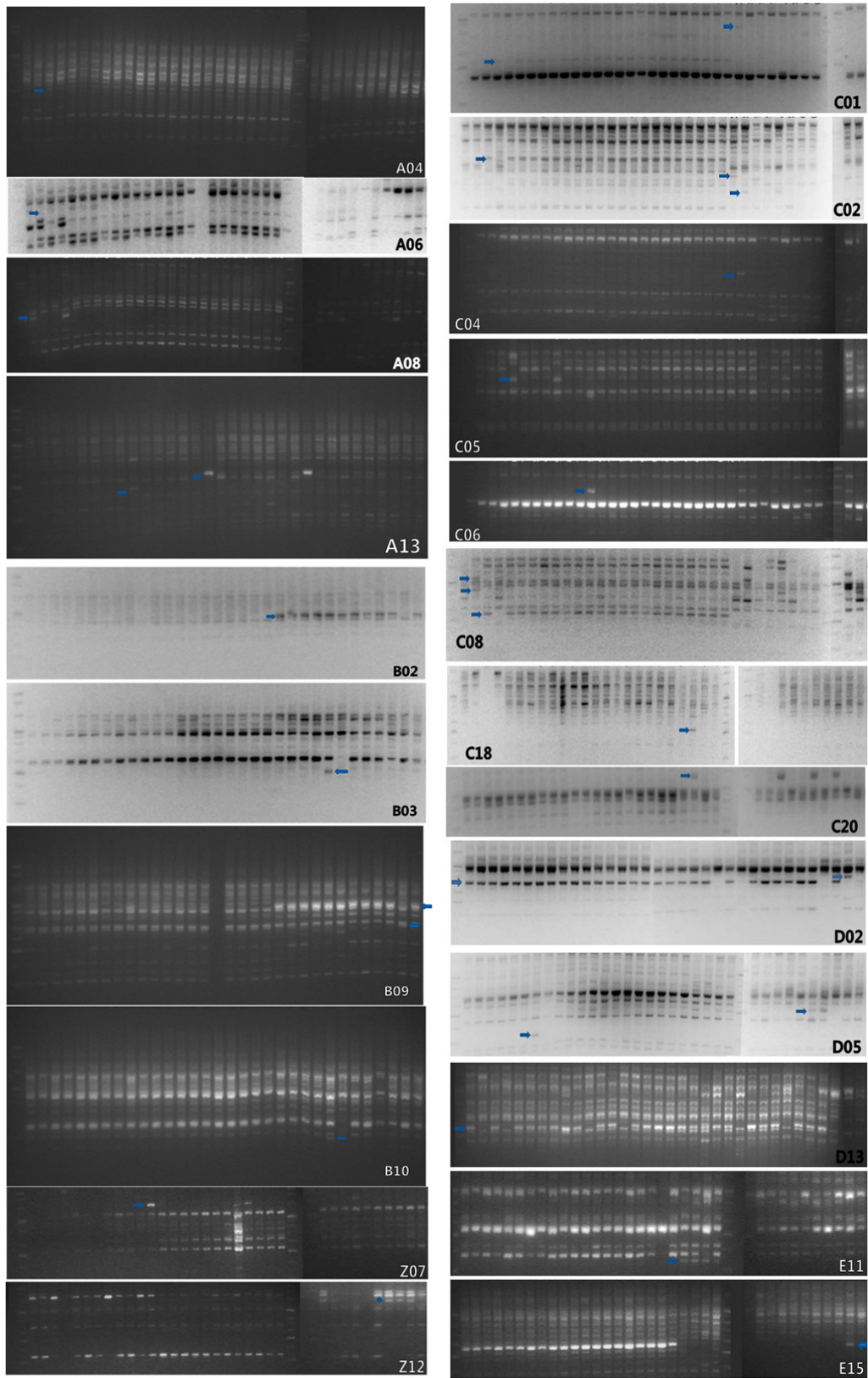


그림 86. 선발 3계통의 RAPD 분석 결과. 화살표는 다형성을 보이는 특이밴드를 나타냄

제 6 절. 환경내성 한국잔디 우수계통의 재배특성 검정 후 20계통 이상 특허 및 품종보호 출원

1. 우수계통 선발 및 재배특성검정

- 생육특성 검정 및 분자표지 분석 등의 결과를 종합하여 신규 품종 특성 요건을 구비한 계통을 품종 등록 신청하고자 하였음
- 육성품종인 그린조아와 더그린 및 1차년도 종내 교배 계통 선발 10라인, 2차년도 종간교배계통 20라인 총 32계통을 비교하였으며, 대조구로는 중지와 녹색포복경의 제니스를 사용함
- 시기별 엽록소함량을 조사하여 봄철 녹화가 일어나는 시기의 녹색정도와 휴면기에 들어가는 시기의 클로로필함량을 측정하여 녹색정도를 비교하였음
- 선발된 10계통의 4월 8일 봄철 녹화가 이루어지는 시기 엽록소함량을 비교한 결과 대조구 중지에 비해 녹색정도가 높은 것을 알 수 있었음 (그림 87)
- 9월11일부터 11월19일 까지 휴면기에 들어가는 시기의 엽록소함량을 비교한 결과 그린조아와 더그린의 휴면기 녹색정도가 가장 높았으면 다른 계통들 또한 대조구 중지에 비해 높은 엽록소함량을 보였음 (그림 88)

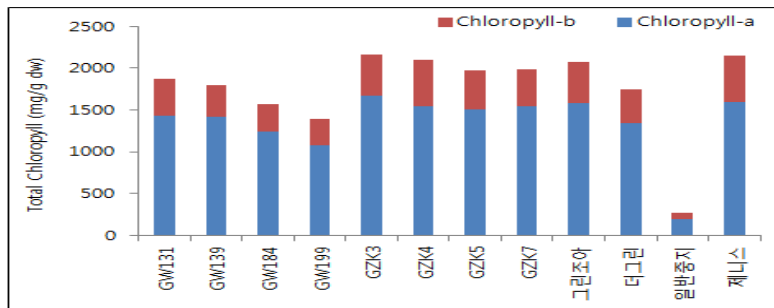


그림 87. 봄철 녹화가 이루어지는 시기의 녹색정도(14년4월8일)

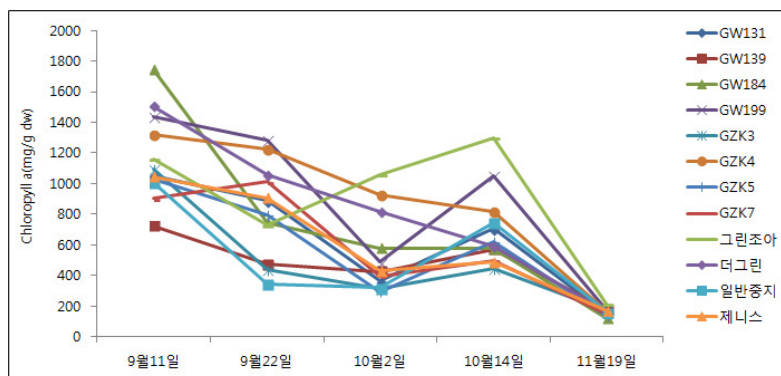


그림 88. 휴면기에 들어가는 시기의 녹색정도

- 육성계통을 실험구에 정식 한 후 시각적인 피복정도를 확인하여 피복정도가 우수한 1차년도 4계통, 2차년도 4계통을 비교함(그림 89, 90)
- 엽신너비를 비교하여 엽의 질감과 잔디조성이 섬세한 계통을 비교함(그림 91)
- 1차년도 종내 교배 계통 선발 10라인에서는 정단부의 4-5번째 절간마디를 채취하여 런너내 셀룰로오스 함량을 측정하여 포복경을 답압성을 비교해 보았음
- 결과를 종합하여 육성품종인 더그린조아와 더그린 및 1차년도 종내 교배 계통 선발 10라인 중 4계통(GZK3, GZK4, GZK5, GZK7)을 선발하였으며, 2차년도 중간교배계통 20라인 중 4계통(GW131, GW139, GW184, GW199)을 선발하였음

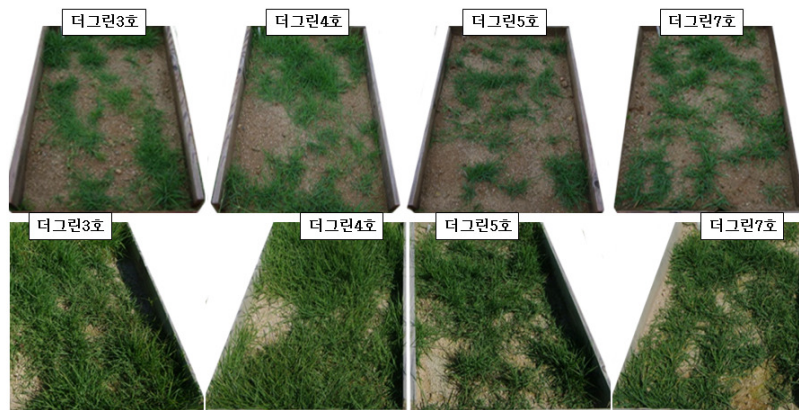


그림 89. 1차년도 정역교배를 통한 선발4계통의 피복정도(위;12년8월20일, 아래;13년9월24일)



그림 90. 2차년도 정역교배를 통한 선발4계통의 피복정도(위;14년4월초, 아래;14년9월말)

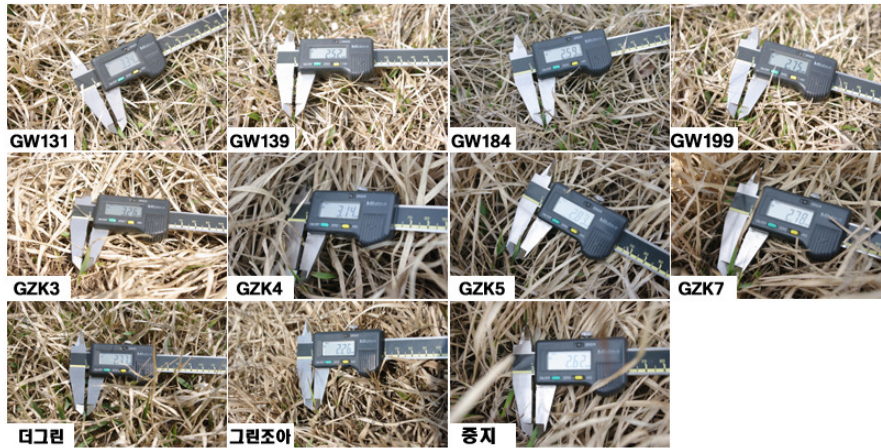


그림 91. 선발 10계통과 대조구의 엽신 너비 비교

2. 품종출원을 위한 특성조사

가. 특성조사 방법

- 특성 조사는 2013-2014년 포장 조건에서 수행하였으며, 육종 품종 그린조아, 더그린 및 우수계통 30라인과 대조구 한국형 들잔디(중지)를 포함하여 총 33종을 사용함
- 조사 항목으로는 피복율, 휴면기 녹색도, 봄철 녹색도, 엽 너비, 엽 길이, 엽 각도, 엽색, 잎의 털 유무, 포복경 색 등을 조사하였음
- 엽 너비와 엽 길이, 지상 포복경 마디 간 길이는 버니어 캘리퍼스를 이용하여 실측하였고, 식물체의 길이는 눈금자를 이용하여 실측하였음. 엽 각도는 줄기의 중심축으로부터 떨어진 정도를 각도기를 이용하여 실측하였음. 엽색은 진한연두색을 1, 탁한 녹갈색을 5로 1~5등급으로 나누어 가시적으로 평가하였으며, 잎의 털유무 조사는 드문형을 1, 약간 드문형 3, 중간형 5, 약간 조밀형 7, 조밀형 9로 나타내어 가시적으로 평가하였음.
- 통계분석은 우수계통과 대조품종 2그룹에 대한 T-검정을 이용하여 1% 유의수준에서의 차이를 검정하였음
- 품종보호 출원을 위한 32계통을 선발하였으며 신품중심사를 위한 특성조사요령에 맞추어 조사하였음 (그림 92)
- 구별성 및 안정성 평가를 위한 조사 개체수는 적어도 20주의 개체에서 조사함
- 재배시험 실시 기간 동안 매년 제출할 충실종자 400립 또는 영양 번식체 6주(보관용30주) 준비함

○ 대조구와 선발계통의 형질조사데이터를 T-검정으로 분석한 결과, 각 계통마다 유의차가 인정되는 형질을 다수 보유하고 있음(표 17)

표 15. 1차년도 종내교배 우수선발 10개 라인의 형태적 특성

번호	선출제 길이	어린식물 높기(미터)	엽초: 길이	엽초: 폭	부엽폭: 길이	부엽폭: 너비	엽신: 길이	엽신: 너비	엽신: 폭	엽신: 기	기엽: 길이	기엽: 너비	화서: 길이	화서: 너비	이삭: 길이	이삭: 수	이삭: 생숙한 이삭의 비	이삭: 미숙한 이삭의 비	형질: 수	화: 길이	화: 너비	수술면: 길이	화술: 길이	자방: 길이	열매: 형태		
GZK1	115.47	작간취어	32.30	어두운회	조밀	31.82	3.12	표린노랑	표린노랑	표린노랑	52.00	55.41	2.98	4.00	중간	38.88	43.55	표린노랑	표린노랑	표린노랑	3.80	1.54	0.80	1.74	굵음	3.15	만곡선형
GZK3	92.85	작간취어	29.32	회황색	표밀	32.98	3.28	표린노랑	표린노랑	표린노랑	58.50	49.09	2.58	5.00	중간	44.88	45.40	표린노랑	표린노랑	표린노랑	13.45	1.50	0.50	1.80	굵음	2.25	만곡선형
GZK4	80.93	작간취어	21.82	연한노랑	표밀	51.03	3.14	표린노랑	표린노랑	표린노랑	88.00	33.75	2.10	3.00	중간	47.34	49.85	표린노랑	표린노랑	표린노랑	23.20	1.80	0.54	1.80	굵음	2.35	표피형
GZK5	89.18	일차엽	34.25	연한노랑	표밀	32.91	2.82	표린노랑	표린노랑	표린노랑	78.50	51.04	2.48	4.00	중간	40.14	49.25	표린노랑	표린노랑	표린노랑	3.85	1.58	0.81	1.70	굵음	3.22	만곡선형
GZK7	75.40	작간취어	24.95	어두운회	조밀	22.84	2.78	표린노랑	표린노랑	표린노랑	58.50	38.05	2.38	5.00	중간	42.72	47.70	표린노랑	표린노랑	표린노랑	2.95	1.85	0.52	1.80	굵음	3.11	표피형
GZK9	70.72	작간취어	23.41	어두운회	조밀	39.82	2.84	표린노랑	표린노랑	표린노랑	88.50	30.41	2.44	3.00	중간	48.43	48.85	표린노랑	표린노랑	표린노랑	12.70	1.50	0.80	1.80	굵음	2.85	만곡선형
GZK9	47.72	일차엽	19.54	연한노랑	조밀	43.39	2.85	표린노랑	표린노랑	표린노랑	55.00	27.54	2.28	4.00	중간	42.15	47.95	표린노랑	표린노랑	표린노랑	9.55	1.84	0.45	2.38	중간	2.84	만곡선형
GZK10	89.21	일차엽	24.43	연한노랑	표밀	22.18	2.27	표린노랑	표린노랑	표린노랑	80.50	40.77	2.42	5.00	중간	42.21	34.50	표린노랑	표린노랑	표린노랑	2.05	1.54	0.58	2.00	굵음	2.71	만곡선형
GZK11	58.37	작간취어	22.92	연한노랑	표밀	20.78	1.88	표린노랑	표린노랑	표린노랑	80.50	28.99	2.08	3.00	중간	40.28	42.80	표린노랑	표린노랑	표린노랑	4.20	1.70	0.57	2.20	굵음	2.83	만곡선형
GZK12	83.38	일차엽	18.91	연한노랑	중간	20.59	2.07	표린노랑	표린노랑	표린노랑	58.00	32.48	2.04	4.00	중간	34.59	39.20	표린노랑	표린노랑	표린노랑	5.10	2.01	0.84	2.89	굵음	2.21	만곡선형
그린포아	85.83	일차엽	84.14	연한노랑	작간부	17.73	2.28	표린노랑	표린노랑	표린노랑	48.50	33.29	3.91	5.00	중간	37.91	38.10	표린노랑	표린노랑	표린노랑	3.90	1.53	0.75	2.84	굵음	1.70	표피형
원주형	70.48	작간취어	21.91	연한노랑	표밀	35.80	2.82	표린노랑	표린노랑	표린노랑	54.00	37.19	4.07	3.00	중간	41.94	48.35	표린노랑	표린노랑	표린노랑	4.85	1.78	0.47	2.02	중간	2.33	만곡선형
더그린	81.12	작간취어	18.24	연한노랑	표밀	39.84	2.77	표린노랑	표린노랑	표린노랑	50.25	34.01	3.51	4.00	중간	35.79	49.25	표린노랑	표린노랑	표린노랑	6.20	1.54	0.80	1.88	중간	2.20	만곡선형

표 16. 2차년도 중간교배 우수선발 20개 라인의 형태적 특성

번호	선출제 길이	어린식물 높기(미터)	엽초: 길이	엽초: 폭	부엽폭: 길이	부엽폭: 너비	엽신: 길이	엽신: 너비	엽신: 폭	엽신: 기	기엽: 길이	기엽: 너비	화서: 길이	화서: 너비	이삭: 길이	이삭: 수	이삭: 생숙한 이삭의 비	이삭: 미숙한 이삭의 비	형질: 수	화: 길이	화: 너비	수술면: 길이	화술: 길이	자방: 길이	열매: 형태		
GW101	41.98	일차엽	12.21	어두운회	조밀	38.09	2.77	표린노랑	표린노랑	표린노랑	80.50	31.84	4.49	3.00	중간	37.53	48.25	표린노랑	표린노랑	표린노랑	10.90	1.87	0.74	1.89	중간	1.98	만곡선형
GW103	48.91	일차엽	11.52	어두운회	조밀	31.32	3.00	표린노랑	표린노랑	표린노랑	52.50	32.04	4.09	4.00	중간	31.52	42.85	표린노랑	표린노랑	표린노랑	10.05	1.88	0.89	2.43	굵음	2.13	표피형
GW105	85.49	일차엽	22.34	어두운회	조밀	35.01	2.75	표린노랑	표린노랑	표린노랑	87.50	48.58	5.15	5.00	중간	37.81	48.70	표린노랑	표린노랑	표린노랑	5.70	1.88	0.31	0.90	중간	2.34	만곡선형
GW108	85.47	일차엽	22.99	어두운회	조밀	35.01	2.75	표린노랑	표린노랑	표린노랑	81.50	45.20	3.71	3.00	중간	37.81	48.70	표린노랑	표린노랑	표린노랑	5.70	1.45	0.80	2.80	중간	2.34	만곡선형
GW119	47.47	일차엽	12.81	어두운회	중간	28.84	2.82	표린노랑	표린노랑	표린노랑	85.00	27.88	3.71	4.00	중간	38.88	49.10	표린노랑	표린노랑	표린노랑	18.20	1.90	0.84	2.83	중간	2.18	만곡선형
GW121	44.00	일차엽	13.57	어두운회	조밀	37.14	3.79	표린노랑	표린노랑	표린노랑	88.00	31.21	3.51	5.00	중간	44.11	44.25	표린노랑	표린노랑	표린노랑	9.00	2.41	0.75	3.22	굵음	2.52	표피형
GW124	45.75	일차엽	15.01	연한노랑	표밀	31.58	3.10	표린노랑	표린노랑	표린노랑	57.00	32.78	3.53	3.00	중간	39.30	43.50	표린노랑	표린노랑	표린노랑	7.30	1.50	0.50	2.00	중간	3.31	만곡선형
GW125	47.85	일차엽	13.54	회황색	조밀	34.32	2.37	표린노랑	표린노랑	표린노랑	83.50	31.78	3.88	4.00	중간	38.58	48.15	표린노랑	표린노랑	표린노랑	11.00	1.80	0.80	2.00	중간	2.23	만곡선형
GW131	44.27	일차엽	10.92	연한노랑	조밀	31.15	3.34	표린노랑	표린노랑	표린노랑	57.00	28.87	3.54	5.00	중간	37.34	50.20	표린노랑	표린노랑	표린노랑	4.95	1.49	0.77	2.90	중간	2.38	만곡선형
GW134	52.09	작간취어	15.54	연한노랑	조밀	31.15	3.34	표린노랑	표린노랑	표린노랑	52.00	33.93	2.94	3.00	중간	37.34	50.20	표린노랑	표린노랑	표린노랑	4.95	1.91	0.59	2.39	중간	2.38	만곡선형
GW135	37.88	일차엽	11.11	회황색	중간	33.37	2.73	표린노랑	표린노랑	표린노랑	83.50	28.28	2.82	4.00	중간	41.53	48.05	표린노랑	표린노랑	표린노랑	8.80	1.84	0.54	1.54	굵음	2.32	만곡선형
GW138	489.73	작간취어	812.25	회황색	조밀	33.13	2.88	표린노랑	표린노랑	표린노랑	88.00	33.34	2.94	5.00	중간	40.30	38.95	표린노랑	표린노랑	표린노랑	5.48	2.00	0.83	2.58	굵음	2.05	만곡선형
GW139	43.75	일차엽	12.82	연한노랑	조밀	24.57	2.51	표린노랑	표린노랑	표린노랑	59.50	30.95	2.55	4.50	중간	35.34	41.45	표린노랑	표린노랑	표린노랑	8.35	1.88	0.72	3.88	굵음	2.27	만곡선형
GW182	85.58	일차엽	19.23	연한노랑	표밀	24.57	2.51	표린노랑	표린노랑	표린노랑	84.50	43.50	3.18	4.00	중간	35.34	41.45	표린노랑	표린노랑	표린노랑	8.35	1.21	0.74	2.09	굵음	2.27	만곡선형
GW184	50.30	일차엽	18.27	회황색	중간	29.91	2.59	표린노랑	표린노랑	표린노랑	59.50	28.09	2.98	5.00	중간	31.48	34.25	표린노랑	표린노랑	표린노랑	8.85	1.74	0.80	2.84	중간	2.03	만곡선형
GW185	82.55	일차엽	14.80	연한노랑	표밀	25.08	2.19	표린노랑	표린노랑	표린노랑	89.00	39.95	3.75	3.00	중간	30.70	43.70	표린노랑	표린노랑	표린노랑	8.15	1.91	0.87	3.25	중간	2.10	만곡선형
GW188	73.55	일차엽	21.10	연한노랑	표밀	25.08	2.19	표린노랑	표린노랑	표린노랑	82.00	43.40	3.95	4.00	중간	30.70	43.70	표린노랑	표린노랑	표린노랑	8.15	1.70	0.70	3.00	중간	2.10	만곡선형
GW191	45.35	일차엽	7.15	회황색	표밀	31.09	2.78	표린노랑	표린노랑	표린노랑	81.00	33.95	3.85	5.00	중간	38.02	44.90	표린노랑	표린노랑	표린노랑	10.75	2.07	0.88	3.48	굵음	1.98	만곡선형
GW199	32.20	취어	8.48	연한노랑	표밀	35.74	2.75	표린노랑	표린노랑	표린노랑	34.75	23.90	2.70	3.80	중간	35.85	37.45	표린노랑	표린노랑	표린노랑	8.80	1.78	0.53	2.41	굵음	2.11	만곡선형
GW202	85.00	일차엽	10.85	회황색	표밀	28.03	1.79	표린노랑	표린노랑	표린노랑	71.75	40.85	3.88	3.00	중간	35.22	52.45	표린노랑	표린노랑	표린노랑	8.55	1.14	0.58	1.70	굵음	2.02	표피형
그린포아	85.83	일차엽	84.14	연한노랑	작간부	17.73	2.28	표린노랑	표린노랑	표린노랑	48.50	33.29	3.91	5.00	중간	37.91	38.10	표린노랑	표린노랑	표린노랑	3.90	1.53	0.75	2.84	굵음	1.70	표피형
원주형	70.48	작간취어	21.91	연한노랑	표밀	35.80	2.82	표린노랑	표린노랑	표린노랑	54.00	37.19	4.07	3.00	중간	41.94	48.35	표린노랑	표린노랑	표린노랑	4.85	1.78	0.47	2.02	중간	2.33	만곡선형
더그린	81.12	작간취어	18.24	연한노랑	표밀	39.84	2.77	표린노랑	표린노랑	표린노랑	50.25	34.01	3.51	4.00	중간	35.79	49.25	표린노랑	표린노랑	표린노랑	6.20	1.54	0.80	1.88	중간	2.20	만곡선형

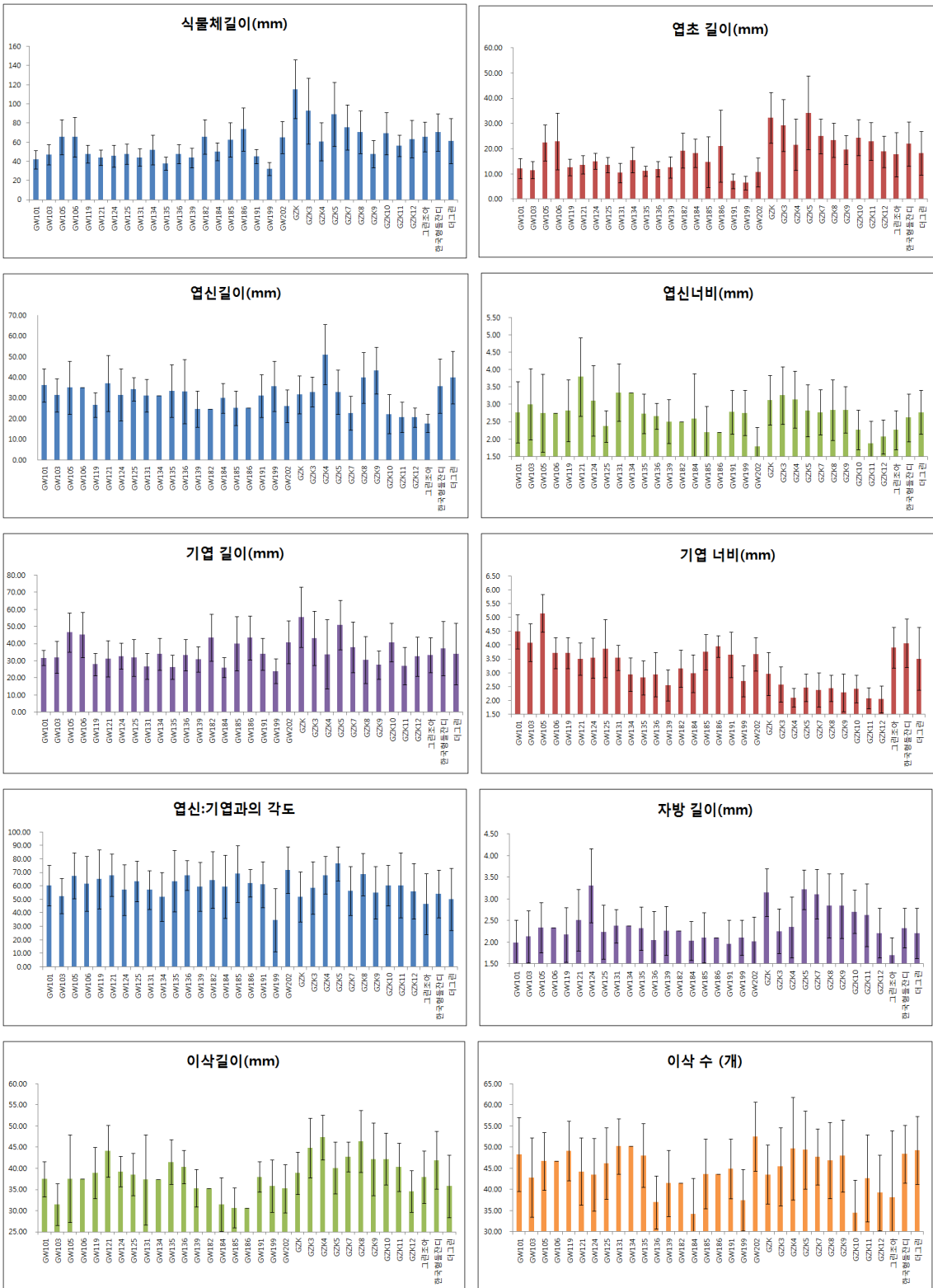


그림 93. 우수 선발 33개 라인 형태적 특성 비교

표 17. 선발계통 형질조사데이터의 T-검정으로 분석 결과.

번호	형질	분리세대 선발												F1 잡종 선발																		
		GZ K	GZ K03	GZ K04	GZ K05	GZ K06	GZ K07	GZ K08	GZ K09	GZ K10	GZ K11	GZ K12	GW 101	GW 103	GW 105	GW 106	GW 119	GW 121	GW 124	GW 125	GW 131	GW 134	GW 135	GW 136	GW 139	GW 182	GW 184	GW 185	GW 186	GW 191	GW 199	GW 202
1	식물체: 길이	o	O	X	O	X	X	x	o	x	x	x	o	o	x	x	o	o	o	o	O	o	o	o	O	x	O	x	x	o	O	x
2	엽초: 길이	o	O	X	O	X	O	x	x	o	x	x	o	o	x	x	x	x	x	x	O	x	o	o	X	x	X	x	x	o	O	o
3	엽신: 길이	o	O	O	O	O	X	o	o	x	x	x	o	o	o	o	o	o	o	O	o	o	o	O	o	O	o	o	o	O	o	
4	엽신: 너비	o	O	O	O	O	O	o	o	x	x	x	x	o	x	x	x	o	o	x	O	x	o	o	X	x	X	x	x	o	O	o
5	엽신: 기엽과의 각도	x	X	X	O	X	O	x	x	o	o	o	x	x	x	x	x	x	x	O	o	x	o	O	o	O	x	x	x	O	x	
6	기엽: 길이	o	X	X	O	X	X	x	x	x	x	x	x	o	o	x	x	x	x	X	x	o	x	X	o	O	x	o	x	O	x	
7	기엽: 너비	o	O	O	O	X	O	o	o	o	o	o	x	o	x	x	x	x	x	X	o	o	o	O	o	O	o	x	x	O	x	
8	이삭: 길이	x	O	O	X	X	O	o	x	x	x	x	o	x	x	x	o	x	x	X	x	x	x	X	x	O	o	x	x	X	x	
9	이삭: 수	x	X	O	O	O	O	x	o	x	x	x	o	x	x	x	o	x	x	O	x	o	x	X	x	X	x	x	x	X	o	
10	자방: 길이	o	O	O	O	O	O	o	o	o	o	o	x	o	o	x	o	o	o	O	x	o	x	O	x	O	o	x	x	O	x	
	1% 유의수준에서 차이가 인정되는 형질의 개수	7	7	6	9	4	7	5	6	4	3	3	5	6	4	2	4	5	4	3	7	4	8	6	5	4	7	4	2	4	8	4

3. 우수계통 특허 및 품종보호 출원

가. 그린조아 선발품종의 육성 과정

- (1) 2010년 들잔디를 자가 수정하여 획득한 종자를 기내에서 배양 중에 녹색 포복경 변형체를 발견하여 기내에서 나타난 녹색 포복경 변형체를 “그린조아” 로 명명함 (그림 94)
- (2) 그린조아는 들잔디의 조직배양 과정에서 나타난 체세포 변형체(somaclonal variant)이며, 지상부 포복경이 녹색이고 포복성(groundling)이 높으며 마디가 짧은 특징을 가짐 (그림 95)
- (3) 그린조아를 순화 후 증식하여 형태적 변이를 조사함 (표 18)
- (4) 그린조아 자가수정 F1개체를 3000립 분리 육종하여 발아된 그린조아 F1개체 중 붉은색 포복경을 갖는 개체는 2개체로 0.1% 포복경 회귀성을 보였음
- (5) 품종비교를 위해 기존품종과 비교 재배시험 수행한 결과 대조구 중지에 비해 런너 절간의 길이가 짧고 밀도가 높으며 포복성이 뛰어나고 뿌리가 발달되어 있음 또한 녹색기간이 길고 휴면기에 들어갈 때 엽색의 차이를 보임
- (6) 포복경색, 마디길이, 휴면기엽색의 차이, 내건성, 엽신 길이와 너비의 차이 등에서 대조품종과 구별성이 있는 그린조아를 신품종으로 등록예정임
- (7) 출원번호는 2015-6번으로 출원일자는 2015. 03. 16일 (그림 96)

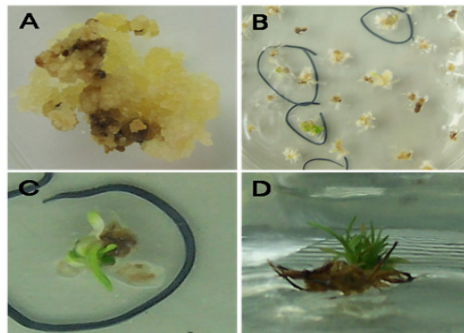


그림 94. 그린조아의 육성과정. A: Embryogenic callus, B; Shoot induction, C and D; Shoot growth.

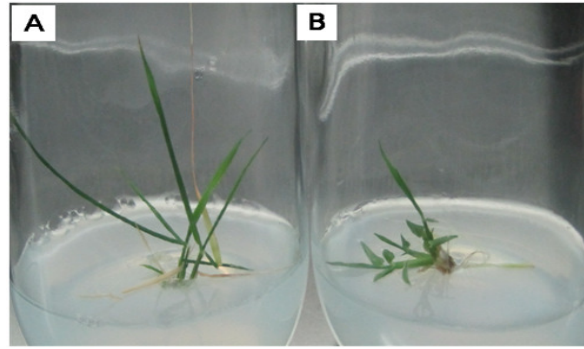


그림 95. 그린조아 포복성 (groundling) A; 들잔디, B; 그린조아.

제목 품종보호 출원번호 알림(잔디-그린조아)

1. 품종심사과 - 1529(2015. 3. 17)호와 관련됩니다.

2. 귀하의 출원 품종에 대하여 「식물신품종 보호법」 제42조의 규정에 의거, 품종보호출원 등록부의 등록 출원일이 확정하여 알려드립니다.

- 품종보호 출원번호 및 출원 일자 내역 -

출원번호	출원일자	품종명칭	학명 및 일반명
2015-6	2015.03.16	그린조아 (Green Zoa)	잔디 <i>Zoysia japonica</i> Steud.

끝.

국립산림품종관리센터장



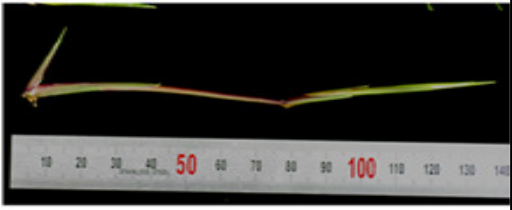

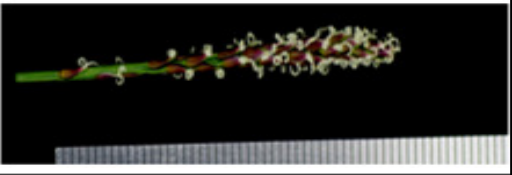








그림 96. 그린조아 품종보호 출원번호

표 18. 그린조아와 대조품종의 형태적 비교

	출원품종(그린조아)	대조품종(일반중지)
런너		
화서		
뿌리		
포복경		
녹색기간		

나. 더그린 선발품종의 육종과정

- (1) 2010년 한국형들잔디(중지)를 모본, 부분을 그린조아로 정역 교배하여 종자를 채종함
- (2) 채종한 F1종자를 육성포장에 파종하여 런너로 증식한 후 F1개체를 자가수정하여 F2를 5760립 채종함 (그림 97)

- (3) 수확한 F2종자를 상토에 파종하여 받아시킨 후, 육성포장에 정식하여 재배하면서 녹색 포복경 개체를 선발하였고 선발된 녹색 포복경 개체는 선발포장에서 분리하여 증식하고 녹색기간 및 환경내성과 관련된 생육 특성을 조사함 (표 19)
- (4) 생육포장에서 총 18개체를 선발하였으나 8개체 고사하여 녹색 포복경을 갖는 10개체를 육성하였으며, 선발 10개체 중 시각적으로 가장 진한 녹색을 보이는 GZK06을 ‘더그린’으로 명명함 (그림 98)
- (5) 녹색 포복경을 가지며 포복성이 강하고 엽신 길이과 너비 등에서 대조품종과 구별성이 있는 더그린을 신품종으로 등록하게 됨 (그림 99, 100)
- (6) 현재 품종보호출원을 위해 서류심사 중에 있음



그림 97. 더그린의 계통도

표 19. 그린조아와 중지 F1 종자를 이용한 녹색포복경 선발후보 개체

선발번호	포복경색	비고
GZK02	녹색	고사
GZK03	녹색	
GZK04	녹색	
GZK05	녹색	
GZK06	녹색	
GZK07	녹색	
GZK08	녹색	
GZK09	녹색	고사
GZK10	녹색	
GZK11	녹색	
GZK12	녹색	
GZK13	녹색	고사
GZK14	녹색	고사
GZK15	녹색	고사
GZK16	녹색	고사
GZK17	녹색	고사
GZK18	녹색	고사
GZK19	녹색	
계	총 18개체 선발 중 10개체 육성	

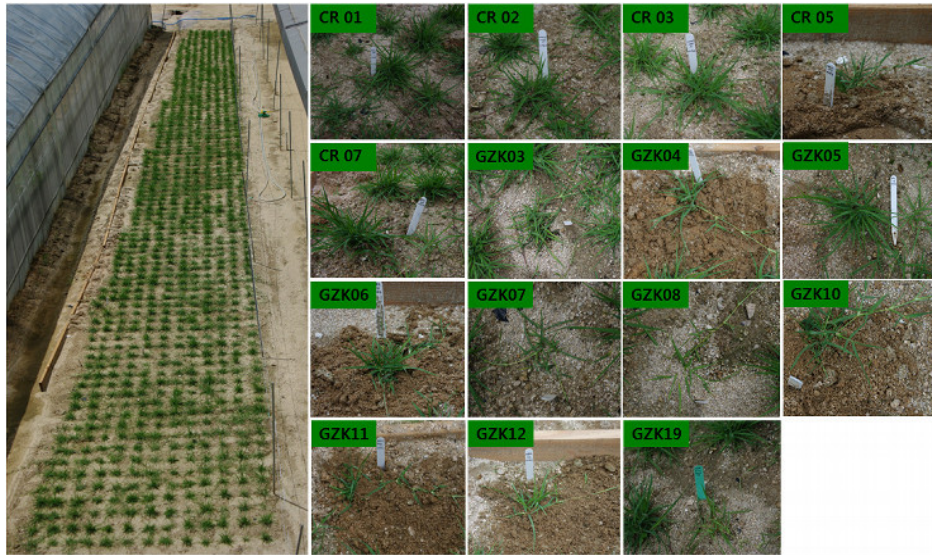


그림 98. F2개체로부터 녹색포복경 개체 선발

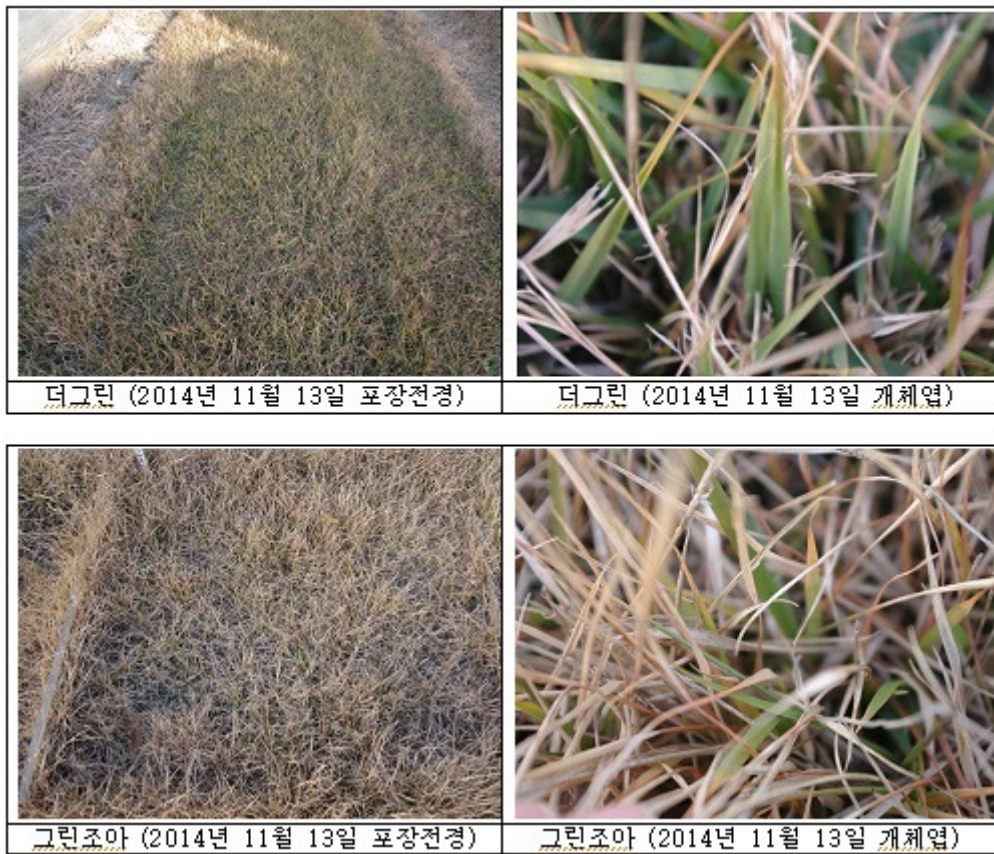


그림 99. 더그린과 그린조아 녹색엽 비교



그림 100. 더그린과 그린조아, 중지 엽의 특성 비교

다. GZK라인 선발품종의 육종과정

- (1) 2010년 한국형 들잔디(중지)를 모본으로 부분을 그린조아로 정역 교배하여 종자 채종함
- (2) 채종한 F1종자를 육성포장에 과종하여 런너로 증식한 후 F1개체를 자가 수정하여 F2를 5760립 채종함
- (3) 수확한 F2종자를 상토에 과종하여 발아시킨 후, 육성포장에 정식하여 재배하면서 녹색 포복경 개체를 선발하였고 선발된 녹색 포복경 개체는 선발포장에서 분리하여 증식하고 녹색기간 및 환경내성과 관련된 생육 특성을 조사함
- (4) 생육포장에서 총 18개체를 선발하였으나 8개체 고사하여 녹색포 복경을 갖는 10개체를 육성하였으며, 선발 10개체 중 우수 4계통을 선발함
- (5) GZK3은 봄철 조기녹화가 이루어져 녹색기간이 길며 식물체길이, 엽초길이, 엽신 길이와 너비 등 대조품종과 비교하여 7개 항목에서 1% 유의수준에서 차이가 인정되었음, GZK4는 봄철 조기녹화가 빠르면 가을 휴면기에 들어가는 시기가 늦어 녹색기간이 길며 대조구와 비교하여 엽신 길이와 너비, 이삭길이와 수 등 6개 항목에서 1% 유의수준에서 차이가 인정되었음, GZK5는 봄철 조기녹화가 빠르고 런너가 단단하며 내답압성이 높다. 대조품종과 비교하여 기엽과의 각도, 기엽의 길이와 너비, 엽신 길이 등 9개 항목에서 1% 유의수준에서 차이가 인정됨, GZK7은 봄철 조기녹화가 이루어져 녹색기간이 길고 대조품종과 비교하여 엽초길이, 엽신 길이, 엽신과의 각도 등 7개 항목에서 1% 유의수준에서 차이가 인정됨
- (5) 녹색 포복경을 가지며 포복성이 강하고 엽신 길이와 너비 등에서 대조품종과 구별성이 있는 GZK3를 “더그린3호”, GZK4를 “더그린4호”, GZK5을 “더그린5호”, GZK7을 “더그린 7호”로 명명하며 신품종으로 출원하게 됨 (그림 101) (그림 102)

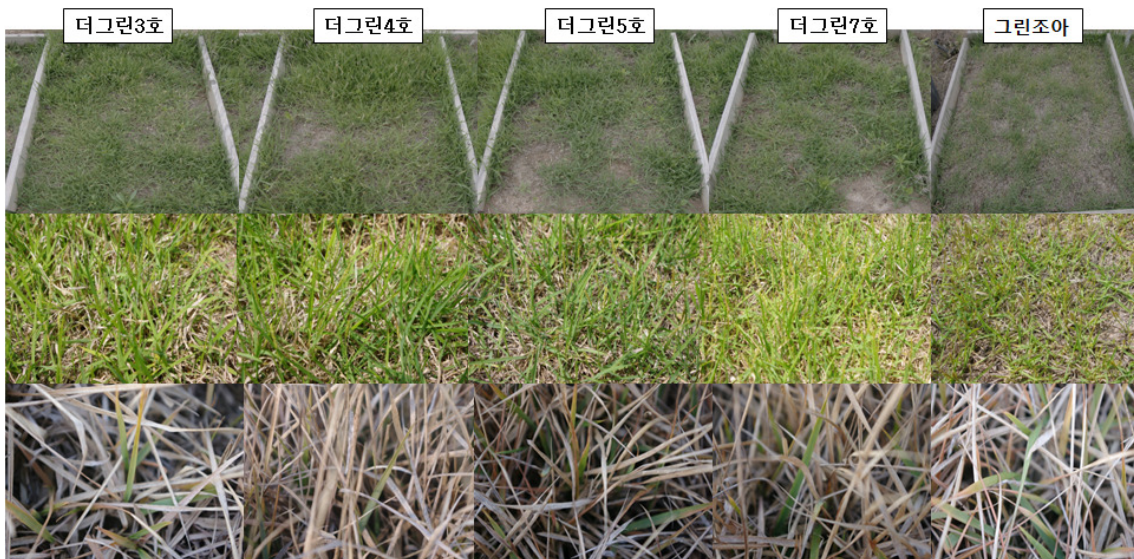


그림 101. 품종출원 GZK라인 4계통 생육비교

제목 품종보호 출원번호 알림(잔디-더그린3호외 3건)

1. 품종심사과 - 2641~2644(2015. 5. 6)호와 관련됩니다.

2. 귀하의 출원 품종에 대하여 「식물신품종 보호법」 제32조 제1항 제1호 및 시행규칙 제42조의 규정에 의거, 품종보호출원 등록부의 등록 출원번호 및 품종명칭이 확정하여 알려드립니다.

- 품종보호 출원번호 및 출원 일자 내역 -

출원번호	출원일자	품종명칭	학명 및 일반명
2015-7	2015.4.22	더그린3호(Thegreen3ho)	<i>Zoysia japonica</i> Steud./잔디
2015-8	2015.4.22	더그린4호(Thegreen4ho)	<i>Zoysia japonica</i> Steud./잔디
2015-9	2015.4.22	더그린5호(Thegreen5ho)	<i>Zoysia japonica</i> Steud./잔디
2015-10	2015.4.22	더그린7호(Thegreen7ho)	<i>Zoysia japonica</i> Steud./잔디

끝.

국립산림품종관리센터장



그림 102. 더그린3, 4, 5, 7호의 품종출원 완료

라. GW라인 선발품종의 육종과정

- (1) 2012년 계통 육성을 위해 그린조아와 한국형 들잔디(중지)를 중간정역교배를 하였고 수확한 종자를 파종하여 받아시킨 후, 생육특성을 조사함(표 20, 21)
- (2) 총 44개체를 선발하였으나 고사된 2개체를 제외하고 우수형질을 가진 녹색포복경 20개체를 선발함
- (3) 최종 선발된 녹색 포복경 20개체는 선발포장에서 분리하여 증식하고 형태적 특성을 조사한 결과 우수 4계통을 선발함
- (4) GW131은 녹색 포복경을 가지며 포복성이 강하여 피복력이 우수하다 또한 봄철 조기녹화가 이루어져 녹색기간이 길다 대조품종과 비교하여 식물체 길이, 엽신 길이와 너비, 이삭 수 등 7개 항목에서 1% 유의수준에서의 차이가 인정되었음, GW139은 녹색 포복경을 가지며 포복성이 강하고 피복력도 우수하다 또한 봄철 조기녹화가 이루어져 녹색기간이 길고 엽신 너비가 좁아 잔디질감이 부드러우며 잔디 조성이 섬세하다 대조품종과 비교하

여 엽신 길이, 엽신과의 각도, 자방길이 등 5개의 항목에서 1% 유의수준에서 차이가 인정됨, GW184는 녹색 포복경을 가지며 포복성이 강하고 피복력이 우수하다 또한 엽의 너비가 좁아 질감이 부드러우며 잔디조성이 섬세한 특징을 가짐, 대조품종과 비교하여 이삭길이, 자방길이, 엽신 길이 등 7개 항목에서 1% 유의수준에서 차이가 인정됨, GW199은 녹색 포복경을 가지며 포복성이 강하고 피복력도 우수하다 또한 가을철 휴면기에 들어가는 시기가 늦어 녹색기간이 길고 대조품종과 비교하여 식물체 길이, 엽신 길이과 너비 등에서 7개 항목에서 1% 유의수준에서의 차이가 인정됨

- (5) 녹색 포복경을 가지며 포복성이 강하고 엽신길이과 너비 등에서 대조품종과 구별성이 있는 GW131을 “참그린131”, GW139를 “참그린139”, GW184를 “참그린184”, GW199를 “참그린199”로 명명하며 신품종으로 출원하게 됨 (그림 103)
- (6) 현재 품종보호출원을 위해 서류심사중에 있음

표 20. 그린조아와 한국형들잔디 교배조합 및 F1 종자 채종

교배계통	채종갯수	총립수	총생체중	평균립수	평균생체중
그린조아 X 한국형들잔디(중지)	58	2772	2	48	0.03
한국형들잔디(중지) X 그린조아	49	1877	1	38	0.02

표 21. 최종선발 4개 라인의 생육특성조사 결과

선발번호	발아율(%)	엽길이(mm)	엽폭(mm)	잎색(G)	포복경색	포복경수	녹병발생
GW131	10	48.5	3.4	194	녹색	1	무
GW139	12.5	40.29	3.3	190	녹색	0	무
GW184	20	27.98	3	184	녹색	0	무
GW199	7.5	50.77	4.8	207	녹색	1	무

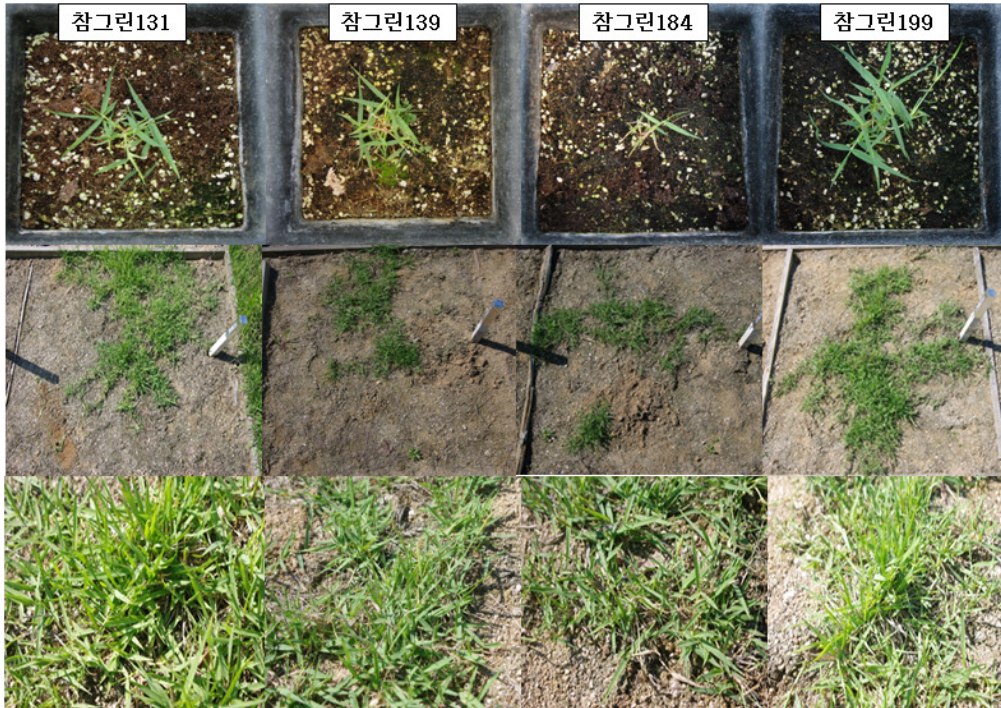


그림 103. GW라인 최종선발 4계통 생육사진

제목 품종보호 출원번호 알림(잔디-더그린외 4건)

1. 품종심사과 - 3437-3441(2015. 6. 5.)호와 관련됩니다.

2. 귀하의 출원 품종에 대하여 「식물신품종 보호법」 제32조 제1항 제1호 및 시행규칙 제42조의 규정에 의거, 품종보호출원 등록부의 등록 출원번호 및 품종명칭과 동일하게 같이 확정하여 알려드립니다.

- 품종보호 출원번호 및 출원 일자 내역 -

출원번호	출원일자	품종명칭	학명 및 일반명
2015-11	2015.5.19	더그린(Thegreen)	<i>Zoysia japonica</i> Steud./잔디
2015-12	2015.5.19	참그린131(chamgreen131)	<i>Zoysia japonica</i> Steud./잔디
2015-13	2015.5.19	참그린139(chamgreen139)	<i>Zoysia japonica</i> Steud./잔디
2015-14	2015.5.19	참그린184(chamgreen184)	<i>Zoysia japonica</i> Steud./잔디
2015-15	2015.5.19	참그린199(chamgreen199)	<i>Zoysia japonica</i> Steud./잔디

끝.

국립산림품종관리센터

그림 104. 더그린 및 참그린131, 139, 184, 199호의 품종출원 완료

제 1 절 포복경 착색 변이체 및 야생형 잔디의 전사체 분석

1. 한국형 잔디에서의 전사체 분석

- 장일조건에서 자란 안양중지(AJ)와 그린조아(GZ) 두 잔디 품종의 숙성된 이삭으로부터 total RNA를 분리하였음
- QC 분석을 통하여 total RNA의 quality를 확인하였음
- Illumina사의 Hi-seq 2000 시퀀서를 이용하여 RNA-sequencing을 수행하였음
- 총 44Gb의 101bp paired-end reads를 확보함

표 1. 잔디의 전사체 분석 전처리 결과

	안양중지(AJ)	그린조아(GZ)
총 raw read 수	22,228,361,386	22,724,700,838
필터링 후 high quality read 수	19,212,882,206	19,253,496,909
assembly에 사용된 평균 read 길이 (bp)	96.4	96.3

- RNA-seq을 통해 확보한 read는 preprocessing 과정을 거쳐 안양중지와 그린조아 각각 19.2Gb의 high quality read를 확보함 (표 1)
- Preprocessing 과정은 quality filtering과 trimming 등의 과정을 수행하여 낮은 quality의 sequence 및 read를 제거하여 향후 진행되는 assembly 과정에서의 효율을 높임 (그림 1)
- 특히 Illumina sequencer를 사용하여 얻은 raw-read에 특화된 프로그램을 이용하여 전체적인 퀄리티를 높였음

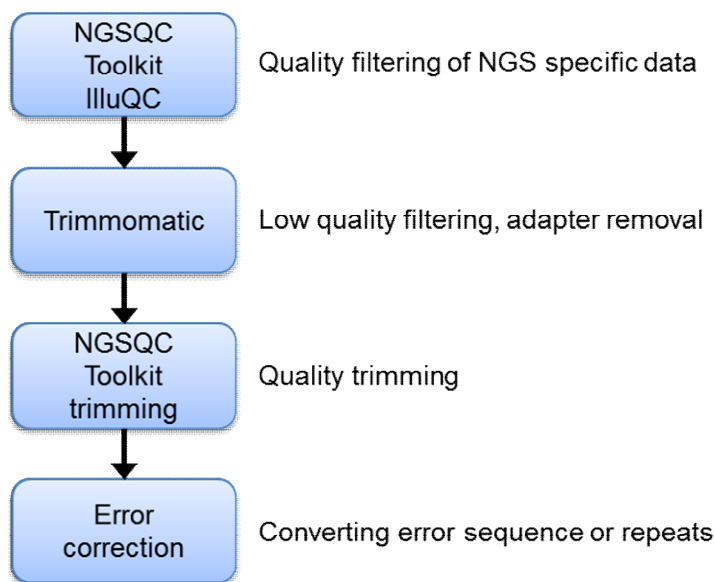


그림 1. preprocessing 과정

- Preprocessing 결과 안양중지와 그린조아의 raw read 들의 전체적인 quality가 향상됨 (그림 2, 3)
- 특히 Q20 이하의 quality를 가지는 sequence를 제거하고 assembly의 정확성을 높이기 위한 high-quality reads를 확보함

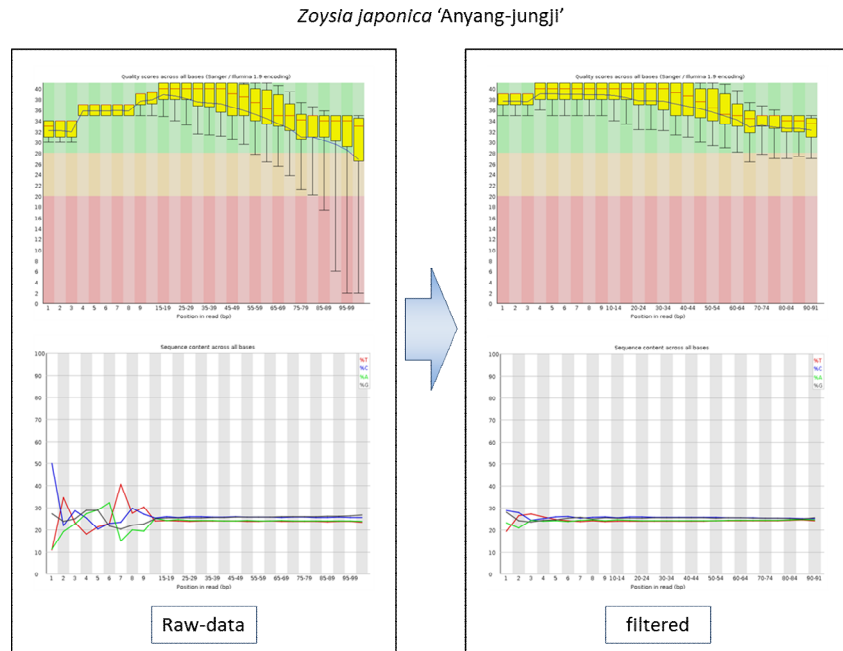


그림 2. 안양중지 raw read의 preprocessing 결과

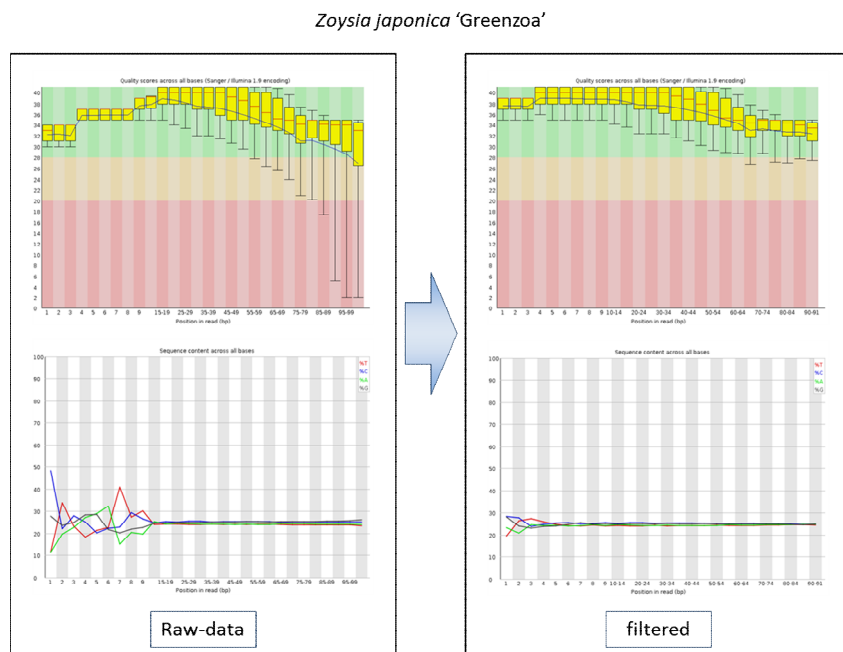


그림 3. 그린조아 raw read의 preprocessing 결과

- Raw reads를 이용하여 전사체를 제작하고 전체적인 전사체 분석을 수행하는 pipeline을 구축함 (그림 4)

- 기존의 여러 assembler의 경우 각각의 assembly 알고리즘이 달라 최종적으로 생성된 전사체 데이터베이스가 다름

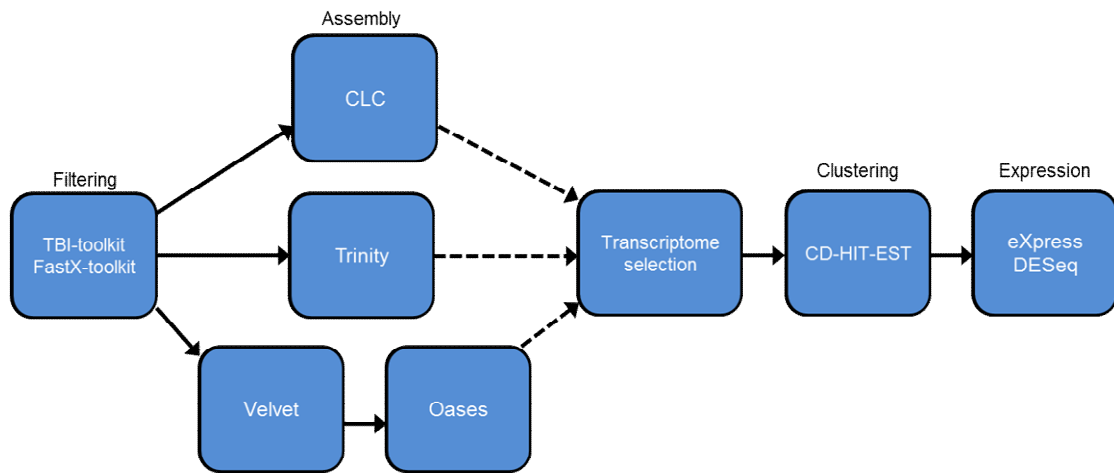


그림 4. 전사체 데이터 베이스 분석 pipeline

- Preprocessing 결과 얻어진 high-quality reads는 Velvet-Oases와 Trinity를 이용한 multi k-mer assembly와 CLC workbench를 이용한 single k-mer assembly를 수행함

표 2. Trinity를 이용한 multi k-mer assembly 수행 결과

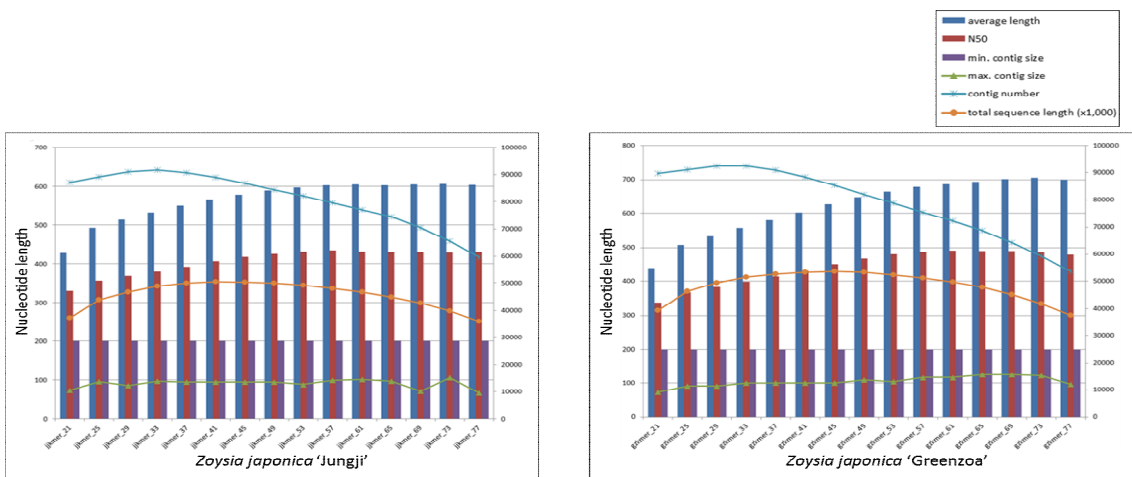
- Jungii

	Ave. contig size (bp)	N50 contig size (bp)	Max. size (bp)	Min. size (bp)	Total contig number	Total length (bp)
JJ_k21	531.2	345	15,831	201	127,704	67,836,611
JJ_k25	1,129.8	652	16,696	201	172,419	194,805,219
JJ_k29	1,221.2	804	16,700	201	184,111	224,835,469
merged	1,581.01	1,296	13,605	200	112,801	178,790,693
clustered	1,344.2	1,029	13,605	200	22,745	30,573,731

- Greenzoa

	Ave. contig size (bp)	N50 contig size (bp)	Max. size (bp)	Min. size (bp)	Total contig number	Total length (bp)
GZ_k21	549.5	357	15,750	201	119,916	65,891,808
GZ_k25	1,232.1	762	16,755	201	161,357	198,815,157
GZ_k29	1367.7	951	16,736	201	172,462	235,871,716
merged	1,756.7	1,453	14,778	200	127,438	223,867,037
clustered	1,401.7	1,089	14,778	200	21,070	29,533,149

- de novo assembly의 경우 reference sequence가 없이 짧은 길이의 raw reads만을 이용하여 수행되기 때문에 보다 정확하고 많은 양의 전사체 데이터베이스 확보가 필요함
- 각각의 assembler는 서로 다른 assembly 알고리즘을 가져 최종 구성되는 전사체의 gene set이 다소 다름
- 이를 보완하기 위해 각 assembler를 이용하여 만들어진 전사체를 통합하여 좀 더 높은 quality의 전사체 데이터베이스를 구축함
- Trinity의 경우 K-mer 값을 각각 21, 25, 29의 세 조건에서 assembly를 수행하고 이들을 통합하여 전사체 데이터베이스를 제작하였음
- Velvet-oases의 경우 K-mer 값을 21부터 77까지 +4 단위로 assembly를 수행하였고 이들을 통합하여 전사체 데이터베이스를 제작하였음
- 제작된 전사체 데이터베이스는 clustering을 사용하여 중복으로 assembly된 contig에 대한 제거 과정을 거쳐 전사체 데이터베이스의 정확성을 높였음



Short k-mer : poorly expressed transcript, higher sensitivity
 Long k-mer : higher expressed transcript, longer contigs

그림 5. Velvet assembler를 이용한 multi k-mer assembly 수행 결과

표 3. Velvet-Oases assembly pipeline을 수행한 결과

- Jungji						
	Ave. contig size (bp)	N50 contig size (bp)	Max. size (bp)	Min. size (bp)	Total contig number	Total length (bp)
merged	1,138.8	902	15,279	200	31,509	35,880,868
clustered	1,208.8	980	15,279	200	13,281	16,054,160
- Greenzoa						
	Ave. contig size (bp)	N50 contig size (bp)	Max. size (bp)	Min. size (bp)	Total contig number	Total length (bp)
merged	1,175.2	924	13,073	200	33,526	39,400,753
clustered	1,212.5	968	13,073	200	13,315	16,144,778

표 4. 다중 assembler를 이용한 전사체 데이터베이스 제작

		Ave. contig size (bp)	Median contig size (bp)	N50 contig size (bp)	Max. size (bp)	Min. size (bp)	Total contig number	Total length (bp)
Z. japonica 'Jungji'	Trinity	1,451.2	1,163	2,043	13,605	200	20,338	29,515,235
	Velvet	1,242.5	1,015	1,643	15,279	200	12,758	15,851,569
	CLC	986.55	714	1,420	15,205	200	25,850	25,502,199
	Merged	1,274.8	959	1,881	13,605	200	29,220	37,249,927
Z. japonica 'Greenzoa'	Trinity	1,516.5	1,233	2,096	14,778	200	18,832	28,558,098
	Velvet	1,252.2	1,010	1,668	13,073	200	12,691	15,891,637
	CLC	989.79	706	1,438	15,359	200	26,445	26,174,934
	Merged	1,261.4	906	1,917	15,359	200	27,975	35,287,252

- de novo assembly 결과 잔디 전사체는 평균 1,270 bp의 contig 길이를 가지며 500bp 이상에서는 대부분의 contig가 annotation이 확인됨 (그림 8)
- 500 bp 이하의 짧은 contig에서만 일부 기능이 확인되지 않은 contig가 존재하였고 500 bp 이상의 contig는 대부분 그 기능이 확인되었음

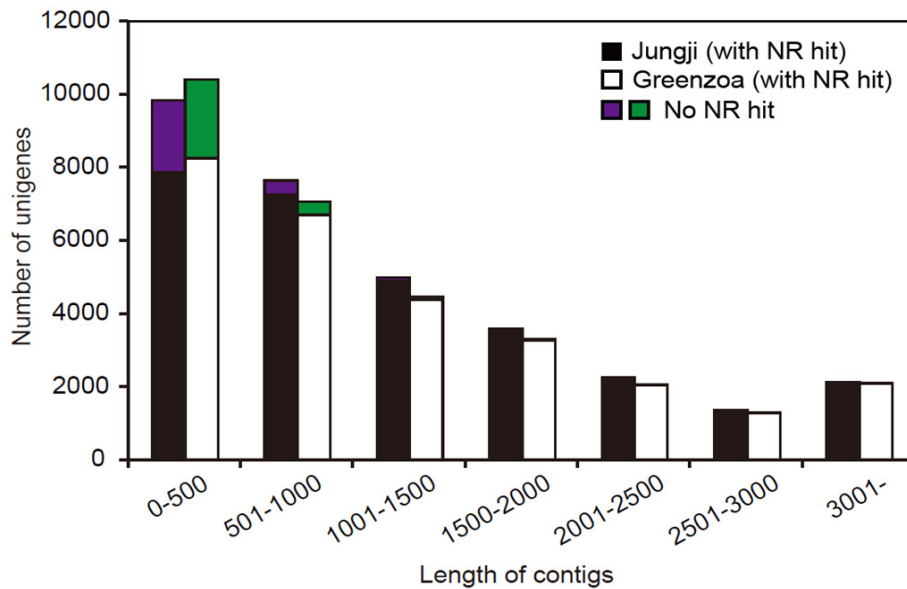


그림 8. 잔디 전사체 데이터베이스의 contig 분포

- 잔디의 전사체 de novo assembly 결과 중지, 그린조아에서 각각 29,220개, 27,975개의 contig set을 확보하였음 (표 5)
- 안양중지와 그린조아 전사체 간 contig의 개수, 전체 전사체 데이터베이스의 N50 길이 및 total length 등이 비슷하여 두 전사체가 전체적으로 비슷한 quality의 전사체 데이터베이스임을 확인하였음

표 5. 증지와 그린조아 품종의 잔디 전사체 assembly 결과

	<i>Zoysia japonica</i> 'Jungji'	<i>Zoysia japonica</i> 'Greenzoa'
Total length (bp)	37,249,927	35,287,252
Number of contigs	29,220	27,975
Average length (bp)	1,274.8	1,261.4
Median length (bp)	959	906
Max length (bp)	13,605	15,359
Min length (bp)	200	200
N20 length (bp)	3,202	3,317
N50 length (bp)	1,881	1,917
N80 length (bp)	971	956
GC content (%)	49	48

- 증지와 그린조아의 annotation 정보를 이용하여 서로 homolog한 ortholog set을 제작하였음 (표 6)
- 총 21,275개의 ortholog set을 구축하였고 이를 이용하여 향후 전사체간 비교 및 차등발현 유전자에 대한 연구를 수행하였음

표 6. 증지와 그린조아 ortholog set 제작

aj_transcriptome	gz_transcriptome	Identity	hit_length	annotation
aj_contig_1	gz_contig_21419	100	260	#N/A
aj_contig_2	gz_contig_9606	100	722	gi 414879584 tpg DAA56715.1
aj_contig_3	gz_contig_15354	98.1	473	gi 242057859 ref XP_002458075.1
aj_contig_5	gz_contig_21764	100	188	gi 357115058 ref XP_003559309.1
aj_contig_6	gz_contig_14089	99.38	959	gi 115489472 ref NP_001067223.1
aj_contig_7	gz_contig_11591	100	527	gi 115454207 ref NP_001050704.1
aj_contig_9	gz_contig_2847	100	1070	gi 115437984 ref NP_001043429.1
aj_contig_10	gz_contig_9127	100	623	gi 212276074 ref NP_001130513.1
aj_contig_12	gz_contig_3539	95.07	2189	gi 242063612 ref XP_002453095.1
aj_contig_13	gz_contig_8608	99.68	923	gi 357137124 ref XP_003570151.1
.
.
.
aj_contig_34221	gz_contig_32902	92.22	539	gi 116317884 emb CAH65912.1

- Full data set is available at <http://ipdgl.snu.ac.kr>

- 증지와 그린조아 ortholog set을 이용하여 전사체 데이터베이스를 비교해본 결과 서로간에 98.4%의 높은 유사도를 나타냄

- 잔디와 가장 가까운 조 (*Setaria italica*) 전사체와의 유사도와 비교했을때 중지와 그린조아는 98.4 %의 높은 homology를 가짐을 확인하였음 (그림 9)

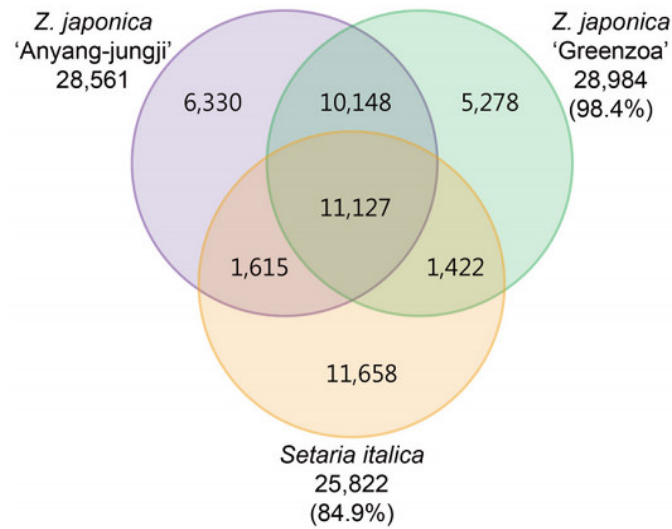


그림 9. 중지와 그린조아의 ortholog set의 유사성 분석

- 중지와 그린조아 두 품종간의 다형성 유전자좌(polymorphic alleles) 확인을 위하여 SNP (Single-nucleotide polymorphism)와 indel (삽입/결실) 분석을 수행함
- 총 1,157개의 ortholog set의 unigene에서의 SNP 분석 결과 99.86%의 동일한 염기서열을 가지는 것을 확인할 수 있었으며 SNP는 1,101 bp 당 한 개씩 존재하고 삽입/결실은 없는 것을 확인하였음 (표 7)

표 7. 중지와 그린조아 전사체 간 SNP 분석

High quality unigenes (Jungji)	2441
High quality unigenes (Greenzoa)	2722
High quality ortholog set	1157
Average identity	99.86
Total length	2,351,013
Average length	2,033.7
Average error per amino acid	1 / 758.6
Average SNPs	1 / 1,101.7
Indels	0

- 잔디와 다른 알려진 식물과의 근연관계 분석을 수행하였는데 이를 통하여 잔디와 가장 가까운 근연종을 찾고 그 가까운 정도를 알아보았음

- 식물의 항존유전자 (housekeeping gene) 중 하나인 *ACTIN* gene 서열을 사용하여 phylogenetic study를 수행하였음
- 잔디에서의 *ACTIN* sequence를 확보하고 다른 식물의 *ACTIN* sequence를 확보하였음 (표 8)
- 잔디와 다른 식물 종간의 phylogenetic analysis 결과 조 (*Setaria italica*)가 가장 가까운 근연종이며 수수 (*Sorghum bicolor*), 옥수수 (*Zea mays*)와 근연 관계에 있음을 확인하였음 (그림 10)

표 8. 식물 종별 *ACTIN* sequence의 NCBI accession number

Species	Accession number
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_179953.2
<i>Brassica rapa</i>	JN120480.1
<i>Brachypodium distachyon</i>	XM_003560541.1
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	D50839.1
<i>Glycine max</i>	NM_001253024.2
<i>Hordeum vulgare</i>	AK251023.1
<i>Medicago truncatula</i>	XM_003621971.1
<i>Oryza sativa</i>	AB047313.1
<i>Physcomitrella patens</i>	XM_001782636.1
<i>Populus trichocarpa</i>	XM_006379531.1
<i>Selaginella moellendorffii</i>	XM_002980705.1
<i>Setaria italica</i>	XM_004981913.1
<i>Solanum lycopersicum</i>	XM_004236699.1
<i>Solanum tuberosum</i>	XM_006351284.1
<i>Sorghum bicolor</i>	X79378.1
<i>Vitis vinifera</i>	XM_002283554.2
<i>Zea mays</i>	NM_001156990.1
<i>Zoysia japonica</i>	GU290545.1

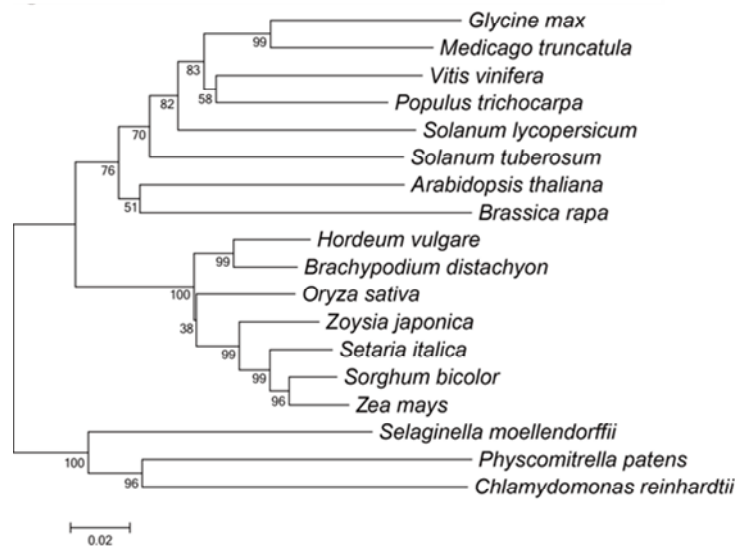


그림 10. 잔디의 phylogenetic study를 통한 근연종 분석

- 잔디의 전사체를 다른 식물종의 전사체와 유사도 비교를 수행한 결과 위 phylogenetic study 결과와 유사한 결과를 확인하였음
- 잔디의 전사체는 조(*Setaria italica*)의 전사체와 가장 높은 유사도 (85%)를 보였으며 그 뒤를 이어 수수(*Sorghum bicolor*)와 옥수수(*Zea mays*)가 높은 유사도를 나타내었음
- 잔디는 단자엽 작물과 높은 유사도 (80% 이상)를 보이는 반면 쌍자엽 작물과는 비교적 낮은 유사도 (75% 이하)를 가지는 것을 확인할 수 있었음 (그림 11)

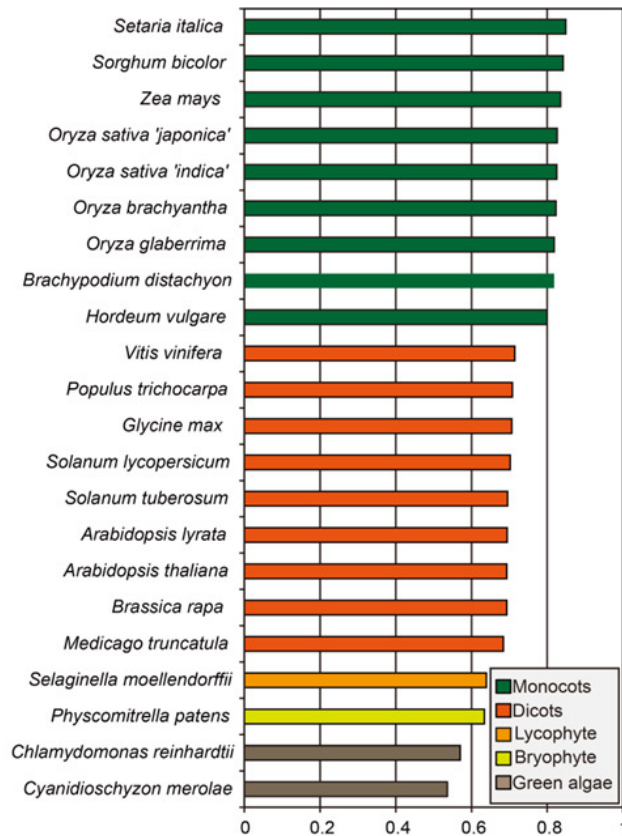


그림 11. 잔디와 다른 식물종간 전사체 데이터베이스 비교

- 잔디 전사체의 기능분석(GO)을 통하여 전체적인 기능을 분류하였음 (표 9)
- de novo GO 분석은 non-redundant reference sequence 데이터베이스와의 BLAST와 기존에 알려진 motif 등을 기반으로 한 mapping, 그리고 annotation의 순서로 분석을 진행하였음
- GO 분석 결과 총 세 개의 주 카테고리 (Cellular component, Molecular function, Biological process)로 분류되고, 각각 9, 14, 21개의 세부 카테고리로 분류되었음
- 중지와 그린조아의 GO 비교분석 결과 거의 비슷한 양상의 기능으로 분류됨을 확인하였고 이는 두 전사체의 유사성과도 깊은 관련이 있을것으로 예상함 (그림 12)

표 9. 잔디의 contig 별 GO anntation 결과

Contig	GO ID
aj_contig_1	GO:0070838 GO:0005739 GO:0008233 GO:0009507 GO:0006508 GO:0030003
aj_contig_4	GO:0005829 GO:0016887 GO:0005634 GO:0006511 GO:0005524 GO:0005886 GO:0008540
aj_contig_6	GO:0000325 GO:0015991 GO:0033179 GO:0005774 GO:0009506 GO:0005794 GO:0046961 GO:0005886
aj_contig_7	GO:0032578 GO:0005886 GO:0022626 GO:0005509 GO:0009705
aj_contig_8	GO:0016760 GO:0005739 GO:0000139 GO:0016021 GO:0005886 GO:0005783 GO:0030244
aj_contig_9	GO:0005739
aj_contig_10	GO:0006468 GO:0006487 GO:0005737 GO:0045727 GO:0004674 GO:0005634 GO:0005524
.	.
.	.
.	.
aj_contig_28550	GO:0016746
aj_contig_28551	GO:0005737

- Full data set is available at <http://ipdgl.snu.ac.kr>

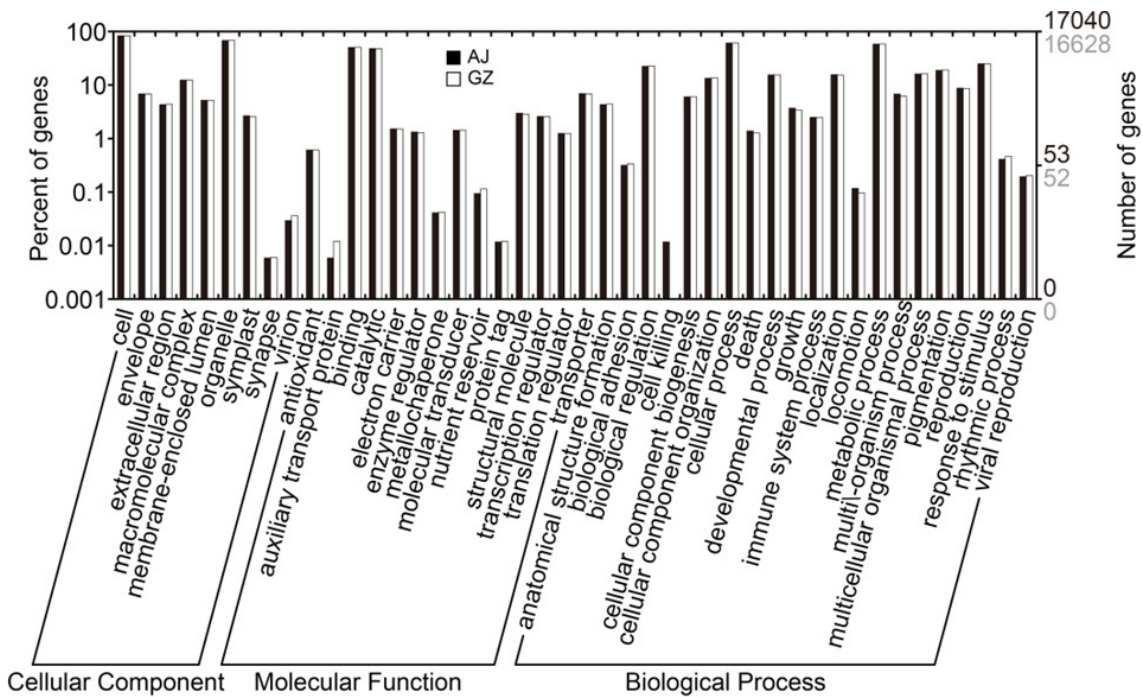


그림 12. 중지와 그린조아의 GO 비교 분석

- 잔디에서의 단순반복염기서열 (SSR, simple sequence repeat)의 분포 양상을 분석하였음
- 중지와 그린조아에서의 SSR 분포 양상을 보면 motif 길이가 3개인 tri-repeat이 가장 많았고 두 품종의 SSR 분포 양상은 비슷함을 확인하였음 (표 10)
- SSR 마커는 품종간 차이를 알기 위한 마커로서 많이 사용되는데 잔디 전사체에서의 SSR 분포를 알아봄으로써 향후 마커개발에도 유용한 활용자원이 될 것으로 사료됨

표 10. 잔디에서의 단순반복염기서열 (SSR, simple sequence repeat) 분포

	Motif length	Repeat number						Total	%	
		5	6	7	8	9	10			>10
안양중지	Di	-	155	76	68	48	65	155	567	38.1
	Tri	567	214	83	23	2	0	0	889	59.7
	Tetra	20	3	11	0	0	0	0	24	1.6
	Penta	3	0	0	1	0	0	0	4	0.3
	Hexa	4	0	0	0	0	0	0	4	0.3
	Total	594	372	160	92	50	65	155	1488	
	%	39.9	25	10.8	6.2	3.4	4.4	10.4		
그린조아	Di	-	142	72	72	49	49	147	531	38.3
	Tri	519	206	66	27	7	1	0	826	59.6
	Tetra	22	5	0	0	0	0	0	27	2
	Penta	2	0	0	0	0	0	0	2	0.1
	Hexa	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	543	353	138	99	56	50	147	1386	
	%	39.2	25.5	10	7.1	4	3.6	10.6		

- 잔디 전사체에서의 전사인자에 대한 분석을 수행하였음
- 분석은 기존에 알려져 있던 전사인자 데이터베이스 (PlantTFDB)와의 BLAST 분석을 통하여 진행되었음
- 전사인자 분석결과 총 1,614개의 전사인자가 확인되었고 총 80개의 그룹으로 분류되었음
- 특히 MYB 관련 전사인자가 가장 많이 확인되었는데 이 중 착색과 관련된 후보유전자를 선별하여 발현양상을 확인한다면 착색과 관련하여 연관성 분석이 가능할 것이라 사료됨 (그림 13)

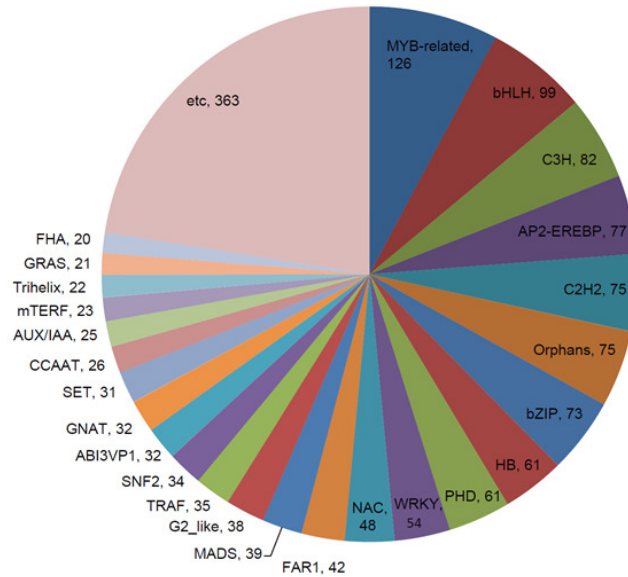


그림 13. 잔디 전사체에서의 전사인자 (transcription factor) 분류

- 작물에서의 전체적인 차별발현 유전자(DEG, differentially expressed genes) 조사에 가장 널리 사용되는 방법 중 하나가 NGS (Next-generation Sequencing) read를 지표로 전사체에서 그 양상을 확인하는것임
- 두 잔디 품종에서의 DEG 확인을 위하여 완성된 두 전사체 데이터베이스에서 raw read를 맵핑하여 그 양상을 확인하였음
- FPKM(Fragments per kilobase of exon model per million mapped reads) value를 이용하여 통계적으로 유의(p-value < 0.01)한 차이를 나타내는 유전자를 DEG로 선별하였음
- 총 1,448개의 non-redundant한 contig가 통계학적으로 유의한 DEG임을 확인하였음
- 전체 DEG 중 1,307개가 중지에서 높게 발현되는 DEG로, 141개가 그린조아에서 높게 발현되는 DEG임을 확인하였음 (그림 14)
- DEG에 대한 GO 분석을 수행한 결과 pigmentation과 관련된 contig도 상당 수 확인된 것을 보았을때 향후 잔디 착색의 차이를 결정하는 차등발현 유전자가 존재할 것이라 예상할 수 있음 (그림 15)

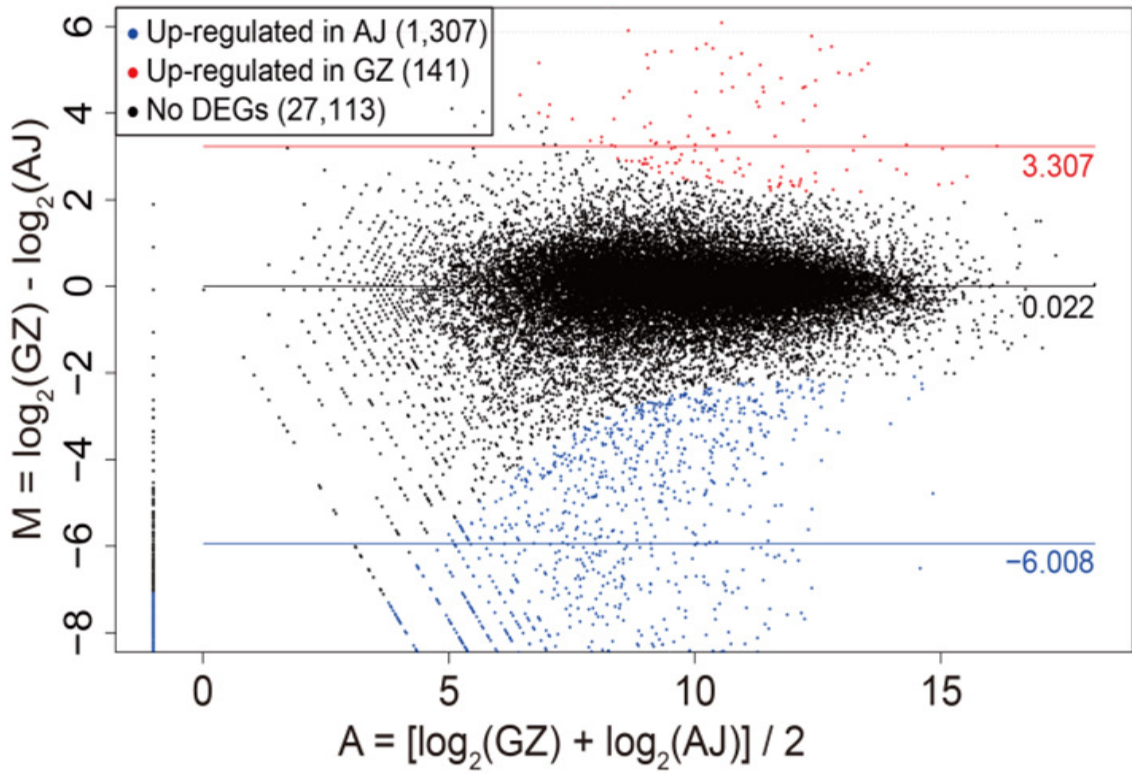


그림 14. 중지와 그린조아 간 차등발현유전자(DEG)의 분포

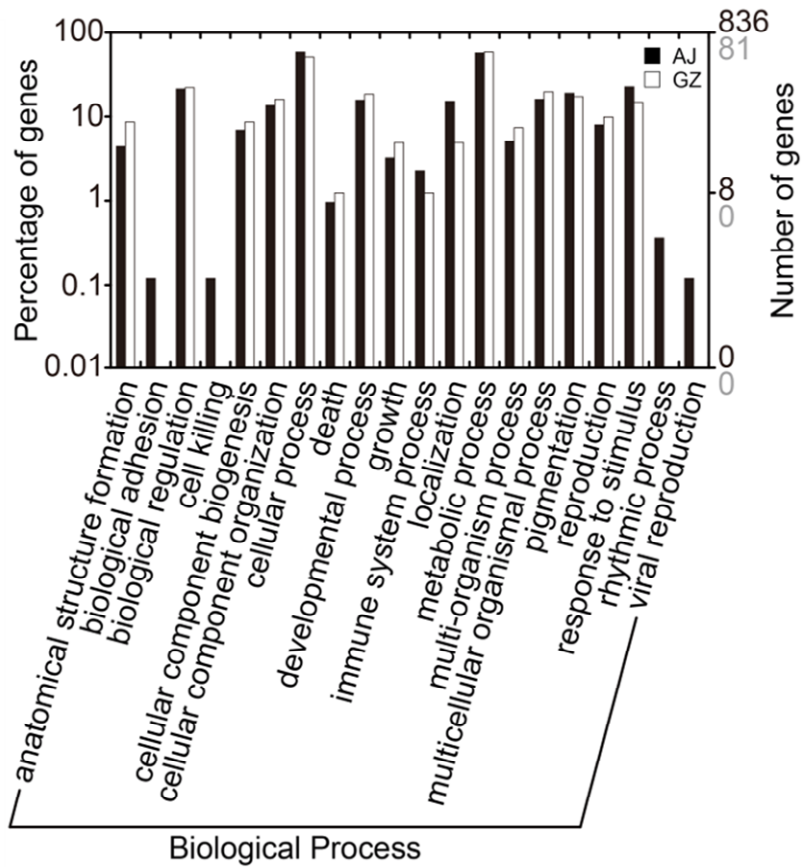


그림 15. 중지와 그린조아 간 차별발현유전자(DEG)의 기능분류

제 2 절 착색 변이체의 안토시아닌 생합성 경로 분석

1. 잔디 이삭의 발달 단계별 안토시아닌 성분 분석

- 중지와 그린조아는 이삭과 포복경의 두 기관에서 착색의 차이를 나타냄
- 특히 생식기관인 잔디의 이삭은 본 연구에 적합한 재료로서 각 발달 단계는 길이, 착색, 그리고 여러 발달 특성이 다른것을 확인하였음 (표 11, 그림 16)
- 잔디의 이삭을 발달 단계에 따라 총 6 단계로 나누어 단계별 이삭으로부터 안토시아닌을 추출하여 HPLC 분석을 수행하였음
- HPLC 분석 결과 중지에서는 안토시아닌 성분이 검출된 반면 그린조아에서는 안토시아닌 성분이 없는 것을 확인하였음
- 중지 이삭의 안토시아닌은 cyanidin과 petunidin이 주 성분이고 발달 단계에 따라 그 성분의 함량 변화가 확인되었음 (그림 17)
- 잔디에서 근연종인 조, 수수에서의 안토시아닌 주성분으로 알려진 luteonidin 등의 다양한 안토시아닌 성분의 존재유무 확인 결과 cyanidin 및 petunidin이 아닌 다른 안토시아닌 성분은 검출되지 않음 (그림 18)

표 11. 잔디 이삭의 발달단계별 특성

발달 단계	이삭 평균길이		착색 여부		발달 특성
	AJ	GZ	AJ	GZ	
S1	21.3 mm	20.9mm	Green	Green	이삭이 잎안에 싸여있음
S2	24.7 mm	24.9mm	Green	Green	이삭이 반쯤 잎밖으로 나옴
S3	26.1 mm	26.1mm	부분적 보라색 (0-30%)	Green	이삭이 전부 잎밖으로 나오고 일부 착색됨 (AJ)
S4	30.4 mm	29.8mm	부분적으로 보라색 (30-80%)	Green	이삭이 익었지만 암술은 나오지 않음
S5	36.2 mm	35.9mm	전체적으로 보라색	Green	수술이 밖으로 나옴
S6	36.8 mm	36.5mm	Fully purple	Green	수술이 지고 암술이 밖으로 나옴



그림 16. 잔디 이삭의 발달단계

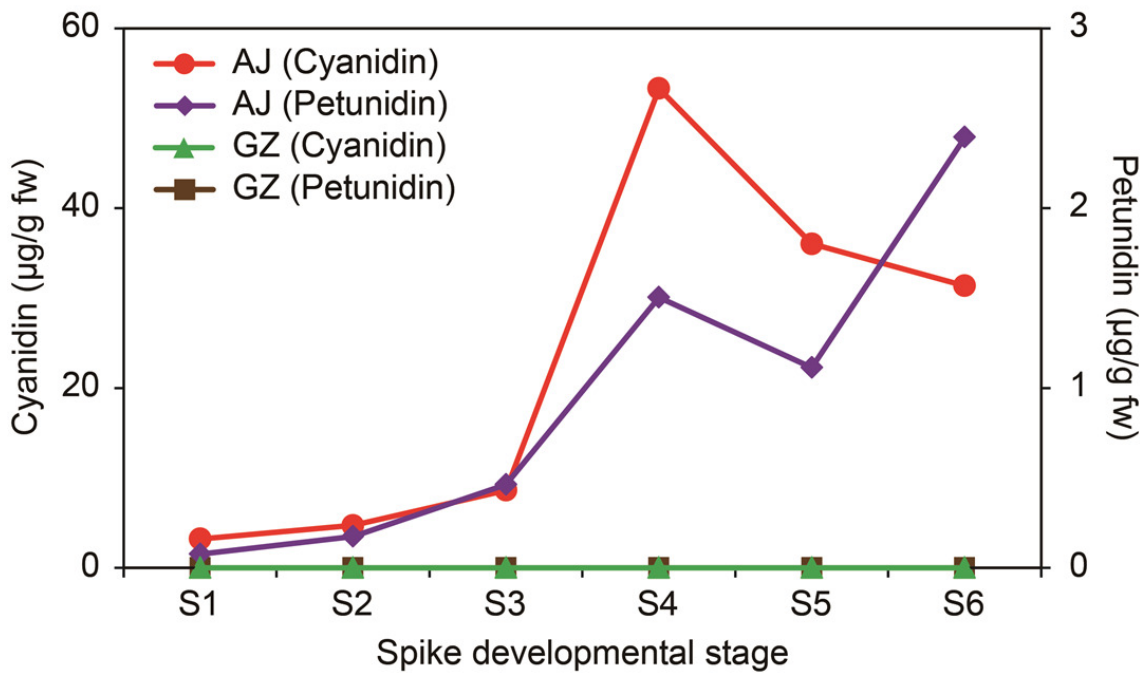


그림 17. 잔디 이삭의 발달단계별 안토시아닌 함량 변화 분석

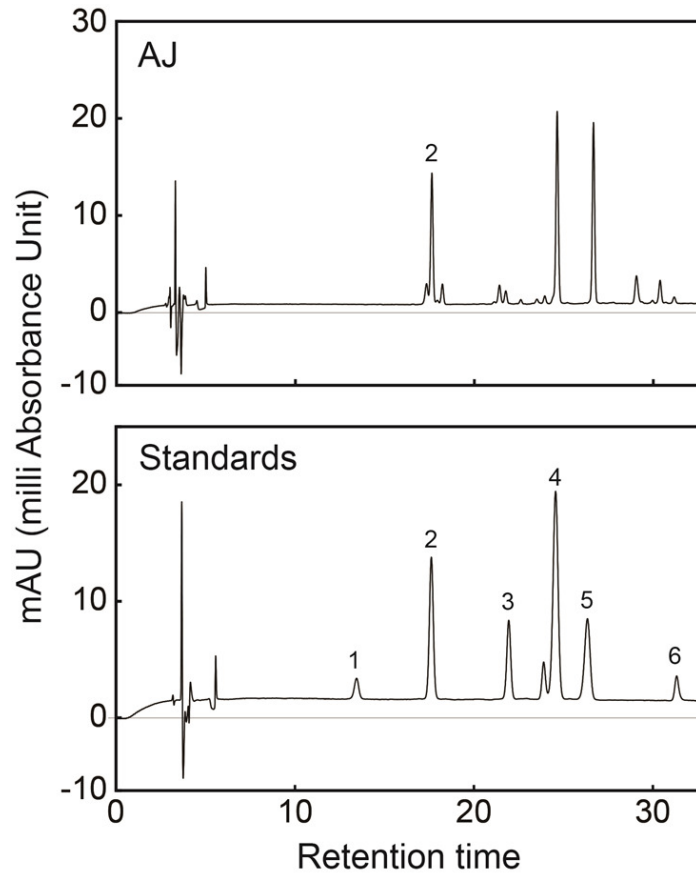


그림 18. 중지 이삭의 다양한 안토시아닌 성분 분석. 1, delphinidin-3-O-glucoside; 2, cyanidin-3-O-glucoside; 3, pelargonidin-3-O-glucoside; 4, peonidin-3-O-glucoside; 5, malvidin-3-O-glucoside; 6, luteolinidin.

- 잔디에서의 안토시아닌 성분 분석 결과 중지는 cyanidin 계열의 대표적인 색소인 cyanidin과 delphinidin 계열 중 하나인 petunidin이 착색의 주 성분임을 확인하였음
- 이를 통해 잔디에서의 안토시아닌 생합성 경로는 cyanidin계열의 색소와 delphinidin 계열의 색소를 합성하는 두 갈래의 경로로 진행될 것이라 사료됨 (그림 19)

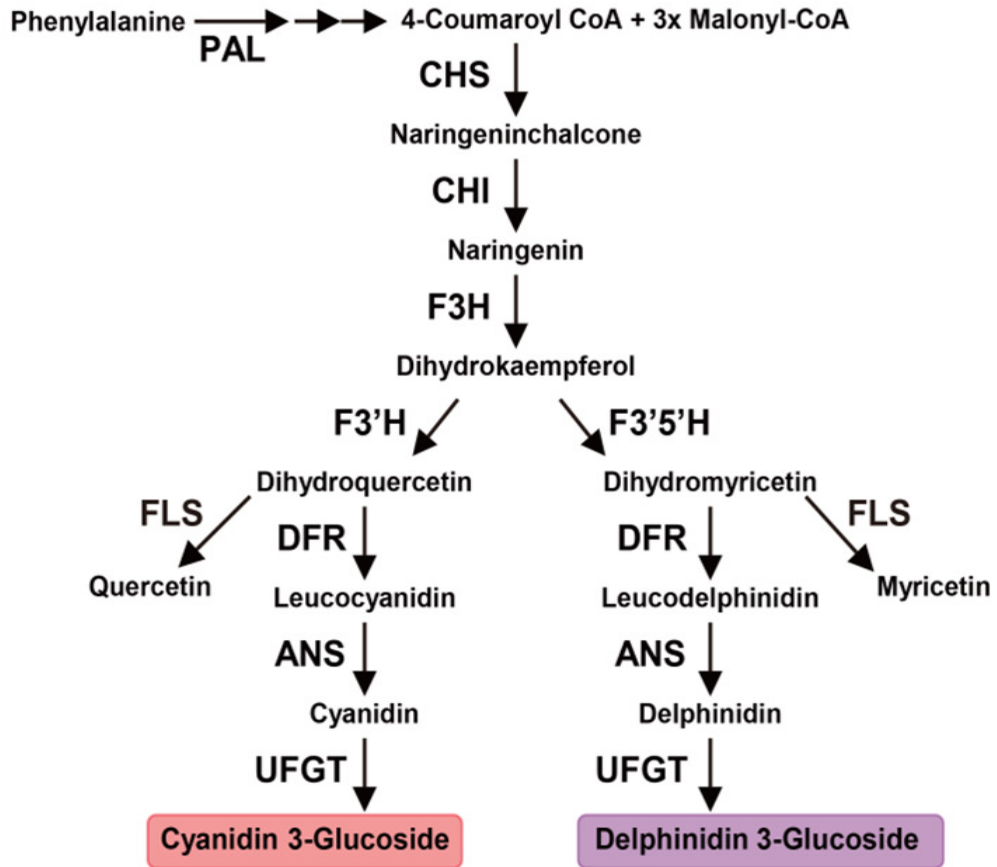


그림 19. 잔디에서의 안토시아닌 생합성 경로

제 3 절 착색 변이체의 유전자 발현 분석

1. 전사체 데이터베이스에서 확보한 후보유전자의 발현 확인

- 잔디의 전사체 데이터베이스에서 선발한 총 22개의 안토시아닌 생합성 관련 후보유전자의 digital expression 확인 결과 중지와 그린조아에서 서로 다르게 발현되는 DEG가 존재함을 확인하였음 (그림 20, 표 12)
- 특히 착색이 되는 중지에서 높게 발현되는 *ZjDFR1*과 *ZjANS1*의 경우 그린조아에서 낮게 발현되는 차이를 보임
- *ZjDFR1*과 *ZjANS1*이 중지와 그린조아의 서로다른 착색의 차이를 결정짓는 주요 요인일 것이라 사료되어 이 두 유전자에 대한 중점적인 연구를 진행하였음
- 잔디의 전사체 데이터베이스에서의 digital expression 분석을 통하여 확인된 안토시아닌 관련 후보유전자를 REFSEQ 데이터베이스에서 blast를 통하여 확인해본 결과 다른 안토시아닌 관련 homolog들과 서열 유사도가 높음
- 확인된 잔디의 안토시아닌 관련 후보유전자의 발현양상을 qRT-PCR로 확인하였음 (그림 21, 22)

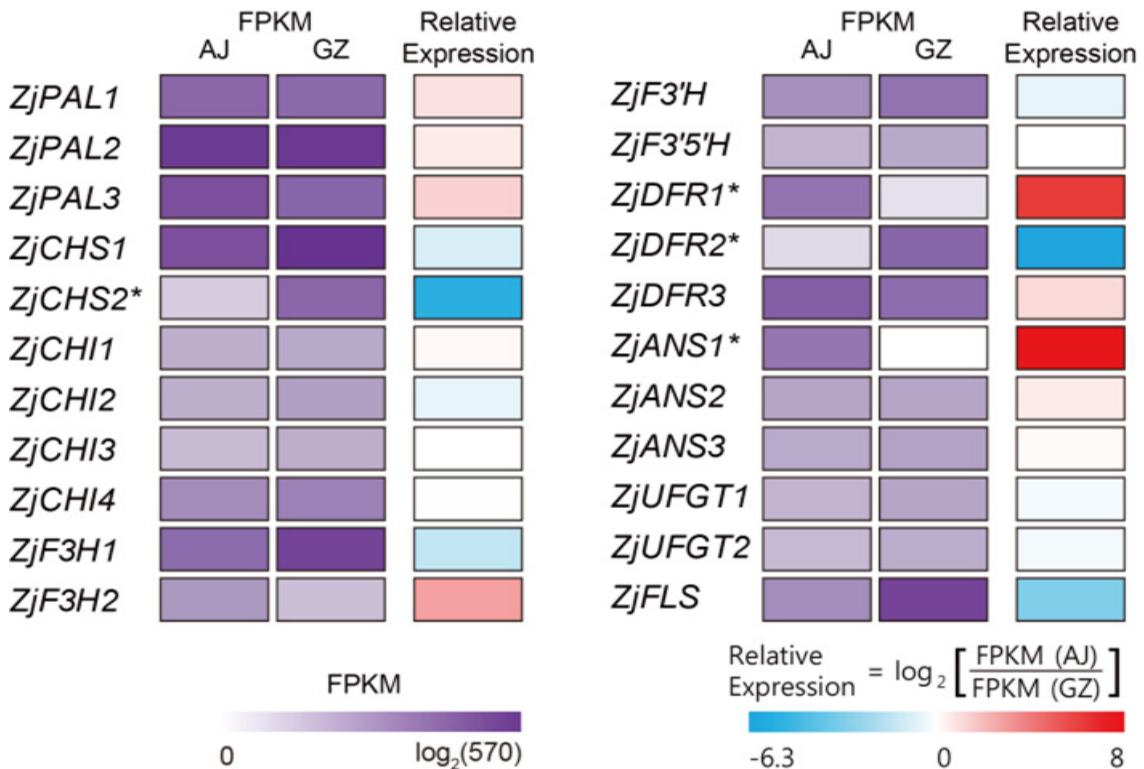


그림 20. 잔디에서의 안토시아닌 생합성 관련 22개 후보유전자의 digital expression 양상. *: 차등발현유전자 (DEG).

표 12. qRT-PCR에 사용된 잔디 후보유전자

Genes	REFSEQ Match	Accession No.	E-value	ID ^a	Region of ID	% Cov	Amplicon region ^d
<i>ZjPAL1</i>	<i>SiPAL</i>	XP_004953154.1	0	93	*1-718*	99	551-639 (1,884)
<i>ZjPAL2</i>	<i>ZmPAL</i>	NP_001241797.1	0	94	*1-701*	99	997-1,113 (2,106)
<i>ZjPAL3</i>	<i>SiPAL</i>	XP_004976238.1	0	87	230-702*	99	576-681 (1,425)
<i>ZjCHS1</i>	<i>SiCHS</i>	XP_004979391.1	0	95	*1-399*	99	896-983 (1,206)
<i>ZjCHS2</i>	<i>ZmCHS</i>	NP_001149508.1	1.00E-127	84	178-412*	98	263-355 (690)
<i>ZjCHI1</i>	<i>AtCHI</i>	NP_567140.1	5.00E-37	34	72-275*	48	526-633 (1,284)
<i>ZjCHI2</i>	<i>ZmCHI</i>	NP_001149585.1	8.00E-88	84	112-274*	99	232-338 (495)
<i>ZjCHI3</i>	<i>BdCHI</i>	XP_003571233.1	3.00E-100	77	68-265*	99	139-256 (627)
<i>ZjCHI4</i>	<i>SiCHI</i>	XP_004981264.1	3.00E-100	84	54-233*	98	160-261 (537)
<i>ZjF3H1</i>	<i>ZmF3H1</i>	NP_001105695.1	0	88	*1-336*	90	310-429 (1,116)
<i>ZjF3H2</i>	<i>SiF3H</i>	XP_004985921.1	0	89	55-336*	98	22-141 (855)
<i>ZjF3'H</i>	<i>BdF3'H</i>	XP_003577475.1	0	77	21-529	96	(1,289), 1383
<i>ZjF3'5'H</i>	<i>SiF3'5'H</i>	XP_004984278.1	1.00E-32	97	456-517	92	98-201 (201)
<i>ZjDFR1</i>	<i>SiDFR</i>	XP_004969260.1	0	86	*1-365*	96	578-716 (1,116)
<i>ZjDFR2</i>	<i>ZmDFR1</i>	NP_001105644.1	0	89	*1-331*	99	265-364 (990)
<i>ZjDFR3</i>	<i>BdDFR</i>	XP_003567727.1	0	83	10-329*	97	144-262 (982)
<i>ZjANS1</i>	<i>ZmANS</i>	NP_001106074.1	5.00E-180	74	*1-395*	99	132-244 (1,179)
<i>ZjANS2</i>	<i>SiANS</i>	XP_004964770.1	1.00E-137	90	117-343*	99	100-216 (685)
<i>ZjANS3</i>	<i>ZmANS</i>	NP_001152138.1	8.00E-142	63	*1-314*	95	379-496 (987)
<i>ZjUFGT1</i>	<i>SiUFGT1</i>	XP_004955859.1	6.00E-147	72	187-470*	99	320-407 (855)
<i>ZjUFGT2</i>	<i>SiUFGT1</i>	XP_004955859.1	1.00E-143	70	187-470*	99	321-408 (856)
<i>ZjFLS</i>	<i>SiFLS</i>	XP_004954034.1	0	79	*3-333*	98	736-823 (1,011)
<i>ZjMYB1</i>	<i>AtMYB-IF35</i>	NP_001105092.1	2.00E-67	94	*1-109	99	164-276 (329)
<i>ZjMYB2</i>	<i>AtMYB4</i>	NP_195574.1	9.00E-68	98	*1-105	69	297-402 (451)

^aPercentage sequence identity (ID), based on amino acid sequence.

^bAsterisks at left and right of the region indicate the presence of predicted start and stop codons, respectively.

^cPercentage coverage, the percentage of total predicted protein length present in unigene sequence.

^dThe nucleotide region within each unigene that qRT-PCR primers were designed to amplify, with total unigene coding sequence length in parentheses.

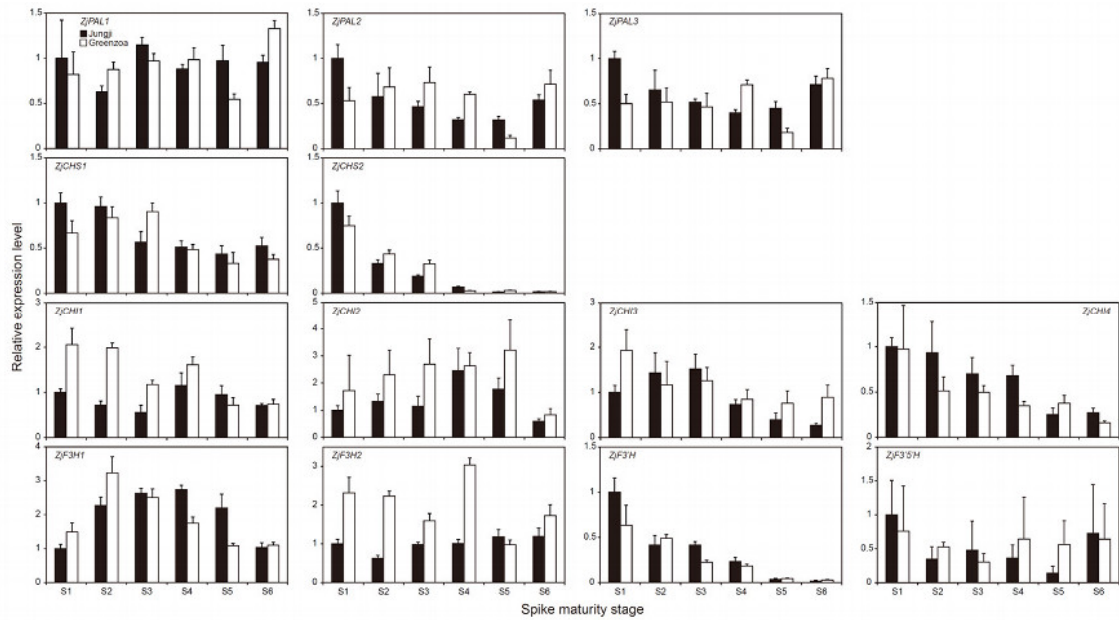


그림 21. 잔디 이삭의 발달 단계별 안토시아닌 생합성 관련 후보유전자(경로 상위 유전자)의 발현양상 비교

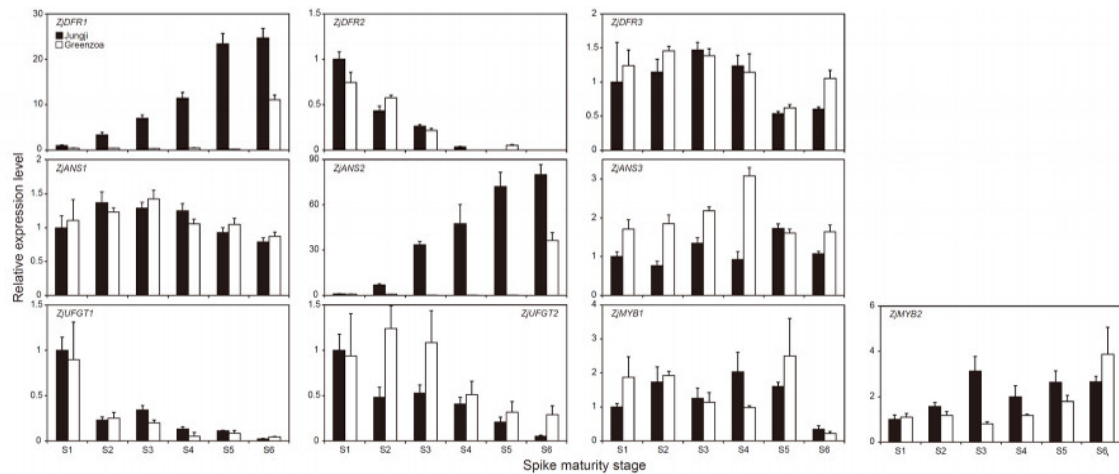


그림 22. 잔디 이삭의 발달 단계별 안토시아닌 생합성 관련 후보유전자(경로 하위 유전자)의 발현양상 비교

- 잔디의 기관별 안토시아닌 생합성 관련 후보유전자의 발현양상을 qRT-PCR을 통하여 확인하였음
- *ZjDFR1*과 *ZjANS1*의 경우 증지와 그린조아에서 착색의 차이를 보이는 이삭과 포복경에서 발현의 차이가 확인됨

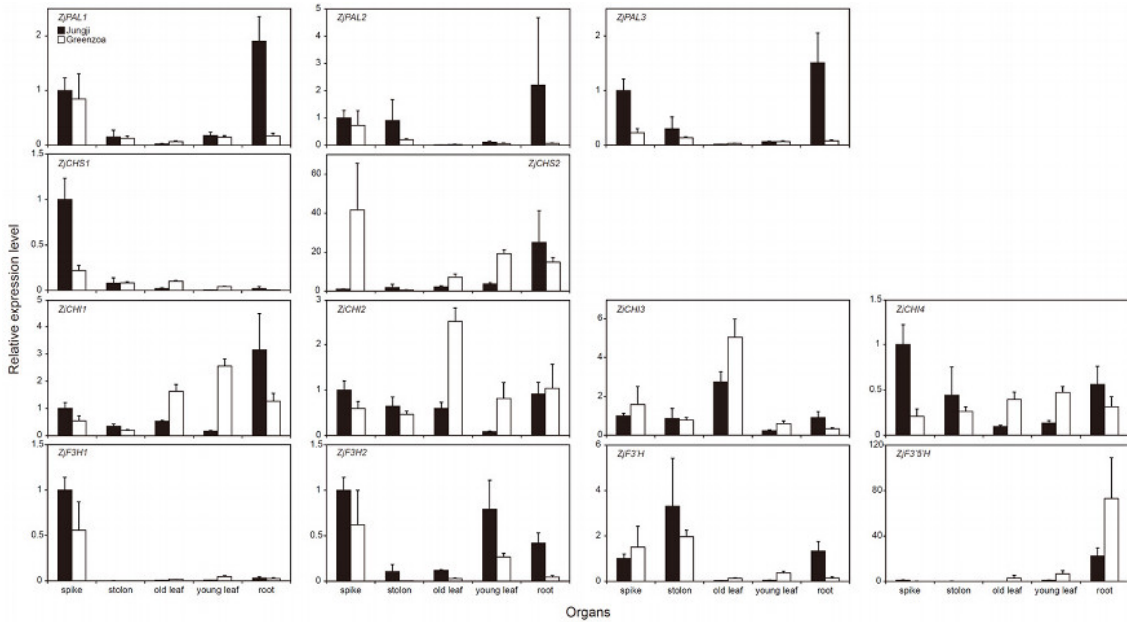


그림 23. 잔디 기관별 안토시아닌 생합성 관련 후보유전자(경로 상위 유전자)의 발현양상 비교

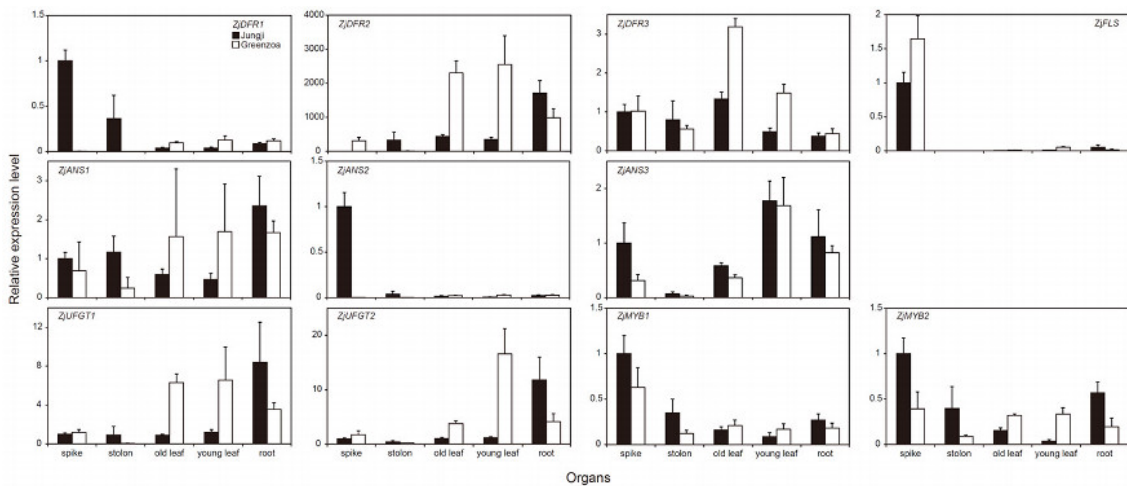


그림 24. 잔디 기관별 안토시아닌 생합성 관련 후보유전자(경로 하위 유전자)의 발현양상 비교

- 잔디의 DFR과 ANS 후보유전자들의 기능을 유추하기 위하여 다른 작물에서 기능이 밝혀진 유사단백질과의 phylogeny 분석을 수행함 (표 13)
- Phylogeny 분석 결과 잔디에서 확인된 세 개의 DFR 후보 유전자 중 ZjDFR1이 다른 유사 단백질들과 높은 유사도를 가짐 (그림 25)
- Phylogeny 분석 결과 잔디에서 확인된 세 개의 ANS 후보 유전자 중 ZjANS1이 다른 유사 단백질들과 높은 유사도를 가짐 (그림 26)

표 13. DFR과 ANS homolog들의 accession number

Gene product ^a	Accession number
AmDFR	P14721.1
AtDFR	NP_199094.1
GhDFR	P51105.1
HvDFR	P51106.1
LjDFR2	BAE19949.1
LjDFR3	BAE19950.1
LjDFR5	BAE19953.1
OsDFR	BAA36183.1
PhDFR	P14720.2
RhDFR	BAA12723.1
VmDFR	AAL89714.1
VvDFR	AAX12423.1
ZmDFR	NP_001152467.1
AtANS	NP_194019.1
GhANS	AAV15744.1
GtANS	BAE44202.1
MdANS	P51091.1
NtANS	BAM37963.1
OsANS	CAA69252.1
PcANS	ABB70119.1
TaANS	BAE98276.1
VvANS	NP_001268147.1
ZmANS	P41213.1

^aAm, *Antirrhinum majus*; At, *Arabidopsis thaliana*; Gh, *Gerbera hybrid*; Gt, *Gentiana triflora*; Hv, *Hordeum vulgare*; Lj, *Lotus japonicus*; Md, *Malus domestica*; Nt, *Nicotiana tabacum*; Os, *Oryza saiva*; Pc, *Pyrus communis*; Ph, *Petunia hybrid*; Rh, *Rosa hybrid*; Ta, *Triticum aestivum*; Vm, *Vaccinium macrocarpon*; Vv, *Vitis vinifera*; Zm, *Zea mays*.

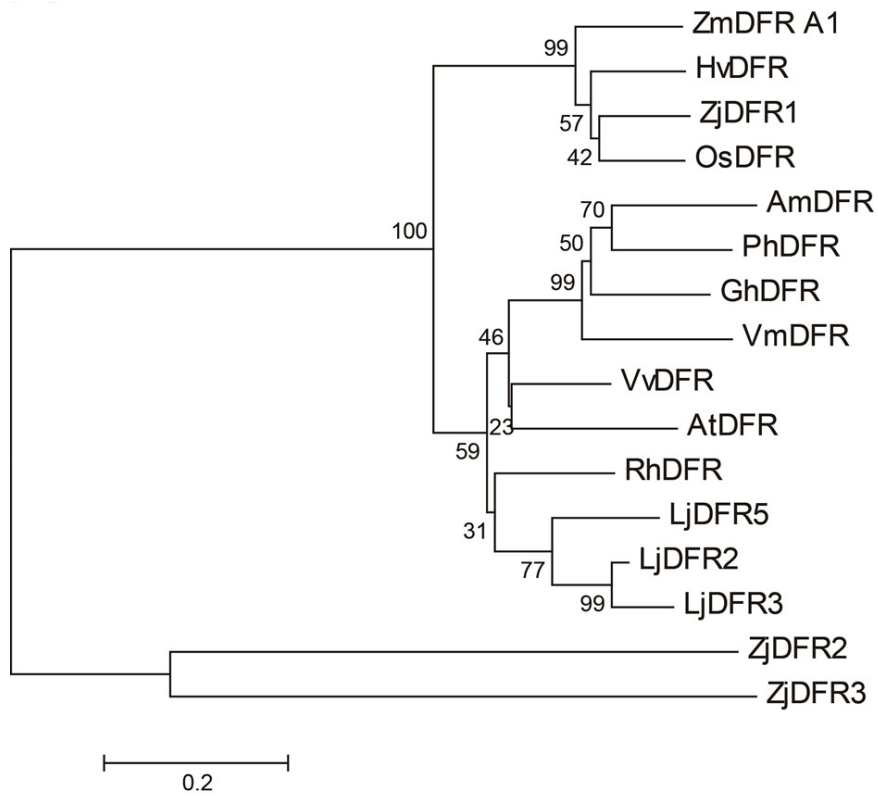


그림 25. DFR 유사 단백질 간 phylogeny 연구

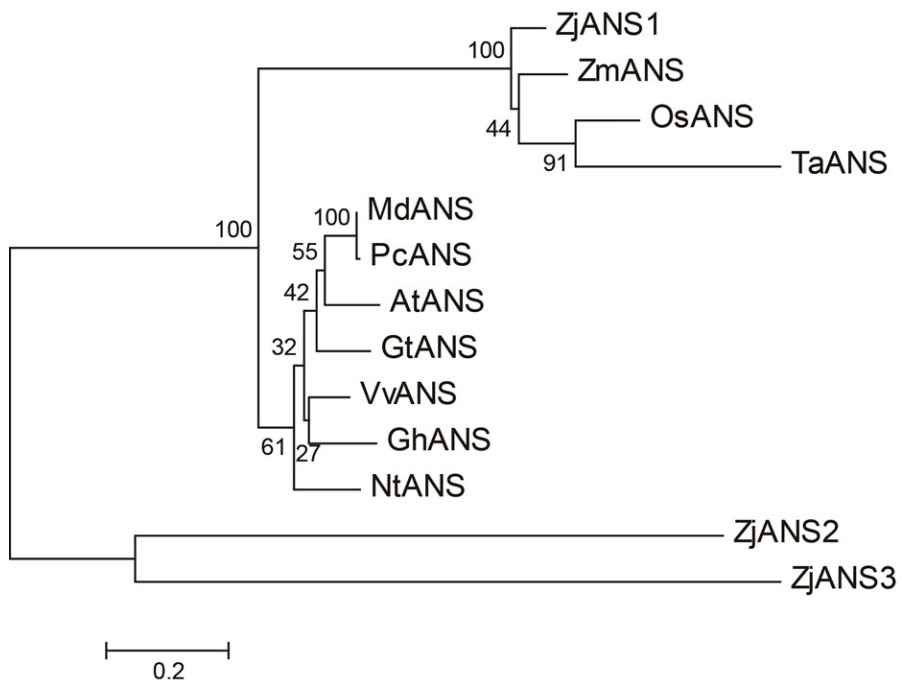


그림 26. ANS 유사 단백질 간 phylogeny 연구

2. 9개 잔디 품종에서의 *ZjDFR1*과 *ZjANS1*의 발현 비교

- 실험에서 사용한 안양중지와 그린조는 한국형 잔디로써 이 두 품종 외에도 많은 한국형 잔디 품종이 시판되고 있음(표 8)
- 그 중 포복경과 이삭에서 안토시아닌 착색이 확인된 품종이 5개(금잔디, 건희, 야지, 마이 어, 세녹), 착색이 되지 않는 품종이 2개(밀록, 제니스)로 HPLC 분석 결과 안토시아닌이 착색의 주 성분임을 확인하였음(그림 27)
- qRT-PCR 수행 결과 착색이 되는 잔디 품종에서 *ZjDFR1*과 *ZjANS1*의 발현이 높은 반면 착색이 되지 않는 3개의 잔디 품종에서는 발현이 낮은 것을 확인하였음(그림 28, 29)

표 13. *Zoysia* 속 잔디 품종의 특성

Cultivar	Species	Leaf color	Stolon color
AJ	<i>Z. japonica</i>	green	purple
Meyer	<i>Z. japonica</i>	green	purple
Senock	<i>Z. sinica</i> x <i>Z. matrella</i>	green	purple
Yaji	<i>Z. japonica</i>	green	purple
Gumjandi	<i>Z. matrella</i>	green	purple
Konhee	<i>Z. matrella</i>	green	purple
GZ	<i>Z. japonica</i>	green	green
Millock	<i>Zoysia</i> cultivar	green	green
Zenith	<i>Z. japonica</i>	green	green

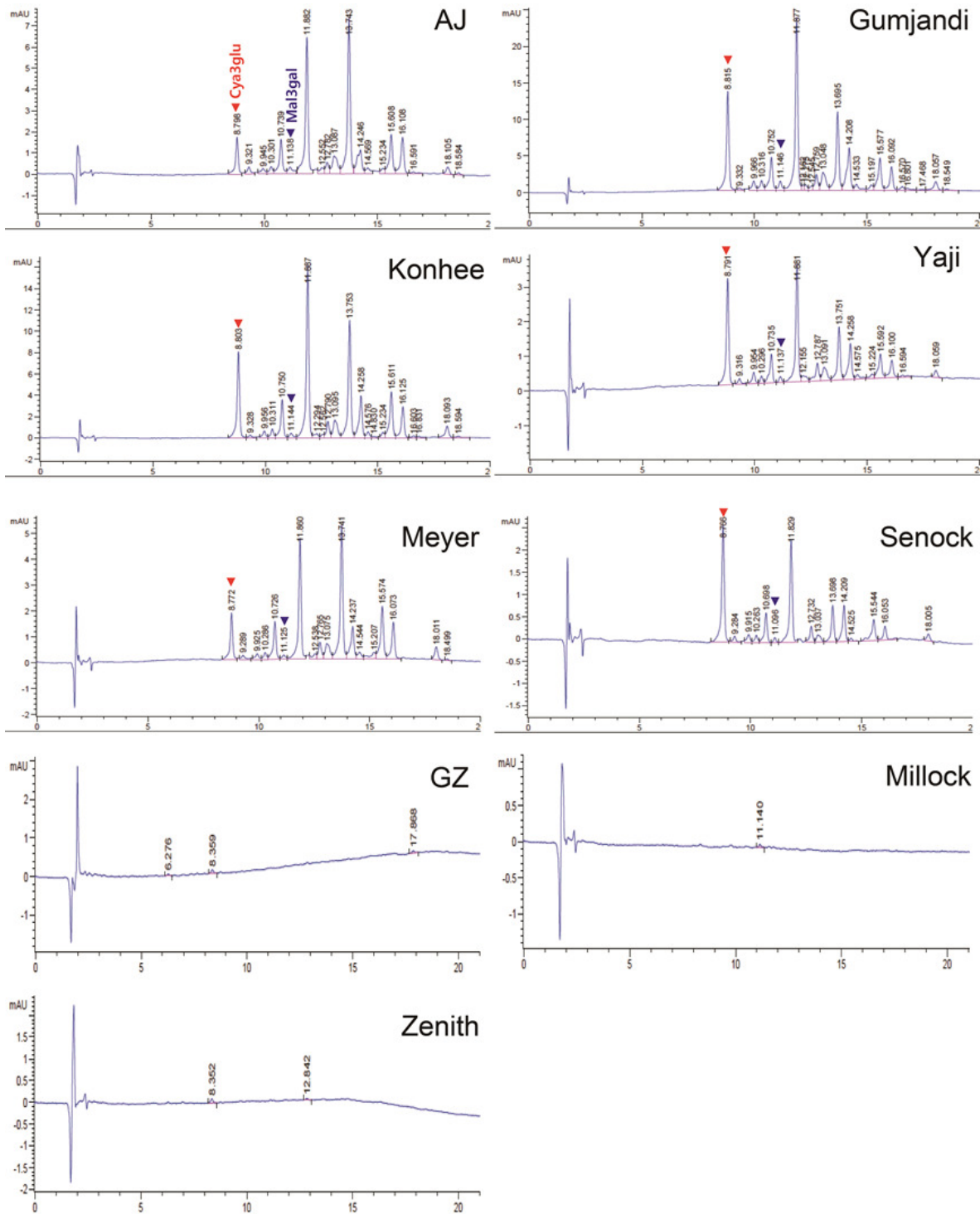


그림 27. 잔디 9개 품종의 이삭에서의 안토시아닌 성분 분석 결과

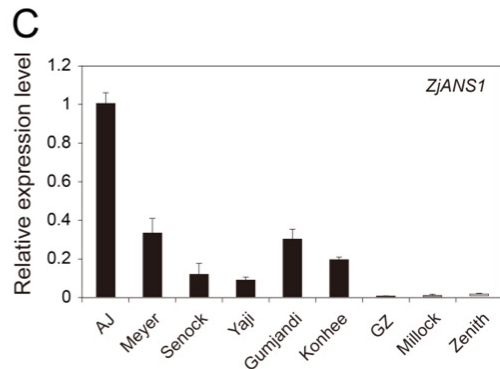
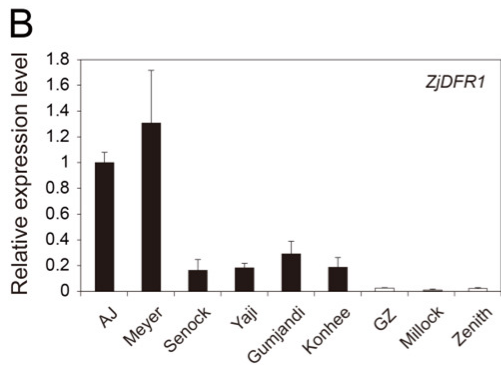


그림 28. 잔디 9개 품종에서의 ZjDFR1과 ZjANS1의 발현양상 비교 (이삭)

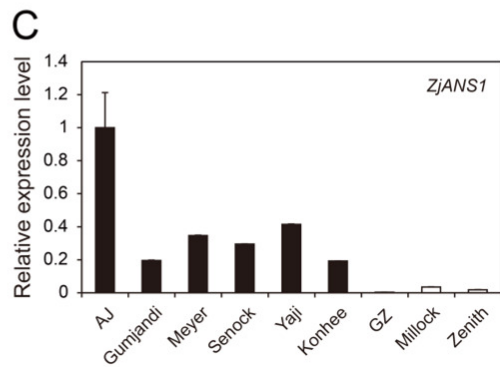
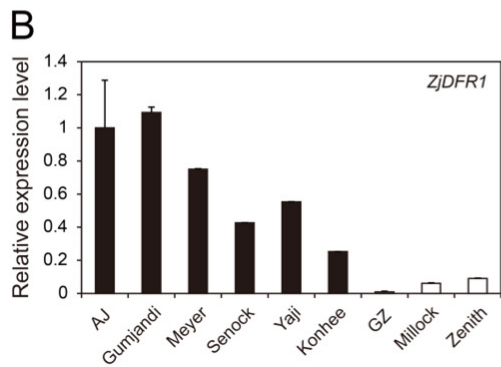


그림 29. 잔디 9개 품종에서의 ZjDFR1과 ZjANS1의 발현양상 비교 (포복경)

- 잔디에서 착색에 관여하는 *ZjDFR1*과 *ZjANS1*의 전체 서열분석을 위하여 RACE와 TAIL-PCR을 수행하였고 각각 1,458, 1,179 bp의 full-length genomic sequence를 확보하였음
- *ZjDFR1*은 4개의 exon과 3개의 intron으로, *ZjANS1*은 1개의 exon으로만 이루어져 있고, *Setaria italica*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays* 등의 단자엽 작물과 동일한 구조로 되어있음 (그림 30)
- 중지와 그린조아 품종에서 얻은 *ZjDFR1*과 *ZjANS1*의 코딩 부분 서열을 비교 분석한 결과 서열이 동일함을 확인하였음 (그림 31)
- 잔디 9개 품종에서의 *ZjDFR1*과 *ZjANS1*의 발현 차이가 동일한 원인에 의한 현상인지 알아보기 위하여 코딩 부분의 서열을 확인하였음
- *ZjDFR1*과 *ZjANS1*의 코딩부분 아미노산 Full-length의 서열 비교를 수행한 결과 착색의 차이와 관련된 서열의 차이를 확인할 수 없었음 (그림 32, 33)
- 또한 *ZjDFR1*과 *ZjANS1*의 프로모터 지역 서열의 차이가 발현에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 TAIL-PCR을 통하여 확보한 약 500 bp의 서열을 가지고 9개 품종에서의 염기서열 차이를 확인하였음 (그림 34, 35)
- 9개 품종 모두 프로모터 지역의 서열은 잘 보존되어 있었으며 착색에 영향을 미칠 것이라 생각되는 서열의 차이를 발견할 수 없었음 (그림 36)

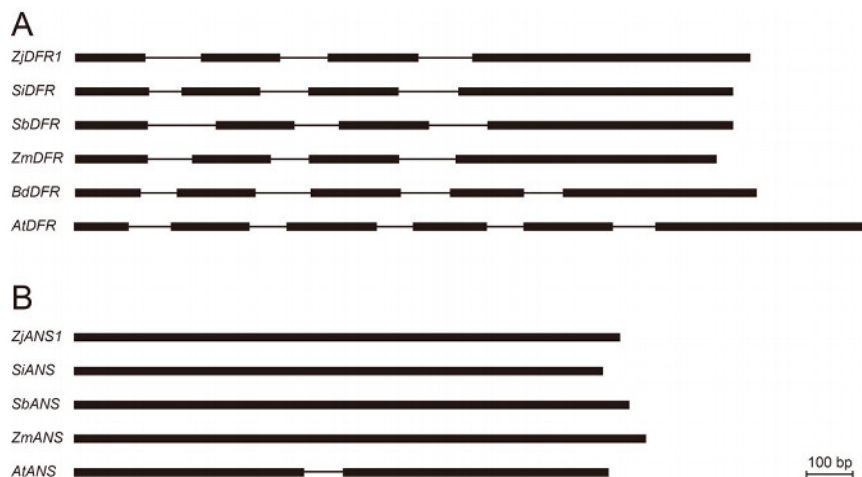


그림 30. *ZjDFR1*과 *ZjANS1*의 다른 유사유전자와의 엑손-인트론 구조 비교

A

ZjDFR1 (AJ) ATGGGGAGGTGGTGGTGAAGCAGGGGGAAGAGGGCATGGAGGTGAAGGGACCGTGGT 60
 ZjDFR1 (GZ) ATGGGGAGGTGGTGGTGAAGCAGGGGGAAGAGGGCATGGAGGTGAAGGGACCGTGGT 60

ZjDFR1 (AJ) GTGACCGGGGCATCGGGCTTCGTGGCTCGTGGCTGCTCATGAAGCTCCAGGGCCGG 120
 ZjDFR1 (GZ) GTGACCGGGGCATCGGGCTTCGTGGCTCGTGGCTGCTCATGAAGCTCCAGGGCCGG 120

ZjDFR1 (AJ) TACACCGTCCGGCCACCGTGGCGGGCCCGGAAATGTCGGGAAGACGAGACCGTGGCTG 180
 ZjDFR1 (GZ) TACACCGTCCGGCCACCGTGGCGGGCCCGGAAATGTCGGGAAGACGAGACCGTGGCTG 180

ZjDFR1 (AJ) GACCTCCCGGAGCAAGGAGGGCTGTCCATCTATAAAGCCGACCTGAGCGACGGGG 240
 ZjDFR1 (GZ) GACCTCCCGGAGCAAGGAGGGCTGTCCATCTATAAAGCCGACCTGAGCGACGGGG 240

ZjDFR1 (AJ) AGCTTCGACGAGGCGATCAAGGCTGACCGGGCTCTTCCACGTGCGCCACGCCATGGAC 300
 ZjDFR1 (GZ) AGCTTCGACGAGGCGATCAAGGCTGACCGGGCTCTTCCACGTGCGCCACGCCATGGAC 300

ZjDFR1 (AJ) TTCGAGTCAAGGACCCGAGAACGAGGTGATCAAGCCGACGGTGAAGGGATGATGAGC 360
 ZjDFR1 (GZ) TTCGAGTCAAGGACCCGAGAACGAGGTGATCAAGCCGACGGTGAAGGGATGATGAGC 360

ZjDFR1 (AJ) ATCATGCGGGCTGCAAGGACGGCCACCGTGAAGCGCATCGTCTTACCTCATCCGGC 420
 ZjDFR1 (GZ) ATCATGCGGGCTGCAAGGACGGCCACCGTGAAGCGCATCGTCTTACCTCATCCGGC 420

ZjDFR1 (AJ) GGGACAGTCAACATCGAGGGGGCGGAGGGCCGTCTACGACACGACACTGGAGCGAT 480
 ZjDFR1 (GZ) GGGACAGTCAACATCGAGGGGGCGGAGGGCCGTCTACGACACGACACTGGAGCGAT 480

ZjDFR1 (AJ) ATCGACTTTTCCGGCCGGTCAAGATGACCGGATGGATGACTTGTGTTCCAAGTCCCTG 540
 ZjDFR1 (GZ) ATCGACTTTTCCGGCCGGTCAAGATGACCGGATGGATGACTTGTGTTCCAAGTCCCTG 540

ZjDFR1 (AJ) GCGGAGAAGCGCCATGGCTACGGGGGAGCAGGGCTGGACCTTATCAGCATATC 600
 ZjDFR1 (GZ) GCGGAGAAGCGCCATGGCTACGGGGGAGCAGGGCTGGACCTTATCAGCATATC 600

ZjDFR1 (AJ) CCGACGCTGGGTGGCCGCTTCTCAGCAGGCGATGCGGGCCAGCTCTGTCAAGCG 660
 ZjDFR1 (GZ) CCGACGCTGGGTGGCCGCTTCTCAGCAGGCGATGCGGGCCAGCTCTGTCAAGCG 660

ZjDFR1 (AJ) CTGGCGTCTGTACAGGAGAACGCGCACTACTCGATCCTCAAGCAGGTGCAAGTTCGT 720
 ZjDFR1 (GZ) CTGGCGTCTGTACAGGAGAACGCGCACTACTCGATCCTCAAGCAGGTGCAAGTTCGT 720

ZjDFR1 (AJ) CACCTCGACGACTCTGCGAGCGCGAGATTACCTCTTCCGAGCACCGGACCGCCCGCG 780
 ZjDFR1 (GZ) CACCTCGACGACTCTGCGAGCGCGAGATTACCTCTTCCGAGCACCGGACCGCCCGCG 780

ZjDFR1 (AJ) CGCTACGCTGCTCCTCCGAGCAGCCACCATCCACGGCTCGCAGCCATGCTCAGGGAG 840
 ZjDFR1 (GZ) CGCTACGCTGCTCCTCCGAGCAGCCACCATCCACGGCTCGCAGCCATGCTCAGGGAG 840

ZjDFR1 (AJ) AGGTACCCCGATGACGATCCCGGAGGCTTCCGGGGATCGAGGACGACCTCCCGCCG 900
 ZjDFR1 (GZ) AGGTACCCCGATGACGATCCCGGAGGCTTCCGGGGATCGAGGACGACCTCCCGCCG 900

ZjDFR1 (AJ) GTGCACCTTTCCCAAGAAGCTCTCGACCAGGGTTACAGTTACAGTACAGGTGACG 960
 ZjDFR1 (GZ) GTGCACCTTTCCCAAGAAGCTCTCGACCAGGGTTACAGTTACAGTACAGGTGACG 960

ZjDFR1 (AJ) GACATGTTGACGAGGCCATAGGACGTGACGGAGAAAGGGCTGATCCCGCTCGCTACG 1020
 ZjDFR1 (GZ) GACATGTTGACGAGGCCATAGGACGTGACGGAGAAAGGGCTGATCCCGCTCGCTACG 1020

ZjDFR1 (AJ) CCTGGAGGTGACGGCTCCATGGATGAGCTGGCGAGACGGGAGGGCATTGGGAAGGATG 1080
 ZjDFR1 (GZ) CCTGGAGGTGACGGCTCCATGGATGAGCTGGCGAGACGGGAGGGCATTGGGAAGGATG 1080

ZjDFR1 (AJ) GCCCGGATGCTGCTTAGAAGGAGCATGTGTGA 1116
 ZjDFR1 (GZ) GCCCGGATGCTGCTTAGAAGGAGCATGTGTGA 1116

B

ZjANS1 (AJ) ATGTCATCTTCGACGGTGTGACGACGACCGCCGGCCGCGACCGGTGGAGGGCTCAGC 60
 ZjANS1 (GZ) ATGTCATCTTCGACGGTGTGACGACGACCGCCGGCCGCGACCGGTGGAGGGCTCAGC 60

ZjANS1 (AJ) CTCAGCAGCTCTCCGGTATCCCGCCGAGTACGTCCGACCCCGCAGCAAGCGCGGGC 120
 ZjANS1 (GZ) CTCAGCAGCTCTCCGGTATCCCGCCGAGTACGTCCGACCCCGCAGCAAGCGCGGGC 120

ZjANS1 (AJ) CTGGCGAGCGCTTCGACCTTTTGGCTGAACAATAGACGACGTCGCGGATCCCGCTC 180
 ZjANS1 (GZ) CTGGCGAGCGCTTCGACCTTTTGGCTGAACAATAGACGACGTCGCGGATCCCGCTC 180

ZjANS1 (AJ) GTCCGACATCTCCCTTTCCCTGATGACACCGGTGGCGCGCAGCAAGGATCAGCGC 240
 ZjANS1 (GZ) GTCCGACATCTCCCTTTCCCTGATGACACCGGTGGCGCGCAGCAAGGATCAGCGC 240

ZjANS1 (AJ) CAGTGGGTGATGCGGTGGCGCGGGCTGCGGAATGGGGCTCATGCACATCGCGGGC 300
 ZjANS1 (GZ) CAGTGGGTGATGCGGTGGCGCGGGCTGCGGAATGGGGCTCATGCACATCGCGGGC 300

ZjANS1 (AJ) CACGGCATCCCGCAGCAGCTTGTGACTGCTCCAAAGCCCGCCAGCCGCTTCTTCGCG 360
 ZjANS1 (GZ) CACGGCATCCCGCAGCAGCTTGTGACTGCTCCAAAGCCCGCCAGCCGCTTCTTCGCG 360

ZjANS1 (AJ) CTCCCATCCACGCCAAGGAGGCTACGCCAAGACCCCGCCCGCGCCGCTGCAAGGC 420
 ZjANS1 (GZ) CTCCCATCCACGCCAAGGAGGCTACGCCAAGACCCCGCCCGCGCCGCTGCAAGGC 420

ZjANS1 (AJ) TAGCGCAGCGCTCGCCACCAAGCCAGTGGCGAGCGGAGTGGGAGGACTACTCTTC 480
 ZjANS1 (GZ) TAGCGCAGCGCTCGCCACCAAGCCAGTGGCGAGCGGAGTGGGAGGACTACTCTTC 480

ZjANS1 (AJ) CACCTCTGACCCCGAGGGCTCGCCGACCAAGCCCTGTGGCCCGCAGCCCGCCGAC 540
 ZjANS1 (GZ) CACCTCTGACCCCGAGGGCTCGCCGACCAAGCCCTGTGGCCCGCAGCCCGCCGAC 540

ZjANS1 (AJ) TACGTCCACACCCCGGAGTTGGCGCGGCTGCTGAGTGGCTCGAGGCTGCTC 600
 ZjANS1 (GZ) TACGTCCACACCCCGGAGTTGGCGCGGCTGCTGAGTGGCTCGAGGCTGCTC 600

ZjANS1 (AJ) GCCATCTCTGCTGGGGCTGGGCTGGCCAGCAGCACAAGTAAAGGATGAGCTTACC 660
 ZjANS1 (GZ) GCCATCTCTGCTGGGGCTGGGCTGGCCAGCAGCACAAGTAAAGGATGAGCTTACC 660

ZjANS1 (AJ) AATAATAGGACCAAGGAGGATGGAGATCAGGAGATCTTCTCTCAGCTCAAGATC 720
 ZjANS1 (GZ) AATAATAGGACCAAGGAGGATGGAGATCAGGAGATCTTCTCTCAGCTCAAGATC 720

ZjANS1 (AJ) AACTACTACCCGGGTGCCGACGGCGAGCTGGCGTGGTGTGAGGCCACACGGAC 780
 ZjANS1 (GZ) AACTACTACCCGGGTGCCGACGGCGAGCTGGCGTGGTGTGAGGCCACACGGAC 780

ZjANS1 (AJ) GTCAGCGGCTCTCTTTCATCTCCACAAAGGGGTGCGAGGGTGCAGGTGCTCATGGC 840
 ZjANS1 (GZ) GTCAGCGGCTCTCTTTCATCTCCACAAAGGGGTGCGAGGGTGCAGGTGCTCATGGC 840

ZjANS1 (AJ) GGCAGTGGGTGACGGCGGCTCGAGCCCGGACCATGATAGTACAGTTGGGACGCC 900
 ZjANS1 (GZ) GGCAGTGGGTGACGGCGGCTCGAGCCCGGACCATGATAGTACAGTTGGGACGCC 900

ZjANS1 (AJ) CTCGAGATCTCAGCAATGGCGGTACACCGGTGCTGCACCGGGTCTGCTCAACCGC 960
 ZjANS1 (GZ) CTCGAGATCTCAGCAATGGCGGTACACCGGTGCTGCACCGGGTCTGCTCAACCGC 960

ZjANS1 (AJ) GAGGCGGTGCGGTTCTCTGGGTGCTTCTGCGAGCCGACACAGAGCCGCTGCTCTG 1020
 ZjANS1 (GZ) GAGGCGGTGCGGTTCTCTGGGTGCTTCTGCGAGCCGACACAGAGCCGCTGCTCTG 1020

ZjANS1 (AJ) CGGCCGCTACCGGAGTGGTCAAGGAGGAGCCCGCCGTTACCGCCGGCAGCATTC 1080
 ZjANS1 (GZ) CGGCCGCTACCGGAGTGGTCAAGGAGGAGCCCGCCGTTACCGCCGGCAGCATTC 1080

ZjANS1 (AJ) AAGGAGCACTCCAGCGAGCTTTCAAGAAGCAGGAGCTGACGGCTACAAGCCGGAC 1140
 ZjANS1 (GZ) AAGGAGCACTCCAGCGAGCTTTCAAGAAGCAGGAGCTGACGGCTACAAGCCGGAC 1140

ZjANS1 (AJ) CACCAAGTATTGCGGATTCATACCGAAAACCACTGA 1179
 ZjANS1 (GZ) CACCAAGTATTGCGGATTCATACCGAAAACCACTGA 1179

그림 31. 중지와 그린조아에서 ZjDFR1과 ZjANS1의 CDS 서열 비교

	▼▼▼▼▼	
AJ	MGEVVVKQGEAEVKGPPVVVTGASGFVGSWLVKLLQAGYTVRATVVRGPANVGKTRPLL	60
Meyer	MGEVVVKQGEAEVKGPPVVVTGASGFVGSWLVKLLQAGYTVRATVVRGPANVGKTRPLL	60
Senock	MGEVVVKQGEAEVKGPPVVVTGASGFVGSWLVKLLQAGYTVRATVVRGPANVGKTRPLL	60
Yaji	MGEVVVKQGEAEVKGPPVVVTGASGFVGSWLVKLLQAGYTVRATVVRGPANVGKTRPLL	60
Gumjandi	MGEVVVKQGEAEVKGPPVVVTGASGFVGSWLVKLLQAGYTVRATVVRGPANVGKTRPLL	60
Konhee	MGEVVVKQGEAEVKGPPVVVTGASGFVGSWLVKLLQAGYTVRATVVRGPANVGKTRPLL	60
GZ	MGEVVVKQGEAEVKGPPVVVTGASGFVGSWLVKLLQAGYTVRATVVRGPANVGKTRPLL	60
Millock	MGEVVVKQGEAEVKGPPVVVTGASGFVGSWLVKLLQAGYTVRATVVRGPANVGKTRPLL	60
Zenith	MGEVVVKQGEAEVKGPPVVVTGASGFVGSWLVKLLQAGYTVRATVVRGPANVGKTRPLL	60
	*****:***** *****:*****	
AJ	DLPGAERLSIYKADLSDEGSFDEAIKGCTGVFHVATPMDFESKDPENEVIKPTVEGMMS	120
Meyer	DLPGAERLSIYKADLSDEGSFDEAIKGCTGVFHVATPMDFESKDPENEVIKPTVEGMMS	120
Senock	DLPGAERLSIYKADLSDEGSFDEAIKGCTGVFHVATPMDFESKDPENEVIKPTVEGMMS	120
Yaji	DLPGAERLSIYKADLSDEGSFDEAIKGCTGVFHVATPMDFESKDPENEVIKPTVEGMMS	120
Gumjandi	DLPGAERLSIYKADLSDEGSFDEAIKGCTGVFHVATPMDFESKDPENEVIKPTVEGMMS	120
Konhee	DLPGAERLSIYKADLSDEGSFDEAIKGCTGVFHVATPMDFESKDPENEVIKPTVEGMMS	120
GZ	DLPGAERLSIYKADLSDEGSFDEAIKGCTGVFHVATPMDFESKDPENEVIKPTVEGMMS	120
Millock	DLPGAERLSIYKADLSDEGSFDEAIKGCTGVFHVATPMDFESKDPENEVIKPTVEGMMS	120
Zenith	DLPGAERLSIYKADLSDEGSFDEAIKGCTGVFHVATPMDFESKDPENEVIKPTVEGMMS	120
	*****:*****	
AJ	IMRACKDAGTVKRIVFTSSAGTVNIEGRQRPVYDHDNWSIDFCRRVKMTGWMYFVSKSL	180
Meyer	IMRACKDAGTVKRIVFTSSAGTVNIEGRQRPVYDHDNWSIDFCRRVKMTGWMYFVSKSL	180
Senock	IMRACKDAGTVKRIVFTSSAGTVNIEGRQRPVYDHDNWSIDFCRRVKMTGWMYFVSKSL	180
Yaji	IMRACKDAGTVKRIVFTSSAGTVNIEGRQRPVYDHDNWSIDFCRRVKMTGWMYFVSKSL	180
Gumjandi	IMRACKDAGTVKRIVFTSSAGTVNIEGRQRPVYDHDNWSIDFCRRVKMTGWMYFVSKSL	180
Konhee	IMRACKDAGTVKRIVFTSSAGTVNIEGRQRPVYDHDNWSIDFCRRVKMTGWMYFVSKSL	180
GZ	IMRACKDAGTVKRIVFTSSAGTVNIEGRQRPVYDHDNWSIDFCRRVKMTGWMYFVSKSL	180
Millock	IMRACKDAGTVKRIVFTSSAGTVNIEGRQRPVYDHDNWSIDFCRRVKMTGWMYFVSKSL	180
Zenith	IMRACKDAGTVKRIVFTSSAGTVNIEGRQRPVYDHDNWSIDFCRRVKMTGWMYFVSKSL	180
	*****:*****	
AJ	AEKAAMAYAAEHGLDLISIIPTLVVGPFLSTAMPSSLVTALALVTRNEPHYSILKQVQFV	240
Meyer	AEKAAMAYAAEHGLDLISIIPTLVVGPFLSTAMPSSLVTALALVTRNEPHYSILKQVQFV	240
Senock	AEKAAMAYAAEHGLDLISIIPTLVVGPFLSTAMPSSLVTALALVTRNEPHYSILKQVQFV	240
Yaji	AEKAAMAYAAEHGLDLISIIPTLVVGPFLSTAMPSSLVTALALVTRNEPHYSILKQVQFV	240
Gumjandi	AEKAAMAYAAEHGLDLISIIPTLVVGPFLSTAMPSSLVTALALVTRNEPHYSILKQVQFV	240
Konhee	AEKAAMAYAAEHGLDLISIIPTLVVGPFLSTAMPSSLVTALALVTRNEPHYSILKQVQFV	240
GZ	AEKAAMAYAAEHGLDLISIIPTLVVGPFLSTAMPSSLVTALALVTRNEPHYSILKQVQFV	240
Millock	AEKAAMAYAAEHGLDLISIIPTLVVGPFLSTAMPSSLVTALALVTRNEPHYSILKQVQFV	240
Zenith	AEKAAMAYAAEHGLDLISIIPTLVVGPFLSTAMPSSLVTALALVTRNEPHYSILKQVQFV	240
	*****:*****	
AJ	HLDDLCDAEIYLFEPDAAGRYVCSDDATIHGLAAMLRERYPEYDIPESFPGIDDDLPP	300
Meyer	HLDDLCDAEIYLFEPDAAGRYVCSDDATIHGLAAMLRERYPEYDIPESFPGIDDDLPP	300
Senock	HLDDLCDAEIYLFEPDAAGRYVCSDDATIHGLAAMLRERYPEYDIPESFPGIDDDLPP	300
Yaji	HLDDLCDAEIYLFEPDAAGRYVCSDDATIHGLAAMLRERYPEYDIPESFPGIDDDLPP	300
Gumjandi	HLDDLCDAEIYLFEPDAAGRYVCSDDATIHGLAAMLRERYPEYDIPESFPGIDDDLPP	300
Konhee	HLDDLCDAEIYLFEPDAAGRYVCSDDATIHGLAAMLRERYPEYDIPESFPGIDDDLPP	300
GZ	HLDDLCDAEIYLFEPDAAGRYVCSDDATIHGLAAMLRERYPEYDIPESFPGIDDDLPP	300
Millock	HLDDLCDAEIYLFEPDAAGRYVCSDDATIHGLAAMLRERYPEYDIPESFPGIDDDLPP	300
Zenith	HLDDLCDAEIYLFEPDAAGRYVCSDDATIHGLAAMLRERYPEYDIPESFPGIDDDLPP	300
	*****:*****	
AJ	VHFSSKLLDHGFRFRYTVQDMFDAIRTCREKGLIPLATPGGDGSMDEPGETGAALGRM	360
Meyer	VHFSSKLLDHGFRFRYTVQDMFDAIRTCREKGLIPLATPGGDGSMDEPGETGAALGRM	360
Senock	VHFSSKLLDHGFRFRYTVQDMFDAIRTCREKGLIPLATPGGDGSMDEPGETGAALGRM	360
Yaji	VHFSSKLLDHGFRFRYTVQDMFDAIRTCREKGLIPLATPGGDGSMDEPGETGAALGRM	360
Gumjandi	VHFSSKLLDHGFRFRYTVQDMFDAIRTCREKGLIPLATPGGDGSMDEPGETGAALGRM	360
Konhee	VHFSSKLLDHGFRFRYTVQDMFDAIRTCREKGLIPLATPGGDGSMDEPGETGAALGRM	360
GZ	VHFSSKLLDHGFRFRYTVQDMFDAIRTCREKGLIPLATPGGDGSMDEPGETGAALGRM	360
Millock	VHFSSKLLDHGFRFRYTVQDMFDAIRTCREKGLIPLATPGGDGSMDEPGETGAALGRM	360
Zenith	VHFSSKLLDHGFRFRYTVQDMFDAIRTCREKGLIPLATPGGDGSMDEPGETGAALGRM	360
	*****:*****	
AJ	ARRSSLRREHV	371
Meyer	ARRSSLRREHV	371
Senock	ARRSSLRREHV	371
Yaji	ARRSSLRREHV	371
Gumjandi	ARRSSLRREHV	371
Konhee	ARRSSLRREHV	371
GZ	ARRSSLRREHV	371
Millock	ARRSSLRREHV	371
Zenith	ARRSSLRREHV	371

그림 32. 잔디 9개 품종에서의 ZjDFR1 단백질 서열 유사도 비교 분석

AJ	MSSSTVLQPPAAARVEALSLSLSAIPPEYVRPADERAGLGDAFDLLAEQLDDGPRIPV	60
Meyer	MSSSTVLQPPAAARVEALSLSLSAIPPEYVRPADERAGLGDAFDLLAEQLDDGPRIPV	60
Senock	MSSSTVLQPPAAARVEALSLSLSAIPPEYVRPADERAGLGDAFDLLAEQLDDGPRIPV	60
Yaji	MSSSTVLQPPAAARVEALSLSLSAIPPEYVRPADERAGLGDAFDLLAEQLDDGPRIPV	60
Gumjandi	MSSSTVLQPPAAARVEALSLSLSAIPPEYVRPADERAGLGDAFDLLAEQLDDGPRIPV	60
Konhee	MSSSTVLQPPAAARVEALSLSLSAIPPEYVRPADERAGLGDAFDLLAEQLDDGPRIPV	60
GZ	MSSSTVLQPPAAARVEALSLSLSAIPPEYVRPADERAGLGDAFDLLAEQLDDGPRIPV	60
Millock	MSSSTVLQPPAAARVEALSLSLSAIPPEYVRPADERAGLGDAFDLLAEQLDDGPRIPV	60
Zenith	MSSSTVLQPPAAARVEALSLSLSAIPPEYVRPADERAGLGDAFDLLAEQLDDGPRIPV	60

AJ	VDISPFLLMTGGADKKDQPCQVDVRAAAAEGVMHIAGHGIPDELVDCLQAAGTAFFA	120
Meyer	VDISPFLLMTGGADKKDQPCQVDVRAAAAEGVMHIAGHGIPDELVDCLQAAGTAFFA	120
Senock	VDISPFLLMTGGADKKDQPCQVDVRAAAAEGVMHIAGHGIPDELVDCLQAAGTAFFA	120
Yaji	VDISPFLLMTGGADKKDQPCQVDVRAAAAEGVMHIAGHGIPDELVDCLQAAGTAFFA	120
Gumjandi	VDISPFLLMTGGADKKDQPCQVDVRAAAAEGVMHIAGHGIPDELVDCLQAAGTAFFA	120
Konhee	VDISPFLLMTGGADKKDQPCQVDVRAAAAEGVMHIAGHGIPDELVDCLQAAGTAFFA	120
GZ	VDISPFLLMTGGADKKDQPCQVDVRAAAAEGVMHIAGHGIPDELVDCLQAAGTAFFA	120
Millock	VDISPFLLMTGGADKKDQPCQVDVRAAAAEGVMHIAGHGIPDELVDCLQAAGTAFFA	120
Zenith	VDISPFLLMTGGADKKDQPCQVDVRAAAAEGVMHIAGHGIPDELVDCLQAAGTAFFA	120

AJ	LPIHAKAYANDPAAGRLQGYGSRLATNASGQREWEDYLFHLLHPDGLADHALWPAHPPD	180
Meyer	LPIHAKAYANDPAAGRLQGYGSRLATNASGQREWEDYLFHLLHPDGLADHALWPAHPPD	180
Senock	LPIHAKAYANDPAAGRLQGYGSRLATNASGQREWEDYLFHLLHPDGLADHALWPAHPPD	180
Yaji	LPIHAKAYANDPAAGRLQGYGSRLATNASGQREWEDYLFHLLHPDGLADHALWPAHPPD	180
Gumjandi	LPIHAKAYANDPAAGRLQGYGSRLATNASGQREWEDYLFHLLHPDGLADHALWPAHPPD	180
Konhee	LPIHAKAYANDPAAGRLQGYGSRLATNASGQREWEDYLFHLLHPDGLADHALWPAHPPD	180
GZ	LPIHAKAYANDPAAGRLQGYGSRLATNASGQREWEDYLFHLLHPDGLADHALWPAHPPD	180
Millock	LPIHAKAYANDPAAGRLQGYGSRLATNASGQREWEDYLFHLLHPDGLADHALWPAHPPD	180
Zenith	LPIHAKAYANDPAAGRLQGYGSRLATNASGQREWEDYLFHLLHPDGLADHALWPAHPPD	180

AJ	YVATREFGRRVRELASRLLAISLGLGLRNEHKLEDELTTNRTKAGDGDQEDLLQLKI	240
Meyer	YVATREFGRRVRELASRLLAISLGLGLRNEHKLEDELTTNRTKAGDGDQEDLLQLKI	240
Senock	YVATREFGRRVRELASRLLAISLGLGLRNEHKLEDELTTNRTKAGDGDQEDLLQLKI	240
Yaji	YVATREFGRRVRELASRLLAISLGLGLRNEHKLEDELTTNRTKAGDGDQEDLLQLKI	240
Gumjandi	YVATREFGRRVRELASRLLAISLGLGLRNEHKLEDELTTNRTKAGDGDQEDLLQLKI	240
Konhee	YVATREFGRRVRELASRLLAISLGLGLRNEHKLEDELTTNRTKAGDGDQEDLLQLKI	240
GZ	YVATREFGRRVRELASRLLAISLGLGLRNEHKLEDELTTNRTKAGDGDQEDLLQLKI	240
Millock	YVATREFGRRVRELASRLLAISLGLGLRNEHKLEDELTTNRTKAGDGDQEDLLQLKI	240
Zenith	YVATREFGRRVRELASRLLAISLGLGLRNEHKLEDELTTNRTKAGDGDQEDLLQLKI	240

▼▼		
AJ	NYYPRCPQPELAVGVEAHTDVSALSFIHNGVPLQVLHGGRWVTARSEPGMTIVHVGD	300
Meyer	NYYPRCPQPELAVGVEAHTDVSALSFIHNGVPLQVLHGGRWVTARSEPGMTIVHVGD	300
Senock	NYYPRCPQPELAVGVEAHTDVSALSFIHNGVPLQVLHGGRWVTARSEPGMTIVHVGD	300
Yaji	NYYPRCPQPELAVGVEAHTDVSALSFIHNGVPLQVLHGGRWVTARSEPGMTIVHVGD	300
Gumjandi	NYYPRCPQPELAVGVEAHTDVSALSFIHNGVPLQVLHGGRWVTARSEPGMTIVHVGD	300
Konhee	NYYPRCPQPELAVGVEAHTDVSALSFIHNGVPLQVLHGGRWVTARSEPGMTIVHVGD	300
GZ	NYYPRCPQPELAVGVEAHTDVSALSFIHNGVPLQVLHGGRWVTARSEPGMTIVHVGD	300
Millock	NYYPRCPQPELAVGVEAHTDVSALSFIHNGVPLQVLHGGRWVTARSEPGMTIVHVGD	300
Zenith	NYYPRCPQPELAVGVEAHTDVSALSFIHNGVPLQVLHGGRWVTARSEPGMTIVHVGD	300

▼▼		
AJ	LEILSNGRYTSVLHRLGNREAVRVSWVVFCEPPDAVLLRPLPELVTEEEPARTPTRF	360
Meyer	LEILSNGRYTSVLHRLGNREAVRVSWVVFCEPPDAVLLRPLPELVTEEEPARTPTRF	360
Senock	LEILSNGRYTSVLHRLGNREAVRVSWVVFCEPPDAVLLRPLPELVTEEEPARTPTRF	360
Yaji	LEILSNGRYTSVLHRLGNREAVRVSWVVFCEPPDAVLLRPLPELVTEEEPARTPTRF	360
Gumjandi	LEILSNGRYTSVLHRLGNREAVRVSWVVFCEPPDAVLLRPLPELVTEEEPARTPTRF	360
Konhee	LEILSNGRYTSVLHRLGNREAVRVSWVVFCEPPDAVLLRPLPELVTEEEPARTPTRF	360
GZ	LEILSNGRYTSVLHRLGNREAVRVSWVVFCEPPDAVLLRPLPELVTEEEPARTPTRF	360
Millock	LEILSNGRYTSVLHRLGNREAVRVSWVVFCEPPDAVLLRPLPELVTEEEPARTPTRF	360
Zenith	LEILSNGRYTSVLHRLGNREAVRVSWVVFCEPPDAVLLRPLPELVTEEEPARTPTRF	360

AJ	KEHLDRKLFKKRSSRSTSVNERDGYKPDHQVIRDSSPKTN	400
Meyer	KEHLDRKLFKKRSSRSTSVNERDGYKPDHQVIRDSSPKTN	400
Senock	KEHLDRKLFKKRSSRSTSVNERDGYKPDHQVIRDSSPKTN	400
Yaji	KEHLDRKLFKKRSSRSTSVNERDGYKPDHQVIRDSSPKTN	400
Gumjandi	KEHLDRKLFKKRSSRSTSVNERDGYKPDHQVIRDSSPKTN	400
Konhee	KEHLDRKLFKKRSSRSTSVNERDGYKPDHQVIRDSSPKTN	400
GZ	KEHLDRKLFKKRSSRSTSVNERDGYKPDHQVIRDSSPKTN	400
Millock	KEHLDRKLFKKRSSRSTSVNERDGYKPDHQVIRDSSPKTN	400
Zenith	KEHLDRKLFKKRSSRSTSVNERDGYKPDHQVIRDSSPKTN	400

그림 33. 잔디 9개 품종에서의 ZjANS1 단백질 서열 유사도 비교 분석


```

AJ          CATTAAGTTCGAATATCCAGACTTCAAACCTAGAGCAATCATCCAATGAGGACGGCCAC -368
Meyer      CATTAAGTTCGAATATCCAGACTTCAAACCTAGAGCAATCATCCAATGAGGACGGCCAC -368
Senock     CATTAAGTTCGAATATCCAGACTTCAAACCTAGAGCAATCATCCAATGAGGACGGCCAC -368
Yaji       CATTAAGTTCGAATATCCAGACTTCAAACCTAGAGCAATCATCCAATGAGGACGGCCAC -368
Gumjandi   CATTAAGTTCGAATATCCAGACTTCAAACCTAGAGCAATCATCCAATGAGGACGGCCAC -368
Konhee     CATTAAGTTCGAATATCCAGACTTCAAACCTAGAGCAATCATCCAATGAGGACGGCCAC -368
GZ         CATTAAGTTCGAATATCCAGACTTCAAACCTAGAGCAATCATCCAATGAGGACGGCCAC -368
Millock    CATTAAGTTCGAATATCCAGACTTCAAACCTAGAGCAATCATCCAATGAGGACGGCCAC -368
Zenith     CATTAAGTTCGAATATCCAGACTTCAAACCTAGAGCAATCATCCAATGAGGACGGCCAC -368
*****

AJ          GTAGAGGCGGTTGAGAGACCAGTAGCGGTCCTCTTAATGCTCCTGTGGACGGGTGAGATT -308
Meyer      GTAGAGGCGGTTGAGAGACCAGTAGCGGTCCTCTTAATGCTCCTGTGGACGGGTGAGATT -308
Senock     GTAGAGGCGGTTGAGAGACCAGTAGCGGTCCTCTTAATGCTCCTGTGGACGGGTGAGATT -308
Yaji       GTAGAGGCGGTTGAGAGACCAGTAGCGGTCCTCTTAATGCTCCTGTGGACGGGTGAGATT -308
Gumjandi   GTAGAGGCGGTTGAGAGACCAGTAGCGGTCCTCTTAATGCTCCTGTGGACGGGTGAGATT -308
Konhee     GTAGAGGCGGTTGAGAGACCAGTAGCGGTCCTCTTAATGCTCCTGTGGACGGGTGAGATT -308
GZ         GTAGAGGCGGTTGAGAGACCAGTAGCGGTCCTCTTAATGCTCCTGTGGACGGGTGAGATT -308
Millock    GTAGAGGCGGTTGAGAGACCAGTAGCGGTCCTCTTAATGCTCCTGTGGACGGGTGAGATT -308
Zenith     GTAGAGGCGGTTGAGAGACCAGTAGCGGTCCTCTTAATGCTCCTGTGGACGGGTGAGATT -308
*****

AJ          CATTTTCGTCGCCGATCAATCGGCCAGTCAACCACATCTGCAGTCTTGCAGACGGGTTGGC -248
Meyer      CATTTTCGTCGCCGATCAATCGGCCAGTCAACCACATCTGCAGTCTTGCAGACGGGTTGGC -248
Senock     CATTTTCGTCGCCGATCAATCGGCCAGTCAACCACATCTGCAGTCTTGCAGACGGGTTGGC -248
Yaji       CATTTTCGTCGCCGATCAATCGGCCAGTCAACCACATCTGCAGTCTTGCAGACGGGTTGGC -248
Gumjandi   CATTTTCGTCGCCGATCAATCGGCCAGTCAACCACATCTGCAGTCTTGCAGACGGGTTGGC -248
Konhee     CATTTTCGTCGCCGATCAATCGGCCAGTCAACCACATCTGCAGTCTTGCAGACGGGTTGGC -248
GZ         CATTTTCGTCGCCGATCAATCGGCCAGTCAACCACATCTGCAGTCTTGCAGACGGGTTGGC -248
Millock    CATTTTCGTCGCCGATCAATCGGCCAGTCAACCACATCTGCAGTCTTGCAGACGGGTTGGC -248
Zenith     CATTTTCGTCGCCGATCAATCGGCCAGTCAACCACATCTGCAGTCTTGCAGACGGGTTGGC -248
*****

AJ          TTGAACAGAGGATACGCGCCGGCAGGACAGTGGGTGCACGTGCCATCCCCTCACCTAA -188
Meyer      TTGAACAGAGGATACGCGCCGGCAGGACAGTGGGTGCACGTGCCATCCCCTCACCTAA -188
Senock     TTGAACAGAGGATACGCGCCGGCAGGACAGTGGGTGCACGTGCCATCCCCTCACCTAA -188
Yaji       TTGAACAGAGGATACGCGCCGGCAGGACAGTGGGTGCACGTGCCATCCCCTCACCTAA -188
Gumjandi   TTGAACAGAGGATACGCGCCGGCAGGACAGTGGGTGCACGTGCCATCCCCTCACCTAA -188
Konhee     TTGAACAGAGGATACGCGCCGGCAGGACAGTGGGTGCACGTGCCATCCCCTCACCTAA -188
GZ         TTGAACAGAGGATACGCGCCGGCAGGACAGTGGGTGCACGTGCCATCCCCTCACCTAA -188
Millock    TTGAACAGAGGATACGCGCCGGCAGGACAGTGGGTGCACGTGCCATCCCCTCACCTAA -188
Zenith     TTGAACAGAGGATACGCGCCGGCAGGACAGTGGGTGCACGTGCCATCCCCTCACCTAA -188
*****

AJ          CACTAACTCGACCGATTAGGTGCAGGCGCGTGTCTGCTCGCGGTGTGATGGCCAGACGA -128
Meyer      CACTAACTCGACCGATTAGGTGCAGGCGCGTGTCTGCTCGCGGTGTGATGGCCAGACGA -128
Senock     CACTAACTCGACCGATTAGGTGCAGGCGCGTGTCTGCTCGCGGTGTGATGGCCAGACGA -128
Yaji       CACTAACTCGACCGATTAGGTGCAGGCGCGTGTCTGCTCGCGGTGTGATGGCCAGACGA -128
Gumjandi   CACTAACTCGACCGATTAGGTGCAGGCGCGTGTCTGCTCGCGGTGTGATGGCCAGACGA -128
Konhee     CACTAACTCGACCGATTAGGTGCAGGCGCGTGTCTGCTCGCGGTGTGATGGCCAGACGA -128
GZ         CACTAACTCGACCGATTAGGTGCAGGCGCGTGTCTGCTCGCGGTGTGATGGCCAGACGA -128
Millock    CACTAACTCGACCGATTAGGTGCAGGCGCGTGTCTGCTCGCGGTGTGATGGCCAGACGA -128
Zenith     CACTAACTCGACCGATTAGGTGCAGGCGCGTGTCTGCTCGCGGTGTGATGGCCAGACGA -128
*****

AJ          GGCGCGCACGGGCAGCACCTCGCCGTATTCTATATTATAGCCTGCGGGTCGCCGCTGGA -68
Meyer      GGCGCGCACGGGCAGCACCTCGCCGTATTCTATATTATAGCCTGCGGGTCGCCGCTGGA -68
Senock     GGCGCGCACGGGCAGCACCTCGCCGTATTCTATATTATAGCCTGCGGGTCGCCGCTGGA -68
Yaji       GGCGCGCACGGGCAGCACCTCGCCGTATTCTATATTATAGCCTGCGGGTCGCCGCTGGA -68
Gumjandi   GGCGCGCACGGGCAGCACCTCGCCGTATTCTATATTATAGCCTGCGGGTCGCCGCTGGA -68
Konhee     GGCGCGCACGGGCAGCACCTCGCCGTATTCTATATTATAGCCTGCGGGTCGCCGCTGGA -68
GZ         GGCGCGCACGGGCAGCACCTCGCCGTATTCTATATTATAGCCTGCGGGTCGCCGCTGGA -68
Millock    GGCGCGCACGGGCAGCACCTCGCCGTATTCTATATTATAGCCTGCGGGTCGCCGCTGGA -68
Zenith     GGCGCGCACGGGCAGCACCTCGCCGTATTCTATATTATAGCCTGCGGGTCGCCGCTGGA -68
*****

AJ          GCAGCAGCACGCGGCAGCTCAGTCACCTAGCAGTAGAGCTCGCTTAGGGAAAAATAACCCG -8
Meyer      GCAGCAGCACGCGGCAGCTCAGTCACCTAGCAGTAGAGCTCGCTTAGGGAAAAATAACCCG -8
Senock     GCAGCAGCACGCGGCAGCTCAGTCACCTAGCAGTAGAGCTCGCTTAGGGAAAAATAACCCG -8
Yaji       GCAGCAGCACGCGGCAGCTCAGTCACCTAGCAGTAGAGCTCGCTTAGGGAAAAATAACCCG -8
Gumjandi   GCAGCAGCACGCGGCAGCTCAGTCACCTAGCAGTAGAGCTCGCTTAGGGAAAAATAACCCG -8
Konhee     GCAGCAGCACGCGGCAGCTCAGTCACCTAGCAGTAGAGCTCGCTTAGGGAAAAATAACCCG -8
GZ         GCAGCAGCACGCGGCAGCTCAGTCACCTAGCAGTAGAGCTCGCTTAGGGAAAAATAACCCG -8
Millock    GCAGCAGCACGCGGCAGCTCAGTCACCTAGCAGTAGAGCTCGCTTAGGGAAAAATAACCCG -8
Zenith     GCAGCAGCACGCGGCAGCTCAGTCACCTAGCAGTAGAGCTCGCTTAGGGAAAAATAACCCG -8
*****

AJ          AAGGGAG -1
Meyer      AAGGGAG -1
Senock     AAGGGAG -1
Yaji       AAGGGAG -1
Gumjandi   GCTGGAG -1
Konhee     GCTGGAG -1
GZ         AAGGGAG -1
Millock    AAGGGAG -1
Zenith     AAGGGAG -1
*****

```

그림 34. 잔디 9개 품종에서의 ZjDFR1의 프로모터 지역의 서열 비교

AJ	GAGGAAGAAAAATAATCGATTTTAAAATTTTAAACGTGAATTAATTT	CATAATATGATGC	-416
Meyer	GAGGAAGAAAAATAATCGATTTTAAAATTTTAAACGTGAATTAATTT	CATAATATGATGC	-416
Senock	GAGGAAGAAAAATAATCGATTTTAAAATTTTAAACGTGAATTAATTT	CATAATATGATGC	-416
Yaji	GAGGAAGAAAAATAATCGATTTTAAAATTTTAAACGTGAATTAATTT	CATAATATGATGC	-416
Gumjandi	GAGGAAGAAAAATAATCGATTTTAAAATTTTAAACGTGAATTAATTT	CATAATATGATGC	-416
Konhee	GAGGAAGAAAAATAATCGATTTTAAAATTTTAAACGTGAATTAATTT	CATAATATGATGC	-416
GZ	GAGGAAGAAAAATAATCGATTTTAAAATTTTAAACGTGAATTAATTT	CATAATATGATGC	-416
Millock	GAGGAAGAAAAATAATCGATTTTAAAATTTTAAACGTGAATTAATTT	CATAATATGATGC	-416
Zenith	GAGGAAGAAAAATAATCGATTTTAAAATTTTAAACGTGAATTAATTT	CATAATATGATGC	-416

AJ	CAATAAAGTTTTAAAGAAATTAATTAATAATATGATTAATAAGTACGAGTACTATATT		-356
Meyer	CAATAAAGTTTTAAAGAAATTAATTAATAATATGATTAATAAGTACGAGTACTATATT		-356
Senock	CAATAAAGTTTTAAAGAAATTAATTAATAATATGATTAATAAGTACGAGTACTATATT		-356
Yaji	CAATAAAGTTTTAAAGAAATTAATTAATAATATGATTAATAAGTACGAGTACTATATT		-356
Gumjandi	CAATAAAGTTTTAAAGAAATTAATTAATAATATGATTAATAAGTACGAGTACTATATT		-356
Konhee	CAATAAAGTTTTAAAGAAATTAATTAATAATATGATTAATAAGTACGAGTACTATATT		-356
GZ	CAATAAAGTTTTAAAGAAATTAATTAATAATATGATTAATAAGTACGAGTACTATATT		-356
Millock	CAATAAAGTTTTAAAGAAATTAATTAATAATATGATTAATAAGTACGAGTACTATATT		-356
Zenith	CAATAAAGTTTTAAAGAAATTAATTAATAATATGATTAATAAGTACGAGTACTATATT		-356

AJ	AATATATTGTCATCGATGCTTTATACTCCAGTATTC	TTTCTTTCCCAAAGCTCTGAG	-296
Meyer	AATATATTGTCATCGATGCTTTATACTCCAGTATTC	TTTCTTTCCCAAAGCTCTGAG	-296
Senock	AATATATTGTCATCGATGCTTTATACTCCAGTATTC	TTTCTTTCCCAAAGCTCTGAG	-296
Yaji	AATATATTGTCATCGATGCTTTATACTCCAGTATTC	TTTCTTTCCCAAAGCTCTGAG	-296
Gumjandi	AATATATTGTCATCGATGCTTTATACTCCAGTATTC	TTTCTTTCCCAAAGCTCTGAG	-296
Konhee	AATATATTGTCATCGATGCTTTATACTCCAGTATTC	TTTCTTTCCCAAAGCTCTGAG	-296
GZ	AATATATTGTCATCGATGCTTTATACTCCAGTATTC	TTTCTTTCCCAAAGCTCTGAG	-296
Millock	AATATATTGTCATCGATGCTTTATACTCCAGTATTC	TTTCTTTCCCAAAGCTCTGAG	-296
Zenith	AATATATTGTCATCGATGCTTTATACTCCAGTATTC	TTTCTTTCCCAAAGCTCTGAG	-296

AJ	CGGCCTAAGGTATCTTGAGGGTGATGCCTAGCACTCGCAGGGGCTGGCACGTGGAAGG		-236
Meyer	CGGCCTAAGGTATCTTGAGGGTGATGCCTAGCACTCGCAGGGGCTGGCACGTGGAAGG		-236
Senock	CGGCCTAAGGTATCTTGAGGGTGATGCCTAGCACTCGCAGGGGCTGGCACGTGGAAGG		-236
Yaji	CGGCCTAAGGTATCTTGAGGGTGATGCCTAGCACTCGCAGGGGCTGGCACGTGGAAGG		-236
Gumjandi	CGGCCTAAGGTATCTTGAGGGTGATGCCTAGCACTCGCAGGGGCTGGCACGTGGAAGG		-236
Konhee	CGGCCTAAGGTATCTTGAGGGTGATGCCTAGCACTCGCAGGGGCTGGCACGTGGAAGG		-236
GZ	CGGCCTAAGGTATCTTGAGGGTGATGCCTAGCACTCGCAGGGGCTGGCACGTGGAAGG		-236
Millock	CGGCCTAAGGTATCTTGAGGGTGATGCCTAGCACTCGCAGGGGCTGGCACGTGGAAGG		-236
Zenith	CGGCCTAAGGTATCTTGAGGGTGATGCCTAGCACTCGCAGGGGCTGGCACGTGGAAGG		-236

AJ	TCCGAGCCGCCACACGTGGAAGGGCGCGTGGTGGTGGTGCACGACCAGTCAAACAC		-176
Meyer	TCCGAGCCGCCACACGTGGAAGGGCGCGTGGTGGTGGTGCACGACCAGTCAAACAC		-176
Senock	TCCGAGCCGCCACACGTGGAAGGGCGCGTGGTGGTGGTGCACGACCAGTCAAACAC		-176
Yaji	TCCGAGCCGCCACACGTGGAAGGGCGCGTGGTGGTGGTGCACGACCAGTCAAACAC		-176
Gumjandi	TCCGAGCCGCCACACGTGGAAGGGCGCGTGGTGGTGGTGCACGACCAGTCAAACAC		-176
Konhee	TCCGAGCCGCCACACGTGGAAGGGCGCGTGGTGGTGGTGCACGACCAGTCAAACAC		-176
GZ	TCCGAGCCGCCACACGTGGAAGGGCGCGTGGTGGTGGTGCACGACCAGTCAAACAC		-176
Millock	TCCGAGCCGCCACACGTGGAAGGGCGCGTGGTGGTGGTGCACGACCAGTCAAACAC		-176
Zenith	TCCGAGCCGCCACACGTGGAAGGGCGCGTGGTGGTGGTGCACGACCAGTCAAACAC		-176

AJ	AACCAACTGTGCCACACGAGCTTGTAGCTGCAGCAGCCTTTCTTCGTTCTGGCAAAGTC		-116
Meyer	AACCAACTGTGCCACACGAGCTTGTAGCTGCAGCAGCCTTTCTTCGTTCTGGCAAAGTC		-116
Senock	AACCAACTGTGCCACACGAGCTTGTAGCTGCAGCAGCCTTTCTTCGTTCTGGCAAAGTC		-116
Yaji	AACCAACTGTGCCACACGAGCTTGTAGCTGCAGCAGCCTTTCTTCGTTCTGGCAAAGTC		-116
Gumjandi	AACCAACTGTGCCACACGAGCTTGTAGCTGCAGCAGCCTTTCTTCGTTCTGGCAAAGTC		-116
Konhee	AACCAACTGTGCCACACGAGCTTGTAGCTGCAGCAGCCTTTCTTCGTTCTGGCAAAGTC		-116
GZ	AACCAACTGTGCCACACGAGCTTGTAGCTGCAGCAGCCTTTCTTCGTTCTGGCAAAGTC		-116
Millock	AACCAACTGTGCCACACGAGCTTGTAGCTGCAGCAGCCTTTCTTCGTTCTGGCAAAGTC		-116
Zenith	AACCAACTGTGCCACACGAGCTTGTAGCTGCAGCAGCCTTTCTTCGTTCTGGCAAAGTC		-116

AJ	ATGACGTGCGTTTATATAGTATAAAAATGCAGTAGCAGTCTTCTTCGATCCATCACCACA		-56
Meyer	ATGACGTGCGTTTATATAGTATAAAAATGCAGTAGCAGTCTTCTTCGATCCATCACCACA		-56
Senock	ATGACGTGCGTTTATATAGTATAAAAATGCAGTAGCAGTCTTCTTCGATCCATCACCACA		-56
Yaji	ATGACGTGCGTTTATATAGTATAAAAATGCAGTAGCAGTCTTCTTCGATCCATCACCACA		-56
Gumjandi	ATGACGTGCGTTTATATAGTATAAAAATGCAGTAGCAGTCTTCTTCGATCCATCACCACA		-56
Konhee	ATGACGTGCGTTTATATAGTATAAAAATGCAGTAGCAGTCTTCTTCGATCCATCACCACA		-56
GZ	ATGACGTGCGTTTATATAGTATAAAAATGCAGTAGCAGTCTTCTTCGATCCATCACCACA		-56
Millock	ATGACGTGCGTTTATATAGTATAAAAATGCAGTAGCAGTCTTCTTCGATCCATCACCACA		-56
Zenith	ATGACGTGCGTTTATATAGTATAAAAATGCAGTAGCAGTCTTCTTCGATCCATCACCACA		-56

AJ	CCTCCAATCCATATTAACAGTGTACTTGGAGGAGATTCAATTATCTGATCGAG		-1
Meyer	CCTCCAATCCATATTAACAGTGTACTTGGAGGAGATTCAATTATCTGATCGAG		-1
Senock	CCTCCAATCCATATTAACAGTGTACTTGGAGGAGATTCAATTATCTGATCGAG		-1
Yaji	CCTCCAATCCATATTAACAGTGTACTTGGAGGAGATTCAATTATCTGATCGAG		-1
Gumjandi	CCTCCAATCCATATTAACAGTGTACTTGGAGGAGATTCAATTATCTGATCGAG		-1
Konhee	CCTCCAATCCATATTAACAGTGTACTTGGAGGAGATTCAATTATCTGATCGAG		-1
GZ	CCTCCAATCCATATTAACAGTGTACTTGGAGGAGATTCAATTATCTGATCGAG		-1
Millock	CCTCCAATCCATATTAACAGTGTACTTGGAGGAGATTCAATTATCTGATCGAG		-1
Zenith	CCTCCAATCCATATTAACAGTGTACTTGGAGGAGATTCAATTATCTGATCGAG		-1

그림 35. 잔디 9개 품종에서의 ZjDFR1의 프로모터 지역의 서열 비교

제 4 절 차등발현 유전자의 기능 및 후생유전학적 영향 연구

1. *ZjDFR1*과 *ZjANS1* 프로모터 지역의 메틸레이션 양상 확인

- *ZjDFR1*과 *ZjANS1*의 품종간 프로모터지역 서열 비교 결과 착색에 의한 서열의 차이가 확인되지 않아 DNA 메틸레이션의 차이에 의한 착색차이 가능성 확인
- *ZjDFR1*과 *ZjANS1*의 프로모터 지역의 메틸레이션 양상을 비교해본 결과 중지와 그린조아 간 메틸레이션 양상의 차이가 발견되지 않았음(그림 37)

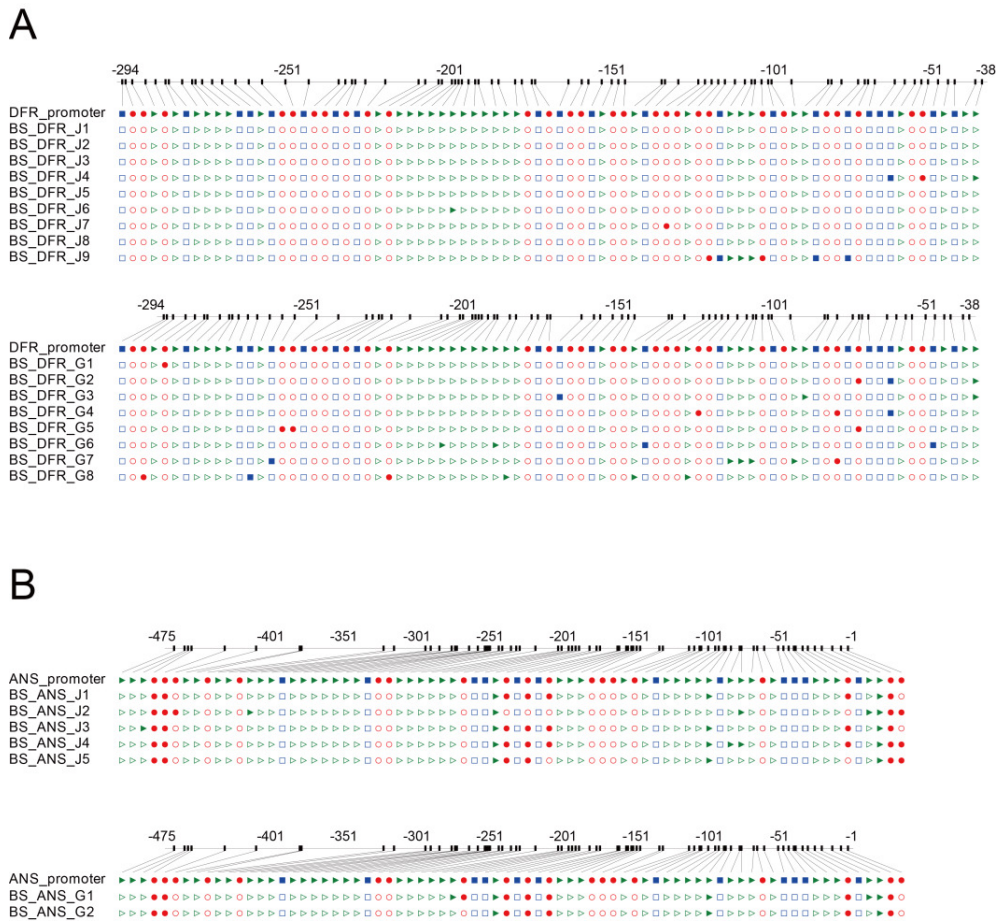


그림 37. 중지와 그린조아에서 *ZjDFR1*과 *ZjANS1*의 프로모터 지역 메틸레이션 비교

2. ZjDFR1과 ZjANS1 단백질의 in vitro 기능 확인

- ZjDFR1과 ZjANS1 단백질의 기능 확인
- 잔디에서의 ZjDFR1과 ZjANS1 단백질을 대장균에 발현시켰음 (그림 38)
- ZjDFR1의 전구물질인 dihydroflavonol과 ZjANS1의 전구물질인 leucoanthocyanidin이 각각 ZjDFR1과 ZjANS1 단백질의 촉매 작용에 의해 leucoanthocyanidin과 anthocyanidin으로 변형됨을 확인하였음 (그림 39)
- ZjDFR1의 촉매 작용에 의해 생성된 leucoanthocyanidin은 스탠다드가 없어 LC-MS 분석을 통하여 그 물질을 확인하였음 (그림 40)

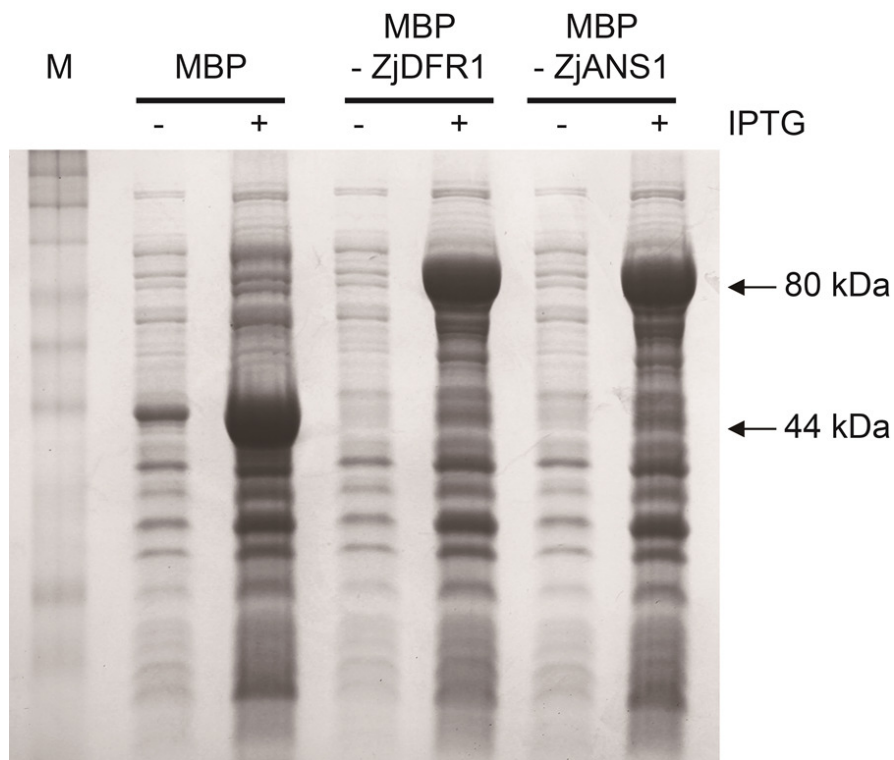


그림 38. 대장균을 통한 MBP-tagged ZjDFR1과 ZjANS1 단백질 발현 확인

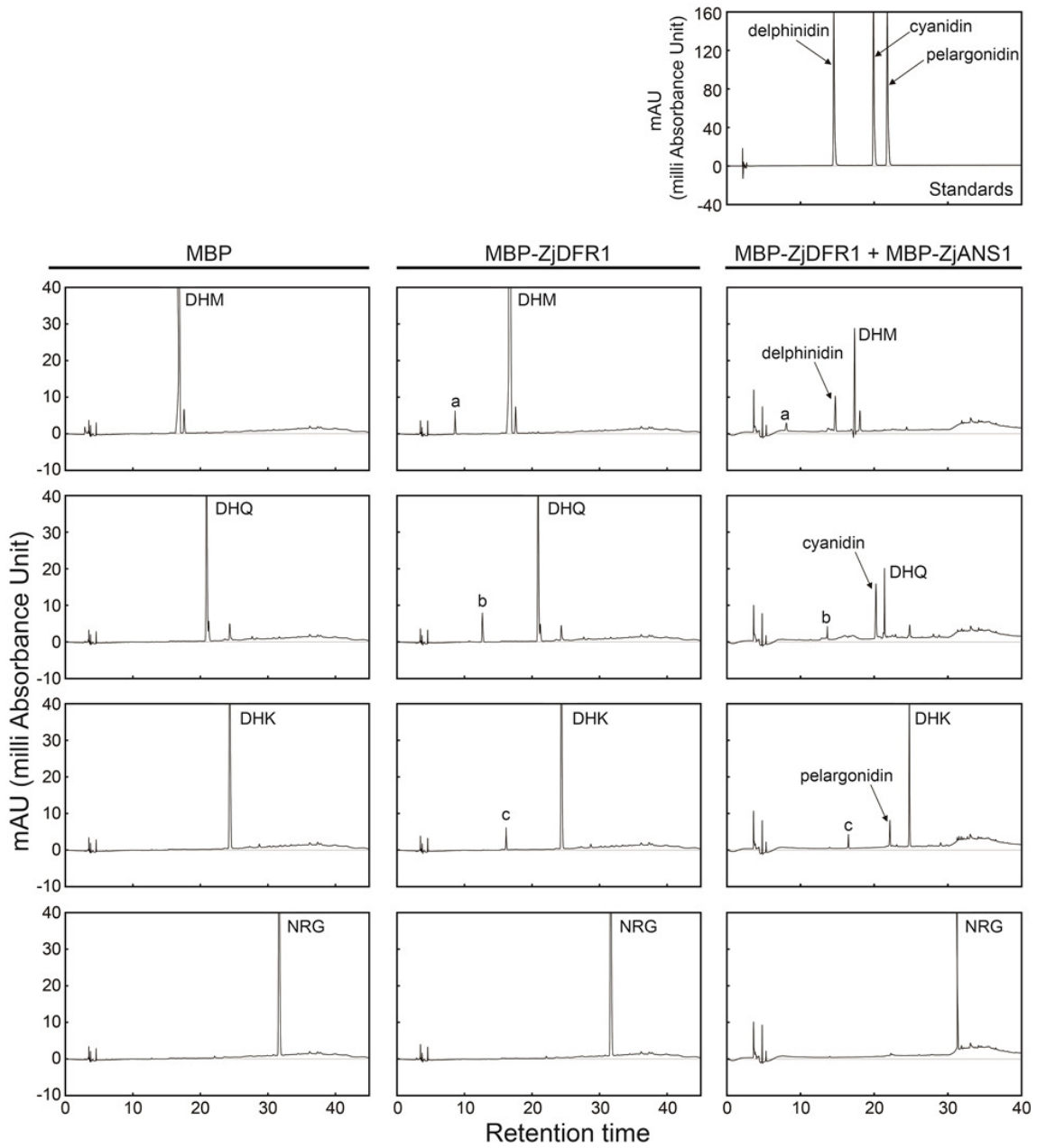


그림 39. HPLC 분석을 통한 재조합 ZjDFR1과 ZjANS1의 leucoanthocyanidin과 anthocyanidin에서의 발현 확인

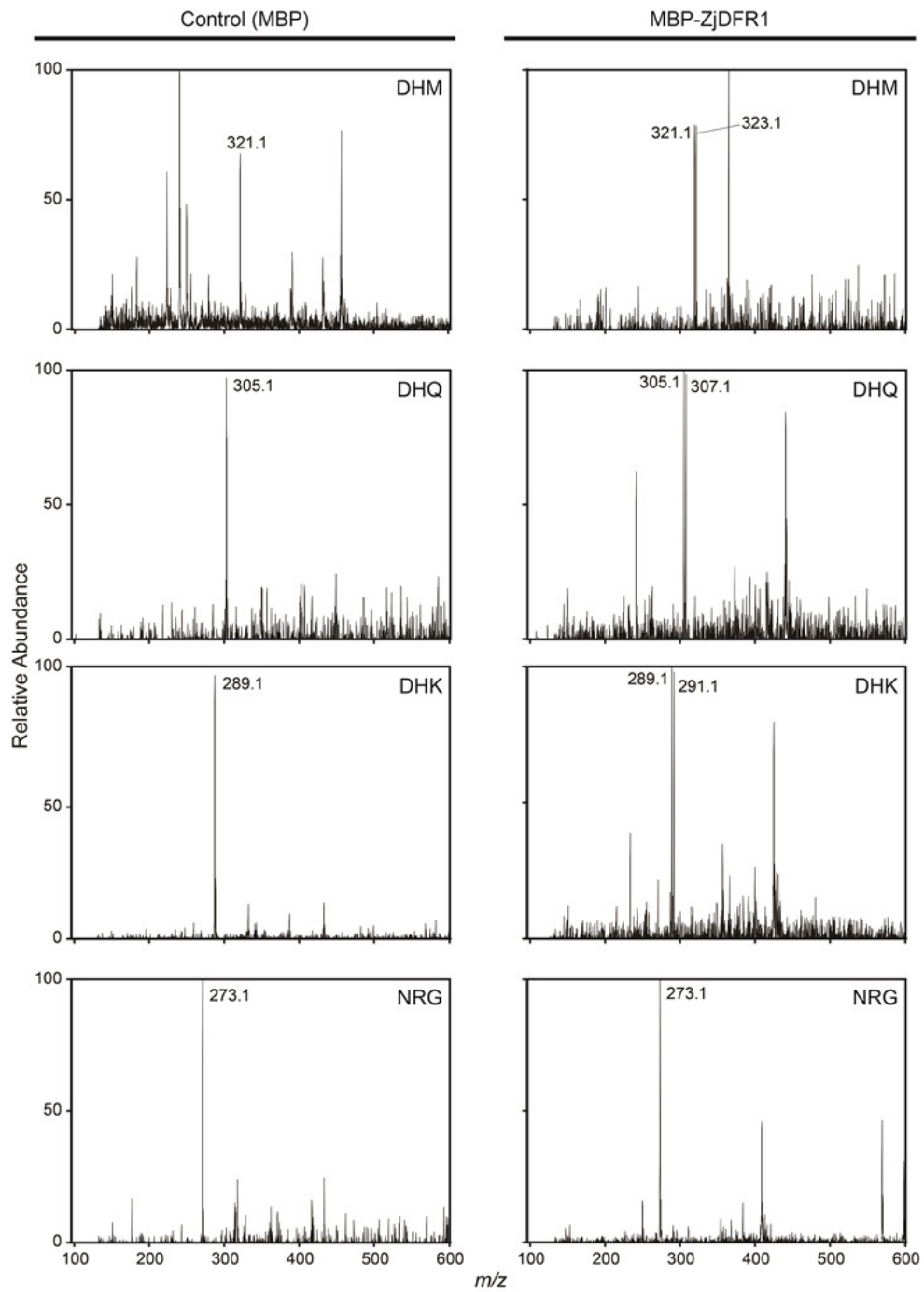


그림 40. LC-MS분석을 통한 ZjDFR1 단백질의 촉매 활성 확인.

제 4 장 목표달성도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도 (%)
1 세부	1차 년도 (2010)	- 환경내성 녹색포복경 한국잔디 (그린조아)와 한국잔디 중지를 교배하여 RIL 육성	- 선행연구에서 교배하여 확보한 F1 종자를 이용하여 녹색포복경 개체 15라인 선발 - 망실 하우스에서 그린조아와 중지의 교배 및 각각의 교배 조합으로부터 F1 종자 수확	100
		- 육성 계통의 녹색기간 관련이 있는 엽록소 함량 등 생리적 특성, 형태적, 특성 등을 조사 - 육성 계통의 특성 (녹색기간, 내한성 등)에 따라 선발된 개체 고정	- 그린조아와 중지의 형태적 특성 조사 및 특성표 작성 - 1차 선발된 그린조아와 대조구로 중지를 노지포장에서 재배하면서 생육과정 중에 나타나는 출아시기 등 녹색기간 관련 생육 특성 조사	90
	2차 년도 (2011)	- 종내 교배 계통의 특성에 따른 재배방법 개발	- 1차년도에 선발한 15라인의 생육 특성비교 조사	100
		- 선발된 후보 계통의 환경내성 특성 분석	- 증식된 개체를 이용한 환경내성 및 녹색기간과 관련된 건조내성 및 가을 낙엽기의 녹색기간 조사	100
		- 각 계통의 대량증식 포장 조건 확립	- 대량 증식 포장에서의 증식율과 재배 및 관리법 확립	100
		- 녹색포복경 그린조아와 들잔디 중지의 종내 교배조합 계통의 유전학적 특성 분석	- 선발된 개체의 염기서열분석을 통한 계통 특이 분자마커 선발을 위한 특성 분석	100
	3차 년도 (2012)	- 교배 육성 계통의 파종시기에 따른 생육 특성 조사	교배육종에 의해 수확한 종자 파종과 녹색포복경 후보 계통 선발 및 생육특성 검정	100
		- 재배방법에 따른 생육 특성 조사	- 1, 2차년도에 선발한 10라인의 생육 특성비교 조사 - 중간 정역교배 후대의 특성분석	100
		- 내재해성 후보 계통 선발	증식된 개체를 이용한 환경내성 특성 조사 - 녹색기간과 관련(엽록소 함량 변화) 생리적 특성 - 내병성(녹병발병 및 회복율 조사) - 내답압성 특성 검정(Cellulose 함량)	100
		- 환경내성 녹색포복경 우수계통 선발 및 5계통 이상 특허 및 품종보호 출원	- 선발 후보계통 특이 분자마커 개발 - 생육 특성 결과를 종합하여 후보 계통 선발	80
	4차 년도 (2013)	- 1, 2, 3차년도에 선발한 계통 및 선발 계통의 생육 특성 비교 조사 계속	- 3차년도까지 선발한 계통의 생육 특성 비교 조사 - 포장 생육 실험을 통한 후보 계통 선발	100
		- 현지 적응성 및 생육 특성 조사	- 후보 계통의 몽골 지역 적응성 및 생육특성 조사 - 내재해성(저온 및 건조) 실험	100
		- 환경저항성 특성 조사 및 용도별 특성조사	- 선발 계통의 온도, 건조, 내병, 내답압 등 내재해성 특성 조사 - 내재해성 특성에 따른 용도 구분	100
		- 계통 특이 분자표지 개발 및 품종보호 출원	- 후보 계통 특이 분자표지 개발 - 분자표지와 형질(생육 특성 및 색깔, 협동과체에서 선발한 후보 유전자 활용) 연관성 분석 - 분석 결과를 종합하여 계통 선발 및 품종보호 출원	80
	5차 년도 (2014)	- 1, 2, 3차년도에 선발한 계통 및 선발 계통의 생육 특성 비교 조사 계속	- 3차년도까지 선발한 계통의 생육 특성 비교 조사 - 포장 생육 실험을 통한 후보 계통 선발	100
		- 현지 적응성 및 생육 특성 조사	- 후보 계통의 몽골 지역 적응성 및 생육특성 조사 - 내재해성(저온 및 건조) 실험	70
		- 환경저항성 특성 조사 및 용도별 특성조사	- 선발 계통의 온도, 건조, 내병, 내답압 등 내재해성 특성 조사 - 내재해성 특성에 따른 용도 구분	100
		- 계통 특이 분자표지 개발 및 품종보호 출원	- 후보 계통 특이 분자표지 개발 - 분자표지와 형질(생육 특성 및 색깔, 협동과체에서 선발한 후보 유전자 활용) 연관성 분석 - 분석 결과를 종합하여 계통 선발 및 품종보호 출원	90

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도 (%)
1 협동	1차 년도 (2010)	야생형과 환경내성 변이체 잔디의 전사라이브러리 작성	-잔디의 주요 조직별 cDNA 라이브러리 제작	100
		야생형과 환경내성 잔디의 전사체 분석	-약 4,000개의 EST를 동정하고 데이터베이스 구축 -EST 데이터베이스 내 발현유전자들의 기능을 예측하고 기능적 카테고리 분류	80
	2차 년도 (2011)	야생형과 환경내성 잔디의 안토시아닌 프로파일 분석	-HPLC로 포복경의 안토시아닌 조성과 함량을 분석	100
		환경내성 변이체 잔디의 포복경 착색 관련 유전경로 탐색	-안토시아닌 생합성 경로 유전자 동정 -잔디에서의 안토시아닌 생합성 경로 제시 -포복경에서 안토시아닌 생합성 관련 유전자들의 발현 연구	75
	3차 년도 (2012)	야생형과 환경내성 잔디의 전사체 비교분석	-NGS 기반 RNA-seq잔디 전사체 데이터베이스 구축	100
		야생형과 환경내성 잔디의 안토시아닌 합성경로 유전자 동정 및 발현양상 비교	-Differential Display를 통한 야생형 잔디 특이적 발현 유전자 동정안토시아닌 합성 유전자의 후생유전학적 변이 양상 분석	100
	4차 년도 (2013)	야생형과 환경내성 잔디의 전사체 비교분석	-잔디 전사체 데이터베이스 구축야생형과 변이체 잔디의 전사체 비교 -타 식물 전사체와의 비교연구 및 DEG 분석	100
		야생형과 환경내성 잔디의 안토시아닌 합성경로 유전자 동정 및 발현양상 비교	-이삭 발달 단계별 안토시아닌 관련 유전자 및 안토시아닌 색소 발현양상 분석 통한 관련성 연구 -안토시아닌 착색에 직접적으로 관여하는 유전자 동정 -여러 한국형 잔디에서의 발현양상 확인을 통한 <i>Zoysia</i> 속에서의 일반적인 현상여부 확인	90
	5차 년도 (2014)	잔디에서의 안토시아닌 생합성 관련 유전자 발현양상 연구	-9개 잔디 품종의 이삭에서의 안토시아닌 생합성 관련 유전자 발현양상 비교분석 -한국형 잔디에서의 착색 원리 규명	100
		착색 및 비착색 잔디의 발달 단계별 전구체 프로파일 분석	-HPLC 분석을 통하여 잔디 이삭의 발달 과정에 따른 전구체 조성과 함량 분석	100
		차등발현 유전자들의 기능 및 후생유전학적 양상 규명	-차등발현 유전자의 프로모터 서열 비교 -차등발현 유전자의 프로모터 부위의 methylation 양상 연구 -잔디의 전사체 데이터베이스를 이용한 안토시아닌 착색에 관여하는 transcription factor의 발현 연구 -애기장대 knock-out mutant를 이용한 유전자 발현 연구	100

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

- 1-4차년도의 결과를 종합하여 우수특성을 가진 30계통을 선발하였음
- 우수 10계통은 특허출원 및 품종보호출원 하였으며, 그 외 품종은 추후 출원할 계획임

선발세대	번호	계통명	품종출원번호	품종명	선발세대	번호	계통명	품종출원번호	품종명
대조구	1	일반중지			고정종	1	그린조아	2015-6	그린조아
분리세대 선발	1	GZK-3	2015-7	더그린3호	F1 잡종 선발	6	GW 121		
	2	GZK-4	2015-8	더그린4호		7	GW 124		
	3	GZK-5	2015-9	더그린5호		8	GW 125		
	4	GZK-6	2015-11	더그린		9	GW 131	2015-12	참그린131
	5	GZK-7	2015-10	더그린7호		10	GW 134		
	6	GZK-8				11	GW 135		
	7	GZK-10				12	GW 136		
	8	GZK-11				13	GW 139	2015-13	참그린139
	9	GZK-12				14	GW 182		
	10	GZK-19				15	GW 184	2015-14	참그린184
F1 잡종 선발	1	GW 101				16	GW 185		
	2	GW 103				17	GW 186		
	3	GW 105				18	GW 191		
	4	GW 106				19	GW 199	2015-15	참그린199
	5	GW 119				20	GW 202		

- 개발잔디의 계통식별 분자마커를 개발하여 지적재산권 주장을 위한 근거로 활용

순서	출원일	출원번호	발명의 명칭
1	2012-01-13	10-2010-0004349	잔디신품종 그린조아
2	2015-08-21	10-2015-0117619	신규 잔디 품종 더그린
3	2015-08-21	10-2015-0117628	신규 잔디 품종 더그린3호
4	2015-08-21	10-2015-0117633	신규 잔디 품종 더그린4호
5	2015-08-21	10-2015-0117641	신규 잔디 품종 더그린5호
6	2015-08-21	10-2015-0117649	신규 잔디 품종 더그린7호
7	2015-08-21	10-2015-0117676	신규 잔디 품종 참그린131
8	2015-08-21	10-2015-0117677	신규 잔디 품종 참그린139
9	2015-08-21	10-2015-0117686	신규 잔디 품종 참그린184
10	2015-08-21	10-2015-0117690	신규 잔디 품종 참그린199

- 야생형과 환경내성 변이체 잔디의 주요 조직별 cDNA 라이브러리 제작
- 야생형과 환경내성 변이체 잔디에서 약 4,000개의 EST를 동정하고 데이터베이스 구축
- 잔디 포복경에서 안토시아닌 생합성 관련 유전자들의 발현 연구 및 안토시아닌 생합성 경로 제시
 - 특허출원: 잔디의 착색에 관여하는 안토시아닌 생합성 유전자 및 이의 용도 (출원번호 10-2015-0073555, 출원일 2015년 5월 27일)
 - 논문게재: Ahn JH, Kim J-S, Kim S, Soh HY, Shin H, Jang H, et al. (2015) De Novo

Transcriptome Analysis to Identify Anthocyanin Biosynthesis Genes Responsible for Tissue-Specific Pigmentation in Zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). PLoS ONE 10(4): e0124497. doi:10.1371

- 본 과제를 통한 연구결과를 국내외 학술회의에 발표함

번호	회의명칭	발표자	발표일시	장소, 국명
1	De Novo Transcriptome Analysis for Differential Anthocyanin Pigmentation in Zoysiagrass (<i>Zoysia japonica</i> Steud.)	Jong Hwa Ahn	2014-05-28	서울대학교 평창캠퍼스 그린바이오과학기술연 구원
2	de novo Transcriptome Assembly and Differential Gene Expression Profiling of Anthocyanin Biosynthesis in Zoysiagrass (<i>Zoysia japonica</i> Steud.)	Jong Hwa Ahn	2015-01-10	San Diego, CA, USA
3	Identification and Expression Analysis of Anthocyanin Biosynthesis Genes in <i>Zoysia japonica</i> L	Jong Hwa Ahn	2014-01-13	San Diego, CA, USA

제 2 절 성과활용 계획

- 한국잔디 신품종의 특허권 자체실시 또는 기술이전
- 10계통은 등록 후 기술이전 등을 실시하여 농가소득 향상을 위한 자원으로 활용
- 국내 보급체계 (잔디재배 농가와 계약재배 등) 확립으로 종자 및 잔디 생산이 가능하도록 하여 농가소득 창출에 활용
- 생산된 신품종은 다양한 수요를 충족시켜 골프장, 학교운동장, 공원녹화, 주택녹지, 산소 등에 폭넓게 활용 가능함
- 환경스트레스저항성(녹기연장) 한국잔디 신품종 육성 및 대량증식을 통한 농가보급으로 소득 향상에 기여
- 수요자의 요구도에 맞는 고품질 한국잔디의 개발을 위한 유용유전자원으로 활용

제 3 절 기대효과

1. 기술적 측면

- 한국잔디 신품종의 특허출원으로 국내 유전자원의 보호 및 세계화
- 녹색 포복경 한국잔디의 유전기작 규명
- 이산화탄소 감축 등 녹색성장 관련분야의 trigger 기술 축적

2. 환경 및 생태적

- 도심 공기정화 및 열섬현상 감소 (매연 및 먼지 감소, 온도저하 등)
- 도심 생태적 기능 향상 (토양침식 방지, 홍수 시 완충능력 향상 등)
- 잔디의 재배 및 수요 증가에 따른 녹지조경 공간의 증가로 온난화 및 탄소배출 가스의

감소

3. 사회적 측면

- 도로변 및 도시 경관 향상 (옥상녹화로 Green Zone 창출)
- 쾌적하고 안전한 그린 생활권 보장
- 학교 운동장 등 피복으로 부상감소 및 환경에 대한 공감대 형성과 소통
- 황사발원지의 피복으로 동아시아 국가의 황사피해 감소로 국가의 위상 제고

4. 경제 산업적 측면

- 종자 및 잔디생산 등 관련 신규 일자리 창출
- 한국잔디의 해외 수출로 126억/년 소득 창출 (2006년 국내 재배면적의 30%인 900ha 수출 기준)
- 이산화탄소 감축 등 청정개발체제 (CDM) 사업으로 부가가치 창출
- 황사지역 녹화로 황사에 의한 경제적 피해 감소

제 6 장 참고문헌

1. 김경남, 박원규, 남상용. 2003. 모래 토양에서 켄터키블루그라스, 퍼레니얼라이그라스, 톨웨스 큐 및 한지형 혼합구 뗏장의 피복도, 균일도, 근계 형성력 및 잔디품질 비교. 한국잔디학회지 17(4):129~146.
2. 김동섭. 1995. Osmotic priming과 시간적산온도가 한국 들잔디(*Z. japonica* Steud.) 종자 발아에 미치는 영향. 단국대학교.
3. 김태준. 1995. 한국들잔디(*Zoysia japonica* Steud.)의 primed 종자생산을 위한 비가역적 발아 단계. 한국원예학회지 36(3):391-400.
4. 류달영, 염도의, 김일중. 1974. 종피처리에 의한 한국잔디 종자의 발아촉진 효과. 한국원예학회지 15:187-193.
5. 박봉주. 2003. 난지형 잔디와 한지형 잔디의 혼식에 관한 생태학적연구. 한국환경복원녹화기술학회지 6(5):21 ~27.
6. 심상렬, 정대영, 안병준. 2004. 들잔디 위의 한지형 잔디 오버씨딩효과. 한국환경복원녹화기술학회지 7(5):85 ~93.
7. 이궁주 외. 2013. 한국잔디 증지 변이개체와 연관된 RAPD-SCAR 마커. Weed Turf. Sci. 2(2):191~197
8. 이재필. 2003. 잔디운동장 조성을 위한 '건희', '건우' 선발과 시공기술개발. 건국대학교 원예학과 박사학위논문.
9. 최준수, 김동섭. 1999. 중엽 종자형 zoysiagrass의 파종량, 파종시기가 조성속도에 미치는 영향. 단국대학교 논문집 34:273-277.
10. 최준수, 양근모. 2004. 한국잔디 신품종 '세녹(Senock)' 개발. 한국잔디학회지 18:201-209.
11. 특허청. 2013.. 국내 한국잔디의 품종 특허 등록 현황.
12. Ahn, B.J., S.R. Shim and H.J. Won. 2001. Genetic characteristics of Kentucky bluegrass(*Poa pratensis*) native to Korea. 9th International Turfgrass Research Conference, Toronto, Canada, July 15 ~ 21, 2001.
13. Aronson, L.J., A.J. Gold, and R.J. Hull. 1987. Cool-season turfgrass responses to drought stress. Crop Sci. 27:1261 ~1266.
14. Baker, B.S., and G.A. Jung. 1968. Effect of environmental conditions on the growth of four perennial grasses. I. Response to controlled temperature. Agron. J. 60:155 ~ 158.
15. Boyd, J.W. and J.H. Baird. 1997. Herbicide effects on sprig establishment of *Zoysia japonica* cv. 'El Toro' and *Cynodon dactylon* x *C. Transaalensis* cv. 'Midlawn'. International Turfgrass Society Research Journal 8:1025-1031.
16. Carroll, M.J., P.H. Dernoeden, and J.M. Krouse, 1996. Zoysiagrass establishment from sprigs following application of herbicides, nitrogen, and a biostimulator. HortScience 31:972-975.
17. Choi, D.K., Yang, G.M. and Choi, J.S. 2008. Flowering periods, genetic characteristics, and cross-pollination rate of *Zoysia* spp. In natural open-pollination. Kor. Turfgrass Sci. 22:13-24. (In Korean)

18. Choi, J.S. 1984. The effect of various treatments on seed germination and stolon rooting of zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). MS. Thesis. Southern Illinois Univ.
19. Choi, J.S., Yang, G.M., Oh, C.J. and Bae, E.J. 2012. Morphological characteristics and growth rate of medium-leaf type zoysiagrasses collected at major sod production area in S. Korea. *Asian J. Turfgrass Sci.* 26:1-7. (In Korean)
20. Chung, S.J., Park, S.J., Choi, Y.I., Kim, I.K., Lee, K.Y., et al. 2013. SCAR markers were developed to identify zoysiagrass mutants exhibiting fine leaf characteristics. *CNU J. Agr. Sci.* 40:1-5. (In Korean) Engelke, M.C.
21. Forbes, I.Jr. and M.H. Ferguson. 1952. Effects of strain differences, seed treatment, and planting depth on seed germination of *Zoysia* spp. *J. Amer. Soc. Agron.* 40:725-732.
22. Hong, K.H. and Yeam, D.Y. 1985. Studies on interspecific hybridization in Korean lawngrass (*Zoysia* spp.). *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 26:169-178. (In Korean)
23. Hyun, S.J., Shim, S.R. and Ahn, B.J. 2010. Analysis of hybridization in Korean ecotypes of *Poa pratensis* L. using RAPD and SCAR markers. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28:281-287. (In Korean)
24. Kang, B.C., Namkung, Y. and Shin, H.K. 1999. Analysis of the genetic variation in Anyang Joonggi and development of Anyang Joonggi specific DNA marker. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 17:197.
25. Kang, S.Y., Lee, G.J., Lim, K.B., Lee, H.J., Park, I.S., Chung, S.J., Kim, J.B. and Rhee, H.K. 2008. Genetic diversity among Korean bermudagrass (*Cynodon* spp.) ecotypes characterized by morphological, cytological and molecular approaches. *Mol. Cells* 25:163-17
26. Qian, Y.L., M.C. Engelke, and M.J.V. Foster. 2000. Salinity effects on zoysiagrass cultivars and experimental lines. *Crop Sci.* 40:488-492.
27. Unruh, J.B., R.E. Gaussonin, and S.C. Wiest. 1996. Basal growth temperatures and growth rate constants of warm-season turfgrass species. *Crop Sci.* 36:997-999.
28. Yeam, D.Y., K.H. Hong, and I.S. Han. 1984. The relation between leaf-node stage and flower initiation in *Zoysia* species. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 25(2):182-185.
29. Youngner, V.B. 1961. Growth and flowering of *Zoysia* species in response to temperatures, photoperiods and light intensities. *Crop Sci.* 1:91-93.