

21300605
5CGV00

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호(O)
Golden Seed 프로젝트 사업 2단계 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003920-01

고당도 씨없는 수박 품종개발

2022.03.25

프로젝트연구개발기관 / 농업회사법인 주식회사 파트너종묘
세부프로젝트연구개발기관 / 농업회사법인 주식회사 파트너종묘
세부프로젝트연구개발기관 / 중앙대학교 산학협력단
세부프로젝트연구개발기관 / 충남대학교 산학협력단
세부프로젝트연구개발기관 / 농업회사법인 주식회사 다나

2022

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

농 립 축 산 식 품 부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “고당도 씨없는 수박 품종개발”(개발기간 : 2017.01. ~ 2021.12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022.03.25

프로젝트연구개발기관명 : 농업회사법인 주식회사 파트너종묘(인)
세부프로젝트연구개발기관명 : 농업회사법인 주식회사 파트너종묘(인)
세부프로젝트연구개발기관명 : 중앙대학교 산학협력단 (인)
세부프로젝트연구개발기관명 : 충남대학교 산학협력단 (인)
세부프로젝트연구개발기관명 : 농업회사법인 주식회사 다과(인)
참여기업명 : 농업회사법인 주식회사 파트너종묘(인)
참여기업명 : 농업회사법인 주식회사 다과(인)

프로젝트연구책임자 : 김용재
세부프로젝트연구책임자 : 김용재
세부프로젝트연구책임자 : 이공표
세부프로젝트연구책임자 : 조병관
세부프로젝트연구책임자 : 김용진
참여기업책임자 : 김용재
참여기업책임자 : 김용진

국가연구개발혁신법 시행령 제33조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	213006-05-5-C GV00	해당단계 연구기간	2017.1.1~2021 .12.31(5년)	단계구분	(2단계)/ (2단계)
연구사업명	단위사업	Golden Seed 프로젝트사업			
	사업명	GSP채소종자사업단			
프로젝트명	프로젝트명	고당도 씨없는 수박 품종개발			
	세부프로젝트명	고당도 씨없는 수박 품종개발 및 종자수출			
프로젝트책임자	김용재	해당단계 참여연구원 수	총: 122명 내부: 122명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부:3,008,000 천원 민간:377,000 천원 계:3,385,000 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 122명 내부: 122명 외부: 0명	총 연구개발비	정부:3,008,000 천원 민간:377,000 천원 계:3,385,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	농업회사법인 (주)파트너종묘 중앙대학교 산학협력단 충남대학교 산학협력단 농업회사법인 (주)다나			참여기업명 농업회사법인 (주)파트너종묘 농업회사법인 (주)다나	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유					

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시 설·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종
								생명 정보	생물 자원	정보
등록·기탁 번호	SCI급 11건	출원 10건 등록 11건	-	-	-	-	-	-	-	출원 15건 등록 11건

<p>○ 연구개발 목표</p> <ul style="list-style-type: none"> - 고당도 내병성 씨없는/씨적은/씨작은 신품종 10종 개발, 2021년 종자수출 300만불 달성 - 수박 내병성, 재배 및 섭취편이 형질 분자표지 4점이상 개발 및 MABC 지원체계 확립 - 씨없는 수박 종자품질 향상 기술 및 표현형 영상 검정 기술 개발 - 고당도, 내병성 씨없는/씨적은/씨작은 신품종 개발 및 수출 <p>○ 연구개발 주요성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 고당도 내병성 씨없는/씨적은/씨작은 신품종 품종보호 15건출원 및 11건 등록, 종자수출 174.36만불 달성 - SCI급 논문 11건, 특허출원 10건 및 등록 11건 - 3배체 수박종자 순도 및 발아 검정 기술개발 - 고속 표현형 검정기술 및 시스템 개발 	<p>보고서 면수</p> <p>376</p>
--	--------------------------

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>○ 연구목표</p> <p>[제 1세부]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 고당도, 내병성 씨없는/씨적은/씨작은 신품종 10종 개발, 2021년 종자수출 300만불 달성 <ul style="list-style-type: none"> - 복합내병성 고당도 내병성 씨없는 수박 4품종 개발 - 섭취/가공용이성 높은 씨적은 수박 3품종 개발 - 복합내병성, 높은 균일성, 고당도 씨작은 수박 3품종 개발 <p>[제 2세부]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 수박 내병성, 재배 및 섭취편이 형질 분자표지 4점이상 개발 및 MABC 지원체계 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 목표형질 선발용 분자표지 개발 - 내병성(덩굴마름병, WMV), 생산성 증대(암꽃질성), 섭취용이성(중피색) 분자표지 개발(4종 이상) - MAB 여교잡용 분자표지 개발 - 대량샘플자동분석이 가능한 분자표지이용여교잡(MABC) 체계 구축 <p>[제 3세부]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 씨없는 수박 종자품질 향상 기술 및 표현형 영상 검정 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 씨없는 수박종자 발아 향상 기술 개발 및 서비스 - 씨없는 수박종자 순도 향상 기술 개발 및 서비스 - 고속 표현형 검정시스템 개발 및 서비스 - 특허 4건 이상, 논문 SCI 4건 <p>[제 4세부]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 고당도, 내병성 씨없는/씨적은/씨작은 신품종 개발 및 해외 마케팅 - 고당도, 내병성 씨없는/씨적은/씨작은 신품종 개발 및 수출 - 2021년 종자수출 300만불 달성에 기여 - 씨없는/씨적은/씨작은 수박 수출활성화를 위한 품질관리체계 구축 <p>○ 연구내용</p> <p>[제 1세부]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 고품질 씨적은, 씨없는 수박 계통 개발 ○ 신품종 개발을 위한 교배조합 작성 및 우수 조합 선발 시험 ○ 균일성, 고당도, 섭취/가공용이성 높은 복합내병성 씨작은, 씨적은 계통 및 품종개발 ○ 복합내병성, 고당도 씨없는 수박 품종 개발 ○ Shuttle breeding을 활용한 연 3세대 세대진전 및 시교/상품 생산
------------------------	--

	<ul style="list-style-type: none"> ○ 수출용 종자생산(채종지) 및 품질관리 ○ 해외 전시포, 종자 품평회(박람회) 추진 및 참가 ○ 해외 목표시장 다각화 및 수출 마케팅 활동 <p>[제 2세부]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 내병성(덩굴마름병, WMV) 육종을 위한 병 검정 환경의 확립 및 분자마커의 개발 ○ 재배용이, 생산성 증대를 위한 높은 암꽃질성 품종을 위한 분자마커 개발 ○ 소비자 섭취용이성 증대를 위한 적색 종피색 품종을 위한 분자마커 개발 ○ 씨없는 수박 계통육성을 위한 배수성에 따른 유전자 dosage 판별마커 개발 ○ 복합내병성 품종개발을 위한 분자표지이용 여교잡(MABC) 시스템 확립 및 지원 ○ 목표형질들에 대한 유전자원(계통) 확보 및 이를 이용한 유전분석과 마커개발용 분리집단 (F2, BC, RIL, NIL) 유전분석 ○ 계놈 resequencing, RNA sequencing을 통한 집단 및 유전자원 SNP 및 IN/DEL 탐색 ○ BSA, 유전자지도작성, QTL 분석 등을 통한 SNP, IN/DEL에 기반한 목표형질 선발용(MAS) 분자마커 개발 및 여교잡용(MAB) 분자마커 개발 ○ 대량샘플자동분석(HT-genotyping) 시스템 활용이 가능한 MAS 및 MAB 체계 구축 <p>[제 3세부]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 3배체 수박 종자의 순도 검정 기술 개발 ○ 3배체 수박 종자의 발아 검정 기술 개발 ○ 내한성 수박 품종 개발을 위한 표현형 검정기술 개발 ○ 고속대량 표현형 검정시스템 개발구축 및 서비스 <p>[제 4세부]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 복합내병성, 높은 균일성, 고당도 씨적은, 씨없는, 씨작은 수박 품종 현지 적용성 시험 및 수출가능 품종 선발 ○ 해외 종자 박람회에 참가하여 품종 홍보 및 거래처 발굴 ○ 수출용 수박 품종 선발을 위한 국내 시험포 운영 및 해외 바이어 초청 품종 평가회 ○ 수출용 종자생산(채종지) 및 품질관리 체계 구축 ○ 해외 시장조사 : 유럽, 멕시코 등 고부가가치 해외 시장 정보 수집 ○ 유럽, 남미 등 해외 거래처 추가 발굴
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제품경쟁력 강화 <ul style="list-style-type: none"> - SCI 논문 12건 - 분자마커/성분분석/병리검정 기술개발 14건

	<ul style="list-style-type: none"> - 분자마커 서비스 55건, 병리검정 서비스 120건 - 해외시험포 14개소, 국내적응성 시험 22건 <p>○권리확보</p> <ul style="list-style-type: none"> - 특허출원 10건, 특허등록 11건 - 품종보호출원 15건, 품종보호등록 11건 <p>○생산역량 강화</p> <ul style="list-style-type: none"> - 인력양성 6명, 세대진전시험포 16건 - 생산종자병원체검정 3건, 채종시험생산량검정 1건 <p>○유통경쟁력 강화</p> <ul style="list-style-type: none"> - 생산판매신고 16건 <p>○홍보역량 강화</p> <ul style="list-style-type: none"> - 홍보물 제작 2건, 종자교역회 참여 7건 - 국내외 전시포 7개소, 신품종평가회 3건, 신품종평가수 3건 <p>○매출 및 수출</p> <ul style="list-style-type: none"> - 종자수출액 174만불 - 국내매출액 2,683백만원 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고기능성 및 내병성 수박 품종 개발을 통한 미국, 유럽 등 선진국 시장 진입을 위한 기술 및 유전자원확보 ○ 고기능성 수박 품종 과정을 통한 국내외 기능성 수박 시장의 확대 및 시장점유 ○ 고기능성 및 내병성 품종개발 과정을 통한 우수한 육종인력 양성 ○ 고기능성 품종개발 및 수출 활동을 통한 선진국 시장 육종 및 종자수출 네트워크 강화 ○ 씨없는 수박을 대체하는 씨가 매우 적은 품종개발을 통한 고기능성 수박품종의 패러다임 전환 및 시장 점유 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	씨작은	씨적은	씨없는 수박	고당도	내병성
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	Tiny-seed	Less-seeded	Seedless	Super-sweet	Pathogen-resistant cultivar

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	8
2. 연구수행 내용 및 결과	22
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	359
4. 연구결과의 활용 계획 등	368
붙임. 참고 문헌	369

<별첨 1> 연구개발보고서 초록

<별첨 2> 연구성과 활용계획서

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 목적

1. 전 세계적으로 3배체 씨없는 수박의 수요 및 재배면적이 증가하고 있음
2. 수박의 재배불안정성을 극복하기 위한 다양한 연구들이 진행되고 있음
3. 세계 기후가 급변함으로 보다 친환경적이고 내병성 품종의 요구도가 증가함
4. 재배안정성 및 품질이 우수한 씨없는 수박 품종 개발을 통해 고부가가치 수박 종자 시장 점유율 향상
5. 균일성, 재배안정성에 관련된 유전자에 대한 특허활동을 통해 원천기술 및 유전자원 확보

제 2 절 연구개발의 필요성

[제 1세부]

1. 고부가가치 씨없는 수박 시장의 확대
 - 가. 북미, 호주, 유럽 등에서 씨없는 수박의 재배면적 시장점유율이 계속 확대되고 있음
 - 나. 북미의 경우 씨없는 수박의 종자가격이 1,600\$/kg 이상으로 부가가치가 매우 높음
 - 다. 북미 수박 종자시장의 크기가 3,500만불 이상으로 형성
 - 라. 미국 내의 수박생산 및 소비는 전체적으로 안정됨
 - 마. 한국, 일본 등에서도 씨없는 수박의 재배 및 소비가 확산되고 있음

표 1. 미국 내 수박 생산, 소비, 가격 (1970~2014)

2. 고품질 Icebox 타입의 씨없는 수박이 점차 확산
 - 가. 종자가격이 4,600\$/kg로 보통의 씨없는 수박에 비해 약 3배 정도 높게 형성
 - 나. 미국, 일본 등 선진국 시장에서 중국, 동남아로 재배가 확대
 - 다. 국내 연구진들이 고품질 수박 계통 및 품종 개발 경험과 관련 유전자원을 다수 보유

라. 고품질이 중요한 중소과종에서는 한국의 고품질과 동남아용의 소과종 특성이 결합된 품종개발로 수출가능성이 매우 높음

3. 고기능성 중소과종을 통한 고부가가치 씨없는 수박종자 수출이 가능

가. 기존의 고품질 소과종 특성에 내병성, 고기능성 특성을 강화하면 시장경쟁력이 충분

- (1) 고품량 라이코핀 수박, 육질이 단단한 fresh-cut
- (2) 흰가루병, 탄저병, 덩굴마름병, 덩굴쪄김병 등 내병계 특성
- (3) 바이러스 저항성응성불임 등을 활용한 저비용, 고품질 3배체 종자생산을 통한 가격경쟁력 강화 필요

4. 품종개발을 위한 기술 확보

가. 현재 중소과종 일반수박 또는 씨없는 수박에 대한 우점품종개발 경험 및 유전자원 확보

나. 씨없는 수박 등에 높은 개발기술 확보

다. 고경도, 고품량 라이코핀 품종개발 경험, 관련 육종소재 다양하게 확보

라. 응성불임을 활용한 고품질 3배체 수박 생산을 위한 기술 개발 완료

마. 응성불임을 활용한 고품질 3배체 수박 생산을 위한 관련마커 개발 가능

바. 상호전좌를 이용한 씨적은 수박 품종 개발, shuttle breeding을 통해 다양한 시장 접근 가능성

5. Fresh-cut (신선편이) 수박에 대한 수요가 선진국을 넘어 중진국에서도 확산

가. 미국 등에서는 ultra-firm flesh 수박에 대한 수요 및 그에 따른 관련 품종의 재배 확대

나. 중국, 동남아 등 신흥국의 백화점 등에서 fresh-cut 소비의 출현 및 확대

다. 경도가 높고 육색이 진한 고품질 수박의 요구도 증대

6. 주스 가공용 원료공급을 위한 품종 요구도 증대

가. 한국 및 선진국 시장에서 수박주스 등에 대한 소비자 선호 확대

나. 가공기술 발달로 인한 수박주스의 확대 가능성이 매우 높음

다. 현재 국내 수박주스 원재료(puree)수입이 동남아를 통해 이루어짐

라. 씨없는 수박/씨적은 수박 등 가공적합 품종에 대한 요구도 높음

7. 파트너종묘의 기술 보유 현황

가. 유전자원 보유

- (1) 고부가가치 4배체 대과종 80계통
- (2) 고부가가치 4배체 소과종 50계통
- (3) 적육계 호피 및 크림슨계 소과종 40계통
- (4) 흰가루, 탄저병, 덩굴마름병, 덩굴쪄김병 내병계 유전자원 600점

나. 연구 시설 현황

- (1) 경기도 안성시 미양면 육종연구소(재배하우스, 육묘상, 인공생육실 등 전체 6000m² 연구시설 보유)
- (2) 태국 콘깬주 소재 shuttle breeding center 운영(연 3회 세대진전 및 선발시험 수행)

다. 개발 품종 현황

- (1) 고탐량 고당도 라이코핀 수박 “리코후레쉬1호” 품종보호등록(제5284호)
- (2) 고탐량 라이코핀 수박 “리코스위트1호” 품종보호등록(제4887호)
- (3) 고탐량 라이코핀 수박 “리코스위트2호” 품종보호등록(제5391호)
- (4) 고탐량 라이코핀 수박 “리코후레쉬1호” 품종보호등록(제5284호)
- (5) 동남아 수출용 icebox 수박 “씨2146” 개발(보호출원 출원2013-549)
- (6) 씨가 50%이상 적어진 고기능성 수박 “씨저근” 개발(보호출원 출원2013-548)
- (7) 수출용 고당도 소과종 씨없는 수박 “블랙보이” 개발(보호출원 출원2014-438)
- (8) 수출용 오렌지육 수박 “오렌지슈가” 개발(보호출원 출원2014-439)
- (9) 씨가 50%이상 적어진 고기능성 수박 “씨저근한여름” 개발(보호출원 출원 2015-389)
- (10) 수출용 씨앗채 먹는 수박 “씨자근” 개발(보호출원 출원2015-388)
- (11) 고당도 수출용 대과종 씨없는 흑피수박 “블랙스위트” 개발(보호출원 출원 2015-625)
- (12) 씨가 75% 이상 적어진 고기능성 수박 “LS레벨업” 개발(보호출원 출원 2016-457)
- (13) 씨가 75% 이상 적어진 고기능성 수박 “LS카카오” 개발(보호출원 출원 2016-512)
- (14) 고당도 흑피수박 “매력” 개발(보호출원 출원 2016-511)

라. 당사 기술 보유

- (1) 2014년 10월 “종자수가 감소한 신품종 수박 및 이의 육종 방법” 특허등록(제 10-1635497)
- (2) 수박 종자크기 판별용 분자 마커 및 이의 용도“ 에 관한 기술 2건 보유
- (3) 수박 흰가루저항성 개체 판별용 분자 마커 및 이의 용도“ 에 관한 기술 1건 보유

마. 수출 현황

- (1) 2014년 7개국 수출 103,259US\$ 달성
- (2) 2015년 12월 현재 7개국 수출 296,658US\$ 달성
- (3) 2016년 11월 현재 6개국 수출 204,763US\$ 달성
- (4) 고탐량 고당도 라이코핀 수박 “리코후레쉬1호” 베트남 수출 중
- (5) 고탐량 라이코핀 수박 “리코후레쉬2호” 중국 수출 중
- (6) 동남아 수출용 icebox 수박 “씨2146” 베트남, 인도 수출 중
- (7) 씨가 50%이상 적어진 고기능성 수박 “씨저근”중국 수출 중
- (8) 수출용 고당도 소과종 씨없는 수박 “블랙보이” 일본, 베트남 수출 중
- (9) 수출용 오렌지육 수박 “오렌지슈가” 개발 말레이시아, 인도네시아 수출 중
- (10) 수출용 씨앗채 먹는 수박 “씨자근” 개발 스페인, 일본 수출 중
- (11) 고당도 수출용 대과종 씨없는 흑피수박 “블랙스위트” 개발 스페인, 일본 수출 중

바. 국책 과제 참여

- (1) 2011~2014 “수박 고탐량 라이코핀 분자 표지 개발 및 이를 이용한 수박 개발 품종 시스템 구축” 세부과제 책임자로 참여하여 고탐량 라이코핀 수박 품종 3점 개발, 개발된 품종은 현재 국내 및 해외 수출중
- (2) 2011~2015 “수박의 종자크기와 흰가루병저항성 관련 계통육성 및 유전자지도 작성용 집단양성” 세부과제 책임자로 참여하여 흰가루병 저항성 계통 육성 및 마커확보

- (3) 2013~현재 “(아)열대/온대지역 노지재배용 수박품종 육성” 프로젝트책임자로 참여 연구수행 중
- (4) 2016~현재 “미주지역 수출용 고당도 씨 없는 수박품종 육성” 프로젝트책임자로 참여 연구수행 중

[제 2세부]

1. 현대 육종기법에 있어서의 분자마커의 역할
 - 가. 전통육종에서 이루어지는 표현형 기반의 선발에 비해 목표형질과 연관된 분자표지를 활용할 경우, 보다 정확하고 신속하게 목표 형질을 지닌 개체를 선발함(MAS)으로서 육종연한 및 노동력, 비용을 급격히 절감할 수 있음
 - 나. 여교잡육종에 있어 분자마커이용여교잡(MAB)을 통해 신속하게 회복친의 유전자들을 선발함으로서 MAS와 함께 활용할 경우 목표형질의 우수 고정계통 개발 효율을 극대화 할 수 있음
 - 다. 따라서 분자마커와 같은 현대적 분자육종기술 적용으로 신속한 수출용 품종개발과 시장경쟁력 제고를 위한 기반구축이 가능함

2. 수박 품종 육성에 있어 분자마커 개발의 필요성
 - 가. 수박의 생육, 재배, 육종과정 특성상 분자마커 이용효율이 매우 큼
 - 나. 현재까지는 국내외 간 분자표지 개발 사례 및 이용수준 차이가 크지 않아 제로베이스 경쟁이 가능하나, 최근 중국이 유전체 정보를 기반으로 한 첨단 육종기술 적용으로 조만간 우수 품종 개발에 박차를 가할 것으로 예상

3. 중국(BGI) 유전체 정보의 공개정도에 따라 국내에서도 deep sequencing을 통한 transcriptome, whole genome sequencing 등 자구적 노력과 더불어 공개된 염기서열정보를 바탕으로 한 resequencing 등 순발력 있는 대응이 요구됨

4. 향후 유전체 정보를 이용한 국가 간 분자마커개발 경쟁이 치열할 것으로 전망

5. 해외시장에서 글로벌 기업들의 신제품 주기는 2-4년으로, 매우 빠른 속도로 재배자, 소비자, 유통전략 등에 대응하고 있어, 수출경험이 일천한 국내기업의 경우엔 더욱더 분자마커 적용을 통한 빠른 육성과정이 필요한 현실임

6. 수박의 내병성 분자마커 필요성
 - 가. 수박에서 내병성 분자마커의 활용성은 매우 높는데, 병원균의 접종, 감염성 여부의 판단, 내병성 자원의 도입 결정, 내병성 계통을 이용한 gene pyramiding (내병성 형질을 한 개체로 집적) 등 많은 분야에서 직접적인 육성계통에 요구되는 시간단축과 노동력 절감을 도모할 수 있음.
 - 나. 특히, 내병성의 경우 병원균 접종 후에 저항성 / 감수성을 판별하는 것에 많은 노력을 들일 수 밖에 없고, 병 접종 및 진단의 확립에 많은 시간을 투자할 수밖에 없어, 내병성 분자마커의 개발은 매우 효용가치가 높다고 할 수 있음.

- 다. 종자시장에서 내병성 형질의 도입여부는 곧바로 종자단가의 상승과 연결되어 있어, 내병성 형질에 연관된 분자마커의 활용은 판매액과 부가가치에 직접적인 관련성이 있다고 할 수 있음.
 - 라. 현재 모든 육성가, 육성회사에서 시급한 내병성 분자마커 확보를 요청하고 있어 수출용 품종의 내병성 (덩굴썩음병, 흰가루병, 탄저병, 덩굴마름병 등) 집단의 개발과 마커의 개발 / 확보에 전력을 기울여야함.
7. 수출용 품종의 주요 육성형질과 순도검정에 대한 육종가의 분자마커 수요 증가
- 가. 수출대상 지역의 현지육종은 현실적으로 제약이 있는 상황으로, 특성을 예측할 수 있는 분자마커의 활용은 수출용 수박품종의 신속한 육성을 위해 필수불가결한 요소로 여겨짐
 - 나. 단기간에는 해외 노지재배 시장에서 요청되는 내병성, 교배효율성, 과특성에 대한 단순형질 마커가 요청되며, 장기적으로는 MAB가 가능한 background selection 과 QTL 등이 가능한 SNP 기반의 분자마커가 요청되고 있음.
 - 다. 순도검정 요청 증가: 수박은 재배종간 유전체 염기서열의 차이가 매우 적어, 기존의 마커 (SSR, CAPS 등) 활용으로는 순도검정용 혹은 품종구분용 분자마커의 개발이 매우 어려웠으나, SNP의 활용이 가능해짐에 따라 육성가 및 육성회사의 순도검정 마커 요구도가 증가하고 있음.

[제 3세부]

1. 연구개발의 중요성 및 필요성

- 가. 국내 종자시장은 약 9,700억원으로 추정되며, 그 중에서 채소류가 약 2,536억원으로 26.1%로 가장 높은 비중을 차지하고 있음. 채소종자 중에서는 수박은 약 127억원(5%)의 매출을 기록하고 있음(한국종자협회, 2015). 수박의 육종기술은 현재 세계적 주준이므로 앞으로 표현형 검정기술 등 첨단육종기술이 접목되어 수출국 현지에 적합한 고품질 종자 개발이 효율적으로 진행된다면 수출 전략 품목으로 전망이 밝음
- 나. 세계적으로 고품질, 고기능성 농산물에 대한 수요가 증가하고 있고, 지구 온난화 등으로 인한 이상기후 현상 및 병충해 발생 등이 증가하고 있어 전통적으로 중시되어 왔던 생산성 높은 단일 품종의 종자 개발 및 생산만으로는 더 이상 경쟁력을 보장받지 못하게 되었음. 전 세계 종자시장을 장악하고 있는 글로벌 종자회사는 이러한 세계적인 흐름을 파악하고 초고속 육종을 위한 첨단 유전자 발현 및 표현형 검정시스템 등 신품종 개발을 위한 대규모 인프라 구축에 적극적인 투자를 하고 있음. 다국적 기업들은 거대한 자금력과 유통망을 내세워 중소 종자기업들을 인수합병하며 더욱 특화되고 대형화되고 있으므로 경쟁력 있는 국내 종자기업의 육성을 위해서는 국내 기업에서 초기 투자하기 어려운 육종관련 인프라 구축 및 연구개발 지원이 매우 중요함

다. 세계 종자시장에서 수요의 증가는 고품질종자의 개발과 종자처리 기술의 발달에 따른 부가가치 향상에 의한 것으로 볼 수 있음. 채소종자 수출증대를 위해서는 선진국 대상 고품질 종자의 수출이 절대적으로 이루어져야 하며 이를 위해서는 대상 국가에 맞는 신품종육종뿐만 아니라 선진국 기준에 맞는 고품질 처리 종자상품 개발이 반드시 필요함

라. 신품종 개발의 “최종목표 달성여부”의 평가는 표현형 검정임. Plant phenomics는 유전적 돌연변이나 환경적 요소에 영향을 받는 식물의 생리생화학적인 특성인 phenome을 검정하는 것으로 유전체연구에 이은 기능유전체 및 대사체 연구의 방법으로 사용되기도 하는 새로운 연구방법론으로 주요 농업형질에 대한 유전적 기초를 규명하고 다양한 유전적 변이를 갖는 유전자원들의 선발에 필수적으로 사용됨

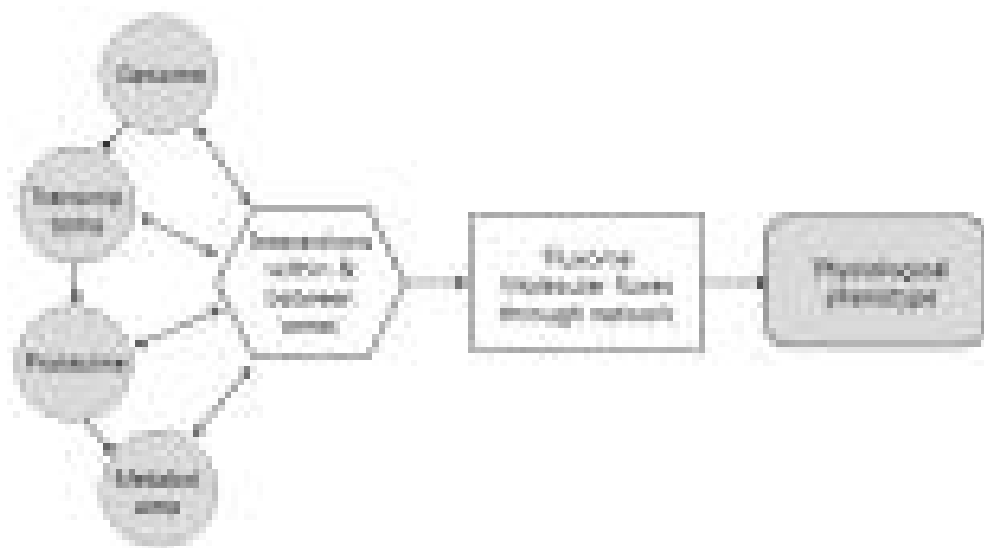


그림 9 작물의 생리적 표현형질과 유전적 형질과의 관계 모식도

마. 세계 여러 지역으로의 국내 개발 종자를 수출하기 위해서는 수출대상국의 다양한 환경자극(내한성 등)에 적응이 가능한 종자의 개발 및 검정이 필수적임. 환경스트레스에 대한 내성 품종의 개발을 위해서는 교배, 돌연변이, 형질전환 등으로 개발된 계통들을 환경스트레스 환경에서 평가 선발해야하나 이러한 환경스트레스 조건을 자연환경에서 인위적으로 부여하여 평가 선발하기에는 비용과 시간이 많이 소요되며, 유전자수준에서 관련 유전자 등의 발현정도로만 선발하기는 어려운 실정임

바. 수량성 등 기본적인 농업형질은 우수하면서 환경스트레스 내성을 갖는 품종 개발을 효과적으로 추진하기 위해서는 자연환경과 유사한 조건에서 작물의 whole plant수준의 반응(phenome)을 효율적이고 효과적으로 대량평가할 수 있는 기술개발이 필요하며, 이러한 기술은 작물 품종 분자육종의 효율을 혁신적으로 향상시킬 수 있음

사. 따라서 변화하는 기후환경과 다양한 스트레스 환경에 적응하는 품종의 개발을 위한 우량 유전자원 및 계통의 선발을 위해서 작물의 생리생화학적 반응, 스트레스환경 적응성 및 내성 진단, 농업적 주요 형질을 손쉽게 평가할 수 있는 고속대량 표현형 다차원 분석 기술인 HTS

(High Throughput Screening) 시스템을 구축하여 개량 목표형질의 선발을 최적화하는 것이 필요함

- 아. 3배체 수박은 씨 없는 수박으로 알려져 있으며, 고수익 종자로서 세계적으로 수요가 증가하는 추세임. 3배체 종자의 품질 평가는 2배체 또는 4배체 종자(씨 있는 수박)의 포함 여부를 평가하는 순도검정이 가장 중요한 부분임. 씨없는 수박상품에서 3배체 이외의 종자가 포함 될 경우, 상품성이 낮아지므로 3배체 순도 검정 기술개발의 수요가 매우 높은 실정임
- 자. 순도 검정 이외에 3배체 종자의 발아력 평가는 종자의 상품성 및 신뢰성을 상승시켜 수익을 높일 수 있는 중요한 요소임. 현재 약 80%의 3배체 수박종자 발아품질을 선별기술을 이용하여 90% 이상으로 향상시킬 시 대부분 수출하는 씨없는 수박종자의 해외 수출 증가 및 수익 창출이 획기적으로 향상되리라 사료됨

[제 4세부]

1. 해외 시험포 운영을 통한 경쟁력 향상 및 시장분석을 통한 해외 마케팅 전략 수립에 대한 필요성

가. 스페인 수박시장

- (1) 스페인 수박 시장은 대략 2만 ha이상으로 추정되고 있으며, 꾸준히 증가추세인 것으로 파악되어 지고 있다. 주재배지는 스페인 남부 안달루시아로 약 1만 ha에 달하며, 안달루시아 지방의 알페리아 지역이 이 지방 재배면적의 반 이상을 차지하고 있다. 스페인 수박 재배지역은 약 60%가 일반 노지 관수재배 방식이며 약 40%가 하우스 관수재배 방식을 따르고 있다.
- (2) 스페인의 수박 생산량은 계속해서 완만하게 증가하고 있는 추세로, 현재는 약 100mt이상이 생산되고 있는 것으로 추정되어진다. 이중 안달루시아 지역의 생산량이 절반이상을 차지하고 있으며, 그 뒤를 이어 스페인 북부 카스티아-라만차, 남동부 무르시아가 재배면적이 가장 넓으며 이는 전체 면적의 약 40%에 해당된다.
- (3) 스페인 자국내 수박소비에 대한 수요가 점차 증가하고 있으며, 씨없는 수박의 수요량은 전체의 10%내외이다. 하지만 스페인내 수박소비에 대한 수요 증가와 맞물려, 씨없는 수박에 대한 수요가 점차 커지고 있어, 스페인내 씨없는 수박의 재배면적은 꾸준히 증가 될 것으로 예측된다.
- (4) 스페인의 수박생산량은 약100mt이며, 이중 60%이상이 해외로 수출되고 있는 실정이다. 또한 국내 수박 소비비중이 높아 연간 스페인내 국내용 수박 비중은 90%이상을 상회하고, 약 10%만이 수입으로, 자급자족이 잘 이루어지고 있음을 알 수 있다.
- (5) 스페인내 등록된 수박의 종자 수는 2014년 기준 87종류이며, 이중 38개가 2000년이후 등록된 품종들이며, 현지 수박시장에서 주로 소비되는 종류는 슈가베이비, 크림슨스위트, 레시스턴드, 클론 다이크, 레이나 데 코라소네스 등이 있다. 이중 레이나 데 코라소네스는 3배체 씨없는 수박으로 그 점유율을 조금씩 늘려가고 있는 추세이다.

나. 중국 수박시장

- (1) 중국은 세계1위의 수박 생산 국가이다. 2018년 기준 79.2 백만톤을 생산하였으며 이는 2위인 터키(3.9백만톤), 이란(2.8백만톤)의 20배가 넘는 수치이다. 최적 재배지역은 간쑤성으로 중국 내 수박재배지역중 최적의 기후 조건을 제공한다.
- (2) 중국 수박재배는 국토면적이 넓어 모든 기후대가 가능하여 동절기에 하우스에서 생산하는 지역도 많은 편이고 하우스에 재배되는 품종은 종자가격도 매우 비싼 편이다. 중국 수박의 주산지는 하남, 산둥, 안휘, 호남, 강소지역이며 품종은 과실형태, 과피색, 과육색, 종자의 유무 등에 따라 분류하고 있으며, 하남성, 산둥성, 안휘성 이들 3개 지역의 재배면적이 중국 전체 재배면적의 약 40%를 차지하며, 전국 생산량의 약 45%가 이들 3개 지역에서 생산되고 있다.
- (3) 중국의 주요 품종은 호피 원형 및 타원형 품종, 무지 원형 및 타원형 품종, 씨 없는 품종, 소과 품종으로 대별되며, 재배품종은 일반종이 많은 비중을 차지하고 있었으나 F1 종자시장으로

급격히 변화 중에 있고 고품질 기능성 수박에 대한 인식과 요구도도 확대되고 있다.

- (4) 중국의 주요 씨없는 수박 품종은 흑5호, 설무자304, 서보, 진2호, 정항무자2호(매무자2 호), 설화피무자(상서과5호), 설홍무자(상서과14호), 설 도무자(상서과12호), 심신1호, 악무자1호, 악무자2호, 동정 2호, 진1호, 정항무자1호(화피무자2 호), 정항무자3호(용 무자3호), 설소옥홍무자, 설황무자(상서과18호), 동정3호 (상서과19호), 동정4호, 동정6호, 동정8호, 1호, 황명무 자서과이다.
- (5) 중국의 주요시장 요구형질은 대과형으로 중북부는 저온기 시설재배용, 동남아시아 및 중국 중남부는 중소과형(icebox type)으로 내병성, 고당도를 요구하고 있으며, 산동지역 및 북경근교에서 시설수박의 재배가 확산되고 있다.

다. 이탈리아 수박시장

- (1) 이탈리아 수박 생산량은 최근 몇 년간 증가하고 있는 추세이며, 이는 시장 수요가 증가하고 또한 특정적으로 씨없는 수박 시장이 증가하고 있기 때문이다. 북부 유럽 시장의 수요 또한 증가하고 있는 상황이며, 씨드리스 수박의 요구조건으로는 5-7kg에 향이 좋고 단단한 육질이 붉은 기존 크림슨 타입 수박이 선호되어지고 있다. 소형 수박의 경우 1.8-3kg에 씨가 적고 껍질이 얇은 조건이 시장내에서 가장 이상적인 타입으로 평가되어지고 있다.
- (2) 이탈리아 수박은 대략적으로 6월 10일 이후부터 9월 첫 번째주 까지 수확이 일반적으로 진행되고 있으며, 기후조건과 수박의 숙기에 따라 조금의 차이를 보인다.
- (3) 이탈리아 수박의 과형은 일반적으로 타원형을 나타내며, 접목묘를 주로 사용하게 되는데 병과 환경스트레스에 대하여 민감하게 대처하는 것으로 보인다. 노지에서 재배하는 곳이 대부분이며, 재배면적은 약 8,000ha이며, 연간 600만톤을 생산하는 것으로 추정된다.

라. 결론

- (1) 이처럼 주요 수박 생산국 및 수출국을 대상으로 수출용 국내 수박을 개발하여 해외 수출용 마케팅 전략을 수립하기 위해서는, 국내 시험포에 국한되지 않고 해외 시험포 재배를 하는 것이 필요하다. 또한 각국마다의 기후조건 및 선호하는 품종이 다르기에 각 국가에서 요구하는 조건을 충족 시키기 위해 우선적으로 품종을 선발하여야 한다.
- (2) 해외 시험포 운영에 따라 현지 거래처 및 농가와의 연계로, 앞으로의 품종개발 전략을 수립할 수 있을 것이며, 현지 적응성 시험에 소요되는 시간을 단축시킬 수 있는 이점이 있어, 육종연한 단축 및 공격적인 마케팅 전략을 수립하기에 최적의 환경을 제공해 줄 것이다.
- (3) 이번 과제를 통하여 중국, 스페인, 이탈리아 현지에서 우수품종을 선발하여 현지 평가회 및 품평회를 통한 수출용 국내 씨없는 수박에 대한 경쟁력을 확인할 수 있을 것이며, 객관적 평가를 통한 피드백은 향후 발전방향에 대하여 알맞은 전략들을 수립할 수 있게 할 것이다.
- (4) 수립된 전략을 통하여 활발한 마케팅 활동을 한다면, 추후 이탈리아, 스페인, 중국뿐만이 아닌

세계 전역에 대한 마케팅 전략을 수립할 수 있는 토대가 되어, 수박 수출이 증가함에 있어 기업브랜드 이미지 향상을 통한 다른 국가의 수박시장 진입의 기초로 활용될 것이다.

2. 한국 수박 수출 시장의 패러다임 전환의 필요성



그림 1 국내 수박 생산/수출/수입 동향(2017)

- 가. 국내 수박 수출은 2017년 기준으로 전년 2016년과 대비하여 감소하였으며, 주요 수출국가로는 일본이 있다. 2018년 기준 일본 외에 러시아, 홍콩, 일부 동남아시아로의 수출 활로가 열렸다는 내용들이 있으나, 초기단계이며 유럽 및 주요 수박재배지에 대한 수출실적은 미미한 편이다.
- 나. 국내 수출용 수박이 일본에 집중되어 있고 육종 방향에 대해서도 세계 트렌드에 맞는 수박 기준은 일반 아시아권에서 재배되고 있는 수박과는 품종간 크게 차이를 보이고 있어, 수출 및 시장진입에 어려움을 겪고 있는 것으로 판단된다. 그 외에도 수출을 위해 가장 중요한 항목인 현지 적응성에 대한 문제도 있는데, 국내의 종자회사에서 현지내 시교사업을 진행을 한다고 하더라도 그에 따른 적절한 관리와 조사가 이루어지지 않기 때문에 정확한 피드백을 적시적소에 받기가 어려운 실정이며, 자주 방문하여 시교를 직접 조사할 수 있는 여건 또한 회사마다의 차이가 있어 대부분이 시교사업 이후 결과에만 의존하고 있다. 이러한 종합적인 이유로 미루어보아 수출용 수박 개발 및 수출이 미진한 것이 현실이다.
- 다. 마케팅적인 측면에서도 현지 재배 및 평가를 통한 전략 수립이 중요한데, 이러한 부분은 본 과제를 통하여 해외 현지 거래처 및 재배농가와 연계한 지속적인 정보교류를 통하여 정확하게 이루어질 수 있을 것이라고 생각한다.
- 라. 포화된 국내용 씨없는 수박을 해외시장으로 전환함으로써, 국내에서 육성된 수박 종자 수출에 기여하며, 현재 당사 해외거래처를 통한 정확한 농가 선정 및 지속적인 관리는 앞으로의 전 세계를 선도하는 품종 트렌드의 육종 가이드라인을 정확하게 제시할 것이며, 본 과제와 더불어 국가적 차원인 수출에 이바지하고 이로 인하여 당사 브랜드 이미지 상승효과 또한 있을 것이라고 생각된다.

제 3 절 연구개발 범위

[제 1세부]

1. 2021년 종자수출 300만불 달성
 - 가. 고부가가치 씨없는 수박, 씨적은 수박, 씨작은 수박 종자 수출
 - 나. 미국, 중국, 스페인, 일본, 인도, 베트남 등 해외 주요 시장에 수박종자 수출
2. 복합내병성 고당도 내병성 씨없는 수박 4품종 개발
 - 가. 흰가루병, 탄저병, 바이러스 등에 저항성인 대과종 씨없는 수박 2품종 개발
 - 나. 흰가루병, 탄저병, 바이러스 등에 저항성인 소과종 씨없는 수박 2품종 개발
3. 섭취/가공용이성 높은 씨적은 수박 3품종 개발
 - 가. 씨가 일반수박대비 25% 이하인 대과종 씨적은 수박 2품종 개발
 - 나. 씨가 일반수박대비 25% 이하인 중소과종 씨적은 수박 2품종 개발
4. 복합내병성, 높은 균일성, 고당도 씨작은 수박 3품종 개발
 - 가. 흰가루병, 탄저병, 바이러스 등에 저항성인 소과종 씨작은 수박 1품종 개발
 - 나. 씨가 작으면서 씨가 일반수박대비 50% 이하인 소과종 씨작은 수박 1품종 개발
 - 다. 씨가 작으면서 씨가 일반수박대비 25% 이하인 소과종 씨작은 수박 1품종 개발

[제 2세부]

1. 내병성(덩굴마름병, WMV) 육종을 위한 병 검정 환경 확립 및 저항성 지표 개발
 - 가. 목표형질인 덩굴마름병, 수박모자이크바이러스(WMV) 저항성을 위한 육종소재의 특성 조사와 분석기술 개발
 - 나. 덩굴마름병 기내검정법 및 접종 프로토콜 확립
 - 다. 수박모자이크바이러스(WMV) 진단을 위한 항체준비 및 진단기술 확립
2. 높은 암꽃절성 및 종피색 육종을 위한 표현형 검정 확립
 - 가. 높은 암꽃절성 형질 표현형 구분을 위하여 유전자원별 주지 및 측지에 대한 고 절성 형질 데이터 수집과 프로파일 분석
 - 나. 종피색 (적색 혹은 백색) 유전자원에 대한 색택 표현형 수집과 분석 표준화
3. 내병성(덩굴마름병, WMV), 높은 암꽃절성, 종피색 육종을 위한 분자마커 4종 개발
 - 가. 덩굴마름병, WMV 저항성 및 높은 암꽃절성, 종피색 핵심육종소재 선발
 - 나. 분자마커 개발을 위한 분리집단 및 여교잡 육종프로그램을 위한 최적 부모본을 고려하여 선발
 - 다. 핵심육종재료 간 교잡을 통한 분자표지 개발용 분리집단(F1, F2, F3, BC, RIL, NIL) 개발

- 라. 분리집단의 표현형 검정 및 목표형질의 유전양상 규명
- 마. 형질선발용 분자마커 개발을 위해 모부분 계통 resequencing, QTL-seq, GBS 등의 기술로 SNP를 대량 생산하고, 유전자지도 작성, ANOVA, QTL 분석 등을 통해 유전자의 계놈상 위치를 파악하고 연관 마커를 탐색
- 바. 개발된 목표형질 연관마커를 실용화하기 위하여 다양한 육종소재 및 분리집단에 적용하여 마커의 실용성을 검정
- 사. 검정된 마커에 대해 대량샘플 유전자형자동화분석 플랫폼에 적절한 마커로 전환하고 MAS를 지원할 수 있도록 제작함

4. 복합내병성 품종개발을 위한 분자표지이용 여교잡(MABC) 시스템 확립 및 지원

- 가. 분자표지이용 여교잡(MABC)를 위해 필요한 forward selection용 최근접 MAS 마커 확립 필요
- 나. 흰가루병 및 탄저병 저항성 연관마커의 유전자 수준의 마커화
- 다. ZYMV, WMV, 덩굴마름병 저항성 연관마커의 유전자 최근접 마커화
- 라. 목적 계통별 background selection용 SNP 선별 및 적용
- 마. 각 내병성 유전자좌의 모부분계통에 대한 피라미딩을 위한 여교잡 시스템 확립

5. 대량샘플 자동분석(HT-genotyping) 시스템 구축

- 가. MAS 및 MAB 체계 구축을 위한 SNP 정보의 분류 및 통합
- 나. 육종 단계별로 경제적이고 효율적인 분자마커적용이 가능한 HT-genotyping 분석 플랫폼 활용 및 실용화
- 다. F1 순도 검정용 HT-genotyping 시스템 구축

[제 3세부]

1. 프로젝트 최종 목표

가. 고해상도 영상기반 고속 표현형 검정시스템(HTS)을 구축하여 수박품종 개발에 필요한 표현형 검정서비스를 제공하며 수박종자 순도검정 기술을 개발함

2. 프로젝트 Micro 로드맵

가. 3배체 수박종자의 발아 향상을 위한 발아 검정 기술을 확립함

나. 3배체 수박종자의 순도 향상을 위한 배수성종자 구분을 통한 순도 검정 기술 확립함

다. 수박의 내한성을 조기 선별 할 수 있는 비파괴 표현형 지표를 확립함

라. 수박의 표현형 지표를 고속 자동 계측할 수 있는 HTS 핵심 기반기술을 확립하고 서비스를 제공함

연구개발 목표	연구개발 범위
○ 수박종자 순도 및 발아 검정 기술 확립	- 순도 및 발아 비파괴 선별모델 개발 - 순도 및 발아 신속측정을 위한 온라인 선별시스템 개발
○ 수박 내한성 조기 표현형검정 기술개발을 위한 비파괴 영상 지표 확립	- 내한성 표현형검정 측정장치 구축 - 내한성 비파괴영상 선별 모델개발
○ 고속 표현형 검정(HTS) 핵심 기반기술 확립	- HTS용 3차원 영상획득 장치 개발 - HTS용 분광영상획득 장치 개발

[제 4세부]

1. 고당도, 내병성 씨없는/씨적은/씨작은 신품종 개발 및 수출

가. 국내외 수박 시장개발을 위한 시험포 운영 및 평가

나. 국내외 수박 종자 판매를 위한 영업/마케팅 활동

다. 우량 수박 종자 관리를 위한 품질관리체계 확립

제 2 장 연구수행 내용 및 결과

제 1 절 프로젝트 연구개발 추진전략

1-1. 프로젝트 연구개발 추진전략

가. 수출목표지향적인 과제운영

- (1) 시장조사, 유전자원 수집을 통한 과제운영의 탄력화
- (2) 현지 업체와의 긴밀한 협력체계 구축

나. 세부프로젝트간 상호협력 체계구축

- (1) 분자유종/유전자원 지원프로젝트
- (2) 마커개발용 유전자원 제공
- (3) 표현형 분석 등의 시험 협력
- (4) 종자품질 개선을 위한 유전자원 제공 및 기술지원

1-2. 세부프로젝트 연구개발 추진전략

[제 1세부]

가. 고당도, 내병성 씨없는/씨적은/씨작은 신품종 10종 개발 및 2021년 종자수출 300만불 달성

- (1) Shuttle breeding을 통한 고기능성 2배체 및 4배체 계통육성 및 품종개발
 - (가) 우량형질을 지닌 2배체 계통의 4배체 유기 및 4배체간의 교잡을 통한 고기능성 4배체 계통육성
 - (나) 북중미용 우량계통에 한국재료의 고당도와 경육 특성 도입
 - (다) 동남아시아(태국)에서 연 3회 재배를 통한 계통육성 및 조합작성
- (2) 주요 내병성 형질도입 및 내병성 품종 개발
 - (나) 덩굴마름병, 탄저병 등 내병성 연관마커 개발을 위한 집단 작성 및 제공
 - (다) shuttle breeding과 분자마커를 활용한 효율적인 여교잡 육종 수행
- (3) 고부가가치 고순도 씨없는 수박 품종 개발
 - (가) 저발아종자 제거를 통한 고품질 수박 종자 공급
 - (나) 고순도 수박 종자 공급
- (4) 고부가가치 가공용 수박 품종 개발 - 상호전좌특성 도입을 통한 씨적은 수박 품종 개발
- (5) 빠른 목표시장 접근을 통한 수박 품종 개발
 - (가) 목표시장 영업/마케팅 회사와의 공동연구를 통한 종자수출
 - (나) 목표시장의 영업/마케팅 회사와 공동으로 선발포장운영

(다) Field day를 통한 buyer 초청 품종선발 및 홍보

[제 2세부]

가. 핵심육종재료 구축 및 마커개발용 분리집단 확보

(1) 내병성(덩굴마름병, WMV) 육종을 위한 병 검정 환경의 확립

(가) 병원균의 접종 혹은 발병방법, race 및 판별식물의 확보가 우선되어야 하며, 접종방법 및 감염성 정도에 대한 지표개발 및 표준화가 이루어져야 함.

(나) 목표형질인 덩굴마름병, 수박모자이크바이러스(WMV) 저항성을 위한 육종소재의 특성 조사와 분석기술 개발이 필요함.

(다) 저항성/감수성 표현형 판정이 어려운 덩굴마름병 기내검정법 및 접종 프로토콜 확립이 필요함

(라) 국내에서 분리된 수박모자이크바이러스(WMV) 진단을 위한 ELISA kit의 적용이 어려워 특이 항체준비 및 진단기술 확립이 필요함.

(2) 높은 암꽃절성 및 종피색 육종을 위한 표현형 검정 확립

(가) 식물체의 재배환경, 생육단계, 숙기에 따라 민감하게 달라질 수 있으므로 표현형을 객관적이고 안정적으로 측정할 수 있는 검정 프로토콜 개발과 방법의 표준설정이 요구됨

(나) 높은 암꽃절성 형질 표현형 구분을 위하여 유전자원별 주지 및 측지에 대한 고 절성 형질 데이터 수집과 프로파일 분석이 요구됨

(다) 섭식 거부감을 낮출 수 있도록 과육과 동일한 색깔의 종피색 (적색 혹은 백색)을 갖는 유전자원에 대한 선택 표현형 수집과 분석 표준화가 필요함

(3) 핵심육종재료 확보

(가) 내병성 등 관련 유전자원은 프로젝트 1세부과제 종자회사 및 국가기관으로부터 분양받음

(나) 분양받은 재료의 표현형 재평가를 통해 정확한 핵심육종재료를 구축함

(다) 재료는 PI나 야생종의 직접적인 집단양성을 피하고, 육성계통을 우선적으로 활용함을 원칙으로 함. 육종가가 활용 가능한 연관마커의 개발이 가장 중요한 연구목표이므로, 육종가 친화적인 Inbred Backcross (IBC) 집단을 우선적으로 활용함

(라) 분리집단 작성은 F2, F2:3, NIL(near isogenic line)으로 전개 혹은 계통육성하며, 분자마커의 확증은 BC1 혹은 F2, F3세대에서 이루어지도록 함

(마) 마커개발을 위한 분리집단 양성은 육종회사와 협력하여 세대진전 하며, 열대지역(태국 등) 채종하는 shuttle breeding과정으로, 연간 3회 세대진전을 통해 가속화 함

(바) 분리집단 개발은 마커 개발용 뿐 만 아니라 여교잡을 통한 다양한 고정계통 개발이 동시에 가능 하도록 계획함.

나. 내병성(덩굴마름병, WMV), 높은 암꽃질성, 종피색 계통을 활용한 분자마커의 개발과 적용

(1) 목표형질에 따라 다양한 마커기술 적용

(가) 과제에서 목표로 하는 목표형질연관 분자마커는 궁극적으로 SNP에 기반하여 개발할 예정이나, 목표형질과 상황에 따라, 분리집단에서 BSA (bulked segregation analysis)방법을 활용할 경우 QTL-seq 등의 BSA-NGS 방법을 적용할 수 있음

(나) NIL의 경우 MutMap 및 variant block을 활용한 bin 분석으로 마커개발이 가능할 수 있음

(다) F2:3 분리세대 전개시 유전자지도 작성 및 QTL 분석을 위한 GBS 방법을 적용할 수 있음.

(라) 덩굴마름병, WMV 저항성 및 높은 암꽃질성, 종피색 핵심육종소재 선발은 1세부과제의 유전자원 및 계통을 대상으로 우선적 선발 및 적용할 계획임

(2) 마커개발용 분리집단 양성, 유전분석

(가) 분자마커 개발을 위한 분리집단 및 여교잡 육종프로그램을 위한 최적 부모본을 고려한 선발이 필요함

(나) 핵심육종재료 간 교잡을 통한 분자표지 개발용 분리집단(F1, F2, F3, BC, RIL, NIL) 개발은 1세부과제에서 태국 농장과의 shuttle breeding 시스템을 최대한 활용함

(다) 모부분 계통 및 분리집단의 표현형 검정 및 목표형질의 유전양상 규명은 2세부과제 농장에서 이루어질 예정이며, 정확한 마커 개발을 위해 최대한 면밀히 검토할 예정이며, 분리집단 개발은 마커 개발용 뿐 만 아니라 1세부과제에서 여교잡을 통한 다양한 고정계통 개발이 동시에 가능 하도록 계획함.

(3) 연관유전자지도 작성과 마커개발

(가) 목적형질 선발용 분자마커 개발을 위해 모부분 계통 resequencing, QTL-seq, GBS 등의 기술로 SNP를 대량 생산하고, 유전자지도 작성, ANOVA, QTL 분석 등을 통해 유전자의 계놈상 위치를 파악하고 연관 마커를 탐색할 예정임

(나) 유전자지도작성은 후대분리세대에 대해 GBS분석으로 고밀도 base map을 확립하고,

QTL의 염색체상 위치를 파악한 후, genetic / physical bin을 기준으로 염색체부위에 대해 보다 자세한 flanking SNP genotyping을 통해 마커-유전자간 범위를 좁혀나감.

(다) In-silico SNP 마커들의 목표 집단에서 보이는 genotyping 및 형질연관 validation은 HRM(high resolution melting)으로 판별하는 LC96 (Roche사) platform을 활용함

(라) Eternal population을 확보하기 위해서는 RIL(recombinant inbred line)의 확보가 필요하며, RIL집단의 resequencing을 통한 유전자지도 작성도 예정하고 있음

(마) 개발된 목표형질 연관마커를 실용화하기 위하여 다양한 육종소재 및 분리집단에 적용하여 마커의 실용성을 검증

(바) 검증된 마커에 대해 대량샘플 유전자형자동화분석 플랫폼에 적절한 마커로 전환하고 MAS를 지원할 수 있도록 제작함

(4) 내병성관련 신규 분자마커 개발

(가) 2단계에서 신규로 WMV 및 덩굴마름병에 대한 SNP 기반 MAS용 분자마커 개발 예정임

(나) 수박 덩굴마름병 (Gummy stem blight) : 노지재배에서 문제되는 덩굴마름병균(덩굴마름병)에 대한 병원성 유지, 집중방법 확립은 아직 부족한 상황이며, 알려진 저항성 계통에 대한 시험을 실시하는 중임. 2단계에서 집중적인 마커개발을 수행할 예정임.

(다) 수박모자이크바이러스병 (Watermelon mosaic virus) : 수박의 생산량을 심각하게 위협하는 바이러스병에는 건열소독으로 발병억제가 가능한 CGMMV 등의 박과감염성 tobamovirus 외에도, 국외에서 보고된 바이러스병은 20여 종류가 넘는 상황임. 이 중에 WMV는 최근 국내외 채종지 및 재배지에서 발병률이 급속히 증가하고 있음. 1세부과제에서는 WMV 저항성 NIL을 육성 중이며, 분리세대 양성을 계획하고 있어, 3년차까지 개발이 가능할 것으로 예상하고 있음.

(5) 내병성 유전자 및 최근집 마커 개발

(가) 1단계에서 본 연구팀이 개발한 흰가루병 및 탄저병 연관마커에 대하여, 보다 정밀한 MAB 여교잡 시스템 적용이 가능한 유전자마커를 개발하고자 함

(나) 수박 흰가루병 (Powdery mildew) : 국내의 수박 감염성 흰가루병균 (Podosphaera xanthii) 저항성 마커는 1단계에서 연관마커가 개발된 바 있으나, 신규 특허 및 1세부 육종계통의 신속한 완성을 위하여 정밀 MAB 여교잡용 유전자 MAS 마커를 개발하고자 함.

(다) 수박 탄저병 (Anthracnose) : 해외 노지재배에서 많은 문제를 야기하는 탄저병 (Collectrichum lagenarium)에 대한 저항성 계통 육성용 마커는 1단계에서 본 연구팀에 의해 개발된 바 있으나, 아직 유전자의 클로닝은 이루어지지 않아 이에 대한 연구를 계획함

(라) 수박 덩굴쪼김병 (Fusarium wilt) : 현재 Fusarium oxysporum var. niveum (FON)의 race 0, 1에 대하여 저항성 마커가 개발되어 있으나 MAB 여교잡용 정밀 MAS 마커 활용을 위한 추가적 연구가 요청됨.

(마) 슈키니황화모자이크바이러스 (Watermelon mosaic virus) : 현재 MAB 여교잡에 활용되고 있으나, 정밀 MAS 마커 활용을 위한 추가적 연구가 요청됨.

(6) 종피색 및 암꽃질성 연관마커 개발

(가) 종피색을 과육과 동일한 적색 또는 백색으로 고정할 수 있도록 하여 섭취시 거부감이 적은 씨작은 수박용 계통육성을 위한 형질임

(나) 적색 종피색을 부계로 하는 RIL 집단 (씨작은 계통 x 거대 적색종피 계통)을 양성 중이며, 2년차부터 RIL 집단을 활용한 종피색 연관마커의 개발을 수행할 계획임

(다) 암꽃질성이 높은 경우, 교배시기의 용이성, 재배시 소형과의 다수확이 가능하여 매우 경제적인 형질이라 할 수 있으며, 1세부과제에서 암꽃개화가 7일에서 평균 2~3일로 단축되는 계통을 확보한 바 있음

(라) 2년차부터 육성한 분리세대를 활용할 수 있을 것으로 판단하며, 이에 대한 QTL 분석으로 유전자좌를 결정할 예정임

(마) 4년차까지 활용가능한 높은 암꽃질성 연관분자마커 개발을 목표로 함

다. 분자마커의 검증 및 대량자동화분석 플랫폼 적용

(1) 분자마커의 검증, 유전자마커 확보, GWAS 분석

(가) 연구를 통해 확보되는 분자마커들은 RNA-seq을 이용한 transcriptome 분석을 통해 최대한 유전자 마커로의 전환할 수 있도록 노력할 예정임

(나) 특히, 본 연구팀이 개발한 CFMMV-based VIGS 방법의 활용으로 신속한 유전자 기능검정이 가능할 것임

(다) 탄저병, 암꽃질성 등 일부 형질들은 GWAS를 통하여 유전자의 위치 검증 및 신규 대립유전자 존재 여부 등을 파악하고 범용마커로서의 활용성을 증대시킬 계획임

(1) 대량자동화분석 플랫폼 적용

- (가) 개발되어 입증된 마커들은 특허출원을 통하여 1세대과제 및 육종산업계에서 활용할 수 있도록 지원함.
- (나) 목표형질 선발용(foreground selection) 마커는 대량샘플자동분석(semi-high throughput)이 가능한 platform에 맞게 전환하여 MAS 지원이 가능하도록 구축함.
- (다) 핵심육종재료의 resequencing에 의해 밝혀진 SNP들은 여교잡용(background selection) 마커로 사용할 수 있도록 선발하고, 대량 자동화분석이 가능한 platform으로 구축하여 MAB 여교잡을 지원함
- (라) F1 순도검정 및 채종지 교잡확인용 품종구분 마커 개발을 위한 SNP 데이터의 축적 및 대량 자동화 분석이 가능한 platform을 구축할 계획임

[제 3세부]

- 가. 주관기관에서 개발된 3배체 종자에 대한 비파괴 순도 및 발아 검정 기술을 개발하고 현장에서 전수검사가 가능한 선별장치 프로토타입을 구축함
- 나. 환경적응성이(내한성, 내서성) 강한 품종 개발을 위해 표현형 지표를 개발하고 참여기관 및 수박육종 기업에서 활용할 수 있는 표현형 검정시스템을 구축하여 서비스를 실시함

[제 4세부]

가. 추진배경

- (1) 본과제의 프로젝트 주관기관인 파트너 종묘는 (주)다나의 협력 관계를 바탕으로, 해외 수출용 수박 판매를 위하여 노력하고 있음.
- (2) GSP 과제를 통하여 해외시험 진행 예정인 품종 및 조합들은 파트너 종묘에서 GSP 과제를 통하여 개발/판매중인 품종 및 조합들임. 아래는 개발된 품종 및 조합들로 이 외에도 많은 조합들이 GSP를 통하여 개발되었음.
 - (가) Seedless: 골드제로, 슈퍼아이조은, 제로스타, 조생제로, 블랙스위트, 블랙보이
 - (나) Less Seeded: 씨저근, 블랙드래곤, 달코미미니, 달코미 흑진주
 - (다) Less Seeded: LS레벨업, LS카카오, AP#61, AP#62, AP#98
 - (라) ETC : 리코후레쉬1, 리코후레쉬2, 씨자근, 오렌지슈가, AP#15, AP#41, AP#44
- (3) 해외 시험 대상 국가인 스페인, 이탈리아, 중국, 멕시코 등지에 Less seeded 및 Seedless 수박 시교조합과 기존 개발된 품종으로 공동 개발을 진행하여 왔음.
- (4) 본 과제를 수행과 더불어 해외 수박 종자 수출을 이루기 위한 Seedless, Less seeded F1 수박 조합 선발과 해외마케팅/품질관리 체계 확립을 위하여 프로젝트 기관과 노력하여 왔음.

나. 추진배경

(1) 상업화 프로세스

(가) 선발

- ① 해외 현지적응성 시험을 위한 국내시험포내 F1 신조합 1차 선발
- ② (나) (가)에서 선발된 F1 신조합의 해외 현지 적응성 시험 및 우수 F1 조합 2선발

(나) 평가

- ① 국내 F1 조합평가는 프로젝트 기관과 진행하는 자체평가와 해외바이어를 초청하여 진행하는 바이어평가로 구분함.
- ② 해외 F1 조합평가는 거래처마다 진행 과정이 다를 수 있으나, 큰 틀에서 해외거래처 자체평가 및 농가평가로 구분함.
- ③ 과제 수행에 있어 각 연차별 해외 F1 조합 평가목적은 아래와 같음.
 - ㉠ 2019년: 초기 시장정보 및 니즈 파악 및 마케팅 방향을 설정
 - ㉡ 2020년: 시장정보 및 니즈 구체화 및 마케팅/개발전략 수정
 - ㉢ 2021년: 상업화 품종 개발 및 판매 / 거래처 관계 강화

(다) 확대

- ① 해외평가가 완료된 F1 조합들중 우수 F1조합에 대한 확대재배 시험 협의
- ② 협의된 F1 선발조합은 농가 확대시교 혹은 준상업화/상업화 목적으로 재시험

(라) 판매

- ① 준상업화/상업화가 확정된 F1선발조합에 대한 판매
- ② 해외거래처와의 독점계약 및 일반계약 논의
- ③ 해외상보 제작 등 마케팅활동에 활용 가능한 모든 수단 검토
- ④ 준상업화/상업화 종자 판매를 위한 생산관리체계 강화
- ⑤ 준상업화/상업화 이후의 신품종 육성을 위한 연구소와의 협업 강화

(2) 생산/품질관리

(가) 생산/품질 관리

- ① 당사와 협력중인 해외 생산업체는 중국내 1개소, 인도내 1개소가 있음.
 - ② 생산 안정성과 품질이 검증된 종자 생산회사를 발굴하고 지속적인 연계를 통하여 자사 종자 생산과 품질에 대한 안정성을 확고히 할 예정임
 - ③ 객관적 지표를 통한 평가로 생산, 품질에 대한 체계를 확립하고 이를 통해 체계적인 관리를 지속적으로 유지 및 보완해 나갈 예정임
 - ④ 생산시 발생하는 애로사항을 조기에 거래처와 관리하여 피해를 미연에 방지할 예정임
 - ⑤ 생산 이후의 종자 정선, 소독, 코팅 등 품질관리 체계를 확립할 예정임
 - ⑥ 최근 생산 전략의 트렌드는 Clean Seeds 생산, 유전자원 유출방지, 중국의 재평가, 안정적인 공급이 주를 이루고 있으며, 당사는 각 트렌드에 필요한 요소들을 파악하여 생산품질관리 체계를 확립할 계획임
- ※ Clean seeds 생산을 위하여 무병 종자 생산지 선정 및 기존 거래처와의 체계 점검
※ 유전자원의 유출방지를 위하여 생산시 전략적으로 물량 배정이 필요하며 원종 출고에

- 서 종자 입고까지 주요 단계별 관리가 필요함
- ※ 중국내에서 유전자원 유출 외에도 생산지역의 노쇠화 및 까다로운 수출입절차로 많은 문제점들이 야기되고 있으므로, 중국을 대체할만한 국가(인도, 미얀마 등)에 대한 접근이 필요함
- ※ 안정적인 공급을 위하여 월별 물량 수급상황을 점검해야 하며 채종지역의 다변화와 기존 채종지의 지속성을 유지하고 기존 채종지역의 새로운 가능성 확인이 필요함

다. 연차별 전략

(1) 3차년도(2019년)

- (가) 3차년도(2019년) 목표 매출액: 해외 1만불
- (나) GSP 과제 해외수출용 국내 개발 수박 품종/조합들에 대한 해외 현지적응성 평가 및 F1 우수조합 선발
- (다) 현지적응성 평가 및 F1 우수조합에 대한 준상업화를 목적으로한 확대시교 및 즉시 상업화를 위한 해외 거래처와의 협의
- (라) 해외거래처와의 지속적인 정보교류 및 현지출장 방문을 통한 거래처와의 유대감 강화
- (마) 국내 시험포 운영을 통한 성능검정 및 해외 바이어 초청과 신조합 및 품종 소개를 통한 평가 및 시장요구도 파악
- (바) GSP 과제 1차년도로 시정정보 및 현지적응성 시험을 통한 피드백 입수에 중점
- (사) 생산/품질관리 체계 확립을 위한 관련업체 방문, 종자 생산/관리시 애로사항 등 정보 수집
- (아) 해외상보 제작 등 마케팅 활동에 활용 가능한 모든 수단 검토

(2) 4차년도(2020년)

- (가) 4차년도(2020년) 목표 매출액: 해외 20만불
- (나) 2019년현지 평가 피드백 프로젝트 기관과 공동 검토 및 해외 마케팅 전략 수정
- (다) 2019년 현지 우수 F1 선발조합에 대한 확대시교 및 준상업화/상업화 논의
- (라) 2019년 국내 선발 F1조합에 대한 해외 현지 평가 내용 공유 및 방향성 논의
- (마) 2020년 국내 시험포 운영을 통한 성능검정 및 해외 바이어 초청과 신조합 및 품종 소개를 통한 평가 및 시장요구도 점검
- (바) 생산/품질관리를 위한 프로젝트 기관과 협력
- (사) 해외상보 제작 등 마케팅 활동에 필요한 모든 수단 검토

(2) 5차년도(2021년)

- (가) 5차년도(2021년) 목표 매출액: 해외 100만불
- (나) 축적된 시장정보를 바탕으로 국가간 거래처별 요구도 분석
- (다) 2020년 현지 우수 F1 선발조합에 대한 확대시교 및 준상업화/상업화 논의
- (라) 2020년 국내 선발 F1조합에 대한 해외 현지 평가 내용 공유 및 방향성 논의
- (마) 2020년 국내 시험포 운영을 통한 성능검정 및 해외 바이어 초청과 신 조합 및 품종 소개를 통한 평가 및 관계 유지
- (바) 생산/품질관리를 위한 프로젝트 기관과 협력 및 관계강화
- (사) 해외상보 제작 등 마케팅 활동에 활용 가능한 모든 수단 검토

1-3. 프로젝트 연구개발 추진체계

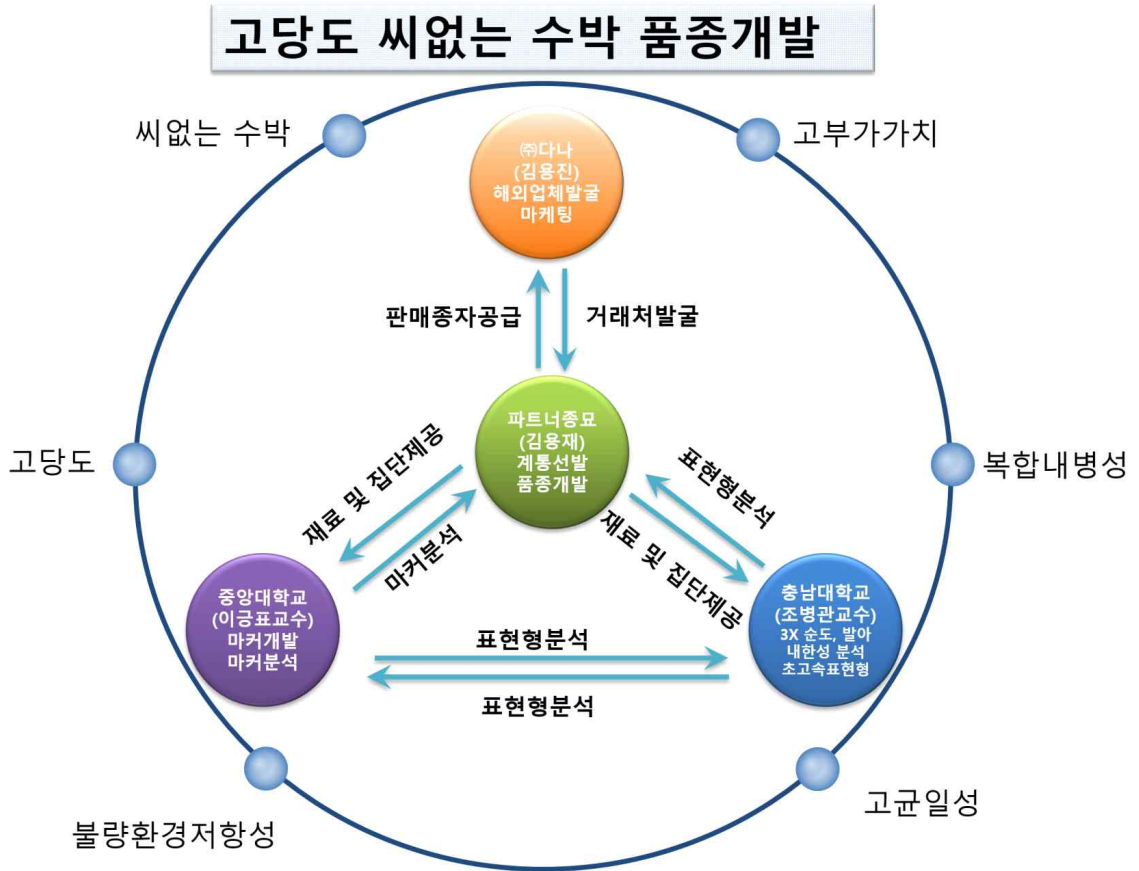


그림 2 연구과제 추진체계

1-4. 연차별 연구개발 추진일정

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2017	<ul style="list-style-type: none"> - 4배체 계통, 씨작은 계통, 씨적은 계통 육성 - 내병성/저항성 계통 육성 - 씨없는 수박, 씨적은 수박, 씨작은 수박 품종 개발 - 해외 세대진전 시험포장운영 - 해외 전시포 및 박람회 참가 - 고기능성 수박 품종 2건 출원 및 1건 등록 - 종자수출 30만불 - 덩굴마름병, WMV 검정환경, 저항성지표 개발 - 핵심육종소재 선발(덩굴마름병, WMV) - 유전자마커 개발(흰가루, 탄저병) - 수박 배수성 진단법 개발 - 분자마커활용 MAB 여교잡 - 고품질 3배체 수박 발아 검정 기술 개발 - 내한성 조기 검출을 위한 비파괴 표현형 기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 고기능성 계통 개발 및 특성 검정 - 세대진전 및 시교생산 - 병리검정, 분자마커검정 - 한국 및 주요 목표시장에서의 품종 성능검정 - 고품질 생산관리 및 상품생산 - 목표 산지 방문, 상담 등을 통한 수출촉진활동 - 덩굴마름병, WMV의 진단기술, 병접중환경, 저항성 지표의 개발 - 덩굴마름병 저항성 핵심육종소재 선발 - 덩굴마름병 저항성 소재 분리집단 양성 - 흰가루병, 탄저병 유전자 마커 개발시작 - 배수성 수박 gene dosage 진단법 개발 - ZYMV 저항성 MAS 마커를 활용한 MAB 여교잡 BC2 진전 - 3배체의 발아 검정 인자 발굴(측정 지표 2개 이상) - 내한성 비파괴 인자 발굴(측정 지표 3개 이상)
2차년도	2018	<ul style="list-style-type: none"> - 4배체 계통, 씨작은 계통, 씨적은 계통 육성 - 내병성/저항성 계통 육성 - 씨없는 수박, 씨적은 수박, 씨작은 수박 품종 개발 - 해외 세대진전 시험포장운영 - 해외 전시포 및 박람회 참가 - 고기능성 수박 품종 2건 출원 및 2건 등록 - 종자수출 50만불 - 병저항성 유전분석 및 마커개발(WMV, 덩굴마름병) - 핵심육종소재 선발 및 양성(종피색, 암꽃질성) - 유전자마커 개발(흰가루, 탄저병) - 최근접 연관분자마커 개발(ZYMV, 덩굴쪄김병) - 분자마커활용 MAB 여교잡 - 고품질 3배체 수박 순도 검정 기술 개발 - 내한성 조기 검출을 위한 비파괴 표현형 기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 고기능성 계통 개발 및 특성 검정 - 세대진전 및 시교생산 - 병리검정, 분자마커검정 - 한국 및 주요 목표시장에서의 품종 성능검정 - 고품질 생산관리 및 상품생산 - 목표 산지 방문, 상담 등을 통한 수출촉진활동 - WMV 저항성 F2세대 활용 유전분석 및 마커개발 시작 - 덩굴마름병 저항성 육종소재 분리집단 양성 진행 - 흰가루병, 탄저병 저항성 유전자 판별 및 마커진단 확립 - 분자마커활용 MAB 여교잡 진행 - 3배체의 순도 검정 인자 발굴(측정 지표 2개 이상) - 내한성 인자검출을 위한 데이터 베이스 구축 및 모델링(50%)

3차년도	2019	<ul style="list-style-type: none"> - 4배체 계통, 씨작은 계통, 씨적은 계통 육성 - 내병성/저항성 계통 육성 - 씨없는 수박, 씨적은 수박, 씨작은 수박 품종 개발 - 해외 세대진전 시험포장운영 - 해외 전시포 및 박람회 참가 - 고기능성 수박 품종 2건 출원 및 2건 등록 - 종자수출 100만불 - 병저항성 MAS 연관마커개발(WMV, 덩굴마름병) - 형질분리집단 유전분석(종피색, 암꽃절성) - 유전자마커 개발(흰가루, 탄저병) - 최근접 연관분자마커 검정(ZYMV, 덩굴쪄김병) - 분자마커활용 MAB 여교잡 - 고품질 3배체 수박 종자 검정 기술 개발 - 내서성 조기 검출을 위한 비파괴 표현형 기술 개발 - 고속대량 표현형 검정시스템구축 - 내한성 조기 검출을 위한 비파괴 표현형 기술 개발 - 국내 시험포 운영을 통한 해외 바이어 초청 및 평가회 실시 - 해외 시험포 2개소 확보 및 현지 경쟁력 평가를 통한 우수조합의 차년도 전시포 운영 협의 - 국제 박람회 및 총회 참석 및 정보 교류를 토대로 한 마케팅 전략 수립 및 강화 - 매출 목표 달성을 위한 홍보활동 및 거래처 1개 확보 - 시장 요구도 및 현지 피드백을 반영한 수출 전략 수립 2019년 수출액 1만불 달성 	<ul style="list-style-type: none"> - 고기능성 계통 개발 및 특성 검정 - 세대진전 및 시교생산 - 병리검정, 분자마커검정 - 한국 및 주요 목표시장에서의 품종 성능검정 - 고품질 생산관리 및 상품생산 - 목표 산지 방문, 상담 등을 통한 수출촉진활동 - WMV, 덩굴마름병 저항성 MAS 마커 개발 - 종피색, 암꽃절성 형질 분리집단 양성 및 유전분석 - 흰가루, 탄저병 저항성 유전자 확보 완료 - ZYMV, 덩굴쪄김병 최근접 연관분자마커 개발 완료 - 분자마커활용 MAB 여교잡 진행 - 3배체 수박의 순도 및 발아 검정 시스템 개발 - 수박의 내서성 비파괴 인자 발굴(측정 지표 3개 이상) - 내한성 조기검출용 HIS 프로토타입 개발(50%) - 내한성 인자검출을 위한 데이터 베이스 구축 및 모델링(100%) - 7월 해외 바이어 초청 평가회 실시를 통한 피드백 제공 및 국내 농가 방문 일정을 통한 품종홍보 및 국내 시험포 방문 - 현지 적응성시험 및 조합평가 - 중국 2개사, 스페인 1개사 경쟁력 평가 실시 및 상업화를 위한 가격 협상 진행 - 국제 종자박람회 및 총회 참석하여 해외업체 미팅을 통한 시장정보 수집 및 분석, 이를 토대로 한 해외 마케팅 전략 수립 및 강화 - 해외거래처 협력 통한 중국, 인도 생산회사 발굴 및 연계를 통한 체계적인 생산과 품질관리체계 실시 및 차년도 생산 물량 협의
------	------	--	---

4차년도	2020	<ul style="list-style-type: none"> - 4배체 계통, 씨작은 계통, 씨적은 계통 육성 - 내병성/저항성 계통 육성 - 씨없는 수박, 씨적은 수박, 씨작은 수박 품종 개발 - 해외 세대진전 시험포장운영 - 해외 전시포 및 박람회 참가 - 고기능성 수박 품종 2건 출원 및 2건 등록 - 종자수출 135만불 - 종피색, 암꽃질성 분자마커 개발 - 병저항성 MAS 마커의 적용성 확대 검정 - 복합내병성 MAB 여교잡 시스템 개발 - 고품질 3배체 수박 종자 검정 기술 개발 - 내서성 조기 검출을 위한 표현형 기술 개발 - 고속대량 표현형 검정시스템구축 - 국내 시험포 운영을 통한 해외 바이어 초청 및 평가회 실시 - 해외 시험포 5개소 확보 및 현지 경쟁력 평가를 통한 우수조합의 차년도 전시포 운영 협의 - 현지 경쟁력 평가를 통한 우수조합의 차년도 상품화 협의 - 국제 박람회 및 총회 참석 및 정보 교류를 토대로 한 마케팅 전략 수립 및 강화 - 매출 목표 달성을 위한 홍보활동 및 거래처 3개 확보 - 해외 생산업체 선정 및 생산 협의 - 시장 요구도 및 현지 피드백을 반영한 수출전략 수립 2020년 수출액 20만불 달성 	<ul style="list-style-type: none"> - 고기능성 계통 개발 및 특성 검정 - 세대진전 및 시교생산 - 병리검정, 분자마커검정 - 한국 및 주요 목표시장에서의 품종 성능검정 - 고품질 생산관리 및 상품생산 - 목표 산지 방문, 상담 등을 통한 수출촉진활동 - 종피색, 암꽃질성 분자마커 개발 완료 - WMV, 덩굴마름병 저항성 MAS 마커의 적용성 확대 검정 - 복합내병성 MAB 여교잡 시스템 개발 - 3배체 수박의 순도 및 발아 검정 시스템 성능 검증 - 내서성 검출을 위한 데이터 베이스 구축 및 모델링(50%) - 내서성 조기검출용 HTS 프로토타입 개발(100%) - 코로나 대유행으로 인한 7월 해외 바이어 초청 평가회를 온라인 플드데일로 대체 실시 및 국내 시험포 선발 조합 평가 진행 - 현지 적응성시험 및 조합평가 - 총 4개사 5개 국가 경쟁력 평가 실시 및 일부 거래처 상업화를 위한 가격협상 및 판매 진행 - 지속적인 교신 및 작황조사를 통한 차년도 시험포 사업 진행여부 협의 - 코로나 대유행으로 인한 전체 해외일정 취소 및 거래처 교신 강화 - 홍보를 위한 해외용 상보 인쇄 및 상보 개정판 제작 진행 - 온라인 필드데이 제작 및 거래처 정보 공유 진행 - 수출용 종자생산 및 품질관리 체계 네트워크 구축 - 해외거래처 협력을 통한 중국, 인도 생산회사 발굴 및 연계를 통한 체계적인 생산과 품질관리체계 실시 및 차년도 생산 물량 협의 - 매출 목표 달성을 위한 중국내 2개사, 멕시코 1개사와 수출진행(\$)
------	------	---	---

5차년도	2021	<ul style="list-style-type: none"> - 4배체 계통, 씨작은 계통, 씨적은 계통 육성 - 내병성/저항성 계통 육성 - 씨없는 수박, 씨적은 수박, 씨작은 수박 품종 개발 - 해외 세대진전 시험포장운영 - 해외 전시포 및 박람회 참가 - 고기능성 수박 품종 2건 출원 및 3건 등록 - 종자수출 300만불 - 복합내병성 MAB 여교잡 시스템 확립 - F1 순도검정용 시스템 활용 확립 - 대량샘플 자동분석용 시스템 활용 확립 - 내서성 조기 검출을 위한 표현형 기술 개발 - 고속대량 표현형 검정시스템구축 - 해외 시험포 운영을 통한 품종 경쟁력 평가 및 생산업체를 통한 생산 품질관리 체계 수립 - 국내 시험포 운영을 온라인 필드데이 운영 - 국내외 매출 증대 - 온라인 국제 종자박람회 참가 	<ul style="list-style-type: none"> - 고기능성 계통 개발 및 특성 검정 - 세대진전 및 시교생산 - 병리검정, 분자마커검정 - 한국 및 주요 목표시장에서의 품종 성능검정 - 고품질 생산관리 및 상품생산 - 목표 산지 방문, 상담 등을 통한 수출촉진활동 - MAS 및 MAB 체계 구축을 위한 SNP 정보의 분류 및 통합 - F1 순도검정용 시스템 활용 확립 - 육종 단계별 경제적, 효율적인 분자마커 적용이 가능한 분석 플랫폼 활용 및 실용화 - 내서성 검출을 위한 데이터 베이스 구축 및 모델링(100%) - 내서성 및 내한성 조기검출용 HTS 성능검증 및 서비스 - 해외 현지 품종평가에 따른 우수 조합 선발 및 상업화를 위한 확대시교와 상업화 진행 - L1, L2, Micro Seeds 등 국가별로 타입을 구분하여 크림슨/쥬빌리/흑피에 대한 시교 사업 및 평가 진행 - 고품질 종자 생산이 가능하도록 생산회사 방문 및 교신을 통한 생산 품질관리 체계 안정화 및 수립 - 코트라 활용을 통한 거래처 발굴 및 시험포 물색 - 국내 시험포내 해외 수출용 수박 조합 선발 및 자체 영상제작을 통한 온라인 필드데이 제작 - 제작된 자료 거래처 공유 및 미팅 - 국내외 수박 종자 판매를 통한 매출액 증대 - 국제 온라인 종자박람회 참가
------	------	--	---

제 2-1 장 세부프로젝트별 연구수행 내용 및 결과

[제 1세부]

제 1 절 연구성과

1. 성과지표별 성과내용

가. 권리확보 및 유통경쟁력 강화

(1) 특허출원 및 등록

특허명 염색체 내에 2개의 전좌를 포함하는 신제품 수박으로서, 염색체 구조변이의 한 종류인 상호전좌의 특성을 이용한 방법이다.

표 10 특허성과 내역

출원·등록 연도	특허명	출원인	출원국	출원·등록번호
출원 : 2017년 등록 : 2020년	염색체 내에 2개의 전좌를 포함하는 신제품 수박	농업회사법인 (주)파트너종묘	대한민국	출원 : 제 10-2017-0083532 등록 : 제 10-2140640

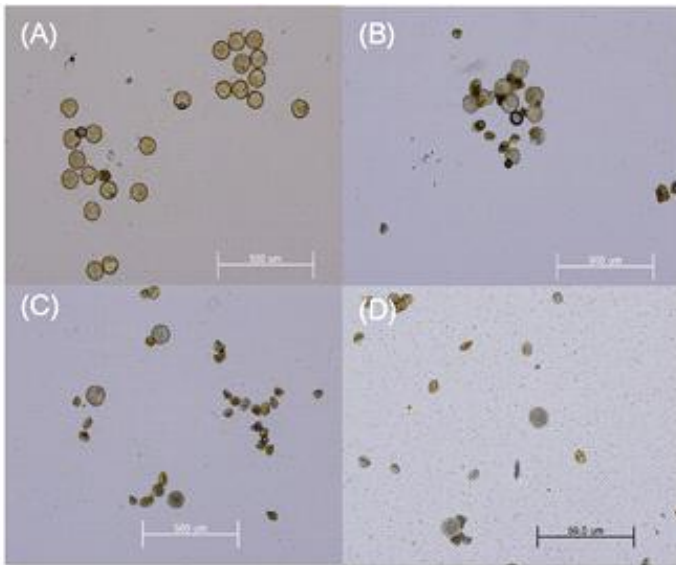


그림 3 화분임성확인 현미경 사진
(A)100%,(B)50%,(C)25%,(D)12.5%



그림 4 특허증

씨적은 특성을 이용위의 표와 같이 현재까지 당사에서 보유하고있는 전좌세트에대한 상호이질성 파악결과이며, 현재까지 파악된 계통들을 이용하여 씨적은

수박품종개발사용하여 아래와 같이 씨적은 수박품종개발을 진행하였다. 그 중 Less Seed(L1)품종인 달코미미니는 2019년 현장중심 우수 연구개발성과에 당선, GSP 2단계 3차년 스페인 첫 수출이후 점차 수출량이 증대하고 있는 추세이다.



그림 5 씨적은 특성의 개발품종



그림 6 2019 현장중심 우수 연구개발성과

표 11 GSP 2단계 달코미미니 수출 실적



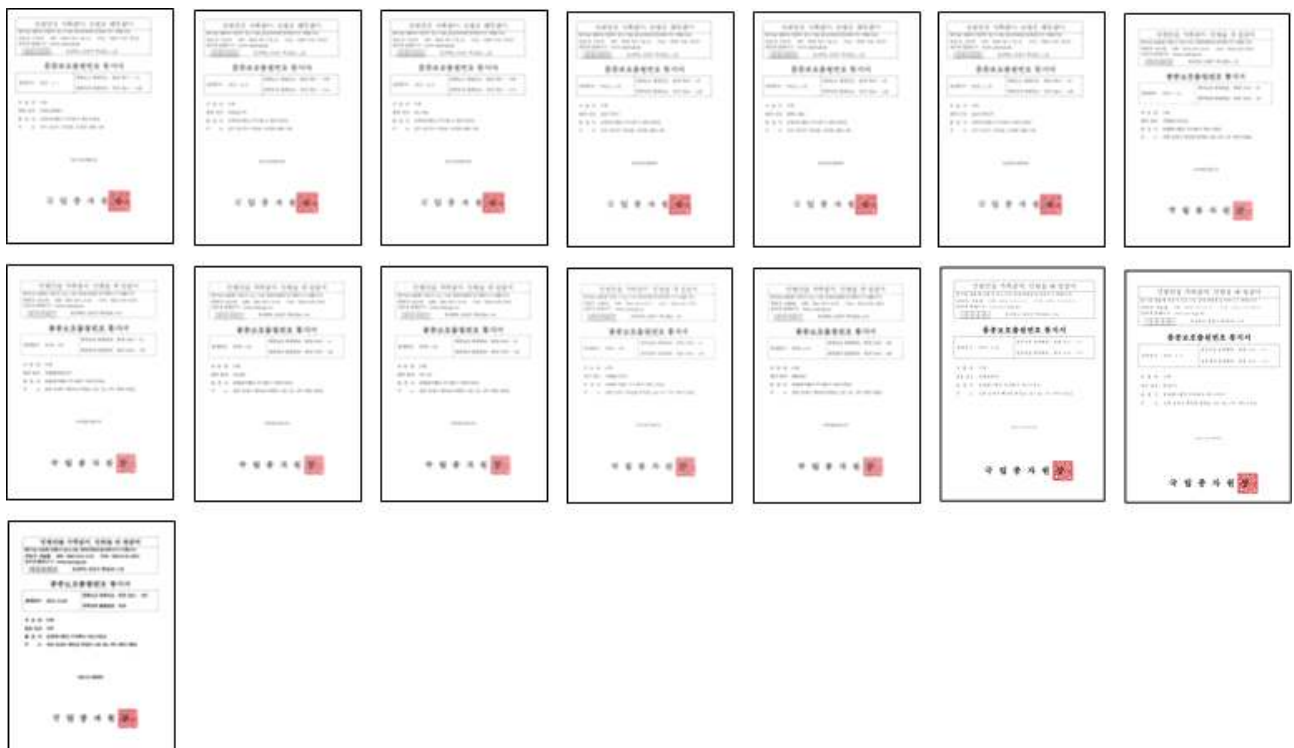
(2) 품종보호 출원 및 등록

(가) 품종보호 출원

5개년 품종보호출원 목표 10개 대비 15개 실적 달성

표 12 GSP 2단계 품종보호 출원 목록

연번	품종명	출원번호	출원일
1	피엠알퍼펙트	2017-51	2017. 2. 1
2	피엠알추석	2017-283	2017. 5. 15
3	골드제로	2017-284	2017. 5.15
4	달코미미니	2018-42	2018. 1. 23
5	블랙드래곤	2018-43	2018. 1. 23
6	달코미흑진주	2018-44	2018. 1. 23
7	피엠알아이조은	2019-33	2019. 1. 21
8	피엠알파워조은	2019-32	2019. 1. 21
9	씨 5280	2020-41	2020. 1. 21
10	씨 7419	2020-42	2020. 1. 21
11	피엠알씨저근	2020-51	2020. 1. 30
12	엔유 023	2020-267	2020. 5. 11
13	피엠알루비	2021-154	2021. 3. 29
14	비 9079	2021-214	2021. 4. 9
15	더빅	2021-439	2021. 10. 28



(나) 품종보호 등록

5개년 품종보호등록 목표 10개 대비 11개 실적 달성

표 13 GSP 2단계 품종보호 등록 목록

연번	품종명	등록번호	등록일
1	씨저근	제 6676 호	2017. 5. 1
2	씨 2146	제 6675 호	2017. 5. 1
3	오렌지슈가	제 6674 호	2017. 5. 1
4	씨자근	제 7088 호	2018. 4.11
5	블랙보이	제 7089 호	2018. 4.11
6	블랙스위트	제 7665 호	2019. 4. 5.
7	피엠알추석	제 7658 호	2019. 4. 5.
8	엘에스레벨업	제 7999 호	2020. 03. 10
9	달리미	제 8036 호	2020. 03. 31
10	엘에스카카오	제 8641 호	2021. 06. 22
11	피엠알아이조은	2022. 1 등록번호 발급예정	2021.12 등록결정

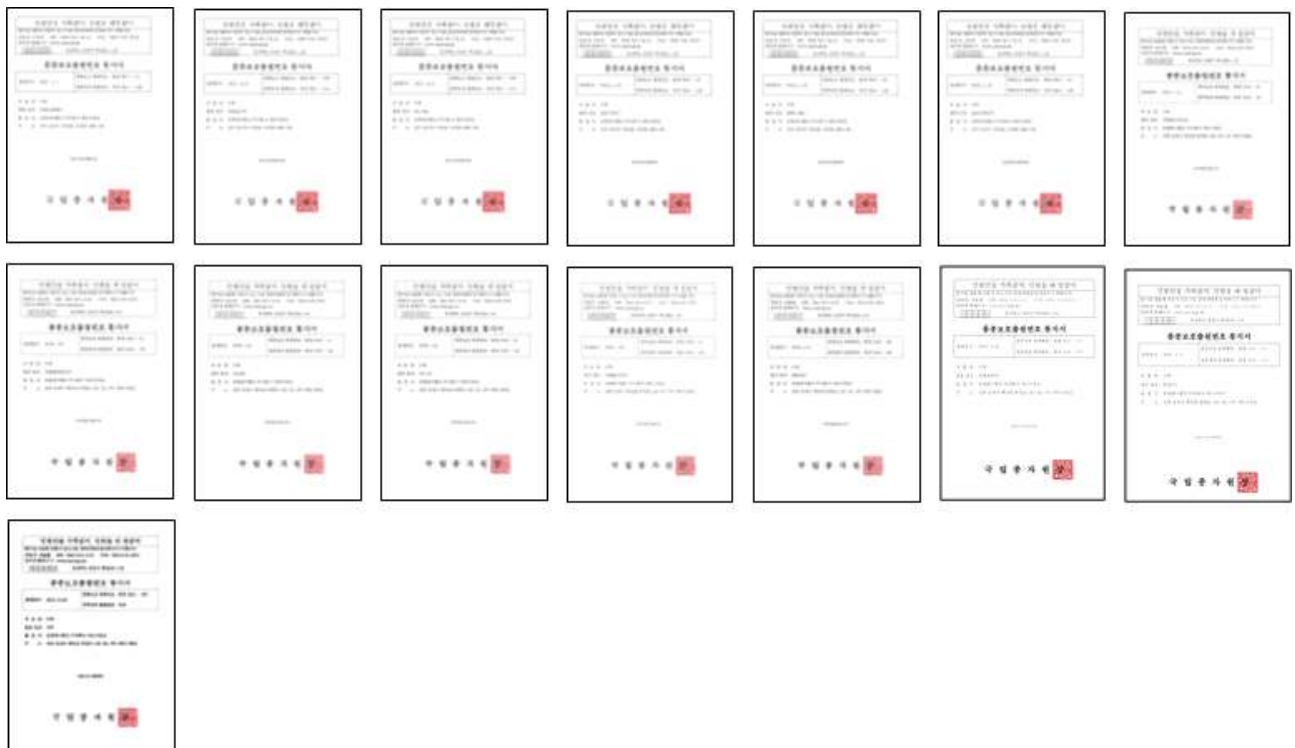


(다) 생산·판매 신고

5개년 생산·판매신고 목표 5개 대비 16개 실적 달성

표 14 GSP 2단계 생산·판매 신고 목록

연번	품종명	등록번호	등록일
1	제로스타	02-0008-2017-10	2017. 2. 10
2	조생제로	02-0008-2017-53	2017. 12. 15
3	제로스타플러스	02-0008-2018-5	2017. 12. 15
4	씨이오	02-0008-2018-13	2013. 3. 13
5	달리미	02-0008-2018-17	2018. 4. 24
6	빅스타트	02-0008-2018-18	2018. 4. 24
7	씨스탑	02-0008-2019-30	2019. 3. 25
8	매력	02-0008-2019-31	2019. 4. 3.
9	슈퍼볼	02-0008-2019-48	2019. 9. 30
10	슈퍼아이조은	02-0008-2019-52	2019. 10. 11
11	피엠강한꿀	02-0008-2019-53	2019. 10. 12
12	나이스꿀	02-0008-2019-54	2019. 10. 13
13	까망반씨	02-0008-2019-55	2019. 10. 14
14	파워꿀	02-0008-2019-56	2019. 10. 15
15	블랙슈가킹	02-0008-2020-11	2020. 5. 14
16	더빅	02-0008-2021-21	2021. 10. 28



나. 생산역량, 제품경쟁력, 홍보역량 강화

(1) 생산역량 강화

(가) 세대진전시험포

연중 수박재배가 가능한 태국 콘캔지방에서 연 3회 세대진전시험포 운영, Shuttle breeding 을 통한 계통세대진전 및 마커개발용 집단양성 실시

표 15 태국 세대진전시험포 경종개요

작형	파종	정식	교배	수확
태국 여름	2 월	3 월	4 월	5 월
태국 우기	6 월	6 월	7 월	8 월
태국 건기 증식	9 월	10 월	11 월	12 월
태국 건기 본시험	10 월	11 월	12 월	차년 1 월



그림 10 입지지역



그림 11 태국 세대진전시험포 포장

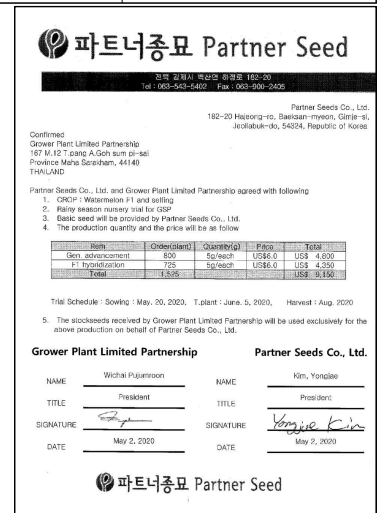


그림 12 세대진전시험포 계약서

(2) 제품경쟁력 강화

(가) 해외시험포

연차	구분	설치일자 (계약시작일자)	계약종료일자	설치지역	비고
1 차년	해외	2017 년 9 월	2017 년 12 월	태국 콘캔	해외 시험포
2 차년	해외	2018 년 1 월	2018 년 4 월	중국 북경	해외 시험포
3 차년	해외	2019 년 2 월	2019 년 5 월	이탈리아 시칠리아	해외 시험포 (현지업체주관)
3 차년	해외	2019 년 3 월	2019 년 6 월	중국 산시성,랴오닝산둥성	해외 시험포
3 차년	해외	2019 년 5 월	2019 년 8 월	독일	해외 시험포 (현지업체주관)
3 차년	해외	2019 년 6 월	2019 년 8 월	스페인 무르시아	해외 시험포 (현지업체주관)
3 차년	해외	2019 년 10 월	2020 년 12 월	베트남 메콩델타	해외 시험포
4 차년	해외	2020 년 2 월	2020 년 6 월	인도	해외 시험포

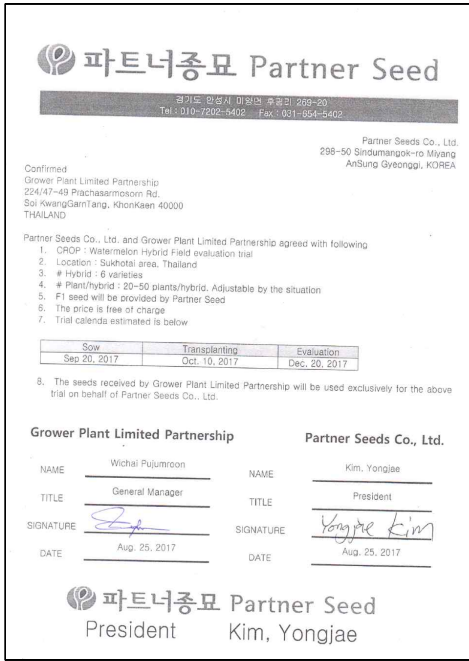


그림 13 태국 1차년 시험포 계약서

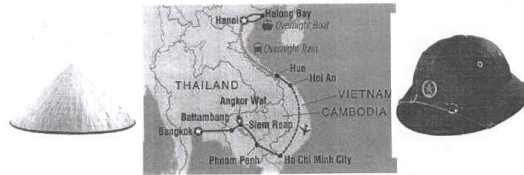


그림 14 중국 2차년 시험포 계약서



그림 15 중국 3차년 시험포 계약서

Vietnam 시범포



Mekong , Dalat , Hanoi
Dec.4th ~ Dec.8 th ,2019
GSP 해외 시범포.
국립종자원 .

그림 16 베트남 3차년 시범포

Watermelon Trial Report

Date of Sowing: 2nd April 2020
Date of Planting: 16th April 2020
Date of Harvest: 18th June 2020
Place: ID-Halli, Bengaluru; Altitude – 750 meters

Historic temperature & rainfall data for Bengaluru region.

	January	February	March	April	May	June	July	August	September	October	November	December
Avg. Temperature (°C)	26.8	22.9	25.6	27.3	28.9	24.4	23.3	23.4	23.3	23.2	21.8	20.6
Min. Temperature (°C)	14.3	15.8	18.4	20.7	20.7	19.5	19	19	18.6	18.6	16.8	15
Max. Temperature (°C)	27.4	30.1	32.9	33.9	33.1	29.4	27.7	27.8	28.1	27.9	26.9	26.3
Precipitation / Rainfall (mm)	1	4	8	38	95	67	99	113	180	148	56	15

그림 17 4차년도 인도 해외 시험포



그림 18 태국 1차년 시험포 작황조사

试验品种 Trial code (CS-2018-018)



Plant	Fruit setting	Fruit Shape	Fruit weight	Fruit Flesh	Brix	Comments
Average-vigour;	Normal	The fruit shape is good and uniform.	7.7Kg	The texture is fine & crisp, the taste is sweet.	15/14.5 14/12	Reposition



그림 19 중국 2차년 시험포 작황조사

그림 20 중국 3차년 시험포 작황조사

표 17 베트남 3차년 종자원주관 GSP 해외 시범포 작황조사표

품종명	과육색	과중	과형	외관	주요특성
AP#122	Deep red	3-4kg	Oblong	Jubilee stripe	Deep red with high sugar and firm flesh
AP#123	Deep red	3-4kg	Oblong	Jubilee stripe	Less seeded, high sugar with firm flesh
AP#102	Deep red	4~5kg	Round	Black skin	Very high sugar and firm with less seeded
AP#124	Deep red	2-3kg	Oblong	Black skin	Firm, deep red flesh with high sugar content
AP#120	Deep red	2-3kg	Oblong	Jubilee stripe	Less seeded, high sugar with firm flesh

그림 21 이탈리아 3차년 해외시험포 현지선발 결과

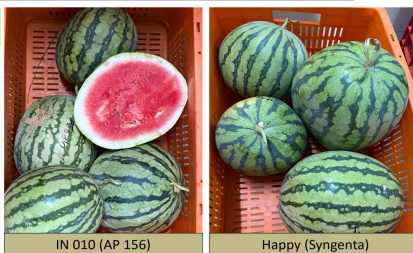
Field	Variety	Sowing 28-03-2019	Substrate (L1) Greenhouse Corvidona (MC) Open field	Transplant : 06-05-2019		Transplant : 03-05-2019		Evaluation : 23-07-2019		Vote	Vote	Remarks		
				Shape	Sham.skin	Diam.skin	Flesh Colour	Flesh	#Bov				#Bov	Weight
1	AA006	Asahi Myako	ring	4	4	3.5	4	13	0.2	5.5	4.0	2.8	2.8	Light coloured Ashi Myako type. Not for Italy
2	AA013	Asahi Myako mini	mid/nd	2	2	3.0	3.0	10.0	0.1	3.75	5.4	3.0	2.0	Not Bona / Not top Thick skin. See flesh. low yield
3	IG059	Crimson mini micro seeds	mid/nd	5	4.5	4.5	4.5	9.5	0.5	2.05	3.1	4	3.5	Water skin than 5. Small seeds. Not ripe
4	IG053	Asahi Myako mini	mid/nd	3.0	4.0	3.5	3.5	11	0.1	2.5	4.0	4	4	Rather pale skin but nice appearance. Small seeds & white seeds
5	IG052	Crimson mini microseeds	nd	4.5	4	4	4	8	0.1	1.95	2.3	4	4	High yield. Not external colour. More seeds. Not ripe
6	IG053	Asahi Myako mini micro seeds	mid/nd	4.0	4.0	4.0	4.0	9	0.0	2.20	2.3	4	4	Should be a bit smaller sized. Micro seeds. High yield
7	IG004	Sugar Baby mini seedless	mid/nd	4	4	4	4	12.5	0.0	2.0	4.1	4	4	Not good size. Uniform high yield. Not ripe
8	IG005	Sugar Baby mini seedless	mid	3.0	3.5	4	4	12.0	0.1	5	3.96	4	4	Larger sized than Sugar Baby. High yield. Small market in Italy. Seems to be needed for local market. Not ripe before 10/08/19
9	IG006	Asahi Myako mini seedless	mid	4	4	4	4	11	0.0	3.20	4.2	4	1	Dark Crimson/Ashi Myako. Too lack. Too ripeness. Not Dark Ashi Myako
10	IG007	Asahi Myako mini seedless	mid/nd	5	5	4.5	4.5	12	0.1	3.05	4.2	4	4	Not Ashi Myako skin. White empty seeds. High yield. Not ripe
11	IG008	Sugar Baby mini seedless	mid	4.5	4.5	4	4	13	0.2	4.3	4.5	4	4.5	High Brix / Good internal quality. Too large sized for seedless. High yield. Uniform
12	IG009	Asahi Myako mini seedless	mid/nd	4	4	4	4	13	0.1	3.30	3.8	4	4	Rather high yield. Very nice internally. White empty seeds

vote (1-5) 1-3 = to drop 3.5 = reject 4-5 = selected for large trials



그림 22 독일 3차년도 현지 시험 작황조사

Selected IN 010 in seedless segment against Happy from Syngenta		
Particular	IN 010	Happy(Syngenta)
Segment	Seedless	Seedless
Flesh Colour	Red	Red
Fruit size (Kg)	2.5kg	3-4kg
Fruit Shape	High Round	High Round
Skin Pattern	Jubilee	Jubilee
TSS (%)	10%	10%
Disease Resistance	Anthraxnose, Powdery Mildew (Intermediate)	-
Advantage	Easy setting & High yield	Easy setting & High yielding



Seeded Varieties

Particular	IN 015	IN 016	IN 012
Flesh Colour	Deep red	Deep Red	Deep Red with excellent internal flesh
Fruit size (Kg)	3-4kg	4kg	3-4kg
Fruit Shape	Oblong	Oblong	Oblong
Skin Pattern	Dark crimson	Black skin	Black skin
TSS (%)	10.5%	7%	9%



Less Seeded Varieties

Particular	IN 009	IN 013	IN 011	IN 017
Flesh Colour	Red	Deep Red	Deep Red	Red
Fruit size (Kg)	2-3kg	4-5kg	3-4kg	3-4kg
Fruit Shape	Round	Round	Oblong	Round
Skin Pattern	Jubilee stripe	Jubilee Stripe	Dark Skin	Jubilee Stripe
TSS (%)	10%	7%	7%	11%
Remarks	High setting, thin skin	Anthraxnose tolerant, high female flowers	Anthraxnose, Powdery Mildew tolerance	Good flesh texture



그림 23 그림 23 4차년도 인도 해외 시험포 현지 작황조사 결과

(3) 홍보역량 강화
 (가) 국내외 전시포
 ① 국외 전시포

연차	구분	설치일자 (계약시작일자)	계약종료일자	설치지역	비고
1 차년	해외	2017 년 1 월	2017 년 4 월	중국 북경	해외 전시포
2 차년	해외	2018 년 6 월	2018 년 9 월	태국 서코타이	해외 전시포
4 차년	해외	2020 년 6 월	2020 년 7 월	미국 캘리포니아	해외 전시포



그림 24 중국 1차년 해외 전시포, 중국 H사 농장



그림 25 중국 2차년 해외 전시포, 중국 H사 농장

'21년 미국 옥스나드 품종 전시포 중간보고

보고자 : 솔라늄네트웍스, 6.18

□ 개요

- 대상작물 및 재배시기 : 멜론·수박·참외·호박, 3월 ~ 7월(5개월)
- 출품내역 : 3업체 4작물 33품종

번호	업체	작물수	품종수	작물 내역			
				멜론	수박	참외	호박
계	3업체	4작물	33품종	8	18	3	4
1	파트너	1	9	-	9	-	-
2	아시아	4	22	6	9	3	4
3	잠순	1	2	2	-	-	-

○ 재배지 주소 및 면적 : 미국 캘리포니아 2,574㎡ (780평)
 - Monero valley(650평, 참외·수박·멜론), ontario(100, 호박), Chino(30, 호박)

○ 현지 재배관리인 : 락용운(Secplus)

□ 내용

- 파종 및 정식 : 3. 7 ~ 3.27/4. 30 ~ 5. 3.
- 주요 생육상황 : 양호한 생육을 보임
 - (생육환경) 월평균 최고기온(25℃), 최저기온(12℃) 및 평균강수량(12.65mm)이 출품품종의 생육에 적당하며, 현재까지 이상기후 등 발생 없음
 - (생육상태) 3지역 포장의 작물생육상태는 매우 양호하며, 정식후 활착이 정상적으로 진행되고 있음(고사주 없음)
 - (특이사항) 파트너종묘의 출품 수박품종 일부가 발아세 및 발아율이 다소 낮았으나 정상 생육 중
- 코로나19 상황 : 코로나19 백신접종'으로 사업추진에 영향은 없음
 - 미국 내 성인 백신접종률 : 46%(1차접종, 5월30일 현재)

□ 향후 계획

- 출품품종의 지속적인 생육관리 실시, 해외현지바이어를 초청하여 출품품종의 생육평가 및 홍보 실시 예정
 - 생육평가(예정) : 7월 5일 ~ 8일

참고 미국 옥스나드 품종전시포 사진

포장조성(4.10) 파종(3.7~3.27) 및 육묘

참외, 수박, 멜론 정식(4.30-5.3) 호박 정식(4.30-5.3)

수박(6.13) 호박(6.13)

* 별첨 : 재배포장 및 생육상황 동영상자료(6.14)

그림 26 미국 4차년 해외전시포, 미국 캘리포니아

② 국내 전시포

연차	구분	설치일자 (계약시작일자)	계약종료일자	설치지역	비고
4 차년	국내	2020 년 8 월	2020 년 10 월	전북 김제	중자산업 진흥센터
5 차년	국내	2021 년 8 월	2020 년 11 월	전북 김제	중자산업 진흥센터



그림 27 김제 국제중자박람회 전시포 출품

(나) 종자교역회 참여

① APSA

2017, 2018, 2019 APSA(Asia Pacific Seed Association)참여

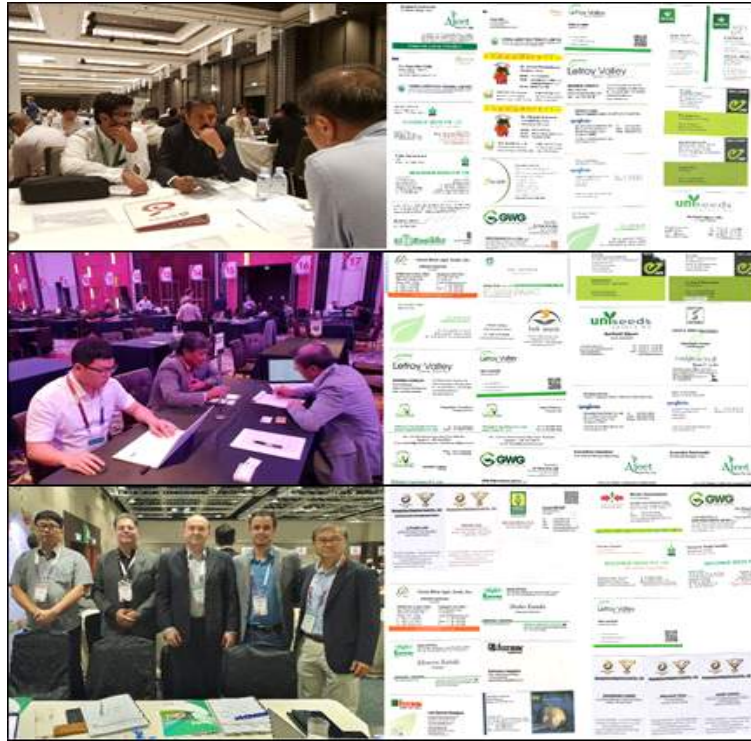


그림 28 APSA 회의 참석-해외바이어 미팅 및 신규고객 발굴

② 김제 국제종자박람회

2019, 2020, 2021 김제 국제종자박람회 참여, 전시포 출품 및 해외바이어 미팅 실시.



그림 29 김제국제종자박람회 전시포출품, 2019년 코트라(KOTRA) 연계 해외바이어 미팅

다. 매출 및 수출

(1) 국내 매출

표 20 GSP 2단계 국내매출내역(천원)

연차	목표 매출액	국내 매출액	달성율
1 차년	50,000	160,664	321.3 %
2 차년	100,000	150,208.3	150.2 %
3 차년	150,000	274,067	182.7 %
4 차년	200,000	1,006,215	503.1 %
5 차년	250,000	1,091,919	436.8%
계	750,000	26,830,643	357.7%

(2) 국외 수출

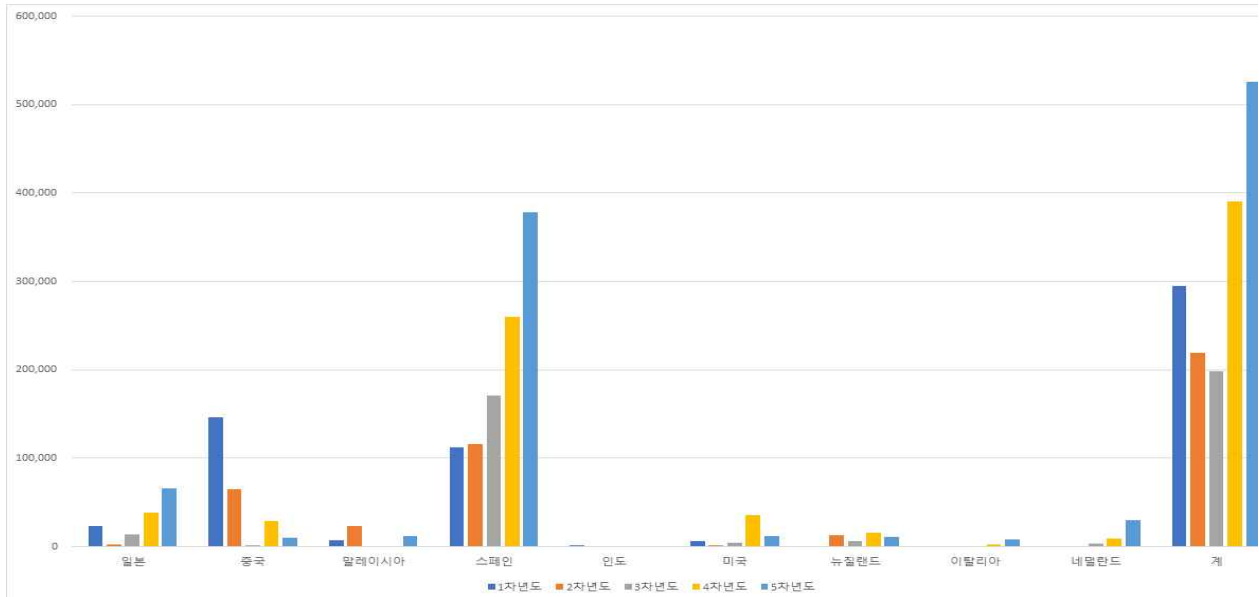


그림 30 수출국가 연차별 판매실적(\$)

표 21 GSP 2단계 수출국가 연차별 상세내역(\$)

국가	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도
일본	23,331	2,518	13,564	38,633	65,670
중국	145,759	64,637	900	28,900	9,600
말레이시아	6,600	23,400	0	0	12,160
스페인	112,500	115,500	170,750	260,215	377,900
인도	438	0	0	0	0
미국	6,000	400	3,850	35,794	11,597
뉴질랜드	0	12,400	6,020	15,555	11,169
이탈리아	0	0	0	2,100	48,704
네덜란드	0	0	3,640	8,865	29,551
계	294,627	218,854.5	198,724	390,062	566,351

표 22 GSP 2단계 수출내역 목록

수출번호	연차	품목	수출일	수출국가	수출액(달러)	구분
001	1차년도	수박	2017-01-13	일본	6,300	호피 대과종 씨없는 수박
002	1차년도	수박	2017-03-20	중국	51,303	씨적은 수박
003	1차년도	수박	2017-06-15	중국	3,720	소과종 씨없는 수박
004	1차년도	수박	2017-07-15	중국	20,250	씨적은 수박
005	1차년도	수박	2017-09-08	말레이시아	6,600	오렌지과육 수박
006	1차년도	수박	2017-11-01	중국	35,678	씨적은 수박
007	1차년도	수박	2017-11-08	중국	34,808	씨적은 수박
008	1차년도	수박	2017-11-10	일본	17,031	씨없는 수박
009	1차년도	수박	2017-11-10	스페인	112,500	씨없는 수박
010	1차년도	수박	2017-11-25	인도	438	씨없는 수박
011	1차년도	수박	2017-12-08	미국	6,000	씨없는 수박
012	2차년도	수박	2018-04-06	말레이시아	6,600	오렌지과육 수박
013	2차년도	수박	2018-04-13	중국	37,865	씨적은 수박
014	2차년도	수박	2018-05-30	뉴질랜드	4,900	고라이코핀함량 수박
015	2차년도	수박	2018-07-12	미국	400	소과종 씨작은 수박
016	2차년도	수박	2018-07-23	중국	25,871	씨적은 수박
017	2차년도	수박	2018-08-16	뉴질랜드	5,500	고라이코핀함량 수박
018	2차년도	수박	2018-09-20	스페인	115,500	소과종 씨작은 수박
019	2차년도	수박	2018-09-28	일본	2,518	소과종 씨작은 수박
020	2차년도	수박	2018-10-16	뉴질랜드	2,000	고라이코핀함량 수박
021	2차년도	수박	2018-12-10	말레이시아	16,800	씨적은 수박
022	2차년도	수박	2018-12-20	중국	900	씨적은 수박
023	3차년도	수박	2019-01-17	스페인	24,750	씨없는 수박
024	3차년도	수박	2019-05-23	미국	3,850	씨없는 수박
025	3차년도	수박	2019-04-04	중국	900	씨적은 수박
026	3차년도	수박	2019-08-28	뉴질랜드	6,020	고라이코핀함량 수박
027	3차년도	수박	2019-09-27	스페인	114,000	씨없는 수박/소과종 수박
028	3차년도	수박	2019-11-07	일본	880	고라이코핀함량 수박
029	3차년도	수박	2019-11-07	네덜란드	3,640	소과종 수박
030	3차년도	수박	2019-11-08	일본	6,144	씨적은 수박
031	3차년도	수박	2019-11-21	일본	6,540	씨적은 수박
032	3차년도	수박	2019-12-17	스페인	32,000	씨없는 수박
033	4차년도	수박	2020-01-17	네덜란드	1,290	씨적은 수박
034	4차년도	수박	2020-01-28	네덜란드	975	씨적은 수박
035	4차년도	수박	2020-01-31	스페인	37,500	씨없는 수박
036	4차년도	수박	2020-02-04	미국	1,300	씨없는 수박
037	4차년도	수박	2020-02-12	미국	6,000	씨적은 수박
038	4차년도	수박	2020-02-12	일본	11,349	씨없는 수박
039	4차년도	수박	2020-03-31	미국	15,200	씨없는 수박
040	4차년도	수박	2020-09-08	뉴질랜드	6,030	씨없는 수박
041	4차년도	수박	2020-09-25	네덜란드	2,500	소과종 수박
042	4차년도	수박	2020-10-06	일본	7,976	소과종 수박
043	4차년도	수박	2020-10-15	일본	16,800	씨적은 수박
044	4차년도	수박	2020-10-16	스페인	136,000	씨없는 수박
045	4차년도	수박	2020-10-21	이탈리아	2,100	씨없는 수박
046	4차년도	수박	2020-10-21	네덜란드	4,100	소과종 수박

047	4차년도	수박	2020-10-30	뉴질랜드	9,525	씨없는 수박
048	4차년도	수박	2020-11-06	중국	6,400	저온기 수박
049	4차년도	수박	2020-11-12	미국	4,494	씨없는 수박
050	4차년도	수박	2020-11-25	스페인	86,715	씨없는 수박
051	4차년도	수박	2020-12-03	일본	2,508	씨없는 수박
052	4차년도	수박	2020-12-09	미국	8,800	씨없는 수박
053	4차년도	수박	2020-12-17	중국	22,500	씨적은 수박
054	5차년도	수박	2021-02-25	스페인	54,000	씨없는 수박
055	5차년도	수박	2021-03-03	네덜란드	3,172	씨적은수박
056	5차년도	수박	2021-03-04	일본	5,670	씨없는 수박
057	5차년도	수박	2021-03-10	스페인	12,000	씨없는 수박
058	5차년도	수박	2021-03-25	네덜란드	5,004	씨적은수박
059	5차년도	수박	2021-03-25	미국	6,000	씨없는 수박
060	5차년도	수박	2021-05-13	미국	1,797	씨없는 수박
061	5차년도	수박	2021-05-18	중국	9,600	씨적은수박
062	5차년도	수박	2021-06-17	뉴질랜드	11,169	씨없는 수박
063	5차년도	수박	2021-07-12	말레이시아	12,160	씨적은수박
064	5차년도	수박	2021-07-23	미국	3,800	씨없는 수박
065	5차년도	수박	2021-09-17	스페인	231,400	씨없는 수박
066	5차년도	수박	2021-09-17	일본	60,000	씨적은수박
067	5차년도	수박	2021-09-30	네덜란드	21,375	씨적은수박
068	5차년도	수박	2021-10-13	이탈리아	7,936	씨없는 수박
069	5차년도	수박	2021-11-11	스페인	80,500	씨없는 수박
070	5차년도	수박	2021-12-00	이탈리아	40,768	씨없는 수박

2. 기술적 성과 및 경제적 성과 연구내용

가. 기술적 성과

(1) 복합내병성 고당도 내병성 씨없는 수박 계통 및 품종 개발

(가) 계통육성

① 2배체 계통 육성

당사에서는 보유중인 우량계통과 야생자원의 유용형질의 도입을 통한 계통육성을 실시했다. 2단계 연구개발 진행과정동안 주요형질을 포함한 계통들에 대한 고정을 진행하였으며, 5차년도에 보유중인 주요 102계통에 대한 품종관별마커를 이용하여 각 계통의 고정도 확인 및 유연관계를 확인하였다. GSP 2단계 기간 동안 확보한 주요계통은 아래의 표와 같으며, 품종관별마커결과를 토대로 각 계통간의 새로운 유용형질 조합을 작성하기 위하여 phylogenetic tree 작성을 실시하여 아래의 그림과 같이 작성하였다. 당사에서 보유하고 있는 우량계통이 보유하고 있는 유용형질들은 상호진좌계통, 절성, 바이러스와 곰팡이 내병성, 기능성물질 고함량 등이 있으며, 이는 현재 전 세계 육종회사에서 보유계통들과 비교하였을 때, 최고수준에 육박한 것으로 판단된다.

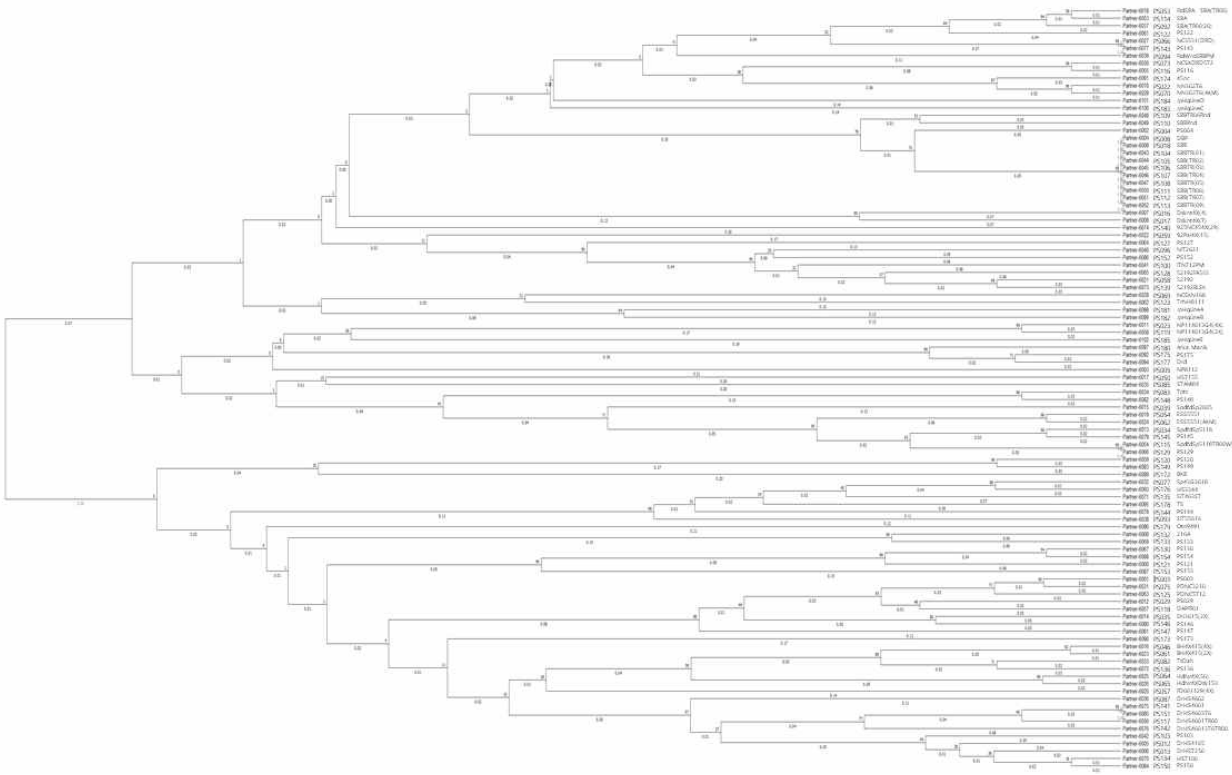


그림 31 102개 우량계통에 대한 Phylogeny tree

표 23 파트너종묘 보유 102개 우량계통 목록

연번	Serial No.	Variety No.	Variety name
1	6001	PS003	PS003
2	6002	PS004	PS004
3	6003	PS005	NP8112
4	6004	PS008	DBP
5	6005	PS012	DrHS4105
6	6006	PS013	DrHS7250
7	6007	PS016	Dsknt4X(4)
8	6008	PS017	Dsknt4X(7)
9	6009	PS018	SBB
10	6010	PS022	NN30276
11	6011	PS023	NP114013G4(4X)
12	6012	PS029	PS029
13	6013	PS034	SpdfdSp5118
14	6014	PS035	SN3615(2X)
15	6015	PS039	SpdfdSp2005
16	6016	PS046	BH4X415(4X)
17	6017	PS050	HS7155
18	6018	PS053	FsdSBA, SBA(TR00)
19	6019	PS054	ESS5551
20	6020	PS057	FD061129(4X)
21	6021	PS058	52192
22	6022	PS059	92Pal4X(15)
23	6023	PS061	BH4X415(2X)
24	6024	PS062	ESS5551(AKM)
25	6025	PS064	HdNc4X(56)
26	6026	PS065	HdNc4XDsk153
27	6027	PS066	NC3531(DRD)
28	6028	PS069	NCSKN168
29	6029	PS070	NN30276(AKM)
30	6030	PS073	NCSKDRD572
31	6031	PS075	PDNC3210
32	6032	PS077	Sp43G3018

연번	Serial No.	Variety No.	Variety name
33	6033	PS082	TsDah
34	6034	PS083	Tpts
35	6035	PS085	STAM84
36	6036	PS087	DrHS4602
37	6037	PS092	SBA(TR00:20)
38	6038	PS093	SIT55616
39	6039	PS094	FsdWnsSBBPM
40	6040	PS096	NIT2621
41	6041	PS100	ITN712PM
42	6042	PS103	PS103
43	6043	PS104	SBBTR(01)
44	6044	PS105	SBB(TR02)
45	6045	PS106	SBBTR(03)
46	6046	PS107	SBB(TR04)
47	6047	PS108	SBBTR(05)
48	6048	PS109	SBBTR06Rnd
49	6049	PS110	SBBRnd
50	6050	PS111	SBB(TR06)
51	6051	PS112	SBB(TR07)
52	6052	PS113	SBBTR(09)
53	6053	PS114	SBA
54	6054	PS115	SpdfdSp5118TR00WS
55	6055	PS116	PS116
56	6056	PS117	DrHS4601TR00
57	6057	PS118	DAPFF01
58	6058	PS119	NP114013G4(2X)
59	6059	PS120	PS120
60	6060	PS121	PS121
61	6061	PS122	PS122
62	6062	PS123	TcNH8111
63	6063	PS125	PDNC5712
64	6064	PS127	PS127
65	6065	PS128	52192FA533

연번	Serial No.	Variety No.	Variety name
66	6066	PS129	PS129
67	6067	PS130	PS130
68	6068	PS132	216A
69	6069	PS133	PS133
70	6070	PS134	HS7100
71	6071	PS135	SIT463ST
72	6072	PS136	PS136
73	6073	PS139	52192BLSK
74	6074	PS140	925NC454X(29)
75	6075	PS141	DrHS4601
76	6076	PS142	DrHS4601376TR00
77	6077	PS143	PS143
78	6078	PS144	PS144
79	6079	PS145	PS145
80	6080	PS146	PS146
81	6081	PS147	PS147
82	6082	PS148	PS148
83	6083	PS149	PS149
84	6084	PS150	PS150
85	6085	PS151	DrHS460376
86	6086	PS152	PS152
87	6087	PS153	PS153
88	6088	PS154	PS154
89	6089	PS172	BKB
90	6090	PS173	PS173
91	6091	PS174	45nc
92	6092	PS175	PS175
93	6093	PS176	HS3344
94	6094	PS177	Drd
95	6095	PS178	TS
96	6096	PS179	Oto9491
97	6097	PS180	Arka Manik
98	6098	PS181	JpHgLineA
99	6099	PS182	JpHgLineB
100	6100	PS183	JpHgLineC
101	6101	PS184	JpHgLineD
102	6102	PS185	JpHgLineE

② 4배체 계통 육성

당사에서 보유중인 배수체 유기 기술을 이용, 3배체 씨없는 수박을 개발하기 위하여 우량 2배체 계통을 이용하여 4배체 계통유기를 실시하였다. 3배체 씨없는 수박에 사용되는 모,부분의 계통화 작업을 위해 2배체 우량계통의 조사 데이터를 기반으로 화학적 4배체 유기방법을 통해 씨없는 수박 품종의 4배체 모계 계통 육성을 진행하였다. 4배체화가 되어 수확된 종자는 수확시 종자의 크기, 생성종자의 수 등을 기준으로 정상 4배화를 확인하였고, 자가수정을 통하여 기존 2배체 계통에서 보유하였던 형질의 고정도를 확인하였다. GSP 2단계 기간동안 총 52개의 2배체 계통을 이용하여 233개의 T0을 선발하여 3배체 씨없는 수박개발을 위한 4배체 계통개발을 완료하였다. 4배체유기가 완료된 후의 선발개체는 자가수분을 통해 그 유전형질을 고정시킴으로서, 추후 3배체 F1작성의 모계로 사용되고 있다.

표 24 GSP 2단계 4배체 유기 목록

연차	Plot	T0 선발수	육색	과형	과피	과중	장점
1차년	2401	5	황육	원형	호피	소과중	흑피 ,소과중
1차년	2402	5	적육	원형	호피	대과중	재배안정성 우수
1차년	2403	2	적육	원형	크림슨	대과중	크림슨과피
1차년	2404	3	적육	원형	흑피	대과중	흰가루내병계
1차년	2405	5	적육	원형	호피	대과중	흰가루내병계
1차년	2406	9	적육	원형	호피	대과중	흰가루내병계
1차년	2407	3	적육	원형	호피	대과중	고함량 라이코핀
1차년	2408	3	적육	원형	호피	대과중	흰가루내병계
1차년	2409	4	적육	원형	호피	대과중	고함량 라이코핀
1차년	2410	3	적육	원형	호피	대과중	흰가루내병계
1차년	2411	2	적육	원형	호피	대과중	흰가루내병계
1차년	2412	3	적육	원형	호피	대과중	고함량 라이코핀
1차년	2413	5	적육	원형	호피	대과중	흰가루내병계
1차년	2414	5	적육	원형	호피	대과중	대과중
1차년	2415	6	적육	원형	호피	대과중	대과중
2차년	2301	6	적육	원형	호피	대과중	흰가루내병계
2차년	2302	2	적육	원형	흑피	대과중	흑피, 종자생산성우수
2차년	2303	5	적육	타원형	호피	대과중	타원형계 4배체
2차년	2304	5	적육	원형	호피	대과중	흰가루내병계
2차년	2305	6	적육	원형	호피	대과중	흰가루내병계
2차년	2306	10	적육	원형	흑피	소과중	고당도 흑피, 고함량 라이코핀

3차년	1501	3	적육	원형	호피	대과중	흰가루내병계
3차년	1502	3	적육	원형	호피	대과중	흰가루내병계
3차년	1503	1	적육	원형	호피	대과중	과형안정
3차년	1504	5	적육	원형	호피	대과중	고함량 라이코핀
3차년	1505	4	적육	원형	호피	대과중	고당도
3차년	1506	4	적육	원형	호피	대과중	흰가루내병계
3차년	1507	3	적육	원형	호피	대과중	흰가루내병계
3차년	1508	3	적육	원형	흑피	소과중	복합내병계
3차년	1509	3	적육	원형	흑피	소과중	고당도
3차년	1510	10	적육	원형	호피	대과중	흰가루내병계
3차년	1511	4	적육	원형	호피	대과중	조기용
4차년	1701	5	적육	원형	무지	대과중	흰가루, 탄저병 내병계
4차년	1702	6	적육	원형	흑피	대과중	흑피, 흰가루, 탄저병 내병계
4차년	1703	4	적육	원형	크림슨	대과중	흰가루, 바이러스내병계
4차년	1704	3	적육	원형	호피	대과중	흰가루, 바이러스내병계
4차년	1705	5	적육	원형	크림슨	대과중	흰가루, 바이러스내병계
4차년	1706	6	적육	원형	호피	대과중	부름있음, 흰가루내병계
4차년	1707	4	적육	원형	호피	대과중	고함량 라이코핀
4차년	1708	4	적육	원형	호피	대과중	고함량 라이코핀
4차년	1709	2	적육	원형	호피	대과중	고함량 라이코핀
4차년	1710	7	적육	원형	호피	대과중	고함량 라이코핀
4차년	1711	4	적육	원형	호피	대과중	고함량 라이코핀
4차년	1712	5	적육	원형	호피	대과중	고함량 라이코핀
4차년	1713	3	적육	원형	호피	대과중	고함량 라이코핀
4차년	1714	7	적육	원형	호피	대과중	고함량 라이코핀
4차년	1715	5	적육	원형	호피	대과중	고함량 라이코핀
4차년	1716	5	적육	원형	호피	대과중	고함량 라이코핀
4차년	1717	5	적육	원형	호피	대과중	고함량 라이코핀
4차년	1718	3	적육	원형	호피	대과중	흰가루 내병계
4차년	1719	4	적육	원형	호피	대과중	흰가루 내병계 부름없음
4차년	1720	6	적육	원형	흑피	대과중	흑피, 부름없음

(나) 복합내병성 형질 도입

① 마커개발 집단양성

2세부 프로젝트와 협력하여 분자마커개발연구를 실시하였다. 2단계 내병성 목표형질인 내병성(덩굴마름병, WMV2)에 대한 분자마커개발을 위하여 집단양성을 실시하였다. 덩굴마름병집단은 TS x PI189225, PI189225 x TS 각각 분리 집단을 작성하고, 저항성 및 감수성 pool을 이용한 BSA-seq을 위한 집단전개를 실시하였다. 이후 PI189225보다 강한 저항성 계통을 야생자원에서 선발하여 CAU-27667으로 명명하고, CAU-267 x SBA F2:3집단을 양성하여 수박덩굴마름병에 대한 분자마커를 개발하기 위하여 2세부프로젝트 제공하였다. WMV2(Watermelon Mosaic Virus 2)에 대한 병저항성 분자마커개발을 위해 2세부프로젝트에서 야생자원스크리닝 결과 R019가 가장 높은 저항성을 보였으며, 이에 따라 당사에서는 저항성 계통 R019와 감수성 계통 PS018을 이용하여 F2집단을 작성하여 2세부프로젝트기관에 제공하였다.

② 분자마커 선발육종

당사에서는 보다 빠른 육종을 위하여 28개의 마커를 이용하여 유묘기 선발을 통한 MAS(Marker Assistant Selection)을 진행하고 있다. 보유하고 있는 유용형질에 대한 분자마커는 SNP marker형태로서, 기존 2차년도까지 2세부프로젝트와 협력하여 HRM analysis를 통해 마커선발을 진행하였으며, 당사가 전북 김제시 민간육종단지에서 이전 후 3차년도부터 현재 농업기술실용화재단 종자산업진흥센터에서 probe-type형태의 마커로 제작하여 분석에 이용하고 있다. 종자산업진흥센터에서 사용하고 있는 대용량 자동화 샘플 전처리 시스템과 자동화 유전자분석시스템(Douglas Scientific LLC 사의 Nexar시스템)을 통하여 유묘기에 샘플채취후 약 2주안에 5천개의 data point 이상을 확보할 수 있는 분석방법을 통해 선발육종을 실시하고 있다. 대용량 분자표지 시스템이 정착된 이후 연간 약 15,000의 data point를 확보하고 있으며, 신규 형질에 대한 마커가 개발됨에 따라 활용도가 증가하고 있다. 당사에서 육종에 사용하고 있는 유전형 분석방법은 전 세계에서 사용할 수 있는 분석방법중 최고수준이며, 이후 개발중인 유전자교정기술을 이용한 유용형질도입이 차후 육종체계에서 필요할 것으로 판단된다.

[기술개발로 농산업 활로 개척한다 | 농업기술실용화재단 첨단육종기술서비스 지원] 종자개발 위해 분자표지 분석 서비스

세계적 시스템 3종 개발
 영세 종자기업 기술지원
 2021-11-18 11:30:09 게재

식량주권 확보를 위한 종자전쟁이 치열해지고 있다. 하지만 국내 종자기업들은 연구 개발(R&D)에 선뜻 나서지 못한다. 국내 종자기업 중 신품종 개발에 투자하는 것은 23.6%에 불과하다. 이 때문에 국내 종자기업들은 시설장비 임대와 육종관련 교육 등 정부지원을 희망하고 있다.

이에 따라 농업기술실용화재단 종자산업진흥센터는 국내 종자기업 첨단육종을 지원하기 위해 분자표지 분석서비스를 제공하고 있다. 분자표지는 작물의 주요 특성을 결정하는 유전자를 구분하는 지표다. 코로나19도 바이러스 분자표지로 진단한 다.

종자산업진흥센터는 50억원을 들여 세계적 수준의 분석 시스템 3종을 구축했다. 자동화 DNA 추출 시스템, 대량 유전자 분석 시스템, 초고속 유전자 분석 시스템이다. 농촌진흥청과 대학 등에서 고추 배추 등 17개 작물에서 병저항성 관련 분자표지 6300여개를 기술이전 받았다. 다양한 작물을 분석가능해 종자기업들이 편리하게 종자 개발에 나서는 환경이 조성된 것이다.



종자개발 지원을 받아 파트너종묘가 개발한 스마트팜용 달코미 미니수박.

2017년 5월 분석 이후 올해 10월까지 국내 종자기업 및 연구기관에 총 584건, 158만 점을 분석해줬다. 하루도 쉬지 않고 매일 약 1000점을 분석해야 달성 가능한 수치다.

올해도 10월까지 전년 대비 의뢰건 기준 11%, 분석점수 16%를 초과해 연말에는 30% 초과달성이 예상된다. 농촌진흥청 등으로부터 7건의 기술이전을 통해 호박 토마토 등 6작물 975개 분자표지를 신규로 확보했다.

종자산업진흥센터는 최근 농생명 빅데이터, 인공지능을 활용하여 고부가가치 품종을 신속하게 개발하는 디지털육종에 대응하기 위해 농식품부로부터 '디지털육종 전환지원사업'을 시행해 국내 종자기업 31개사를 모집해 지원한다.

내년에는 디지털육종에 많이 활용되는 여교배 분석을 확대·강화해 종자기업 품종개발 기간이 단축될 것으로 기대된다. 여교배 분석은 반복적인 교배를 통해 기존 품종에 새로운 특징(내병성 등)을 추가하는 육종방법으로, 전통적으로는 6~7세대가 소요되나 유전자 분석으로 절반으로 줄일 수 있다.

파트너종묘는 스마트팜용 수박 육종기술을 개발했다. 스마트팜 재배에 적합한 수박 개발을 위해 디지털육종 기술을 활용한 자사 고유 분자표지 개발을 희망해 실용화재단을 통해 디지털육종 전환사업을 지원받았다. 스마트팜 재배용 '달코미 미니 수박'이 충북 수박연구소 실증을 통해 우수 품종으로 선발, 국내와 해외에 보급되고 있다.

김용재 파트너종묘 대표는 "수박 개발에는 육종가의 실력과 더불어 분자표지의 개발과 활용이 매우 중요하다"며 "중소 종자기업에서는 대규모 유전자 분석시설 구축과 디지털 데이터 분석에 대한 투자가 쉽지 않지만, 디지털육종 전환지원사업을 통해 그동안 개발하고 싶었던 스마트팜에 적합한 수박을 선발하는 분자표지를 생략보다 짧은 기간에 개발할 수 있었다"고 밝혔다.

김성배 기자 sbkim@naeil.com

그림 32 2021년 파트너종묘 분자표지 현장실용화 관련 기사

(2) 섭취/가공용이성 높은 씨적은 수박 계통 및 품종 개발

(가) 씨저근/씨자근 계통 및 품종 개발

① 염색체 상호전좌

당사에서는 세계최고수준의 씨없는 3배체 수박과 더불어 2배체의 씨가 거의 없어 3배체의 특성을 가진 수박품종개발에 힘을 쏟아왔다. 3배체 수박의 경우 씨가 없고 초세가 강하여 혹서기에 버팀성과 식용이 편하다는 장점이 있는 반면, 수분수를 따로 심어 관리해야하며, 특히 생산성에 가장 큰 어려움이 있다. 3배체수박생산의 경우 4배체와 2배체의 교배를 통해 생산되며, 가장 큰 단점인 생산수량이 일반 2배체수박에 비해 1/10수준이라는 것이 치명적인 단점이다. 이에 염색체 구조변이(상호전좌)를 이용한 씨적은 수박 품종개발 연구를 실시하였다. 당사에서는 1단계에서부터 상호전좌를 이용한 염색체 구조변이를 통하여 인위적인 임성의 감소를 야기하는 기술을 연구해왔다. 인위적인 구조변이는 당사에서 보유중인 우량계통 PS018을 이용하여 진행하였다. 수박 종자에 대한 방사선 처리를 통하여 진행되었으며, 한국원자력연구원 첨단방사선연구소(정읍)에서 이루어졌으며, 플라스틱 용기(28 x 20 x 8 cm³)를 준비하여 수박종자 12,000립(약 500g)을 담고, Co-60 Gamma-ray를 이용한 고준위감마선을 총 선량 1,000 Gy로하여 24시간동안 처리하였다. 확보된 방사선처리종자(TR0세대)에대한 상호전좌의 규명과 이를 유지하기 위하여, 처리된 종자를 자가수분하여 각기다른 계통으로 상호전좌계통을 확보하였으며, TR3세대이후 확보된 상호전좌 계통들의 상이성 확인을 진행하였다.

표 25 상호전좌 세트별 상호작용

	TR00:Fsd	TR01	TR02	TR03	TR04
TR00:Fsd					
TR01	이질				
TR02	이질	이질			
TR03	이질	이질	이질		
TR04	이질			이질	
TR05	이질				
TR06	이질				
TR07	이질				
TR09	이질	이질	이질		이질
TR10					
TR11	이질				
TR20:Sg기	이질	이질	이질	이질	이질

위의 표와 같이 현재까지 당사에서 보유하고 있는 전좌세트에 대한 상호이질성 파악결과이며, 현재까지 파악된 계통들을 이용하여 씨적은 수박품종개발사용하여 아래와 같이 씨적은 수박품종개발을 진행하였다. L4, L5 조합까지 작성 중에 있으며 작성된 조합중 L4의 경우 일반수박대비 약 9.8%정도 수준의 종자생성이 되는 것을 확인하였다. 현재까지 국·내외에서 상호전좌 염색체 구조변이를 이용한 연구는 진행되고 있지만 씨적은 수박이라는 특성을 가지고 특히 국내에서는 품종이 개발된 사례는 없어 씨적은 수박 품종개발에서 당사보유 기술이 최고수준이라 판단된다.



그림 33 일반수박(좌) L4수박(우) 단면 종자량 비교



그림 34 L4 조합 특성검정 (1418)

표 26 L4 계통 선발, 조합 특성 검정

번호	전좌	과중 (kg)	당도 (brix)	비대	균일	단면종자 1;다,5;적	평균 종자량(립)	호피	배수성
1401	L0	7.2	10	5	5	1	616	호피	2n
1402	L2	7.6	11.7	6	6	3	238	후피	2n
1403	L3	7.1	10.4	5	5	3	152	호피	2n
1404	L4	7.8	11.4	6	4	2	510	호피	2n
1405	L4	7.4	10.8	5	4	4	248	호피	2n
1406	L4	8.0	11	6	6	3	205	후피	2n
1407	L4	8.2	11.6	7	6	3	204	호피	2n
1408	L4	7.8	13	6	6	2	249	후피	2n
1409	L4	7.8	10.8	6	5	3	200	호피	2n
1410	L4	7.6	11.7	6	5	2	470	호피	2n
1411	L4	7.9	10.4	6	6	2	408	호피	2n
1412	L4	6.7	11	4	6	2	228	호피	2n
1413	L4	7.0	10.8	5	4	3	176	후피	2n
1414	L4	7.6	10.8	6	6	3	208	호피	2n
1415	L4	7.3	11	5	5	2	182	호피	2n
1416	L4	8.2	13.3	7	6	3	258	후피	2n
1417	L4	7.6	10.6	6	5	3	222	호피	2n
1418	L4	7.4	11.1	5	5	4	136	호피	2n

② 종자크기

섭식이 용이한 수박품종을 만들 기위하여 씨가 적은 특성과 더불어 과육 섭취시 이물감이 느껴지지 않는 방안으로 씨가 아주 작은 특성에 대한 연구를 진행하였다. 종자크기에 대한 연구는 GSP프로젝트 이전부터 진행하여왔으며, NIL(Near Isogenic Line)을 이용한 종자크기에 연관된 유전자에 대해 분자마커개발을 완료하였고, 이를 이용하여 TS(Tomato Seed), MS(Micro Seed), SS(Small Seed), NS(Normal Seed)의 4가 종자크기에 대한 분류로 선발육종을 실시하였다.

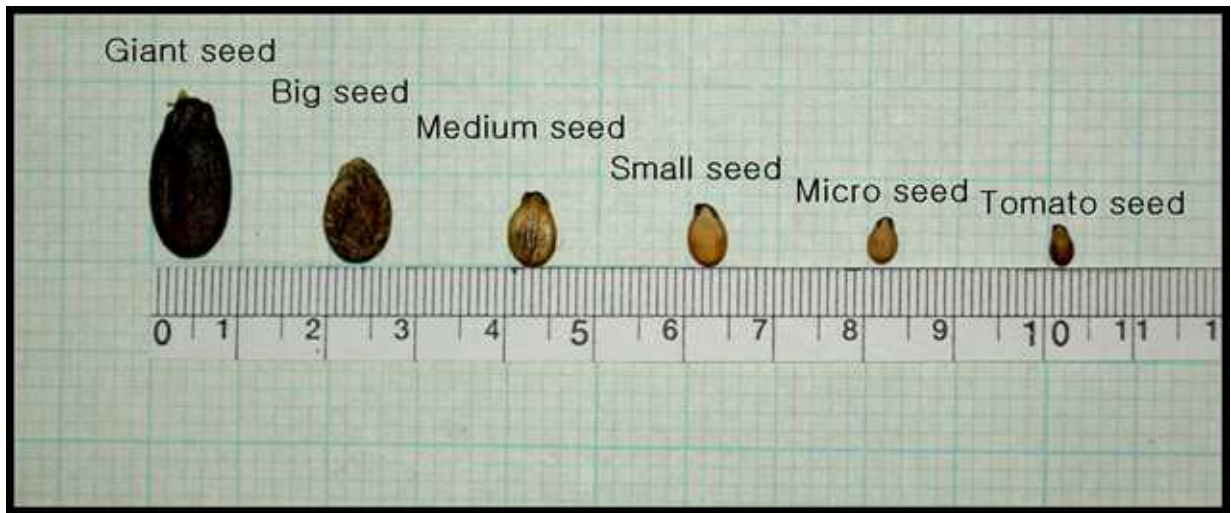


그림 35 종자크기에 따른 분류

종자의 크기에 따라 수확시 과 크기가 결정되는 경향이 있음을 확인하였고, 현재 당사에서는 소과종 수박품종에 MS 수준의 품종을 개발하여 상용판매중이다. 진행 중인 연구에서 TS수준의 종자에 대한 신규조합작성을 실시하고 품종화를 달성할 계획이다. 종자크기와 식물체의 활력 및 과 크기에 영향을 따라 당사에서는 BS와 MS 또는 TS에 대한 F1 조합작성을 통하여 재배적인 관점에서 강한 초세, 안정적인 생육에 관한 연구 또한 진행예정이며, 추후 BS에 대한 마커개발또한 진행할 예정이다.

(나) Fresh-cut용이 과형 계통 및 품종 개발

섭식에 용이하고 이를 가공작업에 편이성을 두기위하여 가공용이 수박품종에 대한 연구를 진행하였다. 수박과육의 가공에 있어서 주요형질을 과육의 상품유지기간 및 물리적 가공작업의 편이성으로 판단하고 과육의 경도 및 과형에 대한 품종개발을 진행하였다. 과육의 경도는 환경의 차이가 크고 계측치에 따른 편차가 커 당사에서는 작황조사에서 가장 단단한 개체를 선발하는 방식으로 고경도 개체를 선발하였다. 가공용이 과형특성에는 구의 형태보다 면의 형태의 재료가 물리적 가공에 용이하므로 과형을 장형의 형태로 집적하는 육종방향을 세우고 품종개발을 실시하였다. 과형의 경우 당사에서 보유중인 과형마커를 이용하여 장타원형의 F1조합작성을 실시하였으며, 추가적으로 고기능성 물질인 라이코펜 함량이 높은 특성을 도입하여 건강보조제의 역할을 첨가하였다. 작성된 F1조합은 5차년도에 성능검정이 실시되었으며, 이를 품종화하기위하여 품종보호출원을 실시하였다.

표 27 가공용이 품종 씨 9077 특성표

품종명	구분	과육색	과중	과형	과피	병저항성
씨 9077	라이코핀 고함량 품종 씨적은품종 (L1)	진한 적색	3-4 kg	장타원형	호피	탄저병 저항성



그림 36 품종보호출원 품종 씨9077

(3) Shuttle breeding을 활용한 연 3세대 세대진전 및 시교/상품 생산

(가) 태국 연 3회 세대진전 시험포 운영

태국에 보유중인 세대진전 및 시험포에서는 연 3회 건기, 여름, 우기 3가지 작형을 이용하여 유용 야생유전자원, 계통에 대한 SSD(Single Seed Descent)를 진행하고 있으며, 마커개발용 집단양성을 위한 시험도 실시중이다. 태국에서는 한작기에 세대진전과 시험집단을 포함하여 약 5,000주정도의 개체를 정식하여 운영중이며, 노지작형에 비점목재배로서 과실의 당도, 과중등의 정확한 실측 형질특성은 파악하기 어려워 종자생산 및 유전적 양상파악에 중점을 두고 있다. 3차년도 코로나발병이후 해외출장에 어려움이 있어, 당사에서는 영상, 현지관측기록, 마커분석을 통하여 육종연구를 진행중이다.



그림 37 태국 콘컨 세대진전 및 시험포

(나) 시교/상품생산 품질관리

① 계통증식 및 시교/상품생산

수출용 상품을 생산하기 위하여 F1품종별 모,부계에 대한 계통증식은 한국 김제 연구소, 태국시험포에서 진행하였다. 생산된 모,부계 원종을 생산회사에 의뢰하여 F1 hybrid 품종을 생산진행하였으며, 주로 태국, 인도, 칠레 등지에서 생산을 진행하였다. 현재 상품생산의 경우 대량 생산을 지원할 수 있는 체계가 한국에서는 비용적인 측면에서 구축되기 어려운 실정이며, 국내·외 종자회사역시 비용적인 면에서 이점이 많은 동남아 지역에서 대부분의 생산이 이루어지고 있다. 칠레의 경우 생산단가가 높은 반면 타 지역에 비해 기후적인 조건이 고온건조하여 최적의 조건을 갖추고 있으며, 생산종자의 발아, 생육 등에서 높은 경향을 보인다. 또한 종자감염 병원성에 대한 위험률이 적어 당사에서는 칠레지역에서의 생산을 지속적으로 유지하고 있는 상태이다.

② 생산종자 품질관리

당사에서는 GSP 프로젝트기간동안 생산회사의 채종지에서 받은 샘플에 대한 품질관리 시스템구축을 진행하였다. 진행중인 품질관리 항목으로 발아검사, 순도·진위검사, 병리검사(Bacteria, Virus)에 대한 품질테스트를 진행하고 있으며, 자체 발아검사로 페트리디쉬 및 상토발아검사를 진행중이며, 출고이전 육묘장 실증발아검사도 함께 진행중이다. 순도·진위검사는 농업기술실용화재단에서 보유중인 품종판별마커를 당사에서 보유중인 계통들에 대해 유효성 검정 후 선발된 마커를 이용하여 진행중이며, 채종된 F1품종 생산에 사용되었던 모,부계에 대한 진위검사를 겸하여 실시중이다. 병리검정에는 종자감염으로 잘 알려져 있는 병원성에 대한 검정을 진행하고 있다. Bacteria에 BFB(Bacteria Fruit Blotch)병에 대한 Acidovorax균에 대한 PCR 검정방법을 이용하여 검정하고 있으며, Virus에 CGMMV, ZGMMV, SqMV, MNSV에 대한 검정을 종자에서 RNA 추출 후, RT-PCR검정방법으로 병리검정을 진행하고 있다. 현재 진행하고 있는 병리검정은 strip kit나 ELISA test보다 더 감응성이 높아 샘플검정을 통해 발생할 수 있는 병해에 예방이 가능하며, 현재 보유하고 있는 검정방법은 최고기술이라고 판단된다.



그림 38 품질관리-발아검정

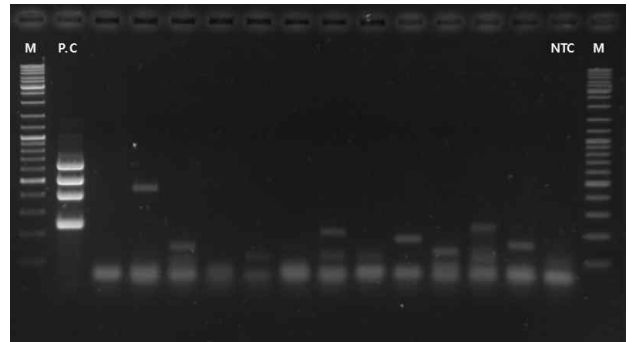
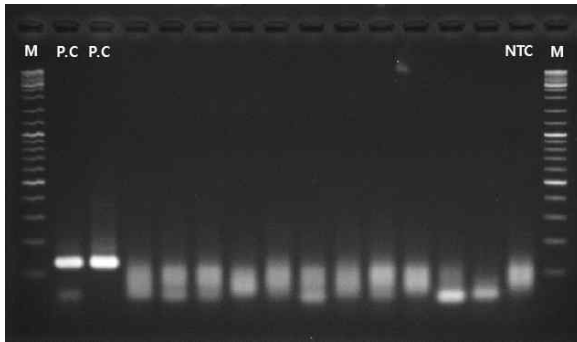


그림 39 품질관리-BFB PCR gel loading

그림 40 품질관리-Virus RT-PCR gel loading

표 28 생산종자 순도·진위 마커검정

연번	Marker	QT114-1	QT114-2	QT114-3	QT115-1	QT115-2	QT115-3
1	chr1_160	A	A	A	B	B	B
2	chr1_619	H	H	H	A	A	A
3	chr10_2268	A	A	A	A	A	A
4	chr10_481	B	B	B	B	B	B
5	chr10_724	B	B	B	B	B	B
6	chr11_1347	A	A	A	A	A	A
7	chr11_2737	H	H	H	H	H	H
8	chr11_3022	H	H	H	B	B	B
9	chr2_224	H	H	H	A	A	A
10	chr2_4409	H	H	H	A	A	A
11	chr2_5000	H	H	H	B	B	B
12	chr3_1610	H	H	H	A	A	A
13	chr3_2400	H	H	H	A	A	A
14	chr3_665	H	H	H	H	H	H
15	chr4_1408	H	H	H	A	A	A
16	chr4_2779	H	H	H	H	B	H
17	chr4_3360	B	B	B	H	H	H
18	chr5_255	B	B	B	A	A	A
19	chr5_2910	B	B	B	A	A	A
20	chr7_20	H	H	H	A	A	A
21	chr8_1999	A	A	A	A	A	A
22	chr8_2027	H	H	H	B	B	B
23	chr8_2530	H	H	H	B	B	B
24	chr8_2673	H	H	H	B	B	B
25	chr9_1541	H	H	H	H	H	H

가. 경제적 성과

(1) 해외 시교사업 종자 품평회(박람회) 추진 및 참가를 통한 매출증대

(가) 국제 종자교역회 참가

2017~2019 APSA 국제종자박람회 참석 및 2019~2021 김제 국제종자박람회 참석을 통하여 해외 바이어미팅 및 신규거래처 발굴을 진행하였다. GSP 2단계 1차년 당시 당사에서 진행중인 수출은 대부분 중국 및 동남아시아권으로, 단가가 매우 낮으며, 종자회사간의 경쟁이 과열되는 시장에서 수출을 진행하고 있었다. 수출실적에서도 나타나듯이, 중국 및 동남아시아를 대상으로 하는 수출은 줄어들었지만 그에 반해 몇 배의 많은 양이 유럽 및 타 대륙으로 수출업무가 진행되고 있다. 가장 큰 역할로서, 국제 종자교역회 참가를 통하여 세계 각국의 수박시장과 판매업체 발굴이 수출양상 변화에 영향을 끼친 것으로 판단한다. 국제 종자교역회를 통하여 발굴된 신규업체들과의 시교사업을 진행해왔으며, 각 국가별 재배환경 및 시장에 맞춘 시교를 공시하고 결과를 공유하며 사업을 확장하여왔다.

표 29 GSP 2단계 해외 시교사업 목록

국가	1 차년	2 차년	3 차년	4 차년	5 차년	계
Australia					9	9
Bangladesh	6		3			9
Brazil		17		12	4	33
China	3	106	59	2	3	173
Colombia					6	6
Costa Rica					4	4
Greece					20	20
Hungry					8	8
India	17	3	5	15	6	46
Italy		6	25	7	6	44
Japan	15	24	30	4	18	91
Jordan		2	5			7
Malaysia	17	4		6	6	33
Mexico		18		15		33
Netherlands	32	12	15	39		98
New Zealand		20	6			26
Russia					6	6
Saudi Arabia					6	6
Spain	14	24	60	26	43	167
Taiwan				2		2
Thailand	10	5				15
Turkey	8	20	18	20		66
USA	48	16	2	27	16	109
Uzbekistan					4	4
Vietnam	8					8
계	178	277	228	175	165	1023



그림 41 해외시교사업 작황조사 결과

시교사업후 선발조합에 대한 현지 상용화를 진행하였으며, 지속적인 관계유지를 위하여 4세부프로젝트와 협업하여 한국 현지 거래처 국내 초청교역 및 필드데이를 실시하였다. 미국 G, W사와 일본 M사를 한국에 초청하여 해당업체들과 신규조합 및 확대시교사업에 대한 회의를 진행하였으며, 해당국가외 판매지역에 대한 신규시장 진출에 대한 사업확대 협의를 진행하였다. 해외 바이어 국내초청을 통해 업체 간 신뢰상승과 더불어 거래량증대 세계 수박시장에 대한 점유율 상승 등이 이루어졌다.



그림 42 해외 거래처 국내 초청 교역

국내에서 진행되었던 김제국제종자박람회에도 3차년도 부터 참가하여 2019년 진행한 종자박람회 코트라 연계 B2B 수출상담회에서도 신규거래처 발굴을 위하여 바이어미팅을 실시하였으며, 미팅을 진행한 업체들과 시교사업을 진행하였다. 이후 김제국제종자박람회는 온라인으로 진행되며 전시포에 매년 출품을 하면서, 코트라를 통하여 화상미팅요청이 들어오고 있으며, 해외 업체와의 교류는 4세부프로젝트에서 전담하여 진행중이다.



그림 43 종자박람회연계 B2B 수출상담회



파트너종묘
Partner Seed
Main Product
Watermelon (Dalkomi-mini, etc.)

Main Product

1. Watermelon

- ▶ **Dalkomi-mini**
 - Red flesh, small-sized watermelon weighing 2~2.5kg on average, setting 2~3 fruits per vine
 - When cultivating 2 fruits per vine, it is important to adjust fruiting cycle.
 - Suitable for stacking cultivation, suitable for 2-line cultivation
- ▶ **Dalkomi-black pearl**
 - Red flesh, small-sized watermelon weighing 2~2.5kg on average, setting 2~3 fruits per vine
 - When cultivating 2 fruits per vine, it is important to adjust fruiting cycle.
 - Suitable for stacking cultivation, suitable for 2-line cultivation
- ▶ **Sijegeun**
 - Small-sized watermelon with edible, less seeds
 - 1.5~2.5kg of fruit weight
 - Micro-seeded and Red flesh
- ▶ **NU023**
 - Small-sized watermelon with edible, less seeds
 - 1.5~2.5kg of fruit weight
 - Micro-seeded and Red flesh
- ▶ **SIS280**
 - Small-sized, lycopenic functional watermelon
 - 2.5~3.5kg of fruit weight
 - High lycopene content and dark-colored flesh
 - Firm flesh and high sugar content
 - Easy to eat with less seeds
- ▶ **S17419**
 - Small-sized, lycopenic functional watermelon
 - 2.5~3.5kg of fruit weight
 - High lycopene content and dark-colored flesh
 - Firm flesh and high sugar content
 - Easy to eat with less seeds



파트너종묘
Partner Seed

Company Introduction

Partner Seed Co., Ltd. is the company specialized in breeding high-valued, functional watermelon and we believe that there will be the promising future in developing seedless watermelons, watermelons with edible seeds, watermelons containing lycopene a lot, etc. In addition, we have researched and developed diverse disease-resistant varieties to actively respond to climate change.

We have developed the new genetic resources useful to customers as well as farmers, and made them into new varieties.

Partner Seed Co., Ltd. has its breeding research centers in Gimje, Jellabuk-do, Korea and Khon Kaen, Thailand.

put strenuous efforts in R&D to become the world's best breeding company for functional watermelons.

Our flagship varieties are PMR1-Joeun (seedless watermelon), Sijegeun (watermelon with less seeds), Dalkomi-mini (small watermelon with edible seeds), etc.

Dalkomi-mini was proudly selected as excellent field-oriented R&D achievement in 2019.

그림 44 김제국제종자박람회 기업 및 품종 소개

(나) 국내 실증시험포 및 품평회

① 국내 실증시험포

GSP 2단계 기간 동안 국내 수박산지를 중심으로 농가실증시험을 실시하였다. 농가선정은 4세부프로젝트를 통해 해당 지역 내 재배특성을 가장 잘 파악할 수 있는 농가를 소개받아 시험을 진행하였다. 저온기 품종에 대한 시험대상 산지로 경남 함안 및 충남부여, 충북음성 지역에서 주로 농가 실증시험을 진행하였으며, 3배체 씨없는 수박 산지로 고창, 부여, 익산에 걸쳐 다양한 지역을 선정하여 농가실증시험을 실시하였다. 농가실증시험에서 선발된 조합은 타 지역 시교사업과 더불어 차후 품종개발화를 진행하였으며, 농가 및 지역 육묘장평가를 통해 해당 품종 및 조합에 대한 입지를 넓혀갔다. 실증시험포는 4세부프로젝트와 함께 지역담당자가 관리하며, 중간작황 및 수확조사를 실시하였다. 1~5차년도까지 농가실증시험을 통해 다음과 같은 정보를 얻을 수 있었다. 음성지역의 경우 2배체 저온기수박 재배가 주로 이루어지고 있으며, 씨없는 수박에 대한 재배가 거의 이루어지고있지않아 새로운 3배체 씨없는 수박시장 개척대상 산지로 판단된다. 봉화지역의 경우 노지작형의 재배방식이 주를 이루고 있으며, 해발 약 400m 산악지형에서 노지 및 시설재배가 이루어지고 있어 흰가루병에 대해 취약하며 저항성품종에 대한 수요가 높은 지역이다. 부여지역의 경우 전국점유 8%를 차지하고 있으며, 수박을 지역특화작물로 재배하고 있으며, 당사의 달리미의 경우 부여군 특화품종으로 자리매김하고 있다. 고창 및 함안의 경우 대한민국 오랜 기간 수박주산지로서 가장 많은 수박재배면적을 가지고 있지만 근래에 이르러 수박재배면적이 급격히 감소하고 있는 추세이며, 현재 수박재배농가에 대한 재배노동력감소등 재배측면에서 이점이 있는 품종개발이 필요할 것으로 판단된다. 위와 같이 국내 실증시험포를 통해 각 지역의 기후환경연구를 실시하여 지역별 특화품종을 나눠 특화함으로써, 해당품종의 우점을 이뤄내 국내 매출증진에 순기능을 작용할 수 있었다.



그림 45 농가 품종 및 조합 실증시험

② 국내 농가 품평회

4세부 프로젝트와 함께 국내 당사가 개발한 수박품종을 재배하고 있는 농가 중 우수작황 농가에 대한 지역민초청 품평회를 실시하였다. 국내 코로나상황으로인하여 2020년까지 품평회를 실시할 수 있었으며, 가까운 지역 수박농가, 농업기술센터, 육묘장관계자등을 초청하여 현장 당도 및 작황에 대한 평가를 진행하였다. 현장평가는 변수가 많이 있고 결과가 악영향을 미칠 수 있지만 고품질로 인정받은 당사의 품종이기에 자신 있는 품평회를 진행할 수 있었다. 품평회의 가장 큰 이점으로 현장에서 농가들이 직접 상품에 대한 품질상태와 주변 상인, 유통업자들의 평가를 확인함으로써 해당품종에 대한 확신을 갖게 할 수 있었다. 상품의 품질이 좋고 유통가격이 좋은 품종들이 차년도 재배작형에서 해당품종의 요구도가 증가하고 이에 따라 하는 이점이 있다. 2019년과 2020년 씨없는 수박 농가 품평회 실시 후 실제 당사의 품종에 대한 수요가 급등하고, 타 지역까지 알려지면서 종자수급에대한 문의가 매해 일어나고 있다.



그림 46 파트너종묘 품종 재배 농가 품평회

(2) 언론 및 매체홍보

(가) 언론매체

2019년 당사는 현장에서 뽑은 우수 R&D성과 10선에 달코미미니가 선정되면서 언론에 다수 노출되기 시작하였다. 달코미미니 품종의 경우 스페인시장수출 주력품목으로서, 충북 수박연구소 실증시험을 통해 우수품종으로 선발되었으며, 전남농업기술원에서는 해당품종을 이용하여 소과중품종의 적정착과수에 대한 연구가 진행 중이다. 2019년 이후 당사에서 판매중인 달코미미니, 블랙보이와 같은 씨없는 수박에 대한 관심도가 증가하고 있고, 실제 뉴스와 기사를 보고 문의를 하는 고객이 늘어나고 있다. 최근 이와 같은 소과중품종을 이용하여 당사에서는 스마트팜 특화 품종을 개발하려고 연구중에 있고, 복합내병성, 시설재배에 적합한 형질들과 관련된 유전자에 대해 분자마커를 개발하기 위하여 농업기술실용화재단을 통해 디지털육종전환사업을 진행중에 있다. 기사에서도 언급되었듯이, 당사는 타 회사에 비해 디지털육종에 대한 접근속도가 빠르고 이를 이용해 실제 고전육종을 벗어나 디지털육종으로 품종개발을 진행하고 있다. 언론매체 특성상 불특정다수가 접근할 수 있는 효과로 육묘장 및 가공업체등 신규고객의 문의가 증가하고 있어, 예상보다 높은 매출증대가 발생할 것으로 기대하고 있다.

11 내일신문

【기술개발로 농산업 활로 개척한다】농업기술실용화재단 첨단육종기술서비스 지원 | 종자개발 위해 분자표지 분석서비스

배추, 수박, 사과, 감 등 농산물은 국민 건강과 직결되는 필수식품이다. 그러나 기후변화와 병해충 발생 등 다양한 요인으로 농작물의 생산량과 품질이 저하되고 있다. 이를 해결하기 위해 농업기술실용화재단은 첨단육종기술서비스를 지원하고 있다. 분자표지 분석 서비스는 종자개발을 위한 핵심 기술로, 유전자 분석을 통해 작물의 특성을 정확히 파악할 수 있다. 이를 통해 농민들의 소득을 높이고, 국가 농산물의 경쟁력을 강화할 수 있다.

농업기술실용화재단은 농민들의 소득을 높이기 위해 첨단육종기술서비스를 지원하고 있다. 분자표지 분석 서비스는 종자개발을 위한 핵심 기술로, 유전자 분석을 통해 작물의 특성을 정확히 파악할 수 있다. 이를 통해 농민들의 소득을 높이고, 국가 농산물의 경쟁력을 강화할 수 있다.

농업기술실용화재단은 농민들의 소득을 높이기 위해 첨단육종기술서비스를 지원하고 있다. 분자표지 분석 서비스는 종자개발을 위한 핵심 기술로, 유전자 분석을 통해 작물의 특성을 정확히 파악할 수 있다. 이를 통해 농민들의 소득을 높이고, 국가 농산물의 경쟁력을 강화할 수 있다.

1인기수와 귀자니움, 그리고 비결은 작은 수박

농업기술실용화재단은 농민들의 소득을 높이기 위해 첨단육종기술서비스를 지원하고 있다. 분자표지 분석 서비스는 종자개발을 위한 핵심 기술로, 유전자 분석을 통해 작물의 특성을 정확히 파악할 수 있다. 이를 통해 농민들의 소득을 높이고, 국가 농산물의 경쟁력을 강화할 수 있다.



농업기술실용화재단은 농민들의 소득을 높이기 위해 첨단육종기술서비스를 지원하고 있다. 분자표지 분석 서비스는 종자개발을 위한 핵심 기술로, 유전자 분석을 통해 작물의 특성을 정확히 파악할 수 있다. 이를 통해 농민들의 소득을 높이고, 국가 농산물의 경쟁력을 강화할 수 있다.

소과중 수박 품종 개발 및 수출

농업기술실용화재단은 농민들의 소득을 높이기 위해 첨단육종기술서비스를 지원하고 있다. 분자표지 분석 서비스는 종자개발을 위한 핵심 기술로, 유전자 분석을 통해 작물의 특성을 정확히 파악할 수 있다. 이를 통해 농민들의 소득을 높이고, 국가 농산물의 경쟁력을 강화할 수 있다.



농업기술실용화재단은 농민들의 소득을 높이기 위해 첨단육종기술서비스를 지원하고 있다. 분자표지 분석 서비스는 종자개발을 위한 핵심 기술로, 유전자 분석을 통해 작물의 특성을 정확히 파악할 수 있다. 이를 통해 농민들의 소득을 높이고, 국가 농산물의 경쟁력을 강화할 수 있다.



(3) 해외 목표시장 다각화 및 수출 마케팅 활동

(가) 해외 품종보호등록

GSP 4차년도 품종보호출원 성과였던 엔유023에 대하여 유럽 네덜란드 거래처에서 Naktuinbouw 품종보호출원을 진행하였다. 유럽 및 미주지역에서는 소과종에 대한 요구도가 빠르게 상승하고 있으며, 이에 따라 현지 업체에서도 경쟁력 있는 품종으로 당사의 엔유023을 선발하여 2020년 출원을 실시하였다. 현지품종명으로 Tigrimi는 2~2.5kg의 소과종 품종이다. 엔유023은 2019년 초 작성된 시고를 통해 처음 네덜란드, 독일지역으로 시고가 공시되었으며, 시고사업후 2020년 수출, 2021년 수출 진행중이다. 이후 유럽시장에서의 엔유023에 시장진입이 활발이 이루어질 것으로 예상되며, 현재 유럽시장 및 미주지역 소과종 주요 품종으로 알려져 있는 mini-love에 경쟁력을 가지고 소과종 시장점유율을 높일 수 있을것이라고 예상한다.



Uniseeds Select B.V.
Jan van der Heydenstraat 66
2565 JB BEESWIK

Risicotransactie, 01-07-2020

GEWAS / Species	Watermelon / Watermelon
KWIEKAAANCIJFING / Breeder's reference	W44 9075
Naamvoorschrift / Variety denomination	Tigrimi
AANVRAAGNUMMER / Application number	450558
Datum autorisatie / Authorization date	02-07-2020

Bevel / concern: verlening autorisatie / granting authorization

U heeft bij Naktuinbouw een autorisatieverzoek ingediend om bovenstaand groentes ras te mogen verhandelen. Dit ras is voor registratie aangemeld, maar nog niet toegelaten.

De bevestigingsaanpak groentesrasen maakt het mogelijk om teeltmateriaal van groentesrasen, die nog in aanmelding zijn, te mogen verhandelen.
Naktuinbouw geeft u toestemming bovengenoemd ras te verhandelen onder hierna genoemde voorwaarden.

- U bewaart **alle** gegevens over instandhouding, vermeerdering, bewerking en verpakking van de productiepartijen tenminste 3 jaar.
- U neemt **van elke** productiepartij een monster, slaaf deze op en houdt deze ter beschikking van Naktuinbouw.
- De omvang van het monster is vermeld in bijlage III, richtlijn 2002/55 (Richtlijn voor het in de handel brengen van groentesaad).
- De zaden worden in een gesloten verpakking in het verkeer gebracht.
- Het **bedrijfs** is voorzorg van de in artikel 28 van de betreffende EU-beschikking opgenomen gegevens.
- U verzamelt informatie over de praktische ervaringen met de teelt van dit ras, waarop deze toestemming van toepassing is.
- U registreert zoveel zaad door u, via uw vestiging in Nederland, naar elk van de 28 landen, is verhandeld.

De toestemming vervalt van rechtswege 1 jaar na de per ras genoemde effectieve datum.
Een verlenging kan daarna voor maximaal 2 jaar worden verformd. De autorisatie wordt automatisch verlengd, maar niet als er zich een wijziging in de situatie heeft voorgedaan. Wordt een aanvraag tot verlenging ingetrokken of geweigerd, brengt u dan Naktuinbouw hiervan direct op de hoogte.

Bid of mail gerust als u nog vragen heeft
U kunt hiervoor contact opnemen met ondergetekende, Telefoon op +31 (0) 71 - 332 6121 of via e-mail teamvoort@realis.nl.

De volledige tekst van de EU-beschikking, 2004/942/EG, staat op onze website.



그림 48 Naktuinbouw 품종보호출원 NU023(Tigrimini)

(나) 국제 우수품종상 출품

2020년 4차년도 미국 우수품종상 AAS(All-American-Selections)에 소과종 품종 씨7419를 출품하였다. 씨7419는 2020년 4차년도에 국내 품종보호출원을 한 품종으로서, 2021년 미국 현지 지역재배 결과로 Mountain/Southwest, West/Northwest region에서 REGIONAL AAS Winner로 선정되며, 2022년부터 샘플공급 및 판매 계획에 있다. 위에 언급되었던 mini-love 역시 2017년 AAS에서 우수품종상을 받아 전 세계적으로 이름이 알려진 품종으로서, 당사에서는 달코미니, 엔유023, 씨7419와 같은 소과종에 대한 경쟁력이 타사대비 월등히 높아질것으로 판단하며, 국·내외 종자기업을 포함하여 다국적 종자회사에 대응할 수 있는 경쟁력을 갖출 것이라고 예상한다.



민원인을 가혹잡아, 민원을 내 일관에
특정법 제68조 제1항 제3호 위반 혐의(과잉징역)로 기소됨
당첨자: 권문경 (전화: 02-911-14115 / FAX: 02-911-14119)
연락처: 권문경 (www.aaswinner.com)

품종보호출원번호 통지서

출원번호: 2021. 4. 30 / 출원번호: 2021. 4. 30
출원번호: 2021. 4. 30 / 출원번호: 2021. 4. 30

국립종자원

Location/Judge	Judge final score	Region
IL - Urbana - Schafer	2-Below average	GL
IL - West Chicago - Schmitz	3-Average	GL
MI - Hesperia - DeLong	3-Average	GL
ON - Dundas - Bill Dam	4-Above average	GL
WI - Watertown - DeLong	X-Trial failure	GL
IA - Ames - Lieben Guth	X-Trial failure	HL
NE - Omaha - Porter	X-Trial failure	HL
TX - Dallas - Proska	4-Above average	MSW
CT - Griswold - Durgy	3-Average	NE
ME - Winslow - Bellavia	3-Average	NE
NY - Geneva - Ferlito	3-Average	NE
NY - Rochester - Noble	3-Average	NE
PA - Warminster - Dimitrov	2-Below average	NE
PE - Charlottetown - Whynot	3-Average	NE
KY - Lexington - Dahl	3-Average	SE
LA - Baton Rouge - Lewis	4-Above average	SE
SC - Hodges - B. Park	3-Average	SE
CA - Gilroy - Bogard	X-Trial failure	WNW
CA - Salinas - Amiya	N-Not adapted to my climate	WNW
CA - Woodland - Cook	4-Above average	WNW
OR - Cottage Grove - Billing	X-Trial failure	WNW

Watermelon F1

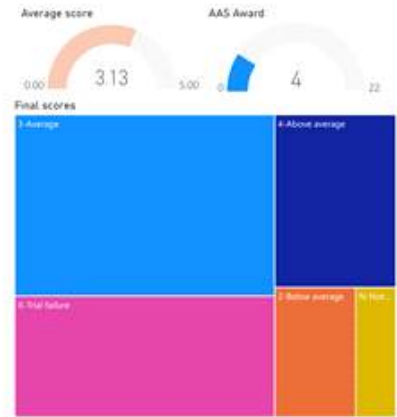


그림 49 AAS 출품 품종 씨7419

(4) 연차별 매출액

(가) 국내 매출액

국내매출은 GSP 2단계 1~3차년까지 점차 증가하다 4차년부터 국내시장에서의 매출급등을 달성하였다. 그 원인으로 당사에서 GSP 프로젝트의 지원을 받아 연구중인 3배체 씨없는 수박에 대한 국내시장요구도가 증가하고, 시자점유율이 대폭 상승했던 원인으로 판단하고 있다. 3차년도에 품종보호출원한 피엠알아이조은이 흰가루내병성품종이면서 육질, 당도, 생육 전반에 걸쳐 우수한 평가를 받아 현재 생산수량보다 높은 수치의 수요가 발생하고 있다. 이와 더불어 아이조은, 조생제로, 제로스타플러스 등의 3배체 씨없는 수박품종의 판매도 늘고 있다. 국내시장의 경우 3배체시장에서 당사의 3배체품종개발기술이 최고기술로 인정받고 있으며, 3배체 수박재배의 경험이 없는 지역,농가에 지역 농업기술센터등의 재배교육지원 등으로인 해 고온기 작형에 버팀성이 좋은 3배체 재배농가의 수가 늘어날 것이라고 예상되며, 이에따라 매출액이 현재보다 더 급등할 것으로 판단하고 있다. 또한 국내수박재배는 해외 일반적인 노지재배형식과는 달리 하우스등의 시설재배가 많고 농업의 디지털화에 따른 스마트팜재배에 대한 관심, 지원사업, 공급등이 높아져 이에 맞춘 스마트팜 특화 형질에 대한 마커개발, 전용 품종의 개발에 힘을 쏟고 있으며, 스마트팜의 확산과동시에 해당품종의 매출도 급등할 것이라고 예상한다.

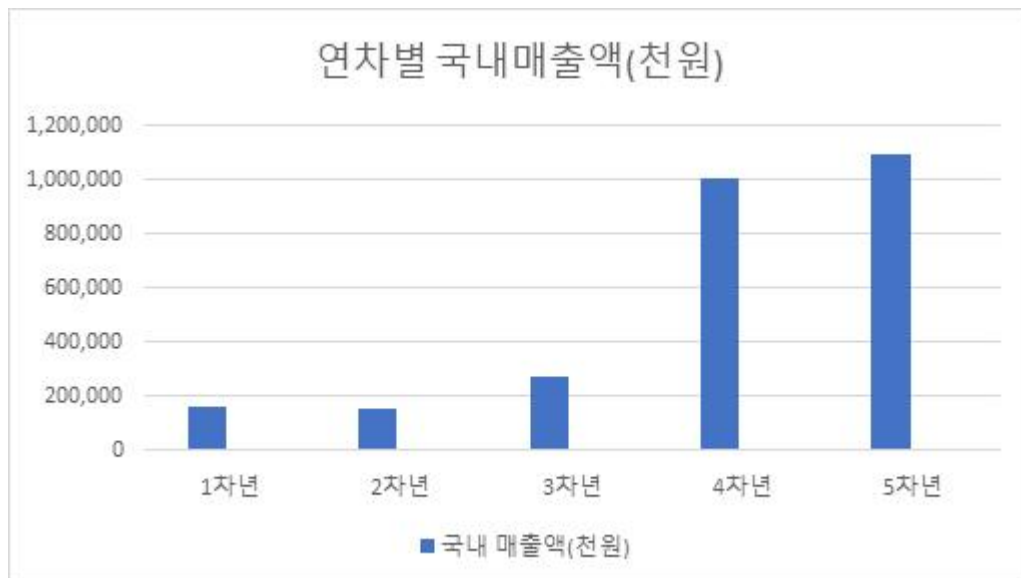


그림 50 연차별 국내 매출액

(나) 수출액

국외수출에서 아래의 그래프와 같이 2,3차년도에 감소추세를 보이다가 4,5차년에 급등하는 경향을 보이고 있다. 이는 1차년도의 경우 이전 관계를 유지해오던 중국 및 동남아시아에서의 매출이 유지되고 있었으며, 해가 거듭함에 따라 유럽 및 미주지역 국가를 대상으로 해외시교사업을 시작하고, 결과에 따른 수출증대가 이어진 것으로 판단한다. 2,3차년도의 수출액 감소에는 상품중자생산과정에서 생산업체의 물량조달 차질, 동남아시아 단가경쟁으로 인하여 감소된 경향이 있었으며, 4차년부터 특히 스페인시장에서 시교사업이 성공적으로 선발되며 주문량이 급등함에 따라 전체 수출액이 높아진 것으로 판단하고 있다. 스페인 대상 주요 수출품목으로 AP#03(씨없는 수박)과 달코미미니가 주요 수출품목으로서 자리매김하고 있다. 금년에도 스페인 수출은 약 40만불가까이 달성하였고, 타 국가에 비해 월등히 높은 요구도를 보였다. 스페인과 마찬가지로 일본, 미국, 이탈리아, 네덜란드에서도 꾸준한 주문증대를 보여왔다. 당사에서는 고부가가치 수박품종육성을 목표로 다음에 많은양의 주문을 받진 않아도 높은 가격의 평가를 받는 업체와 거래를 유지중이다. 세계수박시장의 경우 중국에서 가장 많은 양의 수박재배가 이루어지면서 중국을 중심으로 동남아시아까지 가격경쟁이 과열되고 이에 따라 고품질보다 가격에 맞추어 종자거래가 이루어지는 것으로 판단되고 있다. 평균적인 종자가격이 하락화되면 전 세계 종자업체가 도미노처럼 순차적으로 무너질 가능성도 무시 할 수가 없다. 당사에서는 종자시장에서 고품질·고부가가치의 품종개발을 통하여 세계무대에서 그 가치를 인정받고 있고, 그 결과가 수치화되고 있다. 타 회사에 비해 성장속도가 빠르고, 탄탄한 연구개발 기술력을 토대로 국·내외 종자산업발전에 기여할 예정이다.

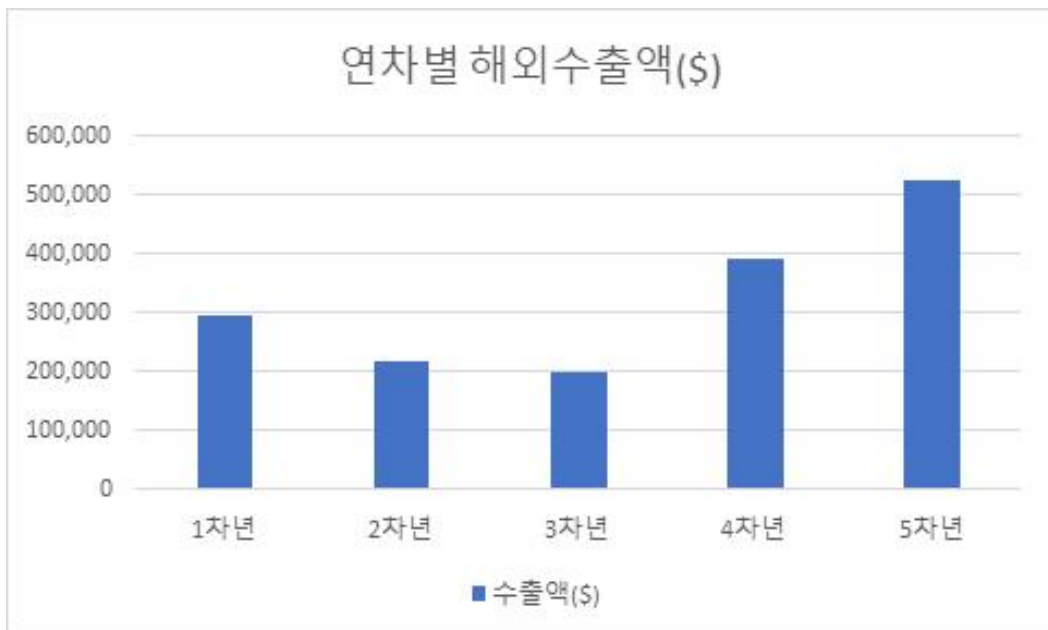


그림 51 연차별 해외 수출액

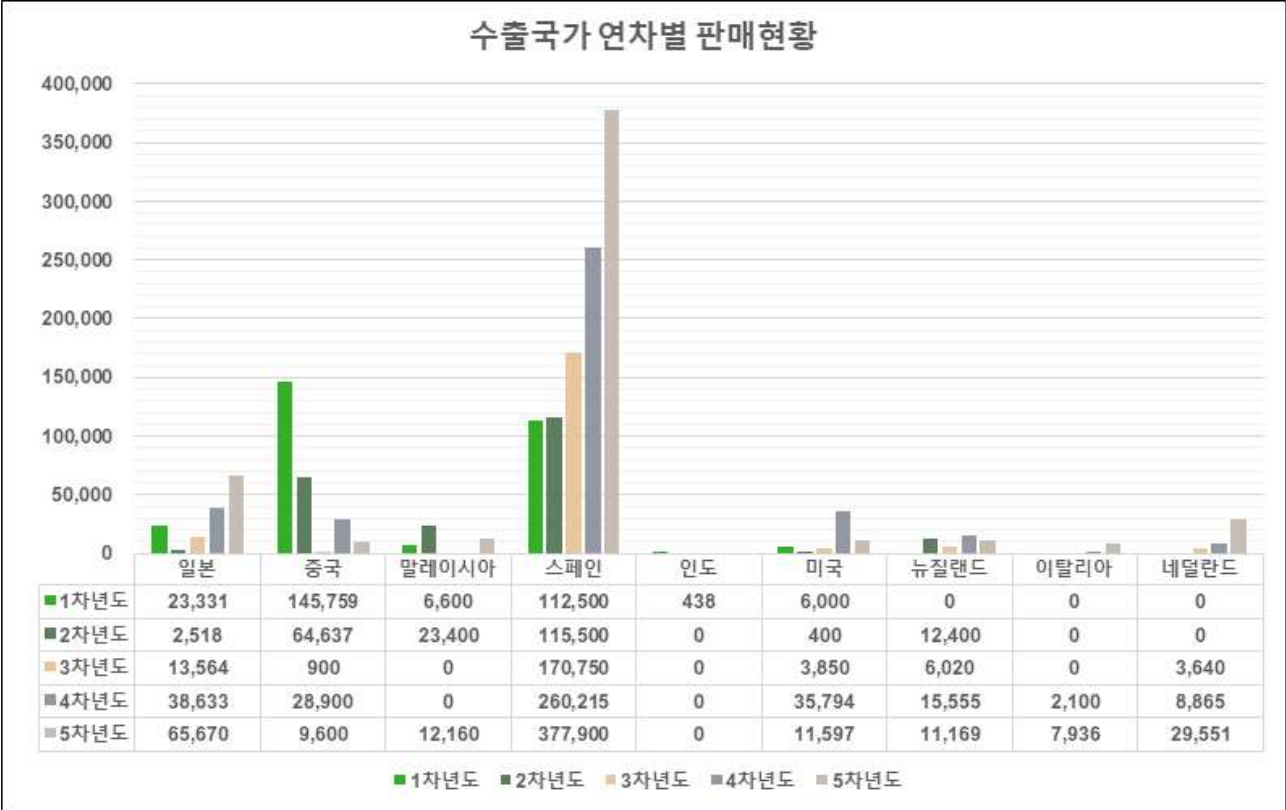


그림 52 수출국가 연차별 실적

제 1 절 수박 복합내병성 분자유종 시스템 확립

1. 수박 덩굴마름병(덩굴마름병) 내병성 분자유종 시스템 확립

가. 덩굴마름병 육종을 위한 병원체 확인 및 내병성 검정 환경의 확립

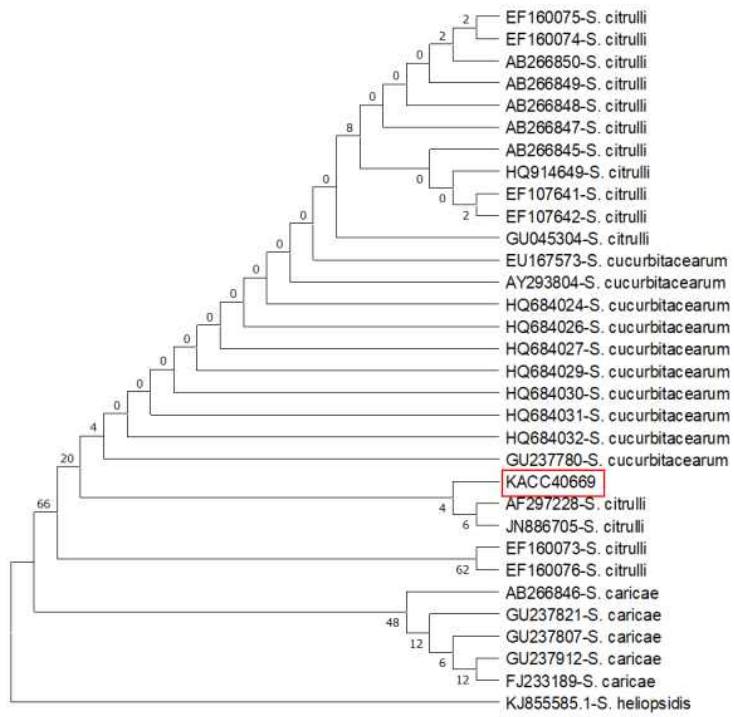
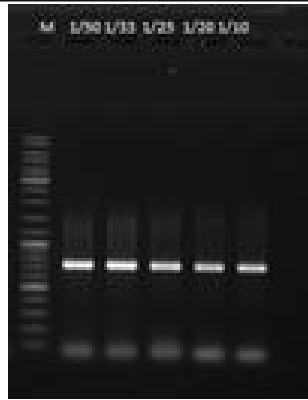
박과에 발생 하는 덩굴마름병은 *Stagonosporopsis* 속에 속한 *S. citulli*, *S. caricae*, *S. cucurbitacearum* (syn. *Didymella bryoniae*)에 의해 발병한다. 지역별(북미, 남미, 유럽, 중국 등)로 박과에서 분리 동정 된 덩굴마름병원균주들은 *S. citulli*이 우점종이며, *S. cucurbitacearum*, *S. caricae* 순서로 많이 분포하고 있고, 수박에서 분리한 덩굴마름병은 대부분 *S. citulli*로 분리 동정 되었다. 3개의 *Stagonosporopsis* 속 모두 수박, 멜론, 오이, 호박 등에 발병이 가능하며, 수박의 경우 3개 중 모두에서 가장 낮은 생존율을 보인다. *S. caricae*의 경우 papaya와 박과 모두를 기주범위로 가지고 있지만, 박과의 경우 다른 2개종에 비해 낮은 병 발생률을 보인다.

(1) 수박 덩굴마름병원균 공시균주 확보 및 ITS 서열분석기반 균의 동정

- 수박 덩굴마름병원균(*Stagonosporopsis citulli*)의 isolate 확보
 - KACC40669(기탁균주)를 확보하였으며, 해당 균주의 계대증식은 PDA배지에서 정상적으로 이루어졌음.
- 수박 덩굴마름병 KACC40669의 ITS서열 분석
 - 확보된 KACC40669의 균주를 이용하여 Internal Transcribed Spacer (ITS) sequencing을 진행함.
 - sequencing 결과를 기반으로 NCBI에 Blast결과 *Stagonosporopsis cucurbitacearum* strain CBS 233.52 small subunit ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence: and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence에서 identity 99%, E-value 0.0으로 나타났음

표 2.1. ITS 검정시 사용한 primer

Primer	Sequence (5'-3')
ITS-F	TTGCCGCTTCACTCGCCGTT
ITS-R	CACCGCCCGTCGCTACTACCG



수박 덩굴마름병 KACC40669 ITS 검정 결과

그림 2.1. 수박 덩굴마름병 ITS검정 결과

[보관 균주 KACC40669 에서 분석된 ITS consensus sequence]

```
TCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCG-ACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTGATTC
ACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTCAGTGAGGCCTCCGGACTGGCTCGGAGAGGTTGG
CAACGACCACTCCGAGCCGGAAAGCTCGTCAAACCTCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAAC
AAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCTAGAGTTGCGGGCTTTGCCTGCCATCTC
TTACCCATGTCTTTTGAGTACCTTCGTTTCCTCGGCGGGTTCGCCCGCCGATTGGACAAAACCTTAA
ACCCTTTGTAATTGAAATCAGCGTCTGAAAAAACATAATAGTTACAACCTTCAACAACGGATCT
CTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAG
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGC
GTCATTTGTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGCGCAGACTCGCC
TCAAACGATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTCCGGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCACA
ACGACGACGTCCGAAAAGTACATTTTTTACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTG
AACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTG
AAGCGGCAAAATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGA
```

(2) 수박 덩굴마름병균 공시균주의 최적 포자형성법 확립

- 고 병원성의 포자를 형성하고자 기 보고된 논문 Hu et al. 2017, Gusmini et al. 2005을 참고하여 포자형성을 실시
 - 방법 : PDA 배지에 덩굴마름병 조각을 올리고 72시간 암배양 후 12시간씩 4일간 광암주기, 그 후 24~48시간동안 암배양을 실시.
- 포자형성시 일반적으로 사용하는 광조건으로는 UV와 형광등 처리를 하는 것으로 알려져 있으며, 본 실험에서는 이 두 방법을 통하여 효과적으로 수박에 감염능력이 있는 conidia를 유도하는 방법을 확립하고자 하였으나, 결과적으로 광원에 따른 conidia의 병원성에는 영향을 주지 않았으며, 정상적인 포자 형성능에는 차이가 없음을 확인.
- 또한 Germination of Pycnidiospore 포자 발아력 검사 결과, 형광등과 UV 처리 사이에 정상적인 포자 형성능에는 차이가 없었음을 확인함.

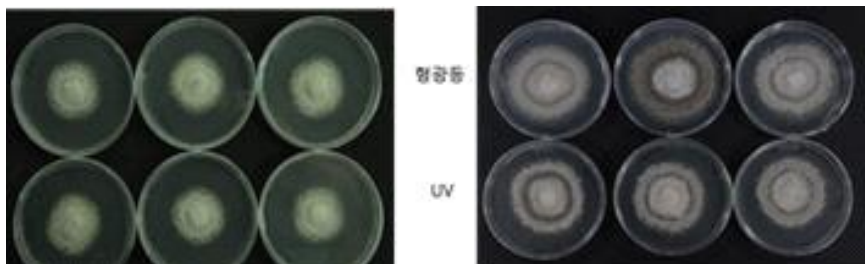


그림 2.2. 72시간 암배양 후의 병원균의 모습과 광처리후 병원균의 모습

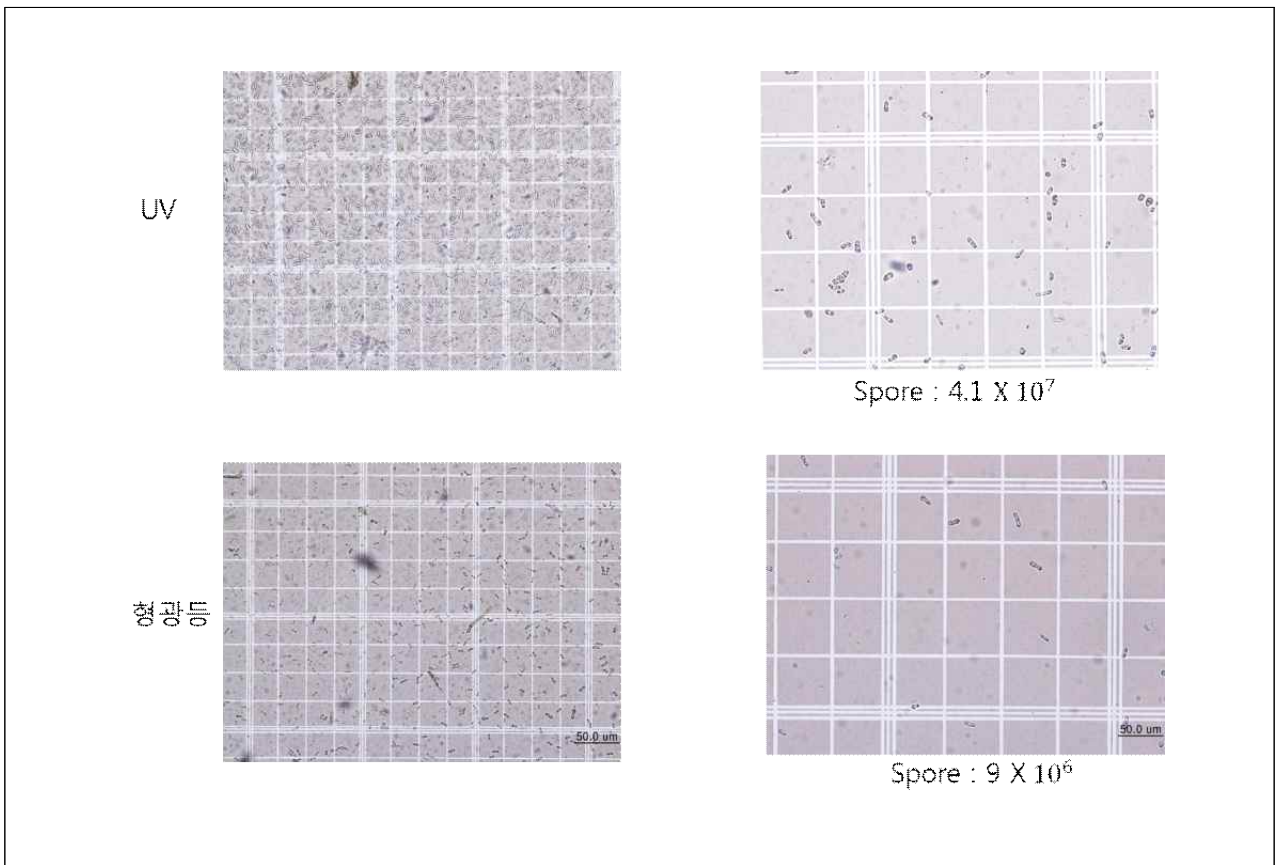


그림 2.3. 광암주기 후 포자 형성의 모습

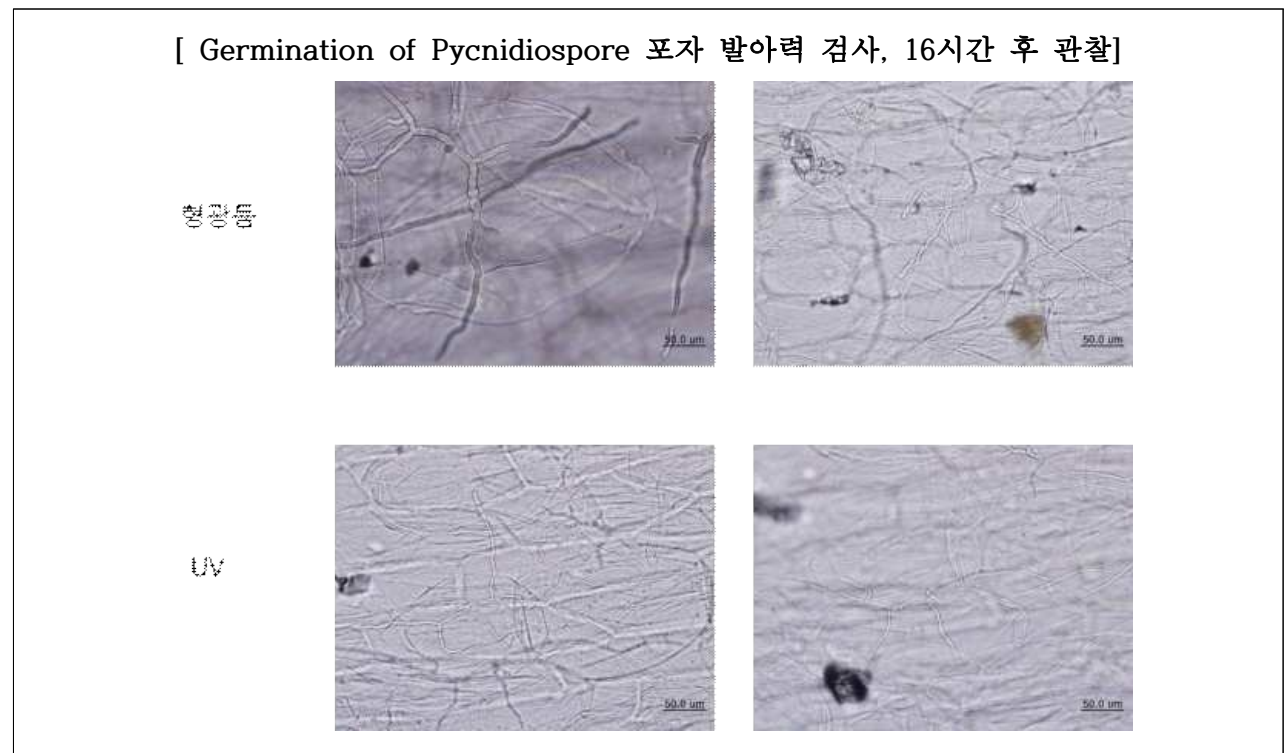


그림 2.4. Germination of Pycnidiospore 포자 발아력 검사

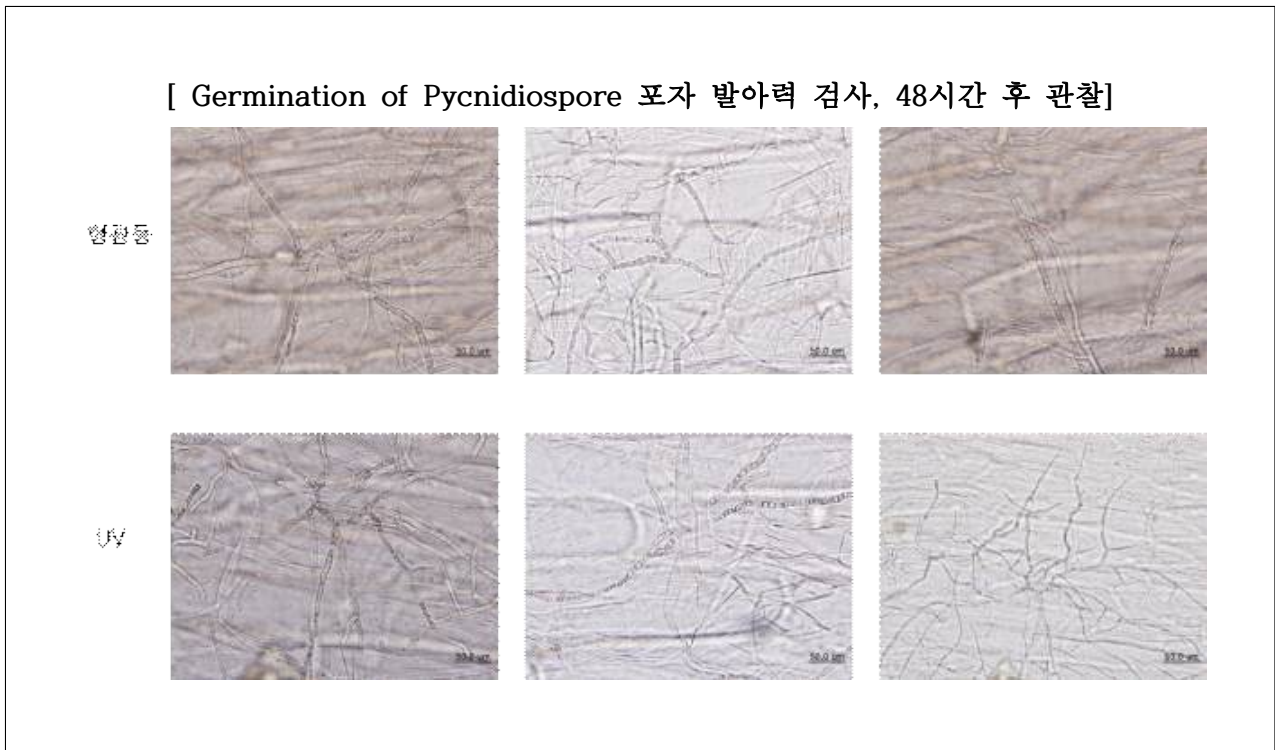


그림 2.5. Germination of Pycnidiospore 포자 발아력 검사

○ 수박 덩굴마름병 병접종 환경 확립

수박 덩굴마름병의 포자의 최적 포자 형성법을 확립하기 위하여 UV 램프로 광주기 설정 조건과, 식물 생육대에 자체적으로 제작한 접종 chamber를 이용 수박 덩굴마름병의 발병의 중요 요소인 상대 습도를 높게 유지하는 환경을 조성하였음.

하지만, F2:3 집단 같이 대량 접종이 필요한 경우, 대량의 포자를 안정적으로 확보하기 위해서는 다수의 petri dish가 필요하여 공간적인 제약이 있었다. 수박 덩굴마름병의 대량 포자를 좀 더 수월하게 확보하기 위하여 기존 10CM petri dish에서 12.5 x 12.5CM 사각 plate로 교체하였음.

또한 이지현 et al (2016) 논문에 따르면, 수박 덩굴마름병 병접종 후 chamber 온도가 병반 면적률에 기여하는 양상을 보이는 결과가 발표 된 바 있다. 따라서 해당 논문을 기반으로 수박 덩굴마름병의 표현형 검정시 적합한 chamber의 내부 온도는 25°C이며, 이보다 낮을 경우(20°C 이하) 감수성 계통에서 덩굴 마름병의 병 발생률 떨어지고, 30°C일 경우 중간 저항성 계통들이 감수성 계통으로 표현형 변화가 발생하기 때문에, chamber 온도가 발병에 중요한 요인으로 간주된다. 따라서 기존 실험실의 식물 생육대 경우 접종 chamber 안의 온도가 30°C가량 상승하게 되는데 이는 광원인 삼과장 램프의 발열 때문으로 추정되며, 이에 수박 덩굴마름병 표현형 검정에 적합한 25°C 조건을 조성하기 위하여 광원을 LED로 교체 후 덩굴마름병 접종을 실시하였음.



그림 2.6. 수박 덩굴마름병의 대량의 포자 생산을 위한 12.5 x 12.5 CM 사각 plate

(3) 수박 덩굴마름병균 대량접종법 확립

- 수박 덩굴마름병이 발병 할 수 있는 최적의 접종 환경을 확립하기 위하여 실험실 자체적으로 접종 chamber를 만들어 인위적인 접종 환경을 조성.
- 접종 후 상대 습도를 70%로 유지하기 위하여, 생육단의 각 단의 6면을 비닐로 감싸 접종실험을 진행
- 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 spore/ml로 희석 하여 감수성 계통 및 저항성 계통에 접종하여, 적정 접종 농도를 규명함.
- 그 결과 그림 2.6 감수성 계통의 경우 1×10^5 에서는 5개체 중 1개체가 저항성을 보였으며, 5×10^5 , 1×10^6 에서는 모두 감수성을 보임. 그림 2.6의 오른쪽 그림의 저항성 계통의 경우 모든 농도구간에서 저항성을 보임을 확인할 수 있었음.
- 따라서 수박 덩굴마름병의 최적 접종 농도는 5×10^5 spore/ml을 확인할 수 있었음.



그림 2.7. 생육실에서 수박덩굴마름병 접종 현황



그림 2.8. 수박 덩굴마름병 표현형 검정에 적합한 25°C 조건을 조성하기 위하여 광원을 LED로 교체



그림 2.9. 덩굴마름병 균주를 이용한 접종가능 농도선별

나. 수박 덩굴마름병균에 대한 수박 유전자원들의 병반응 조사

- 본 실험에서 확보된 균주 및 최적의 접종농도를 이용하여 저항성 자원선발을 진행함.
- 현재 덩굴마름병 저항성 유전자원은 매우 희귀하고, PI189225의 경우 수박덩굴마름병에 강한 저항성을 가지고 있다고 보고되어 있음.
- 해외 노지수박에서 수박덩굴마름병의 발병증가가 보고됨에 따라, PI189225와 견주어 보았을 때 강한 저항성을 가지고 있는 계통을 선별하기 위하여, 수집 유전자원 300여 종에 대하여, 병 스크리닝을 실시함.

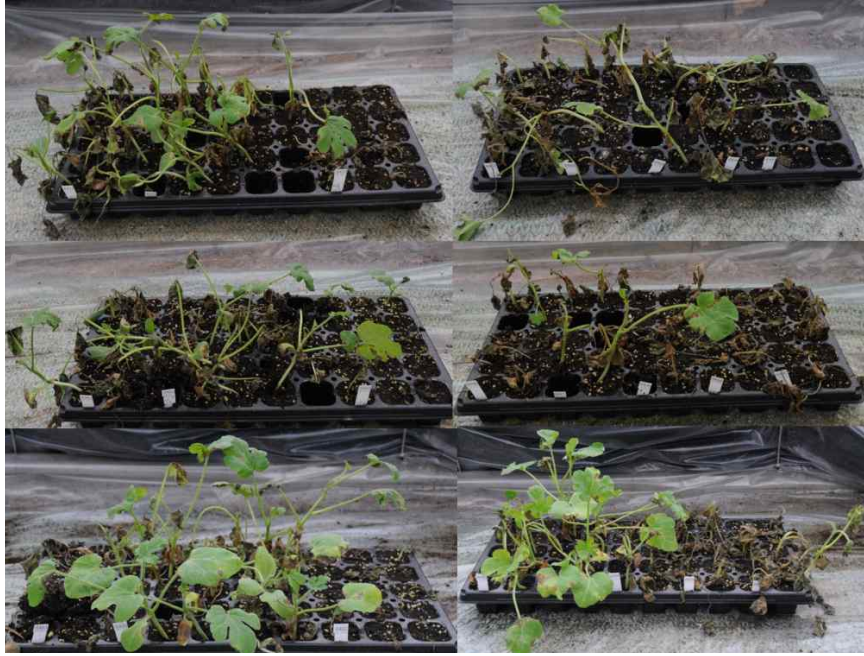


그림 2.10. 수박 야생자원을 대상으로 한 덩굴마름병 접종 결과

표 2.2. 수박 수집야생종에 대한 덩굴마름병 접종후 병징 rating 결과

Plot No.	line	score average	Plot No.	line	score average
7231	부라보꿀	2.54	7337	14-2085	3.48
7301	14-2032	2.3	7338	14-2086	5.4
7302	14-2033	2.1	7339	14-2087	4.3
7303	14-2034	3.2	7340	14-2088	3.6
7304	14-2035	2.5	7341	14-2089	6.2
7305	15-0064	2.5	7342	14-2093	4.58
7306	14-2036	4.4	7343	14-2094	4.8
7307	14-2037	3.6	7344	14-2095	5.7
7308	14-2038	4.8	7345	14-2096	4.8
7309	14-2039	5.8	7346	14-2097	4.76
7310	14-2040	5.3	7347	14-2098	5.16
7311	14-2041	4.4	7348	14-2099	5.7
7312	14-2042	2.56	7349	14-2100	4.68
7313	14-2043	3.04	7350	15-0067	4.4
7314	14-2044	3.3	7351	14-2101	4.5
7315	14-2045	2.94	7352	14-2102	4.9
7316	14-2046	2.4	7353	14-2103	3.6
7317	14-2047	5.86	7354	14-2104	5.78
7318	14-2048	5.3	7355	14-2105	5.76
7319	14-2049	3.96	7356	14-2106	5.44
7320	14-2050	3.38	7357	14-2107	4.86
7321	14-2051	3.6	7358	14-2108	3.58
7322	14-2052	4.4	7359	14-2109	5.4
7323	14-2053	3.06	7360	14-2110	5.4
7324	14-2054	4.58	7361	14-2111	3.78
7325	14-2055	5.2	7362	14-2112	4.28
7326	14-2069	5.38	7363	14-2113	4.76
7327	14-2070	5.34	7364	14-2114	3.38
7328	14-2073	6	7365	14-2115	4.5
7329	14-2074	4.34	7366	14-2116	5.7
7330	14-2075	4.8	7367	14-2117	4.8
7331	14-2076	2	7368	14-2118	5.2
7332	14-2079	2	7369	14-2119	6
7333	14-2080	2.8	7370	14-2120	4.58
7334	14-2082	4.4	7371	14-2121	5.9
7335	14-2083	4.5	7372	14-2122	4.6
7336	14-2084	4.5	7373	14-2123	6.3
7374	14-2124	4.68	7411	14-2161	6.1
7375	14-2125	4.48	7412	14-2162	4.7
7376	14-2126	5.68	7413	14-2163	4.7

Plot No.	line	score average	Plot No.	line	score average
7377	15-0068	-	7414	14-2165	5.3
7378	14-2127	5.58	7415	15-0069	4.7
7379	14-2128	5.88	7416	14-2166	2
7380	14-2129	5.78	7417	14-2167	5.58
7381	14-2130	7.38	7418	14-2168	6.1
7382	14-2131	4.8	7419	14-2169	3.1
7383	14-2132	4.18	7420	14-2170	3.7
7384	14-2133	4.9	7421	14-2171	6.1
7385	14-2134	6.28	7422	14-2172	6.48
7386	14-2135	5.38	7423	14-2173	3.56
7387	14-2136	5.16	7424	14-2175	4.4
7388	14-2138	2.9	7425	14-2176	5.38
7389	14-2139	5.2	7426	14-2177	5.18
7390	14-2140	4.54	7427	14-2178	5.18
7391	14-2141	2.6	7428	14-2179	4
7392	14-3037	4.2	7429	14-2181	6.28
7393	14-2143	4.3	7430	14-2183	3.88
7394	14-2144	3.6	7431	15-0070	3.3
7395	14-2145	4.9	7432	15-0071	3.3
7396	14-2146	6.1	7433	14-2192	2.9
7397	14-2147	5.9	7434	14-2193	2.58
7398	14-2148	5.08	7435	14-2194	3.58
7399	14-2149	6.26	7436	14-2195	6
7400	14-2150	3.9	7437	14-2200	3.98
7401	14-2151	2.72	7438	14-2202	6
7402	14-2152	4.94	7439	14-2204	3.98
7403	14-2153	4.98	7440	14-2205	4.76
7404	14-2154	4.98	7441	14-2206	4.34
7405	14-2155	2.76	7442	14-2207	5.16
7406	14-2156	6.16	7443	14-2208	6
7407	14-2157	4.8	7444	14-2209	5.16
7408	14-2158	4	7445	14-2210	5.08
7409	14-2159	5.12	7446	15-0074	5.6
7410	14-2160	5.38	7447	14-2214	5.96
7448	14-2216	6.36	7485	14-2723	4.47
7449	14-2217	6	7486	4963	3.34
7450	14-2222	5.88	7487	4964	6.78
7451	14-2228	5.96	7488	4965	5.98
7452	14-2229	6.18	7489	15-1036	5.16
7453	14-2233	6.04	7490	14-2724	6.16
7454	14-2234	5	7491	14-2725	5.36
7455	14-2235	5.12	7492	11-1106	5.3

Plot No.	line	score average	Plot No.	line	score average
7456	14-2245	4.72	7493	14-2726	3
7457	14-2246	6.7	7494	14-2727	5.08
7458	14-2249	6.5	7495	15-1037	5.85
7459	14-2250	5.66	7496	4966	8.1
7460	14-2252	6.26	7497	4967	2.7
7461	14-2280	2	7498	4968	3.08
7462	14-2282	4	7499	4969	3.1
7463	14-2283	3.46	7500	14-2728	5.18
7464	14-2289	3.58	7501	14-2795	2.8
7465	11-1083	3.5	7502	14-2729	2.88
7466	11-1084	6.2	7503	15-1038	4.24
7467	11-1085	2.4	7504	14-2730	5.56
7468	11-1086	4.38	7505	15-1039	5.98
7469	11-1088	5.48	7506	14-2731	5.2
7470	11-1089	8.1	7507	14-2732	5.96
7471	11-1090	5.16	7508	4970	4.14
7472	11-1091	5.76	7509	4971	6.2
7473	11-1093	4	7510	4972	4.72
7474	11-1094	3.74	7511	14-2733	6.06
7475	11-1095	3.74	7512	15-1040	4.78
7476	11-1098	4.14	7513	15-1041	5.56
7477	11-1099	4.18	7514	15-1042	5.38
7478	11-1101	-	7515	14-2734	5.3
7479	11-1102	3.84	7516	14-2735	2.36
7480	11-1103	4.54	7517	14-3150	2.94
7481	14-2722	6.28	7518	15-0063	2.4
7482	no sowing	-	7519	14-2839	2.98
7483	no sowing	-	7520	15-1043	2.8
7484	15-1035	4.82	7521	14-2736	1
7596	4994	3.96	7633	14-2801	5.38
7597	4993	5.16	7634	14-2819	3.88
7598	no sowing	-	7635	14-2760	4.06
7599	15-1055	3.92	7636	14-2761	5.2
7600	15-1056	5.44	7637	14-2762	2.54
7601	14-2754	7	7638	12-0669	5.125
7602	4995	2.58	7639	14-2812	5.18
7603	14-2755	4.36	7640	5003	4.14
7604	14-2822	5.16	7641	5004	3.48
7605	14-2756	5.98	7642	5005	3.44
7606	13-0845	2.8	7643	15-1061	5.34
7607	14-2307	5.6	7644	14-2763	5.38
7608	14-3162	3.4	7645	14-2764	5.4

Plot No.	line	score average	Plot No.	line	score average
7609	14-3163	2.5	7646	14-2765	4.94
7610	14-3164	-	7647	14-2766	5.2
7611	14-2757	5.78	7648	5006	6.68
7612	15-1057	6.16	7649	5007	5.25
7613	15-1058	5.04	7650	5008	3.6
7614	14-3165	5.68	7651	5009	4
7615	14-1339	4.18	7652	5010	3.78
7616	4996	4.36	7653	5011	2.98
7617	4997	6.25	7654	5582	3.76
7618	4998	2.725	7655	11-1726	2.5
7619	13-0836	3.725	7656	11-1727	2.8
7620	15-1059	3.96	7657	14-2768	4.46
7621	11-1105	4.14	7658	14-2769	7.8
7622	14-2809	2.54	7659	14-2770	5.5
7623	14-2758	6.3	7660	14-2771	3.7
7624	11-1081	6.88	7661	15-1062	4.7
7625	15-1060	2.9	7662	11-1082	4
7626	14-2810	2.8	7663	14-2827	5.58
7627	5019	1.6	7664	14-2772	6.1
7628	5000	3.9	7665	14-2773	5.56
7629	14-2759	4.98	7666	14-2813	3.88
7630	14-2811	3.78	7667	14-2830	5.46
7631	5001	2.5	7668	14-2774	5.12
7632	5002	2.6	7669	14-2775	6.16
7596	4994	3.96	7633	14-2801	5.38
7597	4993	5.16	7634	14-2819	3.88
7598	no sowing	-	7635	14-2760	4.06
7599	15-1055	3.92	7636	14-2761	5.2
7600	15-1056	5.44	7637	14-2762	2.54
7601	14-2754	7	7638	12-0669	5.125
7602	4995	2.58	7639	14-2812	5.18
7603	14-2755	4.36	7640	5003	4.14
7604	14-2822	5.16	7641	5004	3.48
7605	14-2756	5.98	7642	5005	3.44
7606	13-0845	2.8	7643	15-1061	5.34
7607	14-2307	5.6	7644	14-2763	5.38
7608	14-3162	3.4	7645	14-2764	5.4
7609	14-3163	2.5	7646	14-2765	4.94
7610	14-3164	-	7647	14-2766	5.2
7611	14-2757	5.78	7648	5006	6.68
7612	15-1057	6.16	7649	5007	5.25
7613	15-1058	5.04	7650	5008	3.6

Plot No.	line	score average	Plot No.	line	score average
7614	14-3165	5.68	7651	5009	4
7615	14-1339	4.18	7652	5010	3.78
7616	4996	4.36	7653	5011	2.98
7617	4997	6.25	7654	5582	3.76
7618	4998	2.725	7655	11-1726	2.5
7619	13-0836	3.725	7656	11-1727	2.8
7620	15-1059	3.96	7657	14-2768	4.46
7621	11-1105	4.14	7658	14-2769	7.8
7622	14-2809	2.54	7659	14-2770	5.5
7623	14-2758	6.3	7660	14-2771	3.7
7624	11-1081	6.88	7661	15-1062	4.7
7625	15-1060	2.9	7662	11-1082	4
7626	14-2810	2.8	7663	14-2827	5.58
7627	5019	1.6	7664	14-2772	6.1
7628	5000	3.9	7665	14-2773	5.56
7629	14-2759	4.98	7666	14-2813	3.88
7630	14-2811	3.78	7667	14-2830	5.46
7631	5001	2.5	7668	14-2774	5.12
7632	5002	2.6	7669	14-2775	6.16
7533	14-2741	4.98	7570	no sowing	-
7534	11-1073	7.475	7571	15-1050	5.08
7535	4977	3.225	7572	14-2746	4.9
7536	4978	5.6	7573	14-2747	6.975
7537	4979	6.58	7574	15-1051	5.18
7538	14-2831	6	7575	15-1052	5.72
7539	14-2742	5.34	7576	14-2828	4.68
7540	4980	5.96	7577	no sowing	-
7541	4981	4.18	7578	4985	5.06
7542	15-1046	3.56	7579	14-2749	5.7
7543	14-2743	3.2	7580	15-1053	6.1
7544	15-1047	3.48	7581	14-2750	7.8
7545	14-0076	5.2	7582	14-2825	6.4
7546	14-2744	8.3	7583	4986	5.36
7547	12-0448	4.26	7584	4987	5.66
7548	12-0449	6.3	7585	4988	6.28
7549	12-0450	6.6	7586	14-2751	5
7550	4982	6.4	7587	14-2752	5.38
7551	4983	6.5	7588	15-1054	6.9
7552	4984	6.38	7589	14-2753	5.6
7553	14-2802	4.92	7590	14-2798	3.6
7554	14-2820	3.16	7591	4989	4
7555	14-2797	4.94	7592	4990	-

Plot No.	line	score average	Plot No.	line	score average
7556	14-0078	4.06	7593	11-1721	7.25
7557	14-2803	5.625	7594	15-0168	9
7558	14-2804	2.76	7595	14-2799	5.375
7670	14-2776	6.6	7707	15-0316	2.94
7671	15-1063	6.7	7708	15-1066	5.966667
7672	14-2829	6.5	7709	14-2794	4.54
7673	14-2777	5.16	7710	5018	6
7674	14-2824	6.16	7711	15-1067	5.34
7675	14-2778	4.16	7712	14-2324	5.74
7676	14-2814	4.5	7713	14-3151	3.88
7677	14-2815	6	7714	2116	4.06
7678	14-2779	3.4	7715	2126	5.48
7679	14-2780	2	7716	11-1720	3.88
7680	15-1064	5.14	7717	14-3155	4.15
7681	14-2781	6.18	7718	14-3152	2.22
7682	14-2782	4.18	7719	45NC	3
7683	15-1065	4.64	7719	13-2660	-
7684	14-2783	6.08	7720	14-3035	4.29
7685	14-2784	4.76			
7686	14-2785	6.24			
7687	14-2823	6.14			
7688	5012	-			
7689	14-2800	5			
7690	14-2786	4.94			
7691	14-2787	4.4			
7692	14-2788	-			
7693	14-2816	5.166667			
7694	14-2789	4			
7695	14-2790	6.75			
7696	5013	4.8			
7697	5014	6.28			
7698	14-2309	3.6			
7699	14-3166	6.2			
7700	14-3167	4			
7701	14-3168	5			
7702	14-3169	2.9			
7703	14-2792	4.96			
7704	14-2793	5.5			
7705	5015	6.98			
7706	5016	7.68			

- 300여 개의 계통 중 수박 덩굴마름병 저항성으로 판단이 되는 계통들을 개체수를 증가하고, 접종농도를 2배 증가하여 완전한 저항성을 보이는 계통을 선발하기 위해 2차 스크리닝을 진행.

표 2.3 수박 수집 야생종에 대한 덩굴마름병 저항성 계통 스크리닝.

plot	5 x 10 ⁵				1 x 10 ⁶			
	8dpi		16dpi		8dpi		16dpi	
	개체수	평균	개체수	평균	개체수	평균	개체수	평균
4701	5	4.0	5	6.8	5	2.6	5	4.6
4702	5	3.8	5	5.6	5	2.8	5	6.2
4703	5	6.0	5	8.6	5	4.2	5	6.6
4704	4	1.0	4	2.0	5	1.6	5	2.4
4705	5	2.6	5	4.0	5	3.6	5	2.8
4706	5	3.6	5	5.0	5	8.0	5	10.0
4707	3	7.3	3	7.7	5	8.0	5	9.4
4708	4	4.7	4	7.5	4	7.5	4	10.0
4709	5	6.6	5	10.0	5	8.8	5	10.0
4710	4	5.0	4	6.5	4	8.0	4	7.3
4711	5	1.6	5	2.2	5	1.6	5	2.0
4712	5	3.2	5	4.0	5	7.4	5	7.4
4714	3	1.3	3	2.0	5	6.0	5	6.8
4719	5	2.0	4	2.8	2	2.0	2	3.0
4720	5	2.0	5	3.0	5	10.0	5	10.0
4721	5	2.8	5	3.6	5	8.0	5	10.0
4722	2	4.0	2	3.0	2	7.0	2	10.0
4723	5	6.4	5	9.2	5	10.0	5	10.0
4724	5	9.2	5	9.2	5	10.0	5	10.0
4725	5	9.2	5	10.0	5	10.0	5	10.0
4726	5	6.4	5	8.0	5	5.6	5	6.4
4727	5	4.0	5	4.4	5	3.2	5	4.0
4728	4	2.5	4	2.8	3	2.7	3	3.3
4729	5	2.8	5	4.4	4	5.0	4	6.0
4731	4	3.0	4	4.3	5	2.8	5	3.6
4732	5	3.6	5	5.0	5	3.6	5	5.4
4733	5	2.4	5	2.0	5	3.6	5	3.6
4734	5	3.2	5	3.6	5	4.0	5	5.6
4735	5	6.9	5	7.2	5	4.4	5	5.0
4736	5	5.6	5	7.6	5	4.4	5	4.0
4737	5	10.0	5	10.0	5	8.6	5	9.2
4739	5	4.8	5	5.8	4	3.5	4	4.0

plot	5×10^5				1×10^6			
	8dpi		16dpi		8dpi		16dpi	
	개체수	평균	개체수	평균	개체수	평균	개체수	평균
4740	5	4.0	5	4.2	5	4.4	5	4.4
4741	5	4.0	5	3.2	5	6.6	5	7.2
4743	4	5.0	4	5.5	3	3.3	3	2.7
4744	3	2.0	3	2.3	2	7.0	2	7.0
4745	5	4.0	5	5.6	5	6.4	5	7.4
4746	3	8.7	2	2.0	1	4.0	1	6.0
4754	5	4.0	5	7.2	5	6.8	5	9.2
4755	5	5.6	5	5.8	4	4.2	4	5.5
4756	5	4.0	5	4.4	5	7.0	5	6.4
4757	5	7.2	5	7.2	5	5.2	5	6.4
4758	5	4.4	5	7.0	5	5.6	5	7.2
4761	5	2.8	5	5.4	5	5.2	5	6.4
4763	3	3.3	3	7.3	3	6.0	3	7.3
4764	5	2.6	5	2.8	5	2.0	5	4.2
4765	3	1.3	3	1.3	3	2.0	3	3.3

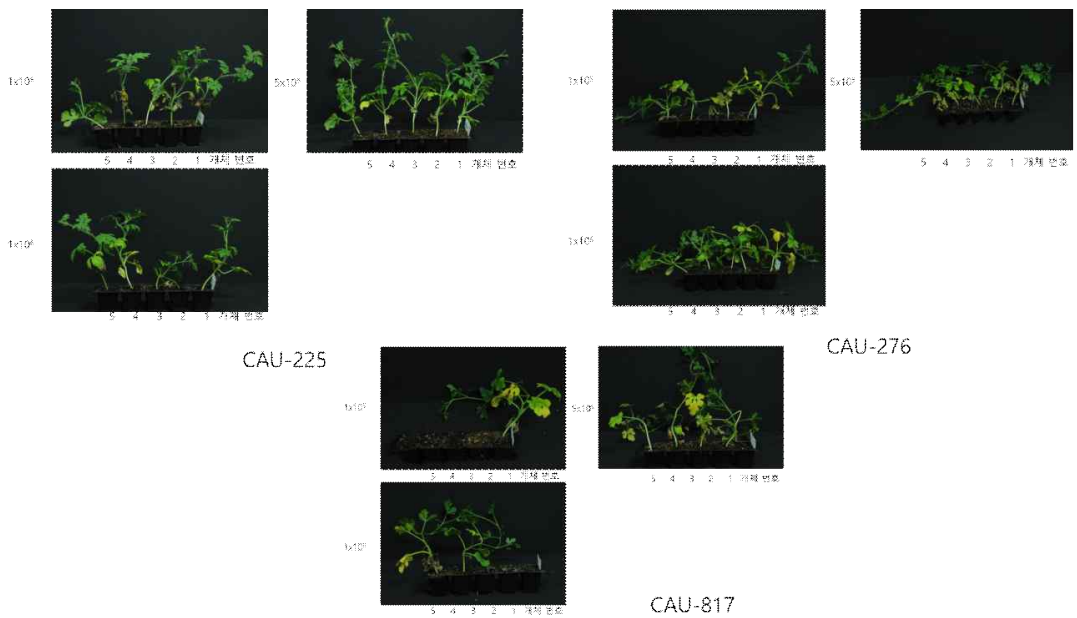


그림 2.11. 농도에 구별 없이 덩굴마름병 저항성으로 판단되는 대표적인 3계통.

- 1차 스크리닝에서 전체 65계통 중 PI189225와 동일한 저항성으로 보이는 6개의 계통 (밑줄 표시가 되어있는 번호)을 선발함.
- 추후 PI189225 계통과 선발된 계통을 이용한 분리집단을 양성하여, 덩굴마름병 저항성 마커개발에 이용하고, 각 저항성에 따른 allele을 발굴전략을 세움

다. 수박 덩굴마름병 저항성 계통인 PI189225 분리집단 검정

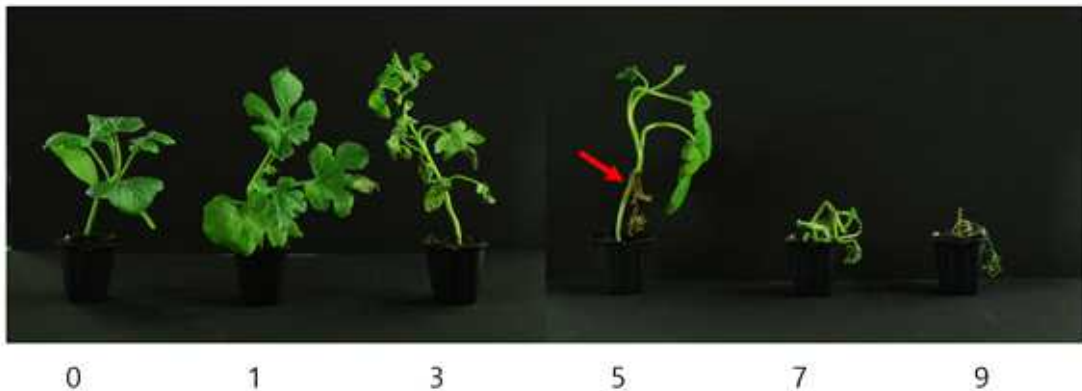
- 본 실험에서 확보된 균주 및 최적의 접종농도를 이용하여 저항성 자원선발을 진행함.
- 덩굴마름병 QTL 분석을 위해 덩굴마름병에 저항성인 PI189225와 감수성인 TS를 교잡하여 작성한 F2:3 집단 97개 계통에 대해서 덩굴마름병 접종 후 표현형 검정을 실시
- PI189225를 모계로 작성된 F2:3집단 48계통과 TS를 모계로 작성된 F2:3집단 49계통, 총 97계통을 3개 plot으로 15립씩 50공 트레이에 과종 후, 유묘가 본엽 2~3매가 전개되는 시점에 덩굴마름병 접종을 실시

(1) PI 189225 분리집단 F2:3 표현형 검정 및 지표설정 방법

- 접종 후 8, 10, 12, 14, 23dpi에 실시하였고, 해당집단의 덩굴마름병 병징지표를 기준으로 덩굴마름병 병징을 관찰함 (그림 2.9).
- 표현형 검정 분석은 F2:3 계통별 병징의 정도를 판별하는 절대적 기준과 병징의 정도 평균값 DI(%), 생존율(%)을 다음과 같이 계산함.

$$DI(\%) = (\text{Sum of all disease rating}) / (\text{Total no. of rating } \times \text{ maximum disease grade}) \times 100.$$

※ 생존율의 경우 0~3점을 저항성 개체, 5~9점을 감수성 개체로 분류한 후, 저항성 개체수를 해당 F2:3 계통의 개체수로 나누어서 구하였음.



- 0점 : 도관수침 없음, 자엽 무병징, 본엽 무병징
- 1점 : 20% 미만의 병징이 자엽 및 본엽 앞에만 보임.
- 3점 : 45%이상의 심각한 병징이 보이기 시작 하고, 도관의 수침이 관찰되지 않음.
- 5점 : 본엽에 20% 미만의 병징이 관찰 되어도, 줄기에 수침현상이 관찰 되면 5점으로 scoring 함.
- 7점 : 본엽에 45%이상의 심각한 병징이 보이고, 줄기 및 잎자루에 수침현상이 관찰.
- 9점 : 고사한 식물.

그림 2.12. 수박 덩굴마름병 접종 후 표현형 검정을 위한 지표설정



TSxPI189225 F2:3
2plot 58-3번 개체

TSxPI189225 F2:3
2plot 156-3번 개체

TSxPI189225 F2:3
2plot 170-4번 개체

그림 2.13. 접종 5dpi 대표적인 감수성 개체 사진.

(2) PI 189225 분리집단 F2:3 대량검정

표 2.4. TS x PI189225 F2:3집단에 대한 덩굴마름병 접종 후 표현형 결과

계통명	8dpi			10dpi			12dpi			14dpi			23dpi		
	평균 단	DI	생존율 %	평균 단	DI	생존율 %	평균 단	DI	생존율 %	평균 단	DI	생존율 %	평균 단	DI	생존율 %
TSxPI189225 F2-4	4.7	46.8	50%	5.1	50.0	50%	6.6	65.9	21%	7.7	78.6	7%	8.7	89.7	0%
TSxPI189225 F2-9	3.6	32.5	64%	4.0	37.3	64%	4.6	43.7	50%	5.9	57.9	29%	7.7	78.6	7%
TSxPI189225 F2-11	5.1	50.4	53%	5.8	57.8	33%	6.9	69.6	20%	7.8	80.0	13%	8.1	83.0	13%
TSxPI189225 F2-23	3.4	37.0	73%	3.7	38.5	67%	4.1	43.0	67%	4.6	47.4	53%	5.3	51.9	47%
TSxPI189225 F2-25	6.0	64.3	43%	6.6	67.5	21%	7.0	70.6	21%	7.4	75.4	21%	7.6	77.0	21%
TSxPI189225 F2-31	2.6	28.1	73%	2.9	31.1	73%	3.3	35.6	73%	3.9	40.0	60%	4.7	45.9	60%
TSxPI189225 F2-36	4.3	45.9	53%	4.7	50.4	53%	6.1	62.2	33%	7.0	71.1	20%	7.7	78.5	13%
TSxPI189225 F2-37	2.7	27.4	92%	3.5	34.2	69%	4.5	44.4	62%	5.2	49.6	54%	6.2	61.5	31%
TSxPI189225 F2-38	4.5	43.0	67%	4.5	43.0	73%	5.7	56.3	27%	6.9	69.6	13%	8.5	87.4	0%
TSxPI189225 F2-43	3.0	31.1	73%	3.8	38.5	67%	4.3	41.5	67%	5.4	53.3	47%	7.3	74.1	7%
TSxPI189225 F2-54	2.9	31.1	87%	3.1	34.1	73%	5.1	53.3	33%	5.9	62.2	33%	6.7	71.1	27%
TSxPI189225 F2-55	5.0	53.2	64%	5.3	56.3	57%	6.3	62.7	36%	7.1	72.2	29%	7.7	78.6	7%
TSxPI189225 F2-58	4.5	47.4	67%	5.5	59.3	47%	6.2	66.7	33%	6.9	74.1	27%	7.1	77.0	20%
TSxPI189225 F2-60	2.5	26.7	80%	3.3	35.6	73%	3.4	37.0	73%	3.4	37.0	73%	4.6	50.4	60%
TSxPI189225	3.5	37.6	69%	4.1	44.4	54%	5.2	56.4	38%	6.8	75.2	23%	7.5	82.1	23%

계통명	8dpi			10dpi			12dpi			14dpi			23dpi		
	평균	DI	생장속도	평균	DI	생장속도	평균	DI	생장속도	평균	DI	생장속도	평균	DI	생장속도
F2-61															
TSxPI189225 F2-62	2.1	22.2	87%	2.6	28.1	73%	3.8	38.5	60%	4.3	44.4	53%	5.8	57.8	27%
TSxPI189225 F2-64	4.3	40.5	64%	4.6	43.7	57%	4.9	46.8	50%	5.3	51.6	43%	5.9	57.9	43%
TSxPI189225 F2-72	3.5	31.7	64%	4.0	37.3	57%	4.7	45.2	43%	5.6	54.8	43%	6.0	59.5	36%
TSxPI189225 F2-74	5.6	56.3	36%	5.7	57.9	36%	5.9	57.9	36%	6.4	64.3	29%	7.6	77.0	21%
TSxPI189225 F2-75	2.2	22.2	93%	2.3	24.6	86%	2.4	26.2	86%	2.9	29.4	86%	4.6	50.0	64%
TSxPI189225 F2-76	3.7	40.0	67%	4.3	47.4	60%	5.1	56.3	47%	5.1	56.3	40%	6.9	74.1	20%
TSxPI189225 F2-80	2.3	25.6	85%	3.0	33.3	77%	3.2	35.0	77%	3.3	36.8	69%	4.8	53.8	46%
TSxPI189225 F2-100	6.7	72.6	27%	7.4	75.6	20%	7.9	81.5	13%	8.1	83.0	7%	8.5	87.4	7%
TSxPI189225 F2-102	2.7	29.1	85%	2.5	27.4	85%	2.8	30.8	85%	3.8	41.0	54%	5.5	58.1	38%
TSxPI189225 F2-104	5.5	60.7	47%	5.8	63.7	40%	6.2	68.1	33%	6.9	75.6	13%	7.9	84.4	7%
TSxPI189225 F2-109	3.9	42.7	62%	3.9	42.7	62%	4.4	44.4	54%	4.7	47.9	54%	5.2	53.0	54%
TSxPI189225 F2-117	3.4	34.1	67%	4.1	38.5	60%	5.1	50.4	47%	5.5	54.8	33%	7.0	71.1	27%
TSxPI189225 F2-121	3.4	34.1	57%	3.7	37.3	64%	5.0	48.4	50%	5.7	56.3	29%	7.4	75.4	14%
TSxPI189225 F2-123	2.2	23.7	87%	2.7	29.6	80%	3.4	34.1	67%	4.1	41.5	53%	5.5	54.8	40%
TSxPI189225 F2-134	3.0	32.4	92%	3.0	32.4	92%	3.0	32.4	92%	3.3	32.4	67%	6.2	60.2	33%
TSxPI189225 F2-138	2.4	26.2	93%	3.0	31.0	86%	3.3	34.1	79%	4.1	43.7	50%	6.1	65.9	36%
TSxPI189225 F2-143	2.1	23.0	93%	2.1	23.0	93%	2.6	27.8	86%	2.6	27.8	86%	3.6	37.3	86%
TSxPI189225 F2-150	3.3	35.6	60%	4.3	47.4	53%	4.7	51.9	47%	5.8	62.2	27%	7.4	80.0	13%
TSxPI189225 F2-156	3.0	32.6	80%	3.1	34.1	80%	3.5	38.5	73%	3.7	37.0	60%	5.1	51.9	53%
TSxPI189225 F2-160	3.7	38.0	75%	5.2	50.9	42%	5.7	54.6	42%	7.5	75.0	8%	8.8	89.8	0%
TSxPI189225 F2-161	1.1	11.9	100%	2.3	25.2	80%	3.0	32.6	80%	4.5	45.9	47%	5.8	57.8	40%
TSxPI189225 F2-170	2.3	20.0	80%	2.9	25.2	73%	3.7	34.1	67%	4.2	40.0	60%	5.3	51.9	47%
TSxPI189225 F2-171	2.4	18.8	85%	2.4	18.8	85%	3.5	30.8	69%	5.5	53.0	38%	6.7	66.7	15%
TSxPI189225 F2-175	1.3	12.0	100%	1.3	12.0	100%	1.5	13.7	100%	1.9	20.5	92%	3.0	30.8	77%
TSxPI189225 F2-185	2.7	26.9	83%	2.2	23.1	83%	3.2	32.4	75%	4.8	49.1	50%	5.8	56.5	25%
TSxPI189225 F2-191	2.0	22.2	93%	1.9	20.6	93%	2.7	30.2	79%	3.6	39.7	71%	5.1	57.1	43%
TSxPI189225	3.5	35.9	85%	2.8	30.8	85%	2.8	30.8	85%	3.3	35.9	85%	4.4	44.4	62%

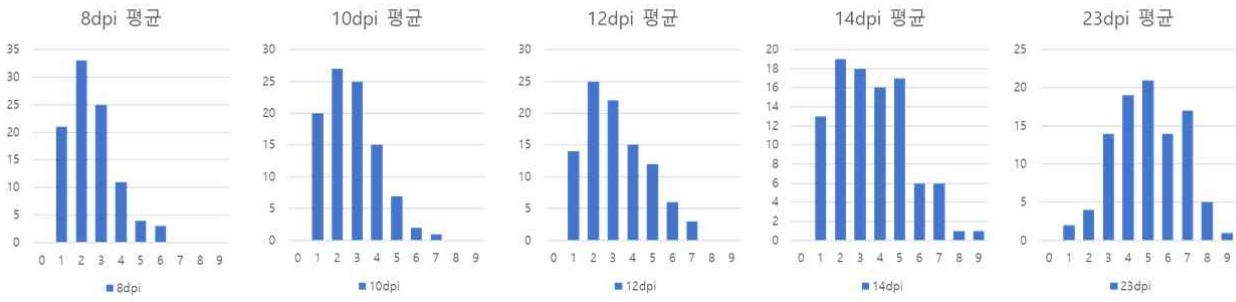
계통명	8dpi			10dpi			12dpi			14dpi			23dpi		
	평균 편	DI	생 장 속 도 %	평균 편	DI	생 장 속 도 %	평균 편	DI	생 장 속 도 %	평균 편	DI	생 장 속 도 %	평균 편	DI	생 장 속 도 %
F2-198															
TSxPI189225 F2-201	3.7	38.5	73%	3.8	40.0	73%	5.0	53.3	60%	5.8	62.2	47%	6.2	66.7	47%
TSxPI189225 F2-204	6.1	61.1	36%	6.6	65.9	29%	7.9	80.2	14%	9.0	92.9	0%	9.0	92.9	0%
TSxPI189225 F2-211	1.9	20.2	100%	1.5	16.2	100%	2.3	24.2	82%	3.2	34.3	73%	4.8	52.5	45%
TSxPI189225 F2-229	4.7	44.4	62%	4.8	46.2	54%	5.0	47.9	54%	6.4	63.2	31%	7.3	73.5	8%
TSxPI189225 F2-246	2.9	24.6	86%	3.1	27.8	71%	4.3	40.5	64%	5.4	53.2	29%	6.7	67.5	21%
TSxPI189225 F2-249	3.8	39.3	77%	4.4	46.2	54%	4.8	51.3	46%	5.5	56.4	31%	7.2	71.8	8%
TSxPI189225 F2-252	3.5	37.6	77%	3.3	35.9	77%	4.8	47.9	54%	5.8	58.1	31%	7.2	71.8	23%

표 2.5. PI189225 x TS F2:3집단에 대한 덩굴마름병 접종 후 표현형 결과

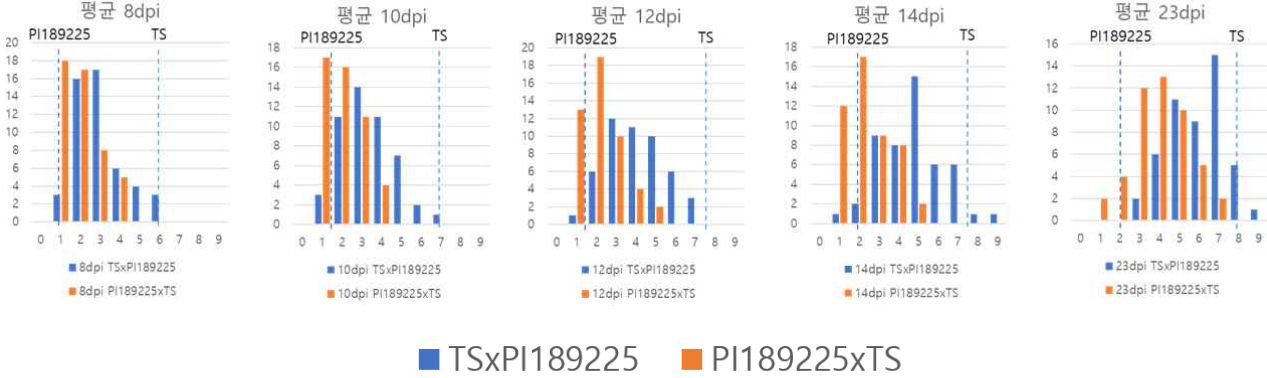
계통명	8dpi			10dpi			12dpi			14dpi			23dpi		
	평균	DI	생식가능률	평균	DI	생식가능률	평균	DI	생식가능률	평균	DI	생식가능률	평균	DI	생식가능률
PI189225xTS F2-1	4.3	48.1	67%	3.9	43.2	67%	3.9	43.2	67%	3.9	43.2	67%	5.0	55.6	56%
PI189225xTS F2-4	3.0	32.3	82%	3.0	32.3	73%	3.0	32.3	73%	3.2	34.3	73%	4.6	50.5	55%
PI189225xTS F2-8	1.9	19.8	93%	2.0	21.4	93%	2.1	23.0	93%	2.3	24.6	86%	3.7	40.5	79%
PI189225xTS F2-10	2.8	30.0	90%	2.0	21.1	90%	2.2	23.3	90%	2.4	25.6	80%	4.6	50.0	50%
PI189225xTS F2-18	3.6	37.6	77%	3.8	39.3	69%	4.1	42.7	62%	4.2	44.4	54%	6.1	65.0	38%
PI189225xTS F2-62	1.9	20.2	91%	1.9	20.2	91%	2.1	20.2	91%	2.5	22.2	82%	4.6	42.4	55%
PI189225xTS F2-82	2.1	23.0	93%	2.3	24.6	93%	2.6	27.8	86%	3.0	32.5	64%	5.9	62.7	43%
PI189225xTS F2-100	2.6	27.8	86%	3.0	32.5	71%	3.4	37.3	64%	3.6	38.9	64%	5.0	54.8	50%
PI189225xTS F2-104	4.3	44.4	67%	3.4	37.0	67%	3.9	42.0	56%	4.6	49.4	44%	6.1	61.7	33%
PI189225xTS F2-120	4.5	47.9	69%	4.5	47.9	69%	4.5	47.9	69%	4.7	49.6	69%	4.8	53.0	62%
PI189225xTS F2-137	2.4	25.6	85%	2.5	27.4	77%	2.7	29.1	77%	2.8	30.8	77%	3.6	39.3	69%
PI189225xTS F2-153	4.0	38.9	60%	4.4	38.9	60%	4.8	43.3	50%	4.8	43.3	50%	5.6	52.2	50%
PI189225xTS F2-165	3.5	37.6	69%	3.8	41.0	77%	4.5	49.6	54%	4.8	53.0	46%	6.8	73.5	31%
PI189225xTS F2-166	1.7	17.8	87%	2.1	22.2	87%	2.2	23.7	87%	2.5	26.7	87%	3.7	40.0	73%
PI189225xTS F2-170	1.0	10.4	100%	1.1	11.9	100%	1.1	11.9	100%	1.1	11.9	100%	2.5	26.7	87%
PI189225xTS F2-171	1.3	13.5	100%	1.6	16.7	93%	1.7	18.3	93%	2.0	21.4	86%	4.3	46.8	64%
PI189225xTS F2-177	2.0	22.2	90%	2.6	28.9	80%	3.4	37.8	60%	3.8	42.2	60%	5.0	55.6	50%
PI189225xTS F2-180	2.1	21.4	93%	1.7	16.7	93%	2.1	21.4	86%	2.3	24.6	71%	5.0	53.2	43%
PI189225xTS F2-185	1.6	18.2	91%	1.7	19.2	91%	1.7	19.2	91%	1.7	19.2	91%	3.2	35.4	64%
PI189225xTS F2-186	1.7	16.7	93%	2.4	23.0	79%	2.6	24.6	71%	3.3	31.0	64%	5.4	53.2	50%
PI189225xTS F2-190	1.9	19.8	100%	1.9	19.8	86%	2.1	23.0	79%	2.4	23.8	77%	4.4	48.4	57%
PI189225xTS F2-193	1.6	16.7	93%	1.4	15.1	93%	1.4	15.1	93%	1.4	15.1	93%	2.1	23.0	86%
PI189225xTS F2-195	3.4	35.6	67%	3.0	32.6	73%	3.7	40.0	60%	4.2	45.9	53%	5.3	57.8	53%
PI189225xTS F2-199	2.2	22.2	87%	2.1	20.7	87%	2.2	22.2	87%	2.3	23.7	80%	3.4	35.6	73%
PI189225xTS F2-203	3.7	41.4	64%	4.6	51.5	55%	5.0	55.6	45%	5.2	57.6	45%	7.9	87.9	18%
PI189225xTS F2-206	1.8	18.8	100%	1.3	13.7	100%	1.3	13.7	100%	1.2	12.0	100%	1.6	17.1	100%

계통명	8dpi			10dpi			12dpi			14dpi			23dpi		
	평균	DI	새집사염	평균	DI	생존율	평균	DI	새집사염	평균	DI	새집사염	평균	DI	새집사염
PI189225xTS F2-211	2.7	29.6	80%	2.9	31.1	80%	2.9	31.1	80%	2.9	31.1	80%	3.9	41.5	73%
PI189225xTS F2-213	3.0	25.6	92%	3.2	27.4	85%	3.5	30.8	77%	3.8	34.2	69%	4.7	44.4	62%
PI189225xTS F2-217	1.9	19.8	93%	2.3	24.6	79%	2.3	24.6	79%	2.4	26.2	79%	3.1	34.1	71%
PI189225xTS F2-221	2.7	26.2	79%	2.6	24.6	79%	2.6	24.6	79%	2.7	24.6	79%	4.0	37.3	64%
PI189225xTS F2-224	2.4	25.6	92%	2.2	23.9	92%	2.4	25.6	92%	2.7	29.1	85%	4.5	47.9	62%
PI189225xTS F2-225	2.0	22.2	100%	1.8	20.0	100%	2.0	22.2	90%	2.4	26.7	90%	3.8	42.2	80%
PI189225xTS F2-227	4.6	48.4	50%	4.9	53.2	43%	5.4	59.5	36%	5.7	62.7	36%	7.3	78.6	29%
PI189225xTS F2-229	1.7	16.7	93%	1.1	11.9	100%	1.4	15.1	93%	1.6	16.7	86%	5.4	59.5	50%
PI189225xTS F2-230	1.7	13.3	93%	1.7	11.9	93%	1.8	13.3	93%	1.8	13.3	87%	3.5	32.6	80%
PI189225xTS F2-232	1.5	16.3	100%	1.3	13.3	100%	1.3	13.3	100%	1.3	13.3	100%	1.7	17.8	93%
PI189225xTS F2-233	1.3	13.9	100%	1.3	13.9	100%	1.3	13.9	100%	1.3	13.9	100%	3.2	34.3	83%
PI189225xTS F2-235	3.4	37.0	73%	3.4	37.0	73%	3.8	41.5	67%	4.3	47.4	47%	5.3	57.8	47%
PI189225xTS F2-239	2.1	21.4	100%	1.4	13.5	100%	1.6	15.1	93%	1.6	16.7	93%	2.3	23.0	93%
PI189225xTS F2-240	2.3	24.4	93%	2.2	23.7	93%	2.2	23.7	93%	2.5	26.7	80%	4.6	48.9	60%
PI189225xTS F2-243	2.9	31.1	73%	3.3	35.6	67%	3.3	35.6	67%	3.8	41.5	60%	6.5	69.6	27%
PI189225xTS F2-244	2.7	26.2	71%	2.6	24.6	71%	2.6	24.6	71%	3.0	29.4	71%	4.7	45.2	57%
PI189225xTS F2-245	1.5	16.3	93%	1.5	16.3	87%	1.5	16.3	87%	1.9	18.5	86%	2.7	29.6	87%
PI189225xTS F2-250	1.9	19.3	93%	1.7	17.8	93%	1.7	17.8	93%	1.8	19.3	87%	3.8	40.0	67%
PI189225xTS F2-276	2.6	28.1	87%	2.5	26.7	87%	2.6	28.1	87%	2.6	28.1	87%	4.3	45.9	60%
PI189225xTS F2-288	3.4	38.3	78%	3.4	38.3	78%	3.9	43.2	67%	4.1	45.7	56%	6.3	70.4	22%
PI189225xTS F2-290	1.6	16.7	100%	1.4	15.1	100%	1.4	15.1	100%	1.4	15.1	100%	3.1	31.0	71%
PI189225xTS F2-296	2.4	26.2	86%	2.0	21.4	86%	2.1	23.0	86%	2.1	23.0	86%	4.1	40.5	64%

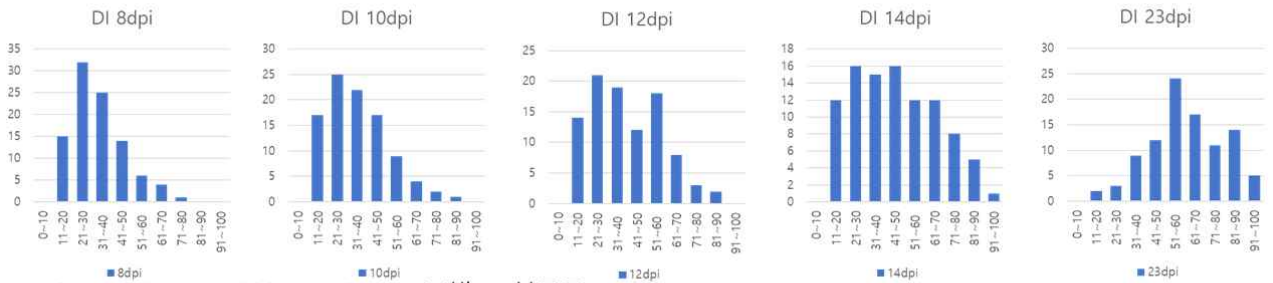
TSxPI189225, PI189225xTS F2:3 dpi별 평균 분포도



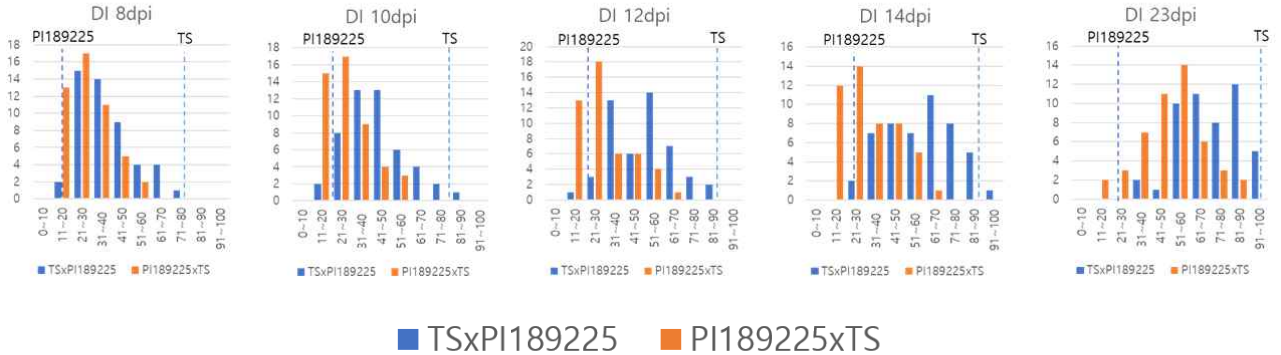
TSxPI189225 vs PI189225xTS F2:3 dpi별 평균 분포도



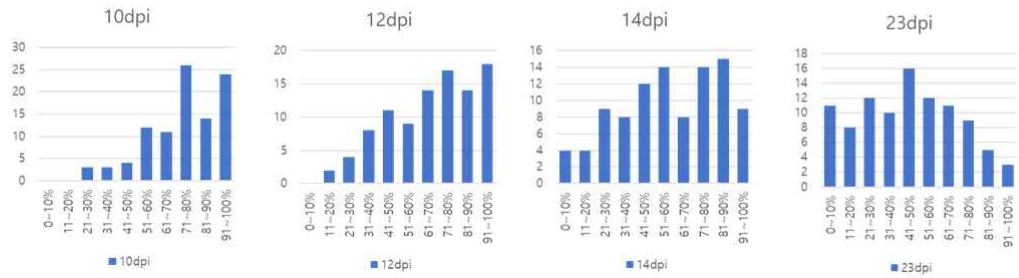
TSxPI189225, PI189225xTS F2:3 dpi별 DI 분포도



TSxPI189225 vs PI189225xTS F2:3 dpi별 DI 분포도



TSxPI189225, PI189225xTS F2:3 dpi별 생존률 분포도



TSxPI189225 vs PI189225xTS F2:3 dpi별 생존률 분포도

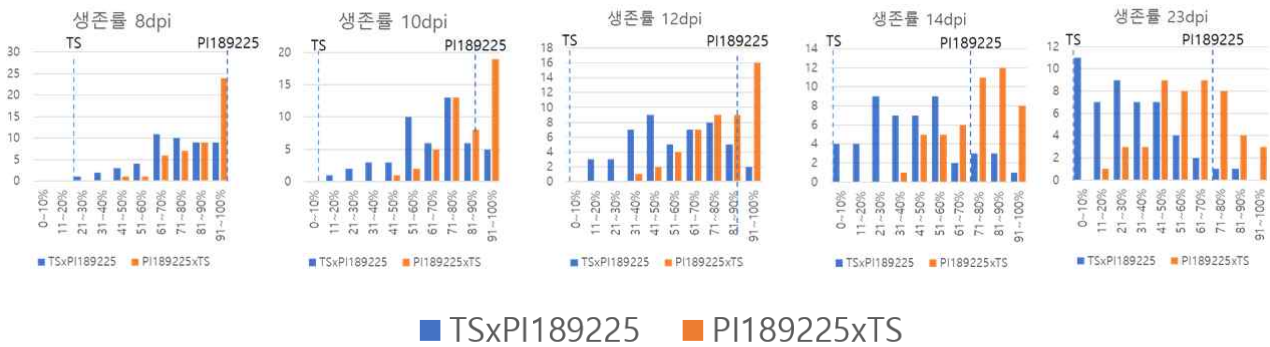


그림 2.14. TS x PI189225 (48계통), PI189225 x TS (47계통) F2:3 dpi별 평균, DI, 생존율 분포도

(3) PI 189225의 수박 덩굴마름병 저항성 QTL 분석

- PI189225 집단 유래 F2:F3 분리세대의 덩굴마름병 저항성 QTL 분석
- PI189225 계통을 이용한 분리집단 F2의 GBS 결과를 기반으로, 각 F2에서 유래한 F3 개체들에 대한 덩굴마름병 저항성 표현형 검정을 실시함.
- 작성된 유전자 지도를 기반으로, QTL분석을 MapQTL 6.0을 사용하여 cofactor를 활용한 MQM 분석을 바탕으로 덩굴마름병의 저항성 연관 부위를 확인 할 수 있었음.

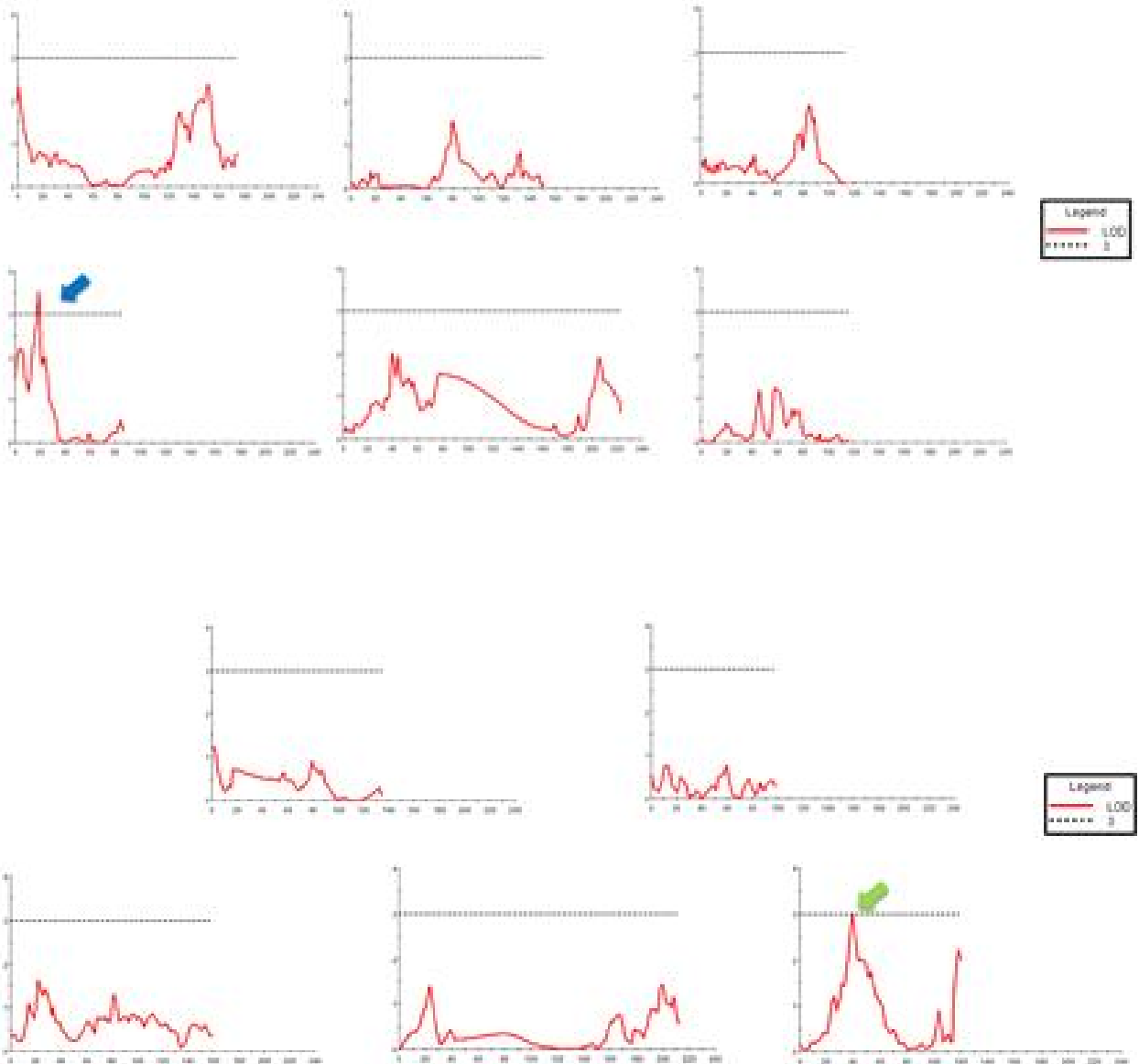


그림 2.15. MapQTL을 이용한 수박 덩굴마름병 QTL 분석

○ BSA-NGS를 통한 연관마커 개발

- TS x PI189225 F3, PI189225 x TS F3 집단에서 수박 덩굴마름병을 접종 후 8dpi~23dpi의 표현형이 F3 family에서 동일하게 나타나는 감수성 25개체 저항성 25개체를 각각 샘플링 하여 DNA를 추출함.
- 각각의 DNA를 동량으로 pooling하여 Illumina NovaSeq 6000을 이용하여 NGS를 수행함.
- 도출된 서열을 이용하여 Bowtie2 프로그램을 이용해 생산된 염기서열과 2013년에 발표된 수박 97103 reference ver.1 기반으로 BAM파일을 생산하고, 도출된 BAM파일을 토대로 VCF (Variant Call Format)를 확보하여 표현형과 연관된 마커발굴을 수행함.
- 감수성 및 저항성 bulk 각각에 대하여 BSA(bulk segregant analysis)-NGS를 수행한 결과로

확보된 VCF파일로 deltaSNP를 구하였음.

표 2.5. TS x PI189225 F2:3 집단의 저항성 선발 개체 (선발 개체 음영처리)

계통명	1반복					2반복					3반복					총개체수	0~3점	5~9점	생존율	평균	DI
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5						
F2-023	9	9	3	1	7	9	5	9	1	3	9	5	3	3	3	15	7	8	47%	5.3	58.5
F2-025	9	9	9	9		3	9	3	1	9	9	9	9	9	9	14	3	11	21%	7.6	84.1
F2-031	9	3	9	1	1	3	1	1	9	1	3	9	9	9	3	15	9	6	60%	4.7	52.6
F2-054	5	9	9	3	1	9	1	1	9	9	9	9	9	9	9	15	4	11	27%	6.7	74.8
F2-060	1	1	3	7	1	3	9	9	3	5	3	9	3	9	3	15	8	6	53%	4.6	51.1
F2-062	9	9	5	9	5	1	9	9	5	1	9	3	5	5	3	15	4	11	27%	5.8	64.4
F2-064	9	9	3	1	9	1	3	9	9	9	9	9		1	1	14	6	8	43%	5.9	65.1
F2-072	9	9	9	9	9	7	1	1	9	9	9	1	1	1		14	5	9	36%	6.0	66.7
F2-123	9	5	5	9	3	1	1	5	9	9	3	9	3	9	3	15	6	9	40%	5.5	61.5
F2-161	9	3	3	5	9	3	9	5	9	3	1	1	9	9	9	15	6	9	40%	5.8	64.4
F2-170	9	1	5	9	9	3	1	9	9	5	3	1	9	3	3	15	7	8	47%	5.3	58.5
F2-175	3		3		1	9	3	1	5	3	1	1	5	1	3	13	10	3	77%	3.0	33.3
F2-198	5	9	9	3	1	3	3		3	3	3	3	5	7		13	8	5	62%	4.4	48.7
F2-211	1	9	9	1	9	3			3			5	3	5	5	11	4	6	36%	4.8	53.5

표 2.6. TS x PI189225 F2:3 집단의 감수성 선발 개체 (선발 개체 음영처리)

계통명	1반복					2반복					3반복					총 개체수	0~3점	5~9점	생존율	평균	DI
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5						
F2-004	9		9	9	9	9	9	5	9	9	9	9	9	9	9	14	0	14	0%	8.7	96.8
F2-009	9	9	9	9	9		9	7	5	1	9	9	7	7	9	14	1	13	7%	7.7	85.7
F2-011	9	9	9	9	9	9	3	9	9	9	9	9	9	7	3	15	2	13	13%	8.1	89.6
F2-036	9	9	9	9	9	9	1	1	5	9	9	9	9	9	9	15	2	13	13%	7.7	85.2
F2-038	9	9	9	9	9	9	9	9	5	9	9	9	9	9	5	15	0	15	0%	8.5	94.1
F2-043	9	9	7	9	9	7	9	5	5	5	9	9	5	9	3	15	1	14	7%	7.3	80.7
F2-055	9	9		9	9	9	9	3	9	9	5	9	5	5	9	14	1	13	7%	7.7	85.7
F2-100	9	1	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	15	1	14	7%	8.5	94.1
F2-104	5	7	9	9	9	3	9	5	9	9	9	9	9	9	9	15	1	14	7%	7.9	88.1
F2-121	9	9	9	9	7	3	9	5	9	9	3		5	9	9	14	2	12	14%	7.4	82.5
F2-150	3	5	9	9	9	5	9	9	9	9	9	3	9	9	5	15	2	13	13%	7.4	82.2
F2-160	9	9	9			9	9	9	9	9	9	9	9	7		12	0	12	0%	8.8	98.1
F2-204	9	9	9		9	9	9	9	9	9	9	9	9		9	14	0	14	0%	9.0	100
F2-229	9		9	9		9	9	5	5	5	9	9	5	3	9	13	1	12	8%	7.3	81.2
F2-249	9	7	9	5	9	9		9	5	9	3		5	5	9	13	1	12	8%	7.2	79.5

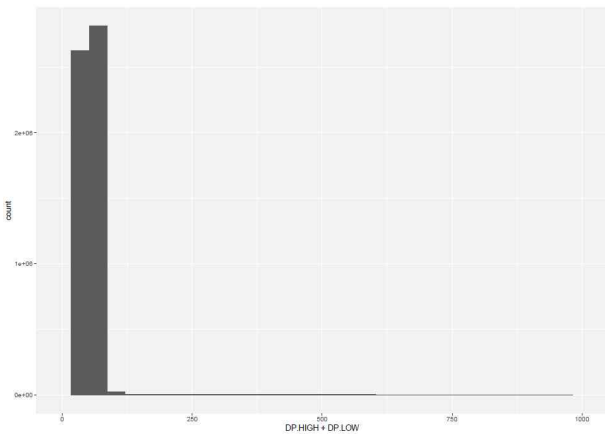
표 2.7. PI189225 x TS F2:3 집단의 저항성 선발 개체 (선발 개체 음영처리)

계통명	1반복					2반복					3반복					총 개체수	0~3점	5~9점	생존율	평균	DI
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5						
F2-166	1	3	3	1	3	3	3	3	1	3	5	9	5	9	3	15	10	4	67%	3.7	40.7
F2-170	1	1	1	1	3	1	3	3	7	7	1	1	3	1	3	15	12	2	80%	2.5	27.4
F2-193	1	1	1	1	1	3	3	3	5		1	3	1	1	5	14	11	2	79%	2.1	23.8
F2-199	3	3	3	9	3	3	5	5	5	3	1	1	3	1	3	15	11	4	73%	3.4	37.8
F2-206	1	1	1	3	3	1	1		3	3	1		1	1	1	13	12	0	92%	1.6	17.9
F2-211	3	1	3	9	9	3	9	7	1	3	3	3	1	1	3	15	11	4	73%	3.9	43.7
F2-230	9	3	3	1	1	3	3	1	3	1	3	3	3	9	7	15	12	3	80%	3.5	39.3
F2-232	1	7	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	3	1	1	15	13	1	87%	1.7	18.5
F2-233	1	1			1	3	3		7	3	1	3	3	9	3	12	9	2	75%	3.2	35.2
F2-239	3	1	3	3	1	9	3	1	1	3	1	1	1	1		14	13	1	93%	2.3	25.4
F2-245	1	9	1	1	1	3	1	1	1	3	3	1	3	9	3	15	12	2	80%	2.7	30.4
F2-250	3	1	3	1	9	3	5	9	5	3	3	3	1	5	3	15	10	5	67%	3.8	42.2
F2-290	5	3	5	9	3	1	1	3	5	3	1	1	1	3		14	10	4	71%	3.1	34.9

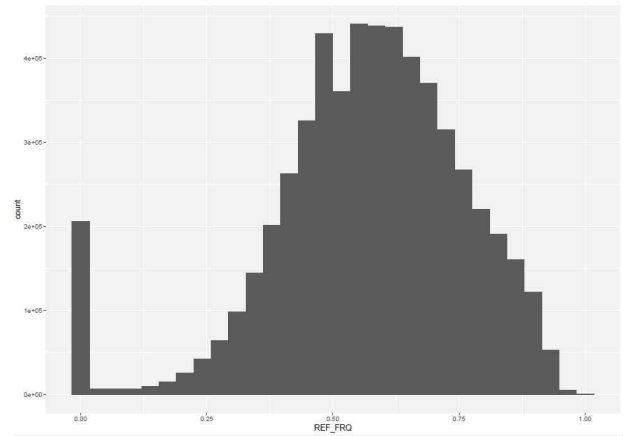
표 2.8. PI189225 x TS F2:3 집단의 감수성 선발 개체 (선발 개체 음영처리)

계통명	1반복					2반복					3반복					총개체수	0~3점	5~9점	생존율	평균	DI
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5						
F2-004	1	1		3	5	9	7		1	5		9	3	3	11	6	5	55%	4.6	51.5	
F2-010	1		1	3	7		9	5	5	9	3		3		10	5	5	50%	4.6	51.1	
F2-018	3	9		3	3	3	9	9	9	3	5	9	9	5	13	5	8	38%	6.1	67.5	
F2-062	9	3	1	9			5	3	3		3	1		9	5	11	6	5	55%	4.6	51.5
F2-082	3	3		9	3	5	5	9	9	9	3	3	3	9	9	14	6	8	43%	5.9	65.1
F2-100	1	9	5		9	9	9	1	5	3	3	1	3	3	9	14	7	7	50%	5.0	55.6
F2-104	5	1	9	1	9			9	3					9	9	9	3	6	33%	6.1	67.9
F2-165	3	9	3	3	3	5	9	9	9	9	9	9			9	13	4	9	31%	6.8	76.1
F2-180	3	5	1		9	1	9	3	9	1	7	3	9	5	5	14	6	8	43%	5.0	55.6
F2-195	1	3	3	1	1	9	9	9	7	9	3	9	3	9	3	15	8	7	53%	5.3	58.5
F2-203		9		9	3	9	3	9		9	9	9	9		9	11	2	9	18%	7.9	87.9
F2-227	3	9	3		3	9	9	3	9	9	9	9	9	9	9	14	4	10	29%	7.3	81.0
F2-229	1	5	3	1	3		3	3	9	9	9	9	9	3	9	14	7	7	50%	5.4	60.3
F2-235	1	3	1	1	3	9	9	9	5	9	1	9	9	3	7	15	7	8	47%	5.3	58.5
F2-243	3	9	3	3	5	7	9	9	9	9	3	5	9	5	15	4	11	27%	6.5	71.9	
F2-288				3	9	7	9		9		5	5	1		9	9	2	7	22%	6.3	70.4

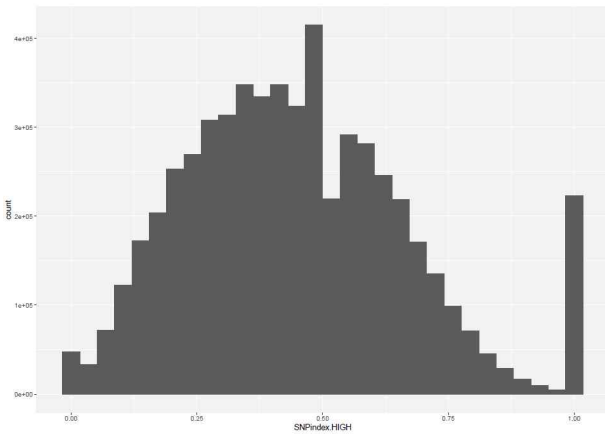
-TS x PI189225 F3 BSA-NGS 결과



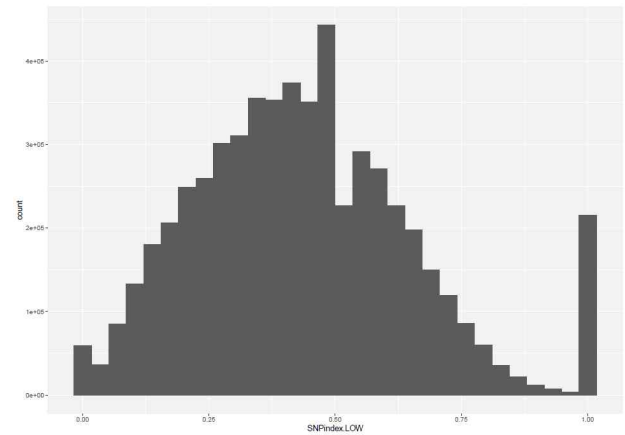
Read-depth histogram



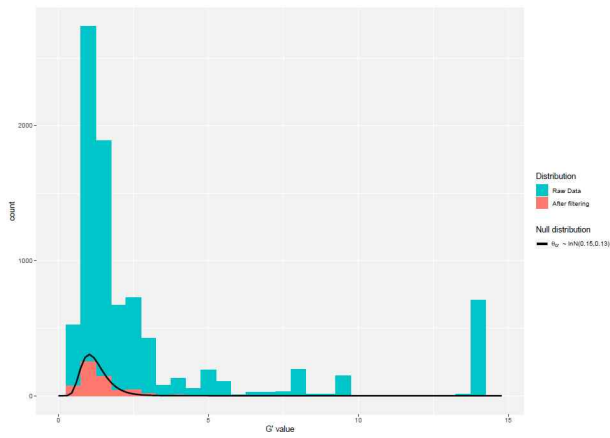
Total reference allele frequency



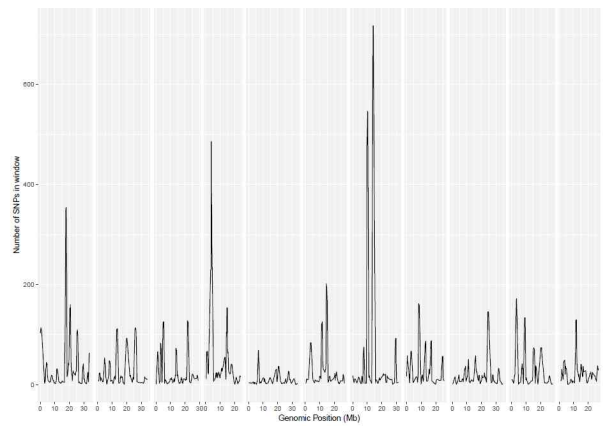
Resistant bulk count



Susceptible bulk count



Gprime value distribution



연관군별 윈도우 내 SNP의 개수 분포

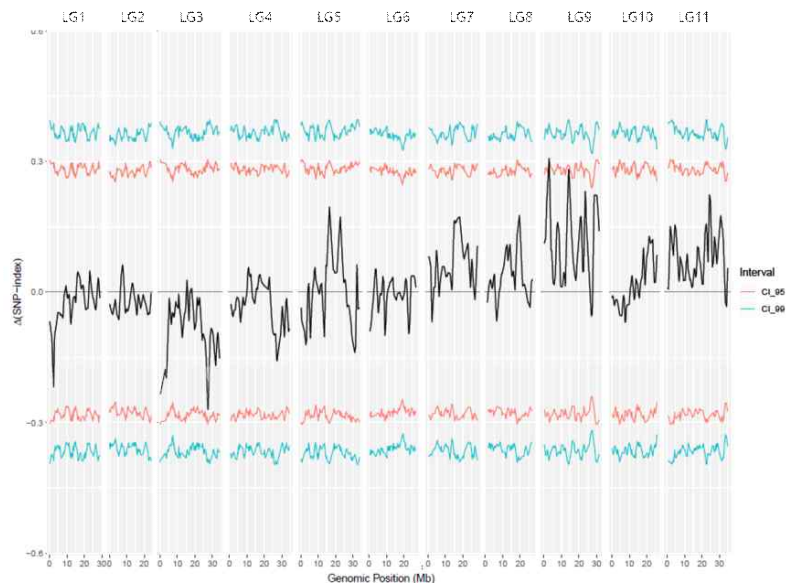


그림 2.16. deltaSNP index with confidence interval plotting ($p=0.05, 0.01$)

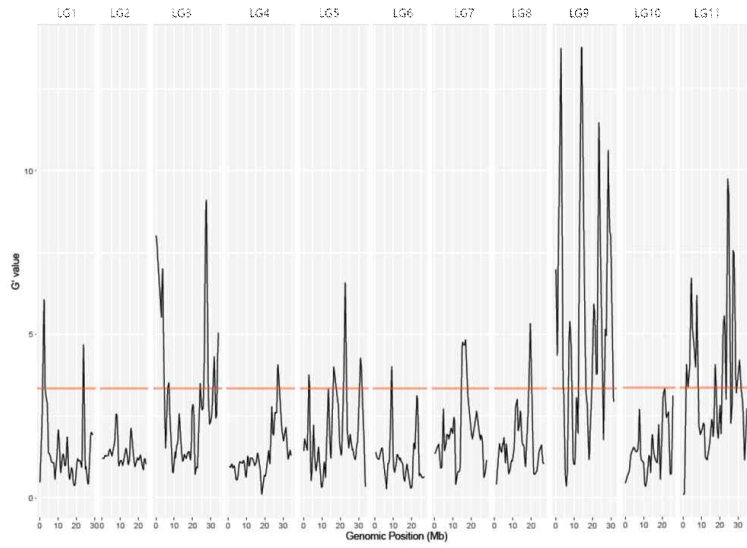
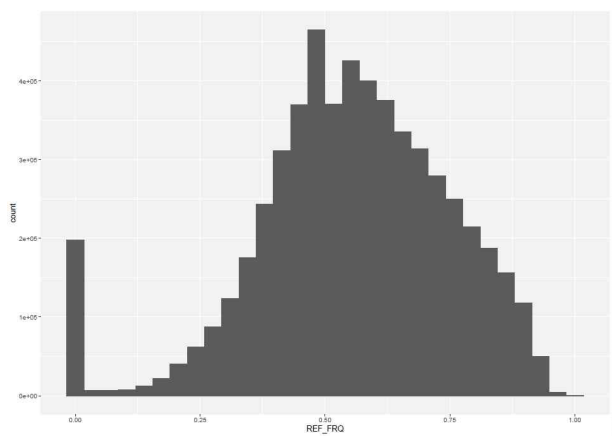
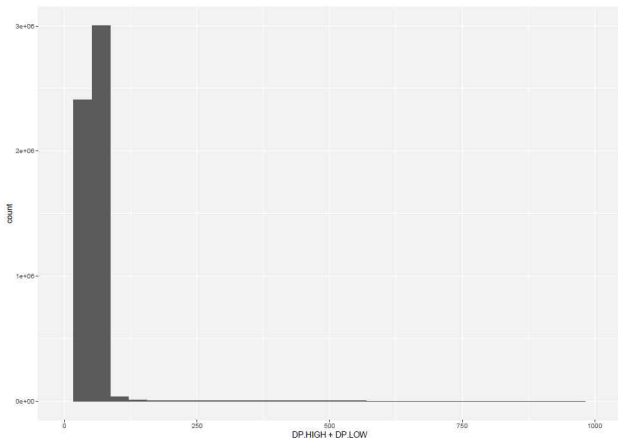


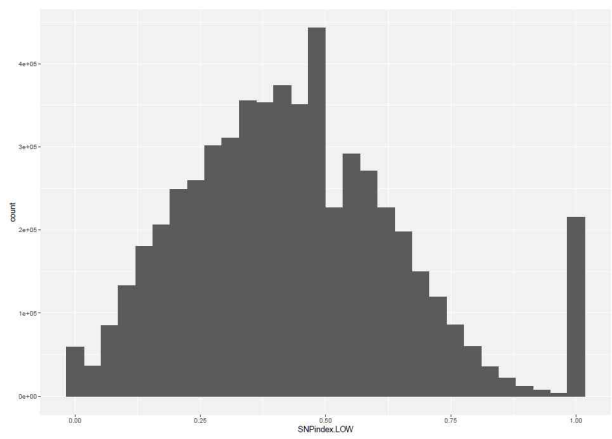
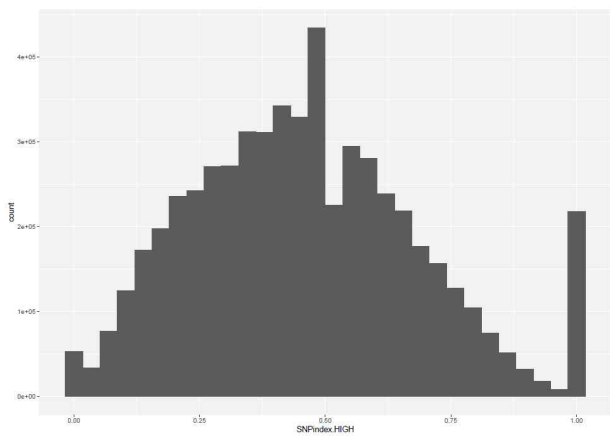
그림 2.17. Gprime value 유의도에 따른 연관군별 QTL 분포

-PI189225 x TS F3 BSA-NGS 결과



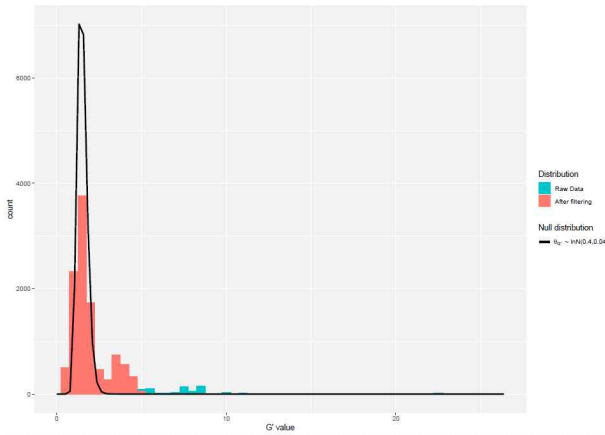
Read-depth histogram

Total reference allele frequency

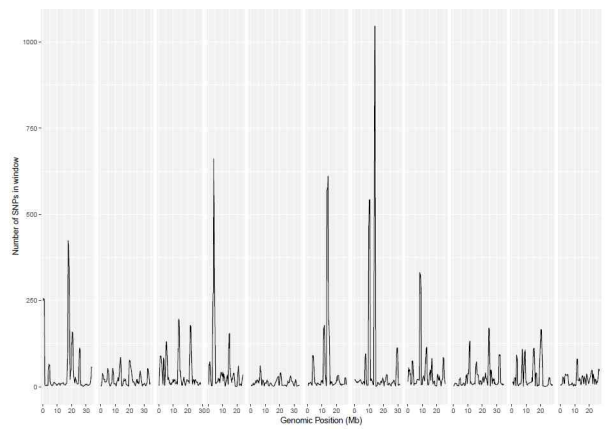


Resistant bulk count

Susceptible bulk count



Gprime value distribution



연관군별 윈도우 내 SNP의 개수 분포

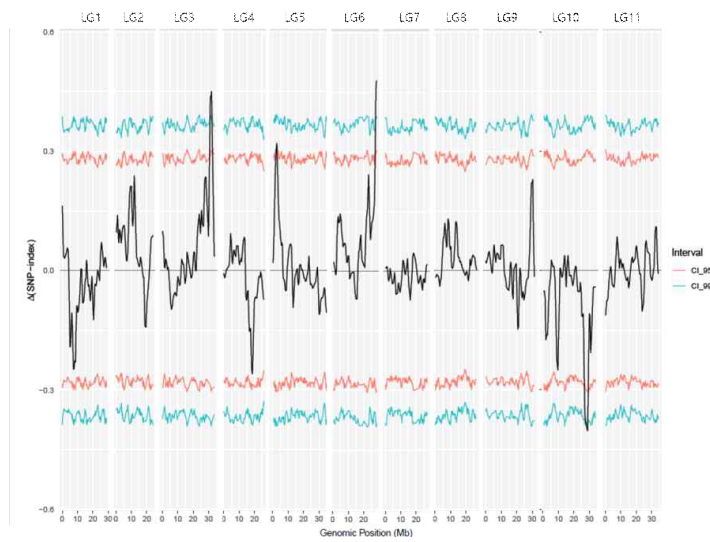


그림 2.18. deltaSNP index with confidence interval plotting ($p=0.05, 0.01$)

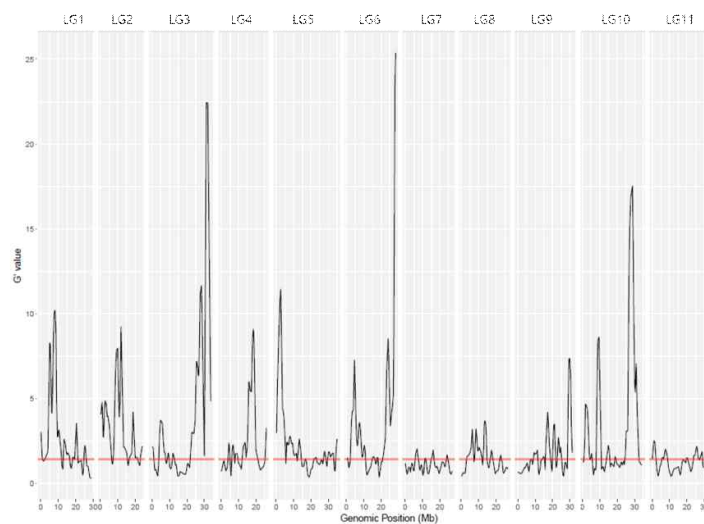


그림 2.19. Gprime value 유의도에 따른 연관군별 QTL 분포

- TS x PI189225, PI189225 x TS F2:3집단을 이용한 BSA-NGS를 통한 연관마커 개발
- BSA-NGS 결과를 통해 TS x PI189225 F3 집단의 경우 LG9의 2지역, PI189225 x TS F3 집단의 경우 LG3, LG5, LG6 각 1개의 지역이 수박 덩굴마름병 저항성에 관여할 것으로 예상할 수 있었다.
- 해당 지역의 유전자들을 수박 reference genome(97103)에서 탐색한 결과 해당 지역에는 다수의 저항성 관련 유전자들이 발견되었다(표 6, 표 7).

표 2.9. TS x PI189225 F3 집단의 덩굴마름병 저항성 관련 QTL 지역내 병 저항성 관련 유전자 리스트

LG	Gene ID	Description
LG9	Cla00xx04	Ethylene-responsive transcription factor-like protein (AHRD V1 *-** F4JS76_ARATH); contains Interpro domain(s) IPR001471 Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF, DNA-binding
	Cla00xx29	Leucine-rich repeat/extensin (AHRD V1 **-- A3KD20_NICPL); contains Interpro domain(s) IPR013210 Leucine-rich repeat, N-terminal
	Cla00xx37	Ethylene-responsive transcription factor (AHRD V1 **** A5HSG1_9FABA); contains Interpro domain(s) IPR001471 Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF, DNA-binding
	Cla00xx80	Cc-nbs -lrr resistance protein
	Cla00xx82	Cc-nbs -lrr resistance protein
	Cla00xx64	Leucine-rich repeat receptor-like tyrosine-protein kinase
	Cla00xx85	Ethylene-responsive transcription factor (Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF, DNA-binding)

표 2.10. PI189225 x TS F3 집단의 덩굴마름병 저항성 관련 QTL 지역내 병 저항성 관련 유전자 리스트

LG	Gene ID	Description	
LG3	Cla0xxx26	Leucine-rich repeat-containing protein	
	cla0xxx35	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (Fragment)	
LG5	Cla0xxx15	Ethylene responsive transcription factor 2a (Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF, DNA-binding)	
	Cla0xxx67	Ethylene-responsive transcription factor 1 (Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF, DNA-binding)	
	Cla0xxx47	Leucine-rich repeat receptor-like kinase	
	Cla0xxx36	Ethylene-responsive transcription factor 4 (Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF, DNA-binding)	
	Cla0xxx32	Ethylene-responsive transcription factor 7 (Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF, DNA-binding)	
	Cla0xxx80	Callose synthase (Glycosyl transferase, family 48)	
	Cla0xxx78	Callose synthase (Glycosyl transferase, family 48)	
	Cla0xxx58	Nbs-lrr resistance protein	
	Cla0xxx57	Cc-nbs -lrr resistance protein	
	Cla0xxx22	Pathogenesis-related thaumatin-like protein (Thaumatococcus, pathogenesis-related)	
	Cla0xxx18	Nbs-lrr resistance protein	
	Cla0xxx17	Cc-nbs-lrr resistance protein	
	Chr6	Cla0xxx24	Nbs-lrr resistance protein

Cla0xxx13	Cc-nbs -lrr resistance protein (
Cla0xxx12	Cc-nbs -lrr resistance protein
Cla0xxx75	Nbs-lrr resistance protein
Cla0xxx76	Nbs-lrr resistance protein
Cla0xxx78	Nbs-lrr resistance protein
Cla0xxx62	Pathogenesis-related protein (Allergen V5/Tpx-1 related)
Cla0xxx12	Leucine Rich Repeat family protein expressed (Leucine-rich repeat, N-terminal)
Cla0xxx04	Ethylene-responsive transcription factor 10 (Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF, DNA-binding)
Cla0xxx07	Leucine-rich repeat receptor-like tyrosine-protein kinase
Cla0xxx64	Disease resistance-responsive (Dirigent -like protein) family protein (Plant disease resistance response protein)
Cla0xxx19	Ethylene-responsive transcription factor 1 (Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF, DNA-binding)
Cla0xxx20	Ethylene-responsive transcription factor 1 (Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF, DNA-binding)
Cla0xxx77	Thaumatococcus-like protein (Thaumatococcus, pathogenesis-related)

○ PI189225 수박 덩굴마름병 저항성 자원을 이용한 마커 개발

- 수박 덩굴마름병 저항성에 관여할 것으로 예상되는 지역내 BSA-NGS를 통하여 확보된 SNP들을 기반으로 HRM 마커를 작성 작성된 HRM 마커를 통하여 표현형이 검정된 F2, F3세대의 genotyping결과 수박 덩굴 마름병 표현형과의 연관성이 떨어지는 것으로 확인되었다.
- 표 8 의 BSA-NGS로 도출된 SNP 기반으로 작성된 HRM 마커의 정확도가 떨어지는 이유로는 표현형 검정에 사용된 F2:3집단의 전체 계통수의 부족으로 인하여 각 저항성, 감수성 개체들이 양극치의 표현형을 대변하지 못한 것으로 예상된다.
- 수박 덩굴 마름병의 저항성 계통으로 사용된 PI189225의 경우 잘 알려진 저항성 계통이지만 논문 Gusmini, et al, 2005에 의하면 수집된 1332계통의 수박 덩굴 마름병 저항성 표현형을 조사한 내용을 참고하면, PI189225의 저항성 보다 강한 저항성을 보이는 저항성 자원들을 보고하였고, PI189225와 PI271778의 저항성 자원을 이용하여 다음 제시하는 4 종류의 저항성 품종 ‘AU-Producer’, ‘AU-Golden Producer’, ‘AU-Jubilant’, ‘AU-Sweet Scarlet’들을 개발하였는데, 이 모든 계통들이 PI189225 보다 낮은 저항성을 보이는 것으로 확인되었다. 이러한 이유는 덩굴마름병의 저항성에 관여하는 다수의 양적형질의 유전자가 존재하기 때문에, 저항성 계통을 선발 하는 것이 어렵고, 고정하면서 linkage disequilibrium에 의해 불필요한 유전자의 유입 및 원하는 유전자 세트를 고정 및 선발이 힘들기 때문에 덩굴마름병 저항성 자원을 개발하는 것이 어렵다고 시사하고 있다.

표 2.11. PI189225 x TS F3 집단의 수박 덩굴마름병 저항성 관련 QTL 지역내 SNP기반을 작성된 HRM결과. (Group1: TS, Group2: PI189225, Group3: F1)

개체 번호	마커	LG317	LG1027	LG3429	LG218	LG260	LG277
	표현형						
F2:3 166 1-4	저항성	Group3	Group3	Group3	Group1	Group2	Group2
F2:3 166 2-4	저항성	Group2	Group3	Group3	Group2	Group2	Group2
F2:3 170 1-2	저항성	Group3	Group2	Group2	Group1	Group3	Group3
F2:3 170 3-2	저항성	Group2	Group2	Group2	Group1	Group2	Group2
F2:3 193 1-1	저항성	Group2	Group3	Group2	Group2	Group3	Group3
F2:3 193 3-3	저항성	Group2	Group3	Group2	Group2	Group3	Group3
F2:3 199 3-4	저항성	Group2	Group1	Group2	Group2	Group1	Group3
F2:3 206 1-1	저항성	Group2	Group2	Group2	Group3	Group2	Group2
F2:3 206 2-2	저항성	Group2	Group3	Group2	Group2	Group2	Group2
F2:3 206 3-3	저항성	Group2	Group1	Group2	Group3	Group2	Group2
F2:3 211 3-4	저항성	Group2	Group3	Group3	Group2	Group3	Group1
F2:3 230 1-4	저항성	Group2	Group3	Group1	Group3	Group3	Group1
F2:3 230 2-3	저항성	Group1	Group3	Group1	Group1	Group3	Group1
F2:3 232 1-4	저항성	Group3	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F2:3 232 2-2	저항성	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F2:3 232 3-2	저항성	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F2:3 233 1-2	저항성	Group1	Group1	Group1	Group3	Group1	Group2
F2:3 239 1-5	저항성	Group2	Group2	Group3	Group2	Group3	Group3
F2:3 239 3-4	저항성	Group3	Group3	Group1	Group1	Group2	Group2
F2:3 245 2-3	저항성	Group2	Group3	Group3	Group1	Group1	Group2
F2:3 245 3-2	저항성	Group2	Group3	Group1	Group2	Group2	Group2
F2:3 250 1-4	저항성	Group1	Group1	Group1	Group3	Group1	Group1
F2:3 250 3-3	저항성	Group3	Group1	Group1	Group2	Group1	Group1
F2:3 004 2-1	감수성	Group3	Group1	Group1	Group1	Group3	Group3
F2:3 010 2-5	감수성	Group3	Group3	Group3	Group2	Group2	Group1
F2:3 018 2-2	감수성	Group1	Group1	Group1	Group3	Group1	Group1
F2:3 018 3-2	감수성	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F2:3 062 1-1	감수성	Group3	Group1	Group1	Group3	Group1	Group1
F2:3 082 2-3	감수성	Group2	Group1	Group1	Group2	Group2	Group2
F2:3 082 2-4	감수성	Group3	Group1	Group1	Group2	Group1	Group1
F2:3 082 3-5	감수성	Group3	Group1	Group1	Group2	Group1	Group1
F2:3 100 1-2	감수성	Group1	Group3	Group1	Group3	Group2	Group2
F2:3 100 2-1	감수성	Group1	Group1	Group3	Group3	Group2	Group2
F2:3 104 3-5	감수성	Group1	Group1	Group3	Group2	Group2	Group1
F2:3 165 2-2	감수성	Group3	Group3	Group1	Group1	Group1	Group1
F2:3 165 2-5	감수성	Group3	Group1	Group1	Group2	Group1	Group1
F2:3 165 3-5	감수성	Group3	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1

F2:3 180 2-4	감수성	Group3	Group1	Group2	Group1	Group1	Group1
F2:3 180 3-3	감수성	Group2	Group1	Group3	Group2	Group1	Group1
F2:3 195 3-2	감수성	Group1	Group2	Group2	Group3	Group3	Group2
F2:3 203 1-4	감수성	Group1	Group1	Group1	Group1	Group3	Group3
F2:3 227 3-5	감수성	Group3	Group3	Group1	Group3	Group1	Group1
F2:3 229 2-4	감수성	Group1	Group2	Group3	Group3	Group1	Group1
F2:3 235 2-5	감수성	Group1	Group3	Group1	Group2	Group3	Group1
F2:3 235 3-3	감수성	Group1	Group1	Group1	Group2	Group2	Group1

- Norton(1979)의 보고에 의하면 PI189225는 덩굴마름병에 대해 단인자 열성 유전을 하는 것으로 보고 하였지만, 최근 G Gusmini and TC wehner, 2017 논문에 의하면 PI189225, PI482283, PI526233의 계통을 이용한 집단에서 덩굴마름병 저항성은 다수의 유전자좌와 환경적인 요인에 의해 결정된다고 보고함.
- 본 실험에 사용한 F2:3 집단 분석 시 전체 계통의 개수가 100계통 미만이며, 반복적인 실험이 필요하나, 확보된 F2:3 집단의 종자수가 부족하여, 3차년도부터 추가로 PI189225 유래 RIL집단을 양성하기로 하였으며, 특히 새로운 저항성 계통의 분리집단을 활용하여 좀더 심도 있는 표현형 검정을 수행하고자 하였음.
- 이에 따라, 새롭게 발굴한 덩굴마름병 저항성 유전자원 및 PI189225에 다른 감수성 상업계통을 교잡하여 덩굴마름병 저항성에 대한 유전양식을 규명하고자 하였음.
- TS x PI189225 RIL 집단의 표현형 검정
 - 다수의 유전자좌에 의하여 표현형이 결정될 것으로 예상되기 때문에 heterotype의 유전형이 다수 포함되어 있는 F2, F3 세대에서는 표현형과 유전자형간의 해석이 명확하지 않을 수 있기 때문에, RIL 집단을 활용하여 좀 더 심도 있는 표현형 검정을 수행하였음
 - 현재 F6~F7세대의 약 50계통들에 대하여 표현형 검정을 진행했음
- 현재까지 이루어진 결과를 활용하여 최소 2개의 연관군내 QTL을 대상으로 SNP 마커를 발굴하고, PI189225 F2:3 및 RIL 집단의 개체들을 대상으로 표현형과의 co-segregation을 확인하였고, 주관과제 육종회사의 신규 저항성 계통 육성에 활용.
- SBA x CAU-276 F3 집단 작성
 - 수박 수집 야생종에 대한 덩굴마름병 저항성 계통 스크리닝 결과 선발된 CAU-276 계통과 재배종인 SBA간에 작성된 F3 세대를 3차년도에 작성완료하였고, 4차년도에 접종시험을 실시함.
 - 수박 덩굴마름병의 경우 저항성 유전양상을 폭넓게 확인하고 이해하기 위하여 실험실에서 보유하고 있는 수박 고정계통들에 대한 수박 덩굴마름병 저항성 계통 스크리닝 결과 PI189225보다 강한 저항성을 보이는 CAU-276 계통을 선발 할 수 있었고, 과육이 적색이며, 당도가 높은 재배종인 SBA를 이용하여 총 301개의 CAU-276 x SBA F2:3 분리집단을 전개하여 이중 170개체에서 종자를 획득하여 표현형 검정을 수행하였음.

표 12. 수박 수집 야생종들에 대한 수박 덩굴 마름병 저항성 계통 스크리닝 결과

Germplasm	Taxonomy	Country	생존율(%)	평균	DI
CAU-276	<i>C. amarus</i>	Zimbabwe	100.0	2.7	29.6
CAU-283	<i>C. amarus</i>	Zimbabwe	100.0	2.8	31.5
CAU-311	<i>C. amarus</i>	Zimbabwe	100.0	2.7	29.6
IT160391	<i>C. lanatus</i>	china	91.7	3.5	38.9
IT188208	<i>C. amarus</i>	Botswana	91.7	3.2	35.2
PI482345	<i>C. lanatus</i>	Zimbabwe	91.7	3.2	35.2
PI494527	<i>C. mucosospermus</i>	Nigeria, Ogun	91.7	3.5	38.9
PI299379	<i>C. amarus</i>	South Africa	91.7	3.3	37.0
IT190088	<i>C. lanatus</i>	Uzbekistan	83.3	3.3	37.0
PI491265	<i>C. lanatus</i>	Zimbabwe	83.3	3.3	37.0
PI505604	<i>C. amarus</i>	Zambia	83.3	3.7	40.7
PI189225	<i>C. amarus</i>	Democratic Republic of the Congo	83.3	3.7	40.7



그림 2.20 CAU-276 x SBA 집단 과실사진.

○ CAU-276 x SBA F2:3집단 수박 덩굴마름병 표현형 검정

- CAU-276 x SBA F2:3 집단의 채종 된 170 계통에 대하여 수박 덩굴마름병 병원균 접종 후 표현형 검정을 위해서 32공 tray에 8개체 2반복으로 파종하여 본엽 2~3매 전개 단계에 접종을 실시

표 2.13. CAU-276 x SBA F2:3 수박 덩굴마름병 접종 후 12dpi 표현형 검정 결과

계통	생존율(%)	평균	DI	계통	생존율(%)	평균	DI	계통	생존율(%)	평균	DI
1	62.5	3.8	41.7	86	87.5	3.3	4.9	184	87.5	3.5	2.8
4	62.5	4.3	42.5	87	85.7	3.0	4.5	186	87.5	3.5	2.8
7	62.5	4.5	40.9	88	100.0	2.8	4.0	187	100.0	3.0	2.4
8	50.0	5.0	41.7	89	28.6	5.3	7.7	188	100.0	2.8	2.2
9	100.0	3.0	23.1	90	100.0	2.8	3.9	190	87.5	3.3	2.5
10	85.7	3.9	27.6	92	87.5	3.8	5.2	193	0.0	9.0	7.0
11	100.0	2.8	18.3	94	75.0	3.0	4.1	199	87.5	3.8	2.9
14	87.5	3.5	21.9	95	87.5	3.8	5.1	200	12.5	8.3	6.3
15	75.0	3.5	20.6	96	87.5	3.5	4.7	204	25.0	6.3	4.7
16	75.0	4.0	22.2	97	87.5	3.3	4.3	206	50.0	5.0	3.8
17	80.0	4.2	22.1	98	87.5	3.0	3.9	209	50.0	5.3	3.9

18	100.0	3.0	15.0
19	100.0	3.0	14.3
20	25.0	4.8	21.6
22	37.5	5.8	25.0
23	87.5	2.8	11.5
24	75.0	3.8	15.0
25	87.5	3.8	14.4
26	50.0	4.0	14.8
28	12.5	7.5	26.8
30	87.5	3.0	10.3
31	75.0	4.3	14.2
32	75.0	4.0	12.9
35	50.0	4.8	14.8
36	75.0	3.5	10.6
37	87.5	3.5	10.3
38	50.0	4.5	12.9
39	100.0	3.0	8.3
40	87.5	3.3	8.8
41	87.5	2.8	7.2
43	87.5	3.0	7.7
45	87.5	3.5	8.8
46	57.1	5.6	13.6
47	100.0	2.8	6.5
49	87.5	3.5	8.1
50	100.0	3.0	6.8
51	87.5	3.3	7.2
52	12.5	6.8	14.7
54	87.5	3.8	8.0
55	87.5	3.5	7.3
56	37.5	5.3	10.7
58	100.0	3.0	6.0
61	100.0	2.3	4.4
63	100.0	2.8	5.3
65	100.0	3.0	5.7
66	100.0	2.4	4.5
70	100.0	2.5	4.5
72	100.0	3.0	5.4
73	100.0	3.0	5.3
74	50.0	4.5	7.8
75	62.5	5.0	8.5
76	75.0	4.0	6.7
78	75.0	3.5	5.7

101	37.5	4.5	5.8
103	100.0	3.0	3.8
104	62.5	5.0	6.3
105	25.0	5.5	6.8
107	100.0	3.0	3.7
110	42.9	5.0	6.0
113	12.5	6.5	7.7
114	87.5	3.8	4.4
115	62.5	4.3	4.9
117	50.0	5.3	6.0
119	62.5	4.8	5.4
121	37.5	4.5	5.1
122	75.0	4.5	5.0
124	87.5	3.3	3.6
125	100.0	3.0	3.3
126	62.5	4.3	4.6
127	100.0	1.5	1.6
130	100.0	2.5	2.6
132	62.5	5.0	5.2
134	50.0	4.3	4.4
135	62.5	4.8	4.8
136	50.0	4.3	4.3
139	50.0	4.5	4.5
147	87.5	3.0	3.0
148	87.5	3.0	2.9
149	28.6	5.9	5.7
153	87.5	3.8	3.6
154	25.0	5.8	5.5
155	25.0	6.5	6.1
158	62.5	4.0	3.7
159	100.0	3.0	2.8
160	25.0	7.3	6.7
161	12.5	7.5	6.8
162	37.5	5.5	5.0
164	75.0	4.5	4.0
165	87.5	3.3	2.9
169	87.5	3.3	2.9
170	87.5	3.8	3.3
172	85.7	3.3	2.8
173	75.0	3.5	3.0
174	100.0	3.0	2.5
177	71.4	4.7	4.0

210	14.3	6.7	5.0
213	37.5	6.0	4.4
214	62.5	4.0	2.9
216	100.0	2.4	1.8
217	75.0	3.8	2.7
222	100.0	2.8	2.0
223	62.5	4.3	3.0
225	100.0	3.0	2.1
226	75.0	4.0	2.8
229	75.0	4.5	3.1
230	75.0	3.5	2.4
232	87.5	3.3	2.2
233	100.0	3.0	2.0
234	87.5	3.8	2.5
235	50.0	6.0	4.0
236	83.3	4.0	2.6
238	71.4	4.1	2.7
244	62.5	4.3	2.8
246	85.7	3.6	2.3
248	50.0	5.8	3.7
251	25.0	7.5	4.8
252	37.5	5.8	3.7
255	87.5	3.5	2.2
257	25.0	6.5	4.1
259	87.5	2.8	1.7
264	40.0	6.6	4.1
271	62.5	4.3	2.6
274	100.0	3.0	1.8
275	85.7	3.9	2.3
277	75.0	3.8	2.3
278	75.0	4.5	2.7
279	75.0	3.5	2.1
280	50.0	5.0	3.0
281	100.0	2.5	1.5
282	75.0	4.5	2.6
283	100.0	3.0	1.7
284	87.5	3.8	2.2
286	100.0	3.0	1.7
289	62.5	3.8	2.1
292	25.0	5.5	3.1
293	25.0	6.3	3.5
298	75.0	4.5	2.5

81	66.7	5.0	8.1
82	75.0	3.8	6.0
83	87.5	3.5	5.5
85	75.0	3.8	5.8

178	87.5	3.3	2.7
179	100.0	2.8	2.3
181	100.0	1.5	1.2
183	100.0	1.5	1.2

299	62.5	4.5	2.5
301	37.5	5.5	3.1

○ CAU-276 x SBA 집단 GBS 분석 및 mapping

- CAU-276 x SBA F2 분리집단의 170 계통을 대상으로 GBS library를 작성하였고, F2:3 분리 집단의 170 계통을 대상으로 표현형 검정을 실시
- 본 집단과 PI189225 집단에서 확인된 QTL들 간 비교시 매우 비슷한 양상을 나타내어 동일한 위치에서 major QTL에 대한 수박 덩굴마름병 저항성 연관마커로 활용하기 위하여 주관기관의 신규 저항성 자원의 선발마커로 활용

2. 수박 Watermelon mosaic virus 2(WMV2) 내병성 분자유종 시스템 확립

가. WMV2 저항성 육종을 위한 바이러스 동정 및 내병성 검정 환경의 확립

- 수박에 만연하는 것으로 알려진 바이러스병은 potyvirus (ZYMV, WMV2, PRSV-W 등), tobamovirus (CGMMV, ZGMMV, KGMMV 등), CMV, MNSV, gemini virus 등이 있다. 그 중 potyvirus들은 진딧물을 매개충으로 하여 transmission이 되며, 종자에 전염소독을 해도 온실 및 노지 주변의 기주식물들에 존재하는 진딧물에 의하여 감염되기 때문에 효과적인 방제가 어렵기 때문에 저항성 계통을 육성하는 것이 중요함
- 본 과제에서는 potyvirus에 대해 저항성으로 보고되고 있는 PI595203 소재를 일차적으로 이용하여, WMV2 저항성에 연관된 지역을 확인하고자 하였음.

(1) 수박 Watermelon Mosaic Virus 2 바이러스의 동정

- Watermelon Mosaic Virus 2 (family: *Potyviridae*, genus: *Potyvirus*)
- 국내 재배포장에서 WMV2의 신규 바이러스 isolate 2종류를 확보 수집 후 RT-PCR 및 ELISA 방법을 이용하여 수박에 감염성이 있는 isolate를 본 실험에 사용함.

[Enzyme-Linked Immunosorbent Assay]

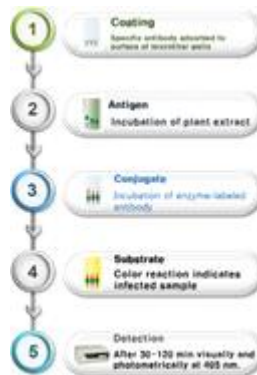


그림 2.21. ELISA 실험 모식도

[WMV-2 DAS-ELISA 실험 방법]

사용한 kit

WMV-2(watermelon mosaic virus 2) complete kit 480

사용한 시약

1. Nunc-Immuno Plates MaxiSorp F96
2. IgG 1000X (Dilute IgG 1000X in coating buffer, $\mu\text{l}/\text{ml}$)
3. Coating buffer(pH 9.6)
4. Washing buffer(PBST buffer, Dissolve in distilled water, 10g/L, pH7.4)
5. Extraction buffer 10X(Dilute 10x in distilled water, 100ml/L, pH 7.4)
6. Conjugate buffer10X(Dilute 10X in distilled water, 10ml/100ml, pH 7.4)
7. Substrate buffer 5X(Dilute 5X in distilled water, 20ml/100ml, pH 9.8))
8. Enzyme conjugate 1000X(Dilute 1000X in conjugate buffer, $\mu\text{l}/\text{ml}$)
9. Positive control
10. Negative control

<Method>

1. Coating : Specific antibody adsorbed to surface of microtiter wells

1-1. Coating buffer(pH 9.6) 제조

멸균된 100ml 유리병에 깨끗한 마그네틱 바를 넣고 DW 100ml을 넣은 후 Coating buffer tablets을 녹여준다. 완전히 다 녹은 후 50ml falcon tube에 분주하여 보관한다.

1-2. Washing buffer(pH 7.4) 제조

Washing buffer(PBS-Tween) 파우더를 1L유리병에 DW를 이용하여 녹여준다.(10g/L)

1-3. Loading and Incubation

Antibody(IgG) 1000X를 Coating buffer에 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 로 희석해준다. (well당 200 μl 씩 계산하여 섞어준다.)

Humid box를 DW를 이용하여 습도를 유지하여 준비한 box 및 plate를 호일로 감싸준다.

Antibody(IgG)와 Coating buffer가 섞인 용액을 well당 200 μl 씩 분주하여주고 호일로 감싸준 뒤 incubation(30°C, 4H).

1-4. Washing

반응이 끝난 plate를 96-well plate에 들어있는 용액을 버린 후 multi-Pipette을 이용하여 1X washing buffer를 각 well에 200 μl 씩 분주한다. cross contamination이 되지 않게 shaking한 후 용액을 버리고 well에 1X washing buffer가 남아 있지 않도록 paper tissue에 완전히 털어준다.

이와 같은 방법으로 5,4,3,2,1min 각 새로운 washing buffer를 이용하여 총 5번 washing하여준다.

2. Antigen : Incubation of plant extract

2-1. Dilution of extraction buffer

10X extraction buffer를 DW를 이용하여 1X로 희석하여준다.

2-2. Homogenize test sample

Antigen으로 사용될 잎 sample을 100mg ceive 봉투에 넣고 extraction buffer 2ml을 넣어준뒤 볼을 이용하여 잘 갈아준다

2-3. Loading and incubation

sample 준비가 완료 되었으면, Kit에 들어있는 Nunc-Immuno Plates MaxiSorp F96 plates에 sample을 각 well당 200 μ l씩 분주한 후 Plate 및 습도를 유지한 컨테이너에 호일로 감싸주고 plate를 습도를 유지한 humid box에 넣어 incubation (4°C, overnight)

2-4. Washing

반응이 끝난 plate를 96-well plate에 들어있는 용액을 버린 후 multi-Pipette을 이용하여 1X washing buffer를 각 well에 200 μ l씩 분주한다. cross contamination이 되지 않게 shaking한 후 용액을 버리고 well에 1X washing buffer가 남아 있지 않도록 paper tissue에 완전히 털어준다. 이와 같은 방법으로 5,4,3,2,1min 각 새로운 washing buffer를 이용하여 총 5번 washing하여준다.

3. Conjugate : Incubation of enzyme-labeled antibody

3-1. Dilution of conjugate buffer

10X conjugate buffer를 DW를 이용하여 1X로 희석하여준다.

3-2. Dilute enzyme conjugate

Conjugate(WMV2-AP)를 Conjugation buffer에 μ l/ml로 희석해준다. (well당 200 μ l씩 계산하여 섞어준다.)

3-3. Loading and incubation

Nunc-Immuno Plates MaxiSorp F96 plates에 sample을 각 well당 200 μ l씩 분주한 후 Plate 및 습도를 유지한 컨테이너에 호일로 감싸주고 plate를 습도를 유지한 humid box에 넣어 incubation (30°C, 5H)

3-4. Washing

반응이 끝난 plate를 96-well plate에 들어있는 용액을 버린 후 multi-Pipette을 이용하여 1X washing buffer를 각 well에 200 μ l씩 분주한다. cross contamination이 되지 않게 shaking한 후 용액을 버리고 well에 1X washing buffer가 남아 있지 않도록 paper tissue에 완전히 털어준다. 이와 같은 방법으로 5,4,3,2,1min 각 새로운 washing buffer를 이용하여 총 5번 washing하여준다.

4. Substrate : Color reaction indicates infected sample

4-1. Dilution of substrate buffer

5X substrate buffer를 DW를 이용하여 1X로 희석하여준다

4-2. Dissolve pNPP(para-nitrophenyl-phosphate) tablet

PNPP(para-nitrophenyl-phosphate) tablet을 substrate buffer에 mg/ml로 녹여준다.

4-3. Loading and observe reaction

Nunc-Immuno Plates MaxiSorp F96 plates에 sample을 각 well당 200μl씩 분주한 후 UV visible spectrometer를 이용하여 405nm에서 5min 간격으로 흡광도를 측정하여준다.

○ ELISA 결과

Name	Positive cont	Positive cont	WMV-V18	WMV-V18	WMV-V18
O.D value	0.238	0.236	0.165	0.099	0.107
Name	WMV-V19	WMV-V19	WMV-V19	Negative cont	Negative cont
O.D value	0.327	0.306	0.409	0.09	0.099

○ WMV2 ELISA결과 negative control의 2개 반복 O.D 수치의 합 0.189보다 높으며, positive control과 비교하였을 때 비슷한 O.D값을 보이는 것으로 나타나는 V19 isolate를 선발 후, PI595203 분리집단에 대한 저항성 판별을 위한 접종원으로 사용함.

○ Watermelon Mosaic Virus2 detection primer를 이용한 RT- PCR.

- 병원성이 높은 바이러스 V19를 이용하여 PI595203(저항성)과 상대친 SBA(감수성) 2계통을 이용하여 RT-PCR을 진행함.

- WMV2 RT-PCR 실험 시 사용한 primer.

Primer	Sequence (5'-3')	Target Size
WMV-SY-F	TGTTGCTTCATGGAAGATTGGT	101bp
WMV-SY-R	AAAATTGTGCCATCAGGTGCTA	



그림 2.14. WMV2 primer를 이용한 RT-PCR결과(lane 01, 02: PI595203 저항성 계통, 03: SBA 감수성 계통, Negative control)

표 2.21. RT-PCR 조건 및 사용시약

RT-PCR procedure	Temperature	Time	Reagent	vol.
cDNA synthesis	50°C	30''	5x one step RtBuf	6ul
Pre-denaturation	50°C	2'	Primer(WMV-SY)-F	1ul
Denaturation	95°C	20''	Primer(WMV-SY)-R	1ul
Annealing	55°C	30''	RNA template	2ul
Extension	72°C	30''	Enzyme	2ul
Final elongation	72°C	5'	DW	18ul
			Total	30ul

- RT-PCR실험결과 WMV2 특이적 primer를 사용하여 RT-PCR을 진행한 결과 저항성계통 PI595203에서는 증폭되지 않았으며, 감수성 계통인 SBA에서만 선택적으로 WMV2가 증폭됨을 확인 할 수 있었음
- 본 실험 결과를 기반으로 최종적으로 WMV2-V19 isolate를 이용하여 PI595203 분리집단에 접종하고 WMV2 저항성에 연관된 마커를 찾고자 하였음

(2) 수박 Watermelon Mosaic Virus 2 바이러스 저항성 지표개발

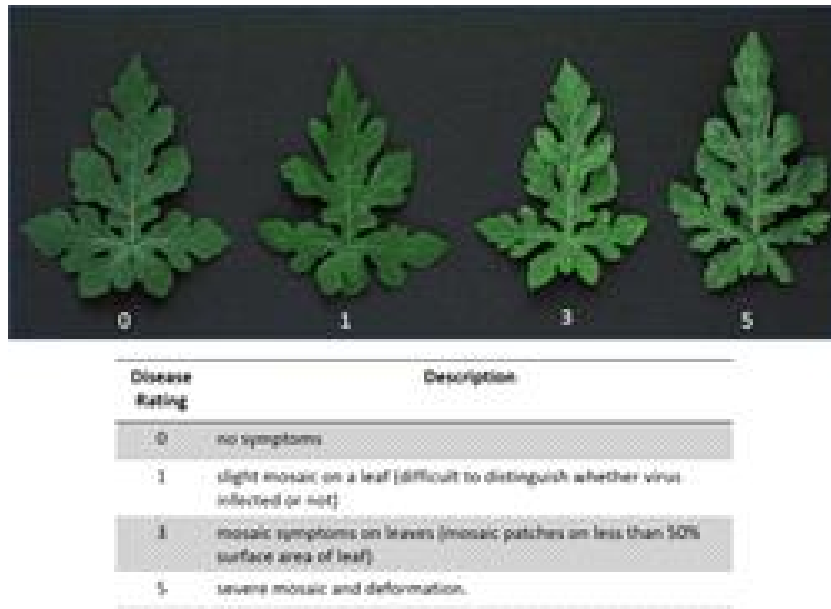


그림 2.15. WMV2-V19의 접종원을 이용한 병징 양상

- 위 그림을 기준으로 PI595203의 분리세대에서의 virus 병징의 정도를 결정하였음.

나. 수박 Watermelon Mosaic Virus 2 바이러스 저항성 계통인 PI 595203을 이용한 교배분리집단에 대한 저항성 검정 및 유전분석

(1) SBA(감수성 상업계통) x PI 595203(저항성 계통): 모본, 부분, F1 및 F2 분리집단에 대한 WMV2 저항성 표현형 검정

표 2.22. PI595203, SBA, F1 분리집단에 대한 WMV2접종 후 병징 rating결과

sample	scoring	sample	scoring	sample	scoring
SBA-1	1 or 3	PI595203-1	0	SBA x PI595203 - 1	3
SBA-2	3	PI595203-2	0	SBA x PI595203 - 2	5
SBA-3	1 or 3	PI595203-3	0	SBA x PI595203 - 3	3
SBA-4	1 or 3	PI595203-4	0	SBA x PI595203 - 4	5
SBA-5	3	PI595203-5	0	SBA x PI595203 - 5	3
SBA-6	1 or 3	PI595203-6	0	SBA x PI595203 - 6	5
SBA-7	1 or 3	PI595203-7	1	SBA x PI595203 - 7	1
SBA-8	1 or 3	PI595203-8	0	SBA x PI595203 - 8	5
SBA-9	3	PI595203-9	3	SBA x PI595203 - 9	5
SBA-10	5	PI595203-10	0	SBA x PI595203 - 10	1
SBA-11	5	PI595203-11	0	SBA x PI595203 - 11	5
SBA-12	5	PI595203-12	3	SBA x PI595203 - 12	5

sample	scoring	sample	scoring	sample	scoring
SBA-13	5	PI595203-13	0	SBA x PI595203 - 13	3
SBA-14	3	PI595203-14	3	SBA x PI595203 - 14	5
SBA-15	5	PI595203-15	0	SBA x PI595203 - 15	3
SBA-16	5	PI595203-16	3	SBA x PI595203 - 16	5
SBA-17	3	PI595203-17	0	SBA x PI595203 - 17	1
SBA-18	0 or 1	PI595203-18	3	SBA x PI595203 - 18	3
SBA-19	5	PI595203-19	3	SBA x PI595203 - 19	3
SBA-20	5	PI595203-20	0	SBA x PI595203 - 20	3
SBA-21	5	PI595203-21	0	SBA x PI595203 - 21	3
SBA-22	5	PI595203-22	0	SBA x PI595203 - 22	5
SBA-23	5	PI595203-23	0	SBA x PI595203 - 23	5
SBA-24	5	PI595203-24	0	SBA x PI595203 - 25	1
SBA-25	1 or 3	PI595203-25	3	SBA x PI595203 - 26	1
SBA-26	3	PI595203-26	0	SBA x PI595203 - 27	1
SBA-27	1	PI595203-27	0	SBA x PI595203 - 28	3
		PI595203-28	0	SBA x PI595203 - 29	5
		PI595203-29	0		
		PI595203-30	0		
		PI595203-31	0		
		PI595203-32	0		
		PI595203-33	0		

표 2.23. BC1P1, BC1P2 분리집단에 대한 WMV2접종 후 병징 rating결과

sample	scoring	sample	scoring
SBA x PI595203 x SBA - 1	1	SBA x PI595203 x PI595203 - 1	0
SBA x PI595203 x SBA - 2	1	SBA x PI595203 x PI595203 - 2	0
SBA x PI595203 x SBA - 3	5	SBA x PI595203 x PI595203 - 3	5
SBA x PI595203 x SBA - 4	1 or 3	SBA x PI595203 x PI595203 - 4	0
SBA x PI595203 x SBA - 5	5	SBA x PI595203 x PI595203 - 5	0 or 1
SBA x PI595203 x SBA - 6	5	SBA x PI595203 x PI595203 - 6	0
SBA x PI595203 x SBA - 7	3	SBA x PI595203 x PI595203 - 7	5
SBA x PI595203 x SBA - 8	0	SBA x PI595203 x PI595203 - 8	3
SBA x PI595203 x SBA - 9	5	SBA x PI595203 x PI595203 - 9	3
SBA x PI595203 x SBA - 10	5	SBA x PI595203 x PI595203 - 10	3
SBA x PI595203 x SBA - 11	0 or 1	SBA x PI595203 x PI595203 - 11	0 or 1
SBA x PI595203 x SBA - 12	5	SBA x PI595203 x PI595203 - 12	0 or 1
SBA x PI595203 x SBA - 13	5	SBA x PI595203 x PI595203 - 13	1
SBA x PI595203 x SBA - 14	0 or 1	SBA x PI595203 x PI595203 - 14	0
SBA x PI595203 x SBA - 15	0	SBA x PI595203 x PI595203 - 15	0 or 1
SBA x PI595203 x SBA - 16	5	SBA x PI595203 x PI595203 - 16	0 or 1
SBA x PI595203 x SBA - 17	1	SBA x PI595203 x PI595203 - 17	0
SBA x PI595203 x SBA - 18	5	SBA x PI595203 x PI595203 - 18	3
SBA x PI595203 x SBA - 19	5	SBA x PI595203 x PI595203 - 19	5
SBA x PI595203 x SBA - 20	5	SBA x PI595203 x PI595203 - 20	0
SBA x PI595203 x SBA - 21	3	SBA x PI595203 x PI595203 - 21	3
SBA x PI595203 x SBA - 22	0	SBA x PI595203 x PI595203 - 22	3
SBA x PI595203 x SBA - 23	3	SBA x PI595203 x PI595203 - 23	5
SBA x PI595203 x SBA - 24	0	SBA x PI595203 x PI595203 - 24	0
SBA x PI595203 x SBA - 25	3	SBA x PI595203 x PI595203 - 25	0
SBA x PI595203 x SBA - 26	5	SBA x PI595203 x PI595203 - 26	0
SBA x PI595203 x SBA - 27	1 or 3	SBA x PI595203 x PI595203 - 27	0
SBA x PI595203 x SBA - 28	0 or 1	SBA x PI595203 x PI595203 - 28	0
SBA x PI595203 x SBA - 29	1	SBA x PI595203 x PI595203 - 29	0
SBA x PI595203 x SBA - 30	0 or 1	SBA x PI595203 x PI595203 - 30	0
SBA x PI595203 x SBA - 31	0	SBA x PI595203 x PI595203 - 31	5
SBA x PI595203 x SBA - 32	0	SBA x PI595203 x PI595203 - 32	0 or 1
SBA x PI595203 x SBA - 33	5	SBA x PI595203 x PI595203 - 33	3
SBA x PI595203 x SBA - 34	5	SBA x PI595203 x PI595203 - 34	0
SBA x PI595203 x SBA - 35	5	SBA x PI595203 x PI595203 - 35	3
SBA x PI595203 x SBA - 36	3	SBA x PI595203 x PI595203 - 36	3
SBA x PI595203 x SBA - 37	5	SBA x PI595203 x PI595203 - 37	5
SBA x PI595203 x SBA - 38	5	SBA x PI595203 x PI595203 - 38	5
SBA x PI595203 x SBA - 39	0 or 1	SBA x PI595203 x PI595203 - 39	0
SBA x PI595203 x SBA - 40	0	SBA x PI595203 x PI595203 - 40	0

sample	scoring	sample	scoring
		SBA x PI595203 x PI595203 - 41	5
		SBA x PI595203 x PI595203 - 42	5
		SBA x PI595203 x PI595203 - 43	5
		SBA x PI595203 x PI595203 - 44	0
		SBA x PI595203 x PI595203 - 45	5
		SBA x PI595203 x PI595203 - 46	5
		SBA x PI595203 x PI595203 - 47	0

표 2.24. F2 분리집단에 대한 WMV2집중 후 병징 rating결과

sample	scoring	sample	scoring	sample	scoring
SBA x PI595203 : F2 -1	3	SBA x PI595203 : F2 -111	5	SBA x PI595203 : F2 -221	0 or 1
SBA x PI595203 : F2 -2	5	SBA x PI595203 : F2 -112	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -222	0
SBA x PI595203 : F2 -3	0	SBA x PI595203 : F2 -113	5	SBA x PI595203 : F2 -223	0 or 1
SBA x PI595203 : F2 -4	3	SBA x PI595203 : F2 -114	5	SBA x PI595203 : F2 -224	5
SBA x PI595203 : F2 -5	3	SBA x PI595203 : F2 -115	5	SBA x PI595203 : F2 -225	5
SBA x PI595203 : F2 -6	3	SBA x PI595203 : F2 -116	5	SBA x PI595203 : F2 -226	0
SBA x PI595203 : F2 -7	5	SBA x PI595203 : F2 -117	5	SBA x PI595203 : F2 -227	0 or 1
SBA x PI595203 : F2 -8	3	SBA x PI595203 : F2 -118	0	SBA x PI595203 : F2 -228	0 or 1
SBA x PI595203 : F2 -9	0	SBA x PI595203 : F2 -119	0	SBA x PI595203 : F2 -229	0 or 1
SBA x PI595203 : F2 -10	3	SBA x PI595203 : F2 -120	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -230	0 or 1
SBA x PI595203 : F2 -11	5	SBA x PI595203 : F2 -121	0	SBA x PI595203 : F2 -231	5
SBA x PI595203 : F2 -12	3	SBA x PI595203 : F2 -122	5	SBA x PI595203 : F2 -232	5
SBA x PI595203 : F2 -13	5	SBA x PI595203 : F2 -123	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -233	0
SBA x PI595203 : F2 -14	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -124	0	SBA x PI595203 : F2 -234	3
SBA x PI595203 : F2 -15	5	SBA x PI595203 : F2 -125	5	SBA x PI595203 : F2 -235	3
SBA x PI595203 : F2 -16	5	SBA x PI595203 : F2 -126	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -236	3
SBA x PI595203 : F2 -17	5	SBA x PI595203 : F2 -127	0	SBA x PI595203 : F2 -237	5
SBA x PI595203 : F2 -18	5	SBA x PI595203 : F2 -128	0	SBA x PI595203 : F2 -238	0
SBA x PI595203 : F2 -19	3	SBA x PI595203 : F2 -129	5	SBA x PI595203 : F2 -239	0
SBA x PI595203 : F2 -20	5	SBA x PI595203 : F2 -130	3	SBA x PI595203 : F2 -240	0
SBA x PI595203 : F2 -21	5	SBA x PI595203 : F2 -131	5	SBA x PI595203 : F2 -241	0
SBA x PI595203 : F2 -22	5	SBA x PI595203 : F2 -132	0	SBA x PI595203 : F2 -242	1
SBA x PI595203 : F2 -23	5	SBA x PI595203 : F2 -133	5	SBA x PI595203 : F2 -243	0
SBA x PI595203 : F2 -24	5	SBA x PI595203 : F2 -134	5	SBA x PI595203 : F2 -244	3
SBA x PI595203 : F2 -25	5	SBA x PI595203 : F2 -135	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -245	0 or 1
SBA x PI595203 : F2 -26	5	SBA x PI595203 : F2 -136	1	SBA x PI595203 : F2 -246	5
SBA x PI595203 : F2 -27	5	SBA x PI595203 : F2 -137	0	SBA x PI595203 : F2 -247	5
SBA x PI595203 : F2 -28	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -138	3	SBA x PI595203 : F2 -248	5
SBA x PI595203 : F2 -29	1	SBA x PI595203 : F2 -139	0	SBA x PI595203 : F2 -249	5
SBA x PI595203 : F2 -30	5	SBA x PI595203 : F2 -140	5	SBA x PI595203 : F2 -250	5
SBA x PI595203 : F2 -31	3	SBA x PI595203 : F2 -141	3	SBA x PI595203 : F2 -251	0
SBA x PI595203 : F2 -32	5	SBA x PI595203 : F2 -142	5	SBA x PI595203 : F2 -252	5
SBA x PI595203 : F2 -33	5	SBA x PI595203 : F2 -143	3	SBA x PI595203 : F2 -253	0
SBA x PI595203 : F2 -34	5	SBA x PI595203 : F2 -144	5	SBA x PI595203 : F2 -254	0
SBA x PI595203 : F2 -35	5	SBA x PI595203 : F2 -145	3	SBA x PI595203 : F2 -255	5
SBA x PI595203 : F2 -36	3	SBA x PI595203 : F2 -146	5	SBA x PI595203 : F2 -256	0
SBA x PI595203 : F2 -37	3	SBA x PI595203 : F2 -147	1	SBA x PI595203 : F2 -257	5
SBA x PI595203 : F2 -38	0	SBA x PI595203 : F2 -148	0	SBA x PI595203 : F2 -258	0

sample	scoring	sample	scoring	sample	scoring
SBA x PI595203 : F2 -39	0	SBA x PI595203 : F2 -149	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -259	1
SBA x PI595203 : F2 -40	0	SBA x PI595203 : F2 -150	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -260	5
SBA x PI595203 : F2 -41	3	SBA x PI595203 : F2 -151	3	SBA x PI595203 : F2 -261	1
SBA x PI595203 : F2 -42	5	SBA x PI595203 : F2 -152	3	SBA x PI595203 : F2 -262	5
SBA x PI595203 : F2 -43	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -153	0	SBA x PI595203 : F2 -263	5
SBA x PI595203 : F2 -44	0	SBA x PI595203 : F2 -154	0	SBA x PI595203 : F2 -264	5
SBA x PI595203 : F2 -45	3	SBA x PI595203 : F2 -155	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -265	0
SBA x PI595203 : F2 -46	0	SBA x PI595203 : F2 -156	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -266	0
SBA x PI595203 : F2 -47	5	SBA x PI595203 : F2 -157	3	SBA x PI595203 : F2 -267	3
SBA x PI595203 : F2 -48	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -158	3	SBA x PI595203 : F2 -268	3
SBA x PI595203 : F2 -49	3	SBA x PI595203 : F2 -159	1	SBA x PI595203 : F2 -269	0
SBA x PI595203 : F2 -50	3	SBA x PI595203 : F2 -160	5	SBA x PI595203 : F2 -270	5
SBA x PI595203 : F2 -51	5	SBA x PI595203 : F2 -161	1	SBA x PI595203 : F2 -271	3
SBA x PI595203 : F2 -52	1	SBA x PI595203 : F2 -162	5	SBA x PI595203 : F2 -272	0
SBA x PI595203 : F2 -53	5	SBA x PI595203 : F2 -163	0	SBA x PI595203 : F2 -273	3
SBA x PI595203 : F2 -54	0	SBA x PI595203 : F2 -164	5	SBA x PI595203 : F2 -274	5
SBA x PI595203 : F2 -55	5	SBA x PI595203 : F2 -165	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -275	5
SBA x PI595203 : F2 -56	5	SBA x PI595203 : F2 -166	3	SBA x PI595203 : F2 -276	0
SBA x PI595203 : F2 -57	5	SBA x PI595203 : F2 -167	3	SBA x PI595203 : F2 -277	0 or 1
SBA x PI595203 : F2 -58	0	SBA x PI595203 : F2 -168	3	SBA x PI595203 : F2 -278	5
SBA x PI595203 : F2 -59	5	SBA x PI595203 : F2 -169	0	SBA x PI595203 : F2 -279	3
SBA x PI595203 : F2 -60	5	SBA x PI595203 : F2 -170	5	SBA x PI595203 : F2 -280	5
SBA x PI595203 : F2 -61	5	SBA x PI595203 : F2 -171	3	SBA x PI595203 : F2 -281	5
SBA x PI595203 : F2 -62	5	SBA x PI595203 : F2 -172	0	SBA x PI595203 : F2 -282	5
SBA x PI595203 : F2 -63	0	SBA x PI595203 : F2 -173	0	SBA x PI595203 : F2 -283	0
SBA x PI595203 : F2 -64	0	SBA x PI595203 : F2 -174	3	SBA x PI595203 : F2 -284	5
SBA x PI595203 : F2 -65	5	SBA x PI595203 : F2 -175	0	SBA x PI595203 : F2 -285	3
SBA x PI595203 : F2 -66	5	SBA x PI595203 : F2 -176	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -286	5
SBA x PI595203 : F2 -67	5	SBA x PI595203 : F2 -177	0	SBA x PI595203 : F2 -287	5
SBA x PI595203 : F2 -68	0	SBA x PI595203 : F2 -178	5	SBA x PI595203 : F2 -288	5
SBA x PI595203 : F2 -69	5	SBA x PI595203 : F2 -179	5	SBA x PI595203 : F2 -289	3
SBA x PI595203 : F2 -70	5	SBA x PI595203 : F2 -180	5	SBA x PI595203 : F2 -290	5
SBA x PI595203 : F2 -71	5	SBA x PI595203 : F2 -181	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -291	5
SBA x PI595203 : F2 -72	5	SBA x PI595203 : F2 -182	0	SBA x PI595203 : F2 -292	3
SBA x PI595203 : F2 -73	5	SBA x PI595203 : F2 -183	3	SBA x PI595203 : F2 -293	5
SBA x PI595203 : F2 -74	0	SBA x PI595203 : F2 -184	3	SBA x PI595203 : F2 -294	5
SBA x PI595203 : F2 -75	0	SBA x PI595203 : F2 -185	0	SBA x PI595203 : F2 -295	0
SBA x PI595203 : F2 -76	5	SBA x PI595203 : F2 -186	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -296	0 or 1
SBA x PI595203 : F2 -77	0	SBA x PI595203 : F2 -187	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -297	5

sample	scoring	sample	scoring	sample	scoring
SBA x PI595203 : F2 -78	5	SBA x PI595203 : F2 -188	0	SBA x PI595203 : F2 -298	0 or 1
SBA x PI595203 : F2 -79	5	SBA x PI595203 : F2 -189	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -299	5
SBA x PI595203 : F2 -80	5	SBA x PI595203 : F2 -190	1	SBA x PI595203 : F2 -300	0
SBA x PI595203 : F2 -81	0	SBA x PI595203 : F2 -191	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -301	5
SBA x PI595203 : F2 -82	5	SBA x PI595203 : F2 -192	3	SBA x PI595203 : F2 -302	3
SBA x PI595203 : F2 -83	5	SBA x PI595203 : F2 -193	0	SBA x PI595203 : F2 -303	5
SBA x PI595203 : F2 -84	5	SBA x PI595203 : F2 -194	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -304	1
SBA x PI595203 : F2 -85	1	SBA x PI595203 : F2 -195	5	SBA x PI595203 : F2 -305	0
SBA x PI595203 : F2 -86	5	SBA x PI595203 : F2 -196	0	SBA x PI595203 : F2 -306	0
SBA x PI595203 : F2 -87	5	SBA x PI595203 : F2 -197	5	SBA x PI595203 : F2 -307	5
SBA x PI595203 : F2 -88	5	SBA x PI595203 : F2 -198	5	SBA x PI595203 : F2 -308	3
SBA x PI595203 : F2 -89	5	SBA x PI595203 : F2 -199	5	SBA x PI595203 : F2 -309	5
SBA x PI595203 : F2 -90	3	SBA x PI595203 : F2 -200	5	SBA x PI595203 : F2 -310	3
SBA x PI595203 : F2 -91	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -201	5	SBA x PI595203 : F2 -311	5
SBA x PI595203 : F2 -92	5	SBA x PI595203 : F2 -202	5	SBA x PI595203 : F2 -312	0 or 1
SBA x PI595203 : F2 -93	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -203	3	SBA x PI595203 : F2 -313	3
SBA x PI595203 : F2 -94	5	SBA x PI595203 : F2 -204	0	SBA x PI595203 : F2 -314	3
SBA x PI595203 : F2 -95	5	SBA x PI595203 : F2 -205	5	SBA x PI595203 : F2 -315	3
SBA x PI595203 : F2 -96	5	SBA x PI595203 : F2 -206	0	SBA x PI595203 : F2 -316	5
SBA x PI595203 : F2 -97	5	SBA x PI595203 : F2 -207	3	SBA x PI595203 : F2 -317	5
SBA x PI595203 : F2 -98	1	SBA x PI595203 : F2 -208	0	SBA x PI595203 : F2 -318	5
SBA x PI595203 : F2 -99	0	SBA x PI595203 : F2 -209	5	SBA x PI595203 : F2 -319	5
SBA x PI595203 : F2 -100	3	SBA x PI595203 : F2 -210	3	SBA x PI595203 : F2 -320	3
SBA x PI595203 : F2 -101	5	SBA x PI595203 : F2 -211	5	SBA x PI595203 : F2 -321	3
SBA x PI595203 : F2 -102	5	SBA x PI595203 : F2 -212	5	SBA x PI595203 : F2 -322	5
SBA x PI595203 : F2 -103	5	SBA x PI595203 : F2 -213	3	SBA x PI595203 : F2 -323	5
SBA x PI595203 : F2 -104	5	SBA x PI595203 : F2 -214	5	SBA x PI595203 : F2 -324	5
SBA x PI595203 : F2 -105	3	SBA x PI595203 : F2 -215	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -325	3
SBA x PI595203 : F2 -106	0	SBA x PI595203 : F2 -216	3	SBA x PI595203 : F2 -326	5
SBA x PI595203 : F2 -107	5	SBA x PI595203 : F2 -217	0 or 1	SBA x PI595203 : F2 -327	0
SBA x PI595203 : F2 -108	5	SBA x PI595203 : F2 -218	1	SBA x PI595203 : F2 -328	0
SBA x PI595203 : F2 -109	3	SBA x PI595203 : F2 -219	0	SBA x PI595203 : F2 -329	0 or 1
SBA x PI595203 : F2 -110	5	SBA x PI595203 : F2 -220	0	SBA x PI595203 : F2 -330	5



그림 2.16. PI595203 분리집단에서의 병징 양상

- 상기 WMV2저항성 PI595203 계통 및 후대에 대한 육안검정 및 ELISA 방법을 통하여 저항성 및 감수성 표현형 결과를 확인함.
- P2에서의 WMV2 저항성으로 판단된 PI595203의 경우 전체 33개의 개체 중 육안검정에서 7개체가 감수성으로 관찰되었으며, 추가적으로 PI595203에서 WMV2 특이적 RT-PCR을 진행한 결과에서는 전 개체에서 virus가 PI595203안에 존재하는 것으로 판단되었으며, ELISA결과에서도 다수의 개체에서 WMV2에 감수성으로 판단됨

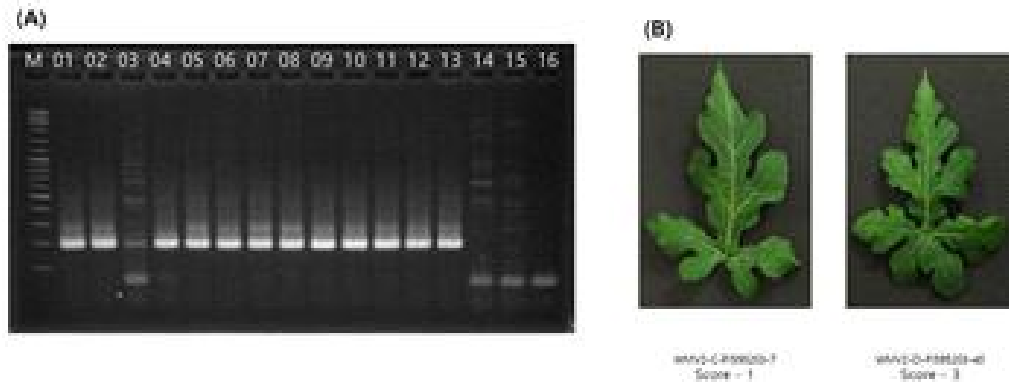


그림 2.17. PI595203을 이용한 RT-PCR결과 및 표현형 검정

표 2.18. 33개의 PI595203개체에서 RT-PCR검정 및 ELISA결과

	Phenotype	RT-PCR Detection	O.D value
PI595203-1	0	O	0.146
PI595203-2	0	O	0.116
PI595203-3	0	O	0.389
PI595203-4	0	O	0.119
PI595203-5	0	O	0.268
PI595203-6	0	O	0.221
PI595203-7	1	O	0.424
PI595203-8	0	O	0.16
PI595203-9	3	O	0.378
PI595203-10	0	O	0.192
PI595203-11	0	O	0.252
PI595203-12	3	O	0.316
PI595203-13	0	O	0.584
PI595203-14	3	O	0.607
PI595203-15	0	O	0.216
PI595203-16	3	O	0.445
PI595203-17	0	O	0.235
PI595203-18	3	O	0.437
PI595203-19	3	O	0.646
PI595203-20	0	O	0.159
PI595203-21	0	O	0.143
PI595203-22	0	O	0.152
PI595203-23	0	O	0.146
PI595203-24	0	O	0.273
PI595203-25	3	O	0.284
PI595203-26	0	O	0.223
PI595203-27	0	O	0.294
PI595203-28	0	O	0.251
PI595203-29	0	O	0.279
PI595203-30	0	O	0.338
PI595203-31	0	O	0.36
PI595203-32	0	O	0.103
PI595203-33	0	O	0.104

- 선행 연구들에서는 PI595203의 경우 WMV2에 저항성을 보이기 위해서 열성저항성이 적어도 3개 이상의 유전자가 관여할 것으로 예상하고 있음.
- 2차년도까지의 연구결과로는 PI 595203이 WMV2에 완전한 저항성을 가지고 있는 것이 아니라, tolerance 수준의 저항성을 가지고 있는 것으로 판단되었으며, 바이러스의 감염상태

(바이러스의 수박 잎조직 내의 농도)와 병징발현이 일치하지 않아, 이 때문에 본 연구에서는 유전양식의 규명이 어려웠다고 판단됨.

- 또한 정확한 병징의 저항성을 판단하기 위해서 접종농도의 threshold를 정해야 하는데 virus의 경우, 잎 즙액을 접종하기 때문에 접종농도를 정량하기 어려운 점 그리고, immune이 아닌 tolerant 수준의 저항성 강도를 가지고 있는 PI 595203의 경우 일정 tolerance 수준의 이상의 바이러스가 접종 될 경우 저항성의 정도를 파악하기 어려울 것으로 판단됨. 이에 이전에 수박의 potyvirus 저항성을 야기하는 것으로 밝혀진 PI595203의 eIF4E, eIF4(Iso-E)의 변이유전자 기반 마커를 2년차부터는 새로운 WMV2에 완전한 저항성을 갖는 신규계통을 선발하여 실험을 진행하고자 하였음.

다. 수박 WMV2 저항성 신규 계통 선발 및 저항성 분석

- 기존의 ZYMV, WMV2 potyvirus들의 저항성 계통으로 보고되었던 PI595203의 경우, WMV2 저항성 분석결과 PI 595203의 저항성 수준이 분석가능한 상황이 아니었기 때문에, 신규 저항성 계통을 선발하고, 2차년도부터 이에 대한 검정을 수행하였음.

(1) 신규 저항성 계통 확인 과정

- WMV2-V19 접종원을 이용하여, WMV2-R019 17개체에 접종을 실시하고, RT-PCR검정, 표현형 육안검정 및 ELISA를 실시함.
- 결과적으로 WMV2-R019계통의 경우 17개체 중 3개체는 감수성을 나타냈으며, 나머지 15개체는 WMV2에 매우 강한 저항성을 보이는 것으로 판단되며, 이 계통을 이용하여 분리 집단을 양성 후 정확한 WMV2에 저항성 지역을 발굴하고자 하였음.
- Potyviruses(WMV, ZYMV, PRSV)의 경우 병징이 매우 혼란스러울 뿐만 아니라 cross contamination이 쉽게 일어나기 때문에 해당 바이러스의 RT-PCR을 진행할 때, 본 연구실에서 제작한 WMV2, ZYMV, PRSV detection primer를 모두 사용하여 단일 strain이 접종되었음을 확인한 후에 저항성 검정을 수행함.

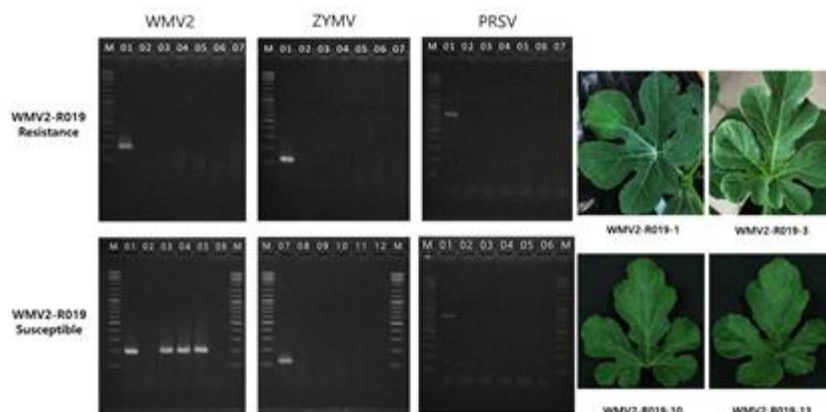


그림 2.25. WMV2-R019 계통의 육안검정 및 RT-PCR 대표적 검정결과

표 2.19. 선정 WMV2-R019의 바이러스 저항성을 확인하기 위한 ELISA결과

Sample	Score	Phenotype	ELISA	
			1반복	2반복
WMV2-R019-1	0	R	0.123	0.127
WMV2-R019-2	0	R	0.124	0.12
WMV2-R019-3	0	R	0.118	0.117
WMV2-R019-4	0	Δ	0.691	0.682
WMV2-R019-5	0	R	0.119	0.128
WMV2-R019-6	0	R	0.127	0.129
WMV2-R019-7	0	R	0.136	0.126
WMV2-R019-8	0	R	0.756	0.647
WMV2-R019-9	0	R	0.126	0.121
WMV2-R019-10	3	S	0.608	0.551
WMV2-R019-11	0	R	0.117	0.115
WMV2-R019-12	0	R	0.134	0.119
WMV2-R019-13	3	S	0.51	0.448
WMV2-R019-14	0	R	0.125	0.117
WMV2-R019-15	0	R	0.122	0.117
WMV2-R019-16	0	R	0.122	0.119
WMV2-R019-17	0	R	0.472	0.544

- 종합적으로 판단할 때, 표현형 결과, RT-PCR 결과, ELISA 결과에서 수박 WMV2-R019 계통의 전체 개체가 저항성을 보이지는 않았지만, PI595203에 비해 WMV2에 강한 저항성을 보이는 것으로 판단이 되었으며, 해당 3개의 결과에서 가장 강한 저항성으로 판단되는 WMV2-R019개체를 이용하여 3차년도부터 새로운 교배 및 분리집단을 시작하였음.

○ Watermelon Mosaic Virus2 detection primer를 이용한 RT- PCR.

병원성이 높은 V19 WMV 접종원을 이용하여, 감수성 개체인 SBA와, 저항성 계통인 R019에 접종한 뒤 RT-PCR을 진행함.

표 2.20. RT-PCR 실험 시 사용한 primer.

Primer	Sequence (5'-3')	Target Size
WMV yj 36	CAGGXXXXXXXXXGCTACG	189bp
WMV yj 37	TTAAXXXXXXXXXXAGTGTG	

(A)

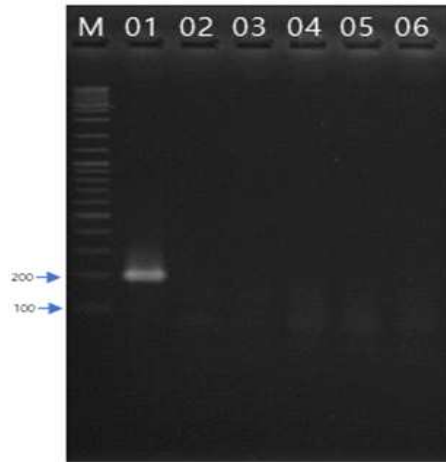


그림 2.26. WMV2 primer를 이용한 RT-PCR결과

(lane 01 : V19접종 SBA(positive control) lane 02, 03, 04, 05, 06 : R019-1,2,3,4,5)

(B)

RT-PCR mixture	Temp	Time	cycle		
cDNA synthesis	50°C	30'			
Pre-Denaturation	95°C	2'		PrimeScript 1 step Enzyme Mix	1 μ l
Denaturation	95°C	30"	35	primer	5p 2 μ l (F,R)
Annealing	62°C	30"		2X 1 step buffer	12.5 μ l
Elongation	72°C	30"		Template	2.5 μ l(200ng/ul)
Final-elongation	72°C	5'		DW	up to 25 μ l
Final hold	4°C				

- WMV2 특이적 primer를 사용하여 RT-PCR을 진행한 결과 저항성계통 R019에서는 증폭되지 않았으며, 감수성 계통인 SBA에서만 선택적으로 WMV2가 증폭됨을 확인 할 수 있었음.

(2) 신규 WMV2 저항성계통, WMV2-R019 교배집단 저항성 표현형 및 유전 분석

- 본 실험결과를 기반으로 WMV2-V19 isolate를 이용하여 저항성계통 R019를 이용한 F2 분리집단을 양성하고, WMV2 저항성에 연관된 마커 개발을 수행함

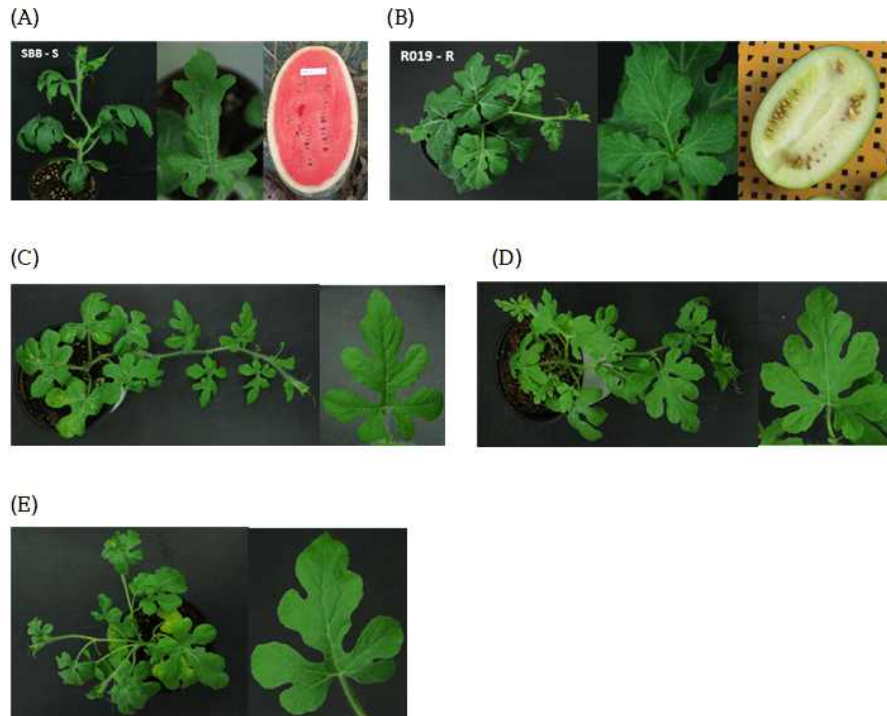


그림 2.27. SBB X R019 분리집단 개체사진.

(A)SBB, (B)R019, (C)SBB x R019:F1, (D)SBB x R019 x SBB:BC1P1, (E) SBB x R019 x R019:BC1P2

○ 수박 병 저항성 지표개발 및 표현형 검정

- 감수성 계통인 SBB(P1), 저항성 계통인 R019(P2)를 이용하여 F1,F2, BC1P1, BC1P2 집단의 표현형 검정을 실시함
- SBB x R019: F2 집단은 본엽 1매 stage에서 WMV2를 접종하였음. 접종 농도는 0.01M phosphate Buffer에 접종된 수박 잎을 갈아준 즙액을 carborundum을 이용해 식물 표면에 접종. 접종된 개체들은 본엽 10~15매 전개되었을 때 온실로 이동하여 생육시켰음. 접종은 1차, 2차(14dpi) 2번에 걸쳐서 거쳐 접종을 진행하였으며, 표현형 검정은 2차 접종 후 14dpi부터 49dpi까지 표현형 검정을 실시하였음.
- Rating은 다음의 기준으로 설정하고 검정하였음.
 - 0: 병징이 없는 개체,
 - 1: 약한 모자이크나 색 빠짐이 보이는 개체,
 - 3: 잎에 50%이하로 모자이크 패턴이 보이고 신엽에도 병징이 있는 개체,
 - 5: 개체 전체에 심한 모자이크를 보이고 일부 침형으로 잎이 변형된 개체.

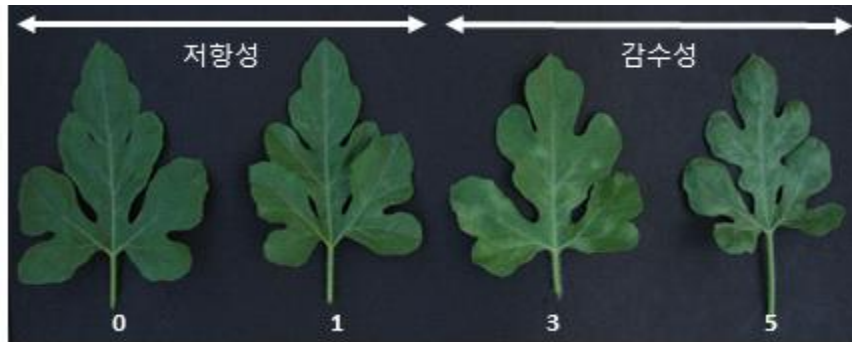


그림 2.28. WMV2-V19의 접종원을 이용한 병징 양상

표 2.21. WMV2 표현형 검정 기준표

Disease Rate	Discription
0	no symptoms
1	Slight qudmosaic on a leaf (difficult to distinguish whether virus infected or not)
3	Mosaic symptoms on leaves (mosaic patches on less than 50% surface area of leaf)
5	Severe mosaic and deformation of leaves

표 2.22. SBB X R019 F2 분리집단을 이용한 WMV2접종 후 병징 scoring 결과 (QTL분석에 사용된 개체는 밑줄로 표시)

Sample	Score-49dpi	RT-PCR 결과	Sample	Score-49dpi	RT-PCR 결과
SBB X R019: F2 -1	3		SBB X R019: F2 -133	3	
<u>SBB X R019: F2 -2</u>	<u>0</u>	<u>R</u>	SBB X R019: F2 -134	1	
<u>SBB X R019: F2 -3</u>	<u>0</u>	<u>R</u>	SBB X R019: F2 -135	1	
SBB X R019: F2 -4	3	S	SBB X R019: F2 -136	1	
SBB X R019: F2 -5	5		<u>SBB X R019: F2 -137</u>	<u>1</u>	<u>R</u>
SBB X R019: F2 -6	3		SBB X R019: F2 -138	3	
SBB X R019: F2 -7	3	S	SBB X R019: F2 -139	3	S
SBB X R019: F2 -8	5		SBB X R019: F2 -140	3	
SBB X R019: F2 -9	3	S	SBB X R019: F2 -141	5	
<u>SBB X R019: F2 -10</u>	<u>5</u>	<u>S</u>	SBB X R019: F2 -142	5	S
<u>SBB X R019: F2 -11</u>	<u>0</u>	<u>R</u>	SBB X R019: F2 -143	3	S
<u>SBB X R019: F2 -12</u>	<u>0</u>	<u>R</u>	SBB X R019: F2 -144	3	
<u>SBB X R019: F2 -13</u>	<u>5</u>	<u>S</u>	SBB X R019: F2 -145	3	
SBB X R019: F2 -14	3	S	SBB X R019: F2 -146	5	
SBB X R019: F2 -15	3		SBB X R019: F2 -147	5	
<u>SBB X R019: F2 -16</u>	<u>5</u>	<u>S</u>	SBB X R019: F2 -148	3	
<u>SBB X R019: F2 -17</u>	<u>5</u>	<u>S</u>	<u>SBB X R019: F2 -149</u>	<u>5</u>	<u>S</u>
SBB X R019: F2 -18	3	S	SBB X R019: F2 -150	3	
<u>SBB X R019: F2 -19</u>	<u>3</u>	<u>R</u>	SBB X R019: F2 -151	3	S
SBB X R019: F2 -20	3	S	SBB X R019: F2 -152	3	

SBB X R019: F2 -21	5		SBB X R019: F2 -153	3	
SBB X R019: F2 -22	1		SBB X R019: F2 -154	3	
SBB X R019: F2 -23	3		SBB X R019: F2 -155	5	
SBB X R019: F2 -24	5		SBB X R019: F2 -156	1	
<u>SBB X R019: F2 -25</u>	<u>5</u>	<u>S</u>	SBB X R019: F2 -157	3	S
SBB X R019: F2 -26	5		<u>SBB X R019: F2 -158</u>	<u>3</u>	<u>R</u>
<u>SBB X R019: F2 -27</u>	<u>0</u>	<u>R</u>	SBB X R019: F2 -159	3	S
SBB X R019: F2 -29	3		SBB X R019: F2 -161	5	
SBB X R019: F2 -30	1		SBB X R019: F2 -162	3	S
SBB X R019: F2 -31	5		SBB X R019: F2 -163	3	
SBB X R019: F2 -32	3	S	<u>SBB X R019: F2 -164</u>	<u>5</u>	<u>S</u>
SBB X R019: F2 -33	3		SBB X R019: F2 -165	1	
SBB X R019: F2 -34	5		SBB X R019: F2 -166	3	
<u>SBB X R019: F2 -35</u>	<u>1</u>	<u>R</u>	SBB X R019: F2 -167	3	
SBB X R019: F2 -36	5		SBB X R019: F2 -168	3	
SBB X R019: F2 -37	5		SBB X R019: F2 -169	3	S
SBB X R019: F2 -38	3	S	SBB X R019: F2 -170	1	
SBB X R019: F2 -39	5		SBB X R019: F2 -171	3	
SBB X R019: F2 -40	3	S	SBB X R019: F2 -172	3	
SBB X R019: F2 -41	3		SBB X R019: F2 -173	3	
<u>SBB X R019: F2 -42</u>	<u>1</u>	<u>R</u>	SBB X R019: F2 -174	3	
<u>SBB X R019: F2 -43</u>	<u>0</u>	<u>R</u>	SBB X R019: F2 -175	3	
SBB X R019: F2 -44	1		SBB X R019: F2 -176	3	
SBB X R019: F2 -45	3	S	SBB X R019: F2 -177	3	
SBB X R019: F2 -46	3		SBB X R019: F2 -178	3	
<u>SBB X R019: F2 -47</u>	<u>1</u>	<u>R</u>	SBB X R019: F2 -179	5	
SBB X R019: F2 -48	1		<u>SBB X R019: F2 -180</u>	<u>5</u>	<u>S</u>
<u>SBB X R019: F2 -49</u>	<u>5</u>	<u>S</u>	<u>SBB X R019: F2 -181</u>	<u>1</u>	<u>R</u>
SBB X R019: F2 -50	3	S	SBB X R019: F2 -182	3	S
SBB X R019: F2 -51	3	S	SBB X R019: F2 -183	5	
<u>SBB X R019: F2 -52</u>	<u>1</u>	<u>R</u>	SBB X R019: F2 -184	3	
SBB X R019: F2 -53	3		SBB X R019: F2 -185	3	S
SBB X R019: F2 -54	3	S	SBB X R019: F2 -186	3	S
SBB X R019: F2 -55	3	S	<u>SBB X R019: F2 -187</u>	<u>1</u>	<u>R</u>
SBB X R019: F2 -56	3	S	<u>SBB X R019: F2 -188</u>	<u>1</u>	<u>R</u>
SBB X R019: F2 -57	3		SBB X R019: F2 -201	3	
SBB X R019: F2 -58	3	S	SBB X R019: F2 -202	5	
<u>SBB X R019: F2 -59</u>	<u>1</u>	<u>R</u>	SBB X R019: F2 -203	3	
SBB X R019: F2 -60	5		SBB X R019: F2 -204	5	
SBB X R019: F2 -61	5		SBB X R019: F2 -205	5	
SBB X R019: F2 -62	5	S	SBB X R019: F2 -206	3	
SBB X R019: F2 -63	3		SBB X R019: F2 -207	3	
SBB X R019: F2 -64	3		SBB X R019: F2 -208	5	
SBB X R019: F2 -65	3		SBB X R019: F2 -209	3	
SBB X R019: F2 -66	3	S	SBB X R019: F2 -210	3	
SBB X R019: F2 -67	3	S	SBB X R019: F2 -211	5	
SBB X R019: F2 -68	3	S	SBB X R019: F2 -212	3	
<u>SBB X R019: F2 -69</u>	<u>5</u>	<u>S</u>	SBB X R019: F2 -213	3	
SBB X R019: F2 -70	3	S	SBB X R019: F2 -214	1	

SBB X R019: F2 -71	3	S	SBB X R019: F2 -215	3
SBB X R019: F2 -72	5		SBB X R019: F2 -216	5
SBB X R019: F2 -73	5		SBB X R019: F2 -217	3
SBB X R019: F2 -74	3	S	SBB X R019: F2 -218	3
SBB X R019: F2 -75	3		SBB X R019: F2 -219	3
SBB X R019: F2 -76	5		SBB X R019: F2 -220	5
SBB X R019: F2 -77	5	S	SBB X R019: F2 -221	5
SBB X R019: F2 -78	5		SBB X R019: F2 -222	3
SBB X R019: F2 -79	3		SBB X R019: F2 -223	3
<u>SBB X R019: F2 -80</u>	<u>5</u>	<u>S</u>	SBB X R019: F2 -224	3
SBB X R019: F2 -81	5		SBB X R019: F2 -225	5
SBB X R019: F2 -82	5		SBB X R019: F2 -226	3
SBB X R019: F2 -83	3		SBB X R019: F2 -227	3
SBB X R019: F2 -84	3		SBB X R019: F2 -228	3
SBB X R019: F2 -85	5		SBB X R019: F2 -229	3
SBB X R019: F2 -86	5	S	SBB X R019: F2 -230	5
SBB X R019: F2 -87	3	S	SBB X R019: F2 -231	5
SBB X R019: F2 -88	5		SBB X R019: F2 -232	3
SBB X R019: F2 -89	3		SBB X R019: F2 -233	5
SBB X R019: F2 -90	5		SBB X R019: F2 -234	1
SBB X R019: F2 -91	5		SBB X R019: F2 -235	5
SBB X R019: F2 -92	3	S	SBB X R019: F2 -236	3
<u>SBB X R019: F2 -93</u>	<u>1</u>	<u>R</u>	SBB X R019: F2 -237	5
SBB X R019: F2 -94	3	S	SBB X R019: F2 -238	3
SBB X R019: F2 -95	3		SBB X R019: F2 -239	3
SBB X R019: F2 -96	3	S	SBB X R019: F2 -240	3
SBB X R019: F2 -97	5		SBB X R019: F2 -241	3
<u>SBB X R019: F2 -98</u>	<u>5</u>	<u>S</u>	SBB X R019: F2 -242	5
SBB X R019: F2 -99	1		SBB X R019: F2 -243	3
SBB X R019: F2 -101	3		SBB X R019: F2 -244	1
SBB X R019: F2 -102	5	S	SBB X R019: F2 -245	1
SBB X R019: F2 -103	5	S	SBB X R019: F2 -246	3
SBB X R019: F2 -104	3		SBB X R019: F2 -247	1
SBB X R019: F2 -105	3		SBB X R019: F2 -248	3
SBB X R019: F2 -106	3		SBB X R019: F2 -249	3
SBB X R019: F2 -107	3	S	SBB X R019: F2 -250	3
SBB X R019: F2 -108	3	S	SBB X R019: F2 -251	1
SBB X R019: F2 -109	3		SBB X R019: F2 -252	1
SBB X R019: F2 -110	3		SBB X R019: F2 -253	1
SBB X R019: F2 -111	3	S	SBB X R019: F2 -254	1
<u>SBB X R019: F2 -112</u>	<u>3</u>	<u>S</u>	SBB X R019: F2 -255	3
SBB X R019: F2 -113	5		SBB X R019: F2 -256	1
<u>SBB X R019: F2 -114</u>	<u>5</u>	<u>S</u>	SBB X R019: F2 -257	1
SBB X R019: F2 -115	3		SBB X R019: F2 -258	1
SBB X R019: F2 -116	3	S	SBB X R019: F2 -259	1
SBB X R019: F2 -117	3	S	SBB X R019: F2 -260	3

SBB X R019: F2 -118	3		SBB X R019: F2 -261	3
SBB X R019: F2 -119	1	S	SBB X R019: F2 -262	5
<u>SBB X R019: F2 -120</u>	<u>3</u>	<u>S</u>	SBB X R019: F2 -263	5
<u>SBB X R019: F2 -121</u>	<u>5</u>	<u>S</u>	SBB X R019: F2 -264	5
SBB X R019: F2 -122	3		SBB X R019: F2 -265	3
SBB X R019: F2 -123	3		SBB X R019: F2 -266	5
SBB X R019: F2 -124	3		SBB X R019: F2 -267	3
SBB X R019: F2 -125	5	S	SBB X R019: F2 -268	5
<u>SBB X R019: F2 -126</u>	<u>5</u>	<u>S</u>	SBB X R019: F2 -269	5
<u>SBB X R019: F2 -127</u>	<u>3</u>	<u>S</u>	SBB X R019: F2 -270	1
SBB X R019: F2 -128	5		SBB X R019: F2 -271	5
<u>SBB X R019: F2 -129</u>	<u>5</u>	<u>S</u>	SBB X R019: F2 -272	5
SBB X R019: F2 -130	3		SBB X R019: F2 -273	1
SBB X R019: F2 -131	3	S	SBB X R019: F2 -274	1
<u>SBB X R019: F2 -132</u>	<u>3</u>	<u>R</u>	SBB X R019: F2 -275	3

표 2.23. BC1P1, BC1P2 분리집단에 대한 WMV2접종 후 병징 rating 결과

Sample (SBB X R019 X SBB: BC1P1)	Score-49 dpi	RT-PCR 결과	Sample (SBB X R019 X R019: BC1P1)	Score-4 9dpi	RT-PCR 결과
SBB X R019 x SBB-1	1	R	SBB X R019 X R019-1	1	
SBB X R019 x SBB-2	5	S	SBB X R019 X R019-2	5	S
SBB X R019 x SBB-3	1		SBB X R019 X R019-3	3	
SBB X R019 x SBB-4	5		SBB X R019 X R019-4	5	
SBB X R019 x SBB-5	1		SBB X R019 X R019-5	3	
SBB X R019 x SBB-6	1		SBB X R019 X R019-6	3	
SBB X R019 x SBB-7	1		SBB X R019 X R019-7	5	
SBB X R019 x SBB-8	3		SBB X R019 X R019-8	5	
SBB X R019 x SBB-9	5		SBB X R019 X R019-9	3	
SBB X R019 x SBB-10	3		SBB X R019 X R019-10	3	
SBB X R019 x SBB-11	1		SBB X R019 X R019-11	3	
SBB X R019 x SBB-12	3		SBB X R019 X R019-12	3	
SBB X R019 x SBB-13	5	S	SBB X R019 X R019-13	5	
SBB X R019 x SBB-14	3		SBB X R019 X R019-14	3	S
SBB X R019 x SBB-15	3	S	SBB X R019 X R019-15	5	
SBB X R019 x SBB-16	3		SBB X R019 X R019-16	1	
SBB X R019 x SBB-17	3		SBB X R019 X R019-17	5	S
SBB X R019 x SBB-18	3		SBB X R019 X R019-18	3	
SBB X R019 x SBB-19	5		SBB X R019 X R019-19	3	
SBB X R019 x SBB-20	5		SBB X R019 X R019-20	5	
SBB X R019 x SBB-21	5		SBB X R019 X R019-21	5	S
SBB X R019 x SBB-22	5		SBB X R019 X R019-22	3	
SBB X R019 x SBB-23	3		SBB X R019 X R019-23	5	
SBB X R019 x SBB-24	3		SBB X R019 X R019-24	3	
SBB X R019 x SBB-25	5	S	SBB X R019 X R019-25	3	
SBB X R019 x SBB-26	1		SBB X R019 X R019-26	5	
SBB X R019 x SBB-27	5		SBB X R019 X R019-27	3	

SBB X R019 x SBB-28	3		SBB X R019 X R019-28	5	
SBB X R019 x SBB-29	5		SBB X R019 X R019-29	5	S
SBB X R019 x SBB-30	1		SBB X R019 X R019-30	5	
SBB X R019 x SBB-31	3	S	SBB X R019 X R019-31	5	
SBB X R019 x SBB-32	1		SBB X R019 X R019-32	3	
SBB X R019 x SBB-33	3		SBB X R019 X R019-33	1	
SBB X R019 x SBB-34	3	S	SBB X R019 X R019-34	1	R
SBB X R019 x SBB-35	5		SBB X R019 X R019-35	3	S
SBB X R019 x SBB-36	1		SBB X R019 X R019-36	3	
SBB X R019 x SBB-37	1		SBB X R019 X R019-37	5	
SBB X R019 x SBB-38	5		SBB X R019 X R019-38	3	
SBB X R019 x SBB-39	3		SBB X R019 X R019-39	3	
SBB X R019 x SBB-40	1		SBB X R019 X R019-40	3	
SBB X R019 x SBB-41	5		SBB X R019 X R019-41	3	
SBB X R019 x SBB-42	3		SBB X R019 X R019-42	3	
SBB X R019 x SBB-43	3		SBB X R019 X R019-43	3	
SBB X R019 x SBB-44	5	R	SBB X R019 X R019-44	3	
SBB X R019 x SBB-45	5		SBB X R019 X R019-45	3	S
SBB X R019 x SBB-46	3		SBB X R019 X R019-46	3	
SBB X R019 x SBB-47	3		SBB X R019 X R019-47	5	
SBB X R019 x SBB-48	3		SBB X R019 X R019-48	5	S
SBB X R019 x SBB-49	5		SBB X R019 X R019-49	5	
SBB X R019 x SBB-50	5	S	SBB X R019 X R019-50	5	
SBB X R019 x SBB-51	3		SBB X R019 X R019-51	3	
SBB X R019 x SBB-52	3		SBB X R019 X R019-52	3	
SBB X R019 x SBB-53	3		SBB X R019 X R019-53	5	
SBB X R019 x SBB-54	5		SBB X R019 X R019-54	3	
SBB X R019 x SBB-55	5	S	SBB X R019 X R019-55	1	R

- BC1P1, BC1P2의 표현형 검정 결과 저항성과 감수성 비율이 1:10, 1:25로 WMV2 유전양식이 단인자유전이 아닌 것을 확인하였음. 따라서 양적형질일 것으로 추정되어 QTL 분석을 실시함.

○ R019 집단 유래 F2 분리세대의 WMV2 저항성 QTL 분석

- R019계통을 이용한 분리집단 F2의 강한 저항성을 보이는 개체 19개체, 강한 감수성을 보이는 개체 19개체를 선발하여 BSA-NGS분석을 실시함.

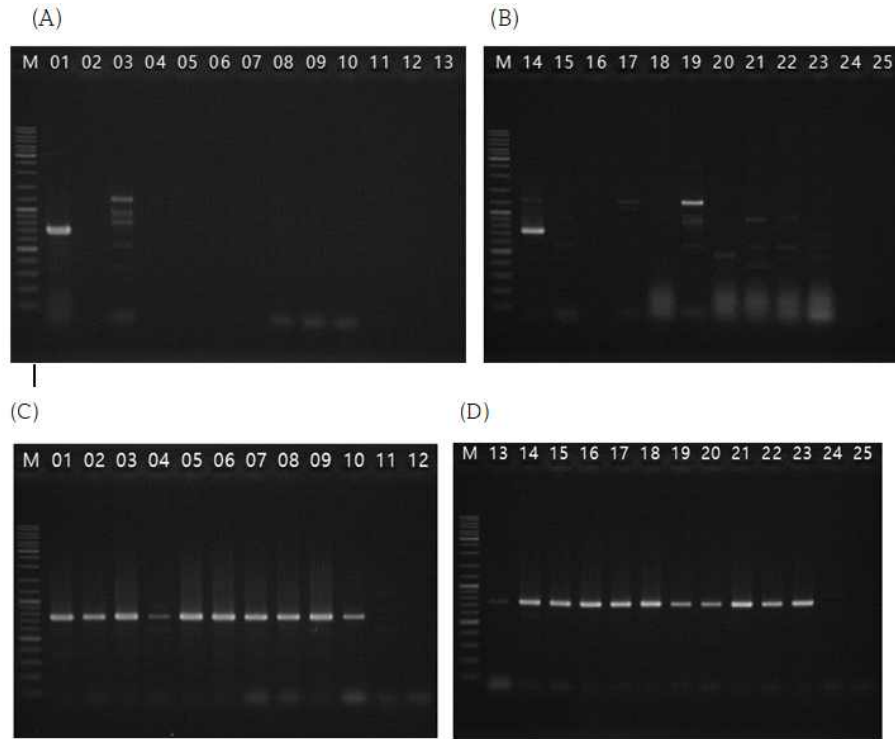


그림 2.29. BSA-NGS분석에 사용한 F2 개체들의 WMV2 RT-PCR 결과 (A), (B) 저항성 개체들의 RT-PCR결과 , (C), (D)감수성 개체들의 RT-PCR결과

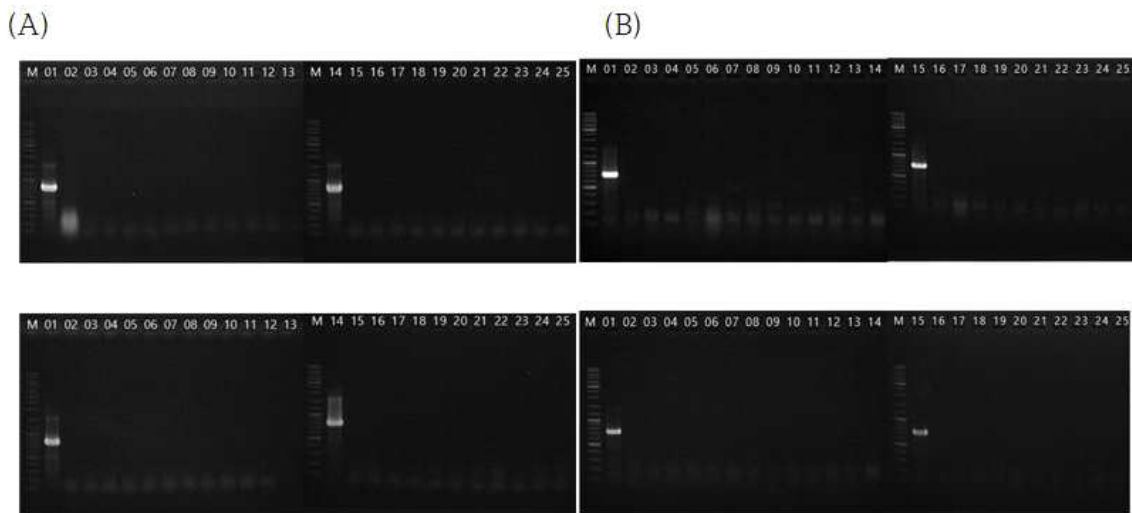


그림 2.30. BSA-NGS분석에 사용한 F2 개체들의 ZYMV, PRSV RT-PCR 결과 (A), ZYMV RT-PCR결과 , (B)PRSV RT-PCR결과

- BSA-NGS 분석에 사용된 저항성 19개체, 감수성 19개체는 모두 WMV2 단독감염이 되었음을 확인 할 수 있었으며, 같은 potyvirus 속인 ZYMV, PRSV에 교차감염이 되지 않은 것을 확인할 수 있었다. 따라서 각 pooling 한 DNA를 이용하여 BSA-NGS을 진행하였음.

○ BSA-NGS를 통한 연관마커 개발

- SBB x R019 F2 집단에서 WMV2를 접종 후 14dpi부터 49dpi까지 최종적으로 표현형이 F2 집단에서 동일하게 강한 저항성 19개체 강한 감수성 19개체를 각각 샘플링하여 DNA를 추출함.
- 각각의 DNA를 동량으로 pooling하여 Illumina NovaSeq 6000을 이용하여 NGS를 수행함. 도출된 서열을 이용하여 Bowtie2 프로그램을 이용해 생산된 염기서열과 수박 reference 97103 reference를 기반으로 BAM파일을 생산하고, 도출된 BAM파일을 토대로 VCF를 확보하여 표현형과 연관된 마커발굴을 수행함.
- 감수성 및 저항성 bulk 각각에 대하여 BSA-NGS를 수행한 결과로 확보된 VCF파일로 deltaSNP를 구하였음. Sliding-window 방법으로 DeltaSNP-index를 계산한 후, R script에서 confidence interval 및 significance 통계적 옵션을 주어 WMV2 저항성 QTL 유전자위를 분석하였음.
- QTL 분석결과 LG 2, 3, 4에서 유의지역을 찾을 수 있었고, 해당 계놈지역에서 16개의 HRM 마커를 제작함.
- 제작한 HRM 마커를 선별한 후 F2 검정을 진행하여 WMV2 저항성 SNP마커 개발함.
- F2:3 집단을 양성하여 개발된 마커를 활용하여 WMV2 저항성에 대한 재검정 및 신규 저항성 계통 육성에 활용.

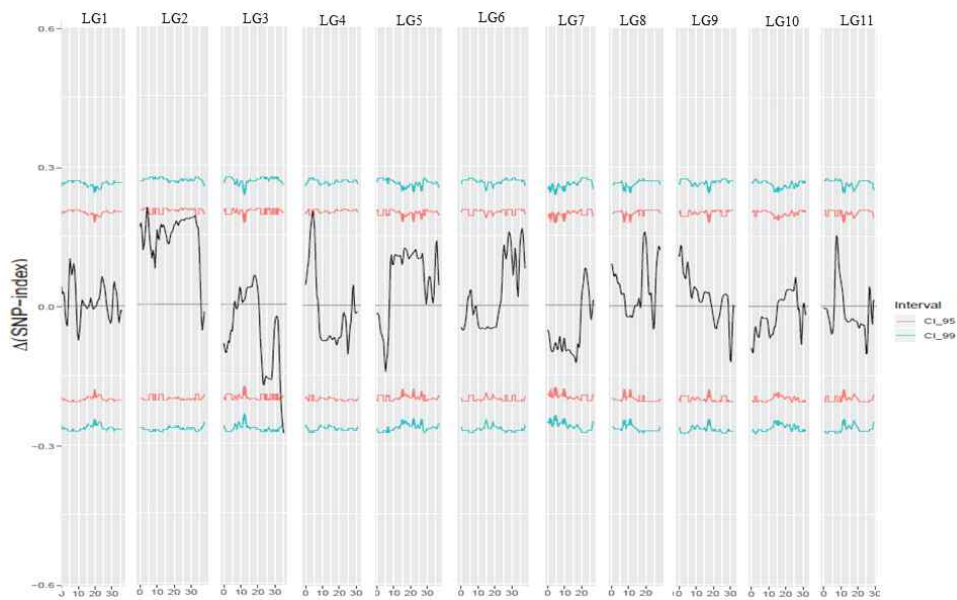


그림 2.31. QTL 분석결과 $\Delta(\text{SNP-index})$ 값($P = 0.05$, 빨간색 선 ; $P = 0.01$, 파란색 선)

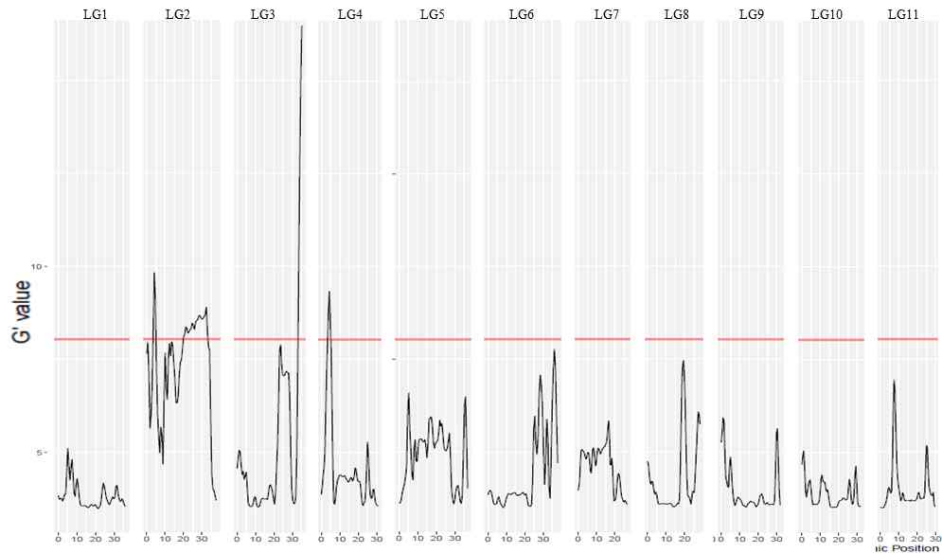


그림 2.32. Gprime value 유의도에 따른 연관군별 QTL 분포

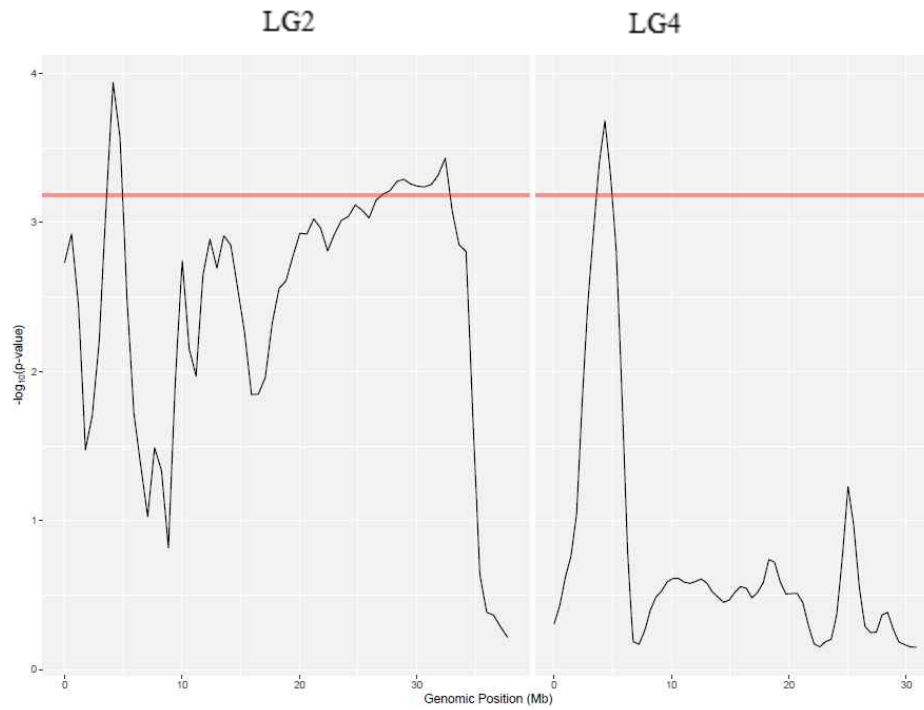


그림 2.33. 유의도($p\text{-value}=0.05$)에 따른 후보 QTL 연관 (LG2, LG4)

표 2.24. BSA를 통한 QTL분석 결과 (p-value = 0.1)

Linkage group	qtl	start	end	peakDeltaSNP	posPeakDeltaSNP	avgDeltaSNP	maxGprime	posMaxGprime	meanGprime
LG2	1	435	1485249	0.175013426	589868	0.163674786	5.443487247	589868	4.977297142
LG2	2	2644499	5724740	0.20931	4126529	0.175680929	7.311568424	4126529	5.613401267
LG2	3	9426557	15877896	0.172343512	12378657	0.15681508	5.451078821	13575817	4.828712749
LG2	4	16656400	34645009	0.191467646	32419483	0.175032424	6.394656955	32419483	5.6824163
LG3	1	22476509	28550814	-0.17445545	23580830	-0.16036461	5.383184979	23580830	4.697999336
LG3	2	32675676	35097039	-0.27952276	35097039	-0.2204687	14.22806186	35097039	9.38957785
LG4	1	2506544	5739866	0.202618825	4335467	0.174597373	6.817873662	4335467	5.544189092
LG5	1	4938844	5311865	-0.14301366	5178231	-0.13920597	4.082866995	5178212	3.972043132
LG5	2	35357230	35728578	0.138902439	35666094	0.137048791	3.985183431	35666094	3.919577794
LG6	1	27707463	29470373	0.158290884	28418335	0.15072681	4.561462614	28418335	4.256584016
LG6	2	34958889	37071435	0.165628735	36114869	0.152341953	5.251835361	36114869	4.660201443
LG8	1	18306423	20236424	0.159294276	19427640	0.150683611	4.952260495	19427640	4.572768648
L11	1	7069072	7971553	0.151752247	7366715	0.14616265	4.423837091	7366715	4.194147195

표 2.25. BSA를 통한 QTL분석 결과(p-value=0.05)

Linkage group	qtl	start	end	peakDeltaSNP	posPeakDeltaSNP	avgDeltaSNP	maxGprime	posMaxGprime	meanGprime
LG2	1	435	1214818	0.175013426	589868	0.167568262	5.443487247	589868	5.132576792
LG2	2	3059265	5392490	0.20931	4126529	0.185306266	7.311568424	4126529	6.083009875
LG2	3	9731813	10409871	0.160770031	10020787	0.153521607	5.188812209	10020787	4.857745423
LG2	4	11535548	15212746	0.172343512	12378657	0.16468222	5.451078821	13575817	5.136084176
LG2	5	17664943	34419636	0.191467646	32419483	0.177373931	6.394656955	32419483	5.774490605
LG3	1	22756705	28037194	-0.17445545	23580830	-0.16193025	5.383184979	23580830	4.761723616
LG3	2	32827542	35097039	-0.27952276	35097039	-0.22711722	14.22806186	35097039	9.793178712
LG4	1	2826061	5526937	0.202618825	4335467	0.18177794	6.817873662	4335467	5.832960648
LG6	1	28390422	28467106	0.158290884	28418335	0.158027608	4.561462614	28418335	4.550249946
LG6	2	35391226	36771029	0.165628735	36114869	0.15874293	5.251835361	36114869	4.929881916
LG8	1	18620567	19825498	0.159294276	19427640	0.155895465	4.952260495	19427640	4.793900501

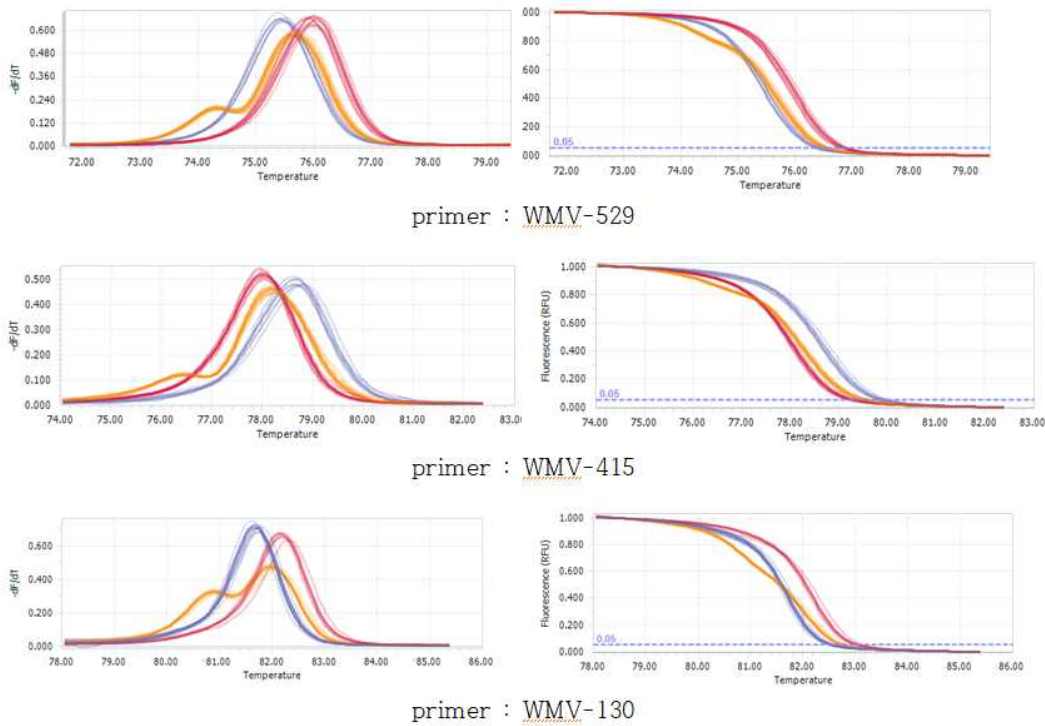


그림 2.34. WMV2 대표 SNP marker를 통한 HRM 분석결과

3. 복합내병성 육종을 위한 ZYMV 저항성 연관분자마커 개발

- 본 과제 of 연구목표에는 포함되지 않았으나, 수박 복합내병성 MAB를 실현하기 위하여 수박 감염성 ZYMV, 덩굴쪄짐병, 흰가루병에 대한 저항성 연관 근접 분자마커를 개발하고자 하였음.

가. Zucchini yellow mosaic virus 저항성 분자마커 개발

1) ZYMV 저항성 마커 개발

○ PI595203에 대한 ZYMV 저항성의 분리 확인

- 본 연구과제 시작 당시 potyvirus에 대한 저항성 소재로 알려진 PI595203을 확보하여, 분리집단을 양성 후 분자 마커를 개발을 시도하였음. 그러나 저항성 계통으로 알려져 있는 PI595203의 저항성이 무너지고, 다른 potyvirus의 교차감염에 의해 정상적인 표현형 검정을 수행하지 못함.
- PI595203의 정확한 진단을 위해 반복실험을 진행하였으며, ZYMV 바이러스를 7일 간격으로 3회 접종 후 21일째 육안검정 및 RT-PCR을 이용하여 표현형 검정을 실시함.
- 결과적으로 20개 검정개체 중 20개 모두 표현형 결과와 RT-PCR 모두 ZYMV에 감수성으로 판단이 되었으며, 이에 ZYMV저항성 마커를 개발하는 저항성 자원으로 부적합 하다고 판단이 되어 새로운 유전자원 탐색이 필요하다고 사료됨.

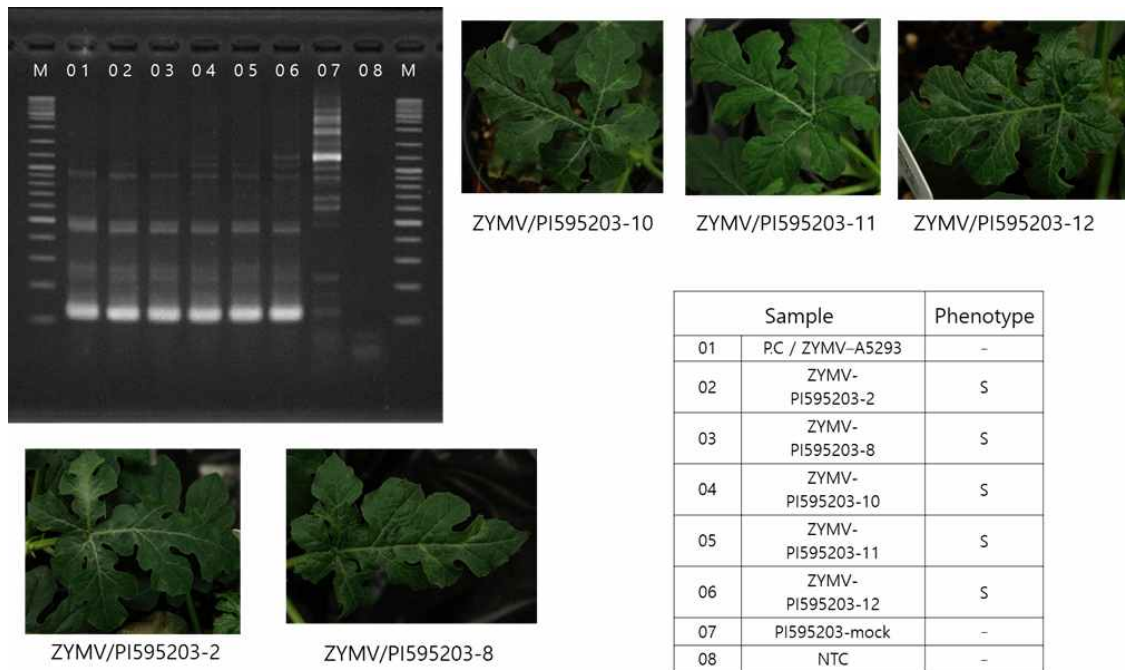


그림 2.35. ZYMV 접종 후 PI595203 표현형 검정 결과 대표 결과

○ R019의 ZYMV 저항성 확인 및 표현형 검정

- R019를 이용하여 potyvirus 스크리닝을 진행하던 중 ZYMV에도 강한 저항성을 보이는 것으로 판단이 되어 R019를 이용해 새로운 분리집단 전개 및 표현형 검정을 실시하기로 함.
- 접종 방법은 7일 간격으로 3번 ZYMV 접종을 실시하고, 온실 및 외부육묘 묘상에서 표현형 검정을 반복적으로 실시함.
- 결과적으로 R019의 접종개체 19개체 중 14개체는 강한 저항성을 보이고, 5개체는 심한 감수성을 보임.
- 이에 환경에 따른 육안 표현형 검정 및 RT-PCR에서 ZYMV에 강한 저항성을 보이는 R019를 선발하여 해당 개체를 이용하여 분리집단을 양성함.

○ R019를 이용한 potyvirus 저항성 마커 재개발

- 종합적으로 R019 계통이 WMV, ZYMV에 강한 저항성을 보이고 있으며, 본 계통을 이용하여 육안검정, RT-PCR, ELISA결과 종합적으로 확인하고, 3가지 결과에서 동일하게 저항성을 보이는 R019를 선발함.
- 모든 potyvirus에 감수성인 SBB를 이용하여 F1, F2, BC1P1, BC1P2 분리집단을 작성함

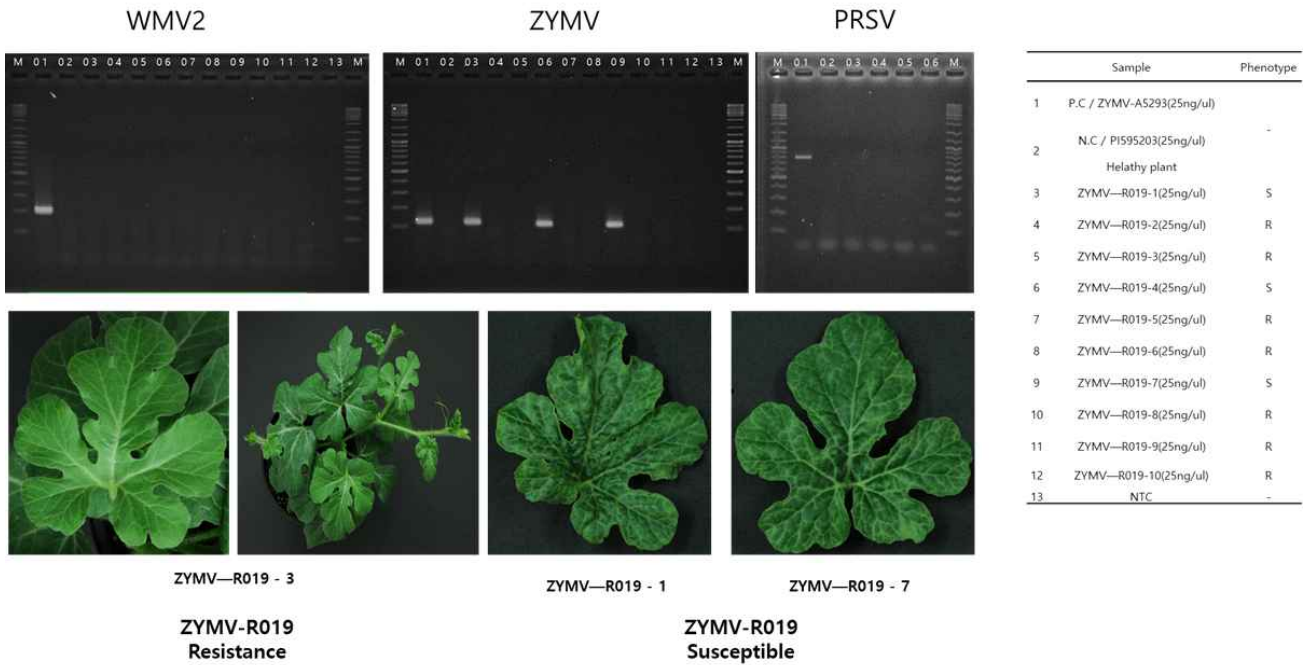


그림 2.36. ZYMV-R019 계통의 육안검정 및 RT-PCR 대표적 검정결과

- 3차년도와 같은 결과가 도출된 원인을 확인한 결과 부분 저항성 R019 계통 내에 저항성 표현형의 분리가 있는 것을 확인하였음. 실험방법으로는 본 연구의 집단 형성에 사용된 R019와 같은 Lot. 종자를 13립정도 파종하여 WMV-2를 접종하여 ELISA결과 및 RT-PCR을 통하여 스크리닝한 결과, R019 계통 종자들의 Lot.에서 WMV2가 분리하는 경향을 확인하였음.
- 3차년도에 수행한 R019의 ELISA, RT-PCR결과를 토대로 가장 강한 저항성을 보이는 R019를 대상으로 자가수분을 통하여 고정시킨 후 F1, F2(종자분양 2020년 10월)를 이용하여 추후 분석에 사용하였음.

표 2.26. R019 WMV-2 표현형검정, ELISA, RT-PCR 결과

	표현형검정 결과	ELISA 결과(1hr)	RT-PCR 결과
Buffer control		0.129	
N.C		0.136	
P.C		2.137	
Mock		0.132	
SBB	5	1.618	
R019 -1	0	0.31	R
R019 -2	0	0.158	R
R019 -3	0	0.132	R
R019 -4	1	0.581	S
R019 -5	0	0.127	R
R019 -6	0	0.12	R
R019 -7	3	0.376	S
R019 -8	1	0.125	S
R019 -9	1	1.736	S
R019 -10	3	2.674	S
R019 -11	0	0.154	R
R019 -12	1	1.762	S
R019 -13	3	2.01	S

표 2.27. ELISA Mock 흡광도값 및 cut-off value 계산

	평균	stdev	cut-off value
30min	0.121	0.002828	0.142434
1hr	0.132	0.002828	0.154534

*** cut-off = (negative O.D mean value +3stdev) x 1.1로 계산하여 0.154534 이하를 저항성, 0.154534 초과는 감수성으로 판단



그림 2.37 R019 RT-PCR WMV-2 detection 결과 (target base: 730bp)

(2) 신규 SBB X R019 F2 집단을 이용한 WMV2 표현형 검정

아래 그림과 표와 같은 기준으로 표현형 검정을 진행했으며, 검정 기준엽은 식물의 정단부로부터 3~5매를 보고 점수를 부여하였음. 2차 접종 후 접종엽은 표시를 해두었으며 접종엽을 포함한 하위엽은 검정에서 제외하였음.

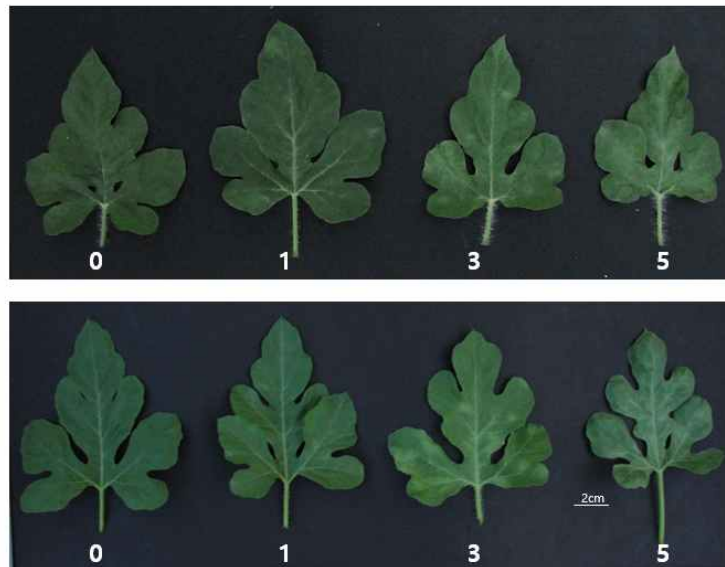


그림 2.38. SBB X R019: F2 집단 표현형 검정 기준 사진

표 2.28. SBB X R019: F2 집단 표현형 검정 기준표

Disease Rate	Discription
0	no symptoms
1	Slightmosaic on a leaf (difficult to distinguish whether virus infected or not)
3	Mosaic symptoms on leaves (mosaic patches on less than 50% surface area of leaf)
5	Severe mosaic and deformation of leaves

- 3차년도에 개발 된 마커를 이용하여 신규 SBB X R019: F2 집단을 제1세부로부터 분양받아 62개체를 대상으로 육안 표현형 검정 및 RT-PCR, ELISA 분석을 수행하였음.

DAS-ELISA(Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

- 바이러스의 Coat protein을 항원으로 하여 항원-항체를 결합시키고 substrate를 통하여 그 흡광도를 측정하는 방법인 효소면역흡착검사법으로 식물의 잎 안에 있는 바이러스의 양을 측정하

였음.

사용한 Kit

BIOREBAS WMV-2 complete kit 480

사용한 시약

1. Nunc-Immuno Platten, MaxiSorp
2. WMV-2 Positive control
3. Negative control
4. WMV-2 Watermelon mosaic virus 2 Conjugate
5. WMV-2 Watermelon mosaic virus 2 IgG
6. pNPP Tablett 20mg
7. Extraction buffer(10X)
8. Washing buffer powder
9. Conjugate buffer(10X)
10. Substrate buffer(5X)

<Method>

1. Buffer 제작

-coating buffer: 멸균병에 coating buffer tablet와 멸균수 100ml을 넣고 stirrering 해서 녹여준다.

-washing buffer : 멸균병에 washing buffer powder 3g과 멸균수 300ml을 넣고 stirrering해서 녹여준다.

-extraction buffer : 멸균병에 10X extraction buffer를 멸균수를 이용하여 희석한다.

2.1차 항체 loading

falcon tube에 coating buffer 21ml에 Antibody(IgG) 1000X 21 μ l을 넣고 inverting해서 섞어준 후 multi pipette reservoir를 이용하여 96well plate에 multi pipette으로 분주한다.

각 well 당 200 μ l씩 분주 후 호일로 감싸고 humid box에 넣고 30도 incubator에서 4시간동안 incubation시켜준다.

3. 샘플 마쇄

ELISA 옆 샘플(100mg)에 추를 넣고 extraction buffer 500 μ l를 넣고 automill을 이용하여 마쇄시켜준다. 추 제거 후에 extraction buffer를 1.5ml을 넣어주고 inverting해준 다음 13000rpm에 5분 동안 원심분리해주고 상층액 230 μ l를 따서 0.2ml tube에 넣어준다.

Positive control, Negative control은 kit에 포함되어 있는 샘플에 extraction buffer 2.5ml을 넣고 섞어준 다음 230 μ l를 따서 0.2ml tube에 넣어준다.

4. Washing

2번 과정에서 incubation이 끝난 plate는 세게 털어서 여액을 모두 버리고 washing buffer를 각 well마다 200 μ l씩 분주하여 넣어준 후 살살 흔들어 씻어준다.

washing은 총 4회에 걸쳐서 하며, 분주 후에 1분, 2분, 3분, 4분에 걸쳐 plate를 shaking 시켜준다.

5. 샘플 loading

3번 과정에서 준비된 샘플을 200 μ l씩 96 well plate에 분주한 후 humid box에 넣고 4도에 16시간 동안 incubation 해준다.

6. Washing (4번 과정과 동일)

7. Conjugate

falcon tube에 10X conjugate buffer를 1X로 희석하여 21ml 넣고 conjugate (WMV2-AP)를 21 μ l 넣고 inverting하여 섞어준 다음 200 μ l씩 96 well plate에 분주해준 다음 30도 incubator에서 5시간 동안 incubation 시켜준다.

8. Washing (4번 과정과 동일)

9. Substrate

5X Substrate buffer를 1X로 희석해서 20ml을 만들고 PNPP tablet을 넣은 후 inverting해서 녹여 준 다음 200 μ l씩 96 well plate에 분주하고 15분, 30분, 1시간마다 Microplate Reader를 이용해서 흡광도 값을 측정한다.

RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

- 수박의 Potyvirus 계열 WMV2, ZYMV(Zucchini Yellow Mosaic Virus), PRSV-W(Papaya ringspot virus)의 coat protein 서열로 primer를 제작하여 식물 RNA에서 RT-PCR로 WMV2 외에 다른 바이러스에 교차오염이 나지 않았는지 확인하고 WMV2의 감염 여부도 확인하였음.

표 2.29. SBB X R019: F2 표현형 검정, RT-PCR, ELISA 결과

개체 번호	표현형 검정 결과	RT-PCR 결과	ELISA 결과	ELISA 결과 (1hr)
SBB X R019 : F2 - 01	5		S	2.621
SBB X R019 : F2 - 02	0	R	R	0.165
SBB X R019 : F2 - 04	0	R	R	0.148
SBB X R019 : F2 - 06	0	R	R	0.161
SBB X R019 : F2 - 07	5		S	2.618
SBB X R019 : F2 - 08	0	R	R	0.144
SBB X R019 : F2 - 09	0	R	R	0.147
SBB X R019 : F2 - 10	1	S	S	2.696
SBB X R019 : F2 - 11	1	S	R	0.147
SBB X R019 : F2 - 12	0	R	R	0.152
SBB X R019 : F2 - 13	1	R	R	0.147
SBB X R019 : F2 - 14	3		S	1.449
SBB X R019 : F2 - 15	5		S	2.593
SBB X R019 : F2 - 17	1	S	S	1.668
SBB X R019 : F2 - 20	3		S	2.285
SBB X R019 : F2 - 21	0	R	R	0.156
SBB X R019 : F2 - 22	0	R	R	0.152
SBB X R019 : F2 - 23	5		S	2.830
SBB X R019 : F2 - 24	0	R	R	0.148
SBB X R019 : F2 - 25	0	R	R	0.148
SBB X R019 : F2 - 26	3		S	3.640
SBB X R019 : F2 - 27	1	S	S	1.558
SBB X R019 : F2 - 28	0	R	R	0.148
SBB X R019 : F2 - 29	0	S(희미한 밴드)	R	0.146
SBB X R019 : F2 - 30	3		R	0.163
SBB X R019 : F2 - 31	0	R	R	0.144
SBB X R019 : F2 - 33	1	S	S	1.828
SBB X R019 : F2 - 34	1	S	S	1.805
SBB X R019 : F2 - 35	1	S	S	2.140
SBB X R019 : F2 - 37	0	R	R	0.149
SBB X R019 : F2 - 38	1	S	S	2.605
SBB X R019 : F2 - 40	5		S	3.396
SBB X R019 : F2 - 42	0	R	R	0.147
SBB X R019 : F2 - 43	1	S	S	2.406
SBB X R019 : F2 - 45	3		S	2.340
SBB X R019 : F2 - 46	5			
SBB X R019 : F2 - 47	3	S	S	2.280
SBB X R019 : F2 - 50	5			
SBB X R019 : F2 - 51	3			
SBB X R019 : F2 - 52	5			
SBB X R019 : F2 - 53	5			
SBB X R019 : F2 - 55	5			
SBB X R019 : F2 - 56	0	S(희미한 밴드)	R	0.148
SBB X R019 : F2 - 57	3		S	3.272
SBB X R019 : F2 - 58	5	S		
SBB X R019 : F2 - 61	1	S	S	2.166
SBB X R019 : F2 - 62	1	S	S	1.803

표 2.30. ELISA non-inoculation sample control 흡광도

Sample Name	ELISA 결과 (1hr)
Buffer control	0.143
N.C	0.147
P.C	3.027
R019 Healthy plant	0.152
R019 Mock control	0.150

표 2.31 ELISA formula for calculation of the cut off value

흡광도 측정 시간	평균	stdev	cut-off value
30min	0.142	0.002828427	0.1655338
1hr	0.15	0	0.165

***Formula for calculation of the cut off value

cut-off = (negative O.D mean value +3stdev) x 1.1



그림 2.39. SBB X R019: F2 RT-PCR WMV-2 detection 결과 (Target size: 189bp)

Sample NO.	Sample name	RT-PCR 결과
01	Positive control	
02	SBB X R019: F2 - 02	R
03	SBB X R019: F2 - 04	R
04	SBB X R019: F2 - 06	R
05	SBB X R019: F2 - 08	R
06	SBB X R019: F2 - 09	R
07	SBB X R019: F2 - 10	S
08	SBB X R019: F2 - 11	S
09	SBB X R019: F2 - 12	R
10	SBB X R019: F2 - 13	R
11	SBB X R019: F2 - 17	S
12	SBB X R019: F2 - 21	R
13	SBB X R019: F2 - 22	R
14	SBB X R019: F2 - 24	R
15	Negative control	
16	NTC	



그림 2.40. SBB X R019: F2 RT-PCR WMV-2 detection 결과 (Target size: 189bp)

Sample NO.	Sample name	RT-PCR 결과 1 반복
01	Positive control	
02	SBB X R019: F2 - 25	R
03	SBB X R019: F2 - 27	S
04	SBB X R019: F2 - 28	R
05	SBB X R019: F2 - 29	S(희미한 밴드)
06	SBB X R019: F2 - 31	R
07	SBB X R019: F2 - 33	S
08	SBB X R019: F2 - 34	S
09	SBB X R019: F2 - 35	S
10	SBB X R019: F2 - 37	R
11	SBB X R019: F2 - 38	S
12	SBB X R019: F2 - 42	R
13	SBB X R019: F2 - 43	S
14	SBB X R019: F2 - 47	S
15	Negative control	
16	NTC	



그림 2.41. SBB X R019: F2 RT-PCR WMV-2 detection 결과 (Target size: 189bp)

Sample NO.	Sample name	RT-PCR 결과 1 반복
01	Positive control	
02	SBB X R019: F2 - 56	S(희미한 밴드)
03	SBB X R019: F2 - 58	S
04	SBB X R019: F2 - 61	S
05	SBB X R019: F2 - 62	S
06	R019-1 (2)	R
07	R019-3 (5)	S
08	R019-6	R
09	R019-7	R
10	Negative control	
11	NTC	



그림 2.42. SBB X R019: F2 RT-PCR ZYMV detection 결과 (Target size:713bp)

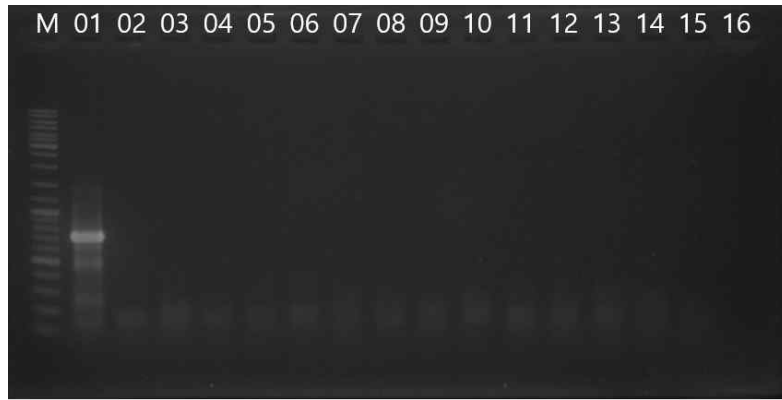
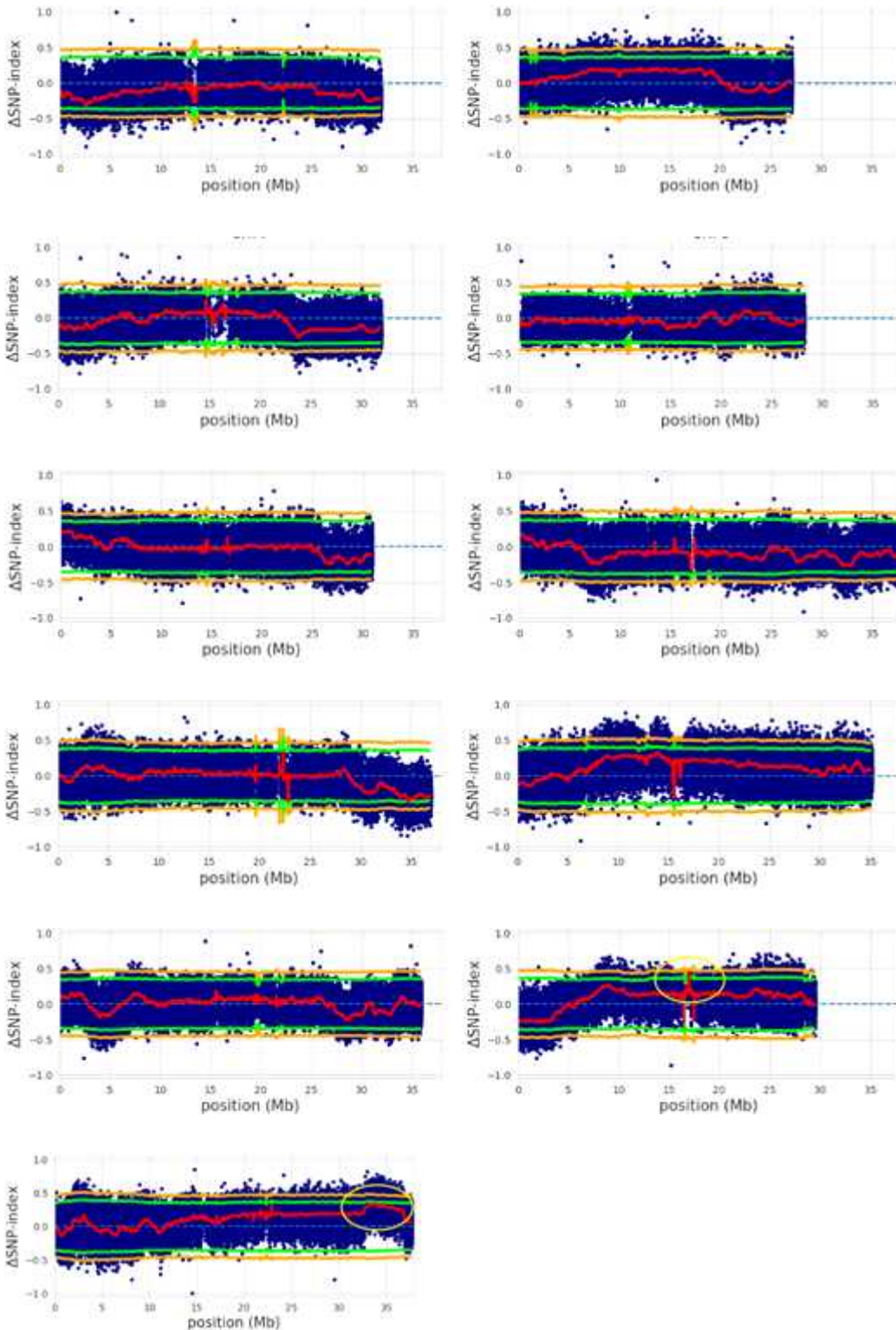


그림 2.43. SBB X R019: F2 RT-PCR PRSV-W detection 결과 (Target size:813bp)

- 육안 표현형 검정, ELISA, RT-PCR 검정을 수행한 결과 62개체 모두 육안표현형 결과와 동일한 결과를 확인할 수 있었으며, 62개체 중 가장 강한 저항성과, 감수성을 이용하여 BSA-seq NGS를 수행하였음.

- 3개의 연관군을 대상으로 마커를 제작하고, 95% 수준의 cosegregation rate를 확보함



4. 복합내병성 육종을 위한 덩굴쪄김병 저항성 연관분자마커 개발

4.1 덩굴쪄김병(*Fusarium wilt*) 균 확보 및 동정

- *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (FON)의 3종 race를 확보함
 - 기탁균주 race 0 (KACC40902), race 1 (KACC40901), race 2 (KACC40905)
- 기탁균주의 race 재확인을 위한 판별기주 확보
 - 판별기주 4종 확보 및 증식
 - 아래 표와 같이 FON race를 판별할 수 있으며, USDA-GRIN에서 판별기주를 분양받아 증식하여 확보하였고, 국내 종자회사들에 분양한 바 있음.

표 2.12 *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (FON)의 판별기주 및 race 구별

판별기주	Race		
	0	1	2
Sugar baby	S	S	S
Charleston Gray	R	S	S
Calhoun Gray	R	R	S
CAU271-FR	R	R	R

- *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (FON)의 증식 및 접종법
 - FON은 계대증식은 PDA 배지를 이용하였으며, 4주 간격으로 계대 보관함.
 - Koch's postulates(코흐의 가설)을 기반으로 해당 균주들을 접종 후, race 별 감수성 개체에서 재분리 후 다시 판별기주에 접종하여 확인하는 방법으로 최종적으로 각 race에 강한 감염성을 보이는 접종 균주를 확보함.
 - Sporulation은 V8 배지를 활용하였고, 최적 접종농도는 race 0 (5.0×10^5), race 1 (2.0×10^5), race 2 (5.0×10^5) conidia/mL로 최적 농도를 설정함.
 - 최적 접종농도를 유지하며, 본엽 1~2매의 유묘의 뿌리를 수세한 후, 15분간 접종액에 침지 후 다시 포트에 정식하여 1주 간격으로 병 진전도를 파악하였음

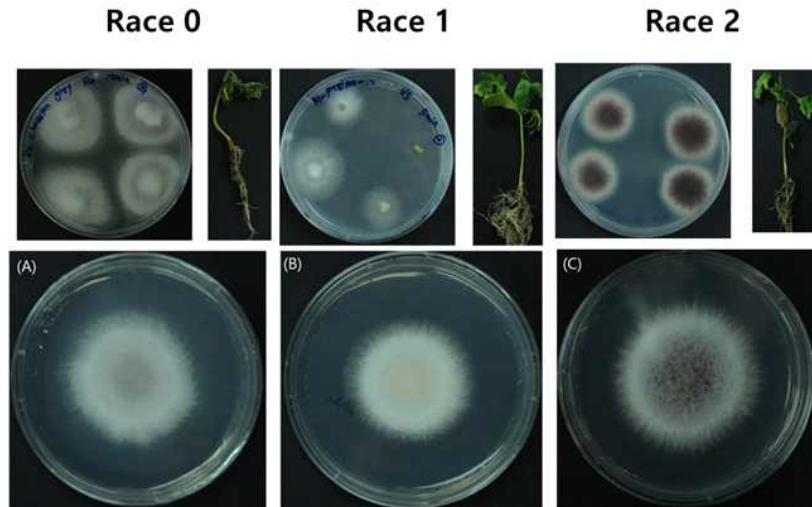


그림 2.44. *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (FON)의 접종개체 재분리 후 증식 모습 (A) KACC40902(Race 0), (B) KACC40901(Race 1), (C) KACC40905(Race 2).

○ 덩굴쪄김병 실내/하우스 접종법 확립

- 덩굴쪄김병 실내 및 하우스에서 접종시 대량의 유묘 검정을 정확히 수행하기 위하여 최적 sporulation 및 접종방법을 확립



그림 2.45. 덩굴쪄김병 접종법 확립

○ *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (FON)의 저항성 지표

- FON의 접종 후, 10일 후 수박의 덩굴쪄김병 병징 스펙트럼 (0~5)이 나타났으며, 저항성 지표를 고도저항성(R; high resistance), 중도저항성(MR; intermediate resistance), 감수성(S; susceptible), 고도 감수성(SS : high susceptible)로 구분함

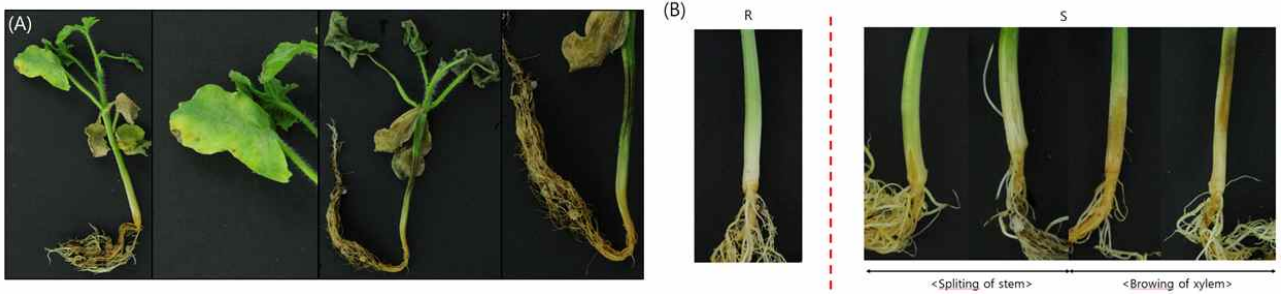


그림 2.46. *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (FON)의 감염증상

○ *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (FON)의 저항성 지표 확립

- 수박 덩굴쪼김병 Race1 접종 10일 후, 병징 스펙트럼 (0~5)이 나타났으며, 저항성 지표를 고도저항성(R: high resistance), 중도저항성(MR: intermediate resistance), 감수성(S: susceptible), 고도 감수성(SS: high susceptible)로 구분함

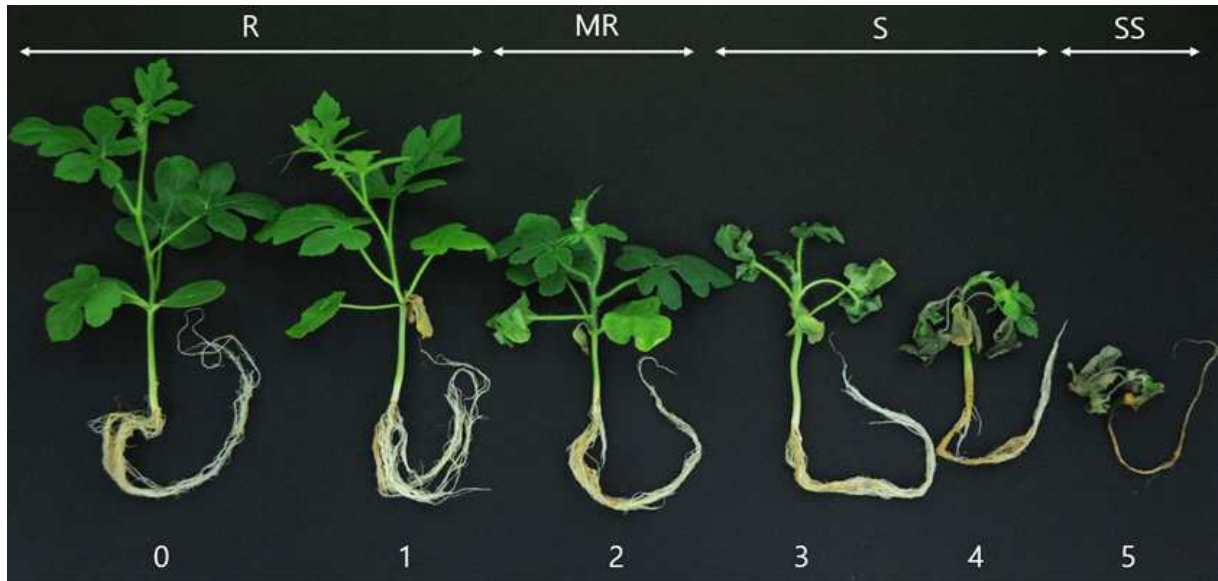


그림 2.47. 수박 덩굴쪼김병 병징에 따른 지표 및 감염 증상

표 2.32. 수박 덩굴쪼김병 저항성 정도에 따른 지표 개발

Disease rating	Symptom
0	정상 생육
1	자엽 또는 본엽 위조
2	자엽, 본엽 위조, 신초 생육가능
3	자엽, 본엽 위조, 신초 발달 억제
4	자엽, 본엽 위조, 신초 극심한 위조, 근관 갈변
5	개체 전체 위조, 생육 불가

○ 수박 덩굴쪄김병 race 1 접종을 위한 균주 스크리닝

- 수박 덩굴쪄김병 race 1(KACC40901) 균주를 PDA(Potato Dextrose agar, Bacto) 배지에 절편체로 균주를 28°C incubator에서 7일 동안 배양함. 수박 덩굴쪄김병의 경우 접종을 위한 포자를 유기하기 위해 PD(Potato dextrose, Bacto) 배지로 28°C shaking incubator에서 배양함. 이후 V8(Campbell Soup co.) 배지에서 배양 후 배양액을 거즈로 거르고 hemocytometer를 이용해 광학현미경에서 포자를 관찰을 했음

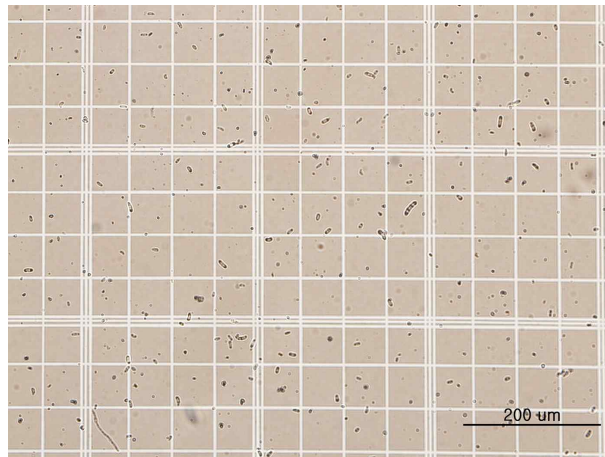


그림 2.48. 광학현미경으로 관찰한 수박 덩굴쪄김병 race 1의 포자

○ 수박 덩굴쪄김병 race 1 접종을 위한 최적의 접종농도 확립

- 1×10^5 conidia/ml, 5×10^5 conidia/ml로 나누어 설정하였으며, 접종대상으로는 판별기주인 Sugar baby, Charleston gray, Calhoun gray, PI296341-FR과 PMTd108(P1), CAU271-FR(P2)을 이용하여 각 계통 당 15개체 반복으로 접종을 실시함.
- 실험 결과 1×10^5 conidia/ml의 농도가 가장 적당하다고 판단 후 실험을 진행함

표 2.33. 수박 덩굴쪄김병 농도 스크리닝을 위한 표현형 검정

1×10^5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Sugar baby	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Charleston gray	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5				
Calhoun gray	5	1	2	5	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0
PI296341-FR	0	5	5	1	1	5	5	5	1	5	5	1	5	5	5
PMTd108(761)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
CAU271-FR	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

5x10 ⁵	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Sugar baby	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Charleston gray	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Calhoun gray	5	5	0	5	5	0	1	1	0	0	5	5	1	5	1
PI296341-FR	5	1	5	5	5	5	5	5	5	5	1	5	5	5	5
PMTd108(761)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5				
CAU271-FR	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1

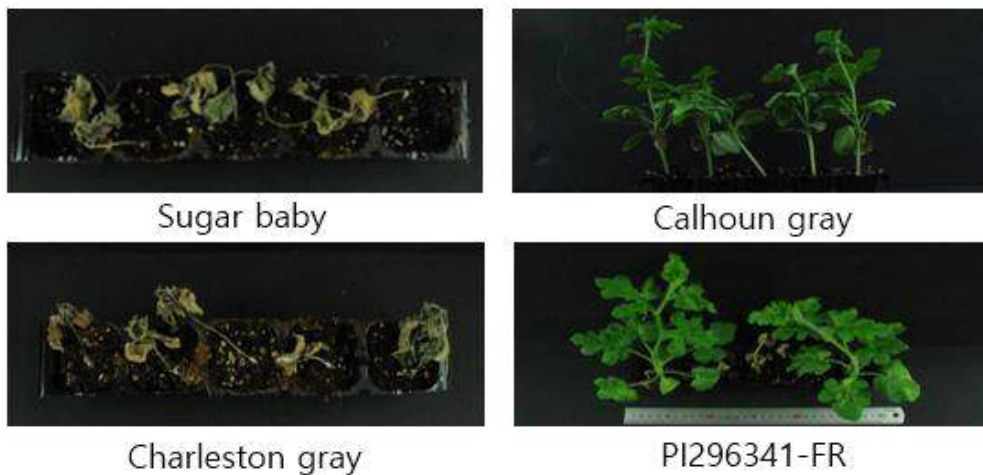


그림 2.49. 수박 덩굴쪼김병 최적 접종 농도 설정을 위한 표현형 검정 사진

○ PI296341-FR의 저항성 분리로 인한 신규자원 탐색

- 1차년도 과제 수행을 위해 덩굴쪼김병 저항성 마커 개발을 위해 수집한 계통은 PI296341-FR이며, 이 계통은 전 세계적으로 대표적인 덩굴쪼김병 저항성 자원으로 활용하고 있음. 덩굴쪼김병을 유발하는 것으로 알려진 진균 race 0, 1, 2에 모두 저항성을 보이는 자원으로 알려져 있었으며, 각 race별로 저항성 유전자의 위치가 다른 것으로 파악되고 있음.
- USDA-ARS GRIN에서 분양받은 PI296341-FR의 고정정도를 알기위하여 후대 표현형 분리가 일어나는지 확인한 바, 잘 고정되어 있음을 확인하였으나, 분리집단 양성 및 표현형검정을 하던 중 저항성이 분리하는 것이 관찰됨
- 또한, 국내 일부 연구자의 경우 PI296341-FR에 대한 덩굴쪼김병 저항성 테스트에서 저항성 발현이 일정하지 않다는 사례에 따라, 본 연구에서 활용하는 PI296341-FR 계통에 대하여 기 확보한 race 0, 1, 2에 모두 대하여 저항성 발현여부 테스트를 수차례 농도별, race별로 추가적으로 진행한 결과, race 0에는 강한 저항성, race 1, 2에서는 반복처리구들 중 감수성, 중간정도의 저항성, 완전 저항성의 계통에서 분리하는 표현형을 보이고 있음을 확인하였음. 이에 새로운 덩굴쪼김병 신규 저항성 자원을 찾고자 하였음.
- 덩굴쪼김병 판별기주, 유전자원 센터 및 육종회사에서 분양받은 수박 핵심자원을 이용하여 수박에서 가장 강하고, 전 세계적으로 문제가 되고 있는 덩굴쪼김병 race 2를 대상으로 가장 강한 저항성을 보이는 자원으로 판단되는 CAU271-FR를 이용하여 새로운 집단 양성.

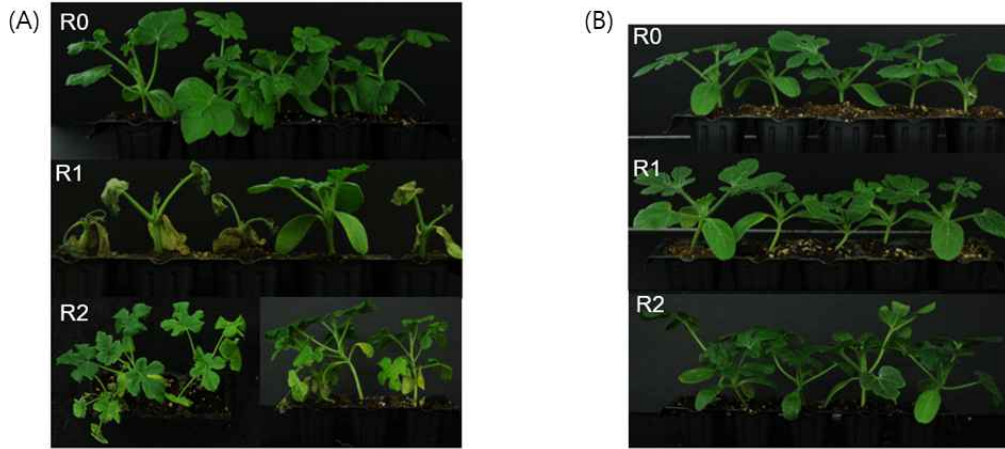


그림 2.50. PI296341-FR과 CAU271-FR를 이용한 덩굴쪄김병 race 0, 1, 2 표현형 관찰.
(A) PI296314-FR, (B) CAU271-FR.

표 2.34. 수박 핵심 유전자원 신규 덩굴쪄김병 저항성 계통 선발

	Accession names	FON Race2 Phenotype		Accession names	FON Race2 Phenotype
1	IT032838	S	41	PI113326	S
2	IT032840	S	42	PI124112	S
3	IT138188	S	43	PI161373	S
4	IT160390	S	44	CAU271-FR	R
5	IT160391	S	45	PI162667	S
6	IT173187	MR	46	PI163203	S
7	IT174828	S	47	PI163574	S
8	IT178328	S	48	PI164634	S
9	IT180715	S	49	PI164685	S
10	IT180716	S	50	PI167059	S
11	IT185455	S	51	PI169232	S
12	IT185457	S	52	PI169237	S
13	IT185463	S	53	PI169256	S
14	IT187901	S	54	PI169274	S
15	IT187902	S	55	PI169282	S
16	IT187903	S	56	PI171392	S
17	IT187904	S	57	PI172798	S
18	CAU208-FR	R	58	PI174100	S
19	IT190052	S	59	PI174106	S
20	IT190053	S	60	PI174812	S
21	IT190055	S	61	PI175102	S
22	CAU056-FR	R	62	PI176487	S
23	IT190061	S	63	PI176494	S
24	IT190063	S	64	PI176916	S
25	IT190068	S	65	PI176923	S
26	IT190069	S	66	PI177327	S
27	IT190071	S	67	PI179239	S
28	IT190076	S	68	PI179242	S

29	IT190077	S	69	PI179883	S
30	IT190078	S	70	PI180426	S
31	IT190079	S	71	PI182933	S
32	IT190084	S	72	PI183398	S
33	IT190085	S	73	PI186489	S
34	IT190086	S	74	PI189317	S
35	IT190088	S	75	PI189318	S
36	IT190089	S			
37	IT190090	S			
38	IT190092	MR			
39	IT190095	S			
40	IT190096	S			

○ 덩굴쪄김병 신규저항성 자원 CAU271-FR 공시

- 수박의 덩굴쪄김병 race 1 저항성에 연관된 마커 개발을 위한 공시재료는 제1 세부과제에서 제공하는 감수성 재배종인 모본 PMTd108(*C. lanatus* sp. *lanatus*), 저항성 야생종 계통인 모본 CAU271-FR(*C. lanatus* sp. *amarus*)을 양친으로 이용하여 작성한 1대 잡종(F1 hybrid)을 자가수분 하여 얻은 119 개의 F2 분리세대를 양성하였음. 각각의 F2 분리세대를 자가수분 하여 F2:3 종자를 분양 받았으며, 여교배를 통해 BC1P1, BC1P2 종자를 확보하였음. 그리고 접종의 정확한 race의 판별을 위해 수박 덩굴쪄김병의 판별기주로 알려져 있는 ‘Sugar baby’, ‘Charleston gray’, ‘Calhoun gray’, ‘PI296341-FR’을 분양 받아 본 실험을 수행하였음.



그림 2.51. 수박 덩굴쪄김병 race 1 저항성 마커 개발을 위한 모부본 수박

왼쪽: PMTd108(*C. lanatus* sp. *lanatus*), 오른쪽: CAU271-FR (*C. lanatus* sp. *amarus*)

F2:3 분리집단을 이용한 BSA-seq NGS pooling DNA re-sequencing

- 표현형의 양 극단의 표현형을 보이는 저항성 17개체와 감수성 17개체를 선발한 뒤, 선발한 개체들의 DNA를 추출 후, sequencing grade DNA를 각 2 group으로 나누어 pooling을 진행하였음.
- F3 분리집단에서 표현형기반으로 제작한 Fon-R1-R, Fon-R1-S의 각각의 Pooling된 DNA를 total 5ug씩 준비하여 QC(Quality control)확인후 sequencing을 수행하였음. Sequencing 기준

은 Novaseq 6000(Illumina, USA)을 사용하였으며, 101bp의 read length를 이용하여 Total read bases Fon-R1-R 15,866,559,246bp, Fon-R1-S 15,478,671,170bp의 약 35X read depth를 기준으로 진행하였으며 read type은 pair-end로 수행하였음. sequencing을 통해 얻은 서열을 trimming과 filtering 과정을 거쳐 얻은 FASTA, FASTAQ data를 가지고 Cucurbit Genomics Database(<http://cucurbitgenomics.org>)의 수박 draft genome 97103의 서열 version 2에 alignment 하여 비교분석을 하였고 최종적으로 SNP variants를 확보하였음.

- 위 sequencing 결과를 토대로 후보 유전자좌를 탐색하였음. 수박 reference genome 97103 version 2에 alignment된 reads data로 유전체내에서 ΔSNP-index값과 G' 값을 나타내는 그래프를 얻었다. ΔSNP-index값에서는 신뢰수준 95%를 기준으로 하였고, G' 값에서는 Threshold를 설정하여 후보 유전자좌를 확인하였음.
- ΔSNP-index값 분석 결과 수박 덩굴쪄김병균 race 1 저항성에 관한 후보 유전자좌 중 가장 높은 peak를 보이는 후보 영역을 발굴하였음.
- qtlseqR을 이용하여 ΔSNP-index값이 0.6이상인 SNP의 지역을 선별하였고, 수박 reference 서열에 각각의 모부분 서열을 alignment하여 SNP variants가 관찰되는 지역을 기준으로 HRM 분석을 위한 primer를 제작하였음.

The total number of bases, reads, GC (%), Q20 (%), and Q30 (%) are calculated for the 2 samples. For example, in Fon-R1-R, 157,094,646 reads are produced, and total read bases are 15.9G bp. The GC content (%) is 35.95% and Q30 is 94.75%.

Table 1. Raw data Stats (maximum 20 samples)

Sample ID	Total read bases (bp)	Total reads	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
Fon-R1-R	15,866,559,246	157,094,646	35.95	64.05	97.99	94.75
Fon-R1-S	15,478,671,170	153,254,170	36.07	63.93	97.56	93.94

- Sample ID : Sample name.
- Total read bases : Total number of bases sequenced.
- Total reads : Total number of reads. For Illumina paired-end sequencing, this value refers to the sum of read 1 and read 2.
- GC(%) : GC content.
- AT(%) : AT content.
- Q20(%) : Ratio of bases that have phred quality score of over 20.
- Q30(%) : Ratio of bases that have phred quality score of over 30.

그림 2.52. F2:3 분리집단을 이용한 BSA-seq NGS pooling DNA re-sequencing

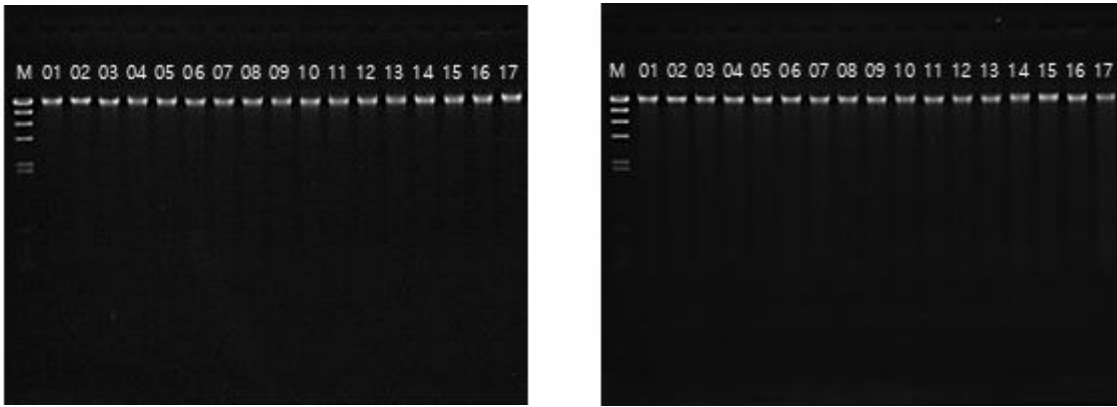


그림 2.53. 수박 덩굴쪄김병균 race 1 QTL-seq을 위한 DNA 전기영동 사진.
 왼쪽 : FON-R1-S 17개체, 오른쪽 : FON-R1_R 17개체

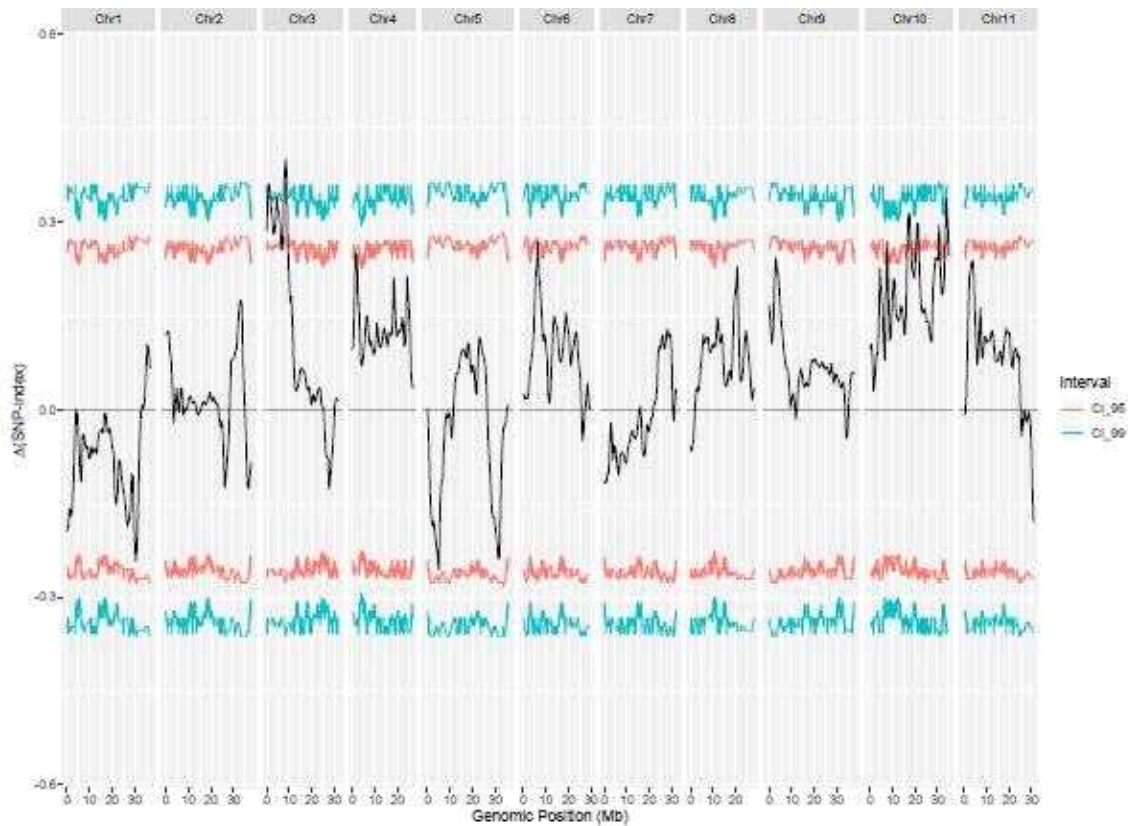


그림 2.54. PMTd108 x CAU271-FR 분리집단의 QTL-seq결과 도출된 Δ SNP-index

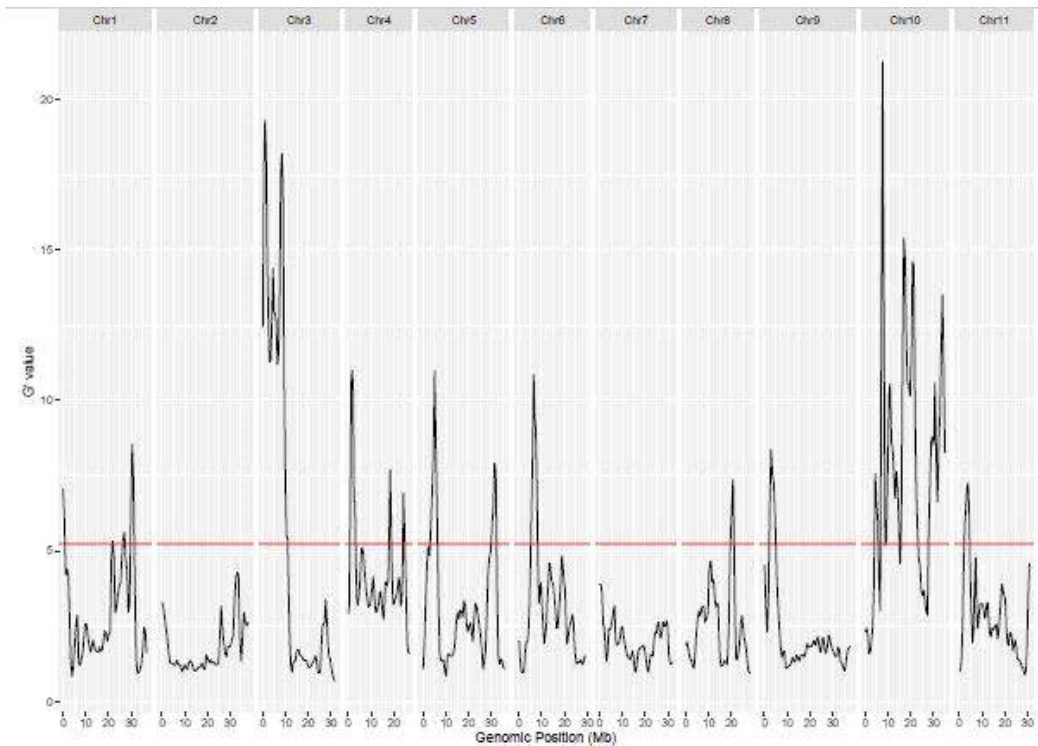


그림 2.55. PMTd108 x CAU271-FR 분리집단의 QTL-seq결과 도출된 G' values

High Resolution Melting(HRM) analysis

- 후보 유전자좌들에 대해 HRM 분석을 위해 Roche Lightcycler96® Software 1.1을 이용하였음. HRM 분석시 사용한 개체는 reference인 parents(PMTd108, CAU271-FR)과 F1 개체 그리고 QTL-seq에 사용된 저항성 17개체 저항성 17개체를 이용하였음.
- Primer selection은 P1, P2, F1 각 두 반복으로 실험을 진행하였음.
- GATK 파일에서 높은 Δ SNP-index 값을 보인 유전자좌에 대해 primer를 여러 개를 제작했는데 그중 primer selection을 통해 총 12개의 primer를 선별하였음. 최종적으로 저항성 유전자좌 영역 및 감수성 유전자좌 영역에 연관된 마커를 개발하였음.

표 2.35. BSA-seq NGS기반 수박 덩굴쪄김병 HRM을 위해 제작된 12개의 primer

Chromosome	Location	SNP	primer	sequence	Mer
10	7,***,053	G->A	R1-10-053-F	TGG*****TC	23
			R1-10-053-R	CAAG*****TCC	22
10	7,***,375	C->T	R1-10-375-F	CTTC*****TAG	20
			R1-10-375-R	TCT*****TGC	23
10	7,***,911	G->A	R1-10-911-F	CA*****TG	19
			R1-10-911-R	CG*****TTT	19
10	16,***,113	A->G	R1-10-113-F	TTG*****TATG	20
			R1-10-113-R	AA*****TAA	20
10	17,***,104	G->T	R1-10-104-F	TC*****TCC	20
			R1-10-104-R	TC*****TT	22
10	21,***,870	A->G	R1-10-870-F	CAA*****T	21
			R1-10-870-R	TTC*****TCC	21
10	33,***,561	G->A	R1-10-561-F	TT*****TTG	23
			R1-10-561-R	CA*****TGA	22
10	34,***,094	G->T	R1-10-094-F	CC*****TG	22
			R1-10-094-R	CC*****TCT	22
10	34,***,639	T->C	R1-10-639-F	GAC*****TAGT	20
			R1-10-639-R	A*****TAG	25
3	1,***,477	G->A	R1-3-477-F	TGA*****TCAAT	20
			R1-3-477-R	ATT*****T	20
3	1,***,084	T->G	R1-3-084-F	ATG*****TTCTG	20
			R1-3-084-R	T*****TAAA	21
3	1,***,269	T->G	R1-3-269-F	TGGG*****TTTT	21
			R1-3-269-R	T*****TC	24

표 2.36. BSA-seq NGS기반 수박 덩굴쪄김병 HRM 수행결과

Chromosome		3	3	3	10	10	10	10	10	10	10	10	10
SNP		G->A	T->G	T->G	G->A	C->T	G->A	A->G	G->T	A->G	G->A	G->T	T->C
Primer		R1-3-477	R1-3-084	R1-3-269	R1-10-053	R1-10-375	R1-10-911	R1-10-113	R1-10-104	R1-10-870	R1-10-561	R1-10-094	R1-10-639
Sample number	disease score												
10	0	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>Negative</u>	resistance	resistance	resistance	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	resistance	resistance	resistance
20	0	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance
24	0	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>
24	0	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>
42	0	resistance	<u>MR</u>	<u>MR</u>	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance
42	0	resistance	<u>susceptible</u>	<u>susceptible</u>	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance
57	0	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>
136	0	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance
136	0	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance
142	0	<u>susceptible</u>	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance
174	0	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance
176	0	resistance	resistance	resistance	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>
176	0	resistance	resistance	resistance	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	resistance	resistance	resistance	resistance	<u>MR</u>	resistance
186	0	<u>susceptible</u>	<u>susceptible</u>	<u>susceptible</u>	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance
189	0	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance
190	0	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	<u>susceptible</u>	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance
219	0	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance	resistance

표 2.37. BSA-seq NGS기반 수박 덩굴쪄김병 HRM 수행결과

	Chromosome	3	3	3	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	SNP	G->A	T->G	T->G	G->A	C->T	G->A	A->G	G->T	A->G	G->A	G->T	T->C
	Primer	R1-3-477	R1-3-084	R1-3-269	R1-10-053	R1-10-375	R1-10-911	R1-10-113	R1-10-104	R1-10-870	R1-10-561	R1-10-094	R1-10-639
Sample number	disease score												
7	5	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	susceptible	susceptible	susceptible
17	5	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible
25	5	susceptible	susceptible	susceptible	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	susceptible	susceptible	susceptible
55	5	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>MR</u>	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	<u>resistance</u>	susceptible	<u>resistance</u>
58	5	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>
59	5	susceptible	susceptible	susceptible	<u>resistance</u>	<u>Unknown</u>	<u>resistance</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>
75	5	susceptible	susceptible	susceptible	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible
87	5	susceptible	susceptible	susceptible	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	susceptible	susceptible	susceptible
95	5	susceptible	susceptible	susceptible	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	susceptible	susceptible	susceptible
123	5	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>
132	5	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	susceptible	susceptible	susceptible
139	5	susceptible	susceptible	susceptible	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	susceptible	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	susceptible	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>
150	5	susceptible	susceptible	susceptible	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	susceptible	susceptible	susceptible
170	5	susceptible	susceptible	susceptible	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible
177	5	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	susceptible	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>
222	5	susceptible	susceptible	susceptible	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	susceptible	susceptible	susceptible
230	5	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>resistance</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>	<u>MR</u>

GBS (Genotyping by sequencing) 분석법을 활용한 수박 덩굴쪄김병 유전자지도 작성

전 계놈을 대상으로 re-sequencing을 수행할 경우 많은 비용이 소요되며, 특히 F2 분리집단을 대상으로 sequencing을 수행할 경우 상당한 분석비용이 소요된다, 따라서 특정 제한효소를 이용하여 절단된 주변을 sequencing을 통하여 서열을 결정하는 GBS방법을 이용하여 각 SNP를 기준으로 대부분의 genotype을 기반으로 F2를 결정하여 연관유전자 지도를 작성하고자 하였음.

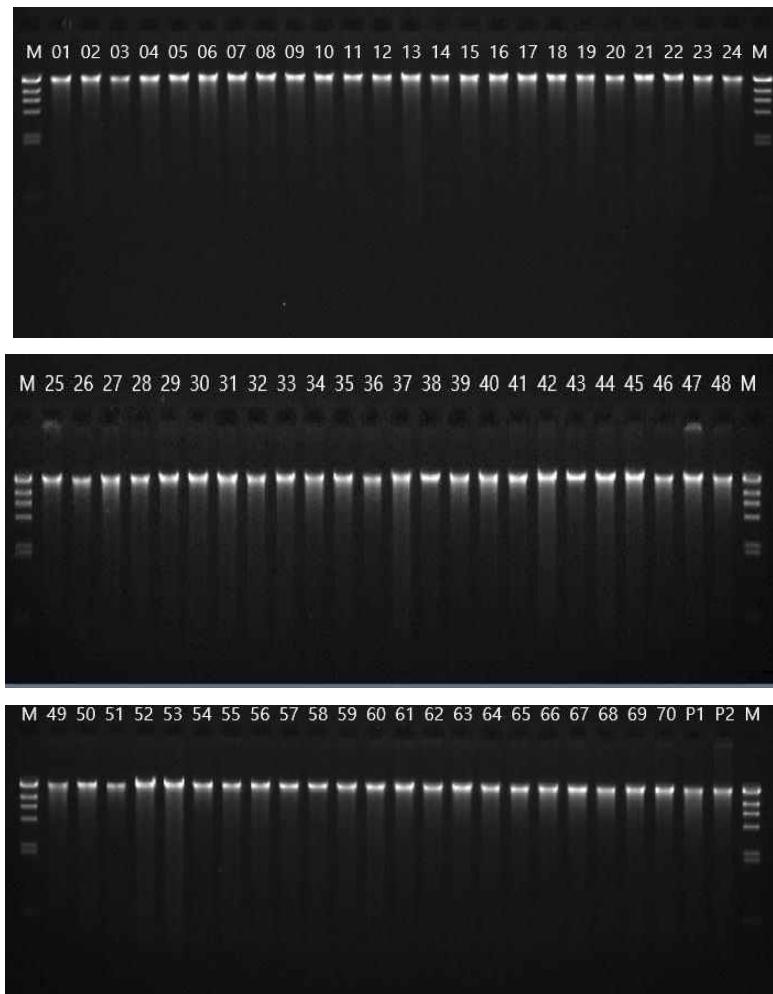


그림 2.56. GBS 분석에 사용된 F2의 DNA 추출 후 50ng씩 전기영동한 대표사진

수박 덩굴쪄김병 저항성 유전자 마커 개발을 위한 고품도 유전자 지도 작성

- 분석집단: Pmtd108 (재배종; *C. lanatus* subsp. *lanatus*) x CAU271-FR (재배종; *C. lanatus* subsp. *amarus*) 및 F2분리세대
- SNP 기반 유전자지도 작성은 F2 모부본을 포함한 119개체에 대하여 349개의 loci가 사용되었으며, Kosambi mapping function을 적용하여 349개의 loci에 대하여 11개의 연관군으로 총 3738.157cM의 유전자 지도가 작성되었다.

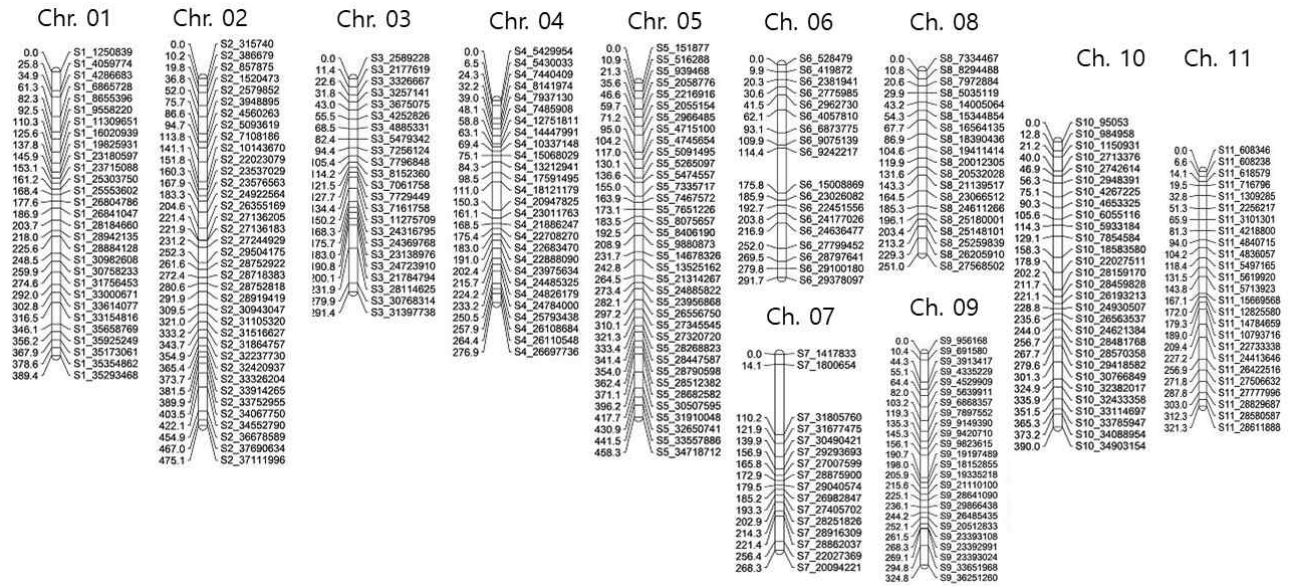


그림 2.57. PMTd108 x CAU271-FR F2분리집단을 이용해 제작된 SNP 마커기반 연관유전자지도

- F2 분리세대 개체별 Fastaq 데이터를 이용하여 TASSEL_v5-GBS_v2 software pipeline에서 분석된 SNPs filtering file을 이용하여 reference서열과 비교를 통해 Burrows-Wheeler Algorithm(BMA)으로 mapping한 후, VCF file을 작성하였음. 작성된 data를 바탕으로 JoinMap4.1을 사용하여 Haldane mapping function, LOD>10 조건에서 연관 유전자지도를 작성하였음.

F2:3 분리집단 표현형 검정

- 119개체의 F2분리집단을 자가교배해 얻은 F2:3종자를 이용해서 표현형 검정을 진행하였음.
- 각 계통 내에서 도출된 표현형 검정 data를 disease index(DI), survival ratio(SR), score mean(SM)으로 3개의 범주로 나누어 data화 시켰음.

표 2.38. F2:3 분리집단을 이용한 Fon race 1 표현형 검정 데이터

	Score mean	Survival ratio	Disease index
PMTd108(761) x CAU769-FR-007	4.8	5.6%	95.6
PMTd108(761) x CAU769-FR-010	3.0	45.0%	60.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-011	3.3	40.0%	66.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-012	4.0	25.0%	79.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-017	4.8	5.0%	96.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-020	1.7	75.0%	33.8
PMTd108(761) x CAU769-FR-024	2.6	55.0%	52.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-025	3.6	33.3%	71.7
PMTd108(761) x CAU769-FR-029	2.9	43.8%	58.8
PMTd108(761) x CAU769-FR-042	2.3	60.0%	46.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-044	2.9	50.0%	57.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-045	5.0	0.0%	100.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-048	3.9	25.0%	78.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-050	4.2	20.0%	83.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-054	4.2	20.0%	84.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-055	3.3	36.8%	66.3
PMTd108(761) x CAU769-FR-056	5.0	0.0%	100.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-057	2.6	60.0%	51.0

PMTd108(761)	x	CAU769-FR-058	4.0	23.5%	80.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-059	3.9	25.0%	78.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-060	4.0	25.0%	79.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-062	3.4	40.0%	68.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-063	4.4	14.3%	88.6
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-072	4.5	12.5%	90.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-073	5.0	0.0%	100.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-075	3.5	35.0%	69.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-087	4.1	20.0%	81.3
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-088	3.3	42.9%	65.7
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-095	4.1	20.0%	82.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-099	3.6	35.0%	71.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-100	4.1	21.4%	81.4
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-101	3.3	37.5%	66.3
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-105	4.9	0.0%	98.7
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-106	4.5	13.3%	90.7
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-114	3.1	42.9%	61.4
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-116	4.5	13.3%	90.7
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-117	4.8	5.9%	95.3
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-122	4.7	6.3%	93.8
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-123	4.8	5.6%	95.6
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-136	1.6	76.5%	32.9
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-137	3.4	40.0%	68.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-142	2.8	50.0%	56.7
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-144	2.6	58.8%	48.9
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-146	3.6	30.0%	72.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-147	3.1	46.7%	62.7
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-151	5.0	0.0%	100.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-152	5.0	0.0%	100.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-161	5.0	0.0%	100.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-167	4.7	6.7%	94.7
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-168	2.1	71.4%	42.9
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-176	2.2	66.7%	44.4
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-231	5.0	0.0%	100.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-232	5.0	0.0%	100.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-233	3.5	36.8%	70.5
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-235	4.4	15.0%	87.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-237	5.0	0.0%	100.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-238	5.0	0.0%	100.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-239	5.0	0.0%	100.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-242	4.5	12.5%	90.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-243	5.0	0.0%	100.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-245	4.3	16.7%	85.6
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-246	3.9	26.7%	78.7
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-247	5.0	0.0%	100.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-249	4.2	20.0%	84.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-250	4.6	10.0%	92.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-251	4.7	6.7%	93.3
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-252	3.8	27.8%	76.7
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-253	4.0	25.0%	80.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-254	4.3	17.6%	85.9
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-256	3.4	38.9%	67.8
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-258	3.5	37.5%	70.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-260	3.2	41.2%	63.5
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-261	5.0	0.0%	100.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-262	5.0	0.0%	100.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-263	2.2	70.6%	43.5
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-266	4.6	10.0%	92.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-270	4.2	20.0%	84.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-271	3.5	35.7%	70.0
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-273	0.9	88.9%	17.8
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-274	2.5	53.3%	49.3
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-275	2.3	55.6%	46.7
PMTd108(761)	x	CAU769-FR-276	1.7	75.0%	33.8

PMTd108(761) x CAU769-FR-277	4.8	5.6%	95.6
PMTd108(761) x CAU769-FR-279	5.0	0.0%	100.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-280	3.8	31.3%	75.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-281	3.5	36.4%	69.1
PMTd108(761) x CAU769-FR-283	4.6	9.1%	92.7
PMTd108(761) x CAU769-FR-284	2.5	50.0%	50.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-285	4.5	15.4%	89.2
PMTd108(761) x CAU769-FR-286	2.1	68.8%	42.5
PMTd108(761) x CAU769-FR-287	5.0	0.0%	100.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-288	4.9	0.0%	97.5
PMTd108(761) x CAU769-FR-289	1.1	94.4%	22.2
PMTd108(761) x CAU769-FR-290	3.1	42.9%	62.9
PMTd108(761) x CAU769-FR-291	4.0	22.2%	80.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-292	4.4	11.1%	88.9
PMTd108(761) x CAU769-FR-294	4.1	22.2%	82.2
PMTd108(761) x CAU769-FR-295	3.8	25.0%	75.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-296	4.9	0.0%	97.8
PMTd108(761) x CAU769-FR-297	4.8	6.3%	95.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-299	4.6	8.3%	91.7
PMTd108(761) x CAU769-FR-301	5.0	0.0%	100.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-302	2.8	45.5%	56.4
PMTd108(761) x CAU769-FR-306	4.4	12.5%	88.8
PMTd108(761) x CAU769-FR-310	4.0	25.0%	80.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-311	4.2	20.0%	84.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-313	5.0	0.0%	100.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-314	4.6	10.0%	92.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-316	4.8	7.1%	95.7
PMTd108(761) x CAU769-FR-317	4.8	0.0%	96.9
PMTd108(761) x CAU769-FR-319	1.9	73.3%	38.7
PMTd108(761) x CAU769-FR-321	3.2	41.2%	63.5
PMTd108(761) x CAU769-FR-322	5.0	0.0%	100.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-323	5.0	0.0%	100.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-324	3.4	37.5%	67.5
PMTd108(761) x CAU769-FR-326	3.6	29.4%	72.9
PMTd108(761) x CAU769-FR-327	2.5	50.0%	50.0
PMTd108(761) x CAU769-FR-329	2.6	61.1%	52.2
PMTd108(761) x CAU769-FR-330	4.8	5.0%	96.0

1) $DI = 100 \times \frac{\sum (\text{Number of plants with disease rating} \times \text{Disease rating})}{(\text{Total number of plants} \times \text{Highest disease rating possible})}$

2) $\text{Survival ratio} = 100 \times \frac{\text{Number of survival plants}}{\text{Total number of plants}} (\%)$

- 작성된 연관 유전자지도와 VCF file 그리고 표현형 검정 data를 이용해 QTL Cartographer를 이용해 QTL 분석을 진행하였음.
- GBS 결과를 토대로 QTL분석을 실시하였을 때 QTL-seq 결과에서 도출되지 않았던 두 개의 염색체 영역에 새로운 peak가 확인되었고, BSA-NGS 결과와 같은 지역이 확인되었음.
- 도출된 영역에 대한 HRM 마커를 작성하였으며, 작성한 SNP 마커는 주관과제의 신규 품종 육성에 활용 예정임.

표 2.39. GBS 분석에서 나온 VCF file filtering 데이터

Chr.	No. of VCF SNPs	Total length (cM)	Average distance (cM)
1	29	389	13.41
2	37	475	12.83
3	23	291	12.65
4	27	277	10.25
5	36	458	12.72
6	18	292	16.22
7	16	268	16.75
8	19	251	13.21
9	24	325	13.54
10	29	390	13.44
11	25	321	12.84
Total/Average	283	3737	13.44

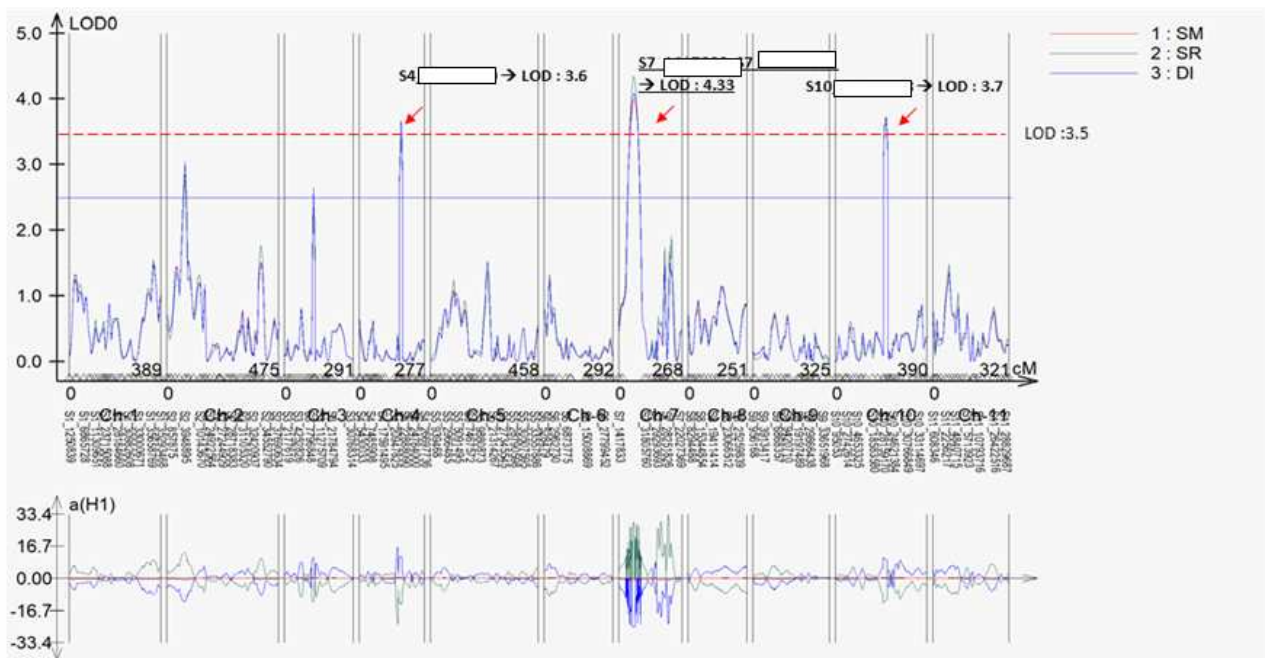


그림 2.58. QTL Cartographer를 이용한 QTL 분석 결과

5. 복합내병성 육종을 위한 탄저병 저항성 유전자 마커 개발

○ 유전자마커 개발 연구목적

- 본 연구과제에서 목표로 하는 복합내병성 상업계통 육성을 위한 분자마커의 개발은 MAS와 MAB를 이용한 저항성 유전자 축적(stackings)을 목표로 하므로, 유전자 또는 최대한 유전자에 최근접한 마커를 개발하여야 함
- 1단계에서 수행하였던 흰가루병 저항성 및 탄저병 연관마커를 개선하고, 연관지역 근처의 알려진 NBS-LRR을 포함한 영역에 대한 fine mapping과 genotyping을 진행함.

1) 탄저병 저항성 유전자 마커개발

○ 수박 고밀도 유전자지도 박성 및 탄저병 저항성 유전자 마커개발 착수

- 2013년 수박 표준유전체서열이 발표되어 다양한 SNP변이를 비교 분석이 가능해 졌으며, 현재 다양한 bioinformatics tool들이 개발됨에 따라 고밀도 유전자지도 작성이 가능해지면서 특정형질에 연관된 QTL지역을 쉽게 찾을 수 있게 됨.

○ 탄저병 저항성 유전자 마커 개발을 위한 수박 고밀도 유전자 지도 작성

- 집단양성: DrHs7250 (재배종: *C. lanatus* ssp. *vulgaris*) x Oto9491(재배종: *C. lanatus* ssp. *vulgaris*) 및 F2 분리세대
- 모부분 및 140개체의 F2분리세대의 DNA를 추출하고, 각 개체들의 DNA를 정량하여 동량의 DNA를 이용하여 DNA를 ApeKI으로 자른 후, 바코드 어댑터를 동일한 제한효소로 잘라 ligation을 진행함. 이후 ligation product를 이용하여 GSB library를 제작하여 resequencing을 진행하였음.
- Whole-genome resequencing은 Illumina HiSeq2500을 이용하여 수행되었고, genotype의 염기서열을 모부분과 비교하여 genetic mapping용 A, H, B genotype으로 conversion 후에 JoinMap 4.1 프로그램을 이용하여 유전자지도를 작성하였음
- SNP 기반 유전자지도 작성은 F2 모부분을 포함한 140개체에 대하여 449개의 loci가 사용되었으며, Kosambi mapping function을 적용하여 384개의 loci에 대하여 11개의 연관군으로 총 2985.029cM의 유전자 지도가 작성됨.

표 2.40. Drhs 7250 x Oto949 F2분리집단을 이용한 GBS 분석 결과

	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Sum
Total No. of Reads	273,096,210	279,298,889	294,224,034	846,619,133
Total No. of High-Quality Barcoded Reads	193,249,334	211,004,389	222,934,549	627,188,272
tagCntMap size	25,127,053	25,828,045	26,243,321	77,198,419
Initial Map Tags				26,243,321
Tags Without Replication				2,045,199
Map Tags				2,045,199
Total Depth:				588,944,117
Avg. Depth Per Tag				287
Total No. of Tags Mapped				389,172
Total No. of Tags Not Mapped				1,387,806
Total No. of Tags in the Tag Table				1,778,811
Total No. of Taxa in the Taxon Table				150
Total No. of Positions in the SNP Position Table				35,673

표 2.41. GBS 결과기반 염색체별 발견 SNP marker 개수

Chromosome	Number of SNPs	Total Length (cM)	Average Distance (cM)
1	43	273	4.88
2	38	281	6.39
3	46	208	3.65
4	19	117	4.88
5	40	280	5.96
6	35	251	4.56
7	22	171	6.33
8	31	190	5.14
9	28	247	7.48
10	22	238	7.21
11	29	231	6.42
Total/Average	353	2487	5.54

○ GBS결과 기반의 QTL 분석

- QTL 분석프로그램은 Wincarto ver. 3을 활용하였으며, 수박 탄저병의 경우 단인자 우성으로 유전되기 때문에 single factor analysis 방법을 사용하여 병 저항성과 관련있는 지역을 탐색하였음. 또한 해당 영역의 QTL지역의 범위를 줄이고자 composite interval mapping을 수행하였음.
- LOD 3.0을 기준으로 7dpi,12dpi에서의 mapping결과 8번 염색체에서 2.5M~13M지역까지 수박 탄저병 저항성에 관련 있는 것으로 판단하였음. 이는 biparental 집단에서 두 교배집단 모두 재배종에서부터 유래되었고 그 genetic background가 reference genome과 비슷하여 많은 SNP의 마커가 도출 되지 않아 해당 유전자좌의 게놈영역 범위가 넓은 것으로 판단됨.

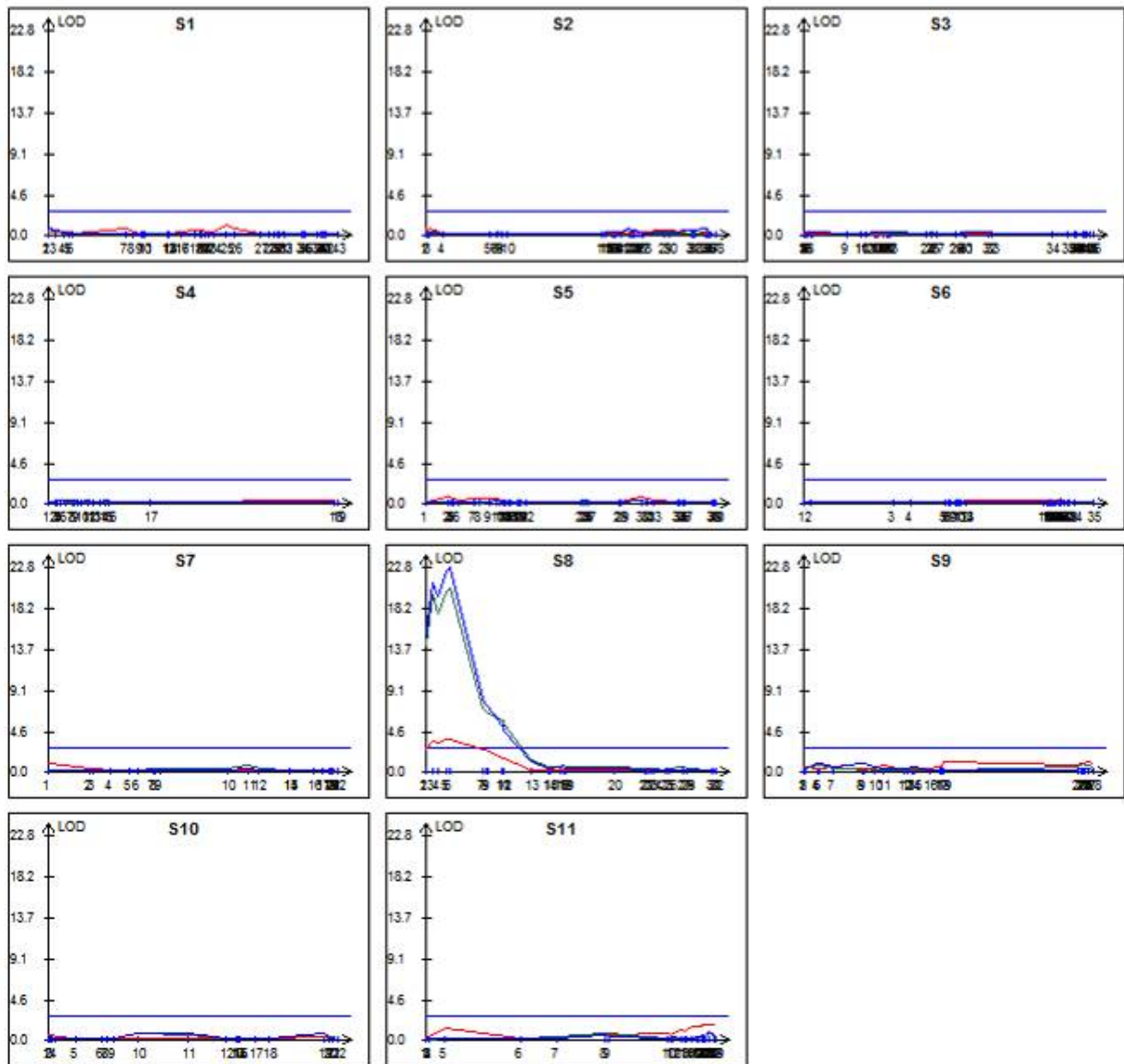


그림 2.60. DrHs7250 x Oto9491 F2집단에 대한 수박 탄저병 저항성 QTL

- 또한 MapQTL의 경우 다음과 같은 결과를 이용하여 수박 탄저병 저항성 연관 유전자좌에 대한 MQM분석을 실시 하였으며, 그 결과 해당 유전자좌 영역에 대한 설명력은 약 76%정도 이며, LOD값은 30이상으로 단인자우성의 효과로 수박탄저병 저항성에 연관되어있는 유전자좌 지역으로 판단할 수 있었음

Nr	Group	Position	Locus	LOD	# Iter.	mu_A	mu_H	mu_B	Variance	% Expl.	Additive	Dominant	GIC
4386	13_S8	7.055		33	1	-0.00758	0.236084	2.71286	0.391207	76.5	-1.36022	-1.11656	0.967
4408	13_S8	27.85		32.75	1	0.129504	0.218111	2.81239	0.395489	76.2	-1.34145	-1.25284	0.974
4387	13_S8	8.055		32.68	1	-0.01049	0.211781	2.69917	0.396748	76.1	-1.35483	-1.13256	0.949
4383	13_S8	4.966		32.6	1	0.004232	0.235356	2.74378	0.398019	76.1	-1.36977	-1.13865	0.965
4384	13_S8	5.966		32.06	1	0.000125	0.273444	2.69587	0.407706	75.5	-1.34787	-1.07455	0.996
4385	13_S8	6.055	S8_254415	31.93	1	0	0.277778	2.68966	0.409907	75.4	-1.34483	-1.06705	1
4382	13_S8	3.966		31.41	1	0.011644	0.221676	2.74449	0.419373	74.8	-1.36642	-1.15639	0.95
4413	13_S8	32.014		31.33	1	0.133666	0.211537	2.82721	0.420865	74.7	-1.34677	-1.2689	0.94
4409	13_S8	28.545	S8_106187	31.28	1	0.142857	0.263158	2.77778	0.421816	74.6	-1.31746	-1.19716	1
4404	13_S8	23.85		31.24	1	0.067154	0.087834	2.72063	0.422502	74.6	-1.32674	-1.30606	0.907
4410	13_S8	29.545		31.09	1	0.140624	0.244966	2.75417	0.425415	74.4	-1.30677	-1.20243	0.987
4412	13_S8	31.014		31.09	1	0.137435	0.224799	2.78255	0.425398	74.4	-1.32256	-1.23519	0.964
4388	13_S8	9.055		31	1	-0.01091	0.209394	2.64786	0.426983	74.3	-1.32938	-1.10908	0.946
4414	13_S8	33.014		30.61	1	0.130012	0.213148	2.84319	0.434329	73.9	-1.35659	-1.27345	0.926
4411	13_S8	30.014	S8_108561	30.02	1	0.142762	0.249737	2.71453	0.44573	73.2	-1.28588	-1.17891	1
4415	13_S8	34.014		28.99	1	0.125839	0.231283	2.82754	0.466327	72	-1.35085	-1.2454	0.923
4381	13_S8	2.966		28.68	1	0.020862	0.235886	2.69388	0.47266	71.6	-1.33651	-1.12148	0.951
4403	13_S8	22.85		28.44	1	0.053114	0.104552	2.62038	0.477789	71.3	-1.28363	-1.2322	0.913
4389	13_S8	10.055		28.38	1	-0.00937	0.22978	2.56341	0.47906	71.2	-1.28639	-1.04724	0.958
4394	13_S8	14.302		27.23	1	-0.0073	0.147229	2.53248	0.503776	69.7	-1.26989	-1.11536	0.917
4395	13_S8	15.302		26.93	1	-0.00524	0.131209	2.52474	0.510409	69.3	-1.26499	-1.12854	0.909
4393	13_S8	13.302		26.86	1	-0.00821	0.179836	2.51648	0.512027	69.2	-1.26235	-1.0743	0.934
4416	13_S8	35.014		26.71	1	0.121728	0.265377	2.78063	0.515408	69	-1.32945	-1.1858	0.931
4396	13_S8	16.302		25.99	1	-0.00243	0.132734	2.49315	0.531995	68	-1.24779	-1.11262	0.91
4392	13_S8	12.302		25.92	1	-0.00706	0.226108	2.47928	0.533654	67.9	-1.24317	-1.01	0.96
4402	13_S8	21.85		25.4	1	0.040286	0.139582	2.50076	0.545797	67.2	-1.23024	-1.13094	0.928
4390	13_S8	11.055		25.33	1	-0.00468	0.269715	2.45453	0.547478	67.1	-1.2296	-0.95521	0.986
4380	13_S8	1.966		25.1	1	0.032217	0.275561	2.59706	0.553065	66.7	-1.28242	-1.03908	0.968
4391	13_S8	11.302	S8_292232	24.57	1	-0.00281	0.281925	2.42507	0.566129	66	-1.21394	-0.9292	0.995
4397	13_S8	17.302		24.53	1	0.001382	0.150553	2.44002	0.567112	65.9	-1.21932	-1.07015	0.92
4417	13_S8	36.014		24.08	1	0.119339	0.312663	2.70621	0.578343	65.2	-1.29343	-1.10011	0.949
4398	13_S8	18.302		22.75	1	0.00705	0.181595	2.36958	0.613184	63.1	-1.18127	-1.00672	0.938
4401	13_S8	20.85		22.46	1	0.02963	0.188504	2.37072	0.621115	62.7	-1.17055	-1.01167	0.952
4420	13_S8	38.045		21.43	1	0.108007	0.363263	2.63935	0.649712	60.9	-1.26567	-1.01041	0.946
4418	13_S8	37.014		21.39	1	0.120767	0.368892	2.61048	0.650831	60.9	-1.24486	-0.99673	0.978
4379	13_S8	0.966	S8_438131	21.36	1	0.047619	0.333333	2.46667	0.65161	60.8	-1.20952	-0.92381	1
4421	13_S8	39.045		21.35	1	0.097617	0.360195	2.66124	0.651885	60.8	-1.28181	-1.01923	0.921
4419	13_S8	37.045	S8_898755	21.31	1	0.120894	0.370727	2.60725	0.653181	60.7	-1.24318	-0.99335	0.979
4422	13_S8	40.045		21.07	1	0.08961	0.362276	2.67164	0.660075	60.3	-1.29102	-1.01835	0.903

그림 2.61. MapQTL의 MQM분석결과 (DrHs7250 x Oto9491 F2)

○ BSA-NGS를 통한 연관마커 개발

- GBS분석 결과 본 연구에 사용한 모부분 특성상 수박 reference genome과 유연관계가 가까운 재배종이기 때문에 수박 탄저병 저항성으로 판단되는 지역에 다수의 연관 SNP마커가 많이 발굴되지 않음.

○ 수박 탄저병 저항성 유전자좌에 대한 교잡 후대 genotyping분석

- 수박 탄저병 저항성으로 판단되는 지역 내 연관도가 높은 유의미한 SNP를 찾기 위해서는 유전자지도와 물리지도의 마커 순서가 일치하여야 하는데, 상기 결과로는 정확한 마커의 위치를 물리적으로 찾기 어려운 상태였음.
- 이에 따라, BSA-NGS 결과를 기반으로 Bonferroni adjusted p value에 따른 유의지역을 탐색하고, 해당지역에서 HRM marker를 선별 후 F2, F3 검정을 실시하였음.
- 추가적인 분석으로는 GATK v1.4.11 pipeline을 이용하여 변형부분을 확인하고, 이후 delta-SNP 지수를 구하고, QTLseqR를 이용하여 저항성 영역을 확인하였음. 한편, 계놈상의 SNP는 LD(linkage disequilibrium)를 가지고 있는바, 계놈상의 물리적 거리를 고려하여 SNP 전후의 위치가 2kb보다 작으면 동일 bin으로 그룹 화하였음. 이어서, 대상bin과 동일한 염색체에 있는 다른bin 사이의 평균 deltaSNP 값을 두 그룹 t-test 검정을 사용하여 비교하였음.

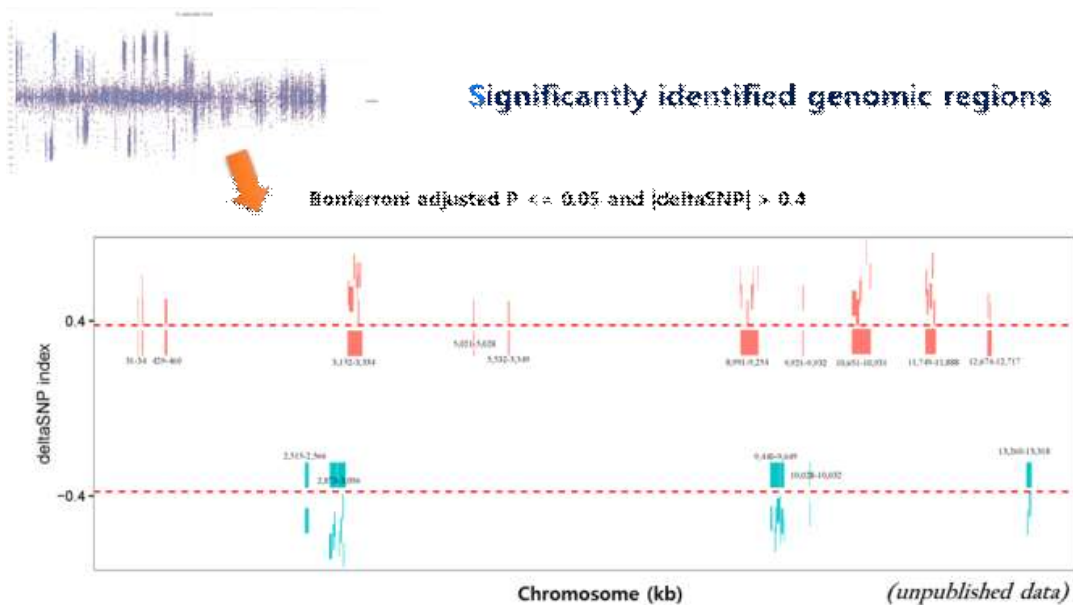


그림 2.62. Bonferroni adjusted p value에 따른 유의지역 도출방법.

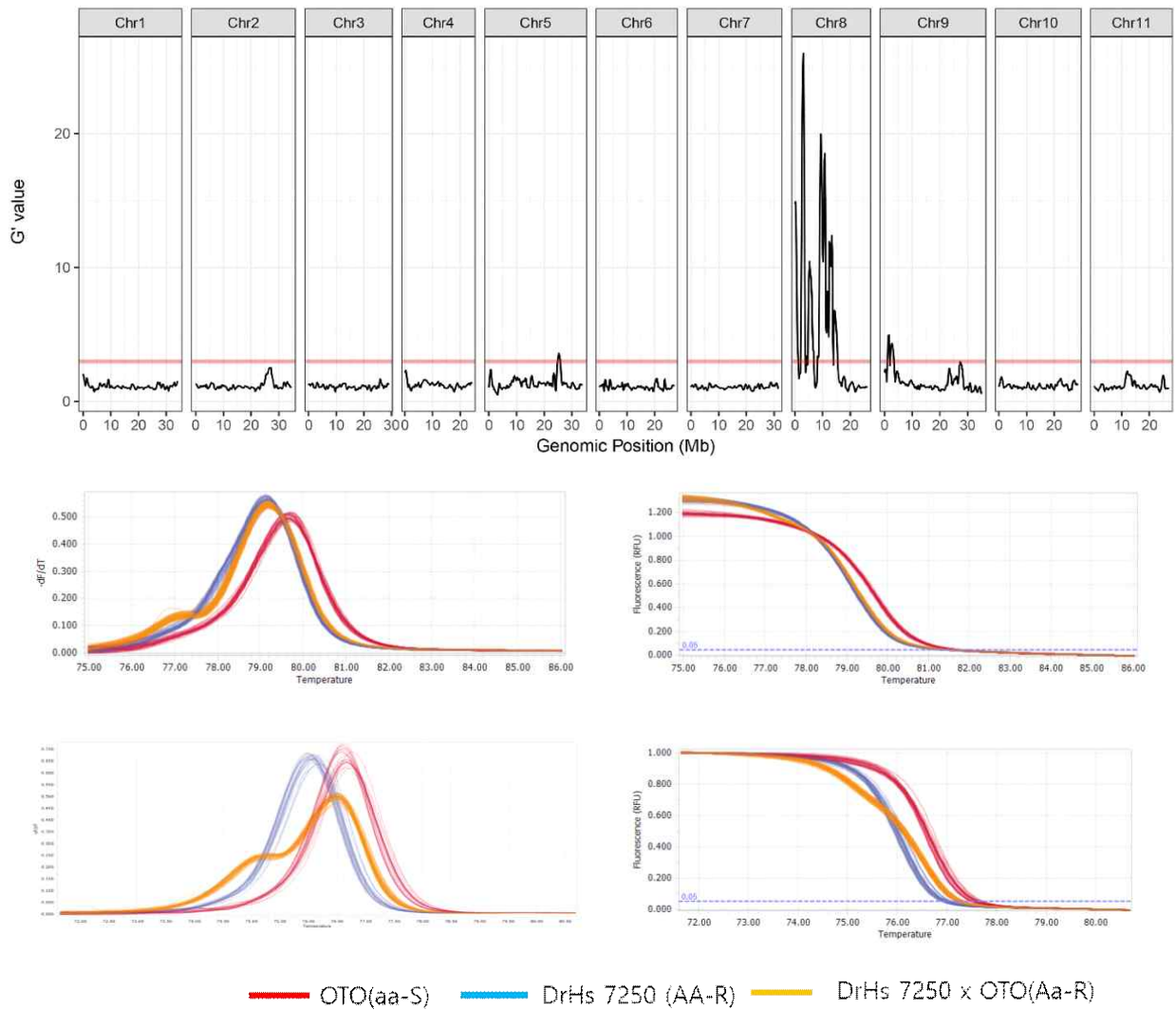


그림 2.63. 수박 탄저병 대표 SNP marker를 통한 HRM 분석결과

○ 개발된 marker의 적용가능성 확인

- Differential hosts, wild, semi-wild, cultivars들을 이용한 탄저병 Race 1 접종 후 표현형 및 genotyping 수행
- 추가적인 분석으로는 GATK v1.4.11 pipeline을 이용하여 변형부분을 확인하고, 이후 delta-SNP 지수를 구하고, QTLseqR를 이용하여 저항성 영역을 확인하였음. 한편, 계놈상의 SNP는 LD (linkage disequilibrium)를 가지고 있는바, 계놈상의 물리적 거리를 고려하여 SNP 전후의 위치가 2kb보다 작으면 동일 bin으로 그룹화하였음. 이어서, 대상 bin과 동일한 염색체에 있는 다른 bin 사이의 평균 deltaSNP 값을 두 그룹 t-test 검정을 사용하여 비교하였음.

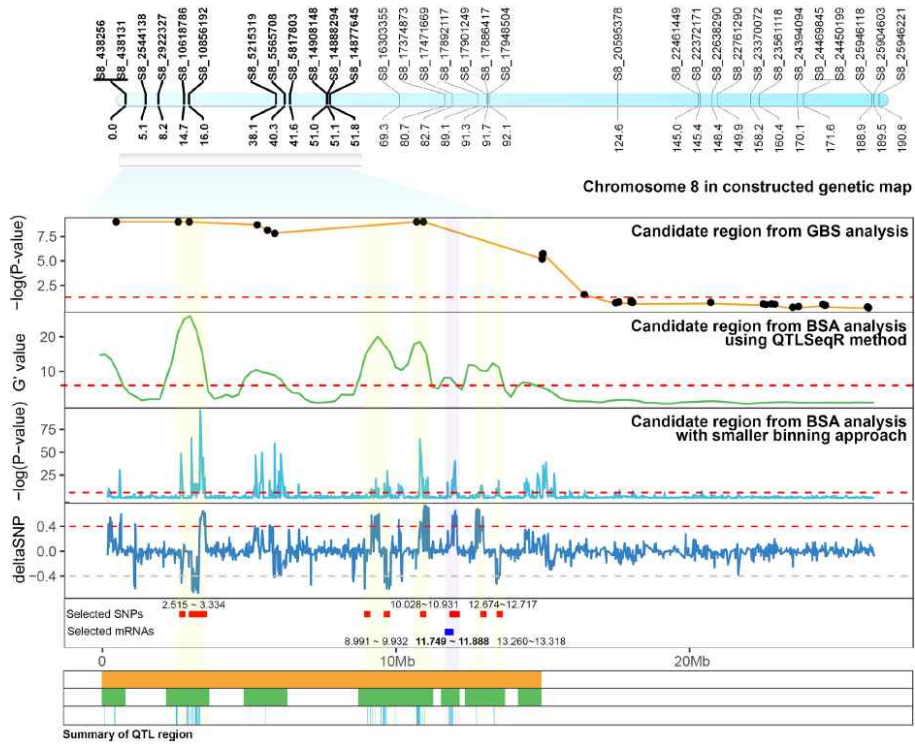


그림 2.64. 수박 탄저병 Race1 저항성 연관마커를 찾기 위한 분석결과

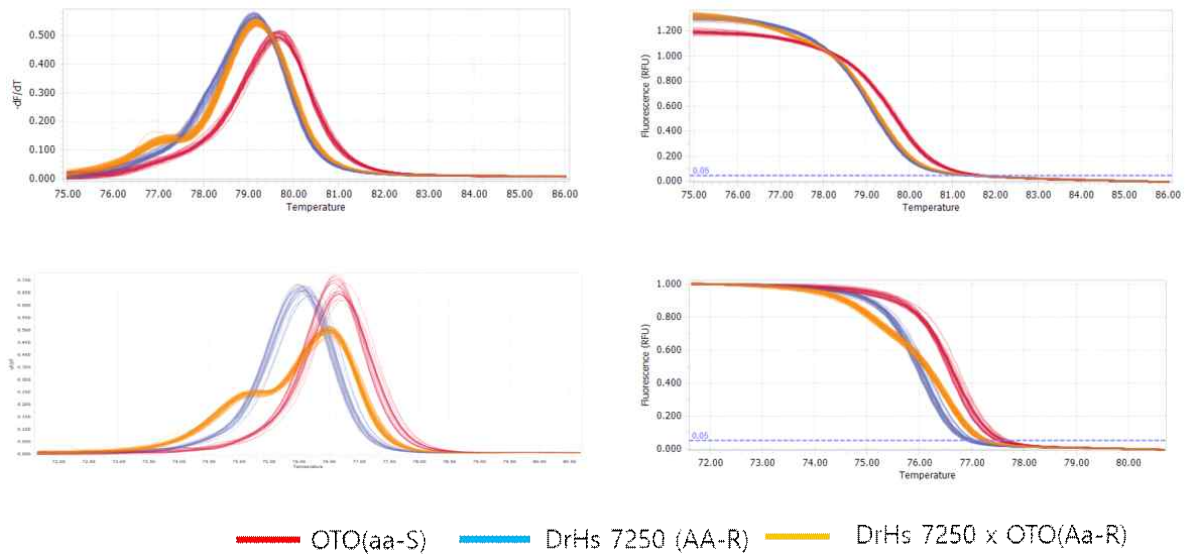


그림 2.65. 수박 탄저병 대표 SNP marker를 통한 HRM 분석결과

○ 개발된 marker의 적용가능성 확인

- Differential hosts, wild, semi-wild, cultivars들을 이용한 탄저병 Race 1 접종 후 표현형 및 genotyping 수행
- HRM분석 결과 개발된 2개의 primer에서 60개 계통 중 유연관계가 먼 것으로 판단되는

wild계통들을 제외하고 표현형 결과와 유전자형 결과가 일치하는 것을 판단 할 수 있었음.

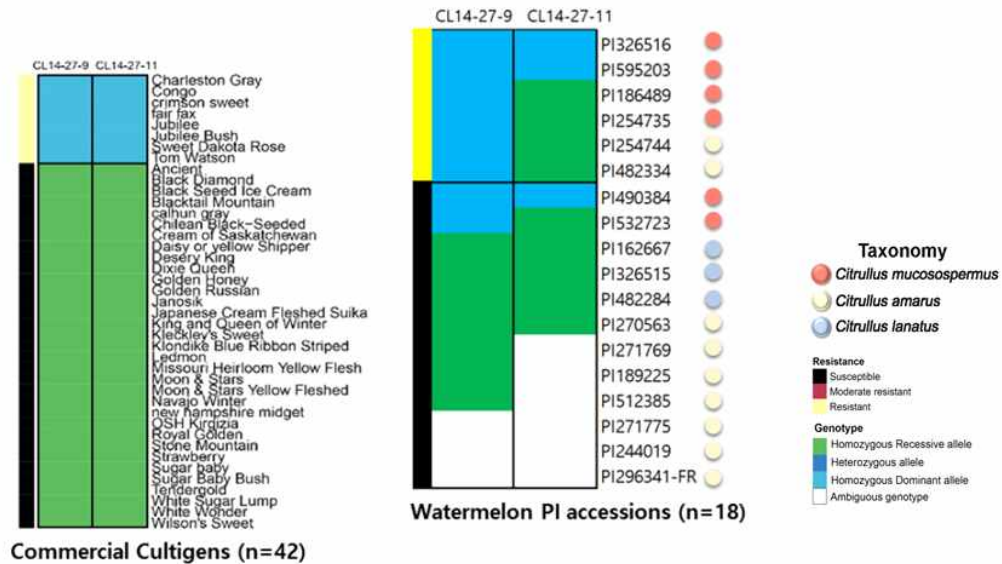


그림 2.66. 수박 탄저병 저항성 마커의 적용가능성 확인을 위한 HRM분석 결과

○ 개발된 marker의 Sanger 염기서열 분석

- Sanger의 ddNTP에 의한 PCR 종결 반응을 이용하여 후보SNP 주변의 약1kb의DNA를 시퀀싱을 진행함. sequencing PCR 프라이머는 HRM 표적SNP 주변의 1kb를 목표로 설계함.
- PCR 혼합물은 1 x Ex-taq 완충액, 1 U의Ex-taq 효소, dNTP 0.2 mM (TaKara, Japan), 100 ng의DNA, 및 500 nM의 각 프라이머를 포함하고, PCR 조건은 하기와 같음: 95°C에서 10분 전처리 -[95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 1분] ×35회 - 72°C에서 5분. PCR 산물은 전기영동(1.2% 아가로스 겔)을 통해 크기를 확인하였음. GeneClean Turbo Kit (MP Biomedicals, OH, USA)을 제조사의 프로토콜에 따라 이용하여 각 amplicon을 겔에서 분리하고, pGem T-Easy vector에 삽입하여 *E. coli*DH5α에 형질주입하고, 각 클론은 T7 및SP6 프라이머 (Bionics, 서울, 한국)를 이용하여 시퀀싱하였음. 분석된 시퀀스는 CLC Genomics Workbench software (CLC Bio, Aarhus, Denmark)를 이용하여 조립하였음.
- 그 결과 CL14-27-9번 primer에서는 exon variation을, 10번 primer에서는 intron variation, 11번 primer에서는 intergenic variation을 관찰함.
- CL14-27-9 exon variations에서는 non-synonomous 아미노산 substitution을 확인 함.
- 본 결과를 기반으로 genetic variation 이 관찰되는 2지역의 transcript를 확인하고자 해당 지역의 유전자 cla001017, cal001019을 대상으로 qRT-PCR을 수행하기로 함,

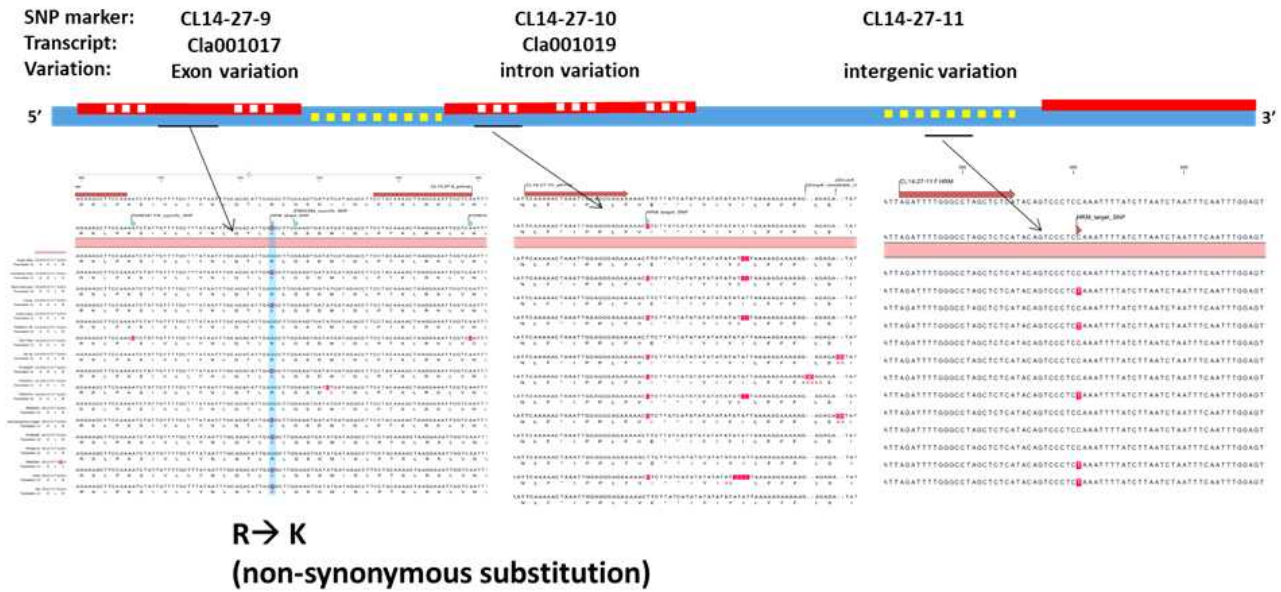


그림 2.67. Sanger sequencing을 통한 탄저병 저항성 마커 주변 염기서열 탐색

○ 수박 탄저병 유전자 마커 개발을 위한 유전자 발현 분석

- Race 1으로 확인된 *C. orbiculare*를 DrHs7250 및 Oto9491에 접종하고, 0, 0.5, 1, 3, 6, 9, 18, 24, 72, 및 120 시간이 경과한 후에 샘플링을 수행함.
- 샘플에서 1 % mercaptoethanol을 함유한 Tri-Reagent®(MRC, OH, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였음.
- 1 µg의 RNA부터 Transcriptor first-strand cDNA synthesis kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 사용하여 cDNA를 획득하여, RT-qPCR을 수행 함.
- 18s rRNA를 기준으로 ΔCq (타겟 유전자의 Cq 값 -18s rRNA의 Cq 값)를 계산하여 유전자의 상대적 발현 정도를 측정하였음.
- 그 결과 해당유전자 지역은 cla001017의 경우 N-terminal에 CC type의 NBS-LRR이었으며, cla001019의 경우 PR5 유전자인 thaumain like protein으로 확인이 됨.
- qRT-PCR결과, 저항성과 감수성 계통을 비교할 때 transcript가 접종 전부터 저항성 계통이 up-regulation 되고 있음을 가정 할 수 있음.
- 이는 본 연구에서 사용한 DrHs7250 저항성 계통특이적인 유전자 발현이 이루어지는 것으로 추측이 되며, 이는 병원체 공격전에 발현되고 있는 것으로 생각됨.
- 이와 같이 HRM marker 분석과, qRT분석 및 sanger sequencing 결과를 종합해 본 결과, 탄저병 저항성에 연관되어 있을 것으로 예상하는 3개의 SNP들 중 exon의 non-synonomous 아미노산 substitution이 있는 CC-NBS-LRR 유전자를 코딩하는 cla001017이 탄저병 저항성을 부여하는 원인 유전자라는 결론을 얻음.

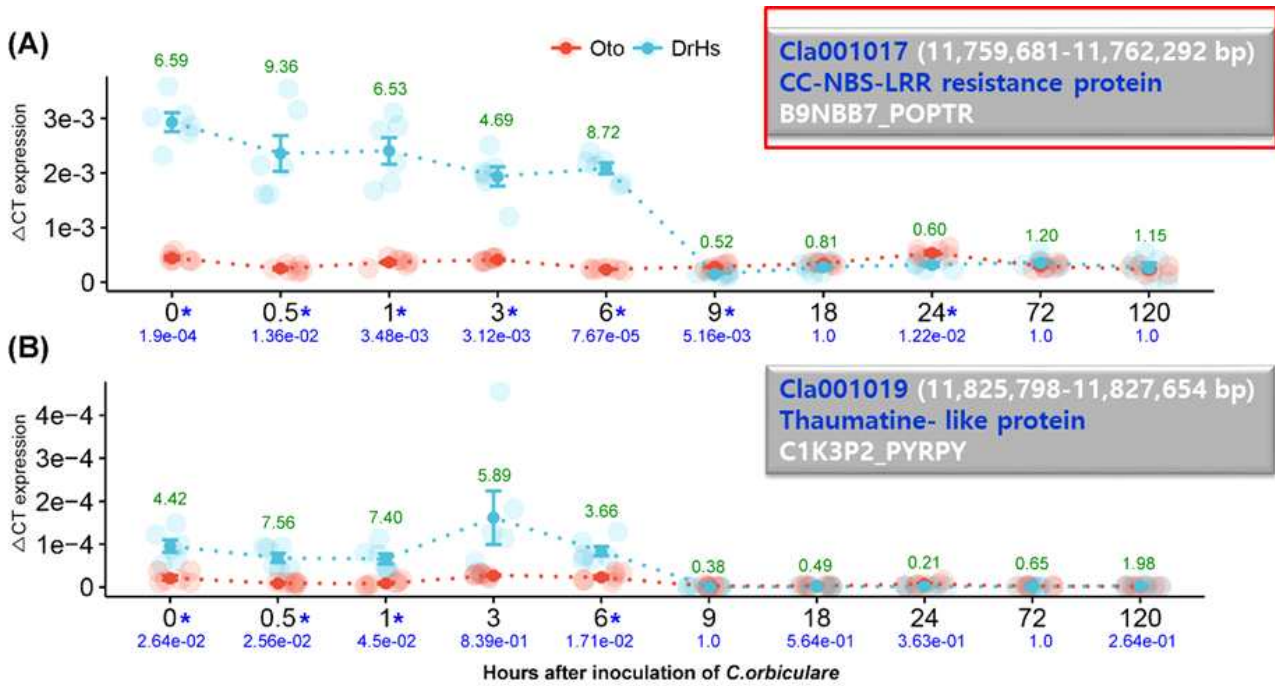
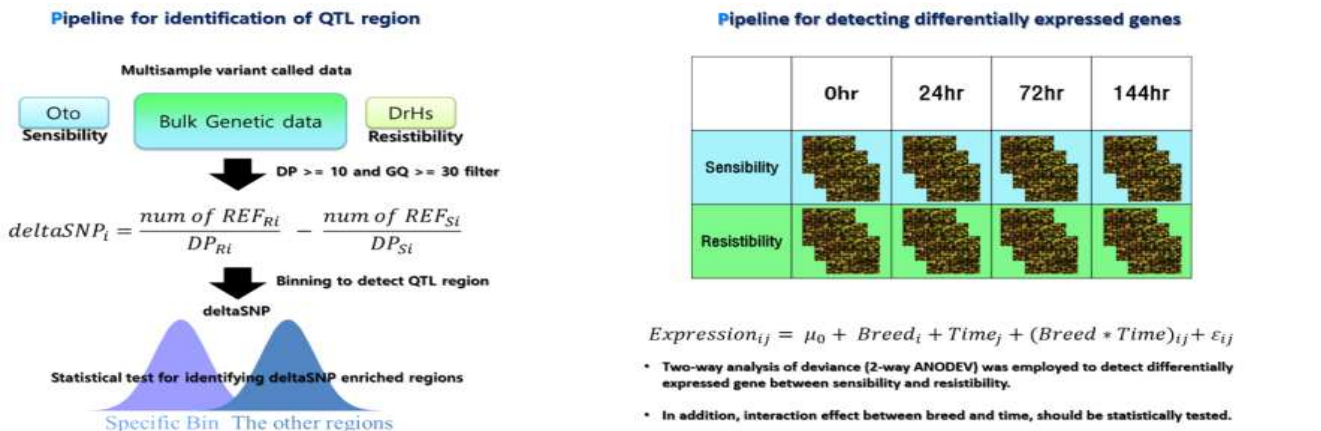


그림 2.68. qRT-PCR을 통한 수박탄저병 저항성 유전자 발현 분석

○ 수박 탄저병 유전자 Transcriptome 분석



1. 탄저병(Anthracnose disease) 저항성 마커 개발 (Transcriptome 분석)

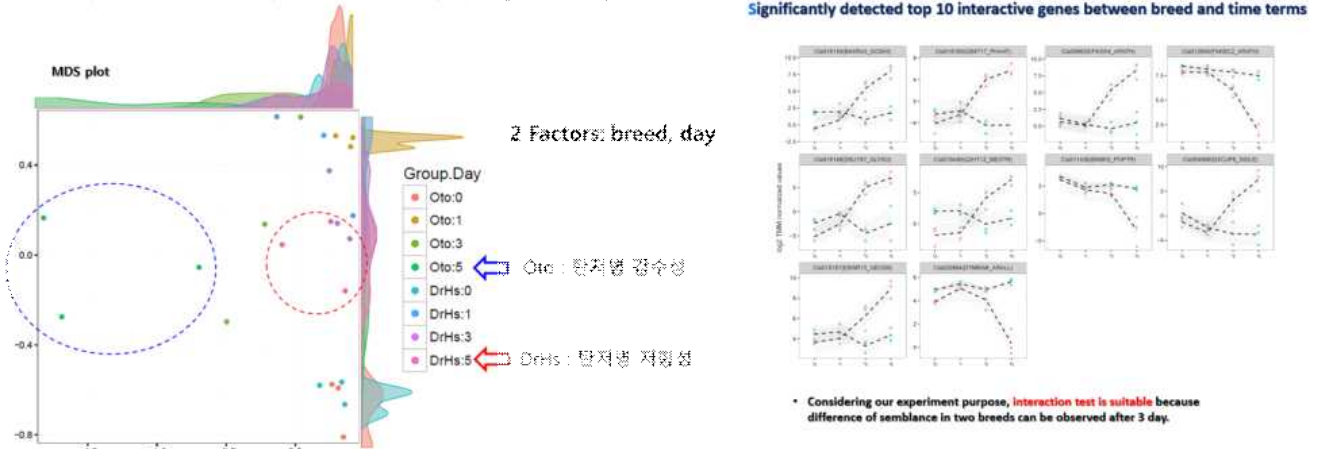


그림 2.69. Transcriptome 의 DEG 분석(2-way ANOVA)을 통한 연구 결과

- Virus induced gene silencing (VIGS) 방법을 이용한 탄저병 race 1의 저항성 유전자 기능 확인
 - RT-PCR을 기반으로 탄저병 Race1 저항성에 관여할 것으로 예상되는 유전자 CC-NBS-LRR을 Virus induced gene silencing (VIGS) 방법으로 유전자 기능을 확인 함.
 - 본 GSP과제를 통하여 본 연구실에서 개발한 cucumber fruit mottle mosaic virus (CFMMV) 이용한 VIGS vector를 이용하여 실험을 진행함 (미국특허, US 10,174,332 B2, Jan. 8, 2019).
 - Rhee et al (2014) 연구결과를 기반으로 박과에서 효율이 높은 VIGS vector의 insert 제작 방법을 이용하여 연구를 진행함.
 - 실험결과 CFMMV-cla17fu VIGS vector를 이용하여 agro-infiltration 후 탄저병 Race 1을 접종한 결과, 하배측에서는 cla001017 유전자의 발현이 Mock control과 큰 차이는 없었지만, 잎, 줄기의 경우 cla001017 유전자의 발현이 Mock control 비하여 약 2.5~5배 정도 현저하게 감소한 것을 확인할 수 있었음

표 2.42. VIGS vector inset 제작시 사용한 primer

Primer	Sequence	Target size
Cla17mid-F	ATTCTCGAxxxxxxxxxxxxxTCAACCAC	250bp
Cla17mid-R	ATTGTTTAAxxxxxxxxxxxxxTGAAGTTGA	
Cla17tail-F	ATTCTCGAxxxxxxxxxxxxxTCAACCAC	326bp
Cla17tail-R	ATT GTTxxxxxxxxxxxxxCCAATGCT	
Cla17fu-F	ATT xxxxxxxxxxxxxxxATGAT	320bp
Cla17fu-R	ATT xxxxxxxxxxxxxxxCCCCAACATT	

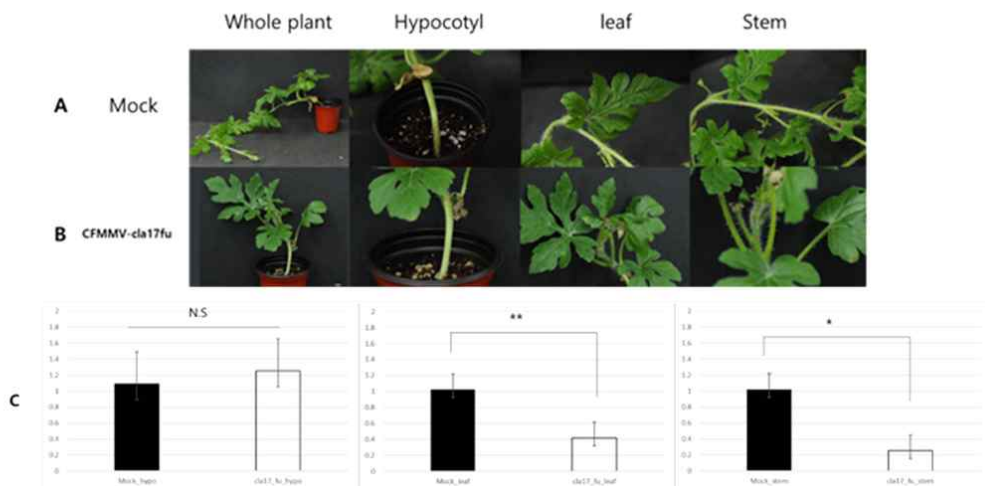
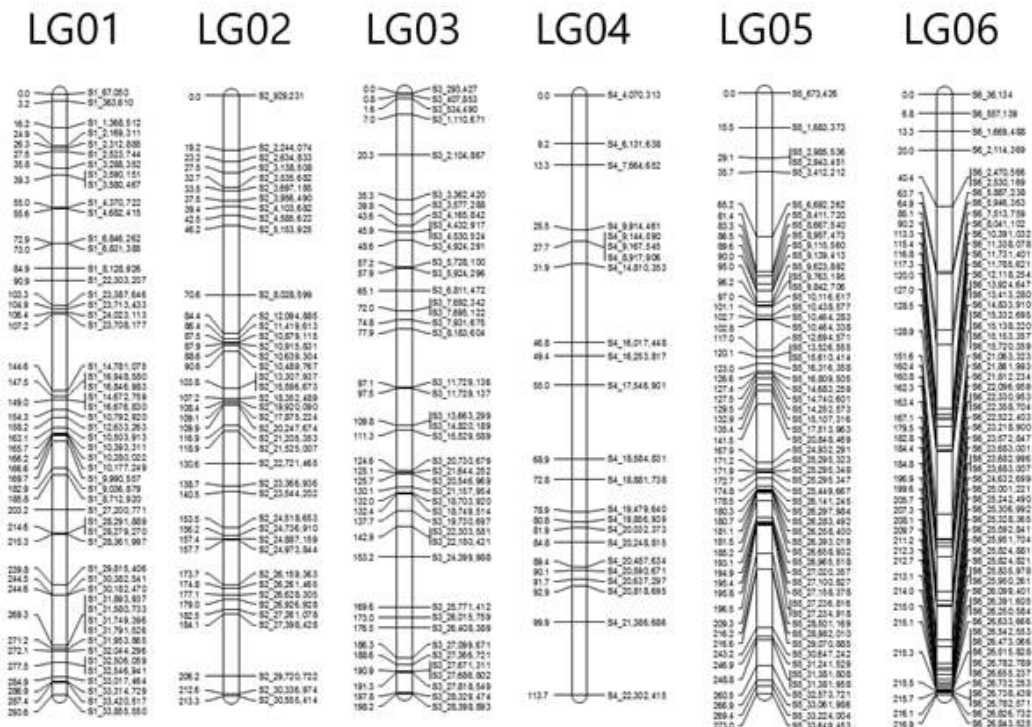


그림 2.70. CFMMV-cla17fu VIGS vector가 접종 된 식물체의 탄저병 접종 후 Cla001017 발현량 검정.

6. 복합내병성 육종을 위한 흰가루병 저항성 근접마커 개발

○ 유전자지도 작성

- 1단계에서 수행하였던 biparental population인 PI 189225(저항성 야생종) x TS(감수성 상업계통)의 F2:3 세대에서의 genetic map 작성 및 QTL 분석을 통한 연관마커 개발을 토대로 2단계에서는 TS x PI 254744(저항성 야생종) 집단의 genetic linkage map 제작 및 QTL 분석을 수행하고자 하였음
- 수박은 유전적 배경이 매우 협소하여, 기존의 SSR 방법으로 공우성 마커를 개발하고 이를 이용한 유전자지도 작성이 원활하지 않으며, 최근에는 high-throughput genotyping을 최종 platform으로 도입하고 있는 상황이기 때문에, 많은 분자마커를 확보할 수 있는 SNP 기반의 genotyping 및 마커개발을 위하여 Genotyping By Sequencing(GBS)을 적용하였음
- GBS 라이브러리는 ApeKI 제한효소를 이용하여 genomic DNA를 분절하고 여기에 134개체의 F2 개체 각각에 해당하는 바코드를 ligation 한 후, PCR을 수행하여 제작하였음
- NGS는 Illumina HiSeq2000을 이용하여 수행되었고, genotype의 염기서열을 모부분과 비교하여 genetic mapping용 A, H, B genotype으로 conversion 후에 JoinMap 4.1 프로그램을 이용하여 유전자지도를 작성하였음
- SNP 기반 유전자지도 작성은 134개체에 대하여 543 loci가 사용되었는데, 최종적으로 Haldane mapping function을 적용한 경우 460개 loci에 대하여 11개의 연관군으로 총 2458.856 cM의 유전자지도가 작성되었음



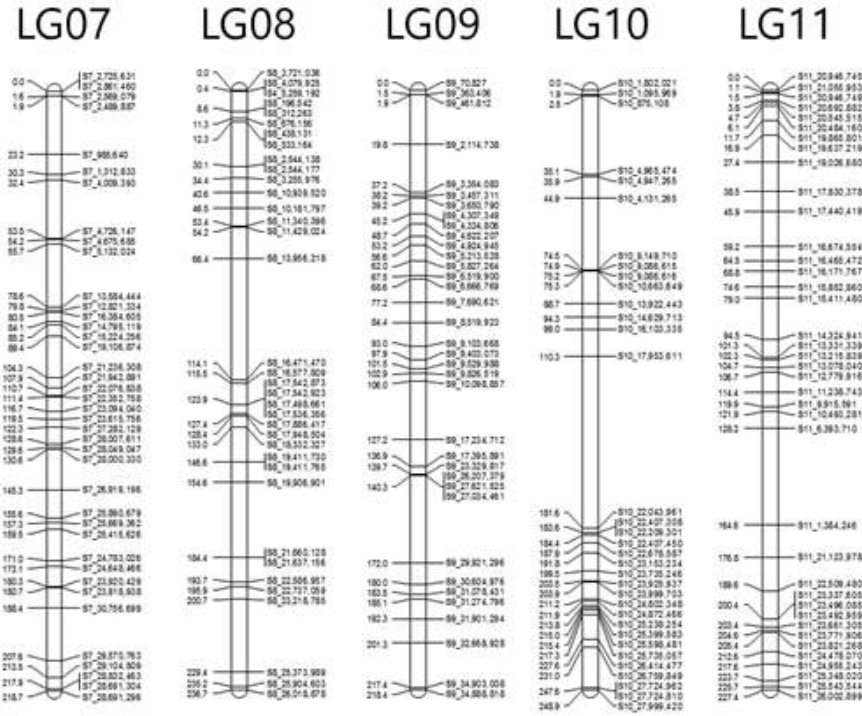


그림 2.71. TS x PI 254744의 F2 집단에 대한 GBS 결과로 얻어진 SNP 기반의 연관유전자지도 작성 결과

○ 흰가루병 저항성 QTL 분석 (PI 254744 저항성 유전자위 분석)

- race 판별용 기주(멜론)를 적용하여 동일한 race1임을 확인하였고, 이에 대한 병원균 재동정 실시후 대상 집단에 집중하여 분석을 수행하였음.

Podospaera xanthii race1

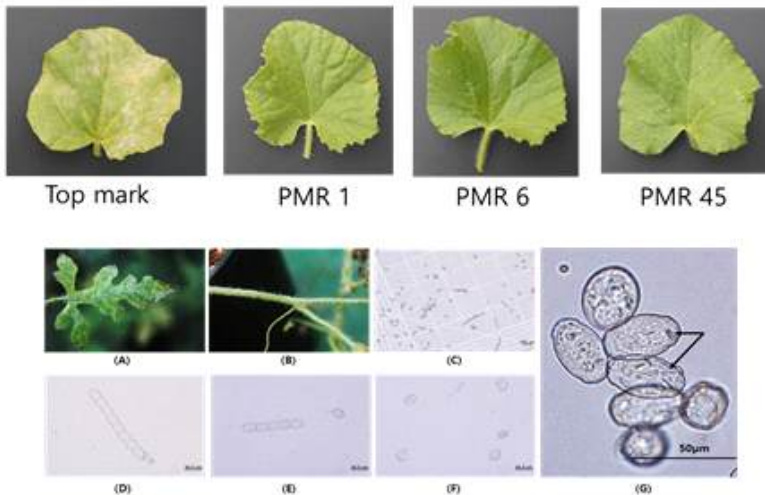


Fig. 1. Powdery mildew fungi found on watermelon leaves (A) and stem (B). (C), (D), (E), (F) and (G) are microscope observation of powdery mildew. Arrows indicate the fibrosin bodies in mature conidia of *Podospaera xanthii* (scale bar : 50 µm) (Han et al., HEB, 2016)

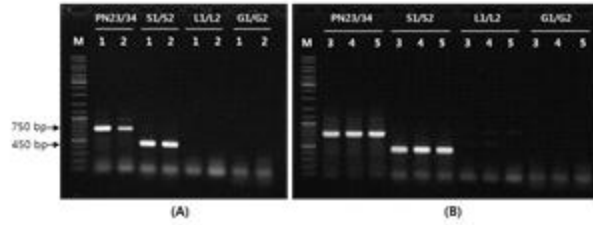


Fig. 2. PCR identification profiles of powdery mildew with 4 primer pairs. Direct PCR (A) and fungal genomic DNA PCR were performed 50 μ l reaction volumes. M: 1kb ladder. Lane 1: 10 spores, 2: 24 spores, 3: 0.5ng, 4: 1.0 ng, and 5: 5.0 ng fungal genomic DNA.

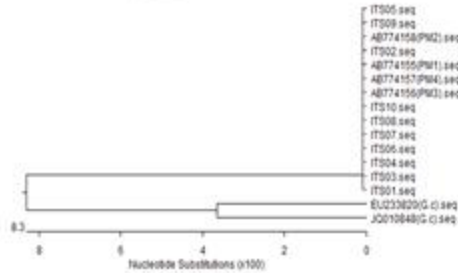
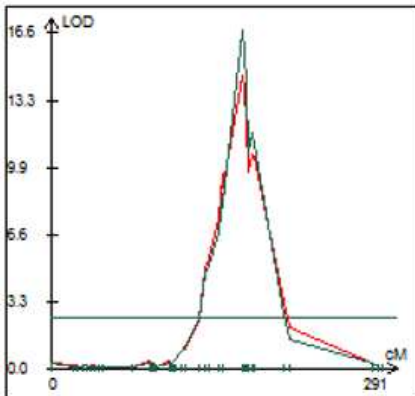


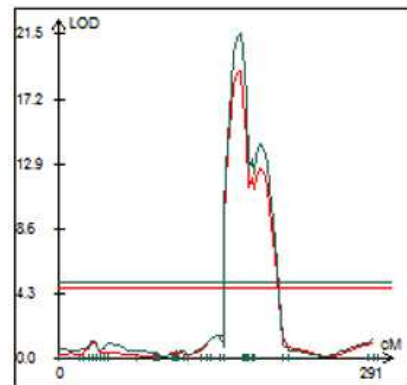
Fig. 4. Genetic diversity of ITS between putative powdery mildew and *Podospheera zanthii* (AB774155, AB774156, AB774157, and AB774158) and *Golovinomyces cichoracearum* (EU233820 and JQ010848).

(Han et al., HEB, 2016)

- 작성된 유전자지도를 토대로 흰가루병 저항성 유전자좌를 찾기 위하여 먼저 저항성, 감수성 표현형 검정 지표를 결정하였음. 특히, 표현형 검정 지표는 본 연구팀에서 개발한 바 있는 자엽, 본엽 1, 3, 5매 등에 대한 저항성 검정 지표를 활용하였음.
- 표현형 데이터를 취합하여 QTL 분석을 수행하였는데, 사전 유전분석 결과 3:1의 멘델식 유전양식을 보여 단인자 우성으로 판단하였음
- QTL 분석프로그램은 WinCarto ver. 3을 활용하였으며, 분석은 nonparametric 기반의 single factor analysis를 수행하였고, 영역을 좁히기 위하여 composite interval mapping을 수행하였음.
그 결과, 다음과 같이 LOD 3.0 및 4.5를 기준으로 자엽기와 본엽기에서의 mapping 결과를 확보하였음.



Single factor analysis 결과
자엽기(녹색), 본엽기(적색)



Composite interval mapping 결과
자엽기(녹색), 본엽기(적색)

그림 2.72. TS x PI 254744 F2:3 집단에 대한 흰가루병 저항성 QTL 분석

- 또한, MapQTL의 경우, 다음과 같은 본엽기 저항성 유전자좌에 대한 MQM 분석 결과를 확보하였음. 해당 유전자좌 영역에 대한 설명력은 약 61%에 해당하며, LOD는 10 이상으로 major gene effect를 확인할 수 있었음.

Nr	Group	Position	Locus	LOD	# iter.	mu_A	mu_H	mu_B	Variance	% Expl.	Additive	Dominanc	Cofactor
495	Gn	167.01		19.25	1	7.80418	5.58562	4.67764	0.533145	35.9	1.56327	-0.65529	
494	Gn	166.01		19.24	1	7.83538	5.58998	4.67035	0.533426	35.8	1.58252	-0.66289	
496	Gn	168.01		19.16	1	7.7696	5.58642	4.69096	0.535452	35.8	1.53932	-0.64386	
493	Gn	165.01		19.12	1	7.86239	5.60006	4.66933	0.536482	35.7	1.59653	-0.6658	
497	Gn	169.01		18.99	1	7.73242	5.59177	4.70997	0.540119	35.6	1.51123	-0.62942	
492	Gn	164.01		18.9	1	7.8844	5.61631	4.67469	0.542438	35.5	1.60485	-0.66324	
498	Gn	169.79	S_xxx,159,363	18.79	1	7.70209	5.59869	4.72844	0.545232	35.3	1.48682	-0.61658	X
491	Gn	163.01		18.57	1	7.90069	5.63897	4.68643	0.55135	35.1	1.60713	-0.65459	
490	Gn	162.01		18.13	1	7.91068	5.66806	4.70445	0.563188	34.6	1.60311	-0.6395	
489	Gn	161.01		17.61	1	7.91399	5.70331	4.7286	0.577839	33.9	1.5927	-0.61798	
488	Gn	160.01		17.01	1	7.91052	5.74416	4.75864	0.595107	33.2	1.57594	-0.59042	
499	Gn	170.79		16.65	1	7.52093	5.56975	4.70342	0.605612	32.7	1.40876	-0.54243	
487	Gn	159.01		16.35	1	7.90042	5.7898	4.79431	0.61472	32.4	1.55305	-0.55757	
486	Gn	158.01		15.64	1	7.8841	5.83922	4.83528	0.636352	31.4	1.52441	-0.52047	
485	Gn	157.01		14.91	1	7.8622	5.89132	4.88114	0.65964	30.4	1.49053	-0.48035	
484	Gn	156.01		14.16	1	7.8355	5.94497	4.93141	0.684205	29.4	1.45205	-0.43849	
483	Gn	155.01		13.41	1	7.80488	5.99912	4.98555	0.709671	28.3	1.40967	-0.39609	
482	Gn	154.01		12.68	1	7.77121	6.05284	5.04293	0.735682	27.2	1.36414	-0.35422	
481	Gn	153.01		11.96	1	7.73533	6.10537	5.10288	0.761911	26	1.31623	-0.31374	
480	Gn	152.01	S_xxx,973,844	11.28	1	7.69801	6.15608	5.16471	0.788068	24.9	1.26665	-0.27529	
1222	Gn	217.345	S_xxx,100,827	4.43	1	6.19713	5.34455	6.2334	0.545232	5.7	-0.01814	-0.87071	X
1221	Gn	216.703	S_xxx,020,357	4.1	1	6.17248	5.34312	6.18707	0.554086	5.3	-0.00729	-0.83665	
2135	Gn	47.48		2.96	1	6.42417	6.09331	6.9601	0.471597	3.2	-0.26797	-0.59883	
2136	Gn	48.48		2.99	1	6.37537	6.07484	6.94821	0.470852	3.2	-0.28642	-0.58695	
2137	Gn	49.48		2.98	1	6.32377	6.05971	6.92277	0.471211	3.2	-0.2995	-0.56357	
2157	Gn	66.086	S_xxx,827,264	2.99	1	6.12789	5.9619	6.70148	0.471031	3.2	-0.2868	-0.45279	
2084	Gn	239.859	S_xxx,018,878	2.52	1	5.88087	5.68703	6.54966	0.545232	3.1	-0.3344	-0.52824	X

그림 2.73. MapQTL의 MQM 분석결과 (TS x PI254744)

○ PI 254744 저항성 유전자위에 대한 NIL-NGS 분석

- 본 결과를 통하여, 1단계 연구결과 SSR 마커로 분석한 바 있는 PI 254744의 저항성 유전자 영역을 좀 더 확실히 좁힐 수 있었으며, 여기에 1세부과제에서 흰가루병 저항성 유전자도입을 위해 여교잡을 통해 진행 중인 NIL(Near-Isogenic Line) 일부를 활용하여 반복친으로 사용된 상업용 계통 45NC에 PI 254744의 저항성 유전자영역이 도입된 계놈영역에 대한 분석을 추가로 실시함.
- PI 254744의 흰가루병 저항성 계놈영역을 파악하기 위하여 반복친 45NC에 여교잡 육성된 NIL 6개 계통 및 PI 254744에 대한 resequencing 후 다음과 같은 variant block 분석 방법으로 도입영역을 확인하였음.

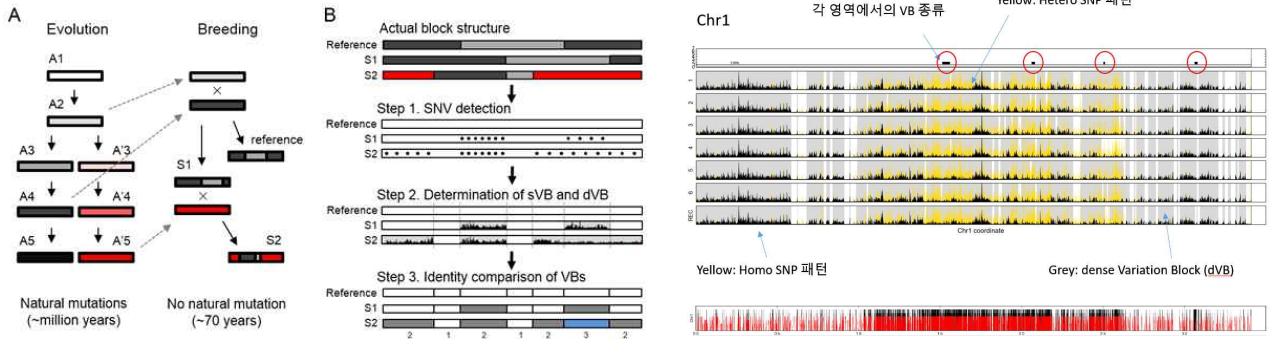


그림 2.74. Whole genome resequencing을 통한 NIL에서의 variant block 분석 예시

- 상업계통 45NC에 대한 PI254744의 흰가루병 저항성 게놈영역의 introgression(도입) 영역은 아래 그림과 같이 특정 염색체의 적색 화살표의 영역으로 파악되었음.

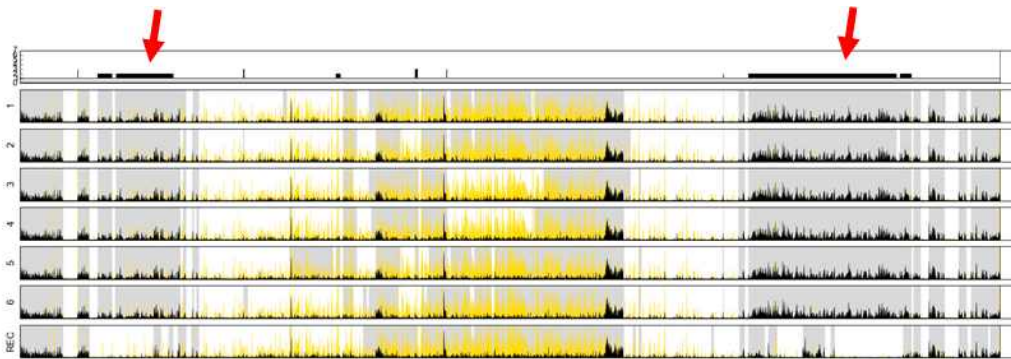


그림 2.75. 반복친 45NC에 도입된 PI254744 흰가루병 저항성 게놈 영역 분석

- 제1세대부과제에서 육성한 NIL에서의 PI 254744 저항성 게놈영역은 앞서 QTL 분석을 통해 확인된 영역을 포함하고 있었으며, 추가적인 dragging에 의해 야생성을 갖는 영역의 introgression이 이루어진 것으로 판단되었음. 이러한 부분은 향후 MAB를 이용한 여교 잡에서는 좀 더 효과적인 현장육종 적용이 가능할 수 있을 것으로 기대함.

○ PI 254744 저항성 유전자위에 대한 교잡후대 genotyping 분석

- PI254744의 흰가루병 저항성 유전자위 영역 내에 유전자 연관도가 높은 SNP를 찾기 위하여 10개의 HRM 분석용 프라이머 세트를 작성하였고, 이중 가장 연관도가 높아 전체 F3 family중 검정을 실시한 300개체에 대해 100% 연관도를 보이는 2개의 프라이머 세트를 확보하였음.
- 최종 확보한 HRM 프라이머 세트는 254Pmr-02 및 254Pmr-04로 다음과 같은 phenogram을 보여, 우성 및 열성 homozygote 및 F1 heterozygote의 구별을 가능하였음.

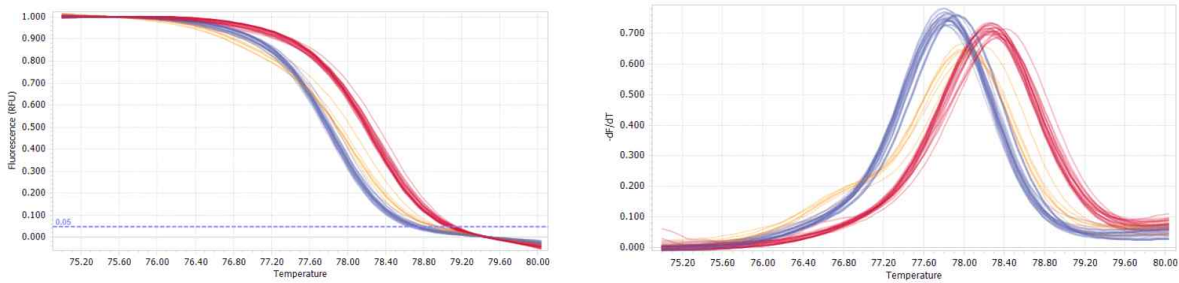


그림 2.76 대표적 HRM 분석결과

○ PI254744 및 PI189225 저항성 유전자위 비교

- 기존 PI189225의 저항성과 PI254744 저항성 기작을 비교하면, PI254744는 상대적으로 PI189225보다 엽병 및 줄기에서 저항성이 강한 표현형을 보이는 반면, PI189225는 상대적으로 자엽단계에서 강한 저항성을 보이는 등 기본적인 저항성 기작은 차이가 있는 것으로 파악되었음
- 그러나, 이들 저항성 자원들의 유전양식은 모두 단인자 우성으로 매우 연관된 영역에서 나타나 allelism을 비교하기는 쉽지 않았으며, 최종 QTL 분석시 저항성 계놈영역이 거의 일치하는 것으로 나타났음. major QTL 부위는 동일한 allele로 파악됨
- 따라서, 본 연구에서는 두 개의 저항성 자원에 동시에 적용 가능한 HRM 연관마커를 개발하고자 하였음. 최종적으로 189-254Pmr-06으로 명명된 HRM 마커를 개발하였고, 개발된 마커는 PI189225 및 PI254744의 후대 분리세대들에 완벽하게 일치하고 있어 흰가루병 저항성 계놈영역 판단에 중요한 마커로 활용이 가능하며, 1세부과제 흰가루병 저항성 계통육성에 곧바로 사용가능함을 확인하였음.
- 해당 저항성 영역의 유전자들은 주로 병저항성에 관여하는 NBS-LRR motif 들이 다수 발견되는 위치이나 표현형과의 일치도를 볼 때, ETI 반응에서 *Podospaera xanthii* race 1의 effector에 대응하는 downstream 유전자들을 후보 유전자로 좁힐 수 있었음.
- 해당 결과는 탄저병저항성 및 흰가루병 저항성 등 복합내병성을 위한 MAB기반 여교잡 육종에 활용하였음.

8. 수박 배수성 진단법 개발

○ 수박 배수성 진단법 개발 연구목적

- 수박의 주요한 품종개발 방향은 소비자의 섭식시 거부감을 야기하는 종자가 없는 씨없는 수박 품종개발로, 미국을 비롯한 서구 선진국 시장의 대부분은 4배체 수박과 2배체 수박의 교잡을 통해 얻어지는 3배체 씨없는 수박품종을 요구하고 있음.
- 씨없는 3배체 수박의 품종개발에서 기본적으로 요구하는 4배체 수박은 4배체 자체로 병저항성 유전자의 도입이 필요하며, 도입하고자 하는 병저항성 유전자 또는 유전자위의 도입 dosage가 어느 정도인지에 대한 빠른 판단이 필요함.

- 따라서, 배수성이 분석된 4배체 및 3배체 수박에서 목적하는 유전자가 4x 또는 3x의 모든 chromatid에 도입되어 있는지 확인할 수 있는 분자마커 및 우성/열성 도입유전자 정량분석 시스템 확립은 기존 배수체 활용 씨없는 수박 육종과정을 보다 효율적으로 진행시킬 수 있음.

○ 수박 배수성 진단법 개발

- 2x, 3x, 4x 등 배수체 수박의 MAS를 수행시, 3x 및 4x 배수체의 gene dosage 판별을 위한 기초 실험으로 각 배수체의 배수성을 확인하기 위한 flowcytometry를 실시하였음.
- 확인된 배수체들의 genomic DNA를 추출하고 ds-DNA를 정확히 정량한 후에 대상 유전자의 도입여부 확인을 위하여 탄저병 저항성 유전자가 도입된 2x, 3x, 4x 배수체에 대한 SNP 차이를 기반으로 allele specific real-time PCR을 수행하고자 하였음. 이 방법의 적용을 통하여 목표 유전자 copy number quatification이 가능할 것으로 판단하고 있음.

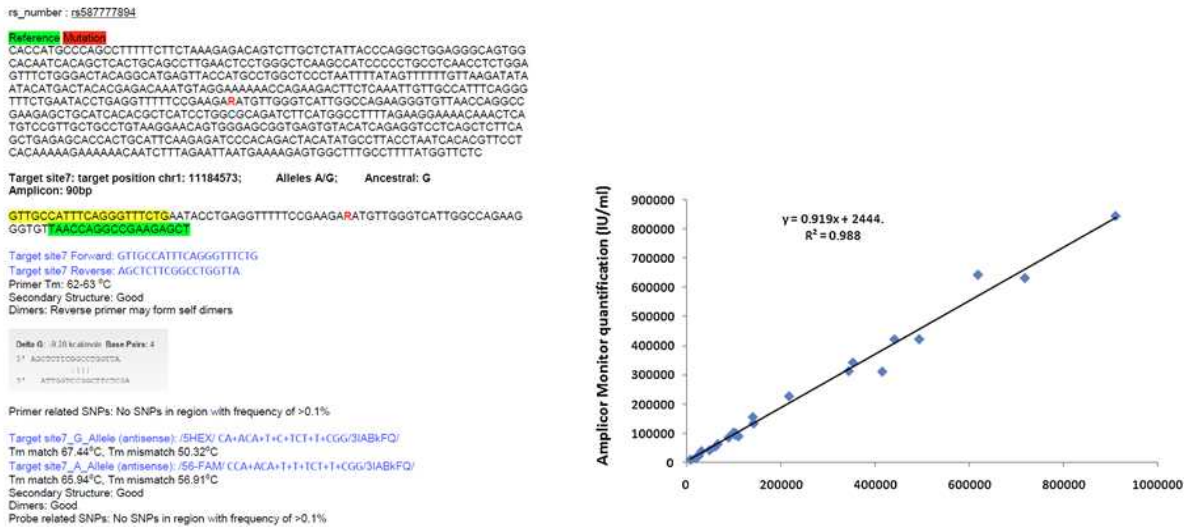


그림 2.77 Allele specific real-time PCR을 위한 probe 작성 및 유전자 정량분석 사례

9. 종피색 연관 분자마커

1) 수박 종피색 핵심소재 선발 및 양성

○연구배경

- 벼, 콩, 참깨, 배추 등에서는 종피색에 따른 성분, 기능 등에 대한 연구가 활발히 진행되어 있으나, 수박의 경우 종피색에 대한 연구는 전무한 실정임.
- 수박 종피의 색은 대체적으로 검은색이 우성형질로 알려져 있으며, 짙은 갈색 혹은 검은색 반점 (Brown Ish/ Black spots), 붉은계열의 갈색 (Tan/Brown), 빨간색, 흰색으로 갈수록 열성 형질에 의해 종피색의 표현형이 나타나는 것으로 알려져 있음. 하지만 정확하게 어떤 유전

자에 의해 조절되는지는 알려져 있지 않음.

- 최근 수박에 대한 사람들의 관심이 높아짐에 따라 기호에 따른 다양한 종류의 수박이 출시되고 있음. 또한 핵가족화가 가속화 되면서 애플수박, 1/2 조각수박, fresh-cut 등 다양한 종류의 수박이 유통되고 있음.
- 또한 수박 섭취 시 가장 큰 문제점은 종자를 뺄어내는 것인데, 현재 종자크기가 작고, 종자 개수가 적은 수박은 많이 개발되어 있지만 (1단계 종자크기에 대한 마커 확보), 추가적으로 과육색과 비슷한 종피색의 표현형이 나타나는 수박을 개발하면 섭취에 거부감이 줄어들 것으로 생각됨.
- 아프리카 및 아시아 국가들에서 다량의 photochemical이 함유되어 있는 여러 종류의 종피색을 보유한 섭취 가능한 수박종자를 생산을 진행하고 있음
- 수박 종피색의 경우 다양한 유전자원에서 Flat black (민무늬 검은색), dotted black (점박이 검은색), Tan (갈색), Green (초록색), Red (빨간색), Clump to white (종피주변을 갈색 표면은 흰색), white (흰색 또는 아이보리색) 으로 구성되어 있음.
- 선행연구에서는 현재까지 알려진 수박 종피색에 관여하는 유전자는 총 4가지일 것으로 예측하고 있으며, 각각의 유전형은 Flat black (RTWD), dotted black (RTWd), Tan (RtW), Green (rTW), Red (rtW), Clump to white (Rtw), white (rtw)으로 예측하고 있음(Paudel, Clevenger et al. 2019).
- Paudel, Clevenger et al. (2019) 선행연구에서는 dotted black x Green, Red x dotted black, dotted black x Clump to white에 관한 종피색의 유전양식을 규명하고, 해당 형질의 마커를 개발함.
- 현재 본 연구에서는 종자크기가 작고, 종자개수가 적은, 과육색이 빨간 수박이 개발되어 있으며(1단계 종자크기에 대한 마커 확보), 추가적으로 과육색과 비슷한 빨간색, 분홍색, 흰색의 종피색 표현형과 연관되어 있는 마커를 찾고자 함.
- 따라서 본 과제의 연구목적은 수박 종피색의 유전양상을 규명하고 유묘기에 종피색을 판별이 가능한 분자마커 개발을 목표로 하였음.

○수박 종피색 핵심육종소재 선발

- 수박 핵심집단을 대상으로 종피색 표현형 검정을 실시 함.
- 그 중 검은색과 짙은 갈색의 중간으로 판단되는 SBA를 모본으로 결정하였으며, 가장 빨간색인 PI307609를 이용하여 분리집단을 양성 함.
- SBA x PI307609를 이용하여 F2분리집단의 표현형을 관찰한 결과 수박의 숙기의 정도 및 종피색의 색의 혼입이 심하여, 표현형을 구분하는데 어려움이 있었음.
- SBA의 검정 종피색의 경우 짙은 갈색, 적색, 흰색 등 여러 색의 상호작용으로 종피색이 결정되는 것으로 생각되며, 추후에 종피색 구분 마커가 확보가 되면 본 집단을 이용해 표현형과 유전자형을 분석하기로 함.



그림 2.78. 수박 핵심 유전자원 소재선발을 위한 종피색 표현형 검정



그림 2.79. SBA x PI307609 분리집단을 이용한 F2 분리세대 종피색 표현형 검정

- 보통 수박 종피색의 경우 모본의 종피색을 그대로 반영하여 후대로 나타나는데, 우선 본 연구에서 양성한 집단의 경우 F1에서는 모본의 종피색 PI307609를 나타나 예상하는 결과와 일치 했으며, F2종자의 표현형은 검은색의 종피색이 나타남.
- 알려진 바로는 수박 종피색의 우성이 검은색으로 알려져 있으나, 본 집단의 교배 조합에서는 검은색 계통이 전무한 상황에서 F1의 표현형이 검은색으로 나타났기 때문에 교배실수로

인한 표현형인지, 우성성에 의한 검은색 종피의 표현형의 결과인지 한 번 더 확인이 필요하다고 사료됨.

- 우선 F2 표현형을 확인하기 위해 해당 종자를 이용하여, F1 자가수정 후 해당 과실의 종자를 받고 종피색 표현형을 검정함.
- 그 결과, 검은색, 짙은 갈색, 붉은갈색, 빨간색, 노란색(완전 흰색은 아님)이거나, 한 과안에 미성숙 종자 혹은 종자의 착색정도에 따라 2가지 색상의 종자가 혼입이 되어 있었음.

○ 새로운 유전자원 선정 및 분리집단 표현형 검정

- Qiu et al.(2016, Plos one)의 콩에 대한 종피색 연구에 따르면 흰색종과, 빨간색의 계통을 이용하여 F2 분리집단을 양성한 결과 빨간색, 검은색, 노란색, 초록색의 표현형이 나타났으며, 각 색의 표현형은 2가지 이상의 색조합의 우성과 열성의 상위작용에 의한 표현형이기 때문에 F2분리 집단 이외 F7세대의 RIL 집단을 양성하여 표현형 검정 및 세대별 분리비 검정을 실시 한 사례가 있음.
- 따라서, 종피색이 흰색인 Royal golden, 종피색이 빨간색인 PI307609를 이용하여 분리집단을 양성하고, 유전분석을 수행함.

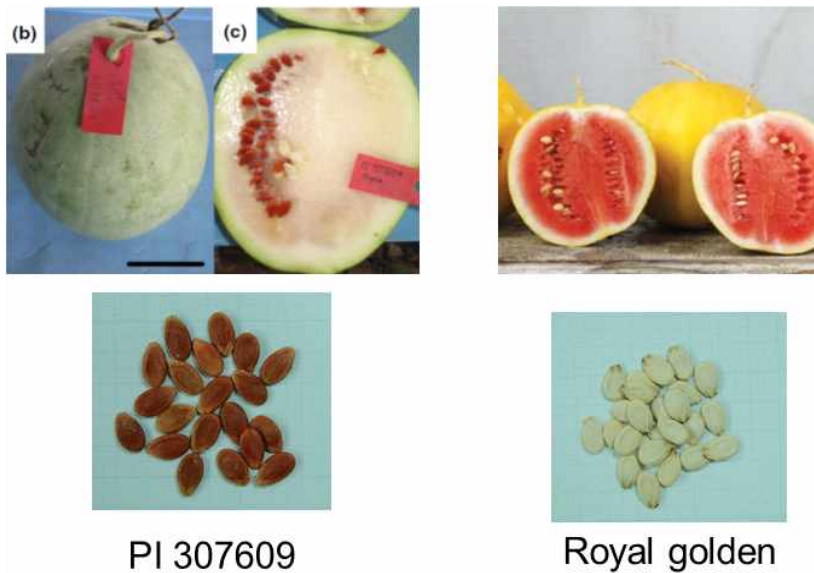


그림 2.80. 붉은 종피의 색을 보이는 부분 PI307609의 종자와, 하얀 종피색을 보이는 RoyalGolden의 종자모습

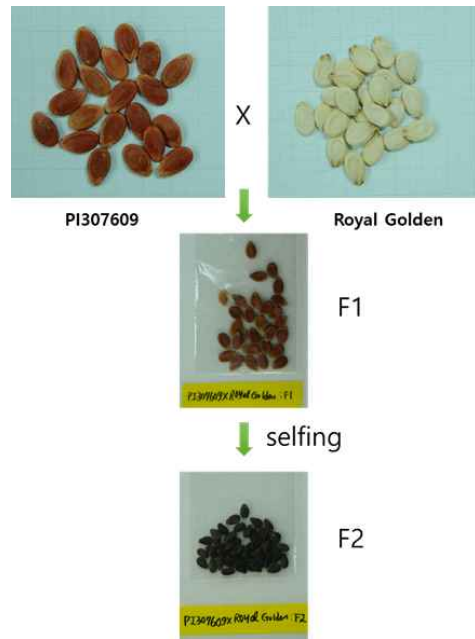


그림 2.81. PI307609 x Royal Golden을 이용한 분리집단 양성 모식도

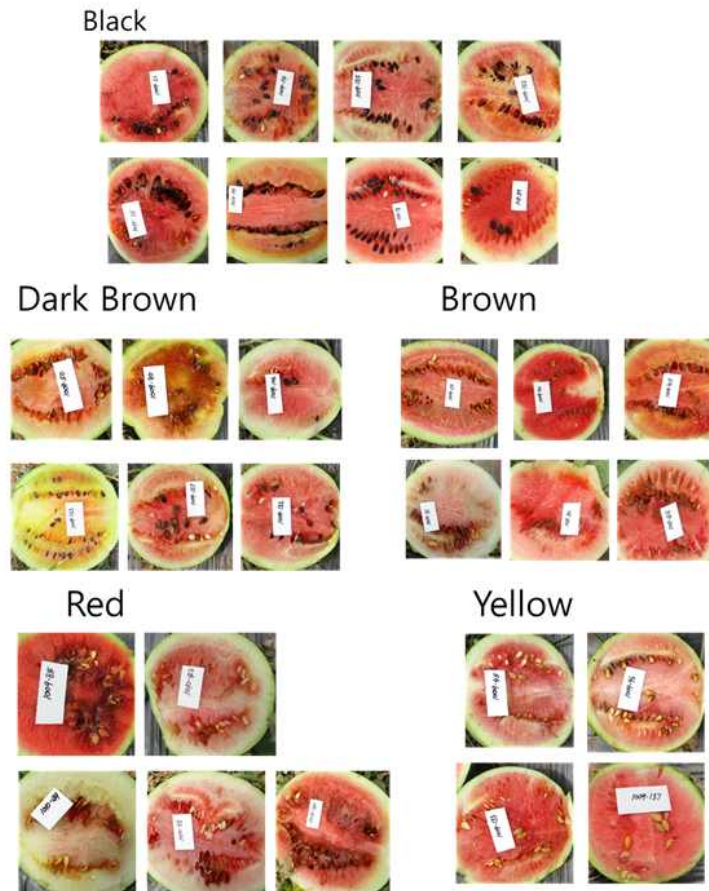


그림 2.82. PI307609 x Royal Golden을 이용한 F2 종피색 표현형 대표결과

○ 수박 종피색의 표현형검정을 위한 지표개발 및 분리세대 표현형검정

- 종피색의 유전양상을 파악하기 위해 분리세대에서 표현형검정을 진행함.
- RoyalGolden x PI307609: F2 집단에서 6개의 기준을 삼아 1점부터 6점까지 분류하여 점수를 매김.
- 1점의 경우 Royal Golden의 종 중피색과 가장 유사하며 흰색에 매우 가까운 정도였으며, 비교적 노르스름한 흰색을 보여 베이지에 가깝다고 할 수 있는 2점과 구별이 가능함. 또한 3점은 황토색에 가까운 색으로 기준을 두었고, 4점은 황갈색을 가지고 있지만 붉은기가 없음. 5점은 4점에 비해 붉은기를 가지고 있으며 6점은 붉은색의 종피색으로 기준을 두었음.



그림 2.83. 분리세대 RoyalGolden x PI307609 : F2에서 표현형 검정을 하기 위해 1점에서 6점까지 세운 기준 표와 점수 별 대표사진



그림 2.84. 수확시 종피색 rating 결과

점수	종피색	표현형 검정
1	흰 노랑	노랑 끼가 적고 흰 끼가 많이 도는 종피에 1점을 부여함.
2	연한 노랑	밝지만 노랑 끼가 더 많이 도는 종피에 2점을 부여함.
3	연한 노랑 주황	노랑지만 갈색빛을 띠지 않는 종피에 3점을 부여함.
4	연한 황갈색	갈색빛을 띠는 밝은 종피에 4점을 부여함.
5	황갈색, 적갈색	진한 갈색빛이 돌고 붉은 끼가 있더라도 적갈색에 가까우면 5점을 부여함.
6	빨간색	갈색빛이 많이 돌지 않는 빨간 종피에 6점을 부여함. 단, 빨간색이 맞지만 갈색빛이 많이 도는 경우 따로 표시하였음.

표 2.43. RoyalGolden x PI307609 :F2 분리세대 230개체의 표현형검정 결과표

종자 ID	세대	표현형 점수	종자 ID	세대	표현형 점수
19-0219	Royal Golden/PI307609:F2-002	4	19-0335	Royal Golden/PI307609:F2-152	1
19-0220	Royal Golden/PI307609:F2-005	2	19-0336	Royal Golden/PI307609:F2-153	5
19-0221	Royal Golden/PI307609:F2-006	2	19-0337	Royal Golden/PI307609:F2-154	4
19-0222	Royal Golden/PI307609:F2-007	1	19-0338	Royal Golden/PI307609:F2-155	5
19-0223	Royal Golden/PI307609:F2-008	1	19-0339	Royal Golden/PI307609:F2-156	4
19-0224	Royal Golden/PI307609:F2-009	3	19-0340	Royal Golden/PI307609:F2-157	2
19-0225	Royal Golden/PI307609:F2-010	1	19-0341	Royal Golden/PI307609:F2-158	5
19-0226	Royal Golden/PI307609:F2-012	1	19-0342	Royal Golden/PI307609:F2-159	1
19-0227	Royal Golden/PI307609:F2-013	5	19-0343	Royal Golden/PI307609:F2-160	6
19-0228	Royal Golden/PI307609:F2-014	4	19-0344	Royal Golden/PI307609:F2-161	1
19-0229	Royal Golden/PI307609:F2-015	3	19-0345	Royal Golden/PI307609:F2-162	2
19-0230	Royal Golden/PI307609:F2-016	2	19-0346	Royal Golden/PI307609:F2-163	4
19-0231	Royal Golden/PI307609:F2-017	4	19-0347	Royal Golden/PI307609:F2-164	5
19-0232	Royal Golden/PI307609:F2-018	4	19-0348	Royal Golden/PI307609:F2-165	4
19-0233	Royal Golden/PI307609:F2-019	6	19-0349	Royal Golden/PI307609:F2-166	4
19-0234	Royal Golden/PI307609:F2-020	2	19-0350	Royal Golden/PI307609:F2-167	5
19-0235	Royal Golden/PI307609:F2-021	4	19-0351	Royal Golden/PI307609:F2-168	4
19-0236	Royal Golden/PI307609:F2-022	4	19-0352	Royal Golden/PI307609:F2-169	3
19-0237	Royal Golden/PI307609:F2-023	5	19-0353	Royal Golden/PI307609:F2-171	4
19-0238	Royal Golden/PI307609:F2-024	5	19-0354	Royal Golden/PI307609:F2-173	5
19-0239	Royal Golden/PI307609:F2-028	2	19-0355	Royal Golden/PI307609:F2-174	6
19-0240	Royal Golden/PI307609:F2-029	4	19-0356	Royal Golden/PI307609:F2-175	4
19-0241	Royal Golden/PI307609:F2-032	4	19-0358	Royal Golden/PI307609:F2-178	2
19-0242	Royal Golden/PI307609:F2-033	5	19-0359	Royal Golden/PI307609:F2-179	5
19-0244	Royal Golden/PI307609:F2-035	5	19-0360	Royal Golden/PI307609:F2-180	3
19-0245	Royal Golden/PI307609:F2-037	5	19-0361	Royal Golden/PI307609:F2-181	4
19-0246	Royal Golden/PI307609:F2-038	1	19-0362	Royal Golden/PI307609:F2-182	4
19-0247	Royal Golden/PI307609:F2-040	4	19-0363	Royal Golden/PI307609:F2-183	4
19-0248	Royal Golden/PI307609:F2-042	4	19-0364	Royal Golden/PI307609:F2-186	4
19-0249	Royal Golden/PI307609:F2-043	4	19-0365	Royal Golden/PI307609:F2-187	4
19-0250	Royal Golden/PI307609:F2-044	3	19-0366	Royal Golden/PI307609:F2-188	4
19-0251	Royal Golden/PI307609:F2-045	5	19-0367	Royal Golden/PI307609:F2-189	4
19-0252	Royal Golden/PI307609:F2-047	5	19-0368	Royal Golden/PI307609:F2-190	6
19-0253	Royal Golden/PI307609:F2-048	1	19-0369	Royal Golden/PI307609:F2-192	4
19-0254	Royal Golden/PI307609:F2-049	4	19-0370	Royal Golden/PI307609:F2-193	5
19-0255	Royal Golden/PI307609:F2-050	3	19-0371	Royal Golden/PI307609:F2-194	3

19-0256	Royal Golden/PI307609:F2-052	3	19-0372	Royal Golden/PI307609:F2-195	4
19-0257	Royal Golden/PI307609:F2-053	4	19-0373	Royal Golden/PI307609:F2-196	2
19-0258	Royal Golden/PI307609:F2-054	4	19-0374	Royal Golden/PI307609:F2-198	3
19-0259	Royal Golden/PI307609:F2-055	2	19-0375	Royal Golden/PI307609:F2-199	5
19-0260	Royal Golden/PI307609:F2-056	3	19-0376	Royal Golden/PI307609:F2-201	2
19-0261	Royal Golden/PI307609:F2-057	4	19-0377	Royal Golden/PI307609:F2-202	2
19-0262	Royal Golden/PI307609:F2-058	2	19-0378	Royal Golden/PI307609:F2-203	5
19-0263	Royal Golden/PI307609:F2-059	4	19-0379	Royal Golden/PI307609:F2-204	3
19-0264	Royal Golden/PI307609:F2-061	1	19-0380	Royal Golden/PI307609:F2-205	3
19-0265	Royal Golden/PI307609:F2-062	4	19-0381	Royal Golden/PI307609:F2-206	4
19-0266	Royal Golden/PI307609:F2-063	4	19-0382	Royal Golden/PI307609:F2-207	4
19-0267	Royal Golden/PI307609:F2-064	4	19-0383	Royal Golden/PI307609:F2-208	4
19-0268	Royal Golden/PI307609:F2-065	5	19-0384	Royal Golden/PI307609:F2-209	3
19-0269	Royal Golden/PI307609:F2-066	3	19-0385	Royal Golden/PI307609:F2-210	3
19-0270	Royal Golden/PI307609:F2-067	1	19-0386	Royal Golden/PI307609:F2-211	5
19-0271	Royal Golden/PI307609:F2-068	4	19-0387	Royal Golden/PI307609:F2-213	5
19-0272	Royal Golden/PI307609:F2-069	5	19-0388	Royal Golden/PI307609:F2-214	4
19-0273	Royal Golden/PI307609:F2-070	3	19-0389	Royal Golden/PI307609:F2-215	4
19-0274	Royal Golden/PI307609:F2-071	1	19-0390	Royal Golden/PI307609:F2-218	5
19-0275	Royal Golden/PI307609:F2-072	4	19-0391	Royal Golden/PI307609:F2-219	4
19-0276	Royal Golden/PI307609:F2-073	5	19-0392	Royal Golden/PI307609:F2-220	4
19-0277	Royal Golden/PI307609:F2-074	3	19-0393	Royal Golden/PI307609:F2-221	3
19-0278	Royal Golden/PI307609:F2-076	4	19-0394	Royal Golden/PI307609:F2-223	4
19-0279	Royal Golden/PI307609:F2-077	2	19-0395	Royal Golden/PI307609:F2-224	4
19-0280	Royal Golden/PI307609:F2-078	1	19-0396	Royal Golden/PI307609:F2-225	4
19-0281	Royal Golden/PI307609:F2-079	3	19-0397	Royal Golden/PI307609:F2-226	3
19-0282	Royal Golden/PI307609:F2-080	2	19-0398	Royal Golden/PI307609:F2-227	4
19-0283	Royal Golden/PI307609:F2-081	4	19-0399	Royal Golden/PI307609:F2-228	2
19-0284	Royal Golden/PI307609:F2-084	5	19-0400	Royal Golden/PI307609:F2-229	4
19-0285	Royal Golden/PI307609:F2-085	4	19-0401	Royal Golden/PI307609:F2-230	3
19-0286	Royal Golden/PI307609:F2-086	5	19-0402	Royal Golden/PI307609:F2-231	4
19-0287	Royal Golden/PI307609:F2-089	3	19-0403	Royal Golden/PI307609:F2-232	4
19-0288	Royal Golden/PI307609:F2-092	4	19-0404	Royal Golden/PI307609:F2-233	2
19-0289	Royal Golden/PI307609:F2-094	3	19-0405	Royal Golden/PI307609:F2-235	4
19-0290	Royal Golden/PI307609:F2-095	5	19-0406	Royal Golden/PI307609:F2-236	1
19-0291	Royal Golden/PI307609:F2-096	5	19-0407	Royal Golden/PI307609:F2-237	4
19-0292	Royal Golden/PI307609:F2-097	4	19-0408	Royal Golden/PI307609:F2-239	3
19-0293	Royal Golden/PI307609:F2-098	2	19-0409	Royal Golden/PI307609:F2-240	6
19-0294	Royal Golden/PI307609:F2-099	4	19-0410	Royal Golden/PI307609:F2-241	4
19-0295	Royal Golden/PI307609:F2-100	2	19-0411	Royal Golden/PI307609:F2-242	2
19-0296	Royal Golden/PI307609:F2-101	1	19-0412	Royal Golden/PI307609:F2-246	4
19-0297	Royal Golden/PI307609:F2-102	3	19-0413	Royal Golden/PI307609:F2-247	3
19-0298	Royal Golden/PI307609:F2-103	3	19-0414	Royal Golden/PI307609:F2-248	1
19-0299	Royal Golden/PI307609:F2-104	4	19-0415	Royal Golden/PI307609:F2-252	6
19-0300	Royal Golden/PI307609:F2-105	5	19-0416	Royal Golden/PI307609:F2-254	1
19-0301	Royal Golden/PI307609:F2-106	4	19-0417	Royal Golden/PI307609:F2-255	3
19-0302	Royal Golden/PI307609:F2-108	4	19-0418	Royal Golden/PI307609:F2-256	3
19-0303	Royal Golden/PI307609:F2-109	5	19-0419	Royal Golden/PI307609:F2-258	4
19-0304	Royal Golden/PI307609:F2-111	4	19-0420	Royal Golden/PI307609:F2-259	4
19-0305	Royal Golden/PI307609:F2-112	4	19-0421	Royal Golden/PI307609:F2-260	5
19-0306	Royal Golden/PI307609:F2-113	1	19-0422	Royal Golden/PI307609:F2-262	3
19-0307	Royal Golden/PI307609:F2-114	3	19-0423	Royal Golden/PI307609:F2-263	5
19-0308	Royal Golden/PI307609:F2-115	2	19-0424	Royal Golden/PI307609:F2-264	5
19-0309	Royal Golden/PI307609:F2-116	2	19-0425	Royal Golden/PI307609:F2-266	2
19-0310	Royal Golden/PI307609:F2-117	2	19-0426	Royal Golden/PI307609:F2-267	5
19-0311	Royal Golden/PI307609:F2-120	1	19-0427	Royal Golden/PI307609:F2-268	4
19-0312	Royal Golden/PI307609:F2-121	5	19-0428	Royal Golden/PI307609:F2-269	4
19-0313	Royal Golden/PI307609:F2-123	5	19-0429	Royal Golden/PI307609:F2-270	3

19-0314	Royal Golden/PI307609:F2-124	5	19-0430	Royal Golden/PI307609:F2-272	2
19-0315	Royal Golden/PI307609:F2-126	5	19-0431	Royal Golden/PI307609:F2-273	4
19-0316	Royal Golden/PI307609:F2-128	3	19-0432	Royal Golden/PI307609:F2-274	1
19-0317	Royal Golden/PI307609:F2-129	3	19-0433	Royal Golden/PI307609:F2-275	2
19-0318	Royal Golden/PI307609:F2-130	4	19-0434	Royal Golden/PI307609:F2-276	1
19-0319	Royal Golden/PI307609:F2-132	2	19-0435	Royal Golden/PI307609:F2-278	3
19-0320	Royal Golden/PI307609:F2-133	5	19-0436	Royal Golden/PI307609:F2-279	1
19-0321	Royal Golden/PI307609:F2-134	4	19-0437	Royal Golden/PI307609:F2-281	4
19-0322	Royal Golden/PI307609:F2-135	4	19-0438	Royal Golden/PI307609:F2-284	5
19-0323	Royal Golden/PI307609:F2-137	6	19-0439	Royal Golden/PI307609:F2-287	4
19-0324	Royal Golden/PI307609:F2-140	3	19-0440	Royal Golden/PI307609:F2-288	4
19-0325	Royal Golden/PI307609:F2-141	5	19-0441	Royal Golden/PI307609:F2-289	4
19-0326	Royal Golden/PI307609:F2-142	1	19-0442	Royal Golden/PI307609:F2-290	2
19-0327	Royal Golden/PI307609:F2-144	4	19-0443	Royal Golden/PI307609:F2-292	4
19-0328	Royal Golden/PI307609:F2-145	4	19-0444	Royal Golden/PI307609:F2-293	5
19-0329	Royal Golden/PI307609:F2-146	3	19-0445	Royal Golden/PI307609:F2-295	3
19-0330	Royal Golden/PI307609:F2-147	1	19-0446	Royal Golden/PI307609:F2-296	6
19-0331	Royal Golden/PI307609:F2-148	1	19-0447	Royal Golden/PI307609:F2-297	4
19-0332	Royal Golden/PI307609:F2-149	3	19-0448	Royal Golden/PI307609:F2-299	3
19-0333	Royal Golden/PI307609:F2-150	3	19-0449	Royal Golden/PI307609:F2-301	4
19-0334	Royal Golden/PI307609:F2-151	5	19-0450	Royal Golden/PI307609:F2-302	3

○ BSA-seq NGS를 활용한 분자마커 개발

Royal Golden(P1), PI307609(P2) re-sequencing

- Royal Golden(P1)과 PI307609(P2)의 염기서열을 분석하기 위해 re-sequencing을 진행하였음. 각 DNA를 5ug씩 준비하여 QC(Quality control)를 통해 NGS grade임을 확인한 후 Novaseq 6000(Illumina, USA)을 이용하여 101bp의 read length를 이용하여, PI307609의 total read bases 152,975,366bp, Royal Golden 165,219,454bp의 약 35X read depth를 기준으로 진행하였으며 read type은 pair-end로 수행하였음. sequencing을 통해 얻은 서열을 trimming과 filtering 과정을 거쳐 얻은 FASTA, FASTAQ data를 가지고 Cucurbit Genomics Database(<http://cucurbitgenomics.org>)의 수박 draft genome 97103의 서열 version 2에 alignment 하여 비교분석을 하였고 Contig 와 scaffold를 확보한 후 SNP variants를 확보하였음.

The total number of bases, reads, GC (%), Q20 (%), and Q30 (%) are calculated for the 2 samples. For example, in PI307609, 152,975,366 reads are produced, and total read bases are 15.5G bp. The GC content (%) is 36.13% and Q30 is 92.37%.

Table 1. Raw data Stats (maximum 20 samples)

Sample ID	Total read bases (bp)	Total reads	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
PI307609	15,450,511,966	152,975,366	36.13	63.87	97.34	92.37
Royal_Golden	16,687,164,854	165,219,454	36.68	63.32	97.29	92.44

- Sample ID : Sample name.
- Total read bases : Total number of bases sequenced.
- Total reads : Total number of reads. For Illumina paired-end sequencing, this value refers to the sum of read 1 and read 2.
- GC(%) : GC content.
- AT(%) : AT content.
- Q20(%) : Ratio of bases that have phred quality score of over 20.
- Q30(%) : Ratio of bases that have phred quality score of over 30.

그림 2.85. Royal Golden(P1), PI307609(P2) re-sequencing 결과

BSA-seq NGS sequencing

- Bulked-segregant analysis(BSA)를 위해 F2 분리집단에서 양 극치의 표현형을 보이는 개체들을 선발하고, 고순도의 DNA를 추출하여 각 DNA를 두 가지의 표현형으로 구별한 후 표현형별 각각의 DNA pooling을 진행하였음. 흰 종피색을 가지는 1점짜리의 개체 16개의 SC-W pool과 붉은 종피색을 가지는 8개의 개체에서 F2 8개체, F3 8개체의 SC-R pool을 동량으로 DNA pool을 제작하였음.
- 앞서 F2와 F3 분리집단에서 제작한 SC-W pool과 SC-R pool도 마찬가지로 각 DNA를 5ug 씩 준비하여 QC(Quality control)를 통해 NGS grade임을 확인한 후 Novaseq 6000(Illumina, USA)을 이용하여 101bp의 read length를 이용하여 Total read bases RoyalGolden Pool 15,529,221,670bp, PI307609 pool 15,164,217,770bp의 약 35X read depth를 기준으로 진행하였으며 read type은 pair-end로 수행하였음. sequencing을 통해 얻은 서열을 trimming과 filtering 과정을 거쳐 얻은 FASTA, FASTAQ data를 가지고 Cucurbit Genomics Database(<http://cucurbitgenomics.org>)의 수박 draft genome 97103의 서열 version 2에 alignment 하여 비교분석을 하였고 Contig 와 scaffold를 확보한 후 SNP variants를 확보하였음.

The total number of bases, reads, GC (%), Q20 (%), and Q30 (%) are calculated for the 2 samples. For example, in RoyalGoldenpool, 153,754,670 reads are produced, and total read bases are 15.5G bp. The GC content (%) is 36.09% and Q30 is 94.09%.

Table 1. Raw data Stats (maximum 20 samples)

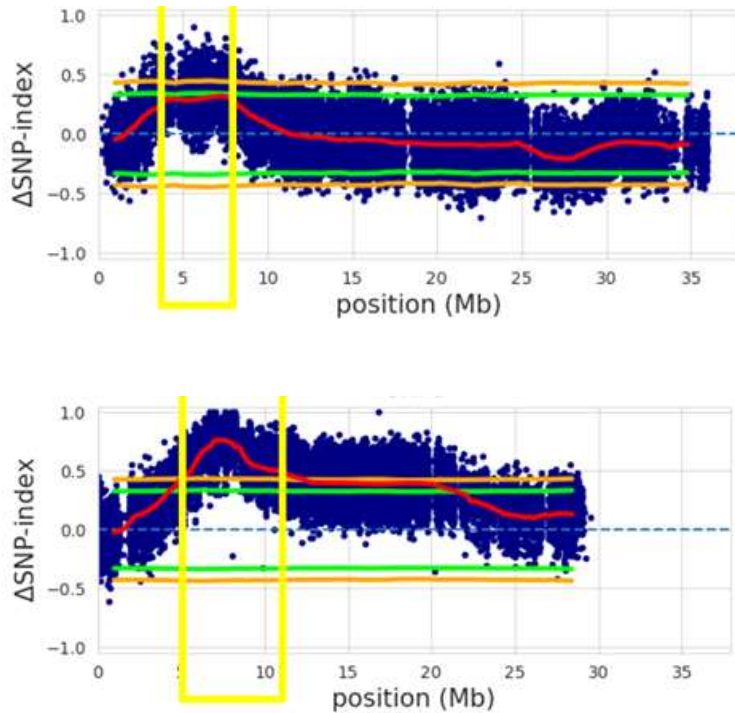
Sample ID	Total read bases (bp)	Total reads	GC(%)	AT(%)	Q20(%)	Q30(%)
RoyalGoldenpool	15,529,221,670	153,754,670	36.09	63.91	97.9	94.09
PI307609pool	15,164,217,770	150,140,770	35.6	64.4	97.65	93.41

- Sample ID : Sample name.
- Total read bases : Total number of bases sequenced.
- Total reads : Total number of reads. For Illumina paired-end sequencing, this value refers to the sum of read 1 and read 2.
- GC(%) : GC content.
- AT(%) : AT content.
- Q20(%) : Ratio of bases that have phred quality score of over 20.
- Q30(%) : Ratio of bases that have phred quality score of over 30.

그림 2.86. BSA-seq NGS sequencing 결과

- sequencing을 통해 얻은 서열을 program Bowtie2 2.3.5.1을 이용하여 정렬하였고, GATK(Genome Analysis Toolkit)를 통하여 도출된 서열과 수박 품종 SBA의 BAM file을 만들어내어, 생산된 BAM file로 read들을 mapping 한 후 VCF(Variant Call Format) 파일을 얻었다.
- SC-R과 SC-W에서 BSA-NGS를 수행하여 얻은 VCF 파일로 QTLseqr tools을 이용하여 Δ SNP index 값을 구하였음.
- Sliding Window 기법으로 Δ SNP index 값을 계산한 후, R script에서 신뢰구간 및 유의수준의 통계적 옵션을 주어 수박 종피색에 관여하는 유전자좌를 분석하고 신뢰구간 95%와 99%에 따라 시각화를 위해 ggplot2로 표현하였음.

BSA-seq NGS sequencing 결과



- 그래프에서 신뢰구간 95% threshold에 가까운 피크를 보인 영역에서 피크지역 주변의 83개의 primer를 설계하였음.

BSA-seq NGS sequencing 기준 수박 종피색 primer 제작

- 실험에 사용된 primer의 염기서열 정보는 International Cucurbit Genomics Initiative database(ICuGI, <http://www.icugi.org>)에 공시된 수박 '97103' reference genome을 토대로 총 83개의 primer set을 합성(Bioneer, daejeon, Korea)하였음.
- 합성된 primer 중 HRM 분석에서 모 부분과 자손 간 다형성(polymorphism)을 보이는 primer set을 선발하였음. 선발된 primer set을 이용하여 F2, F2:3 DNA에 대해 HRM 검정을 진행하였음.

표 2.44. BSA-seq NGS sequencing 기준 수박 종피색 primer서열

No	Marker	Primer_F	mer	Primer_R	mer
1	SC_HRM_01	CGTGTGAGGCTTTTGATTGT	20	TGCCAACTAAGACCCAAATG	20
2	SC_HRM_02	TAGATTGAGGCAGGGGTGTT	20	AAGTTCGGAGTTGGTTTGGTT	21
3	SC_HRM_03	CGTAGGTAATTGCACCAACAA	21	GATGAGGATCGAACTTCCAA	20
4	SC_HRM_04	CCCATATCATTTAGAAAGTTGCAATA	26	AAGCTCGAAAACATTGACTTTT	22
5	SC_HRM_05	GAGCAACGTCCTTCCCTAAG	20	TGTTTTGAAACGGGTGTTGT	20
6	SC_HRM_06	AACTGAAGGTCTCCGGTTC	20	TTCGTTTTAATTCGGGTAAATG	23
7	SC_HRM_07	CCCGAAATTAACGAAAAAGA	22	CAAATGTCAAACAATTAACAAAAAG	25
8	SC_HRM_08	CTCGAAATTTTAAACAAAATAAAGTG	27	TTTTCATTTTAGGACGGGTTT	21
9	SC_HRM_09	TAGAACTTACAAGTAGCGTTTACAAG	27	GCCAGATAGTAGACATAAAATTGAAA	26

No	Marker	Primer_F	mer	Primer_R	mer
10	SC_HRM_10	AGAATCTTAAGCTTTCATTTTATGTC	27	AAGAATGAATTTGATGTTTTATGGAA	26
11	SC_HRM_11	TTCCCTTCTACTCTCATGTTTTACA	26	ATGGTTAAGAAAGGCTTAAAAGAA	24
12	SC_HRM_12	TCCCCTCAAACATACTAAGACGA	23	TGAGGGTTGTTTCCAAAAAT	20
13	SC_HRM_13	TGTTTCATGTTGTTTACATAGTGCAT	26	GCGATTCCAGGCCTATTACGA	20
14	SC_HRM_14	TGTTTCAGGACGACATTCAAA	21	TGAAAATTCACACAGAGTGGACA	23
15	SC_HRM_15	CTGATTCGGTTCATTGCTCA	20	TCAAATCCACAGAGAATCATCG	22
16	SC_HRM_16	GCCAAAACAAATAACTGAAAAGAAA	25	TGAAATTTAACACAAACCTAATAGGAA	27
17	SC_HRM_17	TTGATAGACATTAACACTATTGACGAA	27	TTTGTTTCAATTTGGTCGGTAA	22
18	SC_HRM_18	AAGCCTAACCCGCCATAAGT	20	GGCGATTTCTTTGGTTCGTA	20
19	SC_HRM_19	GACCAAATCATTGGGGATTG	20	ATCCAAATACCCGATTGGA	20
20	SC_HRM_20	CCCATTTTCTCGGATTTT	20	GCATTTCTTGTAATCGGTCCT	22
21	SC_HRM_21	AAAAAGAGGGTTGGTGAATTG	21	CCACAATTCATTTATTCACTCATAGA	26
22	SC_HRM_22	TGAATGTTTTAAGCACAAAAATCG	24	AAGTTTGGCCATAAACTTCTAA	23
23	SC_HRM_23	TGAACAAAAATTGAGAAACAAAACA	25	CCGGTCGAATTCAAACTCAT	20
24	SC_HRM_24	TGATCAAATTTCTAGATTACACAAGAC	27	AACGGTATGAACCTTCAATTATAGG	25
25	SC_HRM_25	CACCATCAGATTGGAGAGTCAA	22	CCTCTCGTTTGAGGAGGGATA	21
26	SC_HRM_26	CATGGATCAAGTTAAGTAAATAGCC	26	TACACAAAGTGAGCCGCATC	20
27	SC_HRM_27	CATGAGACACTAGCGACGTGA	21	CAAATTCACGAGACCCCATATA	21
28	SC_HRM_28	GAAAACCCAAAAGAAAAGGAAA	23	GGAAAATCGCTGGAGAAGAA	20
29	SC_HRM_29	TTAAATGTCCACTAACCAAGTTTGC	24	CAAACCTACATACATCTCTATGCATCC	26
30	SC_HRM_30	AGTTTGACCCCCAATCACAT	20	TTTGTAGGCTTATGCATAGTTTGTG	25
31	SC_HRM_31	AGAGTGCATAAATTGAATCACCA	23	TGAAGTCATAAAGGACGAAGACA	23
32	SC_HRM_32	TTTTCTGTATTTGAAAAGAGCCTA	25	AGGTTAGTTCATGATTACCTAAAA	25
33	SC_HRM_33	GGAACGAAATACCAACCTTTTG	22	TGAAATCGGTTTCCACAAGC	20
34	SC_HRM_34	AGGTTGATAGAGCGTATGTTGTT	23	AAACTCCGTTAATTTGAGAGGA	22
35	SC_HRM_35	CGTTCCTAGTCGAGTGGGTGT	21	GCATAAGATCGAACAAAACCTCCA	23
36	SC_HRM_36	CATTGTCTGGCTAAAGAAACCA	22	TGTCAATAGTTTCTACCATAGCATAAC	27
37	SC_HRM_37	GGAAGGAAAGTTGTCCACACA	20	TCCACCACTACCACACTTTGA	21
38	SC_HRM_38	TCGTTGATAAGTATATTCAGGTGGA	25	ACCTTGGGTCTTGAATTTGC	20
39	SC_HRM_39	CATGACGGGATGTCAGTCAG	20	AAACACCAGGATCCATAAAACG	22
40	SC_HRM_40	GGAATGTGAAGGCACTCGAT	20	GTGAGCCTAAAGCCCAGTGA	20
41	SC_HRM_41	CAAAGGCAGCTCTTTTACCC	21	CATGCCCTTGAGAAAAGAAATAGTG	24
42	SC_HRM_42	TCCAGAAAAATCATGCTCAAA	21	TGAGCTTCACTTCACCTCAAC	21
43	SC_HRM_43	GAAAGGCAACAACCTCAACGTC	21	TGGATCCAAAGACGAGAGAAG	21
44	SC_HRM_44	GTTCTGAACGCAGTCTTTGG	20	TTGGCCAACCTTAAAGGTGCT	20
45	SC_HRM_45	CATTTGGGGATTGGTGAAG	20	CGGTCTTCAAGCCGAAGTAG	20
46	SC_HRM_46	AATCCGGAGTTGTTGAAGGA	20	GATACTCCGCGTAGCAGA	20
47	SC_HRM_47	TGGCAATGGATGAGTAGGAA	20	GGTCCCTCAGCCATGACTAC	20
48	SC_HRM_48	GTTTTTGCCGCATATTGGAC	20	AAAGGCAGTATTGTTGTGGACT	22
49	SC_HRM_49	CACAAACAACCCGTTTCTCA	20	GACATCCCTGGCAAGAAAA	20
50	SC_HRM_50	TGTCGAACGTGCAACTTTTT	20	AACTTGAATGGGTCCACAA	20

No	Marker	Primer_F	mer	Primer_R	mer
51	SC_HRM_51	TTTCGAAACGGATGGTTAGG	20	TGATGGGTATCGATGTGAAGTT	22
52	SC_HRM_52	AGGCGAAGGTTCTCTCTTC	20	TGAAAGATTGGTTAATGGAAACC	23
53	SC_HRM_53	CATCGGATGAGACATCCTTTT	21	GCTGAAACAAGGTGATGTTGAA	22
54	SC_HRM_54	ATGCTCCCATTTCCATTCAG	20	TTATGCAATGCACCCTGGTA	20
55	SC_HRM_55	AAAGTGTGCAAACAACTCTCT	22	TCCAGGAAAGGCTAATGTGG	20
56	SC_HRM_56	CGACACCTTTCTCCGTACAAG	21	CATCGAGGCAGCTGAAGAAG	20
57	SC_HRM_57	ACGGTCAAGCCAAAATTCAC	20	TTGGATTGACAAATGCTCCA	20
58	SC_HRM_58	CCCACGGTGACACACTAACA	20	GTGGCGTCGAAACATTGAG	19
59	SC_HRM_59	GACCAAAAGATCAAACTGAGC	22	TGCATTGAAACGACTTTTGC	20
60	SC_HRM_60	CCCAACTCTTGCGTATTAGC	20	GCCTGAAGGAATCACTTTCG	20
61	SC_HRM_61	TCCTCGATGTGATTGTGTTGA	21	TTTTGTGCGTTTATGCCTCA	20
62	SC_HRM_62	ATCCCCATTACCCGAAAAGA	20	CACTGAGCCGTTAGCTCATT	21
63	SC_HRM_63	AGCACCCAAAAGCTTTCTCA	20	CGGGTGGTTGTTTTCACTTT	20
64	SC_HRM_64	TAAACCATGCTTGGGTGGAC	20	GGCCATAAAAATCTCGCATT	20
65	SC_HRM_65	CGGCCACATTGTATTTGAT	20	TGGTCTTATGCAAACCTATTGC	22
66	SC_HRM_66	CCCCAATTTTGTGGGATAAG	20	TCTGGCCAATGAAAGGGTAG	20
67	SC_HRM_67	AGTGGAGTGACGCGGTAGTT	20	TTCCACATTTCTCTCGTCCA	20
68	SC_HRM_68	TCTTAATTGGGCAGCTTGG	20	CCCACACCAGACACCTACAT	20
69	SC_HRM_69	TGATTGGAATCCCTCAAAGG	20	GCAGCTTTTAAACTGGGAATTG	20
70	SC_HRM_70	CAATTTTGGTTCTTATAGTTTTGTTT	27	TCTGACTAAAAATGCGCAGAA	21
71	SC_HRM_71	TTTGATTTGCATGGGTGAAA	20	AGACCCAAAGTCGCTGCTTA	20
72	SC_HRM_72	TGCATCACTTTCACTGCAAC	20	GCGATGTGAGTCAACAACCA	20
73	SC_HRM_73	GCTCATCACATAACATGCCATA	22	GAAATTCCEAAGACCTTTACGA	22
74	SC_HRM_74	CGAAATTCTCAAATCTCCATCC	22	CTCGCTCAAGTCTCGCTTCT	20
75	SC_HRM_75	CCCACCTTCAATTCTCCTACC	21	CAATGTAACGACCCCAAACC	20
76	SC_HRM_76	GACAAAAACCGGTGGAAAAA	20	CCGCATTGAAGAAAGAAACC	20
77	SC_HRM_77	ACCTTCAGCATTCCTTGCAG	20	AAGCCGCATAAGAGAGGTTT	20
78	SC_HRM_78	GTAGGCTACGGTGCAAGCTC	20	TGAGGGAAACACTATGATTGTCA	23
79	SC_HRM_79	CAATTTTGTGTATAACGTAACCTTCC	26	TGAAAAATCGGTTGTTGAAAA	21
80	SC_HRM_80	AAGTTCAATGTATCAAGCCTTTTT	24	TGTGCTTGGATCATCTAGTGAAA	23
81	SC_HRM_81	AAGTGGAGGAAGCAATTGACA	21	GCTTCAACATGCTTGTATCTGC	22
82	SC_HRM_82	GCCACGGGACAAATAGAGAT	20	GACGGAGAAGCTCCATGAAA	20
83	SC_HRM_83	TTTTGCTTGTATGGGGAAAAC	20	CATGTTTTCGATGGATCAAC	20

모 부분과 F1, F2 분리집단 표현형 검정 결과

- 모 부분과 F1, F2 분리집단에서 종피의 색상을 시각적으로 판단하여 붉은 정도에 따라 1점 부터 6점까지 가장 하얀 종피에 1점, 가장 붉은 종피에 6점을 부여하였음.
- 모든 Royal Golden 개체들은 1점의 표현형을 보였고, 모든 PI307609 개체들은 6점의 표현형을 보임.
- F1 분리집단 종자 표현형의 경우 모두 4점 정도에 해당하는 황갈색을 나타내었음.

- F2의 종피색 표현형, 즉 F3의 종자는 6점 8개체, 5점 43개체, 4점 83개체, 3점 41개체, 2점 27개체, 1점 25개체로 분리하였음.



그림 2.87. F2 분리집단 종피색 표현형 검정 분포도

BSA-seq NGS결과 기반 HRM genotyping 결과

- 작성한 primer 중 모 부분인 Royal Golden, PI307609와 이 둘을 교배한 F1 집단에서 melting curve가 각각 구분이 가능한 32개 primer를 선발하여 HRM 분석에 사용하였음. HRM 분석을 위해서 LightCycler® 96 system(Roche Life Science, USA)을 사용하였으며, 실험방법 및 시약 조성은 LightCycler® 96 system에서 제공하는 매뉴얼 기반으로 실험을 수행하였음.
- F2 분리집단의 표현형과 HRM 결과가 상당히 불일치하는 결과를 확인 할 수 있었는데, 이는 F2 분리집단에서 양 극치의 표현형을 보이는 빨간 종피색을 띄는 개체의 DNA를 pooling 할 때, 부분(PI307609)과 같이 고명도의 붉은 색을 보이는 개체가 전체 227개 중 8개로 나타났음. 이는 해당 표현형 검정을 진행할 당시, 태국에서 종자를 수확하여 건조된 종자를 받아 표현형 검정을 진행하였기 때문에 건조 후 종피색이 건조됨에 따라 탁해지고, 태국에서 수확당시 숙기가 일정하지 않았을 것이라 예상하였음. 또한 특정 종자의 경우 숙기에 따라 갈색을 띄는 경우가 있다고 보고된 바 있음(Paudel, 2019).

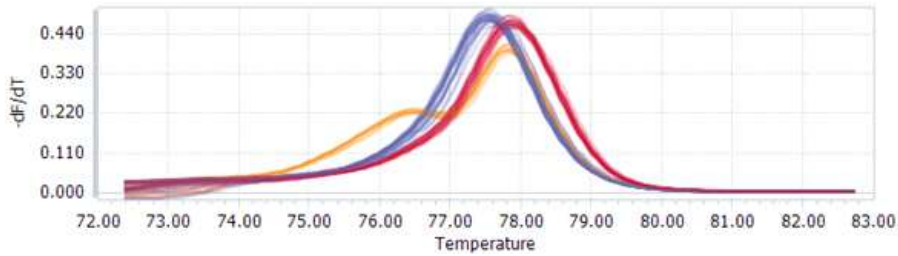


그림 2.88. 수박 F2 집단에서 연관분자마커 (RC-670)의 HRM 결과

표 2.45. 수박 F2 집단에서의 종피색 연관분자마커 개발 결과

SNP location	SC_HRM_61	SC_HRM_62	SC_HRM_64	SC_HRM_66	SC_HRM_67	SC_HRM_68
SNP	T>C	T>C	T>C	A>G	A>C	C>T
Primer name	RC-604	RC-654	RC-670	RC-356	RC-442	RC-586
Rate of cosegregation	95%	98%	98%	96%	96%	94%

- 상기 결과로 적색/흰색 종피색을 결정하는 종피 착색에 연관된 마커를 개발할 수 있었으며, 1세부과제의 씨작은 적색종피용 수박품종 개발에 활용할 수 있을 것으로 기대함.

10. 절성 연관 분자마커

1) 암꽃 절성 핵심소재 선발 및 양성

- 암꽃절성이 높은 경우 교배시기의 용이성, 재배시 소형과의 다수확, 이른 수확시기에 따른 수입 창출 등 많은 장점이 있는 경제적인 형질임.
- 2차년도 실험의 경우 박을 대목으로 하여 수박을 접붙이기 할 경우, 대목과 접수의 사이에서 많은 겹마디가 생기기 때문에 마디수에 따른 절성표현형을 확인하기 어려운 문제가 있었음.
- 3차년도에는 접목을 수행하지 않은 무접목 수박묘의 형태학적 특징에 기반을 두어 표현형 검정을 실시함.
- 표현형 검정방법은 각 마디 수에 출현하는 암꽃 개수를 수치화 하였으며, 2가지 기준을 이용하여 암꽃 절성의 정도를 평가함. 첫 번째 방법은 전체 마디수를 기준으로 절성의 정도를 측정하였으며, 두 번째 방법은 육종현장에서 첫 번째 수정을 시도하는 마디수를 기준으로 절성의 정도를 평가함.
- 표현형 검정 결과 7일에서 2~3일로 단축되는 절성이 높은 계통을 확보하였으며, 해당 계통을 이용하여, 분리집단의 표현형 검정을 수행.

- 검정결과 절성이 짧은 개체는 전체 마디수를 기준으로 평균 2.7마디마다 암꽃이 발견되었으며, 첫 번째 수정 시점을 기준으로 했을 때 평균 2.8 마디마다 암꽃이 발견되었으며, 한 마디에 암꽃이 동시에 피거나, 암, 수꽃이 동시에 피는 경우도 있음.
- 암꽃 절성의 경우 환경 변화에 많은 영향을 받는 것으로 보여지며, 정확한 표현형 검정을 위해, 시기 별, 년차 반복을 통해 신뢰할 수 있는 표현형 결과를 도출하는 것이 바람직한 것으로 판단되며, 연차별 실험이 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료됨.

표 2.46. 정상계통과 절성이 강한 계통을 이용한 표현형 검정 결과

계통명	개체번호	전체마디수	첫번째 마디를 뺀 전체 마디수	10번째 마디를 뺀 전체마디수
Normal	1	5.0	3.7	3.6
	2	4.6	3.8	3.4
	3	4.5	3.4	3.3
	4	5.5	4.0	3.8
	5	5.2	3.5	3.5
	6	5.3	3.9	3.9
	평균	5.0	3.7	3.6

절성	개체번호	전체마디수	첫번째 마디를 뺀 전체 마디수	10번째 마디를 뺀 전체마디수
	1	3.0	2.2	2.1
	2	3.3	2.3	2.4
	3	3.2	2.4	2.3
	4	3.9	3.1	2.9
	5	3.1	2.1	2.1
	6	3.5	2.8	2.6
	평균	3.3	2.5	2.4

F1	개체번호	전체마디수	첫번째 마디를 뺀 전체 마디수	10번째 마디를 뺀 전체마디수
	1	4.7	4.1	3.6
	2	5.3	4.7	4.2
	3	4.9	4.3	3.8
	4	3.6	2.7	2.6
	5	3.9	2.8	2.6
	6	3.8	3.2	3.1
	평균	4.4	3.6	3.3

BC1P1(normal)	개체번호	전체마디수	첫번째 마디를 뺀 전체 마디수	10번째 마디를 뺀 전체마디수
	1	4	4	2.75
	2	5.3	4.3	4.2
	3	3.5	3.5	2.3
	4	4.3	4.3	3.0
	5	4.4	4.4	3.0
6		고사		
	7	4.6	4.6	3.1
	8	5.5	4.4	4.3
	9	4.0	3.4	3.0
	10	3.7	2.6	2.3
	11	4.6	4.0	3.4
	12	4.4	3.8	3.4
	13	3.7	3.7	2.3
	14	5.4	4.4	4.1
	15	4.3	3.3	3.2
	16	4.2	3.7	3.3
	17	5.0	3.7	3.6
	18	4.0	3.6	3.0
	19	5.6	4.4	4.4
	20	5.3	4.4	4.2
	21	4.0	3.6	2.9
	22	5.1	4.6	4.0
	23	4.3	3.3	3.2
	24	3.6	3.2	2.7
	25	4.9	3.8	3.8
	26	4.1	3.6	3.1
	27	5.8	4.5	4.5
	28	4.5	4.0	3.5
	29	4.9	4.3	3.8
	30	4.7	4.1	3.6
	31	4.0	3.5	3.0
	32	4.9	3.9	3.6
	33	5.3	4.1	4.0
	34	4.1	3.7	3.2
	35	5.9	4.6	4.4
	36	4.8	4.0	3.5
	37	5.1	3.9	3.7
	38	4.6	4.0	3.6
	39	4.6	3.9	3.1
	40	4.1	3.3	3.0
	평균	4.8	3.9	3.6

BC1P2(절성)	개체번호	전체마디수	첫번째 마디를 뺀 전체 마디수	10번째 마디를 뺀 전체마디수
	1	3.4	1.9	2.1
	2	3.4	3.0	2.6
	3	3.7	3.2	2.8
	4	3.4	3.1	2.7
	5	3.3	2.9	2.6
	6	3.3	2.8	2.4
	7	4.3	3.8	3.3
	8	3.4	2.8	2.5
	9	4.9	3.9	3.9
	10	3.5	3.0	2.7
	11	3.6	3.2	2.9
	12	3.5	3.0	2.7
	13	4.0	3.5	3.0
	14	4.4	3.6	3.5
	15	3.3	2.9	2.5
	16	5.3	3.9	4.0
	17	3.3	2.9	2.5
	18	4.1	3.2	3.2
	19	4.1	4.1	2.7
	20	3.6	2.8	2.7
	21	3.5	3.0	2.7
	22	2.9	2.3	2.1
	23	3.8	3.2	2.9
	24	4.0	3.5	3.1
	25	3.5	3.0	2.7
	26	3.9	3.3	3.1
	27	3.3	2.9	2.4
	28	3.7	3.2	2.9
	29	4.2	3.3	3.2
	30	3.6	3.3	2.9
	31	3.6	3.2	2.8
	32	3.2	2.6	2.5
	33	3.5	2.8	2.6
	34	3.9	3.1	3.0
	35	3.2	2.9	2.6
	36	3.7	2.9	2.8
	37	3.8	3.1	2.8
	38	3.7	3.2	2.8
	39	2.6	2.6	1.4
	40	3.0	2.5	2.1
	평균	3.3	2.9	2.4

○ 마커개발 진행

- 전체마디 기준의 암꽃의 빈도, 15번째 마디 이후의 암꽃의 빈도의 각 기준의 양극치의 F2 개체를 선발하여, 각각의 DNA pool을 만들어, BSA-NGS 분석을 진행.

- 연차별 환경변이에 따른 반복 실험을 통해 분리집단의 표현형검정 후, 분석방법을 확립하고자 하였음.

표 2.47. 정상계통과 절성이 강한 계통을 이용한 모부분 표현형 검정 결과

계통명	개체번호	전체마디의 암꽃 빈도	15번째 마디부터의 암꽃빈도	계통명	개체번호	전체마디의 암꽃 빈도	15번째 마디부터의 암꽃빈도
정상	1	5.0	4.3	절성	1	2.9	2.2
	2	5.6	5.0		2	3.4	2.9
	3	5.6	5.0		3	3.2	2.6
	4	5.4	4.9		4	3.2	3.4
	5	5.0	5.0		5	2.8	2.6
	6	5.2	5.3		6	2.9	3.6
	7	4.7	5.3		7	2.8	3.0
	8	4.7	4.6		8	3.0	2.7
	9	4.6	4.4	평균	3.03	2.88	
	10	5.2	4.6				
평균	5.10	4.84					

표 2.48. 정상계통과 절성이 강한 계통을 이용한 F1 표현형 검정 결과

계통명	개체번호	전체마디의 암꽃 빈도	15번째 마디부터의 암꽃빈도
F1	1	3.3	4
	2	3.8	3.9
	3	3.1	2.8
	4	3.7	3.6
	5	4.4	4.13
	6	6.3	3.83
	7	3.9	4.00
	8	5.1	5.14
	10	3.7	3.67
	11	3.8	3.89
	12	4.7	4.57
	13	3.7	4.13
	평균	4.13	3.97

표 2.49. 정상계통과 절성이 강한 계통을 이용한 F2 표현형 검정 결과

계통명 : F2 No	전체마디의 암꽃 빈도	15번째 마디부터의 암꽃빈도
1	4.60	4.43
2	4.78	4.67
3	3.67	3.63
4	3.92	4.00
5	2.75	2.64
6	4.09	4.29
7	4.00	4.20
8	4.64	5.14
9	3.83	4.43
10	3.57	3.89
11	3.06	3.40
12	2.88	2.83
13	3.75	3.33
14	3.06	2.83

계통명 : F2 No	전체마디의 암꽃 빈도	15번째 마디부터의 암꽃빈도
15	3.36	2.91
16	4.18	4.43
17	3.80	3.83
18	3.92	4.57
19	3.64	3.13
20	3.07	3.10
21	3.83	3.44
22	3.46	3.33
23	3.93	5.00
24	4.10	3.71
25	3.60	2.63
26	4.09	4.29
27	3.46	3.33
28	3.14	3.63
29	4.40	4.14
30	3.31	4.00
31	3.62	4.57
32	4.36	4.71
33	3.38	3.22
34	3.83	3.44
35	4.70	4.57
36	3.29	3.88
37	3.91	3.50
38	4.00	4.13
39	3.29	3.88
40	4.33	3.43
41	3.15	2.89
42	3.83	4.43
43	3.21	3.33
44	4.18	3.88
45	3.15	3.25
46	2.87	3.11
47	3.23	3.86
48	3.29	3.44
49	3.54	4.43
50	4.60	3.88
51	3.00	3.86
52	4.33	3.43
53	3.38	3.22
54	3.67	3.63
55	2.87	3.11
56	3.67	3.63
57	3.75	4.29
58	3.58	3.11
59	3.62	3.56
60	3.82	3.38
61	3.91	4.00
62	3.14	3.22
63	3.91	3.50
64	3.25	3.43
65	2.75	2.90
66	2.80	2.70
67	2.18	2.44
68	3.91	4.00
69	3.70	3.14
70	3.42	3.71
71	3.00	3.75

계통명 : F2 No	전체마디의 암꽃 빈도	15번째 마디부터의 암꽃빈도
72	3.42	3.25
73	2.81	3.00
74	3.54	4.43
75	3.82	3.38
76	3.64	3.57
77	3.42	3.71
78	2.86	3.13
79	3.45	3.29
80	3.80	3.83
81	3.23	3.38
82	3.50	3.38
83	3.82	3.00
84	3.42	3.25
85	3.29	3.44
86	3.58	3.50
87	3.46	3.33
88	3.70	3.67
89	3.82	3.86
90	3.73	3.71
91	2.75	3.22
92	3.00	3.00
93	2.67	2.25
94	3.14	3.63
95	4.00	4.14
96	3.50	3.38
97	3.67	3.63
98	4.09	4.29
99	3.00	3.00
100	3.33	3.13
101	3.91	4.00
102	3.21	3.33
103	4.50	3.75
104	3.73	3.71
105	4.38	2.86
106	3.58	3.50
107	3.38	3.22
108	4.09	3.33
109	4.56	3.71
110	4.40	4.14
111	4.30	4.00
112	3.67	4.14
113	2.88	3.10
114	3.91	4.00
115	3.46	3.33
116	3.43	3.30
117	4.00	3.63
118	3.91	4.00
119	3.38	2.90
120	3.58	4.00
121	3.73	2.89
122	3.58	3.50
123	3.54	3.88
124	3.91	3.11
125	2.75	2.90
126	4.11	3.14
127	3.82	3.38
128	3.92	4.00

계통명 : F2 No	전체마디의 암꽃 빈도	15번째 마디부터의 암꽃빈도
129	3.58	3.50
130	3.33	3.57
131	3.55	3.43
132	3.47	3.70
133	3.46	3.33
134	3.20	3.30
135	4.30	4.00
136	4.10	3.71
137	4.00	4.14
138	3.23	3.00
139	2.69	2.80
140	3.67	3.63
141	3.14	2.90
142	3.92	3.56
143	4.18	4.43
144	2.47	2.70
145	2.71	3.10
146	3.83	2.67
147	2.94	2.67
148	4.09	4.29
149	2.40	고사
150	3.82	3.86
151	3.92	4.00
152	2.94	2.91
153	3.42	3.25
154	3.67	3.22
155	3.83	4.43
156	4.09	3.75
157	4.00	4.14
158	4.17	3.89
159	2.81	3.00
160	3.46	3.33
161	3.50	3.38
162	3.13	3.20
163	4.00	4.14
164	3.62	4.00
165	3.69	3.67
166	3.20	3.30
167	3.69	3.67
168	4.09	4.29
169	3.69	3.67
170	3.31	3.50
171	6.64	5.27
172	3.31	2.80
173	2.00	고사
174	4.00	4.14
175	3.69	3.67
176	3.58	3.50
177	4.00	3.63
178	4.00	4.14



그림 2.89 절성 표현형 검정 실시 예 대표 사진

- 암꽃 절성의 경우 환경 변화에 많은 영향을 받는 것으로 보여지며, 정확한 표현형 검정을 위해, 식물체의 재배환경, 생육단계, 숙기에 따라 민감하게 달라질 수 있으므로 표현형을 객관적이고 안정적으로 측정할 수 있는 고정계통 및 검정 프로토콜 개발과 방법의 표준설정이 요구된다. 따라서 연차별 계절별 표현형결과를 반영하여 실험을 진행해야 할 것으로 생각된다. 때문에, 3차년도에 수행한 절성이 강한 계통을 이용하여 반복적으로 표현형을 검정한 결과 3차년도에 10개체 반복들에서 균일하게 절성이 짧은 개체는 전체 마디수를 기준으로 평균 2.7마디마다 암꽃이 발견되었으며, 첫 번째 수정 시점을 기준으로 했을 때 평균 2.8 마디마다 암꽃이 발견되었던 표현형이 2020년 봄 표현형 결과 3~4마디로, 절성이 약한 표현형과 약 1마디 정도 차이나는 결과를 확인 할 수 있었다. 이후 해당 결과를 제1세부에 표현형 결과를 공유하여, 절성이 강한 계통을 3회 추가적으로 자가수분하여 이후 유전분석 및 표현형결과를 실시 하고자 하였음.
- 자가수분을 통하여 절성이 고정 된 개체를 이용한 F1, F2, BC1P1, BC1P2분리집단을 양성하여, 표현형검정 및 절성형질 마커를 개발



P1	sample name	No	2020-03-09		2020-03-12		2020-03-16		2020-03-19		2020-03-23		2020-03-26		2020-03-30		2020-04-02		2020-04-06		2020-04-09	
			날짜	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디
	질성 약함	7	16				4		4		4		5		5		4					

그림 2.90. 절성이 약한 계통 표현형 검정 결과



P1	sample name	No	2020-03-09		2020-03-12		2020-03-16		2020-03-19		2020-03-23		2020-03-26		2020-03-30		2020-04-02		2020-04-06		2020-04-09	
			날짜	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디	암꽃마디
	질성 강	8	9	3			4		3		4		3		3		3		4			

그림 2.91. 절성이 강한 계통 표현형 검정결과

- ▶ 2021년 봄, 추가적인 절성 데이터를 확보
- ▶ 최종적으로 전체 수박 염색체 중 3개의 loci를 중심으로 SNP marker를 개발함.

Line	No. of flowering node
Wild-type	5-6
Rapid_female_flowering-type	2-3

HRM primer	SNP
FF329	A > G
FF429	T > C
FF508	A > C

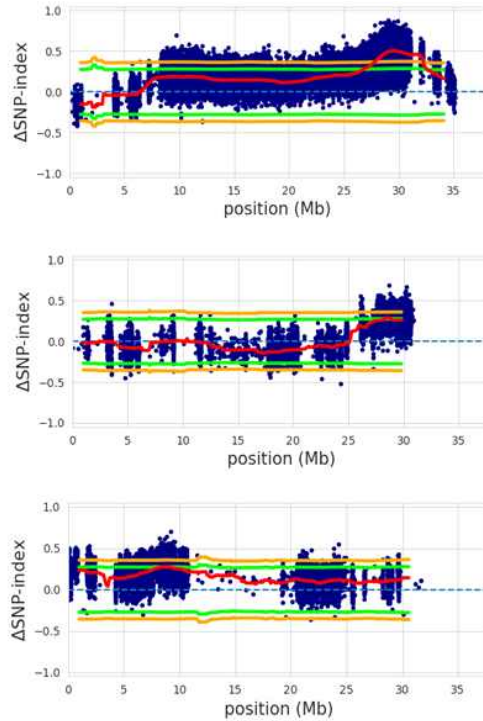


그림 2.92. 수박 암꽃절성 연관 분자마커 개발

10. 분자마커활용 MAB 여교잡

○ ZYMV 저항성 MAS 마커를 활용한 MAB 여교잡

- 복합내병성 품종개발을 위한 MABC 시스템 확립은 기본적으로 forward selection용 최근접 MAS 마커의 확립이 필요하므로, 본 연구에서는 gene marker로서 개발된 PI595203 eIF4E의 변이서열 기반으로 제작된 ZYMV 저항성 유전자마커를 MAS 마커로 활용하여 수박 MABC 시스템을 확립하고자 하였음.
- PI595203(P1: ZYMV 저항성) 및 SBB(P2: ZYMV 감수성 상업계통)을 모본 및 부분으로 하여 F1 조합을 작성하였음. PI595203의 ZYMV 저항성은 열성저항성이므로, F1개체로 BC1P2을 얻어 600개체를 대상으로 ZYMV 저항성 유전자를 갖는 (헤테로형 포함) 300개체를 선발하였음.
- Fluidigm platform을 이용하여, 284개체 BC2P2에 대한 background selection을 수행하고 20개체를 선발하여, 주관(1세부과제)에서 PI595203과 SBB에 대한 whole genome resequencing을 통해 얻어진 SNP 정보를 토대로 Fluidigm genotype system에서의 대상 SNP 96개를 선정후 육종소재 개발에 활용하였음.
- ZYMV의 저항성 유전자 존재여부와 표현형의 일치도를 검정하기 위하여 BC2P2의 selfing을 수행하여 BC2F2를 얻었으며, 최종적으로 8개체를 선발하여 1세부과제의 ZYMV 저항성 육성계통으로 활용하였음.

- 또한, 수박 MABC 체계 활용을 통한 상업계통 육성시 background selection으로 반복친에 의한 BC2F1 세대의 회복율 검정결과, 가장 많은 개체수가 회복율 80%를 보였으며, 80% 이상의 회복율을 보인 개체수들도 상당수 존재함을 알 수 있어 실용적으로 BC2F1에서도 충분히 실용적 육종계통 선발이 가능함을 확인하였음.

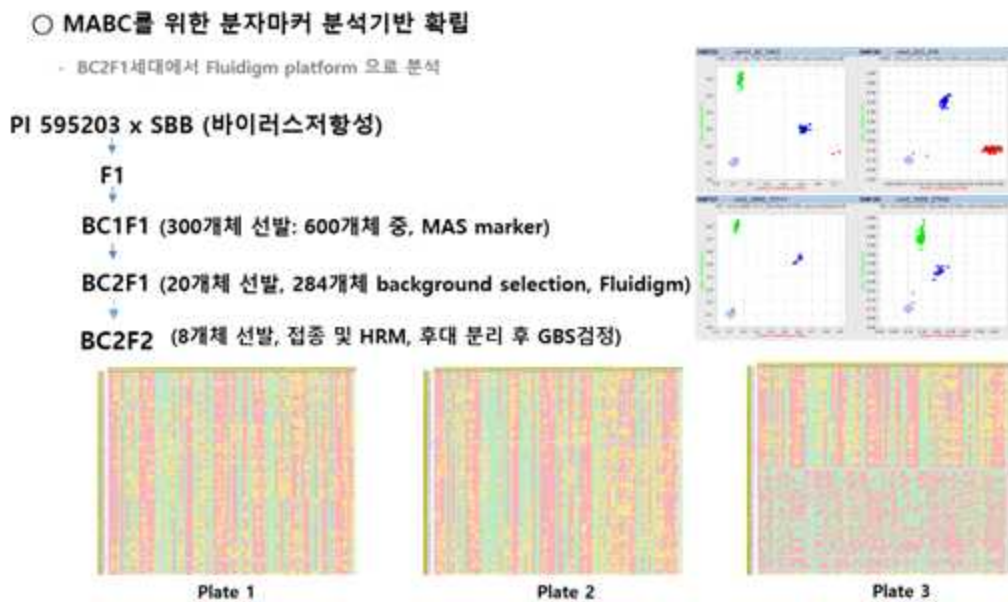
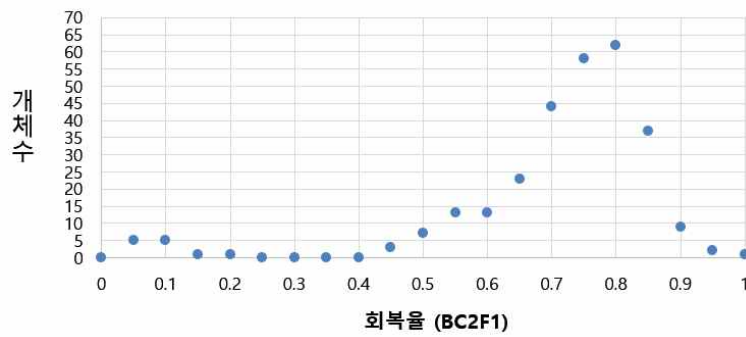


그림 2.93. ZYMV 저항성 유전자를 MAS로 활용한 상업계통 육성용 MABC 체계도



그림 2.94. 284개체 BC1P1에서 최종적으로 선발된 BC2F1세대의 8계통(SBB 포함)



개체별 반복친 회복율 (BC2F1)

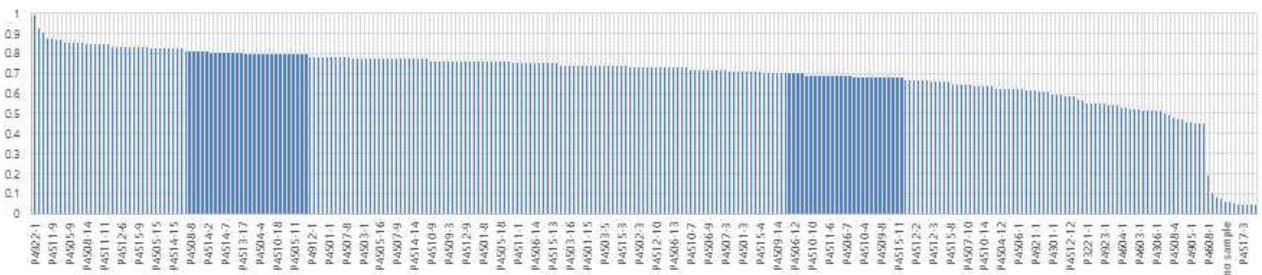


그림 2.95. Background selection에 의한 상업용 우수계통의 background 회복율



ID (BC2F1)	반복친유사성 (%)	SNP Marker Genotyping of BC2F2 (%)			선발 개체수
		R	H	S	
P4505-10	86.5	-	-	100	-
P4505-9	85.4	10	30	60	1
P4507-2	85.4	-	60	40	-
P4510-8	85.4	20	40	40	2
P4508-14	84.3	20	60	20	2
P4511-14	74.0	-	-	100	-
P4512-10	72.9	30	70	-	3

그림 2.96. 육종가에 의해 선발된 최종 계통(BC2F1 및 BC2F2)

- 육종회사의 계통에 대한 high-PIC value를 갖는 (>0.3) SNP를 발굴
 - SNP marker별로 Gene diversity, Heterozygosity, PIC 및 SNP marker 기준 flanking sequence를 추출하고 마커 세트를 준비

- 각 SNP marker는 0.3 이상의 PIC 및 0.5 이상의 Heterozygosity 기준으로 선별되었으며, 각 염색체별로 고루 분포될 수 있도록 하였음

표 2.50. Fluidigm platform 적용을 위해 제작된 probe 세트

INDEX	Target Name	Type	Info	Design Assay ID	Rank
1	wmBG-1S01	Sequence	...CGA[T/A]CAC...	TSA0252435	Standard
2	wmBG-1S02	Sequence	...GCT[A/C]GAA...	TSA0252330	Standard
3	wmBG-1S03	Sequence	...TGC[T/G]TSA...	TSA0252439	Standard
4	wmBG-1S04	Sequence	...ATT[G/C]CAG...	TSA0252426	Standard
5	wmBG-1S05	Sequence	...AAT[G/A]TCT...	TSA0252431	Standard
6	wmBG-1S06	Sequence	...TTA[T/C]GAG...	TSA0252499	Standard
7	wmBG-1S07	Sequence	...TAC[C/A]ATG...	TSA0252356	Standard
8	wmBG-1S08	Sequence	...TTC[T/G]GGT...	TSA0252416	Standard
9	wmBG-1S09	Sequence	...CGC[G/A]CGG...	TSA0252346	Standard
10	wmBG-1S10	Sequence	...TGC[G/T]TAC...	TSA0252336	Standard
11	wmBG-2S01	Sequence	...GCA[T/G]ATA...	TSA0252438	Standard
12	wmBG-2S02	Sequence	...TAT[C/G]CAC...	TSA0252394	Standard
13	wmBG-2S03	Sequence	...GTC[A/G]ACT...	TSA0252417	Standard
14	wmBG-2S04	Sequence	...TTC[A/G]ATA...	TSA0252437	Standard
15	wmBG-2S05	Sequence	...GCT[T/C]GTT...	TSA0252340	Standard

INDEX	Target Name	Type	Info	Design Assay ID	Rank
16	wmBG-2S06	Sequence	...GGT[T/C]TTG...	TSA0252429	Standard
17	wmBG-2S07	Sequence	...CAA[A/C]AAG...	TSA0252390	Standard
18	wmBG-2S08	Sequence	...AGG[A/C]ACA...	TSA0252440	Standard
19	wmBG-2S09	Sequence	...GGA[C/G]AGT...	TSA0252372	Standard
20	wmBG-3S01	Sequence	...TTG[A/G]ATA...	TSA0252406	Standard
21	wmBG-3S02	Sequence	...ACA[A/G]GAG...	TSA0252386	Standard
22	wmBG-3S03	Sequence	...GAG[T/G]TSA...	TSA0252415	Standard
23	wmBG-3S04	Sequence	...CAC[G/A]ACA...	TSA0252423	Standard
24	wmBG-3S06	Sequence	...TCG[G/T]AGA...	TSA0252414	Standard
25	wmBG-3S07	Sequence	...CTC[G/C]GCA...	TSA0252410	Standard
26	wmBG-4S01	Sequence	...CTA[C/T]GAT...	TSA0252425	Standard
27	wmBG-4S02	Sequence	...GAA[A/G]GTG...	TSA0252392	Standard
28	wmBG-4S03	Sequence	...GAT[G/C]TTT...	TSA0252364	Standard
29	wmBG-4S04	Sequence	...TCT[G/A]GGT...	TSA0252387	Standard
30	wmBG-4S05	Sequence	...ATC[A/T]TTA...	TSA0252352	Standard
31	wmBG-4S06	Sequence	...TGA[T/C]AAT...	TSA0252348	Standard
32	wmBG-5S01	Sequence	...TAC[A/G]CAC...	TSA0252436	Standard
33	wmBG-5S02	Sequence	...ATT[A/T]TTT...	TSA0252408	Standard
34	wmBG-5S03	Sequence	...ATT[A/C]TCA...	TSA0252427	Standard
35	wmBG-5S04	Sequence	...TCA[T/G]CGC...	TSA0252358	Standard
36	wmBG-5S05	Sequence	...CCC[A/G]ACA...	TSA0252494	Standard
37	wmBG-5S06	Sequence	...GTC[C/T]TTT...	TSA0252428	Standard
38	wmBG-5S07	Sequence	...ATT[C/A]TTC...	TSA0252381	Standard
39	wmBG-5S08	Sequence	...GGC[T/A]GCA...	TSA0252378	Standard
40	wmBG-5S09	Sequence	...CAA[C/A]TAT...	TSA0252412	Standard
41	wmBG-5S10	Sequence	...ACT[G/A]TCG...	TSA0252374	Standard
42	wmBG-6S01	Sequence	...CAG[C/A]GGA...	TSA0252268	Standard
43	wmBG-6S02	Sequence	...AAA[G/A]CGG...	TSA0252310	Standard
44	wmBG-6S03	Sequence	...CCT[C/T]CTT...	TSA0252274	Standard
45	wmBG-6S04	Sequence	...AAA[A/T]CCG...	TSA0252301	Standard
46	wmBG-6S05	Sequence	...CTG[C/A]ATT...	TSA0252304	Standard
47	wmBG-6S06	Sequence	...CTG[A/G]AGA...	TSA0252272	Standard
48	wmBG-6S07	Sequence	...GCT[A/G]GCT...	TSA0252283	Standard
49	wmBG-6S08	Sequence	...CGA[G/A]TTA...	TSA0252289	Standard
50	wmBG-6S09	Sequence	...AAG[G/A]TTA...	TSA0252281	Standard
51	wmBG-7S01	Sequence	...CTT[G/C]TTG...	TSA0252264	Standard
52	wmBG-7S02	Sequence	...TCA[T/A]TTC...	TSA0252266	Standard
53	wmBG-11S21	Sequence	...AGT[C/A]CAA...	TSA0252497	Standard
54	wmBG-7S04	Sequence	...ATG[A/G]AAA...	TSA0252270	Standard
55	wmBG-7S05	Sequence	...AAG[A/G]ATC...	TSA0252280	Standard
56	wmBG-7S06	Sequence	...TGT[A/C]TAC...	TSA0252318	Standard
57	wmBG-7S07	Sequence	...CCT[T/C]GCC...	TSA0252314	Standard

INDEX	Target Name	Type	Info	Design Assay ID	Rank
58	wmBG-7S08	Sequence	...TCT[C/A]TGG...	TSA0252324	Standard
59	wmBG-8S01	Sequence	...GCT[T/A]CCT...	TSA0252492	Standard
60	wmBG-8S02	Sequence	...TCA[T/A]ATC...	TSA0252271	Standard
61	wmBG-8S03	Sequence	...GAA[G/C]GCA...	TSA0252292	Standard
62	wmBG-8S04	Sequence	...CTG[C/A]CTA...	TSA0252265	Standard
63	wmBG-8S05	Sequence	...ATA[A/T]TTA...	TSA0252263	Standard
64	wmBG-8S06	Sequence	...TCT[C/A]ATT...	TSA0252491	Standard
65	wmBG-8S07	Sequence	...CCC[T/G]CCA...	TSA0252276	Standard
66	wmBG-8S08	Sequence	...GGC[T/C]TGC...	TSA0252278	Standard
67	wmBG-8S09	Sequence	...GAT[G/T]TGT...	TSA0252325	Standard
68	wmBG-9S01	Sequence	...TAA[C/G]GCA...	TSA0252319	Standard
69	wmBG-9S02	Sequence	...TGG[A/C]GCT...	TSA0252279	Standard
70	wmBG-9S03	Sequence	...GAG[C/A]CCG...	TSA0252326	Standard
71	wmBG-9S04	Sequence	...AAT[G/A]GCC...	TSA0252328	Standard
72	wmBG-9S05	Sequence	...AGT[T/G]TTC...	TSA0252253	Standard
73	wmBG-9S06	Sequence	...CTC[G/A]AGA...	TSA0252341	Standard
74	wmBG-9S07	Sequence	...CCA[G/T]TCG...	TSA0252297	Standard
75	wmBG-9S08	Sequence	...ATG[A/G]TCC...	TSA0252337	Standard
76	wmBG-9S09	Sequence	...GTC[G/A]GAG...	TSA0252288	Standard
77	wmBG-10S01	Sequence	...AAA[G/T]CTG...	TSA0252463	Standard
78	wmBG-10S02	Sequence	...TCG[C/A]CCG...	TSA0252458	Standard
79	wmBG-10S03	Sequence	...GTC[A/T]GCA...	TSA0252465	Standard
80	wmBG-10S04	Sequence	...TSA[G/A]GAA...	TSA0252461	Standard
81	wmBG-10S05	Sequence	...GTT[G/T]TTC...	TSA0252466	Standard
82	wmBG-10S06	Sequence	...AGC[T/C]TAT...	TSA0252454	Standard
83	wmBG-10S07	Sequence	...TCA[A/G]CAA...	TSA0252467	Standard
84	wmBG-11S01	Sequence	...GTC[G/A]AAA...	TSA0252446	Standard
85	wmBG-11S02	Sequence	...CCC[A/G]GCA...	TSA0252460	Standard
86	wmBG-11S03	Sequence	...AAG[A/T]AGT...	TSA0252487	Standard
87	wmBG-11S04	Sequence	...TCA[G/C]CTA...	TSA0252473	Standard
88	wmBG-11S05	Sequence	...AGG[A/T]GCC...	TSA0252453	Standard
89	wmBG-11S06	Sequence	...CTG[C/A]GTC...	TSA0252471	Standard
90	wmBG-11S07	Sequence	...TTC[A/C]GCG...	TSA0252489	Standard
91	wmBG-11S08	Sequence	...AGC[C/T]CGG...	TSA0252486	Standard
92	wmBG-11S09	Sequence	...TAA[G/A]AGT...	TSA0252485	Standard
93	wmBG-11S10	Sequence	...AAA[A/G]GAG...	TSA0252462	Standard
94	wmBG-11S11	Sequence	...AGA[G/C]ACC...	TSA0252477	Standard

○ Fluidigm 실험 수행

- Fluidigm Juno 96 x 96 format의 genotyping system을 사용하여 94개 assay (SNP marker)와 수박 계통들에 대한 분석을 수행하였음.
- 전체 layout 사례는 아래와 같으며, 각기 분석된 assay plot 결과의 사례를 제시하였음.

- Fluidigm에서 제공하는 SNP Genotyping Analysis software를 이용하여 normalized data 결과를 분석하고, Call rate 95%이상, Auto Confidence 99% 이상의 샘플과 마커만을 대상으로 필터링하였음.
- 복합내병성 품종개발을 위한 MABC 시스템 확립은 기본적으로 background selection용 마커를 확립하는 것이 중요하므로, 육종회사가 보유하고 있는 상업용 모계에서 활용 가능한 94개 assay를 확보함으로써 marker pyramiding을 위한 MAB 및 MABC에 활용.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: T	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: T Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: C Allele Y: T	Assay: wm... Allele X: T Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: T Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: T Allele Y: A	Assay: wm... Allele X: T Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: A	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: T
B	Assay: wm... Allele X: C Allele Y: A	Assay: wm... Allele X: T Allele Y: A	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: T	Assay: wm... Allele X: C Allele Y: T	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: C Allele Y: T	Assay: wm... Allele X: C Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: C
C	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: T	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: A	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: A	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: A	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: A	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: A	Assay: wm... Allele X: T Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: C Allele Y: T	Assay: wm... Allele X: C Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: T Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: C Allele Y: A
D	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: A	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: A	Assay: wm... Allele X: T Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: C Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: C Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: C Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: T Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: A	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: C
E	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: T	Assay: wm... Allele X: C Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: A	Assay: wm... Allele X: C Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: C Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: C Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: A	Assay: wm... Allele X: T Allele Y: C
F	Assay: wm... Allele X: T Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: T Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: C Allele Y: A	Assay: wm... Allele X: T Allele Y: A	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: C Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: C
G	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: A	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: T	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: T Allele Y: A	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: A	Assay: wm... Allele X: C Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: T Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: C
H	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: T Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: C Allele Y: A	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: T	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: A	Assay: wm... Allele X: C Allele Y: C	Assay: wm... Allele X: C Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: A Allele Y: G	Assay: wm... Allele X: G Allele Y: A	Assay: wm... Allele X: C Allele Y: A

그림 2.97. 수박 상업계통 Fluidigm 분석 layout 사례

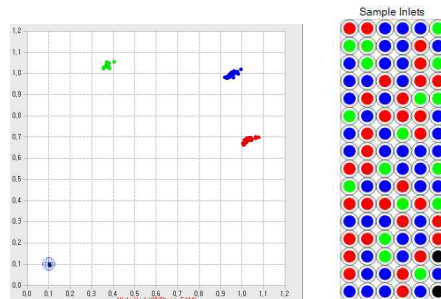


그림 2.98. SNP scatter plot 및 assay presentation

○ 병저항성 MAS 마커의 적용성 확대 검토

- 제 1세부의 내병성 유전자 집적을 통한 복합내병성 수박 품종개발을 지원하기 위하여 본 기관에서 개발된 내병성 마커를 제공함으로써 수박 흰가루병 (Powdery mildew), 수박 탄저병 (Anthracnose), 추키니황화모자이크바이러스 (Zucchini yellow mosaic virus)병에 대한 저항성 계통 육성에 지원을 진행하였음.
- 복합내병성 MAB 여교잡으로 목표로 NGS 등을 활용한 MAS용 유전자 마커 주변 서열 탐색 및 마커 pyramiding 방안 설계를 위해 제1세부와 논의하여 현재 본 연구에서 사용하고 있는 내병성 핵심자원들을 이용하여, 육종가가 활용가능한 내병성 연관마커의 개발을 기반으로 육종친화적인 Inbred Backcross line을 양성하였음.

표 2.51. 내병성 유전자 집적을 통한 복합내병성 수박 품종 개발 지원 결과

	분석의뢰번호	종자번호/파 종번호	교배번호	분석일	M1(CL14-27)	M2(ZYMV)	M3(PMR)
2160	200001	6401-1	7343-0	20.02.25			R
2161	200002	6401-2	7343-0	20.02.25			R
2162	200003	6401-3	7343-0	20.02.25			R
2163	200004	6402-1	323-9 x 103	20.02.25			H
2164	200005	6402-2	323-9 x 103	20.02.25			H
2165	200006	6402-3	323-9 x 103	20.02.25			H
2166	200007	6403-1	631-1	20.02.25			R
2167	200008	6403-2	631-1	20.02.25			R
2168	200009	6403-3	631-1	20.02.25			R
2169	200010	6404-1	7456 x 7455	20.02.25			R
2170	200011	6404-2	7456 x 7455	20.02.25			R
2171	200012	6404-3	7456 x 7455	20.02.25			R
2172	200013	6405-1	1224-1	20.02.25			R
2173	200014	6405-2	1224-1	20.02.25			R
6032	201555/	3289-2	122-2	20.07.01		R	
6033	201556/	3289-3	122-2	20.07.01		H	
6034	201557/	3289-4	122-2	20.07.01		H	
6035	201180/	3290-1	367-5 x 371-0	20.07.01	H	H	
6036	201181/	3290-2	367-5 x 371-0	20.07.01	H	H	
6037	201182/	3290-3	367-5 x 371-0	20.07.01	H	H	
6038	201183/	3290-4	367-5 x 371-0	20.07.01	H	H	
6039	201184/	3290-5	367-5 x 371-0	20.07.01	H	H	
6040	201185/	3290-6	367-5 x 371-0	20.07.01	H	H	
6041	201186/	3290-7	367-5 x 371-0	20.07.01	H	H	
6042	201187/	3290-8	367-5 x 371-0	20.07.01	H	H	
6043	201188/	3290-9	367-5 x 371-0	20.07.01	H	H	
6044	201189/	3290-10	367-5 x 371-0	20.07.01	H	H	
6046	201465/	3293-2	385-0 x 124-0	20.07.01	R		
6047	201466/	3293-3	385-0 x 124-0	20.07.01	R		
6048	201467/	3293-4	385-0 x 124-0	20.07.01	R		
6049	201468/	3293-5	385-0 x 124-0	20.07.01	R		
6050	201469/	3293-6	385-0 x 124-0	20.07.01	R		
6051	201470/	3293-7	385-0 x 124-0	20.07.01	R		

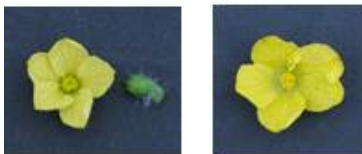
표 2.52. 내병성 핵심자원 및 분자마커를 이용한 품종개발을 위한 계통 양성을 위한 1세부과제와의 MAB 및 MABC 협력연구 내용

Action	시기	계통명
흰가루병(PMA:arkamanik) 집적	19. 태국.	PCAUFF01:PMA(BC3)
흰가루병(PMB:254744) 집적	19. 태국.	PCAUFF01:PMA(BC3) x PMBI9701
덩굴쫄김병(CAU769-FR)집적	19. 태국.	PCAUFF01:PMA(BC3) x CAU769-FR
덩굴마름병(CAU276)	19. 태국.	PCAUFF01:PMA(BC3) x CAU276
PMA + EIF4E	20. 태국 여름	PCAUFF01:PMA(BC3) x NP114013G4(2X):EIF4E
(PMA + EIF4E) + (PMA + 덩굴마름병)	20. 태국 우기	(PCAUFF01:PMA(BC3) x NP114013G4(2X):EIF4E) x (PCAUFF01:PMA(BC3) x CAU276)
(PMA + EIF4E) + (PMA + 덩굴쫄김병)	20. 태국 우기	(PCAUFF01:PMA(BC3) x NP114013G4(2X):EIF4E) x (PCAUFF01:PMA(BC3) x CAU769-FR)
(PMA + EIF4E) + (PMA + PMB)	20. 태국 우기	(PCAUFF01:PMA(BC3) x NP114013G4(2X):EIF4E) x (PCAUFF01:PMA(BC3) x PMBI9701)
(PMA + EIF4E) + (PMA + PMB) X 반복친	20. 태국 건기	((PCAUFF01:PMA(BC3) x NP114013G4(2X):EIF4E) x (PCAUFF01:PMA(BC3) x PMBI9701)) x PCAUFF01:PMA(BC3)
(PMA + EIF4E) + (PMA + 덩굴마름병) + (PMA + EIF4E) + (PMA + PMB)	20. 태국 건기	(PCAUFF01:PMA(BC3) x NP114013G4(2X):EIF4E) x (PCAUFF01:PMA(BC3) x CAU276) x (PCAUFF01:PMA(BC3) x (PCAUFF01:PMA(BC3) x NP114013G4(2X):EIF4E) x (PCAUFF01:PMA(BC3) x PMBI9701)
(PMA + EIF4E) + (PMA + 덩굴쫄김병) + (PMA + EIF4E) + (PMA + PMB)	20. 태국 건기	(PCAUFF01:PMA(BC3) x NP114013G4(2X):EIF4E) x (PCAUFF01:PMA(BC3) x CAU769-FR) x (PCAUFF01:PMA(BC3) x NP114013G4(2X):EIF4E) x (PCAUFF01:PMA(BC3) x PMBI9701)

11. 수박 잎결각 형질 연관마커 개발 (연구계획외 추가 결과)

○ 연구배경

- 최근에 연평균 기온이 올라가고, 시설재배, 하우스 재배를 하는 수박이 증가함에 있어서 고온에 잘 견디는 품종이 필요함.
- Ferjani, Horiguchi et al. (2007) 에 따르면 식물은 고온에서 버티기 위해 충분한 수분과 원활한 가스교환이 뒷받침 되어야함. 또한 잎은 식물에서 광합성을 하는 기관이기 때문에 잎의 모양이나 크기에 따라 수분이용능력과 가스교환능력이 달라지며 다양한 환경요소들이 잎의 모양을 결정하는데 영향을 준다고 알려져 있음.
- 이에 따라 수박의 잎의 모양은 식물의 생존에 있어서 중요한 외관적 요소로 생각됨.
- 이전 연구들의 내용에서는 수박의 잎에서 결각이 우성형질로 알려져 있으며, 무결각의 형질에 대해 멘델의 유전법칙을 성립하여 유전하는 양상으로 알려져 있음.
- 보고된 사실을 바탕으로 하여 이전 논문에서와는 다른 집단을 사용하여 엽결각의 형질을 좌우하는 유전자의 유전양상을 밝히고 유전자좌를 규명하고 마커를 개발함을 목표로 연구를 진행함.



PS137

SIT463ST

그림 2.99. 수박의 핵심집단 중 본 연구에서 사용한 부분 PS137과 모본 SIT463ST의 과실과 꽃의 모습



그림 2.100. 무결각의 형태를 보이는 부분PS137의 9번째 본엽과 주맥 가까이 까지 깊은 결각을 보이는 모본SIT463ST의 9번째 본엽 (노란 화살표로 함물부를 표시함, 양쪽으로 각 4개씩의 함물부를 보임)

- Wei, Chen et al.(2017, Plos one)의 수박에 대한 엽결각 논문에 따르면 본엽의 결각형질의 경우 6매째 이상의 본엽 때부터 확실하게 결각의 유무가 판단이 가능함. 이를 참고하여 본 연구에서는 더 생육단계를 진행시켜 9번째 혹은 10번째 본엽에서 결각의 유무를 판단함.
- 모본으로 사용한 SIT463St의 경우 주맥을 중심으로 하여 4쌍의 함물부를 확인할 수 있음.
- 9번째~10번째의 본엽 성체에서 엽결각을 보이지 않는 PS137, 4쌍의 결각 함물부를 가지고 있는 SIT463ST를 이용하여 분리집단을 양성함.

○ 수박 엽결각 지표개발

- 표현형 검정을 수치화하기 위해 0점, 1점, 2점으로 나누어 결각이 없는 경우(0점), 결각이 있는데 심한 경우 보단 덜해 중간형질을 보이는 경우(1점), 결각이 심한 경우(2점)로 나누었음.

표 2.53. 잎의 결각에 대한 표현형 검정을 위해 설정한 지표

Phenotype score	Description
0	결각이 없음, 대칭적인 돌출부 있음
1	주맥을 중심으로 하여 양쪽에 함물부가 3개씩 있음, 함물의 깊이가 깊지 않음.
2	주맥을 중심으로 하여 양쪽에 함물부가 4개씩 있음, 함물의 깊이가 깊음.

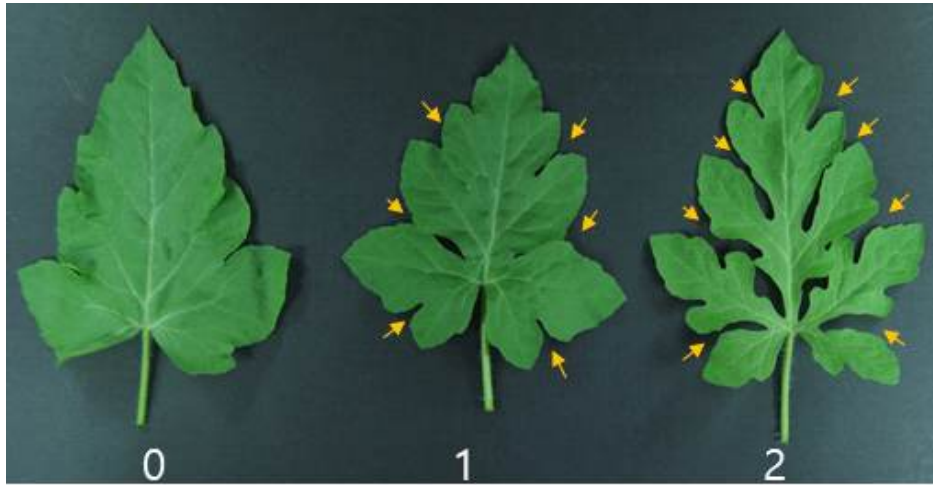


그림 2.101. SIT463ST x PS137 분리세대로부터 양성한 F2 분리세대에서 0점, 1점, 2점의 표현형지표의 기준이 되는 대표개체의 9~10번째 본엽의 성체

- 위 그림을 기준으로 SIT463ST x PS137 의 F2 분리세대에서의 결각의 유무정도를 0점, 1점, 2점으로 분류하였음.
- 1점과, 2점의 경우 결각이 있다하고 판단하였고, 0점의 경우 결각이 없는 형질이라고 판단하여 검정함.
- SIT463ST 15개체, PS137 12개체, F1 13개체, F2 287개체의 표현형 검정을 실시함.
- SIT463ST에서는 모두 2점의 형질을, PS137에서는 모두 0점의 형질을, F1에서는 모두 중간 형질인 1점의 표현형모습을 보이는 것을 확인하였음.
- F2분리세대에서는 멘델의 유전 법칙에 성립하여, 분리 비가 결각 : 무결각이 3 : 1인 결과를 얻고 카이검정을 통해 검증하였음.

○ SIT463ST x PS137 :F2 분리집단 표현형 검정결과

표 2.54. 모·부본 및 분리세대 표현형 분리 비

세대	9번째-10번째 본엽의 표현형		전체 개체 수	기대 비	자유도	X ² 값	P 값
	결각 있음	결각 없음					
SIT463ST	15	0	15				
PS137	0	12	12				
F ₁ (SIT463STxPS137)	13	0	13				
F ₂ (SIT463STxPS137)	228	59	287	3:1	1	0.048339	0.826

표 2.55. F2분리세대 개체별 표현형 검정 결과표

Number	Name	Phenotype score
1	SIT463ST x PS137 :F2 - 12	1
2	SIT463ST x PS137 :F2 - 13	0
3	SIT463ST x PS137 :F2 - 14	0

Number	Name	Phenotype score
4	SIT463ST x PS137 :F2 - 15	1
5	SIT463ST x PS137 :F2 - 17	2
6	SIT463ST x PS137 :F2 - 18	2
7	SIT463ST x PS137 :F2 - 21	0
8	SIT463ST x PS137 :F2 - 22	1
9	SIT463ST x PS137 :F2 - 24	0
10	SIT463ST x PS137 :F2 - 25	1
11	SIT463ST x PS137 :F2 - 26	1
12	SIT463ST x PS137 :F2 - 27	0
13	SIT463ST x PS137 :F2 - 28	1
14	SIT463ST x PS137 :F2 - 29	2
15	SIT463ST x PS137 :F2 - 30	2
16	SIT463ST x PS137 :F2 - 32	1
17	SIT463ST x PS137 :F2 - 33	2
18	SIT463ST x PS137 :F2 - 36	1
19	SIT463ST x PS137 :F2 - 38	1
20	SIT463ST x PS137 :F2 - 39	2
21	SIT463ST x PS137 :F2 - 40	2
22	SIT463ST x PS137 :F2 - 42	0
23	SIT463ST x PS137 :F2 - 43	1
24	SIT463ST x PS137 :F2 - 44	1
25	SIT463ST x PS137 :F2 - 45	0
26	SIT463ST x PS137 :F2 - 47	0
27	SIT463ST x PS137 :F2 - 48	1
28	SIT463ST x PS137 :F2 - 52	1
29	SIT463ST x PS137 :F2 - 54	2
30	SIT463ST x PS137 :F2 - 64	1
31	SIT463ST x PS137 :F2 - 74	1
32	SIT463ST x PS137 :F2 - 75	1
33	SIT463ST x PS137 :F2 - 76	1
34	SIT463ST x PS137 :F2 - 78	2
35	SIT463ST x PS137 :F2 - 80	0
36	SIT463ST x PS137 :F2 - 82	2
37	SIT463ST x PS137 :F2 - 84	1
38	SIT463ST x PS137 :F2 - 85	2
39	SIT463ST x PS137 :F2 - 86	0
40	SIT463ST x PS137 :F2 - 87	0
41	SIT463ST x PS137 :F2 - 89	2
42	SIT463ST x PS137 :F2 - 90	0
43	SIT463ST x PS137 :F2 - 91	1
44	SIT463ST x PS137 :F2 - 93	1
45	SIT463ST x PS137 :F2 - 94	2

Number	Name	Phenotype score
46	SIT463ST x PS137 :F2 - 95	1
47	SIT463ST x PS137 :F2 - 96	1
48	SIT463ST x PS137 :F2 - 97	0
49	SIT463ST x PS137 :F2 - 98	1
50	SIT463ST x PS137 :F2 - 99	1
51	SIT463ST x PS137 :F2 - 100	1
52	SIT463ST x PS137 :F2 - 105	1
53	SIT463ST x PS137 :F2 - 116	0
54	SIT463ST x PS137 :F2 - 121	1
55	SIT463ST x PS137 :F2 - 123	1
56	SIT463ST x PS137 :F2 - 125	1
57	SIT463ST x PS137 :F2 - 127	1
58	SIT463ST x PS137 :F2 - 129	1
59	SIT463ST x PS137 :F2 - 131	1
60	SIT463ST x PS137 :F2 - 132	2
61	SIT463ST x PS137 :F2 - 133	1
62	SIT463ST x PS137 :F2 - 135	1
63	SIT463ST x PS137 :F2 - 140	1
64	SIT463ST x PS137 :F2 - 141	2
65	SIT463ST x PS137 :F2 - 143	0
66	SIT463ST x PS137 :F2 - 144	2
67	SIT463ST x PS137 :F2 - 145	1
68	SIT463ST x PS137 :F2 - 146	1
69	SIT463ST x PS137 :F2 - 147	1
70	SIT463ST x PS137 :F2 - 149	1
71	SIT463ST x PS137 :F2 - 150	1
72	SIT463ST x PS137 :F2 - 151	1
73	SIT463ST x PS137 :F2 - 152	0
74	SIT463ST x PS137 :F2 - 153	2
75	SIT463ST x PS137 :F2 - 154	1
76	SIT463ST x PS137 :F2 - 155	1
77	SIT463ST x PS137 :F2 - 157	2
78	SIT463ST x PS137 :F2 - 158	0
79	SIT463ST x PS137 :F2 - 159	1
80	SIT463ST x PS137 :F2 - 160	2
81	SIT463ST x PS137 :F2 - 161	0
82	SIT463ST x PS137 :F2 - 162	1
83	SIT463ST x PS137 :F2 - 184	0
84	SIT463ST x PS137 :F2 - 188	2
85	SIT463ST x PS137 :F2 - 190	1
86	SIT463ST x PS137 :F2 - 192	2
87	SIT463ST x PS137 :F2 - 194	2

Number	Name	Phenotype score
88	SIT463ST x PS137 :F2 - 196	1
89	SIT463ST x PS137 :F2 - 198	1
90	SIT463ST x PS137 :F2 - 199	2
91	SIT463ST x PS137 :F2 - 200	0
92	SIT463ST x PS137 :F2 - 201	2
93	SIT463ST x PS137 :F2 - 202	1
94	SIT463ST x PS137 :F2 - 203	2
95	SIT463ST x PS137 :F2 - 204	2
96	SIT463ST x PS137 :F2 - 205	1
97	SIT463ST x PS137 :F2 - 206	2
98	SIT463ST x PS137 :F2 - 207	1
99	SIT463ST x PS137 :F2 - 208	0
100	SIT463ST x PS137 :F2 - 209	2
101	SIT463ST x PS137 :F2 - 210	1
102	SIT463ST x PS137 :F2 - 211	1
103	SIT463ST x PS137 :F2 - 212	1
104	SIT463ST x PS137 :F2 - 213	1
105	SIT463ST x PS137 :F2 - 214	2
106	SIT463ST x PS137 :F2 - 215	1
107	SIT463ST x PS137 :F2 - 216	2
108	SIT463ST x PS137 :F2 - 217	1
109	SIT463ST x PS137 :F2 - 218	0
110	SIT463ST x PS137 :F2 - 219	2
111	SIT463ST x PS137 :F2 - 220	1
112	SIT463ST x PS137 :F2 - 221	1
113	SIT463ST x PS137 :F2 - 222	2
114	SIT463ST x PS137 :F2 - 223	0
115	SIT463ST x PS137 :F2 - 224	0
116	SIT463ST x PS137 :F2 - 225	2
117	SIT463ST x PS137 :F2 - 226	0
118	SIT463ST x PS137 :F2 - 227	1
119	SIT463ST x PS137 :F2 - 228	2
120	SIT463ST x PS137 :F2 - 229	0
121	SIT463ST x PS137 :F2 - 230	1
122	SIT463ST x PS137 :F2 - 231	1
123	SIT463ST x PS137 :F2 - 232	1
124	SIT463ST x PS137 :F2 - 233	2
125	SIT463ST x PS137 :F2 - 234	1
126	SIT463ST x PS137 :F2 - 235	1
127	SIT463ST x PS137 :F2 - 236	1
128	SIT463ST x PS137 :F2 - 237	2
129	SIT463ST x PS137 :F2 - 238	0

Number	Name	Phenotype score
130	SIT463ST x PS137 :F2 - 239	2
131	SIT463ST x PS137 :F2 - 240	2
132	SIT463ST x PS137 :F2 - 241	2
133	SIT463ST x PS137 :F2 - 242	1
134	SIT463ST x PS137 :F2 - 243	2
135	SIT463ST x PS137 :F2 - 244	2
136	SIT463ST x PS137 :F2 - 245	1
137	SIT463ST x PS137 :F2 - 246	0
138	SIT463ST x PS137 :F2 - 247	1
139	SIT463ST x PS137 :F2 - 248	2
140	SIT463ST x PS137 :F2 - 249	2
141	SIT463ST x PS137 :F2 - 250	2
142	SIT463ST x PS137 :F2 - 251	0
143	SIT463ST x PS137 :F2 - 252	0
144	SIT463ST x PS137 :F2 - 253	2
145	SIT463ST x PS137 :F2 - 254	2
146	SIT463ST x PS137 :F2 - 255	1
147	SIT463ST x PS137 :F2 - 256	0
148	SIT463ST x PS137 :F2 - 257	1
149	SIT463ST x PS137 :F2 - 258	0
150	SIT463ST x PS137 :F2 - 259	2
151	SIT463ST x PS137 :F2 - 260	1
152	SIT463ST x PS137 :F2 - 261	2
153	SIT463ST x PS137 :F2 - 262	1
154	SIT463ST x PS137 :F2 - 263	2
155	SIT463ST x PS137 :F2 - 264	1
156	SIT463ST x PS137 :F2 - 265	1
157	SIT463ST x PS137 :F2 - 266	1
158	SIT463ST x PS137 :F2 - 267	1
159	SIT463ST x PS137 :F2 - 268	1
160	SIT463ST x PS137 :F2 - 269	1
161	SIT463ST x PS137 :F2 - 270	0
162	SIT463ST x PS137 :F2 - 271	1
163	SIT463ST x PS137 :F2 - 272	1
164	SIT463ST x PS137 :F2 - 273	1
165	SIT463ST x PS137 :F2 - 274	1
166	SIT463ST x PS137 :F2 - 275	1
167	SIT463ST x PS137 :F2 - 276	0
168	SIT463ST x PS137 :F2 - 277	2
169	SIT463ST x PS137 :F2 - 278	1
170	SIT463ST x PS137 :F2 - 279	2
171	SIT463ST x PS137 :F2 - 280	1

Number	Name	Phenotype score
172	SIT463ST x PS137 :F2 - 281	1
173	SIT463ST x PS137 :F2 - 282	2
174	SIT463ST x PS137 :F2 - 283	0
175	SIT463ST x PS137 :F2 - 284	0
176	SIT463ST x PS137 :F2 - 285	1
177	SIT463ST x PS137 :F2 - 286	2
178	SIT463ST x PS137 :F2 - 287	1
179	SIT463ST x PS137 :F2 - 288	1
180	SIT463ST x PS137 :F2 - 289	1
181	SIT463ST x PS137 :F2 - 290	2
182	SIT463ST x PS137 :F2 - 291	1
183	SIT463ST x PS137 :F2 - 292	1
184	SIT463ST x PS137 :F2 - 293	1
185	SIT463ST x PS137 :F2 - 294	1
186	SIT463ST x PS137 :F2 - 295	1
187	SIT463ST x PS137 :F2 - 296	1
188	SIT463ST x PS137 :F2 - 297	1
189	SIT463ST x PS137 :F2 - 298	0
190	SIT463ST x PS137 :F2 - 301	2
191	SIT463ST x PS137 :F2 - 302	0
192	SIT463ST x PS137 :F2 - 303	1
193	SIT463ST x PS137 :F2 - 304	2
194	SIT463ST x PS137 :F2 - 305	1
195	SIT463ST x PS137 :F2 - 306	0
196	SIT463ST x PS137 :F2 - 307	1
197	SIT463ST x PS137 :F2 - 308	2
198	SIT463ST x PS137 :F2 - 309	2
199	SIT463ST x PS137 :F2 - 310	2
200	SIT463ST x PS137 :F2 - 312	0
201	SIT463ST x PS137 :F2 - 313	0
202	SIT463ST x PS137 :F2 - 314	1
203	SIT463ST x PS137 :F2 - 315	1
204	SIT463ST x PS137 :F2 - 316	0
205	SIT463ST x PS137 :F2 - 317	1
206	SIT463ST x PS137 :F2 - 318	0
207	SIT463ST x PS137 :F2 - 319	2
208	SIT463ST x PS137 :F2 - 320	1
209	SIT463ST x PS137 :F2 - 321	1
210	SIT463ST x PS137 :F2 - 322	1
211	SIT463ST x PS137 :F2 - 323	1
212	SIT463ST x PS137 :F2 - 324	1
213	SIT463ST x PS137 :F2 - 325	2

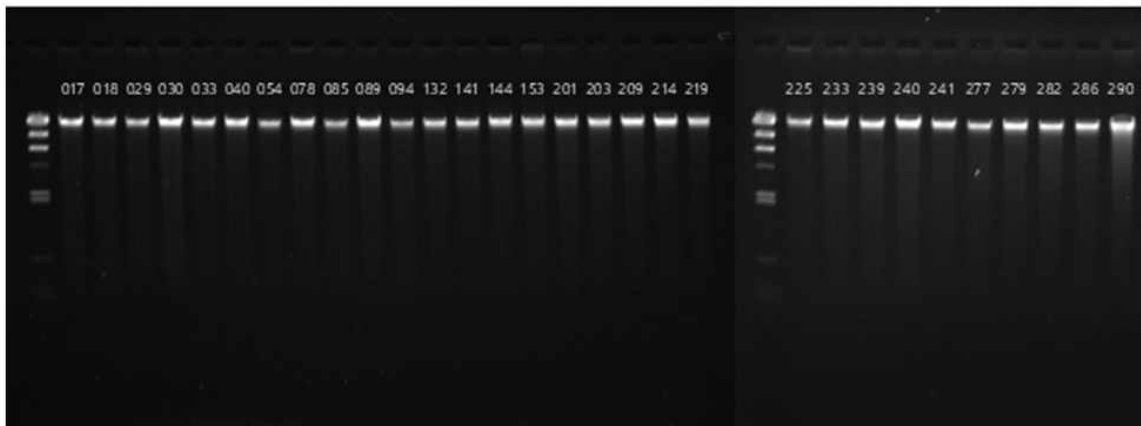
Number	Name	Phenotype score
214	SIT463ST x PS137 :F2 - 326	1
215	SIT463ST x PS137 :F2 - 327	2
216	SIT463ST x PS137 :F2 - 328	1
217	SIT463ST x PS137 :F2 - 329	1
218	SIT463ST x PS137 :F2 - 330	2
219	SIT463ST x PS137 :F2 - 331	0
220	SIT463ST x PS137 :F2 - 332	1
221	SIT463ST x PS137 :F2 - 333	1
222	SIT463ST x PS137 :F2 - 334	0
223	SIT463ST x PS137 :F2 - 335	2
224	SIT463ST x PS137 :F2 - 336	2
225	SIT463ST x PS137 :F2 - 337	2
226	SIT463ST x PS137 :F2 - 338	2
227	SIT463ST x PS137 :F2 - 339	2
228	SIT463ST x PS137 :F2 - 340	1
229	SIT463ST x PS137 :F2 - 341	1
230	SIT463ST x PS137 :F2 - 342	2
231	SIT463ST x PS137 :F2 - 343	2
232	SIT463ST x PS137 :F2 - 344	2
233	SIT463ST x PS137 :F2 - 346	0
234	SIT463ST x PS137 :F2 - 347	0
235	SIT463ST x PS137 :F2 - 348	1
236	SIT463ST x PS137 :F2 - 349	1
237	SIT463ST x PS137 :F2 - 350	1
238	SIT463ST x PS137 :F2 - 351	1
239	SIT463ST x PS137 :F2 - 352	2
240	SIT463ST x PS137 :F2 - 353	0
241	SIT463ST x PS137 :F2 - 354	2
242	SIT463ST x PS137 :F2 - 355	1
243	SIT463ST x PS137 :F2 - 356	0
244	SIT463ST x PS137 :F2 - 357	2
245	SIT463ST x PS137 :F2 - 358	1
246	SIT463ST x PS137 :F2 - 359	1
247	SIT463ST x PS137 :F2 - 360	1
248	SIT463ST x PS137 :F2 - 361	0
249	SIT463ST x PS137 :F2 - 362	0
250	SIT463ST x PS137 :F2 - 363	2
251	SIT463ST x PS137 :F2 - 364	1
252	SIT463ST x PS137 :F2 - 365	1
253	SIT463ST x PS137 :F2 - 366	1
254	SIT463ST x PS137 :F2 - 367	0
255	SIT463ST x PS137 :F2 - 368	1

Number	Name	Phenotype score
256	SIT463ST x PS137 :F2 - 369	1
257	SIT463ST x PS137 :F2 - 370	1
258	SIT463ST x PS137 :F2 - 371	1
259	SIT463ST x PS137 :F2 - 372	2
260	SIT463ST x PS137 :F2 - 373	1
261	SIT463ST x PS137 :F2 - 374	0
262	SIT463ST x PS137 :F2 - 375	2
263	SIT463ST x PS137 :F2 - 376	2
264	SIT463ST x PS137 :F2 - 377	0
265	SIT463ST x PS137 :F2 - 378	1
266	SIT463ST x PS137 :F2 - 379	2
267	SIT463ST x PS137 :F2 - 380	1
268	SIT463ST x PS137 :F2 - 381	1
269	SIT463ST x PS137 :F2 - 382	1
270	SIT463ST x PS137 :F2 - 383	2
271	SIT463ST x PS137 :F2 - 384	2
272	SIT463ST x PS137 :F2 - 385	2
273	SIT463ST x PS137 :F2 - 386	1
274	SIT463ST x PS137 :F2 - 387	1
275	SIT463ST x PS137 :F2 - 388	1
276	SIT463ST x PS137 :F2 - 389	0
277	SIT463ST x PS137 :F2 - 390	1
278	SIT463ST x PS137 :F2 - 391	1
279	SIT463ST x PS137 :F2 - 392	1
280	SIT463ST x PS137 :F2 - 393	0
281	SIT463ST x PS137 :F2 - 394	1
282	SIT463ST x PS137 :F2 - 395	1
283	SIT463ST x PS137 :F2 - 396	0
284	SIT463ST x PS137 :F2 - 397	0
285	SIT463ST x PS137 :F2 - 398	1
286	SIT463ST x PS137 :F2 - 399	0
287	SIT463ST x PS137 :F2 - 400	2

○ SIT463ST, PS137, SIT463ST x PS137:F1,F2 및 샘플링 및 DNA추출

- 표현형검정 결과 양극의 점수인 0점과 2점에서 각각 30개체씩 임의로 선정하여 80-85mg의 무게로 샘플링을 진행함.
- 고순도의 DNA를 추출하여 결각이 심한 표현형을 보이는 2점짜리의 SIT463ST x PS137 :F2 개체 30개의 DNA풀과 결각을 보이지 않는 0점짜리 SIT463ST x PS137 :F2개체 30개의 풀을 동량으로 만들고 결각 DNA풀을 'LL', 무결각 DNA풀을 'Non-LL'이라고 명명함.

결각 DNA풀 'LL'에 사용된 F2 30개체들의 DNA 1ul 전기영동 사진



무결각 DNA풀 'Non-LL'에 사용된 F2 30개체들의 DNA 1ul 전기영동 사진

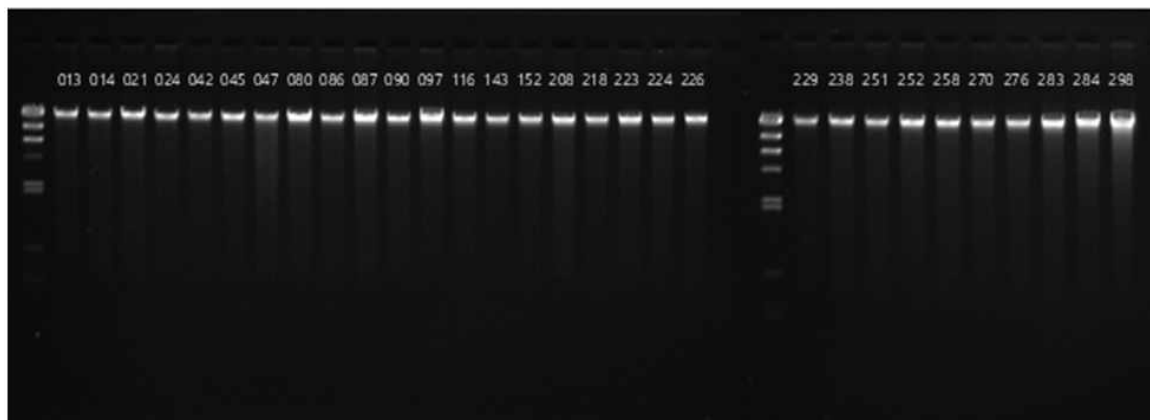


그림 2.102. SIT463ST x PS137: F2에서 0점의 표현형점수를 보이는 30개체(위), 2점의 표현형점수를 보이는 30개체(아래)의 DNA 전기영동 사진

- 수박 엽결각 Bulk Segregant Analysis(BSA) - Next Generation Sequencing(NGS)
 - Illumina Novaseq 6000의 기종을 사용하여 부모집단인 SIT463ST, PS137와 LL, Non-LL DNA풀을 가지고 NGS를 진행하여 서열을 도출함.
- 서열정렬을 통한 서열변이 확인
 - 시퀀싱을 통해 얻어진 서열을 정렬하기 위해 Bowtie2 프로그램을 이용하고 Genome Analysis Toolkit(GATK)를 통하여 도출된 서열과 수박의 레퍼런스 서열인 97103의 BAM 파일을 만들어내어, 생산된 BAM 파일로 리드들을 맵핑한 후 Variant Call Format(VCF) 파일을 얻어냄.
 - DNA풀 LL과 Non-LL 을 가지고 BSA-NGS를 수행한 결과로 얻어낸 VCF 파일로 Delta SNP-인덱스 값을 구하였음.
 - 슬라이딩 윈도우 기법으로 Delta SNP-인덱스 값을 계산한 후, R script에서 신뢰구간 및 유의수준의 통계적 옵션을 주어 수박 엽결각 형질에 관여하는 유전자좌를 분석한 후 R프로그램의 시각화를 위해 ggplot2로 표현하였음.
 - 플롯팅 결과, 아래 그림에 보이는 것처럼 연관군 2,4,6에서 피크가 보였으며 해당 연관군에서 SIT463ST와, PS137 사이에서 SNPs (single nucleotide polymorphisms)를 보이는 후보 유전자좌를 발굴하는 중임.

- 유전체내에서의 SNPs와 표현형의 상관관계를 나타내기 위해서 회기분석을 이용하여 도출된 G'값으로 후보 유전자좌를 확인하였음

표 2.56. Threshold를 넘는 연관군 02번, 04번, 06번에서 G' value의 결과표

CHR	qtl	start	end	peak DeltaSNP	pos PeakDeltaSNP	avgDelta SNP	max Gprime	pos MaxGprime	mean Gprime
LG02	1	1454321	1732948	-0.12505	1732948	-0.11844	4.973323	1732948	4.764832
LG02	2	7795801	12136049	0.078595	7795801	0.004478	4.371964	9778210	2.897864
LG02	3	14744606	15102636	-0.02538	14744606	-0.01977	2.10404	14847446	1.997033
LG02	4	24865236	25517981	-0.01664	24865236	-0.00628	1.756706	25216258	1.712606
LG02	5	26619593	26822590	-0.03816	26822590	-0.03535	1.991573	26822590	1.956899
LG02	6	29957985	31064935	-0.01544	29957985	-0.00506	8.039051	29957985	2.235161
LG02	7	33542296	33664930	-0.12413	33664930	-0.10121	3.451807	33664930	3.124534
LG04	1	801885	1535023	-0.05448	801885	-0.03545	2.209621	801885	1.907198
LG04	2	3409016	3506235	-0.08147	3409016	-0.08059	1.975532	3409016	1.933782
LG04	3	4691293	11230854	-0.09693	8407722	-0.04569	3.335508	5559003	2.434655
LG04	4	15875341	16401354	0.015726	16401354	0.010937	1.701023	16159859	1.667352
LG04	5	21960275	23474019	-0.08677	21960275	-0.06432	2.097502	22726466	2.040128
LG04	6	25992152	26090295	0.003806	26090295	0.003453	1.679793	25992152	1.670206
LG04	7	27797478	29381231	0.19736	27797478	0.041396	6.076663	27797478	3.657565
LG04	8	31592548	32091605	0.044774	31592548	0.008863	4.643933	31592548	2.707876
LG06	1	6023764	6472831	0.035286	6472831	0.022045	2.206616	6132471	2.054523
LG06	2	15934238	18061889	-0.09293	17575019	-0.03451	3.070733	17321544	2.555328
LG06	3	20997075	24001358	-0.36142	21231588	-0.23235	21.53791	20997075	13.66529

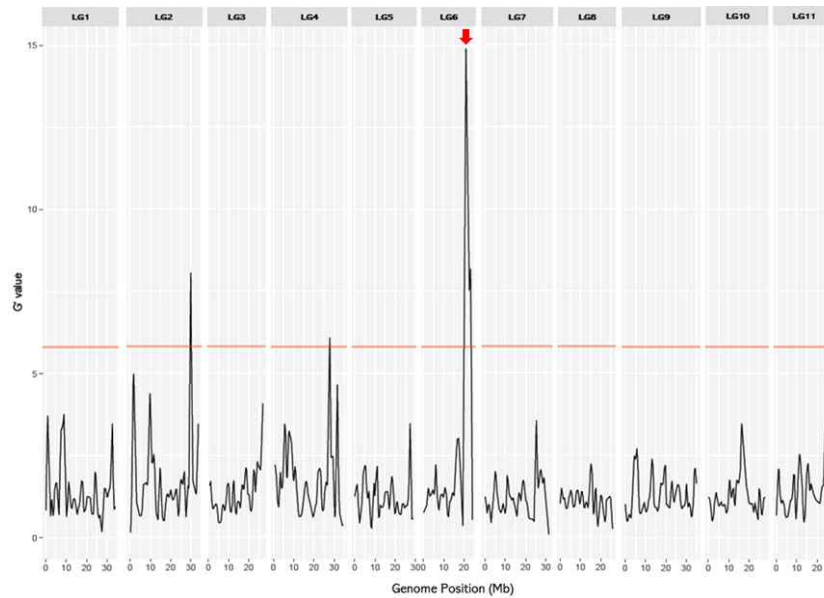


그림 2.103. 연관군별 G'값 유의도에 따른 QTL분포, 6번 연관군에서 가장 높은 피크를 보이고 빨간색 화살표로 표시함.

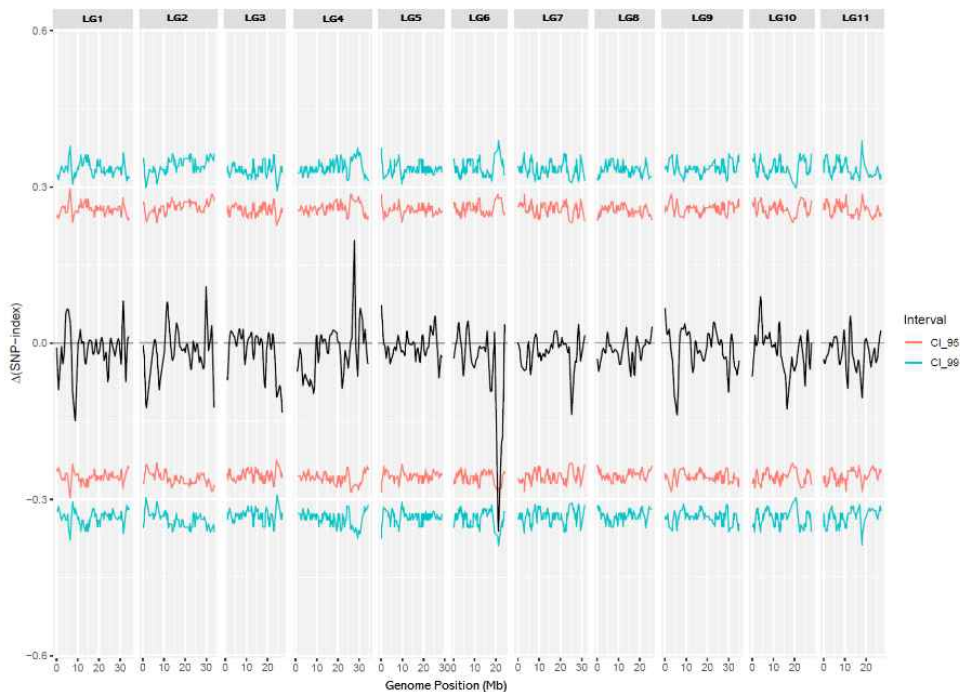


그림 2.104. 연관군별 Delta SNP-인덱스 값, 신뢰수준 95%와 99%를 각각 빨간색과 파란색 선으로 표시함.

- GATK 파일과 VCF 파일을 추합하여 SNPs의 후보 지역을 선정하였고, 프로그램 Tablet1.19을 이용하여 지역별 1kb이상의 거리를 두는 SNPs를 찾아 이를 대상을 HRM(High Resolution Melting)분석용 프라이머를 제작하였음.

○ High Resolution Melting(HRM) 분석

- 후보 SNPs 지역들에 대해 HRM 프라이머를 작성한 후 Roche LightCycler96® Software 1.1을 통해 분석하여 F2분리세대의 표현형과 비교를 통해 일치율이 높은 자리를 찾아 마커로 개발예정 중에 있음.
- HRM 분석실험의 레퍼런스로 부모집단인 SIT463ST, PS137과 분리세대 SIT463STxPS137:F1을 사용하였음
- 제작한 프라이머를 가지고 HRM분석을 수행할 시 레퍼런스로 사용한 PS137, SIT463ST, SIT463ST x PS137: F1가 각각 고유의 곡선을 보여 그룹핑이 가능한 것을 확인후 SIT463ST x PS137: F2 집단을 분석함.
- 현재까지 HRM분석을 수행한 결과 연관군 6번 21.26Mbp~21.28Mbp에서 표현형과의 일치율을 100%를 보이는 결과를 얻음.

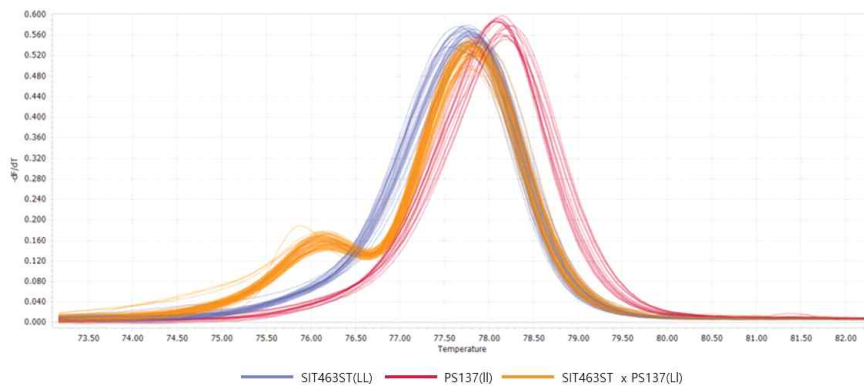


그림 2.105. 6번 연관군의 21.28Mbp 지역 (21,285,956bp)에서의 SNP를 가지고 primer를 작성하여 HRM분석한 Melting curve결과 그래프

- 그림 2.105 에서는 파란색의 곡선이 그룹1 로 결각이 있는 SIT463ST(P1)이고, 빨간색의 곡선이 그룹2로 결각이 없는 PS137(P2)이며 주황색의 곡선이 그룹3로 SIT463ST x PS137: F1을 나타냄.
- 표현형데이터를 기반으로 그룹 1은 우성 Homotype LL이며, 그룹 2는 열성 Homotype II이고, 그룹 3는 LI인 Heterotype라고 추측할 수 있음.

표 2.57. 6번 연관군에서 188개의 SIT463ST x PS137: F2의 표현형과 높은 연관도를 보이는 SNP부분들의 HRM결과; 표현형과 불일치를 보이는 F2개체의 경우 bold와 underline으로 표시하였음.

		위치(bp)	21239403	21262238	21285956	21306879	21324868	21439325
		불일치 개수	18	0	0	2	3	6
세대	번호	표현형 점수						
F ₂ -	12	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	13	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	14	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	15	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	17	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	18	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	21	0	Group3	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	22	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	24	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	25	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	26	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	27	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group3
F ₂ -	28	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	29	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	30	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	32	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	33	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	36	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	38	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	39	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	40	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	42	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	43	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	44	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	45	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	47	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	48	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	52	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	54	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	64	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	74	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	75	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	76	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	78	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1

			위치(bp)					
			21239403	21262238	21285956	21306879	21324868	21439325
불일치 개수			18	0	0	2	3	6
세대	번호	표현형 점수						
F ₂ -	80	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	82	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	84	1	Group3	Group3	Group3	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	85	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	86	0	Group3	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	87	0	Group3	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	89	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	90	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	91	1	Group2	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	93	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	94	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	95	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	96	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	97	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	98	1	Group1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	99	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	100	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	105	1	Group2	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	116	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	121	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	123	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	125	1	Group2	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	127	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	129	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	131	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	132	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	133	1	Group3	Group3	Group3	Group2	Group2	Group3
F ₂ -	135	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	140	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	141	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	143	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	144	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	145	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	146	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	147	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	149	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	150	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	151	1	Group2	Group3	Group3	Group3	Group3	Group1

			위치(bp)	21239403	21262238	21285956	21306879	21324868	21439325
			불일치 개수	18	0	0	2	3	6
세대	번호	표현형 점수							
F ₂ -	152	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	153	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	154	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	155	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	157	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	158	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	159	1	Group1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	160	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	161	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	162	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	184	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	188	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	190	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	192	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	194	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group3
F ₂ -	196	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	198	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	199	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	200	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	201	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	202	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	203	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	204	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	205	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	206	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	207	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	208	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	209	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	210	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	211	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	212	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	213	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	214	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	215	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	216	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Unknown
F ₂ -	217	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	218	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group3
F ₂ -	219	2	Group3	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1

			위치(bp)					
			21239403	21262238	21285956	21306879	21324868	21439325
불일치 개수			18	0	0	2	3	6
세대	번호	표현형 점수						
F ₂ -	220	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	221	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	222	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	223	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group3	Group3
F ₂ -	224	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	225	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	226	0	Group3	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	227	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	228	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	229	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	230	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	231	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	232	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	233	2	Group3	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	234	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	235	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	236	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	237	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	238	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	239	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	240	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	241	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	242	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	243	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	244	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	245	1	Group2	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	246	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	247	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	248	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	249	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	250	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	251	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	252	0	Group3	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	253	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Unknown	Group1
F ₂ -	254	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	255	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	256	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	257	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3

			위치(bp)					
			21239403	21262238	21285956	21306879	21324868	21439325
불일치 개수			18	0	0	2	3	6
세대	번호	표현형 점수						
F ₂ -	258	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	259	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	260	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	261	2	Group3	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	262	1	Group2	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	263	2	Group3	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	264	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	265	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	266	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	267	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	268	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	269	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	270	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	271	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	272	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	273	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	274	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	275	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	276	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	277	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	278	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	279	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	280	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	281	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	282	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	283	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	284	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2
F ₂ -	285	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	286	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	287	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	288	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	289	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	290	2	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1	Group1
F ₂ -	291	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	292	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	293	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	294	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	295	1	Group2	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3

		위치(bp)	21239403	21262238	21285956	21306879	21324868	21439325
		불일치 개수	18	0	0	2	3	6
세대	번호	표현형 점수						
F ₂ -	296	1	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3	Group3
F ₂ -	298	0	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2	Group2

- 6개의 프라이머 세트 중 6번 연관군상의 21,262,238bp지역과 21,285,956bp지역에서 표현형과의 불일치의 개수가 0개로 100% 일치하는 결과를 얻음.
- F₂ 188개체에 대해 HRM분석을 한 결과 확보한 100% 연관도를 보이는 2개의 프라이머 세트 사이에는 3개의 유전자 claxxx362, claxxx363, claxxx364가 있음.
- Wei, Chen et al.(2017, Plos one)의 기존에 수박의 엽결각 연구에서 밝혀진 유전자와는 다른 유전자의 결과를 얻음.
- 후보로 선정된 3개의 유전자 claxxx362, claxxx363, claxxx364 중 가장 연관이 높은 유전자의 선발을 위해 부모집단 SIT463ST, PS137을 대상으로 하여 유전자발현 정도를 비교하기 위한 Quantitative real-time PCR(qRT-PCR)분석을 진행하였음.
- 모 부분 집단인 수박PS137, SIT463ST의 식물체를 약 한달동안 키워 표현형검정을 진행하였던 9번째 본엽에서sampling을 진행하였음. 두가지 부분에서sampling을 진행하였는데 하나는 결각이 있는 경우인 SIT463ST에서 가장 깊게 함몰된 부분을 하였고 부위a로 명명하였으며 결각이 없는 PS137에서는 함몰되어 있지는 않지만 그의 동일 부위를sampling하였음. 두번째 부분으로는 첫번째 진행하였던 함몰부의 바로 위쪽에 있는 돌출부로 선정하여 양쪽의 돌출부를 합쳐서 부위b로 명명하고 RNA를 추출하였음. sampling부위 선정을 위해서 이전 연구를 참고하였는데 목화에서 결각을 형성하는 유전자 *Gorai.002G244000*의 발현량 비교를 위하여 함몰되어 있는 부위의 바로 위에 위치한 돌출부에서 실험을 진행한 결과 가장 유의미한 결과를 보여줬다 (HE et al. 2018). 따라서 본 연구에서도 이 두가지 부위A, B의 mRNA를 추출하여 실험을 진행하였음.

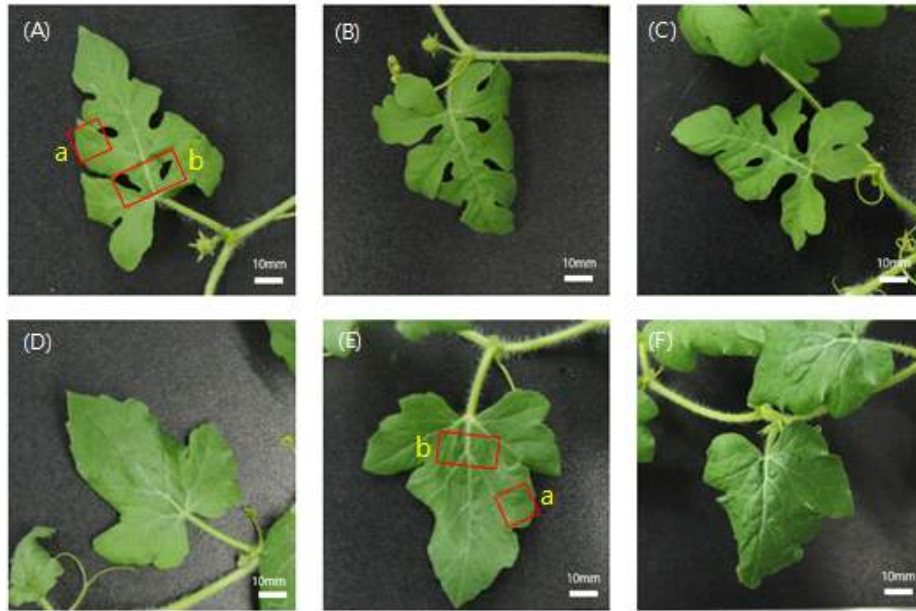


그림 2.106. 수박 엽결각 연관유전자 qRT-PCR sampling 부위

- 본 실험에서 사용된 모 부분을 이용하여 위 유전자들의 발현량을 비교하기 위해 qRT-PCR 을 진행한 결과 앞에서 정한 부위 a, b 모두 결각계통 SIT463ST보다 무결각계통 PS137에서 유전자 Claxxx62의 발현량이 높은 것을 통계검정을 통해 확인할 수 있었으며, 유전자 Claxxx63는 부위a를 대상으로 하였을 때 qRT-PCR primer중 Cla363-2에서 발현량의 차이가 없음을 제외하고 모두 수박 무결각계통 PS137에서 더 높은 발현량을 보였다. 그러나 유전자 Claxxxx64의 경우 부위 a, b 모두에 대하여 결각계통 SIT463ST의 발현량이 무결각계통PS137보다 더 높은 것을 통계검정을 통해 확인하였음.

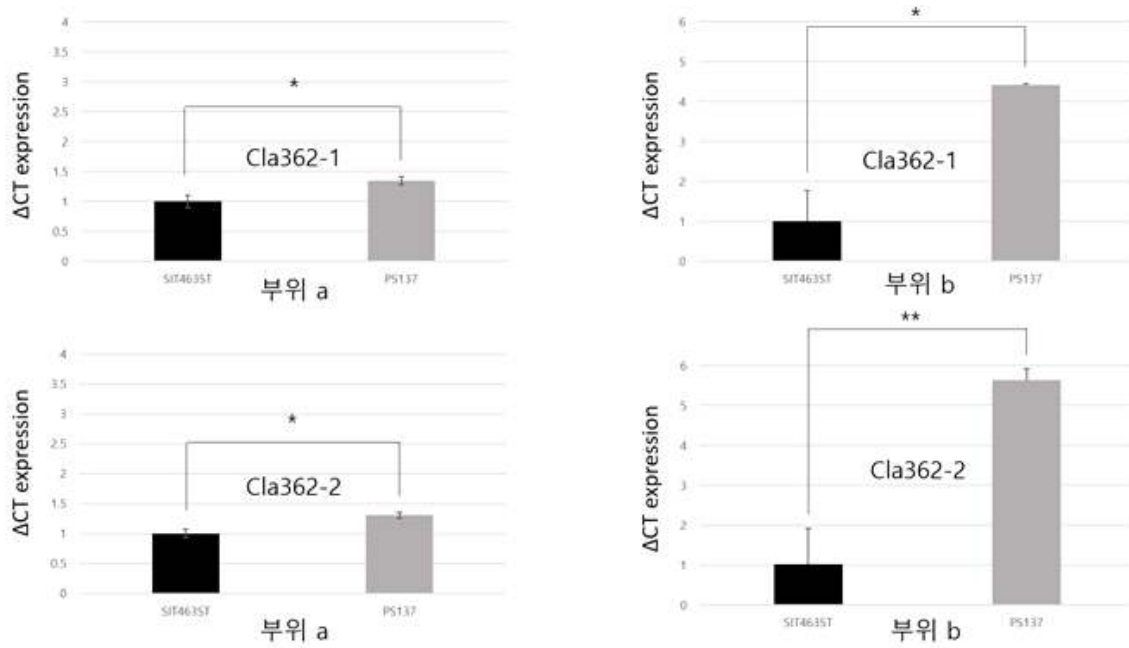


그림 2.107. claxxx362 유전자를 이용한 qRT-PCR결과

Values are mean \pm SD. A Standard deviation test indicated a significant difference in * P < 0.05; ** P < 0.01; NS: nosignificant.

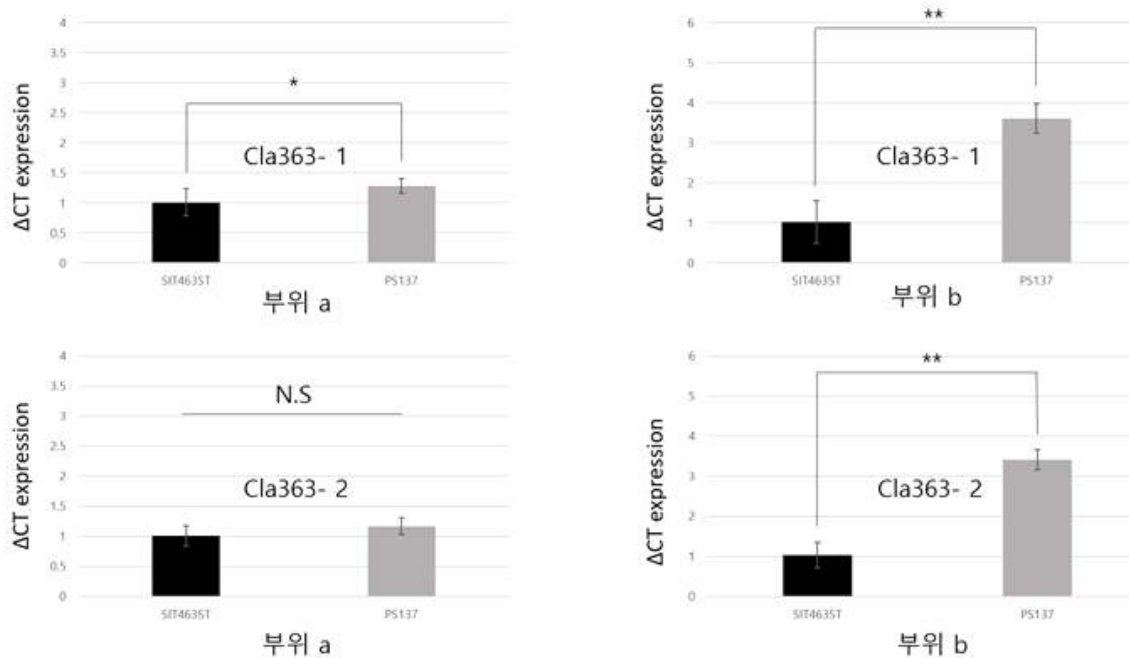


그림 2.108. claxxx363 유전자를 이용한 qRT-PCR결과

Values are mean \pm SD. A Standard deviation test indicated a significant difference in * P < 0.05; ** P < 0.01; NS: nosignificant.

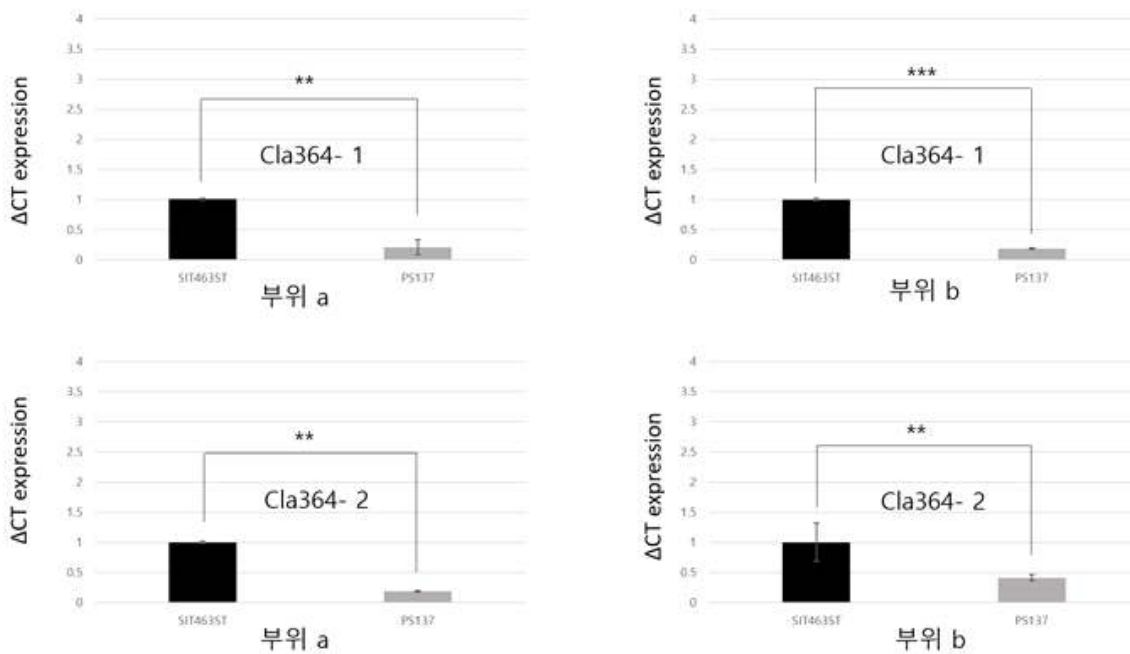


그림 2.109. claxxx364 유전자를 이용한 qRT-PCR결과

Values are mean \pm SD. A Standard deviation test indicated a significant difference in * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; NS: nosignificant.

- 추가적으로 위 세 개 유전자들의 coding sequence(CDS) 부분의 서열을 97103과 대비하여 모부분을 align하여 비교를 해보았을 때, claxxx362와 claxxx363 에서는 차이가 없었으며, phospho protein phosphatase를 encoding하는 유전자 claxxx364에서는 무결각계통 PS137에서 하나의 SNP가 있음을 확인할 수 있었음.
- 하지만 protein sequence를 비교해보았을 때, synonymous였으므로 protein 발현에는 영향을 미치지 않았을 것이라 예상하였음. 따라서 위 세 개의 후보 유전자의 promoter에 의한 가능성이 있어 각 유전자들의 5', 3' 3kb지역 안에서 sequence variation 부분을 확인하였으며, PlantPAN 3.0와 Softberry database를 이용하여, transcription factor binding factor search를 진행하였음. Database를 통해 검색된 transcription factor binding factor를 모두 파란색 윗 줄로 표시를 하였으며 variation을 포함하는 경우엔 주황색 윗 줄로 표시를 하였음. 유전자 claxxx362의 경우 결각계통 SIT463ST와 비교해보았을 때 무결각계통 PS137의 5'upstream 3kb지역에서 1,419bp 위치에 A deletion이 있었고, 3'downstream 3kb 지역에서는 958bp위치에 A deletion이 확인되었음.
- 유전자 claxxx363의 경우에는 결각계통 SIT463ST와 비교해보았을 때 무결각계통 PS137의 5'upstream 3kb지역에서 172bp 위치에 T deletion과 2,387bp 위치에 T substitution이 있었고, 3'downstream 3kb 지역에서는 sequence variation이 확인되지 않았음.
- 유전자claxxx364의 경우에는 결각계통 SIT463ST와 비교해보았을 때, 무결각계통 PS137

의 5' upstream 3kb 지역에서 1,756bp-1,757bp 위치의 AT insertion과 2,669bp-2,670bp 위치의 TA insertion을 확인하였고, 3' downstream 3kb 지역에서는 90bp 위치에 T deletion과, 2,305bp 위치의 T substitution을 확인하였음. 본 결과는 특허등록된 바 있음(2021).

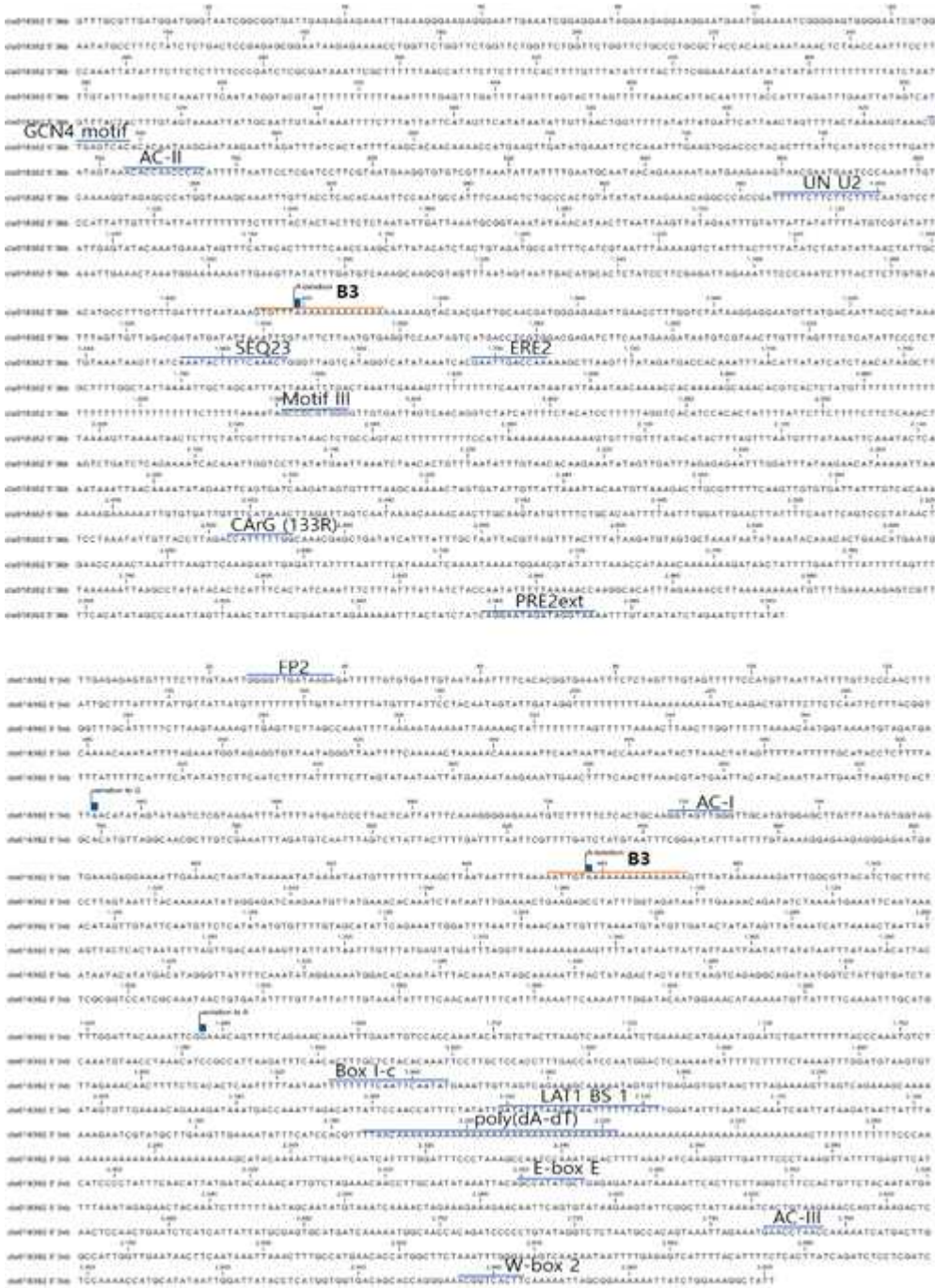


그림 2.110. Sanger 염기서열 분석을 통한 claxxxx62 5' upstream 3kb 지역의 transcription factor binding site 확인

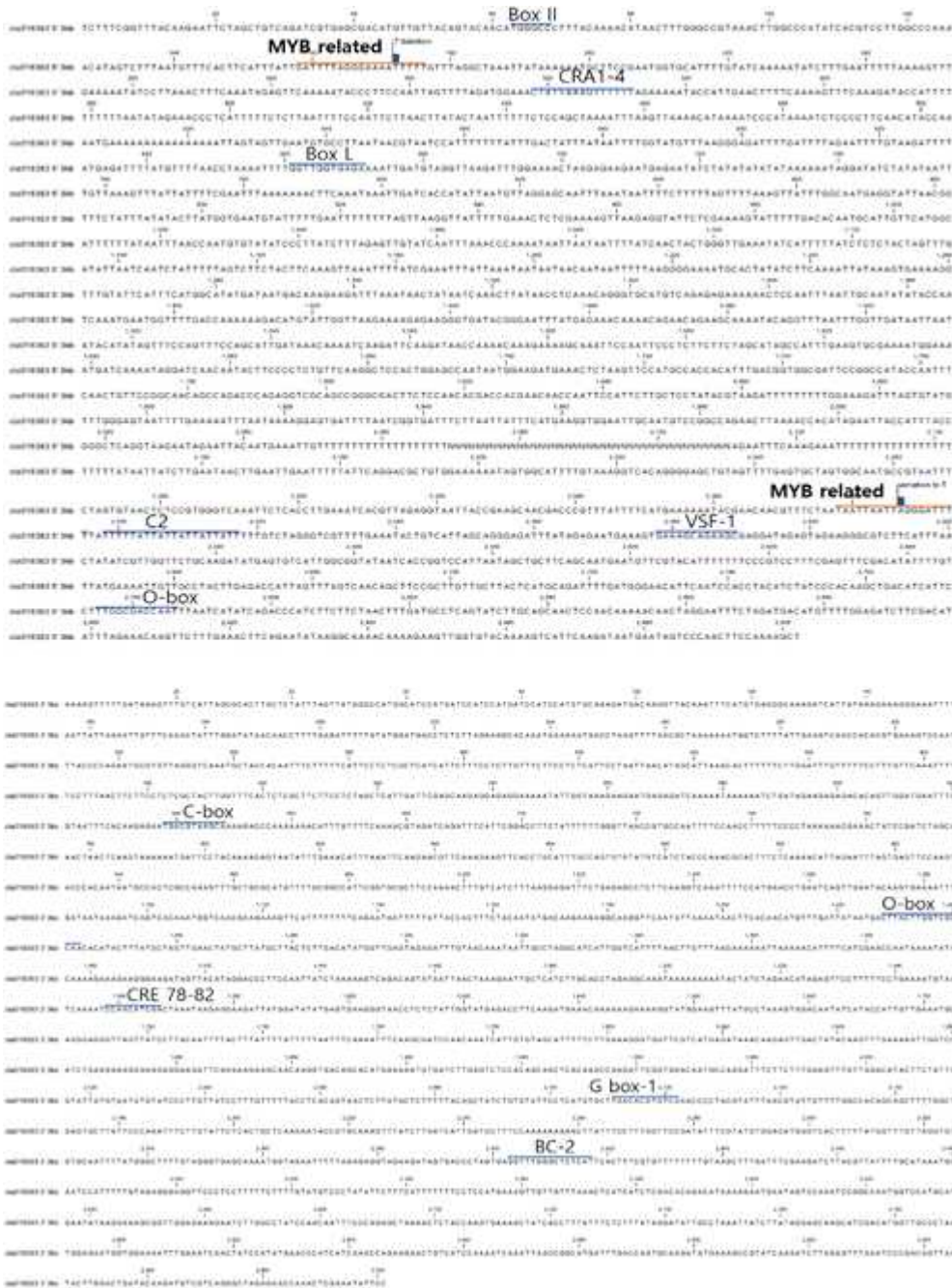


그림 2.111. Sanger 염기서열 분석을 통한 claxxxx63 5' upstream 3kb 지역의 transcription factor binding site 확인

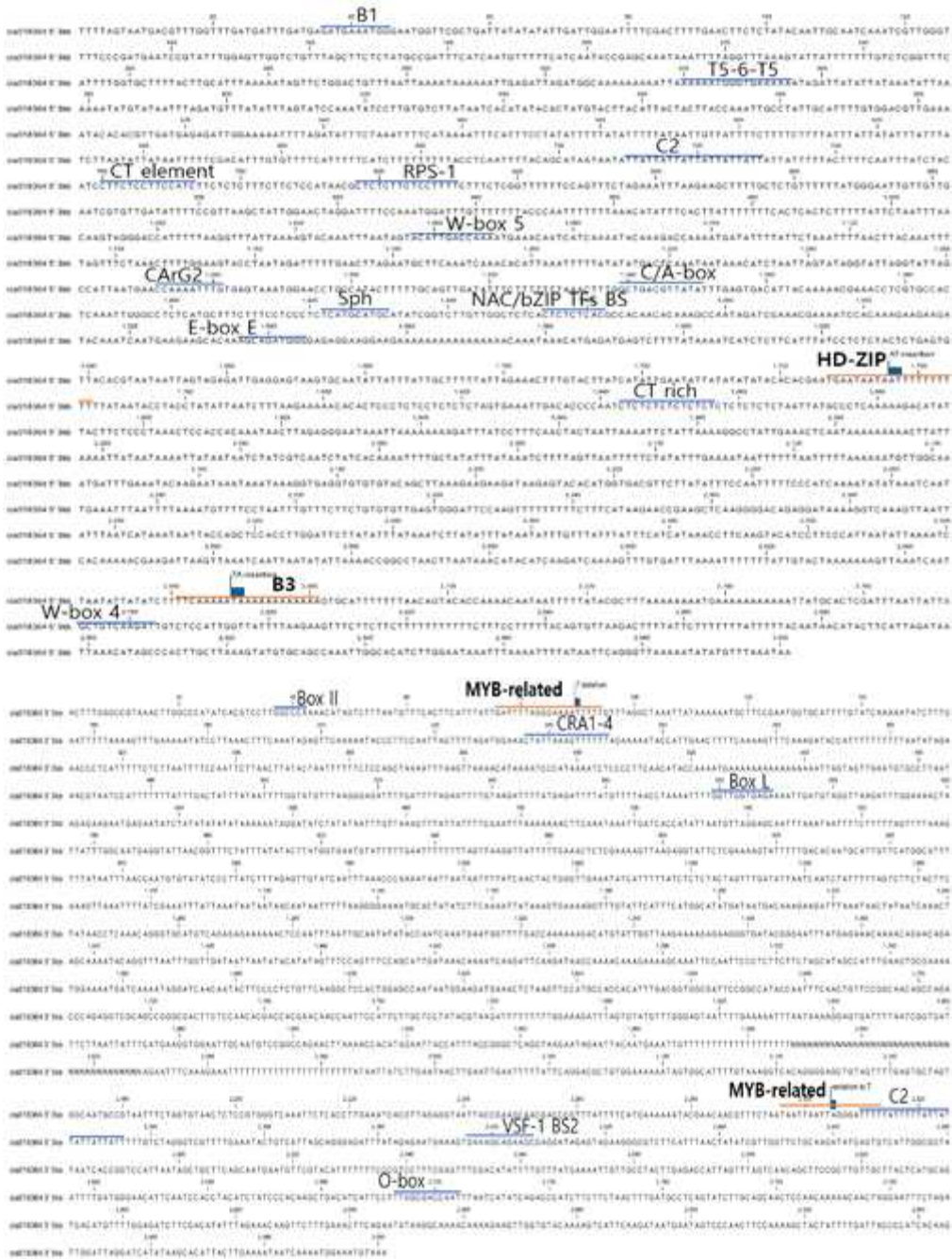


그림 2.112. Sanger 염기서열 분석을 통한 claxxxx64 5' upstream 3kb 지역의 transcription factor binding site 확인

제 1 절 수박종자 순도 및 발아 검정기술 개발

1. 수박종자 순도 검정기술 개발

씨 없는 종자의 품질평가 항목 중에서 순도는 상품의 신뢰도에 큰 영향을 끼친다. 일반 수박(2배체, 염색체) 유묘에 콜히친(colchicine) 처리를 하면 처리부분부터 세포분열시 방추사 기능을 저해하여 세포 내의 염색체 수가 2배(4배체)로 변한다. 4배체 상태에서 수박의 암술에 정상적인 2배체 수박의 꽃가루를 수분하여 만든 종자이다. 하지만 수분 시 만들어지는 종자가 3배체일 확률이 100% 아니며, 2배체 또는 4배체 종자가 발생할 확률이 5% 내외로 존재한다. 또한 시술자의 기술에 따라 3배체 종자 생산의 편차가 심하여 순도 관리가 쉽지 않다. 또한 3배체를 만드는 과정에서 2배체와 4배체가 혼입되는 경우도 자주 발생하므로 수박 종자의 유전적 배체 수의 관리가 시급한 실정이다.

본 연구에서는 비파괴 순도 선별을 위하여 초분광 Vis/NIR, SWIR영상 및 컬러영상의 활용 가능성을 고찰하였다. 초분광 영상은 대상체의 공간 정보는 물론 물리화학적 정보를 영상으로 획득 가능하므로 일반 칼라 영상 보다 더 정밀한 분석이 가능하다는 장점이 있다. 수박 종자의 3배체 순도 검정을 위하여 초분광 영상기술을 적용하고, 분광분석을 통해 최소 파장 구명하고 선별 모델을 구축하고자 하였다. 또한 칼라 영상에 딥러닝 기술을 적용하여 2, 4배체와 3배체를 구분할 수 있는 모델을 구축하고자 하였다.

가. 수박종자 순도 예측 모델

(1) 초분광영상을 활용한 3배체 분류모델 개발

주관기관에서 제공한 2, 3, 4배체 종자 각각 1000립, 총 3000립을 랜덤 추출하여 초분광 영상 분석을 수행하였다. 각 배체는 종자를 제공한 기관에서 미리 구분하여 제공되었다.

(가) 초분광 영상 획득

종자 샘플을 플레이트 위에 배열한 뒤, 라인 스캔을 통하여 초분광영상 정보를 획득하였다. Fig. 1은 수박 종자의 측정을 위해 제작한 플레이트에 종자를 배열한 모습이다. 샘플은 400 nm ~ 1800 nm의 스펙트럼 파장 범위 내에서 측정되었다.



Fig. 1. Samples arrangement for HSI scanning.

(나) 초분광 가시근적외선(Vis/NIR) 영상 다변량분석 결과

Table 1과 Table 2는 다변량분석, Partial Least Square-Determinant Analysis (PLS-DA) 모델을 이용하여 배체별 순도를 구분한 결과이다. 가장 높은 전처리방법은 SG 1차 미분법으로 85%의 validation 정확도를 보였다(Fig. 2).

Table 1. Classification results for the calibration set for purity estimation of watermelon seed using the PLD-DA model developed with Vis/NIR hyperspectral images

Pep.	Samples	Calibration			Calibration accuracy (%)			Overall accuracy
		2x	3x	4x	2x	3x	4x	
Mean	2572	778	718	607	90.7	83.8	70.8	81.8
Max	2572	778	718	624	90.7	83.8	72.8	82.4
Range	2572	778	697	587	90.7	81.3	68.5	80.2
MSC	2572	778	725	620	90.7	84.6	72.4	82.5
SNV	2572	764	712	613	89.0	83.1	71.5	81.2
S.G. 1st	2572	788	740	638	91.8	86.4	74.5	84.2
S.G. 2st	2572	767	728	584	89.4	84.9	68.2	80.8
Raw	2572	777	715	598	90.6	83.4	69.8	81.2

Table 2. Classification results for the validation set for purity estimation of watermelon seed using the PLS-DA model developed with Vis/NIR hyperspectral images.

Pep.	Samples	Validation			Validation accuracy (%)			Overall accuracy
		2x	3x	4x	2x	3x	4x	
Mean	428	126	120	111	88.7	83.9	77.6	83.4
Max	428	128	119	109	90.1	83.2	76.2	83.2
Range	428	129	120	103	90.8	83.9	72.0	82.2
MSC	428	124	118	109	87.3	82.5	76.2	82.0
SNV	428	121	113	105	85.2	79.0	73.4	79.2
S.G. 1st	428	135	120	109	95.1	83.9	76.2	85.0
S.G. 2st	428	126	106	96	88.7	74.1	67.1	76.6
Raw	428	129	120	108	90.8	83.9	75.5	83.4

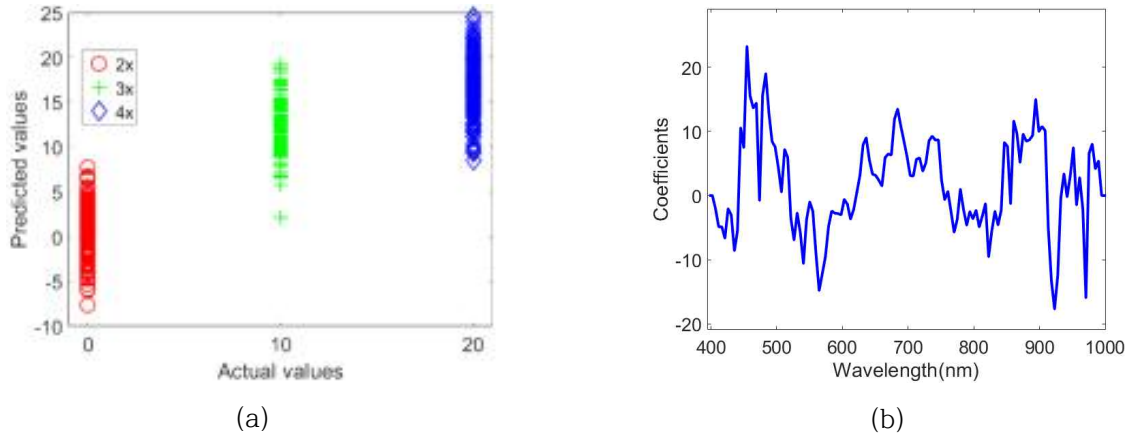


Fig. 2. Results of PLS-DA analysis of purity estimation of watermelon seeds using hyperspectral Vis/NIR image. (a) PLS-DA classification plot, (b) beta coefficient curve from the PLS-DA model.

(다) 초분광 단파적외선(SWIR) 영상 다변량분석 결과

개발된 PLS-DA 모델의 결과는 Table 3, Table 4와 같다. 가장 높은 정확성을 보이는 전처리 분석법은 Range normalization으로 Calibration은 94.0%, Validation은 93.7%의 정확도를 나타내었다.

초분광 영상에 적용하기 위하여, Fig. 3와 같이 수박 종자(a) 이외의 배경을 영상 처리로 제거한 후, 각각의 종자 샘플을 인식하여 라벨링(b)을 진행하였다. 라벨링한 각각의 샘플에서 초분광 스펙트럼을 추출하여 평균을 취한 후, 전처리를 수행한다. 이전에 선정된 전처리 평균값 스펙트럼 데이터를 PLS-DA 분석에 적용하여 최소의 파장별 가중치를 추출한 후, 초분광 영상에 PLD-DA 가중치를 적용한다(c). 가중치를 적용한 영상에 문턱값을 적용하면 최종 PLS-DA 영상이 된다(d).

PLS-DA의 모델 결과에서 1292 nm, 1404 nm, 1534 nm의 가중치가 가장 큰 것으로 나타났다(Fig. 4(a)). 1292 nm는 C-H 2nd overtone에 가까우며 CH결합 구조를 의미한다, 1404 nm는 O-H 1nd overtone으로 ROH(OH가 첨가된 탄소화합물), 1534 nm는 C-H에 해당된다. 이러한 화학 구조 성분이 순도를 선별과 관련된 주요 인자임을 알 수 있다.

PLS-DA 모델 적용 예측 결과는 Fig. 5와 같이 2배체는 파란색, 3배체는 빨간색 4배체는 흰색으로 나타났다. 영상에서는 306개의 종자 중 9개의 오차가 발생하였으며 정확도가 97%로 나타났다. 이러한 영상의 결과는 스펙트럼의 PLS-DA 모델 정확도인 93%보다 상회하는 결과로 신뢰도가 매우 높음을 알 수 있었다.

Table 3. Classification accuracy of PLS-DA model with various preprocessing methods developed for SWIR hyperspectral imaging data of watermelon seed samples for the calibration sets (2X, 3X, 4X).

Preprocessing	Sample	Calibration			Calibration accuracy (%)			Overall accuracy
		2x	3x	4x	2x	3x	4x	
Mean	2572	824	771	656	96.0	90.0	76.5	87.5
Max	2572	777	719	606	90.6	83.9	70.7	81.7
Range	2572	843	827	748	98.3	96.5	87.3	94.0
MSC	2572	850	814	744	99.1	95.0	86.8	93.6
SNV	2572	852	814	745	99.3	95.0	86.9	93.7
S.G. 1st	2572	852	735	703	99.3	85.8	82.0	89.0
S.G. 2st	2572	843	807	751	98.3	94.2	87.6	93.4
Raw	2572	828	809	715	96.5	94.4	83.4	91.4

Table 4. Classification accuracy of PLS-DA model with various preprocessing methods for SWIR hyperspectral imaging data of watermelon seed samples for the Validation sets (2X, 3X, 4X).

Preprocessing	Sample	Validation			Validation accuracy (%)			Overall accuracy
		2x	3x	4x	2x	3x	4x	
Mean	428	138	129	103	97.2	90.2	72.0	86.4
Max	428	131	123	93	92.3	86.0	65.0	81.1
Range	428	142	138	121	100.0	96.5	84.6	93.7
MSC	428	142	136	121	100.0	95.1	84.6	93.2
SNV	428	142	136	120	100.0	95.1	83.9	93.0
S.G. 1st	428	142	117	113	100.0	81.8	79.0	86.9
S.G. 2st	428	142	132	117	100.0	92.3	81.8	91.4
Raw	428	137	135	117	96.5	94.4	81.8	90.9

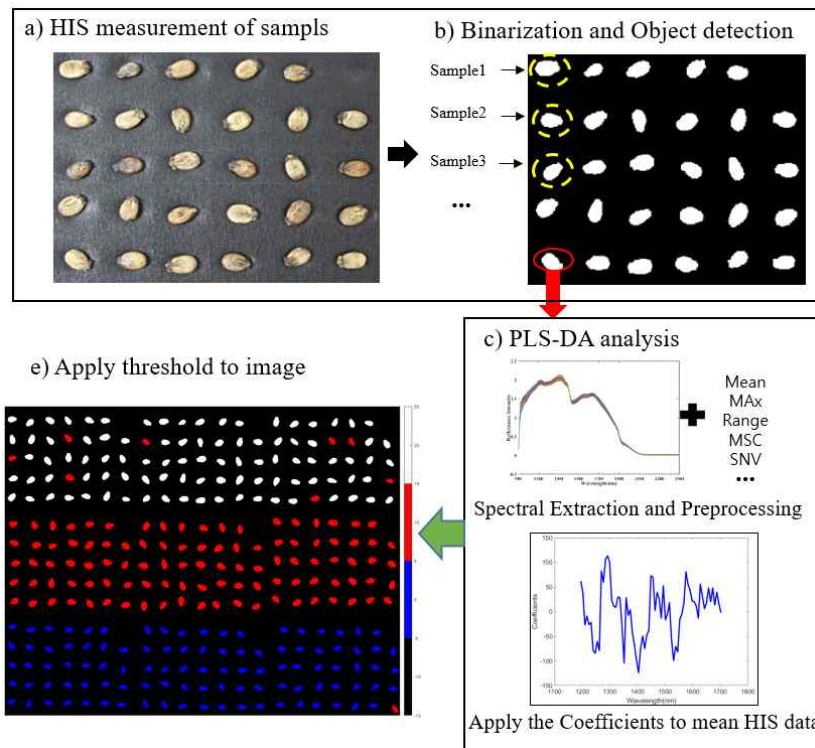


Fig. 3. Application of PLS-DA model to hyperspectral image for spectral analysis and generating classification images.

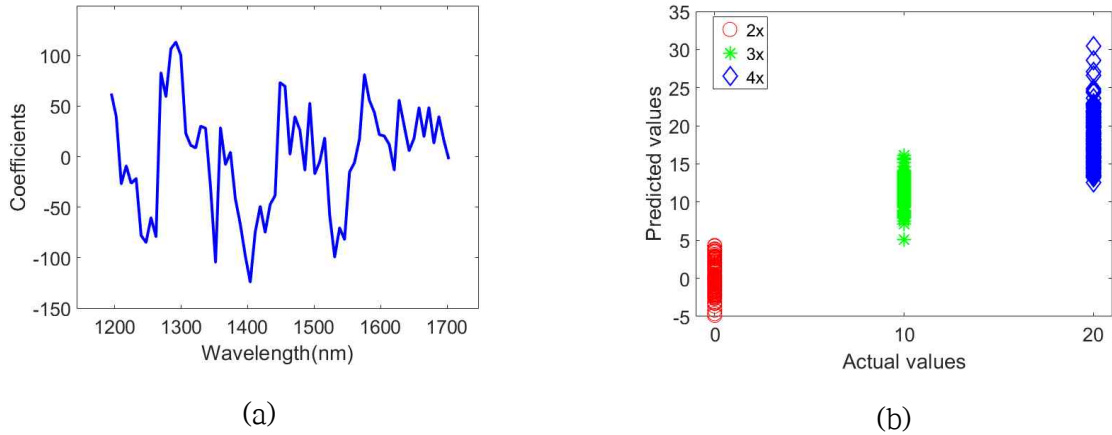


Fig. 4. Results of PLS-DA analysis of SWIR spectral data of watermelon seeds. (a) Beta coefficient curve from the PLS-DA model, (b) PLS-DA classification plot.

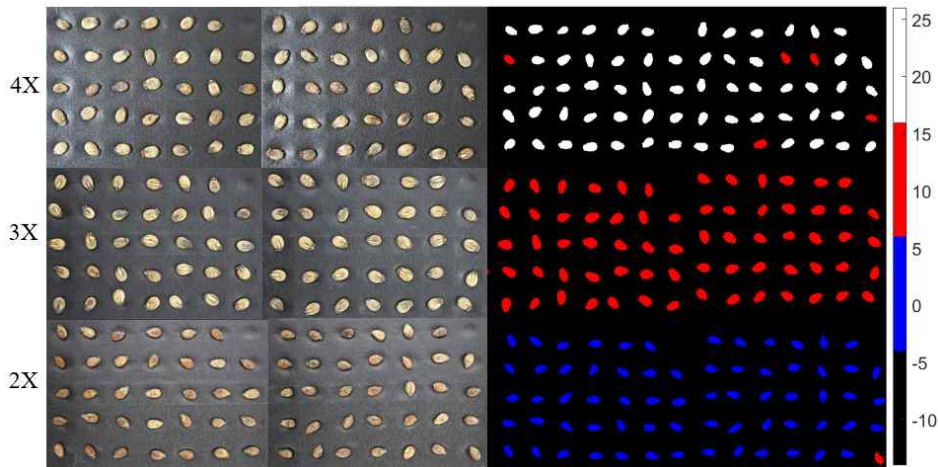


Fig. 5. Classification map of the PLS-DA model for watermelon seed samples.

(2) 컬러영상 및 딥러닝을 활용한 3배체 분류모델 개발

수박종자 3배체와 2, 4배체를 분류하기 위해 컬러영상기반 딥러닝 모델을 활용하였다. 딥러닝 분류모델은 Deeplab v3+ 전이학습을 수행하였으며 기반 네트워크인 Resnet18, Mobletv net 그리고 Xception net을 사용하여 종자 순도 선별에 적합한 알고리즘 조합을 연구하였다. 각각 배체의 수박종자는 Fig. 6과 같이 $299 \times 299 \times 3$ ($[299 \ 299 \ 3]$) 크기의 컬러영상을 사용하였다. 모델은 1,134개의 컬러영상으로 개발되었으며, 모델 학습 세트는 전체 데이터의 70%의 데이터로 사용되었으며, 20%는 검증, 10%는 테스트 데이터로 사용되었다. 개발된 딥러닝 네트워크의 성능 향상을 위하여 Fig. 7(a)와 같이 녹색 배경을 기반으로 종자 선별에 적용하였으며 영상에서 순도를 구분하기 위하여 Fig. 7(b), (c), (d)와 같이 4배체는 빨강, 3배체는 하늘색, 2배체는 보라색으로 표시하도록 설정하였다.

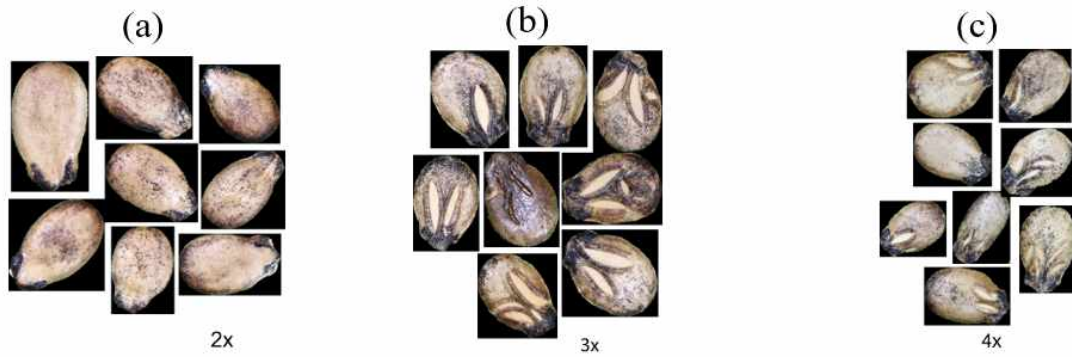


Fig. 6. Watermelon seed images used for deep-learning analysis; (a) 2x, (b) 3x and (c) 4x.

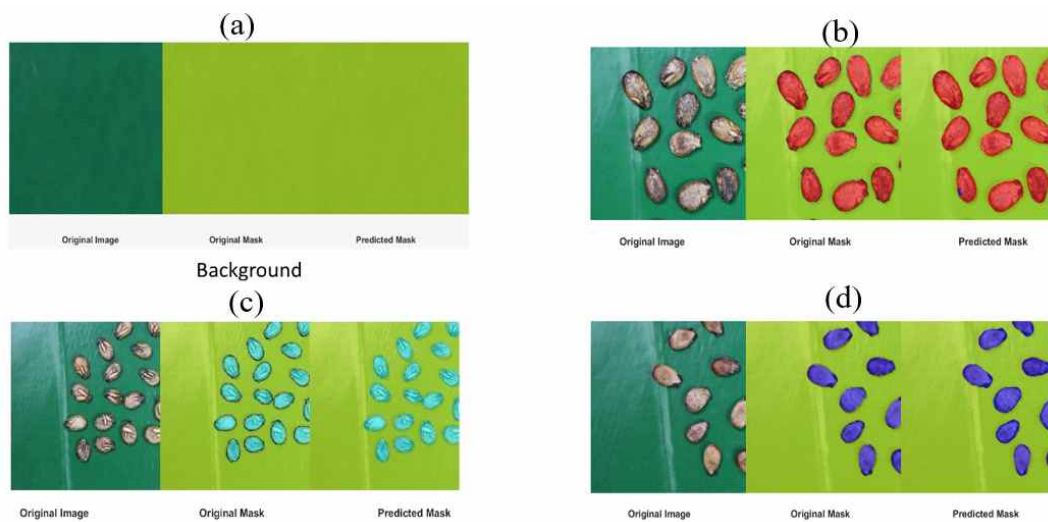


Fig. 7. Image labeling. (a) background, (b) 4x seeds, (c) 3x seeds, and (d) 2x seeds.

(가) 딥러닝 모델 개발

① 카메라 색상 보정

이미지를 획득하기 전에 카메라 이미지 색상을 수정하여 이미지 채도가 없는지 확인하고 획득한 이미지에서 실제 색상과 일치하는 색상을 확인하였다. 백색 LED 조명용 mvBlue 카메라 RGB-D50의 매트릭스 비전 컬러 모드는 기본으로 사용되었으며 노출 시간 속성, 카메라 설정에서 조정된 Red(R) 및 Blue(B)의 화이트 밸런스 비율이다. R, G, B 값이 250인 흰색 기준(99% 반사율의 흰색 테플론 시트)의 8비트 이미지가 획득되었다. 색상 검사기를 사용하고 D50 조명에 대한 색상의 값과 일치시켜 노출과 빨강 및 파랑 화이트 밸런스 백분율을 조정하였다.

② 이미지 비네팅 효과 보정

비네팅 효과는 유효 조리개 크기에 의해 입사 광선 다발의 일부가 차단되어 이미지 주변부 근처의 지점에서 이미지가 점차적으로 사라지는 현상을 나타낸다. 이 효과를 제

거하기 위해 플랫폼 필드 수정을 사용했다. 취해진 조치는 아래와 같다.

$B = \text{imflatfield}(RGB, SIGMA)$, RGB의 음영 성분을 근사화하기 위해 SIGMA의 표준 편차와 함께 가우스 평활화를 사용하여 컬러 이미지 RGB에 평면 필드 보정을 적용했다. RGB 이미지의 경우 이미지가 HSV 색 공간으로 변환되고 평면 필드 보정이 값 채널에 적용되었다. 결과 B는 A와 크기 및 클래스가 동일한 RGB 이미지였다.

③ 이미지 라벨링

획득한 RGB 이미지는 MATLAB 이미지 라벨러를 사용하여 라벨링되었다. 레이블을 지정하기 위해 각각 레이블이 0, 1, 2 및 3인 배경, 2x, 3x 및 4x 시드를 포함하여 4개의 클래스가 있다. Fig. 8는 모델 학습 및 개발 이전의 4개 클래스에 해당하는 딥러닝 레이블을 보여준다.

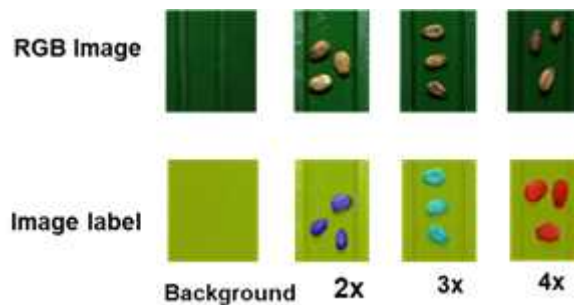


Fig. 8. Deep learning model labels

④ Semantic segmentation

모델은 UNET과 DeepLabv3+(Resnet18, mobilenet2, xception)의 조합으로 개발되었다. Deep Learning Toolbox의 trainNetwork를 사용하여 네트워크를 학습했다. 실험 목적에 맞게 네트워크 구조를 수정하였다. 네트워크의 입력 및 출력 계층은 각각 m 이 1024 크기인 $[m \times m \times 3]$ 및 $[m \times m \times 1]$ 으로 수정하였다. 학습 클래스는 4개로 수정하였다. UNET 구조 네트워크의 경우 교차 엔트로피 손실의 기본 픽셀 분류 계층 손실 함수가 일반화된 주사위 손실로 변경되었다. 교차 엔트로피 손실은 균형 잡힌 데이터 세트에서 가장 잘 작동하는 반면 약간 치우친 데이터 세트는 일반화된 주사위 손실에서 가장 잘 작동하기 때문에 교차 엔트로피 손실보다 일반화된 주사위 손실을 선택하였다. 따라서 교차 엔트로피 손실은 분포 기반 손실이고 일반화된 주사위 손실은 영역 기반 손실이므로 딥러닝으로 개발된 모델에서 영역 기반 특징이 시드 종자에서 삼배체 종자를 구별하는 데 가장 중요할 수 있었다.

⑤ 이미지 수 확대

얼은 이미지는 무작위 회전(-20, 20 0), 무작위 반사(x, y) 및 무작위 자르기를 통해 증가시켰다.

⑥ 학습 매개변수

모델은 34,776개의 이미지로 개발되었으며 training set은 70%, validation set은 20%, test set은 10% 로 구성하였다. 모델 학습 매개변수는 Table 5에 나타내었다. 학습 및 모델 구성에 사용되는 컴퓨터 모델의 사양은 Table 6에 나타내었다.

모델 구축 후 영상 예측을 위한 최적의 분류와 최소 계산 시간을 갖는 인코더-디코더 모델 조합을 온라인 시스템에 적용하고자 하였다.

Table 5. Model training parameters

Training parameter	Size
Input training image size	[1024 x 1024 x 3]
Network depth	4
Batch size	12
Optimizer	Stochastic gradient descent method (sgdm)
Learning rate (LR) initial	0.001
Epoch (max)	40
Shuffle every epoch	enabled
Learning rate drop factor	0.5
Learning rate drop patience	10
Network filter size (f-size)	3
Output prediction size (label image output)	[1024 x 1024 x 1]

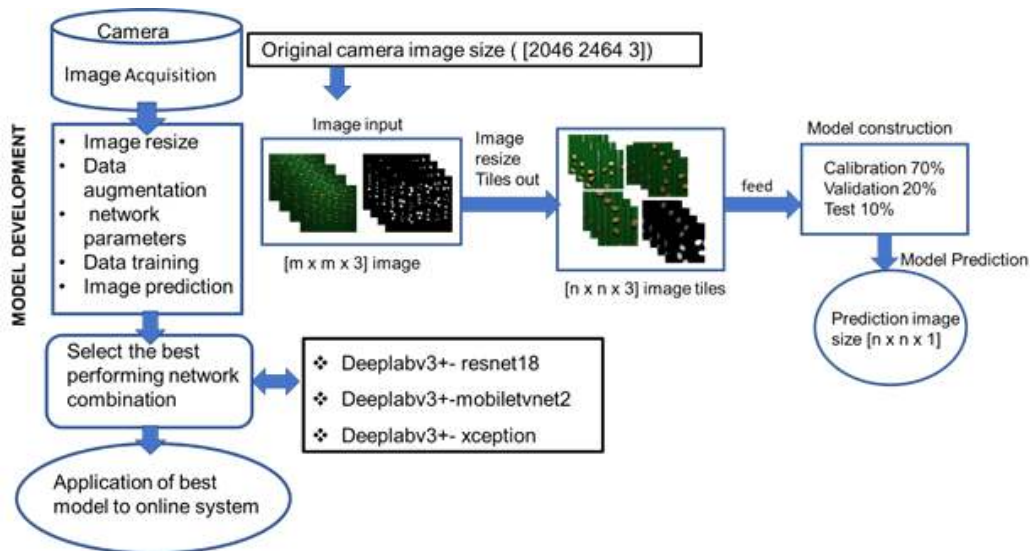


Fig. 9. Implementation structure for model construction

Table 6. Computer parameters used for deep learning training

<i>Component</i>	<i>System specification</i>
RAM	256 GB DDR4
Operating software	Linux/Ubuntu 18.04
GPU	4, NVIDIA Titan RTX (24 GB GDDR6)
CPU	2, Intel Xeon® Gold 6230 Processor (20 cores @ 2.1 GHz)

(나) Resnet18 딥네트워크 적용 결과 (100 layers)

컬러영상에서 각 종자의 객체인식과 종자의 순도를 동시에 분석할 수 있는 모델을 개발하기 위하여 Semantic Segmentation 알고리즘인 Deeplab v3+를 사용하였다. Convolution 네트워크로 deeplab을 사용하고 deconvolution 네트워크로 레이어가 100개인 Resnet 18을 사용하며, 총 1134개의 이미지를 학습하였다. 이 조합 모델은 Table 7과 같이 종자의 객체인식 정확도와, 종자의 순도 선별 정확도가 모두 90% 이상의 정확도를 얻는 것을 확인하였다. 이 모델의 1134개의 영상을 분류하고 예측하는 데 걸린 총 시간은 3.7초였으며, 분류 결과는 Fig. 10과 같다.

Table 7. Classification results with Resnet18.

Global accuracy (%)	Mean accuracy (%)	Mean IoU (%)	Weighted IoU (%)	Mean BFscore (%)
98.2	94.2	88.4	96.6	92.6

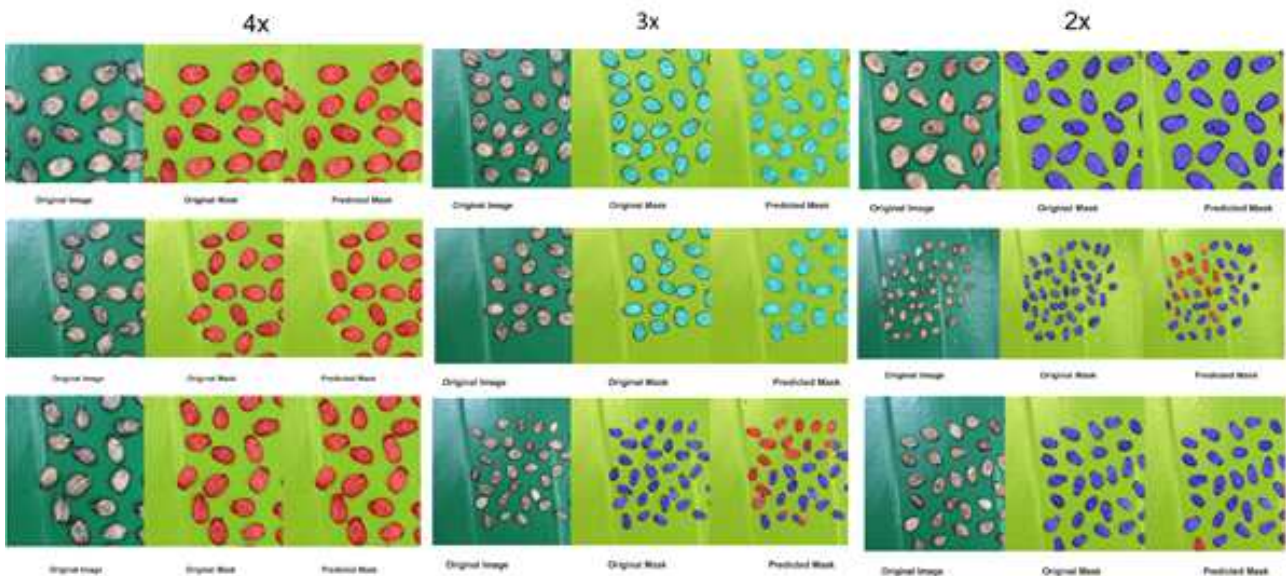


Fig. 10. Resnet18 deep learning model for image classification.

(다) Mobilenetv2 네트워크 적용 결과 (186 layers)

Mobilenetv2 net은 186 개의 레이어가 있는 모델이다. 개발된 모델 정확도는 Table 8과 같이 높은 선별 정확도가 나타났지만, 객체 인식 정확도가 약 83%로 다소 낮은 것을 확인할 수 있었다. 또한 수박 종자의 순도를 예측하고 분류 결과는 Fig. 11과 같았으며 처리하는데 걸리는 시간은 46.7초이었다.

Table 8. Mobilenetv2 classification results.

Global accuracy (%)	Mean accuracy (%)	Mean IoU (%)	Weighted IoU (%)	Mean BFscore (%)
97.9	91.8	85.6	96.3	82.9

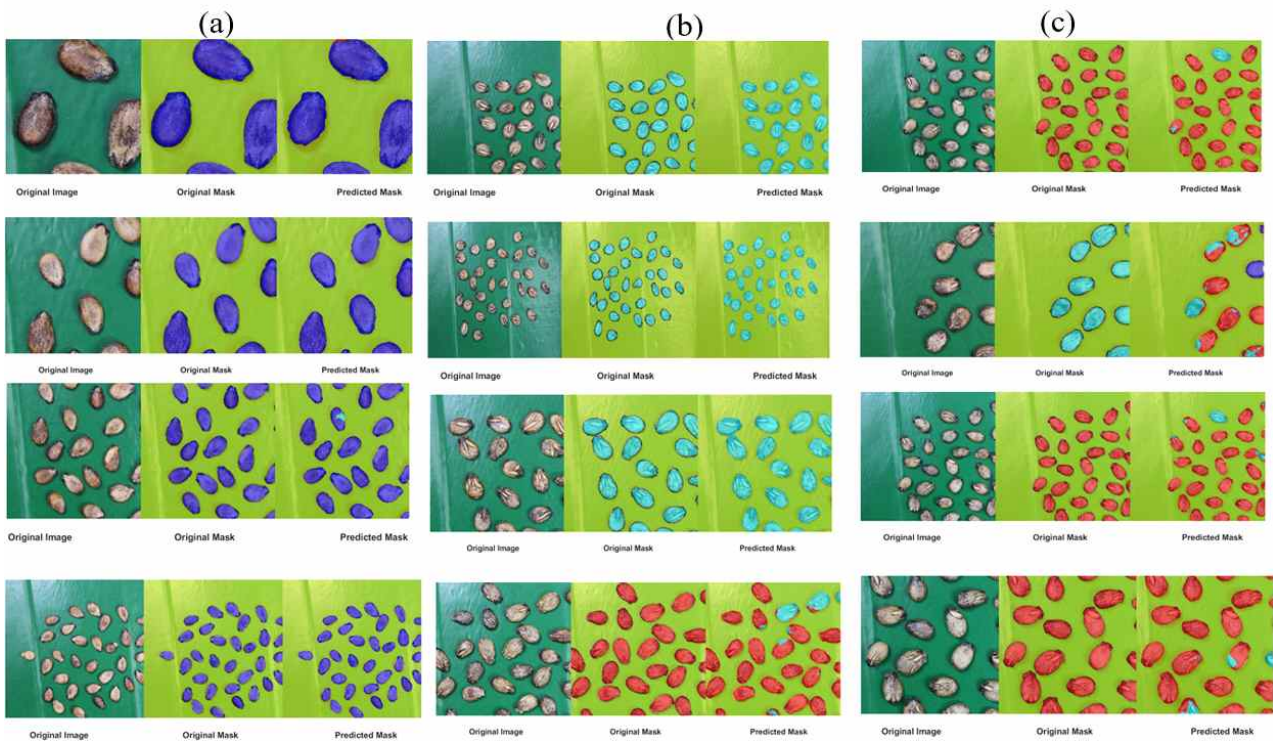


Fig. 11. Mobletv2 model image classification results.

(라) Xception 네트워크 적용 결과 (206 layers)

Xception net은 206개의 레이어가 있는 모델이다. 개발된 모델 정확도는 Table 9와 같이 앞의 Resnet18, Mobilenetv2 보다 종자 선별 정확도와 객체 인식 정확도가 낮은 것을 확인할 수 있었다. 또한 수박 종자의 순도를 예측하고 분류 결과는 Fig. 12과 같았으며 처리하는데 걸리는 시간은 46.9초로 가장 긴 처리시간이었다.

Table 9. Xception model accuracy results.

Global accuracy	Mean accuracy	Mean IoU (%)	Weighted IoU	Mean BFscore
-----------------	---------------	--------------	--------------	--------------

(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
96.5	87.4	77.9	94.2	88.1

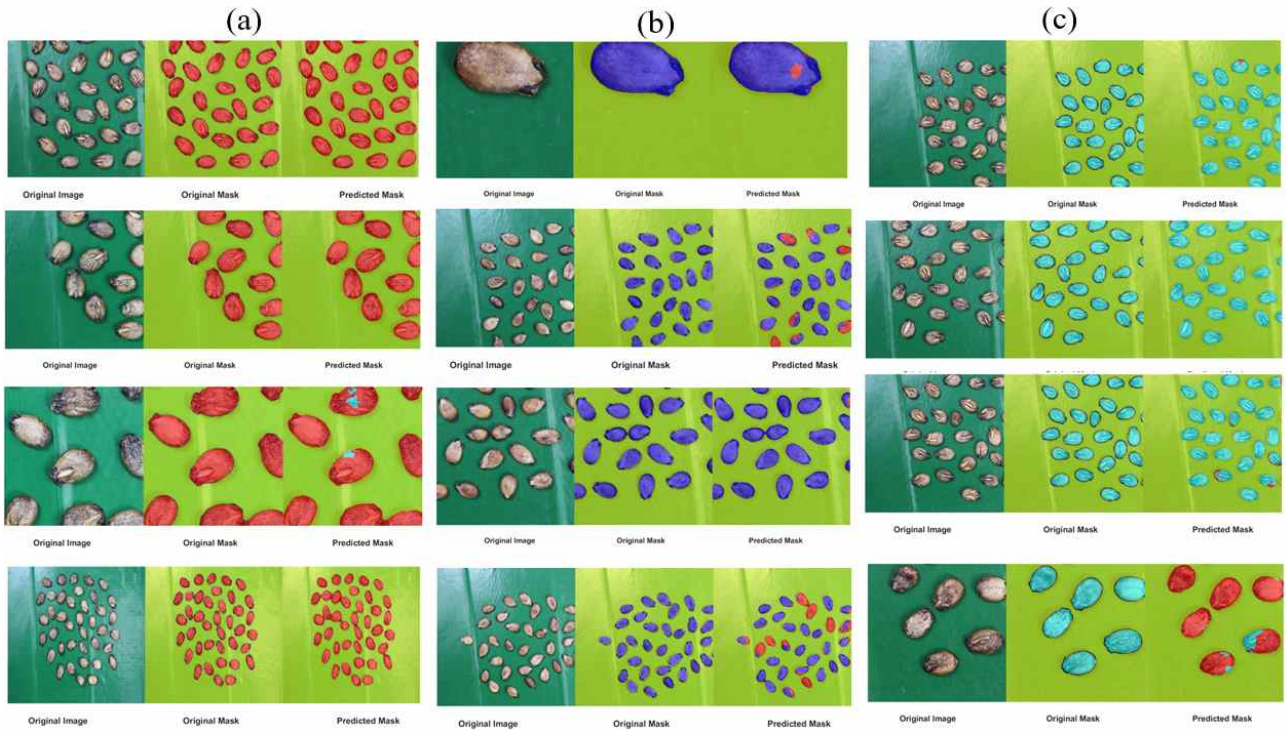


Fig. 12. Xception model image classification results.

(마) 최적 딥러닝 모델 선정

컬러 영상을 이용한 딥러닝 모델은 각 종자 배수 중에 대한 수박 종자의 순도 판별 정확도가 90% 이상으로 나타났다. 특히 Deepnetv3에 Resnet18 모델을 적용할 경우 종자 선별정확도가 매우 높아 향후 온라인 선별에 활용하기에 가장 적합한 분류모델인 것으로 판단되었다.

2. 수박종자 발아 검정기술 개발

가. 초분광 근적외선(NIR) 영상 측정

수박종자의 발아 검정 모델을 개발하기 위하여, 초분광 NIR 영상 카메라(Resonon PICA NIR 640, Table 8)를 통한 초분광영상을 측정하였다.

Table 10. 초분광 NIR Imager specifications

Spectral Range	900-1700
Spectral x spatial channels	512 x 640
Bit Depth	14
Power requirements	12V, 5A
Operating Temperature Range (C/F)	5-40/41-104
Focal length (mm)	25
Max frame Rate (fps)	249
Connection options	GigE

(1) 초분광 영상 데이터의 통계 모델 개발

본 연구에서는 발아 종자 및 비발아 종자의 분류 모델 개발을 위하여 PLS-DA (partial least squares discriminant analysis) 분석법을 사용하였다. Partial least squares regression (PLS-R)은 다량의 스펙트럼 데이터를 처리하는데 특화된 다변수 데이터 분석 기술이다. PLS-DA는 분류 목적으로 일반적으로 사용되는 PLS-R 모델을 일부 수정한 것으로, PLS-DA의 응답 변수 Y는 샘플의 범주 또는 클래스와 관련된 2진 변수 세트이다. PLS-R 또는 PLS-DA는 다음의 식으로 나타낸다.

$$Y = X * b + E_{\epsilon}$$

여기서, X는 각 클래스의 스펙트럼 값을 보유하는 n×p 행렬을 의미하며, b=(b1 ... bn)^T는 회귀 계수, T는 전치 행렬, E는 오차 항을 의미한다. 본 연구에서는 PLS-DA 모델의 구축을 위해 발아 및 비발아 종자의 스펙트럼 데이터를 행렬 X에 배치하고, 행렬 Y에는 다음과 같은 클래스를 배치하였다.

$$Y = \begin{cases} 0 & \text{sample belongs to non - viable group} \\ 1 & \text{sample belongs to viable group} \end{cases}$$

또한, 각 샘플에 대한 전체 데이터 세트를 calibration(전체 샘플의 60%) 및 validation(전체 샘플의 40%)으로 나누었으며, 샘플을 정확하게 분류하기 위하여 각 그룹에 대한 기준선을 0.5로 설정하였다.

(2) PLS-DA 이미지 처리

PLS-DA 모델을 통한 샘플 분류 작업이 완료되면 시각화를 위해 새로운 이미지 처리 기술이 활용된다. PLS-DA 모델에서 얻은 beta 계수에 초분광 영상의 각 픽셀 스펙트럼을 곱하면 PLS-DA 이미지가 형성된다.

$$PLS - DA_{image} = \sum_{k=1}^n b \times H_i + constant_{\epsilon}$$

이때, b = 베타 계수, H = n개의 스펙트럼 이미지 중 i 번째 파장에서의 이미지를 의미하며, constant는 베타 상수를 의미한다.

나. 수박종자 품종별 발아 예측 모델 개발

(1) 청북꿀 품종

초분광 NIR 영상과 발아테스트 결과를 이용하여 청북꿀 수박종자의 발아예측 모델개발 결과를 분석하였다. 총 132개의 종자를 사용하였고, 모델개발에 88개, 모델검증에 44개를 사용하였다. 보다 정확한 결과를 얻기 위해 생존 불가능한 종자와 생존 가능한 종자 모두에 대해 동일한 수를 사용했다. Table 9는 Savitzsky-Golay 2차 미분을 전처리로 적용한 후의 모델 정확도 90.1%를 보여준다.

Table 11. Classification accuracy of the PLS-DA model for watermelon (청북꿀) seed sample with hyperspectral NIR imager applying Savitzsky-Golay 2nd derivative as preprocessing.

Sample	Calibration (n=88)		Calibration accuracy		Validation (n=44)		Validation accuracy		Total (n=132)	Overall accuracy
	Correct	Incorrect	Correct accuracy	Correct	Incorrect	Correct accuracy	Correct	Incorrect	Total accuracy (%)	
청북꿀	80	8	90.9	39	5	88.6	119	13	90.15	

자연적으로 퇴화된 수박씨의 분류는 PLS-DA 모델의 베타 계수를 적용하여 도출된다. Fig. 13은 발아와 비발아 종자의 분류 결과와 사용된 모델의 베타 계수를 나타낸 것이다.

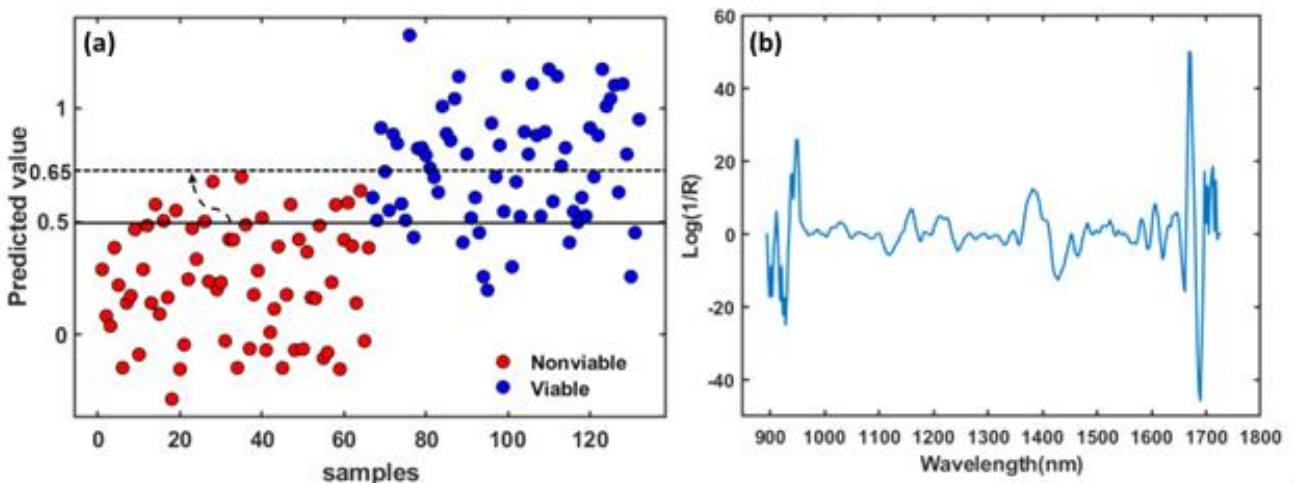


Fig. 13. PLS-DA classification plot for naturally aged watermelon seed. (a) overall model accuracy, (b) Beta co-efficient curve from the PLS-DA model

본 연구에서는 모델을 만드는 것뿐만 아니라 모델에 시험(새로운) 데이터 세트를 적용하여 자연적으로 퇴화된 비발아 종자를 선별하기 위함이다. 이러한 Blind test를 위해 무

작위로 60개의 종자를 추출하여 개발된 모델을 적용하여 발아/비발아 예측을 수행하였다. Blind test 결과 83.3%의 정확도를 보였다.

실제 현장에서 상품으로 중요한 것은 발아종자의 발아여부이다. 청복꿀의 최초 발아율이 42.5%이었는데, 선별을 거치고 난 후는 발아그룹의 발아가 80%이며 선별의 문턱값을 0.7로 조정하였을 경우는 86.6%까지 상승시킬 수 있다. 이때 일부 발아 종자가 비발아로 판별이 되어 버려지는 경우가 생길 수 있다.

Table 12. Confusion matrix of test data set (청복꿀 품종).

		Germination test		
		nonviable	viable	Total
Model detection	nonviable	25	5	30
	viable	6	24	30

Table 13. Classification parameters obtained from test data set after applying the model.

Test set	%Germ	Samples used	Baseline	Acc _(V)	Acc _(N)	Overall accuracy(%)
청복꿀	42.5	60	0.5	80	83.3	81.6
			0.7	86.6	80	83.3

*Accuracy_(V) = Viable seed detection accuracy

*Accuracy_(N) = Non-viable seeds detection accuracy

(2) 금노란꿀 품종

초분광 NIR 영상과 발아테스트 결과를 이용하여 금노란꿀 수박종자의 발아예측 모델개발 결과를 분석하였다. 총 262개의 종자를 사용하였고, 모델개발에 172개, 모델검증에 90개를 사용하였다. 보다 정확한 결과를 얻기 위해 생존 불가능한 종자와 생존 가능한 종자 모두에 대해 동일한 수를 사용했다. Table 14는 Savitzsky-Golay 2차 미분을 전처리로 적용한 후의 모델 정확도 88.5%를 보여준다.

Table 14. Classification accuracy of the PLS-DA model for watermelon (금노란꿀) seed sample with hyperspectral NIR imager applying Savitzsky-Golay 2nd derivative as preprocessing.

Sample	Calibration (n=172)		Calibration accuracy		Validation (n=90)		Validation accuracy		Total (n= 262)		Overall accuracy
	Correct	Incorrect	Correct accuracy	Correct accuracy	Correct	Incorrect	Correct accuracy	Correct	Incorrect	Total accuracy (%)	
금노란꿀	153	19	88.9	79	11	87.7	232	30	88.5		

자연적으로 퇴화된 수박씨의 분류는 PLS-DA 모델의 베타 계수를 적용하여 도출된다. Fig. 14는 발아와 비발아 종자의 분류 결과와 사용된 모델의 베타 계수를 나타낸 것이다.

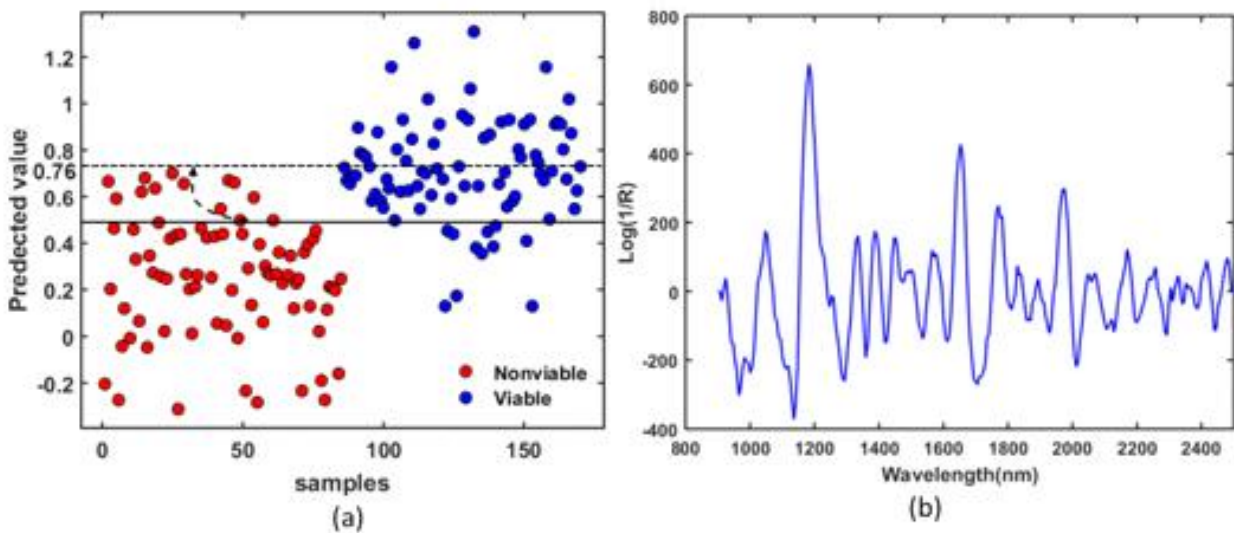


Fig. 14. PLS-DA classification plot for naturally aged watermelon seed. (a) overall model accuracy, (b) Beta co-efficient curve from the PLS-DA model (금노란꿀).

본 연구에서는 모델을 만드는 것뿐만 아니라 모델에 시험(새로운) 데이터 세트를 적용하여 자연적으로 퇴화된 비발아 종자를 선별하기 위함이다. 이러한 Blind test를 위해 무작위로 130개의 종자를 추출하여 개발된 모델을 적용하여 발아/비발아 예측을 수행하였다. Blind test 결과 86.2%의 정확도를 보였다.

실제 현장에서 상품으로 중요한 것은 발아종자의 발아여부이다. 금노란꿀의 최초 발아율이 41.9%이었는데, 선별을 거치고 난 후는 발아그룹의 발아가 84.6%이며 선별의 문턱값을 0.7로 조정하였을 경우는 89.2%까지 상승시킬 수 있다. 이때 일부 발아 종자가 비발아로 판별이 되어 버려지는 경우가 생길 수 있다.

Table 15. Confusion matrix of test data set (금노란꿀).

		Germination test		
		nonviable	viable	Total
Model detection	nonviable	54	11	65
	viable	7	58	65

Table 16. Classification parameters obtained from test data set after applying the model.

Test set	%Germ	Samples used	Baseline	Acc _(V)	Acc _(N)	Overall accuracy(%)
금노란꿀	41.9	130	0.5	84.6	87.6	86.1
			0.7	89.2	83.1	86.2

*Accuracy_(V) = Viable seed detection accuracy

*Accuracy_(N) = Nonviable seeds detection accuracy

(3) 쿨오아시스 품종

초분광 NIR 영상과 발아테스트 결과를 이용하여 쿨오아시스 수박종자의 발아예측 모델 개발 결과를 분석하였다. 총 242개의 종자를 사용하였고, 모델개발에 152개, 모델검증에 72개를 사용하였다. 보다 정확한 결과를 얻기 위해 생존 불가능한 종자와 생존 가능한 종자 모두에 대해 동일한 수를 사용했다. Table 17은 Savitzsky-Golay 2차 미분을 전처리로 적용한 후의 모델 정확도 86.8%를 보여준다.

Table 17. Classification accuracy of the PLS-DA model for watermelon (쿨오아시스) seed sample with hyperspectral NIR imager applying Savitzsky-Golay 2nd derivative as preprocessing.

Sample	Calibration (n=152)		Calibration accuracy		Validation (n=72)		Validation accuracy		Total (n= 242)		Overall accuracy
	Correct	Incorrect	Correct	accuracy	Correct	Incorrect	Correct	accuracy	Correct	Incorrect	Total accuracy (%)
쿨오아시스	135	17	88.8		61	11	84.7		196	46	86.8

자연적으로 퇴화된 수박씨의 분류는 PLS-DA 모델의 베타 계수를 적용하여 도출된다. Fig. 15는 발아와 비발아 종자의 분류 결과와 사용된 모델의 베타 계수를 나타낸 것이다.

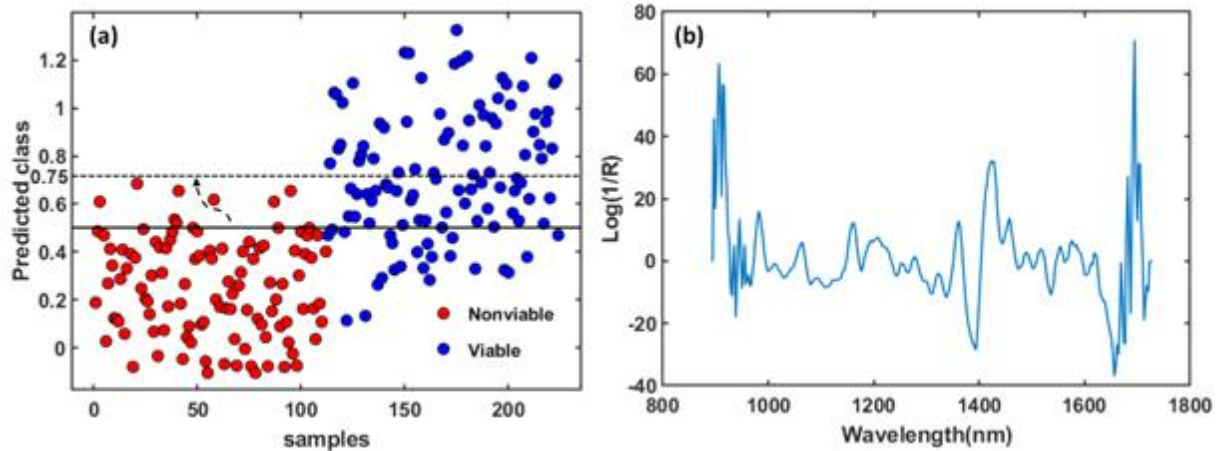


Fig. 15. PLS-DA classification plot for naturally aged watermelon seed. (a) overall model accuracy, (b) Beta co-efficient curve from the PLS-DA model (쿨오아시스).

본 연구에서는 모델을 만드는 것뿐만 아니라 모델에 시험(새로운) 데이터 세트를 적용하여 자연적으로 퇴화된 비발아 종자를 선별하기 위함이다. 이러한 Blind test를 위해 무작위로 192개의 종자를 추출하여 개발된 모델을 적용하여 발아/비발아 예측을 수행하였다. Blind test 결과 78.1%의 정확도를 보였다.

실제 현장에서 상품으로 중요한 것은 발아종자의 발아여부이다. 쿨오아시스의 최초 발아율이 64%이었는데, 선별을 거치고 난 후는 발아그룹의 발아가 75%이며 선별의 문턱값을 0.75로 조정하였을 경우는 89.6%까지 상승시킬 수 있다. 이때 일부 발아 종자가 비발아로 판별이 되어 버려지는 경우가 생길 수 있다.

Table 18. Confusion matrix of test data set (쿨오아시스).

		Germination test		
		nonviable	viable	Total
Model detection	nonviable	64	32	96
	viable	10	86	96

Table 19. Classification parameters obtained from test data set after applying the model (쿨오아시스).

Test set	%Germ	Samples used	Baseline	Acc _(V)	Acc _(N)	Overall accuracy(%)
쿨오아시스	64	192	0.5	75	72.9	73.9
			0.7	89.6	66.6	78.1

*Accuracy_(V) =Viable seed detection accuracy

*Accuracy_(N) = Nonviable seeds detection accuracy

(4) 블랙루비 품종

초분광 NIR 영상과 발아테스트 결과를 이용하여 블랙루비 품종의 수박종자 발아예측 모델개발 결과를 분석하였다. 총 70개의 종자를 사용하였고, 모델개발에 48개, 모델검증에 22개를 사용하였다. 보다 정확한 결과를 얻기 위해 생존 불가능한 종자와 생존 가능한 종자 모두에 대해 동일한 수를 사용했다. Table 20은 Savitzsky-Golay 2차 미분을 전 처리로 적용한 후의 모델 정확도 88.5%를 보여준다.

Table 20. Classification accuracy of the PLS-DA model for watermelon (블랙루비 variety) seed sample with FT-NIR spectroscopy applying Savitzsky-Golay 2nd derivative as preprocessing (블랙루비).

Sample	Calibration (n=48)		Calibration accuracy		Validation (n=22)		Validation accuracy		Total (n= 70)	Overall accuracy	
	Correct	Incorrect	Correct accuracy	Incorrect accuracy	Correct	Incorrect	Correct accuracy	Incorrect accuracy	Correct	Incorrect	Total accuracy (%)
블랙루비	44	4	91.6		18	4	81.8		62	8	88.5

자연적으로 퇴화된 수박씨의 분류는 PLS-DA 모델의 베타 계수를 적용하여 도출된다. Fig. 16는 발아와 비발아 종자의 분류 결과와 사용된 모델의 베타 계수를 나타낸 것이다.

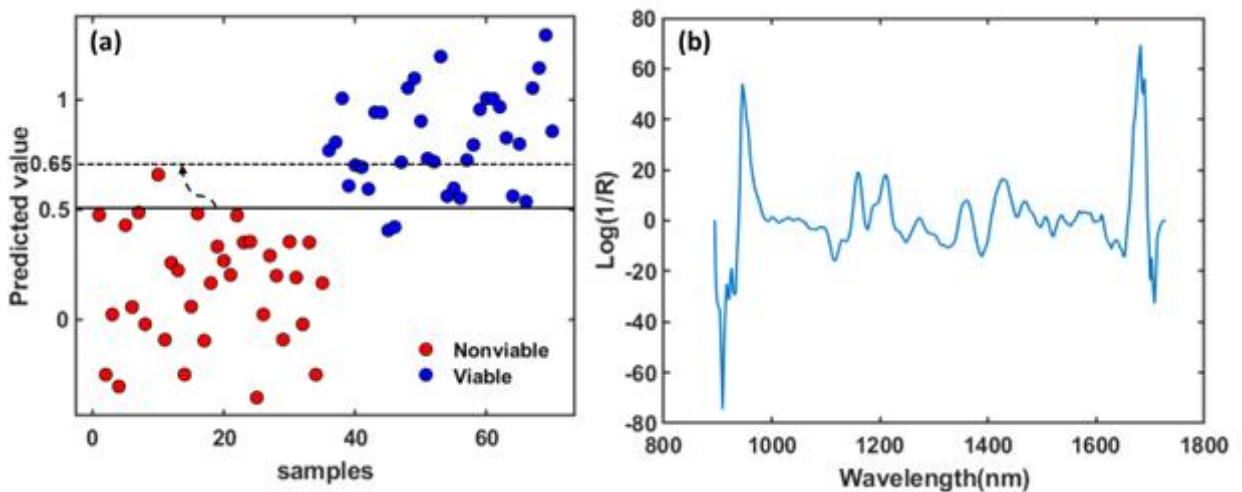


Fig. 16. PLS-DA classification plot for naturally aged watermelon seed. (a) overall model accuracy, (b) Beta co-efficient curve from the PLS-DA model (블랙루비).

본 연구에서는 모델을 만드는 것뿐만 아니라 모델에 시험(새로운) 데이터 세트를 적용하여 자연적으로 퇴화된 비발아 종자를 선별하기 위함이다. 이러한 Blind test를 위해 무작위로 54개의 종자를 추출하여 개발된 모델을 적용하여 발아/비발아 예측을 수행하였다. Blind test 결과 87%의 정확도를 보였다.

실제 현장에서 상품으로 중요한 것은 발아종자의 발아여부이다. 블랙루비의 최초 발아율이 80.4%이었는데, 선별을 거치고 난 후는 발아그룹의 발아가 85.2%이며 선별의 문턱값을 0.65로 조정하였을 경우는 92.6%까지 상승시킬 수 있다. 이때 일부 발아 종자가 비발아로 판별이 되어 버려지는 경우가 생길 수 있다.

Table 21. Confusion matrix of test data set (블랙루비).

		Germination test		
		nonviable	viable	Total
Model detection	nonviable	22	5	27
	viable	2	25	27

Table 22. Classification parameters obtained from test data set after applying the model.

Test set	%Germ	Samples used	Baseline	Acc _(V)	Acc _(N)	Overall accuracy(%)
블랙루비	80.4	54	0.5	85.2	88.8	87
			0.7	92.6	81.5	87

*Accuracy_(V) = Viable seed detection accuracy

*Accuracy_(N) = Nonviable seeds detection accuracy

3. 수박종자 온라인 품질선별시스템 개발

가. 온라인 초분광 NIR 영상 선별시스템

(1) 하드웨어 구성

(가) 온라인 시스템 프로토타입

아래의 그림과 같은 온라인 선별시스템 프로토타입(Fig. 17)에 최적화된 모델을 장착하여 온라인으로 수박종자를 선별할 수 있는 장치를 개발하였다. 선별기에 기본적으로 초분광 NIR 영상 카메라(Resonon PICA NIR 640)를 설치하고 컬러선별이 필요할 시 초분광 카메라 대신 컬러 카메라를 설치하게 된다. 초분광 영상선별시스템으로 활용할 경우, 샘플에서 카

메라까지의 거리가 340 mm이고, 800라인 스캔 및 250 μ s의 노출 시간으로 설정한다. 광원은 텅스텐 할로겐 광원 (100 W) 2세트이며, 종자이송을 위해 20 rpm의 이동 스테이지, 디스플레이 장치로 구성하였다. 또한 종자를 선별하는 선별부의 이진 분류 결과는 입력된 신호에 따라 배출 솔레노이드의 'ON' 및 'OFF' 제어를 위해 Arduino 시스템을 이용하였다.

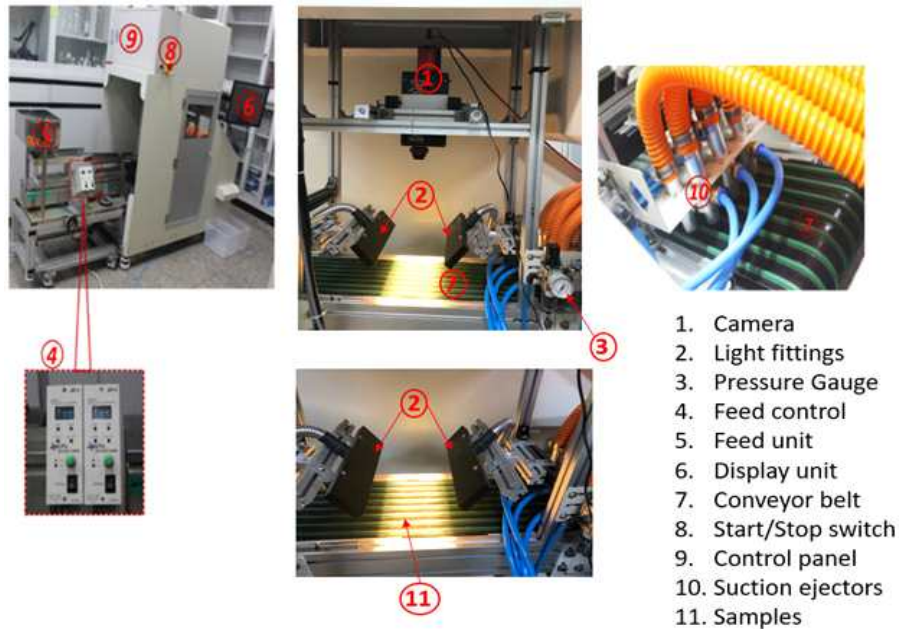


Fig. 17. Online NIR hyperspectral imaging sorting system

Table 23. Computer system specifications

Component	Specification
Processor	Intel (R) core (TM) i5-3570, CPU @ 3.40 GHz 3.80GHz
Installed memory (RAM)	8 GB
windows	Windows 10 Enterprise 2018 Microsoft corporation
System type	64-bit operating system, X64-based processor
Matlab	Matlab 2019
ARDUINO	ARDUINO IDE V 1.6.7 software
Camera	Resonon PIKA-640, NIR

(나) 컨베이어 벨트

시스템 컨베이어 벨트는 종자가 통과할 수 있는 7개의 벨리 공간으로 구성되었으며 이러한 벨리 공간은 시스템의 각 이젝터 노즐에 해당한다. 컨베이어 벨트는 구동 모터에 부착된 간단한 모션 컨트롤러 PLC에 의해 작동되고 프로그램에 의해 제어된다. 이 프로그램은 필요한 모터 속도를 분당 회전수(RPM)로 입력하도록 설계되었으며 범위는 0에서

$$V = 0.00154\omega - 0.00345$$

10,000이다. 구동 모터의 각속도와 컨베이어 벨트의 선속도의 관계는 다음 식으로 주어진다.

여기서; V 는 선형 컨베이어 속도(m/s), ω 는 구동 모터의 각속도(RPM)

(다) 피드 유닛

이 장치는 두 단계로 구성된 진동 베드에 종자를 받는 공급 호퍼로 구성된다. 첫 번째 단계는 평평한 표면이며 두 번째 단계에 종자를 배치하는 전체 표면을 진동하여 종자를 무작위로 분류한다. 두 번째 단계는 컨베이어 벨트의 7개 골 공간에 해당하는 7줄 홈으로 홈이 있다. 이 단계 진동의 목적은 샘플 사이에 공간 분리를 제공하고 진동 크기의 공진에 따라 종자를 컨베이어 벨트로 배출하는 전진 속도 진동이다. 스테이지의 진동 크기는 다음에 따라 다르게 나타난다. 입력 전압과 주파수, 그리고 샘플의 공진 주파수에 의존하는 진폭. 시스템에는 가변 전압(V)과 주파수(F)를 제어하는 디지털 주파수 제어기(JCF-5, AC100-240V, 50-60Hz, 국산)가 있다. 진동 주파수와 전압의 최적값은 컨베이어 벨트의 작동 속도에 따라 선택되어야 한다.

(라) 배출 시스템

프로토타입 온라인 시스템에 사용되는 이젝터 시스템은 흡입 압력 이젝터이다. 그것은 흡입에 의해 거부된 샘플을 배출하기 위해 솔레노이드에 의해 제어되는 압축 공기를 사용한다. 이젝터 노즐은 컨베이어 벨트를 따라 카메라 시야의 중심선에서 약 330 mm 떨어져 있다. 본 연구를 위해 이젝터 시스템은 3x 종자가 감지되면 '예' 신호가 Arduino로 전송되어 이젝터 밸브를 열고 압력으로 종자를 빨아들이고 그렇지 않으면 '아니오'가 신호가 전달되어 밸브가 닫힌다.

(2) 초분광 영상시스템 제어 인터페이스 (GUI) 개발

온라인 초분광 영상 측정 및 결과도출을 위해 GUI를 자체적으로 개발하였다. GUI를 통해 온라인 데이터 처리, 이미지 캡처 및 카메라 포커싱 제어, 전체 라인 프로세스를 제어할 수 있다..

이것은 종자 종류를 구별하기 위한 전처리 방법, 평활화 및 임계값 컷오프 포인트, 컨베이어 벨트의 종자의 위치를 보여주는 라인 번호, 배경 컷오프, 이젝터 노즐 작동을 위한 지연 시간, 전체 프로세스의 라이브 뷰를 보여준다.

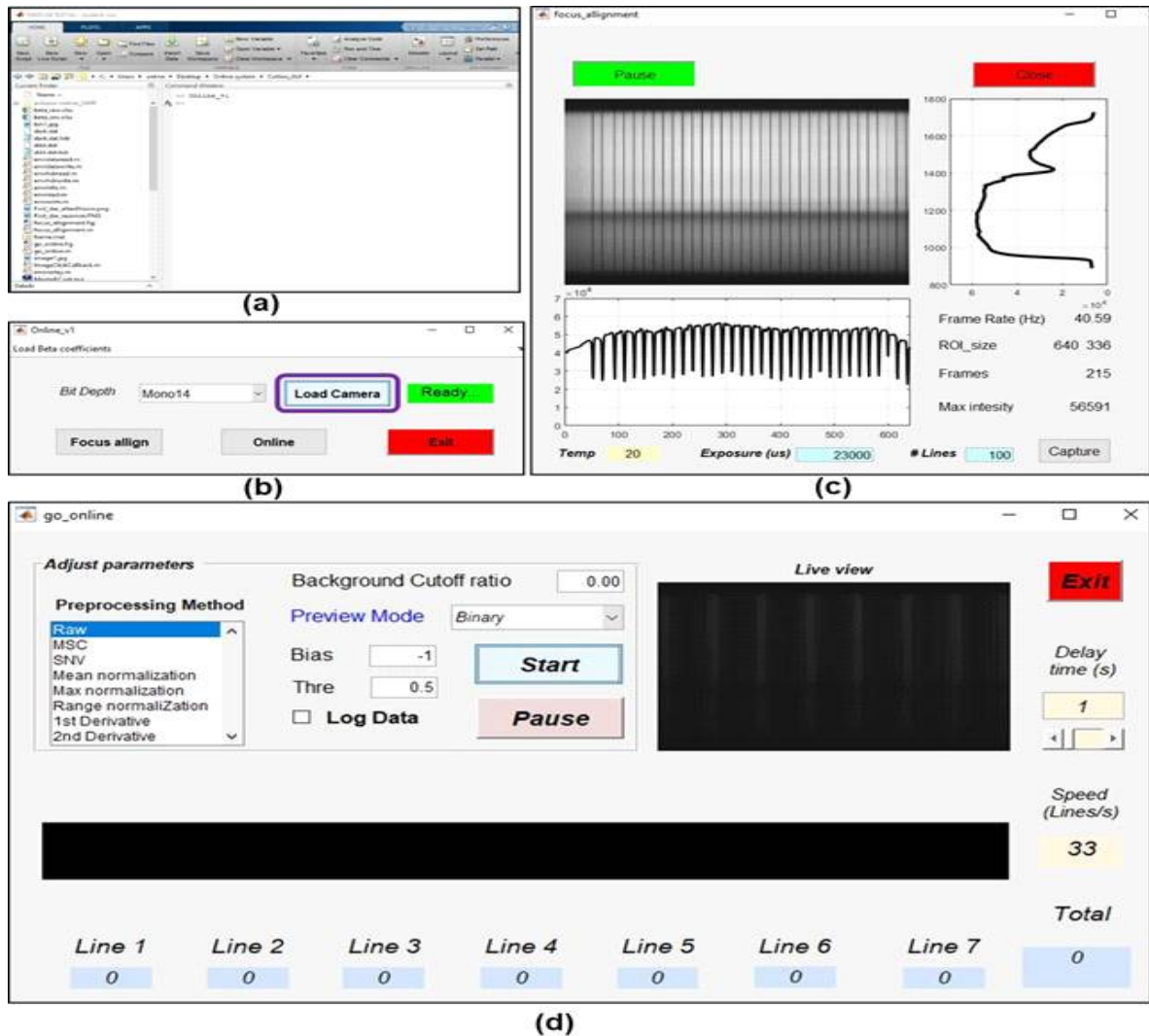


Fig. 18. Developed GUI: (a) Matlab window (b) initializing window, (c) camera focusing & setting, and (d) online interface.

(3) 이미지 획득 및 수정

모든 샘플은 컨베이어 벨트 위에 배치한 후 초분광 영상 및 스펙트럼 획득을 위해 컨베이어 유닛을 통해 운반하였다. 사용된 초분광 영상 카메라는 512의 pixel 범위를 갖는 검출기를 사용하는데, 보정을 통해 개발된 모델 베타 계수의 수와 검출기의 스펙트럼 획득 파장 개수를 일치시켜야 한다. Fig. 19(a)는 초분광장치에서 획득한 스펙트럼 그림이며, Fig. 19(b)는 검출기에서 획득한 pixel의 광세기이다. 이 두 개의 분광정보를 픽셀 매칭을 통해 일치시켰다(Fig. 20).

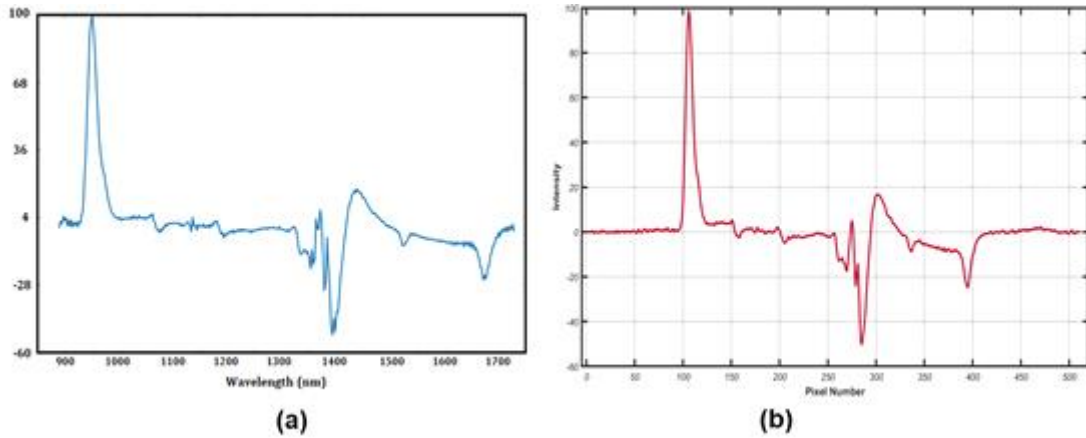


Fig. 19. (a) Raw spectrum, (b) Spectrum against pixel number

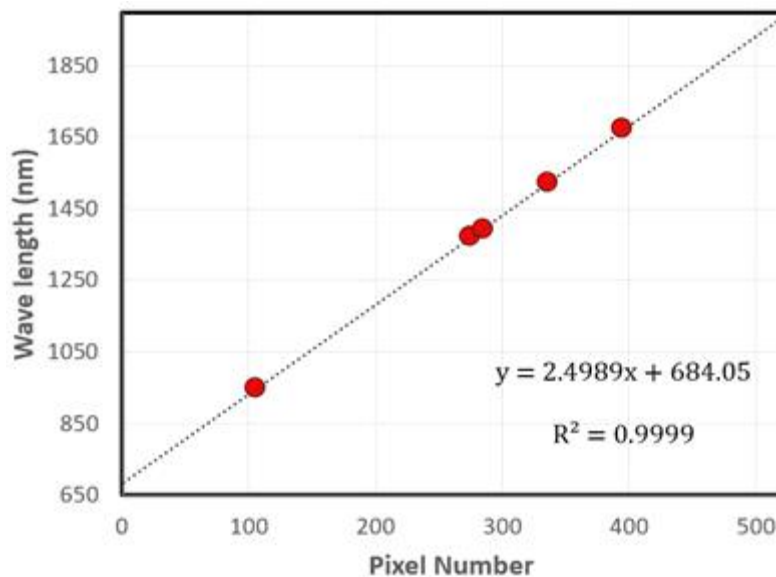


Fig. 20. Relationship between wavelength and pixel number

(가) 데이터 수집

스펙트럼 획득 프로세스는 라인스캔 근적외선 초분광영상 카메라(Resonon PIKA NIR-640)를 사용하여 수행되었다. 샘플 조명은 광섬유를 통해 강도가 가변적인 2개의 100W 텅스텐 할로젠 방사선 소스를 사용하여 수행되었다. 근적외선 초분광영상 카메라를 사용하여 스펙트럼 수집을 위해 3D 하이퍼큐브로 저장하였다.

샘플의 초분광 스캐닝을 수행한 후 외부 환경과 같은 외부 소스에서 발생할 수 있는 노이즈를 보정하기 위해 흰색(I_{white}) 및 어두운(I_{dark}) 이미지를 획득해야 했다. 흰색 이미지는 반사율이 ~99%인 흰색 테프론판을 사용하여 측정하였고 어두운 이미지(반사율 0%)는 광원을 끄고 카메라 렌즈에 불투명 캡을 씌워 측정하였다. 보정된 이미지(I_c)는 아래의 식과 같이 흰색(I_{white}) 및 어두운(I_{dark}) 이미지 외에 측정 초분광 이미지

(I_{raw})를 사용하여 계산되었다.

$$I_c = \frac{I_{raw} - I_{dark}}{I_{white} - I_{dark}}$$

조명 시스템은 양면 조명으로 설정하였다. 샘플의 더 나은 확산 반사를 위해 조명을 적절한 각도로 조정하였다(Fig. 22).

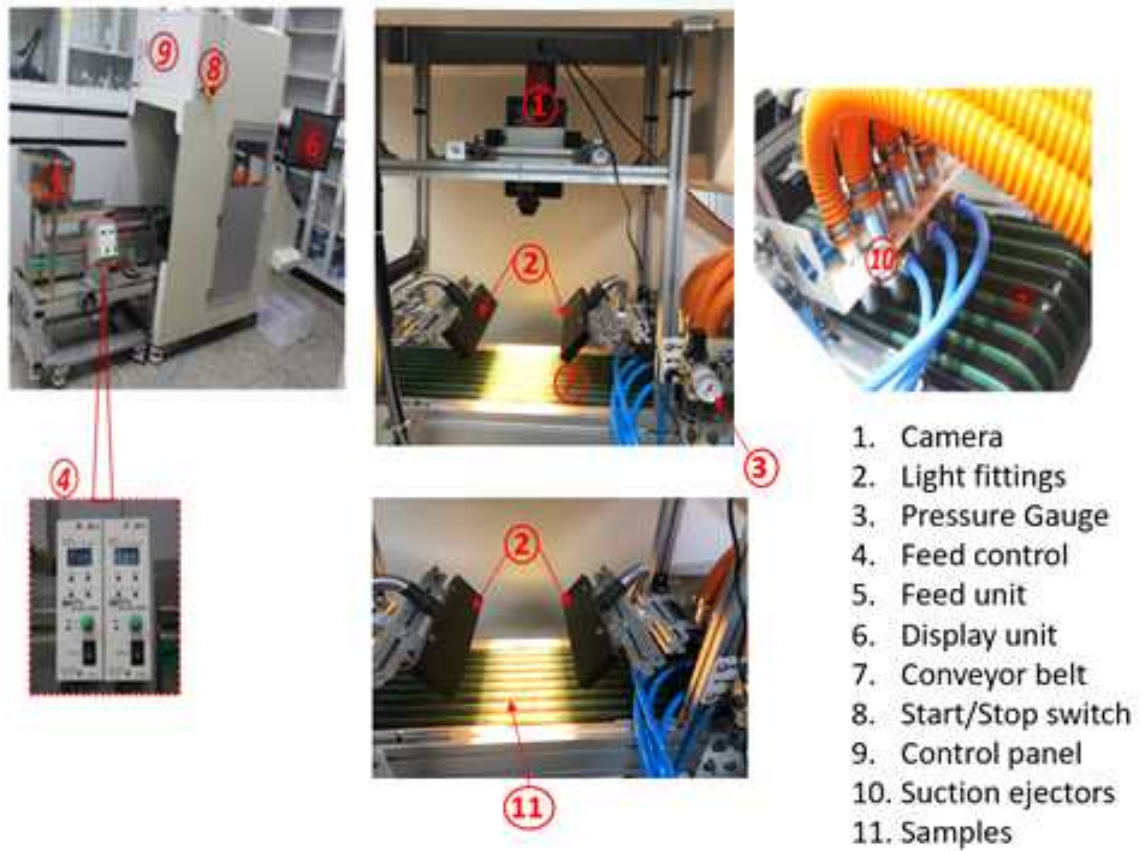


Fig. 21. The online seed sorting system used in the experiment

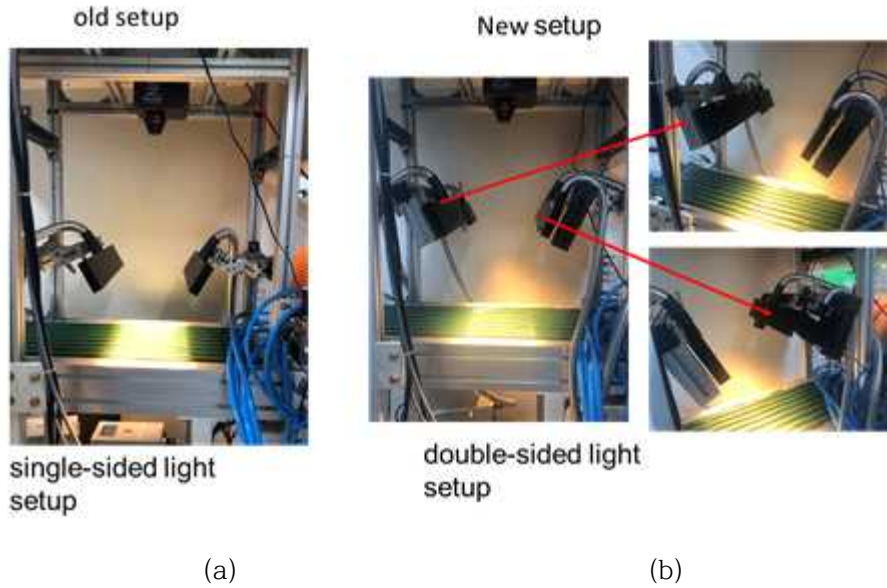


Fig. 22. Lighting system; (a) Single (a) and Double-sided light setup (b).

(나) 데이터 전처리

앞의 과정에서 얻은 초분광 데이터를 다양한 전처리 방법, 즉 정규화(평균, 최대 및 범위), 표준 정규 변량(SNV), 승법 산란 보정(MSC), 도함수(Savitzky-Golay 1 차 및 2 차 도함수) 및 평활화로 처리하였다. 무작위 노이즈, 광산란 및 샘플 텍스처로 인한 스펙트럼 데이터의 불규칙성의 영향을 줄이고 결과적으로 분류 모델의 정확도를 향상시키기 위해 전처리를 수행하였다.

① 종자 그룹 차별을 설정하는 데 사용되는 모델 유형

Eq로 표현된 PLS-DA 분류 모델. 식 (2)와 같이 신뢰할 수 있는 판별 정확도를 제공하기 위해 데이터를 분석하는 데 사용되었다.

$$Y = X \cdot B + E$$

여기서 Y는 측정된 샘플 범주와 관련된 응답 변수의 행렬이다. X는 측정된 각 샘플 범주에 대한 스펙트럼 변수의 $n \times p$ 행렬이다(n 는 샘플 개체 수, p 는 변수 수). B는 스펙트럼 변수에 대한 회귀 계수의 행렬이다. 그리고 E는 잔차 행렬이다.

② 데이터 모델 구축 및 분석

온라인 실시간 분류에 사용하려는 종자 순도 판별 모델을 구성하는 동안 NIR 스펙트럼을 얻은 종자에 0과 1의 그룹을 할당하였다. 0 그룹은 2x와 4x에 속했고, 그룹 1의 종자는 3x에 속했다. 이후 전체 데이터 세트를 보정 및 검증 세트로 나누었다. PLS-DA 방법은 검출기 스펙트럼 범위가 900-1700 nm인 두 종자 그룹에 대한 분류 모델을 구성하는 데 사용되었다. 모델 calibration set는 0과 1로 구성된 두 그룹의

수가 전체의 70%이었고 validation set는 전체의 30%이었다.

(다) 이미지 처리

획득한 3D 하이퍼큐브 데이터에 대해 식 (1)을 사용하여 이미지 클리닝을 적용하고 아래 방정식과 같이 초분광영상 데이터에 대해 배경 제거를 수행하였다.

$$I_{mask} = I_n > 0.32$$

여기서 I_{mask} 는 마스크 이미지이고, I_n 는 초분광영상의 밴드 이미지이다. $n= 1058$ nm을 사용하여 마스크 이미지를 구성하였다.

분류결과 이미지는 다음과 같이 원래의 마스크된 HSI 이미지를 곱한 회귀 계수 벡터를 사용하여 구성된다.

$$PLS\ Image = \sum_{(k=1)}^n BxH_i + constant$$

여기서 H_i 는 i^{th} 총 n 개의 스펙트럼 이미지의 파장에서의 이미지이고, B 는 PLS-DA의 베타 계수이며, 상수는 베타 상수이다.

결과 이미지는 임계값을 사용하여 이진 형식으로 변환되었으며, 여기서 값이 1인 픽셀은 3x 시드 그룹을 나타내고 값이 0인 픽셀은 2x 및 4x 그룹으로 표시된다.

이진 이미지는 $PLS\ Image > 0.5$ 의 조건으로 구성하였는데, 3x에서 2x 및 4x를 구별하기 위해 PLS 이미지의 색상 맵으로 나타내었다. 이후 이미지 후처리(이미지 닫기, 영역 열기 및 이미지 확장)를 적용하여 최종 이진영상을 획득하였다.

(4) 온라인 선별을 위한 이송장치 제어

초분광 영상촬영 및 모델 적용으로 발아 및 비발아 판정이 되면 그룹별로 종자를 분류해야 한다. 이를 위해서는 측정부와 선별부의 거리와 속도를 고려하여 이송시간을 계산하고 배출 트리거를 정확하게 작동시켜야 한다. 이송 컨베이어벨트는 구동 모터에 부착 가능한 모션 컨트롤러 PLC에 의해 작동되고 프로그램에 의해 제어된다(Fig. 23). 이 프로그램은 필요한 모터 속도를 분당 회전 수(RPM)로 입력하도록 설계되었다.

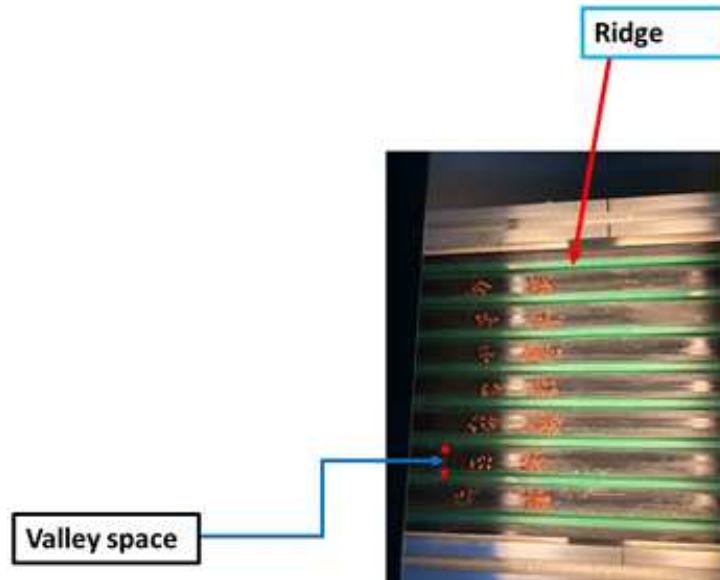


Fig. 23. The online system conveyor belt

초분광 영상촬영 및 모델 적용으로 발아 및 비발아 판정이 되면 그룹별로 종자를 분류해야 한다. 따라서 측정부와 선별부의 거리와 속도를 고려하여 이송시간을 계산하고 배출 트리거를 정확하게 작동시켜야 한다. 이송 컨베이어벨트는 구동 모터에 부착 가능한 모션 컨트롤러 PLC에 의해 작동되고 프로그램에 의해 제어된다. 이 프로그램은 필요한 모터 속도를 분당 회전수(RPM)로 제어하도록 설계하였다.

(5) 종자 공급장치

이 장치는 최초 종자를 투입하는 장치로써 두 단계로 구성된 진동 베드에 종자를 받는 공급 호퍼로 구성되었다. 첫 번째 진동 베드는 평평한 표면으로 종자를 단순이동 시키는 부분이고, 두 번째 진동 베드 단계에서는 컨베이어벨트의 라인홈과 일치하게 7개의 밸리 공간으로 분리되어 진동 이송된다. 이 장치에는 가변 전압(V) 및 주파수(F)를 제어하는 디지털 주파수 컨트롤러(JCF-5, AC100-240V, 50-60Hz)가 있어 진동수 조절을 통해 종자의 이송속도를 제어할 수 있다.

(6) 종자 선별 장치

발아종자와 비발아종자를 구분하는 최종 단계에 사용되는 배출 장치이다. 솔레노이드로 제어되는 압축 공기를 사용하여 비발아종자를 흡입하여 배출하게 된다. 컨베이어벨트와 노즐 사이의 간격을 최적화하여 배출될 수박 종자를 흡입할 수 있는 작동 압력을 설정해야 한다. 수박종자의 경우, 컨베이어벨트와 노즐 사이의 간격은 7.8 mm, 작동 진공 압력은 0.65 MPa으로 설정했을 때 작동이 원활하였다.

(7) 양면 조명 시스템으로 개발된 모델

컨베이어 벨트의 7개 골 공간을 따라 균일한 배광을 위해 양면 조명 시스템을 사용하였다. 컨베이어 벨트 폭을 따라 균일한 조명 분포를 갖는 주요 목적은 개발된 모델을 온라인 모델 프로토타입 시스템에 적용할 때 7개의 계곡 공간이 모두 원활하게 작동하도록 하기 위함이다.

Table 24는 3개의 수박 종자 그룹에서 얻은 스펙트럼 데이터에 대해 얻은 PLS-DA 결과를 요약한 것이다. 따라서 모델은 PLS-DA를 설정하는 동안 21~33개의 잠재 변수를 필요로 하였다. PLS-DA 베타 계수를 획득한 분류용 영상에 적용한 결과 Fig. 24와 같은 결과를 나타내었다. Fig. 24(a)는 78.5%로 가장 높은 영상 분류율을 보인 반면, Fig. 24(b)는 Raw data에서는 42.8%의 이미지로 가장 낮은 분류를 보였다. 획득한 이미지에 사전 처리된 모델 베타 계수를 적용하면 원시 데이터 PLS-DA 모델에서 더 나은 결과를 얻을 수 없다. 이러한 이유로 관찰 결과 이미지 기반(픽셀) PLS-DA 분류 모델과 스펙트럼 PLS-DA 모델 분류 사이에 정확도에 큰 차이가 있음을 보여준다. Spectral PLS-DA 모델은 종자-배수성 그룹 간의 높은 식별 정확도를 보여주었는데, 이는 NIR이 두 종자 그룹이 서로 다른 장소, 다른 환경에서 재배되었을 수 있다는 사실로 인해 두 종자 그룹의 생화학적 조성의 차이를 감지할 수 있었기 때문이다. 영양 및 환경 조건 및 다른 시기에 수확된다.

Table 24. PLS-DA results summary

Preprocessing method		Calibration (382 samples)			Validation (159 samples)			Latent variables
		3x (%)	2x&4x (%)	Overall Accuracy (%)	3x (%)	2x&4x (%)	Overall Accuracy (%)	
Normalization	<i>Mean</i> ¹	100	99.7	99.8	100	98.7	99.4	31
	<i>Max</i> ²	100	99.7	99.8	100	98.1	99.1	32
	<i>Range</i> ³	100	100	100	100	97.5	98.7	34
	<i>MSC</i> ⁴	100	99.5	99.7	100	96.8	98.4	32
	<i>SNV</i> ⁵	98.9	99.4	98.6	100	98.7	98.4	29
Derivatives	<i>SG1</i> ⁶	99.7	98.9	99.3	98.7	98.1	98.4	21
	<i>SG2</i> ⁷	99.7	98.9	99.3	99.4	97.5	98.4	30
	<i>Raw</i> ⁸	100	100	100	100	98.7	99.4	33

¹ Mean normalization, ² Max normalization, ³ Range normalization, ⁴ Multiplicative scatter correction, ⁵ Standard normal variance, ⁶ Savitzky-Golay first derivative, ⁷ Savitzky-Golay second derivative, ⁸ Raw data

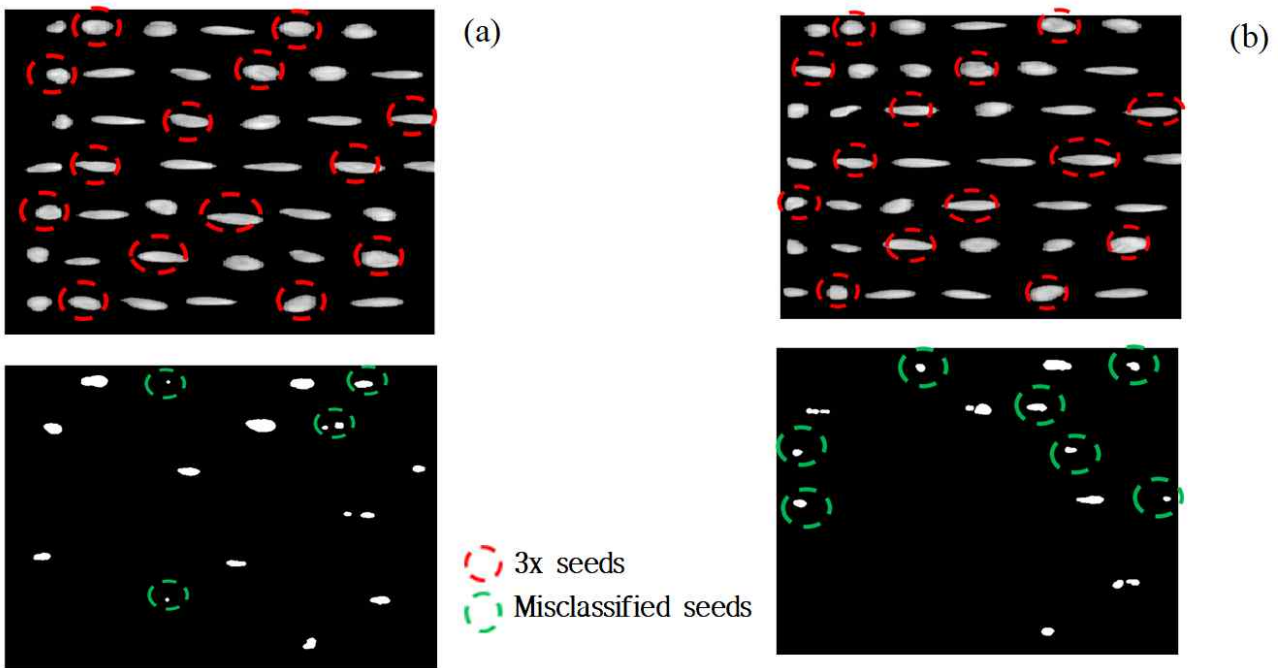


Fig. 24. PLS images for classification

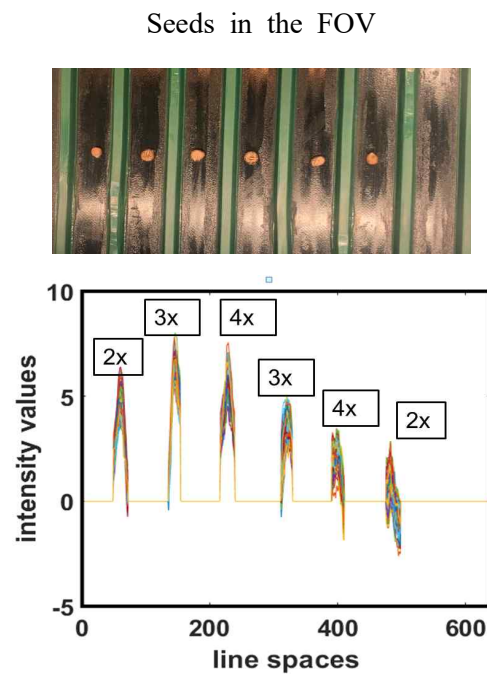


Fig. 25. Real-time seed spectra inspection for the 7 valley spaces on the conveyor belt

나. 온라인 컬러 영상 선별시스템

(1) 하드웨어 구성

앞에서 언급한 온라인 종자선별기는 초분광 영상장치에 최적화된 선별기이므로 컬러 카메라 및 딥러닝에 적용하기 위하여 아래 그림과 같이 구성을 변경해야한다. Fig. 26(a)

와 같이 컬러 카메라를 상단에 고정시키고, 녹색 배경의 컨베이어 벨트를 사용하였다. 광원은 종자의 정반사를 최대한 줄이기 위하여 반사판에 LED 광원을 조사하는 구조로 설계하여 측정된 컬러 영상이 개선되도록 하였다. 특히, 수박 종자의 선별 능력 향상을 위하여 압력기 용량을 최적화하였다.

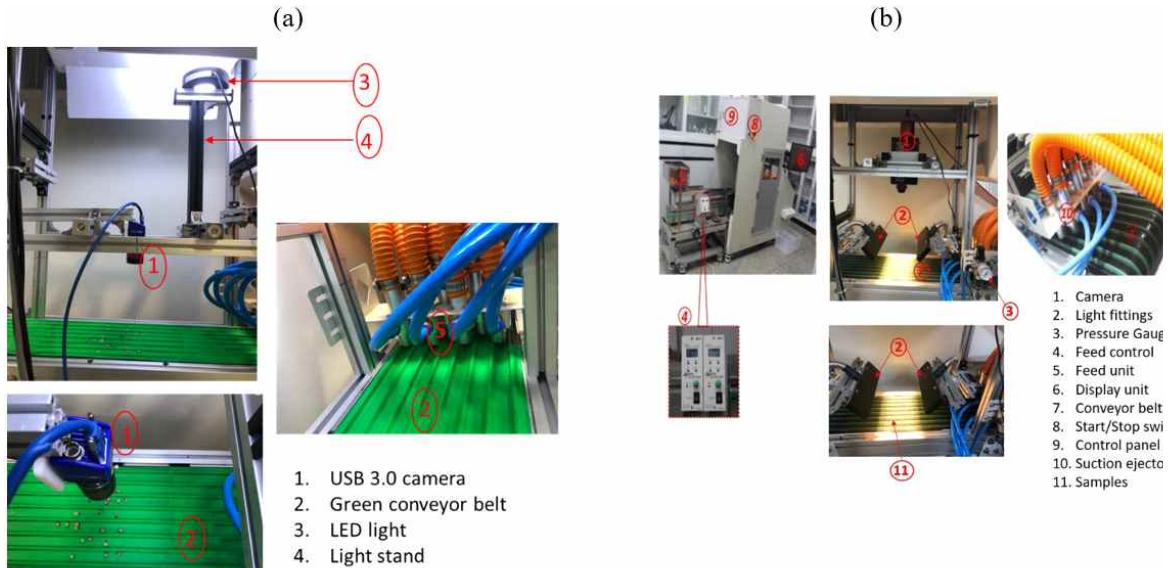


Fig. 26. Hardware modification: (a) modified design and (b) original online prototype.



Fig. 27. Conveyor belt modification: (a) original conveyor belt, and (b) modified with green and light absorbing material.

(가) 피드 유닛

2단의 진동베드에 수박씨를 공급받는 피드호퍼로 구성되어 있다. 첫 번째 진동 단계는 표면이 평평하고 전체 표면이 진동하므로 종자가 이송되며 무작위로 섞인다. 두 번째 단계는 컨베이어 벨트의 7개의 벨리 공간에 해당하는 7개의 라인으로 홈이 구성되어 있다. 이 단계는 샘플 사이에 공간 분리를 제공하며 컨베이어 벨트로 종자를 배출하는 속도를 제어할 수 있다.

(나) 컨베이어 벨트

벨트는 드라이버 모터에 부착된 간단한 모션 컨트롤러 PLC에 의해 작동되고 프로그램에 의해 제어된다. 이 프로그램은 필요한 모터 속도를 분당 회전수(RPM)로 입력하도록 설계되었으며 범위는 0-10,000이다. 해당 컨베이어 선형 속도는 설정된 방정식으로 표현된다.

$$V = 0.00154\omega - 0.00345$$

여기서; V 는 컨베이어의 선형속도(m/s), ω 는 구동모터의 각속도 (RPM)

(다) 카메라 및 조명 시스템

카메라는 이미지 획득을 위해 컨베이어 벨트에서 200 mm 떨어진 곳에 설치되었다. C-마운트 25 mm 렌즈와 F/1.4의 조리개 개방이 있는 컬러 카메라가 사용되었다. 카메라 샘플 감지 및 분류 데이터 분석은 개발된 GUI(그래픽 사용자 인터페이스) MATLAB 소프트웨어에서 수행되었다. 이미지 분류 결과는 분류 결과에서 입력되는 신호에 따라 이젝터 솔레노이드의 'ON' 및 'OFF'를 전환하기 위해 Arduino 시스템으로 전송된다. 사용된 조명 및 카메라의 사양은 Table 25 및 26과 같다.

Table 25. Lighting system specification

Model	Color	Voltage	Ring internal dimension	Ring external dimension	Dimension height (mm)	Manufacturer
LV-R-F 110/53	RGB	VF=DC 24V	53	110	27.5	LV vision

Table 26. Color imaging system specification

Component	Specification
Processor	Intel (R) core (TM) i5-3570, CPU @ 3.40 GHz 3.80GHz
Installed memory (RAM)	8 GB
windows	Windows 10 Enterprise (2018 Microsoft corporation)
System type	64-bit operating system, X64-based processor
Matlab	MATLAB R2019b
ARDUINO	ARDUINO IDE V 1.6.7 software
Camera	mvBlue fox3 USB 3.0

(라) 배출 시스템

연구를 위해 온라인 시스템에 사용된 이젝터 시스템은 흡입 압력 이젝터였다. 솔레노이드로 제어되는 압축 공기를 사용하여 지정된 샘플을 흡입으로 배출한다. 이젝터 노즐은 카메라의 중심 시야에서 약 300 mm 떨어진 곳에 위치하였다. 이상적인 작동 진공 압력은 0.65 MPa이고 컨베이어의 벨리 공간에서 이젝터 노즐의 간격은 약 7.8 mm이었다.

(2) 소프트웨어 구성

소프트웨어는 MATLAB (v2019b, MathWorks, Natick, MA, USA)를 이용하여 개발하였다. 개발된 GUI를 실행하면 Fig. 28a와 같이 창이 팝업되고 카메라 연결을 선택할 수 있다(카메라가 연결되면 버튼이 녹색으로 바뀐다). 데이터 캡처를 클릭하면 새로운 창(Fig. 28b)이 나타난다. 여기에서 카메라 초점을 조정할 수 있고, 캡처를 클릭하여 컬러영상을 획득을 활성화할 수도 있다. 카메라 초점 조정이 완료되면 온라인으로 전환하기 전에 개발된 딥러닝 모델이 저장된 폴더를 읽는다(Fig. 29a). 모델이 로드된 후 온라인을 클릭하면 온라인 사용자 인터페이스로 이동하게 된다(Fig. 29b). 인터페이스에는 라이브 카메라 뷰, 압력 분류 시스템의 지연 시간 그리고 서로 다른 7개 컨베이어 라인에서 인식된 종자를 카운트할 수 있도록 설계하였다.

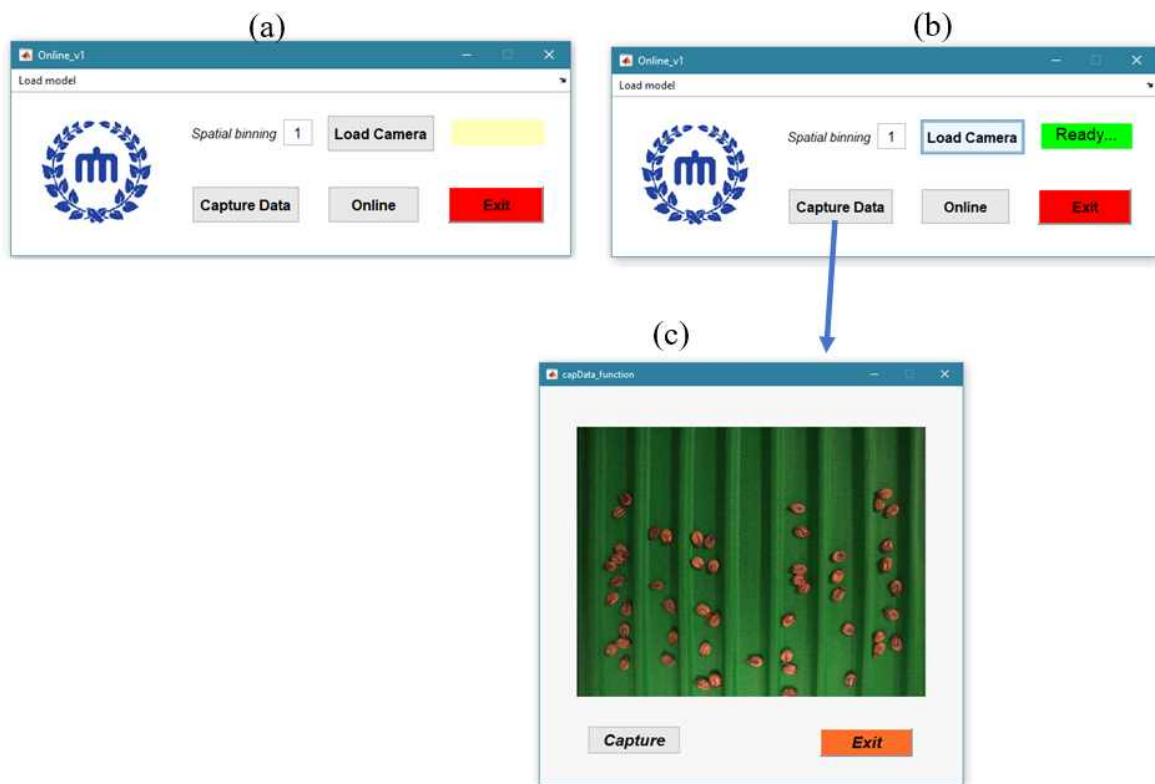


Fig. 28. Camera focusing and image acquisition.

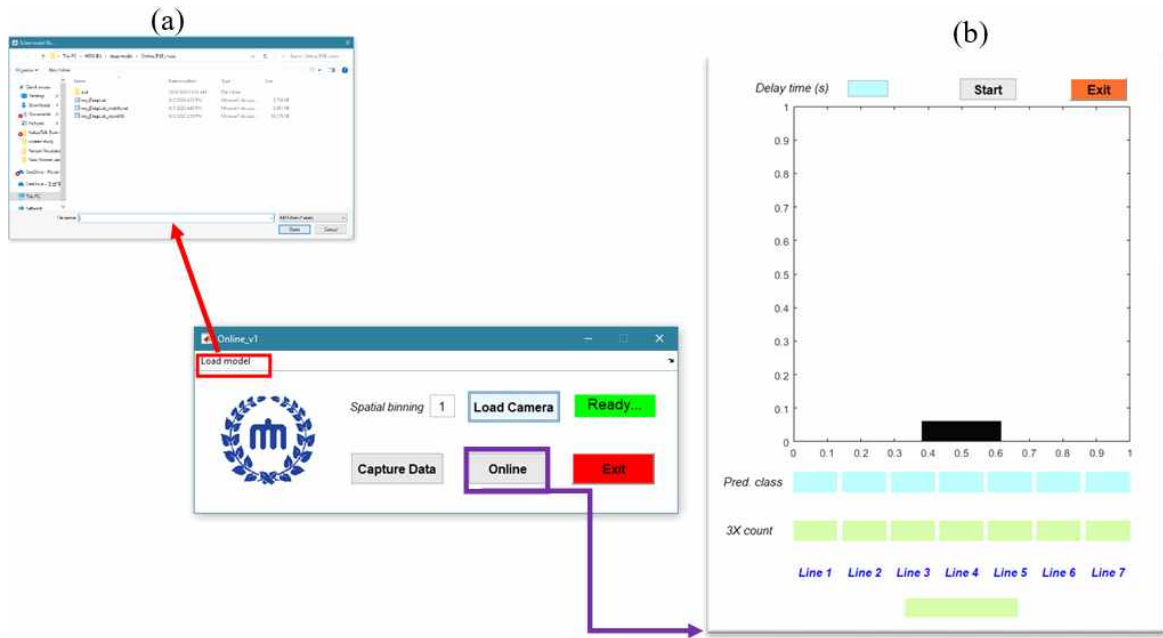


Fig. 29. Online user interface.

(가) 영상 획득

RGB 카메라를 사용하여 배수성 종자 이미지를 획득했다. 시료는 LED 조명(3M Finelux LED 7200)으로 조명되었다. 특징 추출 및 그레이 레벨 동시 발생 행렬(GLCM)을 사용한 이미지 분석은 획득한 배수성 종자 이미지에 대해 수행되었으며 DDSIMCA 모델을 사용하여 One-class 분류 분석을 설정하는 데 사용되었다. 카메라로 이미지를 획득하기 전에 실제 색상이 획득한 이미지의 색상과 일치하도록 Macbeth 색상 검사기를 사용하여 카메라 이미지 색상을 보정하였다.

(나) 특징 추출 및 GLCM 분석

두 세트의 특징, 즉 형태학적 및 조직적(texture) 특징은 배수성 종자 등급에 따라 종자를 평가하는 데 사용되었다. 이러한 특징은 MATLAB 소프트웨어를 사용하여 획득한 이미지에 region-props 방법을 적용하여 추출되었다.

특징 추출 절차는 처음에 획득한 RGB 이미지에서 배경을 제거하고, 이미지를 이진화한 후 형태학적 영역 열기, 닫기, 침식 및 확장 작업을 수행한다. 마지막으로, 유역 분할 후 시드 픽셀을 매핑하여 이미지에서 대상 종자를 분리한다. 이후 GLCM (gray level co-occurrence matrix)을 사용하여 배수성 종자 클래스를 구별할 수 있는 조직 및 형태학적 특징을 분석하였다. 개발된 함수는 영상강도(그레이 레벨) 값이 i 인 픽셀이 j 값을 가진 픽셀이 있는 특정 공간 구성에서 얼마나 자주 발생했는지 계산하여 GLCM을 생성하였다. 결과 GLCM의 각 요소(i, j)는 단순히 입력 이미지에서 값이 j 인 픽셀과 지정된 공간 관계에서 값이 i 인 픽셀이 발생한 횟수의 합이다. 본 연구에서 사용된 영상분석 방법 중 강도 통계 기반 특성(에너지)과 질감 기반 특성(상관성, 균질성 및 대비)이 질감 차이 식별에 중

요한 정보를 제공하였다.

GLCM을 사용하여 이미지에서 텍스처 특징을 추출하기 위해서는 먼저 동시발생행렬의 정규화된 확률밀도 $P \delta(i,j)$ 를 구한다. 각 GLCM에 대해 행렬을 사용하여 에너지(AM), 엔트로피(ENT), 상관 관계(COR), 대비(CON)의 통계적 특성을 계산하였다.

조직 균일성의 척도인 에너지는 아래 식으로 계산된다.

$$ASM = \sum P^2(i,j)$$

계조의 변화를 나타내는 명암비는 아래 식을 사용하여 계산되었으며,

$$CON = \sum \sum (i-j)^2 P(i,j)$$

영상의 무질서를 측정하는 엔트로피는 아래 식을 이용하여 구하였다.

$$ENT = - \sum \sum P(i,j) \log[P(i,j)]$$

상관관계는 아래 식을 사용하여 계산되었으며

$$COR = \frac{\sum \sum ij P(i-j) - \mu_x \mu_y}{\sigma_x \sigma_y}$$

여기서 $\mu_x, \mu_y, \sigma_x, \sigma_y$ 는 각각 P_x 와 P_y 의 평균과 표준편차이며, P_x 는 동시 발생 행렬의 각 행의 합이며, P_y 는 동시 발생 행렬의 각 열의 합이다.

특징 벡터(f)는 아래 방정식과 같이 모든 매개변수의 평균과 분산을 사용하여 계산되었다.

$$f = (\mu ASM, \mu ENT, \mu COR, \mu CON, \sigma ASM, \sigma ENT, \sigma COR, \sigma CON)$$

여기서 μ 는 평균이고 σ 는 매개변수의 분산이다.

(다) 머신러닝 모델개발 - One-class 분류(OCC) 모델

이 방법은 단일 객체 클래스(예, 삼배체 3x 종자)만 학습 세트로 사용하고 학습 세트를 제외한 다른 모든 클래스는 이상값(abnormal)으로 간주한다. DD-SIMCA (Data-Driven Soft Independent Modeling of Class Analogy)는 가장 효과적인 단일 클래스 분류 기술 중 하나이다(Hibbert, 2004). DD-SIMCA 알고리즘의 주요 단계는 다음과 같다. 먼저 PCA(주성분 분석)는 학습($I \times J$) 데이터 행렬 X를 다음과 같이 분해한다.

$$X = TP^t + E$$

여기서 T는 점수($I \times A$) 행렬, P는 로딩($J \times A$) 행렬, E는 잔차($I \times J$) 행렬, A는 주성분(PCs)의 수를 나타낸다. 각 학습 샘플에 대한 총 거리(점수 및 직교 거리)는 다음과 같이 PCA 분해 결과를 사용하여 계산된다.

$$c = N_h \frac{h}{h_0} + N_v \frac{v}{v_0} \propto \chi^2(N_h + N_v)$$

여기서 h 및 v는 각각 점수(SD) 및 직교 거리(OD)의 다양한 공차 영역을 나타내고, v_0 와 h_0 은 스케일링 계수를 나타내고, N_h 와 N_v 는 자유도(DoF)의 수를 나타낸다.

Calibration 그룹의 임계값 또는 수용 영역은 다음과 같이 결정된다.

$$c \leq c_{crit}(\alpha)$$

여기서 $c_{crit} = \chi^{-2}(1-\alpha, N_h + N_v)$ 이며, α 는 주어진 제1종 오류이며 $(1-\alpha)$ 는 DoF가 $(N_h + N_v)DoF$ 인 카이제곱 분포의 분위수를 나타낸다.

허용 영역이 결정되면 모델은 새 샘플을 분류할 준비가 된 것이다. 점수 거리에 대한 직교 방향의 선정영역은 α 로 표시된다. 학습 세트의 샘플은 선정 플롯 내부에 있는 경우 “정규”로 규정된다. 컷오프 값 γ 는 모델의 “이상치” 경계를 결정하기 위해 계산되며 학습 세트(I)의 크기에 따라 다르다. 이상치 영역은 다음과 같이 형성된다.

$$\gamma = (h, v) : N_h \frac{h}{h_0} + N_v \frac{v}{v_0} > \chi^{-2}((1-\gamma)^{1/l}, N_{h+N_v})$$

“경계” 영역은 “일반” 영역과 “이상치” 영역 사이에 있다. γ 값은 학습 세트(I)에서 일반 객체의 잘못된 위치를 지정하고 I값이 클수록 이상값 영역의 위치가 멀어진다.

(라) 딥러닝 모델개발

① 딥러닝 모델

컬러영상 분석을 위해 deepLabv3와 U-net 두 인코더 네트워크를 활용하였다. 디코더 이루어지는 구조는 Resnet18 (100층), mobilenetV2 (186층)과 xception (205층)이었다.

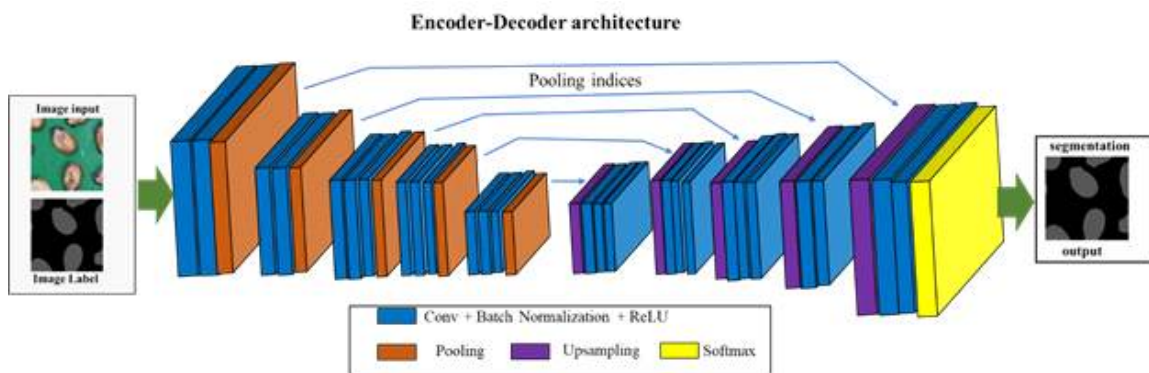


Fig. 30. An illustration of encoder-decoder architecture for semantic segmentation, adopted design

② 데이터 세트

컬러 카메라로 획득한 이미지에 MATLAB 이미지 라벨러를 사용하여 라벨을 실시하였다. 레이블 0, 1, 2 및 3은 배경, 2x, 3x 및 4x 증자로 4개의 클래스로 하였다. 네트워크의 입력 및 출력 레이어는 각각 $[n \times n \times 3]$ 및 $[n \times n \times 1]$ 으로 수정되었으며, 여기서 n 의 크기는 299이다.

배수성 종자 분류모델을 개발하기 위해 34,776개의 이미지 중 70%를 training으로

20%를 validation으로 나머지 10%를 테스트로 사용하였다. Image augmentation을 위해 획득한 이미지는 랜덤 회전(-20~20도), 랜덤 반사(x, y) 및 랜덤 크롭을 통해 수를 증가시켰다.

모델 구성에 사용된 다른 모델 학습 매개변수는 Table 27와 같다. Fig. 31은 클래스 배수성 딥러닝 판별 모델 활용에 대한 개략도이다.

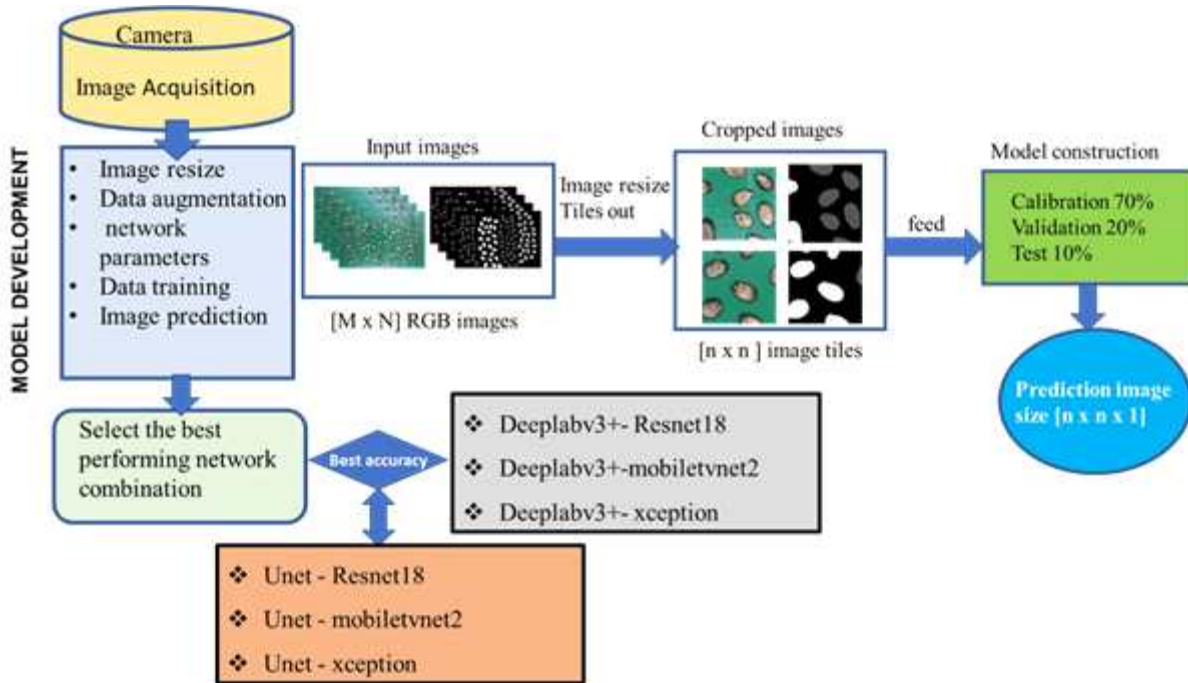


Fig. 31. Illustration of the methodology adopted for developing the class-ploidy deep learning model.

Table 27. Deep learning model training parameters

Training parameter	Size
Input training image size	[299 x 299 x 3]
Network depth	4
Batch size	12
Optimizer	Stochastic gradient descent method
Learning rate (LR) initial	0.001
Epoch (max)	20
Shuffle every epoch	enabled
Learning rate drop factor	0.5
Learning rate drop patience	10
Network filter size (f-size)	3
Output prediction size (label image output)	[299 x 299 x 1]

(마) 모델 성능 분석

① 단일 클래스 모델 분류 결과

추출된 텍스처 특징은 이미지 노이즈를 보정하기 위해 범위 정규화 데이터 전처리를 거친 후 단일 클래스 DD-SIMCA 분류 도구 상자로 처리되었다. 3배체 종자(3x)가 대상 클래스로서 다른 배수체 종자 클래스를 구별하는 데 사용되는 단일 클래스 모델을 구성하는 데 사용되었다. 단일 클래스 모델이 개발되면 (Fig. 32)와 같이 허용 경계를 통해 다른 배수체 종자 클래스를 이상값으로 구분하게 된다. 모델 배수성 종자 식별 개발에 사용된 매개변수는 Table 28에 요약되어 있으며, 여기서 데이터는 스케일링 및 센터링 및 범위 정규화의 전처리 방법을 거쳤다.

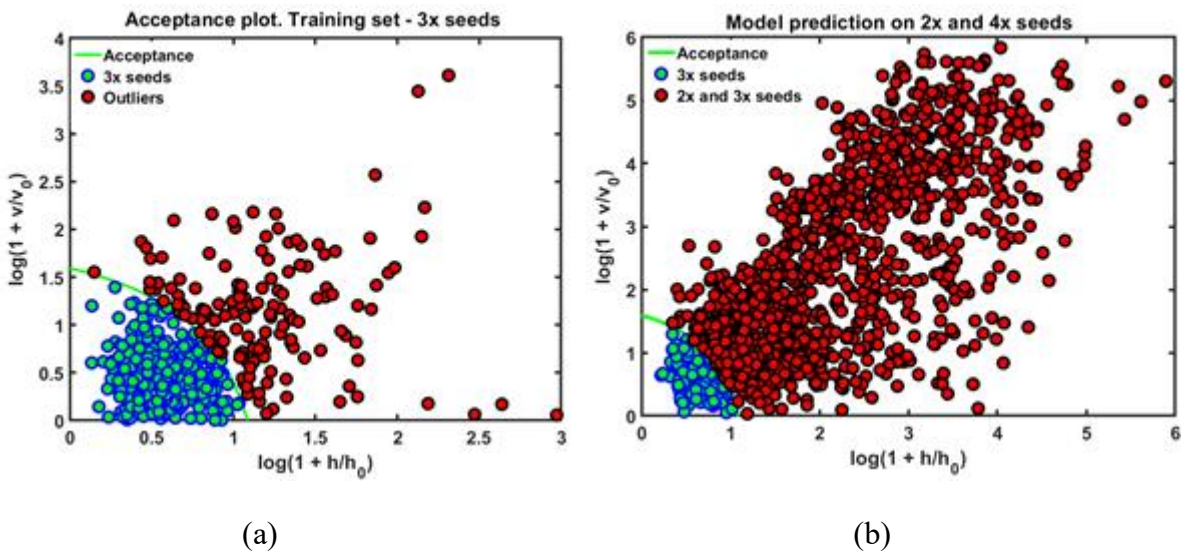


Fig. 32. One-class classification: (a) 3x trained model, and the (b) trained model treated on mixed 2x and 4x seeds.

Table 28. Developed model parameters.

Model parameters	
Principal component (PC)	10
Pre-processing method	Range normalization
Model type	Robust
Data treatment	Centering and scaling
Significance level and outlier	0.25 and 0.08

이미지 기반 모델 분류 성능은 (Fig. 33)와 같이 모든 배수성 종자 클래스에 대해 획득되었다. 69.2%의 정확도로 3x 종자 분류가 되었고, 2x의 경우는 99.2%, 4x의 경우는 76.2%의 분류 정확도를 보였다.

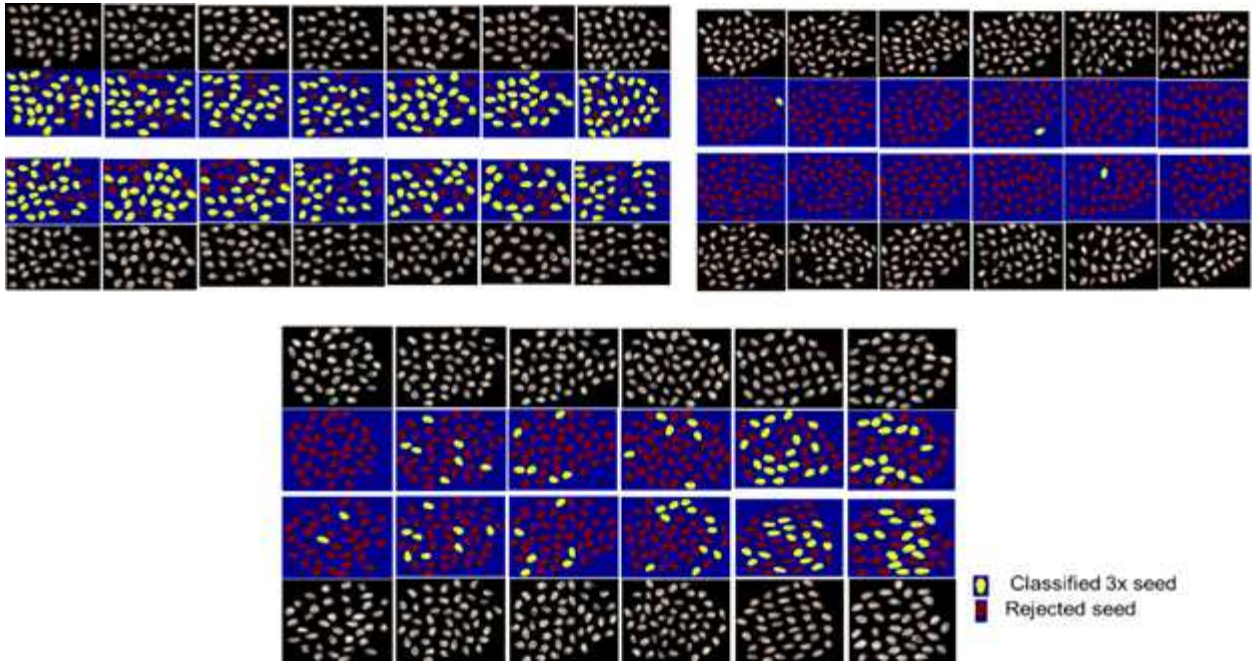


Fig. 33. Image class classification: (a) 3x trained model, (b) trained model treated on 2x seeds, and (c) trained model treated on 4x seeds.

③ SVM 2차 모델 클래스 배수성 분류 결과

배수성 종자 판별의 주요 목표는 실시간 결과에 대한 배수성 종자 분류를 온라인 선별시스템에 적용할 수 있도록 하는 것이다. 그러나 one-class 분류모델의 경우 3배와 4배의 정확도 인식률은 90% 미만으로 낮았다. 따라서 3x와 4x 배수성 종자 간의 명확한 분류와 높은 분류 정확도를 얻기 위해 또 다른 머신러닝 모델 방법을 활용하였다. 획득한 이미지에서 조직 및 형태적 특징을 사용하여 SVM 2차 분류모델을 개발하였다. 분류 결과는 Fig. 34에 나타내었다.

True class	Predicted class			True Positive Rate	False Negative Rate
	↶	↷	↘		
2	95%	1%	4%	95%	5%
3	3%	82%	15%	82%	18%
4	5%	17%	78%	78%	22%

Fig. 34. Confusion matrix for the SVM quadratic classification model developed.

SVM 2차 분류모델은 단일 클래스 분류 방법보다 더 나은 분류 정확도를 보였다(Table 29). 이는 SVM이 서로 다른 클래스 간의 적절한 경계를 직접 검색하여 학습 벡터의 확률 분포를 효율적으로 구성하였기 때문으로 사료된다. SVM의 우수한 분리 또는 더 낮은 일반화 오류는 일반적으로 각 클래스의 가장 가까운 트레이닝 포인트로부터 최대 거리를 갖는 결정 라인에 의해 얻어진다.

각 개별 배수성 종자 클래스에 대한 이미지 분류 결과는 (Fig. 35)에 나타내었다. 3x 종자는 Fig. 35와 같이 82% 정확도로 분류되었고, 2x 종자는 95%, 4x 종자는 78%의 정확도로 분류되었다.

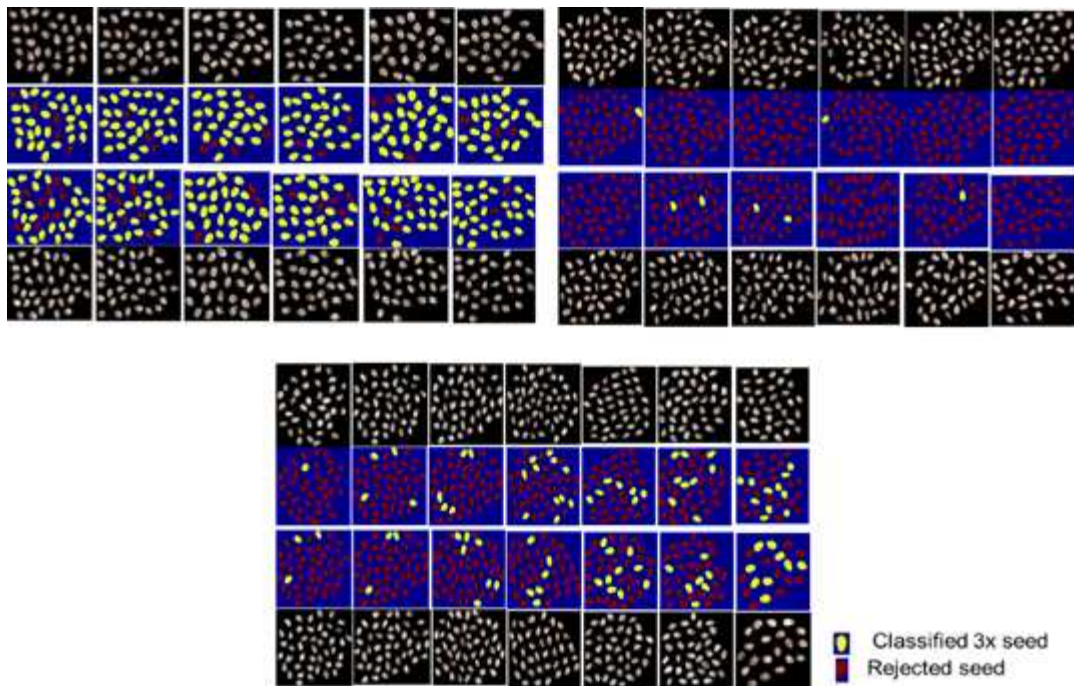


Fig. 35. SVM classification: (a) 3x trained model, (b) 2x trained model, and (c) 4x trained model.

Table 29. SVM classification model performance on discrimination of seed-ploid classes

Model type	3x accuracy (%)	4x & 2x accuracy (%)	Overall accuracy (%)
DD-SIMCA-OCC	69.2	87.7	78.5
SVM-quadratic	82	86.5	84.3

Table 29의 결과는 SVM 2차 분류모델이 다변량 클래스 배수성 분류 방법으로 84.3%의 최고의 배수성 종자 식별 정확도를 보여준다. 그러나 결과를 실제 및 산업에 적용하려면 90% 이상의 높은 식별 정확도를 갖는 것이 필요하다. 이러한 정확도는 딥러닝 분류모델

을 활용했을 때 가능하였다.

개발된 딥러닝 모델의 결과는 Table 30와 같이 Deeplabv3+와 Resnet18을 조합했을 때, 98.2%의 영상 분류 정확도와 96.6%의 가중 IoU를 생성하는 것으로 나타났다. Deeplabv3+는 U-net을 사용했을 때보다 더 높은 식별 정확도를 보였다. Fig. 36은 Table 30의 최상의 모델을 사용하여 이미지 분류 모델을 구성한 결과이다.

Table 30. Deep learning model results

Encoder network	Decoder network	Global accuracy (%)	Mean accuracy (%)	Mean IoU (%)	Weighted IoU (%)	Mean BFscore (%)
Deeplabv3+	Resnet18	98.2	94.2	88.4	96.6	92.6
	Mobilenetv2	97.9	91.8	85.5	96.2	83.0
	xception	96.5	87.4	77.9	94.2	88.1
Unet	Resnet18	96.5	92.6	83.2	94.5	89.9
	Mobilenetv2	94.4	89.4	81.5	91.6	79.6
	xception	93.6	85.9	74.2	89.6	76.3

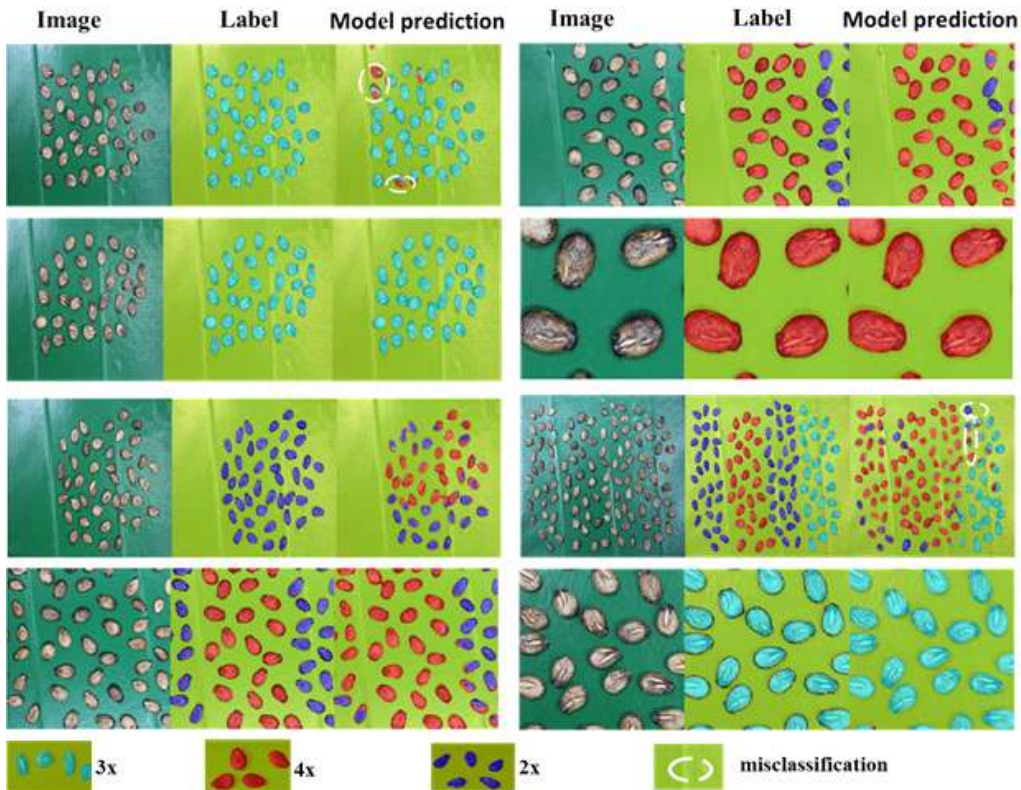


Fig. 36. Ploidy seed image classification and prediction by the deeplabv3+ - Resnet18 model (an offline model).

결과 영상에서 시각화 목적을 위해 3x 종자를 시안색으로 표시하였고, 4x 종자는 빨간색으로 2x 종자는 보라색으로 표시하였다.

Table 31. Summary for Model image prediction accuracy (Deeplabv3+ - Resnet18)

Trials	3x			2x and 4x			Total (Overall)		
	Correct	Not correct	Percentage correct (%)	Correct	Not correct	Percentage correct (%)	Correct	Not correct	Percentage correct (%)
1	31	4	88.6	5	0	100.0	36	4	90.0
2	30	0	100.0	35	0	100.0	65	0	100.0
3	20	0	100.0	44	0	100.0	64	0	100.0
4	22	2	91.7	78	3	96.3	100	5	95.2
5	11	2	84.6	13	0	100.0	24	2	92.3
6	23	0	100.0	24	1	96.0	47	1	97.9
7	20	6	76.9	10	0	100.0	30	6	83.3
8	15	0	100.0	16	1	94.1	31	1	96.9
9	24	0	100.0	30	0	100.0	54	0	100.0
10	18	0	100.0	24	0	100.0	42	0	100.0
									95.6

실제 배수성 종자 이미지 분류 및 예측 정확도를 확인하기 위해 분류된 모든 개별 종자에 대한 실제 예측되고 기록된 10개의 이미지를 무작위로 선택하였다(blind test). 10개의 이미지에 대해 얻은 전체 정확도는 Table 31에 나타내었다. 딥러닝에 의한 배수성 종자 판별 정확도는 모델 정확도의 경우 98.2%인 반면, 랜덤 이미지 예측으로 확인된 정확도는 95.6%였다. 소프트웨어와 확인된 정확도의 차이는 전체 정확도에 영향을 미칠 수 있는 배경에 대한 예측이 포함되었기 때문으로 사료된다. 결론적으로 딥러닝 방법은 one-class 분류 및 SVM 분류 모델에 비해 높은 배수성 종자 식별 정확도를 보였다.

제2절 수박 내한성 표현형 검정기술 개발

현재 한국의 봄철 수박의 파종 및 발아는 환경이 통제된 온실에서 육종하고, 약 3분엽기 이후에는 노지의 온실로 이식하여 생육 된다. 봄철의 노지의 온도 환경은 낮시간과 밤시간의 온도 차이가 크므로 일반적으로 약한 저온에 노출된 모종이 출하된다.

실험을 위해 모종의 환경 설정은 아래 Table 32와 같은 환경을 기준으로 낮 12시간, 밤 12

시간(봄철 일사량 적용), 습도 70%, 광량 평균 약 4000 Lx(형광등)으로 설정하고 제 3분엽이 나올 때까지 재배하였다.

시료는 주관기관에서 공급받은 4가지 수박품종인 45NC(내한성 약), DAP(내한성 중), DAPCT(내한성 강), PI1488(내한성 강, 야생종)을 이용하여 내한성 검증을 수행하였다. 제공된 종자는 종묘회사에서 반복 실험을 통해 검증된 저항성 품종이다. 작물을 제 3분엽기까지 성장시킨 후, 정상 및 저온스트레스에 노출시킨 샘플에 대해 초분광 영상을 획득하였다. 수박 작물의 저항성을 구분할 수 있는 저온 스트레스 환경을 조성하고 스트레스 증상 여부를 검출할 수 있는 분광 모델을 개발하고자 하였다.

Table 32. The basic watermelon seed sowing environment.

Date	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Day(°C)	-	-	25	25	25	25	25	25	25
Night(°C)	28	28	15	15	15	15	15	15	15
	sowing		Germination						

1. 저온 스트레스 조건 설정

저온 실험 환경은 할로겐 램프의 광조사 환경에서, 7일 동안 밤의 온도를 10°C로 낮춘 조건이었다. 관측결과, 정상 환경과 스트레스의 환경에 따른 성장 속도의 차이가 없었다. 일반적인 저온 노출과 관련된 문헌을 확인 결과, 광환경의 질이 높은 경우 저온 저항성이 향상된다는 연구결과가 있었다. 그러므로 약한 광질(형광등)에 노출하는 것이 저온 스트레스 조건에 적합하다는 판단을 하였다. 광원은 3과장 형광등을 이용하여 평균 광 강도 4000 Lx인 환경에서 수박 작물을 재배하였다.

설정된 광조건(형광등)을 기준으로 초분광 영상을 이용하여 저온 저항성을 예측할 수 있는 다양한 온도 조건을 조사하였다. 본 연구에서 조사한 조건은 3가지로, 자세한 내용은 다음과 같다.

- 약한 저온스트레스 조건 - 일주일 동안, 밤 온도 10°C
- 강한 저온스트레스 조건(1) - 48시간 동안, 밤낮 모든 온도 5°C
- 강한 저온스트레스 조건(2) - 72시간 동안, 밤낮 모든 온도 5°C

가. 약한 저온 스트레스 조건 결과

4가지 저항성(45NC-내한성 약, DAP-내한성 중, DAPCT-내한성 강, PI1488-내한성 강, 야생종)의 약한 저온 스트레스 조건 노출 전후의 평균(mm) 성장 결과는 Table 33과 같다. 작물 줄기의 신장 차이는 내한성에 따른 차이가 보이지 않았다. 하지만 2분엽과 3분엽의 장축의 성장속도 차이가 보였으며, 특히 3분엽의 경우 평균 11 mm(내한성 약), 5 mm(내한성 중), 6 mm(내한성 강)의 차이로 내한성 품종의 생육 차이가 나타났다. 정상과 내한성에 노출된 잎

의 성장 차이가 작을수록 저항성으로 판단할 수 있는데, 이러한 차이는 각 품종별로 저온 저항성의 차이가 있음을 알 수 있다. 하지만 초분광 영상을 촬영하여 분석을 수행하면 정상군과 저온노출군의 분광 정보의 차이가 나타나지 않았으므로, 초분광 영상을 통한 내한성 검정에 조건이 부합되지 않았다.

Table 33. Low temperature stress result (Night time at 10°C for one week).

	45NC (weak)				DAP (middle)			
Unit : mm	Control		Stress		Control		Stress	
	Average	Standard Deviation	Average	Standard Deviation	Average	Standard Deviation	Average	Standard Deviation
Stem	6.00	1.87	7.33	1.25	12.50	3.84	7.00	2.00
First leaf	8.50	4.39	2.33	1.48	4.25	2.77	2.50	0.87
Second leaf	28.50	15.31	14.75	1.30	18.00	2.55	14.50	1.12
Third leaf	55.50	5.72	46.50	2.18	44.50	0.87	39.75	1.30
Fourth leaf					44.50	15.07	43.00	8.51
Fifth leaf					24.75	10.30	16.50	3.20
	DAPCT (strong)				PI1488 (strong wild)			
Unit : mm	Control		Stress		Control		Stress	
	Average	Standard Deviation	Average	Standard Deviation	Average	Standard Deviation	Average	Standard Deviation
Stem	6.75	4.38	10.75	7.22	4.00	1.58	4.50	0.50
First leaf	2.00	0.71	3.50	1.12	5.00	2.92	5.00	2.12
Second leaf	14.00	2.24	12.75	3.63	11.50	5.94	13.25	7.79
Third leaf	42.00	9.19	36.00	6.20	47.75	12.50	40.75	13.44
Fourth leaf	40.75	16.93	44.00	7.07	66.25	3.27	44.75	6.10
Fifth leaf	12.25	9.91	19.25	5.12	52.00	11.22		

나. 강한 저온 스트레스 조건(1)의 결과

4가지 다른 저항성 품종의 정상 환경과 강한 저온 스트레스 조건(1)의 줄기 및 잎의 평균 장축의 차이는 Table 34와 같다. 약한 저온 스트레스와 달리 모든 저항성 시료의 줄기 및 잎의 성장이 매우 낮아졌다.

Table 34. Growth difference between normal and strong chilling stress conditions (Day of 5 °C for 48 hours).

	45NC (weak)				DAP (middle)			
Unit : mm	Control		Stress		Control		Stress	
	Average	Standard Deviation	Average	Standard Deviation	Average	Standard Deviation	Average	Standard Deviation
Stem	6.00	1.87	5.25	2.31	12.50	3.84	7.13	4.19
First leaf	8.50	4.39	1.13	2.03	4.25	2.77	0.63	0.74
Second leaf	28.50	15.31	1.38	2.00	18.00	2.55	0.88	0.64
Third leaf	55.50	5.72	4.00	1.07	44.50	0.87	2.88	1.55
Fourth leaf					44.50	15.07	6.00	4.00
Fifth leaf					24.75	10.30	9.13	6.45
	DAPCT (strong)				PI1488 (strong wild)			
Unit : mm	Control		Stress		Control		Stress	
	Average	Standard Deviation	Average	Standard Deviation	Average	Standard Deviation	Average	Standard Deviation
Stem	6.75	4.38	3.38	2.92	4.00	1.58	6.75	4.06
First leaf	2.00	0.71	0.00	0.00	5.00	2.92	0.00	0.00
Second leaf	14.00	2.24	1.25	0.89	11.50	5.94	0.00	0.00
Third leaf	42.00	9.19	1.75	3.01	47.75	12.50	0.50	1.07
Fourth leaf	40.75	16.93	5.25	2.76	66.25	3.27	0.88	1.36
Fifth leaf	12.25	9.91	4.25	3.77	52.00	11.22	4.88	4.91

내한성 약과 내한성 강 식물의 제 3본엽잎을 채취하여 초분광 Vis/NIR 영상을 측정하고, PCA에 적용한 결과는 Fig. 37과 같았다. PC1, PC3, PC4는 내한성 강과 내한성 약의 영상값 차이가 없었다. 반면, PC2는 내한성 강과 약의 영상 차이를 명확히 확인할 수 있었다.

PC2의 파장 가중치는 Fig. 38과 같이 550 nm와 700 nm에서 강한 가중치를 나타내고 있다. 550 nm은 잎이 황화될 때 나타나는 카르테노이드와 관련이 있으며, 700 nm은 엽록소 활성화와 관련되어 광의 반사가 많이 일어나는 파장이다. 따라서 저온 스트레스에 반응하는 Vis/NIR 분광 정보는 잎의 황화와 엽록소 활성도의 변화와 관련이 있음을 알 수 있다.

Fig. 39는 정상 조건의 잎과 약한 저온 환경 그리고 강한 저온 환경(1)에 노출된 잎을 추출하여 초분광 영상을 측정하고, PCA의 PC2 가중치를 적용한 영상이다. 정상 및 약한 저온 스트레스에 노출될 경우 저항성과 관련된 영상값의 차이를 확인할 수 없었다. 강한 저온 스트레스(1)를 부여할 경우 영상값의 차이가 나타났다. 특히, 내한성 약은 다른 품종에 비해 영상값의 차이가 매우 크게 나타남을 알 수 있다.

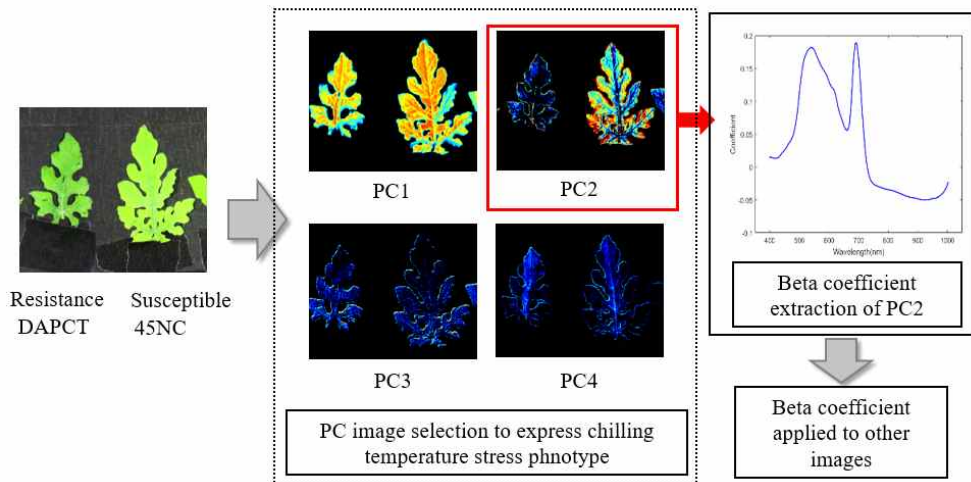


Fig. 37. PCA analysis process for hyperspectral imaging data.

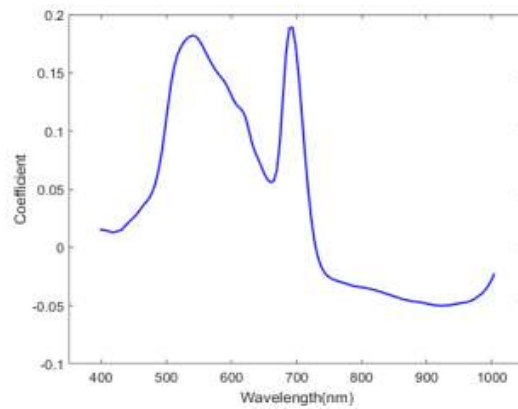


Fig. 38. PC2 coefficient plot associated with strong chilling stress.

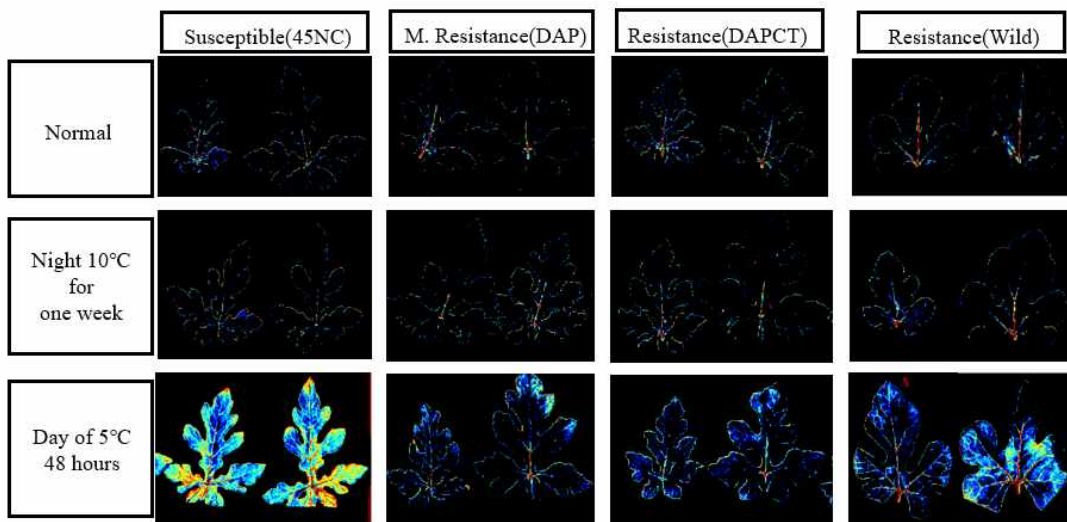


Fig. 39. PC2 coefficient images of resistance plants leaves.

다. 강한 저온 스트레스 조건 결과(2)

강한 저온 스트레스(1) 조건은 초분광 영상을 이용하여 내한성 약의 피해를 확인할 수 있었다. 하지만, 내한성 중 ~ 강 품종을 구분하기 힘들다는 단점이 있으므로, 보다 강한 저온 노출을 통하여 내한성을 정밀하게 예측하고자 하였다. 저온 조건은 5℃ 환경에서 72시간 노출 후 정상 온도(낮25℃, 밤15℃)를 72시간 동안 적용하여 작물을 회복시킨 후 저항성의 차이를 비교하였다. 회복시킨 수박 작물의 초분광 영상을 측정하고, PLS-DA 분석을 통하여 작물의 내한성 강도에 따른 분광 차이를 검토하였다.

2. 저온 스트레스 환경의 초분광 영상 분석 결과

가. Vis/NIR 영역 분석 결과

4개의 내한성 샘플 그룹은 한 그룹당 노출 전 각 10개의 샘플과 노출 후 각 10개의 샘플로 총 80개의 샘플로 구성하였다. PLS-DA를 위한 샘플 그룹의 종속변수(Y)는 다음과 같이 표현하였다.

Y : Group 1 = sample belongs to before exposed chilling stress groups

(45NC, DAP, DAPCT, PI1488)

Group 2 = sample belongs to PI1488 group (strong wild type)

Group 3= sample belongs to DAPCT group (strong)

Group 3 = sample belongs to DAP group (middle)

Group 4= sample belongs to 45NC group (weak)

분류의 기준(Group 1)은 저온 스트레스 노출 전(정상 생육)상태로 놓고, 저항성을 ‘강>약’ 순서대로 Y값을 오름차순으로 배치하였다. 저항성이 강할수록 정상과 비슷한 상태가 유지 될 것이고, 감수성일수록 정상과 다른 특수한 현상(저온 스트레스로 인한 피해 등)이 나타날 것으로 예상되기 때문이다. 각 그룹에 대한 초분광 데이터는 개발 및 검증 세트로 분리하였으며, 개발된 모델을 이용하여 검증 세트로 PLS-DA 모델의 정확도를 확인하였다. Fig. 40은 비 전처리된 데이터를 PLS-DA 분석한 것으로, 평균 예측 정확도는 53.3%이었다. 정상과 내한성의 강도별 예측저항성의 상관관계가 선형으로 보여졌으며, 이러한 패턴은 저항성 선별이 어느 정도 가능하다는 점을 시사한다.

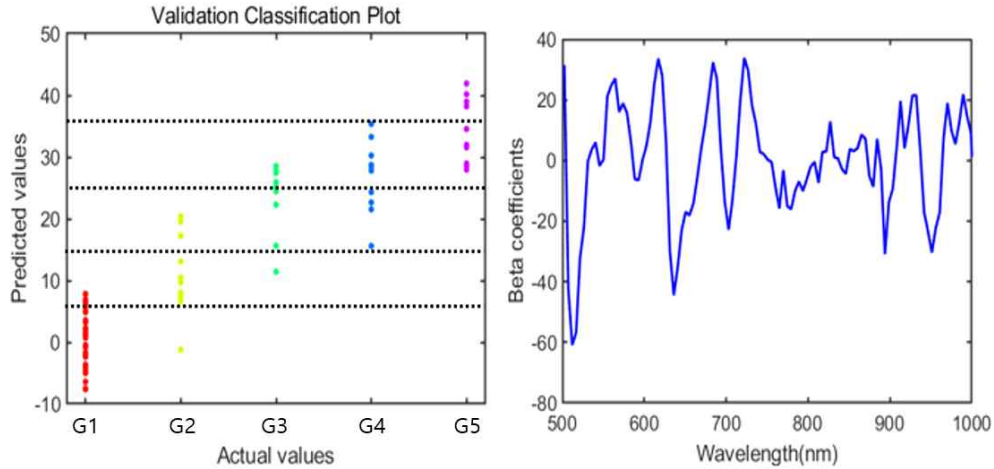


Fig. 40. Results of PLS-DA classification model developed with 5 groups of samples in validation set (a), and PLS-DA beta coefficient plot (b).

(1) Vis/NIR 영역 모델의 최소화

앞의 모델은 예측 정확도가 53.3%로서, 매우 낮은 수치이다. 이러한 이유는 일부 품종에 저항성 값의 편차 크기 때문에 정확도가 낮아진 것으로 판단된다. Fig. 41의 구분 모델을 확인해보면 G3(DAPCT, 내한성 강)는 G2와 G4의 중간 값을 갖는다(약간 더 G4에 치중되어 있다). DAPCT(내한성 강)는 P사에서 PI148(내한성 강, 야생종)과 DAP(내한성 중)의 유전형질을 결합한 것으로 확인되었다. 그러므로 그룹 개수를 줄여 모델의 정확도를 향상시키기 위해 G3와 G4를 혼합하여 다음과 같은 4가지 그룹으로 재구성하였다.

Y : Group 1 - 1= sample belongs to before exposed chilling stress groups

(45NC, DAP, DAPCT, PI1488)

Group 2 - 1= sample belongs to PI1488 group (strong wild type)

Group 3 - 1 = sample belongs to DAP group (middle) + DAPCT group (strong)

Group 4 - 1 = sample belongs to 45NC group (weak)

재구성한 그룹을 이용하여 PLD-DA를 수행한 결과는 Fig. 41과 같다. 앞의 5그룹 분석과 동일하게 저항성에 따른 선형 관계가 나타났으며, 예측 정확도는 73%이었다. 이러한 결과는 품종의 편차를 고려할 때 저항성을 선별할 수 있는 모델이라 판단된다.

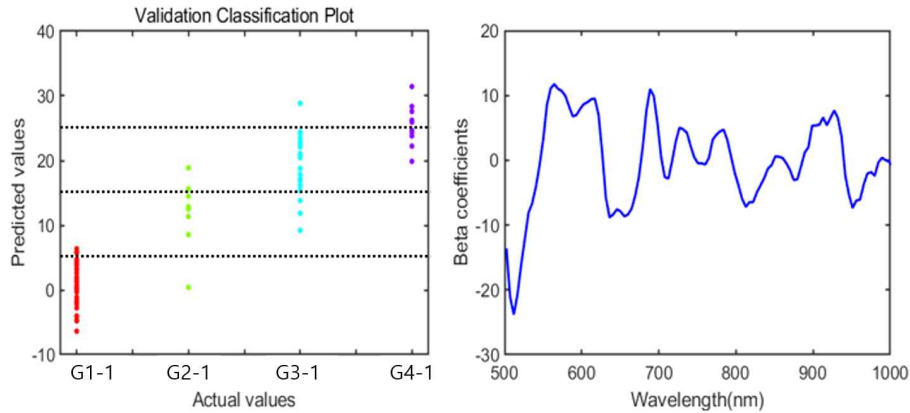
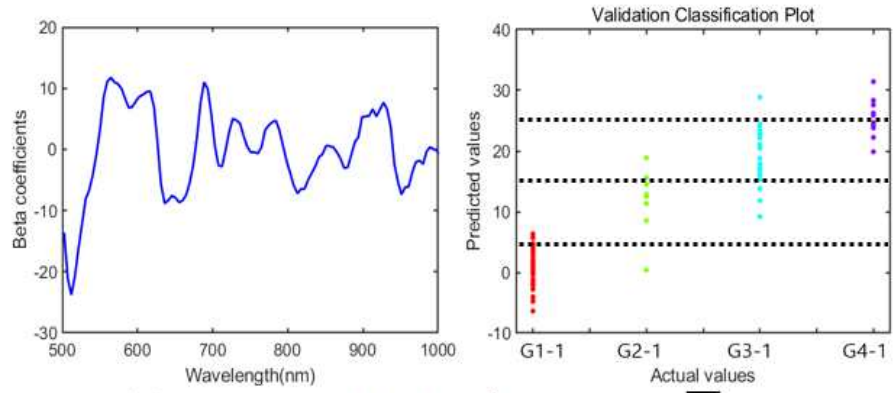


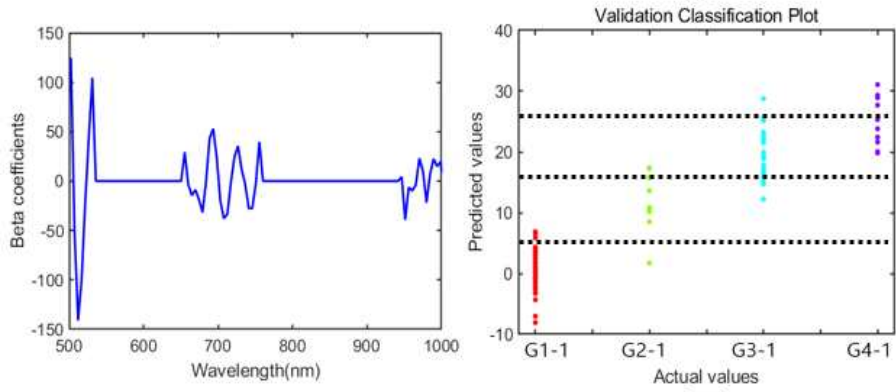
Fig. 41. Results of PLS-DA classification model developed with 4 groups of samples in validation set (a), and PLS-DA beta coefficient plot (b).

4가지 그룹으로 구분한 초분광 Vis/NIR 모델은 500 nm ~ 1000 nm 파장으로 총 106개 파장의 조합이다. 106개의 세밀한 파장 조합은 HTS 장비를 구성하는데 있어서 데이터의 저장 용량의 증대와 장비의 비용 증가를 발생하므로, 관련된 모델 파장의 최소화가 필요하다. 파장의 최소화의 의미는 모델의 정확도를 유지하면서, 파장 조합의 개수를 최소화하는 것이다. 개발된 모델의 파장 최소화를 위하여 Variable Importance on Projection (VIP)와 Successive Projections Algorithm (SPA)를 이용하였다. Fig. 42는 개발된 PLS-DA 모델에 VIP와 SPA를 순차적으로 적용한 결과이다. Fig. 42b는 VIP를 적용하여 106개의 밴드를 42개로 축소시킨 모델의 결과이다. VIP를 수행할 경우 전체 파장 영역에서 주요 파장 영역을 선정할 수 있다는 장점이 있다. 하지만, 정확도가 69.4%이므로 원본 모델보다 정확도가 떨어지는 한계가 있다. Fig. 42c는 VIP 적용한 모델에 SPA를 추가 적용한 것이다. SPA분석은 VIP에서 선정된 파장영역에서 특수한 파장만 추출할 수 있으며, 32개의 파장으로 축소되었다. 또한 정확도는 원본데이터와 같은 수치로 상향 되었으므로, 최소의 파장으로 판단되었다.

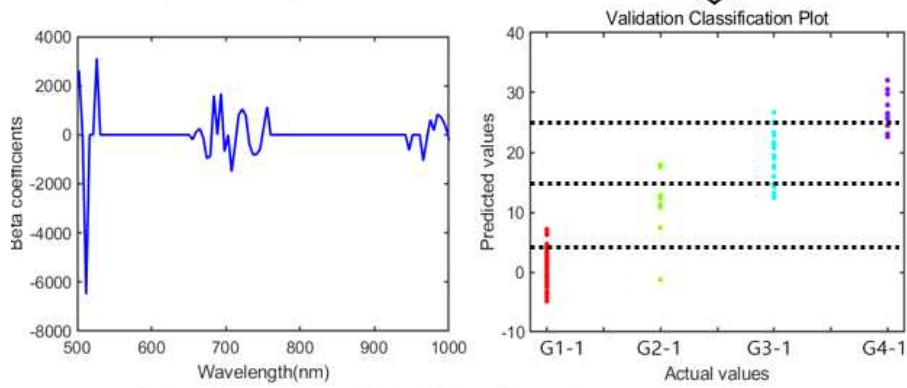
분석에 수행한 데이터는 하나의 식물의 평균 데이터를 사용하므로, 경향성을 파악할 수 있다. 하지만 실제 작물 영상에 적용 시 실제로 저항성 구분이 가능한지는 알 수 없다. HTS시스템에 적용할 경우 영상을 기준으로 저항성을 판단하기 때문에 관련 모델의 영상화는 필수적이다. Fig. 43은 최소화된 32개의 파장 모델을 영상화한 결과이다. 모델 영상은 잎이 저온으로 인한 괴사된 부분을 제외한 나머지 부분을 기준으로 판별한다. 정상과 저온 노출군, 그리고 저항성 그룹마다 차이(한 식물에서 빨강의 면적)는 32파장 분광 모델이 내한성 평가가 가능한 것으로 판단된다. Fig. 43c는 데이터를 평균치로 치환하여 모델의 저항성을 판별한 것으로 식물의 저항성에 따른 차이를 파악할 수 있다.



(a) Accuracy : 73.1%, Bands : 106



(b) Accuracy : 69.4%, Bands : 42



(c) Accuracy : 73.1%, Bands : 32

Fig. 42. Regression coefficient and classification plots of PLS-DA model developed with whole wavenumber (a), VIP selected variable (b), and SPA selected variables (c).

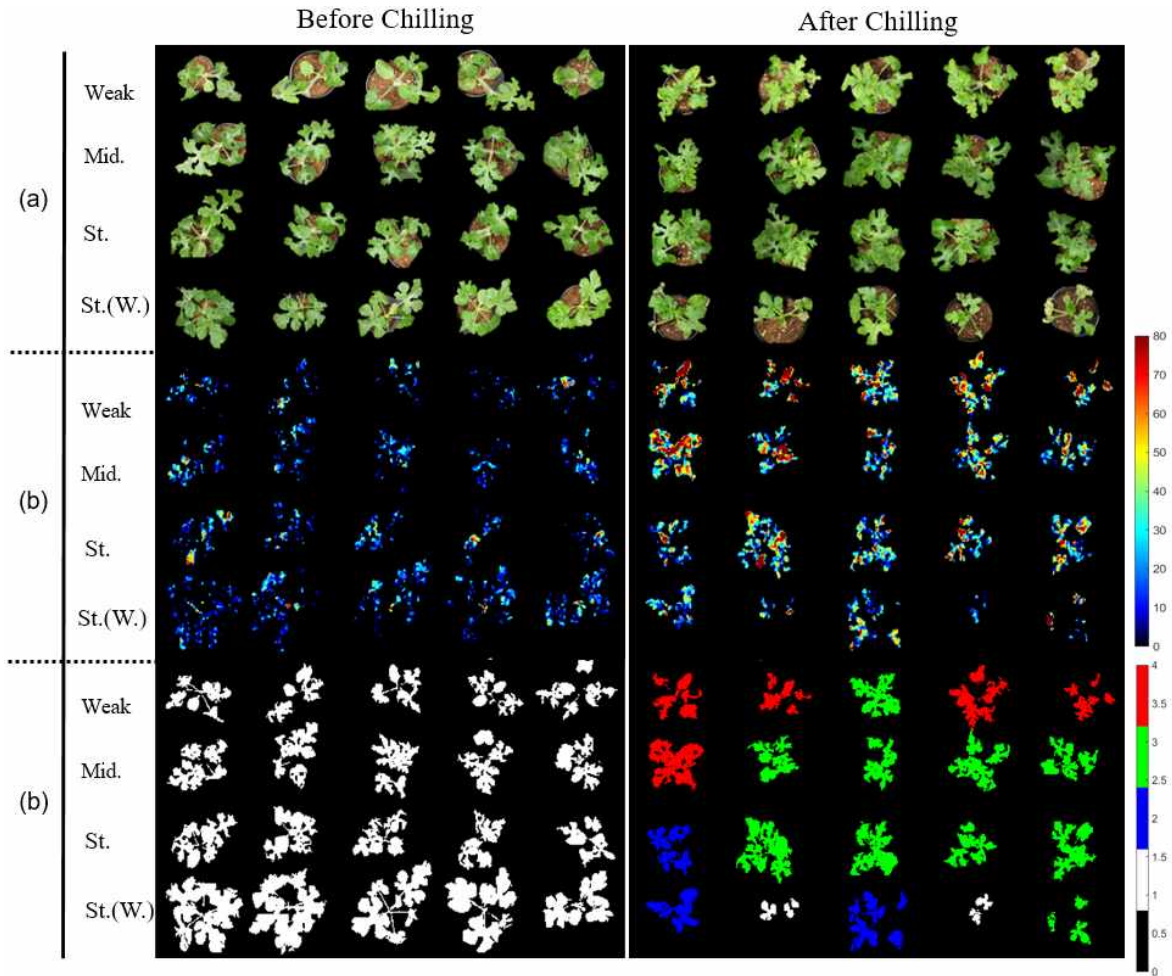


Fig. 43. Classification results based on VIP-SPA-PLS-DA model (4 groups) developed with Vis/NIR images of plants; (a) RGB image, (b) PLS-DA image, and (c) binary image.

(2) 파장 최소화 모델 - 20개 파장 이하

앞의 32 파장 모델은 4가지 그룹을 기준으로 모델링 한 것이다. 하지만 32파장 모델은 내한성 검정에는 유리하나, 분광 카메라의 가격을 최소화하기에는 부족하다. 시중에 판매되는 저가형 분광카메라는 파장의 지원 개수가 20개 미만이므로 이러한 사양에 적합한 모델이 필요하다.

Fig. 44c의 scatter plot을 확인해보면, 그룹 G3-1(내한성 중, 강 - 하늘색)의 데이터를 제외하면 3개의 그룹을 구분할 수 있을 것이라 예측된다. 이렇게 모델의 정확도를 낮추는 그룹 제거한다면 파장 수를 더 줄이고, 32파장과 유사한 모델을 개발할 수 있을 것이다. 그러므로 종속변수는 다음과 같이 재 지정하였다.

Y : Group 1-2 = sample belongs to before exposed chilling stress groups

(45NC, DAP, DAPCT, PI1488)

Group 2-2 = sample belongs to P11488 group (strong wild type)

Group 3-2 = sample belongs to 45NC group (weak)

Fig. 44는 3개의 그룹을 이용하여 PLS-DA를 수행한 결과이다. 이전의 4개의 그룹으로 개발한 모델보다 적은 정보가 들어갔지만, 저온 노출 전(G1-2, 빨강), 내한성 강-야생종(G2-2, 녹색), 내한성약(G3-2, 파랑)의 그룹은 86.7%로 높은 정확도로 구분할 수 있음을 알 수 있다. 또한 Fig. 44b는 이전 결과와 거의 비슷한 형태의 가중치 모델을 고려하면 모델의 성능은 서로 비슷하다 판단된다.

3가지 모델로 구성된 초분광 Vis/NIR 모델(500 nm ~ 1000 nm)을 VIP 및 SPA를 이용하여 Fig. 45와 같이 파장을 최소화하였다. 앞의 4그룹 모델과 달리, 106개의 밴드를 18개의 밴드로 축소가 가능하였다. 3개의 그룹 검정 정확도는 86.7%에서 92.5%로 향상되는 것을 확인하였다. 이는 내한성 예측 모델에 있어서 판별 정확도에 크게 기여하는 파장은 18개이고, 나머지는 노이즈에 가까움을 알 수 있다.

Fig. 46은 최소화된 18개의 파장 모델을 영상화한 결과이다. 모델 영상은 Fig. 45와 비교할 때 내한성 판별 패턴이 매우 유사한 것을 알 수 있다. 특히 저온 노출 전 후, 그리고 저온 민감성과 저항성을 충분히 구분할 수 있을 것으로 판단되었다. 개발한 분광 모델을 이용한 저항성을 선별 정보와 형태학적 발육 상태 정보를 결합한다면, 더 정밀한 내한성 평가를 할 수 있을 것이라 예상된다.

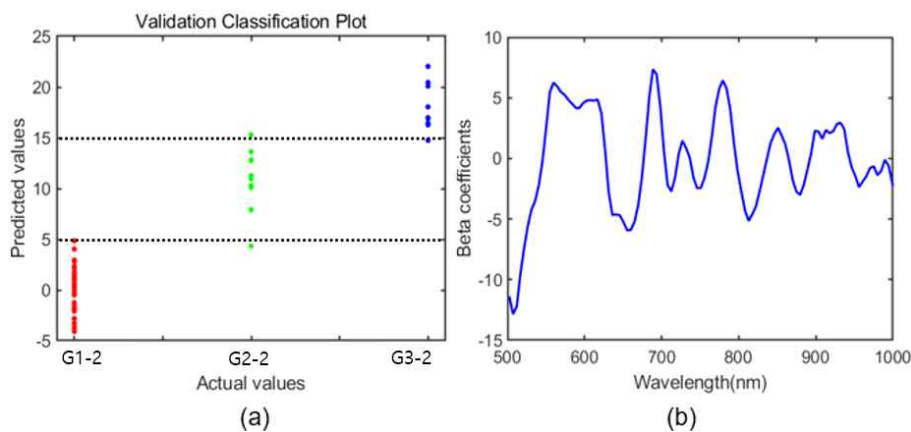


Fig. 44. Results of PLS-DA classification model developed with 3 groups of samples in validation set (a), and PLS-DA beta coefficient plot (b).

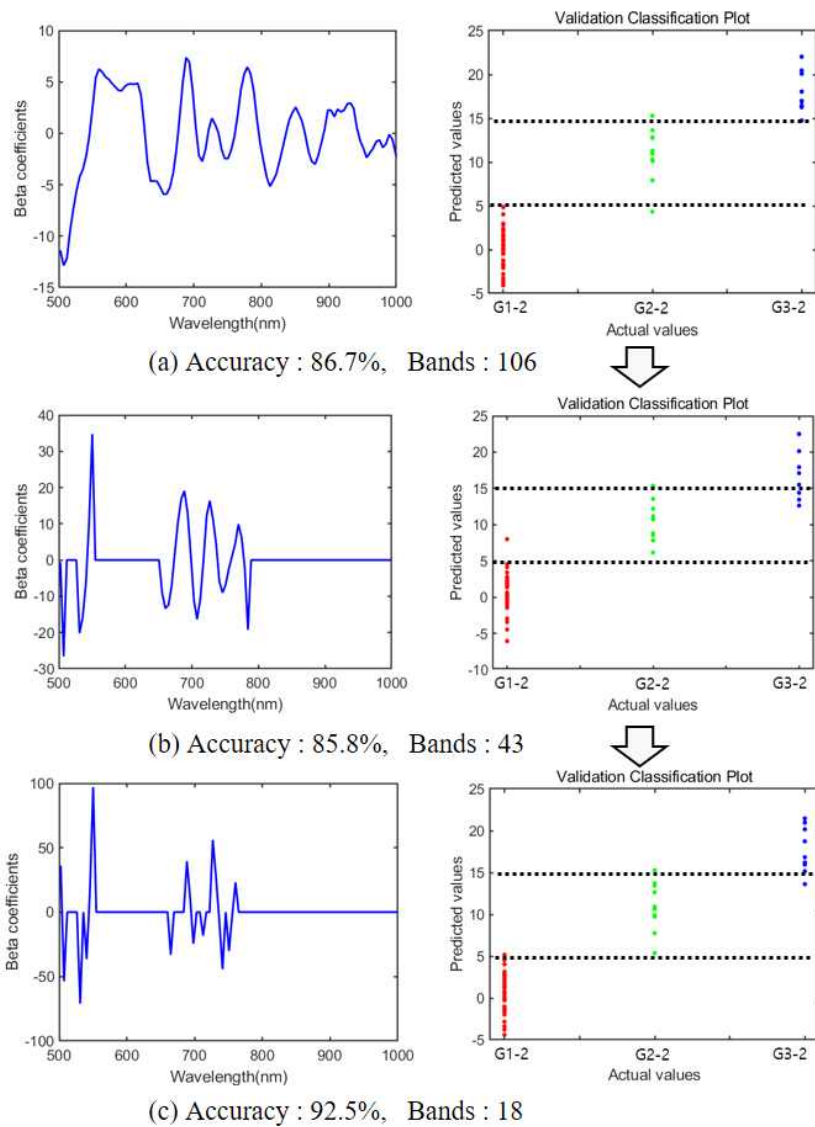


Fig. 45. Regression coefficient and classification plots of PLS-DA model developed with whole wavenumber (a), VIP selected variable (b), and SPA selected variables (c).

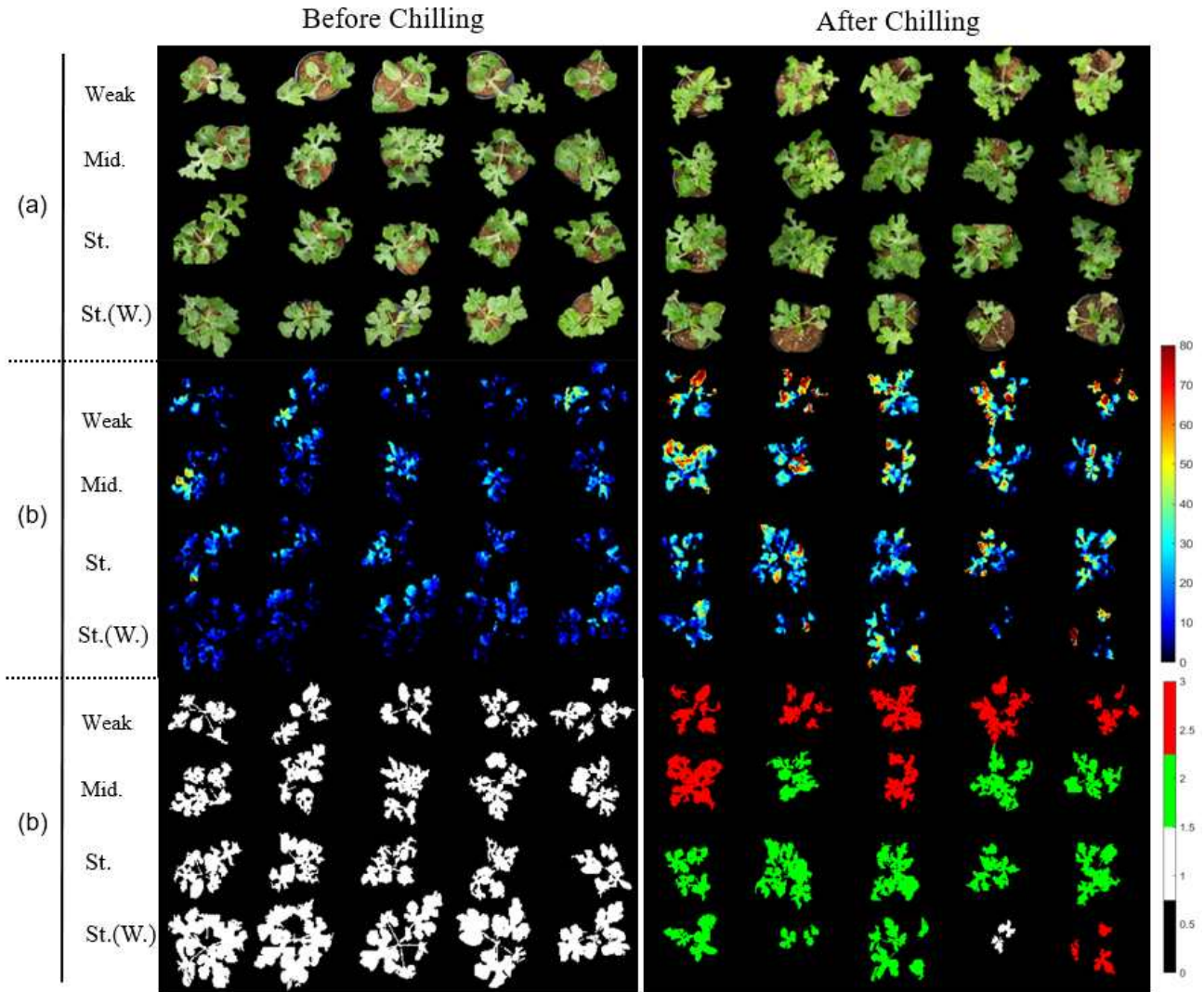


Fig. 46. Classification results based on VIP-SPA-PLS-DA model (3 groups) developed with Vis/NIR images of plants; (a) RGB image, (b) PLS-DA image, and (c) binary image.

나. SWIR 영역 분석 결과

SWIR 영역의 내한성 검정 구분 가능 여부를 조사하였다. PLS-DA를 위하여, Vis/NIR 분석과 같이 각 그룹은 다음과 같은 종속변수(Y)로 표현하였다.

Y : Group 1-3 = sample belongs to before exposed chilling stress groups

(45NC, DAP, DAPCT, PII488)

Group 2-3 = sample belongs to PII488 group

Group 3-3 = sample belongs to DAPCT group

Group 4-3 = sample belongs to DAP group

Group 5-3 = sample belongs to 45NC group

초분광 데이터는 개발 및 검증 세트로 분리하였으며, 개발된 모델을 이용하여 검증 세트로 모델의 정확도를 확인하였다. Fig. 47은 SNV 전처리된 데이터를 PLS-DA 수행한 validation 결과이다. 모델의 정확도는 67.8%로 낮은 수치를 보였으나, 내한성의 강도별 예측이 선형으로 보여졌다. 이러한 패턴은 SWIR 영역에서 내한성 선별의 가능성을 보여준다.

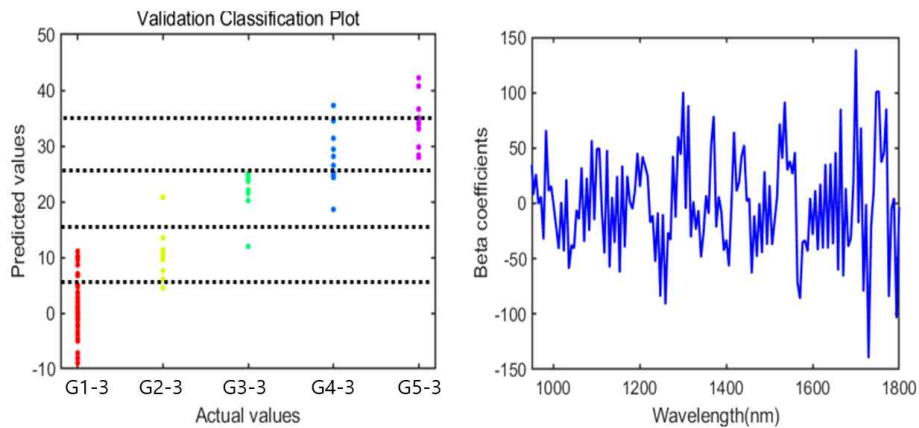


Fig. 47. Results of PLS-DA classification model developed with 5 groups of samples in SWIR validation data set (a), and PLS-DA beta coefficient plot (b).

(1) SWIR영역 모델의 최소화

정확도 67.8%은 내한성을 검정에 적용하기에는 매우 낮은 정확도이다. 각 저항성에 따른 편차가 있어 모델의 정확도가 낮은 것이므로, 종속변수의 차원 줄이고자 하였다. Fig. 47의 그룹 분포를 기반으로, 저항성 예측이 겹치는 부분은 G3-3(내한성 중, DAP), G3-4(내한성 강, DAPCT)으로 판단되어 제거하여 재구성하였다. 이를 적용하여 다음과 같은 3그룹의 종속변수로 재구성하였다.

Y : Group 1-4 = sample belongs to before exposed chilling stress groups

(45NC, DAP, DAPCT, PI1488)

Group 2-4 = sample belongs to PI1488 group

Group 3-4 = sample belongs to 45NC group

재구성한 그룹을 PLD-DA에 적용한 결과는 Fig. 48와 같이 89.1%의 정확도가 나타났다. 모델의 최소화를 수행하는 과정에서 Fig. 48b와 같이 가중치 곡선에 잡음이 포함되면 파장의 축소가 어려워진다. 그러므로 Fig. 48d와 같이 원본스펙트럼 파장에 ‘Gaussian Smoothing (GS)’ 기법(5파장 처리를 적용)을 적용하였다. Fig. 48b와 Fig. 48d의 가중치를 비교해보면, 매우 성공적으로 노이즈가 제거되었음을 확인할 수 있다. 이러한 노이즈 제거

는 주요 파장의 개수 최소화를 위한 분석(VIP, SPA)의 결과가 향상된다는 장점이 있다. Fig. 49는 147개의 초분광 SWIR 모델을 VIP, SPA를 이용하여 최소 파장만 추출한 과정을 도시한 것이다. 최초에 GS기법을 적용하면 정확도가 85.7%로 감소하였지만, 이후 20개의 파장으로 최소화하면서 정확도가 93.3%로 증가하였다. 이러한 결과는 주요한 파장을 제외한 나머지 파장은 노이즈가 될 수 있다는 것을 시사하고 있다. Fig. 50은 20개 SWIR 파장 모델을 적용한 영상이다. 개발된 20파장 모델은 저온 노출 전후, 그리고 저온 민감성과 저항성을 충분히 구분할 수 있을 것으로 판단되었다. Vis/NIR 모델과 SWIR 모델이 함께 적용된다면, 내한성이 가장 강한 품종을 명확하게 선별할 수 있을 것이라 예상된다.

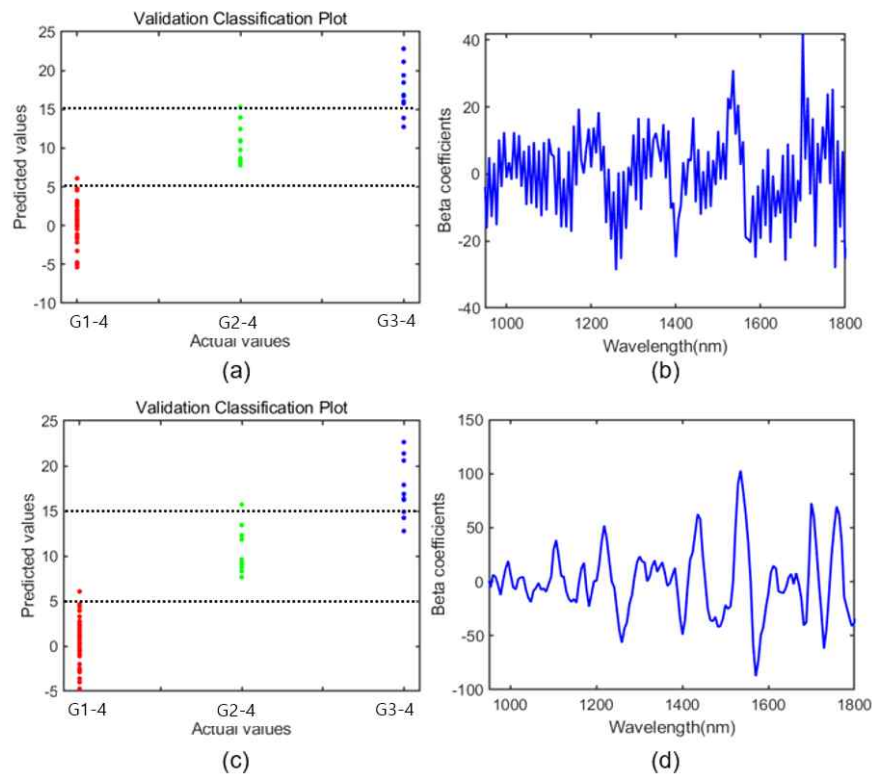


Fig. 48. Applying to GS methods on the SWIR imaging data of 3 groups watermelon plants; Results of PLS-DA classification model developed with validation set (before smoothing (a) and after smoothing (c)) and PLS-DA beta coefficient plot (before smoothing (b) and after smoothing (d)).

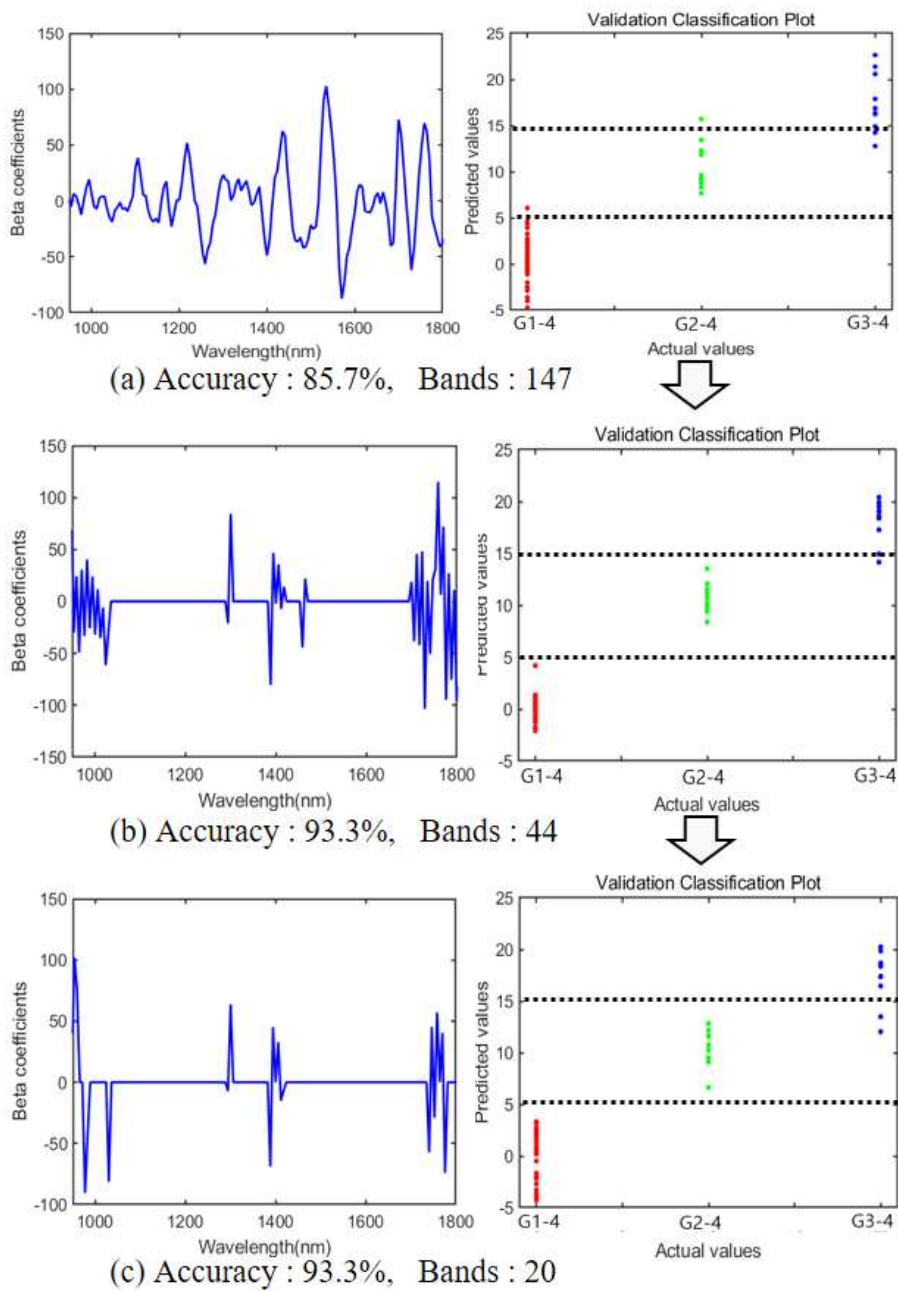


Fig. 49. Regression coefficient and classification plots of PLS-DA model developed with whole wavenumber (a), VIP selected variable (b), and SPA selected variables (c).

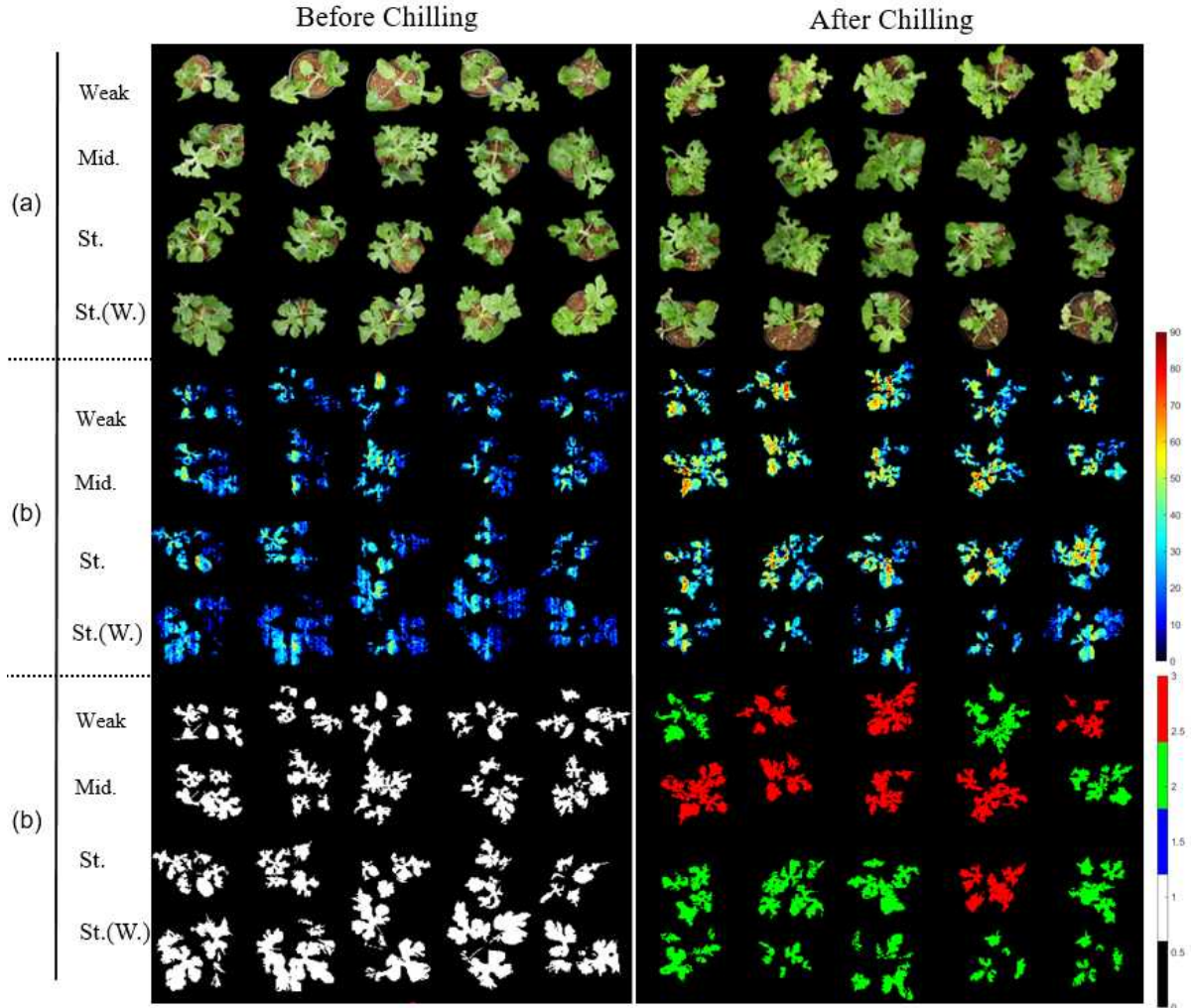


Fig. 50. Classification results based on VIP-SPA-PLS-DA model (3 groups) developed with SWIR images of plants; (a) RGB image, (b) PLS-DA image, and (c) binary image.

다. 개발된 수박의 저온스트레스 분광 모델의 해석

수박의 저온스트레스의 저항성 및 감수성 검정 모델을 개발하기 위하여 Vis/NIR ~ SWIR 영역(400 nm ~ 1800 nm)의 초분광 영상을 측정하였다. 또한 PLS-DA, VIP, SPA 분석을 적용하여 최소의 분광 파장을 선정하였다.

Table 35는 저온스트레스 저항성과 관련된 Vis/NIR영역의 18가지 파장 중 주요 파장을 나열한 것이다. 본 연구에 사용된 Vis/NIR 초분광 카메라는 파장의 분해능이 약 5 nm 이므로 해당하는 파장의 3 nm에 해당하는 표현형 정보를 정리하였다. Vis 영역에서 문헌적으로 파장과 가장 관련있는 성분 변화는 식물잎의 특수 성분인 잔토필, 클로로필, 카르테노이드, 리그닌과 무기 성분인 N, K, P이었다. 또한 유기물 구조 반응은 -OH, -CH가 가장 많았다. 이와 같은 파장 정보는 식물이 환경스트레스에 피해를 입었을 때 나타나는 황화반응(잔토필), 엽록소(클로로필)와 안토시아닌의 성분 정보이다. 이러한 변화는 저온으로 인한 식물 잎의 팽창 또는 시듦 그리고 껍사의 전형적인 표현형이라 판단된다. 또한 리그닌은 식물의 줄기나 나무의 목질부에 주로 검출되는 화합물로 세포벽의 강도를 부여하는 성분으로 알려져 있

다. 최근 리그닌 성분이 낙엽, 낙과의 발생과 큐티클 층을 생성에 연관이 있음이 밝혀졌다. 그러므로 리그닌이 저온 스트레스와 매우 연관이 있을 것으로 판단된다.

Table 36은 저온스트레스 저항성과 관련된 SWIR 영역의 21가지 파장을 중 주요 파장을 나열한 것이다. 본 연구에 사용된 SWIR 초분광 카메라는 파장의 분해능이 약 8 nm 이므로 선정된 파장의 4 nm 범위에 해당하는 정보를 정리하였다. SWIR 영역에서 문헌적으로 파장과 가장 관련있는 성분 변화는 무기 성분인 P가 유일하였고, 유기성분은 -CH₂, -OH, -SH 성분의 파장이 검출되었으며 특이한 성분으로는 Aromatic, ArOH(페놀) 그리고 Cellulose가 있었다. 작물이 저온에 노출되면, 세포막의 물리적 가역변화를 유도한다. 세포막의 막지질은 주로 디아실글리세라이드로 구성되며, 이중 수소로 포화된(-CH₂=CH₂-) 지방산으로 존재한다. 저온에서 지방산은 젤(또는 반결정)상태로 변화하는데, 이는 막의 유동성에 큰 영향을 주어 작물의 생육에 영향을 끼친다. 또한 이러한 반응은 수분스트레스 조건과 매우 유사하다.

Table 35. Main wavelength (Vis/NIR) associated with chilling stress in watermelon plant.

Wavelength	Plant phenotype
531	Xanthophyll
541	Nitrogen value
550	Chlorophyll absorption, Carotenoids
665	K concentration, Chlorophyll absorption, Carotenoids
698	P concentration
713	700 ~ 800 nm for brown pigments
736	ROH, Lignin(TGA-Facter)
741	CH ₃
760	H ₂ O or CH ₂ , Lignin(ADF-Facter)

Table 36. Main wavelength (SWIR) associated with chilling stress in watermelon plant.

Wavelength	Plant phenotype
942	CH ₃
1030	P concentration
1394	CH ₃
1406	ROH
1412	ROH
1418	CH ₂ or aromatic, Water stress
1723	ArOH
1741	SH
1776	CH ₂
1806	Cellulose

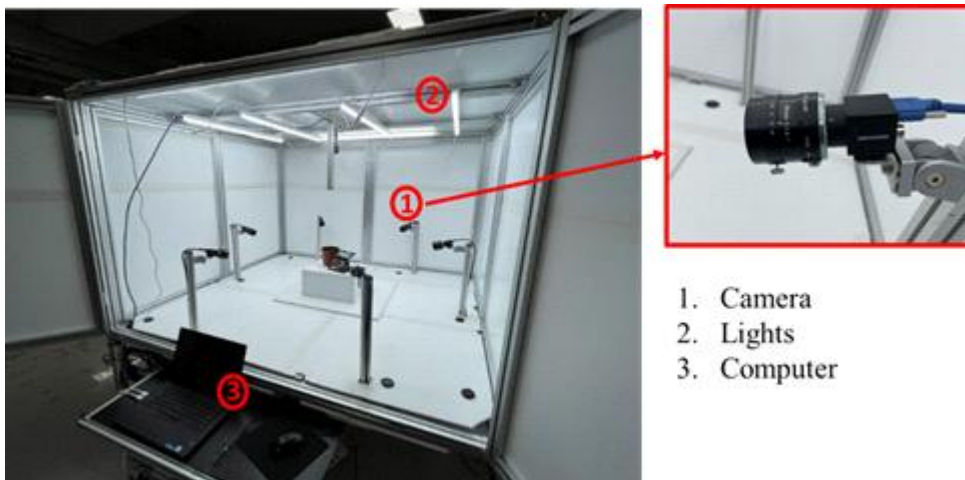
3. 2D 및 3D 기반 수박 작물의 저온 스트레스 예측을 위한 형태적 특성 분석

가. 시스템 설정

(1) 시스템 하드웨어

① 설정 1

이미지 데이터 수집은 Table 37에 표시된 사양의 시스템(Fig. 51)을 사용하여 수행되었다. 카메라의 목표 시야(FOV)는 32 x 27 cm 이므로 카메라와 샘플간의 거리는 FOV를 감안하여 60 cm로 설정되었다. 카메라는 동일한 각도, 거리, 조리개 및 노출 시간(10000 μ s 로 설정)으로 설정되었다. 하나의 카메라는 시스템 상단에 설치되어 작물의 평면도 이미지를 캡처하는 반면 다른 6개의 카메라는 서로 60도 간격으로 작물의 측면도를 캡처하도록 설정되었다.



1. Camera
2. Lights
3. Computer

Fig. 51. System for data collection (setup 1)

Table 37. System specifications

System dimensions	Camera specifications	Lights
Width: 160cm Length: 168cm Height: 107cm	Name: HIKVISION MV-CA050-20UC Type: 5MP 1" CMOS USB3.0 Resolution: 2592 x 2048 Lens: 25mm lens Variable aperture: f/1.4 to f/16 (fixed to f/8) Number: 7 cameras	Type: D65 White LED Power: 15W Quantity: 6 lights

② 설정2

SFM (Structure from Motion) 3D 모델 재구성에 대한 영상 데이터 수집은 Fig. 52와 같이 시스템 설정을 사용하였다. 카메라와 조명 사양은 Table 37와 같으나 카메라 한 대로 360도 회전하는 물체를 측정하는 것이 차별점이다.

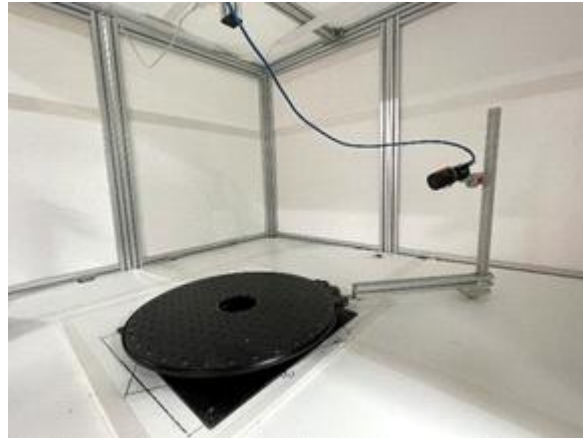


Fig. 52. Modified system setup for data collection (setup 2)

(2) 시스템 소프트웨어

데이터 수집은 MATLAB 소프트웨어(Natick, MA, USA)로 개발된 맞춤형 소프트웨어 UI(Fig. 53 참조)를 사용하여 수행되었다. 카메라 노출은 밝기의 균일성을 유지하기 위해 모든 카메라에 대해 일정한 값으로 유지하였다. 데이터 수집 설정 1의 경우 소프트웨어는 7대의 카메라를 수용하도록 개발된 반면, 데이터 수집 설정 2의 소프트웨어는 한 대의 카메라를 사용하도록 수정되었다.

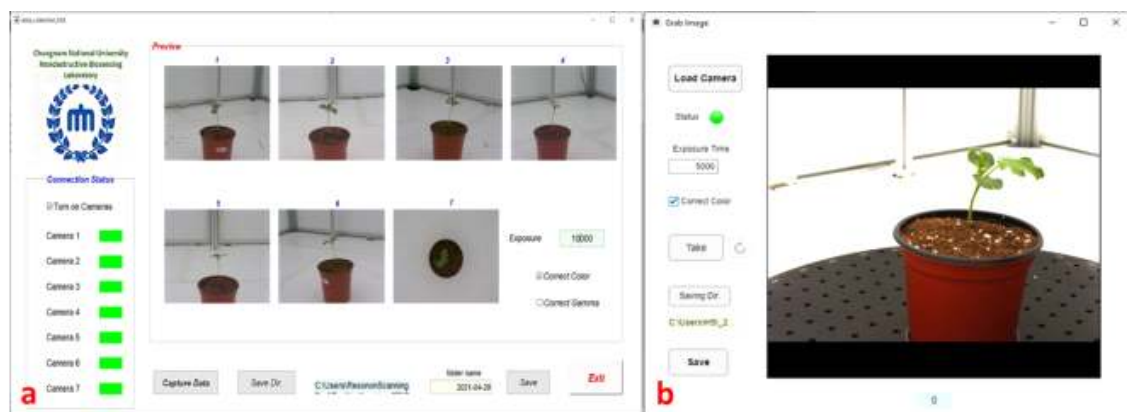


Fig. 53. System software for data collection setup 1 (a) and 2 (b)

색상 보정은 카메라의 색상 응답을 알려진 상태로 조정하기 위해 수행된다. 색상 채널

값의 변화, 조리개 개방 및 제조 허용 오차로 인해 카메라 색상 서명이 달라질 수 있으므로 색상 보정이 필요하다. 색상 보정은 알려진 보정 대상(색상 차트)을 캡처하고 이미지를 차트의 이미지와 비교하여 색상 보정 매트릭스(CCM)를 개발하여 수행된다. X-rite classic (X-Rite Pantone, Grand Rapids, MI, USA) 색상 차트는 색상 보정을 위해 사용되었다. 각 카메라에 대해 개발된 보정식은 다음 식과 같다.

$$\begin{bmatrix} R' \\ G' \\ B' \end{bmatrix} = CCM * \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix}$$

여기서 R' , G' , B' 는 보정 후 RGB 값이고, CCM은 색상 보정 매트릭스, R, G, B 는 보정 전 RGB 값이다. 공간 카메라 보정 프로세스에는 내부 및/또는 외부 카메라 매개변수의 계산, 이전에 논의된 것과 동일한 방식으로 수행되는 두 설정에 대한 카메라의 공간 보정이 포함된다.

(3) 물체 감지

객체 감지 알고리즘은 분류기를 사용하여 객체를 감지하고 이미지의 다른 위치에서 객체에 대한 경계 상자를 생성하였다. 딥러닝 모델 중 YOLO 모델은 빠른 검출 알고리즘으로 개발된 컨볼루션 신경망 아키텍처(Fig. 54)이다. 컨볼루션 신경망을 사용하여 이미지에서 관심 있는 여러 객체의 경계 상자 및 클래스 확률을 예측한다. YOLO v2는 컨볼루션 계층에 배치 정규화를 적용하고 완전히 연결된 계층을 제거하고 앵커 박스를 사용하여 경계 상자를 예측하여 분류를 통해 네트워크를 YOLO 이전 버전 보다 더 빠르게 만든 알고리즘이다.

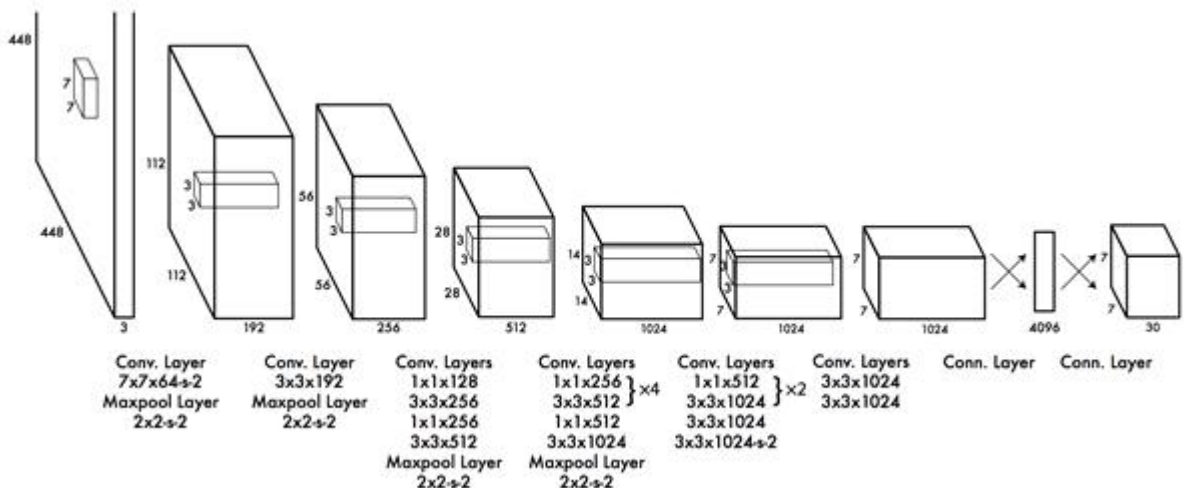


Fig. 54. YOLO network architecture

(4) 이미지 분할

U-net 아키텍처(Fig. 55)는 이미지 분할에 널리 사용되는 딥러닝 아키텍처이다. 네트워크에는 완전히 연결된 레이어가 없으며 입력 이미지에서 전체 컨텍스트를 사용할 수 있는 세

분화 맵의 픽셀을 사용한다. 풀링 레이어가 업샘플링 레이어로 대체된 연속 레이어를 사용하므로 출력 해상도가 높아진다. 네트워크의 업샘플링 섹션에는 네트워크가 컨텍스트 정보를 고해상도 레이어로 전파할 수 있도록 하는 많은 기능 채널이 있다. 이것은 확장 경로를 수축 경로와 대칭으로 만들고 아키텍처에 특징적인 U자 모양을 부여한다.

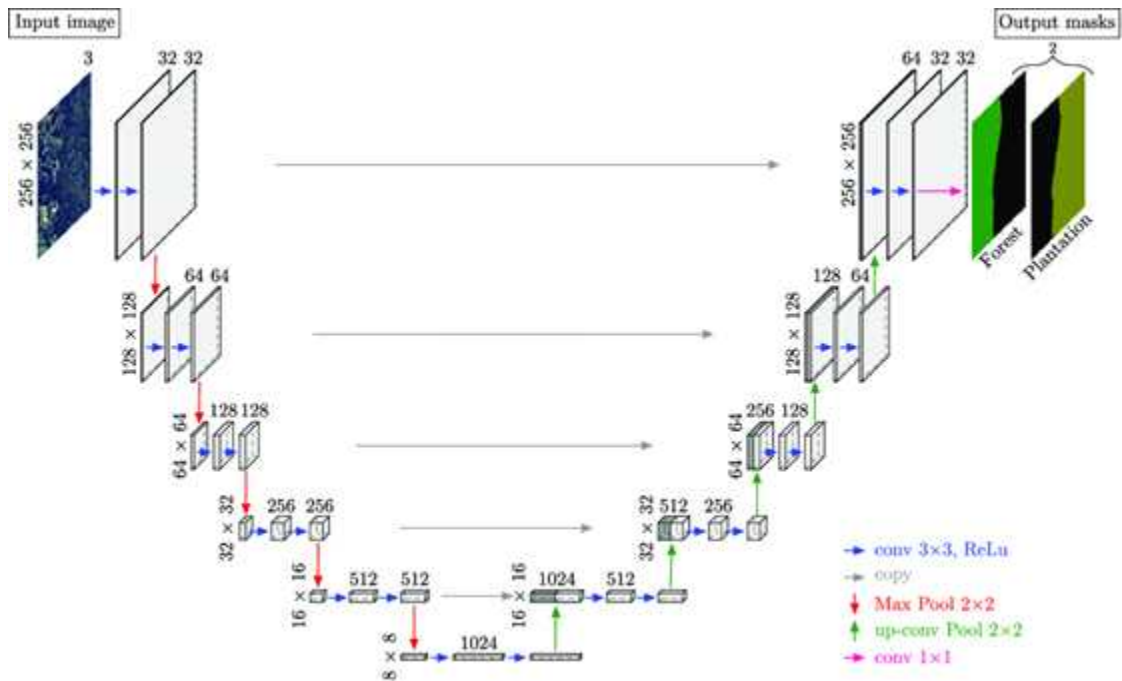


Fig. 55. U-net architecture

네트워크는 총 23개의 컨볼루션 레이어로 구성된다. 왼쪽의 축소 경로는 각각 ReLU와 풀링이 뒤따르는 두 개의 컨볼루션 레이어로 구성된다. 오른쪽의 확장 경로에는 각각 ReLU와 업샘플링 작업이 뒤따르는 2개의 컨볼루션 레이어가 있으며 피쳐 채널의 수를 절반으로 줄이는 컨볼루션이 뒤따른다.

(5) 작물 형태적 특징 추출

일반적으로 사용되는 특징 추출 기술을 작물 형태적 특징 추출에 적용할 수 있지만 추출 이전에 정의된 기술에 속하지 않을 수 있는 추가 특징이 있다. 여기에는 색상, 영상값 크기, 모양 및 일부 질감 기능이 포함된다.

(6) 샘플 준비

종자 샘플은 주관기관에서 제공한 DAPCT, PI482261, DAP, 45NC의 4개 품종을 사용하였다. 총 128개의 종자 중 PI482261은 12개, 45NC 16개, DAP 52개, DAPCT 품종은 48개이었다. 종자를 개별 세포의 용기에 심고 발아를 위해 28°C로 유지되는 생육실에 보관하였다. 2주 후, 묘목을 개별 화분에 이식하고 실험을 위해 따로 마련된 성장 챔버로 옮겼다.

(7) 저온 스트레스 처리

본 연구의 실험 설계는 수박의 평균 수명이 12주인 것을 기준으로 하였다. 연구 성장 조건은 Table 38에 나타난 바와 같다. 각 그룹의 작물은 전체 성장 기간 동안 상대 습도 70%를 유지하는 별도의 챔버에서 성장시켰다. 데이터 수집은 두 번째 주와 여섯 번째 주(수박 작물의 개화 단계까지) 사이에 수행되었기 때문에 매주 각 품종의 작물 중 10%를 저온 스트레스 처리를 하였다(Table 39).

Table 38. Plant growth conditions

Plant condition	Optimal temperature	Growth temperature	
		Day (16 hours)	Night (8 hours)
Control group	20 - 30 °C	28 °C	21 °C
Stress group	≤15 °C	15 °C	10 °C

Table 39. Stress plan

Week number	2	3	4	5
Number of control plants	128	116	104	92
Number of stressed plants	0	12	24	36

(8) 데이터 수집

설정 1의 시스템을 사용하여 7대의 카메라가 각각 시스템 중앙에 배치된 각 수박 작물 샘플에 대해 하나의 이미지를 캡처한다. 이후 캡처된 이미지(Fig. 56)는 PNG(Portable Network Graphics) 형식으로 지정된 디렉터리에 저장된다.

시스템 설정 2를 사용하여 각 작물 별 36개 이미지를 캡처하였다. 360도에 대해 10도 각도 간격으로 촬영하였다. 이 이미지는 3D 형태학적 특징 분석을 위한 SFM 기반 3D 모델 개발에 사용되었다. 캡처된 이미지도 PNG 형식으로 지정된 디렉터리에 저장되었다.

잎 수, 성장 단계(주) 및 스트레스 조건(대조군 또는 스트레스)을 포함하는 데이터는 이미지 데이터 수집 후 매주 각 작물에 대해 기록되었다.

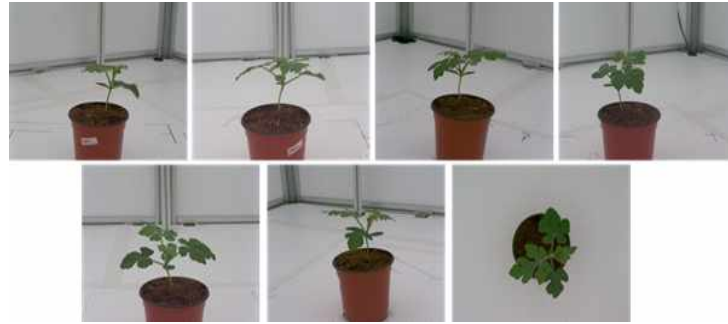


Fig. 56. Watermelon plant images captured using setup 1

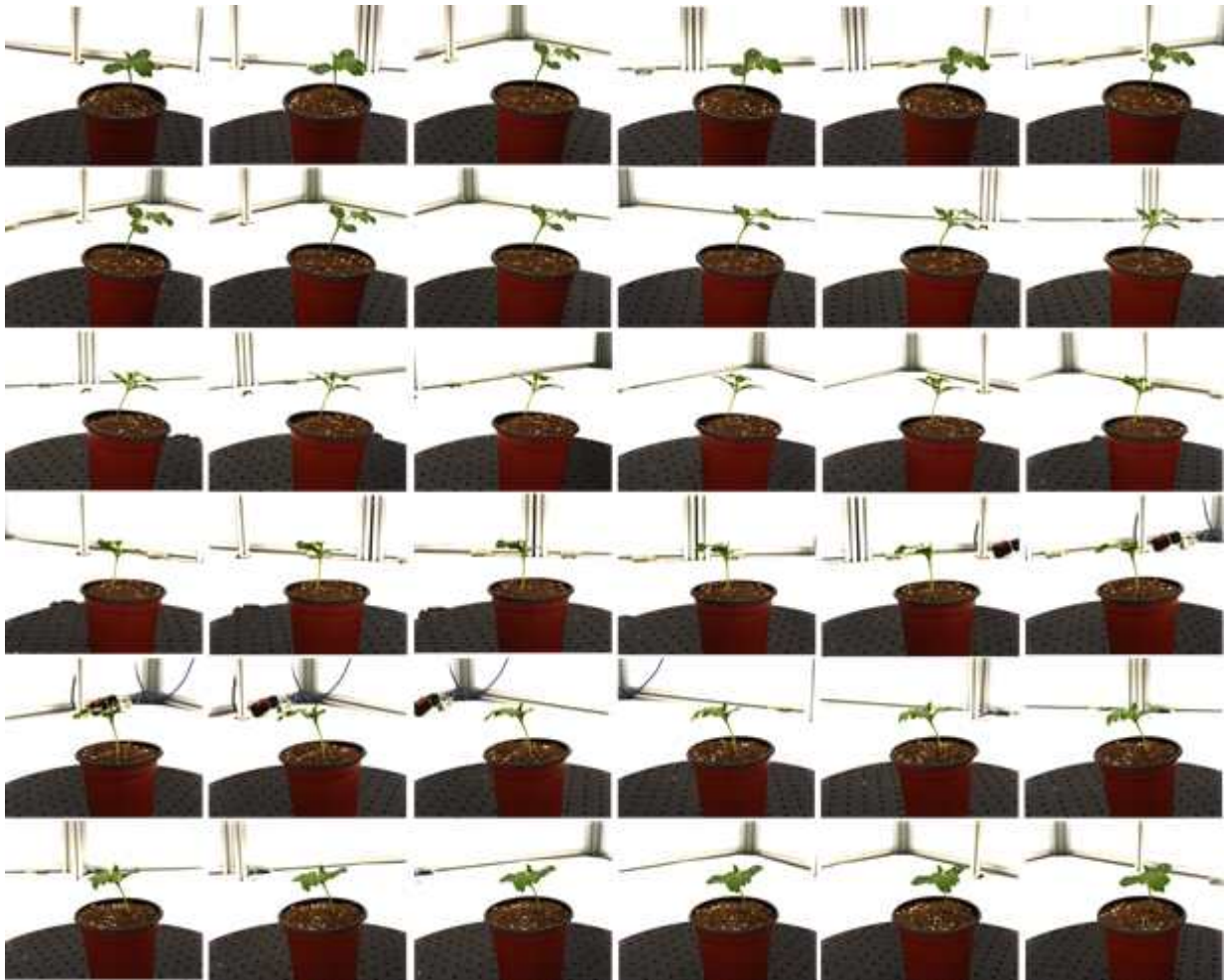


Fig. 57. Watermelon plant images captured using setup 2

(9) 특징 추출

특징 추출 프로세스는 수박 표현형 특성을 모델링하는 데 사용할 정보를 추출하는 것이다. 본 연구에서는 다음과 같이 2개의 특징 추출 파이프라인이 적용되었다.

- 데이터 수집 설정 1에서 캡처한 이미지에서 2D 특징 추출
- 데이터 수집 설정 2에서 캡처한 이미지를 기반으로 3D 영상구성 및 특징 추출

(가) 2D 특징 추출

① 엽수 카운팅

엽수 카운팅은 특히 속도 때문에 객체 인식 작업에서 인기 있는 YOLOv2 딥러닝을 사용하여 수행하였다. 네트워크는 학습, 검증 및 테스트 데이터 세트에 대해 각각 6:2:2 비율로 작물의 평면도의 608개 이미지에 대해 학습하였다. 네트워크의 입력 이미지 크기는 $512 \times 512 \times 3$ 이었다. 사용된 기본 네트워크는 Resnet50이며 총 네트워크 크기는 150개의 레이어다. 네트워크 구성에 대한 자세한 내용은 Table 40과 같다. 데이터 증대는 이미지의 대비, 채도, 밝기, 수직 뒤집기 및 크기를 조정하는 것으로 수행되었다.

Table 40. Network parameters for YOLOv2

Network parameters	Values
Input size	$512 \times 512 \times 3$
Proposed anchor boxes	10
Base network	Resnet50
Number of layers	150
Optimizer	Adam
Learning rate	0.001
Mini-batch size	12
Learning rate drop factor	0.1
Drop period	3
Number of epochs	30

② 영역 속성

관심 영역(이 경우 작물)을 정의하기 위해 배경 제거가 수행되었다. 처음에는 기존의 영상 처리 방법을 사용하여 수행되었다. RGB에서 Lab 색 공간으로의 이미지 변환을 하고 a 및 b 값을 이용하여 배경제거를 실시하였다(Fig. 58).

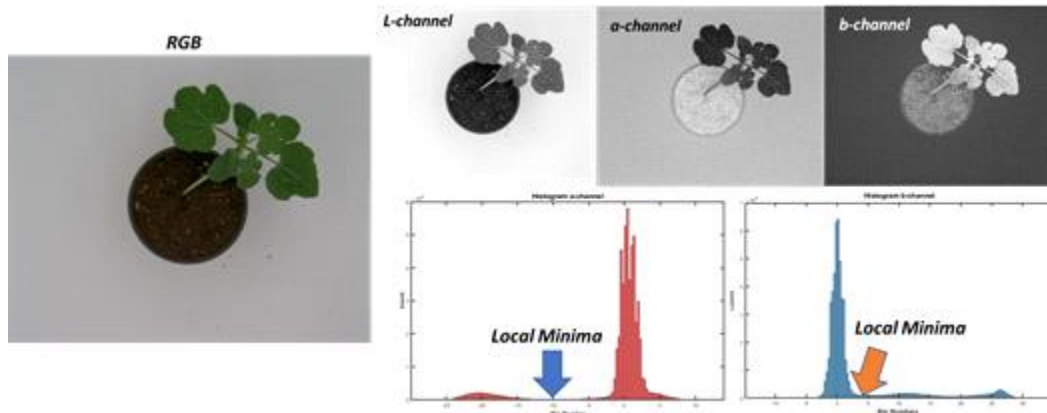


Fig. 58. Summary of conventional image processing background removal algorithm

이미지 분할에 일반적으로 사용되는 네트워크인 U-net을 사용하여 딥러닝을 적용했다. 네트워크는 학습, 검증 및 테스트 데이터 세트 각각에 대해 7:2:1의 비율로 830개의 이미지에 대해 학습하였다. 네트워크의 입력 이미지 크기는 $512 \times 512 \times 3$ 이다. 네트워크 구성에 대한 자세한 내용은 Table 41과 같다.

면적, 중심, 경계 상자, 장축 길이, 단축 길이, 이심률, 방향, 블록 영역, 원형도, 오일러 수, 등가 지름, 견고성, 범위, 둘레 및 페렛 속성을 포함한 영역 속성(Fig. 59)을 계산하였다. 이는 각 이미지에 대해 총 30개의 특징에 해당한다.

Table 41. Network parameters for U-net

Network parameters	Values
Input size	$512 \times 512 \times 3$
Output size	512×512
Number of epochs	100
Mini-batch size	8
Optimizer	Adam
Learning rate	0.001
Drop factor	0.9
Drop period	5



Fig. 59. Overlay of some extracted region properties on watermelon plant images

③ 색상 특징 추출

색상 특징 추출을 위해 RGB 이미지는 주요 색상 공간인 HSV, LAB 및 YCbCr 이미지로 변환하였다. 각 색 공간에서 색 채널의 평균값을 계산하여 각 영상에 대해 총 12개의 특징을 추출하여 색 특징을 추출하였다.

④ 텍스처 기능

텍스처 특징은 MATLAB의 BALU 도구 상자를 사용하여 추출하였다. 수박 마스크 이미지에서 추출한 푸리에 특징을 제외하고 녹색 채널을 사용하여 각 이미지에 대해 총 184개의 텍스처 특징을 추출하였다(자세한 설명은 Table 42와 같다).

Table 42. Texture features that were extracted

Texture features	Specifications	Number of features
Haralick features	Haralick distance = 3	28
GLCM features	For contrast, correlation, energy, homogeneity	4
Fourier features	Vertical and horizontal resize = 64, frequency = 2	8
Fourier descriptor features	Done on the mask image	16
DCT features	Vertical and horizontal resize = 64, frequency = 2	4
Gabor features	Rotations = 8, dilations = 8, mask size = 21, lowest freq. = 0.1, highest freq. = 2	19
LBP features	Vertical and horizontal divisions = 1, neighbor samples = 8, uniform LBP	59
Total number of texture features per image		138

⑤ 추가 특징

추출된 다른 기능에는 강도 및 대비 기능이 포함된다. 강도 특성은 녹색 채널에서 추출되었으며 각 이미지에서 총 6개의 특성이 추출되었다. 대비 기능은 녹색 채널 이미지에서 유사하게 추출되어 5개의 기능이 생성되었다.

Table 43. Total number of features extracted for each watermelon plant

Feature type	Number of features	Remarks
Region properties	30	Extracted from the mask image
Color features	12	Average color values
Texture features	138	Sum of all the total texture features
Other features	11	Including contrast and intensity features
Total for each image	191	Number of features extracted per image
Leaf count	7	Leaf count, average, and median leaf size
Total for 3 images	580	Total number of features extracted per plant

(나) 3D 특징 추출

설정 2에서 수집한 이미지를 사용하여 SFM 재구성을 수행했다. 3D 재구성 파이프라인은 이미지 왜곡 해제, 키 포인트 및 디스크립터 추출, 쌍별 뷰 매칭, 뷰 재구성, 초기 변환 계산, 번들 조정, 각 이미지에 대한 깊이 맵 계산 및 포인트 클라우드 생성의 절차를 따랐다. 그런 다음 포인트 클라우드의 결과 메쉬가 계산된다. 이 프로세스에는 사진 일관성 계산, 그래디언트 평활화, 2차 행렬, 중첩 파티션 및 3D 모델이 생성된 후 재투영이 포함된다. 3D 특징 추출 파이프라인의 목표는 3D 모델에서 볼륨, 텍스처(표면 법선, 정점)를 추출하는 것이었다.

결과 특징은 각 수박 작물 샘플에 대해 수평으로 연결되었다. 각 작물의 결과 특징은 세로로 연결되어 표현형 특성을 모델링하는 데 사용되는 데이터 행렬(행: 샘플, 열: 특징)이 되었다.

(10) 데이터 분석 및 모델 개발

(가) 기능 전처리

데이터에는 각기 다른 크기를 가진 다양한 기능이 포함되어 있기 때문에 최소-최대 정규화를 사용하여 정규화 벡터를 적용하고 결과값을 1에서 0 사이의 범위로 조정한다.

(나) 이상치 탐지

모든 데이터 세트는 오류가 발생할 수 있으므로 특성 추출 중 오탐지로 인해 발생하는 경우 이상치는 반드시 존재하며 모델개발 프로세스 및 전체 성능에 영향을 미칠 수 있다. 데이터에서 이상치를 제거하기 위해 다음 두 단계를 적용하였다.

- 1) 데이터의 주성분 분석(PCA) 계산, 처음 5개 PC의 점수 추출(데이터 분산의 90% 이상을 나타낸다.)
- 2) 추출된 점수에 대해 강력한 다변수 분산 알고리즘을 사용하여 어떤 샘플이 이상

값인지 파악한다.

(다) 기능 정리 및 선택

이미지 데이터에서 추출된 많은 특징으로 인해 데이터에 노이즈, 중복성/공선성으로 인해 관련 없는 특징이 포함될 가능성이 있다. 이러한 관련 없는 특징의 영향을 줄이기 위해 특징 정리 및 SFS(순차 특징 선택)라는 특징 선택 알고리즘을 사용하여 모든 표현형 특성에 대한 관련 특징을 찾았다. 특징 추출 알고리즘은 상수 및 상관 특징을 제거하는 데 사용되었다. SFS 알고리즘은 응답과 가장 상관관계가 있는 기능의 선형 조합을 검색한다. 사용된 주요 알고리즘은 MATLAB BALU 도구를 활용하였다.

(라) 모델 개발

표현형 특성에 따라 분류(LDA) 또는 회귀(MLR) 모델이 개발되었다. 모델개발 과정에서 데이터의 70%는 모델 보정(k-fold 교차 검증으로 구현)에 사용되었고 30%는 결과 모델을 테스트하는 데 사용되었다.

선형 판별 분석(LDA)은 정상(대조군)과 저온 스트레스 수박 작물을 구별하기 위한 모델을 개발하는 데 사용되었다. 대조군에 속하는 작물은 1로, 스트레스를 받은 모든 작물(1, 2, 3주 스트레스 작물)은 2로 표시하였다.

다중 선형 회귀(MLR)는 다중 변수와 응답(이 경우 여러 잎, 성장 단계) 간의 상관관계를 찾는 단순성이 있지만, 고차원 데이터와 상관관계가 높은 데이터에서는 적용이 어렵다. 그러나 SFS 변수 선택 후 변수의 수가 줄어들었기 때문에(40개 이하의 기능으로 축소) MLR을 적용하는 것이 가능하다

(마) 모델 평가

저온 스트레스 작물로부터 정상을 분류하기 위해 개발된 LDA 모델의 성능은 보정 및 예측 세트 모두에 대해 분류 정확도와 혼동 행렬(모델의 특이성과 정밀도를 보여줌)을 사용하여 평가되었다. 잎의 수와 성장 단계를 예측하기 위해 개발된 MLR 모델의 성능은 보정 및 예측 세트에 대한 RMSE(제곱 평균 제곱근) 및 결정 계수(R^2)를 포함한 적합성 기준을 사용하여 테스트하였다 .

(바) 3D 재구성 결과

3D 재구성 파이프라인을 기반으로 3D 이미지를 구성하였을 시 불완전한 표면이 포함되는 등 영상 품질이 좋지 않았다(Fig. 60).

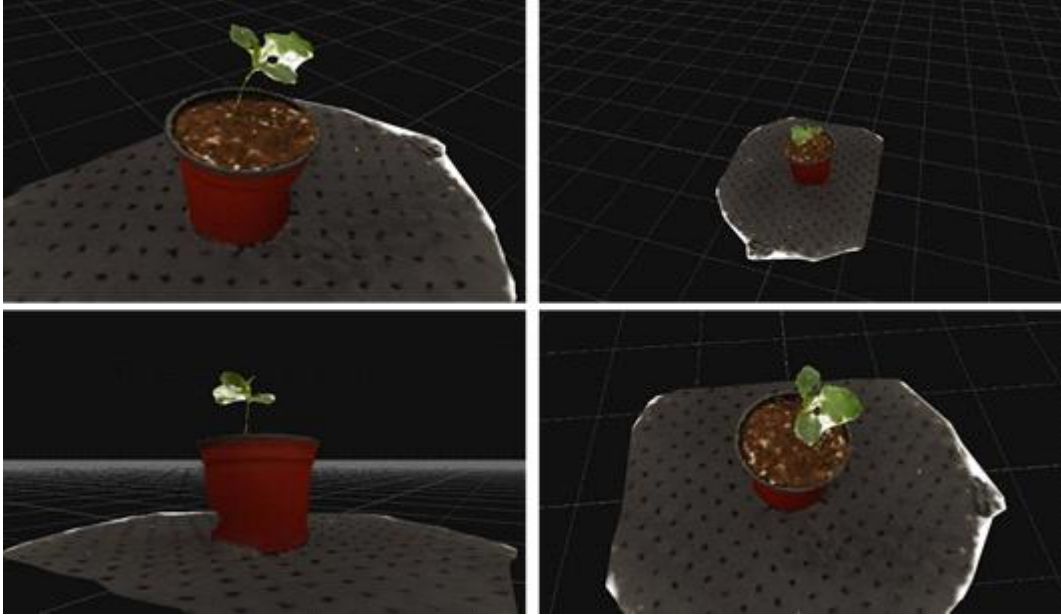


Fig. 60. Screen shots of a 3D model of the watermelon plant

이러한 불완전한 영상 재구성의 원인은 제한된 수의 이미지 확보로 인해 앞서기가 가려진 부분이 있었고, 작물이 회전하면서 영상 촬영 시 흔들리는 현상이 있어 입체영상 구성 시 키포인트 일치가 불완전하였기 때문으로 사료된다. SFM 3D 재구성을 사용하는 기존 연구는 보통 50개 이상의 이미지를 사용했으며, 대부분은 상대적으로 단단하고 규칙적인 물체(40개)에 적용한다.

SFM 3D 모델 재구성을 위한 데이터 수집 준비 시 다음 요소를 고려해야 한다.

- 1) 객체 강성 : 비강성 물체는 데이터 수집 중에 복잡한 변형과 이동이 있다. 따라서 샘플 주위로 카메라를 이동하고 더 많은 뷰/포즈를 캡처하며 조각별 재구성 같은 복잡한 알고리즘을 사용하여 데이터를 캡처하는 것이 좋다.
- 2) 텍스처, 모양, 표면 마감의 관점에서 객체의 복잡성: 이는 장면/객체의 세부 수준에 따라 달라진다. 더 많은 포즈를 포착하고, 특징 추출, 일치, 이상치 감지 등을 위한 조정 매개 변수를 신중하게 선택하는 것이 필요하다.
- 3) 객체의 크기 : 큰 물체의 경우 더 많은 포즈/뷰를 원하는 디테일 수준으로 캡처해야 한다. 또한 카메라 렌즈는 캡처할 물체의 크기에 맞게 광각 또는 매크로 렌즈로 변경할 수 있다.
- 4) 계산 시간의 비용으로 더 나은 3D 모델을 얻을 수 있으므로 일반적으로 더 많은 포즈를 캡처하는 것이 좋다. 필요한 최소 이미지 수는 고정되어 있지 않으며, 시행착오 과정을 거칠 수 있다.
- 5) 카메라 초점 및 객체 깊이: 물체/씬의 크기와 최종 3D 모델에서 원하는 디테일의 수준에 따라 카메라의 초점을 피사체에 맞추고 필드의 좁은 깊이는 피하는 것이 좋다.

6) 조명 : 장면의 그림자를 피하기 위해 균일하고 일정한 빛을 사용해야 한다.

(사) 엽수 카운팅

수박 잎 감지를 위해 YOLOv2 네트워크를 학습시킨 결과는 네트워크가 검증 데이터 세트에서 각각 0.905 및 0.98 픽셀, 평균 정밀도(MAP) 및 RMSE를 달성할 수 있었다. 달성된 mAP(Fig. 61)는 연구 목표가 여러 클래스가 아닌 하나의 객체 클래스(잎)를 감지하는 것이기 때문에 기존 데이터 세트에서 달성한 것보다 높았다. 네트워크는 이미지에서 잎을 감지하는 데 사용되었으며(Fig. 62), 해당 작물의 실제 잎 수와 상관관계가 높았다.

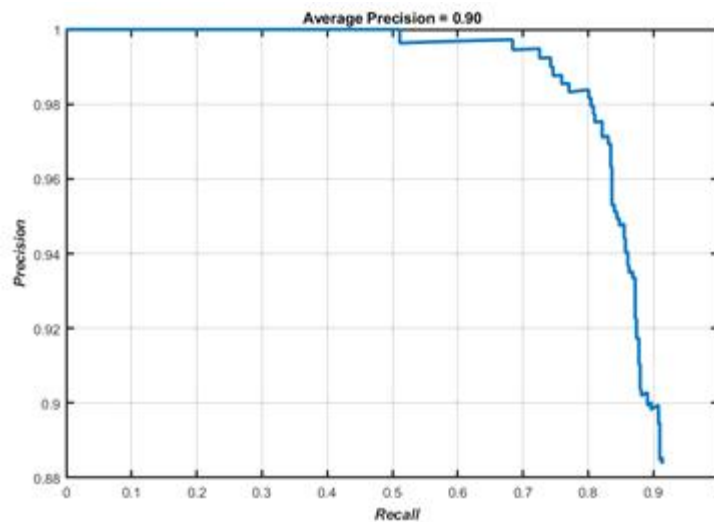


Fig. 61. Plot for precision versus recall achieved during the training of the YOLOv2 network



Fig. 62. Example of the YOLOv2 network leaf detection results

YOLOv2 네트워크의 잎사귀 수 추정치를 평면도 이미지의 실제 잎사귀 수와 연관시키면 R^2 , RMSE 및 MAD(평균 절대차)에 대해 각각 0.75, 1.97 및 2.39의 값이 나타났다(Fig. 63 및 Table 44). 3개의 영상촬영(상단 및 2개의 측면 영상)의 경우, YOLOv2 잎사

귀 수 추정 결과는 각각 0.84, 1.54 및 1.36의 R^2 , RMSE 및 MAD로 개선되었다(Fig. 64 및 Table 44). 이는 하나의 뷰에서 나온 결과 보다 여러 뷰를 사용했을때, 예측 성능이 향상됨을 나타낸다. 잎사귀 수를 예측하기 위해 DL 알고리즘을 사용한 이전 연구와 유사한 결과를 나타내었다.

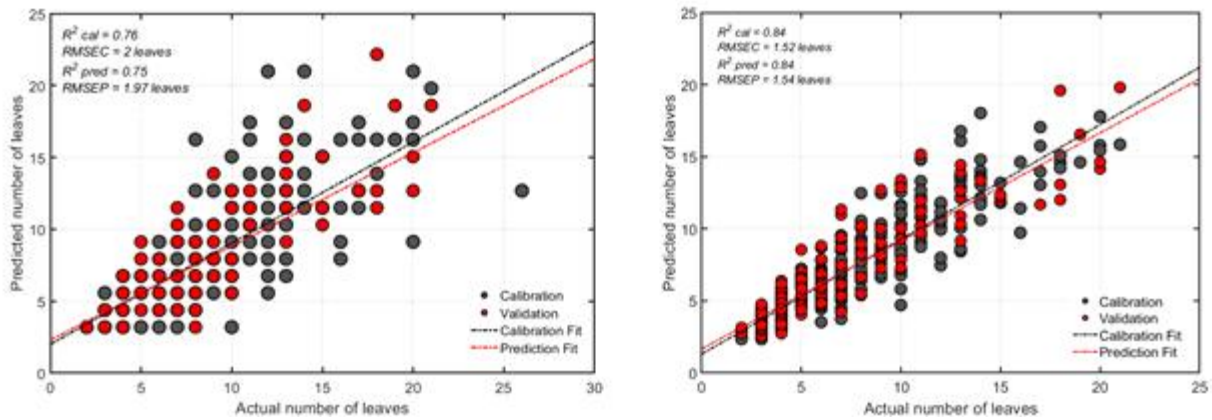


Fig. 63. Regression scatter plots show the relationship between using one view (left) versus using 3 views (right) for estimating watermelon plant leaf count using the YOLOv2 network.

2D 특징 추출 프로세스에서 580개의 특징을 추출하고 이후 SFS 알고리즘을 사용하여 21개의 특징으로 축소하여 수박 작물의 잎 수를 추정하는 모델을 구축했을 시, 우수한 결과를 얻었다(Fig. 64). 예측 성능은 R^2 , RMSE 및 MAD 값이 각각 0.94, 0.87 및 0.88로 YOLOv2 네트워크를 사용한 결과를 능가하였다.

Table 44. Number of leaves estimation results

Method	Calibration		Test			Selected variables
	R^2	RMSE	R^2	RMSE	MAD	
YOLO 1 image	0.76	2.00	0.75	1.97	2.39	1
YOLO 2 images	0.85	1.62	0.75	1.68	1.54	2
YOLO 3 images	0.84	1.52	0.84	1.54	1.36	3
Extracted features	0.95	0.84	0.94	0.87	0.88	21

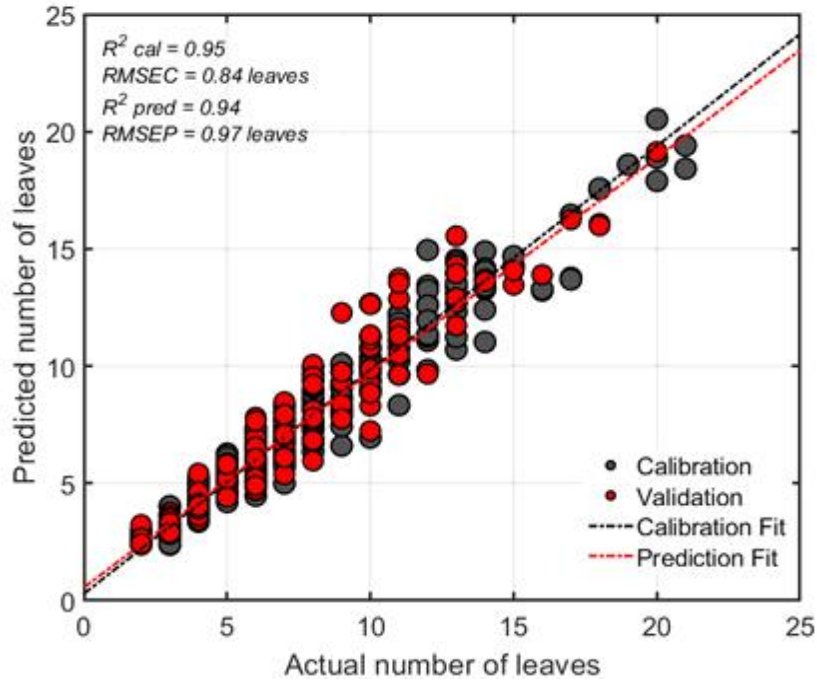


Fig. 64. Regression scatters plot showing number of leaves of watermelon plant estimated using 21 selected features.

(아) 백그라운드 감지



Fig. 65. U-Net (top) and conventional image processing-based (bottom) background removal results overlay on watermelon plant images

2개의 각기 다른 배경 감지 알고리즘을 사용하여 수박 작물을 배경으로부터 분할하고자 하였다. 즉, 하나는 기존 이미지 처리 기반으로 하고 다른 하나는 딥러닝(DL)을 기반으로 하였다. 두 가지 방법의 결과는 U-Net(DL 기반 알고리즘)을 사용하는 것이 기존의 이미지 처리보다 더 나은 성능을 보였다(Fig. 65 및 66). 기존의 이미지 처리 기반 알고

리즘의 성능이 좋지 않은 것은 샘플 또는 카메라 편차로 인한 이미지 간 강도 차이가 발생하여 데이터에 존재하는 편차가 제대로 처리되지 않았기 때문으로 사료된다. 이후로는 U-Net 알고리즘을 이용하여 배경 제거를 하고 배경 장면에서 수박 식물을 분할하였다.



Fig. 68. Comparison of watermelon plant background segmentation using U-Net (left) and a conventional image processing algorithm (right)

(자) 성장 단계 추정

성장단계 추정은 4주 동안 매주 영상자료를 수집하였기 때문에 주 수를 기준정보로 사용하였다. SFS 특징 선택 알고리즘을 사용하여 15개의 특징을 선택하고 MLR을 사용한 회귀 모델을 개발하여 선택된 특징과 정상/대조군 작물 성장 단계 사이의 상관 관계를 구축하였다. 수박 성장단계 예측 모델의 성능은 R^2 는 0.92, RMSE는 0.29주로 나타났다(Fig. 67). 이 모델은 4가지 수박 품종을 모두 고려하여 개발한 경우이고, 개별 수박 품종의 데이터를 사용하면 더 높은 예측 성능을 보였다(Fig. 67 및 Table 45). 수박 품종 간의 명확한 차이로 인해 단일 품종의 데이터가 더 균질한 결과를 보였다(Fig. 68 & 69).

Table 45. MLR model performance based on all and individual watermelon varieties

Varieties	Calibration		Test		Selected variables	Outliers
	R^2	RMSE	R^2	RMSE		
<i>All varieties</i>	0.93	0.28	0.92	0.29	15	5
<i>DAP</i>	0.98	0.15	0.98	0.15	18	2
<i>DAPCT</i>	0.98	0.12	0.97	0.17	18	5
<i>PI482261</i>	1.00	0.02	0.99	0.04	14	1
<i>45NC</i>	1.00	0.03	1.00	0.05	18	1

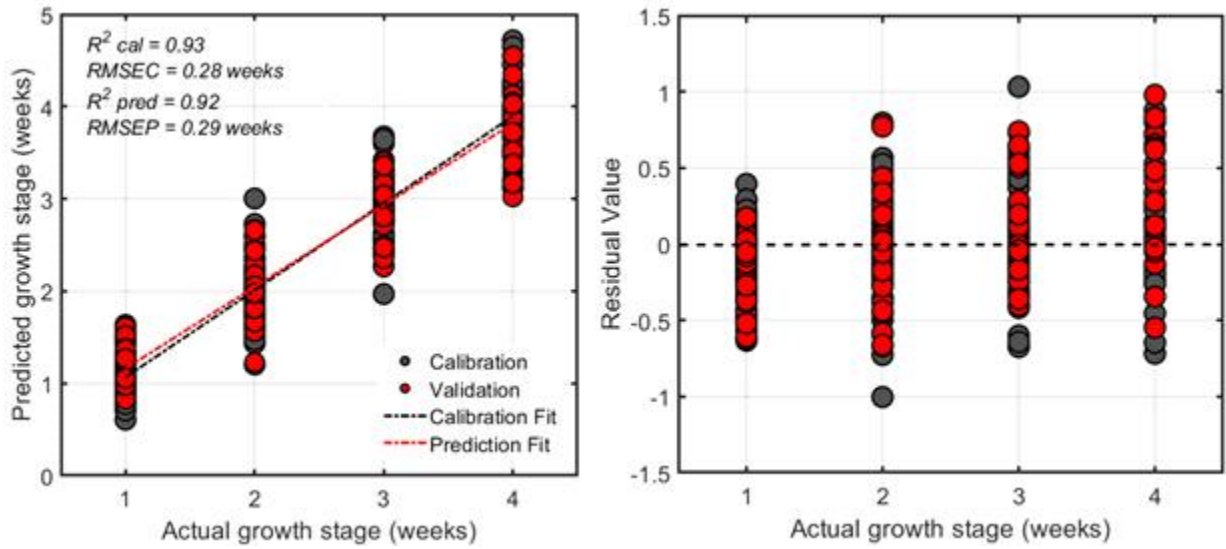


Fig. 67. Regression plots from the model for estimating watermelon growth stage for all 4 varieties

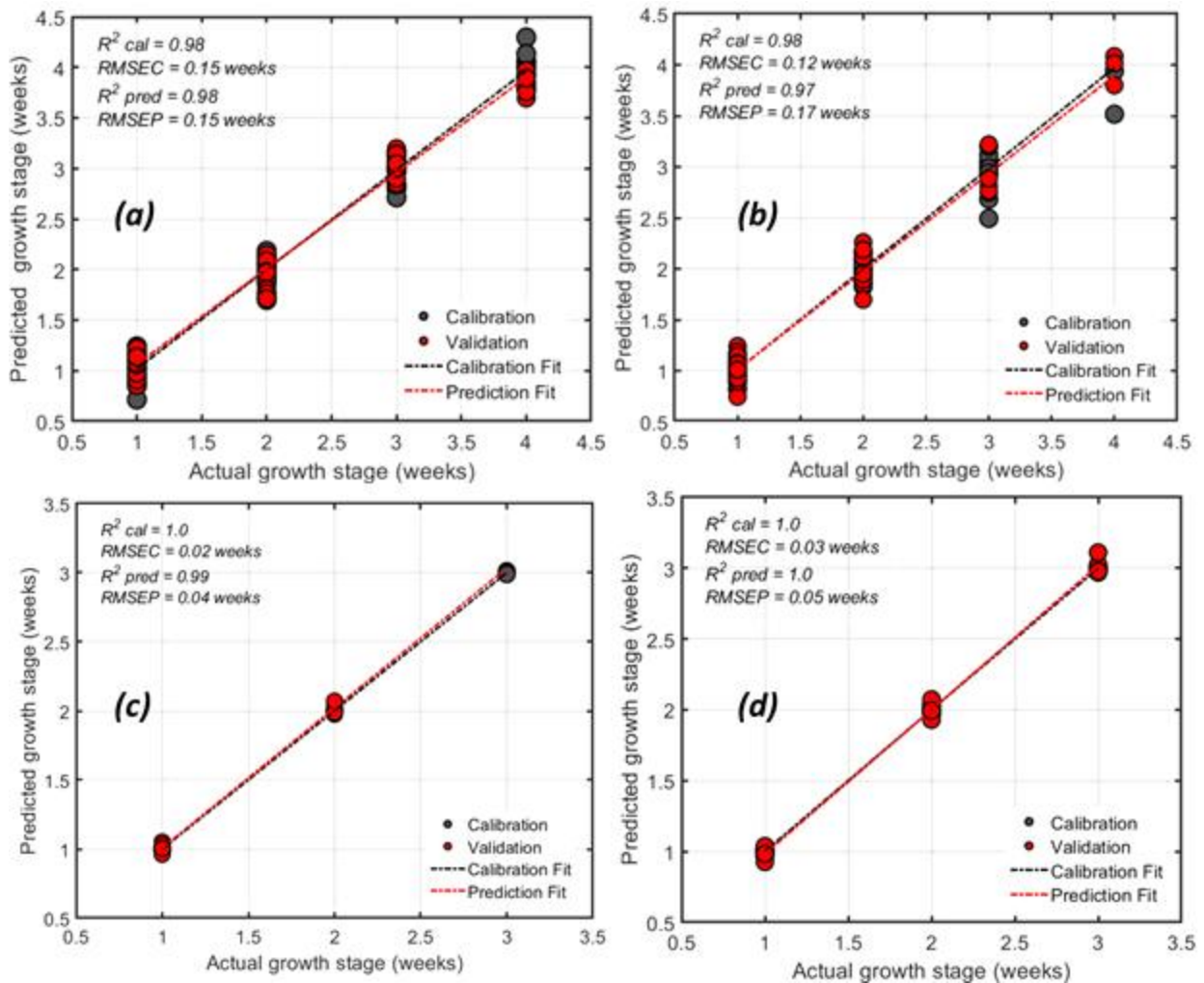


Fig. 68. Model scatter plots for watermelon plant growth stage estimation for individual varieties (DAP, DAPCT, PI482261, 45NC, from a - d)

(차) 스트레스를 받은 작물과 무처리 작물의 구별

정상 및 저온 스트레스 작물 사이의 분류를 위한 LDA 분류기의 결과는 학습 및 테스트 데이터 세트 모두에서 100% 분류 정확도를 나타냈다(Fig. 69). 이러한 명확한 구별의 이유는 정상 작물과 스트레스를 받은 작물 사이의 명확한 차이(크기, 질감 등) 때문으로 사료된다(Fig. 70). 저온 스트레스 기간 동안 작물 성장이 저해되기 때문에 스트레스를 받은 작물은 일반 작물보다 크기가 작다. 유사하게, 저온 스트레스 동안 작물의 잎 모양이 오그라드는데 이는 질감의 차이를 일으킨다. 이것은 저온 스트레스가 생체 에너지 과정을 방해하고 신진 대사에 변화를 일으키며 세포 구조에 손상을 주어 성장이 억제되고 잎이 변형되기 때문이다.

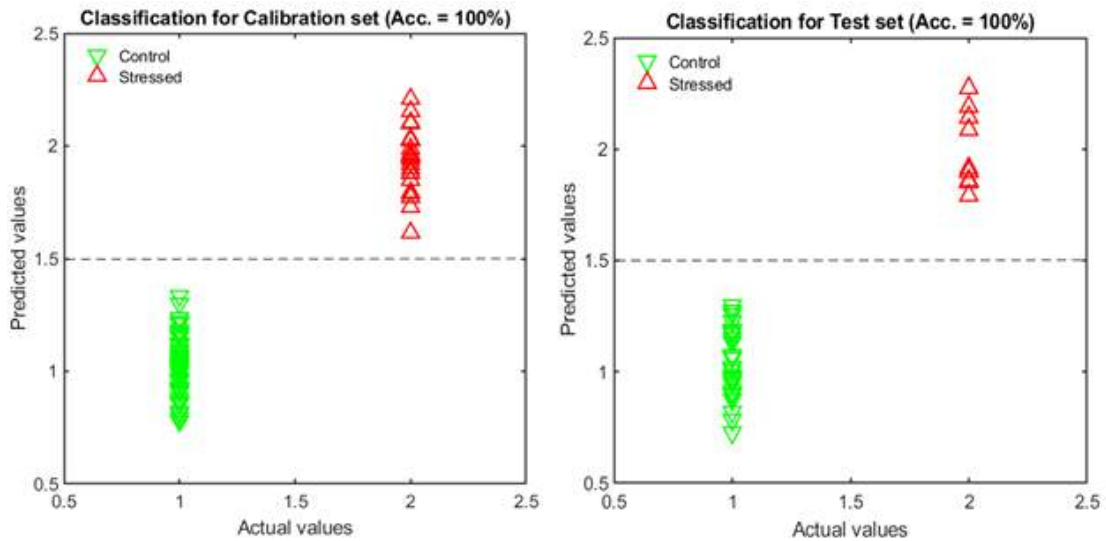


Fig. 69. Classification results for normal and stressed plants.

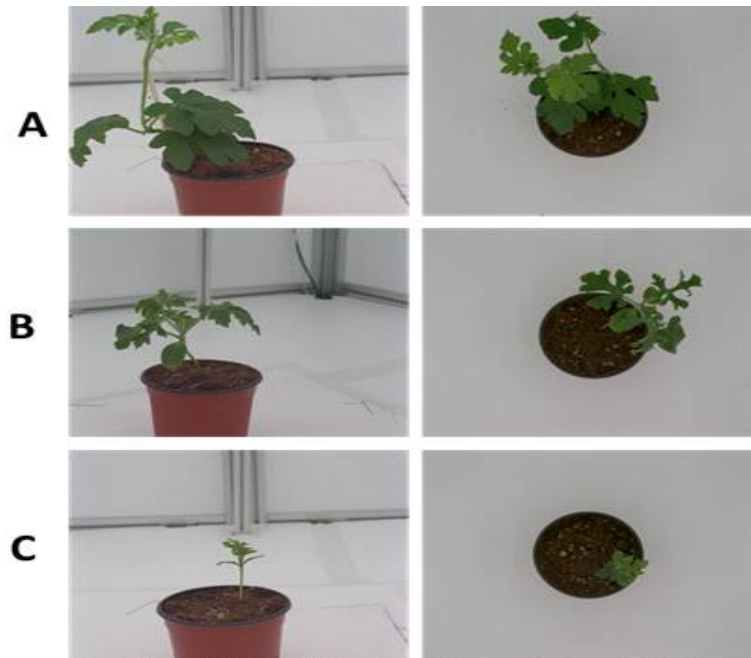


Fig. 70. **A.** Normal watermelon plant at week 6, **B.** Watermelon plant stressed for two weeks (week 4 - 6), and **C.** Watermelon plant stressed for 4 weeks (week 2 - 6).

저온 스트레스 군과 정상군을 분류하기 위해 선택한 특징을 분석한 결과 68.2%, 18.2%, 4.5%, 9.1%가 각각 질감, 공간 특징, 색상 및 기타 특징인 것으로 분석이 되었다 (Fig. 71). 텍스처 특징(식물 텍스처 설명)과 공간 특성(식물 모양 및 크기 설명)은 선택된 특징의 86% 이상을 차지했다. 마찬가지로 이미지 2(60도 뷰 이미지, 선택한 기능의 50%), 이미지 3(탑 뷰 이미지, 선택한 기능의 27.3%) 및 이미지 1(0도 뷰 이미지, 선택한 기능의 22.7%) 순으로 분류 기여도가 분석되었다.

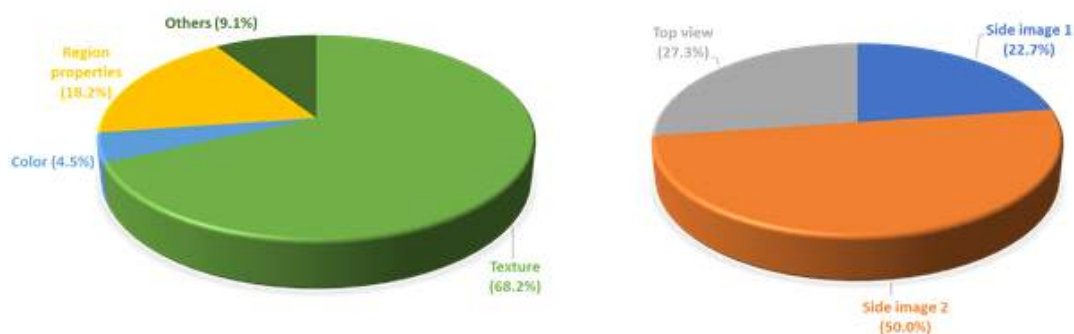


Fig. 71. Composition of selected features for classification of normal and stressed watermelon plants: contribution by feature type (left), and by image number (right)

두 개에서 추출한 특징을 이용해 분류 모델 개발을 반복했고, 한 개의 이미지와 비교를 통해 몇 개의 이미지가 가장 적합한지 분석하였다. 결과는 이미지 수가 크게 다르지 않지만 이미지 개수가 줄어들면(Table 46) 모델 정확도가 다소 감소하였다. 수박의 DAP 및 DAPCT 품종은 유사한 모양과 질감을 갖는 것으로 관찰되었는데, 이에 대한 대조군과 스트레스를 받은 수박과의 분류모델도 고찰하였다(Table 47).

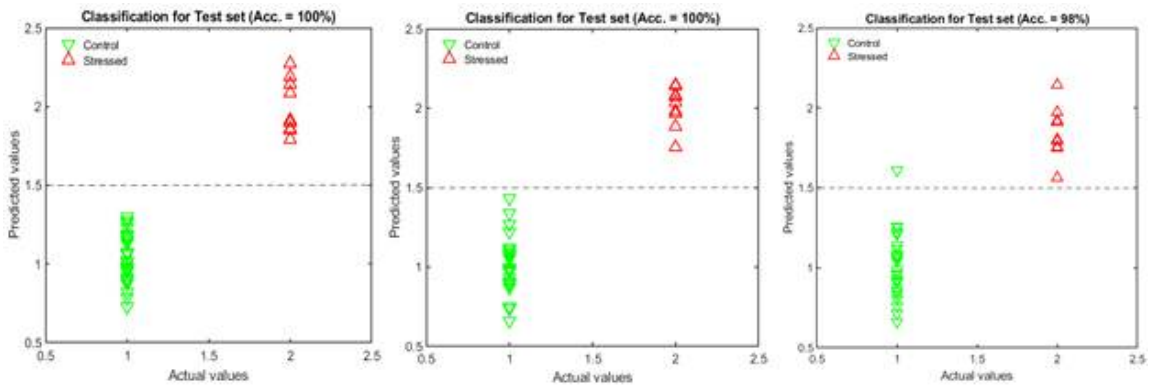


Fig. 72. Classification results for normal and stressed watermelon plants using features from 3 views (left), 2 views (center), and 1 view (right).

Table 46. Comparison of classification results for normal and stressed watermelon plants using features from 3 views, 2 views, and 1 view images

Number of Images	Calibration					Test					Selected variables	Outliers
	TP	FP	TN	FN	Acc. (%)	TP	FP	TN	FN	Acc. (%)		
3 images	62	0	23	0	100	27	0	9	0	100	22	1
2 images	61	0	23	0	100	27	0	9	0	100	22	2
1 image	61	0	22	0	100	24	1	9	0	98	26	4

Table 47. A comparison between LDA classification models using select varieties versus using all varieties.

Varieties	Calibration					Test					Selected variables	Outliers
	TP	FP	TN	FN	Accuracy (%)	TP	FP	TN	FN	Accuracy (%)		
All varieties	62	0	23	0	100	27	0	9	0	100	22	1
DAP & DAPCT	44	0	18	0	100	18	0	7	0	100	17	1

제 3절 고속 표현형 검정기술 및 시스템 개발

개발된 고속대량 표현형 검정시스템은 Fig. 73과 같이 3차원 컬러 영상 측정부와 초분광 영상 측정부로 구성되어 있다. Fig. 74와 같이 각각의 측정부의 지정된 위치에서 지정된 영상을 측정하고, 개발된 모델에 적용하여 수박의 내한성 검증을 수행하게 된다.

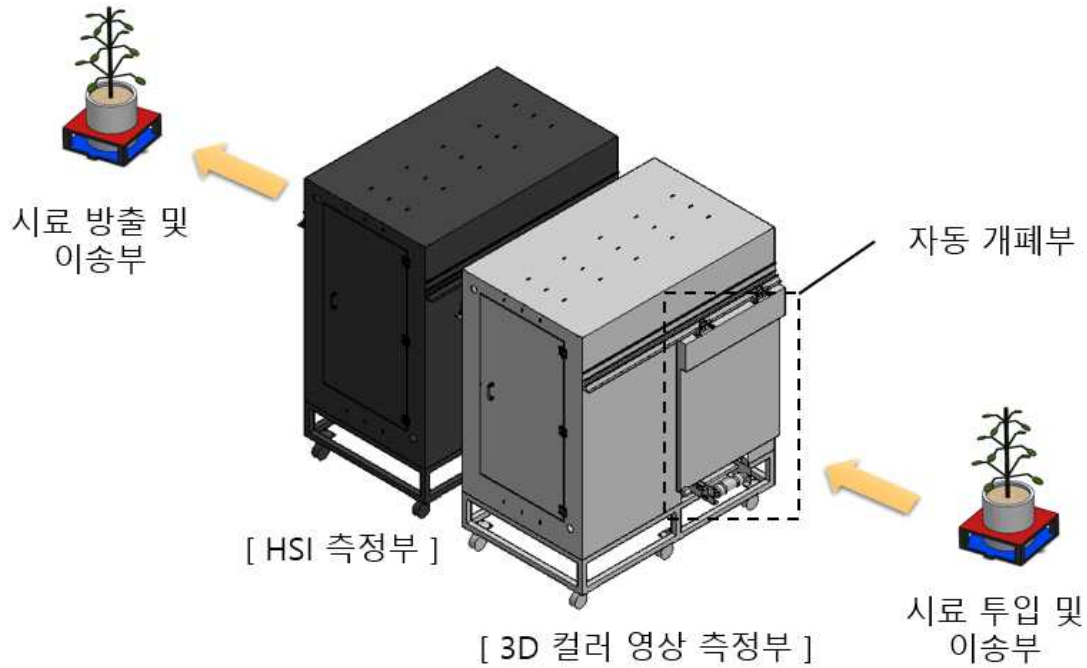


Fig. 73. 고속대량 표현형 검정 시스템의 외부 개략도

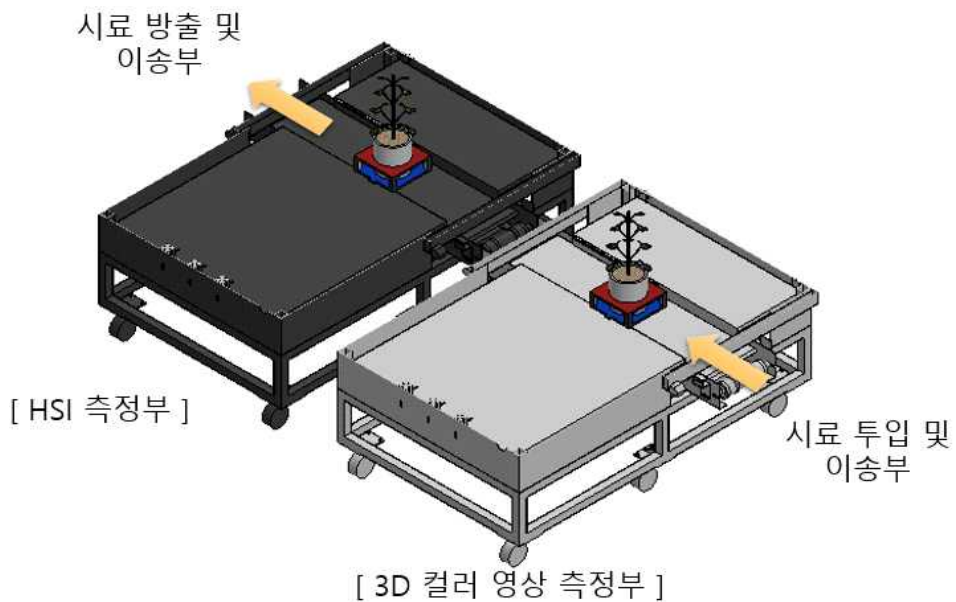


Fig. 74. 고속대량 표현형 검정 시스템의 내부 개략도

1. 3차원 영상측정 장치 개발

기존에 시도되었던 다각도에서 촬영된 작물의 컬러영상을 3차원으로 재구성하는 방법은 해당 작물의 실제 물리적인 상태를 표현하는데 적합하다. 하지만 측정시간과 영상을 차원으로 정합하는데 매우 오랜 시간이 소요되며, 과도한 데이터가 쌓이게 된다. 작물의 상태와 대상에 따라 3차원 정합의 편차가 존재하게 된다. 이러한 문제점은 수박의 저온 저항성 검증에서 상당한 노이즈로 작용하게 되므로 실용화에 적용되기에는 부적합하였다. 실제로 3차원으로 재구성하기보다는, 다각도에서 측정된 컬러영상을 기반으로 수박의 저온 저항성의 물리적인 상태 데이터를 획득하는 것이 충분히 빠르고 정확할 것으로 판단되었다. 그러므로 다음과 같이 3차원 영상장비를 구축하였다.

가. 3차원 영상 획득 장치 구성

3D 컬러 영상 측정부는 Fig. 75와 같이 상단을 측정할 수 있는 컬러 카메라 1개와, 측면을 측정할 수 있는 카메라 1대로 총 2대로 구성되었다. 작물이 이송되어 카메라 측정부에 도착하면, 상단부와 측면의 컬러 영상을 측정하게 된다. 그 이후에 작물이 90° 방향으로 움직이고 측면부의 컬러영상을 측정하는 패턴을 3회 반복한다. 측면 카메라를 기준으로 0°, 90°, 180°, 270° 방향의 컬러 영상을 획득하게 된다.

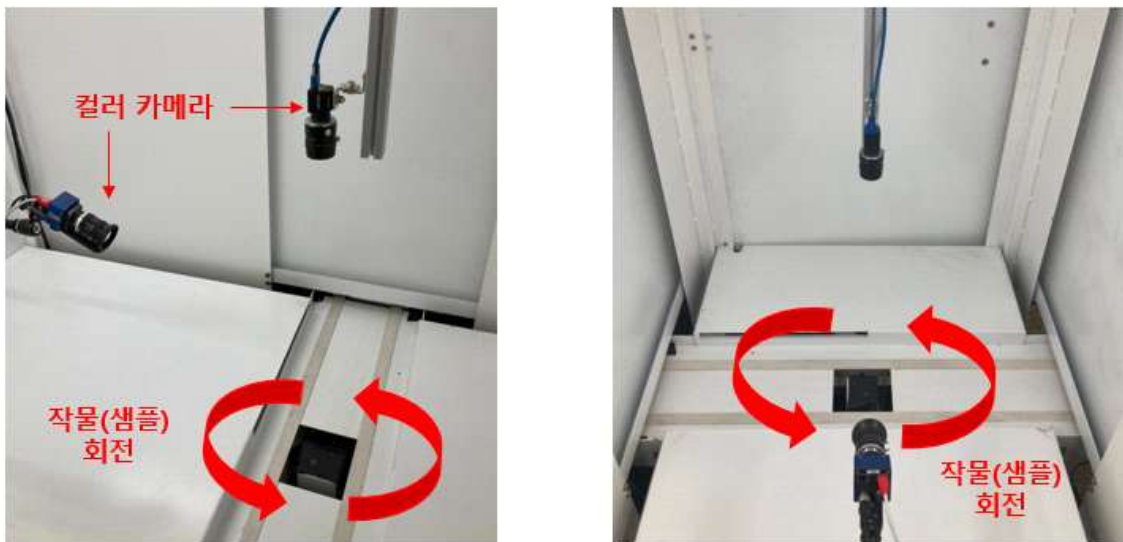


Fig. 75. 3D 컬러 영상 측정부의 장치 구성 및 측정 방법

나. 3차원 데이터 영상 획득 장치 측정 방법

측정된 3차원 컬러영상 데이터는 Fig. 76과 같이 3차원 영상과 유사한 데이터로 저장된다. 이렇게 획득된 5방향의 데이터에서 앞의 색깔, 각도, 면적, 크기, 무게중심 등과 같은 정량적인 데이터를 추출하게 된다. 각 품종당 정상 상태, 저온 노출상태의 데이터를 대량으로 획득하여, 저항성을 예측할 수 있는 기본 데이터로 활용된다.

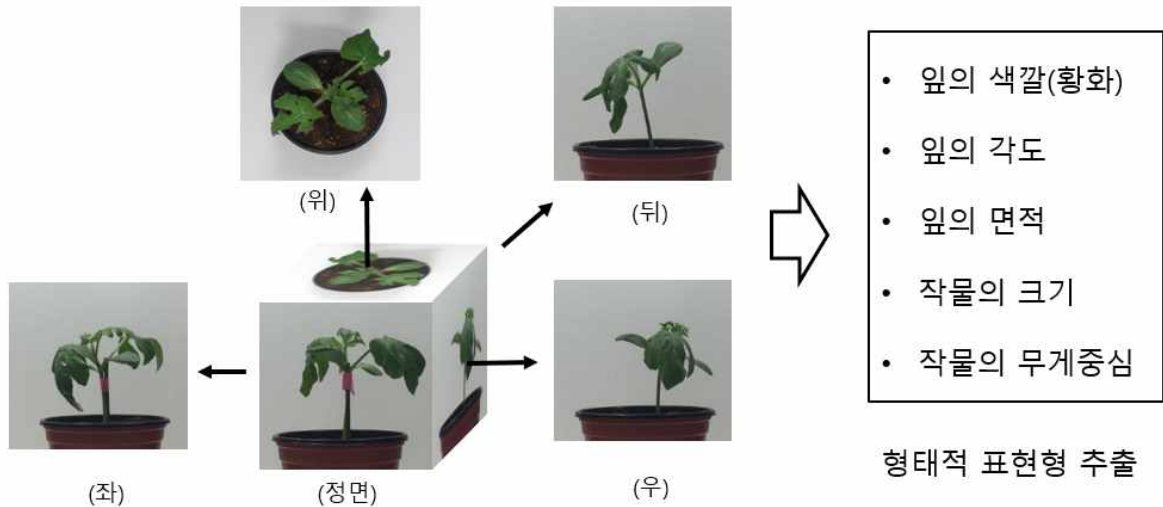


Fig. 76. 3D 컬러 영상 데이터 구조 및 추출 표현형 데이터

2. 초분광 영상측정 장치 개발

가. HTS용 초분광 영상(Hyperspectral imaging, HSI) 시스템

HTS를 위하여 사용된 초분광 영상장치는 900 - 1700 nm의 스펙트럼 영역을 2.5 nm 간격으로 측정할 수 있다(Fig. 77). 총 512개의 파장채널과 640개의 공간픽셀을 획득할 수 있다. 초분광 카메라는 그림과 같이 설치하였다.

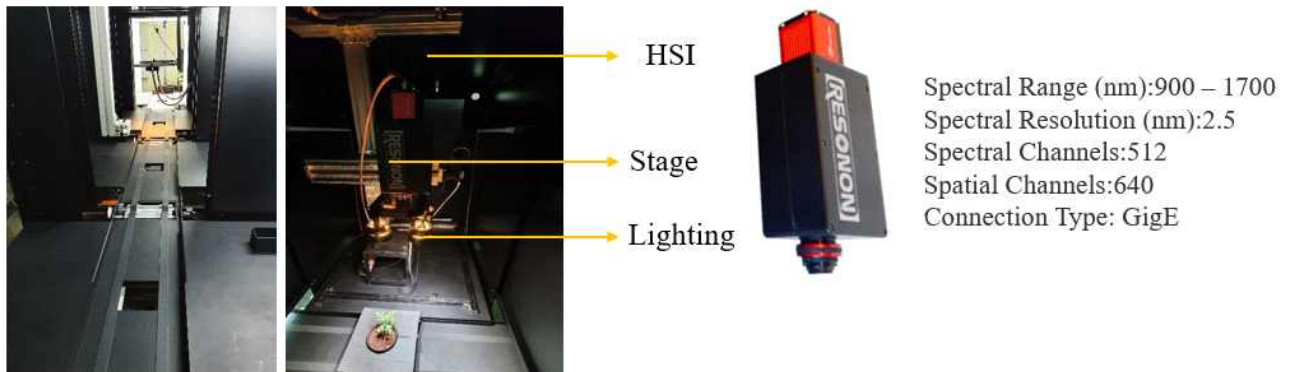


Fig. 77. HTS용 초분광 영상시스템

나. 시스템 설계 및 운영

본 시스템은 식물의 초분광 영상 측정을 위하여 카메라와 광원부를 움직여 라인스캔 하도록 제작하였다. 스텝모터는 라인스캔이 가능하도록 설치하였으며, 카메라와 광원을 지지할 수 있게 베어링휠을 설치하였다. 스텝모터(EzM-42S-A, FASTECT, South Korea)와 컨트롤러(EzS-NDR-42S-A00, FASTECT, South Korea)를 이용하여 최대 240 mm를 스캔할 수 있도록 하였다. 시스템의 조명 장치는 Line-Optical fiber를 이용하여 조사하였으며, 100W

할로젠 램프를 2개를 사용하였다.

다. 시스템 소프트웨어

Matlab (MathWorks, Natick, MA, USA)을 사용하여 개발된 소프트웨어는 아래 그림과 같다. 이 소프트웨어는 기본적으로 초분광 데이터를 저장할 수 있으며, 개발된 내한성 모델을 적용한 초분광 영상을 보여줄 수 있다. 소프트웨어의 대표적인 구성은 6가지로 Fig. 78과 같다.

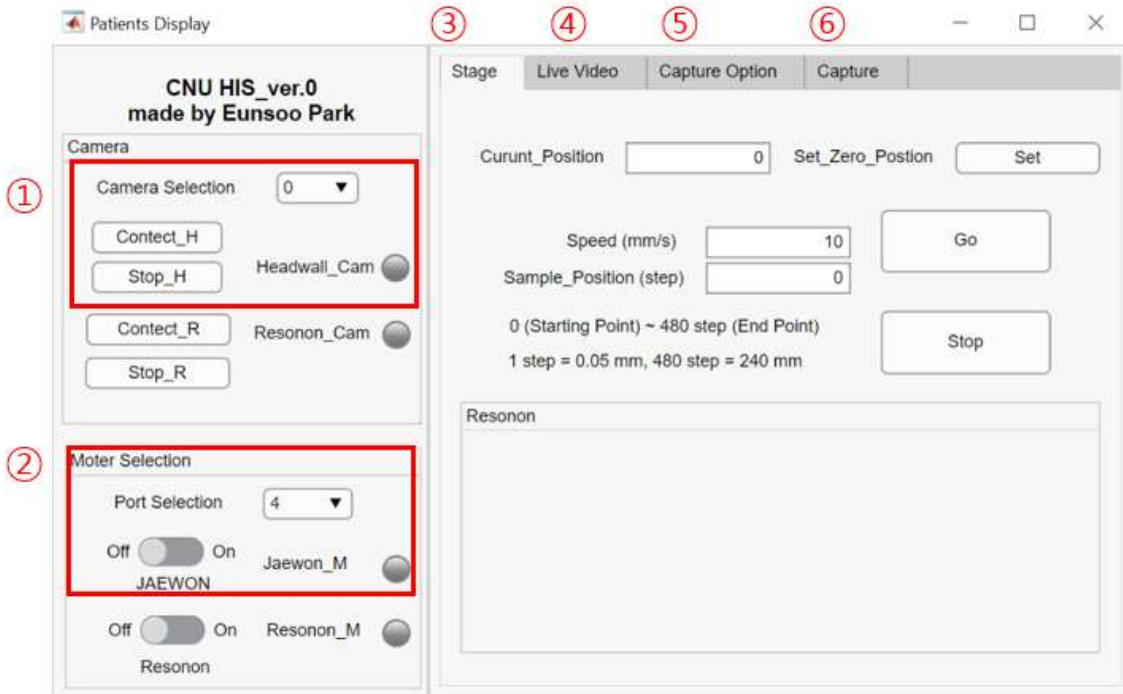


Fig. 78. HTS용 HSI 측정 시스템 구성도

- ① HSI 카메라 연결 부분 (연결이 되면 녹색 점등)
- ② 라인 스테이지 연결 부분 (연결이 되면 녹색 점등)
- ③ 라인 스테이지 동작 테스트 부분(0 ~ 240 mm 사이 조절 가능)
- ④ HSI 라이브 영상 표시 (영상의 포커스, 강도 확인)
- ⑤ HSI 스캔 옵션 설정 (3과장, PLS-DA 모델 적용)
- ⑥ HSI 스캔 동작 및 결과 확인

Fig. 79와 같이 HSI와 라인스테이지가 연결이 되면 ①, ②번 부분이 녹색으로 점등되는 것을 알 수 있다. 이것으로 시스템 구동 상태를 확인할 수 있다. 또한 ③의 'Speed' 공란과 'Sample_Position (step)'에 값을 입력하고 'Go'를 누르면 입력값에 해당하는 속도로 입력된 위치까지 이동하는 것을 확인할 수 있다.

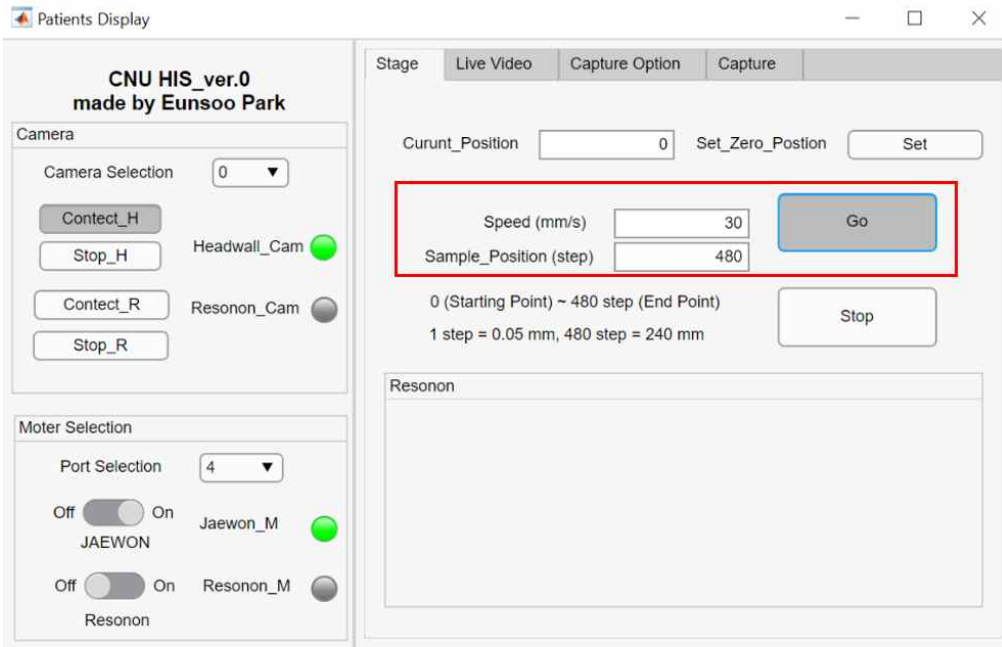


Fig. 79. 소프트웨어의 구동 확인 및 라인 스테이지 테스트

④번 부분을 클릭한 후, 'Show' 버튼을 누르면 Fig. 80과 같이 실시간으로 초분광 영상을 확인할 수 있다. 이러한 기능은 시스템을 구동하기 전에 카메라 렌즈의 초점과 노출 정도를 확인할 수 있다. 또한 'Exposure time' 부분을 이용하여 카메라 노출 시간을 지정 정할 수 있다.

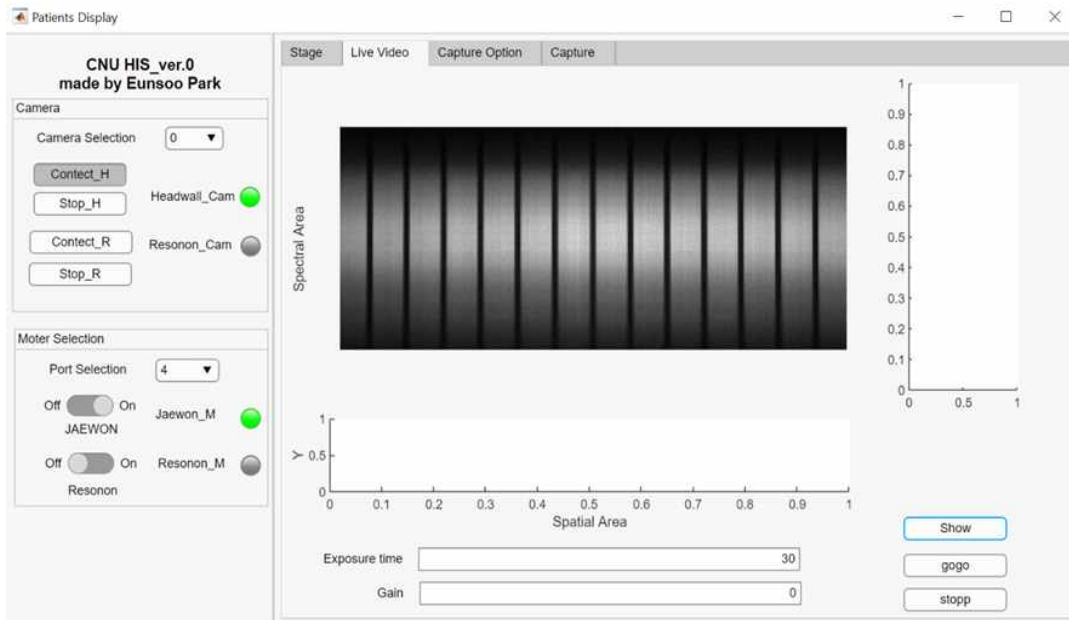


Fig. 80. 카메라 렌즈의 초점 및 노출 조절을 위한 실시간 HSI 확인 기능

⑤번 부분은 Fig. 81과 같이 나타나며, Fig. 81a 부분에 측정하고자 하는 옵션을 입력하고 ‘Calculate’ 를 클릭하면 Fig. 88(b) 부분에 자동으로 계산이 수행되며, ‘Save’ 를 누르면 저장된다. 또한 ‘Showing Option for Capture screen’ 부분의 ‘3 bands’ 또는 ‘PLS-DA’ 옵션을 선택하여 최종 영상의 파장 조합 결과를 미리 확인해 볼 수 있다. ‘3 bands’ 옵션에서 파장 번호를 입력하면 관련 파장이 조합된 영상을 확인해 볼 수 있다(1 ~ 270파장 중 선택). ‘PLS-DA’ 부분은 미리 개발된 모델을 호출하여 저장할 수 있는 기능이며, 이 부분이 실행되면 ⑥번 부분의 최종 영상이 모델이 적용된 영상을 나타내 준다.

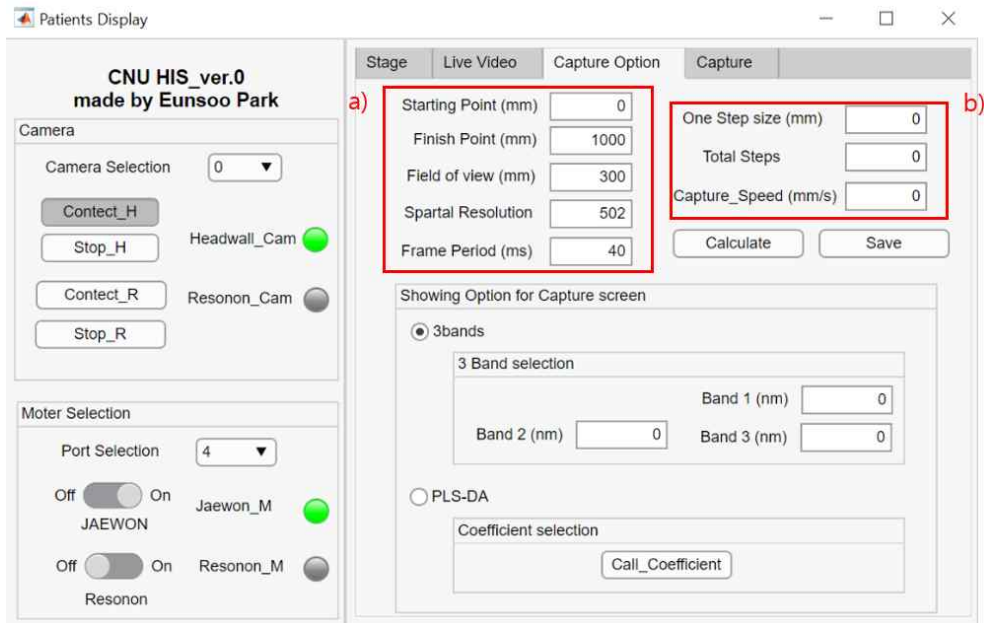


Fig. 81. HSI 측정 옵션 설정 기능

[제 4세부]

가. 해외 시험재배

(1) 해외 현지적응성 시험 조합/품종

년도	국가	거래처	조합수	시험조합/품종
2019년 (3차년도)	중국	A사	11	CT003외 10조합
		B사	4	CW001외 3조합
	스페인	C사	3	AP#11외 2조합
2020년 (4차년도)	중국	D사	4	AP#32외 3조합
		E사	1	AP#159
		F사	1	AP#92
		G사	3	AP#61외 2조합
	멕시코	H사	11	AA001외 10조합
2021년 (5차년도)	브라질	I사	3	AS001외 2조합
	그리스	J사	2	AP#114외 1조합
		K사	11	AP#25외 10조합
	페루	L사	3	AP#22외 2조합
	사우디아라비아	M사	2	AP#114외 1조합
	콜롬비아	N사	5	AP#32외 4조합
	헝가리	O사	2	AP#25외 1조합
	이탈리아	P사	2	AP#25외 1조합
	러시아	Q사	6	AP#09외 5조합
합계			72조합(중복조합 포함)	

표 107 해외 현지적응성 시험 조합 및 품종

- (가) 연구진행 3년간(2019년-2021년) L1 / L2 / Micro seeded / Seedless 4가지 타입에 대하여 11개 국가 68조합(중복조합 포함)을 발송하여 해외거래처와 협력하여 현지적응성 시험재배 및 농가시험을 진행함.
- (나) 2019년 과제 진행시, 기존 관계를 맺고 있는 거래처를 위주로 하여 시험 진행
- (다) 2020년 과제 진행시, COVID-19 대유행을 감안하여, 상대적으로 개발이 빠를 것으로 기대된 중국을 대상으로 시험 집중 진행
- (라) 2021년 과제 진행시, 국가 지역마다의 결과치를 도출하기 위한 전 세계 대상으로 시험 진행

(2) 해외 현지적응성 시험 결과(상업화)

(가) 중국

- ① 2019년 중국 A사 시험 결과 CT003(Seedless), CT008(Less seeded) 준상업화를 위한 협의진행.
- ② 2019년 중국 B사 전체 조합에 대하여 관심도가 높았으나, 유럽 품종독점권에 대한 양사간 의견차이로 인하여 상업화 결렬.

- ③ 2020년 중국 A사 CT003, CT008 확대시교 및 CT008 상업화 일부 판매.
- ④ 2020년 신규 4개 거래처에 대한 시험 결과는 편차들이 있었으나, 상업화 논의는 가격에 대한 의견차이가 심하여 상업화 결렬.



그림 275 중국 현지적응성 시험 결과

- ⑤ 2021년 중국 A사 CT008 수출확대와 더불어 2022년 CT008 생산주문(200KG) 및 CT003 생산주문 완료(15KG).



그림 276 중국 A사 현지 평가 과정

⑥ 평가요약

CT008의 거래처 평가는 대비종보다 과 크기가 크며 중국 시장에서 요구도와 부합함. 고온으로 갈수록 과형 상대적으로 길게 나오는 경향이 있으며 과피색이 대비종에 비하여 약간 연하다는 평가를 받았으나, 과육색이 진하고 당도가 높으며 농가들의 전반적인 만족도가 높았음.

(나) 스페인

- ① 2019년 프로젝트 기관과 연계된 스페인 C사를 방문하여 AP#11, AP#32, AP#34 등 평가 진행
- ② 프로젝트 기관 평가내용 공유 및 스페인 C사 관련 개발/수출을 프로젝트 기관에서 관리하기로 합의



그림 277 스페인 C사 현지 평가 과정

③ 평가요약

AP#11 경우 당도 및 과의 외관이 우수하나, 육색이 황색인 개체가 많고 씨의 크기가 기대했던 것보다 작지 않아 품질이 떨어진다는 평가임. 일반적으로 호피형은 수출용으로 90% 이상이 판매되고 있으나, 현재의 조합으로는 한계가 있는 것으로 판단됨. 수분수로서의 가능성이 있어 지속조사 예정 하였음. AP#32의 경우 수출용으로는 부적합하다는 평가를 받았으며, 내수용으로는 고려될 수 있으나, 과 크기가 현재보다 더 커야 만족할 수 있음. AP#34의 경우 호피가 얇고 진하며, 초세가 강하고 숙기가 느리나, 초세가 강하고 숙기가 느린 것은 후기 착과량 및 과 비대에 좋을 것으로 예상되어, 지속조사 예정하였음. 수분수로서의 활용은 개도농가의 경우 수분수 대비품종 프리미엄, 프리직보다 우수하다는 평가 있었음.

(다) 콜롬비아

- ① 2021년 콜롬비아 N사 Less seeded 품종 AP#92, AP#181 시험재배 및 준상업화 확대시험 진행.
- ② AP#92, AP#181이외에 Seedless 품종에 대한 상업화 시도가 있었으나, 가격 면에서 입장차이가 있어, 상업화 결렬.



그림 278 콜롬비아 N사 현지 평가 과정

③ 평가요약

Results (Atlantic Coast región)

Variety	Setting	Shape	Sweety and Crunch	Weight	Disease Resistance	Average	Ranking
AP 181	4	5	4	4	4	4,20	2
AP 92	4	4	4	4	4	4,00	3
AP 11	5	3	3	2	5	3,60	6
AP 142	4	5	4	5	4	4,40	1
AP 222	4	4	3	5	4	4,00	4
AP 190	3	4	4	4	4	3,8	5
AP 150 (*)							

그림 279 콜롬비아 N사 평가결과 보고서

2022년 콜롬비아에서 시험재배된 품종들은 매우 우수한 작황을 보였음. 대비종들과 비교하여 높은 평점을 부여 받았으며, 특히 AP#142와 AP#181이 평가항목 모든 면에서 좋은 평가를 받았음. 시장에서 요구하는 가장 이상적인 과형은 AP#181이나, 과중이 AP#142에 비하여 적기 나감. 2가지 품종모두 준상업화용으로 유통업자들을 대상으로 한 확대시험 진행중에 있음.

(라) 그리스

① 2021년 그리스 K사 AP#25의 10조합 시험재배 및 AP#219 준상업화 확대시험 진행.



그림 280 그리스 K사 현지 평가 결과-AP#219

② AP#219 이외에도, AP#25, AP#202, AP#216, AP#217, AP#221 재시험중으로 결과에 따라 준상업화/상업화 협의 예정.



그림 281 그리스 K사 현지 평가 결과-AP#25, AP#202, AP#216, AP#217, AP#221

HYBRID	TYPE	REMARKS	POSSITIVE POINT	NEGATIVE POINTS	STATUS
AP#202	ELONGATED SEEDED JUBILEE	Fruit shape: oval. Nice flesh color, good taste. Fruit weight: 8-12 Kgr. Medium to good fruit shape and size. Medium vigour plant.	Flesh color and taste.	Medium vigour plant. Not so uniform fruit shape and size.	We have no market of this type of watermelon in Greece, up to now. Nevertheless, we want to check it again due to the fact that it has good flesh quality. So, we would like to have 500-1.000 seeds up to the end of October, in order to check it in all periods of transplantings (starting from January 2022).
AP#217	LESS SEEDED MIDI	Bostana (Syngenta) type. Fruit weight: 5-8 Kgr. Fruit shape: oval.	Nice flesh color and taste. Brix: 11,5-12,5	A little bit fuzzy skin surface.	We want to check it again, opposite to Bostana (Syngenta) in early segment. We would like to have 500-1.000 seeds up to the end of October.
AP#216	LESS SEEDED MIDI	Bostana (Syngenta) type. Fruit weight: 5-8 Kgr. Fruit shape: oval.	Nice flesh color and taste. Brix: 11,5-12,5	A little bit fuzzy skin surface.	We want to check it again, opposite to Bostana (Syngenta) in early segment. We would like to have 500-1.000 seeds up to the end of October.
AP#219	MICRO SEEDED MINI	Minirossa (Lambo) segment (skin color). Fruit weight: 3-5 Kgr.	Nice taste. Good fruit uniformity.	A little bit less flesh color comparing with Minirossa and Modelino (Essasem).	We want to check it again and we want to see the reactions of our traders for this type of watermelon (microseeded). The taste and the uniformity are strong points of it. We would like to have 500-1.000 seeds up to the end of October.
AP#025	SEEDLESS MIDI BLACK	Fashion (Nunhems) segment. Fruit weight: 4-6 Kgr.	Nice taste. Brix: 13-14.	Not so uniform fruit shape and size.	Unfortunately, we checked it only in one trial. So, we want to check it again, opposite to leader hybrid Fashion. So, we would like to have 500 seeds up to the end of October.
AP#221	SEEDLESS MIDI BLACK	Fashion (Nunhems) segment. Fruit weight: 3-5 Kgr. Brix: 12-13.	Nice flesh color and taste. Brix: 12-13.	Medium fruit size.	Unfortunately, we checked it only in one trial. So, we want to check it again, opposite to leader hybrid Fashion. So, we would like to have 500 seeds up to the end of October.

그림 282 그리스 K사 평가 결과 보고서

③ 평가요약

2022년 그리스에서 시험재배되어 선발된 품종들의 공통적인 장점은 과육색과 당도부분임. AP#219의 경우 과육색이 대비종에 비하여 약간 옅은 단점이 있으나, 유통업자들을 대상으로 반응을 살피기 위한 준상업화용 시험재배 예정임. AP#216, AP#217의 경우 과육이 약간 무르다는 평가가 있으나, 재시험하여 반응을 살피고자 함. AP#202의 경우 그리스내 시장이 형성되어있지 않으나, 과육품질이 우수하여 가능성을 가지고 재시험을 하고자 함. AP#26, AP#221의 경우 과크기, 과형에 약간 단점이 보이나, 첫 재배 시험으로 지켜볼 여지가 남아있어 재시교 예정 함.

(마) 러시아

① 2021년 러시아 Q사 AP#09의 5개 품종 시험재배 및 4개 조합 준상업용 확대시험 진행.



그림 283 러시아 Q사 현지 평가 결과-AP#09

② 선발된 4개 품종(AP#09, AP#42, AP#43, AP#61) 준상업화용 확대시교 물량 일부 유상 판매.

③ 평가요약

AP#42, AP#43은 전반적으로 맛과 품질 등에서 좋은 평가를 받았으며, 과 크기가 한국 시장과 유사한 데이터 결과를 얻었음. AP#61은 맛과 당도 등에서 좋은 평가를 받았으며, 과 크기가 한국 시장과 유사한 데이터 결과를 얻었음. AP#09는 평가시 과색부분에 있어 가장 우수한 평가를 받았음. 데이터가 명확하게 공유가 되지 않고 메일상 약식으로 간단하게 공유되어, 추후 거래처측과 세부사항에 대해협의하고자함.

Dear Jenny

I'm ok, thank you very much. Hope, you do as well.

Below please see the table with watermelon result and also photo by link:

Variety	Direct Sowing	Harvesting	Average weight	
AP#42	10th of May	15th of August	6 - 7 kg	Uniform, very attractive external color, sweetest one
AP#09	10th of May	15th of August	6 - 7 kg	Best internal color
AP#183	10th of May	15th of August	7 - 8 kg	Very attractive external color, earliest one
AP#43	10th of May	15th of August	6 - 7 kg	Very sweet, highly uniform
AP#58	10th of May	15th of August	7 - 8 kg	Very early
AP#61	10th of May	15th of August	8 - 9 kg	Very sweet, perfect color. Most promising one, due to yielding, skin color and sugar contain
Control				
My Honey (NWB)	10th of May	15th of August		
Bedouin (Bejo)	10th of May	15th of August		

We did not manage to make sowing in due time, so varieties were tried in later segment by direct sowing, while normally this type of watermelons is made by transplanting much earlier. Still, preliminary seems to be optimistic, for next season we would like to make promo field 6000 plants of each variety. Please let us know the prices.

Regarding other crops - we will **start** the trials of tomatoes in December, peppers in March 2022. Chinese cabbage was sown in Krasnodar region against control varieties Enduro (Taki) and Anaco (N) results will be in October.

best regards,

그림 284 러시아 Q사 평가 결과

나. 국내 시험포

(1) 부여 시험포(2020년-2021년)

(가) 2020년 조사결과 및 선발

시교번호	구형	과피색	과피 두께	육색	과육 경도	과중 (kg)	당도	씨유무	선발 유무
AP#893	원형	호피	중간	황육	강	5~6	11.2/11.4	Seedless	선발
AP#927	원형	호피	약간 두꺼움	적육	강	5~6	13.2/13	Seedless	x
AP#929	타원형	호피	약간 두꺼움	적육	강	7~8	12.8/13	Seedless	선발
AP#930	타원형	호피	중간	적육	강	7~8	13/14	Seedless	x
AP#931	단타원형	호피	약간 두꺼움	적육	강	8~9	12/12.4	Seedless	선발
AP#932	단타원형	호피	중간	적육	강	6~7	13/12.4	Seedless	선발
AP#933	단타원	호피	중간	적육	강	5~6	11.4/11.	Seedless	x

	형						6		
AP#934	장타원형	호피	두꺼움	적육	강	6~8	12/13.2	Seedless	선발
AP#936	원형	호피	약간 두꺼움	적육	강	5~6	12.2/12	Seedless	선발
AP#937	원형	호피	약간 두꺼움	적육	강	5~6	11.2/12	Seedless	선발
AP#938	단타원형	호피	약간 두꺼움	적육	강	6~7	12/12.4	Seedless	선발

표 108 2020년 조사결과 및 선발조합

(나) 2020년 결과요약

- ① 부여 계약재배 농가 하우스내 Seedless 11조합 시교재배 되었음.
- ② 선발 조합은 AP#893, AP#929, AP#931, AP#932, AP#934, AP#936, AP#937, AP#938 총 8조합이며 내용은 위 표와 같음.
- ③ 크림슨 타입은 현재 개발 진행단계인 상황으로 아시아, 유럽, 북미 지역내 시교개발을 위한 거래처 사진 발송 및 내용 전달.

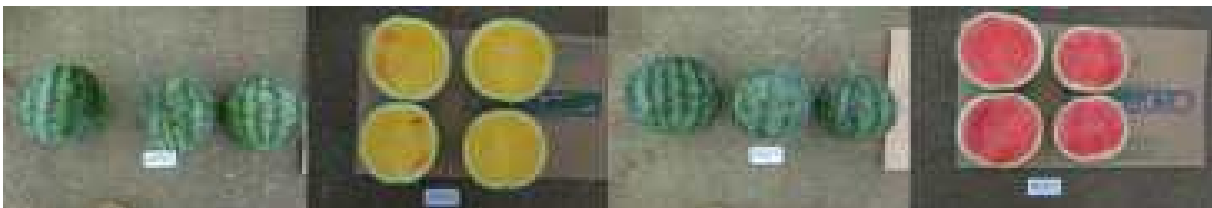


그림 285 AP#893-1 / AP#893-2 / AP#927-1 / AP#927-2



그림 286 AP#929-1 / AP#929-2 / AP#930-1 / AP#930-2



그림 287 AP#932-1 / AP#932-2 / AP#931-1 / AP#931-2



그림 288 AP#933-1 / AP#933-2 / AP#934-1 / AP#934-2

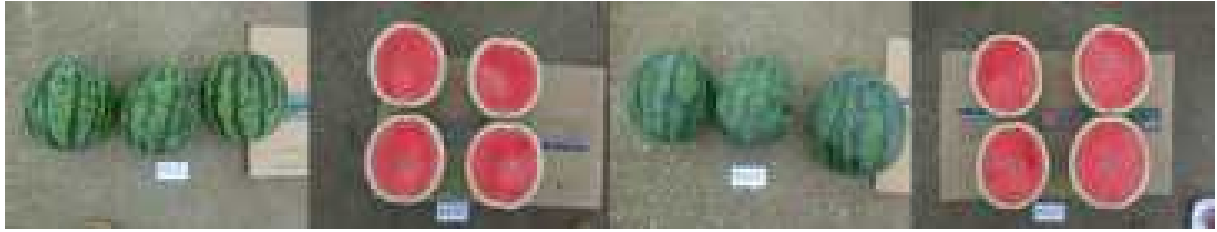


그림 289 AP#936-1 / AP#936-2 / AP#937-1 / AP#937-2



그림 290 AP#938-1 / AP#938-2 / 작황조사

(다) 2021년 조사결과 및 선발

시교번호	구형	과피색	과피 두께	육색	과육 경도	과중 (kg)	당도	씨유무	선발 유무
3109	원형	호피	중간	적육	강	10.4	9.3	Seeded	선발

표 109 2021년 조사결과 및 선발조합

(라) 2021년 결과요약

- ① 부여 계약재배 농가 하우스내 Seedless/Seedless 총 11조합 시교재배 되었음.
- ② 선발 조합은 3109 총 1조합이며 내용은 위 표와 같음.
- ③ 호피 원형계의 선발을 통한 국가별 거래처내 새로운 시장 개발 타진하였으며, 차년도 중국내 시험재배가 가능할 것으로 보임.



그림 291 2021년 선발조합-3109

(2) 함안 시험포(2020년)
 (가) 2021년 결과요약

시교번호	구형	과피색	초세	육색	과육 경도	과중 (kg)	당도	씨유무	선발 유무
AP#722	원형	흑피	중강	적육	강		11.6	Seedless	선발
AP#880	원형	호피	중강	적육	강		11.4	Seedless	x
AP#881	원형	호피	중강	적육	강		11.6	Seedless	선발
AP#919	원형	호피	중	적육	강		11.2/12.4	Seedless	x
AP#920	원형	호피	중강	진한적육	강		11.4/11	Seedless	선발
AP#921	원형	호피	중강	적육	강		10.4	Seedless	x
AP#922	원형	호피	중강	적육	강		11.4/12.2	Seedless	선발
AP#923	원형	호피	중	적육	강		12.4	Seedless	선발
AP#924	원형	호피	중	적육	강		12.2	Seedless	x
대비#1	단타원형	호피	중	진한적육	강		13/12	Seedless	
대비#2	단타원형	호피	중	연한적육	강		10.4	Seedless	

표 110 2020년 함안 시험포 결과

(나) 2020년 결과요약

- ① 부여 계약재배 농가 하우스내 Seedless 9조합 및 대비종 2종이 시교재배 되었음.
- ② 선발 조합은 AP#722, AP#881, AP#920, AP#922, AP#923 총 5조합이며 내용은 위 표와 같음.
- ③ 아시아, 유럽, 북미 지역내 시교개발을 위한 거래처 사진 발송 및 내용 전달하였으나, 단가 차이에 대한 이견이 있어, 현재 시교발송 보류됨.



그림 292 AP#722-1 / AP#722-2 / AP#880-1 / AP#880-2

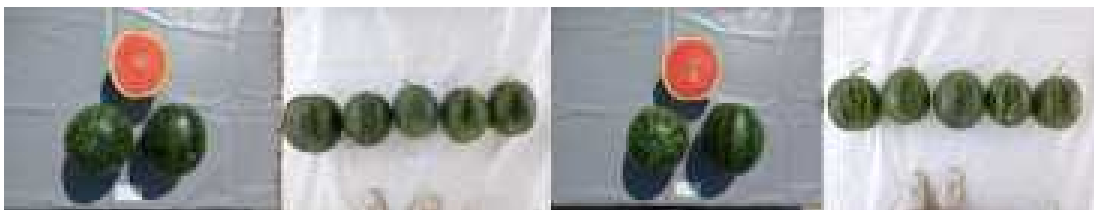


그림 293 AP#881-1 / AP#881-2 / AP#919-1 / AP#919-2

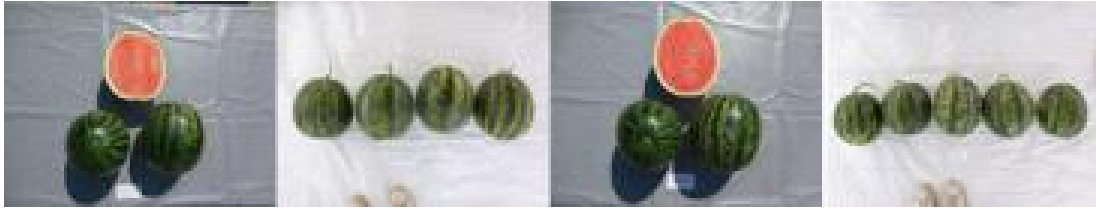


그림 294 AP#920-1 / AP#920-2 / AP#921-1 / AP#921-2



그림 295 AP#922-1 / AP#922-2 / AP#923-1 / AP#923-2



그림 296 AP#924-1 / AP#924-2 / 대비#1-1 / 대비#1-2

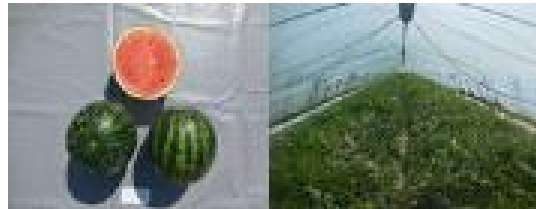


그림 297 대비#2 / 시험포전경

(다) 2021년 조사결과 및 선발

시교번호	구형	과피색	과피 두께	육색	과육 정도	과중 (kg)	당도	씨유무	선발 유무
923	단타원형	호피	중간	적육	강	7.72	11.5	Seeded	선발
952	단타원형	호피	두꺼움	적육	강	6.68	12.35	Seeded	선발
953	단타원형	호피	중간	적육	강	9.24	12.2	Seeded	선발

표 111 2020년 함안 시험포 조사결과 및 선발조합

(라) 2021년 결과요약

- ① 고창 계약재배 농가 하우스내 시교 조합 및 대비품종 조합이 시교재배 되었음.
- ② 선발 조합은 #923, #952, #953 총 3조합이며 내용은 위 표와 같음.
- ③ 프로젝트 기관과 협의하여, 차년도 시교시 적합한 국가별 거래처 선발하여 개발할것으로 함의.



그림 298 2020년 함안 시험포 선발조합

(2) 음성 시험포(2020~2021년)

(가) 2020년 결과요약

시교번호	구형	과피색	초세	육색	과육 경도	과중 (kg)	당도	씨유무	선발 유무
AP#722	단타원형	흑피	중	적육	강	6.72	12.2	Seeded	선발
AP#866	단타원형	호피	중강	적육	강	7.8	11.1	Seeded	x
AP#909	단타원형	호피	중강	적육	강	7	11.5	Seeded	x
AP#921	단타원형	호피	강	적육	강	7.08	12.2	Seeded	선발
AP#940	단타원형	호피	강	적육	강	7.94	10.6	Seeded	선발
AP#943	단타원형	호피	중강	적육	강	7.8	12.2	Seeded	x
AP#950	단타원형	호피	중강	적육	강	7.82	11.7	Seeded	x
대비#1	단타원형	호피	중	적육	강	6.76	11.9	Seeded	
대비#2	단타원형	호피	중	적육	강	7.76	11.1	Seeded	
대비#3	단타원형	호피	강	적육	강	7.7	10.4	Seeded	

표 112 2020년 음성 시험포 결과

(나) 2021년 결과요약

- ① 부여 계약재배 농가 하우스내 Seeded 시교 7조합 및 대비품종 3조합이 시교 재배 되었음.
- ② 선발 조합은 P#722, AP#921, AP#940 총 3조합이며 내용은 위 표와 같음.
- ③ 아시아, 유럽, 북미 지역내 시교개발을 위한 거래처 사진 발송 및 내용 전달하

였으나, 멕시코내 거래처 의견으로 호피 2배체 수박의 경우 크림슨이 선호되고 있으며, 과중 10kg이상의 조합을 원하고 있어 선발된 조합들을 시험 재배하기에는 적절하지 못하다는 평가 있음.

- ④ 과의 균일도 및 멕시코 현지내 재배시 당도가 조금더 축적이 될것으로 예상되고 있어, 수분수 혹은 새로운 시장 개척용으로 재배가능할 것으로보이나 큰 진전은 없었음.

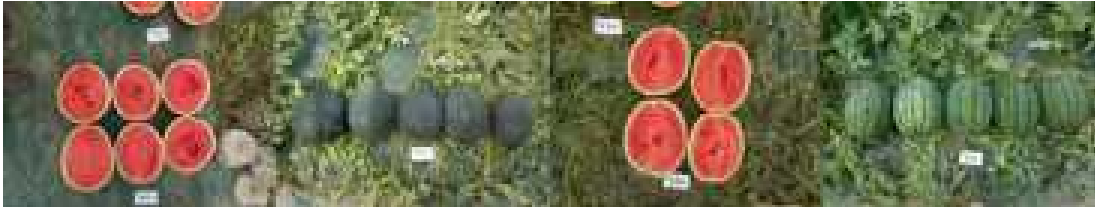


그림 299 AP#722-1 / AP#722-2 / AP#866-1 / AP#866-2

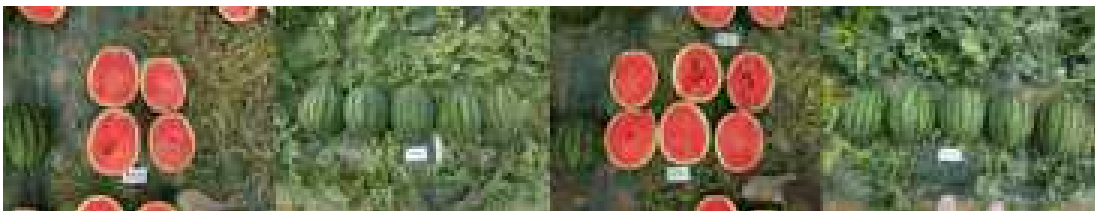


그림 300 AP#909-1 / AP#909-2 / AP#921-1 / AP#921-2

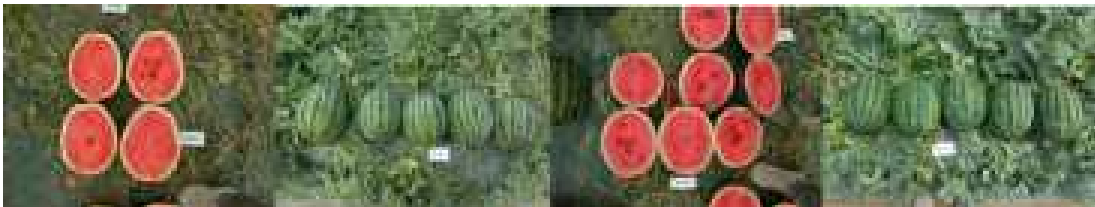


그림 301 AP#943-1 / AP#943-2 / AP#940-1 / AP#940-2

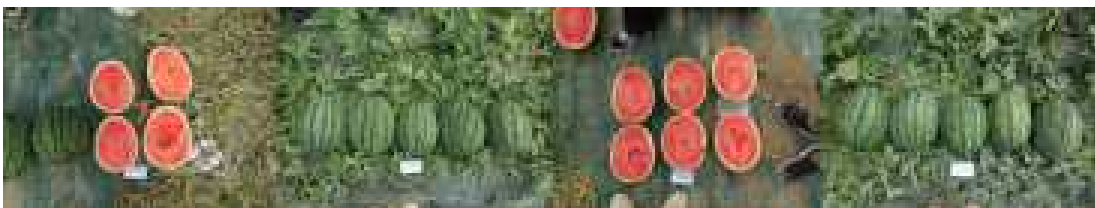


그림 302 AP#950-1 / AP#950-2 / 대비#1-1 / 대비#1-2

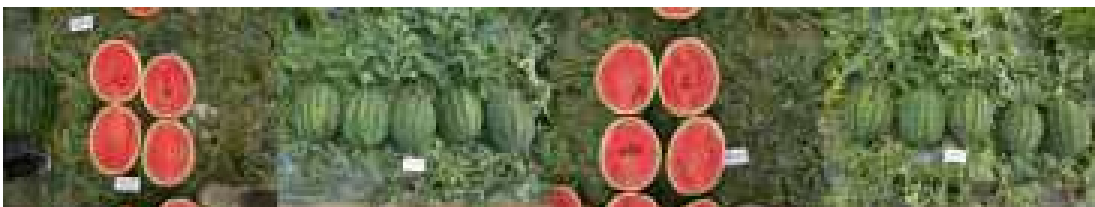


그림 303 대비#2-1 / 대비#2-2 / 대비#3-1 / 대비#3-2

(다) 2021년 조사결과 및 선발

시교번호	구형	과피색	과피 두께	육색	과육 경도	과중 (kg)	당도	씨유무	선발 유무
2103	단타원형	호피	중간	적육	강	9.2	12.36	Seeded	선발
2110	단타원형	호피	중간	적육	강	8.5	11.64	Seeded	선발

표 113 2021년 음성 시험포 조사결과 및 선발

(라) 2021년 결과요약

- ① 부여 계약재배 농가 하우스내 Seedless/Seedless 총 11조합 시교재배 되었음.
- ② 선발 조합은 3109 총 1조합이며 내용은 위 표와 같음.
- ③ 호피 원형계의 선발을 통한 국가별 거래처내 새로운 시장 개발 타진하였으며, 차년도 중국내 시험재배가 가능할 것으로 보임.



그림 304 2021년 함안 시험포 선발조합

(2) 고창 시험포(2020~2021년)

(가) 2020년 조사결과 및 선발

포장번호	시교번호	구형	과피색	육색	과육 경도	과중 (kg)	당도	씨유무	선발 유무
13	AP#129	단타원형	흑피	진한적육	강			Seedless	선발
8	AP#901	단타원형	호피	적육	강			Seedless	선발
6	AP#917	단타원형	연흑피	적육	강			Seedless	선발
2	AP#929	단타원형	호피	적육	강			Seedless	선발
3	AP#930	단타원형	호피	적육	강			Seedless	선발
12	AP#932	단타원형	호피	적육	강			Seedless	선발
4	AP#933	단타원형	호피	적육	강			Seedless	선발
5	AP#934	단타원형	호피	적육	강			Seedless	선발
7	AP#951	단타원형	호피	적육	강			Seedless	선발

표 114 2020년 고창 시험포 조사결과 및 선발조합

(가) 2020년 결과요약

- ① 고창 계약재배 농가 하우스내 시교 14조합 및 대비품종 2조합이 시교재배 되었음.
- ② 선발 조합은 AP#129, AP#901, AP#917, AP#929, AP#930, AP#932, AP#933, AP#934, AP#951 총 9조합이며 내용은 위 표와 같음.
- ③ 일부 조합은 부여 시험포 조합과 같거나 유사한 조합으로 고창시험포 평가가 가장 늦게 이루어졌기에, 아시아, 유럽, 북미 지역내 시교개발을 위한 거래처 사진 발송 및 내용 전달시 중복된 내용은 제외하여 다시 전달 하였음. 중국의 경우 단가 차이에 대한 이견이 있어, 현재 시교발송에 대한 결정이 보류중인 상태이며, 국가 담당자의 지속 협업을 통하여 곧 결정될 예정임.

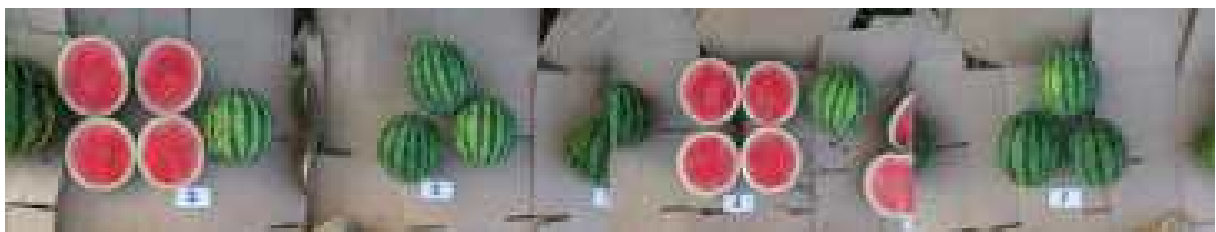


그림 305 시교2번-1 / 시교2번-2 / 시교3번-1 / 시교3번-2

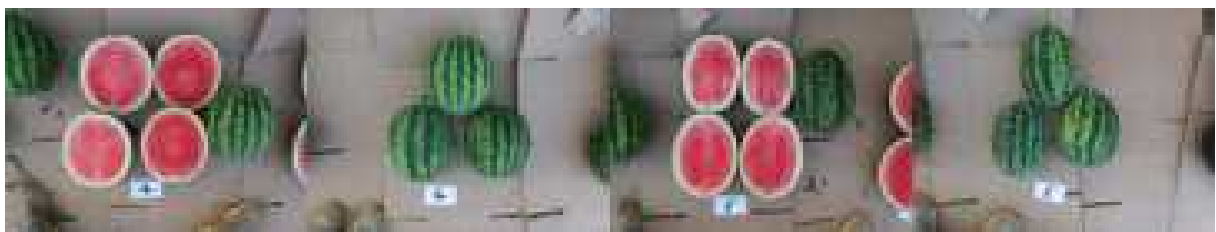


그림 306 시교4번-1 / 시교4번-2 / 시교5번-1 / 시교5번-2



그림 307 시교6번-1 / 시교6번-2 / 시교7번-1 / 시교7번-2



그림 308 시교8번-1 / 시교8번-2 / 시교12번-1 / 시교12번-2

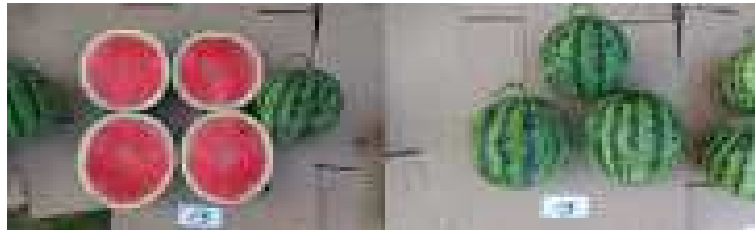


그림 309 시교13번-1 / 시교13번-2

다. 마케팅

(1) 해외활동

(가) 2019년 신규 거래처 발굴 위한 국제총회 APSA, ISF 및 해외 종자박람회 참석

① 2019년 APSA참석시 23개 거래처 미팅, 9개 신규 거래처 해외 시험재배 협의

② 2019년 ISF참석시 19개 거래처 미팅, 10개 신규 거래처 해외 시험재배 논의

(나) 2019년 해외 거래처와의 우수 F1품종 선발을 위한 해외 현지 작황조사 실시

(다) 2020년-2021년 COVID-19 대유행으로 인한 해외활동 불가

(라) 2020년-2021년 KOTRA ‘사업파트너 연결지원 사업’적극 활용

① 2020년-2021년 화상미팅, 영상통화, 메일 교신을 통한 해외 정보 공유 진행



그림 310 KOTRA 접촉거래처/화상미팅



그림 311 APSA, ISF 해외 종자박람회 참석



그림 312 2019년 해외 현지 작황조사

(2) 국내활동

(가) 2019년 프로젝트 기관과 협력하여 해외바이어 초청 및 국내 개발 수박 품종 공동선발/평가

- ① 해외바이어 3개사 초청 및 수박 품종, F1 조합 선발 및 평가 실시.
- ② 첫 해외바이어 초청 행사였던 만큼, 해외 바이어를 통한 객관적인 시장정보 파악과 F1 신조합, 품종의 평가 및 소개를 통한 수박 개발 가능성 타진 주력
- ③ 씨없는 수박 및 씨적은수박(L1, L2), 마이크로씨드 수박에 대한 정보가 생소한 상황으로 일정 진행중 프로젝트 기관 김용재 박사를 통한 수박품종 세미나를 진행 및 정보전달 집중



그림 313 2019년 해외 바이어 초청

(가) 2019년-2021년 프로젝트기관과 협력하여 국내 성능검정 시험포 운영

- ① 2019년-2021년 프로젝트 기관과 협력하여 시험포 재배 농가 선정
- ② 성능검정을 통한 해외 시험용 품종 / F1 신조합 선발 및 다양한 재배조건에서의 작황을 파악 및 데이터 수집을 위한 국내 농가 소량 시험 재배 진행.
- ③ 시험내용 및 결과 프로젝트 기관과 공유 및 해외 개발용 수박 최종 선정 및 해외상보 제작시 활용



그림 314 2019-2021년 국내 성능검정 시험포 운영

라. 기타활동 상보, 시장조사

(1) 해외상보 제작

- (가) 2019년 GSP 개발품종 및 F1 신조합을 중심으로한 초판 제작
- (나) 2020년 F1 신조합 및 일부 해외 시험재배를 바탕으로한 개정판 제작
- (다) 2021년 3년간의 해외 시험재배 결과 및 F1 신조합을 바탕으로 최종 개정



그림 315 2019년 수박 해외상보 제작

(2) 해외시장 정보조사

- (가) 2019년-2021년 3년간의 해외 거래처 정보공유를 통한 중국 멕시코, 스페인 시장 정보는 아래와 같음.
- (나) 해외시장 정보는 해외 현지 거래처의 정보와 현지 작황조사시 시장 정보를 종합

하여 주관적인 관점에서 수집되었으므로 다소 부정확할 수 있음.

(다) 2021년 시험재배중인 국가들 또한 정보수집을 바탕으로 시장정보를 파악하고자 시도중에 있음.

*중국

1. 수박 주 재배지역

- 산둥성, 광둥성, 호북성, 기타 지역 넓게 산재되어있음

2. 재배면적

- 중국 전체 수박면적은 약 200만Ha로 추정되고 있음
- 산둥성, 광둥성, 호북성 외에도 여러지역에 걸쳐 재배되고 있어, 정확한 통계치를 내기가 어려움

3. 선호 수박타입

- 산둥성 : 진한 과육색, 재포성, 내서성, 수량성 / 안휘성내 중국회사 호생이 리딩
- 광둥성 : 약간 무른 식감, 소과종으로 전환분위기, 당도, 경도, 재포성
- 호북성 : 정보 수집중

4. 애로사항

- 가격 이슈 가장 큼



그림 316 중국 시장 정보조사

*멕시코

1. 수박 주 재배지역

- 할리스코주, 콜리마주, 소노라주, 시날로아주, 치와와주

2. 재배면적(콜리마주)

- Seeded대과종 (200Ha), Seedless중대과종(200Ha), Seedless(180Ha)
- 거래처마다의 지역 집중도가 다르며, 시장정보 공개에 대하여 다소 부정적임.

3. 선호 수박타입

- Seedless 중대과종 (Crimson & Jubilee type / 2~2.5kg / Not elongated)
- Seedless 소과종 (Crimson type/ 7~9kg / Not elongated)
- Seeded 대과종 (Crimson / 10~12kg / Oval)

4. 재배방법

- 50cm x 3m / 평당 약 3주 정식
- Seeded 평균 1Ha = 3,000주 / Seedless(소과종) 평균 1Ha = 10,000주
- Seeded의 경우 Seedless 재배시 수분수로 주로 활용됨.



그림 317 멕시코 시장 정보조사

스페인

1. 수박 주 재배지역

- 알메리아(안달루시아), 무르시아, 발렌시아, 마드리드

2. 재배면적

- 알메리아(4,000Ha), 무르시아(3,300Ha), 발렌시아(1,500Ha), 카스티야라만차(2500Ha)

*2019년도에 비하여 재배면적이 소폭 상승하였을 것이라는 것이 거래처 예측임.

*카스티야라만차 지역은 18년도 폭발적으로 증가하였으나 최근 하락세로 판단됨.

3. 선호 수박타입

- 흑피계와 호피계가 50 : 50을 유지하고 있으나 점차 호피계로 변하고 있는 추세임
- 시장 소비 선호도가 점차 개인소비로 변화함에 따라 중소과종(3~5kg)을 점차 선호하는 추세임.
- 중대과종 씨없는수박 시장(발렌시아)에서는 현재 Boston(노엘)이 선호되고 있으며, 오래된 품종이나 작과 및 재배안정성, 당도 등이 우수하여 현재까지 재배되고 있음.

4. 시장동향

- 지역마다의 차이를 보이고 있으며, 발렌시아 지역이 시설적으로 가장 낙후되어 있어 스페인내 가격경쟁력이 가장 떨어지고 있음.



그림 318 스페인 시장 정보조사

라. 품질관리

(1) 생산관리

(가) 생산 적응성 시험

- ① 2019년 - 2021년 프로젝트 기관과 공동 협력으로 해외 시험생산 진행
- ② 2019년 인도, 태국, 중국내 생산업체와 협의하여 진행되었음. 인도, 태국은 기존 프로젝트 기관에서 관리하는 지역이며, 중국은 신규 생산시험 국가로 GSP 과제 시작 후 관계 형성.
- ③ 2019년 해외 생산 시험재배의 철저한 관리를 위하여 프로젝트 기관과 현지 업체 방문하여 재배현황과 개선사항 논의.
- ④ 2020년 COVID-19 대유행 이후 생산업체 방문이 불가함에 따라, 2019년 프로젝트 기관과 공동 관리된 태국/인도는 프로젝트 기관 자체 관리 및 (주)다나는 중국 생산 재배시험 진행.

(2) 생산 시험 결과

년도	작물	BN	목표	재배면적 (MU)	결과	비고
2019	Watermelon (Seedless)	H1901	7	2	1.8	파종시 저온피해 파종시기 연장검토
2021	Watermelon Seeded)	H2101	100	11.5	13.27	수정시기 장기간 폭우 지속 /생육저해 차년도 재책마련 협의중
	Watermelon (Seedless)	H2102	50	6.6	13.1	

표 115 2019-2021 생산 시험 결과

- ① 2019년 생산 농가의 seedless 수박 재배 경험이 많지 않았으며, 파종 초기 저온으로 인한 정상생육에 지장이 있었음. 그 결과 정상 목표치보다 낮은 결과를 얻었으며, 재시험시 파종기간을 1달 가량 늦추는 것으로 협의되었으며, 재배면적 1mu당 10~12kg를 목표설정 함.
- ② 2021년 시험시기가 늦어 적기 파종이 여의치 않았으며, 7월~9월 사이 중국내 폭우로 인한 수정시기에 어려움이 발생하였음. 수정이후 일조량 부족으로 인한 생육저해 현상이 나타났으며, 그 결과 목표치보다 아주 저조한 결과를 얻었음. 암거시설 등 폭우를 대비한 시설장비는 생산업체쪽에서 갖추고 있으나, 2021년 기록적인 폭우는 일반적이지 않은 사항으로, 방지를 위한 대책마련을 논의하고 있음.



그림 319 2019년 생산업체 방문

(2) 순도/진위검정

- ① 프로젝트 기관과 협의하에 프로젝트 기관 자체진행
- ② 순도검정 : 190개 샘플에 대한 순도검정실시, 품종판별마커 2종을 이용하여 각 모부계를 포함하여 F1 190개의 샘플에 대한 검정 실시
- ③ 진위검정 : 순도검정에 사용되었던 F1 3개에대해서 품종판별마커 25종을 이용하여 검정

		Marker 1	Marker 2	Marker 3	Marker 4	Marker 5	Marker 6	Marker 7	Marker 8	Marker 9	Marker 10	Marker 11	Marker 12	Marker 13	Marker 14	Marker 15	Marker 16	Marker 17	Marker 18	Marker 19
P S 1 7 0	QT83-F	B	B	A	B	A	B	A	A	B	A	B	A	A	A	B	B	B	B	B
P S 1 7 1	QT83-M	B	B	A	B	A	A	A	B	A	A	A	B	B	A	A	A	B	B	A
대상지		B	B	A	B	A	#REF!	A	#REF!	#REF!	A	#REF!	#REF!	#REF!	A	B	#REF!	B	B	#REF!
	QT83-1	B	B	A	B	A	H	A	H	H	A	H	H	H	A	B	H	B	B	H
	QT83-2	B	B	A	B	A	H	A	H	H	A	H	H	H	A	B	H	B	B	H
	QT83-3	B	B	A	B	A	H	A	H	H	A	H	H	H	A	B	H	B	B	H

그림 320 진위검정 예

QT112-2	Marker 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
	Marker 1	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
	Marker 2	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H

QT112-1	Marker 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
	Marker 1	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
	Marker 2	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H

그림 321 순도검정 예시

(3) 병리검정

① BFB test

PCR 조건 및 실험 결과

Primer	ORF12F, 13R
Loading	8ul
Marker	Gene ruler (100ng/ul)
target size	600bp

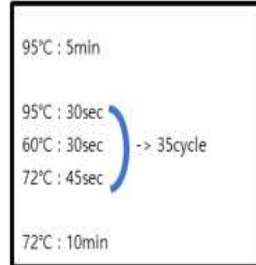
PCR Mix	ul
Total	20
Buf	2
5p Primer(F/R)	2
dNTP	1.6
Ex Taq	0.25
D.W	Up to 20ul
Template	2ul



<- 일반 PCR
ORF 12, 13 primer

Primer	ORF21
Loading	8ul
Marker	Gene ruler (100ng/ul)
target size	140bp

PCR Mix	ul
Total	20
Buf	2
5p Primer(F/R)	2
dNTP	1.6
Ex Taq	0.25
D.W	Up to 20ul
Template	2ul



<- Nested PCR
ORF 21 primer

-P.C (Aac#0 DNA 를 Template 로 사용한 Positive control)

그림 322 PCR조건 및 실험결과

- ㉠ 생산업체에서 전달받은 샘플종자에 대한 병리검정, 약 1만립 실시
- ㉡ 나중자를 PBST buffer를 이용하여 마쇄, 침전후 1/100 과 1/1000희석하여 PCR 진행
- ② Virus test (CGMMV, SqMV, KGMMV, MNSV)
 - ㉠ 프로젝트 기관과 협의하에 프로젝트 기관 자체진행
 - ㉡ RNA 추출 후 RT-PCR 진행

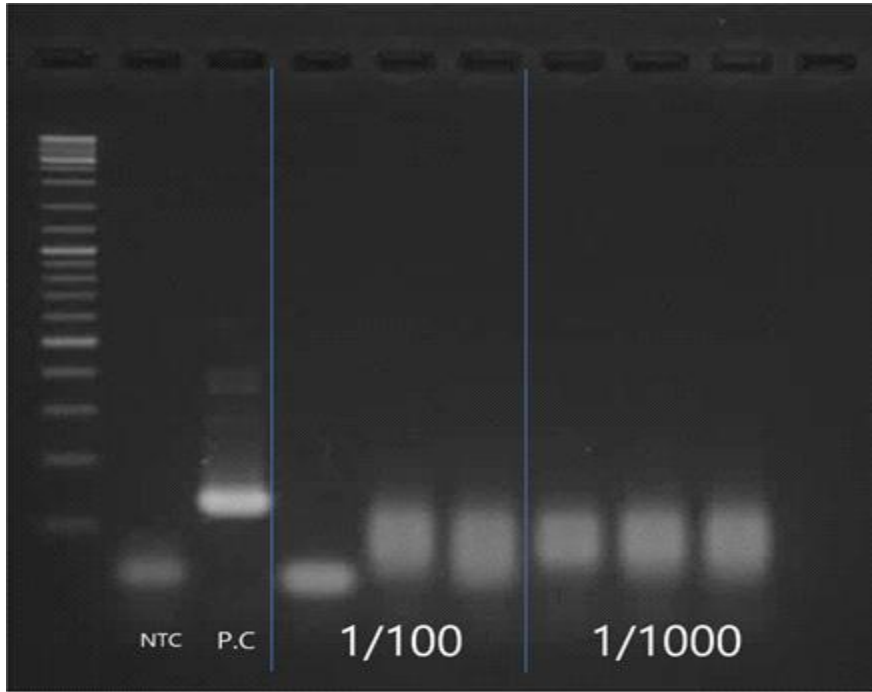


그림 323 BFB test 진행

Multiplex RT-PCR kit
Cucurbit2 (CGMHV+SgMV+KGMHV+MNSV)
 Cat. No. Plutos MX 2662-0096CP (30 reactions) store at : -20℃

Components

1. ZX RT-PCR Master Mixture (Not tag)	96 tube
2. Positive control (Total RNA)	50 ul
3. Protocol	1 copy

Introduction

This Kit is designed to multidetect Cucurbit Viruses(CGMHV+SgMV+KGMHV+MNSV) accurately & fast and valid up to one year at -20℃. Very specific primer sets being included in this kit.

Preparation for RT-PCR

- Pick up three ZX RT-PCR Master Mixture tubes.
- First one for test sample, second for positive control & third for negative control.
- Add 1-5ul of template RNA into the first tube and add 1ul of positive control into the second.
- Then add DEPC DW into each tube until the total reaction volume become just 20ul.
- Mix and spin down prior to thermal cycling.
- Perform PCR reaction as per following thermal cycling program.

RT-PCR Component	Volume (ul)
ZX RT-PCR Master Mix	10
Add Template RNA	to 1 st tube 1-5
Positive Control	to 2 nd tube 1
DEPC DW	to all tubes Max 10
Total reaction volume	Just 20 ul

Please spin down before thermal cycling.

RT reaction	90℃	20 min	1 cycle
Pre-denature	95℃	15 min	1 cycle
Denature	95℃	20 sec	
Annealing	55℃	40 sec	40 cycle
Extension	72℃	60 sec	
Final extension	72℃	5 min	1 cycle

Result <Cucurbit-2> 1/1/1/1

RT-PCR product size : CGMHV 609bp
 SgMV 480bp
 KGMHV 376bp
 MNSV 229bp

그림 324 Virus test 진행

(나) 품질관리 QA 장비/시설 구축

- ① 2019년-2021년 연구과제 진행동안 (주)다나 품질관리 체계 구축을 위한 기본적인 장비 시스템 확충.



그림 325 QA장비/시설 구축

- ② 최소 인력 활용 가능한 범위 안에서 장비 시스템 구축되었으며, 향후 전략적으로 필요에 의한 장비 구입 및 그에 따른 인력충원으로 체계 확립 예정.

구분	직무	내용	장비구축	구축계획
정선	비중정선	저중량 종자 제거		2023
	입자선별	종자 사이즈별 구분		2022
	기형선별	종자 모양불량 구분		2023
	나선선별	엽채류/깨진종자와 이물질 제거		2024
	풍압정선	먼지, 이물질, 가벼운종자 제거	o	2020
	3인산소다처리	종피에 붙어있는 바이러스 제거		2024
	코팅	시각적효과/종자소독		2021
	건조	약품/코팅 이후 종자 수분 제거		2024
	프라이밍	종자 발아세 증대		2025
	건열소독	바이러스 제거		2025
포장	자동 포장기계	조합식 계량기/로터리		2025
	수동 포장기계		o	2020
	셀링/인쇄/프린트		o	2020

표 116 장비구축 계획

구분	직무	인력충원	계획년도
품질검사	종자생리	품질관리 확립이후 진행	2025
	종자병리		

	순도		
품질관리	관리	기준	
	종자기획		
	나중자관리		
	상품입출고		
	정선관리	1명	2022
	포장관리	1명	2023
	사무관리	1명	2023

표 117 인력충원 계획

제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1 절 목표

1. 세부프로젝트별 목표

[제 1세부]

- 가. 고당도, 내병성 씨없는/씨적은/씨작은 신품종 10종 개발 및 2021년 종자수출 300만불 달성
- (1) 복합내병성 고당도 내병성 씨없는 수박 4품종 개발
 - (2) 섭취/가공용이성 높은 씨적은 수박 3품종 개발
 - (3) 복합내병성, 높은 균일성, 고당도 씨작은 수박 3품종 개발

[제 2세부]

- 가. 수박 내병성, 재배 및 섭취편이 형질 분자표지 4점이상 개발 및 MABC 지원체계 확립
- (1) 목표형질 선발용 분자표지 개발
 - (2) 내병성(덩굴마름병, WMV), 생산성 증대(암꽃절성), 섭취용이성(종피색) 분자표지 개발 (4종 이상)
 - (3) 배수성 수박 유전자 dosage 관별 시스템 개발
 - (4) MAB 여교잡용 분자표지 개발
 - (5) 대량샘플자동분석이 가능한 분자표지이용여교잡(MABC) 체계 구축

[제 3세부]

- 가. 씨없는 수박 종자품질 향상 기술 및 표현형 영상 검정 기술 개발
- (1) 씨없는 수박종자 발아 향상 기술 개발 및 서비스
 - (2) 씨없는 수박종자 순도 향상 기술 개발 및 서비스
 - (3) 내한성 수박 품종 개발을 위한 표현형 검정기술 개발
 - (4) 고속대량 표현형 검정시스템 개발구축 및 서비스

[제 4세부]

- 가. 고당도, 내병성 씨없는/씨적은/씨작은 신품종 개발 및 수출
- (1) 국내외 수박 시장개발을 위한 시험포 운영 및 평가
 - (2) 국내외 수박 종자 판매를 위한 영업/마케팅 활동
 - (3) 우량 수박 종자 관리를 위한 품질관리체계 확립

제 2 절 목표달성 여부

[제 1세부]

가. 고당도, 내병성 씨없는/씨적은/씨작은 신품종 10종 개발 및 2021년 종자수출 300만불 달성
GSP 2단계동안 품종개발에 있어 국내 품종보호출원 15건 및 등록 11건의 성과를 달성하였다.
이와 별개로 약 400여개의 우수조합을 선발하여 그중 국외 수출에 나가는 품종또한 별도로
관리중이다. 수출성과에 있어서 기존 목표치는 2021년 종자수출 300만불 달성이었지만 현재
56만6천불을 진행하였다.

[제 1세부]

연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성도
2017	○ 고기능성 수박 계통 및 품종개발	40 %	- 개발 계통 및 목표시장에서의 조합시험 및 시교 활동 - 개발된 품종 수	100%
	○ 수박 종자 수출	60 %	- 수박 종자수출액	100%
2018	○ 북중미용 수박품종 개발	60 %	- 개발 계통 및 목표시장에서의 조합시험 및 시교 활동 - 개발된 품종 수	100%
	○ 수박 종자 수출	40 %	- 수박 종자수출액	100%
2019	○ 북중미용 수박품종 개발	60 %	- 개발 계통 및 목표시장에서의 조합시험 및 시교 활동 - 개발된 품종 수	100%
	○ 수박 종자 수출	40 %	- 수박 종자수출액	100%
2020	○ 북중미용 수박품종 개발	50 %	- 개발 계통 및 목표시장에서의 조합시험 및 시교 활동 - 개발된 품종 수	100%
	○ 수박 종자 수출	50 %	- 수박 종자수출액	100%
2021	○ 북중미용 수박품종 개발	40 %	- 개발 계통 및 목표시장에서의 조합시험 및 시교 활동 - 개발된 품종 수	100%
	○ 수박 종자 수출	60 %	- 수박 종자수출액	100%

[제 2세부]

연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성도
2017	○ 병검정, 저항성지표 개발	20 %	- 덩굴마름병, WMV 진단기술, 병검종환경, 저항성 지표 개발	100%
	○ 핵심육종소재 선발	20 %	- 덩굴마름병 저항성 핵심육종소재 선발 및 분리집단 양성	100%
	○ 유전자마커 개발	20 %	- 흰가루병, 탄저병 유전자 마커 개발시작	100%
	○ 수박 배수성 진단법 개발	20 %	- 배수성 수박 gene dosage 진단법 개발	100%
	○ 분자마커활용 MAB 여교잡	20 %	- ZYMV 저항성 MAS 마커를 활용한 MAB 여교잡 BC2 진전	100%
2018	○ 병저항성 유전분석 및 마커개발	30 %	- WMV 저항성 F2세대 활용 유전분석 및 마커개발 시작	100%
	○ 핵심육종소재 선발, 양성	10 %	- 덩굴마름병 저항성 육종소재 분리집단 양성 진행	100%
	○ 유전자마커 개발	30 %	- 흰가루병, 탄저병 저항성 유전자 판별 및 마커진단 확립	100%
	○ 최근접 연관분자마커 개발	20 %	- ZYMV, 덩굴쪄김병 최근접 연관분자마커 개발 시작	100%
	○ 분자마커활용 MAB 여교잡	10 %	- 분자마커활용 MAB 여교잡 진행	100%
2019	○ 병저항성 MAS 연관마커개발	30 %	- WMV, 덩굴마름병 저항성 MAS 마커 개발	100%
	○ 형질분리집단 유전분석	10 %	- 종피색, 암꽃절성 형질 분리집단 양성 및 유전분석	100%
	○ 유전자마커 개발	30 %	- 흰가루, 탄저병 저항성 유전자 확보 완료	100%
	○ 최근접 연관분자마커 검정	20 %	- ZYMV, 덩굴쪄김병 최근접 연관분자마커 개발 완료	100%
	○ 분자마커활용 MAB 여교잡	10 %	- 분자마커활용 MAB 여교잡 진행	100%
2020	○ 종피색, 암꽃절성 분자마커 개발	30 %	- 종피색, 암꽃절성 분자마커 개발 완료	100%
	○ 병저항성 MAS 마커의 적용성 확대 검정	30 %	- WMV, 덩굴마름병 저항성 MAS 마커의 적용성 확대 검정	100%
	○ 복합내병성 MAB 여교잡 시스템 개발	40 %	- 복합내병성 MAB 여교잡 시스템 개발	100%
2021	○ 복합내병성 MAB 여교잡 시스템 확립	30 %	- MAS 및 MAB 체계 구축을 위한 SNP 정보의 분류 및 통합	100%
	○ F1 순도검정용 시스템 활용 확립	30 %	- F1 순도검정용 시스템 활용 확립	100%
	○ 대량샘플 자동분석용 시스템 활용 확립	40 %	- 육종 단계별 경제적, 효율적인 분자마커 적용이 가능한 분석 플랫폼 활용 및 실용화	100%

[제 3세부]

연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성도
2017	○ 3배체 수박 종자의 비파괴 발아 검정 인자 발굴	60 %	- 3배체 발아검정 인자 2개 이상 발굴	100%
	○ 비파괴 내한성 조기 검출 인자 발굴	40 %	- 표현형 검정 인자 3개 이상 발굴	100%
2018	○ 3배체 수박 종자의 비파괴 순도 검정 인자 발굴	60 %	- 3배체 순도검점 인자 2개 이상 발굴	100%
	○ 내한성 검출용 데이터 베이스 구축	40 %	- 표현형 검정 인자 3개에 대한 데이터 베이스 구축 여부	100%
2019	○ 3배체 종자 순도 및 발아 검정 시스템 개발	40 %	- 시스템 구축 1건	100%
	○ 내한성 검출용 데이터 베이스 구축 및 모델링	30 %	- 내한성 표현형 검정 인자 데이터 베이스 구축 완료여부	100%
	○ 비파괴 내서성 조기 검출 인자 발굴	30 %	- 표현형 검정 인자 3개 이상 발굴	100%
2020	○ 내서성 검출용 데이터 베이스 구축	40 %	- 표현형 검정 인자 3개에 해당하는 데이터 베이스 구축 여부	100%
	○ 내서성 조기 검출용 HTS 개발	60 %	- 시스템 구축 1건	100%
2021	○ 내서성 검출용 데이터 베이스 구축 및 모델링	30 %	- 내서성 표현형 검정 인자 데이터 베이스 구축 완료여부	100%
	○ 내한성, 내서성 통합 조기 검출용 HTS 개발 및 검증	70 %	- 시스템 성능검증 및 서비스 여부	100%

표 121 GSP 2단계 프로젝트 성과

7-block	성과지표	단위	총괄		1차년도		2차년도		3차년도		4차년도		5차년도	
			목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적
제품경쟁력 강화	논문 SCI	건	11	11	1	3	2	3	2	3	3	1	3	1
	논문 비SCI	건	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	분자마커/성분분석/병리검정 기술개발	건	2	14	0	2	1	2	0	3	1	3	0	4
	성분분석 서비스	점	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	분자마커 서비스	점	0	55	0	0	0	0	0	0	0	55	0	0
	병리검정 서비스	점	0	120	0	0	0	0	0	0	0	120	0	0
	배양 서비스	점	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	DH계통 서비스	점	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	DH계통 식물체 유기 서비스	점	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	유전자원등록	점	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	유전자원수집	점	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	DB시스템구축	건	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	DH계통개발	점	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	자원분양	점	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	해외시험포	개소	10	26	1	1	1	1	3	8	1	4	4	12
	국내적응성시험	품종수	0	22	0	0	0	0	0	22	0	0	0	0
	데이터베이스 구축	건	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	프로그램 개발	건	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	조사 분석 보고서	건	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	유효추출물확보 및 전임상 효능규명	건	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
학술대회 발표	건	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

권리 확보	특허출원	건	9	10	1	4	2	1	3	2	3	1	0	2
	특허등록	건	7	11	1	3	1	2	1	1	2	3	2	2
	품종출원	건	10	15	2	3	2	3	2	2	2	4	2	3
	품종등록	건	10	11	1	3	2	2	2	2	2	2	3	2
생산역량 강화	기술실시/이전	건	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	인력양성	명	1	6	0	1	0	0	0	1	1	3	0	1
	생산종자병원체검 정	병원체 수	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
	원종증식	건	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	채종시험생산량검 정	건	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	종자발아율검정	건	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	세대진전시험포	건	15	16	3	3	3	4	3	3	3	3	3	3
	순도검정	건	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
유통경쟁력 강화	생산판매신고	건	5	16	1	2	1	3	1	8	1	2	1	1
	저온저장시설운용	개소	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
홍보역량 강화	홍보물 제작	건	0	2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
	국내외 전시포	개소	4	8	1	1	1	1	1	1	1	5	0	0
	종자교역회 참여	건	1	7	0	0	1	1	0	4	0	1	0	1
	신품종평가회	회	0	3	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
	신품종평가수	품종수	0	3	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
목표고객	판매국가	국가수	0	29	0	0	0	0	0	6	0	10	0	13
	판매업체	업체수	35	50	5	5	6	6	7	14	8	11	9	14
	전시포운영 기업수	기업수	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
매출 및 수출	총자수출액	만불	615	174.36	30	29.45	50	21.88	100	21	135	40.014	300	61.99
	국내매출액	백만원	750	2683.06	50	160.66	100	150.208	150	274.06	200	1006.21	250	1091.91

제 3 절 목표달성 미달성 원인(사유) 및 차후대책

[제 1세부]

1. 미달성 사유

가. 종자 생산공급체계

2,3차년에 급격한 기후변화로 인하여 생산지에서 병해에 의해 예수량에 미치지 못하는 수확이 이루어졌고, 이에 따라 종자품질의 저하로인하여 수출업체에 정상적인 종자공급이 어려운점이 있었다. 병해에 의한 어려움으로 생산업체에서 받은 종자에 대한 품질검정시 병리검정에서 종자감염병원성이 검출되는 경우들이 있고, 이에따라 당사에서는 전량폐기를 하며 주문물량에 대한 공급 시기가 늦어지는 영향이 발생하였다. 이로인하여 수출액이 감소하는추세가있었으며, 파생효과로 추가주문에대한 물량이 적어지는 영향이 있었다. 4차년부터 생산지변경과 병원성소독등의 상품생산에 대한 대응책을 마련하였고, 당사의 예측 수요량에 맞추어 종자공급이 이루어지고 있다.

나. 해외 업체 교류지연

현재까지 당사에서는 해외지점이나, 거점현지법인등이 마련되어있지 않은상태여서, 국제종자박람회 등 해외 업체들과의 직접적인 만남을 통한 거래의 기회가 매우 절실한 상황이다. 2019년이후 코로나상황으로인하여 전 세계적으로 직접적인 교류가 단절됨에따라 기존 업체와의 소통도 늦어짐과 더불어 신규업체발굴에는 더더욱 힘이들게되어 기존 GSP프로젝트 시작점에서 예상수치보다 낮은 실적을 달성하였다.

다. 중국 종자시장 단가

과거와 현재까지 전세계 수박종자시장에서 가장큰 규모를 차지하고있는 중국시장의 단가가 현저히 낮아짐에따라 품종개발과 생산 비용을 고려하였을 때 저소득시장으로 분류되며, 중국내수시장의 경우 각국의 종자회사간 극심한 경쟁과 품종의 유출과 같은 위험요소가 커짐에따라 중국시장 판매규모를 축소하였다. 이에따라 주된 목표시장을 변환하는 시점을 맞이하며 전체적인 수출액 증대의 가속화가 늦춰졌다.

2. 차후대책

가. 종자 품질관리 및 생산지관리

2021년 하반기부터 세계적으로 봉쇄되었던 국경이 풀리고있는 추세이고, 이에따라 당사에서도 현지 생산지 채종포점검을 실시하였다. 현지 생산상황에대해 직접적인 상황판단을 통하여 종자주문업체에대한 빠른 피드백이 가능해지고있고, 4차년도부터 병리검정에 대한 평가방법의 기준점확립등을 통하여 보다 고도화된 방법으로 품질관리를 진행할 수 있게되었다. 차후 발생할 수 있는 병원성에 대한 기보고된자료와 현장상황 데이터를 축적하여 병리검정 또는 신규 우수채종지선정으로 정상적인 종자공급체계를 갖출예정이다.

나. 해외업체 교역

각국의 국경은 점차열리고있지만 많은 업체가 참가하여 교류할 수 있는 교역회등에 대한 제한은 여전하기 때문에, 차선책으로 당사에서는 코트라연계 해외 신규바이어 발굴에 나서고 있다. 해외바이어 상담 및 수출관련업무는 4세부프로젝트에서 전담하여 진행하고 있으며, 신규업체와의 화상회의를 통해 시교사업을 우선적으로 진행하고있으며, 국제정세가 나아지면 해외 바이어초청 및 필드데이등 행사를 진행할 예정이다.

다. 고부가가치 시장 확보

중국을 포함한 동남아시아 지역에서 주로 진행되었던 과거 종자수출목표시장이 GSP 2 단계를 진행하며 스페인, 호주, 미국, 네덜란드,일본과 같은 선진국가에 고부가가치 시장으로의 전환을 맞이하였다. 스페인의 경우 1차년도 11만불에서 5차년도 37만불 수출로 3 배이상 증가하는 추세이며, 변화에 반응이 느린 일본의 경우에도 1차년 대비 3배이상의 수출증대가 이루어지고 있다. 당사에서는 박리다매의 비슷한 품종이 많은 저가시장에서의 불필요한 경쟁보다 경제적으로 가치가 뛰어난 유용형질이 도입된 품종의 개발을 통해 고부가가치 수박 시장에서 점유율 확대를 목표로 종자시장 개척을 진행할 예정이다.

[제 3세부]

1. 미달성 사유

가. 본 연구는 씨없는 수박에 대한 순도 및 발아선별, 내한성 표현형검정 및 고속표현형검정 장치플랫폼 개발 등 국내에서 미흡한 원천기술개발확보를 위한 연구개발임. 기초연구의 확립부터 실용화단계까지 전체를 구성하는 과제의 성격상 기초연구에 해당하는 SCI 논문 성과는 200%에 달함

2. 차후대책

가. 특허출원 및 등록의 경우는 최초 과제구성단계에서 선별을 위한 분류모델 알고리즘 개발을 머신러닝 방식의 분석 성능이 낮아 출원이 지연이 되었음. 최신 딥러닝 기술을 활용한 우수결과를 보완하여 특허 성과를 달성할 예정임

[제 4세부]

1. 미달성 사유

가. 당사는 목표들중 매출 및 수출분야에서 목표를 달성하지 못하였음.

나. 상업화를 위한 기본단계는 1차시험 -> 2차 확대시험/준상업화 -> 3차 상업화이며, 각 단계마다 최소 1년의 시간이 소비됨.

다. 당사는 GSP 제4세부 프로젝트 과제를 수행함에 있어, 당사와 관계를 맺고있는 해외 거래처를 대상으로 국내 육성 수박 개발이 가능할 것으로 초기 판단하였음.

라. 2019년 첫 수박 해외시교를 국가별 거래처에 공시하고, 해외 거래처와 협력하여 해외 시험포를 운영하였으나, 국가별 시장요구도를 만족하는 조합을 선별할 수 없었으나 시험한 국가들의 시장요구도 흐름을 대략적으로 파악할 수 있었음.

마. 2020년 중국내 일반 2배체 CT008의 상업화가 확정되었으나, 중국 수박 수출시 가격협상에 있어 저가를 요구하여 난항이 많았음. 가격협상 이후 수출이 이루어지고 2020년 대비 2021년 수출량이 7배 증가하였으나, 수출단가가 저렴하기에 목표치에 만족하는 결과를 낼수 없었음. 3배체인 CT008에 대하여 상업화가 협의중인 과정에 있으나 생산이 까다로워 종자 수급에 어려움이 있어 크게 확대되지 못하였음.

바. 중국 외 국가들의 경우도 매출을 발생시킬 수 있는 여력이 충분치 못하였음. 현재 2022년-2023년 결과에 따라 매출을 발생시킬 수 있는 잠재 국가는 중국을 제외하고 그리스, 러시아, 콜롬비아 등임. 2019년-2020년 2년간 국가별 시험 진행시 전반적으로 우수한 작황을 보였다고 여겨지나, 상업화 이전 마지막 단가협상에서 이견이 보이는 경우가 많아 상업화가 적극적으로 이루어지지 못하였음. 2021년 신규 거래처 발굴을 통한 시험사업은 가격에 대한 선협상을 우선으로 하여 진행된바, 2022년 결과에 따라 수출이 가능할 것으로 판단되나, 과제 기간내에는 달성하기에는 무리가 있음.

사. 거래처와 협력한 해외시험포 운영은 양사간의 신뢰관계속에서 이루어짐. 해외영업/마케팅의 거래처와의 관계유지는 교신도 중요하나, 현지 방문을 통한 공동 작황조사 또한 신뢰 형성에 있어 중요한 역할을 차지함. 2020년 COVID-19 대유행으로 인한 해외출장이 불가능해짐에 따라, 기존 거래처와의 관계유지가 여의치 않았으며, 미응답 거래처들이

더러 발생하였음. 2021년 차선책으로 KOTRA를 통한 해외 신규거래처와의 접촉을 하여 현재 시험재배 진행중에 있으나, 관계 형성이 제대로 이루어지지 않은 상황에서 시험재배와 상업화 두 가지를 동시에 이행하기에는 무리가 있었음.

아. 상기 예시와 상황 설명을 종합하면 품종에 대한 검증은 어느정도 성공적으로 진행되었으나 총체적으로 개발기간 부족과 함께 우리나라 종자가 저렴하다는 인식이 해외 거래처측에 만연해 있어 상업화 협상이 실패하는 경우가 많아 GSP 부여 목표를 달성하기가 여의치 않았음.

2. 차후대책(후속연구의 필요성)

가. 2019년-2021년 2년 9개월이라는 기간동안 국가별 시험재배가 이루어지면서, 개발방향에 대한 기준을 적립할 수 있었음.

나. GSP 종료 이후에도 현재 시험재배중인 국가와 상업화 예정인 국가를 중심으로하여, 시험재배 및 상업화 논의를 계속해서 이어나갈 예정이며, 상기 언급했던 상업화 가능성이 있는 국가들의 2022년 결과가 만족스러울 시, 종자 수출 활성화가 이루어질 것으로 판단됨.

다. COVID-19 백신 접종으로, 차년도부터는 해외출장 및 해외바이어 초청이 가능할 것으로 기대하고 있으며, 이는 거래처 관계 개선과 현지 작황조사를 통한 보다 정확한 데이터를 수집하는데 큰 역할을 할것으로 판단됨.

라. GSP를 통한 시행착오는 기간이 경과함에 따라 줄어들것으로 생각되며, 프로젝트 기관과의 더욱 더 긴밀한 협력을 통하여 시장 요구도의 오차범위를 줄여나갈 예정임.

마. 전 세계 수박종자시장은 거대하며, GSP 연구과제 진행을 통하여 가능성을 발견하고 결과를 창출하기 위하여 지속적으로 노력하고 있으므로 후속 개발은 필수적으로 필요함.

제 4 장 연구결과의 활용 계획 등

[제 1세부]

가. 분자표지기반의 육종플랫폼 구축

- 신규분자표지 개발을 위하여 재배자/소비자의 요구 형질에 대한 수요 파악 실시 예정
- 마커개발을 위하여 파트너종묘/대학교/공기관 기관특성에 따른 개발협업진행
- 파트너종묘에서 자원증식/집단작성등의 실증연구를 통해 재료 공급
- 대학/공기관에서 각 형질에따른 유전형/표현형 분석계획수립
- 개발된 분자표지를 이용하여 차세대 육종플랫폼 구축을 진행할 계획
- 분석된 계통들의 염기서열 정보를 디지털데이터화 시켜 육종에 활용할 계획

나. 소과종 고부가가치 신규 시장 형성

- 세계 수박시장소비 트렌드에 맞춰 개발된 품종들의 형질들을 이용하여 소과종품종 개발연구 예정
- 실증시험의 결과물과 시험농가 및 국가에서의 피드백은 향후 개선되어야 할 육성 및 마케팅 방향을 설정하는데 활용

다. 주요 해외시장 참여자들과 전략적 제휴

- 국제종자교역회 참석 등을 통하여 거래가진행되고있는 업체들을 거점으로 신규 해외시장 발굴 예정
- 영업/마케팅 활동은 국내외 수박시장의 판매촉진과 기업 이미지 상승을 위한 자료로 활용

라. 연구결과의 기대효과

- 국내 수박이 세계최고수준의 고품질화 및 국제화, 국내 및 해외 수박시장의 다양화
- 분자마커 등 유전체수준의 디지털육종분야의 확대 및 고차원화
- 고기능성 수박 품종 과정을 통한 국내외 기능성 수박 시장의 확대 및 시장점유
- 수박 식품 가공산업의 증진 및 소비자 요구도에 충족하는 상품으로 경제 활성화
- 고기능성 및 내병성 품종개발 과정을 통한 우수한 육종인력 양성
- 개발된 신품종을 국내외 시장에 개발함으로써, 국내의 경우 수박 재배 품종 확대를 통한 전문 수박재배 농가들이 선택할 수 있는 품종 다양성의 확보와 더 좋은 품질을 소비할 수 있는 최종 소비자들의 선택의 폭을 넓힐 수 있을 것이며, 국외로는 국내개발 품종의 경쟁력 확보와 더불어 국내 종자 산업의 위상을 재고 시킬 것으로 기대

[제 2세부]

가. 수박 복합내병성을 위한 분자마커중 유전자 근접마커로 개발된 흰가루병, 탄저병, ZYMV 저항성 SNP 마커 및 QTL분석을 통해 개발된 주동유전자 연관마커인 덩굴쪄김병, 덩굴마름병, WMV2를 활용하여 1세부과제는 MAB 및 MABC 신규 육종소재를 개발하고 있음.

나. 수박 종피색 연관마커는 상업용 수박의 섭취용이성을 증대할 수 있는 적색 종피색의 씨작은 과실생산용 목표형질을 위하여 1세부과제에서 MAB용 육종소재 개발에 활용될 예정임.

다. 수박 수분/수정시기의 탄력성을 증가시켜 최종적으로 생산성 증대를 야기할 수 있는 암꽃 개화 간격의 단축에 관련한 육종소재는 1세부과제에서 개발완료 하였으며, 본 과제에서 개발된 연관마커는 향후 MAB를 통한 품종개발에 활용될 예정임.

라. 본 과제에서 개발된 다양한 내병성, 종피색, 암꽃 절성(개화간격 단축) 형질에 대한 연관마커들은 현재 1세부과제의 대량샘플자동분석이 가능한 분자표지이용교잡(MAB)에 활용되어

육종소재 개발이 이루어지고 있으며, 향후 신품종 개발에도 적극적인 활용이 가능할 것으로 판단됨.

[제 3세부]

- 가. 3배체 수박종자 순도 및 발아 선별기술: 자체기술 활용을 통한 분석서비스 제공, 노하우 기술이전
- 나. 수박작물 저온 스트레스 진단기술: 노하우 기술이전 및 제품화
- 다. 채소작물 HTS시스템 장치기술: 노하우 기술이전 및 제품화

[제 4세부]

- 가. 본 과제를 통하여 진행된 시험재배 결과는 앞으로 진행될 시교사업에 있어 국가별 시교 선발의 지표로 활용될 것임.
- 나. 본 과제를 통하여 수집된 모든 정보는 앞으로 해외 마케팅/영업에 있어 신규 거래처 발굴, 기존 거래처와의 신뢰관계 강화에 활용될 것임.
- 다. 본 과제를 통한 결과는 향후 마케팅/영업 전략수립에 있어 기본 바탕으로 작용할 것이며 매출증대의 기본 자료로서 활용할 것임.
- 라. 추후 프로젝트 기관과 협업을 더욱 강화하여 품질관리 체계 등을 지속 발전시켜나갈 예정이며, 구축된 프로세스를 바탕으로 향후 생산되는 수박 종자에도 적용시키고자 함.

붙임. 참고문헌

[제 2세부]

1. Hartley, R. I. (1992). Estimation of relative camera positions for uncalibrated cameras. Paper presented at the European conference on computer vision.
2. Hayata, Y., Niimi, Y., & Iwasaki, N. J. J. o. t. A. S. f. H. S. (1995). Synthetic cytokinin-1-(2-chloro-4-pyridyl)-3-phenylurea (CPPU)-promotes fruit set and induces parthenocarpy in watermelon.120(6), 997-1000.
3. Ji Hyun Lee et al.,(2016) Development of an Efficient Screening System for Resistance of Watermelon plants to *Didymella bryoniae*, Res. Plant Dis.
Gabriele Gusmini et al.,(2005) New Sources of Resistnace to Gummy Stem Blight in Watermelon, Crop sic.
4. Kanda, T. J. J. G. (1931). The inheritance of seed-coat coloring in the watermelon.7, 30-48.
5. Li, B., Lu, X., Gebremeskel, H., Zhao, S., He, N., Yuan, P., . . . Liu, W. J. F. i. P. S. (2019). Genetic mapping and discovery of the candidate gene for black seed coat color in watermelon (*Citrullus lanatus*).10, 1689.
6. Łopusiewicz, Ł. J. H. P. (2018). Antioxidant, antibacterial properties and the light barrier assessment of raw and purified melanins isolated from *Citrullus lanatus* (watermelon) seeds.64(2), 25-36.
7. Maina, F. N., Nyam3bura, K. J. A. J. o. T., Education, V., & Training. (2018). Effect of seed coat colour on the seed quality of water melon (*Citrullus Lanatus*).3(1), 195-201.
Marr, C. W., & Gast, K. L. J. H. (1991). Reactions by consumers in a farmers' market to prices for seedless watermelon and ratings of eating quality.1(1), 105-106.
Mavi, K. J. H. S. (2010). The relationship between seed coat color and seed quality in watermelon Crimson sweet.37(2), 62-69.
8. McKay, J. J. J. o. H. (1936). Factor interaction in *Citrullus*: Seed-coat color, fruit shape and markings show evidence of mendelian inheritance in watermelon crosses.27(3), 110-112.
Nerson, H., Paris, H., Karchi, Z., & Sachs, M. J. H. (1985). Seed treatments for improved germination of tetraploid watermelon.20(5), 897-899.
9. NeSmith, D. S., & Duval, J. R. J. H. (2001). Fruit set of triploid watermelons as a function of distance from a diploid pollinizer.36(1), 60-61.
10. Paudel, L., Clevenger, J. P., & McGregor, C. J. F. i. p. s. (2019). Chromosomal locations and interactions of four loci associated with seed coat color in watermelon.10, 788.
11. Poole, C. F. J. J. A. R. (1941). Inheritance of seed characters in watermelon.63, 433-456.
SUGIYAMA, K., & MORISHITA, M. J. J. A. R. Q. J. (2002). New method of producing diploid seedless watermelon fruit.36(3), 177-182.
12. Sugiyama, K., & Morishita, M. J. J. o. t. J. S. f. H. S. (2000). Fruit and seed characteristics of diploid seedless watermelon (*Citrullus lanatas*) cultivars produced by soft-X-irradiated

pollen.69(6), 684-689.

13. Weetman, L. M. J. I. A. E. S. R. B. (1937). Inheritance and correlation of shape size, and color in the watermelon.228, 222-256.
14. Xiaoli, Y., Jiana, L., Zhanglin, T., Ying, L., & Li, C. J. Z. w. x. b. (2001). Study on seedcoat color and related characters of Brassica napus.27(5), 550-556.
15. Xiaoli, Y., Xuegang, L., & Jiana, L. J. Z. w. x. b. (2002). Mechanism of melanin synthesis in seed coat of Brassica napus L.28(5), 638-643.
16. Yan, W., Xuehui, L., MaoSu, L., & Rong, Y. P. R. J. A. L. (1996). Study on the structure of several natural melanins by FTIR spectrometer.6(6), 10.13595.
17. Ye, X., Li, J., Tang, Z., & Chen, L. (2001). Dynamic studies on difference of seedcoat pigments and related characters between black-seeded and yellow-seeded rapeseed lines (Brassica napus L.) in the developmental stages of embryo.Paper presented at the Proceedings international symposium on rapeseed science.
18. Zhang, X., Yang, G., Chen, L., Yin, J., Tang, Z., Li, J. J. S. S., & Technology. (2006). Physiological differences between yellow-seeded and black-seeded rapeseed (Brassica napus L.) with different testa characteristics during artificial ageing.34(2), 373-381.
19. Zheng, X., Li, X., Xu, Y. J. S. B., Development, & Ecology. (2007). The effect of hydropriming on germination barriers of triploid watermelon seeds. 269-440.
20. 동부한농. (2004). 2005년 수박 품종안내 상보.

[제 3세부]

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations The Future of Food and Agriculture. *Food Agric. Organ. United Nations* **2017**, 1-52.
2. Urban, D.; Roberts, M.J.; Schlenker, W.; Lobell, D.B. Projected temperature changes indicate significant increase in interannual variability of U.S. maize yields: A Letter. *Clim. Change* **2012**, *112*, 525-533, doi:10.1007/s10584-012-0428-2.
3. Ray, D.K.; Mueller, N.D.; West, P.C.; Foley, J.A. Yield Trends Are Insufficient to Double Global Crop Production by 2050. *PLoS One* **2013**, *8*, doi:10.1371/journal.pone.0066428.
4. Granier, C.; Aguirrezabal, L.; Chenu, K.; Cookson, S.J.; Dauzat, M.; Hamard, P.; Thioux, J.J.; Rolland, G.; Bouchier-Combaud, S.; Lebaudy, A.; et al. PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit. *New Phytol.* **2006**, *169*, 623-635, doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01609.x.
5. Walter, A.; Scharr, H.; Gilmer, F.; Zierer, R.; Nagel, K.A.; Ernst, M.; Wiese, A.; Virnich, O.; Christ, M.M.; Uhlig, B.; et al. Dynamics of seedling growth acclimation towards altered light conditions can be quantified via GROWSCREEN: A setup and procedure designed for rapid optical phenotyping of different plant species. *New Phytol.* **2007**, *174*, 447-455, doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02002.x.
6. Ha, S.; Tae, S.; Kim, R. A study on the limitations of South Korea's national roadmap for greenhouse gas reduction by 2030 and suggestions for improvement. *Sustain.* **2019**, *11*, doi:10.3390/su11143969.
7. Mishra, S.B.; Verma, A.; Mukerjee, A.; Vijayakumar, M. Pharmacognostic standardization and phytochemical screening of leaves of *Amaranthus spinosus* L. *Pharmacogn. J.* **2011**, *3*, 34-38, doi:10.5530/pj.2011.26.6.
8. Kozai, T.; Niu, G.; Takagaki, M. *Plant factory: An indoor vertical farming system for efficient quality food production: Second edition*, 2019; ISBN 9780128166918.
9. Park, E.; Kim, Y.S.; Omari, M.K.; Suh, H.K.; Faqeerzada, M.A.; Kim, M.S.; Baek, I.; Cho, B.K. High-throughput phenotyping approach for the evaluation of heat stress in Korean ginseng (*Panax ginseng* Meyer) using a hyperspectral reflectance image. *Sensors* **2021**, *21*, doi:10.3390/s21165634.
10. Charrière, R.; Hébert, M.; Trémeau, A.; Destouches, N. Color calibration of an RGB camera mounted in front of a microscope with strong color distortion. *Appl. Opt.* **2013**, *52*, 5262-5271, doi:10.1364/AO.52.005262.
11. Laureano, G.T.; de Paiva, M.S.V.; da Silva Soares, A.; Coelho, C.J. A topological approach for detection of chessboard patterns for camera calibration. *Emerg. Trends Image Process. Comput. Vis. Pattern Recognit.* **2015**, 517-531, doi:10.1016/B978-0-12-802045-6.00034-X.
12. Schmidt, J.; Marques, M.R.G.; Botti, S.; Marques, M.A.L. Recent advances and applications of machine learning in solid-state materials science. *npj Comput. Mater.* **2019**, *5*, doi:10.1038/s41524-019-0221-0.
13. Mahajan, S.; Raina, A.; Gao, X.Z.; Pandit, A.K. Plant recognition using morphological feature extraction and transfer learning over SVM and Adaboost. *Symmetry (Basel)*. **2021**, *13*, 1-16, doi:10.3390/sym13020356.
14. Choudhary, B.; Pandey, S.; Singh, P. Morphological diversity analysis among watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb) Mansf.) genotypes. *Progress. Hortic.* **2012**, *44*, 321-326.
15. Xu, Y.; Chu, C.; Yao, S. The impact of high-temperature stress on rice: Challenges and solutions. *Crop J.* **2021**, *9*, 963-976, doi:10.1016/j.cj.2021.02.011.
16. Kumar, G.; Bhatia, P.K. A detailed review of feature extraction in image processing systems. *Int. Conf. Adv. Comput. Commun. Technol. ACCT* **2014**, 5-12, doi:10.1109/ACCT.2014.74.
17. Sali, T.S.; Sonal, G. A review of feature extraction techniques BTC, DCT, Walsh and PCA with FDM and BDM for face recognition. *2013 Int. Conf. Green High Perform. Comput. ICGHPC 2013* **2013**, doi:10.1109/ICGHPC.2013.6533908.
18. Persoon, E. Discrimination Using Fourier Descriptors. *Analysis* **1986**.
19. Kumar, A.; Pang, G.K.H. Defect detection in textured materials using optimized filters. *IEEE Trans.*

Syst. Man, Cybern. Part B Cybern. **2002**, *32*, 553–570, doi:10.1109/TSMCB.2002.1033176.

20. Kavitha, J.C.; Suruliandi, A. Texture and color feature extraction for classification of melanoma using SVM. *2016 Int. Conf. Comput. Technol. Intell. Data Eng. ICCTIDE 2016* **2016**, doi:10.1109/ICCTIDE.2016.7725347.
21. Mingqi, Y.; Kidiyo, K.; Joseph, R. *A Survey of Shape Feature Extraction Techniques*, 2008; ISBN 9789537619244.
22. Ojala, T.; Pietikäinen, M.; Mäenpää, T. Multiresolution gray-scale and rotation invariant texture classification with local binary patterns. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* **2002**, *24*, 971–987, doi:10.1109/TPAMI.2002.1017623.
23. Rahman, A.; Park, E.; Bae, H.; Cho, B.-K. Hyperspectral imaging technique to evaluate the firmness and the sweetness index of tomatoes. *Korean J. Agric. Sci.* **2018**, *45*, 823–837, doi:10.7744/kjoas.20180075.
24. Faqeerzada, M.A.; Perez, M.; Lohumi, S.; Lee, H.; Kim, G.; Wakholi, C.; Joshi, R.; Cho, B.K. Online application of a hyperspectral imaging system for the sorting of adulterated almonds. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 1–16, doi:10.3390/APP10186569.
25. Rahman, A.; Lee, H.; Kim, M.S.; Cho, B.K. Mapping the Pungency of Green Pepper Using Hyperspectral Imaging. *Food Anal. Methods* **2018**, *11*, 3042–3052, doi:10.1007/s12161-018-1275-1.
26. Siedliska, A.; Baranowski, P.; Mazurek, W. Classification models of bruise and cultivar detection on the basis of hyperspectral imaging data. *Comput. Electron. Agric.* **2014**, *106*, 66–74, doi:10.1016/j.compag.2014.05.012.
27. Noah, L.; Robert, P.; Millar, S.; Champ, M. Near-Infrared Spectroscopy As Applied to Starch Analysis of Digestive Contents. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2593–2597, doi:10.1021/jf960891n.
28. Latorre, C.H.; Crecente, R.M.P.; Martín, S.G.; García, J.B. A fast chemometric procedure based on NIR data for authentication of honey with protected geographical indication. *Food Chem.* **2013**, *141*, 3559–3565, doi:10.1016/j.foodchem.2013.06.022.
29. Hennessy, A.; Clarke, K.; Lewis, M. 植物高光谱分类:波段选择泛化研究综述. *Remote Sens.* **2020**, *12*, 113.
30. Melandri, G.; Thorp, K.R.; Broeckling, C.; Thompson, A.L.; Hinze, L.; Pauli, D. Assessing Drought and Heat Stress-Induced Changes in the Cotton Leaf Metabolome and Their Relationship With Hyperspectral Reflectance. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 1–19, doi:10.3389/fpls.2021.751868.
31. Zhang, Q.; Li, Q.; Zhang, G. Rapid determination of leaf water content using VIS/NIR spectroscopy analysis with wavelength selection. *Spectrosc. (New York)* **2012**, *27*, 93–105, doi:10.1155/2012/276795.
32. Borraz-Martínez, S.; Simó, J.; Gras, A.; Mestre, M.; Boqué, R. Multivariate Classification of Prunus Dulcis Varieties using Leaves of Nursery Plants and Near Infrared Spectroscopy. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–9, doi:10.1038/s41598-019-56274-5.
33. Alzubaidi, L.; Zhang, J.; Humaidi, A.J.; Al-Dujaili, A.; Duan, Y.; Al-Shamma, O.; Santamaría, J.; Fadhel, M.A.; Al-Amidie, M.; Farhan, L. *Review of deep learning: concepts, CNN architectures, challenges, applications, future directions*, Springer International Publishing, 2021; Vol. 8; ISBN 4053702100444.
34. Farizawani, A.G.; Puteh, M.; Marina, Y.; Rivaie, A. A review of artificial neural network learning rule based on multiple variant of conjugate gradient approaches. *J. Phys. Conf. Ser.* **2020**, *1529*, doi:10.1088/1742-6596/1529/2/022040.
35. Glaser, Y.M. Densely Connected Convolutional Neural Networks for Natural Language Processing Densely Connected Convolutional Networks for. **2018**.
36. Handalage, U.; Kuganandamurthy, L. Real-Time Object Detection using YOLO: A review. **2021**, doi:10.13140/RG.2.2.24367.66723.
37. Weng, W.; Zhu, X. INet: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation. *IEEE Access* **2021**, *9*, 16591–16603, doi:10.1109/ACCESS.2021.3053408.
38. Toldo, R. Towards automatic acquisition of high-level 3D models from images. **2013**, 141.
39. Pudil, P.; Novovičová, J.; Kittler, J. Floating search methods in feature selection. *Pattern Recognit. Lett.* **1994**, *15*, 1119–1125, doi:10.1016/0167-8655(94)90127-9.
40. Lee, M. Consensus of Non-Rigid Reconstructions. 4670–4678.

41. Aich, S.; Stavness, I. Leaf counting with deep convolutional and deconvolutional networks. *Proc. - 2017 IEEE Int. Conf. Comput. Vis. Work. ICCVW 2017* **2017**, 2018-January, 2080–2089, doi:10.1109/ICCVW.2017.244.
42. Korkmaz, A.; Dufault, R.J. Developmental consequences of cold temperature stress at transplanting on seedling and field growth and yield. II. Muskmelon. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2001**, *126*, 410–413, doi:10.21273/jashs.126.4.410.
43. M. Adhikari, D.R. Yadav, S.W. Kim, Y.H. Um, H.S. Kim, S.C. Lee, J.Y. Song, H.G. Kim, Y.S. Lee, Biological control of bacterial fruit blotch of watermelon pathogen (*Acidovorax citrulli*) with Rhizosphere associated bacteria, *Plant Pathol. J.* **33** (2017) 170–183. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.09.2016.0187>.
44. K.J. Lee, J.R. Lee, R. Sebastin, M.J. Shin, S.H. Kim, G.T. Cho, D.Y. Hyun, Genetic diversity assessed by genotyping by sequencing (GBS) in watermelon germplasm, *Genes* (Basel). **10** (2019) 822. <https://doi.org/10.3390/genes10100822>.
45. Y.-S. Huh, E.-J. Kim, S.-J. Noh, Y.-M. Jeon, S.-W. Park, G.-S. Yun, T.-I. Kim, Y.-H. Kim, Characteristics of Growth, Yield, and Physiological Responses of Small-Sized Watermelons to Different Soil Moisture Contents Affected by Irrigation Starting Point in a Plastic Greenhouse, *Prot. Hortic. Plant Fact.* **29** (2020) 388–398. <https://doi.org/10.12791/ksbec.2020.29.4.388>.
46. A.D. Assefa, O.S. Hur, N.Y. Ro, J.E. Lee, A.J. Hwang, B.S. Kim, J.H. Rhee, J.Y. Yi, J.H. Kim, H.S. Lee, J.S. Sung, M.K. Kim, J.J. Noh, Fruit morphology, citrulline, and arginine levels in diverse watermelon (*Citrullus lanatus*) germplasm collections article, *Plants*. **9** (2020) 1–16. <https://doi.org/10.3390/plants9091054>.
47. J. Yasmin, M.R. Ahmed, S. Lohumi, C. Wakholi, M.S. Kim, B.K. Cho, Classification method for viability screening of naturally aged watermelon seeds using FT-NIR spectroscopy, *Sensors* (Switzerland). **19** (2019). <https://doi.org/10.3390/s19051190>.
48. C.F. Andrus, V.S. Seshadri, P.C. Grimbball, PRODUCTION OF SEEDLESS WATERMELONS, 1971. https://books.google.co.kr/books?hl=en&lr=&id=Y6UoAAAAYAAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=triploid+watermelon+production&ots=pHvVonLiiJ&sig=tFqqQ3XveoIZ_zIzX0dQprFdmSg#v=onepage&q=triploid+watermelon+production&f=false (accessed October 23, 2019).
49. B.Y.V.L. Chopra, M.S. Swaminathan, F.A. Sc, in *Watermelon*, (1959).
50. P. Phat, S. Sheikh, J.H. Lim, T.B. Kim, M.H. Seong, H.G. Chon, Y.K. Shin, Y.J. Song, J. Noh, Enhancement of seed germination and uniformity in triploid watermelon (*Citrullus lanatus* (thunb.) Matsum. and Nakai), *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* **33** (2015) 932–940. <https://doi.org/10.7235/hort.2015.14193>.
51. .L. Grange, D.I. Leskovar, L.M. Pike, B.G. Cobb, Excess moisture and seedcoat nicking influence germination of triploid watermelon, *HortScience*. **35** (2000) 1355–1356. <https://doi.org/10.21273/hortsci.35.7.1355>.
52. H. NERSON, H. PARIS, Z. KARCHI, M. SACHS, Seed treatments for improved germination of tetraploid watermelon, *Hortscience*. **20** (1985) 897–899. <https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=8433390> (accessed January 15, 2021).
53. LIU Peng, LIU Wengge, ZHAO Shengjie, YAN Zhihong, HE Nan, LU Xuqiang, Comparison of Seedcoat Structure Between Different Ploidy Watermelons, (2010). https://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTTotal-CJSC201008009.htm (accessed April 13, 2021).
54. D.N. and others Maynard, *Watermelons: characteristics, production, and marketing.*, SHS Press. (2001). <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20023058252> (accessed January 15, 2021).
55. S. Grange, D.I. Leskovar, L.M. Pike, B.G. Cobb, Seedcoat structure and oxygen-enhanced environments affect germination of triploid watermelon, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **128** (2003) 253–259. <https://doi.org/10.21273/jashs.128.2.0253>.
56. X. Lu, Y.M.N. Adedze, G.N. Chofong, M. Gandeka, Z. Deng, L. Teng, X. Zhang, G. Sun, L. Si, W. Li, Identification of high-efficiency SSR markers for assessing watermelon genetic purity, *J. Genet.* **97** (2018) 1295–1306. <https://doi.org/10.1007/s12041-018-1027-4>.
57. A. Rahman, B.K. Cho, Assessment of seed quality using non-destructive measurement techniques: A review, *Seed Sci. Res.* **26** (2016) 285–305. <https://doi.org/10.1017/S0960258516000234>.
58. M.M. Sofu, O. Er, M.C. Kayacan, B. Cetişli, Design of an automatic apple sorting system using machine vision, *Comput. Electron. Agric.* **127** (2016) 395–405. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2016.06.030>.

59. S. Jeong, Y.M. Lee, S. Lee, Development of an automatic sorting system for fresh ginsengs by image processing techniques, *Human-Centric Comput. Inf. Sci.* 7 (2017) 41. <https://doi.org/10.1186/s13673-017-0122-5>.
60. M.C. Pasikatan, F.E. Dowell, Sorting systems based on optical methods for detecting and removing seeds infested internally by insects or fungi: A review, *Appl. Spectrosc. Rev.* 36 (2001) 399–416. <https://doi.org/10.1081/ASR-100107719>.
61. T. Pearson, Machine vision system for automated detection of stained pistachio nuts, *LWT - Food Sci. Technol.* 29 (1996) 203–209. <https://doi.org/10.1006/fstl.1996.0030>.
62. A. Vibhute, S. K. Bodhe, Applications of Image Processing in Agriculture: A Survey, *Int. J. Comput. Appl.* 52 (2012) 34–40. <https://doi.org/10.5120/8176-1495>.
63. M. Bukovec, Ž. Špiclin, F. Pernu, B. Likar, Automated visual inspection of imprinted pharmaceutical tablets, *Meas. Sci. Technol.* 18 (2007) 2921–2930. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/18/9/023>.
64. A. Arefi, A. Modarres Motlagh, R. Farrokhi Teimourlou, Wheat class identification using computer vision system and artificial neural networks, *Int. Agrophysics.* 25 (2011) 319–325. www.international-agrophysics.org (accessed February 15, 2021).
65. A. Krizhevsky, I. Sutskever, G.E. Hinton, ImageNet classification with deep convolutional neural networks, *Commun. ACM.* 60 (2017) 84–90. <https://doi.org/10.1145/3065386>.
66. K. He, X. Zhang, S. Ren, J. Sun, Deep residual learning for image recognition, in: *Proc. IEEE Comput. Soc. Conf. Comput. Vis. Pattern Recognit.*, 2016: pp. 770–778. <https://doi.org/10.1109/CVPR.2016.90>.
67. C. Szegedy, V. Vanhoucke, S. Ioffe, J. Shlens, Z. Wojna, Rethinking the Inception Architecture for Computer Vision, in: *Proc. IEEE Comput. Soc. Conf. Comput. Vis. Pattern Recognit.*, 2016: pp. 2818–2826. <https://doi.org/10.1109/CVPR.2016.308>.
68. Y.J. Heo, S.J. Kim, D. Kim, K. Lee, W.K. Chung, Super-high-purity seed sorter using low-latency image-recognition based on deep learning, *IEEE Robot. Autom. Lett.* 3 (2018) 3035–3042. <https://doi.org/10.1109/LRA.2018.2849513>.
69. B.G. Osborne, T. Fearn, P.T. Hindle, *Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis*, Longman Scientific and Technical, Harlow, Essex, England, 1993. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19931464035> (accessed January 2, 2019).
70. L.M. Kandpal, H. Lee, M.S. Kim, C. Mo, B.K. Cho, Hyperspectral reflectance imaging technique for visualization of moisture distribution in cooked chicken breast, *Sensors (Switzerland).* 13 (2013) 13289–13300. <https://doi.org/10.3390/s131013289>.
71. S. Lohumi, S. Lee, H. Lee, M.S. Kim, W.H. Lee, B.K. Cho, Application of hyperspectral imaging for characterization of intramuscular fat distribution in beef, *Infrared Phys. Technol.* 74 (2016) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2015.11.004>.
72. A. Ambrose, L.M. Kandpal, M.S. Kim, W.-H. Lee, B.-K. Cho, High speed measurement of corn seed viability using hyperspectral imaging, *Infrared Phys. Technol.* 75 (2016) 173–179. <https://doi.org/10.1016/J.INFRARED.2015.12.008>.
73. C. Wakholi, L.M. Kandpal, H. Lee, H. Bae, E. Park, M.S. Kim, C. Mo, W.H. Lee, B.K. Cho, Rapid assessment of corn seed viability using short wave infrared line-scan hyperspectral imaging and chemometrics, *Sensors Actuators, B Chem.* 255 (2018) 498–507. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.08.036>.
74. L.M. Kandpal, S. Lohumi, M.S. Kim, J.S. Kang, B.K. Cho, Near-infrared hyperspectral imaging system coupled with multivariate methods to predict viability and vigor in muskmelon seeds, *Sensors Actuators, B Chem.* 229 (2016) 534–544. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.02.015>.
75. H. Chen, Q. Song, G. Tang, Q. Feng, L. Lin, The Combined Optimization of Savitzky-Golay Smoothing and Multiplicative Scatter Correction for FT-NIR PLS Models, *ISRN Spectrosc.* (2013) 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/642190>.
76. R.J. Barnes, M.S. Dhanoa, S.J. Lister, Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra, *Appl. Spectrosc.* 43 (1989) 772–777. <https://doi.org/10.1366/0003702894202201>.
77. A. Candolfi, R. De Maesschalck, D. Jouan-Rimbaud, P.A. Hailey, D.L. Massart, The influence of data pre-processing in the pattern recognition of excipients near-infrared spectra, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 115–132. <https://doi.org/10.1080/13554790490495140>.

78. D. Akkaynak, T. Treibitz, B. Xiao, U.A. Gürkan, J.J. Allen, U. Demirci, R.T. Hanlon, Use of commercial off-the-shelf digital cameras for scientific data acquisition and scene-specific color calibration, *J. Opt. Soc. Am. A.* 31 (2014) 312. <https://doi.org/10.1364/josaa.31.000312>.
79. H. Kekre, S.D. Thepade, Anuja K. Sarode, V. Suryawanshi, Image Retrieval using Texture Features extracted from GLCM, LBG and KPE, *Int. J. Comput. Theory Eng.* (2010) 695–700. <https://doi.org/10.7763/ijcte.2010.v2.227>.
80. N.R. Prasad, S. Almanza-Garcia, T.T. Lu, Anomaly detection, *Comput. Mater. Contin.* 14 (2009) 1–22. <https://doi.org/10.1145/1541880.1541882>.
81. A.L. Pomerantsev, O.Y. Rodionova, On the type II error in SIMCA method, *J. Chemom.* 28 (2014) 518–522. <https://doi.org/10.1002/cem.2610>.
82. A.L. Pomerantsev, O.Y. Rodionova, Concept and role of extreme objects in PCA/SIMCA, *J. Chemom.* 28 (2014) 429–438. <https://doi.org/10.1002/cem.2506>.
83. A. Krizhevsky, I. Sutskever, G.E. Hinton, ImageNet Classification with Deep Convolutional Neural Networks, *Commun. ACM.* 60 (2017) 84–90. <https://doi.org/10.1145/3065386>.
84. R. Girshick, J. Donahue, T. Darrell, J. Malik, Rich feature hierarchies for accurate object detection and semantic segmentation, in: *Proc. IEEE Comput. Soc. Conf. Comput. Vis. Pattern Recognit.*, 2014: pp. 580–587. <https://doi.org/10.1109/CVPR.2014.81>.
85. B. Hariharan, P. Arbeláez, R. Girshick, J. Malik, Simultaneous detection and segmentation, in: *Lect. Notes Comput. Sci. (Including Subser. Lect. Notes Artif. Intell. Lect. Notes Bioinformatics)*, Springer Verlag, 2014: pp. 297–312. https://doi.org/10.1007/978-3-319-10584-0_20.
86. C. Farabet, C. Couprie, L. Najman, Y. Lecun, Learning hierarchical features for scene labeling, *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* 35 (2013) 1915–1929. <https://doi.org/10.1109/TPAMI.2012.231>.
87. M. Mostajabi, P. Yadollahpour, G. Shakhnarovich, Feedforward semantic segmentation with zoom-out features, in: *Proc. IEEE Comput. Soc. Conf. Comput. Vis. Pattern Recognit.*, 2015: pp. 3376–3385. <https://doi.org/10.1109/CVPR.2015.7298959>.
88. S. Hong, T. You, S. Kwak, B. Han, Online tracking by learning discriminative saliency map with convolutional neural network, in: *32nd Int. Conf. Mach. Learn. ICML 2015*, 2015: pp. 597–606. <http://proceedings.mlr.press/v37/hong15.html> (accessed March 3, 2021).
89. S. Ji, W. Xu, M. Yang, K. Yu, 3D Convolutional neural networks for human action recognition, *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* 35 (2013) 221–231. <https://doi.org/10.1109/TPAMI.2012.59>.
90. K. Simonyan, A. Zisserman, Two-stream convolutional networks for action recognition in videos, in: *Adv. Neural Inf. Process. Syst.*, Neural information processing systems foundation, 2014: pp. 568–576.
91. A.G. Howard, M. Zhu, B. Chen, D. Kalenichenko, W. Wang, T. Weyand, M. Andreetto, H. Adam, MobileNets: Efficient convolutional neural networks for mobile vision applications, *ArXiv.* (2017). <https://arxiv.org/abs/1704.04861> (accessed March 8, 2021).
92. X. Zhang, X. Zhou, M. Lin, J. Sun, ShuffleNet: An extremely efficient convolutional neural network for mobile devices, *ArXiv.* (2017). http://openaccess.thecvf.com/content_cvpr_2018/html/Zhang_ShuffleNet_An_Extremely_CVPR_2018_paper.html (accessed March 8, 2021).
93. X. Li, H. Chen, X. Qi, Q. Dou, C.W. Fu, P.A. Heng, H-DenseUNet: Hybrid Densely Connected UNet for Liver and Tumor Segmentation from CT Volumes, *IEEE Trans. Med. Imaging.* 37 (2018) 2663–2674. <https://doi.org/10.1109/TMI.2018.2845918>.
94. Y. Weng, T. Zhou, Y. Li, X. Qiu, NAS-Unet: Neural architecture search for medical image segmentation, *IEEE Access.* 7 (2019) 44247–44257. <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2019.2908991>.
95. Z. Zeng, W. Xie, Y. Zhang, Y. Lu, RIC-Unet: An Improved Neural Network Based on Unet for Nuclei Segmentation in Histology Images, *IEEE Access.* 7 (2019) 21420–21428. <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2019.2896920>.
96. D. Naik, C.D. Jaidhar, Image segmentation using encoder-decoder architecture and region consistency activation, in: *11th Int. Conf. Ind. Inf. Syst. ICIS 2016 - Conf. Proc.*, Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., 2016: pp. 724–729. <https://doi.org/10.1109/ICIINFS.2016.8263033>.
97. A. Syed, B.T. Morris, SSeg-LSTM: Semantic scene segmentation for trajectory prediction, in: *IEEE Intell. Veh. Symp. Proc.*, Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., 2019: pp. 2504–2509.

<https://doi.org/10.1109/IVS.2019.8813801>.

98. S. Jadon, A survey of loss functions for semantic segmentation, in: 2020 IEEE Conf. Comput. Intell. Bioinforma. Comput. Biol. CIBCB 2020, 2020. <https://doi.org/10.1109/CIBCB48159.2020.9277638>.
99. S. Javanmardi, S.H. Miraei Ashtiani, F.J. Verbeek, A. Martynenko, Computer-vision classification of corn seed varieties using deep convolutional neural network, *J. Stored Prod. Res.* 92 (2021) 101800. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2021.101800>.
100. ColorChecker Passport Photo 2 | Request A Quote from X-Rite, (n.d.). <https://www.xrite.com/categories/calibration-profiling/colorchecker-classic-family/colorchecker-passport-photo-2> (accessed March 9, 2021).
101. X-Rite: +Colorimetric values for ColorChecker Family of Targets, (n.d.). https://xritephoto.com/ph_product_overview.aspx?ID=820&Action=support&SupportID=5159 (accessed March 10, 2021).
102. S.J. Kim, M. Pollefeys, Robust radiometric calibration and vignetting correction, *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* 30 (2008) 562-576. <https://doi.org/10.1109/TPAMI.2007.70732>.

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

프로젝트명	(국문)고당도 씨없는 수박 품종개발				
	(영문)Watermelon variety development of high sugar and seedless watermelon				
프로젝트 연구기관	농업회사법인 (주) 파트너종묘	프로젝트연구	(소속)농업회사법인 (주) 파트너종묘		
참여기업	농업회사법인 (주) 파트너종묘 농업회사법인 (주)다나	책임자	(성명)김용재		
총연구개발비 (3,406,000천원)	계	3,406,000	총 연구 기간	2017.1.1. ~ 2021.12.31. (5년0월)	
	정부출연 연구개발비	3,028,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인원	122
	기업부담금	378,000		내부인원	122
	연구기관부담금	0		외부인원	0

□ 연구개발 목표 및 성과

○ 연구개발 목표

- 고당도 내병성 씨없는/씨적은/씨작은 신품종 10종 개발, 2021년 종자수출 300만불 달성
- 수박 내병성, 재배 및 섭취편이 형질 분자표지 4점이상 개발 및 MABC 지원체계 확립
- 씨없는 수박 종자품질 향상 기술 및 표현형 영상 검정 기술 개발
- 고당도, 내병성 씨없는/씨적은/씨작은 신품종 개발 및 수출

○ 연구개발 주요성과

- 고당도 내병성 씨없는/씨적은/씨작은 신품종 품종보호 15건출원 및 11건 등록, 종자수출 174.36만불 달성
- SCI급 논문 11건, 특허출원 10건 및 등록 11건
- 3배체 수박종자 순도 및 발아 검정 기술개발
- 고속 표현형 검정기술 및 시스템 개발

□ 연구내용 및 결과

- 분자마커를 이용한 고당도 내병성 씨없는/씨적은/씨작은 수박 품종개발
- 염색체 상호전좌를 이용한 씨적은 수박 품종 개발
- MAB 여교잡용 분자표지(내병성-흰가루병·탄저병·ZYMV, 종피색, 암꽃 절성형질) 개발
- 3배체 수박 종자의 순도 검정 기술 개발 (정확도 98% 이상 분류 가능)
- 3배체 수박 종자의 발아 검정 기술 개발 (발아율 87-90%로 향상 가능)
- 내한성 수박 품종 개발을 위한 표현형 검정기술 개발 (저온 stress 정확도 100% 진단)
- 고속대량 표현형 검정시스템 개발구축 (입체 및 초분광영상 HTS 시스템 개발 완료)

□ 연구성과 활용실적 및 계획

- 개발된 신품종에 대하여 상업화진행, 국내 및 해외 수출
- 염색체 2개의 상호전좌유전자를 포함한 수박품종 특허기술을 이용하여 일반수박대비 약 25%의 종자발생을 보이는 수박품종의 개발, 상업화 및 판매
- 개발된 MAB 여교잡용 분자표지를 이용한 복합내병성 우량계통 개발
- 3배체 수박종자 순도 및 발아 선별기술 → 자체 분석서비스 제공, 노하우 기술이전
- 수박작물 저온 스트레스 진단기술 → 노하우 기술이전 및 제품화
- 채소작물 HTS시스템 장치기술 → 노하우 기술이전 및 제품화

[별첨 2]

연구성과 활용계획서 (2017~2021)

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
프로젝트명	고당도 씨없는 수박 품종개발			
프로젝트 연구기관	농업회사법인 주식회사 파트너종묘	프로젝트연구책임자	김용재	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	3,008,000	377,000	0	3,385,000
연구개발기간	2017.1.1~2021.12.31(5년)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 고당도 내병성 씨없는/씨적은/씨작은 신품종 10종 개발	신품종 품종보호출원 15건 및 등록11건 달성
② 종자수출액 총 615만불 달성	5개년 총 수출액 174.36백만원 달성
③ 병검정, 저항성지표개발	흰가루병, 탄저병, ZYMV, 덩굴썩김병, 덩굴마름병, WMV2 저항성지표 개발
④ MAB 여교잡용 분자표지 개발	MAB 여교잡용 내병성, 종피색, 암꽃 절성형질 분자표지 개발
⑤ 3배체 수박 종자의 순도,발아 검정 기술 개발	순도 정확도 98% 이상 분류 가능 발아율 87-90%로 향상 가능
⑤ 내한성 수박 품종 개발을 위한 표현형 검정기술 개발	저온 stress 정확도 100% 진단
⑥ 고속대량 표현형 검정시스템 개발 구축	입체 및 초분광영상 HTS 시스템 개발 완료
⑦고당도, 내병성 씨없는/씨적은/씨작은 신품종 개발 및 해외 마케팅	미국, 멕시코, 헝가리, 그리스, 이탈리아, 러시아 신규 거래처 확보
⑧ 씨없는/씨적은/씨작은 수박 수출활성화를 위한 품질관리체계 구축	종자품질검정체계 및 가공시설 구축

3. 연구비 집행실적 (2017~2021 누적)

단위:천원

구분	금액		계획금액	사용액	잔액	비고
	세부프로젝트명					
수박	(수박6-1)고당도 씨없는 수박 품종개발 및 종자수출		1,365,000	1,365,000	0원	
	(수박6-2)수박의 복합내병성, 암꽃질성 및 종피색 연관 분자육종 시스템 개발		800,000	800,000	0원	
	(수박6-3)씨없는 수박 종자품질 향상 및 표현형 영상 검정 기술 개발		700,000	700,000	0원	
	(수박6-4)고당도 씨없는 수박 품종개발을 위한 품질관리체계 구축 및 해외 마케팅		520,000	520,000	0원	
총계			3,385,000	3,385,000	0원	

4. 연구목표 대비 성과

구분	품종개발		특허		논문		분자마커	유전자원		국내 매출액 (백만원)	종자 수출액 (만불)	기술 이전	마케팅 전략 수립 보고서	인력 양성
	출원	등록	출원	등록	SCI	비SCI		수집	등록					
최종목표	10	10	9	7	11		4			750	615			1
최종실적	15	11	14	11	11		14			2683.06	174.36			6
달성율(%)	150	110	155	171	100		350			357	27.5			
1차년도	목표	2	1	1	1	1				50	30			0
	실적	3	3	4	3	3				237.6	30			1
	달성률	150	300	400	300	300				475	100			-
2차년도	목표	2	2	2	2	2	1			100	50			0
	실적	3	2	1	2	3	3			150	20.1			1
	달성률	150	100	50	100	150	300			150	40.2			-
3차년도	목표	2	2	3	1	2	1			100	100			1
	실적	2	2	2	1	3	3			274.067	20.872			1
	달성률	150	100	66	150	150	300			182	20.8			100
4차년도	목표	2	2	3	2	3	1			200	115			1
	실적	5	2	1	3	1	2			1,006.215	40.0062			3
	달성률	250	100	33	150	33	200			503	29.7			300
5차년도	목표	0	2	0	2	3	0			250	300			0
	실적	3	2	1	2	1	4			1091.191	58.36			3
	달성률	-	100	-	100	33	-			436.47	19.05			

5. 핵심기술

구분	핵심기술 명
①	3배체 씨없는 수박 생산 기술
②	염색체 상호전좌를 이용한 씨적은 수박품종 개발
③	유용형질에 관여하는 SNP marker를 이용한 MAS
④	온라인 3배체 수박 종자의 순도 검정 기술
⑤	온라인 3배체 수박 종자의 발아 검정 기술
⑥	내한성 수박 표현형 검정기술
⑦	고속대량 표현형 검정시스템 개발 기술

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					v		v			
②의 기술		v				v	v			
③의 기술					v	v	v			
④의 기술		v			v		v			
⑤의 기술		v			v		v			
⑥의 기술		v		v			v			
⑦의 기술		v		v			v			

9. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

[제 3세부]

핵심기술 명	온라인 수박종자 순도 및 발아선별 장치		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	50,000천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	1년	실용화예상시기	2024년
기술이전 시 선행조건			

핵심기술 명	고속 표현형검정(HTS) 영상분석 시스템		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	50,000천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	1년	실용화예상시기	2024년
기술이전 시 선행조건			

<붙임 3> (프로젝트) 프로젝트별 현장실태조사보고서 및 자체평가보고서

프로젝트별 현장실태조사표 (2021)

2021 . 12 . 30 .

1. 과제개요

과제번호	213006-05-5-CGV00	연구기간	2017 . 1. 1 ~ 2021 .12 .31 (총5년)		
사업단명	GSP채소종자사업단				
프로젝트명	고당도 씨없는 수박 품종개발				
세부프로젝트 연구기관	세부프로젝트명	연구기관	세부프로젝트 책임자	해당 연구개발비(천원)	
	고당도 씨없는 수박 품종 개발 및 종자수출	농업회사법인 (주)파트너종묘	김용재	1,365,000	
	수박의 복합내병성, 암꽃 절성 및 종피색 연관 분자 육종 시스템 개발	중앙대학교	이궁표	800,000	
	씨없는 수박 종자품질 향 상 및 표현형 영상 검정 기술 개발	충남대학교	조병관	700,000	
	고당도 씨없는 수박 품종 개발을 위한 품질관리체 구축 및 해외 마케팅	농업회사법인 (주)다나	김용진	520,000	
연구개발비총괄 (단위 : 백만원)	정부출연금	참여기업 부담금			합 계
		현금	현물	소계	
1차년도	510	5.250	47.250	52.500	562.5
2차년도	520.5	5.5125	49.6125	55.125	575.625
3차년도	640.5	8.648	76.477	85.125	725.625
4차년도	668.5	9.213	82.912	92.125	760.625
5차년도	668.5	9.213	82.912	92.125	760.625
합계	3,008	37.8365	339.1635	377	3,385

2. 연구추진실적(현재까지 추진실적)

가. 연구개발내용

연구기관	주요연구내용	연구개발비 (천원)	가중치 (%)
농업회사법인 (주)파트너종묘	○고기능성 계통 및 품종 개발 ○해외 세대진전 시험포 운영 ○수출 촉진 활동 및 종자수출	1,365,000	40
중앙대학교	○복합내병성 MAB 여교잡 시스템 확립 ○F1 순도검정용 시스템 활용 확립 ○대량샘플 자동분석용 시스템 활용 확립	800,000	25
충남대학교	○내한성 품종 육종 표현형 검정 서비스 ○HTS 성능검증 및 서비스	700,000	20
농업회사법인 (주)다나	○복합내병성, 높은 균일성, 고당도 씨적은, 씨없는, 씨작은 수박 품종 현지 적응성 시험 및 수출 가능 품종 선발 ○해외 종자 박람회 참가하여 품종 홍보 및 거래처 발굴 ○수출용 수박 품종 선발을 위한 국내 시험포 운영 및 해외 바이어 초청 품종 평가회 ○수출용 종자생산(채종지) 및 품질관리 체계 구축 ○해외 시장조사 : 유럽, 멕시코 등 고부가가치 해외 시장 정보 수집 ○유럽, 남미 등 해외 거래처 추가 발굴	520,000	15

3. 연구개발비 집행실적(연구개발비 기준)

(현재까지, 단위 : 천원)

<총괄>

비목	금액		계획금액	사용액	잔액	비고	
	세목						
직접비	내부인건비	미지급	(109,020)				
		지급	현금	207,288	200,659.596	6,628.4	
			현물	33,300	29,700	3,600	
	외부인건비	미지급					
		지급	현금				
			현물				
	연구 지원인력인건비						
	학생인건비			93,900	90,165.164	3,734.836	
	인건비 소계			334,488	320,524.76	13,963.240	
	연구시설장비비	현금	일반	80,500	76,911.674	3,588.326	
			통합관리				
		현물		49,612	49,612		
	연구활동비			116,150.35	77,816.637	38,333.713	
	연구재료비			66,201.65	108,043.844	-41,842.194	
	연구수당			44,869	32,090	12,779	
위탁연구개발비							
직접비 소계			695,405.388	665,817.915	29,587.473		
간접비	간접비		68,804	68,788	16		
연구개발비 총액			760,625	734,605.915	26,019.085		

<1세부>

비목	금액		계획금액	사용액	잔액	비고	
	세목						
직접비	내부인건비	미지급		(15,600)			
		지급	현금	84,480	82,983.69	1,496.31	
			현물				
	외부인건비	미지급					
		지급	현금				
			현물				
	연구 지원인력인건비						
	학생인건비						
	인건비 소계			84,480	82,983.69	1,496.31	
	연구시설장비비	현금	일반	57,500	55,812.874	1,687.126	
			통합관리				
		현물		49,612	49,612		
	연구활동비			54,196.350	40,693.420	13,502.93	
	연구재료비			16,836.650	31,022.493	-14,185.843	
	연구수당			10,000	10,000		
위탁연구개발비							
직접비 소계			272,625	270,124.477	2,500.523		
간접비	간접비		3,000	2,984	16		
연구개발비 총액			275,625	273,108	2,516.523		

<2세부>

비목	금액		계획금액	사용액	잔액	비고	
	세목						
직접비	내부인건비	미지급	(19,200)				
		지급	현금	18,734.836	18,734.836	41.321	
			현물				
	외부인건비	미지급					
		지급	현금				
			현물				
	연구 지원인력인건비						
	학생인건비			39,405.164	39,405.164	750	
	인건비 소계			58,140	58,140		
	연구시설장비비	현금	일반				
			통합관리				
		현물					
	연구활동비			4,516.33	3,766.33		
	연구재료비			49,139.672	52,586,076.00		
	연구수당			13,000	13,000		
위탁연구개발비							
직접비 소계			124,796	127,492.404	791.321		
간접비	간접비		35,204	35,204	0		
연구개발비 총액			160,000	162,696.404	791.321		

◁세부▷

비목	금액		계획금액	사용액	잔액	비고	
	세목						
직접비	내부인건비	미지급	(9,600)				
		지급	현금	13,317.070	13,317.070	0	
			현물				
	외부인건비	미지급					
		지급	현금				
			현물				
	연구 지원인력인건비						
	학생인건비			50,760	50,760	0	
	인건비 소계						
	연구시설장비비	현금	일반				
			통합관리				
		현물					
	연구활동비			8,428.512	7,569.031	1,096.144	
	연구재료비			24,894.418	24,894.418	0	
	연구수당			12,000	12,000	0	
위탁연구개발비							
직접비 소계			109,400	108,540.519	1,096.144		
간접비	간접비		30,600	30,600	0		
연구개발비 총액			140,000	139,140.519	1,096.144		

<4세부>

비목	세목		금액	계획금액	사용액	잔액	비고	
직접비	내부인건비	미지급		(46,470)	(42,817.5)	(3,652.5)		
		지급	현금	93,408	85,624	7,784		
			현물	33,300	29,700	3,600		
	외부인건비	미지급						
		지급	현금					
			현물					
	연구 지원인력인건비							
	학생인건비							
	인건비 소계							
	연구시설장비비	현금	일반	21,098.8	21,098.8	0		
			통합관리					
		현물						
	연구활동비				27,418.706	27,418.669	0.037	이자94,506원 계획금액에 산입
	연구재료비							
	연구수당				9,869	9869	0	
위탁연구개발비								
직접비 소계								
간접비	간접비							
연구개발비 총액				18,594.506	173,710.469	11,289.531		

4. 참여기업 재무현황(현재기준)

사업자등록번호	381-87-00176	대표자	김용재
설립년도	2015.09.10	주요생산품	수박종자
실무책임자	권기범	연락처	063-543-5402
주소	전라북도 김제시 백산면 하정로 182-20 파트너종묘		

자본금	10천만원		
연간 매출액	140천만원	수출액	64천만원
연구개발투자비용	12.8천만원	매출액대비 비율	9.1%
총 종업원수	7명	연구가용인력	6명
재무상황 프로젝트 책임자의 종합의견	재무현황 이상없음 확인.		

사업자등록번호	293-87-00597	대표자	정용동
설립년도	2016.12	주요생산품	종자
실무책임자	박지홍	연락처	031-211-4773
주소	경기도 용인시 기흥구 흥덕4로 15번길 3-21 4층		

자본금	20천만원		
연간 매출액	480천만원	수출액	20천만원
연구개발투자비용	44천만원	매출액대비 비율	4%
총 종업원수	22명	연구가용인력	8명
재무상황 프로젝트 책임자의 종합의견	재무현황 이상없음 확인.		

5. 기타의견

- 기타의견 없음

6. 프로젝트 책임자의 종합의견

5차년도 계획에 맞게 정상적으로 수행됨.

자체평가보고서

사업단명	GSP채소종자사업단	과제번호	213006-05-5-CGV00		
프로젝트명	고당도 씨없는 수박 품종개발				
프로젝트연구기관	농업회사법인 (주)파트너종묘				
연구담당자	프로젝트 연구책임자	김용재			
	세부프로젝트 연구책임자	기관(부서)	농업회사법인 (주)파트너종묘	성명	김용재
		기관(부서)	중앙대학교	성명	이금표
		기관(부서)	충남대학교	성명	조병관
		기관(부서)	농업회사법인 (주)다나	성명	김용진
연구기간	총 기간	2017 . 1. 1 ~ 2021 .12 .31 (총5년)	당해 연도 기간	2021 . 1. 1 ~ 2021 .12 .31	
연구비(천원)	총 규모	3,385,000	당해 연도 규모	760,625	

1. 연구는 당초계획대로 진행되었는가?

당초계획 이상으로 진행 계획대로 진행 계획대로 진행되지 못함

○ 계획대로 수행되지 않은 원인은?

4세부프로젝트의 과제특성상 해외현지미팅 및 작황조사등이 주를 이루었지만 아래와 같은이유에 의해 당초계획과 다르게진행되었음

1. 해외 시험재배 시행착오로 인한 개발기간 지연
2. COVID-19로 인한 해외영업/마케팅 활동 저해

2. 당초 예상했던 성과는 얻었는가?

예상외 성과 얻음

어느 정도 얻음

얻지 못함

구분	품종 개발		특허		논문		분자마커	분자마커서비스	병리검정서비스	해외시험포	세대진전시험포	생산판매신고	국내외전시포	종자교역회참여	판매업체수	국내매출액(백만원)	종자수출액(만불)	인력양성
	출원	등록	출원	등록	SCI	비SCI												
최종목표	10	10	9	7	11		2	0	0	10	15	5	5	1	35	750	615	1
연구기간내 달성실적	15	11	10	11	11		14	55	120	18	16	16	12	7	50	2683	172	6
달성율(%)	150	110	111	157	100		700			180	107	320	240	700	143	358	28	600

3. 연구개발 성과 세부 내용

3-1 과학기술적 성과

- 2세부프로젝트기관에서 개발한 분자표지를 이용해 해당형질에 대한 MABC를 실용화 함으로서, 1세부프로젝트기관 산업체에서 신속정확한 대량유전자검정을 통해 품종개발 육종연한단축을 달성
- 3세부프로젝트의 영상분석기법을 이용한 순도,발아예측검정 시스템개발로 생산종자의 품질향상달성

3-2 경제적 성과

- 세계수박종자시장에서 한국 수박종자의 인지도향상
- 내병성과 같은 우수한 형질의 수박품종개발로 재배농가의 소득증대 및 부가산업활성화
- 개발된 분자표지와 대량분석검정시스템을 통해 품종육성 및 생산종자품질검정에 소요되는 비용 절감

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 :

기업 등예의 기술이전 기업명 :

기술지도 등 기업명 :

6-2 산업·지식재산권 등

- 국내출원/등록 출원 11 건, 등록 건
 해외출원/등록 출원 건, 등록 건

6-3 논문게재·발표 등

- 국내 학술지 게재 건
 해외 학술지 게재 11 건
 국내 학·협회 발표 건
 국내 세미나 발표 건
 기 타 건

6-4 인력양성효과

- 석 사 6 명
 박 사 명
 기 타 명

6-5 수상 등

- 있다 상 명칭 및 일시 : 2019 현장 중심 우수 연구개발(R&D)성과 10선 2019.11.8.
2021 농업기술실용화 우수기업가 포상 2021.12.23
 없다

6-6 마스크 등의 PR

- 있다 4 건
 없다

7. 연구개발 착수 이후 국내 다른 기관에서 유사한 기술이 개발되거나 또는 기술 도입함으로써 연구의 필요성을 감소시킨 경우가 있습니까?

- 없다 약간 감소되었다 크게 감소되었다

8. 관련된 기술의 발전속도나 추세를 감안할 때 연구계획을 조정할 필요가 있다고 생각하십니까?

- 없다 약간 조정필요 전반적인 조정필요

9. 연구과정에서의 애로 및 건의사항은?

코로나상황으로 인하여 해외업체와의 교류에 어려움이 있었음

(※ 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	농업회사법인 (주) 파트너종묘	대표	김 용 재 

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 Golden Seed프로젝트사업의 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부(농림식품기술기획평가원)에서 시행한 Golden Seed프로젝트사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.