

21300
8-05-
5-CG8
00

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

Golden Seed 프로젝트 사업 2단계 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003964-01

수입대체용 환경내성 김 종자 개발과 국내외 산업화

2022. 3. 25.

프로젝트연구개발기관/공주대학교
세부프로젝트연구개발기관/한국생명공학연구
세부프로젝트연구개발기관/전남대학교

수입대체용
환경내성
김
종자
개발과
국내외
산업화

2022

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부
해양수산식품부

해양수산부
농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 · 해양수산부장관 귀하

본 보고서를 “Golden Seed 프로젝트 사업” (기간 : 2017. 01. 01 ~ 2021. 12. 31) “수입대체용 환경내성 김 종자 개발과 국내외 산업화” 프로젝트(세부프로젝트 “내병성 김 종자 개발”, “고온내성 김 종자 개발”, “김 발현유전체 정보 탐색 및 활용기술 개발”)의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 03. 25.

프로젝트연구기관명 : 공주대학교
세부프로젝트연구기관명 : 한국생명공학연구원
세부프로젝트연구기관명 : 전남대학교




프로젝트연구책임자 : 김광훈
세부프로젝트연구책임자 : 정원중
세부프로젝트연구책임자 : 최동욱

국가연구개발혁신법 시행령 제33조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	213008-05-5-C G800	해당단계 연구기간	2017년 1월 1 일~ 2021년 12 월 31일	단계구분	2/2
연구사업명	단위사업	Golden Seed 프로젝트사업			
	사업명	Golden Seed Project			
프로젝트명	프로젝트명	수입대체용 환경내성 김 종자 개발과 국내외 산업화			
	세부프로젝트명	1세부 : 내병성 김 종자 개발 2세부 : 고온내성 김 종자 개발 3세부 : 김 발현유전체 정보 탐색 및 활용기술 개발			
프로젝트책임자	김 광 훈	해당단계 참여 연구원 수	총:136명 내부:136명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:3,420,000천원 민간: 천원 계:3,420,000천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총:293명 내부:293명 외부: 명	총 연구개발비	정부:7,060,000천원 민간: 천원 계:7,060,000천원
연구기관명 및 소속부서명	공주대학교 산학협력단			참여기업명	
국제공동연구	상대국명 : 해당없음			상대국 연구기관명 : 해당없음	
위탁연구	연구기관명 : 해당없음			연구책임자 : 해당없음	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유					

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허		보고서 원문	연구 시설· 장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화 합 물	생명자원		신품종	
		출원	등록						생명정보	생물자원	정보	실물
등록 · 기탁 번호	1226-2617		제10-17 56358호	11-11920 00-00083 3-01	연구 시설· 장비	특허출원 제10-2018-0 034260호(발 명의 명칭: 고온성 잇바디돌김 신품종)	소프트 웨어	화 합 물	KY569073	생명자원	정보	실물 
	0921-8971		제10-18 76775호						KY569074			
	1063-0740								KY569075			
	2211-9264	10-2017- 0100815	제10-19 58957호						KY569076			
	1863-5466	10-2018- 0034260	제10-19 83724호						KY569077			
	1436-2228	10-2018- 0117989	제10-22 25223호						MF838766			
	1229-2818	10-2017- 0100991	제10-19 50968호						MF838767			
	1322-0829	10-2018- 0106715	제10-20 89573호						MF838768			
	1664-462X								MF838769			
									KX610933			
			KX610934									
			KX610935									

0031-8884	10-2019-0130503	제10-22 90111호	품종 골드2호 양식기술	압착과 동시에 살균하는 김 제조기	KX610936	골드2호		
	0022-3646				10-2020-0010527			KX610937
	2076-2607				10-2020-0055427			KY127451
	0735-9640				10-2020-0098275			KY127452
	0971-5894				10-2021-0167860			KY127453
	1226-9999				10-2021-0061532			MG966494
	0022-0957							MG966495
								MG966496
		MG966497	골드3호					
		MT122996						

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요 약 문

연구의 목적 및 내용	<p>환경내성 김 신품종의 개발 및 산업화를 위한</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 갯병 원인 균주의 확보 및 배양시스템 구축 ○ 원인 균주별 감염기작 규명 및 김 질병 진단 기술 개발 ○ 내병성 품종의 특성 분석 ○ 고온내성 품종의 특성 분석 ○ 고온내성 종자 유전자 특성 규명 ○ 양식 현장평가 및 피드백을 통한 양식조건 최적화 ○ 환경내성 및 갯병 내병성 우량 김 종자 개발 및 국내외 산업화 ○ 김의 전사체 생성 및 해독 및 김 DNA 마커 개발
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 서·남해 지역을 중심으로 각 해역별 감염균주의 확인 및 확보 ○ 감염균주의 해역별 환경특성 분석 및 종별 감염균주의 특이성을 분석 ○ 감염균주의 특성을 고려한 균주 배양시스템의 구축 ○ 균주의 조건별 성장률 측정 및 각 해역에 분포하는 균주의 특성 파악 ○ 감염균주와 감염숙주의 관계파악을 위한 감염시스템 구축 및 배양 ○ 갯병 감염을 통한 갯병 내성 업체 탐색 및 선발 ○ 내병성 품종 후보의 확보 후 돌연변이 육종을 통한 품종 개량 ○ 내병성 및 고온내성 김 종자에 대한 기능성 식품 소재 가능성 평가 ○ 우량 환경내성 김 종자 생산기술 개발 및 국내외 산업화 ○ 개발종자의 안정성 측정 및 표준화 ○ 김 품종 구분 DNA 마커 개발 ○ 내병성 품종에 대한 과학적인 라이브러리 구축과 데이터 베이스화 ○ 감마선 조사를 이용한 고온내성 돌연변이체 확보 ○ 고온내성 변이주 전사체 분석을 통한 대사관련 유전자 정보 확보 ○ 고온내성 변이주 성장률, 색소 함량, 광합성능 등 성장특성 분석 ○ 방사무늬김 다당류 분해효소 유전자의 기능 검증 및 활용기술 개발 ○ Genome SSR 분석 및 SSR의 PCR 증폭을 위한 primer set 개발 ○ 방사무늬 김 품종 식별 SSR marker 개발 ○ 김 고온 및 건조 스트레스 처리 염상체로부터 전사체 확보 ○ 전사체 분석을 통한 스트레스 반응 유전자 (PtCYP, PyMPV17, PysHSPs family 등) 선별 및 선별 유전자의 생리적 기능 연구 ○ 홍조류 특이 스트레스 반응 유전자 (PyDRG, PyHRG등) 분리 ○ 내병성 품종 ‘골드1호’ 품종 등록 ○ 고온내성 품종 ‘골드2호’ 품종 등록 ○ 고온성 잇바디돌김 품종 ‘골드3호’ 특허 등록 ○ 개발된 12개의 SSR 마커는 특허 등록 ○ 황백화 내성 품종 개발
연구개발성과 의	<p><성과의 활용도 제고(가치사슬 생태계 육성)></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 품종 보호와 동시에 산업화를 추진하여 곧바로 어가에 보급하고 종자를 꾸준

<p>활용계획 (기대효과)</p>	<p>히 공급할 종묘업체와 마른김을 생산하는 1차 가공업체 및 조미김을 생산할 2차 가공업체까지 가족회사 계약을 하여 기술의 현장 보급 및 산업화를 바로 달성할 수 있는 가치 사슬 생태계 육성</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 우수한 형질을 가지는 국산 김 종자를 개발함으로써 식물품종보호제도로 부터 김 양식 산업을 보호하고 종자의 수입대체 및 수출 효과를 창출 할 수 있음 (연간 100억 원 이상의 경제적 효과) ○ UPOV대비 해조류 품종보호제도 기반연구의 수행을 통하여 다양한 방식의 김 품종 개발 기법을 제안하고 이를 개발하기 위한 연구를 수행 <p><과학기술적 파급효과></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 본 연구로 개발된 우량 품종과 기초자료는 우리나라 김 양식 산업 발전을 위한 기반자료로 활용할 수 있으며 고부가가치화를 위한 응용연구에 활용 기대 ○ 김의 우량형질에 대한 생물학적, 산업적 가치 부여와 김 분자유종원의 원천기술 확보를 통해 다른 해조류 육종에 바로 적용함으로써 우리나라 해조류 산업발전 도모 ○ 돌연변이에 의한 신품종 개발로부터 얻은 기술적·과학적 진보는 다른 생물계의 연구 및 기술개발에 활용 가능하며 생명공학 산업 발전을 기대 ○ 해조류는 식품으로서의 가치 이외에도, 식품첨가물, 화장품, 피코콜로이드 (phycocolloids)의 원재료, 지방산과 색소, polysaccharides, 가축사료, 비료, 바이오에너지생산용, 폐수처리, 지구온난화가스 CO2의 생물학적 제거용으로 개발되고 있으며, 파생 산업을 고려하면 현재의 경제적 중요성에 부가하여 막대한 잠재적 가치를 가지고 있으며 이를 활용한 유용 유전자, 바이오에너지 및 유용 바이오소재 발굴 ○ 해조류 생명공학을 이용하여 기존의 해조류의 이용성을 넓혀서, 분자유종에 의한 신품종 개발, 의약 또는 산업적으로 중용한 유용단백질 또는 유용물질 생산의 bioreactor로서 해조류 연구 가능 ○ 선발된 고온내성 후보군 김의 양식실증을 통한 품종화 및 김을 포함한 거대조류에서 유전자 발현 조절, 유전자 기능 검증에 활용 ○ 방사무늬 김 reference gene 정보 제공: 관심 유전자의 구조 분석 및 클로닝 정보로 사용, reference-based transcriptome analysis 가능 ○ 확보된 홍조류 특이 스트레스 반응 유전자는 스트레스 내성 작물 개발에 활용 가능 <p><경제사회적 파급효과></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 고온에서 업체 생장이 우수한 고수온내성의 김 품종이 개발되어 하절기에도 김을 채취함에 따라 김의 연중생산 가능성 기대 ○ 기존 18℃ 부근에서 최고 성장률을 보임에 반해 25℃ 이상의 고수온에서 최고의 성장률을 나타내며 이는 지구온난화에 따른 해수온 상승 등 기후 변화에 대응 가능
------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<ul style="list-style-type: none"> ○ 종래 동절기에 한정된 김 양식 주기를 벗어나서 연중으로 김 생산이 가능하게 되어 어민의 소득증대뿐만 아니라 김 관련 산업에 큰 기여 효과를 기대 ○ 내병성 김 종자를 개발하여 질병 발생으로 인한 성장 저하 및 수확량 감소를 억제하고 고품질의 김 생산으로 경제적, 산업적 발전 도모 ○ 김의 갯병 방제를 위한 활성처리제(유기산 기반)개발을 통해 기존의 활성처리제 보다 낮은 농도에서도 붉은갯병과 낭균병 모두를 효과적으로 방제할 수 있어 김 양식장의 피해를 막고 수확된 김의 품질을 향상시킬 수 있으며 이를 통한 어가 소증에 기여 할 수 있음 ○ 감염기작 및 균주 분리를 통한 김 질병 분야의 지적 재산권 선점하고 신 품종 개발로 인한 수산분야 수출 정책 개발 및 추진에 우위를 차지 ○ 어민 소득 증대 및 갯병 방제를 위한 처리제의 사용에 따른 해양 환경오염 방지 					
국문핵심어 (5개 이내)	김	내병성	돌연변이	품종개발	수입대체
영문핵심어 (5개 이내)	<i>Pyropia</i>	Disease-resistant	Mutation	Breeding	Import substitution

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

목 차

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 연구수행 내용 및 결과	17
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	375
4. 연구결과의 활용계획 등	436

<붙임>참고 문헌

<별첨 1> 연구개발보고서 초록

<별첨 2> 자체평가 보고서

<별첨 3> 연구성과 활용계획서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발의 목적

본 과제의 최종연구목표는 수입대체 및 수출용 우량 김 종자 개발 및 산업화 기반 확보, 2021년까지 환경내성 김 3개 품종 개발, 수출액 300만 달러 달성, 수입대체 26.6%이다.

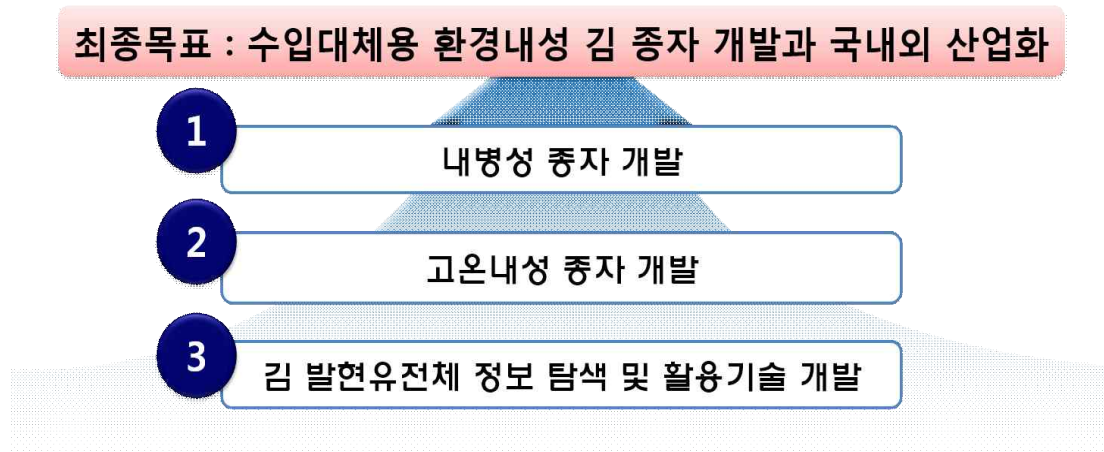


그림1. 수입대체용 환경내성 김 종자 개발 프로젝트의 연구목표 및 세부연구목표

□ 세부연구목표

1. 1세부과제: 내병성 김 종자 개발

- 본 연구의 최종목표는 김에 질병을 야기하는 감염원인 균주 조사를 통해 1) 갯병 원인 균주를 확보 하여 2) 갯병 감염기작을 규명하고 이를 바탕으로 3) 갯병에 대한 내병성 종자를 개발하고자 함.
- 감염원인 균주의 확보 및 배양 시스템 구축
- 원인 균주별 감염기작 규명 - 생화학적, 분자생물학적, 생리적 측면에서 규명
- 내병성 감지기술 개발과 내병성 종자의 특성을 규명
- 갯병 내병성 종자의 개발과 개발종자의 상품화

최종 목표: 갯병 내병성 김 종자 개발

- 1 갯병 원인 균주 확보 (분자 마커 개발)
- 2 원인 균주별 감염 기작 규명
- 3 갯병 내병성 감지 기술 개발
- 4 갯병 내병성 김 종자 개발 및 상품화

그림2. 갯병에 대한 내병성 김 종자 개발의 최종목표

□ 세부연구목표 및 내용

- 감염원인 균주의 확보 및 배양 시스템 구축 (해조류(김) 기생균주의 확립)
 - 우리나라 주요 김 양식장 지역 조사를 통한 감염 균주의 채집 및 확보
 - 감염원인 균주의 규명과 생태계에 미치는 영향 연구
 - 배양시스템 구축과 배양균주 유지
 - 김 질병 진단 기술 개발
- 원인 균주별 감염기작 규명
 - 기생 균주의 감염 단계는 숙주 세포에 부착, 균의 기생, 숙주의 사멸, 숙주로부터 분리 및 재감염 되는 여러 단계로 이루어져 있음. 감염 초기단계에 관련된 특성을 분석함으로써 숙주인 조류로의 감염기작을 이해할 수 있고, 이를 통하여 감염에 대응하는 방안을 제시 할 수 있을 것으로 생각됨.
 - 세포벽 및 세포막 결합 / 인지 단백질을 암호화 하는 유전자의 선별 및 규명
 - 유전자 발현을 및 유전자 특성에 따른 숙주 특이성 규명
 - 감염기작에 따른 신호전달 및 유전자발현 조절기작 규명
 - 감염 관련 유전자 규명을 통한 감염기작 제어 방법 개발
- 갯병 내병성 종자의 개발
 - 선발육종 및 돌연변이 유도를 통한 내병성 종자의 발굴
 - 우수 형질을 가지는 김 종자의 채집과 보관
 - 해조류 바이오 연구소에 보관된 김 계통주에 대한 내병성 테스트와 고 내병성 종자의 분리
 - 감마선을 이용한 돌연변이 유도조건 확립
 - 유도 돌연변이종의 내병성 테스트
 - 개발된 김 질병 진단 기술을 이용한 내병성 파악

- 기존의 갯병 감염기작에 따른 내병성 정도 판단
- 내병성 감지기술 개발과 내병성 종자의 특성을 규명
 - 김 질병 진단기술 개발
 - 내병성 종자별 특성 규명

2. 2세부과제: 고온내성 김 종자 개발

□ 연구목표

- 1단계 기반연구를 통하여 확보된 20여 고온내성 후보 라인들을 대상으로, 각각의 순계 라인을 확립하고, 이들의 기내 특성 분석 및 현장 실증 양식을 수행하여, 우수 고온내성 변이주를 선발하여 품종으로 개발함

□ 연구내용

- 20여 고온내성 돌연변이주의 순계화 및 기내 특성 분석
 - 각 변이주별 순계화
 - 각 순계의 사상체 및 엽체 특성 분석
 - 양식특성 피드백을 통한 변이주별 최적생장조건 규명
- 변이주별 유전적 특성 분석
 - 유전자 분석을 통한 변이주별 유전적 특성 분석
 - 후대 형질 특성 분석
 - 기내 및 양식 개체의 유전적 특성 비교 분석
- 양식 실증을 통한 고온내성 우량 김 종자 개발
 - 양식 생장 특성 및 환경 적응성 분석
 - 양식 특성 피드백 연구를 통한 변이주 양식조건 최적화
 - 후대 분석을 통한 우수라인 안정성 확보 및 고온내성 김 품종화

3. 3세부과제: 김 발현유전체 정보 탐색 및 활용기술 개발

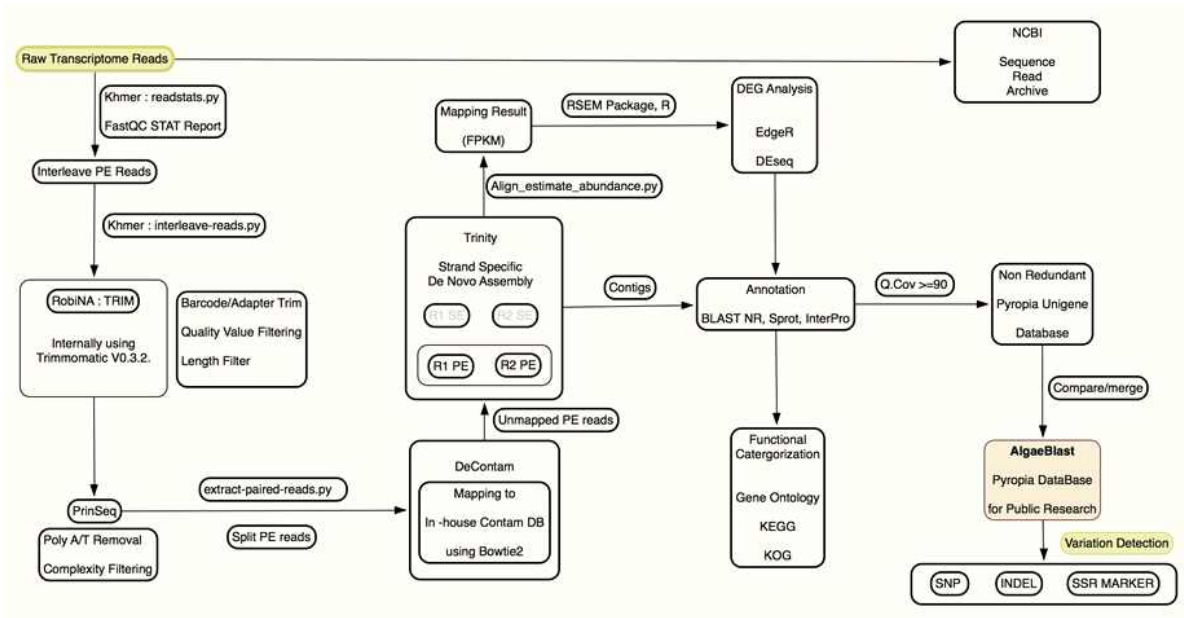
1) 김 발현유전체 생성 및 탐색

- 김 발현유전체 생성
 - 1, 2 세부과제에서 개발된 고온 및 병내성 김 품종을 제공 받아 전사체 생성
 - 개발된 신품종 외, 특이적 특성을 보이는 김 계통주 및 김의 환경 내성 기작 이해를 위해 필요한 김 조직에 대한 전사체를 생성함

- 1, 2 세부과제에서 개발하고 있는 신품종은 모두 방사무늬김 (*P. yezoensis*)를 기반으로 하고있음. 따라서 전사체 생성은 주로 방사무늬김을 중심으로 진행함
- 전사체 생성은 NGS (Hi-Seq platform) 기반으로 전사체 생성 및 분석 경험이 있는 기업체를 통해 생성함
- 전사체 생성을 위한 생물시료는 triplicate로 준비, 동일 처리구에 대해 항상 3개의 시료로부터 전사체를 생성해 시료간 정보변이를 최소화함
- 각 시료로부터 전사체 서열 생성은 각 시료당 1/8 region을 사용해 약 ~5Gb를 생산함

○ 김 발현유전체 분석

- 김 전사체의 기초적 분석은 본 연구실에 구축되어 있는 pipeline을 이용함



- 전사체 mapping을 위한 reference로 1단계에서 만들어진 방사무늬김 엽상체 unigene를 활용함
- 핵 유전체 정보와 비교 발현 유전체 분석 기반 구축
- 생물정보학 기반 김 전사체의 특성 분석 및 정보 탐색

2) 개발된 김 품종 특이 DNA 마커 개발

- 전사체 분석 기반 개발된 김 품종 특이 DNA 마커 후보들을 탐색함
- 마커 후보는 Indel, SNP 및 SSR를 기반으로 탐색함, 돌연변이 신품종 특이 마커는 Indel을 중심으로 집중 탐색함
- 선별된 Indel를 중심으로 DNA 마커 개발 후보들을 선정하고, primer design함
- 모조와 돌연변이 품종간 안정적 변이를 보이는 마커들을 listup하고 개발된 김 품종 구별을 위해 사용 가능한 DNA 마커의 조합을 제안함

3) 고온 및 환경반응 유전자 선별 및 기능 연구

○ 환경 반응 유전자 선별

- 비교 유전체 및 생물정보학 기술을 이용 전사체 기반 고온, 갯병 및 환경 내성 김 유전자 후보들을 선별함
- 전사체 분석 기반 선별된 유전자들은 qRT-PCR를 이용해 각 유전자들의 발현 패턴을 확인하고 유전자 발현 분석 통해 확인된 유전자들을 대상으로 환경 반응 유전자들을 선별함
- 선별된 유전자들은 클로닝하고 염기서열을 결정함
- 선별 유전자들은 다양한 생리적 환경스트레스 조건하에 있는 김 시료를 대상으로 생리적 조건, 배양 및 환경 조건의 변화에 따른 발현 패턴을 조사함

○ 선별 유전자의 기능 연구

- 선별 유전자의 기능은 1차적으로 sequence homology 조사를 통해 예측함
- 다양한 환경 스트레스 조건에 따른 발현 조사를 통해 기능 예측
- GFP와 같은 reporter gene을 이용 단백질의 세포내 위치를 추적: 담배 protoplast 또는 양파의 표피세포 사용
- *Chlamydomonas*, yeast와 같은 모델 생물을 이용해 선별 유전자의 생리적 기능 조사를 연구함
- E. coli BXO4와 같은 특정 기능 유전자 돌연변이체를 대상으로 complementary assay 수행을 통해 유전자의 생화학적 기능 조사
- 유전자의 생화학적 기능 연구를 위해서 선별 유전자가 coding하고 있는 단백질을 E. coli 이용해 순수 분리하고, 스트레스 내성 관련 생화학적 연구 수행
- 환경 반응 유전자 기능 연구 및 환경 스트레스 내성 형질의 유전적 변이를 위한 표적 유전자 제안

1-2. 연구개발의 필요성

- 일본으로 주로 수출이 되는 일반김의 경우 전량 일본으로부터 들여온 종자를 사용하고 있을 정도로 국산종자의 점유율은 대단히 낮은 수준임
- 따라서, 지역별, 생산규모별 분류를 통한 목표시장의 설정이 어려울 정도이며, 시급히 요구되는 사항은 국산종자의 우선적인 보급임
- 2008년 개발된 해풍1호(수퍼김)의 점유율이 3년만에 일반김에서 약 8%를 차지했을 정도로 종묘 생산업체에서는 국산종자에 대한 요구가 상시 존재하고 있었음. 2017년 이전대 부분의 종묘업체에서 일본종자를 사용하고 있었고 이를 해결하기 위해서는 맛, 선택 품질 등이 우수한 국산종자 개발에 대한 연구가 시급해짐
- 생산자의 경우 선호하는 종자는 맛, 선택 등 품질이 우수한 종자, 고수온에 내성을 가져 양식기간을 늘릴 수 있는 종자 (고온내성), 질병에 강한 종자(내병성) 등 요구사항이 다양함. 하지만 이를 모두 반영한 종자의 개발은 어려우며, 다양한 종자 개발을 통한 종자 생산자 및 김 생산자의 선택의 폭을 늘려 주는 것이 필요할 것임. 종자의 다양화는 제품의 다양화를 이룰 수 있을 것으로 사료됨
- 따라서, 개발된 종자에 대한 설명회를 통한 어민들의 선택권을 보장하여야 할 것으로 보이며, 나아가 개발된 종자의 효과적인 관리와 보급이 이루어질 수 있도록 연구가 본 종자개발 연구와 함께 수행되어야만 할 것 임
- 김은 전체 수산양식 및 해조류 양식에서 대단히 커다란 비중을 차지하고 있으나 일본을 포함한 외국산 종자의 사용이 많아 국산 종자의 개발이 시급히 요구됨
- 특히, 수산식품품종보호제도의 도입과 더불어 외국산 종자의 사용이 지속될 경우 종자의 자립도가 낮아지고 이에 따른 비용의 지출이 김 산업 전체에 타격을 줄 가능성이 높음
- 김 종자는 육상작물과는 달리 사상체 형태로 유통되어 소량만으로 양식에 필요한 종자를 대량 증식할 수 있어 육상작물의 종자시장과는 다른 관점에서 바라보아야만 할 것이며, 특히 영세한 종자업체의 규모를 본다면 국가적인 차원에서 종자의 개발과 관리를 담당하고 종자업체의 자립도를 키워 기술을 이전하는 형태로 이루어져야만 할 것임
- 생산자 측면에서 종자개발의 방향을 바라보면, 우리나라 김 양식의 면적과 생산어가가 한정되어 있어 생산량에 한계가 있으며, 이는 어가에서 직접적으로 체감하는 부분임. 따라서 어가의 생산성을 향상시킬 수 있는 방향으로 종자개발이 이루어져야 할 것으로 여겨지며 이는 고생장이나 고온내성, 내병성 종자에 해당 됨

- 현재 김 양식이 시작되는 초겨울이 아닌 가을부터 봄에 이르는 시기에 양식이 가능해지면 김 수확 횟수의 증가와 더불어 생산량 증대에 도움을 줄 것임. 특히 해풍 1호(수퍼김)의 개발이 기존의 김에 비해 맛이 떨어지는 단점이 있지만 어가에서 호응을 받고 있는 것은 그간 양식현장에서 속성장 종자 개발에 대한 기대를 반영하는 것임
- 또한 갯병 피해로 인한 김의 품질저하는 수매가 하락으로 이어져 어가 경제에 직접적인 타격을 받고 있으며, 매년 바다 환경의 변화와 수온상승에 대응 할 수 있는 내병성 종자 및 고온내성 종자의 개발을 요구하고 있음
- 소비자 측면에서 종자개발의 방향을 바라보면, 김은 우리나라 주요 식품 중 하나로서 과거와는 달리 맛을 강조하고 건강식품으로서의 성향이 두드러지게 나타나는 것을 알 수 있음. 최근에는 가공 시 첨가물의 변화 등을 통해 기능이 다양화된 제품이 출시되어 소비자들의 호응을 얻고 있으며 각 기업의 매출이 증대됨을 알 수 있음. 또한 소비자들은 식품안전성에도 높은 관심을 가지고 있어 현재 사용되고 있는 활성처리제에 대한 반감을 가지고 있는 것도 알 수 있음. 이를 해결하기 위해서는 내병성 종자의 개발을 통해 무산 김 생산을 유도 하여 김이 웰빙 및 건강식품임을 강조하고 특화 시키는 것임. 또한 고기능성이 강조된 김의 개발을 통하여 국내 김 소비를 촉진 시키고 우리나라 고품질 김 제품을 생산하여 고급화 전략 및 한국산 김 브랜드 가치를 높일 수 있음
- 국내 시장현황을 보았을 때, 김 신제품 개발의 방향은 속성장, 고온내성, 내병성, 고기능성 종자 개발로 이루어져야 할 것임

표1. 생산자와 소비자 요구 김 종자

생산자	소비자
<ul style="list-style-type: none"> ○ 종자의 생산성 향상 <ul style="list-style-type: none"> - 속성장 - 고온내성 - 내병성 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 종자의 웰빙 식품화 <ul style="list-style-type: none"> - 맛, 고기능성 ○ 식품안전성 <ul style="list-style-type: none"> - 내병성

1. 1세부과제: 내병성 종자 개발

□ 기술적 측면에서 갯병 내병성 종자 요구

- 김 갯병은 현재 김 양식에 피해를 주는 가장 큰 요인이나 갯병을 일으키는 균주나 갯병 감염기작에 대한 이해는 미흡한 편임
- 매우 다양한 종류의 갯병이 피해를 주고 있으나 이에 대한 과학적인 이해가 부족하여 새로운 내병성 종자개발에 걸림돌이 되고 있음. 특히, 아직까지 알려지지 않은 많은 종류의

갯병이 존재할 것으로 예상되며 이에 대한 대처가 필요함

- 갯병에 대한 대책 또한 “좋은 환경으로 옮김”, “환경을 좋게 해줌”, “갯병의 병변부를 조기 수확함” 등 어민들에게 실질적인 도움을 주지 못하고 있음
- 갯병에 대응하기 위한 방법은 활성처리제를 이용한 방법이 주요방법이었음
 - 관련특허 동향을 살펴보면 질병구제에 관한 대부분의 특허는 활성처리제의 조성변화에 기반을 두고 있음.
 - 갯병에 내성을 가지는 내병성 종자는 아직까지 보고 된 바 없음. 이는 질병 감염기작을 아직 명확히 이해하지 못하였고, 관련 균주를 실험실내에서 배양하지 못하고 있기 때문인 것으로 판단됨

표2. 갯병의 종류와 발생원인, 현재의 대책

갯병명	증상	발생원인	대책
싹갯병	싹의 끝이 꼬부라지고 흰색으로 변함	일조과다, 무통, 난기 계속, 적조	밑식예방 (좋은환경으로 옮김)
붉은갯병	붉은반점 (내부에 녹색에서 담황색으로 변함)	노출부족, 붉은 갯병균< <i>Phthium</i> >의 기생	해황변화에 합당한 적당한 노출선 유지
낭균병	잎끝에서 붉게 되었다가 담녹색에서 황백색	낭균의 기생	초기 : 냉동망
흰갯병	잎끝부터 붉은색에서 백화유식	노출부족, 해수교환 불량	고노출, 조기채취, 어장이동, 유기산 처리
규조갯병	규조착생, 부류식양식에서 많이 발생	규조 < <i>Licmouhora sp.</i> >	노출, 냉장, 유기산 처리
녹반병	얇은 녹색반점, 중앙부 백색으로 변함	바이러스, 고 수온기의 강우시 발생	고노출, 유기산 처리
쪼그랑병	엽체가 쪼글쪼글하게 오물어듬	혹한기에 발생하며 원인은 불명	병반부 엽체채취, 유기산 처리

- 따라서, 갯병을 용이하게 검출할 수 있는 기술의 개발, 갯병에 내성을 가지는 종자의 개발이 필요함
- 또한, 갯병 감염기작의 이해는 새로운 종자를 개발하는데 있어서 중요한 정보를 제공할 수 있을 것으로 판단되며 종자개발의 자원이나 시간을 절약 할 수 있을 것으로 사료됨

□ 경제, 산업, 환경적인 측면에서 갯벌 내병성 종자 요구

- 양식수산물의 생산량은 해마다 지속적으로 증가하고 있으며, 웰빙, 건강식품으로 인식되어 소비량도 점점 증가하고 있다. 아울러, 국내 수산물 공급에서 양식수산물이 차지하는 비중이 점차 높아짐에 따라 국민들에게 단백질 등을 공급하는 중요 식량산업으로 성장해 가고 있다(수산연감 2020)
- 2019년도 천해양식 생산량은 약 237만 톤을 기록하였다. 품종별 생산량은 다시마류가 662천 톤(27.9%)로 가장 많았으며, 김(607천 톤), 미역류(495천 톤), 굴류(326천 톤), 홍합류(52천 톤) 순으로 나타났다(수산연감 2020)
- 하지만 최근 우리나라의 해조 양식산업의 대두되고 있는 문제는 양식어장이 주로 연안에 위치하고 있어 육상 오염원의 유입에 따른 부영양화와 자가오염 등으로 인한 유해성적조의 대량 발생, 양식생물의 폐사 등과 같은 어장 노후화 현상의 빈번한 발생과 이로 인한 품질 및 생산성의 저하 등으로 볼 수 있으며(수산연감 2020), 이를 해결할 수 있는 대책 마련이 시급함
- 해조류 질병은 해조류의 생산량을 감소시키고 맛과 질을 저하시키는 요인이 되고 있으며, 이를 회피하기 위하여 어가에서는 활성처리제(산처리)등의 방법을 이용하여 구제하고 있으나 이로 인한 해양환경오염문제가 새로운 문제로 대두되고 있는 실정임
- 수산연감에 의하면 전체 김 생산량의 약 10.2%가 피해를 받는 것으로 추산하고 있으며 연간 평균 피해액은 18억 원에 달함. 직접적인 피해액이 18억 원 정도라 하더라도 소비자들의 소비 감소와 한국 김에 대한 저평가는 김 산업 전반에 대단히 큰 영향을 끼칠 수 있음
- 최근에는 각종 미디어에서 김의 활성처리제 문제 등을 보도하였으며, 정부에서도 시급히 해결해야 하는 수산분야 과제로 인식하고 있음 (다만, 새로운 종자의 개발 보다는 무기산처리제를 대체처리제인 유기산 등의 대체하도록 유도하는데 그치고 있음)

표3. 질병으로 인한 김 양식 피해율, 갯병 등으로 인한 피해

년도	생산량 (톤)	금액 (천달러)	피해율(%)	피해량 (톤)	피해금액 (천달러)
2007	210,956	163,951	10.2%	21,517	16,723
2008	224,242	179,811		22,872	18,340
2009	210,405	140,982		21,461	14,380
2010	235,534	199,460		24,024	20,344
2011	316,428	199,286		32,275	20,327
2012	349,827	246,267		35,682	25,119
2013	405,526	249,645		41,363	25,463
2014	397,841	292,819		40,579	29,867
2015	389,077	281,018		39,685	28,663
2016	409,724	385,420		41,791	39,312
2017	523,648	546,242		53,412	55,716
2018	567,800	608,270		57,915	62,043
2019	606,873	481,756		61,901	49,139

피해율: 10.2%, 연간 평균 피해액: 18억원, 자료: FAO Fisheries & Aquaculture, 수산연감

- 소비자들의 친환경 먹거리에 대한 관심 증가는 농수산물 식품개발에 있어서 새로운 트렌드로 부상하고 있음
- 특히, 장흥에서 생산되는 무산김에 대한 소비자들의 호응이 높은 현상은 소비자들이 최근에는 건강한 먹거리를 추구하는 현상을 대변 함
- 최근에는 고기능성, 웰빙, 건강식품에 대한 기대가 커지고, 소비패턴 또한 변화하고 있기 때문에 고기능성, 웰빙, 건강식품으로서 김 종자 개발은 김 산업의 발전을 도모 할 수 있을 것으로 기대함
- 소비자들의 구매욕 감소는 김 산업에 직접적인 문제가 될 수 있으며, 이를 해결하기 위한 근본적 대안은 우수한 내병성 신종자의 개발과 이를 현장에 적용함으로 환경 친화적 양식이 가능하도록 하고 산업화로 발전시키는 것임

- 김 양식이 오랜 기간 동안 활발히 이루어져 온 일본에서도 김 갯병에 대한 문제가 발생하고 있으며, 이러한 문제를 해결하기 위해 내병성 종자 개발에 박차를 가하고 있음. 특히, 일본, 중국을 포함한 우리나라는 김 산업분야에서 경쟁관계를 형성하고 있어 시장에서 우위를 점하기 위해서는 관련 기술 및 시장을 재빨리 선점할 필요가 있음

2. 2세부과제: 고온내성 종자 개발

- 상품성 있는 유용 해조류 김의 국내 신품종을 개발함으로써 외국품종 도입에 따른 로열티 지급을 감소시키고 역으로 국내신품종의 수출을 도모할 필요성 있음
- 최근 육상식물에서는 돌연변이 기술접목에 의해 신품종이 개발되어 이미 상업화 단계에 있음
- 기존의 해조류의 식품 및 원재료로서 효용성을 넓혀서, 해조류 생명공학을 이용하여 고기능, 고부가가치, 생산성 제고용 신품종 개발이 필요함. 신품종 개발의 한 방법으로서 돌연변이 기술의 개발 및 활용이 중요함
- 해수온의 지속적 상승으로 김 양식장의 피해가 예상되며, 일본에서는 해수 상승에 대비한 고수온 내성 종자 개발이 진행되고 있음
- 최근 국내 해수온 상승에 의한 김의 양식 가능 지역이 바뀌고 있으며, 양식 가능 면적이 감소하고 있으므로 우수한 특성의 종자중 고온에 내성을 가지는 종자개발이 필요함
- 기술적 측면에서는,
 - 새로운 고기능성 및 고부가가치성, 각종 병 및 고수온에 내성을 보이며 생산성이 제고된 해조류 신품종 개발 기술은 기존 어업의 한계를 극복하고 우리 해조류의 국제경쟁력을 확보하기 위한 필수 기술로서 시급히 개발되어야함
 - 우수한 특성을 가지는 신품종을 개발하기 위해 김의 돌연변이 기술을 확립하여 효율적인 선발 기술을 적용하는 것이 필요함
 - 육상식물은 구조유전체 연구와 EST연구를 통하여 유용한 유전체정보가 축적되었고, 수많은 유전체 정보를 이용하여 우수특성을 분자수준 및 생리 생화학적 수준에서 확인하고, 돌연변이 기술로 개발된 다양한 육상식물의 신품종이 이미 상업화 되고 있음.
 - 현재 일부 김을 포함한 조류(algae)의 구조유전체 및 EST 프로젝트가 진행되어, 해조류 유전자 및 유전체 정보가 축적되고 있음
 - 기존 육종기술에 더하여 유용해조류에서 안정적인 돌연변이 기술을 확립하여 신품종을

개발하는 것이 중요함

- 김의 신품종 개발에 돌연변이 기술을 적용하기 위해서는 김의 유전체 정보, 단세포로부터 개체로의 재생기술, 돌연변이 생산 기술, 돌연변이된 유전자의 발현/분석 기술의 확보가 선행되어야 함
 - 최근 유럽, 일본, 한국에서 김의 유전체 정보가 생산되고 있으며, 김의 단세포로부터 개체로의 재생기술은 확립되어 있다. 또한 최근 국내 연구팀에서 향산화 김등 돌연변이 품종이 개발되고 있음
 - 즉 김에서 돌연변이 신품종을 개발할 수 있는 기반 기술이 확립되고 있으며 효율적인 돌연변이체 생산 기술을 확립하고, 이로부터 고온에 내성을 가지는 라인을 선발하여, 그 특성을 규명하고 그 특성이 안정적으로 고정되도록 하는 기술의개발이 필요함
 - 또한 고온내성을 부여하게 된 변이 유전자들의 분석 및 활용을 위해 모델 조류에서 기능을 검증하는 연구가 필요함
- 경제·산업적 측면에서는,
- 해조류는 식품으로서의 가치 이외에도, 식품첨가물, 화장품, 피코콜로이드 (phycocolloids)의 원재료, 지방산과 색소, polysaccharides, 가축사료, 비료, 바이오에너지생산용, 폐수처리, 지구온난화가스 CO₂의 생물학적 제거용으로 개발되고 있으며, 파생 산업을 고려하면 현재의 경제적 중요성에 부가하여 막대한 잠재적 가치를 가지고 있음
 - 해조류는 유용 유전자원 (유용 유전자 발굴 소스 /해조류의 기능성 발굴), 바이오에너지 (홍조류 에탄올 및 해조류 바이오디젤) 및 유용 바이오소재(홍조류 펄프)로 개발되고 있음
 - 최근 해조류 생명공학을 이용하여 기존의 해조류의 이용성을 넓혀서, 분자육종에 의한 신품종 개발, 의약 또는 산업적으로 중용한 유용단백질 또는 유용물질 생산의 bioreactor로서 해조류 연구가 진행되고 있음
 - 최근까지 김의 소비는 주로 중국, 일본, 한국에 국한되어 있었으나, 최근 미국 등에서 김이 건강식품으로의 인식되는 등 소비가 증가하고 있으며, 국내에서 수출하고 있다. 따라서 향후 아시아뿐만 아니라 미국 유럽 등에서도 소비가 증가하게 될 것임
 - 김은 2012년부터 품종보호대상 식물로 지정되었으므로 경쟁력 있는 국내 신품종을 개발함으로써 외국품종 도입에 따른 로열티 지급을 감소시키고 역으로 국내신품종의 종묘 수출을 도모할 필요성 있음

○ 사회·문화적 측면(공공성 포함)

- 차세대 해조류 생명공학기술의 우위 및 선점을 통하여 국가위상 제고 및 국가경쟁력 확보가 가능할 것임
- 생명공학을 통한 해조류 신품종의 개발은 어촌의 노동력의 절감 및 고생산성 어업으로의 발전을 위해 필요한 기술임
- 본 연구를 통하여 생명공학기술에 의한 김 신품종이 개발되어 사회, 경제적으로 기여를 할 수 있다면 과학기술에 대한 국민의 인식수준이 크게 고양되어 선진 국가를 이룩하기 위한 큰 인식전환점이 될 것임

3. 3세부과제: 김 발현유전체 정보 탐색 및 활용기술 개발

- 현재 종자 개발 및 관리는 해당 생물자원의 유전체 및 유전자 정보를 바탕으로 진행되고 있으며, 전사체는 가장 쉽고 빠르게 해당 생물의 유전 정보를 얻을 수 있는 방법임.
- 전사체 생성은 김과 같이 해당 생물에 대한 선행된 유전적 기초 정보 없이도 생성 및 분석이 가능
- 전사체 탐색을 통해 해당 생물의 발달, 생리, 환경 특이적 반응 유전자 선별 및 promoter 정보 등을 얻을 수 있음
- 전사체 기반 선별된 유전자 기능 연구를 통해 산업적 가치가 있는 유용 유전자들은 특허화가 가능하며 그 가치가 보호 되고 있음. 나아가 환경내성 유전적 변이체 생성을 위한 정보를 제공할 것임
- 확보된 김 전사체 분석을 통해 얻어진 유전자 및 관련 정보는 다른 김 세부프로젝트 간 정보를 공유하도록 함으로써 시너지 효과를 얻을 수 있을 것으로 기대됨
- 방사무늬김 (*P. yezoensis*)는 동아시아에서 가장 널리 양식되고 있는 *Pyropia* 종으로 많은 육종 노력의 다양한 *P. yezoensis* 품종이 개발되고 있음. 지구온난화에 따른 해수온 상승 등의 재배환경 변화에 대처하기 위해서는 보다 다양한 방사무늬 김 품종 개발이 필요함
- 방사무늬 김은 형태가 단순하고 종의 성장률과 표현형이 환경의 영향을 많이 받기 때문에 표현형으로 품종을 식별하는 것은 상대적으로 어려움.
- 표현형 기반 식별과 달리 DNA 마커를 이용한 분자식별은 표현형적 간섭을 방지할 수 있어서 특정 유전자형의 식별에 용이함. 따라서 방사무늬 김 동정을 위한 분자 마커, DNA 마커가 개발되고 적용 되어야함

- SSR등 DNA 마커 정보는 전사체보다는 유전체 정보로부터 보다 다양하고 대량으로 확보할 수 있음. DNA 마커 뿐만아니라 및 다양한 김 특이적 유전정보를 확보를 위해 방사무늬김 유전체 정보를 해독할 필요가 있음
- 개발된 DNA 마커는 품종 식별 정보를 제공할 뿐만 아니라 품종의 유전적 변이와 생리적 특성을 이해하는 중요한 기초자료가 될 것임

1-3. 연구개발의 범위

1. 1세부과제: 내병성 김 종자 개발

- 원인균주의 배양시스템 구축/ 배양
 - 서·남해 지역을 중심으로 각 해역별 감염균주의 확인 및 확보
 - 감염균주의 해역별 환경특성 분석 및 종별 감염균주의 특이성을 분석
 - 균주의 형질 및 특성 조사 후 조건별 배양시스템을 통한 확보된 균주 유지
 - 김 질병 진단 기술 개발

- 원인 균주별 감염기작 규명
 - 균주의 종별, 해역별, 계절에 따른 특이성 및 해조류 생장에 영향을 미치는 요소를 측정 및 수집
 - 균주의 조건별 성장률 측정 및 각 해역에 분포하는 균주의 특성 파악
 - 감염개체별 균주와 감염숙주의 관계파악을 위한 감염시스템 구축 및 배양
 - 실내배양시스템을 통한 균주 유지를 위해 균주별 배양조건(배지별, 온도별, 광도별)의 확보 후 각각의 유전자 발현을 측정하여 특이적 유전자 탐색
 - 균주에 의한 김 세포내 면역계의 활동 관찰을 통한 치료 및 내병성 연구 및 타 종에 전이실험을 통한 처리제 개발

- 갯병 내병성 우량 김 종자 개발
 - 해역별 채집된 개체들 중 원인 균주에 대해 내성을 지니는 품종을 확보
 - 내병성 강화를 위한 감염테스트 및 감마선 조사를 통한 돌연변이 육종
 - 유성생식을 통한 세대교번 이후 내병성의 형질유무 확인 및 순계주 유지 보존

- 개발종자의 현장적용 시험 및 형질특성 조사
 - 출원 품종 골드1호 재배심사 및 개발종자의 형질특성 조사 및 안정성 테스트
 - 내병성 품종 채묘 후 내병성 테스트 및 생산량 검증
 - 내병성 품종 및 황백화 내성 품종의 엽체 감염률 분석/생산량 테스트

- 내병성 우량 김 종자에 대한 과학적인 라이브러리 구축과 데이터 베이스화
 - 내병성 품종의 안정성 DB구축(1-4년차 시험양식 결과 DB구축)
 - 내병성 품종의 지표성분 표준화 및 생리활성에 대한 라이브러리와 DB 구축

- 우량 환경내성 김 종자 생산기술 개발 및 국내외 산업화
 - 환경내성 품종의 대량생산 및 국내외 판매
 - 개발품종의 유리사상체 국내분양 및 가공품 수출전략 수립
 - 국내 메이저 가공업체를 통한 개발품종 가공품 생산 및 내수판매
 - 2021년 상반기 골드1, 2, 3호의 마른김 및 조미김 수출(미국, 동남아 등)

2. 2세부과제: 고온내성 김 종자 개발

- 고온내성 김 돌연변이주 선발
- 고온내성 돌연변이주 특성 분석
- 고온내성 종자 유전자 특성 규명
- 고온내성 김 양식 현장평가 및 피드백을 통한 양식조건 최적화
- 신규 변이주 시험양식
- 산업화 기반 구축

3. 3세부과제: 김 발현유전체 정보 탐색 및 활용기술 개발

- 김 품종의 유전적 특성 분석 및 품종 구분 DNA 마커 개발
 - 방사무늬김 유전체 정보 확보
 - Genome 기반 SSR 분석 및 SSR 마커 개발
 - SSR 마커의 방사무늬김 품종 식별 및 유전적 특성 분석에 적용
 - Indel 또는 SNP기반 DNA 마커 개발
- 환경내성 김 유전자 선별 및 기능 연구
 - 김의 전사체 생성 및 DEG 분석
 - 김 전사체 기반 고온 및 환경 반응 유전자 선별
 - 선별된 환경 스트레스 반응 유전자의 클로닝 및 발현 특성 분석
 - Model organism을 이용하여 overexpression (OX) mutant를 생성하고 이를 이용한 유전자의 기능 연구

2. 연구수행 내용 및 결과

제 1 절. 내병성 김 종자 개발

[1차년도]

1. 선발육종 및 돌연변이 유도 기술 확보

가. 내병성 품종의 선발

(1) 우성엽체의 선발

- 2015년 3월 충청남도 서천군 마량리 근해 김 양식장의 비 처리 실험 구에서 대부분의 엽체는 갯병으로 인해 사멸되었으나 일부 생존된 엽체 중 빠른 성장을 나타내고 높은 생존율을 가진 엽체를 선발하였음
- 채집된 엽체는 2월 말 이후 수온 10℃ 조건에서 갯병에 내성을 가진 엽장 1.2m, 엽폭 1m 이상의 엽체만 선발 하였으며 선발 후 단조화 및 순계과정을 거쳐 선발된 엽체를 10℃조건에서 배양하고, 최종 선발된 1~2개의 엽체를 이용하여 사상체를 유도함으로써 선발육종 순계주를 확보하였음

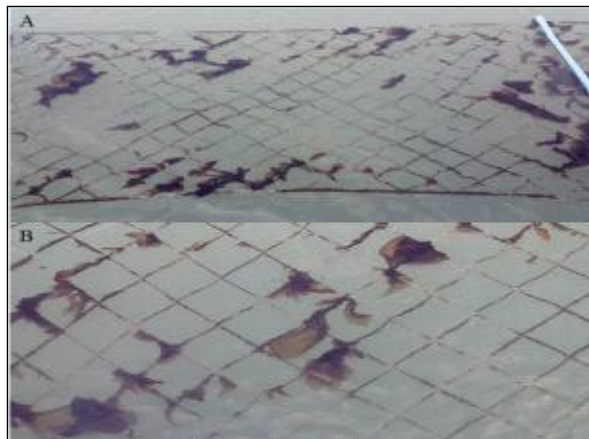


그림1. 갯병 내성을 가진 엽체의 선발

- 기존의 엽체 형태와 달리 광엽이며 선발 엽체의 크기는 가로 60cm X 세로 70cm로 확인되었고 연변부의 거치가 없는 것으로 확인되어 자웅동주인 방사무늬김으로 판단되었음

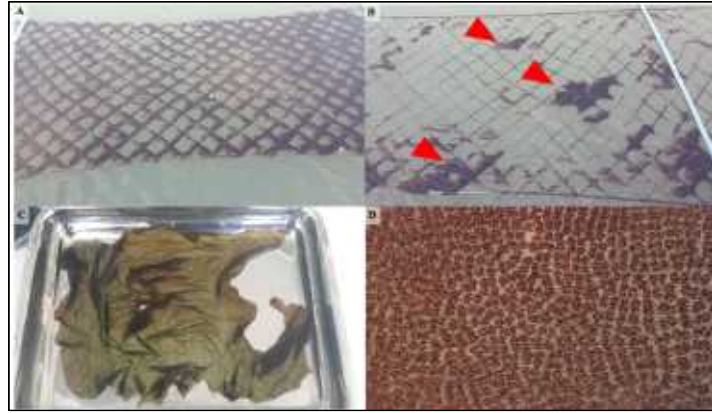


그림2. 내병성 계통주의 채집 및 형태적 특징

- 선발된 우성엽체는 실험실 이동 후 PES medium을 이용하여 단일 배양하였으며 10℃ 배양기에 엽장을 10cm X 10cm 의 크기로 절단하여 통기배양 하였음

(2) 우성엽체의 단포자 방출

- 약 1주 간격으로 엽체의 크기 및 과포자(Carpospores) 방출 및 단포자 방출 유무 방사무늬검과 참김을 대조구로 하여 조사하였음

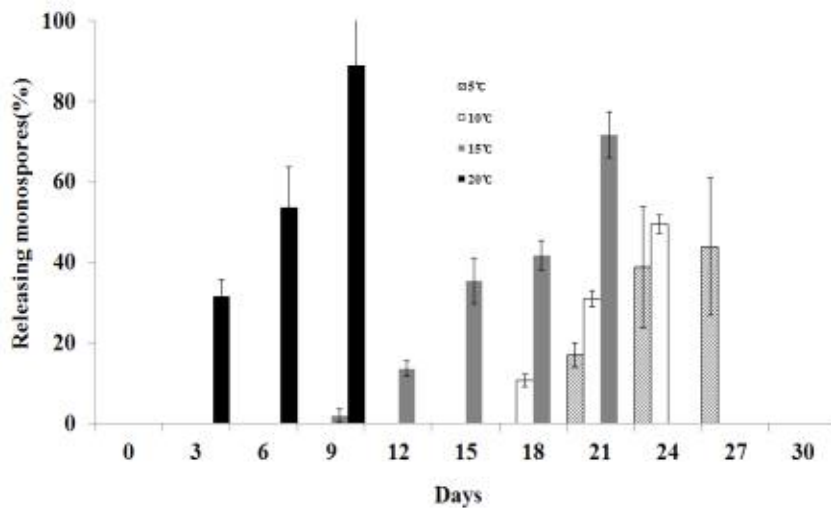


그림3. 선발 계통주의 온도별 단포자 방출

- 선발 계통주에 대한 온도별 단포자 방출 특성을 조사한 결과는 20℃에서 89.2%, 15℃에서 71.8%, 10℃에서 49.7%, 5℃에서 44%로 20℃에서 가장 높게 나타났음

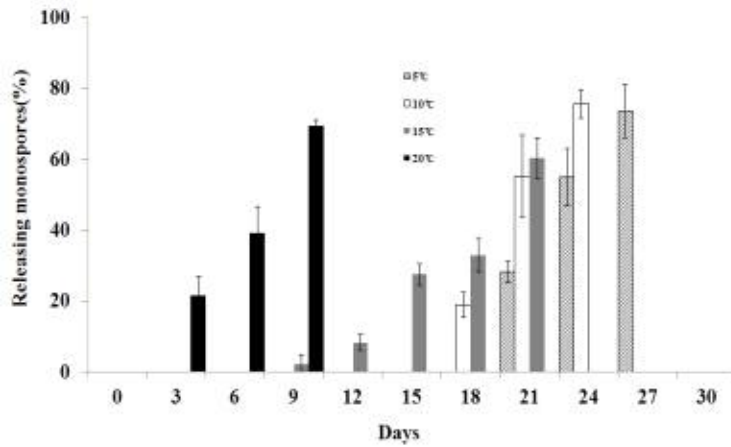


그림4. 방사무늬김의 온도별 단포자 방출

- 방사무늬김의 단포자를 방출한 업체 비율은 20°C에서 69.6%, 15°C에서 60.3%, 10°C에서 75.6%, 5°C에서 73.6%로 20°C에서 가장 높게 나타났음

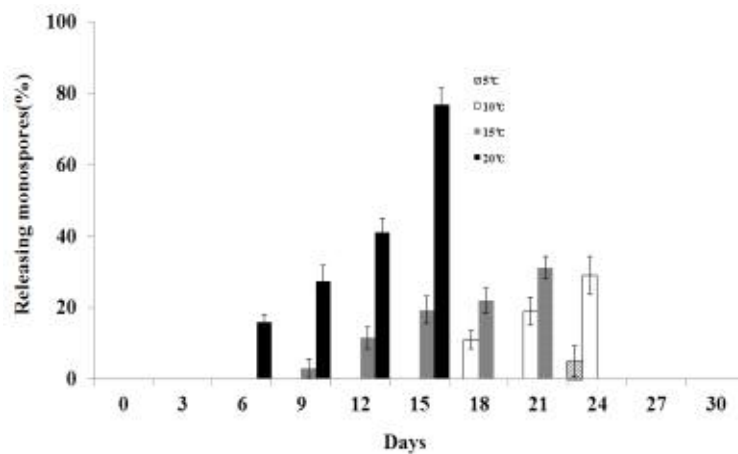


그림5. 참김의 온도별 단포자 방출

- 선발 계통주는 온도조건인 20°C와 23°C에서 실험개시 후 9일 만에 단포자가 방출되어 실험대상 계통주 중에서 가장 빨랐고, 15°C에서는 20일 후, 10°C에서는 24일 후에 단포자가 방출되었고 5°C에서는 27일 후에 단포자가 방출되었음

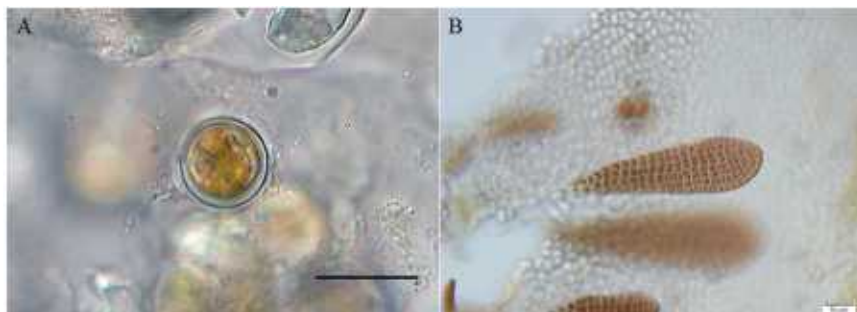


그림6. 골드 1호의 단포자 방출

- 개발된 골드 1호의 단포자 방출을 위해 김의 엽체를 일정한 크기로 잘라 각각 농도별로 H₂O₂처리를 실시하였음

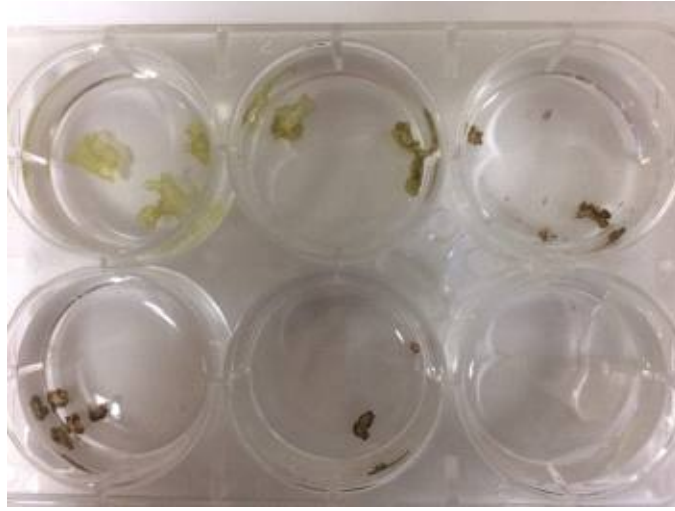


그림7. 골드 1호의 H₂O₂ 1.5mM 농도의 단포자 방출

- 실험 결과 Set1 의 1.5 mM의 농도에서 단포자의 방출을 확인하였고 Set2 의 2mM에서 기존의 1.5mM의 농도 보다 많은 양의 단포자 방출이 확인되었음

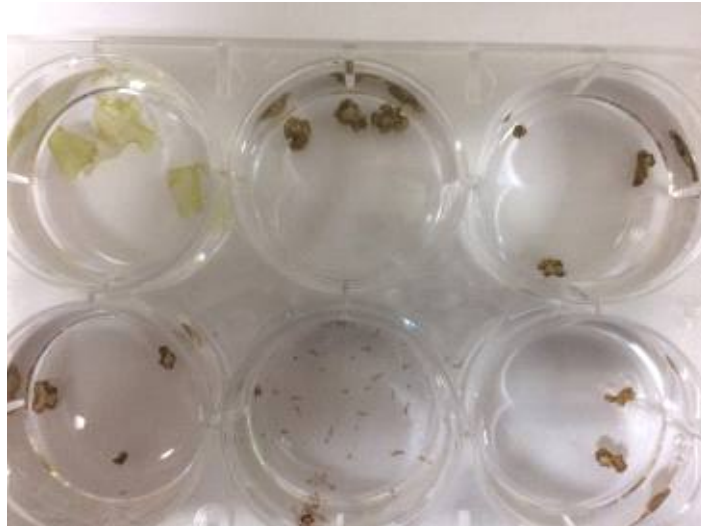


그림8. 골드 1호의 H₂O₂ 2mM 농도의 단포자 방출

- 전체적인 결과를 확인 했을 때 골드 1호의 경우 내병성의 특성을 갖는 이유로 산화적 스트레스의 내성이 강해 기존의 일반 방사무늬김과 참김에 비해 비교적 적은양의 단포자 방출을 확인 하였으나 환경에 따라 유동적인 것으로 확인됨

나. 내병성 강화

(1) 감마선 조사

- 선발 계통주는 전남 정읍시에 위치한 첨단 방사선 연구소에서 Co-60 감마선 조사 시설 (IR-70 gamma irradiator, MDS Nordion, Montreal, Canada)을 이용하여 시간당 100Gy와 200Gy 선량율로 흡수되도록 총 3시간 감마선 조사를 실시하였음
- 사상체의 각포자(Conchospores) 방출 4주 후 일정크기(엽장 5cm)의 엽체를 각각 1회씩 수행하였으며, 감마선 조사 후 즉시 환수를 하였고 생존 엽체를 약 2달 간 배양 후 동일한 과정을 1회 반복 하여 조사하였음

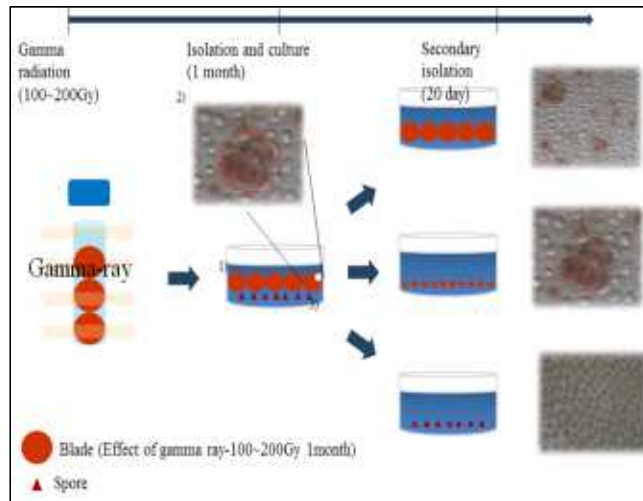


그림9. 선발 계통주의 100~300Gy 감마선 조사

- 100Gy 감마선 조사 엽체의 생존율은 감마선 조사 직후 인 1일 차 에는 엽체 전체가 생존 하였으며 3일차에는 85.4%, 6일차 75%로 나타났고 8일차 50%를 기준으로 하여 12일 차 10% 미만의 생존율을 나타냈으며, 200Gy에서는 감마선 조사 직후 인 1일 차 에는 100Gy 와 마찬가지로 엽체 전체가 생존하였으며 3일차에는 82.5%, 6일 차 70%로 나타났고 8일 차 45%를 기준으로 하여 12일 차 10%미만의 생존율을 나타냈음

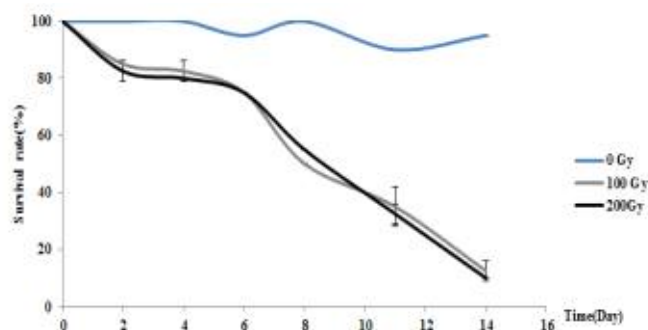


그림10. 선발 계통주 엽체의 100~300Gy 감마선 조사 후 생존율

(2) 내병성 테스트

- 감마선 조사를 실시한 후 선발된 내병성 선발 계통주에 대한 각각의 깃병인 낭균병과 붉은깃병, 녹반병 내병성 테스트 실험을 진행하였음

(가) 낭균병

- 숙주의 배양은 실험군과 대조군으로 나누어 약 7일 동안 10℃의 PES Medium에 배양하였으며 3일에 한 번씩 현미경(Olympus BX50)을 통해 아래와 같은 식으로 계산하였음

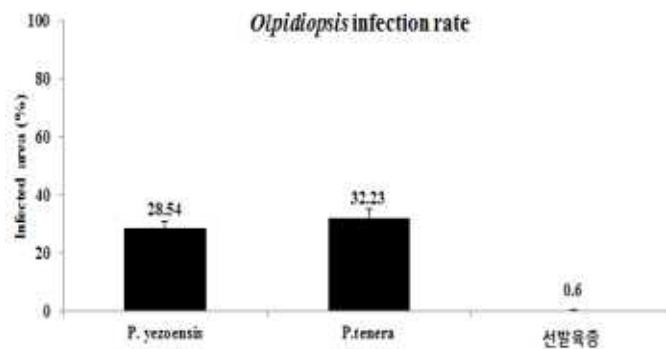


그림11. 내병성 선발 계통주의 낭균병 감염 실험

- 낭균병 균주를 방사무늬김과 선발 계통주 엽체에 감염시킨 결과는 10일차에 대조구인 방사무늬김에서 28.5%의 감염률을 나타냈으며 대조구인 참김의 경우 32.2%로 가장 높게 나타났음
- 선발 계통주의 경우 0.6%로 대조구에 비해 약 60배 정도 차이를 보였으며 감염 15일차 이후에는 대조구인 방사무늬김과 참김은 엽체 전체가 낭균에 감염되어 사멸하였고 선발 계통주의 경우 15일 차 이후에도 엽체 대부분이 생존하였음

(나) 붉은깃병

- Cornmeal agar 배지에서 약 30일 주기로 20℃, 300lux~800lux(12 : 12 : L : D) 에서 계대 배양하였으며 실험에 사용할 때에는 장기보관 할 때와 같은 조건에서 Arasaki B 배지에서 1주 간 현탁 배양 후 생식기가 형성되지 않은 상태에서 사용하였고, 1일에 한 번 식 현미경을 통해 검경하였으며 아래와 같은 식으로 계산하였음

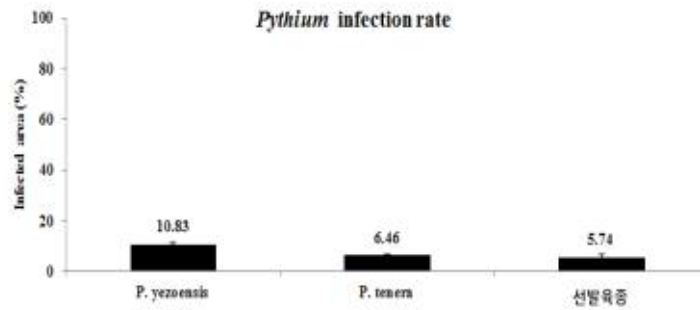


그림12. 내병성 선발 계통주의 붉은갯병 감염 실험

- 붉은갯병 균주를 방사무늬김과 선발 계통주 엽체에 감염시킨 결과 선발 계통주 엽체의 감염률은 10일차에 대조구인 방사무늬김에서 10.83%로 가장 높은 감염률을 나타냈으며, 대조구인 참김의 경우 6.46%로 나타났고 선발 계통주의 경우 5.74%로 대조구에 비해 약 0.3~1배 정도로 큰 차이를 보이지 않았음
- 하지만 감염 10일차 이후에는 대조구인 방사무늬김과 참김은 엽체 전체가 붉은갯병에 감염되어 사멸하였으며 선발 계통주의 경우 15일차 이후 엽체 전체가 사멸하여 대조구인 방사무늬김과 참김보다 약 5일 정도 높은 생존율을 나타냈음

(다) 녹반병

- 실험에 사용된 녹반병(Green spot disease)은 감염 엽체를 정상 엽체와 함께 배지에 배양하여 실험실내에서 분리하였고 PES배지에서 4℃, (12L : 12D)의 조건으로 배양하였으며 3일에 한 번 씩 현미경(Olympus BX50)을 통해 검경하였고 아래와 같은 식으로 계산하였음

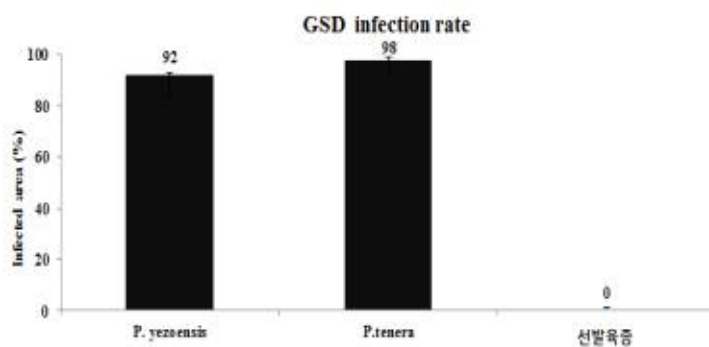


그림13. 내병성 선발 계통주의 녹반병 감염 실험

- 녹반병 균주를 방사무늬김과 선발 계통주 엽체에 감염 시킨 결과 선발 계통주 엽체의 감염률은 10일차에 대조구인 방사무늬김에서 92%로 상당히 높은 감염률을 나타냈으며 대조구인 참김 에서는 98%로 가장 높게 나타났고, 선발 계통주의 경우 녹반병이 전혀 감염되지 않는 걸로 확인되었음

- 대조구에 비해 약 98배 정도 차이를 보였고 감염 15일차 이후에는 대조구인 방사무늬김과 참김은 엽체 전체가 녹반병에 감염되어 사멸하였으며 선발 계통주의 경우 15일 차 이후에도 녹반병은 감염되지 않았음

다. 순계유도

(1) 순계주 선발

- 단포자 방출을 위해 채집된 엽체를 김 양식조건 중 채묘기인 10월부터 11월의 평균수온인 20℃, 저수온기인 5℃, 김 양식이 가장 활발히 이루어지는 10℃와 15℃의 조건에서 통기배양 하였으며 단포자 방출이 용이하도록 1L 통기배양기에 31%의 PES 배지를 첨가한 멸균 해수와 증류수를 7:3 비율로 섞어 단포자를 유도하였음
- 배양 10일차에 단포자가 방출되었으며, 방출된 엽체를 15℃, 1000lux~2000lux(10 : 14 : L : D)의 조건에서 방출된 단포자에서 1개의 엽체를 선발하여 단포자 방출 조건과 동일한 15℃, 1000lux~2000lux(10 : 14 : L : D)의 범위에서 단조화 하였음

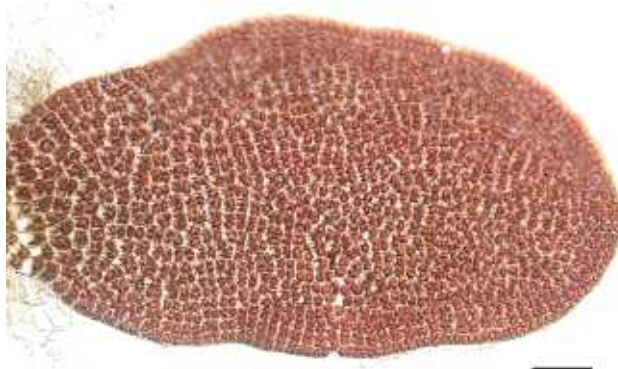


그림14. 내병성 선발 계통주의 순계주 유엽
(A) 기저부와 하부, (B) 중부와 상부. Scale bars: 50um (A-B)

- 갯병 내성 테스트를 거친 갯병 내성품종 순계주 확보를 위해 단포자로부터 발아한 엽체를 분리하여 선발하는 과정을 3회 반복하여 1개의 엽체를 최종 선발하였고 이 엽체를 자가 수정 시킨 후 형성된 접합포자를 방출시켜 사상체로 발달하게 하였음
- 선발된 품종의 특징으로는 난형의 엽체를 가지고 있으며 단포자 방출은 기타 다른 품종과 비슷한 수준을 유지 하였고 엽체의 색은 흑녹색으로 나타났음

(2) 유리사상체 대량배양

- 시험양식 및 패각사상체 배양을 위한 유리 사상체 대량배양을 실시하였으며, 확보된 순계

주 1g을 20℃, 300lux~800lux(14 : 10 : L : D)의 범위에서 통기배양 하였음

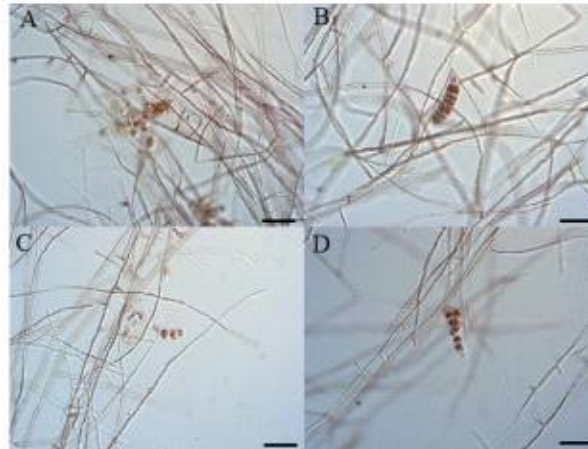


그림15. 내병성 선발 계통주의유리사상체. Scale bars: 10um (A-D)

- 사상체 가지가 뺏어나가는 것을 현미경(Olympus BX50)을 통해 확인하였으며 분쇄 후 사상체의 색택은 투명한 색을 나타냈으며 배양 10일 후 색택은 적갈색으로 나타났고 약 100일 후 1g의 사상체가 약 50g으로 증식하였음

2. 1단계에서 개발된 품종의 시험양식을 통한 검증

가. 내병성 품종의 시험양식

(1) 패각 사상체 배양

- 2016년 2월 내병성 선발 계통주의 시험양성을 위해 유리사상체 약 10g을 확보 하였고 10℃, 500lux~1000lux(14 : 10 : L : D)로 배양 하였으며, 2016년 2월 22일 충남 서천군 마량리에 위치한 (주)선진수산 패각 배양장에서 패각사상체 부착을 실시하였음
- 3m X 10m의 수조에 약 10,000패각을 평면 식으로 부착 시켰고 패각 부착 후 배양조건은 15℃, 300lux~800lux(14 : 10 : L : D)의 범위에서 수하식으로 배양하였음
- 배양 4주 후 부착의 상태를 확인하기 위해 패각 일부를 수거하여 현미경으로 검경하였으며, 사상체의 부착면적을 확인하였고, 부착이 완료된 후 17℃, 800lux~1200lux(14 : 10 : L : D)로 조건을 변경하여 포자낭 형성을 유도하였음

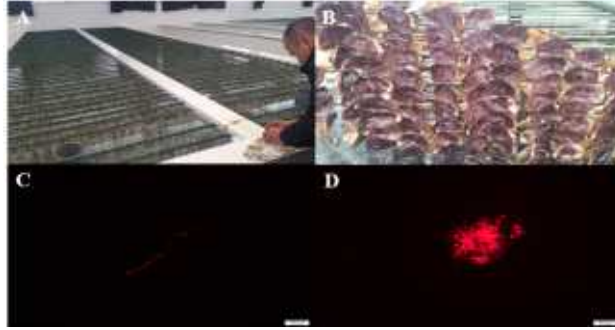


그림16. 내병성 선발계통주의 패각사상체와 패각 잠입 후 사상체의 현미경 사진 Scale bars:
20um (C-D)

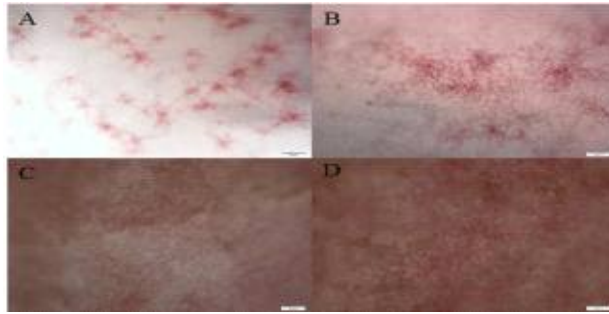


그림17. 내병성 선발계통주의 패각사상체의 사상체 잠입 상태. Scale bars: 20um (C-D)

- 배양 8주 후 부착의 상태를 확인하기 위해 패각 약 10개를 수거하여 검경한 결과 패각에 부착된 사상체는 18~20℃, 조도 1,000~2,000lux 배양 조건에서 약 30일 이후부터 패각사상체가 육안으로 확인되었고, 사상체 가지가 뻗어 나가면서 빠르게 성장하는 것을 확인 할 수 있었음
- 이후 사상체는 2~3mm이상으로 성장하여 패각표면에 번무하여 적자색으로 변화였으며 패각사상체를 수온 20℃이상으로 조절하여 배양하여 포자낭 형성을 촉진시켰고 약 40~50일 후, 사상체 가지에서 각포자낭이 형성되었음

표1. 내병성 선발 계통주의 패각사상체 성장률

Strain	Length of conchocelis filaments ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$)				
	0	2	4	6	8Weeks
1	62±22	108±52	238±89	1659±345	4529±1231
2	50±18	113±42	244±46	1239±462	4332±1439
3	58±14	93±22	207±68	1890±480	4798±2045
4	49±11	126±32	248±74	2056±562	5462±2109
5	50±17	91±12	198±48	1876±433	4887±1765
6	62±23	132±45	289±89	2459±896	5064±2331
7	68±21	84±13	196±93	1783±640	4430±1430
8	48±17	88±26	216±79	2509±690	5820±2234
9	68±23	142±56	303±59	2894±1059	6023±2677
10	51±15	117±34	256±77	2989±1277	6549±2986

- 배양 약 120일 후, 각포자낭이 다소 부풀어 포자낭의 세포와 세포막이 간격이 생기고, 세포는 성숙이 진행될수록 흑적색을 띠고 있었으며 배양 150일 이후에도 크게 변화하지 않았으며 포자낭은 80% 이상 성숙도를 나타내었고 방출하기 좋은 상태로 성장하였음

(2) 육상채묘

- 채묘는 배양된 패각 사상체 약 1,000패각을 이용하여 회전식 실내채묘 하였으며 수조에 물레의 하부가 약 30cm 정도 해수에 잠기게 하여 물레를 1분에 10회 회전을 시켰으며 10회 회전 후 김발의(폴리에스테르 합사) 각포자 착생상태를 현미경으로 검경 후 채묘를 반복하여 실험하였음

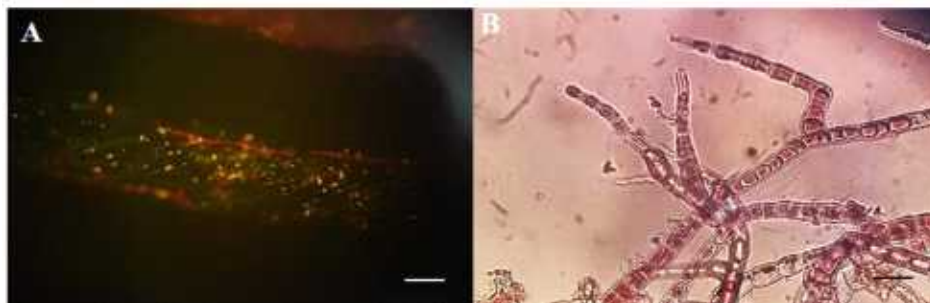


그림18. 내병성 선발계통주의 채묘 후 각포자의 현미경 사진. Scale bars: 20um (C), 100um(D).



그림19. 내병성 선발계통주의 채묘 과정

- 성숙된 내병성 선발 계통주의 패각 사상체는 약 1000패각을 1 톤의 수조에 옮겨 통기시켜 각포자를 자극하였고, 방출된 각포자의 크기는 약 15um로 확인되었음

- 방출된 각포자는 폴리에스테스 합사로 제작된 김발(1장 당 폭 2.5m X 길이 40m) 65장에 회전식으로 부착하였으며 10회 회전 후 김발을 절단하여 현미경으로 검경 하였고 확인 직 후 물레의 김발을 수거하여 22℃의 수조에 포자 분열을 유도하였음
- 약 10시간 분열 후 김발을 수거하여 수분을 제거 한 뒤 -40℃으로 냉동시켜 보관하였음

(4) 시험양식

- 10장씩 겹친 겹망을 약 3주간 1차 배양 한 후 다시 육지로 이송하여 1장씩 분리하는 분망 과정을 끝난 내병성 선발 계통주의 시험양식장을 진행하였음

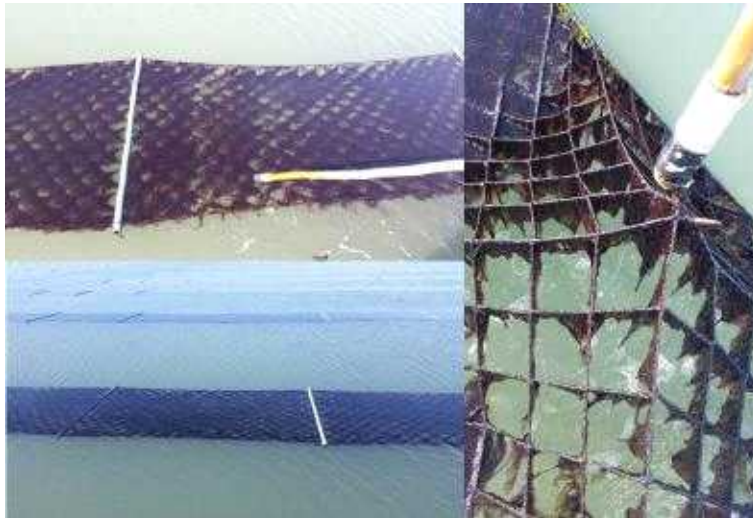


그림20. 내병성 선발계통주 시험양식장

- 시험양식장의 위치는 내병성 선발 계통주의 양식 과정 중 해류와 환경의 영향을 최소화 하기 위해 김 양식장의 중심부를 선택하였고 월 2회 현장 조사를 실시하였고 내병성 테스트와 김 엽체의 형질을 조사하였음

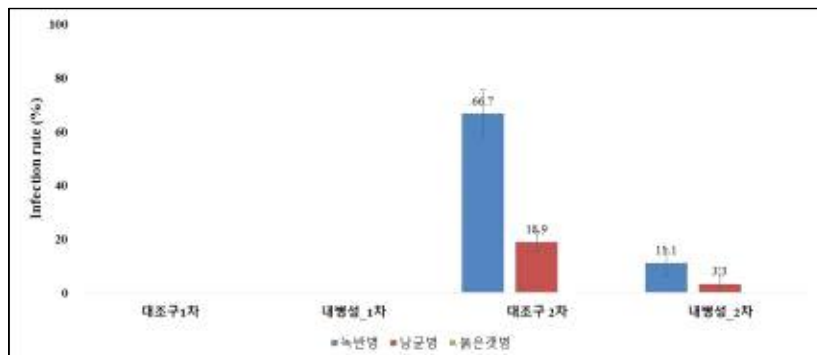


그림21. 시험양식장 내병성 선발계통주의 1,2차 갯병 발병률

- 2016년 11월 18일 내병성 선발 계통주 1차 갯병 감염률 테스트 결과 전체적으로 갯병이 발병하지 않았으며 2016년 12월 10일 2차 실험 결과 대조구인 방사무늬김에 비해 내병성 품종에서 낭균병이 60%이상 저해율을 나타냈고 녹반병의 경우도 대조구인 방사무늬김에 비해 약 60%이상 높은 저해율을 나타냈음

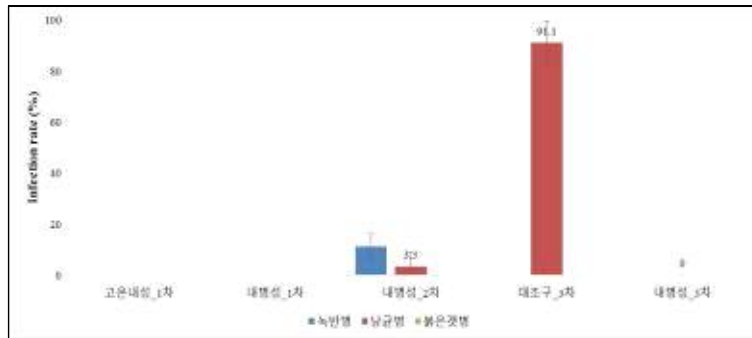


그림22. 시험양식장 내병성 선발계통주의 1,2차 갯병 발병률

- 2017년 01월 18일 내병성 선발 계통주 3차 실험결과 내병성 품종은 갯병에 전혀 감염되지 않았으며 대조구인 방사무늬김은 약 90% 이상 낭균에 감염된 것을 확인 할 수 있었으며 녹반병의 경우 김 양식장 전체적으로 나타나지 않았음

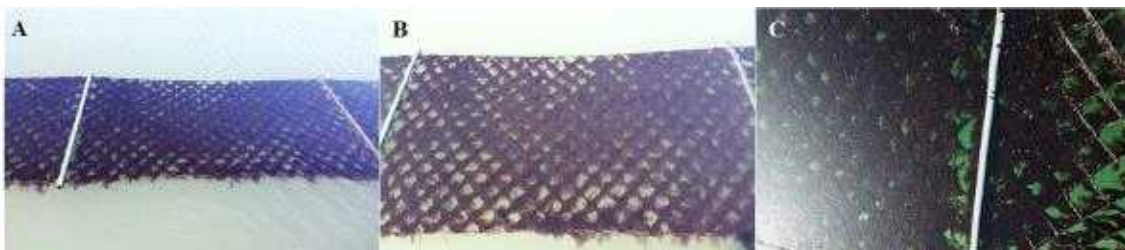


그림23. 내병성 선발계통주 시험양식장

- 내병성 선발 계통주의 양식장 김밭은 엽체의 높은 성장률과 폭의 넓이로 인해 김밭 전체를 덮은 모습으로 색택은 뚜렷한 진녹색을 띄고 있으며 기저부의 부착이 상당히 강해 기상악화나 태풍으로 인해 손실되는 엽체의 양이 상당히 미미할 것으로 판단됨



그림24. 방사무늬김의 시험양식장

- 반면 대조구인 방사무늬김의 경우 엽체의 성장이 고르지 못한 경우도 있으며 세엽 형태의 엽체로 길이 성장은 빠르나 전체적인 엽체의 수확량은 내병성 선발 계통주에 비해 약간 떨어지는 것으로 판단되며 기상악화나 태풍으로 인해 탈락되는 엽체의 양이 내병성 선발 계통주보다 많은 것으로 확인되었음

3. 원인균주의 배양 유지 및 추가확보

가. 갯병 감염주의 배양

- 채집된 원인균주의 분리 및 배양을 위해 탐색된 갯병 배양의 최적조건에 종류별 갯병 균주에 종류별 배양 배지인 PES medium, Arasaki medium를 사용하여 배양 하였고 바이러스성 갯병인 녹반병은 동결보존을 통한 균주 보존배양을 하였음
- 배양온도는 낭균병 20℃, 녹반병 -40℃, 붉은갯병 15℃에서 균주 배양중이며 장기보존이 어려운 경우 원인균주의 숙주인 김 엽체에 계대 배양하여 감염균주를 유지하였음
- 각각의 갯병의 균주는 조건별 실험에 사용하기 위해 감염 균주가 출현하지 않는 4월부터 10월 까지 숙주인 김 엽체를 일정기간별로 교체하여 보존하였음

표2. 원인균주 종별 리스트

Strain No.	Strain	종명	Collecting Site
1	붉은갯병 (<i>Pythium</i> sp.) - 1	<i>Pythium</i> sp. (SC)	충남 서천
2	붉은갯병 (<i>Pythium</i> sp.) - 2	<i>Pythium</i> sp. (JD)	전남 진도
3	<i>Dendryphiella</i> sp.	<i>Dendryphiella salina</i>	일본 무로란
4	낭균 (<i>Olpidiopsis</i> sp.) -1	<i>Olpidiopsis</i> sp.(<i>porphyrae</i>)	충남 서천 전남 진도
5	낭균 (<i>Olpidiopsis</i> sp.) -2	<i>Olpidiopsis pyropiae</i>	충남 진도
6	낭균 (<i>Olpidiopsis</i> sp.) -3	<i>Olpidiopsis</i> sp.(<i>koreanum</i>)	충남 서천 전남 해남
7	녹반병(GSD) -1	PyroV1-JD	진도 회동
8	녹반병(GSD) -2	PyroV1-SC	충남 서천
9	녹반병(GSD) -3	PyroV1-HN	전남 해남

10	녹반병(GSD) -4	PyroV1-WD	전남 완도
11	<i>Licmophora flabellata</i>	<i>Licmophora flabellata</i> 균조류	충남 서천
12	<i>Navicula</i> sp.	<i>Navicula</i> sp.(Tube-dwelling) 균조류	충남 서천

(가) 낭균병

- 낭균의 감염실험을 위한 균주채집은 2014년 12월부터 2017년 01월 까지 충남 서천 일대와과 전북 군산, 전남 진도에서 채집된 엽체로부터 총 3종을 분리하였음
- 분리된 낭균의 숙주로 방사무늬김과 갯병 내성품종을 사용하였으며 2mm X 3mm의 엽체 100개씩을 15°C, 1000lux~2000lux(10 : 14 : L : D)의 조건으로 통기배양기에 통기배양 하였음

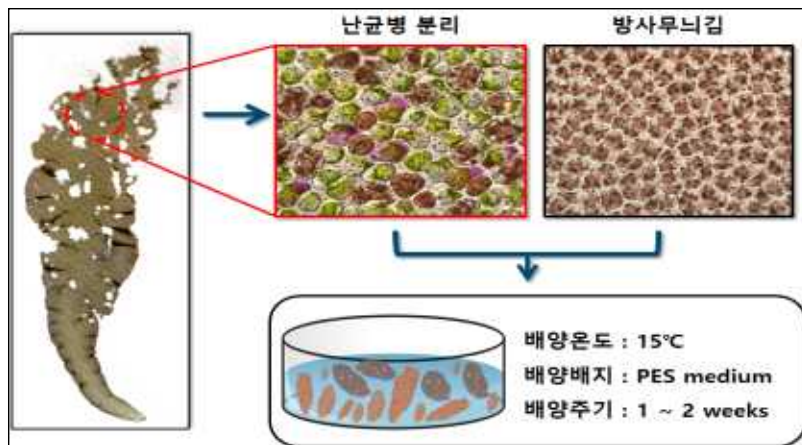


그림25. 낭균의 분리 및 배양



그림26. 낭균병 균주의 배양

(나) 붉은갯병

- 붉은갯병균(*Pythium porphyrae*)은 낭균병과 마찬가지로 2014년 12월부터 2017년 01월 까지 충남 서천과 전남 진도 김 양식장에서 채집한 방사무늬김에서 총 3종을 분리

하였음.

- Cornmeal agar 배지에서 약 30일 주기로 20℃, 300lux~800lux(12 : 12 : L : D) 에서 계대 배양하였음
- 실험에 사용할 때에는 장기보관 할 때와 같은 조건에서 Arasaki B 배지에서 1주 간 현탁 배양 후 생식기가 형성되지 않은 상태에서 사용하였으며, 1일에 한 번 식 현미경 (Olympus BX50)을 통해 검경하였음



그림27. 붉은갯병(*Pythium porphyrae*)의 분리과정

- 감염과정은 Time-lapse video 장치를 이용하여 장시간 현상 관찰을 위하여 샘플을 슬라이드 글라스에 올려놓고 커버 글라스로 덮은 후, V:L:P (1 : 1 : 1 = Vaseline : Lanolin : Paraffin)을 70℃로 녹인 후 sealing해 주었음



그림28. 붉은갯병 균주의 배양

(다) 녹반병

- 녹반병(Green spot disease)은 2014년 12월부터 2017년 01월 까지 충남 서천에서 채집된 감염 엽체를 정상 엽체와 함께 배지에 배양하여 실험실내에서 총 1종을 분리하였음
- 녹반병의 통기배양: 숙주와 병원체를 동시에 배양하여 병원체의 활성을 유지하는 방법임. 일반적인 김 배양방법을 통해 병원체의 보관이 가능하나 병원체의 특성이 변성될 수 있음
- 녹반병의 동결보존: 병원체에 감염된 숙주 또는 분리된 병원체를 보관하는 방법임. 동결배지 (KNU-Cryo1)를 이용하여 동결시킨 병원체는 최대 1년 까지 보관이 가능하며 병원체의 특성 변화가 거의 없음
- PES배지에서 4℃, (12L : 12D)의 조건으로 배양하였으며 3일에 한 번 씩 현미경 (Olympus BX50)을 통해 검경하였고 감염력 확인은 화상 해석 장치(Image analysis system : Cell sense)를 사용하여 관찰하였음



그림29. 녹반병 균주의 배양 및 동결보존

- 녹반병에 걸린 병원체를 분리하기 위한 방법 중 녹반병에 걸린 김을 몇 일간 배양시킨 배양수를 다양한 크기의 여과지로 여과한 결과 필터하지 않은 배양액에서부터 0.1 μm 크기로 필터한 배양액까지 감염력이 나타났고 100 kDa크기로 여과한 배양액에서는 감염력이 나타나지 않았음
- 녹반병 병원체는 감염 되지 않은 김 세포를 동결 했을 때와는 다르게 다른 여러 가지 동결배지 중 KNU-Cryo1에서 약 80%로 가장 높게 감염력이 보존되었으며 김 세포의 동결보존에 효과가 있었던 1M Sucrose와 5% DMSO는 60% 미만의 감염률을 보인 결과 동결보존의 효과를 입증하였고 이와 같은 보존력을 나타내는 것으로 확인하였음

나. 원인균주의 추가확보

- 2017년 01월부터 2017년 10월 까지 새로운 균주의 채집을 위해 서천, 해남, 진도, 완도, 군산에서 지역별로 김을 채집중에 있으며 채집된 개체 중 감염된 개체를 분리 및 배양하여 갯병 원인균주를 확보하였음
- 채집된 각각의 엽체들에서 갯병 감염의 형태적 특성을 분석하고 이를 표본으로 제작하여 자료를 보존하였음

채집지 : 충남 서천	채집일시 : 2017.01.19	종명 : 방사무늬김 <낭균병 감염 개체>
		
<p>형질 특성 : 낭균병에 감염되면 감염초기에는 육안으로 구분하기 힘들 정도로 차이가 나타나지 않지만 시간이 지남에 따라 좁쌀만한 구멍들이 생겨난다. 엽체는 점차 연녹색으로 변하며 마지막에는 전체가 변색되어 사멸하게 된다. 감염속도는 수온이나 조도와 밀접한 관계가 있어 정확하게 판단하기는 어렵다</p>		

채집지 :군산 선유도	채집일시 : 2017.01.19	종명 : 방사무늬김 <녹반병 감염 개체>
-------------	-------------------	------------------------



형질 특성 : 엽체의 구멍이 생기고 세포가 탈락되며 탈락된 부분의 색은 흰색이나 연녹색으로 탈색되는 것이 특징이다. 감염이 오래 진행된 곳의 구멍은 2cm~3cm이상의 큰 구멍이 생기기도 한다. 감염 속도는 빠르게 진행 된다

채집지 :군산 선유도	채집일시 : 2017.01.19	종명 : 방사무늬김 <붉은갯병 감염 개체>
-------------	-------------------	-------------------------



형질 특성 : 붉은갯병에 감염되게 되면 기저부의 형태가 정상적이지 못하며 군사의 피해로 기저부 탈락 및 영양부족으로 엽체의 여러부분이 사멸하게 된다

- 각각의 갯병 균주는 종류별로 배양조건이 다르며 이를 파악하고 최적의 조건을 찾기 위해 실내 배양시스템에 적용 하였고 이를 배양 Chamber에 setting 후 최적의 조건을 탐색하였음
- 채집된 원인균주의 분리 및 배양을 위해 탐색된 갯병 배양의 최적조건에 종류별 갯병 균주에 종류별 배양 배지인 PES medium, Arasaki medium를 사용하여 배양 하였고 바이러스성 갯병인 녹반병은 동결보존을 통한 균주 보존배양을 하였음
- 배양온도는 낭균병 20℃, 녹반병 -40℃, 붉은갯병 15℃에서 균주 배양중이며 장기보존이 어려운 경우 원인균주의 숙주인 김 엽체에 계대 배양하여 감염균주를 유지하였음
- 각각의 갯병의 균주는 조건별 실험에 사용하기 위해 감염 균주가 출현하지 않는 4월부터 10월 까지 숙주인 김 엽체를 일정기간별로 교체하여 보존하였음

4. 김 질병 진단기술 개발/ 내병성 특성규명

(1) 녹반병

- 식물에서는 질병에 대한 방어 기작으로 세포내 활성산소를 생성함. 활성산소는 세포 외/내부에서 질병원에 대한 직접적인 방어와 신호전달 물질로서 역할을 함
- PyroV1(녹반병 바이러스)감염에는 뚜렷한 패턴은 나타나지 않았으며 참김에선 갯병 질병원에 반응하여 활성 산소를 생성하지만 질병 감염의 전파를 막을 만큼 영향을 끼치지 않는 것으로 확인됨

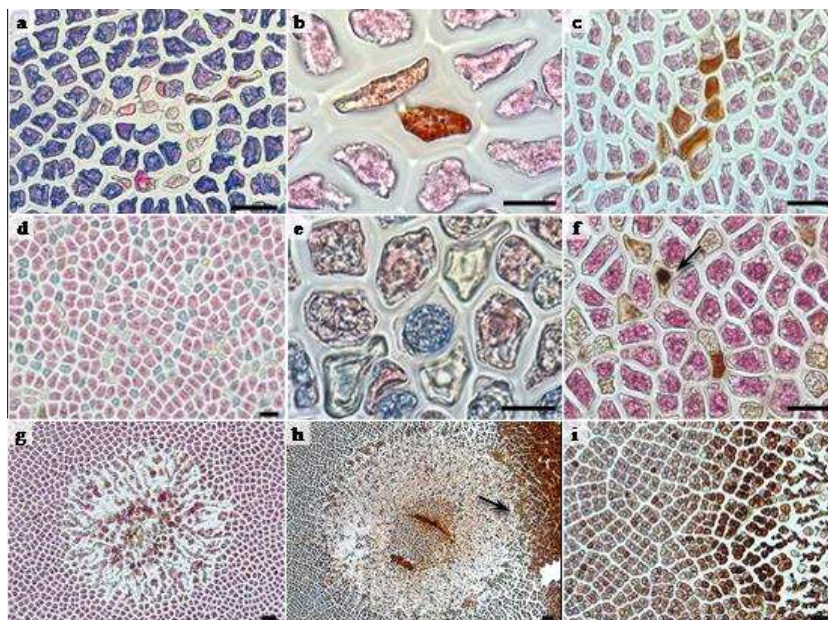


그림30. 각 갯병에 감염된 참김의 활성산소 축적

- 세 가지 갯병에 감염된 참김에서 발현이 증가하는 유전자를 Microarray 분석을 통해 분석한 결과, 전체적으로 세포내 스트레스 저항과 질병 저항에 관련하는 유전자들의 발현이 증가한 것을 확인함
- 발현이 증가한 유전자들 중 Heat shock protein (HSP) 그룹이 가장 많은 수로 증가한 것을 확인하였고 Small HSP는 HSP70와 세포내에서 단백질 접힘에 관여하여 세포내 안정성을 유지하는 것으로 나타남
- HSP70과 HSP90은 세포내 신호전달에 관여하는 것으로 나타났으며 HSP와 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase는 세포내 산화적 스트레스 저항에 관여한다고 보고된 바 있음
- Serine protease와 Cell wall-associated hydrolase는 세포의 apoplast에서 질병에 대응하는 역할을 한다고 판단됨

Upregulated genes in common in all treatments

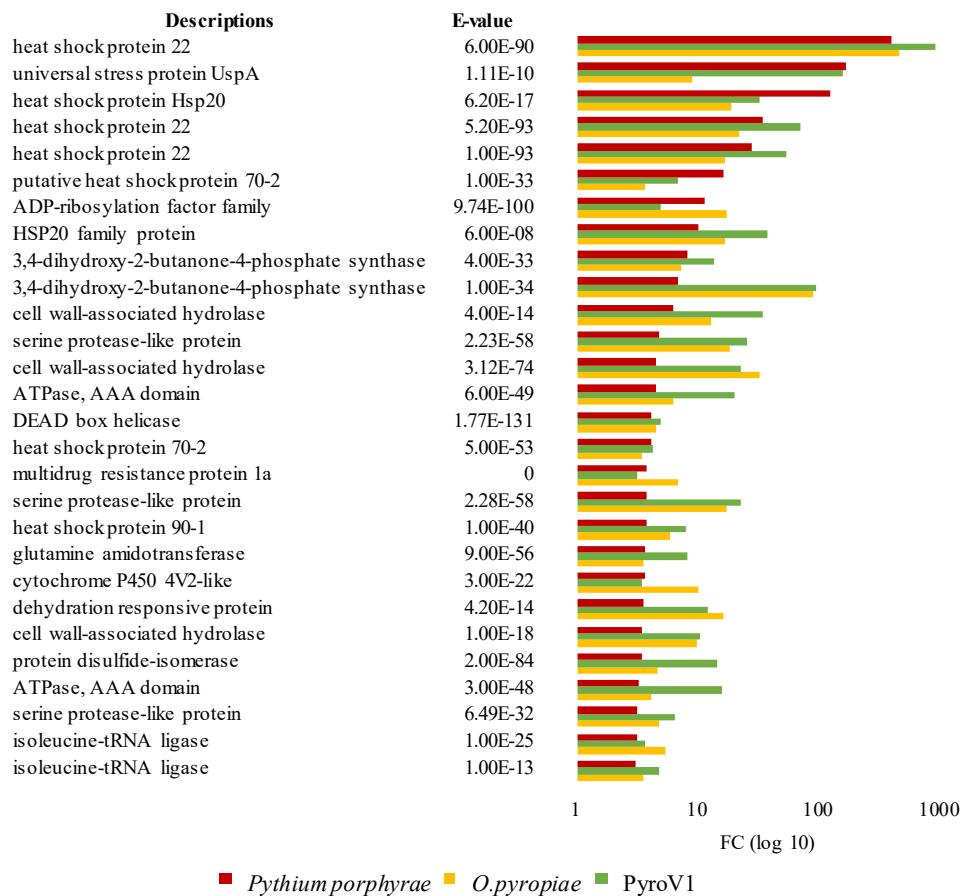


그림31. 각 갯병별 Microarray 분석결과

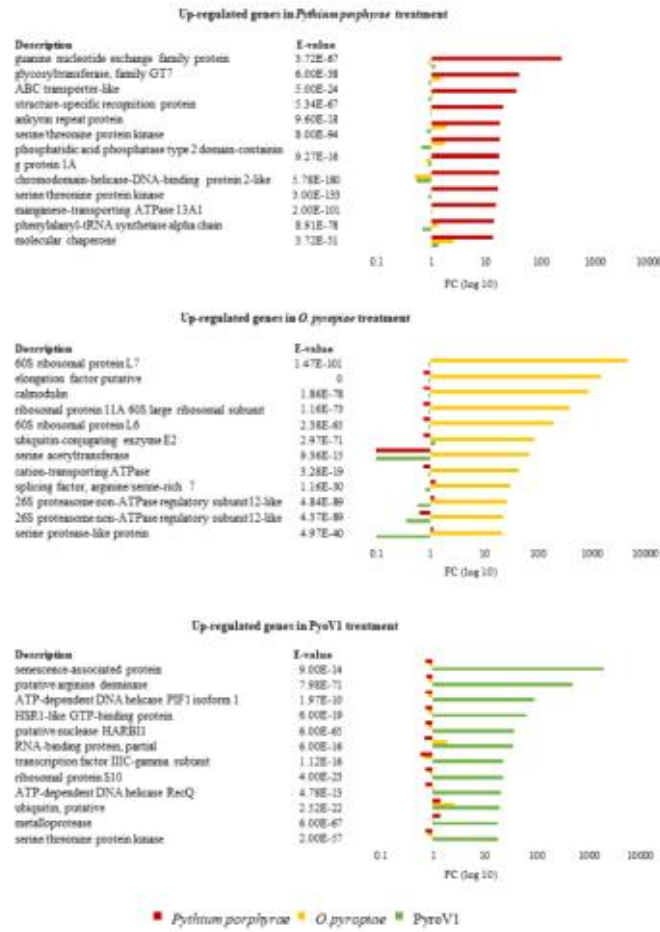


그림32. 각 갯병별 Microarray 분석결과

- 붉은 갯병 감염에 반응하여 김에서 방어기작에 관련하는 guanine nucleotide exchange protein, ankyrin repeat protein 등의 유전자의 발현이 크게 증가한 것을 확인함
- 낭균병 감염에 반응하여 방어기작에 관여하는 serine protease와 세포내 단백질분해에 관련하는 26S proteasome도 발현이 증가하는 것으로 나타났음
- 대부분 ribosomal protein 유전자 발현이 증가했는데 이는 낭균병이 숙주 세포내의 감염을 원활하게 하기 위해 발현이 증가됐다고 판단되며 ribosome을 이용하기 위한 것으로 사료됨
- 녹반병에 감염된 김에서는 세포 자살과 관련된 Senescence-associated protein과 DNA/RNA 관련 유전자들의 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었으며 이는 숙주 세포내 바이러스 증식과 관련되어 각 질병 감염에 대해 특이적인 발현이 나타나는 것으로 확인됨

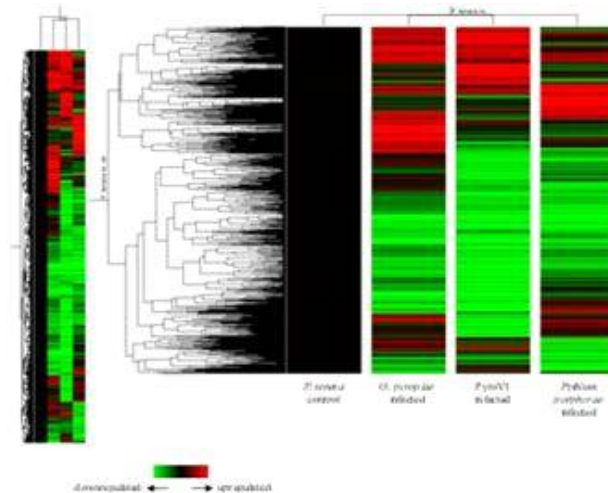


그림33. 각 갯병 감염별 참김의 유전자 발현 Heat map

- 갯병에 대해 발현된 김의 유전자를 Heat map으로 유전자의 발현이 증가될수록 밝은 붉은 색을 띠며, 감소될수록 밝은 초록색을 나타냄
- Heat map을 통해 각 갯병에 반응한 유전자의 발현 차이를 한눈에 확인할 수 있었으며 녹 반병 유전자 발현 패턴과 낭균병의 유전자 발현 패턴이 흡사하여 이는 두 갯병의 숙주 세포 내에 일정기간 동안 기생하는 질병원인 비슷한 것으로 판단됨

(2) 낭균병

- 난균(Oomycete)의 감염인자 (Effector)는 숙주세포 표면의 PI3P와 결합 하여 Lipid Raft mediated Endocytosis에 의해 세포 속으로 침투하고 감염인자 (Effector)가 식물세포 속으로 들어가면 숙주의 방어시스템이 무력화 된다고 알려짐
- 식물세포 표면에는 PI3P가 매우 적게 분포하며, 난균은 이를 극복하기 위해 PI3P를 숙주의 세포표면에 분비함

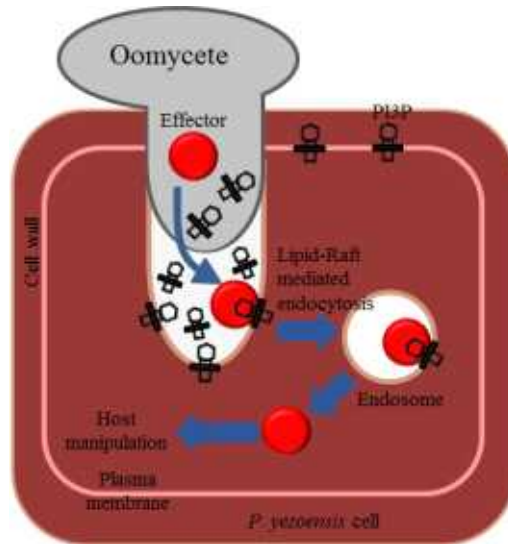


그림34. 난균류(oomycete)의 감염인자 pathway

- PI3P는 PI3Kinase라는 효소에 의해 형성되며 PI3Kinase를 저해 시켰을 때 난균의 감염률 변화를 관찰하기 위해 PI3Kinase 저해제로 알려진 Wortmannin과 LY294002를 사용하여 실험을 수행함



그림. (A) Control, (B) 50μM LY294002, (C) 2μM Wortmannin, Scale bars = 20μm

그림35. PI3K 저해제 처리 후 난균의 감염 사진

- 실험결과 PI3P를 생산을 억제하는 Wortmannin과 LY294002를 처리한 결과 난균의 감염률이 감소하는 것이 관찰 되었고 난균의 감염인자는 PI3P 결합하여 김 세포속으로 침투하는 것으로 판단됨

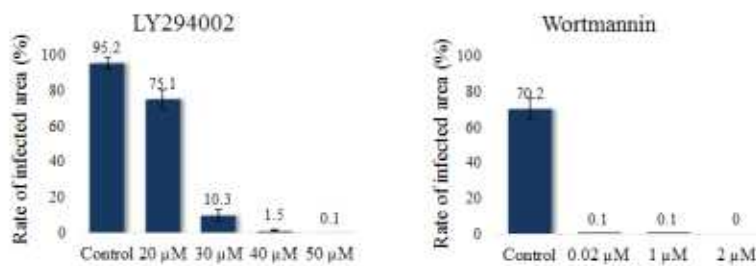


그림36. PI3K 저해제 처리 후 난균의 감염률

- 다음은 감염인자 저해제로 알려진 Inositol 1,3 bisphosphate, Inositol 1,4 bisphosphate를 처리한 결과 낭균의 감염률이 낮아지는 것이 나타남

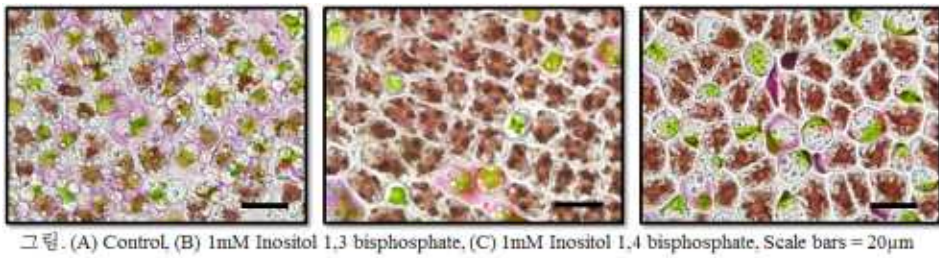


그림37. Inositol 1,3 bisphosphate, Inositol 1,4 bisphosphate 처리 후 낭균의 감염 사진

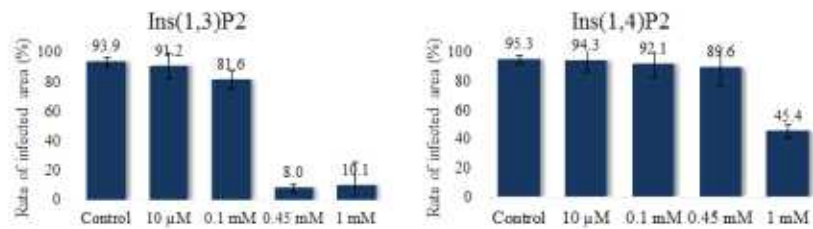


그림38. Inositol 1,3 bisphosphate, Inositol 1,4 bisphosphate 처리 후 낭균의 감염률

- 낭균의 PI3K 유전자를 선별하여 감염 시간대 별로 qPCR을 수행한 결과 낭균의 감염과정 중 PI3P를 생산하는 PI3K유전자의 발현이 증가함 따라서 낭균은 감염과정 중 PI3P를 생산하는 것을 확인함

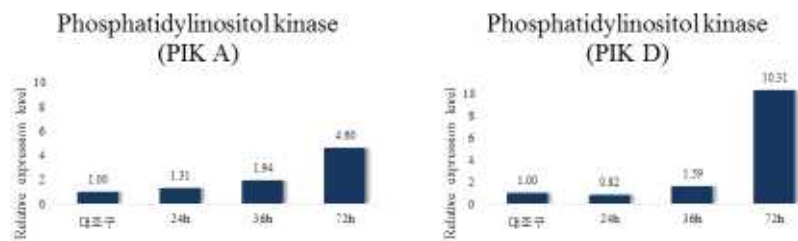


그림39. PI3K유전자의 발현 패턴 분석

(3) 붉은갯병

- 식물은 병원체에 대응하여 직접 유도되는 면역반응도 가지고 있으며 이러한 병원체에 방어 기작은 살리실산 호르몬에 의해 유도된다고 알려져 있음
- 고등 식물은 병원체의 감염 시에 살리실산을 신호 호르몬으로 분비하여 세포내 활성산소의 형성을 촉진하거나 세포자살을 통해 병원체의 증식을 억제함

- 김의 붉은갯병 감염 및 유전자 발현율을 측정하기 위해 김 엽체에 살리실산을 처리한 후 붉은갯병균을 이용하여 감염을 유도하였음

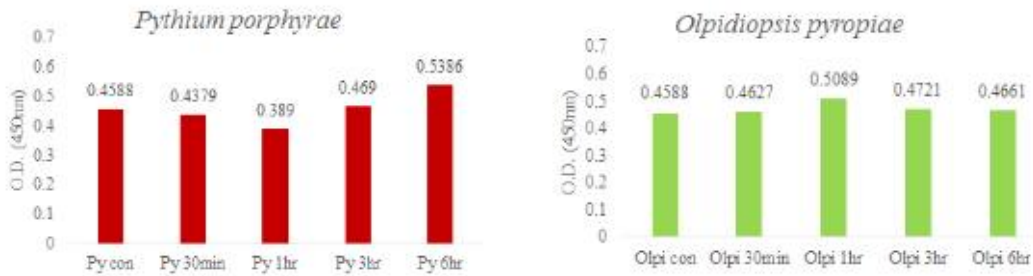


그림40. Salicylic acid 처리에 따른 김의 붉은갯병과 낭균병 감염률

- 홍조류 방사무늬김이 붉은갯병균에 대응하여 이와 같은 살리실산 매개에 의한 질병 저항성 유무를 ELISA test로 수행한 결과 방사무늬김이 실제로 붉은갯병, 낭균병에 감염 시에 살리실산을 생성하는 것으로 나타남

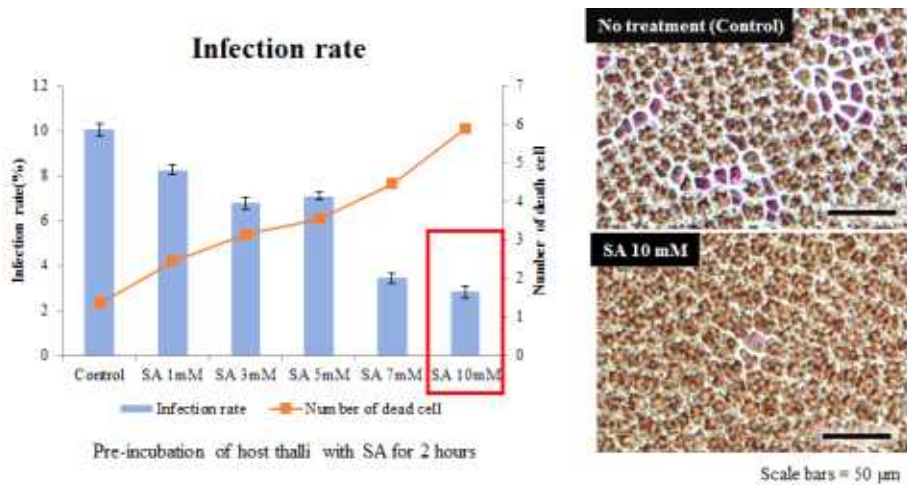


그림41. Salicylic acid 처리에 따른 방사무늬 김의 붉은갯병과 낭균병 감염률

- 방사무늬김에 살리실산을 2시간 동안 전처리 한 후 붉은갯병 감염 실험을 수행하였을 때 감염률이 대조구에 비해 현저히 낮아지며 살리실산 농도 구배에 따라 붉은갯병균에 대한 저항성이 증가하는 것으로 나타남

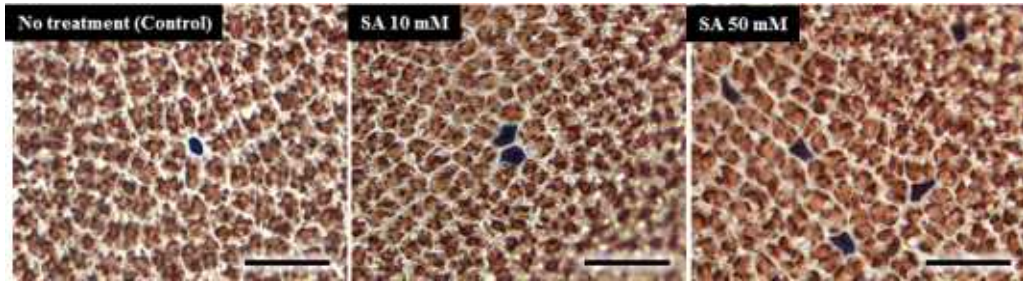


그림42. Salicylic acid 처리에 2시간 후 따른 김의 붉은갯병균의 현미경 사진

- 세포 자살 확인 시약인 트리판 블루를 처리하였을 때, 살리실산을 전처리한 김에서는 감염 초기에 대조구에 비하여 3배 이상 많은 세포자살이 관찰 되었고 방사무늬김 엽체 위에서 붉은갯병의 균사가 성장하는 것을 막아 감염을 억제하는 것으로 나타남
- 살리실산 처리 후 DAB를 처리하여 활성산소종의 축적을 관찰한 결과 살리실산을 처리한 후 붉은갯병균에 감염된 방사무늬김에서 6배 이상 많은 염색 부위를 확인 할 수 있었으며 살리실산이 방사무늬김의 활성산소 형성을 촉진하는 것으로 확인됨

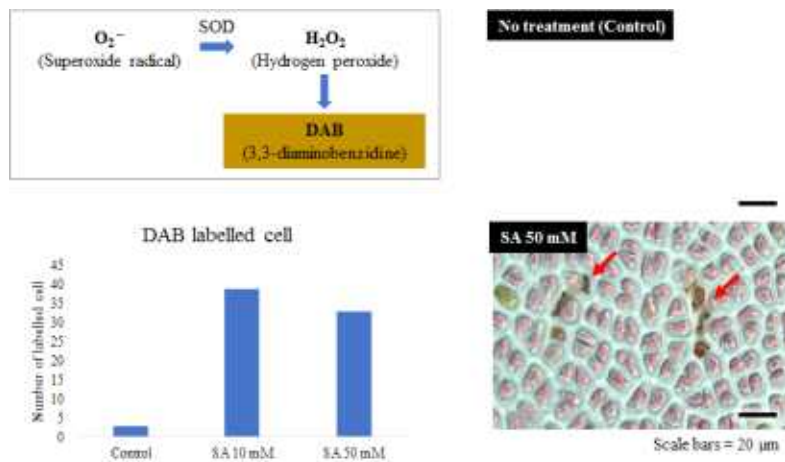


그림43. Salicylic acid 처리 농도 및 김의 붉은갯병균의 현미경 사진

- 방사무늬김에 살리실산을 전처리 결과 30초 정도의 단시간 노출되었을 때에도 감염률이 대조구에 비하여 낮게 나타남
- 이는 살리실산이 방사무늬김의 면역력을 높일 뿐 아니라 잡초 제거 효과도 가지고 있어 활성처리제를 효과적으로 대체할 수 있을 것으로 판단됨

5. 내병성 품종 개발(1 품종)

가. 내병성 품종 “골드 1호” 출원

- 내병성 테스트 및 감마선 돌연변이 과정을 거쳐 개발된 내병성 품종은 2017년 03월 국립

수산과학원 “수산식품품종관리센터”에서 출원 승인이 완료되었으며 재배심사 1년차 진행중에 있음

- 내병성 품종은 2016년 10월 양식을 시작으로 김 양식이 끝나는 4월 초 7차 수확을 하였음
- 총 49,320kg의 생산량을 나타내어 기존의 다른 품종들보다 10~15% 이상 생산량이 높게 나타난 것을 할 수 있었음

표3. 2017년 내병성 품종 “골드 1호”의 생산량과 단가

	내병성 품종(골드 1호)				일반 방사무늬김			다카라 9호		
	횟수	총량(kg)	단가(원)	총액(원)	총량(kg)	단가(원)	총액(원)	총량(kg)	단가(원)	총액(원)
(2016-2017)	1	6,240	125,000	6,500,000	5,400	94,000	4,230,000	5,640	126,000	5,922,000
	2	8,040	136,000	9,112,000	5,520	123,000	5,658,000	7,320	126,000	7,686,000
	3	7,260	123,000	7,500,000	5,760	92,000	4,416,000	5,400	163,000	7,335,000
	4	4,920	203,000	8,323,000	7,200	123,000	7,500,000	6,240	115,000	5,980,000
		4,080	162,000	5,508,000						
	5	5,280	122,000	5,368,000	5,700	168,000	8,060,000	6,480	127,000	6,858,000
	6	5,460	122,000	5,560,000	6,360	90,000	4,770,000	5,280	178,000	7,832,000
	7	8,040	17,300	1,165,000	5,880	10,000	490,000	6,480	16,000	864,000
	합계	49,320	-	49,036,000	41,820	-	35,124,000	42,840	-	42,387,000

국립수산과학원 원지 재배심사 계획동보

(1) 명 칭 : 국립수산대학교 산학협력단
 주 소 : 충남 공주시 공주대학교 30
 대 리 인 성 명 :
 주 소 :
 계 목 명 : 행사수수료
 품 종 명 칭 : 골드1호 (별도명) Gold No. 1
 (2) 명 호 : 2017-1

이 "골드1호"에 대한 장사를 사준과 같이 원지에서 생산되고
 하고 그 계획을 통보하오니 원지 재배심사 절차에 관행되도록
 계다 협조하여 주시기 바랍니다.

다 음

1. 원지 재배심사 시기 : 2017년 4월 ~ 2018년 3월(1년차)
2. 원지 재배심사 장소 : 수원민적 공표배양장 및 양식어장
3. 조사내용 및 방법 : 총합리 관리 등 13개 항목
4. 기타 원지 재배심사에 필요한 사항 : 식요제원 사 공원인 협조 요청 가능

2017년 3월 16일

원 사 관 황 비 국

그림44. 2017년 내병성 품종 “골드 1호”의 품종 출원서

- 출원된 내병성 품종 “골드 1호”는 2017년 1차 재배심사과정에 있으며 2차 재배심사가 끝나는 2019년 03월 품종등록을 할 예정이다
- 현재 “골드 1호”는 어가에 무료 분양 중에 있으며 생산량과 단가에 있어 높은 결과를 나타내고 있으며 매년 수요가 증가하여 사상체의 필요량이 증가하고 있음



그림45. 2017년 내병성 품종 “골드 1호”의 양식계획

나. 내병성 품종 “골드 1호” 재배심사

- 2017년 10월 품종 등록을 위한 재배심사는 “수산식품품종관리센터 규정에 의해 년 1기작 2회 반복으로 정해져 있으며 현재 골드 1호는 1년차 재배심사 과정에 있음



그림46. 2017년 내병성 품종 “골드 1호”의 재배심사 배양장

- 재배심사를 위한 채묘는 골드 1호 1 품종과 대조구 2품종으로 실시하였으며 원활한 포자 부착을 위해 자연채묘를 선택 하였고 품종 당 1.8m X 40m의 김밭 3대 씩 설정하였음.

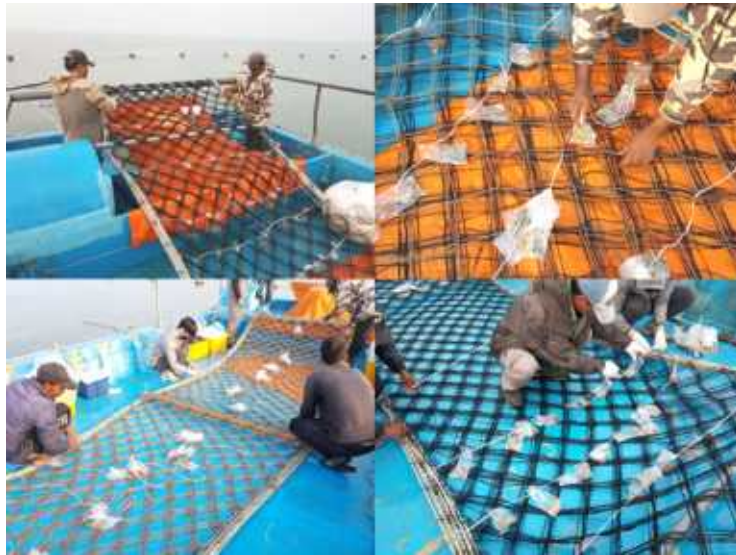


그림47. 2017년 내병성 품종 “골드 1호”의 재배심사 과정(자연채묘)

- 각포자 부착의 최적 수온인 수온 18℃에 부착하였고 부착과 동시에 1차 배양장에 이식 하였으며 채묘 20일 후 유엽을 확인 할 수 있었음



그림48. 2017년 내병성 품종 “골드 1호”의 채묘 직 후 1차 배양과정

- 유엽의 길이는 A 품종 약 400 μ m 로 확인되었으며, B 품종은 200 μ m, C 품종은 250 μ m 으로 확인 되었고 유엽의 특성상 각각의 품종에 형태적 특징은 확인 할 수 없었음
- 각각의 엽체들은 비교적 건강하게 발아 한 것으로 확인 되었으나 김 양식기 특성상 유엽 기 김밭은 파래의 성장이 더 높은 것으로 확인되어 파래제거를 위한 약처리를 실시하였음



그림49. 2017년 내병성 품종 “골드 1호”의 재배심사 3 품종의 유연기

다. 품종수출을 위한 현지협약체결

- 골드 1호의 품종 수출을 위해 2017년 09월 27일 국내 무역회사인 E&EChem을 통해 중국 “하문해태양식협회”와 접촉하여 현지를 방문 1차 회의를 진행하였으며 담당기관인 천진농업연구중심을 소개받아 담당 공무원과 함께 하문 양식 협회에서 회의를 진행하였음. 회의에 참석한 결과 현지에서 내병성 계통주에 대한 매우 강한 관심을 보여 우리나라에서 품종 등록이 되면 현지 협회가 중국 농업부에 허가를 요청하고 현지 재배 협약을 하고 싶다는 요청을 받음



그림50. 골드 1호 수출을 위한 2017년 중국 “하문해태양식협회” 회의

- 10월의 2차 방문에서 천진농업연구 중심에서 새로 소개해준 연운항 주변 양식장으로 방문해 줄 것을 요청 받았으며 방문하여 회의한 결과 중국 측 현지 업체가 실제 재배까지 걸리는 시간을 절약하기 위해 중국 농업부에 먼저 “김 양식장과 교류 및 김 양식에 관한 승인 요청”을 2017년 10월 16일자로 제출하기로 하였음. 국산 품종의 중국 현지 등록기간은 대략 3년으로 예상하며 사업단에서 승인이 날 경우 곧바로 협의를 더 진행할 예정임
- 골드 1호의 홍보를 위해 중국 현지 연운항 주변 김 양식장 답사를 실시하였으며 현지 김 양식장의 양식 방법과 환경적 특성 분석을 마쳤음. 내병성 계통주가 꼭 필요한 이유는 현지 어가에서는 예산 부족으로 최소한의 산처리도 할 수 없는 상황이었으며 지주식 김발이 여러 차례 재사용되어 각종 질병에 무방비로 노출되어 있는 실정이어서 현지 주민들로부터 내병성 종자의 이식에 대한 강력한 요청이 있었음



그림51. 2017년 10월 중국 연운항 김 양식장

- 하문해태양식협회로부터 제안을 받은 바로는 골드 1호의 이식 승인이 나서 현지 재배가 가능해지면 중국 정부의 정식 승인이 나기 전까지 3년간 시험 양식장으로 약 60ha의 면적 (현물 투자 규모 6억원/년) 을 할애해 줄 수 있다는 제안을 받았으며 2018년 04월 이후 3만 3천 패각 분량의 잠입을 할 수 있는 규모인 패각 배양장 (현물 투자 규모 3000만원/년) 사용을 무상 제공하기로 제안 받았음



그림52. 2017년 10월 중국 연운항 패각 배양장 현지 답사

- 기술의 유출을 막기 위해 현지 패각 잠입은 골드 1호 개발 연구진이 직접 참여하여 실시할 예정이고 품종의 현지 적용 가능성을 위해 골드 1호의 파종 없이 다른 종자를 사용 위의 시설을 이용할 수 있는지를 타진 중이며 사업단의 승인이 나면 월 1회 방문을 통해 패각의 성숙과정과 각각의 성장조건 및 배양과정을 조사할 예정임. 현지 방문 비용과 체재비는 천진과학기술유한공사에서 대부분 부담할 예정임

5. 내병성 및 고온내성 김 종자에 대한 기능성 식품 소재 가능성 평가

- 본 과제에서 사용된 김 샘플들은 공주대학교 실험실의 환경에서 만들어진 후 바다에서 양식되어진 물김을 시료(내병성 김(이하 NT 1), 고온 내성 김(NT 2), 방사무늬 김(이하 Control) 3가지 종류)로 받은 다음 흐르는 물에 수세를 한 뒤 원적외선 건조기(Dryer KEC-60, 50℃)를 이용하여 24시간 동안 건조를 한 뒤 50 mesh 이하로 분쇄를 하여 -20℃에 보관하여 사용함

(1) 내병성 및 고온내성 김의 영양성분 함량

- 내병성, 고온내성 및 방사무늬 김에 대하여 영양성분의 함량을 분석하여 지역별 계절별로 양식된 방사무늬 김 (이하 기존 김) 데이터와 비교함. 내병성 및 고온내성 김 시료들은 총 2가지로 내병성 김(NT 1), 고온 내성 김(NT 2), 방사무늬 김은 control으로 표시하였다. 영양성분 함량은 AOAC법에 의하여 정량 분석 되었으며, 탄수화물 함량은 100%에서 단백질, 회분, 지질, 수분의 함량을 더한 값을 제외한 나머지 값으로 정량함

1) 내병성 및 고온내성 김의 수분 함량

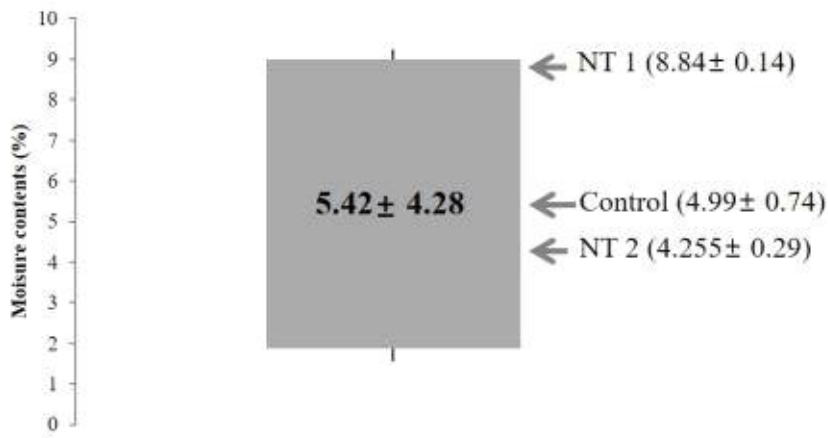


그림53. 내병성, 고온내성 및 기존 방사무늬 김의 수분 함량 비교

2) 내병성 및 고온내성 김의 단백질 함량

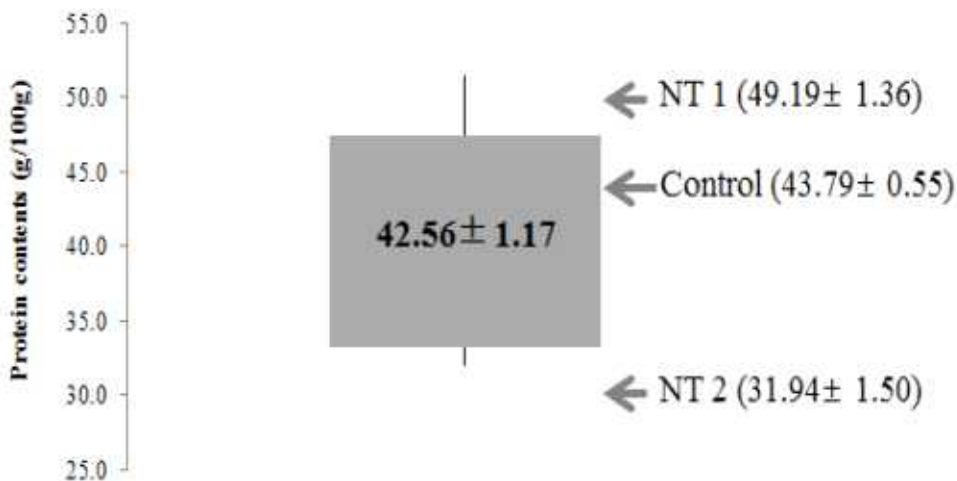


그림54. 내병성, 고온내성 및 기존 방사무늬 김의 단백질 함량 비교

- Noda et al(1971)은 김의 일반성분 함량은 채집시기와 장소에 따라 다르며, 비교적 저 수온기일 수록 단백질 함량이 높고 고 수온기로 갈수록 단백질 함량이 줄어드는 대신 탄수화물 함량이 증가함. 이에 기초하여 기존 김의 단백질 함량 평균값 42.56 ± 1.17 %과 비교하여 보면 NT 1의 단백질 함량이 가장 많으며 다음으로 control, NT 2의 순서로 가장 많았으나, NT 2의 경우 기존 김보다 단백질 함량이 적었음.. 이는 Noda et al의 보고와 유사한 결과임

3) 내병성 및 고온내성 김의 탄수화물 함량

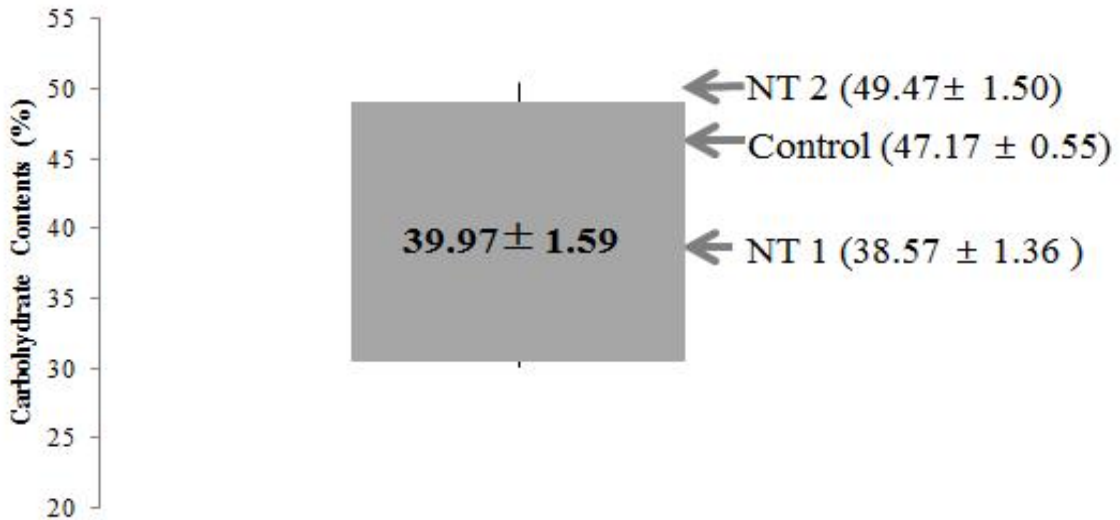


그림55. 내병성, 고온내성 및 기존 방사무늬 김의 탄수화물 함량 비교

- 탄수화물 함량은 단백질 함량의 순서와 반대로 NT 2가 가장 많았으며, 그 다음으로 control과 NT 1 순서였다. 그리고 기존 김의 탄수화물 함량의 평균은 39.97 ± 1.59 % 이며 NT 1은 기존 김의 탄수화물 평균 값과 비슷하며, NT 2와 control은 기존 김보다 탄수화물 함량이 많았음. 하지만 앞서 언급하였듯이 김의 일반성분에서 고 수온기로 갈수록 단백질 함량이 줄어드는 대신 탄수화물 함량이 증가한다고 하였으나, NT 2의 경우는 고온내성 김에도 불구하고 단백질 함량보다도 탄수화물 함량이 증가함.

4) 내병성 및 고온내성 김의 회분 함량

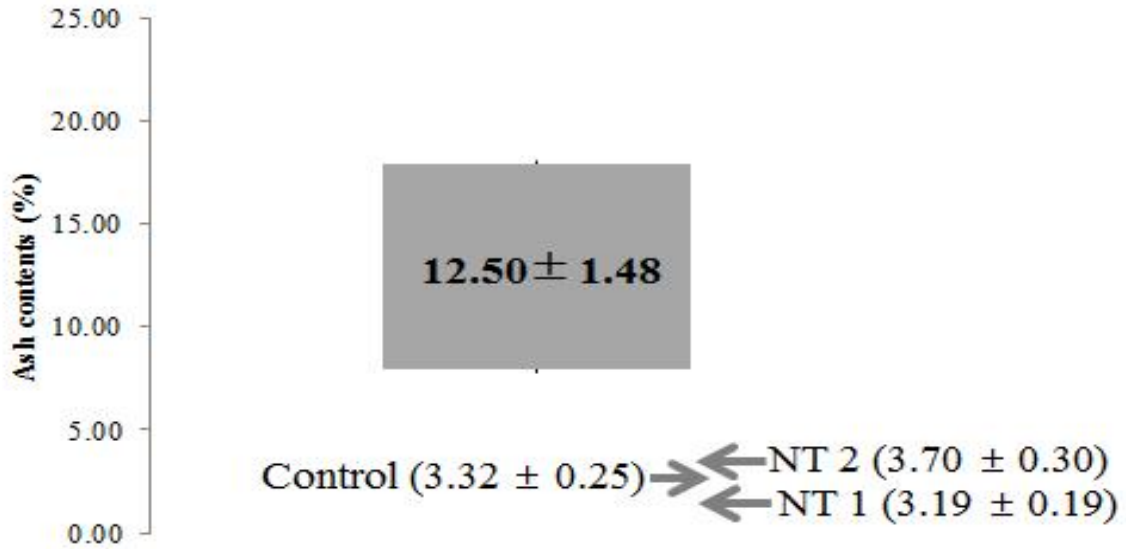


그림56. 내병성, 고온내성 및 기존 방사무늬 김의 회분 함량 비교

- 기존 김의 회분함량은 12.50± 1.48%인데 반해 NT 1, NT 2, Control의 회분함량은 모두 3% 내외로 낮았으며, 아무래도 기존 김의 경우 지역별 및 계절별 방사무늬 김의 평균값이기 때문에 내병성 및 고온내성 김의 지역별 및 계절별에 따른 차이로 인하여 이러한 결과가 나온 것이 아닌가 사료됨

5) 내병성 및 고온내성 김의 지질 함량

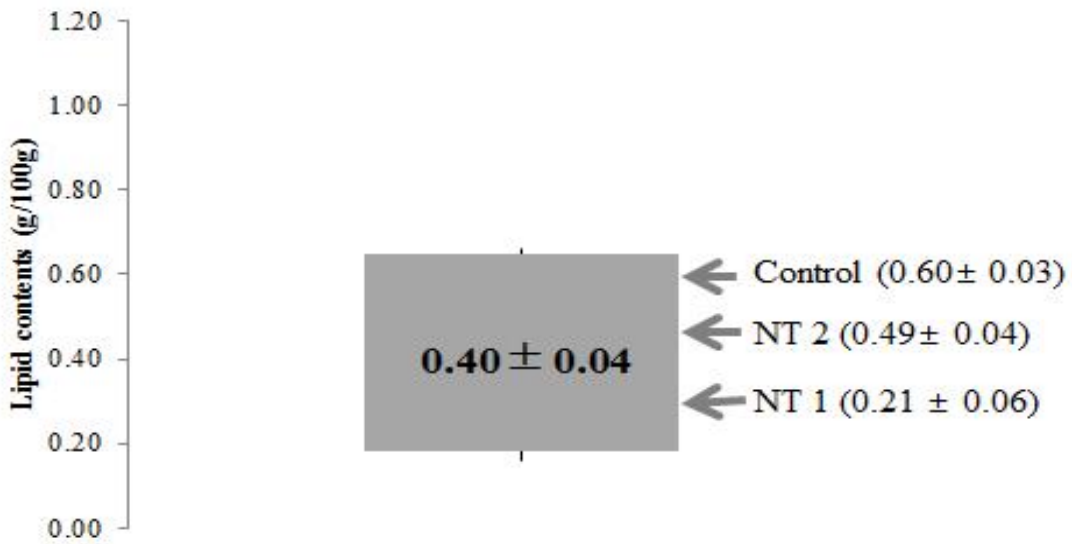


그림57. 내병성, 고온내성 및 기존 방사무늬 김의 지질 함량 비교

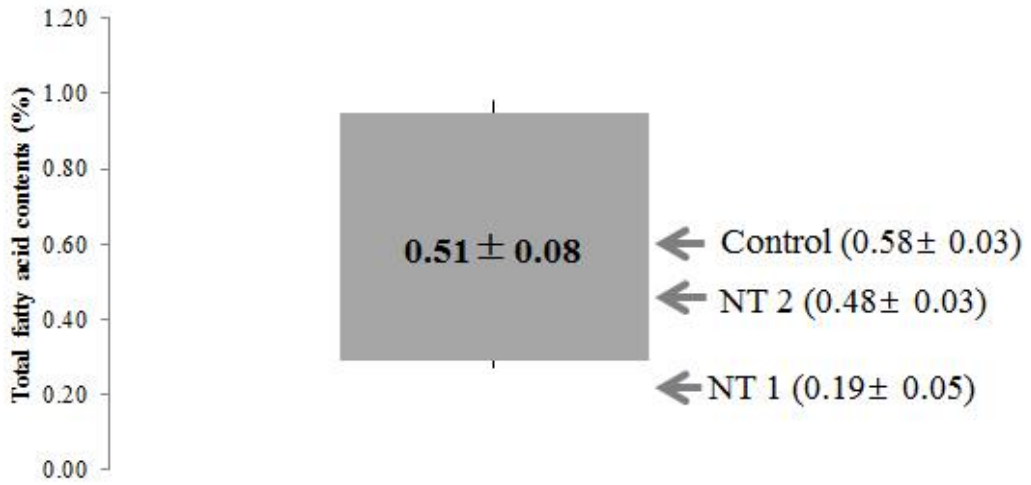


그림58. 내병성, 고온내성 및 기존 방사무늬 김의 지질 내 총 지방산 함량 비교

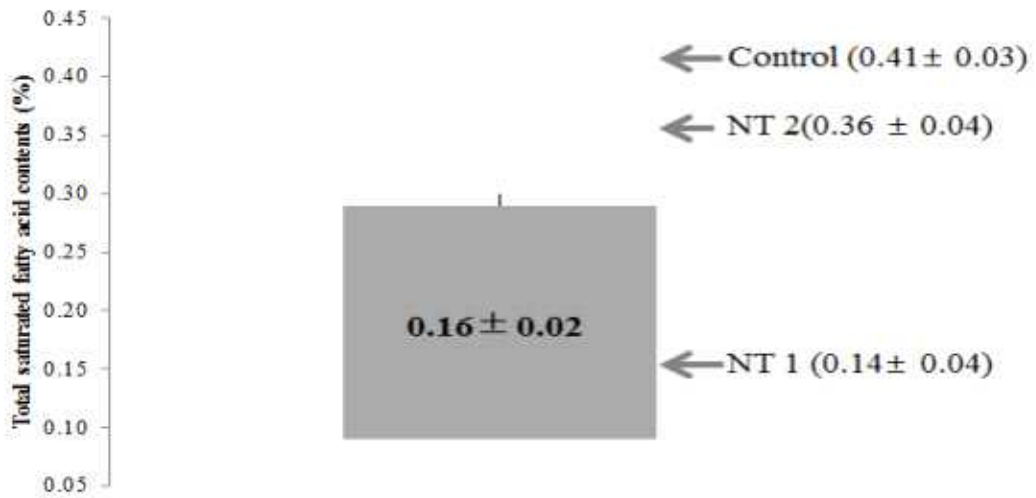


그림59. 내병성, 고온내성 및 기존 방사무늬 김의 지질 내 총 포화지방산 함량

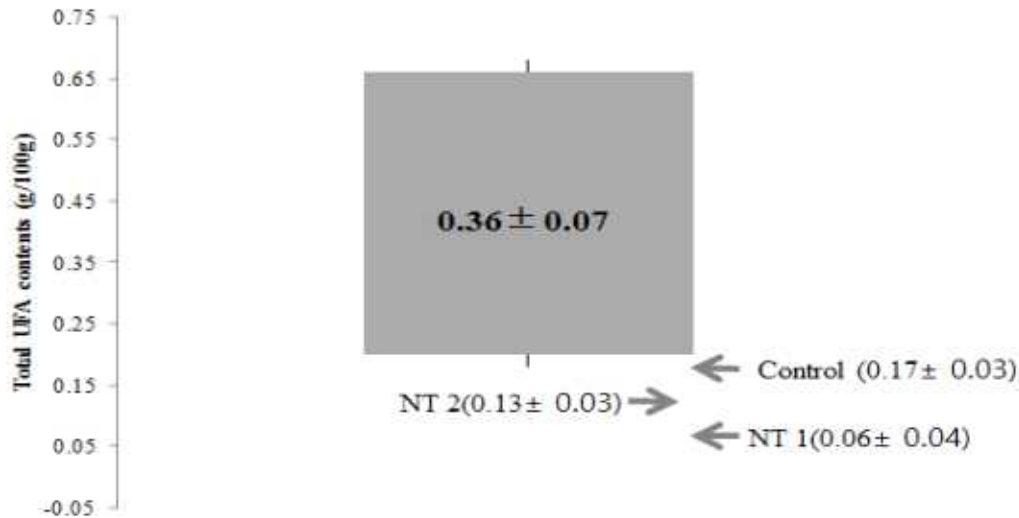


그림60. 내병성, 고온내성 및 기존 방사무늬 김의 지질 내 총 불포화 지방산 함량

- 기존 김의 지질 함량은 평균 $0.40 \pm 0.04\%$ 이며, 이와 비교하여 가장 많은 지질 함량을 가진 것은 control 이고, 그 다음으로 NT 2, NT 1 순서로 가장 많았다. 이 순서는 그림56-그림59의 지질 내 총 지방산, 포화 및 불포화 지방산 함량의 순서와 동일한 결과를 나타냄. 그러나 기존 김은 지질 내 불포화 지방산이 포화지방산보다 많았으나, NT 1은 포화 지방산이 불포화 지방산보다 많은 것으로 보아 NT 1이 함유하고 있는 지질의 종류가 이로운 불포화 지방산이 아닌 포화 지방산으로 이루어져 있음을 알 수 있음

(2) 내병성 및 고온내성 김의 기능성 성분 함량

- 기존 김의 기능성 성분 분석을 하였던 것과 동일하게 김의 기능성 색소체인 Phycoerythrine 과 beta-carotene, UV보호효과 등의 기능성을 가진다고 알려진 Mycosporine-like amino acids 와 여러 가지의 기능성을 가지고 있다고 보고된 Phytosterol종류인 Sterol의 함량을 분석하여 내병성 및 고온내성 김의 기능성 성분 함량을 기존 김의 함량과 비교함

1) 내병성 및 고온내성 김의 기능성 색소체(Phycoerythrine, beta-carotene) 함량

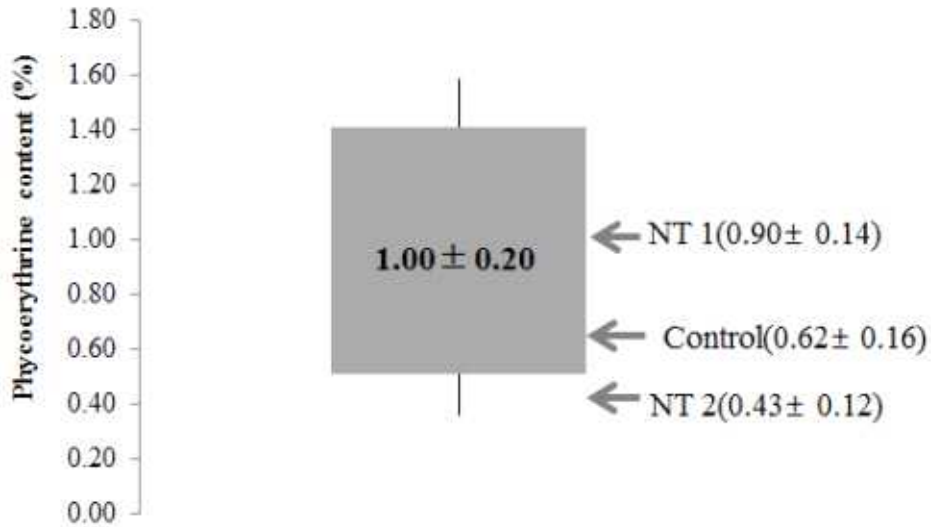


그림61. 내병성, 고온내성 및 기존 방사무늬 김의 Phycoerythrin 함량

- 기능성 색소체 중 파이코에리스틴(Phycoerythrin)은 protein-pigment complex로서 단백질 계열의 색소체로 알려져 있으며, 홍조류의 대표 색소체로 항산화 및 UV 보호효능을 갖음. 기존 김의 파이코에리스틴 함량은 평균 $1.00 \pm 0.20\%$ 이며, NT 2의 파이코에리스틴 함량은 기존 김에 비해 작다는 것을 알 수 있다. 이는 NT 2가 고온내성의 기능을 갖고 있어 환경적 변화에 적응하며 생성되는 기능성 물질인 파이코에리스틴의 함량이 기존 김에 비해 적게 나타난 것으로 사료됨

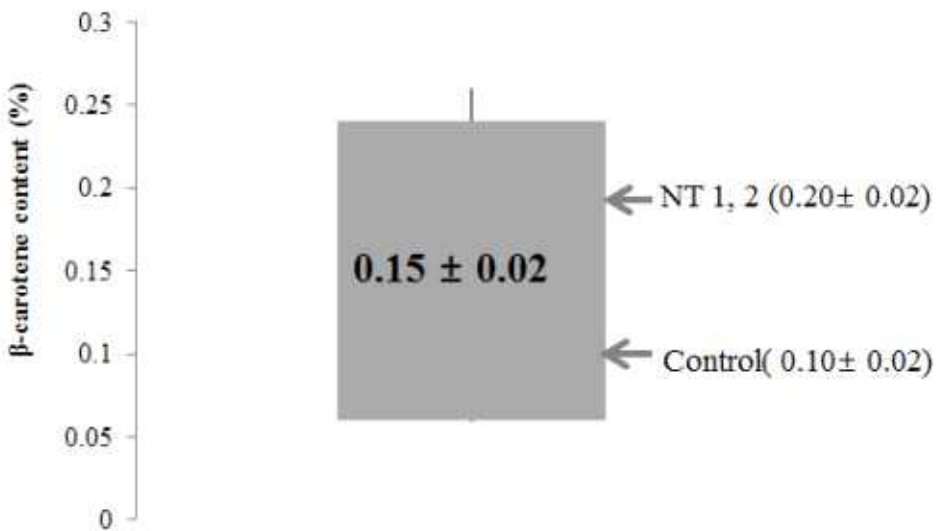


그림62. 내병성, 고온내성 및 기존 방사무늬 김의 beta-carotene 함량

- 베타카로틴(beta-carotene)은 자연계에 존재하는 500여 종류의 카로티노이드 중의 하나이며, 비타민 A의 전구체로서 장과 간에서 레티놀로 전환되고, 이는 다시 비타민 A의 전구체로 가치가 큼. 그래서 기존 김과 내병성 및 고온내성 김의 베타카로틴의 함량을 비교하였다. 기존 김의 베타카로틴의 함량은 평균 $0.15 \pm 0.02\%$ 이며, NT 1과 NT 2는 기존 김

보다도 함량이 더 많았음

2) 내병성 및 고온내성 김의 마이코스포린 유사 아미노산 함량

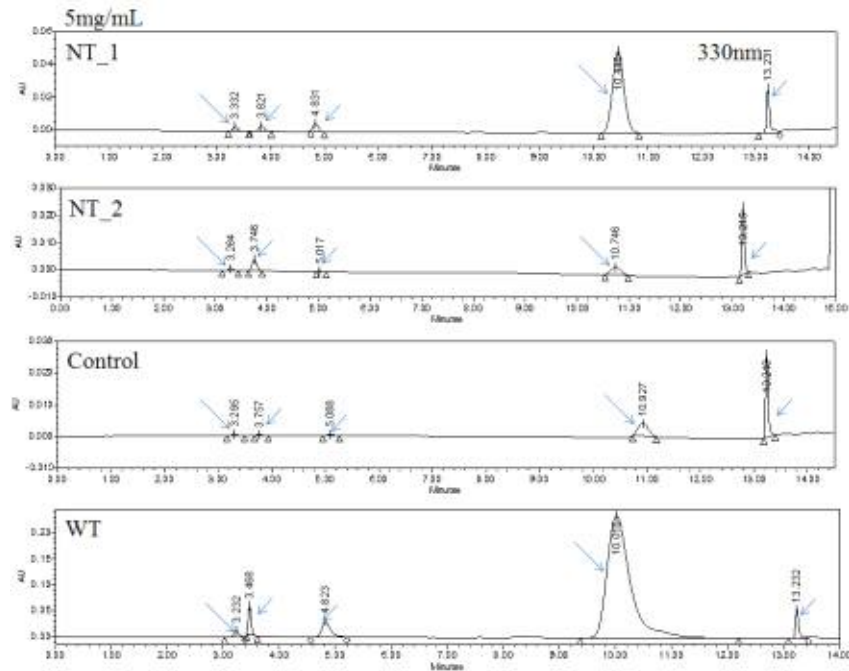


그림63. 내병성, 고온내성 및 기존 방사무늬 김의 마이코스포린 유사 아미노산의 HPLC분석 크로마토그램 (RT값 순서대로 F1, 2, 3, 4, 5)

- 김에 존재하는 마이코스포린 유사 아미노산은 자외선을 차단하는 산호, 홍조류 및 남조류 등 해양생물의 2차 대사산물 중 하나이며, MAAs는 현재까지 20여종의 다양한 형태를 갖는다고 알려져 있으며, 공통적으로 cyclohexenimine 또는 cyclohexenone 고리 구조로 이루어져 있어 자외선을 직접 차단하거나 자외선에 의한 피해를 감소시킬 수 있고, 또한 활성산소종에 대한 소거 효능을 갖는다고도 알려 왔음

표4. 내병성, 고온내성 및 기존 방사무늬 김의 마이코스포린 유사 아미노산의 area 값

5mg/ml	NT 1	NT 2	control	WT
F1 (Palythine)	20329	5194	3116	85799
F2 (Shinorine)	23039	27163	2110	251376
F3 (Asterina-330)	30254	1217	3070	346143
F4 (Porphyra-334)	741281	38679	54969	6813695
F5 (Usujirene)	113225	83478	91698	228212

- 기존 김과 내병성 및 고온내성 김의 마이코스포린 유사 아미노산의 함량을 크로마토그램상의 area값으로 비교를 해보면 5가지의 마이코스포린 유사 아미노산 모두 기존 김에 비해 NT 1, NT 2, Control 모두 작은 것을 알 수 있으며, 그 중 NT 1이 가장 많은 것을

알 수 있다. NT 1이 기존 김과 비슷하게 F4가 가장 많은데 반해 NT 2와 control은 F4보다 F5가 가장 많은 것을 알 수 있음

3) 내병성 및 고온내성 김의 Total sterol 함량

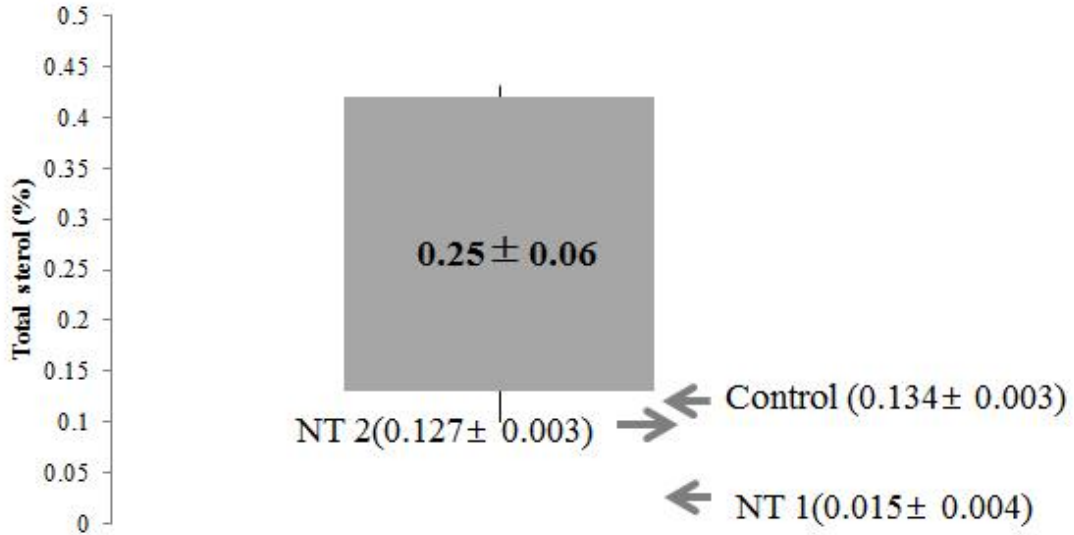


그림64. 내병성, 고온내성 및 기존 방사무늬 김의 total sterol 함량

- 기능성을 나타내는 sterol의 함량을 기존 김의 평균값과 비교 시 NT 1, NT 2, Control의 함량이 기존 김 평균값에 전혀 미치지 못함을 확인하였다. 아무래도 기존 김의 경우 지역별 및 계절별 방사무늬 김의 평균값이기 때문에 내병성 및 고온내성 김의 지역별 및 계절별에 따른 차이로 인하여 이러한 결과가 나온 것이 아닌지 사료됨

(3) 내병성 및 고온내성 김 내 유기성분 추출과 그 기능성 평가

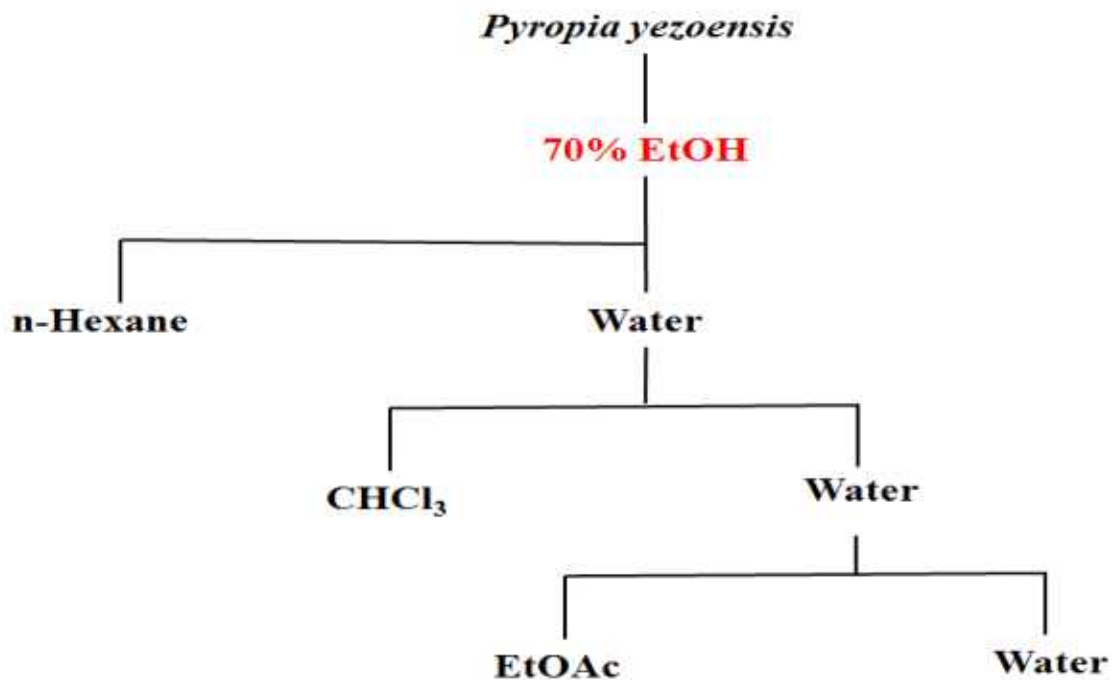


그림65. 내병성 및 고온내성 김의 70% EtOH 추출 및 유기용매 분획과정

표5. 내병성, 고온내성 및 방사무늬 김의 유기용매 분획물의 수율

Weight	EtOH	Hex	CHCl3	EA
NT 1	279mg	41.4mg	96.7mg	51.3mg
NT 2	291mg	25.1mg	31.7mg	43.9mg
Control	231mg	43.2mg	28.1mg	47.4mg

- NT 1, NT 2, control을 70% EtOH로 추출을 한 뒤 농축하여 얻은 물층으로 비극성도가 가장 큰 hexane과 chloroform과 ethylacetate로 분획을 하여 추출물과 분획물을 얻어 이후 기능성을 평가함

표6. 내병성, 고온내성 및 방사무늬 김의 유기용매 분획물의 H₂O₂ 소거활성

	NT 1			NT 2			Control		
	PYH	PYC	PYE	PYH	PYC	PYE	PYH	PYC	PYE
IC50 Value	0.71± 0.16	1.13± 0.56	0.66± 0.03	0.68± 0.01	0.96± 0.00	0.78± 0.14	0.71± 0.00	0.77± 0.00	1.07± 0.13

- NT 1, NT 2, control의 Hydrogen peroxide 소거 활성을 측정한 결과 NT 2가 가장 항산화 활성이 우수하며 NT 1이 가장 약한 활성을 나타냄

표7. 내병성, 고온내성 및 방사무늬 김의 유기용매 분획물의 항염증 활성

IC ₅₀ Value(μg/ml)	NT 1	NT 2	Control
PYH	38.18	16.5	19.65
PYC	32.39	18.43	16.71
PYE	83.96	18.44	24.82

- 항염증 활성은 마우스의 대식세포인 RAW 264.7 세포를 이용하여 세균의 세포벽을 구성하는 LPS로 염증을 유도 시켜 증가하는 NO 생성량을 각 시료가 감소시키는 정도로 항염증 활성을 평가함. 항염증 활성을 평가한 결과 NT 2가 Control과 비슷한 수준의 항염증 활성을 나타냄을 확인할 수 있었음

(4) 내병성 및 고온내성 김의 효소 가수분해물의 기능성 평가

- 앞서 내병성 및 고온내성 김의 영양성분을 분석한 결과 탄수화물과 단백질의 함량이 가장 풍부한 것을 알 수 있었음. 따라서 탄수화물과 단백질을 타깃으로 한 효소 가수분해를 진행하여 각 효소 가수분해물의 기능성을 평가하여 방사무늬 김과 비교함
- 효소는 장내 가수분해 효소인 pepsin, trypsin, α-chymotrypsin, α-amylase 와 상업효소인 AMG, Alcalase로 하여 각 효소별로 기질과 효소의 비율은 1: 100으로 하여 진행함.

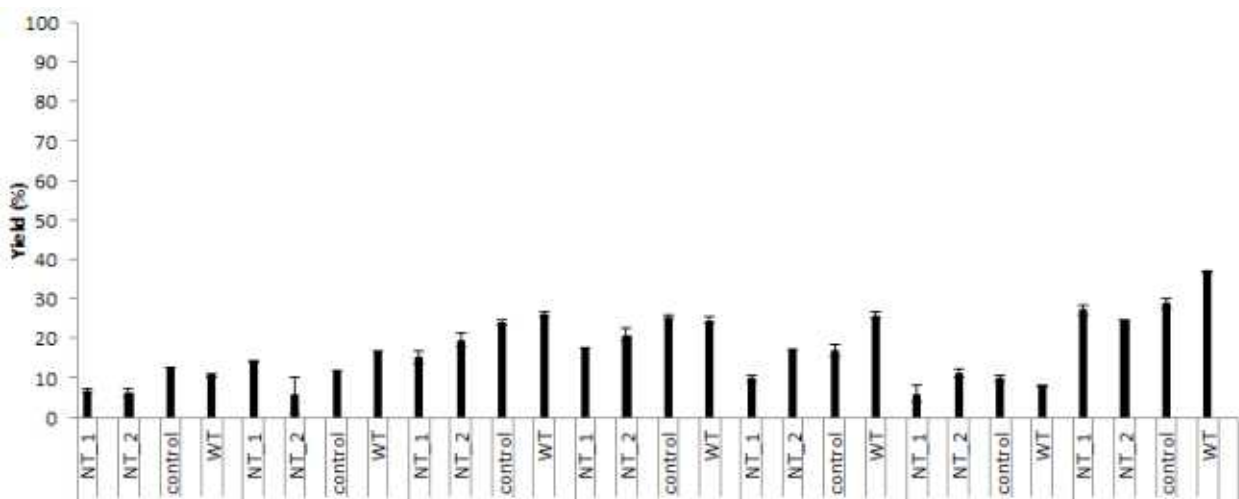


그림66. 내병성, 고온내성 및 기존 방사무늬 김의 효소 가수분해물의 수율

- 효소 가수분해물의 수율을 확인한 결과 NT 1과 NT 2 효소 가수분해물의 수율이 Control과 기존 김(WT)보다 수율이 떨어지는 것을 알 수 있으며, 그 중 수율이 가장 좋은 효소는 trypsin, α -chymotrypsin, alcalase이며, NT 2에서 가장 수율이 높았다. 그리고 이를 바탕으로 각 효소 가수분해물의 성분들을 확인하기 위해 당 함량과 단백질 함량을 분석함

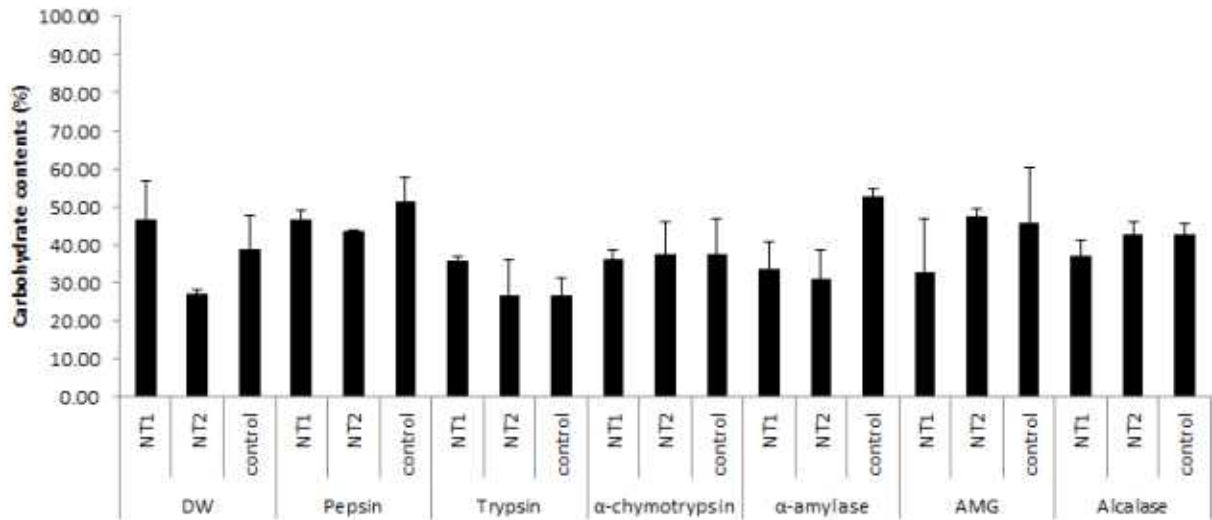


그림67. 내병성, 고온내성 및 기존 방사무늬 김의 효소 가수분해물의 당 함량

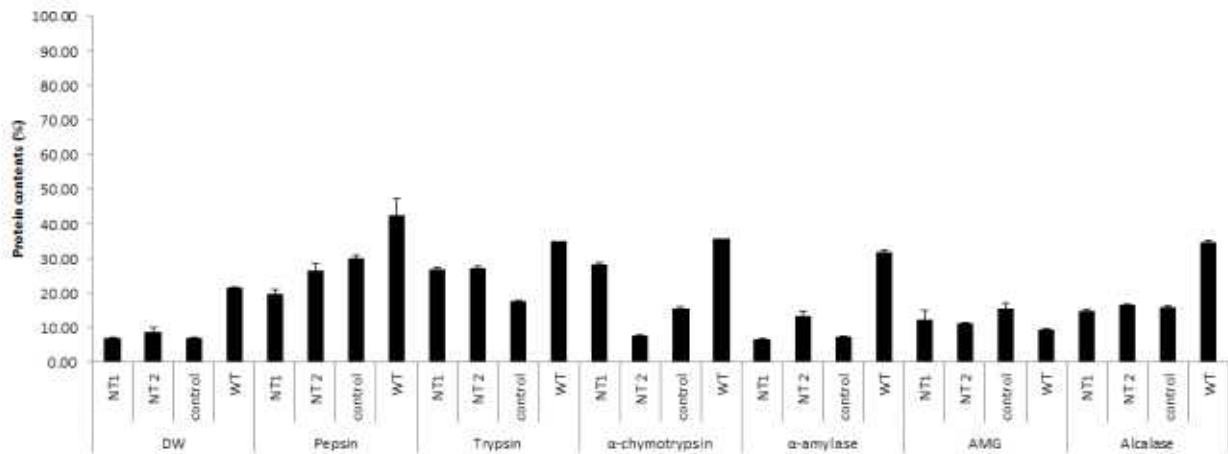


그림68. 내병성, 고온내성 및 기존 방사무늬 김의 효소 가수분해물의 단백질 함량

- 효소 가수분해물의 당 함량과 단백질 함량을 분석한 결과 내병성 김의 효소 가수 분해물에서는 주로 당 함량이 단백질 함량보다 높았으며, 당 함량이 가장 높은 효소 가수 분해물은 pepsin, α -amylase, AMG 가수 분해물에서 가장 높았으며, 단백질함량은 pepsin, trypsin, α -chymotrypsin 가수 분해물에서 가장 높게 나타남

표8. 내병성, 고온내성 및 방사무늬 김 효소 가수분해물의 alkyl 라디칼 소거 활성.

IC ₅₀ Value(mg/ml)	NT_1	NT_2	control
DW	0.54± 0.02	0.54± 0.03	0.37± 0.01
Pepsin	1.20± 0.18	0.75± 0.19	0.53± 0.18
Trypsin	0.54± 0.04	0.46± 0.00	0.54± 0.02
α-chymotrypsin	0.28± 0.11	> 0.3125	0.17± 0.10
α-amylase	1.00± 0.19	0.62± 0.01	0.42± 0.09
AMG	1.28± 0.09	1.02± 0.07	0.87± 0.48

○ ESR 장비를 이용한 alkyl 라디칼 소거 활성을 측정한 결과, 다른 효소 가수분해물들에서는 control에서 가장 활성이 좋았으나, 유일하게 α-chymotrypsin 효소 가수분해물에서 NT 2 효소 가수분해물이 가장 우수한 활성을 보였음

표9. 내병성, 고온내성 및 방사무늬 김 효소 가수분해물의 hydrogen peroxide 소거 활성

	DW			Pepsin			Trypsin			α-chymotrypsin		
	NT 1	NT 2	Con	NT 1	NT 2	Con	NT 1	NT 2	Con	NT 1	NT 2	Con
IC ₅₀ Value (mg/ml)	1.29± 0.14	1.04± 0.13	1.19± 0.24	1.09± 0.23	0.68± 0.20	0.65± 0.16	0.15± 0.04	0.08± 0.03	0.08± 0.03	0.15± 0.05	0.15± 0.09	0.10± 0.02
				alcalase			AMG			α-amylase		
				NT1	NT2	Con	NT 1	NT 2	Con	NT1	NT2	Con
				0.90± 0.12	0.40± 0.15	0.60± 0.13	0.16± 0.05	0.12± 0.00	0.27± 0.06	0.85± 0.12	0.65± 0.15	0.52± 0.14

○ Hydrogen peroxide 소거활성을 측정한 결과, NT 2의 trypsin 및 α-chymotrypsin 효소가 가수분해물들에서 control보다 우수한 활성을 보였음

표10. 내병성, 고온내성 및 방사무늬 김 효소 가수분해물의 vero세포에서 항산화 활성

IC ₅₀ Value(mg/ml)	NT 2	control
Trypsin	0.14± 0.02	0.27± 0.02
α-chymotrypsin	0.25± 0.03	0.05±0.01
α-Amylase	0.10± 0.03	0.06± 0.01

○ 앞서, alkyl 라디칼 소거 및 hydrogen peroxide 소거활성에 가장 좋은 활성을 나타내었던 NT 2 trypsin, α-chymotrypsin 효소 가수분해물 및 그 다음으로 활성이 좋았던 α-Amylase 효소 가수분해물의 vero 세포에서 항산화 활성을 평가한 결과, control 가수분

해물들에 비해 전체적으로 낮은 활성을 나타냄. 하지만 trypsin 효소 가수분해물만을 두고 봤을 때 NT 2 가수분해물이 control 가수분해물에 비해 더 높은 활성을 나타내었음

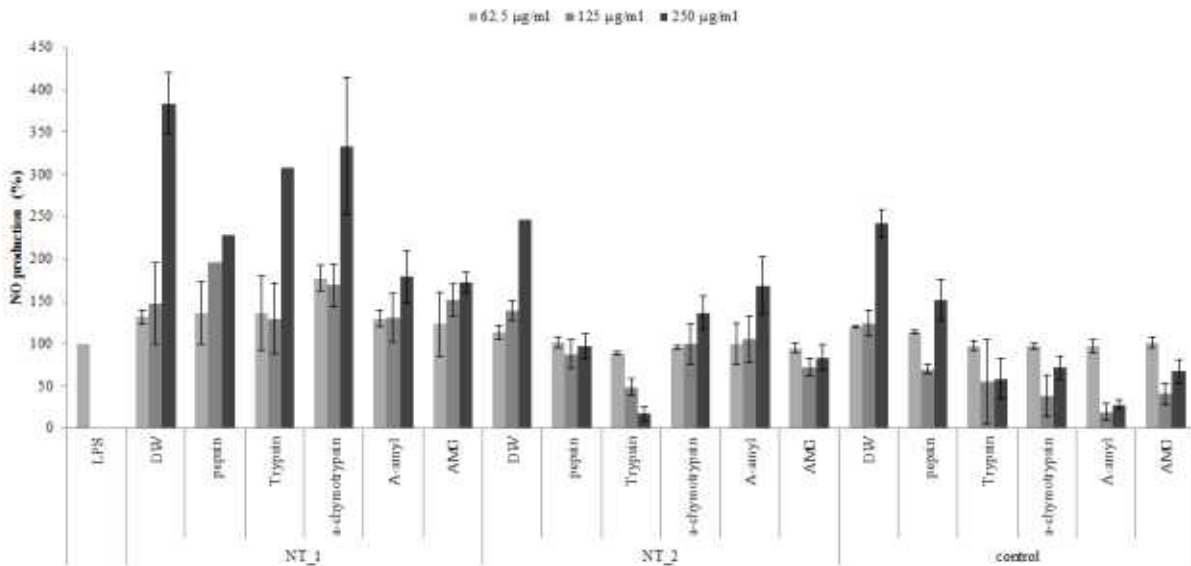


그림69. 내병성, 고온내성 및 기존 방사무늬 김의 효소 가수분해물의 항염증 활성

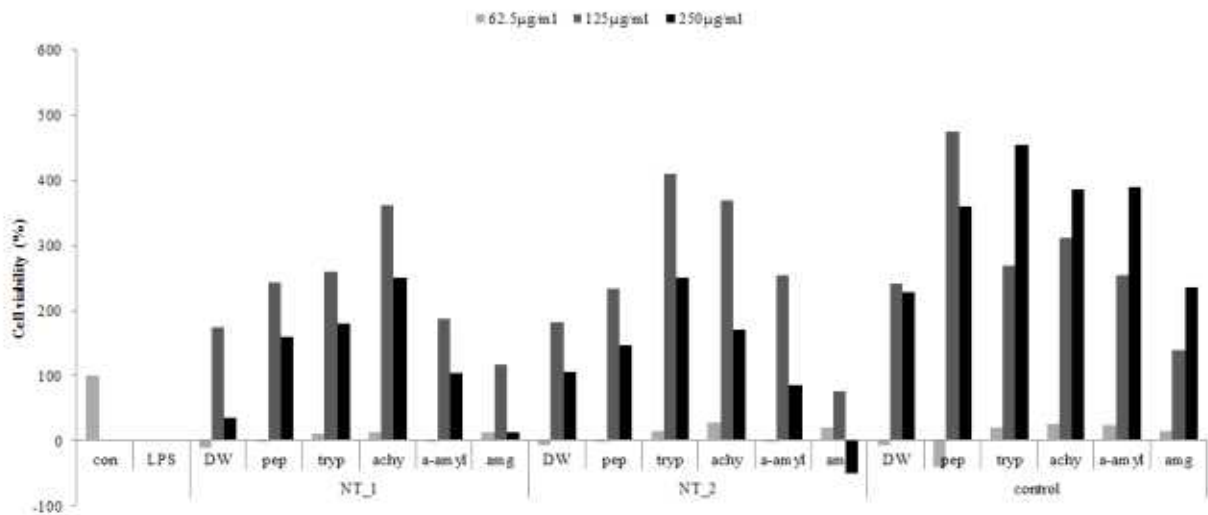


그림70. 내병성, 고온내성 및 기존 방사무늬 김의 효소 가수분해물의 세포생존율

- 효소 가수분해물들의 항염증 활성을 평가한 결과 NT 2 trypsin 가수분해물에서 가장 우수한 활성을 보였고 그 외 α-chymotrypsin, α-amylase 효소 가수분해물에서도 우수한 항염증 활성이 나왔으므로 차후 실험을 진행하기로 하였음. NT 2의 pepsin 및 AMG 가수분해물의 항염증 활성만을 살펴보면 우수한 결과를 나타내나 세포생존율을 살펴봤을 때 독성을 나타냄을 확인하여 선택하지 않았음

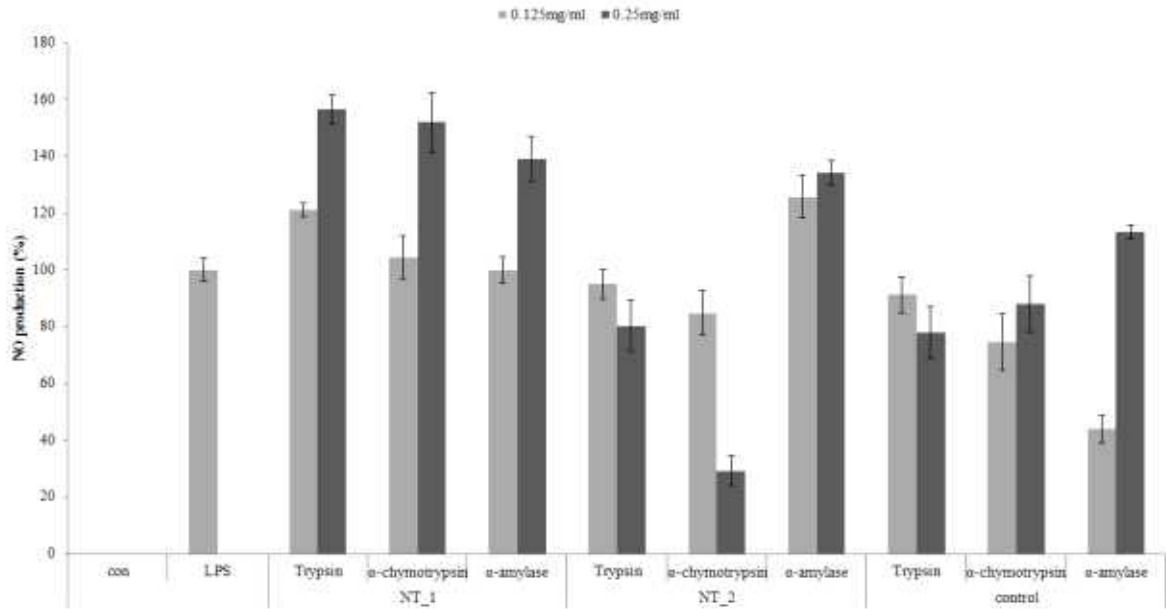


그림71. 내병성, 고온내성 및 기존 방사무늬 김 중 가장 활성이 좋았던 trypsin, α-chymotrypsin, α-amylase 가수 분해물들의 항염증 활성

- 차후 실험을 진행하기 위해 효소가수분해물 중 우수한 항염증 활성을 보였던 trypsin, α-chymotrypsin, α-amylase 가수분해물들을 가지고 RAW264.7 cell에서 항염증 활성을 다시 재확인해보았음. 그 결과, NT 2 trypsin과 α-chymotrypsin 가수 분해물에서 항염증 활성이 가장 좋았으며, 차년도에 메커니즘 연구가 필요하다고 생각되어지며 이를 통해 김을 먹었을 시 우리 몸에 항염증 효능을 기대할 수 있을 것이라 사료되어짐

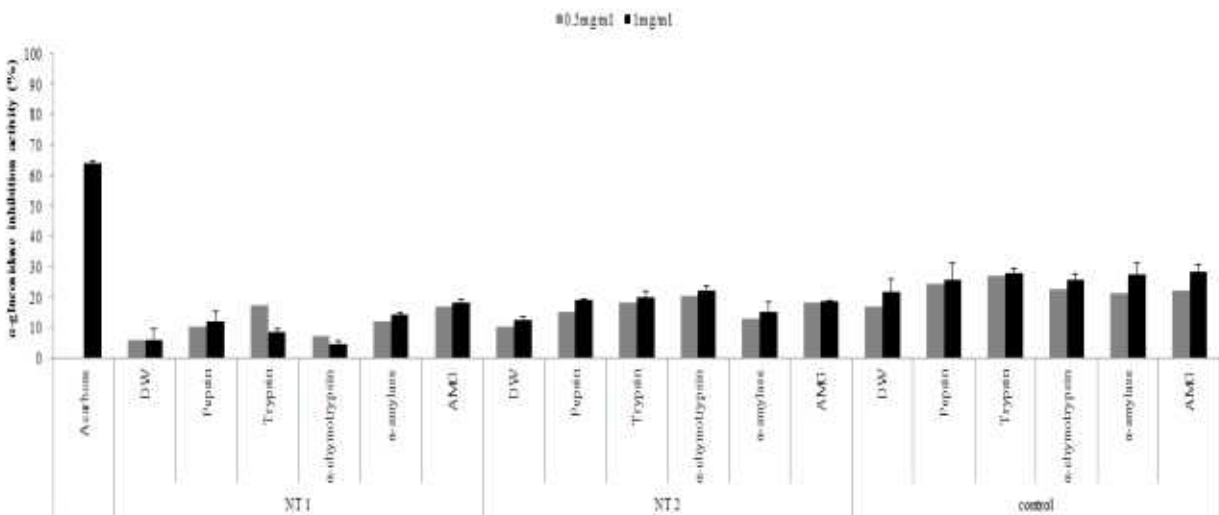


그림72. 내병성, 고온내성 및 기존 방사무늬 김의 효소 가수분해물의 α-glucosidase 저해 활성

- 김 효소 가수분해물의 α-glucosidase 저해 활성을 측정한 결과 positive control인 acarbose와 비교하였을 때 가수분해물 전체적으로 낮은 활성을 보였음. 하지만 이전 연구에서보면 김 유기용매 분획물 유래에서 높은 항당뇨 효능이 있었기에, 항당뇨 활성에 대해서는 좀 더 차년도에 세포실험 (glucose uptake) 등을 통해 다른방면으로 항당뇨 활성이 있는지에 대한 연구가 필요하다고 생각되

어집

[2차년도]

1. 내병성 김 종자 개발

가. 김 대표적 3대 질병인 낭균병, 붉은갯병, 녹반병 질병 진단기술 개발

(1) 낭균병, 붉은갯병, 녹반병

- 채집된 원인균주의 분리 및 배양을 위해 갯병 배양의 최적조건에 종류별 갯병 균주에 각각의 배양 배지인 PES medium, Arasaki medium를 사용하여 배양 하였고 바이러스성 갯병인 녹반병은 동결보존을 통한 균주 보존배양을 하였음
- 배양온도는 낭균병 20℃, 녹반병 -40℃, 붉은갯병 15℃에서 균주 배양중이며 장기보존이 어려운 경우 원인균주의 숙주인 김 엽체에 계대 배양하여 감염균주를 유지하였음
- 각각의 갯병의 균주는 조건별 실험에 사용하기 위해 감염 균주가 출현하지 않는 4월부터 10월 까지 숙주인 김 엽체를 일정기간별로 교체하여 보존하였음

표1. 원인균주 종별 리스트

Strain No.	Strain	종명	Collecting Site
1	붉은갯병 (<i>Pythium</i> sp.) - 1	<i>Pythium</i> sp. (SC)	충남 서천
2	붉은갯병 (<i>Pythium</i> sp.) - 2	<i>Pythium</i> sp. (JD)	전남 진도
3	<i>Dendryphiella</i> sp.	<i>Dendryphiella salina</i>	일본 무로란
4	낭균 (<i>Olpidiopsis</i> sp.) -1	<i>Olpidiopsis</i> sp.(<i>porphyrae</i>)	충남 서천 전남 진도
5	낭균 (<i>Olpidiopsis</i> sp.) -2	<i>Olpidiopsis pyropiae</i>	충남 진도
6	낭균 (<i>Olpidiopsis</i> sp.) -3	<i>Olpidiopsis</i> sp.(<i>koreanum</i>)	충남 서천 전남 해남
7	녹반병(GSD) -1	PyroV1-JD	진도 회동
8	녹반병(GSD) -2	PyroV1-SC	충남 서천
9	녹반병(GSD) -3	PyroV1-HN	전남 해남
10	녹반병(GSD) -4	PyroV1-WD	전남 완도
11	<i>Licmophora flabellata</i>	<i>Licmophora flabellata</i> 규조류	충남 서천
12	<i>Navicula</i> sp.	<i>Navicula</i> sp.(Tube-dwelling) 규조류	충남 서천

- 식물에서는 질병에 대한 방어 기작으로 세포내 활성산소를 생성함. 활성산소는 세포 외/내부 에서 질병원에 대한 직접적인 방어와 신호전달 물질로서 역할을 함
- PyroV1(녹반병 바이러스)감염에는 뚜렷한 패턴은 나타나지 않았으며 참김에선 갯병 질병

원에 반응하여 활성 산소를 생성하지만 질병 감염의 전파를 막을 만큼 영향을 끼치지 않는 것으로 확인됨

- DCFH-DA 염색을 이용하여 3가지 갯병균에 감염된 *P. yezoensis*를 관찰한 결과 많은 양의 활성산소종을 축적하는 것으로 확인됨

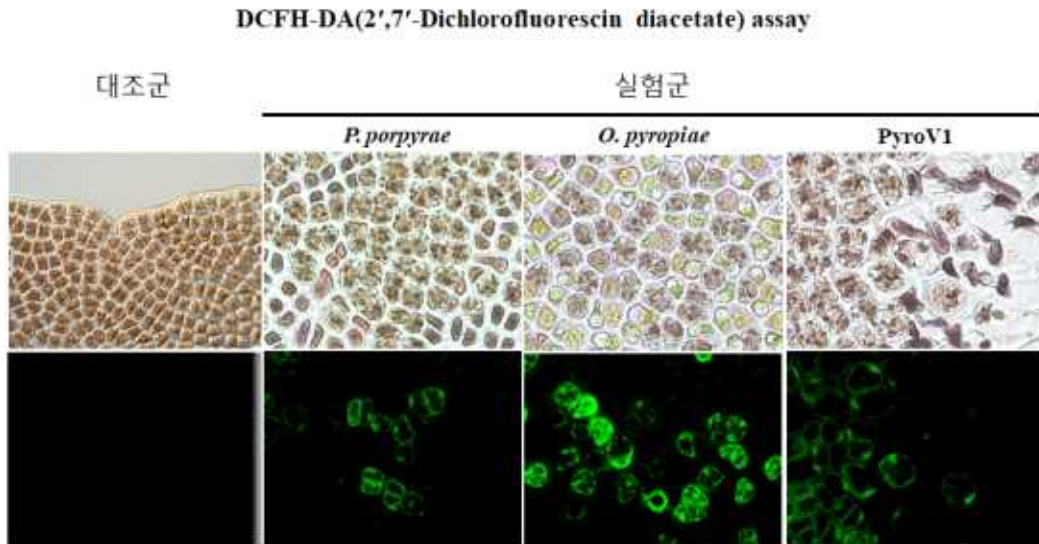


그림1. 각 갯병(녹반병, 붉은갯병, 낭균병)에 감염된 방사무늬김의 활성산소 축적

- 활성산소종을 생성하여 산화적 폭발을 일으키는데 핵심적인 역할을 한다고 알려진 respiratory burst oxidase (Rboh) gene이 3가지 갯병균에 대해 빠르게 반응함
- 낭균병, 붉은갯병, 녹반병 각각의 갯병균에 대한 Pyrboh1, Pyrboh2, Pyrboh3의 반응은 발현량, 발현시기가 각각 달랐지만 갯병균에 대해 일정한 패턴으로 반응하는 것으로 확인됨

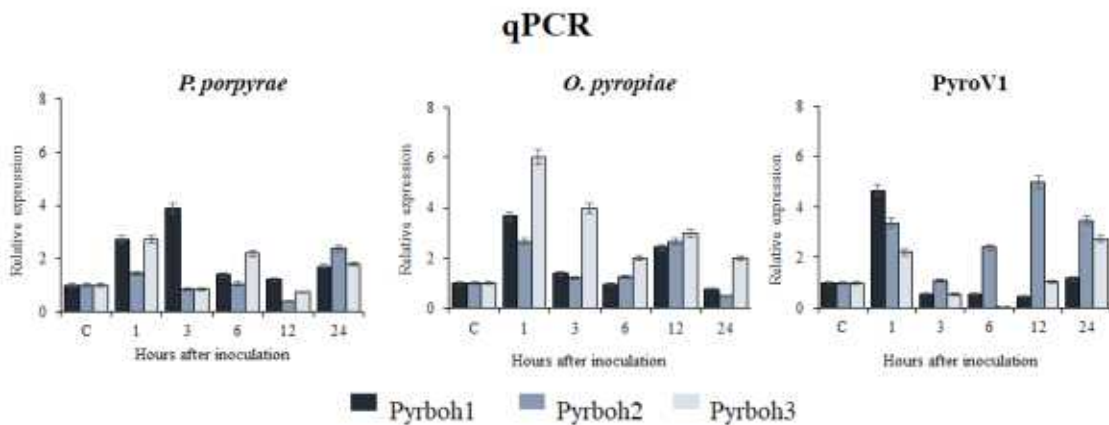


그림2. qPCR을 이용한 방사무늬김의 활성산소 축적

- Rboh protein inhibitor인 (dephenyleneiodonium) DPI의 처리는 병원체 감염에 대한 ROS 생성을 저해시키는 것으로 나타났고 이는 3가지 병원체에 의해 유도되는 활성산소종의 일부가 Rboh에 의해 생성되었다는 것을 의미함
- 또한 DPI 처리는 병원체 감염을 증가시켰는데 이는 활성산소 생성의 저해가 병원체에 대한 저항성을 감소시켰기 때문으로 판단되며 숙주 세포내 바이러스 증식과 관련되어 각 질병 감염에 대해 특이적인 발현이 나타나는 것으로 확인됨

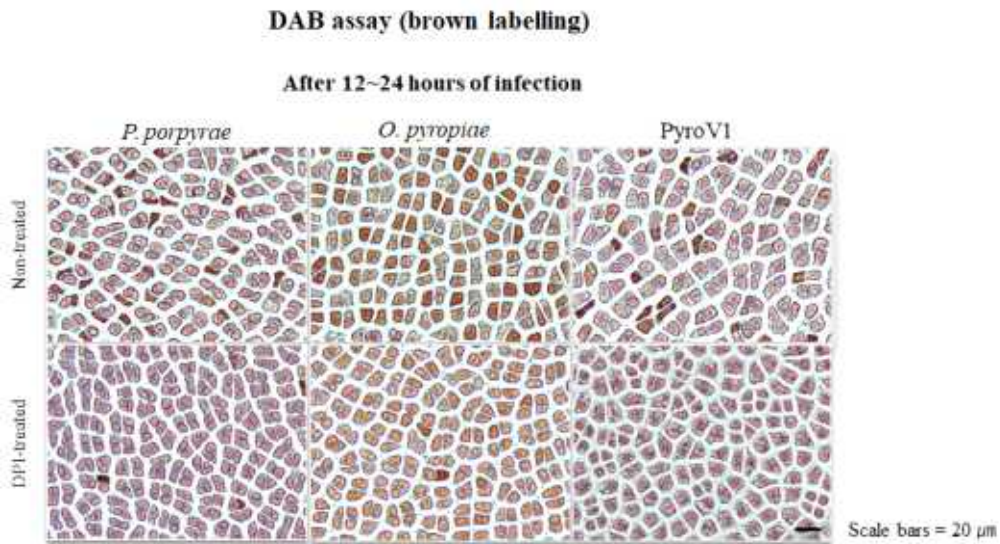


그림3. DAB assay 를 이용한 ROS 생성 확인

- DAB assay결과 oomycete 병원체에 감염된 숙주세포에서는 많은 양의 ROS가 축적되는 것으로 관찰되었고 *P. porphyrae*에 감염된 *P. yezoensis*는 병징의 최초 관찰 시기보다 병의 진행된 이후에 더 많은 양의 ROS를 축적함
- *O. pyropiae*에 감염된 세포는 이와 반대의 결과를 보였으며 Necrotropic 병원체인 *P. porphyrae*의 감염 진행에는 숙주세포의 ROS가 이용되는 것으로 판단됨

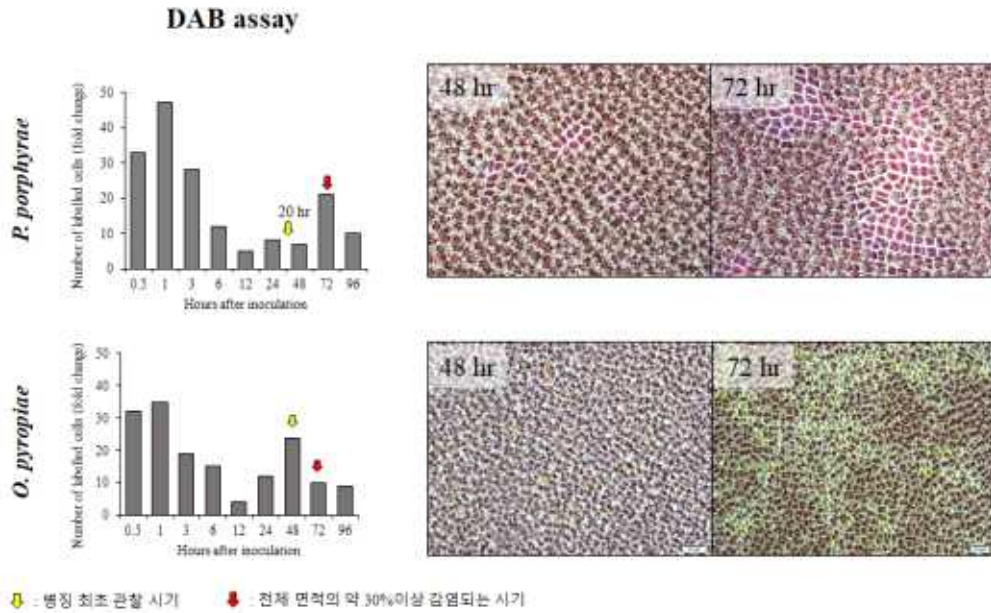


그림4. DAB assay 를 이용한 ROS 생성 확인

- 따라서 활성산소종 생성에 대한 세포자살 연관성을 확인하기 위해 Trypan blue assay를 수행하였고 그 결과 대조군은 DPI가 처리된 실험군에 비해 사세포율이 현저히 높았으며 이는 참김의 rboh에 의해 매개되는 산화적 폭발이 육상식물에서와 마찬가지로 세포자살을 유도하여 질병의 확산을 저해하는 것으로 확인됨

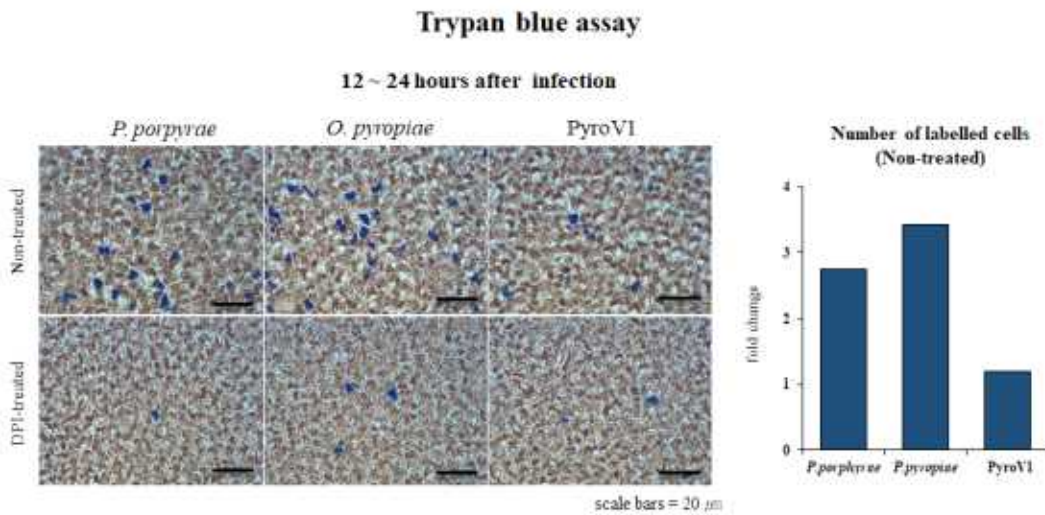


그림5. Trypan blue assay 를 이용한 김 세포사멸 확인

- 식물은 외부로부터 유입되는 병원체에 대응하여 직접 유도되는 면역반응도 가지고 있으며 이러한 병원체에 방어 메커니즘은 살리실산 호르몬에 의해 유도된다고 알려져 있음
- 고등 식물은 병원체의 감염 시 살리실산을 신호 호르몬으로 분비하여 세포내 활성산소의 형성을 촉진하거나 세포자살을 통해 병원체의 증식을 억제함

- 김의 붉은갯병 감염 및 유전자 발현율을 측정하기 위해 김 엽체에 살리실산을 처리한 후 붉은갯병균을 이용하여 감염을 유도하였음

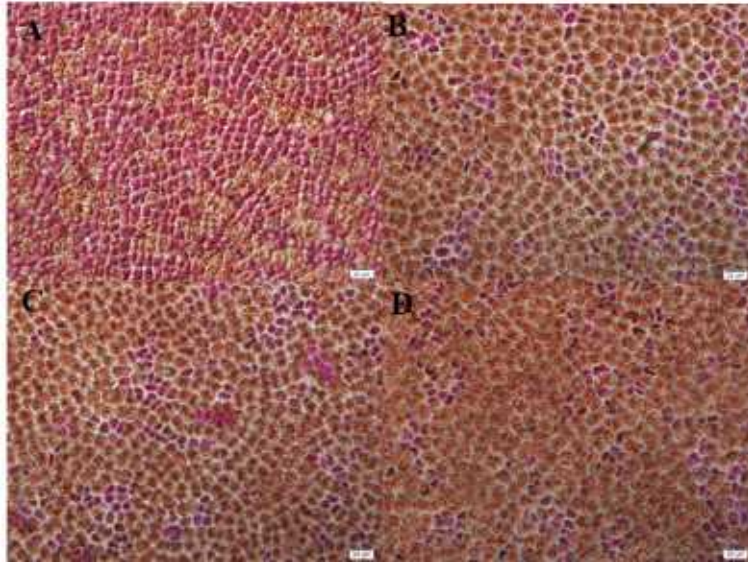


그림6. Salicylic acid 처리에 2시간 후 따른 김의 붉은갯병균의 현미경 사진

- 방사무늬김에 살리실산을 2시간 동안 전처리 후 붉은갯병 감염 실험을 수행하였을 때 감염률이 대조구에 비해 현저히 낮아지며 살리실산 농도 구배에 따라 붉은갯병균에 대한 저항성이 증가하는 것으로 나타남

(2) 낭균병 신호기작을 이용한 갯병 감염률 분석

- 외부 환경요인에 대응하여 일어나는 생물의 세포 생리적 반응은 종종 병원균에 대한 감염 등 다른 스트레스 요인에 대응하는 것을 priming 이라 함
- 난균성 질병 (oomycete disease) 에 대한 방사무늬김의 내성을 증진시키는 환경적 요인을 확인을 위해 저온, 건조, 영양소 부족 등의 비생물적 요인과 다른 질병의 병원균에 대한 노출로 생물적 요인을 전처리 후 감염률의 변화를 비교하였음

교차감염: 녹반병 → 낭균병

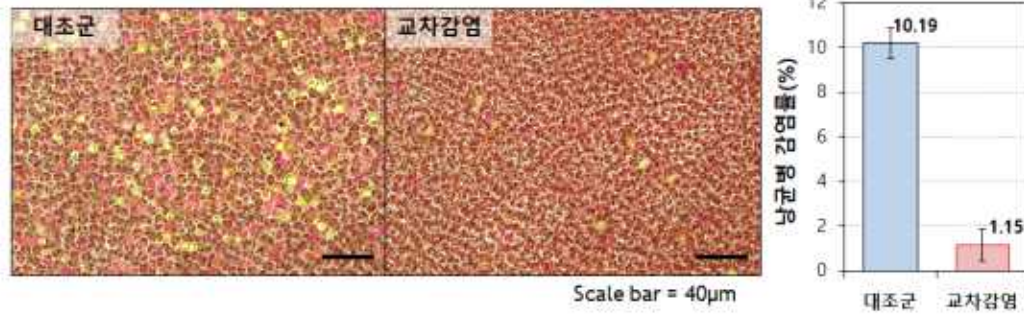


그림7. 녹반병 감염체의 낭균병 발현률

- 낭균병과 붉은갯병, 녹반병의 원인균인 *Oplidiopsis porphyrae* var. *koreanae*, *Pythium porphyrae*와 PyroV1을 교차 감염하여 관찰한 결과 PyroV1 바이러스에 노출된 방사무늬김은 낭균병에 대한 내성이 크게 증가하여 비교군에 비해 80% 이상 감염이 감소한 반면 붉은갯병균과 낭균병은 서로의 감염에 대해 큰 영향을 미치지 않았음

교차감염: 붉은갯병 → 낭균병

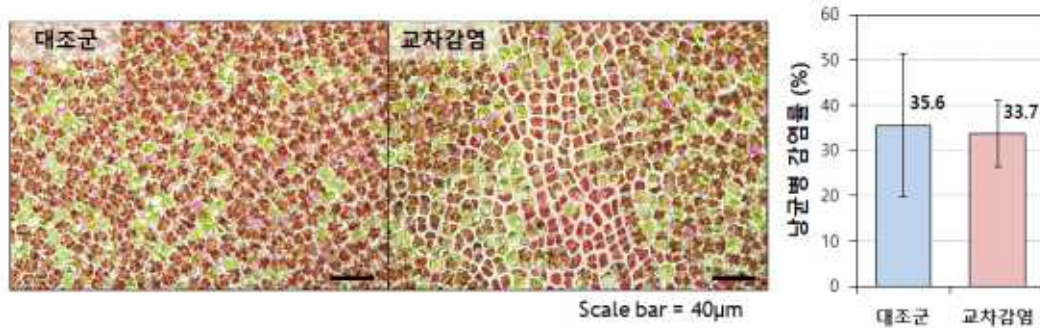


그림8. 붉은갯병 감염체의 낭균병 발현률

- 붉은갯병에 감염된 방사무늬김은 낭균병 감염시 큰 차이를 보이지 않았지만 대조군에 비해 약간 낮은 결과를 나타내었고 이는 낭균병에 대한 붉은갯병 교차 감염시 내성을 증진시키는 환경적 요인이 일부 나타나는 것을 확인하였음

교차감염: 낭균병 → 붉은갯병

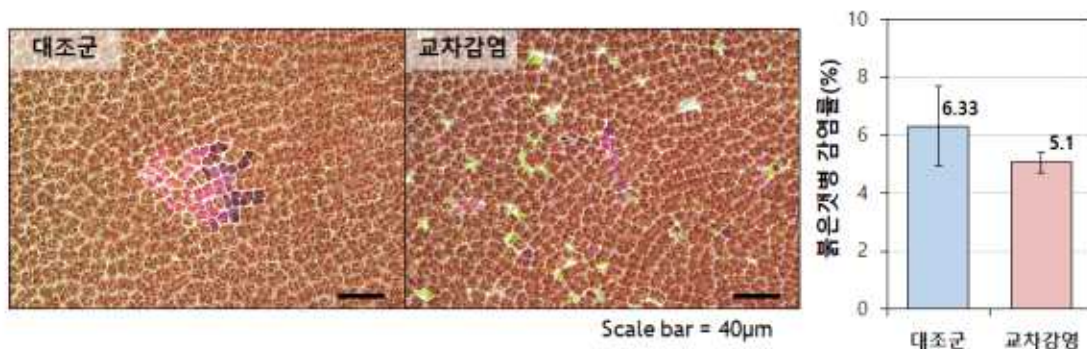


그림9. 낭균병 감염체의 붉은갯병 발현율

- 낭균병에 감염된 방사무늬김은 붉은갯병 감염시 대조구에 비해 약간 낮은 결과를 나타내었으며 이는 붉은갯병에 대한 낭균병 교차 감염시 위의 결과와 마찬가지로 내성을 증진시키는 환경적 요인이 일부 나타나는 것을 확인하였고 세포내 병원체 감염시 중복 감염으로 인한 갯병 내성이 발현되는 것으로 판단됨

건조(Dry stress) → 낭균

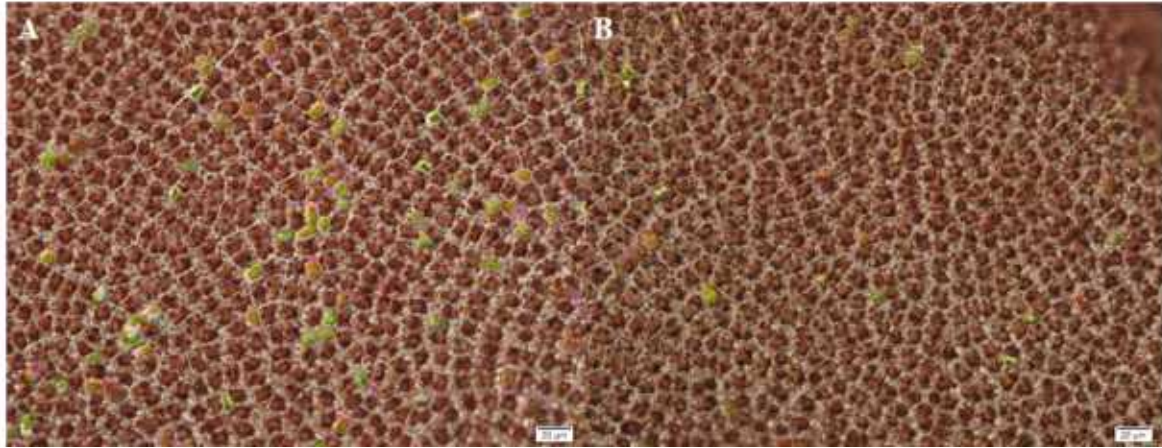


그림10. 건조된 김 엽체의 낭균병 감염율(A : 일반엽체, B : 건조엽체)

- 또 방사무늬김의 엽체를 건조, 급냉, 영양결핍과 같은 극한적 스트레스에 노출하였을 때 낭균성 질병에 대한 내성이 관찰되었고 극한적 상황에서 세포의 질병 방어 시스템이 일부 작동하는 것으로 확인됨
- 건조 엽체의 낭균병 감염률은 대조구에 비해 약 50% 이상 낮은 감염률을 나타냈고 이는 건조과정 중 갯병의 숙주인 세포내 갯병의 활성이 저해된다고 판단되며 수분 함량에 따라 다른 결과를 나타 낼 것이라 판단됨

저온(freezing stress) → 낭균

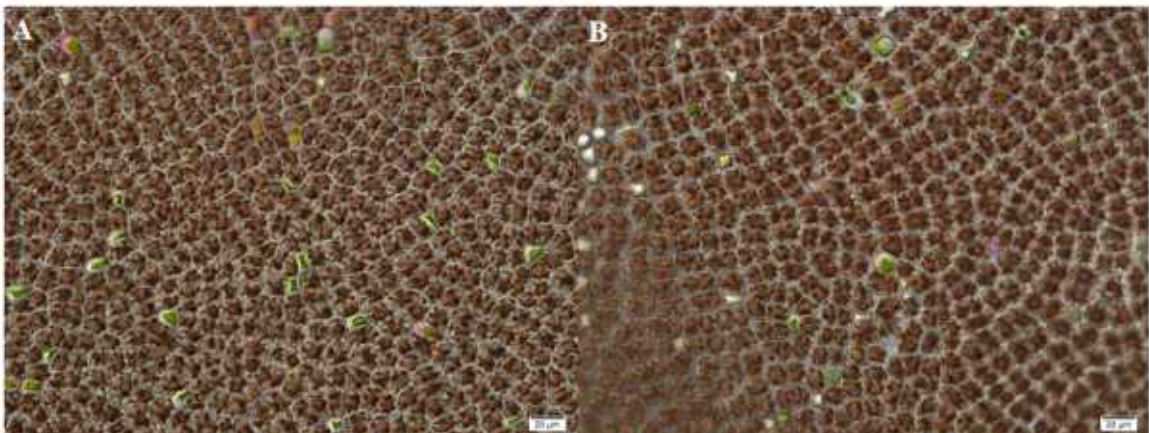


그림11. 저온상태의 김 엽체의 낭균병 감염율(A : 일반엽체, B : 저온조건 엽체)

- 저온 스트레스 조건의 낭균병 감염률은 대조구에 비해 약 30% 이상 낮은 감염률을 나타냈고 이는 건조 스트레스 조건과 비슷한 양상을 나타냈으며 저온에 있어 껍질의 발현율이 저해된다고 판단됨
- 이에 따라 질병에 대한 내성을 증진시키는 생물적, 환경적 요인 및 전 처리에 대한 확실한 규명이 필요하다고 판단되며 이는 김 양식에 있어 경제적으로 크게 기여할 것으로 사료됨

나. 개발종자의 현장적용 시험 및 형질특성 조사

(1) 내병성 품종 “골드1호” 재배심사

- 골드1호의 품종 등록을 위한 재배심사는 “수산식품품종관리센터 규정에 의해 년 1기작 2회 반복으로 정해져 있으며 현재 골드1호는 1년 차 재배심사를 마치고 2018년 10월 2년 차 재배심사 과정에 있으며 심사가 끝나는 2019년 3월 품종 등록 예정임

[별지 제21호 서식] 현지 재배심사 계획통보

국립수산과학원 현지 재배심사 계획통보

(1) 성 명 : 국립공주대학교 산학협력단
 주 소 : 충남 공주시 공주대학교 56
 대 리 인 성 명 :
 주 소 :
 작 물 명 : 방사무늬김
 품 종 명 칭 : 골드1호 (영문명) Gold No. 1
 (2) 번 호 : 2017-1

이 '골드1호'에 대한 심사를 다음과 같이 현지에서 실시키로 하고 그 계획을 통보하오니 현지 재배시험이 적절히 진행되도록 적극 협조하여 주시기 바랍니다.

다 음

1. 현지 재배시험 시기 : 2017년 4월 ~ 2018년 3월(1년차)
2. 현지 재배시험 장소 : 출원인의 종묘배양장 및 양식어장
3. 조사내용 및 방법 : 유엽의 길이 등 13개 형질
4. 기타 현지 재배시험에 필요한 사항 : 시료채취 시 출원인 협조 요청 가능

2017년 3월 16일


심 사 관 황 비 숙 

그림12. 2017년 내병성 품종 “골드 1호”의 품종 출원서

- 현재 “골드 1호”는 어가에 무료 분양 중에 있으며 생산량과 단가에 있어 높은 결과를 나타내고 있으며 매년 수요가 증가하여 사상체의 필요량이 증가하고 있음
- 품종의 등록까지는 2년 2기작의 시험양식과 2년 2기작의 재배심사를 거쳐야 가능하여 현재 골드1호는 2년의 시험양식 후 품종출원을 거쳐 2년 차 재배심사를 위해 해상채묘를 완료했음
- 골드1호의 2년 차 재배심사는 골드1호, 대조구 A, 대조구 B, 총 3종의 품종을 선정하여 진행되며 매년 01월 패각의 잠입과 패각의 배양과정, 환경조건을 1차 심사기준으로 두고 매년 10월 패각사상체를 이용한 해상채묘 후 월 2회 김발을 무작위 채취하여 심사 품종의 특성, 길이, 엽폭 등을 확인함



그림13. 2018년 내병성 품종 “골드 1호”의 2년 차 재배심사 통보 공문

- 재배심사를 위한 채묘과정은 1차 년 심사와 동일한 방법으로 23℃에서 패각사상체 전처리 과정을 거치고 해수의 흐름이 적은 조급기, 각포자 부착의 최적 수온 18℃에 겹장(10장)된 김발에 부착하였고 부착과 동시에 1차 배양장(포자구간)에 이식 하였으며 채묘 20일 후 유

업을 확인 할 수 있을 것으로 판단됨



그림14. 2018년 내병성 품종 “골드 1호”의 2년 차 재배심사 과정(해상채묘)

- 시험양식중인 골드1호는 2018년 10월 현재 포자배양구간에서 배양중이며 2018년 여름 폭염으로 인해 채묘시기 및 포자배양시기가 일부 늦춰졌고 이에 따라 골드1호의 수확 시기는 기존 매년 11월부터 이듬해 2월 중순에서 3월 중순으로 확대될 전망이다



그림15. 2018년 내병성 품종 “골드1호”의 패키징사상체 및 채묘 김밭

- 현재 특허출원을 마친 고온성 잇바디돌김 신품종 “골드3호”는 어가에서 상당히 높은 관심을 보이고 있고 2018년 3월 출원을 마치고 현재 시험 분양중이며 2019년 기술특허 등록을 통해 시장 확대를 도모하고 있음



고온성 잇바디돌김 신제품 업체 (2017년)

출원번호통지서

출원 일자 : 2018.03.26
 배기시일 : 심사청구(무) 공개신청(무) 불응번호(0)318175)
 출원번호 : 10-2018-0034299 (중수번호 1-1-2018-0296123-40)
 출원인명칭 : 공주대학교 산학협력단(2-2004-033237-6)
 대리인명칭 : 특허법률(9-1998-000674-4)
 발명자명칭 : 김광훈 김모은 안종복
 발명위명칭 : 고온성 잇바디돌김 신제품

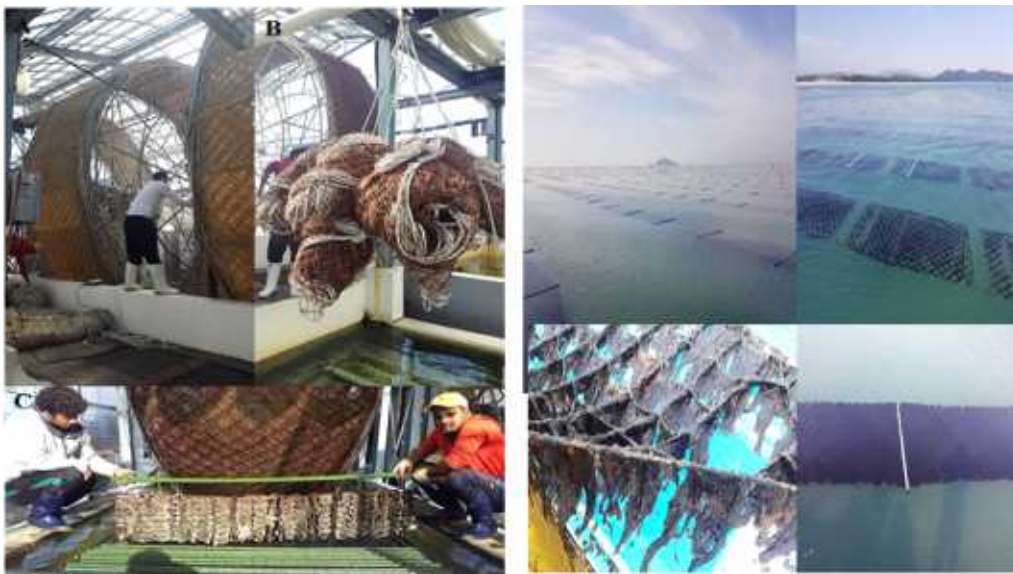
특 허 청 장

그림16. 2018년 고온성 잇바디돌김 신제품 “골드3호”의 기술 특허출원

다. 개발종자 가공품의 내수 및 수출판매

(1) 내수판매

- 골드1호의 경우 기존 일반 방사무늬김에 비해 온도 변화에 대한 내성이 높고 60~90% 높은 내병성을 가지며 중국 시장의 높은 관심과 기존 품종 (다카라) 대비 20-30% 이상 높은 생산성 나타냄



골드 1호 채묘 과정

서천 지역 골드 1호 양식장

그림17. 골드1호의 산업화 생산

- 2018년 제1회 김연구회를 통해 골드 1호의 홍보를 실시하였고 골드1호의 특성과 양식방법을 어민들에게 보급하므로 어민들로부터 내병성 종자의 이식에 대한 강력한 요청이 있었고 어민을 상대로 서천에 위치한 종묘 배양장에 골드1, 3호 유리사상체 분양하였음

- 골드1호의 사상체는 2018년 총 1250g 분양 되었으며 패각 사상체의 양은 전남지역 약 10만 상자, 충남, 경기지역은 패각 사상체 약 25만 상자를 채묘 할 것으로 예상되고 2019년 패각 사상체 35만 상자 이상 확대 보급으로 국내 점유율 25% 이상 점유를 목표로 하고 있음

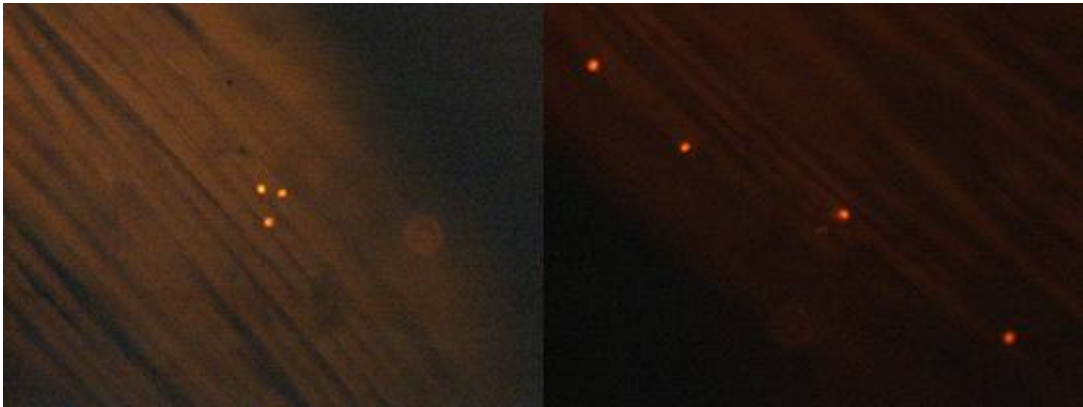


그림18. 2018년 골드1호의 육상채묘(각포자 부착)

- 2018년 서천, 군산지역 골드1호의 총 채묘(육상채묘)량은 50m 김발 약 12,000대 이며 이는 200ha. 의 규모로 서천, 군산지역에서만 약 100억 원의 물김이 생산되는 규모임



그림19. 2018년 골드1호의 육상채묘(각포자 부착)

- 기존의 육상채묘 방식은 김발을 감아놓고 채묘를 하는 방식이었으나 대량채묘와 각포자 유실방지를 위해 각포자를 부착하면서 감는 방식으로 바꾸었으며 이 기술로 인해 기존보다 약 30%이상 높은 채묘량을 나타냈고 각포자 부착 후 유실되는 양이 현저히 줄었음
- 채묘 조건은 23℃, 3000lux 조건으로 김발 1대 당 약 5개의 패각이 소모되었으며 기존 1회 방출이었던 2~3회 방출유도 기술로 전년 대비 약 30%~50%이상 높은 채묘율을 나타냈음
- 전남, 진도지역의 경우 패각 사상체를 이용한 해상채묘를 실시하였고 전남지역 100m 김발 기준 약 20,000대 규모로 확인되었고 이는 물김 생산금액 약 180억 원 이상일 것으로 추측됨



그림20. 2018년 골드1호의 해상채묘(전남)

- 기존의 해상채묘 방식과 동일하게 수온 20℃에 맞춰 포자구간에 설치하였으며 패각 사상체를 김발에 거는 방식으로 진행하였고 각포자 부착이 안전하게 이루어지도록 약 2주간 패각 사상체를 방치 할 예정이며 부착이 완료되면 패각을 제거 할 예정임



그림21. 골드3호의 산업화 생산

- 2018년 서천, 군산, 경기지역 골드3호의 총 채묘(육상채묘)량은 50m 김발 약 17,000대 이며 이는 300ha. 의 규모로 서천, 군산, 경기지역에서만 약 200억 원의 골드3호 물김이 생산되는 규모임
- 골드3호의 경우 기존 대조구(잇바디돌김)에 비해 온도 변화에 대한 내성이 높고 일반 잇바디돌김에 비해 30% 높은 고온내성을 가지며 기존 품종 대비 20-30% 이상 높은 생산성을 나타냄
- 골드1호의 2018년 유리사상체 분양 규모는 총 1,250g 으로 서천의 (주)선진수산 850g, 해남의 믿음수산 100g, 진도의 동해수산 100g, 영암의 명지수산 100g, 정가네수산 100g 분양하였으며 이는 총 1,500ha. 규모로 국내 김 양식 점유율 3.15% 정도로 확인됨
- 골드3호의 사상체는 2019년 총 300g 이상 분양 예정이며 패각 사상체의 양은 전남지역 약 3만 상자, 충남, 경기지역은 패각 사상체 약 5만 상자를 채묘 할 것으로 예상되고 2019년 패각 사상체 확대 보급을 목표로 하고 있음

사상체 분양

구분 (연도)	사상체 분양 내용	분양 업체	패각 사상체 생산량
2차년도 (2018)	사상체 850g	서천 (주)선진수산	150,000 상자(1상자/40패각)
	사상체 100g	해남 밀음수산	25,000 상자(1상자/40패각)
	사상체 100g	진도 동해수산	25,000 상자(1상자/40패각)
	사상체 100g	영암 명지수산	25,000 상자(1상자/35패각)
	사상체 100g	해남 정가네수산	25,000 상자(1상자/35패각)

양식 면적

구분 (연도)	채묘업체	양식업체	양식면적
2차년도 (2018)	서천 (주)선진수산	서천(마함) 삼호수산 외 3개 업체	300 Set(1 Set/60대)
		서천(비인) 동백수산 외 4개 업체	400 Set(1 Set/60대)
		개야도 한김수산 외 3개 업체	350 Set(1 Set/60대)
		선재도 4개 업체	50 Set(1 Set/60대)
		국화도 1개 업체	20 Set(1 Set/60대)
	동해수산, 밀음수산, 정가네 수산, 명지수산	전남 지역(진도, 해남, 고흥, 영암) 30개 업체	총 350 Set(1 Set/60대) 규모

그림22. 골드1호의 사상체 분양 계획

- 골드1, 3호는 물김 생산 후 서천에 위치한 (주)선진수산 마른김 가공공장에서 마른김을 생산 하였으며 2017-2018년 미국 및 중국, 동남아로 수출판매 (2018년 2월까지 약 14억 원(직접 수출) 판매하였음
- 4월까지 27억 원(간접수출) 수출 완료) (주)대천김에서 골드3호 상표 독점권 계약 실시하였으며(2018년 부터 2021년 까지) 대천김에서는 골드1호, 3호(특허출원) 조미김을 2018 하반기부터 상표등록 후 수출판매 예정임



그림23. 골드1, 3호 가공김 생산과정 (주)대천김)

- 골드1, 3호는 2018년 4월까지 약 14 억 원으로 확인 되었으며 2017년 부터 2018년 4월 까지 국내 업체 재가공 수출을 포함하면 27억 원으로 집계 되었고 2018-2019년 골드1, 3호 사상체 확대 분양으로 수출 금액 60 억 원 달성 계획에 있음

골드 1호 마른김 수출 진행 상황(2018.08 현재)

								(직접수출 : 선진수산)	
품목	품종	연구 책임자	연구기관	수출 국가	수출 날짜	수출량(박스)	단가(속)	수출액(\$)	
김	골드 1호	김광훈	공주대학교	대만	2017.02.19	520	4.6	195,776	
					2017.05.29	209	4.6	162,559	
					2017.07.17	182	7.1	147,888	
					2017.09.28	490	4.2	123,965	
					2017.11.23	500	4.7	167,400	
					2017.12.28	500	5.8	208,476	
				일본	2018.01.25	200	4.8	69,000	
					2018.02.04	226	5.3	80,658	
					2018.02.18	520	6.1	215,705	
					2018.02.21	63	6.1	25,610	
					소계		3,560		13억9703만

								(간접수출 : 대천김)	
품목	품종	연구 책임자	연구기관	수출 국가	수출 날짜	수출량(박스)	단가(USD)	수출액(\$)	
김	골드 1호	김광훈	공주대학교	중국	2017.05.07	490	255	142,950	
					2017.05.25	490	255	142,950	
					2017.10.08	497	258	128,226	
					2017.10.13	497	258	128,226	
					2017.11.19	545	258	140,610	
					2017.11.26	545	258	140,610	
					2018.02.23	545	271	147,695	
					2018.03.04	545	203	110,635	
					2018.04.08	545	203	110,635	
					2018.04.22	545	202	110,602	
					소계		3,560		13억0313만

그림24. 골드1, 3호 가공김 수출현황

(2) 수출판매

- 골드 1호의 품종 수출을 위해 2018년 07월 국내 무역회사인 E&E캠을 통해 중국 “중국 위해 김양식산업단지”와 접촉하여 현지를 방문 1차 회의를 진행하였으며 회의에 참석한 결과 현지에서 골드1호의 가공품(마른김) 대한 큰 관심을 보여 2018년 7월 골드1호의 수출을 위한 협약체결을 하였고 2018년 11월 이후 년 간 500만불 규모의 마른김 및 가공김 수입 의향서 발송하였음
- 국내에서 생산된 골드1, 3호의 마른김은 중국 위해시 김 산업단지로 수출예정이며 국내 조미김 가공기계와 동일한 장비를 사용하여 현지에서 직접 가공하는 것으로 협약을 할 예정 이고 중국 현지 실정에 맞는 인력이 필요하면 추후 국내 가공김 기술진이 투입 될 가능성이 있음
- 골드1, 3호의 마른김 수출 후 월 1회 중국 가공공장 방문을 통해 조미김 가공에 따른 기술 지도와 현장 상황을 조사할 예정이며 현지 방문 비용과 체재비는 위해 김산업단지에서 대부분 부담할 예정임



그림25. 2018년 03월 중국 위해 김 가공공장 현지답사

- 2018년 중국 위해 조미김 생산기지를 방문하여 2018년 11월 골드1, 3호 현지 가공(조미김) 생산을 위한(중국 위해) 협약체결이 예정되어 있으며 2018년 12월 골드1, 3호 마른김 수출 후 중국 현지에 맞는 조미법을 이용하여 가공 및 판매 예정임



그림26. 2018년 07월 중국 위해 김양식산업단지 현지 답사

- 이로 인해 2018년 11월 골드1, 3호 마른김 및 가공김 중국 수출 예정이며 수출 규모는 직, 간접 수출로 약 450만 달러로 예상하고 있음

구매 의향서

구입 희망 품목	공드1호, 공드3호로 알식된 가공품(마른김 및 초미김)		
구매기관	주식회사 투진무역	담당자 성명	김성진
E-MAIL	jinchen@tjhan1964@gmail.com	회사 홈페이지	www.dcggroup.jp
전화번호(회사)	02-867-5553	FAX번호(회사)	02-867-5554
주소(회사)	서울 구로 구로동 110-4. 도림 투산에이스타빌 511호		

제안사항 :
한국산 김 품종 "공드 1, 3호" 의 수출을 위해 투진무역은 (대표 : 김성진)는 다음과 같은 내용을 제공한다.

1. 수출범위 : 마른김과 초미김
2. 수 량 : 년 간 100만속, 한회 50억원 상당(마른김과 초미김 비율은 추후 협의)
3. 제품의 수분함량 : 10% (용도별 제용은 추후 협의)
4. 이물제거기 : 설치요양
5. 제품의 생산 : 매년 12월에서 1월까지 생산된 물감만 사용 할 것

본사는 위와 같이 귀교(貴校)의 개발용종인 공드1, 3호의 가공품을 본사의 제안사항에 부합할 경우 현재 타사에서 구매하여 일본 및 대만에 수출 진행중인 마른김 및 가공김을 대체하여 구입할 의향이 있으며, 문의 사항에 답변 부탁드립니다. 세미나 및 시연회 개최 시 초청장과 제물에 관한 안내 자료를 준비되면 발송하여 주시기 바랍니다.

2018년 09월 08일

김성진 : 김성진 (인)
Toshin Trade Co., Ltd.
MR SEONG JIN
President / Seong jin Kim

국립공주대학교 산학협력단 귀하

그림27. 2019년 09월. 무역업체 구매의향서

라. 내병성 및 고온내성 김 종자에 대한 기능성 식품 소재 가능성 평가

(1) 김의 국내 지역별 영양성분 분석 및 항산화 활성 평가

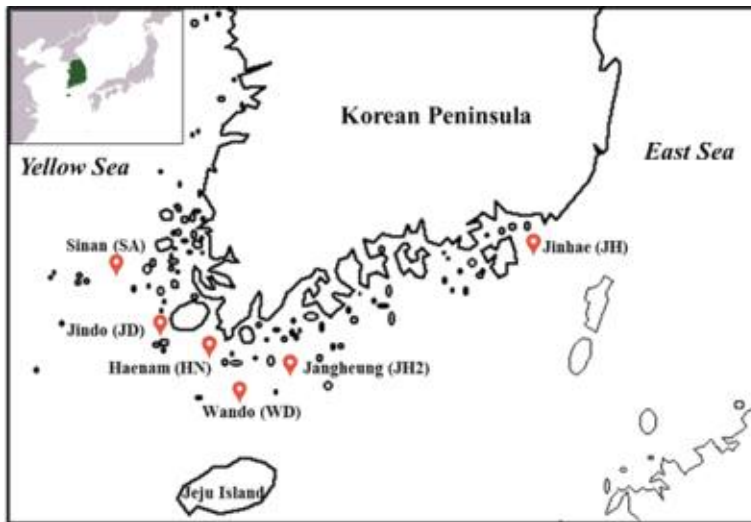


그림28. 국내의 김을 생산하는 지역과 6곳의 채집 지역

표2. 김 추출물(70 % 에탄올)의 지역별 구성 성분 (다당류, 단백질, 폴리페놀 등) 분석

Content (%)	진해 (JH)	해남 (HN)	장흥 (JH)	진도 (JD)	완도 (WD)	신안 (SA)
Yield	14.8±0.2	11.8±0.2	10.2±0.1	20±0.2	16.2±0.3	14.7±0.2
Polyphenol	1.31 ±0.21	2.76 ±0.31	2.22 ±0.1	4.92 ±0.1	2.31 ±0.31	6.31±0.21
Carbohydrate	6.31±0.23	4.40±0.32	3.28±0.28	8.22±0.12	8.15±0.17	9.67±0.2
Protein	10.86±0.67	15.15±0.89	5.78±0.67	11.82±0.22	6.57±0.44	18.33±0.67
Total sterols	0.27 ±0.01	0.31 ±0.01	0.22 ±0.01	0.33 ±0.01	0.21 ±0.01	0.34±0.01
Lipid	3.27 ±0.01	2.95 ±0.01	4.06 ±0.01	4.1 ±0.01	3.51 ±0.01	3.22±0.01
Ash ^a	11.5	11.8	10.0	13.2	14.4	10.0
Moister ^a	5.36±0.10	5.54±0.10	5.04±0.10	5.85±0.10	5.53±0.10	5.25±0.10

- 국내 김의 서식지에 따라 영양성분 조사를 통해, 우수한 기능성, 영양성분을 구성하고 있는 김을 구분하고, 이에 따라서 종자를 개발하는데 바탕이 되는 데이터를 확보할 수 있었음
- 이 결과에 따르면, 신안과 진도에서 채집한 김에서 다당류, 단백질과 폴리페놀 함량이 진해, 해남, 장흥, 완도 지역보다 높은 것을 확인 할 수 있었음
- 이전의 여러 연구에 따르면, 단백질, 다당류, 폴리페놀은 영양 성분이며, 이에 따른 생리 활성이 다양한 생리 활성 논문에 보고된 바가 있음

표3. 김 추출물(70 % 에탄올)의 지역별 DPPH, Alkyl radical 소거 활성

IC ₅₀ (mgm L ⁻¹)	진해 (JH)	해남 (HN)	장흥 (JH)	진도 (JD)	완도 (WD)	신안 (SA)
DPPH ^a	1.15±0.1	0.9±0.2	0.73±0.2	0.26±0.2	0.26±0.1	0.05±0.01
Alkyl ^b	0.67±0.02	0.16±0.03	0.75±0.03	0.38±0.03	0.53±0.02	0.19±0.02

- 국내 김의 서식지에 따라 항산화 능력을 DPPH, Alkyl radical 의 소거 활성법을 통하여 측정 한 결과임
- 이 결과를 통하여 신안 지역에서 채집한 김이 우수한 DPPH, Alkyl radical 의 소거 활성을 나타내는 것을 확인하였음
- 위 결과는 신안 지역에서 표 1 결과에서 확인 할 수 있듯이, 폴리페놀, 다당류, 단백질의 함량이 다른 지역과 비교하여 구성 성분 함량이 높아짐에 따라 활성 산소의 소거능이 우수해지는 결과를 확인 할 수 있었음

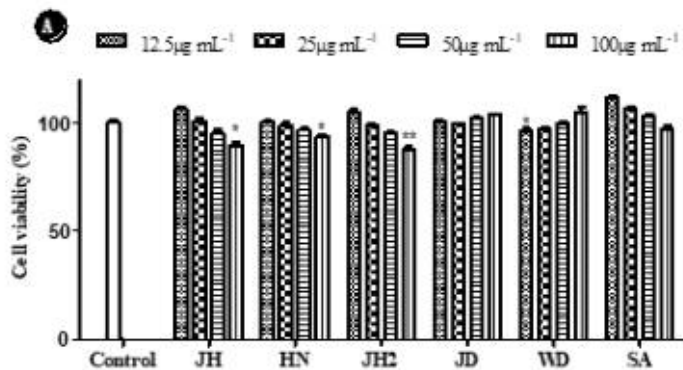


그림29. 김 추출물(70 % 에탄올)의 지역별 추출물의 세포 독성 (JH: 진해, HN: 해남, JH (장흥), JD (진도), WD (완도), SA (신안))

- 위 MTT 결과를 확인하였을 때, 정상 세포에서 김 추출물(70 % 에탄올)의 12.5 - 100 ug/ml에서 독성을 나타내지 않는 결과를 확인할 수 있었음
- 다음과 같은 결과를 통해 AAPH로 산화적 스트레스를 유도하여 김 추출물이 세포 내에서 산화적 스트레스를 소거하는 실험은 12.5 - 100 ug/ml 농도 범위내에서 실험을 진행함

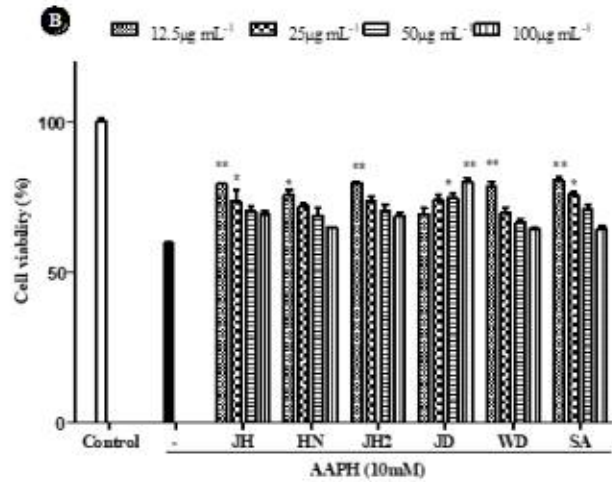


그림30. AAPH로 유도한 세포 사멸로부터 김 추출물의 보호효과 (JH: 진해, HN: 해남, JH (장흥), JD (진도), WD (완도), SA (신안))

- AAPH로 산화적 스트레스를 유도하여 김 추출물이 세포 사멸로부터 보호하는 효과는 진해, 해남, 진도, 완도, 신안에서 우수한 활성을 나타내었으나, 특히 진도 김 추출물에서 농도 의존적으로 산화적 스트레스로 유도한 세포 사멸을 보호하는 효과를 확인 할 수 있었음

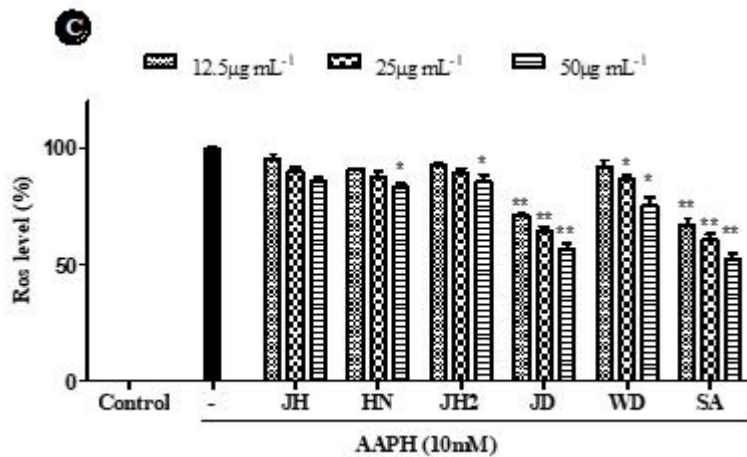


그림31. AAPH로 유도한 세포 사멸로부터 김 추출물의 보호효과 (JH: 진해, HN: 해남, JH (장흥), JD (진도), WD (완도), SA (신안))

- AAPH로 산화적 스트레스를 유도하여 김 추출물이 세포 내 활성 산소 소거 활성을 측정 하였을 때 진도, 완도, 신안에서 채집한 김 추출물 (70% 에탄올)이 우수한 산화적 스트레스 소거 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었음
- 특히, 진도와 신안 지역에서 채집한 김 추출물이 농도 의존적으로 AAPH 로 유도한 산화적 스트레스를 억제 시키는 활성을 보이는 결과를 확인하였음

- 이 결과를 통하여 진도와 신안에서 우수한 활성 성분 (다당류, 폴리페놀, 단백질) 함량이 타 지역 (진해, 해남, 장흥, 완도) 에 비하여 높아짐에 따라, 산화적 스트레스를 소거시키는 효과 또한 유의적이게 높아지는 결과를 보여줌

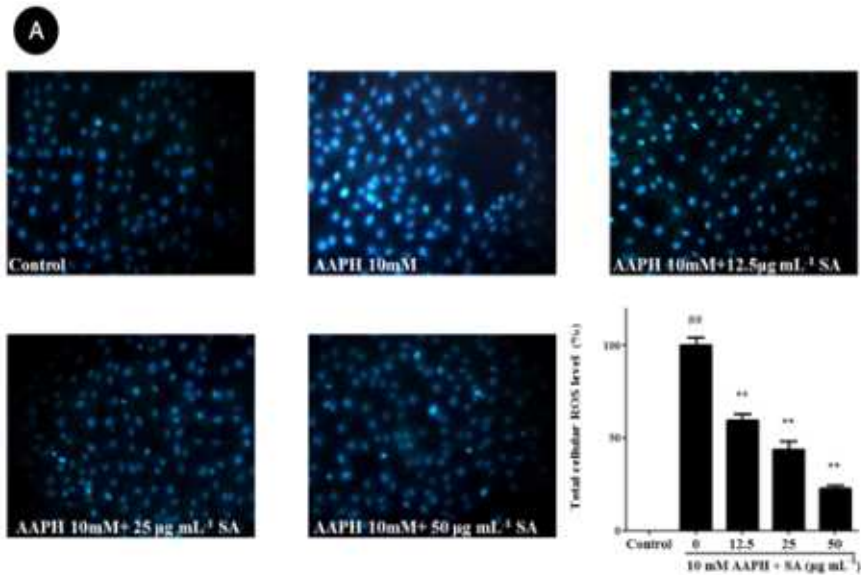


그림32. AAPH로 유도한 세포 사멸로부터 신안 김의 70% 에탄올 추출물의 보호 효과

- AAPH로 유도한 세포 사멸로부터 신안에서 채집한 김 추출물의 보호 효과를 Ho33342 시약 염색법을 통해 관찰한 결과, 신안에서 채집한 김 추출물이 우수한 세포 사멸 보호효과를 나타내는 결과를 확인 할 수 있었음

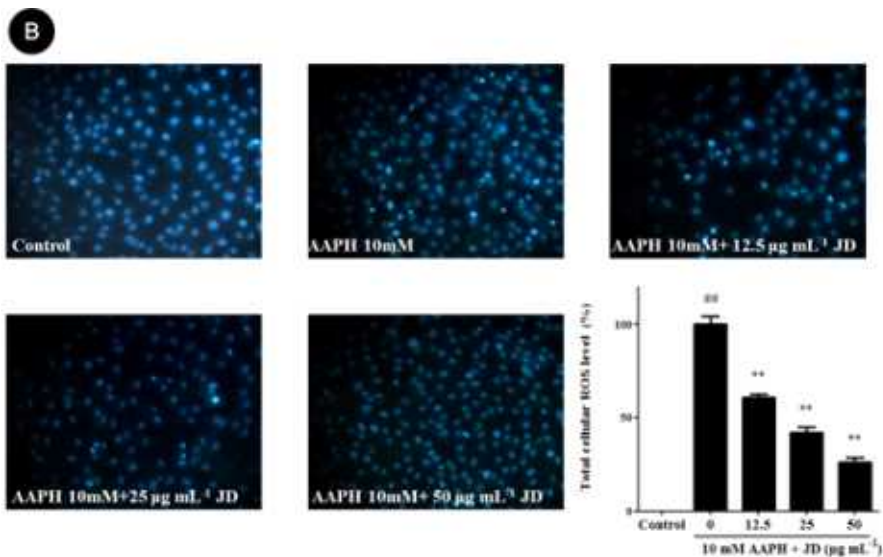


그림33. AAPH로 유도한 세포 사멸로부터 진도 김의 70% 에탄올 추출물의 보호 효과

- AAPH로 유도한 세포 사멸로부터 신안에서 채집한 김 추출물의 보호 효과를 Ho33342 시약 염색법을 통해 관찰한 결과, 신안에서 채집한 김 추출물이 우수한 세포 사멸 보호효과를 나타내는 결과를 확인 할 수 있었음

- 다음과 같은 결과를 확인했을 때, 산화적 스트레스로 유도한 세포 사멸을 김의 신안, 진도 70% 에탄올 추출물을 처리하였을 때 우수한 보호 효과를 농도 의존적으로 확인할 수 있었음
- 위의 결과를 요약해봤을 때, 신안 김 70% 에탄올 추출물이 세포내에서 우수한 산화적 스트레스로 야기된 세포 사멸을 억제 시켜주는 결과를 확인할 수 있었고, 따라서 신안 김 추출물을 선택하여 in vivo 실험을 제브라피쉬 모델에서 진행하였음

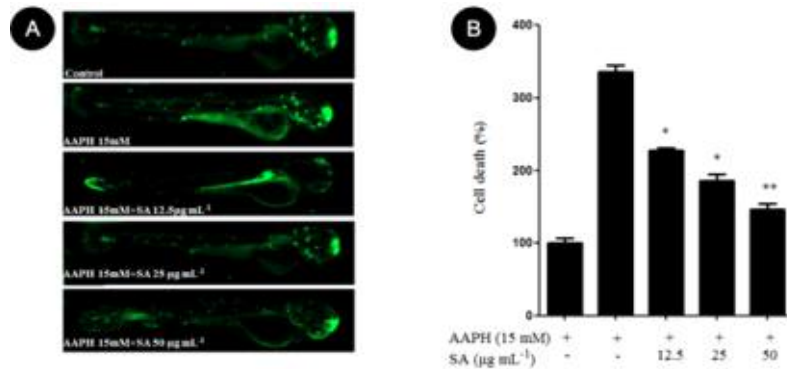


그림34. 제브라 피쉬 모델에서 AAPH로 유도한 세포 사멸로부터 진도 김의 70% 에탄올 추출물의 보호 효과

- 실험동물의 활용은 사람에게서 발생하는 질환의 원인 및 병태생리 규명과 질환의 예방, 진단 및 치료방법을 모색하는 수단으로 사용되어 왔으며, 대표적으로 마우스를 이용한 기초 중개 임상연구가 중점적으로 연구되어왔음
- 그러나 마우스를 이용한 연구는 발생 초기 질병의 표현형 관찰, 유전자의 고속기능분석, 대규모 스크리닝의 어려움, 시간/ 경제적 측면에서 부담으로 최근에는 이의 단점을 대체할 수 있는 제브라 피쉬를 활용한 연구가 주목받고 있음
- 제브라피쉬는 게놈 시퀀싱 프로젝트 결과, 질환 관련 유전자를 포함하여 적어도 70% 유전자가 인간과 동일하게 존재하여, 질환 및 생리활성 연구 모델로 적합하여 다음과 같은 모델을 사용하여 국내 산 지역별 김 에탄올 추출물의 산화적 스트레스를 억제시키는 효과를 검증하였음
- 제브라 피쉬 모델에서 AAPH로 산화적 스트레스를 야기하여 세포 사멸을 유도한 결과, AAPH를 처리 하였을 때 세포 사멸이 증가된 결과를 확인할 수 있었으나, AAPH와 신안 김 추출물 (70% 에탄올)을 처리 하였을 때 12.5 - 50 ug/ml 에서 농도 의존적으로 세포 사멸이 감소되는 결과를 확인할 수 있었음

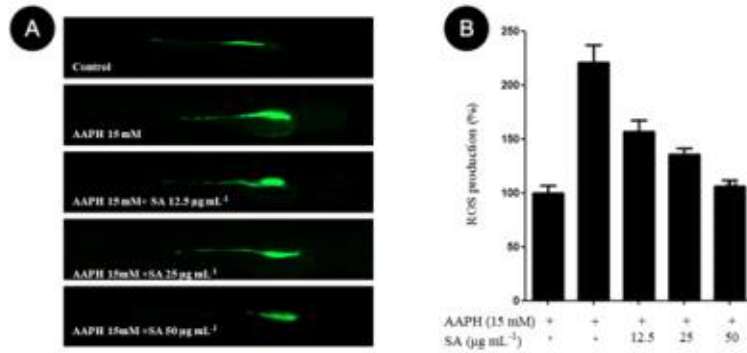


그림35. 제브라 피쉬 모델에서 AAPH로 유도한 산화적 스트레스로부터 진도 김의 70% 에탄올 추출물의 소거 효과

- 위의 결과를 확인하였을 때, AAPH로 산화적 스트레스를 유도하였을 때 활성산소가 과다하게 생성되었지만, AAPH와 신안 김 추출물과 처리한 경우 농도 의존적으로 활성 산소를 제브라 피쉬 모델에서 소거시켜주는 결과를 확인할 수 있었음

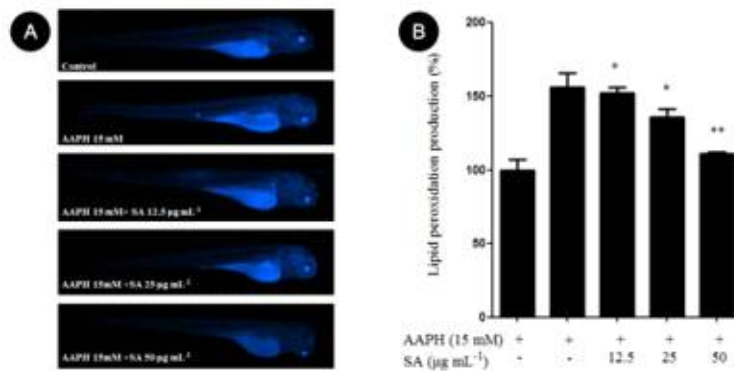


그림36. 제브라 피쉬 모델에서 AAPH로 유도한 지질 산화로부터 진도 김의 70% 에탄올 추출물의 지질 산화 억제 효과

- 위의 결과를 확인하였을 때, AAPH로 산화적 스트레스를 유도하였을 때 활성산소가 과다하게 생성되었지만, AAPH와 신안 김 추출물과 처리한 경우 농도 의존적으로 활성 산소를 제브라 피쉬 모델에서 소거시켜주는 결과를 확인할 수 있었음
- 결과를 종합해봤을 때, 신안 김 추출물 (70% 에탄올)에서 폴리페놀, 다당류, 단백질 함량이 높아짐에 따라서 AAPH로 유도한 산화적 스트레스를 통한 세포 사멸을 신안에서 채집한 김 추출물이 우수한 보호 효과를 나타내는 결과를 확인할 수 있었음
- 이 결과를 통하여, 국내 김 중에서 신안의 김의 영양성분이 풍부하며, 잠재적으로 항산화제로 산업적으로 화장품이나 기능성 식품에 응용될 수 있을 것이라 사료되어짐

Protective effect of extracts from *Pyropia yezoensis* against AAPH-stimulated oxidative damage in vitro and in zebrafish model

Journal:	<i>Journal of Oceanology and Limnology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Dai, Yulin; Jeju National University Hyun, Jimin; Jeju National University Kim, G. H.; Kongju Natl Univ, Chungnam South Korea , Jeon, You-Jin; Jeju National University, Kang, Mincheol; Jeju National University
Keywords:	<i>Pyropia yezoensis</i> , Antioxidant effect, Polyphenols, protein, Zebrafish embryos

Journal of Oceanology and Limnology 에 투고중인 논문

표4. 김 추출물(DW)의 수율 및 항산화 활성 (NT1: 내병성 김 종자, NT2: 고온 내성 김 종자(WT: 시중에 판매되는 김)

Solvent	Sample	Yield(%)	DPPH	IC ₅₀ (mg/ml)		
				Alkyl	Hydrogen peroxide	Hydroxyl
	NT1	20.00±0.00	0.63±0.01	0.37±0.03	0.18±0.02	0.71±0.01
D.W	NT2	20.50±0.87	0.47±0.01	0.28±0.02	0.36±0.01	0.42±0.01
	WT	40.00±1.73	0.75±0.02	0.47±0.02	0.31±0.02	-

- 김이 우리나라 수산업 및 식품산업에 미치는 영향이 높으나, 수산식물에 대한 품종보호제도 시행으로 일본, 중국 등 김 주요 생산국으로부터 견제를 받을 가능성이 높음에 따라서 우리나라에서 생산되는 김 품종을 우리나라의 고유 종자로 대체하여 개발할 필요성이 있음
- 따라서, 이 과제를 통하여 다음과 같은 내병성 (NT1), 고온내성 (NT2)를 개발하여 기존의 시중에 판매되는 김 종자와 활성 성분 분석과 생리활성 효과를 검증하였음
- 위의 결과에 따르면 NT1 (내병성), NT2 (고온내성), 시중에 판매되고 있는 김의 항산화 활성을 검증해본 결과 시중에 판매되는 김보다 내병성, 고온내성으로 개발된 김이 우수한 활성산소 (DPPH, Alkyl, hydroxyl 라디칼) 소거 활성을 나타내는 것으로 확인할 수 있었음
- 특히, NT2 (고온내성)으로 개발된 김에서 우수한 DPPH, Alkyl 라디칼 소거 활성이 나타내는 것으로 확인되어, 고온내성으로 개발되는 김을 원료로 선정하여 추후 실험에 사용하였음

표5. NT2 (고온내성) 김을 원료로 이용한 효소 추출 조건

Enzymes	Type	pH	Temperature
Celluclast®	Carbohydrase	4.5	50 °C
Viscozyme®	Carbohydrase	4.5	50 °C
AMG®	Carbohydrase	4.5	60 °C
Termamyl®	Carbohydrase	6.0	60 °C
Ultraflo®	Carbohydrase	7.0	60 °C
Neutrase®	Proteinase	6.0	40 °C
Protamex®	Proteinase	6.0	40 °C
Flavourzyme®	Proteinase	7.0	50 °C
Alcalase®	Proteinase	8.0	50 °C

- 식물에서 생리활성물질을 추출하기 위하여 효소의 추출방법은 추출시간을 단축시키고, 용매 사용 최소화, 수율을 높이고 생리 활성을 높이는데 사용되고 있음
- 따라서 이 연구에서는 고온내성 김의 종자를 효소 추출법을 이용하여 가수분해하고 이 추출물의 수율과 항산화 활성을 검증함

표6. NT2 (고온내성) 김을 원료로 효소 (9종)을 이용한 가수분해물의 항산화 활성 및 구성 성분

Sample	Enzyme	Type	Yield (%)	Proximate composition (%)			ROS Scavenging activity (IC50 - mg/mL)
				Protein	Polysaccharides	Polyphenol	Alkyl
*1NT2	Celluclast	Carbohydrase	24.75±1.06	20.75±0.01	46.53±3.12	0.18±0.07	0.46±0.05
	Viscozyme	Carbohydrase	24.75±1.06	20.52±0.01	43.18±1.29	0.23±0.14	0.81±0.02
	AMG	Carbohydrase	14.25±1.06	33.78±0.01	35.25±0.21	0.77±0.07	0.70±0.01
	Ultraflo	Carbohydrase	37.50±2.12	54.60±0.02	25.96±1.56	1.36±0.07	0.17±0.02
	Termamyl	Carbohydrase	23.00±0.87	47.74±0.00	29.86±0.07	1.11±0.14	0.35±0.00
	Flavourzyme	Proteinase	47.00±0.87	36.64±0.01	33.45±4.76	1.66±0.21	0.20±0.00
	Neutrase	Proteinase	38.50±0.87	55.74±0.00	25.65±0.35	1.76±0.35	0.10±0.01
	Protamex	Proteinase	45.00±0.00	54.60±0.01	23.62±0.08	1.46±0.21	0.27±0.02
	Alcalase	Proteinase	47.00±0.87	38.47±0.00	25.66±4.99	1.71±0.00	0.17±0.03
*2D.W	-	20.50±0.00	51.40±0.00	25.55±0.47	1.96±0.07	0.28±0.02	

* *1NT2(High-temperature resistant strain), *2DW(No added enzyme)
 • Solvent of all samples are D.W
 • 20mg(s) + 30mL(DW)

- 위의 결과에서 다양한 효소 추출물에서 우수한 Alkyl 라디칼 소거 활성과 단백질, 다당류, 폴리페놀 성분이 다량 함유되고 있는 결과를 확인 할 수 있었음
- 특히, Neutrase로 가수분해한 NT2 (고온내성) 김에서 높은 단백질 함량과 Alkyl 라디칼

소거활성을 나타내는 결과를 확인하였음

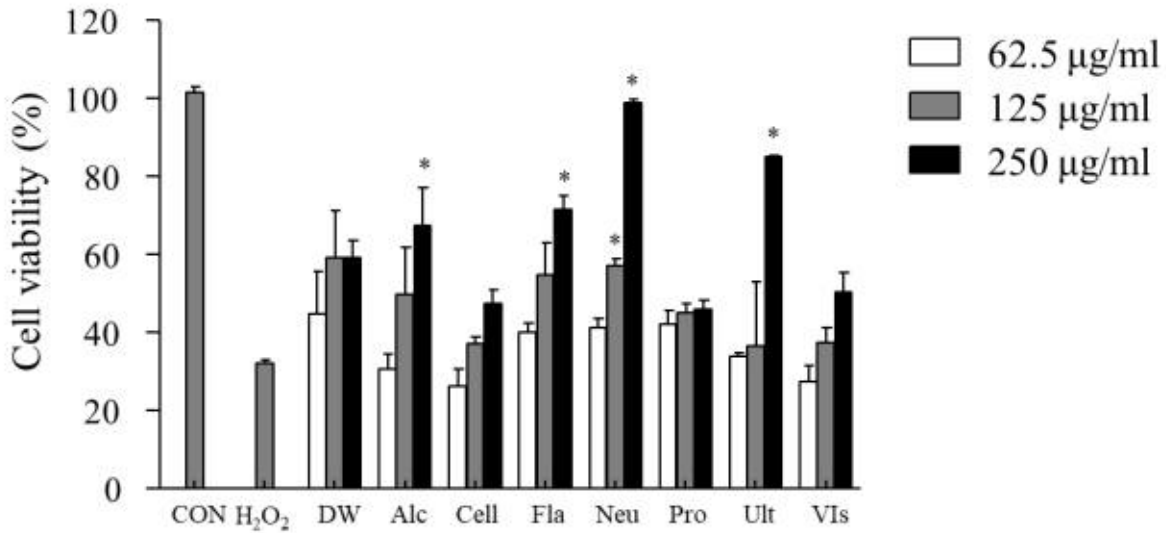


그림37. 제브라 피쉬 모델에서 H₂O₂로 유도한 세포 사멸로부터 NT2 (고온내성) 김의 보호효과

- NT2 (고온내성) 김 가수분해물의 H₂O₂로 유도한 세포 사멸로부터 NT2 (고온내성) 김의 보호효과를 MTT 실험 방법을 통하여 확인한 결과, 김을 효소 가수분해물에서 보호효과를 나타내었으나, 특히 고온 내성 김을 Neutrase로 가수분해 하였을 때 H₂O₂ 로 유도한 세포 사멸을 농도 의존적 보호 해주는 효과를 확인할 수 있었음

표7. NT2 (고온내성) 김을 원료로 Neutrase 가수분해물의 일반 성분 및 분자량 (10 kda 이하.이상) 의 항산화 활성

Sample	Classification	Proximate composition (%)			ROS scavenging activity (IC ₅₀ - mg/mL)		
		Protein	Polysaccharide	Polyphenol	Hydrogen peroxide	DPPH	Alkyl
	Extract	57.70±0.94	25.65±0.35	1.76±0.35	0.48±0.11	0.60±0.09	0.36±0.01
*NT2	Above 10 kDa	48.80±0.31	37.24±2.17	0.41±0.40	1.66±0.54	0.46±0.00	0.28±0.00
	Below 10 kDa	76.60±0.94	4.18±0.17	1.54±1.20	0.23±0.80	0.27±0.01	0.18±0.01

* *NT2(High-temperature resistant strain).

- NT2 (고온내성) 김 Neutrase 가수분해물을 10 kDa 이상, 이하를 한외여과막을 이용하여 분리하여 일반 성분 조성과 항산화 효과를 탐색하였음
- 그 결과로 고온내성 김 Neutrase 가수 분해물의 10 kDa 이하에서 단백질 함량이 가수분

해물보다 함량이 증가하였으며, 항산화 활성 (Hydrogen peroxide, DPPH radical, Alkyl radical) 소거 활성이 가수 분해물과 10 kDa 이상보다 우수한 것을 확인 할 수 있었음

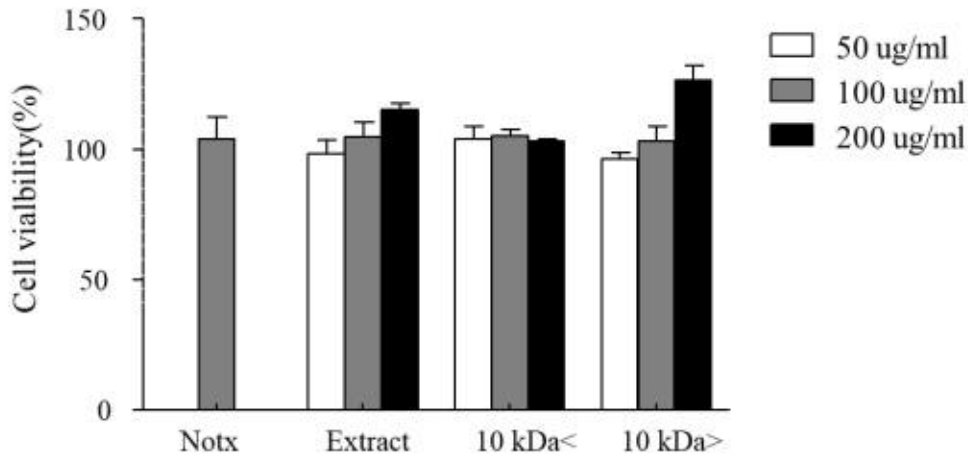


그림38. NT2 (고온내성) 김을 원료로 Neutrased 가수분해물과 10 kDa 이상, 이하의 세포독성

○ NT2 (고온내성) 김을 원료로 Neutrased 가수분해물과 10 kDa 이상, 이하의 샘플에서 세포 독성이 나타나지 않는 것을 확인 할 수 있었음

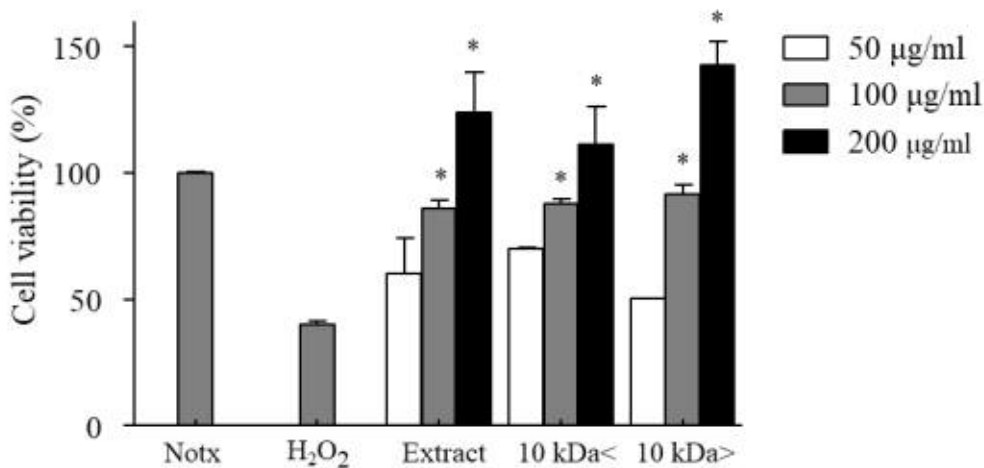


그림39. NT2 (고온내성) 김을 원료로 Neutrased 가수분해물과 10 kDa 이상, 이하의 세포 사멸 억제 효과

○ NT2 (고온내성) 김을 원료로 Neutrased 가수분해물과 10 kDa 이상, 이하의 샘플의 하이드로젠 퍼록사이드 (H₂O₂)로 산화적 스트레스를 유도하였을 때 가수분해물과 10 kDa 이상, 이하의 샘플에서 우수한 산화적 스트레스로부터 세포사멸을 보호하는 효과를 나타내는 결과를 확인할 수 있었음

○ 위 결과를 종합하여봤을 때, NT2 (고온내성) 김을 원료로 Neutrased 가수분해물과 10 kDa 이상, 이하의 항산화 활성은 10 kDa 이하의 샘플에서 단백질 함량이 높아짐에 따라서

DPPH, Alkyl 라디칼 소거 활성이 높아지고 세포 내에서 보호효과가 우수한 결과를 확인할 수 있었음

- 따라서 고온 내성 (NT2) 김의 원료에서 Neutralse로 가수분해하고 10 kDa 이하의 샘플은 우수한 항산화 효과를 가지고 있으며, 이를 이용한 기능성 식품, 기능성 화장품으로 충분히 응용가능할 것이라고 사료되어짐

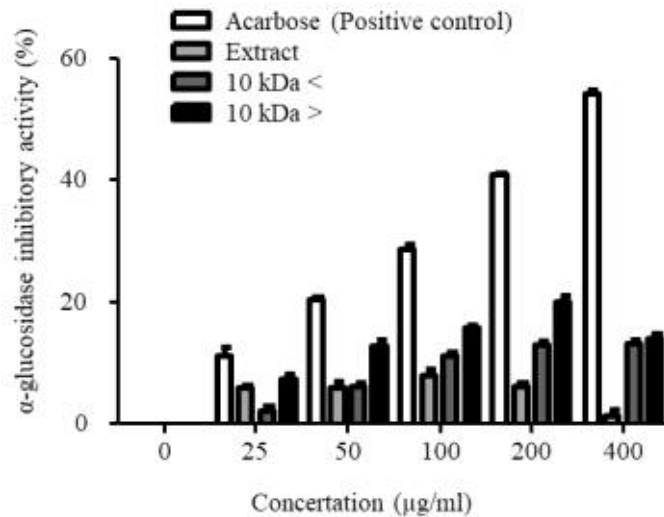


그림40. NT2 (고온내성) 김을 원료로 Neutralse 가수분해물과 10 kDa 이상, 이하의 항당뇨 효과 (α-glucosidase 효소 저해 활성)

- 위의 결과에 α-glucosidase 효소 저해 활성을 측정하였을 때, positive control (Acarbose)의 억제 활성에 미치지 못하는 못하였지만 10 kDa 이하 원료에서 농도 의존적으로 증가하는 억제 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었음

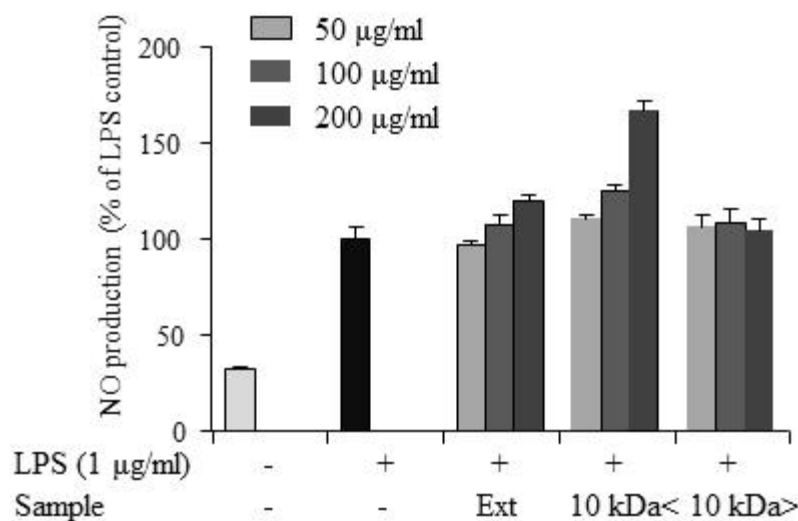


그림41. NT2 (고온내성) 김을 원료로 Neutralse 가수분해물과 10 kDa 이상, 이하의 항염증 효과

- NT2 (고온내성) 김을 원료로 Neutrase 가수분해물과 10 kDa 이상, 이하의 항염증 효과를 측정하였을 때, 항염증 효과가 모든 샘플에서 항염증 효과가 미비한 결과를 확인 할 수 있었음
- 따라서, 이 연구에서는 고온내성 김에서 항염증과 항당뇨 효과는 미비하였으나 NT2 김 추출물에서 10 kDa 이하에서 우수한 항산화 효과가 나타나는 결과를 확인할 수 있었음
- 추후 고온 내성 김의 아미노산 구성성분 분석과 이에 대한 생리 활성 실험을 세포 와 제브라 피쉬 모델을 이용하여 진행할 예정에 있음

[3차년도]

1. 내병성 김 종자 개발

가. 김 대표적 3대 질병인 낭균병, 붉은갯병, 녹반병 질병 진단기술 개발

- 채집된 원인균주의 분리 및 배양을 위해 갯병 배양의 최적조건에 종류별 갯병 균주에 각각의 배양 배지인 PES medium, Arasaki medium를 사용하여 배양 하였고 바이러스성 갯병인 녹반병은 동결보존을 통한 균주 보존배양을 하였음
- 배양온도는 낭균병 20℃, 녹반병 -40℃, 붉은갯병 15℃에서 균주 배양중이며 장기보존이 어려운 경우 원인균주의 숙주인 김 염체에 계대 배양하여 감염균주를 유지하였음
- 각각의 갯병의 균주는 조건별 실험에 사용하기 위해 감염 균주가 출현하지 않는 4월부터 10월 까지 숙주인 김 염체를 일정기간별로 교체하여 보존하였음

표1. 원인균주 종별 리스트

Strain No.	Strain	종명	Collecting Site
1	붉은갯병 (<i>Pythium</i> sp.) - 1	<i>Pythium</i> sp. (SC)	충남 서천
2	붉은갯병 (<i>Pythium</i> sp.) - 2	<i>Pythium</i> sp. (JD)	전남 진도
3	<i>Dendryphiella</i> sp.	<i>Dendryphiella salina</i>	일본 무로란
4	낭균 (<i>Olpidiopsis</i> sp.) -1	<i>Olpidiopsis</i> sp.(<i>porphyrae</i>)	충남 서천 전남 진도
5	낭균 (<i>Olpidiopsis</i> sp.) -2	<i>Olpidiopsis pyropiae</i>	충남 진도
6	낭균 (<i>Olpidiopsis</i> sp.) -3	<i>Olpidiopsis</i> sp.(<i>koreanum</i>)	충남 서천 전남 해남
7	낭균 (<i>Olpidiopsis</i> sp.)	<i>Olpidiopsis</i>	영국 스코틀랜드

	-4	sp.(<i>scotiae</i>)	
8	녹반병(GSD) -1	PyroV1-JD	진도 회동
9	녹반병(GSD) -2	PyroV1-SC	충남 서천
10	녹반병(GSD) -3	PyroV1-HN	전남 해남
11	녹반병(GSD) -4	PyroV1-WD	전남 완도
12	녹반병(GSD) -4	PyroV1-NL	뉴질랜드
13	<i>Licmophora flabellata</i>	<i>Licmophora flabellata</i> 규조류	충남 서천
14	<i>Navicula</i> sp.	<i>Navicula</i> sp.(Tube-dwelling) 규조류	충남 서천

- 식물에서는 질병에 대한 방어 기작으로 세포내 활성산소를 생성함. 활성산소는 세포 외/내 부에서 질병원에 대한 직접적인 방어와 신호전달 물질로서 역할을 함
- PyroV1(녹반병 바이러스)감염에는 뚜렷한 패턴은 나타나지 않았으며 참김에선 갯병 질병원에 반응하여 활성 산소를 생성하지만 질병 감염의 전파를 막을 만큼 영향을 끼치진 않는 것으로 확인됨
- DCFH-DA 염색을 이용하여 3가지 갯병균에 감염된 *P. yezoensis*를 관찰한 결과 많은 양의 활성산소종을 축적하는 것으로 확인됨



그림1. 낭균의 감염과정 모식도

- 김이 낭균에 노출되었을 때, 유주자에 감염된 세포는 엽록체가 붕괴되고 유주자낭이 생성되며 그 주변 세포는 액포가 팽창되거나 일부 세포는 세포자살의 형태를 보임

낭균의 감염 형태 및 특성

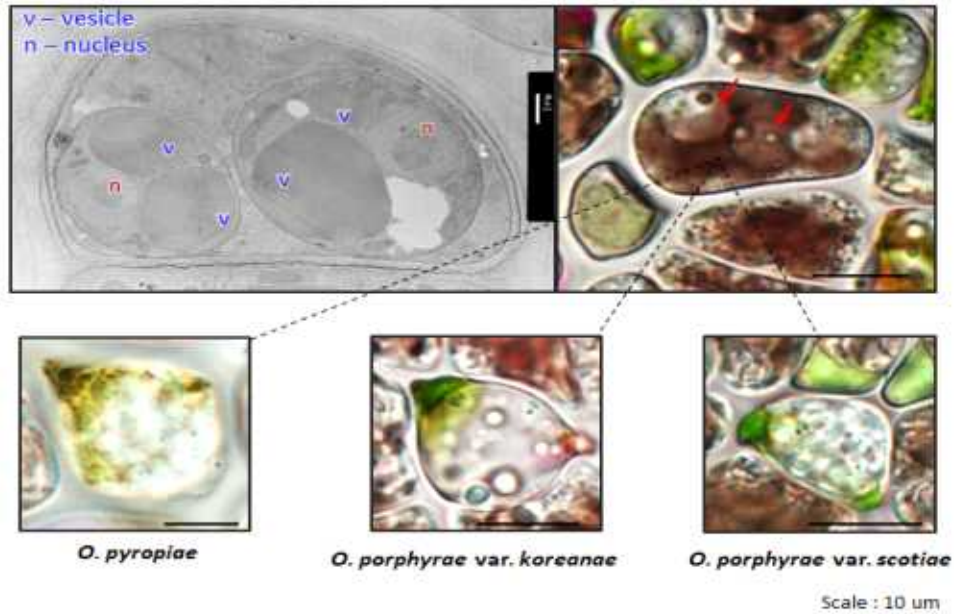


그림2. 낭균 3종의 초미세구조 및 감염 특성

- *O. pyropiae*와 *O. porphyrae*의 초미세구조는 매우 유사하지만 감염특성은 매우 상이하고 *O. pyropiae*는 *O. porphyrae*와 비교하여 감염 속도가 더 빠르며 숙주 세포에 갈색의 입자가 형성되며 *O. porphyrae*에 감염된 김 세포는 녹색의 입자를 형성함

감염 시간에 따른 감염세포 수

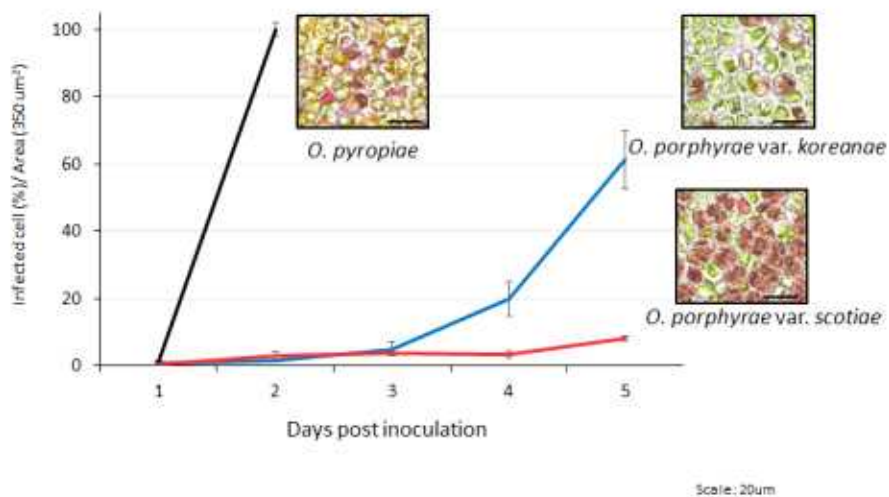


그림3. 낭균의 감염패턴 분석

- 3종의 낭균 균주의 감염 패턴을 분석한 결과 *O. pyropiae*에 감염된 김 엽체는 48시간 이내에 전체 세포가 감염되었고 *O. porphyrae var. scotiae*는 감염 180시간 후에도 김 엽체의 10%만을 감염시켰으며 숙주와 오랜시간 공존할 수 있음을 나타내고 *O. porphyrae var.*

*scotiae*에 감염된 김에서는 많은 수의 사세포가 관찰되는데 이는 병원체에 대한 방어반응의 결과로 판단됨

낭균의 교차감염

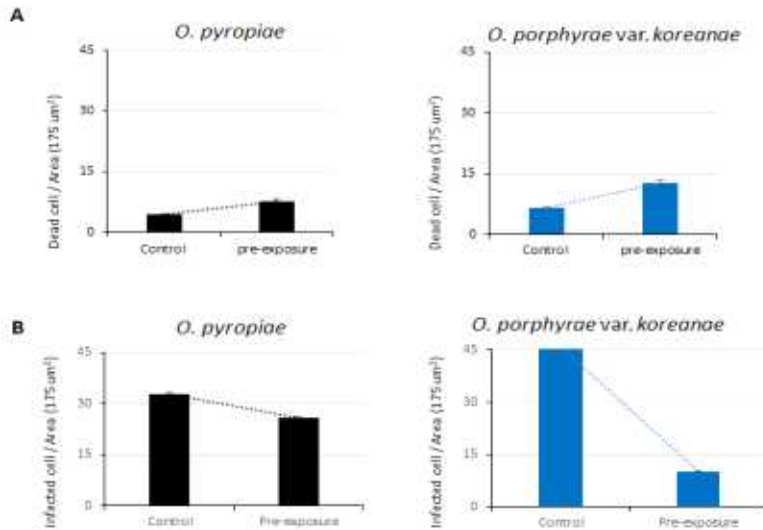


그림4. (A)사세포율, (B)감염률

낭균에 감염된 방사무늬김의 활성산소종 생성 특성

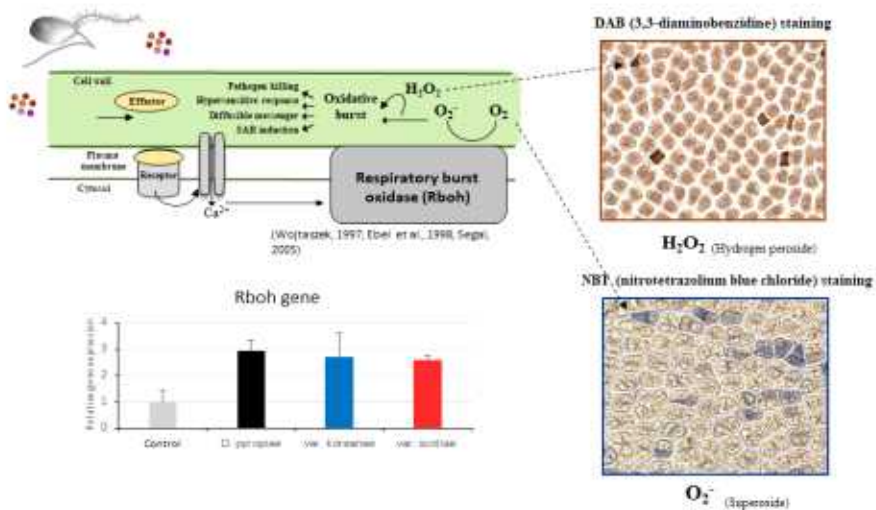


그림5. 조직화학적 염색을 통한 활성산소종 탐지

- *O. porphyrae* var. *scotiae*에 미리 노출된 김은 *O. pyropiae*와 *O. porphyrae* var. *koreanae*에 감염되었을 때 세포사멸이 증가하고 감염률이 감소되는 것으로 나타남. 이러한 결과는 방사무늬김이 세포사멸을 이용한 병원체 방어기작을 가지고 있으며 이는 elicitor에 의해 프라이밍 되는 것으로 판단됨

- 낭균에 감염된 방사무늬김의 활성산소종 생성 특성을 분석한 결과 많은 양의 hydrogen peroxide와 Superoxide가 생성 및 축적되었음. 또한 3종의 낭균에 감염된 방사무늬김은 respiratory burst oxidase 유전자의 발현이 control과 비교하여 2배이상 증가하는 것으로 나타남

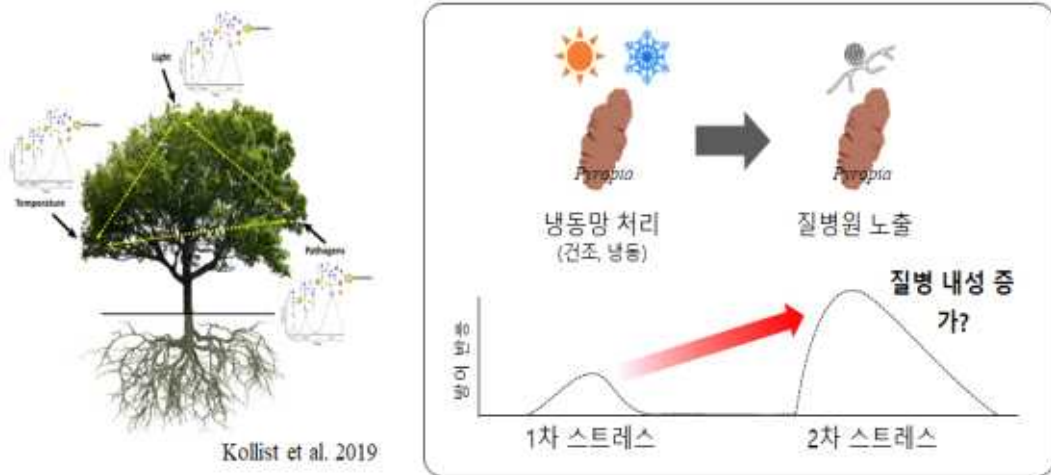


그림6. 냉동망 처리와 갯병의 상관관계

- 김은 강한 환경 내성을 가지고 있어 조건대 생장과 지주식 양식이 가능하며 특히, 김은 건조와 저온 스트레스에 매우 강한 내성을 갖고 채묘 후 유엽이 자란 김망을 건조하여 냉동 보관하는 기술로 채묘시기에 상관없이 김의 이모작이 가능하며 갯병, 황백화 및 태풍과 같은 해황 변화에 대비할 수 있음
- 일본의 경우 1960년대 냉동망이 최초로 개발되었으며 어민들이 직접 제작하며 사용률이 높지만 국내는 1980년대 후반 김 냉동망이 최초로 보급되었으며 기업 중심의 냉동망 제작으로 사용률이 낮고 일본과 비교하여 냉동망 기반 연구가 부족한 실정임
- 세포생리학적 기전 연구와 최적 냉동 기술 확립을 통해 활용 가능성을 높일 수 있을 것으로 판단되며 식물은 서로 다른 스트레스에 대한 방어 메커니즘을 공유할 수 있고 김의 냉동망 처리는 질병 스트레스 내성을 변화시킬 수 있을 것으로 기대됨

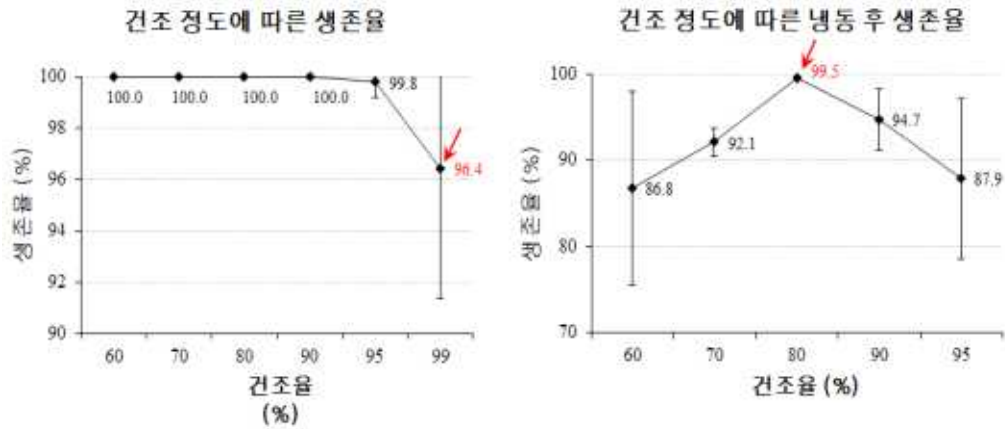


그림7. 건조와 냉동 처리 후 생존률

- 방사무늬김은 극도의 건조(95% 이상)에도 높은 생존율을 보이지만 80% 건조에서 냉동 후 생존율이 가장 높게 나타났으며 이는 방출된 각포자가 일정량의 수분함량을 요구하는 것으로 판단되고 냉동기간과 냉동온도 및 해동 방법에 따라 상이하게 나타날 수 있다고 판단됨
- 냉동전 전처리에 있어 탈수 방법에 대한 연구가 필요하다고 판단되고 수분함량을 적정량 유지 할 수 있는 시약 개발 및 방법론 개발연구가 필요한 실정임

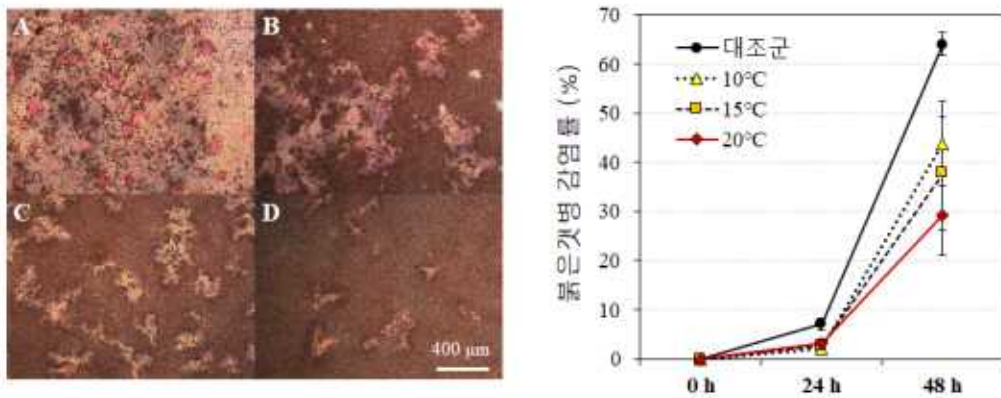


그림8. 건조 과정의 온도가 붉은갯병 감염에 미치는 영향

- 건조 후 냉동 실험에서 건조 온도가 높을 수록 붉은갯병 감염률이 감소하는 것으로 보아 김의 환경, 질병 프라이밍 공유는 고온 스트레스 관련 유전자를 포함할 수 있을 것으로 생각됨

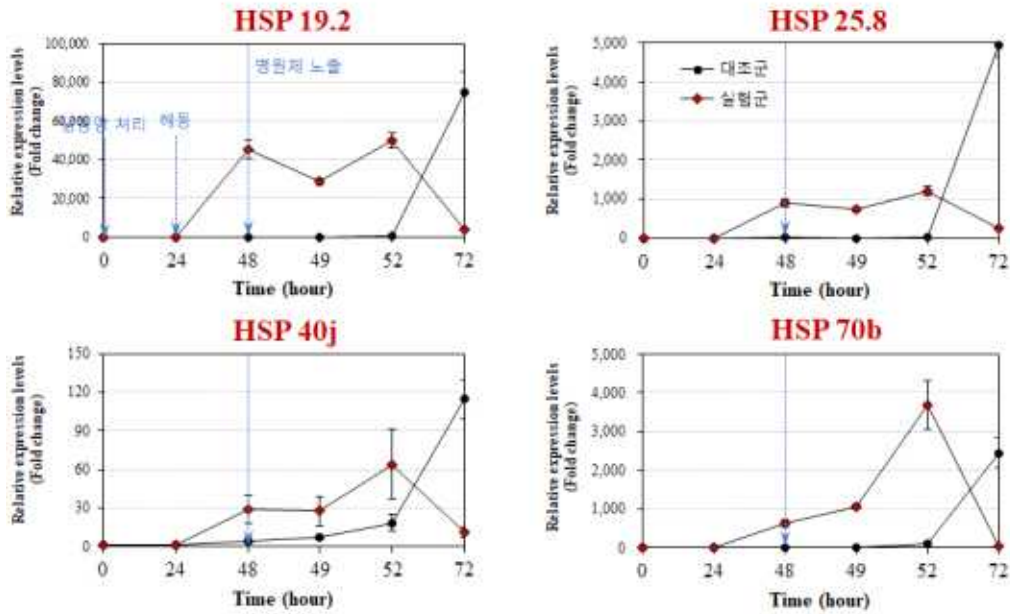


그림9. *P. yezoensis*의 HSP gene의 q-PCR 결과

- 난균류 병원체에 감염된 방사무늬김의 microarray분석 결과 heat shock protein 유전자 중 다수가 각 질병 감염에서도 높게 발현되며 냉동 전처리를 한 방사무늬김에서는 붉은갯병 감염시 HSP 유전자가 대조군에 비해 빠르게 증가하였음

유기산 처리를 통한 감염 저해 효과 관찰



그림10. 유기산 6종의 붉은갯병 방제 효과

- 붉은갯병과 낭균병은 감염 기작과 특성이 상이하지만 구분된 방제방법 없이 산처리에 의존하지만 갯병에만 효과적인 산처리는 다른 갯병의 확산을 도울 수 있으므로 복합적인 활성처리제 개발이 필요함

- 현재 국가고시에 의해 활성처리제에 들어갈 성분은 유기산 10%이상 염산 함량 9.5% 이하로 엄격히 규제되고 있으며 pH가 가장 낮은 구연산 및 타타르산 처리구에서 가장 낮은 방제 효과가 관찰되었고 프로피온산과 젖산에서 가장 높은 효과가 관찰되었으며 이러한 결과는 유기산 질병방제 효과는 pH보다는 화학적 특성에 의존한다는 것을 나타냄

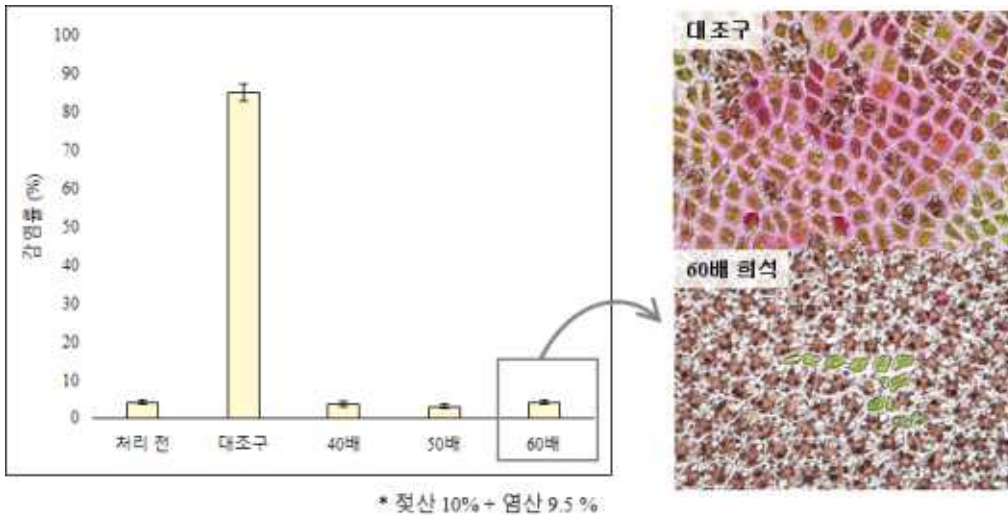


그림11. 젖산과 염산의 희석 농도에 따른 붉은깃병 방제효과

- 고시에 맞추어 젖산 10%와 염산 9.5%를 혼합하여 일반적으로 사용되고 있는 활성처리제의 희석농도(20배)에서부터 60배 희석한 농도에서까지 뚜렷한 질병방제 효과를 나타내는 것을 확인하였고 대조구는 감염이 계속 진행되어 살아 있는 세포를 거의 볼 수 없는 반면 처리구는 감염이 멈추고 추가적인 감염이 이루어지지 않는 것으로 나타남

프로피온산+염산의 희석농도에 따른 효과

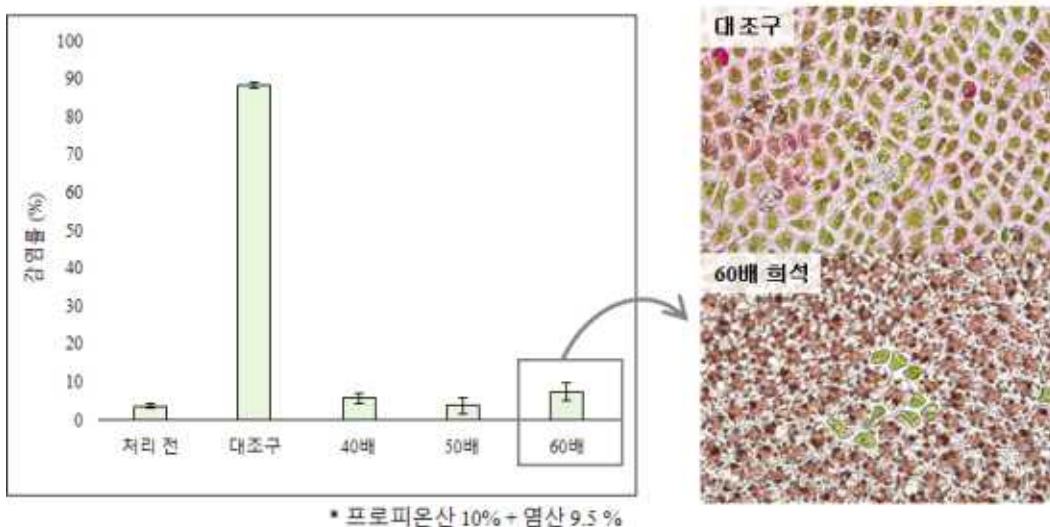


그림12. 프로피온산과 염산의 희석농도에 따른 붉은갯병 방제 효과

- 프로피온산과 염산을 혼합한 경우에도 최대 60배 희석한 농도에서도 질병방제 효과가 뚜렷하였으며 추가적인 감염 또한 저해되는 것으로 나타났음, 이는 프로피온산과 염산의 혼합에 있어 화학적 출동을 일으키지 않는 것으로 판단됨

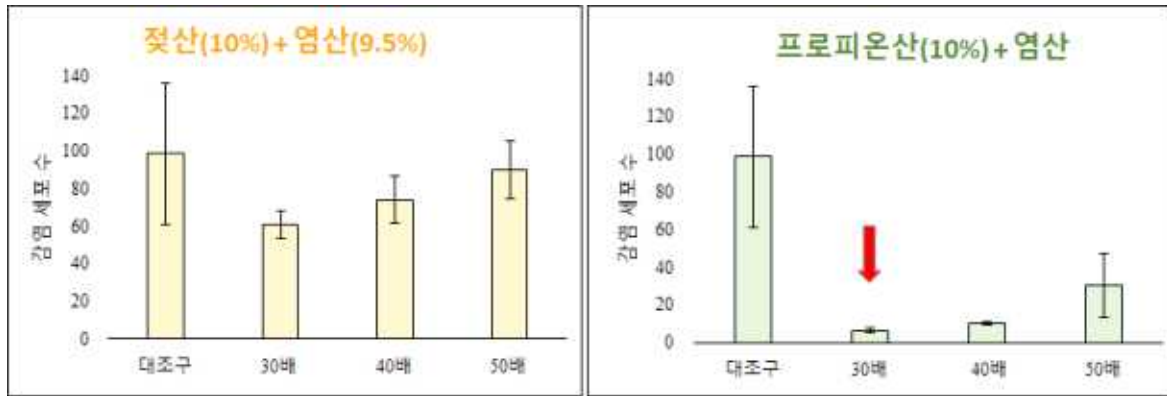


그림13. 젖산과 프로피온산의 낭균병 저해 효과

- 젖산과 염산이 혼합된 처리제는 낭균병 방제에 큰 효과가 없었으나 프로피온산과 염산을 혼합한 처리제는 뚜렷한 방제 효과를 나타냈으며 이러한 결과를 종합하여 낭균병 방제는 프로피온산, 붉은갯병 방제는 젖산 혼합액이 적절할 것으로 생각됨

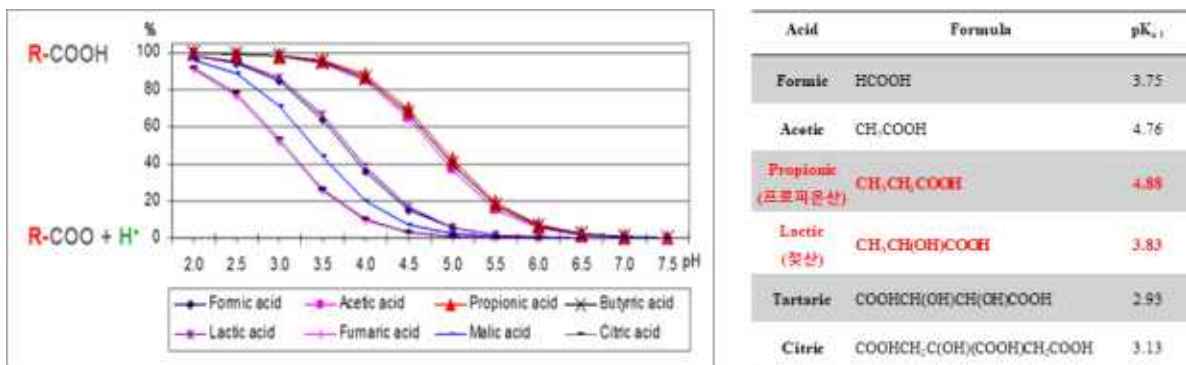


그림14. 유기산 6종의 pH에 따른 해리도

- 일반적으로 균은 산성 용액에서 사멸하거나 성장이 저해됨. 해리 상태의 이온은 세포막을 투과할 수 없기 때문에 난균류와 같은 두꺼운 세포벽을 갖는 병원균의 성장은 비해리 유기산에 의해 사멸되거나 성장이 저해될 수 있음
- 비해리 상태의 유기산은 세포막을 쉽게 통과할 수 있기 때문에 높은 산성도를 갖는 무기산에 비해 병원균을 더욱 효과적으로 제어할 수 있으며 프로피온산과 젖산은 pKa값이 높아 pH값이 높아져도 비해리된 유기산의 비율이 높아 6종의 유기산 중 프로피온산과 젖산은 비해리된 산에 의해 붉은갯병과 낭균병 방제에 대한 높은 효과를 나타내는 것으로 판

단됨

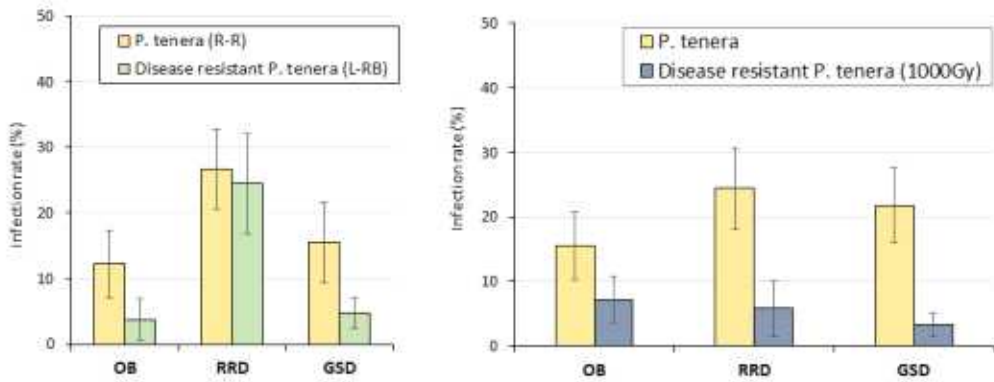


그림15. 감염성 갯병에 대한 내병성 테스트

- 우리나라에서 발생하는 세가지 감염성 갯병에 대한 내병성테스트를 수행한 결과 낭균병과 녹반병에 높은 내병성을 보였으나 붉은갯병에는 내병성을 보이지 않은 반면 돌연변이육종으로 선발된 내병성 참김은 낭균병과 녹반병 뿐만 아니라 붉은갯병에도 내병성을 갖으며 특히 바이러스성 갯병인 녹반병에 대해 높은 내병성을 보임

나. 순계주 유지 및 보존

(1) 유리사상체 순계

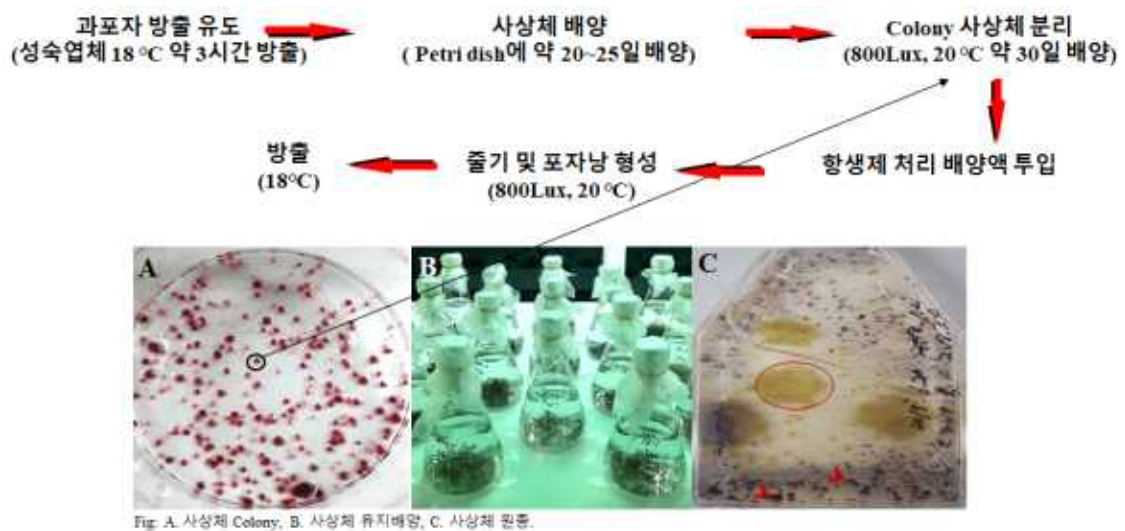


그림16. 개발품종 골드1호의 유리사상체

- 개발품종 골드1호의 1차 순계과정은 개발품종의 유성생식 엽체를 확보하여 무성생식(단포자 방출)을 두 번에 걸쳐 유도함

- 두 번의 무성생식 과정을 거친 개발품종 골드1호는 마지막 단계(두번째 무성생식)의 엽체를 확보하여 수온 18℃~20℃에서 유리사상체를 유도함
- 약 60일 후 유리사상체가 유도되었으며 이를 따로 분리하여 사상체 순계주를 확보하였고 20℃에서 정지 배양함

(2) 유리사상체 대량배양

- 개발된 내병성 품종 골드1호의 사상체 대량배양을 위해 150~500 μ m 내외의 크기로 분쇄되었으며 분쇄
- 사상체는 각각 0.5g씩 수온 18℃~20℃, 조도800lux~1800lux 조건에서 각각의 통기배양기에서 배양함
- 사상체 보존 시 각포자낭의 형성을 제어하기 위해 정지배양 하였으며 분양시기 60일 전 통기배양을 통해 대량배양을 실시함

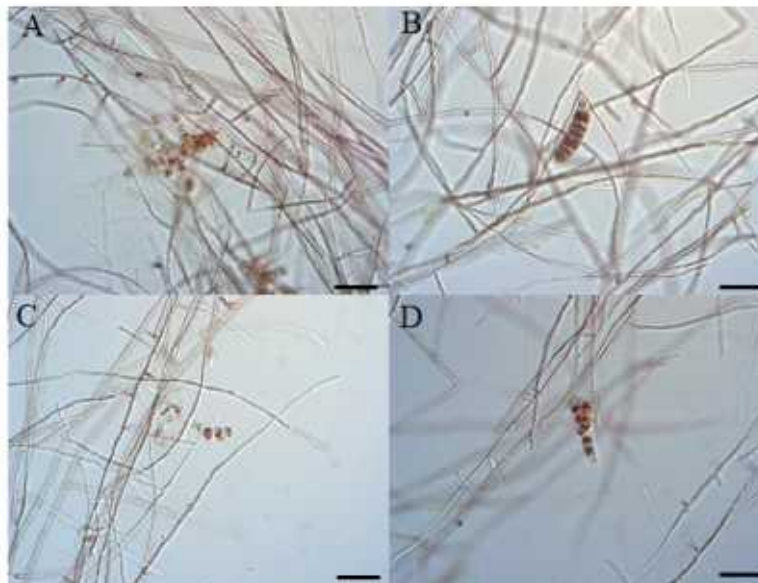


그림17. 개발품종 골드1호의 유리사상체

- 순계를 통해 방출된 유성생식 엽체는 일정한 패턴을 가지는 형태를 나타내며 이는 순계를 통해 후세대 까지 품종의 안정성을 가짐



그림18. 개발품종 골드1호의 순계화된 엽체

다. 개발종자의 현장적용 시험 및 형질특성 조사

(1) 내병성 품종 “골드1호” 재배심사

- 골드1호의 품종 등록을 위한 재배심사는 “수산식물품종관리센터 규정에 의해 년 1기작 2회 반복으로 정해져 있으며, 현재 골드1호는 1년 차, 2년 차 재배심사를 마치고 2019년 10월 3년 차 재배심사 과정에 있으며 심사가 끝나는 2020년 3월 품종 등록 예정임

국립수산과학원 현지 재배심사 계획통보

- (1) 성 명 : 국립공주대학교 산학협력단
주 소 : 충남 공주시 공주대학교 56
대 리 인 성 명 :
주 소 :
작 물 명 : 방사무늬김
품 종 명 칭 : 골드1호 (영문명) Gold No. 1
(2) 번 호 : 2017-1

이 '골드1호'에 대한 심사를 다음과 같이 현지에서 실시키로 하고 그 계획을 통보하오니 현지 재배시험이 적절히 진행되도록 적극 협조하여 주시기 바랍니다.

다 음

1. 현지 재배시험 시기 : 2017년 4월 ~ 2018년 3월(1년차)
2. 현지 재배시험 장소 : 출원인의 종묘배양장 및 양식어장
3. 조사내용 및 방법 : 유엽의 길이 등 13개 형질
4. 기타 현지 재배시험에 필요한 사항 : 시료채취 시 출원인 협조 요청 가능

2017년 3월 16일


심 사 관 황 비 숙 

그림19. 2017년 내병성 품종 “골드 1호”의 품종 출원서

- 현재 “골드 1호”는 어가에 무료 분양 중에 있으며 생산량과 단가에 있어 높은 결과를 나타내고 있으며 매년 수요가 증가하여 사상체의 필요량이 증가하고 있음
- 품종의 등록까지는 2년 2기작의 시험양식과 2년 2기작의 재배심사를 거쳐야 가능하여 현재 골드1호는 2년의 시험양식 후 품종출원을 거쳐 3년 차 재배심사를 위해 해상채묘를 완료했음
- 골드1호의 3년 차 재배심사는 골드1호, 대조구 A, 대조구 B, 총 3종의 품종을 선정하여 진행되며 매년 01월 패각의 잠입과 패각의 배양과정, 환경조건을 1차 심사기준으로 두고 매년 10월 패각사상체를 이용한 해상채묘 후 월 2회 김발을 무작위 채취하여 심사 품종의 특성, 길이, 엽폭 등을 확인함



“맑은하늘 KOREA, 맑은 물은 HIGH”

국립수산물과학원



수산 국립공주대학교 산학협력단장
(경표)

제목 품종보호 출원품종(골드1호) 2년차 재배심사 수수료 납부 요청

1. 관련근거

- 가. 식물신물질 보호법 제30조(출원 품종 보호의 출원) 및 제30조(출원 품종 보호의 면제)
- 나. 식물신물질 보호법에 따른 품종보호료 및 수수료 징수규칙 제8조(출원 품종 보호료의 면제 및 반환) 및 제13조(수수료의 면제, 반환 및 대체)
- 2. 우리 센터에서는 2017년까지 국립대학교 산학협력단을 대학의 하부조직으로 판단하여 품종보호 관련 수수료를 징수하지 않았습니니다. 그러나 2018년부터 국립대학교 산학협력단은 독자적인 법인으로서 수수료 면제 대상에서 제외됨을 알려드립니다.
- 3. 이에 따라, 귀 대학에서 2017년 2월 24일 출원한 방사부리길 골드1호 외 2018년도 2년차 재배심사 수수료를 요청하오니 납부하여 주시기 바랍니다(단, 2017년까지 납부하지 않은 수수료는 소급하지 않음).
- 가. 수수료 내역

출원번호	품종명칭	출원일	수수료(원)
2017-1	골드1호	2017. 2. 24	2년차 심사료 : 500,000

※ 입금계좌 : 농협 301-0181-0839-11(국립수산물과학원 수산식물품종관리센터) 금

수산식물품종관리센터장



국립수산물과학원 수산식물품종 2018.4.9.
 사 김승우 전의장하청 김지현
 연락처
 시행 수산식물품종관리센터 (2018. 4. 9.) 발부
 742 김지현 전의장하청서 국립대도 130 국립수산물과학원 수산식물품종 http://www.nifs.go.kr
 후 88728 김지현 전의장하청
 연락처 061-280-5303 팩스번호 061-280-5555 / nifsgyu@korea.kr / 비공개18)
 “물 맑은 청정(Clean Ocean), 맛 좋고 영양은 높힌 우리 국립수산물”

그림20. 2018년 내병성 품종 “골드 1호”의 2년 차 재배심사 통보 공문



국립수산물과학원

수산물안전

수신 국립공주대학교 산학협력단장
(경유)

제목 김 출원품종 골드1호의 3년차 재배시험 추진

1. 관련근거 : 수산식물품종관리센터-013(2017. 03. 28.) 및 -211(2018. 01. 23.)
2. 우리 센터에서 방사우늬김 골드1호를 대상으로 1년차(2017년), 2년차(2018년) 재배 시험을 실시한 결과, 조사된 13개 항질 중에서 ‘유엽의 길이’만 구별성이 나타났으나 이 항질은 연차간 안정성이 없는 것으로 분석되었습니다.
3. 따라서 관련특성의 연차간 차이가 환경요인에 따른 것인지 여부를 연일하게 재검토 하기 위해서 3년차 재배시험을 추진하고자 하오니, 출원인께서는 재배시험이 원활히 진행될 수 있도록 종자배양장 및 양식어장 준비에 최선을 다해 주시기 바랍니다.
4. 또한, 「수산식물품종 보호법에 따른 품종보호료 및 수수료 징수규칙」에 따라 3년차 재배시험 수수료를 요청하오니 납부하여 주시기 바랍니다.
가. 수수료 내역

출원번호	품종명칭	출원일	재배시험 수수료(원)
2017-1	골드1호	2017. 02. 24.	3년차 : 500,000원

* 입금계좌 : 농협 301-0181-0835-11(국립수산물과학원 수산식물품종관리센터), 물.

수산식물품종관리센터장



국립수산물과학원
수산식물품종관리센터
주소: 충청남도 태안군 태안읍 남부리 130-1
전화번호: 061-280-5303 / 팩스번호: 061-280-5353 / niceguy@korea.kr / 비공개(5)
“ 청정우선(Clean Ocean), 국민의 물과 행복을 실현하는 국립수산물 ”

그림21. 2019년 내병성 품종 “골드 1호”의 3년 차 재배심사 통보 공문

- 재배심사를 위한 채묘과정은 1, 2차 년 심사와 동일한 방법으로 23℃에서 폐각사상체 전처리 과정을 거치고 해수의 흐름이 적은 조금기, 각포자 부착의 최적 수온 18℃에 겹장(10장)된 김발에 부착하였고 부착과 동시에 1차 배양장(포자구간)에 이식 하였으며 채묘 20일 후 유엽을 확인 할 수 있을 것으로 판단됨



그림22. 2019년 내병성 품종 “골드 1호”의 3년 차 재배심사 과정(해상채묘)

- 시험양식중인 골드1호는 2019년 10월 현재 포자배양구간에서 배양중이며 2019년 여름 폭염으로 인해 채묘시기 및 포자배양시기가 일부 늦춰졌고 이에 따라 골드1호의 수확 시기는 기존 매년 11월부터 이듬해 2월 중순에서 3월 중순으로 확대될 전망이다



그림23. 2019년 내병성 품종 “골드1호”의 패각사상체 및 채묘 김발

(2) 고온성 잇바디돌김 품종 “골드3호” 어가보급

- 현재 특허출원을 마친 고온성 잇바디돌김 신품종 “골드3호”는 어가에서 상당히 높은 관심을 보이고 있고 2018년 3월 출원을 마치고 현재 시험 분양중임
- 골드3호의 경우 기존 대조구(잇바디돌김)에 비해 온도 변화에 대한 내성이 높고 일반 잇바디돌김에 비해 30% 높은 고온내성을 가지며 기존 품종 대비 20-30% 이상 높은 생산성을 나타냄
- 신품종 잇바디돌김 “골드3호”는 2019년 5월 특허등록을 마쳤으며 2019년 9월에 서천에 위치한 (주)선진수산에서 채묘 후 -40℃에 냉동보관 후 해수온이 22℃로 떨어지는 시점에 포자구간에 유엽배양 후 각 지역 양식장에 보급하였음



그림24. 2019년 고온성 잇바디돌김 신품종 “골드3호”의 김밭과 엽체

- 2019년 골드3호의 총 채묘(육상채묘)량은 50m 김밭 약 17,000대 이며 이는 300ha. 의 규모로 서천, 군산, 경기지역에서만 약 200억 원의 골드3호 물김이 생산되는 규모임

- 2019년 9월 전국 각 지역의 양식장 (경기지역-선재도, 제주도, 국화도, 충남지역-서천)에서 양식중에 있고 기존품종에 비해 병에 강하고 생산량이 높아 어가 소득에 큰 기여를 할 것으로 판단됨



그림25. 2018년 고온성 잇바디돌김 신품종 “골드3호”의 기술 특허출원



그림26. 2019년 고온성 잇바디돌김 신품종 “골드3호”의 기술 특허등록증

- 신품종 잇바디돌김 “골드3호”는 양식이 끝나는 11월 중순 각 지역의 실험 데이터를 확보하여 DB 구축 후 2020년 신품종 잇바디돌김 “골드3호” 유리사상체를 전국으로 확대보급할 예정임
- 골드3호의 사상체는 2020년 총 1,000g 이상 분양 예정이며 패각 사상체의 양은 전남지역 약 5만 상자, 충남, 경기지역은 패각 사상체 약 10만 상자를 채묘 할 것으로 예상되고 2020년 패각 사상체 확대 보급을 목표로 하고 있음

(3) 황백화 내성 품종 특성 및 시험양식

- 황백화 내성 품종과 일반 방사무늬김과 질소결핍배지에서 황백화 내성 실험을 수행한 결과, 형태적으로 보았을 때 10일 후에 일반 김은 완전히 탈색되면서 황백화가 유도되는 반면, 개발 중인 내성 김은 더 안정적으로 유지됨. 물론 황백화 내성 김에서 처음보다 엽록체가 축소되고 색이 조금씩 연해지긴 했지만, 일반 김보다 좀 더 색이 안정적으로 유지되면서 느리게 진행되는 것이 확인됨
- 황백화 내성 품종과 일반 방사무늬김의 변화하는 색소체 단백질 유전자 발현을 비교 분석한 결과, phycobilisome 색소 관련 단백질을 구성하는 유전자들의 발현이 질소결핍배지에서 황백화 현상이 진행됨에 따라 감소하는 경향성을 보였으며 일반 방사무늬김에 비해 황백화 내성 김에서 높게 발현되는 것이 확인됨

사상체 분양

구분 (연도)	사상체 분양 내용	분양 업체	패각 사상체 생산량
3차년도 (2019)	사상체 1,200g	서천 ㈜선진수산	150,000 상자(1상자/40패각)
	사상체 700g	해남 믿음수산	87,500 상자(1상자/40패각)
	사상체 300g	진도 동해수산	37,500 상자(1상자/40패각)
	사상체 300g	진도 정가네수산	37,500 상자(1상자/40패각)

양식 면적

구분 (연도)	채묘업체	양식업체	양식면적
3차년도 (2019)	서천 ㈜선진수산	서천(마량) 삼호수산 외 15개 업체	200 Set(1 Set/60대)
		서천(비인) 동백수산 외 14개 업체	200 Set(1 Set/60대)
		개야도 한길수산 외 7개 업체	100 Set(1 Set/60대)
		선재도 4개 업체	30 Set(1 Set/60대)
		국화도 3개 업체	30 Set(1 Set/60대)
	동해수산, 믿음수산, 정가네 수산	전남 지역(진도, 해남, 고흥, 영암) 30개 업체	총 200 Set(1 Set/60대) 규모

그림27. 골드1,3호의 사상체 분양 현황

- 골드1, 3호는 물김 생산 후 서천에 위치한 ㈜선진수산 마른김 가공공장에서 마른김을 생산하였으며 2019-2020년 미국 및 중국, 동남아로 수출판매 (2019년 10월까지 820,092\$ (직접수출) 판매하였음
- ㈜선진수산 마른김 가공공장에서 골드1, 3호 마른김을 ㈜대천김에서 가공하여 2019년 10월 현재까지 총 1,334,212\$의 조미김을 수출하였음
- 12월까지 90만\$(직접수출) 예정이며 ㈜대천김에서 골드3호 상표 독점권 계약 실시하였고 (2018년 부터 2021년 까지) 대천김에서는 골드1호, 3호(특허출원, 등록) 조미김을 2018 하반기부터 상표등록 후 수출판매 하고 있으며 추후 수출 확대 예정에 있음
- 골드1, 3호는 2019년 10월까지(직, 간접 수출) 약 20억 원으로 집계 되었고 2019-2020년

골드1, 3호 사상체 확대 분양으로 수출 금액 100 억 원 달성 계획에 있음

골드 1호 마른김 수출 진행 상황(2019.10 현재)								
(직접수출 : 선진수산)								
품목	품종	연구 책임자	연구기관	수출 국가	수출 날짜	수출량(박스)	단가(속)	수출액(원)
김	골드1호	김광훈	공주대학교	중국	2019.04.26	62,208	5.4	335,923,200
소계						62,208		3억3천6백 만원
(간접수출 : 대천김)								
품목	품종	연구 책임자	연구기관	수출 국가	수출 날짜	건수		수출액(원)
김	골드1호	김광훈	공주대학교	중국	2019.01	10		53,091,777
					2019.02	15		66,545,227
					2019.03	10		79,418,001
					2019.04	19		148,050,894
					2019.05	16		300,843,244
					2019.06	13		253,289,715
					2019.07	17		452,425,382
					2019.08	8		178,648,208
					2019.09	15		227,306,656
					2019.10	9		225,761,704
소계						132		19억8천5백 만원

그림28. 골드1, 3호 가공김 수출현황

(5) 수출판매

- 골드 1호의 품종 수출을 위해 2019년 04월 국내 무역회사인 The L&K를 통해 중국 “중국 강소성 김양식산업단지”와 접촉하여 현지를 방문 1차 회의를 진행하였으며 회의에 참석한 결과 현지에서 골드1호의 가공품(마른김) 대한 큰 관심을 보여 2019년 7월 골드1호의 수출을 위한 협약체결을 하였고 2019년 11월 이후 년 간 100만불 규모의 마른김 및 가공김 수입 의사를 밝혔음
- 골드1, 3호의 마른김 수출 후 월 1회 중국 가공공장(위해, 강소성) 방문을 통해 조미김 가공에 따른 기술 지도와 현장 상황을 조사할 예정이며 현지 방문 비용과 체재비는 중국에서 부담할 예정임



그림29. 2019년 04월 중국 강소성 김 연구센터 현지답사

- 2019년 중국 강소성 김연구센터를 방문하여 가공(조미김)수입을 위한(중국 강소성) 협약체결을 하였으며 2020년 2월 골드1, 3호 마른김 수출 후 중국 현지에 맞는 조미법을 이용하여 가공 및 판매 예정임



그림30. 2019년 04월 중국 강소성 패각배양장 및 김 가공공장 현지답사

- 이로 인해 2020년 02월 골드1, 3호 마른김 및 가공김 중국 수출 예정이며 수출 규모는 적,

간접 수출로 약 50만 달러로 예상하고 있음

다. 내병성 및 고온내성 김 종자에 대한 기능성 식품 소재 가능성 평가

(1) 고온내성 (NT2) 김의 생리활성 성분 분석 및 기능성 평가

- 본 과제를 통해 개발된 고온내성 (NT2) 김 유래 다양한 효소 추출물 중 우수한 항산화 효능을 보인 Neutrase 가수분해물을 선정하고 한외여과막을 이용하여 분자량 (10 kDa 이하/이상) 에 따라 분리하고 이를 세포 및 체브라피쉬 모델에서 다양한 생리활성을 평가함
- 추후 실험에서는 고온내성 (NT2) 김 유래 Neutrase 가수분해물을 NAE (Neutrase assisted extract) 라고 하며 10 kDa 이상은 10A (10 kDa above), 이하는 10B (10 kDa below) 라고 표기함
- 한외여과막을 이용하여 NAE를 분자량 (10 kDa 이하/이상) 에 따라 분리하였으며 이를 SDS-PAGE를 통하여 확인함. 위의 결과에서 NAE의 경우 전체적으로 분포되는 것을 확인함. 한외여과막을 이용하여 분자량에 따라 분리한 경우, 10A는 분자량 10 이상에서 진한 파란색의 띠를 확인하였으며, 10B는 분자량 10 이하에서 진한 파란색 띠를 확인함

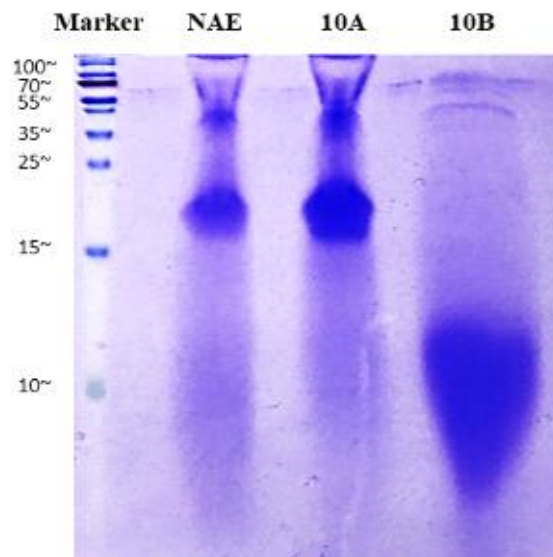


그림31. SDS-PAGE를 이용한 NAE, 10A, 및 10B의 분자량 확인

- 이를 통해 NAE가 분자량에 따른 분리가 잘 되었음을 확인하고 아미노산 구성성분 분석 및 추후 실험에 계속 사용함
- 아미노산은 단백질의 최소단위로 우리 몸을 구성하는 중요한 영양소로 필수 아미노산 함량은 식품 단백질의 영양적 가치 평가 기준으로서 매우 중요함. 이에 따라, NAE, 10A, 및 10B의 아미노산 구성성분을 통해 분자량에 따른 분리가 아미노산 함량 차이의 여부를 확인함

- 표1을 보시는 바와 같이, 전체적으로 10B의 아미노산 총 함량이 NAE보다 증가하는 것을 확인하였으며, 필수 아미노산 함량에서도 증가하는 것을 확인함. 이를 통해, 10B는 식품 단백질로서 영양적 가치가 있음

표2. NAE, 10A, 및 10B 의 아미노산 구성성분 분석

Amino acids	µg/mg		
	NAE	10A	10B
†CYA*	1.83	1.01	3.65
ASX**	44.67	29.20	48.18
GLS**	50.48	33.92	61.09
SER	22.27	15.39	30.07
GLY	29.99	20.96	44.50
†HIS	6.82	3.96	9.81
ARG	19.44	10.10	31.12
†THR	22.33	15.23	30.63
ALA	39.95	28.83	58.69
PRO	24.30	17.47	36.03
TYR	7.52	2.02	20.21
†VAL	29.09	18.53	35.39
†MET	11.08	6.58	16.54
†ILE	18.96	11.93	23.25
†LEU	32.17	20.74	40.97
†PHE	20.85	13.47	25.75
†TRP	1.63	0.60	0.43
†LYS	27.33	17.72	35.38
TOTAL	410.73	267.67	551.68

† Essential amino acids (Hou and Wu 2018)

*CYA mean the sum of cysteine &cystine

**ASX, GLX mean the sum of asparagine & aspartic acid, and glutamine & glutamic acid

- 위의 결과를 통해, NAE에서 분리된 10B를 선택하여 *in vivo* 실험으로 제브라피쉬 모델에서 항산화 효능평가를 수행함
- 실험동물모델로서 주목받고 있는 제브라피쉬는 질환 관련 유전자를 포함하여 적어도 70% 유전자가 인간과 동일하게 존재함으로써 질환 및 생리활성 연구모델로 적합함에 따라 본 연구에서 사용됨
- 제브라피쉬 모델에서 H₂O₂로 산화적 스트레스를 유도시키고 10B 처리에 따른 생존율을 측정 한 결과, H₂O₂만 처리한 군에서는 80% 이하의 생존율을 보이나, 10B를 농도별 (12.5, 25, 50, 및 100 µg/ml) 로 처리하였을 때, 농도의존적으로 90% 이상의 생존율을 확인함

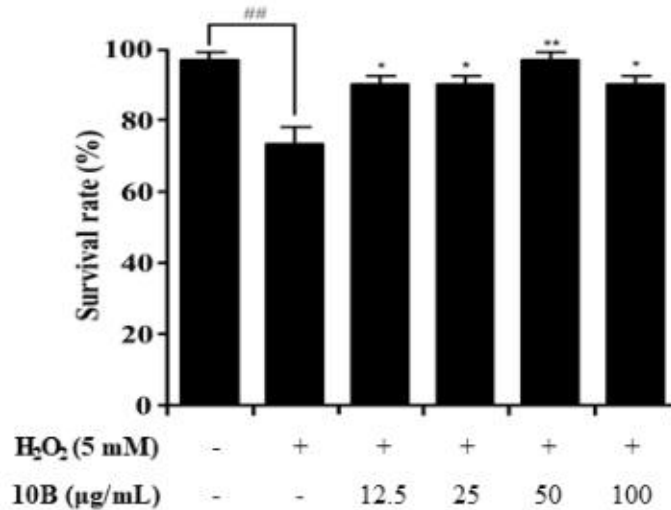


그림32. 제브라피쉬 모델에서 H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스로부터 10B 처리에 따른 생존율 변화

- 제브라피쉬 모델에서 H₂O₂로 산화적 스트레스를 유도시키고 10B 처리에 따른 심박수 변화를 측정된 결과, H₂O₂만 처리한 군에서는 90% 이하의 심박수를 보이지만, 10B를 농도별 (12.5, 25, 50, 및 100 µg/ml) 로 처리하였을 때, 농도의존적으로 90% 이상의 심박수를 증가시키는 것을 확인함

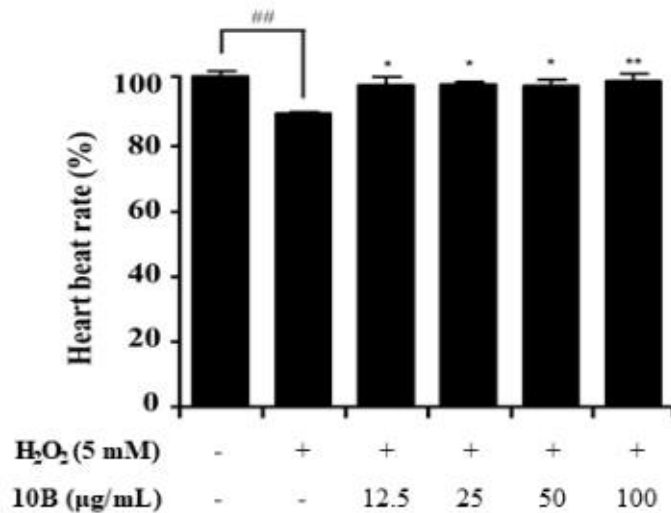


그림33. 제브라피쉬 모델에서 H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스로부터 10B 처리에 따른 심박수 변화

- 제브라피쉬 모델에서 H₂O₂로 산화적 스트레스에 의한 Reactive oxygen species (ROS) 생성량을 DCF-DA로 측정된 결과, H₂O₂만 처리한 군에서는 2배 이상의 ROS를 생성시키지만, 10B를 농도별 (12.5, 25, 50, 및 100 µg/ml) 로 처리하였을 때 농도의존적으로 ROS 생성을 억제시키는 것을 확인함. 특히, 100 µg/ml에서 Control군과 유사한 결과를 확인함

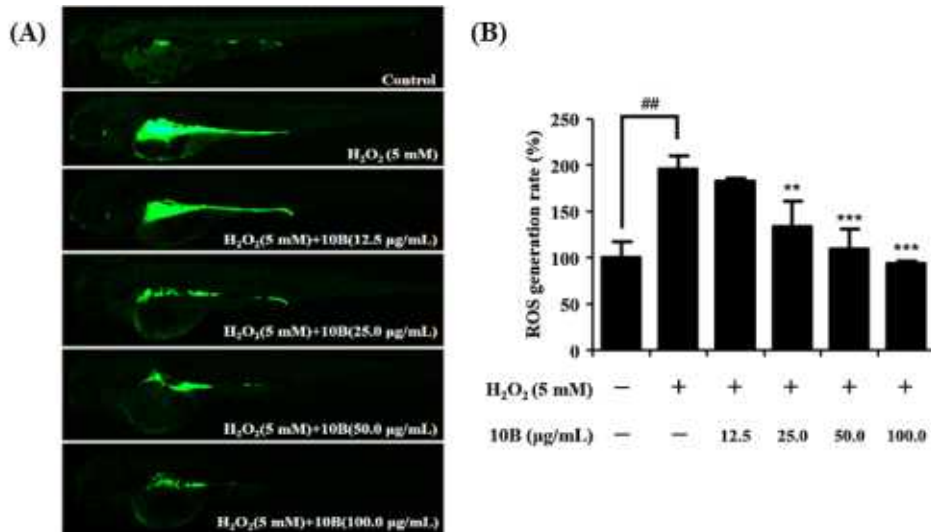


그림34. 제브라피쉬 모델에서 H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스로부터 10B 처리에 따른 ROS 생성량 변화 (A) 형광 발현 변화 (B) 형광 발현량에 따른 수치화

- 제브라피쉬 모델에서 H₂O₂로 산화적 스트레스에 의한 세포사멸을 Acridine orange 측정 한 결과, H₂O₂만 처리한 군에서는 2.5배 이상의 세포사멸이 유도되지만, 10B를 농도별 (12.5, 25, 50, 및 100 µg/ml) 로 처리하였을 때 농도 의존적으로 세포사멸을 억제시키는 것을 확인함, 특히, 100 µg/ml에서 Control군과 유사한 결과를 확인함

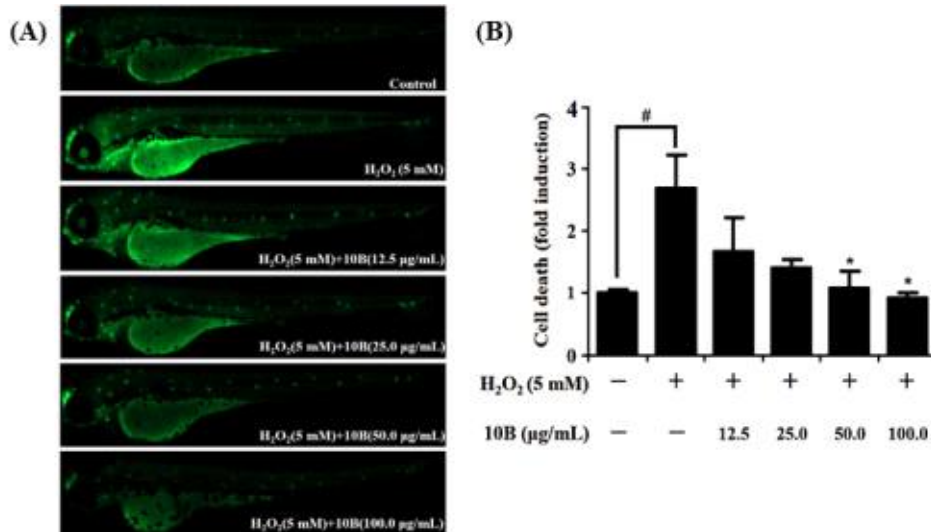


그림35. 제브라피쉬 모델에서 H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스로부터 10B 처리에 따른 세포사멸 변화 (A) 형광 발현 변화 (B) 형광 발현량에 따른 수치화

- 위의 결과를 종합하였을 때, 10B는 H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스에 의한 감소된 생존율과 심박수를 증가시키는 것을 확인함. 또한, 증가된 ROS 생성량 과 세포사멸을 감소시키는 것을 확인함

- 이를 통해, NAE로부터 분리된 10B는 산화적 스트레스에 의한 우수한 항산화 효능을 나

타내며 이는 잠재적으로 항산화제로서 산업적으로 기능성 식품 또는 화장품에 응용될 수 있을 것이라 사료되어짐에 따라 추후 에탄올에 대한 간보호, 고혈압, 항비만 및 화장품 관련 생리활성을 진행함

- 이전 연구에서 아미노산은 우수한 항산화 효능, 콜레스테롤 저하, 및 간기능 활성화 및 보호 효능이 있다고 보고됨. 이에 따라 아미노산 함량이 높고 우수한 항산화 효능을 보인 10B의 에탄올에 대한 간보호 효능을 제브라피쉬 모델에서 평가함
- 제브라피쉬 모델에서 에탄올 0.03%와 10B 처리에 따른 생존율을 측정된 결과, 에탄올만 처리한 군에서는 50%의 이하의 생존율을 보이나, 10B를 농도별 (12.5, 25, 50, 및 100 μ g/ml) 로 처리하였을 때, 농도 의존적으로 생존율이 증가하는 것을 확인함

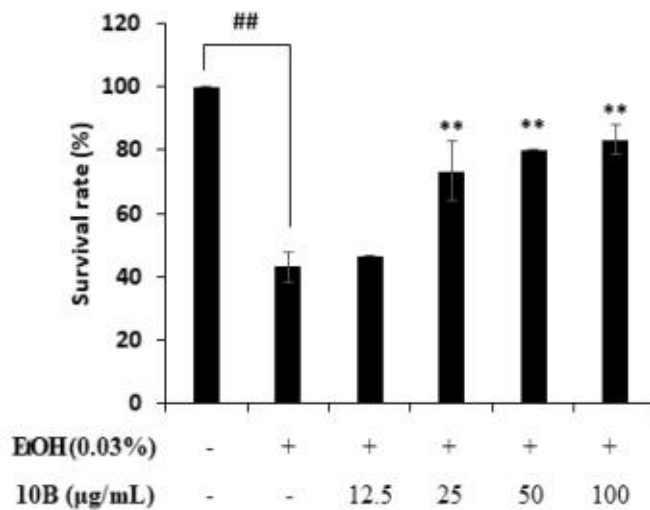


그림36. 제브라피쉬 모델에서 에탄올에 대한 10B 처리에 따른 생존율 변화

- 제브라피쉬 모델에서 에탄올 0.03%와 10B 처리에 따른 심박수 변화를 측정된 결과, H₂O₂ 만 처리한 군에서는 90% 이하의 심박수를 보이지만, 10B를 농도별 (12.5, 25, 50, 및 100 μ g/ml) 로 처리하였을 때, 농도 의존적으로 심박수를 증가시키는 것을 확인함

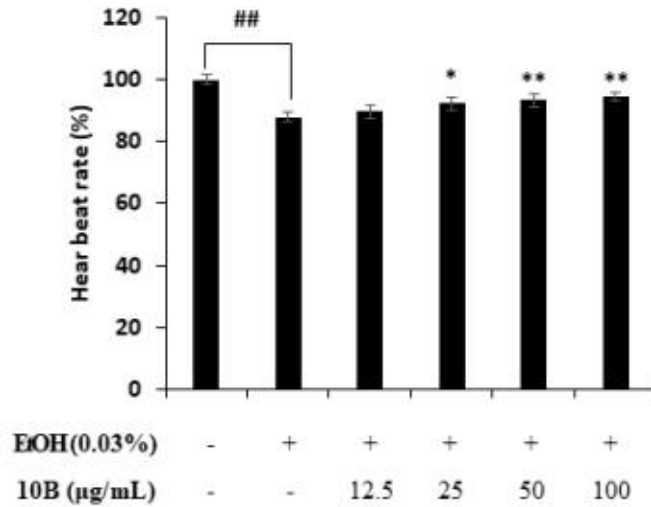


그림37. 제브라피쉬 모델에서 에탄올에 대한 10B 처리에 따른 심박수 변화

- 제브라피쉬 모델에서 에탄올로 산화적 스트레스에 의한 손상인 Reactive oxygen species (ROS) 생성량을 DCF-DA로 측정한 결과, 에탄올만 처리한 군에서는 2배 이상의 ROS를 생성시키지만, 10B를 농도별 (12.5, 25, 50, 및 100 µg/ml) 로 처리하였을 때 농도의존적으로 ROS 생성을 억제시키는 것을 확인함

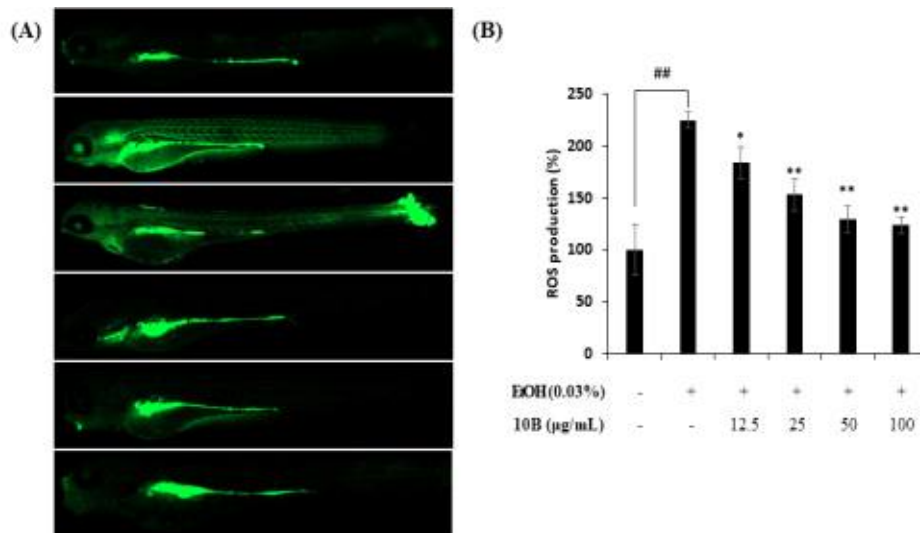


그림38. 제브라피쉬 모델에서 에탄올에 대한 10B 처리에 따른 ROS 생성량 변화

- 제브라피쉬 모델에서 에탄올로 산화적 스트레스에 의한 손상인 세포사멸을 Acridine orange 측정된 결과, 에탄올만 처리한 군에서는 1.5배 이상의 세포사멸이 유도되지만, 10B를 농도별 (12.5, 25, 50, 및 100 µg/ml) 로 처리하였을 때 농도 의존적으로 세포사멸을 억제시키는 것을 확인함

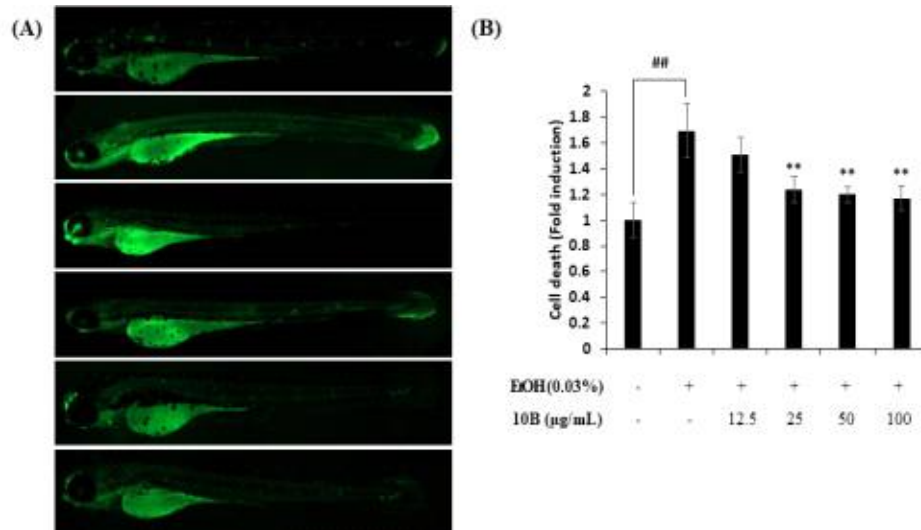


그림39. 제브라피쉬 모델에서 에탄올에 대한 10B 처리에 따른 세포사멸 변화

- 위의 결과를 통해 제브라피쉬 모델에서 에탄올로 산화적 스트레스에 의한 10B를 농도별 (12.5, 25, 50, 및 100 µg/ml) 로 처리하였을 때, 생존율, 심박수, ROS 생성량 및 세포사멸을 보호하는 것을 확인함
- 에탄올에 대한 보호 효능이 있음을 통해 추후 Glutathione (GSH) assay kit를 통해 간기능 정상화에 도움을 주는 GSH 수치 변화를 확인할 예정임
- 이전 연구에서 항산화 효능이 있는 김 유래 생리활성 물질이 항고혈압 효능이 있음이 보고되어짐에 따라 본 연구에서 우수한 항산화 효능을 보인 NAE와 분자량에 따라 분리된 10A 와 10B의 항고혈압 효능을 평가함
- 고혈압 치료제로 많이 쓰이는 Angiotensin converting enzyme (ACE) 억제제는 angiotensin I에서 angiotensin II로 생성되는 것을 억제함. ACE는 angiotensin I에서 angiotensin II로 변환시키며 이에 따라 생성된 angiotensin II는 혈압을 상승시킴
- 이에 따라 ACE kit를 사용하여 NAE, 10A, 및 10B의 ACE 억제 활성을 확인함. 그 결과, NAE, 10A 및 10B는 농도가 증가함에 따라 ACE를 억제시키며 각각의 IC₅₀ (µg/ml)값은 175.19 ± 0.03, 374.76 ± 4.06, 및 57.83 ± 0.39 로 나타남. 특히, 10B에서 낮은 IC₅₀ (µg/ml)값을 보임
- 이에 따라, 세포실험을 통해 항고혈압 효능 평가 및 아미노산 염기서열 분석을 통해 추후 Molecular docking 시뮬레이션을 진행할 예정임

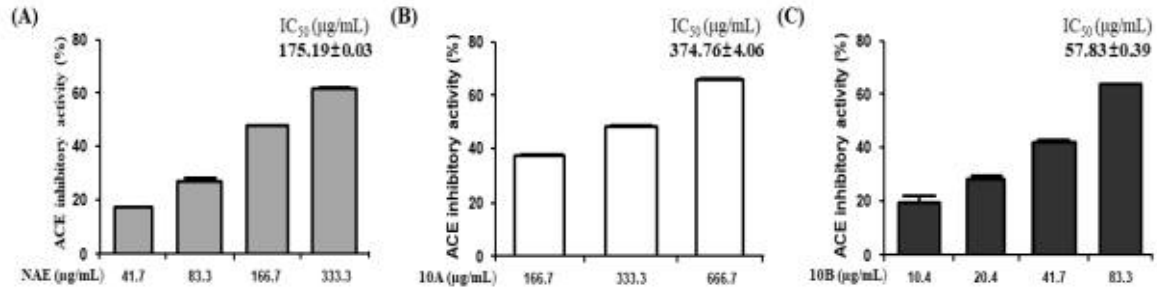


그림40. NAE, 10A, 및 10B의 항고혈압 효능 평가 (A) NAE, (B) 10A, (C) 10B

- 비만, 당뇨와 같은 대사성질환 진행에 영향을 주는 것이 산화적 스트레스라는 것을 통해 우수한 항산화 효능을 지닌 NAE, 10A, 및 10B 가 항비만 효능이 나타나는지 평가하고자 함
- 항비만 효능평가를 위해 지방세포인 3T3-L1 세포를 사용하였으며 분화를 통해 비만을 유도시켜 각 시료를 농도별 (50, 100, 및 200 µg/ml)로 처리하였을 때, 지방세포만 염색시키는 Oil red O staining 방법을 통해 지방 축적 억제 효능을 평가함
- 그 결과, 비만을 유도시킨 Control 군에서는 빨간색으로 염색된 지방이 축적된 것을 확인하였으나, 각 시료를 농도별로 처리하였을 때 빨간색이 줄고 지방 축적 억제 효능을 확인함. 특히, NAE에서 분리된 10B에서 지방 축적이 억제된 것을 확인함

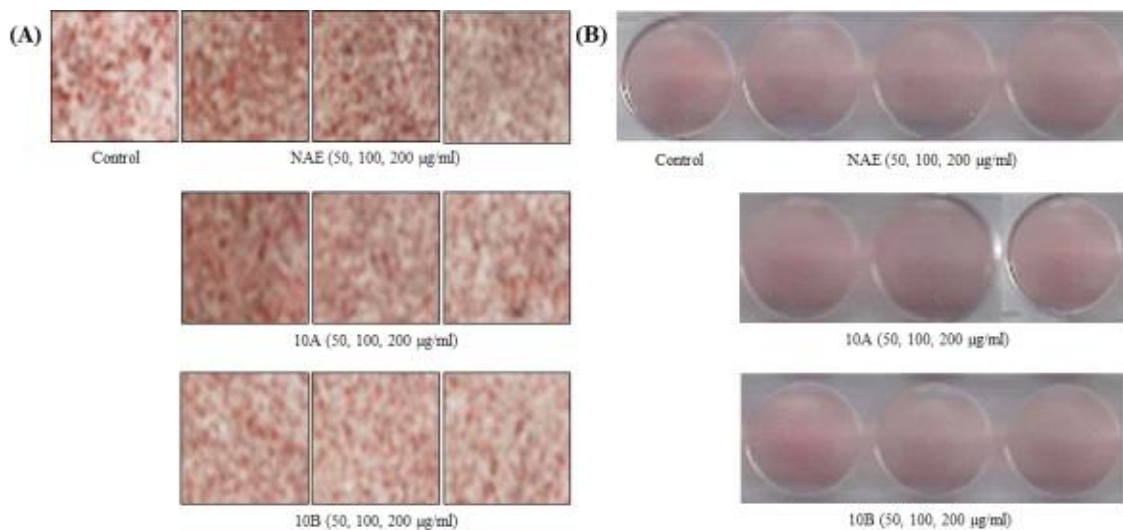


그림41. NAE, 10A, 및 10B의 항비만 효능 평가 (A) NAE, (B) 10A, (C) 10B

- 항산화제로서의 잠재력을 통해 산업적으로 화장품에 응용될 수 있을 것으로 사료되어짐에 따라 이와 관련된 실험으로써 미백 효능 평가를 수행함
- 미백효능평가를 위해 흑색종 세포 B16F10을 사용하였으며 α-MSH로 멜라닌 생성을 유도시켜 NAE에서 분리된 10B을 농도별 (25, 50, 및 100 µg/ml)로 처리하였으며, positive

control로서 미백효능이 있다고 알려진 arbutin을 사용함

- 그 결과, α -MSH만을 처리한 군에서 2배 이상의 멜라닌 함량이 증가하였으나, 10B를 농도별 (25, 50, 및 100 $\mu\text{g/ml}$)로 처리한 군에서는 농도의존적으로 멜라닌 함량이 감소하는 것을 확인함

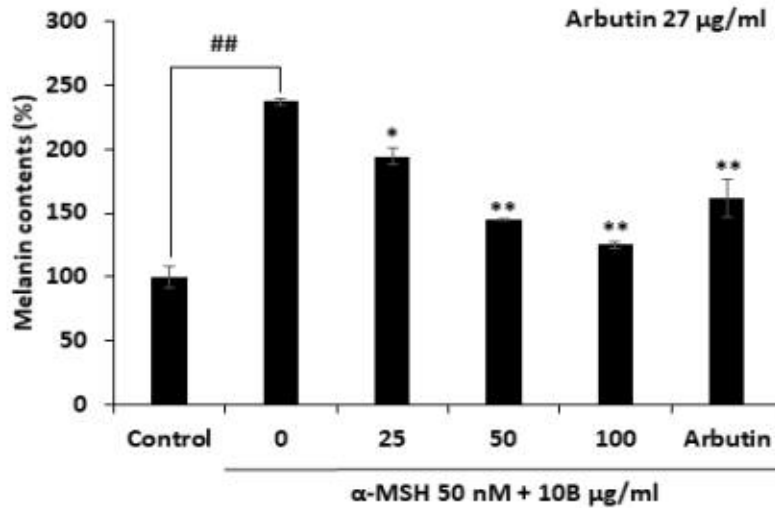


그림42. B16F10 세포에서 10B의 미백효능평가

- 위의 결과를 통해, NAE에서 분리된 10B를 *in vivo* 실험으로 제브라피쉬 모델에서 미백 효능평가를 수행함
- 멜라닌을 갖고 있는 제브라피쉬 모델에 일정기간동안 10B를 농도별 (25, 50, 및 100 $\mu\text{g/ml}$)로 처리한 결과, 육안적으로 멜라닌이 감소하는 것을 확인함

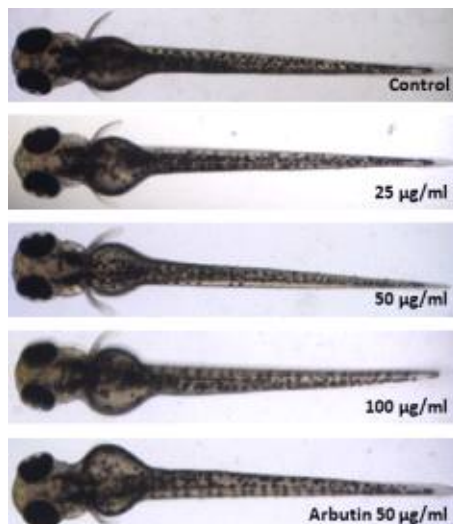


그림43. 제브라피쉬 모델에서의 미백효능평가

- 위의 결과를 통해 멜라닌 함량을 측정된 결과 농도에 따라 control군에 비해 멜라닌 함량이 감소하는 것을 확인함

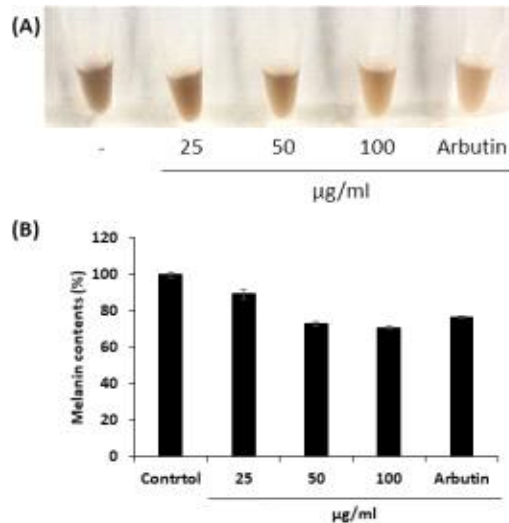


그림44. 제브라피쉬 모델에서의 미백효능평가

- 이에 따라, 아미노산 염기서열 분석을 통해 추후 Molecular docking 시뮬레이션을 수행할 예정

(2) 내병성 김 (골드 1호)의 일반성분 분석 및 기능성 평가

- 본 과제를 통해 개발되어 수출되고 있는 내병성 김 (골드 1호)의 일반성분 분석 및 기능성 평가를 위해 70% EtOH 과 DW 추출을 진행함. 본 연구에서 사용된 골드 1호는 기존에 개발된 NT1과 다른 년도에 생산되었으며 이를 NT1-1이라고 표기함
- NT1-1의 70% EtOH 과 DW 추출물의 수율 및 일반성분 (단백질, 다당류, 및 폴리페놀)을 분석한 결과 추출 용매 상관없이 일반성분 중 단백질 함량이 가장 높은 것으로 확인함. 특히, 70% EtOH 추출물보다 DW 추출물에서 폴리페놀을 제외한 수율, 단백질, 다당류 함량이 높은 것으로 확인함

표3. 추출 조건에 따른 NT1-1의 수율 및 일반성분 분석

	Yield	Proximate composition		
		Protein	Polysaccharide	Polyphenol
70% EtOH	12.33 ± 0.00	31.99 ± 0.14	13.52 ± 1.08	0.53 ± 0.00
DW	41.40 ± 0.85	43.44 ± 0.43	18.46 ± 1.58	≤ 0.00

- NT1-1의 70% EtOH 과 DW 추출물의 항산화 효능 평가를 위해 활성산소 (DPPH, Alkyl, 및 Hydrogen peroxide) 소거능을 측정함
- 그 결과, 70% EtOH 추출물보다 DW 추출물에서 우수한 IC₅₀ (µg/ml) 값을 나타남을 통해 추후 DW 추출물의 기능성 평가를 수행할 예정임

표4. 추출 조건에 따른 NT1-1의 항산화 효능 평가

	ROS scavenging activity			IC ₅₀ (µg/ml)
	Hydrogen peroxide	DPPH	Alkyl	
	70% EtOH	1.10 ± 0.05	0.27 ± 0.00	
DW	0.23 ± 0.02	0.36 ± 0.00	0.14 ± 0.00	

(3) 신제품 돌김 (골드 3호)의 일반성분 분석 및 기능성 평가

- 본 과제를 통해 개발된 고온내성 잇바다돌김 신제품 (골드 3호)가 기존에 시판되고 있는 김과 비교분석을 위해 일반성분 분석 및 기능성 평가를 위해 70% EtOH과 DW 추출을 진행함. 신제품 돌김을 NT3이라고 표기하며 기존에 시판되고 있는 김은 WT-1이라고 표기함
- NT3 과 WT-1을 각각 70% EtOH 과 DW 에 추출하였으며 각 추출물의 수율 및 일반성분 (단백질, 다당류, 및 폴리페놀)을 분석한 결과 추출 용매 상관없이 일반성분 중 단백질 함량이 가장 높은 것으로 확인함

표5. 추출 조건에 따른 신제품 NT3과 시판김 WT-1의 수율 및 일반성분 분석

		Yield	Proximate composition			%
			Protein	Polysaccharide	Polyphenol	
			70% EtOH	NT3	15.78 ± 0.51	
	WT-1	22.17 ± 0.45	38.02 ± 0.87	9.39 ± 2.93	≤0.00	
DW	NT3	24.90 ± 0.00	49.27 ± 0.00	21.76 ± 0.75	0.53 ± 0.00	
	WT-1	49.82 ± 1.14	38.54 ± 0.72	43.58 ± 0.69	≤0.00	

- NT3 과 WT-1의 70% EtOH 과 DW 추출물의 항산화 효능 평가를 위해 활성산소 (DPPH, Alkyl, 및 Hydrgen peroxide) 소거능을 측정함
- 그 결과, NT3 과 WT-1의 70% EtOH 추출물 보다 DW 추출물이 우수한 IC₅₀ (µg/ml)을 확인함. 추후 각각의 DW 추출물의 기능성 평가를 수행할 예정임

표6. 추출 조건에 따른 신제품 NT3과 시판김 WT-1의 항산화 효능 평가

		ROS scavenging activity			IC ₅₀ (µg/ml)
		Hydrogen peroxide	DPPH	Alkyl	
		70% EtOH	NT3	1.09 ± 0.13	
	WT-1	0.94 ± 0.05	0.36 ± 0.01	0.54 ± 0.03	
DW	NT3	0.23 ± 0.01	0.41 ± 0.02	0.28 ± 0.01	
	WT-1	0.24 ± 0.18	0.54 ± 0.01	0.27 ± 0.01	

[4차년도]

1. 개발종자의 안정성 측정 및 표준화

가. 내병성 품종의 모본과 유성생식체의 형질특성 조사 및 안정성 테스트

(1) 김 갯병의 배양 및 새로운 질병의 감염 테스트

- 새롭게 채집된 원인균주의 분리 및 배양을 위해 최적조건에 신종의 갯병 균주에 각각의 배양 배지인 PES medium, Arasaki medium를 사용하여 배양 하였고 질병의 종류 및 특성 분석을 위해 배양중에 있음
- 기존의 김 3대 질병인 낭균병, 녹반병, 붉은갯병은 각각 20℃, -40℃, 15℃에서 균주 배양 중이며 장기보존이 어려운 경우 원인균주의 숙주인 김 엽체에 계대 배양하여 감염균주를 유지하였음
- 각각의 갯병에 안정성 및 특성을 유지하기 위해 갯병의 특성 분석을 통한 배양조건을 달리 하였고 김 양식 어기와 관계없이 갯병 테스트를 진행 할 수 있는 조건을 유지하였음
- 갯병의 균주는 조건별 실험에 사용하기 위해 감염 균주가 출현하지 않는 4월부터 10월 까지 숙주인 김 엽체를 일정기간별로 교체하여 보존하였음

표1. 원인균주 종별 리스트

Strain No.	Strain	종명	Collecting Site
1	붉은갯병 (<i>Pythium</i> sp.) - 1	<i>Pythium</i> sp. (SC)	충남 서천
2	붉은갯병 (<i>Pythium</i> sp.) - 2	<i>Pythium</i> sp. (JD)	전남 진도
3	<i>Dendryphiella</i> sp.	<i>Dendryphiella salina</i>	일본 무로란
4	낭균 (<i>Olpidiopsis</i> sp.) -1	<i>Olpidiopsis</i> sp.(<i>porphyrae</i>)	충남 서천 전남 진도
5	낭균 (<i>Olpidiopsis</i> sp.) -2	<i>Olpidiopsis pyropiae</i>	충남 진도
6	낭균 (<i>Olpidiopsis</i> sp.) -3	<i>Olpidiopsis</i> sp.(<i>koreanum</i>)	충남 서천 전남 해남
7	낭균 (<i>Olpidiopsis</i> sp.) -4	<i>Olpidiopsis</i> sp.(<i>scotiae</i>)	영국 스코틀랜드
8	녹반병(GSD) -1	PyroV1-JD	진도 회동
9	녹반병(GSD) -2	PyroV1-SC	충남 서천
10	녹반병(GSD) -3	PyroV1-HN	전남 해남

11	녹반병(GSD) -4	PyroV1-WD	전남 완도
12	녹반병(GSD) -4	PyroV1-NL	뉴질랜드
13	<i>Licmophora flabellata</i>	<i>Licmophora flabellata</i> 규조류	충남 서천
14	<i>Navicula</i> sp.	<i>Navicula</i> sp.(Tube-dwelling) 규조류	충남 서천
15	실가리병	(분석중)	전남 진도

- 실가리병 관찰 및 병원체 탐색

- 2020년 01월 전라남도 지역(고흥, 진도)의 김 양식장에서 ‘실가리병’이 대량 발생함
- 실가리병은 김의 기저부를 약하게 하며 엽체 색이 흐려지고 탄력성이 없어지는 것이 특징으로 물김의 생산량 및 품질을 떨어트려 위판 가격에 영향을 주며 기존 낭균병과 녹반병의 유사한 패턴을 가지는 것으로 판단됨 (그림 1)
- 현재까지 원인 및 대책에 대해 밝혀진 바가 없으며 일부 어장에서는 실가리병 방제를 목적으로 김발건조 또는 산 처리를 하지만 뚜렷한 효과가 없음

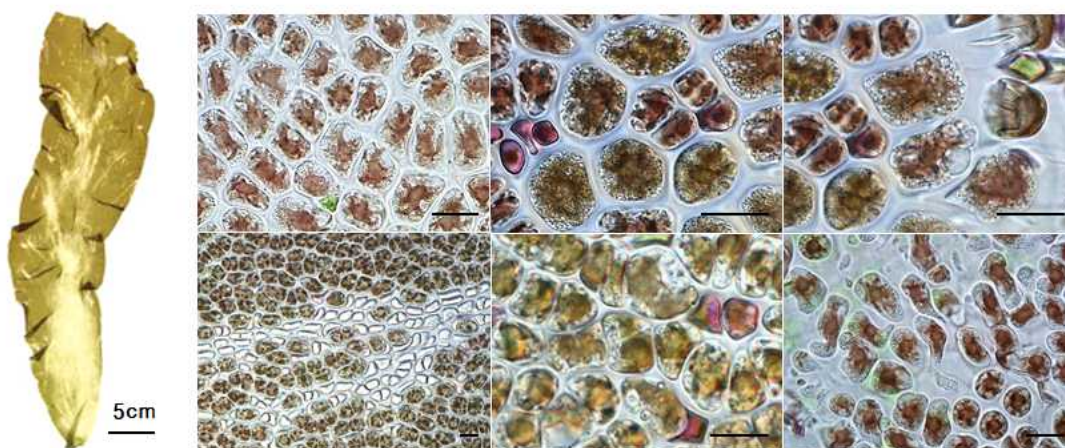


그림1. 전라남도 고흥 김 양식장에서 발생한 실가리병의 병징. scale bars : 20µm

- 실가리병에 걸린 김을 실내에서 배양한 방사무늬김과 함께 배양했을 때, 동일한 병징이 나타나는 것을 확인하였으며 세포의 형태 변화에 따라 병의 진행 과정이 5단계로 나뉘 (그림 1)
- 현미경 관찰 시 세포 내 많은 수의 입상구조가 관찰되며 색소체의 윤곽이 희미해지고 일부 세포는 본 형태를 유지하지 못하고 용혈됨

- 실가리병이 김 엽체와 엽체간 전염되는 것으로 보아 병원체에 의한 감염성 갯병으로 생각되며 실가리병의 병징은 미생물 증식에 따른 환경변화로 인한 생리적 반응이거나 병원체에 대한 면역 반응(pathogen-triggered immunity, Effector-triggered immunity) 또는 병원체의 증식 및 방출에 의한 세포 사멸 과정으로 예상되지만 유전자 분석을 통해 정확한 분석이 필요함
- 실가리병의 병원체를 탐색하기 위해 실가리병에 걸린 김을 배양한 배양액을 100~0.1 μm pore size로 필터한 후 감염실험을 수행함
- 그 결과 control에서는 20일 후 약 1~3개의 세포에서 입상구조가 관찰되었으나 감염 엽체를 직접 넣어준 조건과 100, 0.22, 0.1 μm 여과액에서는 30~60개의 세포에서 입상구조가 관찰되었음 (그림 2)
- 0.1 μm 여과액에서도 병징이 나타나는 것은 실가리병 병원체가 바이러스일 가능성이 높다는 것을 의미함

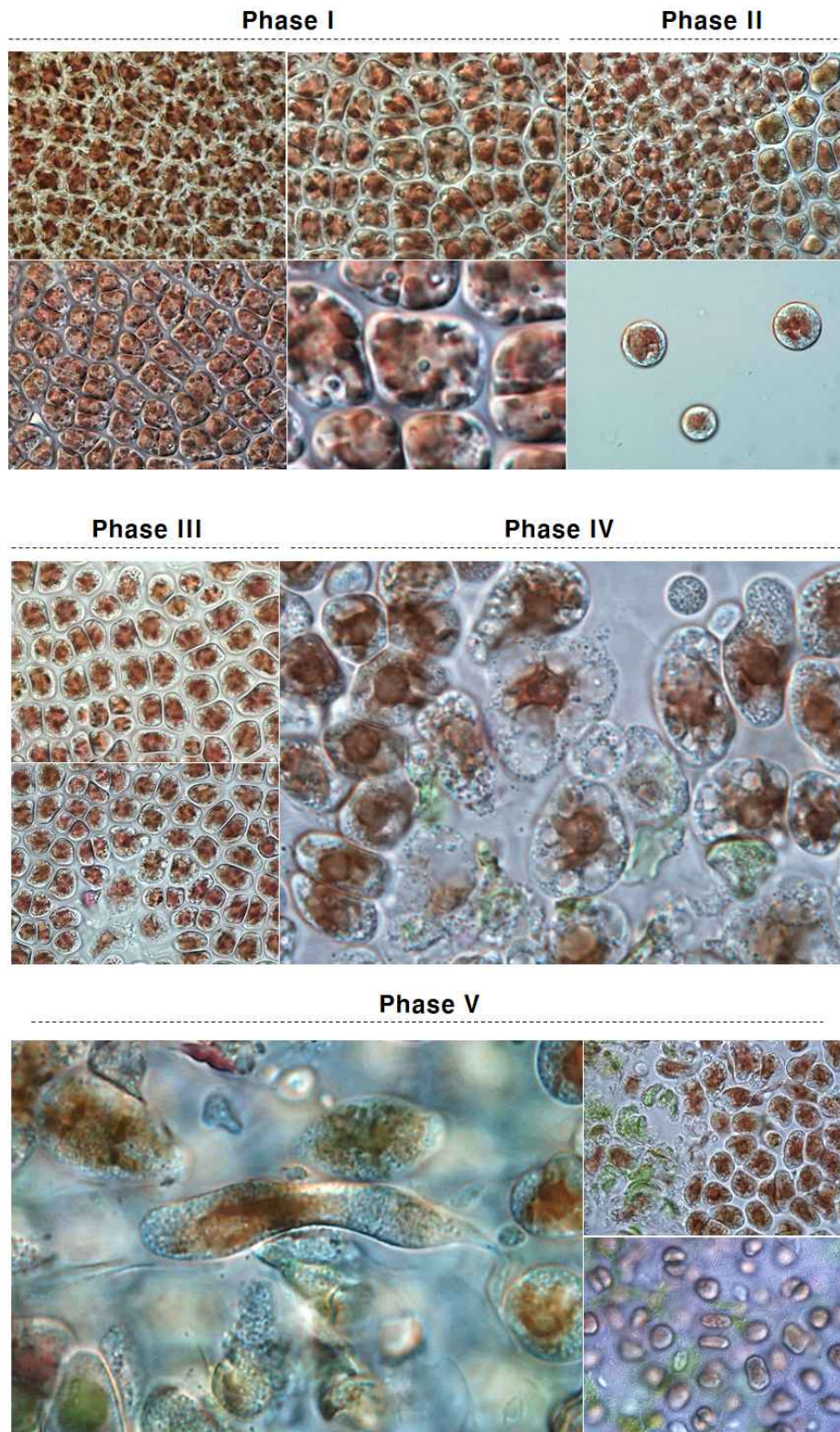


그림2. 실가리병의 진행 과정

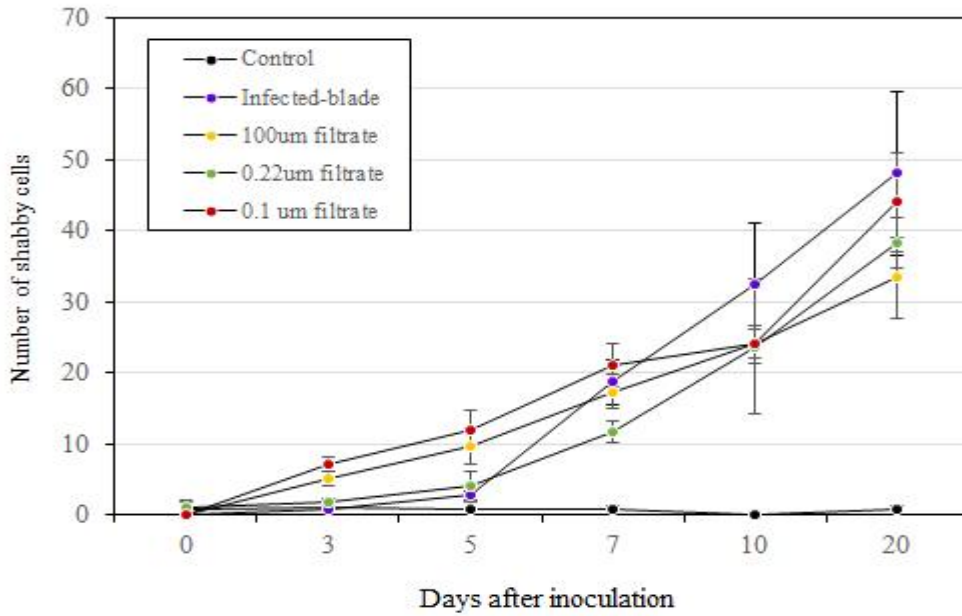


그림3. 실가리병 배양액을 이용한 감염 실험

- 실가리병에 걸린 김에서 병원체의 DNA를 관찰하기 위해 DAPI염색을 수행함. 그 결과 병원체의 것으로 보이는 DNA염색은 관찰되지 않았으나 세포 내에 특이적으로 염색되는 구조를 확인하였으며 추후 연구를 통해 질병과의 상관성을 밝힐 예정임 (그림 4)

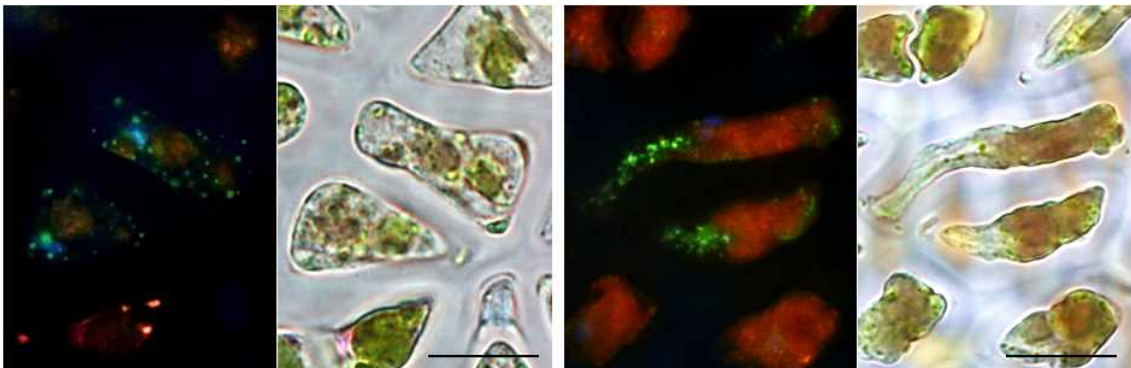


그림4. 실가리병에 걸린 김의 DAPI 염색

- 몽실이김 관찰 및 특성파악

- 몽실이김은 엽체가 짧고 둥글게 자라며 주름져 엽체가 아래로 뺨지 못하고 해수면으로 떠오르는 김을 말하며 어가에서는 품종 특성 또는 생식세포 생성에 의한 증상으로 추측하고 있으나 그 원인이 명확히 밝혀지지 않음
- 몽실이김을 현미경으로 관찰한 결과 정상적인 세포분열 방향과 다르게 분열되는 부위에 의해 엽체 전체가 주름지게되고 낭균의 유주자낭이 엽체 전체에서 분포함 (그림 5)
- 지속적인 연구를 통해 몽실이김의 원인을 정확히 파악하고 그에 따른 해결책 마련이 시급

함

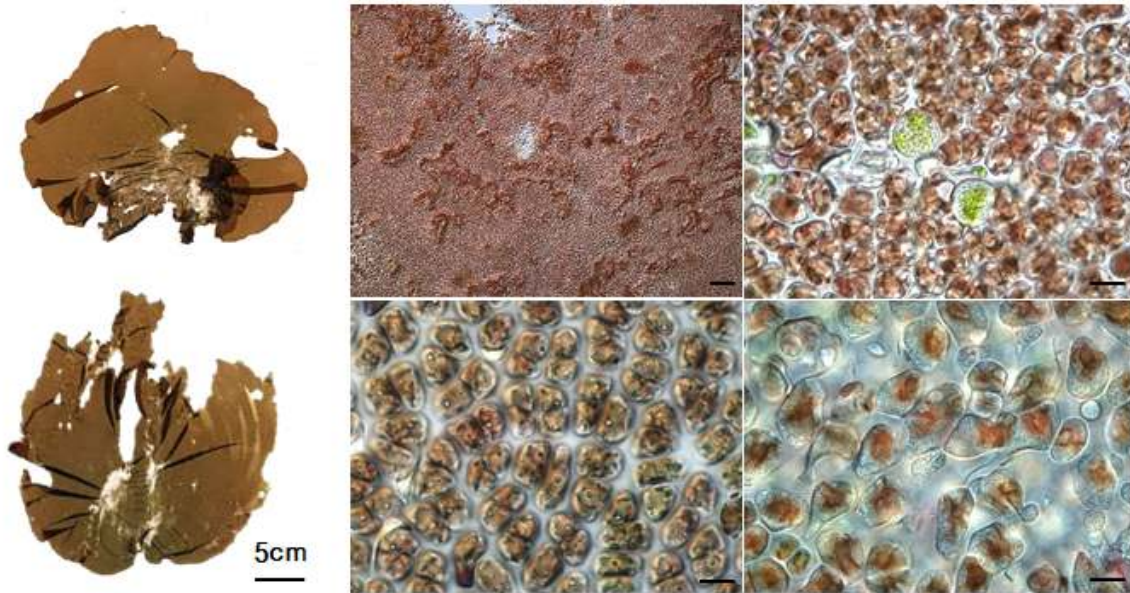


그림5. 뽕실이감 표본 및 현미경 관찰 scale bars : 20 μ m

- 물김 위판 가격과 갯병의 상관관계

- 감염성 갯병은 물김의 생산성과 품질을 떨어트리며 위판 가격을 감소시키는 요인 중 하나임
- 2017년부터 2020년까지 우리나라 물김의 주요 생산지인 진도, 해남, 서천을 중심으로 위판되는 물김을 수집하여 현미경 관찰을 통해 발병률을 확인하고 물김 위판 가격과 갯병의 상관관계를 분석함
- 2017년 01월 해남지역에서 위판되는 물김을 현미경으로 관찰한 결과 녹반병과 붉은갯병이 발병하였으며 녹반병 감염률이 증가하면 위판가격이 감소하는 경향을 나타냄(그림 6)
- 붉은갯병은 위판가격에 큰 영향을 미치지 않으나 감염률이 40%이상일 때 위판가격이 크게 감소함 (그림 6)

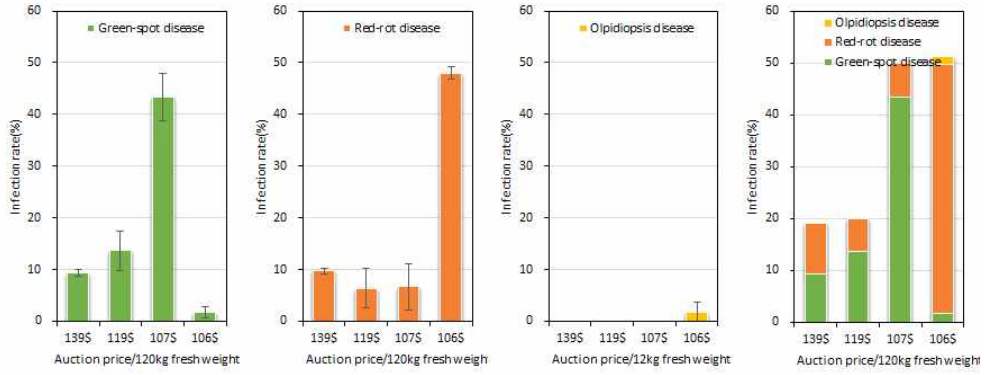


그림6. 2017년 01월 해남의 물김 위판 가격과 갯병의 상관관계

- 2017년 02월 진도의 물김 위판장에서는 당월 서천지역의 황백화현상으로 인해 물김 가격이 급상승하였으며, 녹반병 감염률이 증가함에 따라 위판가격이 감소하는 경향을 나타냄 (그림 7)
- 붉은갯병과 낭균병은 감염률이 40%이하일 때 위판가격에 큰 영향을 주지 않음 (그림 7)

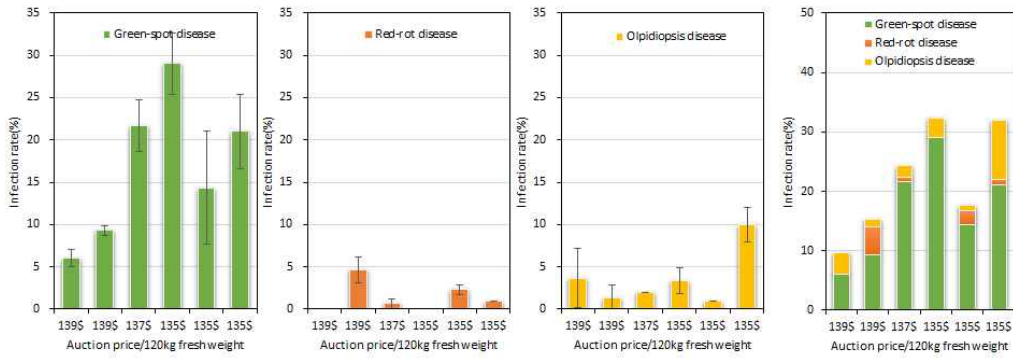


그림7. 2017년 02월 진도의 물김 위판 가격과 갯병의 상관관계

- 2017년 03월 진도에서 위판된 물김은 녹반병 감염률이 증가함에 따라 위판가격이 감소하는 경향을 나타내었으며 붉은갯병과 낭균병은 감염률이 40% 이하일 때 위판가격에 큰 영향을 주지 않음(그림 8)

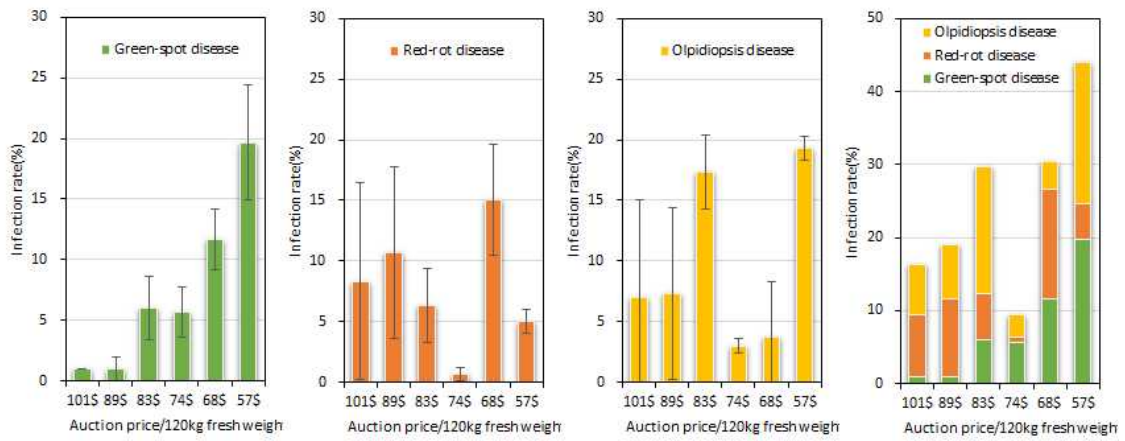


그림8. 2017년 03월 진도의 물김 위판 가격과 갯병의 상관관계

- 2019년 02월 진도 회동 지역에서 위판된 잇바디물김의 최고 가격은 469\$로 갯병 감염률이 30%였으며 최저가인 370\$는 갯병 발병률이 50%이상임 (그림 9)

- 녹반병 발병률이 높아질수록 위판 가격이 감소하는 경향을 나타냄

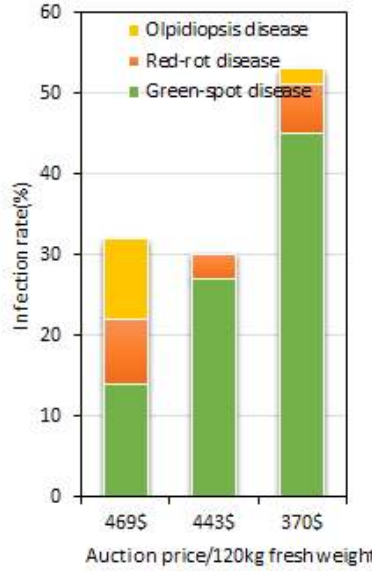


그림9. 2019년 02월 진도의 물김 위판 가격과 갯병의 상관관계

- 2020년 02월 서천 지역에서 위판된 방사무늬김에서는 낭균병의 발병률이 높게 나타났으며 낭균병 발병률이 증가할수록 위판가격이 감소하는 경향을 나타냄 (그림 10)

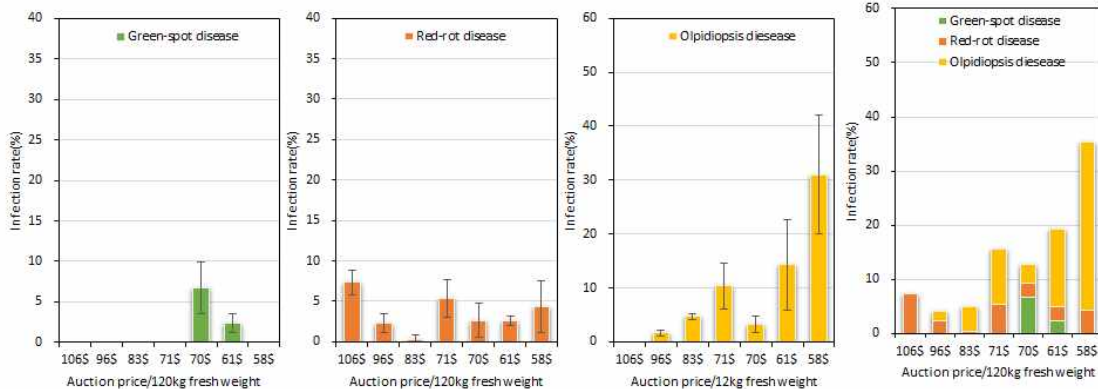


그림10. 2020년 02월 서천의 물김 위판 가격과 갯병의 상관관계

- 방사무늬김의 내병성 기작 규명

- 활성산소종의 신속하고 일시적인 생산은 식물이 병원체를 성공적으로 인식한 특징으로 알려져 있음
- 김은 생물, 비생물적 스트레스에 대해 산화적폭발로 반응한다고 알려져 있지만 활성산소종의 생성 기작과 패턴에 대해서는 밝혀진바가 거의 없음
- 난균류인 *P. porphyrae*와 *O. pyropiae*에 감염된 방사무늬김에서 DAB염색 통해 감염시간

별 hydrogen peroxide의 생성 및 축적을 관찰함

- *P. porphyrae*에 감염된 방사무늬김은 병원체에 노출된지 30분만에 hydrogen peroxide의 생성이 7배 높았으며 1시간까지 최대로 증가하다가 감소하는 경향을 나타냄
- 12시간 이후에는 대조군과 비슷하거나 2배 정도의 차이를 보였음
- 감염초기에는 엽체 전체에 산발적으로 hydrogen peroxide가 생성되었으나 균사가 발달한 이후로는 균사와 직접 접촉한 세포를 중심으로 생성됨
- *O. pyropiae*에 감염된 김은 병원체에 노출된지 30분만에 hydrogen peroxide 생성이 증가했지만 유의미한 차이는 보이지 않음
- 1시간 이후 대조군에 비해 hydrogen peroxide의 생성이 7배 이상 증가하였으며 병원체와 접촉한 세포뿐만 아니라 그 주변 세포에서도 많은 양의 hydrogen peroxide가 축적되었음

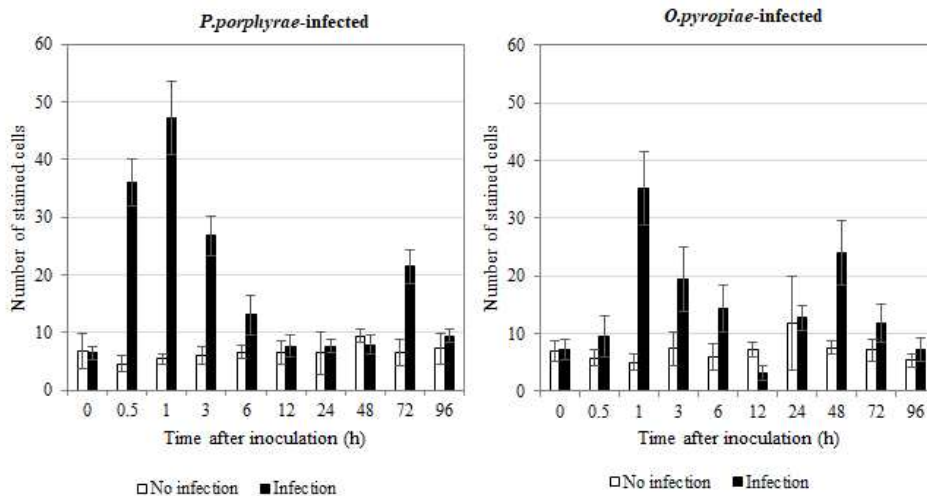


그림11. 방사무늬김의 두가지 난균류 감염에 대한 감염 시간별 hydrogen peroxide의 생성

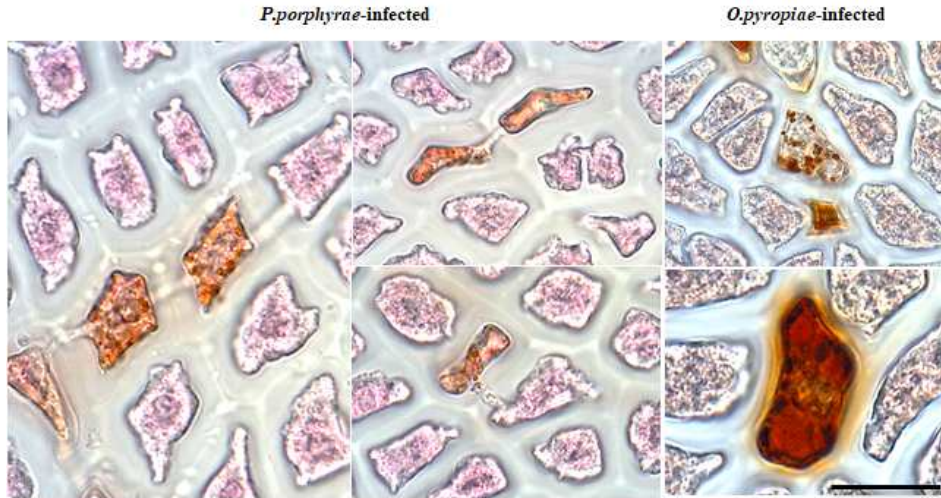


그림12. DAB염색을 이용한 hydrogen peroxide의 생성 및 축적 관찰

(2) 유리사상체 대량배양

- 형질특성 분석을 위해 개발된 내병성 품종 골드1호의 사상체 대량배양을 위한 유리사상체 증식 및 유지배양
- 유리사상체는 150~500 μ m 내외의 크기로 분쇄 되었으며 분쇄 사상체는 각각 0.5g씩 수온 18 $^{\circ}$ C~20 $^{\circ}$ C, 조도800lux~1800lux 조건에서 각각의 통기배양기에서 배양함
- 사상체 보존 시 각포자낭의 형성을 제어하기 위해 정치배양 하였으며 시험양식(1단계 폐각사상체 배양) 60일 전 PES medium을 사용하여 통기배양을 통해 대량배양을 실시함
- 유리사상체의 세포분열을 통한 열화를 우려하여 매년 시험양식장에서 F2의 우성 염체를 선발해 새로운 유리사상체를 생산하고 있음

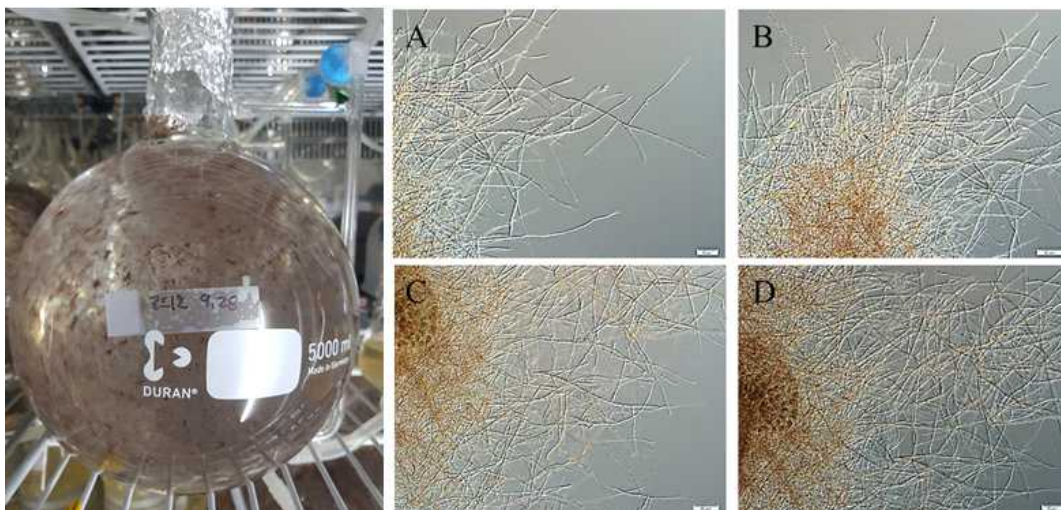



그림13. 2020년 내병성 품종 “골드1호”의 유리사상체

- 순계를 통해 방출된 유성생식 업체는 일정한 패턴을 가지는 형태를 나타내며 이는 순계를 통해 후세대 까지 품종의 안정성을 가짐


(2) 내병성 품종의 재배심사(4년차) 및 시험양식

- 골드1호의 품종 등록을 위한 재배심사는 “수산식품품종관리센터 규정에 의해 년 1기작 2회 반복으로 정해져 있으며, 현재 골드1호는 4년 차 재배심사 과정에 있으며 심사가 끝나는 2021년 3월 품종 등록 예정임
- 현재 “골드 1호”는 2020년 상반기 까지 어가에 무료 분양을 하였으며 2020년 하반기부터 가족회사와 기술이전을 통해 유상분양을 실시할 계획이고 매년 생산량과 단가에 있어 높은 결과를 나타내 매년 수요가 증가하여 사상체의 필요량이 증가하고 있음

일자리가 성장이고 복지입니다.



국립수산과학원



정부혁신
보다 나은 정부

수신 국립공주대학교 산학협력단장
(경유)
제목 김 출원품종 골드1호의 4년차 재배시험 수수료 납부 요청

1. 국립공주대학교 산학협력단의 무궁한 발전을 기원합니다.
2. 2017년 2월 24일 귀 단에서 출원한 방사무늬김 '골드1호'의 2020년 4년차 재배시험을 실시하고자 하오니 재배시험이 원활히 진행될 수 있도록 종자배양장 및 양식어장 준비에 최선을 다해 주시기 바랍니다.
3. 또한, 「식물신품종 보호법에 따른 품종보호료 및 수수료 징수규칙」에 따라 3년차 재배시험 수수료를 요청하오니 납부하여 주시기 바랍니다.

가. 수수료 내역

출원번호	품종명칭	출원일	재배시험 수수료(원)
2017-1	골드1호	2017. 02. 24.	4년차 : 500,000원

※ 입금계좌 : 농협 301-0181-0835-11(국립수산과학원 수산식품품종관리센터) 끝.

수산식품품종관리센터장



그림14. 2017년 내병성 품종 “골드 1호”의 4년차 재배심사 통보 공문

- 품종의 등록까지는 2년 2기작의 시험양식과 2년 2기작의 재배심사를 거쳐야 가능하여 현재 골드1호는 2년의 시험양식 후 품종출원을 거쳐 4년 차 재배심사를 위해 해상채묘를 완

료했고, 3년차 해양환경에 의한 황백화 현상으로 4년차 재배심사까지 마치고 2021년 3월 품종등록 예정임

- 골드1호의 4년 차 재배심사는 골드1호, 대조구 A, 대조구 B, 총 3종의 품종을 선정하여 진행되며 매년 01월 패각의 잠입과 패각의 배양과정, 환경조건을 1차 심사기준으로 두고 매년 10월 패각사상체를 이용한 해상채묘 후 월 2회 김발을 무작위 채취하여 심사 품종의 특성, 길이, 엽폭 등을 확인함

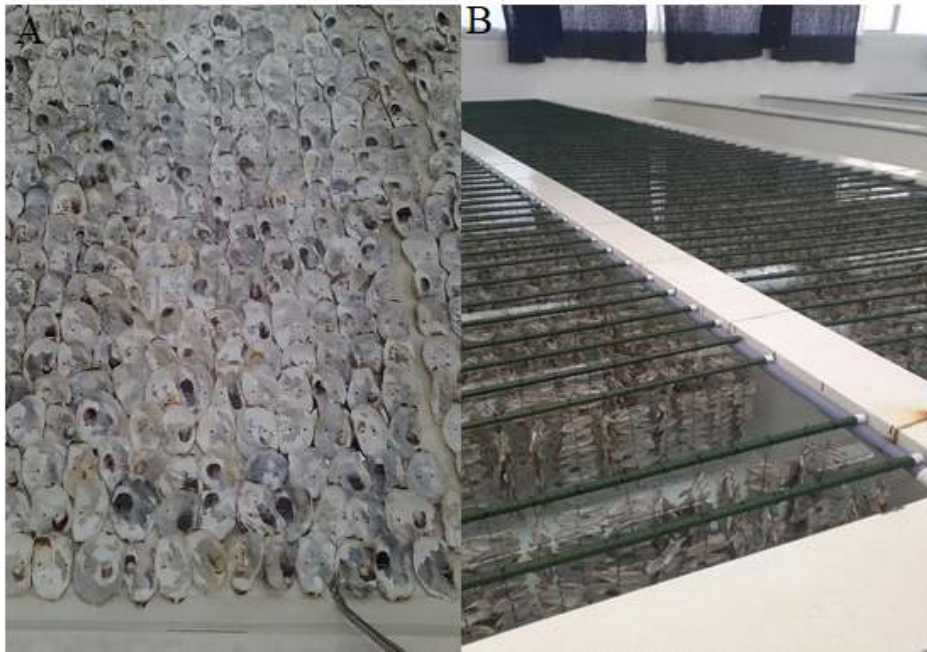


그림15. 2020년 내병성 품종 “골드1호”의 패각사상체

- 시험양식중인 골드1호는 2020년 10월 현재 포자배양구간에서 배양중이며 2020년 기상 상황으로 인해 채묘시기 및 포자배양시기가 일부 늦춰졌고 이에 따라 골드1호의 수확 시기는 기존 매년 11월부터 이듬해 2월 중순에서 3월 중순으로 확대될 전망이다

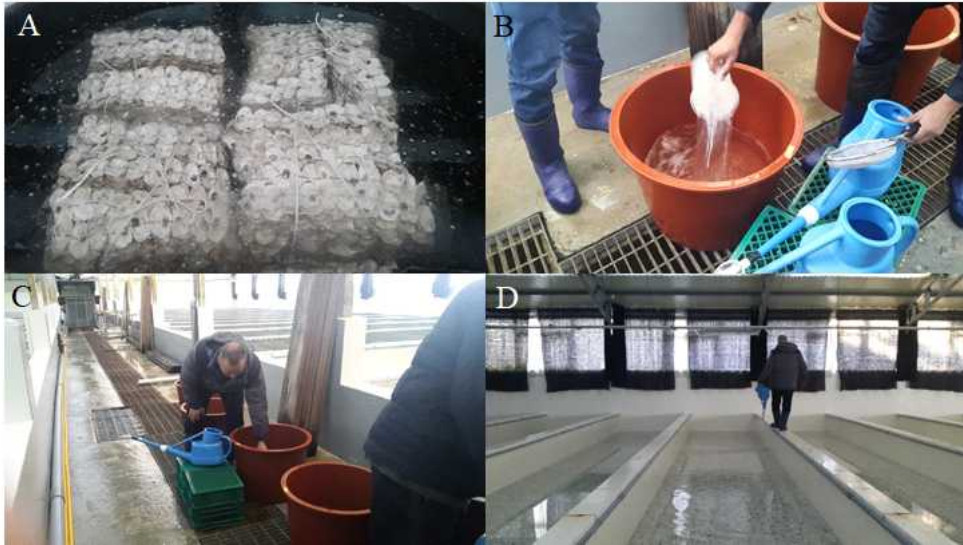


그림16. 2020년 내병성 품종 “골드1호”의 패각사상체 잠입과정

- 재배심사는 기존의 육상채묘보다 효율성이 높다고 판단되어 2020년 9월 해상채묘를 실시하였고 김발 10개를 겹망으로 하여 패각사상체를 매달아 각포자를 방출시키는 채묘법으로 30일이 지나고 유엽의 크기가 약 1~2cm 정도 일 때 10월 말에 분망 예정에 있으며 시험양식은 대량채묘를 위해 육상채묘를 실시하였음

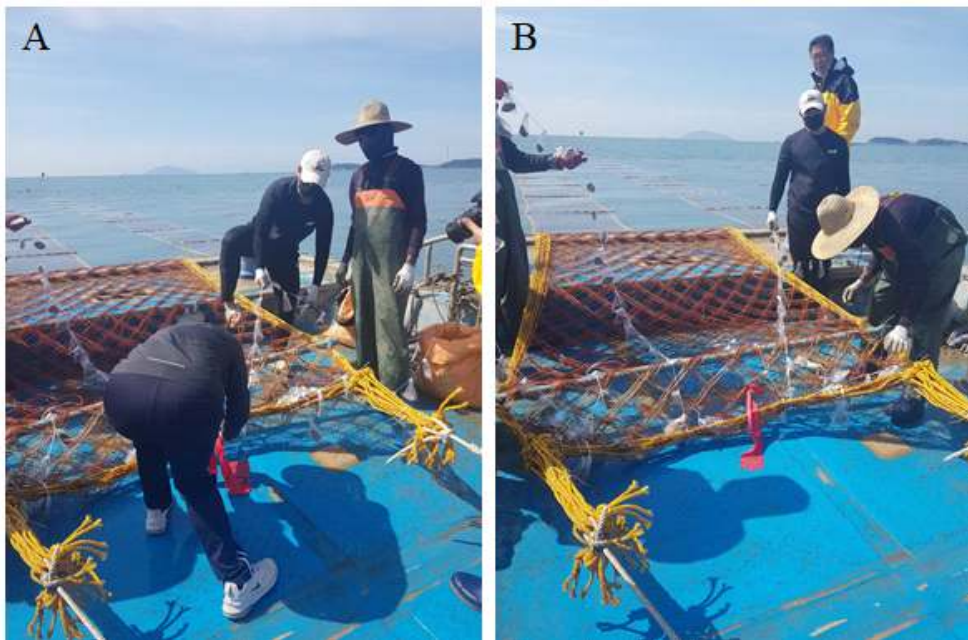


그림17. 2020년 내병성 품종 “골드 1호”의 4년 차 재배심사 과정(해상채묘)

- 재배심사에 있어 해황을 고려하여 서천 마량항 2번 지역, 외부의 바닷물이 가장 잘 유입되는 구역으로 선택을 하였고 이에 따라 재배심사에 있어 상당히 유리할 것으로 판단됨

- 2020년 골드1호의 시험양식 구간(서천 마량항)은 1.8m X 50m 김밭 총 1000대 이상이고, 2021년 3월까지 생산량은 총 700톤으로 예상됨



그림18. 2020년 내병성 품종 “골드 1호”의 시험양식 과정(육상채묘)

- 시험양식으로 생산된 개발품종 골드1호의 물김은 가족회사((주)대천김, (주)선진수산)의 가공 공장에서 가공하여 수출 및 국내판매 예정임

나. 황백화 내성품종의 특성 분석

(1) 김의 황백화 현상

- 황백화 내성 품종과 일반 방사무늬김과 질소결핍배지에서 황백화 내성 실험을 수행한 결과, 형태적으로 보았을 때 10일 후에 일반 김은 완전히 탈색되면서 황백화가 유도되는 반면, 개발 중인 내성 김은 더 안정적으로 유지됨
- 물론 황백화 내성 김에서 처음보다 엽록체가 축소되고 색이 조금씩 연해지긴 했지만, 일반 김보다 좀 더 색이 안정적으로 유지되면서 느리게 진행되는 것이 확인됨
- 황백화 내성 품종과 일반 방사무늬김의 변화하는 색소체 단백질 유전자 발현을 비교 분석한 결과, phycobilisome 색소 관련 단백질을 구성하는 유전자들의 발현이 질소결핍배지에서 황백화 현상이 진행됨
- 따라서 일반 방사무늬김에 비해 황백화 내성 김에서 높게 발현되는 것이 확인되었고 황백화 현상은 phycobilisome 색소 관련 단백질을 구성하는 유전자들의 발현에 영향을 미치는 것으로 확인됨

- 김 양식장에 발생하는 질병 중 병원균이 아닌 해수의 영양 결핍에 의해 일어나는 황백화 현상은 매우 광범위한 지역에 회복이 불가능한 피해를 끼치면서 생산 어민들의 생존 기반을 위협하고 있음
- 김 색깔이 누렇게 변하며 성장이 부진해지는 황백화 현상은 양식어장의 해수 중 질소 영양염의 결핍이 가장 큰 원인임

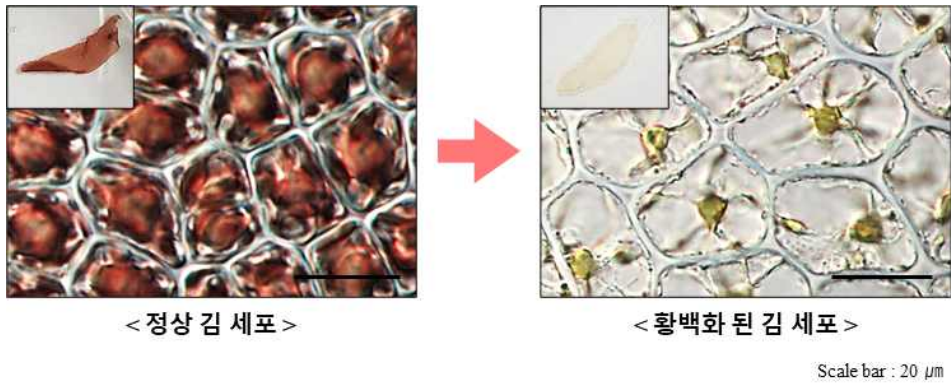


그림19. 황백화 유도된 김 세포 사진

- 황백화가 유도되었을 때는 일반 김에 비해 세포에 포함된 엽록체가 축소하는 한편 액포가 확장하여 커지면서 전체적으로 투명해지는 것을 확인할 수 있으며, 이는 영양소가 부족한 수질환경에서 김 세포 내의 질소 저장고 역할을 하는 엽록체가 줄어든다는 것을 의미함



그림20. 김 양식장의 황백화 현상

- 이러한 황백화 현상은 매년 진도, 서천 등 지역별로 간헐적으로 나타나고 있음

(2) 감마선을 이용한 형질특성 강화

- 황백화 현상에 대비하기 위한 황백화 내성 품종을 개발하고자 한국원자력연구원 첨단방사선연구소에서 1 KGy 감마선 조사를 수행함

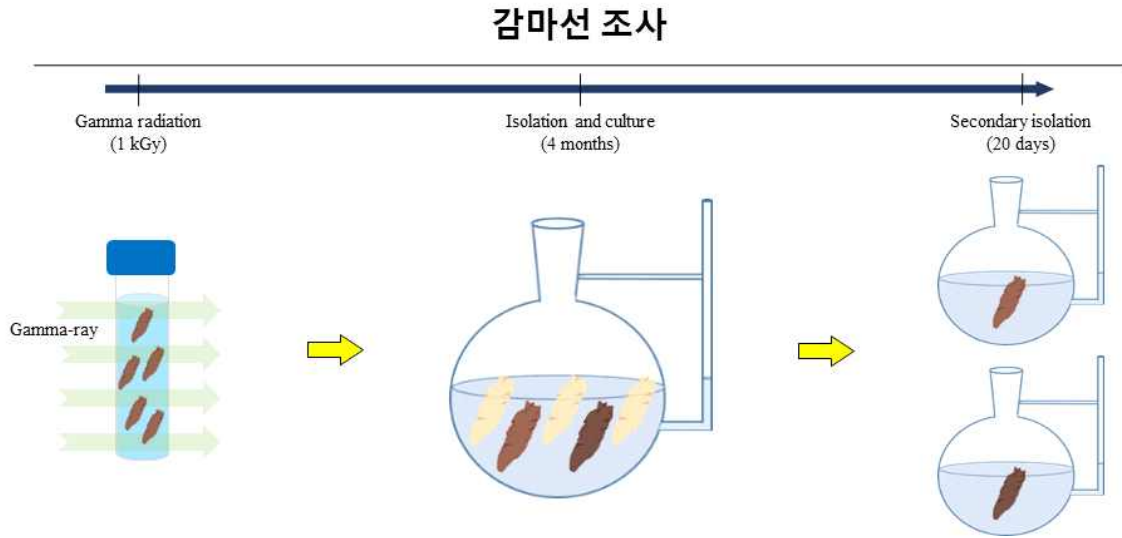


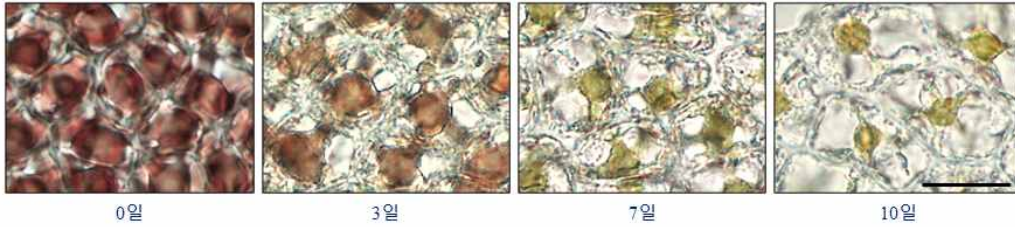
그림21. 감마선을 이용한 형질특성 강화

- 황백화 내성 강화 및 우량엽체 개발을 위해 감마선 조사를 실시하였으며, 감마선 조사 후 약 4~5개월 동안 영양배지 결핍조건에서 배양한 다음 거기서 생존한 엽체를 가지고 계대 배양을 통해 반복적으로 선별하였음

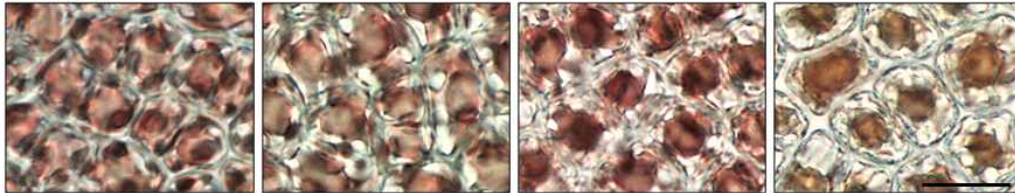
(3) 황백화 내성 품종 특성

- 황백화 내성 품종과 일반 방사무늬김과 질소결핍배지에서 황백화 내성 실험을 수행한 결과, 형태적으로 보았을 때 10일 후에 일반 김은 완전히 탈색되면서 황백화가 유도되는 반면, 개발 중인 내성 김은 더 안정적으로 유지됨

일반 김



황백화 내성 김



Scale bar : 20 μm

그림22. 황백화가 진행됨에 따라 일반 방사무늬김과 황백화 내성 품종의 세포 사진

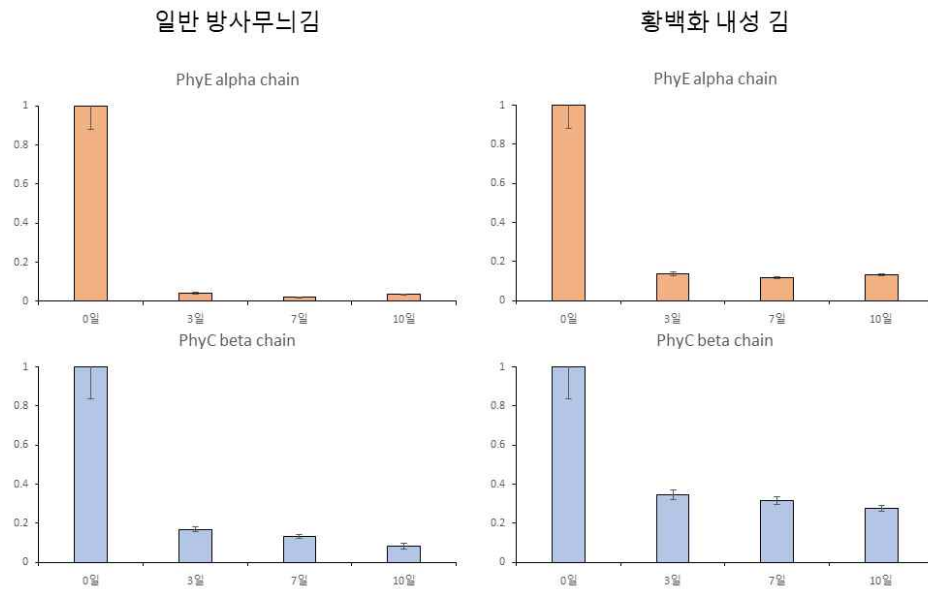


그림23. 일반 방사무늬김과 황백화 내성 품종의 phycobilisome 색소 단백질 유전자 발현

- 황백화 내성 품종과 일반 방사무늬김의 변화하는 색소체 단백질 유전자 발현을 비교 분석한 결과, phycobilisome 색소 관련 단백질을 구성하는 유전자들의 발현이 질소결핍배지에서 황백화 현상이 진행됨에 따라 감소하는 경향성을 보였으며 일반 방사무늬김에 비해 황백화 내성 품종에서 높게 발현되는 것이 확인됨

다. 황백화 내성 품종의 실내배양 및 안정성 테스트(실내실험)

(1) 황백화 내성 품종의 황백화 유도 및 회복과정 관찰

황백화 내성 김

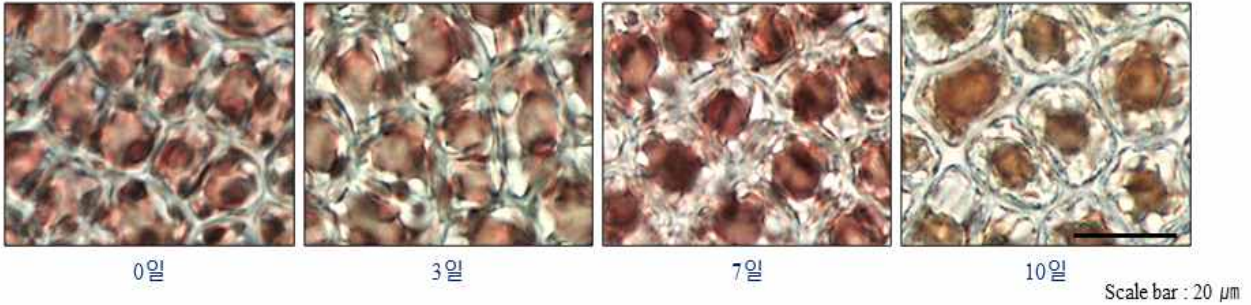


그림24. 황백화가 진행됨에 따라 황백화 내성 품종의 세포 사진

- 황백화 유도를 위해 실내배양 중인 황백화 내성 김을 종합 영양배지인 PES를 첨가하지 않은 질소결핍배지에 노출시켰으며 배양 조건은 10 °C, 12 h : 12 h (L : D) cycle ($>20 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)로 하였고, 산소 공급기와 통기 배양기를 사용하여 10일 동안 통기 배양함
- 황백화 회복을 위해 황백화가 유도된 김에 종합 영양배지인 PES를 첨가하였으며 (5 ml /L), 배양 조건은 10 °C, 12 h : 12 h (L : D) cycle ($>20 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)로 하였고, 산소 공급기와 통기 배양기를 사용하여 10일 동안 통기 배양함
- 광학현미경 (Olympus BX50 microscope)을 이용하여 김의 황백화 유도과 회복과정을 0, 3, 7, 10일 별로 관찰함
- 반복 유도실험한 결과 황백화 내성 품종에서 초기 상태보다 엽록체가 축소되고 색이 조금씩 연해지긴 했지만, 일반 김보다 좀 더 색이 안정적으로 유지되면서 7~10일 정도 황백화 현상이 느리게 진행되는 것이 확인됨

(2) 황백화 내성 품종의 Phycobilisome 색소 관련 단백질을 구성하는 유전자 발현 분석

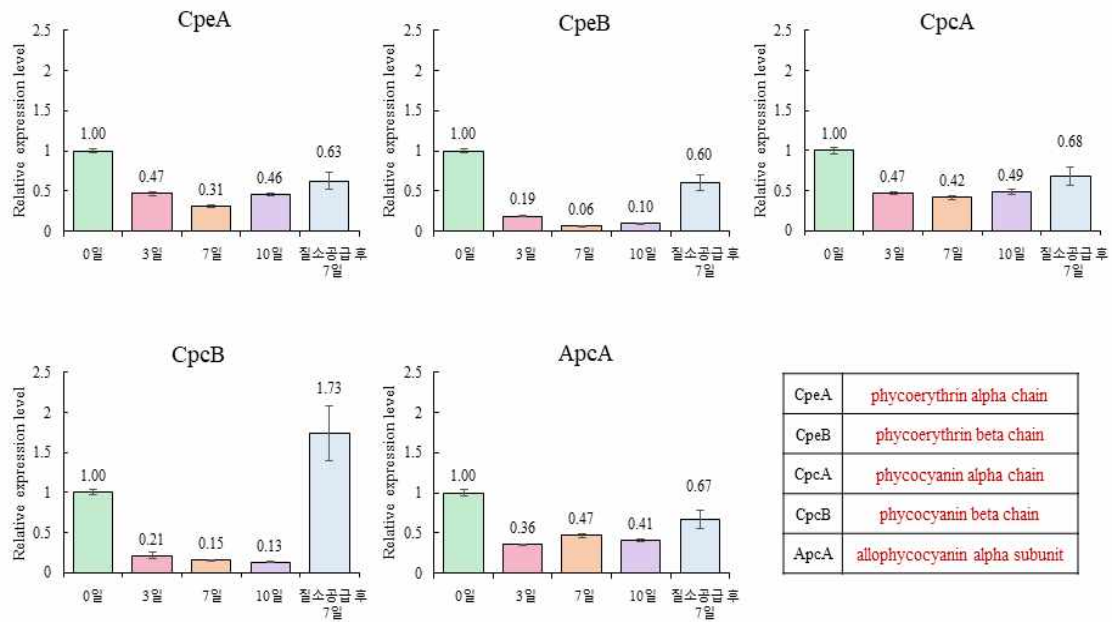


그림25. Real-time PCR을 이용한 황백화 내성 품종의 phycobilisome을 구성하는 관련 유전자들의 발현량 분석

- 홍조류 phycobilisome을 구성하는 관련 유전자들을 선별하고 real-time PCR을 수행하여 개발한 황백화 내성 품종의 색소체 유전자 발현량을 분석함
- 그 결과 phycobilisome 색소 관련 단백질을 구성하는 유전자들의 발현이 질소결핍배지에서 황백화 현상이 진행됨에 따라 감소하는 경향성을 보였으며 질소를 공급한 후에는 다시 증가하는 경향성을 보여줌
- 질소결핍배지에서 질소원 저장고 역할을 하는 phycobilisome 단백질이 분해되면 그 단백질을 다시 합성하기 위해 관련 유전자들의 발현이 오히려 증가하는 것으로 나타날 수도 있지만, 그래프와 같이 황백화가 실제로 관찰되는 시기보다 훨씬 먼저 색소 관련 유전자들의 발현량이 감소하는 것으로 볼 때, 이는 김 세포의 황백화는 질소 부족 상황에 대한 선제 대응의 결과인 것으로 판단됨

라. 순계 및 종 보존

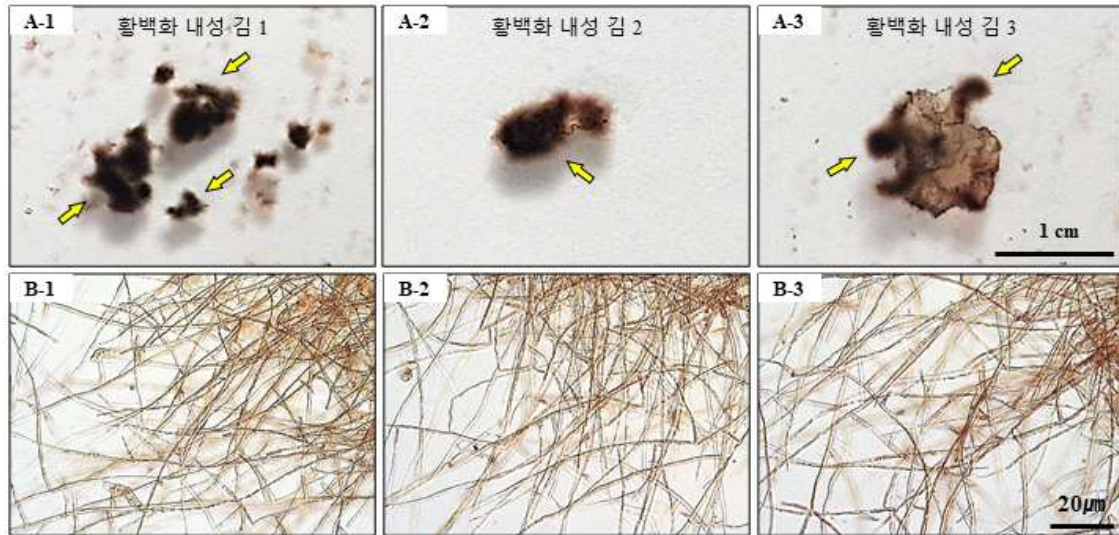


Fig: A-(1)-(3) = 일반 사진, B-(1)-(3) = 광학현미경 사진

그림26. 황백화 내성 품종의 순계 유도 및 유리 사상체배양

- 황백화 내성 강화 및 우량업체 개발을 위한 감마선 조사 후 질소결핍조건에서 생존한 업체를 가지고 계대배양을 통해 반복적으로 선별하였음. 그 후 순계 유도된 유리사상체 증식 및 유지 배양
- 유리사상체는 수온 20℃, 조도800lux~1800lux 조건에서 각포자낭의 형성을 제어하기 위해 main culture dish에서 PES medium을 사용하여 정치배양함

마. 개발품종의 모본과 유성생식체의 형질특성 분석

(1) 유리사상체 대량배양

- 형질특성 분석을 위해 개발된 황백화 내성 품종의 사상체 대량배양을 위한 유리사상체 증식 및 유지배양
- 시험양식(1단계 폐각사상체 배양) 60일 전 PES medium을 사용하여 통기배양을 통해 대량 배양을 실시함
- 유리사상체의 세포분열을 통한 열화를 우려하여 2020년 8월 한국원자력연구원 첨단방사선 연구소에서 기존의 황백화 내성 품종을 가지고 500 Gy, 1 KGy 감마선 조사를 수행하였으

며 우성 엽체를 선발해 새로운 유리사상체를 생산할 계획임

(2) 황백화 내성 품종의 시험양식(2년 차)

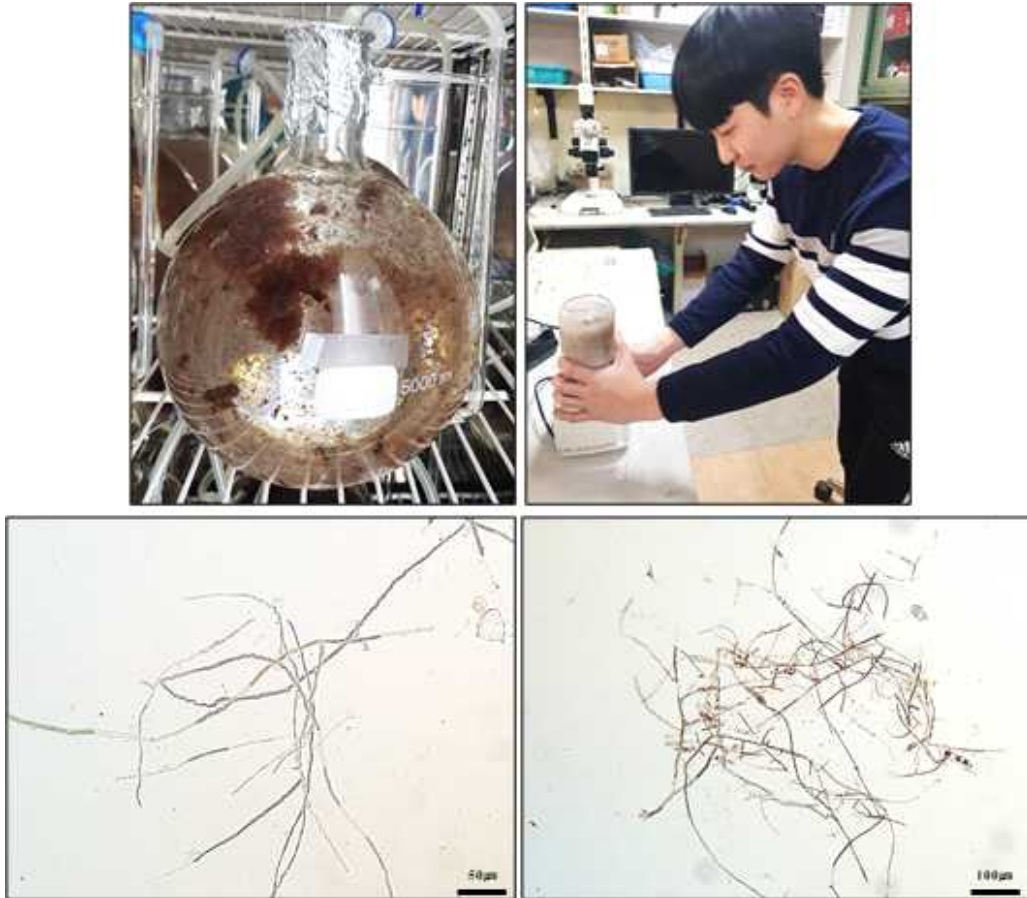


그림27. 2020년 황백화 내성 품종 유리사상체

- 2년 차 시험양식을 위해 2020년 02월 11일 황백화 내성 품종의 사상체를 400~500 μm 분쇄하여 서천에 위치한 패각배양장의 패각에 잠입시킴

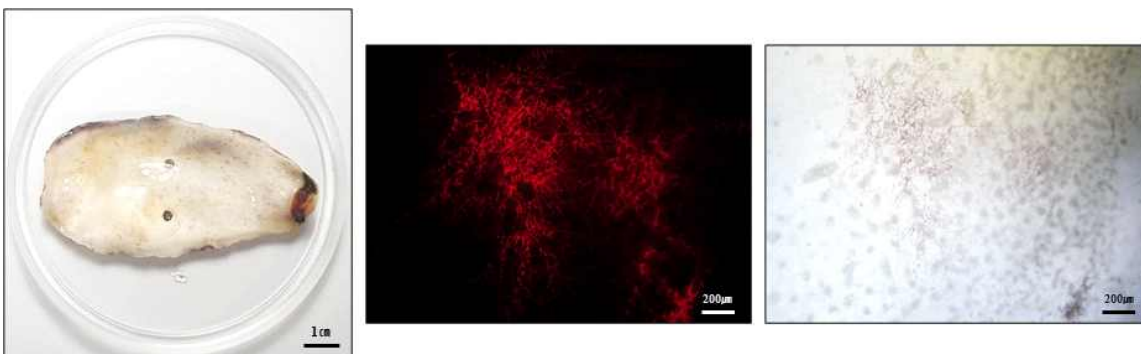


그림28. 황백화 내성 품종 유리사상체 패각 잠입 상태 확인

- 2020년 02월 패각사상체 잠입시킨 후 2주 뒤에 수거하여 현미경으로 사상체가 성공적으로 잠입된 것을 확인하였으며 2020년 9월 중순까지 일정기간별로 현지 조사 및 채집을 통해 패각사상체의 성장률을 확인하였음
- 황백화 내성 품종 패각사상체는 2020년 09월 27일 해상채묘를 이용하여 1차배양장(포자구간)에 곽망 상태로 들어간 상태임

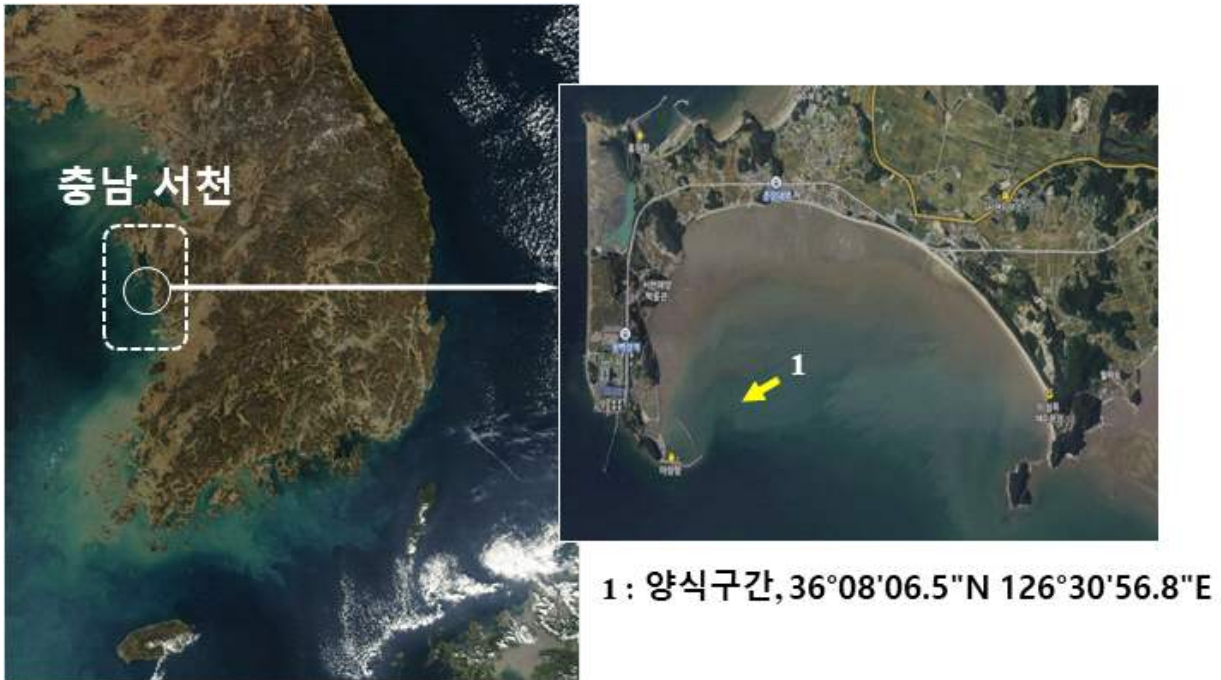


그림29. 황백화 내성 품종의 시험양식을 위한 양식시설 구축

- 황백화 내성품종의 시험양식을 위해 충남 서천에 위치한 패각배양장과 마량항에서 2キロ 근해에 있는 김 양식장에 시설구축을 하였음



그림30. 2019년 황백화 내성 품종의 패각사상체 및 1차 시험양식을 위한 해상채묘 과정



그림31. 2020년 황백화 내성 품종의 패각사상체 및 2차 시험양식을 위한 해상채묘 과정

- 황백화 내성 품종 1, 2차 시험양식을 위한 채묘과정은 각각 2019년 10월, 2020년 09월 해수의 흐름이 적은 조금기, 각포자 부착의 최적 수온 20℃에 겹장(10장)된 김밭에 부착하였고 부착과 동시에 1차 배양장(포자구간)에 이식하였으며 채묘 20~30일 후 유업을 확인할 수 있을 것으로 판단

바. 안정성 테스트 DB 구축

(1) 황백화 현상의 메커니즘 분석 및 DB 구축

- 최근 활발히 연구중인 활성산소종 ROS 관련 선행연구를 통해 ROS에 의한 산화적 스트레스가 황백화와의 관련이 있는지 알아보기 위해 ROS와 항산화제 관련 실험을 수행하고 있음
- ROS는 환경적 스트레스에 대한 독성 부산물이기도 하며 그 농도가 증가하면 세포막, 단백질, RNA 및 DNA 등 세포구조에 산화적 손상을 유발할 수 있음 (산화적 스트레스)
- 질소결핍과 같은 비생물적 스트레스는 엽록체에서 superoxide anion 및 singlet oxygen과 같은 ROS 생성을 높이며 이로 인해 황백화로 이어지는 핵 유전자 발현의 재편성을 일으킴
- 황백화의 원인으로 판단되는 엽록체 ROS는 ascorbic acid (비타민 C) 및 glutathione (GSH)과 같은 항산화제의 고농도로 완화됨

L-ascorbic acid 지속처리

P.yezoensis + 멸균 해수(PES x)

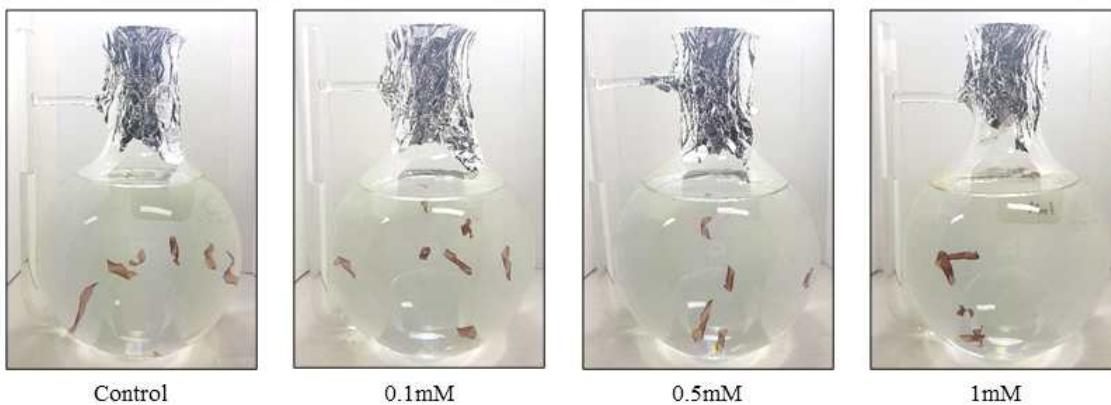
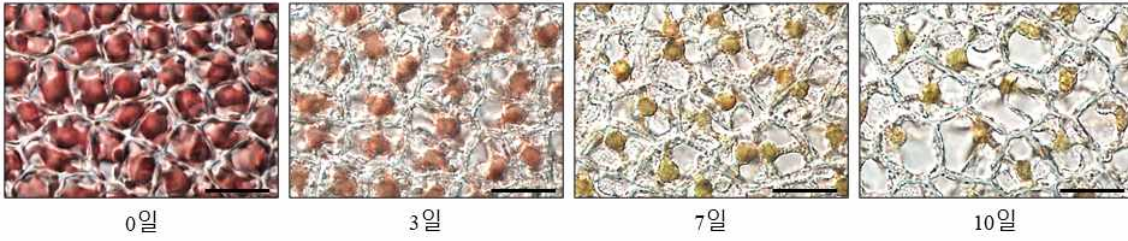


그림32. 일반 김에 L-ascorbic acid (비타민 C) 농도별로 처리

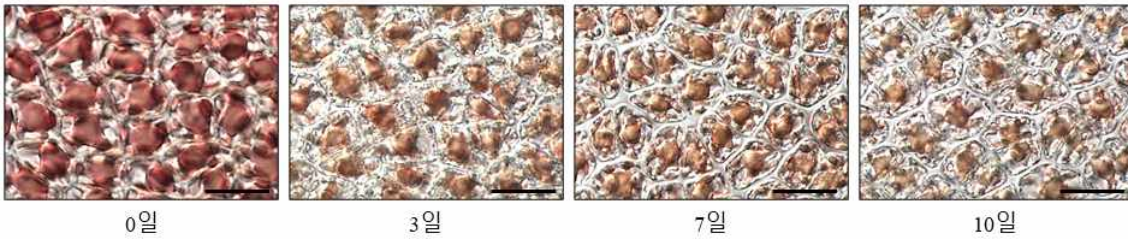
- 황백화의 원인으로 판단되는 엽록체 ROS를 완화시킬 수 있는 ascorbic acid를 일반 김에 농도별로 처리하여 질소결핍배지에서 10일 동안 통기 배양함

L-ascorbic acid 지속처리

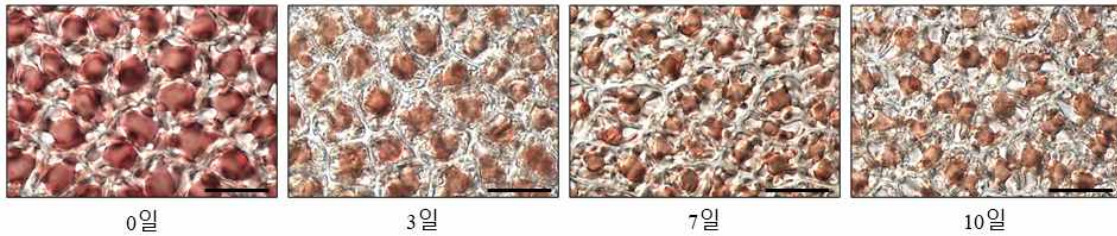
Control



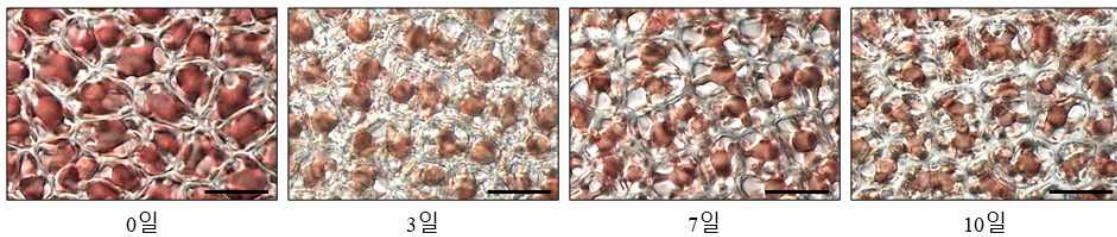
0.1mM



0.5mM



1mM



Scale bar : 20 μ m

그림33. L-ascorbic acid (비타민 C) 농도별로 처리 후 10일 동안 배양한 김 세포 사진

- 질소결핍조건에서 김 엽체에 ascorbic acid를 처리한 결과, 현미경으로 관찰했을 때 처리를 하지않은 대조군에서는 10일 이내에 황백화가 유도되는 반면 ascorbic acid를 처리해준 군에서는 농도가 높아질수록 시간이 지남에 따라 엽록체의 형태와 색이 더 안정적으로 유지되는 것을 확인할 수 있었음

L-ascorbic acid 지속처리

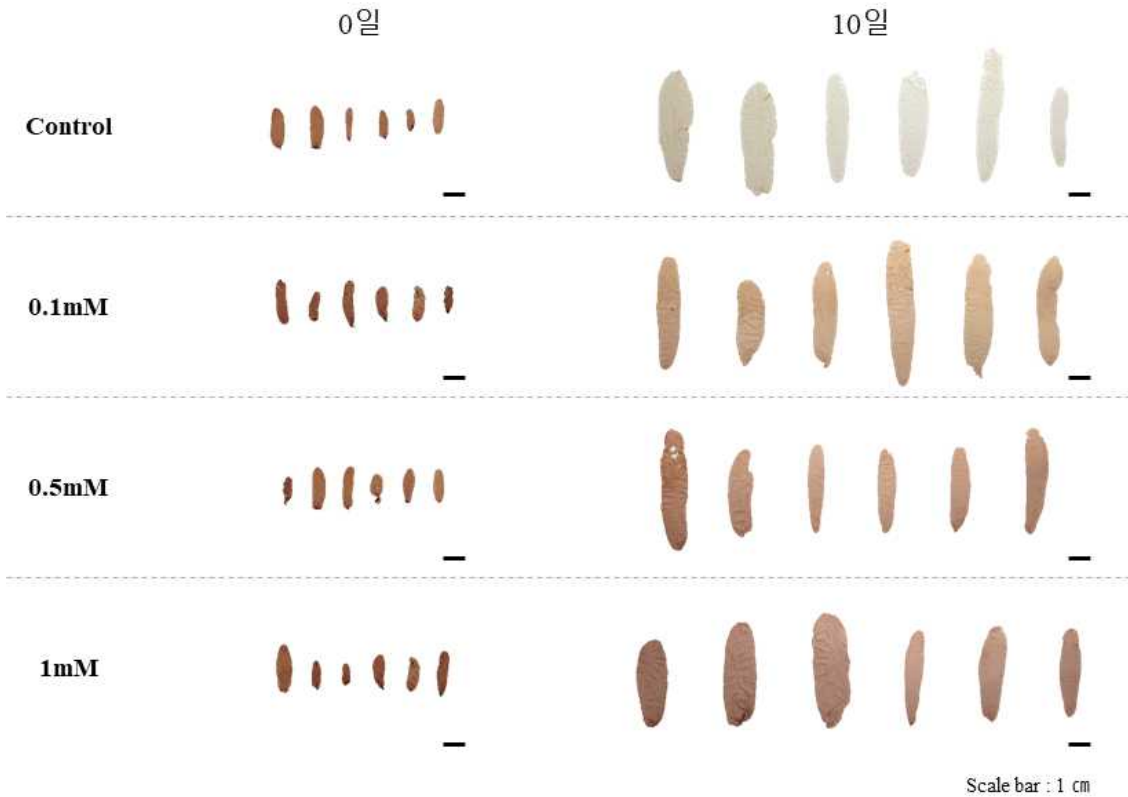
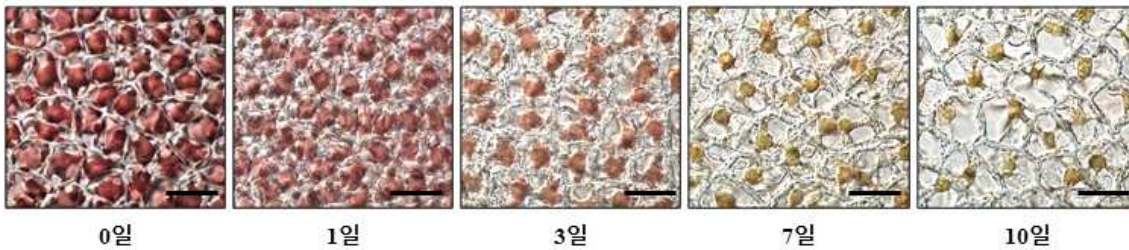


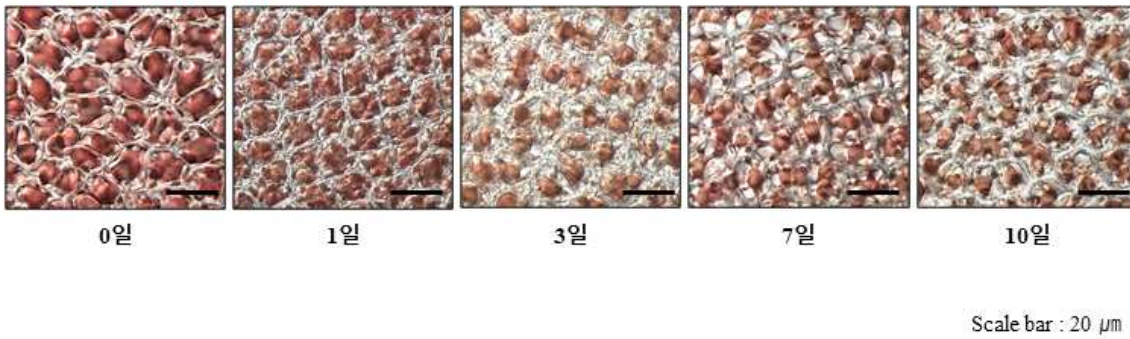
그림34. L-ascorbic acid (비타민 C) 농도별로 처리 후 10일 동안 배양한 김 엽체 사진

- 육안으로 관찰해보아도 그 차이를 확연하게 볼 수 있었으며 ascorbic acid가 황백화의 원인으로 판단되는 엽록체 ROS를 완화시켜주는 것으로 확인되었음
- 이를 통해 ascorbic acid가 황백화 현상에 대해 효과가 있는 것으로 생각되며 실제 양식장에서 황백화가 발생했을 때 질소와 철 성분과 ascorbic acid를 적절히 배합한 비료를 사용하면 좀 더 나아질 것으로 판단됨

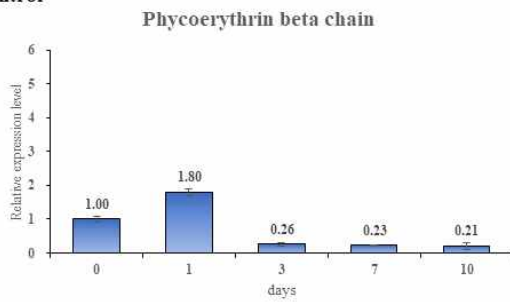
Control



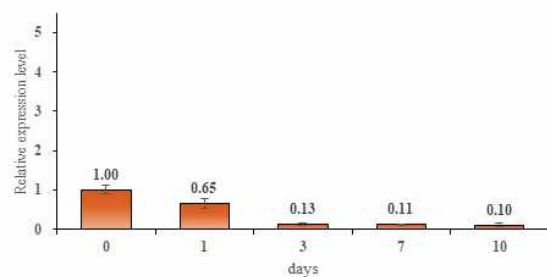
L-ascorbic acid 1mM



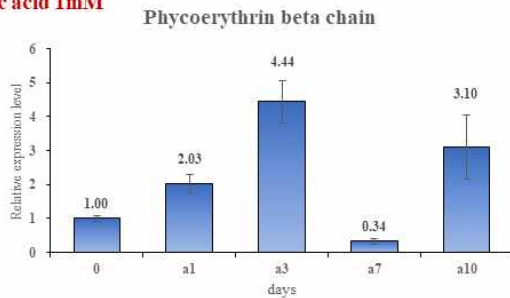
Control



Phycocyanin beta chain



L-ascorbic acid 1mM



Phycocyanin beta chain

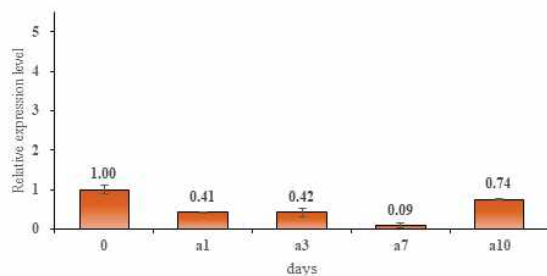


그림35. L-ascorbic acid (비타민 C) 지속 처리 후 phycobilisome을 구성하는 관련 유전자 발현량 분석

- 시간별로 ascorbic acid를 처리하지 않은 대조군과 ascorbic acid를 1mM 처리한 군의 phycobilisome을 구성하는 관련 유전자 발현량을 분석하였으며 처리한 군의 색소체 유전자가 현저히 높게 발현한 것을 확인하였음
- 황백화 현상에 대한 반복적인 세포학적 관찰을 통해 안정성 테스트를 수행하였으며 RNA 추출, cDNA 합성 및 real-time PCR 등과 같은 분자적 실험을 통해 DB를 구축함

2. 우량 환경내성 김 종자 생산기술 개발 및 국내외 산업화

가. 개발품종의 유리사상체 국내분양

2020-2021년 사상체 분양 계획

구분 (연도)	사상체 분양 내용	분양 업체	패각 사상체 생산량
4차년도 (2020)	사상체 1,000g	서천 ㈜선진수산	176,000 상자(1상자/40패각)
	사상체 1,000g	해남 믿음수산	176,000 상자(1상자/40패각)
	사상체 300g	진도 동해수산	52,800 상자(1상자/40패각)
	사상체 300g	해남 한국수산	52,800 상자(1상자/40패각)
	사상체 300g	무안 수암종묘	52,800 상자(1상자/40패각)

양식 면적

구분 (연도)	채묘업체	양식업체	양식면적
4차년도 (2020)	서천 ㈜선진수산	서천(마량) 삼호수산 외 3개 업체	300 Set(1 Set/60대)
		서천(비인) 동백수산 외 4개 업체	400 Set(1 Set/60대)
		개야도 한김수산 외 3개 업체	350 Set(1 Set/60대)
		선재도 4개 업체	50 Set(1 Set/60대)
		국화도 1개 업체	20 Set(1 Set/60대)
	동해수산, 믿음수산, 한국수산, 수암종묘	전남 지역(진도, 해남, 고흥, 영암) 30개 업체	총 350 Set(1 Set/60대) 규모

그림36. 2020-2021년 유리사상체 분양 현황

- 골드1, 3호는 2019-2020년 총 3,100g 유리사상체가 분양 되었으며 2020-2021년 총 2,900g 유리사상체 분양이 계획되어 있으며 2020년 12월부터 분양을 시작하고 이듬해 3월까지 전국의 패각사상체 배양업체에 1,000g부터 300g 까지 분양 예정임.

사상체 분양

구분 (연도)	사상체 분양 내용	분양 업체	패각 사상체 생산량
3차년도 (2019)	사상체 2,200g	서천 ㈜선진수산	387,200 상자(1상자/40패각)
	사상체 300g	해남 믿음수산	52,800 상자(1상자/40패각)
	사상체 300g	진도 동해수산	52,800 상자(1상자/40패각)
	사상체 300g	진도 정가네수산	52,800 상자(1상자/40패각)

그림37. 2020-2021년 유리사상체 분양 현황

- 2020년 12월 “한국해조류종자연구소”와 가족회사 및 기술이전 협약을 맺고 이에 따른 유리사상체 배양에 관한 전반적인 기술과 개발품종의 특성에 관한 공동연구를 진행할 예정이며 골드1, 3호의 분양도 가족회사인 한국해조류종자연구소를 통해 분양할 예정임
- 2021년 개발품종의 패각사상체 분양량은 약 50만 상자 이상이며 이는 국내 김 양식 점유율 25% 이상으로 확인됨

골드 1, 3호 마른김 수출 진행 상황(2020.10 현재)

(직접수출 : 선진수산)

품목	품종	연구 책임자	연구기관	수출 국가	수출 날짜	수출액(\$)
김	골드 1호	김광훈	공주대학교	중국	2020.01	35,148
					2020.02	120,205
					2020.03	0
					2020.04	219,619
					2020.05	0
					2020.06	0
					2020.07	0
					2020.08	0
					2020.09	0
					2020.10	0
소계						374,972 \$

(간접수출 : ((주)대창수산)

품목	품종	연구 책임자	연구기관	수출 국가	수출 날짜	수출액(원)
김	골드 1호	김광훈	공주대학교	중국	2019.12	2,569,059,600
					2020.01	1,639,209,600
					2020.02	2,191,125,600
					2020.03	2,207,907,600
					2020.04	0
					2020.05	0
					2020.06	0
					2020.07	0
					2020.08	0
					2020.09	0
2020.10	0					
소계						8,607,302,400원

그림38. 2020년 골드1, 3호의 가공김 수출현황

- 골드1, 3호는 물김 생산 후 서천에 위치한 (주)선진수산 마른김 가공공장에서 마른김을 생산 하였으며 2019-2020년 중국으로 수출판매 (2019년 12월부터 2020년 10까지 약 4억 원(직접수출)하였음
- (주)선진수산 마른김 공장에서 골드1, 3호 마른김을 해외 수출용 원료로 가공하여 (주)대창수산에 2020년 10월 현재까지 총 80억 원 상당의 마른김을 판매하였음
- 12월까지 50만\$(직접수출) 예정이며 (주)대창수산과 (주)대천김에서는 골드1호, 3호(특허출원, 등록) 조미김을 2018 하반기부터 상표등록 후 수출판매 하고 있으며 추후 수출 확대 예정에 있음
- 골드1, 3호는 2020년 10월까지(직, 간접 수출) 약 85억 원으로 집계 되었고 2020-2021년 골드1, 3호 사상체 확대 분양으로 수출 금액 100 억 원 달성 계획에 있음

나. 개발품종의 수출전략 및 현지 생산 가공업체 방문을 통한 수출판매

- 골드 1호의 품종 수출을 위해 2020년 01월 가족회사인 (주)선진수산을 통해 일본 “사가현 김 양식협회”와 접촉하여 현지를 방문 1차 회의를 진행하였으며 회의에 참석한 결과 현지에서 골드1호의 가공품(마른김) 대한 큰 관심을 보여 2020년 2월 골드1호의 수출을 위한 협약체결((주)선진수산-사가현 김양식협회)을 하였고 2020년 11월 이후 년 간 100만불 규모의 마른김 및 가공김 수입 의사를 밝혔음
- 2020년 01월 일본 사가현 마른김 위판장을 방문하여 수출(마른김)을 위한(일본 사가현) 회

의를 진행 하였으며 2020년 11월 이후 골드1호 마른김 수출 후 일본 현지에 맞는 조미법을 이용하여 가공 및 판매 예정임

- 이로 인해 2020년 11월 이후 골드1호 마른김 및 가공김 일본 수출 예정이며 수출 규모는 직, 간접 수출로 약 100만 달러로 예상하고 있음



그림39. 2020년 01월 일본 사가현 김양식협회 및 김 가공공장 현지답사

- 2020년 상반기 Covid-19로 인해 수출 관련 바이어의 입국이 불가능한 점을 감안하여 당초 수출물량에 대해 계약과 관련된 내용이 일부 수정 및 변경 될 수 있음

3. 개발품종의 영양학적 평가 및 기능성 성분 분석

가. 골드1, 2, 3호 기능성 및 영양학적 평가

(1) 내병성 김 (골드 1호)의 일반성분 분석 및 기능성 평가

- 본 과제를 통해 개발되어 수출되고 있는 내병성 김의 일반성분 분석 및 기능성 평가를 위해 70% EtOH 과 DW 추출을 진행하였고 연구에서 사용된 골드 1호는 기존에 개발된

NT1과 다른 년도에 생산되었으며 이를 NT1-1이라고 표기하였음

- NT1-1의 70% EtOH 과 DW 추출물의 수율 및 일반성분 (단백질, 다당류, 및 폴리페놀)을 분석한 결과 추출 용매 상관없이 일반성분 중 단백질 함량이 가장 높은 것으로 확인함. 특히, 70% EtOH 추출물보다 DW 추출물에서 폴리페놀을 제외한 수율, 단백질, 다당류 함량이 높은 것으로 확인함

표2. 추출 조건에 따른 NT1-1의 수율 및 일반성분 분석

	Yield	Proximate composition		
		Protein	Polysaccharide	Polyphenol
70% EtOH	12.33 ± 0.00	31.99 ± 0.14	13.52 ± 1.08	0.53 ± 0.00
DW	41.40 ± 0.85	43.44 ± 0.43	18.46 ± 1.58	≤ 0.00

- NT1-1의 70% EtOH 과 DW 추출물의 항산화 효능 평가를 위해 활성산소 (DPPH, Alkyl, 및 Hydrogen peroxide) 소거능을 측정함
- 그 결과, 70% EtOH 추출물보다 DW 추출물에서 우수한 IC₅₀ (µg/ml) 값을 나타남을 통해 추후 DW 추출물의 기능성 평가를 수행중에 있음

표3. 추출 조건에 따른 NT1-1의 항산화 효능 평가

	ROS scavenging activity			IC ₅₀ (µg/ml)
	Hydrogen peroxide	DPPH	Alkyl	
70% EtOH	1.10 ± 0.05	0.27 ± 0.00	0.30 ± 0.01	
DW	0.23 ± 0.02	0.36 ± 0.00	0.14 ± 0.00	

(2) 고온내성 (NT2) 김의 생리활성 성분 분석 및 기능성 평가

- 고온내성 (NT2) 김 유래 다양한 효소 추출물 중 우수한 항산화 효능을 보인 Neutrase를 분리하고 이를 세포 및 체브라피쉬 모델에서 다양한 생리활성을 평가함
- 추후 실험에서는 고온내성 (NT2) 김 유래 Neutrase 가수분해물을 NAE (Neutrase assisted extract) 라고 하며 10 kda 이상은 10A (10 kDa above), 이하는 10B (10 kDa below) 라고 표기함
- 한외여과막을 이용하여 NAE를 분자량 (10 kDa 이하/이상) 에 따라 분리하였으며 이를 SDS-PAGE를 통하여 확인함. 위의 결과에서 NAE의 경우 전체적으로 분포되는 것을 확인함. 한외여과막을 이용하여 분자량에 따라 분리한 경우, 10A는 분자량 10 이상에서 진한 파란색의 띠를 확인함

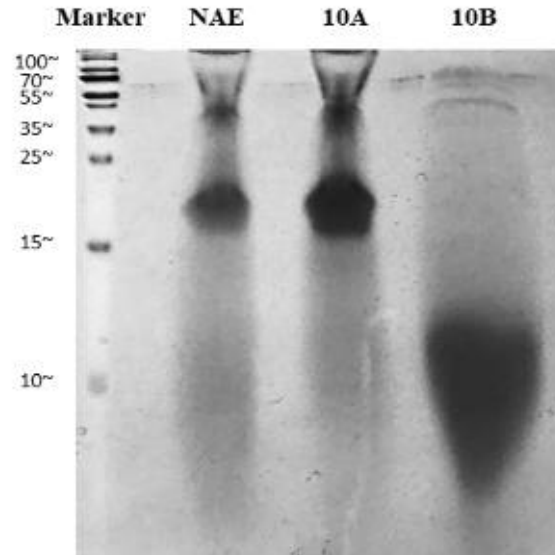


그림 40. SDS-PAGE를 이용한 NAE, 10A, 및 10B의 분자량 확인

- 아미노산은 단백질의 최소단위로 우리 몸을 구성하는 중요한 영양소로 필수 아미노산 함량은 식품 단백질의 영양적 가치 평가 기준으로서 매우 중요함
- 이에 따라, NAE, 10A, 및 10B의 아미노산 구성성분을 통해 분자량에 따른 분리가 아미노산 함량 차이의 여부를 확인함
- 전체적으로 10B의 아미노산 총 함량이 NAE보다 증가하는 것을 확인하였으며, 필수 아미노산 함량에서도 증가하는 것을 확인함

표4. NAE, 10A, 및 10B 의 아미노산 구성성분 분석

Amino acids	µg/mg		
	NAE	10A	10B
† CYA*	1.83	1.01	3.65
ASX**	44.67	29.20	48.18
GLS**	50.48	33.92	61.09
SER	22.27	15.39	30.07
GLY	29.99	20.96	44.50
† HIS	6.82	3.96	9.81
ARG	19.44	10.10	31.12
† THR	22.33	15.23	30.63
ALA	39.95	28.83	58.69
PRO	24.30	17.47	36.03
TYR	7.52	2.02	20.21
† VAL	29.09	18.53	35.39
† MET	11.08	6.58	16.54
† ILE	18.96	11.93	23.25
† LEU	32.17	20.74	40.97
† PHE	20.85	13.47	25.75
† TRP	1.63	0.60	0.43
† LYS	27.33	17.72	35.38
TOTAL	410.73	267.67	551.68

† Essential amino acids (Hou and Wu 2018)

*CYA mean the sum of cysteine & cystine

**ASX, GLX mean the sum of asparagine & aspartic acid, and glutamine & glutamic acid

- 실험동물모델로서 주목받고 있는 제브라피쉬는 질환 관련 유전자를 포함하여 적어도 70% 유전자가 인간과 동일하게 존재함으로써 질환 및 생리활성 연구모델로 적합함에 따라 본 연구에서 사용됨
- 제브라피쉬 모델에서 H₂O₂로 산화적 스트레스를 유도시키고 10B 처리에 따른 생존율을 측정 한 결과, H₂O₂만 처리한 군에서는 80% 이하의 생존율을 보이나, 10B를 농도별 (12.5, 25, 50, 및 100 µg/ml) 로 처리하였을 때, 농도의존적으로 90% 이상의 생존율을 확인함

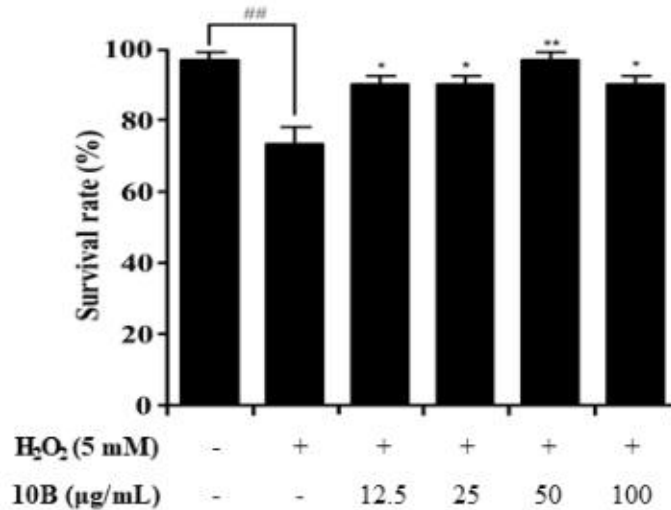


그림41. 제브라피쉬 모델에서 H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스로부터 10B 처리에 따른 생존율 변화

- 제브라피쉬 모델에서 H₂O₂로 산화적 스트레스를 유도시키고 10B 처리에 따른 심박수 변화를 측정된 결과, H₂O₂만 처리한 군에서는 90% 이하의 심박수를 보이지만, 10B를 농도별 (12.5, 25, 50, 및 100 µg/ml) 로 처리하였을 때, 농도의존적으로 90% 이상의 심박수를 증가시키는 것을 확인함

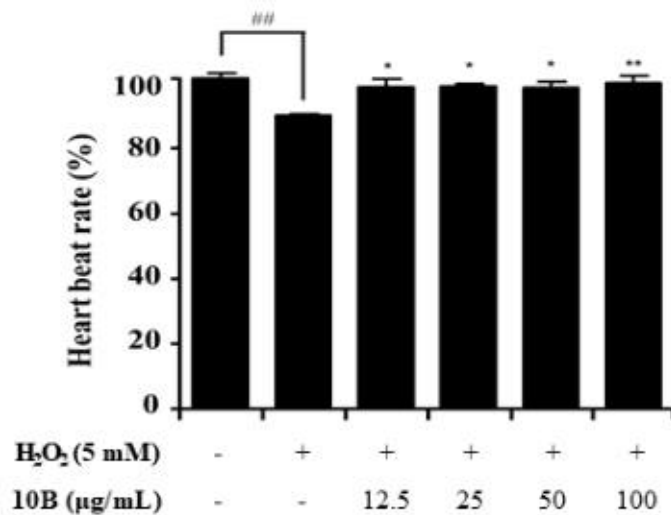


그림42. 제브라피쉬 모델에서 H₂O₂로 유도한 산화적 스트레스로부터 10B 처리에 따른 심박수 변화

- 이를 통해, NAE로부터 분리된 10B는 산화적 스트레스에 의한 우수한 항산화 효능을 나타내며 이는 잠재적으로 항산화제로서 산업적으로 기능성 식품 또는 화장품에 응용될 수 있을 것이라 사료되어짐에 따라 추후 에탄올에 대한 간보호, 고혈압, 항비만 및 화장품 관련 생리활성을 진행함
- 이전 연구에서 아미노산은 우수한 항산화 효능, 콜레스테롤 저하, 및 간기능 활성화 및

보호 효능이 있다고 보고됨. 이에 따라 아미노산 함량이 높고 우수한 항산화 효능을 보인 10B의 에탄올에 대한 간보호 효능을 제브라피쉬 모델에서 평가함

- 제브라피쉬 모델에서 에탄올 0.03%와 10B 처리에 따른 생존율을 측정된 결과, 에탄올만 처리한 군에서는 50%의 이하의 생존율을 보이나, 10B를 농도별 (12.5, 25, 50, 및 100 μ g/ml) 로 처리하였을 때, 농도의존적으로 생존율이 증가하는 것을 확인함

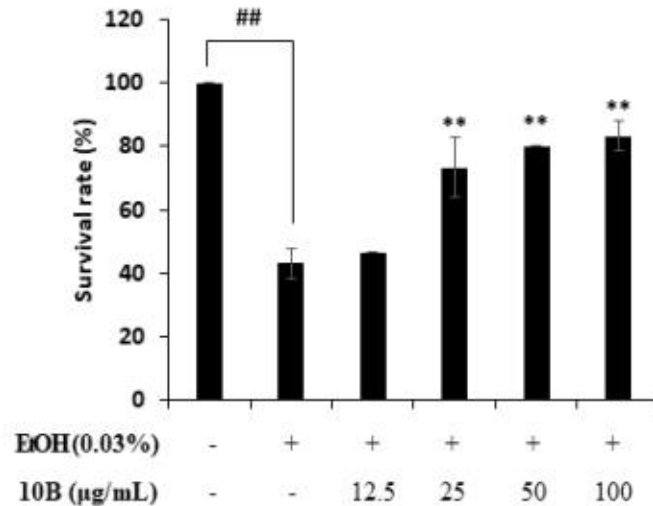


그림43. 제브라피쉬 모델에서 에탄올에 대한 10B 처리에 따른 생존율 변화

- 제브라피쉬 모델에서 에탄올 0.03%와 10B 처리에 따른 심박수 변화를 측정된 결과, H₂O₂만 처리한 군에서는 90% 이하의 심박수를 보이지만, 10B를 농도별 (12.5, 25, 50, 및 100 μ g/ml) 로 처리하였을 때, 농도의존적으로 심박수를 증가시키는 것을 확인함

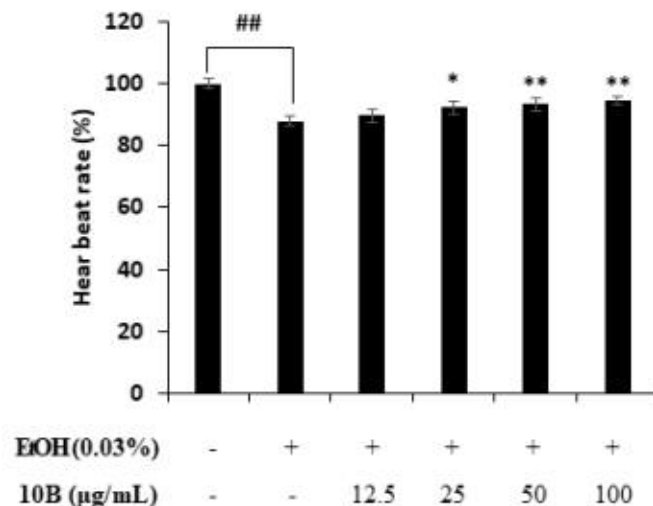


그림44. 제브라피쉬 모델에서 에탄올에 대한 10B 처리에 따른 심박수 변화

- 에탄올에 대한 보호 효능이 있음을 통해 추후 Glutathione (GSH) assay kit를 통해 간기능 정상화에 도움을 주는 GSH 수치 변화를 확인할 예정이다

- 이전 연구에서 항산화 효능이 있는 김 유래 생리활성 물질이 항고혈압 효능이 있음이 보고되어짐에 따라 본 연구에서 우수한 항산화 효능을 보인 NAE와 분자량에 따라 분리된 10A 와 10B의 항고혈압 효능을 평가함
- 고혈압 치료제로 많이 쓰이는 Angiotensin converting enzyme (ACE) 억제제는 angiotensin I에서 angiotensin II로 생성되는 것을 억제함. ACE는 angiotensin I에서 angiotensin II로 변환시키며 이에 따라 생성된 angiotensin II는 혈압을 상승시킴
- 이에 따라 ACE kit를 사용하여 NAE, 10A, 및 10B의 ACE 억제 활성을 확인함. 그 결과, NAE, 10A 및 10B는 농도가 증가함에 따라 ACE를 억제시키며 각각의 IC₅₀ (μg/ml)값은 175.19 ± 0.03, 374.76 ± 4.06, 및 57.83 ± 0.39 로 나타남. 특히, 10B에서 낮은 IC₅₀ (μg/ml)값을 보임
- 이에 따라, 세포실험을 통해 항고혈압 효능 평가 및 아미노산 염기서열 분석을 통해 추후 Molecular docking 시뮬레이션을 진행할 예정임

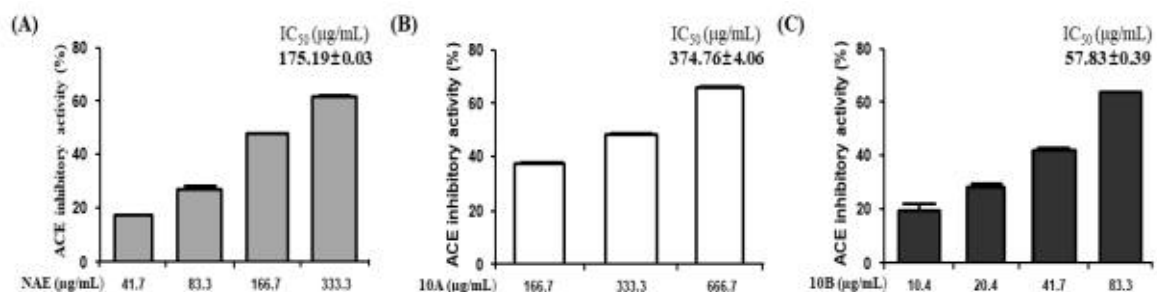


그림45. NAE, 10A, 및 10B의 항고혈압 효능 평가 (A) NAE, (B) 10A, (C) 10B

- 비만, 당뇨와 같은 대사성질환 진행에 영향을 주는 것이 산화적 스트레스라는 것을 통해 우수한 항산화 효능을 지닌 NAE, 10A, 및 10B 가 항비만 효능이 나타나는지 평가하고자 함
- 항비만 효능평가를 위해 지방세포인 3T3-L1 세포를 사용하였으며 분화를 통해 비만을 유도시켜 각 시료를 농도별 (50, 100, 및 200 μg/ml)로 처리하였을 때, 지방세포만 염색시키는 Oil red O staining 방법을 통해 지방 축적 억제 효능을 평가함
- 그 결과, 비만을 유도시킨 Control 군에서는 빨간색으로 염색된 지방이 축적된 것을 확인하였으나, 각 시료를 농도별로 처리하였을 때 빨간색이 줄고 지방 축적 억제 효능을 확인함. 특히, NAE에서 분리된 10B에서 지방 축적이 억제된 것을 확인함

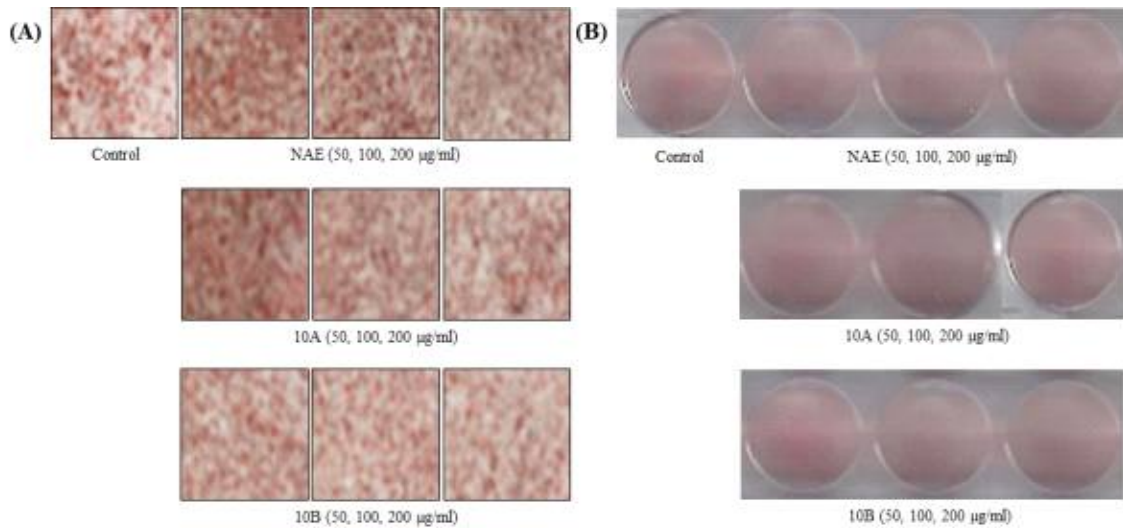


그림46. NAE, 10A, 및 10B의 항비만 효능 평가 (A) NAE, (B) 10A, (C) 10B

- 항산화제로서의 잠재력을 통해 산업적으로 화장품에 응용될 수 있을 것으로 사료되어짐에 따라 이와 관련된 실험으로써 미백 효능 평가를 수행함
- 미백효능평가를 위해 흑색종 세포 B16F10을 사용하였으며 α -MSH로 멜라닌 생성을 유도시켜 NAE에서 분리된 10B를 농도별 (25, 50, 및 100 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하였으며, positive control로서 미백효능이 있다고 알려진 arbutin을 사용함
- 그 결과, α -MSH만을 처리한 군에서 2배 이상의 멜라닌 함량이 증가하였으나, 10B를 농도별 (25, 50, 및 100 $\mu\text{g/ml}$)로 처리한 군에서는 농도의존적으로 멜라닌 함량이 감소하는 것을 확인함

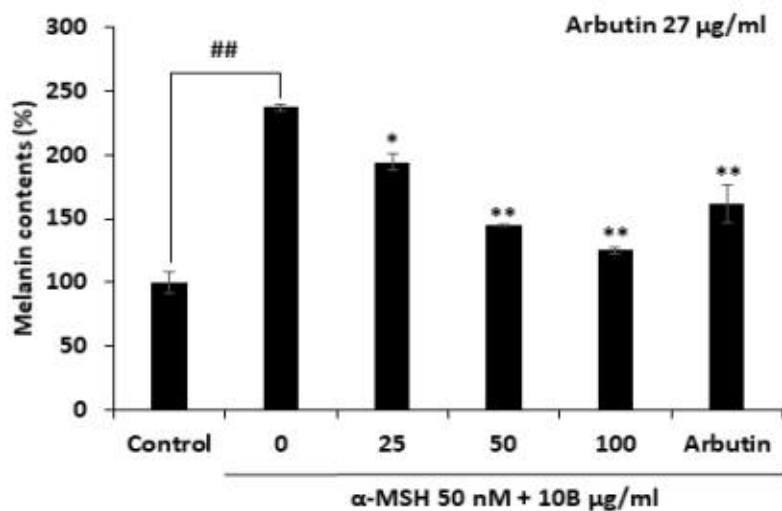


그림47. B16F10 세포에서 10B의 미백효능평가

- 위의 결과를 통해, NAE에서 분리된 10B를 *in vivo* 실험으로 제브라피쉬 모델에서 미백 효능평가를 수행함

- 멜라닌을 갖고 있는 제브라피쉬 모델에 일정기간동안 10B를 농도별 (25, 50, 및 100 μ g/ml)로 처리한 결과, 육안적으로 멜라닌이 감소하는 것을 확인함
- 위의 결과를 통해 멜라닌 함량을 측정 한 결과 농도에 따라 control군에 비해 멜라닌 함량이 감소하는 것을 확인함

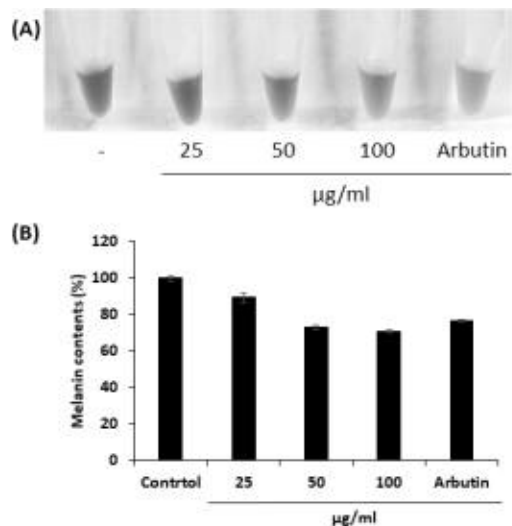


그림48. 제브라피쉬 모델에서의 미백효능평가

- 이에 따라, 아미노산 염기서열 분석을 통해 추후 Molecular docking 시뮬레이션을 수행할 예정
- (3) 고온성 잇바디돌김(골드3호) 김의 생리활성 성분 분석 및 기능성 평가
- 고온내성 잇바디돌김 신품종 (골드3호)가 기존에 시판되고 있는 김과 비교분석을 위해 일반성분 분석 및 기능성 평가를 위해 70% EtOH과 DW 추출을 진행함. 신품종 돌김을 NT3이라고 표기하며 기존에 시판되고 있는 김은 WT-1이라고 표기함
 - NT3 과 WT-1을 각각 70% EtOH 과 DW 에 추출하였으며 각 추출물의 수율 및 일반성분 (단백질, 다당류, 및 폴리페놀)을 분석한 결과 추출 용매 상관없이 일반성분 중 단백질 함량이 가장 높은 것으로 확인함

표5. 추출 조건에 따른 신품종 NT3과 시판김 WT-1의 수율 및 일반성분 분석

%

		Yield	Proximate composition		
			Protein	Polysaccharide	Polyphenol
70% EtOH	NT3	15.78 ± 0.51	41.60 ± 1.01	21.17 ± 0.58	≤0.00
	WT-1	22.17 ± 0.45	38.02 ± 0.87	9.39 ± 2.93	≤0.00
DW	NT3	24.90 ± 0.00	49.27 ± 0.00	21.76 ± 0.75	0.53 ± 0.00
	WT-1	49.82 ± 1.14	38.54 ± 0.72	43.58 ± 0.69	≤0.00

- NT3 과 WT-1의 70% EtOH 과 DW 추출물의 항산화 효능 평가를 위해 활성산소 (DPPH, Alkyl, 및 Hydrngen peroxide) 소거능을 측정 한 결과 NT3 과 WT-1의 70% EtOH 추출물 보다 DW 추출물이 우수한 IC₅₀ (µg/ml)을 확인함. 추후 각각의 DW 추출물의 기능성 평가를 수행중에 있음

표6. 추출 조건에 따른 신품종 NT3과 시판김 WT-1의 항산화 효능 평가

IC₅₀ (µg/ml)

		ROS scavenging activity		
		Hydrogen peroxide	DPPH	Alkyl
70%	NT3	1.09 ± 0.13	0.53 ± 0.03	0.36 ± 0.00
EtOH	WT-1	0.94 ± 0.05	0.36 ± 0.01	0.54 ± 0.03
DW	NT3	0.23 ± 0.01	0.41 ± 0.02	0.28 ± 0.01
	WT-1	0.24 ± 0.18	0.54 ± 0.01	0.27 ± 0.01

[5차년도]

1. 내병성 우량 김 종자에 대한 과학적인 라이브러리 구축과 데이터 베이스화

가. 내병성 품종의 안정성 DB구축(1-4년차 시험양식 결과 DB구축)

(1) 내병성 품종의 시험양식 결과

표1. 2017-2020년 내병성 품종 “골드1호”의 생산량과 단가(1ha. 기준)

내병성 품종(골드1호)				일반 방사무늬김			다카라(세업품종)		
수확년도	총량 (kg)	평균단가 (120kg/원)	총액 (원)	총량 (kg)	평균단가 (120kg/원)	총액 (원)	총량 (kg)	평균단가 (120kg/원)	총액 (원)
2017	49,320	125,000	51,375,000	44,700	94,000	35,015,000	40,570	111,000	37,527,250
2018	50,480	116,000	48,797,300	46,800	113,000	44,070,000	42,320	103,000	36,324,600
2019	47,890	93,000	37,091,500	43,670	90,000	35,752,500	39,430	84,000	27,601,000
2020	47,450	102,000	40,332,500	42,250	93,000	32,743,750	38,440	90,000	28,830,000
합계	195,140	109,000	177,596,300	177,420	97,500	147,581,250	160,760	97,000	130,282,850

출처. 서천 서부수협(2017-2020) 위판고

- 2021년 품종 등록된 내병성 품종 “골드1호”는 2017년 1차 재배심사과정과 동시에 일반분양을 하였으며 2020년 까지 품종의 안정성 테스트를 위한 시험양식을 실시하였음
- 골드1호는 2021년 품종등록 완료됐으며 5년차 안정성 테스트과정에 있고 테스트 마지막년도인 2021년 이후 전국 김 양식장 점유율 약 30% 이상일 것으로 판단됨



골드1호 품종등록증



골드1호 표본



골드 1호의 재배심사 과정

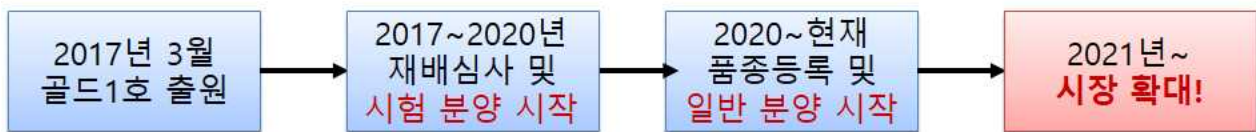


그림1. 골드1호 품종등록증 및 안정성 테스트 과정

- 2017년부터 2020년 까지 충남 서천에서 “골드1호”의 안정성 테스트 및 시험양식을 실시한 결과생산량과 단가에 있어 기존 품종(일반 방사무늬김, 세엽품종)에 비해 높게 나타났고 매년 수요가 증가하여 사상체의 필요량이 증가하고 있음
- 내병성 품종 골드1호의 경우 기존품종에 비해 평균단가가 가장 높았으며, 전체적인 생산량에서도 기존품종에 비해 약 20% 이상 높은 생산량을 나타냈으며 기존품종의 김 양식 시즌 평균 채취 횟수(약 7회)에 비해 1~2회 더 많은 수확을 하였고 이를 감안하면 평균 생산량과 단가는 더 높에 나타날 수 있음
- 골드1호 1ha. 시험양식결과 4년간의 총 생산량은 약 200톤 정도로 기존품종에 비해 우수하게 나타났으며 매년 골드1호 양식어가 소득이 약 20% 이상 높아진 것으로 판단됨
- 내병성 품종 골드1호는 전국 김양식장으로 확대되어 어가에서 양식중에 있으며 지역별 특성 분석을 위해 2020년 골드1호 물김 단백질 분석을 실시하였음
- 골드1호 및 대조구(재래품종)물김 산지는 진도, 고흥, 부안, 서천, 고군산, 당진, 군산, 선재도였으며 2020년 1월 물김의 단백질 함량이 가장 높은 시기에 채취하여 총단백질과 총지방의 함량을 분석한 결과 골드1호의 경우 평균 총단백질은 45%이상으로 나타났으며, 기존 품종은 평균 39%로 나타났음
- 골드1호의 평균 총단백질 45%는 돌김과 비슷한 수치이며 색택이 뚜렷하고 색소체 함량이 높아 관능성에 있어 뛰어나다는 것을 의미함

시험성적서

TEST REPORT

Report No. 2020KRIBS0431.001

page 1 of 1

시험기간 : 2020. 05. 14. - 2020. 06. 04.	발급일자 : 2020. 06. 04.
업체명 : 공주대학교	대표자 :
주소 :	
시료명 : 재래종(진도), 재래종(고흥), 재래종(부안), 골드1호(서천), 골드1호(군산), 골드1호(당진), 골드1호(고군산)	용도 : 내부 확인용
시험항목 : 총단백질 및 총지방 정량분석	시험방법 : KRIBS-033

시험결과

시료명	총단백질 (%)	총지방 (%)
재래종 (진도)	35.58	0.38
재래종 (고흥)	37.16	0.40
재래종 (부안)	40.74	0.36
골드1호(서천)	45.23	0.45
골드1호(군산)	43.76	0.39
골드1호(당진)	47.11	0.42
골드1호(고군산)	46.89	0.39

확인	시험자 성명	이평안 (서명)	승인자 성명	정호균 (서명)
비고	1. 본 시험성적서는 의뢰자가 제시한 시료에 대한 시험 결과이며 용도이외의 목적으로 사용을 금합니다. 2. 본 성적서의 이미지 무단도용 및 결과수치수정에 대한 사용은 법적일 제재를 받을 수 있습니다.			

한국의과학연구소장

대전광역시 중구 대흥로 28번길 6 한국의과학연구원빌딩 . 전화번호 : 042-716-2310 <http://www.okkr.kr>

본 문서는 한국의과학연구원의 자산이며 무단으로 복제 및 배포할 수 없습니다. [KRIBS-DF11-REV.C]

그림2. 골드1호의 지역별 생산물감 단백질 분석표

- 단백질 분석에 사용된 골드1호 및 기존품종의 양식과정에 있어 환경이 동일하다고 판단하기는 어렵지만 지역별 양식 환경에 적합한 방법으로 배양을 실시하였으며 활성처리제 및 영양제는 동일하게 사용하였음
- 이를 통해 골드1호 품종과 기존 품종은 총단백질 함량의 수치로 구분 할 수 있다고 판단

되며 추후 품질관리 및 Quality control에 있어 중요한 요소로 판단됨

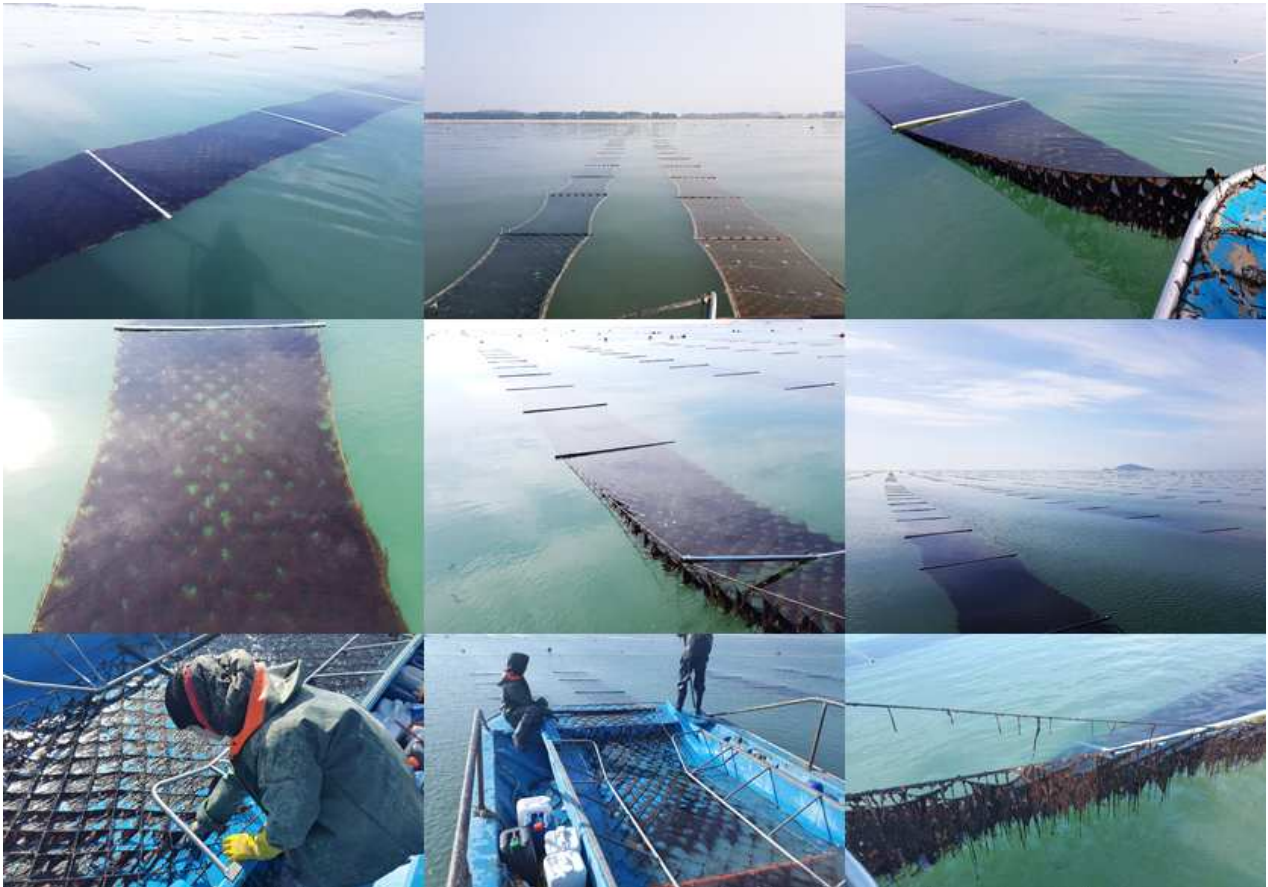


그림3. 골드1호 및 일반품종의 지역별 물김생산과정

(2) 내병성 품종의 관리지침 DB구축

- 내병성 품종 골드1호의 갯병 감염 특징 및 양식과정에 있어 표준관리 지침 및 갯병 DB, 골드1호 양식과정 매뉴얼을 제작함
- 기존의 김 3대 질병인 낭균병, 녹반병, 붉은갯병은 원인균주의 숙주인 김 세포에 침투하여 감염되는 방식으로 질병관리에 있어 주기적인 조사를 통한 사전 예방, 김발의 노출시간을 길게 하여 균의 번식을 억제하고 활성처리제 사용을 권장하며 심각한 감염을 나타내는 김 발은 냉동망으로 입고하여 저수온기인 1월에 양식장으로 재배치하는 것을 권장함
- 각각의 갯병에 특성을 분석하기 위해 갯병의 배양조건을 달리 하여 김 양식 어기와 관계 없이 갯병 테스트를 진행 하였고 이에 다른 결과에 대한 통계치를 정량함
- 갯병의 균주는 조건별 실험에 사용하기 위해 감염 균주가 출현하지 않는 4월부터 10월 까지 숙주인 김 염체를 일정기간별로 교체하여 보존하였음



그림4. 골드1호 양식장 갯병관리를 위한 표준 지침서 표지

- 붉은갯병은 내병성 품종 골드1호에 미치는 감염력은 낮으나 붉은갯병 감염률이 높아지는 수온상승기에 미약하게 감염이 일어나며 김 세포가 죽어가면서 엽체 내에 붉은색의 반점이 형성되며 시간이 지나면 녹색으로 변함
- 감염력이 강하고 전파 속도가 빨라 최초 감염 후 일주일 정도면 어장 전체로 확산됨 김 생산량을 감소시키고 품질이 저하되는 특징을 가짐

01 붉은갯병 (Red-rot disease)

원 인 - 붉은갯병균 (*Pythium porphyrae*)의 기생

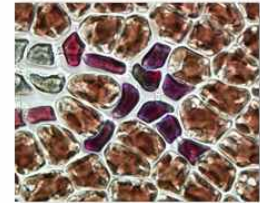
증 상 - 김 세포가 죽어가면서 엽체 내에 붉은색의 반점이 형성되며 시간이 지나면 녹색으로 변함
 - 감염력이 강하고 전파 속도가 빨라 최초 감염 후 일주일 정도면 여장 전체로 확산됨
 - 김 생산량을 감소시키고 품질이 저하됨

발병 시기 - 10월 ~ 2월 및 수온 상승기 (12~15℃)

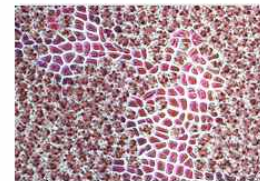
질병 관리 - 붉은갯병은 기생성 갯병으로 병변부를 육안으로 확인할 수 있을 정도로 진행된 상태에서는 특별한 대책이 없으므로 예방이 중요함
 - 주기적인 조사를 통한 사전 예찰
 - 김밭의 노출시간을 길게 하여 균의 번식을 억제
 - 활성처리제 사용
 - 감염된 김밭을 절거하여 냉동망으로 입고



▲ 붉은갯병 감염 엽체



▲ 붉은갯병 감염 부위



▲ 붉은갯병균 감염 엽체

그림5. 골드1호 양식장 갯병관리를 위한 표준 지침서(붉은갯병)

- 기존품종은 붉은갯병 감염 시 빠른 확산으로 김밭의 철수 및 수확량 감소로 이어지지만 골드1호는 감염력이 현저히 낮게 나타나며 조기 철수가 아닌 태양광 노출 및 활성처리제 시비로 억제 할 수 있음
- 이에 따라 골드1호는 붉은갯병 감염시 병변부를 육안으로 확인할 수 있을 정도로 진행된 상태에서는 활성처리제 시비 후 조기수확을 권장함
- 기존 품종에 비해 붉은갯병 감염력이 50%이상 억제되는 특징을 가지는 골드1호는 활성처리제 시비에 높은 억제력을 나타내며 효과가 뛰어난 활성처리제는 자체 개발하여 협력사에 기술이전 하였음
- 낭균은 붉은갯병과 같은 곰팡이성 질병으로 내병성 품종 골드1호에 미치는 감염력은 현저히 낮으나 김 엽체에 원형의 녹색 또는 황백색 반점이 발생하며 감염이 심해질수록 전체적으로 녹색 또는 황백색으로 변하고 낭균의 생활사 주기가 2~3일로 짧아서 최초 발생 지점에서부터 전체적으로 빠르게 퍼지는 것이 특징이며 감염부위가 탈락되어 생산량이 크게 감소함

- 12월 말에서 1월에 한 순간 폭발적으로 감염률이 증가 했다가 점점 감소하는 경향이 나타나며 이 때 질병관리를 제대로 하지 않으면 엽체의 손실이 커지므로 각별한 주의가 필요함
- 기존품종은 낭균병 감염 시 수확량 감소로 이어지지만 골드1호는 감염력이 현저히 낮게 나타나며 조기 철수가 아닌 태양광 노출 및 활성처리제 시비로 억제 할 수 있음
- 이에 따라 골드1호는 붉은갯병 감염시 병변부를 육안으로 확인할 수 있을 정도로 진행된 상태에서는 활성처리제 시비 후 조기수확을 권장하며 일반품종의 경우 냉동망 입고 후 저수온기에 양식장으로 재배치 하는 것을 권장함
- 기존 품종에 비해 낭균 감염률이 70%이상 억제되는 특징을 가지는 골드1호는 낭균병 감염에 높은 내성을 갖기에 일반품종 및 재래품종과 교차 양식을 통해 감염률을 낮추는 것이 옳다고 판단됨

02 낭균병 (Olpidiopsisdisease)

원 인 - 낭균 (*Olpidiopsis* spp.)의 감염

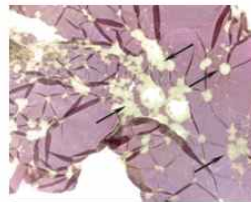
징 상

- 감염체에 원형의 녹색 또는 황백색 반점이 발생하며 감염이 심해질수록 전체적으로 녹색 또는 황백색으로 변함
- 낭균의 생활사 주기가 2~3일로 짧아서 최초 발생 지점에서부터 전체적으로 빠르게 퍼지는 것이 특징임
- 감염부위가 탈락되어 생산량이 크게 감소함

발병시기 - 12월 ~ 4월초

질병 관리

- 낭균병은 12월 말에서 1월에 한 순간 폭발적으로 감염률이 증가 했다가 점점 감소하는 경향이 나타나며 이 때 질병관리를 제대로 하지 않으면 엽체의 손실이 커지므로 각별한 주의가 필요함
- 주기적인 조사를 통한 사전예찰
- 활성처리제 사용
- 감염된 김발을 철거하여 냉동망으로 입고



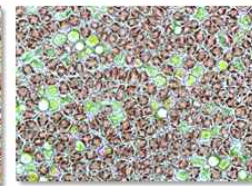
▲ 낭균병 감염 엽체



▲ 낭균병 유주자낭



▲ 낭균병 감염 부위
(*O. pyropiae* var. *koreane*)



▲ 낭균병 감염 부위
(*O. pyropiae*)

그림6. 골드1호 양식장 갯병관리를 위한 표준 지침서(낭균병)

- 녹반병은 바이러스성 질병으로 감염의 원인은 PyroV1 바이러스의 감염으로 육안 관찰로는 붉은갯병과 매우 유사한 특징을 나타냄

- 현미경적 관찰을 통해 정확한 구분이 가능하고 김 엽체에 녹색의 둥근 반점이 생기며 시간이 지나면 반점의 크기와 수가 증가하며 엽체의 탄력이 줄어 심각한 세균 오염을 동반함 또, 감염이 시작되면 일주일 내에 엽체 전반적으로 빠르게 퍼짐
- 11월 ~ 2월초 및 10 ℃ 이하의 수온에서 자주 발생하며 바이러스성 질병 특징인 빠른 감염으로 엽체의 손실이 커지므로 각별한 주의가 필요함
- 기존품종은 녹반병 감염 시 생육장애 및 생산량 감소로 이어지지만 골드1호는 감염력이 현저히 낮게 나타나며 감염시 병변부 조기수확으로 감염을 억제 할 수 있음
- 대부분 갯병의 특징이 이와 비슷하지만 약간의 차이를 보이기에 이를 혼동해서는 안되며 지침에 따라 주의한다면 안정된 생산성을 올릴 수 있음
- 기존 품종에 비해 녹반병 감염력이 50%이상 억제되는 특징을 가지는 골드1호는 녹반병 감염에 높은 내성을 갖기에 일반품종 및 재래품종과 교차 양식을 통해 감염력을 낮추는 것이 옳다고 판단됨

03 녹반병 (Green-spot disease)

원 인 - PyroVI 바이러스의 감염

징 상 - 육안 관찰로는 붉은갯병과 매우 유사한 특징을 나타내며 현미경적 관찰을 통해 정확한 구분이 가능함
 - 김 엽체에 녹색의 둥근 반점이 생기며 시간이 지나면 반점의 크기와 수가 증가함
 - 엽체의 탄력이 줄어들고 종종 심각한 세균 오염을 동반함
 - 감염이 시작되면 일주일 내에 엽체 전반적으로 빠르게 퍼짐

발병시기 - 11월 ~ 2월초 및 10 ℃ 이하의 수온

질병 관리 - 엽체의 50%이상 감염될 경우 수확이 가장 좋은 방법이며 감염 이후 생육은 기대하기 어려움
 - 대부분 갯병의 특징이 이와 비슷하지만 약간의 차이를 보이기에 이를 혼동해서는 안되며 지침에 따라 주의한다면 안정된 생산성을 올릴 수 있음



▲ 녹반병 감염 엽체



▲ 녹반병 감염 부위



▲ 녹반병 감염 부위

그림7. 골드1호 양식장 갯병관리를 위한 표준 지침서(녹반병)

- 황백화 현상의 원인은 해수 중 용존 무기질소 함량 감소(0.07mg/L 이하)로 육안 관찰로는 갯병과 매우 유사한 특징을 나타내지만 병원체에 의한 질병이 아닌 영양부족으로 나타나는 현상임
- 김 엽체가 황백색으로 변하고 10일 이내에 원래의 색으로 돌아오며 황백색으로 변한 시기에 정상적인 생장이 이루어지고 현미경으로 관찰하면 액포가 비대해지고 색소체가 황백색을 띠
- 11월 ~ 12월 김 양식 초기에 주로 발생하며 수확시기에 황백화 현상이 나타나면 물김의 품질이 현저히 떨어지므로 김 엽체가 황백색으로 변한 경우 질소성분이 포함된 영양물질을 공급하고 색이 정상적으로 회복될 때 까지 수확을 미루는 것이 바람직함
- 골드1호는 단백질 함량과 색소체 함량이 기존품종에 비해 높아 황백화 현상에 노출되는 시기가 짧고 회복시점도 빠른 특징을 가지고 있음
- 황백화 현상은 갯병의 특징이 이와 비슷하지만 병원체에 감염을 통한 질병이 아니므로 이를 혼동해서는 안되며 지침에 따라 주의한다면 김 양식장의 황백화 현상을 예방 할 수 있다고 판단됨

04 황백화 (Chlorosis)

원 인 - 해수 중 용존 무기질소 함량 감소 (0.07mg/L 이하)

징 상 - 김 엽체가 황백색으로 변하고 10일 이내에 원래의 색으로 돌아옴
 - 황백색으로 변한 시기에도 정상적인 생장이 이루어짐
 - 현미경으로 관찰하면 액포가 비대해지고 색소체가 황백색을 띠

발병시기 - 11월 ~ 12월에 주로 발생함

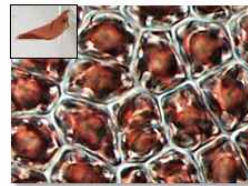
질병 관리 - 주기적으로 영양염 농도를 모니터링하고 영양염 농도가 낮을 경우 수확 시기를 앞당기는 것이 좋음
 - 김 엽체가 황백색으로 변한 경우 질소성분이 포함된 영양물질을 공급하고 색이 정상적으로 회복될 때 까지 기다림



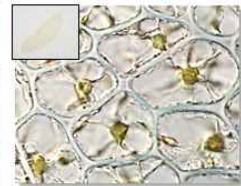
▲ 정상 김밭



▲ 황백화 김밭



▲ 정상 김 세포



▲ 황백화 김 세포

그림8. 골드1호 양식장 갯병관리를 위한 표준 지침서(황백화)

- 구조 부착증 현상의 원인은 구조류의 대량 번식 및 부착 (*Nacicula* sp., *Licmophora* sp.) 으로 육안 관찰로는 김 엽체의 색이 탁하게 나타나는 것이 특징이며 구조류가 대량 번식 하여 김 엽체에 부착해 노란색 막을 형성하며 손에 묻어남
- 갯병에 걸린 김에서 구조의 성장과 전파 속도가 빨라지며 구조가 김 양식장 전체로 확산 되면 김의 성장을 저해하고 결과적으로 김의 품질을 저하시킴
- 12월 ~ 03월 주로 발생하며 저수온기 해수의 철분함량이 많아지는 시기 나타나는 현상으로 활성처리제 시비로 대부분 억제됨
- 갯병에 감염된 엽체에 구조부착증이 나타나면 생육에 있어 심각한 문제를 초래 할 수 있으나 수확 직전 활성처리제를 사용하고 인(P)을 포함한 영양물질 사용을 자제한다면 큰 문제를 일으키지 않을 것으로 판단됨

골드1호 김 양식장의 관리를 위한 표준 지침

부록

연구 협력 체계

김 양식지역 지자체 수산과
피해발생 신고 접수
현장조사 지원
행정 지원



공주대학교
해양환경 모니터링
사전예찰 정보 제공
현장조사
갯병 진단
피해 대책 제시

(주)한국김산업연합회

기초자료 제공
현장조사 지원
피해 대책 방안 자문

관련기관 연락처		
기관명 (담당부서)	주소	전화
진도군청 (수산지원과)	전라남도 진도군 진도를읍마길 25	061-540-3551
국립공주대학교 (조류세포생리학 실험실)	충청남도 공주시 공주대학교 56 자연과학대학 생명과학과 205호	041-850-8504
한국김산업연합회	전라남도 무안군 삼향읍 용광대로 242, 전남개발빌딩 401호	061-287-4370
한국김생산자연합회	전라남도 목포시 고하대로 597번길 57	061-247-0985
주요별 (개발본부)	전라북도 군산시 외항1길 32-31 주요별	010-8719-3132

분류	감염성 질병			생리적 질병	해적생물
	붉은갯병	남균병	녹색병	황백화	규조류 부착증
원인	붉은갯병균의 감염	남균의 감염	바이러스의 감염	해수 중 용존 무기질소량 감소 (0.07mg/L 이하)	규조류 대량 번식 및 부착
증상	녹색 또는 붉은색 반점 감염부위 탈락	녹색 또는 황백색 반점 감염부위 탈락	녹색의 등근 반점 엽체의 탄력 감소	황백색의 엽체 * 무기질소량 증가 시 색이 돌아옴	김 엽체 주변의 노란색 막 * 손에 묻어 남
발병시기	10~2월 (수온 상승기)	12~4월 초	11~2월 초 (10°C 이하)	11~12월에	12~3월 초
질병관리	주기적인 조사를 통한 사전예찰 합성처리제 처리	주기적인 조사를 통한 사전예찰 합성처리제 처리	감염된 엽체 수확	주기적인 영양염 농도 모니터링	수확 직전 합성처리제 처리
	감염된 김발 제거 및 냉동방입고	감염 김발 제거 및 냉동방입고		모니터링을 통한 수확시기 조절 * 질소성분이 포함된 영양물질 공급	인(P)을 포함한 영양물질 사용 자제
	김발의 노출 시간 증가				

그림9. 골드1호 양식장 갯병관리를 위한 표준 지침서(연구협력체계)

- 현장어민을 통해 피해발생 신고 접수, 현장조사 지원, 행정 지원을 바탕으로 김 양식지역 각 지자체 및 한국김산업연합회와 연구 협력 체계를 구축하여 골드1호 및 일반 김양식 과정에 있어 피해발생 신고, 접수현장조사 지원, 행정 지원을 통해 해양환경 모니터링 사전예찰 정보 제공, 현장조사, 갯병 진단, 피해 대책에 대한 메뉴얼 제작·배포 예정임

나. 내병성 품종의 지표성분 표준화 및 생리활성에 대한 라이브러리와 DB 구축

(1) 내병성 품종의 지표성분 분석

- 실험에 사용한 골드1호 물김 엽체는 2020년 12월 서천에서 채묘 후 10주차의 물김 엽체를 이용하여추출 수율의 향상을 위해 잘게 분쇄한 후 감칠맛을 좌우하는 글루탐산, 류신, 아르기닌의 함량을 분석하였음
- 골드1호의 물김은 일반 재래종 물김에 비해 글루탐산, 류신, 아르기닌의 함량이 높게 나타났으며 글루탐산 함량에서 재래종에 비해 70% 이상 높게 나타났으며, 류신은 100%, 아르기닌 600%로 높게 나타났음

- 이 결과는 엽체의 짙은 색소체를 가진 골드1호만의 특징을 나타내고 있으며 김 양식과정에 있어 품종의 유전자 마커(DNA marker)이외의 품종을 분류하는 방법으로 사용이 가능함

- 골드1호의 물김에서 지표성분의 차이를 비교한 결과는 물김을 이용하는 여러 식품 성분 분석의 기초 자료로 이용될 수 있으며 이를 통해 목적에 맞는 식품의 제조 및 제형을 이용한 기능성 제품의 개발에도 유용하게 응용될 수 있을 것으로 판단됨

1. 유리아미노산 분석결과

영문명	국문명	골드1호	재래종
		Conc(mg/L) = ppm	Conc(mg/L) = ppm
P-Set	포스포세린	0.0000	0.0000
Tau	타우린	579.2511	586.3657
PEA	페탄올아민인산	0.0000	0.0000
Urea	요소	0.0000	0.0000
Asp	아스파르트산	26.0825	48.7314
Thr	트레오닌	12.3273	8.2966
Ser	세린	2.7709	0.1555
Glu	글루탐산	439.8469	247.0446
Sar	사르코신	0.0000	0.0000
α -AAA	알파-아이노아미노프산	0.0000	0.0000
Gly	글리신	9.9261	10.6126
Ala	알라닌	393.6164	348.1831
Cit	시트룰린	9.3024	19.4600
α -ABA	알파-아이노부티르산	0.0000	0.0000
Val	발린	19.7002	12.2451
Cys	시스틴	0.0000	0.0000
Met	메티오닌	0.0000	0.0000
Cysthi	시스타티오닌	0.0000	0.0000
Ile	이소류신	8.6616	4.7201
Leu	류신	12.1905	6.1923
Tyr	타이로신	5.6229	3.1649
Phe	페닐알라닌	6.3042	2.3810
β -Ala	베타-알라닌	0.0000	0.0000
β -AlBA	베타-아이노어소부티르산	0.0000	0.0000
α -ABA	알파-아이노부티르산	3.3039	8.3348
ECHNH2	에탄올아민	1.8990	1.9715
Trp	트립토판	0.0000	0.0000
NH3	암모니아	8.7232	17.2516
Hylys	하이드록시라이신	0.0000	0.0000
Orn	오르니틴	0.5505	2.3957
Lys	라이신	5.1582	1.8765
1Mehis	1-메틸히스티딘	0.0000	0.0000
His	히스티딘	1.7402	0.0000
3Mehis	3-메틸히스티딘	0.0000	0.0000
Ans	안세린	0.0000	0.0000
Car	카르노신	0.0000	0.0000
Arg	아르기닌	6.8543	0.5003
Hypro	하이드록시프롤린	0.0000	0.0000
Pro	프롤린	9.2213	5.3567

그림10. 골드1호의 유리아미노산 분석표

(2) 내병성 품종의 생리활성에 대한 라이브러리와 DB 구축

- 병원체 노출에 따른 활성산소 생성

- 난균성 병원균은 유주자 부착, 피낭형성, 발아관 성장, 부착기 형성, 감염 (균사성장) 단계로 이루어져 있으며 두 난균성 병원균 모두 부착 후 피낭형성 단계부터 활성산소종이 발생함

- 이후 유주자의 성장방향에 따라 활성산소종이 이동하는 것을 볼 수 있지만 낭균의 경우 완전히 숙주세포를 뚫고 감염이 되면 더 이상 활성산소종을 생성하지 않음

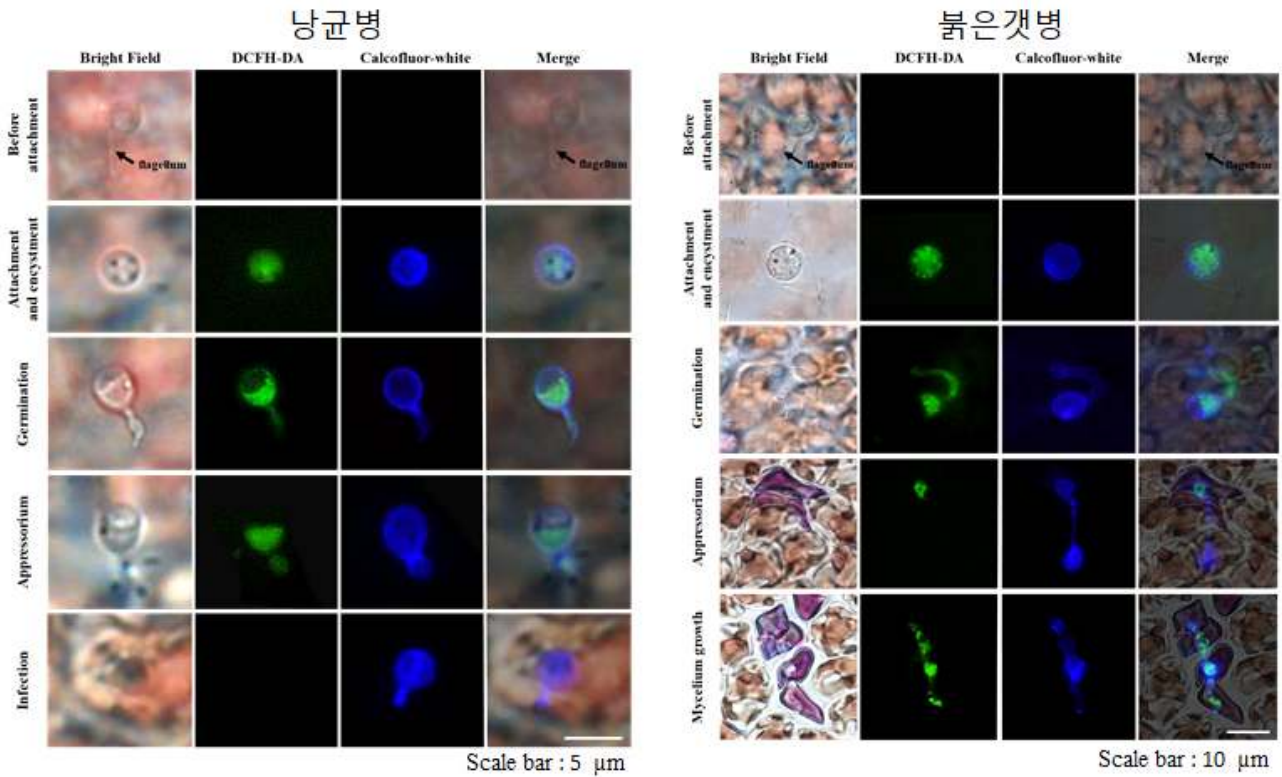


그림11. 병원체 감염을 위한 발달 시 활성산소종 생성여부 DCFH-DA assay

- 무처리구의 김 엽체는 활성산소가 발생하지 않지만 난균성 병원균인 낭균병, 붉은갯병의 감염시 노출 약 1시간 이내에 다량의 활성산소가 숙주세포 표면에서 발생하며 시간이 지남에 따라 활성산소종의 생성은 줄어 병원체 노출에 의해 일시적이고 빠르게 활성산소종이 발생함
- 육상식물은 NADPH oxidase에서 생성된 활성산소종으로 초기 빠른 방어작용이 일어나고 NADPH oxidase에서 발생하는 활성산소종의 생성을 억제 했을때 병원체를 접종하여도 활성산소종이 발생하지 않음

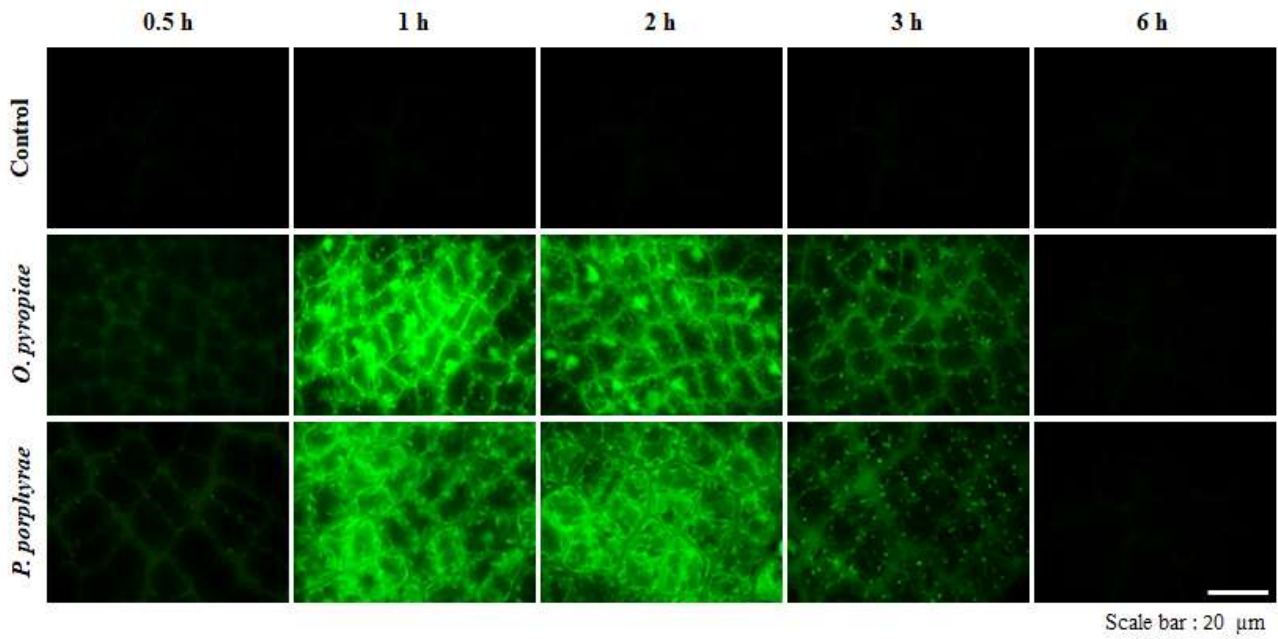


그림12. 병원체 감염을 위한 발달 시 활성산소종 생성여부 DCFH-DA assay

- 숙주세포 NADPH oxidase 저해제(DPI)에 따른 세포 자살을 변화는 10 uM DPI 전처리 후 두 난균성 병원균을 접종시켰을 때, 세포 자살률은 오히려 감소하는 것을 볼 수 있었고 NADPH oxidase에 의한 활성산소종 생성은 세포자살을 촉진하는 신호로 작용하여 병원균의 확산을 저해함

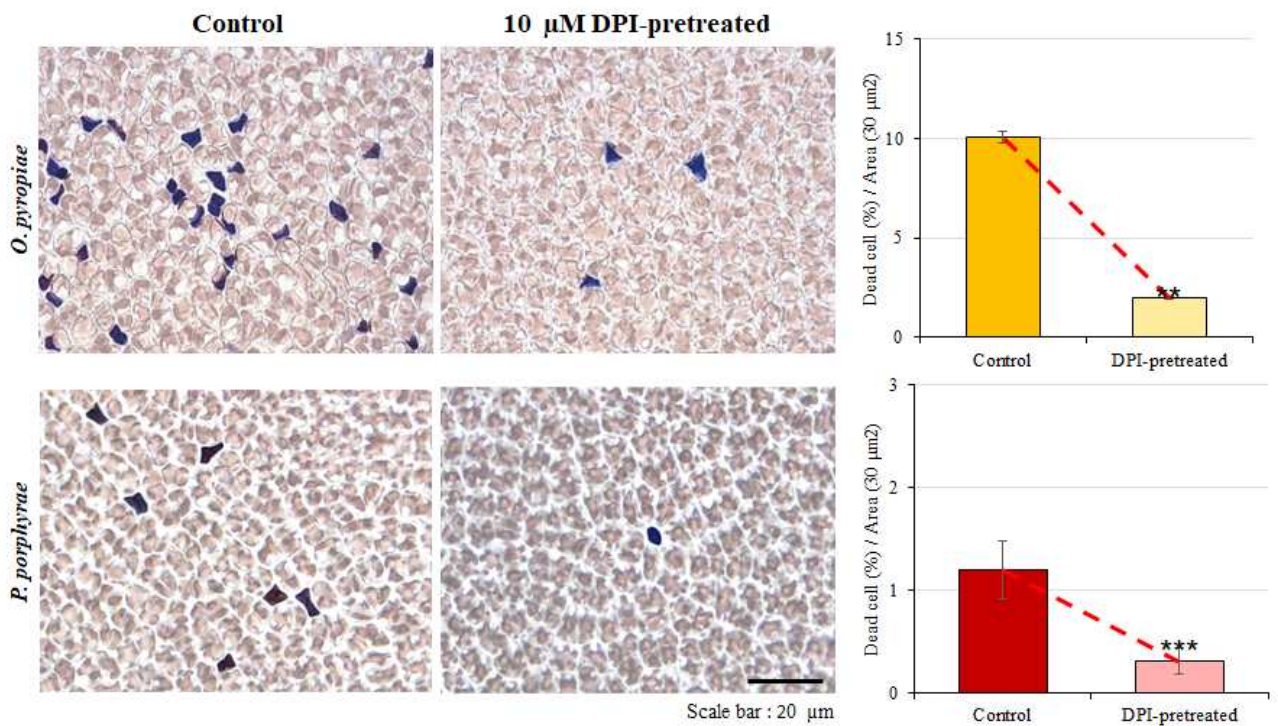


그림13. 숙주세포_ NADPH oxidase 저해제(DPI)에 따른 세포자살을 변화

- 병원체_NADPH oxidase 저해제(DPI)에 따른 유주자 부착을 변화는 10 uM DPI 전처리 후 두 난균성 병원균을 접종시켰을 때, 두 병원체 모두 유주자가 숙주세포에 제대로 부착하지 못하는 것을 확인하였고 부착하여도 위와 같이 두 병원체 모두 제대로 된 발달 단계가 진행되지 못함

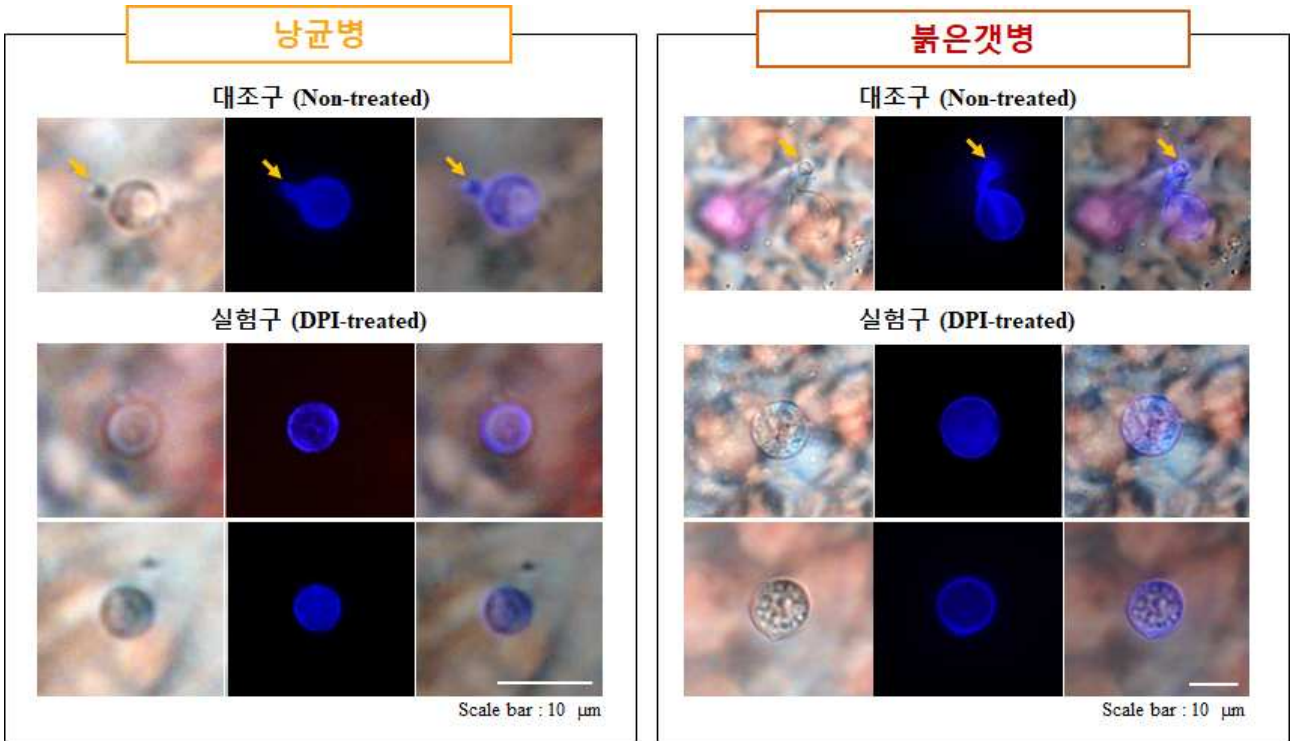


그림14. 병원체의 NADPH oxidase 저해는 난균성 병원체의 발달을 억제

- DPI는 유주자 부착율에 영향을 주지만 유주자의 발달단계를 억제하는지에 대해서는 정확히 판단할 수 없어 일정량의 유주자를 부착시킨 후 이후 발아관 성장, 부착기 형성, 감염과 같은 발달단계에 미치는 영향을 확인한 결과 일정량의 유주자를 부착 후 10 uM DPI 처리하였을 때 위와 같이 두 병원체 모두 피낭형성(부착) 이후 단계로 진행이 잘 이루어지지 않는 것을 볼 수 있음

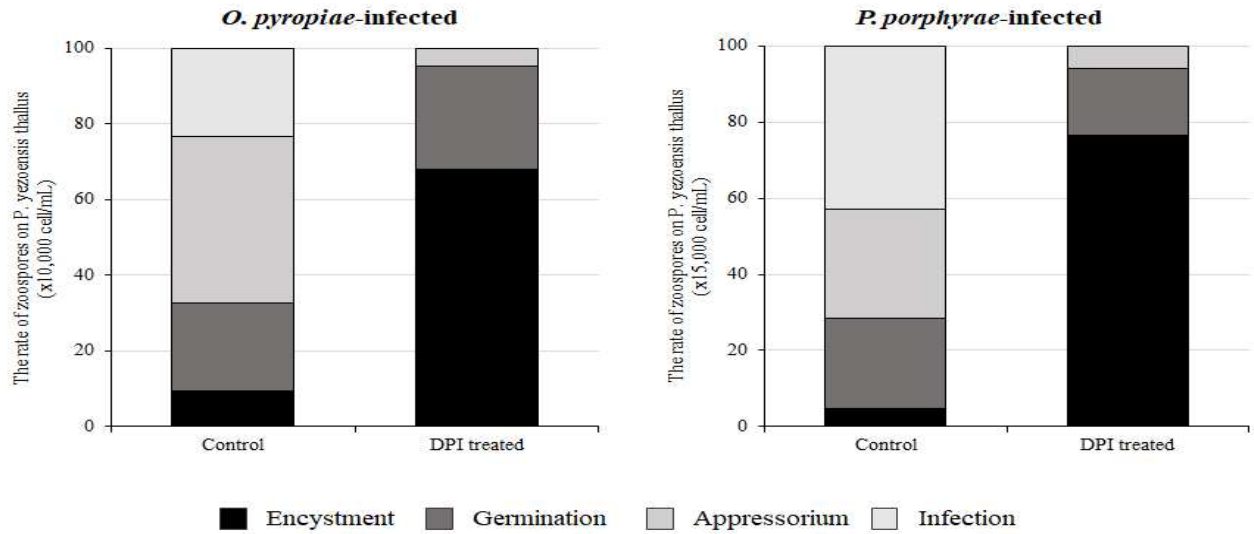


그림15. 병원체_NADPH oxidase 저해제(DPI)에 따른 유주자 발달단계 변화

- *PyRBOH1,2,4*의 경우 두 병원체 모두 감염 초기에 유전자 발현량이 증가하는 것을 볼 수 있었으며 특히, 붉은갯병의 경우 낭균병보다 빠른 15분부터 발현량이 급격히 증가하는 것을 확인하였고 이는 초기 감염 상태에 생성되는 ROS가 *PyRBOH*에 의해 생성된다는 것을 확인함

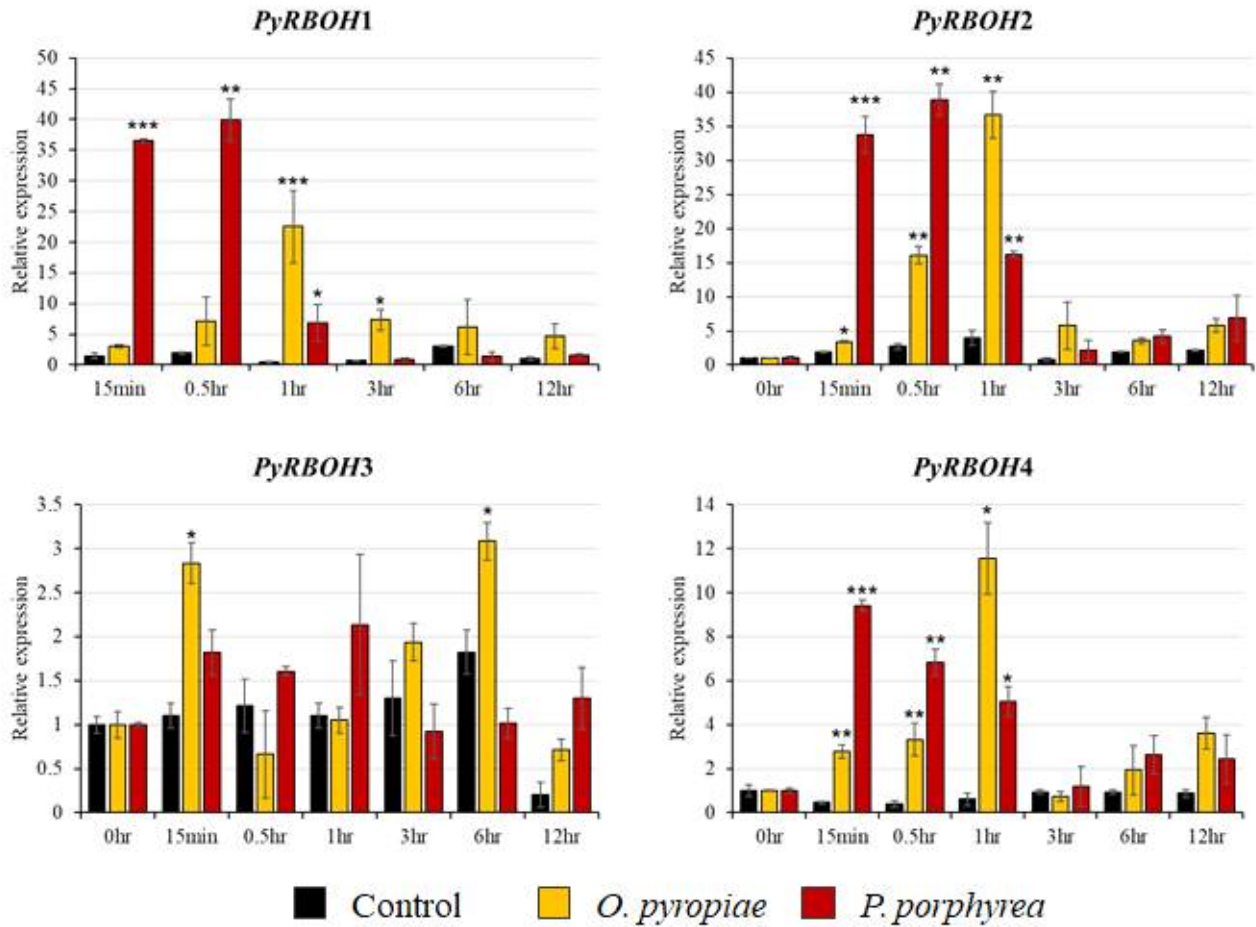


그림16. *PyRBOH* 유전자 발현 분석

- 김 엽체의 해수 유속에 따른 질병 저항성

- 붉은갯병은 유동성이 빠른 통기배양 상태에서 질병의 감염률이 가장 낮게 나타났고 교반 배양, 정지배양 순으로 높은 감염률을 나타냈음, 이는 붉은갯병 균주가 해수 유동에 따라 감염 저항성을 다르게 가지며 유동성과 질병 감염이 밀접하게 작용한다는 것을 확인함

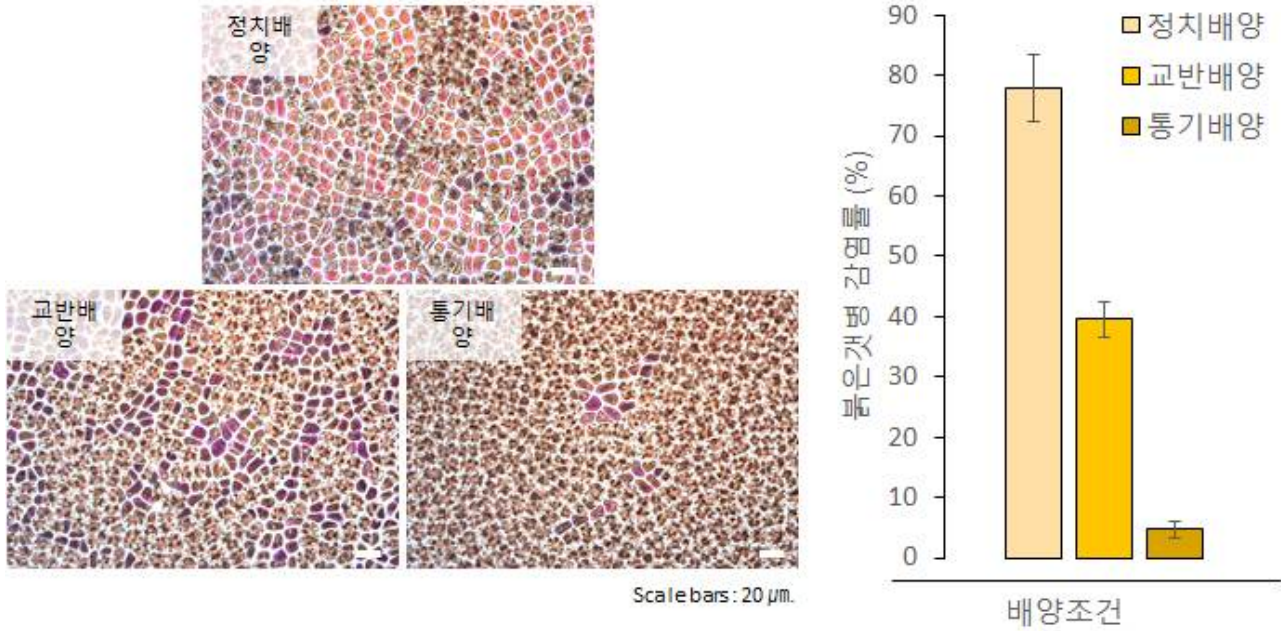


그림17. 물 유동에 의한 방사무늬김의 붉은갯병 저항성 증가

- 낭균병은 붉은갯병과 동일한 결과를 보였으며 유동성이 빠른 통기배양 상태에서 질병의 감염률이 가장 낮게 나타났고 교반배양, 정지배양 순으로 높은 감염률을 나타냈음, 낭균병은 붉은갯병과 같은곰팡이성 질병으로 균주가 해수 유동에 따라 감염 저항성을 다르게 가지며 해수 유동성과 질병 감염이 밀접하게 작용한다는 것을 확인함

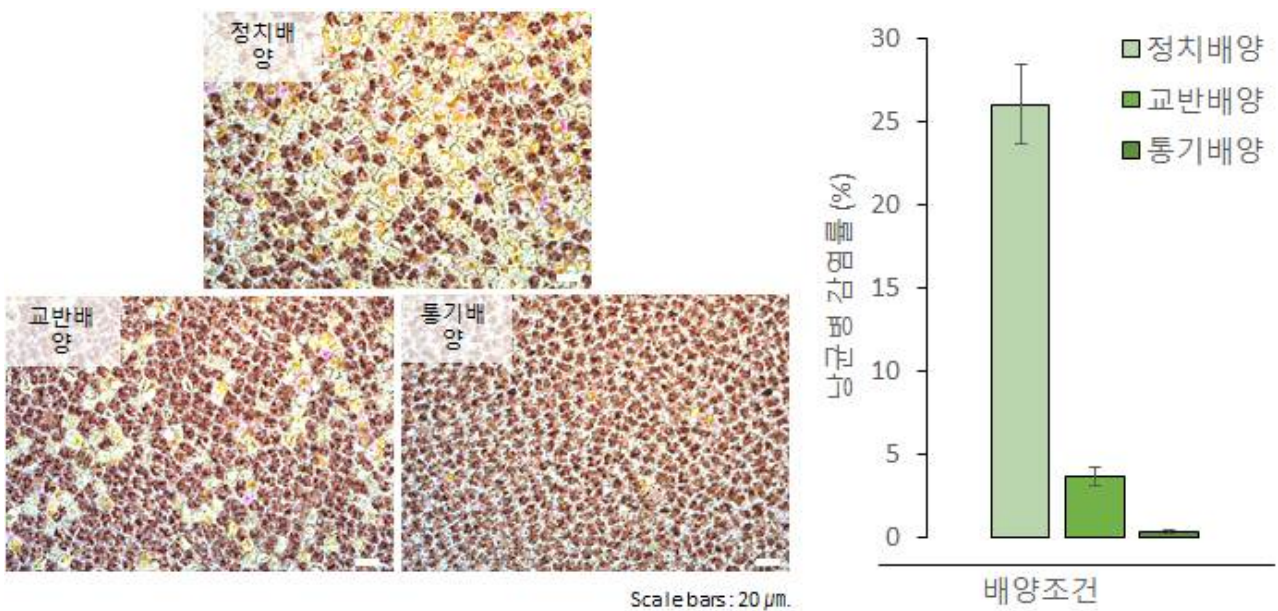


그림18. 물 유동에 의한 방사무늬김의 낭균병 저항성 증가

- 다음은 유속이 0, 30, 80 RPM 조건의 붉은갯병의 감염률 결과 붉은갯병의 경우 물의 유동 속도가 빠를수록 갯병 감염률이 낮아지는 것을 확인할 수 있었고 80 RPM에서 질병의 감염률이 가장 낮게 나타났고 30, 0 RPM 순으로 높은 감염률을 나타냈음, 이는 붉은갯병

균주가 해수 유동 속도에 따라 감염 저항성을 다르게 가지며 유속과 질병 감염이 밀접하게 작용한다는 것을 확인함

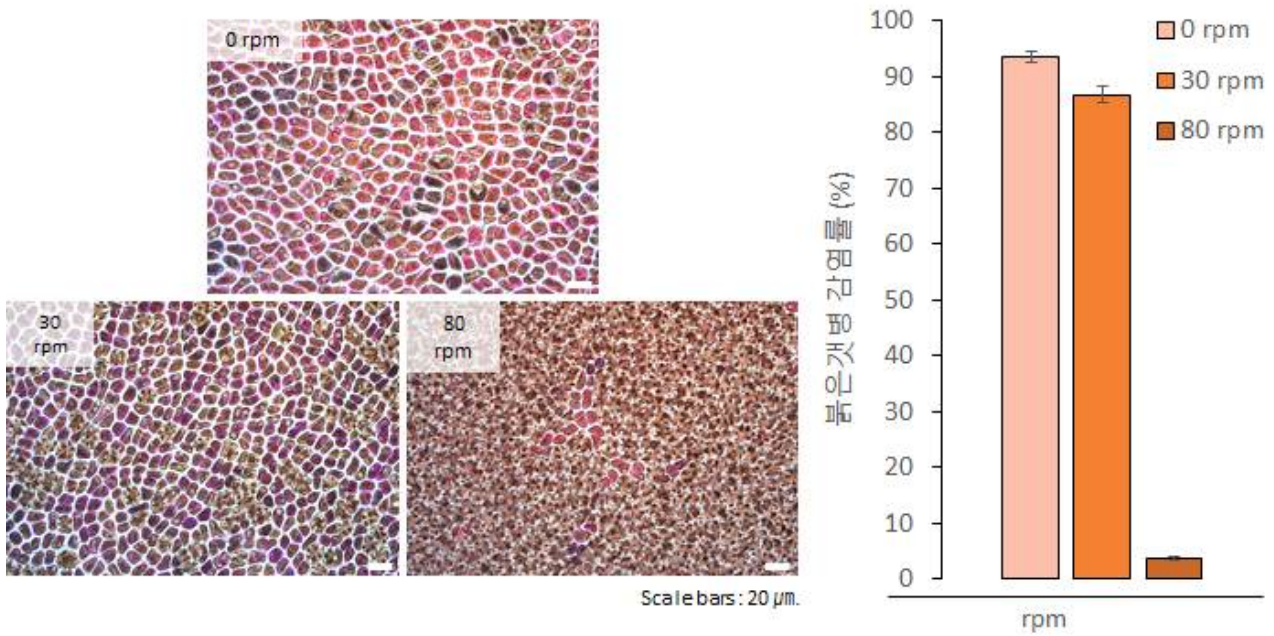


그림19. 물 유동 속도에 의한 방사무늬김의 붉은갯병 질병 저항성

- 붉은갯병과 동일한 조건의 실험결과 낭균병의 감염률은 붉은갯병과 마찬가지로 물의 유동 속도가 빠를수록 갯병 저항성이 높아지는 것을 확인할 수 있었고 80 RPM에서 질병의 감염률이 가장 낮게 나타났고 30, 0 RPM 순으로 높은 감염률을 나타냈음

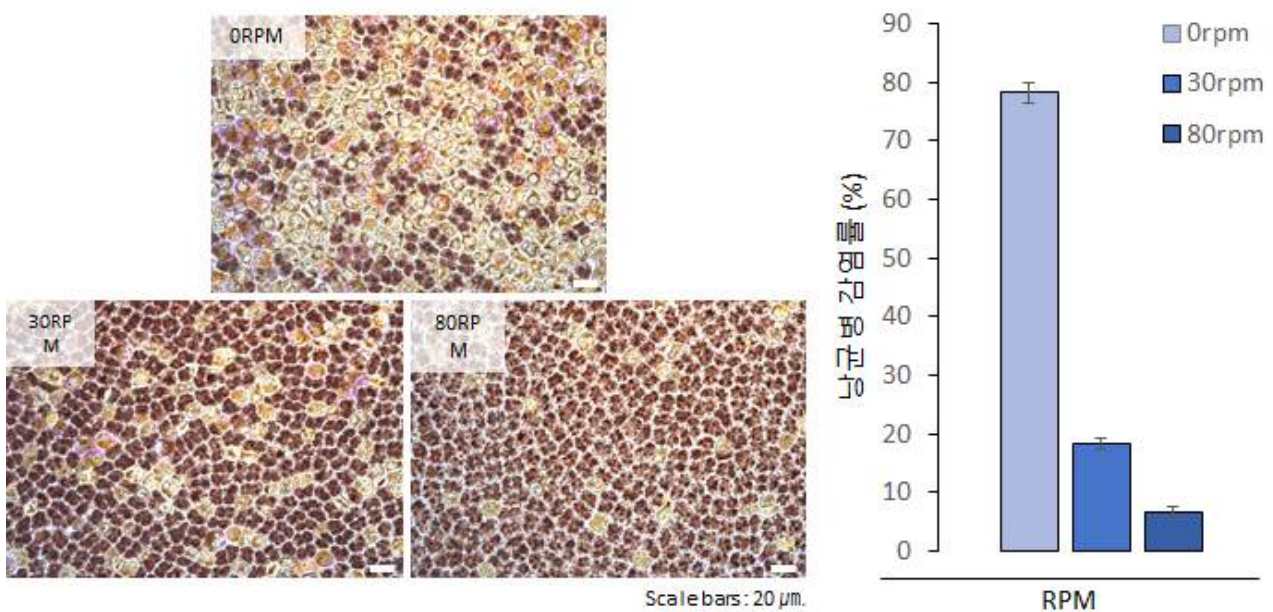


그림20. 물 유동 속도에 의한 방사무늬김의 낭균병 질병 저항성

- 기계적 스트레스에 따른 활성산소의 생성을 증명하기 위한 DCFH-DA 염색 결과 정치배양과 교반배양에서 정상 김 세포는 ROS가 확인되지 않았고 통기배양으로 인해 기계적 스트레스를 받은 김 세포에서는 ROS가 생성되는 것을 확인 할 수 있었음

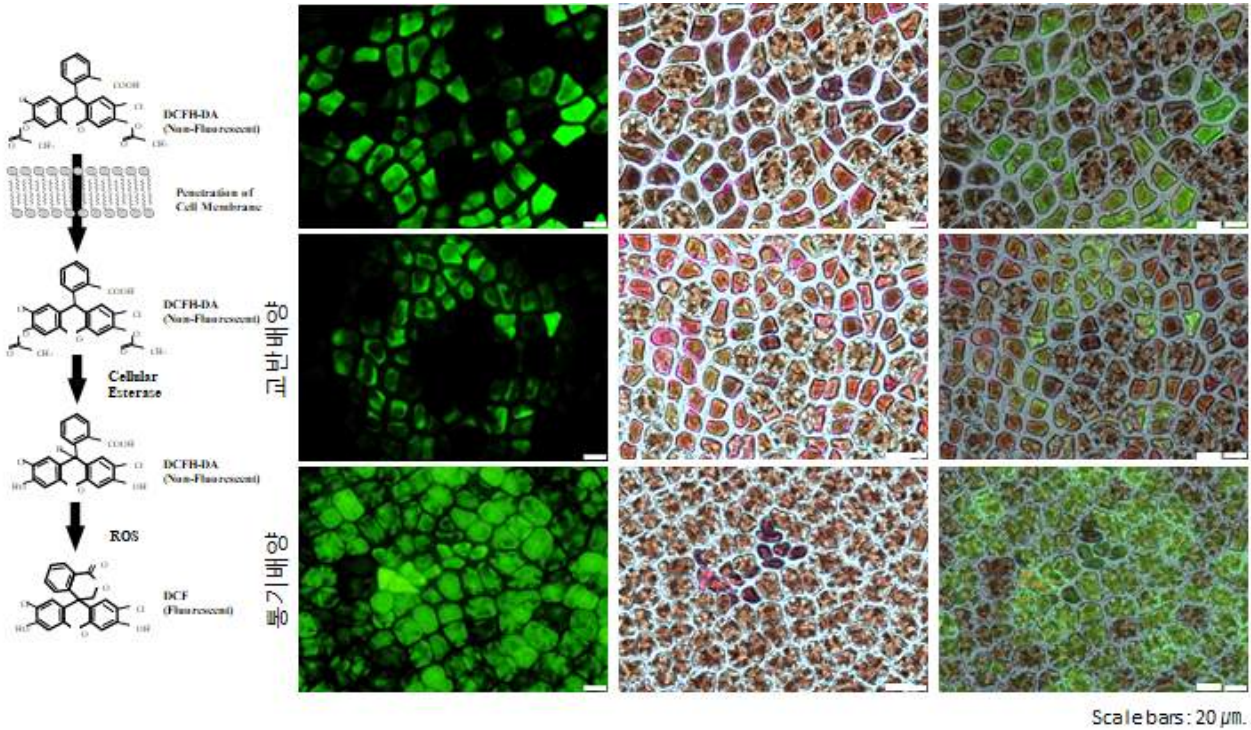


그림21. 활성산소종 생성에 미치는 기계적 스트레스의 영향 + 붉은갯병균

- 물의 유동에 따라 김 세포의 색소체 변화를 확인할 수 있었고 정치배양, 교반배양, 통기배양 순으로 기계적 스트레스를 받은 김 세포는 붉은색으로 변화였고 R(Red),G(Green),B(Blue)분석 결과 교반배양은 R, 통기배양에서 G, B가 가장 높게 나타났음

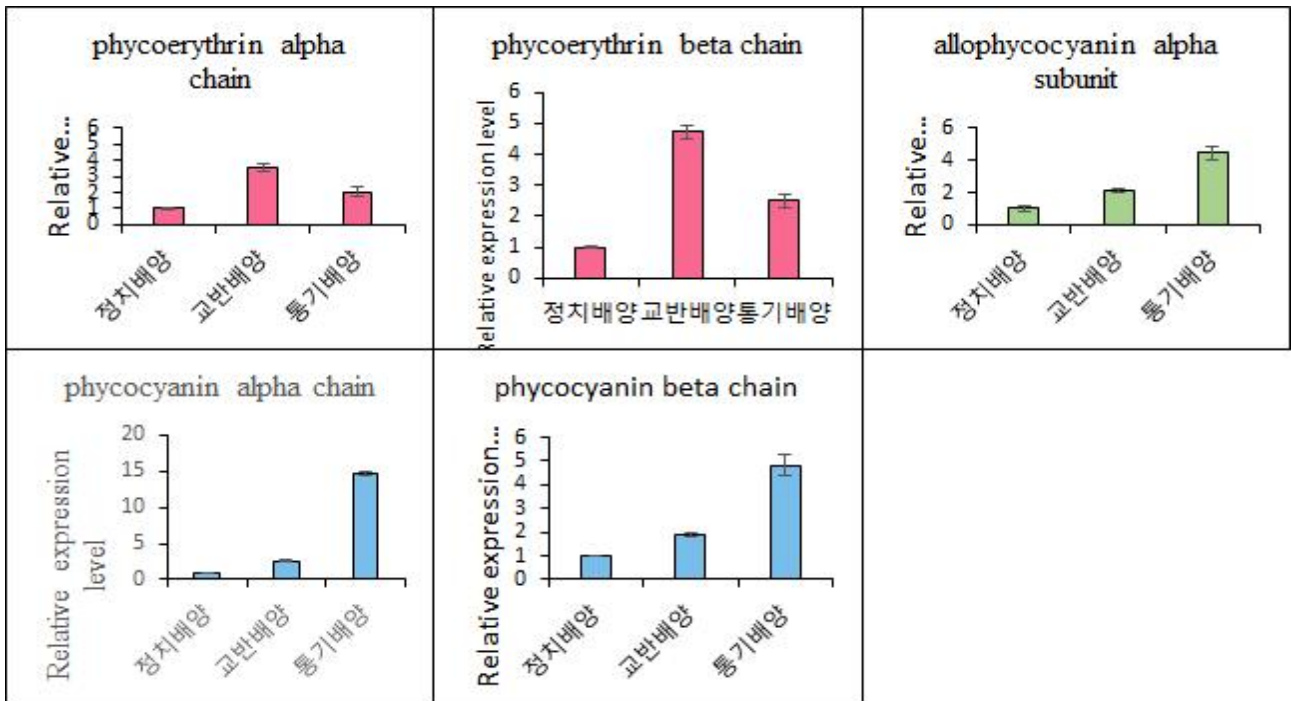


그림22. 색소단백질체 유전자 발현량 확인

- 이 결과 해수의 기계적 스트레스에 의한 김세포 손상은 교반배양, 통기배양에서 가장 높게 나타났으며 세포의 색소체 변화에서 G, B로 변하는 과정에 있어 기계적 스트레스는 색소 단백질체 유전자 발현을 촉진시키는 것을 확인하였음

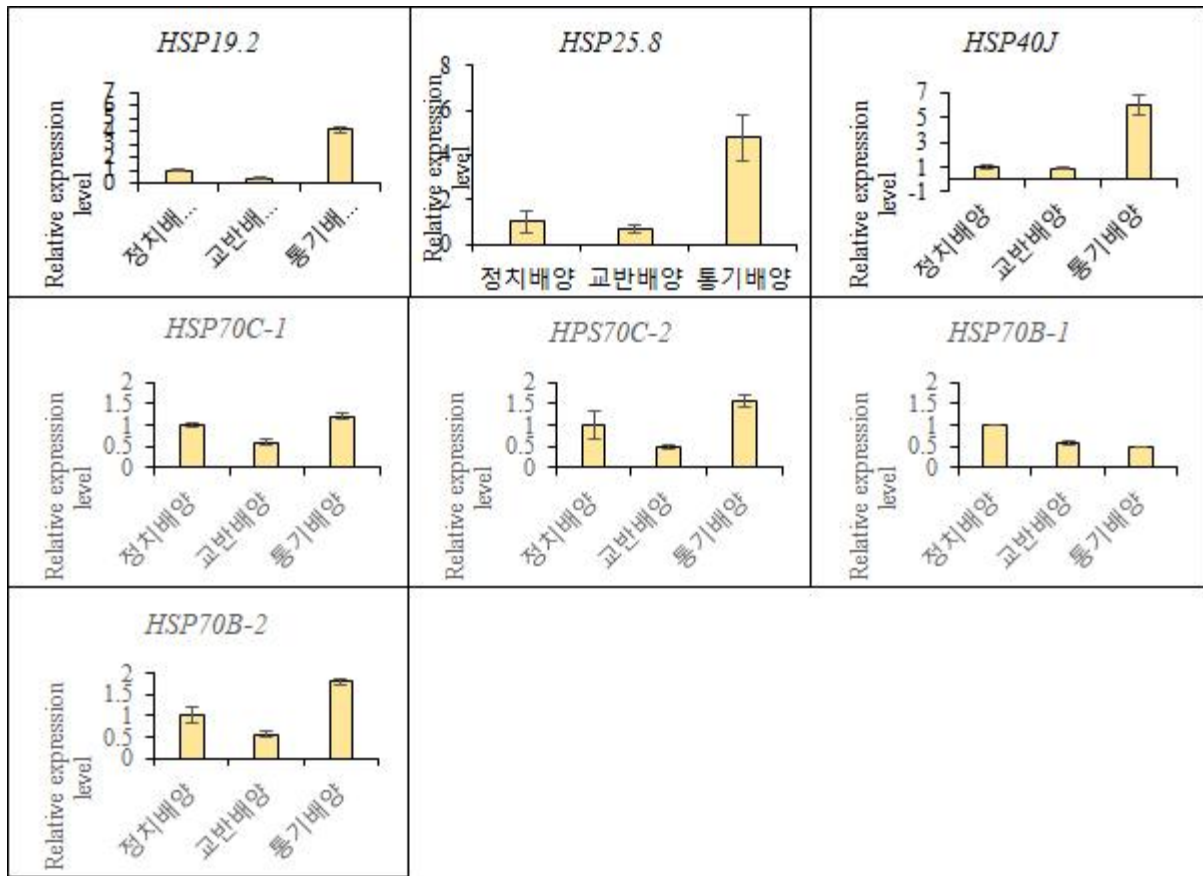


그림23. Heat Shock Protein 유전자 (HSP) 발현량 확인

- 갯병 감염 매개체(유주자)형성 과정에 따른 활성산소 생성

- 붉은갯병균 유성생식 과정에서 활성산소종 신호가 생물의 세포신호전달 물질로 작용하여 다양한 발달과정에 관여하는 것으로 밝혀졌고 이에 따라 갯병 방제에 효과적인 물질 탐색을 위해 DCFH-DA 염색 후 활성산소종 신호를 확인한 결과 붉은갯병균 유성생식 과정에서 활성산소종 신호를 확인하였고 DPI 처리 시 활성산소종 신호가 관찰되지 않았음

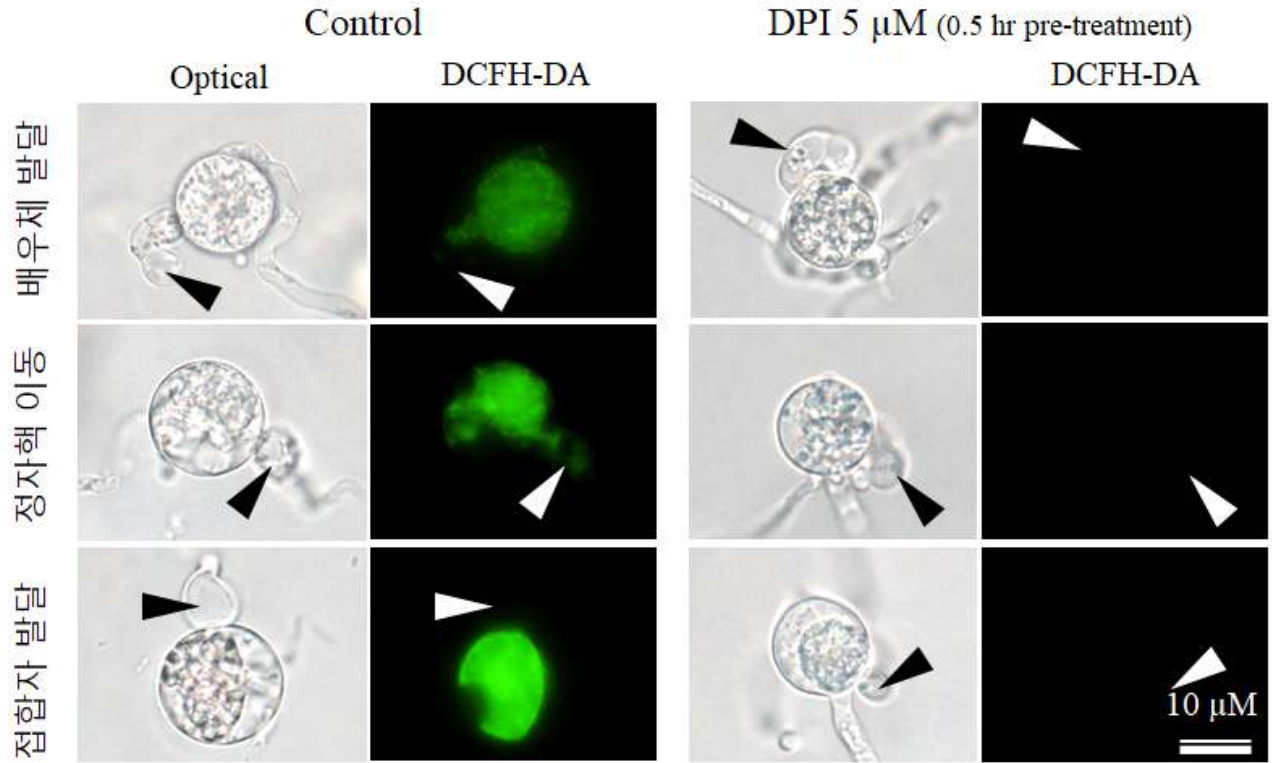


그림24. 붉은갯병균 유성생식과정에서 활성산소종 신호

- 붉은갯병균의 유주자 유도시 DPI 처리를 통해 NADPH oxidase 활성산소종을 억제한 결과 형성되는 붉은갯병균 유주자의 수가 현저하게 감소하는 것을 확인하였고 활성산소종 억제가 붉은갯병균 감염 억제를 위한 기작에 활용 가능성을 보임

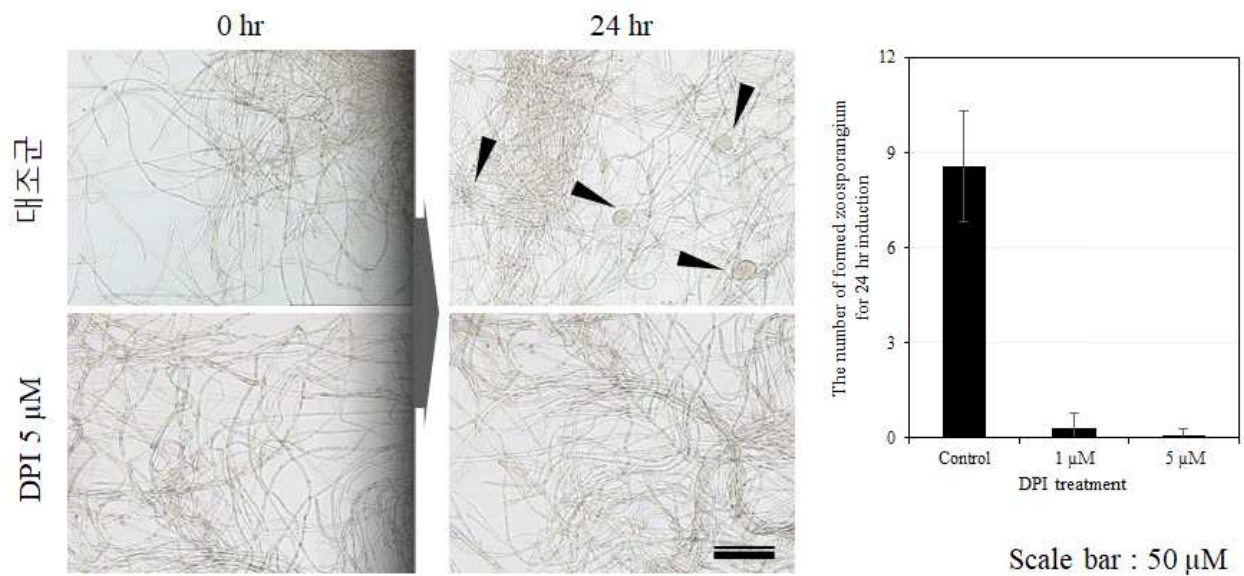


그림25. (A-B) A. 유주자 유도 시 대조구와 DPI 5 μ M 처리구의 군사 모습 (대조구에서 유주자낭 관찰). B. DPI 처리에 따른 유주자 형성률 분석

- 김 감염 과정 중 붉은갯병균 내 활성산소종 신호 확인 결과 DCFH-DA 염색 후 발달과정 (부착, 발아, 부착기 형성)에서 활성산소종 신호가 관찰되었으며 DPI 처리 시 NADPH oxidase에서 형성된 활성산소종을 억제함에 따라 김에 부착하는 붉은갯병균 유주자의 수가 현저하게 떨어졌고 부착한 유주자에서 감염을 위한 발달과정(발아, 부착기 형성)이 저해 되는 것을 확인함

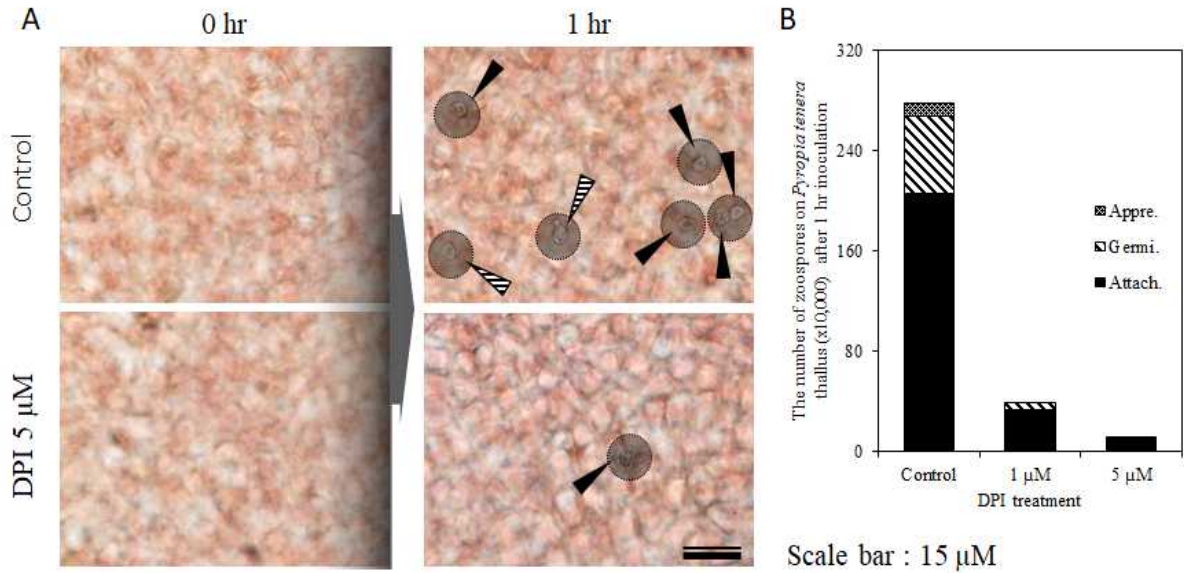


그림26. (A-B) A. 붉은갯병균 접종 시 대조구와 DPI 5 μ M 처리구의 김 엽체 표면 모습. B. 김에 접종한 붉은갯병균 유주자의 발달과정 분석

2. 개발종자의 안정성 측정 및 표준화

가. 황백화 품종의 시험양식 및 안정성 테스트(실내실험)

(1) 황백화 내성 품종의 시험양식(2년 차 결과)

황백화 내성품종 시험양식 (2020. 11. 11 서천)

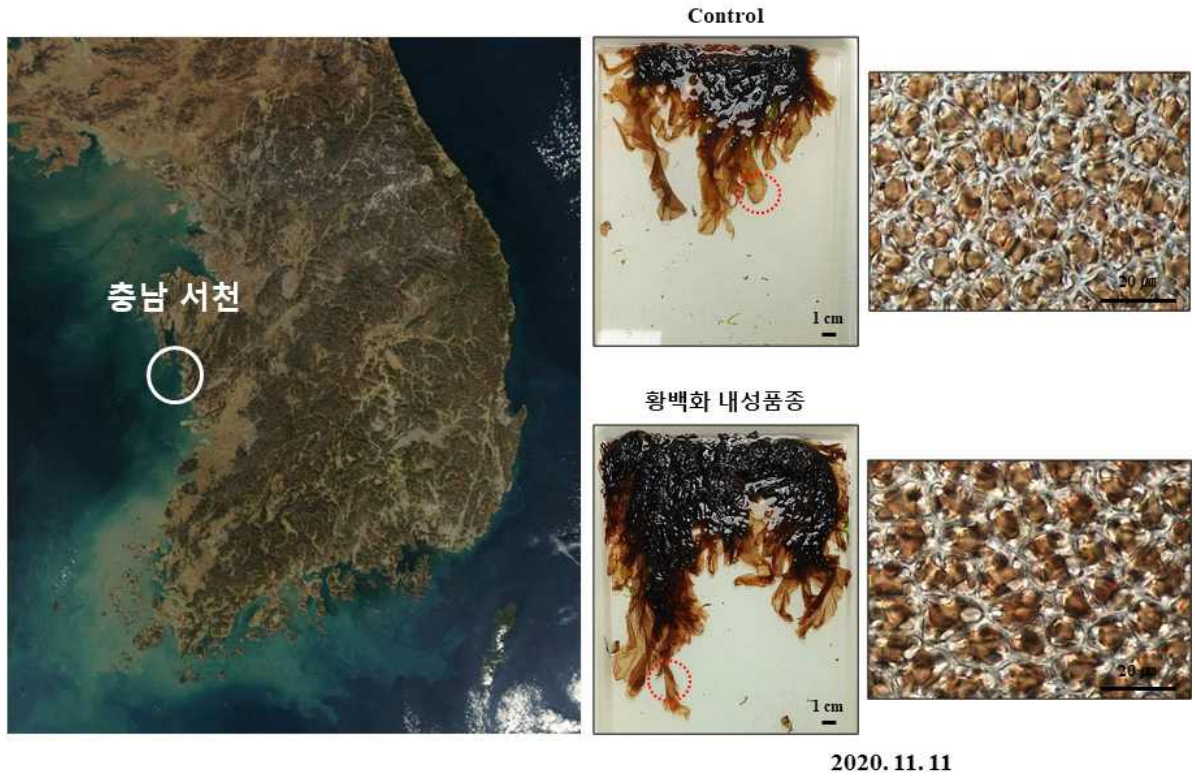
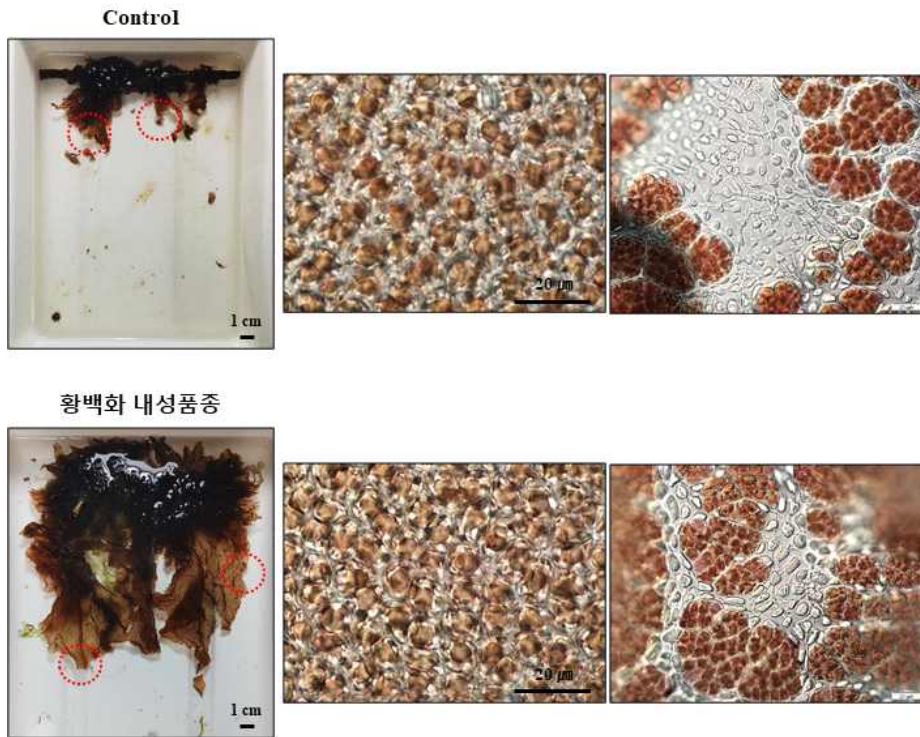


그림27. 2020년 11월 11일 채집한 일반 방사무늬김과 황백화 내성품종의 김발 및 세포사진

황백화 내성품종 시험양식 (2020. 12. 02 서천)



2020. 12. 02

그림28. 2020년 12월 02일 채집한 일반 방사무늬김과 황백화 내성품종의 김발 및 세포사진

- 채묘 30일 후 황백화 내성품종 2차 시험양식 업체 확인을 위해 2020년 11월 11일과 12월 02일 김발을 채집하였음
- 일반 방사무늬김과 비교한 결과 성장률에서 큰 차이가 있었으며 색태와 상품성에 있어 황백화 내성품종이 더 우수하게 나타난 것을 확인하였음
- 현미경으로 관찰한 결과 황백화 내성품종이 일반 방사무늬김에 비해 붉은갯병에 의한 피해가 현저히 적었음

(2) 황백화 내성 품종의 시험양식(3년 차 진행 중)

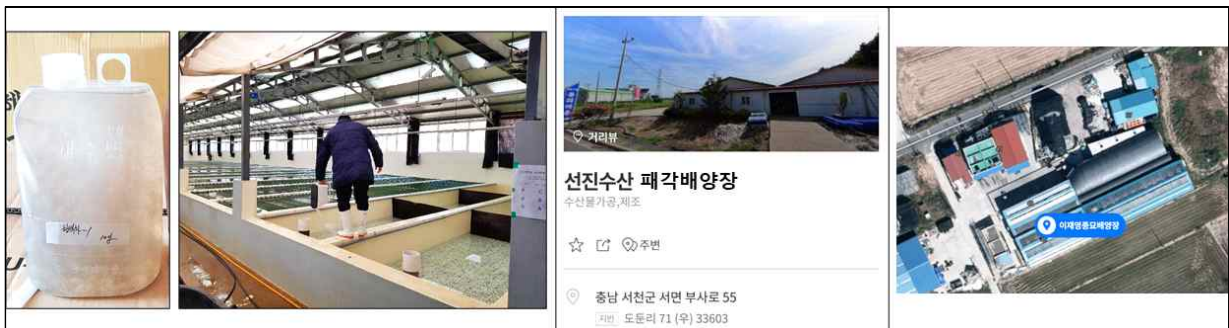


그림29. 2021년 황백화 내성품종 3차 시험양식을 위한 유리사상체 폐각 잠입 (선진수산, 동해수산)

- 3년 차 시험양식을 위해 2021년 01월 중순 황백화 내성 품종의 사상체를 400~500 μ m 분쇄하여 서천에 위치한 선진수산 폐각배양장과 진도에 위치한 동해수산 폐각배양장의 폐각에 잠입시킴

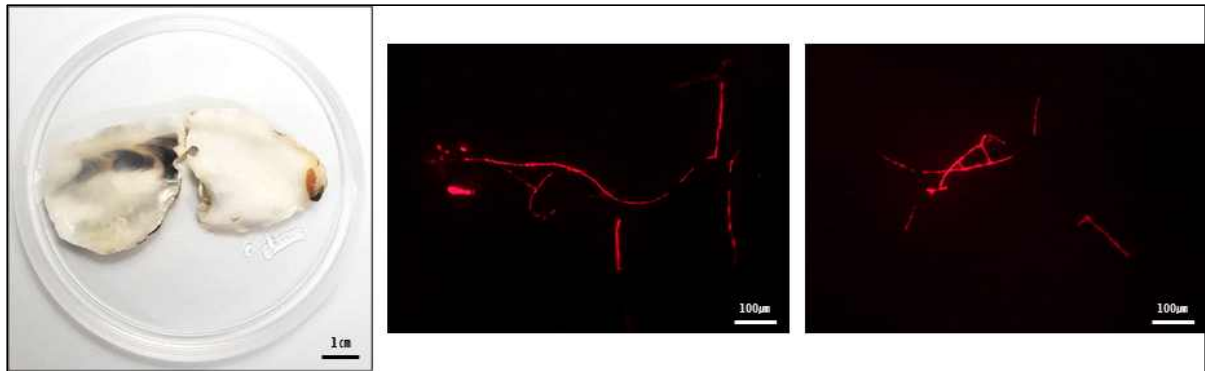


그림30. 황백화 내성 품종 유리사상체 폐각 잠입 상태 확인

- 2021년 01월 폐각사상체 잠입시킨 후 2주 뒤에 수거하여 현미경으로 사상체가 성공적으로 잠입된 것을 확인하였으며 2021년 9월 중순까지 일정기간별로 현지 조사 및 채집을 통해 폐각사상체의 성장률을 확인하였음
- 황백화 내성품종 폐각사상체는 2차 시험양식(2020년) 경우 해상채묘를 수행했지만 3차 시험양식(2021년)은 육상채묘를 이용하여 1차배양장(포자구간)에 곽망 상태로 들어간 후 현재 분망 상태로 양식중에 있음
- 이에 따라 현재 개발 진행중인 황백화 내성품종은 약 10년간 개발품종 모니터링에 따라 DB구축 예정이고 개발품종(골드 1, 2, 3호)과 동일한 방법으로 진행 예정임



그림31. 황백화 내성품종의 시험양식을 위한 양식시설 구축

- 황백화 내성품종 2차 시험양식은 충남 서천에 위치한 김 양식장에서만 진행되었지만 이번 3차 시험양식은 서천뿐만 아니라 인천 선재도, 전북 부안, 전남 고흥을 포함한 다양한 지역의 김 양식장에 시설을 구축하였음



그림32. 2021년 황백화 내성품종의 3차 시험양식을 위한 육상채묘 과정

- 황백화 내성품종 3차 시험양식을 위한 육상채묘 과정은 2021년 09월 말 각포자 부착의 최적 수온 23℃ 조건에서 진행되었으며 겹장(10장)된 김발에 각포자를 부착하였고 부착과 동시에 1차 배양장(포자구간)에 이식하였으며 채묘 20~30일 후 유연성을 확인할 수 있을 것으로 판단

황백화 내성품종 시험양식 (2021. 10. 27 서천)

일반 방사무늬김



황백화 내성품종

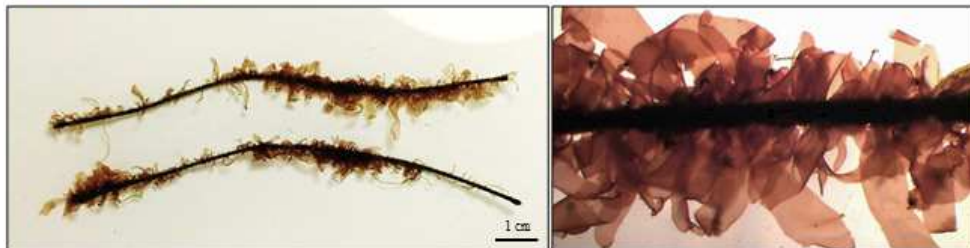


그림33. 2021년 10월 27일 채집한 일반 방사무늬김과 황백화 내성품종의 김발 사진

황백화 내성품종 시험양식 (2021. 11. 18 서천)

일반 방사무늬김

황백화 내성품종



그림34. 2021년 11월 18일 채집한 일반 방사무늬김과 황백화 내성품종의 김발 및 세포사진

- 황백화 내성품종 3차 시험양식 업체 확인을 위해 2021년 10월 27일, 11월 18일 김발을 채집하였으며 11월 18일에 황백화 내성품종은 한번 수확한 상태였음
- 일반 방사무늬김과 비교한 결과 2차 시험양식때와 마찬가지로 성장률에서 큰 차이가 있었으며 육안으로 확인했을 때 색태와 상품성에 있어 황백화 내성품종이 더 우수하게 나타난 것을 확인하였음

나. 개발품종(골드1호, 황백화 내성품종)순계 및 종 보존

(1) 황백화 내성품종 순계 및 유리사상체 대량배양

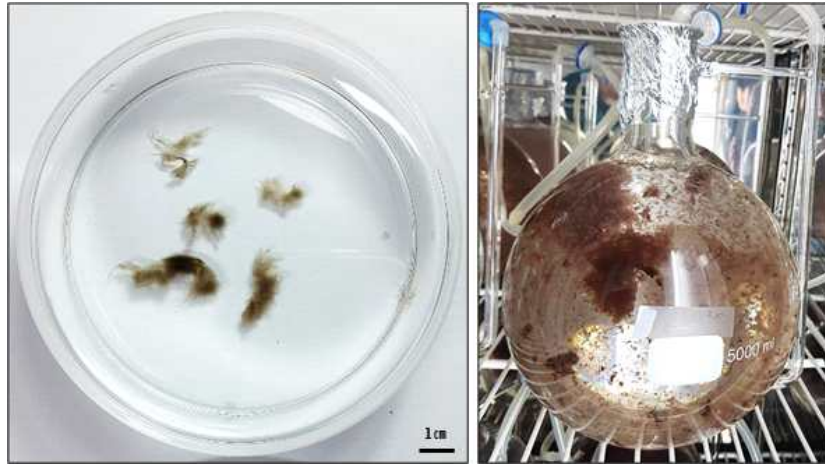


그림35. 황백화 내성품종 유리사상체 배양

- 감마선 조사 후 질소결핍조건에서 생존한 엽체를 가지고 계대배양을 통해 반복적으로 선별하고 그 후 순계된 유리사상체는 수온 20℃, 조도800lux~1800lux 조건에서 각포자낭의 형성을 제어하기 위해 main culture dish에서 PES medium을 사용하여 정치배양함
- 시험양식을 위한 패각잡입을 할 경우 3개월 전에 PES medium을 사용하여 통기배양을 통해 대량배양을 실시함

(2) 황백화 내성품종 보존 및 품종 개량

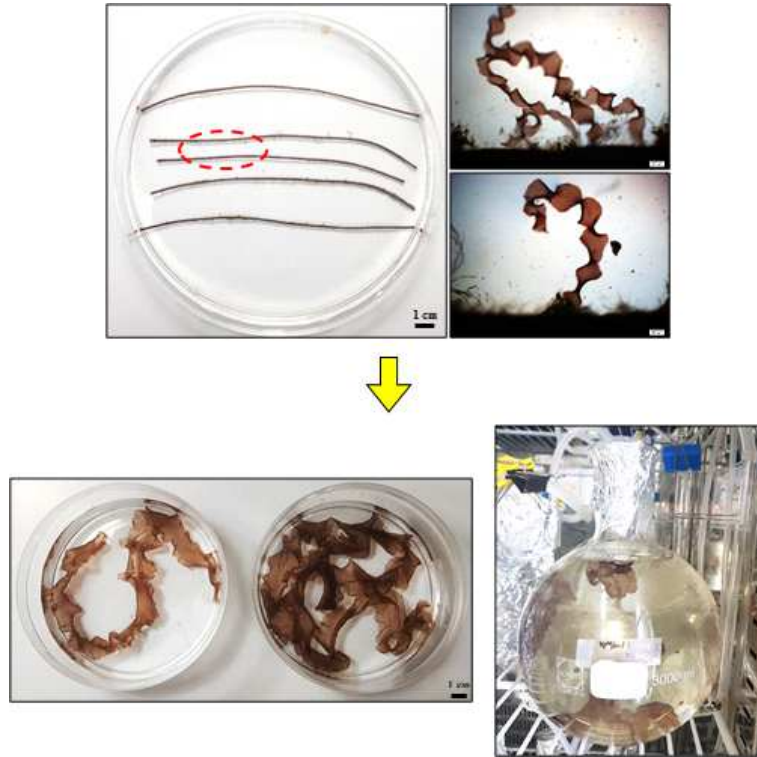


그림36. 황백화 내성품종 보존 및 품종 개량을 위한 엽체 선별

- 황백화 내성품종 시험양식 중 수확한 김발에서 성장률이 우수하고 김발에 잘 붙어있는 두 엽체를 선별하고 따로 배양함
- 두 엽체 모두 실내배양시 성장률이 우수, 4주차에 정치배양으로 우선 엽체의 포자화를 유도하였고 이후 포자화 유도가 확인된 후 통기배양으로 단포자를 받음(2번 반복)

감마선을 이용한 황백화 내성품종 형질특성 강화

감마선 조사

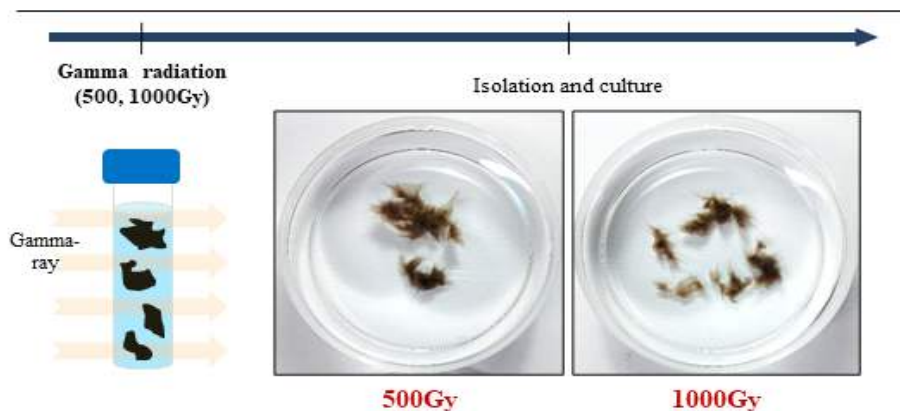


그림37. 감마선을 이용한 형질특성 강화

- 황백화 내성품종 보존 및 품종 개량을 위해 황백화 내성품종 시험양식장에서 우량품종을 선별하여 사상체 유도 후 한국원자력연구원 첨단방사선연구소에서 500 Gy, 1 Kgy 감마선 조사를 수행하였으며, 살아남은 사상체를 선발해 업체 유도시킨 후 기존의 황백화 내성을 가지면서 성장률이 우수한 업체를 선발할 계획임

다. 안정성 테스트 DB 구축

(1) 황백화 현상의 메커니즘 분석 및 DB 구축

- 최근 활발히 연구중인 활성산소종 ROS 관련 선행연구를 통해 ROS에 의한 산화적 스트레스가 황백화와의 관련이 있는지 알아보기 위해 ROS 관련 실험을 수행하고 있음
- 다양한 ROS 중에서 자유롭게 확산 가능하고 상대적으로 수명이 긴 H₂O₂는 스트레스 신호 전달 pathways에서 중심 역할을 함
- 최근 여러 연구에 따르면 H₂O₂ priming은 ROS 해독, 여러 스트레스 반응 경로, 유전자 발현을 조절하여 비생물적 스트레스 내성을 향상시킬 수 있다고 보고됨
- 식물에 대한 많은 연구에서 적절한 수준의 H₂O₂ 전처리는 광합성과 같은 생리적 과정과 ROS 해독과 같은 여러 스트레스 반응 경로를 조절함으로써 비생물적 스트레스에 대한 내성을 향상시킬 수 있음

Hydrogen peroxide (H₂O₂) 지속처리

P. yezoensis + 멸균 해수

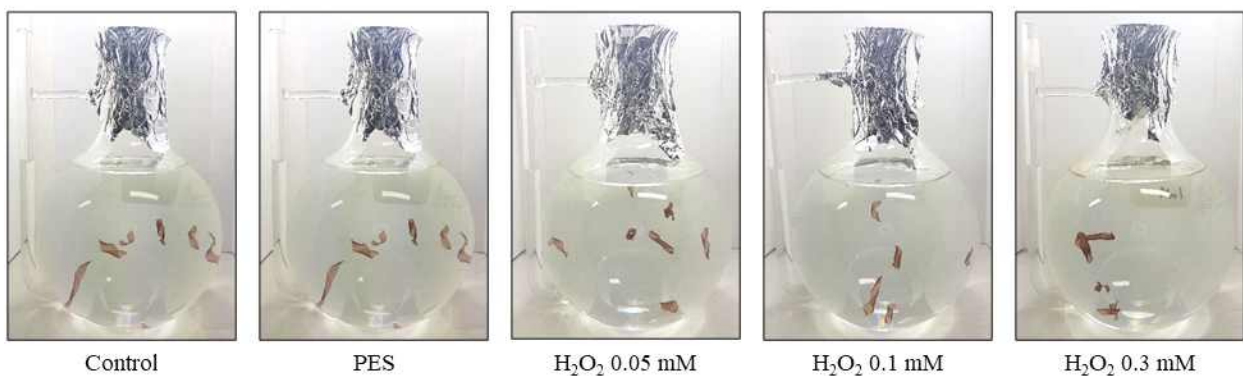


그림38. 일반 방사무늬김 H₂O₂ 농도별로 지속처리

Hydrogen peroxide (H₂O₂) 지속처리

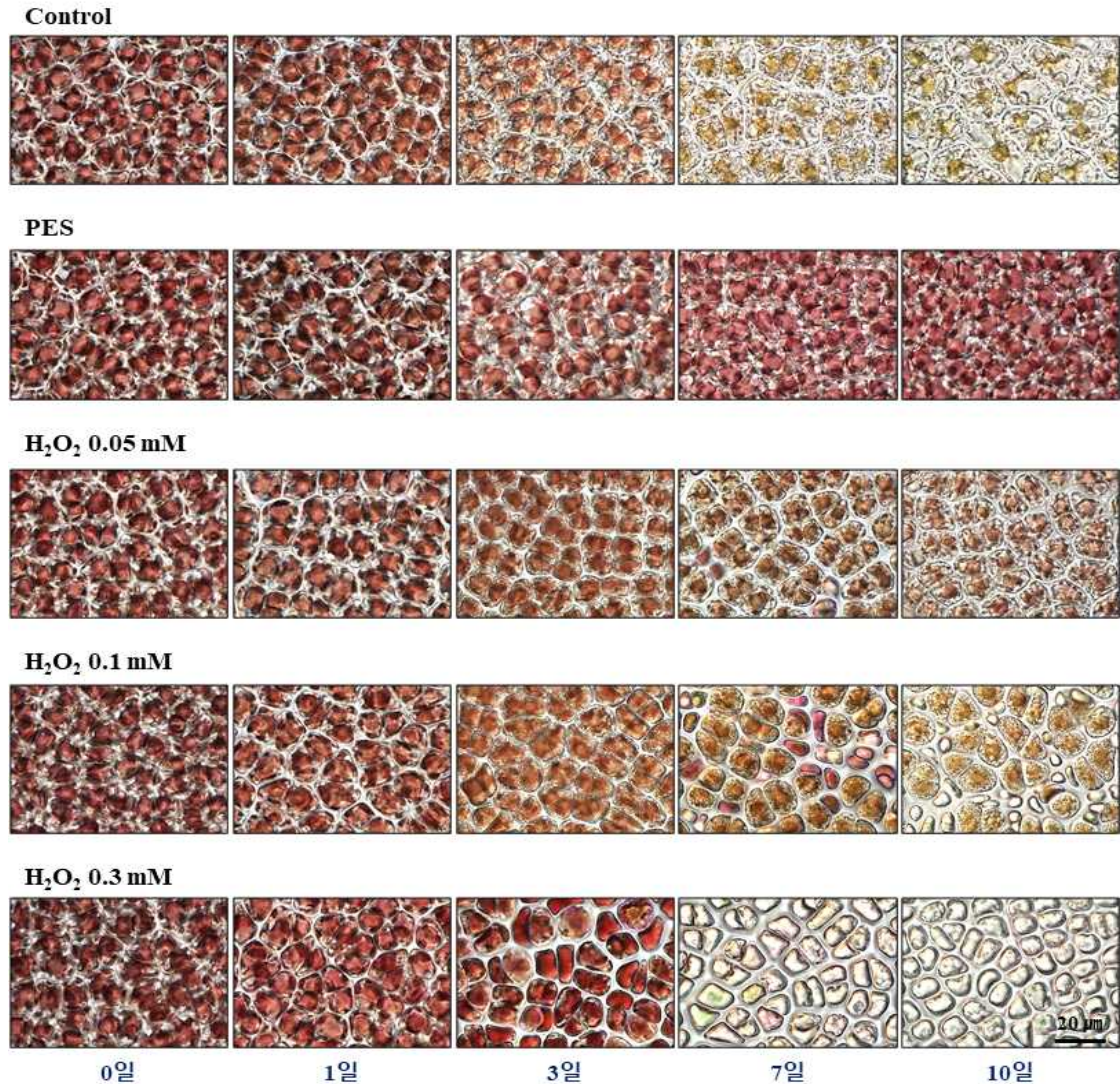


그림39. H₂O₂ 농도별로 지속처리 후 10일 동안 배양한 김 세포 사진

- H₂O₂ 처리가 황백화에 대해 효과가 있는지 확인하기 위해 일반 방사무늬김에 농도별로 지속처리하여 질소결핍배지에서 10일 동안 통기배양함
- 질소결핍조건에서 김 엽체에 H₂O₂를 농도별로 지속처리한 결과, 현미경으로 관찰했을 때 처리를 하지 않은 대조군에서는 10일 이내에 황백화가 유도되는 반면 H₂O₂를 0.05 mM 처리해준 군에서는 시간이 지남에 따라 엽록체의 형태와 색이 control에 비해 더 안정적으로 유지되는 것을 확인할 수 있었음
- H₂O₂를 0.1 mM 이상 처리해준 군에서는 시간이 지남에 따라 사세포가 발생하였으며 10일 후에는 사멸하여 탈색되는 것이 확인되었음

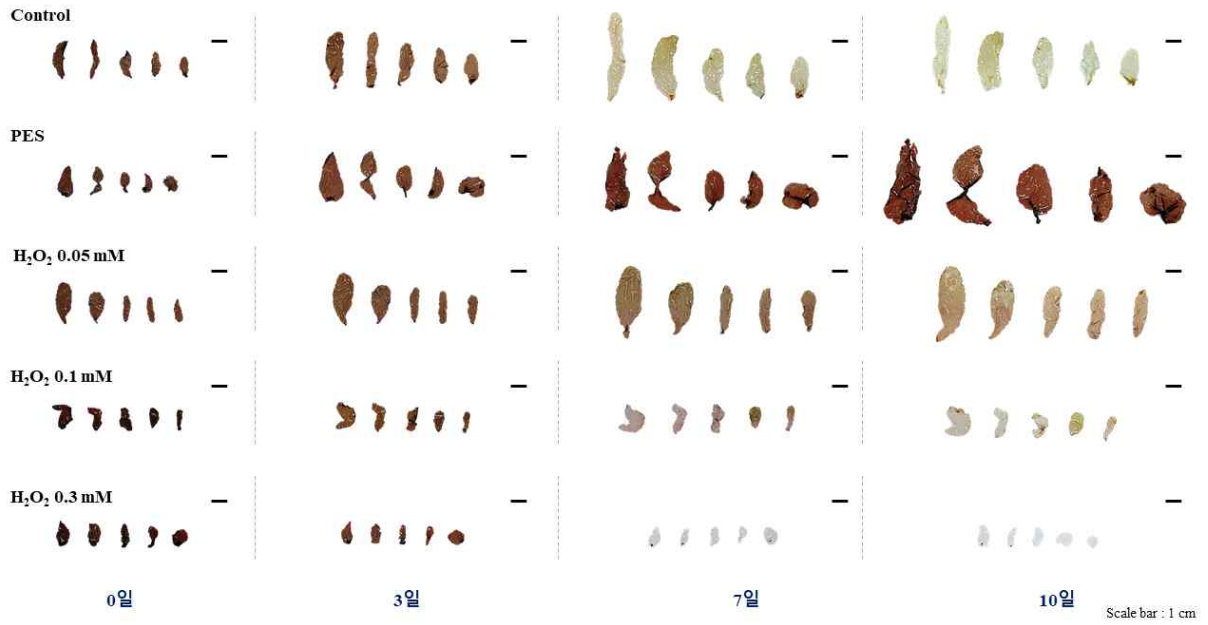


그림40. H₂O₂ 농도별로 지속처리 후 10일 동안 배양한 김 엽체 사진

- 육안으로 관찰한 결과 H₂O₂ 0.05 mM 처리구는 control에 비해 황백화 현상이 늦춰지는 것을 확인할 수 있었으며 성장 또한 정상적으로 이루어지는 것이 확인되었음
- H₂O₂ 0.1 mM 이상 처리구에서는 3일만에 사세포가 확인되었으며 7일 이후에는 엽체가 사멸하여 완전히 탈색되었음

Hydrogen peroxide (H₂O₂) 2시간 전처리

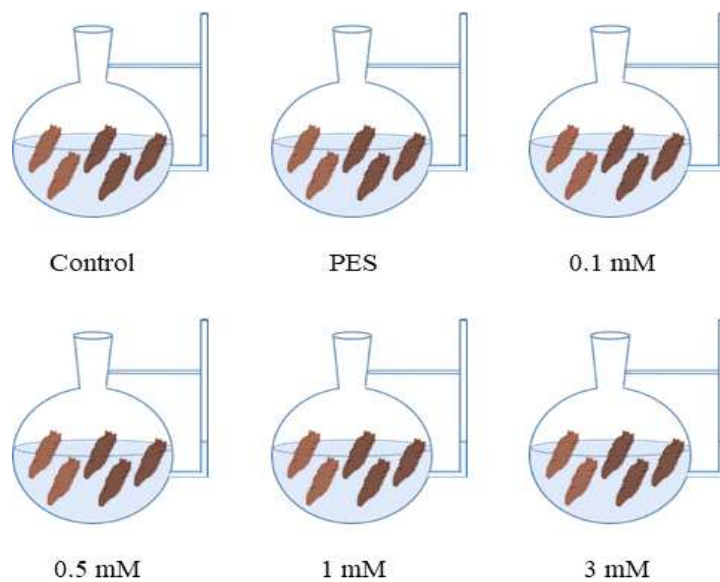


그림41. 일반 방사무늬김 H₂O₂ 농도별로 2시간 전처리

Hydrogen peroxide (H₂O₂) 2시간 전처리

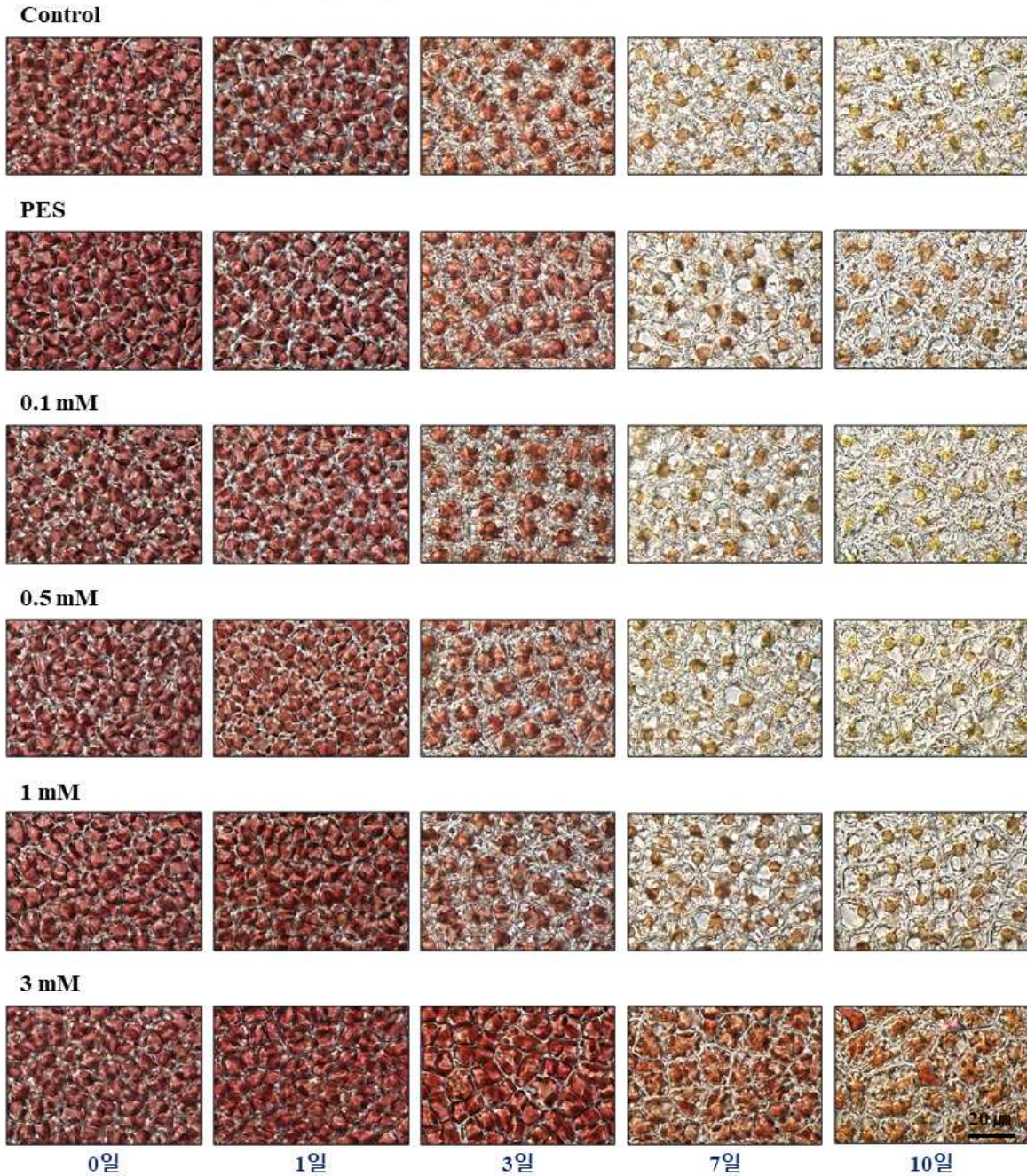


그림42. H₂O₂ 농도별로 2시간 전처리 후 10일 동안 배양한 김 세포 사진

- H₂O₂ 지속처리가 아닌 전처리에서도 황백화에 대해 효과가 있는지 확인하기 위해 일반 방사무늬김에 농도를 높여 2시간 전처리하여 질소결핍배지에서 10일 동안 통기배양함
- 질소결핍조건에서 김 엽체에 H₂O₂를 농도별로 2시간 전처리한 결과, 현미경으로 관찰했을 때 H₂O₂를 1 mM 농도 이상 2시간 전처리해준 군에서는 시간이 지남에 따라 엽록체의 형태와 색이 control에 비해 안정적으로 유지되는 것을 확인할 수 있었음

Hydrogen peroxide (H₂O₂) 2시간 전처리

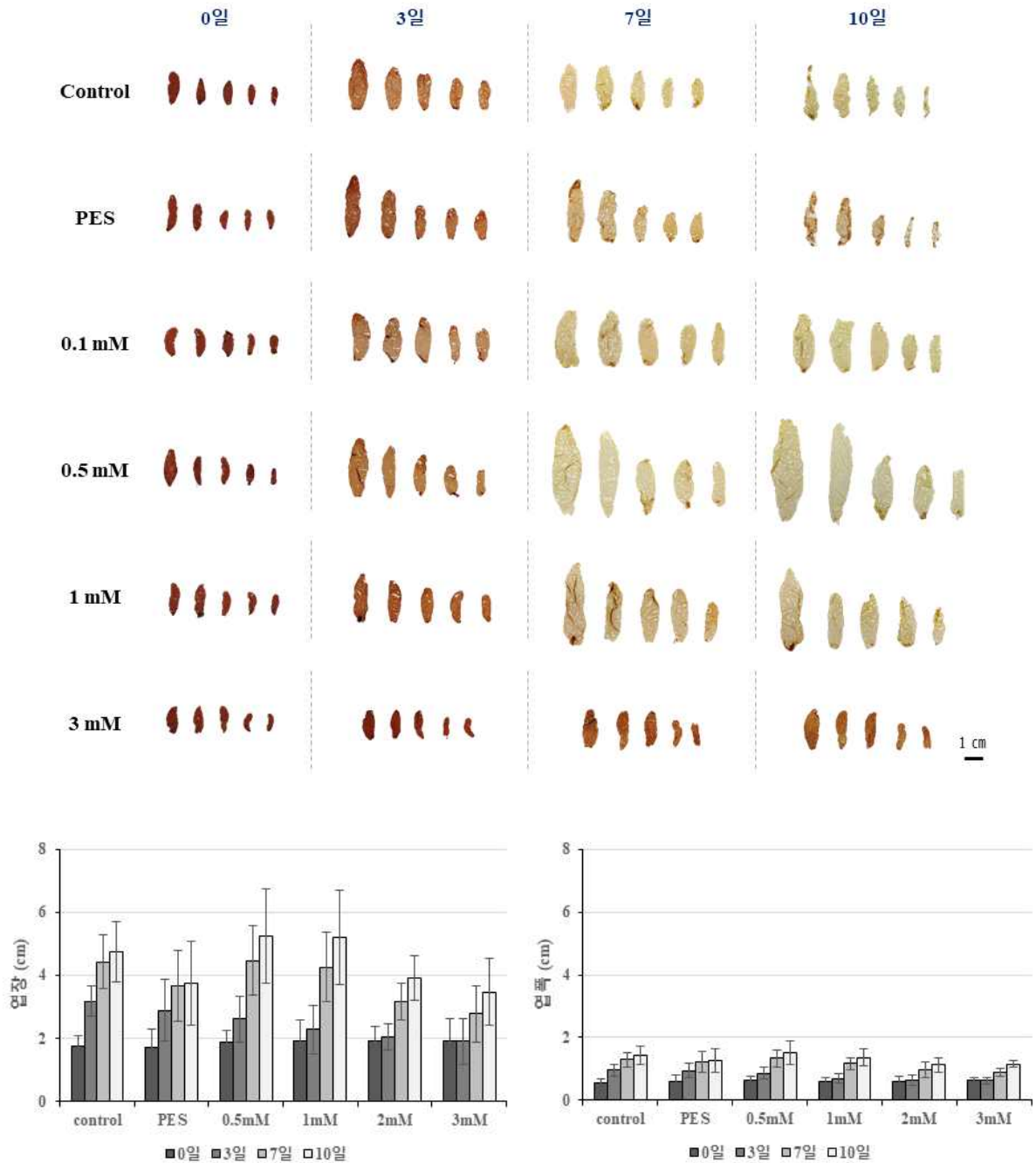


그림43. H₂O₂ 농도별로 2시간 전처리 후 10일 동안 배양한 김 엽체 사진 및 성장률

- 육안으로 관찰한 결과 H₂O₂ 1 ~3 mM 2시간 전처리구는 control에 비해 황백화 현상이 늦춰지는 것을 확인할 수 있었지만 성장률은 3 mM에서 많이 낮아지는 것이 확인되었음
- 이를 통해 H₂O₂ 처리가 황백화 현상에 대해 효과가 있는 것으로 생각되지만 실제 양식장

에 적용시키기 위해서는 김 약처리 시간인 20초 전처리도 실험을 수행할 필요가 있음

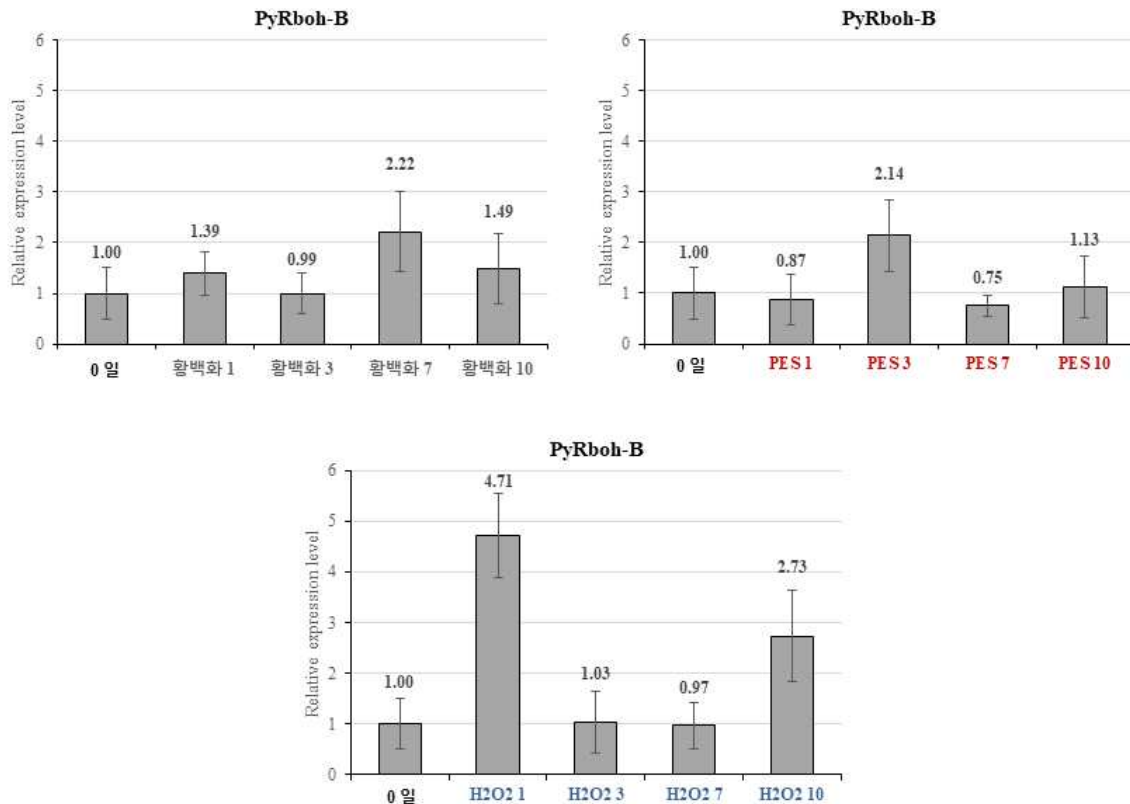


그림44. H₂O₂ 농도별로 지속처리 후 ROS 생성과 관련이 있는 방사무늬김 NADPH oxidase 관련 유전자 발현량 분석

- 시간별로 H₂O₂를 처리하지 않은 조건과 PES 영양배지를 처리한 조건, H₂O₂를 0.05 mM 지속처리한 조건의 NADPH oxidase 관련 유전자 발현량을 분석하였으며 H₂O₂ 처리한 군의 1일차에서 유전자가 급격히 높게 발현한 것을 확인하였음
- 황백화 현상에 대한 반복적인 세포학적 관찰을 통해 안정성 테스트를 수행하였으며 RNA 추출, cDNA 합성 및 real-time PCR 등과 같은 분자적 실험을 통해 DB를 구축함



시험성적서

TEST REPORT

대전광역시 중구 대흥로 28번길 6 한국과학기술연구원빌딩
 대표전화: 042-716-2310 팩스: 042-716-2309
 이메일: pgaegur@hanmail.net 홈페이지: www.okkr.kr

Report No. 2020KRIBS0431.001 page 1 of 1

시험기간 : 2020. 05. 14. - 2020. 06. 04.	발급일자 : 2020. 06. 04.
업체명 : 공주대학교	대표자 :
주소 :	
시료명 : 재래종(서천), 황백화품종(서천)	용도 : 내부 확인용
시험항목 : 총단백질 및 총지방 정량분석	시험방법 : KRIBS-033

시험결과

시료명	총단백질 (%)	총지방 (%)
재래종(서천)	42.12	0.39
황백화품종(서천)	47.54	0.40

확인	시험자 성명	이필안 	승인자 성명	정문규 
비고	1. 본 시험성적서는 의뢰자가 제시한 시료에 대한 시험 결과이며 용도이외의 목적으로 사용을 금합니다. 2. 본 성적서의 이미지 무단도용 및 결과수치의 수정사용은 법적인 제재를 받을 수 있습니다.			



한국의과학연구소장

대전광역시 중구 대흥로 28번길 6 한국과학기술연구원빌딩 . 전화번호 : 042-716-2310 <http://www.okkr.kr/>

본 문서는 한국과학기술연구원의 자산이며 무단으로 복제 및 배포할 수 없습니다. [KRIBS-DF11-REV.C]

그림45. 황백화 내성품종과 일반 방사무늬김의 총단백질 및 총지방 정량분석

- 개발한 황백화 내성품종과 일반 방사무늬김의 총단백질 및 총지방 정량분석을 수행함
- 황백화 내성품종은 총단백질 함량 47.54%, 총지방 함량 0.40%로 나타났으며, 일반 방사무늬김은 42.12%, 0.39%로 나타나 황백화 내성품종이 각각 5.42%, 0.01% 더 높게 나타난 것이 확인되었음
- 이를 통해, 황백화 내성품종은 김 식품 단백질로서 일반 방사무늬김보다 영양적 가치가

있을 것으로 판단됨

3. 우량 환경내성 김 종자 생산기술 개발 및 국내외 산업화

가. 환경내성 품종의 대량생산 및 국내외 판매

- 골드1, 3호는 물김 생산 후 서천에 위치한 (주)선진수산 마른김 가공공장에서 마른김을 생산 하였으며 2017-2020년 4월 까지 약 28억 원 상당의 마른김을 중국으로 수출판매 하였음
- (주)선진수산 마른김 공장에서 골드1, 3호 마른김을 해외 수출용 원료로 가공하여 (주)대천김, (주)대창수산에 2021년 11월 현재까지 총 155억 원 상당의 마른김 및 조미김을 판매하였음
- 12월까지 100만\$(직접수출) 예정이며 (주)대창수산과 (주)대천김에서는 골드1호, 3호(품종 등록, 특허 등록) 조미김을 2018 하반기부터 상표등록 후 수출판매 하고 있으며 추후 수출 확대 예정에 있음
- 골드1, 3호는 2021년 11월까지(직, 간접 수출) 약 155억 원으로 집계 되었고 2018-2020년 골드1, 3호 사상체 확대 분양으로 수출 금액 100 억 원 계획 달성함

골드 1호, 3호 마른김 수출 진행 상황(2021.11 현재)										
									(직접수출 : 선진수산)	
품목	품종	연구 책임자	연구기관	수출 국가	수출 날짜	수출량(박스)	단가(속, 천원)	수출액(\$)		
김	골드 1호 골드 3호	김광훈	공주대학교	중국	2019.04.26	1,152	5.4	298,468		
					2019.10.22	1,152	3.7	217,714		
					2019.12.17	576	3.2	93,795		
					2020.01.07	240	3.5	35,148		
					2020.02.19	576	5.1	120,205		
					2020.04.20	1,335	3.3	219,619		
소계							2017년~2020년 = 28억 2455만			
(간접수출 : 대천김, 대창식품)										
품목	품종	연구 책임자	연구기관	수출 국가	수출 날짜	수출량(박스) 수출량(속)	단가(속, 천원)	수출액(\$)		
김	골드 1호 골드 3호	김광훈	공주대학교	미국,캐나다,호주,플란드,태국,인도,중국,일본,홍콩,브라질,영국,인도네시아	2019.01 ~ 2019.12			1,136,162 (대천김 마른김) 747,008 (대천김 조미김)		
					중국 및 제 3국	2020.02.03	333,563	3.9	1,119,971 (대창식품)	
						2020.03.31	316,944	4.0	1,116,326 (대창식품)	
						2020.05.20	728,982	4.9	3,107,499 (대창식품)	
						2020.06.25	478,536	5.2	2,148,631 (대창식품)	
소계							2017년~2020년 = 126억 6070만			

그림46. 2021년 골드1, 3호의 마른김, 가공김 수출현황

나. 개발품종의 유리사상체 국내분양

- 골드1, 3호는 2021년 12 현재까지 총 2,200g 유리사상체가 분양 되었으며 2021-2022년 총

4,000g 유리사상체 분양이 계획되어 있으며 2021년 12월부터 분양을 시작하고 이듬해 3월 까지 전국의 패각사상체 배양업체에 1,000g부터 300g 까지 분양 예정임

- 충남, 경기지역은 패각 사상체 약 30만 상자를 채묘 할 것으로 예상되며(육상채묘 포함) 2022년 패각 사상체 100만 상자 이상 확대 보급으로 국내 점유율 30% 이상 점유 목표에 있음

사상체 분양 계획

구분 (연도)	사상체 분양 내용	분양 업체	패각 사상체 생산량
5차년도 (2021)	사상체 1,200g	서천 (주)선진수산 외 1개 업체	150,000 상자(1상자/40패각)
	사상체 300g	해남 믿음수산	37,500 상자(1상자/40패각)
	사상체 300g	진도 동해수산 외 1개 업체	37,500 상자(1상자/40패각)
	사상체 100g	해남 백두수산	12,500 상자(1상자/40패각)
	사상체 100g	목포 달리수산 외 2개 업체	12,500 상자(1상자/40패각)
	사상체 100g	무안 제일수산 외 1개 업체	12,500 상자(1상자/40패각)
	사상체 100g	해남 일출수산	12,500 상자(1상자/40패각)

양식 면적

구분 (연도)	채묘업체	양식업체	양식면적
5차년도 (2021)	서천 (주)선진수산	서천(마량) 삼호수산 외 15개 업체	200 Set(1 Set/60대)
		서천(비인) 동백수산 외 14개 업체	200 Set(1 Set/60대)
		개야도 한김수산 외 7개 업체	100 Set(1 Set/60대)
		선재도 4개 업체	30 Set(1 Set/60대)
		국화도 3개 업체	30 Set(1 Set/60대)
		부안 위도 외 2개 업체	20 Set(1 Set/60대)
	동해수산, 믿음수산, 정가네 수산	전남 지역(진도, 해남, 고흥, 영암) 30개 업체	총 200 Set(1 Set/60대) 규모

그림47. 2021-2022년 유리사상체 분양 현황

다. 개발품종의 가공품 수출전략 수립

- 2020년 01월 일본 사가현 마른김 위판장을 방문하여 수출(마른김)을 위한(일본 사가현) 회의를 진행 하였으며 2020년 11월 이후 골드1호 마른김 수출 후 일본 현지에 맞는 조미법을 이용하여 가공 및 판매중에 있음
- 골드 1, 3의 가공품 수출을 위해 2021년 03월 가족회사인 (주)선진수산을 통해 일본 “사가현 김 양식협회”와 유선상 회의로 미팅을 진행하였으며 회의에 결과 현지에서 골드1호의 가공품(마른김)의 반응이 좋았고 2020년과 같은 규모로 매년 수입 의사를 밝혔음
- 이로 인해 2021년 11월 이후 골드1호 마른김 및 가공김 일본 수출 예정이며 수출 규모는 직, 간접 수출로 약 100만 달러로 예상하고 있음
- 2020년 상반기 Covid-19로 인해 수출 관련 바이어의 입국이 불가한 점을 감안하여 당초 수출물량에 대해 계약과 관련된 내용이 일부 수정 및 변경 될 수 있음

라. 국내 메이저 가공업체를 통한 개발품종 가공품 생산 및 내수판매(2021년 상반기)

- 골드1, 2, 3호는 물김 생산 후 서천에 위치한 (주)선진수산 마른김 가공공장에서 마른김을 생산하고 미국 및 중국, 동남아로 수출 판매되고 있으며 대천김에서는 골드1, 2, 3호(품종등록 및 특허등록) 조미김을 상표등록 후 수출판매 중임(2020년 (4년차) - 수입대체율 11.6%, 수출액 41.4만\$ 달성)



그림48. 협력사의 개발품종(골드1, 2, 3호) 가공품

- 골드1, 2, 3호는 물김 생산 후 서천에 위치한 (주)선진수산 마른김 가공공장에서 마른김을 생산하고 미국 및 중국, 동남아로 수출 판매되고 있으며 대천김에서는 골드1, 2, 3호(품종등록 및 특허등록) 조미김을 상표등록 후 수출판매 중임(2020년 (4년차) - 수입대체율 11.6%, 수출액 41.4만\$ 달성)
- 골드1호는 2021년 07월 (주)대천맛김과의 품종사용 실시권(통상계약)을 통해 3년간 개발품종의 가공품을 사용하여 수출판매 및 제 3업체(롯데마트)로 위탁판매 함으로서 내수시장 확대를 도모함

기술이전 계약서

공주대학교 산학협력단(이하 “갑”이라 함)과 “(주)대천맛김”(이하 “을”이라 함)은 “갑”이 보유한 “골드1호 품종 사용권”에 대하여 “을”에게 실시권 허락을 위한 계약을 다음과 같이 체결한다.

제1조 (정의)

- ① “계약기술”이라 함은 상기 기술과 관련하여 “갑”이 개발하여 “계약발효일” 이전에 그 소유권을 보유하고 있는 “골드1호 품종 사용권”(및 관련 기술 노하우)로서 붙임 1(기술이전 내용 및 범위)에 기술된 내용으로 한정된다.
- ② “계약제품”이라 함은, “을”이 “계약기술”을 “실시”하여 “골드1호 품종”으로 생산된 원조품 원료로 하여 제조, 판매 하는 모든 제품(마른김, 구운김, 조미김 등)을 의미한다.
- ③ “실시”라 함은 특허법 제2조에서 정의한 실시를 의미한다.
- ④ “생산 개시”라 함은 “을”이 “계약기술”을 실시하여 “계약제품”을 최초로 생산하는 것을 의미하며, 그 해당일을 “생산 개시일”이라 한다.
- ⑤ “계약기간”이라 함은, 본 계약이 유효한 기간을 의미한다.
- ⑥ “계약 발효일”이라 함은, 양측의 정당한 대표자가 본 계약서에 서명 날인을 완료한 날을 의미한다.

제2조 (실시권 허여)

- ① “갑”은 “을”이 본 계약에서 규정된 조항들을 준수하는 것을 조건으로 “을”이 “계약기간”동안 “계약기술”을 “계약제품”에 한하여 독립적으로 “실시”하는 것을 허락한다.
- ② “을”이 본 계약에 의하여 허락받은 권리는 독점적이고 “갑”의 동의 없이는 제3자에게 양도될 수 없으며, 제3자에게 “재실시권”을 허여하는 권리를 포함하지 않는다.

제3조 (계약의 범위)

- ① 본 계약의 효력이 미치는 지역은 대한민국의 영토에 한정한다. “을”이 대한민국의 이외의 지역에서 “계약기술”을 직접 “실시”하거나, 또는 제3자에게 “대여”, “실시”, 또는 위탁제조하기를 원할 경우, 사전에 “갑”과 협의하여 본 계약과 별도로 국외실시에 대한 “계약”을 체결하여야 한다.

(갑)

주 소: 충남 공주시 공주대대로 56

기관명: 공주대학교 산학협력단

대표자: 김길희

기술이전책임자:

생명과화학과 교수 김광훈

(을)

주 소: 충청남도 보령시 대천로 425-21(요양동)

회사명: ㈜대천맛김

대표자: 김태복

기술이전책임자: 이권우

상무

그림49. 협력사의 기술이전 계약서(골드1호 품종사용권)

제 2 절. 고온내성 김 종자 개발

[1차년도]

1) 20 line 고온내성 돌연변이 주 순계화

- 1단계에서 방사선 조사를 통하여 획득한 고온에 내성을 보이는 돌연변이체를 순계화 하였다. 순계주 확보를 위하여 엽체(엽상체)를 4 mm 간격으로 자른 후 통기배양하면서 단포자를 방출 시켰다. 그 후 20℃, 10h light/14 h dark 광주기조건 (10L:14D)에서 엽체를 선발하는 과정을 3회 반복하여 20℃에서 잘 자라는 엽체를 확보 하였고, 이 엽체 1개체를 이용하여 자가수정을 하는 사상체를 확보하였으며 이 사상체중 1개만을 선발하여 순계주를 확보하였다 (Fig. 1). 이때 배양 조건은 무성생식시에는 20℃, 10L:14D, 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 로 하였고 과포자, 사상체 단계는 20℃, 14L:10D, 30 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 배양하였으며, 각포자낭은 20℃, 10L:14D, 70 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 배양하였고 각포자 방출은 21℃, 10L:14D, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 하였다. 통기 배양을 위하여 통기 배양기와 산소 공급기를 사용하였고 오염됐을 경우 ESL Medium에 GeO2를 첨가해 주었다 (final concentration 1mg L⁻¹, Lewin, 1996).

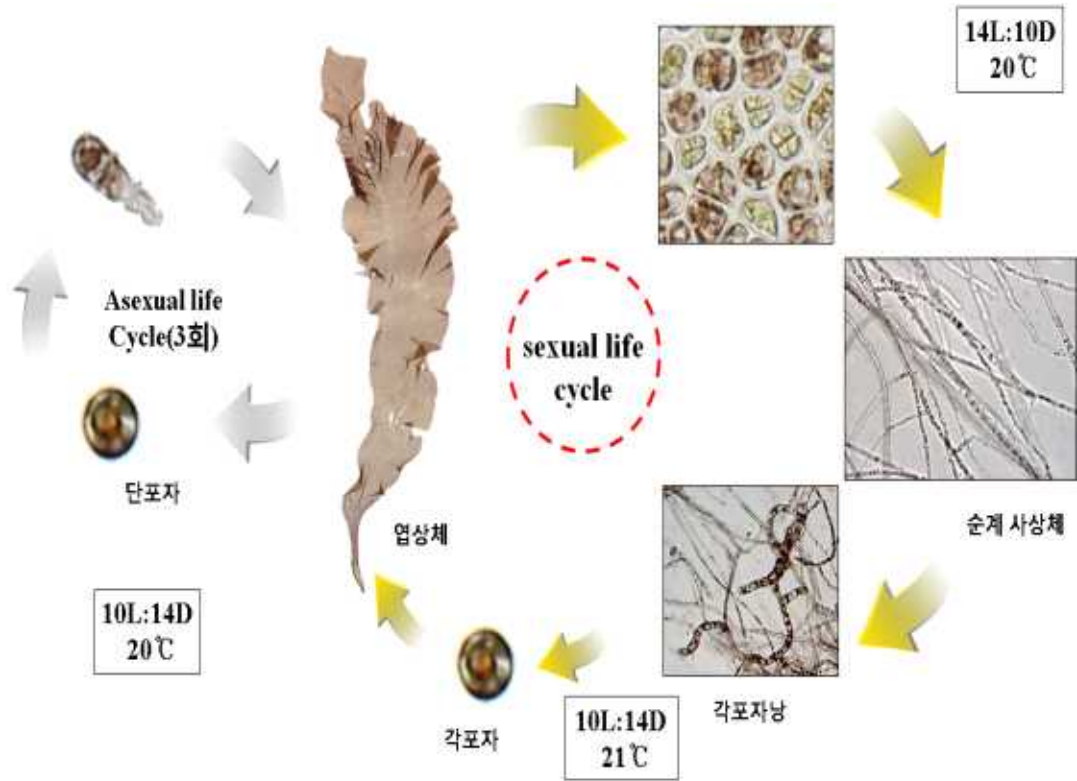


Fig 1. 순계화 방법

- 상기의 방법으로 순계주 5 line을 확보 하였다 (Fig. 2). 17 line은 현재 3차 단조화 중이며, 이후 12, 20°C 모두에서 잘 자라는 엽체 1개체를 선발하여 순계사상체를 확보할 예정이다 (Fig. 3).

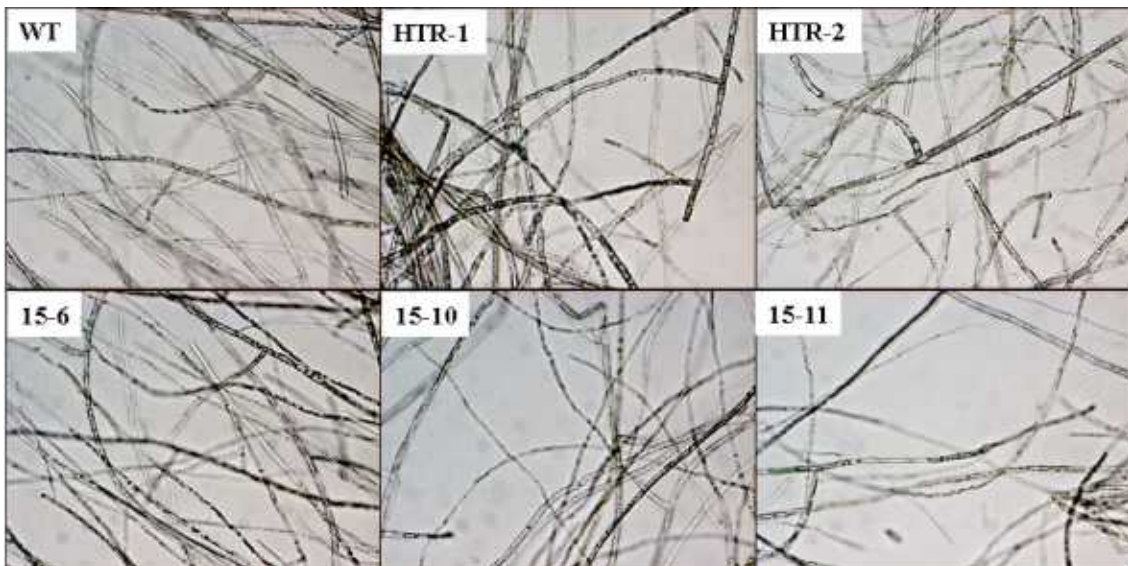


Fig 2. 순계 22line의 사상체



Fig 3. 단조화 중인 돌연변이 주

2) 변이주별 사상체 및 엽체 성장 특성 분석

- 순계가 확립된 돌연변이체 2 line 14-3(HTR-1), 14-4(HTR-2)을 이용하여 사상체 및 엽체의 성장특성을 분석 하였다.

가) 사상체로부터의 각포자낭 생성 및 각포자 방출

- 사상체 성숙과 체묘 온도 및 방출율을 확인하고자 특성 분석을 수행하였다. 각포자낭 성숙은 각포자낭이 생기지 않은 사상체를 이용하여 온도별로 $30 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 관찰하면서 성숙정도를 확인하였다. 15°C (10L:14D), 20°C (10L:14D), 20°C (14L:10D), 25°C (10L:14D) 조건에서 배양시 15, 20°C 단일 조건에서는 HTR-1 69%, 72% HTR-2 77%, 81%로 대조구의 성숙율이 더 높았고 20°C 장일 조건에서는 HTR-1 97%, HTR-2 81%의 성숙율을 확인 하였다 (Fig. 4).

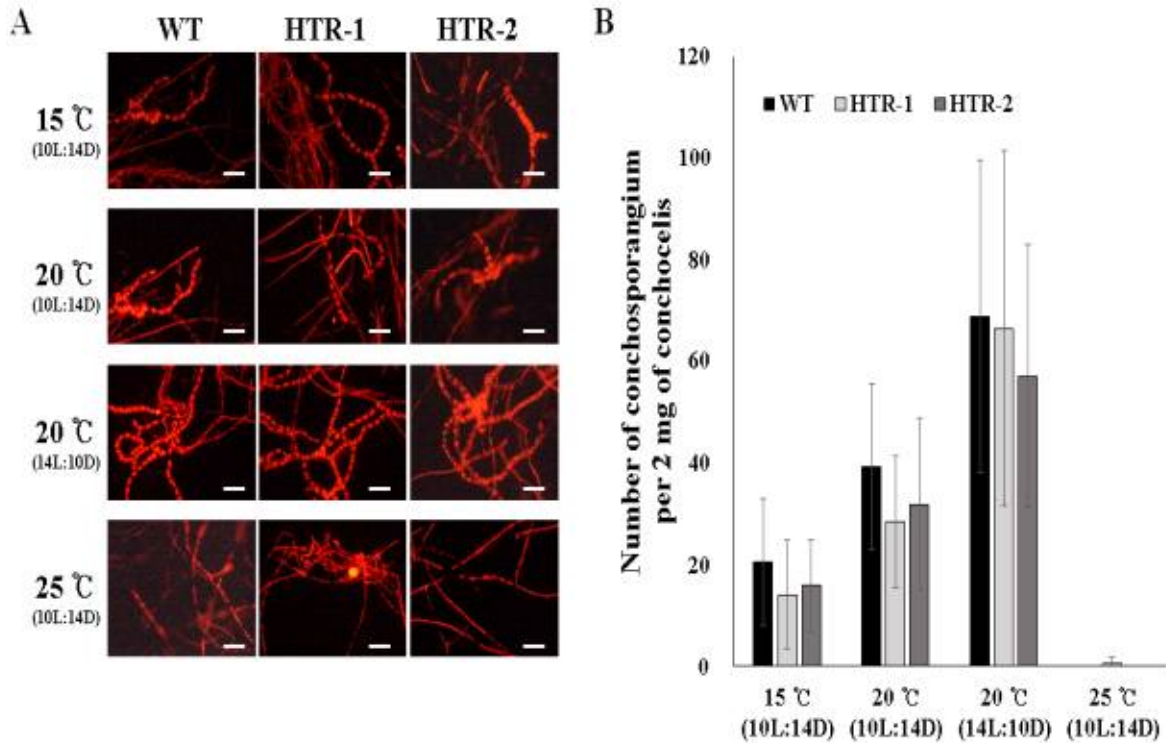


Fig 4. 각포자낭 성숙율

Efficiency of conchosporangium maturation of mutants and wild type incubated at different conditions. (A) Fluorescence micrographs of conchosporangium. (B) Efficiency of conchosporangium maturation. Two mg of conchocelis for each strains were incubated to mature conchosporangium for eight weeks. Ten replicates were performed. Scale bars indicate 100 μ m.

- 성숙된 각포자낭의 각포자 방출율을 확인하기 위하여 온도별 (15, 19, 21, 23, 25 °C)로 단일 조건에서 필라멘트를 넣어 준 후 7일 동안 통기배양하여 방출율을 조사하였다. 15 °C에서 대조구 22%, HTR-1 18%, HTR-2 17%의 방출율을 확인하였고 19 °C에서 대조구 24%, HTR-1 22%, HTR-2 20%의 방출율을 확인하였고 21 °C에서 대조구 100%, HTR-1 104%, HTR-2 103%의 방출율을 확인하였다. 또한 23 °C에서 대조구 61%, HTR-1 68%, HTR-2 76%의 방출율을 확인하였고 25°C에서는 3 line 모두 방출이 4~5%로 거의 일어나지 않았다 (Fig. 5).

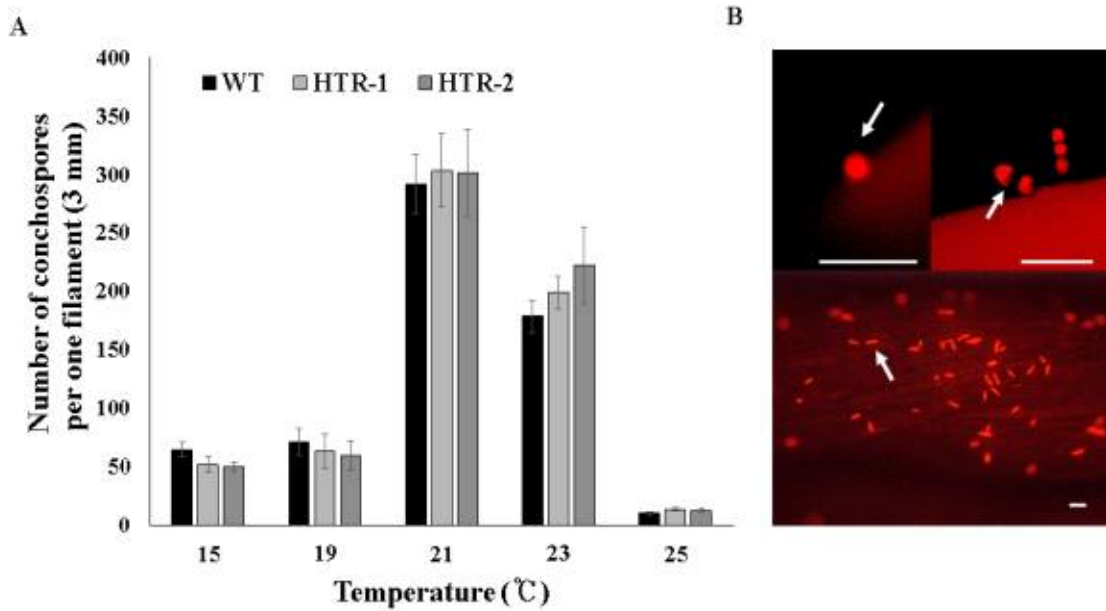


Fig 5. 각포자 방출율

Observation of conchospores release.(A) Efficiency of conchospores release for 4 weeks. (B) Fluorescence micrographs of conchospore and germinated conchospores on filament. Ten replicates were performed. Scale bars indicate 100 μ m.

나) 엽체의 성장 특성 분석

○ 변이주(HTR-1, HTR-2)를 대조구와 비교하여 정상 온도조건 (12 °C)와 고온 (20°C)에서의 성장 특성을 조사하였다.

- 성장 분석

○ 12°C에서 엽체를 3cm까지 키운 후 각각 12, 20°C에서 42일간 배양하면서 대조구와의 차이를 비교한 결과 12°C에서 배양시 대조구는 42일째에 47±2.6cm, HTR-1의 경우 44±1cm, HTR-2 17±1cm로 성장 하였다. 그리고 20°C 배양시 대조구는 14일까지는 6±0.2cm 까지 성장하다가 이후부터는 엽체의 색이 연해지고 일부가 탈락하면서 42일째 엽체의 색이 일부 하얗게 탈색되었고 길이는 7±0.4cm였다. 반면, 변이주의 경우 42일째 HTR-1 45±2.9cm, HTR-2 28cm±1.7cm 까지 성장 하였다 (Fig. 6).

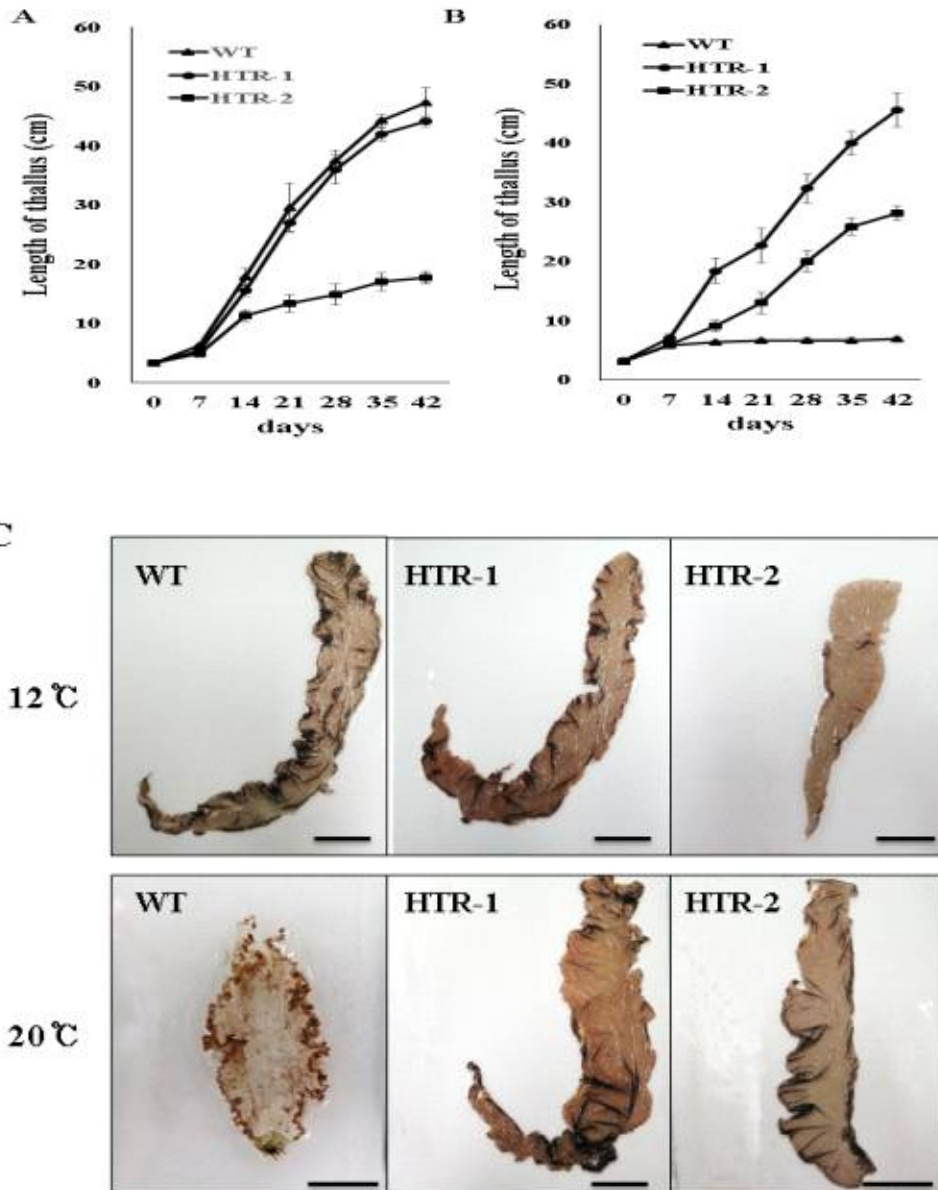


Fig 6. 엽체 성장 분석

Growth performance of the mutants. (A) Growth rate at 12°C.(B) Growth rate at 20°C. (C)Photographed image of thallus grown for 42 days at 12°Cand 20°C. WT; wild type, HTR-1 and HTR-2; two mutants. Conchospore gemlings (3 cm) of wild type and mutants were cultured at 12°Cand 20°C. Length of thallus was measured weekly for 42 days. Three replicates were performed.Scale bars represent 5 cm for 12°C (WT, HTR-1) & 20°C (HTR-1, HTR-2), 3 cm for 12°C (HTR-2), and 1 cm for 20°C (WT).

- 12,20°C에서 광합성 효율 (Fv/Fm) 분석

○ 12, 20°C에서 14일간 배양하면서 엽체의 특성을 분석 하였다. 먼저 광합성 효율 (F_v/F_m) 을 측정하기 위하여 김 엽체의 광계 II에서의 엽록소 형광을 Plant Efficiency Analyzer

(PEA, Hansatech)로 분석하였다 (Fig 7). 12°C에서 배양시 14일째 까지 대조구와 변이주 2 line 모두 0.60~0.66으로 값이 일정하게 유지되었고, 20°C에서 배양시 대조구는 시간이 지남에 따라(0, 3, 7, 14일) 0.62, 0.50, 0.40, 0.30으로 값이 급격히 감소하는 반면, HTR-1의 경우 0.61~0.64, HTR-2의 경우 0.59~0.61로 값이 유지 되었다. 이러한 결과는 고온처리 시 대조구의 광합성효율은 크게 감소해서 7일 이후에는 회복이 되지 않으나 변이주의 경우는 높은 광합성 효율이 계속 유지되고 있음을 나타낸다

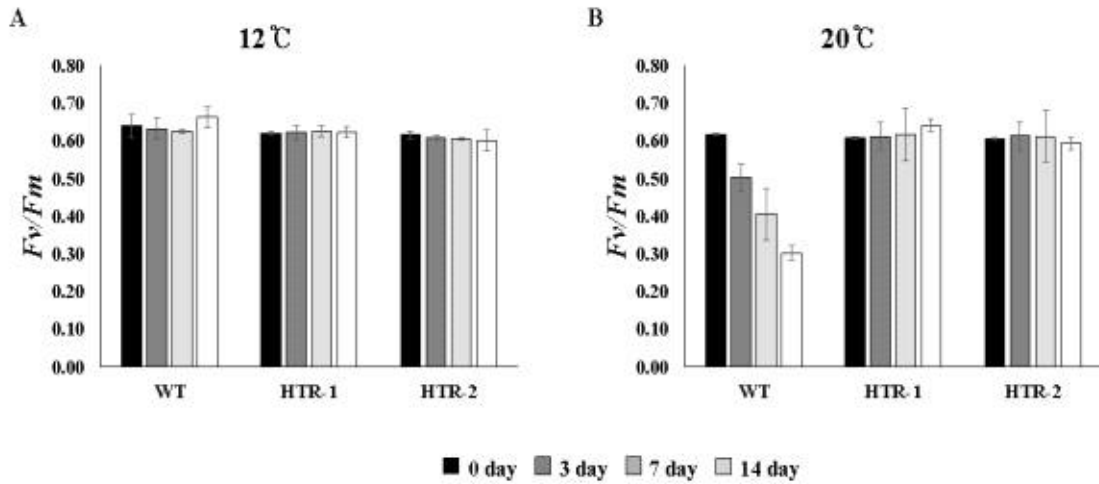


Fig 7. Fv/Fm

Photosynthesis efficiency of the mutants.(A) Maximal photochemical efficiency (F_v/F_m) of thallus grown at 12°C. (B) F_v/F_m of thallus grown at 20°C. Conchospore gemlings (3 cm) of wild type and mutants were cultured under $80 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (10L:14D) at 12°C and 20°C for 14 days. F_v/F_m was measured with thallus grown for 3, 7, 10, and 14 days. Three replicates were performed.

- 색소 분석

- 12°C에서 약 1cm 까지 키운 김 엽체를 이용하여 20°C, $80 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 10L:14D에서 14일간 배양하면서 색소분석을 수행하였다. 20°C에서 3, 7, 14일 처리 후 2일간 동결 건조하고 파쇄후 고온스트레스에 대한 chlorophyll, Phycoerythrin, Phycocyanin 색소의 함량변화를 측정하였다 (Fig. 8). Chlorophyll의 경우 대조구는 3일째 78%, 7일째 59%, 14일째 54%로 초기 100%에 비해 크게 감소하였고 HTR-1의 경우 3일째 103%, 7일째 99%, 14일째 107%로 고온처리에 도 chlorophyll 함량이 증감없이 유지되었다. HTR-2는 7일째 87%로 감소되었다가 14일 102%로 증가하였다. Phycoerythrin는 3, 7, 14일째에 대조구는 70%, 56%, 59%로 크게 감소하였다. 그러나 HTR-1은 91%, 89%, 87%로 HTR-2는 94%, 85%, 81%로 약간 감소하였다. 한편 Phycocyanin의 경우 대조구는 시간이 지남에 따라 82%, 40%, 40%로 크게 감소하였다. 그러나 HTR-1의 경우 Phycocyanin의 함량이 초기에 비해 3, 7, 14일 111%, 112%, 102%로 약간 증가 또는 유지되었으며 HTR-2는 99, 91, 88%로 약간 감소되었다 (Table 1)

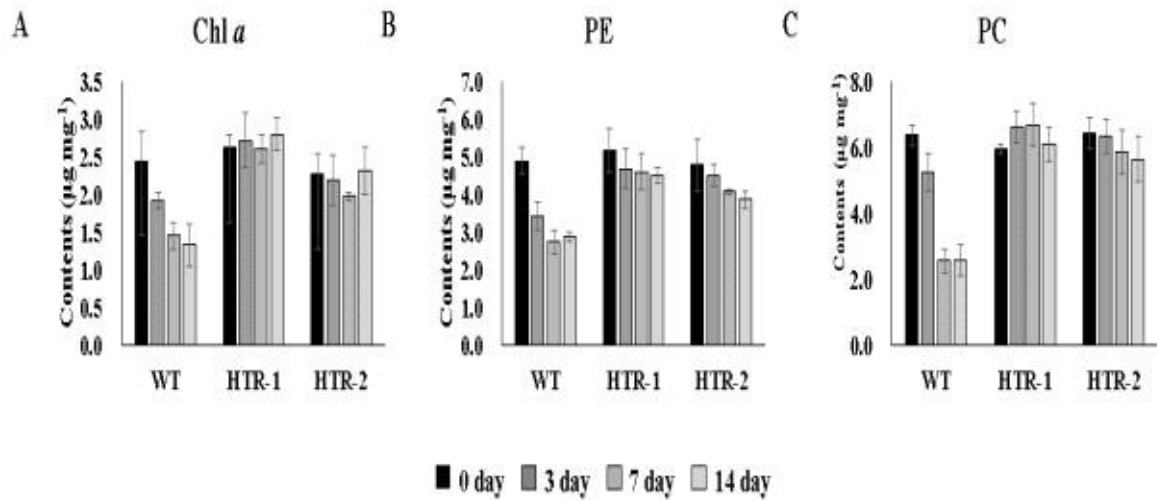


Fig 8. 색소분석

Analysis of pigments contents.(A) Contents of Chlorophyll *a*(Chl *a*). (B) Contents of Phycoerythrin (PE). (C) Contents of Phycocyanin (PC). Conchospore gemlings (1 cm) grown at 12°C were cultured under 80 µmol photons m⁻²s⁻¹(10L:14D) at 20°C for 14 days. Pigments were measured with each thallus grown for 3, 7, 10, and 14 days. Three replicates were performed.

Table 1. 색소 분석

Days	Chlorophyll <i>a</i>			Phycoerythrin			Phycocyanin		
	WT	HTR-1	HTR-2	WT	HTR-1	HTR-2	WT	HTR-1	HTR-2
0	4.89±0.4 0	5.17±0.1 6	4.79±0.2 7	4.89±0.3 5	5.17±0.5 9	4.79±0.7 0	6.39±0.3 1	5.96±0.1 3	6.44±0.4 7
3	3.40±0.1 1	4.69±0.3 6	4.50±0.3 4	3.40±0.3 8	4.69±0.5 3	4.50±0.2 9	5.25±0.5 8	6.64±0.4 8	6.35±0.5 4
7	2.74±0.1 8	4.60±0.2 0	4.08±0.0 6	2.74±0.3 1	4.60±0.4 8	4.08±0.0 7	2.56±0.3 6	6.70±0.6 5	5.87±0.6 9
14	2.86±0.2 8	4.50±0.2 1	3.86±0.3 1	2.76±0.1 3	4.50±0.2 1	3.86±0.2 3	2.56±0.0 9	6.10±0.2 4	5.64±0.1 3

- 엽체로부터 단포자 방출

○ 통기배양기에 필라멘트와 자른 엽체를 넣어 주어 온도별로 필라멘트에 붙은 단포자 또는 단포자로부터 발아한 어린 개체(germlind)의 수를 조사함으로써, 대조구와 변이주들의 단포자 방출율을 비교하였다. 4주 후 방출율은 대조구의 경우 12°C에서 9개, 15°C에서 13개, 20°C에서 21개, 25°C에서 7개 이었고, HTR-1의 경우 12°C에서 7개 15°C에서 12개 20°C에서 20개 25°C에서 21개 이었으며 HTR-2의 경우 12°C에서 4개 15°C에서 11개 20°C

에서 17개 25℃에서 19개 이었다. 단포자의 방출은 25℃를 제외한 모든 온도에서 대조구가 변이주에 비하여 HTR-1 약 15%, HTR-2의 경우 27% 높게 나타났으며 25℃의 경우 변이주가 대조구에 비하여 약 2~3배 가량 높게 방출 하였다 (Fig. 9)

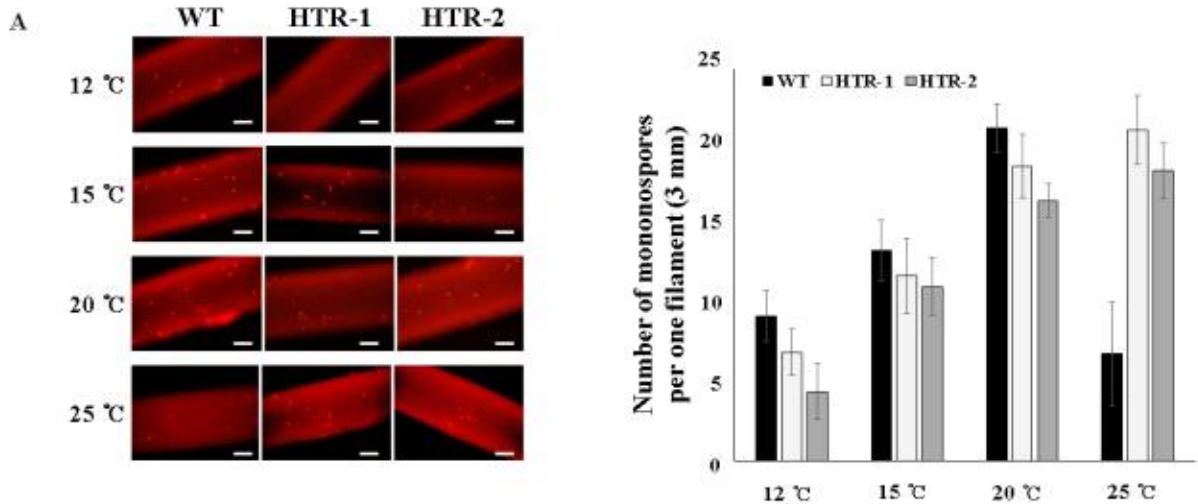


Fig 9. 단포자 방출

Efficiency of monospores release.(A) Fluorescence micrographs of monospores and germinated monospores on filament. (B) Efficiency of monospores release. Ten replicates were performed. Scale bars indicate 100 μ m.

- 이상의 사상체단계 및 엽체 단계의 분석결과를 요약하면 다음과 같다. 분석된 고온내성변이주 HTR1과 HTR2는 모두 고온내성 특성을 보였다. HTR1과 HTR2는 대조구의 생장이 멈추는 고온에서 왕성한 성장을 보여주었다. 한편 일반생장온도에서 HTR2는 생장이 느렸으나, HTR1은 대조구와 성장속도가 유사하였다
- HTR1과 HTR2이외의 나머지 돌연변이주들의 경우에도 순계화가 완료되면 동일한 분석 실험을 진행하여 모든 변이주들의 특성을 조사할 예정이다

3) 고온내성 변이주 유전자 특성 분석

가) 전사체 분석

- 고온내성 변이주들의 유전적 특성을 분석하기 위하여 대조구 및 HTR1과 HTR2의 전사체를 분석하였다. 12℃, 10L:14D, 80 μ mol photons $m^{-2}s^{-1}$ PES medium에서 약 1cm 까지 키운 김 엽체를 20℃, 80 μ mol photons $m^{-2}s^{-1}$ 10L:14D에서 3시간 처리하며 고온스트레스를 준 후 분석하였다. 이때 line당 500mg의 엽체를 각각 6개 준비하여 3 반복으로 수행하였다. 전사체 서열확보 및 bioinformatics 분석은 LAS에 의뢰하였다. 전사체 염기서

열분석을 수행하고 확보한 염기서열을 전남대 최동욱교수 연구팀의 전사체 기반의 *P.yezoensis* unigene set (9318 gene)를 참조로하여 mapping 및 DEG분석을 수행하였다

- Mapping 결과 분석된 서열의 10-20%만이 unigene set에 mapping되었다 (Table 2). 이상의 결과는 아직 unigene set가 최종본이 아니라서 분석된 서열에는 더 많은 김 유전자의 존재 가능성과 공생세균에서 생성된 유전자가 존재하기 때문일 것이다
- 이어서 unigene set 기반의 DEG분석을 수행하였다 (Table 3). q value 0.05를 기준으로 보면 대조구 (wild type)와 두 개의 변이체에서 고온처리에 의해 총 834, 1053, 2674개 유전자의 발현이 크게 변하였는데 각각에 대해 약 50%의 유전자가 증가 또는 감소한 것으로 분석되었다. 한편 12°C에서 배양한 wild type과 두 개 변이체 사이에는 2271, 1899개 유전자의 발현이 크게 변하였으며, 역시 약 50% 유전자가 증가 또는 감소하였다. 다음으로 발현이 변한 유전자들을 대사경로별 group으로 나누어 분석하였다
- 3시간 고온처리한 wild type의 경우에 4개의 고온반응관련 유전자와 산화스트레스 관련 및 CCM관련 유전자의 발현이 증가하였다 (Table 4). 한편 고온내성 변이체와 wild type 간에 12°C 정상온도에서의 유전자 발현변화를 분석하였다 (Table 5-6). 그결과 13개의 고온반응관련 유전자의 발현이 크게 변하였으며 산화스트레스, CCM, glycolysis, calvin cycle, lipid 대사 관련 유전자들의 변화가 눈에 띄게 증감하였다
- 이상의 결과들은 고온반응 및 고온내성을 가지는데 heat shock family protein이외에도 다양한 대사경로가 직간접적으로 영향을 미치고 있음을 나타낸다. 한편 CCM (carbon concentrating mechanism)에 관련된 carbonic anhydrase와 bicarbonate transporter 유전자의 발현이 크게 증가하였는데, 이는 고온조건에서 배양환경의 무기탄소 (Ci) 함량이 변하였기 때문일 것이다. 그 외에 산화스트레스, glycolysis, calvin cycle, 지질대사관련 유전자들의 발현변화가 나타났다. 향후 보다 자세한 분석을 통하여 변이 유전자의 정보를 확인하면, 이를 다른 방사무늬김과 구별되는 고온내성 특이 marker로 사용가능할 것이다. 또한 이상의 정보 및 update를 통하여 김의 고온내성 특성을 이해하는 유전적 생리 생화학적 기작을 규명할 것이다

Table 2. 분석된 reads수 대비 unigene set에 mapping 비교표

Sample	Num of reads	Num of trimmed reads	Trimmed/ Raw(%)	reads mapping		Aligned Pairs	Concordant Pairs %
				Mapped	rate		
12_14_3_1	27,835,226	27,751,085	99.70	5,030,842	18.1	4,049,751	14.1
	27,835,226	27,751,085	99.70	4,457,163	16.1		
12_14_3_2	25,676,157	25,596,392	99.69	3,951,383	15.4	3,127,988	12.0
	25,676,157	25,596,392	99.69	3,467,879	13.5		
12_14_3_3	26,599,509	26,510,446	99.67	3,147,406	11.9	2,438,798	9.0
	26,599,509	26,510,446	99.67	2,719,068	10.3		
12_14_4_1	25,860,658	25,749,040	99.57	3,535,422	13.7	2,765,453	10.6
	25,860,658	25,749,040	99.57	3,082,857	12.0		
12_14_4_2	27,523,788	27,438,836	99.69	4,216,057	15.4	3,357,211	11.9
	27,523,788	27,438,836	99.69	3,716,770	13.5		
12_14_4_3	26,568,701	26,484,850	99.68	3,646,155	13.8	2,910,517	10.8
	26,568,701	26,484,850	99.68	3,231,882	12.2		
12_WT_1	27,332,815	31,198,382	99.67	7,616,954	24.4	6,324,048	19.0
	31,302,884	31,198,382	99.67	6,854,459	22.0		
12_WT_2	27,546,880	27,443,385	99.62	4,672,077	17.0	3,654,605	12.9
	27,546,880	27,443,385	99.62	4,056,025	14.8		
12_WT_3	27,332,815	27,232,492	99.63	4,656,692	17.1	3,601,980	12.7
	27,332,815	27,232,492	99.63	4,034,082	14.8		
20_14_3_1	25,879,183	25,786,248	99.64	4,461,764	17.3	3,414,810	13.0
	25,879,183	25,786,248	99.64	3,788,253	14.7		
20_14_3_2	24,141,285	24,068,039	99.70	4,488,061	18.6	3,504,535	14.2
	24,141,285	24,068,039	99.70	3,876,354	16.1		
20_14_3_3	37,065,903	36,968,043	99.74	6,403,035	17.3	5,558,543	14.8
	37,065,903	36,968,043	99.74	6,398,296	17.3		
20_WT_1	27,673,171	27,544,260	99.53	4,383,188	15.9	3,322,501	11.9
	27,673,171	27,544,260	99.53	3,699,754	13.4		
20_WT_2	25,592,415	25,476,106	99.55	3,963,538	15.6	2,883,080	11.0
	25,592,415	25,476,106	99.55	3,217,155	12.6		
20_WT_3	25,479,560	25,399,431	99.69	4,743,131	18.7	3,757,477	14.3
	25,479,560	25,399,431	99.69	4,142,810	16.3		
20_14_4_1	36,034,530	35,998,487	99.90	5,027,971	14.0	4,339,423	11.9
	36,034,530	35,998,487	99.90	5,085,311	14.1		
20_14_4_2	43,649,114	43,570,846	99.82	6,111,634	14.0	5,284,291	11.9
	43,649,114	43,570,846	99.82	6,199,469	14.2		
20_14_4_3	39,646,320	39,554,327	99.77	5,564,004	14.1	4,827,973	12.1
	39,646,320	39,554,327	99.77	5,623,558	14.2		

Table 3. 온도변화에 따른 대조구, 변이주들 각각 또는 상호간의 유전자 발현변화 (DEGs)

Sample		Number of differential expressed genes with the significance level of											
Control	Case	q<0.001			q<0.05			p<0.001			p<0.01		
		All	Up	Down	All	Up	Down	All	Up	Down	All	Up	Down
12_WT	12_14_3	925	452	473	2,271	1,208	1,063	1,448	737	711	2,233	1,182	1,051
12_WT	12_14_4	741	304	437	1,899	929	970	1,192	525	667	1,878	914	964
12_WT	20_WT	169	46	123	834	351	483	352	112	240	810	337	473
20_WT	20_14_3	708	364	344	2,000	1,029	971	1,162	603	559	3,020	2,061	959
20_WT	20_14_4	790	515	275	1,786	1,076	710	1,114	705	409	1,758	1,060	698
12_14_3	20_14_3	264	96	168	1,053	435	618	480	188	292	1,026	422	604
12_14_4	20_14_4	1,208	686	522	2,674	1,419	1,255	1,738	951	787	2,635	1,405	1,230

Table 4. 3시간 고온처리한 wild type에서 발현이 증가한 대표적인 유전자

	transcript_id	12_WT	20_WT	log2(fold_change)	description
고온반응	TCONS_00000694	252.006	490.406	0.96052	hsp90-like protein grp94
	TCONS_00000111	192.958	338.624	0.811393	hsp90
	TCONS_00005640	1.9432	4.27365	1.13703	protein chloroplastic (chaperone protein / DnaJ-related protein)
	TCONS_00005258	6.19772	11.1875	0.852079	chaperone protein -related protein
oxidative stress	TCONS_00006343	16.9746	50.5897	1.57547	superoxide dismutase
	TCONS_00006244	5.46827	11.4271	1.0633	superoxide dismutase
CCM	TCONS_00005670	4.33827	11.9557	1.46251	carbonic anhydrase
	TCONS_00008790	6.50529	12.5406	0.946921	carbonic anhydrase
	TCONS_00006397	14.8043	27.9918	0.918987	gamma carbonic anhydrase

Table 5 12℃에서 배양한 wild type 대비 14-3에서 발현이 증감한 대표적인 유전자

	transcript_id	12_WT	12_14-3	log2(fold_change)	description
고온 반응 관련	TCONS_00003030	16.1813	1008.83	5.96221	dehydration responsive protein
	TCONS_00001102	0.460497	3.45951	2.9093	chaperone protein dnaJ 10
	TCONS_00001523	0.730643	5.1555	2.81887	chaperone protein dnaJ 10
	TCONS_00005640	1.9432	11.5563	2.57217	protein chloroplastic (chaperone protein / DnaJ-related protein)protein chloroplastic
	TCONS_00003460	3.58392	13.9757	1.96331	20 kda chaperonin
	TCONS_00003221	49.2886	164.355	1.73749	chaperonin
	TCONS_00007026	55.6469	175.638	1.65823	molecular chaperone
	TCONS_00001681	61.6186	187.688	1.6069	molecular chaperone
	TCONS_00007705	7.46199	20.3848	1.44986	molecular chaperone hsp33
	TCONS_00003852	180.142	400.057	1.15107	fk506-binding protein
	TCONS_00005258	6.19772	13.9212	1.16748	chaperone protein -related protein
	TCONS_00008857	134.687	272.946	1.019	early responsive to dehydration protein

	TCONS_0000011	192.958	385.625	0.998908	hsp90
oxidative stress관련	TCONS_00001233	0.634992	16.6221	4.71022	catalase
	TCONS_00008801	44.1693	53.4485	0.275105	catalase
	TCONS_00008800	228.707	236.941	0.051028	catalase
	TCONS_00002692	32.6906	24.7711	-0.40022	catalase
	TCONS_00006678	21.3915	41.4844	0.955531	glutathione peroxidase
	TCONS_00007936	62.3428	104.04	0.738838	glutathione peroxidase
	TCONS_00006779	21.4828	80.0382	1.89751	manganese superoxide dismutase
	TCONS_00007093	21.3668	49.6702	1.21701	superoxide dismutase
	TCONS_00006343	16.9746	28.5264	0.748924	superoxide dismutase
	TCONS_00007553	16.1746	22.4173	0.470885	superoxide dismutase
	TCONS_00006244	5.46827	6.24124	0.190747	superoxide dismutase
	TCONS_00003577	13.7289	15.3152	0.157752	superoxide dismutase
	TCONS_00007439	119.968	65.1316	-0.88122	superoxide dismutase
	TCONS_00007227	212.723	48.1413	-2.14363	superoxide dismutase
	TCONS_00006514	99.5673	404.588	2.02271	photosystem ii oxygen-evolving enhancer protein
	TCONS_00005156	513.459	1332.46	1.37577	oxygen-evolving enhancer protein
	TCONS_00005806	35.0057	56.9966	0.703283	photosystem ii oxygen-evolving enhancer protein 1
	TCONS_00004595	40.198	9.05752	-2.14993	oxygen-evolving enhancer protein
CCM	TCONS_00006258	5.31424	86.3275	4.02189	carbonic anhydrase
	TCONS_00005688	852.034	3590.58	2.07523	carbonic anhydrase
	TCONS_00009089	2.43403	8.05936	1.72732	carbonic anhydrase
	TCONS_00006933	947.031	2823.61	1.57606	carbonic anhydrase
	TCONS_00005670	4.33827	12.7219	1.55212	carbonic anhydrase
	TCONS_00008790	6.50529	15.4782	1.25056	carbonic anhydrase

	TCONS_000029 91	151.174	341.091	1.17394	carbonic anhydrase
	TCONS_000000 84	7.61599	30.0608	1.98078	hco3- transporter
	TCONS_000027 06	16.564	42.8468	1.37114	hco3- transporter
	TCONS_000086 20	0.742344	2.26378	1.60857	fructose-bisphosphate cytoplasmic isozyme 1
Glycolysis	TCONS_000025 84	402.5	991.335	1.30039	fructose-bisphosphate aldolase
	TCONS_000004 02	1242.82	2806.21	1.17501	fructose-bisphosphate aldolase
	TCONS_000074 21	123.812	265.367	1.09984	fructose- -bisphosphate / fructose-1,6-bisphosphate aldolase = aldolase
	TCONS_000016 72	297.154	873.659	1.55586	type i glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
	TCONS_000023 10	174.58	536.405	1.61943	phosphoglycerate kinase
	TCONS_000073 93	50.5176	106.357	1.07406	phosphoglycerate kinase 1
	TCONS_000042 57	11.876	30.7431	1.37221	phosphoglycerate mutase
	TCONS_000002 69	123.553	256.05	1.0513	phosphoglycerate mutase (-diphosphoglycerate-independen t)
	TCONS_000002 63	72.2331	202.651	1.48826	enolase
	TCONS_000020 10	157.762	70.6571	-1.15884	enolase
	TCONS_000052 28	8.41786	24.5376	1.54347	phosphopyruvate hydratase / enolase의 다른 말
	TCONS_000006 46	262.69	612.305	1.22089	pyruvate kinase
	TCONS_000074 06	29.5404	61.4906	1.05768	pyruvate kinase
PPP	TCONS_000077 41	143.342	23.333	-2.61902	phosphogluconate dehydrogenase (nadp(+)- decarboxylating)
	TCONS_000059 12	29.6581	101.563	1.77587	ribose 5-phosphate isomerase
	TCONS_000091 60	856.013	2215.29	1.37179	transketolase
	TCONS_000092 33	3.28413	8.03794	1.29132	transketolase
	TCONS_000039 10	80.0907	214.511	1.42135	transaldolase
Calvin cycle/glu	TCONS_000033 10	259.905	694.422	1.41783	chloroplast sedoheptulose- -bisphosphatase /

coneogenesis					Sedoheptulose-bisphosphatase (also sedoheptulose-1,7-bisphosphatase or SBPase)
	TCONS_00003772	171.438	429.007	1.32332	fructose-bisphosphatase
	TCONS_00002933	3.23972	10.9177	1.75273	fructose-bisphosphatase
	TCONS_00004252	81.3442	226.83	1.4795	chloroplast fructose-bisphosphatase
	TCONS_00001337	320.843	789.132	1.2984	chloroplast fructose-bisphosphatase
Lipid metabolism	TCONS_00004802	19.3626	67.164	1.79442	beta-ketoacyl-acyl-coenzyme A reductase
	TCONS_00007547	44.5594	134.596	1.59483	delta 5 fatty acid desaturase
	TCONS_00002142	175.093	411.276	1.23198	fatty acid desaturase
	TCONS_00001279	21.9214	45.7037	1.05997	long-chain-fatty-acid-CoA ligase
	TCONS_00001335	14.5311	29.3727	1.01534	acetyl-coenzyme A synthetase
	TCONS_00006853	7.90123	15.8463	1.00399	beta-keto reductase
	TCONS_00003326	3.59045	10.6201	1.56457	lysophospholipid acyltransferase lpeat1-like isoform x2
	TCONS_00002003	69.8003	19.7385	-1.82222	fatty acid elongase / long chain fatty acid elongase
	TCONS_00007107	5.58343	1.96408	-1.50729	diacylglycerol acyltransferase

Table 6 12C에서 배양한 wild type 대비 14-4에서 발현이 증감한 대표적인 유전자

	transcript_id	12_WT	12_14-4	log2(fold_change)	description
고온반응	TCONS_00003030	16.1813	375.984	4.53828	dehydration responsive protein
	TCONS_00001102	0.460497	2.48842	2.43397	chaperone protein dnaj 10
	TCONS_00001523	0.730643	3.62749	2.31173	chaperone protein dnaj 10
	TCONS_00008182	62.678	164.668	1.39353	dnaj homolog subfamily c member 2-like
	TCONS_00008857	134.687	346.467	1.3631	early responsive to dehydration protein
	TCONS_00003852	180.142	436.371	1.27642	fk506-binding protein
	TCONS_00005584	65.3005	154.209	1.23972	activator of 90 kda heat shock protein atpase homolog
	TCONS_00007705	7.46199	17.5544	1.2342	molecular chaperone hsp33

	TCONS_00002 528	195.425	438.252	1.16514	molecular chaperone
	TCONS_00005 559	16.1456	35.1236	1.1213	early-responsive to dehydration protein
	TCONS_00001 681	61.6186	130.929	1.08735	molecular chaperone
	TCONS_00003 460	3.58392	7.20831	1.00812	20 kda chaperonin
oxidative stress관련	TCONS_00001 233	0.634992	1.61967	1.35089	catalase
	TCONS_00007 093	21.3668	47.4996	1.15254	superoxide dismutase
	TCONS_00007 227	212.723	87.8975	-1.27508	superoxide dismutase
	TCONS_00007 553	16.1746	5.35149	-1.59572	superoxide dismutase
CCM	TCONS_00009 089	2.43403	7.10027	1.54453	carbonic anhydrase
	TCONS_00005 670	4.33827	11.0614	1.35034	carbonic anhydrase
	TCONS_00005 688	852.034	2011.83	1.23952	carbonic anhydrase
	TCONS_00005 833	241.687	98.2856	-1.29809	carbonic anhydrase
	TCONS_00003 092	31.9497	9.6344	-1.72953	carbonic anhydrase precursor
	TCONS_00002 706	16.564	49.9359	1.59203	hco3- transporter
glycolysis	TCONS_00008 758	0.008206	5.88E-0 5	-7.12366	glucose-6-phosphate isomerase
	TCONS_00008 759	15.6302	0.010194	-10.5824	glucose-6-phosphate isomerase
	TCONS_00004 257	11.876	25.5444	1.10496	phosphoglycerate mutase
	TCONS_00002 469	34.4176	70.2835	1.03004	phosphoglycerate mutase-like protein
PPP	TCONS_00005 227	2.31553	7.15759	1.62813	ribulose-phosphate 3- cytoplasmic isoform / 제대로 된 것은 ribulose 5-phosphate 3-epimerase, cytoplasmic
	TCONS_00009 233	3.28413	6.93938	1.07929	transketolase
Calvin cycle/gluc oneogenei s	TCONS_00002 974	17.8102	41.7135	1.22781	phosphoenolpyruvate carboxykinase
Lipid	TCONS_00000	6.6625	18.2254	1.45181	diacylglycerol o-acyltransferase

metabolism	256				
	TCONS_00002 142	175.093	424.827	1.27875	fatty acid desaturase
	TCONS_00003 326	3.59045	8.69489	1.276	lysophospholipid acyltransferase lpeat1-like isoform x2
	TCONS_00006 362	12.9143	31.1741	1.27137	fatty acid desaturase
	TCONS_00000 954	27.158	62.0838	1.19284	fatty acid desaturase chloroplastic-like
	TCONS_00001 893	277.578	621.904	1.1638	delta6 fatty acid desaturase

나) Genome editing

○ Genome editing 기술은 특정유전자를 knock out시킴으로써 유전자 특성분석에 필수적인 기술이다. 방사무늬김 (*Pyropia yezoensis*)에서 유전자 교정기술을 개발하고자 하였다. CRISPR/Cas9 system을 성공한 동물, 식물에서는 대부분 sgRNA 발현을 위해 자체의 U6 유전자의 promoter와 terminator를 사용하였다. 한편 방사무늬김에서는 U6 gene이 알려져 있지 않으므로 genome 및 transcriptome에서 염기서열의 유사성을 이용하여 U6 후보유전자의 서열을 확보하고자 하였다. PyU6 gene을 찾기위해 3세대과제를 수행하는 전남대학교 최동욱교수 연구팀이 확보한 방사무늬김의 일부 genome sequence를 이용하여 4개의 후보 contig를 확보하였다 (Fig. 10). 각 contig에서 붉은색으로 표시된 서열은 방사무늬김의 U6 RNA 후보서열이다. 이 정보와 전사체 정보를 이용하여 방사무늬김 CRISPR/Cas9 system을 확립할 것이다

>contig00024894

```
CTAGACAGGCGATACACAGGCATAGGCGGGGACAATAACAGATACACAGAGGCAA
AGCAATGAAAAGCGGGCGCGAACCTGGATTCCCGCCATCGCCTCCCAGTGTGTCAGAG
CCCTCTACACATAATCGACGCACGAAAATGCACACAGCACCTAGTGTCCGTCCCTT
TAAATTTCGCTCGCACCCAGGACATCGACACATCCACCACCATCAGTCTTGCATCAC
ACCCTCCCTTTCTACTTGCCTCCGGGCCACGCTACTTGAAACACACCCTGCCCCC
CAACATGCTGGCAGCTCAGCCCGACAAACGTACGTCGTCCCCCTTATCACCGTCCAG
TCCTGCAGCCAACGTCTTGGGCAGGCTGCCACCGCTGACTGCTAGCCGAAACACCCC
ACGTGCGGATACCGCCGCGGCCCGCTGCCAGCACGCGGGCGCCGAGCGTGTCCCC
AACCGCCGCCCCGTCGCGCCTACCGTCACTACCGGGGTGGGTGGCGCGTCGCCCCGCC
ATGCTAACCGGAGACAGGGTGGCGGGGAGGCTGGCAGGTGATGGCACCCCTAGCGGC
GATGACCACCGCCAAGTGACACGAGGAGGGCGGCGGCAGGCGTGGGGGGAGAACG
GCCAGCCGATGCGTGACGAGCCGAGAAAGCGCCGGCAAGCGTCCCGGCGGGGGGGCT
CACAAACGAACGCGGTGACAGACGCGGCTGCGGTGGGCATCGTGGGGAGTGC GGCTT
```

GCAGCGGGGAGGAGAAACCTGCCTCTGCTGCGGCGGATGTGTGTACTGCGAGAGGC
ACTGCACGAGTAGGATGGAGGGGGCCCCTCCGAACGCGCACCCCTCCGCGAGGGGGGC
GGTCGAGTCGGTGTGCGCCACAAACCTCCTGGACTGGGATTGTTTGACAAGTGACC
TGCTGACGCGGATCACGCGTTCGAACAGATTCAAAGCGACTCAAGGTGAACAGAAA
AACCGAATTAGATACAAGAGACCAGGATGCTTATCTTGTCTGTTCCCACAAGATG
GTCAGTACAACGCGCAATGGCTGCTTTTCGGCTTCGGCCATATGATACACTGGAAA
ACAAACAGAGAAGATTAGCATGAGTCCTCGCGCAGAGATGACACACGTACAATCCG
AAGAGTACCACTTTTTTTTGGTATTTTTTTTGGTGTGTTGAGCTACGGAGTGGTGG
GGGGGGGTGTGACTCACCCCCCATCGCTTTTGTGTTGCGTGGGGAAGCGGTATGGG
GGCGGATCGGGCGGTTTTTGGTCGCTGTCTTGGCGGCGGTGGAGGCGGTCATCGCGGC
GGCGACGGCCAAGTCGACGGCGACGGAGCGGAAAGCGCTGACAGTGGCTGTCATTT
CGGCCTTGTCGGCCAACCACGGGCCGTGTACCGGCAGCGACGGGGGTGTTGGTGGTC
CTCGTCGGCGGGCGGGAACGCGTTTTGGCGGGGGGGGTGGGGTCTTTCCCCTCCTCGC
CGGCATCGGGCGGGGGTGGGCCACCCCTACTCCTCTGTCCCCCGCGGCAGGTGCAG
CGGCGGCGGGCAACGTGACGGCGGACGCGGTGGCGGCGGCAGCGAGCGGCACGGCGG
CGGCCTCGGCGGCGGCCGAGGGCGCGGCCCTCCTCGGCGGCCGAGCAAGCGGTGG
GGCGTGCTCGGCGGGTGCCCCGGGCGCATCGCCCCCTCGGGGGGGCAGAGGCTCCCC
CTGCGGTGGAGGGGGGGTAAACGCTCGGGTTACCTGGGCTGAGGCGGTCCGCCGAG
CGGCAGCCTGCGGGCGGCCGCGAGGCAACGGTCCCGGCTGGGGGGGCAGCCGGCGG
GGCGGGCCCGGCCCGCGGTGCGGCGTTCGGCCCGCGCCAAAGACGTTCGGCCGAGCGC
GCGGCGGCGGCGGCCGCGCGCTCACGCGTGTGGCCGGCCGCGCGGGACGGTCGCCC
CGTTGGCGACCGTCTACGTGGCCGGCGTGTGCGGTGACGCGCGCGCCACCGCCTAC
GCTCCCTCCTGGTGGACCTGACAGGAGTGGACGCGCATGCGGTGGTGGACGTGGACC
GCTTTGGCGCCACCACCGCGGTGACGCTGGTCACGGACGCTACCGAGGCGTTTTTGC
CGGCGGTGCGGGGCGGCCAGCGGCCAAGGTGCTGACCCTGCTGCCGGCCGCCGACCC
GTGGTCGGCGTCGCTCCTGGGCGCGCGCCCGCTTCCCAGCTGTCGTGTGAGGCGGC
GGCGGCCACAGCGGAGGATCTTTGCCGCCCGCCCTCGAGGCCAAGCTCGGCCAGCT
GGGCACGCGGGCTGGTATGCCGCCCCACGTGCGCGCGTCGCT

>contig00023943

CCCAGGTAGGCAAGCACCCACCCGGGGAATAAGTCATGCGGTTCCCATTGACATTC
TCCACCTTTCATCGGCTCACTGCCTTCCCTCCCGTAACCTGGGAAGCGCCGTGGGTG
CCATGATCCATGGATGTCCACGAGAGTGACGTTAATTTTTTGGGCGGCGTATAGAA
TCAAGCAAAAAACGACAAAGAACAAGGCCAAGCACAGGACCGGGCACAAACACATG
TAACGTCAACCACTGTCCGAAACCCGACCACTCCACGGGGGCGTGAGCTGCAGAGGC
CGGCCCATAGAGAATATGACTCGATGGCAGCGCTTACGTCATGAATCCGAGGATG
TGGTTGGCTCAGACAGTGGTCGACATAAAAAACGAGTCATTTTTGTGCTAGCATA
TCATATTGCAATACCCCGAATTTTTGTCTCATGGCGACAATAACAACAACAGGGCTA

CAACAGGCCAATGGCATGCCTCAGATGGTGCACCACTGGCCAATGAATGCTCCGCG
TTAGGGTGGAAACAGTACGATCTGAGACTTTCTTGGGATTTTTGCCCACATCGAA
GAGGGAACAGGCATCGCAGGAACCAGCTGCGACCTCTCTCAGTGCTCTTTTTGTGG
ATCGGGCCGAGATAGAGGGAAATCCGCTGAGATCGTGAGGGAAAACAACAGCTATC
TGACCAACCAGCGTTCGGTATCAGATCCGCCGCGACTGCAGCCAATCATCGCCTGA
TCAAAAGGAATGTCCCCTGCACGCTGTTGGTCCGCTGCGAGCTCCCAGCACGCCGT
TGGCTCAAGGCCTTGTGTACGCTGTTGCTCTTGTCTCCATGAGACAAAATTCGG
GGAGCTGCAATAGCTTGGCGGGAACGCATGCGATACATAGATACAAAAAGAAACA
CGGCGTGCAACTCCTCGCTAATCATTTCATTGTGGTGCATGTTGTTCTTTCTGCAG
CGCTACTTCACCCACGGAGGCTGAGAATGGTCGACTTGTGGTGCAGACTGGCTACC
GTGCACTCAGAGCTTCCAAGCGTCTCAATTCAGTGTGAACTCGAAATAGTTGGACA
TTGTGCGCCGGGACGGCCAGCACGTCAGCTCGCAGTGCGGTTCTAGAACAGCTAGT
ATTAGCAGTTTACTGGCTTCGGCCATATGATACACTGGAAAACAAACAGAGAAGA
TTAGCATGAGTCCTCGCGCAGAGATGACACACGTACAATCCGAAGAGTACCCTTT
TTTTTCTTTTCCCCTCTCTGCATTCGCCTGCGCTATTCCTCCAGCTGACCGTCACT
CGTCTGCGCCCGTCTGCGACAGGGCATCCCCCAATTGGAGGCGCGGGTTCGTGCGCT
GTCTGAGGTGGAGGCAAGGGGTGGGCGGGGGGGTGGGCTTCGCACGAAGGGCGG
AGCAGCCCGACCCTCCGAGCCGTCTGGATGCCACCCGTGTGCCCGGCCATCCCAT
GTCCATGAGCGACAGAACACACCCTTCAGCCGCCGCTGCTCATGGCACTGAGCGGGG
AATGCTGGGTTTTCGGGGCGAGAGGAGGGAGAGGAACGGCCATGCCAGCCGCCAGCG
ACTGGGACGCCTGGAAATGGTGGACTGTTAAGCGAGTGCTCTGGGGTGGGAATAAT
GAGAATGTGTGCGCACTGCACAGCACAGTACAGTGCCTTCGGACACACACCCGGGT
GTCACGCCCCCCTCCCCCGCGGCGGCCCCCGTCGCCTTCAGCGGCCCGCGTCGC
CGCGGCTGAGGAGGGCCAGCCAGCCGCCCCACCAGGGTCATCAGCGTGTAGATGC
TGAGGTGAGAAATAGGCTGAGGAGGCCGAGAAAGTCGGCGAGAAACGCCACAGGC
GACACGGCTGCGTGCGCCTCGGTGACAACCGTTGCGGGGCCGCTGCCTTTGCTACC
GCCGCATCCGTCCCCTGGTCAACCCCCCAACGGTGGTGGCCACCGTCGCGGTTCGAC
ACGGCCTCGGAGACAAAGCCAACATCCACCACGTACGCGATGGCCGCGACGGGCGCC
GATGCCGGGTGCAACAGCCGGTCCACCCGCTGCAGCCGCACGCTGTCGGCAGCGGGCG
GCAACGTAACCGACGCGCCATTGACGCGGTGCCGCACAAAGCGGATGCGCGACGCG
GCGTTGGCGGGGAGGGCGGCGAGGAGGGTGGCCGCTCGGCGCGGCCGGCGGAGGTC
GCCGACGCCGACGCCGACCCGATGATGGAGGCGACGGCGACGGAGACGGCGCGGGCG
GGGAGGTCGCCGCCACGCTGCCGCCACGCGGGGAGCCCGCCACCCCCCGCGGTTCG
TCACCAGCCCCGACAGACGCGGTAAGACGTAGGCGGTGCGGCTATCGGCCGACGGTG
GCGTCGCGGGCGTAGGCGGGGTTCGTCCAGCCTA

>contig00000285

GGCTTTACTGCTTCACCCCTCCTCCCGCTCATGCAGATCATTGTGCCTGGGACCACC
GCACACCAGAAAATAGCTCAGGGGACGAGCCCTCTGCTCATGCGTCTATATTTTCC
GTGCATACGTGCAGATCAATTTGTTTTTCAGGAGTAGAAGCGATCCGGAAGCGATC
ATATCCTTTTGGCCATGTGCTCGGAAAACGTTTCCGAGGGGGTGACCTTGAAATTT
GATCCCTCTGTGACAGGGTTGAGAGGCAATAAATATTGAGTCAAAGTTATCGAGT
AAATTATCAGAAAAGAATAACGTTTCAGGAGAACCGGAACGATAATGATTATCATT
ATCAGACGTCCACGTGTTCCACCACGTGTCGGCTCGGAGGCCCATCAGACCAGACCG
GACCGCCTGATCACGCGGCAGTGCCGCACCCTGTCGTCGTTTTTCGAACTGTGTACG
TAGCCGCGATACAGTACGGCAGCGTGCCAGCCAAGATCCAGACCCACACCACGAGG
ACGATAGGAGCTACGTACGCCACTAGGACTTCACATCCTCCGCGGGCGTACTGTAC
ACGGCGGGTGCGGCCGCCCCACGCGGCACGTTCTCCGCCGCTGCGTACTACGCGGCC
CAATTTAGGCTCTATGCCCTTTCCGAATGCCGTGTCCGCAGCTCGTCAGGCGGCTCG
TGTTGGGCACGACGTGGTTAATTCATTGGTGTTCCTAACACGTGGCTCATGGGC
GATAACTATCAGAAACGTCTTCAATAATTATCGCATGTTTTTACTAACGATGGAT
GCTTTCGCAAATATATCAACCCTGACCGTTTGTGGCGACCGTAAGCCCAAGGATT
GAAACTTGATTCGCCCTCTGATTGGTCGATGACAACGATCGAATGCTGACACATG
CGTTGATCGCACCGTAGAGGTCGGTTCGACCTGCATTGGTTACTAGACACCGTGCCC
AAGAAAGGATGTCACAGCAATGGAGAAAGGCTGTACCCTCGGTGACCATCATTCGA
CCCACCCTCGGTACCTTCAAGCGACAACTTTAAGTGCCTCAAATAATTAGAAGTC
TAAAAAAAAACGCCACATATGTGGTTGTCGGACACTGTGAGCCAGGACGGGCAGCA
CGTCAGCTCTCAGTGCGGTTCTATTCTCGCAAGTATCTCGTCGTCCTTGGCTTCGG
CCATATGATACACTGGAAAACAAACAGAGAAGATTAGCATGAGTCCTCGCGCAGA
GATGACACACGTACAATCCGAAGAGTACCTCTTTTTTTTCGGTTATTTTTTTCCCGTC
GTTGCAACCGCCCATGAAGTGCCGCGCACTCGCTACCTACACCGCCAGTCGGTGGCC
GGCAGGAGGCGAGCAACGCATAGCAGGGTGGGTGGGCGGGCGCGCGGGCGGTGGCTG
TGCGCCACCGGGCAGCAGCGCGGGGCGGTGTGGCGGCGCGGAGCGCACATACGCAC
AGCGGCGGGGGGGGGCGGTGGCTGCCGCCGCTGCCGCACGCGGGGCACCTCCCCCCCC
CCCCCGCGGCACACGCGCGGTGGCTTGCCGCAGCACCCCTGCGTGGGGGATGGCGCTG
CGCGGTTGCCGAGGGGACCCCGGAGCGCCATCCCCACCCGGGGAGGCGGTAATGGAG
AGTTGGAGACGCAGGAGAGGAGAAGGTCAGTGGGGAGGGGGTGCCTGCTGCGGCAC
TCCCCTGCCCCAAGGTGGCTGTGGGTGGGCGGGGCGTAGCCCGTGTCTCCCCCCTT
CAGCCACTTGCTTTCCGTTCTTTTTGCTTCCCCGCTCCCTCCGCATCCCACGACCA
CCGCGCGTCCAATGCCGCCGCTCCGCCGCCGGCCGCTATCCTCTACGCCGACAGCT
CGCCCCTCCCCGCCATCGTCGGCCCCTGTGCCATTGTCTCCAGCGCCCTCGTCGA
CAGGGCCCGCTCCTCTTCTGACAGTGTTGCCGTCCCCCTTCCCCCTCCTTACCAGAG
CCGCTGCCCCCTCCTGTGACAGCTGCTTGCGGTGGTGGCTGCTGGCGAGGTAGCAGT
GGTGGCCGTTGCGTGGCTGCTGCCGTTTTCTGGCGGCTGCTGACGGGGGCCGAGAAG
GCAGGGAGTGGCGGCCGTGCACTTGTTTTTGACTGCCGCTACCAGCTGCTGTCACGGG

TGCCGGGCGGCTGCGTGGATGGGACCTGATGGCAGCGGTTCGGATATGGCAATGGCC
 GTCGGTTGCTCCTGCTCCCCGCCATTCGTAGTGATGGTGGAGGCTGGCAGCGGCATG
 GCCGAGGCGGTGGCGGCAGGCTTTTGGTGGAGCGAGGCACTGCGGGCGGGGTGCTA
 TTTAGTTGCGGCTGCCTCTTGGCCGTCGTGGTTCAGCGGCAGGGGCTTTGGCGGGAG
 TCTGTGGGCGGCCACAGGCACATGCGGCG

Fig 10. Genomic DNA sequence of putative PyU6 gene.

4) 양식 성장 특성/환경적응성 분석

가) 시험양식 과정

- 고온내성 돌연변이주의 품종출원을 위해 시험양식을 수행하였다. 확보된 순계주를 20℃, 30uE·m⁻²·s⁻¹ 14L:10D에서 사상체를 대량 배양하였다. 고압멸균 된 해수 ESL Medium을 이용하여 통기배양 하였고 규조류에 오염 되었을 때, GeO₂를 첨가해주고 이를 이용하여 서천에 위치한 (주) 선진수산에서 패각 약 1만패를 배양하였다. 그 후 회전식 실내채묘 하면서 김발에 각포자의 부착을 형광현미경으로 확인 후 채묘를 완료 하였다. 수온이 18℃ 이하로 떨어졌을 때 냉동상태로 보관한 김발을 겹망 후 1차 배양하였으며 분망 후 서천 마량항 부근 김 양식장에서 시험양식 하였다 (Fig. 11).

2016년 시험양식 진행 일정

구분 \ 월 별	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
유리사상체 배양	■	■	■	■								
패각 사상체 잠입					■	■	■	■	■			
겹망 & 분망										■		
1차 시험양식											■	■

2017년 시험양식 진행 일정

구분 \ 월 별	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
유리사상체 배양	■	■	■									
패각 사상체 잠입				■	■	■	■	■	■			
겹망 & 분망										■		
1&2차 시험양식	■	■	■								■	■

Table 7. 시험양식 진행 과정

	2016년	2017년
유리 사상체 증식	1월 ~ 4월	1월 ~ 4월
패각 잠입	5월 - 9월	5월 - 9월
육상채묘	9. 2	9. 27
겹망	10. 19	10. 6
분망	11. 04	10. 25
수확	11. 21	

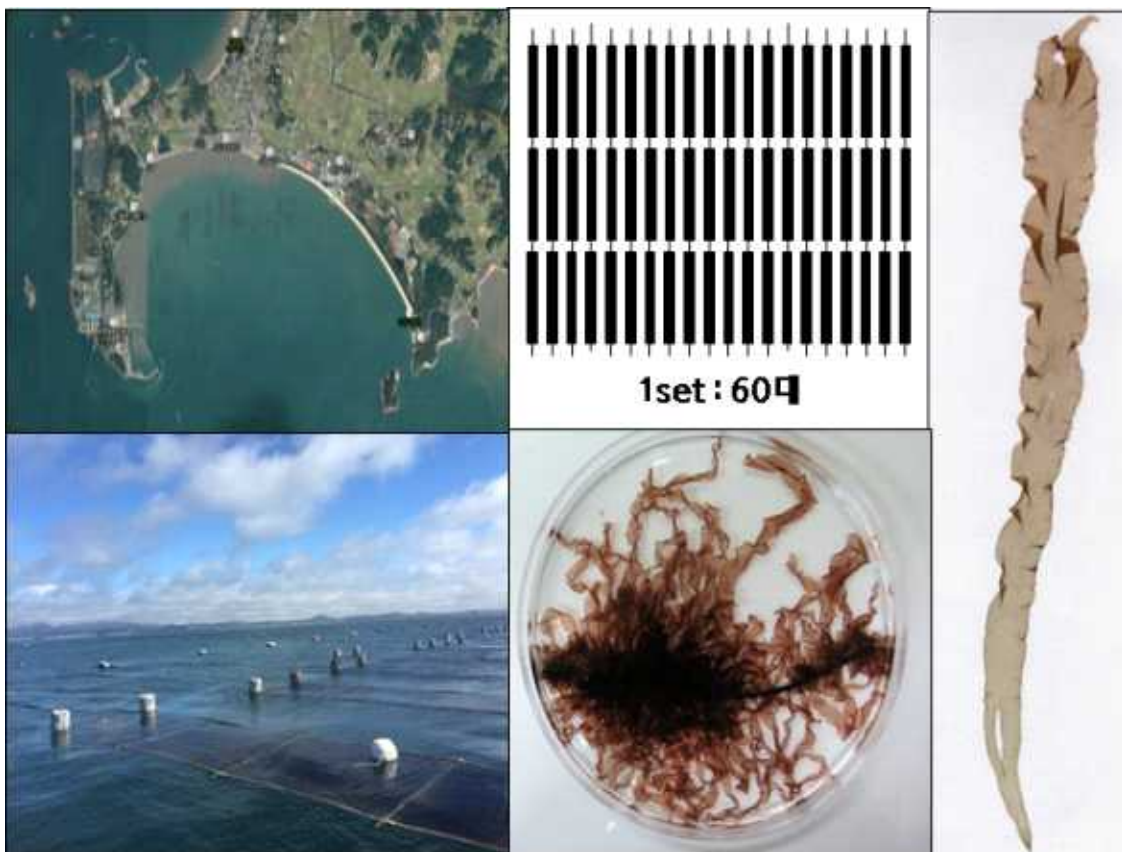


Fig 11. 시험양식 과정

나) 시험양식 돌연변이주 품종 특성

- 시험양식시 엽체의 모양은 선형으로 너비는 넓지 않았고 엽체의 연변부에 거치는 없었으며 엽체의 색은 중앙부는 갈녹색이고 하부는 청녹색으로 다르게 나타났다
- 생식 유형은 암수한몸 혼합형이다 (Fig. 12). 성엽의 길이는 8주차 약 $20.8 \pm 4.4\text{cm}$, 너비

는 $3.5 \pm 1.4\text{cm}$ 이었고 엽체의 두께는 약 $42\mu\text{m}$ 이며 선형이다 (Fig. 13)



Fig 12. 품종특성



Fig 13. 엽체 표본

다) 패각사상체 배양

- 품종출원을 위한 2차 시험양식은 1차 시험양식과 마찬가지로 증식된 돌연변이 주 사상체와 대조군 사상체 10 g을 충남 서천의 “선진수산”에 의뢰하여 2017년 4월 ~ 2017년 9월까지 패각 사상체 배양을 수행하였다. 8 주간 15 °C에서 14L:10D로 배양한 후 18~20°C에서 패각상태에 따라 광주기를 조절하여 배양 (패각 잠입 및 증식, 성숙) 하였다. 사상체의 패각 잠입 및 성숙, 증식 등은 대조구와 비슷한 속도로 진행되었다. 패각의 잠입 색은 KS 표준색 C&D 155colors를 기준으로 하여 2017년 5월 4일 대조구 먼셀기호 5Y 2/2로 검은 노랑, 돌연변이주 역시 검은 노랑에 해당되고 2017년 7월 4일 대조구 5Y 3/1 어두운 회노랑 돌연변이주 먼셀기호 5Y 2/2로 검은 노랑에 해당된다 (Fig. 14)

2017.05.04(5주)

대조구
(수과원 104)



번호	기본색 이름	약호	먼셀기호 H V/C
123	검은 노랑	Y/bk	5Y 2/2

고온내성



번호	기본색 이름	약호	먼셀기호 H V/C
123	검은 노랑	Y/bk	5Y 2/2

2017.07.04(13주)

대조구
(수과원 104)



번호	기본색 이름	약호	먼셀기호 H V/C
113	어두운회 노랑	Y/dkgy	5Y 3/1

고온내성



번호	기본색 이름	약호	먼셀기호 H V/C
123	검은 노랑	Y/bk	5Y 2/2

Fig 14. 패각사상체 배양

라) 육상채묘

- 육상채묘는 2017년 9월 27일 충남 서천군 마량리에 위치한 (주)선진수산 채묘장에서 배양된 패각 사상체 약 100패각을 이용하여 회전식 실내채묘 하면서 김발에 붙은 각포자의 부착을 형광현미경으로 확인 후 채묘를 완료 하였다. 돌연변이주의 경우 육상채묘가 2~3일간 진행되었다. 대조구로는 수과원104가 사용되었다 (Fig. 15)



강한 빛, 물레 아래에 성숙한 패각
설치 후 방출

Fig 15. 2017. 9. 27 육상채묘

마) 곽망 & 분망

- 육상채묘 후 냉동상태로 보관한 김발을 수온이 18℃ 이하로 떨어졌을 때 곽망 후 서천 마량항에서 약 3주간 1차 배양 하였으며 2017년 10월 25일에 분망을 진행 하였다 (Fig. 16)



Fig 16. 2017. 10. 25 분망

[2차년도]

1) 신규 고온내성 변이주 순계 사상체 및 엽체 기내 특성 분석

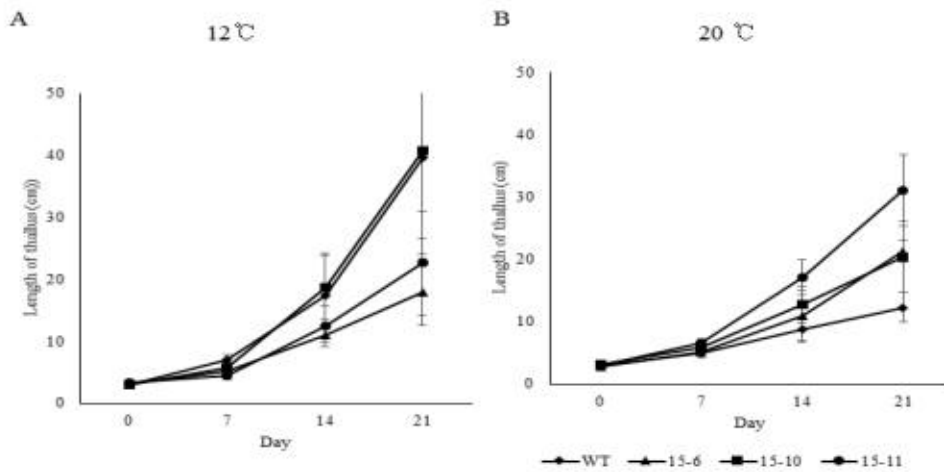
- 본 연구에서는 1단계 연구에서 확보된 순계 돌연변이체 15-6, 15-10, 15-11 를 대상으로 사상체 및 엽체의 생장 특성을 분석하였다

가) 엽체의 생장 특성 분석

- 기확보된 3개의 변이주 (15-6, 15-10, 15-11)를 대조구와 비교하여 정상 온도 조건 (12 ℃) 과 고온(20 ℃)에서의 생장 특성을 조사하였다

- 생장 분석

- 12 ℃에서 엽체를 3 cm까지 키운 후 각각 12, 20 ℃에서 21일간 배양하면서 대조구와의 생장차이를 비교한 결과 12 ℃에서 배양 시 대조구는 21일째에 39.7±15cm, 15-6의 경우 17.9±5.4cm, 15-10의 경우 40.7±14cm, 15-11의 경우 22.6±8.3cm로 생장하여 대조구와 15-10이 비슷한 성장률을 보였다
- 20℃ 고온배양 시 대조구는 14일까지는 8.6±1.8cm 까지 성장하다가 이후부터는 거의 성장하지 못하고 21일째 길이는 12.1±2.3cm 였다. 반면, 변이주의 경우 21일째 15-6 21.2±1.8cm, 15-10 20.3±5.7cm, 15-11 31±5.6cm 까지 성장하여 대조구에 비해 모든 변이주



는 1.7~2.5배 더 높은 성장률을 보였다 (Fig. 1)

Fig 1-1. 엽체 성장 분석

Growth performance of the mutants. (A) Growth rate at 12 °C. (B) Growth rate at 20 °C. WT; wild type, 15-6, 15-10 and 15-11; two mutants. Conchospore germlings (3 cm) of wild type and mutants were cultured at 12°C and 20°C. Length of thallus was measured weekly for 21 days. Five replicates were performed.

- Fv/Fm 분석

○ 12, 20 °C에서 14 일간 배양하면서 엽체의 특성을 분석하였다. 광합성 능력 (Fv/Fm)을 측정하기 위하여 김 엽체의 광계 II에서의 엽록소 형광을 Plant Efficiency Analyzer (PEA, Hansatech)로 분석하였다(Fig 2). 12 °C에서 배양 시에는 14일째 까지 대조구와 변이주 3 line 모두 0.54~0.68으로 값이 일정하게 유지되었다. 20 °C에서 배양 시 대조구는 시간이 지남에 따라(0, 3, 7일) 0.66, 0.63, 0.57로 값이 감소하다가 14일째는 엽체가 하얗게 탈색되어 Fv/Fm 값이 0 으로 측정되었다. 반면 모든 변이주 (15-6, 15-10, 15-11)는 경우 14일 까지 0.62~0.64로 값이 유지되어 고온에서도 정상적인 광합성 능력을 유지하였다

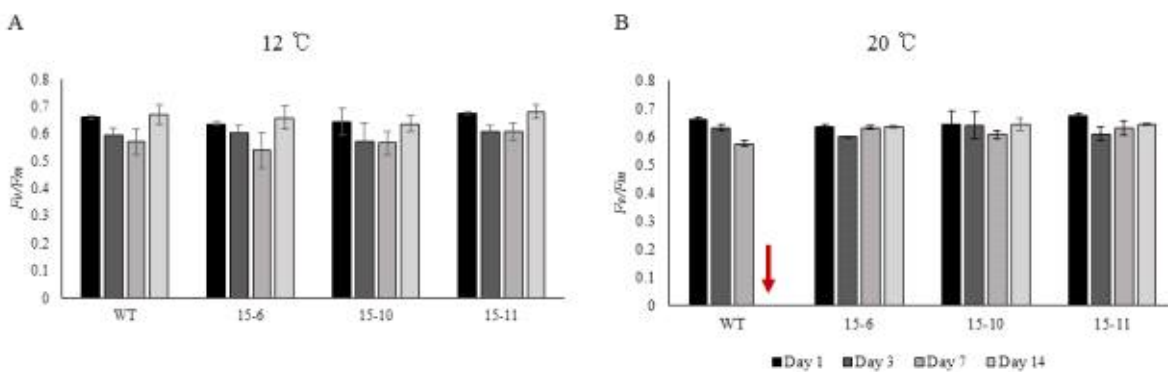


Fig 1-2. Fv/Fm

Photosynthesis efficiency of the mutants. (A) Maximal photochemical efficiency (Fv/Fm) of thallus grown at 12°C. (B) Fv/Fm of thallus grown at 20 °C. Conchospore germlings (3 cm) of wild type and mutants were cultured under 80 μmol photons m⁻²s⁻¹

¹ (10 L:14 D) at 12 °C and 20°C for 14 days. *Fv/Fm* was measured with thallus grown for 3, 7, 10, and 14 days. Three replicates were performed.

- 색소 분석

○ 12 °C에서 약 3 cm 까지 키운 김 엽체를 이용하여 20 °C 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 10 L:14 D 에서 14일간 배양하면서 색소 분석을 수행하였다. 20 °C에서 3, 7, 14일 처리 후 2 일간 동결건조하고 파쇄 후 고온 스트레스에 대한 chlorophyll, Phycoerythrin, Phycocyanin 각각 세 가지 색소 함량을 측정하였다 (Fig. 3). Chlorophyll 함량을 조사한 결과 대조구는 3일째에 92%, 7일째 68%, 14일째 54%로 감소하였다. 그러나 15-6의 경우 3일 105%, 7일에 89% 로 감소하였다가 14일 103%로 증가하였고. 15-10의 경우 3일 105%, 7일 105%, 14일 100%로 큰 변화가 나타나지 않았고. 15-11의 경우 3일 105%, 7일에 104% 로 변화가 나타나지 않다가 14일 92%로 감소하였다. Phycocyanin는 대조구 100, 59, 71%로 감소하였고 15-6과 15-10은 시간에 따른 차이가 거의 보이지 않았다. 15-11은 0일에 0.049±0.006으로 가장 높은 수치를 보였으며 3일 이후 97, 84, 78%로 감소하였다. 또한 Phycoerythrin의 경우 대조구는 시간이 지남에 따라 82%, 81%, 47%로 감소하였고 15-6은 100, 85, 105%로 14일 동안 값을 유지하였고 15-10과 15-11은 3일에 각각 127, 112% 로 증가하였다가 14일까지 0일과 유사한 값을 유지하였다 (Fig. 3)

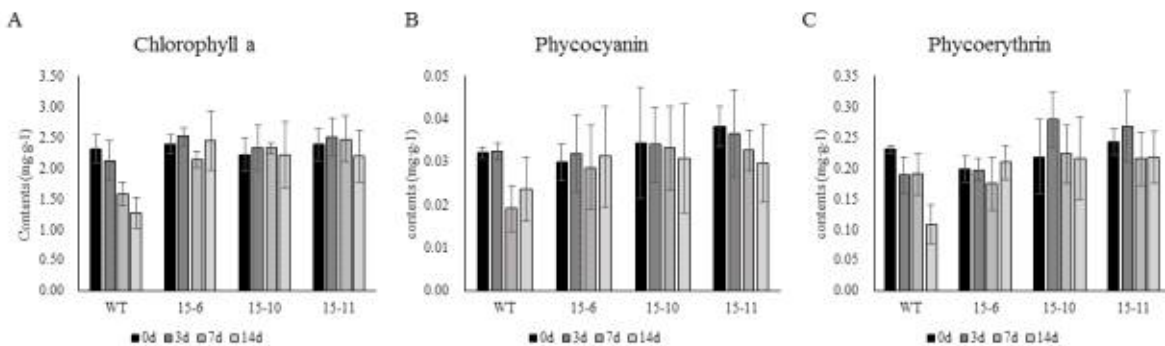


Fig 1-3. 색소분석

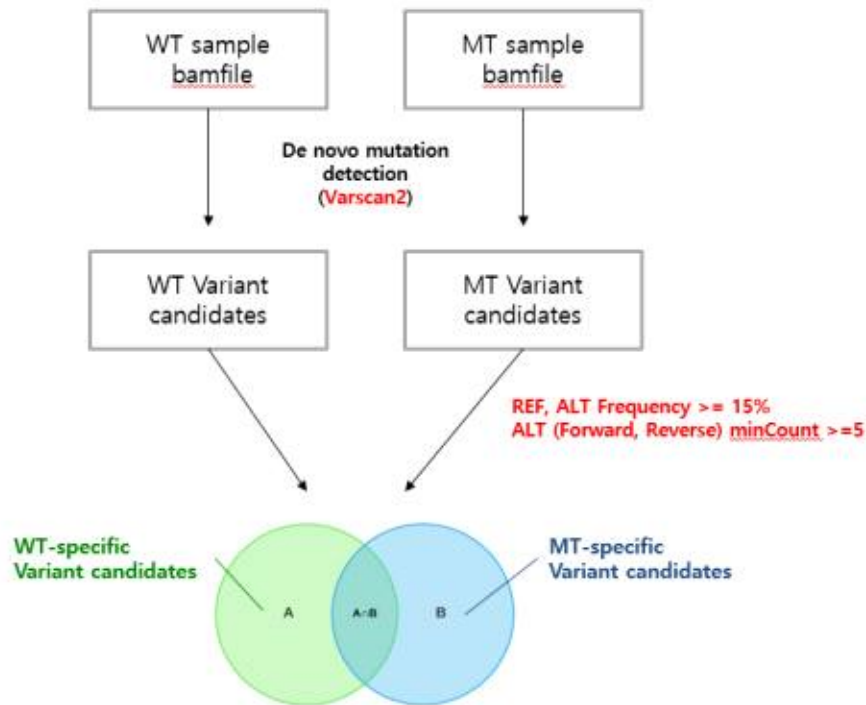
Analysis of pigments contents. (A) Contents of Chlorophyll *a*. (B) Contents of Phycoerythrin. (C) Contents of Phycocyanin. Conchospore germlings (3 cm) grown at 12 °C were cultured under 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (10 L:14 D) at 20 °C for 14 days. Pigments were measured with each thallus grown for 3, 7, 10, and 14 days. Three replicates were performed.

2) 고온내성 변이주 유전자 및 유전체 분석을 통한 특성 분석

가) 전사체 분석

- 고온내성김의 변이위치를 확인하여 고온내성 기작을 규명하고자 2017년에 확보한 고온내성김의 전사체결과를 분석하였다. (주)인실리코젠에 의뢰하여 대조구(수과원104와) 14-3, 14-4의 전사체들의 변이서열분석을 수행하였다. variant calling 방법을 이용하여 고온내성 변이체에서 특이적으로 나타나는 Indel과 SNP를 분석한 결과, Indel의 경우 대부분 일정비율로 대조구에서도 나타났다. 그러나 SNP의 경우 대조구에서는 발견되지 않는 변이들이 14-3의 경우 3개 14-4의 경우 4개 발견되었다

Variant calling Workflow



<전사체 비교분석을 통한 변이서열 분석 방법>

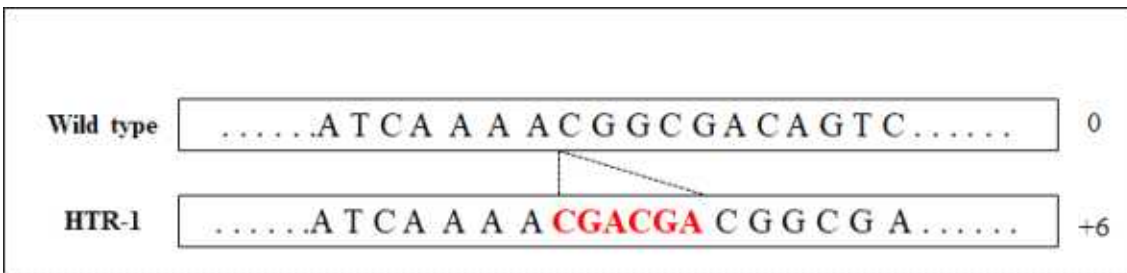
Tag	Transcript_name	pos	ref	alt	12_WT	%REF	%ALT	12_14_3	%REF	%ALT	Statistics	gene_id	go_id	go_desi	INFO
Mutant_specific	TRINITY_DN10308_c113_g2_i1	12	G	A	98.51	1.49	0.67	99.33	0.79E-57						
Mutant_specific	TRINITY_DN44402_c111_g5_i1	35	G	A	98.72	1.28	0.83	99.17	8.79E-57						

<전사체 비교분석을 통한 Indel 분석 결과 일례>

Tags	transcript_n	pos	ref	alt	%REF	%ALT	12_14_3	%REF	%ALT	Fisher_Pval	gene_id	go_id	go_desi	keg
Mutant_specific	TRINITY_DN3	39	G	A	99.4	0.6	0	100	2.21E-59					
Mutant_specific	TRINITY_DN5	22	G	A	99.58	0.42	0	100	2.21E-59					
Mutant_specific	TRINITY_DN5	49	T	C	99.44	0.56	0	100	2.21E-59		gi544668768	GO:0016787	hydrolase activity	

<전사체 비교분석을 통한 고온내성 특이 SNP 결과>

- 상기의 SNP와 Indel의 변이는 genomic PCR 및 sequencing을 통하여 재확인결과 일부 확인된 변이는 유전자 기능분석을 통하여 고온내성 기작 규명에 이용하고, 또한 품종특이 마커개발에 활용될 수 있을 것이다
- 그 한 예로서 서열 Trinity_DN48859의 경우 대조구와는 다르게 변이체 (HTR1)에서 6개의 base가 insertion되었고 이것은 PCR 및 sequencing을 통하여 확인되었다



>TRINITY_DN48859_c0_g2_i1 of HTR-1

CGACCGCCAGCAATTTGGGCCATTAAACTGAAGAGACAATGAACGAGAAAACCTATAC
AAGCTGACACACTAGATTCAGCTTCTGATCTGAGCGAAGATCAAAAACGGCGACAGTCC
CAGTCCGGACGGATCGATACAATCCCACGCAAAAACGAAAATCTACACTTGGTGTATGG
CACCGCTTGAAGCGCGCGCTTTTTCCTTCAACCGAAGGCATGAGCATTCTGTAAGACT
TCAGTGAAGCACTTAAAAATGGCAACCACTGATTGATTCAGGGTTTTCTGTGATGAGC
CGCTATGCTTATGATAAATCTGCTTATGCGCGAAGTTCGTGTTGAGGATGTGATGA
TCCCCTGTCAGATATTATCGCCGTGGATCGTTCAATTTTCGCTTGGTGATCTCACAAAC
CGTGTTTGAAAATTCTGGTCATTCTAGAATGCCGGTCTTCTCAGATAAATCTAGATGA
TCCCAAAGGCATGGTGCATATTCGAGACTTGCTCGCCTATTACACCAGA

>Wild_type_sequence corresponding for TRINITY_DN48859_c0_g2_i1

CGACCGCCAGCAATTTGGGCCATTAAACTGAAGAGACAATGAACGAGAAAACCTATAC
AAGCTGACACACTAGATTCAGCTTCTGATCTGAGCGAAGATCAAAAACGGCGACAGTCC
GGACGGATCGATACAATCCCACGCAAAAACGAAAATCTACACTTGGTGTATGGCACCGC
TTGAAGCGCGCGCTTTTTCCTTCAACCGAAGGCATGAGCATTCTGTAAGACTTCTAGTGA

AAGCACTTAAAAATGGCAACCACATTGATTTCAGGGTTTTCTGCTGATGAGCGCGCTAT
 GCTTGATAACATTCTGCTTATGCGCGAAGTTCGTGTTGAGGATGTGATGATCCCGCGT
 GCAGATATTATCGCCGTGGATCGTTCAATTTTCGCTGGTGATCTCACAACCGTGTTTG
 AAAATTCTGGTCATTCTAGAATGCCGGTCTTCTCAGATAATCTAGATGATCCCAAAG
 GCATGGTGCATATTTCGAGACTTGCTCGCCTATTACACCAGA

나) 고온적응 유전자 발현 분석

- 확보된 3개의 변이주 (15-6, 15-10, 15-11)와 대조구 (WT, HTR1)를 정상 온도 조건 (12 °C)에서 1-2 cm 키운 후 고온 (20 °C)에서 3 시간 동안 incubation 하였다. 각 각의 온도 조건 (12, 20 °C)에서 배양된 변이주와 대조구를 이용하여 RNA를 분리하고 이 RNA 5 ug 을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 template로 PCR을 수행하여 내재성 유전자인 actin을 증폭하고 이를 대조구로 사용하였다. 고온반응 관련 유전자들을 Table 과 같은 primer set를 이용하여 94 °C 30 sec, 52-58 °C 30 sec, 72 °C 30 sec, 27-30 cycle 조건으로 PCR을 수행하였다

Primer name	Primer sequence(5'-3')
PtCyclophilin	F: GCGTGTCTTTGACATGACC R: GTTCTCGTCCGCAAACCTCTC
PtHSP70D	F: CTGGAGGGCTATCTGTACAACG R: GTTGACCACCTCCTGTACCTCA
PyRRF	F: GGGTGCCTCAAGGATATCGAAA R: CCTGTCAATCATGCCACGT
HSPact	F: ACTCTGCCGCGGTCGACTT R: CCCACCCAAAGACGACCTT
PySTI	F: TGATGCGTGCCTGGACATTGA R: CGTCTCCAICTGTTGCAGCATGT
PyHSF	F: CGGCGGTGGCGCTGCT R: TCGAGCGTGTGCGACTTGA

Table 2-1. RT-PCR에 사용된 primers.

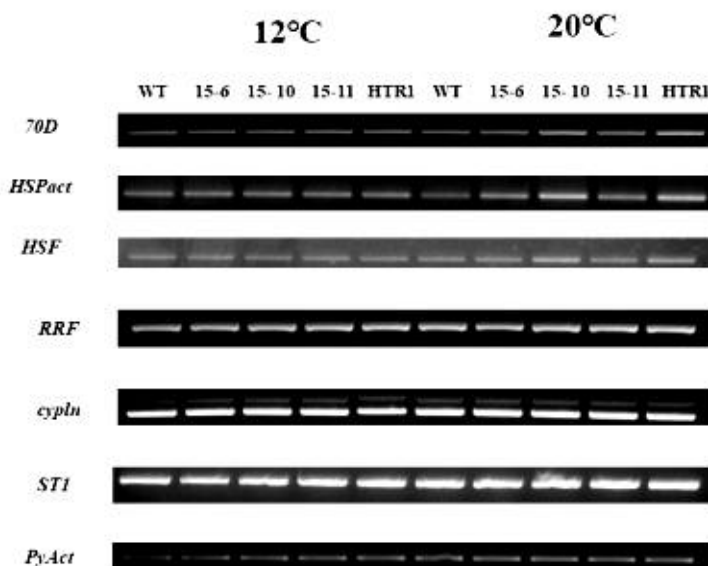


Fig 2-1 고온반응 관련 유전자들의 RT-PCR. *PyAct* 유전자는 loading control.

- 신규 고온내성 변이주(15-6, 15-10, 15-11)의 고온적응 유전자 발현은 각각 다르게 나타났다. 15-10의 경우 기존에 분석되었던 고온내성라인 HTR1과 유사하게 20 °C에서 heat shock 관련 유전자들 (HSP70D, HSF, HSPact)의 발현이 대조구 대비 높은 발현을 보여주었다. 그러나 15-6과 15-11의 경우 HSPact를 제외하고는 대조구 대비 발현 증가가 미미하였다. 이러한 결과는 변이주마다 고온내성 기작이 서로 상이함을 나타내는 것이다

다) 김 유전자 기능 검증 기술 개발

(가) Genome editing 기반 구축

- genome editing을 위한 리포터라인 분석

- 1년차에서 확립한 형질전환 기술을 이용하여 *P. tenera* (참김)에 PyGUS 유전자를 안정적으로 도입하였고, 도입된 유전자의 기능을 검증하고자 하였다. 먼저 형질전환한 참김을 hygromycin으로 selection되는 엽체를 선발하였다 (Fig 2-3)

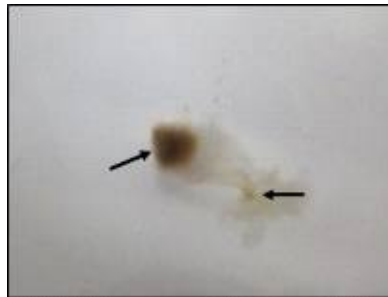


Fig 2-2. Selection of hygromycin-resistance line in *P. tenera*

- Hygromycin으로 선발된 엽체에서 사상체를 만들고 이 사상체가 PyGUS 유전자를 가진 형질전환체인지를 확인하기 위해 GUS staining을 수행하였다. 그 결과 대조구를 제외한 GUS staining을 수행한 모든 line에서 gus staining되었다 (Fig 2-4)

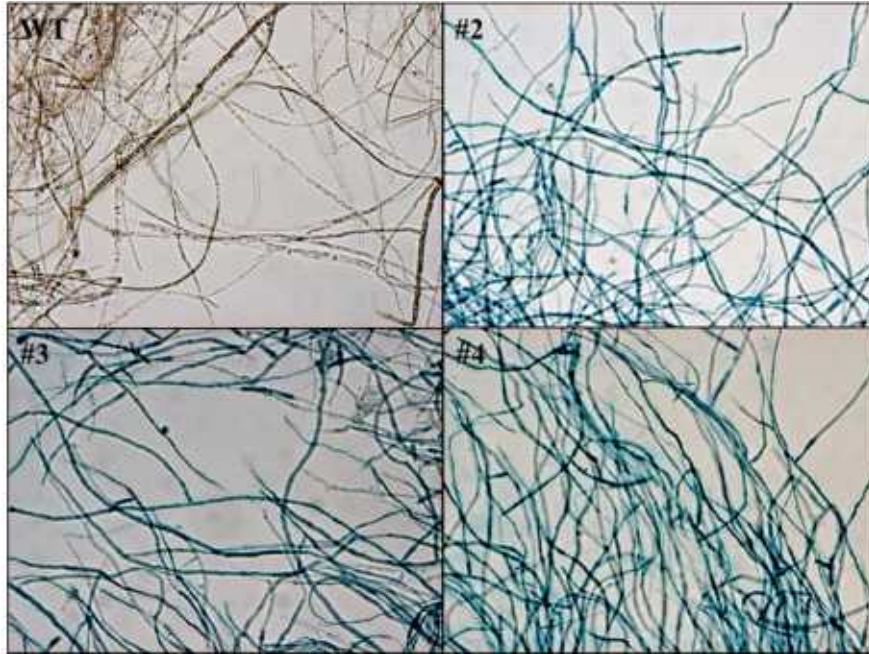


Fig 2-3. Histochemical assay for *PyGUS* expression in the conchocelis.

- GUS staining으로 확인된 형질전환체들의 genome에 *PyGUS* 유전자가 intact하게 도입되었는지를 확인하기 위해 southern blot을 수행하였다 (Fig. 2-5)

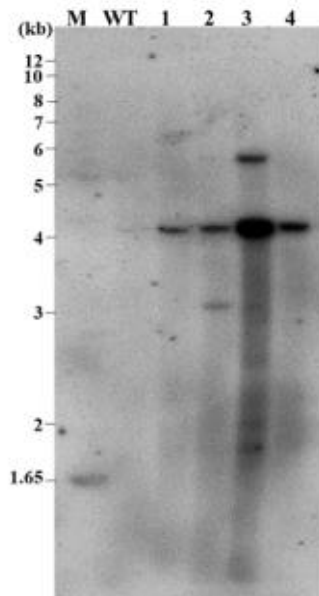


Fig 2-4. Southern blot analysis of *P. tenera* transgenic lines.

- 이러한 southern blot 결과는 형질전환체에서 최소한 1 copy 이상의 *PyGUS* 유전자가 참김의 genome에 도입됨을 보여준다. Fig 2-4.에서 GUS staining으로 확인된 사상체에서 발달한 유엽과 엽상체의 *PyGUS* 유전자의 도입을 확인하기 위해 같은 방법으로 GUS staining을 수행하였다. 그 결과 사상체에서와 동일하게 유엽에서도 대조구를 제외한 형질전환체의 모든 line에서 GUS staining됨을 확인하였다 (Fig 2-6)

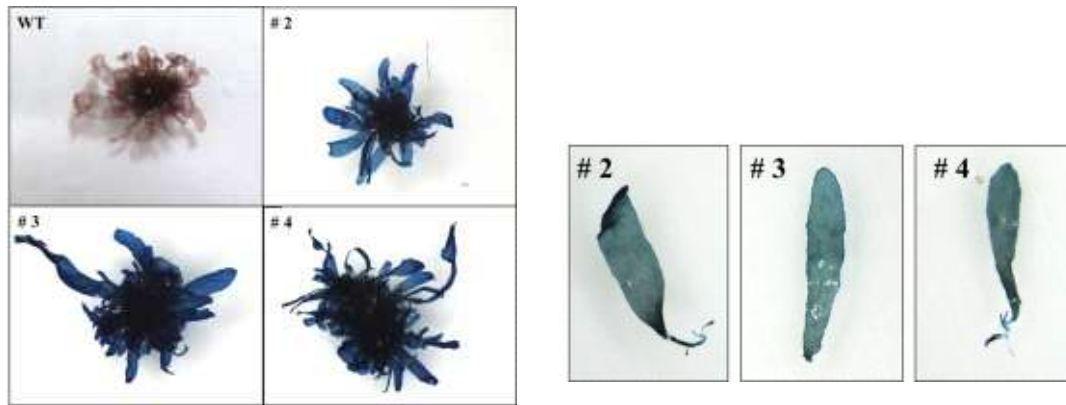


Fig 2-5. Histochemical GUS staining of young thallus and gametophytes of wild type and transgenic lines.

- 이는 PyGUS 유전자가 사상체에서 발달한 유엽과 엽상체에서도 안정적으로 도입됨을 보여준다.
- 사상체에서 GUS staining을 확인한 후 다음 세대에서의 GUS 발현 여부를 확인하기 위해 각포자낭, 각포자에서 GUS staining을 수행하였다.

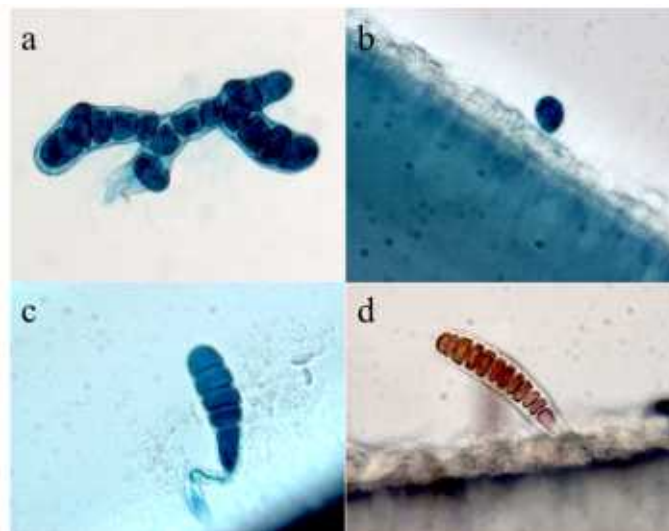


Fig 2-6. GUS staining of conchosporangia, conchospore and conchospore germling.

- GUS staining 결과 예상대로 모든 사상체에서는 참김 형질전환체에서 GUS staining이 확인되었다. 사상체에서 방출된 각포자에서도 형질전환체에서는 100% GUS staining됨을 확인하였다. 그러나 각포자에서 발달한 conchospore germling에서는 염색되는 유엽과 염색되지 않은 유엽이 동시에 확인되었다. 이는 방사무늬김에서 확인된 gene silencing이 참김에서도 일어남을 보여준다. Conchospore germling에서 어느 정도의 비율로 gene silencing이 일어나는지를 확인하기 위해 GUS staining을 확인하였다. 그 결과 30-40% 정도의 비율로 gene silencing이 발생한다는 사실을 확인하였다 (Fig. 2-8)

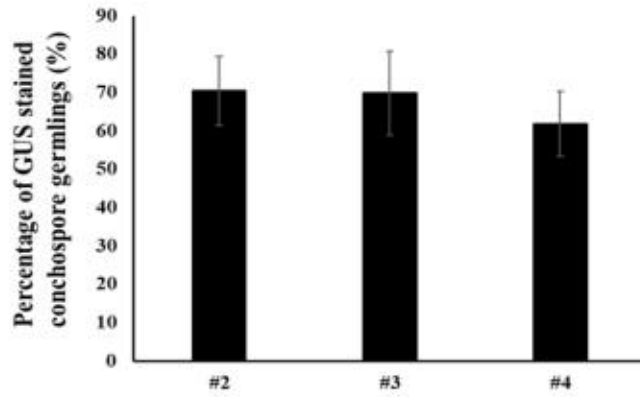


Fig 2-7. GUS staining rate in the conchospore germlings of representative transgenic lines

- 사상체와 여기서 만들어진 각포자낭, 그리고 각포자낭에서 방출된 각포자에서는 모든 형질 전환체에서 GUS 염색이 되었지만 각포자에서 발달된 conchospore germling에서는 염색되거나 되지 않는 현상이 나타나는 것으로 보아 참김에서의 gene silencing 과정은 아마도 감수분열 이후에 나타남을 간접적으로 보여준다
- 이러한 결과를 확인하기 위해 형질전환체의 다음세대의 엽체에서 GUS 유전자가 intact하게 존재하는지를 gDNA PCR을 수행하였고, 또한 GUS 유전자의 발현 유무를 RT-PCR 통해 확인하였다 (Fig 2-9). gDNA PCR 결과 형질전환체의 모든 line에서 GUS 유전자가 존재함을 확인하였다. 그러나 RT-PCR 결과 30-50%에서 GUS 유전자의 발현이 감소됨을 확인하였다. 이는 GUS 유전자는 존재하지만 gene silencing의 결과로 발현양이 현저히 감소됨을 보여준다.

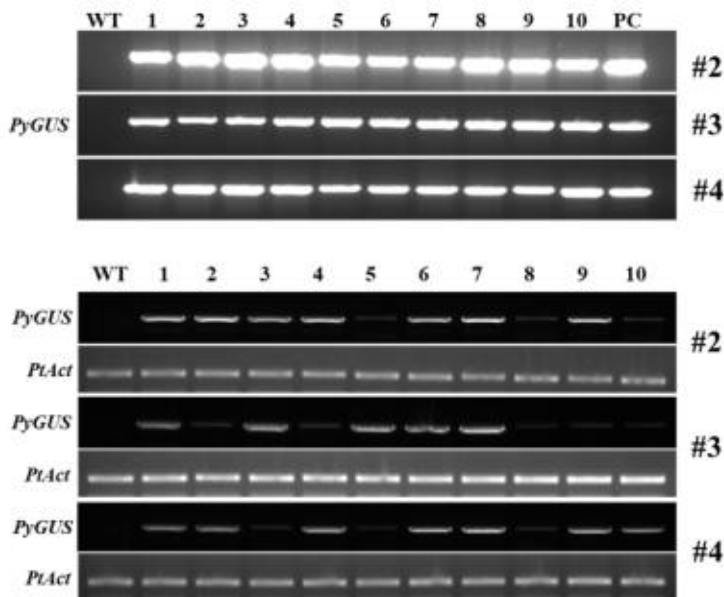


Fig 2-8. Genomic and RT-PCR in the next generation of transgenic lines.

○ 현재, 참김 생활사의 어떤 과정에서 이러한 gene silencing이 일어나는지를 분석 중에 있다

- 리포터 유전자 교정을 위한 벡터 구축

○ 2년차 1단계에 이어 2단계에서도 *Pyropia*에서 유전자 교정기술을 개발하고자하였다. 이를 위해서 김의 U6 promoter를 클로닝하여 sgRNA vector 제작에 이용하였다 (Fig 2-2)

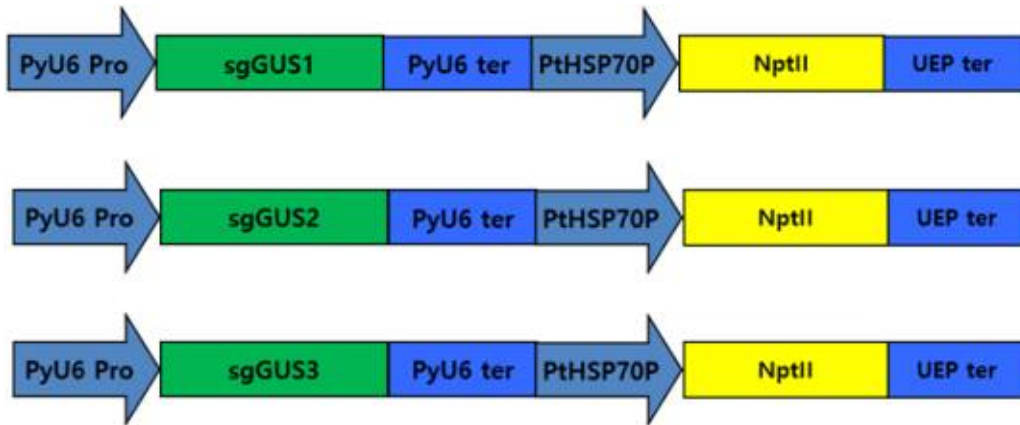


Fig 2-9. Construction of sgRNA vectors

○ 2년차 1단계에서 확보한 *Pyropia yezoensis*의 genome sequence과 5' race를 통해 확보한 서열을 바탕으로 정확한 Py6U gene의 promoter와 terminator 서열을 확인하여 sgRNA vector 제작에 사용하였다. 가이드 RNA는 PtHSP70P-GUS-hyg2 vector가 도입된 김의 GUS 유전자를 target으로 하여 서로 다른 위치의 target sequence를 3 군데 찾아서 sgRNA vector를 제작하였다. Cas9 vector는 2년차 1단계에서 제작한 PtHP-hyg-Cas9 vector를 사용하였다. 현재 두 vector를 PtHP-hyg-GUS2 vector가 도입된 김에 형질전환 중에 있다

(나) 방사무늬김 다당류분해효소의 기능검증 및 활용기술개발

○ algaenan은 다당류로 이루어진 것으로 추정되면, 많은 조류의 세포를 물리적으로 보호하는 강력한 세포벽 물질로서 조류로부터 유용물질 추출을 위한 세포파쇄에 큰 걸림돌이다. 한편 현재까지 Algaenan층을 제거할 수 있는 생물학적 기술이 개발되지 않았으며, algaenan의 정확한 구조와 생합성 과정이 알려져 있지 않다. 미세조류 *Nannochloropsis*는 오메가-3함량이 매우높고 지질함량이 풍부하여 상업적으로 사용되고 있으나 세포벽 주요 성분인 Algaenan 때문에 추출에 많은 비용이 소요된다. 방사무늬김 유전자중에 alginate lyase로 명명된 유전자 (Genbank Accession No: AB512413)는 다양한 다당류를 분해할 수 있는 것으로 알려져 있다. 이 유전자의 Algaenan을 분해가능성을 조사하고자 과량발현에 의한 *Nannochloropsis* 세포벽 두께를 분석하였다. 형질전환 *Nannochloropsis*에서 다당류 분해효소가 분비되고 그 결과 세포벽의 Algaenan 층이 부분적으로 분해되었음이 확인

되었다 (Fig 2-10).

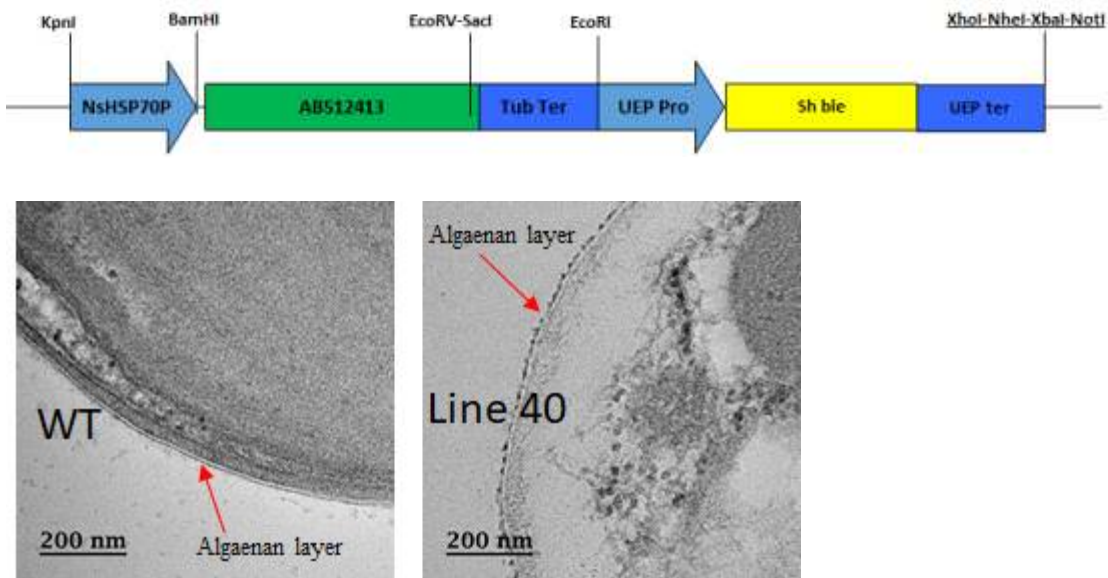


Fig 2-10. Generation of polysaccharide lyase producing Nannochloropsis

- 이러한 결과로서 방사무늬김의 다당류 분해효소 유전자의 algaenan 분해능력이 검증됨으로써 향후 algaenan 구조분석 및 생합성 경로의 규명, 그리고 상업적으로 algaenan 층의 생물학적 분해기술 개발에 활용될 것으로 기대된다

3) 신규 변이주 시험양식 성장 특성/환경적응성 분석

가) 시험양식 과정

- 확보된 순계주 (15-10, 15-11)를 20 °C, 30 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (14 L:10 D)에서 대량 배양하였다. 고압멸균 된 해수 ESL Medium을 이용하여 통기배양 하였고 규조류에 오염되었을 때, GeO₂를 첨가해 7~10일간 배양 후 배지를 교체해주었다. 대량 배양된 사상체를 이용하여 폐각 약 1만패를 서천에 위치한 (주) 선진수산에서 배양하였다. 그 후 회전식 실내 채묘를 하면서 김발에 붙은 각포자의 부착을 형광 현미경으로 확인 후 채묘를 완료 하였다. 수온이 23 °C 이하로 떨어졌을 때 냉동 상태로 보관한 김발을 곁망 후 1차 배양하였으며 분망 후 서천 마량항 부근 김 양식장에서 시험양식 하였다 (Fig 3-1)

2018년 시험양식 진행 일정

구분 \ 월 별	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
유리사상체 배양	■	■	■	■								
패각 사상체 잠입					■	■	■	■	■			
겹망 & 분망										■		
1차 시험양식											■	■

2019년 시험양식 진행 일정

구분 \ 월 별	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
유리사상체 배양	■	■	■	■								
패각 사상체 잠입					■	■	■	■	■			
겹망 & 분망										■		
1, 2차 시험양식											■	■

Table 3-1. 시험양식 진행 과정

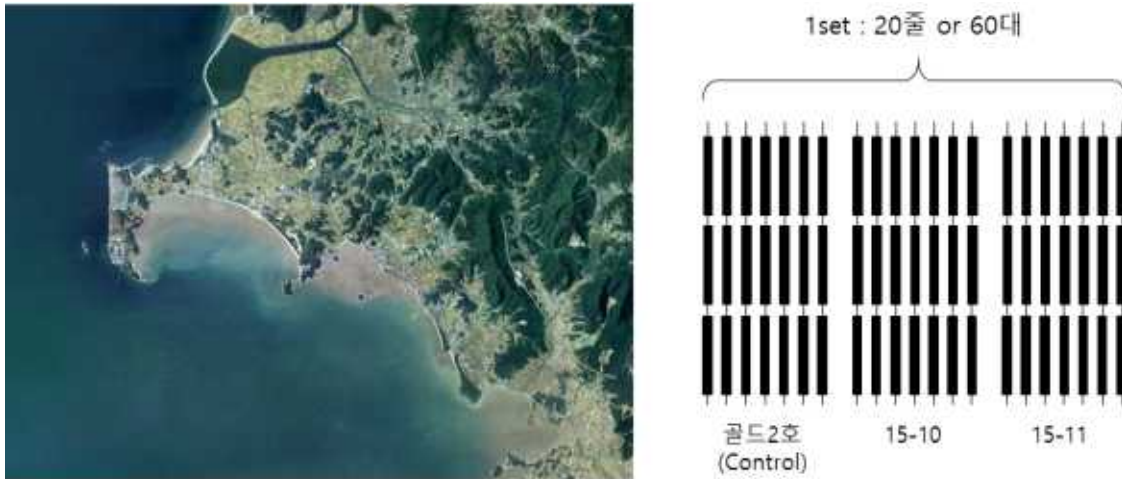


Fig 3-1. 시험양식 과정

나) 돌연변이주 품종 특성

- 실내 배양 시 엽체의 모양은 선형으로 너비는 넓지 않았고 엽체의 연변부에 거치는 없었으며 엽체의 색은 중앙부는 갈녹색이고 하부는 청녹색으로 다르게 나타났다. 생식 유형은 암수한몸 혼합형이다

다) 패각 사상체 배양

- 1차 시험양식은 대량 배양한 돌연변이주 사상체 (15-10, 15-11)와 대조군 10 g을 충남 서천의 “선진수산”에 의뢰하여 2018년 4월 ~ 2018년 9월까지 패각 사상체 배양을 수행하였다. 8 주간 15 °C에서 14 L:10 D로 배양한 후 18~20 °C에서 패각상태에 따라 광주기를 조절하여 배양 (패각 잠입 및 증식, 성숙) 하였다. 사상체의 패각 잠입 및 성숙, 증식 등은 대조구와 비슷한 속도로 진행되었다. 패각의 잠입 색은 KS 표준색 C&D 155colors를 기준으로 하여 2018년 5월 4일 돌연변이주는 먼셀기호 5Y 3/1로 어두운 회노랑에 해당되고 2018년 8월 2일 돌연변이주는 먼셀기호 N2로 검정에 해당된다 (Fig. 3-2)

2018. 05. 04

고온내성 (15-10)



번호	기본색 이름	약호	먼셀기호H/V/C
113	어두운 회노랑	Y/dkgy	5Y 3/1

고온내성 (15-11)



번호	기본색 이름	약호	먼셀기호H/V/C
113	어두운 회노랑	Y/dkgy	5Y 3/1

2018. 08. 02

고온내성 (15-10)



번호	기본색 이름	약호	먼셀기호H/V/C
154	검정	Black	N2

고온내성 (15-11)



번호	기본색 이름	약호	먼셀기호H/V/C
154	검정	Black	N2

Fig 3-2. 패각사상체 배양

라) 해상채묘 및 곁망 & 분망

- 해상채묘는 2018년 10월 01일 충남 서천군 마량리 양식장에서 수온이 21 °C 이하로 떨어졌을 때, 여러 곁으로 곁친 김밭(곁망)에 대조구와 실험구(15-10, 15-11)의 패각 사상체를 묶어 자연 채묘하였다. 약 3주간 1차 배양 후 김밭에 붙은 각포자의 부착을 형광현미경으로 확인하고 2018년 10월 25~30일 경 분망을 진행할 예정이다 (Fig 3-3, 3-4)



Fig 3-3. 해상채묘 및 겹망, 분망

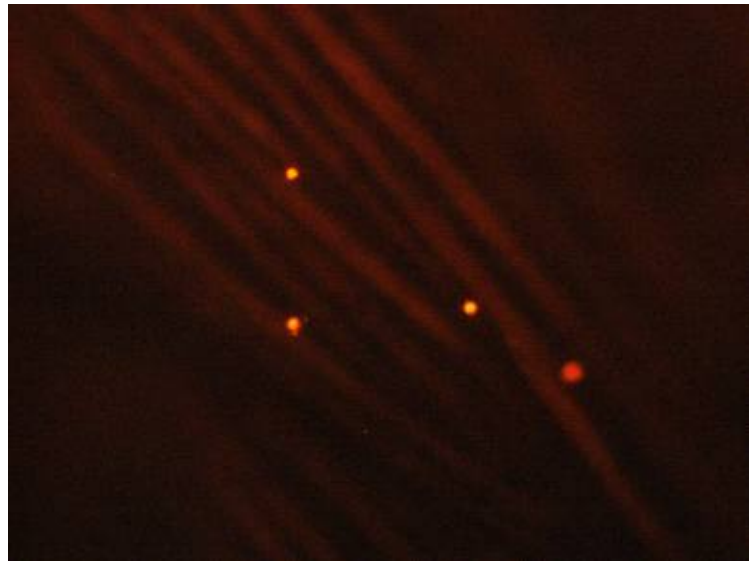


Fig 3-4. 해상채묘 후 김발에 붙은 각포자

4) 피드백을 통한 양식 조건 최적화

- 김의 양식에서 고온내성, 내병성, 광엽형을 동시에 가지는 것이 매우 유용하다는 김 양식업자 및 전문가들의 분석결과를 토대로, 기 개발 고온내성주에 상기형질의 집적가능성을 수행하였다

가) 내병성 테스트

- 매년 김 양식에 경제적 손실을 일으키는 갯병에 대해 고온내성 계통주가 내성을 가지는지 알아보기 위하여 고온내성 계통주 (15-1, 15-3, 15-6, 15-10, 15-11, 15-15)에 붉은갯병과 낭균병 감염실험을 수행하였다.

- 붉은갯병 내병성 테스트

- 붉은갯병균 (*Pythium porphyrae*)은 국립공주대학교에서 분양 받았다. 균주는 20 °C (10 L:14 D), 40 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 Cornmeal agar를 이용하여 배양하였다. 30일간 계대배양 후 Arasaki B medium 에 고체 배지를 넣어 7~10일간 현탁 배양하여 감염 실험에 사용하였다. 멸균된 해수에 대조구, 실험구(15-1, 3, 6, 10, 11, 15) 엽체와 붉은갯병균 균사를 넣어주고 3일 후 감염률을 측정하였다. 그 결과 15-1을 제외한 모든 실험구에서 대조구보다 낮은 감염률을 보였다. 대조구가 현미경 관찰 시 한 화면에 37.7 ± 1.7 개의 세포가 감염되었고 15-1은 43.3 ± 2.2 개로 대조구에 비해 114% 높은 감염률을 보였고 15-6의 경우 31 ± 2.2 개, 15-10의 경우 23.6 ± 0.8 개, 15-11의 경우 20.2 ± 0.6 개로 대조구에 비해 82%, 62%, 53% 정도 낮은 감염률을 보였다. 15-3의 경우 2.9 ± 0.3 개, 15-15의 경우 7.1 ± 1.1 개로 7%, 18%로 현저히 낮은 감염률이 나타나 붉은갯병에 대한 내병성으로 가지는 것으로 보인다. 특히, 15-3의 경우 균사로 인한 감염 부위 주변 김세포의 액포가 커지며 사멸하는 것으로 감염을 효과적으로 억제하는 것으로 보인다 (Fig 4-1)

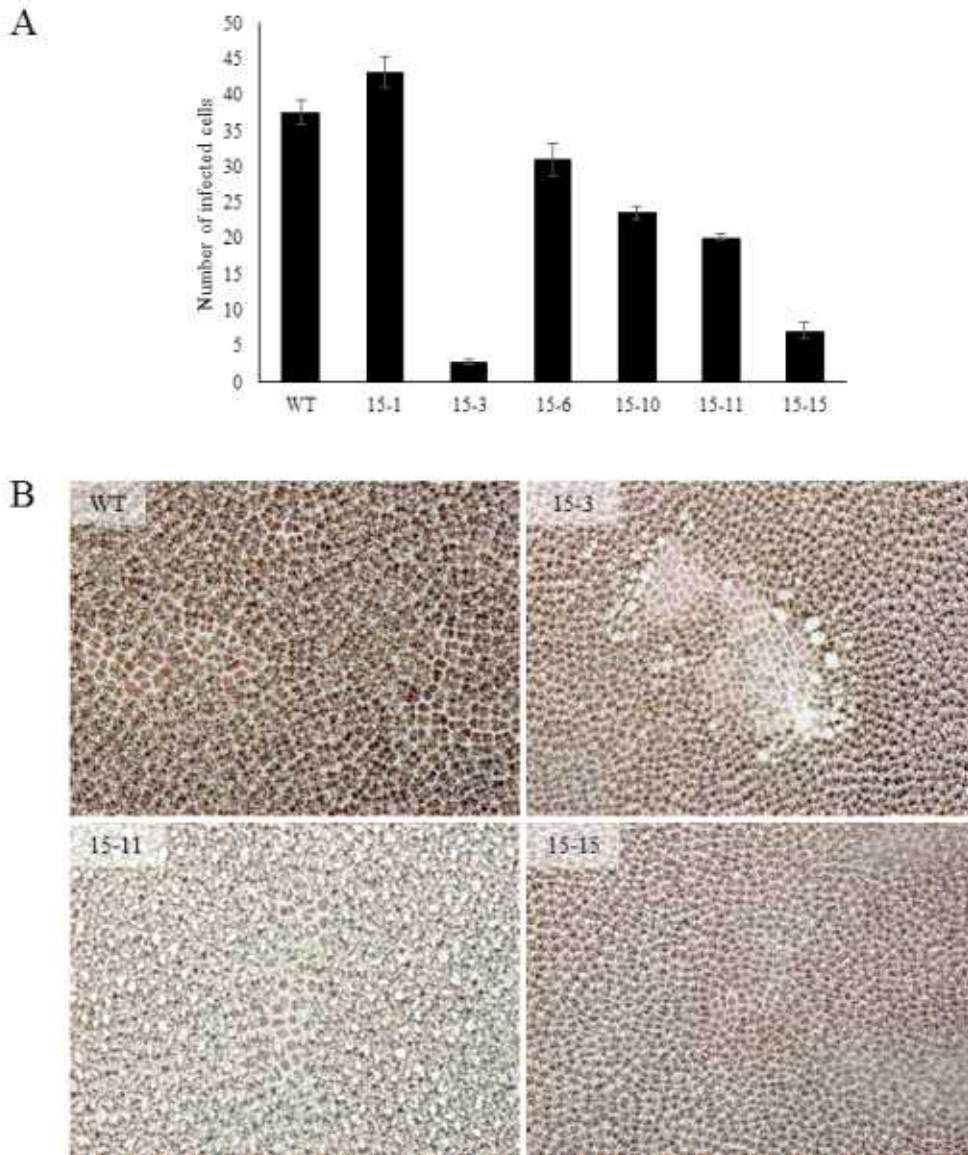


Fig 4-1. Infection rate of red rot disease. (A) Number of infected cells, (B) Microscopic image of infected cells after 3 day.

- 낭균병 내병성 테스트

- 낭균 (*Olpidiopsis koreanum*)은 국립공주대학교에서 분양 받았다. 감염 엽체는 13 °C (10 L:14 D), 50 μ mol photons m⁻²s⁻¹에서 배양하였다. 멸균된 해수에 정상 엽체와 감염 엽체를 넣고 3일 후 감염률을 측정하였다. 대조구는 현미경 관찰 시 한 화면에 41.8±8.5개의 세포가 감염되었다. 15-1의 경우 41.1±18.8개, 15-15는 44.9±14.2개로 대조구와 비슷한 수치로 나타났고 15-10의 경우 31.4±5.7개, 15-11은 25.8±7.8개로 각각 75%, 62% 정도 낮은 감염률을 보였다. 특히, 15-3의 경우 14.4±5.7개, 15-6은 18.1±8.5개로 34%, 43% 정도로 현저히 낮은 감염률을 보였다 (Fig 4-2)

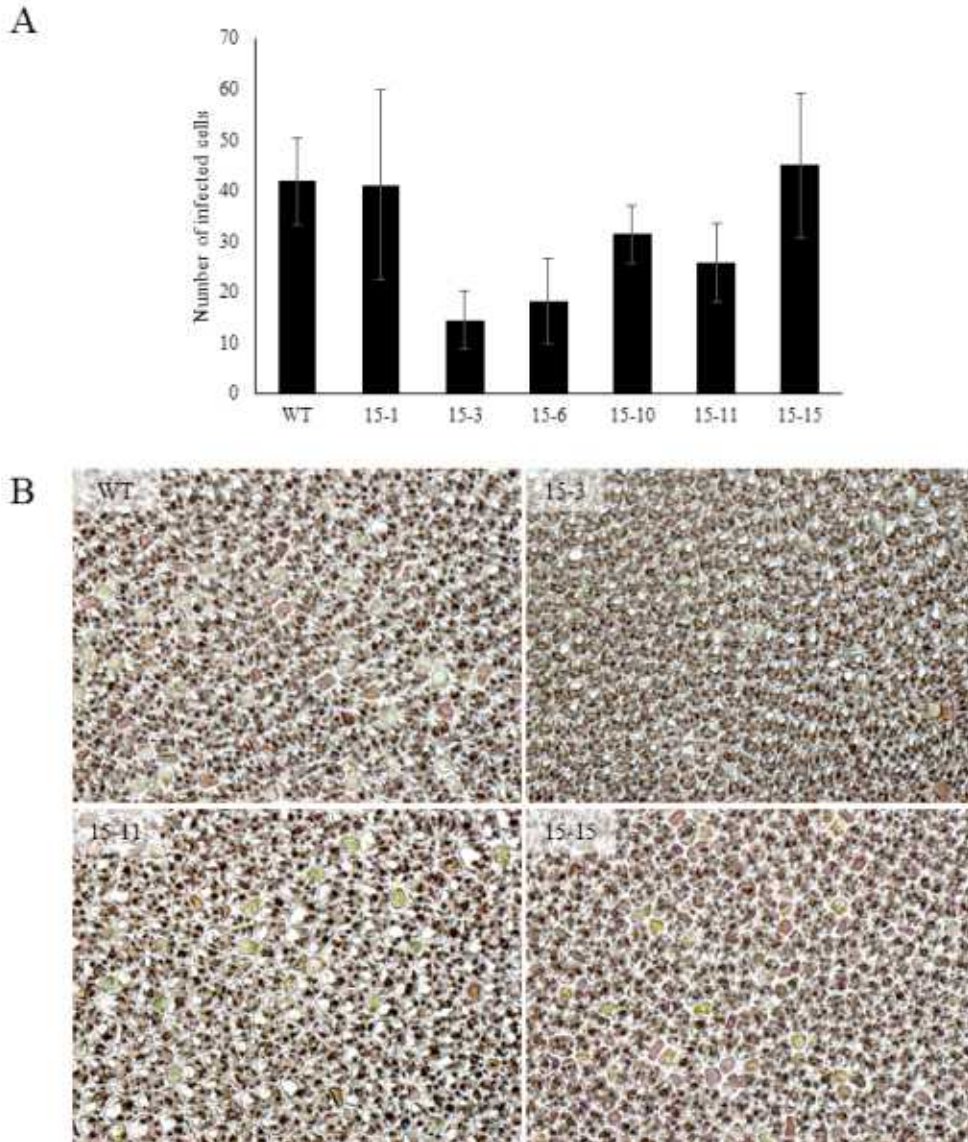


Fig 4-2. Infection rate of *Olpidiopsis* disease. (A) Number of infected cells, (B) Microscopic image of infected cells after 3 day.

나) 고온내성 광엽 돌연변이주 선발

- 대부분 선형인 고온내성 계통주에서 광엽으로 자라는 2 line (15-8, 15-13)을 선발하여 단조화를 진행하였다. 순계주 확보를 위하여 엽체를 자른 후 통기배양하면서 단포자를 방출시켰다. 그 후 20 °C (10 L:14 D), 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 광엽인 엽체를 선발하는 과정을 3회 반복하여 20°C에서 성장률이 높고 기존 고온내성 계통주보다 엽체 너비가 넓은 엽체를 확보 하였다. 현재 3차 단조화를 진행하고 있고 최종 선발된 엽체 1개체를 이용하여 사상체를 확보하고 이 사상체 중 1가닥을 선발하여 11월 중 순계주를 확보할 예정이다 (Fig 4-3)

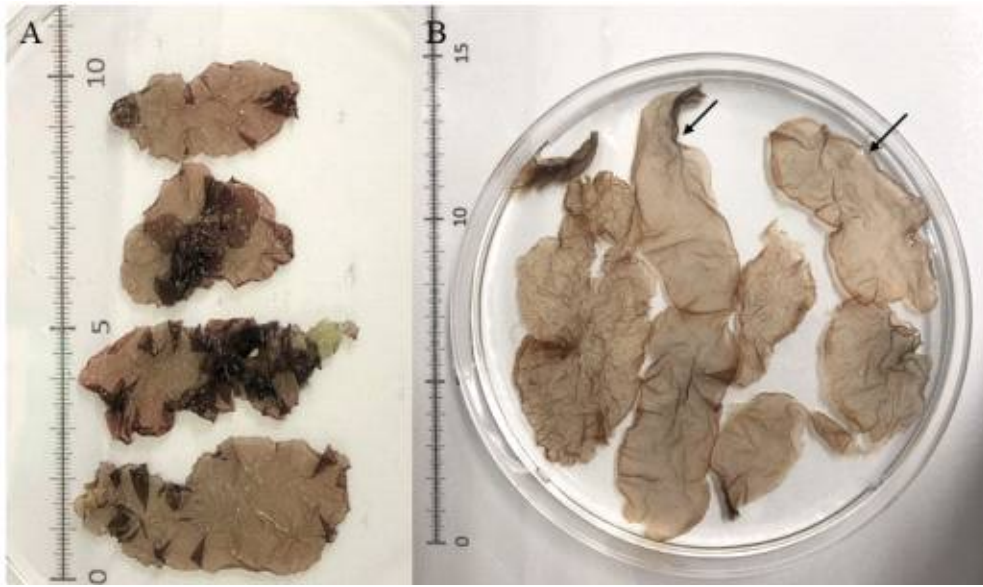


Fig 4-3. Photographed image of thallus. (A) 15-8, (B) 15-13

다) 보다 높은 고온(25 ℃)내성 돌연변이주 개발

- 기존 고온내성 계통주보다 높은 온도 (25 ℃)에서 성장 가능한 계통주를 확보하기 위해 1차 재배심사를 진행하고 있는 골드 2호 사상체에 500 gry 세기로 방사선 조사하여 20 ℃ (10 L:14 D), 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 각포자를 방출시켰다. 방출된 각포자는 25 ℃에서 배양하여 성장률이 높은 엽체를 선발하였다. 선발된 엽체는 순계주 확보를 위하여 단조화를 진행할 예정이다 (Fig 4-4)



Fig 4-4. Photographed image of thallus selected at 25 ℃.

5) 고온내성 종자 개발: 골드 2호

가) 종자 출원명세

- 선발과정

- 방사무늬김 (수과원104호/Sugwawon No.104)에 엽체 세포 50%가 사멸하는 LD₅₀인 1000Gray의 감마선을 조사 후 고온에 내성을 보이는 변이체를 선발하였다. 순계주 확보를 위하여 단조화 과정을 거쳐 20℃에서 잘 자라는 엽체를 확보 하였다. 그 후 엽체 1개체에서 자가수정하는 사상체를 배양 후 1가닥을 선발하여 순계주 (골드2호/Gold No.2)를 확보하였다

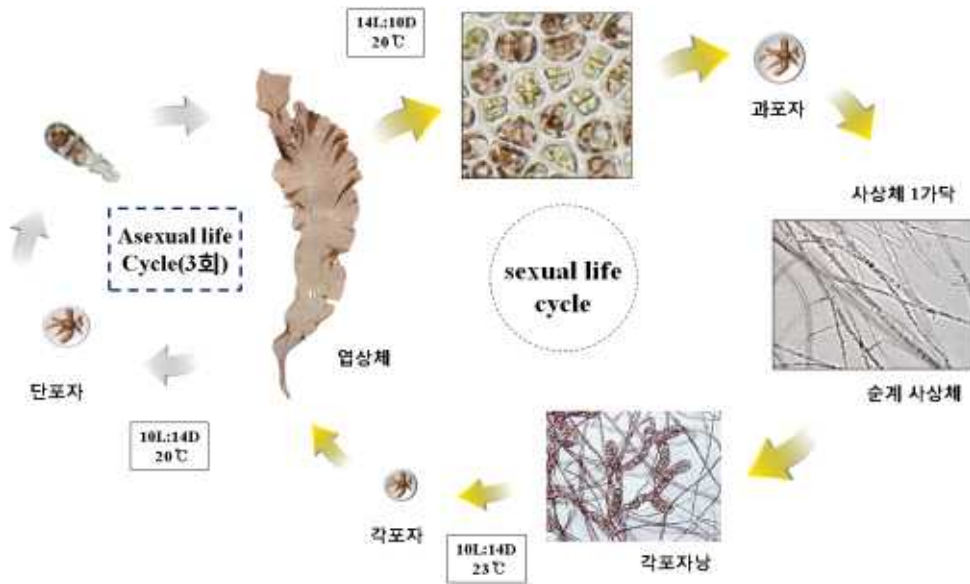


Fig 5-1. 순계 과정

- 폐각사상체 배양 및 육상 채묘

- 확보된 순계주를 20℃, 30uE·m⁻²·s⁻¹ 14L:10D에서 대량 배양하였다. 유리사상체 10g을 이용하여 선진수산에서 3m X 10m 수조에서 빛과 온도를 조절하여 1만 패를 평면식으로 부착하였다. 배양된 폐각을 충남 서천군 서면 마량리에 위치한 선진수산 채묘장에서 회전식 실내 채묘하였다



Fig 5-2. 패각사상체 배양 및 육상채묘



Fig 5-3. 충청남도 서천군 서면 마량리 시험양식장

- 대조구와 골드2호 성장 특성 분석

- 감마선 조사를 통하여 20℃에서 잘 자라는 엽체 선발 후 단조화 과정을 거쳐 20℃에서 내성을 보이는 순계주 (골드2호/Gold No.2)를 확보하여 대조구 (수과원104호/Sugwawon No.104)와 성장 특성을 분석하였다
- 12, 20℃에서 14일간 배양하면서 엽체의 특성을 분석하였다. 먼저 광합성 능력 (F_v/F_m)을 측정하기 위하여 김 엽체의 광계 II에서의 엽록소 형광을 Plant Efficiency Analyzer (PEA, Hansatech)로 분석하였다. 12℃에서 배양 시 대조구 (수과원104호/Sugwawon No.104)와 골드2 (Gold No.2)호 모두 0.62~0.66으로 값이 일정하게 유지되었고 20℃에서 배양 시 대조구는 시간이 지남에 따라 값이 감소하는 반면 골드2호 (Gold No.2)의 경우 0.61~0.64로 값이 유지되었다 (Fig 5-4)

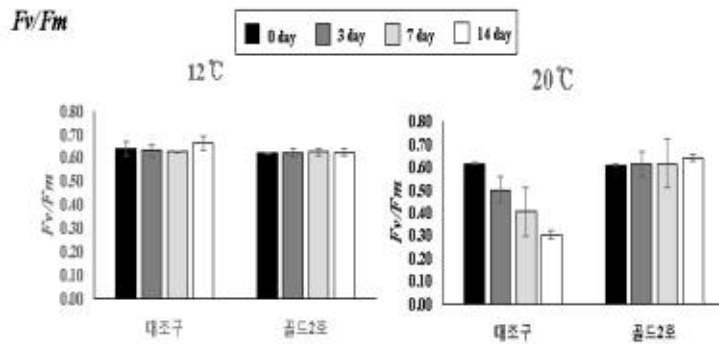


Fig 5-4. 대조구와 골드 2호의 시간별 F_v/F_m 비교

- 다음으로 성장 특성을 관찰하였다. 12, 20℃에서 42일간 배양하면서 대조구 (수과원104호/Sugwawon No.104)와의 차이를 비교한 결과 12℃에서 배양 시 대조구는 42일간 47cm까지 성장하였고 골드2호 (Gold No.2)의 경우 44cm로 확인되었다. 또한 20℃ 배양 시 대조구는 14일까지는 6cm까지 성장하였으나 이후부터는 엽체의 색이 연해지고 일부가 탈락하면서 42일째에는 엽체의 색이 일부 하얗게 탈색되었고 길이는 7cm였다. 반면, 골드2호 (Gold No.2)의 경우 42일간 45cm까지 성장하였다

생장비교

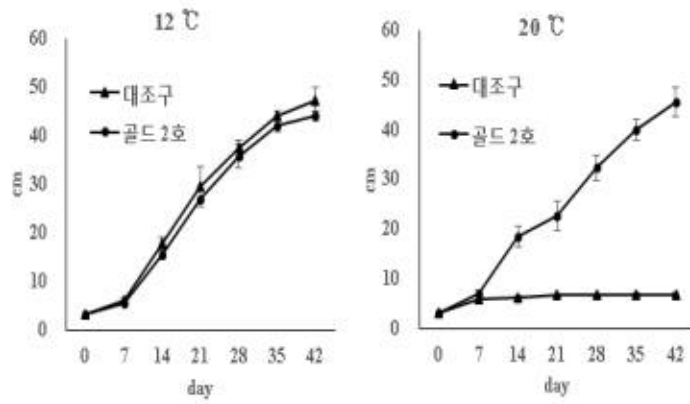


Fig 5-5. 대조구와 골드 2호의 온도별 성장 비교

- 골드 2호 특성

(1) 패각사상체 색

○ 출원품종 패각사상체 색은 흑녹색에 해당된다



Fig 5-6. 출원품종의 패각사상체

(2) 엽체 모양

○ 출원품종 엽체의 모양은 선형으로 너비는 넓지 않다



Fig 5-7. 출원품종 현미경 사진

(3) 성엽 : 엽체 연변부의 거치 유무(없음)

○ 엽체 연변부의 거치는 없다

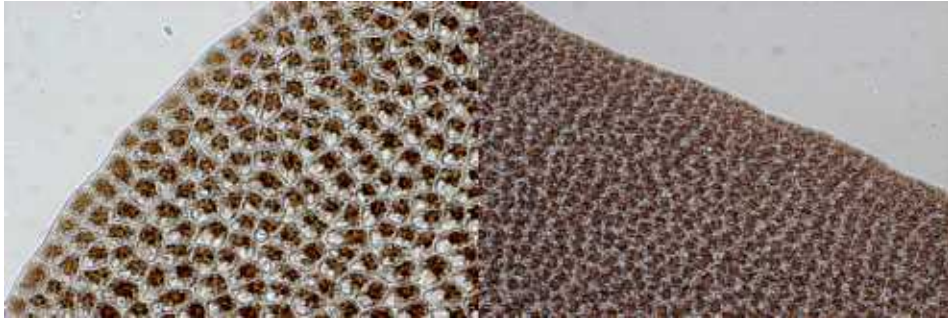


Fig 5-8. 출원품종 엽체 연변부의 거치유무

(4) 엽체의 색 판정

- 엽체 중앙부(a), 하부(b)의 색 : 출원품종 엽체의 중앙부(a)는 갈녹색이고 하부(b)는 청녹색으로 차이가 있다



Fig 5-9. 출원품종 엽체 사진

(5) 엽체의 생식유형

- 출원품종 엽체의 생식 유형은 암수한몸-혼합형이다



Fig 5-10. 출원품종 엽체의 사진

품종보호출원번호 통지서

출원일자 : 2018. 1. 18.	품종보호 출원번호 : 출원 2018 - 1 품종명칭 출원번호 : 명칭 2018 - 1
---------------------	----------------------------------------------------

작 물 명 : 방사무늬김
품 종 명 칭 : 골드2호(Gold No. 2)
출 원 인 : 한국생명공학연구원
주 소 : 대전광역시 유성구 과학로 125

2018년 1월 22일

국립수산과학원 

Fig 5-11. 품종 출원

- 재배 심사 및 분양

- 품종출원된 골드 2호/Gold No. 2를 확보하여 2번의 시험양식을 거쳤고 현재 1차 재배심사 진행 중이다
- 골드 2호를 김 양식에 사용할 수 있도록, 사상체를 대량 실내 배양하여 2018년 10월까지 약 1000g의 사상체를 배양하고 있다. 현재 600g이 확보되었으며 12월 이전까지 1000g을 생산하여 향후 김 양식이 가능하도록 분양에 사용될 계획이다



Fig 5-12. 분양용 골드 2호 사상체

[3차년도]

1) 고온내성 종자 후대 분석 및 신규 변이주 특성 분석

- 본 연구에서는 1단계 연구에서 확보된 순계 돌연변이체 15-13을 대상으로 엽체의 성장 특성을 분석하였다. 일반 방사무늬 김(*Pyropia yezoensis*, 수과원104)과 고온내성 돌연변이주의 특성을 비교하기 위하여 대조구와 실험구의 순계 사상체를 20 °C, 광도 30~40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ · L : D = 14 : 10 조건에서 배양하여 각포자낭을 형성시켰다. 각포자낭이 성숙하였을 때 광도 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 강한 빛을 조사하여 각포자 방출을 유도하였다. 방출된 각포자는 12 °C에서 배양하여 엽체로 발달시켰다

- 크기비교

- 상기의 방법으로 얻어진 고온내성 돌연변이체의 특성을 확인하기 위해 온도 별로 통기 배양하여 크기를 비교하였다. 12 °C에서 배양한 약 3cm 크기의 대조구과 실험구 엽체를 각각 12 °C와 20 °C에 7개체씩 나누어 통기 배양하였다 (그림 1-1). 7~14일 간격으로 대조구와 실험구의 길이와 너비를 측정하였다
- 12 °C에서 배양 시 고온내성 돌연변이체의 길이 생장이 대조구에 비해 더 빠른 것으로 나타났다. 20 °C에서는 실험구의 길이가 35일 동안 평균적으로 약 25 cm 까지 성장하는 것에 비하여 대조구는 최대 10 cm 까지 자란 후 14일부터 서서히 단포자를 방출하여 엽체가 탈락하여 소실되었다 (그림 1-2, 그림 1-3)

- 대조구와 실험구의 너비는 12 °C에서 최대 3 cm까지 성장하였고 큰 차이가 나타나지 않았다 (그림 1-4)

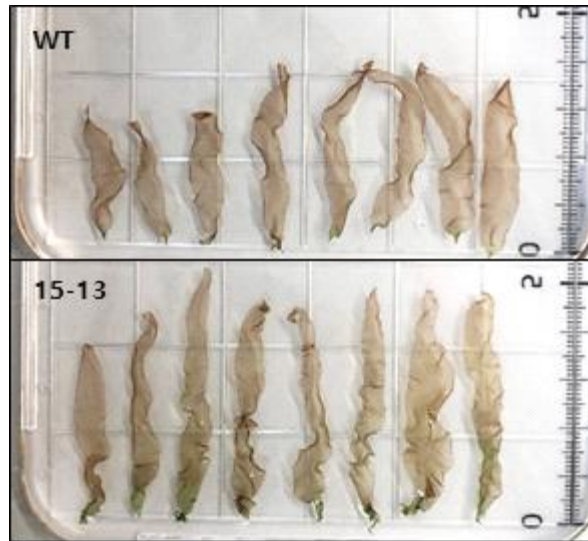


그림 1-1. 대조구와 고온내성 돌연변이체의 유엽.

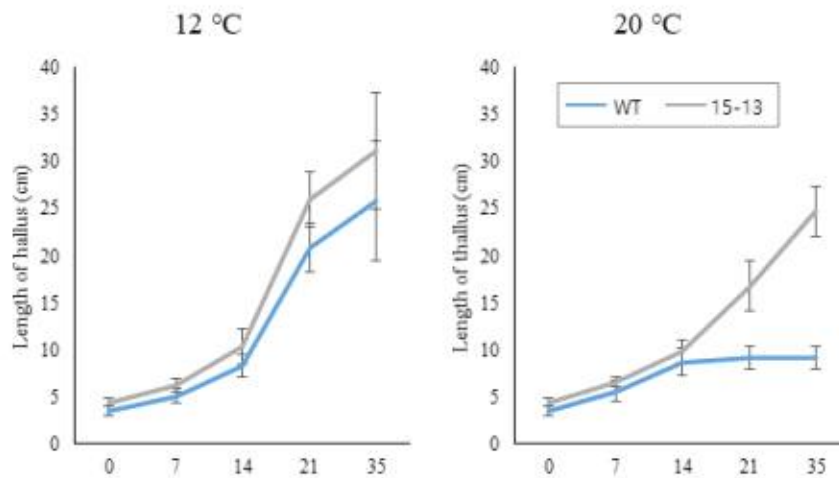


그림 1-2. 온도별 엽체의 길이에 따른 성장 그래프.

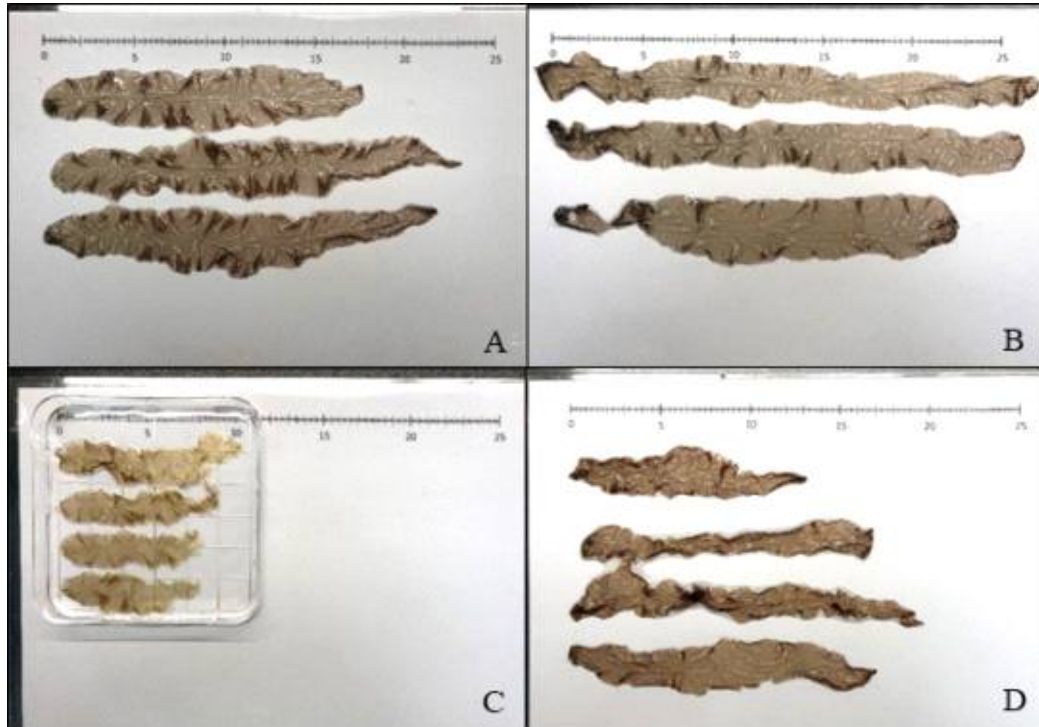


그림 1-3. 온도 별 대조구와 고온내성 변이체의 크기 비교. A. 12 °C 에서 배양한 대조구, B. 12 °C에서 배양한 실험구, C. 20 °C에서 배양한 대조구, D. 20 °C에서 배양한 실험구.

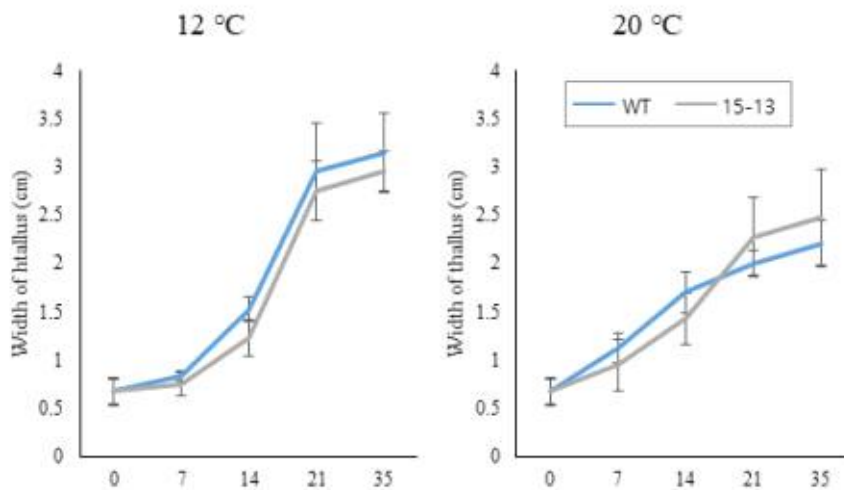


그림 1-4. 온도별 엽체의 너비에 따른 성장 그래프.

- 광합성능 분석

- 보다 자세히 고온내성 정도를 조사하기 위하여 대조구와 고온내성 돌연변이체의 광합성 능력을 온도별로 분석하였다. 대조구와 실험구의 엽체를 각각 12 °C 와 20 °C에서 통기배양하고 시간별로 김 엽체의 광계II에서의 엽록소 형광을 Plant Efficiency Analyzer (PEA, Hansatech)로 분석하였다. 12 °C에서 배양 시 25일까지 대조구와 고온내성 방사무늬 김의 Fv/Fm 값이 0.48~0.63을 유지되었다. 20 °C에서는 고온내성 방사무늬 김의

Fv/Fm 값이 0.52~0.64로 유지되어 고온에서도 정상적인 광합성 수행하였지만 대조구는 13일을 기점으로 그 값이 서서히 감소하여 21일 이후로 엽체가 소실되어 Fv/Fm 값이 측정되지 않았다

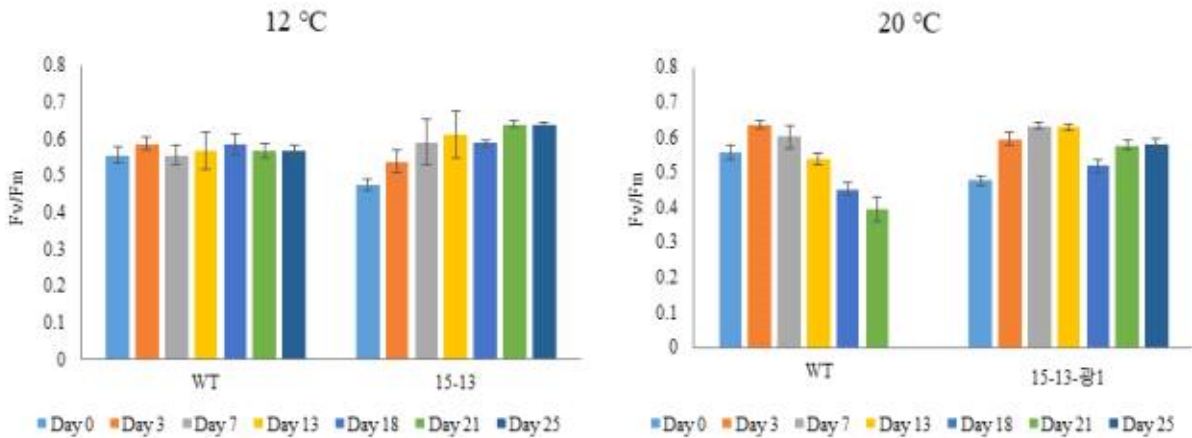


그림 1-5. 온도별 대조구와 광엽형 고온내성 김의 광합성능 비교.

2) 고온내성 종자 유전자 특성 분석

- 2년차 1단계에서 고온내성 변이주들의 유전적 특성을 분석하기 위하여 대조구 및 HTR1 과 HTR2의 탄소농축기작 (CCM) 유전자발현을 분석하였다. 12°C, 10L:14D, 80μmol photons m⁻²s⁻¹ PES medium에서 약 1cm 까지 키운 김 엽체를 20°C, 80μmol photons m⁻²s⁻¹ 10L:14D에서 3시간 처리하며 고온스트레스를 준 후 분석하였다. 20°C 배양 조건에서 대조구와 고온내성 변이주에서 CCM (carbon concentrating mechanism) 에 관련된 carbonic anhydrase와 bicarbonate transporter 유전자의 발현이 증가하였다. 구체적으로는 순계화 된 #6, 10, 11 라인을 대상으로 위와 동일한 배양조건 후 RT-PCR를 통해 CCM 유전자의 발현 양상을 확인하였다. 그 결과 대조구의 α, β-CA의 발현양이 고온내성 변이주보다 낮거나 비슷하였다. Wild type과 HTR2의 DEG 분석결과 α-CA6의 발현 양은 고온내성 변이주보다 대조구에서 높게 나타났으나 RT-PCR의 결과는 대부분의 고온내성 변이주에서 α-CA6의 발현양이 증가되었다. 특히 15-10, 15-11라인의 경우, carbonic anhydrase의 발현양이 대부분 증가되었다. Bicarbonate transporter (BCT2)의 경우 정상적인 배양 조건에서 15-6, 15-10 라인에서는 대조구에 비해 감소하였으나 15-11의 경우는 증가되었다
- 한편 고온 배양 조건에서는, 고온 내성 변이주에서 대부분의 α, β-CA의 발현양이 증가되었다. 그러나 15-6의 경우, bicarbonate transporter의 발현양이 감소된 경향을 보였다 (그림 2-1)

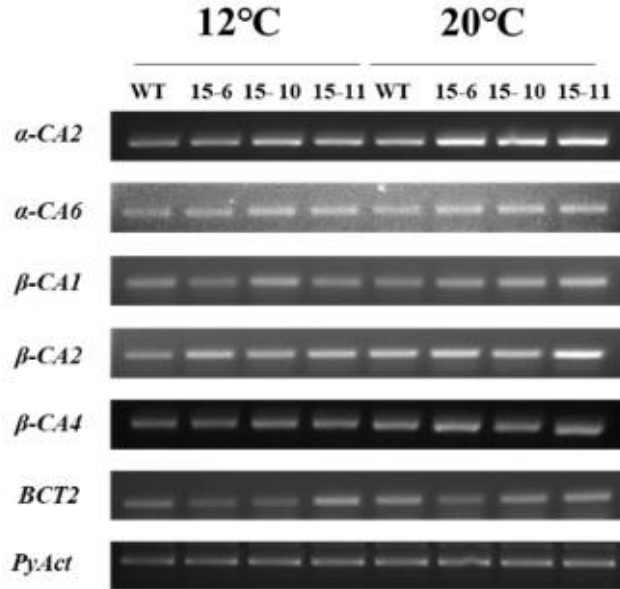


그림 2-1. 12°C, 20°C 배양 조건에서의 RT-PCR를 통한 CCM 유전자들의 발현 변화.

- 전반적으로 고온조건에서 고온내성 변이체들의 CCM 유전자들의 발현양이 크게 증가하였는데, 이는 고온조건에서 효율적으로 이산화탄소를 고정할 수 있음으로 보여주는 것이다. 향후 보다 자세한 분석을 통하여 변이 유전자의 정보를 확인하면, 이를 다른 방사무늬검과 구별되는 고온내성 특이 marker로 사용가능할 것이다

3) 양식 현장평가 및 피드백을 통한 양식조건 최적화

- 국내 현장양식에서는 엽체가 넓은 광엽형이 생산성이 높기 때문에 선호하고 있다. 또한 고온조건에서는 많은 병이 발생하기 때문에 고온내성과 내병성을 동시에 가지는 품종이 요구되었다. 본 연구에서는 광엽형 고온내성 김 변이주와 내병성 고온내성 김 변이주를 선발하여 특성을 분석하였다

가) 광엽형 고온내성 종자 개발

- 단조화 및 순계화

- 고온내성 변이체의 유전적 순계를 얻기 위하여 단조화 과정을 거쳤다 (그림 3-1). 우선 방사선 조사를 통해 얻어진 고온내성 엽체를 20 °C에서 통기 배양하여 단포자를 유도하였다. 약 7~10 cm 자란 개체 중에서 엽폭이 넓은 엽체를 선발하여 12 °C와 20 °C에서 10 일간 생장을 확인하였다. 동일한 과정을 3회 반복하여 최종적으로 1개의 엽체를 선발하였다. 선발된 엽체를 자가수정 시킨 후 형성된 과포자를 방출시켜 사상체로 발달시켰다. 사상체 한 가닥을 선발하여 최종적으로 순계 사상체를 확보하였으며, 실내배양을 통해

보존하였다 (그림 3-2)

- 일반 방사무늬 김과 광엽형 방사무늬 김의 특성을 비교하기 위하여 순계 사상체를 20 ℃, 광도 30~40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, L : D = 14 : 10 조건에서 배양하여 각포자낭을 형성시켰다. 각포자낭이 성숙하였을 때 광도 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 강한 빛을 조사하여 각포자 방출을 유도하였다. 방출된 각포자는 12 ℃에서 배양하여 엽체로 발달시켰다

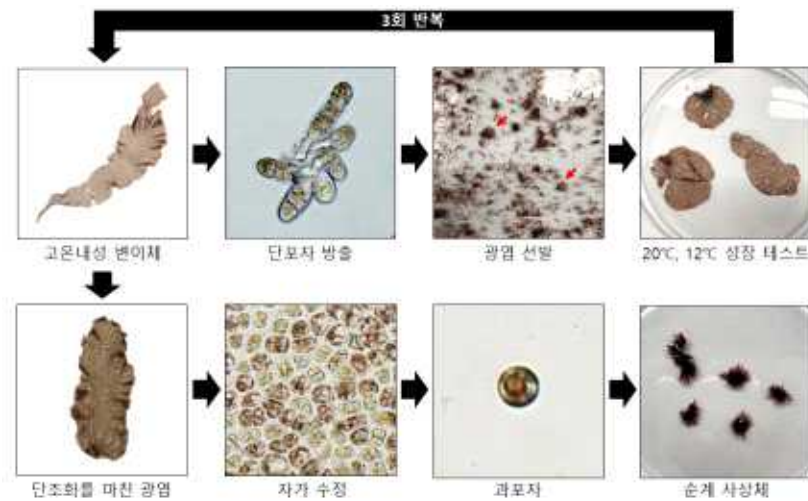


그림 3-1. 광엽 선발을 위한 순계화 과정.

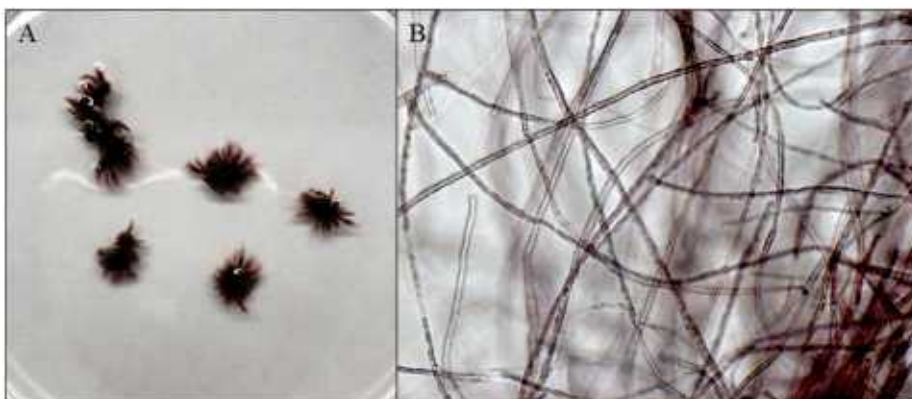


그림 3-2. 광엽형 고온내성 김의 순계 사상체.

- 크기 비교

- 상기의 방법으로 얻어진 광엽형 고온내성 방사무늬 김의 형태적 형질을 확인하기 위해 온도 별로 통기 배양하였다. 12 ℃에서 배양한 일반 방사무늬 김과 광엽형 방사무늬 김을 각각 12 ℃와 20 ℃에 약 3 cm 크기의 엽체를 5개씩 나누어 통기 배양하였다 (그림 3-3). 7~14일 간격으로 대조구와 광엽형 방사무늬 김의 길이와 너비를 측정하였다 (그림 3-4, 그림 3-5, 그림 3-6). 12 ℃에서는 대조구와 광엽형 방사무늬 김의 길이가 35일 동안 큰 차

이가 나지 않았지만, 20 ℃에서는 광엽형 방사무늬 김의 길이가 35일 동안 평균적으로 약 18cm 까지 성장하는 것에 비하여 대조구는 14일부터 서서히 단포자를 방출하여 엽체가 탈락하여 소실되었다. 엽체의 너비는 12 ℃와 20 ℃ 모두에서 대조구보다 광엽형 방사무늬 김의 너비가 더 넓었다. 특히, 20 ℃에서는 최대 2배까지 너비의 차이가 나타났다



그림 3-3. 대조구와 광엽형 고온내성 김의 유엽. A. 대조구(수과원104)의 유엽, B. 광엽형 고온내성 김의 유엽.



그림 3-4. 대조구와 광엽형 고온내성 김의 엽체 크기 비교 A. 대조구(수과원104)의 성엽, B. 광엽형 고온내성 김의 성엽.

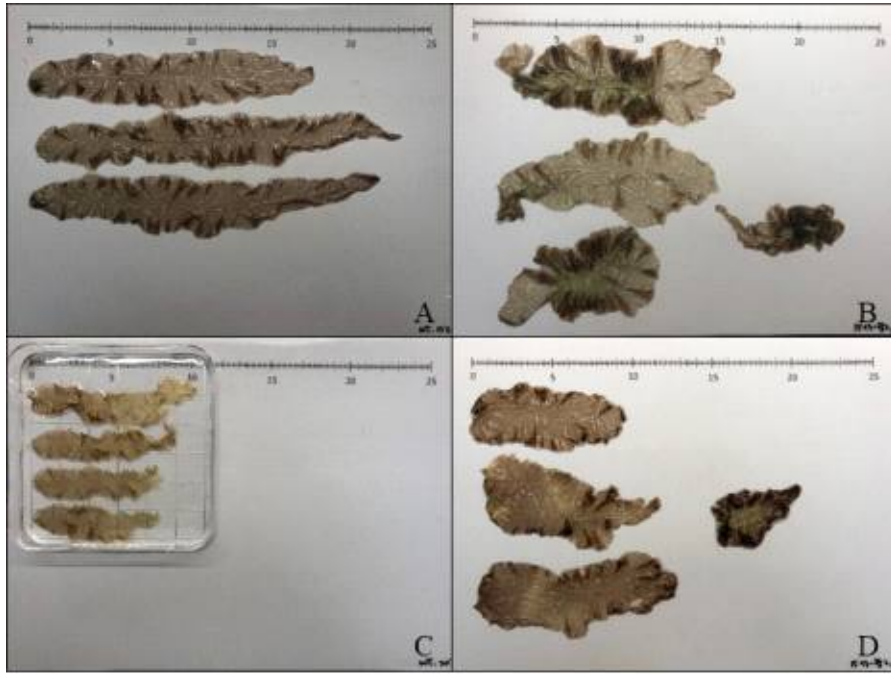


그림 3-5. 온도 별로 21일 동안 방사무늬 김. A. 12 °C 에서 배양한 대조구, B. 12 °C에서 배양한 광엽형 방사무늬 김, C. 20 °C에서 배양한 대조구, D. 20 °C에서 배양한 광엽형 방사무늬 김.

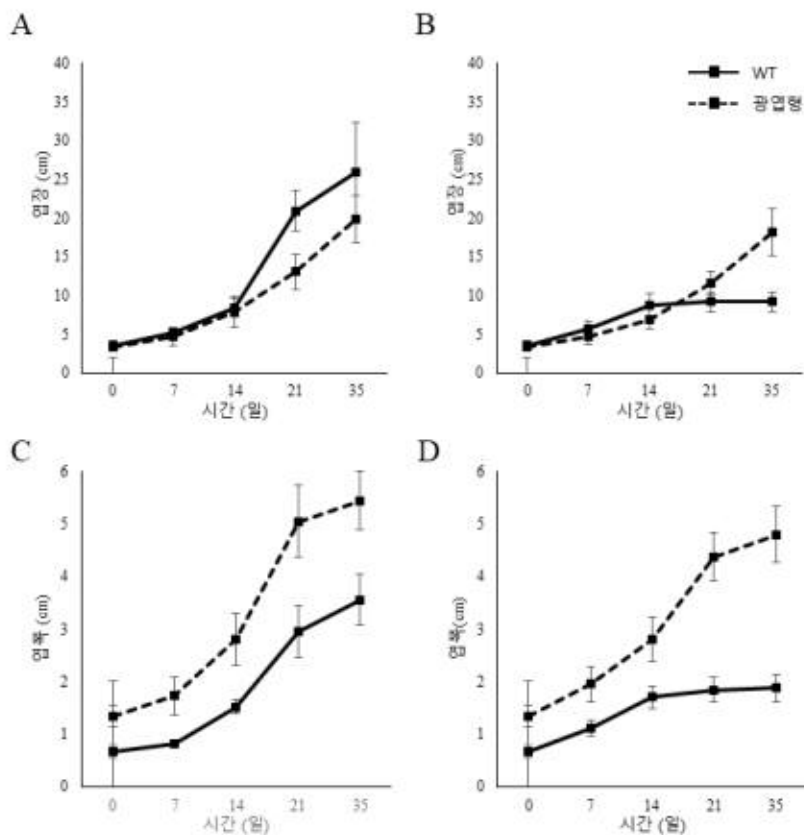


그림 3-6. 성장 그래프. A. 12 °C에서 배양한 엽체의 길이, B. 20 °C에서 배양한 엽체의 길이, C. 12 °C에서 배양한 엽체의 너비, D. 20 °C에서 배양한 엽체의 너비.

- 광합성능 분석

- 보다 자세히 고온내성 정도를 조사하기 위하여 대조구와 고온내성 방사무늬 김의 광합성 능력을 비교하였다. 대조구와 고온내성 방사무늬 김의 엽체를 각각 12 °C 와 20 °C에서 통기배양하고 시간별로 김 엽체의 광계II에서의 엽록소 형광을 Plant Efficiency Analyzer (PEA, Hansatech)로 분석하였다. 12 °C에서는 25일까지 대조구와 고온내성 방사무늬 김의 Fv/Fm 값이 0.55~0.63을 유지하였다. 하지만 20 °C에서는 고온내성 방사무늬 김의 Fv/Fm 값이 0.52~0.64을 유지하였지만 대조구는 14일을 기점으로 그 값이 서서히 감소하여 21일 이후로 엽체가 탈락하여 Fv/Fm 값이 측정되지 않았다 (그림 3-7)

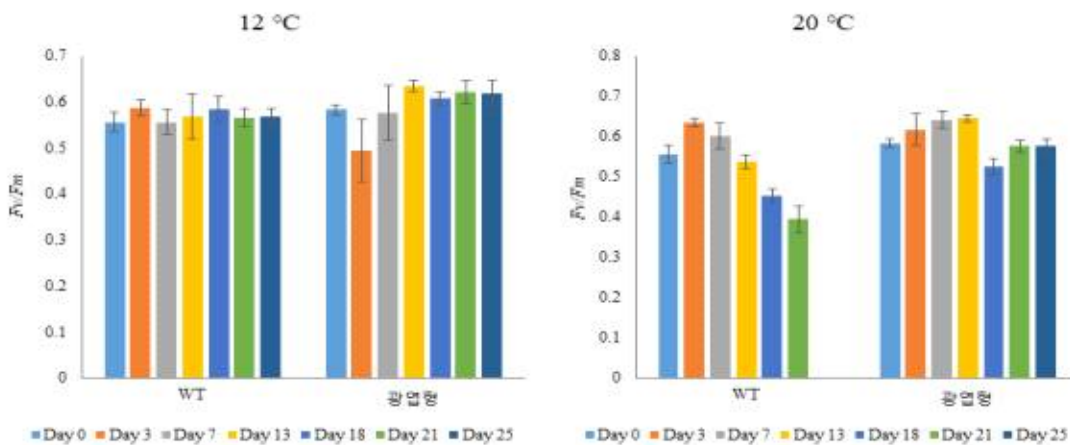


그림 3-7. 온도별 방사무늬 김의 광합성능.

- 이상의 결과를 종합하면 광엽형 고온내성 방사무늬 김은 일반 방사무늬 김이 생장하지 못하는 20 °C에서 엽체의 생장이 빠르고 너비가 광엽형인 새로운 품종임을 확인할 수 있었다(특허출원 : 10-2019-0130503)

나) 내병성 고온내성 종자 개발

- 다양한 환경변화로 인해 생겨난 김 양식에서의 문제점을 해결하기 위해 고온내성, 내병성의 형질을 동시에 가지는 품종을 선호한다는 조사결과를 토대로 기 개발 고온내성 돌연변이주에 상기 형질의 집적 가능성을 수행하였다. 본 실험실에서 개발한 고온내성 돌연변이주를 이용하여 붉은갯병에 내성을 가지는 돌연변이주를 개발하고자 하였다

- 붉은갯병 내병성 테스트

- 실험에 사용된 붉은갯병균 (*Pythium porphyrae*)은 국립공주대학교에서 분양 받아 사용하였다. 균주는 20 °C (10 L:14 D), 40 μmol photons m⁻²s⁻¹에서 Cornmeal agar를 이용하여 배양하였다. 30일간 계대배양 후 Arasaki B medium 에 고체 배지를 넣어 7~10일

간 현탁 배양하여 감염실험에 사용하였다. 현탁배양한 사상체를 멸균된 해수에 옮겨 24~36 시간 후 발달한 붉은갯병균 유주자를 1×10^3 cell/ml 농도로 대조구, 실험구(15-10, 15-11)에 처리한 후 24~48시간 후 감염된 세포수를 측정하였다 (그림 3-8)

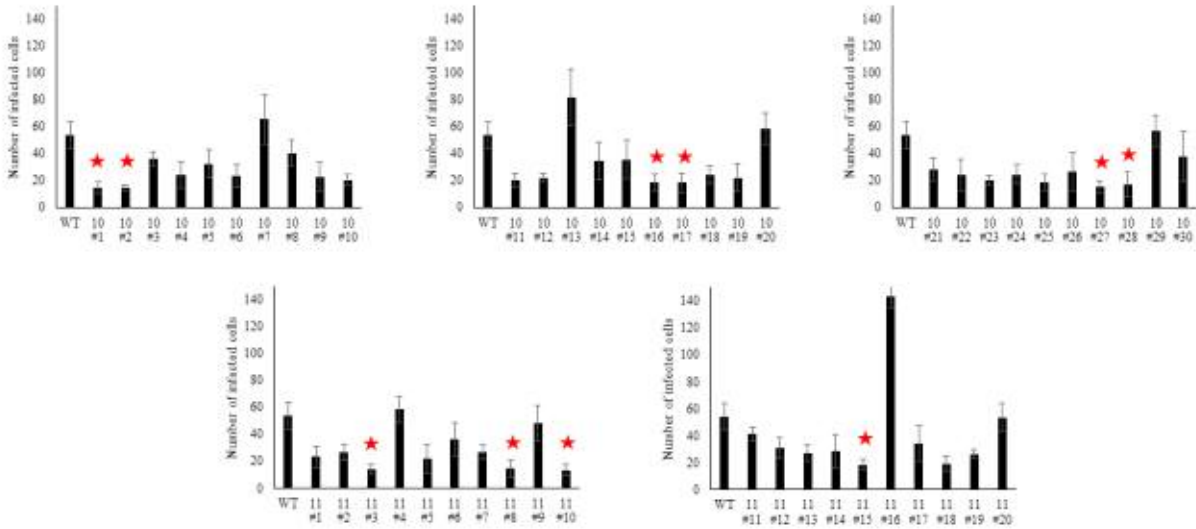


그림 3-8. 붉은갯병 감염률 (1차 단조화).

- 단조화 및 순계화

- 붉은갯병균에 감염된 고온내성 돌연변이주를 30일간 배양 후 감염된 엽체에서 생존한 단포자를 분리하여 배양하였다. 단포자를 각각 유엽으로 배양한 후 붉은갯병균을 이용하여 감염실험을 수행하였다. 가장 낮은 감염률을 보이는 개체를 선발하여 1달간 배양 후 엽체에서 생존한 단포자를 분리하여 유엽으로 배양하였다 (그림 3-9). 상기의 방법을 총 3번 반복하여 단조화 하였고, 최종 선발한 2개체를 12 °C와 20 °C에서 10일간 성장 테스트 후 음건하여 순계 사상체를 유도하였다. 사상체 확보 후 1가닥을 선발하여 11월 중 순계주를 확보할 예정이다 (그림 3-10). 최종 선발한 고온내성 내병성 돌연변이체는 형태적, 생리적 특성 분석 후 시험양식 예정이다

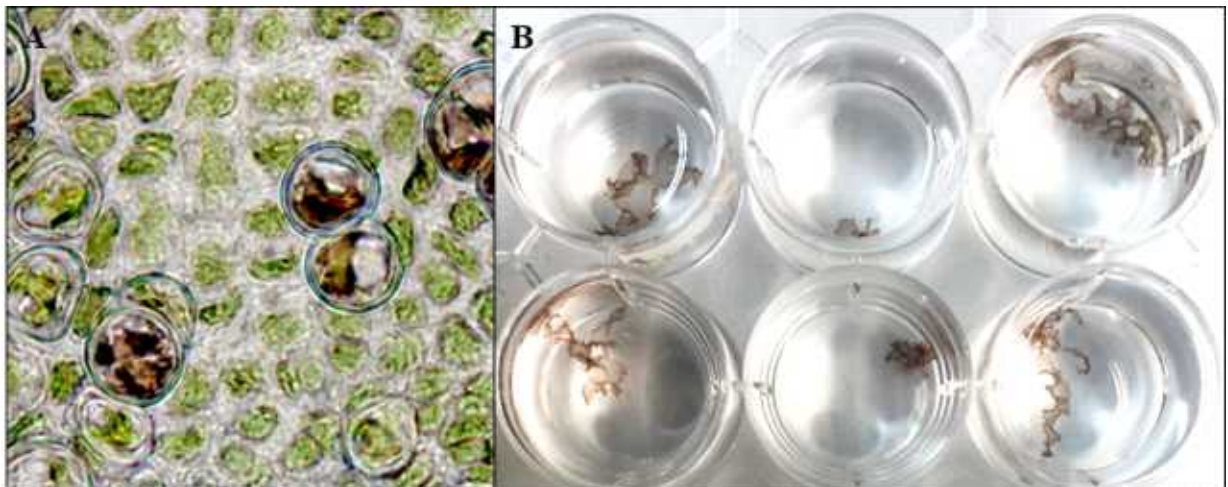


그림 3-9. 내병성 고온내성 변이주 개발 A. 붉은갯병 감염 30일 후 생존한 단포자, B. 내병성

후보군 유업.

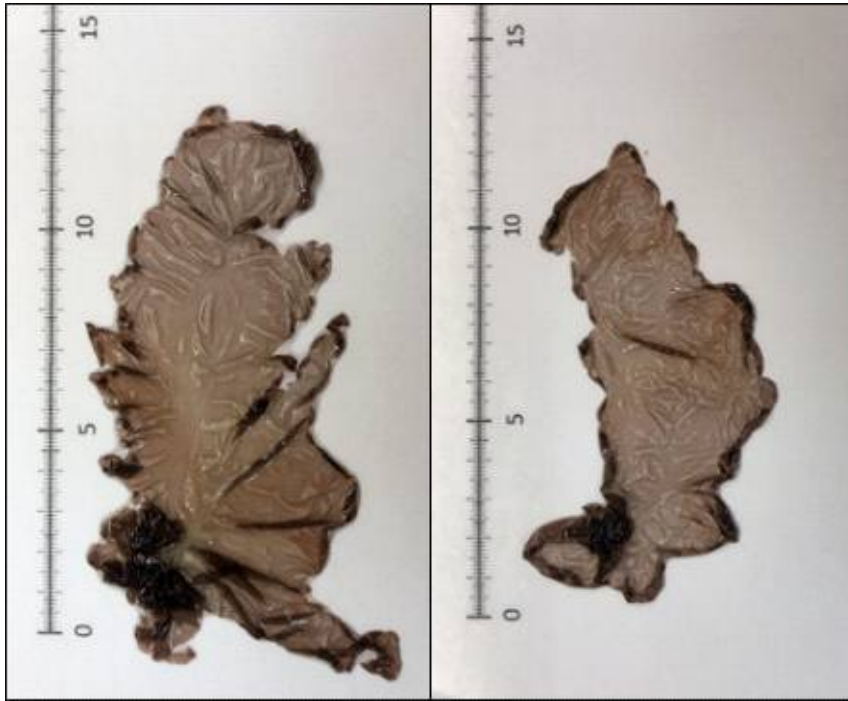


그림 3-10. 최종 선발한 고온내성 내병성 돌연변이체.

4) 신규 변이주 시험양식

가) 1년차 시험양식 (2018-19년)

- 서천 마량항 인근 김 양식장에서 고온내성 돌연변이체 15-10, 15-11의 시험양식을 진행하였다. 2018년 10월 초 김밭 10장씩 겸망하여 해상 채묘를 수행하였고 2주 후 김밭에 유업이 부착한 것을 확인하였다. 채묘 1달 후 분망하고 2주 간격으로 샘플을 채취하여 각 돌연변이체의 성장 특성을 비교하였다 (그림 4-1)

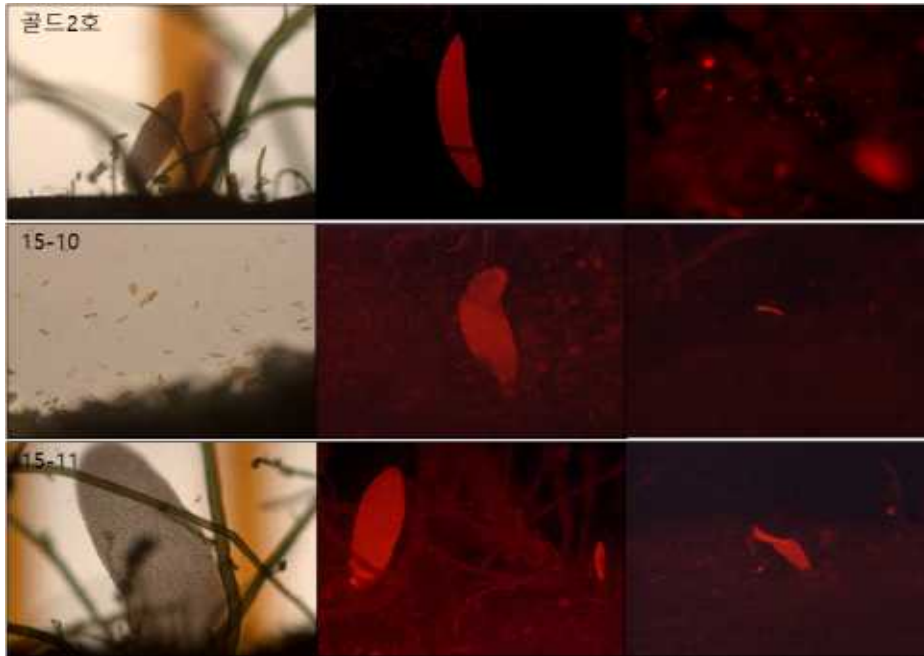


그림 4-1. 채묘 2주 후 채취한 고온내성 품종 후보군 유엽.

- 채묘 4주 후 채취한 고온내성 돌연변이체의 길이는 15-11가 평균 25 cm로 가장 높은 생장률을 보였지만, 15-10, 골드 2호와 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다 (그림 4-2). 고온내성 돌연변이체의 너비는 15-11이 평균 2.7 cm 로 가장 폭이 넓게 성장하였으며 골드 2호와 15-10은 뚜렷한 차이를 보이지 않았다 (그림 4-3)

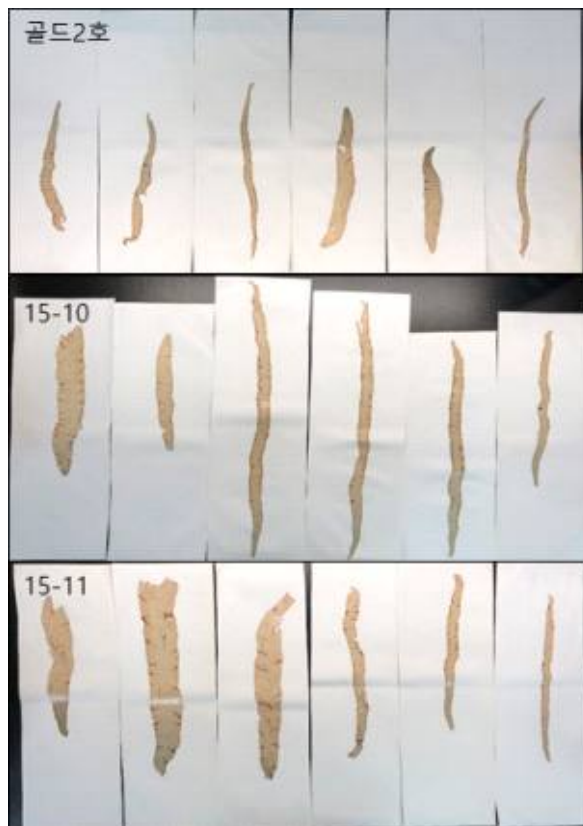


그림 4-2. 채묘 4주 후 채취한 고온내성 품종 후보군 표본.

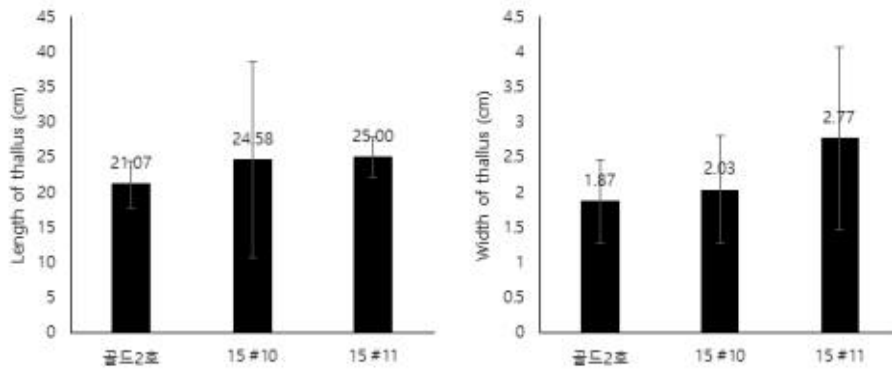


그림 4-3. 채묘 4주 후 채취한 고온내성 품종 후보군 엽체의 길이와 너비.

나) 2년차 시험양식 (2019-20년)

- 1년차 시험양식의 재현성을 확인하기 위하여 서천 마량항 인근 김 양식장에서 고온내성 돌연변이체 15-10, 15-11의 2년차 시험양식을 진행하였다 (그림 4-4). 붉은갯병과 낭균병에 내성을 보인 고온내성 돌연변이체의 현장 특성을 확인하기 위하여 15-3의 1년차 시험양식을 추가로 진행하였다

- 패각 사상체 이식 및 배양

- 확보된 순계주 3종(15-3, 15-10, 15-11)를 20 °C, 30~40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ · L : D = 14 : 10 조건에서 대량배양 하였다. 유리 사상체 5g 을 이용하여 선진수산에서 3m × 10m 수조에서 15,000패를 평면식으로 이식 및 부착하였다. 패각 사상체 잠입을 확인한 후 수하식으로 바꾸어 3월부터 9월까지 빛과 온도를 조절하여 패각 사상체를 배양하였다. 1달에 한번씩 패각 사상체의 성장 특성을 분석하였다 (그림 4-5). 고온내성 품종은 사상체의 패각 잠입 및 성숙, 증식 등은 대조구와 비슷한 속도로 진행되었다. 9월 말 대조구와 실험구 모두 각포자낭이 안정적으로 성숙한 것을 확인한 후 채묘를 진행하였다 (그림 4-6)

구분	월 별												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
유리사상체 배양													
패각 사상체 잠입													
채묘 (겉망, 분망)													
시험양식													

그림 4-4. 시험양식 진행 일정



그림 4-5. 시험양식용 패각 사상체.

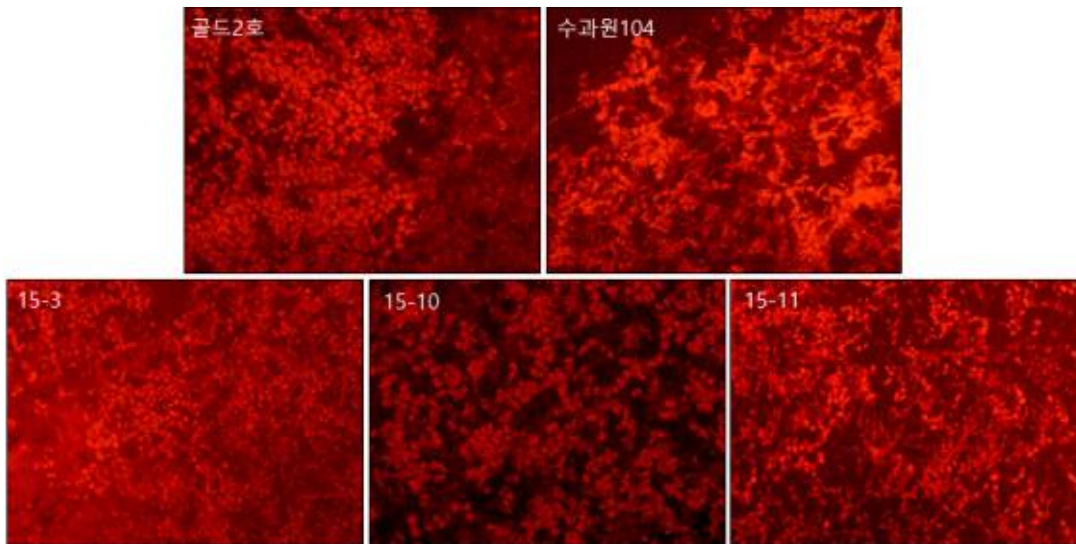


그림 4-6. 시험양식용 패각 사상체의 각포자낭.

- 해상 채묘

- 해상채묘는 2019년 10월 초 김발 10장씩 겹망하여 충남 서천군 마량리 양식장에서 수온이 21 ℃ 이하로 낮아졌을 때 진행하였다. 채묘 2주 후 김발에 각포자와 유엽이 정상적으로 부착한 것을 확인하였다 (그림 4-7). 채묘 1달 후 분망하고 2주 간격으로 샘플을 채취하여 각 돌연변이체의 성장 특성을 비교할 예정이다



그림 4-7. 해상 채묘.

5) 골드2호 재배심사

- 골드 2호의 재배심사는 골드2호, 대조구 A, 대조구 B, 총 3종의 품종을 선정하여 패각의 잠입과 배양 과정, 환경 조건을 1차 심사 기준으로 두고 10월 패각 사상체를 이용한 해상 채묘 후 월 2회 김발을 무작위 채취하여 심사 품종의 특성, 엽체의 길이와 너비, 거치 유무, 색 측정, 단포자 형성과 방출 유무를 조사하였다
- 골드 2호의 품종 등록을 위한 재배심사는 수산식물품종관리센터 규정에 따라 2회 반복을 수행하고 있으며 2019년 3월에 1년차 재배심사를 마치고 2019년 3월부터 2년차 재배심사를 수행하였다. 2020년 3월 재배심사 종료 후 심의를 받아 품종 등록 예정이다

- 현재 2년차 재배심사는 2019년 3월부터 9월까지 패각 사상체를 배양하였으며, 각포자낭이 성숙한 패각 사상체를 10월 초 각포자 부착의 최적 수온인 18℃에 맞추어 곱망한 김발에 부착하였다. 이를 1차 배양장에 이식하였으며 채묘 2주 후 김발에 붙은 각포자와 유엽을 확인하였다

6) 개발 종자의 산업화 기반 구축

- 골드 2호는 일반 방사무늬 김에 비해 20 ℃의 고온에서 빠른 성장을 보이는 세장형 엽체로 2019년 총 300g의 사상체를 어가에 무상 분양하였다 (그림 6-1). 충청, 전남지역에서 약 37,500 상자를 채묘할 것으로 예상되고 2020년 패각 사상체 확대 보급으로 국내 점유율을 높이는 것을 목표로 하고 있다

구분(연도)	사상체 분양 내용	분양업체	패각사상체 생산량
3차년도 (2019)	사상체 100g	선진수산	12,500상자(1상자/40패각)
	사상체 100g	믿음수산	12,500상자(1상자/40패각)
	사상체 100g	정가네수산	12,500상자(1상자/40패각)

그림 6-1. 2019년도 골드2호 분양 현황.

- 골드 2호는 2019~20년도 물김 생산 후 서천에 위치한 (주)선진수산 마른김 가공공장에서 마른김으로 생산하여 가공성분석을 진행할 예정이다
- 한국생명공학연구원은 2019년 3월 선진수산과 연구분야에서 공동 연구 및 기술개발을 통한 상호 연구성과의 활용도를 높이기 위하여 상호간에 긴밀한 협력이 필요하다는 공통된 인식하에 기술 및 연구 교류에 관한 협정을 체결하였다 (그림 6-2)
- 해당 사업을 통해 개발된 연구성과를 활용하기 위해 ‘한국산 김 품종 골드2호 양식 기술’을 선진수산종묘장에 2018년부터 2021년 12월까지 기술이전계약을 체결하였다 (그림 6-3)



그림 6-2. 연구 및 기술교류 협정서.

기술이전계약서

선진수산종묘장(이하 "실시권자"라 한다)과 한국생명공학연구원(이하 "연구원"이라 한다)은 다음과 같이 기술이전계약을 체결한다.

제1조 (정의)

- ① 본 계약상 "기술"이란 2항의 품종과 관련된 "한국산 김 품종 골드2호 양식기술"을 말한다.
- ② 본 계약상의 "품종"란 다음과 같다.

품종명	출원번호	출원일
골드2호(Gold No.2)	품종보호출원: 출원 2018-1	2018. 01. 18

- ③ 본 계약상 "실시"란 특허법 제2조 제3호에서 정하는 실시를 말한다.
- ④ 본 계약상 "실시제품"이라 함은 "기술"의 전부 또는 일부를 사용하여 생산되는 제품 및 생산장치, 중간체나 원료, 공정 등 산출물 인체를 말한다.
- ⑤ 본 계약상 "총대금액"이라 함은 "실시제품"으로 발생한 대금액의 합계를 말한다.

제2조 (실시권의 내용)

- ① "연구원"은 "실시권자"에 대하여 본 계약에서 정하는 바에 따라 아래와 같은 내용으로 "기술"을 실시할 권한을 허락한다.

실시권의 유형	봉상실시권
실시 기간	2025. 12. 31까지
실시 지역	국내

- ② "실시권자"는 "연구원"의 사전 서면 동의 없이는 제3자로 하여금 "기술"을 실시하게 할 수 없다.

제3조 (생산개시 의무)

- ① "실시권자"는 본 계약체결일로부터 3년(이하, "생산개시기한"이라 한다) 이내에 "기술"을 실시하여 생산에 착수해야 한다.
- ② "실시권자"는 제1항의 생산을 개시한 경우 즉시 "연구원"에 그 사실을 서면으로 통보해야 한다.
- ③ "실시권자"가 제1항에서 정하는 "생산개시기한" 내에 생산을 개시할 수 없는 경우,

그림 6-3 기술이전계약서

[4차년도]

1. 고온내성 특성 후대 분석

- 3년차에 개발한 고온내성 광엽형 품종 (15-13)의 김 양식장에서의 생산량을 추산하기 위하여 생중량을 비교하였다. 12 °C에서 배양한 일반 방사무늬 김과 광엽형 방사무늬 김을 각각 12 °C와 20 °C에 약 3 cm 크기의 엽체를 10개씩 나누어 통기 배양하였다. 7일 간격으로 대조구와 광엽형 방사무늬 김의 생중량을 측정하였다. 12 °C에서는 대조구와 광엽형 방사무늬 김의 생중량이 28일까지 큰 차이가 나지 않았지만 이후 광엽형 방사무늬김의 생중량이 더 높게 측정되었다. 20 °C에서는 광엽형 방사무늬 김의 생중량이 42일 동안 0.3~0.37 g 까지 성장하는 것에 비하여 대조구는 14일부터 서서히 단포자를 방출하여 엽체가 탈락하여 소실되었다(Fig. 1)

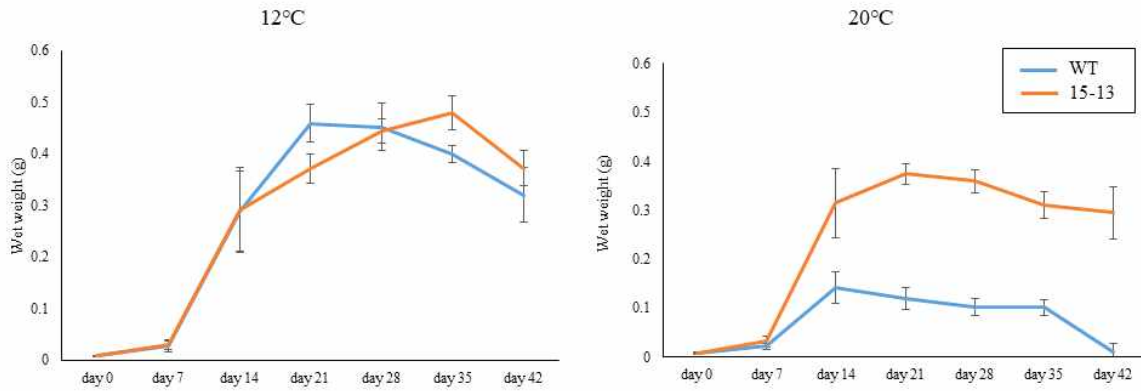


Fig 1. 온도별 방사무늬 김 생중량

- 2019-2020년 시험양식을 통해 얻어진 엽체를 이용하여 아미노산 분석, 영양 분석 등 고온 내성 품종의 후대 분석을 진행할 예정이었으나 황백화로 인한 피해로 엽체 확보가 불가능해 2020년 11~12월로 일정을 연기하였다.
- 고온내성 김 품종의 특성이 김 양식장에서 유지되는지 확인하기 위하여 11월 양식장에서 재배한 엽체를 실내 배양하여 12, 20 °C에서 성장률, 광합성률, 색소 분석을 통해 후대 분석할 예정이다

2. 고온내성 변이주 유전적 특성 규명

1) 고온 민감성 조류 특성분석을 통한 고온내성 특성 분석

- 고온내성 라인들과 wild type의 고온에서 유전자들의 발현을 전사체 정보로부터 분석한 결과 고온내성 라인들에서 스트레스 내성 (heat shock proteins, ROS scavenge, CCM 등) 유전자들의 발현이 증가하는 한편 calvin cycle, glycolysis 관련 유전자들의 발현이 증가하였다. 이러한 사실은 “고온에 내성을 가지기 위해 많은 에너지가 필요하며 세포내에 충분한 acetate가 생성되면 많은 에너지 생성이 가능하다”는 가설을 세울 수 있다. 고온 스트레스하 활발한 광합성이 불가능한 상태에서 에너지를 얻는 방법은 glycolysis를 통해 저장된 에너지를 확보하는 것이다. Glycolysis 과정에서 생성된 pyruvate를 기질로 PDC (phosphate decarboxylase)와 ALDH (aldehyde dehydroxylase)의 활성화에 의해 acetate가 생성된다. 김의 전사체 분석결과 PDC 유전자는 발견되지 않았으나 ALDH 유전자는 5개 (TCONS_00002190, TCONS_00000161, TCONS_00000162, TCONS_00000064, TCONS_00000333)의 전사체가 발견되었다. 4개의 전사체는 크게 변하지 않았으나, TCONS_00002190의 발현은 고온내성 라인들에서 4.5배 증가하였다 (Table 2-1)

transcript_id	wild type	HTR	expression/wt	expression/HTR	log2(fold_change)	p_value	q_value	description
HTR1								
TCONS_00002190	20_WT	20_14_4	7.25668	33.4786	2.20586	5.00E-05	0.000611	aldehyde dehydrogenase
TCONS_00000162	20_WT	20_14_4	3.58061	5.04778	0.495444	0.6516	0.786679	aldehyde dehydrogenase
TCONS_00000161	20_WT	20_14_4	4.92009	6.47054	0.395203	0.25735	0.441352	aldehyde dehydrogenase
TCONS_00000064	20_WT	20_14_4	13.7915	14.6738	0.0894564	0.7651	0.863965	aldehyde dehydrogenase
TCONS_00000333	20_WT	20_14_4	592.183	468.393	-0.338322	0.2519	0.435747	aldehyde dehydrogenase
HTR2								
TCONS_00000064	20_WT	20_14_3	13.7915	16.9831	0.300314	0.30845	0.495525	aldehyde dehydrogenase
TCONS_00000161	20_WT	20_14_3	4.92009	5.36797	0.125693	0.72245	0.835685	aldehyde dehydrogenase
TCONS_00000162	20_WT	20_14_3	3.58061	3.59427	0.00549529	0.957	0.972587	aldehyde dehydrogenase
TCONS_00000333	20_WT	20_14_3	592.183	291.454	-1.02277	0.00105	0.008106	aldehyde dehydrogenase
TCONS_00002190	20_WT	20_14_3	7.25668	31.5427	2.11993	5.00E-05	0.000611	aldehyde dehydrogenase

Table 2-1. 고온내성 유전자 발현량

- 본 연구에서는 저온에서는 내성을 가지지만 고온에서 민감한 특성을 가지는 ADH과발현 미세조류(nannochloropsis)를 통해 위 가설을 증명하고자 하였다. 남세균 유래 ADH유전자를 과발현하는 Nannochloropsis를 제작하여 수행하였다
- ADH 과발현 형질전환체가 고온 스트레스에 어떻게 반응하는 지를 확인하기 위해 wild type과 ADH 과발현 형질전환체들을 고온 (37℃)에서 12시간 동안 incubation 후 정상 생장 조건 (25℃)으로 옮겨 spot test를 통해 생장을 비교하였다. 25℃ 조건하에서 배양된 wild type과 ADH 과발현 형질전환체들은 정상적으로 성장하였지만, 37℃ 조건하에서 12시간 배양 후 25℃에서 17일 동안 배양된 ADH 과발현 형질전환체들은 wild type에 비해 생장이 현저하게 느렸다 (Fig 2-1A). 더구나 F/2N 액체 배지에서 37℃에서 3일 동안 배양 후 생장을 비교하면 ADH 과발현 형질전환체들의 생장이 급격히 감소됨을 확인할 수 있었다 (Fig 2-1 B). 이러한 결과들은 ADH 과발현 형질전환체들이 wild type에 비해 고온 스트레스에 더 민감함을 보여 준다

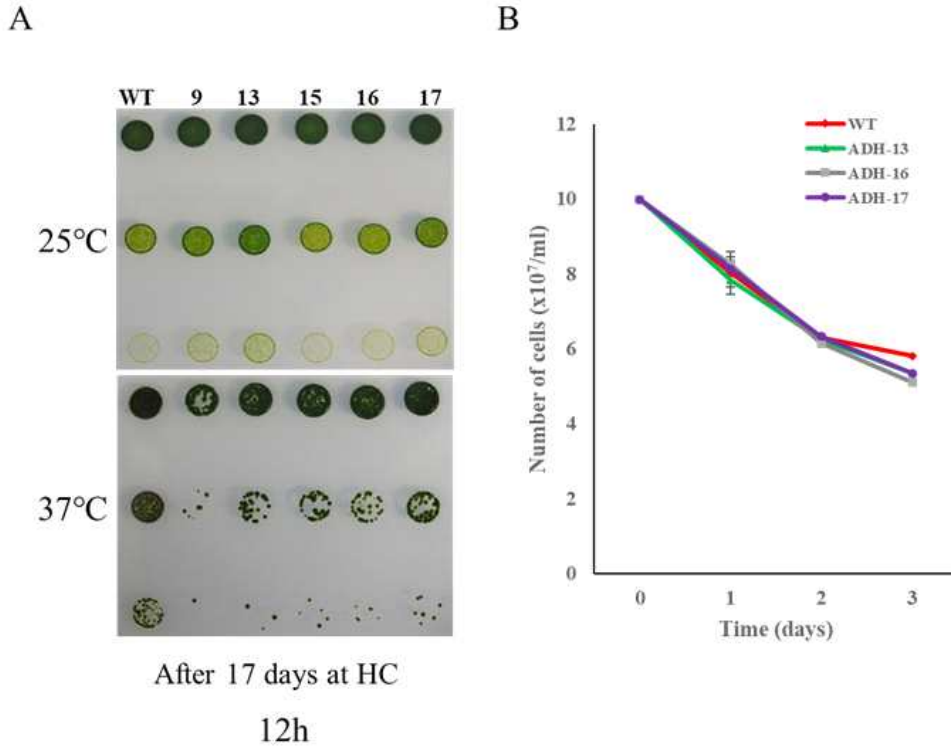


Fig 2-1. Growth performance of WT and ADH-overexpressing lines cultured under high temperature condition.

- ADH 과발현 형질전환체들이 고온 스트레스 하에서 생장이 억제된 이유를 확인하고자 wild type과 ADH 과발현 형질전환체들을 37°C 에서 12시간 배양 후 ROS를 측정하였다 (Fig 2-3). 정상 조건에서는 wild type과 형질전환체들의 ROS 양에는 큰 차이가 없지만 고온 배양 조건에서는 wild type에 비해 ADH 과발현 형질전환체들의 ROS 양이 3.9~5.4 배 증가됨을 확인하였다. 이러한 결과는 ROS양이 ADH 과발현 형질전환체들의 고온 스트레스 조절에 중요한 요인임을 보여준다

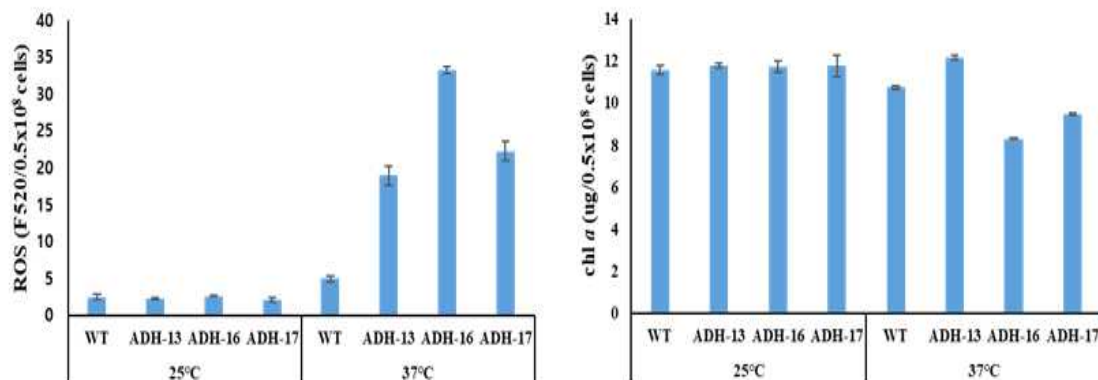


Fig 2-3. ROS and chlorophyll measurement of WT and ADH-overexpressing lines under high temperature condition.

- 위에서의 가설처럼 고온 스트레스 조건하에서 ADH 과발현 형질전환체들이 wild type에 비해 생장이 느린 이유가 에너지 생성원인 acetate를 충분히 생산하여 사용하지 못하기 때문인지를 간접적으로 확인하고자 wild type과 ADH 과발현 형질전환체들을 고온 처리 후 ALDHs와 PDC의 발현을 확인하였다 (Fig 2-4.). 먼저 ALDHs의 경우, nanochloropsis에서는 최소 2개의 ALDH가 확인되었다. 따라서 ALDH1, 2 유전자의 발현을 확인하였다. 그 결과, 정상 성장 조건에서는 ADH 과발현 형질전환체들의 ALDH1, 2 유전자의 발현이 wild type에 비해 최대 3배 증가되었지만 (Fig 2-4. A), 고온 조건하에서는 wild type에 비해 ADH 과발현 형질전환체들의 ALDH1, 2 유전자의 발현이 오히려 최대 3배 감소하였다(Fig 2-4. B)

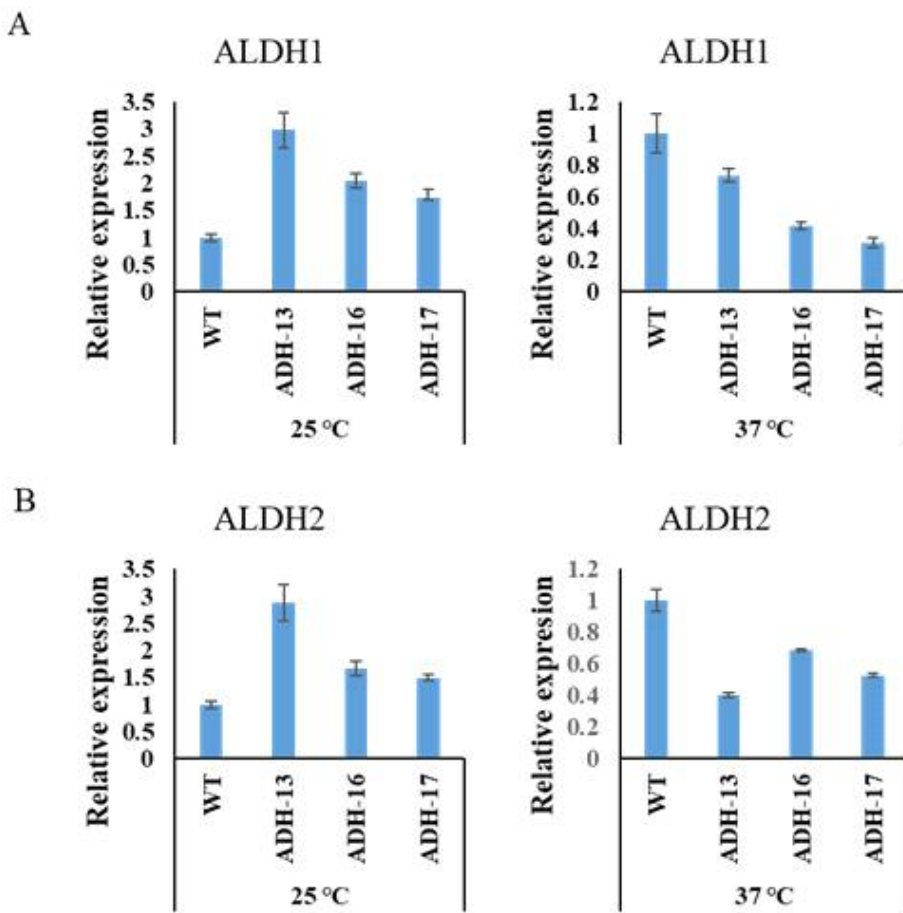


Fig 2-4. Relative expression level of ALDHs in WT and ADH transgenic lines cultured under high temperature condition.

- 또한 PDC의 경우, nanochloropsis에서는 1개의 PDC 유전자가 확인되었다. 이 유전자를 이용하여 정상 성장 조건과 고온 조건에서 배양된 wild type과 ADH 과발현 형질전환체에서 qRT-PCR를 수행하였다 (Fig 2-5). 그 결과 정상 배양조건에서는 PDC 유전자의 발현이 거의 차이가 없지만, 고온 조건하에서 배양된 ADH 과발현 형질전환체들의 PDC 유전자의 발현이 wild type에 비해 최대 5배 감소하였다 (Fig 2-5). 이러한 결과들은 고온 내

성을 가지기 위해서는 ALDH와 PDC의 활성이 중요한 factors 임을 보여준다

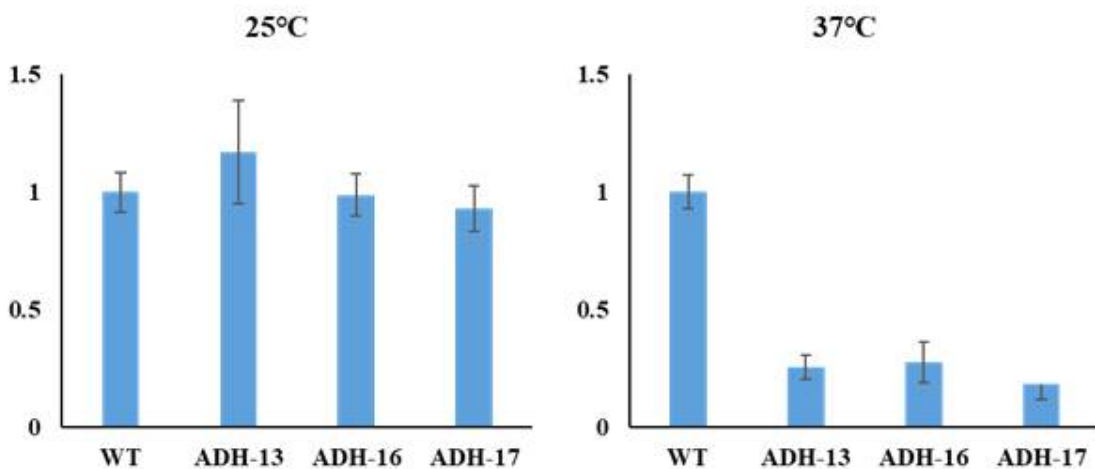


Fig 2-5. Relative expression level of PDC in WT and ADH transgenic lines cultured under high temperature condition.

- 이상의 결과들을 요약하면 adh 과발현 Nannochloropsis는 고온조건에서 PDC와 ALDH가 감소하였고, ROS가 증가하였다. 따라서 처음의 가설처럼 PDC와 ALDH가 충분하지 않으면 acetate의 부족으로 고온스트레스를 극복하기 위한 에너지가 부족하여 ROS를 감소시키지 못함으로써 고온에 sensitive하게 된 것으로 보인다

2) Genome editing 기술 개발

- Genome editing 기술은 외래 DNA 유전자의 도입 없이 목적형질을 변환시켜 인위적 돌연변이를 만들 수 있는 새로운 기술이다. 이를 위해서는 RNA 및 단백질을 고효율로 김 세포내에 도입하는 기술이 개발되어야 한다
- 김의 genome editing 의 선행 기술을 개발하기 위하여, 기존의 particle bombardment 방법보다 효율이 높을 것으로 예상되는 원형질체와 전기천공법을 이용하고 분석이 용이한 GUS DNA 유전자를 이용하였다. 우선 방사무늬 김의 원형질체 분리 방법을 개선하고 electroporation 조건을 확립하였다

(1) 김 원형질체 분리 기술 개발

- 원형질체 분리는 조류의 생리, 생화학 및 분자생물학을 연구하는데 매우 유용한 도구로 인식되어 있다. 특히 상업적으로 중요한 유용 해조의 증식과 유전자 개량에 효과적으로 이용되고 있다.
- 기존 방사무늬김 원형질체 분리에 사용되던 macerozyme, cellulase를 대체하기 위하여

Viscozyme, Celluacast, PecticEX (VCP 용액)를 각각 2% 농도로 처리하였다. 1~3mm 크기로 자른 김 엽체에 각각의 효소혼합액을 처리하고 3시간 후 분리된 김 원형질체의 개수를 비교하였다. macerozyme, cellulase 혼합액은 4×10^4 cells/ml, VCP 용액은 1.25×10^5 cells/ml 의 원형질체를 분리할 수 있었다

- 김의 세포벽 구성 물질은 주요 골격을 형성하는 cellulose 와 매트릭스 성분인 porphyran 으로 구성되어 있다. cellulose 는 시판되는 효소를 이용하여 분해할 수 있으나 다양한 치환기를 가지는 porphyran을 분해하기 위해서는 해산 조식동물의 소화효소를 이용하는 것이 효과적이라 알려져 있다
- 보다 효과적으로 김 원형질체를 분리하기 위하여 국내에 자생하는 해산 조식동물인 전복의 소화효소를 추출하여 혼합사용 하였다. 전복의 소화기관을 절제하여 동결건조한 후 파쇄하였다. 파쇄한 전복 소화기관을 아세톤과 디에틸에테르로 세척한 후 다시 한번 동결건조하여 사용하였다
- 전복 효소추출물(AAP)의 적정 처리 농도를 찾기 위하여 2% VCP 용액에 전복 효소 추출물을 0, 0.1, 0.5, 1, 2 % 농도로 혼합하여 방사무늬 김 엽체에 3시간 동안 처리하였다. 그 결과, VCP 용액만 처리한 대조구에서는 2.3×10^5 cells/ml, 0.1, 0.5, 1% AAP 처리구에서는 각각 6.8×10^5 cells/ml, 8.5×10^5 cells/ml, 8.6×10^5 cells/ml 농도의 김 원형질체가 분리되었고 2% AAP 처리구에서는 모든 세포가 사멸한 것을 확인하였다 (Fig 2-6). 1% AAP 처리구에서 가장 많은 수의 김 원형질체가 분리되었지만 AAP에 의한 세포 손상을 최소화하기 위하여 2% VCP 용액과 0.5 % AAP를 혼합하여 김 원형질체를 분리하였다 (Fig 2-7)

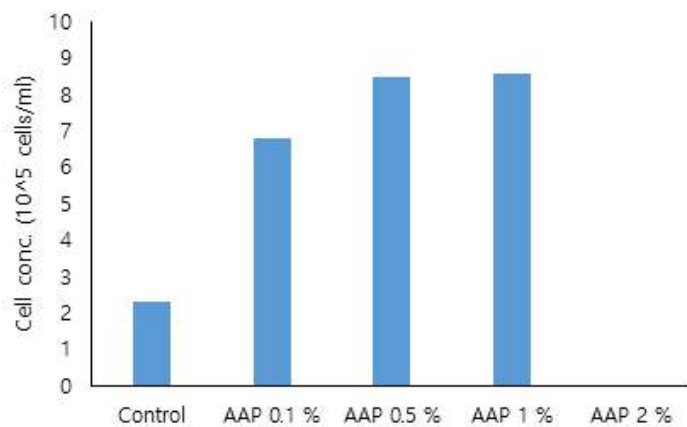


Fig 2-6. 전복 효소추출물 농도별 김 원형질체 생산량

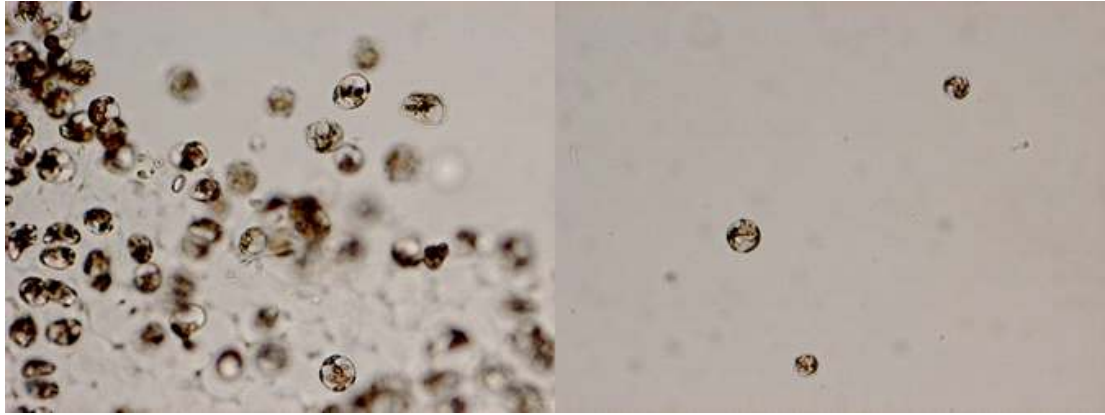


Fig 2-7. 방사무늬 김 원형질체

김 원형질체의 재분화를 관찰하였다. 세포벽 형성, 세포분할

(2) 김 원형질체에 전기천공법을 이용한 GUS 유전자 도입 분석

○ 방사무늬 김의 원형질체를 분리하여 PyGUS 유전자를 안정적으로 도입하고자 하였다. 먼저 Electroporation solution 의 적정 농도를 찾기 위해 방사무늬 김 원형질체에 각각 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 M mannitol과 sorbitol 을 처리하고 2시간 후 관찰하였다. 0.5, 0.6 M mannitol 과 sorbitol 처리구에서는 세포의 크기가 비대해 지고 초록색으로 사멸하였다 (Fig 2-8). 최종적으로 0.8 M mannitol 농도로 electroporation solution을 조제하여 사용하였다

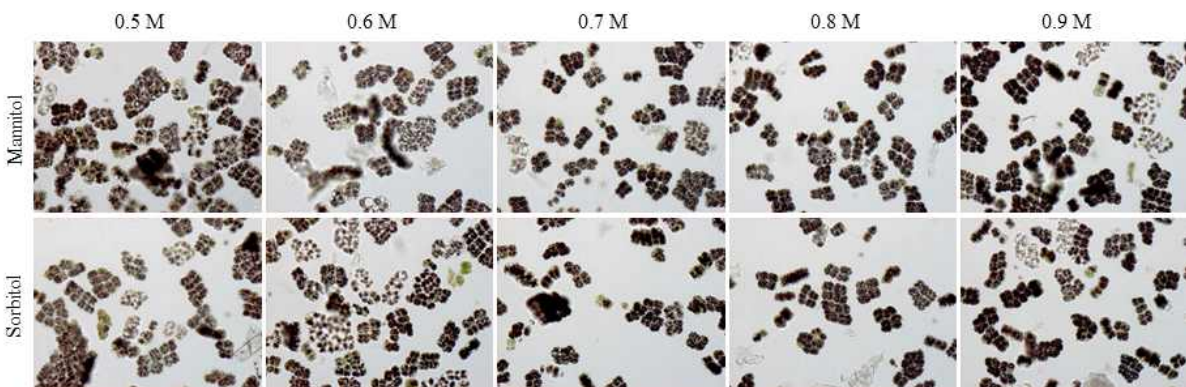


Fig 2-8. Electroporation solution 처리 농도별 김 원형질체

○ 김 원형질체에 BIORAD gene Pulser Xcell 전기 충격 시스템을 이용하여 PyGUS 유전자를 도입하고자 하였다. 적정 전력을 찾기 위해 200, 400, 600, 800, 1000 V의 전력으로 형질전환을 시도하였다. 형질전환 후 2일 동안 암조건에서 회복시켰고 이후 Hygromycin 으로 선별을 진행하였으며 온도 12 °C, 조도 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, L : D = 10 hr : 14 hr 조건에서 배양하였다. 회복 후 2일 간격으로 김 원형질체를 GUS staining 하여 안정적으로 유전자가 삽입되었는지 확인하였다. 그 결과, 형질전환 9~11일 이후 600 V의 전력으로 electroporation 하였을 때만 GUS staining 이 확인되었다 (Fig 2-9)

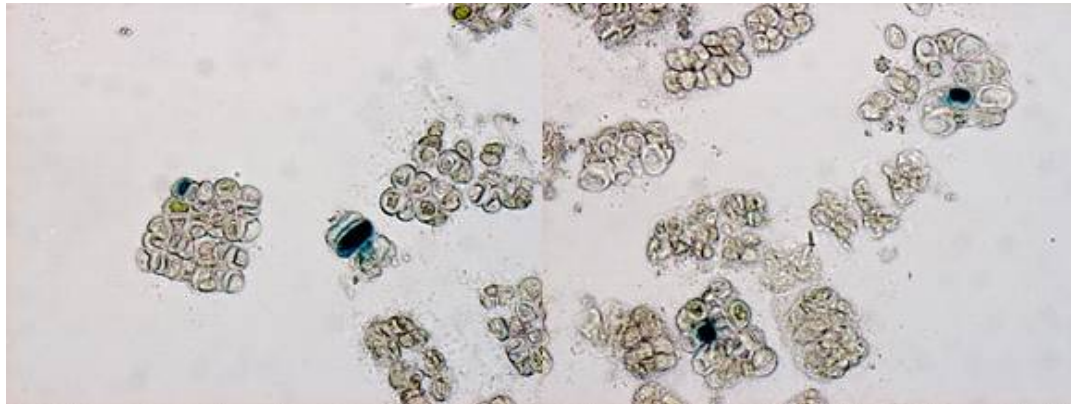


Fig 2-9. 김 원형질체를 이용한 PyGUS 형질전환체

- 이상의 결과로 김의 원형질체 분리 방법 및 전기천공법을 통한 유전물질 도입 기술이 개발되었으므로 이후 genome editing 기술을 적용하고자 한다

3. 고온내성 김 양식 현장 평가 및 피드백

- 황백화란 영양염 부족으로 김 엽체의 색상이 황백색으로 변하고, 엽체 탈락으로 인한 생산성 저하 및 생장 퇴색으로 상품성이 하락하는 현상을 뜻한다. 최근 황백화로 인하여 김 양식장의 경제적 피해가 증가하고 있다
- 황백화는 그 현상이 일어나는 명확한 시기를 추측할 수 없어 김 어가에 큰 피해를 주고 있다. 본 연구에서는 기존 고온내성 품종을 개량하여 황백화와 고온에 내성을 가지는 김 품종을 개발하여 김 양식장의 피해를 줄이고 김의 안정적 생산에 기여하고자 하였다

1) 황백화 내성 고온내성 종자 개발

- 기존에 가지고 있는 고온내성 품종 15-10, 15-11 과 고온내성 광엽형 품종 15-13 엽체를 각각 1g 씩 원자력 연구소에서 1 Kgy 로 방사선 조사 하였다. 방사선 조사 후 황백화 현상이 발생했을 때와 유사한 영양염 결핍 조건을 조성하였다
- ESL 배지 : 증류수 = 25 : 75, 50 : 50, 75 : 25 조건과 영양염이 첨가되지 않은 멸균해수에서 방사선 조사한 엽체를 배양하였다. 황백화가 주로 발생하는 김 양식 어기 초반의 수온과 유사하고 고온내성 특성을 유지하기 위하여 온도 20 ℃, 조도 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, L : D = 10 hr : 14 hr 조건에서 엽체를 정치배양 하였다 (Fig 3-1)



Fig 3-1. 영양염 결핍 조건에서 배양한 고온내성 김 엽체

○ 영양염 결핍 조건에서 배양한 엽체는 대부분 사상체로 발달하였고 그 중 엽체의 형태를 유지하며 성장한 개체를 선발하였다(Fig 3-2)

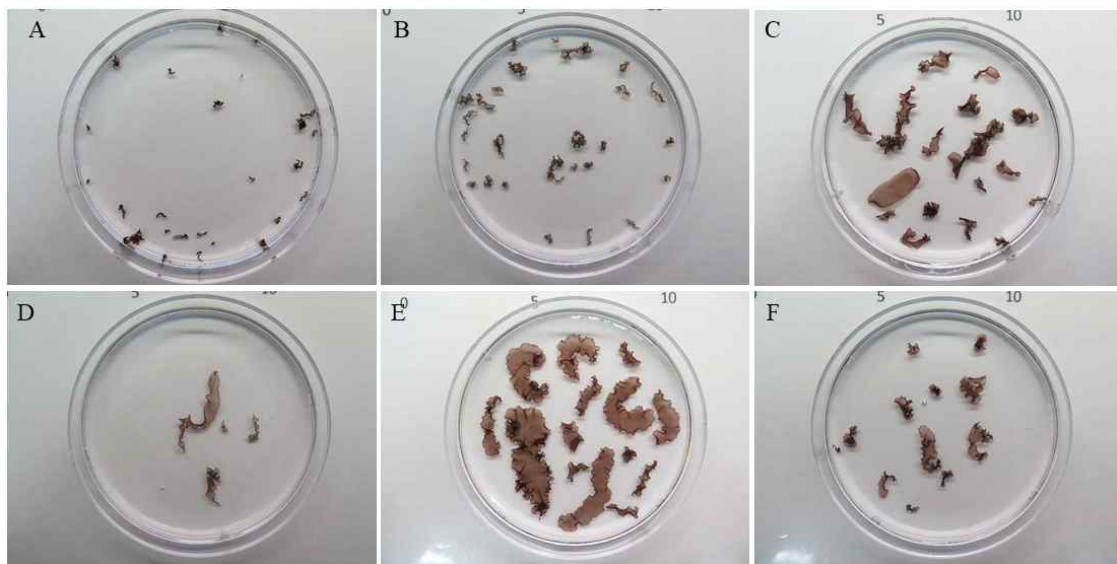


Fig 3-2. 영양염 결핍 조건에서 선발한 황백화 내성 후보군

○ 2차 방사선 조사를 통하여 획득한 영양염 결핍조건에서 성장이 빠른 돌연변이체를 순계화 진행하였다. 순계주 확보를 위해 선발된 엽체를 5 mm 간격으로 자른 후 20 °C에서 통기 배양하여 단포자 방출을 유도하였다. 그 후 12 °C, L : D = 10 hr : 14 hr 조건에서 성장이 빠른 엽체를 선발하는 과정을 3회 반복하여 단조화 하였다. 현재 2차 단조화까지 진행

되었고 3차 단조화 후 최종적으로 1개의 업체를 선발하고, 선발된 업체를 자가수정 시킨 후 형성된 과포자를 방출시켜 사상체로 발달시켜 순계 사상체를 확보할 예정이다

- 확보된 순계 사상체에서 각포자낭과 각포자를 순차적으로 유도하여 황백화 내성을 재확인 하고 형태적, 생리적 특성을 분석하여 최종적으로 황백화와 고온에 내성을 가지는 품종을 개발할 예정이다

4. 골드 2호 재배심사

1) 2년차 재배심사 (2019-2020)

- 골드 2호의 재배심사는 골드2호, 대조구 A, 대조구 B, 총 3종의 품종을 선정하여 패각의 잠입과 각포자낭 성숙 등의 조건을 1차 심사 기준으로 두고 2019년 10월 패각 사상체를 이용한 해상 채묘 후 월 2회 김발을 무작위 채취하여 심사 품종의 특성, 업체의 길이와 너비, 거치 유무, 색 측정, 단포자 형성과 방출 유무를 조사하였다(Fig 4-1, 4-2)
- 골드 2호의 품종 등록을 위한 재배심사는 수산식물품종관리센터 규정에 따라 2회 반복 수행 후 심의를 받아 품종 등록 예정이었다. 채묘 후 8주차까지 정상적으로 심사가 이루어졌으나, 출원 품종과 대조품종의 채묘밀도가 낮았고, 황백화로 인한 업체 탈락으로 정상적인 특성조사 진행이 불가하여 재배심사 연기 통지를 받았다(Fig 4-3)



Fig 4-1. 2019년 고온내성 품종 골드 2호 의 2년차 재배심사 과정 (해상채묘)



Fig 4-2. 채묘 후 8주차 재배심사 엽체

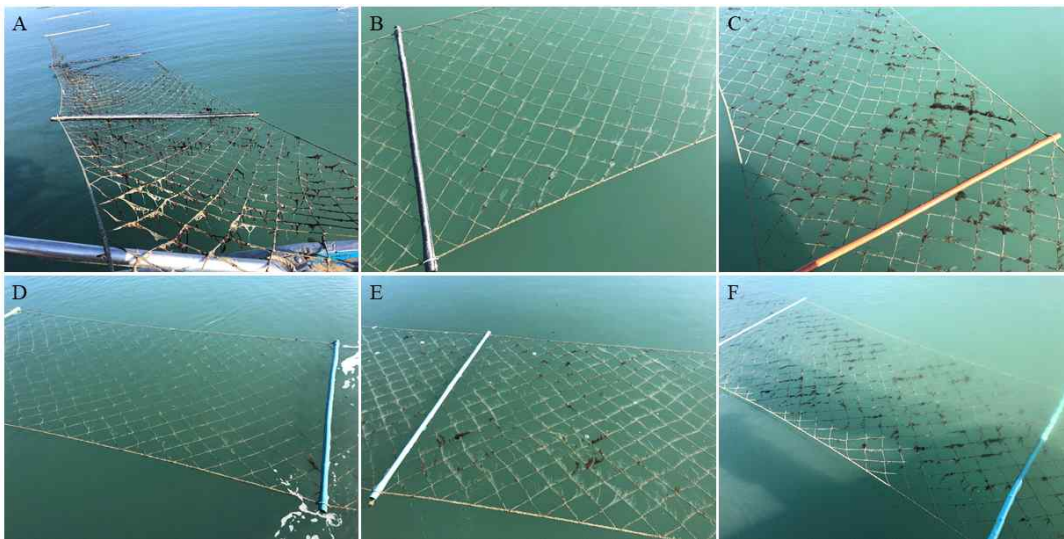


Fig 4-3. 채묘 후 10주차 황백화로 인한 엽체 탈락

2) 3년차 재배심사 (2020-2021)

- 3차 재배심사는 서천군 서면 인근 김 사상체 배양장에서 진행하였다. 재배심사를 위한 패각 배양 과정은 1, 2차년 심사와 동일한 방법으로 2020년 3월 골드 2호, 대조구 A, 대조구 B, 총 3종의 품종의 선정하여 패각을 잠입하였다. 2주 후 패각 사상체의 잠입여부를 확인하였고, 30일 후 평면식에서 수하식으로 교체하여 패각 사상체를 배양하였다(Fig 4-4.)
- 3~8월까지의 약 30일 간격으로 사상체의 성장을 비교하였고, 9월부터 채묘 전까지 매주 각 포자낭 성숙도를 비교하였다. 대조품종과 출원품종 간에 큰 차이 없이 각포자낭이 성숙한 것을 확인하였다(Fig 4-5)

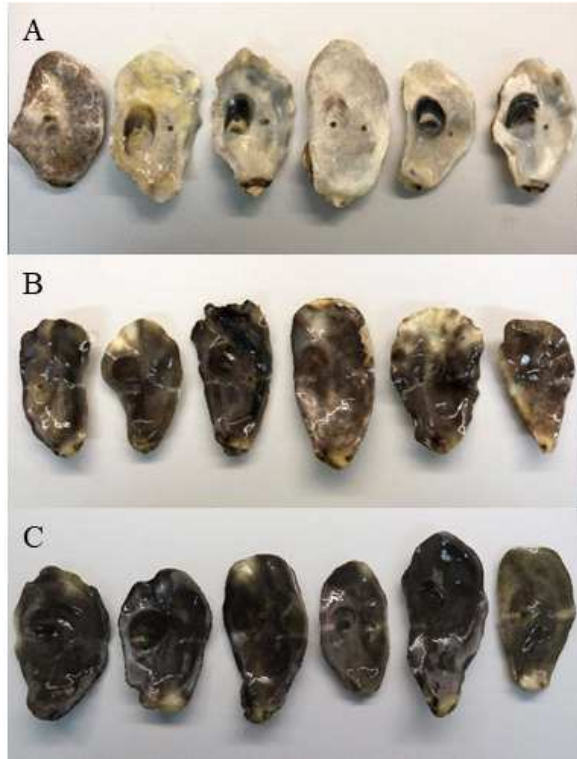


Fig 4-4. 2020년 고온내성 품종 골드 2호 의 3년차 재배심사 과정 (패각사상체 배양)

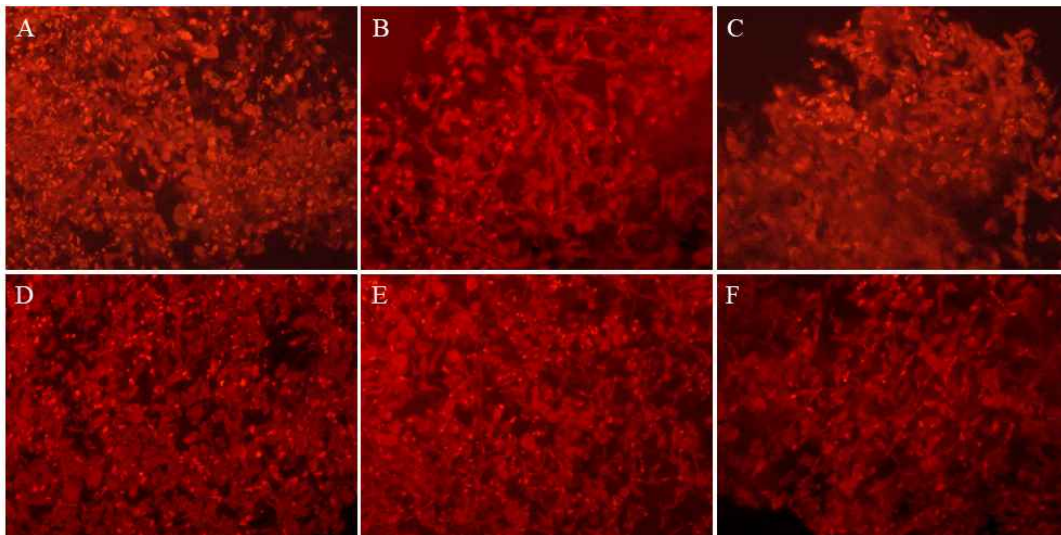


Fig 4-5. 2020년 고온내성 품종 골드 2호 패각 사상체의 각포자낭

- 채묘과정은 2020년 9월 말 1, 2차년과 동일한 방법으로 23 ℃에서 각포자 방출을 유도하는 전처리 과정을 거치고 10장으로 겹쳐둔 김발에 패각 사상체를 이식하여 1차 배양장에 해상채묘를 진행하였다. (Fig 4-6). 채묘 2주 후 유엽을 확인할 수 있을 것으로 보인다
- 유엽이 확인되면 10월 중 2차 배양장으로 김발을 분망하여 2주 간격으로 엽체를 무작위 채취하여 심사 품종의 특성, 엽체의 길이와 너비, 거치 유무, 색 측정, 단포자 형성과 방출

유무를 조사할 예정이다

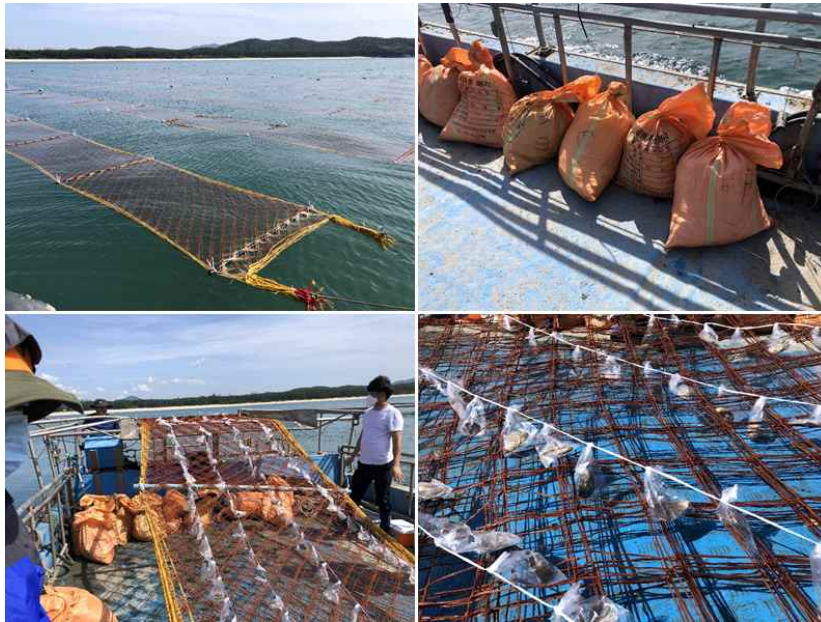


Fig 4-6. 2020년 고온내성 품종 골드 2호 의 3년차 재배심사 과정 (해상채묘)

5. 산업화 기반 구축

1) 골드 2호 분양, 생산을 통한 점유율 확대

- 골드 2호는 일반 방사무늬 김에 비해 20 ℃의 고온에서 빠른 성장을 보이는 세장형 엽체로 2020년 총 300g의 사상체를 어가에 무상 분양하였다 (Table 5-1). 충청, 전남지역에서 약 37,500 상자를 채묘할 것으로 예상되고 점차 수요가 증가할 것으로 보임에 따라 유리 사상체의 대량배양을 진행하고 있다
- 골드 2호 사상체 1g을 3~5L 용적의 통기배양기에서 온도 20 ℃, 조도 30 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, L : D = 14 : 10 조건으로 유지하여 대량 배양하고 있다

국내 종자 판매 실적			
번호	일자	판매처	매출액
2020-1	2020-01-16	선진수산	100g
2020-2	2020-01-16	해림수산	200g

Table 5-1. 2020년 골드 2호 분양 현황.

[5차년도]

1. 고온내성 종자의 유전적, 생리·생화학적 분석

1) 고온내성 광엽형 방사무늬김 품종 특성 분석

- 본 연구에서 개발한 고온내성 광엽형 품종 (15-13)과 기존 고온내성 방사무늬김(HTR-1)의 차이점을 알아보기 위하여 방사무늬김 부위별 세포 크기를 비교하였다. 12 °C에서 배양한 고온내성 김과 광엽형 방사무늬 김의 단포자를 유도하여 세포분열 초기부터 2~3일간격으로 세포의 수를 측정하였다
- 세포분열 초기에는 일반 방사무늬김(WT)과 고온내성 김(HTR-1), 고온내성 광엽형 방사무늬김(광엽) 사이에 큰 세포수 차이를 보이지 않았다. 2~3주 이후 WT과 HTR-1 은 부위별 단위면적당 세포수에 큰 차이를 보이지 않았지만 광엽형 방사무늬김의 경우 상, 중부 위치에서 WT, HTR-1 보다 단위면적당 세포수가 적은 것을 확인하였다. 이는 광엽형 방사무늬김의 형태적 특성이 세포 크기에서 비롯되었음을 보여준다(Fig 1-1, 1-2)

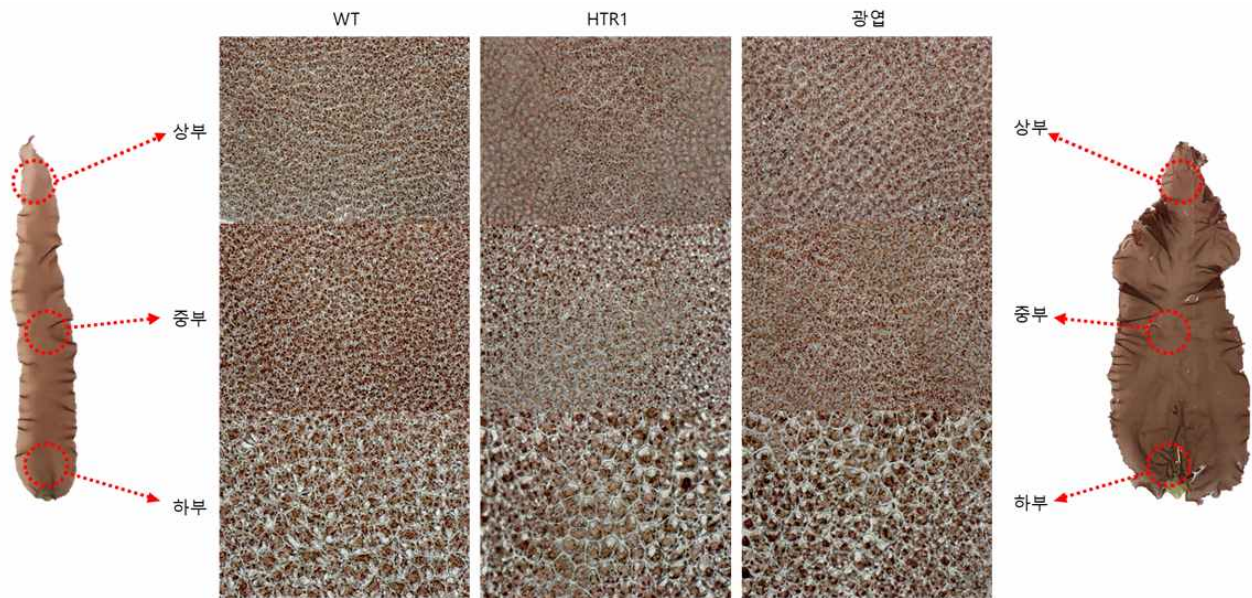


Fig 1-1 . 방사무늬김 부위별 사진

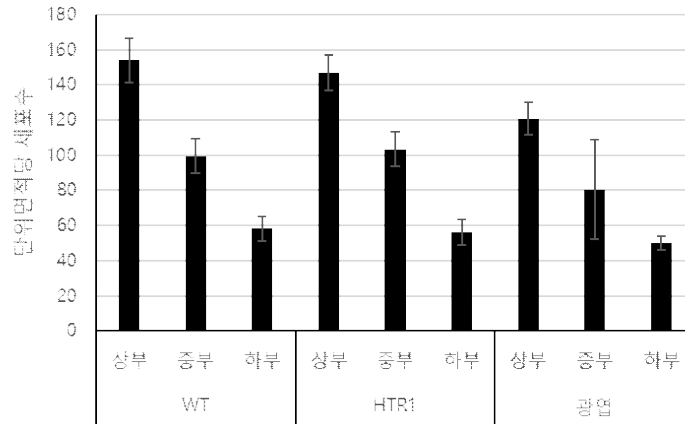


Fig 1-2. 방사무늬곰 부위별 단위면적당 세포 수

- 고온내성 광엽형 곰 돌연변이체의 특성이 곰 양식장에서 유지되는지 확인하기 위하여 12월 양식장에서 채배한 엽체를 실내 배양하여 성장 특성 조사를 통해 후대 분석이 진행 중이다
- 고온내성 광엽형 방사무늬곰의 유전적 변이를 확인하기 위하여 RAPD PCR (Random amplified polymorphic DNA PCR) 을 수행하였다. 먼저 Qiagen DNA extraction kit를 사용하여 genomic DNA를 분리하였다. 프라이머는 20개의 RAPD 용 프라이머를 사용하였고 (OPA 1~20), PCR 반응조성은 추출한 genomic DNA를 주형 DNA로 하여 $5U \mu l^{-1}$ Ex Taq polymerase (Takara, Japan), 10 mM의 dNTP mix, 5 pmol의 유전자 프라이머(OPA 1~20)를 첨가한 후 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 변성(denaturation) $94^{\circ}C$ 에서 1분, 결합(annealing) $35^{\circ}C$ 에서 30초, 신장(extention) $72^{\circ}C$ 에서 1분을 40회 반복 수행하여 증폭하였다. 그 결과 WT, HTR-1, 광엽형 방사무늬곰에서 차이가 나는 밴드들을 확인할 수 있었고 이후 Gel purification 과 cloning을 수행하여 정확한 유전적 변이를 조사하고 있다 (Fig 1-3)

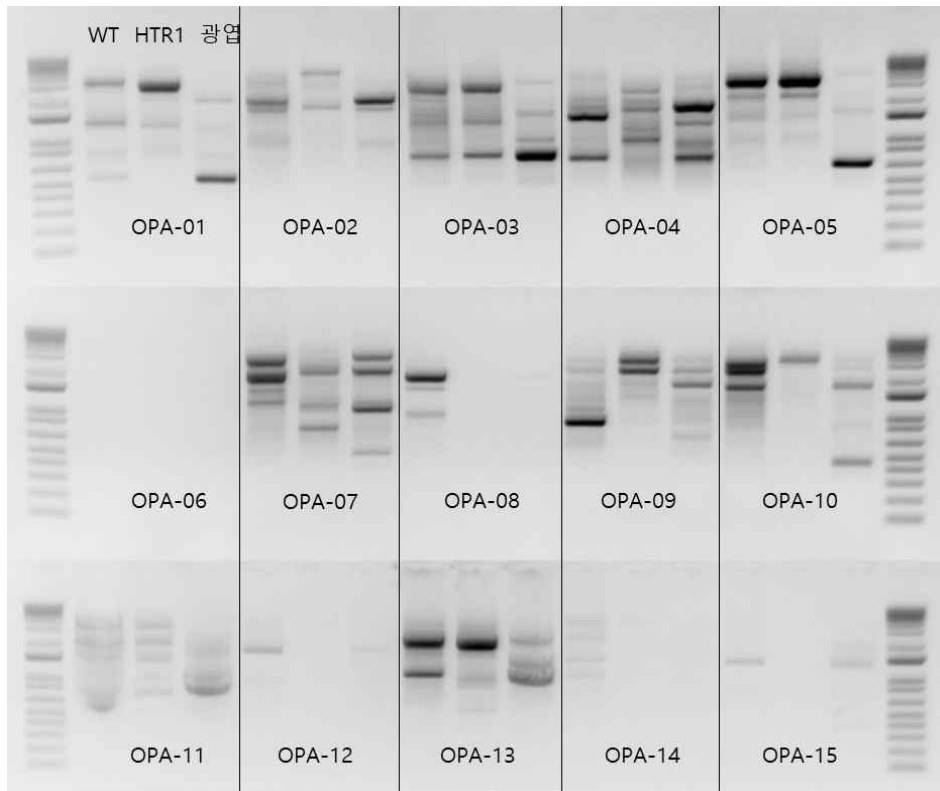


Fig 1-3. RAPD PCR

2) 골드2호 구조변이 분석

- 본 연구에서 개발한 고온내성 품종 ‘골드2호’의 유전적 변이가 나타난 위치를 탐색하고자 구조변이 분석을 수행하였다. 분석에는 기존에 보유하고 있던 reseq. 데이터를 이용하였다. Short reads 들의 PCR duplicate reads를 제거한 후 Cutadapt를 이용하여 adaptor 서열을 제거하였다. 이후 quilty trimming 을 위해 DynamicTrim을 이용하여 퀄리티가 좋지 않은 서열들을 제거하고 LengthSort 프로그램을 사용하여 너무 많은 서열이 잘린 read를 제거하는 과정을 수행하였다
- 전처리 과정을 통해 얻어진 reads를 reference genome 서열에 mapping을 수행하였다. 이후 Picard MarkDuplicates 프로그램을 사용하여 duplicate를 제거한 후, BreakDancer, Pindel, Delly 프로그램을 사용하여 구조 변이(Structural variation)를 탐색하였다. 분석 대상 샘플 간의 구조변이 비교 분석을 위해 SV matrix를 작성하고 필터를 진행하였다. SV matrix 를 대상으로 비교 샘플간의 SV supporting reads 값을 비교하여 두 샘플간 서로 차이를 보이는 polymorphic SVs를 탐색하였다

No. of Scaffolds	Total length (bp)	Min. length (bp)	Max. length (bp)	Avg. length (bp)	N50 length (bp)
638	104,366,231	9,969	847,292	163,583	241,694

Fig 1-4. Summary of reference genome

Samples	No. of Reads	Avg. length	Total length (bp)	Trimmed/Raw* ¹	Genome cov* ²
Py104	56,812,107	125.97	7,156,790,576	69.17%	≈115.12X
	56,812,107	92.87	5,276,203,093	50.99%	
Gold2	21,548,599	114.39	2,464,867,842	67.11%	≈44.46X
	21,548,599	108.45	2,336,963,995	63.63%	
Total	156,721,412		17,234,825,506		

Fig 1-5. Statistics of final trimmed data

Sample	No. of Total trimmed reads* ¹	No. of Mapped reads* ²	Mapped region* ³ (%)
Py104	113,624,214	31,053,336 (27.33%)	101,852,281 (97.59%)
Gold2	43,097,198	11,376,983 (26.40%)	91,962,563 (88.12%)

Fig 1-6. Statistics of alignment to reference genome

- BreakDancer 프로그램으로 선발된 후보 SV 24개 결과를 IGV 프로그램을 통해 read alignment를 확인하였을 때, polymorphic SV로 추정되는 후보 4개를 선발하였다(Fig 1-7, 8, 9, 10)

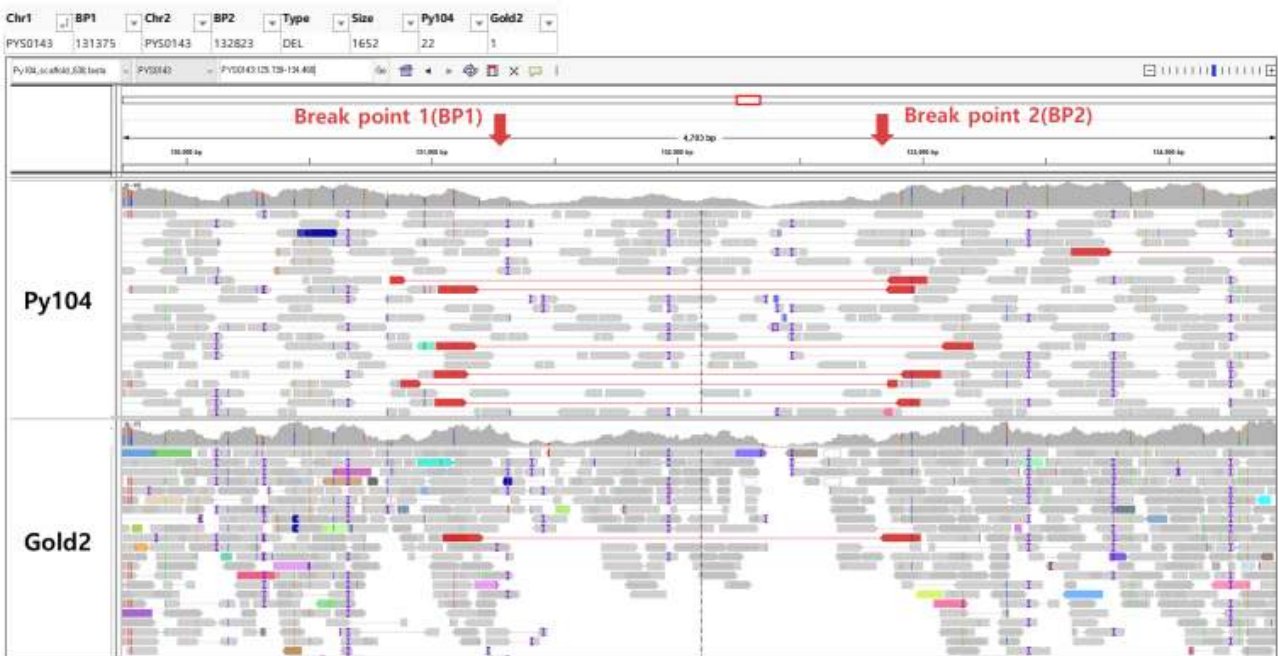


Fig 1-7. 구조변이 후보1 (PYS0143)

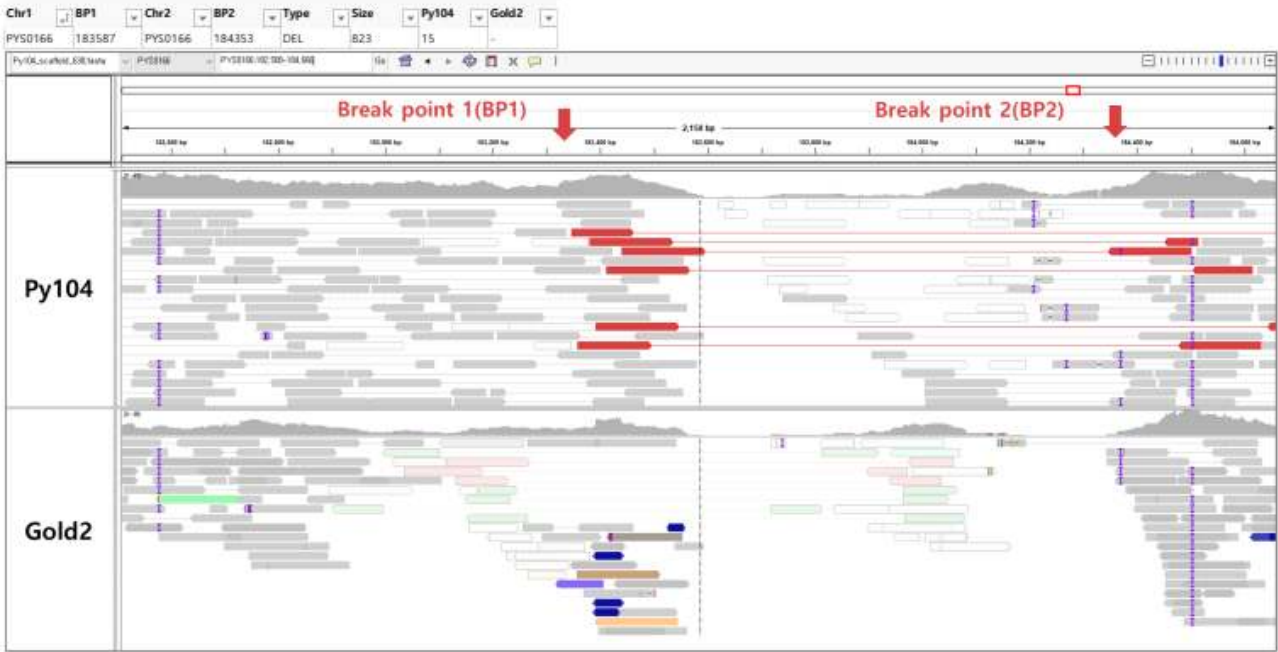


Fig 1-8. 구조변이 후보2 (PYS0166-1)

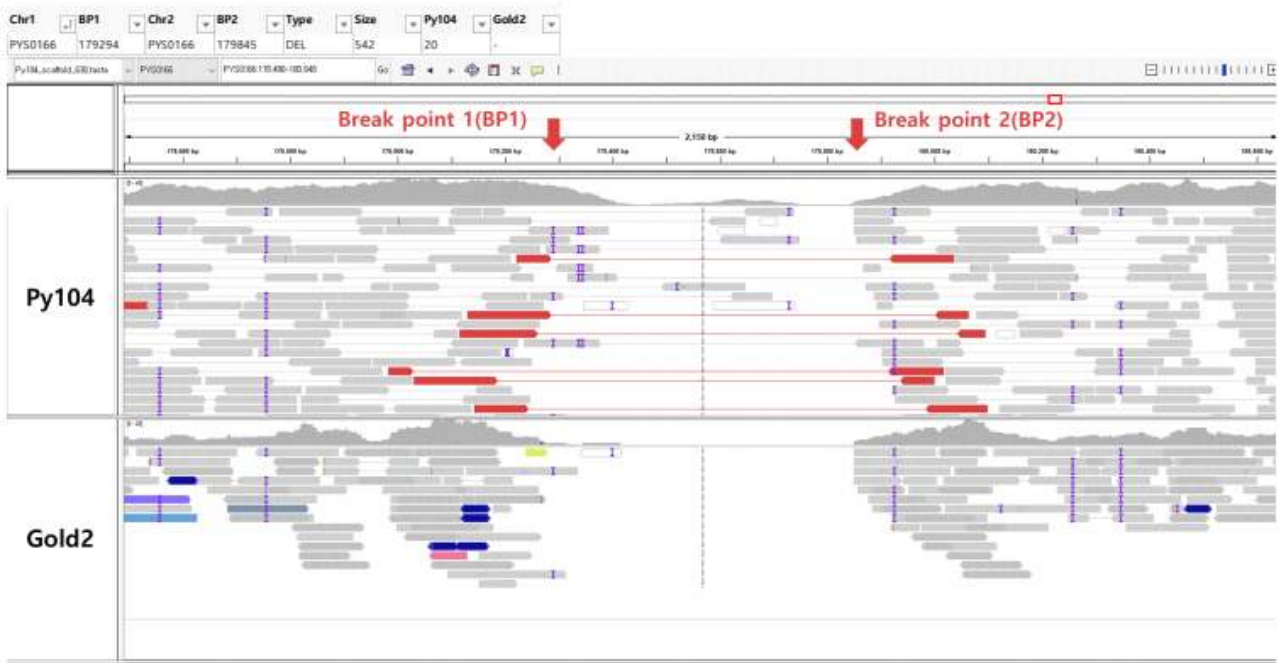


Fig 1-9. 구조변이 후보3 (PYS0166-2)

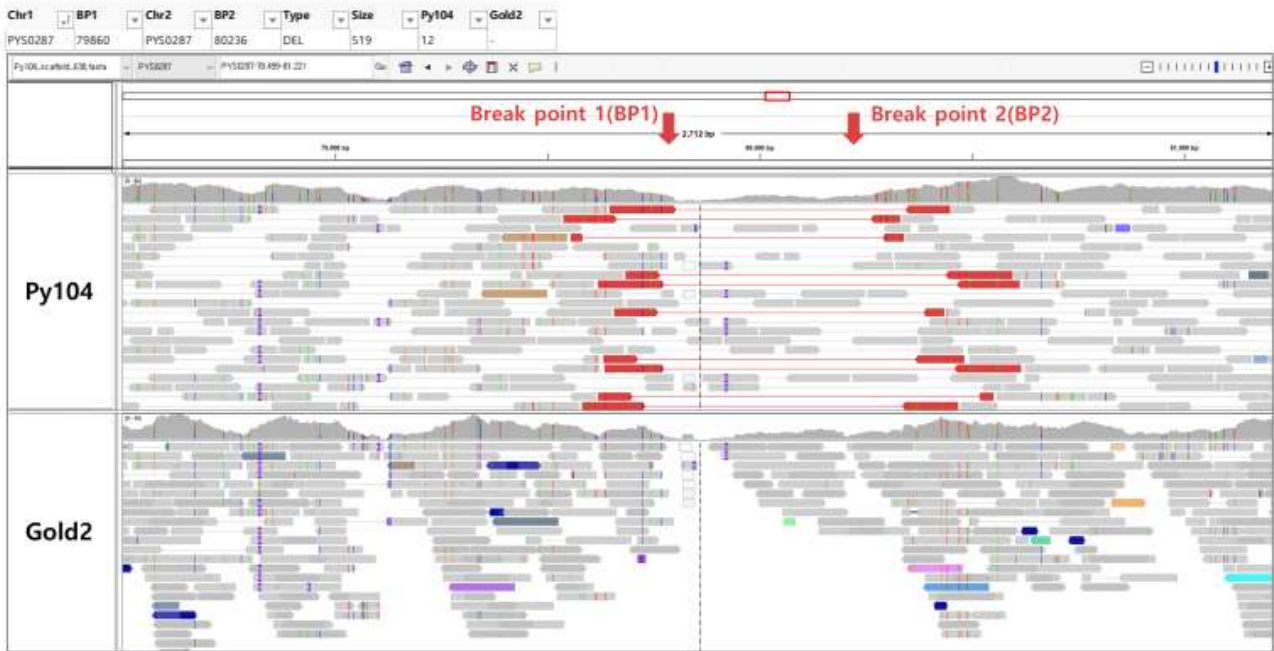


Fig 1-10. 구조변이 후보4 (PYS0287)

2. 고온내성 종자의 현장특성 분석

- 기존 고온내성 변이주는 가늘고 긴 세장형의 특성을 가지고 있어 성장이 빨라 어업인들이 선호하였지만 일부 양식현장에서는 엽체가 넓은 광엽형 종자의 생산성이 높기 때문에 선호하기도 한다. 또한 양식초기의 상대적으로 해수온이 높을 때, 다양한 갯병이 발생하기 때문에 고온내성과 내병성을 동시에 가지는 품종이 요구되었다. 따라서 본 연구에서는 기존 고온내성 품종에 광엽형과 내병성의 특성을 동시에 가지는 품종을 개발하고자 한다
- 2021-2022년 시험양식을 통해 얻어진 고온내성 광엽형 변이주를 이용하여 아미노산 분석, 영양 분석 등 고온내성 광엽형 품종의 후대 분석을 진행할 예정이다
- 고온내성 광엽형 변이주의 특성이 김 양식장에서 안정적으로 유지되는지 확인하기 위하여 12월 양식장에서 재배한 엽체를 실내 배양하여 12, 20 °C에서 성장률, 광합성률, 색소 분석을 통해 후대 분석할 예정이다

3. 고온내성 유전체 발현 분석을 통한 고온내성 기작 분석

1) 고온반응 및 내성 연구

- 2단계 5년간 고온내성, 대조구, 고온민감 특성을 보이는 김 및 미세조류에서 고온스트레스에 대한 반응을 전사체 분석, 유전자 발현 분석, ROS등의 생리학적 분석을 수행하였다. 그 결과들을 요약하면 다음과 같다

- 전사체 분석한 고온내성 라인의 전사체 분석결과를 보면 고온반응 및 고온내성을 가지는 데 heat shock family protein이외에도 다양한 대사경로가 직간접적으로 영향을 미치고 있음을 나타낸다. 한편 CCM (carbon concentrating mechanism) 에 관련된 carbonic anhydrase와 bicarbonate transporter 유전자의 발현이 크게 증가하였는데, 이는 고온조건에서 배양환경의 무기탄소 (Ci) 함량이 변하였기 때문일 것이다. 그 외에 산화스트레스, glycolysis, calvin cycle, 지질대사관련 유전자들의 발현변화가 나타났다
- 고온내성 라인들과 wild type의 고온에서 유전자들의 발현을 전사체 정보로부터 분석한 결과 고온내성 라인들에서 스트레스 내성 (heat shock proteins, ROS scavenge, CCM 등) 유전자들의 발현이 증가하는 한편 calvin cycle, glycolysis 관련 유전자들의 발현이 증가하였다. 이러한 사실은 “고온에 내성을 가지기 위해 많은 에너지가 필요하며 세포내에 충분한 acetate가 생성되면 많은 에너지 생성이 가능하다”는 가설을 세울 수 있다. 고온 스트레스하 활발한 광합성이 불가능한 상태에서 에너지를 얻는 방법은 glycolysis를 통해 저장된 에너지를 확보하는 것이다. Glycolysis 과정에서 생성된 pyruvate를 기질로 PDC (phosphate decarboxylase)와 ALDH (aldehyde dehydroxylase)의 활성화에 의해 acetate가 생성된다. 김의 전사체 분석결과 PDC 유전자는 발견되지 않았으나 ALDH 유전자는 5개 (TCONS_00002190, TCONS_00000161, TCONS_00000162, TCONS_00000064, TCONS_00000333)의 전사체가 발견되었다. 4개의 전사체는 크게 변하지 않았으나, TCONS_00002190의 발현은 고온내성 라인들에서 4.5배 증가하였다
- 고온내성 라인에서 CCM 유전자들의 발현을 RT-PCR방법으로 분석한 결과, 고온 20℃ 배양 조건에서 대조구와 고온내성 변이주에서 CCM (carbon concentrating mechanism) 에 관련된 carbonic anhydrase와 bicarbonate transporter 유전자의 발현이 증가하였다. 즉 전반적으로 고온조건에서 고온내성 변이체들의 CCM 유전자들의 발현양이 크게 증가하였는데, 이는 고온조건에서 효율적으로 이산화탄소를 고정할 수 있음으로 보여주는 것이다
- 한편 고온민감 미세조류와 대조구 미세조류의 라인을 분석한 결과 정상 조건에서는 wild type과 고온민감 라인들의 ROS 양에는 큰 차이가 없지만 고온 배양 조건에서는 wild type에 비해 고온민감 라인들의 ROS 양이 3.9~5.4배 증가됨을 확인하였다. 이러한 결과는 ROS양이 고온 스트레스 조절에 중요한 요인임을 보여준다. 또한 qRT-PCR분석결과 ADH, ALDH, PDC의 발현 및 활성이 고온스트레스를 이겨내는데 중요한 factor 임을 알 수 있었다
- 또한 미세조류의 CCM 변이체 분석결과 역시 고온에 민감한 표현형을 보여주었다. 그림 x에서와 같이 CCM 변이체들은 CCM 유전자 발현, CA활성 및 세포내 Ci농도에 큰 변화를 보여주었는데 high CO₂에서 대조구는 고온에 내성을 보였으나, 변이체들은 모두 고온 스트레스에 민감하였다. 이러한 사실 역시 세포내 CCM이 고온스트레스에 반응함을 나타낸다

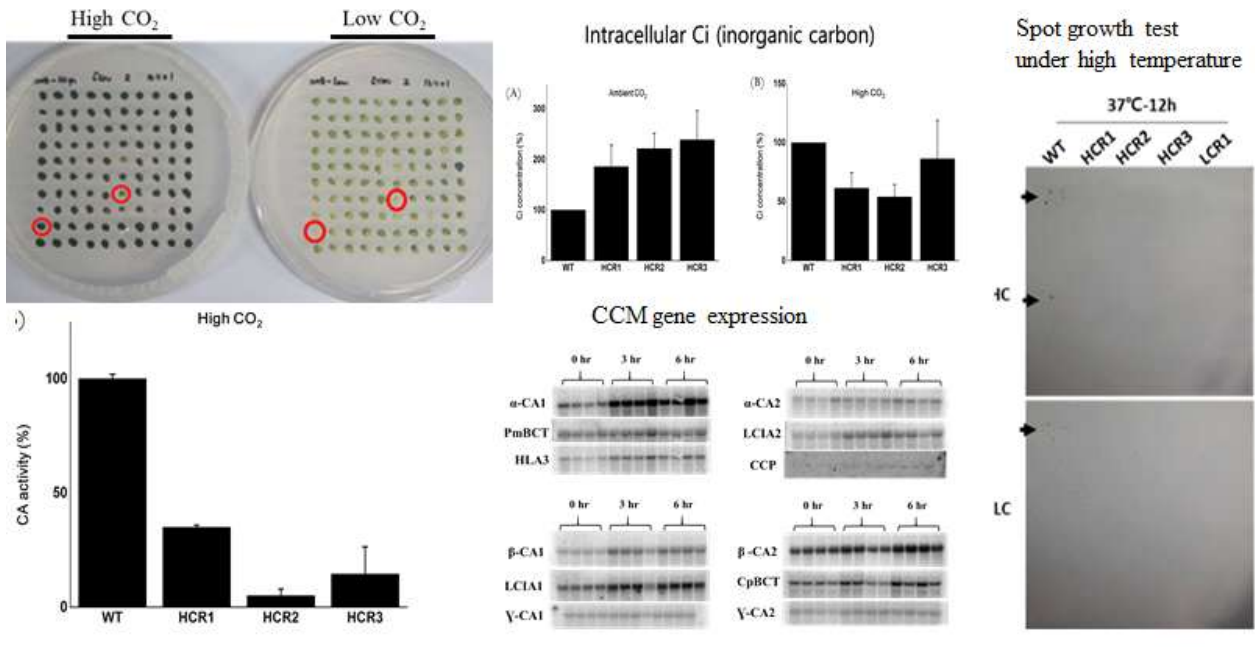


Fig 3-1. 미세조류 *Nannochloropsis* CCM 변이체의 CCM 분석 및 고온스트레스 반응

- 이상을 분석으로부터 생물이 고온반응 및 고온내성을 가지는데 heat shock family protein 이외에도 다양한 대사경로가 직간접적으로 영향을 미치고 있음을 나타낸다. 예를 들면 CCM (carbon concentrating mechanism)이 관여하여 에너지를 공급하는 역할과 더불어 고온스트레스에 의해 발생하는 ROS를 산화스트레스 극복기작과 공조하여 감소시키는 것으로 보인다. 여기에는 다양한 대사경로 즉 glycolysis, calvin cycle, 지질대사 등이 관여되어 있다. 현재 고온내성 변이체의 구조변이를 분석중인데, 그 결과로 변이유전자(군)을 발굴하여 고온반응 및 내성 부여 경로를 규명하는 연구가 진행될 것이다

2) 방사무늬김 유전자 교정기술 개발

- 실험에 사용된 재료는 국립수산물연구원 해조류바이오연구센터로부터 분양 받은 방사무늬김 (*P. yezoensis*, 수과원104)에 pPtHSP70P-hyg-GUS2 벡터를 형질전환하여 얻은 Hyg, GUS2 #1 (Shin et al., Plant Biotechnol. Rep. 2016)을 사용하였다. *PyGUS* 형질전환체는 ESL 배지를 이용하여 배양하였고 배양 조건은 12°C, 10:14 = L:D로 하였으며 통기 배양을 위하여 통기 배양기와 산소 공급기를 사용하였다
- PtHP-Cas9-sgGUS 벡터를 제작하기 위해 pNssgRNA 벡터(Jeong et al., Microorganisms 2020, 8:1195)의 UEP promoter-NsNpt II-UEP terminator의 UEP 프로모터를 PtHSP70 프로모터로 교체하여 PtHSP70 promoter-NsNpt II-UEP terminator (PtHP-Npt II) 벡터를 제작하였다. 김(*Pyropia*)에서는 *U6* 유전자가 알려져 있지 않으므로 Human, 애기장대, 감자의 *U6* 유전자를 Blast를 통해 공통적으로 보존된 서열을 확보하고 이를 바탕으로 방사무늬김의 전사체 데이터와 상동성을 확인하여 18 bp의 보존된 서열을 확보하였다. *U6* 유

전자의 전사 개시 서열을 확인하고자 이 부분을 프라이머로 제작하고 5' Race PCR을 수행하였다. 5' Race kit (5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, ThermoFisher Scientific, USA)를 통해 확보한 전사 개시 서열을 포함함 *U6* 유전자 서열을 방사무늬김 게놈 서열과 상동성을 확인하여 *U6* 유전자 프로모터와 터미네이터를 포함하는 게놈 서열을 확보하였다. 이로부터 *U6* 프로모터는 *U6* 유전자의 전사 개시 서열에서 5' 상류(upstream) 방향으로 약 1 kb 부분을, *U6* 터미네이터는 *U6* 유전자 서열에서 3' 하류(downstream) 방향으로 약 500 bp 부분을 사용하였다. 이어서 PyU6P-F(KI)/PyU6P-R 프라이머를 사용하여 1,045 bp의 *PyU6* 프로모터를, PyU6ter-F(EI)/PyU6ter-R(SmI-SpI) 프라이머를 사용하여 488 bp의 *PyU6* 터미네이터를 증폭하고 pTOP TA-Blunt V2 벡터에 클로닝하여 염기서열을 확인하고 다음 벡터 제작에 사용하였다

- 가이드 RNA (sgRNA)는 PtHP-GUS-hyg2 벡터 (Shin et al. 2016)가 도입된 김의 *PyGUS* 유전자를 표적으로 하여 서로 다른 위치의 표적 염기서열을 3 군대를 디자인하고, *Py6U* 프로모터와 *Py6U* 터미네이터를 이용하여 PyU6P-sgRNAs-PyU6 terminator 벡터를 제작하였다(sgRNA 벡터). PtHP-GUS-hyg2 벡터와 PtHSP70P-NptII-UEPter 벡터를 각각 HindIII/EcoRI으로 자른 후 접합(ligation)하여 PtHP-GUS-NptII 벡터를 제작하였다. 그리고 PyU6P-sgRNA-PyU6ter를 KpnI/SmaI 처리 후 PtHP-GUS-NptII 벡터에 도입하여 최종 PtHP-Cas9-sgRNA 벡터를 제작하였다 (Fig 3-2)

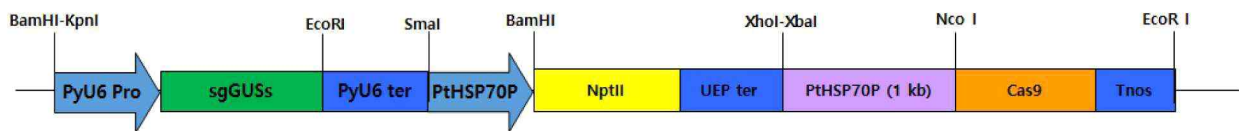


Fig 3-2. PtHP-Cas9-sgRNA vector.

- 시료는 기내 배양한 1~3cm 크기의 Hyg, PyGUS2 #1 엽체를 멸균해수로 적신 여과지 위에 치상하여 준비하였다. 최종 제작한 PtHP-Cas9-sgRNA 벡터를 *E. coli* 에 형질전환시킨 후 플라스미드 DNA를 추출하였다. 추출한 플라스미드 DNA는 KpnI 제한효소로 처리하여 선형(linear form)으로 사용하였다. 0.6 μ m 직경의 금 입자(gold particle)에 PtHP-Cas9-sgRNA 벡터(sgRNA1, 2, 3)를 코팅하여 1,100 psi의 파열판(rupture disk)을 사용하여 형질전환을 수행하였다. 이후 유전자총을 수행한 김 엽체를 ESL 배지에서 24시간 동안 암조건에서 정치배양하였다 (Fig 3-3)

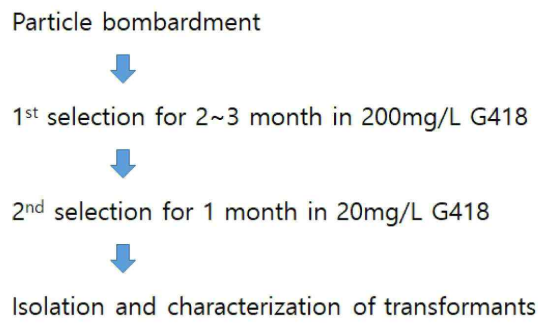
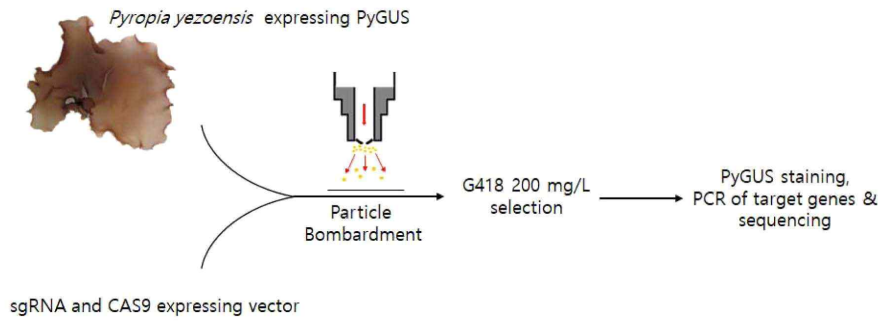


Fig 3-3. 방사무늬김 형질전환 과정

○ ESL 배지에서 하루 동안 암배양한 김 엽체는 G418 200 mg/L 농도의 ESL 배지로 옮겨 선발 과정을 거쳤다. 배양조건은 12°C, 10:14 = L:D로 하였으며 2~3주 간격으로 배지를 교체 해주었다. 2~3달 정도 배양하면 세포사멸로 엽체 전체가 하얗게 탈색되는 것을 관찰할 수 있었다. 현미경으로 관찰하였을 때 1차 선발된 개체가 관찰되었고 이후 항생제 농도를 20 mg/L 농도로 낮추어 배양하였다 (Fig 3-4). 항생제를 통해 선발한 개체의 일부를 잘라 5-bromo-4-chloro-3-indolylglucuronide (X-glc)를 이용한 GUS 염색 버퍼(5mM potassium ferricyanide, 5mM potassium ferrocyanide, 1.5M sorbitol, 2mM X-glc in DMSO, 50mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.5% Triton X-100) 용액에 옮겨 37°C에서 2시간 동안 GUS 염색을 수행하였다. 염색이 되지 않은 개체를 *PyGUS* 유전자 녹아웃 후보군으로 판단하였다



Fig 3-4. GUS knock out 형질전환체 후보군

- sgRNA1, 2, 3에서 각각 131, 133, 86 개체씩 염색을 선발할 수 있었다. 그 중 각각 18, 25, 4 개체에서 GUS 염색이 되지 않는 것을 확인하여 이를 *PyGUS* 유전자 녹아웃 후보군으로 판단하였고, 선발된 개체를 대상으로 유전자 변이를 확인하고자 하였다. GUS 염색이 되지 않은 녹아웃 후보 라인을 현미경을 통해 세포를 확인하였다. GUS 염색이 되지 않는 방사무늬김 야생종(수과원104)과 GUS 염색이 되는 라인(Hyg, *PyGUS2* #1)을 대조구로 사용하였다. *PyGUS* 유전자 녹아웃 후보군은 대부분 야생종과 같이 염색이 되지 않았다(Fig 3-5). 일부 개체에서는 줄무늬 모양으로 염색이 되지 않은 부위와 염색이 된 부위를 동시에 관찰할 수 있었다 (Fig 3-6)

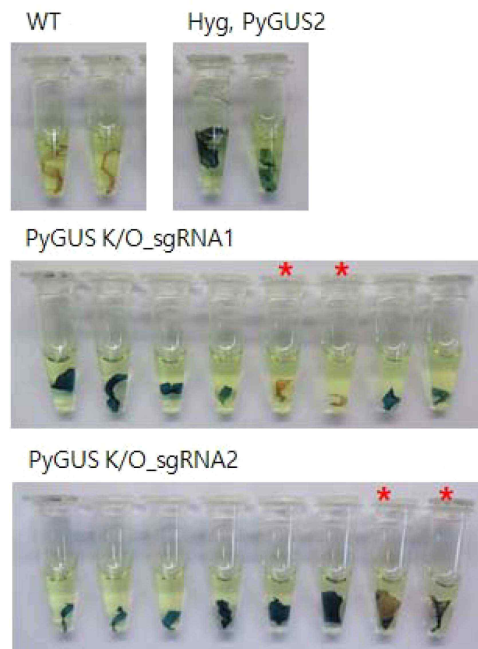


Fig 3-5. GUS knock out 후보군 조직화학적 염색 사진

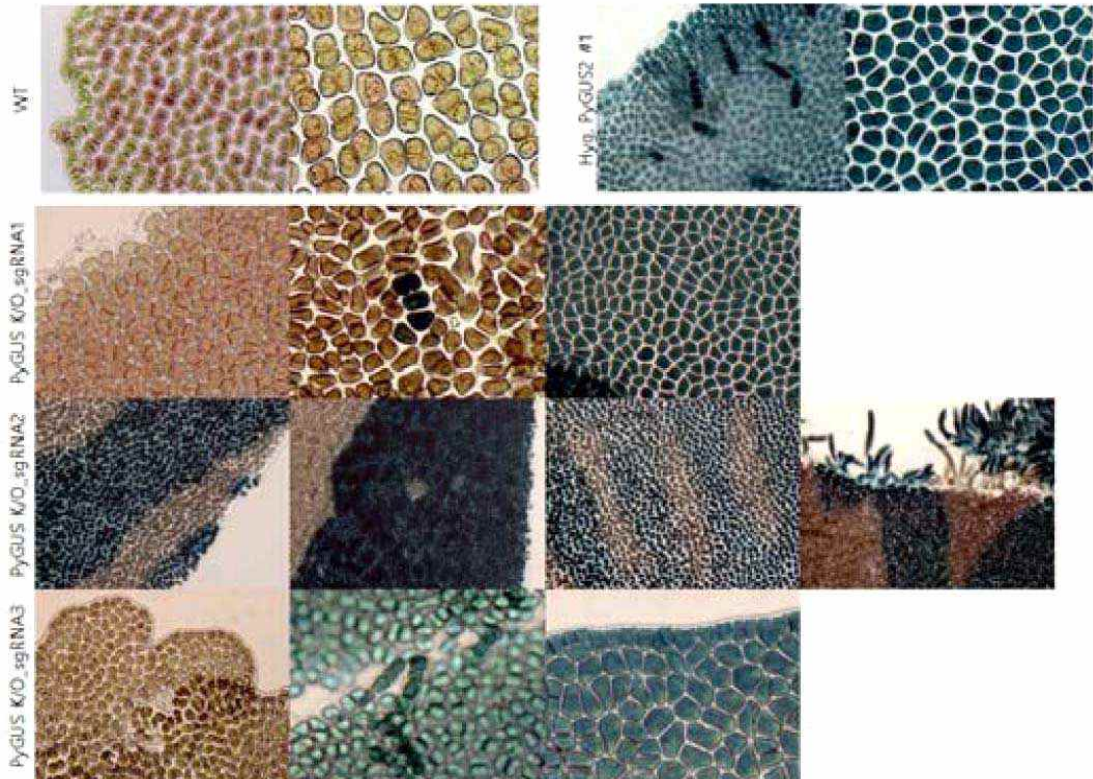


Fig 3-6. GUS knock out 후보군 조직화학적 염색 현미경 사진

- 염색이 되지 않은 개체를 *PyGUS* 유전자 녹아웃 후보군으로 판단하고 변이가 일어난 위치를 찾기 위해 PCR 확인 후 유전자 서열을 확인하였다. 후보군의 어린 엽체에서 Qiagen DNA extraction kit를 사용하여 게놈 DNA를 분리하였다
- 우선 후보군에서 도입된 PyCas9-sgGUS 벡터를 확인하기 위하여 Cas9 유전자에 대한 PCR을 수행하였다. PCR 반응조성은 추출한 게놈 DNA를 주형 DNA로 하여 5U μl^{-1} Ex Taq polymerase (Takara, Japan), 10 mM의 dNTP mix, 5 pmol의 유전자 프라이머 (Cas9_F1/R2)를 첨가한 후 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 변성(denaturation) 98°C에서 20초, 결합(annealing) 60°C에서 30초, 신장(extention) 72°C에서 30초를 30회 반복 수행하여 증폭하였다. 그 결과 추출한 모든 후보군에서 예상 사이즈인 303 bp에서 밴드를 확인하였고 PyCas9-sgGUS 벡터가 도입된 것을 확인할 수 있었다
- 이후, *PyGUS* 유전자가 교정된 부위를 찾기 위하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응조성 및 조건은 상기와 같으며, 프라이머 세트는 PyGUS-F(sg)/R(sg)을 사용하였다. 그 결과, 예상 사이즈인 407 bp 부근에서 밴드를 확인할 수 있었고 확인한 *PyGUS* PCR 산물을 겔 분리 (gel purification)하여 유전자 염기서열을 확인하여 교정부위를 찾고자 하였다 (Fig 3-7)

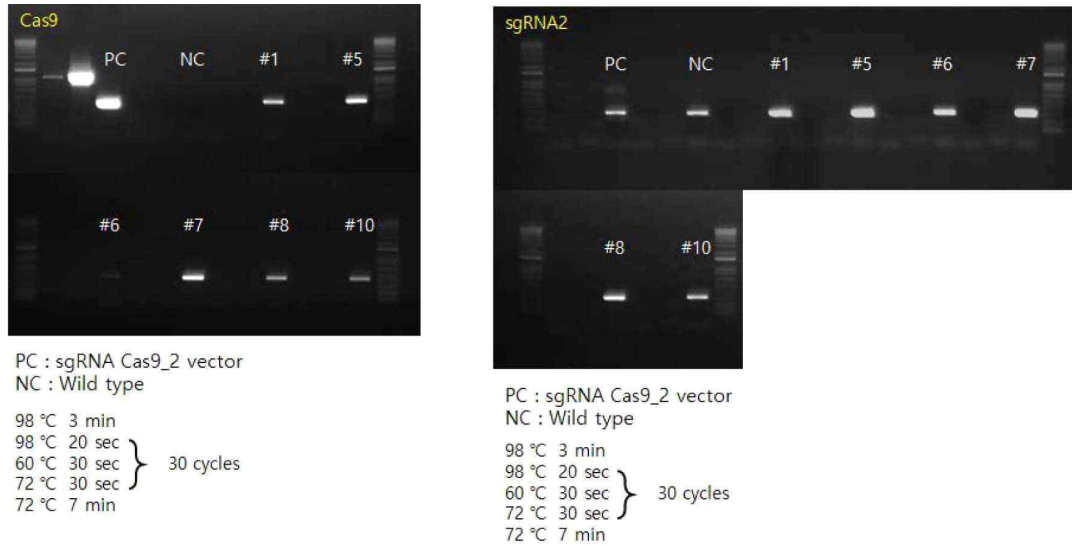


Fig 3-7. GUS knock out 후보군 PCR

- 겔 분리한 PCR 산물을 standard sequencing 방법을 사용하여 서열화하였다(Macrogen, South Korea). 그 결과, sgGUS1 #1 형질전환체에서 2 bp 삽입과 sgGUS2 형질전환체에서 2 bp 결실을 확인하였다(Fig 3-8). Standard sequencing을 통해 얻은 서열은 아미노산 서열로 바꾸어 *PyGUS* 형질전환체와 비교하였다. sgGUS1 #1의 경우 2 bp 삽입된 부분부터 아미노산 서열이 바뀐 것을 확인하였고 sgGUS2 #1의 경우 2 bp 결실된 부분부터 아미노산 서열이 바뀌며 이후 종결코돈이 생성된 것을 확인하였다 (Fig 3-9)

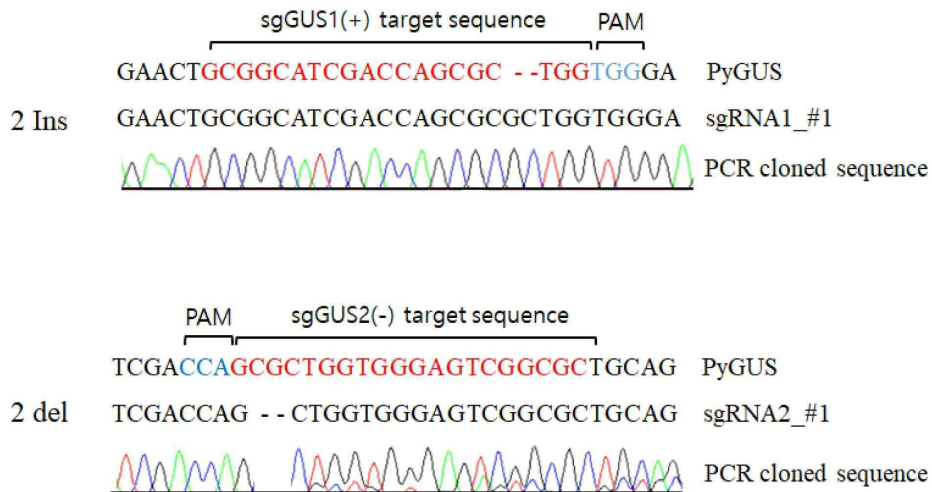


Fig 3-8. GUS knock out 형질전환체 유전자 표적 부위 서열과 크로마토그램.

PyGUS MLRPVETPTREIKKLDGLWAFSLDRENCGIDQRWWESALQESRAIAVPGSFNDQFADAD
 sgRNA1_#1 MLRPVETPTREIKKLDGLWAFSLDRENCGIDQRAGGSRRRCRSRARSRCPARSTTSSRTRTS

PyGUS MLRPVETPTREIKKLDGLWAFSLDRENCGIDQRWWESALQESRAIAVPGSFNDQFADAD
 sgRNA2_#1 MLRPVETPTREIKKLDGLWAFSLDRENCGIDQLVGVAAGVARDRGAR stop

Fig 3-9. GUS knock out 형질전환체 유전자 표적 부위 아미노산 서열.

2) 방사무늬김 색소체 유전자 교정

- 방사무늬김을 이용한 유전자 교정 기술을 확립하기 위하여 방사무늬김 색소체 관련 유전자를 타겟으로 한 벡터를 제작하였다. 실험에 사용된 재료는 국립수산과학원 해조류바이오 연구센터로부터 분양 받은 방사무늬 김(*P. yezoensis*, 수과원104)을 사용했다. 방사무늬김은 ESL 배지에서 12°C, 10:14 = L:D 조건으로 통기 배양기와 산소 공급기를 사용하여 배양하였다
- 가이드 RNA (sgRNA)는 PyPE α , β unit, PyPC α , β unit를 표적으로 하여 서로 다른 위치의 표적 염기서열을 각각 3 군데씩 디자인하였다 (Fig 3-10). 앞선 실험에 사용된 *Py6U* 프로모터와 *Py6U* 터미네이터를 가진 벡터를 이용하여 가이드 RNA 부분만 치환하여 벡터를 제작하였다 (Fig 3-11)

cpcA	
sgRNA1	ATTGCATCTGCTGATAGCCA (+)
sgRNA2	ATATGGGAACTTAGTATATA (-)
sgRNA3	GTTACATATTGTTTAGTTGT (+)
cpcB	
sgRNA4	ACGTTGGATATTACCTTGAA (-)
sgRNA5	GTTAACTACTGCTTAGTTGT (+)
sgRNA6	AACGGATTCAAGATCGGAAC (-)
cpeA	
sgRNA7	CCTCAGCTAATTCAGCCTGG (+)
sgRNA8	GGCTGCTTGCTTAAGAGATA (+)
sgRNA9	TTAGACGATAGATGCTTAAA (+)
cpeB	
sgRNA10	ACGCTCTTCTTGCTGGAGAT (-)
sgRNA11	AAAGAACTTACATCGCTTT (+)
sgRNA12	AAGAGCTGTAAGCATCATGA (+)

Fig 3-10. 방사무늬김 색소체 유전자 타겟 서열

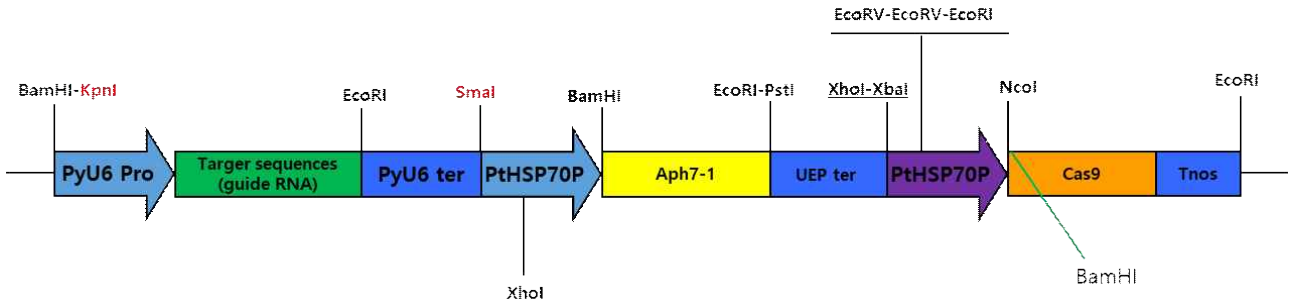


Fig 3-11. PtHP-Cas9-sgRNA vector.

- 시료는 기내 배양한 1~3cm 크기의 방사무늬곰 엽체를 멸균해수로 적신 여과지 위에 치상하여 준비하였다. 최종 제작한 PtHP-Cas9-sgRNA 벡터를 *E. coli* 에 형질전환시킨 후 플라스미드 DNA를 추출하였다. 추출한 플라스미드 DNA는 KpnI 제한효소로 처리하여 선형 (linear form)으로 사용하였다. 0.6 μm 직경의 금 입자(gold particle)에 PtHP-Cas9-sgRNA 벡터(sgRNA 1~12)를 코팅하여 1,100 psi의 파열판(rupture disk)을 사용하여 형질전환을 수행하였다. 이후 Particle bombardment 를 수행한 곰 엽체를 ESL 배지에서 24시간 동안 암조건에서 정치배양하였다
- ESL 배지에서 하루 동안 암배양한 곰 엽체는 Hygromycin 1 g/L 농도의 ESL 배지로 옮겨 선발 과정을 거쳤다. 배양조건은 12 $^{\circ}\text{C}$, 10:14 = L:D로 하였으며 2~3주 간격으로 배지를 교체해주었다. 2~3달 정도 배양하면 세포사멸로 엽체 전체가 하얗게 탈색되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig 3-12). 현미경으로 관찰하였을 때 1차 선발된 개체가 관찰되었고 이후 항생제 농도를 100 mg/L 농도로 낮추어 배양하였다. 이후 선발된 개체가 충분히 성장하면 유전자 교정 부위를 찾기 위한 PCR을 수행할 예정이다

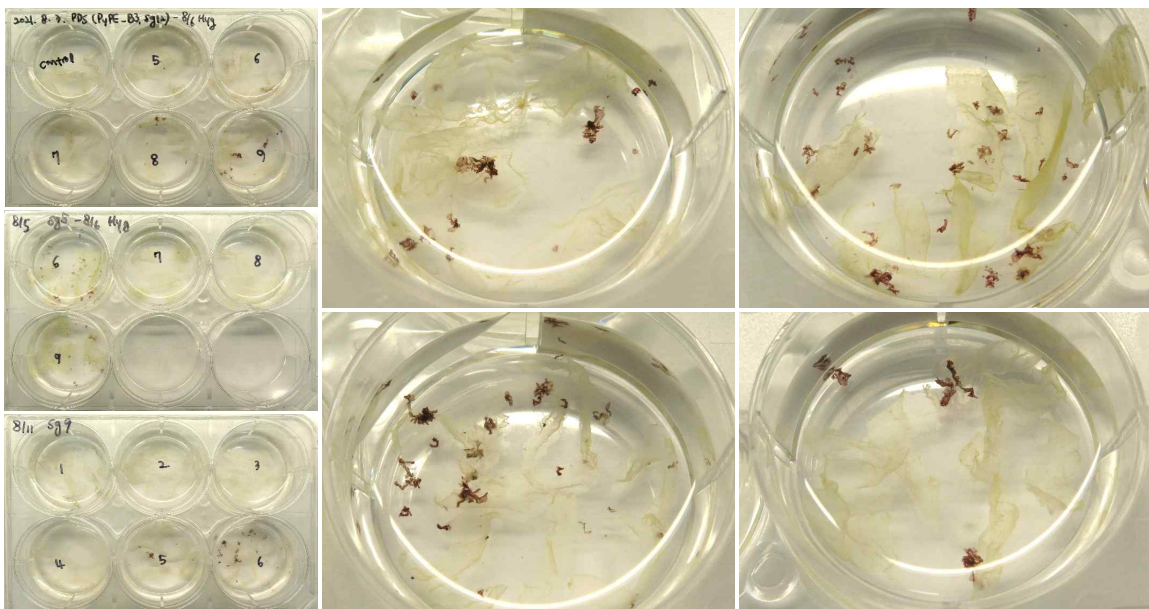


Fig 3-12. 1차 선발한 방사무늬곰 색소체 형질전환체 후보군.

4. 골드2호의 분양 생산을 통한 점유율 확대

- 골드 2호는 일반 방사무늬 김에 비해 20 ℃의 고온에서 빠른 생장을 보이는 세장형 엽체로 2021년 총 300g 의 사상체를 어가에 분양하였다. 충청, 전남지역에서 약 37,500 상자를 채묘할 것으로 예상되고 점차 수요가 증가할 것으로 보임에 따라 유리 사상체의 대량배양을 진행하고 있다 (Fig 4-1)
- 골드 2호 사상체 1g을 3~5L 용적의 통기배양기에서 온도 20 ℃, 조도 30 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, L : D = 14 : 10 조건으로 유지하여 대량 배양하고 있다

국내 종자 판매 실적			
번호	일자	판매처	매출액
2021-1	2021-01-20	선진수산	200g
2021-2	2021-03-16	해림수산	100g

Fig 4-1. 2021년 골드 2호 분양 현황.

제 3 절. 김 발현유전체 정보 탐색 및 활용기술 개발

I. 방사무늬김 DNA 마커 개발 및 적용

가. 방사무늬김 (*P. yezoensis*) 유전체 해독

(1) 방사무늬김 핵 유전체 sequencing 및 assembly

- 방사무늬김 (*Pyropia yezoensis*) 유전체 분석을 위해 표준 품종으로 해조류연구센터에서 개발한 수과원104 품종을 사용하였다. 방사무늬김 수과원 104 품종은 해조류연구소에서 분양받아 연구실에서 배양하면서 시료로 사용하였다. 방사무늬김 수과원 104 품종은 선발된 김 gametophyte (n)로부터 순계화과정을 거쳐 만들어진 순계 line (double haploid)이다.
- 방사무늬김 수과원104 gametophyte로부터 Total DNA를 분리하고 genome sequencing을 위한 shotgun library, mate-pair library, PacBio platform sequencing library를 구축하고 아래 Table 3.3.1과 같이 각각의 library로부터 sequencing을 수행하였다.

Table 3.3.1. Statistics of NGS sequencing of the *P. yezoensis*

Statistics of <i>P.yezonesis</i> NGS sequencing						
NGS	Library		Sequence data (Q ≥ 20, bp)		Data clean up (Deconseq)	
					Genome (bp)	Other organisms (bp)
Illuminai (HiSeq4000)	300 bp	Paired End	20,093,360,350	44,986,343,417	43,895,689,196	773,152,758
	3 kb	Mate Pair	24,892,983,067			
PACBIO (RSII)	10 kb	Long read	13,070,008,185	13,070,008,185	13,070,008,185	
Sum				58,056,351,602	56,965,697,381	773,152,758

Deconseq DB: human, virus, fungi, micorb, E.coli

- Assembly 결과 *P. yezoensis* 유전체 서열은 638개의 scaffold를 구성하였고, 약 104.4 Mb를 크기를 보였다 (Table 3.3.1). 참김 (*P. tenera*) 유전체 서열은 513개의 scaffold를 구성하였고, 약 132.0Mb의 크기를 보였다. 생성된 서열 중 많은 서열이 bacteria 또는 other eukaryote 서열로 판단되었으며, 이들 서열은 assembly에서 제외하였다. 방사무늬김과 참김은 모두 약 64%의 높은 GC%를 보였다.

Summary statistics for the three bins into which scaffolds were separated							
Statistic	P.yezonesis		P.tenera		P.umbilicalis		
	Main genome	Other eukaryote + Bacteria	Main genome	Other eukaryote + Bacteria	Main genome	Other eukaryote	Bacteria
% GC	64.51	55.81	64.08	55.95	65.78	60.21	56.19
Main genome scaffold total	638	1,707	513	2,137	2,125	180	847
Main genome contig total	1,286	1,726	513	2,137	2,183	180	847
Main genome scaffold sequence total	104.4Mb	142.2Mb	132.0Mb	105.0Mb	87.7Mb	21.2Mb	64.5Mb
Main genome contig sequence total	104.3Mb (0.1% gaps)	142.2Mb (0.0% gap)	132.0Mb (0.0% gap)	105.0Mb (0.0% gap)	87.6 Mb (0.1% gaps)	21.2Mb (0.0% gap)	64.5Mb (0.0% gap)
Main genome scaffold N/L50	144/241.6kb	34/379.0kb	96/411.6kb	16/458.9kb	130/202.0kb	17/473.0kb	14/872.0 kb
Main genome contig N/L50	297/108.5kb	34/369.1kb	96/411.6kb	16/458.9kb	137/188.0kb	17/473.0kb	14/872.0 kb
Number of scaffolds > 50 kb	528	386	443	173	436	58	154
% main genome in scaffolds > 50 kb	96.42%	76.01%	98.31%	65.48%	88.40%	93.80%	86.20%

Figure 3.3.1 Statistics of Assembly and sequencing of the *P. yezoensis*, *P. tenera* and *P. umbilicalis*

- 확보된 약 114Mb의 방사무늬김과 약 132Mb의 참김 핵 유전체를 대상으로 repeat sequence를 분석한 결과 방사무늬김은 전체 genome의 약 43%가 repeat sequence로 구성됨을 보였다.(Table 3.3.2) Repeat sequence 중 LTR element가 가장 높은 비율로 분포하였다.

Table 3.3.2. Summary of repetitive sequences in *P. yezoensis* genome

Elements	# of elements	length occupied(bp)	% of sequence
SINEs:	40	2,566	0.00%
ALUs	0	0	0.00%
MIRs	0	0	0.00%
LINEs:	243	270,242	0.24%
LINE1	3	6,657	0.01%
LINE2	0	0	0.00%
L3/CR1	0	0	0.00%
LTR elements:	9,481	27,030,086	23.66%
ERVL	0	0	0.00%
ERVL-MaLRs	0	0	0.00%
ERV_classI	0	0	0.00%
ERV_classII	0	0	0.00%
DNA elements:	3,463	2,244,095	1.96%
hAT-Charlie	0	0	0.00%
TcMar-Tigger	333	250,255	0.22%
Unclassified:	19,631	19,152,714	16.76%
Total interspersed repeats:		48,699,703	42.62%

(2) 방사무늬 김 핵 Gene annotation

- 방사무늬 김 핵 유전체로 판단한 685개 scaffold를 대상으로 유전자를 분석하기 위해 아래 Figure 3.3.2와 같은 전략을 확립하였다. RNA sequence data는 총 12개의 cDNA library로부터 생성된 RNA seq data가 사용되었으며, 방사무늬 김의 엽상체 RNA seq data로부터 만들어진 unigene list가 함께 사용되었다. 또한 일본팀에서 발표된 방사무늬 김 (partial genome sequence) 유전자 정보도 함께 사용되었다.

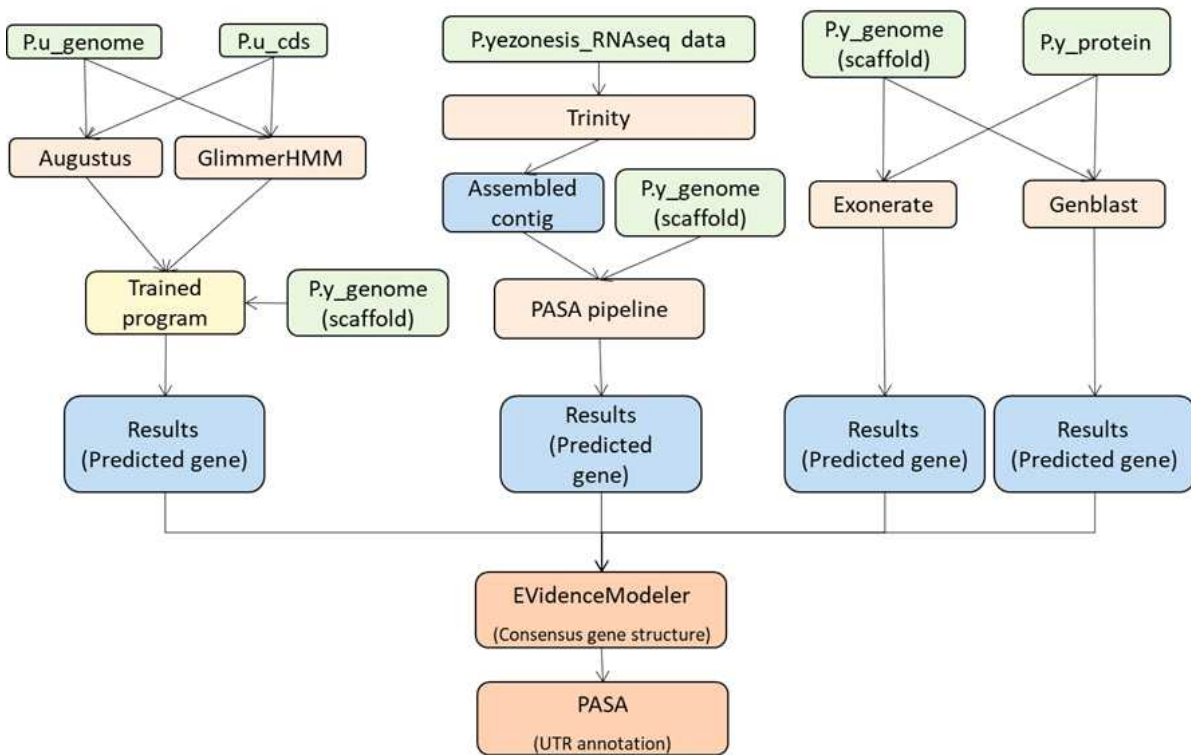


Figure 3.3.2. Flow chart for gene prediction of *P. yezoensis*

Table 3.3.3 Summary of annotation of draft-genome of *P.yezoensis* and *P. tenera*

Annotation	Species	Gene number
	<i>P.yezoensis</i> , 104	12,123
	<i>P. tenera</i>	14,799
	<i>Phophyra umbilicalus</i>	10,327
	<i>P.yezoensis</i> , Tu	13,125
	<i>Py_Tu</i> : 2013년 일본 연구팀 분석에 사용된 <i>P. yezoensis</i>	

- 방사무늬김 (*P. yezoensis*, 수과원 104) draft-genome으로부터는 총 12,123개의 유전자가 참김 (*P. tenera*)로부터는 총 14,799개의 유전자가 annotation 되었다. (Table 3.3.3)

- annotation된 유전자들을 방사무늬김, 참김 그리고 *Porphyra umbilicalis*와 비교한 결과 방사무늬김은 참김과 가장 높은 matching percent를 보였다. (Table 3.3.4)

Table 3.3.4 comparison of the gene identity annotated in draft-genome sequence of *P. yezoensis*, *P. tenera* and *P. umbilicalis*

Py104-12,123 vs Pt-14,799				
Matched length(bp)	Matched CDS	% Matched	AV length(bp)	Identity(%)
≥1	11,111	75.08	628.67	95.94
≥100	10,389	70.20	668.50	96.06
≥150	9,984	67.46	690.58	96.19
≥200	9,508	64.25	716.41	96.30
Py104-12,123 vs Py_Tu-13,125				
Matched length(bp)	Matched CDS	% Matched	AV length(bp)	Identity(%)
≥1	9,092	69.27	545.79	98.50
≥100	7,296	55.59	670.16	99.07
≥150	7,000	53.33	693.19	99.20
≥200	6,642	50.61	721.07	99.29
Py104-12,123 vs Pu-10,327				
Matched length(bp)	Matched CDS	% Matched	AV length(bp)	Identity(%)
1~99	8,818	85.39	285.42	88.55
~100	5,071	49.10	459.81	84.51
~150	4,305	41.69	519.63	84.23
~200	3,703	35.86	575.86	84.13

- annotation된 유전자들의 기능 분석 결과 metabolic process에 관여하는 유전자가 가장 많은 비율을 차지하였다. (Figure 3.3.3)

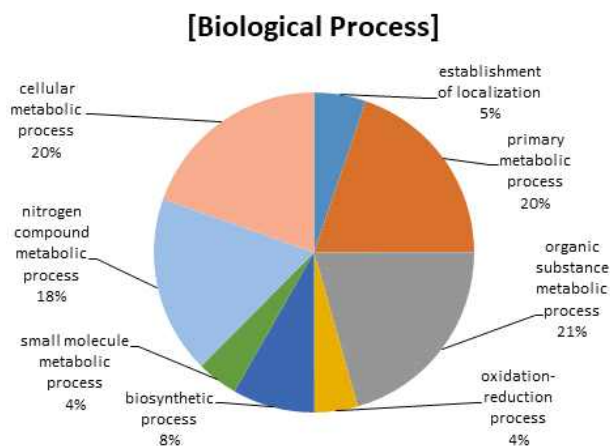


Figure 3.3.3 GO analysis of annotated genes in *P. yezoensis* draft-genome

(3) 김 유전체 database construction

- 확보된 방사무늬김 (*Pyropia yezoensis*, 수과원 104)과 참김 (*Pyropia tenera*)의 draft-genome sequence 그리고 annotation된 gene list를 blast를 이용해 검색할 수 있는

database를 구축하였다.



Figure 3.3.4 Algae BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

나. 김 DNA SSR 마커 개발

(1) 방사무늬 김 (*Pyropia yezoensis*) SSR 분석

- 방사무늬 김 (*Pyropia yezoensis*)의 품종 수과원104 핵 유전체로부터 생성된, draft genome sequence (636개의 scaffold, 104.4 Mb)를 대상으로 SSR 분석을 수행하였다.
- Di-re[eat SSR은 8회 이상, Tri-repeat SSR은 5회 이상 반복되고, Tetra-, Penta- and Hexa-repeat SSR은 4회 이상 반복되는 서열을 선별하였다.
- 방사무늬김 유전체로부터 총 23,120개의 SSR이 선별되었다. 방사무늬 김 유전체로부터 선별된 SSR은 아래 Table 3.3.5에 정리하였다. 100bp 이내에 2개의 SSR이 위치하는 경우 combined SSR로 정리하였다.(Table 3.3.6)
- 전체 SSR 중 Tri-repeat nucleotide SSR이 가장 높은 비율(71.7%)로 나타났다. Tri-repeat SSR 주에서도 GGC type (GGC/GCG/CGG/GCC/CCG/CGC) motif가 22,092개로 가장 높은 빈도 (85.9%)로 발견되었다 (Table 3.3.6).

Table 3.3.5. Summary of simple sequence repeats (SSRs) identified in the *Pyropia* genome

Repeat type	Repeat number	Total SSR length	Frequency	Relative frequency
di	8–26	16–52	257	1.1%
tri	5–33	15–99	16,583	71.7%
tetra	4–26	16–104	954	4.1%
penta	4–15	20–75	191	0.8%
hexa	4–37	24–222	764	3.3%

combined*	-	-	4,371	18.9%
total	-	-	23,120	100.0%

Table 3.3.6. Distribution of tri-nucleotide simple sequence repeat (SSR) motifs identified in the nuclear genome of *Pyropia yezoensis*

Tri- nucleotide repeat	Frequency	Relative frequency
AAT (AAT/ATA/TAA/ATT/TTA/TAT)	3	0.01%
AAG (AAG/AGA/GAA/CTT/TTC/TCT)	35	0.14%
AAC (AAC/ACA/CAA/GTT/TTG/TGT)	61	0.24%
ATG (ATG/TGA/GAT/CAT/ATC/TCA)	12	0.05%
AGT (AGT/GTA/TAG/ACT/CTA/TAC)	2	0.01%
AGG (AGG/GGA/GAG/CCT/CTC/TCC)	485	1.89%
AGC (AGC/GCA/CAG/GCT/CTG/TGC)	970	3.77%
ACG (ACG/CGA/GAC/CGT/GTC/TCG)	484	1.88%
ACC (ACC/CCA/CAC/GGT/GTG/TGG)	1,552	6.04%
GGC (GGC/GCG/CGG/GCC/CCG/CGC)	22,092	85.97%

(2) SSR 마커 후보 선발 및 적용

- DNA 마커 개발을 위한 후보는 우선 전체 반복 서열이 24이상 (2 repeat, 12이상, 3 repeat는 8회 이상, 4 x 6, 5 x 5, 6 x 4)인 SSR을 선발하였다.
- PCR을 위한 primer는 SSR의 up-stream 및 down-strem으로 약 500bp 이내에서, PCR product는 150~350bp가 되게 design하였다. Design된 PCR primer는 김 유전체 서열에 mapping하고 target site가 하나로 판단된 primer 조합을 선발하였다.
- 선발된 primer는 방사무늬김 품종 수과원 104호와 해풍 1호 핵 유전체 DNA를 template로 PCR를 수행하고 변이를 조사하였다.
- 총 353개의 SSR를 선발하여 PCR한 결과 228개의 SSR primer set에서 성공적으로 PCR 산물을 얻으며, 그중 53개의 SSR이 실험에 사용한 품종간 변이를 보였다.
- Polymorphism을 보이는 SSR를 수산식물품종보호시스템에 등록되어 있고, 국내 어가에서 재배되고 있는 총 16개 품종 (Table 3.3.7)을 대상으로 적용했을 때 모든 품종에서 PCR 단편을 증폭하고 안정적으로 동일 대립유전자를 생성하는 SSR만을 최종 SSR 마커로 선발하였다.

Table 3.3.7. *Pyropia yezoensis* cultivars included in the present study

Code	Cultivar	Origin	Characteristic	
			Blade type	Other
Gold1	Gold1	Korea	slender blade	pathogen tolerant
Gold2	Gold2	Korea	broad blade	heat tolerant
EB 6	Ebisu 6	Japan	slender blade	-
SG104	Sugawon 104	Haenam, Korea	slender blade	early harvest
SG105	Sugawon 105	Haenam, Korea	slender blade	early growth, superior color and gloss
SG106	Sugawon 106	Muan, Korea	broad blade	monospore rich
SG108	Sugawon 108	Shinan, Korea	broad blade	monospore rich, high yield
SG109	Sugawon 109	Shinan, Korea	broad blade	monospore rich
SG110	Sugawon 110	Busan, Korea	slender blade	high yield
SG111	Sugawon 111	Jindo, Korea	broad blade	monospore rich, early harvest
SG112	Sugawon 112	Shinan, Korea	slender blade	monospore rich
SG114	Sugawon 114	Jindo, Korea	broad blade	monospore rich, superior color
JS2	Jeonsu 2	Shinan, Korea	broad blade,	monospore rich, early growth, high yield
HP1	Haepoong 1	Haenam, Korea	broad blade	monospore rich, high yield
HP2	Haepoong 2	Haenam, Korea	broad blade	-
HG	Hagkari	Haenam, Korea	broad blade	monospore rich, low yield

- 반복 실험을 통해 최종적으로 확인된 결과는 6개의 SSR (Py7908, Py14178, Py12748, Py18354, Py10860)이 3개의 대립유전자를 생성하였고 나머지 SSR은 모두 단지 2개의 대립유전자를 생성하였다.
- 최종적으로 *P. jezoensis* 품종의 유전적 다양성을 평가하기 위해 DNA marker로 12개의 SSR이 선택되었다. 최종적으로 선발된 12개의 SSR 프라이머 세트의 SSR 모티프 및 프라이머 서열은 Genebank에 등록하였으며 Table 3.3.8에 요약하였다.

Table 3.3.8. Simple sequence repeat (SSR) markers and corresponding primers

SSR ID	Motif*	Location**	Accession number***	Forward primer	Reverse primer
Py7908	(TGG)27	Intergenic seq	MW574008	AGCGACGGTAGCAGTTCAGT	CTCCCCTGGTGGCTCTT
Py14178	(GACC)7	Intergenic seq	MW574009	AGCATTGGTCAGTCAGAGGG	GTTGGTGGTTGTTCCAACG
Py12748	(GCA)20	Intergenic seq	MW574010	CTCTTCCCTCTCCCCCTC	GGGAAACCAGCCACGTC
Py18354	(GGC)16	Intergenic seq	MW117145	ATCCTATGAGCGACCTGGTG	CGGCGAAAAATTGAAGTAAT G
Py10860	(GCG)8	Intergenic seq	MW574011	GCTGGGAGCTAAGGAGGAC T	GGCTTAGTCGAACGACCGTA
Py13740	(GTT)20	Exon	MW574012	GGCTCCGTCATCGTATCACT	AACGCCAACAACAACAACA A

Py2036	(GCC)10	Intergenic seq	MW574013	GGGTCATGGGATGTGTAGGA	GGAAACGGGTTGTTTGATGT
Py18840	(AT)21	Intergenic seq	MW574014	CAAACGCAGGTGTCTTCTGA	GCCAATACAATGAGCCATGA
Py10891	(GCG)8	Intron	MW574015	ATTGGCGTGAGTAGTGAGGG	GTCTCCTTCAACCCCTCTGC
Py5233	(CCCCT)7	Intergenic seq	MW574007	GGGTACCTCAAAACCGTGTG	CTGGAAGAGAGGAGCGTCA C
Py20987	(CTG)8	Exon	MW574016	AGCGCCAAGAATCAATCAAT	ATCAGTACGGAGGAGGACG A
Py8596	(CGG)9	Intron	MW574017	GGCCATGATTAATGAACGGT	ATAGTCATAGCCGCGAGCAC

* number indicate repeat times; **seq: sequence; ***, Genbank accession number

- 각 SSR 프라이머 쌍은 *P. yezoensis* 품종에 따라 동일하거나 다른 크기의 PCR 단편을 생성했습니다. SSR 프라이머 세트에 의해 증폭된 대부분의 PCR 산물은 모든 *P. yezoensis* 품종에서 피크 스캐너에 의해 고유한 크기로 검출되었습니다. 예를 들어 Figure 3.3.4은 SSR Py10860의 PCR 산물의 스캔 이미지를 보여줍니다. SSR Py10860은 분석된 *P. yezoensis* 품종에 따라 3가지 다른 크기(339, 348, 351bp)의 PCR 산물을 증폭했습니다. 이 SSR 마커는 품종 SG106 및 SG108에서 339 bp PCR 산물로, 품종 HG, HP1, HP2, SG109, SG111, SG114, JS2에서 348 bp PCR 산물로, 351 bp Ev6, SG104, SG105, SG110 및 SG112에서는 351 bp PCR 산물로 검출되었습니다.(Figure 3.3.4)

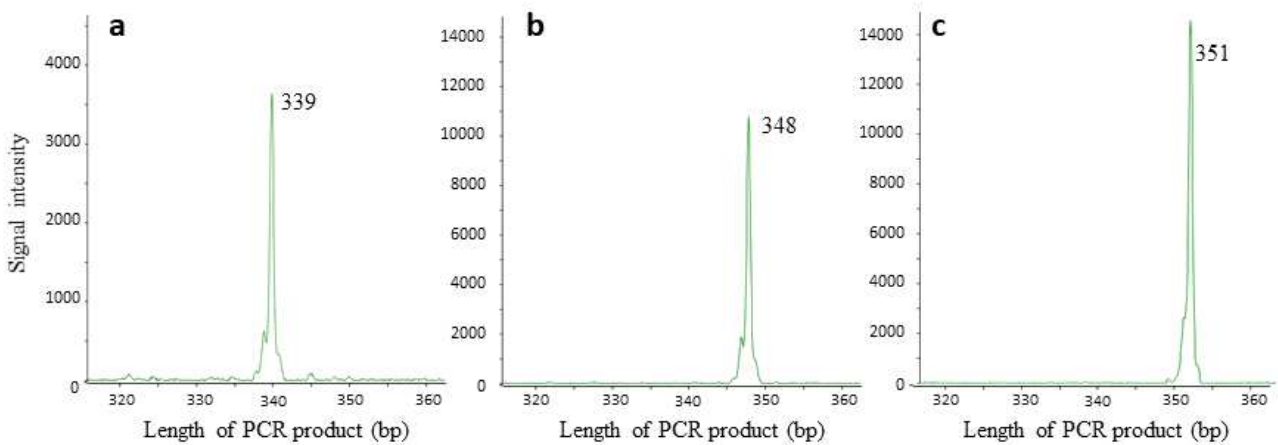


Figure 3.3.4. Peak scan image of PCR products produced by simple sequence repeat (SSR) marker Py10860 from different *Pyropia yezoensis* cultivars. PCR products were analyzed using an ABI 3730XL sequencer and determined using Peak Scanner. SSR marker Py10860 amplified PCR products of three different sizes, depending on the cultivar, including PCR products of (a) 339 bp in cultivars SG106 and SG108; (b) PCR products of 348 bp in cultivars Gold1, HG, SG109, SG111, SG114, HP1, HP2, and JS2; and (c) PCR products of 351 bp in cultivars Gold2, EB6, SG104, SG105, SG110, and SG112.

- 12개의 SSR 프라이머 세트를 사용하여 16개의 *P. yezoensis* 품종으로부터 PCR에 의해 증폭된 단편의 길이는 Table 3.3.9 에 요약되어 있습니다. 12개의 SSR 유전자좌는 유전자좌당 2 개에서 3개의 대립형질 범위의 총 30개 대립형질을 산출했습니다. 6개의 Py7908, Py14178,

Py12748, Py18354, Py10860 및 Py13740 SSR은 3개의 대립 유전자를 생성하고 6개의 다른 SSR은 Py2036, Py18840, Py10891, Py5233, Py5233은 2개의 대립유전자를 생성하였음

Table 3.3.9 Sizes of simple sequence repeat (SSR) markers amplified by PCR from the genomic DNA of 16 *Pyropia yezoensis* cultivars.

SSR ID	Cultivars															No. allele	
	Gold1	Gold2	EB6	SG104	SG105	SG110	SG112	HP1	HP2	SG108	HG	SG106	SG109	SG111	SG114		JS2
Py7908	254	296	296	296	296	296	296	254	263	263	263	263	254	254	254	254	3
Py14178	273	277	277	277	277	277	277	273	^{265/27} ₃	265	265	265	273	273	273	273	3
Py12748	272	290	290	290	290	290	290	272	275	275	272	275	272	272	272	272	3
Py18354	313	319	319	319	319	319	319	313	313	301	301	301	313	313	313	313	3
Py10860	348	351	351	351	351	351	351	348	348	339	348	339	348	348	348	348	3
Py13740	341	344	344	344	344	344	344	341	341	341	^{344/35} ₆	341	341	341	341	341	3
Py2036	313	325	325	325	325	325	325	313	313	313	325	313	313	313	313	313	2
Py18840	346	350	346	350	350	350	350	346	350	350	346	350	346	346	346	346	2
Py10891	159	156	156	156	156	156	156	159	159	159	156	159	159	159	159	159	2
Py5233	320	330	330	330	330	330	330	320	^{320/33} ₀	320	320	320	320	320	320	320	2
Py20987	333	342	342	342	342	342	342	333	333	333	^{333/34} ₂	333	333	333	333	333	2
Py8596	249	255	249	255	255	255	255	249	249	249	249	249	249	249	249	249	2

- 특정 SSR 프라이머 세트에 의해 증폭된 각각의 PCR 단편을 단일 유전자좌로 간주되며, 각 유전자좌에 대해 동일한 분자량을 갖는 PCR 단편을 동일한 대립유전자로 간주된다. 본 연구에 사용된 모든 *P. yezoensis* 품종의 *conchocelis*(2n)는 반수체 단포자(n)로부터 순계화된 double haploid (2n)계통이다. 따라서 각 품종의 *conchocelis*는 동형접합체로 가정되고 각 SSR 유전자좌에 대해 단일 대립유전자를 산출할 것으로 예상되었다.

- 본 연구에서 대부분의 SSR 프라이머 세트에 의해 증폭된 PCR 산물은 모든 *P. yezoensis* 품종에서 1개의 고유한 크기로 검출되었습니다 Table 3.3.9 이러한 결과는 이 연구에 사용된 대부분의 품종이 반수체 단포자로부터 발달된 double haploid 계통(2n)임을 입증한다.

- 그러나 여러 SSR 마커는 HP2 및 HG 품종에서 두 가지 다른 크기의 PCR 산물을 생산했습니다. SSR 마커 Py14178 및 Py5233은 품종 HP2에서 두 가지 크기의 PCR 산물을 생산했으며 SSR 마커 Py13740 및 Py20987은 품종 HG에서 두 가지 크기의 PCR 산물을 생산했습니다 (Figure 3.3.5). 이러한 결과는 HP2 및 HG 품종이 순계화 과정을 거치지 않는 heterozygote임을 보여준다.

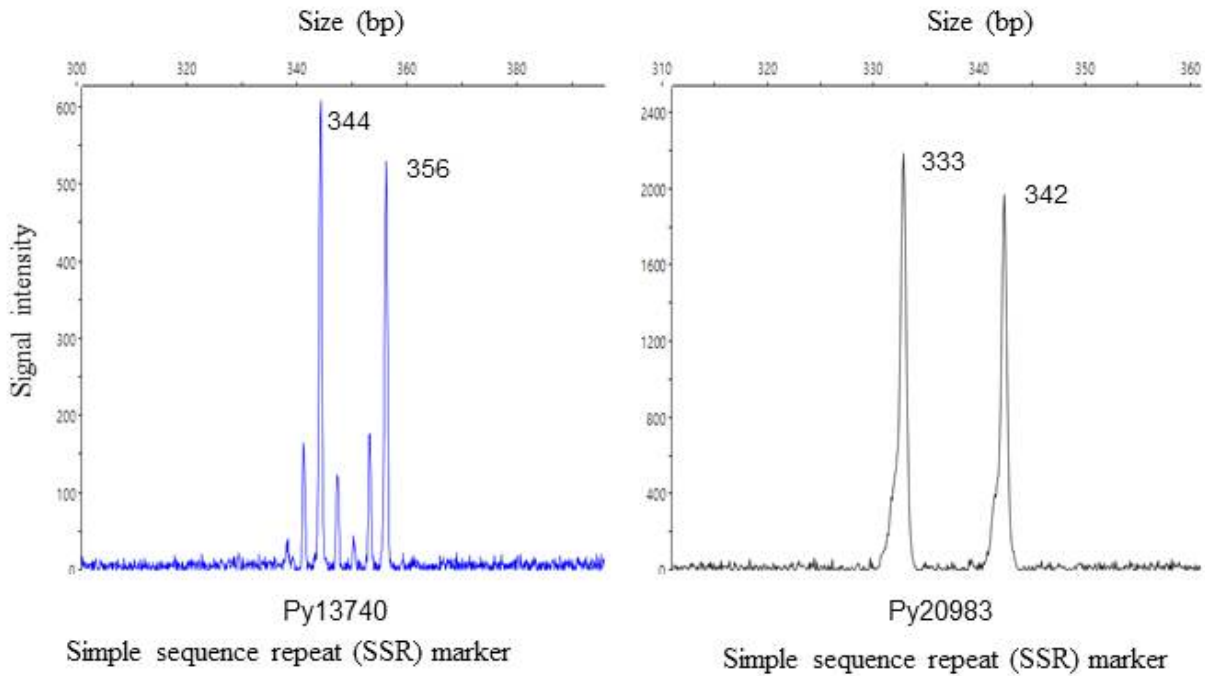


Figure 3.3.5 Peak scan image of PCR products produced by simple sequence repeat (SSR) markers Py13740 and Py20983 from *Pyropia yezoensis* cultivar HG (for details on the cultivars, see Table 1). SSRs Py14178 and Py5233 produced PCR products of two different sizes from cultivar HG, respectively.

- Dice's smilarity coefficients를 계산하여 본 연구에 사용된 *P. yezoensis* 품종 간의 유전적 관계를 평가하는 데 사용했습니다. *P. yezoensis* 품종의 Dice's smilarity coefficients 값은 0.0에서 1.0 사이였습니다. UPGMA 클러스터 분석를 사용하여 구성된 dendrogram은 분석에 사용된 방사무늬 김 품종이 크게 두 개의 주요 클러스터로 분리될 수 있음을 보여주었습니다 (Figure 3.3.6).

- 클러스터 I에는 Gold2, EB6, SG104, SG110, SG112 및 SG105를 포함한 4가지 품종이 포함되었습니다. 품종 EB6은 일본 품종으로 다른 4개 품종과 분리되었습니다. 클러스터 II에는 3개의 하위 그룹이 포함되었습니다. 한 가지에는 단일 품종(HG)만 포함되고, 두 번째 가지에는 6개의 품종(JS2, SG114, SG111, SG109, gold1호 및 HP1)이 포함되고, 세 번째 가지에는 3개의 품종(HP2, SG106 및 SG108)이 포함됩니다.

- 첫 번째 군집에 속하는 모든 품종은 가느다란 형태의 칼날을 가지고 있는 반면, 두 번째 군집의 모든 품종은 넓은 형태의 칼날을 가지고 있다(Table 3.3.7, Figure 3.3.6).

- 선택된 SSR을 *P. yezoensis* 품종 SG104의 scaffold-genome에 mapping한 결과, 선택된 SSR의 대부분은 *Pyropia* 게놈의 intergenic sequence 영역에 위치했지만 3개의 SSR은 gene의 엑손 또는 인트론에 위치함을 나타냅니다. SSR Py8596은 추정되는 sentrin-specific protease 1을 인코딩하는 유전자의 첫 번째 인트론에 매핑되었습니다. SSR Py13740 및 Py20987은 모두 hypothetical gene의 엑손에 mapping 되었다.

- 불행히도 첫 번째 클러스터의 품종 Gold2, SG104, SG110, SG112 및 SG105와 두 번째 클러스터의 품종 JS2, SG114, SG111, SG109, Gold1 및 HP1은 12개의 SSR 마커를 사용하여 구별할 수 없었다. 이러한 결과는 이들 품종이 유전적으로 매우 유사하고 품종을 구별하기 위해서

는 다른 SSR 마커의 개발이 필요함을 보여준다. 이 연구에서 선발된 SSR 마커는 방사무늬김 genome으로부터 분석된 SSR의 일부이며, 그 중 소수만이 test에 적용되었다. 보다 많은 SSR를 적용하면 현재로는 구별되지 않는 품종을 식별할 수 있는 SSR를 찾을 수 있을 것이다.

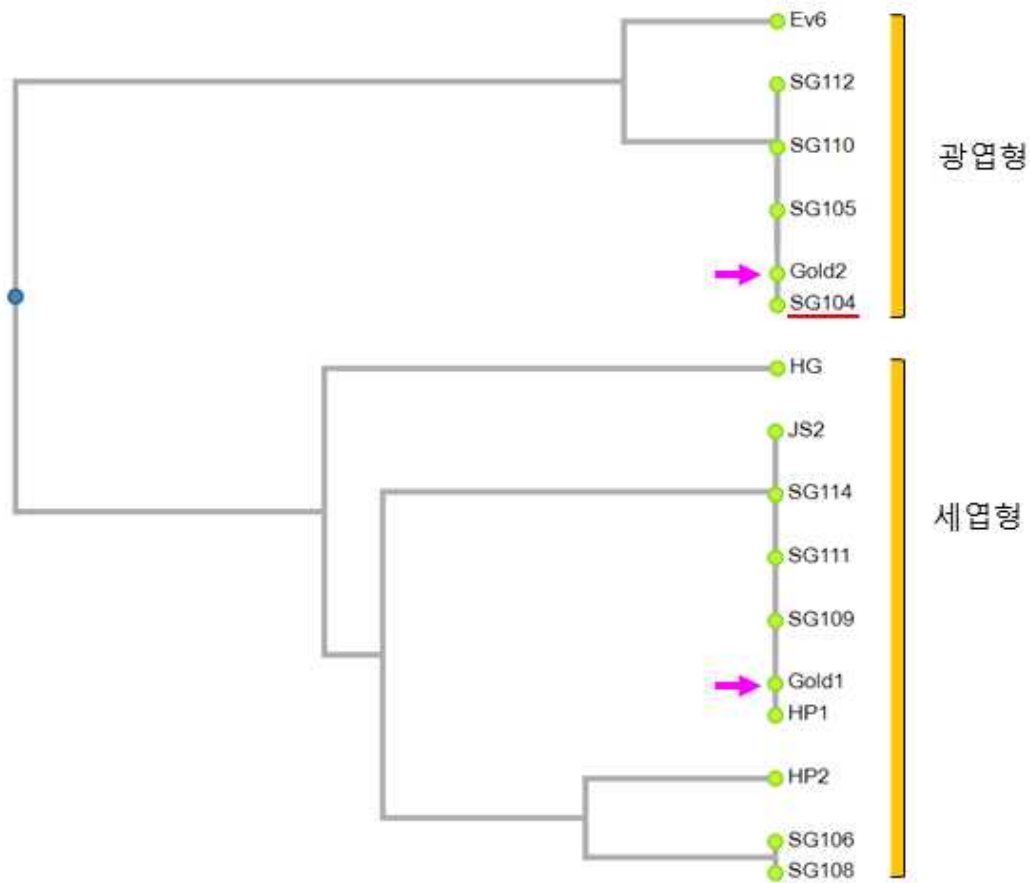


Figure 3.3.6. Simple sequence repeat (SSR)-based dendrogram of *Pyropia yezoensis* cultivars. The tree is based on unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA) cluster analysis and Dice's similarity coefficients, with allelic diversity data from 12 SSR markers (30 alleles).

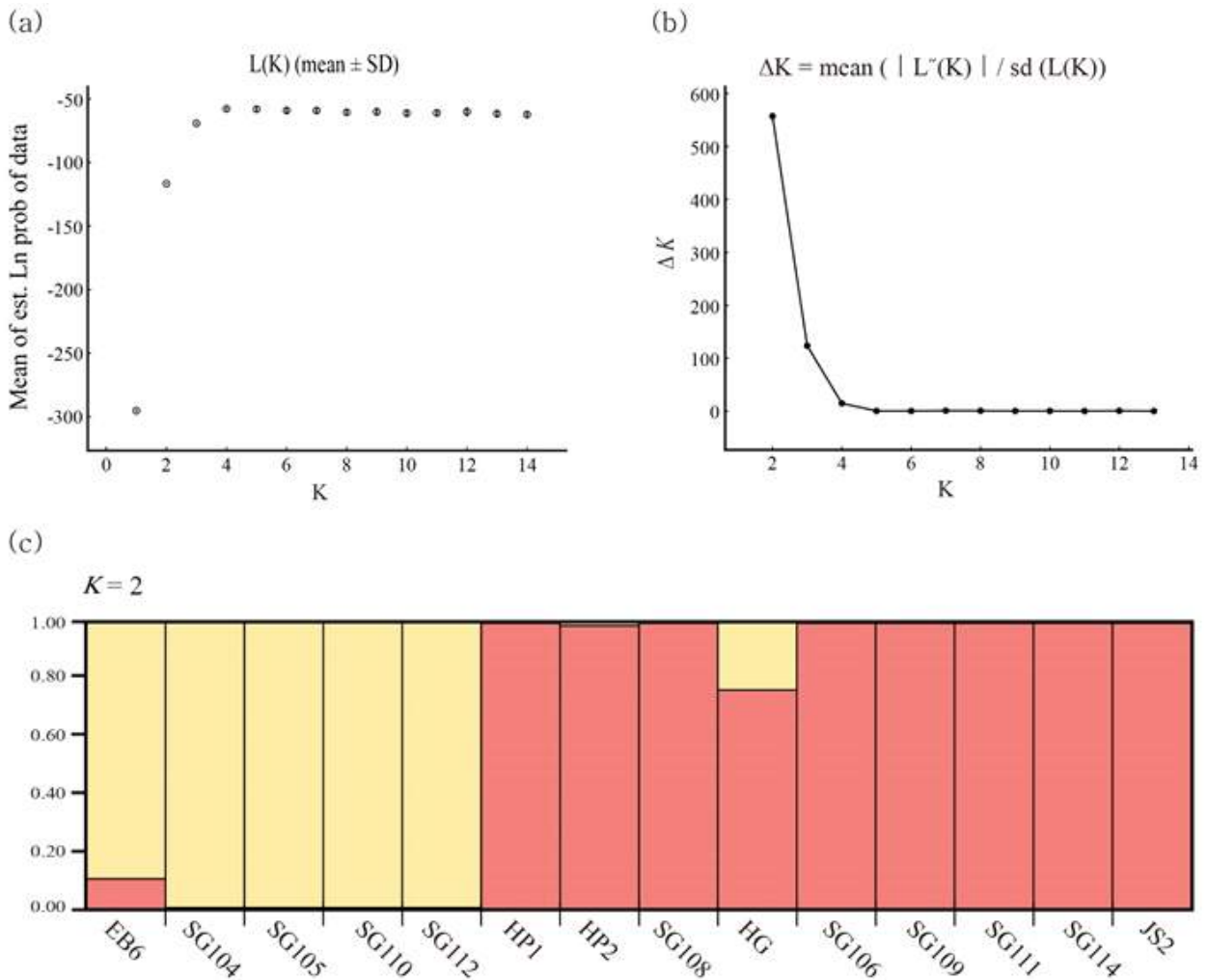


Figure 3.3.7 STRUCTURE analysis of simple sequence repeat (SSR) data from 14 *Pyropia yezoensis* cultivars used in the present study (for details on the cultivars, see Table 3.3.7.). (a) Mean log likelihood of the data [$L(K)$]. (b) Evanno's delta K statistic. (c) Bar plot for $K = 2$ and $K = 10$, including two clusters and four clusters, respectively

- 본 연구에 사용된 방사무늬김 품종의 품종 구조는 STRUCTURE(v 2.3; Earl 및 vonHoldt 2012)에서 구현된 베이지안클러스터링 접근법을 사용하여 분석되었다. 방사무늬김 품종의 유전적 구조 분석을 위해 STRUCTURE HARVESTER의 K 방법을 사용하여 최적의 클러스터 수 (K)를 결정했다.

- 가장 높은 델타 K 값은 $K=2$ 에서 얻어졌는데, 이는 품종이 두 개의 클러스터로 분리될 수 있음을 나타

낸다(Figure 3.3.7 a,b)

- 첫번째 군집에는 5가지 품종 ('Ev6','SG104','SG105','SG110','SG112')이 포함되었고, 두 번째 군집에는 나머지 9종이 포함되었다(Figure 3.3.7c). Figure 3.3.7b는 $K = 10$ 에서 작은 피크가 있음을 보여줍니다. $K = 10$ 에 대한 막대 그래프는 이 연구에 사용된 품종이 4개의 하위 그룹으로 나누어져 있음을 보여 준다(Figure 3.3.7). 이러한 결과는 Figure 3.3.6의 dendrogram 결과에 일치한다.

(3) SSR 마커를 이용한 *Pyropia* 종의 식별

- 방사무늬김 품종간에 변이를 보이는 SSR이 다른 김(*Pyropia*) 종 (species)의 식별에도 적용할 수 있는지 검토하였다.

- 이를 위해 해초 연구 센터로부터 *P. tenera*, *P. seriata*, *P. dentata* 및 *P. haitanensis*의 Conchocelis를 제공받았다.

- 조사 결과 SSR 중 Py20987은 양식업에서 널리 재배되는 *Pyropia* 종인 *P. tenera*, *P. seriata*,

P. dentata 및 *P. haitanensis* 사이에서도 다형성을 보였다 (Figure 3.3.8.).

- *P. haitanensis*에서 두 개의 피크가 검출되었습니다. 이 결과는 이 연구에서 시험한 다른 *Pyropia*

종과 달리 *P. haitanensis*는 배가 반수체가 아님을 나타낸다.

- 따라서 SSR Py20987은 이러한 김 양식장에서 많이 재배되고 있는 *Pyropia* 종을 구별하는 마커로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

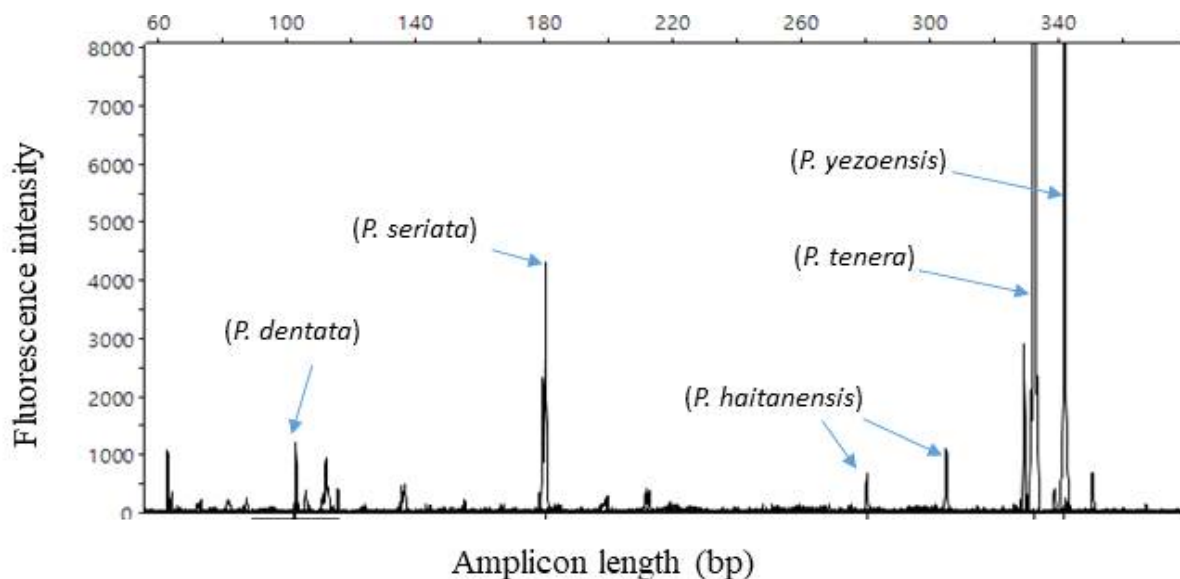


Figure 3.3.8. Size distribution of SSR marker, Py20987 fragments amplified from the genomic DNA of several *Pyropia* species cultivated most on the farm.

다. 방사무늬 김 InDel 및 SNP 기반 DNA 마커 개발

(1) 방사무늬김 골드 2호 genome re-sequencing

- 골드2호는 고온내성 특성을 보이는 품종으로 수과원104를 모조로 방사선 육종 방법을 이용해 개발되었다.
 - 골드2호의 유전적 특성을 이해하고 골드2호 식별 DNA marker 개발을 위해 골드2호의 genome를 Hi-Seq platform를 사용하여 resequencing하였다.
 - 얻어진 골드2호 genome sequence reads는 수과원 104 draft-grnome를 reference로 사용하여 assembly하고 locus gene 및 intergenic region에서 InDel과 SNP를 분석하였다.
- 골드2호 genome resequencing 전략 및 결과는 아래 Figure 3.3.9와 Table 3.3.10.에 간단히 정리하였다.

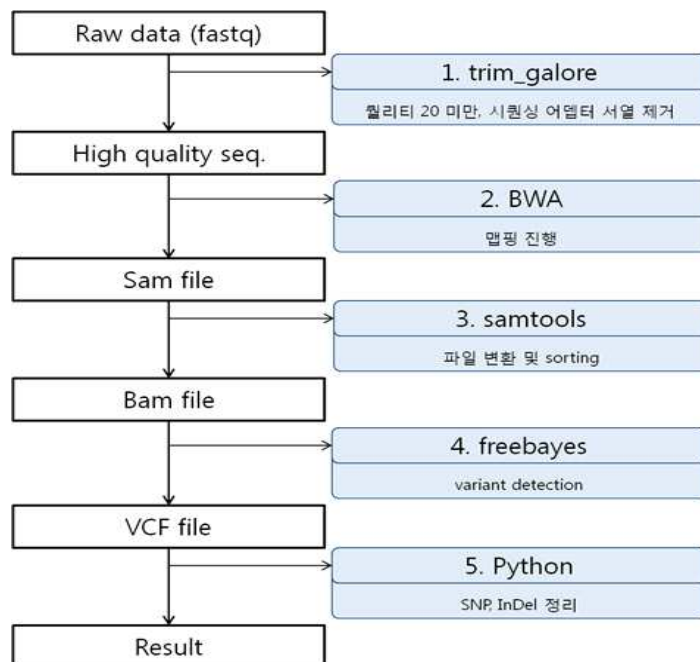


Figure 3.3.9. Gold 2 genome resequencing

Table 3.3.10. Summary of resequencing result of Gold2 genome

구분	Raw reads				Trimmed reads (≥Q20)					
	Sub		Total		Sub		Total			
	Reads (x10 ³)	Read bases (Mb)	Reads (x10 ³)	Read bases (Mb)	Reads (x10 ³)	Read bases (Mb)	Reads (x10 ³)	Reads (%)	Read bases (Mp)	Bases (%)
R1	24,324	3,673	48,648	7,346	22,531	2,916	47,281	97.2	5,968	81.2
R2	24,324	3,673			22,531	2,884				
Single					2,220	169				

- Hi-Seq platform을 이용해 생성된 총 read를 preprocessing을 통해 얻어진 high quality

read는 47,281,377 개로 약 5.9 Giga bp 방사무늬김 genome의 약 40X이상을 cover하였다.

(2) 골드2 Point (InDel and SNP) mutation 선별 및 재확인

- 골드2 genome resequencing 자료를 수과원104 draft genome에 mapping하여 수과원104 기준 골드2 genome의 Insertion, deletion 그리고 두 품종에서의 SNP를 분석하였다.
- Point mutation 분석은 depth 100 이상을 cover하는 region을 대상으로 진행하였으며, SNP는 총 5,969개, Insertion mutation은 123개 그리고 deletion mutation은 37개가 발견되었다 (Table 3.3.11)

Table 3.3.11. Summary of point mutation including SNP, Ins (insertion) and Del (deletion) in Gold2 genome

구분	Total depth				
	≥100	≥150	≥200	≥250	≥300
SNP	5,969	2,207	1,066	528	315
Ins	123	58	32	27	23
Del	37	12	6	4	4
Sum	6,129	2,277	1,104	559	342

- 골드2호 resequencing을 통해 발견된 point mutation을 확인하기 위해 8개의 InDel mutation을 선정하였다(Table 3.3.12).
- 선정된 InDel mutation을 재확인하기 위해 InDel mutation을 포함하는 서열을 증폭하는 PCR primer를 design하고 수과원104와 골드2호 genomic DNA를 주형으로 PCR을 수행하였다. PCR를 통해 얻은 PCR product는 염기서열을 결정하여 예상된 위치에서 Insertion 또는 Deletion 여부를 재확인하였으나 조사된 모두 PCR 산물에서 예상되는 Insertion 또는 Deletion 변이는 나타나지 않았다. 이는 NGS를 통해 얻은 sequencing과 그리고 bioinformatics를 통해 분석된 자료가 실제 서열과 차이가 있음을 의미하나 보다 많은 InDel 변이의 추가 분석이 요구된다.

Table 3.3.12. Summary of point mutations selected for double-check by PCR and resequencing

ID	Position	SG104	Gold 2	Total depth	Qual	Type	InDel 크기 (bp)
PYS0004	710299	AAGGGTGA	AAGGGGTGA	101	226.1	ins	1
PYS0037	401795	GCT	GCCT	130	969.2	ins	1
PYS0065	315856	CTTAAAACAAC	CTTAAACAAC	100	377.3	del	1
PYS0065	317771	TCCCACCT	TCGCCACCT	193	1048.2	ins	1
PYS0088	132603	ATAC	ATAAC	100	400.4	ins	1
PYS0088	134107	CAAAAGC	CAAAAAGC	158	176.0	ins	1
PYS0088	134418	CGT	CGGT	191	1139.8	ins	1
PYS0088	134534	GCCCCGT	GCCCCTGT	137	679.0	ins	1
PYS0088	135315	GTGA	GTTGA	174	573.5	ins	1
PYS0088	143491	TCGA	TCTGA	110	438.8	ins	1

(3) Mig-Seq primer 개발 및 골드1호와 해풍1호 대상 SNP haplotype 발굴

- Mig-Seq은 많은 시료를 대상으로 NGS를 사용하여 genome-wide region으로부터 SNP 발굴을 위해 개발된 방법이다.
- Mig-Seq은 genome 내 SSR 사이, 즉 inter-simple sequence repeats (ISSRs)를 증폭하기 위한 SSR 기반 여러종류의 primer를 제작하고 multiplex PCR primer 조합을 적용해 genome의 SSR 사이 지역들을 PCR 증폭한다.
- PCR 증폭된 inter-simple sequence repeat (ISSR) region은 염기서열을 결정하고 이 지역에서 SNP을 발굴하고자 하였다.
- 해풍1과 골드1호 식별을 위한 SNP haplotype 발굴을 위해 방사무늬김 draft genome 서열 분석으로부터 얻은 SSR 정보를 사용하여 Mig-Seq primer를 제작하였다. (Table 3.3.13)

Table 3.3.13. Mig-seq primer sets for 1st PCR into *Pyropia yezoensis*

F-primer	ID	Tail	CTG	SSR	Anchor
1F	(GGC)4TG-F	CGCTCTTCCGATCT	CTG	GGCGGCGGCGGC	TG
2F	(CGG)4TC-F	CGCTCTTCCGATCT	CTG	CGGCGGCGGCGG	TC
3F	(CGC)4AC-F	CGCTCTTCCGATCT	CTG	CGCCGCCGCCGC	AC
4F	(CCG)4TG-F	CGCTCTTCCGATCT	CTG	CCGCCGCCGCCG	TG
5F	(GCT)4TG-F	CGCTCTTCCGATCT	CTG	GCTGCTGCTGCT	TG
6F	(GTG)4AC-F	CGCTCTTCCGATCT	CTG	GTGGTGGTGGTG	AC
7F	(GT)6TC-F	CGCTCTTCCGATCT	CTG	GTGTGTGTGTGT	TC
R-primer					
1R	(GGC)4TG-R	TGCTCTTCCGATCT	GAC	GGCGGCGGCGGC	TG
2R	(CGG)4TC-R	TGCTCTTCCGATCT	GAC	CGGCGGCGGCGG	TC
3R	(CGC)4AC-R	TGCTCTTCCGATCT	GAC	CGCCGCCGCCGC	AC

4R	(CCG)4TG-R	TGCTCTTCCGATCT	GAC	CCGCCGCCGCCG	TG
5R	(GCT)4TG-R	TGCTCTTCCGATCT	GAC	GCTGCTGCTGCT	TG
6R	(GTG)4AC-R	TGCTCTTCCGATCT	GAC	GTGGTGGTGGTG	AC
7R	(GT)6TC-R	TGCTCTTCCGATCT	GAC	GTGTGTGTGTGT	TC

- 해풍1호와 골드1호 genomic DNA template로 부토 생성된 PCR product는 Hi-Seq platform을 이용해 염기서열을 결정하였다. (Table 3.3.14)
- 생성된 총 read를 preprocessing을 통해 얻어진 high quality sequence는 골드1호 (gold_01)로부터 약 50Mb, 그리고 해풍1호 (HP_01)로부터 약 178MB가 생성되었다.

Table 3.3.14. Summary of Mig-Seq from two *P. yezoensis* cultivar, Gold_01 and HP_01

Sample ID	구분	Trimmed reads (≥Q30)					
		Sub		Total			
		Reads	Read bases (bp)	Reads	Reads (%)	Read bases (bp)	Bases (%)
gold_01	R1	208,240	25,912,585	416,480	47.9	50,620,174	38.6
	R2	208,240	24,707,589				
HP_01	R1	760,237	91,070,296	1,520,474	47.1	178,367,329	36.6
	R2	760,237	87,297,033				

- 골드1호와 해풍1호로부터 생성된 Mig-Seq read들은 방사무늬김 수과원 104로부터 만들어진 draft-genome에 mapping 하여 골드1호와 해풍1호 사이에 변이를 보이는 서열, SNP 들을 발굴하였다.

- Mig-Seq을 통해 발견된 SNP을 확인하기 위해 7개의 SNP haplotype를 선정하였다 (Table 3.3.15).

Table 3.3.15. Summary of SNP haplotypes selected for double-check by PCR and resequencing

		Ref = Gold 1		gold 1		HP			
ID		Ref	Ref	Alt1	Alt1	Alt2	Alt2	Alt1+Alt2 Freq(%)	Total depth
NO	locus position								
1	PYS0008	471,632	C	93	0	G	3	3.1	96
	PYS0008	471,515	G	93	0	A	2	2.1	95
	PYS0008	471,533	T	93	0	C	2	2.1	95
	PYS0008	471,602	T	91	0	C	2	2.2	93
2	PYS0010	192,244	C	140	0	G	2	1.4	142
	PYS0010	192,204	T	128	0	G	2	1.5	130
	PYS0010	192,222	A	88	0	G	1	1.1	89
	PYS0010	192,282	A	86	0	C	1	1.1	87
	PYS0010	192,259	A	80	0	G	2	2.4	82
3	PYS0042	16,663	G	159	0	A	1	0.6	160
	PYS0042	16,662	C	158	0	T	1	0.6	159
	PYS0042	16,652	A	156	0	G	1	0.6	157
	PYS0042	16,631	T	99	0	C	1	1.0	100
4	PYS0120	152,433	G	225	0	A	2	0.9	227
	PYS0120	152,287	C	189	0	T	1	0.5	190
	PYS0120	152,320	T	135	0	G	1	0.7	136
5	PYS0388	13,372	T	87	0	C	1	1.1	88
	PYS0388	13,409	C	86	0	T	1	1.1	87
	PYS0388	13,416	T	80	0	C	2	2.4	82
6	PYS0508	43,186	A	52	0	G	1	1.9	53
	PYS0508	43,149	G	51	0	A	2	3.8	53
7	PYS0061	349,716	C	49	0	A	2	3.9	51
	PYS0061	349,717	G	50	0	A	1	2.0	51
	PYS0061	349,725	C	49	0	T	2	3.9	51

- 선정된 SNP haplotype을 재확인하기 위해 SNP haplotype을 포함하는 서열을 증폭하는 PCR primer를 design하고 골드1호와 해풍1호 genomic DNA를 주형으로 PCR을 수행하였다
- PCR 결과 5개의 primer set로부터 PCR product를 얻을 수 있었다. 생성된 PCR product는 염기서열을 결정하여 예상된 위치에서 SNP 여부를 재확인하였으나 조사된 모두 PCR 산물에서 예상되는 SNP 변이는 나타나지 않았다. 이는 앞선 InDel 변이 분석에서와 같이 NGS를 통해 얻은 sequencing과 그리고 bioinformatics를 통해 분석된 자료가 실제 서열과 차이가 있음을 의미하나 보다 많은 InDel 변이의 추가 분석이 요구된다.

II. 김 전사체 생성 및 분석

가. 다양한 김 전사체 생성

지금까지 방사무늬김과 참김으로부터 생성된 전사체 정보를 아래표에 정리하였다. 생산된 전사체는 방사무늬김에서 확보된 reference gene을 이용해 reference 기반 분석을 통해 필요에 따라 DEG를 재분석하고 있다.

Table 3.3.16. Transcriptome information generated from *P.tenera* and *P.yezoensis*

Species	Treatment		반복	NGS platform	Total read number	total read length
<i>P. tenera</i>	건조 스트레스	control	2	454	357,747	135,018,015
		0.5, 1, 2, 4, 8hr	1	454	1,086,454	457,724,615
<i>P. yezoensis</i> (학가리)	환경 스트레스	Control	2	Hi-Seq	66,191,138	8,340,083,388
		고온 (25°C)	2	Hi-Seq	103,245,294	13,008,907,044
		건조	2	Hi-Seq	63,598,248	8,013,379,248
	Control	단포자 유도	2	Hi-Seq	107,410,092	10,848,419,292
		단포자 형성	2	Hi-Seq	101,913,808	10,293,294,608
	고온	단포자 유도	2	Hi-Seq	103,282,096	10,431,491,696
		단포자 형성	2	Hi-Seq	95,139,282	9,609,067,482
	Ca ²⁺	단포자 유도	2	Hi-Seq	106,014,604	10,707,475,004
		단포자 형성	2	Hi-Seq	100,066,912	10,106,758,112
	사상체	사상체 유도	2	Hi-Seq	109,969,408	13,856,145,408
		사상체 형성	2	Hi-Seq	69,073,286	8,703,234,036
	<i>P. yezoensis</i>	Control (수과원 104)	15°C	3	Hi-Seq	157,087,746
20°C			3	Hi-Seq	115,947,818	17,508,120,518
500 Gy		15°C	3	Hi-Seq	123,634,880	18,668,866,880
		20°C	3	Hi-Seq	107,666,614	16,257,658,714
<i>P. yezoensis</i> (학가리)	ABA	control	3	Hi-Seq	147,855,108	22,326,121,308

		4 hr	3	Hi-Seq	129,114,400	19,496,274,400
		28 hr	3	Hi-Seq	104,636,478	15,800,108,178
<i>P. yezoensis</i>	Control (수과원 104)	15°C	3	Hi-Seq	132,993,564	20,082,028,164
		20°C	3	Hi-Seq	142,154,640	21,465,350,640
	14-3	15°C	3	Hi-Seq	144,649,276	21,842,040,676
		20°C	3	Hi-Seq	148,614,588	22,440,802,788
	14-4	15°C	3	Hi-Seq	154,390,804	23,313,011,404
		20°C	3	Hi-Seq	144,637,146	21,840,209,046

(1) 방사무늬김 수과원 104와 골드 14-3/14-4 전사체 분석

- 골드2호는 모조인 수과원104와 비교시 고온 내성의 특징을 보인다. 고온내성을 보이는 골드2호 (14-3)와 역시 고온내성을 보이는 품종 14-4의 유전적 특성을 연구하기 RNA sequencing을 수행하였다. 고온내성 품종은 생명공학연구원 정원중 박사로부터 분양받아 본 연구실에서 유지하면 시료로 사용하였다.

- RNA sequencing을 12C 정상배양 조건 (대조구)에서 배양한 김 엽상체와 20C 고온에서 배양한 김 엽상체로부터 total RNA를 추출하고 Hi-Seq platform을 사용하여 sequencing하였다. 시료의 신뢰도, 재현성을 높이기 위해 RNA sequencing은 3개의 replicate로부터 생성되었다. (Table 3.3.17)

Table 3.3.17. RNA pre-processing data from *P. yezoensis* 수과원 104, 14-3 and 14-4

Sample 구분	Samples	Raw data				Pre-processed data(Q30)			
		# reads	# bases (bp)	# bases (Gbp)	%	# reads	# bases (bp)	# bases (Gbp)	%
14-3	14-3-12C-1	41,118,148	6,208,840,348	6.21	100%	40,890,006	5,837,419,033	5.84	94%
	14-3-12C-2	61,957,174	9,355,533,274	9.36	100%	61,564,678	8,961,511,112	8.96	96%
	14-3-12C-3	41,573,954	6,277,667,054	6.28	100%	41,352,828	5,907,060,972	5.91	94%
	14-3-20C-1	51,149,082	7,723,511,382	7.72	100%	50,860,078	7,254,720,723	7.25	94%
	14-3-20C-2	50,520,690	7,628,624,190	7.63	100%	50,221,486	7,218,495,942	7.22	95%
	14-3-20C-3	46,944,816	7,088,667,216	7.09	100%	46,660,150	6,696,072,815	6.70	94%
14-4	14-4-12C-1	54,980,078	8,301,991,778	8.30	100%	54,640,864	7,858,602,364	7.86	95%
	14-4-12C-2	50,609,734	7,642,069,834	7.64	100%	50,323,708	7,260,755,682	7.26	95%
	14-4-12C-3	48,800,992	7,368,949,792	7.37	100%	48,603,978	6,842,361,184	6.84	93%
	14-4-20C-1	54,483,538	8,227,014,238	8.23	100%	54,149,398	7,828,666,134	7.83	95%
	14-4-20C-2	46,100,714	6,961,207,814	6.96	100%	45,827,236	6,599,307,535	6.60	95%
	14-4-20C-3	44,052,894	6,651,986,994	6.65	100%	43,800,888	6,269,720,325	6.27	94%
김 104	104-12C-1	45,316,524	6,842,795,124	6.84	100%	45,108,290	6,497,471,802	6.50	95%
	104-12C-2	40,842,272	6,167,183,072	6.17	100%	40,655,910	5,737,992,125	5.74	93%
	104-12C-3	46,834,768	7,072,049,968	7.07	100%	46,567,546	6,665,503,895	6.67	94%
	104-20C-1	58,859,132	8,887,728,932	8.89	100%	58,543,578	8,438,808,168	8.44	95%
	104-20C-2	46,687,026	7,049,740,926	7.05	100%	46,429,936	6,655,211,638	6.66	94%
	104-20C-3	36,608,482	5,527,880,782	5.53	100%	36,279,638	5,006,745,858	5.01	91%

(2) 반복 샘플의 재현성

3반복 샘플 재현성 확인을 위한 pairs plot은 다음과 같다.(Figure 3.3.10) 1에 가까울수록 재현성이 높고, 3반복 중 재현성이 높은 두 샘플을 골라 분석에 이용했다.

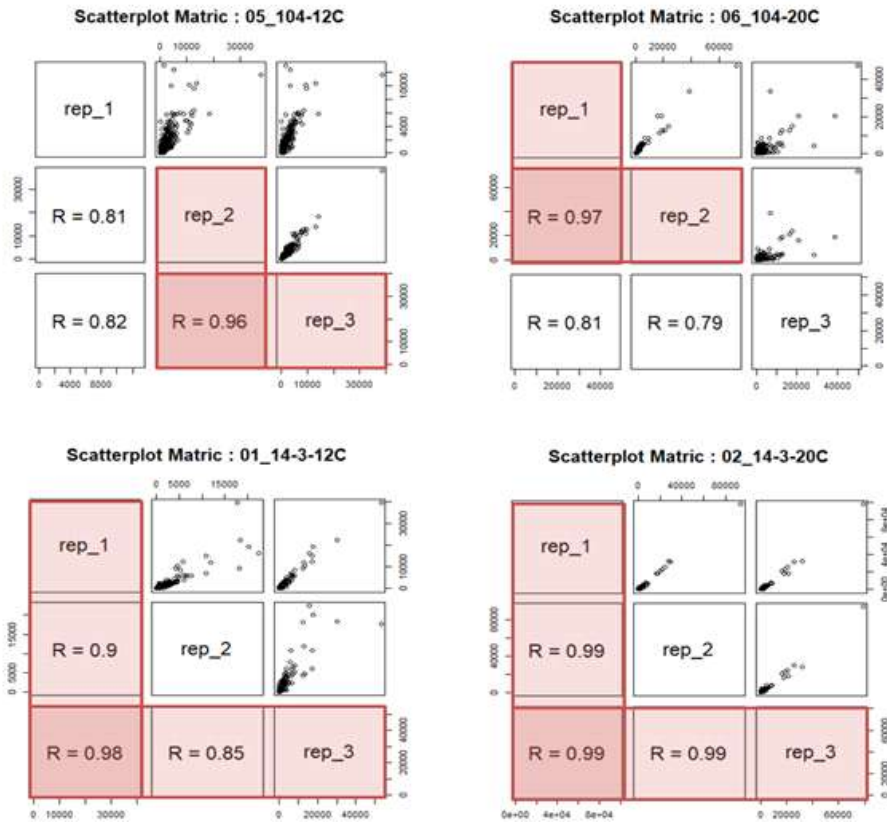


Figure 3.3.10. 반복 샘플 재현성

(3) Reference 서열 정보

- 김 품종 골드2호는 방사무늬김 수과원 104에 방사선 조사 후 돌연변이체 분석을 통해 선발되었다. 따라서 김 골드2호의 유전적 특성 분석을 위해 방사무늬김 수과원104의 핵 유전체로부터 annotation된 locus gene를 reference로 사용하였다.
- reference로 사용한 유전자의 서열 길이 분포는 아래와 같다(Figure 3.3.11).

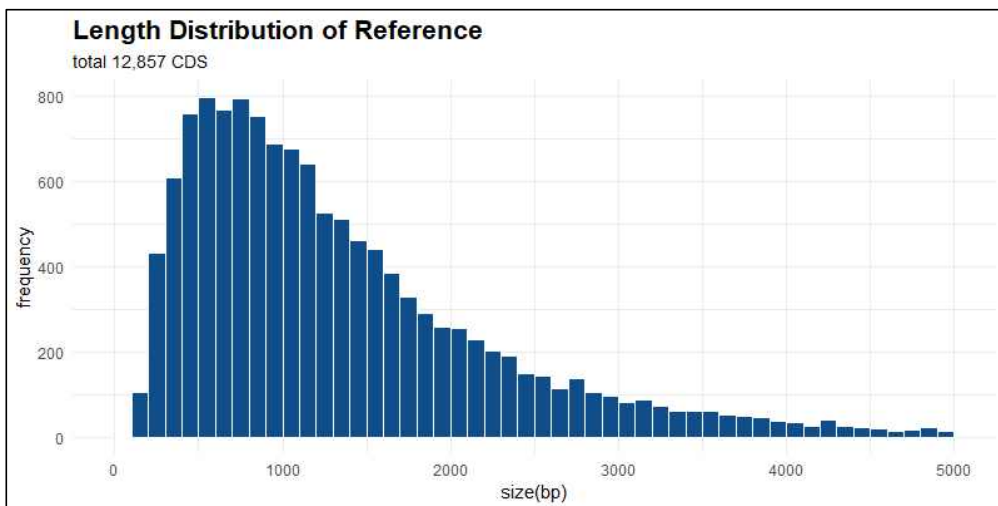


Figure 3.3.11. Reference 길이 분포

(4) DEG (differentially expressed gene) 선별

- sequencing depth와 transcript length에 대한 normalization으로 FPKM(Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads)값을 이용하였다. 그리고 FPKM값(평균값)이 모든 조건에서 10이하인 locus는 분석에서 제외하였다.
- R DEGseq package를 이용하여 DEG를 판별하였으며, DEG method 는 Random sampling model의 MA plot based method를 이용하였다. DEG 선별은 Q-value <0.05, normalized |log2(FC)|>1 의 조건으로로 설정하였다.
- 방사무늬김 수과원 104에 고온 처리시 1,273개 유전자가 발현이 up되었으으며, 414개 유전자의 발현이 down regulation 되었다.(Table 3.3.18)
- 고온 조건에서는 수과원 104에 비해 골드1호에서는 140개의 유전자가 up-regulation되었고 145개의 유전자 발현이 down-regulation되었다.(Table 3.3.18)

Table 3.3.18. Summary of DEGs selected from *P. yezoensis* Gold 1.

Samples		# DEGs	
Control	Treatment	Up	Down
골드2-12C	골드2-20C	250	284
수과원 104-12C	수과원 104-20C	1,273	414
수과원 104-12C	골드2-12C	1,197	352
수과원 104-20C	골드2-20C	140	145

Table 3.3.19. 고온 처리시 대조구에서는 발현이 증가하지만 골드2호에서는 변화가 없는 유전자

Reference information			mean FPKM								Normalized log2(FC) (treatment vs control)				
			01	02	03	04	05	06		Set 1	Set 2	Set 3	Set 6	Set 7	
Locus ID	Reference	Length (bp)	Description	골드1-12	골드1-20	14-4-12C	14-4-20C	104-12C	104-20C	total	14-3-20C vs. 14-3-12C	14-4-20C vs. 14-4-12C	104-20C vs. 104-12C	14-3-12C vs. 104-12C	14-4-12C vs. 104-12C
PYS0207_G08084	ATGGGTT	588	hypothetical protein BU14	0.37	1.23	0.14	0.26	0.17	171.07	173.25	1.78	0.84	10.24	1.37	0.06
PYS0068_G04160	ATGGCGA	627	hypothetical protein BU14	1.30	2.40	1.12	1.78	0.51	69.67	76.78	0.92	0.63	7.33	1.58	1.44
PYS0327_G10245	ATGGCGT	1,161	hypothetical protein BU14	0.14	0.18	0.22	0.08	0.82	110.57	112.02	0.44	-1.59	7.30	-2.36	-1.61
PYS0178_G07491	ATGGGCG	516	hypothetical protein BU14	2.68	4.58	0.55	2.09	2.16	170.03	182.10	0.80	1.89	6.53	0.55	-1.67
PYS0266_G09200	ATGGGCC	810	hypothetical protein BU14	90.87	86.63	33.90	46.09	3.10	100.29	360.88	-0.04	0.41	5.25	5.10	3.74
PYS0074_G04409	ATGTGGC	2,100	hypothetical protein BU14	29.92	55.27	48.37	51.68	4.49	69.15	258.87	0.91	0.06	4.18	2.97	3.72
PYS0006_G00978	ATGGCCG	501	endoplasmic reticulum calc	43.88	39.95	87.30	40.27	4.49	33.95	249.84	-0.11	-1.15	3.15	3.52	4.57
PYS0090_G04995	ATGGTCG	660	hypothetical protein BU14	22.51	33.70	27.63	43.22	8.21	56.26	191.52	0.61	0.61	3.01	1.69	2.04

- 골드2호의 유전적 특징 중 대조구인 수과원 104의 경우 고온 처리에 의해 발현이 증가하나 골드2호에서는 발현변화가 없는 유전자들을 1차로 선별하였다. (Table 3.3.19)

- 선별한 유전자들은 qRT-PCR를 통해 실제 각 유전자들의 발현패턴을 조사하였다 (Figure 3.3.12)

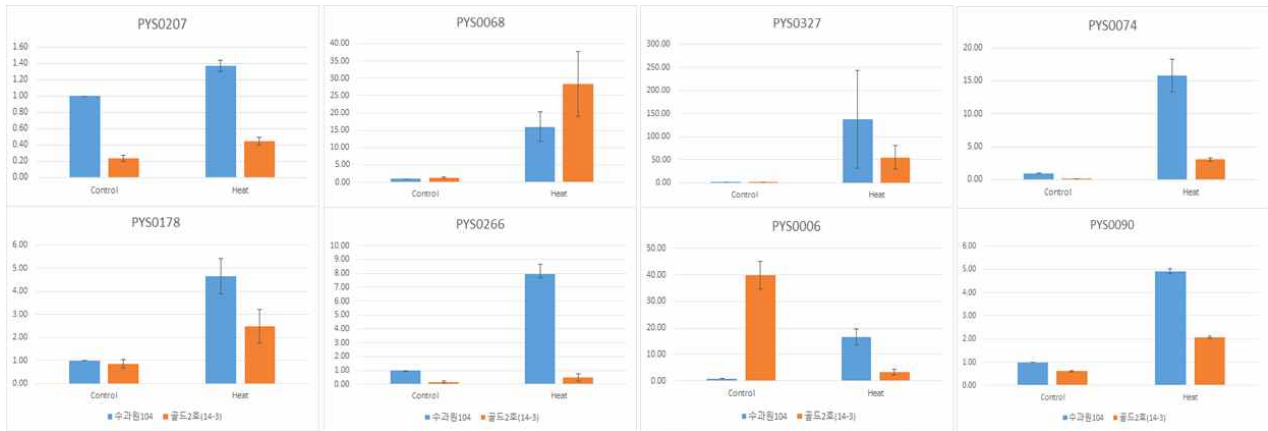


Figure 3.3.12. 수과원 104에서 발현이 up-regulation되는 유전자의 qRT-PCR

Reference information				mean FPKM							Normalized log2(FC) (treatment vs control)				
				01	02	03	04	05	06		Set 1	Set 2	Set 3	Set 6	Set 7
Locus ID	Reference	Length (bp)	Description	골드1-12C	골드1-20C	14-4-12C	14-4-20C	104-12C	104-20C	total	14-3-20C vs. 14-3-12C	14-4-20C vs. 14-4-12C	104-20C vs. 104-12C	14-3-12C vs. 104-12C	14-4-12C vs. 104-12C
PYS0450_G11671	ATGGCAT	1,374	phosphog	81.16	21.59	68.43	27.12	4770.60	151.23	5120.13	-1.88	-1.37	-4.75	-5.65	-5.83
PYS0051_G03451	ATGGCAG	708	hypothetic	94.68	33.98	47.46	38.14	565.54	27.78	807.58	-1.45	-0.35	-4.11	-2.35	-3.28
PYS0057_G03639	ATGCTCG	819	hypothetic	27.23	12.15	37.46	7.68	202.64	11.77	298.92	-1.14	-2.32	-3.87	-2.66	-2.14
PYS0024_G02163	ATGTACG	573	hypothetic	32.28	33.59	25.62	26.62	864.86	55.04	1038.01	0.08	0.02	-3.74	-4.51	-4.78
PYS0477_G11867	ATGGACG	1,194	hypothetic	39.68	84.62	30.25	92.62	2171.89	178.36	2597.41	1.12	1.58	-3.37	-5.54	-5.87
PYS0498_G12046	ATGGCTT	435	hypothetic	840.90	605.85	319.99	289.29	1622.84	140.84	3819.71	-0.45	-0.18	-3.29	-0.72	-2.05
PYS0083_G04708	ATGGTGG	915	ribulose-p	60.44	72.05	68.44	59.34	1040.53	93.41	1394.21	0.28	-0.24	-3.24	-3.87	-3.63
PYS0065_G04044	ATGGCGT	534	hypothetic	66.18	70.41	30.02	61.68	580.94	69.74	878.97	0.12	1.00	-2.82	-2.90	-3.98
PYS0166_G07208	ATGGATG	1,050	fructose-b	33.31	26.78	42.78	22.09	471.37	58.18	654.51	-0.29	-0.99	-2.78	-3.59	-3.17
PYS0177_G07470	ATGCCCT	729	hypothetic	208.28	112.93	160.35	123.29	2140.80	269.85	3015.49	-0.86	-0.41	-2.75	-3.13	-3.45
PYS0525_G12277	ATGACGC	498	hypothetic	409.18	322.24	256.40	261.90	2435.55	309.46	3994.73	-0.32	0.00	-2.74	-2.34	-2.95
PYS0119_G05897	ATGAGCG	441	hypothetic	101.21	68.14	63.67	61.89	651.81	84.01	1030.74	-0.54	-0.07	-2.72	-2.46	-3.06

Table 3.3.20. 고온 처리시 대조구에서는 발현이 감소하지만 골드2호에서는 변화가 없는 유전자

골드2호의 유전적 특징 중 대조구인 수과원 104의 경우 고온 처리에 의해 발현이 감소하지만 골드2호에서는 발현변화가 없는 유전자들을 2차로 선별하였다. (Table 3.3.20)

- 선별한 유전자들은 qRT-PCR를 통해 발현패턴을 조사하였다 (Figure 3.3.13)
- qRT-PCR 통해 발현패턴에 변화를 보이는 DEG 중에서 추가 연구를 위한 유전자들을 선별하고 클로닝하였다.

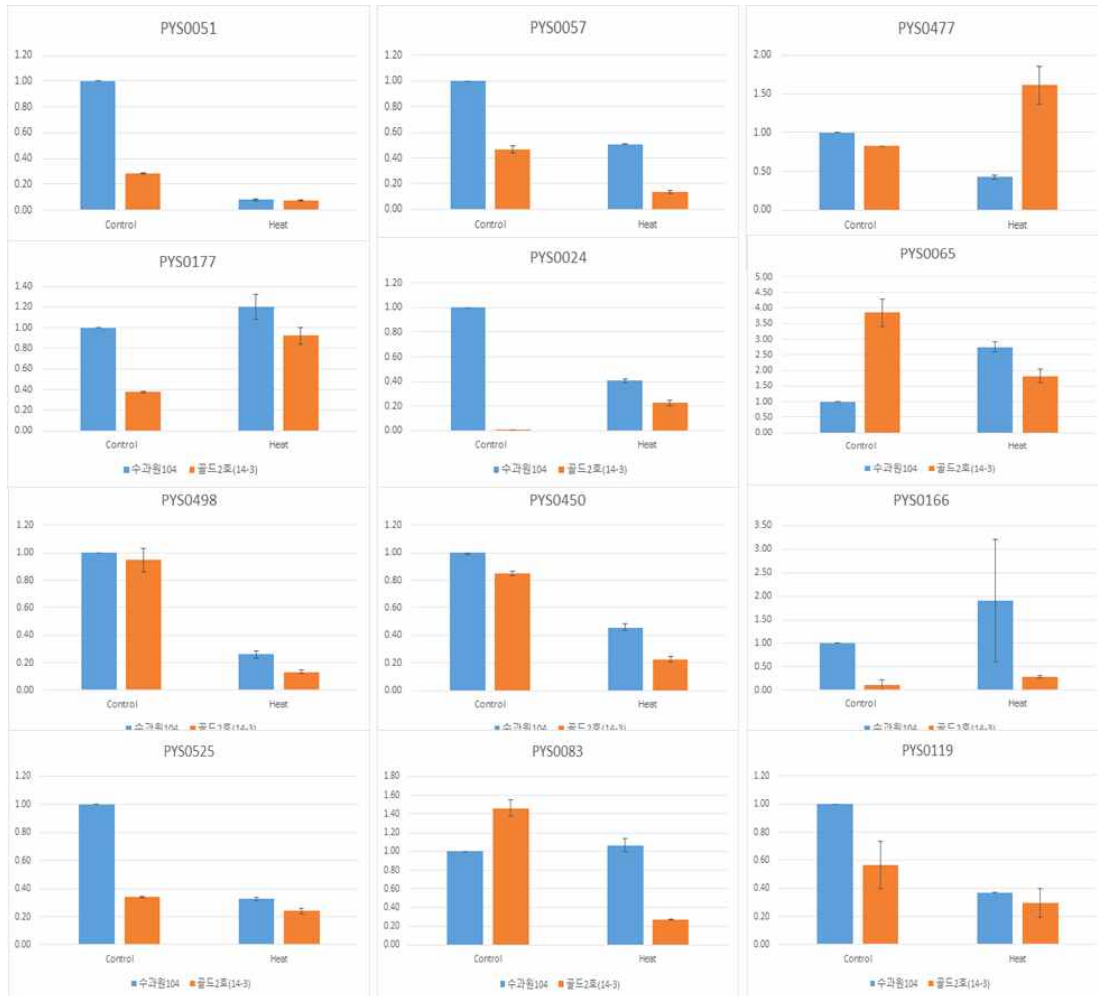


Figure 3.3.13. 수과원 104에서 발현이 down-regulation되는 유전자의 qRT-PCR

다. 방사무늬김 고온내성 돌연변이 500Gy 김 전사체 분석

- 제 2 프로젝트의 2세부과제를 수행하고 있는 해조류 연구소의 박은정 박사팀으로부터 방사선 조사를 통해 선별된 고온 내성 돌연변이 김 500Gy를 제공 받았다. 500Gy 고온내성김은 고온과 저온에서 대조군 수과원104 (SG104)보다 생장률이 높지만, 정상 조건에서는 수과원 104보다 생장률이 낮다. 이러한 차이는 방사선에 의한 유전적 변화가 이루어 졌고 이러한 변화가 고온과 저온 조건하에서의 성장률 변이를 보이게한 것으로 추정된다.
- 방사무늬 김의 고온내성 돌연변이체, 500Gy의 유전적 변화를 분석하기 위해 고온 처리한 김엽상체로부터 생성된 Transcriptome을 생성하였다. 수과원 104(SG104) 품종은 대조구로 사용되었다. 시료의 신뢰도, 재현성을 높이기 위해 RNA sequencing을 위한 시료는 3개의 replicate로 준비하고 Hi-Seq platform을 이용하여 sequencing하였다.
- 생성된 transcriptome 결과는 아래 Table 3.3.20.에 정리하였다. 총 12개의 라이브러리에서 총 113.2Gb의 전사체 시퀀스가 생성되었으며 전처리 후 총 69.4Gb의 고품질 시퀀스가 얻어졌다(Table 3.3.20). De novo 어셈블리 처리는 N50 길이가 961bp이고 총 161.8Mb를 포함하는 총 242,470개의 contig를 생성했다(Table 3.3.20).

Table 3.3.20. Summary of the generation and *de novo* assembly of transcriptome sequence reads from the gametophyte thalli of wild-type SG104 and heat-tolerant mutant Gy500 *Pyropia yezoensis* under control and heat stress conditions

		Wild-type (SG104)						Heat-tolerant mutant (Gy500)						Total
		Control (CT)			Heat (HT)			Control (MC)			Heat (MT)			
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Raw	Total No. (10 ⁶ pairs)	43.9	25.3	33.5	29.5	32.2	27.2	25.2	41.6	32	30.5	30.5	23.4	374.7
	Total length (Gb)	13.3	7.6	10.1	8.9	9.7	8.2	7.6	12.6	9.7	9.2	9.2	7	113.2
Clean	Total No. (10 ⁶ pairs)	40.9	14.6	18.9	17.9	19.4	16.7	17.4	19.4	14	15.1	23.9	19.8	238.1
	Total length (Gb)	11.9	4.3	5.5	5.2	5.7	4.9	5	5.6	4.1	4.5	6.9	5.8	69.4
Assembly	No. of contigs													242,470
	Total length (Mb)													161.8
	N50 (bp)													961
	No. of contigs >1 kb													40,906
	Average contig length (bp)													667.3

RNA sequences were generated from three replicates for each sample.

- Sample correlation matrix의 clustering 분석결과는 실험에 적용된 3개의 replicate이 매우 유사함을 보여준다 (Figure 3.3.14). 내열성 돌연변이 Gy500의 전사체는 대조군 조건과 열 스트레스 조건 모두에서 대조군 조건에서 생성된 전사체보다 열 스트레스 하에서 야생형 SG104의 배우자체에서 생성된 전사체에서 유의하게 더 높은 상관관계를 보였다. 열 스트레스에 반응하는 DEG를 스크리닝하기 위해 FPKM 값 배수 변화 비교로 contig를 분석했습니다. 열 스트레스에 대한 반응으로 총 1,251개의 contig가 DEG로 식별되었습니다. 확인된 DEG 중 총 409개의 contig는 열 스트레스를 받은 야생형 SG104에서 하향 조절되었으며 내열성 돌연변이 Gy500에서 대조군 조건에서도 낮은 수준을 보였다.

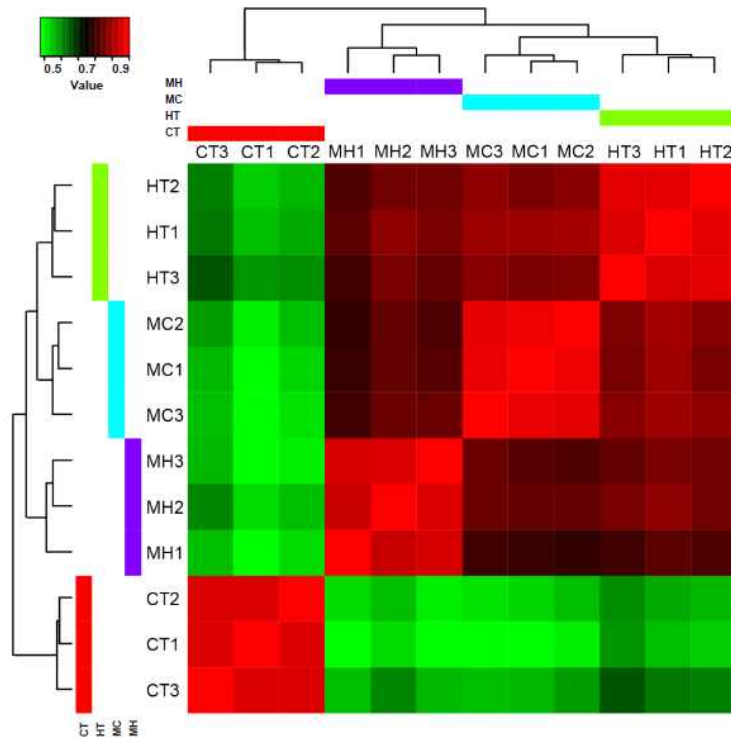


Figure 3.3.14 Heatmap of the sample correlation matrix. Three cDNA libraries were generated from three replicates for each sample. A total of 113.2 Gb of transcriptome sequences were obtained from 12 libraries (Table 3.3.20): CT1, CT2, and CT3 from wild-type *Pyropia yezoensis* SG104 under the control condition; HT1, HT2, and HT3 from SG104 under the heat stress condition; MC1, MC2, and MC3 from the heat-tolerant mutant Gy500 under the control condition; and MT1, MT2, and MT3 from Gy500 under the heat stress condition.

이 연구에서 우리는 열 스트레스 하에서 야생형 SG104의 배우자체에서 유의하게 하향 조절되고 제어 및 열 스트레스 조건 모두에서 내열성 돌연변이 Gy500에서 낮은 수준으로 검출되는 DEG에 초점을 맞추었습니다. 대조군 조건 하에서 SG104에서 FPKM 값이 20보다 크고 대조군 조건에서 SG104:Gy500 비율이 32보다 큰 DEG를 선택하여 Table 3.3.21에 요약했습니다.

선발된 DEG 중 일부는 열 스트레스 하에서 돌연변이 Gy500에서 보다 낮은 수준으로 검출되었습니다(Table 3.3.21). qRT-PCR을 사용하여 열 스트레스 조건 및 내열성 돌연변이체에서 배우자체에서 DEG Py97124의 하향 조절을 확인했습니다.

Table 3.3.21. Summary of selected DEGs downregulated in the gametophyte of *Pyropia yezoensis* SG104 under heat stress condition and in heat-tolerant mutant *P. yezoensis* Gy500

DEG contig ID ^a	Expression level (FPKM ^b)				Sequence homology			
	SG104		Gy500		NCBI NR		Swissprot	
	Control	Heat	Control	Heat	Description	E-value	Description	E-value
DN97124_c0_g3_i3 ^c	290.09	2.03	0.73	0.81	Hypothetical protein BU14_0577s0005 [<i>Porphyra umbilicalis</i>]	1.00E-44	NA ^d	-
DN100909_c0_g3_i5	156.56	3.39	3.78	2.78	NA	-	NA	-
DN60776_c0_g1_i3	124.08	-	2.12	14.71	NA	-	NA	-
DN98375_c0_g2_i4	90.24	0.13	0.01	0.01	Beta-glucuronosyltransferase GlcAT14B [<i>Gracilariaopsis chorda</i>]	2E-63	Beta-glucuronosyltransferase GlcAT14B	6E-20
DN103548_c0_g6_i4	89.98	-	1.51	0.08	NA	-	NA	-
DN104214_c1_g5_i3	86.05	0.98	2.60	0.27	Hypothetical protein KFL_013290010, partial [<i>Klebsormidium nitens</i>]	2E-97	Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon TNT 1-94	1E-68
DN102638_c2_g4_i4	75.98	0.45	-	0.73	NA	-	NA	-
DN103283_c0_g1_i7	74.91	1.18	0.43	1.38	Hypothetical protein BU14_0055s0021 [<i>Porphyra umbilicalis</i>]	4E-89	Histone H3 [<i>Drosophila melanogaster</i>]	7E-88
DN105032_c1_g8_i4	65.85	0.99	1.84	0.17	Hypothetical protein AVDCRST_ MAG94-1486, partial [uncultured <i>Leptolyngbya</i> sp.]	1E-117	Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon TNT 1-94	3E-88
DN104263_c2_g4_i5	30.44	-	0.27	0.31	Hypothetical protein BU14_0207s0014 [<i>Porphyra umbilicalis</i>]	8E-106	NA	-
DN104187_c0_g3_i3	23.46	0.33	0.38	0.19	Hypothetical protein BU14_0728s0002 [<i>Porphyra umbilicalis</i>]	1E-75	NA	-
DN104436_c1_g2_i4	21.84	0.23	0.27	-	Hypothetical protein BWQ96_03366 [<i>Gracilariaopsis chorda</i>]	8E-88	NA	-

DEG, differentially expressed gene; FPKM, fragments per kilobase per million reads.

^aDEGs with FPKM values greater than 20 in SG104 under control conditions and SG104 : Gy500 ratios greater than 3.2 under control conditions were selected.

^bAverage of FPKM from three replicates.

^cDN97124_c0_g3_i3 was selected for further research in this study and named PyHRG1.

^dNA, not available. Contigs with an E-value of >1.0E-10 were considered not available.

(2) PtDRG1 유전자의 발현 특성

여러 가지 비 생물 적 스트레스에 대한 PtDRG1의 발현 패턴을 조사하기 위해, 스트레스 처리한 gametohytes로부터 총 RNA를 추출하고 qRT-PCR을 수행 하였다. PtDRG1은 건조 응력에 매우 민감하게 반응하였다. PtDRG1의 전사는 건조 치료 후 30 분에 약 4 배 증가했다. 이 발현 수준은 스트레스 조건 동안 유지되었다.(Figure 3.3.16) PtDRG1 전사는 또 mannitol 및 H₂O₂ 처리에 의해 증가되었다. 그러나, PtDRG1은 열 및 추위와 같은 온도 변화에 반응하지 않았다.

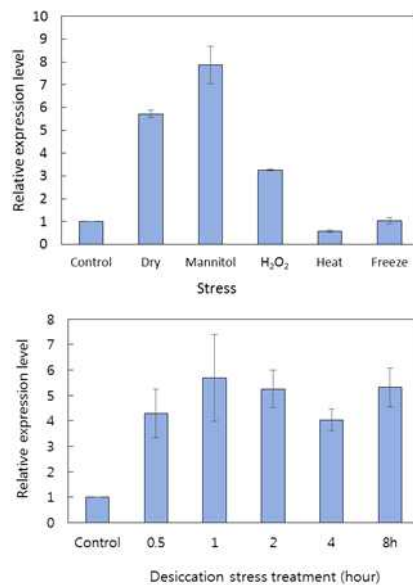


Figure 3.3.16. Expression pattern of PtDRG1 gene in *P. tenera* under various abiotic stress conditions.

A. Gametophyte thalli of *P. tenera* were cultured under desiccation stress conditions or in medium containing 0.5 M mannitol or 20 mM H₂O₂. a For heat or freezing stress treatment, gametophyte thalli were cultured at 20 °C or 4 °C, respectively. B. These gametophyte thalli under desiccation stress conditions were harvested at different time points. Total RNAs were purified from these gametophytes and amplified by qRT-PCR. PtAct gene was used as an internal control. Bars are means ± standard deviation (SD).

(3) PtDRG1의 세포내 위치

컴퓨터 프로그램을 이용한 PtDRG1의 세포 내 위치의 예측은 PtDRG1이 엽록체와 같은 세포 내 기관에 국한 될 수 있음을 시사했다. 비록 PtDRG1의 N-terminal에 소수성 서열이 존재하지만 signal peptide는 검출되지 않았다. PtDRG1의 세포 내 위치를 조사하기 위해 식물 발현

벡터 326-GFP의 GFP report 유전자에 PtDRG1을 클로닝했다. 그런 다음 키메라 PtDRG1-GFP 발현 구조를 담배 (*Nicotiana bethamiana*) 원형질체에 도입하고 형광 현미경으로 형광 단백질의 위치를 추적하였다. PtDRG1-GFP 융합 단백질의 형광은 주로 엽록체에서 관찰되었다. (Figure 3.3.17) 이것은 PtDRG1이 삼투압 스트레스 조건 하에서 발현되고 엽록체로 운반된다는 것을 입증한다.

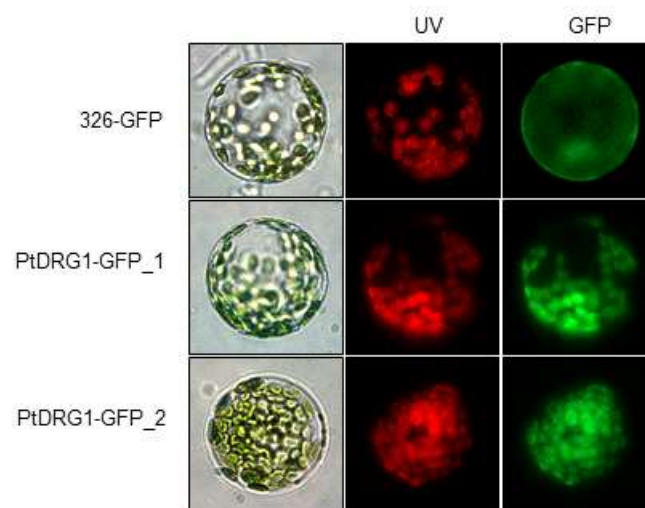


Figure 3.3.17. Subcellular localizations of PtDRG1 heterologously expressed in plant protoplast.

A reporter gene encoding green fluorescent protein (GFP) was fused to PtDRG1 under the control of CaMV 35S promoter in 326-GFP vector. The construct was introduced into protoplasts of *Nicotiana bethamiana*. 326-GFP empty vector served as the control. After overnight incubation, PtDRG1-GFP localization in individual cells was observed by GFP fluorescence in two different transformed cells: PtDRG1-GFP_1 and PtDRG1-GFP_2

(4) PtDRG1의 환경 스트레스 내성

PtDRG1은 건조 및 mannitol 처리에 반응한다. 그것은 PtDRG1이 *Pyropia*에서 삼투압 스트레스 저항성과 관련이 있을 수 있음을 의미한다. PtDRG1 유전자의 생리적 기능을 연구하기 위해 PtDRG1 유전자를 *Chlamydomonas reinhardtii* Mut11 균주에 도입 하였다. (Figure 3.3.18A, B) 형질전환 *Chlamydomonas* 내로의 PtDRG1 유전자의 도입은 PCR로 확인 하였다. (Figure 3.3.18B.)

PtDRG1 유전자의 생리 기능을 분석하기 위하여, PtDRG1을 과발현하는 *Chlamydomonas* 세포를 200 mM mannitol 또는 80 mM NaCl을 함유하는 한천 배지에 접종 하였다. 빈 pCR112 벡터 (Hyg)를 갖는 세포를 대조군으로 사용 하였다. 대조군과 형질전환된 *Chlamydomonas* 세포 모두 대조군 배지에서 비슷한 성장률을 보였다. (Figure 3.3.18C.) 그러나, 형질전환된 *Chlamydomonas* 세포는 대조군 세포에 비해 만니톨 또는 염 함유 배지에서보다 높은 성장률을 보였다. (Figure 3.3.18C) 이러한 결과는 PtDRG1이 *Chlamydomonas* 세포에서 만니톨과 염에 의해 유도 된 삼투압 스트레스에 대한 내성 기작에 역할을 한다는 것을 증명한다.

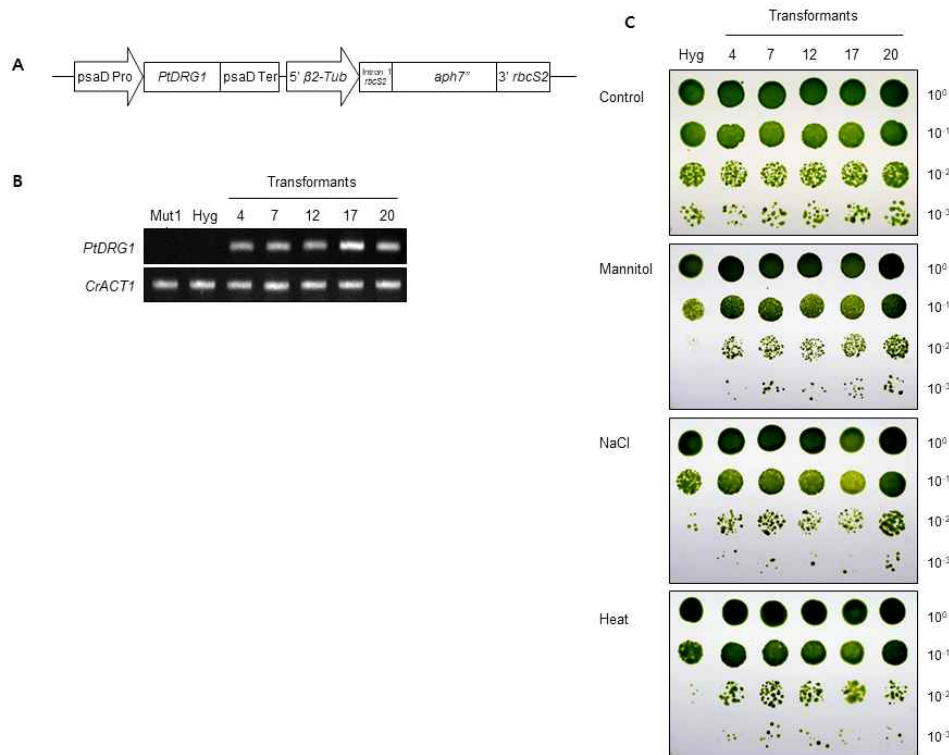


Figure 3.3.18. Effects of PtDRG1 on growth of *Chlamydomonas* under stress conditions.

A. To confirm the introduction of PtDRG1 gene, genomic DNAs were purified from transgenic *Chlamydomonas* cells and used for PCR amplification with PtDRG1 specific primers. B. Survival and growth assay of transgenic *Chlamydomonas* cells harboring PtDRG1 under abiotic stress condition. *Chlamydomonas* cells were diluted to $10^0 - 10^{-3}$ in fresh medium and 10 μ l of diluted cells were inoculated onto agar plates containing 200 mM mannitol and 50 mM NaCl. For heat treatment, cells were incubated at 37 °C for 3 days and subsequently transferred to a 25 °C growth chamber. *Chlamydomonas* transformed with an empty vector pCR112 (Hyg) served as control.

(5) PtDRG1의 고온 내성 기능

Figure 3.3.18의 결과는 *Chlamydomonas* 세포를 고온 (37° C)에서 3 일간 배양하면 형질전환

세포가 대조군 세포보다 잘 자라는 것을 보인다.(Figure 3.3.19C) 그러나 PtDRG1 유전자의 전사는 고온에 반응하지 않음에도 PtDRG1은 내열성을 향상시킴을 의미한다. 이러한 가설을 증명하기 위해 PtDRG1 유전자를 pET28a 벡터에 클로닝하여 대장균에 도입 하였다. 대장균에서의 PtDRG1 유전자의 발현은 SDS-PAGE에 의해 확인되었다.(Figure 3.3.19A) PtDRG1 단백질은 25 kDa 이상의 크기로 SDS-PAGE 겔에서 검출되었다. Empty pET28a 벡터를 갖는 대장균 세포를 대조군으로 사용 하였다. 대조군과 형질전환 박테리아는 모두 37°C에서 유사한 성장 패턴을 보였다. 그러나 형질전환 박테리아 세포를 PtDRG1 유전자 발현을 위해 IPTG로 처리 한 후 고온 (46 °C)에서 배양 하였을 때, 이들 형질 전환 세포는 대조군 세포보다 높은 성장 속도를 보였다 (Figure 3.3.19b). 이러한 결과는 PtDRG1이 Chlamydomonas뿐만 아니라 박테리아 세포에서의 열 스트레스 저항성을 향상 시킨다는 것을 입증한다. 이것은 건조 처리 된 세포가 고온에 대한 내성을 가질 수 있음을 시사한다.

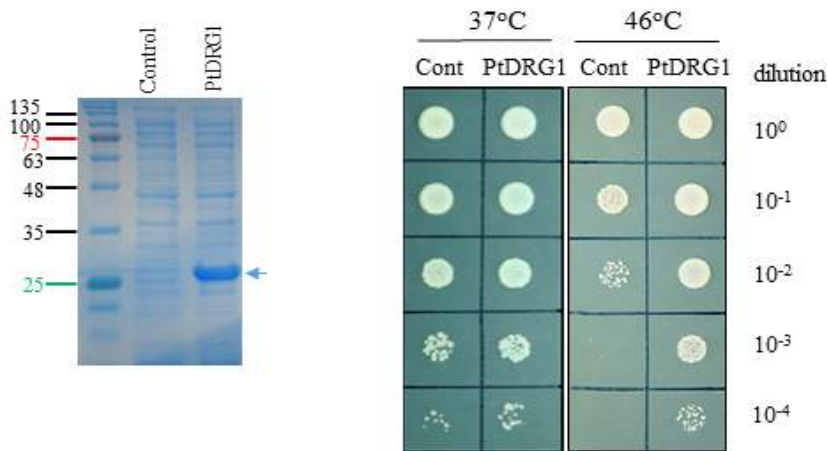


Figure 3.3.19. Effects of PtDRG1 on growth of *E. coli* under high temperature.

a Expression of PtDRG1 in transformed *E. coli* cells was verified by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). PtDRG1 gene expression was induced by 0.1 mM IPTG. Band corresponding to PtDRG1 protein is indicated by an arrow. b Growth of bacteria cells was measured by spotting diluted cultures (serial dilution of 10^0 to 10^{-4} from cultures at OD 600 = 0.5) on LB agar plates. Cells were incubated at 37 and 46 °C, respectively. Photographs were taken after 12 h of incubation for cells incubated at 37 °C and after 15 h for cells incubated at 46 °C

(6) PtDRG1의 Chaperone 활성

이전의 연구들은 많은 스트레스 단백질이 세포에서 초기 단백질의 응집을 방지하고 응집체로부터 기질 응집체를 보호함으로써 폴리펩티드의 정확한 폴딩을 촉진시키는 molecular Chaperone 기능을 나타내는 것으로 나타났다. PtDRG1은 환경 스트레스에 반응하고 열 및 삼투압과 같은 비 생물적 스트레스 내성을 향상시킨다. 비 생물성 스트레스 저항성에서 PtDRG1의 분자기능을 분석하기 위해, 우리는 대장균으로부터 PtDRG1 단백질을 정제 하고 (Figure

3.3.20), 정제 된 PtDRG1 단백질을 사용하여 Chaperone 활성이 있는지를 결정 하였다. 알코올 탈수소 효소 (ADH)를 단백질의 열 응집을 억제하는 PtDRG1의 능력을 평가하기 위한 기질로 사용 하였다. ADH 용액은 다양한 농도 (0.1 ~ 5mg / ml) 또는 PtDRG1 (ADH 단독)없이 준비 되었고 55°C에서 보관되었다. 열처리에 의해 단백질 응집체를 분석하기 위해, ADH 용액의 탁도를 A360 nm에서 50 분 동안 모니터링 하였다. BSA (10mg / ml)는 샤페론 활성을 지니기 때문에 양성 대조군으로 사용되었다. 결과는 PtDRG1이 열 스트레스 조건 하에서 기질로서 ADH의 열 응집을 현저히 감소시킴을 보였다 (Figure 3.3.20). 이러한 결과는 PtDRG1이 열 스트레스 하에서 단백질의 응집을 보호 할 수 있는 분자 샤페론 활성을 갖는다는 것을 입증한다.

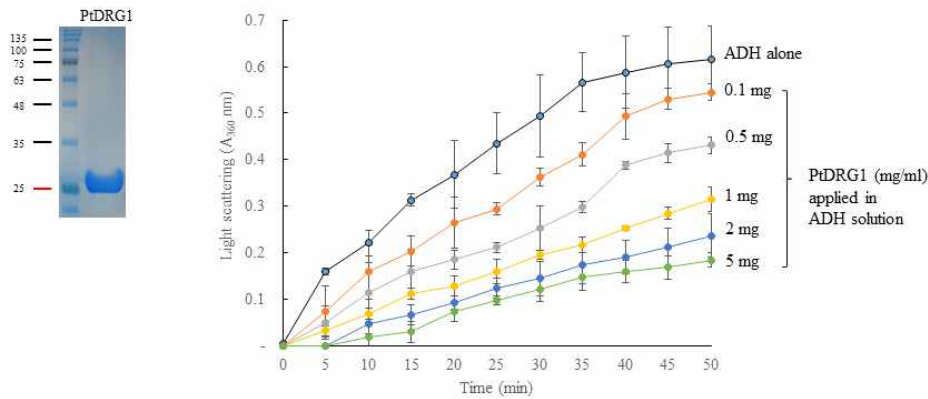


Figure 3.3.20. Chaperone activity of PtDRG1. PtDRG1 was used for chaperone activity assay after confirming purity using SDS-PAGE.

SDS-PAGE analysis result of recombinant PtDRG1 protein purified from *E. coli* (left). B. Chaperone function of PtDRG1 was examined using alcohol dehydrogenase (ADH) as a substrate (right). To induce aggregation, ADH was heated to 55 °C. Thermal aggregation of ADH was determined by monitoring the turbidity at A 360 for 50 min in the presence of PtDRG1 protein (0.1~5 mg/ml) or without (linear line with open circle). Standard deviations (vertical bar) were calculated from data obtained from three replicate experiments.

(7) PtDRG1 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 형질전환체 제작 및 특성분석

김 유전자인 PtDRG1을 육상식물에서도 스트레스 내성을 부여하는지 확인하기 위해 식물 전용 발현 벡터인 pPZP211에 클로닝 후 *Agrobacterium*을 이용하여 애기장대에 형질전환 하였다. 형질전환된 애기장대를 종자를 Knamycin을 통하여 7개의 Line을 선별하였다. 7개의 Line에서 gDNA를 추출 한 후 PCR을 통하여 PtDRG1 유전자의 도입을 확인 한 결과 6개의 Line에서 형질전환이 확인되었고 이들의 RNA를 추출하여 발현 유무를 확인하였다. 그 결과 모두 발현되고 있는 것을 확인하였고 이는 김 유전자인 PtDRG1가 형질전환된 애기장대를 제작 할 수 있었다. 이들을 이용하여 건조 스트레스 내성 유무를 확인하였다. MS배지와 200 mM, 300 mM, 400 mM 농도의 Mannitol을 포함한 MS배지에 옮겨 1주 동안 뿌리 길이를 확인한 결과 기본 MS배지와 다양한 농도의 Mannitol을 포함한 MS배지에서 Col-0보다 형질전환체에서 뿌

리길이 생장이 더 잘 일어나는 것을 확인하였다. 기본 MS 배지에서는 형질전환체가 Col-0보다 8% 정도 뿌리 성장 속도가 더 빨랐고 Mannitol을 포함한 MS배지에서 형질전환체는 Col-0보다 13~17% 뿌리 성장 속도가 더 빠른 것을 확인할 수 있었다

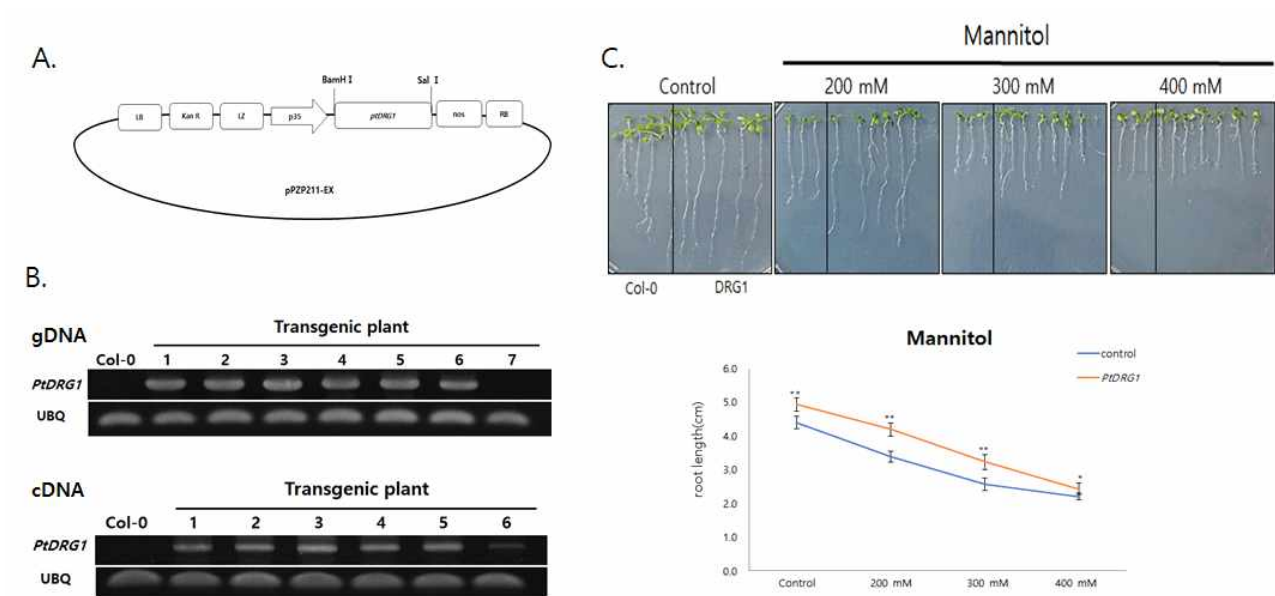


Figure 3.3.21 Assay for mannitol stress tolerance of PtDRG1 overexpression Arabidopsis.

(A) Diagram of the T-DNA region of the binary vector pZP211. LB, left border; RB, right border; p35, cauliflower mosaic virus 35S promoter; Kan R, kanamycin resistance gene; NOS, nopaline synthase terminator. (B) gDNA PCR and RT-PCR analysis of PtDRG1 in transgenic Arabidopsis lines. Wild Type(Col-0) was used as a control. UBQ8 was a loading control. (C) The phenotype of transgenic and Wild Type(Col-0) Arabidopsis Primary root lengths on MS, MS + 200 mM mannitol, MS + 300 mM mannitol and MS + 400 mMmannitol respectively, for 7 days.

나. PtFUT의 선별 및 기능 연구

(1) PtFUT 유전자 선별 및 특성

참김 desiccation transcriptome 분석을 통해 선별된 desiccation DEG의 발현 특성을 qRT-PCR를 이용하여 조사하였다. 조사한 DEG중 contig 7289는 건조 스트레스하에서 발현이 크게 증가되었으며, 이 유전자는 591개의 아미노산으로 구성된 약 63.26 kDa의 pI 5.11의 단백질을 암호화하고 있었으며, blast를 이용한 아미노산 유사성 검사 결과 알려진 fucosyltransferase에 존재하는 domain이 존재함을 보였다. 따라서 이 유전자를 fucosyltransferase like protein, PtFUT로 명명하였다. Domain을 중심으로 아미노산 서열 분석 결과 PtFUT는 α -1,2 fucosyltransferase와 가장 높은 유사성을 보였다 (Figure 3.3.22)

FUT family	Species	EMBL/NCBI	Conserved peptide motifs			
			I	II	III	
Pyropia	<i>P. tenera</i>	N/A	394	TVVGLHLRLGQYK <29>PVLVVASDDLEAVLR<28>FPDWYMLTQCDVLAISN-STFSFTACMA 505		
	<i>P. yezoensis</i>	N/A	394	TVVGLHLRLGQYK <29>PVLVVASDDLEAVLR<28>FPDWYMLTQCDVLAISN-STFSFTACMA 505		
	<i>P. seriata</i>	N/A	399	TVVGLHLRLGQYK <29>PVLVVASDDLEAVLR<28>FPDWYMLTQCDVLAISN-STFSFTACMA 510		
α -1.2	<i>H. sapiens</i>	M35531	213	TFVGVHVRGQYK <30>PVFVVTSSNGMWCLE<20>KEDFALLTQCNTIMTI-GTFGFWAAYL 317		
	<i>M. musculus</i>	U90553	215	TFVGVHVRGQYK <30>PVFVVTSSNGMWCLE<20>KEDFALLTQCNTIMTI-GTFGFWAAYL 319		
	<i>S. scrofa</i>	L50534	213	TFVGVHVRGQYK <30>PVFVVTSSNGMWCLE<20>KEDFALLTQCNTIMTI-GTFGFWAAYL 317		
	<i>B. taurus</i>	AF186465	213	TFVGVHVRGQYK <30>PVFVVTSSNGMWCLE<20>KEDFALLTQCNTIMTI-GTFGFWAAYL 317		
	<i>H. sapiens</i>	U17894	194	TFVGVHVRGQYK <30>LIFVVTSSNGMWCLE<20>AKDFALLTQCNTIMTI-GTFGIWAAYL 298		
	<i>M. musculus</i>	AF214656	198	TFVGVHVRGQYK <30>PVFVVTSSNGMWCLE<20>KEDFALLTQCNTIMTI-GTFGIWAAYL 302		
	<i>S. scrofa</i>	U70881	191	TYVGVHVRGQYK <30>PVFVVTSSNGMWCLE<20>KEDFALLTQCNTIMTI-GTFGIWAAYL 295		
	<i>B. taurus</i>	X99620	195	TYVGVHVRGQYK <30>PVFVVTSSNGMWCLE<20>KEDFALLTQCNTIMTI-GTFGIWAAYL 299		
	<i>H. laevis</i>	E25301	207	TFIAIHVRGQYK <30>PVFVVTSSNGMWCLE<20>KEDFALLTQCNTIMTI-GTFGFVWVYL 311		
	<i>A. Thaliana</i>	AT2015390	236	PHLYMHNLDSDR<105>QVTSCTQREKLL-PE<70>LAEMVLLSLTDNIVASSRSTFGYVAYSL 465		
α -1.6	<i>H. sapiens</i>	D89289	358	PVIGVHVRGQYK <32>RVYLATDDPSLL-KE<34>ILDHFLSQADFLVCTF-SSQVCRVAYE 477		
	<i>M. musculus</i>	AB025198	358	PVIGVHVRGQYK <32>RVYLATDDPSLL-KE<34>ILDHFLSQADFLVCTF-SSQVCRVAYE 477		
	<i>S. scrofa</i>	D86723	358	PVIGVHVRGQYK <32>RVYLATDDPSLL-KE<34>ILDHFLSQADFLVCTF-SSQVCRVAYE 477		
	<i>B. taurus</i>	AF247186	358	PVIGVHVRGQYK <32>RVYLATDDPSLL-KE<34>ILDHFLSQADFLVCTF-SSQVCRVAYE 477		
	<i>X. laevis</i>	AJ514872	361	PVIGVHVRGQYK <32>RVYLATDDPSLL-KE<34>ILDHFLSQADFLVCTF-SSQVCRVAYE 480		
	<i>D. melanogaster</i>	AY051451	397	PVIGVHVRGQYK <32>RVYLATDDPSLL-KE<34>ILDHFLSQADFLVCTF-SSQVCRVAYE 516		
	<i>C. elegans</i>	AJ512486	344	PVIGVHVRGQYK <34>RVYLATDDPSLL-KE<34>ILDHFLSQADFLVCTF-SSQVCRVAYE 464		
	<i>C. intest.2</i>	AJ515151	269	PVIGVHVRGQYK <34>RVYLATDDPSLL-KE<35>VTVVHLLVECDHFGVTF-SSNIGRLVYE 389		
	<i>C. intest.5</i>	AJ515152	312	PVIGVHVRGQYK <33>RVYLATDDPSLL-KE<33>LQDVFLMAECDYFVGM-SSNVGRLVHE 431		
	<i>A. Thaliana</i>	AT5028910	397	PVIGVHVRGQYK <47>RVYLATDDPSLL-KE<17>LAEMVLLSLTDNIVASSRSTFGYVAYSL 516		
O-FUT	<i>H. sapiens</i>	AF375884	233	PVIGVHVRGQYK <59>SVYIATDSESYV-PE<19>QIDLYILGQADHFIGNCVSSFTAFVKRE 365		
	<i>M. musculus</i>	AF375885	238	PVIGVHVRGQYK <59>SVYIATDSESYV-SE<19>QIDLYILGQADHFIGNCVSSFTAFVKRE 370		
	<i>S. scrofa</i>	AJ567917	225	PVIGVHVRGQYK <59>SVYIATDSESYV-PE<19>QIDLYILGQADHFIGNCVSSFTAFVKRE 357		
	<i>G. gallus</i>	AJ535754	225	PVIGVHVRGQYK <59>SVYIATDSEPYT-KE<19>QIDLYILGQADHFIGNCVSSFTAFVKRE 357		
	<i>X. laevis</i>	AJ514425	225	PVIGVHVRGQYK <59>SVYIATDSEPYT-AE<19>QIDLYILGQADHFIGNCVSSFTAFVKRE 357		
	<i>D. melanogaster</i>	Q9V6X7	238	PVIGVHVRGQYK <62>SVFVASDSNHMI-GE<20>YLDLAILGRANHFIGNCISYSYAFVKRE 374		
	<i>A. gambiae</i>	EAA05278	229	PVIGVHVRGQYK <62>AVFVASDSNHMI-GE<20>YLDLAILGRANHFIGNCISYSYAFVKRE 365		
	<i>C. intestinalis</i>	AK112708	226	PVIGVHVRGQYK <58>SLFIATDASSYE-NE<22>MMDLALLIESDRFIGSCGSSVTAFAVSRK 360		
	<i>A. Thaliana</i>	AT1604910	255	PVIGVHVRGQYK <62>RIYLAAGELGFFEQF<68>FRITIRPDRFALAPIFIARERKRGAGE 440		
	Consensus				PVIGVHVRGQYK	PVIVATDDGMLL-KE
Conservation						
Sequence logo						

Figure 3.3.22. Alignment of three motif peptides found in PtFUT and various animal fucosyltransferases including α -1,2-fucosyltransferases, α -1,6-fucosyltransferases and o-fucosyltransferases.

Numbers in start and end column indicate the location of the conserved peptide motifs in polypeptide sequences and < > indicate amino acid numbers in between motifs.

그러나 김 FtFUT는 녹색 식물 보다는 cyanobacteria의 FUT와 계통학적 연관성을 보인다. (Figure 3.3.23) 아래 Figure 3.3.23는 김을 포함한 홍조류의 FUT like protein을 동물을 포함 여러 종의 FUT간 phylogenic tree를 그린 결과이다.

아미노산 서열 분석 결과 김 FUT는 핵으로 전달되는 signal peptide 서열이 존재하였다 (Figure 3.3.24). 따라서 이 단백질은 핵 단백질로 예측된다.

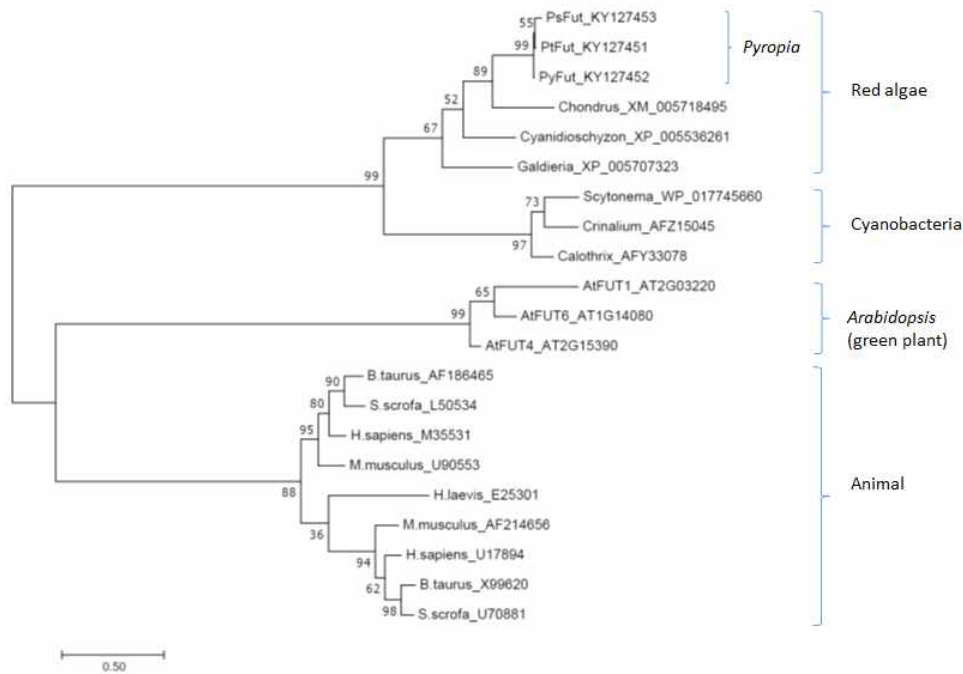


Figure 3.3.23. Phylogenic analysis of α -1,2-fucosyltransferases.

Polypeptide of FtFUT and FtFUT homologs from red algae and α -1,2-fucosyltransferases from Arabidopsis and animals were compared.

```

PtFut  MAVDMTTSTTT----TPMGSSTCADGTAQPPVTKKMRRAGGFGATCEVSGLSAKLPTASSVKASELASLLDLLYAKAGVVEGATETEEVAALLGADGYNL
PyFut  MAVDMTTSTTT----TPMGSSTCADGTAQPPVTKKMRRAGGFGATCEVSGLSAKLPTASSVKASELASLLDLLYAKAGVHEDATETEEVAALLGADGYNL
PsFut  MAVDMATSTTTNVHANPMVVSSTCADGMVQPPLTKKMRRAGGFGSTCDVPGLSAKLPTASTVKASELASLLDLLYAKAGVHEDATETEEVAALLGADGYNL
*****:***** .** ***** .***:*****:***:*.*****:*****:*****:*.*****:*****

PtFut  VTRLGALAVAPQSP-SESLDVSVDGLSSDDGCVSPSTQGDRFVPCSSVRVDDDA | S | EHDLCVAPDMAPEPVDLTLPVVDAPVVPDVSRRPVGVSNAAA
PyFut  VTRLGALAVAPQSP-SESLDVSVDGLSSDDGCVSPSTQGDRFVPCSSVRVDDDA | S | ERDLCAVPDMAPEPVDLTLPVVDAPVVPDVSRRPVGVSNAAA
PsFut  VTRLGALAVAPQLPPTVSLDVSVDGLSSDDGCVSPSSQDSCVSPFGRVDDDA | S | EHDLNAVPDVAPEPVDLTVRAVDVAVVPDVRPVPVPIAAA
***** * : *****:*** *. . *****:*** *****:*.*****:*.*****:*.*****

PtFut  ESYAVKADTEI ALSRI FELGKVAKVHPEI SPMAPYDGPVVTMTGFGELGRFGNQVLQYAFRLRCYAAKHGNLEI QVPSWVGASLFLNNPEVKRPFPAV
PyFut  EPVAVKADTEI ALSRI FELGKVAKVHPEI SPMAPYDGPVVTMTGFGELGRFGNQVLQYAFRLRCYAAKHGNLEI QVPSWVGASLFLNNPEVKRPFPAV
PsFut  EPVAVKADTEI ALSRI FELGKVAKVHPEI SPLAPYDGPVVTMTGFGELGRFGNQVLQYAFRLRCYAAKHGNLEI QVPSWVGASLFLTNPEVNRPFPAV
*.*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

PtFut  VESRDTKANSTFTSDFI DYI KASNAGMDVPELPECI LDADQPRPAANVDVWGWFWQWHTRAYAPYKTLI QNTFTPVPAVAEPLRAAFDKSLRFRGGVKRTV
PyFut  VESRDTKANSTFTSDFI DYI KASNAGMDVPELSECI LDADQPRPAANVDVWGWFWQWHTRAYAPYKTLI QNTFTPVPAVAEPLRAAFDKSLRCRGGVKRTV
PsFut  VESRDTKANSTFTSDFI DYI KASNAGMDVPELPECI LDADQPRPAANVDVWGWFWQWHTRAYAPYKTLI QKTFTPVPAVADPLRDAFEKALRFRGGMKRTV
***** .*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

PtFut  VGLHLRLGDYKTI AASSFGYCAPTSWYLEWLAQVWPTLENPVLCVASDDLEAVLRDFAEYNPITSEAAGLELPESFRGKGAGFFPDWYMLTQCQDVLAI SN
PyFut  VGLHLRLGDYKTI AASSFGYCAPTSWYLEWLAQVWPTLENPVLCVASDDLEAVLRDFAEYNPITSEAAGLELPESFRGKGAGFFPDWYMLTQCQDVLAI SN
PsFut  VGLHLRLGDYKTI AASSFGYCAPTSWYLEWLAQVWPTLENPVLCVASDDLEAVLRDFAEYNPITSEAAGLELPESFRGKGAGFFPDWYMLTQCQDVLAI SN
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

PtFut  STFSFTACMANTRPGARFYRAHYAHFMEEI APWDADI VHRDVSALSTLQVLYNTQGAALARNVLYELPYYGVRSVLMKGVLGVRRAARAKAVAAV identity
PyFut  STFSFTACMANTRPGARFYRAHYAHFMEEI APWDADI VHRDVSALSTLQVLYNTQGAALARNVLYELPYYGVRSVLMKGVLGVRRAARAKAVAAV 98.5%
PsFut  STFSFTACMANTVPDARFYRAHYAHFMEEI APWDADI VHRDVSALSTLQVLYNTQGAALARNVLYELPYYGVRSVLMKGVLGVRRAARAKAVAAV 81.9%
***** * .*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

Figure 3.3.24. Alignment of the amino acid sequence of the PtFUT and its homologs.

Amino acid alignment of PtFUT and its homolog from *P. yezoensis* and *P. seriata*. A amino acid sequence for nuclear localization was boxed. The motifs for GDP-fucose binding found in the fucosyltransferases are marked as bold. Asterisk (*) and : indicate identical and similar amino acid residues, respectively. The alignment was performed using the Clustal X.

(2) PtFUT 유전자의 발현 특성 및 세포내 위치 확인

여러 가지 환경 스트레스에 대한 PtFUT 유전자의 발현 특성을 조사하기 위해 고온, 건조 그리고 mannitol, H₂O₂를 처리한 김엽상체로부터 Total RNA를 분리하여 qRT-PCR를 수행하였다. 분석결과 PtFUT 유전자는 desiccation stress와 mannitol 및 과산화 수소처리에 의해 유도된 osmotic stress 에 의해 발현이 증가됨을 보였다. 그러나 heat stress 는 반응하지 않았다. (Figure 3.3.25a). 또 PtFUT 유전자 발현은 건조스트레스 처리시 30분내로 반응함을 보였다. 김 엽상체의 상대 습도는 건조 처리 30분 후 약 86.0% 로 측정되었다. 또 PtFUT 유전자는 육상식물에서 스트레스 호르몬으로 잘 알려진 ABA에 반응함을 보였다 (Figure 3.3.25c). 이러한 결과는 PtFUT 유전자는 건조 및 osmotic stress하에서 발현되어 이들 스트레스에 대한 tolerant 기작에 관여함을 추측하게 한다.

PtFUT는 nuclear localization signal인 PPVTKKMRRAGGF 서열을 가지고 있어서 핵에 위치할 것으로 예상된다. PtFUT의 세포내 위치를 추적하기 위해 PtFUT 유전자를 326-GFP (green fluorescent protein) 벡터의 GFP gene에 클로닝해 PtFUT-GFP 재조합 DNA를 제작하였다. 재조합 DNA를 tobacco (*Nicotiana bethamiana*) protoplasts에 도입했을 때 PtFUT-GFP fusion proteins의 형광은 주로 핵에서 관찰되었다 (Figure 3.3.26.). 대조구인 326-GFP는 세포

질에서 관찰된다. 그리고 담배 원형질체를 DAPI 염색했을 때 PtFUT-GFP fusion protein의 형광은 DAPI signal과 overlapped되었다(Figure 3.3.26 g, h, i). 이러한 결과는 PtFUT이 핵에 위치함을 보여준다.

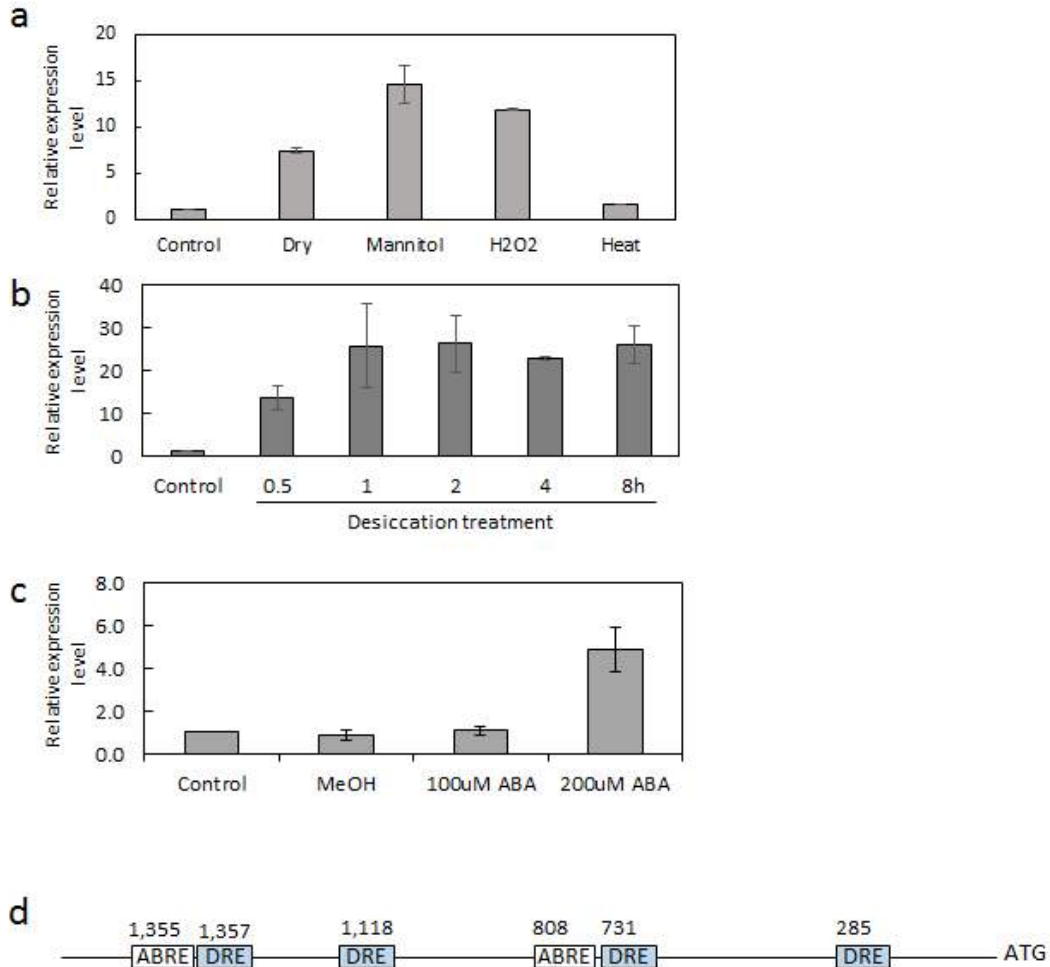


Figure 3.3.25. Expression pattern of the PtFUT gene under various abiotic stress conditions in gametophyte thalli of *P. tenera*.

a. Total RNAs were purified from the gametophyte thalli of *P. tenera* under desiccation, heat or tissues cultured in media containing 0.5M mannitol or 20mM H₂O₂ and amplified by qRT-PCR. The PtAct gene was used as the internal control. Bars are means \pm standard deviations (SD). b. PtFUT gene expression under osmotic stress. Gametophyte thalli of *P. tenera* were harvested 0.5, 1, 2, 4 and 8 hours after gametophytes were transferred into medium containing 0.5M mannitol. c, ABA response of the PtFUT gene. Gametophyte thalli of *P. tenera* were cultured in medium containing 100uM or 200 uM ABA for 4 hours. MeOH was used as control. d, Putative cis-elements in the PtFUT promoter region. The approximately 1,500 bp upstream from the start codon of PtFUT was analyzed for putative regulatory sequence elements. The consensus sequences identified were ACGTGT/GC for the ABA responsive element (ABRE), and CCGAC for the drought

response element (DRE). Numbers on the boxes indicate the nucleotides relative to the site of the start codon.

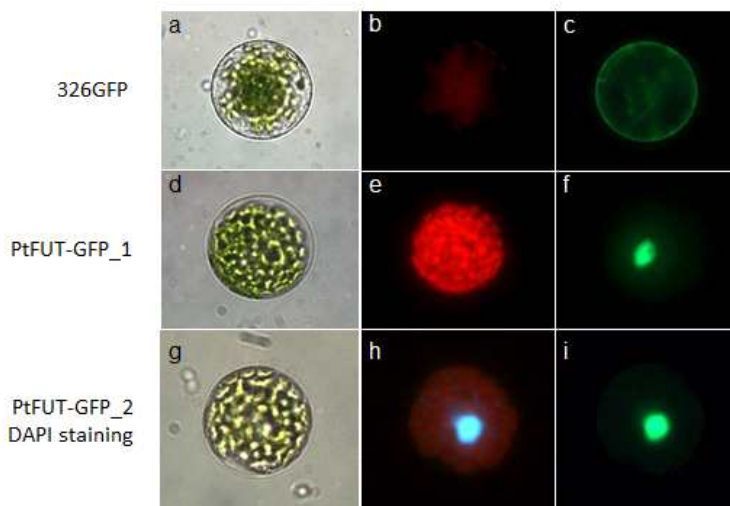


Figure 3.3.26. Subcellular localizations of PtFUT

A reporter gene encoding green fluorescent protein (GFP) was fused to PtFUT under the control of the CaMV 35S promoter in the 326-GFP vector. The constructs were introduced into the protoplasts of *Nicotiana benthamiana*. The 326-GFP empty vector served as the control. After overnight incubation, PtFUT-GFP localization in individual cells was observed by GFP fluorescence. a, d and g: contrast interference images of the structure of the whole protoplast; b, e and h: cell images using a UV filter; c, f and i: cell images using a green filter for GFP fluorescence. To check nucleus location, protoplast were stained with DAPI and observed under UV and green filter (g, h and i).

(3) PtFUT 유전자의 기능 연구

김 PtFUT 유전자 생리적 기능을 조사하기 위해 PtFUT 유전자를 *Chlamydomonas* 발현 벡터인 pCr112에 클로닝(Figure 3.3.27a)하고 제작한 재조합 DNA를 *Chlamydomonas reinhardtii* Mt11에 도입하여 형질전환체들을 얻었다. PtFUT 유전자의 도입과 발현은 형질전환된 *Chlamydomonas* 세포로부터 genomic DNA 및 Total RNA를 추출하고 cDNA를 합성하여 PtFUT 유전자 specific primer를 이용한 PCR를 통해 확인하였다 (Figure 3.3.27.b).

세포내에서 PtFUT의 생리적 기능을 조사하기 위해 PtFUT 유전자가 도입되어 발현되는 *Chlamydomonas* 형질전환체를 mannitol 및 PEG가 첨가된 배지에서 배양하며 관찰하였다 (Figure 3.3.27.c). 분석결과 Mannitol과 PEG가 첨가된 배지에서 형질전환 *Chlamydomonas*는 대조구에 비해 더 높은 생장을 보였다. 이는 도입된 PtFUT 유전자의 발현이 형질전환된 *Chlamydomonas*에서 mannitol 및 PEG에 의해 유도된 osmotic stress에 대한 내성에 관여함을 보여준다.

PtFUT 유전자가 환경 스트레스 내성 기능은 특히 출원하였으며, PtFUT 유전자의 클로닝 및 기능 연구 결과는 논문으로 정리해 투고하였다.

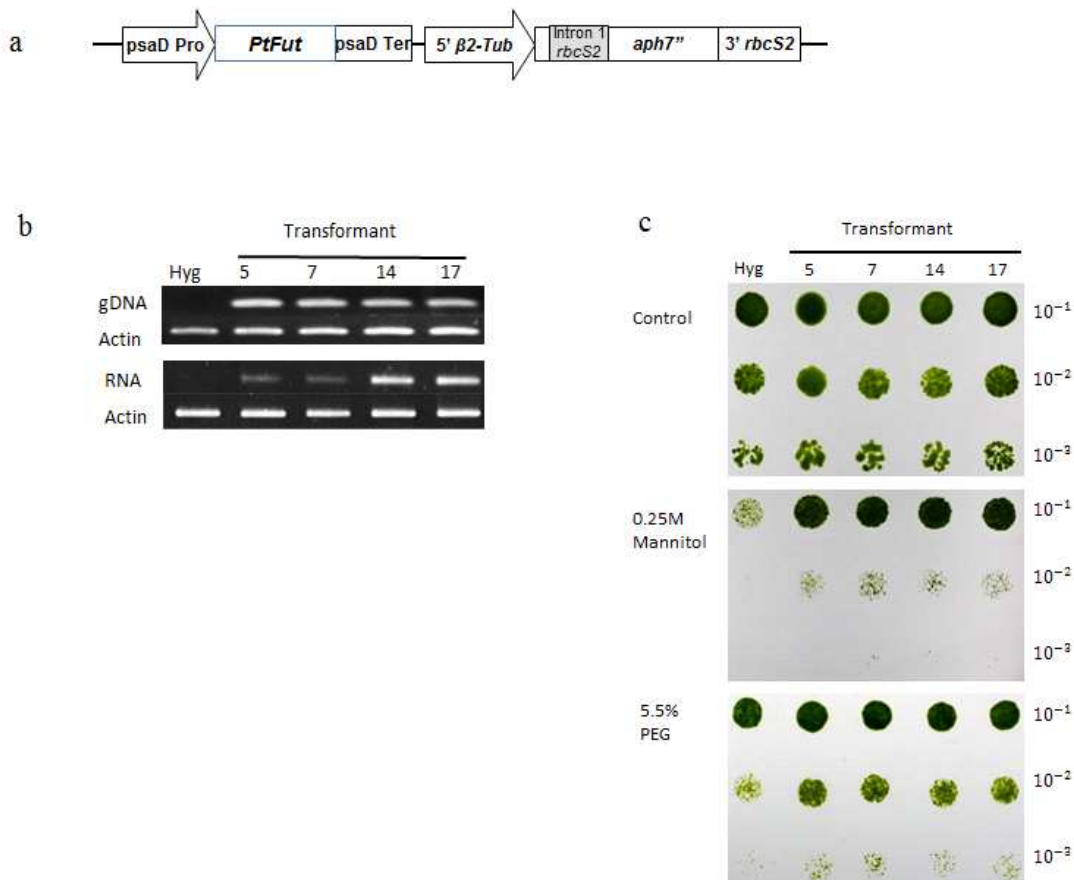


Figure 3.3.27. Effects of PtFUT on growth of Chlamydomonas under stress conditions

a. Vector map for the expression of PtFUT in Chlamydomonas. b, To evaluate the introduction and expression of the PtFUT gene, genomic DNAs and total RNAs were purified from transgenic Chlamydomonas cells, respectively and then PCR amplified with a PtFUT specific primer. c, Four transgenic Chlamydomonas cell lines harboring PtFUT were selected. Survival and growth of the transgenic Chlamydomonas cells were assayed under abiotic stress condition. Chlamydomonas cells were diluted to 10^{-1} - 10^{-3} in fresh medium and 8 ml of diluted cells were inoculated onto agar plates containing 0.25M mannitol and 5.5% PEG. Chlamydomonas transformed with an empty vector, pCR112 (Hyg) served as the control.

다. PyMPV17 유전자 선별 및 기능 연구

(1). PyMPV17 유전자의 클로닝

*Pyropia tenera*의 desiccation transcriptom 분석을 통해 desiccation stress에 반응하는 DEG 들을 선별하였다. 선별된 DEG를 대상으로 qRT-PCR를 통해 Desiccation 조건에서 발현이 증가됨이 확인된 DEG 중 스트레스하에서 약 log239의 높은 수준으로 발현이 증가되는 유전자 Pt contig 7289를 선별하였다 (Figure 3.3.28). Contig 7289는 pI 10.45, 분자량 31.8 KDa의 단백질을 암호화하고 있으며 BLAST를 통해 분석 결과 contig 7289의 C-terminal쪽에 MPV17/PMP22 superfamily domain을 가지고 있는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3.3.28). 우리는 방사무늬김 (*Pyropia yezoensis*)으로부터 contig 7289의 ortholog gene을 클로닝하였으며, 이 유전자를 PyMPV17 like gene으로 명명하였다.

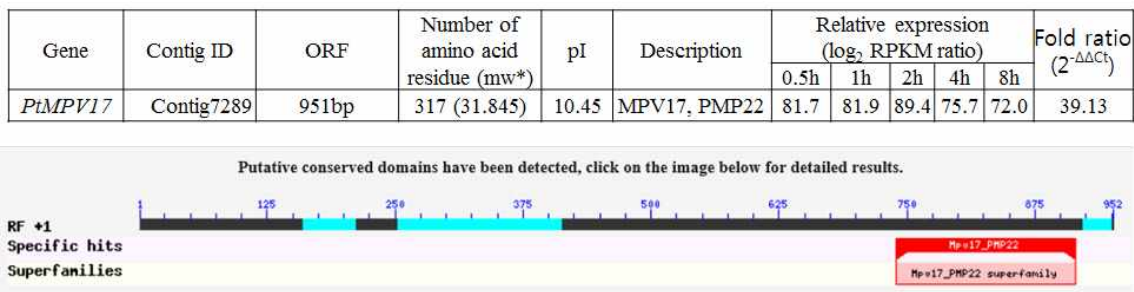


Figure 3.3.28. PyMPV17 protein selected from *P. tenera* desiccation transcriptomes

MPV17은 여러 생물계에 잘 보존되어 있으며 포유동물 (Karasawa et al., 1993), 어류 (Krauss et al., 2013) 및 효모 (Trott and Morano, 2004)에서 이들 각각의 돌연변이체는 매우 다른 표현형을 일으킨다. 특히 포유동물에서는 매우 심각한 질환으로 간뇌질환, 사구체 경화증 등을 일으키며 어류의 경우에는 음영돌연변이(tra), 효모에서는 고온의 에탄올배지에서 대사적 결함을 일으키는 것으로 알려져 있다. MPV17은 미토콘드리아 내막에 위치하는 단백질로 mtDNA 유지보수에 관여할 것으로 예상되고 있으며 MPV17의 점돌연변이나 결실돌연변이의 경우 mtDNA의 복제수 감소와 이로 인한 산화적 인산화의 문제, 활성산소종(ROS) 신호의 활성화와 아포토시스를 일으키는 것으로 알려져 있지만 아직까지 명확한 기능은 알려지지 않았다. 이러한 MPV17유전자가 김의 Desiccation transcriptom DEG에서 선별되었으며 이는 홍조류에서 MPV17이 건조 스트레스와 관련이 있을 것으로 예상되어 PtMPV17의 생리적, 분자적 기능을 조사하였다.

(2) PyMPV17의 서열분석

김의 MPV17과 인간의 MPV17유전자의 단백질 서열을 Clustal 2.1을 통하여 비교분석해 본 결과 C-terminal쪽의 서열들이 잘 보존되어 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 3.3.29).

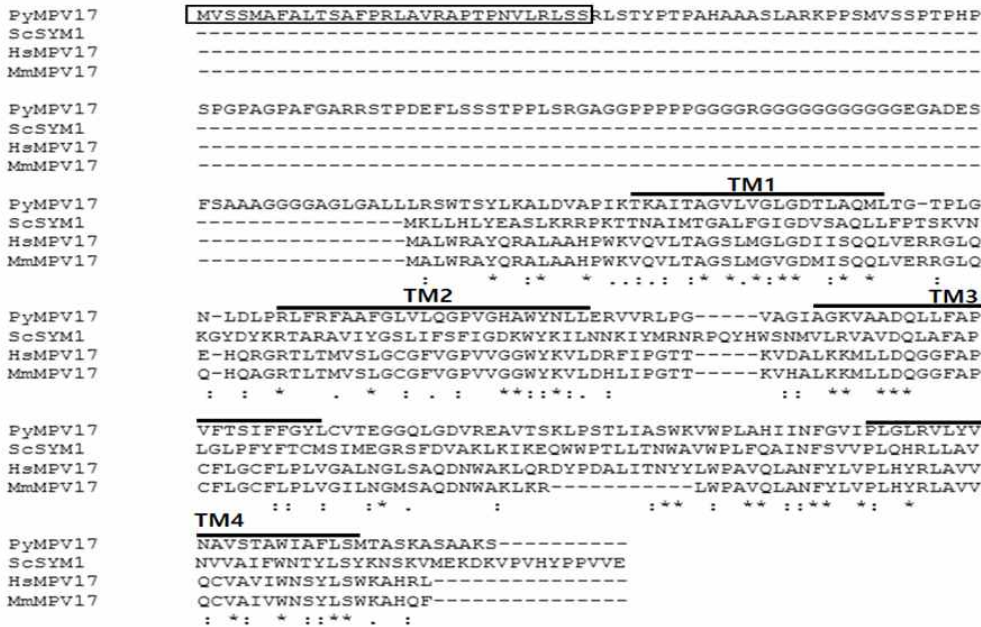


Figure 3.3.29. Amino acid alignment of MPV17 from *P. yezoensis* (PyMPV17), yeast (ScSYM1), human (HsMPV17) and mouse (MmMPV17)

지금까지 알려진 선행연구에서는 MPV17이 4개의 transmembrane을 가지고 있으며 미토콘드리아 내막에 위치하지만 이 유전자의 수송을 뒷받침할만한 신호단백질 서열을 찾을 수가 없었다. 그런데 김의 MPV17의 경우 5개의 transmembrane을 가지고 있으며 N-terminal에 signal peptide가 존재하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 이는 PyMPV17은 세포내 소기관으로 이동되어 존재함을 의미한다. GVA의 서열의 경우 protein kinase C phosphorylation site로 예상되어 지지만 이를 뒷받침할만한 데이터는 아직까지는 보고되지 않았다.

여러종의 MPV17과 PMP22 유전자의 단백질 서열들을 NCBI로부터 얻었으며, PtMPV17의 계통수를 작성해본 결과 분석에 사용한 모든 생물종에서 MPV17과 PMP22서열이 구분되고 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 3.3.30). PtMPV17은 PMP22 계열 보다는 MPV17 계열의 위치함을 확인할 수 있었다. 또한 애기장대 At3g24570의 경우 PMP22 like protein으로 동정되었지만 MPV17 유전자일 것으로 예상되며 진화상 척추동물의 MPV17과 매우 유사함을 알 수 있었다.

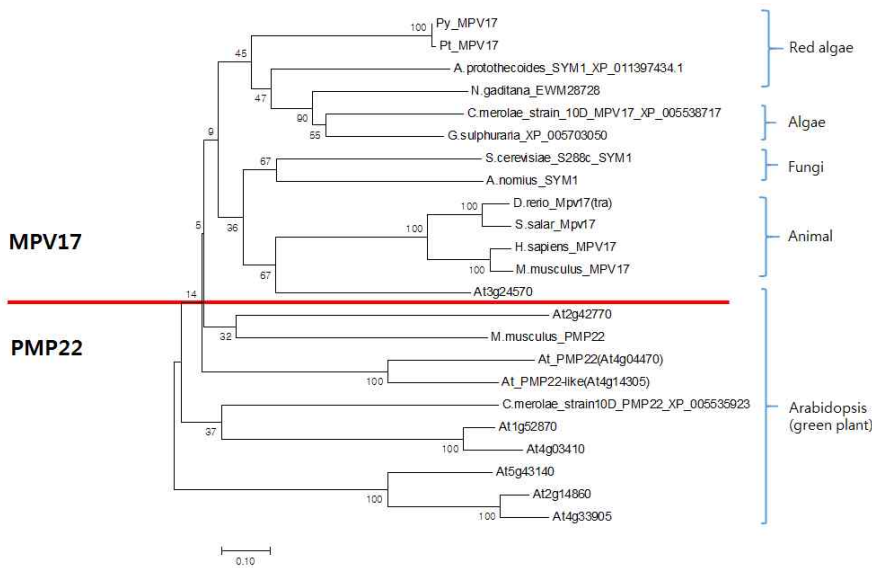


Figure 3.3.30. Phylogenetic analysis of MPV17 and PMP22 from various organisms

(3) PyMPV17 유전자의 발현 패턴 및 세포소기관 위치 확인

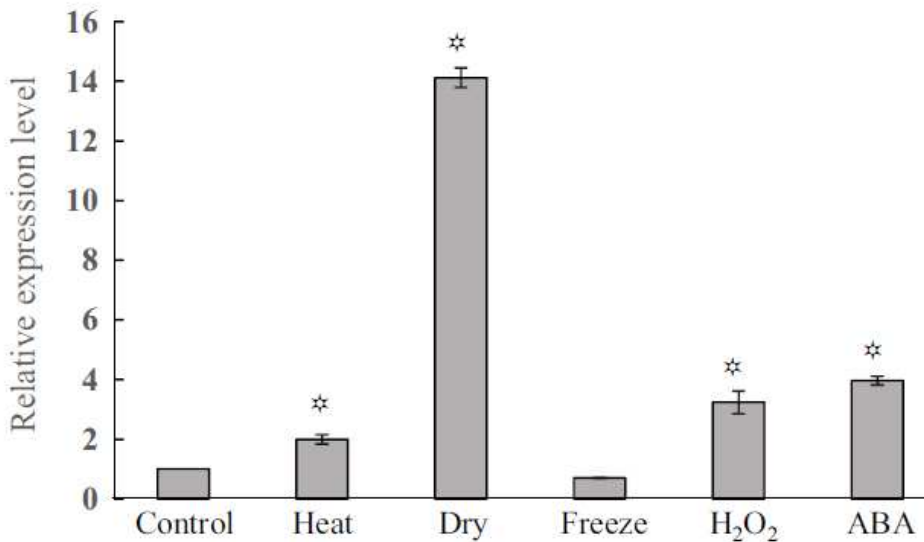


Figure 3.3.31. Expression levels of the PyMPV17 gene in the *Pyropia yezoensis* gametophyte thalli under various abiotic stress conditions. Total RNAs were purified from the gametophyte thalli subjected to desiccation and from tissues cultured in a medium containing 20 mM H₂O₂ or 200 μM abscisic acid (ABA) and amplified by qRT-PCR. Heat and freezing stress were induced at 20°C or -4°C, respectively, for 4 h. The PyGAPDH gene was used as the internal control. Bars Mean ± standard deviation (SD). * Treatment was significantly different from the control at P < 0.05

Desiccation transcriptome DEG에서 선발된 PyMPV17이 과연 건조스트레스에서 어느 정도로 유의미한 발현 차이가 있는지 확인하기 위해서 qRT-PCR을 수행하게 된다. 건조 스트레스뿐만 아니라 여러 비 생물적 스트레스에 관여하는지 혹은 관여하지 않는지를 확인해 보기위해서 실험을 설계한다. *Pyropia yezoensis* 엽상체(15°C growth)를 각각 Heat(20°C), dry(거즈위에서 말리다), freeze(-4°C), 20mM H₂O₂, 200μM ABA 4시간씩 처리한다. RNeasy plant mini kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 total RNA를 추출 한다. 그리고 RNA fragment analyzer Qstep100 (Bioptic, Taiwan)를 이용하여 RNA RIN값을 계산하여 8 이상의 점수를 받은 RNA를 사용한다. AmfiRivert reverse transcriptase (Gendepot, USA)을 사용하여 3ug씩 cDNA를 합성한 후 QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany)로 qRT-PCR을 진행하였다. (Figure 3.3.31)

기존의 yeast 연구에서 SYM1이 heat에 up되는 연구결과가 있었는데 김에서도 2배 정도의 발현패턴을 보이고 있음을 확인할 수 있었다. Freeze를 제외하고는 전체적으로 abiotic stress에 up되고 있으며 특히 dry sample에서 14배로 가장 높은 발현 패턴을 보이고 있음을 다시 한번 확인 할 수 있었다. (Figure 3.3.31). 또한 MPV17이 여러 ROS(활성산소종)의 유전자와 관련이 있어 20mM H₂O₂를 타임코스별로 처리하여 확인해본결과 8시간까지 3배 가까이 up되다 다운되는 것을 확인 할 수 있었다.

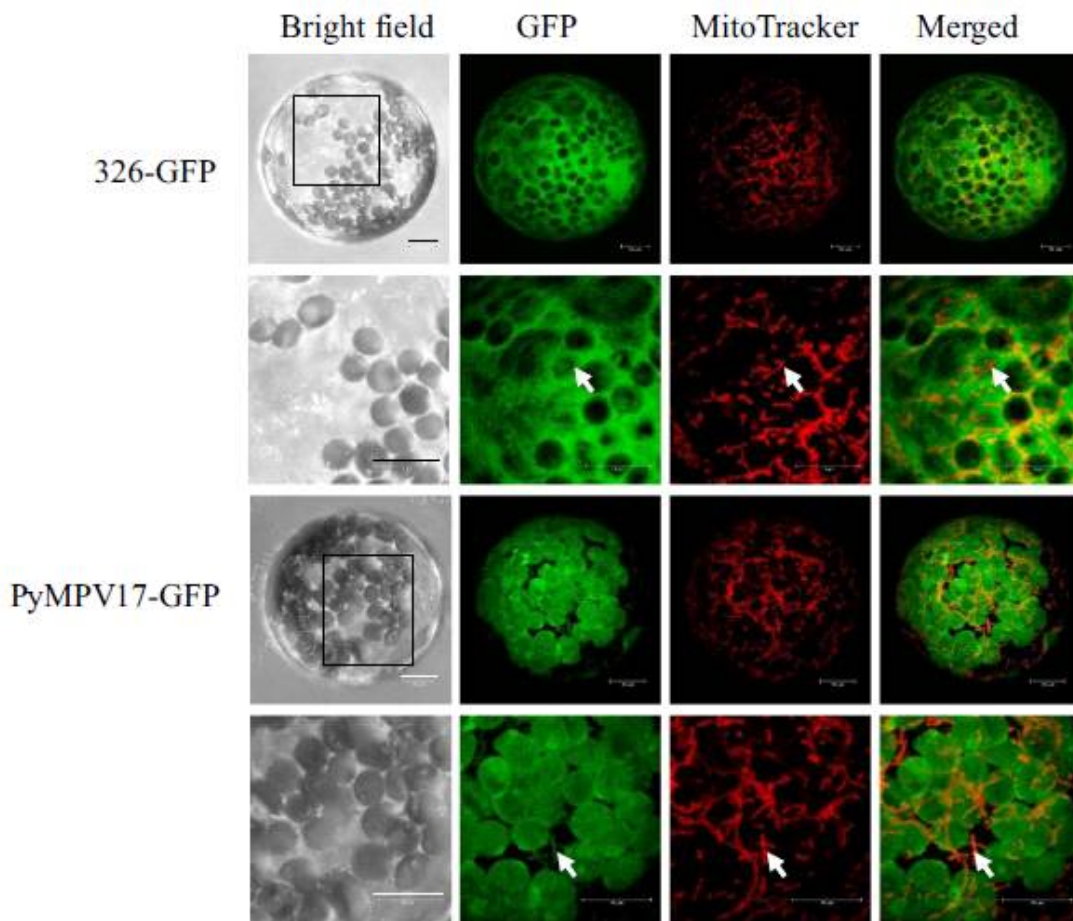


Figure 3.3.32. Subcellular localizations of PyMPV17. A reporter gene encoding green fluorescent protein (GFP) was fused to PyMPV17 under the control of a CaMV 35S

promoter in the 326-GFP vector and introduced into tobacco protoplasts.

The tobacco protoplasts were examined to evaluate GFP expression using a laser confocal scanning microscope. MitoTracker Red was used to track the mitochondria in the tobacco protoplasts. The rectangles show enlarged areas from the bottom row of pictures. Brightfield Contrast interference images of the whole protoplast structure. 326-GFP, empty 326-GFP vector; PyMPV17-GFP, PyMPV17-GFP recombinant. GFP Cell images taken PyMPV17-GFP location after GFP fluorescence; MitoTracker Cell images with a MitoTracker showing the location of mitochondria; Merged a merged image of the GFP and the MitoTracker images. Arrows Location of PyMPV17-GFP. Bar 10 μm

PyMPV17 단백질의 세포내 위치를 추적하기 위해 PyMPV17 유전자를 326-GFP 벡터의 GFP gene에 클로닝해 PyMPV17-GFP 재조합 DNA를 제작하였다. 재조합 DNA를 tobacco (*Nicotiana bethamiana*) protoplasts에 도입했을 때 PyFUT-GFP fusion proteins의 형광은 세포내 특정 위치에서 관찰되었다(Figure 3.3.32). 대조구인 326-GFP의 형광은 세포질에서 관찰된다. 이러한 결과는 PyMPV17은 세포내 특정 소기관에 위치하는 것으로 추측된다.

(4) PyMPV17의 생물학적인 기능 확인

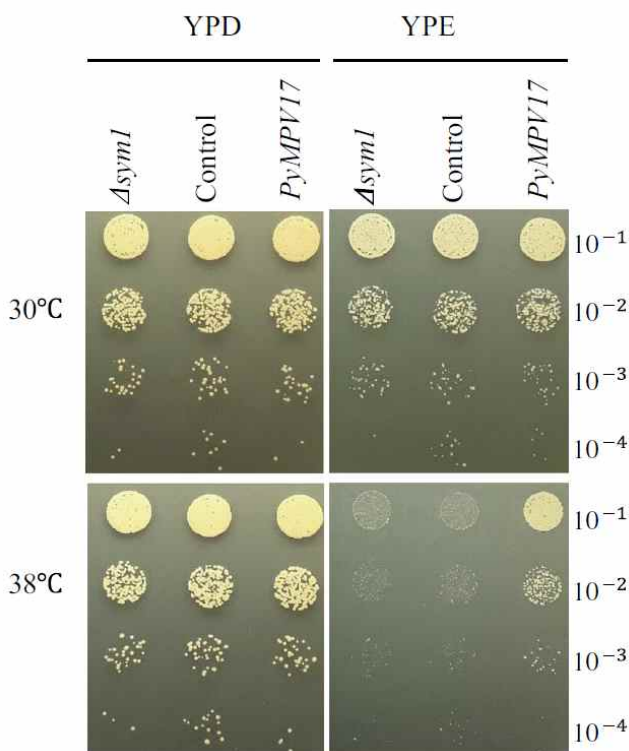


Figure 3.3.33. PyMPV17 complements the 38°C ethanol growth defect shown by the yeast *sym1*.

The PyMPV17 gene was introduced into yeast *sym1* cells. The yeast cells were diluted to 10⁻¹ - 10⁻⁴ in fresh medium and 10 μL of diluted cells were inoculated onto agar plates to determine cell growth in a medium containing dextrose (YPD) or ethanol (YPE) at 30°C and 38°C. Transformed cells containing an empty pDP195 vector were used as the control.

Δ sym1, yeast knock-out mutant of the SYM1; Control, trans-formed sym1 cells with empty vector pDP195; PyMPV17, transformed sym1 cells overexpressing PyMPV17 gene

효모에서 MPV17은 SYM(스트레스 - 유도 성 효모 Mpv17)으로 명명되었으며 인간 MPV17 및 SYM1과 48 %의 유사성 및 32 %의 동일성뿐만 아니라 transmembrane의 유사한 모양을 보고 이들은 ortholog로 간주되었다. yeast에서 SYM이 녹아웃 되면 37°C 에탄올 배지(YPE)에서 성장결함이 나타나는데 이 yeast line에 정상적인 인간의 MPV17을 넣어주면 표현형이 회복되지만 질환을 일으키던 돌연변이의 경우에는 표현형이 회복되지 못하는 것을 확인하였다. 김 PyMPV17의 생물학적 기능 연구를 위해 먼저 SYM 유전자가 KO된 효모 돌연변이체를 얻고, 효모 sym KO mutant가 김 PyMPV17에 의해 회복되는지 상보성 실험을 수행하였다.

KanMX cassette(Dharmacon, NYSE : GE) 도입에 의해 SYM 유전자가 knockout 된 yeast 돌연변이체 (diploid homozygote)와 wild type 효모 BY4743(Mata, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0)는 Dharmacon 사로부터 구입하였다. 그 후 에탄올 배지에서도 발현 될 수 있는 yeast vector인 pDR195에 PyMPV17을 클로닝(Xho I ::Py150126::BamH I forward primer 5'-CTCGAGATGGTGTCTCCATGGCCTTTGC-3', reverse primer 5'-GGATCCTTACGACTTGGCCGCCGAAGCC-3')하였다. SYM1이 KO된 yeast에 pDR195 vector (empty vector) 와 pDR195에 PyMPV17이 클로닝된 재조합 DNA (pDR195-PyMPV17)를 형질 전환시킨다. 형질전환체는 Uracil이 첨가되지 않은 0.67 % Yeast Nitrogen Base(YNB, Standard Minimal Medium) 배지에서 각각 selection 한다. 그 후 colony PCR을 통하여 형질 전환 여부를 확인한 후 assay를 수행하였다.

BY4743 (wild type), Δ SYM1(sym1 KO mutant), pDR195(empty vector in Δ SYM1 KO mutant), PyMPV17(pDR195_PyMPV17 in Δ SYM1 KO mutant) 4개의 yeast cell line을 각각 OD660=0.8~0.9 까지 키운 후 OD660=0.4로 맞추어 다음 1/10 씩 희석하여 4포인트씩(1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000) 각각 만든 후 YPD 배지와 YPE (1 % yeast extract, 2 % Bacto Peptone, 2 % Ethanol) 배지에 10 μ l 씩 접종한 후 30°C, 37°C에서 각각 배양하였다. YPD배지의 경우 1일, 30°C YPE의 경우 1~2일, 37°C YPE의 경우 4~5일 후 yeast colony를 사진을 찍었다. (Figure 3.3.33)

Δ SYM1와 pDR195의 cell line의 경우에는 37°C YPE 배지에서 심각한 성장결함이 나타나는 이전 연구 점을 다시 한 번 볼 수 있었다. 또한 PyMPV17이 Δ SYM1에 삽입될 경우에는 대사 결함 표현형이 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 contig 7289가 MPV17 기능을 시사하고 있음을 확인하였다.

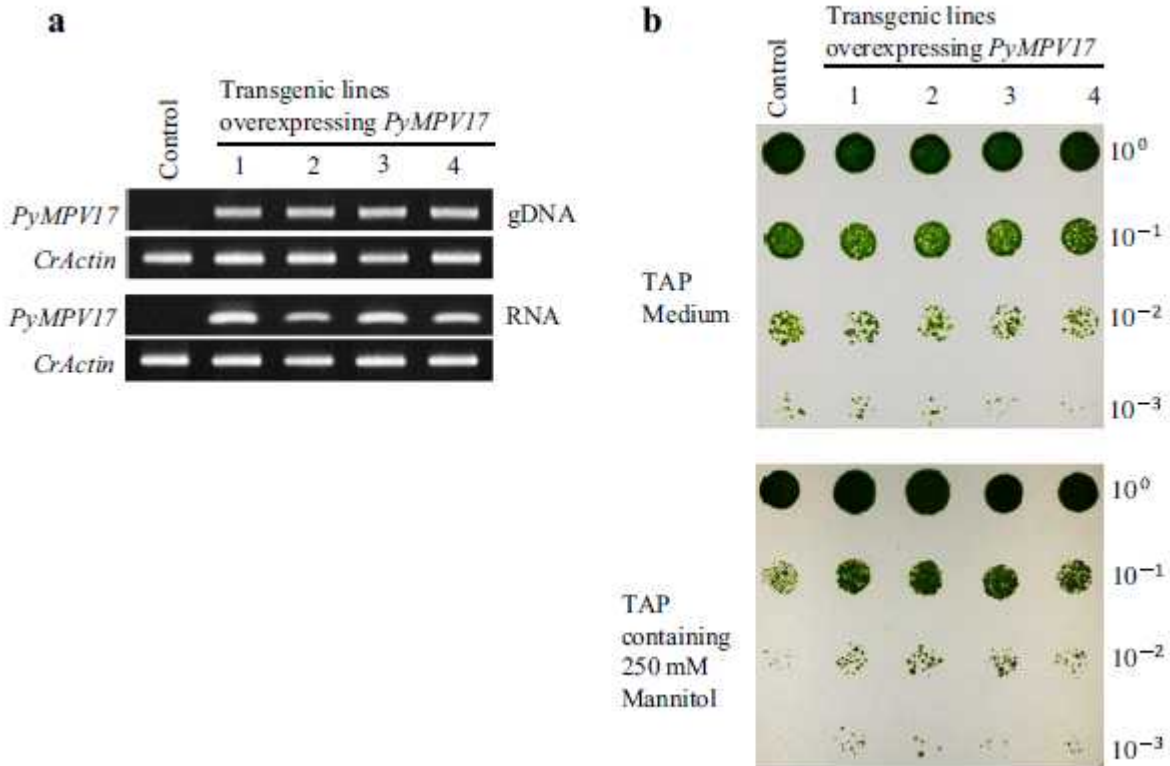


Figure 3.3.34. a,b Effects of PyMPV17 on Chlamydomonas growth under stress conditions.

a Genomic DNAs (gDNA) and RNA (RNA) from transgenic Chlamydomonas cells were purified and PCR amplified with a PyMPV17 specific primer to evaluate the introduction of the PyMPV17 gene. The Chlamydomonas actin gene (*CrActin*) gene was used as the control. b Survival and growth assay of transgenic Chlamydomonas cells harboring PyMPV17 under abiotic stress conditions. The Chlamydomonas cells were diluted to 10⁰ - 10⁻³ in fresh medium and 8 μL of diluted cells was inoculated onto TAP agar plates or TAP containing 250 mM mannitol. The control was Chlamydomonas transformed with an empty vector, pCR112

(5) PyMPV17은 녹조류인 Chlamydomonas에서 삼투 스트레스 내성을 향상시킵니다. 생리적 기능을 조사하기 위해 PyMPV17 유전자를 pCR112 벡터에 클로닝한 다음 녹조류인 Chlamydomonas 녹조류 세포에 도입했습니다. PyMPV17 유전자 ORF는 정방향(5'-CATA TGGTGTCTCCATGGCCTTTG-3') 및 역방향 (5'-GATATCTTACGACTTGGCCGCCGAA-3') 프라이머를 사용하여 PyMPV17 유전자 ORF 전부를 포함하는 플라스미드 DNA로부터 증폭되었습니다. 그 후 pCR112 벡터에 클로닝 하였습니다. pCR112-PyMPV17 플라스미드는 Chlamydomonas reinhardtii 균주 Mut11 세포에 형질전환 하였습니다. PyMPV17이 비생물적 스트레스 내성에 관여하는지 여부를 테스트하기 위해 PyMPV17 유전자를 보유한 Chlamydomonas 세포를 약 2-4×10⁶ cells mL⁻¹의 농도로 성장시키고 새로운 TAP 배지에서 10⁰-10⁻³으로 희석했습니다. 희석된 세포(8μL)를 한천 플레이트에

접종하고 25°C 챔버에서 14:10(밝은:어두운) 광주기하에서 배양했습니다. 그런 다음 세포를 삼투압 스트레스 처리를 위해 250mM 만니톨을 함유하는 한천 배지에 접종하였다. 빈 pCr112 벡터를 보유하는 *C. reinhardtii* 균주 Mut11을 대조군으로 사용하였다.

4개의 형질전환된 *Chlamydomonas*에서 PyMPV17 유전자의 도입 및 발현은 *Chlamydomonas*의 DNA 및 RNA를 추출하여 PCR을 통하여 확인하였다(Figure 3.3.34a). PyMPV17 유전자를 과발현하는 *Chlamydomonas* 세포를 삼투압 스트레스 처리를 위해 250mM 만니톨을 함유하는 한천 배지에 접종하였다. 빈 pCR112 벡터가 도입된 세포를 대조군으로 사용했습니다. PyMPV17 유전자를 과발현한 *Chlamydomonas* 세포는 대조군 세포보다 만니톨 함유 배지에서 더 높은 성장률을 보였다(Figure 3.3.34b). 이러한 결과는 PyMPV17이 *Chlamydomonas* 세포에서 만니톨에 의해 유도된 삼투압 스트레스 하에서 내성을 향상시킴을 입증했습니다.

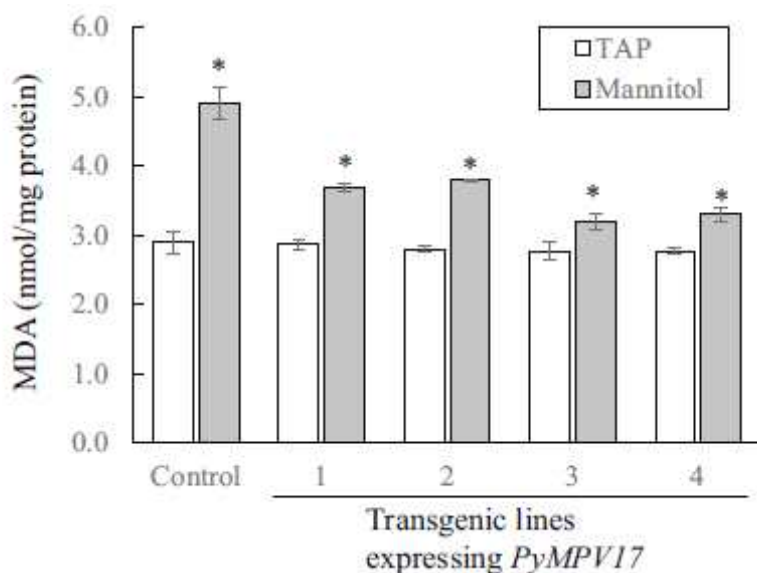


Figure 3.3.35. Malondialdehyde (MDA) content in *Chlamydomonas* cells.

Transgenic *Chlamydomonas* cells harboring PyMPV17 were cultured in culture medium (TAP) or medium containing 250 mM mannitol (Mannitol). The control was *Chlamydomonas* transformed with an empty vector, pCR112. The MDA contents were analyzed according to Chen and Zhang (2016). Values are the means obtained from three identical tests. * Mannitol treatment was significantly different from the TAP treatment at $P < 0.05$. Error bar Standard deviation

MDA는 지질 과산화에 대한 바이오마커로 널리 사용되어지고 있습니다. 삼투 스트레스 내성기작을 확인하기 위해 형질전환된 *Chlamydomonas* 세포를 이용하여 MDA 함량을 측정하여 대조군과 비교하였습니다. $OD_{750}=0.7$ 의 *Chlamydomonas* 세포를 각각 TAP 배지 및 250mM 만니톨이 포함된 TAP에서 동일한 조건으로 7일 동안 배양하였다. *Chlamydomonas* 세포를 원심분리를 이용하여 수확하고 10mL PBS완충액(pH 7.0)에 재현탁 시켰다. 세포를 액체 질소에서 급속 동결시킨 다음 초음파 분쇄기를 사용하여 파쇄하였다. 원심분리를 통해 상등액을 수확하고 전체 단백질 함량을 측정 후 전체 단백질 함량 대비 MDA 함량을 결정하였다. 0.1mL 단백질 제제를 10% 트리클로로아세트산 중 1mL 0.25% 티오바르비투르산에 첨가하였다. 반응

혼합물을 95℃에서 15분 동안 가열하고 얼음 위에서 빠르게 냉각시켰다. 그 다음, 532 및 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

MDA 함량은 만니톨이 없는 TAP 배지에서 대조군과 형질전환 세포 모두에서 유사했습니다 (Figure 3.3.35). MDA 함량은 *Chlamydomonas* 세포를 mannitol이 포함된 배지에서 배양한 경우 증가하였다(Figure 3.3.35). 만니톨을 포함하는 배지에서 PyMPV17 유전자를 과발현하는 형질전환 세포에서 MDA 함량 증가는 대조군 세포보다 낮았다(Figure 3.3.35). 이러한 결과는 PyMPV17의 과발현이 삼투압 스트레스 조건에서 지질 과산화 손상을 감소시켰음을 나타낸다.

라. 고온 내성 유전자 PyHRG1 분리 및 기능 연구

(1) PyHRG1 유전자의 분리

- 500Gy의 염체로부터 생성한 전사체 분석을 통해 얻은 DEG 중, 정상배양 조건에 비해 고온 처리 조건에서 더 낮은 발현율을 보이는 고온 반응 DEG를 분석하였다. 선택된 DEG 중 알려진 유전자와 서열 상동성이 없었고 열 스트레스 조건 및 열 내성 돌연변이에서 고도로 하향 조절 DEG인 contig Py97124를 선발하였다.
- 고온조건에서 contig Py97124의 하향 조절 발현 패턴은 정량적 RT-PCR역전사 증합효소 연쇄 반응(qRT-PCR)을 사용하여 검증되었다고 (Figure 3.3.36) 이를 "Heat response gene 1 of *P. yezoensis*" (PyHRG1)로 명명하였다.

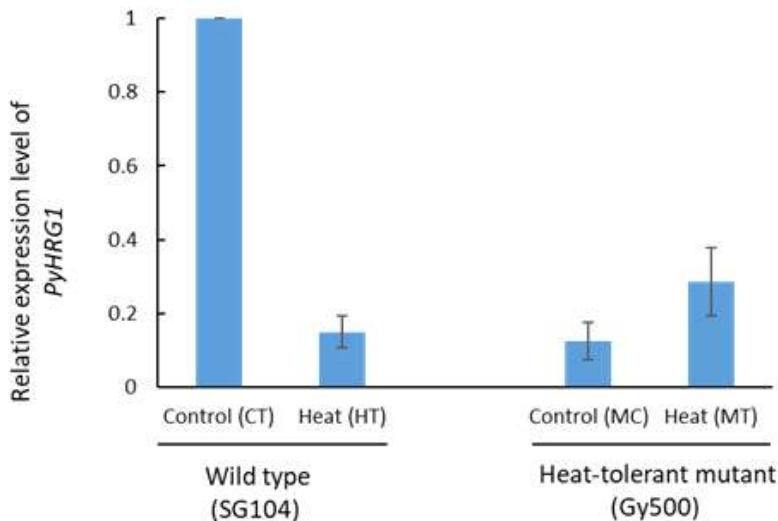


Figure 3.3.36 *PyHRG1* expression in wild-type (SG104) and heat-tolerant (Gy500) *Pyropia yezoensis*.

Total RNA was purified from gametophyte thalli cultured at 12 or 20°C and analyzed using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. The gene *PyUBQ* was used as an internal control.

- PyHRG1의 cDNA (accession no, MT122996)는 26.5kDa의 분자량 및 9.11의 pI를 갖는 241개 아미노산의 폴리펩타이드를 암호화합니다. 글리신(14.2%)은 PyHRG1 폴리펩타이드에서 가장 풍부한 아미노산이었습니다(Figure 3.3.37A). PyHRG1은 다른 홍조류의 유전자를 제외하고 현재 공개 데이터베이스에 기탁된 알려진 유전자와 서열 상동성을 공유하지 않는 것으로 나타났습니다. PyHRG1 동족체는 다른 *Pyropia* 종인 *P. tenera* 및 *P. seriata*에서도 확인되었습니다(Figure 3.3.37A). PyHRG1은 *P. yezoensis*의 가장 가까운 친척인 *P. tenera*의 PtHRG1과

97.9% 서열 동일성을 공유했습니다. PyHRG1 동족체는 다른 *Porphyra* 종인 *Porphyra umbilicalis*에서도 확인되었습니다(Figure 3.3.37B).

- 홍조류와 녹색 식물은 비생물적 스트레스 내성 메커니즘을 공유하지만 녹색 식물에서 확인된 모든 스트레스 반응 유전자가 홍조류에서 발견되는 것은 아닙니다. 일부 스트레스 유전자는 홍조류에 특이적입니다.

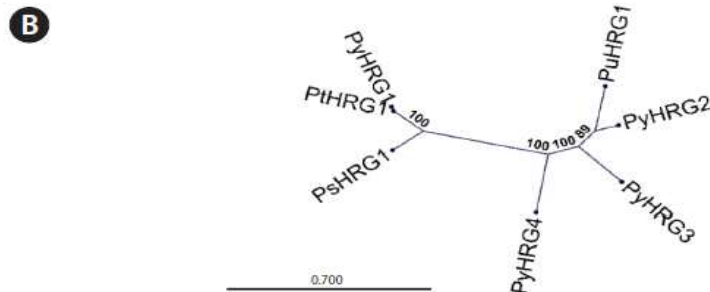
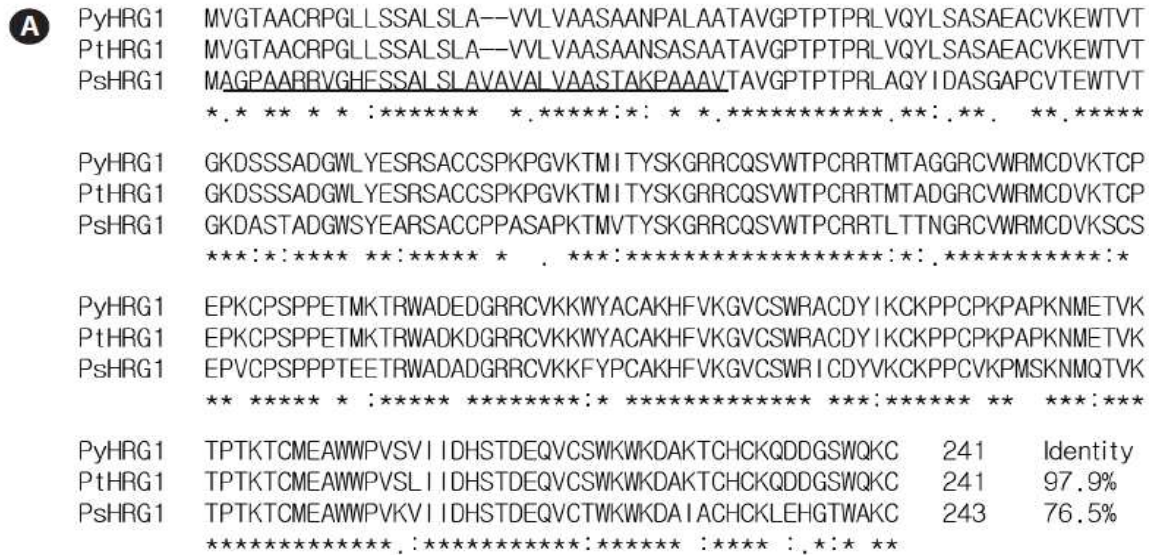


Figure 3.3.37. Amino acid sequence alignment and phylogenetic analysis of *PyHRG1*.

(A) Amino acid sequence alignment of *PyHRG1* and its homolog from the *Pyropia* species—*P. yezoensis*, *P. tenera*, and *P. seriata*. The alignment was performed using CLUSTALW. The putative signal peptide is underlined. The asterisk (*) and colon (:) indicate identical and similar amino acid residues, respectively. (B) Phylogenetic analysis of *PyHRG1* with its homologs. The three genes in Fig. 2A, three *PyHRG1* homologs found in the *P. yezoensis* genome, and one gene from *Porphyra umbilicalis* were used for phylogenetic tree analysis.

(2) PyHRG1 기능 연구

- PyHRG1은 열 스트레스 조건에서 *P. yezoensis* SG104 배우자 식물에서 하향 조절되었다. 그리고 내열성 돌연변이 Gy500의 배우자체에서 PyHRG1의 전사체는 SG104보다 훨씬 낮은 수준에서 검출되었다.

- PyHRG1의 생리학적 기능을 평가하기 위해 PyHRG1 유전자를 단일 세포 녹조류인 *C.*

reinhardtii Mut11에 도입하였다. 형질전환 *C. reinhardtii*에서 PyHRG1의 도입 및 발현은 PyHRG1-특이적 프라이머를 사용한 역전사 증합효소 연쇄 반응 RT-PCR을 사용하여 확인하였다 (Figure 3.3.38). PyHRG1 전사체는 선택된 모든 형질전환된 *C. reinhardtii* 세포에서 검출되었고, 빈 pCR112 벡터로 형질전환된 대조군 세포에서는 증폭 밴드가 관찰되지 않았다.

- PyHRG1을 과발현하는 형질전환 *C. reinhardtii* 세포는 정상 성장 조건(23°C)에서 야생형 세포보다 더 느린 성장률을 보였습니다. (Figure 3.3.38B). 이러한 결과는 PyHRG1이 *C. reinhardtii* 세포의 성장에 역할을 한다는 것을 입증한다.

- PyHRG1을 과발현하는 형질전환 *C. reinhardtii* 세포가 열 스트레스에 노출되었을 때, 세포 성장 억제가 더욱 악화되었다. 이러한 결과는 PyHRG1이 열 스트레스 하에서 세포 성장 억제에 관여하는 유일한 유전자가 아님을 시사합니다.

- PyHRG1이 세포 성장을 억제함으로써 직접적으로 작용하는지 아니면 세포 성장을 제어하는 다른 단백질에 영향을 주어 간접적으로 작용하는지 여부는 명확하지 않다. 녹색 식물에 대한 연구에 따르면 비생물적 스트레스 요인 하에서 식물은 유전자 발현을 변경하여 성장을 감소시키고 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 것으로 나타났다

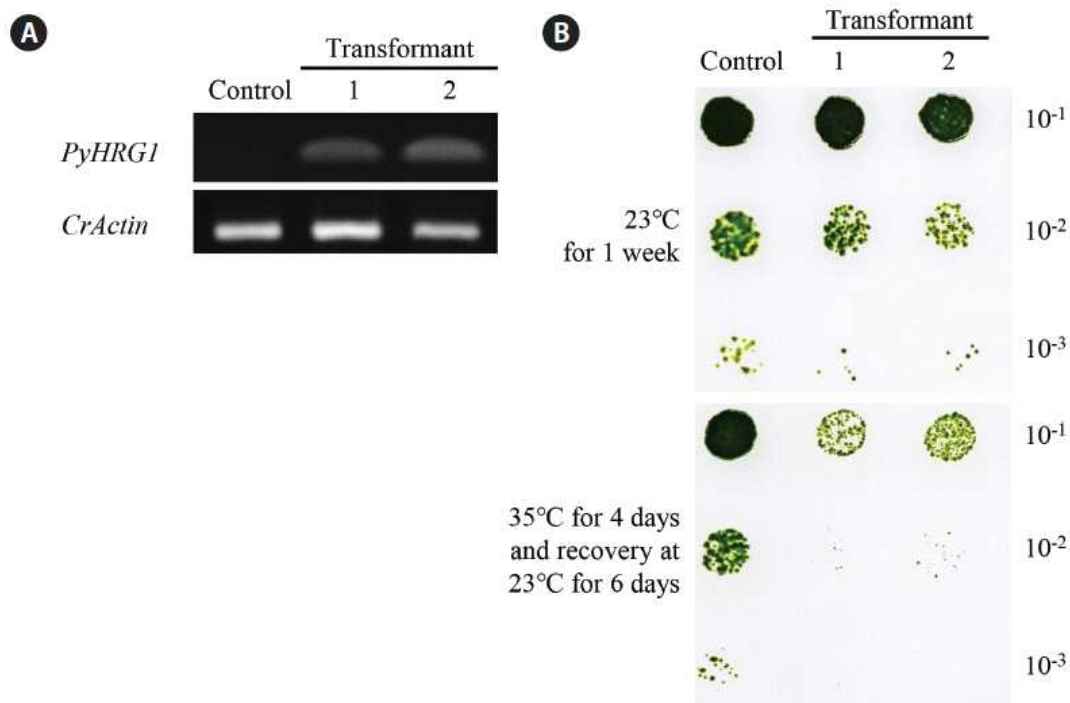


Figure 3.3.38. Effects of *PyHRG1* on the growth of *Chlamydomonas reinhardtii*.

(A) To verify the introduction and expression of *PyHRG1*, total RNA was purified from transgenic *C. reinhardtii* cells and used for reverse transcription polymerase chain reaction analysis with *PyHRG1*-specific primers. Transformed *C. reinhardtii* cells containing empty vectors were used as a control. *CrActin*, a *Chlamydomonas* actin gene, was used as an internal control. (B) To assay cell growth, *C. reinhardtii* cells were diluted to 10⁻¹, 10⁻², and 10⁻³ in fresh medium; 10 mL of diluted cells was inoculated onto agar plates. Images were taken after 1 week of culture at 23°C. For the heat treatment, cells were kept at 35°C for 4 days and were subsequently transferred to a 23°C growth chamber for further growth. Images were also taken after 6 days of incubation at 23°C.

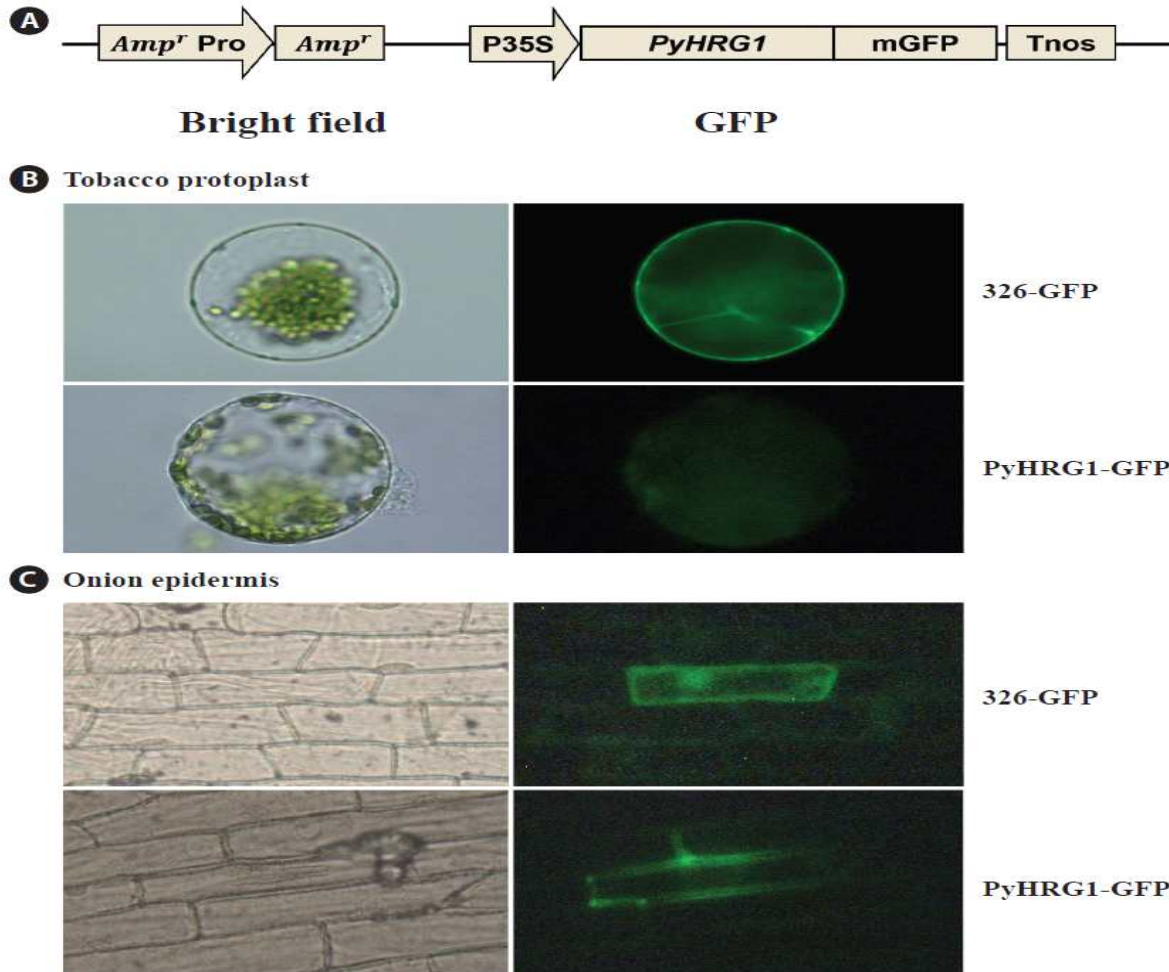


Figure 3.3.39. Subcellular localization of PyHRG1. (A) Map of the recombinant vector for the PyHRG1-GFP fusion protein.

PyHRG1 was introduced into the 326-GFP vector and fused with GFP under the control of a CaMV 35S promoter. This construct was introduced into the protoplasts of tobacco (*Nicotina benthamiana*) (B) or the epidermis of onion (*Allium cepa*) (C). The 326-GFP empty vector was served as the control. The fluorescence signals of PyHRG1-GFP fusion protein were evaluated under a fluorescence microscope. Bright field contrast-interference images of the structure of the whole tobacco protoplast and onion epidermis cells are shown. GFP, cell images using a green filter for PyHRG1-GFP location with GFP fluorescence.

Bioinformatic를 이용한 분석은 PyHRG1이 분비 단백질 것으로 예측했다. PyHRG1의 세포 위치를 조사하기 위해 식물 발현 벡터 326-GFP에서 35S 프로모터와 GFP 사이에 PyHRG1을 클로닝했다(Figure 3.3.39A). 그런 다음 재조합 PyHRG1-GFP 구조를 담배(*N. benthamiana*) 원형질체 및 양파(*A. cepa*) 표피 세포에 도입했습니다. PyHRG1-GFP 융합 단백질의 형광은 담배 원형질체에서 검출되지 않았다(Figure 3.3.39B). 녹색 형광은 양파 표피의 세포벽 영역에서 주로 관찰되었다(Figure 3.3.39C). 이러한 결과는 PyHRG1이 세포벽 또는 세포외 기질에 위치한 분비 단백질을 입증합니다.

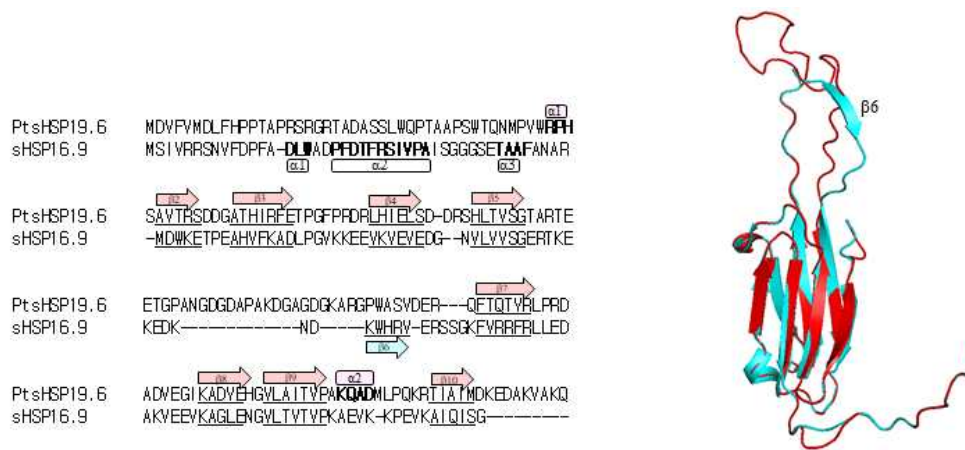


Figure 3.3.41. Sequence alignment of PtsHSP19.6 and wheat sHSP16.9 (1GME_A), which used as template to predict tertiary structure. Alpha-helix and beta-sheets are displayed as open box with bold and arrows with underline. C, Superimposition of the monomeric PtsHSP19.6 (red) and wheat sHSP16.9 (blue). Beta-sheet 6 was found at only sHSP16.9 (blue). The 3D model was built by SWISS server (<http://swissmodel.expasy.org>), and analyzed by PyMOL program.

(2) 김 PtsHSP19.6 유전자의 발현 특성

각 PtsHSP19.6 유전자의 발현 패턴을 알아보기 위해 열, 건조, 결빙 및 고염 처리한 *Pyropia tenera*의 배우체로부터 total RNA를 분리하고 qRT-PCR 분석을 수행 하였다. Figure 3.3.42는 다양한 스트레스 조건 하에서 PtsHSP19.6의 발현 패턴을 나타낸다. 김 배우체가 열 스트레스에 노출되었을 때, PtsHSP19.6 유전자의 전사 수준은 매우 증가했다. (Figure 3.3.42) 고온 처리 후 PtsHSP19.6의 전사 수준은 30분에 빠르게 증가한 다음 열처리 후 4 시간에 감소했다 (Figure 3.3.42). 그러나, PtsHSP19.6은 건조, 결빙 또는 높은 염 스트레스에 반응하지 않았다 (Figure 3.3.42).

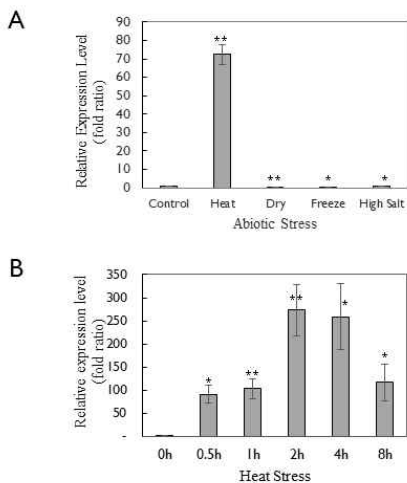


Figure 3.3.42. Expression pattern of PtsHSP19.6 in *Pyropia tenera*.

A, Total RNA was purified from the gametophyte thalli of *Pyropia tenera* under heat, dry, cold or low salt stress conditions and amplified using qRT-PCR. PtAct was used as the internal control. B, Total RNA was purified from the gametophyte thalli of *Pyropia tenera* at the indicated time point after heat treatment to check the expression pattern of PtsHSP19.6 during heat stress. Bars are means \pm standard deviation (SD). Asterisks above the columns indicate values that are statistically different from the control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ when compared with the control).

(3) 김 PtsHSP19.6의 Chaperone 활성

지금까지 다른 생물에서의 연구에 따르면 대부분의 sHSP는 변성 단백질을 결합하여 열과 같은 스트레스에 의한 돌이킬 수 없는 단백질 응집으로 인한 손상으로부터 세포를 보호함으로써 ATP와 무관한 분자 샤페론 역할을 하는 것으로 알려졌다. 비록 ACD가 PtsHSP19.6에서 발견되었지만 알려진 sHSPs와 유의한 한 아미노산 서열에서 매우 낮은 상동성을 공유한다. PtsHSP19.6이 공지된 sHSP와 유사한 샤페론 기능을 갖는지를 확인하기 위해, 재조합 PtsHSP19.6을 대장균으로부터 정제하고 (Figure 3.3.43.) 샤페론 활성을 조사하였다. ADH는 단백질의 열 응집을 억제하는 PtsHSP19.6의 능력을 평가하기 위한 기질로서 사용되었다. ADH 용액을 다양한 농도 (0.5 및 5 mg / mL) 또는 PtsHSP19.6 (ADH 단독) 없이 제조하고 55 °C에서 50 분 동안 배양하였다. 열처리를 통해 단백질 응집체를 분석하기 위해 A360에서 ADH 용액의 탁도를 모니터링하였다. 양성 대조군으로 BSA (5 mg / mL)를 사용하였다. 그 결과, PtsHSP19.6은 고온 하에서 ADH의 열 응집을 현저히 감소시켰다. (Figure 3.3.43.) 이러한 결과는 PtsHSP19.6이 열 스트레스 조건 하에서 단백질 응집으로부터 보호할 수 있는 분자 샤페론 활성을 갖는다는 것을 입증한다.

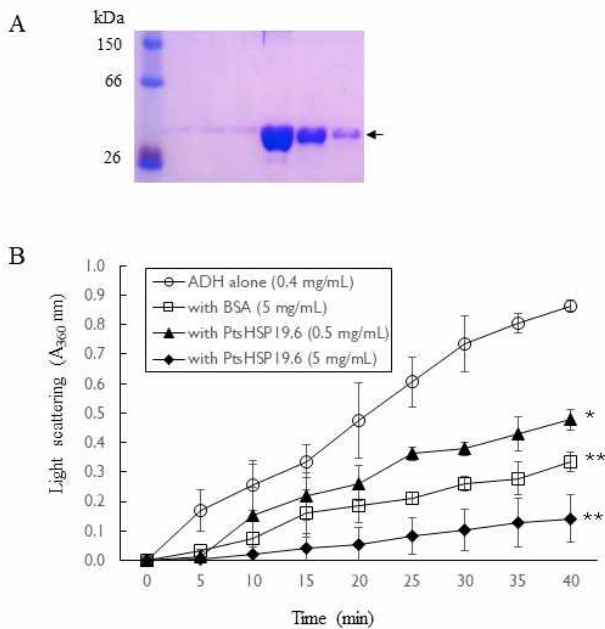


Figure 3.3.43. Chaperone activity of PtsHSP19.6.

A. Recombinant PtsHSP19.6 purified from *Escherichia coli* was checked using SDS-PAGE. Arrow indicates band corresponding to PtsHSP19.6. B. Chaperone function of PtsHSP19.6 was examined using alcohol dehydrogenase (ADH) as the substrate. To induce aggregation, ADH was heated to 55°C. Thermal aggregation of ADH was determined by monitoring turbidity at A₃₆₀ for 50 min in the presence of PtsHSP19.6 (5 mg/mL, line with a closed rectangle) or without (line with an open circle). BSA (10 mg/mL) was used as the positive control (dashed line with x). Standard deviations (vertical bars) were calculated from the data obtained from three replicate experiments. Asterisks are statistically different from the control (ADH alone) value (* p < 0.05, ** p < 0.01).

(4) 김 PtsHSP19.6의 고온 내성

PtsHSP19.6은 샤페론 활성을 가지며 열 스트레스에 강하게 반응한다. 이것은 PtsHSP19.6이 열 스트레스 조건 하에서 고온 내성에 관여 할 수 있음을 시사한다. 고온 내성에 PtsHSP19.6의 관련성을 확인하기 위해, PtsHSP19.6을 대장균 세포에 도입 하였다. 대장균에서의 PtsHSP19.6의 발현은 SDS-PAGE를 사용하여 확인되었다. (Figure 3.3.44.) 대조구와 PtsHSP19.6 유전자의 발현이 유도되지 않은 형질전환된 박테리아는 모두 37 °C에서 유사한 성장 패턴을 보였다. 그러나 PtsHSP19.6 발현 유도를 위해 IPTG로 처리 한 후 고온 (46 °C)에서 배양 하였을 때, 형질전환 세포는 대조군보다 높은 성장 속도를 보였다 (Figure 3.3.44.) 빈 벡터를 갖는 대장균을 대조군으로 사용 하였다. 이러한 결과는 PtsHSP19.6이 박테리아 세포에서 열 스트레스 저항성을 강화 시킨다는 것을 입증한다.

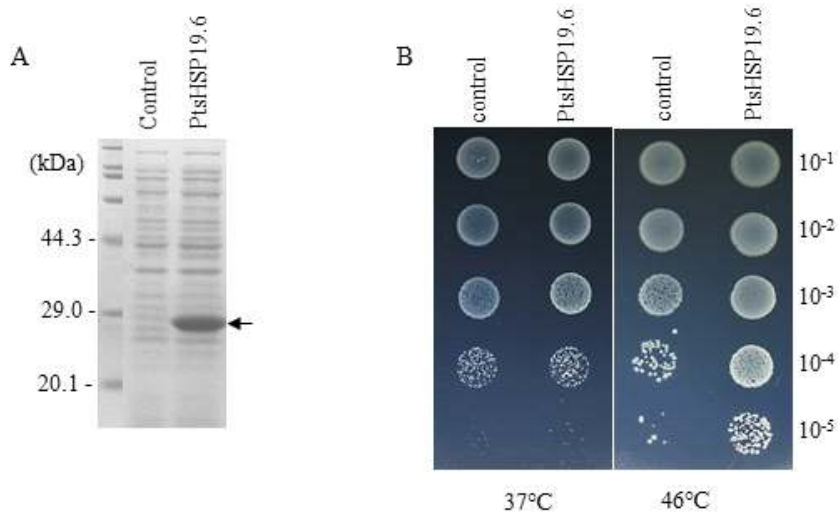


Figure 3.3.44. Effects of PtsHSP19.6 on the growth of Escherichia coli at high temperature. A. Expression of PtsHSP19.6 in transformed Escherichia coli cells was verified using sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE). Band corresponding to PtsHSP19.6 is indicated with an arrow. B. Growth of the bacterial cells was measured by spotting diluted cultures (serial dilution of 10^{-1} to 10^{-5} from cultures at OD600 = 0.5) on LB agar plates. The cells were incubated at 37°C and 46°C. Photographs were obtained after 12 h of incubation at 37°C and after 18 h at 46°C.

(5) 김 PtsHSP19.6의 세포내 위치

PtsHSP19.6의 세포 내 위치를 평가하기 위해, PtsHSP19.6 ORF 서열을 식물 발현 벡터 p326-GFP에서 GFP 리포터 유전자의 상류에 융합시켜 만든 재조합 벡터 p326-PtsHSP19.6-GFP를 담배 (*Nicotiana benthamiana*) 원형질체에 도입되었다. Figure 3.3.45. 는 형질 전환 된 담배 원형질체의 형광 현미경 사진을 나타낸다. 대조구로 사용한 p326-GFP 벡터는 세포질에 GFP 신호를 보였다. PtsHSP19.6-GFP 융합 단백질의 형광은 주로 cytosol에서 몇 개의 큰 반점으로 관찰되었다 (Figure 3.3.45). 생화학 및 현미경 연구는 식물 sHSP가 세포질에 과립형 응집체를 형성함을 보여 주었다. 이러한 이전의 연구를 바탕으로, PtsHSP19.6 은 녹색 식물의 sHSP처럼 세포질에서 응집체를 형성하는 것으로 추측된다.

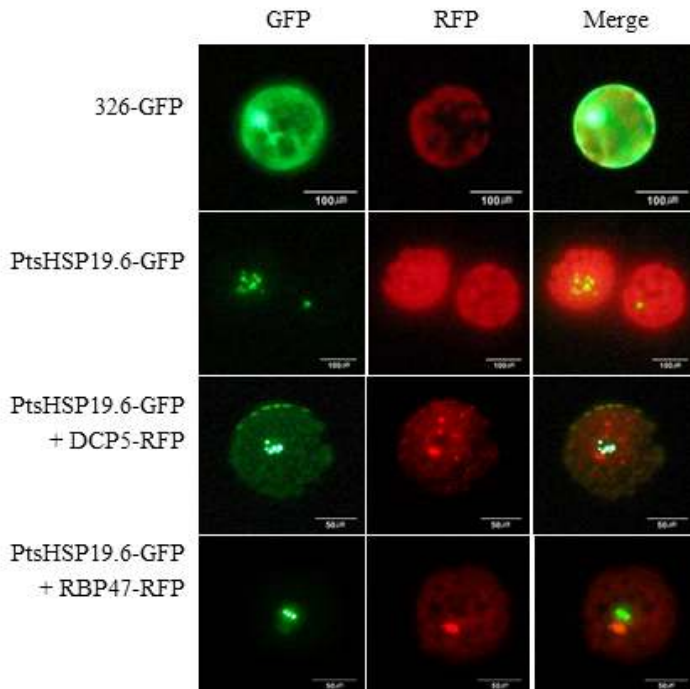


Figure 3.3.45. Subcellular localization of PtsHSP19.3.

A reporter gene encoding the green fluorescent protein (GFP) was fused to PtsHSP19.6 under the control of the CaMV 35S promoter in the 326-GFP vector. The constructs were introduced into the protoplasts of *Nicotiana benthamiana*. The 326-GFP empty vector served as the control. PtsHSP19.6-GFP localization in individual cells was observed as several granular aggregates by using GFP fluorescence. To check if the fluorescence of the PtsHSP19.6-GFP fusion protein was attributable to the processing body (PB) or stress granule, PtsHSP19.6-GFP recombinant vector was cotransformed with the PB marker protein, DCP5-RFP, or stress granule marker protein, RBP47-RFP. The location of DCP5-RFP or RBP47-RFP was detected using RFP fluorescence. Contrast interference images of the structure of the whole protoplast are to the left. GFP, cell images using a green filter for the location of PtsHSP19.6-GFP with GFP fluorescence. RFP, cell images using a red filter for DCP5-RFP and RBP47-RFP. Merge, merged cell image from GFP and UV filter.

(6) 김 PtsHSP19.6의 구조 분석

PtsHSP19.6은 녹색 식물의 sHSP처럼 세포질에서 응집체 구성하는 것으로 추측된다. 용액에서 PtsHSP19.6의 올리고머 상태를 조사하기 위해, 우리는 대장균 (*Escherichia coli*)으로부터 재조합 PtsHSP19.6 단백질을 정제하고 (Figure 3.3.46), 용액에서 PtsHSP19.6 단백질의 올리고머 형성을 측정 하였다. size-exclusion chromatography 분석은 PtsHSP19.6이 150kDa의 분자량을 갖는 ADH 보다 먼저 단일 피크로서 분리됨을 보였다 (Figure 3.3.46). Non-denatured PAGE 분석은 또한 PtsHSP19.6이 240 kDa보다 큰 단일 고 분자량으로 존재함을 나타냈다 (Figure

3.3.46B). DLS (Dynamic light scattering) 분석은 또한 PtsHSP19.6의 평균 유체 역학 반경이 $169 \pm 38.4 \text{ \AA}$ 인 입자로 분자량은 $\sim 1,300 \text{ kDa}$ 임을 보였다. 모든 실험 데이터는 PtsHSP19.6이 적어도 240 kDa 이상의 분자량을 갖는 올리고머로서 용액에 존재한다는 결론을 강력히 뒷받침한다.

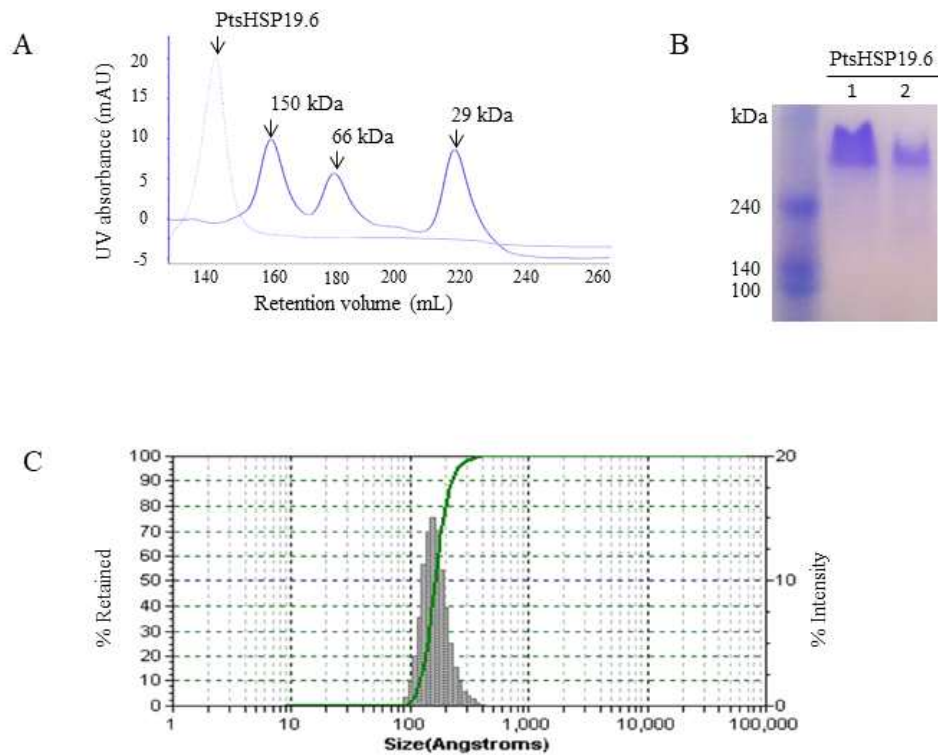


Figure 3.3.46. Analysis of the oligomeric states of PtsHSP19.6.

A, Gel filtration chromatography results. PtsHSP19.6 was separated using the Superdex 200 size-exclusion column. The concentration of PtsHSP19.6 was $688 \mu\text{M}$ in 20 mM Tris-HCl (pH 8) containing 200 mM NaCl and 10 mM β -mercaptoethanol. The protein standards are alcohol dehydrogenase (150 kDa), human serum albumin (66 kDa), and carbonic anhydrase (29 kDa). B, Five (μL lane 1) and 2.5 (μL lane 2) of a fraction containing PtsHSP19.6 from the gel filtration were run for 2 h on a 6% native polyacrylamide gel. C, Dynamic light scattering (DLS) analysis. The calculated mean diameter of hydrodynamic and its distribution are $169 \pm 38.4 \text{ \AA}$.

마. 방사무늬 김 small heat shock protein gene (PysHSP) family 동정 및 특성 연구

(1) 방사무늬김 PysHSP gene family 선별 및 특성

- sHSP은 진핵 생물과 원핵 생물에서 어디에나 발견되는 HSP의 한 종류로서 ATP소모 없이 Charperone 기능을 통하여 고온에 의해 변성될 Proteome을 보호하는 역할을 수행하는 단백질이다.
- 크기는 약 12kDa 이상 42kDa 미만으로 α - 크리스탈 린 도메인 (ACD)이라고 하는 약 90 개 아미노산의 보존된 C- 말단 도메인 갖는 것을 특징으로 한다.
- sHSP는 α - 크리스탈 린 도메인을 제외한 N- 말단 영역 및 C- 말단의 확장된 영역을 갖으며 이들의 길이와 amino acid 서열은 매우 가변적이다.
- sHSP는 기본적으로 열 스트레스 조건하에서 샤페론 기능을 통하여 단백질의 비가역적 응집을 방지하고 응집된 단백질을 재 가용화하는 역할을 수행하지만, 최근 육상 종자식물에서 소기관에 존재하는 sHSP의 경우 종자 성숙 및 발아, 꽃가루 발달 및 과실의 성숙과 같은 특정 발달 단계에서도 크게 관여함이 보고되고 있다.
- 방사무늬 김 (*Pyropia yezoensis*)는 가장 많이 재배되고 상업적으로 가치가있는 해양 홍조류다.
- 방사무늬 김의 엽상체는 겨울 동안 차가운 온도에서 자라며 여름에는 포자체 conchocelis 단계로 전환된다. 따라서 온도는 *P. yezoensis*의 life cycle 뿐만 아니라 배우체의 성장에 큰 영향을 미친다.
- 최근 연구에서 Kobayashi et al. (2014)는 sHSP가 홍조류의 고온 내성을 위한 핵심 유전자라고 제안한 바 있다. 그러나 김의 sHSP 정보는 제한적입니다.
- 김의 sHSP를 연구하기 위해 방사무늬 김 draft genome sequence을 검색하고 7 개의 sHSP 유전자를 확인했습니다.
- 방사무늬김 sHSP gene family의 특성은 Table1 에 정리하였다

Table 3.3.22. Summary of the PysHSPs gene family in *Pyropia yezoensis* genome

Name	Size (AA)	pI	Mw (kDa)
PysHSP19.2	172	5.43	19.22
PysHSP19.3	172	5.25	19.30
PysHSP19.6	179	7.07	19.63
PysHSP20.3	200	5.93	20.30
PysHSP25.8	246	8.96	25.88
PysHSP28.4	268	9.81	28.44
PysHSP37.4	365	7.72	37.45

Seven sHSP gene containing α -crystal domain (ACD) are identified in the draft genome of the *P. yezoensis* and then named according to their molecular weight. AA, amino acids; pI, isoelectric point; Mw, molecular weight.

- Figure 3.3.47은 draft genome sequence에서 동정한 7개의 PysHSPs의 amino acid sequence alignment 결과를 보여주고 있다.
- 동정된 7개의 PysHSPs 모두 α -크리스탈린 도메인(ACD)이 매우 잘 보존되어 있으며, 8개의 β - 시트로 구성된 ACD를 가지고 있다.
- Figure 3.3.47은 PysHSP의 아미노산 서열 정렬로 특히 N- 말단 및 C-말단에서 결실 및 치환을 포함하는 서열 변이를 매우 잘 보여주고 있으며, PysHSP19.2는 PysHSP19.3과 가장 높은 아미노산 서열 유사성을 보였다. PysHSP19.2, PysHSP19.3, PysHSP19.6 및 PysHSP20.3은 짧은 N- 말단 영역을 갖지만 다른 3개의 경우 길고 다양한 N- 말단 영역(NTD)과 짧은 C- 확장 영역(CTE)을 가지고 있다.

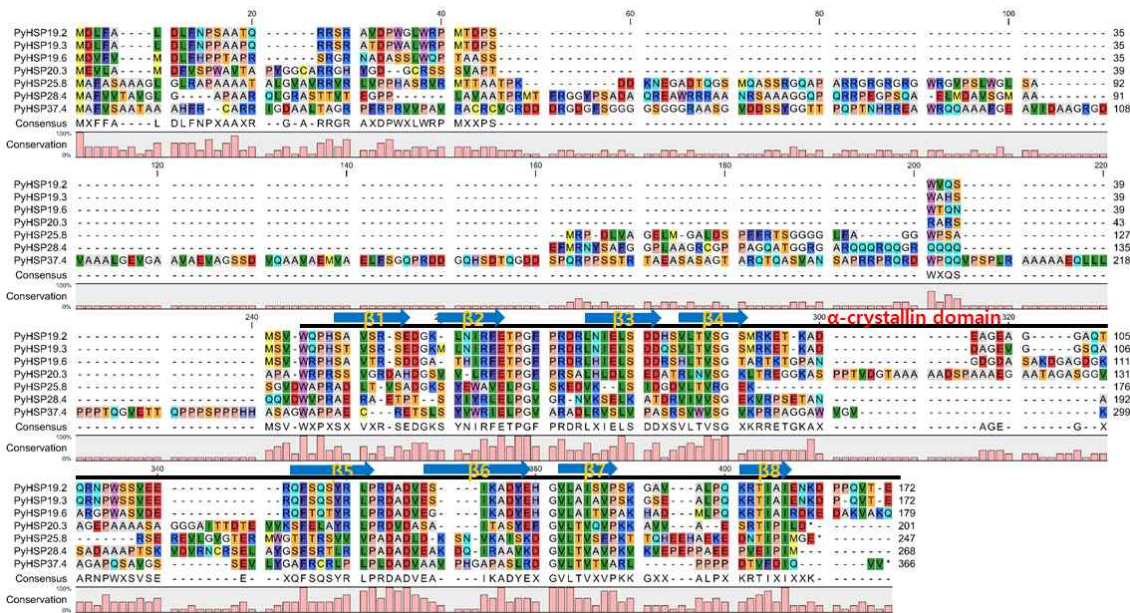


Figure 3.3.47. Amino acid sequence alignment and characteristics of the seven PysHSPs.

Eight β -strands within the α -crystal domain (ACD) are indicated by arrows. The characteristic motifs, GVL and IxI are boxed. The alignment was performed using CLC program. Bars present gaps to make maximum similarity. Consensus sequence and conservation percent were under the each amino acid residues. The numbers correspond to the amino acid positions from the first methionine residue.

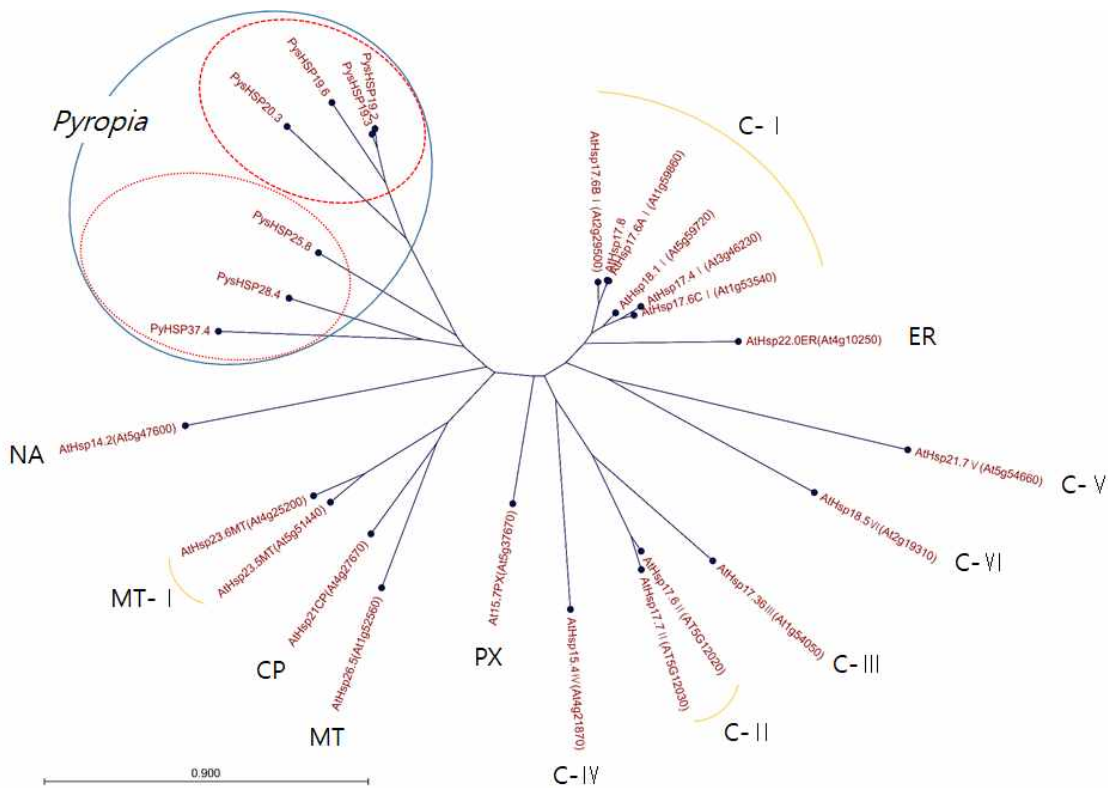


Figure 3.3.48. Phylogenetic tree of Alpha Crystalline Domain in *Pyropia yezoensis* and *Arabidopsis thaliana*.

- 육상식물 애기 장대에서는 structure와 target organelle에 의해 11개의 subfamilies로 분류되며, 그중 5개 (CI, CII, CIV, CV, CVI)는 세포질에서 발견되고 있으며 나머지는 엽록체(CP), 미토콘드리아(MTII), 핵(CIII), 소포체(ER), 퍼옥시좀(PX) 또는 엽록체와 미토콘드리아(MTI/CP) 이중 표적으로 현재까지 보고되어 있다.
- 동정된 7개의 PysHSPs와 애기장대의 sHSP의 ACD만 두고 계통수를 그려본 결과 2개의 subfamilies로 나뉘지고 있으며, PysHSP19.2, PysHSP19.3, PysHSP19.6 및 PysHSP20.3가 하나로 묶여있으며, PysHSP25.4, PysHSP28.3, PysHSP37.4가 묶여있음으로 확인된다.

Table 3.3.23. PysHSP homologs in genus *Pyropia* and *Porphyra*

sHSP	P. yezoensis				P. tenera		Porphyra umbilicalus****	
	Strain S104†		Strain Tu*		AA	Mw (kDa)	AA	Mw (kDa)
	AA	Mw (kDa)	AA	Mw (kDa)				
PysHSP19.2	172	19.2	171	19.1	-	-	172	18.7
PysHSP19.3	172	19.3	171	19.2	172	19.3**	177	19.3
							261	28.4
PysHSP19.6	179	19.6	178	19.5	179	19.6***	175	18.8
							175	18.9
PysHSP20.3	200	20.3	-	-	200	20.2†	202	20.5
PysHSP25.8	246	25.8	245	25.8	246	25.7†	242	24.4
PysHSP28.4	268	28.4	175	18.8	257	26.8†	190	20.1
					268	28.4†		
PysHSP37.4	365	37.4	-	-	365	37.4†	360	37.5

†, this study; *, Uji et al (2019); **, Jin et al (2017); ***, Yang et al (2018); ****Brawley et al (2017)

-, not identified

- 2017년 미국 캘리포니아 스탠포드 대학교 Hopkins marine station에서 보고한 *Porphyra umbilicalis* Genome 데이터에서도 동정된 7개의 PysHSP를 모두 커버하는 9개의 sHSP homologue가 존재하는 것을 확인 할 수 있었으며 Table 2에 정리하였다.
- 방사무늬김 유전체 서열 및 이를 기반으로 sHSP gene family를 2014년 일본의 연구팀에서 보고된 바 있다. 그러나 이 보고는 방사무늬김 핵 유전체의 전체서열을 cover하지 못한 partial genome seuquence로 판단되어지고 있다.
- 일본 팀에서 발표한 방사무늬김 유전체 기반으로 분석된 sHSP gene family, 그리고 방사무늬 김과 계통적으로 가장 유사한 것으로 알려진 참김 (*P. tenera*)의 sHSP family를 Table 2에 함께 정리하였다.
- 일본팀 보고서에는 PysHSP20.3과 PysHSP37.4가 빠져있으며, 다른 sHSP의 amino acid residue가 1개씩 빠져 있다.
- 참김 sHSP는 방사무늬김에서 발견되는 sHSP19.2가 없으며 대신 sHSP28.4가 two copy로 존재함을 보인다.

(2) PysHSP의 발현 및 생리적 기능 분석

Pyropia yezoensis gemone에서 동정된 7개의 PysHSPs가 과연 비생물적 스트레스에서 어느 정도로 유의미한 발현 차이가 있는지 확인하기 위해서 qRT-PCR을 수행하게 된다. 고온 스트레스 뿐만 아니라 여러 비생물적 스트레스인 저온, 건조, H2O2 및 abscisic acid (ABA)를 처리하고 이에 관여하는지 혹은 관여하지 않는지를 확인해 보기 위해서 실험을 설계한다. *Pyropia yezoensis* 엽상체에 각각 Heat(20°C), dry(건조), Cold(4°C), 20mM H2O2, 및 200µM ABA에 4시간씩 처리한다. RNeasy plant mini kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 total RNA를 추출하고, RNA fragment analyzer Qstep100 (Biopotic, Taiwan)를 이용하여 RNA RIN값을

계산하여 8 이상의 점수를 받은 RNA를 사용한다. cDNA Synthesis Kit(PCR Biosystems, UK)을 이용하여 4ug씩 cDNA를 합성한 후 (PCR Biosystems, UK) qPCRBIO SyGreen Mix로 qRT-PCR을 진행하였다. Figure 3은 모든 PysHSP의 전사가 고온 스트레스 뿐만 아니라 여러 비생물적 스트레스에 의해 반응하는 것을 보여준다.

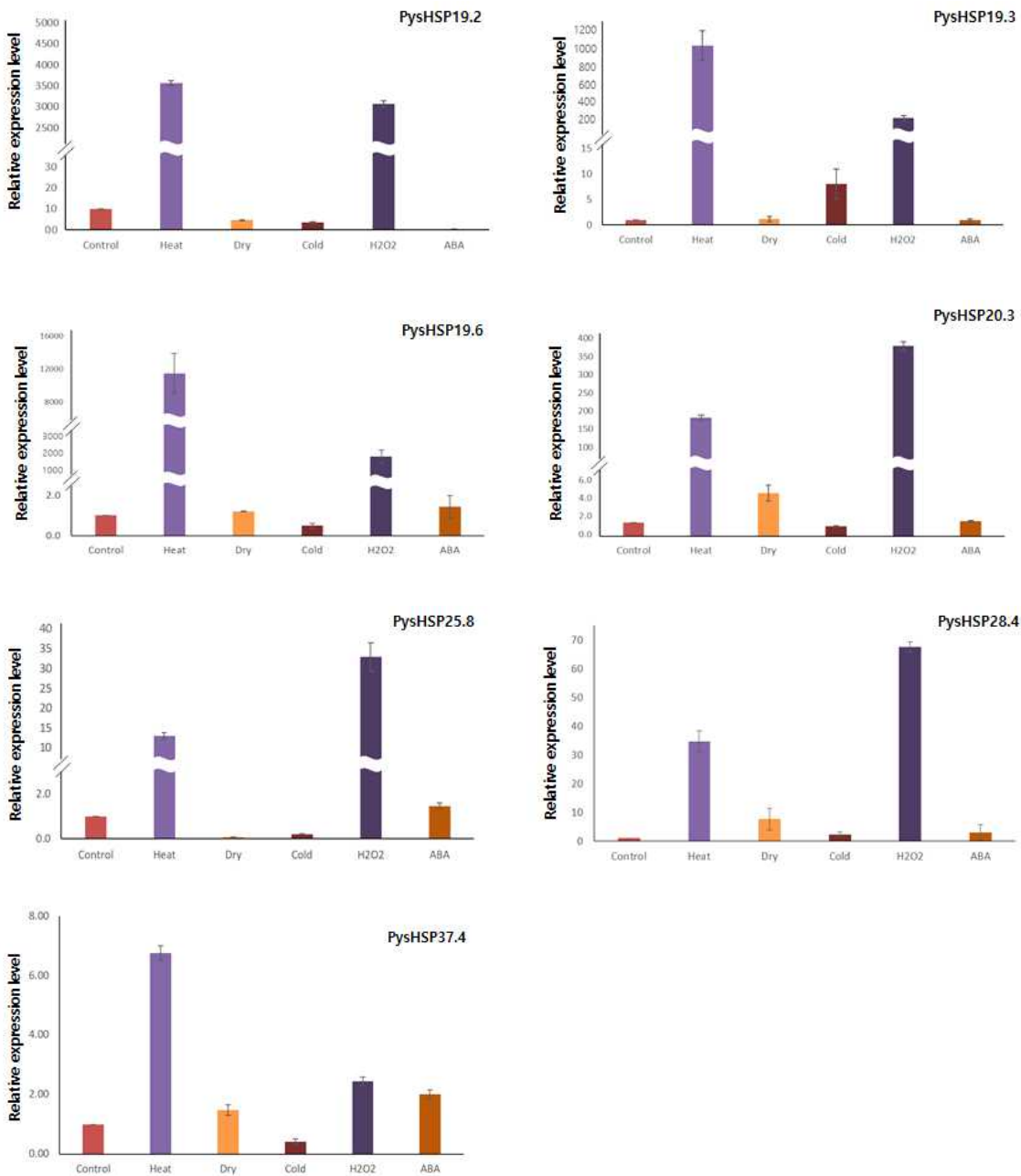


Figure 3.3.49. Relative expression levels of the PysHSP genes in the *P. yezoensis* gametophyte thalli under various abiotic stress conditions.

To heat treatment, growth bottles containing *P. yezoensis* were transferred to a 25°C growth chamber with the same light intensity and photoperiod and culture for 4 hours. Cold stress were treated at -4°C for 4 hours. For desiccation stress the gametophyte thalli were placed on the cheesecloth over a beaker in growth chamber under and harvested 4

hours after treatment. For H₂O₂ and ABA treatment, gametophyte thalli were cultured in a medium containing 20 mM H₂O₂ or 200 μM ABA for 4 hours. The PyGAPDH gene was used as the internal control. Bars represent the mean ± standard deviation (SD).

class1 이라고 예상되는 PysHSP19.2, PysHSP19.3, PysHSP19.6 및 PysHSP20.3의 경우 고온에 의해 3500, 1000, 12000, 200배로 고온스트레스에 극적으로 증가하였다. 반면에 class2로 예상되는 PysHSP25.8, PysHSP28.4, 및 PysHSP37.4의 경우 15, 30, 7배 class1에 비해 낮은 수준으로 반응하였다. class2의 PysHSP25.8, PysHSP28.4는 고온 스트레스 보다는 H₂O₂ 처리 조건에서 더 높은 수준으로 전사되었다.

- PysHSP25.8이 내열성에 관여하는지 분석하기 위해 PysHSP25.8을 *E. coli* 세포에 도입했습니다. 공 벡터가 들어간 대조군 세포를 대조군으로 사용하였고, 고온 내성을 향상시키는 것으로 알려진 PtsHSP19.6 형질전환 세포를 양성 대조군으로 사용하였다.

- 대조군과 형질전환된 박테리아는 37°C에서 유사한 성장 패턴을 보였다 (Figure 3.3).

- *E. coli* 세포를 PysHSP 발현을 위해 IPTG로 처리 한 후 고온 (44°C)에서 배양했을 때 PysHSP25.8로 형질전환된 세포는 대조군 세포에 비해 훨씬 낮은 성장률을 보였다. 그러나 PtsHSP19.6으로 형질전환된 세포는 대조군 세포뿐만 아니라 PysHSP25.8을 갖는 형질 전환 체보다 더 높은 속도로 성장함을 보였다. 이러한 결과는 PysHSP25.8이 박테리아 세포에서 열 스트레스 내성에 관여하지 않았음을 보여준다.

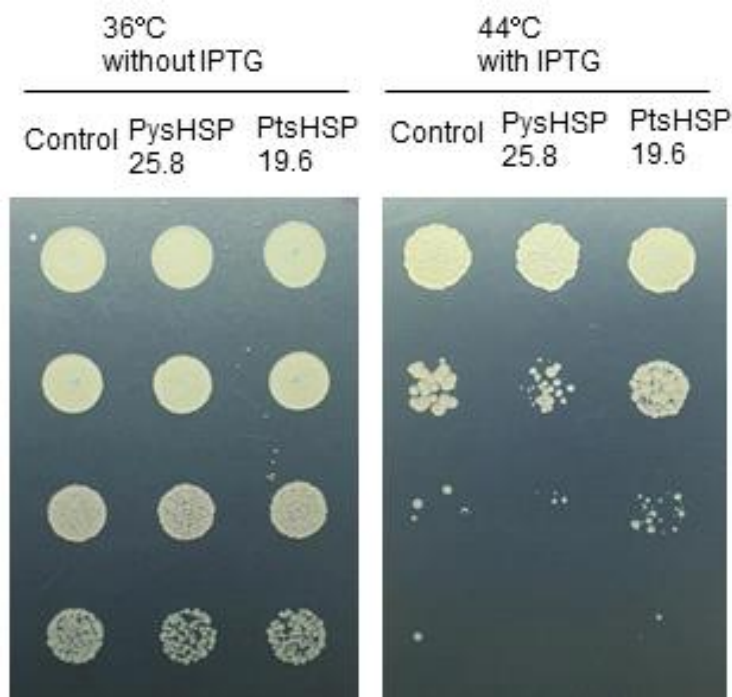


Figure 3.3.50. Effects of PtDRG1 on growth of *E. coli* under high temperature.

Growth of bacteria cells was measured by spotting diluted cultures (serial dilution of 100 to 10⁻³ from cultures at OD₆₀₀ = 0.5) on LB-agar plates. Cells were incubated at 37°C and 44°C, respectively. Photographs were taken after 12 hours of incubation for cells incubated at 37°C and after 15 hours for cells incubated at 44°C.

(3) PysHSPs의 세포내 위치확인

- 웹 프로그램, WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp>) 및 Predotar (<https://urgi.versailles.inra.fr>)를 사용한 PysHSPs의 세포 위치 예측은 Class1의 경우 핵과 세포질에 위치해있고 반면에 Class2의 PysHSPs의 경우 엽록체 및 색소체에 위치한다고 예측되었다.
- 이전에 우리는 *P. tenera*의 PysHSP19.3 및 PysHSP19.6 상동체가 cytosol에서 과립으로 위치한다고 보고하였다. 그러나 PysHSP25.8 및 PysHSP28.4의 세포 위치는 plastid를 표적으로 하는 것으로 예측된다. 그리고 이 PysHSP25.8 및 PysHSP28.4는 고온보다는 과산화수소에 강하게 반응하여 세포질에 위치한 PysHSP19.3 및 PysHSP9.6과 다른 발현 패턴을 나타낸다.
- 지금까지 김을 포함한 홍조류에서 plastid나 mitochondria와 같은 세포 소기관에 위치한 sHSP는 보고된 바 없으며, 모든 sHSP는 세포질에 위치하는 것으로 보고되고 있어 추가적인 연구가 필요하다.

Table 3.3.24. Cellular localization prediction of the PysHSPs

Name	WoLF PSORT (https://wolfpsort.hgc.jp)*	Predotar (https://urgi.versailles.inra.fr)**
PysHSP19.3	Nucleus (13)	Elsewhere (0.77)
PysHSP19.2	Nucleus (10)	Elsewhere (0.70)
PysHSP19.6	Nucleus (7)	Elsewhere (0.59)
PysHSP20.3	Cytosol (8)	Elsewhere (0.78)
PysHSP28.4	Chloroplast (14)	Plastid (0.61)
PysHSP25.8	Chloroplast (13)	Plastid (0.50)
PysHSP37.4	Chloroplast (11)	Plastid (0.67)

*, Cell organelle where the most genes are located among the 14 homologs that exhibit sequence similarity to sHSP. Parentheses is the number of homologs

**, Parentheses is the estimated probability. Elsewhere, place except plastid, mitochondria and ER.

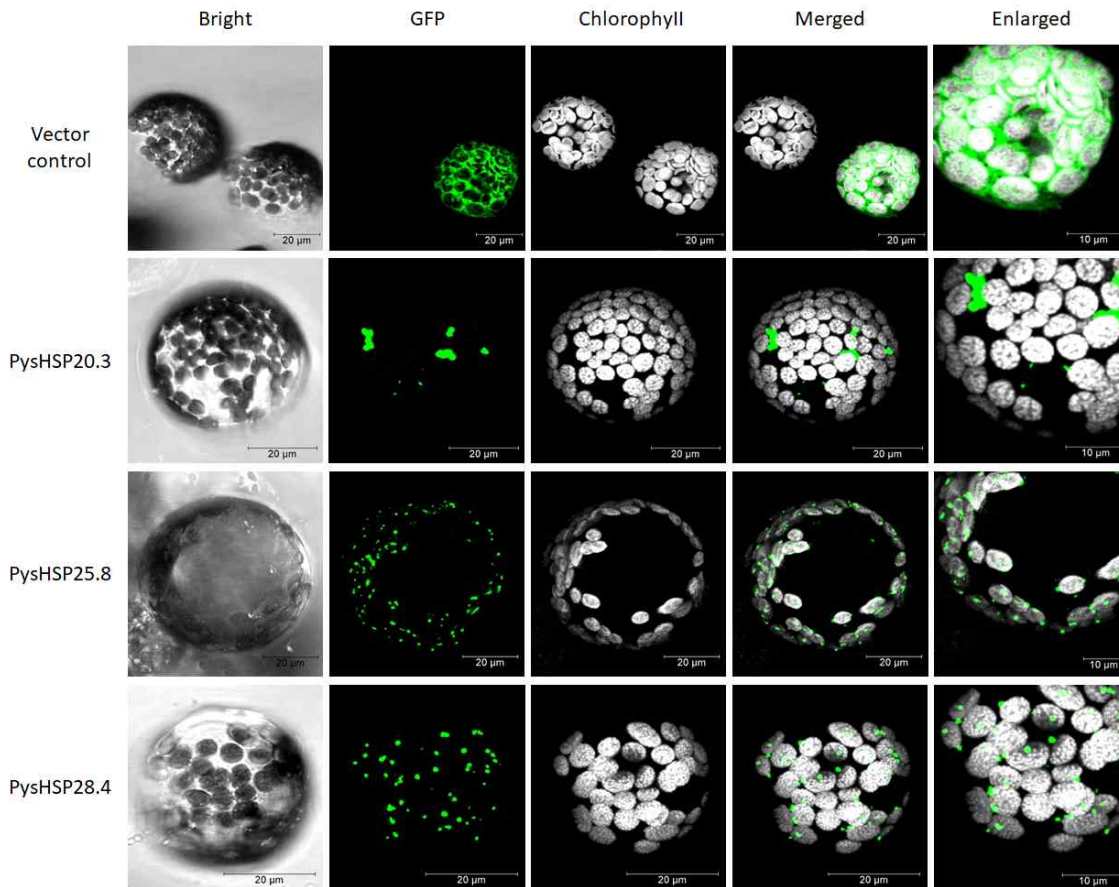


Figure 3.3.51. Protoplast transient expression using PysHSP-GFP fusion constructs were used to determine the subcellular localization.

A reporter gene encoding green fluorescent protein (GFP) was fused to PysHSPs under the control of a CaMV 35S promoter in the 326-GFP vector and introduced into tobacco protoplasts. Fluorescence images of GFP and chlorophyll autofluorescence (Chl) were captured with confocal laser scanning microscopy and are shown in green and white respectively (scale bars, 20 μm). Merged GFP fluorescence and chlorophyll autofluorescence images (scale bars, 10 μm).

- PysHSP20.3, PysHSP25.8 및 PysHSP28.4의 세포 내 위치를 조사하기 위해 식물 전용 발현 벡터인 326GFP의 GFP reporter 유전자에 PysHSP20.3, PysHSP25.8 및 PysHSP28.4을 클로닝하고, PysHSPs-GFP 재조합 벡터를 담배 (*Nicotiana bethamiana*) 원형질체에 도입하였다.
- Class1에 PysHSP19.3 및 PysHSP19.6와 함께 묶이던 PysHSP20.3의 경우 이전에 우리가 보고한 *P. tenera*의 PysHSP19.3 및 PysHSP19.6 상동체와 비슷한 모양으로 Cytosol에 과립 되어 위치해 있었다.
- 반면 Class2 그룹이던 PysHSP25.8 및 PysHSP28.4의 경우 Class1의 과립보다는 작은 크기로 엽록체와의 형광이 겹치면서 서로 부착된 형태로 존재하고 있음을 확인하였다.
- 육상 식물에서 발생하는 세포 소기관에 국한된 sHSP는 식물 성장, 발달 및 스트레스 반응에도 매우 중요하며 그 기능은 일반적으로 세포 소기관과 관련이 있습니다. 특히 엽록체는 식물의 광합성이 일어나는 장소이기 때문에 식물 세포의 가장 중요한 구성 요소 중 하나입니다.

특히 gymnosperms의 일부 CP sHSP는 미토콘드리아와 동시 표적을 수반하며, 고온스트레스 및 산화적 스트레스의 데미지로부터 온도에 민감한 광계II(PSII)를 보호할 수 있다고 보고되었다.

- 특히 엽록체 sHSP의 경우 PSII D1 and D2의 단백질과 결합하면서 온도에 민감한 광계 II(PSII)를 보호하거나, plastid-encoded RNA polymerase (PEP)인 TAC5와 결합함으로써 고온 스트레스에 저항합니다. 더욱이 엽록체 sHSP는 식물이 사전의 고온스트레스를 기억하였다가 다음에 또 올 고온 스트레스에 저항하는 중요한 구성 요소인 것으로 나타났으며, 이는 색소체 메탈로프로테아제 FtsH6에 의해 조절된다고 보고되었다.

- 이러한 엽록체 표적 sHSP가 홍조류인 *P. yezoensis* 에서도 존재하고 있으며, 이는 고등생물의 고온 내성기작과 유사하게 작용 할 것으로 예상된다.

○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	11.6 억원	
			향후 3년간 매출	50 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	200 억원	
			향후 3년간 매출	500 억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 16% 국외 : -%	
			향후 3년간 매출	국내 : 30% 국외 : %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 20% 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : 40% 국외 : %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3			
	소요예산(백만원)	500			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		200	500	1000	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	16	30	50
국외					
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

구분 (연도)	세부프로젝트명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차년도 (2017)	내병성 김 종자 개발	<ul style="list-style-type: none"> 내병성 김 종자 개발 기반 기술 확보 	100	<ul style="list-style-type: none"> 국내 갯병 원인 균주 확보 및 원인 균주별 감염기작 규명 분리된 원인균주를 이용한 감염인자 규명 갯병 내병성 테스트를 통한 내병성 강화
		<ul style="list-style-type: none"> 갯병 내병성 우량 김 종자 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> 해역별 채집된 개채들 중 원인균주에 대해 내성을 지니는 품종을 확보 내병성 강화를 위한 감염테스트 감마선 조사를 통한 돌연변이 육종 유성생식을 통한 세대교번 이후 내병성의 형질유무 확인 순계주 유지 및 보존
		<ul style="list-style-type: none"> 내병성 및 고온내성 김 종자에 대한 기능성 식품 소재 가능성 평가 	100	<ul style="list-style-type: none"> 내병성 및 고온내성 김 종자에 대한 일반성분 및 아미노산, 지방산 등의 영양학적 평가 내병성 및 고온내성 김 종자에 대한 마이코스포린 유사 아미노산, 베타카로틴, 파이코에리스린, 스테롤의 정량분석 기존 방사무늬 김과 내병성 및 고온내성 김 종자에 대한 단백질 효소 가수분해물의 기능성 평가 (항염증)
	고온내성 김 종자 개발	<ul style="list-style-type: none"> 고온내성 김 돌연변이주 선발 	100	<ul style="list-style-type: none"> 20여 고온내성 돌연변이주의 순계화를 진행하여 5라인의 순계화가 완료되었고, 17라인의 순계화가 진행중임 순계화가 확립된 2 변이주의 사상체 및 엽체 성장 특성 분

				<p>석을 수행하여 양식조건에서 고온내성 이외에도 다양한 특성을 비교 분석하였음. HLT1이 대조구보다 모든 조건에서 동일 또는 우수하였음</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 고온내성 변이주 2개의 전사체 분석을 수행하여 변이주에서 특히 발현이 크게 변한 대사관련 유전자들의 정보를 확보하였음 ▪ 품종출원을 위한 2차 시험양식을 수행하여 양식환경에서의 생장 특성, 환경적응성을 조사하였음
	김 발현유전체 정보 탐색 및 활용기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 김 환경내성 품종의 유전적 특성 분석 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 신품종의 유전적 분석을 위한 유전체 분석: 방사무늬김 (수과원 104) 유전체를 PacBio 기반 분석함 ▪ 고온 내성 돌연변이체의 유전적 변이를 전사체 수준에서 조사함; DNA 마커 개발을 위한 INDEL 과 SSR 정보를 수집함
		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 환경내성 김 유전자 선별 및 기능 연구 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 고온 및 건조 내성 관련 유전자 선별 ▪ 환경 내성 유전자 DRG2의 기능 연구 결과를 정리 논문 투고함 ▪ 환경 내성 김 유전자 PtFUT의 기능연구 결과를 논문 투고하고 유전자는 특허 출원함 ▪ 건조 관련 김 유전자 PtDRG1의 유전적 분자적 기능 연구 하고 그 결과를 특허 출원 함 ▪ 고온 내성 관련 김 유전자 sHSP 연구 결과를 논문으로 발표함
2차년도 (2018)	내병성 김 종자 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 김 질병 진단기술 및 내병성 특성 규명 완료 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 김 대표적 3대 질병인 낭균병, 붉은갯병, 녹반병 질병 진단기

			<ul style="list-style-type: none"> 술 개발 -갯병 균주 감염 후 김 세포내 방어기작 분석 -PCR을 통한 김 갯병균에 유전자 발현 분석 -낭균병 신호기작을 이용한 갯병 감염률 분석 -붉은갯병 유주자 형성에 김 세포의 미치는 원인 분석
		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 개발종자의 현장적용 시험 및 형질특성 조사 	<p style="text-align: center;">100</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 출원 품종 골드1호 2년 차 재배심사 ▪ 개발종자의 형질특성 조사 및 안정성 테스트 ▪ 내병성 품종 1set(1.8m X 40m 총 60대)와 일반 방사무늬김 1set를 수온 18℃에 채묘완료 ▪ 채묘 4주 후 유엽기 내병성 테스트 및 생산량 검증 예정 ▪ 김 양식 어기인 11월부터 이듬해 2월까지 월 2회 채집을 통한 내병성 품종 및 황백화 품종의 엽체 감염률 분석/생산량 테스트
		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 개발종자 가공품의 내수 및 수출판매 (종자-내수,가공품-수출) 	<p style="text-align: center;">100</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 수출전략 -개발된 내병성 품종(골드1호)을 가족회사인 (주)선진수산을 통해 수확 및 가공 후 해외로 수출 -중국 위해 김 양식단지와 협의하여 년 간 50억원 상당의 마른 김 수출 협약 ▪ 내수전략 -개발된 골드1,2,3호 품종은 가족회사를 통해 분양 후 국내 김양식장에 총 120만 평 규모로 분양
		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 내병성 및 고온내성 김 종자에 대한 기능성 식품 소재 가능성 평가 	<p style="text-align: center;">100</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 내병성 및 고온내성 김 종자에 대한 다양한 생리활성 평가 (항산화, 항염증, 항당뇨)

	<p>고온내성김 종자 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 고온내성 돌연변이주 특성 분석 	<p>100</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 신규고온내성 변이주 순계라인(15-6, 15-10, 15-11) 분석 결과 생장, 색소함량, 광합성 능력에서 고온내성 특성을 보여주었음 ▪ 기존 고온내성라인 HTR1, HTR2의 변이분석을 수행하여 고온내성 기작 및 마커개발을 위한 변이부분을 확보하였음 ▪ 고온내성 변이주 (HTR1, 15-6, 15-10, 15-11)의 고온적응 유전자 발현은 변이주마다 다른 양상을 보여 고온내성 기작이 서로 상이함을 나타냈음 ▪ 김의 고온내성 기작규명을 위한 리포터 유전자의 안정성 검증과 유전자교정기술개발을 위한 벡터를 구축하였음 ▪ 방사무늬김 다당류분해효소 유전자의 기능을 검증하여 활용기술을 개발하였음 ▪ 신규 고온내성 변이주 15-10과 15-11를 동백수산과 선진수산에 의뢰하여 1년차 시험양식을 시작하였음 ▪ 개발된 고온내성 라인중에서 15-3은 붉은 갯병과 낭균병에 현저한 내성을 보여주었음. ▪ 개발된 라인중에서 15-8과 15-13으로부터 고온내성과 광엽형 특성을 동시에 보이는 라인을 이차로 선발 ▪ 시험양식이 완료된 고온내성 1라인의 품종출원 (골드 2호)을 완료하였으며 1차 재배심사가 진행 ▪ 개발된 품종을 김 양식에 사
--	------------------------	----------------------------------------------------------------------	------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

				<p>용하기 위하여 골드2호의 분양을 위해 사상체를 증식</p> <ul style="list-style-type: none"> 방사무늬김 핵 유전체 서열 초안 완성: 685 scaffold (114.3Mb). 김 핵 유전체 기반 SSR 분석: 23,120개 (4 repeat 이상 SSR) Annoatation: repetitive sequence 비율 = 42.6% 개발된 환경 내성 김 (Gold 1호) 품종 구분 DNA 마커 후보 선발 및 개발
	김 발현유전체 정보 탐색 및 활용기술 개발	김 환경내성 품종의 유전적 특성 분석	100	
		환경내성 김 유전자 선별 및 기능 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> 고온내성 김으로부터 고온내성 관련 유전자 Py97124를 분리 Py97124 유전자의 생리적 기능을 연구하고 세포생장 억제 기능 관련 특허 출원함 small heat shock protein, PtsHSP19.6의 생리적 분자적 기능 연구를 수행하고 결과를 논문으로 정리해 투고 PtMPV17 유전자의 Arabidopsis homolog인 AtMPV17 유전자의 KO line 및 OX(Over expression) line 제작 건조 내성관련 유전자 PtDRG1의 기능 연구를 수행하고 그 결과를 논문으로 발표
3차년도 (2019)	내병성 김 종자	<ul style="list-style-type: none"> 갯병 내병성 우량 김 종자 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> 내병성 강화를 위한 감염테스트 영양결핍상태에서 황백화 내성 강화를 위한 테스트 유성생식을 통한 세대교번 이후 내병성 및 황백화 내성 형질유무 확인

				<ul style="list-style-type: none"> ▪ 순계주 유지 및 보존
	개발	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 우량 환경내성 김 종자 생산기술 개발 및 국내외 산업화 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 출원 품종 골드1호 3년 차 재배심사 ▪ 내병성 참김 및 황백화 내성 품종 1년 차 시험양식 수행 ▪ 내병성 참김 육상채묘 (1.8m X 50m 총 100대) 및 황백화 내성 품종 해상채묘 완료 ▪ 개발종자의 채묘 4주 후 유엽기 내병성 및 황백화 내성 테스트 ▪ 김 양식 어기인 11월부터 이듬해 2월까지 월 2회 채집을 통한 개발 품종들의 엽체 감염률 분석/생산량 테스트 예정
	고온내성 김 종자 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 내병성 및 고온내성 김 종자에 대한 기능성 식품 소재 가능성 평가 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 내병성 및 고온내성 김 종자에 대한 생리활성 평가를 바탕으로 NT2 (고온내성) 김의 종자의 생리활성 성분 분리 및 이에 대한 활성을 세포 내 제브라피쉬 모델에서 규명 ▪ 내병성 및 고온내성 김 종자에 대한 생리활성 성분 분석 및 기존 김과의 비교분석 ▪ 그 외에 생리활성 탐색 (항비만, 화장품, 간 보호 효과 활성 등)
		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 고온내성종자 후대분석 및 신규 변이주 특성 분석 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 순계 돌연변이체 15-13을 대상으로 정상온도 및 고온조건에서 성장능력 및 광합성이 우수함을 확인

		<ul style="list-style-type: none"> 고온내성종자 유전자 특성 규명 	100	<ul style="list-style-type: none"> 고온내성 변이주에서 CCM 유전자군의 발현이 증가
		<ul style="list-style-type: none"> 양식 현장평가/피드백을 통한 양식조건 최적화 및 산업화 기반구축 	100	<ul style="list-style-type: none"> 광엽형 고온내성 변이주 및 내병성 고온내성 변이주 선발 골드2호를 대상으로 MOU 및 기술이전 실시하였고, 2019년 산 마른김 생산 국내 인지도 및 점유율을 높이기 위해 무상분양을 실시
		<ul style="list-style-type: none"> 신규 변이주 시험양식 	100	<ul style="list-style-type: none"> 고온내성 돌연변이체 15-10, 15-11의 1년차 시험양식 완료 및 2년차 시험양식을 진행
		<ul style="list-style-type: none"> 골드2호 시험재배 (2회차) 	100	<ul style="list-style-type: none"> 골드2호의 2회차 시험재배가 진행
		<p>김 환경내성 품종의 유전적 특성 분석 및 DNA 마커 개발</p>	100	<ul style="list-style-type: none"> 김 유전체 해독: 방사무늬김 (<i>P. yezoensis</i>, 수과원 104), 참김(<i>P. tenera</i>) draft genome sequence 분석 및 gene annotation 골드 2호 전사체 분석을 통한 유전적 특성 조사 SSR 조사; 방사무늬김 draft genome 서열 기반 SSR 분석 방사무늬김 품종간 변이 조사를 위한 SSR 선별 및 적용 1차로 선별한 SSR를 16개의 방사무늬김 품종에 적용하여 변이 조사 16개의 방사무늬김 품종을 대상으로 SSR를 적용하고 분석하고, 김의 유전적 특성 분석 및 품종 식별에 적용할 수 있는 SSR 마커 확보
4차년도 (2020)	김 발현유전체 정보 탐색 및 활용기술 개발	환경내성 김 유전자 선별 및 기능 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> 고온 내성김 골드2호로부터 생성한 전사체를 방사무늬김 draft-genome 분석을 통해 확보한 reference gene를 사용

				<ul style="list-style-type: none"> 하여 DEG를 선별 ▪ 선별한 DEG의 발현 패턴은 조사를 통해 고온 반응 관련 유전자들을 선별 ▪ 선별한 유전자들을 클로닝 ▪ Arabidopsis MPV17 homolog를 클로닝하고 AtMPV17 KO mutant와 AtMPV17 과발현 형질전환체를 제작하여 생리적 기능을 조사 ▪ 방사무늬김 draft-genome sequence를 기반으로 small HSP gene family를 조사
내병성 김 종자 개발	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 개발종자의 안정성 측정 및 표준화 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 내병성 품종의 모본과 유성생식체의 형질특성 조사 및 안정성 테스트 ▪ 황백화 내성품종의 특성 분석 ▪ 황백화 품종의 실내배양 및 안정성 테스트(실내실험) ▪ 순계 및 중 보존 ▪ 개발품종의 모본과 유성생식체의 형질특성 분석 ▪ 안정성 테스트 DB 구축 	
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 우량 환경내성 김 종자 생산기술 개발 및 국내외 산업화 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 출원 품종 골드1호 4년 차 재배심사 ▪ 내병성 참김 및 황백화 내성 품종 2년 차 시험양식 ▪ 내병성 참김 육상채묘 (1.8m X 50m 총 200대) 및 황백화 내성 품종 400대 해상채묘 ▪ 개발종자의 채묘 후 유엽기 내병성 및 황백화 내성 테스트 ▪ 김 양식 어기인 11월부터 이듬해 2월까지 월 2회 채집을 통한 개발 품종들의 엽체 감염률 분석/생산량 테스트 ▪ 2021년 3월까지 충남 서천에 위치한 (주)선진수산 마른김 가공공장에서 골드1, 3호, 황백 	

				<ul style="list-style-type: none"> 화 내성품종의 마른김 생산 2020-2021년 수출판매(2020년 10월까지 약 70억 원(직, 간접 수출) 판매, 국내 대형마트 직접 계약으로 12월까지 100억 원 국내매출 예정) 골드1, 3호의 유리사상체는 전남지역 1,500g, 충남지역 1,000g 분양
	고온내성 김 종자개발	<ul style="list-style-type: none"> 고온내성 특성 후대 분석 	100	<ul style="list-style-type: none"> 고온내성 광엽형 돌연변이주 15-13의 생중량을 비교
		<ul style="list-style-type: none"> 고온내성 변이주 유전적 특성 규명 	100	<ul style="list-style-type: none"> 고온내성 변이주에서 스트레스 내성, calvin cycle, glycolysis 관련 유전자들의 발현이 증가 ADH 과발현 미세조류를 통해 고온스트레스 관련 유전자의 특성 규명
		<ul style="list-style-type: none"> 고온내성 김 양식 현장 평가 및 피드백 	100	<ul style="list-style-type: none"> 기존 고온내성 라인에 방사선 조사를 재수행하여 황백화와 유사한 영양염 결핍 조건에서 선발하여 황백화 내성을 가지는 돌연변이주를 확보
		<ul style="list-style-type: none"> 골드2호 시험재배 (3년차) 	100	<ul style="list-style-type: none"> 골드2호의 3회차 시험재배가 진행
		<ul style="list-style-type: none"> 산업화 기반 구축 	100	<ul style="list-style-type: none"> 개발된 골드2호 품종을 김 양식어가에 무료분양하기 위해 사상체를 대량 증식
5차년도 (2021)	김 발현유전체 정보 탐색 및 활용기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> 김 품종 구분 DNA 마커 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> 김 유전체 정보 기반 SSR 분석 및 primer를 design 함 DNA 마커를 위한 SSR 선별 및 선별 SSR의 방사무늬김 품종내 Polymorphism 분석 PIC 가 높고 방사무늬 김 품종 식별 가능 SSR 선별 방사무늬 김 품종 식별에 중요하고 PIC 값이 높은 11개의 SSR 마커는 특허 출원 SSR 마커 선별 및 적용 그리고 선별 SSR 마커를 이용한

				방사무늬 김 구조 분석 결과를 정리하여 Journal of Applied Phycology에 투고함; 현재 revision 중
내병성 김 종자 개발	<ul style="list-style-type: none"> 내병성 우량 김 종자에 대한 과학적인 라이브러리 구축과 데이터 베이스화 	100	<ul style="list-style-type: none"> 내병성 품종의 안정성 DB구축(1-4년차 시험양식 결과 DB구축) 내병성 품종의 지표성분 표준화 및 생리활성에 대한 라이브러리와 DB 구축 	
	<ul style="list-style-type: none"> 개발종자의 안정성 측정 및 표준화 	100	<ul style="list-style-type: none"> 황백화 품종의 시험양식 및 안정성 테스트(실내실험) 개발품종(골드1호, 황백화 품종)순계 및 종 보존 황백화 내성 품종의 안정성 DB구축 	
	<ul style="list-style-type: none"> 우량 환경내성 김 종자 생산기술 개발 및 국내외 산업화 	100	<ul style="list-style-type: none"> 환경내성 품종의 대량생산 및 국내외 판매 개발품종의 유리사상체 국내분양 개발품종의 가공품 수출전략 수립 국내 메이저 가공업체(기술이전을 통한 가족회사-(주)선진수산, (주)대천김)를 통한 개발 품종 가공품 생산 및 내수판매 2021년 상반기 골드1, 2, 3호의 마른김 및 조미김 수출(미국, 동남아 등) 	
고온내성 김 종자 개발	<ul style="list-style-type: none"> 고온내성 종자의 유전적, 생리·생화학적 분석 	100	<ul style="list-style-type: none"> 골드2호 구조변이 분석을 수행함 고온내성 광엽형 돌연변이체의 부위별 세포 크기를 비교 	
	<ul style="list-style-type: none"> 고온내성 종자의 현장 특성 분석 	100	<ul style="list-style-type: none"> 고온내성 광엽형 방사무늬 김의 시험양식을 실시 	
	<ul style="list-style-type: none"> 고온내성 유전체 발현 	100	<ul style="list-style-type: none"> 고온내성, 민감 조류의 wild 	

		분석을 통한 고온내성 기작 분석		<p>type 및 변이체들을 대상으로 전사체, 유전자, CCM 반응, ROS 분석 등을 수행하여 고온내성 기작에 heat shock protein 이외에 다양한 대사경로 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 고온내성 기작 분석을 위한 후보유전자 기능 검증기술을 개발하기 위하여 방사무늬 김의 유전자 교정기술을 확보
		▪ 산업화 기반 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 골드2호의 분양 생산을 통한 점유율 확대
	김 발현유전체 정보 탐색 및 활용기술 개발	▪ 김 품종의 유전적 특성 분석 및 품종 구분 DNA 마커 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 고온 내성 김 골드2호 re-sequencing ▪ 수과원 104와 골드2호의 유전체 비교 분석을 통한 InDel 및 SNP 발굴 ▪ Mig-Seq primer set 개발 및 골드1호와 해풍 1호를 대상으로 적용 ▪ Mig-Seq 기반골드1호/해풍1호 SNP haplotype 발굴
		▪ 환경내성 김 유전자 선 별 및 기능 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 수과원 104 draft-genome 기반 만들어진 Reference gene based transcriptome 분석: 고온내성 김 14-3, 14-4 그리고 고온내성김 500Gy 전사체 분석을 통한 고온 반응 DEG 분석 ▪ 방사무늬김 Genome 정보기반 PysHSP gene family 분석 및 7번째의 PysHSP 클로닝 ▪ 각 sHSP의 발현 특성 및 cellular localization 분석: 추가로 클로닝한 sHSP는 고온보다 H₂O₂에 반응하며 엽록체 주변에 위치 ▪ 고온 스트레스 반응 김 유전자, PyHRG1 재분석 및

			정리하고 논문으로 발표 ▪ 고온내성 김 품종의 전사체분석 기반 선별 유전자 Py525 (Py_transaldolase) 기능연구: Py525는 고온 스트레스하에서 발현 감소하며, 인위적 발현 증가시 고온 감수성 증가함 ▪ PyDRG1 도입 애기장대 생성 및 생리적 특성 조사: PyDRG1 도입 애기장대 유식물체는 대조구보다 높음
--	--	--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

3-2. 목표 달성여부

- 최종 성과목표의 평가는 각 프로젝트별 세부 목표의 연구내용에 따라 평가하였으며 각각의 세부 프로젝트별 목표는 100% 달성하였음

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

- 7-Block의 수출실적(최종 300만 달러) 및 품종등록(최종 품종등록 3건)은 2019년 수출실적 종자환산율에 따라 96만 달러에서 약 7만 달러로 변경되어 수치가 줄었으며, 품종등록은 잇바디돌김 골드3호가 특허등록으로 변경됨에 따라 품종등록2건 특허등록1건으로 정정됨
- 현재 총 수출액 116만 달러에서 미달성 184만 달러는 물김 생산 시기인 2021년 하반기와 2022년 상반기에 대량생산되어 마른김 가공 후 본격 수출 시기인 2022년 4월부터 2022년 하반기 까지 점차 확대 될 것으로 예상되며 가족회사의 수출 예상금액은 약 2천 만 달러 (종자환산 금액 약 200만 달러)로 확인됨
- 잇바디돌김 골드3호의 경우 2018년 국립수산물과학원 품종관리센터의 출원서 반려로 특허청의 특허등록을 하였음. 품종관리센터의 매뉴얼에 따라 자웅이주체인 잇바디돌김 특성상 10회(10년)의 시험양식 기간을 거쳐 매년 동일한 후세대의 특성 결과로 출원 및 등록이 결정됨. 이에 따라 연구기간 내에 잇바디돌김의 품종등록이 물리적으로 어렵다고 판단하여 특허등록을 결정함
- 2천 만 달러의 종자수출액 환산금액은 약 200만 달러 이상으로 2021년-2022년 가족회사 및 3자 수출계약 업체의 수출금액이 최종목표인 300만 달러를 넘을 것으로 확인되며 수출 상황에 따라 예상 수출액 이상일 것으로 판단됨

- 품종개발 이후 개발품종의 국내 점유율을 매년 약 10% 이상 늘어나고 있으며 일본품종의 사용이 점차 줄어들고 있음. 이에 따라 다양한 품종 및 김 양식기술 개발이 필요하다는 김 양식 산업 관련자들의 요구에 김 양식 및 품종개발 관련후속 연구가 절실히 필요하다고 판단됨
- 김 양식의 경우 환경변화에 민감하기 때문에 매년 새로운 갯병의 출현과 이상기온의 대응으로 다양한 품종의 개발이 필요하며 지역별 특성을 고려한 새로운 양식기술 개발이 절실히 함

붙임. 참고문헌

- Alfonso M, Yruela I, Almárcegui S, Torrado E, Pérez MA, Picorel R. 2001. Unusual tolerance to high temperatures in a new herbicide-resistant D1 mutant from *Glycine max* (L.) Merr. cell cultures deficient in fatty acid desaturation. *Planta*, **212**, 573–582.
- Arasaki S. 1947. Studies on the rot of *Porphyra tenera* by a *Pythium*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **13**, 74–90.
- Arasaki S, Akino K, Tomiyama T. 1968. A comparison of some physiological aspects in marine *Pythium* on the host and on the artificial medium. *Bull. Misaki Mar. Biol. Inst. Kyoto Univ.*, **12**, 203–206.
- Bae SH. 1991. The origin and development process of laver culture industry in Korea.1. Laver culture history till the end of Chosun dynasty, *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **24**.
- Beuchat LR, Harris LH, Linda J, Ward TE, Kajs TM. 2001. Development of a processed standard method for accessing the efficacy of fresh produce sanitizers. *Journal of Food Protection*, **54**, 1103–1109.
- Cao M, Xu K, Yu X *et al.* 2019. A chromosome-level genome assembly of *Pyropia haitanensis* (Bangiales, Rhodophyte). *Molecular Ecology Resources*, DOI: 10.1111/1755-0998.13102
- Choi HS, Choi KH, Rhew TH. 2000. Simple and rapid isolation of plasmids from *Porphyra tenera*. *Algae*, **15**, 133–136.
- Choi S, Kim SH, Im SO, Jeong WJ, Hwang MS, Park EJ, Choi DW. 2015. The heat shock protein 70a from *Pyropia seriata* increases heat tolerance in *Chlamydomonas*. *Plant Omics Journal*, **8**, 327 - 334.
- Cho YC, Chang JW. 1986. On the disease occurrence of cultured laver(*Pyropia tenera* Kjellman form. tamatsuensis miura), and production at the Nokdong laver farming area. *Bulletin of National Fisheries Research and Development Agency* **39**, 111–125.
- Dee MG. 1997. Use of Ozone for Food Processing. *Food Technol*, **51**, 72–75.

- Dziezak D.** 1986. Preservatives antimicrobial agents. *Food Technol*, **49**, 104–111.
- FAO** 1950–2014. Global Aquaculture Production “Laver”, 1950–2014.
- Frank HG, Floris VO, Osu L, Anthony WDL.** 2013. Ecological roles of zoosporic parasites in blue carbon ecosystem. *Fungal Ecology*, **6**, 319–327.
- Fujimoto T.** 1978. Study on a relation with the color environmental factor of Nori. *Bulletin of the Fukuoka Prefectural Fisheries Experimental Station*, **1978**, 121–131.
- Fukuhara E.** 1968. Studies on the taxonomy and ecology of *Porphyra* of Hokkaido and its adjacent waters. *Bull. Hokkaido Reg. Fish. Res. Lab*, **34**, 40–99.
- Ha YD, Kim KS.** 2000. Civilization History of Vinegar. *Food Industry and Nutrition*, **5**, 1–6
- Holiday SL, Scouten AJ, Beychat LR.** 2000. Efficacy of chemical treatments in eliminating *salmonella* and *Esheria coli 0157:H7* on scarified and plished alfalfa seeds. *Journal of Food Protection*, **64**, 1489–1495.
- Hong DD, Kim TH, Hwang M.S, Chung IK, Lee CH.** 1998. Effects of salinity on chlorophyll fluorescence from *Porphyra* thalli and comparison of species with different intertidal distribution. *Fisheries and aquatic sciences*, **1**, 122–128.
- Huang L, Yan X** 2019, Construction of a genetic linkage map in *Pyropia yezoensis* (Bangiales, Rhodophyte) and QTL analysis of ververal economic traits of blades. *PLOS ONE*, **14**, e0209128.
- Hwangbo K, Lim JM, Jeong SW, Vikramathithan J, Park YI, Jeong WJ.** 2018. Elevated Inorganic Carbon Concentrating Mechanism Confers Tolerance to High Light in an Arctic *Chlorella* sp. ArM0029B. *Frontiers in plant science*, **9**, 590.
- Hwang MS.** 1994. A taxonomic study on the genus *Porphyra*(Bangiales, Rhodophyta) in Korea, *Ph. D. Dissertation. Seoul Univ*, **227**.
- Hwang MS, Han M, Lee IK.** 1998. Allozyme variation and species relationships in the genus *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) from Korea. *Algae*, **13**, 447–459.

- Hwang MS, Kim JK, Sim DS, Oh YS, Choi HG.** 2005a. Growth and reproduction of *Porphyra kuniedae* Kurogi(Bangiales, Rhodophyta) from Korea. *Key Engineering Materials*, **277**, 569–576.
- Hwang MS, Kim SM, Ha DS, Baek JM, Kim HS, Choi HG.** 2005b. DNA sequences and identification of *Porphyra* cultivated by natural seeding on the southwest coast of Korea. *Algae*, **20**, 183–196.
- Hwang MS, Lee IK.** 1994. Two species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta), *P. koreana* sp. nov. and *P. lacerata* Miurafrom Korea. *Korean Journal of Phycology*, **9**, 169–177.
- Hwang MS, Lee IK.** 2001. Taxonomy of the genus *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) from Korea. *Algae*, **16**, 233–273.
- Hwang MS, Lee IK.** 2002. Character analysis and numerical taxonomy of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) from Korea. *Algae*, **17**, 217–233.
- Hwang TY, Park YJ, Moon KD.** 2005. Effects of Ozone–Water Washing on the Quality of Melon. *Korean Journal of Food Preservation*, **12**, 252–256.
- In JS, Lim JM, Jung S. et al.** 2021. Production of porphyra-334 in transgenic lines of *Nannochloropsis salina* by the expression of mycosporine–like amino acid biosynthetic genes of *P. yezoensis*. *Journal of Applied Phycology*, **2021**, 1663 - 1672.
- IPCC** 2014. Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Contributions of Working Group II to the Fifth Assessment Report, *Cambridge University Press, New York, USA*, 1131.
- Jayaraman V, Hwangbo K, Lim JM et al.** 2017. Reduced gene expression at the branch point of chlorophyll and heme biosynthesis in Arctic *Chlorella* ArM0029B. *Plant Biotechnology Reports*, **11**, 9 - 15.
- Jayaraman V, Hwangbo K, Lim JM, Lim KM, Kang DY, Park YI, Jeong WJ.** 2020. Overexpression of *Chlamydomonas reinhardtii* LCIA (CrLCIA) gene increases growth of *Nannochloropsis salina* CCMP1776. *Algal Research*, **46**, 101807.
- Jeong SW, HwangBo K, Lim JM, Nam SW, Lee BS, Jeong BR, Chang YK, Jeong WJ, Park YI.** 2020. Genetic Impairment of Cellulose Biosynthesis Increases Cell Wall

Fragility and Improves Lipid Extractability from Oleaginous Alga *Nannochloropsis salina*. *Microorganisms*, **8**, 1195.

Jimenez-Escrig A, Goni CI. 1999. Nutritional evaluation and physiological effects of edible seaweeds. *Archivos latinoamericanos de nutricion*, **49**, 114-120.

Jin LG, Kim MS, Choi JS, Cho JY, Jin HJ, Hong YK. 2000. Morphology and sequence analysis of nuclear 18S rDNA from the summer strain of *Porphyra suborbiculata* (Rhodophyta) in Korea. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **33**, 489-495.

Jin LG, Kim MS, Kim YD, Kim HG, Hong YK. 2001. Sequence analysis of nuclear 18S rDNA from *Porphyra pseudolinearis* (Rhodophyta) in Korea. *Algae*, **16**, 379-385.

Jin LG, Kim MS, Choi JS, Cho JY, Jin HJ, Hong YK. 2002. Sequence analysis of nuclear 18S rDNA from the seaweed *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) in Korea. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **35**, 633-638.

Jin LG, Kim MS, Choi JS, Cho JY, Jin DH, Hong YK. 2003. Sequence analysis of nuclear 18S rDNA from *Porphyra tenera* (Rhodophyta) in Korea. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **36**, 35-38.

Jo YH, Kang SP, Seo TH, Choi SJ, Kho KH, Kuwano K, Saga N, Kim MY, Shin JA. 2003. Cryopreservation of sporothalli of the genus *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) from Korea. *Algae*, **18**, 321-331.

Kang JW. 1972. Disease of the cultivated *Porphyra* at culture beds with special reference to the effects of fertilizer plant effluents. *BULL KOR FISH SOC*, **5**, 39-44.

Kang YH, Park SR, Oak JH, Seo TH, Shin JA, Chun IK. 2009. Physiological responses of *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) exposed to high ammonium effluent in a seaweed-based integrated aquaculture system. *Fisheries and Aquatic Sciences*, **12**, 170-77.

Kim C, Hung YC, Robert EB. 2000. Roles of oxidation reduction potential in electrolyzing and chemically modified water for the inactivation of food-related pathogens. *Journal of Food Protection*, **63**, 19-24.

Kim GH, Klochkova TA, Lee DJ, Im SH. 2016. Chloroplast virus causes green-spot disease in cultivated *Pyropia* of Korea. *Algal Research*, **17**, 293-299.

- Kim GH, Moon KH, Kim JY, Shim JB, Klochkova TA.** 2014. A reevaluation of algal diseases in Korean *Pyropia* (*Pyropia*) sea farms and their economic impact. *Algae*, **29**, 249–265.
- Kim JG, AE Yosep, GW Chism.** 1999. Use of Ozone to inactivate microorganisms on lettuce. *Journal of Food Safety*, **19**, 17–34.
- Kim KH, Kim CS.** 1982. Studies on the manufacture of *Underia pinnatifida* laver and its physicochemical properties I. Histochemical properties. *Korean Journal of Food Science and Technology*, **14**, 336–341.
- Kim KJ, Lim WS, Kim KH, Lee JH, Hwang IY, Kim JS, Choe SN, Kim JB, Park KH.** 1999. Bioconcentration of fluoranthene, a polycyclic aromatic hydrocarbon, and its effects on the conchocelis growth in *Porphyra*. *Algae*, **14**, 195–200.
- Kim KS.** 2000. Civilization History of Vinegar. *Food Industry and Nutrition*, **5**, 1–6.
- Kim MS, Choi JS, Cho JY, Jin HJ, Hong YK.** 2000. Morphology and sequence analysis of nuclear 18S rDNA from the summer strain of *Porphyra suborbicuiata* (Rhodophyta) in Korea. *Fisheries and Aquatic Sciences*, **33**, 489–495.
- Kim NG, Notoya M.** 2004. Life history of *Porphyra seriata* Kjellman (Bangiales, Rhodophyta) from Korea in laboratory culture. *Algae*, **19**, 303–309.
- Kim NG.** 1999. Culture studies of *Porphyra dentata* and *P. pseudolinearis* (Bangiales, Rhodophyta), two dioecious speices from Korea. *Hydrobiologia*, **398/399**, 127–135.
- Kim NG.** 2000. Effect of temperature, photon flux density and photoperiod on the life history of *Porphyra suborbiculata* Kjellman f. *latifolia* Tanaka(Bangiales, Rhodophyta). *Aquaculture*, **13**, 295–301.
- Kim NG.** 2000. Physiological study on the hybrid by interspecific crossing between *Porphyra pseudolinearis* and *P. dentata* (Bangiales, Rhodophyta), two dioecious speices in culture. *Aquaculture*, **13**, 353–357.
- Kim NG.** 2011. Culture study on the hybrid by interspecific crossing between *Porphyra peudolinearis* and *P. dentata* (Bangiales, Rhodophyta), two dioecious species in culture. *Algae*, **26**, 79–86.

KMI 수산업관측센터 2014. 해조류 수산관측.

Kim OM, HA DJ, Jeong YJ. 2003. Antibacterial activity of Vinegars on *Streptococcus mutans* Caused Dental Caries. *Korean Journal of Food Preservation*, **10**, 565-568.

Kim TH, Hwang MS, Song JD, Oh MH, Moon YH, Chung IK, Rhew TH, Lee CH. 2006. A simple method for extraction of high molecular weight DNA from *Porphyra tenera* (Rhodophyta) using diatomaceous earth. *Algae*, **21**, 261-266.

Kim YJ, Choi KD, Shin IS. 2010. Bactericidal activity of strongly acidic electrolyzed water on various vegetables and kitchen apparatus. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, **39**, 776-781.

Klochkova TA, Jung S, Kim GH. 2017. Host range and salinity tolerance of *Pythium porphyrae* may indicate its terrestrial origin. *Phycology*, **29**, 1-9.

Klochkova TA, Shim JB, Hwang MS, Kim GH. 2012. Host-parasite interactions and host species susceptibility of the marine oomycete parasite, *Olpidiopsis* sp., from Korea that infects red algae. *Journal of Applied Phycology*, **24**, 135-144.

Koh NP. 1981. Study on the cultivation of *Porphyra pseudolinearis* UEDA. *Bull. Nat. Fish. Res. Dev. Agency*, **26**, 51-61.

Koh NP, Choe KJ, Rho S, Ko CS. 1980. Study on improvement of laver. *Bull. Fish. Res. Dev. Agency*, **24**, 47-58.

Lee IK, Kang JW. 1986. A check list of marine algae in Korea. *The Korean Journal of Phycology*, **1**, 311-325.

Lee J Y. 2008. Global trends in food safety management system and HACCP. *J Fd Hyg Safety* **23** : 19-25

Lee JH, Yoon JM. 2006. Genetic difference and variations in two *Porphyra* species (Bangiales, Rhodophyta). *Journal of Aquaculture*, **19**, 67-76.

Lee SD, Park YJ, Chung SK. 1987. Studies on culture of *Porphyra* growing on rocks along the Kangwon-do coast (II). *Bull. Nat. Fish. Res. Dev. Agency*, **40**, 43-50.

Lee SH, Jang MS. 2004. Effects of Electrolyzed Water and Chlorinated Water on Sensory

and Microbiological Characteristics of Lettuce. *Korean journal of food and cookery science*, **20**, 499–507.

Lee SJ, Park SW, Lee JH, Kim YS. 2012. Diseases of the cultivated *Pyropia* at seochen area. *Journal of Fish Pathology*, **25**, 249–256.

Lee YK, Lee HK. 2003. A simple method for DNA extraction from red algae. *Algae*, **18**, 65–69.

Li W, Zhang T, Tang X, Wnag B. 2010. Oomycetes and fungi: important parasites on micro algae. *Acta Oceanologica Sinica*, **29**, 74–81.

Lim JM, Shin Y.J, Jung S et al. 2019. Loss of copy number and expression of transgene during meiosis in *Pyropia tenera*. *Plant Biotechnology Reports*, **13**, 653 - 661.

Marchetti R, Casadei MA, Guerzoni ME. 1992. Microbial population dynamic in ready-to-use vegetable salads. *Journal of Food Science*, **4**, 97–108.

Metcalf & Eddy Inc. 2004. “Wastewater Engineering Treatment and Reuse”, 4th Edition, McGraw Hill.

MiFAFF 2011. Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries, Project document for new work on a standard for laver products.

MiFAFF 2011. Food, Agriculture, Forestry and Fisheries Statistical Year Book.

Migita S. 1969. *Olpidiopsis* disease of culture *Porphyra*. Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ., **28**, 131–145.

Miura A. 1984. A new variety and a new form of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) from Japan: *Porphyra tenera* Kjellman var. *tamatsuensis* Miura, var. nov. and *P. yezoensis* Ueda form. *narawaensis* Miura, form. nov. *J. Tokyo Univ. Fish.*, **71**, 1–14.

NACMCF. 1998. HACCP principles and application guidelines. *Journal of Food Protection*, **61**, 1246–1259.

NACMCF. 1998. Principles of risk assessment for illness caused by food borne biological agents. *Journal of Food Protection*, **61**, 1071–1074.

- Nakamura Y, Sasaki N, Kobayashi M et al.** 2013, The First symbiont-free genome sequence of marine red alga, susabi-nori (*Pyropia yezoensis*). *PLOS ONE*, **8**, e57122
- Nam BH, Park JY, Jin DH, Hong YK.** 2006. Optimization of parameters for GUS transformation of *Porphyra yezoensis* by particle bombardment. *Fisheries and Aquatic Sciences*, **9**, 135-139.
- Okamura K.** 1913. The marine algae of Chosen. *Rep. Imp. Bur. Fish. Sci. Invest.*, **2**, 17-30.
- Park CK, Park CH, Park JN.** 2001a. Extractive nitrogenous constituents of dried laver, *Porphyra yezoensis*. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **34**, 394-402.
- Park CK, Park CH, Park JN.** 2001b. Extractive nitrogenous constituents of dried laver, *Porphyra dentata*. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **34**, 403-411.
- Park EJ.** 2006. Genetic polymorphism within *Porphyra yezoensis* related species (Bangiales, Rhodophyta) from Japan and Korea detected by CAPS analysis. *Ph. D. Thesis, Univ. Hokkaido, Hokkaido, Japan*, pp. 136.
- Park KJ, Lim JH, Kim BK, Kim JC, Jeong JW, Jeong SW.** 2008. Effect of aqueous chlorine dioxide and citric acid on reduction of *Salmonella Typhimurium* on sprouting radish seeds. *Korean Journal of Food Preservation*, **15**, 754-759.
- Sekimoto S, Yokoo K, Yoshio K, Daiske H.** 2008 Taxonomy, molecular phylogeny, and ultrastructural morphology of *Olpidiopsis porphyrae* sp. nov. (*Oomycetes, straminipiles*), a unicellular obligate endoparasite of *Bangia* and *Porphyra* spp. (*Bangiales, Rhodophyta*), *Mycological Research*, **3**, 361 - 374.
- Shin JA.** 1999. Crossing between *Porphyra yezoensis* and *P. tenera*. *Algae*, **14**, 73-77.
- Shin YJ, Min SR, Kang DY et al.** 2018. Characterization of high temperature-tolerant strains of *Pyropia yezoensis*. *Plant Biotechnology Reports*, **12**, 365 - 373.
- Smith GM.** 1955. Cryptogamic Botany vol. 1, Algae and Fungi. *Mc Graw-Hill Book Company, Inc. New York*, 1955, 401-409.
- Song HI, Kim DH, Kim JR, Kim SU.** 1993. A study on the occurrence of the laver disease, with its environmental factors in the laver farming area. *Bulletin of National*

Fisheries Research and Development Agency, **47**, 177–196.

Suto S. 1963. Intergeneric and interspecific crossings of the lavers (*Porphyra*). *Bull. Fish. Jap. Soc. Sci. Fish.* **29**, 739–748.

Tanaka T. 1952. The systematic study of the Japanese *Protofloridae*. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ*, **2**, 1–91.

Tatyana A, Shin YJ, Moon KH, Taizo M, Kim GH. 2016. New species of unicellular obligate parasite, *Olpidiopsis pyropiae* sp. nov., that plagues *Pyropia* sea farms in Korea. *Phycology*, **28**, 73–83.

The guide of sanitary management in school food service, Ministry of Education, Science and Technology. 2010. Seoul, Korea. p.39.

Vijayakumar C, Wolf-Hall CE. 2002. Evaluation of household sanitizers for reducing levels of *Escherichia coli* on iceberg lettuce. *Journal of food protection*, **65**, 1646–1650.

Wang D, Yu X, Xu K et al. 2020. *Pyropia yezoensis* genome reveals diverse mechanisms of carbon acquisition in the intertidal environment. *Nature Communications*, **11**, 1–11.

Woo SM, Jang SY, Kim OK, Youn KS, Jeong YJ. 2004. Antimicrobial Effects of on the Harmful Food-bom Organisms. *Korean Journal of Food Preservation*, **11**, 117–121.

Xiaorong T, Xiugeng F. 1997. Relationship between light, temperature and growth, development of conchocelise of *Porphyra haitanensis*. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, **5**.

Yabu, H, Tokida, J. 1963. Mitosis in *Porphyra*. *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.* **14**, 131–136.

Yangi K, Swem BL, Li Y. 2003. The Effect of pH on inactivation of Pathogenic Bacteria on Fresh-cut Lettuce by Dipping Treatment with Electrolyzed Water. *Journal of Food Science*, **68**, 1013–1017.

Yoshida T, Notoya M, Kikuchi N, Mitaya M. 1997. Catalogue of species of *Porphyra* in the world, with special reference to the type locality and bibliography. *Nat. Hist. Res. Special Issue*, **3**, 5–18.

Yuko N, Yuko M, Mihoko K. 1996. Evaluation of electrolyzed strong acid aqueous solution called the "function water". *Bunseki Kagaku*, **45**, 701.

Zhang S, Farber JM. 1996. The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. *Food Microbiology*, **13**, 311-321.

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

프로젝트명	(국문)수입대체용 환경내성 김 종자 개발과 국내외 산업화				
	(영문)Development of environmentally resistant strain of <i>Pyropia</i> for domestic and international industrial use				
프로젝트 연구기관	공주대학교		프로젝트연구 책임자	(소속)공주대학교	
참여기업				(성명)김광훈	
총연구개발비 (7,060,000천원)	계	3,420,000천원	총 연구 기간	2017.01.01.~2021.12.31.(5년 -월)	
	정부출연 연구개발비	3,420,000천원	총 참여 연구원 수	총 인원	136명
	기업부담금			내부인원	136명
	연구기관 부담금			외부인원	
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> -국내 갯병 원인 균주의 확보 및 배양시스템 구축 -원인 균주별 감염기작 규명 및 김 질병 진단 기술 개발 -내병성 품종의 특성 분석 -고온내성 품종의 특성 분석 -고온내성 종자 유전자 특성 규명 -양식 현장평가 및 피드백을 통한 양식조건 최적화 -환경내성 및 갯병 내병성 우량 김 종자 개발 및 국내외 산업화 -김의 전사체 생성 및 해독 및 김 DNA 마커 개발 <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> -서·남해 지역을 중심으로 각 해역별 감염균주의 확인 및 확보 -감염균주의 해역별 환경특성 분석 및 종별 감염균주의 특이성을 분석 -감염균주의 특성을 고려한 균주 배양시스템의 구축 -감염균주와 감염숙주의 관계파악을 위한 감염시스템 구축 및 배양 -내병성 품종 후보의 확보 후 돌연변이 육종을 통한 품종 개량 -내병성 및 고온내성 김 종자에 대한 기능성 식품 소재 가능성 평가 -우량 환경내성 김 종자 생산기술 개발 및 국내외 산업화 -개발종자의 안정성 측정 및 표준화 -김 품종 구분 DNA 마커 개발 -내병성 품종에 대한 과학적인 라이브러리 구축과 데이터 베이스화 					

- 고온내성 변이주 성장률, 색소 함량, 광합성능 등 성장특성 분석
- 방사무늬김 다당류 분해효소 유전자의 기능 검증 및 활용기술 개발
- 전사체 분석을 통한 스트레스 반응 유전자 (PtCYP, PyMPV17, PysHSPs family 등) 선별 및 선별 유전자의 생리적 기능 연구
- 내병성 품종 '골드1호' 품종 등록
- 고온내성 품종 '골드2호' 품종 등록
- 고온성 잇바디돌김 품종 '골드3호' 특허 등록
- 개발된 12개의 SSR 마커는 특허 등록
- 황백화 내성 품종 개발

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 품종 보호와 동시에 산업화를 추진하여 곧바로 어가에 보급하고 종자를 꾸준히 공급할 종묘업체와 마른김을 생산하는 1차 가공업체 및 조미김을 생산할 2차 가공업체까지 가족회사 계약을 하여 기술의 현장 보급 및 산업화를 바로 달성할 수 있는 가치 사슬 생태계 육성
- 우수한 형질을 가지는 국산 김 종자를 개발함으로써 식물품종보호제도로부터 김 양식 산업을 보호하고 종자의 수입대체 및 수출 효과를 창출 할 수 있음 (연간 100억 원 이상의 경제적 효과)
- 개발된 우량 품종과 기초자료는 우리나라 김 양식 산업 발전을 위한 기반자료로 활용할 수 있으며 고부가가치화를 위한 응용연구에 활용 기대
- 돌연변이에 의한 신품종 개발로부터 얻은 기술적·과학적 진보는 다른 생물계의 연구 및 기술 개발에 활용 가능하며 생명공학 산업 발전을 기대
- 해조류는 식품으로서의 가치 이외에도, 식품첨가물, 화장품, 피코콜로이드(phycocolloids)의 원재료, 지방산과 색소, polysaccharides, 가축사료, 비료, 바이오에너지생산용, 폐수처리, 지구온난화가스 CO₂의 생물학적 제거용으로 개발되고 있으며, 파생 산업을 고려하면 현재의 경제적 중요성에 부가하여 막대한 잠재적 가치를 가지고 있으며 이를 활용한 유용 유전자, 바이오에너지 및 유용 바이오소재 발굴
- 해조류 생명공학을 이용하여 기존의 해조류의 이용성을 넓혀서, 분자유종에 의한 신품종 개발, 의약 또는 산업적으로 중용한 유용단백질 또는 유용물질 생산의 bioreactor로서 해조류 연구 가능
- 선발된 고온내성 후보군 김의 양식실증을 통한 품종화 및 김을 포함한 거대조류에서 유전자 발현 조절, 유전자 기능 검증에 활용
- 고온에서 엽체 생장이 우수한 고수온내성의 김 품종이 개발되어 하절기에도 김을 채취함에 따라 김의 연중생산 가능성 기대
- 기존 18℃ 부근에서 최고 성장률을 보임에 반해 25℃ 이상의 고수온에서 최고의 성장률을 나타내며 이는 지구온난화에 따른 해수온 상승 등 기후변화에 대응 가능
- 종래 동절기에 한정된 김 양식 주기를 벗어나서 연중으로 김 생산이 가능하게 되어 어민의 소득증대뿐만 아니라 김 관련 산업에 큰 기여 효과를 기대
- 내병성 김 종자를 개발하여 질병 발생으로 인한 성장 저하 및 수확량 감소를 억제하고 고품질의 김 생산으로 경제적, 산업적 발전 도모
- 김의 갯병 방제를 위한 활성처리제(유기산 기반)개발을 통해 기존의 활성처리제 보다 낮은

농도에서도 붉은갯병과 낭균병 모두를 효과적으로 방제할 수 있어 김 양식장의 피해를 막고 수확된 김의 품질을 향상시킬 수 있으며 이를 통한 어가 소증에 기여 할 수 있음

- 감염기작 및 균주 분리를 통한 김 질병 분야의 지적 재산권 선점하고 신품종 개발로 인한 수산분야 수출 정책 개발 및 추진에 우위를 차지
- 어민 소득 증대 및 갯병 방제를 위한 처리제의 사용에 따른 해양 환경오염 방지

환경내성 김 프로젝트별 현장실태조사표

2021. 12. 10.

1. 과제개요

과제번호	213008-05-4-SB810	연구기간	2017년 01월~2021년 12월(총 5년)		
프로젝트명	수입대체용 환경내성 김 종자 개발과 국내외 산업화				
세부프로젝트 연구기관	세부프로젝트명	연구기관	프로젝트 책임자	해당 연구개발비(천원)	
	내병성 종자 개발	공주대학교	김광훈	269,000	
	고온내성 김 종자 개발	한국생명공학 연구원	정원중	169,000	
	김 발현유전체 정보 탐색 및 활용기술 개발	전남대학교	최동욱	102,000	
연구개발비총괄 (단위 : 백만원)	정부출연금	참여기업 부담금			합 계
		현금	현물	소계	
1차년도	850,000				850,000
2차년도	800,000				800,000
3차년도	680,000				680,000
4차년도	540,000				540,000
5차년도	550,000				550,000
합계	3,420,000				3,420,000

2. 연구추진실적(현재까지 추진실적)

가. 연구개발내용

연구기관	주요연구내용	연구개발비 (천원)	가중치 (%)
1세부 : 공주대학교	○ 내병성 우량 김 종자에 대한 과학적인 라이브러리 구축과 데이터 베이스화	100,000	40
	○ 개발종자의 안정성 측정 및 표준화	160,000	50
	○ 우량 환경내성 김 종자 생산기술 개발 및 국내외 산업화	9,000	10
2세부 : 한국생명공학연구원	○ 고온내성 종자 특성 규명	42,000	24.9
	○ 고온내성 기작 규명	38,000	22.5
	○ 고온내성 김 안정성 분석	46,000	27.2
	○ 산업화 기반구축	43,000	25.4
3세부 : 전남대학교 산학협력단	○ 김 발현유전체 정보 탐색 및 활용기술 개발 - 김 전사체 기반 고온 및 환경 반응 유전자 선별 및 기능 연구	50,000	49

나. 연구계획대비 진도표

개발내용	구분	연구 개발 기간(월)												진도 (%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
○ 내병성 우량 김 종자에 대한 과학적인 라이브러리 구축과 데이터 베이스화		→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	100
○ 개발종자의 안정성 측정 및 표준화		→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	100
○ 우량 환경내성 김 종자 생산기술 개발 및 국내외 산업화		→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	100
○ 고온내성 종자 특성 규명		→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	100
○ 고온내성 기작 규명		→	→									→	→	100
○ 고온내성 김 안정성 분석		→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	100
○ 산업화 기반구축		→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	100
○ Re-sequencing 및 유전체 구조 분석		→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	100
○ 김 품종 및 종 구분 DNA 마커 개발 및 적용				→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	100
○ 유전체 구조 및 전사체 기반 김 유용 유전자 선별				→	→	→	→	→						100
○ 선별 유전자의 특성 및 기능 연구		→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	100
총 진도율		→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	100
* → 로 진도 표기														

3. 연구개발비 집행실적(연구개발비 기준)

(현재까지, 단위 : 원)

<총괄>

비목	세목			계획금액	사용금액	잔액	집행률(%)	
직접비	인건비	참여 연구원	내부 인건비	미지급				
				지급	현금	162,110,200	117,348,194	44,761,006
			현물					
			외부 인건비	미지급				
				지급	현금			
			현물					
	연구지원인력인건비							
	학생인건비				78,300,000	78,300,000	0	100
	인건비 소계				240,410,200	195,648,194	44,761,006	81
	연구시설·장비비		현금	일반	38,000,000	38,000,000	0	
				통합관리				
			현물					
	연구활동비				23,034,200	390,585,769	29,834,431	92
	연구재료비		현금		121,342,600	121,254,716	87,884	100
			현물					
연구수당				27,000,000	27,000,000	0	100	
위탁연구개발비								
직접비 소계				294,535,000	268,681,489	25,853,511	91	
간접비				104,069,000	102,584,163	1,484,837	98	
연구개발비 총액				553,856,000	507,009,652	46,845,348	92	

< 1세부 >(현재까지, 단위 : 천원)

비목	세목			계획금액	사용금액	잔액	집행률(%)	
직접비	인건비	참여 연구원	내부 인건비	미지급				
				지급	현금	99,212	79,704	19,507
			현물					
		외부 인건비	미지급					
			지급	현금				
		현물						
	연구지원인력인건비							
	학생인건비				25,200	25,200	0	100
	인건비 소계				124,412	104,904	19,507	
	연구시설·장비비		현금	일반	38,000	38,000	0	100
				통합관리				
			현물					
	연구활동비				17,806	17,806	0	100
	연구재료비		현금	21,918	21,883	35	99	
			현물					
연구수당				18,000	18,000	0	100	
위탁연구개발비								
직접비 소계				95,724	95,689	35		
간접비				62,720	62,720	0	100	
연구개발비 총액				282,856	263,313	19,542	93	

< 2세부 >11월 까지

비목	세목			계획금액	사용금액	잔액	집행률(%)	
직접비	인건비	참여 연구원	내부 인건비	미지급				
				지급	현금	62,898,200	37,644,194	25,254,006
			현물					
			외부 인건비	미지급				
		지급		현금				
			현물					
	연구지원인력인건비							
	학생인건비			22,260,000	22,260,000	0	100	
	인건비 소계			85,158,200	59,904,194	25,254,006		
	연구시설·장비비		현금	일반				
				통합관리				
			현물					
	연구활동비			1,214,200	998,769	215,431	82.26	
	연구재료비		현금	61,678,600	61,678,591	9	100	
			현물					
연구수당								
위탁연구개발비								
직접비 소계			148,051,000	122,581,554	25,469,446			
간접비			20,949,000	19,464,163	1,484,837	92.91		
연구개발비 총액			169,000,000	142,045,717	26,954,283	84.05		

<3세부>(현재까지, 단위 : 천원)

비목	세목			계획금액	사용금액	잔액	집행률(%)
직접비	인건비	참여 연구원	내부 인건비	미지급			
				지급	현금		
			현물				
		외부 인건비	미지급				
			지급	현금			
		현물					
	연구지원인력인건비						
	학생인건비			30,840	30,840	0	100
	인건비 소계			30,840	30,840	0	100
	연구시설·장비비		현금	일반			
				통합관리			
			현물				
	연구활동비			4,014	3,717.81	296.19	92.6
	연구재료비		현금	37,746	37,693.125	52.875	99.9
			현물				
연구수당			9,000	9,000	0	100	
위탁연구개발비							
직접비 소계			50,760	50,410.935	349.065	99.3	
간접비			20,400	20,400	0	100	
연구개발비 총액			102,000	101,650.935	349.065	99.7	

4. 참여기업 재무현황(현재기준)

▶ 참여업체명

사업자등록번호		대표자	
설립년도		주요생산품	
실무책임자		연락처	
주소			

자본금		수출액	천만원
연간 매출액	천만원	매출액대비 비율	천만원
연구개발투자비용	천만원	연구가용인력	%
총 종업원수	명		명
재무상황			
프로젝트 책임자의 종합의견			

5. 기타의견

가. 연구관리규정 및 제도개선이 필요한 사항

나. 연구수행 중 애로사항 및 건의사항

- 기술이전 업체 및 협력업체에서 김 수출이 점차 진행되고 있는 상황이지만 그에 따른 수출 실적에 대한 서류는 업체마다 제출할 수 있는 기준이 다름(가격이 표시된 수출서류나 입금내역서 같은 경우 업체에서 제출하기를 꺼려함)
- 수출실적은 수출에 대한 객관적 사실을 증명할 수 있는(예: 수출무역협회 증빙자료) 서류로 대체 요망
- 모든 국제 학회 활동이나 김 연구회 같은 국내 활동은 COVID 19로 인하여 아직 미정임
- COVID 19로 인해 국제 관계(예: 현지 미팅, 수출에 관한 바이어 미팅)에 있어 조율이 필요하므로 단기간의 실적보다는 장기적인 협력을 통한 우호적 관계 유지가 우선이라 판단됨

다. 성과에 대한 홍보 요청사항

6. 프로젝트 책임자의 종합의견

- 수출에 대한 실적이 작년 대비 -30%로 제한적이었지만 2021년 하반기부터 점차적으로 수출량이 증가할 것으로 판단됨
- 국제 정세(COVID 19)가 점차 회복됨에 따라 수출 실적과 연구 성과에 있어 긍정적인 결과를 도출할 수 있도록 노력하겠음

[별첨 2]

자체평가보고서

사업단명	수산중자사업단	과제번호	213008-05-5-CG800		
프로젝트명	수입대체용 환경내성 김 종자 개발과 국내외 산업화				
프로젝트연구기관	공주대학교				
연구담당자	프로젝트 연구책임자	김광훈			
	세부프로젝트 연구책임자	기관(부서)	공주대학교	성명	김광훈
		기관(부서)	한국생명공학연구원	성명	정원중
		기관(부서)	전남대학교	성명	최동욱
		기관(부서)		성명	
연구기간	총 기간	2017년 1월 1일~ 2021년 12월 31일	당해 연도 기간	2021년 1월 1일~ 2021년 12월 31일	
연구비(천원)	총 규모	3,420,000천원	당해 연도 규모	550,000천원	

1. 연구는 당초계획대로 진행되었는가?

- 당초계획 이상으로 진행
 계획대로 진행
 계획대로 진행되지 못함
 계획대로 수행되지 않은 원인은?

2. 당초 예상했던 성과는 얻었는가?

- 예상외 성과 얻음
 어느 정도 얻음
 얻지 못함

구분	품종개발		특허		논문		분 자 마 커	유전자원		국내 매출액	종자 수출액	기술 이전	마케팅 전략 보고서	인력 양성
	출 원	등 록	출 원	등 록	SCI	비SCI		수 집	등 록					
최종목표	3	3	10	9	30	5	2		5	26.6	300	3		19
연구기간 내 달성실적	3	2	11	8	32	3	22		22	39.5	111.1	5		19
달성율(%)	100	67	초 과	89	초 과	60	초 과		초 과	초 과	37	초 과		100

3. 연구개발 성과 세부 내용

3-1 기술적 성과

- 서·남해 지역을 중심으로 각 해역별 감염균주의 확인 및 확보
- 감염균주의 해역별 환경특성 분석 및 종별 감염균주의 특이성을 분석
- 감염균주의 특성을 고려한 균주 배양시스템의 구축
- 균주의 조건별 성장률 측정 및 각 해역에 분포하는 균주의 특성 파악
- 감염균주와 감염숙주의 관계과약을 위한 감염시스템 구축 및 배양
- 갯병 감염을 통한 갯병 내성 업체 탐색 및 선발
- 내병성 품종 후보의 확보 후 돌연변이 육종을 통한 품종 개량
- 내병성 및 고온내성 김 종자에 대한 기능성 식품 소재 가능성 평가
- 우량 환경내성 김 종자 생산기술 개발 및 국내외 산업화
- 개발종자의 안정성 측정 및 표준화
- 개발된 12개의 SSR 마커는 특허 등록

3-2 과학적 성과

- 김 품종 구분 DNA 마커 개발
- 내병성 품종에 대한 과학적인 라이브러리 구축과 데이터 베이스화
- 감마선 조사를 이용한 고온내성 돌연변이체 확보
- 고온내성 변이주 전사체 분석을 통한 대사관련 유전자 정보 확보
- 고온내성 변이주 성장률, 색소 함량, 광합성능 등 생장특성 분석
- 방사무늬김 다당류 분해효소 유전자의 기능 검증 및 활용기술 개발
- Genome SSR 분석 및 SSR의 PCR 증폭을 위한 primer set 개발
- 방사무늬 김 품종 식별 SSR marker 개발
- 김 고온 및 건조 스트레스 처리엽상체로부터 전사체 확보
- 전사체 분석을 통한 스트레스 반응 유전자 (PtCYP, PyMPV17, PysHSPs family 등) 선별 및 선별 유전자의 생리적 기능 연구
- 홍조류 특이 스트레스 반응 유전자 (PyDRG, PyHRG등) 분리

3-3 경제적 성과

- 내병성 품종 ‘골드1호’ 품종 등록
- 고온내성 품종 ‘골드2호’ 품종 등록
- 고온성 잇마디돌김 품종 ‘골드3호’ 특허 등록
- 황백화 내성 품종 개발
- 고온에서 업체 생장이 우수한 고수온내성의 김 품종이 개발되어 하절기에도 김을 채취함에 따라 김의 연중생산 가능성 기대
- 기존 18℃ 부근에서 최고 성장률을 보임에 반해 25℃ 이상의 고수온에서 최고의 성장률을 나타내며 이는 지구온난화에 따른 해수온 상승 등 기후변화에 대응 가능
- 종래 동절기에 한정된 김 양식 주기를 벗어나서 연중으로 김 생산이 가능하게 되어 어민의 소득증대 뿐만 아니라 김 관련 산업에 큰 기여
- 김의 갯병 방제를 위한 활성처리제(유기산 기반)개발을 통해 기존의 활성처리제 보다 낮은 농도에서도 붉은갯병과 낭균병 모두를 효과적으로 방제할 수 있어 김 양식장의 피해를 막고 수확된 김의 품질을 향상시킬 수 있으며 이를 통한 어가 소득증대에 기여
- 감염기작 및 균주 분리를 통한 김 질병 분야의 지적 재산권 선점하고 신품종 개발로 인한 수산분야

수출 정책 개발 및 추진에 우위를 차지

- 어민 소득 증대 및 갯병 방제를 위한 처리제의 사용에 따른 해양 환경오염 방지
- 기술이전을 통해 개발품종의 고품질 김 제품을 생산하여 수출 및 내수판매 실시

3-4 사회적 성과

- 품종 보호와 동시에 산업화를 추진하여 곧바로 어가에 보급하고 종자를 꾸준히 공급할 종묘업체와 마른 김을 생산하는 1차 가공업체 및 조미김을 생산할 2차 가공업체까지 가족회사 계약을 하여 기술의 현장 보급 및 산업화를 바로 달성할 수 있는 가치 사슬 생태계 육성
- 우수한 형질을 가지는 국산 김 종자를 개발함으로써 식물품종보호제도로부터 김 양식 산업을 보호하고 종자의 수입대체 및 수출 효과를 창출(연간 100억 원 이상의 경제적 효과)
- UPOV대비 해조류 품종보호제도 기반연구의 수행을 통하여 다양한 방식의 김 품종 개발 기법을 제안하고 이를 개발하기 위한 연구를 수행

3-5 인프라 성과

- 기술이전 참여기업을 통한 바이어 인프라 구축 및 수출국 확대(미국, 중국, 일본 외 17개국)
- 중국 및 일본의 김 관련기관 MOU를 통한 개발품종의 현지 가공 및 수출 의향 협약식 진행

4. 연구과정 및 성과가 농림어업기술의 발전·진보에 공헌했다고 보는가?

- 공헌했음
- 현재로서 불투명함
- 그렇지 않음

5. 경제적인 측면에서 종자산업의 수출증대와 수입대체에 공헌했다고 보는가?

- 공헌했음
- 현재로서 불투명함
- 그렇지 않음

6. 얻어진 성과와 발표상황

6-1 경제적 효과

- 기술료 등 수익 수 익 : 2018년 기술료 - 3300만원, 3300만원
2019년 기술료 - 3300만원
2020년 기술료 - 1100만원

- 기업 등예의 기술이전 기업명 : 선진레이버영어조합법인, 대천맛김㈜, 선진수산종묘장, 주식회사 더맘마

- 기술지도 등 기업명 :

6-2 산업·지식재산권 등

- 국내출원/등록 출원 11건, 등록 8건
- 해외출원/등록 출원 0건, 등록 0건

6-3 논문게재·발표 등

- 국내 학술지 게재 7건

- 해외 학술지 게재 28건
- 국내 학·협회 발표 89건
- 국내 세미나 발표 6건
- 기 타(국외학회) 27건

6-4 인력양성효과

- 석 사 13명
- 박 사 2명
- 기 타(학사) 4명

6-5 수상 등

- 있다 상 명칭 및 일시: 2017-09-07 우수포스터상 1건
 2017-11-03 우수포스터상 2건, 우수논문상 1건
 2018-08-24 우수포스터발표상 2건
 2018-10-26 우수포스터상 2건, 우수논문상 1건
 2018-11-09 우수발표상 2건
 2019-05-03 우수학생포스터상 1건
 2019-10-25 우수포스터상 1건
 2021-10-22 우수포스터상 1건
 2021-11-05 학생구두발표 최우수상 1건, 학생구두발표 장려상 1건
 2021-12-07 제7회 해양수산과학기술대상 우수상 1건

없다

6-6 마스크 등의 PR

- 있다 4건
- 없다

7. 연구개발 착수 이후 국내 다른 기관에서 유사한 기술이 개발되거나 또는 기술 도입함으로 연구의 필요성을 감소시킨 경우가 있습니까?

- 없다
- 약간 감소되었다
- 크게 감소되었다

○ 감소되었을 경우 구체적인 원인을 기술하여 주십시오.

8. 관련된 기술의 발전속도나 추세를 감안할 때 연구계획을 조정할 필요가 있다고 생각하십니까?

- 없다 약간 조정필요 전반적인 조정필요

9. 연구과정에서의 애로 및 건의사항은?

(※ 아래사항은 기업참여시 기업대표가 기록하십시오)

1. 연구개발 목표의 달성도는?

- 만족 보통 미흡

(근거 : _____)

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구 성과가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

- 충분 보통 불충분

나. 연구 성과가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

- 충분 보통 불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

- 충분 보통 불충분

나. 향후 계속 참여 의사는? (※중간·단계평가에 한함)

- 충분 고려 중 중단

다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는? (※중간·단계평가에 한함)

- 확대 동일 축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

- 즉시 기업화 가능 수년 내 기업화 가능 기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

구 분	소 속 기 관	직 위	성 명
프로젝트 책임자	공주대학교	교수	김광훈 (인)

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 황백화 내성 품종의 안정성 DB구축 ○ 내병성 및 고온내성 김 종자에 대한 기능성 식품 소재 가능성 평가 ▪ 내병성 및 고온내성 김 종자에 대한 일반성분 및 아미노산, 지방산 등의 영양학적 평가 ▪ 내병성 및 고온내성 김 종자에 대한 마이코스포린 유사 아미노산, 베타카로틴, 파이코에리스린, 스테롤의 정량분석 ▪ 기존 방사무늬 김과 내병성 및 고온내성 김 종자에 대한 단백질 효소 가수분해물의 기능성 평가 ○ 김 질병 진단기술 및 내병성 특성 규명 완료 ▪ 김 대표적 3대 질병인 낭균병, 붉은갯병, 녹반병 질병 진단기술 개발 ▪ 갯병 균주 감염 후 김 세포내 방어기작 분석 ▪ PCR을 통한 김 갯병균에 유전자 발현 분석 ▪ 낭균병 신호기작을 이용한 갯병 감염률 분석 ▪ 붉은갯병 유전자 형성에 김 세포의 미치는 원인 분석 ○ 개발종자의 현장적용 시험 및 형질특성 조사 ▪ 출원 품종 골드1호 재배심사 ▪ 출원 품종 골드1호의 품종등록(골드1호)
<p>② 고온내성 김 종자 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고온내성 김 돌연변이주 선발 ▪ 20여 고온내성 돌연변이주의 순계화 진행 후 5라인의 순계화 완료 ▪ 순계화된 변이주의 사상체 및 엽체 생장 특성 분석을 수행하여 양식조건에서 고온내성 이외에도 다양한 특성을 비교 분석결과 HLT1이 대조구보다 모든 조건에서 동일 또는 우수함 ▪ 고온내성 변이주 2개의 전사체 분석을 수행하여 발현이 크게 변한 대사관련 유전자들의 정보를 확보 ○ 고온내성 돌연변이주 특성 분석 ▪ 신규고온내성 변이주 순계라인 분석결과 생장, 색소함량, 광합성 특성을 나타냄 ▪ 기존 고온내성라인 HTR1, HTR2의 변이분석을 수행하여 고온내성 기작 및 마커개발을 위한 변이부분을 확보 ▪ 김의 고온내성 기작규명을 위한 리포터 유전자의 안정성 검증과 유전자교정기술개발을 위한

	<p>백터를 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 방사무늬김 다당류분해효소 유전자의 기능을 검증하여 활용기술을 개발 <p>○ 고온내성종자 후대분석 및 신규 변이주 특성 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 광엽형 고온내성 변이주 및 내병성 고온내성 변이주 선발 ▪ 출원 품종 골드2호 재배심사 ▪ 출원 품종 골드2호의 품종등록
<p>③ 김 발현유전체 정보 탐색 및 활용기술 개발</p>	<p>○ 김 환경내성 품종의 유전적 특성 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 신품종의 유전적 분석을 위한 유전체 분석: 방사무늬김 유전체를 PacBio 기반 분석완료 ▪ DNA 마커 개발을 위한 INDEL 과 SSR 정보를 수집 ▪ 방사무늬김 핵 유전체 서열 초안 완성: 685 scaffold (114.3Mb). ▪ 김 핵 유전체 기반 SSR 분석: 23,120개 (4 repeat 이상 SSR) ▪ 개발된 환경 내성 김 (Gold 1호) 품종 구분 DNA 마커 후보 선발 및 개발 <p>○ 환경내성 김 유전자 선별 및 기능 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 고온 및 건조 내성 관련 유전자 선별 ▪ 환경 내성 김 유전자 PtFUT의 유전자 특허 출원 ▪ 건조 관련 김 유전자 PtDRG1의 유전적 분자적 기능 특허 출원 ▪ 고온내성 김으로부터 고온내성 관련 유전자 Py97124를 분리 ▪ Py97124 유전자의 세포성장 억제 기능 관련 특허 출원 <p>○ 김 환경내성 품종의 유전적 특성 분석 및 DNA 마커 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 김 유전체 해독: 방사무늬김 (<i>P. yezoensis</i>, 수과원 104), 참김(<i>P. tenera</i>) draft genome sequence 분석 및 gene annotation ▪ 골드 2호 전사체 분석을 통한 유전적 특성 조사 ▪ SSR 조사; 방사무늬김 draft genome 서열 기반 SSR 분석 ▪ 방사무늬김 품종간 변이 조사를 위한 SSR 선별

	<p>및 적용</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 16개의 방사무늬김 품종을 대상으로 SSR를 적용하고 분석하고, 김의 유전적 특성 분석 및 품종 식별에 적용할 수 있는 SSR 마커 확보 ▪ 김 유전체 정보 기반 SSR 분석 및 primer를 design ▪ DNA 마커를 위한 SSR 선별 및 선별 SSR의 방사무늬김 품종내 Polymorphism 분석 ▪ 방사무늬 김 품종 식별에 중요하고 PIC 값이 높은 11개의 SSR 마커는 특허 출원
--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구비 집행실적 (2017~2021)

(단위: 천원)

구분	금액 세부프로젝트명	년도	계획금액	사용액	잔액	비고
김	내병성 김 종자 개발	1	400,000	400,000	0	
		2	400,000	400,000	0	
		3	340,000	340,000	0	
		4	269,000	269,000	0	
		5	279,000	278,900	100	
	고온내성 김 종자 개발	1	250,000	250,000	0	
		2	250,000	249,299	701	
		3	212,000	211,994	6	
		4	169,000	168,970	30	
		5	169,000	168,995	5	
	김 발현유전체 정보 탐색 및 활용기술 개발	1	200,000	200,000	0	
		2	150,000	150,000	0	
		3	128,000	128,000	0	
		4	102,000	102,000	0	
		5	102,000	11,831.235	168.765	
총계			3,420,000	3,328,989.235	1,010.765	

4. 연구목표 대비 성과

가. 연구개발 성과목표 대비 실적

구분	품종개발		특허		논문		분 자 마 커	유전자원		국내 매출 액	종자 수출액	기 술 이 전	마케 팅 전략 수립 보고 서	인력 양성
	출원	등록	출원	등록	SCI	비S CI		수 집	등록					
최종목표	3	3	10	9	30	5	2		5	26.6	300	3		19
최종실적	3	2	11	8	31	3	22		22	39.5	111.1	5		19
달성율(%)	100	67	초 과	89	초과	60	초과		초과	초과	37	초 과		100
1차 년도	목 표	1		2		6	1		1					5
	실 적	1		2	1	9	2		17					3
	달 성 률	100		100	초과	초과	초과		초과					60
2차 년도	목 표	1		1		6	1	1	1	2	2	1		4
	실 적	2		3	1	6	-	-	4	4.04	7.2	2		8
	달 성 률	초과		초 과	초과	100	0	0	초과	초과	초과	초 과		초과
3차 년도	목 표	1	1	1	3	6	1	1	1	4	10	1		4
	실 적	-	-	1	3	5	-	-	-	7.9	19.1	1		2
	달 성 률	0	0	100	100	83	0	0	0	초과	초과	100		50
4차 년도	목 표		1	3	2	6			1	6	30	1		3
	실 적		-	3	1	7		11	1	11.6	41.4	1		3
	달 성 률		0	100	50	초과		초과	100	초과	초과	100		100
5차 년도	목 표		1	3	4	6	2		1	14.6	258			3
	실 적		2	2	2	4	1	11	-	16	43.4	1		3
	달 성 률		초	67	50	67	50	초과	0	초과	17	초		100

	클		과									과		
--	---	--	---	--	--	--	--	--	--	--	--	---	--	--

나. 품종개발

세부적으로 전부(건별로)기록하며, 국외인 경우 반드시 국명을 기록합니다]										
구 분	품종 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출 원			등 록			기 타	
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호		
품종출원	골드1호 (Gold No. 1)	대한민국	국립공 주대학 교산학 협력단	2017-02 -24.	출원 2017-1	국립공 주대학 교산학 협력단	2021-0 6-29	AQ-제 22호		
품종출원	골드2호 (Gold No. 2)	한국	한국생 명공학 연구원	2018.1.18	골드2호 '(08-000 1-21)	한국생 명공학 연구원	2021-0 6-29	AQ-제 23호		

다. 특허

지식재산권[발명특허, 실용신안, 의장, 상표, 규격] 등으로 구분하고, 세부적으로 전부(건별로)기록하며, 국외인 경우 반드시 국명을 기록합니다]										
구 분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출 원			등 록			기 타	
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호		
발명특허	방사무늬김 추출물을 포함하는 알코올성 간질환 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	제주대 학교 산학협 력단	2016.12. 16	10-2016-0 172755	제주대 학교 산학협 력단	2017.07 .04	10-1756358		
발명특허	김 유래 건조, 삼투 및 고온 스트레스 저항성 유전자 및 이를 이용한 형질전환체	대한민국	전남대 학교 산학협 력단	2016.10. 21	10-2016-0 137899	전남대 학 교 산학협 력 단	2018.07 .04	제 10-1876775호		
발명특허	김속 유래 건조 및 삼투 스트레스 저항성 유전자 PtFUT 및 이를 이용한 형질전환체	대한민국	전남대 학교 산학협 력단	2017.08. 09	100-2017- 010815	전남대 학 교 산학협 력 단	2019.03 .11	제 10-1958957 호		

품종특허	고온성 잇바디돌김 신품종	대한민국	김광훈 김로원 문중석	2018.03. 26	10-2018-0 034260	공주대학 교산학협 력단	2019.05 .23	10-1983724	
발명특허	다당류 분해효소 또는 셀룰로오스 합성효소의 발현을 조절하여 세포벽이 얇아진 미세조류 제조방법.	대한민국	한국생 명공학 연구원	2018.10. 04	10-2018-0 117989		2021.03 .03	제 10-2225223 호	
발명특허	김 유래 건조 및 삼투 스트레스 저항성 유전자 및 이를 이용한 형질전환체	대한민국	전남대 학교 산학협 력단	2017.08. 09	제 10-2017-0 100991호	전남대학 교 산학협 력 단	2019.02 .15	제 10-1950968 호	
발명특허	생장을 저해하는 새로운 단백질 및 이를 암호화하는 유전자	대한민국	전남대 학교 산학협 력단	2018.09. 06	10-2018-0 106715	전남대학 교 산학협 력 단	2020.03 .10	제 10-2089573 호	
특허	감마선을 조사하여 수득한 고온내성 및 광엽형의 김 변이체 및 이의 생산 방법	대한민국	한국생 명공학 연구원	2019.10. 21	10-2019-0 130503				
발명특허	김의 난균성 껍질 방제를 위한 활성처리제 조성물	대한민국	공주대 학교 산학협 력단	2020.01. 29	10-2020-0 010527				
발명특허	방사무늬김의 품종 판별을 위한 SSR 마커 검출용 프라이머 세트 및 이를 이용한 방사무늬김의 품종 판별 방법	대한민국	전남대 학교 산학협 력단	2020.05. 08	10-2020-0 055427	전남대학 교 산학협 력 단	2021.08 .10	제 10-2290111 호	
발명특허	김 MAAs 유전자 를 이용한 Porphyra-334 대량 생산 Nannochloropsis salina 라인 개발	대한민국	한국생 명공학 연구원	2020.08. 06	10-2020-0 098275				
발명특허	방사무늬김 U6 유 전자 유래의 프로모 터 및 이의 용도	대한민국	한국생 명공학 연구원	2021.11. 30	10-2021-0 167860				

발명특허	세엽형과 광엽형 방사무늬김의 판별을 위한 SSR 마커 및 이의 응용	대한민국	전남대학교 산학협력단	2021.05.12	10-2021-0061532				
------	---------------------------------------	------	-------------	------------	-----------------	--	--	--	--

라. 논문

논문(국내외 전문학술지) 게재							
번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	Morphological, molecular, and chromosomal identification of dwarf haploid parthenosporophytes of <i>Tauya basicrassa</i> (<i>Phaeophyceae, Laminariales</i>) from the Sea of Okhotsk	Algae	Tatyana A. Klochko va	32	KOR EA	KOREAN SOC PHYCOLOGY	SCIE
2	A pathogen of New Zealand <i>Pyropia plicata</i> (Bangiales, Rhodophyta), <i>Pythium porphyrae</i> (Oomycota)	Algae	Nora Diehl	32	KOR EA	KOREAN SOC PHYCOLOGY	SCIE
3	<i>Olpidiopsis porphyrae</i> var. koreanae, an endemic endoparasite infecting cultivated <i>Pyropia yezoensis</i> in Korea	Journal of Applied Phycology	Min Seok Kwak	29	Nethe rlands	Springer Netherlands	SCI
4	Molecular phylogeny of the marine <i>Prasiola</i> and <i>Rosenvingiella</i> species (Chlorophyta: prasiolales) from southeastern kamchatka	Russian Journal of marine biology	Tatyana A. Klochko va	43	Russi a	Pleiades Publishing	SCIE
5	DEVELOPMENT OF MOLLUSK PLACIDA BABAI UNDER LABORATORY-CONTROLLED CONDITIONS (GASTROPODA, OPISTHOBRANCHIA)	Bulletin of Kamchatka State Technical University	Tatyana A. Klochko va	1	Russi a	Kamchatka State Technical University	비SCI
6	Isolation and characterization of two phototropins in the freshwater green alga, <i>Spirogyra varians</i> (Streptophyta, Zygnematales)	Algae	Ji Woong Lee	32	KOR EA	KOREAN SOC PHYCOLOGY	SCIE
7	A new endoparasite <i>Olpidiopsis heterosiphoniae</i> sp. nov. that infects red algae in Korea	Algal Research	Tatyana A. Klochko va		Nethe rlands	ELSEVIER SCIENCE BV	SCI
8	Reduced gene expression at the branch point of chlorophyll	Plant Biotechnol	정원중	11		Springer Nature	SCIE

	and heme biosynthesis in Arctic <i>Chlorella</i> ArM0029B	Rep					
9	Transcriptome-Based Identification of the Desiccation Response Genes in Marine Red Algae <i>Pyropia tenera</i> (Rhodophyta) and Enhancement of Abiotic Stress Tolerance by PtDRG2 in <i>Chlamydomonas</i>	Mar Biotechnol	최동욱	19	USA	Springer US	SCIE
10	PsCYP1 of marine red alga, <i>Pyropia seriata</i> (Bangiales, Rhodophyta) confers salt and heat tolerance in <i>Chlamydomonas</i>	Journal of Applied Phycology	최동욱	29	Netherlands	Springer	SCI
11	Overexpression of the small heat shock protein, PtsHSP19.3 from marine red algae, <i>Pyropia tenera</i> (Bangiales, Rhodophyta)	J Plant Biotechnol	최동욱	44	KOR EA	한국식물생명공학회	비SCI
12	Morphological and molecular identification of <i>Alaria paradisea</i> (Phaeophyceae, Laminariales) from the Kurile Islands	Algae	Anna V. Klimova	33(1)	KOR EA	KOREAN SOC PHYCOLOGY	SCIE
13	Characterization of <i>Porphyra lucasii</i> pigmet mutant induced by gamma irradiation	Phycological Research	Hak-Jung Lee	66(3)	USA	WILEY	SCI
14	Characterization of high temperature-tolerant strains of <i>Pyropia yezoensis</i>	Plant Biotechnol Rep	정원중	accepted		Springer Nature	SCIE
15	Elevated Inorganic Carbon Concentrating Mechanism Confers Tolerance to High Light in an Arctic <i>Chlorella</i> sp. ArM0029B A nuclear	Frontiers in Plant Science	정원중	9: 590		Frontiers Media	SCIE
16	fucosyltransferase-like protein, <i>PtFUT</i> , from marine red algae <i>Pyropia tenera</i> (Rhodophyta) confers osmotic stress tolerance.	Journal of Applied Phycology	Dong-Woog Choi	30:717-727	Netherlands	Springer	SCI
17	<i>PtDRG1</i> , a desiccation response gene from <i>Pyropia tenera</i> (Rhodophyta), exhibits chaperone function and enhances abiotic stress tolerance	Marine Biotechnology	Dong-Woog Choi	20(5)	USA	Springer	SCI
18	The role of egg flagella in the	Phycologia	Tatyana	58(2)	Engla	TAYLOR	SCI

	settlement and development of zygotes in two Saccharina species		A. Klochko va		nd	& FRANCIS LTD	
19	Red And far-red regulation of filament movement correlates with the expression of phytochrome and FHY1 genes in <i>Spirogyra varians</i> (Zygnematales, Streptophyta)	Journal of Phycology	Ji Woong Lee	55(3)	USA	WILEY	SCI
20	Genetic toolkits of the red alga <i>Pyropia tenera</i> against the three most common diseases in <i>Pyropia</i> farms	Journal of Phycology	Soo Hyun Im	55(4)	USA	WILEY	SCI
21	Loss of copy number and expression of transgene during meiosis in <i>Pyropia tenera</i>	Plant Biotech. Rep.	Won-Joong Jeong	Online published https://doi.org/10.1007/s11816-019-00563-y		Springer	SCI
22	PtsHSP19.6, a small heat-shock protein from the marine red alga <i>Pyropia tenera</i> (Rhodophyta), aggregates into granules and enhances heat tolerance	Journal of Applied Phycology	Dong-Woog Choi	31	Nethe rlands	Springer	SCI
23	Early Light-Inducible Protein (ELIP) Can Enhance Resistance to Cold-Induced Photooxidative Stress in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	frontiers in physiology	Ji Woong Lee	11	Switz erland	Frontiers Media S.A	SCI
24	SEX-SPECIFIC GENES AND THEIR EXPRESSION IN THE LIFE HISTORY OF THE RED ALGA BOSTRYCHIA MORITZIANA (CERAMIALES, RHODOMELACEAE)	Journal of Phycology	Shim Eunyoung	.	USA	WILEY	SCI
25	Protective effects of extracts from six local strains of <i>Pyropia yezoensis</i> against oxidative damage <i>in vitro</i> and in zebrafish model	ALGAE	Gwang Hoon Kim	35(2)	KOR EA	KOREAN SOC PHYCOLOGY	SCI
26	Genetic Impairment of Cellulose Biosynthesis Increases Cell Wall Fragility and Improves Lipid Extractability from	Microorga nisms	Won-Joong Jeong	8(8)	Switz erland	MDPI	SCIE

	Oleaginous Alga <i>Nannochloropsis salina</i>						
27	Overexpression of <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> LCIA (CrLCIA) gene increases growth of <i>Nannochloropsis</i> <i>salina</i> CCMP1776	Algal Research	Won- Joong Jeong	46	Nethe rlands	ELSEVIER SCIENCE BV	SCI
28	<i>PyMPV17</i> , the <i>MPV17</i> homolog of <i>Pyropia yezoensis</i> (Rhodophyta), enhances osmotic stress tolerance in <i>Chlamydomonas</i>	Plant Molecular Biology Reporter	Dong-W oog Choi	38	USA	Springer	SCIE
29	Arabidopsis AtMPV17, a homolog of mice MPV17, enhances osmotic stress tolerance	Physiology and Molecular Biology of Plants	Dong-W oog Choi	26	Switz erland	Springer	SCIE
30	A new record of epiphytic red alga <i>Madagascaria</i> <i>erythrocladioides</i> (Erythropeltidales, Rhodophyta) in Korea	Korean Journal of Environme ntal Biology	Xianyin g Wen	39(3)	KOR EA	Korean Society of Environme ntal Biology	SCI
31	Hydrogen peroxide signaling mediates fertilization and post-fertilization development in the red alga <i>Bostrychia</i> <i>moritziana</i>	Journal of Experimen tal Botany	Eunyoun g Shim	https:// doi.or g/10.1 093/jx b/erab 453	Engla nd	Oxford University Press	SCIE
32	Production of porphyrin-334 in transgenic lines of <i>Nannochloropsis</i> <i>salina</i> by the expression of mycosporine-like amino acid biosynthetic genes of <i>P. yezoensis</i>	Journal of Applied Phycology	Jae-sun In	33	Nethe rlands	Springer	SCI
33	Development of genomic simple sequence repeat (SSR) markers of <i>Pyropia yezoensis</i> (Bangiales, Rhodophyta) and evaluation of genetic diversity of Korean cultivars	Journal of Applied Phycology	Myoung Su Kim	33(5)	Nethe rlands	Springer	SCI
34	Downregulation of PyHRG1, encoding a novel secretory protein in the red alga <i>Pyropia</i> <i>yezoensis</i> , enhances heat tolerance	ALGAE	Narae Han	36(3)	KOR EA	KOREAN SOC PHYCOLO GY	SCI

마. 분자마커

분자마커 개발				
번호	특성	보유건수	주요내용	활용년도
1	SSR 마커	11건	방사무늬 김 품종 식별(특허출원)	2020
2	<i>Pyropia yezoensis</i> microsatellite Py18354 sequence	1	방사무늬 김 품종 식별(Genbank 등록, Accession no. MW117145)	2020
3	<i>Pyropia yezoensis</i> SSR markers	11건	방사무늬 김 품종 식별(Genbank 등록, Accession no. MW574007 ~ MW574017)	2021

바. 유전자원

세부적으로 전부(건별로)기록						
번호	특성	수집	등록			기 타
			등록인	등록일	등록번호	
1	<i>Olpidiopsis porphyrae</i> var. <i>koreanae</i> strain KNU-M-omc3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence.		Tatyana A. Klochkova	2017-04-01	KY569073	Genbank
2	<i>Olpidiopsis porphyrae</i> var. <i>koreanae</i> cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial.		Tatyana A. Klochkova	2017-04-01	KY569074	Genbank
3	<i>Olpidiopsis pyropiae</i> cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial.		Tatyana A. Klochkova	2017-04-01	KY569075	Genbank
4	<i>Olpidiopsis porphyrae</i> var. <i>koreanae</i> cytochrome c oxidase subunit II gene, partial cds; mitochondrial.		Tatyana A. Klochkova	2017-04-01	KY569076	Genbank
5	<i>Olpidiopsis pyropiae</i> cytochrome c oxidase subunit II gene, partial cds; mitochondrial.		Tatyana A. Klochkova	2017-04-01	KY569077	Genbank
6	<i>Heterosiphonia japonica</i> isolate KNU-001 cytochrome oxidase subunit 1 gene, partial cds;		Tatyana A. Klochkova	2017-10-25	MF838766	Genbank

	mitochondrial.					
7	Olpidiopsis heterosiphoniae isolate KNU-M-omc4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence.		Tatyana A. Klochkova	2017-10-25	MF838767	Genbank
8	Olpidiopsis heterosiphoniae isolate KNU-M-omc4 cytochrome c oxidase subunit I gene, partial cds; mitochondrial.		Tatyana A. Klochkova	2017-10-25	MF838768	Genbank
9	Olpidiopsis heterosiphoniae isolate KNU-M-omc4 cytochrome oxidase subunit II gene, partial cds; mitochondrial.		Tatyana A. Klochkova	2017-10-25	MF838769	Genbank
10	김 유전자		최동욱	2017-04-24	KX610933	Genbank
11	김 유전자		최동욱	2017-04-24	KX610934	Genbank
12	김 유전자		최동욱	2017-04-24	KX610935	Genbank
13	김 유전자		최동욱	2017-04-24	KX610936	Genbank
14	김 유전자		최동욱	2017-04-24	KX610937	Genbank
15	김 유전자		최동욱	2017-07-17	KY127451	Genbank
16	김 유전자		최동욱	2017-07-17	KY127452	Genbank
17	김 유전자		최동욱	2017-07-17	KY127453	Genbank
18	Pyropia yezoensis DRG1 mRNA, cds		최동욱외	2018-04-17	MG966494	Genbank
19	Pyropia seriata DRG1 mRNA, cds		최동욱외	2018-04-17	MG966495	Genbank
20	Pyropia tenera MPV17 mRNA, cds		최동욱외	2018-04-17	MG966496	Genbank
21	Pyropia yezoensis MPV17 mRNA, cds		최동욱외	2018-04-17	MG966497	Genbank
22	Pyropia yezoensis heat response protein (HRG) mRNA		최동욱외	2020.12.15	MT122996	Genbank

사. 수입대체율

국내 종자 분양 실적				
번호	일자	판매처	사상체 분양(g)	수입대체율
2018-1	2018,01,20	(주)선진수산	850g	4.04
2018-2	2018,03,19	명지수산	100g	
2018-3	2018,03,19	믿음수산	100g	
2018-4	2018,03,19	동해수산	100g	
2018-5	2018,03,20	정가네수산	100g	
2019-1	2019.01.19	(주)선진수산	1,200g	7.9
2019-2	2019.03.20	믿음수산	700g	
2019-3	2019.03.20	동해수산	300g	
2019-4	2019.03.21	정가네수산	300g	
2019-5	2019.03.22.	정가네수산	100g	
2019-6	2019.03.22.	믿음수산	100g	
2019-7	2019.03.22.	(주)선진수산	100g	
2020-1	2020.01.02	(주)선진수산	1,000g	11.6
2020-2	2020.01.16	(주)선진수산	100g	
2020-3	2020.01.16	해림수산	200g	
2020-4	2020.02.05	믿음수산	1,000g	
2020-5	2020.02.08	동해수산	300g	
2020-6	2020.02.27	한국수산	300g	
2020-7	2020.03.02	수암종묘	300g	
2021-1	2021.01.05	(주)선진수산	1,200g	16.3
	2021.11.15			
2021-2	2021.02.15	믿음수산	300g	
2021-3	2021.02.15	동해수산	300g	
2021-4	2021.02.18	백두수산	100g	
2021-5	2021.02.18	달리수산	100g	
2021-6	2021.02.18	제일수산	100g	
2021-7	2021.02.20	일출수산	100g	
2021-8	2022.01	선진수산	2,300g(예정)	

○2021년 사상체 총 4,500g 분양(2022년 분양 예정분 포함)

○사상체 1g당 패각사상체 117상자(2018), 130상자(2019), 176상자(2020), 176상자(2021)

○국내 패각사상체 총 사용량 484만 상자

○사상체(4,500g)는 2021년 총 792,000상자 생산

○ 792,000(골드1, 2, 3호 패각사상체 생산량) / 4,840,000상자(국내 총 사용량)= 16.3%

아. 종자수출액

종자수출액(USD)					
번호	수출품목	수출액			
		수출일	수출국	수출금액(\$)	합계
2018-1	마른김	2017,02,19	대만	195,776	2,370,697
		2017,05,29	대만	162,559	
		2017,07,17	대만	147,888	
		2017,09,28	대만	123,965	
		2017,11,23	대만	167,400	
		2017,12,28	대만	208,476	
		2018,01,25	일본	69,000	
		2018,02,04	일본	80,658	
		2018,02,18	일본	215,705	
		2018,02,21	일본	25,610	
		2018,01	대만, 인도	307,923	
2018-2	조미김	2018,02	대만, 브라질	221,270	974,314
		2018,03	브라질	248,895	
		2018,04	브라질	50,817	
		2018,05	미국	2,349	
		2018,06	미국	41,445	
		2018,07	캐나다	54,339	
		2018,08	캐나다	47,276	
2019-1	마른김	2019.04.26	중국	298,468	609,977
		2019.10.22	중국	217,714	
		2019.12.17	중국	93,795	
2019-2	마른김	2019.01~2019.11	미국, 캐나다, 호주, 폴란드, 태국, 인도, 중국, 일본, 홍콩, 브라질, 영국, 인도네시아	1,136,162	1,136,162
	조미김	2019.01~2019.11	미국, 캐나다, 호주, 폴란드, 태국, 인도, 중국, 일본, 홍콩, 브라질, 영국, 인도네시아	747,008	747,008
2020-1	마른김	2020.01~2020.10	중국	374,972	374,972
2020-2	조미김 및 스낵김 (간접수출)	2019.12~2020.10	중국 및 제 3국	7,448,340 (8,607,302,400원)	7,448,340 (8,607,302,400원)
2021-1	마른김	2021.01~2021.12	중국	1,584,174	1,584,174
2021-2	조미김 및 스낵김 (간접수출)	2020.12~2021.11	중국 및 제 3국	5,540,058	5,540,058
2021 현재 종자수출액 43.4만 달러이지만 추후에 증가할 예정임					

※마른김

○ 마른김 : 1,584,174 \$ * 9.2% = 145,744 \$

○ 조미김 : 5,540,058 \$ * 5.1% = 288,083 \$

→ 145,744 \$ + 288,083 \$ = 433,827\$

※ 수출은 마른김 종자비율(9.2%) 적용하여 14.6만 달러, 조미김 종자비율(5.1%) 적용하여 28.8만 달러로

총 43.4만 달러

자. 기술이전

기술이전					
번호	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)
1	노하우	한국산 김 품종 “골드1호” 양식기술	선진레이버영어 조합법인	2018.01.01	33,000,000
2	특허	골드3호	(주) 대천맛김	2018.07.16	33,000,000
3	통상실시-노하우	‘한국산 김 품종 골드2호 양식 기술’	선진수산종묘장	2019.05.08	33,000,000 (21년 하반기 발생 예정)
4	특허	압착과 동시에 살균하는 김 제조기	(주) 더맘마	2020.03.10	11,000,000
5	노하우	골드1호 품종 사용권	(주) 대천맛김	2021.07.15	33,000,000

차. 마케팅 전략수립 보고서

기타 활용 및 홍보실적(단행본 발간, CD 제작 등)			
번호	일자	활용명칭	활용내역
1	2017.01.02	뉴스홍보	공주대 김광훈 교수님 Golden seed 프로젝트 김품목 주관기관 선정
2	2018.10.12	뉴스홍보	국립공주대학교, 고온성 잇바디돌김 ‘골드3호’ 신품종 개발 주목
3	2019.11.04	뉴스홍보	공주대학교 김광훈교수 연구팀 환경내성 김 품종 설명회 개최
4	2020.12.09	뉴스홍보	공주대학교 김광훈교수 연구팀, 고온성 잇바디돌김 신품종 골드 3호 양식 성공
5	2021.12.28	보도자료	공주대 김광훈 교수, 제7회 해양수산과학기술대상 학술연구부문 우수상 수상

카. 인력양성

연구인력 활용/양성 성과													
번호	분류	기준년 도	인력양성 현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	1차년도	2017		3			2	1		1		2	
2	2차년도	2018	1	5	2		4	4		7		1	
3	3차년도	2019		2			2			1			1
4	4차년도	2020		3			2	1	1		1	1	
5	5차년도	2021	1	2			1	2		1		2	

5. 핵심기술

구분	핵심기술 명
①	국내 갯병 원인균주 확보 및 배양시스템 구축
②	원인 균주별 감염기작 규명
③	내병성 김 품종개발
④	김 양식과정의 DB 구축

6. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		√						√		
②의 기술		√						√		
③의 기술	√						√	√		
④의 기술	√							√		

7. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술 명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	-국내 최초 갯병 원인 균주를 분리하여 특성을 파악하여 지역별, 해역별 갯병의 억제방법을 개발 할 수 있을 것으로 판단되며 이를 통해 김 양식어가 및 국내 김 시장에도 경제적으로 큰 이익이 될 것으로 사료됨 -바이러스성 갯병과 곰팡이성 갯병의 분리배양 성공으로 기타 질병의 원인 균주를 배양하는데 있어 이를 적용 할 수 있으며 해조류 및 어류의 바이러스성 질병을 진단하고 이를 구제 할 수 있는 방법의 개발과 질병의 분석 및 특성 규명이 가능 할 것임
②의 기술	-기존 김 양식기 이외에 갯병 관련 연구에 지장을 받았으나 갯병 원인균주의 분리배양으로 휴식기 없는 갯병 연구가 가능하고 추후 김 이외의 기타 해조류에 적용하여 해조류 질병 억제 및 진단이 가능 할 것으로 판단됨 -숙주의 감염을 통해 본래의 질병이 가지고 있는 형질이나 생식에 대한 원인을 분석하여 갯병의 원천적 차단 및 갯병 매개체를 이용한 억제방법을 개발 할 수 있을 것으로 판단됨
③의 기술	-지구온난화 및 고수온으로 인한 갯병 발병이 잦아지고 이에 따른 결과는 김 생산량 저하로 나타나기 때문에 개발된 갯병 내성 품종 골드1호는 양식 어가의 경제적으로 도움이 될 수 있는 방법이라고 사료됨 -연구에서 확보한 신품종 육종 기술, 우량 계통주 선발 기술 및 특성 분석 기술과, 이러한 과정에서 얻은 정보들은 김을 포함한 다양한 조류에서 내병성 품종 및 종자 개발에 활용될 수 있을 것임
④의 기술	-김 양식과정에 있어 갯병과 이상 기온으로 년 간 김 양식어가의 손실이 늘고 있으나 김 양식 DB의 개발 및 정립으로 갯병 발병 시기 예측과 친환경 유기산 처리의 교육 등을 통하여 생산량 증대 및 어가의 소득 증대에 큰 변화를 줄 것으로 판단됨 -매년 김 양식 신기술 개발을 통해 수산물 수출품목 1위인 김의 생산량 증대 및 고품질 김 생산을 기대 할 수 있으며 이로 인해 수산물 수출국의 위상을 높이고 국가 경제 발전에 도움이 될 것이라 판단됨

8. 연구종류 후 성과창출 계획

구분	품종개발		특허		논문		분자마커	유전자원		국내 매출액	종자 수출액	기술 이전	마케팅 전략 수립보고서	인력 양성
	출원	등록	출원	등록	SCI	비SCI		수집	등록					
최종목표	3	3	10	9	30	5	2		5	26.6	300	3		19
연구기간내 달성실적	3	2	11	8	31	3	22		22	39.5	111.1	5		19
연구종료 후 성과창출 계획	0	2	3	4	5	3	0	0	3	15	200	1	0	6

9. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술 명	특허출원 제10-2018-0034260호(발명의 명칭: 고온성 잇바디돌김 신품종)		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	33,000천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	1개월	실용화예상시기	2018년 07월 16일 이후
기술이전 시 선행조건	<ul style="list-style-type: none"> - “대전맛김(주)”은 계약기술의 실시를 위해 필요한 자료나 정보를 계약 발효일로부터 30일 이내에 “공주대학교 산학협력단”에게 요청할 수 있으며, “공주대학교 산학협력단”은 가능한 범위 내에서 이를 제공한다. 단, 비용이 발생하는 경우, “대전맛김(주)”이 부담한다. - “대전맛김(주)”은 계약기술의 실시를 위해 필요한 기술지도를 1일 4시간 범위 내에서 계약 발효일로부터 30일 이내에 “공주대학교 산학협력단”에게 요청할 수 있다. 단, 위의 기간을 초과하는 기술지도에 소요되는 출장비, 상담료 등의 비용은 협의하여 정하고 “대전맛김(주)”이 부담한다. 		

핵심기술 명	한국산 김 품종 “골드 1호” 양식 기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	33,000천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	1개월	실용화예상시기	2018년 10월 05일 이후
기술이전 시 선행조건	<ul style="list-style-type: none"> - “선진레이버영어조합법인”은 계약기술의 실시를 위해 필요한 자료나 정보를 계약 발효일로부터 30일 이내에 “공주대학교 산학협력단”에게 요청할 수 있으며, “공주대학교 산학협력단”은 가능한 범위 내에서 이를 제공한다. 단, 비용이 발생하는 경우, “선진레이버영어조합법인”이 부담한다. - “선진레이버영어조합법인”은 계약기술의 실시를 위해 필요한 기술지도를 1일 4시간 범위 내에서 계약 발효일로부터 30일 이내에 “공주대학교 산학협력단”에게 요청할 수 있다. 단, 위의 기간을 초과하는 기술지도에 소요되는 출장비, 상담료 등의 비용은 협의하여 정하고 “선진레이버영어조합법인”이 부담한다. 		

핵심기술 명	한국산 김 품종 골드2호 양식기술		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	33,000천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	1개월	실용화예상시기	2019년 05월 08일 이후
기술이전 시 선행조건	<ul style="list-style-type: none"> - “선진수산종묘장” 또는 “선진수산종묘장”의 임원 및 피용자가 기술의 성능이나 효과를 향상하기 위하여 기술을 개선, 확장, 대체 또는 추가발명 등의 방법으로 기술을 개량한 경우(이하 “개량기술”이라 한다), “선진수산종묘장”은 지체 없이 “한국생명공학연구원”에 그 사실을 서면으로 통보하여야 한다. - “선진수산종묘장”이 “개량기술”에 관하여 특허 등 지식재산권을 출원, 등록하고자 하는 경우 반드시 사전에 “한국생명공학연구원”의 서면 동의를 받아야 한다. - “개량기술”에 관한 특허 등 지식재산권에 관해서는 “선진수산종묘장”과 “한국생명공학연구원”이 공동으로 소유하기로 한다. - “개량기술”에 관한 특허 등 지식재산권의 확보, 유지에 필요한 제반 비용은 “선진수산종묘장”이 부담한다. 		

핵심기술 명	압착과 동시에 살균하는 김 제조기		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	11,000천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(특허권양도)		
이전소요기간	1개월	실용화예상시기	2020년 04월 02일 이후
기술이전 시 선행조건	<ul style="list-style-type: none"> - “공주대학교 산학협력단”은 “대상특허”의 실시가 상업적으로 성공할 것을 보증하지 않으며 “대상특허”의 내용 및 권리성 등에 대한 판단 및 결정은 “주식회사 더맘마”의 책임과 판단하에 이루어진다. - “공주대학교 산학협력단”은 “주식회사 더맘마”가 “대상특허”를 실시하는 행위가 제3자의 지식재산권을 침해하지 않는다는 것을 보증하지 않으며, “주식회사 더맘마”가 “대상특허”를 실시함으로써 인해 발생하는 모든 민형사상 책임으로부터 면책된다. - “공주대학교 산학협력단”과 “주식회사 더맘마”는 본 계약의 실행에 있어서 관계법령을 준수할 것을 보증한다. 		

핵심기술 명	골드1호 품종 사용권		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	33,000천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타(특허권양도)		
이전소요기간	1개월	실용화예상시기	2021년 07월 15일 이후
기술이전 시 선행조건	<ul style="list-style-type: none"> - “대천맛김(주)”은 계약기술의 실시를 위해 필요한 자료나 정보를 계약 발효일로부터 30일 이내에 “공주대학교 산학협력단”에게 요청할 수 있으며, “공주대학교 산학협력단”은 가능한 범위 내에서 이를 제공한다. 단, 비용이 발생하는 경우, “대천맛김(주)”이 부담한다. - “대천맛김(주)”은 계약기술의 실시를 위해 필요한 기술지도를 1일 4시간 범위 내에서 계약 발효일로부터 30일 이내에 “공주대학교 산학협력단”에게 요청할 수 있다. 단, 위의 기간을 초과하는 기술지도에 소요되는 출장비, 상담료 등의 비용은 협의하여 정하고 “대천맛김(주)”이 부담한다. 		

4. 연구결과의 활용 계획

1. 1세부과제: 내병성 종자 개발

- 국내 최초 갯병 원인 균주를 분리하여 특성을 파악하여 지역별, 해역별 갯병의 감염 기작이나 억제방법을 개발 할 수 있을 것으로 판단되며 이를 통해 김 양식어가 및 국내 김 시장에도 경제적으로 큰 이익이 될 것으로 사료됨
- 바이러스성 갯병과 곰팡이성 갯병의 분리배양 성공으로 기타 질병의 원인 균주를 배양하는데 있어 이를 적용 할 수 있으며 해조류 및 어류의 바이러스성 질병을 진단하고 이를 구제 할 수 있는 방법의 개발과 질병의 분석 및 특성 규명이 가능할 것임
- 기존 김 양식기 이외에 갯병 관련 연구에 지장을 받았으나 갯병 원인균주의 분리배양으로 휴식기 없는 갯병 연구가 가능하고 추후 김 이외의 기타 해조류에 적용하여 해조류 질병 억제 및 진단이 가능할 것으로 판단됨
- 숙주의 감염을 통해 본래의 질병이 가지고 있는 형질이나 생식에 대한 원인을 분석하여 갯병의 원천적 차단 및 갯병 매개체를 이용한 억제방법을 개발 할 수 있을 것으로 판단됨
- 지구온난화 및 고수온으로 인한 갯병 발병이 잦아지고 이에 따른 결과는 김 생산량 저하로 나타나기 때문에 개발된 갯병 내성 품종 골드1호는 양식 어가의 경제적으로 도움이 될 수 있는 방법이라고 사료됨
- 연구에서 확보한 신품종 육종 기술, 우량 계통주 선발 기술 및 특성 분석기술과, 이러한 과정에서 얻은 정보들은 김을 포함한 다양한 조류에서 내병성 품종 및 종자 개발에 활용될 수 있을 것임

2. 2세부과제: 고온내성 김 종자 개발

- 본 연구에서 확보한 돌연변이 생산 기술, 고온내성 라인 선발 기술 및 고온내성 특성 분석 기술과, 이러한 과정에서 얻은 정보들은 김을 포함한 다양한 조류에서 고온내성 품종 및 종자 개발에 활용될 수 있을 것임
- 고온내성 기작 연구, 즉, 김의 고온에 대한 김의 생리, 생화학, 유전학적 반응, 특히 유전자군의 발현양상 정보 및 유전자 기능검증 기술의 확립은 김을 포함한 거대조류에서 고온에 대한 반응과 고온내성 기작 규명 및 고온내성 종자 개발에 크게 활용될 수 있을 것임

3. 3세부과제: 김 발현유전체 정보 탐색 및 활용기술 개발

- 방사무늬김 핵 유전체 및 발현 유전체 정보는 유용 유전자 확보 및 다양한 김 분자 육종

소재 발굴에 활용

- 핵 유전체 및 발현유전체 정보는 방사무늬김 유전적 특성 분석 및 DNA 마커 개발에 활용
- 개발된 방사무늬김 SSR DNA 마커는 김 식별 및 유전적 특성 연구에 활용
- 확보된 김 유전자는 김 및 홍조류의 스트레스 내성에 대한 이해에 기초를 제공하며 나아가 육상작물의 스트레스 내성 증가에 적용 가능

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부, 해양수산부에서 시행한 Golden Seed 프로젝트사업 수입대체용 환경내성 김 종자 개발과 국내외 산업화 연구개발과제 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부, 해양수산부(농림식품기술기획평가원)에서 시행한 Golden Seed 프로젝트 사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.