

(뒷면)

(앞면)

발간등록번호

11-1543000-000959-01

채소류 유전체 분석을 통한 분자육종 통합 지원 시스템 구축

채소류 유전체 분석을 통한 분자육종
통합 지원 시스템 구축
(Development of Integrated Supporting
Systems for the Cabbage and Broccoli
Genomics Assisted Breeding)

한국생명공학연구원

주 의
(편집순서 8)

농림축산식품부

농림축산식품부

↑
3cm
↓

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “채소류 유전체 분석을 통한 분자유종 통합 지원 시스템 구축” 과제의 보고
서로 제출합니다.

2014년 6월 30일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 김 혜 란

세부연구책임자 : 김 대 수

세부연구책임자 : 권 석 윤

세부연구책임자 : 박 정 미

협동연구기관명 : 충남대학교

협동연구책임자 : 박 상 언

협동연구기관명 : 순천대학교

협동연구책임자 : 노 일 섭

협동연구기관명 : 삼성중묘(주)

협동연구책임자 : 백 남 권

협동연구기관명 : (주)코레곤

협동연구책임자 : 강 관 호

협동연구기관명 : 아시아중묘(주)

협동연구책임자 : 송 준 호

위탁연구기관명 : 아시아중묘(주)

위탁연구책임자 : 이 인 호

위탁연구기관명 : 충남대학교

위탁연구책임자 : 최 수 련

위탁연구기관명 : (주)씨더스

위탁연구책임자 : 조 성 환

요 약 문

I. 제 목

채소류 유전체 분석을 통한 분자유종 통합 지원 시스템 구축
(양배추류 유전체 육종 통합지원 시스템 개발)

II. 연구개발의 목적 및 필요성

양배추류는 전세계적으로 가장 많이 재배되고 있는 채소작물로서, 고부가가치를 창출할 수 있는 국내 주요 수출 전략 품목이다. 국내의 양배추류 육종은 중소규모의 종묘회사에 의해 이루어지고 있으며, 전통 육종 기반으로 신품종이 개발되어 신품종의 시장수명에 비해 개발 기간이 길고, 국제적 경쟁력이 약화 되어 있는 상황이다. 이에 본 사업단은 첨단 오믹스 기법을 기반으로 활용하여 보다 신속하고 경제적으로 양배추류 품종 개발을 할 수 있도록 신품종 개발에 활용 가능한 tool의 개발 및 체계적인 품종 개발 기반을 구축 하는데 그 목적이 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 유전체 정보 가공 시스템 구축 및 유전체 정보 생산
 - 가. NGS resequencing 기술을 이용한 효율적인 유전체 정보 생산 시스템 구축
 - 나. 양배추류의 Transcriptome, miRNA 생산 및 분석 시스템 구축
 - 다. 양배추 표준 유전자 세트 개발
 - 라. 29계통의 유전체 정보 생산
2. 신품종 개발에 활용 가능한 tool 개발
 - 가. 병 (시들음병, 뿌리혹병) 저항성 검정용 연관 분자표지 개발
 - 나. 석회결핍 둔감형 검정용 연관 분자표지 개발
 - 다. 내서성 검정용 연관 분자표지 개발
 - 라. 배추좁나방 저항성 검정용 연관 바이오마커 개발
 - 마. F₁ 품종 순도검정 분자표지 개발
 - 바. 계통 고정 검정 분자표지 개발
 - 사. 여교배 선발용 SNP 분자표지 개발
 - 아. 양배추류 기본 유전자 지도 작성 및 QTL 지도 작성
 - 자. 신 마커 개발용 데이터베이스 구축
 - 차. 엘리트 계통의 마커 개발
3. 품종개발 관련 유용형질의 실험적 진단 기법 구축
 - 가. 시들음병 뿌리혹병 저항성, 감수성 진단법 구축
 - 나. 내서성, 석회 결핍둔감형 조기 진단법 구축

- 다. 개발된 분자표지 검정 시스템 구축
- 4. 유용형질 관련 유전자 및 대사체 확보
 - 가. 전사체, 단백질 발현 비교 분석을 통한 시들음병, 뿌리혹병 저항성 관련 유용 유전자 확보
 - 나. 전사체 비교분석을 통한 내서성, 석회결핍 둔감형 관련 유용 유전자군 확보
 - 다. 배추좁나방 저항성 관련 대사체 확보
- 5. 양배추류 개량에 적용 가능한 유용 유전자군 개발
 - 가. 병저항성 및 스트레스 저항성 관련 유전자군 발굴
 - 나. 석회결핍 둔감형 관련 tip-burn 저항성 연관 유전자군 발굴 및 기작 연구
- 6. 양배추류 유전자원 수집 및 육종 소재 개발
 - 가. 형질 전환용 multiplex 벡터 construct 제작
 - 나. 양배추류 유전자원 수집 및 고정
 - 다. 브로콜리 소포자 유래 계통 육성
 - 라. 목표형질 관련 RIL 또는 F₂ 분리 집단 작성
 - 마. 양배추류 국제 표준 유전집단 증식
- 7. 국내기반 형질전환 발현 시스템 구축
 - 가. 양배추의 고효율 형질 전환 시스템 구축
 - 나. 배추 유래 병저항성 유전자 관련 promoter 분석
- 8. 유전체 육종 기반 신품종 개발
 - 가. 목표형질 관련 양배추 신품종 개발
 - 나. 목표형질 관련 브로콜리 신품종 개발

IV. 연구개발결과

1. 유전체 정보 가공 시스템 구축 및 유전체 정보 생산
 - 가. NGS resequencing 기술을 이용하여, 효율적인 유전체 정보 생산 시스템을 구축하고, 유전체 정보의 가공 및 genetic variants 발굴 파이프라인 작성
 - 나. 양배추 및 브로콜리의 효율적인 RNA sequence (transcriptome)와 miRNA 정보 생산 시스템 구축 및 유전자 발현 profiling, 유용유전자 발굴, 조절유전자 동정 분석 파이프라인 구축
 - 다. 35,274개의 locus가 annotation 된 53,562 locus를 양배추 표준 유전자 세트에 개발하고, functional category 별 annotation 함
 - 라. 목표형질관련 저항성 및 감수성 보유 계통 29계통으로부터 총 586Gb의 high quality 유전체 정보 생산 (12~88X genome coverage)
2. 신품종 개발에 활용 가능한 tool 개발
 - 가. FocBo1 유전자위 관련 양배추의 시들음병 저항성 및 이병성 판별용 우성 PCR 형태의 분자표지 개발 및 113점 검정을 통한 육종가 지원
 - 나. 석회결핍 둔감형 연관 유전자로 DREB 유전자 발굴 및 발현 분자표지로 개발
 - 다. 내서성 검정용 연관 분자표지로 BoHsp70과 BoSCL13-1 유전자를 조기검정에 이용 가능한 유전자로 발현마커화 하였고, BoHSP70 유전자위 관련 PCR 형태의 분자표

- 지화 (출원 품종 7품종 검정에 활용)
- 라. 배추좁나방 저항성 감수성 계통의 1차 대사체 분석을 통해 8개의 함량 차이를 보이는 대사물질을 규명해 배추좁나방 저항성 연관 바이오마커로 개발
 - 마. F₁ 품종 순도검정 분자표지로 12개의 SNP 마커 (1-2마커/염색체)를 fluidigm system 기반으로 개발 (570점 순도 검정을 통한 육종가 지원)
 - 바. 계통 고정 검정용으로 24개의 SNP (2-5마커/염색체)를 fluidigm system기반의 분자표지로 개발 (560점 검정을 통한 육종가 지원)
 - 사. 여교배 선발용 분자표지를 2-5Mb genome distance로 384개의 SNP 개발 (fluidigm system)
 - 아. 양배추류 국제 표준 유전집단인 BoITBDH 집단을 이용하여 총 350개의 마커가 지도화 된 887.5cM (1마커/2.5cM)의 기본 유전자 지도 작성 및 배추좁나방저항성 형질의 분리 집단에서 염색체 3번 4번에 QTL 지도화
 - 자. 신 마커 개발 및 육종 지원을 위해 29계통의 resequencing 데이터를 기반으로 21,781 SSR 마커, 58,158 SNP 마커, 992,012 InDel 마커 및 증폭인자, 기존에 보고된 양배추 유전자지도 8개가 통합된 통합 유전자지도, 양배추 genome browser, 형질별 특이 마커, genetic variable block의 데이터가 탑재된 데이터베이스 구축
 - 차. *B. rapa*, *B. oleracea*, *B. napus*, *A thaliana*의 CDS, ESTs, Transcriptome 데이터로부터 unigene 분석 및 annotation 하고, 진화적인 유연관계가 Brassicae의 genomic block 정보로 통합되어진 가 A, C genome의 유전자 기능 및 진화연구용 exome 데이터베이스 구축
 - 카. 육종가의 주요 엘리트 양배추 계통 12계통의 SNP 분자표지 및 증폭인자를 개발하여 육종가의 필요에 맞게 활용하도록 함
3. 품종개발 관련 유용형질의 실험적 진단 기법 구축
- 가. 뿌리혹병 병리 검정 실험실 처리 조건을 파종 후 10일된 유묘에 뿌리혹병균을 4.0×10^8 spores/pot가 되도록 접종하였으며, 20°C에서 5주간 배양한 후 발병도를 0-4범위로 조사하고, control로 오조라 감수성 품종과 중도 저항성의 대박나를 사용
 - 나. 시들음병 병리 검정은 파종 후 14일된 유묘의 양배추 뿌리를 씻고 시들음병균을 1×10^7 conidia/ml의 농도로 30분 동안 침지 후 이식하여 25°C에서 3주 동안 배양한 후 발병도를 저항성, 감수성으로 조사하고, control로 저항성으로 YR호남과 감수성 품종인 레드마트를 사용 (107점 병리 검정 지원)
 - 다. 시들음병과 뿌리혹병 특이적인 genomic DNA oligomer를 합성하여, 양배추에 감염된 fungi의 biomass를 측정하여 뿌리혹병, 시들음병 저항성 반응의 정량화 검정법 확립
 - 라. 내서성 검정 처리 조건은 파종 후 2주된 유묘를 42°C에서 하루 2시간씩 일주일간 처리하고 계통간 표현형의 차이를 분석함
 - 마. 0.3mM [Ca²⁺] 조건의 기내 배양을 통해 tip-burn이 나타나는 정도를 기반으로 석회 결핍 둔감형을 조기에 진단함.
 - 바. 여교배 선발용 SNP는 Fluidigm 기반, F₁ 품종 순도검정 및 계통 고정 검정 분자표지는 Fluidigm과 HRM 기반, 시들음병 저항성 검정 마커는 PCR 기반으로 검정 시스템 구축

4. 유용형질 관련 유전자 및 대사체 확보
 - 가. 단백질 발현 비교 분석을 통해 시들음병 저항성 관련 유용 유전자 47개, 뿌리혹병 저항성 특이 유전자 22개 선별하여 유용 유전자를 확보
 - 나. 전사체 비교분석을 통해 내서성 관련 유용 유전자 6개 및 석회결핍 둔감형 관련 유용 유전자군 165개 확보
 - 다. 배추좁나방 저항성 관련 1차 대사체 분석을 통해 저항성 관련 대사체 25종 확보
5. 양배추류 개량에 적용 가능한 유용 유전자군 개발
 - 가. 바이오맵 구축을 통해 병저항성 및 스트레스 저항성 관련 유전자군 129,743개 발굴하여 데이터베이스 화
 - 나. 석회결핍 둔감형 관련 tip-burn 저항성 연관 유전자군으로 칼슘수송유전자 발굴 및 기작 연구
6. 양배추류 유전자원 수집 및 육종 소재 개발
 - 가. 제초제 저항성 유전자 (bar), 내병성 관련 유전자 (chitinase), 내충성 유전자 (Cry I Ab, Cry I Ac, Cry II A)를 이용한 형질 전환용 multiplex 벡터 construct 제작 및 이를 이용한 형질 전환 양배추 및 브로콜리 소재 제작
 - 나. 목표형질 관련 re-sequencing 재료 증식, 수집 계통 9계통 증식, 수집종 58종 세대 진전, 수집종 4종으로부터 소포자 배양체 97개체 확보
 - 다. F₁ 25품종으로부터 총 7조합/품종과 3품종에서 약배양 유래된 총 150계통 확보 및 내병성 우량형질 보유 39계통 선별
 - 라. 시들음병, 내서성, 석회결핍둔감형 관련 유전집단 각각 5집단, 4집단, 3집단 작성하여 F₂ 또는 F₃ 분리집단 종자 확보
 - 마. 양배추류 국제 표준 유전집단인 BoITBDH 집단 150 계통과 모본 부분의 증식
 - 바. 유전자원 792점 수집 및 유용형질 특성 검정
7. 국내기반 형질전환 발현 시스템 구축
 - 가. 양배추 및 브로콜리의 자엽을 이용하여 형질전환율 3.8~8.7%의 고효율 형질 전환 시스템 구축
 - 나. 배추 유래 병저항성 유전자 관련 promoter 분석을 통해 뿌리, 꽃봉우리, 식물체 전체에 특이적인 프로모터 발굴
8. 유전체 육종 기반 신품종 개발
 - 가. 시들음병, 내서성 보유 양배추 품종 7종 개발
 - 나. 석회결핍둔감형 보유 양배추 품종 2종 개발
 - 다. 시들음병 저항성 보유 브로콜리 품종 3종 개발

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구에서는 현장 적용 검정을 거쳐 육종에 활용할 수 있는 분자표지로 시들음병 저항성 분자표지, F₁ 순도검정 분자표지, 계통 고정 검정 분자표지를 개발하였으며, 시들음병 저항성, 뿌리혹병 저항성, 석회결핍둔감형, 내서성 등의 형질진단법을 확립 하였다. 이 분자표지와 형질 진단법은 양배추 신품종 개발 시 유용한 tool로서의 역할을 할 것이며, 현재 서비스 가능 기관 및 연구팀으로 기술이전을 통한 현장 활용도 극대화를 위한 노력중

이다. 관련 학회 및 워크숍을 통해 개발된 분자표지에 대한 교육 및 홍보를 진행할 계획이다. 유전자원 수집, 고정, 증식, 약배양 등을 통해 육종 소재를 개발하고 유전자원을 등록하였으며, 이는 양배추 신품종 개발에 있어 훌륭한 유전자원으로 사용될 것이다. 본 연구 수행을 통해 12 품종을 개발하여 품종 출원 또는 등록 하였다. 이중 8 품종에 대해서는 기술이전이 되어 중국, 인도 등 아시아뿐만 아니라 유럽 등 전 세계를 대상으로 상품화 추진할 계획이다. 또한 2품종에 대해서는 현재 기술이전 추진 중이다. 육종 목표에 따른 분자표지 필요시 분자표지를 용이하게 개발할 수 있는 데이터베이스와 유전자의 기능 연구시 필요한 유전자 데이터베이스를 구축하였으며, 구축된 데이터베이스와 발굴된 유용 정보는 기탁을 통해 공공 이용을 통해 더 많은 연구 및 육종에 활용되도록 할 계획이다.

SUMMARY

I. Title

Development of Integrated Supporting Systems for the Cabbage and Broccoli Genomics Assisted Breeding

II. The Purpose and the Needs of the Research & Development

Such as *Brassica oleracea* so called the cole crops is the most widely grown vegetable crop throughout the world, and is a major export strategic product of Korea, which can create a high added value. The current domestic cultivar of the cole crops has been performed by the small and medium-sized seed companies, and as the new varieties have been developed based on the conventional cultivar, the development period got longer than the market life of a new variety, and its global competitiveness has been weakened. To this end, the project corporation aims to develop a tool utilizable in the development of a new variety and to build systematic development basis of the breed based on a state-of-the-art omics technique in order to enable the breed development of the cole crops in more speedy and more economical manner.

III. The Content and the Scope of the Research & Development

1. Construction of genome information processing system and production of genomic resources
 - A. Construction of an efficient production system of genome information in use of the NGS resequencing technology
 - B. Construction of a production and analysis system of transcriptome and miRNA of *Brassica oleracea*
 - C. Development of reference gene set for cabbage
 - D. Production of genome information for the 29 lines
2. Development of genomics assisted breeding tools for the cabbage breeding program
 - A. Molecular marker associated with disease resistance (Fusarium wilt, Clubroot)
 - B. Molecular marker associated with calcium deficiency insensitivity
 - C. Molecular marker associated with heat resistance
 - D. Molecular marker associated with diamond back moth resistance
 - E. Molecular marker set for F₁ purity test
 - F. Molecular marker set for the line fixation test

- G. Development of SNP molecular markers for the selection of backcross Lines
- H. Basic genetic linkage mapping and QTL mapping
- I. Construction of database for development of new markers
- J. Molecular marker development for breeders elite lines
- 3. Construction of experimental diagnostic technique for the useful traits
 - A. Construction of diagnosis method for resistance and sensitivity to Fusarium wilt and Clubroot
 - B. Construction of early diagnosis method for heat resistance and calcium deficiency insensitivity
 - D. Construction of a testing system for developed molecular markers
- 4. Securing the useful traits related genes and metabolites
 - A. Securing the useful genes related to resistance to Fusarium wilt and Clubroot through a comparative analysis of transcriptome and proteome expressions
 - B. Securing the useful gene groups related to heat resistance and calcium deficiency insensitivity related through a comparative analysis of transcriptome
 - C. Securing the metabolites related to the resistance to diamond back moth
- 5. Development of useful gene groups applicable to improvement of cabbages
 - A. Finding the gene clusters related with disease resistance and stress resistance
 - B. Finding the genes associated with the calcium deficiency insensitivity related tip–burn resistance and the mechanisms study
- 6. Collecting the genetic resources of *Brassica oleracea* and development of the breeding materials
 - A. Production of the multiplex vector constructs for transformation
 - B. Collecting and fixation the genetic resources of *Brassica oleacea*
 - C. Cultivation of Broccoli microspore culture line
 - D. Preparation of the targeted character related RIL or F₂ isolation cluster
 - E. Multiplication the international standard genetic mapping population of *Brassica oleracea*
- 7. Construction of the in–country based transgenic expression system
 - A. Construction of high–efficiency transgenic system of cabbages
 - B. Analysis of the Chinese cabbage–originated disease resistant gene related promotor
- 8. Development new variety based on the genomics assisted breeding system
 - A. Development of the targeted character–related new variety cabbage
 - B. Development of the targeted character–related new variety broccoli

IV. Results of Research & Development

- 1. Construction of genome information processing system and production of genomic resources

- A. An efficient genome information production system was constructed based on NGS resequencing technology, and completed a pipeline to process the NGS data and to find genetic variants.
 - B. An efficient RNA sequence (transcriptome) and miRNA information production system was constructed and completed a pipeline for gene expression profiling, useful gene discovery and control gene identification analysis for cabbage and broccoli
 - C. The reference gene set of cabbage was developed using 53,562 locus to which 35,274 locus was annotated, and conducted the annotation by functional category
 - D. A total of 586Gb high quality genome information (12~88X genome coverage) was produced from 29 lines that own the targeted character related resistance and sensitivity
2. Development of a tool which can be utilized in new variety development
- A. Dominant PCR molecular marker for differentiating FocBo1 locus-related Fusarium wilt resistance of the cabbage and susceptibility was developed. Support breeders through the genotyping of 113 breeding materials
 - B. DREB gene was developed to expression marker associated with calcium deficiency insensitivity test
 - C. BoHsp70 and BoSCL13-1 genes as associated molecular markers for the heat resistance were made as the expression markers usable to the early selection, and BoHSP70 locus related PCR marker was developed (utilized for testing 7 of applied breeds)
 - D. Diamond back moth resistance associated biomarkers were developed by identifying 8 primary metabolites that showed content differences through the primary metabolome analysis of the resistance and sensitivity lines
 - E. F₁ purity test molecular markers, 12 SNP markers (1-2 marker/chromosome) as a set were developed in fluidigm system format (Support the breeding program by genotyping 570 samples)
 - F. 24 SNPs (2-5 marker/chromosome) were developed as the fixation test molecular markers in fluidigm system format (Support the breeding program by genotyping 560 samples)
 - G. 384 SNPs were developed as the selecting molecular markers for the back-cross with 2-5Mb genome distance (fluidigm system)
 - H. Basic genetic map of 887.5cM (1 marker /2.5cM) where a total of 350 markers were mapped by using the international standard genetic mapping population: BolTBDH, and QTL mapping of the diamond back moth resistant trait to the chromosome No. 3 and No. 4
 - I. A database was constructed containing the data of 21,781 SSR markers, 58,158 SNP markers, 992,012 InDel markers and amplification primers, an

integrated genetic map in which 8 of previously reported genetic maps for cabbage, the cabbage genome browser, trait specific markers, and genetic variable block, were contained

- J. Unigene analysis and annotation was done from the data of CDS, ESTs, and Transcriptome of *B. rapa*, *B. oleracea*, *B. napus* and *A. thaliana*, and the exome database was constructed for the A and C genome gene function and evolution studies, in which the evolutionary relationship was integrated as genomic block information of Brassica
- K. SNP molecular markers and amplification primers of 12 major elite cabbage lines were developed to be utilized according to the need of the breeding programs
3. Construction of Experimental Diagnostic Techniques of the cultivar development-related useful traits
 - A. The laboratory processing conditions for the pathological test of clubroot included inoculation of *Plasmodiophora brassica* to seedlings at 10 days after sowing to become 4.0×10^8 spores/pot, and after incubation at 20°C for 5 weeks, the disease index was investigated in the range of 0–4, while Ohjora as sensitivity cultivar and Daebakna for moderate resistance were used as the controls
 - B. For the pathological test of fusarium wilt, the root of seedling cabbage at 14 days after sowing, and inoculated with *Fusarium oxysporum* after immersion at the inoculum concentration of 1×10^7 conidia/ml for 30 minutes. After incubating at 25°C for 3 weeks, the disease index was investigated with resistance and sensitivity, while YR Honam as the resistance control and Redmart as the sensitivity cultivar were used as the control (107 samples were tested to support breeders)
 - C. By synthesis of Clubroot and Fusarium wilt specific-genomic DNA oligomer and measurement of the biomass of fungi infected to cabbage, a quantification screening method of resistant reaction to clubroot and fusarium wilt was established
 - D. As for the heat resistance test processing conditions, the seedlings at 2 weeks after sowing were processed at 42°C by 2 hours per day for 1 week and the difference of the inter-lines genotypes were analyzed.
 - E. Based on the degree of tip-burn display through In vitro Culture at 0.3mM $[Ca^{2+}]$, the calcium deficiency insensitivity was diagnosed at early stage.
 - F. The screening systems were constructed for back cross selection, F₁ purity test, line fixation test, Fusarium wilt resistance test based on Fluidigm system, Fluidigm and HRM and PCR, respectively
4. Securing the useful trait-related genes and metabolites
 - A. Through a comparative analysis of proteomics expression, the useful genes

- were secured by selecting 47 of Fusarium wilt resistance–related genes and 22 of Clubroot resistance–specific genes.
- B. 6 of the heat resistance–related useful genes and 165 of the calcium deficiency insensitivity–related genes were secured from the comparative analysis of transcriptome
 - C. 25 kinds of the resistant primary metabolites to diamond back moth were secured from the resistance–related primary metabolome analysis
5. Development of useful genes applicable to the improvement of the cabbage crops
- A. A database was constructed by discovering 129,743 disease resistance and stress resistance related gene clusters through building a biomap
 - B. Discovery of the calcium deficiency insensitivity–related genes associated with tip–burn resistance and the mechanisms study
6. Collecting and developing the genetic resources of the cabbage crops
- A. Construction of a multiplex vector for transformation using herbicide resistant genes (bar), disease resistance related genes (chitinase), and insect resistant genes (Cry I Ab, Cry I Ac, Cry II A) and production of transgenic cabbages and broccoli by using the vector
 - B. Securing 97 lines from microspore culture, multiplication of the targeted traits related re–sequencing materials, proliferation of the 9 collected lines, generation advancement of 58 collections
 - C. Securing a total of 150 lines originated from a total of 7 combination/cultivars and 3 cultivars from 25 F₁ cultivars and selecting 39 lines holding the disease resistant superior characters
 - D. Fusarium wilt, heat resistance and calcium deficiency insensitivity related genetic mapping populations were prepared by 5, 4 and 3 cross combinations, respectively, and secured the seeds of F₂ or F₃
 - E. Proliferation of 150 lines of the international standard genetic mapping population, BolTBDH and proliferation of parents lines
 - F. 792 collections of genetic resources and the test for the characteristics of the useful traits
7. Construction of the in–country based transformation expression system
- A. Construction of high–efficiency transformation system in the transgenic rate ranging 3.8 to 8.7% by using the cotyledons of the cabbage and broccoli
 - B. Discovery of root, flower, and the whole plant–specific promoters through the analysis of the cabbage–derived disease resistance genes and promoter analysis
8. Development of new varieties by genomics assisted breeding system
- A. Development of 7 cabbage cultivars resistant to Fusarium wilt and heat
 - B. Development of 2 cabbage cultivars resistant to the calcium deficiency insensitivity
 - C. Development of 3 broccoli cultivars resistant to Fusarium wilt

V. Research performance and its utilization plan

In this study, molecular markers were developed for the fusarium wilt resistance, F₁ purity test, the line fixation test as the molecular markers which might be utilized in breeding through field application test, and the diagnosis of traits was established for fusarium wilt resistance, clubroot-resistance, calcium-deficiency insensitive type and heat resistance. The molecular markers and trait diagnosis will serve as a useful tool in developing new varieties of cabbage, and currently its field utilization has been tried for maximization through a technology transfer to institutions and research team available for the services. And plans to implement the education and promotion on the molecular markers developed are established with related conferences and workshops.

The breeding materials were developed by genetic resources collection, fixation, proliferation and anther culture, while the genetic resources were registered, which will be used as an excellent genetic resources in developing new varieties of cabbage.

12 cultivars were developed from performing the present study and they were applied and registered as new varieties. Among them, eight varieties are planned to promote for commercialization globally by the technology transfer in China, India and Asia as well as Europe. In addition, the technology transfer is in progress for 2 varieties currently. A database that can easily develop the molecular markers when needed according to the breeding goals and the genetic database was also constructed for the genetic function studies. The constructed database and useful information discovered will be utilized for further researches and breeding by public use through assessment

CONTENTS (영 문 목 차)

Chapter I.	Summary of the Project -----	20
Chapter II.	Domestic and International status of This Technology Development -----	029
Chapter III.	Scope and Results of Research -----	033
Chapter IV.	Accomplishment and Contribution -----	746
Chapter V.	Application of the Results -----	766
Chapter VI.	Foreign Science Technology Information Collected During Research -----	782
Chapter VII.	Status of the Research Equipments and Instruments -----	783
Chapter VIII.	Reference -----	784

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	20
제1절	연구개발의 목적	20
제2절	연구개발의 필요성	20
제3절	연구개발의 범위	27
제 2 장	국내외 기술개발 현황	29
제1절	국내 기술 개발 현황	29
제2절	국외 기술 개발 현황	30
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	33
1.	유전체 정보 가공 시스템 구축 및 유전체 정보 생산	33
가.	NGS resequencing 기술을 이용한 효율적인 유전체 정보 생산 시스템 구축	33
①	NGS-resequencing 기술을 이용한 Resequencing 생산 시스템 구축	33
②	NGS-resequencing 기술을 이용한 오믹스데이터 분석시스템 구축	36
③	양배추 5계통에 대한 genome sequence 생산 결과	39
④	양배추 resequencing 유전체데이터 QC과정	40
⑤	양배추 5계통에 대한 genome assembly과정	41
⑥	양배추 resequencing 유전체데이터 Genetic variant 발굴	43
나.	양배추류의 transcriptome, miRNA 생산 및 분석 시스템 구축	48
①	NGS-resequencing 기술을 이용한 Resequencing 생산 시스템 구축	48
②	NGS-resequencing 기술을 이용한 miRNA 생산 시스템 구축	54
③	NGS RNA-Seq데이터 분석 시스템 구축 방법	61
④	NGS small RNA 분석 시스템 구축	67
⑤	양배추 내서성 및 위황병 계통에 대한 RNA-Seq 데이터 생산	70
⑥	양배추 내서성/위황병/석회결핍 민감형과 둔감형 계통에 대한 RNA-Seq	

데이터 Filtering	72
⑦ 양배추 내서성/위황병/석회결핍 민감형과 둔감형 계통에 대한 RNA-Seq 데이터 Normalization	73
⑧ 양배추 내서성/위황병/석회결핍 민감형과 둔감형 계통에 대한 RNA-Seq 데이터 분석	73
⑨ 양배추 내서성/위황병/석회결핍 민감형과 둔감형 계통에 대한 RNA-Seq Transcript Difference Expression 분석	75
⑩ 양배추 내서성/위황병/석회결핍 민감형과 둔감형 계통에 대한 RNA-Seq 유전자발현 profiling	76
⑪ 양배추 samll RNA 오믹스 데이터 생산 및 분석	78
⑫ 브로콜리 miRNA의 유전자발현 조절하는 타겟 유전자 예측	81
다. 양배추 표준 유전자 세트 개발	82
① 양배추 표준 유전자 세트 작성	82
라. 29계통의 유전체 정보 생산	87
① 양배추류 재료 및 형질	87
② Resequencing 결과 및 통계치	89
③ High quality SNP 마커 개발을 위한 pipeline	91
2. 신품종 개발에 활용 가능한 tool 개발	104
가. 병 (시들음병, 뿌리혹병) 저항성 검정용 연관 분자표지 개발	104
① 양배추 BoCYP38 유전자를 이용한 시들음병 저항성 또는 감수성 품종 선별용 SNP 마커 개발	104
② 시들음병 마커 개발 및 검증	108
③ 시들음병 저항성 유전자 FocBo1 및 저항성 유전자들과 양배추 육종 소개의 관계분석	111
④ 전사체 비교 분석을 통한 시들음병 특이적인 발현 유전자 marker	113
⑤ 실험적으로 검증된 뿌리혹병 발현 마커	115
⑥ 전사체 비교 분석을 통한 뿌리혹병 특이적인 발현 유전자 marker	118
⑦ 병 저항성 domain 가진 특이 발현 마커 검증	122
나. 석회결핍 둔감형 검정용 연관 분자표지 개발	129
① DREB 유전자 발굴 및 발현 분자표지 개발	129
다. 내서성 검정용 연관 분자표지 개발	132
① 내서성 모니터링용 분자표지 개발	132
② 내서성 계통 간 RNA-Seq. 분석을 통하여 개발된 유전자마커	135
라. 배추좁나방 저항성 검정용 연관 바이오마커 개발	143
① 대사체분석을 통한 배추좁나방 저항성 바이오마커 개발	143
마. F1 품종 순도검정 분자표지 개발	146
바. 계통 고정 검정 분자표지 개발	151
사. 여교배 선발용 SNP 분자표지 개발	157
① SNP validation	157

② SSR 마커 개발을 위한 증폭인자 개발	158
③ 2-3Mb distance 수준의 genome-wide (GW) SNP set 개발 및 초기형태 바이오 칩 개발	161
아. 양배추류 기본 유전자 지도 작성 및 QTL 지도 작성	161
① 양배추류의 유전자 지도 작성	161
② 사업단에서 개발한 SNP 마커 지도화 및 형질 연관 개발된 SNP 마커 지도화	177
③ Tip-burn 저항성 형질 관련 QTL 분석	182
④ F2 분리집단에서 배추좁나방 저항성 형질 표현형 조사 및 QTL 분석	185
자. 신 마커 개발용 데이터베이스 구축	190
① 데이터베이스 구축	190
차. 엘리트 계통의 마커 개발	219
3. 품종개발 관련 유용형질의 실험적 진단 기법 구축	229
가. 시들음병 뿌리혹병 저항성, 감수성 진단법 구축	229
① 시들음병 병리 검정을 통한 품종 라인 선별 및 실험실 처리 조건 확립	229
② 뿌리혹병 병리 검정을 통한 품종 라인 선별 및 실험실 처리 조건 확립	231
③ 분자생물학적 분석을 통한 양배추 시들음병, 뿌리혹병 저항성 반응의 정량화	233
나. 내서성, 석회 결핍둔감형 조기 진단법 구축	235
① 양배추 고온 스트레스 처리조건	235
② 양배추 계통간 내서성 형질 확인	235
③ 석회결핍 둔감형 계통의 특성분석 방법 확립	237
다. 개발된 분자표지 검정 시스템 구축	239
① PCR 기법을 통한 내서성 형질 계통 간 내서성 구분 유전자마커 가능성 분석	239
② PCR 기법을 통한 위황병 검정 시스템 구축	244
③ Fluidigm을 이용한 F1 순도검정 진단법 구축	247
④ Fluidigm을 이용한 계통고정 검정 진단법 구축	256
4. 유용형질 관련 유전자 및 바이오마커 확보	274
가. 전사체, 단백질 발현 비교 분석을 통한 시들음병, 뿌리혹병 저항성 관련 유용 유전자 확보	274
① 저항성, 감수성 양배추 계통의 2-D 단백질 분석	274
② 내병성 관련 대사체 분석	275
③ RNA-seq을 이용한 양배추 시들음병 저항성, 감수성 개체의 발현체 분석	279
④ 십자화과 제늄 염기서열 비교를 통해서 시들음병과 뿌리혹병 처리에	

의해서 발현되는 병 특이 발현 마커 유전자 확보	284
나. 전사체 비교분석을 통한 내서성, 석회결핍 둔감형 관련 유용 유전자군 확보	289
① 석회(칼슘) 결핍 생리 장애 관련 RNA-seq 분석을 통한 유용 유전자군 발굴	289
② 조건별 석회 결핍 생리 장애 관련 선발된 유전자군(DEG)의 GO 및 SNP 분석을 통한 유용 유전자군 선발	293
③ 전사체 비교분석을 통한 내서성 저항성 후보 유전자군 선발	302
다. 배추좁나방 저항성 관련 대사체 확보	309
① 배추좁나방 저항성, 감수성 양배추의 대사체 수준 비교	309
② GC-TOFMS이용한 metabolite profiling	311
5. 양배추류 개량에 적용 가능한 유용 유전자군 개발	320
가. 병저항성 및 스트레스 저항성 관련 유전자군 발굴	320
① 내서성 조절 기작연구 및 관련 특이 유전자군 발굴	320
② 내서성 저항성 후보 유전자군의 프로모터 영역 염기서열 분석	326
③ 시들음병, 뿌리혹병 저항성 관련 유전자 연구	332
④ 병 관련 chitinase 유전자 연구	339
⑤ 스트레스 관련 유전자 Thaumatin, Dirigent 유전자 연구	360
⑥ Defensin 및 Betv1AFP 유전자 연구	385
⑦ WRKY 유전자 연구	387
⑧ Alfin-like TF family 유전자의 동정 및 해석	405
나. 석회결핍 둔감형 관련 tip-burn 저항성 연관 유전자군 발굴 및 기작 연구	409
① 애기장대를 이용한 석회결핍 관련 기작 연구	409
② 칼슘부족현상에 대한 유전자 발현패턴 분석	412
③ DREB2와 칼슘결핍과의 관계	414
④ 애기장대를 이용한 칼슘제한 조건 특이 유전자 기능 연구	415
⑤ Microarray 분석을 통한 칼슘결핍조건에서의 유전자 발현 변화 분석	416
다. 배추좁나방저항성 관련 유용 유전자군 발굴	449
① 저항성 유전자 바이오맵 구축	449
② 배추좁나방저항성 관련 유전자 PLA	454
③ 글루코시놀레이트 생합성 관련 유전자의 전사량 조사	456
③ 배추 좁나방 저항성과 감수성 양배추의 글루코시놀레이트, 유리아미노산 분석	464
④ 양배추 글루코시놀레이트 및 GABA 합성 관련 전사인자 과다발현 형질전환체 제작	473
⑤ 배추 글루코시놀레이트 합성 관련 전사인자가 과다발현된 모상근 제작	474

6. 양배추류 유전자원 수집 및 육종 소재 개발	479
가. 형질 전환용 multiplex 벡터 construct 제작	479
① Multiplex 벡터 construct 제작	479
② 항생제 무선헌용 벡터 구축	482
나. 양배추류 유전자원 수집 및 고정	482
① 양배추류 핵심집단 증식 및 사업단 기탁	482
② 석회결핍, 배추좁나방 계통 및 조합 선발	495
③ 보유자원 및 수집유전자원 원예적특성 평가 및 선발	507
다. 브로콜리 수집품종, 시험조합 특성 검정	596
① 수집품종과 시험조합의 특성검정	596
라. 브로콜리 소포자 유래 계통 육성	602
① 약(소포자) 유래 계통 육성을 위한 연구방법 및 소재 확보	602
② 약유래 계통 세대진전 및 우수계통선발	612
③ 약유래 우수계통 최종선발	612
마. 목표형질 관련 RIL 또는 F2 분리 집단 작성	614
① 양배추류 유전집단(F1 및 F2) 양성	614
② 유전집단 교배조합 및 F1, F2 종자 생산	618
③ 유전집단 소포자 배양	625
바. 양배추류 국제 표준 유전집단 증식	626
7. 국내기반 형질전환 발현 시스템 구축	633
가. 양배추의 고효율 형질 전환 시스템 구축	633
① 배축법을 이용한 형질전환	633
② 고효율 녹색꽃양배추 및 양배추의 형질전환 시스템 개발	637
③ 녹색꽃양배추 및 양배추의 형질전환체 T2 세대에서 도입 유전자 (CraIIA) 의 발현 확인 및 제초제 검정	648
④ 형질전환체의 세대 진전 및 도입 유전자의 발현 분석	650
나. 배추 유래 병저항성 유전자 관련 promoter 분석	651
① 병 저항성 유전자 관련 promoter의 동정 및 해석을 통한 형질전환용 vector 구축	651
8. 유전체 육종 기반 신품종 개발	657
가. 목표형질 관련 양배추 신품종 개발	657
① 시들음병, 내서성 보유 양배추 품종 개발	657
② 석회결핍둔감형 보유 양배추 품종 개발	700
나. 목표형질 관련 브로콜리 신품종 개발	707
① 기보유 우수형질 및 내병계 계통 선발	707
② 세포질 응성불임성(CMS) 계통 육성 및 조합성능검정	733
③ 선발 조합의 품종보호출원	742
④ 해외 적응성 시험	745

제4장 목표달성도 및 관련 분야에의 기여도	746
1절. 연구개발의 목표의 달성도	746
2절. 관련분야의 기술발전예의 기여도	764
제5장 연구개발 성과 및 성과 활용계획	766
1절. 연구개발 성과	766
2절. 연구개발 성과 내역	767
3절. 연구개발 성과 활용 및 연구 종료 후 활용 계획	780
제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보	782
제 7 장 연구시설·장비 현황	783
제 8 장 참고문헌	784

제 1 장 연구개발과제의 개요

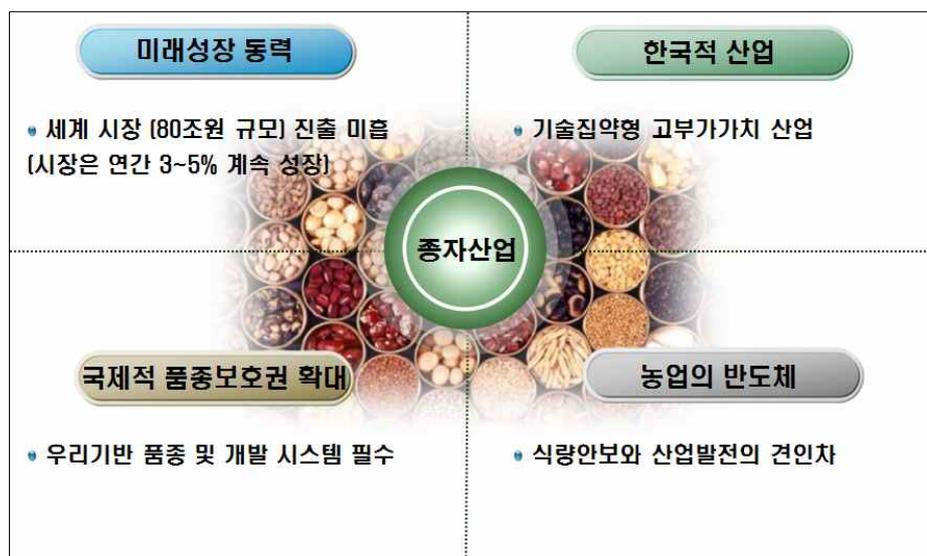
제1절 연구개발의 목적

양배추는 전세계적으로 가장 많이 재배되고 있는 채소작물로서, 고부가가치를 창출할 수 있는 국내 주요 수출 전략 품목이다. 국내의 양배추류 육종은 중소기업에 의해 이루어지고 있으며, 전통 육종 기반으로 신품종이 개발되어 신품종의 시장수명에 비해 개발 기간이 길고, 국제적 경쟁력이 약화 되어 있는 상황이다. 이에 본 사업단은 첨단 오믹스 기법을 기반으로 활용하여 보다 신속하고 경제적으로 양배추류 품종 개발을 할 수 있도록 신품종 개발에 활용 가능한 tool의 개발 및 체계적인 품종 개발 기반을 구축하는데 그 목적이 있다.

제2절 연구개발의 필요성

1. 종자산업

- 세계 종자산업 시장 규모는 약 700억불로 추정되며 현재 첨단생명공학기법 접목으로 지속 성장하고 있다. 품목별로는 농산이 365억불로 전체의 53%를 점유하고 있으며, 축산(25%)과 수산(22%)이 나머지를 차지하며 한국은 약 1.5%의 종자 시장 점유율을 확보하고 있다. 세계 10개 다국적 종자기업이 영세·중소 종묘사들을 합병 인수하며 시장 지배력을 강화시키며, 현재 전체 시장의 70%정도의 점유율을 확보한 것으로 보고되어 지고 있다 (출처 : ETC group, Action Group on Erosion, Technology and Concentration,'08). 또한 전 세계적으로 식량안보 및 산업경쟁력 제고를 위해 유전자원 수집·평가·이용 등 유전자원에 대한 주권을 강화하고, 유전자원을 활용하여 종자 개발·생산·유통·수출입 등을 주도하는 민간 산업이 활성화 되고 있는 추세이다.

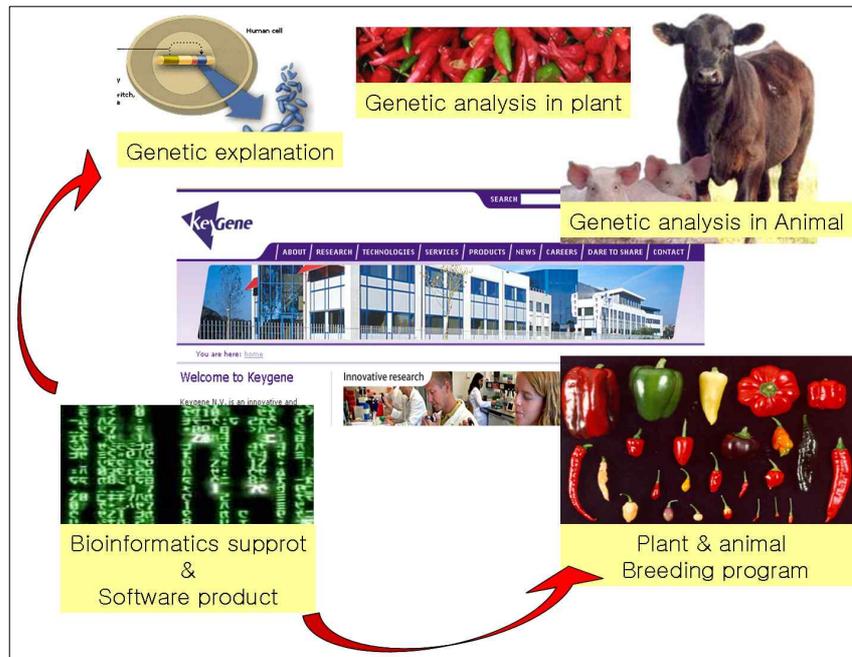


<우리나라의 종자 산업 활성화 필요성>

- 국내 종자시장은 4억\$ (5.8천억원) 수준으로 세계 시장의 1.1% 차지, 식량·화훼·과수 등의 종자개발은 정부에 의해, 채소는 민간업체가 주도하고 있으나, IMF이후 다국적기업이 국내종자회사 M&A를 통해 국내시장 진출하여 점유율을 높혀 가며, 국내기반 민간육종은 중소형의 첨단육종을 시도하지 못하고 있는 실정이다.
- 2002년 국제식물신품종보호연맹 (UPOV) 가입으로 품종보호권 설정 품종에 대한 로열티 지급 의무법이 생겨났으며 현재 로열티 지급액은 해마다 증가되는 추세이다. 세계 품종보호 대상 작물은 최근 10년동안 약 27종에서 223종으로 증가되었으며, 종자의 복제 및 로열티 지급 관련사항이 국내 종자산업 현안문제로서 대두되고 있다.
- 종자산업은 미래 성장동력 산업으로 발전 가능성이 매우 높은 분야이다. 생명공학기술 등 첨단기술의 활용은 더 활발하게 일어날 것이며, 종자시장은 품목중심 1차 생산물 시장에서 식품, 제약, 레저 등을 포함한 융복합 시장으로 확대되어질 것으로 전망된다.
- 종자산업은 기술·자본 집약산업으로서 우수한 인적자원과 기술력을 보유한 우리나라에 적합하다. 종자는 농업생산성과 생산비를 결정하는 중요한 요소로 신품종 개발에 장기간 투자를 필요로 하여 초기시장 형성을 위한 정부지원이 매우 중요하다. 세계 각국의 유전자원 확보경쟁과 품종보호권 확대에 대응한 종자산업 육성이 필요성이 더욱 부각되어지고 있다. 이를 위해 경제적이고 효율적인 육종 기반을 확립하고, 민간 육종 역량을 강화하고 품종보호권 강화와 수입 대체 및 수출용 품종이 국제 경쟁력 있게 개발될 수 있는 기반 구축으로 이 매우 절실한 실정이다.

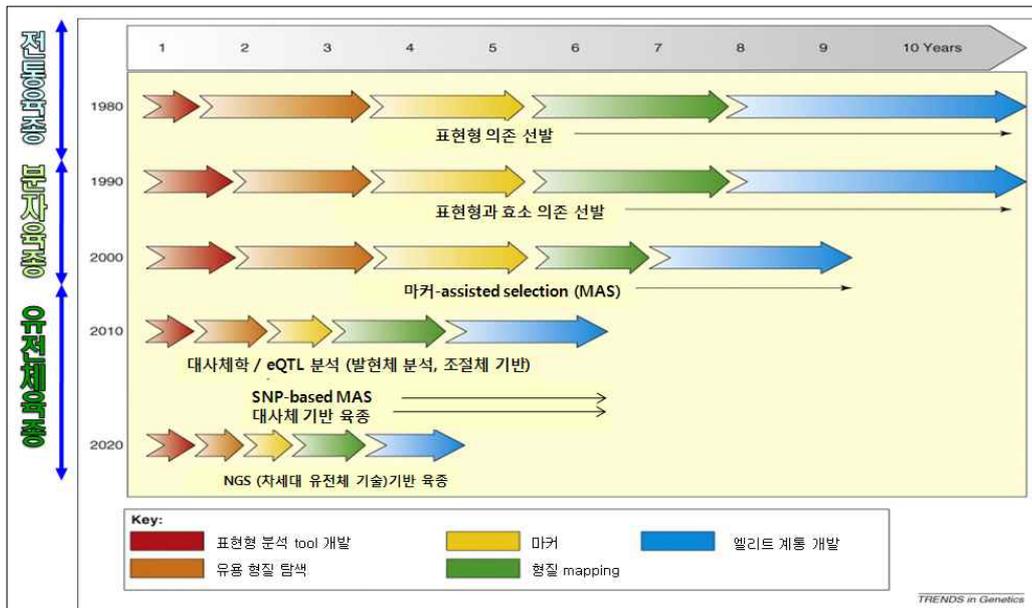
2. 분자유종, 유전체 육종

- 현재 상당수의 경제 작물의 전체게놈서열을 결정하려는 움직임이 있고, 많은 수의 재배 작물의 분자유전자지도가 작성되고 있으며 이를 통한 대규모 분자표지개발 (molecular marker development)이 이루어져 전통적인 육종 방법에 접목되고 있어 전통육종의 효율을 획기적으로 증대시키는 기술이 머지않은 장래에 다수 개발될 것으로 전망된다.
- 선진국에서의 분자유종의 장래는 확실시된다. 비록 현재 유전공학에 대한 많은 우려 때문에 분자유종의 상업화가 일부 지연되고 있는 것은 사실이며, 이러한 과정은 반드시 필요한 검정과정이라는 것이 일반적인 판단이다. 그러나 분자유종이 작물의 개량에 일반화될 것임은 분명하다. 그 이유는 물론 현재의 인구증가율을 고려할 때 현재의 육종기술로는 도저히 식량 수요를 충족시킬 수 없다는 심각하게 예상되는 식량부족 현상이 중요원인 중 하나이나, 이에 못지않게 현재의 분자유종에 대한 우려가 거의 대부분 기우임이 확인될 것이기 때문이다. 즉, 분자유종기술이 가져올 수 있는 문제점은 현재 인류가 활용하고 있는 많은 수의 과학기술이 가져올 수 있는 가능한 문제점 보다 더 우려할 바는 아님이 일반인들에게 인지될 것이기 때문이다. 일반적으로 우리 인류가 상용하는 기술에 비해 위협하지 않다면 편리하고 생산성이 높고 또한 환경 친화적인 성격이 강한 분자유종 기술이 각광받을 것으로 본다.



<해외 기업의 신제품 개발 모식도>

- 선진국에서는 1세대 분자유종기술이 상업화에 진입함에 따라 차세대 분자유종기술의 개발을 시작하였다. 전체 유전체의 염기서열을 결정하고 유전체에 기록되어 있는 모든 단백질의 구조와 기능을 분석하여 자료화함으로써 기존의 유전학적, 생리학적, 생화학적 분석법에 의해 확인될 수 없었던 생리와 발달과정을 규명하게 될 것이다. 따라서 대대적으로 앞으로 20년 사이에 작물이 가지는 모든 생화학적, 생리학적, 발생학적, 유전학적 현상이 분자수준에서 규명되어질 것으로 예상된다. 아울러 작물의 유전자 도입에 의한 형질변환기법의 개발도 커다란 성과가 있을 것으로 예상된다. 이들은 현재까지 이루어진 단일 transgene을 활용한 분자유종이 아니라 다수 transgene의 도입과 도입된 transgene의 다양한 발현조절이 가능한 분자유종을 가져오게 할 것이다.
- 이러한 연구의 결과들은 미래 작물의 육종이 분자유종에 크게 의존하게 됨을 의미한다. 이러한 단계에 진입하면 작물의 육종에서 기본 재료인 순계의 의미도 크게 퇴색할 것이다. 즉, 앞으로의 작물육종은 엄청난 유전자 염기서열 정보, 기능체 정보, 이들을 상업화로 이끄는 형질변환기법을 위시한 다양한 생명공학기법을 어느 나라가 가장 잘 활용할 수 있느냐로 성패가 결정될 것으로 예측된다.
- 최근들어 주요 작물의 전체 유전체 정보가 확보되고, 첨단 기술인 차세대유전체해독 시스템의 도입, 대사체와 발현체 조절체 정보를 기반으로 하는 유전체 육종 시대를 맞이하며, 그 기법을 유전자원 특성 평가, 여교배 선발, 종자순도검정, 교배조합능력 검정으로 활용하여 선발 효율이 1,000배 이상 증가하여 육종연한을 1/2~1/3정도 단축시킬것으로 예측되어진다. 이러한 유전체 육종은 신속하고 정확한 육종을 위한 도입이 불가피 하다.



<선진국의 육종 파이프라인: 과거, 현재, 미래> 출처: Trends in Genetics, 2009

3. 작물 유전체 정보 이용 기술의 필요성

- 유전체 연구는 한 개체 내에 존재하는 염기서열의 총합체인 유전체 (Genome) 및 관련 정보를 체계적으로 분석하는 연구 분야 및 이와 관련된 인프라를 포함한다. 유전체 연구는 생명공학 연구의 패러다임을 변화시키며 보건의료, 환경, 에너지, 화학, 농식품 등 광범위한 분야에서 활용 중이며 산업은 물론 국민의 삶의 질 제고에도 막대한 파급 효과를 줄 것으로 기대되어지고 있다
- 작물의 유전체 정보는 농생명산업의 기반 핵심 기술로서 고부가가치 신품종 개발에 있어 유전자원 특성 평가, 우수형질 도입, 여교배 선발, 종자순도검정, 교배 조합 능력 검정 등의 분야로 직접적으로 활용되어 신속 정확한 첨단 육종에 필수 요소이며, 따라서 개발되는 신품종의 가치와 가격 결정에 있어 결정적인 요인이다.

4. 양배추류 육종소재 개발의 중요성

- 배추가 아시아(한국, 중국, 일본 및 동남아)에 주로 한정 되어있는 채소인데 비해 양배추는 전 세계적으로 식용되고 있는 작물로 시장규모가 배추에 비해 월등히 크다. 최근 4년간의 수출증가추세에도 나타난 바와 같이 국내 양배추류의 육성 수준이 전 세계적으로 경쟁력을 갖추고 있다. 그러나 품종육성 수준은 기본적인 경쟁력을 갖추고 있으나 추가로 생명공학 등을 이용한 내병성 또는 내충성에 대한 연구가 체계적으로 시행되지 않는다면 현재까지 이루어 놓은 모든 기반자체가 일본 및 선진국에 또다시 위협받을 것이다.
- 국내에서 재배되는 양배추류는 대부분 외국산 품종이며, 그중에서도 일본산 품종이 다수를 차지한다. 이는 양배추 재배 면적이 2008년도를 기준으로 보았을 때 6,087 ha로, 무(27,308 ha)나 배추(37,285 ha), 고추(48,825 ha) 등에 비해 극히 적기 때문에 정

부연구기관이나 종자 회사에서 품종 육성에 크게 신경을 쓰지 않은 것과 우리나라에서 양배추가 재배되기 시작할 때부터 일본산 품종을 주로 사용해왔던 것이 가장 큰 이유이다. 지금까지도 주산단지라 할 수 있는 대관령이나 제주도 등지의 재배 농민들이 일본산 품종 또는 기타 수입종 품종을 대부분 재배하고 있다.

- 반면에 국내에서 육성된 양배추류 품종들이 외국에서는 상당히 인기가 있어 종자 수출액이 2009년에 약 250만 달러로 무와 고추 다음으로 많은 양이 수출되고 있다. 이는 국내에서 육성된 품종들이 결코 일본산 품종에 뒤지지 않는 경쟁력을 확보하고 있음을 반증하는 것이다.
- 전 세계 양배추 재배 면적은 1,600,000 ha정도이고, 종자 시장 규모는 약 1,600 ton 정도로 전세계적으로 가장 많이 재배되고 있는 채소 작물 중 하나이다. 중국의 연간 양배추 재배 면적은 약 937,000 ha, 인도의 경우 약 280,000 ha 그리고 동남아의 경우 약 100,000 ha로 전세계 양배추 재배 면적의 약 80% 이상을 차지한다. 그러나 대부분은 네덜란드와 일본종자회사의 육성품종이 재배되고 있어 외국의 바이어들도 일본과 네덜란드보다 종자가격이 다소 저렴하면서 품질이 우수한 다수의 품종을 한국의 종자회사에 요구하고 있어 우량 품종을 육성한다면 종자수출이 가능하다.
- 양배추류는 그동안 미국, 유럽, 일본 등의 나라에서 활발하게 품종육성을 해왔고 세계 시장을 주도해 오고 있으나 우리나라의 배추, 무 등 배추과 작물의 육종능력은 세계수준에 이미 도달해 있기 때문에 이들 육종기술을 양배추에 접목한다면 충분히 단기간에 세계시장에서 우위를 확보할 수 있다.
- 최근 육묘기술의 발달로 재배농민들은 점점 더 고순도, 고품질, 고기능성의 품종을 원하고 있다. 자식주가 발생하지 않는 100% 교잡종을 얻기 위하여 세포질웅성불임성을 이용한 육종방법이 각광을 받고 있는데 그동안 세포질웅성불임성을 이용한 양배추 품종육성은 몬산토, 신젠타 등 몇몇 다국적기업에서 해왔으나 최근 중국 농과원에서 활발히 웅성불임품종을 발표하고 있다. 따라서 우리나라도 자가불화합성 뿐만 아니라 세포질웅성불임성에 대한 연구를 활발히 할 필요성이 있으며 또한 품종의 종자생산시에 해외의 채종포에서 양친이 유출되는 것을 방지할 수 있기 때문에 웅성불임 육종이 매우 중요하다고 하겠다.
- 현재 국내의 종자생산자협회에 신고된 양배추류는 꽃양배추 51종, 녹색꽃양배추 176종, 양배추 276종, 케일 56종, 콜라비등 16종으로 총 575종이며, 그중 본 과제에 참여한 삼성종묘(주)는 꽃양배추 1종, 녹색꽃양배추 4종, 양배추 2종, 방울다다기 1종, (주)코레곤은 꽃양배추 3종, 녹색꽃양배추 4종, 양배추 12종, 케일 1종, 아시아종묘(주)는 꽃양배추 4종, 녹색꽃양배추, 19종, 양배추 19종, 케일 2종을 신고하여 판매하고 있다(3회사 총 72종).
- 따라서 본 3핵심과제를 통해 수행된 다양한 유전자원 수집, 전통적 육종방법(선발과 교배) 및 생명공학기법을 이용한 내서성, 내병성 및 복합저항성 양배추류의 소재개발 및 품종육성은 중국, 유럽 등의 거대시장을 개척할 수 있는 가능성 및 실현성을 충분히 포함하고 있으며, 목표 품종개발시에 고가의 종자가격으로 현재의 국내 종자수출액을 몇 배 더 키울 수 있고 국가의 중요한 수출작물로도 육성할 수 있을 것이다.

5. 양배추류 병·해충저항성 품종 육성의 필요성

- 현재까지 우리나라에서 육성, 발표된 양배추 및 녹색꽃양배추의 품종은 모두 자가불화합성을 이용한 1대잡종 품종이며, 최근 들어 세포질 응성불임성을 이용한 품종 육성이 시도되고 있다. 그러나 자가불화합성 채종에 있어서는 F₁ 종자의 순도저하와 양친 계통의 누출이 문제가 되고 있으며, 응성불임성 채종에 있어서는 소재의 한계성 및 로열티 문제가 있다.
- 시장성이 좋은 양배추류를 모델로 국제 경쟁력이 있는 분자유종기술을 도입하여 우수 품종을 개발하는 것은 수출증대를 확대 시킬수 있으며, 친환경농업이 가능하게 되며, 육종기간, 비용 및 생산비를 줄일 수 있다. 분자유종기술에 의해 양배추류에 있어 대표적으로 문제가 되고 있는 위황병 및 배추좀나방 등에 강한 복합내병성 품종이 육성될 수 있다.
- 배추좀나방은 우리나라를 비롯하여 전 세계적으로 문제가 되고 있는 해충이다. 피해를 줄이는 방법으로 기본적인 살충제에 의존하는 방법 이외에 성페로몬을 이용한다거나 천적의 이용, 인위적인 강수로써 성충의 부화를 억제하는 방법 등이 있으나 완전한 구제방법은 아직까지 개발되어 있지 않다. 다행히도 최근에 개발된 BT계열의 살충제는 해충의 구제에 어느 정도 효과적이라 할 수 있으나 동일 약제 살포에 대한 내성의 문제, 약제구입에 대한 경제적인 문제, 과다한 약제 살포로 인한 잔류독성 문제, 환경파괴 문제 등이 존재한다. 따라서 이러한 약제살포의 문제점을 해소하기 위하여 형질전환법을 이용한 GM 작물의 개발 및 교배에 의한 품종육성이 시급하다.
- 위황병은 불완전 균류에 속하는 전형적인 토양 전염성 병해로 california 채종지에서 최초로 발견되었으며, 최근에는 우리나라 및 동남아시아의 양채류 재배 전 지역에서 발견되고 있어 점차 피해가 증가하고 있는 실정이다. 위황병의 증상은 지상부는 황화 위축되고, 지하부는 도관부가 갈색으로 변하여 결국은 고사하는 병으로써 기온이 25~30℃, 건조조건에서 발병이 잘되며, 우리나라의 경우 여름에서 가을 재배 시 위황병의 피해가 심하다. 위황병의 방제방법으로 윤작재배, 훈증처리 등이 있으나 농가의 현실로 볼 때 윤작재배를 고려하기 어려우며 훈증처리 시 비용이 많이 들고 효과도 뚜렷하지 못하여 사실상 방제가 곤란하다. 따라서 저항성 유전자원의 확보가 시급하고 저항성 육종소재의 개발 및 품종육성이 필요하다.
- 뿌리혹병은 배추과의 주요 병해 가운데 가장 피해가 심하고 방제하기 어려운 병 중의 하나이다. 약제방제 또한 효율적이지 않아 재배 농가와 육성가를 오랫동안 괴롭혀 왔다. 배추에서는 Williams가 16개 레이스로 병원균을 분류하였으며, European Clubroot Differential set(ECD)로 분류체계가 연구에 활용되고 있으며, 일본에서는 “슈퍼CR히로키”, “용덕”, “무쌍” 품종을 이용해 4개 레이스 군으로 분류하여 육성에 활용하고 있다.
- 뿌리혹병 저항성 소재 및 품종이 양배추류에서는 매우 제한적인 것이 현실이다. 독일과 체코의 국경지방에서 재배중인 일부 품종과 아일랜드의 landrace와 소수의 유채품종이 저항성 소재로 가능성을 보이고 있다. 지금까지 밝혀진 양배추 저항성 유전은 polygenic한 특성을 보이며, 몇몇 연구그룹은 1개 QTL내에 1개 CR(Clubroot resistance) 유전자가 존재하고 있는 것으로 각각 보고하였으나 이들이 동일한 QTL과 CR 유전자인지 여부는 아직 베일에 가려져 있다.
- 한편 최근 몬산토와 다우아그로사이언스가 공동 개발한 SmartStax 옥수수가 식용과

사료용으로 국내 승인을 얻었다. SmartStax 옥수수는 8개의 유전자가 삽입된 초복합 형질 유전자변형농산물로써 지상 및 지하의 해충과 제초제에 저항성을 갖도록 제작되었다. 이 신품종의 개발은 농민들이 해충과 잡초의 통제를 더욱 효과적으로 할 수 있게 하였다.

6. 양배추류의 스트레스 저항성 및 고 기능성 품종 육성의 중요성

- 양배추류에서 가장 어려운 점은 정식 후에 제초제를 살포할 수 없기 때문에 회피방법으로 비닐을 멀칭하여 재배하는 점이다. 이 것은 대규모 재배에서 작업이 번거롭고 많은 노동력이 소요되어 비용이 많이 든다. 따라서 정식 후 제초제를 살포하여 제초할 수 있는 제초제 저항성을 가진 품종육성이 시급하다.
- 양배추는 그동안 활발한 연구와 품종육성으로 사시사철 재배할 수 있게 작형분화가 비교적 잘 되어 있는 작물이다. 하지만 인도, 파키스탄, 중국남부, 동남아 등의 열대지방에서 주로 재배되는 내서성에 강한 품종은 1970~80년대에 일본에서 개발한 품종들(KK Cross, KY Cross, Green Coronet 등)로 신품종이 제때에 개발되지 않아 이들 시장에서의 품종대체 욕구가 매우 크다.
- 중국, 인도, 인도네시아 등의 양배추 및 녹색꽃양배추 산지에서는 계속되는 연작과 고온다습 등 재배환경이 불량하여 위황병과 뿌리혹병의 피해가 날로 심해지고 있다. 따라서 내서성에 강하면서 위황병, 뿌리혹병에 강한 양배추를 농민들은 절실히 원하고 있으나 아직 이것을 충족시킬 품종개발이 대단히 더디기 때문에 시장을 개발할 좋은 기회라고 할 수 있고, 목표품종 개발 시 고가의 종자가격으로 현재의 종자시장을 몇 배 더 키울 수 있으며, 국가의 중요한 수출작물로 육성할 수 있을 것이다.
- 석회결핍증 내성 양배추는 기후 온난화의 영향으로 향후 그 요구도가 급격히 증가할 것으로 판단된다. 이에 따라 석회결핍증 내성 품종의 육성은 해외시장 확대에서 지렛대 효과를 가져올 것이며 이후 타 품종의 진입 장벽으로 작용할 것이다.
- 양배추류는 단백질, 당질, 무기질, 비타민 A, B1, B2, C 등이 상당량 함유되어 있으며, 필수아미노산의 일종인 라이신이 있어 영양가치가 높아 뇌 세포의 기능 활성화, 기억력 향상에 도움을 준다. 또한 식물성 2차 대사산물인 glucosinolate, flavonoid, polyphenol류, 황화합물 등이 풍부하며, 이러한 물질들은 생리활성 물질로서 체내에서 약리 작용을 나타내는데, 특히 면역계를 강화시킴으로써 건강유지에 기여하며 최근에는 암을 예방하는 대표적인 식품으로 여겨지고 있다. 따라서 고기능성 소재개발 및 품종육성은 유럽 및 북미시장을 개척할 수 있는 중요한 당면과제이다.

7. 고효율 양배추 신품종 개발을 위한 유전체육종 지원의 중요성

- 세계적 작물인 양배추의 고효율 신품종 개발 시스템 구축은 국가적인 고부가가치 창출에 있어 중요하다. 국내의 양배추류 육종은 중소규모의 종묘회사에 의해 이루어지고 있으며, 전통 육종 기반으로 신품종이 개발되어 신품종의 시장수명에 비해 개발 기간이 길고, 국제적 경쟁력이 약화 되어 있는 상황이다.
- 작은 규모이기는 하지만 양배추는 국내 3대 수출 작물에 속하여 수출 기반이 구축된 상황이어서 고효율 신품종 개발 기술에 대한 요구도는 매우 높은 상황이다. 국내 양배추 종자 수출은 2005년 21톤, 금액으로 1.8백만불을 수출하였으며, 2006년에는

31톤, 2.8백만불을 수출하여 고추(6.9백만불), 무(5.2백만불) 다음으로 큰 수출 품목이며 해마다 증가하고 있으며 2009년에는 25,494kg, 금액으로 250만불 이상 수출하여 고추, 무 다음의 수출 효자 품목으로 주로 인도, 중국, 인도네시아에 수출하고 있어 연구 주력시 경제성 확보 가능성이 매우 높은 작물이다.

- 수출용 품종 개발에 있어 병저항성, 해충저항성, 내서성, 석회결핍둔감형 등을 수출대상국의 요구도에 맞춰 그 우선순위가 높은 형질이라고 할 수 있다.
- 점점 단축되어가는 신품종의 시장 수명에 대비하여 효율적이고 빠른 신품종 개발 기술은 그 해결이 시급한 당면 과제이다.
- 분자표지를 이용하며 효율적으로 선발하여 보다 빠르고 정확한 신품종 개발은 종자시장에서 가장 중요한 개발 기술이라고 할 수 있다.
- 국내에 분자표지 개발을 위한 연구기반이 취약하고 마이너 작물인 양배추의 고효율 품종개발을 위해서는 효율적인 육종 시스템 확립이 시급하며, 이는 고부가가치 창출의 기반이 될 것이다.

따라서, 유전체 정보를 기반으로 하는 활용기술은 작물유전체 연구의 방향과 미래 비전을 제시할 것이며, 이를 통해 구축된 유전체 정보 가공 시스템은 타 작물의 유전체 및 분자표지 개발에 있어 중요한 밑거름이 될 것이다. 첨단 오믹스 기법을 이용한 주요 형질의 조기 진단 마커 개발 및 선발/탐색 마커 개발은 양배추 품종 개발에 있어 효율과 경제성을 확보할 매우 중요한 tool 이 될 것이다. 또한 품종개발에 있어 기초가 되는 유전자원의 체계적인 수집, 증식, 창성은 신품종개발의 경쟁력 확보에 밑거름이 될 것이다. 국제 경쟁력 있는 소비자 지향적 고부가가치 품종 개발이 필요한 시점이며, 이를 위한 신속 정확, 고효율적인 고기능성 품종 개발을 위한 국제 경쟁력 있는 첨단 tool 개발이 절실하다.

제3절 연구개발의 범위

1. 본 연구에서는 목표형질과 관련된 주요 유전자원의 유전체 분석을 통해 NGS resequencing 기술을 이용한 효율적인 유전체 정보 생산 시스템 구축, 양배추류의 Transcriptome, miRNA 생산 및 분석 시스템 구축, 양배추 표준 유전자 세트 개발을 하고자 한다.
2. 양배추류 신품종 개발에 활용 가능한 tool 개발로는 시들음병 및 뿌리혹병 저항성, 석회결핍 둔감형, 내서성, 배추좁나방 저항성 검정용 연관 분자표지 개발, F₁ 품종 순도 검정 및 계통 고정 검정 분자표지, 여교배 선발용 SNP 분자표지 개발을 포함하며, 분자표지 개발 및 유용 유전자의 기능 연구에 있어 중요한 양배추류 기본 유전자 지도 작성, 신 마커 개발용 데이터베이스 구축을 하고자 하며, 중요한 엘리트 계통의 마커를 개발하여 육종가를 지원하고자 한다.
3. 품종개발 관련 유용형질 (시들음병 뿌리혹병 저항성, 내서성, 석회 결핍둔감형)의 실험적 진단 기법을 구축한다.
4. 전사체, 단백질체 발현 비교 분석 및 대사체 분석을 통해 유용형질 관련 유전자 및 대사체를 확보하며 이들의 기작 연구를 통해 양배추류 개량에 적용 가능한 유용 유전자군을 개발하고자 한다.
5. 형질전환, 소포자 배양과 양배추류 유전자원 수집 고정을 통해 육종 소재를 개발하고

중요 자원의 증식을 통해 활용도를 높이며, 기능 연구 및 목표형질 관련 핵심마커 개발을 위한 목표형질 관련 RIL 또는 F₂ 분리 집단 작성한다.

6. 유용 유전자의 기능 연구 및 유전자원 창성에 기반이 되는 형질전환 발현 시스템과 양배추의 고효율 형질 전환 시스템을 구축하고자 한다.
7. 본 연구의 목표 형질을 보유한 양배추와 브로콜리 신품종 개발을 하며, 본 연구에서 개발되는 품종 개발용 tool 들의 현장 검증을 거쳐 개발된 tool의 활용성을 높이며, 양배추의 유전체 정보를 이용한 분자유종 가능성을 검증한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내 기술 개발 현황

1. 국내 양배추 육종 기술은 배추과의 다른 작물에 비해 연구기간이 짧지만, 품종 육성을 위한 기반을 어느 정도 갖춘 상태이다. 국내 양배추와 관련된 연구 인력은 10명 내외 수준이며, 현재까지 일본이나 유럽 품종들과 경쟁할 수 있는 우수한 품종들이 꾸준히 개발되고 있으나 응성불임(CMS)계통 육성은 초보단계이다.
2. 국내 양배추 육성은 민간주도로 1970년대 말 수출 목적으로 본격화 되었고, 외국에 비해 늦게 육성을 시작하였으나, 축적된 배추과 작물의 육성 기술을 바탕으로, 1990년대 초반부터는 인도, 중국, 동남아, 미국 등지에 많은 종자를 수출하는 수준으로 발전하고 있다
3. 국내 종묘업체는 몬산토 등 메이저 기업에 비하면 R&D투자 규모가 미미한 수준이고 연구 전문인력도 부족한 상황이어서 글로벌 기업과의 기술력 차이가 크다. 국내 양배추 종자 기술 경쟁력이 세계최고 수준에 근접하여 있지만, 산업적 측면에서 아시아 시장에서 세계 시장으로 진출할 기업 육성이 필요하다
4. 국내 양배추 종자 생산량은 2014년 기준 6,989kg이었으며(2013년 1,470kg의 4.75배 증가), 종자 수출량은 33,393kg(2013년 30,582kg의 1.1배 증가)으로 4,108천불(2013년 3,758천불의 1.1배)을 기록하였다. 이는 2014년 채소종자 수출 총액의 10%를 차지하는 금액이다. 하지만 2014년 양배추 종자 수입량이 47,667kg(1,916천불)으로서 아직은 수출량 보다 많은 양의 종자를 수입하고 있어 하루빨리 기업화 단계에 진입하여 전 세계를 무대로 수출을 증대시켜야 할 것이다
5. 몬산토, 신젠타 등 다국적기업들이 국내기업을 합병함에 따라 양배추 유전자원과 육종 기술이 유출되었기에 국내 품종 육성 기술의 기반 확대와 신규 유전자원의 확보가 시급한 상황이다
6. 현재 상당수의 경제 작물의 전체 유전체 정보를 결정하려는 움직임이 있고, 많은 수의 재배 물의 분자유전자지도가 작성되고 있다.
7. 국가 지원 사업으로 본과제는 양배추류의 유전체 기반 육종 tool을 개발하고 있으나 그 결과를 활용할 수 있는 규모의 육종 회사가 미비하며 신품종 개발은 전통 육종방법에 의해 진행되고 있다
8. 국내의 경우 내재해성, 내병충성 양배추 육종이 시작 단계에 있으며, 수출 목적지 별 요구도 (복합 병저항성 등) 만족형 품종 육성 중이다
9. 첨단 오믹스 기법을 이용한 조기 진단 마커 개발 및 선발/탐색 마커 개발은 고부가가치 양배추 신품종 개발에 있어 효율과 경제성을 확보할 매우 중요한 tool 이다. 국제 경쟁력 있는 소비자 지향적 고부가가치 품종 개발이 필요한 시점이며, 이를 위한 신속 정확, 고효율적인 고기능성 품종 개발을 위한 국제 경쟁력 있는 첨단 tool 개발이 절실하게 요구되고 있다.

제2절 국외 기술 개발 현황

1. 세계 주요 종자기업은 내재해성 유전자 확보, 고부가가치 신품종 개발에 중점 투자하고 있으며, 내서성에 강하면서 뿌리혹병에 강한 양배추류에 대한 수요가 높으나 아직 이것을 충족시킬 품종개발은 이루어져 있지 않다.
2. 해외 주요 업체에서 유전자원 보호 차원에서 MS활용 육성이 증가하고 있어 유전자원의 활용에 어려움이 커지고 있으며, 전통 육종 외에 소포자배양, 약배양 등 조직배양 기술이 앞서 있다.
3. 최근 뿌리혹병의 오염포장이 넓어지고 Race의 분화가 시작되어 신젠타에서 개발한 내병성 품종이 중국 북방지역에서는 내병성을 발현하나 남방에서는 내병성이 무너지는 현상이 일어나고 있다. 이에 따라 내병성 품종 육성을 위해 주요 병에 대한 마커 활용이 활발하게 이루어지고 있으며, 뿌리혹병 저항성(CR)과 검은썩음병 저항성(BR)인 품종이 출시되고 있다
4. 선진국에서는 1세대 분자유종기술이 상업화에 진입함에 따라 차세대 분자유종기술의 개발을 시작하였다.
5. 시들음병은 불완전 균류에 속하는 전형적인 토양 전염성 병해로 California 채종지에서 최초로 발현되었으며, 최근에는 우리나라 및 동남아시아의 양채류 재배 전 지역에서 발견되고 있고 점차 피해가 증가하고 있는 실정이다. 특히 우리나라의 경우 여름에서 가을 재배시 시들음병의 피해가 심하다. 위황병의 방제방법으로 윤작재배, 훈증처리 등이 있으나 농가의 현실로 볼 때 윤작재배를 고려하기 어려우며 훈증처리 시 비용이 많이 들고 효과도 뚜렷하지 못하여 사실상 방제가 곤란하다.
6. 뿌리혹병은 배추과의 주요 병해 가운데 가장 피해가 심하고 방제하기 어려운 병 중의 하나이다. 약제방제 또한 효율적이지 않아 재배 농가와 육성가를 오랫동안 괴롭혀 왔다. 최근 배추에서 Williams가 16개 레이스, 일본에서 “슈퍼CR히로키”, “용덕”, “무쌍” 품종을 이용해 4개 레이스 균을 분류하여 육성에 활용하고 있다.
7. 양배추류에서 뿌리혹병 저항성 소재와 저항성 품종이 매우 제한적인 것이 현실이다. 독일과 체코의 국경지방에서 재배 중인 일부 품종과 아일랜드의 landracea 및 소수의 유채품종이 저항성 소재로 가능성을 보이고 있다. 지금까지 밝혀진 양배추 저항성 유전은 polygenic한 특성을 보이며, 몇몇 연구그룹은 1개 QTL 내에 1개 CR(Clubroot resistance) 유전자가 존재하고 있는 것으로 각각 보고하였으나 이들이 동일한 QTL과 CR 유전자인지 여부는 아직 밝혀져 있지 않다.
8. 배추좀나방은 우리나라를 비롯하여 전 세계적으로 문제가 되고 있는 해충이다. 피해를 줄이는 방법으로 기본적인 살충제에 의존하는 방법 이외에 성페로몬을 이용한다거나 천적의 이용, 인위적인 강수로써 성충의 부화를 억제하는 방법 등이 있으나 완전한 구제방법은 아직까지 개발되어 있지 않다. 다행히도 최근에 개발된 BT계열의 살충제는 해충의 구제에 어느 정도 효과적이라 할 수 있으나 동일 약제 살포에 대한 내성의 문제, 약제구입에 대한 경제적인 문제, 과도한 약제 살포로 인한 잔류독성 문제, 환경과 괴 문제 등이 존재한다. 또한 형질전환에 의한 저항성 품종 육성의 경우 채소라는 특수성과 채소 품종의 다양성으로 인해 발생하는 경제성 등이 문제로 지적되고 있을 뿐 아니라 현재 BT 위주의 저항성 기작으로 인한 한계가 존재한다. 따라서 이러한 약제

살포의 문제점을 해소하기 위하여 배추좁나방 저항성 품종육성이 시급하다.

9. 양배추에서 석회결핍증은 수확부위인 결구부위의 품질을 저하시키는 요인으로 작용하며 불량환경에서 그 피해가 크다. 최근의 불안정한 환경요인으로 인해 그 피해가 점차 증가하고 있다. 석회결핍증 내성 양배추는 기후 온난화의 영향으로 향후 그 요구도가 급격히 증가할 것으로 판단된다. 이에 따라 석회결핍증 내성 품종의 육성은 해외시장 확대에서 지렛대 효과를 가져올 것이며 이후 타 품종의 진입 장벽으로 작용할 것이다.. 따라서 석회결핍증 발생이 적은 둔감형 품종의 육성은 매우 중요하나 현재까지 전 세계적으로 석회결핍증 둔감형 품종의 보급은 이루어지고 있지 않으나 육종 과정에서 선발의 지표로 중요시 되고 있다. 육종 과정에서의 선발도 재배시험 포장에서의 자연발생에 의지하는 경향으로 보다 적극적인 칼슘결핍증 내성 선발을 통해 보다 빨리 우수 품종을 육성한다면 경쟁시장에서 우위를 확보할 수 있다.
9. 양배추에 대한 연구 및 품종 육성은 전 세계적으로 활발히 이루어지고 있으나, 양배추 종자 시장은 몬산토, 베조, 다끼이, 신젠타, 사카타 종묘업체 등에서 대부분을 차지하고 있는 실정이다. 이들 거대 글로벌 기업들은 꾸준한 연구개발 투자로 그 기술 수준은 이미 안정화 단계에 있으며 그 결과물인 고품질의 양배추 품종을 앞세워 전 세계적으로 판매하고 있는 상황이다. 한편, 우수 형질의 양배추를 이용하여 양배추 유전체 연구도 활발히 진행하고 있어, 유전체 정보를 바탕으로 기존보다 월등히 우수한 품종을 짧은 기간 내에 확보하고 있으며 이러한 유전체 정보는 내병성 검정 및 종자순도 검정에도 적용하고 있는 상황이다.

<개발 기술의 국내외 비교>

구분	구분	기술격차 (년)	최고기술수준 보유 국가(기업)	최고기술수준의 의미
육종 기반	시설/장비	3	일본(Takii)	세계 각국에 현지법인을 통한 Shuttle breeding 가능 분자마커 개발능력 인력 세계 최고 생명공학분야의 지속적인 R&D의 투자로 시설, 장비의 첨단화
	인력	3	스위스(sygneta)	육종효율 높일 수 있는 다수의 R&D 인력 보유
	정보	3	일본(Keneko)	전 세계 현지법인을 통한 각국 정보의 수집능력 탁월 보유 유전자원 정보의 그룹내 육종가 간의 개방된 공유 및 제공
유전자원	유전자원 보유	3	네덜란드(SVS)	오랜 육종역사를 가진 기업으로 이에 따른 유전자원 축적
	유전자원 기초 및 안정성 연구	3	일본(다끼이)	육종소재의 기본적인 유전 정보에 관한 DB 구축
품종 육성	전통육종	3	일본(Keneko)	오랜 육종 역사와 최고 육종인력 보유
	분자육종	5	스위스(sygneta)	MAB, MAS를 통한 육성연한 단축
	생력화	3	일본(Takii)	육종효율을 향상하기 위한 자동화 기술, 기계 보유 및 지속적인 개발
	품종평가	2	미국(Monsanto)	순도검정 및 성분분석, 병리검정에 관한 분자마커 개발을 통한 체계적인 종자 생산관리
종자 상용화	종자생산	3	일본(다끼이)	종자생산의 체계적인 매뉴얼화

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 유전체 정보 가공 시스템 구축 및 유전체 정보 생산

가. NGS resequencing 기술을 이용한 효율적인 유전체 정보 생산 시스템 구축

① NGS-resequencing 기술을 이용한 Resequencing 생산 시스템 구축

㉠ Genomic DNA의 추출 : NGS-resequencing을 위해 필요한 샘플 DNA 준비 (그림 1-1)

- ㉡. 양배추 5계통의 샘플에서 DNA를 분리하기 위해 grinding 된 샘플 50g을 취하여 e-tube에 담고 ATL buffer 180ul와 Proteinase k 20ul을 섞어 넣고 56℃에서 한 시간 동안 반응시킴
- ㉢. AL buffer 200ul를 넣고 섞어 준 후 다시 56℃에서 10분간 반응시킨 후 반응이 끝나면 200ul 에탄올을 넣고 섞은 후 spin column로 옮겨 담고 8,000rpm에서 1분간 원심 분리함
- ㉣. 다음 AW1 buffer 500ul를 넣고 동일하게 원심 분리한 다음 다시 AW2 buffer 500ul를 넣고 14,000rpm에서 3분간 원심 분리함
- ㉤. Column에 남은 에탄올을 완전히 제거하고 난 후 새 튜브로 옮긴 후 1xTE buffer 50ul를 넣고 원심 분리하여 DNA를 회수하여 정량함
- ㉥. DNA 농도는 1ug 이상이어야 하고, purity 측정을 위한 OD260/280 값은 1.8~2.0 이어야 함

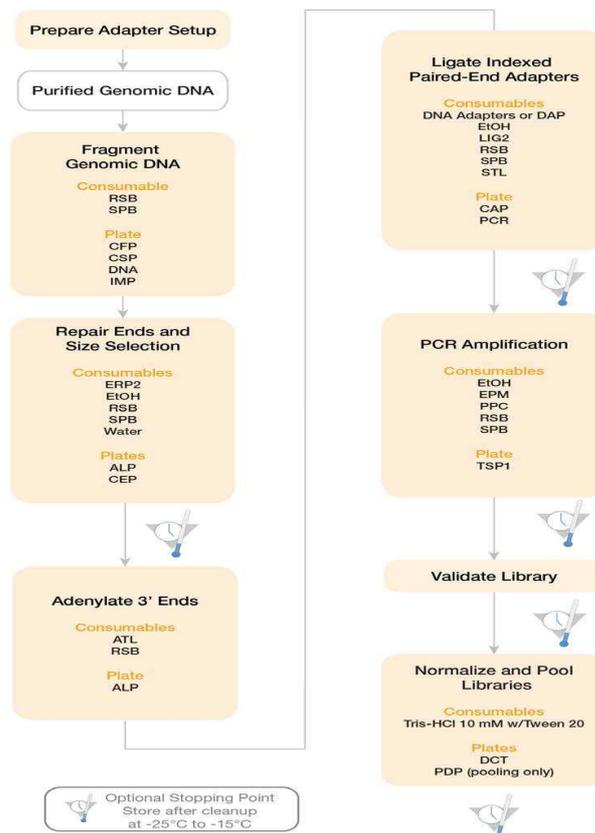


그림 1-1. Genomic DNA Library제작 방법

㉔ NGS-resequencing용 DNA Library : NGS 장비인 HiSeq2000을 이용하여 유전체 데이터를 생산하기 위한 DNA Library 제작

- ㉔. 샘플 DNA Fragment DNA : TruSeq Nano DNA Library(350bp, Insert size)를 제작하기 위해서 정제된 genomic DNA(0.1~1ug)를 resuspension buffer와 섞어 (총 53ul) Covaris S220을 이용해 DNA를 조각으로 단편화하기 위하여 준비함(350 bp Insert, Duty factor 5%, Peak Incident Power 175 W, Cycles per burst 200, Duration 50 seconds, Mode Frequency sweeping, Temperature 5.5 ~ 6°C). 단편화시킨 DNA조각은 Sample Purification Bead 80ul을 잘 섞어준 다음 15분 동안 incubation 시킨 후, magnetic stand 상에서 8분 incubation시켜 층이 분리되면 상층액을 제거함. 다음 bead를 200ul의 80% 에탄올로 2번 washing 을 수행한 후 magnetic stand 상에 둔 채 15분 incubation 해서 완전히 말린 다음 62.5ul Resuspension buffer로 elution함. 다음 60ul 상층액만 따서 새 PCR tube에 옮김
- ㉕. End Repair 및 Size Selection : 60ul 상층액에 10ul의 End Repair Mix 2를 섞어 준 다음 thermal cycler상에서 30°C에서 30분 incubation 후 4°C에 유지시켜 줌. Sample Purification Bead와 PCR grade water를 1:1로 희석한 것을 160ul넣고 잘 섞어준 다음 실온에서 5분 incubation해 줌. 반응액을 magnetic stand 상에서 5분 incubation해 준 다음 층이 분리되면 250ul의 상층액을 따서 새 tube에 옮김. 이 과정에서 큰 사이즈의 DNA 조각이 제거되게 됨. 다시 작은 사이즈의 DNA 조각을 제거해 주기 위해 옮긴 250ul의 상층액에 30ul의 Sample Purification Bead를 섞어준 다음 5분 incubation시켜주고 magnetic stand 상에서 5분 incubation해 준 다음 층이 분리되면 상층액을 제거함. 200ul의 80% 에탄올로 2번 washing해 줌. Magnetic stand 상에 둔 채 15분 incubation해서 완전히 말린 다음 20ul Resuspension buffer로 bead pellet을 녹여줌. Magnetic stand 상에서 5분 incubation한 다음 층이 분리되면 17.5ul 상층액만 따서 새 PCR tube에 옮김
- ㉖. Adenylate 3' Ends : 17.5ul 상층액에 12.5ul A-Tailing Mix를 섞어준 다음 thermal cycler상에서 반응시켜 3'말단에 A를 붙이게 됨. 37°C에서 30분, 70°C에서 5분, 4°C에서 5분 반응 시킨 후 4°C로 유지함. 반응이 끝난 샘플에 30분 후 2.5ul DNA Ligase Mix와 2.5ul Ligase Control mix, 2.5ul RNA Adapter Index 를 잘 섞어준 다음 thermal cycler 상에서 30°C에서 10분 incubation해 줌. 5ul Stop Ligase Mix를 잘 섞어 줌으로써 반응을 정지시킴. Sample Purification Bead 42ul를 잘 섞어 준 다음 실온에서 15분간 둔 다음 magnetic stand 상에서 5분 incubation해서 층이 분리되는 걸 확인 후 상층액만 제거해 줌. 200ul 의 80% 에탄올로 2번 씻어줌. Magnetic stand 상에 15분 동안 두면서 완전히 말린 다음 52.5ul Resuspension buffer로 pellet을 녹임. Magnetic stand 상에서 5분 incubation 한 다음 상층액 50ul 따서 새 tube에 옮김. 50ul Sample Purification Bead와 섞어준 다음 실온에서 5분 incubation한 후 magnetic stand 상에서 5분 incubation해서 층이 분리되면 상층액을 제거해 줌. 200ul의 80% 에탄올로 2번 washing해 줌. Magnetic stand 상에 15분 동안 두면서 완전히 말린 다음 27.5ul 의

Resuspension buffer로 bead를 녹인 다음 magnetic stand 상에서 5분 incubation 후 층이 분리되면 bead가 떨어져오지 않게 25ul의 상층액만 따 내어 새 tube에 옮김

- ㄹ. Enrich DNA Fragments : 25ul의 상층액에 5ul의 thawed PCR Primer Cocktail 과 20ul의 thawed PCR Master Mix를 섞어준 다음 PCR반응을 통해 증폭시켜 줌(95℃에서 3분, 8 cycles(98℃에서 20초, 60℃에서 15초, 72℃에서 30초), 72℃에서 5분, 4℃에서 유지). 반응이 끝난 다음 50ul Sample Purification Bead 와 섞어준 다음 실온에서 5분 incubation해 줌. Magnetic stand 상에서 5분 incubation해 주고 층이 분리되면 상층액을 제거해 줌. 200ul의 80% 에탄올로 2 번 washing해 줌. Magnetic stand 상에 둔 채 15분 incubation해서 완전히 말린 다음 32.5ul Resuspension buffer로 bead pellet을 녹인 다음 magnetic stand 상에서 5분 incubation해 줌. 층이 분리되면 bead가 떨어져오지 않게 30ul의 상층액만 따 내어 새 tube에 옮김. 최종적으로 얻은 상층액이 완성된 DNA 라이브러리임
- ㅁ. Validate Library : Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer를 사용해서 Agilent DNA-chip으로 라이브러리 size와 purity를 측정함. 이 product의 band는 평균 470bp이상에 있어야 함. 통과한 라이브러리는 KAPA Library Quantification Kit 를 이용해 qPCR과정에 들어가고 정확한 몰농도를 측정하여, sequencing에 적절한 cluster를 합성할 수 있는 목표몰농도(10nM)로 희석하여 sequencing에 사용함(그림 1-2)

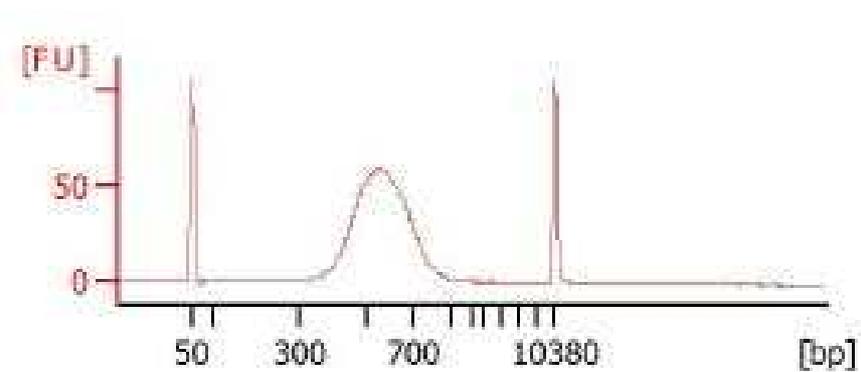


그림 1-2. TruSeq Nano DNA Library Prep 350bp insert Library

② NGS-resequencing 기술을 이용한 오믹스데이터 분석시스템 구축

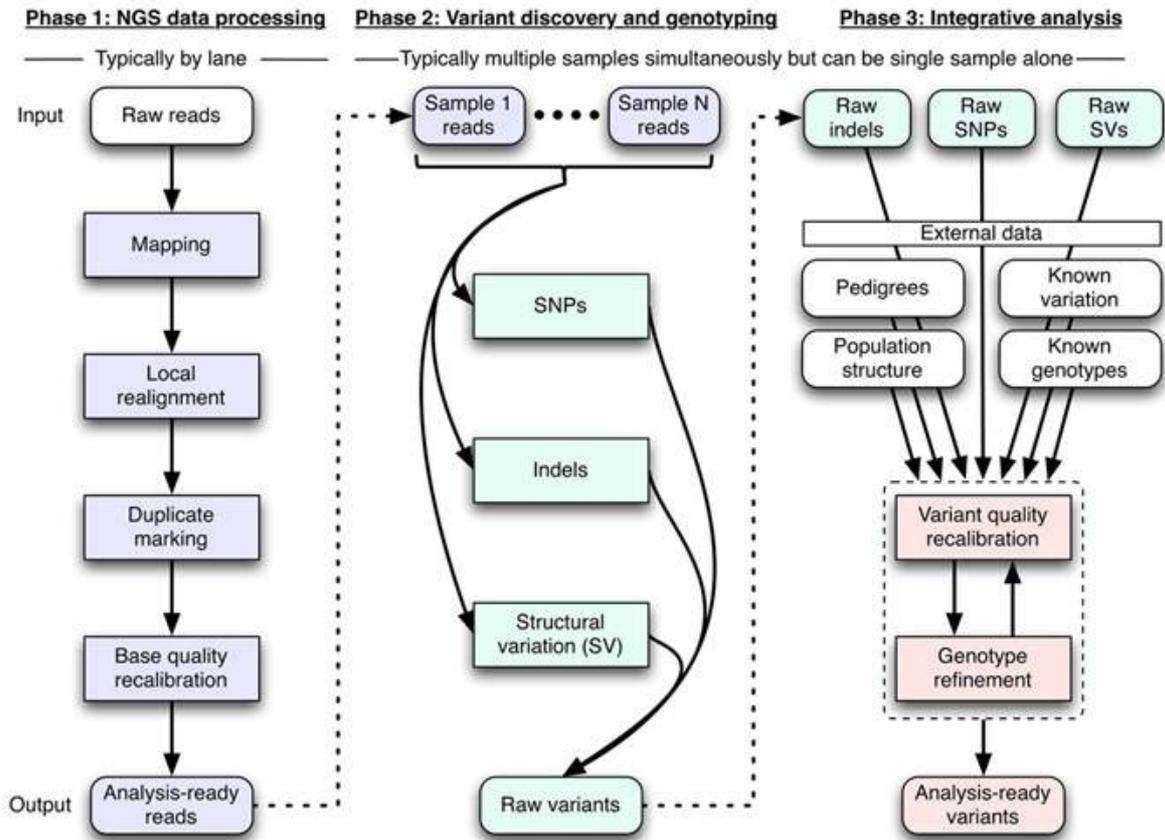


그림 1-3. 양배추 Resequencing을 통해 분자마커 동정 절차

㉞ 유전체 sequencing (HiSeq2000)

- ㄱ. 라이브러리 품질검사를 통과한 라이브러리는 cluster 합성을 위해 cBot기기를 이용하여 cluster를 합성함. cluster 수를 750-820K를 기준으로 함
- ㄴ. 합성이 종료되면, sequencing시약인 SBS kit를 원하는 sequencing cycle에 맞는 양만큼 준비함. 그런 다음 각각의 sequencing 시약은 HiSeq2000 기기내의 정해진 위치에 로딩함
- ㄷ. cluster가 합성된 flow cell을 기기 내에 위치시킨 후, reagent delivery check를 수행하여 fluidic system에 문제가 없음을 확인함. Fluidic system이 정상일 경우, sequencing을 진행함
- ㄹ. Read 1 해독이 종료되면, Read 2를 위한 시약을 장착하고 염기서열 해독을 계속 진행함
- ㅁ. 생산된 sequencing 데이터는 Illumina사의 pipeline 프로그램인 CASABA 1.8.2를 이용하여 품질검사를 수행함

㉞ NGS-resequencing데이터 유전체분석을 이용한 분자마커 데이터 생산 : SNP 및 INDEL 데이터 생산을 위해서는 크게, 해독기기에서 생산된 paired-end 서열의(short read)의 필터링, SNP 및 INDEL 발굴, SNP 및 INDEL annotation 의 세 가지 과정이 필요함.

- ㉔ Paired-end 서열 필터링 : 해독기에서 생산된 paired-end 서열로부터 정확한 변이정보를 얻기 위해, 해독된 단서열 중 quality가 떨어지는 read를 제거함. 이를 위해 Sickel 프로그램(<https://github.com/najoshi/sickle>)을 사용함. 이 프로그램은 각 단서열의 평균 Q score를 계산하여 이 값이 사용자가 선택한 quality 기준 값 미만(Q score < 20) 이면 단서열을 끝에서부터 시작하여 하나씩 자르고(trimming) 나머지 염기의 말단부터 다시 Q score를 계산하여 평균값이 기준 quality 값 (quality 기준 값) 이상이 나올 때까지 이 작업을 반복함. Trimming은 사용자의 선택에 따라 3'말단이나 5'말단으로부터 시작할 수 있음. 최종적으로 얻어진 단서열의 길이가 사용자가 선택한 기준 값(50bp)보다 작을 경우, 해당 단서열을 제거하고 그렇지 않을 경우 해당 단서열의 필터링을 종료함.
- ㉕ SNP 및 INDEL 발굴 : 필터링 과정을 거친 paired-end서열을 정확하게 분석하여 변이정보를 추출하기 위해 양배추 표준 서열에 mapping, PCR duplication 제거, local realignment, base recalibration, 변이체 발굴 및 변이체 필터링의 단계를 거침. 이를 위해 Burrows-Wheeler Aligner (BWA), Picard, Samtools 및 Genome Analysis Toolkit (GATK) 툴을 이용함.

㉖. 양배추 resequencing 데이터 표준 서열에 mapping

1. 양배추 5계통의 샘플에 대해 샘플 당 전장게놈(whole genome)의 약 30배수 이상에 해당하는 paired-end 서열을 양배추 표준 서열(Brassica oleracea reference sequence)에 효과적으로 mapping하기 위해 Burrows-Wheeler Aligner(BWA) 0.7.4 버전의 프로그램이 이용됨. 이때 사용한 명령어와 옵션은 아래와 같음
2. `bwa aln -I -t 3 -l 45 -k 2 ref.fa sample1_1.fq.gz > sample1_1.sai, bwa aln -I -t 3 -l 45 -k 2 ref.fa sample1_2.fq.gz > sample1_2.sai`
`bwa sampe -r '@RG\tID:TGP2010D0009\tSM:TGP2010D0009\tPL:Illumina' ref.fa sample1_1.sai sample1_2.sai sample1_1.fq.gz sample1_2.fq.gz > sample1.sam`
3. 분석의 편의성 및 호환성을 위해, Picard 1.59 버전의 프로그램을 이용하여 mapping 결과 파일인 SAM 포맷 파일을 정렬함과 동시에 BAM 포맷으로 변환함. 이때 사용한 명령어와 옵션은 아래와 같음
4. `java -jar SortSam.jar INPUT=sample1.sam OUTPUT=sample1.sorted.bam VALIDATION_STRINGENCY=LENIENT`

㉗. PCR duplication 제거

1. 정확한 변이체 발굴을 위해 Samtools 0.1.18 버전의 프로그램을 이용하여 PCR duplicate reads를 제거 함. 이때 사용한 명령어와 옵션은 아래와 같음
2. `samtools rmdup sample1.sorted.bam sample1.sorted.rmdup.bam`

㉘. Local realignment 과정

1. 전 단계에서 생성된 BAM파일을 GATK Lite 2.3.9 버전의 프로그램을 이용하여 부분적인 재배열(local realignment)을 수행함. 이 단계는 단서열의 부분적인 재배열을 통해 전체 paired-end 서열 중에 mismatch 되는 염기의 수를 최소화하기 위해 고안되었으며, 아래의 두 세부 단계로 이루어짐

2. Realignment가 필요해 보이는 의심스러운 짧은 interval을 결정하는 단계 (RealignerTargetCreator)
3. 이들 interval에 걸쳐 부분적인 재배열을 하는 단계(IndelRealigner) : indel로 인하여 misalignment가 일어나는 read들의 local realignment를 실행. 이 단계에서 사용한 명령어와 옵션은 아래와 같음.
4. `java -jar GenomeAnalysisTKLite.jar -T RealignerTargetCreator -R ref.fa -I sample1.sorted.rmdup.bam -o forIndelRealigner.intervals -known Mills_and_1000G_gold_standard.indels.hg19.vcf`
5. `java -jar GenomeAnalysisTKLite.jar -T IndelRealigner -R ref.fa -I sample1.sorted.rmdup.bam -o sample1.sorted.rmdup.realign.bam -targetIntervals forIndelRealigner.intervals -consensusDeterminationModel USE_READS--maxReadsForRealignment 50000 -LODThresholdForCleaning 5.0 -maxReadsInMemory 300000 -known Mills_and_1000G_gold_standard.indels.b37.vcf`

ㄴ. Base recalibration 과정

1. GATK Lite 2.3.9 프로그램에서 제공하는 BaseRecalibrator 옵션을 이용하여, 단서열의 성질과 관련하여 사용자가 지정한 다양한 covariant들을 바탕으로 recalibration 테이블을 만들고, 이에 따라 염기의 quality score를 재보정 (recalibration)함. 사용자가 지정할 수 있는 covariant들로는 read group, 기존에 보고된 quality score, machine cycle 및 nucleotide context 값 등이 있음. 이 단계에서 사용한 명령어와 옵션은 아래와 같음.
2. `java -jar GenomeAnalysisTKLite.jar -T BaseRecalibrator -R ref.fa -I sample1.sorted.rmdup.realign.bam -o out.grp --plot_pdf_file out.grp.pdf -knownSites dbsnp_137.hg19.vcf -disable_indel_qual, java -jar GenomeAnalysisTKLite.jar -T PrintReads -R ref.fa -I sample1.sorted.rmdup.realign.bam -o sample1.sorted.rmdup.realign.recalib.bam -BQSR out.grp`

ㄷ. SNP 및 INDEL 발굴

1. GATK Lite 2.3.9 프로그램에서 제공하는 UnifiedGenotyper 옵션을 이용하여 변이체를 발굴함. 이 옵션은 Bayesian genotype likelihood model을 이용하여 가장 높은 확률의 변이체 유전형 및 위치를 예측함. 사용된 명령어와 옵션은 아래와 같음.
2. `java -jar GenomeAnalysisTKLite.jar -T UnifiedGenotyper -downsample_to_coverage 10000 --genotype_likelihoods_model BOTH -R ref.fa -I sample1.sorted.rmdup.realign.recalib.bam -o sample1.vcf -D dbsnp_137.hg19.vcf -hets 0.001 -rf BadCigar`

ㄹ. SNP 및 INDEL 필터링

1. GATK Lite 2.3.9 프로그램에서 제공하는 VariantFiltration 옵션을 사용하여 변이체 필터링을 수행함. 이 옵션은 사용자 지정 필터를 이용하여 변이체 자

료 값을 평가한 후 기준에 미달되는지의 여부를, 새 파일의 'FILTER' 컬럼에 PASS, HARD_TO_VALIDATE 혹은 DepthFilter 등으로 표시함. 이때 사용된 명령어와 자세한 옵션은 아래와 같음.

```
2. java -jar GenomeAnalysisTKLite.jar -R ref.fa -T VariantFiltration -variant
sample1.vcf-o sample1_filtered.vcf --filterExpression "MQ0 >= 4 && ((MQ0 /
(1.0 * DP)) > 0.1)"--filterName "HARD_TO_VALIDATE" --filterExpression
"QUAL < 10" --filterName"QualFilter" --filterExpression "DP < 5"
--filterName "DepthFilter"
```

㉞ SNP 및 INDEL annotation 과정

ㄱ. 양배추 표준 서열(Brassica oleracea reference sequence)의 정보를 근간으로 각 SNP 및 INDEL의 게놈에서의 위치정보 및 유전자 정보를 확보하는 annotation 을 수행함. 변이체 annotation을 위해서는 보편적으로 이용되는 툴 중 하나인 snpEff 버전 3.3을 이용함. 이때 사용된 명령어와 옵션은 아래와 같음

```
ㄴ. (java -Xmx2g -Djava.io.tmpdir=/AnalysisTemp/ -jar
/Tools/SnpEff/snpEff_v3_3/snpEff.jar eff -v hg19 -o vcf -c
/Tools/SnpEff/snpEff_v3_3/snpEff.config /chr1/Databind/chr1.target.vcf-s
/chr1/AnalysisTemp/chr1.target.html > /chr1/Databind/chr1.snpEff.vcf)
```

③ 양배추 5계통에 대한 genome sequence 생산 결과

- ㉠ GS 장비인 Illumina의 Hiseq2000을 이용하여 양배추 종 5 계통(B16, Bma, DH1, DH3, DUN)의 유전체 염기서열을 paired-end 방식으로 해독하였음
- ㉡ Paired-end library의 insert size는 300 bp와 350 bp로 제작되었으며, 2 flow cell을 모두 사용하여 101 cycle로 해독되었음
- ㉢ 염기서열 해독에는 각 flow cell 당 약 5일 정도가 소요되었으며, 해독된 서열의 길이는 adapter 서열을 포함하여 약 120bp 정도를 해독하였음

표 1-1. 양배추 5계통 Hiseq2000에서 생산된 염기서열 데이터 양

양배추 샘플명	Sum of read	Sum of bp
B16	558,662,780	55,866,278,000
Bma	506,114,122	50,611,412,200
DH1	454,804,780	45,480,478,000
DH3	491,221,854	49,122,185,400
DUN	441,614,334	44,161,433,400
총	2,452,417,870	245,241,787,000

표 1-2. 양배추 25계통에 대한 genome sequence 생산

양배추 25계통 (아시아, 누뎀, 삼성종묘, 코레콘, Guy Barker)	
위황병 저항성	브로콜리 F1 부분, 위황병 중도 저항성 강
위황병 저항성	케일
칼슘 민감	위황병 감수성
칼슘 둔감	아시아 등록 F1 모본
좀 나방 모본 (강)	아시아 등록 F1 부분
좀 나방 부분 (약)	내서 성 강 #107-HO-154
좀 나방 부분(약)	내서 성 강 #5-KK-146
브로콜리 위황병 강	내서성 약 #108-EB-8S8-7
브로콜리 위황병 약	내서 성 약 #10-JK-JK-2
브로콜리 위황병 약	양배추 cold/freezing 강 #111-DS-2437-51
양배추 cold/freezing 강 #112-QT-DWB-25	케일 5333
자색양배추 #116-PH-347-51	칼슘민감 from 삼성종묘

④ 양배추 resequencing 유전체데이터 QC과정

㉓ 양배추 5계통의 생산된 서열 데이터의 sequencing 질을 검증하기 위해 FASTX tool kit을 사용하여 검증 작업을 수행하였음.

ㄱ. fastq_to_fasta -Q33 -i in.fq -o out.fa

ㄴ. cat in.fq | awk '{ if (NR%4==1) print ">"\$0 ; if (NR%4==2) print }' > out.fa

㉔ 결과 그림 1-4와 같이 서열 전반에 걸쳐 퀄리티 스코어의 중앙값이 38 정도의 높은 수준을 보였음

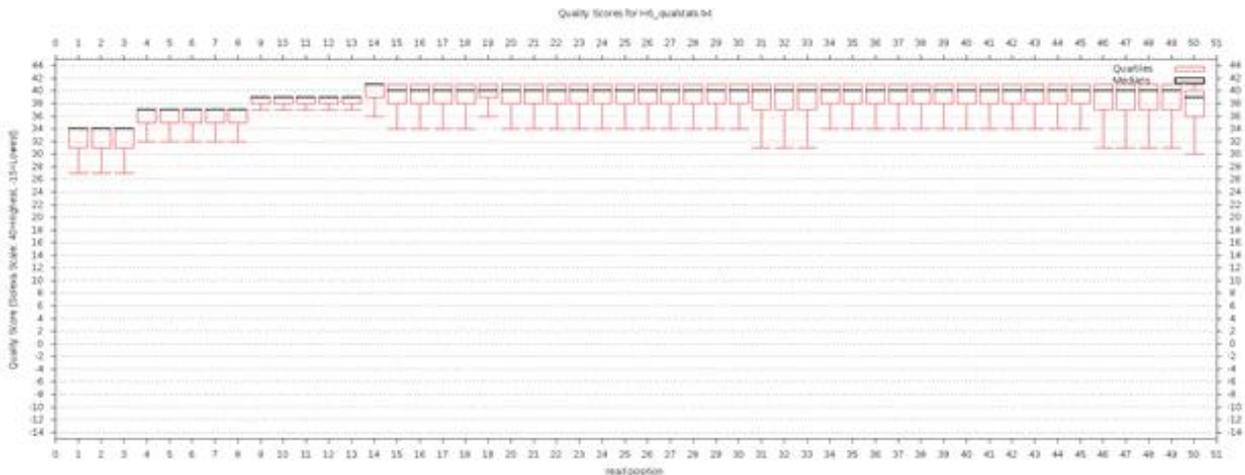


그림 1-4. 염기서열 해독 퀄리티 스코어 통계

⑤ 양배추 5계통에 대한 genome assembly과정

- ㉔ 양배추 5계통의 게놈 표준지도를 조립하기 위해서는 생산된 Paired-end 서열의 필터링, k-mer 분석, 에러 보정, contig 조립, insert size 측정, scaffold 조립, gap closing의 과정이 필요함 (그림 1-5)

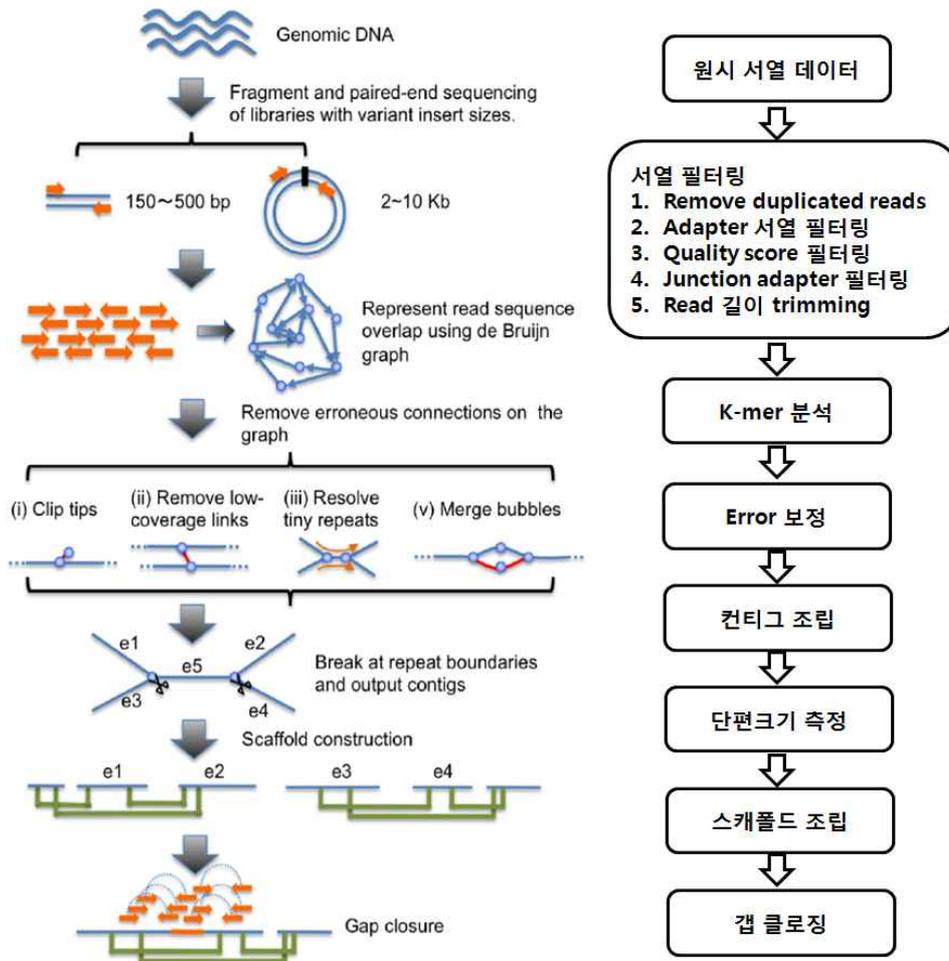


그림 1-5. 양배추 게놈지도 조립순서

㉔. Paired-end 서열 필터링

- 해독기에서 생산된 Paired-end서열로부터 정확한 게놈표준지도를 얻기 위해, 해독된 단서열 및 긴 짝서열 중 PCR과정에서 생기는 중복된 read와 adapter가 포함된 read, 그리고 quality가 낮은 read를 제거함. 이와 같은 과정을 위해 각각 PrinSeq, SOAPfilter, cutadapt 프로그램들이 사용하였음
- PrinSeq -derep 1 -derep_min 2 -fastq Sample_1.fastq -fastq2 Sample_2.fastq-out_format 3 -log out_log -out_good out_read.fastq -out_bad out_bad.fastq
- SOAPfilter -f -1 -q 33 -t 4 -B -1 -w -1 -y -F GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC -R GATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT Sample_1.fastq Sample_2.fastq out_read1.stat out_read1 out_read2

4. PrinSeq -ns_max_p 5 --min_qual_mean 20 -fastq Sample_1.fastq
- fastq2 Sample_2.fastq -out_format 3 -log out_log -out_good
out_read.fastq - out_bad out_bad.fastq
5. cutadapt -b CTGTCTCTTATACACATCT -b
AGATGTGTATAAGAGACAG -m 49--too-short-output=out_bad
Sample_1.fastq 2> out_log > out_read.fastq

ㄴ. Paired-end 서열 trimming

1. 서열해독기의 특성상, 해독된 서열의 5'말단 및 3'말단부분의 서열 해독 quality가 떨어지는 부분 그리고 양 말단에 나타나는 Poly-A tail과 같은 서열 조립에 영향을 줄 수 있는 부분을 일괄적으로 잘라냄. 단서열의 경우 90bp가 되도록 5'말단부분의 3base 및 3'말단부분의 8base를 trimming하였음

ㄷ. contig 조립

1. 필터링 및 error correction된 단서열을 이용하여 contig를 조립함. 여러 조립 알고리즘 중 de Bruijn graph 방식을 이용한 프로그램인 SOAPdenovo2(r240)를 사용하여 contig를 조립함. 최적의 k-mer 값을 찾기 위해, 29, 39, 49, 55, 59, 63, 69, 75, 79의 k-mer 값에 대해 contig 조립을 수행함. 사용된 명령어는 아래와 같음
2. SOAPdenovo-63mer pregraph -s ShortLib.cfg -K 55 -p 53 -o KOREF1_K55
2> pregraph_K55.err > pregraph_K55.log
3. SOAPdenovo-63mer contig -g KOREF1_K55 2> contig_K55.err >
contig_K55.log

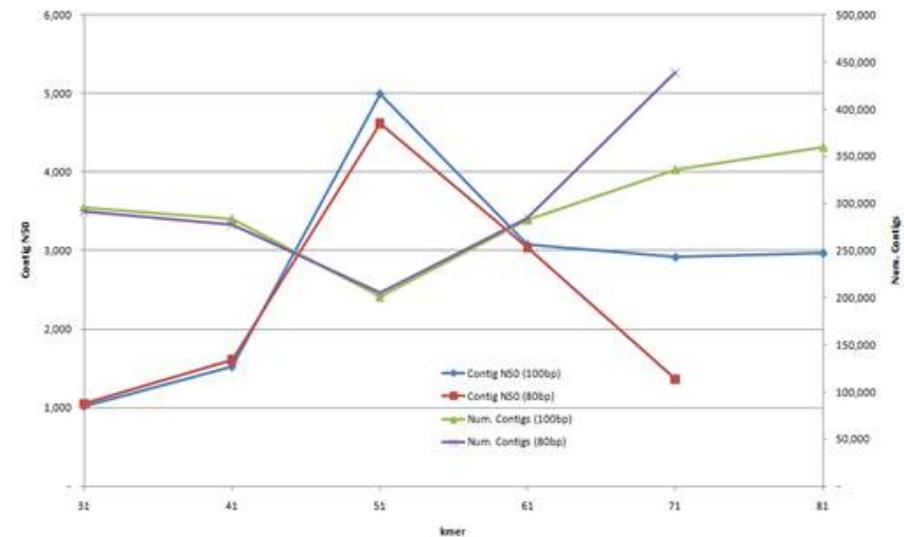


그림 1-6. k-mer 길이 별 scaffold N50과 개수

4. 그림 1-6의 결과에서 보면 입력 read 서열의 길이가 100 bp 일 경우, k-mer 길이가 71bp 일 경우 scaffold의 N50이 가장 긴 것을 확인할 수 있음
5. 결론적으로 read의 길이가 100 bp 일 경우, k-mer 길이가 51 bp 일 경우

contig의 N50이 가장 긴 것을 확인할 수 있었음. 생산된 scaffold의 전체 길이에 대한 것으로 약 400Mb 정도의 scaffold가 생산되어 1번의 염기서열해독만으로 수치 상 전체 유전체의 약 70% 정도가 커버되었음을 알 수 있음.

⑥ 양배추 resequencing 유전체데이터 Genetic variant 발굴

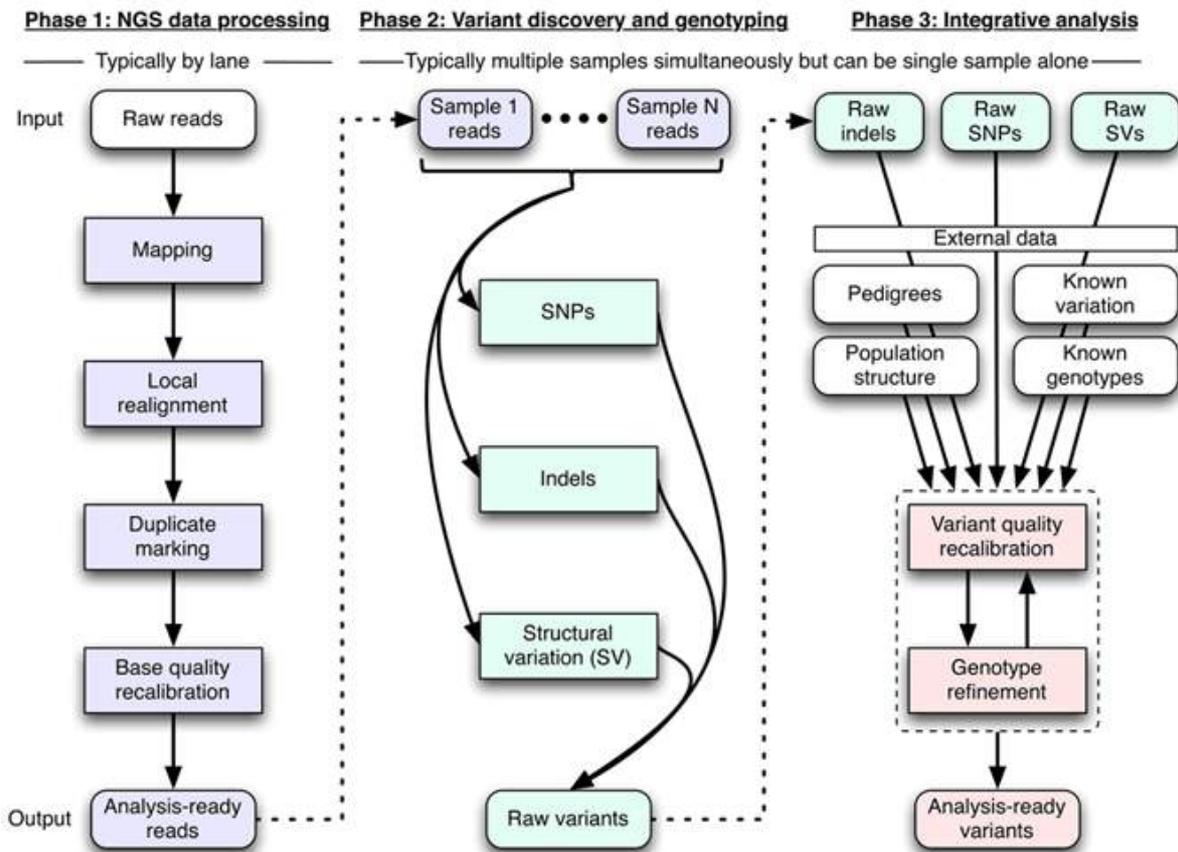


그림 1-7. 양배추 resequencing 유전체데이터 Genetic variant 발굴 과정

㉔ 양배추 5계통을 이용하여 genetic variant 발굴

- ㄱ. 5 계통 중 유일하게 양배추 원시종인 B16을 대표 유전체로 사용하여 나머지 4 계통의 read를 대표 유전체에 mapping 함으로써 양배추 유전체에 존재하는 genetic variant를 발굴함
- ㄴ. 양배추 genetic variant를 연구를 위한 방법으로 유전체 서열의 표본이 정교하게 완성된 후 동일 분석을 재 수행함으로써 보다 정확한 genetic variant를 발굴할 수 있음
- ㄷ. 본 연구팀에서는 양배추 유전체에 존재하는 SNP (Single Nucleotide Polymorphism)과 Indel (Insertion and deletion) 등과 같은 genetic variant를 발굴하기 위해 BWA, GATK 프로그램을 사용하여 구축한 변이체 발굴 자동분석 파이프라인을 이용하였음

- ㄴ. Mapping을 통해 read depth가 34 이상인 variant를 발굴한 결과 SNP는 6,610개, INDEL 74개를 합해 총 6,684개의 genetic variant를 발굴하였음
- ㄷ. 양배추 B16을 제외한 4 계통 공통의 SNP는 총 398개를 발굴하였으며, 각 계통 특이적인 SNP는 Bma 196개, DH1 42개, DH3 4개, DUN 64개로 이들 계통 특이적 SNP는 이후 표적영역 연구를 위한 증폭인자 개발의 후보 영역으로 사용되었음 (그림 1-8, 표 1-3)

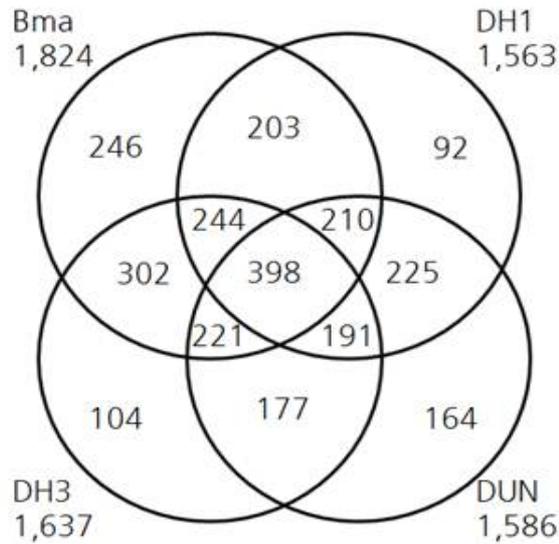


그림 1-8. 양배추 4계통간의 SNP 비교

표 1-3. 양배추 4계통에서 발굴한 genetic variant 6,684개의 SNP 및 INDEL

Strain	Scaffold info	Start Position in Ref	End Position in Ref	Reference Bases	Variation Bases	Strain	Scaffold info	Start Position in Ref	End Position in Ref	Reference Bases	Variation Bases
Bma	scaffold39359	520783	520783	G	A	DH1	scaffold04547	202730	202730	C	A
Bma	scaffold116951	625652	625652	G	A	DH1	scaffold99935	379173	379173	T	C
Bma	scaffold117602	643862	643862	T	C	DH1	scaffold28817	101629	101629	T	C
Bma	scaffold124985	668683	668683	A	G	DH1	scaffold28837	756400	756400	T	C
Bma	scaffold63967	310602	310602	A	G	DH1	scaffold119125	655315	655315	T	C
Bma	scaffold63980	718059	718059	G	A	DH1	scaffold153064	455742	455742	G	A
Bma	scaffold135785	673922	673922	T	C	DH1	scaffold161527	698253	698253	C	T
Bma	scaffold70754	637103	637103	G	A	DH1	scaffold161530	496004	496004	C	T
Bma	scaffold121095	770913	770913	G	A	DH1	scaffold161564	445865	445865	G	A
Bma	scaffold69471	596845	596845	T	C	DH1	scaffold161565	177413	177413	G	A
DH1	scaffold24705	464351	464351	A	G	DUN	scaffold50157	157525	157525	A	G
DH1	scaffold26853	792006	792006	C	T	DUN	scaffold118398	220213	220213	T	C
DH1	scaffold74637	44003	44003	G	A	DUN	scaffold118399	552266	552266	C	A

DH1	scaffold21210	605298	605298	C	T	DUN	scaffold11839 9	235546	235546	T	C
DH1	scaffold02315	696308	696308	A	G	DUN	scaffold11839 5	817461	817461	C	A
DH1	scaffold15414 2	529471	529471	G	A	DUN	scaffold11839 5	59477	59477	G	A
DH1	scaffold80166	237161	237161	G	A	DUN	scaffold11839 5	795198	795198	C	A
DH1	scaffold05817	256051	256051	C	T	DUN	scaffold02864	26245	26245	A	T
DH1	scaffold45667	681193	681193	T	C	DUN	scaffold15473 7	546454	546454	A	G
Bma	scaffold79000	198243	198243	A	G	DH3	scaffold53259	763916	763916	A	G
Bma	scaffold79002	399700	399700	C	G	DH3	scaffold53259	483021	483021	G	A
Bma	scaffold11475 3	227052	227052	G	C	DH3	scaffold53262	190754	190754	A	G
Bma	scaffold11479 1	445945	445945	G	C	DH3	scaffold53263	475022	475022	G	A
Bma	scaffold11253 7	706818	706818	G	A	DH3	scaffold53263	220687	220687	T	C
Bma	scaffold10971 6	673328	673328	G	A	DH3	scaffold47808	621966	621966	T	C
Bma	scaffold10971 6	556761	556761	G	A	DH3	scaffold29009	747009	747009	A	G
Bma	scaffold11383 2	817511	817511	T	C	DH3	scaffold29009	759562	759562	TTC	-

㉔ 표적영역 연구를 위한 증폭인자 개발 연구

- ㄱ. 양배추 4 계통의 중 특이적 SNP를 이용한 표적영역 증폭 인자 개발에 앞서 선별한 4 계통의 계통 특이적 SNP 606개를 이용하여 변이 영역을 표적으로 하는 증폭인자를 개발했음
- ㄴ. 각 변이 영역을 기준으로 5'과 3' flanking 서열을 포함하여 서열을 추출하고, 추출한 606개의 서열에 대해 Primer3 프로그램을 이용하여 5'과 3' primer 서열을 예측하였음 (표 1-4).

표 1-4. 표적영역 연구를 위해 개발한 primer set 전체의 목록

SNP	Forward primer	Reverse primer	SNP	Forward primer	Reverse primer
S-1	AAATCGGCCATC ACGACAAC	GATAGTCAGGTT CACAGAAC	S-304	GCTGCTCTAGTTA ATCACAC	TACTCGAAAGTA CCTATTGT
S-2	TTTCTCACTGCTC TCTTGC	TTCAGCTTCTCGT TCTCTC	S-305	CCCGTGTCAACCG ATAAAGTA	ACACATGGTCAC ACGTACGT
S-3	TGTGGGAATGGA CTACTC	GGCTTTAACAAC CGTGAC	S-306	TTAGGACGGAGA AATGGCAC	GGTAGCTAATAA ATGTGCTG
S-9	AAATCGGCCATC ACGAAC	CAAAGACTATCC CTTCCTAC	S-307	AGAACGACAGAG ATCTATTA	GGATACTGCCCA GTGTGCGAC
S-10	CACACAGATTCT CCTCTCTC	CTGCGTTTGTGT CTCATC	S-308	TGGGTGAACTTG CTAATTGA	CCGCTAGCCGGA CTATGCAT
S-11	CCATCACGACAA GTTTCC	TAAGAGTCAACA ACCCTTGG	S-309	CCAGGATGTGGA GACTCGTC	CTGGTATCAGTG CAACGTAA

S-12	TTGGCTGTGTTCC AGAAG	AATGGCTGAGTC ATCAGAG	S-310	ACGCGGAAGATT TTCTGTAG	GGCACTGTCTGG CTAGGAAT
S-13	AGAACCTCGTGA AGAAGTG	ATAACCTTCTCGA CCTTGTC	S-311	GGCTGGGAAAGC AGAGAACA	CCCGCCTGACTC CGGAGTAC
S-14	AAATCGGCCATC ACGATG	GCTGAGATCGTT ACAAACTG	S-312	CTCGTAAGCTTTG GCGGCCT	ACCCACTTTAGG CTCATTGG
S-15	TCTTGAACGAAG GTGATGG	ACCAAAGCGACA CATCTC	S-313	AGCCCGGCAACC GCGTCAAT	TAGACCGGTAAT CATGGTAC
S-16	TTACAAGACTCTC CGTGAC	GCATCATCATCA CCAACC	S-314	GCATGATGGATC CAGAGCCG	AGCACCAGTAAT TACCTGAC
S-18	GAACCAGAGCTT CTTTCC	GAAAGAGCCAAG CACAAG	S-315	GCCGATTGGCAA TGTGGCTG	AGCACGTATCCT GCCTAAAC
S-19	GATTCTCTTAGGC GAAAGC	CAAGAGGATGAC CATCATG	S-316	TCACGACTCAAG CTCGGTCA	TTACATGTCCGTC GACGCTA
S-20	TAACACAACCTCT CCCTCTC	CTTCTGCGCATCA ATTCTG	S-317	AATTTAATCTACC AACGGGC	GACCGGAGAACT GCCCGGAT
S-21	AAGCCTTTGAGG GAATACG	ACAGCCAAGGTA TGTCTC	S-318	AAAGGGACCAAC ATAAAACG	CGGGAACAAGGT GCAATTC
S-22	GCCATCACGAGA TATTTCCG	GTTGCGTTTGATC GTGAG	S-319	AACTTTTCCGGCA AGAGAGC	AGGTCTGATCTA AGTGAATT
S-23	TCTGTACGCTTAC CTTTCTC	GTGAATGGTTCG CTAAACG	S-320	GCCGGAAATGAT TTGTAAGA	CCCCGTATTCCA ATTTCTGG
S-24	CACGGCCAATCA AAACAC	GATGTTCAATTA GGGGGAAC	S-321	ACTTGTTATATTG GAGTGTC	TCTTTACTAAGGA CGACAAT
S-25	CAATAGACTCCT ACACCTAC	TTCACTGGCTGA GTACAG	S-322	AAAAGGCTCGTC GTTGAGTA	GGGCGCGCTCGT GTCACACT
S-26	CCGTTAGACAAG TGGAAG	GAAGTTACAGGT TCTCTCTC	S-323	CTGACCTAGCAC GCACAAAG	GGGCTGCAAACG TCGCTGAA
S-27	AGTAACCGGCCA ATGAAC	CCGATGAAGACA TTCAACAC	S-324	TTGTGCCCCGTCA CTCGCTG	GAAGGCAATGAC AGCCAGTA
S-28	GTTGAGAGTCAT GGCTAC	TTTGGCTGTTGGG TGATC	S-325	TGGGTGCTACCTT ATGTAGC	TGTGTCATGAAG AGAAGCTT

㉔ 양배추 25계통을 이용하여 genetic variant 발굴

- ㄱ. Mapping을 통해 read depth가 10 이상인 variant를 발굴한 결과 SNP 및 INDEL은 각각 8,610개, Indel은 3000개를 합해 총 11,610개의 genetic variant를 발굴함
- ㄴ. 각 계통 공통의 SNP는 총 450개를 발굴하였으며, 나머지는 각 계통 특이적인 SNP 및 INDEL로 이들 계통 특이적 SNP 및 INDEL은 이후 표적영역 연구를 위한 증폭인자 개발의 후보 영역으로 사용하였음(표 1-5)

표 1-5. 양배추 25개통의 genetic variation 표적영역 연구를 위해 개발한 primer set

Index	Status	Chr. Name	Chr. Start	INDEL Sequence	Forward Primer	Reverse Primer	Product Size
Boleracea Reference Genome Vs bma	DEL	C2	2468	-AAGTGTGTTGACC AAAAAAAAAATAA TTAAAAT/-AAGTG TGTTGACCAAAAA AAAATAATTAATA T	AAACAAG CTATGAGA AATCTAG	AAAGAA CTGTAC AACGGT TAC	190
Boleracea Reference Genome Vs bma	INS	C1	7269	+AAAGGTGTTTTG CCATAAGAAC/+A AAGGTGTTTTGCC ATAAGAAC	AAACAAG TACGCAGT AGGAG	AATGGT ATCGTGC ATGAGA C	192
Boleracea Reference Genome Vs bma	DEL	C2	3780	-TTTGTATTTGTATT TGTATCC/-TTTGT ATTTGTATTTGTAT CC	AAACAAT TGGGTAC AAGGG	TTCATTC ACACAT GTCCAG G	199
Boleracea Reference Genome Vs bma	DEL	C2	3178	-AACATCTGTTAAT TCACCTGAATTC ATAAACTCAGGT TATTAAAT/-AACA TCTGTAAATTCACC TGAATTCATAAAA ACTCAGGTTATTA AAT	AAACACC ATTACAG ACGTTG	TGGGTTA AATGGT AGACTC AG	199
Boleracea Reference Genome Vs bma	DEL	C1	870	-ATTGCTCATTTTG CAATGATCAAACA AG/-ATTGCTCATT TTGCAATGATCAA ACAAG	AAACACTT ACGCGAC CAAAG	TGATTTA ATTGGCT GACGTG	191
Boleracea Reference Genome Vs bma	DEL	C2	4047	-ATGTGACTGACG ACACACGTGATTA ATGGCCTGG/-ATG TGAATGACGACAC ACGTGATTAATGG CCTGG	AAACAGA GAAAGAG GAAGAG	GAAAGA CTGGAG CAGGTC	199
Boleracea Reference Genome Vs bma	DEL	C1	6676	-AACAAATTTTCAG ATTATATGGCGAT /-AACAAATTTTCAG ATTATATGGCGAT	AAACAGT CGGAGAT GAAGAC	GATCTCT CTCCGTT CCATTG	190
Boleracea Reference	DEL	C1	6926	-CATACAAGGTTTT AGAGAAC/-CATA	AAACAGT TGCATGCA	TTCGTGA ATCAAG	194

Genome Vs bma				CAAGGTTTTAGAG AAC	GTTTG	TGACAA C	
Boleracea Reference Genome Vs bma	DEL	C2	4966	-ACAATTTGACTA TCCAATTTGCTACT AAAGATT/-ACA ATTTGACTATCCA ATTTGCTACTAAA GATT	AAACATC CAGTTAGA CATGC	GATTTGT AGGTTGT TGCCTC	197

나. 양배추류의 transcriptome, miRNA 생산 및 분석 시스템 구축

① NGS-resequencing 기술을 이용한 Resequencing 생산 시스템 구축

- ㉞ 샘플 RNA 추출 : 양배추 내서성, 위황병, 흑부병 및 석회결핍 샘플에서 높은 퀄리티의 RNA 추출 방법 (그림 1-9, 표 1-6)
- ㄱ. 50~100mg의 샘플을 액체질소로 동결한 상태에서 곱게 갈아준 뒤 미리 동결 시켜둔 1.5ml RNA-free tube에 마쇄한 시료를 옮기고 400ul의 buffer I을 즉시 첨가함
 - ㄴ. 강하게 vortexing하여 혼합한 후 250ul의 phenol-chloroform혼합액(1:1, pH 4.7)을 첨가하고 잘 섞어(inversion)준 후 바로 13,000g, 4°C에서 15분간 centrifugation 함
 - ㄷ. 상층액 약 250ul을 조심스럽게 취하여 buffer II 250ul이 담겨진 미리 준비된 1.5ml 튜브로 옮겨 잘 섞어(inversion)준 후 상온에 10분 간 방치함
 - ㄹ. 200ul의 chloroform-isoamyl alcohol(24:1)을 첨가하여 13,000g, 4°C에서 15분 간 centrifugation한 후 상층액 약 450ul을 조심스럽게 새 튜브에 취하고, 300ul의 isopropanol과 250ul의 1.2M NaCl을 첨가하여 잘 섞어 (inversion)준 후, 얼음 위에 15분 간 방치함
 - ㅁ. 13,000g, 4°C에서 15분간 centrifugation 하여 상층액을 제거하고, RNA pellet을 400ul의 70% 에탄올로 세척 한 후 pellet을 상온 후드에서 15~20분 간 건조시킨 후 약 50ul의 RNase-free water에 녹이고 -70°C에 저장함

표 1-6. Buffer 조성

buffer I	buffer II
100mM Tris (pH8.0)	70% guanidinium sulfate (w/w)
150mM LiCl	0.75M sodium citrate
50mM EDTA	10% lauryl-sarcosine
1.5% SDS	2M sodium acetate (pH4.0)
1.5% 2-mercaptoethanol	

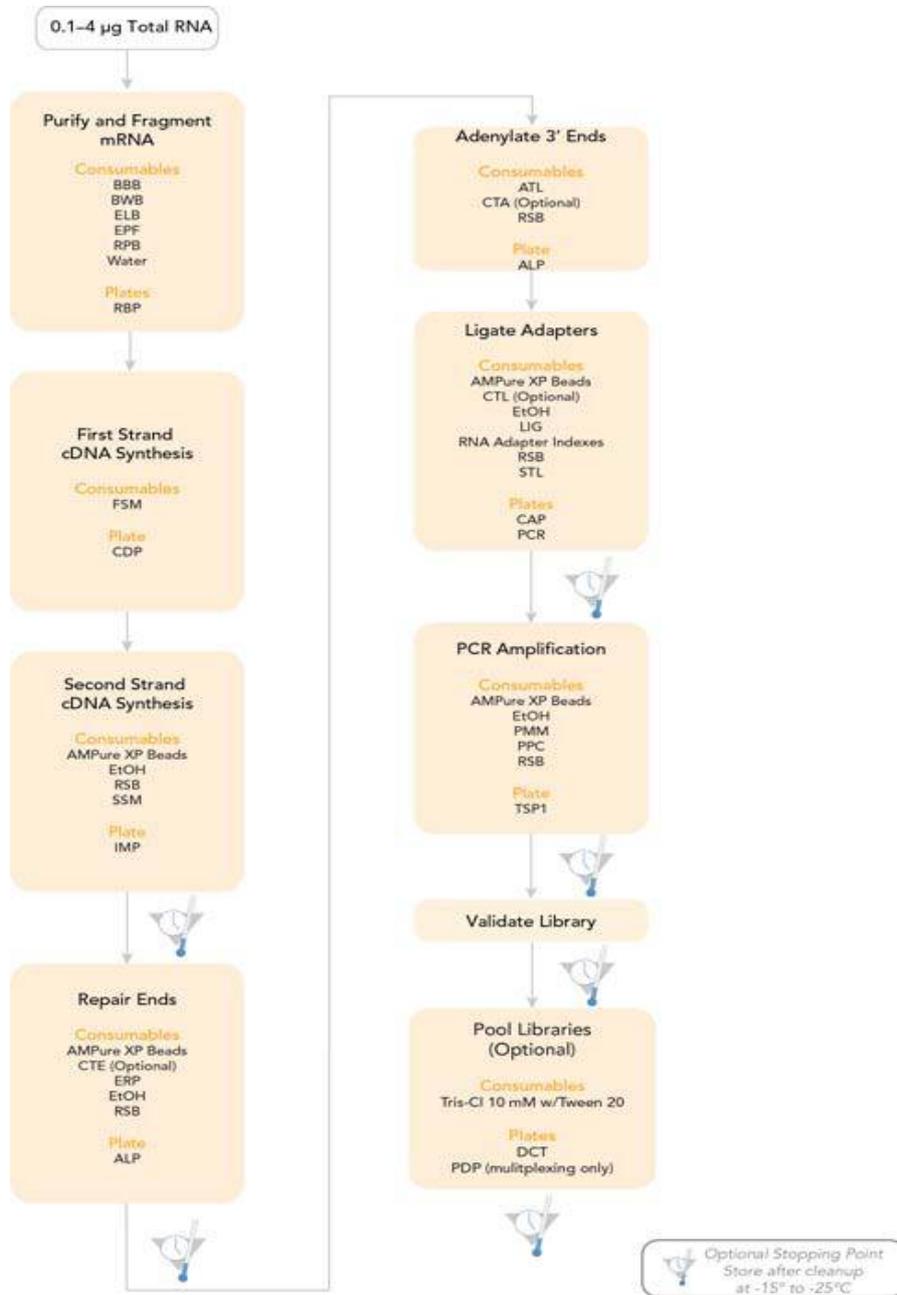


그림 1-9. RNA Library 제작 방법

㉔ 샘플 RNA 시료의 정성 및 정량분석 방법

1. Total RNA를 확보하고, 정성 및 정량분석에서 정한 기준치 이상일 경우만 sequencing을 해야 분석 결과의 오류를 최대한 줄일 수 있음. Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer기기를 통한 RNA Integrity Number (RIN) 측정에서 RIN값이 8이상이어야 하며 라이브러리 진행을 위해서는 1 ~ 10µg의 Total RNA가 필요하고 농도가 200ng/ul이상 되어야 함 (그림 1-10)

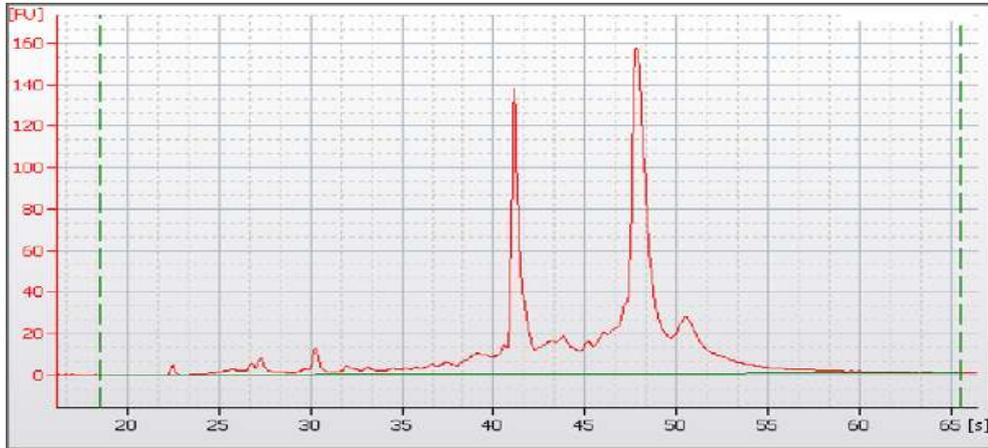


그림 1-10. RNA 6000 ladder (Bioanalyzer)

㉔ 샘플 RNA 시료의 정성 및 정량분석 방법

ㄱ. mRNA 단편의 정제

1. 0.3ml tube에 50ul final volume을 만든 다음에 50ul of RNA Purification Bead를 잘 섞어준 다음 sealing 후 thermal cycler에 돌림
2. 65℃에서 5분간 incubation하고, 4℃에 정지시킴
3. 실온에 5분간 incubation후 이 반응액에 200ul Bead Washing Buffer를 넣고 잘 섞어준 다음 실온에서 5분간 incubation한 다음 magnetic stand 위에 올려 5분간 올려놓은 다음 층이 분리되기를 기다림
4. 상층액(rRNA와 non-messenger RNA포함)을 제거한 다음 50ul의 Elution Buffer로 bead를 녹임
5. Thermal cycler에서 80℃에 2분간 incubation후, 25℃로 온도를 내린 다음 50ul의 Binding Buffer를 섞어 주고 실온에서 5분간 incubation함
6. Magnetic stand 상에 5분간 둔 다음 층이 분리되면 상층액을 제거하고 200ul의 Bead Washing Buffer로 정제해 줌
7. 19.5ul의 Elute, Prime, Fragment Mix 로 bead를 녹인 다음 thermal cycler상에서 94℃에 8분간 incubation 후 4℃로 유지

ㄴ. First Strand cDNA의 합성

1. Thermal cycler상에서 반응이 끝난 다음 magnetic stand 에 5분간 올려놓은 다음 층이 분리되면 상층액만 17ul 따서 새 tube에 옮김
2. 8ul의 First Strand Master Mix and SuperScript II의 혼합물(9:1)을 잘 섞어준 다음 sealing해서 1st Strand PCR과정을 돌림(25℃에서 10분, 42℃에서 50분, 70℃에서 15분, 4℃로 유지)

ㄷ. Second Strand cDNA의 합성

1. 반응이 끝난 25ul의 1st Strand solution 에 Second Strand Master Mix를 25ul 섞어준 다음 16℃에서 1시간 incubation 함
2. Ampure bead를 30분 전에 실온에 꺼냄
3. 반응이 끝난 다음 Ampure bead 90ul을 섞어준 다음 15분간 실온에 두었다가 magnetic stand 상에서 5분간 올려놓은 다음 층이 분리되면 상층액 제거함

4. 200ul의 80% 에탄올로 2번 washing함
5. Magnetic stand 상에서 15분간 bead를 완전히 말린 다음 52.5ul의 Resuspension buffer로 녹여줌
6. 실온에서 2분간 두었다가 magnetic stand 상에서 5분간 incubation 후 층이 분리되면 50ul 상층액만 따내 새 tube에 옮김

ㄹ. End Repair 과정

1. 50ul의 2nd Strand cDNA에 10ul의 End Repair Control과 40ul의 End Repair Mix를 섞어준 다음 thermal cycler상에서 30℃에 30분간 incubation해 줌
2. AMPure XP Bead를 160ul 잘 섞어준 다음 15분간 실온에서 반응하도록 함.
3. Magnetic stand 상에서 5분간 두었다가 층이 분리되면 bead가 떨어져오지 않도록 상층액만 제거함
4. 200ul 의 80% 에탄올로 2번 bead를 씻어냄
5. Magnetic stand 상에 둔 채 15분 incubation 해서 완전히 말린 다음 17.5ul Resuspension buffer로 elution함
6. 15ul 상층액만 따서 새 tube에 옮김

ㄷ. Adenylate 3' Ends 과정

1. End repair된 15ul 상층액에 2.5ul의 희석된 A-Tailing Control과 12.5ul의 A-Tailing Mix를 섞어준 다음 thermal cycler상에서 37℃에 30분 incubation해 줌
2. 30분 후 2.5ul DNA Ligase Mix와 2.5ul Ligase Control mix, 2.5ul RNA Adapter Index를 잘 섞어준 다음 thermal cycler상에서 30℃에서 10분 incubation해 줌
3. 5ul Stop Ligase Mix를 잘 섞어 줌으로써 반응을 정지시켜줌
4. AMPure XP Bead 42ul를 잘 섞어 준 다음 실온에서 15분, magnetic stand 상에서 5분 incubation해서 층이 분리되는 걸 확인 후 상층액만 제거해 줌
5. 200ul 의 80% 에탄올로 2번 씻어줌
6. Magnetic stand 상에 15분간 두면서 완전히 말린 다음 52.5ul Resuspension buffer로 pellet을 녹여 magnetic stand 상에서 5분 incubation 한 다음 상층액 50ul 따서 새 tube에 옮김
7. 50ul AMPure XP Bead 와 섞어준 다음 실온에서 15분간 둔 다음 magnetic stand 상에서 5분 incubation해서 층이 분리되는 걸 확인 후 상층액만 제거해 줌
8. 200ul 의 80% 에탄올로 2번 씻어줌
9. Magnetic stand 상에 15분 두면서 완전히 말린 다음 22.5ul 의 Resuspension buffer로 bead를 녹인 다음 magnetic stand 상에서 5분 incubation 후 층이 분리되면 bead가 떨어져오지 않게 20ul의 상층액만 따 내어 새 tube에 옮김

ㄷ. DNA Fragment의 증폭

1. 20ul의 상층액에 5ul의 PCR Primer Cocktail 과 25ul의 PCR Master Mix를 섞어준 다음 증폭시켜 줌 (98°C for 30 seconds, 15 cycles of : 98°C for 10 seconds, 60°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds, 72°C for 5 minutes, Hold at 4°C).
2. 반응이 끝난 다음 50ul AMPure XP Bead 와 섞어준 다음 실온에서 15분 incubation해 줌
3. Magnetic stand 상에서 5분 incubation한 후 층이 분리되면 상층액 제거해 줌
4. Bead를 200ul의 80% 에탄올로 2번 씻어줌
5. Magnetic stand 상에 둔 채 15분 incubation 해서 완전히 말린 다음 32.5ul Resuspension buffer 로 녹인 후 다시 magnetic stand 상에서 5분 incubation함.
6. 층이 분리되면 bead가 팔러오지 않게 30ul의 RNA 라이브러리만 따 내어 새 Tube 에 옮김.

ㄸ. Validate Library 과정

1. Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer를 사용해서 Agilent DNA-1000 chip으로 size와 purity를 측정함. 이 product의 band는 약 260bp에 있어야 함
2. 확인된 라이브러리는 qPCR과정에 들어가고 정확한 몰농도가 측정되어, sequencing에 적절한 cluster를 합성할 수 있는 목표몰농도(10nM)로 희석되어 sequencing에 사용됨 (그림 1-11)

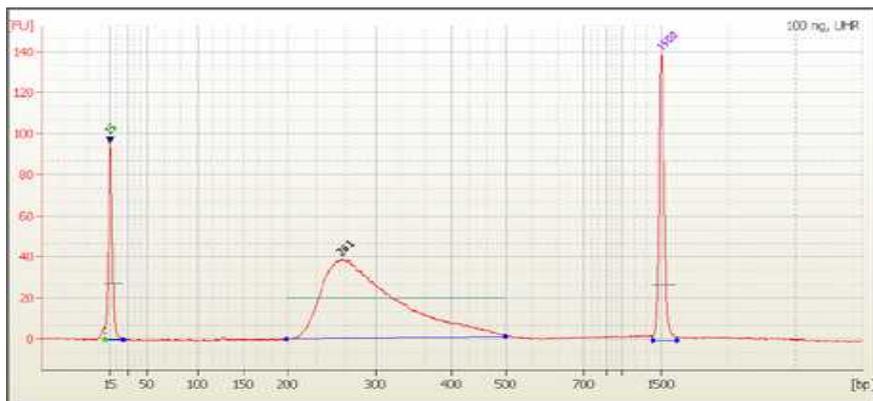


그림 1-11. RNA Bioanalyzer 결과

ㅇ. Cluster Generation using illumina cBot

1. qPCR 과정을 통해 적당한 농도로 희석된 DNA template는 denaturation 과정을 거쳐 oligonucleotides가 깔려있는 flow cell (8 lanes)로 옮겨짐
2. Template는 flow cell의 oligonucleotides와 결합하게 되고, 3'으로 확장되어 double-strand를 형성한 다음 한쪽 끝 말단은 다시 primer와 hybridize 되어 U-shaped bridge template를 형성함(그림 1-12, 그림 1-13).
3. DNA bridge는 primer로부터 copy 되어 double-stranded DNA bridge를 형성

하고 다시 denaturation 과정을 반복하여 새로운 bridge template를 형성함. 이러한 iso-thermal bridge amplification 과정을 35회 반복하여 2,000 molecules 이상의 cluster를 형성하게 됨

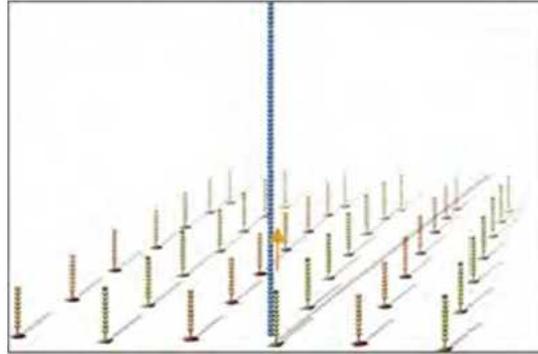


그림 1-12. Capture and extension of template

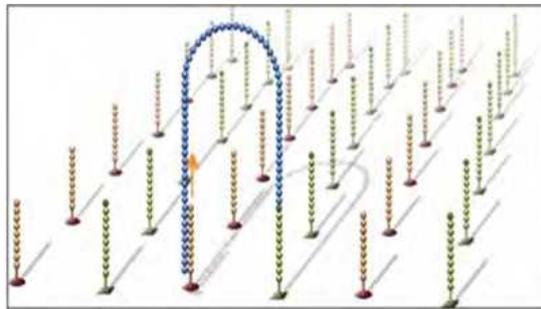


그림 1-13. Bridge Formation

4. Reverse strand specific primer가 cleavage 됨으로써 reverse strand가 제거되어 forward strand 만이 남게 됨(그림 1-14). 이때 3' 말단의 -OH end가 non-specific priming을 방지하기 위해 blocking 되고, DNA template free end에 sequencing primer가 hybridization 되게 됨. 이렇게 cBot 장비를 이용하여 clonal cluster가(그림 1-15) 형성된 flow cell은 illumina sequencing 장비로 옮겨져 sequencing 진행 과정을 거치게 됨

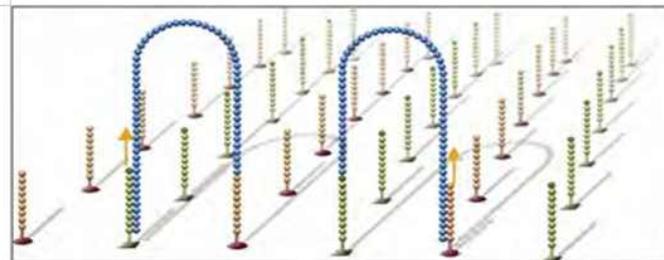


그림 1-14. Further Amplification of template

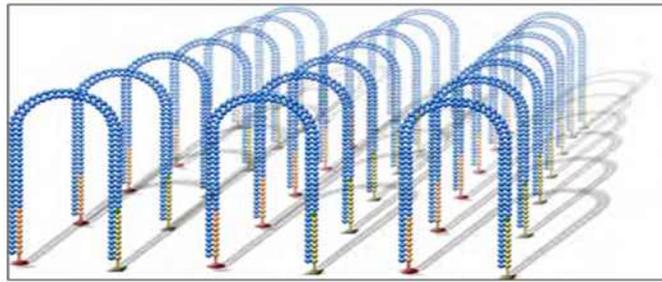


그림 1-15. Clonal Cluster

ㄷ. Sequencing using illumina Hiseq 2500 및 데이터 분석과정

1. Cluster가 형성된 flow cell은 illumina Hiseq 2500에 장착되어 sequencing 이 이루어지고 automated analysis pipeline을 통해 image analysis to locate clusters, base calling, demultiplexing of lanes, alignment of sequences to a reference genome, quality control, delivery of the data to a user accessible folder 과정을 거침으로써 염기서열을 확보하게 됨 (그림 1-16).

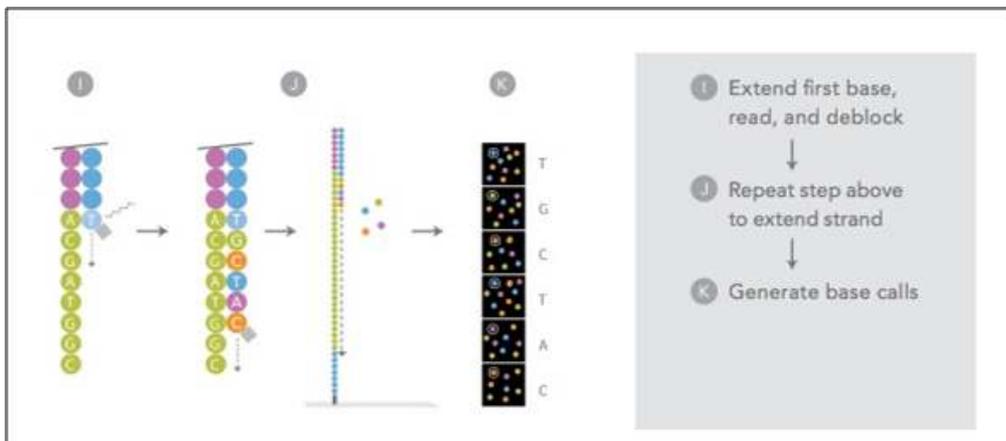


그림 1-16. HiSeq RNA-Seq 데이터 생성 과정

② NGS-resequencing 기술을 이용한 miRNA 생산 시스템 구축

- ㉠ 샘플 RNA 추출 : 양배추 내서성, 위황병, 흑부병 및 석회결핍 샘플에서 높은 quality의 RNA 추출 방법 (그림 1-17, 표 1-7)
 - ㄱ. 50~100mg의 샘플을 액체질소로 동결한 상태에서 곱게 갈아준 뒤 미리 동결 시켜둔 1.5ml RNA-free tube에 마쇄한 시료를 옮기고 400ul의 buffer I을 즉시 첨가함
 - ㄴ. 강하게 vortexing하여 혼합한 후 250ul의 phenol-chloroform혼합액(1:1, pH 4.7)을 첨가하고 잘 섞어준 후 (inversion) 혼합 직후 13,000g, 4℃에서 15분간 centrifugation 함
 - ㄷ. 상층액 약 250ul을 조심스럽게 취하여 buffer II 250ul이 담겨진 미리 준비된 1.5ml 튜브로 옮겨 잘 섞어준 후(inversion) 상온에 10분간 방치함

- 르. 200ul의 chloroform-isoamyl alcohol(24:1)을 첨가하여 13,000g, 4℃에서 15분간 centrifugation한 후 상층액 약 450ul을 조심스럽게 새 튜브에 취하고 300ul의 isopropanol과 250ul의 1.2M NaCl을 첨가하여 잘 섞어준 후 (inversion), 얼음 위에 15분간 방치함
- ㅁ. 13,000g, 4℃에서 15분간 centrifugation 하며 상층액을 제거하고 RNA pellet을 400ul의 70% 에탄올로 세척 한 후 pellet을 상온 후드에서 15~20분 간 건조시킨 후 약 50ul의 RNase-free water에 녹이고 -70℃에 저장함

표 1-7. Buffer 조성

buffer I	buffer II
100mM Tris (pH8.0)	70% guanidinium sulfate (w/w)
150mM LiCl	0.75M sodium citrate
50mM EDTA	10% lauryl-sarcosine
1.5% SDS	2M sodium acetate (pH4.0)
1.5% 2-mercaptoethanol	

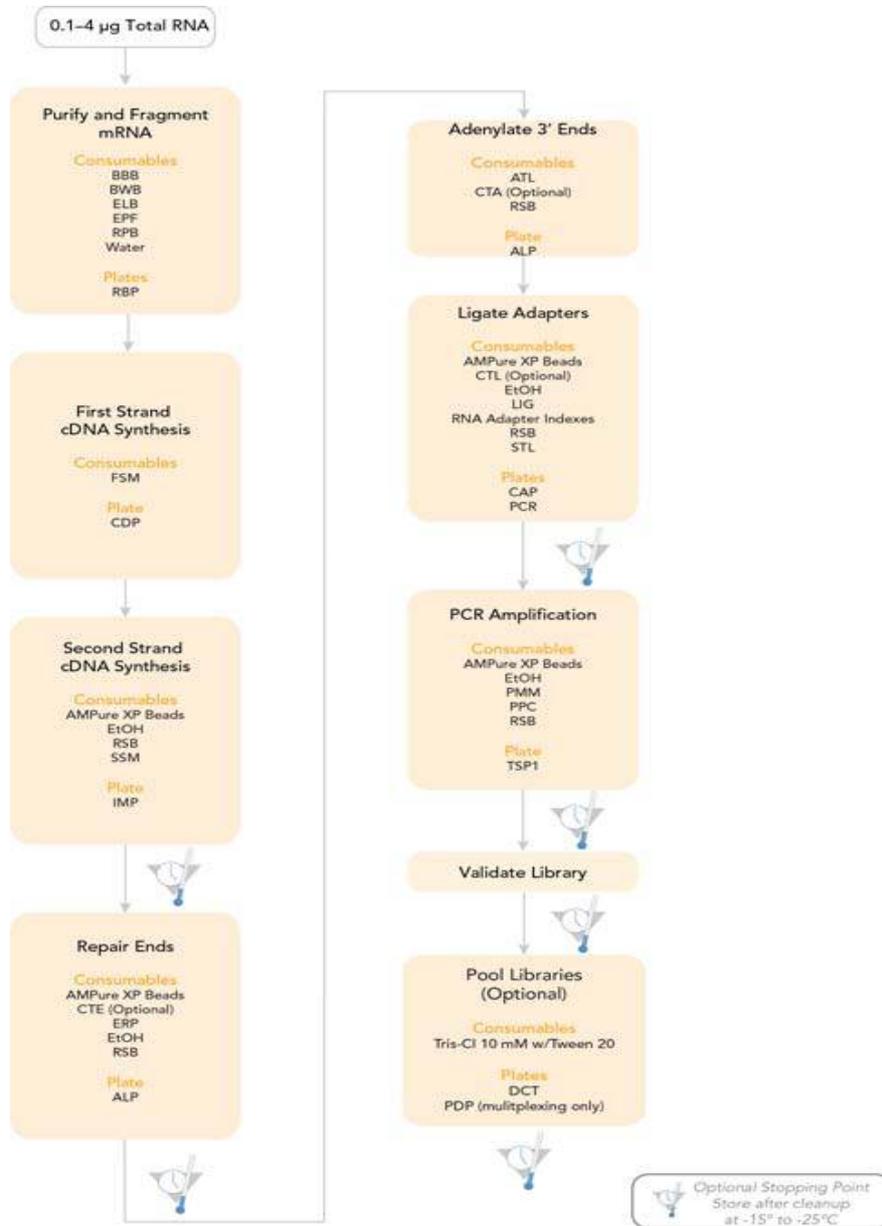


그림 1-17. RNA Library 제작 방법

㉞ 샘플 RNA 시료의 정성 및 정량분석 방법

ㄱ. Total RNA를 확보하고, 정성 및 정량분석에서 정한 기준치 이상일 경우만 sequencing을 해야 분석 결과의 오류를 최대한 줄일 수 있음. Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer 기기를 통한 RNA Integrity Number(RIN) 측정에서 8이상이어야 하며 라이브러리 진행을 위해서는 1 ~ 10ug의 Total RNA가 필요하고 농도가 200ng/ul이상 되어야 함 (그림 1-18)

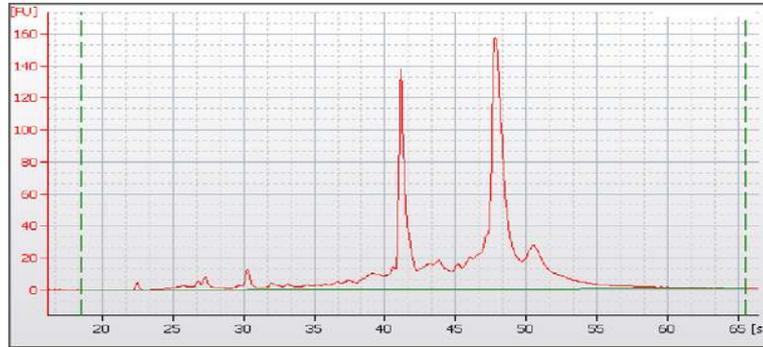


그림 1-18. RNA 6000 ladder(Bioanalyzer)

㉔ 서열 해독을 위한 miRNA 라이브러리 제작

ㄱ. 5'말단과 3'말단에 adapter를 ligation 시킴.

1. 얼음 위에서 nuclease-free 200ul PCR tube에 ligation reaction mix를 만듦 (표 1-8)

표 1-8. ligation reaction mix 조성

Reagent	Volume(ul)
RNA 3' Adapter (RA3)	1
1ug Total RNA in Nuclease-free Water	5
Total Volume	6

2. 70°C(thermal cyler)에 2분간 incubation하고 바로 얼음에 꽂음
3. T4 Ligase mix를 만들어서 반응 tube에 4ul 넣고 잘 섞은 후 28°C(thermal cyler)에서 1시간 incubation함(표 1-9)

표 1-9. T4 Ligase mix 조성

Reagent	Volume(ul)
Ligation Buffer (HML)	2
RNase Inhibitor	1
T4 RNA Ligase 2, Deletion Mutant	1
Total Volume per Sample	4

4. 1시간 후 thermal cyler에 반응 tube를 놓은 상태로 1ul Stop Solution을 넣고 잘 섞어준 다음 28°C(thermal cyler)에서 15분간 incubation후 얼음에 꽂아둠
5. 새 200ul PCR tube에 1.1ul RNA 5' Adapter(RA5)를 넣고 70°C에서 2분간 incubation 후 얼음에 꽂아 식힌 다음 1.1ul의 10mM ATP와 1.1ul의 T4 RNA Ligase를 넣어 잘 섞어준 다음 3ul를 따 내서 반응 tube에 넣어 Total 14ul의 반응액을 잘 섞어줌
6. 28°C(thermal cyler)에서 1시간 incubation하고 얼음에 꽂아 식힘 (그림 1-19)

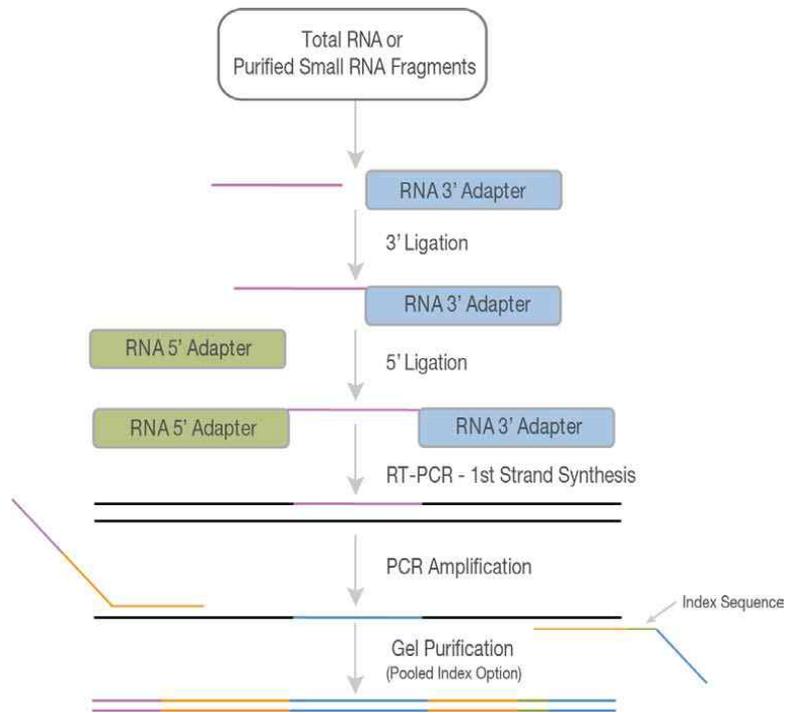


그림 1-19. small RNA 제작 과정

ㄴ. Reverse Transcribe and Amplify 과정

1. 5'말단과 3'말단에 adapter-ligated 된 RNA 샘플에 RNA RT Primer 1ul을 잘 섞어준 후 70℃에서 2분간 incubation과 바로 얼음에 꽂아 식힌 다음 SuperScript II Reverse Transcriptase mixture 5.5ul를 만들어 잘 섞어줌(표 1-10)

표 1-10. Transcriptase mixture

Reagent	Volume (ul)
5X First Strand Buffer	2
12.5 mM dNTP mix	0.5
100 mM DTT	1
RNase Inhibitor	1
SuperScript II Reverse Transcriptase	1
Total Volume per Sample	5.5

2. 50℃에서 1시간 incubation하고 얼음에 꽂아 식힘.
3. PCR증폭 mixture를 만들어 37.5ul을 잘 섞어줌(표 1-11)

표 1-11. Mixture

Reagent	Volume (ul)
Ultra Pure Water	7.5
PCR Mix (PML)	25
RNA PCR Primer (RP1)	2
RNA PCR Primer Index (RPIX)	2
Total Volume per Sample	37.5

4. Thermal cycler에서 조건에 맞게 반응시킴 (98°C for 30 seconds, 11 cycles of : 98°C for 10 seconds, 60°C for 30 seconds, 72°C for 15 seconds, 72°C for 10 minutes, 4°C hold)
5. 반응이 끝난 후 Agilent 2100 high sensitivity DNA chip으로 micro RNA를 확인함 (그림 1-20).

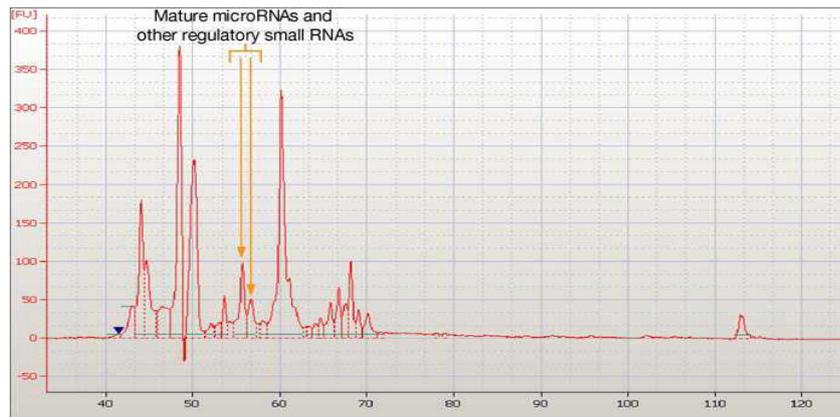
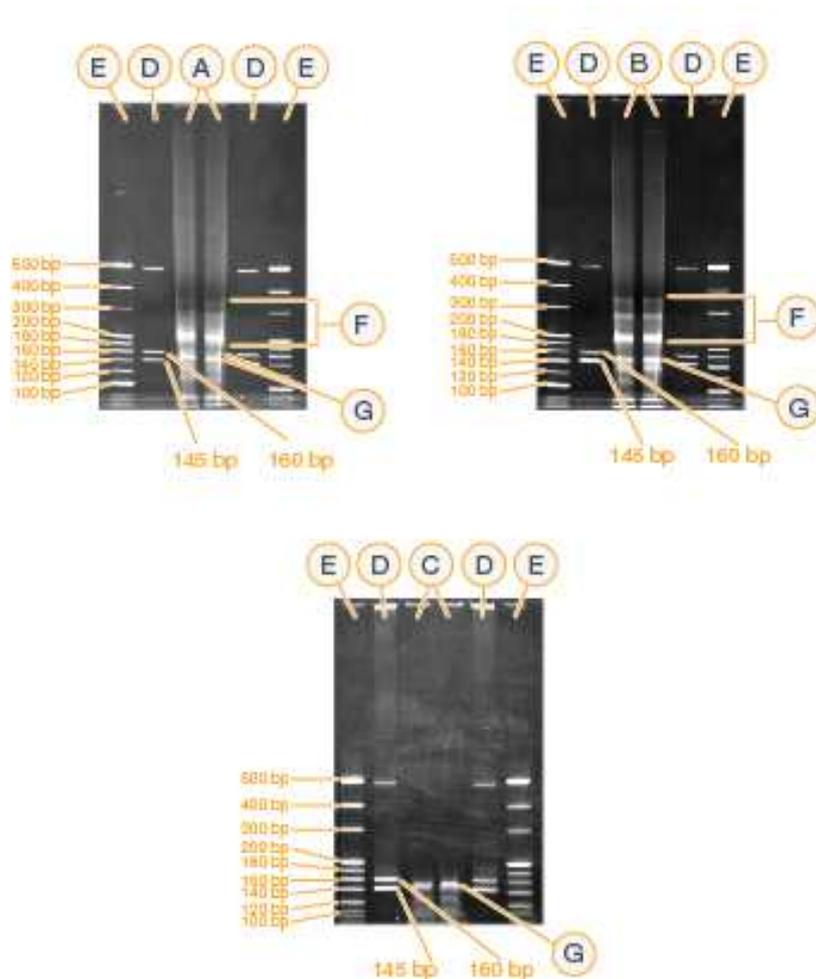


그림 1-20. Agilent 2100 high sensitivity DNA chip으로 micro RNA 확인

㉔. 전기영동을 통해 증폭된 Small RNA부분만 분리

1. 전기영동 장치에 1X TBE Buffer를 채우고 6% PAGE Gel을 준비하고 전류를 확인함
2. 1개의 tube에 2ul의 Custom Ladder와 2ul의 DNA Loading Dye를 섞음
3. 1개의 tube에 1ul의 High Resolution Ladder와 1ul의 DNA Loading Dye를 섞음
4. 샘플 25ul과 Custom Ladder mix 2ul와 loading dye mix 1ul를 2well씩 분주하여 145V에서 1시간 전기영동으로 내림.
5. Custom Ladder에 맞추어 145bp에서 160bp 사이의 band를 잘 잘라냄
6. 잘라낸 gel은 작게 조각내서 0.5ml Gel Breaker tube에 넣어 20,000xg microcentrifuge에서 2분간 원심분리해서 나온 gel debris를 Ethanol Precipitation과정을 거쳐 정제하게 됨
7. gel debris를 2ml tube에 옮기고 300ul의 Ultra Pure Water를 섞은 다음 실온에서 최소 2시간 이상 rotating하면서 섞이도록 함
8. 5um filter에 옮겨 원심분리해서 얻어낸 샘플에 2ul of Glycogen, 30ul of 3M NaOAc, 2ul of 0.1X Pellet Paint와 975ul의 100% 에탄올을 넣고 잘 섞어준 다음 centrifuge에서 20,000xg 값으로 20분간 원심분리해서 상등액은 제거하고 바닥에 남겨진 pellet을 확인함
9. 500ul의 70% 에탄올을 넣고 20,000xg 값으로 2분간 돌려 pellet을 2회 정제해 준 다음 37°C heat block에서 10분간 말린 후 10ul의 10 mM Tris-HCl(pH 8.5)로 잘 녹여줌 (그림 1-21)



- A. Total RNA
- B. Total RNA
- C. Pre-purified microRNA
- D. Custom Ladder
- E. High Resolution Ladder
- F. Small Non-coding RNAs
- G. MicroRNA

그림 1-21. small RNA 전기영동 사진

르. samll RNA Library의 확인 및 정량

1. 만들어진 Library의 size를 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer의 DNA-1000 이나 High Sensitivity DNA chip으로 확인함
2. 확인된 라이브러리는 qPCR과정에 들어가고 정확한 몰농도가 측정되어, sequencing에 적절한 cluster를 합성할 수 있는 목표몰농도(10nM)로 희석되어 sequencing에 사용 (그림 1-22)

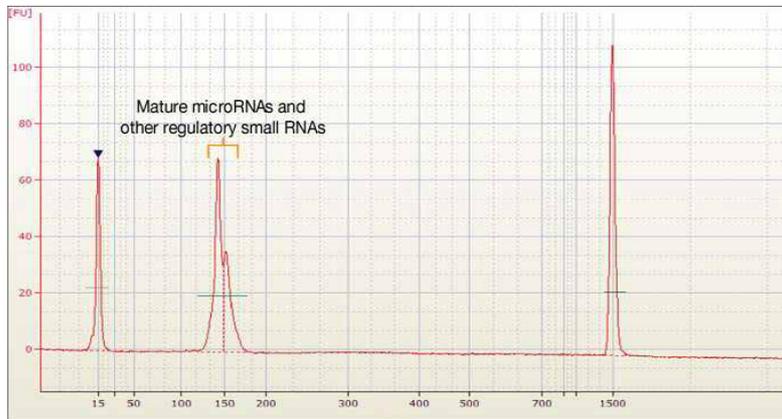


그림 1-22. Agilent 2100 high sensitivity DNA chip으로 micro RNA Final Library Total RNA sample 확인

③ NGS RNA-Seq 데이터 분석 시스템 구축 방법

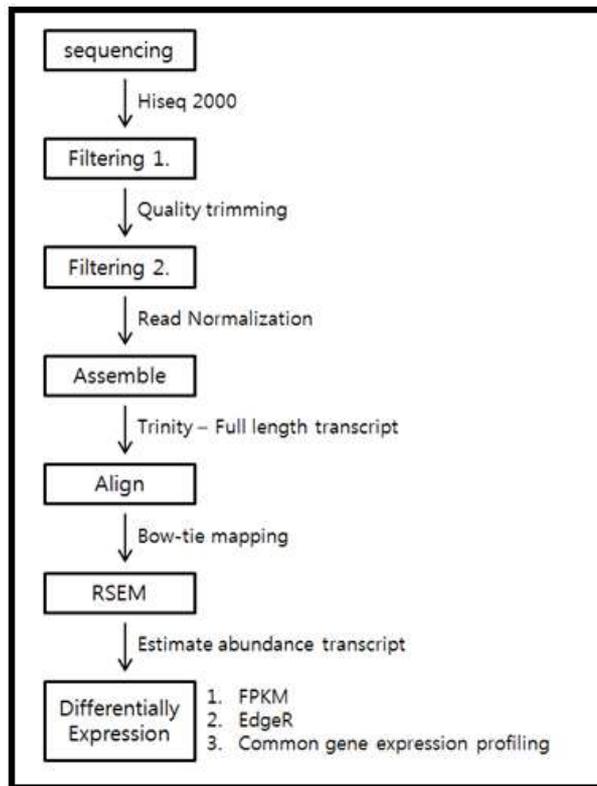


그림 1-23. RNA-Seq 분석 절차

㉠ HiSeq2000의 RNA-seq 생산 : RNA-Seq 라이브러리 준비가 끝나면 Cluster Generation 절차를 거치는데 해당과정에서는 앞서 준비한 라이브러리를 flow cell에 붙이는 작업을 하게 됨. 이 단계는 HiSeq2000 데이터 quality에 직접적인 영향을 미치는 중요한 절차임

㉡ HiSeq2000의 데이터 quality는 Cluster Generation과정의 cluster density에 많이 의존하게 되는 해당 분석에서는 488k/mm² 이상의 cluster density를 유지하여 양질의 데이터 quality를 확보함

- ㄴ. Cluster Generation 이 완료되면 다음 단계인 Sequencing by Synthesis 과정을 거침
- ㄷ. 샘플의 Total RNA에 대한 cDNA 라이브러리를 만들고 해당 라이브러리를 HiSeq2000 시퀀서의 flow cell에 라이브러리를 붙여 Cluster Generation을 하고 증폭한 후에 sequencing by synthesis 과정에서 flow cell 위의 cluster station에 붙어 있는 라이브러리 조각에 1cycle마다 형광물질을 붙이고 레이저로 이를 읽어 내어 데이터를 생산 함
- ㄹ. 데이터는 그림 1-24와 같은 이미지로 생산되며, 이미지 파일들을 엮기서열로 이루어진 read 데이터로 변환하기 위해 Illumina에서 제공하는 CASAVA 프로그램을 이용하여 fastq 형식으로 read 데이터를 생산함

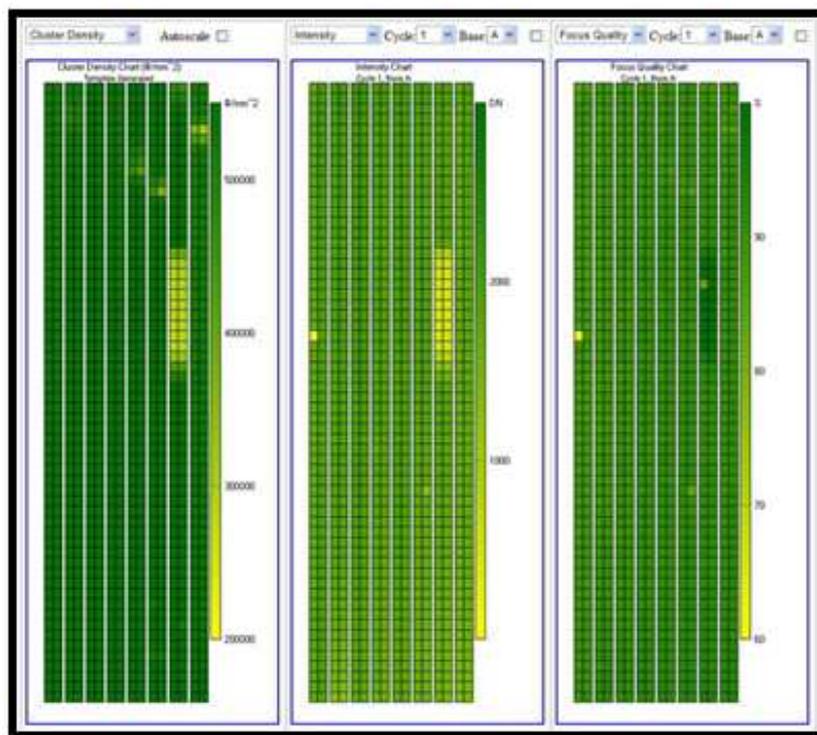


그림 1-24. HiSeq2000 sequencing으로 생산된 데이터

㉞ HiSeq2000의 RNA-seq 데이터 필터링

- ㄱ. HiSeq2000을 통해 생산된 read 데이터는 반드시 퀄리티 체크를 통해 일정 기준 이상의 quality를 가진 read만 분석에 사용되어야 함. NGS와 같은 High throughput sequencing의 장점인 대용량 데이터 생산 방식의 근본적이 문제점은 바로 sequencing error 및 일정하지 않는 quality를 들 수 있음. HiSeq2000의 경우 sequencing과정의 증폭 단계의 절차상 100bp read를 생산하고 합성하는 과정에서 70bp 이후의 합성 quality가 낮아질 수밖에 없음
- ㄴ. 따라서 이렇게 기준치에 부합되지 않는 낮은 quality의 read를 가지고 분석을 진행할 경우 데이터 생산 및 분석 결과의 신뢰도에 직접적인 영향을 미치게 되므로 일차적으로 생산된 데이터에 대해서 quality 체크 및 trimming을 수행해야 함.

생산된 read 데이터는 서열과 quality 값이 함께 저장되어 있는 fastq 형식으로 생산되어 졌으며, 이 데이터를 바탕으로 일반적으로 quality가 낮아지는 70bp 이후의 서열을 제거하고 quality 값이 20이하인 read를 제거하는 trimming 과정을 수행하였음 (그림 1-25).



그림 1-25. RNA-Seq 데이터 read 길이에 따른 quality값 분포

㉔ Read 데이터의 normalization 분석

- ㄱ. 생산된 데이터는 리눅스 서버를 통해 full-length의 transcript로 assemble 하고 이 assemble된 full-length transcript를 reference로 각 read들을 mapping 하여 발현량을 샘플별로 측정하여 그 차이를 보고자 하는 분석을 수행하는데, 현재 생산된 데이터는 분석하기 위해 요구되는 컴퓨팅 환경을 압도적으로 상회 하는 read가 생산되었기 때문에 이 read의 양을 결과에 영향을 미치지 않는 한 도 내에서 줄일 필요가 있음
- ㄴ. 백만 개의 read를 De novo assemble하고 mapping 하는데 1G의 RAM을 필요로 하는데 37억 개의 read를 생산하였고, 도합 4,000G 이상의 RAM을 필요로 하기 때문에 각 read 데이터에 대한 normalization을 통해 read의 양을 줄였음.
- ㄷ. Greedy k-mer-based approach 방식으로 trimming 한 read들을 k-mer(25bp)로 profiling해서 해시 테이블을 만들고 가장 빈도가 높은 k-mer를 seed로 삼아서 seed가 겹치는 빈도를 coverage로 삼아서 정규화 하고자 하는 기준이상의 read 데이터는 제거하는 방식으로 전체 샘플의 발현을 비교하기 위한 read의 상대적인 비율을 훼손 하지 않는 범위 내에서 read의 양을 감소시키는 normalization을 수행하였음

㉕ RNA-Seq Read 데이터의 Assembly

- ㄱ. RNA-seq 분석은 크게 reference 모델이 있는 경우와 그렇지 않는 경우 두 가지로 나뉘는데 본 연구에서는 사용할 reference 모델이 없었기 때문에 생산된 read를 가지고 de-novo assemble를 통해 full-length transcript를 생산하는 방식으로 분석을 진행하였음 (그림 1-26)

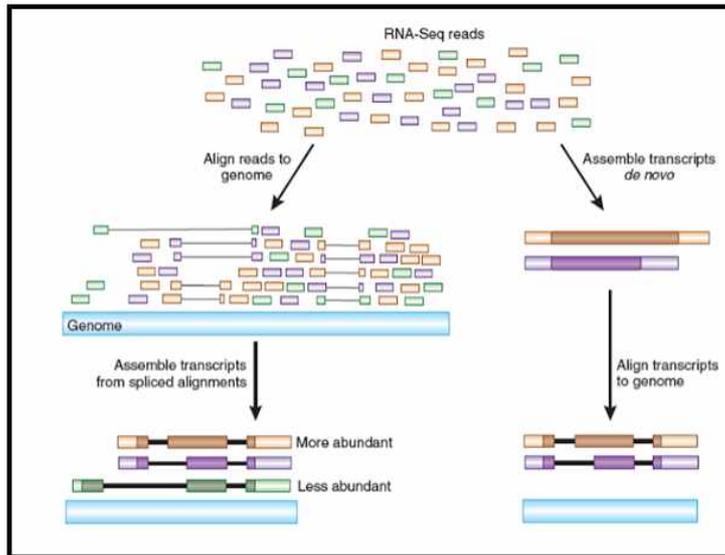


그림 1-26. RNA-seq de novo assembly

- ㄴ. RNA-seq 분석을 위한 소프트웨어는 현재 많은 종류의 소프트웨어가 나와 있고, 결과의 정확도 및 성능의 비교 분석한 결과 본 분석에서는 Trinity 소프트웨어로 de-novo assemble 및 downstream 분석을 진행하였음
- ㄷ. Trinity de novo assembly 과정은 크게 3개의 과정을 통해서 assemble을 수행하게됨 (a. Inchworm, b. Chrysalis, c. Butterfly)(그림 1-27)

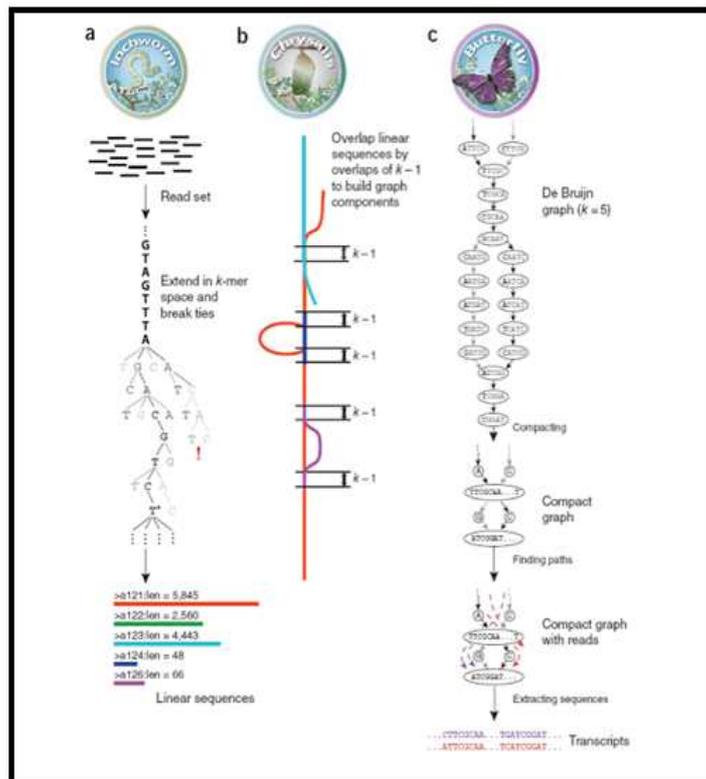


그림 1-27. Trinity 소프트웨어의 Full-length transcript 생산을 위한 de-novo assembly 절차

- ㄹ. Inchworm 과정 : 준비된 read set에서 k-mer로 profiling 해서 해시 테이블을 만들고 가장 빈도가 높은 k-mer를 seed로 삼아서 이 seed를 양방향으로 overlap 되는 것끼리 (k-1 mer overlap) 연결시켜 contig를 만드는데 만약 k-1 overlap이 k-mer가 많을 시에는 k-mer중 빈도가 높은 것을 연결함. Seed를 선정하고 k-1 mer의 overlap으로 contig 확장을 계속적으로 반복하여 contig들을 만들어 냄.
 - ㅁ. Chrysalis 과정 : Clustering 후 complete de Bruijn graph를 생성함. Inchworm 단계에서 생성된 contig를 clustering하는데 k-1 mer이상 겹치는 contig들 또는 read에 의해 바로 연결되는 contig들을 grouping 함. 그 뒤 각 cluster(component)마다 de Bruijn graph를 생성함. 이때 node가 k-1 mer이고 edge가 k-mer임. 각 edge는 read frequency로 weight를 구함. 그 후 각 read 들을 가장 많은 k-mer가 공동이 되는 component에 할당함
 - ㅂ. Butterfly 과정 : 생성된 component들에 read를 대입해서 가능한 모든 full-length transcript를 찾음. 이는 두 단계로 구성되어 있는데 첫 번째로 graph simplification을 수행함. Graph simplification은 chrysalis에서 만든 graph 의 node를 merging하고 error로 판단되는 edge를 pruning 하는 것으로 이루어짐. 두 번째로 plausible path scoring 작업을 함. 이는 실제 read를 simplified된 graph에 대입함으로써 path를 찾게 되어 full-length transcript를 생성함
- ㉑ 양배추 RNA-Seq데이터 Alignments
- ㄱ. Assemble된 full-length transcript를 reference로 삼아 각 샘플의 read 데이터를 reference에 alignments함
 - ㄴ. Alignments은 bowtie 소프트웨어를 사용하여 진행하였으며 그림 23과 같이 reference에 align된 read들의 분포 및 depth를 확인 할 수 있으며 그림 24와 같이 bam파일을 생산하였음. 이 데이터는 transcript의 발현 정도를 측정하는데 중요한 데이터로 사용됨
- ㉒ 양배추 RNA-Seq데이터 Expression profiling 의 normalization
- ㄱ. Full-length transcript 생성 후 이후의 유전자발현 분석을 진행하는데 있어서, 다음과 같은 문제점을 고려하며 분석을 진행하였음
 - ㄴ. 샘플별 생산된 RNA-Seq reads가 다르기 때문에 full-length transcript에 mapping된 NA-Seq reads가 달라 transcript마다 expression 양이 다름
 - ㄷ. 한 transcript에서 나온 read들이라도 coverage가 고르지 못함
 - ㄹ. 많이 발현되는 transcript의 sequencing error가 있는 read가 적게 발현되는 transcript의 read 보다 많을 수 있음
 - ㅁ. 가까이 있는 transcript 들이 overlap 되어서 잘못된 chimeric transcript로 예측할 수 있음.
 - ㅂ. Alternative splicing을 고려한 data structure가 필요함
 - ㅅ. 서로 다른 transcript 사이에 유사한 sequence가 있을 때 생기는 ambiguity가 있음

- ㉔ 위와 같은 문제점들로 인해 assemble 한 Full-length transcript에 read 데이터를 align 하여 해당 read의 abundance를 expression량으로 보고 분석을 진행 할 수 없음. 보다 정확한 분석을 위해 full-length transcript에 read 데이터를 Align하였고 그 값을 FPKM (expected fragments per kilobase of transcript per million fragments sequenced) 값으로 치환하였음
- ㉕ FPKM 값은 read 하나하나의 값에 의미를 두는 게 아니라 paired-end read 한 쌍의 fragment를 대상으로 백만개의 fragment 서열당 1kb의 transcript에 mapping 되는 fragment들의 값들을 발현 량으로 계산함으로써 각 transcript마다 발현되는 양이나 transcript의 길이의 차이 때문에 잘못 계산될 수 있는 read의 발현 정도를 보정하였음

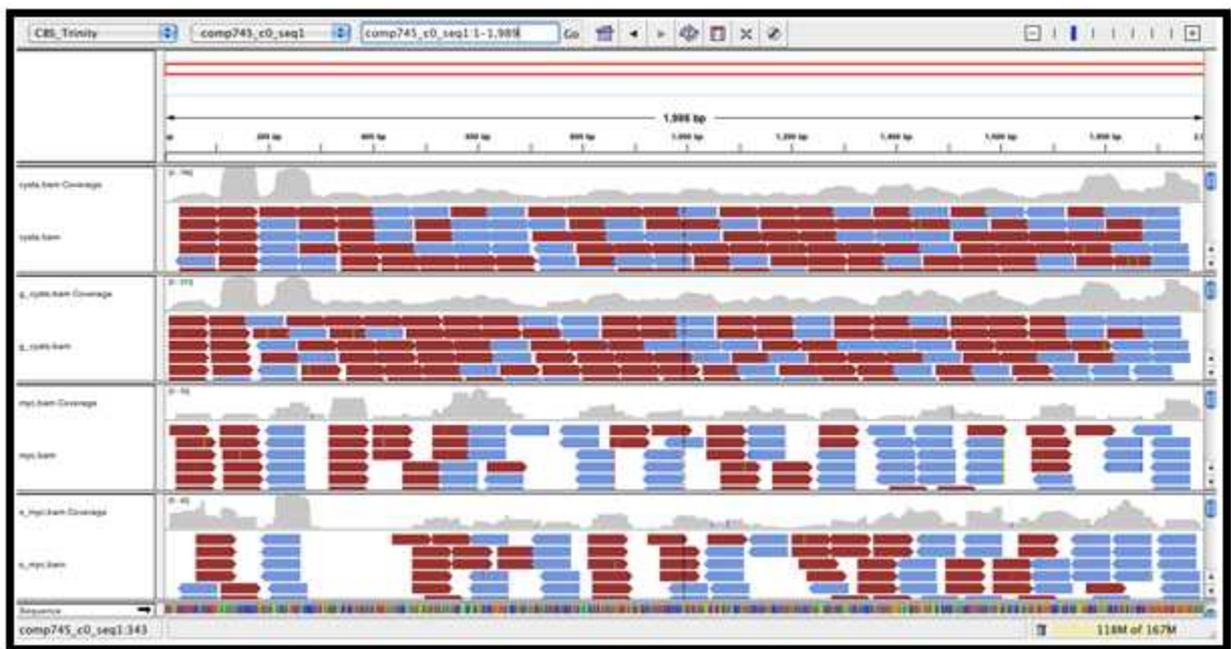


그림 1-28. Full-length transcripts에 RNA-Seq alignment된 결과

```

-rw-rw-r-- 1 bhaas broad 33644239 Oct 29 09:51 bowtie_out.coordSorted.sam
-rw-rw-r-- 1 bhaas broad 5761928 Oct 29 09:51 bowtie_out.coordSorted.bam
-rw-rw-r-- 1 bhaas broad 33644239 Oct 29 09:51 bowtie_out.nameSorted.sam
-rw-rw-r-- 1 bhaas broad 4256476 Oct 29 09:51 bowtie_out.nameSorted.bam
-rw-rw-r-- 1 bhaas broad 4416 Oct 29 09:51 bowtie_out.coordSorted.bam.bai
-rw-rw-r-- 1 bhaas broad 33634652 Oct 29 09:51 bowtie_out.coordSorted.sam+.sam
-rw-rw-r-- 1 bhaas broad 9587 Oct 29 09:51 bowtie_out.coordSorted.sam-.sam
-rw-rw-r-- 1 bhaas broad 33634652 Oct 29 09:51 bowtie_out.nameSorted.sam+.sam
-rw-rw-r-- 1 bhaas broad 9587 Oct 29 09:51 bowtie_out.nameSorted.sam-.sam
-rw-rw-r-- 1 bhaas broad 5759999 Oct 29 09:51 bowtie_out.coordSorted.sam+.bam
-rw-rw-r-- 1 bhaas broad 4416 Oct 29 09:51 bowtie_out.coordSorted.sam+.bam.bai
-rw-rw-r-- 1 bhaas broad 1836 Oct 29 09:51 bowtie_out.coordSorted.sam-.bam
-rw-rw-r-- 1 bhaas broad 1680 Oct 29 09:51 bowtie_out.coordSorted.sam-.bam.bai
-rw-rw-r-- 1 bhaas broad 4255371 Oct 29 09:51 bowtie_out.nameSorted.sam+.bam
-rw-rw-r-- 1 bhaas broad 1843 Oct 29 09:51 bowtie_out.nameSorted.sam-.bam

```

그림 1-29. Full-length transcripts에 RNA-Seq alignment된 BAM 파일

- ㉠ 양배추 RNA-Seq 데이터 RSEM 소프트웨어를 사용한 Transcript Abundance 예측
 - ㄱ. Full-length transcript와 align된 데이터를 바탕으로 transcript의 발현 정도를 예측하기 위한 절차로써 reference를 만들고 RNA-seq reads을 mapping하고 expression calculate 및 rsem-simulate-reads를 거쳐 gene / isoform abundance estimate를 수행함.
 - ㄴ. 이 과정의 결과로 그림 1-30와 같은 각 gene 및 해당 gene의 transcript 의 길이 및 TPM, FPKM값이 생산됨.

transcript_id	gene_id	length	effective_length	expected_count	TPM	FPKM	isoPct
comp28_ro_seq1	comp28_ro	209	1.73	0.00	0.00	0.00	0.00
comp43_ro_seq1	comp43_ro	233	7.18	1.00	12581.54	2882.75	100.00
comp22_ro_seq1	comp22_ro	213	3.82	0.00	0.00	0.00	0.00
comp28_ro_seq1	comp28_ro	329	54.60	4.00	6981.85	2772.31	100.00
comp33_ro_seq1	comp33_ro	307	40.39	3.00	6697.56	2616.66	100.00
comp35_ro_seq1	comp35_ro	229	3.33	0.00	0.00	0.00	0.00
comp35_r1_seq1	comp35_r1	204	1.19	1.00	75295.09	31665.75	100.00
comp39_ro_seq1	comp39_ro	348	68.20	1.00	1319.32	504.84	100.00
comp39_ro_seq2	comp39_ro	253	13.97	0.00	0.00	0.00	0.00
comp41_ro_seq1	comp41_ro	562	295.77	13.00	2650.37	1533.16	100.00
comp44_ro_seq1	comp44_ro	261	78.10	1.00	1151.09	484.46	100.00
comp44_r1_seq1	comp44_r1	280	25.22	1.00	3368.05	1300.54	100.00

그림 1-30. 해당 gene의 transcript 의 길이 및 TPM, FPKM값

- ㉡ 양배추 RNA-Seq differentially expressed transcripts
 - ㄱ. 각 transcript들의 발현 값을 가지고 각 샘플간 differentially expressed transcript들에 대한 clustering 및 expression profiling을 수행함
 - ㄴ. Transcript들의 FPKM값의 matrix를 만들고 연관 있는 transcript들과의 clustering과 P-value 0.05 이하, fold change 2 이상의 값을 가지는 transcript 들을 분류함

④ NGS small RNA 분석 시스템 구축

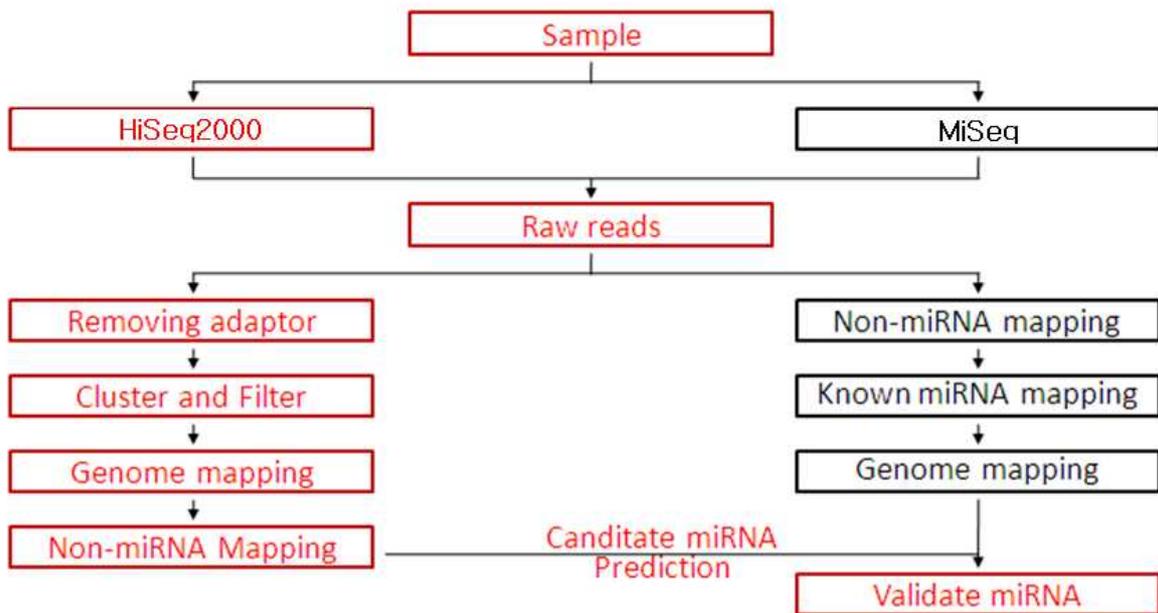


그림 1-31. NGS small RNA 분석 시스템 구축 방법

㉔ NGS-resequencing 기술을 이용한 small RNA 분석시스템 구축

- ㄱ. miRNA(microRNA)는 약 22개의 염기서열로 이루어진 짧은 non-coding RNA로 유전자의 발현을 억제시키는 전사 후 조절인자(post-transcriptional regulator)의 기능을 하는 것으로 알려져 있음
- ㄴ. 이들은 표적(target) mRNA의 3' UTR 말단에 상보적으로 결합함으로써 표적 miRNA들을 분해시키거나 단백질로의 번역을 억제함.
- ㄷ. 이러한 조절기능이 개체의 발생 과정에서 세포분열, 분화, 사멸을 조절할 뿐만 아니라 질환의 발병 원인과 밀접한 관련이 있다는 것이 밝혀짐에 따라 miRNA의 연구가 활발히 진행되고 있음
- ㄹ. 2008년 Nature Biotechnology에 의하면, miRDeep을 이용하여 NGS 데이터로부터 novel miRNAs를 발굴하여, 가능한 miRNA biogenesis 모델을 예측하였음
- ㅁ. 가장 최신 버전의 miRNA 분석 프로그램은 miRDeep2, 정확도가 98.6~99.9%로 매우 높음. 그 외에, NGS 데이터로 miRNA expression을 detection 하거나, novel miRNAs를 발굴하기 위한 프로그램으로는 deepBase, Geoseq, miRNAkey, miRExpress가 있음

㉕ miRNA 데이터 전처리 과정

- ㄱ. miRNA데이터 필터링 : 해독기기에서 생산된 단서열로부터 정확한 서열정보를 얻기 위해, 해독된 단서열 중 quality가 떨어지는 read를 제거함. 이를 위해 Sickle 프로그램 (<https://github.com/najoshi/sickle>)이 이용되었음. 이 프로그램은 각 단서열의 평균 Q score를 계산하여 이 값이 사용자가 선택한 quality 기준 값 미만(Q score < 20)이면 단서열을 끝에서부터 시작하여 하나씩 자르고 (trimming) 나머지 염기로 다시 Q score를 계산하여 평균값이 기준 quality 이상이 나올 때까지 이 작업을 반복함. Trimming은 사용자의 선택에 따라 3' 말단이나 5' 말단으로부터 시작할 수 있음. 최종적으로 얻어진 단서열의 길이가 사용자가 선택한 기준값 (18 < 서열 길이) 보다 작을 경우, 해당 단서열을 제거하고 그렇지 않을 경우 해당 단서열의 필터링을 종료함
- ㄴ. 브로콜리 reference genome에 단서열을 mapping할 때 여러 loci에 mapping되는 것을 방지하기 위해서 rRNAs, tRNAs, other ncRNA 등을 미리 필터링하는 것이 좋음

㉖ miRNA 발굴

- ㄱ. miRDeep 패키지는 deep sequencing data(Solexa 및 Illumina)에서 known 또는 novel miRNA를 찾는데 초점이 맞춰져 있는 클래식한 방법 중 하나임. 필터링 과정을 거친 단서열을 정확하게 분석하여 miRNA 정보를 추출하기 위해 게놈에서 potential miRNA precursor를 찾음. 이때 아래 그림과 같이 miRNA 생성 모델에 따라 score를 줌. miRNA precursor 또는 non-miRNA local hairpin 구조로부터 단서열을 mapping 함으로써 miRNA를 발굴함 (그림 1-32).

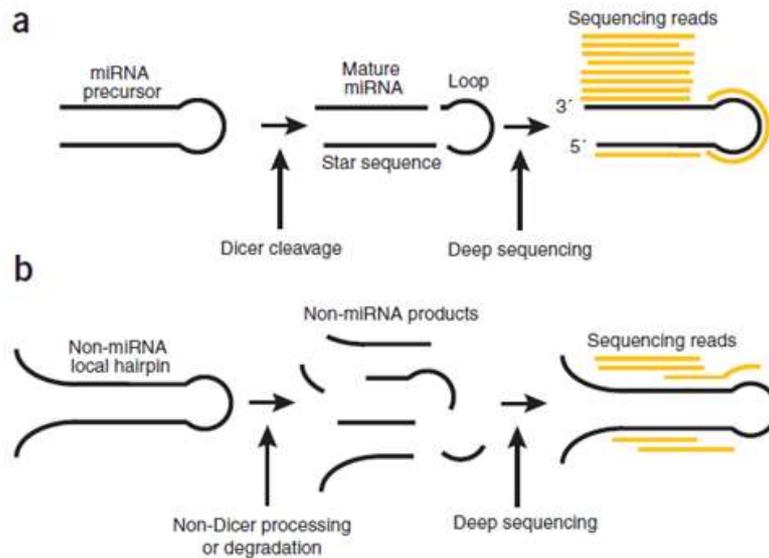


그림 1-32. miRNA 분석 방법

- ㄴ. miRNA(ce1_cluster.fa)을 표준 서열(reference sequence; ce1_cluster)에 mapping하기 위해 먼저, 표준 서열 게놈 인덱스화를 진행함. Bowtie 프로그램이 이용됨. 이때 사용한 명령어와 옵션은 아래와 같음(bowtie-build ce1_cluster.fa ce1_cluster).
- ㄷ. 단서열을 미리 Index화한 표준 서열에 mapping한다. 이때 효과적인 mapping을 위해 mirdeep2에서 단서열의 필터링 기능을 제공하므로 이를 이용함. 먼저, 단서열에 존재하는 비서열 문자를 제거하고(서열문자: a,c,g,t,u,n,A,C,G,T,U,N) 3' 말단의 adapter 서열을 제거함. 제거하고 남은 단서열 길이가 18nt보다 짧으면 그 단서열은 제거하였음
- ㄹ. 전처리가 끝난 단서열을 genome에 bowtie를 이용하여 mapping함
- ㅁ. mapper.pl reads.fa -c -j -k TCGTATGCCGTCCTTCIGCTTGT -l 18 -m -p
- ㅂ. ce1_cluster -s reads_collapsed.fa -t reads_collapsed_vs_genome.arf -v
- ㉑ miRNA annotation
 - ㄱ. miRBase의 알고있는 precursor 정보를 이용하여 mapping된 단서열을 빠르게 체크함. 결과 파일로 miRNA_expressed.csv를 얻을 수 있는데, 이 파일은 표준 miRNA의 단서열 수를 제공함
 - ㄴ. quantifier.pl -p precursors_ref_this_species.fa -m mature_ref_this_species.fa -r
 - ㄷ. reads_collapsed.fa -t ce1 -y 16_19
- ㉒ NGS 데이터로부터 known miRNA와 novel miRNA을 확인하기 위해 사람의 precursor miRNA 정보와 mature 정보를 옵션으로 넣어줌으로써 찾게 되는데 이때 다른 종의 mature miRNA 정보도 넣어주어 고려함. results.html 결과 파일은 인터넷 브라우저를 통해 확인 가능함
 - ㄱ. miRDeep2.pl reads_collapsed.fa ce1_cluster.fa reads_collapsed_vs_genome.arf
 - ㄴ. mature_ref_this_species.fa mature_ref_other_species.fa precursors_ref_this_species.fa-t C.elegans 2> report.log

⑤ 양배추 내서성 및 위황병 계통에 대한 RNA-Seq 데이터 생산

- ㉠ 위황병 샘플은 2핵심에서 양배추의 위황병, 위황병 저항성, 위황병 감수성에 특이적으로 발현되는 유전자들을 보기위하여 정상 양배추에 *F. oxysporum*을 감염시켜 3일동안 키워 채취한 샘플과 *F. oxysporum*을 처리하지 않은 샘플을 각각 분리하여 샘플링 한 후 totla RNA를 뽑았음
- ㉡ 뽑혀진 RNA의 quality를 체크 한 후 QC를 통과한 샘플들만 데이터 생산 절차를 따랐으며, QC를 통과하지 못한 샘플은 샘플을 다시 채취하여 RNA를 뽑아 QC를 체크하여 RNA-seq데이터 생산하기 위하여 준비하였음
- ㉢ 내서성 샘플은 2핵심에서 양배추의 내서에 특이적으로 발현되는 유전자들을 보기위하여 정상 양배추에 heatshock을 처리한 샘플과 heatshock을 처리하지 않은 샘플을 각각 분리하여 샘플링 한 후 total RNA를 뽑았음
- ㉣ RNA의 quality를 체크 한 후 QC를 통과한 샘플들만 데이터 생산 절차를 따랐으며, QC를 통과하지 못한 샘플은 샘플을 다시 채취하여 RNA를 뽑아 QC를 체크하여 RNA-seq데이터 생산하기 위하여 준비하였음
- ㉤ RNA-Seq데이터는 최신 NGS 장비인 Hiseq2000을 이용하여 데이터를 생산rna-seq 데이터를 이용하여 정확한 유전자 발현 패턴 분석을 위해 Hiseq2000 library는 faired-end library를 구축하여 데이터를 생산하였음
 - ㉥. paired-end library insert size는 350 bp로 구축하였음
 - ㉦. 각 샘플당 RNA-Seq데이터 생산량은 전체적인 유전자들의 발현을 모두 보기 위하여 최소한 read 개수가 30,000,000이상이 되게 데이터를 생산하였음
 - ㉧. RNA-Seq 데이터의 read 개수가 30,000,000정도 되어야 알려진 유전자의 85% 정도를 커버할 수 있기 때문에 위황병 비교군과 위황병 처리군, 내서성 과 heatshock 처리군의 데이터의 read 개수가 30,000,000 이상이 되게 데이터를 생산하였음

표 1-12. 양배추 내서성 RNA-Seq 데이터 생산

Sample		Normal		Heat Shock	
Treatment 강도	Sample Name	Yield(Mbase)	Reads#	Yield(Mbase)	Reads#
	HO	14,730	147,307,218	29,769	297,696,986
강	KK	17,339	173,395,320	13,745	137,456,942
	RK	16,826	168,262,412	12,705	127,051,858

표 1-13. 양배추 위황병 RNA-Seq 데이터 생산

Index	Analysis set	control(0h)			treatment(3d)		
		sample name	Yield (Mbases)	Read count #	sample name	Yield (Mbases)	Read count #
위황병	analysis set 1	101_shoot_Fo_0h	13,181	131,819,588	101_shoot_Fo_3d	12,972	129,722,342
위황병 저항성	analysis set 2	101_shoot_mock_0h	13,632	136,325,114	101_shoot_mock_3d	14,589	145,898,330
위황병	analysis set 3	102_shoot_Fo_0h	11,792	117,921,900	102_shoot_Fo_3d	18,149	181,495,778
위황병 저항성	analysis set 4	102_shoot_mock_0h	12,731	127,312,340	102_shoot_mock_3d	16,247	162,472,080
위황병	analysis set 7	105_shoot_Fo_0h	18,028	180,284,474	105_shoot_Fo_3d	17,344	173,445,370
위황병 저항성	analysis set 8	105_shoot_mock_0h	19,395	193,956,286	105_shoot_mock_3d	17,495	174,953,800
위황병	analysis set 5	104_shoot_Fo_0h	18,629	186,295,318	104_shoot_Fo_3d	5,982	59,822,448
위황병 감수성	analysis set 6	104_shoot_mock_0h	19,104	191,045,538	104_shoot_mock_3d	6,399	63,992,272
위황병	analysis set 9	106_shoot_Fo_0h	22,267	222,674,722	106_shoot_Fo_3d	18,109	181,094,028
위황병 감수성	analysis set 10	106_shoot_mock_0h	22,892	228,928,810	106_shoot_mock_3d	11,711	117,117,172
위 황 병 저 항 성	analysis set 11	14R_shoot_mock_3d	14,846	148,467,042	14R_shoot_Fo_3d	17,904	179,044,996
위 황 병 감 수 성	analysis set 12	16S_shoot_mock_3d	19,047	190,475,216	16S_shoot_Fo_3d	17,461	174,611,728

- 엽분 차이는 브로콜리 계통 RNA-seq 데이터 생산 (HiSeq 2000)
- Koregon Seed CO., Ltd

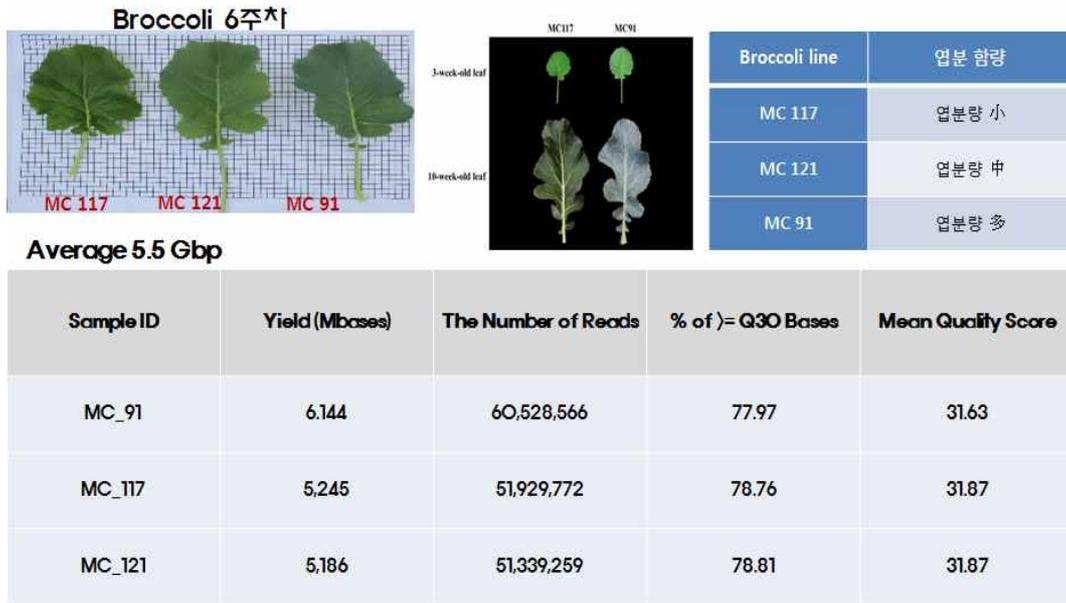


그림 1-33. 엽분차이를 보이는 브로콜리 RNA-Seq 데이터 생산

⑥ 양배추 내서성/위황병/석회결핍 민감형과 둔감형 계통에 대한 RNA-Seq 데이터 Filtering

- ㉔ 생산된 양배추 내서성/위황병 계통의 RNA-Seq Read 데이터는 서열과 quality값이 함께 저장되어 있는 Fastq방식으로 생산되어 졌으며 이 데이터를 바탕으로 공통적으로 quality가 낮아지는 70bp이후의 서열을 제거하고 quality값이 20이하인 read를 제거하는 Trimming 과정을 수행함(표 1-14).

표 1-14. RNA-Seq데이터 QC 이후 결과

샘플명	Raw data (Reads)	
	Read Yield (Mbase)	Read count #
101_shoot_Fo_0h / 101_shoot_Fo_3d	26,153	261,541,930
102_shoot_Fo_0h / 102_shoot_Fo_3d	29,941	299,417,678
104_shoot_Fo_0h / 104_shoot_Fo_3d	24,611	246,117,766
위황병 105_shoot_Fo_0h / 105_shoot_Fo_3d	35,372	353,729,844
16S_shoot_mock_3d / 16S_shoot_Fo_3d	36,508	365,086,944
14R_shoot_mock_3d / 14R_shoot_Fo_3d	32,750	327,512,038
106_shoot_Fo_0h / 106_shoot_Fo_3d	40,376	403,768,750
위황병 감수성 104_shoot_mock_0h / 104_shoot_mock_3d	25,503	255,037,810
106_shoot_mock_0h / 106_shoot_mock_3d	34,603	346,045,982
위황병 저항성 101_shoot_mock_0h / 101_shoot_mock_3d	28,221	282,223,444
102_shoot_mock_0h / 102_shoot_mock_3d	28,978	289,784,420
105_shoot_mock_0h / 105_shoot_mock_3d	36,890	368,910,086

⑦ 양배추 내서성/위황병/석회결핍 민감형과 둔감형 계통에 대한 RNA-Seq 데이터 Normalization

- ㉠ 생산된 데이터는 리눅스 서버를 통해 full-length의 transcript로 assemble 하고 assemble된 full-length transcript를 reference로 각 read들을 mapping 하여 발현량을 샘플별로 측정하여 그 차이를 보고자 하는 분석을 수행하는데, 현재 생산한 데이터를 분석하기 위해 요구되는 컴퓨팅 환경을 압도적으로 상회하는 read가 생산되었기 때문에 이 read의 양을 결과에 영향을 미치지 않는 한도 내에서 제거함.
- ㉡ RNA-Seq reads 백만개의 Read를 De novo assemble하고 mapping하는데 1G의 RAM을 필요로 하는데 37억 개의 read를 생산하였고 도합 4000G이상의 RAM을 필요로 하기 때문에 각 read 데이터에 대한 normalization을 통해 read의 양을 줄였음.
- ㉢ Greedy k-mer-based approach 방식으로 trimming 한 read들을 k-mer(25bp)로 profiling해서 사전을 만들고 가장 빈도가 높은 k-mer를 seed로 삼아서 이 겹치는 빈도를 coverage로 삼아서 정규화 하고자 하는 기준이상의 read 데이터는 제거하는 방식으로 전체 샘플의 발현을 비교하기 위한 read의 상대적인 비율을 훼손하지 않는 범위 내에서 read의 양을 감소시키는 normalization을 수행하였음.

⑧ 양배추 내서성/위황병/석회결핍 민감형과 둔감형 계통에 대한 RNA-Seq 데이터 분석

- ㉠ 양배추 내서성 및 위황병 RNA-seq 분석은 Reference 모델이 없었기 때문에 생산된 read를 가지고 de-novo assembly를 통해 full-length transcript를 생산하는 방식으로 분석을 진행하였음(표 1-15).
- ㉡ RNA-seq 분석을 위한 소프트웨어는 현재 많은 종류의 소프트웨어가 나와 있고, 결과의 정확도 및 성능의 비교 분석한 결과 본 분석에서는 Trinity 소프트웨어로 de-novo assembly 및 downstream 분석을 진행하였음(표 1-16, 그림 1-34).

표 1-15. 양배추 내서성 RNA-Seq Assembly 결과

내서성 Contig size 구간 별 개수							
HO		KK		EB		JK	
구간	개수	구간	개수	구간	개수	구간	개수
201~1,000	139,370	201~1,000	147,783	201~1,000	146,478	201~1,000	153,389
1,001~2,000	92,464	1,001~2,000	129,064	1,001~2,000	101,531	1,001~2,000	106,976
2,001~3,000	35,995	2,001~3,000	62,873	2,001~3,000	44,772	2,001~3,000	50,156
3,001~4,000	13,327	3,001~4,000	24,396	3,001~4,000	17,447	3,001~4,000	22,320
4,001~5,000	4,348	4,001~5,000	9,455	4,001~5,000	6,878	4,001~5,000	9,433
5,001~6,000	1,568	5,001~6,000	3,932	5,001~6,000	2,614	5,001~6,000	4,165

6,001~7,000	756	6,001~7,000	2,197	6,001~7,000	1,494	6,001~7,000	2,137
7,001~8,000	389	7,001~8,000	1,073	7,001~8,000	578	7,001~8,000	1,108
8,001~9,000	173	8,001~9,000	420	8,001~9,000	345	8,001~9,000	299
9,001~10,000	40	9,001~10,000	189	9,001~10,000	162	9,001~10,000	183
10,001~11,000	32	10,001~11,000	287	10,001~11,000	70	10,001~11,000	112
11,001~12,000	32	11,001~12,000	153	11,001~12,000	25	11,001~12,000	90
12,001~13,000	79	12,001~13,000	158	12,001~13,000	72	12,001~13,000	81
13,001~14,000	31	13,001~14,000	97	13,001~14,000	76	13,001~14,000	80
14,001~15,000	40	14,001~15,000	51	14,001~15,000	26	14,001~15,000	13
15,001~16,000	107	15,001~16,000	70	15,001~16,000	45	15,001~16,000	20
16,001~17,000	13	16,001~17,000	8	16,001~17,000	33	16,001~17,000	33
17,001~18,000	0	17,001~18,000	0	17,001~18,000	12	17,001~18,000	28
18,001~19,000	0	18,001~19,000	0	18,001~19,000	0	18,001~19,000	3
total	288,764	total	382,206	total	322,658	total	350,626

표 1-16. 양배추 내서성 RNA-Seq Assembly 결과

위황병 Transcript size 구간 별 개수	
구간	#Transcript
201~500	83,637
501~1,000	23,936
1,001~2,000	18,366
2,001~3,000	5,664
3,001~4,000	1,716
4,001~5,000	444
5,001~6,000	106
6,001~7,000	36
7,001~8,000	13
8,001~9,000	2
9,001~10,000	3
10,001~11,000	2
Total	133,925

Assembly Result Total Assembly Genes: 136,165

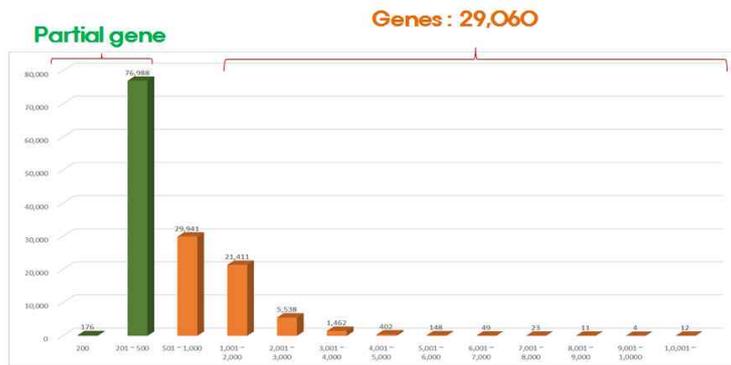


그림 1-34. 브로콜리 엽분차이보이는 RNA-Seq assembly 결과

㉑ 양배추 내서성/위항병/석회결핍 민감형과 둔감형 계통에 대한 RNA-Seq Transcript Difference Expression 분석

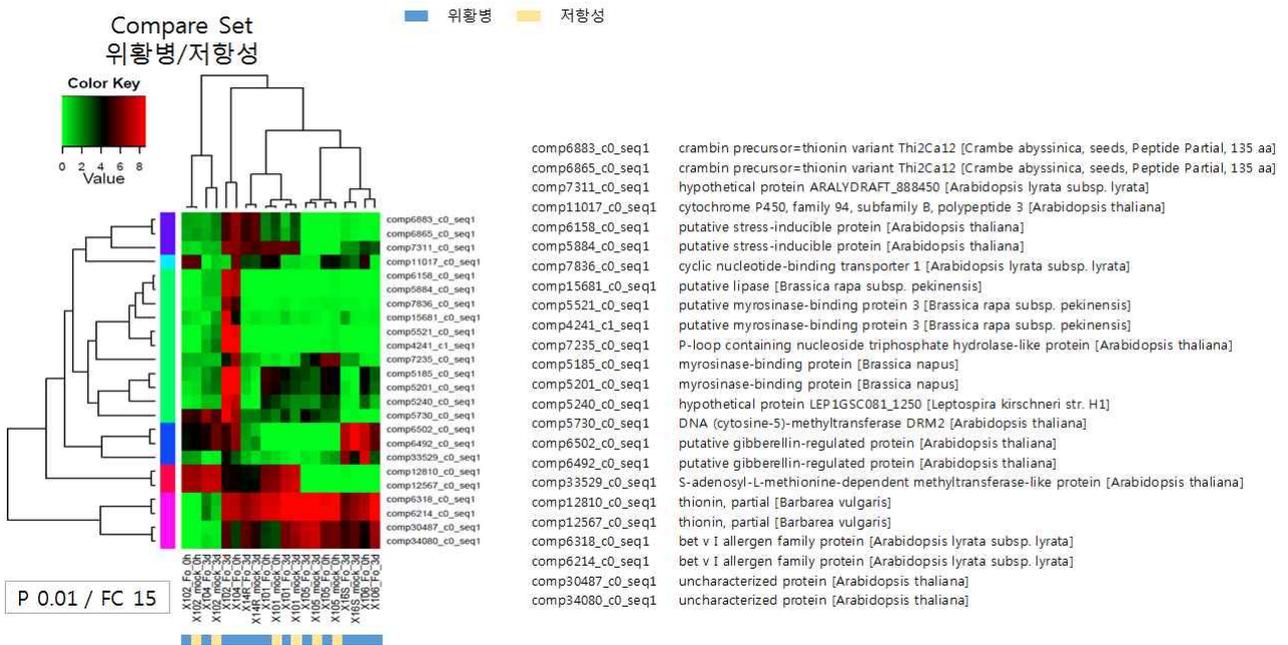
- ㉒ Full-length transcript와 Align된 데이터를 바탕으로 transcript의 발현 정도를 예측하기 위한 절차로써 reference를 만들고 RNA-seq reads을 mapping하고 expression calculate 및 rsem-simulate-reads를 거쳐 gene/isoform abundance estimate를 수행함
- ㉓ RNA-Seq데이터 분석파이프라인으로 데이터를 분석한 결과는 해당 유전자의 Transcript의 길이 및 TPM, FPKM값이 계산됨.
- ㉔ Transcript들의 발현 값을 가지고 각 샘플 간 differentially expressed transcript들에 대한 clustering 및 expression profiling을 수행함.
- ㉕ Transcript들의 FPKM값의 matrix를 만들고 연관 있는 transcript들을 clustering하고 P-value 0.05 이상, Fold change 2 이상의 값을 가지는 transcript들을 분류하였음(표 1-17).

표 1-17. 양배추 RNA-Seq Assembly Difference Expression 분석 결과

분류	Analysis set	#Expression Profile (P-Value <= 0.01, Fold Change >= 4)
All_Set	위항병/감수성/저항성	21,189
	위항병/감수성	21,189
Compare_Set	위항병/저항성	21,189
	감수성/저항성	21,189
Pair_Set	101_shoot_Fo_0h / 101_shoot_Fo_3d	460
	102_shoot_Fo_0h / 102_shoot_Fo_3d	3,812
	104_shoot_Fo_0h / 104_shoot_Fo_3d	2,949
	105_shoot_Fo_0h / 105_shoot_Fo_3d	954
	106_shoot_Fo_0h / 106_shoot_Fo_3d	579
	101_shoot_mock_0h / 101_shoot_mock_3d	348
	102_shoot_mock_0h / 102_shoot_mock_3d	593
	104_shoot_mock_0h / 104_shoot_mock_3d	269
	105_shoot_mock_0h / 105_shoot_mock_3d	408
	106_shoot_mock_0h / 106_shoot_mock_3d	186
	14R_shoot_mock_3d / 14R_shoot_Fo_3d	22
	16S_shoot_mock_3d / 16S_shoot_Fo_3d	72

⑩ 양배추 내서성/위황병/석회결핍 민감형과 둔감형 계통에 대한 RNA-Seq 유전자발현 profiling

- ㉠ 내서성 강한 계통과 내서성 약한 계통의 양배추 heat shock 처리전화 처리후의 유전자 발현 분석을 통해 내서성 계통에 특이적인 유전자들을 동정하기 위하여 분석 fold change 값을 최소 2배에서 10배 구간의 비교분석하여 특이적인 차이를 보이는 유전자들을 분석하였음
- ㉡ 각 분석 set마다 유전자 발현이 2배 이상 차이가 나며, P-value 0.05이하의 유전자로 profiling된 gene들을 위황병 샘플(위황병, 감수성, 저항성) 내서성 샘플을 각 3분류와 2분류로 나누어 각 분류마다 공통적으로 발현되는 유전자를 찾아내서 위황병 특이적인 유전자, 위황병 감수성 특이적인 유전자, 위황병 저항성 특이적인 유전자 내서성 강한 계통에 특이적인 유전자, 내서성 약한 계통에 특이적인 유전자를 뽑아내어 유전자 발현패턴차이의 재현성을 확보하였음(그림 1-35, 그림 1-36, 그림 1-37).
- ㉢ 위황병 샘플간 특이적인 유전자 발현차이를 보이는 유전자 206개, 위황병 저항성 샘플간의 공통적으로 특이적인 유전자발현차이를 보이는 유전자 328개, 위황병 저항성 샘플간 특이적인 유전자발현차이를 보이는 유전자 173개를 선발하였음(그림 1-38).



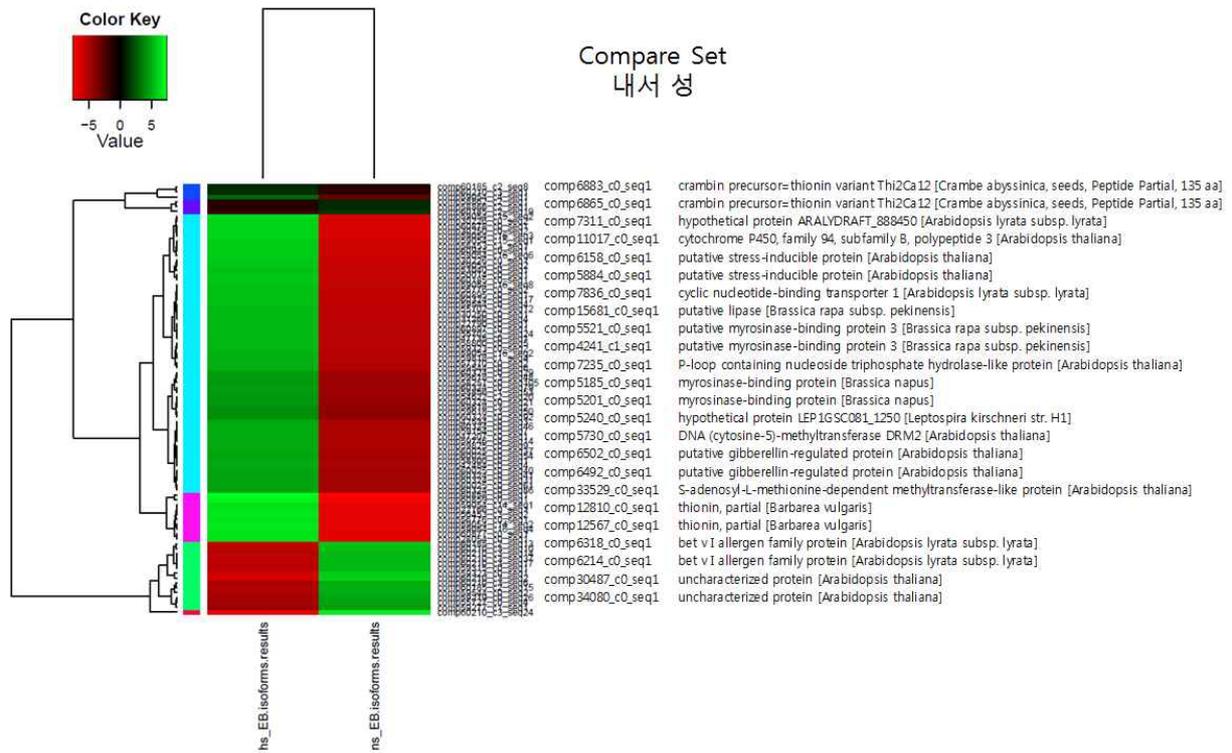


그림 1-36. 양배추 내서성 RNA-Seq 데이터 유전자 발현차이 분석

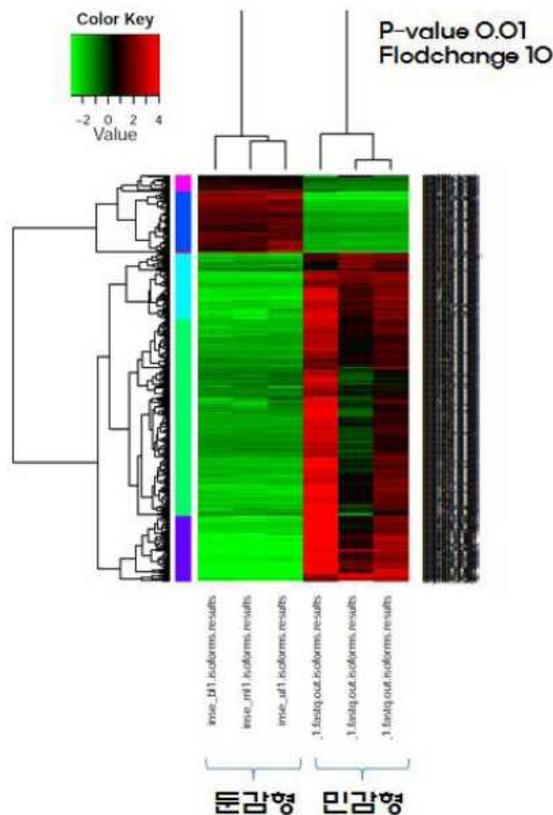


그림 1-37. 양배추 석회결핍 민감형 과 둔감형 RNA-Seq 데이터 유전자 발현차이 분석

Total assembly genes: 29,060

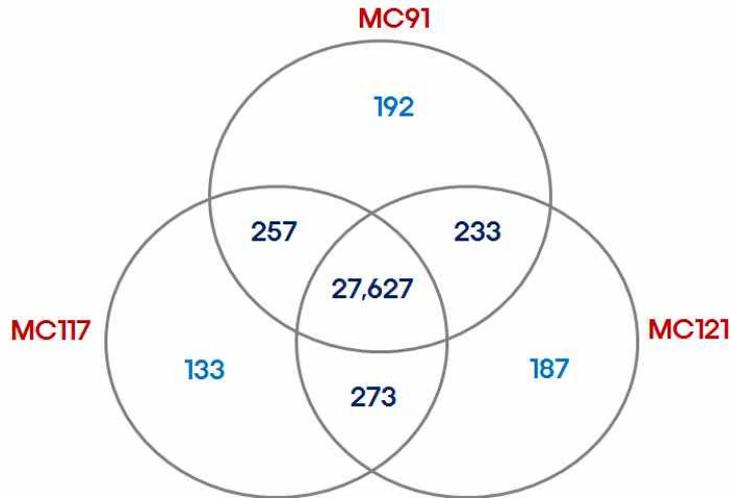


그림 1-38. 엽분 차이를 보이는 브로콜리 RNA-Seq 분석 결과 계통 특이적인 유전자

⑪ 양배추 samll RNA 오믹스 데이터 생산 및 분석

- ㉔ 브로콜리 칼슘 함량은 잎 부위별로 다르게 분포하고 있으며, 칼슘 결핍 시 식물의 tip-burn 현상과 관련 있음을 선행 연구에서 밝혔으며, 양배추 및 케일 계통 내 칼슘 함량에 따른 Tip-burn 현상을 transcriptome 수준에서 분석하기 위한 실험계획을 설계 하였음
- ㉕ 칼슘 함량에 결정적인 영향을 주는 유전자 군은 찾기 위하여, 석회결핍 표준형, 둔감형의 브로콜리 잎으로부터 NGS cDNA library를 제작한 후 Illumina 사의 HiSeq2000을 사용하여 paired end 방법으로 101base의 길이로 sequencing하였음 (그림 1-39)



Broccoli line	엽분 함량
MC 117	엽분량 小
MC 121	엽분량 中
MC 91	엽분량 多

Average 389 Mbp

Sample ID	Yield (Mbases)	The Number of Reads	% of >= Q30 Bases
MC_91	389	12,579,724	96.6
MC_117	429	13,561,414	
MC_121	351	11,115,372	

그림 1-39. 엽분차이를 보이는 브로콜리 miRNA 데이터 생산

㉔ 양배추 samll RNA 오믹스 데이터 분석

- ㄱ. miRDeep2 프로그램을 이용하여 브로콜리 엽분차이를 보이는 유전자 발현 조절하는 miRNA를 동정하였음
- ㄴ. 브로콜리 표준유전체가 공개되지 않았기 때문에 공개DB Bolbase에서 제공하는 B.oleracea_v1.0.chromosomes.fasta 표준유전체 데이터를 이용하였음
- ㄷ. B.oleracea의 miRNA는 miRBase 데이터베이스에 11개가 등록되어있었기 때문에 이미 등록된 miRNA데이터를 이용하여 브로콜리 miRNA를 정확히 동정하는데 프로그램의 옵션을 체크 화하는데 이용하였음
- ㄹ. miRNA데이터 필터링 : 해독기기에서 생산된 단서열로부터 정확한 서열정보를 얻기 위해, 해독된 단서열 중 quality가 떨어지는 read를 제거함. 이를 위해 Sickle 프로그램 (<https://github.com/najoshi/sickle>)이 이용되었음
- ㅁ. 브로콜리 reference genome에 단서열을 mapping할 때 여러 loci에 mapping되는 것을 방지하기 위해서 rRNAs, tRNAs, other ncRNA 등을 미리 필터링하였음

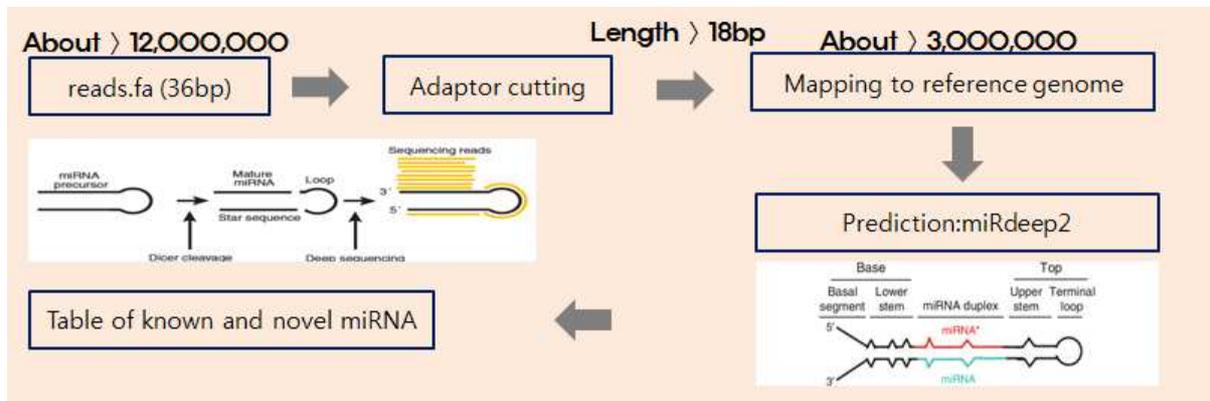


그림 1-40. 브로콜리 miRNA분석 방법

- ㄴ. miRDeep 패키지는 known 또는 novel miRNA를 찾는데 초점이 맞춰져 있는 클래식한 방법 중 하나임. 필터링 과정을 거친 단서열을 정확하게 분석하여 miRNA 정보를 추출하기 위해 계놈에서 potential miRNA precursor를 찾음. miRNA 생성 모델에 따라 score를 줌. miRNA precursor 또는 non-miRNA local hairpin 구조로부터 단서열을 mapping 함으로써 miRNA를 발굴하였음(그림 1-40).

㉕ 양배추 miRNA 오믹스 데이터 결과

- ㄱ. miRBase의 알고있는 precursor 정보를 이용하여 mapping된 단서열을 빠르게 체크하며 결과 파일로 miRNA_expressed.csv를 얻을 수 있는데, 이 파일은 표준 miRNA의 단서열 수를 제공함(그림 1-41)

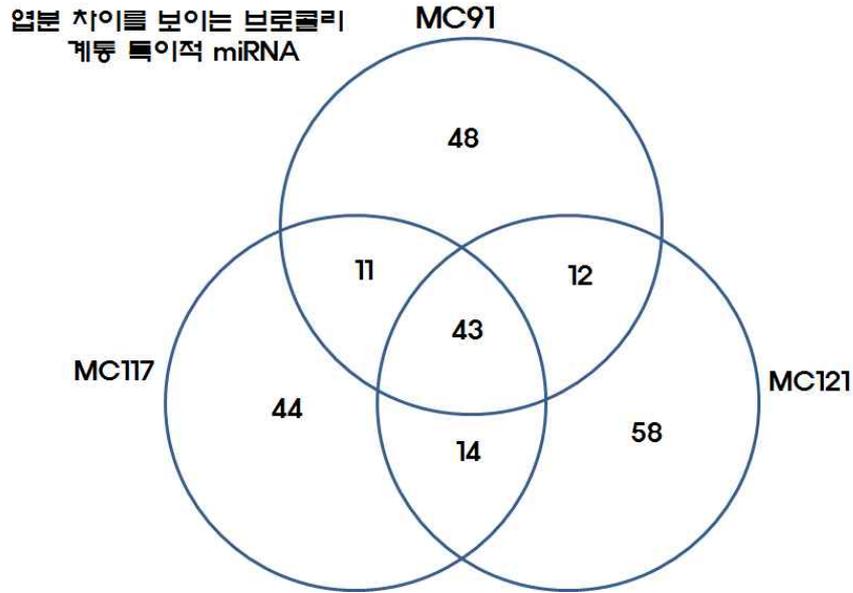


그림 1-43. 계통 특이적인 miRNA 결과

⑫ 브로콜리 miRNA의 유전자발현 조절하는 타겟 유전자 예측

㉠ 브로콜리 miRNA에서 동정한 miRNA(그림 1-44, 그림 1-45)

- ㉠. MC91 계통에서 예측한 miRNA 114, 타겟 유전자 : 2,406
- ㉡. MC121 계통에서 예측한 miRNA 126, 타겟 유전자 : 2,405
- ㉢. MC117 계통에서 예측한 miRNA 112, T타겟 유전자 : 2,401

```

Forward:      Score: 142.000000  Q:2 to 13

Query:       3' tccgcaagcataTATGCCGATCTg 5'
              || :|||||||
Ref:        5' tggcaaaggaccAT-TGGCTAGAc 3'
  
```

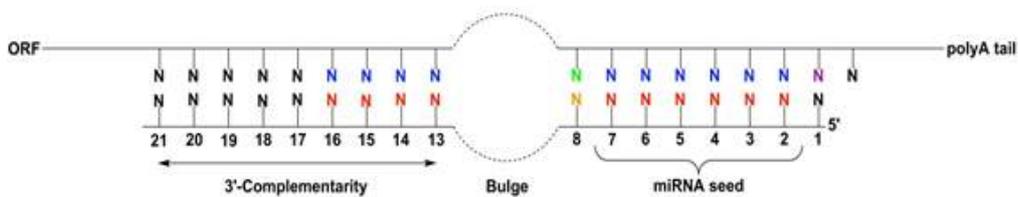


그림 1-44. miRNA target 유전자 예측 방법

Cuticular wax biosynthesis (Genes: 34)

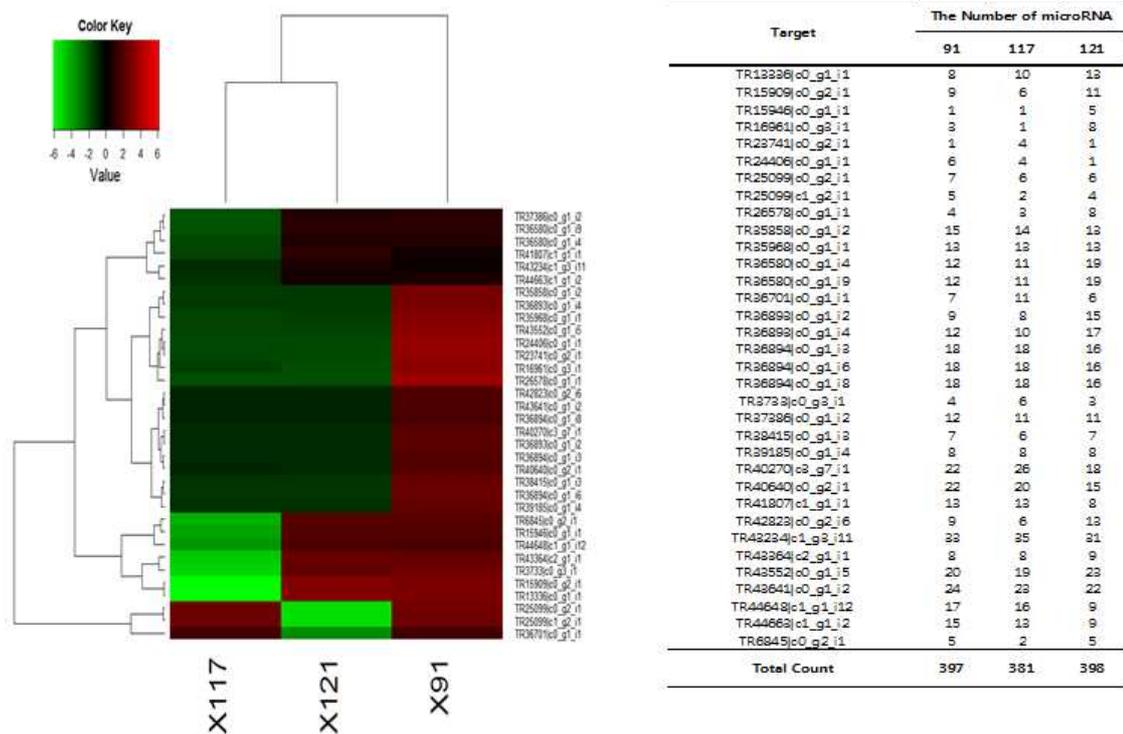


그림 1-45. miRNA target 유전자의 유전자 발현차이를 보이는 결과

다. 양배추 표준 유전자 세트 개발

① 양배추 표준 유전자 세트 작성

㉠ 양배추 각 조직별 시퀀싱 데이터 생산

- ㉠ 양배추 조직별(잎, 뿌리, 유묘, 꽃 / 칼슘 부족 구, 칼슘 정상 처리구) total RNA를 추출하여 library를 작성하고, NGS sequencer (HiSeq2000)를 이용하여 전사체(RNA-seq) 염기서열 생산

표 1-18. Sequencing data의 short reads의 통계치

No	Short read files	Raw short reads			Trimmed short reads			
		No. of read	Avg. length	Total length (bp)	No. of read	Avg. length	Total length (bp)	Trimmed/Raw (%)
1	석회 결핍 둔감형 유묘 칼슘 무처리구_1.fastq	34,624,707	101	3,497,095,407	24,354,470	85.87	2,091,247,601	59.80%
	석회 결핍 둔감형 유묘 칼슘 무처리구_2.fastq	34,624,707	101	3,497,095,407	24,354,470	81.49	1,984,759,087	56.75%
2	석회 결핍 둔감형 잎_1.fastq	34,251,160	101	3,459,367,160	24,226,112	86.01	2,083,708,818	60.23%
	석회 결핍 둔감형 잎_2.fastq	34,251,160	101	3,459,367,160	24,226,112	81.66	1,978,355,107	57.19%
3	석회 결핍 둔감형 뿌리_1.fastq	34,498,464	101	3,484,344,864	24,392,613	85.84	2,093,832,721	60.09%
	석회 결핍 둔감형 뿌리_2.fastq	34,498,464	101	3,484,344,864	24,392,613	81.82	1,995,910,543	57.28%

4	석회 결핍 둔감형 유묘 칼슘 처리구_1.fastq	28,689,985	101	2,897,688,485	19,748,580	85.43	1,687,143,552	58.22%
	석회 결핍 둔감형 유묘 칼슘 처리구_2.fastq	28,689,985	101	2,897,688,485	19,748,580	80.82	1,596,106,418	55.08%
5	석회 결핍 표준형 꽃_1.fastq	34,862,210	101	3,521,083,210	24,560,086	85.88	2,109,226,057	59.90%
	석회 결핍 표준형 꽃_2.fastq	34,862,210	101	3,521,083,210	24,560,086	81.32	1,997,329,831	56.72%
6	석회 결핍 표준형 유묘 칼슘 처리구_1.fastq	33,800,967	101	3,413,897,667	24,129,959	85.98	2,074,749,747	60.77%
	석회 결핍 표준형 유묘 칼슘 처리구_2.fastq	33,800,967	101	3,413,897,667	24,129,959	81.64	1,969,897,208	57.70%
Total		401,454,986	101	40,546,953,586	282,823,640	83.65	23,662,266,690	58.31%

㉞ RNA-seq de novo Assembly 파이프라인 개발

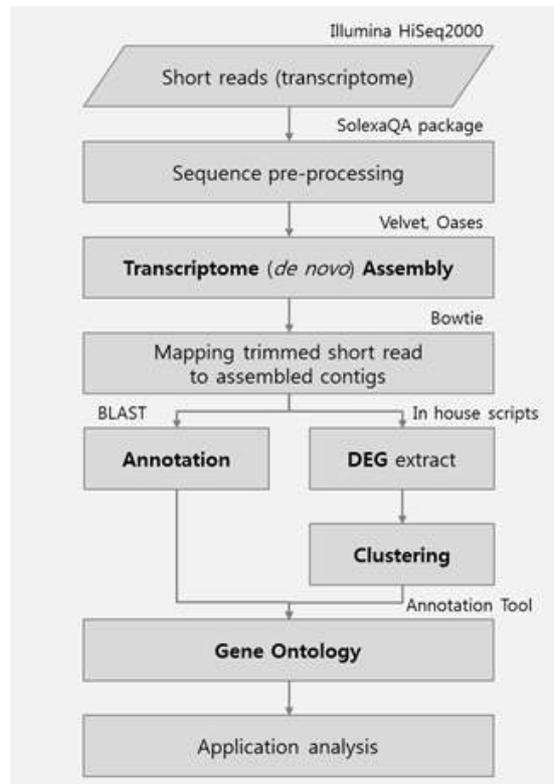


그림 1-46. RNA-seq 데이터 분석 파이프라인

- ㄱ. 양배추 RNA-seq 데이터의 분석 과정은 위의 그림 1-46에 나온 process에 따라 최적화 조건을 확립하며 진행함.
- ㄴ. 시퀀싱 된 양배추의 RNA-seq 데이터는 전처리 과정을 통하여 base quality phred score 20이상으로 정제하고, 남은 read 길이가 25bp 이상인 read 만 취하여 정제함.
- ㄷ. 정제한 데이터를 이용하여 양배추 표준 유전자 세트를 생성하기 위하여 공개된 assembly 프로그램인 Velvet & Oases를 이용하여 de novo assembly를 수행함. Trimming을 거친 short reads를 일정 길이(k-mer)의 조각으로 잘라 연결

하는 de Bruijn algorithm을 기초로 하여 assembly를 수행함. 다양한 k-mer를 적용하여 assembly 하면서 들깨 전사체의 최적의 k-mer를 찾음. 1차 assembly를 통해 형성된 contigs를 재료로 다시 2차 assembly를 수행하여 최종 transcripts를 형성하여 최종 gene set을 확보함.

- ㄹ. 생성된 유전자 세트와 SEEDERS Plant DB를 비교하여 BLASTX를 이용한 gene annotation을 수행하고 e-value 값 1e-10 이하의 신뢰도 있는 정보만 취함.
 - ㄷ. 시료별 유전자 발현값(mapping되는 read의 수 측정)을 측정하여 측정된 유전자 발현값을 이용하여 비교 대상 간 발현이 유의한 유전자 (DEGs)를 선별하고, clustering 기법을 이용하여 패턴분석을 수행함.
 - ㄹ. DEGs와 clustering 과정에 포함되는 각각의 유전자는 annotation 정보를 이용하여 기능 분석을 수행하며, 기능 분석에 대한 database로 GO 정보 및 KEGG pathway를 이용함.
- ㉔ 양배추 RNA-seq 데이터의 de novo Assembly를 통한 표준 유전자 세트 작성
- ㄱ. 양배추 조직별 trimmed reads를 Velvet & Oases 어셈블러를 이용하여 de novo Assembly를 수행하여 작성된 unigenes의 개수는 205,046개임. Unigenes을 대표 서열(locus)로 분류하면 53,562개의 locus 가 형성되어 locus 당 평균 약 3.8개의 unigenes이 할당됨.

표 1-19. assembled unigene 어셈블리 결과 통계치

Sequence	Total Number	Sequence Length (bp)				
		Total length	Minimum	Maximum	Average	N50
Assembled unigenes	205,046	약 294 Mb	200	16,439	1,434	1,915
Assembled locus	53,562	약 60 Mb	200	16,439	1,125	1,703

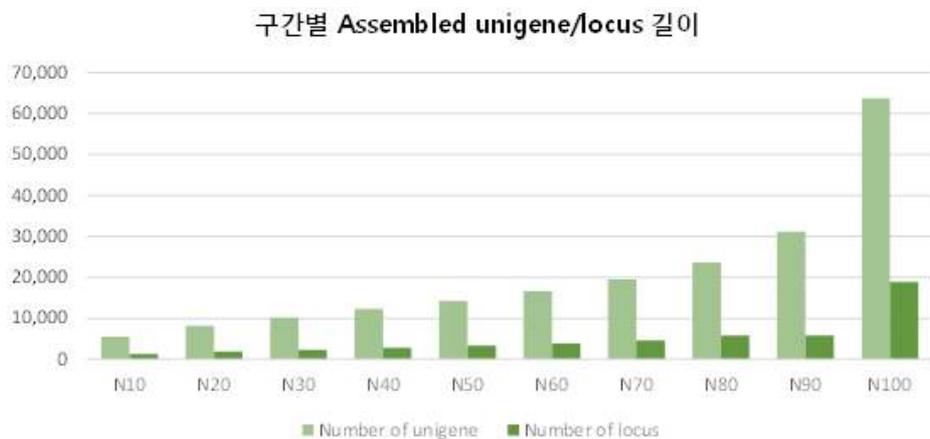


그림 1-47. 길이별 Assembled unigene/locus 개수

라) Gene Annotation 결과

- ㄱ. 양배추 assembled locus와 SEEDERS annotation DB와의 비교분석 결과 53,562개의 locus를 SEEDERS plant annotation DB의 proteins 서열과 BLASTX을 이용한 서열 상동성 검색 결과, 35,274개의 locus가 annotation 되어 기능을 예측함.

표 1-20. 양배추 assembled locus와 SEEDERS annotation DB의 plant protein과 annotation 결과

	Assembled locus	SEEDERS plant annotation DB Protein
Input 개수	53,562	1,436,385
Annotation 된 개수	35,273	26,971

- ㄴ. Arabidopsis 유전자를 이용한 functional category 별 gene annotation 수행 결과 Gene annotation 결과, 양배추 unigene 별 얻게 된 Arabidopsis 유전자를 이용한 gene ontology 정보를 분류함.

표 1-21. Annotation 된 assembled unigene의 Functional category 정보 (Biological Process 1)

Category	Term	Count	%
GOTERM_BP_1	developmental process	1,421	8.01
GOTERM_BP_1	multicellular organismal process	1,372	7.73
GOTERM_BP_1	biological regulation	3,098	17.45
GOTERM_BP_1	reproductive process	707	3.98
GOTERM_BP_1	response to stimulus	2,835	15.97
GOTERM_BP_1	reproduction	719	4.05
GOTERM_BP_1	cellular process	6,969	39.26
GOTERM_BP_1	cellular component organization	949	5.35
GOTERM_BP_1	localization	1,569	8.84
GOTERM_BP_1	establishment of localization	1,527	8.60
GOTERM_BP_1	growth	197	1.11
GOTERM_BP_1	rhythmic process	44	0.25
GOTERM_BP_1	metabolic process	6,824	38.45

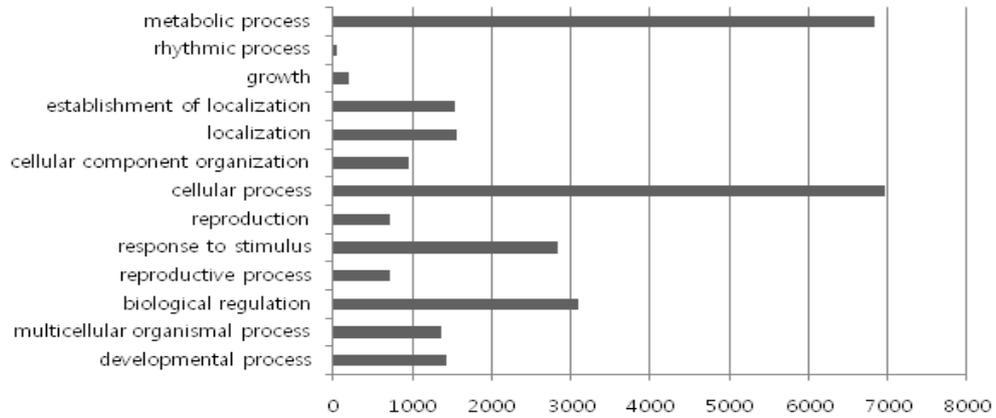


그림 1-48. Annotation 된 assembled unigene의 Biological Process category

표 1-22. Annotation 된 assembled unigene의 Functional category 정보 (Cellular Component 1)

Category	Term	Count	%
GOTERM_CC_1	organelle	6,843	38.55
GOTERM_CC_1	organelle part	2,063	11.62
GOTERM_CC_1	cell	11,522	64.91
GOTERM_CC_1	cell part	11,522	64.91
GOTERM_CC_1	envelope	591	3.33
GOTERM_CC_1	membrane-enclosed lumen	527	2.97
GOTERM_CC_1	symplast	15	0.08

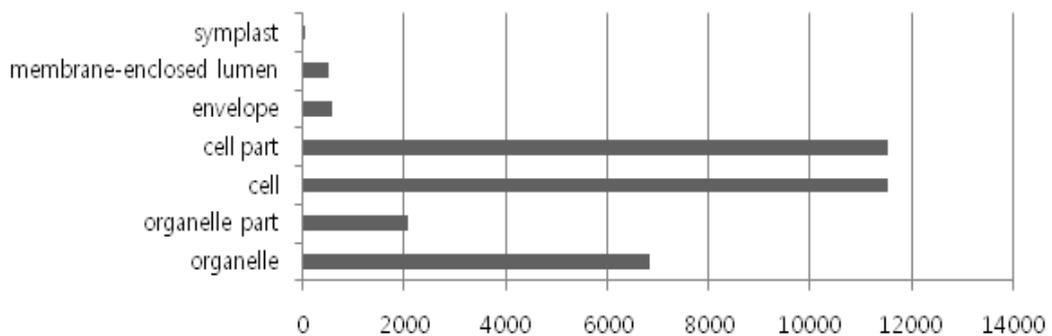


그림 1-49. Annotation 된 assembled unigene의 Cellular Component category

표 1-23. Annotation 된 assembled unigene의 Functional category 정보 (Molecular Function 1)

Category	Term	Count	%
GOTERM_MF_1	catalytic activity	6,354	35.80
GOTERM_MF_1	transcription regulator activity	1,455	8.20
GOTERM_MF_1	transporter activity	960	5.41
GOTERM_MF_1	molecular transducer activity	573	3.23
GOTERM_MF_1	antioxidant activity	111	0.63

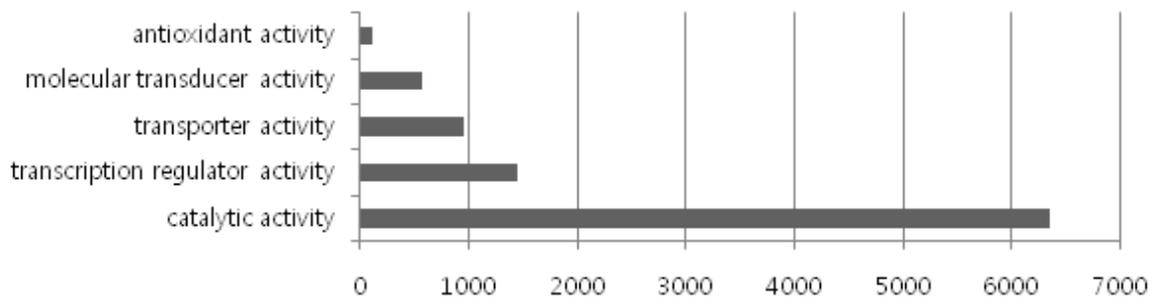


그림 1-50. Annotation 된 assembled unigene의 Molecular Function category

라. 29계통의 유전체 정보 생산

① 양배추류 재료 및 형질

- ㉔ 양배추 계통 간 SNP 변이 마커 발굴 및 2핵심과제의 목표형질 (칼슘 결핍 둔감형, 내서성, 위황병 저항성, 배추 줌나방 저항성) 연구를 위해 목표형질에 대한 강/약의 형질을 지니는 계통 24계통의 양배추 및 브로콜리, 케일을 참여기업으로부터 확보하였다. 확보된 계통의 sequence 정보는 1-2세부과제로부터 생산되었으며, SNP 분석에 사용한 양배추류 29계통 (1차 년도 5계통 포함)의 보유 형질 특성 및 계통 정보는 아래 표와 같다 (표 1-24). 특히 사업단의 연구 목표 형질인 칼슘 결핍 둔감형, 내서성, 위황병 저항성, 배추 줌나방 저항성에 대해 저항성/민감성 각 2계통 이상씩 선정하였고, out group으로 양배추와 근연관계가 높은 브로콜리 3계통, 케일 2계통 및 야생종 *Brassica macrocapa* (BMA)와 등을 포함하였다.

표 1-24 . 양배추류 29 계통 정보 요약

Index	Common Name	Source	Traits
K0001	Cabbage	107-HO-154, Asia Seed. Co., Korea	Heat tolerance
K0002	Cabbage	5-KK-146, Asia Seed. Co., Korea	Heat tolerance
K0003	Cabbage	105-RK-P6-1, Asia Seed. Co., Korea	Heat tolerance, yellow wilt resistance
K0004	Cabbage	106-HY-164, Asia Seed. Co., Korea	heat moderate tolerance, Yellow wilt susceptible
K0005	Cabbage	108-EB-8S8-7, Asia Seed. Co., Korea	Heat susceptible
K0006	Cabbage	104-Jk-JK-2, Asia Seed. Co., Korea	Heat susceptible, Yellow wilt susceptible
K0007	Cabbage	101-KR-518, Asia Seed. Co., Korea	Yellow wilt resistance
K0008	Cabbage	102-OK-517, Asia Seed. Co., Korea	Yellow wilt resistance
K0009	Cabbage	104-JK-JK-2, Asia Seed. Co., Korea	Yellow wilt susceptible
K0010	Cabbage	103-MT-621, Asia Seed. Co., Korea	Yellow wilt susceptible
K0011	Cabbage	LN-748-4-3, Nunhemns TM	Diamond-back moth resistance
K0012	Cabbage	100587, Samsung Seed Co., Korea	Diamond-backmothsusceptible
K0013	Cabbage	FA9747-1, Nunhemns TM	Diamond-back moth susceptible
K0014	Cabbage	110-CH-221, Asia Seed. Co., Korea	Tip-burn tolerance
K0015	Cabbage	107140, Samsung Seed Co., Korea	Tip-burn tolerance, Diamond-back moth resistance
K0016	Cabbage	HRIGRU009386, Warwick Crop Centre, UK	Tip-burn susceptible
K0017	Cabbage	102119, Samsung Seed Co., Korea	Tip-burn susceptible
K0018	Cabbage	111-DS-2437-51, Asia Seed. Co., Korea	Cold/freezing tolerance
K0019	Cabbage	112-QT-DWB-25, Asia Seed. Co., Korea	Cold/freezing tolerance
K0020	Cabbage	116-PH-347-51, Asia Seed. Co., Korea	red cabbage
K0021	Cabbage	Badger inbred 16 (B16), Asia Seed. Co., Korea	Black rot resistance
K0022	Cabbage	HRIGRU007826, Warwick Crop Centre, UK	double haploid line
K0023	Cabbage	HRIGRU009617, Warwick Crop Centre, UK	double haploid line
K0024	B. macrocapa	Warwick Crop Centre, UK	wild species
K0025	Broccoli	MC140, Koregon, Korea	Yellow wilt resistance
K0026	Broccoli	2Br01, Koregon, Korea	Yellow wilt resistance
K0027	Broccoli	MC22, Koregon, Korea	Yellow wilt resistance
K0028	Kale	5333, Asia Seed. Co., Korea	Tip-burn tolerance
K0029	Kale	FB, Asia Seed. Co., Korea	Tip-burn tolerance

② Resequencing 결과 및 통계치

㉠ 방법

ㄱ. 위에서 확보한 28 계통의 양배추류 및 BMA의 genomic DNA를 isolation하여 NGS library를 만든 후 HiSeq2000 플랫폼을 이용하여 101 bp paired-end sequencing을 수행 하였다. 그 결과, 1차년도 5계통의 결과와 합쳐서 6,213,683,564개의 NGS reads로부터 625,129,552,094 bp의 sequences를 확보 하였다 (표 1-25). 그 중 5계통 (code: K0003, K0005, K0006, K0007, K0008)의 read는 low quality로 인한 문제를 보완하기 위하여 4차 년도에 read를 재생산 하여 사용하였다 (그림 1-51).

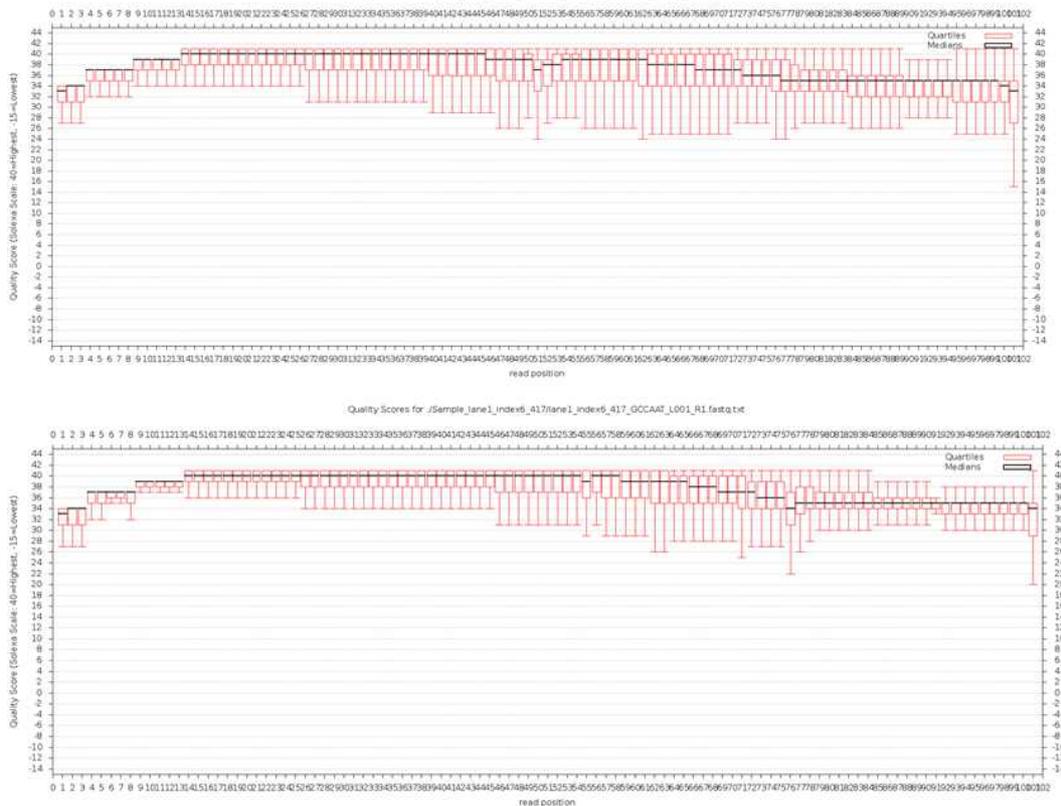


그림 1-51 . example of high quality reads

㉡ 결과

ㄱ. 각 계통별 read 수는 최소 90,798,122 ~ 558,662,780 reads가 생산되었으며, 평균 read 수는 214,264,950개였다. yield의 통계치는 최소 9,170,610,322 bp, 최대 55,866,278,000 bp sequences를 확보하였고, 평균 21,556,191,452 bp sequences를 확보하였다. 이는 630 Mb의 양배추 genome (<http://www.ocri-genomics.org/bolbase/>) size를 기준으로 보아 약 14.56 ~ 88.68 배의 genome coverage에 달한다. high-quality read를 얻기 위하여 quality score Q30, length >= 50으로 preprocessing 한 결과, 73,625,026~524,799,496 read로부터 7,396,671,606~55,464,783,800 bp의 yield를 보였다. 이러한 수율은 raw data의 평균 88.87%에 해당하며, *B. oleracea* genome의 32x를 cover 하는 수치이다.

표 1-25. 양배추류 29계통의 HiSeq2000 Sequencing 결과 및 high quality sequence의 통계치

Index	No. of raw reads	raw yields	No. of HQ reads	HQ yields	(%)	HQ depth
K0001	129,892,454	13,119,137,854	114,123,736	11,142,164,159	87.86	17.69
K0002	90,798,122	9,170,610,322	73,625,026	7,396,671,606	81.09	11.74
K0003	124,445,500	12,568,955,500	114,684,594	11,445,635,461	92.16	18.17
K0004	182,021,210	18,384,142,210	157,102,942	15,461,912,332	86.31	24.54
K0005	127,134,418	12,840,576,218	117,408,058	11,732,942,469	92.35	18.62
K0006	116,565,554	11,773,120,954	108,014,602	10,796,292,016	92.66	17.14
K0007	124,455,766	12,570,032,366	114,870,446	11,465,634,106	92.30	18.20
K0008	127,388,482	12,866,236,682	116,608,722	11,628,890,054	91.54	18.46
K0009	176,298,472	17,806,145,672	151,588,812	14,899,744,592	85.98	23.65
K0010	155,945,354	15,750,480,754	141,395,054	14,009,068,563	90.67	22.24
K0011	182,957,904	18,478,748,304	134,501,406	13,139,341,131	73.51	20.86
K0012	217,034,034	21,920,437,434	140,648,650	13,714,848,673	64.80	21.77
K0013	159,581,386	16,117,719,986	147,561,780	14,668,639,410	92.47	23.28
K0014	179,156,386	18,094,794,986	161,497,110	16,007,025,967	90.14	25.41
K0015	441,614,334	44,161,433,400	415,176,228	40,699,750,574	94.01	64.60
K0016	129,513,882	13,080,902,082	119,329,762	11,857,831,049	92.14	18.82
K0017	163,305,522	16,493,857,722	146,313,576	14,512,238,860	89.59	23.04
K0018	170,509,150	17,221,424,150	149,469,100	14,643,198,145	87.66	23.24
K0019	151,696,970	15,321,393,970	134,876,220	13,306,884,505	88.91	21.12
K0020	213,704,574	21,584,161,974	189,978,800	55,464,783,800	88.90	88.04
K0021	558,662,780	55,866,278,000	524,799,496	51,490,693,905	93.94	81.73
K0022	454,804,780	45,480,478,000	427,192,250	41,905,424,541	93.93	66.52
K0023	491,221,854	49,122,185,400	457,453,790	44,816,396,109	93.13	71.14
K0024	506,114,122	50,611,412,200	470,358,270	46,152,434,490	92.94	73.26
K0025	175,696,970	17,745,363,970	156,766,782	15,482,810,020	89.23	24.58
K0026	254,049,076	25,658,956,676	224,451,584	22,157,660,641	88.35	35.17
K0027	163,732,658	16,536,998,458	141,742,554	13,937,653,401	86.57	22.12
K0028	103,384,698	10,441,854,498	98,729,294	9,920,192,380	95.50	15.75
K0029	141,997,152	14,341,712,352	125,812,322	12,480,697,396	88.60	19.81
Sums	6,213,683,564	625,129,552,094	5,576,080,966	586,337,460,355	25.77	931
min	90,798,122	9,170,610,322	73,625,026	7,396,671,606	64.80	11.74
max	558,662,780	55,866,278,000	524,799,496	55,464,783,800	95.50	88.04
average	214,264,950	21,556,191,452	192,278,654	20,218,533,116	88.87	32.09

③ High quality SNP 마커 개발을 위한 pipeline

- ㉠ 양배추류의 SNP 분자마커를 개발하기 위하여 1-2차년도에서 29계통의 유전자원을 수집하고, SNP prediction을 위하여 pipeline을 설계 및 수정 하였다 (그림 1-52). 3차 년도 부터는 설립된 pipeline에서 prediction 된 SNP의 quality를 test 하고 평가함으로써 high accuracy의 SNP genotyping을 위한 pipeline을 설립하였다. 이 과정에서 4차 년도에 Dynamic array를 기반으로 96%의 genotyping accuracy확인하고, 5차년 도에 384 Dynamic array 기반의 SNP genotyping chip을 생산하였다. 아래 단락에서는 high quality의 양배추류 SNP genotyping chip 생산을 위한 실험 방법 및 결과에 대하여 요약하였다.

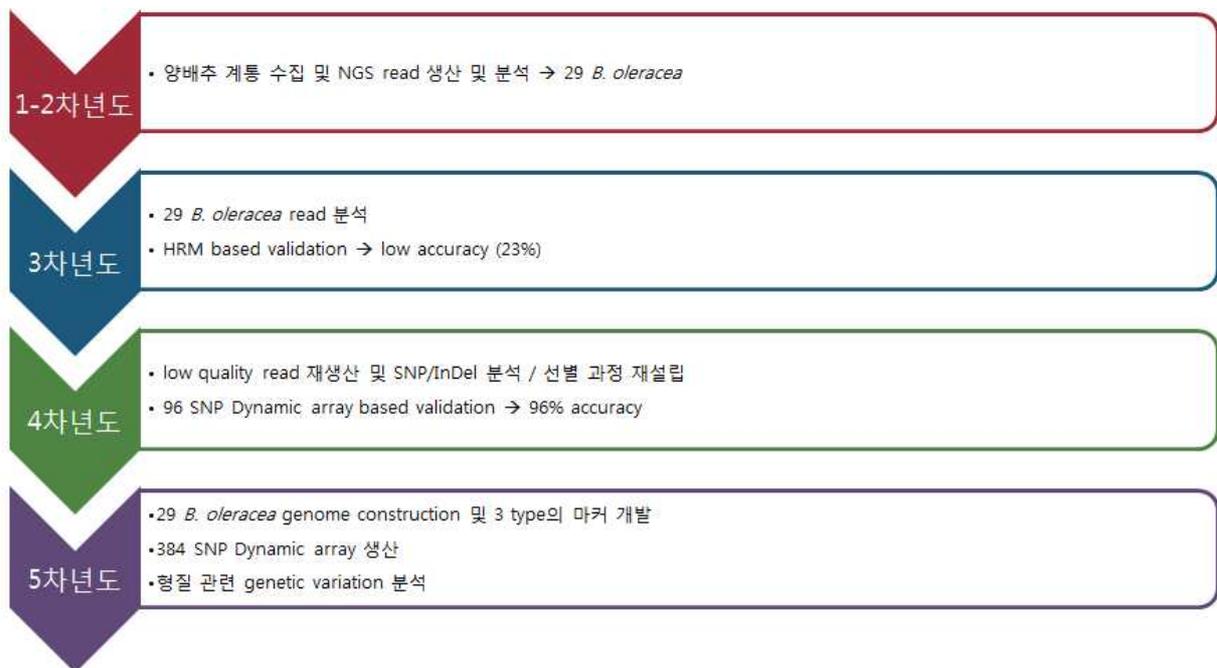


그림 1-52 . SNP 마커 quality 개선 현황

㉡ SNP calling pipeline 설계

- ㄱ. 위에서 전처리 과정을 거친 high-quality paired-end read들은 양배추 국제 콘소시엄에서 공여받은 *B. oleraceae* reference genome (TO1000)에 BWA 프로그램 (ver. 0.6.2)을 default option (seed length = 32, maximum differences in the seed = 2, mismatch penalty = 3, gap open penalty = 11, -E gap extension penalty = 4)으로 mapping 하였다 (그림 1-53). mapping 한 결과로부터 duplicate masking, proper-pair read checking, 및 local realignment 과정을 거쳐 mapping artifact를 최소화 하고자 하였다. 그 후 UnifiedGenotyper를 이용하여 SNP 및 InDel을 분석 하였다.

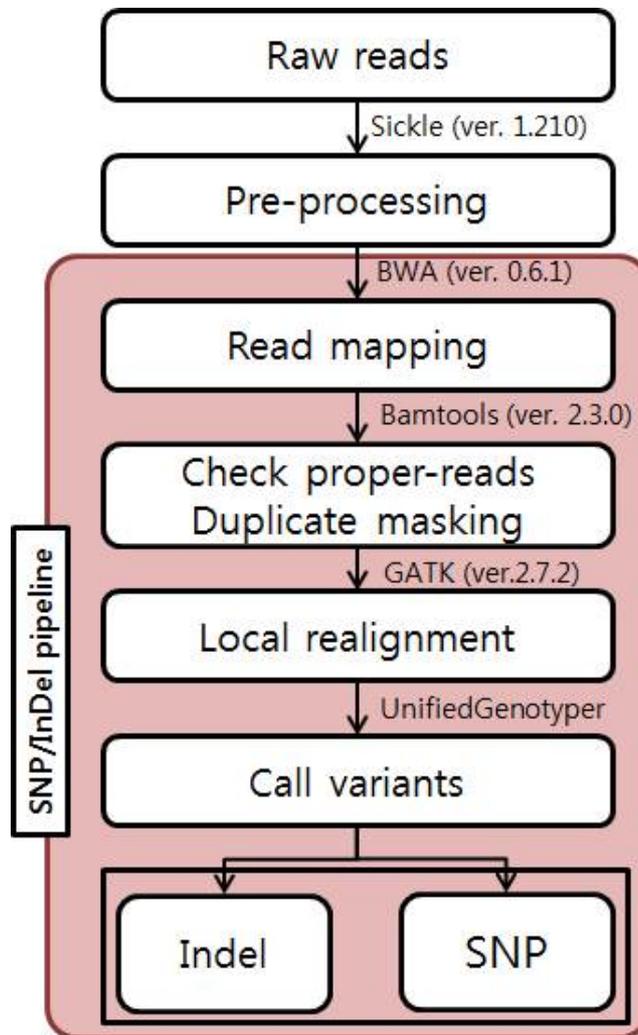


그림 1-53 . SNP 분석을 위한 pipeline

- ㄴ. read mapping 결과, draft genome의 84% 정도를 cover 하였고, 평균 4,317,773개의 SNP가 calling 되었다. homo-SNP와 hetero-SNP의 비율은 약 2.73:1로 homo가 많이 분포하였고, Transition과 Transversion의 비율은 약 1.38이었다 (표 1-26). 평균 indel의 개수는 450,777 (299,191-927,597)개이고, SNP와 같이 homozygote의 비율이 heterozygote의 비율보다 높게 나타났다. UnifiedGenotyper로 calling된 SNP 및 indel은 vcf-merge를 이용하여 merge한 결과, 19,262,615 개의 SNP loci와 2,325,028 indel loci가 identification 되었다.

㉔ HRM 기반의 SNP validation

- ㄱ. HRM 기반의 SNP validation 방법: 3차년도에서 200개의 primer set을 선정하여 HRM을 이용한 validation을 시도하였다. HRM 분석은 primer sets이 amplifying 하는 DNA 염기서열에서 genotype에 따른 melting temperature의 profile을 기반으로 서로 다른 curve를 나타냄으로써 SNP를 detection 할 수 있는 분석 방법이다 (그림 1-55).

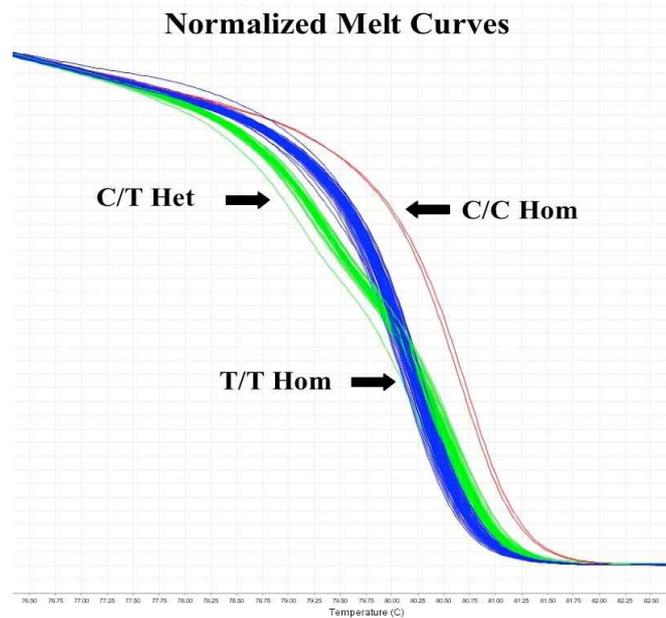


그림 1-55. discover and detect of SNP types with HRM

- ㄴ. HRM Validation 결과: 200개의 primer sets을 TO1000DH3와 양배추류 3계통 (K0009, K0014, K0027)을 대상으로 HRM analysis를 수행하였다. HRM 결과를 TO1000DH3의 pattern을 A로 정하고, 다른 pattern의 group인 경우 "B", "C", "D"로 표시하여 분석하였다. 그리고, calling 한 genotype과 비교하여 pattern이 일치할 경우 true positive ("T"), 일치하지 않을 경우 false positive ("F")로 표시하였고, 판단 할 수 없는 것은 not detectable ("?")로 표시하였다. 그 결과, HRM의 curve type과 genotype이 일치하는 true positive가 46 (23%), 일치하지 않는 false positive가 109 (54.5%), not detectable이 45 (22.5%)였다. False positive의 원인을 분석하기 위하여, 만들어진 primer sets을 다시 reference genome에 mapping한 결과, 104 (52.26%) primer sets이 unique한 영역에 mapping되었고, 47 (25.62%)는 2 영역, 18 (9.05%)는 3영역 8 (4.02%)는 4영역으로 정확하게 mapping 되었다 (그림 1-56). 이러한 multiple-loci는 양배추류의 whole genome triplication event와 관련하여 genomic duplication 된 영역이 detection 된 것으로 여겨진다. 그리고, 4 loci이상으로 mapping 된 primer set은 22 (11.06%)개로 5-198개의 mapping loci를 포함하고 있다. 이러한 영역은 아마도 repetitive region에서 primer set이 분석 되었을 것으로 여겨진다.

						Curve Type 1: A Curve Type 2: B Curve Type 3: C Curve Type 4: D								
order	Primer ID	Amplification				Curve type				No. of align	GENOTYPE			
		TO1000DH3	MC22	#17 -K OK-2	합성물감 #701 CT-12 female	TO1000DH3	K0027	K0014	K0009		TO1000DH3	K0027	K0014	K0009
1	Bol 2MC01-1	O	O	O	O	A	A	B	B	2	T,A	[AT,21]		F
2	Bol 2MC01-2	O	O	O	O	A	A	B	C	2	A,C	[INDEL,41]	[GG,24]	T
3	Bol 2MC01-3	O	O	O	O	A	A	A	A	2	A,M	[AA]		F
4	Bol 2MC01-4	O	O	O	O	A	B	B	A	1	A			F
5	Bol 2MC01-5	O	O	O	O	A	B	C	B	1	C			F
6	Bol 2MC01-6	O	O	O	O	A	A	A	A	1	C			T
7	Bol 2MC01-7	O	O	O	O	A	A	A	A	17	C,M,M,M			?
8	Bol 2MC01-8	O	O	O	O	A	A	B	B	1	G			F
9	Bol 2MC01-9	O	O	O	O	A	A	A	A	1	T			T
10	Bol 2MC01-10	O	O	O	O	A	B	C	D	2	C,M			?
11	Bol 2MC01-11	O	O	O	O	A	A	B	A	2	N,G			F
12	Bol 2MC01-12	O	O	O	O	A	B	C	C	1	T			F
13	Bol 2MC01-13	O	O	O	O	A	B	C	D	2	C,M		[TT,4]	?
14	Bol 2MC01-14	O	O	O	O	A	B	A	A	4	N,M,G	[AA,6]		?T
15	Bol 2MC01-15	O	O	O	O	A	A	B	A	2	M			F
16	Bol 2MC01-16	O	O	O	O	A	A	A	A	22	G,M			?
17	Bol 2MC01-17	O	O	O	O	A	A	A	A	9	G,M			?
18	Bol 2MC01-18	O	O	O	O	A	B	B	B	3	G,N,T			F
19	Bol 2MC01-19	O	O	O	O	A	B	B	B	4	G,M			?T
20	Bol 2MC02-1	O	O	O	O	A	A	B	A	2	G,M	[GA,45]	[CT,28]	F
21	Bol 2MC02-2	O	X	O	O	A	n.a	A	A	2	T,T			T
22	Bol 2MC02-3	O	O	O	O	A	B	C	B	1	C		[GG,21]	F
23	Bol 2MC02-4	O	O	O	O	A	B	B	B	2	G,A			F
24	Bol 2MC02-5	O	O	O	O	A	A	A	B	76	M			?
25	Bol 2MC02-6	O	O	O	O	A	A	B	B	1	A			F
26	Bol 2MC02-7	O	O	X	O	A	B	n.a	B	1	C			F
27	Bol 2MC02-8	O	O	O	O	A	A	B	A	1	G			F
28	Bol 2MC02-9	O	O	O	O	A	B	B	B	10	M			?
29	Bol 2MC02-10	O	O	O	O	A	B	C	B	1	G			F
30	Bol 2MC02-11	O	O	O	O	A	B	B	B	3	G,N,G	[GT,32]	[GTT,39]	F
31	Bol 2MC02-12	O	O	O	O	A	B	B	B	1	A			F
32	Bol 2MC02-13	O	O	O	O	A	B	A	B	1	A			F
33	Bol 2MC02-14	O	X	X	O	A	n.a	n.a	B	1	G			F
34	Bol 2MC02-15	O	O	O	O	A	A	A	A	111	M			?
35	Bol 2MC02-16	O	O	O	O	A	B	C	D	2	T,M	[CC,13]		?
36	Bol 2MC02-17	O	O	O	O	A	A	B	A	198	M			?

그림 1-56 . example of HRM validation

ㄷ. 3차 년도의 SNP validation에서 은 accuracy에 대한 분석 결과 low depth, low quality의 서열이 일부 library에서 발견되어 4차 년도에 read 재생산을 수행하였을 뿐만 아니라, read mapping의 quality를 높이기 위한 filtering step도 추가적으로 진행하였다. 그리고, multi-locus를 amplify 할 수 있는 가능성이 제시되어 primer 제작 후 single locus amplification을 위한 filtering step도 추가 하였다. 그리고, 4차 년도에서는 SNP profiling 방법은 Dynamic array를 기반으로 수행하였다.

㉠ Dynamic array 기반의 SNP validation

ㄱ. 3차 년도의 validation 결과를 기반으로 수정 한 pipeline을 기반으로 만들어진 SNP map을 기반으로 96 primer sets을 선택하여 validation 하였다. 양배추류에서 genetic variatioin이 큰 구역을 찾아 마커로 만들기 위하여, highly variable region을 분석하고 variable 한 영역에서의 marker를 design 함으로써 다른 계통에서도 분석한 marker의 polymorphic probability를 높이기 위하여 Audic's test를 통하여 variation이 많은 또는 적은 genomic blocks을 분석하였다 (그림 1-57).

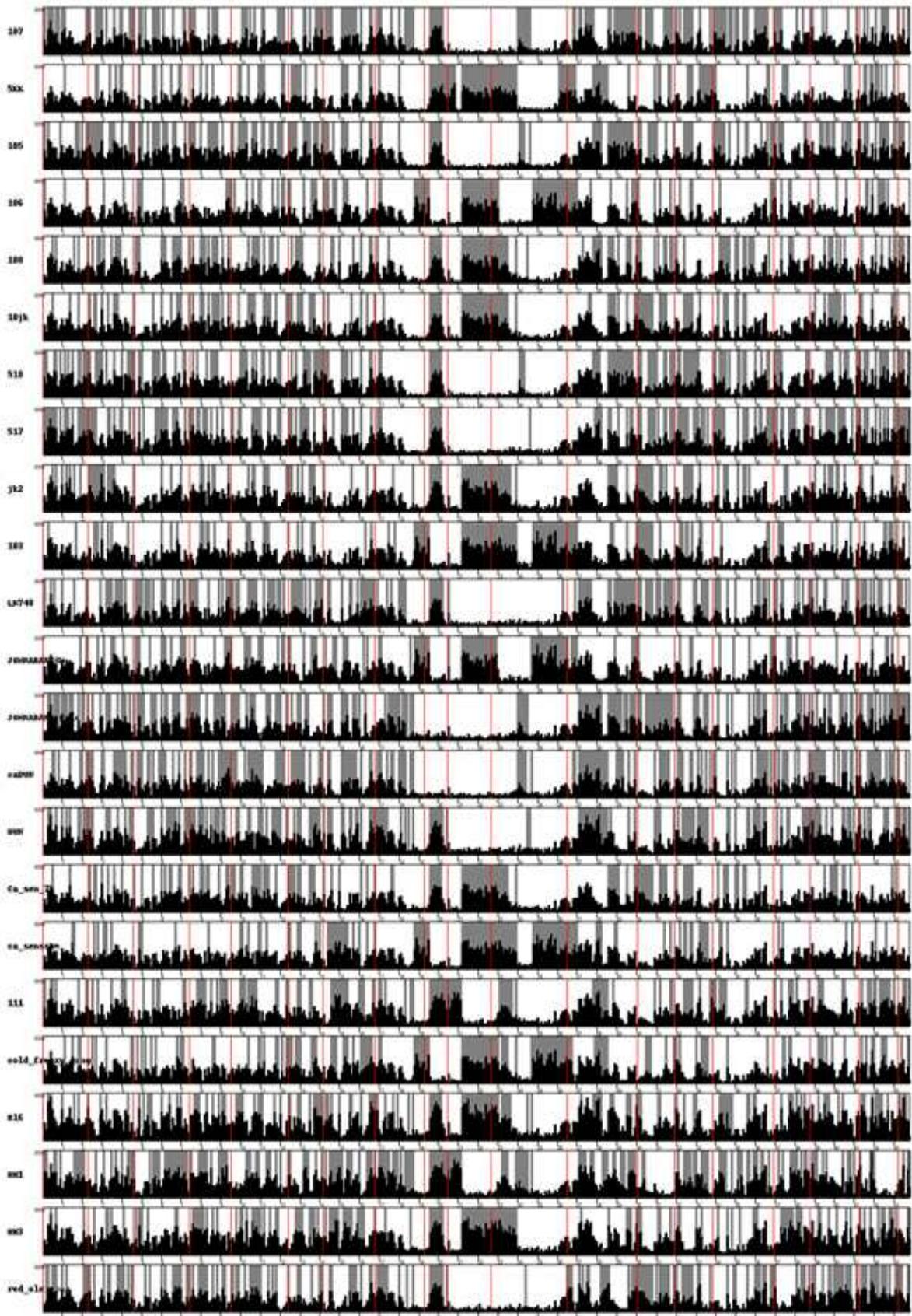


그림 1-57 . example of HVR

ㄴ. Calling 된 전체 SNPs (homozygous, heterozygous) 를 기반으로 SNP가 dense 한 genomic block 과 SNP가 rare 한 genomic block을 조사하였다 (Table 1-27). 전체 100 Kb를 window로 한 4,464개의 genomic block 중 1,353 (30.31% in K0007) ~ 1,972 (44.18% in K0023)의 genomic blocks이 통계적으로 high variable genomic block (HVB)으로 detection 되었고, 1,600 (35.84% in K0001) ~ 1,953 (43.75% in K0025) 이 통계적으로 rare variable genomic block (RVB)으로 분석되었다. HVB 또는 RVB의 개수를 전체 identification된 SNP의 개수와 비교해 보았을 때, HVB나 RVB의 개수는 SNP의 개수와는 연관이 없는 것으로 보인다.

표 1-27. distribution of HVB and RVB in each *B. oleracea* line

Code	No. of HVB (%)	No. of RVB (%)
K0001	1,658 (37.14)	1,600 (35.84)
K0002	1,595 (35.73)	1,671 (37.43)
K0003	1,618 (36.25)	1,719 (38.51)
K0004	1,617 (36.22)	1,651 (36.98)
K0005	1,404 (31.45)	1,717 (38.46)
K0006	1,353 (30.31)	1,680 (37.63)
K0007	1,495 (33.49)	1,686 (37.77)
K0008	1,762 (39.47)	1,688 (37.81)
K0009	1,469 (32.91)	1,701 (38.10)
K0010	1,557 (34.88)	1,643 (36.81)
K0011	1,672 (37.46)	1,691 (37.88)
K0012	1,602 (35.89)	1,684 (37.72)
K0013	1,579 (35.37)	1,670 (37.41)
K0014	1,757 (39.36)	1,654 (37.05)
K0015	1,754 (39.43)	1,760 (39.43)
K0016	1,526 (37.46)	1,672 (37.46)
K0017	1,619 (36.27)	1,746 (39.11)
K0018	1,428 (31.99)	1,651 (36.98)
K0019	1,673 (37.48)	1,675 (37.52)
K0020	1,627 (36.45)	1,709 (38.28)
K0021	1,618 (36.25)	1,862 (41.71)
K0022	1,972 (44.18)	1,804 (40.41)
K0023	1,686 (37.77)	1,835 (41.11)
K0024	1,808 (40.50)	1,953 (43.75)
K0025	1,676 (37.54)	1,690 (37.86)
K0026	1,809 (40.52)	1,754 (39.29)
K0027	1,785 (39.99)	1,818 (40.73)
K0028	1,628 (36.47)	1,707 (38.24)
K0029	1,702 (38.13)	1,677 (37.57)

㉔. Dynamic array Chip 생산을 위하여 각 primer set은 HVR 영역 중 계통 전체에서 calling 된 SNP의 수가 7개 이상이고, 모두 homozygous type인 SNP를 포함하고 있는 영역을 대상으로 하였다. 이들 primer의 genomic distribution은 *B. oleracea* genome의 2-3Mb distance로 하였다 (그림 1-58).

Chr	loci	distance	107-5-KI105-106-108-10-J518-517 JK2	103-LN-JOMJOMcaD DUF	CaS_ca_s111	ole_red	B16	DH:DH:GD:A12	##	BM/MC:brof	MC:Kale	Kale
C1	5,124,836	2,037,693	A	G G G G N	G G G G G G G G N N	G G N	G N	G G	N N N	N	N N G G	
C1	7,162,529	4,687,030	G	A N A A N	N A A N N A A N A A N A A N N N	N N	A A	N N	N A N A A N A			
C1	11,849,559	2,675,863	C	T N T N T	N T T N N N N N T T T N N T N N N N	T N	N N	T N N N	N N N N N N N N T			
C1	14,525,422	2,590,289	G	A A A A N	N A A N N N A A N A N N N A N A A A	N N	A A A		A A A A A N			
C1	17,115,711	2,980,332	A	C N C N N	C C C C C C N C N C C N C C N N N N	N C	N N	N C N C N N	C N C N N N			
C1	20,096,043	8,429,095	A	N G N N	G G N N N G G N G N G G G G N	G N	G G	N N N G	N N N G			
C1	28,525,138	4,180,500	A	T N T N T	T T T T T T T T N T N N T T N N T T N	T N	N T	T N T N T N	N N N N N N N N T			
C1	32,705,638	4,577,256	C	T T T T N	T T N T T N T N T N T T T T N T N N N	N T	N N	N T N N N	N N N N T N T			
C1	37,282,894	2,226,366	C	A A A A A	N A A N A A N A A N A A A A A N A N A N	A A	A A	N A A A A	N A A A A A			
C1	39,509,260	#REF!	T	C C C C C	C C C C C N C C N N N C C N C N C C N C N	C C	N C	C C C C	C C N C N C N			
C2	204,926	4,248,838	C	T N T N T	N T N T T N T N T N T N N T T N T T T T N	T N	T T	T N N N N	T T T T T N			
C2	4,453,764	1,979,778	C	G G G G G	G G G N G N N G G G N G N N N G N N	G N	N N	G N N	N N N N N N N N G N			
C2	6,433,542	44,642	A	N T N T T	T T N N T T N N T N N T N T N T N T N T	N T	N T	N T N T N	N N N N T N N N N			
C2	8,568,381	4,640,765	C	T N T N T	T T T T T T T T T T N N T N T N T T T T	N N	T N	T T T T	N N T T N T N N T N			
C2	13,209,146	2,601,099	T	A A A A N	A A N N A A N N A A N A A N A A N A A N A	A A	A A	N A A A A	N A A A A A			
C2	15,810,245	4,105,725	T	C C C C C	C C C C C N C C C N N C N C C C C N N	C C	C N	C C C N	C C C C C N			
C2	19,915,970	4,196,654	T	N C C C	N N C C N C N N N N C C N C C N C N N	C N	C N	N C N N	C N N N C N			
C2	24,112,624	13,691,468	C	N N A N	A A A A A A N N A N N A A N N A A A A	N A	A A	N A A A	N A N A A A			
C2	37,804,092	4,386,695	T	A N N N A	A A N N A A A A A A A A A A A N A A A N	A A	A A	N A A A A	N A A A A A			
C2	42,190,787	5,644,760	G	C N N C	C C C N N C A C N C C N C C N C C N C C	C C	C N	C C N C	C C N C C N C C			
C2	47,835,547	#REF!	A	N N N N	T T N N T N N N T N N T N N N N T N N N N	T N	T T	T N N N	T T T N N T T T N			
C3	5,062,633	3,131,550	A	N C N C	N N N N N N N C C C N C N C N N C N N	C N	C N	N N N N	N N N N N N N N N N			
C3	8,194,183	5,304,513	C	N T T T	T T T T T T T T T T T N T N T N T N T N	T N	T N	T N N N	N N N N N N N N T N			
C3	13,498,696	3,506,271	T	N N C C	C C C C C C N C C N N C C C N N N C N	C N	C N	N N N C	N N C C N C			
C3	17,004,967	3,857,354	T	G N N N	N N N N N G N N N N G N G N N G N G G G	N G	N G	N G N G	N G N G N G			
C3	20,862,321	3,214,385	G	A N A N	N N N N N A A N N N N N A N A A N A A N	A A	A A	N A A A A	N A A A A A			
C3	24,076,706	3,316,887	C	T T T N	T N T T N T N N T T T T T T T T T T N N	N N	T T	T T N N	T T N N T T N T N			
C3	27,393,593	3,619,199	G	N N N C	C C C N C C C C C N C C N C C C N C C	C N	C C	N C C N	C G N N N C			
C3	31,012,792	3,850,700	G	N A N A	N N N N N N A A N A A A A A N A N N N	A A	A A	N A A A A	N A N N N A A N N N A			
C3	34,863,492	1,900,008	C	N A N N	A N N A N N A N A N N N N A A A A A A N	N N	A A	N N N N	N A N N A A			
C3	36,763,500	19,618,580	T	N N N C	C C N N C C N C C C C N C N C N C N	C N	C N	N C N N	C N C N C N			
C3	56,382,080	3,121,142	A	G G G N	N N N G G N G G N N G G G G G G G G G G	N G	N G	N G N G	N G N G N G			
C3	59,503,222	4,527,089	C	G G G N	G G G G G G G N G N N G N G G G G N G	N N	N G	N N N G	N G G G N G			
C3	64,030,311	-63,993,401	C	N T T T	T T T T T T N T T T T T N T N T T T T N	T N	T T	T T N	N N N T N N T T T			

그림 1-58. example of GW SNP sets

㉕. 추가적인 validation을 위하여 Fluidigm방법을 이용하였다. Fluidigm SNPtype Assays는 allele-specific PCR detection system으로 low-cost, high-quality SNP genotyping 방법이다 (그림 1-59). 2개의 allele-specific primer (ASP)와 specific target amplification (STA) primer, locus-specific primer (LSP)를 웹 (<https://d3.fluidigm.com/account/login>) 상에서 BML의 pipeline에 따라 design 하였다.

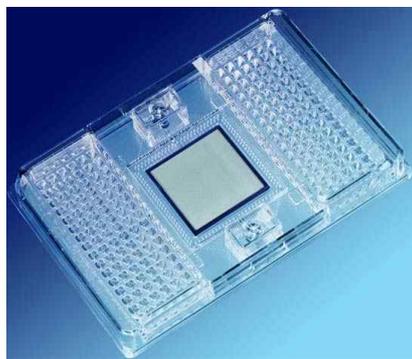


그림 1-59 . dynamic array™ IFC-genotyping

㉑. amplification of hemiSNP: HRM은 curve pattern을 기반으로 polymorphism pattern을 알 수 있는 반면 Fluidigm은 allele specific primer를 사용함으로써 SNP의 genotype을 정확하게 detection 할 수 있다. 먼저, HRM test에서 가장 문제가 되었던 hemi-SNP의 amplification 및 Fluidigm의 accuracy를 test하기 위하여 수정된 pipeline에서 정확히 제거되었는지 확인하기 위하여 TO1000DH3 line을 3반복으로 genotyping을 시도 하였다 (그림 1-60).

	Ref:Alt	TO_1	TO_2	TO_3
C1_05124836	A:G	A:A	A:A	A:A
C1_07162529	G:A	G:G	G:G	G:G
C1_1849559	C:T	C:C	C:C	C:C
C1_14525422	G:A	G:A	G:A	G:A
C1_17115711	A:C	A:A	A:A	A:A
C1_20096043	A:G	A:G	A:G	A:G
C1_28525138	A:T	A:A	A:A	A:A
C1_32705638	C:T	C:T	C:T	C:T
C1_37282894	C:A	C:C	C:C	C:C
C1_39509260	T:C	T:T	T:T	T:T
C2_00204926	C:T	C:C	C:C	C:C
C2_04453764	C:G	C:C	C:C	C:C
C2_06433542	A:T	A:A	A:A	A:A
C2_08568381	C:T	C:C	C:C	C:C
C2_13209146	T:A	T:T	T:T	T:T
C2_15810245	T:C	T:T	T:T	T:T
C2_19915970	T:C	T:T	T:T	T:T
C2_24112624	C:A	No Call	No Call	No Call
C2_37804092	T:A	T:T	T:T	T:T
C2_42190787	G:C	G:G	G:G	G:G
C2_47835547	A:T	T:T	T:T	T:T
C3_05062633	A:C	A:A	A:A	A:A
C3_08194183	C:T	C:C	C:C	C:C
C3_13498696	T:C	T:T	T:T	T:T
C3_17004967	T:G	T:T	T:T	T:T
C3_20862321	G:A	G:G	G:G	G:G
C3_24076706	C:T	C:C	C:C	C:C
C3_27393593	G:C	G:G	G:G	G:G
C3_31012792	G:A	G:G	G:G	G:G
C3_34863492	C:A	C:C	C:C	C:C
C3_36763500	T:C	T:T	T:T	T:T
C3_56382080	A:G	A:A	A:A	A:A
C3_59503222	C:G	C:C	C:C	C:C
C3_64030311	C:T	C:C	C:C	C:C
C4_00036910	T:C	T:T	T:T	T:T
C4_06149886	A:G	A:A	A:A	A:A
C4_08497524	T:C	T:T	T:T	T:T
C4_11571462	T:A	T:T	T:T	T:T
C4_15116107	T:A	T:T	T:T	T:T
C4_24108845	A:G	A:A	A:A	A:A
C4_29818914	A:G	A:A	A:A	A:A
C4_34561363	A:G	A:G	A:G	A:G
C4_37080145	T:C	T:T	T:T	T:T
C4_42897392	T:G	T:T	T:T	T:T

그림 1-60 . 3반복의 TO1000 genotyping 결과

㉒. 전체 test에서 no call이 나온 경우는 3개의 loci에서 6 번으로 실험 실패의 확률은 대략 2.08% (6/(96*3))로 확인 할 수 있었다 (그림 1-61). 이 중 한 loci는 3반복에서 모두 “No call”이 나왔고 (C2_24112624), 한 경우는 2번 (C9_25880297)이 , 한 경우는 1번 (C8_16424882)이 “No call”이 나왔다. 이 경우, preliminary assembled reference를 사용하였기 때문에 reference의 서열이 정확하지 않아 ASP design이 잘못 되었을 가능성도 배제할 수 없다. 특히, 일부 sample에서 “No call”로 나온 loci의 genotype을 비교해 보면 C8_16424882의 경우 reference allele과 같이 calling 되었지만, C9_25880297의 경우 Alt allele과 같은 genotype이 calling된 것을 보면 reference 서열이 잘못 되었을 가능성이 있음을 보여준다.

	Ref:Alt	TO_1	TO_2	TO_3
C9_25880297	G:C	C:C	No Call	No Call
C8_16424882	A:G	A:A	No Call	A:A
C2_24112624	C:A	No Call	No Call	No Call

그림 1-61 . list of experimental errors

ㅅ. Reaction이 성공적으로 일어난 Fludigm 결과에서 reference genome과 Fludigm의 genotype을 비교한 결과, 93 primer set에서 85 개의 test가 3 반복 모두 TF로 나온 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 수정 된 SNP 마커 개발을 위한 pipeline의 accuracy는 91.40%였다. false positives는 reference sequence의 TO1000DH3개체가 DH line 임에도 불구하고 heterozygous한 genotype을 보였다. 이의 원인을 분석하기 위하여, 웹에서 design한 영역의 primer sets을 reference genome 상에 BLAST 한 결과, 한 loci (C1_20096043)의 경우 promiscuously mapping 되었고, 2 loci (C1_14525422, C6_38299158)는 4개의 primer set이 specific하게 target loci에 mapping 된 반면, 2 loci (C1_32705638, C4_34561363)는 ASP가 2 loci이상, 2 loci (C6_20543679, C7_455779857)는 STA primer가 2 loci이상 align 되었다. 그리고, C8_22159620의 경우 ASP, STA primer 모두가 2 곳으로 align되어 hemi-SNP calling 가능성을 보여 준다 (그림 1-62). 따라서, 우리 pipeline에서 detection한 primer set으로 single loci amplification을 확인 하였음에도 불구하고, flanking 60bp를 기반으로 random으로 primer set을 만들 경우에 6.45% 정도의 hemi-SNP call을 detection 할 수 있지만, 91.40%의 loci에서는 loci specific genotyping이 가능하므로 새로 만들어진 pipeline이 기존의 Brassica SNP genotyping을 위한 pipeline보다 훨씬 우월함을 알 수 있다.

	Ref:Alt	TO_1	TO_2	TO_3
C1_14525422	G:A	G:A	G:A	G:A
C6_20543679	C:T	C:T	C:T	C:T
C7_455779857	A:C	A:C	A:C	A:C
C1_20096043	A:G	A:G	A:G	A:G
C1_32705638	C:T	C:T	C:T	C:T
C6_38299158	A:T	A:T	A:T	A:T
C8_22159620	C:T	C:T	C:T	C:T
C4_34561363	A:G	A:G	A:G	A:G

그림 1-62. list of false positives result in SNP calls

- . 위의 결과를 요약해 볼 때, 전체 SNP calling의 결과 90%이상의 loci는 hemi-SNP로부터 자유로움을 알 수 있다 (표 1-28).

표 1-28 . Accuracy test for hemi-SNP amplification

	#1	#2	#3
No calls	1	3	2
Hetero	8	8	8
homo	77	75	76
Accuracy (%)	90.59	90.36	90.48

㉞ 25 양배추류의 genotyping with 96 Dynamic Array

1. SNP calling의 accuracy를 판단하기 위하여 SNP 분석에 이용 된 양배추류 중 25 lines을 선별하여 Dynamic array를 이용하여 genotyping을 수행 하였다 (그림 1-61). 그 결과, validation에 사용 된 계통은 96개의 SNP loci 중 32-62 SNPs를 포함하고 있었고, 89-94 (92.72-97.92%)의 loci에서 prediction 한 결과와 genotyping 한 결과의 genotype이 일치함을 확인 할 수 있었다 (표 1-29). 따라서, 수정된 실험 재료 및 pipeline은 96.70%의 SNP prediction을 보였고, 0.95 sensitivity와 0.99의 specificity를 보임으로써 성공적인 결과를 얻을 수 있었다.

표 1-29. Accuracy test of SNP calls with 25 *B. oleracea* lines

Lines	SNPs ^a	Exp. Err. ^b	Homo Calls				Statistics		
			TP	TN	FP	FN	Acc.	Sen.	Spe.
K0001	58	2	53	30	1	3	0.95	0.95	0.97
K0002	57	4	50	31	0	4	0.95	0.93	1.00
K0003	62	7	60	22	0	0	1.00	1.00	1.00
K0004	57	3	53	30	0	2	0.98	0.96	1.00
K0005	56	7	54	32	0	0	1.00	1.00	1.00
K0006	51	5	45	37	0	1	0.99	0.98	1.00
K0007	60	4	56	27	1	1	0.98	0.98	0.96
K0008	57	5	51	28	0	4	0.95	0.93	1.00
K0010	62	2	55	29	0	5	0.94	0.92	1.00
K0011	55	5	53	30	0	1	0.99	0.98	1.00
K0012	59	5	56	25	0	0	1.00	1.00	1.00
K0013	61	5	60	27	0	0	1.00	1.00	1.00
K0014	50	3	45	43	0	2	0.98	0.96	1.00
K0015	47	6	44	34	0	4	0.95	0.92	1.00
K0016	55	5	47	34	0	6	0.93	0.89	1.00
K0017	60	3	53	31	0	4	0.95	0.93	1.00
K0018	59	3	55	27	1	2	0.96	0.96	0.96
K0019	54	4	47	34	0	5	0.94	0.90	1.00
K0020	58	4	53	33	0	2	0.98	0.96	1.00
K0022	32	5	30	51	0	7	0.92	0.81	0.96
K0023	59	2	55	32	1	3	0.96	0.95	0.97
average	55.67	4.24	51.19	31.76	0.19	2.67	0.97	0.95	0.99

^a Number of SNP calls in each line. ^b experimental error of Dynamicarray. Abbreviations:

Acc; accuracy, Sen.: sensitivity, Sep. : specificity

Table S6. Accuracy test by Fluidigm genotyping

NA calls: experimental error
 (1) low association coefficient including both T and C
 (2) calling a C/G at a homozygous reference site (R)
 (3) calling a heterozygous reference at a variant site (V)
 (4) green: heterozygous call

그림 1-61 . SNP genotyping of 25 *B. oleracea* lines

④ 384 Dynamic array Chip 생산

- ㉞ 4차년도에서 수정 된 pipeline을 기반으로 선정 된 SNP loci를 기반으로, 5차 년도에서는 3개의 96 Dynamic array chip를 추가 생산하였다(그림 1-62). 추가 생산 된 3 set의 SNP는 서로 교차 발생할 수 있도록 제작하였다.
- ㉟ 그 결과, 각 Dynamic array chip의 combination은 chromosome size에 따라 38-55개의 SNP를 genotyping할 수 있도록 제작되었으며, 평균 1.1M의 distance를 가지도록 제작되었다 (그림 1-63).

Chr	loci	distance	Ref	Alt	K0001	K0002	K0003	K0004	K0005	K0006	K0007	K0008	K0009	K0010	K0011	K0012	K0013	K0014	K0015	K0016	K0017	K0018	K0019	K0020	K0021	K0022	K0023	K0024	K0025	K0026	K0027	K0028	K0029	SNPNo					
C1	1,191,873		C	G	N	N	N	N	N	G	N	G	N	N	G	N	N	G	G	N	G	G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	10	
C1	2,407,985	1,216,112	T	A	N	N	N	N	A	A	N	N	A	N	N	N	A	A	N	A	N	N	A	A	A	A	N	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	11	
C1	3,591,790	1,183,805	A	T	T	T	T	T	T	N	N	T	N	T	T	T	T	T	T	N	T	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	20	
C1	5,124,836	1,533,046	A	G	G	G	G	N	G	G	G	G	G	G	G	N	N	G	N	G	N	G	G	N	G	N	G	N	G	N	N	N	N	G	G	N	N	21	
C1	7,162,529	2,037,693	G	A	A	N	A	A	N	N	A	A	N	N	A	A	N	A	A	N	A	A	N	N	N	A	A	A	N	A	A	N	A	A	N	A	N	19	
C1	8,455,794	1,293,265	T	A	N	A	N	N	A	A	N	N	A	A	N	N	A	N	N	A	A	N	N	N	N	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	9	
C1	9,320,748	864,954	C	T	N	N	N	T	N	N	N	N	N	N	T	T	N	T	N	N	N	T	N	N	N	N	N	T	N	T	T	N	N	N	N	N	N	8	
C1	10,997,783	1,677,035	A	G	G	G	G	G	N	N	G	G	N	N	N	G	N	G	G	N	G	G	G	N	G	N	G	N	G	N	N	N	N	N	N	N	N	16	
C1	11,849,559	851,776	C	T	T	N	T	N	T	N	T	T	N	N	N	N	T	T	N	N	C	N	C	N	T	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	T	11	
C1	12,618,279	768,720	C	T	N	T	N	T	N	N	N	N	N	N	T	T	N	N	T	T	N	N	N	N	T	T	N	T	N	T	N	N	N	N	N	N	N	10	
C1	13,603,018	984,739	T	C	N	N	N	C	N	C	N	C	C	N	C	C	N	C	C	N	C	C	N	C	N	N	C	C	C	N	N	N	N	N	N	N	C	14	
C1	14,525,422	922,404	G	A	A	A	A	A	N	N	A	A	N	N	N	A	A	N	A	N	N	N	N	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	N	21	
C1	15,753,817	1,228,395	G	A	A	A	A	A	A	N	A	A	N	N	A	A	A	A	N	A	N	N	N	A	A	A	N	N	N	N	A	A	A	A	A	A	N	18	
C1	16,428,676	674,859	G	C	C	C	C	N	C	N	C	C	C	C	C	N	N	C	C	C	N	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	N	18		
C1	17,115,711	687,035	A	C	C	N	C	N	N	C	C	C	C	C	C	N	C	C	N	C	C	N	N	N	N	N	C	C	N	C	N	N	N	N	N	N	16		
C1	19,091,941	1,976,230	C	T	N	N	N	T	N	N	N	N	N	T	N	T	N	N	N	N	T	N	T	N	N	N	N	N	T	N	N	N	N	N	N	N	N	6	
C1	20,096,043	1,004,102	A	G	N	G	N	N	G	G	N	N	G	N	G	N	G	G	G	N	G	N	G	N	G	G	G	G	G	N	N	N	N	N	N	N	N	G	17
C1	21,824,092	1,728,049	T	A	N	A	N	A	A	A	N	N	A	A	N	A	N	N	A	A	N	A	N	A	N	A	A	A	A	A	N	A	A	N	A	A	N	17	
C1	22,470,145	646,053	G	T	N	T	N	T	T	N	N	T	T	N	T	N	N	N	N	T	N	N	T	N	N	T	N	T	N	T	N	N	N	N	N	N	N	T	15
C1	23,431,073	960,928	C	T	N	T	N	N	T	T	N	N	T	T	N	N	N	N	N	N	N	T	T	N	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	16	
C1	24,775,193	1,344,120	C	G	N	N	N	G	N	N	N	N	N	G	N	G	N	N	N	N	N	G	N	G	N	N	N	N	N	G	G	N	N	N	N	N	N	8	
C1	25,450,266	675,073	G	A	N	N	N	A	N	N	N	N	N	A	N	A	N	N	N	N	A	N	A	N	N	N	N	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	6
C1	26,921,924	1,471,658	T	G	N	G	N	G	N	N	N	N	N	G	N	G	N	N	N	N	G	N	N	N	N	N	N	N	G	N	N	N	N	N	N	N	N	6	
C1	28,525,138	1,603,214	A	T	T	N	T	N	T	T	T	T	T	T	N	T	N	N	N	T	N	N	T	T	N	T	N	T	N	N	N	N	N	N	N	N	N	T	16
C1	29,732,364	1,207,226	C	G	G	N	G	G	N	N	G	G	N	N	G	G	G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	10
C1	30,357,803	625,439	A	T	N	N	N	N	N	T	N	N	T	T	N	N	N	N	N	N	T	N	N	N	T	N	T	N	T	N	N	N	N	N	N	N	N	7	
C1	31,190,293	832,490	G	C	N	N	N	N	N	C	N	N	C	C	N	N	N	C	N	C	N	N	C	N	N	N	N	N	N	N	C	N	N	N	N	N	N	N	7
C1	32,705,638	1,515,345	C	T	T	T	T	N	T	T	N	T	N	T	N	T	N	T	T	T	T	N	T	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	T	19
C1	33,875,386	1,169,748	C	G	N	N	N	G	N	G	N	N	G	N	G	G	G	N	G	G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	10
C1	34,565,282	689,896	A	T	N	N	N	N	N	T	T	N	N	T	N	T	N	T	T	T	T	T	N	T	T	T	N	T	N	T	N	N	N	N	N	N	N	N	15
C1	35,555,058	989,776	A	G	N	G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	G	N	G	N	N	G	G	G	N	G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	8
C1	36,317,157	762,099	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	N	A	A	N	A	A	A	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	22
C1	37,282,894	965,737	C	A	A	A	A	A	A	N	A	A	N	A	N	A	A	N	A	A	A	A	N	N	A	N	A	N	N	A	A	A	A	A	A	A	A	A	23
C1	38,377,430	1,094,536	T	C	N	C	C	C	C	C	C	C	C	C	N	C	N	C	C	C	C	C	C	C	C	N	C	N	C	N	N	N	N	N	N	N	C	22	
C1	39,509,260	1,131,830	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	N	C	N	C	N	N	C	C	N	C	N	C	C	C	C	C	N	N	N	N	N	N	N	N	22	
C1	40,649,792	1,140,532	T	A	N	A	N	N	N	N	A	A	N	N	A	N	A	N	A	N	A	A	A	A	N	A	N	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	13

그림 1-62. example of SNP genotyping loci
 빨강: 1st set , 노랑: 2nd set, 초록: 3rd set, 보라: 4th set

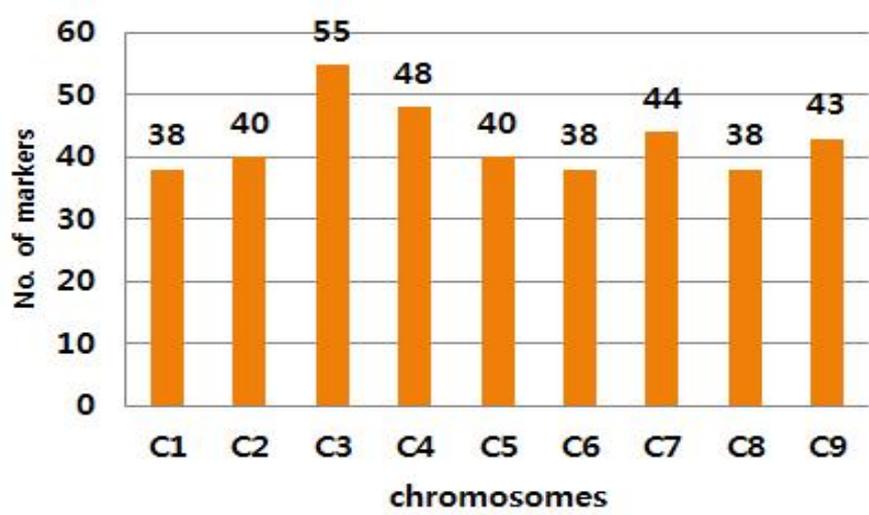


그림 1-63. SNP marker distribution throughout the *B. oleracea* genome

㉔ SNP marker를 검출하는 실험 방법 확립

ㄱ. SNP을 검출하는 여러 가지 실험 방법 중 간편하고 효율적인 실험장비 등을 이용하여 확인할 수 있는 방법으로 SNP를 포함하는 DNA 부위를 증폭을 위한 PCR 분석으로 SNP에 대한 genotyping assay를 확립하였다. 시들음병 marker는 시들음병 저항성 특이적인 염기서열을 BoCYP38 SAS F(short allele specific), 그리고 시들음병 감수성 특이적인 염기서열을 BoCYP38 LAS F(long allele specific)를 쉽게 agarose gel에서 구분하기 위하여 BoCYP38 LAS F 프라이머를 BoCYP38에 비특이적인 염기서열을 10bp 길게 디자인하였고, BoCYP38 SAS F, BoCYP38 LAS F 그리고 BoCYP38 R 프라이머를 동시에 넣어서 PCR을 수행하면 110bp의 SNP를 포함하는 DNA 부위를 증폭할 수 있다. 그리고 3% agarose gel에서 증폭한 PCR product를 확인하여 얻은 결과는 시들음병 저항성 품종이 증폭된 크기와 그 보다 10bp 큰 시들음병 감수성 품종이 증폭된 결과를 확인하였다(그림 2-2). 또한 PCR product가 two band의 결과는 시들음병 저항성과 감수성 두 allele이 있는 heterozygous임을 알 수 있다. 표 2-1에 시들음병 SNP marker 판별에 이용한 양배추 품종을 나타내었다.

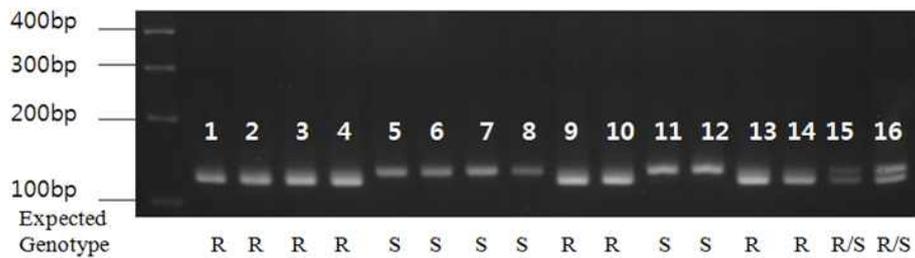


그림 2-2. 시들음병 SNP marker에 대한 genotyping

표 2-1. 양배추 시들음병 저항성 및 감수성 판별에 이용한 양배추 품종

번호	계통명	특징
1	518	시들음병 저항성
2	518	시들음병 저항성
3	517	시들음병 저항성
4	517	시들음병 저항성
5	624	시들음병 감수성
6	624	시들음병 감수성
7	164	시들음병 감수성
8	164	시들음병 감수성
9	518	시들음병 저항성
10	517	시들음병 저항성
11	164	시들음병 감수성
12	JK-2	시들음병 감수성
13	YCR	시들음병 저항성 F1
14	YCR	시들음병 저항성 F1
15	CT-18	시들음병 감수성 F1
16	CT-18	시들음병 감수성 F1

㉔ akt mutant의 병저항성 연구 및 프로모터 분석

- ㄱ. 애기장대의 돌연변이체 연구로부터 확보된 akt1 mutant의 시들음병 저항성 phenotype으로부터 실제로 애기장대에서처럼 양배추의 시들음병 저항성, 감수성 식물들이 시들음병 처리시 potassium 농도의 차이가 있는지 식물체내 이온 농도를 잴 수 있는 기기를 이용하여 측정 하였음. 실험 결과로부터 양배추에서도 저항성 품종은 병 접종 시 potassium 이온의 농도가 감소하고 감수성은 변화가 없는 것을 확인 함(그림2-3, 2-4).
- ㄴ. akt1 유전자의 발현이 시들음병 처리에 의해 변화하는지 알아보기위해 AKT1 유전자의 프로모터에 GUS 보고자 단백질이 fusion된 construct를 확보하고 이를 애기장대에 도입한 형질 전환체 확보. Potassium 이온 농도에 의한 유전자 발현 변화를 없애기 위해 시들음병 균과 KCl을 같이 처리하고 GUS 발현을 측정 함(그림2-5)

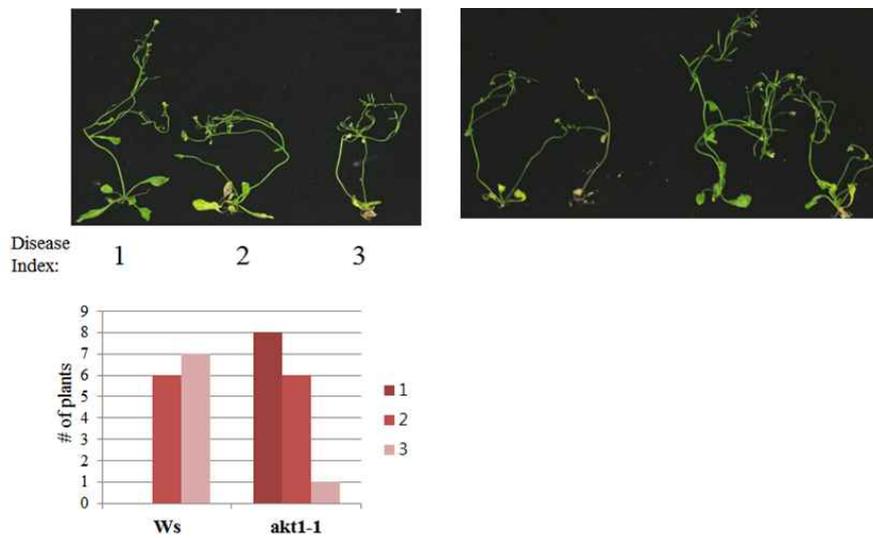


그림 2-3. akt1 돌연변이체가 시들음병 처리에대해 저항성을 보임

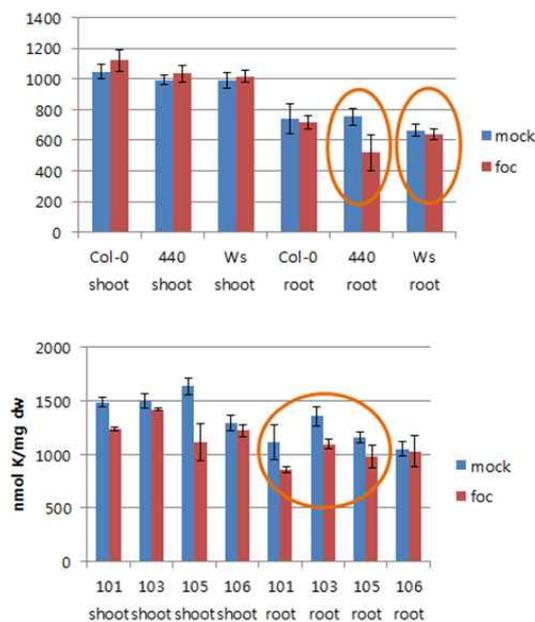


그림 2-4. 시들음병균 처리를 한 식물 개체내의 potassium ion 농도 측정

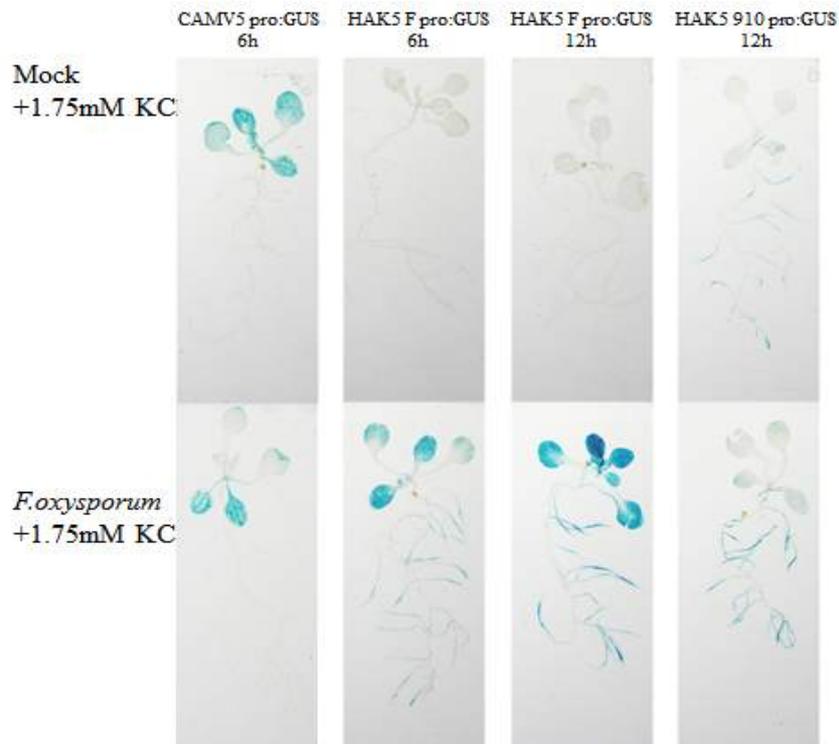


그림 2-5. 시들음병균 특이 GUS 발현을 확인 함.

㉠ 특이 발현을 보이는 중요 저항성 유전자 (R gene)의 분리

- ㄱ. 시들음병 특이 발현 마커 중에서 병 저항성 관련 domain을 가진 유전자 그룹만을 선별해서 genomic DNA 수준에서 유전자 존재 유무를 실험 함.
- ㄴ. 이중 3개의 유전자가 genomic DNA 수준에서 저항성 품종에서만 존재한 것을 확인 함(그림2-6).
- ㄷ. 3개의 PCR product를 cloning하여 유전자의 일부분을 확보함.
- ㄹ. 뿌리혹병 특이 발현 유전자 중 저항성 관련 유전자로 생각되어지는 유전자 8개를 선별하여 cloning 함.

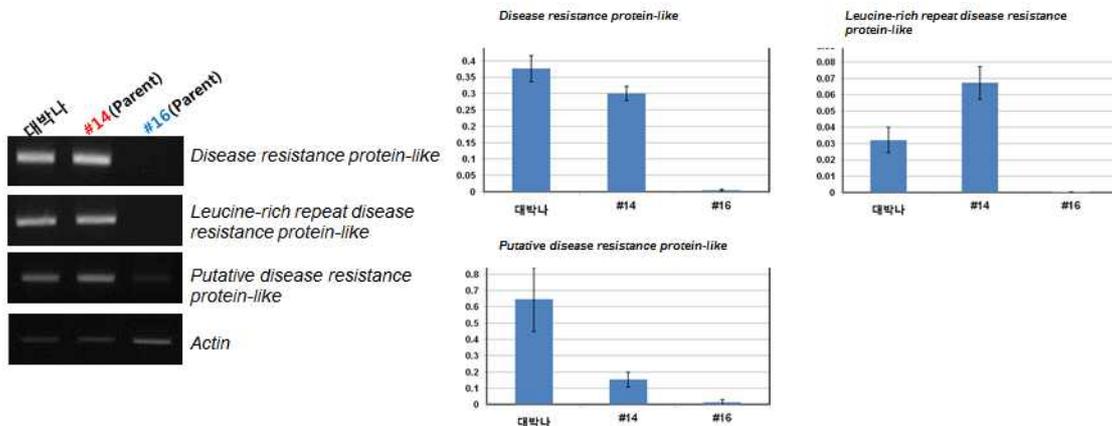


그림 2-6. 저항성 유전자의 존재를 genomic DNA 수준에서 확인 함.

② 시들음병 마커 개발 및 검증

㉠ 선발된 분자 마커들의 유용성 검증

ㄱ. 1차년도에서 KR518 (시들음병 저항성 라인 no. 14), HY164(시들음병 감수성 라인 no. 16), YCR 이념(뿌리혹병 저항성 품종 no. 22) 그리고 CT-18(뿌리혹병 감수성 품종no. 26)을 선발하여 1차년도에 선발된 분자 마커들의 유용성 검증을 시들음병은 *F. oxysporum* 접종 후 처리 3, 10, 15, 21일 그리고 뿌리혹병은 *P. brassicae* 처리 5, 15, 28일에 Q-PCR을 통해 분자 마커들의 발현을 조사하여 유용성 검증을 검토하였다 (그림 2-7).

ㄴ. 시들음병 감수성 품종에서는 BoPIG 1, 7, 9 시들음병 저항성 품종에서는 BoPIG 5, 6, 8의 각각 *F. oxysporum* 처리에서 발현이 높았다. 뿌리혹병 감수성 품종에서는 BoPIG 1, 2, 7 그리고 뿌리혹병 저항성 품종에서는 BoPIG 3, 8, 9에서 *P. brassicae* 처리시 발현이 높게 관찰되었다.

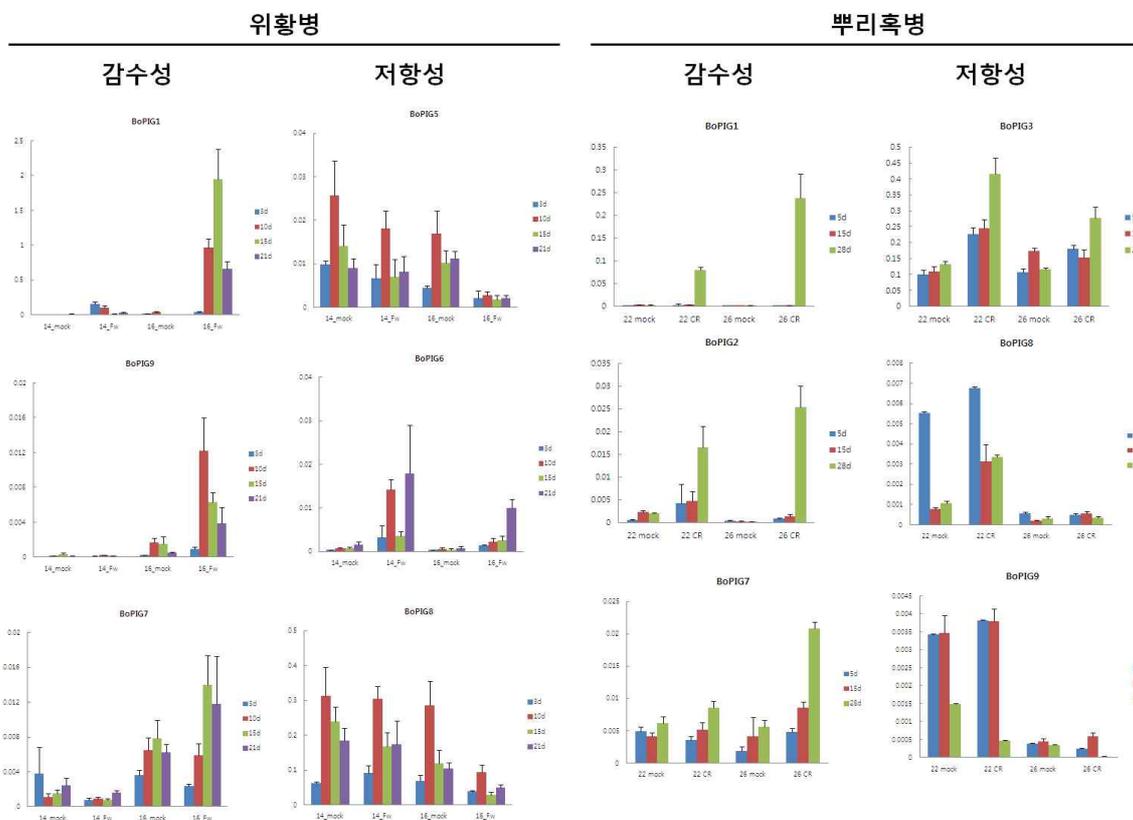


그림 2-7. 시들음병과 뿌리혹병 처리시 분자 마커 유용성 검증

ㄷ. 각 병 처리시 저항성과 감수성 품종에서 특이적으로 차이가 나는 유전자의 발현을 비교 할 수 있고 선발된 분자 마커들로 병 처리시 저항성과 감수성 품종을 구분 할 수 있을 것이라 사료된다. 이로서 일관성 있는 샘플 시료의 확보와 이들 병 처리 반응의 정량화를 위한 분자 표지 개발로 병의 증상이 발현되지 않은 초기 상태에서도 조기진단이 가능할 것으로 사료된다.

- ㄹ. 발현 값을 기준으로 140개의 프라이머 합성하고 두 개의 biologically 다른 실험군의 RNA 샘플을 이용하여 특이 발현 양상을 실험.
- ㅁ. 54개의 프라이머 셋트에서 두 번의 독립적인 병 처리 구 샘플 모두에서 특이 발현 패턴이 관찰 되는 것을 확인 함.
- ㅂ. 확보된 시들음병 처리 양배추의 초고밀도 발현체 결과를 효과적인 발현체 마커 선별을 위해 여러 조합으로 심도 있게 분석 함.
- ㅅ. 우선 순위를 두기 위해 저항성 3품종의 병처리 전후 공히 발현이 4 fold change되는 유전자 군 추출, 감수성 2품종 의 병 처리 전 후 발현이 4 fold change 되는 유전자 군 추출. 두 그룹을 비교해서 공유되는 유전자를 제외.
- ㅇ. 분석을 위해서 시들음병 저항성 2품종(101, 대박나)과 감수성 품종(106)을 soil에서 발아시킨 후 14일 동안 키운 후 *F. oxysporum f. sp. conglutinans*을 2×10^7 spore/ml 농도로 병 처리하여 3일 후 지상부 조직을 채취하여 뿌리와 잎 조직으로 나누어 RNA를 분리하여 실험에 사용하였음.

표 2-2. 실험적으로 검증된 시들음병 특이 발현 마커 유전자 list

B_1018411	Disease resistance protein-like
B_1072936	Leucine-rich repeat disease resistance protein-like
B_1044362	Leucine-rich repeat disease resistance protein-like
B_1039357	At1g14250 Disease resistance protein-like
B_1002136	CONSTANS-like 1 protein
B_1073837	Cysteine-rich antifungal protein 3 precursor
X_1001921	Glutaredoxin-C13
B_1051208	Putative auxin-induced protein
B_1070793	MYST1 protein
B_1035442	Thaumatococcus-like protein/pathogenesis-like protein 2
X_1059139	Thaumatococcus-like protein/pathogenesis-like protein
B_1026673	O-methyltransferasefamily2protein
B_1075161	Peroxidase 54 precursor
B_1060626	Peroxidase
B_1086500R	Putative receptor-like protein kinase
B_1039338S	Protein At1g14240
B_1005081S	Protein At1g14240
B_1086646R	Endochitinase isolog
B_1008599S	Pathogenesis-related protein 5 precursor
B_1079885S	Pathogenesis-related protein 1

X_1044223s	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 41 precursor
B_1068061s	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 41 precursor
B_1006616s	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 10 precursor
X_1001352s	Basic endochitinase CHB4 precursor
B_1044280	Leucine-rich repeat disease resistance protein-like
B_1065933	leucine-rich repeat family protein / protein kinase family protein
B_1034213	AP2-like ethylene-responsive transcription factor TARGET OF EAT 3
B_1058248	Ethylene-responsive transcription factor ERF109
B_1067908	S-locus protein kinase, putative
B_1076597	Mitogen-activated protein kinase kinase 5
B_1064262	AT5g39670/MIJ24_140
B_1014192	Oxalic acid oxidase
B_1081763	Unknown
X_1006910	Calmodulin-binding protein
B_1056448	RING-H2 finger protein ATL4L
X_1056964	Metallothionein type 3
B_1057544	Gb AAD15386.1
X_1039556	Putative extensin
B_1087537	Putative chitinase
B_1050418	Subtilisin-like protease
X_1073222	Peroxidase 52 precursor
X_1087641	Similarity to RNA binding protein
B_1029008	Auxin-induced protein, putative
B_1071745	Auxin-induced protein-like
B_1078760	Auxin-induced protein-like
B_1087950	Auxin response factor 16
B_1082288	Auxin response factor 10
B_1062030	Auxin efflux carrier component 7
B_1082893	Putative cyclin-dependent protein kinase
B_1059738	Serine/threonine protein kinase-like protein
B_1015316	Serine/threonine-protein kinase bub1,checkpoint-associated-like protein
B_1026138	leucine-rich repeat family protein / protein kinase family protein
B_1007018	CIPK8 (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 8)
X_1041893	protein kinase family protein

③ 시들음병 저항성 유전자 FocBo1 및 저항성 유전자들과 양배추 육종소재의 관계 분석

㉠ 시들음병 저항성 특이 유전자 발현 마커의 검증을 위하여 아시아종묘로부터 분양받은 6가지 품종에, 1차년도에 사용되었던 병리검정 방법에서 세부사항이 조절된 방법으로 시들음병 병리검정을 진행하였다 (표 2-3). 실험 처리의 공정성을 위해, 저항성에 대한 control로 대박나를 사용하였고, 시들음병에 대한 병원균은 *Fusarium oxysporium f. sp. Conglutinans*를 사용하였다. 과종 후 17일 째 된 유묘의 뿌리를 씻어 흙을 제거한 후 1×10^7 conidia/ml의 농도로 30초간 침지 후 이식하여 23℃에서 19일 동안 배양 한 후 시들음병에 대한 발병도를 조사하였다 (그림 2-8). 병조사 기준은 0= 병증 없음, 1= 식물체의 황화, 2= 고사 등의 3단계로 하였다. 발병도 조사결과를 바탕으로 발병도를 수치화하였고 시들음병의 평균 발병도가 1.0 이하인 경우에는 저항성, 1.0 - 1.85은 중도 저항성 (MR), 1.86 이상은 감수성으로 판정하였다. 모든 실험은 각 육종 별로 8~12 이상의 개체를 가지고 수행 하였으며, 독립적인 실험으로 2회 실시하였다. 병리 검정 index를 바탕으로 발병도를 수치화 (그림 2-9) 하였으며, <표 2-3>에 품종간 특성, 발병도, 발병도에 따른 저항성 판정을 나타내었다.

표 2-3. 양배추 품종간 특성과 시들음병에 대한 저항성 판정

NO.	품종명	특성	발병도	시들음병 저항성 판정
-	Dabakna	Flat	0	R
#14, (101)	KR-518	Flat	0	R
102	OK-517	Flat	0.125	R
103	MT-624	Round	1.86	MS
104	JK-2	Round	2	S
105	RK-P6-1	Oval	1	MR
#16(106)	HY-164	Flat	1.86	S



그림 2-8. 시들음병 접종후 19일 째 양배추

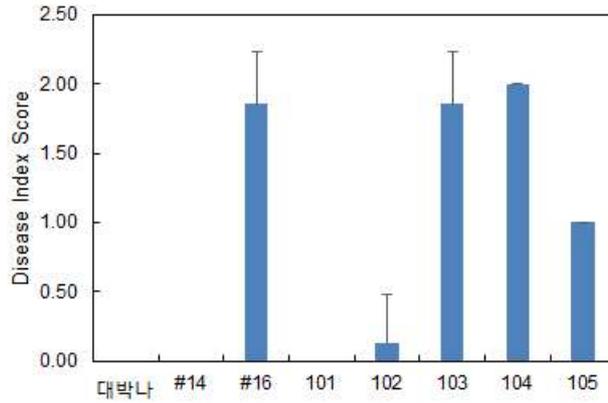


그림 2-9. 양배추 품종에 대한 시들음병 병리검정 결과

- ㉔ 대박나, #14(101), #16(106), 102, 104의 경우 1차년도와 마찬가지로 대박나, #14, 102의 경우 시들음병에 대해 저항성을 보였으며, #16, 104의 경우 감수성을 보였다. 반면 103과 105의 경우 103은 감수성, 105는 중도저항성의 표현형을 나타냈으나 2번의 반복 실험에서 발병도의 차이를 보였으며, 병징이 병처리시의 환경 차이에 따라 변화하는 표현형을 나타냈다. 따라서 병징 차이만으로 시들음병의 저항성 정도를 판단하기에 어려움이 있으므로, 2차년도에 확립된 시들음병 Biomass 측정 방법을 통해 시들음병에 대한 6가지 품종의 저항성을 평가하였다(그림 2-10).

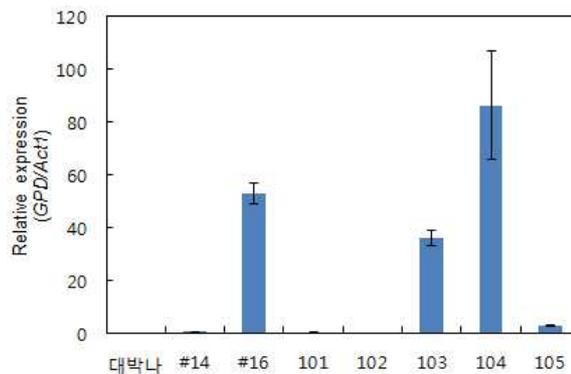


그림 2-10. 시들음병 처리후 19일후 양배추 내 F.oxysporum biomass 정량

- ㉔ 시들음병 biomass를 측정하기 위하여 시들음병 처리 19일째 양배추 shoots 시료에서 genomic DNA를 분리하여 *F. oxysporum* Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GPD) 그리고 양배추 iASK 특이적인 oligomer를 이용하여 Q-PCR을 수행하였다.
- ㉔ Fungal biomass 측정 결과 감수성인 #16(106), 103, 104에서 biomass 양이 현저하게 높아지는 것을 확인함으로써, 시들음병에 대한 저항성 품종과 감수성 품종을 확연히 구분할 수 있었다.

④ 전사체 비교 분석을 통한 시들음병 특이적인 발현 유전자 marker

- ㉠ 병원균과 저항성 기주의 초고밀도 발현체 분석을 위해서 시들음병 저항성 3품종(101, 102, 105)과 감수성 2품종(104, 106)을 soil에서 발아시킨 후 14일 동안 키운 후 *F. oxysporum f. sp. conglutinans*을 2×10^7 spore/ml 농도로 병 처리하여 3일 후 지상부 조직을 채취하여 RNA를 분리하여 RNA-seq을 수행하여 분석 하였다
- ㉡ 저항성 품종 특이 up regulation 유전자군: At5g39670 like 유전자와 기능이 알려져 있지 않은 unknown는 KR518에서 up regulation 반면 HY164 에서는 감소하는 발현을 보이고 Methallothionein type 3 유전자는 두 품종에서 모두 시들음병에 induction 되고 mock과 비교해서 저항성 품종에서 더 높은 발현을 보인다 (그림 2-11).

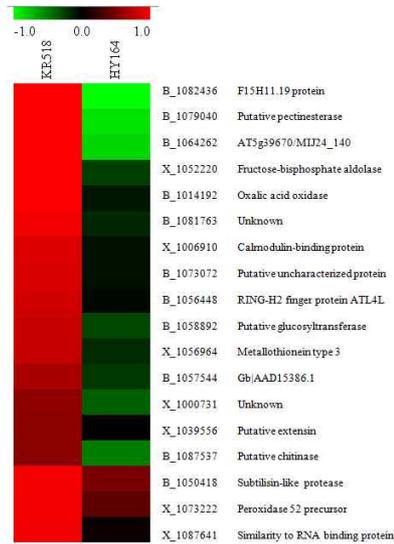


그림 2-11. 시들음병 저항성 품종에서 특이적으로 Up-regulation 하는 유전자 후보군

- ㉢ 시들음병 저항성 신호전달 유전자군: 후보 유전자 중에서 62%로 가장 높은 빈도율을 보였고 크게 4가지의 발현 형태로 관찰 되었다. 1. B_1071655 : 저항성 감수성 모두에서 높은 발현 2. X_1013192 : 감수성에서만 낮은 발현 3. B_1006616 : 저항성에서 높고 감수성에서는 낮은 발현 4. B_1020118 저항성 감수성 모두에서 낮은 발현을 보였다. 이러한 결과는 RNA-seq 결과와도 일치하는 것으로 저항성과 감수성 품종 그리고 시들음병 특이적인 발현체에서 NBS and leucine-rich repeat(LRR), ser/thr protein kinase, receptor like 유전자들을 확인하였다 (그림 2-12, 2-13).

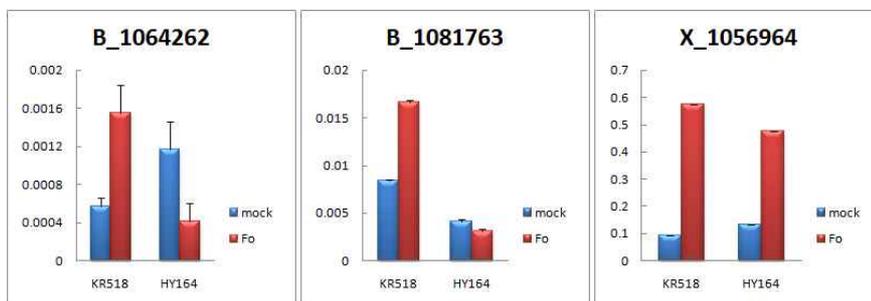


그림 2-12. 저항성 품종 특이 up regulation 유전자군

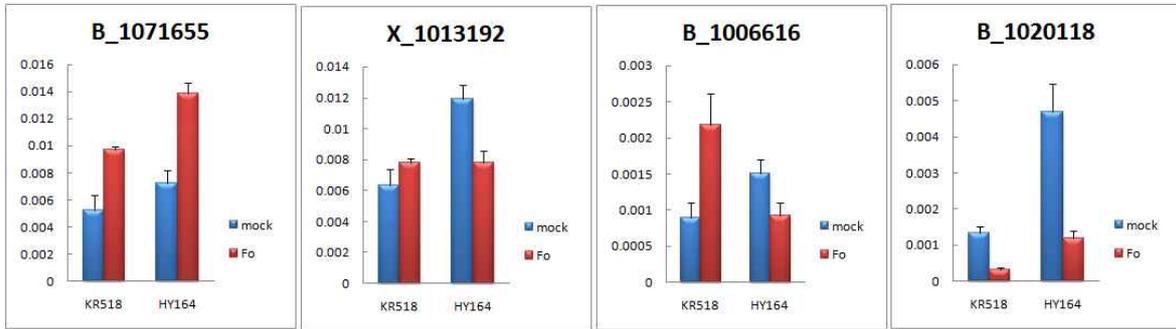


그림 2-13. 시들음병 저항성 신호전달 유전자군

라) Disease resistance 유전자군 (□ : up-regulation □ : down-regulation)

Probe ID	description	KR518	HY164
B_1071655	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	Red	Red
B_1001121	Receptor-like protein kinase	Red	Red
B_1072936	Leucine-rich repeat disease resistance protein-like	Red	Red
B_1057436	Cyclin-dependent protein kinase-like protein	Red	Blue
B_1007018	CIPK8 (CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE8)	Red	Blue
B_1073837	Cysteine-rich antifungal protein 3 precursor	Red	Blue
B_1006616	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 10 precursor	Red	Blue
X_1044223	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 41 precursor	Red	Blue
B_1068061	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 41 precursor	Red	Blue
B_1086500	Putative receptor-like protein kinase	Red	Blue
X_1013192	Putative receptor-like protein kinase	Red	Blue
B_1044362	Leucine-rich repeat disease resistance protein-like	Red	Blue
B_1020118	Protein kinase	Blue	Blue
B_1018411	Disease resistance protein-like	Red	Blue
B_1073107	Disease resistance protein-like	Red	Blue
B_1035032	Disease resistance protein-like	Red	Blue
B_1002247	Disease resistance protein-like	Red	Blue
B_1073763	Putative disease resistance protein	Red	Blue
B_1039357	Disease resistance protein-like	Red	Blue

마) 병원체와 식물의 interaction이 일어나서 식물의 해당 수용체(pattern recognition receptors, PRRs)와 상호 결합하면 PTI 및 basal resistance가 활성화된다. 식물의 저항성 유전자들은 넓은 범위의 병 저항성을 지속적으로 유지할 수 있다. 이러한 이유로 KR518 저항성 품종은 시들음 병에 강한 품종으로 육종된 것이므로 Fusarium oxysporum이 침입해 들어오면 병 저항성이 일어나고 관련 유전자의 발현이 높아 질 것이다. 기존 알려진 disease resistance 유전자는 아주 중요한 후보군이며 발현의 pattern도 저항성 품종에서는 up regulation, 감수성 품종에서는 down regulation으로 관찰되었다 (그림 2-14).

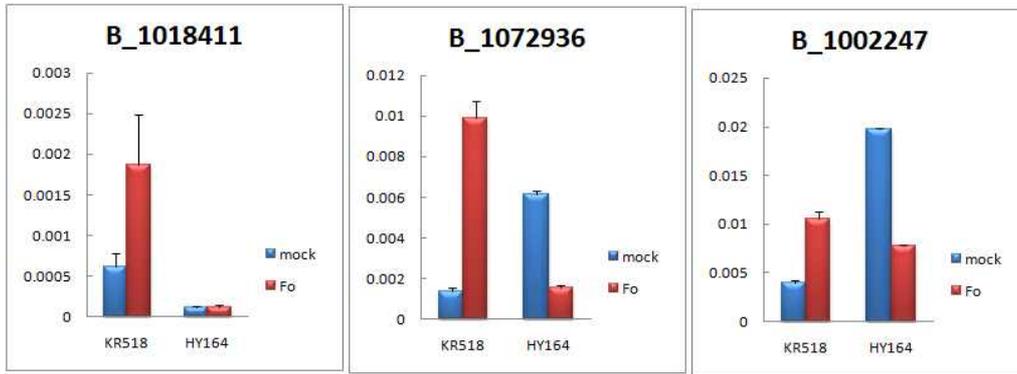


그림 2-14. Disease resistance 유전자군

㉞ 조직 특이적인 저항성 유전자 marker (그림 2-15)

㉞. Pathogenesis 유전자로 알려져 있는 Thaumatin like protein은 저항성 품종에서 up regulation 되는데 shoot 조직에서 보다 root 조직에서 더 높은 발현을 보이고, b-glucosidase precursor 유전자는 감수성 품종 shoot 조직에서 높은 발현을 나타내고 있다.

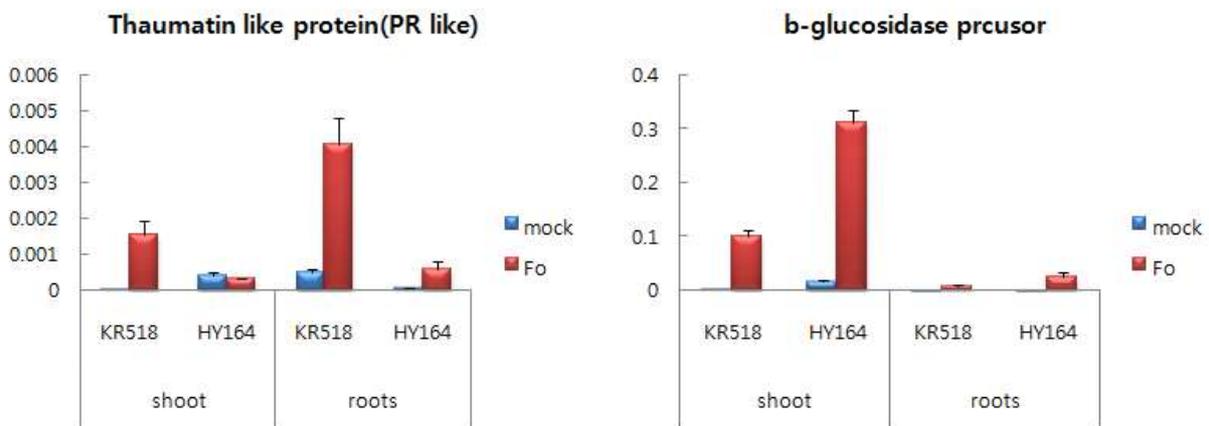


그림 2-15. 시들음병 저항성 품종 KR518과 감수성 품종 HY164 조직 특이적인 발현을 나타내는 유전자

⑤ 실험적으로 검증된 뿌리혹병 발현 마커

- ㉞ 발현체 연구(DNA chip) 결과로부터 도출된 뿌리혹병 관련 shoot 328개, root 261개 유전자를 이용한 생물정보 분석 실행.
- ㉞ 70개 유전자에 대한 primer를 합성; 저항성 유전자군과, 호르몬 관련 유전자군에서 발현 차이 정도와 putative 단백질 기능의 중요도에 따라 개별 유전자의 Q-RT-PCR 프라이머를 제작
- ㉞ 32개의 프라이머 세트에서 1차 병 처리구 실험 셋트에서 발현특이 패턴을 확인 함.

표 2-4. 실험적으로 검증된 뿌리혹병 특이 발현 마커 유전자 list

No/ Probe ID	No/ Probe ID
X_1070916	at1g19300 contributes to xylan biosynthesis
B_1062030	Auxin efflux carrier component 7
B_1082288	Auxin response factor 10
B_1087950	Auxin response factor 16
B_1084899	Putative auxin-regulated protein
X_1001352	Basic endochitinase CHB4 precursor
B_1086646	Endochitinase isolog
X_1000622	Ethylene-responsive transcription factor 1A
B_1077992	Ethylene-responsive transcription factor ABA REPRESSOR 1
B_1086006	Ethylene-responsive transcriptional coactivator-like protein
B_1044362	Leucine-rich repeat disease resistance protein-like
B_1067685	RPP13LIKE
B_1079885	Pathogenesis-related protein 1
B_1008599	Pathogenesis-related protein 5 precursor
B_1078882	pectate 14 precursor
B_1060626	Peroxidase
B_1075161	Peroxidase 54 precursor
B_1001617	Peroxidase 58 precursor
B_1006616	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 10 precursor
B_1086500	Putative receptor-like protein kinase
X_1013192s	Putative receptor-like protein kinase
B_1001121s	Receptor-like protein kinase
B_1015316	Serine/threonine-protein kinase bub1,checkpoint-associated-like protein
B_1045276	Wall-associated receptor kinase 4 precursor
B_1067701	Wall-associated receptor kinase-like 8 precursor
B_1085393	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit
X_1001627	Flavonol-3-O-glycoside-7-O-glucosyltransferase 1
X_1020459	Flavonol-3-O-glycoside-7-O-glucosyltransferase 1
B_1071367	Sucrose-phosphate synthase-like protein
B_1076111	Sucrose-phosphate synthase-like protein
X_1080842	RING-H2 zinc finger protein RHA2b
B_1005800	Glutamine synthetase, chloroplast precursor

- ㉠ 발현체 분석에 사용된 실험군 외의 다른 품종에서도 32개의 프라이머 셋트가 발현마커로 활용 될 수 있는 지 확인하기 위해 2개의 저항성 라인 (YCR, Sungam), 2개의 감수성 라인 (CT-38, CT-12), 상업적으로 판매되고 있는 감수성 식물체 2개 (Dabakna, Ohjora)를 추가하여 6개의 샘플에서 병 처리 전 후 RNA 분리
- ㉡ 32개의 primer 중 15개의 primer 셋트 실험에서 2개의 저항성 품종, 2개의 감수성 품종 간에 유사한 발현 패턴이 관찰 됨.

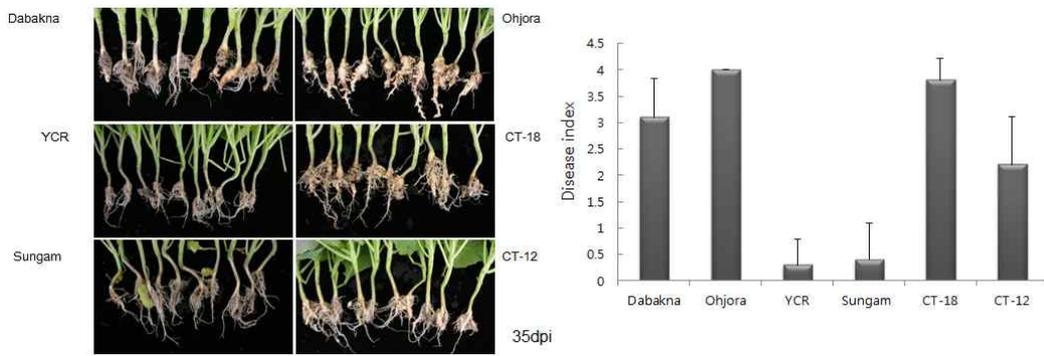
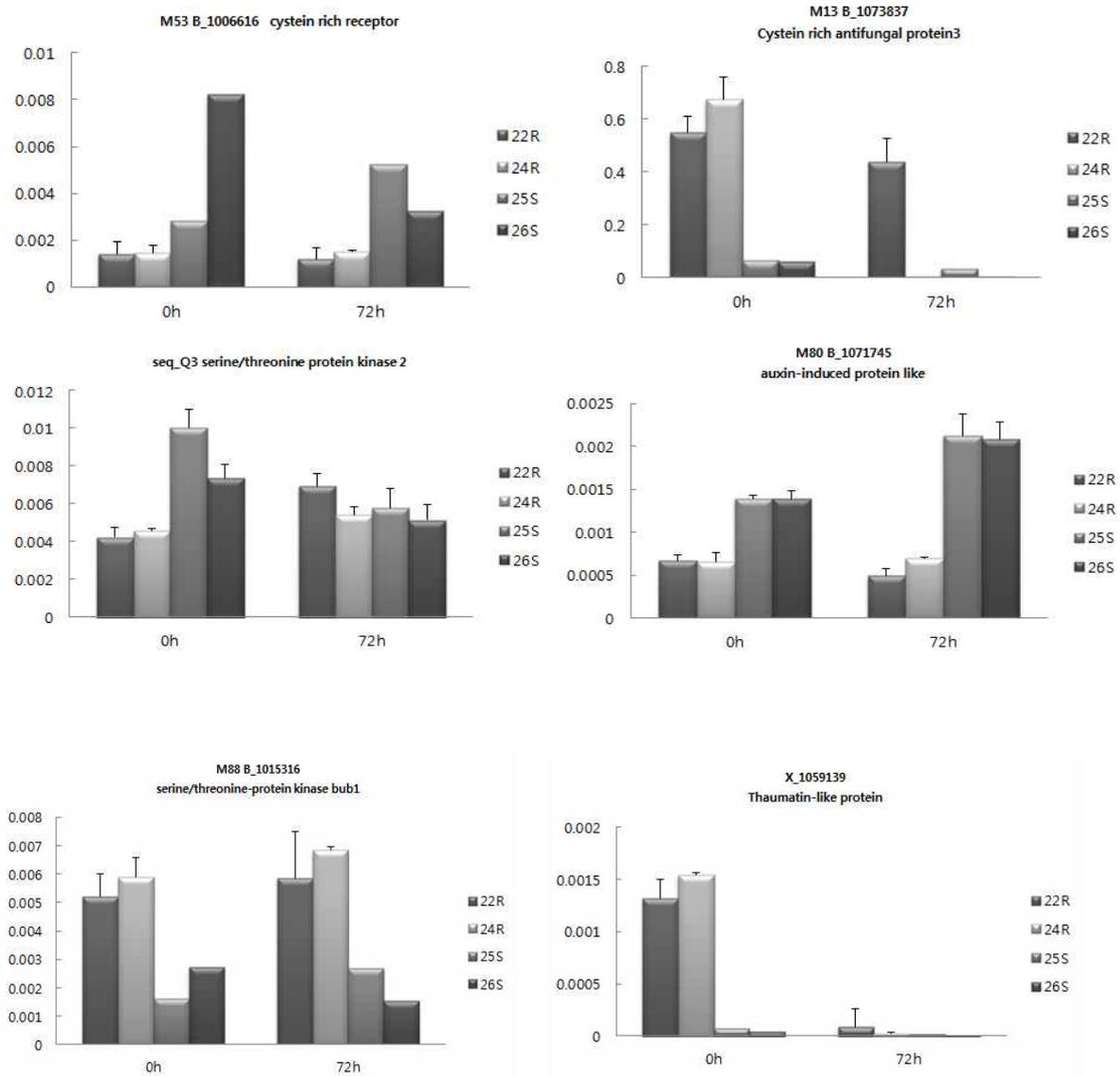


그림 2-16. 6개 양배추의 뿌리혹병 처리 후의 병징



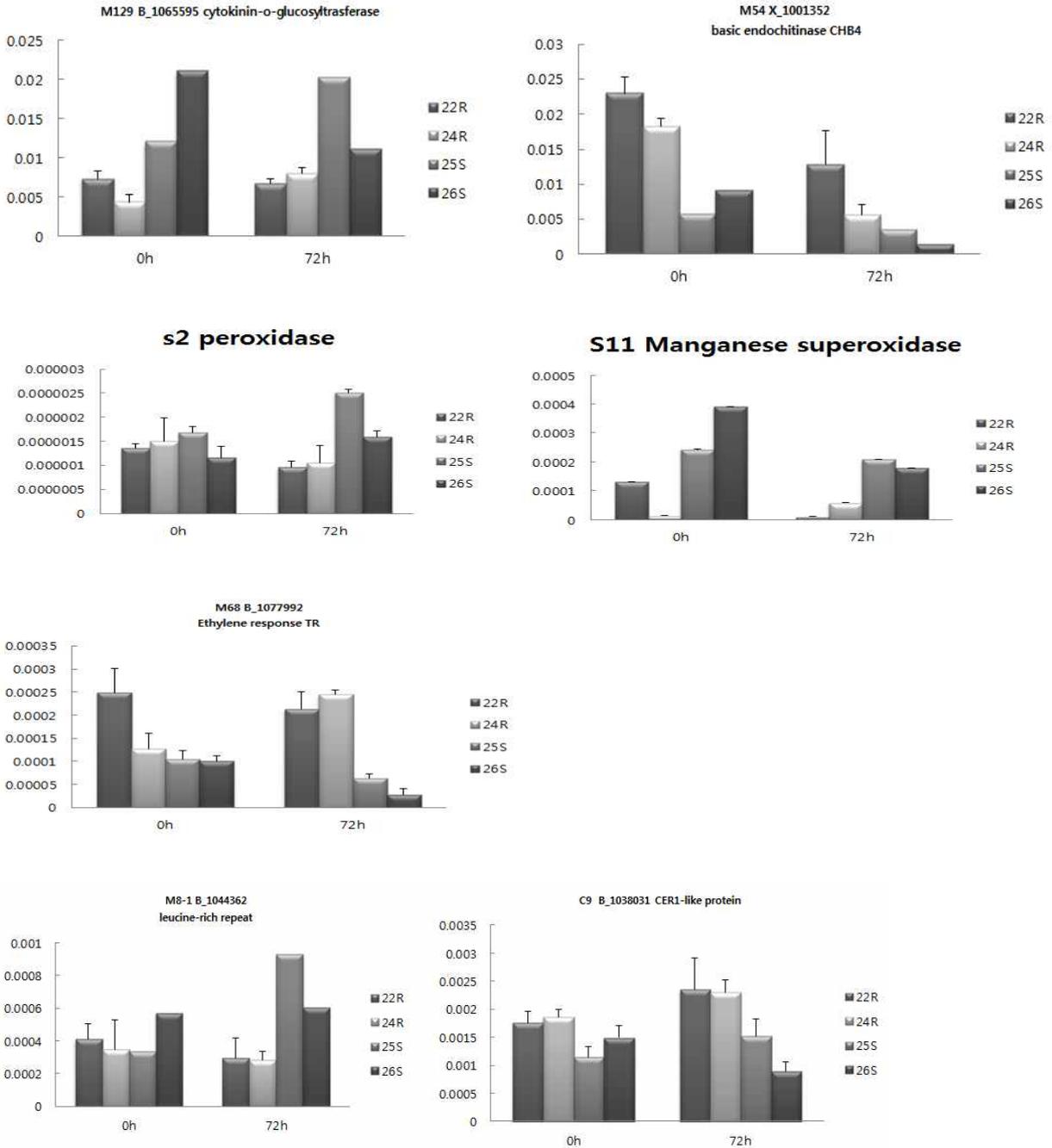


그림 2-17. 4개의 양배추 품종에서 뿌리혹병 관련 특이발현이 확인된 마커

⑥ 전사체 비교 분석을 통한 뿌리혹병 특이적인 발현 유전자 marker

㉞ YCR 이념(뿌리혹병 저항성 품종) 그리고 CT-18(뿌리혹병 감수성 품종)을 선별하여 Brassica microarray를 이용하여 시들음병과 뿌리혹병 저항성 계통의 발현 profile을 분석하였다. 시들음병은 mock과 *F. oxysporum* 처리 3일째에 뿌리혹병은 *P. brassicae* 처리 5일째에 roots과 shoots 부분으로 나누어서 RNA를 분리하여, agilent brassica 105k (napus, rapa, oleracea) chip 분석을 수행하였다.

㉔ 뿌리혹병 저항성 품종 YCR과 감수성 품종 CT-18을 Agilent Brassica chip 분석 후 유전자의 up-down regulation profiling을 MAPMAN software analysis를 이용하여 뿌리혹병에 의한 특이적인 품종간의 발현을 관찰 할 수 있었다(그림 2-18). 관찰된 pattern으로 뿌리혹병 저항성 유전자 후보군을 선택하여 qPCR을 통해 확인하였다.

㉕ 뿌리혹병 호르몬관련 유전자군

ㄱ. 시들음병과는 달리 뿌리혹병 호르몬 유전자 발현 profiling은 저항성 품종과 감수성 품종에서 뚜렷하게 up-down regulation이 관찰 되었다. Auxin은 저항성 품종에서 Auxin-induced protein의 up regulation이 감수성 품종에서는 down regulation의 유전자를 확인했고, ethylene-responsive transcription factor, cytokinin response factor 3, Ethylene-responsive transcription factor ERF019 유전자들이 뿌리혹병 감수성에서 특이적으로 발현이 높음을 알 수 있다 (그림 2-18).

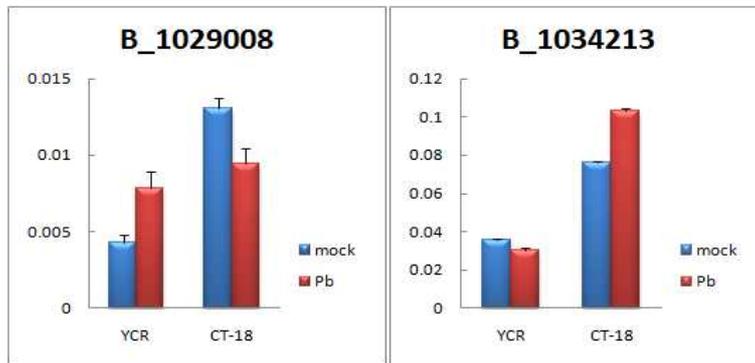


그림 2-18. 뿌리혹병 호르몬관련 유전자군

(□ : up-regulation □ : down-regulation)

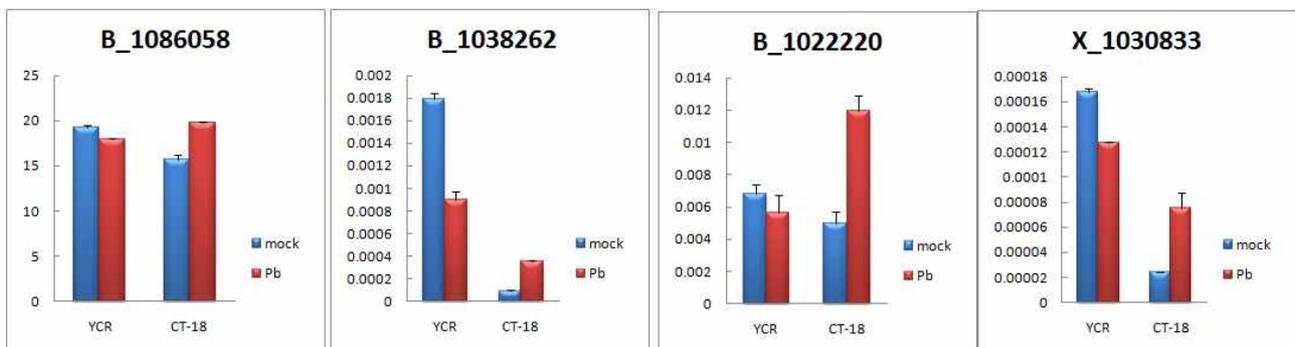
Probe ID	description	YCR	CT-18
B_1029008	Auxin-induced protein, putative		
B_1065997	Auxin-induced protein-like		
B_1071745	Auxin-induced protein-like		
B_1078760	Auxin-induced protein-like		
B_1051208	Putative auxin-induced protein		
B_1034213	AP2-like ethylene-responsive transcription factor		
B_1059993	Ethylene-responsive transcription factor cytokinin response factor 3		
B_1018910	Ethylene-responsive transcription factor cytokinin response factor 3		
X_1045902	Ethylene-responsive transcription factor ERF019		
B_1004244	Ethylene-responsive transcription factor ERF061		
B_1058248	Ethylene-responsive transcription factor ERF109		

㉔ 뿌리혹병 저항성 신호전달 유전자군

ㄱ. 양배추의 품종 육종에서 self-incompatibility-locus 기능을 가진 glycoproteins (SLG)은 extracellular S-domain을 가지고 S-locus receptor kinase(SRK)와 유사하다. S-domain은 12개 conserved cysteine residues을 가진다. 이러 이유로 양배추에서는 receptor kinase(SRK)는 물리적으로 S locus와 연관되어 있고, 또한 S-RLK(receptor like kinase)중 plant defense response에 관여한 보고도 있다. B_1067908는 S-locus protein kinase로 저항성 품종에서 특이적으로 up-regulation 되었고, Cysteine-rich receptor 또한 뿌리혹병에 특이적으로 발현함을 알 수 있으며 이러한 이유로 S-locus protein kinase 뿌리혹병 유전자 marker의 중요한 후보군이다.

(□ : up-regulation □ : down-regulation)

Probe ID	description	YCR	CT-18
B_1039357	Disease resistance protein-like		
B_1026138	leucine-rich repeat family protein		
B_1059738	Serine/threonine protein kinase-like protein		
B_1067908	S-locus protein kinase, putative		
B_1018411	Disease resistance protein-like		
B_1072936	Leucine-rich repeat disease resistance protein-like		
B_1061594	Putative disease resistance protein		
B_1073837	Cysteine-rich antifungal protein 3 precursor		
B_1044362	Leucine-rich repeat disease resistance protein-like		
B_1067685	RPP13 like		
B_1006616	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 10 precursor		
B_1086500	Putative receptor-like protein kinase		
X_1013192	Putative receptor-like protein kinase		
B_1001121	Receptor-like protein kinase		
B_1015316	Serine/threonine-proteinkinase		



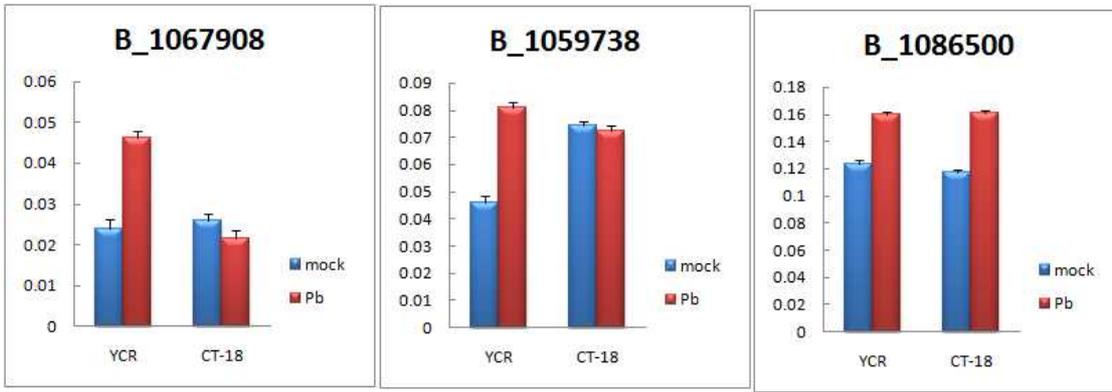


그림 2-19. 뿌리혹병 저항성 신호전달 유전자군

㉔ 뿌리혹병 감수성 특이 up-regulation 유전자군

ㄱ. 뿌리혹병은 뿌리에 *Plasmodiophora brassicae*가 침입하여 뿌리혹을 만드는 것으로 병원균에 의한 감수성 품종의 뿌리혹 형성과정으로 저항성 품종보다 2차 대사산물의 변화가 많을 것이다. 또한 뿌리에 형성되는 2차 대사산물의 변화는 지상부의 저항성 품종과는 다른 유전자 발현을 유도 할 것이다. Chip 분석을 통해서 감수성 지상부 조직에서 특이적으로 ATP synthase, flavonoid synthase, terpenoid synthase, Superoxide dismutase [Cu-Zn] 그리고 methyltransferase 유전자가 up regulation 되었고, 이것은 뿌리혹병에 의한 감수성 품종에서 특이적으로 발현되는 유전자임을 알 수 있다.

(□ : up-regulation □ : down-regulation)

Probe ID	description	YCR	CT-18
B_1046618	ATP synthase subunit alpha	■	
B_1086058	ATP-dependent protease subunit	■	■
B_1038262	Cytokinin-O-glucosyltransferase 1	■	■
B_1022220	AT1G19540 flavonoid synthase	■	■
X_1030833	Putative S-linalool synthase Terpenoid synthase	■	■
B_1038031	CER1-like protein	■	■
B_1059889	Superoxide dismutase [Cu-Zn]		■
B_1075927	Superoxide dismutase [Cu-Zn]		■
B_1032853	Superoxide dismutase [Cu-Zn]		■
X_1017949	Superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplast precursor		■
B_1016315	Superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplast precursor		■
B_1071915	methyltransferase	■	■
B_1026673	O-methyltransferasefamily 2 protein		■

⑦ 병 저항성 domain 가진 특이 발현 마커 검증

- ㉠ 대부분의 식물의 disease resistance(R) protein의 경우 leucine-rich-repeats(LRRs), nucleotide binding site(NBS)와 signaling domain으로 예상되는 amino-terminal domain 등으로 이루어져 있다. 토마토에 병을 일으키는 *F. oxysporum f. sp. Lycopersici race 2*에 대한 토마토 저항성 유전자인 *I-2*는 NBS - LRR protein을 인코딩 하는 것으로 알려져 있으며, 멜론에 병을 일으키는 *F. oxysporum f. sp. melonis*에 대한 저항성 유전자인 *Fom-1* 와 *Fom-2*의 경우 각각 TIR - NBS - LRR protein과 NBS - LRR proteins을 인코딩 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 양배추에 시들음병을 일으키는 *Fusarium oxysporium f. sp. Conglutinans*에 대한 저항성 유전자를 탐색하기 위해 3차년도에 확보된 양배추 시들음병 특이 발현 유전자 중, 십자화과인 아라비도시스의 TIR-NBS-LRR disease resistance protein과 높은 상동성을 보이는 유전자에 대한 연구를 진행하였다.
- ㉡ 3차년도에 선별된 NBS-LRR domain을 갖는 유전자 그룹 중 시들음병 저항성 품종에서 특이적으로 up regulation하는 발현체를 후보 유전자로 선정하고, 31개의 유전자에 대한 프라이머를 제작하여, 시들음병에 대한 병징 반응을 관찰한 6가지 품종의 양배추를 대상으로, 병처리 후 8일째 shoot 시료를 이용하여 RNA를 추출하고 cDNA를 합성한 후 RT-PCR을 실행하여 유전자의 발현 유무를 실험하였다 (그림 2-20).
- ㉢ BoFc50, BoFc55, BoFc57, BoFc73, BoFc77 마커 등이 저항성 양배추에서는 발현하고 감수성 양배추 에서는 발현하지 않는 것을 확인하였다.
- ㉣ 검증된 저항성 특이 발현 마커 연구
 - ㄱ. 3차년도와 4차년도에서 선별된 병 저항성 NBS-LRR domain을 갖는 특이 발현 마커에 대해 genomic DNA와 cDNA 수준에서 시들음병 저항성 품종과 감수성 품종간의 유전자 존재 유무의 차이와 발현 유무를 비교하였다.
 - ㄴ. 특이 마커의 프라이머를 이용하여 증폭된 밴드를 클로닝 한 후 시퀀싱 하여 BoFc12 마커와 BoFc50 마커의 염기서열을 얻었으며 , NCBI BlastX 검색 결과는 <표 2-5>에 표기하였다.

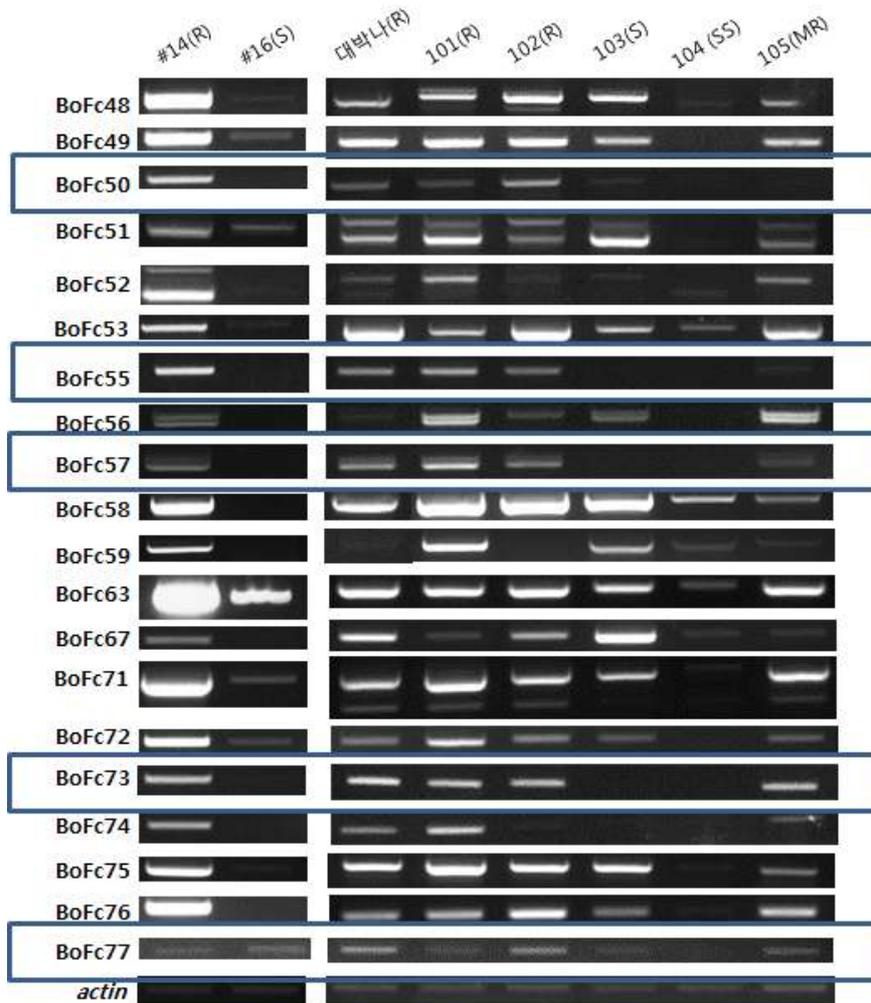


그림 2-20. NBS-LRR domain 갖는 시들음병 특이 발현 마커 검증

표 2-5. 병저항성 특이 마커 유전자 list

Primers	Predicted gene names	Blastx
BoFc12	TIR-NBS-LRR class disease resistance protein [Arabidopsis thaliana]	TIR-NBS-LRR class disease resistance protein [Arabidopsis thaliana]
		PREDICTED: putative disease resistance protein At4g11170 [Camelina sativa]
BoFc50	TIR-NBS-LRR class disease resistance protein [Arabidopsis thaliana]	TIR-NBS-LRR class disease resistance protein [Arabidopsis thaliana]
		disease resistance protein [Brassica rapa subsp. pekinensis]

ㄷ. BoFc12

1. BoFc12 마커의 경우 3차년도 병저항성 마커 검증 시 감수성 #16에 비해 저항성 #14에서의 유전자 발현이 높아지는 것을 Q-RT-PCR 실험을 통해 확인한 바 있다. 따라서 4차년도에는 이러한 발현 차이를 다른 저항성, 감수성 양배추 품종과 함께 PCR과 RT-PCR 실험을 통해 검증하였다. genomic DNA에서 감수성 품종인 #16이 저항성에 비해 증폭 정도가 약하지만 증폭이 되는 것을 확인하였으나, cDNA에서는 #16에서 BoFc12 마커가 증폭되지 않은 것을 확인하였다. 따라서 #16에서 BoFc12 유전자의 염기서열은 존재하나 실제로 발현하지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. 반면 다른 감수성 품종인 104번의 경우 BoFc12 마커의 발현이 확인되었으며, 따라서 병저항성 특이 발현 마커의 후보에서 제외하였다 (그림 2-21).

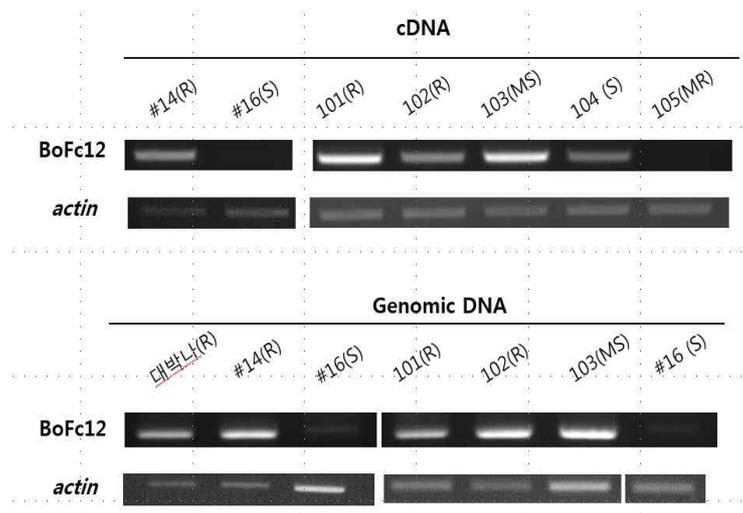


그림 2-21. 양배추 병처리 8일 후 BoFc12마커의 발현

ㄹ. BoFc50

1. BoFc50 마커는 4차년도에 수행한 6가지 양배추 저항성 감수성 품종에 대한 RT-PCR 수행 결과에서, 저항성 품종에서는 BoFc50 특이 마커가 증폭됨을 확인하였으나, 감수성 품종에서는 증폭이 되지 않음을 확인하였다 (그림 2-22). 또한 브로콜리 Shoot 시료로 RNA를 추출하여 RT-PCR을 실행하였을 때도 BoFc50 마커를 이용해 시들음병에 대한 저항성 품종과 감수성 품종을 구분할 수 있음을 확인하였다. 따라서 BoFc50 마커는 브로콜리의 시들음병 저항성, 감수성 품종을 구분할 수 있는 마커일 것으로 사료된다.
2. BoFc12 마커 검증 실험에서 genomic DNA에는 유전자가 존재하나 실제로 발현이 일어나지 않는 경우를 관찰한 바 있으므로, BoFc50 마커의 검증시에도 genomic DNA에서 PCR을 실행하여 저항성 유전자의 유무를 추가로 확인하였다. 양배추의 경우 저항성 104 품종은 genome 상에 BoFc50 유전자를 가지고 있으나 실제로 발현은 일어나지 않는 것으로 보이며, 브로콜리 감수성 품종인 A302B는 genome에 BoFc50 유전자를 보유하지 않는 것으로 생각된다.

3. 이러한 결과로 BoFc50 마커를 이용하여 시들음병 처리시 양배추와 브로콜리의 저항성과 감수성 품종에서 BoFc50 유전자의 발현을 비교함으로써 시들음병이 진행되지 않은 초기에 양배추와 브로콜리 저항성, 감수성 품종을 구분 할 수 있을 것이라 사료된다.
4. BoFc50 마커를 *Brassica Oleracea* TIR-NBS-LRR Resistance(R) gene-50 (BoTNR-50)의 이름으로 명명하고 특허를 출원 함.

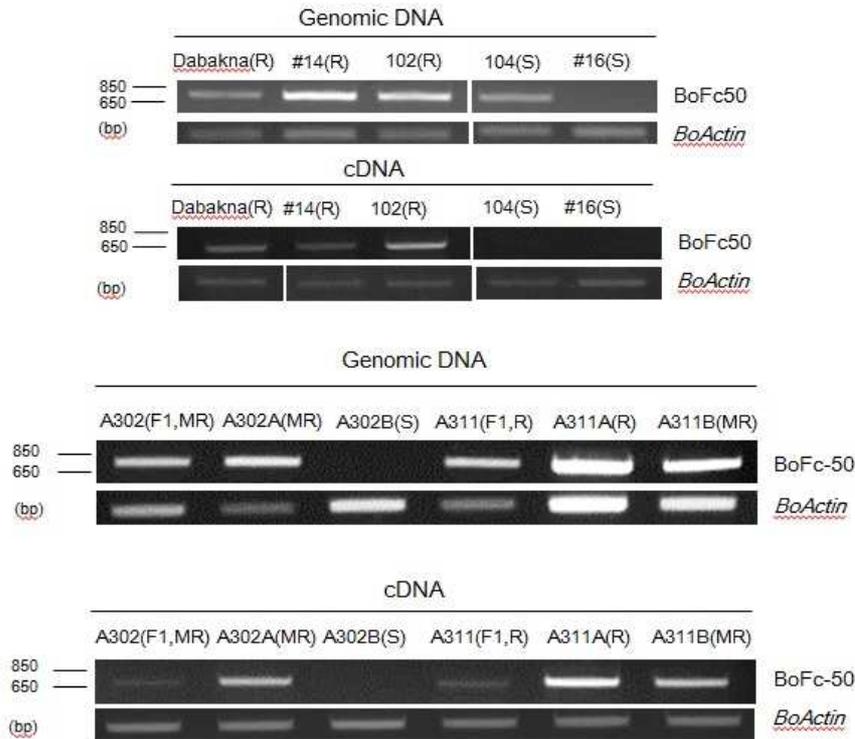


그림 2-22. 양배추와 브로콜리에서의 BoFc50 마커 발현

㉔ 양배추 시들음병 유전자 *FacBo1*에 관한 연구

ㄱ. 최근 양배추의 시들음병을 조절하는 것으로 여겨지는 *FacBo1* 라는 저항성 유전인자에 대한 연구 내용이 발표되었다. Pu et al. (2012)은 시들음병 저항성 양배추와 감수성 브로콜리를 교잡, 이들의 자손 세대에서 시들음병에 대한 표현형을 관찰하여, 시들음병 저항성을 조절할 것으로 예상되는 단일 우성 대립 유전자를 발견하고 이를 *FacBo1*이라 명명하였다 (Pu et al. 2012). 그리고 *FacBo1* 유전자를 토대로 시들음병 저항성 양배추를 구분 할 수 있는 분자 마커인 MTK-C에 대한 연구결과를 발표하였다. MTK-C를 이용하여 일본에서 상업적으로 이용되고 있는 양배추 품종의 genomic DNA로부터 *FacBo1* 유전자의 존재를 확인 한 결과, 모든 저항성 품종에서는 MTK-C에 의해 증폭된 DNA 조각이 확인 되지만 감수성에서는 확인되지 않았다(Shimizu et al. 2015). 그러나 국내에서 보유한 양배추 품종에서 *FacBo1* 유전자에 의해서 시들음병이 조절되는지에 대한 연구는 이루어진 바가 없으므로, 시들음병에 대한 반응성이 확인된 6가지 양배추 품종에 MTK-C 마커를 적용하여 *FacBo1* 유전자와의 상관관계를 확인하였다.

ㄴ. MTK-C 마커를 이용한 시들음병 표현형과 저항성 유전자 간 상관관계 분석

1. 먼저 MTK-C 마커로 PCR과 RT-PCR을 실시하여, 양배추 유전자 상에 *FocBo1* 유전자를 보유하고 있는지 확인하였다 (그림 2-16). 실험에 사용된 6가지 양배추 품종은 병처리 후 8일째 Shoot 시료를 이용하여 genomic DNA와 RNA를 추출하였다. 양배추 genomic DNA수준에서는 MTK-C 마커에 의해 모든 저항성 양배추에서 단일 밴드가 증폭되었다. 시들음병 감수성 양배추인 103, 104 품종에서는 밴드가 증폭되지 않았으나 감수성인 106 품종에서 저항성과 동일한 패턴의 밴드가 증폭되었다. 따라서 MTK-C 마커에 의해 증폭된 염기서열에서 저항성 품종과 106 품종과의 차이를 확인하기 위하여 증폭 산물을 클로닝하여 염기서열을 확인하였으나, 염기서열에서 두 품종간의 차이는 보이지 않았다.

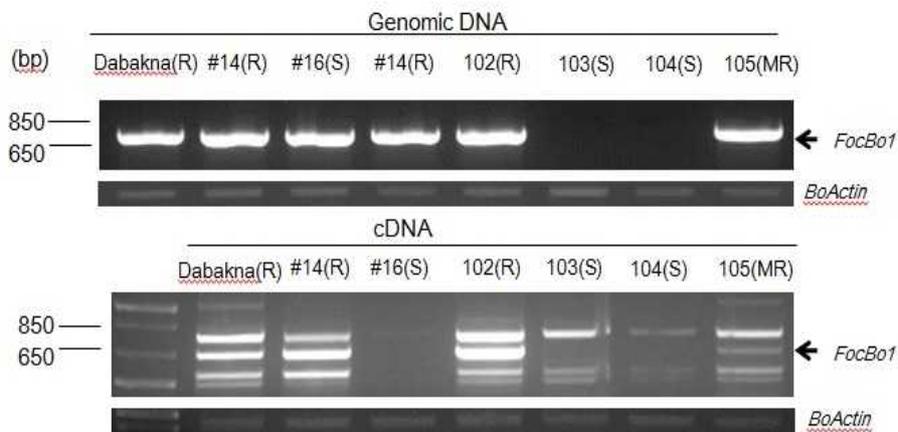


그림 2-23. 병처리 8일 후 6가지 양배추 품종의 MTK-C 마커 발현

2. 시들음병 저항성 유전자가 genomic DNA에는 존재하고 있음은 검증하였으나 실제로 발현하고 있는지를 확인하기 위하여 cDNA수준에서 MTK-C 마커를 검증하였다. 그러나 (그림 2-24)과 같이 비특이적인 밴드가 다수 증폭되어 *FocBo1* 유전자로 예상되는 크기인 600 bp~800 bp 사이의 세개의 밴드를 클로닝하여 염기서열을 확인한 결과, 658 bp 크기의 밴드가 MTK-C 마커에 의해 증폭된 *FocBo1* 유전자 산물임을 확인하였다. 이 크기의 밴드는 시들음병 저항성 양배추 품종에서만 증폭됨을 확인하였으며, genomic DNA에서 밴드가 증폭되었던 106 품종에서 밴드가 증폭되지 않음을 확인하였다.

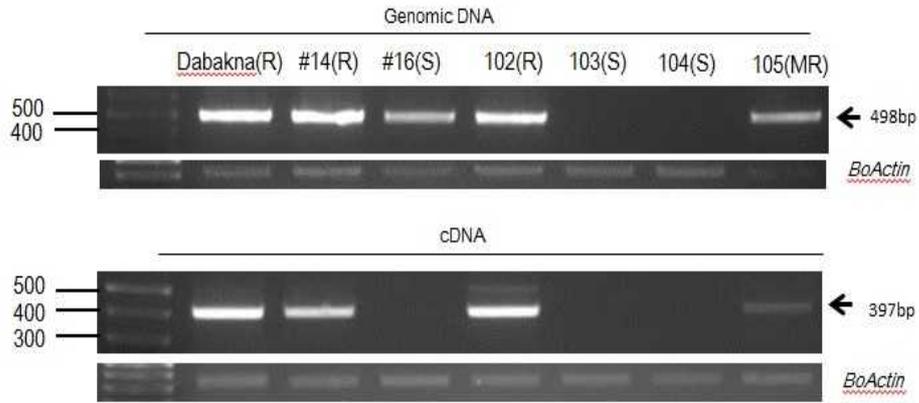


그림 2-24. 병처리 8일 후 6가지 양배추 품종의 FocBo1-C 마커 발현

ㄷ. FocBo1-C 마커 검증

1. MTK-C 프라이머 쌍을 이용하여 cDNA를 주형으로 RT-PCR을 수행 하였을 때 여러 크기의 비 특이적인 PCR 산물들이 확인됨으로, 저항성 품종인 #14(101)품종에서 MTK-C 마커에 의해 증폭되어 얻은 염기서열을 바탕으로 RT-PCR 수행 시 단일 밴드를 증폭할 수 있는 새로운 FocBo1-C 프라이머 쌍을 디자인하였으며, FocBo1-C 프라이머를 이용하여 6가지 육종 계통의 gDNA 및 cDNA에서 PCR을 수행하였을 때 약 400bp 크기의 FocBo1-C 프라이머 특이적인 단일 밴드를 확인할 수 있었다.

ㄹ. F2 식물체를 이용한 FocBo1-C 마커의 시들음병에 대한 병리검정

1. 시들음병 마커 검증을 위해 #14(저항성)X#16(감수성) 교배종 F1을 자가교배한 F2 종자를 아시아 종묘로부터 분양받아 병리검정을 실시하였다. 병리검정은 4차년도에 확립한 병리검정 방법을 이용하였다. 3차년도 F2 식물체의 병리검정에서 시들음병에 대한 복합적인 표현형을 보여 마커 검정에 어려움을 겪은 바 있으므로 biomass 측정을 함께 실시하여 표현형 병리검정을 보완하고자 하였다(그림 2-18). 시들음병에 대한 병조사와 biomass 측정은 시들음병 처리 후 19일째 식물체를 그 대상으로 하였다 (그림 2-25).
2. 대체로 시들음병에 대한 표현형과 biomass량은 서로 일치하는 결과를 보였다. 그러나 #7번 개체의 경우 표현형은 중도 저항성을 보였으나 곱팡이 생체량이 다른 중도 저항성 개체에 비해 높은 수치를 보였다.



그림 2-25. 시들음병 접종 후 19일째 F2 식물체

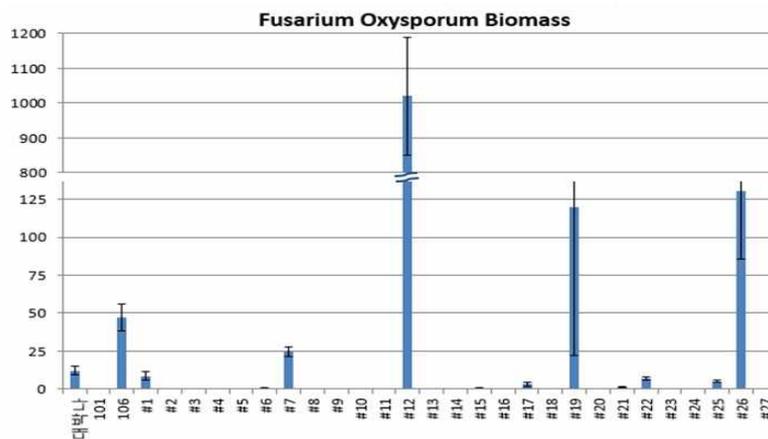


그림 2-26. 시들음병 접종 후 19일째 F2 식물체 내 biomass

㉑. F2 식물체를 이용한 FocBo1-C 검증 결과

1. 앞선 실험에서, 6가지 저항성, 감수성 양배추에서 FocBo1-C 마커를 검증한 결과, 감수성 #16 품종은 genomic DNA에 *FocBo1* 유전자를 보유하고 있으나 cDNA 수준에서 확인했을 때는 발현이 없는 것을 확인하였다. 따라서 F2 식물체에서의 FocBo1-C 마커 검증을 위해, 병처리 후 7일째 Shoot 시료에서 RNA를 추출한 후 cDNA를 합성하여 RT-PCR을 수행하였다 (그림 2-27).
2. FocBo1-C 마커 검정 결과, 표현형 병리검정과 biomass 측정 결과에서 강한 감수성을 보였던 #12, #19, #26의 세 개체에서 FocBo1-C 마커의 발현이 사라지는 것을 확인할 수 있었으며, 따라서 cDNA 수준에서 FocBo1-C 마커를 이용하여 F2 식물체에서도 시들음병 감수성 양배추를 구분 할 수 있을 것으로 보인다.
3. 이 결과로부터 FocBo1-C 마커를 이용하여 시들음병 처리시 양배추의 저항성과 감수성 품종에서 *FocBo1* 유전자의 발현을 비교 할 수 있고, FocBo1-C 마커로 병 처리시 저항성과 감수성 품종을 구분 할 수 있을 것이라 사료된다. 이로서 병의 증상이 발현되지 않은 초기 상태에서도 조기진단이 가능할 것으로 사료된다.

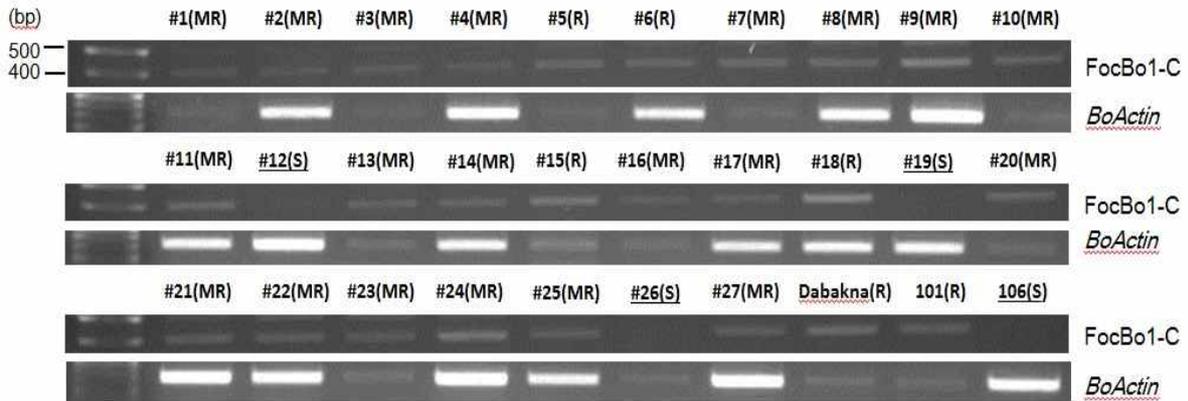


그림 2-27. 병처리 19일 후 F2 식물체의 FocBo1-C 마커 발현

나. 석회결핍 둔감형 검정용 연관 분자표지 개발

① DREB 유전자 발굴 및 발현 분자표지 개발

- ㉠ 양배추 유전체 정보에서 확보된 애기장대 DREB 유사 서열이 과제를 통해 확보한 양배추 발현유전체 정보에 포함되어 있는지 확인하였으며, 확보된 염기서열 정보는 다음과 같다 (표 2-6). 이들의 아미노산 서열에 DREB 유전자의 특징적인 domain인 AP2 domain을 가지고 있는지를 확인하기 위해 SMART 데이터베이스 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)를 이용하여 확인한 결과 선발한 양배추 유래 유전자가 AP2 domain을 갖고 있음을 확인 할 수 있었다(그림 2-28).
- ㉡ 확보된 양배추 DREB 유전자는 둔감형 계통에서 칼슘처리 유무에 따라 서로 다른 발현량을 나타내며, 둔감형 및 표준형 사이에서도 발현량의 차이를 나타내는 것을 확인 할 수 있었다 (표 2-7). 이러한 차이는 NGS 데이터의 in silico 분석에 의한 결과로 read counts의 차이를 나타낸다. 따라서 RT-PCR 등의 방법을 통해 해당 유전자의 발현이 조건 및 계통에 따라 다르게 나타나는지를 확인할 필요가 있다. 둔감형 계통을 대상으로 정상적인 칼슘처리 조건, 칼슘 무처리 후 9일 또는 정상조건에서 9일 생육 후 5일간 칼슘 무처리 조건에서 생육시킨 재료를 대상으로 RT-PCR을 수행하였다. 또한 표준형 계통을 대상으로도 동일한 조건에서 생육시킨 재료를 대상으로 분석하였다(그림 2-29).

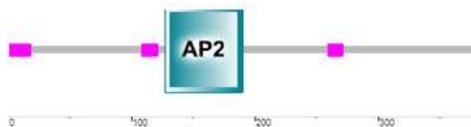
표 2-6. 애기장대 및 양배추 유래 DREB 유전자

TAIR ID	Description	Canada Bo ID	Cabbage ID
AT3G11020.1	DREB2B	Bol005881	Locus_3124
		Bol023176	Locus_8866
AT5G05410.1	DREB2A	Bo9g177130	Locus_10606
		Bo2g006960	Locus_48554
AT2G40350.1	DREB2H	Bol025408	Locus_14182
AT2G40340.1	DREB2C	Bol025408	Locus_14182
AT2G38340.1	DREB2E	Bol017795	locus_32148
AT1G75490.1	DREB2D	Bol039893	Locus_48350
		Bol039317	Locus_33546
		Bol027723	Locus_11254
AT3G57600.1	DREB2F	Bol011045	Locus_43430
		Bol045507	Locus_14391
AT2G40220.1	ABI4	Bol007544	Locus_46859

* 애기장대 DREB 유전자 아미노산 서열을 양배추 유전체 정보와 비교하여 확보함. 양배추 유전체 정보 유래 서열을 본 과제를 통해 확보한 전사체 정보와 비교하여 양배추 유전자 확보함.

>Locus_8866_2B_4

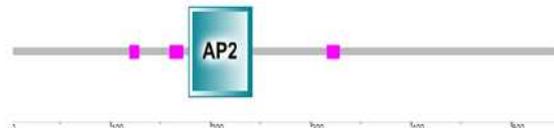
```
KLEKKRR+KKTRHSEEE+GIRITIVTRENTAEVEIRLEF+SYP SHWGFDFATAKKKMAIY
EQTGTDTSSKPKRSRARDGTTVADRLKKWKEYNDIVNKGENKPRRKVPKGSKKGC
MKGKGGPENHTCSFRGVRQRVWGKVVVAEIREPNRVSRLWLGTFPTAEAAASAYDEAA
KAMYGPLARLNFPEQCWASEFASTSQSEVCSSEVHKPVLGGDVCVTRDDAGSESR
QVSIQIRDNIRMSDDLDEFDEEYWGRRVSKIEKPKEGEEELTVADYGWSNDMLNEQ
DLWDPNEVFDVDELLGDIDECIMLTGTGVDEDQNGINPGGYDSHIPLEPHDGHFFD
LSSQDL+EC+GNEWSAVDSLNLNKR+VLMKRLTLT
```



Name	Start	End	E-value
low complexity	1	17	N/A
low complexity	108	120	N/A
AP2	127	190	5.95e-35
low complexity	259	270	N/A

>Locus_10606_2A_4

```
AQRKRTRNSEQGSDDSSAYKVSRLRTPP+LQFHYYVDLILEKWSSSELSRSIT+L+GSSNQ
IAMKSFKIESDSASCLRN+GVYIWCVAEV+TSSFCRVLLIGPRMAVYDHSGEINKTEF
DTTKKRSRSRREGITVADRIKMWKEYNDTVEESPSSKRRVPKGSKKGCMKGGGPENG
GCSFRGVRQRVWGKVVVAEIREPNRVSRLWLGTFPTAEKAAAAYDEAAKAMYGLARVNF
PQSCSVSDVASTSRSEVCTVEPPGVVRWKTEDVDCESRPFVDRVESEANAGEEEMKVD
ATVDIQGKDWLSELEQECWTGLLEEKQKLEKEIAAAGNFQRQPDLSVSDYGPWADLYQ
NQWDSSEMFVSELLGDLNGDIFTGNSNQNCCLGDNVGGGLPEPEKQQLQSLGSDYGF
PLQHEAKDGSDFDLFLNKN+D$GGAVGCLWIRLWLLSHE TLI+VFSIDIE TL TRU TPRI
KKENCICYCEIMLHTMKKLL+RCPASIVFCLESLLL+QEKKM+HWSQMGLNWNLMGLSV
SAEES+LTSWVLYICNC
```



Name	Start	End	E-value
low complexity	119	127	N/A
low complexity	159	171	N/A
AP2	178	241	5.27e-37
low complexity	316	327	N/A

그림 2-28. 양배추 발현유전체 정보에서 확보된 DREB 후보 유전자의 분석 결과 (AP2 domain 보유 여부 확인 분석)

표 2-7. 양배추 DREB 유전자의 칼슘 처리 유무 및 계통간 발현 차이 분석

TAIR ID	Description	Bo ID	Transcript ID	무처리/처리(둔감)	표준/둔감
AT3G11020.1	DREB2B	Bol005881	Locus_3124	0.59	1.70
		Bol023176	Locus_8866	0.13	-0.29
AT5G05410.1	DREB2A	Bo9g177130	Locus_10606	-1.00	0.16
		Bo2g006960	Locus_48554	0.54	2.57
AT2G40350.1	DREB2H	Bol025408	Locus_14182	-1.65	0.70
AT2G40340.1	DREB2C	Bol025408	Locus_14182	-1.65	0.70
AT2G38340.1	DREB2E	Bol017795	locus_32148	-0.42	-1.00
AT1G75490.1	DREB2D	Bol039893	Locus_48350	0.19	0.51
		Bol039317	Locus_33546	0.00	3.17
		Bol027723	Locus_11254	-0.65	-3.87
AT3G57600.1	DREB2F	Bol011045	Locus_43430	0.19	0.51
		Bol045507	Locus_14391	0.47	0.00
AT2G40220.1	ABI4	Bol007544	Locus_46859	-0.66	-0.20

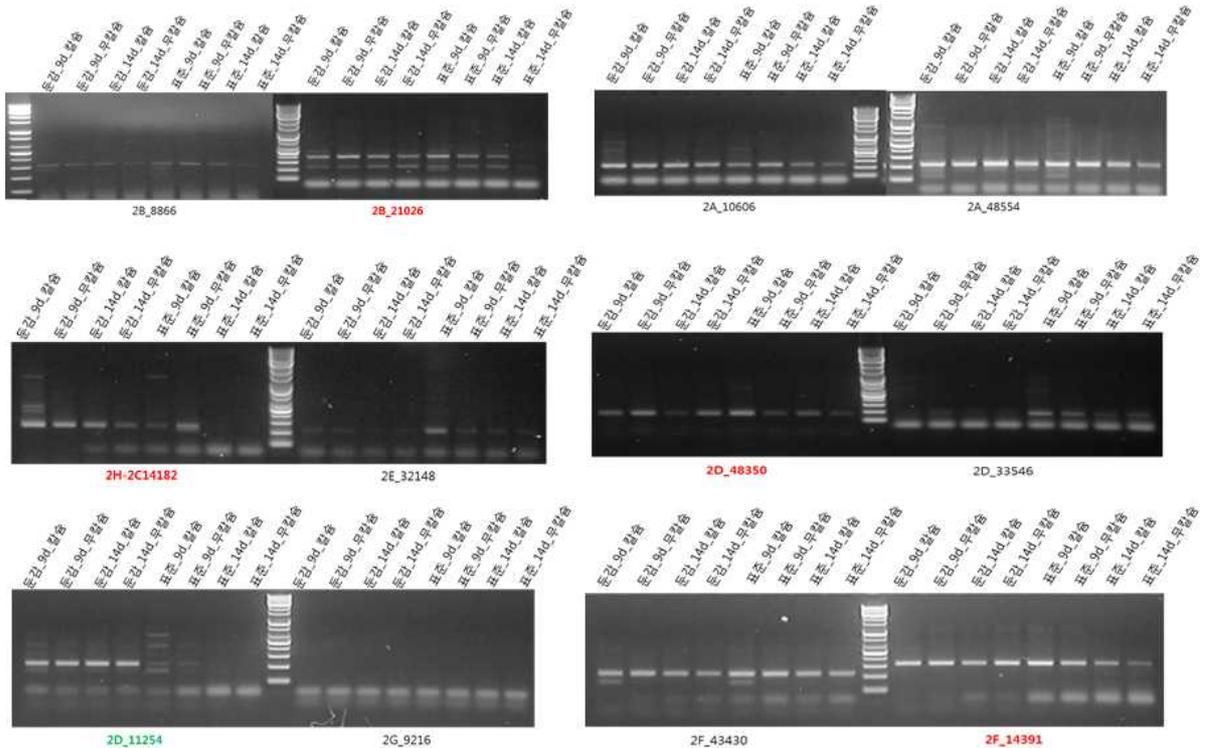


그림 2-29. RT-PCR을 통한 양배추에서 DREB 유전자의 조건(칼슘처리/무처리) 및 계통(둔감형/표준형)에 따른 발현 변화 분석

- ㉔ 위의 결과를 요약하면 <표 2-8>과 같이 정리할 수 있으며 후속연구를 통해 DREB 유전자와 석회결핍과의 관련성에 대한 정보를 확인할 수 있을 것으로 판단된다.

표 2-8. 양배추 DREB 유전자의 칼슘처리 조건 및 계통간 발현 변화

	1군 (9d 및 14d)			
	칼슘		무칼슘	
	둔>표	둔<표	둔>표	둔<표
2B_Locus_8866	-	-	-	-
2B_Locus_21026		○	○	
2A_Locus_10606	○		○	
2A_Locus_48554	-	-	-	-
2H-2C_Locus_14182	○		○	
2E_Locus_32148	-	-	-	-
2D_Locus_48350		○	○	
2D_Locus_33546		○		○
2D_Locus_11254	○		○	
2G_Locus_9216	-	-	-	-
2F_Locus_43430	-	-	-	-
2F_Locus_14391	-	○	○	
ABI4_Locus_46859		○	○	

다. 내서성 검정용 연관 분자표지 개발

① 내서성 모니터링용 분자표지 개발

- ㉔ 양배추 고온스트레스 관련 유전자의 정보분석을 통해 모니터링용 8개 유전자 선발 (표 2-9).
- ㉕ 각 계통 간 정상조건 및 고온스트레스 조건에서의 고온스트레스 관련 유전자 발현 분석
- ㄱ. 내서성이 강한 계통/품종 (1~5번)에서는 고온스트레스 조건에서만 유도되는 대부분의 유전자발현이 스트레스가 없는 정상조건 (24°C) 에서도 강하게 유도되는 특이성을 나타냄.
 - ㄴ. 고온스트레스 관련 유전자의 발현 정도와 내서성 형질의 일치됨을 확인함. (BoHSP101, BoHSP90, BoHSP81-2, BoHsFA 등) (그림 2-30).
 - ㄷ. 따라서 본 실험에 의해 내서성형질 모니터링을 위한 분자표지 발굴을 위한 유전자 정보 및 이용 가능성을 확인함.

표 2-9. 고온스트레스 모니터링용 양배추 유전자의 RT-PCR 분석용 primer 염기서열

<i>Brassica oleracea</i> Genes	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence
BoHSP101	5'-TTC ATG TTC ATG GGT CCA ACA GGT G-3'	5'-TTA GAT GTC ATA ATC ACA ACA CAG-3'
BoHSP90	5'-CTG GAA GCA GCA AGG AGC AAC TGG AG-3'	5'-CACACT CTC ATC CTC TGG GTC GCT AG-3'
BoHSP70	5'-GCC TAT TGT CCT CGG CTC AGC ACT AC-3'	5'-GCA AAG ACA GGG GAG GTA ATT CCT GG-3'
BoHSP18.2	5'-GGT GGA GAT CGA GGA TGA CAG CG-3'	5'-CAG ACA CTC GCA AAC ACC AGA AC-3'
BoHSP81-2	5'-GAA GGT TTC TCA CGA GTG GGA CTT GG-3'	5'-CGG AGC AAC TCA GCG ATC TTG GTT C-3'
BoFKBP62	5'-CGC ACT CGC TTC CAA GAG ATA C-3'	5'-GCC AGT GAA CCA TTC TCC ACG ATG-3'
BoFKBP65	5'-GCT CGA TGG GAC CAA GTT CGA TTC-3'	5'-GAA CCT TCT CTG CCT TCT TCA TGG-3'
BoHsFA1	5'-GAA GC GAG ACT CAC TGA GGA TGC-3'	5'-GTC GCT GCT CTC TAG TGT TGT CTC-3'
BoACT1	5'-CAG TGT CTG GAT CGG TGG TTC C-3'	5'-GAG GCA TAC ATC AAT TCG ATC AC-3'

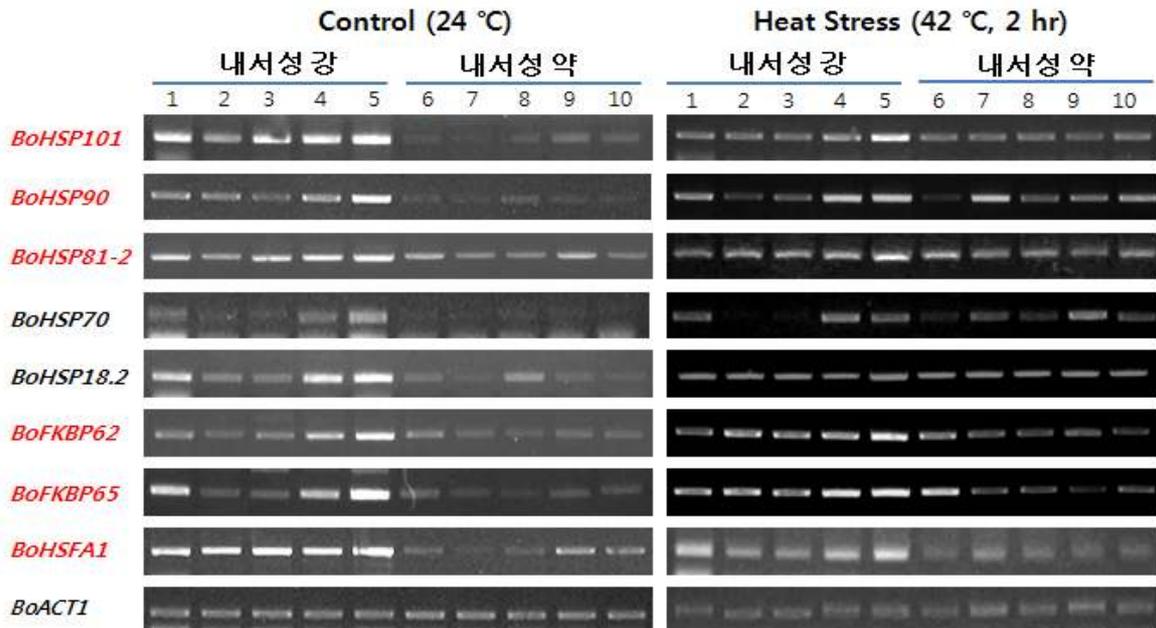


그림 2-30. 계통간 정상조건/고온스트레스 조건에서의 RT-PCR을 통한 고온스트레스 관련 유전자발현 분석

㉔ 최근 애기장대 HsFA 관련 유전자의 과다발현을 통한 내서성 증가와 하위 조절 유전자의 발현 증가가 내서성 형질과의 관련성을 보고됨 (Ogawa et al., J. of Exp. Botany, 2007).

㉕. BoHsFA 하위조절 유전자 발현 분석으로 내서성 형질 특이적 유전자분석

㉖. 내서성기작의 유전자발현조절에 기능하는 BoHsFA에 의한 하위조절유전자 발현 정도를 정상조건과 고온스트레스에서 비교한 결과, 내서성이 있는 계통/품종에서는 BoHsFA에 의한 BoHSP18.2, BoGolS1, BoBAG6 등의 하위조절유전자가 정상조건에서도 발현이 되고 있음을 확인하였다 (그림 2-31).

㉗. 이상의 결과로부터 계통간 고온스트레스 관련 유전자의 발현비교에 의한 내서성 형질 모니터링용 분자표지의 발굴 가능성을 확인할 수 있었다.

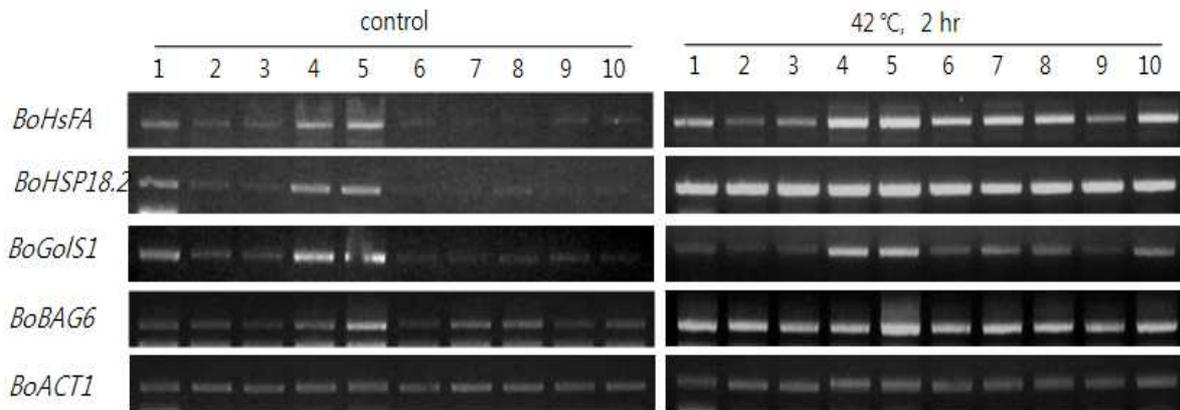


그림 2-31. 계통 간 HsFA transcription factor 하위조절 유전자발현 분석

㉘ 모니터링 분자표지의 특이성 확인

㉙. 기 사용된 고온스트레스 관련 유전자발현의 특이성 검증을 위해 다른 환경스트레스(생물학적 병원균) 관련 유전자의 발현을 비교 분석하였다.

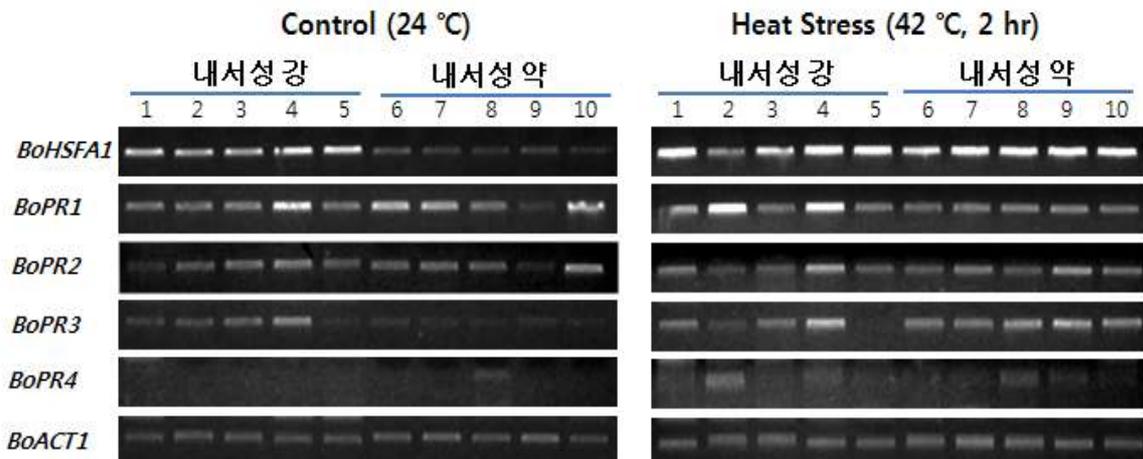


그림 2-32. 내서성 계통 간 생물학적스트레스 반응 유전자발현 비교 분석

ㄴ. 양배추 PR 1-4 유전자발현 양상은 정상조건뿐 아니라 고온스트레스 조건에서도 내서성 형질과의 어떠한 연관성이 없는 발현양상을 보임으로써 고온스트레스 관련 유전자가 양배추 내서성 모니터링용 분자표지 특이성을 나타냄을 확인하였다 (그림 2-32).

② 내서성 계통 간 RNA-Seq. 분석을 통하여 개발된 유전자마커

㉑ RNA-Seq. 비교 분석에 의한 후보 유전자 선발

- ㄱ. 내서성 강과 약 각 2 계통에 대해 정상 조건과 고온 스트레스 조건에서 RNA를 분리하여 transcriptome 정보를 확보하였다.
- ㄴ. DEG 분석에 의해 두 계통 간 일관성을 보이는 DEG 값을 기준으로 후보 유전자를 선발하였다.
- ㄷ. 내서성 강에서 높은 발현을 보이는 상위 4개 유전자와 내서성 약 계통에서 높은 발현을 보이는 상위 4개 유전자를 선발하였다 (그림 2-33).



그림 2-33. 내서성 계통 간 RNA-Seq. 비교 분석 과정 및 DEG에 의한 유전자 선발

1. 정상 조건에서는 내서성 형질 간 유전자발현이 구분되는 후보 유전자는 없는 걸로 판단됨
2. 고온 스트레스 조건에서 특이적으로 유전자 발현이 증가하는 후보 유전자, B031030, B032358, B018129는 내서성 강 계통들에서 약 계통에 비해 상대적으로 유전자발현이 크게 증가되었음.

3. B014937 유전자발현은 비록 정상 조건에서는 일고나성이 없지만 고온 스트레스 조건에서 앞의 세 후보 유전자와 같이 내서성 강 계통에 특이적으로 높은 발현을 나타내어 후보 유전자로 선발 하였다 (그림 2-34).

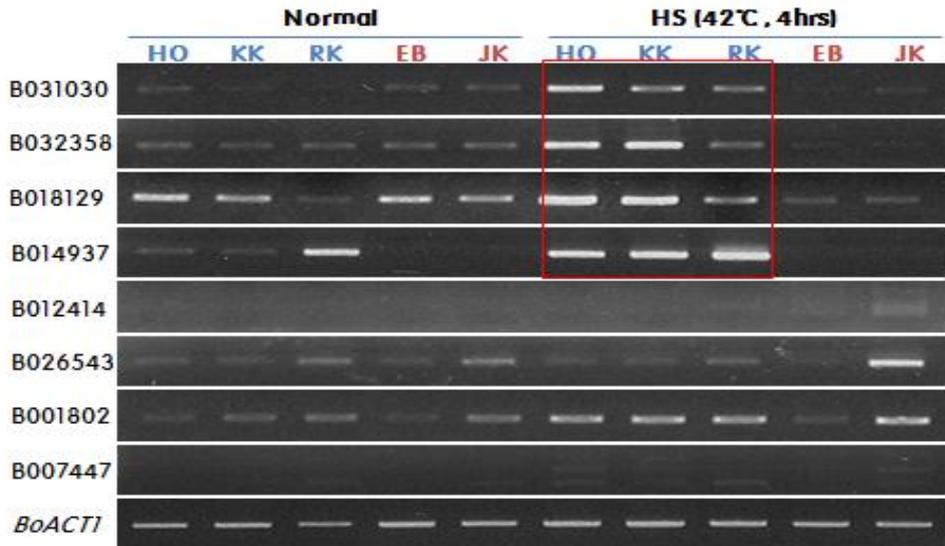


그림 2-34. 내서성 형질 계통 간 후보유전자 RT-PCR 분석. HO, KK, RK; 내서성 강 계통, EB, JK; 내서성 약 계통

㉔ RNA-Seq. 후보 유전자의 유전자발현 qRT-PCR 분석

- ㄱ. 위의 4개 후보 유전자를 대상으로 유전자 발현 값을 정량화 하기 위한 qRT-PCR 분석을 하였다(그림 2-35).
- ㄴ. RT-PCR 분석에서와 같이 qRT-PCR 분석 결과에서도 고온 스트레스 조건에서는 후보 유전자의 유전자발현 정도가 내서성 형질 계통 간 차이를 보여 주었다.

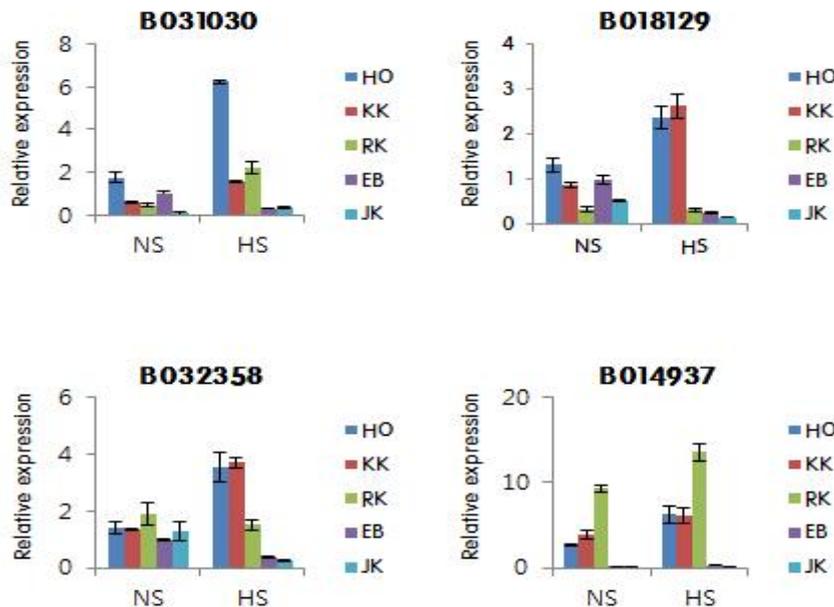


그림 2-35. 내서성 형질 계통 간 후보유전자 qRT-PCR 분석. HO, KK, RK; 내서성 강 계통, EB, JK; 내서성 약 계통. NS; normal condition, HS; heat shock stress condition

㊦ RNA-Seq. 후보 유전자의 유전자발현 RT-PCR 분석 (그림 2-36)

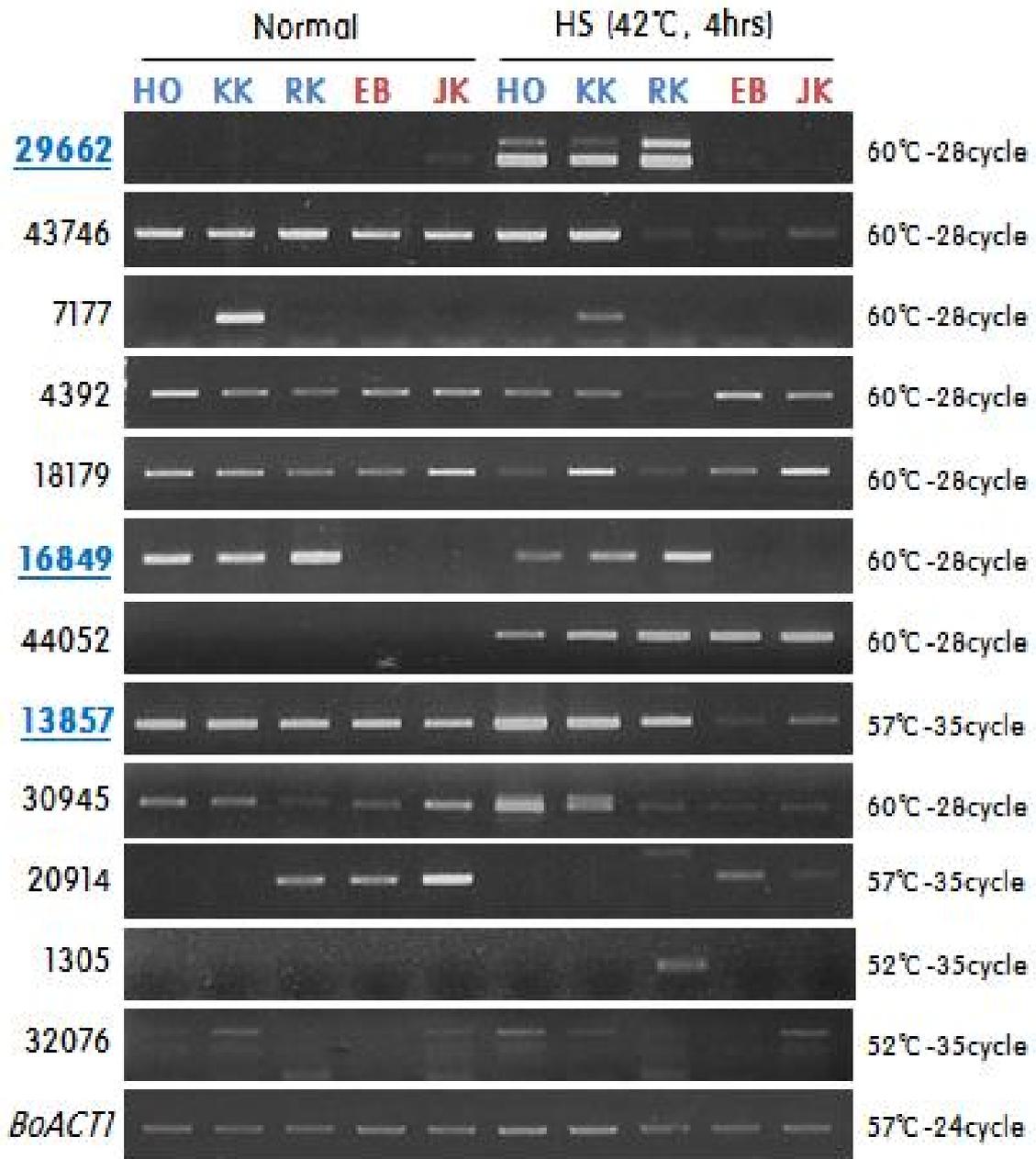


그림 2-36. 내서성 형질 계통 간 후보유전자 RT-PCR 분석. HO, KK, RK; 내서성 강 계통, EB, JK; 내서성 약 계통

㉔ 최종 선발 후보 유전자 재확인 (그림 2-37)

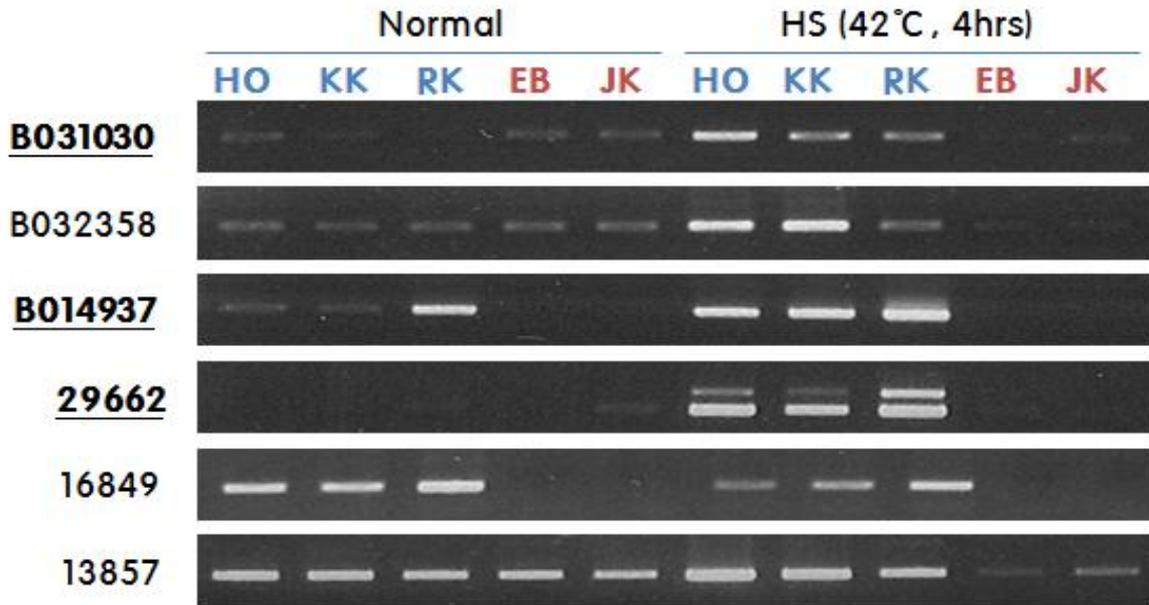


그림 2-37. 내서성 형질 계통 간 유전자발현 차이를 보이는 최종 선발 유전자의 RT-PCR 분석

㉕ 내서성 계통 간 RNA-Seq. 분석을 통한 후보 유전자의 프로모터 영역 분석

ㄱ. B031030 (unknown) ; Promoter region sequencing

1. 내서성 형질 계통간 gDNA 영역의 차이점은 발견되지 않았음
2. 계통 간 유전자발현의 차이가 프로모터 영역에 의한 것이 아님을 확인
3. 유전자마커 개발을 위한 후보 유전자는 아닌 것으로 판단되지만 프로모터의 영역을 더 탐색 하거나 intron 유전자 구조에 의한 차이가 있을 수도 있다고 판단 됨 (그림 2-38).

ㄴ. B029662 : Promoter region sequencing

1. 내서성 형질 계통간 -1.5kb 프로모터 영역이 모두 일치함
2. 계통 간 유전자발현의 차이가 프로모터 영역에 의한 것이 아님을 확인 (그림 2-39).

ㄷ. B014937: Promoter region sequencing

1. 내서성 형질 강/약 계통 간 -0.6 kb 프로모터 영역의 뚜렷한 차이를 보여줌.
2. 6개 영역의 In-Del 과 12개 SNP가 정확히 구분됨
3. 유전자 후보 마커로서의 가능성을 확인 함 (그림 2-40).

- 2000 bp - 1600 bp - 100 bp | ATG



그림 2-38. 내서성 강/약 5개 계통에 대한 B031030 - 0.6 kb 프로모터 영역 염기서열 비교분석.

HO,RK,KK,HY,EB,JK -모두 일치

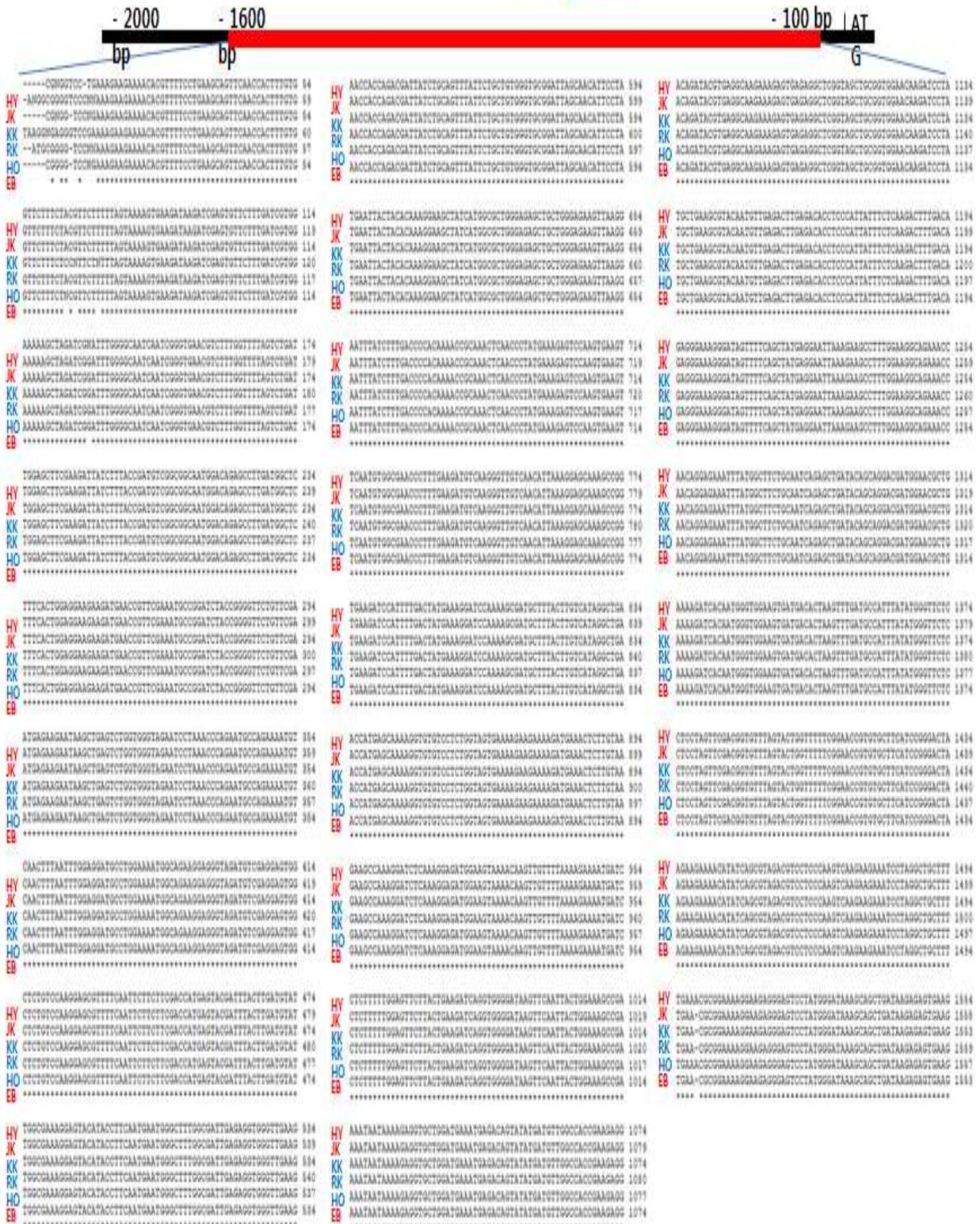


그림 2-39. 내서성 강/약 5개 계통에 대한 B029662 1.5 kb 프로모터 영역 염기서열 비교분석.

- ㉔ B014937 유전자의 In-Del 마커 가능성을 위한 PCR 분석
 - ㄱ. 내서성 형질 강/약 계통 간 구분 In-Del 프라이머 제작.
 - ㄴ. 내서성 형질 강/약 계통 특이적 PCR 분석 확인 (그림 2-42)

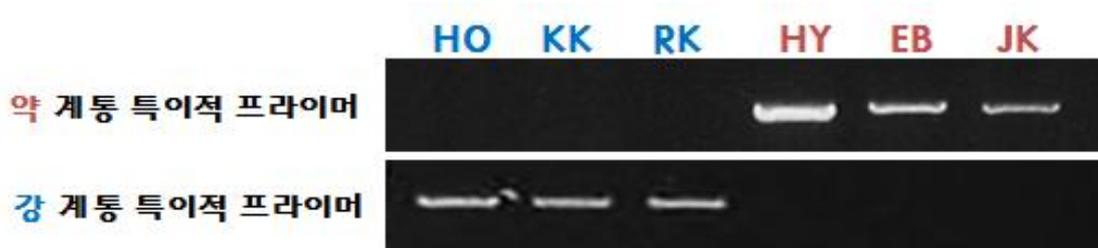


그림 2-42. 내서성 강/약 구분 B014937 유전자마커 PCR 분석 결과. 내서성 강 계통; HO, KK, RK, 내서성 약 계통; HY, EB, JK,

라. 배추좀나방 저항성 검정용 연관 바이오마커 개발

① 대사체분석을 통한 배추좀나방 저항성 바이오마커 개발

- ㉔ 대사체 분석을 위하여 유전분석 집단 확보
 - ㄱ. 대사체 분석을 위한 목표형질로 배추좀나방저항성 형질을 선택하고 기존 농림 부사업에서 지원하였던 사업에서 개발한 배추좀나방 저항성 형질을 가지고 있는 양배추류 유전자원 분양 받아 사용하였음.
 - ㄴ. 배추좀나방 저항성 형질을 가지고 있는 유전자원은 배추좀나방 저항성 계통성, 감수성 계통과 이들 두 계통간의 교배로 생성한 F₃ 집단 150 계통임. 그림 2-43는 저항성 형질과 감수성 형질의 표현형적 차이를 나타냄.

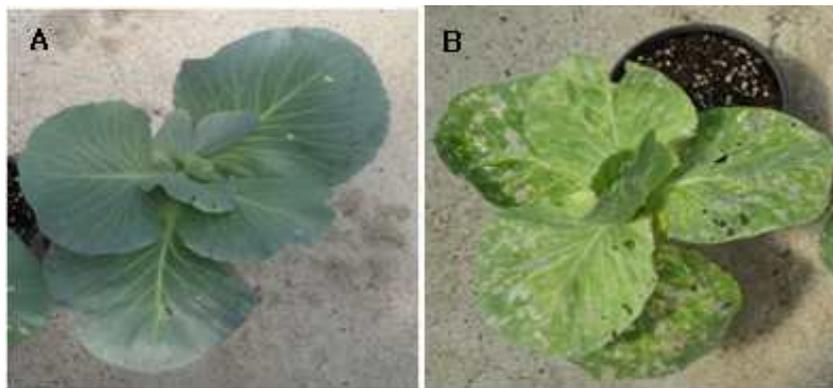


그림 2-43. 배추좀나방의 가식 정도, 저항성 계통(A)과 감수성 계통(B)의 표현형

㉔ 배추좀나방 저항성 형질 분리집단 재배 및 대사체 분석 위한 시료 준비

- ㄱ. 저항성 및 감수성, 두 계통간의 차이가 나는 1차 대사산물에 대하여 좀나방저항성 형질 분리집단에서 조사하고자 하였다. 배추좀나방 저항성 계통과 감수성 계통을 교배하여 만든 F₁을 자가수정하여 저항성 형질이 분리된 F₂ 집단(139 개체로 구성)을 사용하여 배추좀나방 가식에 의한 피해 정도를 측정해보고자

하였다. 좀나방 유충은 기타 나방이나 나비류 보다 월등히 작아 초기 어린 유충들의 섭식에 의한 잎의 피해정도(잎의 구멍)은 매우 작으며, 섭식이 잎의 뒷면에서부터 깊어 먹어 잎의 표면에 구멍을 내는데, 잎의 윗면까지 완전히 뚫리지 않고 얇고 투명한 그물과 같은 구조가 남아 있게 된다. 피해 정도가 더 심해지면 작은 구멍들이 연결되어 큰 구멍을 내거나 얇고 투명한 그물구조가 찢어지게 된다. 피해 정도를 조사하는 실험을 노지에서 수행할 경우, 실제 좀나방에 의한 섭식도 있겠으나 주위에 공존하는 다양한 곤충 및 유충 (과밤나방, 배추흰나비, 달팽이 등)에 의한 피해를 가려내기가 어렵다. 따라서 좀나방 저항성 표현형 조사를 보다 정확하게 하기 위하여 외부와 격리된 유리온실(경상남도 농업기술원)에서 수행하였다(그림 2-37). 50공 트레이에 파종하여 육묘한 후 직경이 약 10 cm의 화분에 옮겨 재배하다가 양배추의 생체중이 커지는데 비하여 화분크기가 작아 생육 환경이 부적절하여 직경이 약 18cm의 화분에 정식하여 재배하였다. 저항성 형질 분리집단에서 대사체 분석을 위해 좀나방 섭식 전에 시료를 채취하였으며 액체 질소를 사용하여 갈아서 고운 가루 상태로 만들어 동결건조기로 건조하여 보관하였다(그림 2-44, 그림 2-45).



그림 2-44. 외부와 격리된 유리온실에서 재배, 경상남도 농업기술원



그림 2-45. 좀나방 저항성 분리집단에서 좀나방 접종하는 과정. A, 좀나방 애벌레 먹이; B, 좀나방 애벌레 생육; C, 분리집단에서 좀나방 번데기 접종; D, 접종 후 섭식에 의한 표현형



그림 2-46. 대사체 분석 위해 시료의 동결건조

- ㉔ 배추 줌나방 저항성 계통과 감수성 계통간의 대사체 분석을(metabolite profiling) FT-IR을 이용하여 분석, 계통간의 metabolite 차이 검정하였다. FT-IR 분석을 위해 시료를 동결건조하고, 시료 20mg을 사용하여 20% MtOH을 200ul를 넣어 잘 섞어준 후 50°C waterbath에서 20분간 추출을 하여 분석에 사용하였다. 20분 후에 원심분리기에서 13,000rpm으로 15분간 원심분리하여 새로운 1.5ml tube에 추출된 상층액을 수거하고, 다시 1분간 13,000rpm에서 원심분리하여 분석 시료 준비를 완료하였다. 추출된 시료를 384-well ZnSe plate을 사용하여 whole-cell에 3ul 씩 분주하고, 상온에서 건조 시켰다. FT-IR 스펙트럼 조사는 Tensor 27, Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany을 사용하였다. 건조된 ZnSe plate를 Tensor 27에 삽입하고 OPUS software (version 6.5)를 이용하여 FT-IR 스펙트럼을 조사하였다.
- ㉕ 배추줌나방 유충이 양배추 잎을 갉아먹는(섭식) 피해정도가 다른 두 가지 형태의 양배추를 각기 저항성 계통, 감수성 계통이라 명칭 하였으며, 이들 저항성 계통(A)과 감수성 계통(B)의 줌나방 섭식에 대한 정도(표현형)는 그림 3과 같이 육안으로 현저하게 차이가 남을 볼 수 있었다. 줌나방 섭식에 대한 두 계통간의 표현형적 차이를 나타내는 원인을 알고자 배추줌나방에 저항성 계통, 감수성 계통과 이들 두 계통간의 교배로 만든 F1 계통을 1차 대사산물의 차이를 GC-TOFMS로 분석하였다. GC-TOFMS는 대사체 분석에서 가장 많이 사용되는 분석방법 중 하나로 1차대사산물을 결정할 수 있으며, 이 분석방법은 시료속에 있는 저분자량 친수성 성분을 측정하고 동정할 수 있는 장점이 있으며 실제로 대사체군에 변화가 있음을 작년에 확인하였다. 총 46 종류의 검출한 대사산물 중에서 Aspartic acid, Glyceric acid, Glycolic acid, Inositol, Quinic acid, Trehalose 는 감수성 계통에서 저항성 계통보다 많이 존재함을 알 수 있었으며, Fumaric acid, Shikimic acid는 저항성 계통에서 감수성 계통보다 더 많이 존재함을 알 수 있었다(그림 2-47).

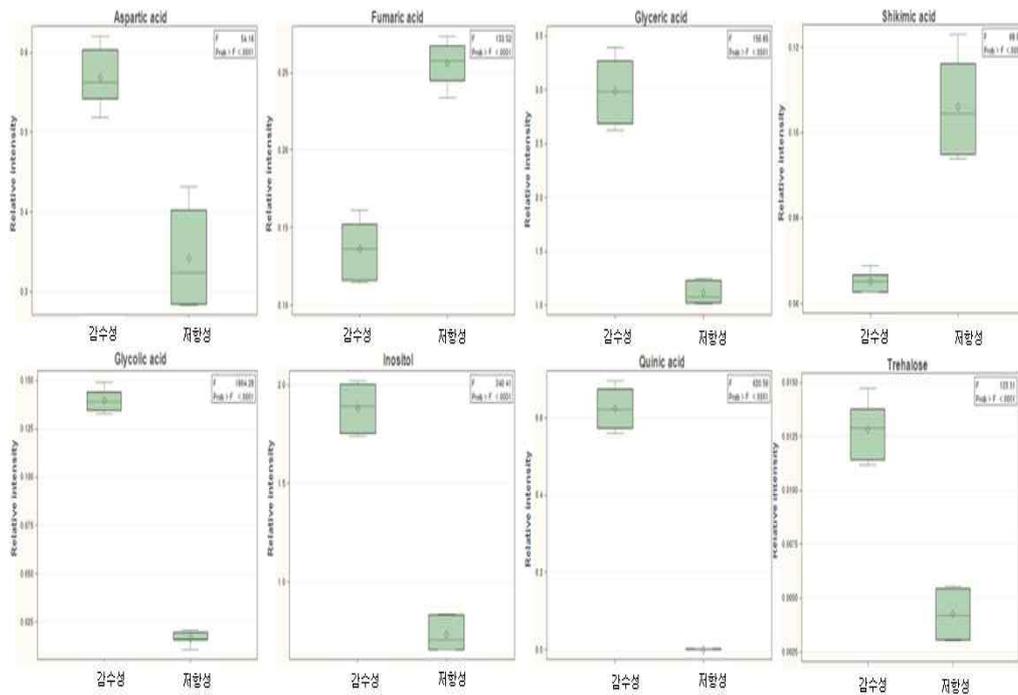


그림 2-47 .저항성, 감수성 계통간 구분되는 대사체, $P < 0.0001$

마. F₁ 품종 순도검정 분자표지 개발

- ① 첫 번째 Dynamic Array에서 검증 된 genotyping 결과를 기반으로 순도 검정용 SNP loci 12개와 고정 검정용 SNP loci 24개를 선별하였다.

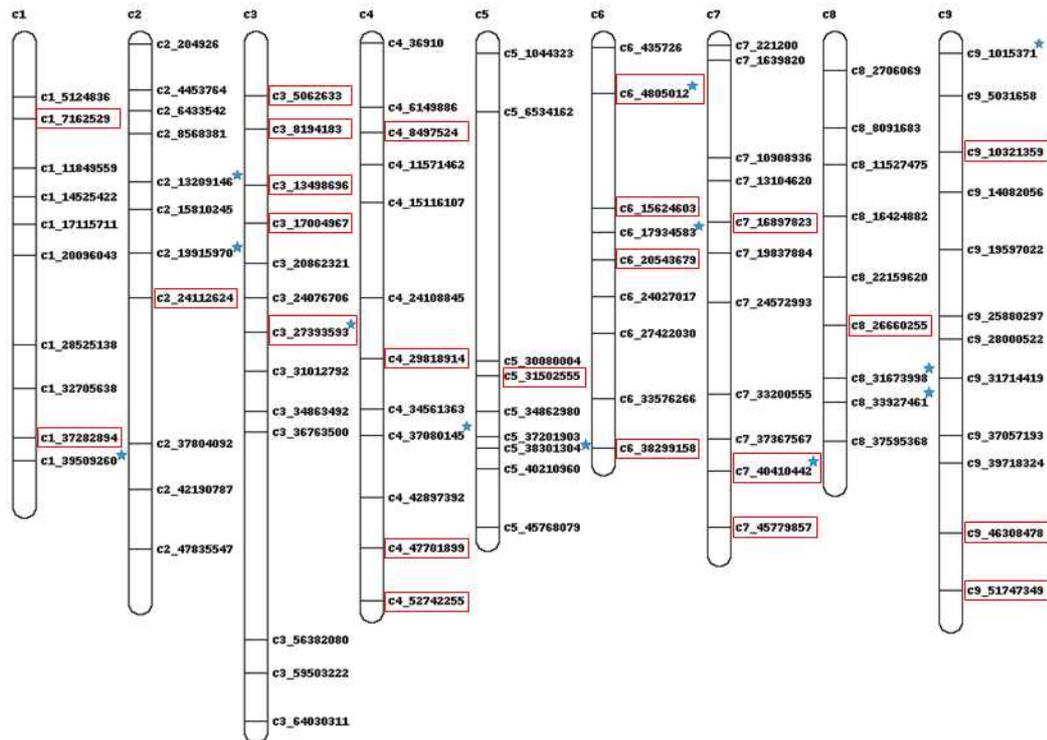


그림 2-48. 12 markers for F₁ 순도검정 test, Red box: 24 markers for 고정검정

② F₁식물체의 순도 검정을 위하여, SNP 분석에 사용되지 않은 26 set의 양배추류의 부모 및 1-3 개체의 F₁식물체의 샘플을 수집하여, 12개의 SNP 마커를 기반으로 부모의 genotype을 비교 하였다. 순도 검정을 위하여, 부모의 genotype이 homozygous 하면서 부모간의 allele이 다른 locus를 test의 대상으로 선정하였다. 그 결과, 각 실험 sample 당 1-12개의 SNP가 부모 line 에서 발견되었으며, 평균 6.08개의 homozygous & different allele이 발견되었다 (표 2-10). 이는 랜덤한 양배추류의 집단, 또는 엘리트 라인에서 12개의 SNP 마커 셋을 기반으로 순도 검정을 했을 때, 평균 6개의 locus에서 다형성 검정을 할 수 있는 영역임 (target locus)을 의미한다 (그림2-과랑색 부분). 특히, 26개의 실험 set 중 부모 간의 genotype이 다른 locus가 절반 이상 (6)인 set이 15 sets (61%) 였으며, 이러한 차이가 4 이하인 개체는 4 set (15%) 였다. 이는 random한 SSR 마커를 이용하여 다형성을 보일 확률 (약 30% 미만)보다 높은 것으로 사료된다. 26개의 실험 군에서 1-3개의 F₁식물체 샘플 (총 40 샘플)의 genotype을 조사 한 결과 99.38% (477/480) loci에서 genotyping이 성공적으로 detection 되었고, 267 loci가 순도검정의 target이 되었다.

표 2-10. 순도검정 결과 요약

	No. of different homozygous alleles in parents line (%)	No. of F ₁ test	No. of No. of expect ed hetero allele	No. of alleles in locus	hetero FALSE No	No Call	No. of heterozyg ous alleles in not targeted loci		
Set1	6	50%	1	6	6	100%	0	0	0
Set2	8	67%	3	24	24	100%	0	1	0
Set3	7	58%	3	21	19	95%	2	1	4
Set4	6	50%	2	12	12	100%	0	0	0
Set5	8	67%	2	16	13	87%	3	1	6
Set6	12	100%	3	36	36	100%	0	0	0
Set7	8	67%	3	24	24	100%	0	0	4
Set8	12	100%	2	24	24	100%	0	0	0
Set9	12	100%	2	24	20	83%	4	0	0
Set10	5	42%	3	15	15	100%	0	0	3
Set11	4	33%	1	4	4	100%	0	0	3
Set12	6	50%	1	6	6	100%	0	0	0
Set13	5	42%	1	5	5	100%	0	0	0
Set14	6	50%	1	6	6	100%	0	0	0
Set15	7	58%	1	7	7	100%	0	0	0
Set16	8	67%	1	8	8	100%	0	0	0
Set17	4	33%	1	4	4	100%	0	0	0
Set18	6	50%	1	6	6	100%	0	0	0
Set19	6	50%	1	6	6	100%	0	0	0
Set20	2	17%	1	2	2	100%	0	0	0
Set21	4	33%	1	4	4	100%	0	0	0

Set22	1	8%	1	1	1	100%	0	0	0
Set23	3	25%	1	3	3	100%	0	0	0
Set24	4	33%	1	4	4	100%	0	0	0
Set25	5	42%	1	5	5	100%	0	0	0
Set26	3	25%	1	3	3	100%	0	0	0

㉔ 이 중 자식 중에서 heterozygous genotype을 보인 allele을 총 267로 96.74%의 accuracy를 보였으며, 40 sample 중 6 (15%) 샘플 - set3 (F1_2, 2), set5 (F1_1, 3), set9 (F1_1,4), set11 (F1_1,2,3, 2) -에서 2-4개의 homozygous allele이 확인되었다. 이런 자식 중에서 나타나는 homozygous allele이 biased 되어 나타나는 경향은 해당 자식 중의 sample의 꽃가루가 외부로부터 contamination 되었을 가능성을 예측할 수 있으며, 12개의 마커가 순도 검정에 효율적으로 이용 될 수 있음을 의미한다. 또한, 본 실험에서는 부모의 genotype이 homozygous 한 allele에서 자식 중에서의 heterozygous한 allele을 보이는 genotype을 20 (9.80%)개 발견하였다 (Figure2-회색). 이 중 2 locus는 실험 set (set 10, set 11)내에서 conserved 하게 보였으나, 나머지는 (14 genotypes) test sample에서 biased 되어 나타났다 - set3 (F1_1, 4), set5 (F1_1, 2), (F1_2, 4), set7 (F1_3, 4) -. 이러한 예외적 genotype은 (부모의 allele이 동일한 locus에서 F1식물체에서 heterozygous한 genotype을 보이는 경우, 또는 부모의 allele이 다른 locus에서 F1식물체의 genotype이 homozygous 한 경우)은 F1식물체의 증식 과정에서 일부 꽃가루 contamination이 있었을 가능성을 추측할 수 있다. 따라서, 본 연구 결과에서 생산한 12개의 SNP marker set은 random한 양배추류의 순도 검정에 효율적으로 이용 될 수 있음을 의미한다.

㉕ 순도 검정에 이용되는 primer 정보는 아래 표 와 같다 (표 2-11).

	ASP1_SEQ	ASP2_SEQ	LSP_SEQ	STA_SEQ	Ref	Alt
S1	AGTTTCAATCATCCTA ACTAAAGAGAGGAC	AAGTTTCAATCATCCT AACTAAAGAGAGGAA	GCAAACCCTCGAGGCT CAAA	AGCCATAGAGGAGGT AAGTTTCAAT	G	T
S2	ACTGCACATGGTAAGA TCATCTTTCA	CTGCACATGGTAAGAT CATCTTTTCG	TGTGTGCTGCTTATGTC AAGATAGGA	ACCTATTGAAAACAA AACAACACTGC	T	C
S3	CAAAGCGTATAAGCC ATCCGTTATAC	TCAAAGCGTATAAGCC ATCCGTTATAG	GATCGACTGGTGGACG ACTAATGT	ACCTGAAGCACGATGT TCAAAG	G	C
S4	GATTCCTCAAGAAAGA AAATGGTACCATG	TGATTCCTCAAGAAAG AAAATGGTACCATA	TCTTTTCTTGATCTGAG TTGTTCTTCTCTTCA	CCTAAGCTCCTTGATT TGATTCCTC	G	A
S5	TCATCTCCAAGTTGTA TCAAAGGTCG	TCATCTCCAAGTTGTA TCAAAGGTCT	GGCTGGCAAACGGAA GTTCT	TCAGGTTTGTGTTGTA CACTCATC	G	T
S6	TCCAGATTTATCCAG AACAGTACATTCT	CCAGATTTATCCAGA ACAGTACATTCC	GCTGCCAAAATAAGTA GAAGCTAAACTGAA	TCGTATGGAAGGTATG TCCAGATT	T	C
S7	GGGTCAACGACAAAA ATGATGGAAAATA	GGTCAACGACAAAA TGATGGAAAATG	CTTTATATTCGTATCCA AAAATGGCGAAGAAG A	CATGTGTGAAGAATCG GGTCAA	T	C
S8	CCCCACCACTAATGAA CTAAAACTCT	CCCCACCACTAATGAA CTAAAACTCA	AAAACCGAAAAAGAT ACGAGGAGGAAGA	CCTTATTACTCCGTAA GTCCCA	A	T
S9	GGTAATTATCTTGGCG CGTGAA	GGTAATTATCTTGGCG CGTGAC	CAATCCGTGCTCGCCG T	CTGCGTGTGCGCGGT T	T	G
S10	CATCTCGTGGGAGCCT GT	ATCTCGTGGGAGCCTG C	AACCGACGGCACGGG TA	GAGGCCACAAGAAAT GGATTACTAG	A	G

S11	CCTCCTTTACCCTTTGC TCATCT	CCTCCTTTACCCTTTGC TCATCA	AGAGGTCCATGGTCAG CCAG	CTAATGGTCGCACCAG TTTCC	T	A
S12	AATCCTCTCCGTATTG GCTAAGTTT	AATCCTCTCCGTATTG GCTAAGTTC	CACTGATTGGTATAAA ATAACTAAACGGGTGC	AGAGACAATCCAAAA TGCAAATCCT	T	C

Marker		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
4000M	모분	G:G	T:T	C:C	G:G	T:T	T:T	T:T	A:A	G:G	A:A	A:A	C:C
3960F	부분	T:T	C:C	C:C	A:A	G:G	T:T	T:T	A:A	T:T	G:G	A:A	C:C
155F1	F1	G:T	T:C	C:C	G:A	G:T	T:T	T:T	A:A	T:G	A:G	A:A	C:C
4031M	모분	T:T	C:C	C:C	A:A	G:G	C:C	T:T	T:T	G:G	A:A	T:T	C:C
4122F	부분	T:T	C:C	C:C	G:G	G:G	T:T	T:T	A:A	T:T	A:A	A:A	C:C
144F1	F1	T:T	C:C	C:C	G:A	G:G	T:C	T:T	A:T	T:G	A:A	T:A	C:C
4022M	모분	T:T	C:C	C:C	A:A	G:G	C:C	T:T	T:T	G:G	A:A	T:T	C:C
4011F	부분	T:T	C:C	C:C	G:G	G:G	T:T	T:T	A:A	T:T	G:G	A:A	C:C
114F1	F1	T:T	C:C	C:C	G:A	G:G	T:C	T:T	A:T	T:G	A:G	T:A	C:C
4109M	모분	T:T	C:C	C:C	A:A	T:T	T:T	C:C	A:A	T:T	A:A	A:A	C:C
4047F	부분	T:T	C:C	G:G	A:A	G:G	C:C	T:T	T:T	G:G	A:A	A:A	C:C
119F1	F1	T:T	C:C	G:C	A:A	G:T	T:C	T:C	A:T	T:G	A:A	A:A	C:C
4118M	모분	T:T	C:C	C:C	A:A	T:T	C:C	C:C	T:T	G:G	A:A	A:A	T:T
4116F	부분	G:G	C:C	C:C	A:A	G:G	C:C	T:T	A:A	T:T	G:G	T:T	C:C
142F1	F1	G:T	C:C	C:C	A:A	G:T	C:C	T:C	A:T	T:G	A:G	T:A	T:C
4022M	모분	T:T	C:C	C:C	A:A	T:T	T:T	T:T	A:A	T:T	A:A	T:T	C:C
4025F	부분	T:T	C:C	C:C	A:A	G:G	T:T	C:C	A:A	T:T	G:G	A:A	C:C
153F1	F1	T:T	C:C	C:C	A:A	G:T	T:T	T:C	A:A	T:T	A:G	T:A	C:C
4142M	모분	T:T	C:C	C:C	A:A	T:T	T:T	T:T	A:A	G:G	A:A	T:T	C:C
4143F	부분	G:G	C:C	C:C	A:A	G:G	C:C	T:T	T:T	G:G	G:G	T:T	T:T
163F1	F1	G:T	C:C	C:C	A:A	G:T	T:C	T:T	A:T	G:G	A:G	T:T	T:C
4119M	모분	T:T	C:C	C:C	A:A	T:T	C:C	C:C	T:T	G:G	A:A	A:A	T:T
4125F	부분	G:G	C:C	C:C	A:A	T:T	C:C	T:T	A:A	T:T	A:A	T:T	C:C
141F1	F1	G:T	C:C	C:C	A:A	T:T	C:C	T:C	A:T	T:G	A:A	T:A	T:C
3964M	모분	G:G	C:C	C:C	A:A	G:G	C:C	T:T	A:A	G:G	G:G	T:T	C:C
3466F	부분	G:G	C:C	C:C	A:A	G:G	T:T	T:T	A:A	G:G	G:G	A:A	C:C
147F1	F1	G:G	C:C	C:C	A:A	G:G	T:C	T:T	A:A	G:G	G:G	T:A	C:C
3965M	모분	G:G	C:C	C:C	A:A	G:G	C:C	T:T	A:A	G:G	G:G	T:T	C:C
4141F	부분	T:T	C:C	C:C	A:A	T:T	T:T	T:T	A:A	G:G	A:A	T:T	C:C
113F1	F1	G:T	C:C	C:C	A:A	G:T	T:C	T:T	A:A	G:G	A:G	T:T	C:C
4148M	모분	G:G	C:C	C:C	G:G	T:T	T:T	T:T	A:A	G:G	A:A	A:A	C:C
4254F	부분	G:G	C:C	C:C	G:G	G:G	T:T	T:T	A:A	G:G	A:A	A:A	C:C
118F1	F1	G:G	C:C	C:C	G:G	G:T	T:T	T:T	A:A	G:G	A:A	A:A	C:C
3901M	모분	G:G	C:C	C:C	A:A	G:G	T:T	C:C	A:A	G:G	A:A	A:A	C:C
4002F	부분	T:T	C:C	C:C	A:A	T:T	T:T	C:C	T:T	G:G	A:A	A:A	C:C
140F1	F1	G:T	C:C	C:C	A:A	G:T	T:T	C:C	A:T	G:G	A:A	A:A	C:C
4252M	모분	G:G	C:C	C:C	A:A	G:G	C:C	T:T	A:A	G:G	G:G	T:T	C:C
4254F	부분	G:G	C:C	C:C	G:G	G:G	T:T	T:T	A:A	G:G	A:A	A:A	C:C
148F1	F1	G:G	C:C	C:C	G:A	G:G	T:C	T:T	A:A	G:G	A:G	T:A	C:C
4141M	모분	T:T	C:C	C:C	A:A	T:T	T:T	T:T	A:A	G:G	A:A	T:T	C:C
4116F	부분	G:G	C:C	C:C	A:A	G:G	C:C	T:T	A:A	T:T	G:G	T:T	C:C
162F1	F1	G:T	C:C	C:C	A:A	G:T	T:C	T:T	A:A	T:G	A:G	T:T	C:C
4148M	모분	G:G	C:C	C:C	G:G	T:T	T:T	T:T	A:A	G:G	A:A	A:A	C:C
4230F	부분	T:T	C:C	C:C	G:G	G:G	T:T	T:T	A:A	T:T	A:A	A:A	C:C
131F1	F1	G:T	C:C	C:C	G:G	G:T	T:T	T:T	A:A	T:G	A:A	A:A	C:C

그림 2-48. 순도 검정 결과

㉔ Template 내 SNP genotyping을 위한 primer 위치는 아래와 같다 (표 2-12).

S1 (TO1000 G/타입종 T)	
ATTTTTTTTTATGTTTGGTTGTTTAAAGATCTTTATGCAAACCCTCGAGGCTCAAAAAT [G/T] TCCTCTCTTTAGTTAGGATGATTGAAACTTACCTC CTCTATGGCTATTGCAACCTAATTC	ASP1_SEQ : G TCCTCTCTTTAGTTAGGATGATTGAAACT ASP2_SEQ : TTCCTCTCTTTAGTTAGGATGATTGAAACT
S2 (TO1000 T/타입종 C)	
TGTGCTGTAGATGATCTTTCGTGTGCTGCTTATGTCAAGATAGGAATTTAAGTGGT [T/C] GAAAGATGATCTTACCATGTGCAGTGTGTTTTGT TTTCAATAGGTCAGAGCATTATGCG	ASP1_SEQ : T GAAAGATGATCTTACCATGTGCAGT ASP2_SEQ : CGAAAGATGATCTTACCATGTGCAGT
S3 (TO1000 G/타입종 C)	
AGGAGAGAGATGCATTAAGATCGACTGGTGGACGACTAATGTATTGTAAATGTGAGAA [G/C] TATAACGGATGGCTTATACGCTTTGACATCGTGC TTCAGGTGTGTTACCTTTTGCTTTTC	ASP1_SEQ : G TATAACGGATGGCTTATACGCTTTG ASP2_SEQ : CTATAACGGATGGCTTATACGCTTTGA
S4 (TO1000 G/타입종 A)	
AGCAGAGAAACATGTCCTAAGCTCCTTGATTGATTCCTCAAGAAAGAAAATGGTACCAT [G/A] ATGAAGAGAAGACAACCTCAGATCAAGAAAAGAA CTTGAGCTAAGGCTTGCACCACCCG	ASP1_SEQ : GATTCCTCAAGAAAGAAAATGGTACCATG ASP2_SEQ : TGATTCCTCAAGAAAGAAAATGGTACCAT A
S5 (TO1000 G/타입종 T)	
ATTACAACCAGATTGCTCAGGTTTGTGTTGTACATCATCTCCAAGTTGTATCAAAGGTC [G/T] CTAATACAGAACTTCCGTTGCCAGCCTAATCTGA TTGTTAACGTTGCTTCTCTAAATTT	ASP1_SEQ : TCATCTCCAAGTTGTATCAAAGGTCG ASP2_SEQ : TCATCTCCAAGTTGTATCAAAGGTC T
S6 (TO1000 T/타입종 C)	
ATTAATTAGGAGGGATTCGTATGGAAGGTATGTCAGATTATTCCAGAACAGTACATTC [T/C] GATTTTCAGTTTAGCTTCTACTTATTTTGGCAGC TTTATGCAAAACCAATAACGTAATT	ASP1_SEQ : TCCAGATTATTCCAGAACAGTACATTC ASP2_SEQ : CCAGATTATTCCAGAACAGTACATTC C
S7 (TO1000 T/타입종 C)	
TATTTTATTAGATTAGAACAAAACCTTTATATTTCGTATCCAAAATGGCGAAGAAGATAA [T/C] ATTTCCATCATTTTTGTGCTTGACCCGATTCCTC ACACATGGTTGAACATCTTCTGTAT	ASP1_SEQ : T ATTTCCATCATTTTTGTGCTTGACCC ASP2_SEQ : CATTTCCATCATTTTTGTGCTTGACCC
S8 (TO1000 A/타입종 T)	
TCAACGGAAGGAAGATTAAAAATAATTAAAACCGAAAAGATACGAGGAGGAAGAGC [A/T] GAGTTTTAGTTCATTAGTGGTGGGACTTACGGAG TAATAAGGTGCGGCGGCGACGACAC	ASP1_SEQ : A GAGTTTTAGTTCATTAGTGGTGGG ASP2_SEQ : T GAGTTTTAGTTCATTAGTGGTGGG
S9 (TO1000 T/타입종 G)	
TAACTTTAATCCAGACCAAAATGAATATTCGTCTCTATCCATCCGTGCTCGCCGTCTTT [T/G] TCACGCGCCAAGATAATTACGCCGACACGCAGTT TACTTCGTTATAGCTACGCCGCGAC	ASP1_SEQ : T TCACGCGCCAAGATAATTACC ASP2_SEQ : GTCACGCGCCAAGATAATTACC

S10 (TO1000 A/타품종 G)	
ATCCTTGCCTCCTCATCTTTGCTGGAAGTTACAAACCGACGGCACGGGTAAGTAAGGTGG [A/G] CAGGCTCCCACGAGATGCTAGTAATCCATTTCTTG TGGCCTCTAAGGGGGCTGCCATCTA	ASP1_SEQ : A CAGGCTCCCACGAGATG ASP2_SEQ : GCAGGCTCCCACGAGAT
S11 (TO1000 T/타품종 A)	
CTGTTCAAACGGGAAACACCTAATGGTCGCACCAGTTTCTCCTTTACCCTTTGCTCATC [T/A] GAGTCACTGGCTGACCATGGACCTCTTGCCCCATT CCCTGAAGAAATCGCAGCTTTGAGC	ASP1_SEQ : CCTCCTTTACCCTTTGCTCATC T ASP2_SEQ : CCTCCTTTACCCTTTGCTCATC A
S12 (TO1000 T/타품종 C)	
AAATATTTTGCATGTTAGAGACAATCCAAAATGCAAAATCCTCTCCGTATTGGCTAAGTT [T/C] ATCATCTAATGCACCCGTTAGTATTTTATACCA ATCAGTGTCAAGTTTGGTGTAAAAA	ASP1_SEQ : AATCCTCTCCGTATTGGCTAAGTTT ASP2_SEQ : AATCCTCTCCGTATTGGCTAAGTT C

바. 계통 고정 검정 분자표지 개발

① 고정 검정을 위한 24개의 마커 셋을 기반으로 고정여부 판별이 가능한지를 검정하기 위하여 6계통의 양배추류의 29-30 sample을 genotyping 하였다 (그림 2-49). 그 결과 4,088 (95.16%)의 genotype이 성공적으로 결정되었고, 210 (4.59%)에서 “No call”이 나왔다 (표 2-13). “no call”은 플로다임 결과 디자인 된 두 type의 allele중 어느 것도 detection 되지 않은 것으로 SNP prediction이 잘못 되었거나, population 내에서 recombination에 의해 genomic structure가 바뀐 영역일 가능성을 시사한다. “no call”가 많이 일어나는 genomic loci를 각 test set에서 조사한 결과, 86.67%의 “no call”은 4개의 locus (H3, 14, 19, 20)에서 집약적으로 나타나는 것을 알 수 있었다. 특히, 6개의 test set에서 “H20”는 4번이 frequent “no call”을 보였고, “H3”은 2번, “H14”, “H19”는 한번씩 frequent “no call”을 보였다. 따라서, 이들 영역은 SNP error라기 보다 양배추류에서의 recombinant hot spot으로 생각된다. 또한 고정 검정을 위한 homozygosity를 분석 한 결과 3개의 test set (9913, 9914, 9918)에서는 89%이상의 homozygous SNP를 관측할 수 있었고, 3% 이하의 random heterozygous genotype을 확인하였다. 반면 2 test set (9915, 9916)에서는 9-10%의 random heterozygous SNP가 관측됨으로써 중간 정도의 고정을 예측할 수 있었고, test set 9916에서는 37% 이상의 heterozygous SNP를 관측함으로써 고정이 덜 된 것을 알 수 있었다. 또한, homozygous한 SNP 중 major allele (파랑)과 minor allele (분홍)이 관측되었는데, 고정이 많이 된 계통에서 major type의 homozygous allele 이 더 많이 분포하고 있음을 알 수 있었다. 따라서, homozygous SNP 및 major/minor allele의 비율을 기반으로 봤을 때 본 연구에서 선정한 24개의 SNP 마커를 기반으로 고정 검정을 위한 분석이 가능 할 것으로 생각된다.

표 2-13. 고정검정 실험결과 통계치

<i>B. oleracea</i> lines	No. of genotypes	No. of homozygous (%)		No. of heterozygous (%)		No. of recombinant loci ^c
		Minor/Maj or ^a	Total	Biased ^b	Random	
9913	684	0/636	636 (92.98)	30 (4.39)	9 (1.32)	2
9914	620	0/558	558 (90.00)	60 (9.67)	2 (0.32)	3
9918	679	6/673	606 (89.25)	58 (8.54)	15 (2.20)	1
9917	685	4/681	549 (80.15)	80 (11.67)	56 (8.17)	2
9915	705	11/590	601 (85.25)	30 (4.25)	74 (10.49)	1
9916	715	81/366	447 (62.52)	28 (3.92)	240 (33.57)	0
sums	4,410		3,397	118	534	9

^a No. of alleles frequently and rarely distributed homozygous genotype. ^b biased calls of heterozygosity denote heterozygous calls with less than 6 exceptions. ^cNo. of recombinant loci were estimated with locus "No calls" more than one-third.

Sample	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24
9913_01	T.T	T.T	AA	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	No Call	GG	AA	AA	T.T
9913_02	T.T	T.T	No Call	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CT	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	No Call	GG	AA	AA	T.T
9913_03	T.T	T.T	AA	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CT	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	No Call	GG	AA	AA	T.T
9913_04	T.T	T.T	No Call	GG	CC	GG	T.T	AA	GG	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	No Call	GG	AA	AA	T.T
9913_05	T.T	T.T	AA	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	No Call	GG	AA	AA	T.T
9913_06	T.T	T.T	AA	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	AA	GG	AA	AA	T.T
9913_07	T.T	T.T	AA	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CT	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	No Call	GG	AA	AA	T.T
9913_08	T.T	T.T	AA	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	AA	GG	AA	AA	T.T
9913_09	T.T	T.T	No Call	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	No Call	GG	AA	AA	T.T
9913_10	T.T	T.T	AA	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	AA	GG	AA	AA	T.T
9913_11	T.T	T.T	No Call	GG	CC	GG	T.T	AA	GG	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	AA	GG	AA	AA	T.T
9913_12	T.T	T.T	No Call	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	No Call	GG	AA	AA	T.T
9913_13	T.T	T.T	AA	GG	CC	GG	T.T	AA	GG	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	AA	GG	AA	AA	T.T
9913_14	T.T	T.T	No Call	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	No Call	GG	AA	AA	T.T
9913_15	T.T	T.T	AA	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	No Call	GG	AA	AA	T.T
9913_16	T.T	T.T	AA	GG	CC	GG	T.T	AA	GG	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	No Call	GG	AA	AA	T.T
9913_17	T.T	T.T	No Call	GG	CC	GG	T.T	AA	GG	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	No Call	GG	AA	AA	T.T
9913_18	T.T	T.T	No Call	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	No Call	GG	AA	AA	T.T
9913_19	T.T	T.T	No Call	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	No Call	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	No Call	GG	AA	AA	T.T
9913_20	T.T	T.T	No Call	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	No Call	GG	AA	AA	T.T
9913_21	T.T	T.T	No Call	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	No Call	GG	AA	AA	T.T
9913_22	T.T	T.T	AA	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	AA	GG	AA	AA	T.T
9913_23	T.T	T.T	AA	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	AA	GG	AA	AA	T.T
9913_24	T.T	T.T	No Call	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	AA	GG	AA	AA	T.T
9913_25	T.T	T.T	AA	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	No Call	GG	AA	AA	T.T
9913_26	T.T	T.T	AA	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	No Call	GG	AA	AA	T.T
9913_27	T.T	T.T	No Call	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	AA	GG	AA	AA	T.T
9913_28	T.T	T.T	No Call	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	No Call	GG	AA	AA	T.T
9913_29	T.T	T.T	AA	GG	CC	GG	T.T	AA	GG	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	No Call	GG	AA	AA	T.T
9913_30	T.T	T.T	AA	GG	CC	GG	T.T	AA	CC	AA	T.T	GG	CC	CC	CC	AA	CC	CA	T.T	No Call	GG	AA	AA	T.T

sample	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24
9915_01	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	T.T	AA	CT	AC	TT	AA	CC	AA	GG	AA	AA	AA	TT	CT
9915_02	CT	CC	GA	GG	CT	GG	CT	AA	GG	AG	TT	AA	CC	CC	TT	AT	TC	AA	GG	AA	AA	AG	AT	CT
9915_03	CT	CC	GA	GG	CT	GG	CC	AA	GG	AG	TT	AA	CC	AC	TT	AA	CC	CA	GG	AA	AG	AA	TT	TT
9915_04	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CC	AC	TT	AA	CC	AA	GG	AA	AA	AA	TT	TT
9915_05	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CT	AA	GG	AG	TT	AG	CC	AA	TC	AA	CC	AA	GG	AA	AA	AA	TT	TT
9915_06	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CC	AA	TT	AA	CC	AA	GG	AA	AA	AA	TT	TT
9915_07	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CC	AC	TT	AA	CC	AA	GG	No Call	AA	AA	TT	TT
9915_08	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CC	CC	TT	AA	CC	AA	GG	No Call	AA	AA	TT	TT
9915_09	CT	CC	GA	GG	T.T	GG	CT	AA	GG	AG	TT	AA	CC	No Call	TT	AA	TC	AA	GG	AA	AA	AA	TT	CT
9915_10	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CC	AA	TT	AA	CC	AA	GG	AA	AA	AA	TT	TT
9915_11	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CT	AC	TT	AA	CC	AA	GG	AA	AA	AA	TT	TT
9915_12	CT	CC	GA	GG	CT	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CT	CC	TT	AT	TC	AA	GG	AA	AA	AG	AT	CT
9915_13	T.T	CT	GA	GG	T.T	GG	CC	AC	CC	GG	TC	AA	CC	AA	TT	AT	CC	AA	TG	AA	AA	AA	AT	TT
9915_14	T.T	CT	GA	GG	T.T	GG	CC	AC	CC	GG	TC	AA	CC	AA	TT	AT	CC	AA	TG	AA	AA	AA	AT	TT
9915_15	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CC	AG	TT	AA	CC	AA	GG	AA	AA	AA	TT	TT
9915_16	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CC	No Call	TT	AA	CC	CA	GG	No Call	AA	AA	AT	TT
9915_17	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CC	CC	TT	AA	CC	AA	GG	No Call	AA	AA	TT	TT
9915_18	CT	CT	GA	GG	CC	GG	CT	AA	CC	GG	TC	AG	CC	CC	TC	TT	CC	CA	TG	AA	AA	GG	AT	TT
9915_19	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CC	No Call	TT	AA	CC	AA	GG	AA	AA	AA	TT	TT
9915_20	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CC	No Call	TT	AA	CC	AA	GG	No Call	AA	AA	TT	TT
9915_21	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CC	AA	TT	AA	CC	AA	GG	No Call	AA	AA	TT	TT
9915_22	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CC	AA	TT	AA	CC	AA	GG	AA	AA	AA	TT	TT
9915_23	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CT	AA	CC	AG	TT	AG	CC	AA	TC	AA	CC	AA	GG	No Call	AG	AA	AT	CT
9915_24	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CC	CC	TT	AA	CC	AA	GG	No Call	AA	AA	TT	TT
9915_25	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CC	CC	TT	AA	CC	AA	GG	AA	AA	AA	TT	TT
9915_26	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	GG	AG	TT	AA	CC	No Call	TT	AA	CC	AA	GG	AA	AA	AA	TT	TT
9915_27	CT	CT	GA	GG	CT	GG	CT	AA	CC	AG	TC	GG	CC	AA	CC	TT	CC	CA	TG	AA	AA	AG	TT	TT
9915_28	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CC	AC	TT	AA	CC	AA	GG	No Call	AA	AA	TT	TT
9915_29	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CC	AA	TT	AA	CC	CA	TG	No Call	AA	AA	TT	TT
9915_30	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CC	CC	TC	AA	CC	AA	GG	AA	AA	AA	TT	TT

sample	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21	H22	H23	H24
9916_01	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CC	AA	TT	AA	CC	AA	GG	No Call	AA	AA	TT	TT
9916_02	CT	CT	GA	GG	CT	AG	CT	CC	GG	AG	CC	AA	CC	AA	TT	AT	TT	AA	TT	No Call	GG	AA	TT	CT
9916_03	CT	TT	GA	GG	CT	AG	CT	CC	GG	GG	CC	AG	CC	AA	TC	AT	CC	AA	TT	No Call	GG	AG	AA	TT
9916_04	CT	CT	GA	GG	CC	AA	CT	CC	GG	AA	TC	AG	CC	AA	TC	AT	TC	CA	TG	AA	GG	AG	AT	CT
9916_05	CT	CC	GA	GG	CT	AA	CT	AC	GG	AG	TT	AG	CC	AG	TT	AT	TC	AA	GG	AA	AG	GG	AA	CT
9916_06	CT	CT	AA	GG	CC	AG	CT	AA	GG	AG	TT	AA	CC	AA	TT	TT	CC	CA	GG	AA	GG	GG	AA	TT
9916_07	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CT	CC	TT	AA	CC	AA	GG	AA	AA	AA	TT	TT
9916_08	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CC	AC	TC	AA	TC	CA	TG	AA	AG	AG	AT	CT
9916_09	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CC	AA	TT	AA	CC	AA	TG	AA	AA	AA	TT	TT
9916_10	CC	CT	GA	GG	CC	CT	GG	CT	AA	CC	GG	TC	AG	CC	AA	TC	CA	TG	No Call	GG	AA	TT	CT	CT
9916_11	CT	CT	GA	GG	CC	AG	CT	AC	GG	GG	TC	AG	CC	AA	TC	TT	TT	AA	TG	AA	GG	GG	AA	CT
9916_12	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CC	CC	TT	AA	CC	AA	GG	No Call	AA	AA	TT	TT
9916_13	T.T	CC	GA	GG	T.T	GG	CC	AA	CC	GG	TT	AA	CC	AC	TT	AA	CC	AA	GG</					

㉔ 위의 고정검정에 이용되기 위한 24개의 primer sets은 아래 표와 같다 (표 2-14).

표 2-14 . 고정검정 용 프라이머 셋

	ASP1_SEQ	ASP2_SEQ	LSP_SEQ	STA_SEQ	Ref	Alt
H1	CCATTTCTGTTCCCTCAGCATAAC	TCCATTTCTGTTCCCTCAGCATAAC	TTTCAGGATATCAGGTTTGGCTCTC GA	TCAACCTATCAACACTCGTCCA	C	T
H2	ATGCTCTTTCTTCAAACCTATACAA ACAC	GATGCTCTTTCTTCAAACCTATACA AACAT	GGCCACCGCTTACAATTTTCTATCA	TGTTGCTAATTTGTATTTTAAGATG CTCTTT	C	T
H3	CACCGCAACTTTATTCTCCTCG	CCACCGCAACTTTATTCTCCTCA	TTGGCTTGCATGCTGATATTGCT	CGACTTCGGCTATTAGTAATAACCA	G	A
H4	CAAAGCGTATAAGCCATCCGTTATA C	TCAAAGCGTATAAGCCATCCGTTAT AG	GATCGACTGGTGGACGACTAATGT	ACCTGAAGCACGATGTTCAAAG	G	C
H5	CGCACTTGCTCTAGCTCGG	CGCACTTGCTCTAGCTCGA	ACGACGACGCTCTTGAAGCA	TTATCCACAAACTTCCTCATCGC	C	T
H6	CATCTCGTGGGAGCCTGT	ATCTCGTGGGAGCCTGC	AACCGACGGCACGGGTA	GAGGCCACAAGAAATGGATTACTAG	A	G
H7	GATTCATTCAACCGTCTGCACAG	GATTCATTCAACCGTCTGCACAA	AGTTACACGGCGTCTCGTCA	GCTGAAGAACAAGAGGATTCAAGA	C	T
H8	ACCGAAACAGAGAAAACTTGGGA	CCGAAACAGAGAAAACTTGGC	AACCTGGTGTACTACTTTTCCCGA	CTGATCTCTTGGAGATCTAAATAC C	A	C
H9	CAGAACCTCTGAGGAAGCTGAC	CAGAACCTCTGAGGAAGCTGAG	GTGGTTGGCCTTTTACATATGATT CCA	TCCTTGCTTTGCGATTATATTGACA	G	C
H10	GGAACATGTAATGACATTCTCAAAG GAT	GGAACATGTAATGACATTCTCAAAG GAC	CTTTTGAAGATGCGCTCCCA	CAAAAATAAGTCAAGATCACGGAAC AT	A	G
H11	CTAAATCGCCGAGGCTAAGAGAT	AAATCGCCGAGGCTAAGAGAC	AGGCTCTGAAAATTCACCAAGTCA	AGCTGATTGTGTTTTGTGGATACT	T	C
H12	CAGAACCGTTCAAATACAAGATAAT GAATCAA	AGAACCGTTCAAATACAAGATAATG AATCAG	CTTTGTGACATGAATCTTTTGT GCATTAAC	GATTAGCACAAACAGAACCGTTCA	A	G
H13	GGCTGATACGAGCCGTTTG	GGGCTGATACGAGCCGTTTA	ACCTGTAATCACGGCACCAGT	CAAAGACTGTATCTTATCCAAGTGG G	C	T
H14	TCGGAGGATTCAAACCTGGCA	TCGGAGGATTCAAACCTGGCC	ATTACCAATGGAGGAGAGATCACA C	CGAAGAAAGATTACAAGTCTGAACC	A	C
H15	GGCTCTCACATCAAGACAGCTTT	GCTCTCACATCAAGACAGCTTC	CCACCTTACATGAAAAGACAAACA TTCAAAT	TCCAGGAGACGATGTAAGGC	T	C
H16	ACAATCCCCAAGTTGAAAGACTTCT A	CAATCCCCAAGTTGAAAGACTTCTT	GAGCTGACCGGTATAGCTCCTT	CTGCGTGATATATGGAATGTA CAAT	A	T
H17	TGTTGCATGGACCTGACTCA	TGTTGCATGGACCTGACTCG	TCACGTGTTGCAATATAGGAGGTT A	TGCTACAGAATTTGAGGAAACATTG T	T	C
H18	TCGTCCATTACCAGCG	CATCGTCCATTACCAGCT	GTCTGGCTTTTCTTCAACATGAGG T	TCCAGAAAGTACTTCTCCACAT	C	A
H19	CAAGAGTCTTGAAACTTAGAACACC CTA	AGAGTCTTGAAACTTAGAACACCT C	CGATGCTTTTGTCTTCTGCTGTTCAA C	GCTCAAGAACGATTATGCAAGAGT	T	G
H20	AAGTTAACATCGAGACCAGCTGATA G	TTTAAGTTAACATCGAGACCAGCTG ATAT	TCATTGTTAGCTTGATGAAACCACA AATTAAGAA	GGATTAGTGTGGCTTTAACATTTAA GTT	C	A
H21	ACCTTATCACGTCATATTTTCGAGC AAT	CCTTATCACGTCATATTTTCGAGCA AC	GCCAATACAAGAAGGAGGAAGTCAA AA	GGAGCAGATACCTTATCACGTC	A	G
H22	CCAGGTCTTTATTGATACGCTCTTC CT	CCAGGTCTTTATTGATACGCTCTTC CC	CAACATACGCACATAGAAGAAAATG TAGTGATT	TCCTGATAAAAATCCAGATCCAGGT	A	G
H23	CCCCACCATAAATAAAACTC T	CCCCACCATAAATAAAACTC A	AAAACCGAAAAAGATACGAGGAGGA AGA	CCTTATTACTCCGTAAGTCCCA	A	T
H24	GTCGAGTAGCTCGGGAAGTC	GTCGAGTAGCTCGGGAAGTT	ACAAGCCGAGCTACTGCGT	GGCAGTGGTGAATCTGTATTTAG A	C	T

㉕ 위의 서열을 포함하는 template내 SNP primer 위치는 다음과 같다 (표 2-15).

H1 (T01000 C/ 다른종 T)
TTTCTCTCATTCCTCTCCTCAACCTATCAACACTCGTCCATTTCTGTTCCCTCAGCATAACA [C/T] ATTCGAGAGCAAACCTGATATCCTGAAAAGT TCTTCCCTTTATCCACTTTAGCTAACTT
ASP1_SEQ : CCATTTCTGTTCCCTCAGCATAAC
ASP2_SEQ : TCCATTTCTGTTCCCTCAGCATAACA T
H2 (T01000 C/ 다른종 T)
AGTATACCGGTGTTGCTAATTTGTATTTTAAGATGCTCTTTCTTCAAACCTATACAAACA [C/T] AGTTCCGTTTTTTTATGATAGAAAATTTGTAAG CGGTGGCC TAAAGTTTTGTTAGTAGATT
ASP1_SEQ : ATGCTCTTTCTTCAAACCTATACAAACAC
ASP2_SEQ : GATGCTCTTTCTTCAAACCTATACAAACA T
H3 (T01000 G/ 다른종 A)
TGGTTGATTGCATGAGCGACTTCGGCTATTAGTAATAACCCACCGCAACTTTATTCTCCTC [G/A] TCAGCGAAGCAAATATCAGCATGCAAGCCAAA

CATAATACCTCTGAGTCGATTCATCATC	
ASP1_SEQ : CACCGCAACTTTATTCTCCTCG	
ASP2_SEQ : CCACCGCAACTTTATTCTCCTC A	
H4 (TO1000 G/ 다른종 C)	
AGGAGGAGAGATGCATTAAGATCGACTGGTGGACGACTAATGTATTGTAAATTGTGAGAA [G/C] TATAACGGATGGCTTATACGCTTTGAACATCG TGCTTCAGGTGTGTTACCTTTTGCTTTC	
ASP1_SEQ : G TATAACGGATGGCTTATACGCTTTG	
ASP2_SEQ : CTATAACGGATGGCTTATACGCTTTGA	
H5 (TO1000 C/ 다른종 T)	
GAAAGCCCTTCTCCGTGGACTCACGACGAGCTCTTGAAGCACGGGAGAATCAAGACGAC [C/T] CGAGCTAGAGCAAGTCCGATGAGGAAGTTTGT GGATAAGATGATTACTCTCGCTAAAGAT	
ASP1_SEQ : C CGAGCTAGAGCAAGTGCG	
ASP2_SEQ : T CGAGCTAGAGCAAGTGCG	
H6 (TO1000 A/ 다른종 G)	
ATCCTTGCGTCTCATCTTTGCTGGAAGTTACAACCGACGGCAGGGTAAAGGTGG [A/G] CAGGCTCCCACGAGATGCTAGTAATCCATTTCT TTGTGGCCTTAAGGGGGCTGCCATCTA	
ASP1_SEQ : A CAGGCTCCCACGAGATG	
ASP2_SEQ : GCAGGCTCCCACGAGAT	
H7 (TO1000 C/ 다른종 T)	
AGATTGTTGCTGCAGTTCACACCTATCCAGTTACACGGCTCTCGTCAATGCCGTTCCAG [C/T] TGTGCAGACGGTTGAATGAATCTTGAAATCCT CTGTTCTTCAGCTCCAATAGAACTGAC	
ASP1_SEQ : C TGTGCAGACGGTTGAATGAATC	
ASP2_SEQ : TGTGCAGACGGTTGAATGAATC	
H8 (TO1000 A/ 다른종 C)	
AGCTGGTGTCCAGGCTGATCCTCTTTGGAGATCTAATAACCGAAACAGAGAGAAAACCTGG [A/C] GAGCTAGTTCGGGAAAAGTATGACACCGAGTT CTACATCTGCATCGCTATCCTTCGGCT	
ASP1_SEQ : ACCGAAACAGAGAGAAAACCTGGA	
ASP2_SEQ : CCGAAACAGAGAGAAAACCTGG C	
H9 (TO1000 G/ 다른종 C)	
ACAATCAGTCTGAAAGTAATGTCTATGTGGTTGGCCTTTTACATATGATTTCCAGTAGTA [G/C] TCAGCTTCCTCAGAGGTTCTGTCAATATAACT GCAAAGCAAGGAAATAGTTAATTTATTT	
ASP1_SEQ : G TCAGCTTCCTCAGAGGTTCTG	
ASP2_SEQ : C TCAGCTTCCTCAGAGGTTCTG	
H10 (TO1000 A/ 다른종 G)	
ATAACCACACTCATCTCGTGTGTTTCTTTCTTTGAGAATGCGCCTCCCAACATCTCG [A/G] TCCTTTGAGAATGTCATTACATGTTCCGTGAT CTTGACTTATTTTTGCTACAGACCTTGT	
ASP1_SEQ : A TCCTTTGAGAATGTCATTACATGTTCC	
ASP2_SEQ : G TCCTTTGAGAATGTCATTACATGTTCC	
H11 (TO1000 T/ 다른종 C)	
GATAACGGTGACATGAGCTGATTGTGTTTTGTTGGATACTAAATCGCCGAGGCTAAGAGA [T/C] TGGAGATTATGACTTGGTGAATTTCCAGAGC CTCATTGATAATTACACTGACTTATCAT	
ASP1_SEQ : CTAAATCGCCGAGGCTAAGAGAT	
ASP2_SEQ : AAATCGCCGAGGCTAAGAGA C	
H12 (TO1000 A/ 다른종 G)	
AACATAAGTGGAAACAGAGATTAGCACAAAGAACCCGTTCAATAACAAGATAATGAATCA [A/G] CTAAGTTAATGCAAAACAAAAGATTTCATGTCA CAAAGAAACCAATCAAATATCAGCTAAG	
ASP1_SEQ : CAGAACCCTTCAATAACAAGATAATGAATCAA	
ASP2_SEQ : AGAACCTTCAATAACAAGATAATGAATCA G	
H13 (TO1000 C/ 다른종 T)	
AGCTTTGCAATCAAGTTATCCCTACTCTTACCTGTAATCACGGCACCAGTTACGCGAGCA [C/T] AAACGGCTCGTATCAGCCCCTTGGATAAGAT ACAGTCTTTGTTAAATTTAGATGATGAG	
ASP1_SEQ : C AAACGGCTCGTATCAGCC	
ASP2_SEQ : TAAACGGCTCGTATCAGCCC	
H14 (TO1000 A/ 다른종 C)	

TACATGCAACCGCAGACGAGAAAGAGTTACAAGTCTGAACC	TCGGAGGATTCAAACCTGGC [A/C]	GGTGTGATCTCTCCCTCCATTGGTAATCTCTC		
CTTTCTCATATCACTTAATCTTGAGAC				
ASP1_SEQ : TCGGAGGATTCAAACCTGGCA				
ASP2_SEQ : TCGGAGGATTCAAACCTGGC C				
H15 (TO1000 T/ 다른종 C)				
AGATTCACAACAAGAAGAACTCTCCAGGAGACGATGTAAGGC	TCTCACATCAAGACAGCTT [T/C]	TTATGATGCTCTATAAGATTGGAATGTTTGTC		
TTTTCAATGTAAGGTGGCTCTTTGAGGG				
ASP1_SEQ : GGCTCTCACATCAAGACAGCTTT				
ASP2_SEQ : GCTCTCACATCAAGACAGCTT C				
H16 (TO1000 A/ 다른종 T)				
CAGTTCACCTGGCTGCGTGATATATGGAATGTAAAA	CAATCCCAAGTTGAAAGACTTCT [A/T]	TGGAGAGTAATAA	AAGGAGCTATACCGGTACG	
CTCAAACCTTGAAAGGAGAGGGCTCCCG				
ASP1_SEQ : ACAATCCCAAGTTGAAAGACTTCT A				
ASP2_SEQ : CAATCCCAAGTTGAAAGACTTCT T				
H17 (TO1000 T/ 다른종 C)				
ACGTCAGGGCTCAGACAAATGTCACGTGTTGCAATATAGGAGGTTCA	AAATATAGATGC [T/C]	GAGTCAGGTCCATGCAACA	ATGTTTCCTCAA	
TTCTGTAGCATTATCAGCTCTTAGTTTT				
ASP1_SEQ : T GAGTCAGGTCCATGCAACA				
ASP2_SEQ : CGAGTCAGGTCCATGCAACA				
H18 (TO1000 C/ 다른종 A)				
TAGGTTGGAGAAGGAGTCTGGCTTTTTCTTCAACATGAGGT	ACTTTGAAGACTGTATAAC [C/A]	GCTGGTGAATGGGACGATG	TGGAGAAGTACCT	
TTCTGGATTCACTAAAGCTGATGACAAT				
ASP1_SEQ : C GCTGGTGAATGGGACGA				
ASP2_SEQ : AGCTGGTGAATGGGACGATG				
H19 (TO1000 T/ 다른종 G)				
AGATCTCAGTATCGGATT	CGATGCTTTTGTCTGCTGTTCAACT	TATATAAAAGCTTGTG [T/G]	AGGGTGTCTAAGTTTCAAGACTCTTG	CATAA
TCGTTCTTGAGCCATACTAATCAATTC				
ASP1_SEQ : T AGGGTGTCTAAGTTTCAAGACTCTTG				
ASP2_SEQ : G AGGGTGTCTAAGTTTCAAGACTCT				
H20 (TO1000 C/ 다른종 A)				
TTAAAACTATATAATTATTA	TCAATGTTAGCTTGATGAAACCACAAATTAAGAAATAC [C/A]	TATCAGCTGGTCTCGATGTT	AACTTAAATGTT	
AAAGCCACACTAATCCCATAGGTTGTAG				
ASP1_SEQ : C TATCAGCTGGTCTCGATGTTAACTT				
ASP2_SEQ : ATATCAGCTGGTCTCGATGTTAACTTAA				
H21 (TO1000 A/ 다른종 G)				
AATTATAATGTATATG	GCCAATACAAGAAGGAGGAAGTGA	AAACTTGAACATCTACTT [A/G]	TTCGTCGAAAATATGACGTGATAAGGT	ATCTG
CTCCATATTTCTTTCAGGATTGACCGAG				
ASP1_SEQ : A TTCGTCGAAAATATGACGTGATAAGGT				
ASP2_SEQ : GTTCGTCGAAAATATGACGTGATAAGG				
H22 (TO1000 A/ 다른종 G)				
TCTGCGGAGTTCAATACACAGAT	CAACATACGCACATAGAAGAAAATG	TAGTGATTAAAG [A/G]	GGAAGACGTATCAAATAAAGACCTGG	ATCTGG
ATTTTATCAGGATGGTATTGAATGGAC				
ASP1_SEQ : A GGAAGACGTATCAAATAAAGACCTGG				
ASP2_SEQ : GGAAGACGTATCAAATAAAGACCTGG				
H23 (TO1000 A/ 다른종 T)				
TCAACGGAAAAGGAAGATTTAAAATAATT	AAACCGAAAAGATACGAGGAGGAAGAGC [A/T]	GAGTTTTAGTTTCATTAGTGG	TGGGGACTTACG	
GAGTAATAAGGTGCGCGGCGACGACAC				
ASP1_SEQ : A GAGTTTTAGTTTCATTAGTGGGG				
ASP2_SEQ : TGAGTTTTAGTTTCATTAGTGGGG				
H24 (TO1000 C/ 다른종 T)				
GGTATGTTGCCTTTGGCAGTGGTGAATCTGTATTTTAGAT	GTCGAGTAGCTCGGGAAGT [C/T]	TCTCAGGACGCAGTAGCTCGGCTTGT	AGTTCC	
ACAAGTGATTGCCAAAACAACCTCCTTTG				
ASP1_SEQ : GTCGAGTAGCTCGGGAAGTC				
ASP2_SEQ : GTCGAGTAGCTCGGGAAGT T				

사. 여교배 선발용 SNP 분자표지 개발

① SNP validation

㉠ 29계통의 re-sequencing read를 보완하여 아래 그림과 같은 우수한 quality로 데이터를 얻어 (그림 2-50), quality score 30, read length 50 bp을 기준으로 trimming하였다. 29계통의 raw 데이터로부터 평균 88.47% ~ 89.87%의 read가 high-quality reads로서 preprocessing을 거쳐 filtering 되었다. 이러한 양의 reads 는 630Mb (estimation) 양배추 지놈의 11.74-88.04X를 cover하며 다음 단계의 분석에 사용되었다. pre-processing을 마친 high-quality reads는 BWA로 read mapping 하였다. mapping이 잘못 된 reads를 masking하기 위하여, proper-reads를 checking 하고, PCR 과정에서 duplication된 reads도 picard를 이용해 masking 하였다. 그 결과, 29계통 전체 read의 84.53% (82.65%-86.23%)가 mapping 되었다 (표 2-16). 그 후 indel에 의해 잘못 mapping 된 reads를 보정하기 위해 GATK를 이용하여 local realignment를 수행하고, 보정 된 mapping 결과를 기반으로 UnifiedGenotyper를 이용하여 SNP 및 Indel를 Identification 하였다. 그 결과, 평균 4,317,773개의 SNP가 calling 되었고, homo-와 hetero-의 비율은 약 2.73:1로 homo가 많이 분포하였다 (표 2). Transition과 Transversion의 비율은 약 1.38이었다 . 평균 indel의 개수는 450,777 (299,191-927,597)개이고, SNP와 같이 homozygote의 비율이 heterozygote의 비율보다 높게 나타났다 (표 2-16). UnifiedGenotyper로 calling된 SNP 및 indel은 vcf-merge를 이용하여 merge한 결과, 19,262,615 개의 SNP loci와 2,325,028 indel loci가 identification 되었다.

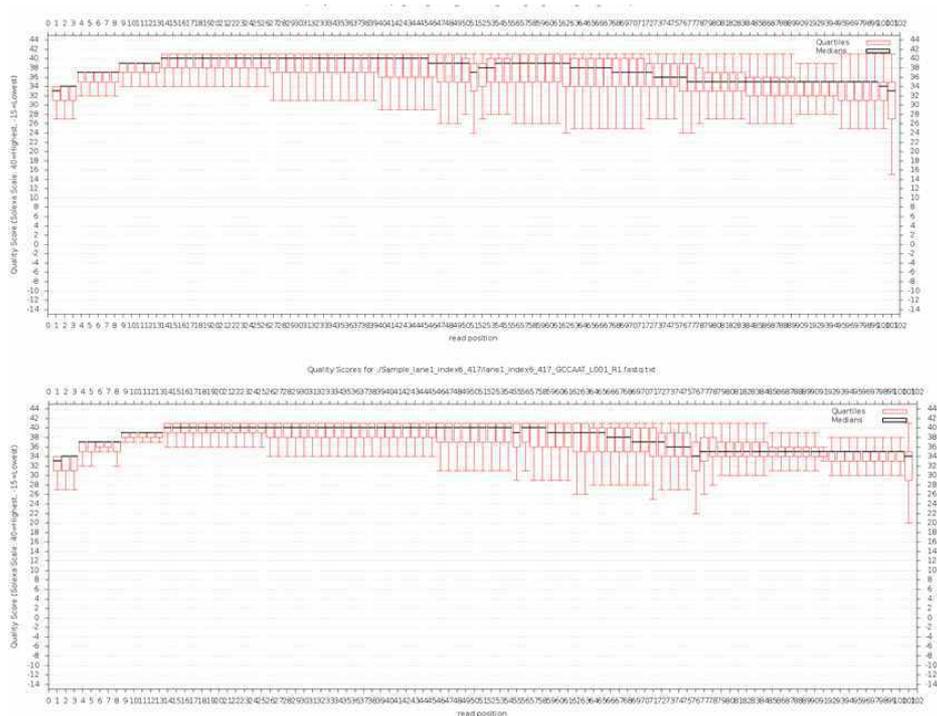


그림 2-50 . Example of high quality reads

표 2-16. Statistics of genome-wide SNP and Indels

code	형질	품종	Genome coverage %	SNP				Insertion		Deletion	
				homo	hetero	Ti	Tv	homo	hetero	homo	hetero
K0001	내서성 강	107-HO-154	84.27	3,044,492	922,011	2,301,001	1,665,502	162,228	21,024	176,313	24,822
K0002		5-KK	83.16	2,825,430	647,192	2,013,554	1,459,068	127,646	14,356	141,459	15,730
K0003		105-RK-P3-1	86.23	2,129,366	2,324,856	2,560,823	1,893,399	124,135	88,793	134,615	96,634
K0004	내서성 중	106-HY-164	84.35	2,916,874	915,913	2,231,859	1,600,928	163,845	16,849	168,435	27,838
K0005	내서성 약	108-E8-858-7	83.91	3,166,139	927,591	2,355,760	1,737,970	193,267	23,765	207,754	26,885
K0006		10-Jk-Jk-2	84.01	3,000,041	978,357	2,292,229	1,686,169	177,685	28,652	191,674	31,668
K0007	위황병저항성	518	86.09	2,222,964	2,518,983	2,517,968	1,863,979	131,836	83,833	142,393	90,939
K0008		517	84.84	2,443,329	1,947,871	2,526,697	1,864,503	149,815	75,736	161,576	82,691
K0009	위황병감수성	JK-2	84.30	3,076,885	1,455,251	2,623,196	1,908,940	188,120	37,614	203,679	45,180
K0010		103-MT-621	84.16	3,005,866	1,240,919	2,447,819	1,798,966	168,709	22,444	175,244	34,836
K0011	좁나방 저항성	LN-748-4-3	84.53	3,024,108	833,046	2,245,919	1,611,235	168,109	19,384	183,255	22,239
K0012	좁나방 감수성	JOMNABANGSM	84.32	2,787,374	1,369,476	2,415,148	1,741,702	138,736	29,176	151,649	35,050
K0013		JOMNABANG_male	84.33	3,101,851	1,362,925	2,580,289	1,884,487	192,443	27,001	199,113	41,130
K0014	칼슘 둔감	caDUN	82.65	2,768,734	888,654	2,153,015	1,504,373	155,950	15,725	160,487	25,317
K0015		DUN	85.56	3,468,897	1,204,354	2,706,200	1,967,051	243,144	31,231	254,394	35,891
K0016	칼슘 민감	Ca_sen_7	83.72	2,871,808	911,434	2,211,949	1,571,293	153,233	16,091	157,381	26,609
K0017		ca_senssam	84.15	2,917,439	896,743	2,233,947	1,580,235	150,129	15,026	155,137	24,803
K0018	Cold/freezing 강	111-DS-2437-51	83.99	3,166,103	1,174,135	2,506,074	1,834,164	192,311	27,506	208,368	33,329
K0019		ole_cold_freezy_gang	84.22	2,907,080	906,014	2,218,734	1,594,360	164,748	17,749	169,851	28,712
K0020	흑부병	B16	85.53	3,676,523	1,811,172	3,148,392	2,339,303	267,530	49,080	283,644	60,658
K0021	고정계통	DH1	85.92	3,178,437	1,117,787	2,496,747	1,799,477	225,949	28,833	238,088	33,364
K0022	고정계통	DH3	85.96	3,588,354	1,281,481	2,826,956	2,042,879	252,520	34,352	261,527	39,398
K0023		red_oleracea	84.60	3,106,761	1,014,030	2,396,752	1,724,039	188,984	20,737	193,552	32,793
K0024	hetero 많음	BMA	83.65	5,663,024	2,258,466	4,691,940	3,229,550	373,655	72,832	396,136	84,974
K0025	브로콜리 위황병 강	MC140	84.59	2,978,930	955,242	2,289,791	1,644,381	177,614	19,694	182,252	30,936
K0026	브로콜리 위황병 중도(강)	broF1	85.48	3,280,843	1,314,947	2,656,727	1,939,063	217,917	30,791	222,358	44,895
K0027	브로콜리 위황병 약	MC22	84.48	3,141,155	876,794	2,343,350	1,674,599	178,174	20,433	192,958	23,625
K0028	케일	kale5353	84.03	2,731,086	1,215,835	2,293,863	1,653,058	146,208	33,286	158,109	36,783
K0029	케일	KaleFB	84.36	2,854,667	899,366	2,193,061	1,560,972	159,362	16,282	164,296	26,819

② SSR 마커 개발을 위한 증폭인자 개발

㉠ SSR marker를 만들기 위해 TO1000 (reference genome)에서 121,735개의 genome-wide SSRs (from monomer to hexamer)을 identification 하였다. 이로 부터 flanking 300bp를 template으로 하여 dimer-hexamer인 SSR을 amplify 하기 위한 primer sets을 만들었다 (그림 2-51). Prediction된 primer sets을 blast로 TO1000DH3 genome에 search하여 600 bp이상 1Kb 이하로 amplification 할 수 있는 primer sets이 2개 이상 나오는 primers는 제거하였다. 그 결과, 23,587개의 primer set이 만들어 졌다 (그림 3). 각 SSR marker를 모티프 길이별로 정리하면, Dimer는 8,492 sets, trimer는 6,783 sets, tetramer는 2,816 sets, pentamer는 3,493 sets, hexamer는 2,303 sets이 개발되었다 (그림 2-51). 개발된 SSR과 증폭 인자의 상세한 정보는 본 과제에서 개발하고 있는 양배추류의 genome browser 에 데이터베이스화 되어 탑재하여 활용도를 높였다.



그림 2-51 . Statistics of SSR markers

- ㉔ Calling 한 SNP의 validation을 위하여 29개의 양배추류 계통에서 calling한 SNP를 기반으로 matrix를 만들고, homozygous SNP types으로 이루어진 loci 200개를 골라 HRM 분석을 위한 primer sets을 만들었다. 200개의 primer sets을 TO1000DH3 (reference genome)와 양배추류 3계통 (K0009, K0014, K0027)을 대상으로 HRM analysis를 수행하였다. HRM 결과를 TO1000의 pattern을 A로 정하고, 다른 pattern의 group인 경우 "B", "C", "D"로 표시하여 분석하였다. 그리고, calling 한 genotype과 비교하여 pattern이 일치할 경우 true positive ("T"), 일치하지 않을 경우 false positive ("F")로 표시하였고, 판단 할 수 없는 것은 not detectable ("?")로 표시하였다. 그 결과, HRM의 curve type과 genotype이 일치하는 true positive가 46 (23%), 일치하지 않는 false positive가 109 (54.5%), not detectable이 45 (22.5%)였다.
- ㉕ False positive의 원인을 분석하기 위하여, 만들어진 primer sets을 다시 reference genome에 mapping한 결과, 하나의 primer set에서 mapping error가 나타났고, 109개의 primer set이 reference genome에 mapping 되었다. 그 중 104 (52.26%) primer sets이 unique한 영역에 mapping되었고, 47 (25.62%)는 2 영역, 18 (9.05%)는 3영역 8 (4.02%)는 4영역으로 정확하게 mapping 되었다 (그림 2-52). 이러한 multiple-loci는 양배추류의 whole genome triplication event와 연관하여 genomic duplication 된 영역이 detection 된 것으로 여겨진다. 그리고, 4 loci 이상으로 mapping된 primer set은 22 (11.06%)개로 5-198개의 mapping loci를 포함하고 있다. 이러한 영역은 repetitive region에서 primer set가 분석 되었을 것으로 여겨진다.

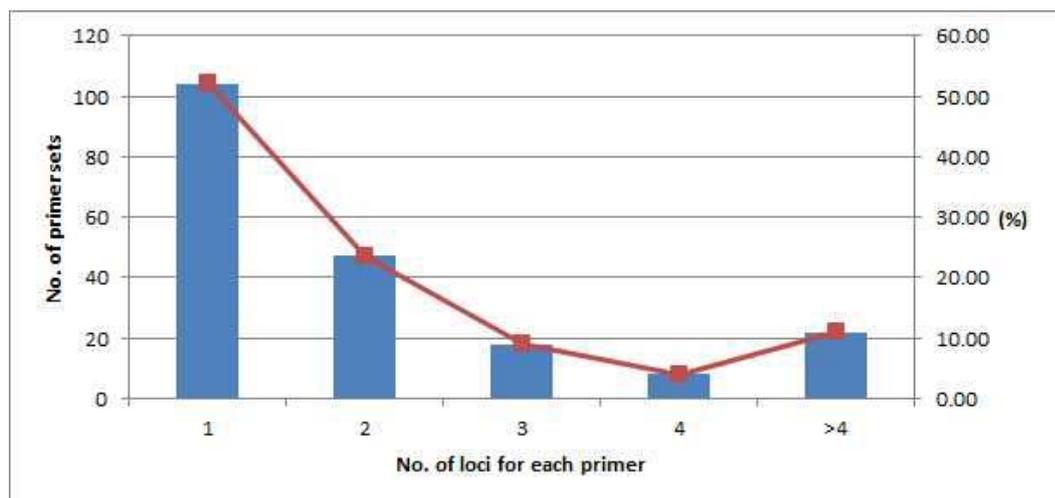


그림 2-52. Mapping numbers of primer sets throughout the reference genome

- ㉖ primer가 2 loci로 mapping (47 primer sets) loci를 대상으로 primer 영역 내에서 calling 될 수 있는 SNP의 개수를 none (N), single (S), 2개 이상 (multi-, M)로 나누어 분석한 결과 "NN"이 1(2.12%)개, "NS"가 9개 (19.14%), "SS"가 12 (25.53%), "SM"이 25 (53.19%)로 두 loci 중 한쪽이 다른 loci보다 SNP 개수가 더 많은 것 (NS, SM class)을 알 수 있었다 (표 2-17). 이러한 pattern은 primer

set이 3 loci로 mapping 된 primer set에서도 동일한 양상을 보인다. 따라서, 양배추의 SNP 마커 개발에 있어 primer set의 single mapping이 보장 되지 않을 경우, 47% 정도의 polymorphism은 hemi-SNP 또는 orthologous genomic loci의 SNP가 detection 되었을 가능성이 있다. 또한, primer 영역 내의 SNP 개수의 차이를 기반으로 했을 때, 3개 이상의 curve pattern이 detection 될 수 있음을 알 수 있다. 양배추의 진화적이 관점에서 볼 때, primer set 내의 관측 SNP 수의 차이는 양배추류의 WGT 이후 3 genome fragment는 independent evolution을 진행해 왔으며, 3 genomic segment 중 한 loci는 substitution에 더 tolerant하고, 다른 loci는 substitution에 susceptible 하다는 것을 간접적으로 보여준다. 또한 이러한 결과는 유전자의 sub-functionalization 및 neo-functionalization과도 밀접한 관계를 가질 것으로 여겨진다.

표 2-17 . 2 또는 3 loci로 mapping 된 primer set에서 detected SNP number pattern. 약어 No SNPs (N), single SNPs (S), multi SNPs (M)

	Class	No. patterns	(%)
di-mapped primers	N,N	1	(2.12)
	N,S	9	(19.14)
	S,S	12	(25.53)
	S,M	25	(53.19)
tri-mapped priemrs	N,S,S	4	(22.22)
	S,S,S	3	(16.67)
	N,S,M	3	(16.67)
	S,S,M	2	(11.11)
	S,M,M	5	(27.22)
	M	1	(5.56)

㉞ 104개의 single mapped primer set에서는 SNP가 multiple로 detection 된 것은 없었으며, 33 (31.73%)가 true-positives (TP)로 validation 되었고, TP로 validation 된 모든 SNP는 3 계통에서 reference와 비교하였을 때 polymorphism이 없는 것이었다. SNP로 calling 된 것 중 HRM에서 polymorphic 한 것으로 detection 한 것이 몇 개인지 알아보기 위하여 primer set이 single mapping되고, false positives로 분류 된 것 중 SNP로 detection 된 수를 계통별로 분석했다. 그 결과 K0027, K0014, K0009에서 각각 7, 7, 8개의 SNP가 calling 되었고, calling 된 SNP의 평균 depth는 14.14, 23.29, 21.75로 high depth evidence가 있고, 모두 homo 한 것이었다. SNP의 false positives 는 1) read mapping이 없거나 낮은 경우, 2) read mapping이 잘못 된 경우로 나눌 수 있다. 따라서, calling 된 SNP의 경우 false positives일 확률이 매우 낮은 것들이다. 이 각각의 SNP가 True라는 가정아래 HRM 결과가 true인 것은 중 K0027, K0014, K0009에서 각각 2, 3, 3개였다.

③ 2-3Mb distance 수준의 genome-wide (GW) SNP set 개발 및 초기형태 바이오 칩 개발

- ㉠ 위의 pipeline을 기반으로 만들어진 SNP map을 기반으로 *B. oleracea*의 2-3Mb distance로 전체 genome 수준의 SNP marker set을 개발하기 위하여 계통 전체에서 calling 된 SNP의 수가 7개 이상이고, 모두 homozygous type인 SNP set을 parsing 하였다. 그리고, 2-3 Mb를 cover 할 수 있도록 manual editing을 통해 96 primer sets을 선택하여 validation에 사용 하였다 (그림 2-53).

Chr	loci	distance		107	5-KI	105	106	108	10	J518	517	JK2	103	LN	JON	JON	caD	DUF	CaS	ca_s	111	ole_red	B16	DH	DH	GD	A12	##	BM	MC	brof	MC	Kale	Kale					
C1	5,124,836	2,037,693	A	G	G	G	G	N	G	G	G	G	G	G	G	N	N	G	G	N	G	N	G	N	G	N	G	N	N	N	N	N	N	G	G				
C1	7,162,529	4,687,030	G	A	N	A	A	N	N	A	A	N	N	A	A	N	A	A	N	A	A	N	A	A	N	N	N	A	A	N	N	N	N	A	N	A	A	N	A
C1	11,849,559	2,675,863	C	T	N	T	N	T	N	T	T	N	N	N	T	T	N	N	T	N	N	N	N	T	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	T	
C1	14,525,422	2,590,289	G	A	A	A	A	N	N	A	A	N	N	N	A	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	N	
C1	17,115,711	2,980,332	A	C	N	C	N	N	C	C	C	C	C	N	C	C	N	C	C	N	C	C	N	N	N	N	N	C	N	N	C	N	C	N	C	N	N		
C1	20,096,043	8,429,095	A	N	G	N	N	G	G	N	N	G	G	N	G	G	G	G	N	G	N	G	G	N	N	N	G	N	G	N	N	N	G	N	N	N	G		
C1	28,525,138	4,180,500	A	T	N	T	N	T	T	T	T	T	T	N	N	N	T	T	N	N	T	T	N	N	T	N	N	T	N	N	N	N	N	N	N	N	T		
C1	32,705,638	4,577,256	C	T	T	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	T	T	T	N	T	N	N	N	T	N	N	N	N	N	N	N	N	T	N		
C1	37,282,894	2,226,366	C	A	A	A	A	A	N	A	A	N	A	N	A	A	N	A	A	A	A	A	N	N	A	N	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A		
C1	39,509,260	#REF!	T	C	C	C	C	C	C	C	C	N	C	C	N	N	C	C	N	C	C	N	C	C	C	C	C	N	C	C	N	C	C	N	C	N			
C2	204,926	4,248,838	C	T	N	T	N	T	N	T	T	N	T	N	T	N	N	T	N	T	N	T	T	T	T	N	N	N	N	N	N	N	N	N	T	T	T		
C2	4,453,764	1,979,778	C	G	G	G	G	G	G	N	G	N	N	G	G	G	N	G	N	N	N	G	N	N	G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	G	N	
C2	6,433,542	44,642	A	N	T	N	T	T	T	N	N	T	N	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
C2	8,568,381	4,640,765	C	T	N	T	N	T	T	T	T	T	T	N	N	T	N	T	T	T	T	N	T	T	T	N	N	T	N	N	N	N	N	N	N	N	T	N	
C2	13,209,146	2,601,099	T	A	A	A	A	N	N	A	A	N	N	A	N	N	A	N	A	A	N	A	A	N	A	A	N	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A		
C2	15,810,245	4,105,725	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	N	C	C	C	N	C	N	C	C	C	C	N	N	N	N	C	C	C	C	C	C	C	C	N			
C2	19,915,970	4,196,654	T	N	C	C	C	N	N	C	C	N	N	N	C	N	N	C	C	N	C	N	C	N	N	C	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	C	N	
C2	24,112,624	13,691,468	C	N	N	A	N	A	A	A	A	A	N	N	A	N	N	A	N	A	N	A	A	A	A	N	N	A	N	N	A	N	N	A	N	N	A	N	
C2	37,804,092	4,386,695	T	A	N	N	N	A	A	N	N	A	A	A	A	A	A	A	A	N	A	A	A	A	N	A	A	A	N	A	N	N	A	A	N	N	A	A	
C2	42,190,787	5,644,760	G	C	N	N	C	C	C	N	N	C	C	N	C	C	N	C	C	N	C	C	C	N	C	N	N	C	N	N	C	N	C	N	C	C	C		
C2	47,835,547	#REF!	A	N	N	N	N	T	T	N	N	T	N	N	T	N	N	N	N	T	N	N	N	N	N	T	N	T	T	N	N	T	T	T	N	N			
C3	5,062,633	3,131,550	A	N	C	N	C	N	N	N	N	N	N	N	C	C	C	N	N	C	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
C3	8,194,183	5,304,513	C	N	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	N	T	T	N	N	T	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	T	N	
C3	13,498,696	3,506,271	T	N	N	C	C	C	C	C	C	C	C	N	C	C	N	N	C	C	N	N	C	N	N	C	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	C	N	
C3	17,004,967	3,857,354	T	G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	G	N	N	N	N	G	N	N	G	N	N	G	N	G	N	G	N	N	N	N	N	N	N	G	N	
C3	20,862,321	3,214,385	G	A	N	A	N	N	N	N	N	N	A	A	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	
C3	24,076,706	3,316,887	C	T	T	T	N	T	N	T	T	N	T	N	N	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	T	N	
C3	27,393,593	3,619,199	G	N	N	N	C	C	C	N	C	C	C	C	N	C	N	N	C	C	N	N	N	C	C	N	C	G	N	N	C	N	C	N	N	N	N		
C3	31,012,792	3,850,700	G	N	A	N	A	N	N	N	N	N	N	A	A	N	A	A	A	A	N	A	N	N	N	A	N	N	N	A	A	N	N	N	N	N	A	A	
C3	34,863,492	1,900,008	C	N	A	N	N	N	A	N	N	A	N	A	N	N	N	N	A	A	N	A	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	A	
C3	36,763,500	19,618,580	T	N	N	N	C	C	C	N	C	N	C	C	C	C	N	C	C	N	C	N	N	C	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	C	C	N	C
C3	56,382,080	3,121,142	A	G	G	G	N	N	N	G	N	G	N	N	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	N	G	N	N	G	N	N	G	N	N	G	N	N	G	G
C3	59,503,222	4,527,089	C	G	G	G	N	G	G	G	G	G	G	N	G	N	N	G	N	G	G	G	G	N	G	N	N	G	N	N	G	G	G	G	N	N	N	N	
C3	64,030,311	-63,993,401	C	N	T	T	T	T	T	T	T	N	T	T	T	T	N	T	N	T	N	T	T	T	N	T	N	N	N	N	N	N	N	T	N	N	T	T	

그림 2-53. Example of GW SNP sets

아. 양배추류 기본 유전자 지도 작성 및 QTL 지도 작성

① 양배추류의 유전자 지도 작성

- ㉠ 양배추 유전자 지도 작성용 집단 확보

ㄱ. 양배추류 유전자 지도를 작성하기 위해 C 지놈의 표준 유전집단을 이용하고자, 양배추류 유전 집단 'BoITBDH'를 영국의 HRI에서 분양 받아 사용하였다. TBDH 유전 집단은 'rapid-cycling *B. oleracea* DH' 계통의 내흔계 'TO1000DH3'와 'broccoli DH' 계통의 내흔계 'Early Big'을 교배하여 생성된 F1을 약배양하여 만든 DH 집단 150계통으로 구성되어 있다. 양친과 DH 집단의 잎으로부터 DNA를 추출하여 PCR 반응에 사용하였다.

ㄴ. BoITBDH 집단은 'rapid-cycling *B. oleracea*'를 약배양으로 고정된 'TO1000DH3'와 'broccoli'를 약배양으로 고정된 'Early Big'을 교배하여 생성

된 F₁을 약배양하여 만든 DH(Doubled haploid) 집단으로 총 150계통으로 구성되었음.

㉔ 양배추 유전자 지도 작성용 마커 확보

- ㄱ. 양배추의 유전자 지도 초안을 작성하기 위해 배추분자마커연구사업단의 기존 도출성과를 활용하고자 하였다. 배추에서 기 개발 및 사용가능한 마커 수는 기초 유전자지도관련 마커 3000여종 (Seed BAC 클론 염기서열 기반 개발, 749개; BAC-end 염기서열 기반 개발, 1680개; EST 염기서열 기반 개발, 707개, Indel 148개)의 정보를 확보하여 양친과의 다형성 검정에 사용하였다.
- ㄴ. 사업단에서 선별한 양배추 유전체 정보 이용하여 디자인한 SNP 이용하여 지도 작성에 사용하였다. 양배추류 기본 유전자 지도 작성 위해 1세부과제에서 양배추 유전체 정보 이용하여 9개 염색체에 고르게 분포하는 SNP 프라이머를 물리적 거리, 2Mb 당 선별하여 프라이머 제작 및 글루코시놀레이트, 프로고이 트론 생합성 관련 유전자 연관 SNP 프라이머를 제작하였고, 본 유전자 지도 작성하였다.

표 2-18. 기초 유전자지도관련 마커종류

Primer set	Marker type	Resource	No. of primers	Integ-4 populations mapped	LG1	LG2	LG3	LG4	LG5	LG6	LG7	LG8	LG9	LG10
ACMP	SSR	EST	707	234	17	12	40	18	33	29	28	13	31	13
BRPGM	SSR	BAC-end	1618	216	18	20	29	12	23	18	30	14	27	25
cnu_m000	SSR	BACs	605	342	31	13	63	22	50	15	49	26	72	1
nia_m000	SSR	BACs	144	84	12	4	11	4	6	6	8	6	16	11
BBSRC	SSR	BACs	200	41	2	2	14	-	2	4	5	6	3	3
IBP	IBP	gDNA	272	153	12	15	31	9	12	10	14	11	29	10
Indel	Indel	gDNA	169	130	12	5	16	15	18	17	18	9	15	5
기타(eg. cnu_eE030)	SSR	EST	44	44	5	4	2	1	6	8	6	5	1	6
기타(Piao et al.)	SSR	EST	125	125	12	11	10	11	13	20	15	13	10	10
			3884	1369	121	86	216	92	163	127	173	103	204	84

㉕ 양배추 유전자 지도 작성용 마커 선별

- ㄱ. Bol TBDH 집단의 모본과 부분인 'TO1000DH3'와 'Early Big' 간에 다형성 검정으로 마커를 선별하였다.
- ㄴ. 확보한 총 3884개의 마커 중 1396개가 배추 유전자 지도의 10개의 연관그룹에 표기되었음. 각 연관그룹별로 적게는 84개(LG10)에서 많게는 216(LG3)를 포함하고 있었음. 이들 표기된 마커가 transferability가 높을 것으로 예상 되어 다형성 검정에 우선순위를 두고 수행 하였음 (표 2-18).
- ㄷ. PCR 반응 조성은 총 반응 양을 10 μ l로 하고, primer 농도는 0.4 μ M, dNTP 농도 250 μ M, Taq polymerase 0.1 unit 와 주형DNA를 10 ng을 이용하였음. 증폭을 위한 profile은 Cycle을 시작하기 전 시료를 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 predenaturation하였고, 94 $^{\circ}$ C에서 45sec, 프라이머별 적정 annelling 온도에서 45sec, 72 $^{\circ}$ C에서 45sec 간 합성을 1 cycle로 하여 35 cycle을 수행하였음. 35

- cycle증폭 후에는 완전한 DNA extension을 위해 72°C에서 7분간 final elongation을 수행하였음. 증폭단편의 다형성은 PAGE을 이용하여 분석하였음.
- ㄹ. SSR 프라이머의 경우 PAGE 전기영동법을 사용하였으며, SNP 프라이머는 HRM, 바이오막 시스템을 사용하여 분석하였다. 다형성 검정을 수행하여 선발한 프라이머는 유전자지도 작성용 마커로써, 분리집단에서 유전자형 검정 및 유전자지도 작성용 데이터 matrix를 작성하였다.
 - ㄷ. 총 618개의 SSR 마커 사용한 다형성 분석에서 'TO1000DH3'에서는 평균적으로 85.6%와 'Early Big'에서 86.6%가 PCR 반응에서 성공적으로 증폭되었음. 다형성을 나타내는 비율은 마커 셋트 별로 27.3~42.7%로 차이가 있었고 평균 34.3%의 마커가 다형성을 나타내었음 (표 2-19). EST 염기서열을 기반으로 개발한 SSR 마커셋트(marker type, ACMP)보다는 BAC 클론 정보를 이용하여 개발한 SSR 마커셋트(marker type, BRPGM&cnu_m000)가 양배추류에 적용하였을 때 PCR 반응에 의한 증폭 및 다형성 빈도에서 높은 빈도로 마커 적용성을 보였음. 이는 타 실험에서 다형성 검정시 무작위적으로 수행하였을 때 나타내던 다형성 비율이 약 10% 전후였던 결과와 비교해 볼 때 매우 효율적인 결과였음. 양배추류 유전자 지도 작성에 이용 가능한 마커 212개를 선발하였음.

표 2-19. 양배추류 유전자 지도 작성용 마커 선발을 위한 다형성 검정 결과

Marker type	No. of primers assayed	No. of primers amplified in (%)		No. of primers amplified as a single amplicon (%)		No. of polymorphic primers (%)
		TO1000DH	Early Big	TO1000DH	Early Big	
ACMP	227	178 (78.4)	185 (81.5)	169 (74.4)	176 (77.5)	62 (27.3)
BRPGM	199	191 (96.0)	189 (95.0)	160 (80.4)	154 (77.4)	85 (42.7)
cnu_m000	192	160 (83.3)	161 (83.9)	147 (76.6)	146 (76.0)	65 (33.9)
Total	618	529 (85.6)	535 (86.6)	476 (77.0)	476 (77.0)	212 (34.3)

㉠ 양배추 유전자 지도 작성

- ㄱ. 다형성을 나타내 유전자 지도 작성용으로 선발한 마커를 이용하여 BolTBBDH 집단을 대상으로 유전자형을 검정하고, 이 자료를 기반으로 양배추류 유전자지도를 작성하고자 하였다. 'BolTBBDH' 집단에서 분석한 유전자형 data matrix를 이용하여 마커를 유전자지도에 표기하고자 하였다.
- ㄴ. 연관분석 및 유전자지도 작성에는 JoinMap v.4.0 프로그램을 사용하였으며 map distance 계산은 Kosambi's mapping function을 이용하였다. 유전자지도는 최소 LOD 스코어 2.0 및 최대 재조합 비율 0.4에 근거하여 작성하였다.
- ㄷ. 총 212개의 마커(배추의 BAC클론에서 개발된 SSR 마커 150개, EST염기서열에서 개발된 SSR 마커 62개) 중 150개의 마커를 사용하여 BolTBBDH 집단에서 유전자형 분석이 완료되었음. 이들 유전자형 data matrix 정보를 이용하여 마커를 유전자지도에 표기하고자 하였음. JoinMap v.4.0 프로그램을 사용하였으며 map distance는 Kosambi's mapping function을 이용하여 계산하였음. 27개의 마커가 그룹에 포함되지 않았으며 LOD value 2.0에서 8개의 연관그룹을 형성하였고 이중의 한 개의 연관그룹이 LOD value 8에서 나뉘어 졌음. 총

123개의 BAC 클론 연결된 분자마커가 9개의 연관그룹에 분포하였으며, 전체 유전자 지도 길이는 598.7 cM 이었음 (그림 2-54, 표 2-20). 기존에 배추유전자 지도에 사용된 마커를 사용함으로써 두 유전체에 공통으로 사용된 마커를 이용하여 유전체간의 비교가 가능함. 추후 본 사업단의 1핵심 및 2핵심 과제에서 도출되는 결과를 이용하여 형질 마커를 유전자 지도에 표기하여 형질관련 연구를 수행할 수 있는 기반을 조성하고자 하였음.

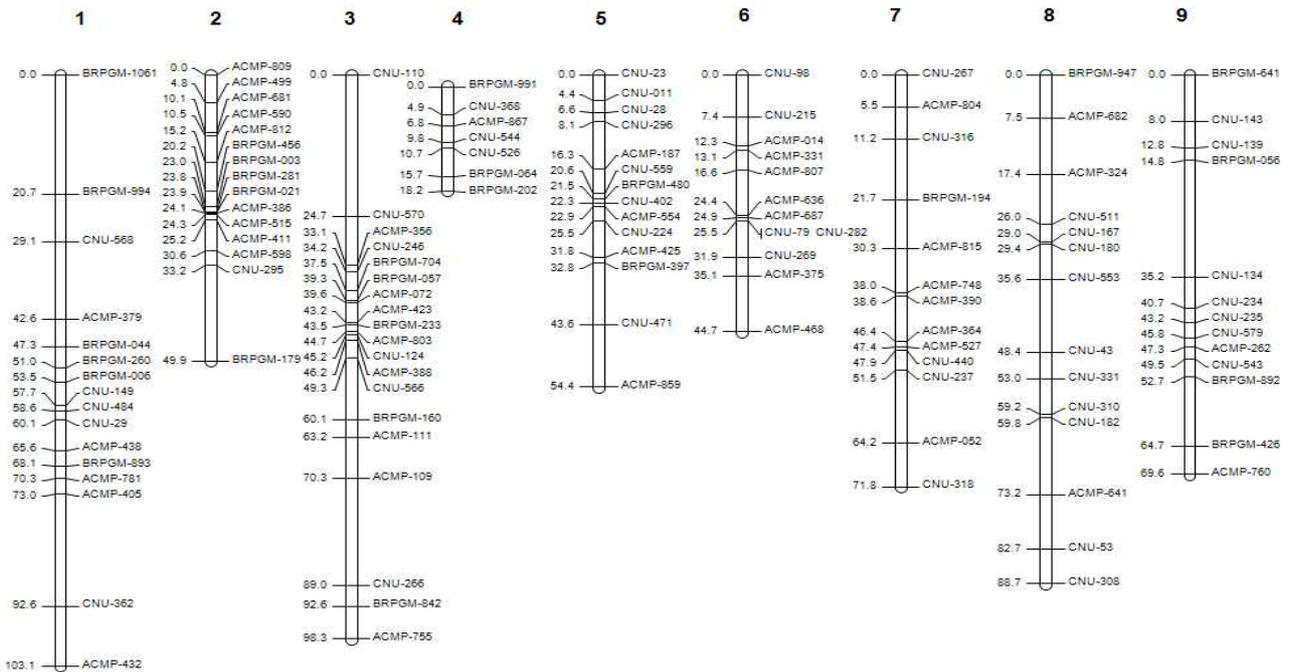


그림 2-54. 양배추류 BoITBDH 집단을 이용한 유전자 연관지도 (진행중). 연관지도 작성은 JoinMap v. 4.0으로 분석 하였으며 연관 그룹의 왼 편에는 유전자 지도의 거리, 오른 편에는 유전자좌의 이름을 표기했음. 9개의 연관 그룹으로 구성된 연관지도는 123개의 마커를 포함하고 있으며 총 길이는 598.7 cM 었음.

표 2-20. 유전자 연관 지도에 대한 요약.

연관그룹	마커 수	연관그룹 길이 (cM)
1	16	103.1
2	15	49.9
3	19	98.3
4	7	18.2
5	14	54.4
6	12	44.7
7	13	71.8
8	14	88.7
9	13	69.6
합계	123	598.7

<2년차>

㉞ 배추유전자지도에 있는 마커 16개를 추가 표기하고 공통마커를 이용하여 양배추류 기본 유전자 지도와 비교

ㄱ. 배추유전자지도 사용 마커로 증폭되는 염기서열 단편을 blast로 상동성 검색하여 애기장대의 genome block (A-Z)으로 표기하여 연관그룹 왼편에 표기하였음. 또한 마커가 배추유전자지도에서 위치하는 연관그룹 정보를 연관그룹 왼편에 표기하였음. 이로써 공통조상인 애기장대에서 양배추, 배추로 분화된 유전체 구조를 볼 수 있었다. 이로써 양배추 연구에서 특정 영역의 정보가 필요하게 될 때 모델식물인 애기장대 뿐 만 아니라 작물이면서 유전적으로 더 가까우면서 유전체 정보가 상대적으로 더 많이 축적된 배추의 정보를 이용할 수 있는 계기가 되었음.

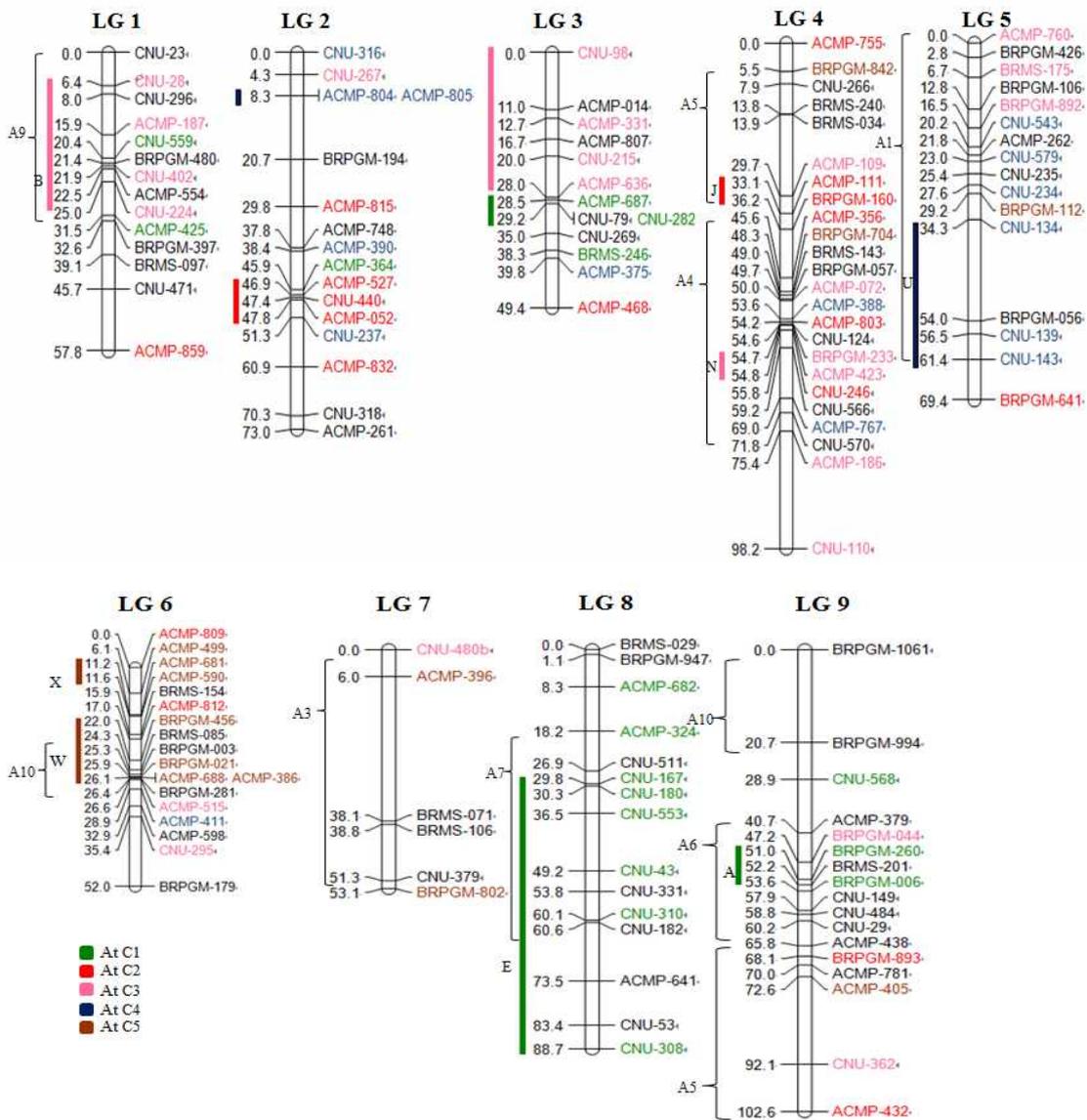


그림 2-55. 양배추류 'BoITBDH' 집단을 이용한 유전자 연관지도. 연관지도 작성은 JoinMap v. 4.0으로 분석 하였으며 연관 그룹의 왼 편에는 유전자 지도의 거리, 오른 편에는 유전자좌의 이름을 표기했음. 9개의 연관 그룹으로 구성된 연관지도는 139개의 마커

를 포함하고 있으며 총 길이는 644.2 cM 였음. 연관 그룹 왼 편에 색 막대는 애기장대 염색체의 각기 다른 염색체를 나타내며 A1-A10은 배추유전자지도에서 연관 그룹을 나타냄.

㉞ 표준유전자지도에 사용된 마커 이용 다형성 검정

ㄱ. 양배추류 표준유전자지도의 정보를 이용하고자 유전자지도간의 연동이 가능하도록 표준유전자지도에 표기된 마커를 지도화 함으로써 통합유전자 지도 작성하고자 하였음. 9개의 연관그룹에 분포하는 표준마커 (Fito marker sets 등) 176개를 이용하여 'BoITBDH'집단의 모본, 부분인 'TO10000DH3'와 'Early Big' 간에 다형성 나타내는 마커 선별하였음. 총 68개가 다형성을 나타냈으며 이 중 15개는 우성으로, 나머지는 공우성으로 나타났음. 공우성 마커 중에서 30개의 마커로 'BoITBDH'집단에서 유전자형 분석을 수행하였음. PCR 반응은 총 반응 양을 10 μ l로 하고, primer 농도는 0.4 μ M, dNTP 농도 250 μ M, Taq polymerase 0.1 unit 와 주형 DNA 10 ng을 이용하였음. 증폭을 위한 profile 은 Cycle을 시작하기 전 시료를 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 predenaturation하였고, 94 $^{\circ}$ C에서 45sec, 프라이머별 적정 annelling 온도에서 45sec, 72 $^{\circ}$ C에서 45sec 간 합성을 1 cycle로 하여 35 cycle을 수행하였음. 35 cycle증폭 후에는 완전한 DNA extension을 위해 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 final elongation을 수행하였음. 증폭단편의 다형성은 PAGE을 이용하여 분석하였음.

㉟ 사업단에서 양배추 유전체 정보를 기반으로 디자인한 SNP 프라이머 이용 다형성 검정

ㄱ. InDel 프라이머 다형성 검정: 양배추 사업단에서 양배추 유전체 정보를 기반으로 디자인한 InDel 프라이머 중 PAGE 로 다형성 나타냈던 29쌍으로 HRM 을 이용하여 다형성 검정. 12 프라이머에서는 다형성이 없었으며, 16 프라이머에서 다형성 나타내었으나 5 프라이머에서 melting temperature curve 의 형태와 차이가 매우 적었으며 16 프라이머를 이용하여 집단에서 유전자형을 분석하였음 (그림 2-56).

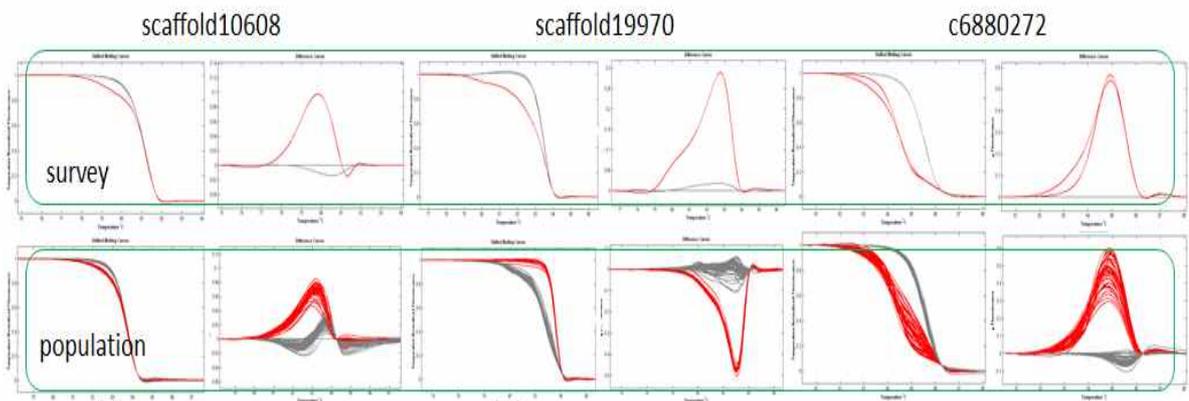


그림 2-56. 양배추 유전체 정보를 기반으로 디자인한 InDel 프라이머 이용 HRM 으로 다형성 있는 프라이머 선별 및 집단에서 유전자형 검정 예시. 프라이머 ID: scaffold10608, scaffold19970, c6880272

- ㄴ. SNP 프라이머 다형성 검정: 양배추 사업단에서 양배추 유전체 정보를 기반으로 디자인한 SNP 프라이머를 HRM 이용하여 다형성 검정.
- ㄷ. 2년차 HRM으로 7 점의 유전자원을 대상으로 validation 했던 프라이머 90쌍 이용, 'TO10000DH3'와 'Early Big' 간에 다형성 검정, 총 38 쌍이 다형성을 나타냈고 이 중 11개는 매우 근소한 차이로 다형성을 나타냄. 27 쌍 SNP 프라이머로 'BoITBDH' 집단에 genotyping 하였음 (그림 2-57).

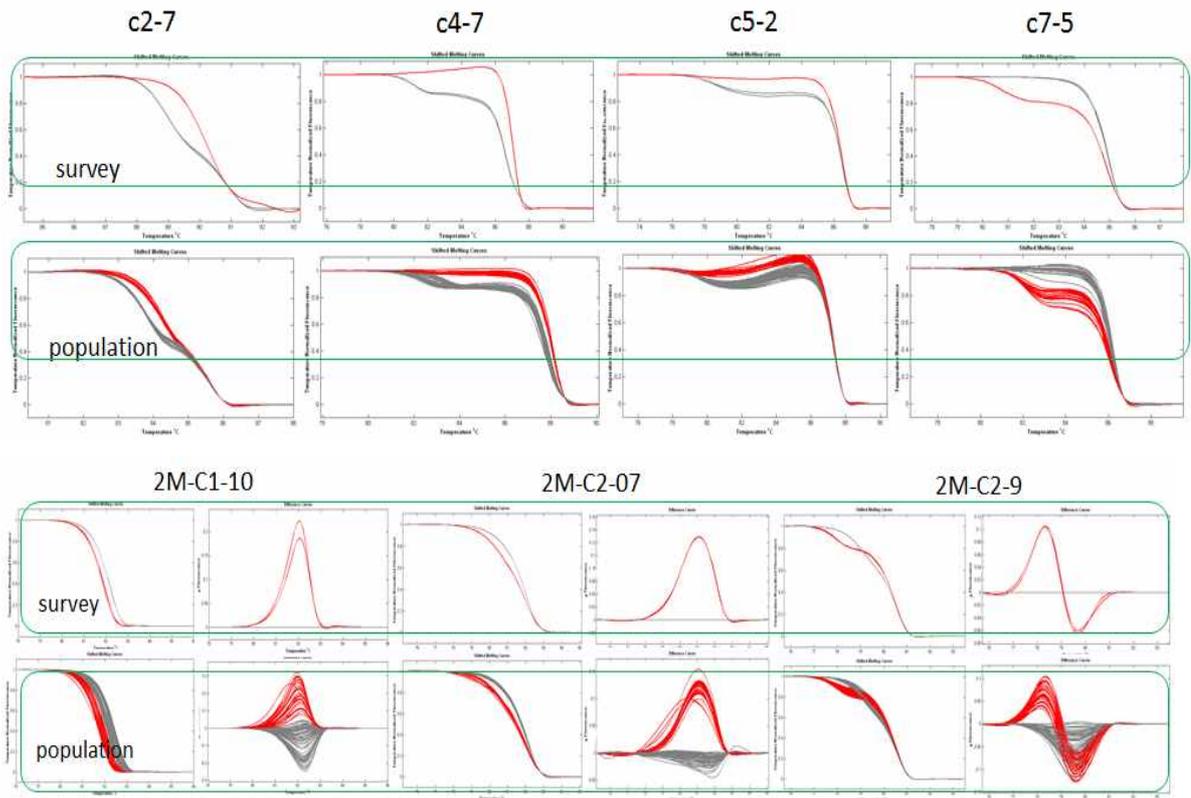


그림 2-57. 양배추 유전체 정보를 기반으로 디자인한 SNP 프라이머 이용 HRM 으로 다형성 있는 프라이머 선발 및 집단에서 유전자형 검정 예시. 프라이머 ID: C2-7, C4-7, C5-2, C7-5, 2M-C1-10, 2M-C2-07, 2M-C2-9

- ㄹ. PCR 반응은 총 반응 양을 10 μ l로 하고, primer 농도는 0.4 μ M, dNTP 농도 250 μ M, Taq polymerase 0.1 unit 와 주형 DNA 10 ng, 0.5xLCgreen 을 이용 하였음. 증폭을 위한 profile은 Cycle을 시작하기 전 시료를 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 predenaturation하였고, 94 $^{\circ}$ C에서 45sec, 프라이머별 적정 annelling 온도에서 45sec, 72 $^{\circ}$ C에서 45sec 간 합성을 1 cycle로 하여 35 cycle을 수행하였음. 35 cycle증폭 후에는 완전한 DNA extension을 위해 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 final elongation을 수행하였음. 증폭단편의 다형성은 LightScanner (Idaho Technology Inc.)를 이용하여 분석하였음.

㉠ 양배추류 유전자 지도 작성

ㄱ. 다형성을 나타내 유전자 지도 작성용으로 선발한 마커를 이용하여 BoITBDH 집단을 대상으로 유전자형을 검정하고, 이 자료를 기반으로 양배추류 유전자 지도를 작성하고자 함. 다형성을 나타낸 총 마커 수는 138개였으며, 이 중에서 100개의 마커가 'BoITBDH' 집단에서 유전자형 분석이 완료되었음 (표 2-21). 이들 유전자형 data matrix 정보를 이용하여 마커를 유전자지도에 표기하고자 하였음.

표 2-21. 양배추류 유전자 지도 작성용 마커 선발 결과

Marker type	Resource	No.of		
		primers assayed	polymorphic primers	genotyping population
SSR (BRMS)	<i>B. rapa</i>	45	16	16
SSR (Fito)	<i>B. oleracea</i>	176	68	30
InDel	<i>B. oleracea</i>	29	16	16
SNP (1st validation)	<i>B. oleracea</i>	90	38	38
Total		340	138	100

ㄴ. JoinMap v.4.0 프로그램을 사용하였으며 map distance는 Kosambi's mapping function을 이용하여 유전자지도작성을 하였음. 총 207 개의 마커가 그룹을 형성하였으며 9개의 큰 연관그룹과 3개의 작은 연관그룹에 분포하였으며, 전체 유전자 지도 길이는 946 cM 이었음 (그림 2-58). 표준지도의 마커를 사용함으로써 BoITBDH 집단을 이용한 유전자 연관지도의 일부 연관그룹과 연결하였음 (그림 2-59).

<3년차>

㉔ 양배추 유전체 정보를 기반으로 디자인한 SNP 프라이머 이용 다형성 검정

- ㄱ. 양배추류 기본 유전자 지도 작성 위해 1세부과제에서 양배추 유전체 정보 이
용하여 9개 염색체에 고르게 분포하는 SNP 프라이머를 물리적 거리, 2Mb 당
선발하였고 본 과제에서는 이를 분양받아 사용하였다. 이들 SNP 프라이머를
HRM 기법으로 다형성 검정을 수행하여 다형성이 나타난 프라이머는 마커로
지도에 표기 하고자 하였다. 총 200개의 SNP 프라이머는 'BoITBDH'집단의 모
본, 부분인 'TO10000DH3'와 'Early Big'에서 각각 197개(99%), 193개(97%)의
프라이머가 PCR에서 성공적으로 증폭되었다. 46(23%)개의 프라이머가 HRM에
서 동일한 melting curve를 나타냈으며 154개(77%)의 프라이머가 다형성을 나
타냈다(표 2-22, 그림 2-60). 이 중에서 86개의 프라이머는 다형성이 있으나 차
이가 매우 근소하였으며, 58개는 melting curve 형태나 melting temperature의
차이가 비교적 분명하였다. 추가로 사업단에서 분양받은 SNP 프라이머 96개중
에 33개가 다형성을 나타냈다. 총 296개의 프라이머에서 다형성을 조사하여
187개의 다형성을 나타내는 마커를 선발하였다. 구분이 쉽게 되는 프라이머를
우선순위로 시작하여 총 91개의 마커로 'BoITBDH'집단에서 유전자형 분석을
완료하였다.
- ㄴ. 유전자형 분석을 위한 PCR 반응은 총 반응 양을 10 μ l로 하고, primer 농도
는 0.4 μ M, dNTP 농도 250 μ M, Taq polymerase 0.1 unit 와 주형 DNA 10
ng, 0.5xLCgreen 을 이용하였다. 증폭을 위한 profile은 Cycle을 시작하기 전
시료를 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 predenaturation하였고, 94 $^{\circ}$ C에서 45sec, 프라이머별 적
정 annelling 온도에서 45sec, 72 $^{\circ}$ C에서 45sec 간 합성을 1 cycle로 하여 35
cycle을 수행하였다. 35 cycle증폭 후에는 완전한 DNA extension을 위해 72 $^{\circ}$ C
에서 7분간 final elongation을 수행하였다. 증폭단편의 다형성은 LightScanner
(Idaho Technology Inc.)를 이용하여 분석하였다.

표 2-22. 유전체 정보 기반 SNP 다형성 검정 결과

	Tested	No. of markers				Polymorphic type*			
		Amplified in TO10000DH3	Amplified in Early Big	Mono-morphic	Poly-morphic	1	2	3	-
Bol C01	19	19	19	4	15	6	3	6	-
Bol C02	24	24	24	7	17	12	3	2	-
Bol C03	29	29	29	6	23	8	6	8	1
Bol C04	24	24	23	7	17	9	4	3	1
Bol C05	21	21	21	4	17	10	5	2	-
Bol C06	18	17	14	1	17	10	2	2	3
Bol C07	22	22	21	8	14	9	4	0	1
Bol C08	20	19	19	5	15	8	3	3	1
Bol C09	23	22	19	4	19	14	1	1	3
Total	200	197	189	46	154	86	31	27	10

* 1-3, 다형성의 정도를 나타냄. 1, 다형성이 있으나 그 차이가 매우 근소함; 3, 다형성의 차이가 분명하기에 구분이 쉽게 가능함.

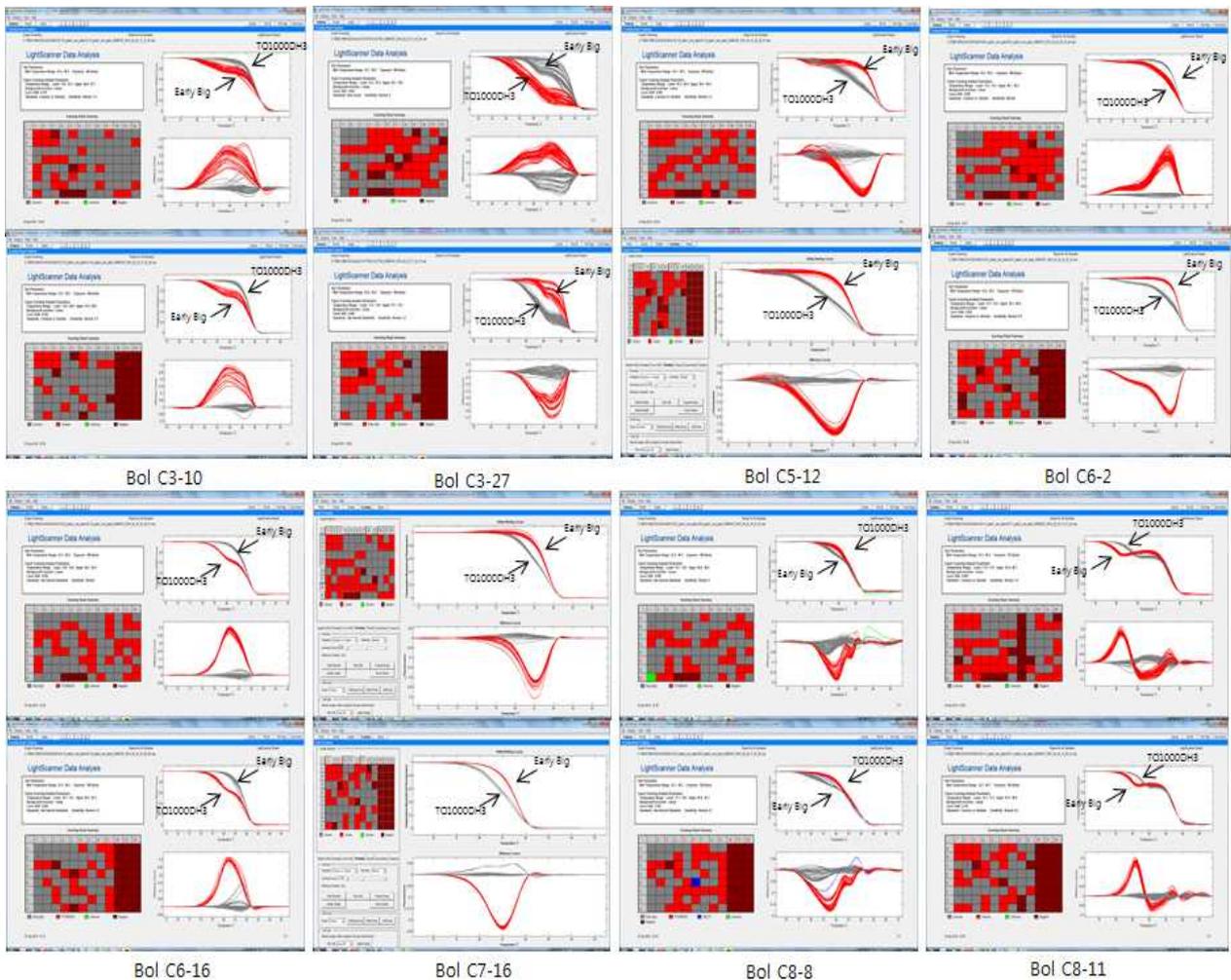


그림 2-60. 양배추 유전체 정보를 기반으로 디자인한 SNP 프라이머 이용하여 HRM 으로 다형성 있는 프라이머 선발 및 집단에서 유전자형 검정 예시.

㉔ 양배추류 유전자 지도 작성

ㄱ. 다형성을 나타내 유전자 지도 작성용으로 선발한 마커를 이용하여 BolITBDH 집단을 대상으로 유전자형을 검정하고, 이 자료를 기반으로 양배추류 유전자지도를 작성하고자 하였다. 'BolITBDH' 집단에서 분석한 유전자형 data matrix를 이용하여 마커를 유전자지도에 표기하고자 하였다. 유전자지도 작성에는 JoinMap v.4.0 프로그램을 사용하였으며 map distance는 Kosambi's mapping function을 이용하였다. 총 296개의 SNP 프라이머쌍에서 선발한 187개의 다형성을 나타내는 마커 중 91개의 마커를 사용하여 BolITBDH 집단에서 유전자형 분석이 완료되었다. 44개의 마커가 그룹에 포함되지 않았으며 LOD value 4.1-7.4에서 9개의 연관그룹을 형성하였고 258 개의 마커가 그룹을 형성하였으며, 지도 길이는 41.6 cM (LG3)에서 190.7 cM(LG5) 까지 분포하였다. 각 연관 그룹 별로 적게는 19개(LG3), 많게는 47개(LG6)의 마커가 포함되었으며, 지도 길이는 41.6 cM (LG3)에서 190.7 cM(LG5) 까지 분포하였다. 각 연관 그룹 별로 마커와 마커간의 거리는 2.2cM(LG3, LG4)에서부터 5.4cM(LG5)로

나타났으며 평균 거리는 3.3cM이었다(표 2-23). 전체 유전자 지도 길이는 845cM로 나타났다(그림 2-61). 표준지도의 마커를 사용함으로써 BolTBBDH 집단을 이용한 유전자 연관지도의 일부 연관그룹과 연결하였다.

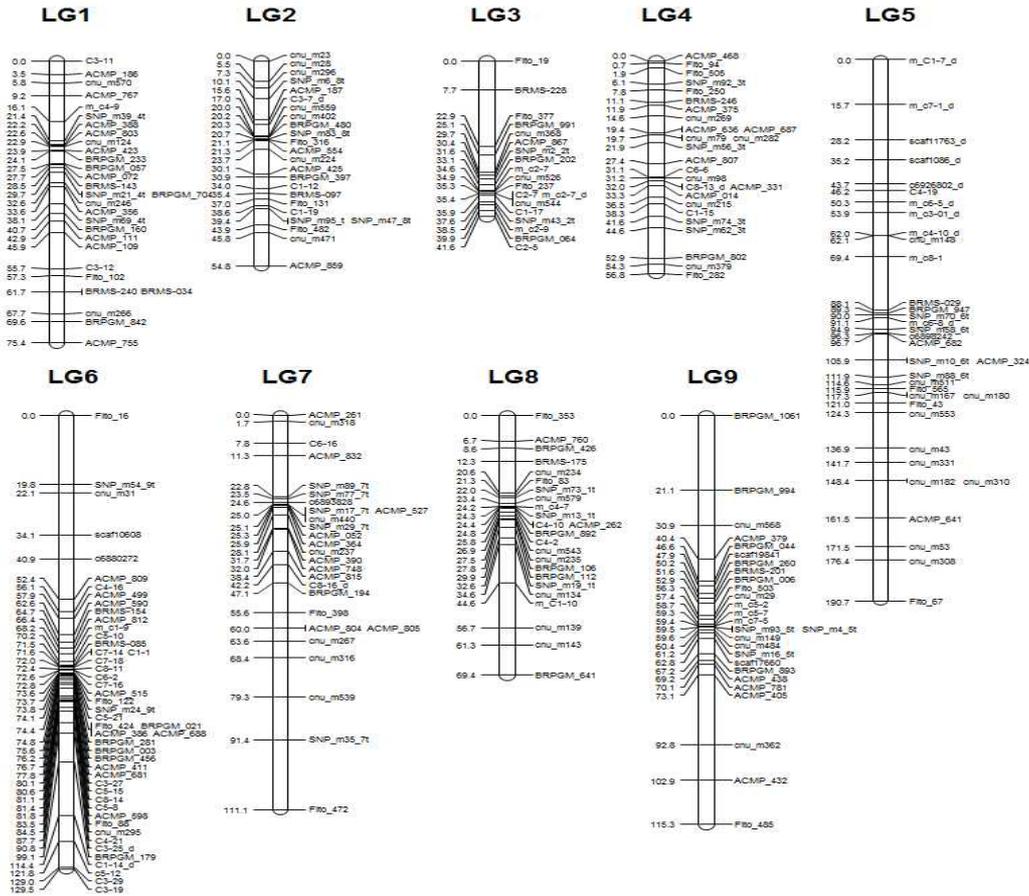


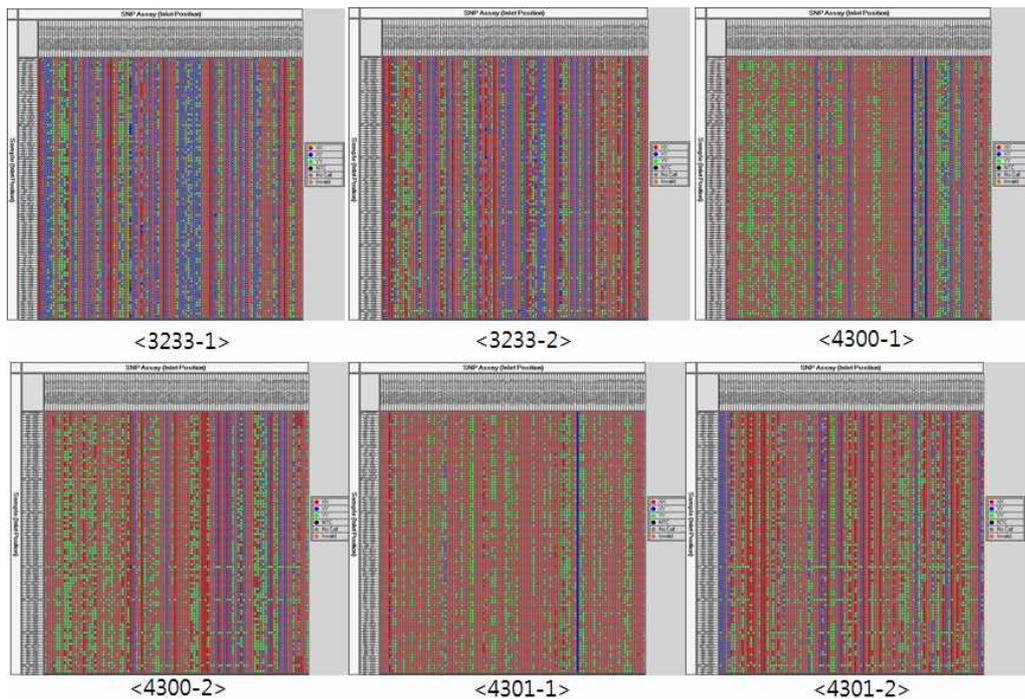
그림 2-61. 양배추류 BolTBBDH 집단을 이용한 유전자 연관지도. 연관지도 작성은 JoinMap v. 4.0으로 분석 하였으며 연관 그룹의 왼 편에는 유전자 지도의 거리, 오른 편에는 유전자 좌의 이름을 표기했다. 9개의 연관 그룹으로 구성된 연관지도는 258개의 마커를 포함하고 있으며 총 길이는 845cM 이다.

표 2-22. 양배추류 유전체 정보 기반한 SNP 마커가 표기된 유전자지도 정보

LG	No. of markers	Length(cM)	Marker interval(cM)
1	29	75.4	2.6
2	24	54.8	2.3
3	19	41.6	2.2
4	26	56.8	2.2
5	35	190.7	5.4
6	47	129.5	2.8
7	27	111.1	4.1
8	24	69.4	2.9
9	27	115.3	4.3
Total	258	844.7	3.3

<4년차>

- ㉠ 양배추류 유전체 기반 개발된 SNP 프라이머를 바이오막 시스템을 이용한 SNP validation 및 과 genotyping
- ㄱ. 1세부과제에서 양배추류 유전체를 기반으로 제작한 SNP 프라이머 96개, 3 세트(명명: 3233, 4300, 4301)를 이용하여 Fluidigm 사의 바이오막 시스템으로 SNP genotyping을 하였다. 각 SNP 프라이머 96개들이 1 세트를 대상으로 모본과 부분인 'TO1000DH3'와 'Early Big'은 2번씩 반복하였고, TBDH 집단의 각 150계통은 1번씩 calling 하는 것을 기본으로 SNP genotype을 분석하였다. TBDH 집단의 크기가 150 계통이므로 각 프라이머 세트 당 두 plate (plate 1, plate 2) 로 나누어 분석을 진행하였다(그림 9). 각 프라이머 세트(3233, 4300, 4301)에서 'call confidence result'는 94.1%, 96.6%, 96.1%로 평균 95.6% 였다.
 - ㄴ. 각 plate 에 모본과 부분이 2반복씩 분석하였으므로 분석 결과가 재현성 있게 되었는지를 확인하였고, 같은 프라이머로 분석했을 때 서로 다른 genomic DNA가 담긴 plate 1과 plate 2에 결과에서 모본과 부분의 결과가 재형성(다형성 유무, SNP genotype)을 비교하여 확인하였다. 모본과 부분의 genomic DNA를 기준으로 비교하였을 때, 동일 plate에서 반복 실험의 결과 재현성이 비교적 높았으나, plate 1과 plate 2에서 재현성은 일부 프라이머에서 나타나지 않았다. SNP type calling이 homozygous(XX)이 heterozygous(XY)로 바뀌기도 하였고, 'Early big' 계통의 동일한 gDNA가 plate1 에서는 'A:G'로 코딩, plate2에서는 'A:A'로 코딩되어 실제로는 다형성이 아님을 확인할 수 있었다(표 2-23, 표 2-24). 따라서 재현성있게 calling 된 프라이머를 선발하였고, 총 갯수는 118개의 SNP data를 유전자 지도작성용으로 사용하였다(표 2-25).



<그림 2-62. 바이오막 프라이머 3233, 4300, 4301 셋트로 TBDH 집단에서 call map result>

표 2-23. call map result 정보를 기반으로 동일한 plate 결과에서 'TO1000DH3'와 'Early big' 계통간 다형성 있는 프라이머 선발

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
	C1_10997783	C1_42649992	C2_7482388	C3_43988978	C4_14862008	C4_44406680	C5_33670829	C6_1691880	C6_6044020	C7_38692850	C8_30605627	C9_22860462	C1_13603018	C2_14632813	C3_1018168	C3_50959621	C4_22401572	C4_48559145	C5_36805329	C6_19927452	C7_12159547	C7_41518436	C8_34846602
TO1000	A:A	G:G	A:A	T:G	T:C	T:T	A:A	G:G	A:A	G:G	C:C	A:A	T:T	C:C	T:T	C:C	T:T	G:G	C:C	G:G	C:C	A:A	G:G
TO1000	A:A	G:G	A:A	T:G	T:C	T:T	A:A	G:G	A:A	G:G	C:C	A:A	T:T	C:C	T:T	C:C	T:T	G:G	C:C	G:G	C:C	A:A	G:G
TO1000	A:A	G:G	A:A	T:G	T:C	T:T	A:A	G:G	A:A	G:G	C:C	A:A	T:T	C:C	T:T	C:C	T:T	G:G	C:C	G:G	C:C	A:A	G:G
Early big	A:A	G:G	A:A	G:G	No C	G:G	A:A	G:G	G:G	G:G	C:C	G:G	T:T	C:C	A:A	C:C	T:T	T:T	C:C	A:A	C:C	No C	T:T
Early big	A:A	G:G	A:A	No C	No C	G:G	A:A	G:G	G:G	G:G	C:C	G:G	T:T	C:C	A:A	C:C	T:T	T:T	C:C	A:A	C:C	No C	T:T
Early big	A:A	G:G	A:A	No C	T:T	G:G	A:A	G:G	G:G	G:G	C:C	G:G	T:T	C:C	A:A	C:C	T:T	T:T	C:C	A:A	C:C	No C	T:T

표 2-24. call map result 정보를 기반으로 서로다른 plate(plate1, plate2) 결과에서 'TO1000DH3'와 'Early big' 계통간 다형성 있는 프라이머 선발

		C1_15783817	C3_43717298	C4_39549216	C5_23132597	C6_7599990	C7_26065010	C8_40372720	C8_5367916	C9_3410068	C12_477333	C2_22402018	C2_30807066	C3_39162769	C3_4826010	C4_41518436	C5_21444032	C5_29055515	C7_20212489	C8_18190854	C9_12291399	C9_42463528	C1_26023504	C2_2377298	C2_52526064	C3_35160602	C4_31062697	C4_47053310	C5_27251697
1381974308-call_(plate 1)	Early big	G:G	A:G	A:A	C:T	C:C	T:T	A:A	T:G	G:G	C:C	C:C	G:G	C:T	No (No (G:G	No (A:G	A:A	C:C	G:G	T:T	A:A	G:G	G:A	C:T	G:G	T:T			
1381974308-call_(plate 2)	Early big	G:G	A:G	A:A	C:T	C:C	T:T	A:A	T:G	G:G	C:C	C:C	G:G	C:T	No (No (G:G	No (A:G	A:A	C:C	G:G	T:T	A:A	G:G	G:A	C:T	G:G	T:T			
1381974310 call_(plate 2)	Early big	G:G	A:A	A:A	C:T	C:C	T:T	A:T	T:G	G:G	C:C	C:C	G:G	C:T	No (No (G:G	No (A:G	A:A	C:C	G:G	T:T	A:A	G:G	G:A	No (G:G	T:T				
1381974308-call_(plate 1)	TO1000DH3	G:G	A:G	A:A	C:C	T:C	T:T	A:A	T:G	G:G	C:C	C:C	A:G	C:T	A:T	C:T	T:G	T:G	A:G	G:A	T:C	G:G	T:T	A:A	G:G	G:A	C:C	C:C	A:A
1381974308-call_(plate 1)	TO1000DH3	G:G	A:G	A:A	C:C	T:C	T:T	A:A	T:G	G:G	C:C	C:C	A:G	C:T	A:T	C:T	T:G	T:G	A:G	G:A	T:C	G:G	T:T	A:A	G:G	G:A	C:C	C:C	A:A
1381974310 call_(plate 2)	TO1000DH3	G:G	A:A	A:A	C:C	T:C	T:T	A:T	T:G	G:G	C:C	C:C	A:G	C:T	A:A	C:C	T:G	T:T	A:G	G:A	T:C	G:G	T:T	A:A	G:G	G:A	C:C	C:C	A:A
1381974310 call_(plate 2)	TO1000DH3	G:G	A:A	A:A	C:C	T:C	T:T	A:T	T:G	G:G	C:C	C:C	A:G	C:T	A:A	C:C	T:G	T:T	A:G	G:A	T:C	G:G	T:T	A:A	G:G	G:A	C:C	C:C	A:A

표 2-25. call map result 정보를 기반으로 다형성 있는 프라이머 갯수 요약

Primer set ID	Population	No. of total primers	Polymorphic between EarlyBig&TO1000DH3	No. of 'No Call' in TO/EB	No. of common polymorphic primer between Plate1&Plate2
3233	1381974308-call_(plate1)	96	44	7	35
	1381974310-call_(plate2)		42		
4300	1381974307call_(plate1)	96	49	4	46
	1382110349call_(plate2)		49		
4301	1381974305 call_(Plate1)	96	44	7	37
	1381974304 call_(Plate2)		44		
Total		288	137	18	118

- ㄷ. HRM으로 SNP validation (마커 다형성 검정) 효율을 높이기 위한 방법 개선
1. 양배추류의 기본 유전자 지도 작성을 위한 SNP validation(다형성 검정)의 효율을 높이기 위해 기존의 'TO1000DH3', 'Early big' 그리고 150계통을 PCR하는 방법을 개선하였다. HRM은 PCR과정에서 생성된 amplicon 의 melting temperature의 차이를 감별하는 방법으로 해상력이 좋아 amplicom의 크기가 차이가 큰 InDel, SSR 마커 구분 뿐만 아니라 단일염기변환에 의한 SNP validation도 적용 가능하다. 다만, amplicon 내의 염기 구성에 따라 다소 구분이 어려운 경우도 있다. 따라서 해상도를 높여 validation 효율을 높이고자, HRM이 amplicon 의 melting temperature 에

따른 curve pattern의 변화를 이용한다는 점에 착안하여 실험 방법을 개선하였다. 'TO1000DH3', 'Early big' 그리고 150계통에 'Early big'의 동일한 농도의 gDNA를 혼합하여 인위적으로 heterotype를 만든다. 예시로, (그림 10)의 Progoitrin 관련 C9_1번 마커의 경우 기존 방법으로 실험 하였을 시 'TO1000DH3'와 'Early big'간의 극명한 차이가 나며 이것을 집단에 같이 실험하였을 경우 좋은 다형성을 보임을 알 수 있다. 반면 Glucosinolate 관련 C5-6 마커의 경우 'TO1000DH3'와 'Early big'간의 다형성은 없어 보인다(그림 2-62). 이는 집단에서도 다형성이 없는 것으로 나타난다(그림 2-63).

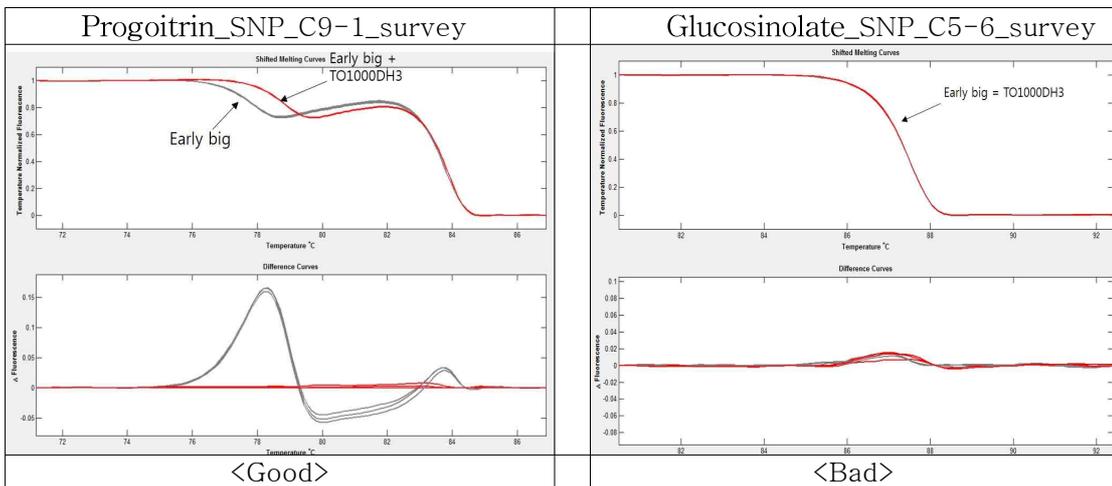


그림 2-62. 다형성이 보이는 마커와 다형성이 보이지 않는 마커의 survey 결과

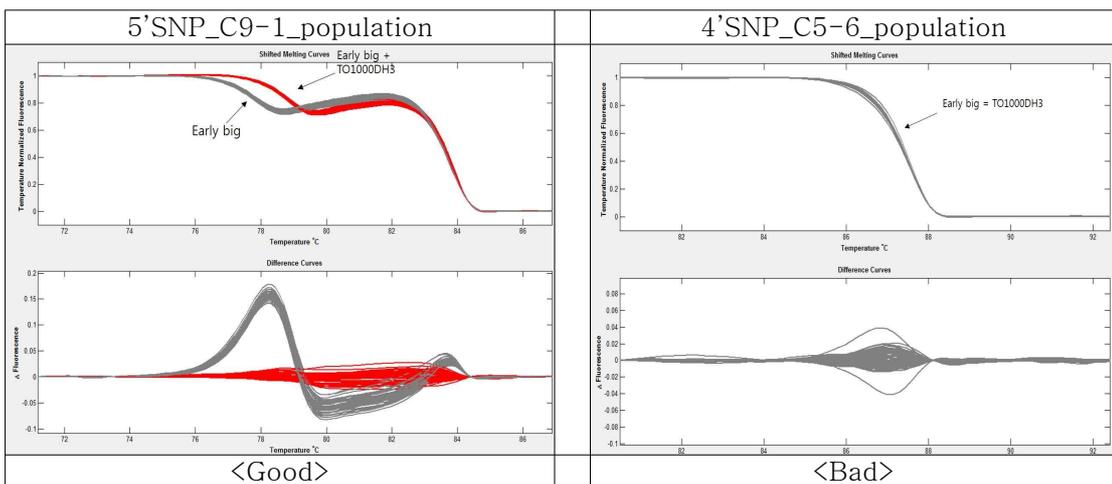


그림 2-63. 다형성이 보이는 마커와 다형성이 보이지 않는 마커의 150계통의 HRM 결과

2. Early big을 동일한 농도를 혼합하여 실험을 하였을 경우 melting curve 형태나 melting temperature의 차이가 없는 마커(그림 2-64)가 차이가 분명해짐을 확인할 수 있었다(그림 2-65). TO1000DH3의 genotype는 Early big과 혼합되어 heterotype로 나타났으며 Early big은 기존 방법과 동일한 곡선을 보였다. 이와 같은 방법에서 야기될 수 있는 문제점으로는 false positive(위 양성)의 결과가 나올 수 있다는 것이다. 즉, 시료에서 본 PCR amplicon(산물)이 없거나 실험시 미숙함으로 결과가 'NO call'인 경우 이를 혼합산물(Early big)로 잘못 인식 할 수 있다. 또한 동일한 농도의 gDNA을 혼합하지 않았을 시 heterotype의 곡선이 Early big의 곡선과 가까워지는 것을 볼 수 있다(그림 2-65). 본 실험에서는 false positive를 방지하기 위하여 Early big을 혼합하기 전에 PCR을 하여 증폭이 되는 개체를 확인 후 증폭된 개체만을 가지고 Early big을 혼합하여 PCR하는 개선된 방법으로 HRM을 수행하였다.

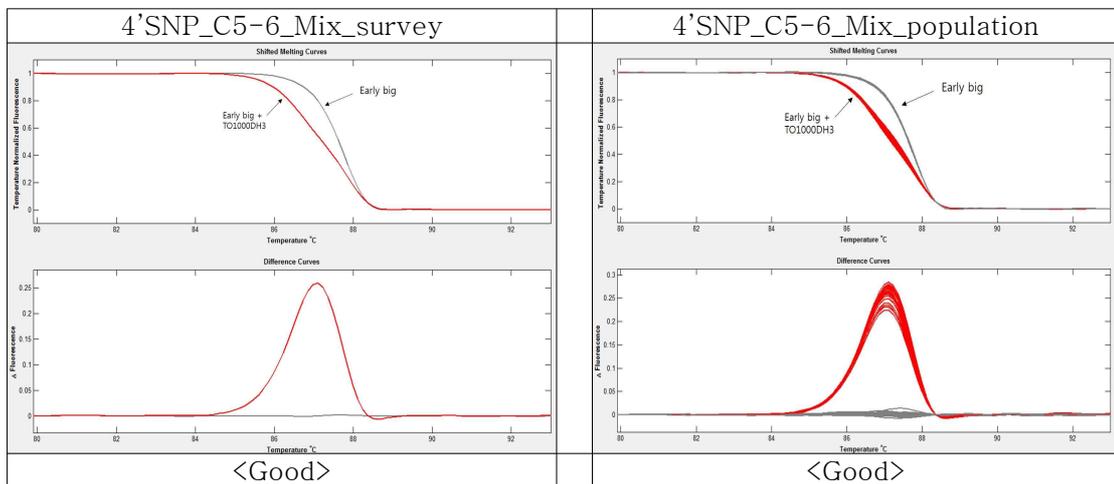


그림 2-64. 다형성이 보이는 않는 마커에 Early big을 혼합 후 HRM 결과

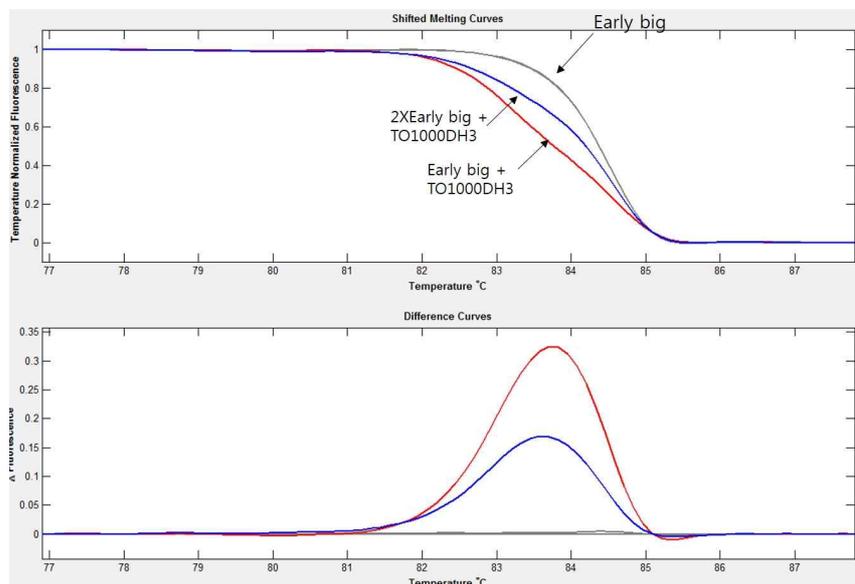


그림 2-65. 두배의 농도의 Early big을 혼합한 경우

3. 위의 방법으로 HRM을 진행한 결과 glucosinolate, progoitrin 관련 마커 88 개의 survey 결과, 보통의 다형성을 나타내는 마커 48개와 극명한 다형성을 나타내는 마커 11개로 총 59개의 마커가 선발되었다(표 2-26). 이 55개의 마커를 가지고 HRM을 한 결과 24개의 마커가 다형성을 보였다. 이는 30.37%의 확률이다. 그 후 Early big의 gDNA을 혼합한 개선한 HRM 방법으로, 28개의 마커에서 추가로 다형성을 보여 총 65.82%의 다형성을 가진 마커를 확보 할 수 있었다.

표 2-26. 양배추류 유전자 지도 작성용 마커 선발 결과

Marker type	Source	No. of			
		primers assayed	polymorphic primers	genotyping in population	
1년차	SSR (BRPGM)	B. rapa	199	85	33
	SSR (ACMP)	B. rapa	227	62	56
	SSR (CNU_m)	B. rapa	192	65	56
	sub total		618	212	145
2년차	SSR (BRMS)	B. rapa	45	16	13
	SSR (Fito)	B. oleracea	176	68	30
	InDel	B. oleracea	29	16	13
	SNP (1st validation)	B. oleracea	90	38	38
	SNP (2nd validation)	B. oleracea	96	50	29
	sub total		436	188	123
3년차	SNP (3nd validation)	B. oleracea	96	46	31
	sub total		96	46	31
4년차	SNP (4nd validation)	B. oleracea	79	52	45
	SNP (5nd validation)	B. oleracea	8	8	7
	SNP (6nd validation)	B. oleracea	288	155	130
	sub total		375	215	182
Total			1525	661	481

② 사업단에서 개발한 SNP 마커 지도화 및 형질 연관 개발된 SNP 마커 지도화

㉠ 5년차 validation 한 SNP 마커 이용 지도 작성

ㄱ. 바이오막 시스템으로 분석한 SNP genotype을 이용하여 유전자지도를 작성하였다. 양친 사이에 다형성이 있는 118개의 SNP와 양친 중에 한쪽이 'No Call'로 나온 12개의 SNP 마커를 포함, 총 130개의 SNP data를 사용하여 JoinMap v.4.0 프로그램을 사용하여 분석하였다. map distance는 Kosambi's mapping function을 이용하여 계산하였다. 한쪽이 'No Call'로 나온 12개의 SNP는 false positive 가능성이 있기에 양배추류 9개의 연관그룹을 분석시에는 사용하지 않았고, 그룹이 확정된 후에 추가 하여 분석하였다. SNP 마커가 표준유전체 정보를 기반으로 제작한 것(마커이름이 물리지도 위치로 표기 되어 있음)이고,

유전체에서 물리적인 위치(target loci)를 알고 있으므로, 유전자 지도에서 마커의 위치와 표준 유전체 정보 기준으로 loci position을 비교할 수 있었다. 총 7개의 연관그룹(C1/C2/C4/C6/C7/C8/C9)이 LOD value 2.0에서 3.5 사이에서 분리되어 연관그룹을 형성하였고 이중의 두 개의 연관그룹(C3/C4)이 LOD value 5.3에서 나뉘어 졌으며 round 1 map으로 작성하였다. 총 113개의 SNP 분자마커가 9개의 연관그룹에 분포하였으며, 전체 유전자 지도 길이는 582.17 cM 이었다. 그룹에서 마커의 순서는 물리지도에 준하여 위치하였으나, C5/C7/C8/C9에서 적게는 3개에서부터 많게는 7개의 SNP 이 유전자지도에서 같은 위치에 표기되었다. SNP 마커가 개발된 물리지도 위치를 고려해 봤을 때, 마커 C5_12984047 (물리지도 위치: 12,984,047bp)와 C5_29151171 (물리지도 위치: 29,151,171) 이 유전자지도에서는 동일한 위치(7.839cM)에 위치하였다. 따라서 이들 마커의 위치는 추가 마커를 개발 및 사용 하였을 때 유전자 지도에서 마커의 순서가 바뀔 수 있으리라 생각된다. 또한 이들 9개의 연관그룹은 모두 10cM 이상의 gab 이 하나 이상 존재하였으므로 전체 유전체를 나타내기에는 부족한 부분이 많으나, frame map 으로 사용할 수 있다.

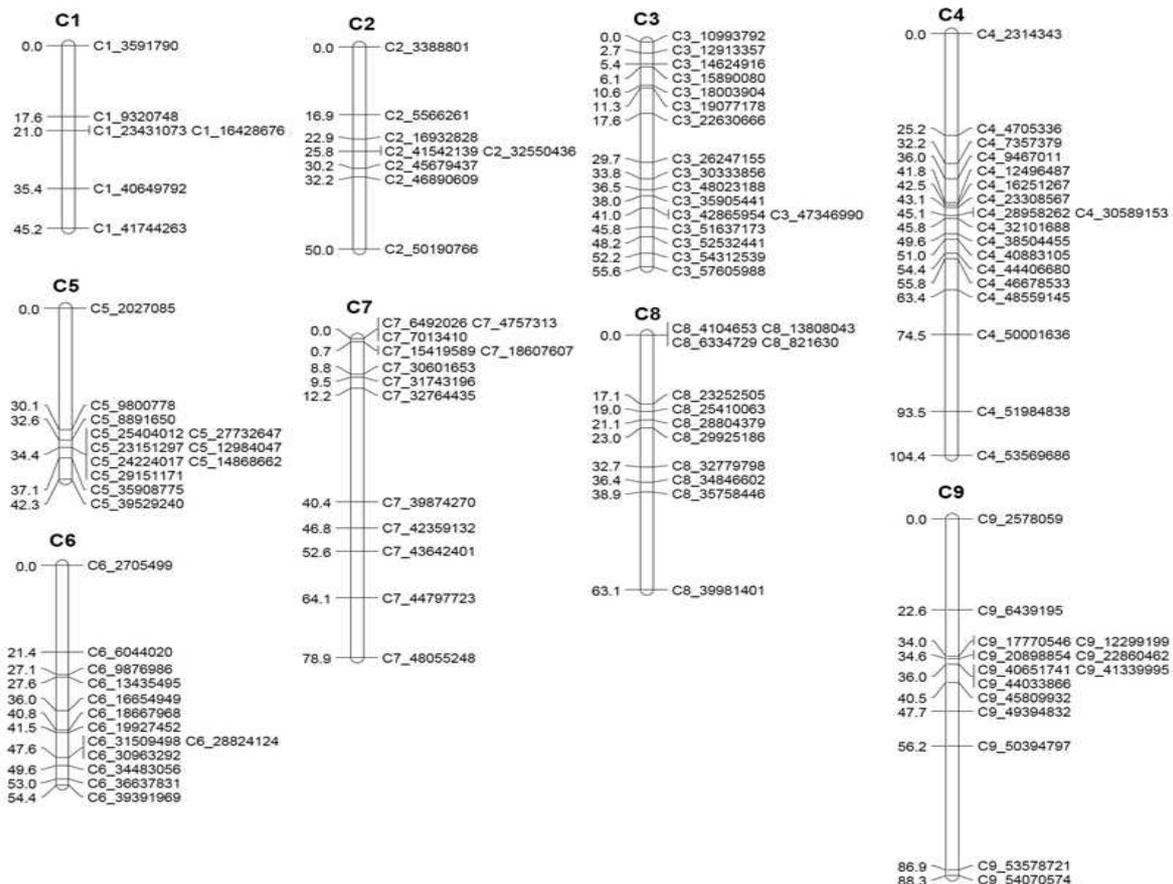


그림 2-66. 양배추류 유전체정보 기반으로 개발된 SNP 마커(바이오막 분석) 113개로 구성된 기초 유전자지도

표 2-27. 양배추류 유전체 정보 기반한 SNP 마커를 바이오막 시스템으로 분석한 유전자지도 정보

LG	No. of markers	Length(cM)	Marker interval(cM)
C1	6	45.21	7.5
C2	8	50.03	6.3
C3	17	55.59	3.3
C4	18	104.44	5.8
C5	12	42.26	3.5
C6	13	54.36	4.2
C7	13	78.92	6.1
C8	12	63.08	5.3
C9	14	88.26	6.3
Total	113	582.10	5.2

㉔ 5년차 개선된 HRM방법으로 validation 한 SNP 마커 이용 지도 작성

- ㄱ. 5년차에는 개선된 HRM validation 방법으로 사용하여 SNP validation 효율을 높일 수 있었다. 4차, 5차 SNP를 비롯하여 2차년도에 모부본간에서 다형성을 확인하였으나, 집단에서 분석이 모호했던 1차, 2차 프라이머에 대하여 추가 분석을 수행하여 총 70개의 SNP genotyping을 수행하였다. Fluidigm 사의 바이오막 시스템으로 288개의 SNP assay를 하여 총 130개의 SNP를 집단에서 분석할 수 있었다. 이에 1,2년차에 개발한 배추 SSR 마커로 분석한 data 161개를 추가로 사용하여 총 391개의 마커에 대한 data matrix로 유전자지도 작성에 사용하였다. 2차년도에 수행한 SSR 마커 중, 'Fito000'로 명명된 마커는 기 보고된 유전자지도의 연관그룹과 본 연구에 사용한 TBDH 집단에서 연관그룹이 다르게 나왔기에 분석에서 제외되었다. 기 마커가 사용된 집단의 이름은 'TBDH' 집단으로 같으나 저널에 공개되어 있는 계통들의 구성이 계통명을 기준으로 하여 비교해 보았을 때 공통되는 부분이 약 1/3 정도만이 일치함을 확인 할 수 있었는데, 이러한 차이가 원인인 것으로 생각된다. 2차 SNP의 경우 대부분의 마커가 염색체 번호와 일치하지 않게 위치하는 것으로 보아 유전자 지도 작성에 제외하였고, 추후 data matrix 생성시 사용한 프라이머ID와 물리 지도 위치정보와 일치성 여부를 확인할 필요가 있다.
- ㄴ. 총 391개의 SNP data를 사용하여 JoinMap v.4.0 프로그램을 사용하여 분석하였고, 분석 방법은 위와 같다. LOD value 2.6-5.0 사이에서 9개의 연관그룹을 형성하였고, 총 350개의 마커가 그룹을 형성하였다. C4/C5/C6를 제외한 나머지 연관그룹은 round1 map으로 작성되었다. 전체 유전자 지도 길이는 887.5 cM 이었다. SNP 마커가 표준유전체 정보를 기반으로 제작한 것으로 유전체에서 마커가 제작된 물리적인 위치 자료를 참고하여 유전체 대비 유전자지도가 나타내는 정도를 비교할 수 있다. 이 유전자 지도는 대략 유전체에서

401,306,390 bp를 나타낸다고 추정한다면, C 지놈인 양배추류의 표준유전체 크기가 696Mb 임을 감안할 때 전체 유전체 정보에서 대략 57.6%에 해당한다고 할 수 있다.

㉔. 각 연관 그룹별로 적게는 26개(C1/C2), 많게는 62개(C5)의 마커가 포함되었으며, 지도 길이는 C8 연관그룹이 72.3 cM 로 가장 짧았으며, C7 연관그룹이 126.2 cM으로 가장 길었다. 각 연관그룹 별로 마커와 마커간의 거리는 1.6 cM(C5)에서부터 4.4 cM(C2)로 나타났으며 평균 거리는 2.5 cM이었다. 전체 유전자 지도 길이는 887.5 cM 이었다(표 2-28). 각 연관그룹간에 포함하고 있는 마커수와, 마커간의 간격은 전년도에 비하여 개선되었으나, 9개의 연관그룹 모두에서 10cM 이상의 *gab* 이 존재하였다(그림 2-67). 추후 유전자지도 이용시 데이터 분석해상도를 높이고자 한다면 해당 *gab* 부분에서 추가 마커개발이 요구된다. 앞서 frame map에서 각 연관그룹에서 마커의 순서는 물리지도에 준하여 동일하게 위치하였으나, C5/C7/C8/C9에서 적게는 3개에서부터 많게는 7개의 SNP 이 유전자지도에서 같은 위치에 표기되었다. 추가 마커가 지도화 되면서 C2/C5/C7/C9 연관그룹의 해당 부분에서 마커의 순서가 물리지도와 달라지는 결과가 나타났다. 4차, 5차 SNP는 각각 글루코시놀레이트 성분과 프로그로이트론 성분 생합성 관련 유전자에 위치하는 SNP를 대상으로 프라이머가 디자인 되었다. 글루코시놀레이트 생합성 관련 유전자 마커는 C3/C5/C8/C9 연관그룹에 분포하였으며 이중에서 C5의 중간 부분에 밀집하여 위치하였다. 프로그로이트론 성분 생합성 관련 유전자 마커는 C3/C8/C9 연관그룹에 분포하였으며 이중에서 C9의 상단 부분에 밀집하여 위치하였다. 이러한 마커 정보는 추후 성분관련 생합성 유전자와 성분함량에 연관성을 조사하기 위한 QTL 분석에 유용한 자료로 사용이 가능하다. 따라서 주요 형질 마커를 유전자 지도에 표기하여 형질관련 연구를 수행할 수 있는 기반 조성을 하였다.

표 2-28. 양배추류 유전자지도 정보

LG	No. of markers	Length(cM)	Marker interval(cM)	Physical length(bp)
C1	26	72.9	2.8	41,744,263
C2	26	113.8	4.4	50,190,766
C3	37	86.0	2.3	61,485,079
C4	46	113.3	2.5	53,569,686
C5	62	97.1	1.6	41,139,805
C6	33	88.9	2.7	38,299,158
C7	40	126.2	3.2	46,874,281
C8	30	72.3	2.4	13,932,778
C9	50	117.2	2.3	54,070,574
Total	350	887.5	2.5	401,306,390

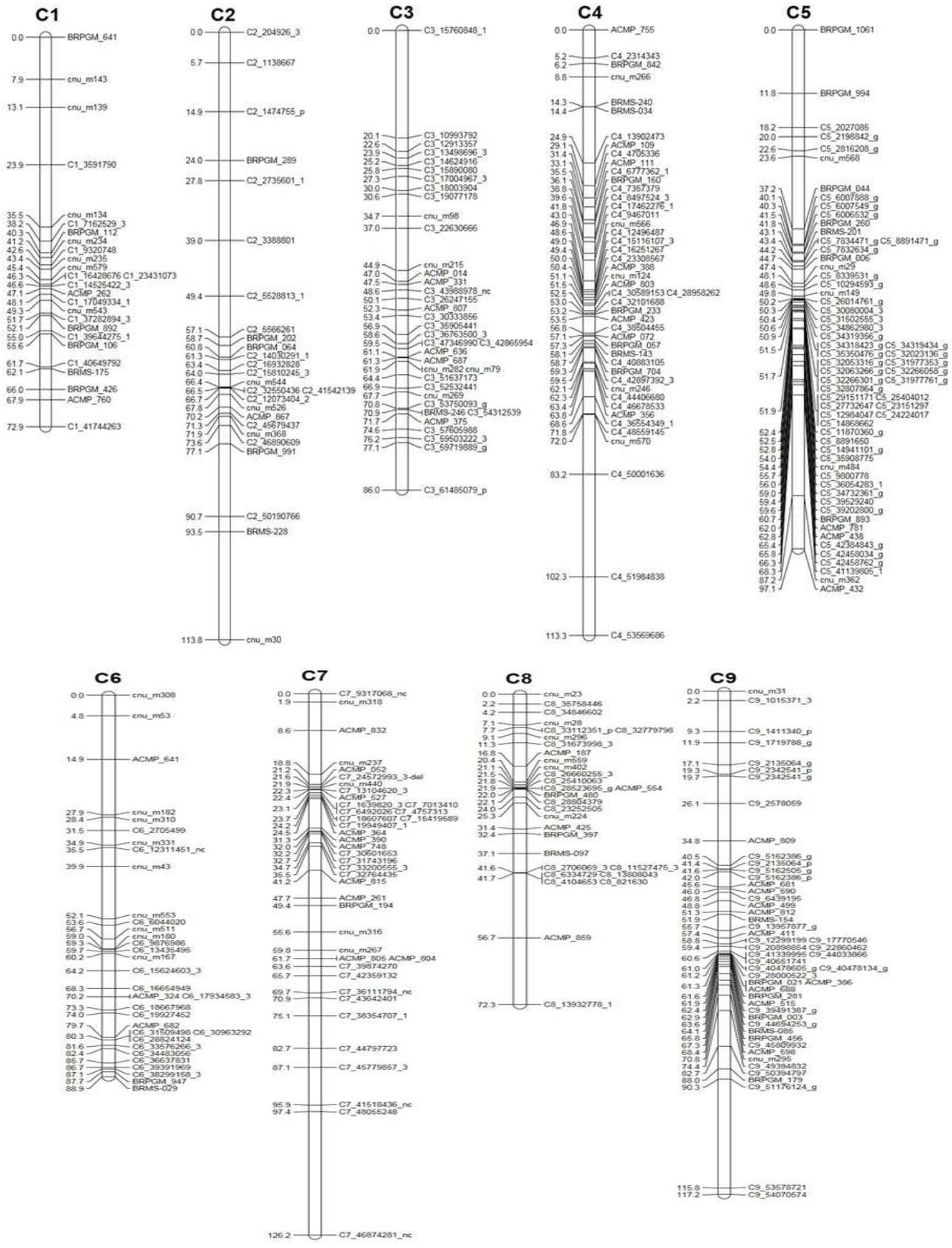
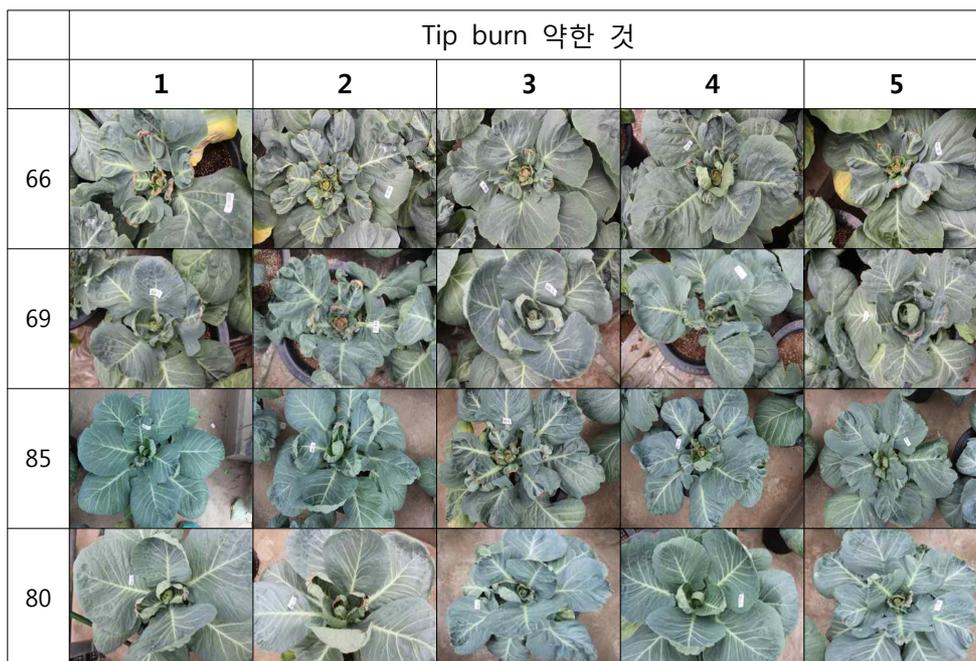


그림 2-67. 양배추류 유전자지도

③ Tip-burn 저항성 형질 관련 QTL 분석

㉠ Tip-burn 저항성 형질 QTL 분석위한 형질 조사

1. 양배추 유용형질을 분리집단에서 형질을 조사하고, QTL 분석을 통해 바이오마커 개발을 위한 기반 조성을 하고자 하였다. Tip-burn 현상은 Ca 이온부족에서 오는 대표적인 생리장애 현상이라 하겠다. Tip-burn 현상이 잘 발생하지 않는 계통 '107140'과 쉽게 발생하는 계통간의 교배로 생성한 F3 집단을 이용하여 'Tip-burn' 증상에 대하여 조사하였다. 진주 농업기술원에 격리된 유리온실에서 계통당 5개체씩 재배하여 조사하였다(그림 2-68). 'Tip-burn' 증상이 없는 개체를 1로, 증상이 개체 전반적으로 모두 나타나는 개체를 5로 육안으로 조사하여 기록하였다(표 2-29). 조사결과 전체 분리집단 중 94개체를 조사하였으며 개체들의 최소값은 1, 최대값은 4.33이었다. 이들의 평균값은 2.36 였다. 표준편차는 0,69였으며, 분산은 0,48 이었다(표 2-30).



		Tip burn 강한 것				
		1	2	3	4	5
41						
87						
73						
94						

그림 2-68. Tip-burn 저항성 형질 분리집단에서 대표적인 표현형

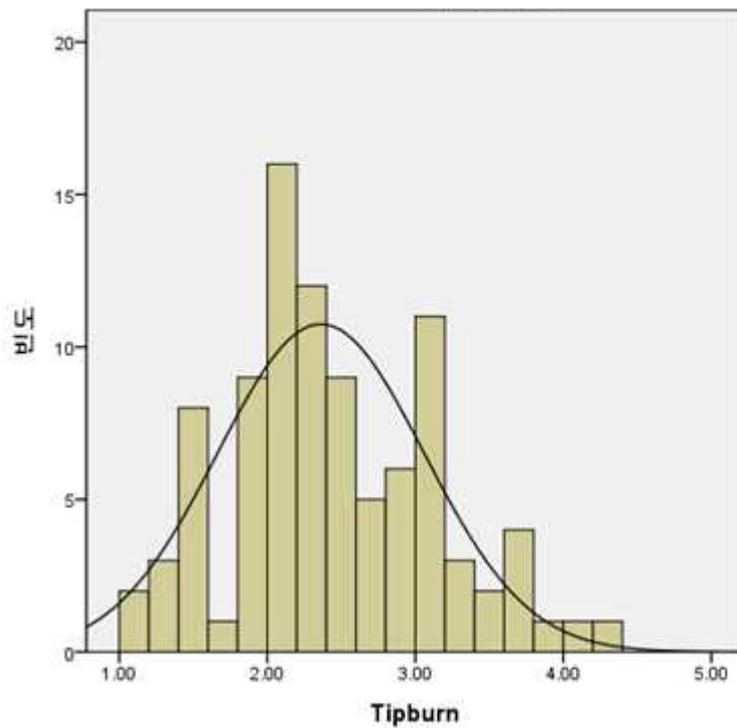


그림 2-69. Tip-burn 저항성 형질 조사결과 분포도

표 2-29. Tip-burn 저항성 형질 분리집단에서 표현형 조사값 결과

식물계통 번호	표현형 등급							평균	식물계통 번호	표현형 등급							평균
	1 (저항성)	2	3	4	5	6 (감수성)	1 (저항성)			2	3	4	5	6 (감수성)			
1	1	1	1	-	-	-	1.00	50	1	1	2	2	-	-	1.50		
2	2	2	1	3	1	-	1.80	51	2	2	5	1	3	-	2.60		
3	3	5	5	-	-	-	4.33	52	2	2	2	2	2	-	2.00		
4	2	3	1	2	1	-	1.80	53	3	2	2	3	2	-	2.40		
5	1	2	5	1	-	-	2.25	54	3	3	2	2	1	-	2.20		
6	3	1	2	1	2	-	1.80	55	3	2	2	4	3	-	2.80		
7	2	1	3	5	2	2	2.50	56	5	5	2	3	3	-	3.60		
8	1	1	2	5	5	-	2.80	57	3	2	4	3	3	-	3.00		
9	5	4	2	2	1	-	2.80	58	1	2	1	2	3	-	1.80		
10	2	2	2	3	1	-	2.00	59	3	2	5	2	3	-	3.00		
11	3	1	2	3	-	-	2.25	60	2	2	2	-	-	-	2.00		
12	1	1	1	-	-	-	1.00	61	1	3	2	1	3	-	2.00		
13	1	2	3	2	-	-	2.00	62	3	2	2	2	-	-	2.25		
14	5	5	2	5	2	-	3.80	63	4	3	3	3	2	-	3.00		
15	1	4	5	4	1	-	3.00	64	2	1	1	2	-	-	1.50		
16	1	2	1	2	-	-	1.50	65	2	3	2	2	2	-	2.20		
17	4	3	3	3	3	-	3.20	66	3	3	4	3	5	-	3.60		
18	3	3	3	1	2	-	2.40	67	2	1	3	2	2	-	2.00		
19	1	1	3	1	-	-	1.50	68	3	3	4	4	1	-	3.00		
20	1	2	3	2	-	-	2.00	69	3	4	3	3	3	-	3.20		
21	2	2	3	2	2	-	2.20	70	3	1	1	3	3	-	2.20		
22	4	3	3	2	3	-	3.00	71	4	3	2	2	2	-	2.60		
23	2	2	3	4	4	-	3.00	72	1	2	5	3	2	-	2.60		
24	3	2	2	2	-	-	2.25	73	2	2	1	2	2	-	1.80		
25	3	5	5	3	-	-	4.00	74	4	4	3	2	3	-	3.20		
26	5	5	3	2	-	-	3.75	75	1	2	2	3	-	-	2.00		
27	2	3	3	5	5	-	3.60	76	2	2	2	-	-	-	2.00		
28	3	1	1	2	3	-	2.00	77	1	1	1	2	2	-	1.40		
29	3	3	-	-	-	-	3.00	78	2	1	5	2	-	-	2.50		
31	2	3	5	2	5	-	3.40	79	2	2	2	2	2	-	2.00		
32	4	5	3	1	2	-	3.00	80	3	3	3	3	3	-	3.00		
33	2	1	3	2	3	-	2.20	81	2	3	1	2	2	-	2.00		
34	3	3	5	3	-	-	3.50	82	2	1	2	1	1	-	1.40		
35	1	2	3	2	-	-	2.00	83	3	2	3	4	2	-	2.80		
36	3	2	3	3	1	-	2.40	85	3	3	3	3	3	-	3.00		
37	3	3	3	2	3	-	2.80	86	2	3	2	3	2	-	2.40		
38	3	3	2	3	-	-	2.75	87	2	2	2	2	2	-	2.00		
39	3	3	3	2	2	-	2.60	88	3	3	2	2	2	-	2.40		
40	2	1	2	2	2	-	1.80	89	2	3	3	2	2	-	2.40		
41	1	1	1	1	2	-	1.20	90	1	2	2	2	-	-	1.75		
42	2	1	1	1	2	-	1.40	91	2	2	1	2	2	-	1.80		
43	2	2	1	1	1	-	1.40	92	2	2	2	2	2	-	2.00		
44	3	3	3	3	2	-	2.80	93	2	2	2	1	2	-	1.80		
45	2	2	3	2	2	-	2.20	94	1	1	2	1	-	-	1.25		
46	3	2	2	2	-	-	2.25	96	2	2	2	1	4	-	2.20		
47	1	1	2	-	-	-	1.33	97	2	1	4	1	2	-	2.00		
48	1	3	3	1	1	-	1.80	107140	2	2	2	2	-	-	2.00		
49	3	3	2	2	-	-	2.50	F1	2	2	2	2	-	-	2.00		

표 2-30. TBDH 집단에서 조사한 Tip-burn 증상 조사 자료의 기초 통계

번호	모집단	평균	표준 편차	분산	최소값	최대값
1	96	2.36	0.69	0.48	1	4.33

④ F₂ 분리집단에서 배추좀나방 저항성 형질 표현형 조사 및 QTL 분석

㉠ F₂ 분리집단에서 배추좀나방 저항성 형질 표현형 조사

ㄱ. 집단에 접종할 좀나방은 국립농업과학원 농산물안전성부(농업생물부)에서 애벌레와 번데기 상태로 분양 받아서 사용하였다. 애벌레 생육을 위해서 유채씨를 파종하여 돌아난 새순을 먹이로 사용하여 생육상자 안에서 생육 및 증식하였다. 격리된 유리온실에서 좀나방 저항성 분리집단에 좀나방의 번데기를 방사, 애벌레를 접종 하였다(그림 2-70). 좀나방 접종 후 잎의 피해정도는 8월 6일, 11월 4일에 두 개의 F₂ 분리집단을 각각 조사하였다. 좀나방 섭식에 따른 잎의 피해정도에 따라 5계급으로 기록하였다. 잎에 피해가 없는 표현형은 저항성으로 보고 '0'으로 표기하였으며 피해가 가장 심한 계급은 '4'로 표기하였다(표 2-31).

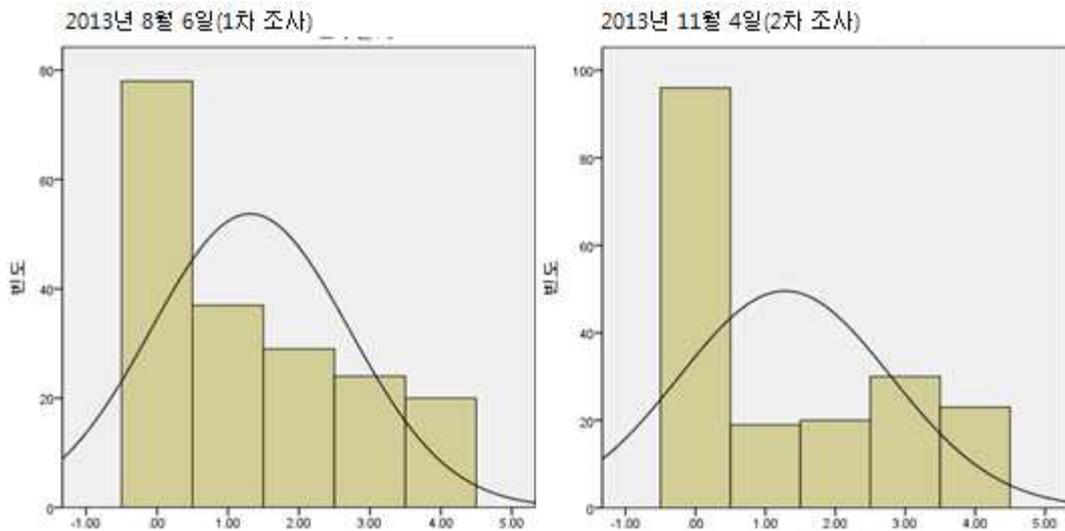


그림 2-70. TBDH 집단에서 좀나방 저항성 표현형 조사값의 분포도

표 2-31. 좀나방 저항성 형질 분리집단에서 표현형 조사 기준

DI score	Description of disease severity
0	no symptom
1	a few
2	25 % leaf surface exhibited disease symptoms (yellow color)
3	25-50 % leaf surface exhibited disease symptoms (yellow color)
4	50-75 % leaf surface exhibited disease symptoms (yellow color)
5	All

㉔ 배추좁나방 저항성 형질 QTL 분석

- ㄱ. 좁나방 저항성 QTL 분석은 WinQTL catographer v. 2.5 소프트웨어를 사용하였다. 1cM 간격으로 composite interval mapping을 하였다. permutation test는 500회를 실시하여 LOD threshold를 기준으로 사용하여 QTL을 검출하였다. 8월 6일(1차조사), 11월 4일(2차 조사) 두 차례에 조사한 표현형 데이터를 이용하여 각각 해당 QTL 분석을 실시하였다 (표 2-32). LOD threshold 2.5 이상 값을 나타내는 QTL이 4개의 연관그룹에서 총 10곳('DBM_1'~'DBM_10')에서 검출되었다. 1차 조사 데이터로 C2와 C4에서 각각 2개, C3과 LG9에서 각각 1개의 QTL이 검출되었다(그림 2-71, 그림 2-72, 그림 2-73, 표 2-33).
- ㄴ. 2차 조사 데이터로 C3과 C4에서 각각 2곳의 QTL이 검출되었다. 1차 조사와 2차 조사 데이터에 의한 QTL 분석 결과, C3에서 1곳, C4에서 2곳의 QTL은 두 번의 서로 다른 데이터에서 반복적으로 검출되어 반복 간에 가장 유의성이 있었기에 저항성 형질에 주요하게 관여하는 QTL로 나타났다. 1차 실험과 비교해 볼 때 2차 실험에서 QTL의 개수는 줄었으나 LOD threshold 값이 월등히 증가하였다. 전체 QTL 중에서 C3과 C4에 위치한 QTL 'DBM_4'와 'DBM_8'은 가장 높은 LOD threshold 값을 나타냈으나 이 중에서 C3에 위치한 'DBM_4'의 표현형에 대한 변이율(R²)은 매우 낮았다. 비록 두 번의 반복 실험에서 공통으로 QTL이 검출되진 않았으나 1차 검정에서 검출된 C9에 위치한 'DBM_9'와 'DBM_10'은 표현형에 관여하는 변이율을 나타내는 R² 값이 14와 15로 전체 QTL 중에 가장 높았다. 저항성 표현형에 관여하는 R² 값이 각각의 QTL에서 적게는 1%에서부터 많게는 20% 로 비교적 낮은 값을 나타내었다. 이러한 낮은 저항성 표현형이 좁나방이 섭식했을 때 죽이거나 완전 기피하도록 하는 '완전 저항성'이 아님을 고려해 볼 때 이런 낮은 값이 나타날 가능성이 있을 수 있다고 생각 할 수 있다.. 1차 검정과 2차 검정이 시기적으로 동일한 시기에 조사가 된 것이 아니라 각기 8월과 11월이라는 시간차가 있기에 정확히 반복 실험이라고 하기에는 계절적인 편차가 작용할 수 도 있으리라 판단 된다. 따라서 양배추의 생육단계 또는 계절적 편차를 맞추어 유사한 조건에서 표현형 값 조사가 반복하여 수행될 필요성이 있다.

표 2-32. 좁나방 저항성 형질 분리집단에서 표현형 조사값 결과>

시료 ID	조사 (2013)		시료 ID	조사 (2013)		시료 ID	조사 (2013)		시료 ID	조사 (2013)	
	8월6일	11월4일		8월6일	11월4일		8월6일	11월4일		8월6일	11월4일
F2-2	2	3	F2-54	3	3	F2-115	0	1	F2-161	4	4
F2-5	3	3	F2-56	2	0	F2-116	1	3	F2-162	3	3
F2-7	4	3	F2-57	4	*	F2-118	0	0	F2-163	3	2
F2-8	4	2	F2-60	2	1	F2-119	1	1	F2-165	3	*
F2-9	3	4	F2-62	1	3	F2-120	*	*	F2-166	0	3
F2-10	3	0	F2-63	1	2	F2-122	1	2	F2-167	1	0
F2-11	3	3	F2-65	4	*	F2-123	1	3	F2-170	2	3
F2-12	4	3	F2-66	1	1	F2-124	1	3	F2-172	1	4
F2-14	3	*	F2-67	2	1	F2-127	1	0	F2-175	0	3
F2-16	3	1	F2-68	3	1	F2-128	0	0	F2-176	2	0
F2-17	2	1	F2-70	4	2	F2-130	1	0	F2-177	*	*
F2-18	2	2	F2-75	1	1	F2-131	2	*	F2-178	1	3
F2-19	1	*	F2-77	4	*	F2-132	1	2	F2-179	2	4
F2-21	*	*	F2-78	4	1	F2-133	2	*	F2-182	4	0
F2-22	1	*	F2-80	2	3	F2-135	0	2	F2-184	3	3
F2-23	2	3	F2-81	4	*	F2-136	1	1	F2-186	1	4
F2-26	0	0	F2-82	1	4	F2-137	4	2	F2-189	1	4
F2-27	4	2	F2-85	4	4	F2-138	1	3	F2-191	2	*
F2-28	0	3	F2-88	1	4	F2-139	0	*	F2-192	2	1
F2-29	3	2	F2-89	3	4	F2-140	0	0	F2-193	4	3
F2-30	3	3	F2-92	1	0	F2-141	1	2	F2-194	2	4
F2-31	2	4	F2-93	*	3	F2-142	0	4	F2-195	3	1
F2-32	2	2	F2-94	*	*	F2-143	0	3	F2-196	4	0
F2-33	1	*	F2-95	2	4	F2-144	*	2	F2-198	3	2
F2-36	1	4	F2-97	3	1	F2-145	1	3	F2-199	2	*
F2-37	3	4	F2-101	0	0	F2-148	0	*	F2-200	4	2
F2-38	3	*	F2-102	0	1	F2-150	0	4	F2-201	2	3
F2-41	2	2	F2-103	4	*	F2-151	1	3	F2-202	2	4
F2-42	1	4	F2-104	3	2	F2-152	1	0	F2-203	3	4
F2-44	1	1	F2-105	2	3	F2-153	1	0	F2-205	3	2
F2-45	0	1	F2-107	*	*	F2-156	1	0	F2-208	3	*
F2-48	2	0	F2-110	2	3	F2-157	0	*	F2-210	2	2
F2-50	4	1	F2-113	1	4	F2-159	1	4			
F2-51	2	*	F2-114	4	1	F2-160	2	4			

8월 6일(1차 조사)_C9

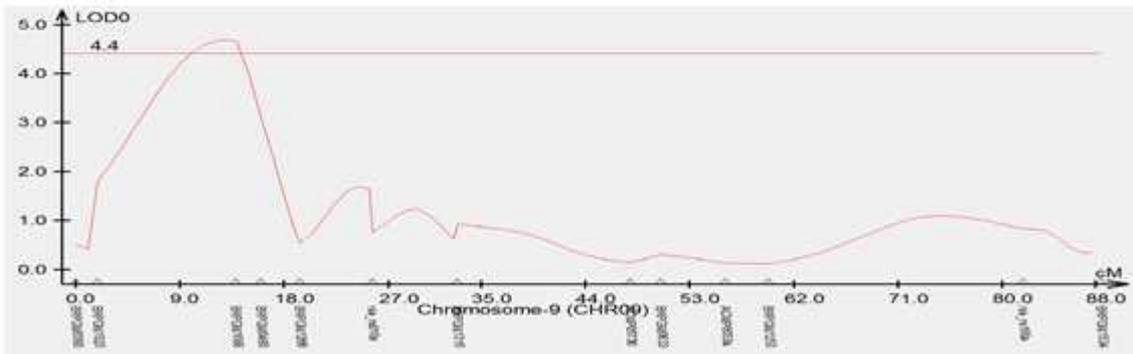
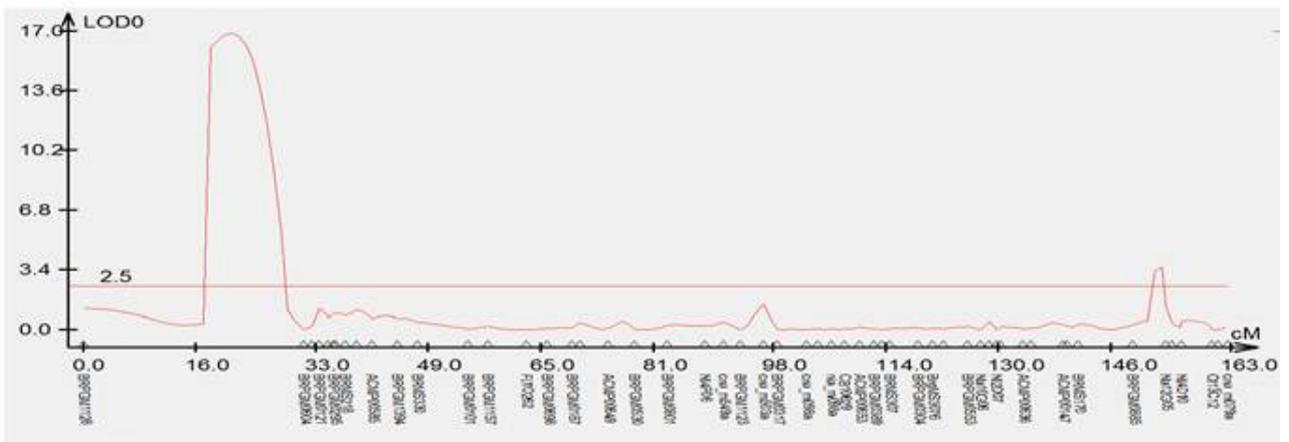


그림 2-71. 좁나방 저항성 형질의 1차조사결과, 유전자지도 C9 그룹에 위치하는 QTL

11월 4일(2차 조사)_C3



11월 4일(2차 조사)_C4

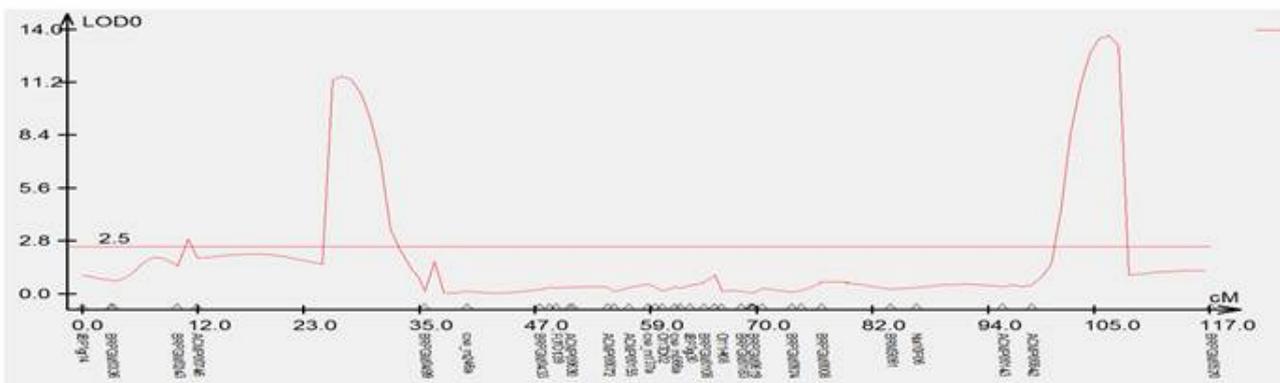


그림 2-72. 좁나방 저항성 형질의 2차조사결과, 유전자지도 C3/C4 그룹에 위치하는 QTL

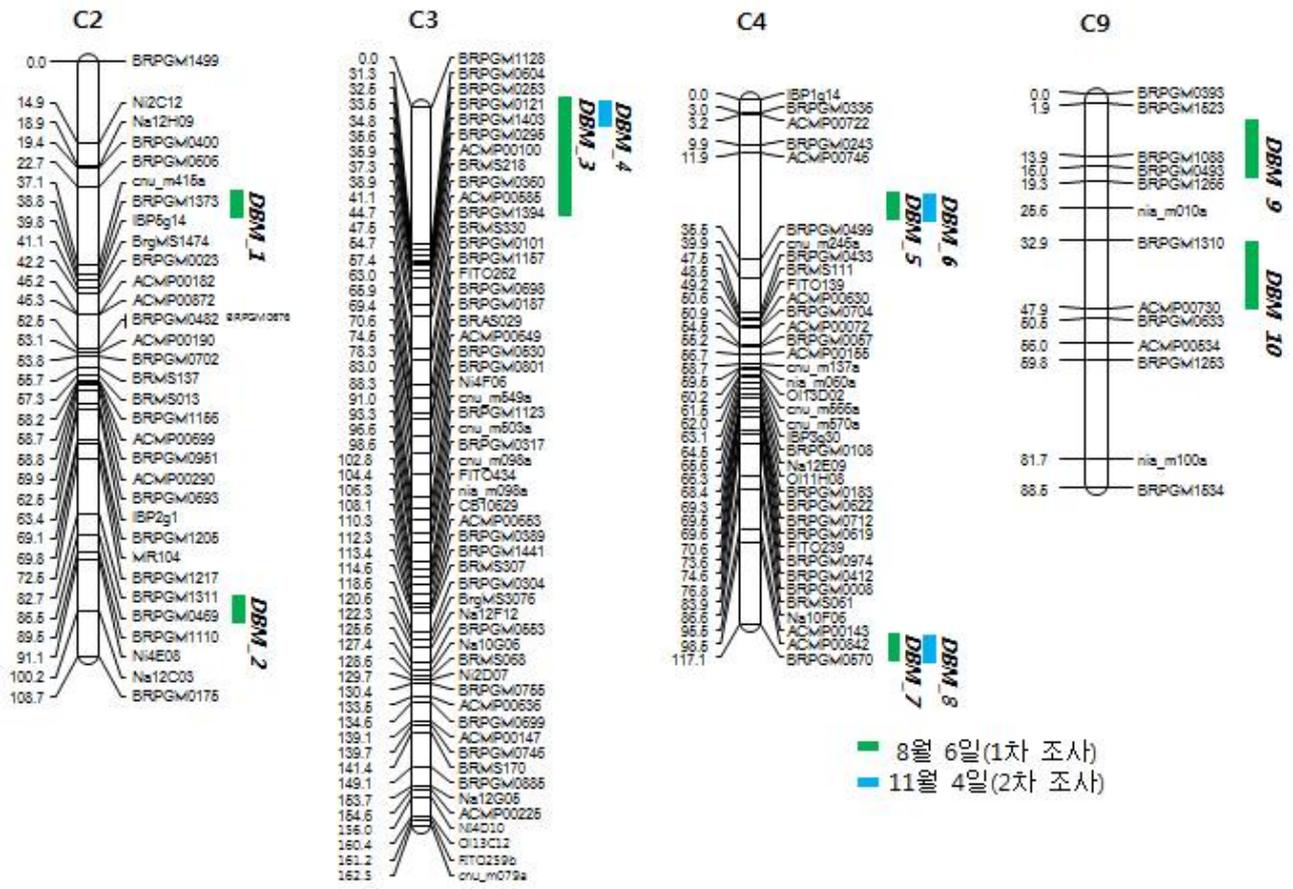


그림 2-73. 좁나방 저항성 형질 분리집단 유전자지도에서 QTL 위치

표 2-33. 좁나방 저항성 형질 분리집단에서 QTL 위치 및 결과

QTL	Chr	Investigation	LOD	Position	Flanking markers	R2
DBM_1	2	1st	2.73	23.8-25.4	BRPGM0606	1
DBM_2		1st	3	91-95.6	Ni4E08-Na12C03	8
DBM_3	3	1st	3.16	13.5-31.1	BRPGM1128-	7
DBM_4		2nd	16.6	16.4-29.2	BRPGM0604	1
DBM_5	4	1st	2.63	27.8-31.8	ACMP00746-BRPGM049 9	5
DBM_6		2nd	11.4	24.2-32.7	ACMP00746-BRPGM049 9	6
DBM_7	4	1st	4.4	101.7-107.6	ACMP00842- BRPGM0570	1
DBM_8		2nd	13.6	100.6-108.5	ACMP00842- BRPGM0570	5
DBM_9	9	1st	4.57	4.9-31.1	BRPGM1523- BRMS1310	14
DBM_10	9	1st	3.83	35.8-40.9	BRMS1310- ACMP00730	20

자. 신 마커 개발용 데이터베이스 구축

① 데이터베이스 구축

- ㉠ 효율적인 육종을 위해서는 다양한 step에서 다양한 형태의 polymorphic marker 를 필요로 한다 (그림 2-74). 양배추류의 육종을 지원하기 위하여 앞에서 선별 된 29계통의 re-sequencing 결과를 기반으로 분자 마커 제공 및 분석을 위한 database 및 web interface를 개발 하였다.

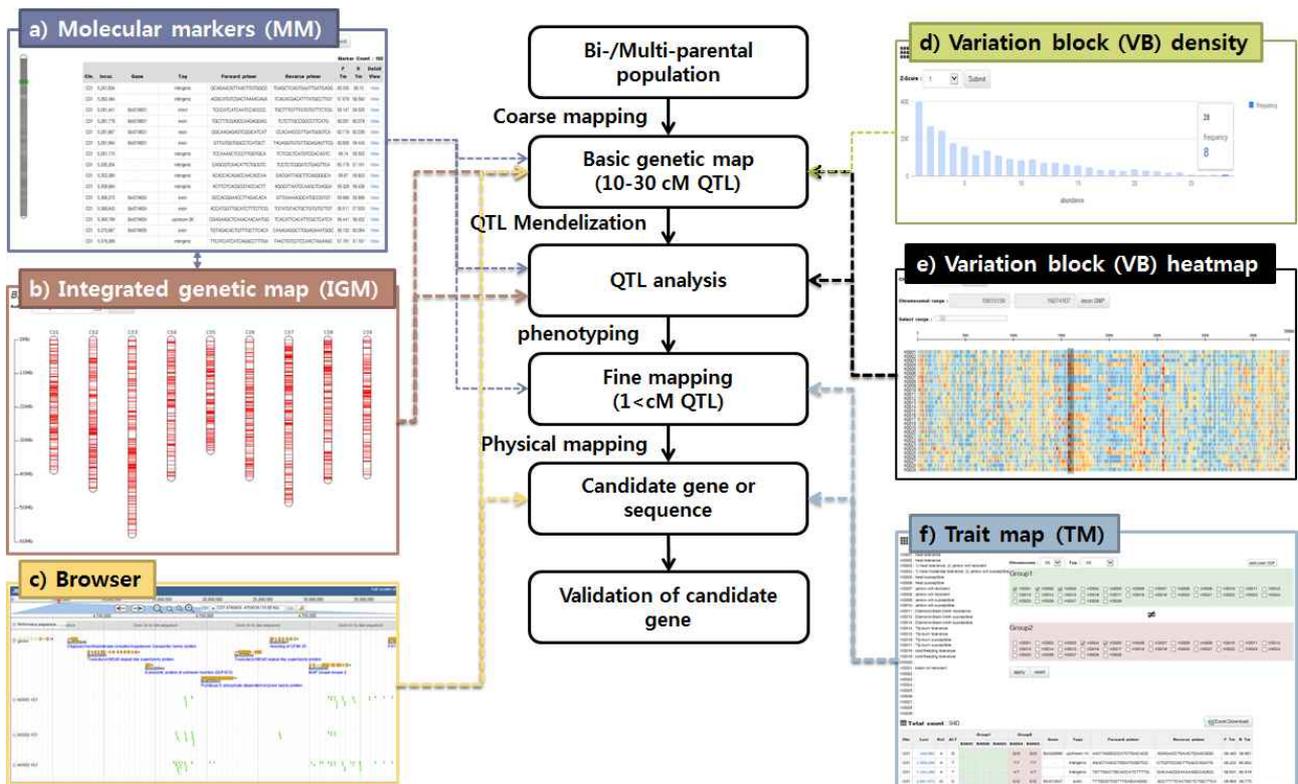


그림 2-74. BolMT database was constructed with assumption of breeding program in centric pipeline. Breeding is overall process to finding genomic loci or candidate gene affecting the interesting trait by reducing the map intervals. To assist these breeding program, BolMT provides a) polymorphic molecular markers (MMs) and their physical loci of the “MM” and b) “integrated genetic map (IGM)” web. All variations and variation densities are comparable through the c) “Browser” and d-e) “variation block (VB)” analysis, respectively. For allele comparison, BolMT provides f) “trait map (TM)” comparing conserved and variable genotypes between selected or uploaded lines. Details are described in text.

- ㉡ 육종 지원을 위한 분자마커는 실험적인 validation이 용이하여 가장 대표적으로 사용되고 있는 3 종류의 마커 - SNP, InDel, SSR-를 개발 대상으로 하였으며, database 구축을 위한 기본 pipeline은 reference based genomic assembly, genetic variation analysis, *in silico* polymorphism 분석으로 나누어 분석되어 진다 (그림 2-75). genome assemble 및 SNP 분석을 위한 reference 당시 publically available 한 *B. oleracea* var. *capitata* line 02-12 을 이용하였다.

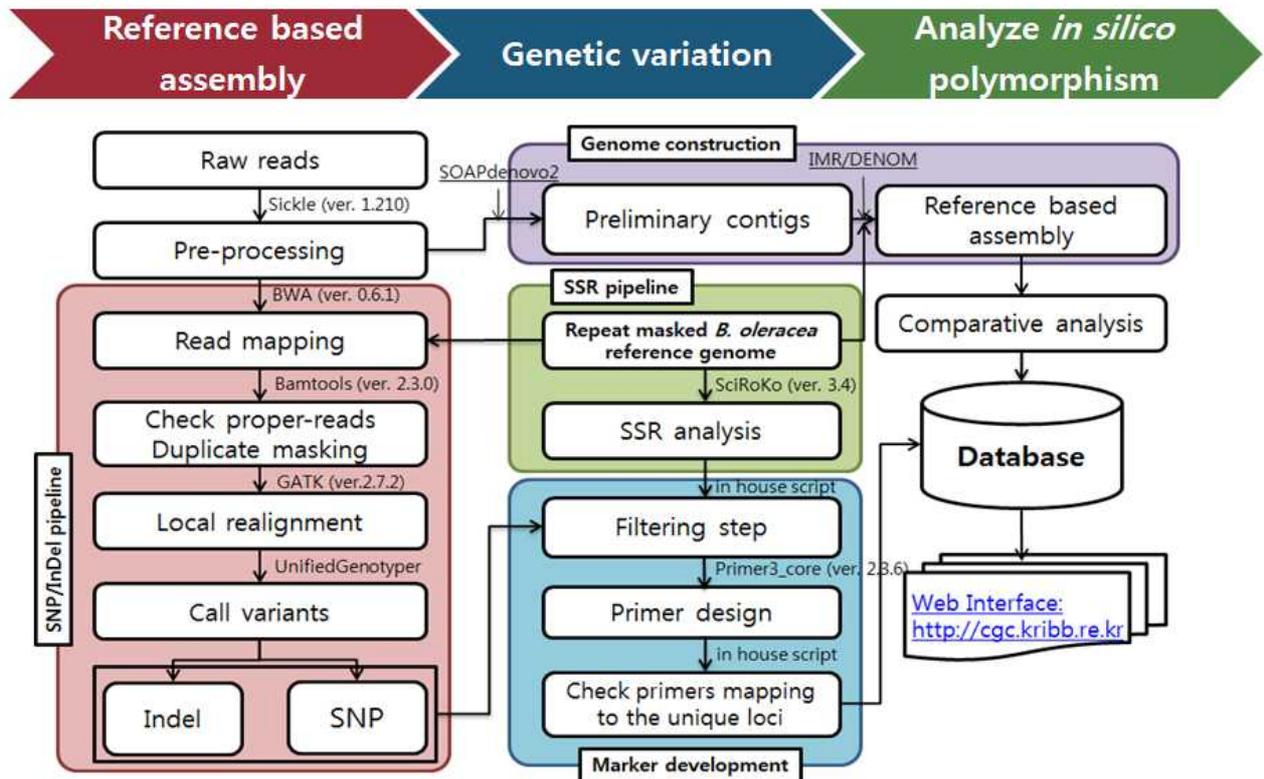


그림 2-75. Overall process to construct markers of BolMT DB

BolMT was constructed mainly 4 pipelines including identification i) SNPs/InDels (red box) and ii) SSR (green box) markers iii) filtering of molecular markers *in silico* methods to prevent sub-genomic polymorphisms (blue box), and iv) construction of individual genomes comparing with *B. oleracea* var. *capitata* line 02-12 genome (Liu, et al. 2014). Filtered and refined markers were stored in the MySQL database and represented to web (<http://cgc.kribb.re.kr:8080/boss2>)

㉔ SNP/InDel 분석 결과

- ㄱ. 앞에서 high quality read로 분석된 read들을 *B. oleracea* var. *capitata* line 02-12 reference에 mapping 한 결과 60.10%-70.14%의 read가 reference에 mapping 되었고, 전체 assemble된 genome의 74.50%를 cover 하였다 (표 2-34). 그리고, SNP/InDel calling을 위한 평균 Depth는 40.73x 였다. 이러한 read depth 및 coverage는 high quality의 SNP를 발굴하는데 충분 할 것으로 사료된다.
- ㄴ. Unifiedgenotyper는 29 계통에서 총 83,102,199개의 SNP를 발굴 하였고, 계통 별로 2,244,180~6,603,243개의 SNP가 발굴되었다 (표 2-35). SNP가 많이 발굴된 계통은 1차 년도에 re-sequencing한 5 계통 (K0015, K0021, K0022, K0023, K0024)으로 3백만 개 이상의 SNP가 발굴 되었으며, 특히 outgroup으로 분석한 BMA에서는 9,903,243개의 SNP가 발굴 되었다. 각 계통에서 homo-SNP와 hetero-SNP의 ratio는 1.35로 homo-SNP의 비율이 높게 나타났다. homo-SNP의 비율이 가장 낮은 계통은 K0003으로 0.46이었고, 가장 높은 계통은 2.12로

K0002였다. transition (Ts) 와 transversion (Tv) SNP를 분석하였을 때 Ts/Tv의 비율은 약 1.34로 Ts가 높게 나타났다.

표 2-34. Statistics of read mapping against *B. oleracea* var. *capitata* line 02-12

Index	Mapped reads		No. of reads after filtration		Genome coverage	average DP
	No. of reads	%	No. of reads	%		
K0001	76,945,018	67.42%	66,804,164	86.82%	74.21%	24.38
K0002	50,967,174	69.23%	45,154,744	88.60%	73.26%	16.61
K0003	80,443,881	70.14%	71,180,400	88.48%	76.08%	26.05
K0004	107,428,058	68.38%	94,415,532	87.89%	74.88%	34.19
K0005	82,194,417	70.01%	72,452,806	88.15%	74.68%	26.66
K0006	74,976,699	69.41%	66,087,988	88.14%	74.58%	24.32
K0007	80,331,843	69.93%	70,685,594	87.99%	75.95%	26.02
K0008	80,023,166	68.63%	69,674,706	87.07%	75.70%	25.88
K0009	100,363,484	66.21%	86,737,674	86.42%	74.91%	32.01
K0010	94,203,330	66.62%	82,401,202	87.47%	74.52%	30.17
K0011	89,703,712	66.69%	78,057,458	87.02%	74.91%	28.37
K0012	87,052,153	61.89%	71,515,738	82.15%	74.46%	27.10
K0013	98,072,175	66.46%	87,569,158	89.29%	74.81%	31.49
K0014	104,511,382	64.71%	92,201,878	88.22%	72.83%	33.43
K0015	288,744,599	65.56%	249,639,136	86.46%	75.54%	88.46
K0016	79,042,070	66.24%	70,590,478	89.31%	74.30%	25.38
K0017	95,858,301	65.52%	83,478,682	87.09%	74.18%	30.69
K0018	102,184,291	68.36%	89,856,318	87.94%	74.49%	32.50
K0019	89,502,720	66.36%	78,391,444	87.59%	74.73%	28.53
K0020	128,884,797	67.84%	113,284,908	87.90%	74.92%	41.13
K0021	362,568,794	65.37%	316,637,890	87.33%	73.67%	111.34
K0022	299,780,754	66.26%	265,951,918	88.72%	74.33%	91.80
K0023	315,423,262	64.59%	275,403,030	87.31%	75.55%	95.89
K0024	301,450,553	60.10%	259,068,138	85.94%	72.43%	91.74
K0025	103,914,917	66.29%	91,003,320	87.57%	74.87%	33.16
K0026	145,654,219	64.89%	128,692,452	88.35%	73.97%	46.41
K0027	93,741,142	66.13%	80,801,200	86.20%	73.54%	29.87
K0028	67,051,863	67.91%	59,015,010	88.01%	73.76%	21.82
K0029	80,835,212	64.25%	71,083,524	87.94%	74.46%	25.86
Sums	3,761,853,986		3,287,836,490	25.37%		
min	50,967,174	60.10%	45,154,744	82.15%	72.43%	16.61
max	362,568,794	70.14%	316,637,890	89.31%	76.08%	111.34
average	129,719,103	66.60%	113,373,672	87.50%	74.50%	40.73

㉔ 2-36. Statistics of SNP predictions

Index	Statistics of SNPs						
	Homo	Hetero	Total ^a	ratio	Ts	Tv	Ts/Tv
K0001	1,495,893	871,143	2,367,036	1.72	1,362,349	1,007,893	1.35
K0002	1,572,981	742,203	2,315,184	2.12	1,322,454	995,158	1.33
K0003	896,342	1,943,768	2,840,110	0.46	1,618,027	1,226,387	1.32
K0004	1,565,588	1,120,199	2,685,787	1.40	1,527,187	1,163,054	1.31
K0005	1,372,855	871,325	2,244,180	1.58	1,280,879	966,390	1.33
K0006	1,373,791	918,230	2,292,021	1.50	1,308,331	986,728	1.33
K0007	995,830	1,833,273	2,829,103	0.54	1,612,862	1,220,645	1.32
K0008	1,134,204	1,699,290	2,833,494	0.67	1,618,549	1,219,415	1.33
K0009	1,383,939	1,171,834	2,555,773	1.18	1,474,450	1,085,413	1.36
K0010	1,447,415	959,191	2,406,606	1.51	1,386,526	1,023,645	1.35
K0011	1,388,088	923,216	2,311,304	1.50	1,326,286	988,090	1.34
K0012	1,489,963	1,186,143	2,676,106	1.26	1,536,878	1,143,576	1.34
K0013	1,330,705	1,016,127	2,346,832	1.31	1,351,123	999,425	1.35
K0014	1,448,561	999,976	2,448,537	1.45	1,421,298	1,031,241	1.38
K0015	1,754,167	1,604,405	3,358,572	1.09	1,892,668	1,475,935	1.28
K0016	1,345,263	930,826	2,276,089	1.45	1,313,010	966,323	1.36
K0017	1,507,257	967,801	2,475,058	1.56	1,429,693	1,049,100	1.36
K0018	1,563,726	977,902	2,541,628	1.60	1,463,798	1,081,803	1.35
K0019	1,424,553	968,789	2,393,342	1.47	1,371,566	1,025,307	1.34
K0020	1,507,600	1,092,410	2,600,010	1.38	1,386,526	1,023,645	1.35
K0021	1,760,888	1,640,230	3,401,118	1.07	1,924,278	1,487,325	1.29
K0022	2,396,077	1,777,343	4,173,420	1.35	2,371,704	1,815,685	1.31
K0023	1,838,300	1,693,608	3,531,908	1.09	1,995,627	1,547,468	1.29
K0024	3,908,488	2,694,755	6,603,243	1.45	3,825,504	2,808,889	1.36
K0025	1,456,484	1,033,244	2,489,728	1.41	1,428,032	1,065,719	1.34
K0026	2,152,469	1,461,878	3,614,347	1.47	2,064,935	1,558,132	1.33
K0027	2,106,590	1,099,496	3,206,086	1.92	1,849,522	1,362,349	1.36
K0028	1,608,009	1,280,297	2,888,306	1.26	1,653,781	1,238,822	1.33
K0029	1,438,559	958,712	2,397,271	1.50	1,382,242	1,018,315	1.36
Sums	46,664,585	36,437,614	83,102,199		47,500,085	35,581,877	

^a Number of homozygous and heterozygous SNPs/InDels were included every loci of SNPs/InDels. In case of multi-allelic loci, they multiply counted.

ㄷ. 발굴 된 SNP loci의 genomic coordinate를 분석 한 결과 69.89%, 83.41%의 homo- and hetero-SNP는 intergenic region에 분포하고 있었고, 10.97%, 6.27%의 homo- and hetero-SNP는 유전자의 upstream 1kb 영역에 분포하고 있었다 (그림 2-76). 반면에, exon과 intron의 SNP는 각각 9.92%, 9.17%의 homo-SNP와 5.73%, 4.56% hetero-SNP를 가지고 있음을 알 수 있었다. 그리고, 1% 미만의 splicing donor and acceptor에서의 SNP도 발굴 되었다. 전체적인 homo-SNP와 hetero-SNP의 비율은 homo-SNP에서 높게 나타나나, intergenic 영역에서는 특이적으로 hetero-SNP의 비율이 우월하게 분포하고 있음을 알 수 있었다.

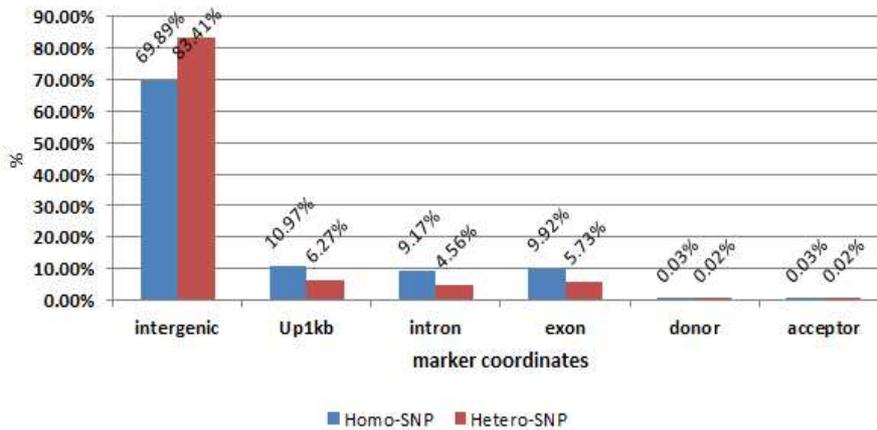


그림 2-76. SNP marker annotation

ㄹ. 발굴 된 exonic SNP의 분포를 조사한 결과 약 21,589 (60.98%)의 유전자에서 적어도 하나의 SNP가 발굴되었으며 maximum 486 SNP/gene이 발굴 되었다 (표 2-37). 평균 exonic SNP는 10.52개였으나 유전자별로 SNP 정도의 차이는 클 것으로 사료된다. SNP 결과 amino acide의 변이를 보이는 non-synnonimous substitution의 비율은 107,682 (46.80%)로 synonymous substitution의 비율 122,259 (53.20%)보다 약간 낮게 분포하고 있었다. 또한, protein 합성 및 기능에 중요한 codon 인 start codon 및 stop codon의 생성 및 붕괴를 기반으로 leatal effect를 조사한 결과 non-synnonimous substitution의 평균 271 (0.25%)에서 start codon 붕괴를 보이고 있었고, 1,422 (1.32%)는 internal stop codon 생성, 486 (0.45%)는 stop codon 붕괴를 보이고 있었다. 이러한 substitution은 단백질 합성을 방해하거나 folding이 제대로 이루어지지 않아 단백질 기능을 상쇄할 것으로 여겨진다.

ㅁ. Unifiedgenotyper는 29 계통에서 총 8,609,503개의 InDel을 발굴 하였고, 각 계통에서 homo-InDel와 hetero-InDel의 ratio는 3.79로 homo-InDel의 비율이 높게 나타났다 (표 2-38). InDel에서의 homo-, heter- 비율은 대체적으로 SNP에서의 비율보다 더 높게 나타나는 것을 알 수 있었으며, homo-InDel의 비율이 가장 낮은 계통은 K0003으로 0.67이었고, 가장 높은 계통은 5.68로 K0027였다.

表 2-37. synonymous/non-synonymous changes of SNP data

code	No. of gene		Total Number of exonic SNPs			synonymous substitution		non-synonymous substitution		lethal effects					
						No.	No.	No.	No.	desruption of start codon		make internal stop codon (aa-->"*")		desruption of stop codon ("*" --> "aa")	
	(%)	(%)	(%)	(%)	No.					(%)	No.	(%)	No.	(%)	
K0001	20,003	56.51%	340	10.3	206,143	110,928	53.81%	95,215	46.19%	224	0.24%	1,218	1.28%	429	0.45%
K0002	20,608	58.21%	240	9.21	190,010	100,516	52.90%	89,494	47.10%	203	0.23%	1,143	1.28%	394	0.44%
K0003	24,040	67.91%	300	10.11	243,239	130,069	53.47%	113,170	46.53%	240	0.21%	1,375	1.21%	464	0.41%
K0004	20,312	57.38%	385	10.29	209,135	111,064	53.11%	98,071	46.89%	245	0.25%	1,316	1.34%	467	0.48%
K0005	18,137	51.23%	330	9.71	176,208	93,479	53.05%	82,729	46.95%	206	0.25%	1,046	1.26%	403	0.49%
K0006	18,983	53.62%	315	9.51	180,640	95,927	53.10%	84,713	46.90%	197	0.23%	1,109	1.31%	419	0.49%
K0007	23,941	67.63%	319	10.03	240,274	129,065	53.72%	111,209	46.28%	247	0.22%	1,345	1.21%	460	0.41%
K0008	23,131	65.34%	346	10.46	242,080	130,008	53.70%	112,072	46.30%	263	0.23%	1,384	1.23%	482	0.43%
K0009	19,731	55.74%	361	10.37	204,887	108,923	53.16%	95,964	46.84%	262	0.27%	1,278	1.33%	460	0.48%
K0010	19,808	55.95%	323	9.89	196,045	103,338	52.71%	92,707	47.29%	233	0.25%	1,278	1.38%	430	0.46%
K0011	18,943	53.51%	319	9.93	188,301	101,530	53.92%	86,771	46.08%	204	0.24%	1,138	1.31%	400	0.46%
K0012	21,221	59.95%	432	10.43	221,470	117,493	53.05%	103,977	46.95%	253	0.24%	1,409	1.36%	469	0.45%
K0013	18,639	52.65%	334	10.18	189,846	101,030	53.22%	88,816	46.78%	207	0.23%	1,174	1.32%	423	0.48%
K0014	20,611	58.22%	380	10.35	213,542	113,703	53.25%	99,839	46.75%	243	0.24%	1,346	1.35%	455	0.46%
K0015	21,793	61.56%	477	11.19	244,011	128,612	52.71%	115,399	47.29%	279	0.24%	1,667	1.44%	533	0.46%
K0016	18,672	52.75%	320	9.71	181,428	95,962	52.89%	85,466	47.11%	233	0.27%	1,164	1.36%	425	0.50%
K0017	20,769	58.67%	336	10.11	210,150	111,905	53.25%	98,245	46.75%	251	0.26%	1,280	1.30%	449	0.46%
K0018	20,218	57.11%	395	10.53	212,988	114,712	53.86%	98,276	46.14%	236	0.24%	1,266	1.29%	447	0.45%
K0019	19,921	56.27%	309	9.93	198,039	105,803	53.43%	92,236	46.57%	229	0.25%	1,213	1.32%	443	0.48%
K0020	20,601	58.19%	362	10.39	214,262	114,693	53.53%	99,569	46.47%	252	0.25%	1,274	1.28%	427	0.43%
K0021	21,408	60.47%	484	11.24	240,749	126,888	52.71%	113,861	47.29%	303	0.27%	1,670	1.47%	536	0.47%
K0022	26,029	73.53%	486	11.86	308,826	163,137	52.82%	145,689	47.18%	408	0.28%	1,963	1.35%	612	0.42%
K0023	22,142	62.55%	443	11.49	254,602	133,786	52.55%	120,816	47.45%	331	0.27%	1,727	1.43%	519	0.43%
K0024	32,838	92.76%	475	15.42	506,555	266,918	52.69%	239,637	47.31%	680	0.28%	3,197	1.33%	1025	0.43%
K0025	20,045	56.62%	330	10.11	202,691	108,193	53.38%	94,498	46.62%	236	0.25%	1,250	1.32%	454	0.48%
K0026	25,119	70.96%	444	11.21	281,841	149,056	52.89%	132,785	47.11%	371	0.28%	1,728	1.30%	616	0.46%
K0027	24,792	70.03%	364	10.84	268,860	143,921	53.53%	124,939	46.47%	314	0.25%	1,605	1.28%	529	0.42%
K0028	23,797	67.22%	293	10.26	244,378	129,659	53.06%	114,719	46.94%	277	0.24%	1,484	1.29%	522	0.46%
K0029	19,817	55.98%	294	9.94	197,086	105,197	53.38%	91,889	46.62%	228	0.25%	1,201	1.31%	415	0.45%
	21,589	60.98%	486	10.52	229,941	122,259	53.20%	107,682	46.80%	271	0.25%	1,422	1.32%	486	0.45%

표 2-38. Statistics of InDel prediction

Index	Statistics of InDels			
	Homo	Hetero	Total	ratio
K0001	184,558	38,354	222,912	4.81
K0002	170,937	34,851	205,788	4.90
K0003	112,209	167,484	279,693	0.67
K0004	216,912	54,408	271,320	3.99
K0005	187,963	43,920	231,883	4.28
K0006	180,349	51,261	231,610	3.52
K0007	125,654	156,037	281,691	0.81
K0008	147,241	142,012	289,253	1.04
K0009	188,702	60,336	249,038	3.13
K0010	182,057	39,107	221,164	4.66
K0011	189,192	43,443	232,635	4.35
K0012	175,006	61,677	236,683	2.84
K0013	175,006	61,677	236,683	2.84
K0014	189,307	39,048	228,355	4.85
K0015	303,450	81,756	385,206	3.71
K0016	161,337	37,892	199,229	4.26
K0017	180,733	38,332	219,065	4.71
K0018	216,158	44,663	260,821	4.84
K0019	190,761	45,112	235,873	4.23
K0020	216,772	48,638	265,410	4.46
K0021	297,319	80,394	377,713	3.70
K0022	410,364	94,118	504,482	4.36
K0023	317,373	87,093	404,466	3.64
K0024	648,292	172,828	821,120	3.75
K0025	202,321	48,233	250,554	4.19
K0026	333,658	73,272	406,930	4.55
K0027	293,713	51,666	345,379	5.68
K0028	210,797	78,345	289,142	2.69
K0029	184,797	40,608	225,405	4.55
Sums	6,592,938	2,016,565	8,609,503	

ㄷ. 발굴된 InDel loci의 genomic coordinate를 분석한 결과 60.25%, 76.57%의 homo- and hetero-InDel는 intergenic region에 분포하고 있었고, 18.28%, 11.09%의 homo- and hetero-InDel는 유전자의 upstream 1kb 영역에 분포하고 있었다 (그림 2-77). 반면에, exon과 intron의 InDel은 각각 2.73%, 18.49%의 homo-InDel과 2.01%, 10.21% hetero-InDel을 가지고 있음으로써, SNP에서는 exon과 intron의 portion이 비슷한데 반해 InDel에서는 intron에서의 observation이 더 큼을 알 수 있었다. 그리고, 1% 미만의 splicing donor and acceptor에서의 InDel도 발굴되었다. 전체적인 homo-InDel와 hetero-InDel의 비율은 homo-InDel에서 높게 나타나나, intergenic 영역에서는 특이적으로 hetero-InDel의 비율이 우월하게 분포하고 있음을 알 수 있었다. 이러한 경향은 SNP와 InDel에서 공통적으로 나타나는 특징이다.

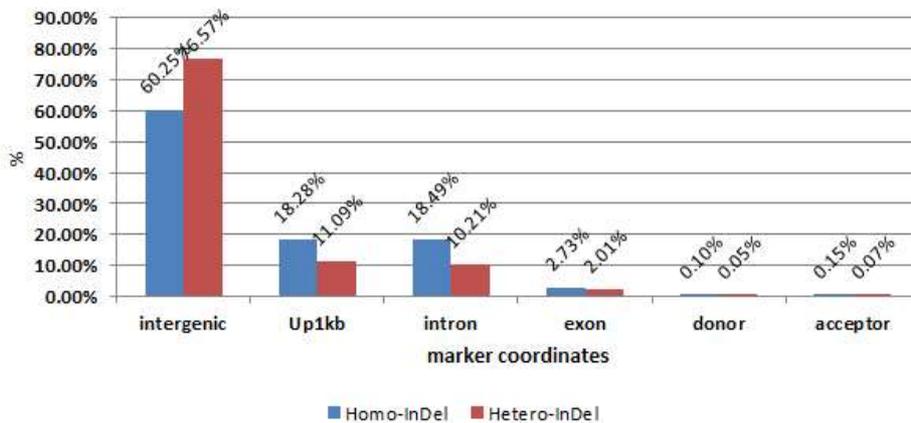


그림 2-77. InDel marker annotation

ㄸ. SSR 분석 결과: Genome-wide SSR은 repetitive sequence를 masking을 한 후 SciRoKo 프로그램을 이용하여 양배추 reference *B. oleracea* var. *capitata* line 02-12 서열을 기반으로 분석하였다. 그 결과, mono-hexa mer의 motif가 반복적으로 나타나는 pattern을 16,589 (24%), 22,611 (33%), 9,743 (14%), 6,125 (9%), 9,083 (13%), 5,038 (7%)로 순차적으로 분석되었고 (그림 2-78A), 전체 52,600개의 SSR이 136.2/Mb로 분포하고 있었다. validation에 application 되지 않는 monomeric SSR을 빼고 SSR 마커 후보군의 chromosome 별 distribution을 분석해 볼 때 C02에서 132.13/Mb로 가장 적게 분포하고 있었고, C03에서 143.71/Mb로 가장 많이 분포하고 있었다 (그림 2-78B). 이러한 SSR은 2.82Mb 당 1개의 SSR이 분포함을 의미한다.

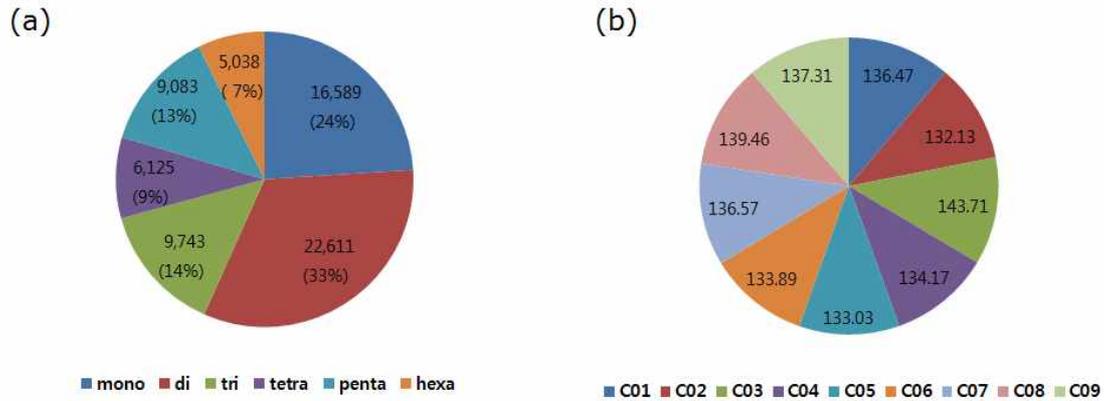


그림 2-78. genomic distribution of SSRs

- . genome reconstruction 결과: 앞에서 발굴한 SSR의 *in silico* polymorphisms을 분석하기 위하여 29 계통의 re-sequencing 한 data를 기반으로 IMR/Denom을 이용하여 genome reconstruction을 수행 하였다 (표 2-39). 먼저, IMR 프로그램을 이용하여 reference based assembly를 수행 한 결과 평균 377,682,324 bp genome이 construction 되었고, 계통별로 372,298,163 - 381,371,890 bp의 genome이 construction 되었다. 이는 reference genome의 97-99%에 해당한다. 또한, Soap *de novo*로 분석 하였을 때, 총 18,120,539,491 bp의 contig가 assembly 되었고, 약 2,659,615 개의 contig로 평균 644,784,055 bp의 *de novo* contigs를 생산하였고, 평균 N50은 360,174bp 였다. 위의 두 결과를 합쳐 reconstruction 된 genome은 계통별로 376,981,261-382,750,299 bp를 가지고 있으며 평균 381,154,502 bp로 reference genome의 99%에 달한다.

ㄱ 2-39. Genome reconstruction

	IMR		Soap denovo Contigs							Final genome	
	genome size	genome /ref (%)	No. of contigs (>100 bp)	total length of contigs (bp)	max. Len	average Len	N50	No. of contigs in N50	GC%	genome size	genome /ref (%)
K0001	376,499,179	0.98	1,618,013	524,244,218	32,695	324	688	114,190	36.69	381,858,799	0.99
K0002	381,371,890	0.99	1,643,976	521,291,126	24,501	317	627	139,334	36.30	380,973,972	0.99
K0003	378,974,004	0.98	2,991,456	705,671,254	22,778	235	248	545,916	35.73	381,980,117	0.99
K0004	376,509,933	0.98	2,148,556	584,392,589	21,157	271	411	193,644	36.59	381,522,885	0.99
K0005	376,433,701	0.98	1,620,837	530,884,935	35,766	327	738	106,186	36.28	380,483,738	0.99
K0006	377,592,855	0.98	1,652,994	533,667,824	28,300	322	679	116,014	36.22	381,657,041	0.99
K0007	379,945,323	0.99	2,786,826	680,519,986	24,288	244	264	473,574	35.71	382,079,984	0.99
K0008	377,637,582	0.98	2,561,554	654,079,358	26,416	255	286	380,823	35.98	381,822,521	0.99
K0009	377,784,530	0.98	1,855,613	556,326,391	30,155	299	489	154,839	36.81	380,875,007	0.99
K0010	379,963,818	0.99	2,565,495	625,297,830	21,457	243	308	264,294	36.88	381,520,907	0.99
K0011	377,672,712	0.98	1,778,442	548,298,204	28,743	308	619	122,557	36.45	381,240,611	0.99
K0012	380,027,196	0.99	2,394,885	600,597,599	21,311	250	319	285,446	37.02	382,453,595	0.99
K0013	377,229,252	0.98	2,100,613	573,685,946	18,203	273	414	203,687	36.70	381,148,236	0.99
K0014	380,235,849	0.99	2,766,276	624,116,408	14,311	225	251	359,247	37.79	382,750,299	0.99
K0015	378,317,050	0.98	3,470,996	718,361,510	12,777	206	218	485,570	38.50	381,175,645	0.99

K0016	378,355,757	0.98	1,934,613	557,341,682	24,304	288	483	165,186	36.87	381,985,010	0.99
K0017	376,903,773	0.98	2,352,269	596,252,376	20,947	253	341	238,101	37.07	380,837,522	0.99
K0018	381,014,118	0.99	1,666,228	532,862,836	30,113	319	699	110,655	36.53	382,358,916	0.99
K0019	376,951,253	0.98	2,271,487	597,255,112	25,043	262	387	205,740	36.57	381,938,698	0.99
K0020	376,048,759	0.98	2,446,345	614,184,439	17,571	251	325	263,898	36.51	380,192,549	0.99
K0021	377,517,069	0.98	4,908,477	876,938,975	12,036	178	154	931,032	38.72	381,560,415	0.99
K0022	376,190,954	0.98	4,155,980	791,844,388	18,021	190	175	661,155	38.40	380,079,215	0.99
K0023	377,565,034	0.98	5,999,320	1,061,200,373	15,767	176	160	1,297,653	38.79	379,385,176	0.99
K0024	372,298,163	0.97	6,506,693	1,151,664,734	39,665	176	166	1,516,894	38.66	376,981,261	0.98
K0025	376,840,620	0.98	2,459,850	616,183,306	25,043	250	334	248,962	36.59	381,530,100	0.99
K0026	376,336,638	0.98	2,731,359	637,982,453	14,411	233	266	362,524	36.68	379,572,265	0.99
K0027	374,791,186	0.97	1,665,150	535,457,545	40,927	321	696	110,957	36.46	381,050,555	0.99
K0028	378,934,469	0.98	1,948,537	569,936,094	27,323	292	415	195,547	36.28	381,432,870	0.99
K0029	376,844,743	0.98	2,125,997	578,196,661	29,333	271	415	191,431	36.81	381,032,663	0.99
sums	10,575,942,667	27.47	75,002,840	18,120,539,491	674,029	7,288	11,160	10,253,625	1,034	10,672,447,909	28
average	377,682,324	0.98	2,659,615	644,784,005	24,254	261	399	360,174	36.92	381,154,502	0.99
min	372,298,163	0.97	1,618,013	521,291,126	12,036	176	154	106,186	35.71	376,981,261	0.98
max	381,371,890	0.99	6,506,693	1,151,664,734	40,927	327	738	1,516,894	38.79	382,750,299	0.99

ㄷ. polymorphic marker 분석: 위에서 분석 한 69,189 SSR, 14,516,760의 SNPs, 1,926,951 InDels을 기반으로 52,600 (76.23%) SSR, 177,474 (1.22%)의 SNP marker targets을 선정하였다. SSR 마커에서는 motif length가 1인 것을 제거 하였고, SNP marker에서는 인접 60bp에 다른 SNP 또는 InDel이 detection 되는 영역을 marker target에서 제거 하였다. 반면에, InDel는 전 영역을 마커 타겟으로 선정 하였다. 전체 42.51%-61.35%의 marker target에서 primer가 성공적으로 design 되었고, single genomic locus를 target으로 하는 마커를 분석 한 결과, 총 21,781 SSR, 58,158 SNP, 992,012 InDel 마커가 최종적으로 database 상에 저장 되었다 (그림 2-79a-c). gene coordinate를 기반으로 분석 하였을 때, 50% 이상의 마커는 intergenic regions에서 발굴되었고, SSR, InDel 마커의 경우 다음으로 non-coding 또는 up-stream 1K 영역에서 abundant 하게 발굴 되었다. 하지만 SNP 마커의 경우 genetic variation이 많은 영역에서는 target 선정에서 많이 제거되어 exonic marker가 상대적으로 많이 분포하는 경향을 보였다 (그림 2-79d-f). polymorphism 정도 및 type을 비교 분석 하였을 때 SSR과 InDel 마커의 경우 10 bp 이하의 length polymorphism이 대부분으로 나타났고, 10% 이하의 마커에서는 10 bp 이하로 나타났다. SNP의 경우 transition과 transversion type의 비율이 유사한 형태로 polymorphisms이 나타났다. (그림 2-79g-i) 29 계통 사이에 polymorphic 정도를 분석 한 결과 20-30%의 분자마커는 BMA에 특이적인 polymorphisms을 보였고, *B. oleracea* 내에서는 polymorphisms이 없는 것으로 나타났다 (그림 2-79j). 11.33%의 SSR marker는 계통 특이적인 polymorphisms을 보였고, 계통 특이적인 변이의 분포는 SNP (19.50%) 또는 InDel (54.10%)에서는 더 낮게 나타났다. 이러한 polymorphism의 특징은 육종가들이 계통 선별 또는 분석을 위한 마커 선정에 있어서 중요한 포인트가 될 것으로 사료 된다.

ㄸ. 기존 논문에 publish 된 genetic map 발굴: 기존에 논문상에서 publish 된 genetic map을 PubMed의 Keyword search를 통해 얻고, primer sets을 manually download받아 분석하였다 (표 2-40). 총 1,699개의 primer set이 DB화 되어있고, 각 primer set을 short-BLAST로 genome에 align하여 identity > 70%, mismatch < 4, potential amplicon length < 1K 이하로 match 될 경우 chromosome상으로 primer set을 assign 하였다. 위의 criteria를 기반으로 했을 때, 0.63%~90.20%의 primer set이 chromosome 상으로 anchoring 되었고, 일부의 primer sets은 genome 상에서 여러번

mapping 되었음을 알 수 있다. 이러한 marker sets은 length polymorphic이라기 보다 whole genome triplication 된 양배추 genome의 다른 c염색체 영역에서 amplification 되었을 가능성을 보여준다.

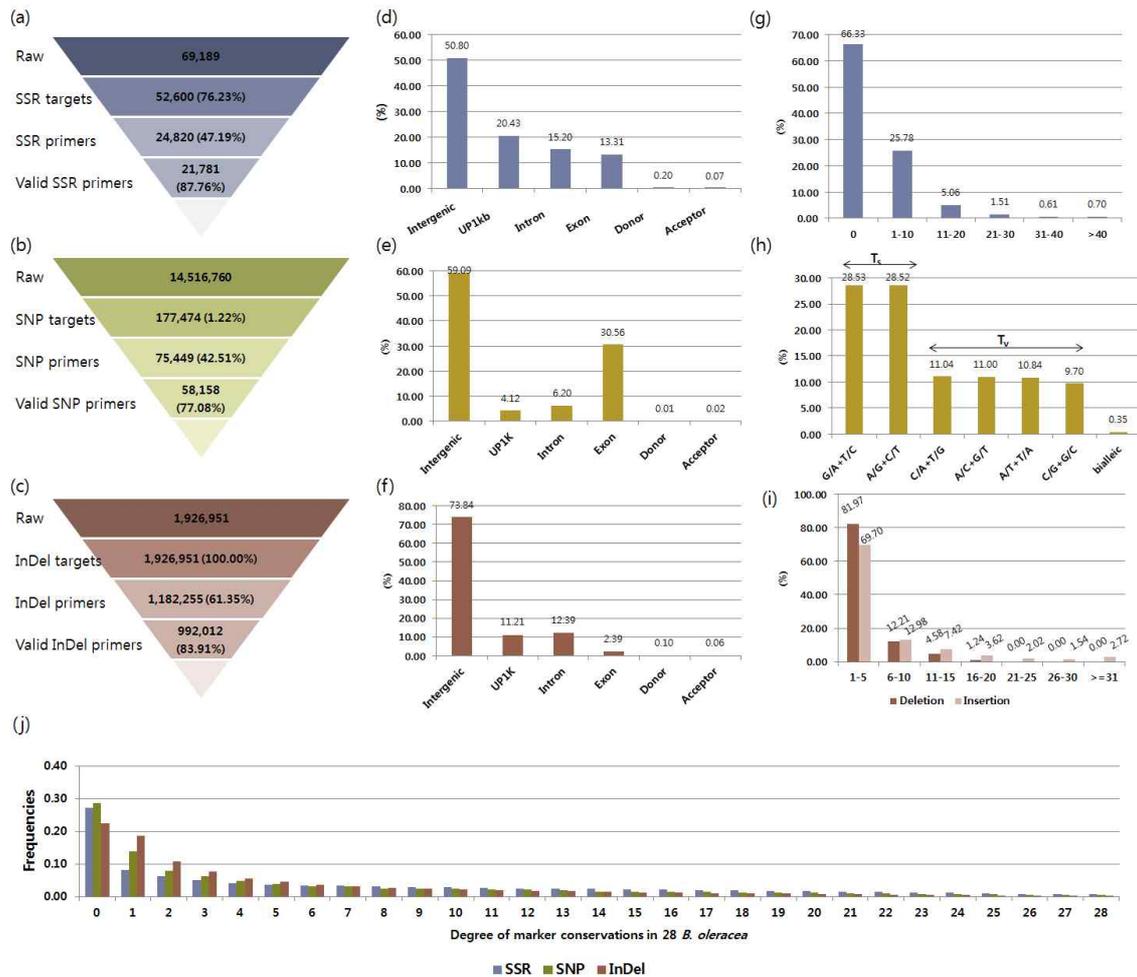


그림 2-79. Statistics of Molecular markers storing in BolMT database

Statistics of 3 types of molecular markers were represented; Number of markers according to developing process (a-c), marker coordinates associated reference genes (d-f), marker polymorphism by comparing reference and individual genomes (g-i). Marker types were classified by figure colors: SSR (blue), SNP (green), InDel (brown).

표 2-40. statistics of marker information stored in integrated genetic map

No. of marker	mapped primer (%)		unmapped primer	Total loci of mapped markers	reference
1,227	928	75.63%	299	1,336	Wang et al. (2012) BMC Genomics 13:523
240	200	83.33%	40	522	Carlier et al. (2011) G3 1(7):593-601
159	1	0.63%	169	1	Li et al. (2003) Theor Appl Genet 107(1):168-80
108	9	8.33%	99	11	Gao et al. (2007) Theor Appl Genet 115(2):277-87
51	46	90.20%	5	71	Mei et al. (2013) Theor Appl Genet 126(2):549-56
50	6	12.00%	44	8	Okazaki et al. (2006) Theor Appl Genet 114(4):595-608
39	7	17.95%	32	9	Nagaoka (2010) Theor Appl Genet 120(7):1335-1346
18	1	5.56%	17	1	Zhang (2011) Theor Appl Genet 123(2):231-8

② 웹 인터페이스 구축

- ㉠ 위에서 분석한 분자 마커 및 genetic polymorphisms을 양배추류의 육종가가 검색 및 활용 가능하도록 하기 위해서 다음과 같은 web-interface를 구축하였다. 전체 웹은 database 구축의 pipeline을 보여주는 “1) Home“을 포함하여 ”2) Browser“, ”3) Marker“, ”4) Trait Map (TM)“, ”5) integrated genetic map (IGM)“, ”6) variation block (VB) heatmap“, ”7) VB density“으로 7개의 contents를 가지고 있다 (그림 2-80).



그림 2-80. web contents

㉠ Browser web

- ㄱ. Browser는 reference와의 sequence difference를 기반으로 구성되어 있으며, genome 상에서의 marker distribution을 genome-wide하게 볼 수 있다 (그림 2-81a). 또한, annotation 된 유전자를 탑재시킴으로써 polymorphic marker에 인접한 유전자에 대한 정보도 얻을 수 있어 기능연구에도 도움을 줄 수 있도록 구성되어 있다. 또한 “Zoom in”, “Zoom out” 기능을 이용하면 원하는 영역의 마커들을

㉔ 마커 & IGM 웹

ㄱ. 마커 웹에서는 4차년도에서 수정된 pipeline을 기반으로 만들어진 101,639 SNP, 122,686 Indel, 23,587 SSR 마커에 대한 primer set을 제공한다 (그림 2-82a). user의 specific한 chromosome 또는 loci의 원하는 type의 marker를 개발하기 위해서는 simple하게 통계값을 click하여 들어 갈 수 있다. 또한, 기존의 genetic map에서 사용된 maker를 physical map 상으로 integration (표 2-41) 하여 구축한 IGM 웹을 기반으로 marker density가 낮은 영역을 click하여 해당 영역의 marker를 손쉽게 찾을 수 있도록 구축하였다 (그림 2-82b). 그 결과, user는 chromosome 상의 marker density와 함께 target 영역의 marker primer, gene information, polymorphic degree를 알 수 있다. 그리고, exon, intron, upstream, intergenic으로 나누어져 있는 TAG 및 위치 정보를 기반으로 target 영역의 marker primer를 filtration 할 수 있다 (그림 2-82c).

표 2-41. statistics of marker information stored in integrated genetic map

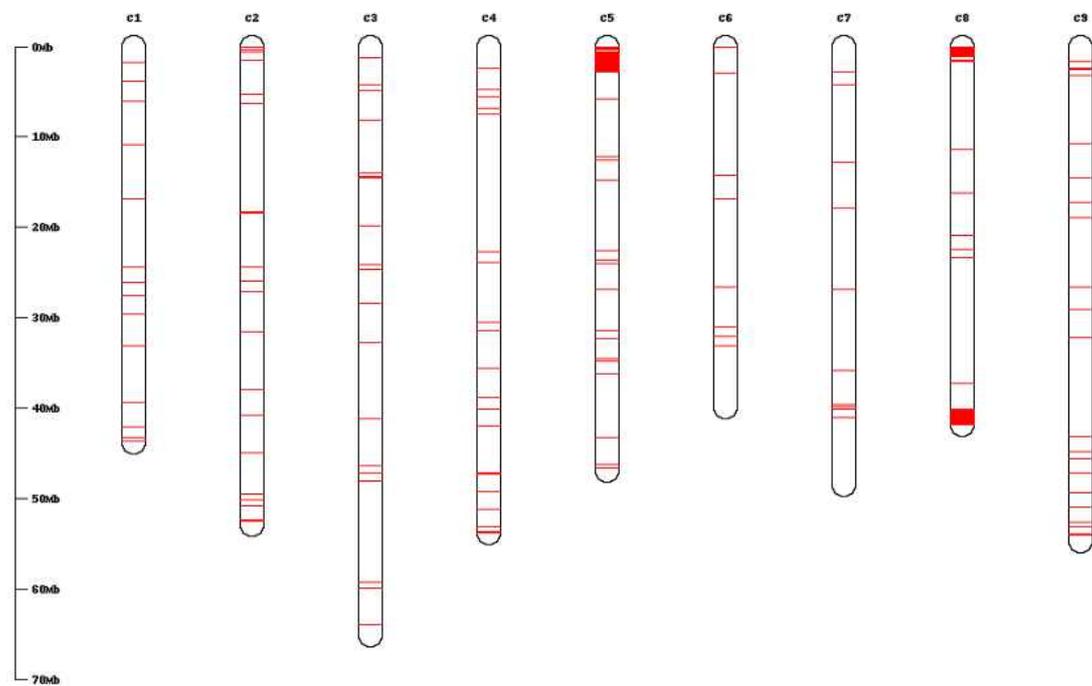
	No. of marker	mapped primer (%)		unmapped primer	Total loci of mapped markers	reference
1	1,227	928	75.63%	299	1,336	Wang et al. (2012) BMC Genomics 13:523
2	240	200	83.33%	40	522	Carlier et al. (2011) G3 1(7):593-601
3	159	1	0.63%	169	1	Li et al. (2003) Theor Appl Genet 107(1):168-80
4	108	9	8.33%	99	11	Gao et al. (2007) Theor Appl Genet 115(2):277-87
5	51	46	90.20%	5	71	Mei et al. (2013) Theor Appl Genet 126(2):549-56
6	50	6	12.00%	44	8	Okazaki et al. (2006) Theor Appl Genet 114(4):595-608
7	39	7	17.95%	32	9	Nagaoka (2010) Theor Appl Genet 120(7):1335-1346
8	18	1	5.56%	17	1	Zhang (2011) Theor Appl Genet 123(2):231-8

ㄴ. IGM은 문헌상의 first author 및 출판 년도를 기반으로 검색이 가능하며, publish 된 genetic map의 physical distribution 및 statistics 를 보여 준다 (그림 2-83). 또한 형질에 관련 된 연구를 한 논문인 경우 target trait 정보도 같이 얻을 수 있어 유용하다.

IGM - in silico intergrated genetic map

B. oleracea genetic marker

Author : Carlier et al. 2011 Trail : Downy mildew resistance locus Pp523 [쿼리 전송](#)



*Statistics : total 600

Chromosome	No. of Primers	%
C1	31	5.17
C2	67	11.17
C3	23	3.83
C4	43	7.17
C5	160	26.67
C6	10	1.67
C7	10	1.67
C8	138	23
C9	43	7.17
Scaffold	35	5.83
Unmapped	40	6.67

그림 2-83. example of IGM map

㉔ trait map (TM)

- ㄱ. 양배추 육종 지원 사업단에서 수집한 양배추는 6개의 형질 특히 4개의 대표 형질 (위황병, 내서성, tip-burn, 줌나방) 형질에 대해 2계통 이상의 저항성군과 민감성 군의 계통을 포함하고 있다. 이들 형질에서 공통적으로 나타나는 genotype을 분석하는 것을 지원하기 위하여 선택한 계통 group 간의 SNP genotype의 conservation과 variation을 분석할 수 있는 web을 구축하였다.
- ㄴ. 형질 관련 SNP는 저항성 그룹과 민감성 그룹으로 나누어 분석하였고, 그룹 내의 genotype이 같고 그룹간의 genotype이 다른 SNP를 선별하였다. 선별된 SNP는 genomic coordinates에 따라 upstream-1K, exon, intron으로 categorized 하였다.
- ㄷ. 위의 방법으로 선별 된 형질 관련 SNP는 형질 별로 내서성 329,867 (표 2-41), tip-burn 443,222 (표 2-42), 위황병 200,979 (표 2-43), and 줌나방 389,263 (표 2-44) 개를 발굴 하였고, 이러한 SNP set은 전체 발굴 된 SNP의 2.27%, 3.05%, 1.38%, 2.68%을 차지한다. Gene coordinate를 기반으로 분류하였을 때 약 75.46%의 형질관련 SNP가 intergenic region에 분포하고 있었고, 다음으로는 upstream 1K (9.33%), exon (7.97%), intron (7.25%) regions에 각각 분포하고 있었다.

표2-41. 내서성 형질 관련 SNPs 예

Chr	loci	K0001	K0002	K0003	K0005	K0006	BolGene	TAG	AthGene
C01	55,529	A/T	A/T	A/T	None	None	Bol028792	exon	AT1G64390.1
C01	55,530	T/C	T/C	T/C	None	None	Bol028792	exon	AT1G64390.1
C01	55,562	G/A	G/A	G/A	None	None	Bol028792	exon	AT1G64390.1
C01	69,713	None	None	None	A/G	A/G	Bol028796	intron	AT4G39030.1
C01	69,733	None	None	None	A/T	A/T	Bol028796	intron	AT4G39030.1
C01	145,821	None	None	None	A/A	A/A	Bol028816	exon	AT4G39400.1
C01	146,668	None	None	None	T/T	T/T	Bol028816	exon	AT4G39400.1
C01	147,448	None	None	None	C/C	C/C	Bol028816	exon	AT4G39400.1
C01	147,522	None	None	None	C/C	C/C	Bol028816	exon	AT4G39400.1
C01	147,642	None	None	None	C/C	C/C	Bol028816	exon	AT4G39400.1
C01	195,114	None	None	None	G/G	G/G	Bol028817	exon	AT4G39410.1
C01	202,504	None	None	None	A/A	A/A	Bol028818	upstream-1K	AT4G39420.2
C01	203,996	None	None	None	A/A	A/A	Bol028818	exon	AT4G39420.2
C01	204,096	None	None	None	C/C	C/C	Bol028818	exon	AT4G39420.2
C01	204,347	None	None	None	A/A	A/A	Bol028818	exon	AT4G39420.2
C01	205,006	None	None	None	A/A	A/A	Bol028818	exon	AT4G39420.2

표 2-42. tip-burn 형질 관련 SNPs 예

Chr	loci	K00014	K00015	K00016	K00017	BolGene	TAG	AthGene
C01	70897	A/A	A/A	None	None	Bol028796	intron	AT4G39030.1
C01	99236	None	None	A/A	A/A	Bol028803	upstream-1K	AT4G39120.1
C01	99674	None	None	C/A	C/A	Bol028803	upstream-1K	AT4G39120.1
C01	99954	None	None	C/T	C/T	Bol028803	upstream-1K	AT4G39120.1
C01	100686	None	None	T/T	T/T	Bol028804	upstream-1K	AT4G39130.1
C01	100692	None	None	T/T	T/T	Bol028804	upstream-1K	AT4G39130.1
C01	100766	None	None	C/C	C/C	Bol028804	upstream-1K	AT4G39130.1
C01	101031	None	None	C/C	C/C	Bol028804	upstream-1K	AT4G39130.1
C01	102325	None	None	A/A	A/A	Bol028805	exon	AT4G39140.5
C01	102588	None	None	A/A	A/A	Bol028805	intron	AT4G39140.5
C01	102671	None	None	G/G	G/G	Bol028805	intron	AT4G39140.5
C01	103533	None	None	C/C	C/C	Bol028805	upstream-1K	AT4G39140.5
C01	103542	None	None	T/T	T/T	Bol028805	upstream-1K	AT4G39140.5
C01	103580	A/A	A/A	None	None	Bol028805	upstream-1K	AT4G39140.5
C01	103665	None	None	G/G	G/G	Bol028805	upstream-1K	AT4G39140.5
C01	103667	None	None	C/C	C/C	Bol028805	upstream-1K	AT4G39140.5
C01	103912	None	None	G/G	G/G	Bol028805	upstream-1K	AT4G39140.5
C01	103932	None	None	T/T	T/T	Bol028805	upstream-1K	AT4G39140.5
C01	104265	None	None	C/C	C/C	Bol028806	intron	AT4G39150.2
C01	106562	None	None	C/C	C/C	Bol028806	upstream-1K	AT4G39150.2
C01	106562	None	None	C/C	C/C	Bol028807	upstream-1K	AT1G19610.1
C01	109208	None	None	G/G	G/G	Bol028808	upstream-1K	AT4G39200.1

표 2-43. 위황병 관련 SNPs 예

Chr	loci	K0003	K0007	K0008	K0004	K0006	K0009	K0010	BolGene	TAG	AthGene
C01	256985	G/A	G/A	G/A	None	None	None	None	Bol028825	exon	AT1G62020.1
C01	256986	A/G	A/G	A/G	None	None	None	None	Bol028825	exon	AT1G62020.1
C01	256989	T/C	T/C	T/C	None	None	None	None	Bol028825	exon	AT1G62020.1
C01	256992	T/C	T/C	T/C	None	None	None	None	Bol028825	exon	AT1G62020.1
C01	396384	None	None	None	T/A	T/A	T/A	T/A	Bol028850	upstream - 1 K	AT4G39910.1
C01	396436	None	None	None	A/T	A/T	A/T	A/T	Bol028850	upstream - 1 K	AT4G39910.1
C01	429060	A/A	A/A	A/A	None	None	None	None	Bol028857	intron	AT4G40000.1
C01	429411	A/A	A/A	A/A	None	None	None	None	Bol028857	intron	AT4G40000.1
C01	429530	C/T	C/T	C/T	None	None	None	None	Bol028857	intron	AT4G40000.1
C01	429547	G/A	G/A	G/A	None	None	None	None	Bol028857	intron	AT4G40000.1
C01	487442	None	None	None	G/G	G/G	G/G	G/G	Bol028870	upstream - 1 K	AT4G38050.1
C01	487446	None	None	None	A/A	A/A	A/A	A/A	Bol028870	upstream - 1 K	AT4G38050.1
C01	487450	None	None	None	G/G	G/G	G/G	G/G	Bol028870	upstream - 1 K	AT4G38050.1
C01	493026	A/A	A/A	A/A	None	None	None	None	Bol028871	upstream - 1 K	AT4G38040.1
C01	504994	G/G	G/G	G/G	T/G	T/G	T/G	T/G	Bol028873	intron	AT4G38020.1
C01	580708	None	None	None	T/T	T/T	T/T	T/T	Bol028882	exon	AT4G37860.1
C01	766191	None	None	None	A/A	A/A	A/A	A/A	Bol028906	upstream - 1 K	AT4G37510.1
C01	779662	C/T	C/T	C/T	T/T	T/T	T/T	T/T	Bol028908	exon	AT4G37460.1
C01	779671	C/T	C/T	C/T	T/T	T/T	T/T	T/T	Bol028908	exon	AT4G37460.1
C01	779674	T/C	T/C	T/C	C/C	C/C	C/C	C/C	Bol028908	exon	AT4G37460.1
C01	990792	C/C	C/C	C/C	None	None	None	None	Bol028937	upstream - 1 K	AT4G36960.2
C01	1138390	A/T	A/T	A/T	None	None	None	None	Bol028965	intron	AT4G36850.1

표 2-44. 좁나방 관련 SNPs 예

Chr	loci	K0000 7	K0000 8	K0000 9	K0001 0	BolGene	TAG	AthGene
C01	99,810	T/T	T/T	None	None	Bol028803	upstream-1K	AT4G39120.1
C01	99,811	G/G	G/G	None	None	Bol028803	upstream-1K	AT4G39120.1
C01	99,814	C/C	C/C	None	None	Bol028803	upstream-1K	AT4G39120.1
C01	102,348	G/G	G/G	None	None	Bol028805	intron	AT4G39140.5
C01	103,031	A/A	A/A	None	None	Bol028805	upstream-1K	AT4G39140.5
C01	103,358	T/G	T/G	None	None	Bol028805	upstream-1K	AT4G39140.5
C01	104,985	G/G	G/G	None	None	Bol028806	intron	AT4G39150.2
C01	105,516	G/G	G/G	None	None	Bol028806	exon	AT4G39150.2
C01	105,528	A/A	A/A	None	None	Bol028806	exon	AT4G39150.2
C01	105,537	T/T	T/T	None	None	Bol028806	exon	AT4G39150.2
C01	105,684	C/C	C/C	None	None	Bol028806	acceptor	AT4G39150.2
C01	109,381	C/C	C/C	None	None	Bol028808	upstream-1K	AT4G39200.1
C01	109,388	A/A	A/A	None	None	Bol028808	upstream-1K	AT4G39200.1
C01	109,393	A/A	A/A	None	None	Bol028808	upstream-1K	AT4G39200.1
C01	114,145	A/A	A/A	None	None	Bol028809	exon	AT4G39260.3
C01	126,338	A/A	A/A	None	None	Bol028813	exon	AT4G39350.1
C01	225,219	T/T	T/T	None	None	Bol028821	exon	AT4G39520.1
C01	225,629	C/C	C/C	None	None	Bol028821	intron	AT4G39520.1
C01	225,678	A/A	A/A	None	None	Bol028821	intron	AT4G39520.1
C01	225,684	A/A	A/A	None	None	Bol028821	intron	AT4G39520.1
C01	230,296	A/A	A/A	None	None	Bol028822	intron	AT4G39540.2
C01	243,466	C/C	C/C	None	None	Bol028824	exon	AT4G39590.1

르. 이러한 형질 관련 SNP 중 upstream 영역과 genic 영역의 SNP는 functional marker의 후보군으로써 유전자의 조절이나 기능에 관여할 수 있으므로 특히 중요하다. 90% 이상의 형질 관련 SNP는 20개 이하로 분포하고 있었으며, 최대 232개/gene 의 SNP도 관찰되었다 (그림 2-84). 그리고, 발굴된 형질관련 SNP의 76.52-84.54%는 homozygous alleles을 가지고 있었으며, 약 1.86%는 bi-allelic SNPs 이거나 동일 loci에서 homo-, hetero-관계였다 (represented as common "C"). 형질 관련 SNP의 gene 상에서의 distribution을 분석 하였을 때, 80% 이상이 저항성 "R" 또는 민감성 "S" 유전자 상에서 발굴되는 biased variation pattern을 보였다.

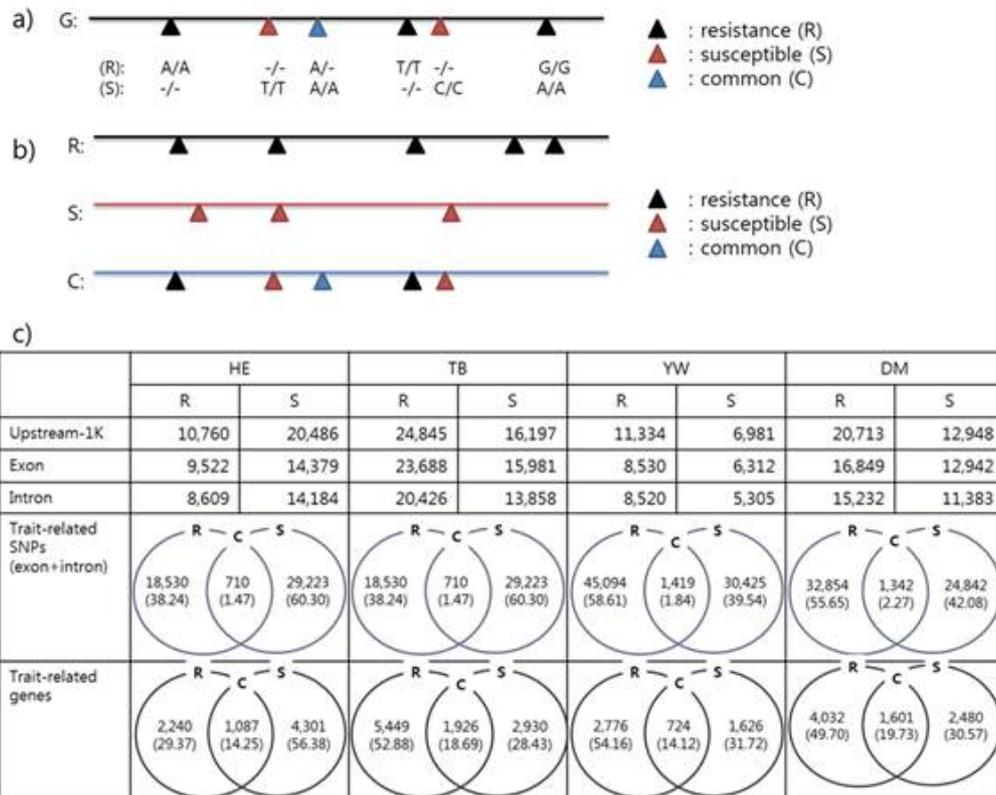


그림 2-84. Statistics of trait related SNPs and genes

a) Definition of the trait-related SNPs, b) definition of the trait-specific genes, c) gene coordinates and distribution of trait-related SNPs according to above definitions. Abbreviations: HE: heat; TB: tip-burn; YW: yellow-wilt, DM: diamond back moth

㉔ Variation block (VB) 분석

- ㄱ. 양배추 genome 내에서의 각 계통의 variation block을 찾기 위해 각 genome상의 100K bin에 있는 SNP data를 기반으로 Z-test를 수행하였다.
- ㄴ. 그 결과, 총 107,940개의 bin (3,855 bin/genome)을 조사한 결과 bin내의 평균 SNP density는 608.61개 였고, SNP의 frequency는 z-score value와 positive correlation을 이루고 있음을 알 수 있었다 (표 2-45). 따라서, z-score value는 각 genome 상의 SNP hotspot block (HB) 와 coldspot block (CB)를 결정하는 기준이 될 수 있을 것으로 보았다.

표 2-45. HB/CB blocks according to z-score

Z-score	Cold block (CB)				Hot block (HB)			
	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4
Average (SNP)	n.d.	n.d.	68	248	1,296	1,639	2,120	2,559
Ratio to average	n.d.	n.d.	0.11	0.41	2.13	2.69	3.48	4.20
Average number of bins	n.d.	n.d.	2.50	625.46	661.89	127.75	18.82	4.50
Genomic portion (%)	n.d.	n.d.	0.04	16.22	17.17	1.86	0.27	0.07

n.d.: not detected

- ㄷ. HB 및 CB의 개수는 z-score에 따라 급 감소하는 pattern을 보였고, 특히 CB는 z-score <-3에서는 보이지 않았다. Z-score +1 (HB), -1 (CB)의 criteria를 기준으로 볼 때, 이 영역은 각각 17.17%, 16.22%의 genomic portion을 가지고 있었고, 2를 기준으로 할 때 2% 미만의 genomic portion을 보여준다. HB와 CB의 abundance는 1-28까지 분포하고 있었고, frequency는 decreased 되는 pattern을 보였다. VB 및 CB의 gene density는 average gene densities (9.23 HB/8.70 CB), exon numbers (4.48/4.38), and gene length (172.33/172.47로 큰 차이를 보이지 않았다. HB의 SNP density는 higher (upstream: 3.85/Kb, exon: 2.78/Kb, intron: 2.88/Kb) 로 CB (upstream: 3.53/Kb, exon: 2.50/Kb, intron: 2.60/Kb, respectively) 보다 약간 많이 분포하는 것으로 나타났다 (그림 2-86).

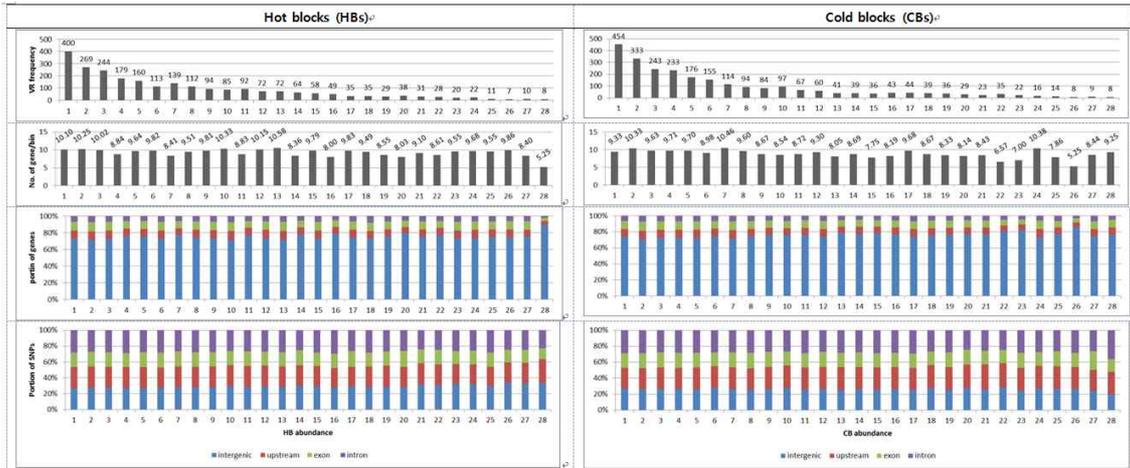


그림 2-86. Distribution of Variation Blocks in 28 *B. oleracea* individual and genetic features

㉞ VB density

ㄱ. HB와 CB의 abundance를 기반으로 분석 한 결과 각 8개의 HB 및 CB가 공통적인 영역에서 나타나는 것을 알 수 있었고, 이 영역을 각각 hyper variable region (HVR), hyper cold region (HCR)로 명명 하였다. 이러한 영역의 분석은 28개의 양배추류에서 공통적으로 variation이 많거나 적은 영역으로 마커 분석 및 density 조절에 유용하게 사용 될 것으로 사료되며 VB density 웹 상에서 분석 가능 하도록 구축하였다(그림 2-87).

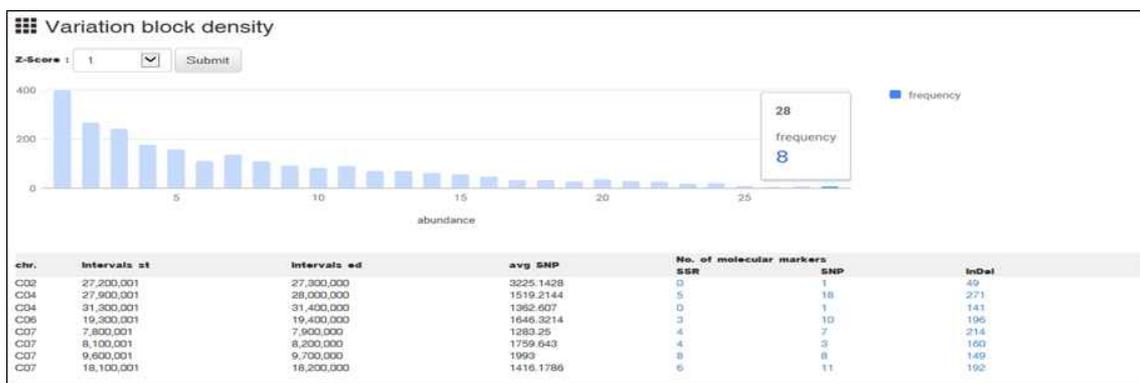


그림 2-87. VB density web

Variation blocks (VB) were analyzed by z-test with SNP frequencies. a) Degree of the VB was determined by user selected criteria of z-score and VB abundances meeting user's criteria in 28 *B. oleracea* enable to analyze on a "VB density" web.

㉔ Variation heat-map

ㄱ. variation heatmap은 각 genome의 variation 정도를 web상에서 비교 분석 할 수 있도록 구축 된 web으로 z-score를 기반으로 representation 되어있다(그림 2-88).



그림 2-88. SNP Heat-map

Heat-map represents hot- (red) and cold-blocks (blue) in each Brassica line, according to z-scores. Interesting chromosome and genomic regions enable to select by select box and slide bar, respectively. By clicking bottom of the "exon SNP", exonic SNPs in the selected loci were represented for each line. VR comparison enables to compare trait-related hot-spots comparing with other loci.

- ㄴ. 특히, heatmap 상의 variation block이 형질과 연관되면 QTL 분석에 도움이 될 것으로 사료된다. 예를 들어, yellow-wilt 저항성의 QTL로 밝혀진 "FocBo1"영역은 yellow-wilt 저항성을 가진 계통에서 z-score가 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 2-89).
- ㄷ. 또한 이 영역의 SNP density의 차이는 browser web에서 더 자세히 비교할 수 있다 (그림 2-90).

YW-QTL
(*FocBo1*)
↓

		-100		+100
resistant	K0003	1,204	1,045	1,359
	K0007	1,031	1,099	1,260
	K0008	875	879	467
susceptible	K0004	801	1,094	1,359
	K0006	311	764	725
	K0009	338	813	777
	K0010	363	917	611

그림 2-89. FocBo1 영역의 SNP density 비교

SNP densities around of YW-QTL (Shimizu et al. 2015). An arrow represents genomic loci of YW-QTL (C07:38,813,696-38,822,022) Values in each cell represent number of SNP in bins of each line. Red and blue colors of bins represented positive and negative values of z-score, respectively. Orange colors of bin represented z-score larger than 1.

a) **Browser**



그림 2-90. Detail view of the “Browser” web

All predicted SNP/InDels were represented in JBrowse. a) overview of “Browser” web. ① User can search SNP/InDels in specific “genomic loci” or reference gene ids” and ② all predicted SNP/InDels for interesting trait by loading “vcf files” at Full-screen view options. It helps analyze genetic variations for several lines depending on user’s selection. The gene structures, including annotation, CDS/exon sequences can analyze by clicking gene models (③) and information for SNP/Indel can be analyze by clicking every green boxes (④). b) An example of the genetic variation showed genomic loci of the published QTL (Shimizu, et al. 2015) for yellow wilt (YW) resistance and the selection of lines for YW resistance (K0007, K0008) and susceptible (K0009, K0010) lines.

차. 엘리트 계통의 마커 개발

- ① 아시아 종묘의 elite line 마커를 대량 발굴하기 위해서 NGS library를 만든 후 HiSeq2000 플랫폼을 이용하여 101 bp paired-end sequencing을 수행 하였다. 그리고, SNP/Indel 발굴은 4차년도에 확립한 pipeline을 이용하여 분석하였다 (그림 2-91).

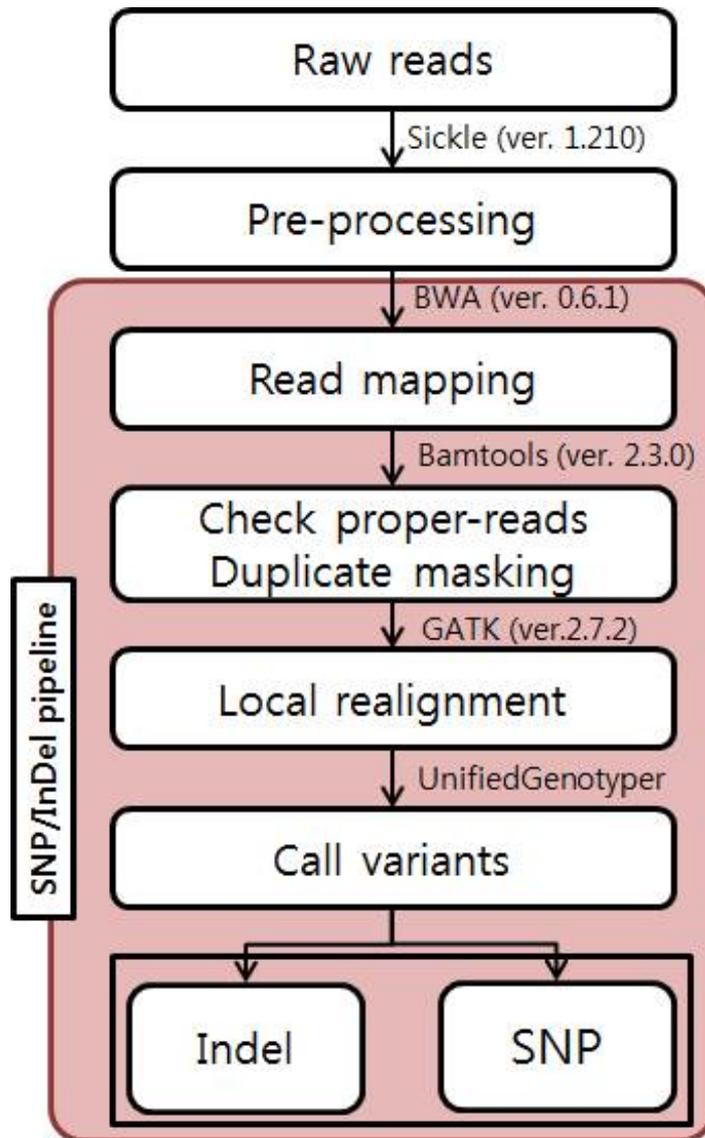


그림 2-91 . SNP 분석을 위한 pipeline

② sequencing 결과, 1,663,234,142개의 NGS reads로부터 168,910,692,184 bp의 sequences를 확보 하였다 (표 2-46). high quality (HQ) read를 확보하기 위하여 pre-processing을 거친 결과 총 1,327,967,524 paired-end read가 남았고, yield로는 131,791,942,582 bp가 남았다. 이는 평균 78.97%의 read가 HQ로 남았음을 의미하고 HQ read의 depth는 평균 17.43로 계통별로 10.10-22.42 depth의 서열을 확보하였다.

표 2-46. 아시아 종묘 12 elite line reads

Index	No. of raw reads	raw yields	raw depth	No. of HQ reads	HQ yields	(%)	HQ depth
9906	168,784,150	17,047,199,150	27.06	144,233,502	14,123,631,679	85.45	22.42
9914	157,326,956	15,890,022,556	25.22	135,126,002	13,222,930,952	85.89	20.99
9918	167,087,794	16,875,867,194	26.79	127,533,790	12,501,447,255	76.33	19.84
9920	151,435,682	15,295,003,882	24.28	114,180,536	11,182,438,699	75.40	17.75
9930	130,723,838	13,203,107,638	20.96	91,773,826	9,027,371,376	70.20	14.33
9934	115,631,524	11,678,783,924	18.54	81,106,348	7,973,788,457	70.14	12.66
9936	95,563,892	9,651,953,092	15.32	68,049,746	6,744,045,719	71.21	10.70
9938	90,232,030	9,113,435,030	14.47	64,231,310	6,365,584,948	71.18	10.10
9940	134,715,592	13,606,274,792	21.60	112,090,788	11,099,742,213	83.21	17.62
9943	127,732,934	13,825,070,176	21.94	109,150,604	11,737,589,322	85.45	18.63
9968	162,271,290	16,389,400,290	26.01	140,231,780	13,906,946,212	86.42	22.07
9970	161,728,460	16,334,574,460	25.93	140,259,292	13,906,425,750	86.73	22.07
Sums	1,663,234,142	168,910,692,184	268.11	1,327,967,524	131,791,942,582	947.61	209.19
min	90,232,030	9,113,435,030	14.47	64,231,310	6,365,584,948	70.14	10.10
max	168,784,150	17,047,199,150	27.06	144,233,502	14,123,631,679	86.73	22.42
average	138,602,845	14,075,891,015	22.34	110,663,960	10,982,661,882	78.97	17.43

③ read mapping 결과, 평균 92,559,318개의 read가 draft genome 상에 mapping 되었고, 이는 genome의 82.45% 정도를 cover 하는 것에 해당한다 (표 2-47). redundant read, proper-paired가 깨진 read 들을 제거하는 filtration을 거친 후 총 843,479,498개의 read가 mapping 되었고, filtration 후 평균 depth는 20.45로 high quality의 SNP calling을 할 수 있는 조건에 해당되었다.

표 2-47. elite line read mapping 결과

Index	Mapped reads		No. of reads after filtration		Genome coverage	average DP	% of DP > 15
	No. of reads	%	No. of reads	%			
9906	119,910,855	82.11	93,250,415	63.85	75.58	25.86	64.03
9914	112,382,554	82.12	87,604,665	64.02	75.40	23.66	58.40
9918	106,756,586	82.72	83,418,521	64.64	75.63	23.60	61.01
9920	95,744,676	82.85	74,653,550	64.60	75.53	21.26	56.17
9930	79,019,139	83.67	56,709,539	60.05	75.93	16.94	35.20
9934	69,214,952	82.95	49,729,424	59.60	75.65	14.96	29.14
9936	56,632,258	82.19	39,346,315	57.10	75.29	12.84	18.88
9938	53,282,698	81.93	36,999,871	56.90	75.21	12.11	16.89
9940	93,368,826	82.25	71,138,180	62.67	75.61	20.60	51.34
9943	92,365,612	83.18	70,272,971	63.29	75.61	22.16	57.32
9968	116,320,553	81.92	90,319,232	63.61	75.82	25.57	64.28
9970	115,713,109	81.52	90,036,815	63.43	75.91	25.82	65.91
Sums	1,110,711,818	989.44	843,479,498	743.76	907.18	245.39	578.56
min	53,282,698	81.52	36,999,871	56.90	75.21	12.11	16.89
max	119,910,855	83.67	93,250,415	64.64	75.93	25.86	65.91
average	92,559,318	82.45	70,289,958	61.98	75.60	20.45	48.21

④ 위의 mapping 결과로부터 SNP를 prediction 한 결과, 12 elite line의 평균 SNP는 34,660,327개가 calling 되었다. homo-SNP와 hetero-SNP의 비율은 약 0.68로 hetero SNP가 많이 분포하였고, Transition과 Transversion의 비율은 약 1.37로 29계통의 Ts/Tv 비율과 유사한 수준이었다 (표 2-48).

표 2-48. Statistics of SNP prediction of 12 elite lines

Index	Statistics of SNPs						
	Homo	Hetero	Total	Homo /Hetero	Ts	Tv	Ts/Tv
9906	1,509,925	2,257,152	3,767,077	0.67	2,183,818	1,583,259	1.38
9914	1,650,194	2,287,087	3,937,281	0.72	2,284,577	1,652,704	1.38
9918	1,480,037	2,188,518	3,668,555	0.68	2,123,354	1,545,201	1.37
9920	1,535,888	2,155,213	3,691,101	0.71	2,134,271	1,556,830	1.37
9930	1,307,766	1,910,620	3,218,386	0.68	1,861,026	1,357,360	1.37
9934	1,333,107	1,806,916	3,140,023	0.74	1,814,095	1,325,928	1.37
9936	1,174,242	1,651,140	2,825,382	0.71	1,631,925	1,193,457	1.37
9938	1,158,721	1,591,536	2,750,257	0.73	1,588,830	1,161,427	1.37
9940	1,410,647	2,121,365	3,532,012	0.66	2,046,108	1,485,904	1.38
9943	1,462,120	2,220,294	3,682,414	0.66	2,133,871	1,548,543	1.38
9968	1,459,995	2,253,535	3,713,530	0.65	2,150,498	1,563,032	1.38
9970	1,369,380	2,296,931	3,666,311	0.60	2,123,383	1,542,928	1.38
Sums	16,852,022	24,740,307	41,592,329	8.21	24,075,756	17,516,573	16.49
min	1,158,721	1,591,536	2,750,257	0.60	1,588,830	1,161,427	1.37
max	1,650,194	2,296,931	3,937,281	0.74	2,284,577	1,652,704	1.38
average	1,404,335	2,061,692	3,466,027	0.68	2,006,313	1,459,714	1.37

- ⑤ 평균 indel의 개수는 293,063 (204,354-342,321)개이고, InDel의 경우 SNP와는 달리 homozygote의 비율이 heterozygote의 비율보다 높게 나타났다 (표 2-49).

표 2-49. Statistics of InDel prediction of 12 elite lines

Index	Statistics of InDels			
	Homo	Hetero	Total	Homo/Hetero
9906	233,913	92,851	326,764	2.52
9914	248,430	93,891	342,321	2.65
9918	230,285	91,093	321,378	2.53
9920	231,196	90,417	321,613	2.56
9930	182,908	79,246	262,154	2.31
9934	187,255	73,838	261,093	2.54
9936	152,543	60,469	213,012	2.52
9938	147,886	56,468	204,354	2.62
9940	213,155	88,183	301,338	2.42
9943	225,674	96,175	321,849	2.35
9968	230,515	93,198	323,713	2.47
9970	217,602	99,564	317,166	2.19
Sums	2,501,362	1,015,393	3,516,755	29.66
min	147,886	56,468	204,354	2.19
max	248,430	99,564	342,321	2.65
average	208,447	84,616	293,063	2.47

⑥ 위에서 발굴한 SNP 의 genomic distribution을 조사 한 결과 약 70%의 SNP가 intergenic 영역에서 발굴되었고, 11%가 upstream 1Kb, 10% 정도가 exon, 9%가 intron, 1% 미만의 SNP가 각각 splicing junction (donor, accpetor) 영역에 분포하고 있었다 (그림 2-92). 각 계통별 genomic coordinate는 표 2-50와 같다.

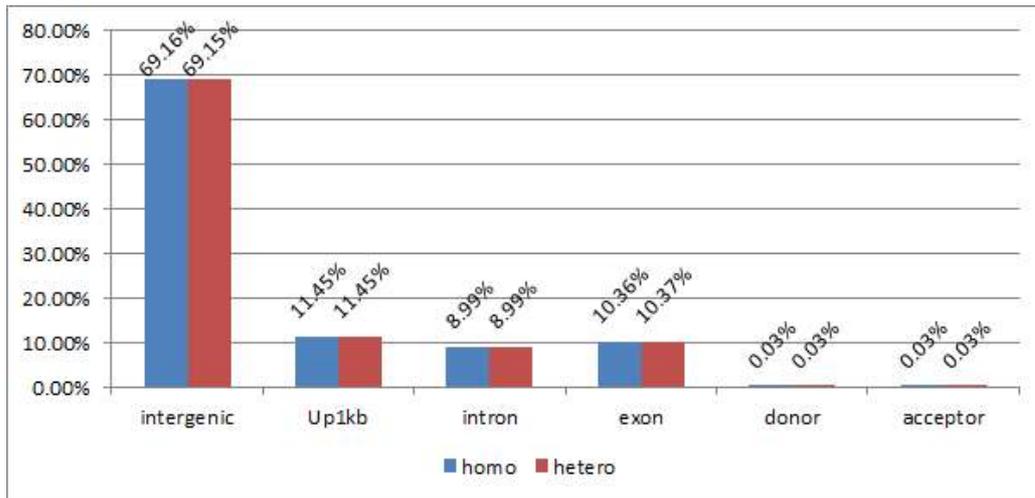


그림 2-92. SNP의 genomic coordinates

표 2-50. elite line SNP의 genomic coordinate

Sample	SNP											
	Homo						Hetero					
	intergenic	Up1kb	intron	exon	donor	acceptor	intergenic	Up1kb	intron	exon	donor	acceptor
9906	1,042,801	172,320	135,640	154,621	399	378	1,674,833	119,865	94,359	364,939	667	478
9914	1,164,172	181,704	139,364	160,313	431	409	1,705,358	119,969	95,081	363,764	664	502
9918	1,022,460	169,656	132,580	150,955	411	387	1,631,936	115,998	92,106	345,360	603	470
9920	1,074,058	169,840	134,472	153,189	421	407	1,610,666	112,839	90,554	338,101	603	454
9930	907,461	147,004	115,445	134,305	360	337	1,397,223	102,489	85,469	322,841	596	439
9934	910,197	153,853	122,399	142,836	382	353	1,308,313	98,407	82,089	315,424	576	415
9936	794,323	137,236	109,427	130,044	338	316	1,178,292	90,867	78,535	301,010	549	404
9938	777,683	136,063	110,792	131,065	344	313	1,138,376	85,610	74,014	291,225	526	385
9940	970,603	163,976	126,564	145,425	401	349	1,561,105	112,668	91,644	353,089	657	480
9943	1,015,456	166,278	128,950	147,281	396	366	1,632,513	118,884	95,637	370,007	644	485
9968	1,006,700	167,584	131,858	149,650	409	370	1,682,709	117,995	94,088	355,620	640	458
9970	941,078	158,748	123,866	141,643	386	339	1,695,286	127,099	101,544	369,714	661	484
average	968,916	160,355	125,946	145,111	390	360	1,518,051	110,224	89,593	340,925	616	455

⑦ 위에서 발굴한 InDel의 genomic distribution을 조사 한 결과 약 61%의 SNP가 intergenic 영역에서 발굴되었고, 18%가 upstream 1Kb, 2.5% 정도가 exon, 16%가 intron, 1% 미만의 SNP가 각각 splicing junction (donor, accpetor) 영역에 분포하고 있었다 (그림 2-93). 10% 정도의 SNP가 exon영역에 분포하는데 비해 exon영역의 Indel의 분포는 현저히 떨어짐을 알 수 있다. 각 계통별 InDel의 genomic coordinate는 표 2-51와 같다.

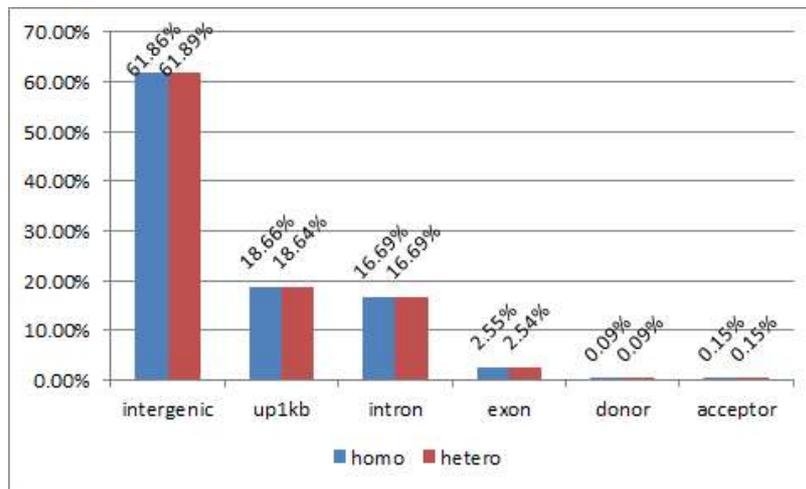


그림 2-92. SNP의 genomic distribution

⑧ 위의 SNP 및 InDel loci를 기반으로 양쪽 60bp에 variation이 없는 SNP를 기반으로 primer를 제작 한 결과 총 1027983개의 primer가 제작되었고 (표 2-52), 각 chromosome 별 primer 수는 아래와 같다 (그림 2-93).

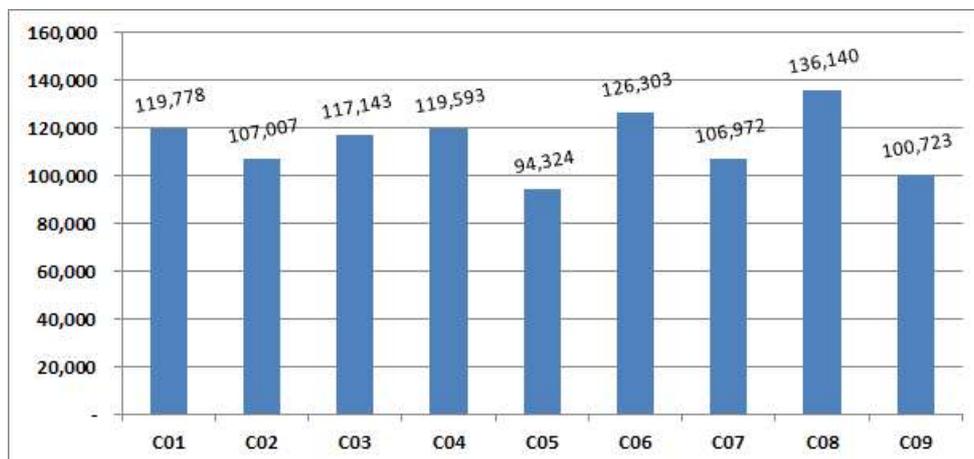


그림 2-93. number of primers for elite lines

표 2-51. elite line Indel의 genomic coordinate

Sample	InDel											
	Homo						Hetero					
	intergenic	up1kb	intron	exon	donor	acceptor	intergenic	up1kb	intron	exon	donor	acceptor
9906	143,598	44,074	38,879	6,057	192	340	71,679	8,121	8,222	4,479	86	113
9914	156,061	44,930	39,809	6,297	220	353	72,454	8,138	8,322	4,628	89	121
9918	142,697	42,705	37,849	5,781	193	322	71,020	7,750	7,915	4,049	81	115
9920	144,543	42,039	37,771	5,544	229	348	70,495	7,735	7,791	4,039	84	100
9930	113,261	33,581	30,497	4,593	154	285	60,158	7,280	7,696	3,789	84	117
9934	115,159	34,690	31,674	4,674	169	295	55,724	6,787	7,416	3,582	76	112
9936	92,036	28,841	26,902	3,913	144	252	45,381	5,561	6,261	3,021	69	82
9938	88,525	28,276	26,499	3,767	148	237	42,530	5,110	5,722	2,860	63	89
9940	130,677	40,396	35,348	5,591	187	320	67,281	7,757	8,279	4,524	94	118
9943	140,047	41,552	37,023	5,873	202	326	73,388	8,576	8,897	4,939	95	129
9968	142,491	43,087	37,839	5,851	204	306	72,132	8,021	8,238	4,453	89	109
9970	133,532	41,160	36,079	5,617	196	338	74,864	9,718	9,867	4,664	100	143
homo	128,552	38,778	34,681	5,297	187	310	64,759	7,546	7,886	4,086	84	112

표 2-52. example of primers for elite lines

chr	loci	Ref	Alt	FWD	REV	FWD_TM	REV_TM	PCR_len
C01	1098	A	[T]	ACATGGGCATCGTTCTCTTT	TTCTCCGTTTCTCTAGAATAACGA	57.5031	57.25167	109
C01	1104	C	[T]	ACATGGGCATCGTTCTCTTT	TTCTCCGTTTCTCTAGAATAACGA	57.5031	57.25167	109
C01	1759	A	[C]	AGTAGAACTTCATATGCTCCCTAAA	GGTCTGGAACCTTTGTTGTCTC	57.32332	59.12097	92
C01	1774	C	[A]	TCATATGCTCCCTAAATCAATGGA	TGATGATGGTTAGAGAGGTCTGG	57.54724	59.03663	99
C01	1776	C	[T]	TCATATGCTCCCTAAATCAATGGA	TGATGATGGTTAGAGAGGTCTGG	57.54724	59.03663	99
C01	1790	C	[T]	TCATATGCTCCCTAAATCAATGGA	TGATGATGGTTAGAGAGGTCTGG	57.54724	59.03663	99
C01	1791	A	[G]	TGCTCCCTAAATCAATGGATAAAAC	TGATGGTTAGAGAGGTCTGGA	57.65325	57.24205	91
C01	1804	G	[A]	AAACCCCCCAACAAAATCGC	TGCATATTTGTATCGTGAACTAACA	59.60506	57.16437	100
C01	1808	C	[T]	AAACCCCCCAACAAAATCGC	TGCATATTTGTATCGTGAACTAACA	59.60506	57.16437	100
C01	2084	A	[T]	CGGTACATGTGCATCGTTCT	TCCGTTTTTTCTAGAATAGCGATTT	58.35957	57.39459	110
C01	2092	C	[T]	GGTACATGTGCATCGTTCTATTT	TCCGTTTTTTCTAGAATAGCGATTT	57.26515	57.39459	109
C01	8607	T	[C]	TCAGTGTACTTTTGCAAAACAGA	TCAATCCACAGCCTCCTCAA	57.11131	58.6388	96

3. 품종개발 관련 유용형질의 실험적 진단 기법 구축

가. 시들음병 뿌리혹병 저항성, 감수성 진단법 구축

① 시들음병 병리 검정을 통한 품종 라인 선별 및 실험실 처리 조건 확립

- ㉠ 아시아 종묘사로부터 시들음병에 강한 5품종과 시들음병에 약한 5품종(표 3-1)을 분양 받아서 병리 검정을 수행하였다. 시들음병에 대한 병원균은 *Fusarium oxysporium* f. sp. *conglutinans*을 사용하여 양배추에 접종하였다. 파종 후 14일 동안 재배하여 양배추 뿌리를 씻고 1×10^7 conidia/ml의 농도로 30분 동안 침지 후 이식하여 25℃에서 3주 동안 배양 한 후 결과를 관찰하였다. 병원균 처리에 대한 control로 병리 검정으로 확실하게 저항성 판정을 받은 YR호남과 감수성 품종인 레드마트를 사용하여 실험 처리의 공정성을 두었다.

표 3-1. 아시아 종묘로부터 분양 받은 시들음병 관련 계통

품종명	종묘사	특성
대박나	아시아	시들음병 강한 F1, 편형
CT-45	“	시들음병 강한 F1, 구형
그랜드마트	“	시들음병 강한 F1, 편형
KR	518	시들음병 강한 계통, 편형
OK	517	시들음병 강한 계통, 편형
HY	164	시들음병 약한 계통, 편형
JK	JK-2	시들음병 약한 계통, 구형
CT-12	아시아	시들음병 약한 F1, 편구형
CT-16	“	시들음병 약한 F1, 편형
CT-18	“	시들음병 약한 F1, 편구형

- ㉡ 시들음병 접종 후 3주째의 양배추(그림 3-1)는 지상부가 황변, 갈변되거나 시들어 죽거나, 정상적인 성장을 보이는 phenotype이 관찰되었다. 시들음병에 대한 병리 검정기준은 1-5범위로 병리 검정 index를 확립하였다. 1=지하부는 갈변되거나 지상부는 시들지 않고 병징이 없는 것, 2=지하부는 갈변되고 지상부는 시드는 것, 3=지하부는 갈변되고 지상부는 시들며 황화하는 것, 4=지하부는 갈변되고 지상부는 심하게 황변하여 시들고 낙엽된 것, 5= 고사 등 5단계로 하였으며, 평균발병도가 1.0 이하인 경우에는 저항성, 1.0~2.5는 중도저항성, 2.5 초과는 감수성으로 판정하였다. 병리 검정 index를 바탕으로 발병도를 수치화(그림 3-2) 하였고 시들음병에 대한 병리 검정결과를 나타내었고 <표 3-2>에 품종간의 발병도와 저항성 판정을 하였다.



그림 3-1. 시들음병 접종 3주 후 양배추

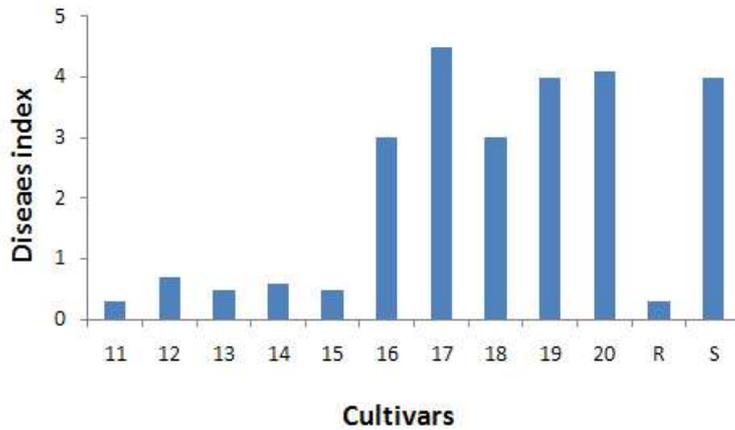


그림 3-2. 양배추 품종에 대한 시들음병 병리검정 결과.

표 3-2. 양배추 품종의 시들음병에 대한 저항성판정

NO.	품종명	발병도	저항성판정
11	대박나	0.3	R
12	CT-45	0.7	R
13	그랜드마트	0.5	R
14	KR	0.6	R
15	OK	0.5	R
16	HY	3.0	S
17	JK	4.5	S
18	CT-12	3.0	S
19	CT-16	4.0	S
20	CT-18	4.1	S
R	YR호남	0.3	R
S	레드마트	4.0	S

② 뿌리혹병 병리 검정을 통한 품종 라인 선별 및 실험실 처리 조건 확립

㉓ 아시아 종묘사로부터 뿌리혹병에 강한 5품종과 뿌리혹병에 약한 3품종(표 3-3)을 분양 받아서 병리 검정을 수행하였다. 뿌리혹병에 대한 병원균은 강원지역에서 뿌리혹 발병 양배추의 뿌리를 채취하여 냉동 보관한 것을 파쇄하여 양배추에 접종하였다. 양배추를 파종 10일된 유묘에 뿌리혹병균을 4.0×10^8 spores/pot가 되도록 접종하였으며, 20℃에서 5주간 배양한 후 발병도를 조사하였다. 병원균 처리에 대한 control로 병리 검정으로 오조라 감수성 품종과 중도 저항성을 가진 대박나를 사용하여 실험 처리의 공정성을 두었다.

표 3-3. 아시아 종묘로부터 분양 받은 뿌리혹병 품종 라인

품종명	종묘사	특성
신람	사카타	뿌리혹병에 강한 F1, 편형
YCR 이념	일본 농림사	뿌리혹병에 강한 F1, 편형
YCR 다혜	“	뿌리혹병에 강한 F1, 편형
선감 336	신젠타	뿌리혹병에 강한 F1, 구형
CT-12	아시아	뿌리혹병에 약한 F1, 편구형
CT-18	“	뿌리혹병에 약한 F1, 편구형
8398	중국 농과원	뿌리혹병에 약한 F1, 구형
과일	일본 농림사	뿌리혹병에 강한 F1, 편구형

㉔ 뿌리혹병에 대한 병리 검정 조사 기준은 뿌리혹의 정도로 0-4범위(그림 3-3)로 병리 검정 index를 확립하였다. 뿌리혹 기준은 0=뿌리혹병 발생이 없음, 1=측근에 뿌리혹이 착생되어 비대정도가 적고 서로 독립하여 존재, 2=측근에 뿌리혹이 착생되며 비대정도가 비교적 큼, 3=주근에 뿌리혹이 착생되며 서로 접합되고 비대정도가 큼, 4=주근에 뿌리혹이 착생되며 서로 접합되고 비대정도가 매우 큰 정도를 기준으로 삼았다. 뿌리혹병 병리검정 결과(표 3-4)는 뿌리혹병 발병 5주째에 수행하여(그림 3-4) 21 품종은 중도 저항성, 22, 23, 24, 28 품종은 저항성 그리고 25, 26, 27 품종은 감수성으로 판정되었다.



그림 3-3. 뿌리혹병 뿌리검정

표 3-4. 양배추 뿌리혹병 병리검정 결과

NO	Disease index*	저항성 판정
CR 21	1.3	MR
CR 22	0.2	R
CR 23	0.5	R
CR 24	0.4	R
CR 25	2.4	S
CR 26	3.8	S
CR 27	2.1	S
CR 28	1.0	R
<hr/>		
대조구	4.0	S
	2.3	S

*저항성 : $0 \leq DI \leq 1.0$, 중도저항성 : $1 < DI \leq 2$, 감수성 : $2 < DI$

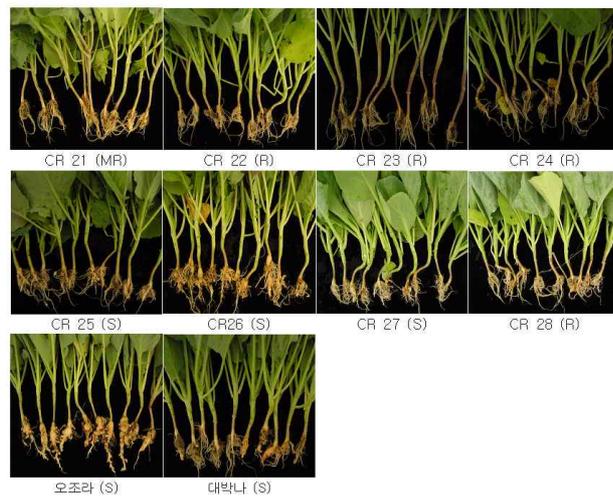


그림 3-4. 양배추 뿌리혹병 발병 5주

③ 분자생물학적 분석을 통한 양배추 시들음병, 뿌리혹병 저항성 반응의 정량화

- ㉓ 1차년도에는 시들음병과 뿌리혹병 계통의 병리검증을 통해 저항성과 감수성 품종을 확인하였다. 2차년도에는 저항성 품종간의 병 저항성 정도를 비교하기 위해 분자생물학적 분석을 통해서 뿌리혹병, 시들음병 저항성 반응의 정량화를 시들음병과 뿌리혹병 특이적인 genomic DNA oligomer를 합성하여, 양배추에 감염된 fungi의 biomass를 측정하였다 (그림 3-5).
- ㉔ 시들음병 biomass를 측정하기 위하여 시들음병 처리 7일째 양배추 shoots 시료에서 genomic DNA를 분리하여 *F. oxysporum* Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GPD) 그리고 양배추 iASK 특이적인 oligomer를 이용하여 Q-PCR을 수행하였다.
- ㉕ 뿌리혹병 biomass를 측정하기 위하여 *Plasmodiphora brassicae* GPD 유전자 프라이머를 사용하여 *P. brassicae* 처리한 뿌리조직에서 genomic DNA를 분리하여 Q-PCR을 수행하였다. 병리 검증을 확인하는 28일째에는 뿌리혹병 감수성 품종에서는 *P. brassicae* 발현이 현저하게 높았고 감염후 5일과 15일에도 낮은 *P. brassicae* biomass 이지만 뿌리혹병 저항성과 감수성의 구분을 확실하게 관찰 할 수 있었다 (그림 3-6).

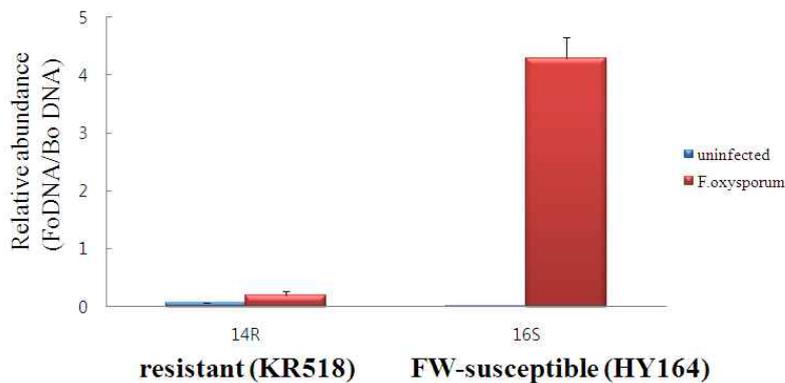


그림 3-5. 시들음병 감수성 저항성 계통 식물체내의 *F. oxysporum* 정량

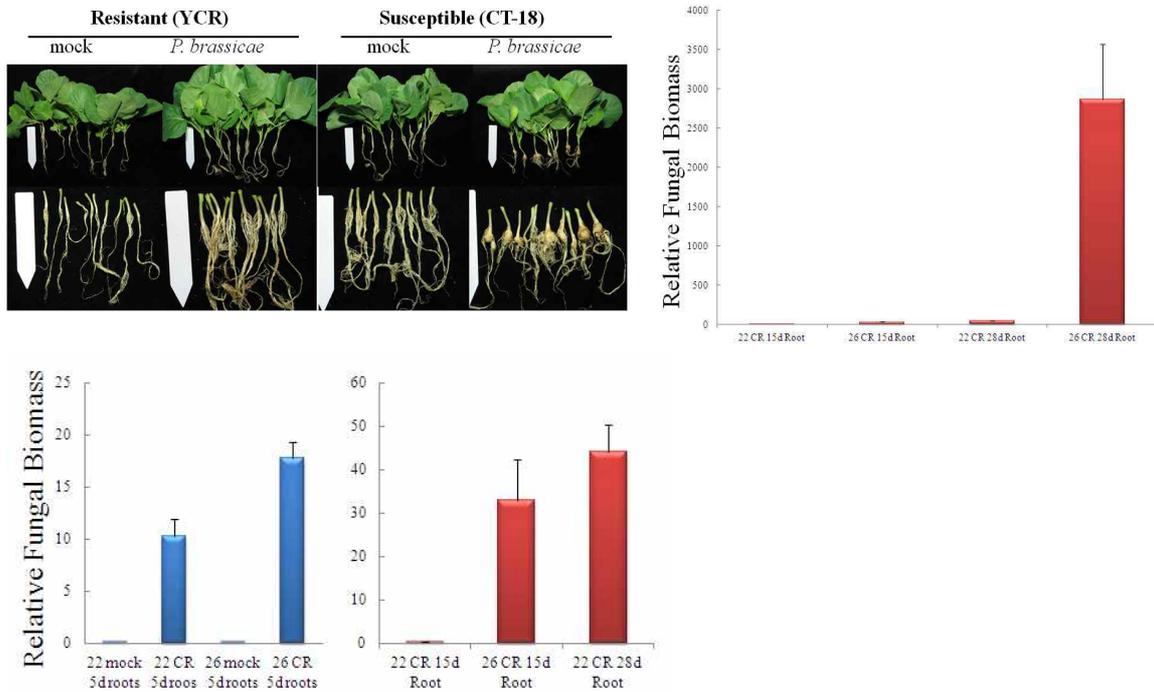


그림 3-6 *P. brassicae* 처리 28일후 뿌리혹병 감수성 저항성 양배추의 phenotype 및 식물체내 *P. brassicae* biomass 정량

㉔ 세포생물학적 분석을 통한 양배추 시들음병 저항성 계통의 저항성 반응 구별

ㄱ. Confocal 현미경으로 *F. oxysporum*이 처리된 양배추 뿌리와 hypocotyl 에서 WGA-Alexa Fluor 488로 염색을 하여 양배추에 감염된 *F. oxysporum* 형광을 관찰하였다. WGA-Alexa Fluor 488은 곰팡이 특이 세포벽에 결합하여 형광을 나타내는 물질로 알려져 있다. *F. oxysporum*이 처리된 감수성 품종 HY164의 유관속 조직에서는 *F. oxysporum*이 침투하여 감염되어 있음을 확인한 반면에(화살표의 green fluorescence) 저항성 KR518 품종에서는 *F. oxysporum* 형광을 관찰할 수 없는 것으로 저항성 품종의 유관속 조직으로 침투하지 못한 것을 관찰하였다(그림 3-7).

ㄴ. 또한 저항성 계통인 #14와 #15의 저항성 기작에 있어서 #14는 약간의 균사 성장이 있지만 #15는 처음 감염된 세포에서 병원균에 대한 저항성 반응이 나타나 더 강력한 저항성 반응을 하고 있는 것으로 보인다.

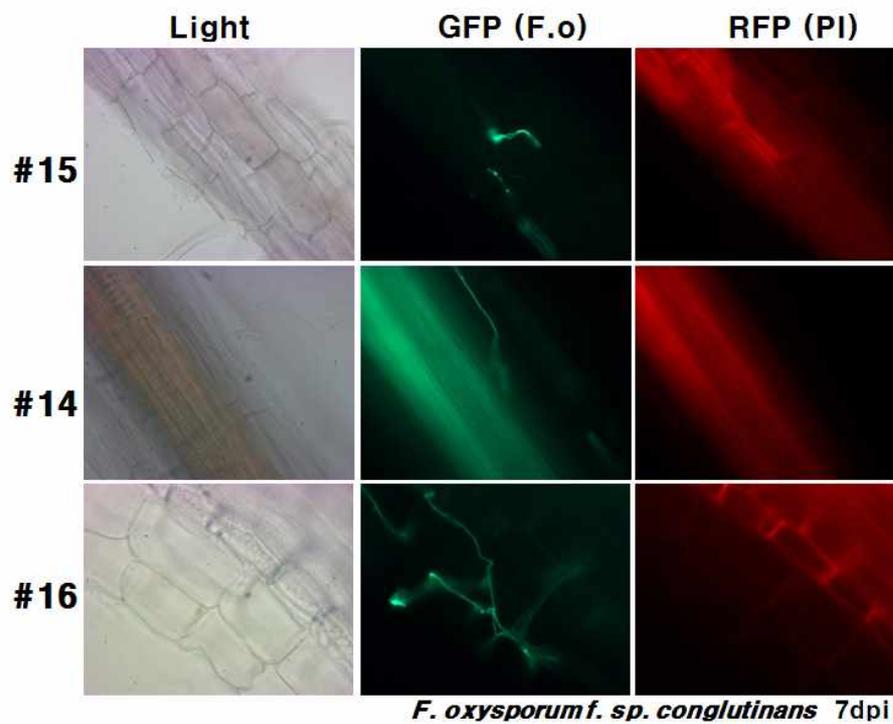


그림 3-7 *F. oxysporum* 처리 후 시들음병 감수성 저항성 양배추의 식물체 내 감염 확인

나. 내서성, 석회 결핍증감형 조기 진단법 구축

① 양배추 고온 스트레스 처리조건

- ㉠ 내서성에 대한 중간 정도의 형질을 갖는 계통을 기준으로 종자 발아 후 유 식물체 발달 단계에 따른 고온 스트레스 처리 조건을 탐색하였다
- ㉡ 고온 조건은 37°C, 40°C, 42°C, 45°C 등 여러 조건에서 표현형을 관찰하였다
- ㉢ 고온 처리 기간은 육종 현장에서의 고온스트레스 조건을 최대한 고려하여 특정 고온 조건에서 하루 2시간씩 일정 기간 처리하여 표현형을 관찰하였다.

② 양배추 계통간 내서성 형질 확인

- ㉠ 아시아종묘로부터 10개 종류의 종자를 분양받아 실험실 조건에서 약 6주간 배양하였다.
- ㉡ 각 종자의 재배현장 내서성 형질 및 생리적·유전적 특징은 표 3-5와 같다.

표 3-5. 아시아종묘 내서성 형질 분양종자

종자번호	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
내서성 (아시아종묘)	강	강	강	강	강	약강	약	약	약	약
결구형태	편형	편형	편형	편형	편형	편구형	구형	구형	구형	구형
유전적상태	F ₁	F ₁	F ₁	계통	계통	계통	F ₁	F ₁	계통	계통
내서성(KRIBB)	강	강	강	강	강	약	약	약	약	약

㉔ 양배추 고온스트레스 처리 조건 확립

- ㄱ. 최대한 자연상태의 처리조건을 고려하여 42°C에서 하루 2시간씩 일주일간 2주된 유식물체를 대상으로 고온스트레스를 처리하고 계통간 표현형의 차이를 분석함 (그림 3-8).
- ㄴ. 분석 결과 아시아종묘(주)에서 제시한 내서성 특징이 대부분 일치하였으나 (표 3-5), <종자 6>의 경우 실험실 조건에서는 내서성에 매우 약한 형질로 나타남.
- ㄷ. 향후 각 계통/품종에 대한 분자생물학적 분석을 위한 실험실에서 고온스트레스 처리조건을 확립함.



그림 3-8. 고온스트레스 처리에 의한 내서성 계통 간 표현형

③ 석회결핍 둔감형 계통의 특성분석 방법 확립

- ㉓ 석회결핍에 의해 발생하는 tip-burn 현상을 실험실에서 처리하기 위한 조건을 확립하기 위해 해당 자원을 보유하고 있는 제3핵심 제2세부과제 연구팀(삼성종묘)로부터 종자를 확보하여 실험재료로 활용하였음. 칼슘이온의 농도를 조절함으로써 석회결핍 현상을 기내 또는 온실에서 확인할 수 있었음.
- ㉔ 석회결핍과 관련하여 보고된 논문 등을 참고하여 연구계획을 수립하고 진행하였음.
- ㉕ 제3핵심 제2세부과제로부터 분양 받은 석회결핍 둔감형 계통을 대상으로 실험실내에서 석회결핍에 따른 표현형의 변화를 관찰하였다.
- ㉖ 분양받은 계통(표준형 및 석회결핍둔감형)의 생장은 정상조건에서도 차이를 나타내었는데, 식물체 크기는 둔감형이 표준형보다 작은 특성이 있었으며 잎 표면의 밀납 (wax)의 경우 둔감형에서 많이 발현되는 특성이 있어, 성장단계가 두 계통에서 큰 차이를 보여 석회결핍에 의한 증상을 구분하기 어려웠다 (그림 3-9).



그림 3-9. 석회결핍 둔감형 계통과 표준형 양배추의 생육

- ㉓ 석회결핍 증상을 계통별로 확인하며 $[Ca^{2+}]$ 의 농도를 조절하여 식물체를 배양하기 위해 Hoagland's solution을 이용하였는데, 4주 동안 정상 토양에서 성장시킨 식물체를 $Ca(NO_3)_2$ 의 형태로 $[Ca^{2+}]$ 의 농도를 0 mM 혹은 5 mM로 조절한 Hoagland's solution을 포함하는 Perlite에서 성장시키며 생장을 관찰하였다 (그림 3-10). 표준형 양배추의 경우 석회결핍에 의한 장애가 둔감형 보다 일찍 관찰되었으며 식물의 크기에도 차이가 관찰되었다.

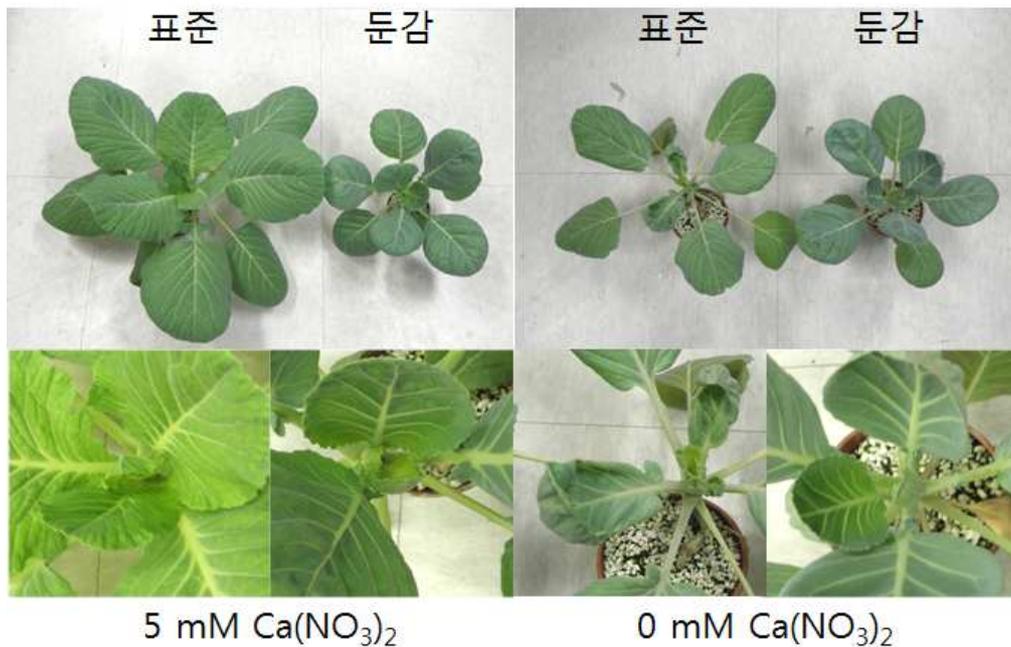


그림 3-10. 칼슘 결핍 조건에서 표준형 및 둔감형 양배추 계통의 생장

- ㉔ 기내 배양 조건에서 표준형 및 둔감형의 성장차이를 비교하기 위해 다양한 농도의 $[Ca^{2+}]$ 조건에서 식물체의 생장을 비교하였다. 0 mM $[Ca^{2+}]$ 조건에서 표준형 및 둔감형의 생육은 크게 저해되어 제1엽의 발달이 진행되지 않았으며, 0.15 mM $[Ca^{2+}]$ 조건에서는 표준형의 경우 제1엽의 발달이 둔감형에 비해 tip-burn현상이 시작되는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만, 기내 배양조건에서 표준형 및 둔감형의 $[Ca^{2+}]$ 농도에 따른 생육차이는 크게 관찰되지 않았다. (그림 3-11).

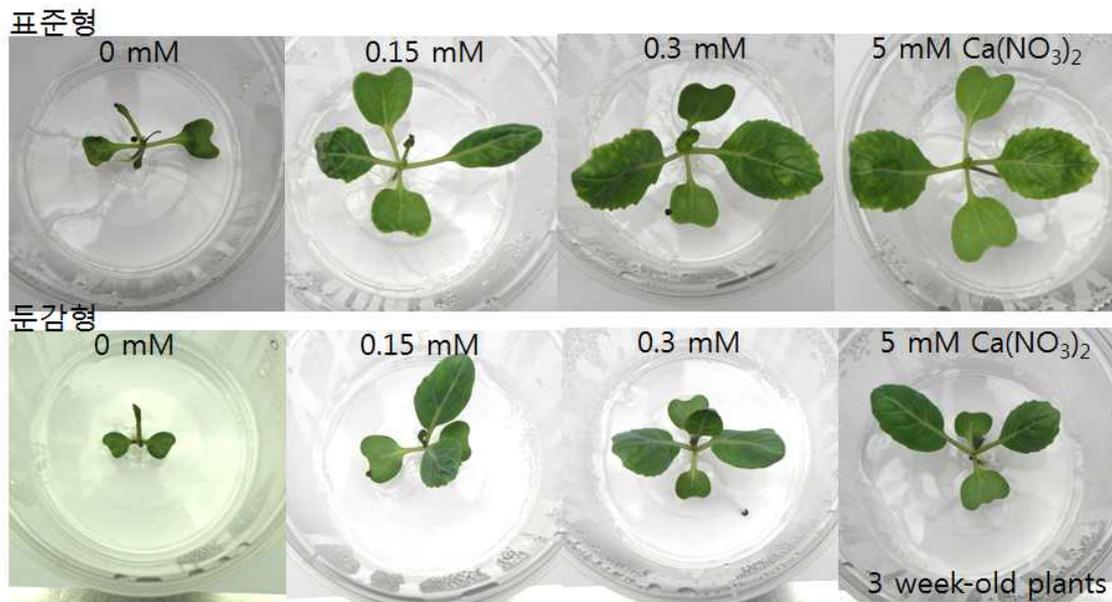


그림 3-11. 기내배양 조건에서 $[Ca^{2+}]$ 농도에 따른 표준형 및 둔감형의 생육 비교

다. 개발된 분자표지 검정 시스템 구축

- ① PCR 기법을 통한 내서성 형질 계통 간 내서성 구분 유전자마커 가능성 분석
 - ㉠ 내서성 형질 구분을 위한 BoHSP70 유전자 마커용 primer 제작

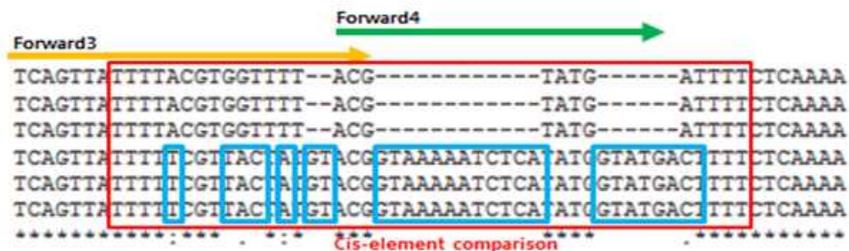


그림 3-12. 내서성 강/약 계통 간 형질 구분 gDNA 유전자 마커의 프라이머 제작 염기서열. Forward 3; 내서성 강 구분 특이적 프라이머, Forward 4; 내서성 약 구분 특이적 프라이머

- ㉠ 내서성 형질 구분 유전자 마커 PCR 분석 (그림 3-13)
 - ㄱ. 내서성 강/약 구분 primer를 이용한 PCR 분석 결과, 내서성 강 특이적 Forward 3 primer 사용 결과 예상대로 내서성 강 계통에서만 PCR band가 확인되었고, 내서성 약 특이적 Forward 4 primer 사용 결과에서는 내서성 약 계통에서만 PCR band가 확인 되었다.
 - ㄴ. Reference 계통과 함께 그룹 III로 분류된 내서성 강 KK와 내서성 약 402의 경우 두 가지 primer에서 모두 PCR band가 확인 되었다.

- ㉔. 본 연구 결과로부터, BoHSP70 프로모터 유전자 염기서열에 의한 내서성 강/약 형질 구분이 DNA 수준에서도 가능 할 수 있는 가능성을 발견 할 수 있었다.

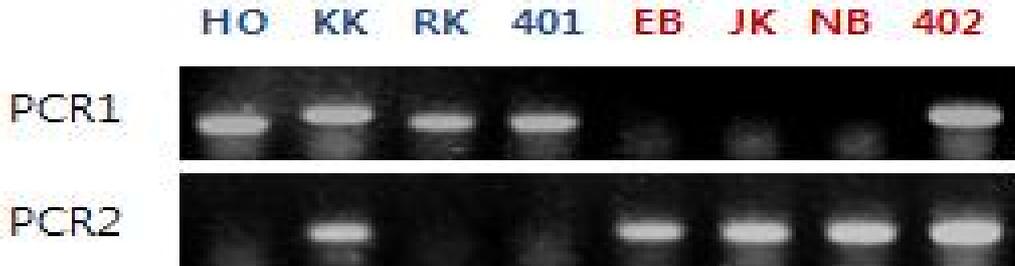


그림 3-13. 내서성 강/약 구분 BoHSP70 유전자마커 PCR 분석 결과. 내서성 강 계통, HO, KK, RK, 401; 내서성 약 계통, EB, JK, NB, 402. PCR1, Forward 3 and Reverse primer set; PCR2, Forward 4 and Reverse primer set.

- ㉕ Blind test에 의한 내서성 유전자마커 후보 BoHSP70 활용성 검증
 - ㄱ. 육종현장에서 개발 중인 내서성 형질 계통간 후보 유전자 마커 검증을 위해 아시아종묘에서 개발 중인 다양한 계통의 잎 샘플을 대상으로 위의 BoHSP70의 내서성 강/약 프라이머를 이용한 PCR 검증을 실시하였다.
 - ㄴ. 분석 결과 5 개의 내서성 강 계통 중 4개에서는 내서성 강 특이적 프라이머 Forward 3에 반응 하였으나 내서성 약의 경우, 3059는 앞의 group III 에 해당하였으며 나머지 두 계통 중 3828만이 내서성 약 프라이머 특이성을 보여 주었다.
 - ㄷ. Blind test를 통해 각 계통에 대한 실험실내 내서성 형질을 확인할 것이며, 고온스트레스에 대한 BoHSP70 유전자발현이 검증 되어야 할 것으로 사료된다.
 - ㄹ. 또한 각 계통에 대한 PCR product의 염기서열을 분석하여 후보유전자마커에 대한 활용성을 검증할 계획이다.



그림 3-14. 아시아종묘 개발 계통에서의 내서성 형질구분 후보 유전자마커 BoHSP70 PCR 분석 결과. 내서성 강 계통, 3052, 3327, 3085, 4122, 4128; 내서성 약 계통, 3347, 3828, 3059

㉔ 분자유전학적 검증을 위한 F1 세대 분석

- ㄱ. 내서성 강 HO 와 내서성 약 EB의 부모계로부터 생산된 F1, 8913 을 대상으로 후보마커 유전자의 분자 유전학적 특성을 분석 하였다.
- ㄴ. BoHSP70 유전자 마커를 이용한 PCR 분석 결과, 내서성 강, 약 계통의 HO 와 EB 는 형질 간 구분되는 PCR band를 나타내었고, 두 계통의 교잡 F1 세대 유식물체에서는 BoHSP70 유전자에 대한 게놈 DNA가 부모 양친의 형질을 모두 포함하고 있음을 PCR band로 확인 하였다.
- ㄷ. 즉 F1 세대에서는 내서성 강/약 형질에 대한 염색체가 각각 유전되어 두 가지 경우의 primer에 모두 반응하였다.
- ㄹ. 추후, F2 세대를 생산하여 분자유전학적 내서성 형질을 확인할 예정이다.

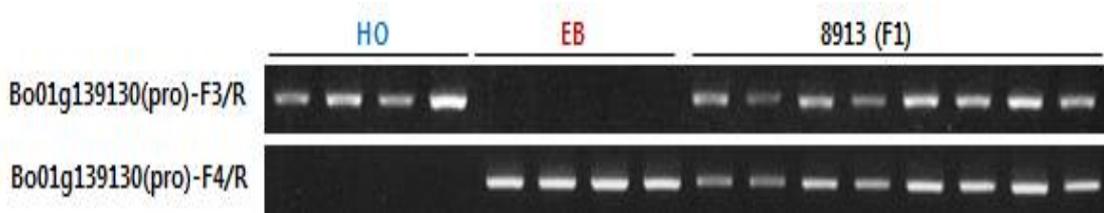


그림 3-15. 내서성 강/약 계통의 F1 세대를 통한 후보유전자마커 BoHSP70 유전자의 유전학적 특성 분석 PCR 결과. HO, 내서성 강 계통; EB, 내서성 약 계통; 8913, 두 계통 간 교잡에 의한 F1세대.

㉕ HO, EB, 그리고 F1 세대 BoHSP70 프로모터 영역 염기서열분석 (그림 3-16)

- ㄱ. 위의 PCR 분석 결과를 염기서열 분석으로 재확인 하고자 In-Del 부위를 포함하는 보다 넓은 프로모터 영역을 PCR 전기영동하여 T-vector로 크로닝하고 여러 transformant clone으로부터 염기서열을 분석하였다.
- ㄴ. 분석 결과 내서성 강 계통, HO와 내서성 약 계통 EB는 앞의 염기서열과 동일하게 분석되었고, 두 계통을 교잡한 F1 세대에서는 그림 61에서와 같이 부모 계통의 게놈 정보를 모두 포함하고 있음을 염기서열로 재 확인 할 수 있었다.
- ㄷ. 추후, F1 세대의 실험실 조건에서의 내서성 표현형 및 고온스트레스에 대한 BoHSP70 유전자 발현 등을 조사할 예정이다.

```

EB TACNTTTTGC-CCCCCGNTCCTTAATAGACGCTGATTGATTACAGATGGTGTCTATAACRAAT 59
8913-1 --TATTTTGCACCCCGTCCCTTAAATAGACGCTGATTGATTACAGATGGTGTCTATAACRAAT 58
HO TACNTTTTGC-CGCCCCGACCTTAA-TAGACGCTGATTGATTACAGATGGTGTCTATAACRAAT 59
8913-2 --TATTTTGCACGCCCGACCTTAAATAGACGCTGATTGATTACAGATGGTGTCTATAACRAAT 58
.....

EB TGAATAAAAACCATATTTAAGCTAAAATCAAAGACTAAATCAATCATATTACGTTCCACCA 119
8913-1 TGAATAAAAACCATATTTAAGCTAAAATCAAAGACTAAATCAATCATATTACGTTCCACCA 118
HO TGAATAAAAACCATATTTAAGCTAAAATCAAAGACTAAATCAATCATATTACGTTCCACCA 119
8913-2 TGAATAAAAACCATATTTAAGCTAAAATCAAAGACTAAATCAATCATATTACGTTCCACCA 118
.....

EB AACAAAGTCAAGACTAGAGACGCTTTGTCACTCAACGATCTTTGTTCTAACGTGATAAGT 179
8913-1 AACAAAGTCAAGACTAGAGACGCTTTGTCACTCAACGATCTTTGTTCTAACGTGATAAGT 178
HO AACAAAGTCAAGACTAGAGACGCTTTGTCACTCAACGATCTTTGTTCTAACGTGATAAGT 179
8913-2 AACAAAGTCAAGACTAGAGACGCTTTGTCACTCAACGATCTTTGTTCTAACGTGATAAGT 178
.....

EB TCCGATCTCCTAACGAATGAAATATGTTTCATGATTTCATATGTCATAAACTCAAACGTT 239
8913-1 TCCGATCTCCTAACGAATGAAATATGTTTCATGATTTCATATGTCATAAACTCAAACGTT 238
HO TCCGATCTCCTAACGAATGAAATATGTTTCATGATTTCATATGTCATAAACTCAAACGTT 239
8913-2 TCCGATCTCCTAACGAATGAAATATGTTTCATGATTTCATATGTCATAAACTCAAACGTT 238
.....

EB TACATTCATAATTTTATTGCCAATTATATTGACGACCAATTTTCTTTAACCOCTCAGTTA 299
8913-1 TACATTCATAATTTTATTGCCAATTATATTGACGACCAATTTTCTTTAACCOCTCAGTTA 298
HO TACATTCATAATTTTATTGCCAATTATATTGACGACCAATTTTCTTTAACCOCTCAGTTA 299
8913-2 TACATTCATAATTTTATTGCCAATTATATTGACGACCAATTTTCTTTAACCOCTCAGTTA 298
.....

EB TACATTCATAATTTTATTGCCAATTATATTGACGACCAATTTTCTTTAACCOCTCAGTTA 299
8913-1 TACATTCATAATTTTATTGCCAATTATATTGACGACCAATTTTCTTTAACCOCTCAGTTA 298
HO TACATTCATAATTTTATTGCCAATTATATTGACGACCAATTTTCTTTAACCOCTCAGTTA 299
8913-2 TACATTCATAATTTTATTGCCAATTATATTGACGACCAATTTTCTTTAACCOCTCAGTTA 298
.....

EB TTTTTCGTTACTATGTACGGTAAAAATCTCATATGGTATGACTTTTCTCAAACCGGCTGA 359
8913-1 TTTTTCGTTACTATGTACGGTAAAAATCTCATATGGTATGACTTTTCTCAAACCGGCTGA 358
HO TTTTTCGTTACTATGTACGGTAAAAATCTCATATGGTATGACTTTTCTCAAACCGGCTGA 359
8913-2 TTTTTCGTTACTATGTACGGTAAAAATCTCATATGGTATGACTTTTCTCAAACCGGCTGA 358
.....

EB GTTTTCGATATTCAAAATAGGATATCTGGAAGGAGCGGAGAAACCAATACAAATAAAAA 419
8913-1 GTTTTCGATATTCAAAATAGGATATCTGGAAGGAGCGGAGAAACCAATACAAATAAAAA 418
HO GTTTTCGATATTCAAAATAGGATATCTGGAAGGAGCGGAGAAACCAATACAAATAAAAA 419
8913-2 GTTTTCGATATTCAAAATAGGATATCTGGAAGGAGCGGAGAAACCAATACAAATAAAAA 418
.....

```

그림 3-16. HO, EB, F1 세대 8913의 후보 유전자마커 BoHSP70 프로모터 영역 염기서열 비교 분석

- ㉞ 육종 현장 F1 품종을 대상으로 확보된 유전자 마커의 blind-test
 - ㄱ. 내서성 강 형질에 대한 BoHSP70 gDNA 유전자 마커는 활용 가능성이 있는 것으로 판단됨 (그림 3-17).
 - ㄴ. 추후, F2 분리 유전집단의 형질 표현형과 마커 유전자의 유전형 비교 분석 검증이 필요함.
 - ㄷ. 내서성 강/약 형질 간 BoTic32 gDNA 유전자 마커는 활용 가능성이 없는 것으로 판단됨 (그림 3-18).

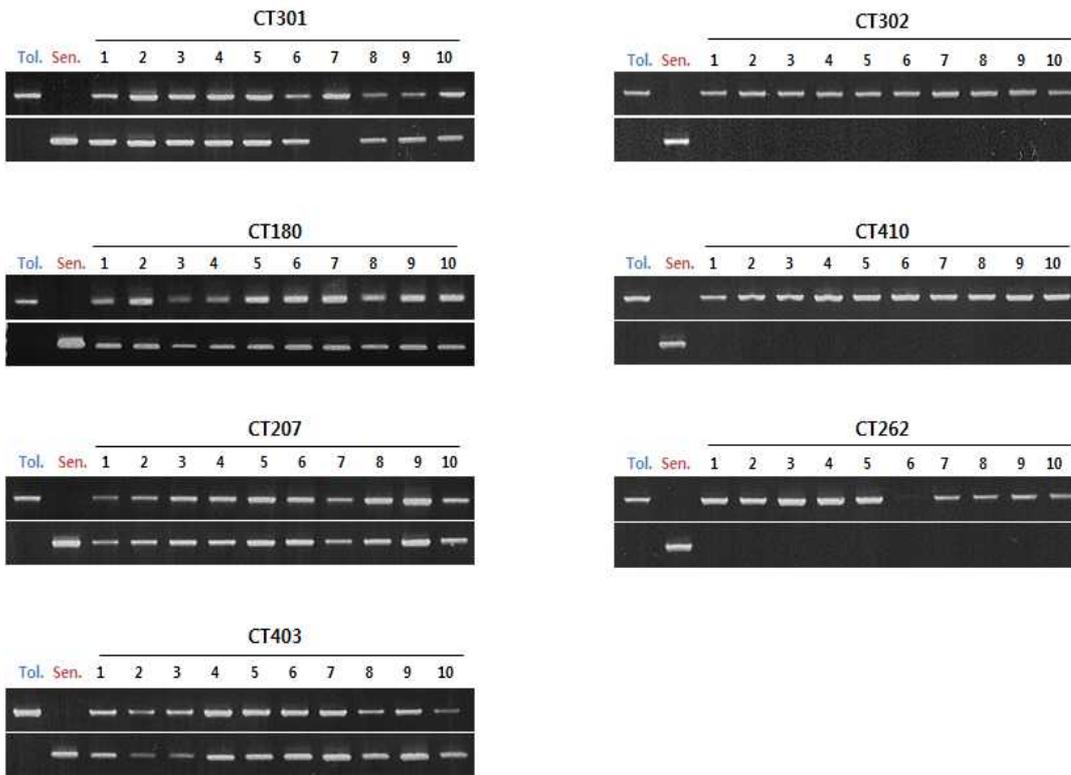


그림 3-17. BoHSP70 후보 유전자 마커를 이용한 내서성 형질 구분 PCR 분석

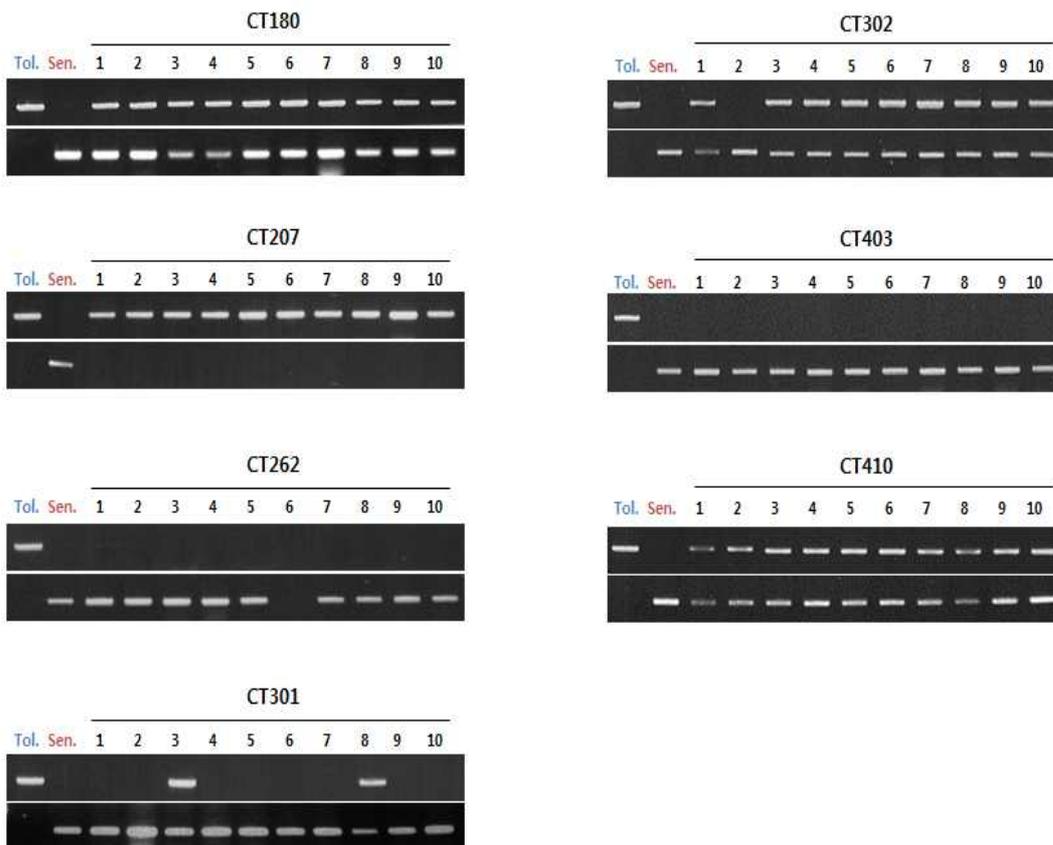


그림 3-18. BoTic32 후보 유전자 마커를 이용한 내서성 형질 구분 PCR 분석

② PCR 기법을 통한 위황병 검정 시스템 구축

㉞ 양배추 시들음병 저항성 및 이병성 판별 마커 개발

ㄱ. 양배추 시들음병에 대하여 NBS-LRR 유전자 중 하나인 *FocBo1* 유전자에서 3'UTR fragment에 deletion으로 인해 이병성이 된다는 내용이 2014년도 shimizu et al에 의해 보고 되었다. 기 보고된 MTK-C-F1(5'-GAG CTC TCT TTC TCT ACA AGT CAA GG-3') 및 MTK-C-R1(5'-GTT AGC TGA GTA ACG AGA TAG ACC ATG-3') 마커의 경우 그림 3-18와 같이 35사이클에서 약하게 나오는 밴드를 40사이클로 늘리게 되면 SG-JO-12, SG-JO-16, SG-WD-11과 같이 밴드가 더 진하게 증폭되어 저항성과 이병성을 판별하기가 어려웠다. 따라서 그 주위에 여러 set의 프라이머를 디자인하여 저항성과 이병성을 잘 구분해 낼 수 있는 프라이머를 선발하여 마커를 개발하였다. 개발된 마커로 113개의 양배추 계통에 대하여 PCR을 수행한 결과 47개의 샘플에 대해서는 저항성을 보였으며, 66개의 샘플에 대해서는 이병성을 나타내었다(그림 3-19, 표 3-6).

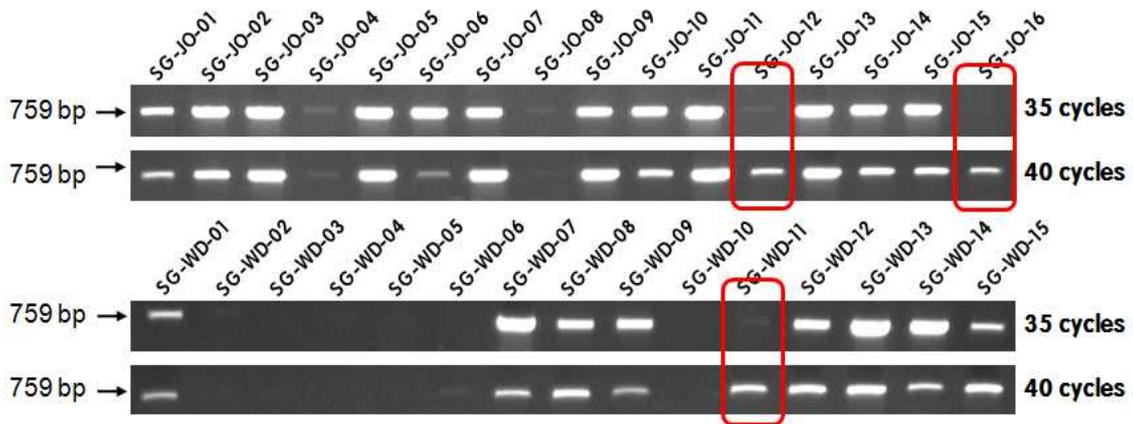


그림 3-18. MTK-C-F1 및 MTK-C-R1 primer를 이용해 양배추 위황병 저항성 판별

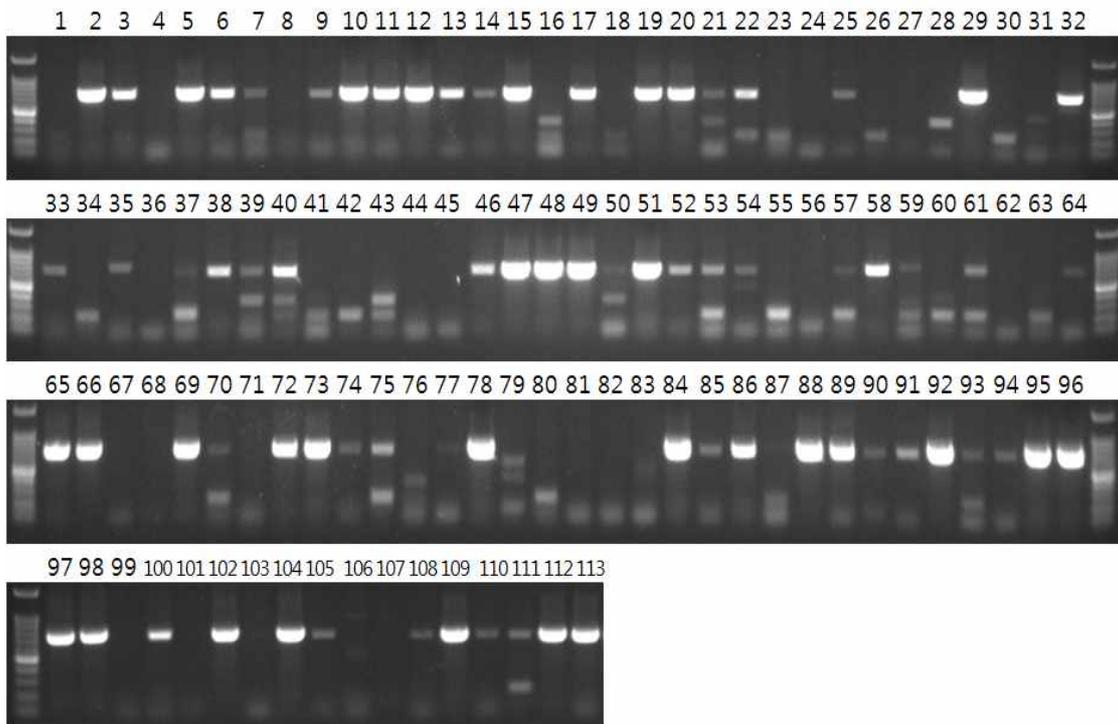


그림 3-19. 113개 양배추 line에 대한 시들음병 마커 테스트 결과

표 3-6. 시들음병 마커 테스트 결과

No.	Sample Name	Genotype	No.	Sample Name	Genotype
1	301	Susceptible	61	4139	Susceptible
2	303	Resistant	62	4262	Susceptible
3	305	Resistant	63	4265	Susceptible
4	309	Susceptible	64	4266	Susceptible
5	311	Resistant	65	4270	Resistant
6	313	Resistant	66	7271	Resistant
7	314	Resistant	67	4274	Susceptible
8	315	Susceptible	68	4278	Susceptible
9	316	Resistant	69	7281	Resistant
10	317	Resistant	70	4282	Susceptible
11	318	Resistant	71	4285	Susceptible
12	319	Resistant	72	4288	Resistant
13	320	Resistant	73	4289	Resistant
14	321	Susceptible	74	4290	Susceptible
15	322	Resistant	75	4291	Susceptible
16	4041	Susceptible	76	4292	Susceptible
17	4043	Resistant	77	4293	Susceptible
18	4044	Susceptible	78	4294	Resistant

19	4047	Resistant	79	4295	Susceptible
20	4078	Resistant	80	4296	Susceptible
21	4050	Susceptible	81	4297	Susceptible
22	4051	Resistant	82	4298	Susceptible
23	4052	Susceptible	83	4300	Susceptible
24	4053	Susceptible	84	4305	Resistant
25	4055	Susceptible	85	4308	Susceptible
26	4064	Susceptible	86	4309	Resistant
27	4065	Susceptible	87	4310	Susceptible
28	4066	Susceptible	88	4311	Resistant
29	4067	Resistant	89	4313	Resistant
30	4068	Susceptible	90	4318	Susceptible
31	4069	Susceptible	91	4321	Susceptible
32	4070	Resistant	92	4322	Resistant
33	4071	Susceptible	93	4326	Susceptible
34	4073	Susceptible	94	4406	Susceptible
35	4074	Susceptible	95	4409	Resistant
36	4075	Susceptible	96	4411	Resistant
37	4076	Susceptible	97	4414	Resistant
38	4077	Resistant	98	4437	Resistant
39	4080	Susceptible	99	4439	Susceptible
40	4083	Resistant	100	4441	Resistant
41	4085	Susceptible	101	4442	Susceptible
42	4086	Susceptible	102	4443	Resistant
43	4087	Susceptible	103	4445	Susceptible
44	4090	Susceptible	104	4446	Resistant
45	4105	Susceptible	105	4447	Susceptible
46	4106	Resistant	106	4448	Susceptible
47	4108	Resistant	107	4449	Susceptible
48	4111	Resistant	108	4462	Susceptible
49	4112	Resistant	109	4466	Resistant
50	4118	Susceptible	110	4472	Susceptible
51	4119	Resistant	111	4485	Susceptible
52	4120	Resistant	112	4490	Resistant
53	4121	Susceptible	113	4526	Resistant
54	4125	Susceptible	X		
55	4126	Susceptible			
56	4127	Susceptible			
57	4128	Susceptible			
58	4129	Resistant			
59	4131	Susceptible			
60	4137	Susceptible			

③ Fluidigm을 이용한 F₁ 순도검정 진단법 구축

㉞ 순도검정 진단법 구축을 위하여 C1_39509260, C2_13209146, C2_19915970, C3_27393593, C4_37080145, C5_38301304, C6_17934583, C6_4805012, C7_40410442, C8_31673998, C8_33927461, C9_1015371 primer set을 선별하여 fluidigm을 수행하였다. 3-4세부과제로부터 제공받은 F₁ 양배추 19계통의 순도검정을 테스트한 결과 아래 표 3-7과 같다.

표3-7. F₁ 양배추 19계통의 순도검정 결과

	C1_39 50926 0	C2_13 20914 6	C2_19 91597 0	C3_27 39359 3	C4_37 08014 5	C5_38 30130 4	C6_17 93458 3	C6_48 05012	C7_40 41044 2	C8_31 67399 8	C8_33 92746 1	C9_10 15371
1_1	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_2	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_3	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_4	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_5	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_6	C:C	A:A	T:T	C:C	T:T	G:G	C:C	A:A	G:G	T:T	T:T	G:G
1_7	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_8	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_9	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_10	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_11	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_12	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_13	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_14	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_15	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_16	C:C	A:A	T:T	C:C	T:T	G:G	C:C	A:A	G:G	T:T	T:T	G:G
1_17	C:C	A:A	T:T	C:C	T:T	G:G	C:C	A:A	G:G	T:T	T:T	G:G
1_18	C:C	A:A	T:T	C:C	T:T	G:G	C:C	A:A	G:G	T:T	T:T	G:G
1_19	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_20	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_21	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_22	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_23	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_24	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_25	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_26	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_27	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_28	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_29	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
1_30	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
2_1	C:C	A:A	T:T	C:C	T:T	G:G	C:C	A:A	G:G	T:T	T:T	G:G
2_2	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
2_3	C:C	A:A	T:T	C:C	T:T	G:G	C:C	A:A	G:G	T:T	T:T	G:G
2_4	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
2_5	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
2_6	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
2_7	C:C	A:A	T:T	C:C	T:T	G:G	C:C	A:A	G:G	T:T	T:T	G:G
2_8	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
2_9	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
2_10	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
2_11	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
2_12	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G
2_13	C:C	A:A	T:T	C:C	T:T	G:G	C:C	A:A	G:G	T:T	T:T	G:G
2_14	C:C	A:A	T:T	C:C	T:T	G:G	C:C	A:A	G:G	T:T	T:T	G:G
2_15	C:C	T:A	T:T	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:G	T:G	T:T	G:G

18_13	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:A	T:G	T:T	G:G
18_14	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:A	T:G	T:T	G:G
18_15	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:A	T:G	T:T	G:G
18_16	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:A	T:G	T:T	G:G
18_17	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:A	T:G	T:T	G:G
18_18	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:A	T:G	T:T	G:G
18_19	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:T	A:A	T:G	T:T	G:G
18_20	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:A	T:G	T:T	G:G
18_21	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:A	T:G	T:T	G:G
18_22	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:A	T:G	T:T	G:G
18_23	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:A	T:G	T:T	G:G
18_24	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:A	T:G	T:T	G:G
18_25	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:A	T:G	T:T	G:G
18_26	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:A	T:G	T:T	G:G
18_27	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:T	A:A	T:G	T:T	G:G
18_28	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:A	T:G	T:T	G:G
18_29	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:A	T:G	T:T	G:G
18_30	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	G:A	C:C	A:T	A:A	T:G	T:T	G:G
19_1	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_2	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_3	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_4	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_5	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_6	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_7	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_8	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_9	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_10	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_11	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_12	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_13	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_14	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_15	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_16	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_17	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_18	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_19	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_20	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_21	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_22	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_23	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_24	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_25	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_26	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_27	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_28	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_29	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G
19_30	C:C	T:A	T:C	C:C	T:C	A:A	C:C	A:A	G:G	T:G	G:G	G:G

④ Fluidigm을 이용한 계통고정 검정 진단법 구축

㉠ 3-4세부로부터 제공받은 7계통 (CT-207, CT-262, CT-30, CT-302, CT-180, CT-403, CT-410)의 계통고정을 위하여 fluidigm 실험을 수행하였다. 그 결과 12개 프라이머 세트를 이용하여 fluidigm 실험 결과 CT-180계통 100% 고정, CT-207계통 100% 고정, CT-262계통 81.7% 고정, CT-301계통 87.6% 고정, CT-302계통 85%, CT-403계통 91.3% 고정, CT-410계통 98.7% 고정되었다 (표 3-8).

표3-8. Fluidigm을 이용한 양배추 CT-180계통고정 검정 결과

	C7_4 0410 442	C1_3 9509 260	C4_3 7080 145	C6_4 8050 12	C9_1 0153 71	C3_2 7393 593	C6_1 7934 583	C8_3 3927 461	C2_1 9915 970	C5_3 8301 304	C8_3 1673 998	C2_1 3209 146
CT180_1	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_2	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_3	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_4	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_5	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_6	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_7	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_8	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_9	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_10	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_11	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_12	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_13	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_14	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_15	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_16	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_17	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_18	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_19	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_20	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_21	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_22	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_23	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_24	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_25	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_26	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_27	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_28	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_29	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_30	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_31	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_32	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A

67												
CT180_68	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_69	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_70	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_71	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_72	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_73	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_74	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_75	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_76	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_77	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_78	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_79	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A
CT180_80	A:A	C:C	T:T	T:T	T:T	G:C	T:C	T:T	C:C	G:A	T:G	A:A

표 3-9. Fluidigm을 이용한 양배추 CT-207계통고정 검정 결과

	C7_4 0410 442	C1_3 9509 260	C4_3 7080 145	C6_4 8050 12	C9_1 0153 71	C3_2 7393 593	C6_1 7934 583	C8_3 3927 461	C2_1 9915 970	C5_3 8301 304	C8_3 1673 998	C2_1 3209 146
CT207_1	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_2	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_3	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_4	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_5	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_6	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_7	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_8	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_9	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_10	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_11	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_12	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_13	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_14	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_15	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_16	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_17	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A

52												
CT207_53	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_54	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_55	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_56	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_57	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_58	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_59	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_60	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_61	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_62	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_63	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_64	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_65	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_66	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_67	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_68	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_69	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_70	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_71	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_72	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_73	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_74	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_75	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_76	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_77	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_78	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_79	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_80	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_81	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A
CT207_82	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:C	G:G	T:T	G:A	T:T	A:A

표 3-10. Fluidigm을 이용한 양배추 CT-262계통고정 검정 결과

C7_4 0410 442	C1_3 9509 260	C4_3 7080 145	C6_4 8050 12	C9_1 0153 71	C3_2 7393 593	C6_1 7934 583	C8_3 3927 461	C2_1 9915 970	C5_3 8301 304	C8_3 1673 998	C2_1 3209 146
---------------------	---------------------	---------------------	--------------------	--------------------	---------------------	---------------------	---------------------	---------------------	---------------------	---------------------	---------------------

CT262_1	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:A	G:G	A:A
CT262_2	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_3	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_4	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_5	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_6	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:A	G:G	A:A
CT262_7	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_8	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_9	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_10	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:A	G:G	A:A
CT262_11	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_12	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_13	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_14	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_15	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_16	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_17	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_18	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_19	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_20	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_21	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:A	G:G	A:A
CT262_22	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:A	G:G	A:A
CT262_23	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_24	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:A	G:G	A:A
CT262_25	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_26	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_27	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_28	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_29	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_30	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:A	G:G	A:A
CT262_31	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_32	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_33	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_34	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:A	G:G	A:A

35												
CT262_36	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_37	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_38	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_39	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_40	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:A	G:G	A:A
CT262_41	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_42	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_43	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_44	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_45	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_46	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_47	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_48	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_49	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_50	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_51	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_52	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_53	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_54	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_55	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_56	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_57	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:A	G:G	A:A
CT262_58	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_59	A:A	C:C	T:T	A:A	G:G	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_60	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_61	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_62	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_63	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_64	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_65	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_66	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_67	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_68	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_69	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:A	G:G	A:A

CT262_70	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_71	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:A	G:G	A:A
CT262_72	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:A	G:G	A:A
CT262_73	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:A	G:G	A:A
CT262_74	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_75	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_76	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_77	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_78	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_79	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_80	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:A	G:G	A:A
CT262_81	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT262_82	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A

표 3-11. Fluidigm을 이용한 양배추 CT-301계통고정 검정 결과

	C7_4 0410 442	C1_3 9509 260	C4_3 7080 145	C6_4 8050 12	C9_1 0153 71	C3_2 7393 593	C6_1 7934 583	C8_3 3927 461	C2_1 9915 970	C5_3 8301 304	C8_3 1673 998	C2_1 3209 146
CT301_1	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_2	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_3	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:C	G:G	T:G	A:A
CT301_4	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:C	G:G	T:G	A:A
CT301_5	A:G	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_6	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_7	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_8	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_9	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_10	A:A	T:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	T:A
CT301_11	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_12	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_13	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_14	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:C	G:G	T:G	A:A
CT301_15	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_16	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_17	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_18	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A

CT301_19	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_20	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_21	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_22	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_23	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_24	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_25	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_26	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_27	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_28	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_29	A:G	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_30	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_31	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_32	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_33	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:C	G:G	T:G	A:A
CT301_34	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_35	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:C	G:G	T:G	A:A
CT301_36	A:G	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_37	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_38	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_39	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_40	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_41	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_42	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_43	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_44	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_45	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:A	T:G	A:A
CT301_46	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_47	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_48	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_49	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:C	G:G	T:G	A:A
CT301_50	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_51	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_52	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_53	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A

53												
CT301_54	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_55	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_56	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:C	G:G	T:G	A:A
CT301_57	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_58	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_59	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_60	A:G	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_61	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_62	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_63	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_64	A:G	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_65	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_66	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_67	A:G	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_68	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_69	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_70	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_71	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_72	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_73	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_74	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_75	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_76	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_77	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_78	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_79	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_80	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A
CT301_81	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:G	T:G	A:A

표 3-12. Fluidigm을 이용한 양배추 CT-302계통고정 검정 결과

	C7_4 0410 442	C1_3 9509 260	C4_3 7080 145	C6_4 8050 12	C9_1 0153 71	C3_2 7393 593	C6_1 7934 583	C8_3 3927 461	C2_1 9915 970	C5_3 8301 304	C8_3 1673 998	C2_1 3209 146
CT302_1	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_2	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A

CT302_3	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_4	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_5	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_6	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_7	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	C:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_8	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_9	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_10	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_11	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_12	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_13	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:G	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_14	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_15	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_16	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_17	A:A	C:C	T:C	A:A	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_18	A:A	C:C	T:T	A:A	T:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	T:A
CT302_19	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_20	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_21	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_22	A:A	C:C	T:C	A:A	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	T:A
CT302_23	A:A	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_24	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_25	A:A	C:C	T:C	A:A	T:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	T:A
CT302_26	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_27	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_28	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_29	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_30	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_31	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_32	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_33	A:A	C:C	T:T	A:A	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_34	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_35	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_36	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_37	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A

37												
CT302_38	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_39	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_40	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_41	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_42	A:A	C:C	T:C	A:A	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_43	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_44	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_45	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_46	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_47	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_48	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_49	A:A	C:C	T:C	A:A	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_50	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_51	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_52	A:A	C:C	T:C	A:T	T:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_53	A:A	C:C	T:C	A:A	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_54	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_55	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT302_56	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_57	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_58	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_59	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_60	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_61	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_62	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_63	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_64	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_65	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_66	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_67	A:A	C:C	T:C	A:A	T:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	T:A
CT302_68	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_69	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_70	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_71	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A

CT302_72	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	T:A
CT302_73	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_74	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_75	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_76	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	C:C	C:C	G:G	T:T	G:G	G:G	A:A
CT302_77	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_78	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_79	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	A:A
CT302_80	A:A	C:C	T:C	A:T	G:T	G:C	C:C	G:T	T:T	G:A	G:G	T:A

표 3-13. Fluidigm을 이용한 양배추 CT-403계통고정 검정 결과

	C7_4 0410 442	C1_3 9509 260	C4_3 7080 145	C6_4 8050 12	C9_1 0153 71	C3_2 7393 593	C6_1 7934 583	C8_3 3927 461	C2_1 9915 970	C5_3 8301 304	C8_3 1673 998	C2_1 3209 146
CT403_1	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_2	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_3	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_4	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_5	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_6	G:G	C:C	T:T	A:A	G:G	C:C	C:C	T:T	C:C	G:G	T:T	T:T
CT403_7	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_8	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_9	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_10	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_11	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_12	G:G	C:C	T:T	A:A	G:G	C:C	C:C	T:T	C:C	G:G	T:T	T:T
CT403_13	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_14	G:G	C:C	T:T	A:A	G:G	C:C	C:C	T:T	C:C	G:G	T:T	T:T
CT403_15	G:G	C:C	T:T	A:A	G:G	C:C	C:C	T:T	C:C	G:G	T:T	T:T
CT403_16	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_17	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_18	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_19	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_20	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_21	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_22	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T

57												
CT403_58	G:G	C:C	T:T	A:A	G:G	C:C	C:C	T:T	C:C	G:G	T:T	T:T
CT403_59	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_60	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_61	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_62	G:G	C:C	T:T	A:A	G:G	C:C	C:C	T:T	C:C	G:G	T:T	T:T
CT403_63	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_64	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_65	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_66	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_67	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_68	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_69	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_70	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_71	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_72	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_73	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_74	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_75	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_76	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_77	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_78	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_79	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T
CT403_80	A:G	C:C	T:C	A:T	G:G	C:C	C:C	T:T	T:C	G:A	T:G	T:T

표 3-14. Fluidigm을 이용한 양배추 CT-410계통고정 검정 결과

	C7_4 0410 442	C1_3 9509 260	C4_3 7080 145	C6_4 8050 12	C9_1 0153 71	C3_2 7393 593	C6_1 7934 583	C8_3 3927 461	C2_1 9915 970	C5_3 8301 304	C8_3 1673 998	C2_1 3209 146
CT410_1	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_2	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_3	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_4	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_5	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_6	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_7	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A

42												
CT410_43	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_44	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_45	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_46	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_47	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_48	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_49	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_50	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_51	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_52	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_53	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_54	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_55	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_56	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_57	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_58	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_59	A:G	C:C	T:T	A:A	G:T	C:C	T:T	G:T	T:C	G:G	T:T	T:A
CT410_60	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_61	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_62	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_63	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_64	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_65	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_66	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_67	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_68	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_69	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_70	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_71	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_72	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_73	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_74	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_75	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_76	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A

CT410_77	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_78	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_79	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A
CT410_80	A:G	C:C	T:T	A:T	G:T	G:C	T:C	G:T	T:C	G:A	G:G	A:A

4. 유용형질 관련 유전자 및 바이오마커 확보

가. 전사체, 단백질 발현 비교 분석을 통한 시들음병, 뿌리혹병 저항성 관련 유용 유전자 확보

① 저항성, 감수성 양배추 계통의 2-D 단백질 분석

㉞ 내병성관련 기능성 유전자를 확보하기 위해 단백질체 분석을 시도하였다. Proteomics는 특정한 환경에 의해서 특정 단백질의 발현 변화를 찾아낼 수 있으므로, 시들음병과 뿌리혹병 처리후의 양배추 저항성 감수성 계통의 단백질의 발현 변화를 2-D 기법을 이용하여 관찰하였다. 시들음병 처리구는 *F. oxysporum* 처리 후 3일, 뿌리혹 병은 *P. brassicae* 처리 후 5일째에 각 shoots 부분의 시료를 확보하여 단백질을 분리한 후 2D 분석을 수행하였다. 각 병 특이적인 발현을 보이는 spots과 품종간 특이적인 발현을 보이는 단백질 spots을 확보하였다 (그림 4-1, 4-2). 두 번의 반복 실험 결과를 ImageMaster 2D Platinum (v6.0) software를 사용하여 2반복의 Spot volume값 log2, average 구한 다음 Fold change를 계산하였다. One-Way ANOVA Test를 통하여 시들음병 : P-value < 0.05인 spot 47개, 뿌리혹병 : P-value < 0.05인 spot 22개를 확보하고 이들 단백질 spots을 분리하여 MALDI-TOF-TOF 을 수행하고 각 spots의 단백질의 염기서열을 분석 하고 있음 (그림 4-4).

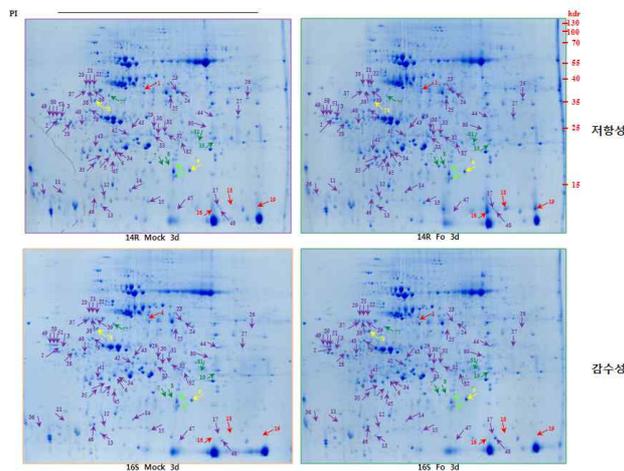


그림 4-1. 시들음병 저항성 (#14), 감수성 (#16) 양배추의 병 처리후의 단백질 발현 패턴

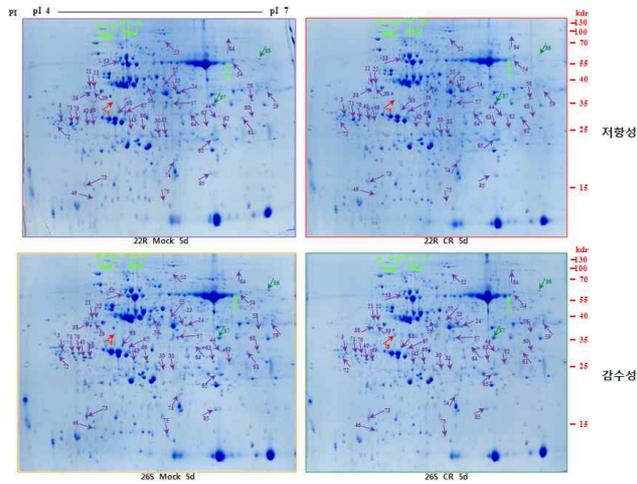


그림 4-2. 뿌리혹 병 저항성 (#22), 감수성 (#26) 양배추의 병 처리후의 단백질 발현 패턴

② 내병성 관련 대사체 분석

- ㉠ 식물 내에 존재하는 대사체의 양은 외부의 환경변화나 내부의 유전적 변화에 의해서 변화된다. 따라서 식물 대사체학은 돌연변이 또는 기타 다른 조작을 가했을 때 나타나는 식물들의 특이적인 반응들에 대해서 이해하는데 도움을 준다.
- ㉡ 식물체의 대사체 분석을 통하여 시들음병과 뿌리혹병 저항성 품종과 감수성 품종의 대사체 스펙트럼의 차이를 확인하고자 FT-IR 스캐너를 분석을 하였다. 시들음병 저항성과 감수성 품종간의 스펙트럼은 뚜렷하게 구분되지 않았지만, 뿌리혹병 품종간에는 저항성과 감수성의 대사체가 뚜렷하게 구분되는 것을 확인하였다(그림4-3).

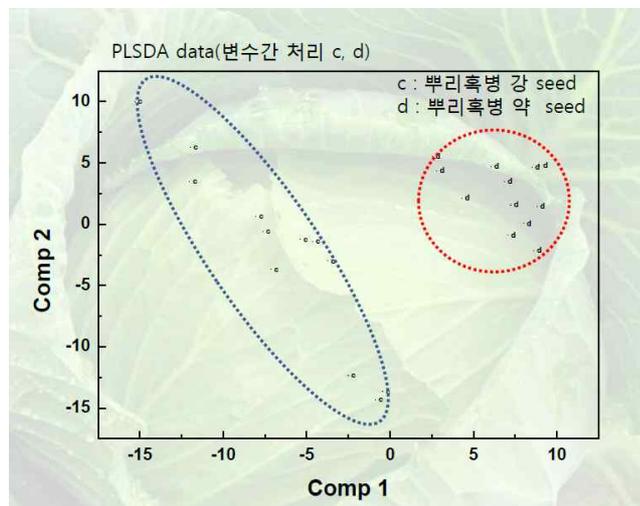


그림 4-3. 뿌리혹 병 저항성과 감수성 품종간의 FT-IR 분석 결과

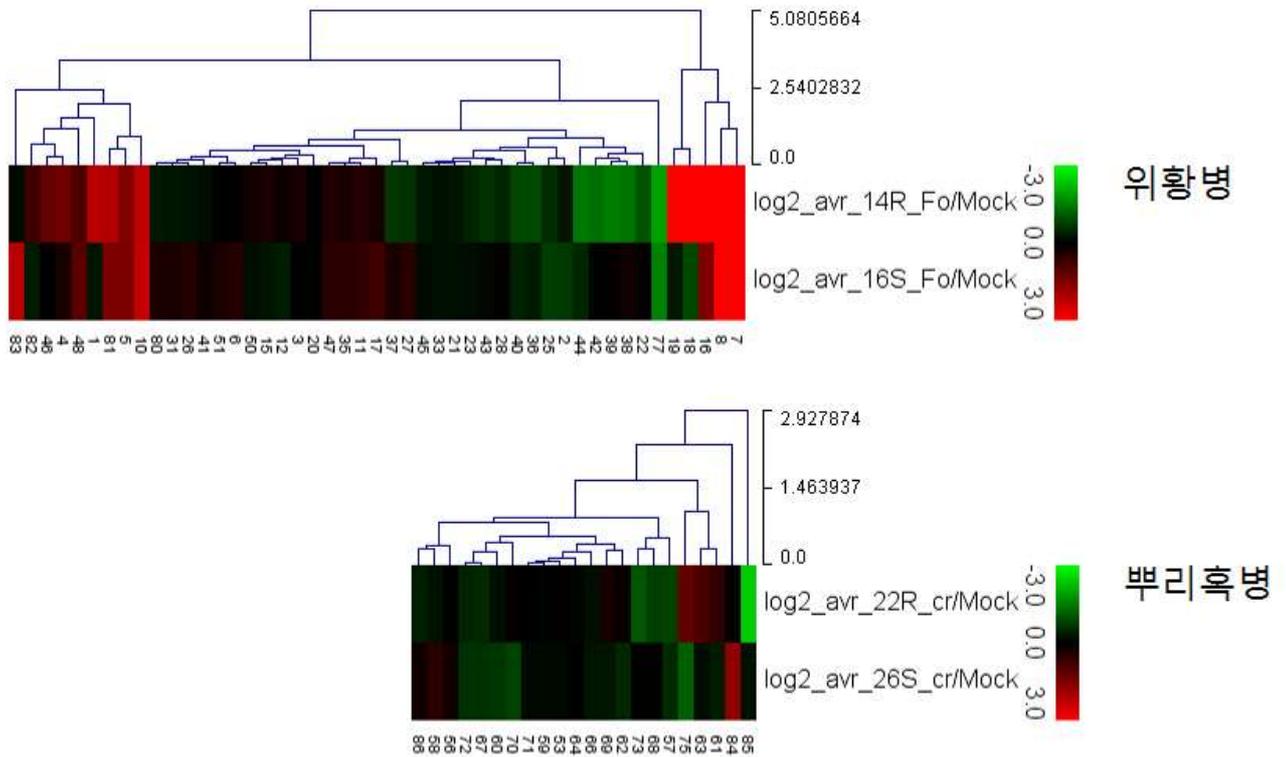


그림 4-4. 실험의 2반복의 Spot volume값을 log2로 변환하고, average를 구한 다음 병처리에 따른 각 spots의 fold change 분석으로부터 분리된 spots.

㉔ Agilent *Brassica* chip을 이용한 양배추 계통간의 병 특이 유전자군의 발현 비교 분석

- ㄱ. KR(시들음병 저항성 라인), HY(시들음병 감수성 라인), YCR 이념 (뿌리혹병 저항성 품종) 그리고 CT-18(뿌리혹병 감수성 품종)을 선별하여 *Brassica* microarray를 이용하여 시들음병과 뿌리혹병 저항성 계통의 발현 profile을 분석하였다. 시들음병은 mock과 *F. oxysporum* 처리 3일째에 뿌리혹병은 *P. brassicae* 처리 5일째에 roots과 shoots 부분으로 나누어서 RNA를 분리하여, agilent *brassica* 105k (*napus*, *rapa*, *oleracea*) chip 분석을 수행하였다.
- ㄴ. 3일째와 5일째는 병 진행 상황에 대한 유전자 발현 마커를 통해 분석한 결과 비교적 빠른 병원균-기주간의 상호 작용을 볼 수 있는 것으로 추정되어 선택하였으며, 샘플을 chip 분석을하기 전에 1차년도에 개발한 유전자 마커 및 병원균 바이오메스 측정으로 처리 샘플의 정확도를 확인 하였다.
- ㄷ. Mock-*F. oxysporum* 처리간 RNA 발현량에서 2-fold up 또는 down 된 2426개(shoots)와 2109개(roots) 유전자, 그리고 *P. brassicae* 처리 시 2776개(shoots)과 1382개(roots) 유의 유전자(그림 4-5)를 선별하여 hierarchical clustering data 분석을 하였다.

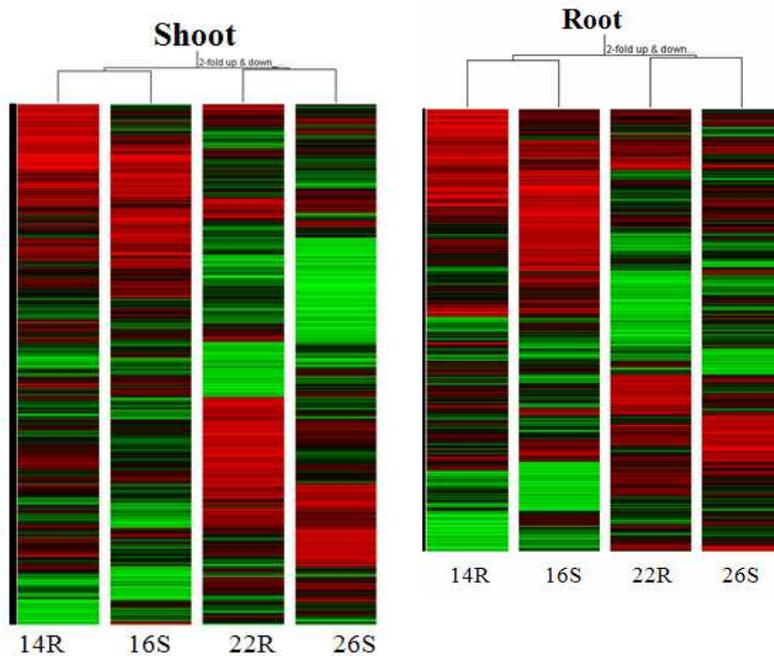


그림 4-5. 시들음병, 뿌리혹병 저항성, 감수성 양배추의 shoot, root 조직의 유전자 발현

ㄷ. 재미있게도 시들음병과 뿌리혹병 모두 뿌리 감염 병원균으로 이들에 의한 shoot 유전자 발현에도 특이 변화가 있는지 관찰해보고자 하였는데, 아래 그림에서와 같이 root 조직에서와 마찬가지로 shoot 조직에서도 계통간의 유전자 발현의 차이보다도 병원균 특이적이 양배추 유전자의 발현 양상이 있는 것으로 나왔다. 선별된 유전자 중 그 기능이 알려진 유전자들을 보면 metabolic pathway, ion transport, signal transduction, cell cycle, sugar phosphate metabolism, defense, growth, development 에 관여하는 유전자들이 activation 됨을 확인하였다. 선별된 발현 차이 유전자군으로 인해 작동 될 수 있는 pathway의 자세한 분석을 통해 양배추 저항성 품종에서 시들음병과 뿌리혹병 저항성을 결정하는 중요 분자 지표 및 병원균 특이 유도 양배추 유전자군을 확립할 수 있을 것으로 기대한다.

㉑ cDNA 칩 분석을 통한 양배추 내병성 유전자 마커 선별

ㄱ. 통합 발현체 연구 (DNA chip) 결과로부터 도출된 유전자 군의 병 특이 발현을 검증하였다. 시들음병 저항성 품종에서 shoot 310개, root 293개, 뿌리혹병 저항성 품종에서 shoot 328개, root 261개의 up regulation 되는 발현체를 후보 유전자로 선별하였다. 식물체의 저항성 유전자는 특정 병원균을 인식하는 특이성을 나타내고 있는데 핵산결합서열(NBS)과 leucine-rich repeat(LRR) 부위를 갖고 있고 또한 ser/thr protein kinase를 코딩하는 저

항성 유전자가 확인되었고, 신호전달과정에서 세포안 protein kinase 부분을 구성하는 receptor 그룹도 관여한다. 내병원성 관련(pathogenesis gene) 유전자들의 발현이 증가하고 식물방어 반응을 유도하여 살리실산 혹은 자스몬, 에틸렌 그리고 오옥신 등의 호르몬들의 방어 작동도 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 보고를 바탕으로 Agilent Brassica chip을 이용한 양배추 계통간의 병 특이 유전자군의 발현 비교 분석을 통해서 후보 저항성 유전자들을 선정하여 칩 분석과 다른 실험 set에서 qPCR을 통해 검증하여 내병성 유전자 마커 선별 과정을 수행하였다.

위험병

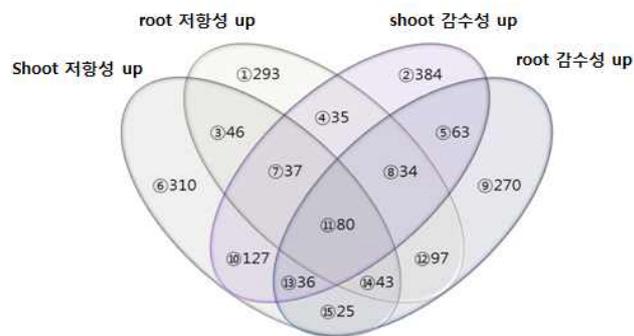


그림 4-6. chip 실험 결과 분석을 통해서 시들음 병, 뿌리혹 병 관련 특이적으로 Up-regulation 하는 유전자 밴다이어그램.

표 4-1. chip 분석을 통해 선별된 후보 저항성 유전자 그룹

Description	Probe No.	log2=0.5이상	gene marker(%)
protein kinase & receptor-like	785	102	62
저항성 품종 Resistance specific up	259	80	44
Pathogenesis related genes	15	8	60
Peroxidase	94	23	50
Chitinase	18	12	50
Disease resistance genes	284	46	33
Ethylene	167	24	15
auxin	190	40	14

③ RNA-seq을 이용한 양배추 시들음병 저항성, 감수성 개체의 발현체 분석

㉑ 병원균과 저항성 기주의 초고밀도 발현체 분석을 위해서 시들음병 저항성 3 품종(101, 102, 105)과 감수성 2품종(104, 106)을 soil에서 발아시킨 후 14일 동안 키운 후 *F. oxysporum f. sp. conglutinans*을 2×10^7 spore/ml 농도로 병 처리하여 3일 후 지상부 조직을 채취하여 RNA를 분리하여 RNA-seq을 수행 하였다.

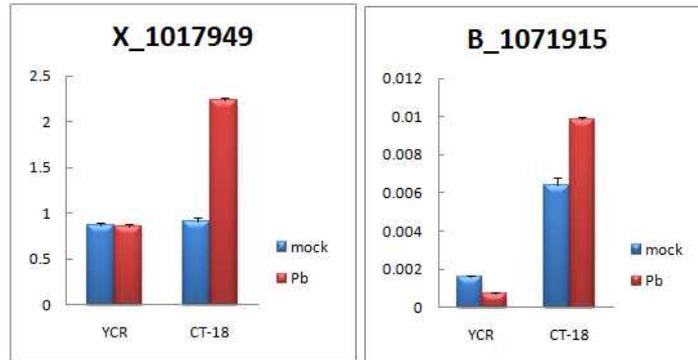


그림 4.7. 뿌리혹병 감수성 특이 up-regulation 유전자군

표 4-2. 시들음병 저항성과 감수성 품종의 transcriptome의 de NOVO assembly

샘플명	Raw data (Reads)		Assemble data		Gene Expression Profile (P-Value <= 0.05, Fold Change >= 2)	위험병 5 (5 sample Common Gene) 저항성 4 (4 sample Common Gene) 감수성 3 (3 sample Common Gene)	위험병 특이적 저항성 특이적 감수성 특이적	Blastx matched
	Read Yield (Mbase)	Read count #	Gene Yield (Mbase)	Gene count #				
위험병	101_shoot_Fo_0h / 101_shoot_Fo_3d	26153	261,541,930	228	221,577	15,922		
	102_shoot_Fo_0h / 102_shoot_Fo_3d	29,941	299,417,678	282	253,067	51,698		
	104_shoot_Fo_0h / 104_shoot_Fo_3d	24,611	246,117,766	204	193,998	20,721	206	108
	105_shoot_Fo_0h / 105_shoot_Fo_3d	35,372	353,729,844	276	230,367	19,309		
106_shoot_Fo_0h / 106_shoot_Fo_3d	40,376	403,768,750	182	180,001	11,464			
위험병 감수성	104_shoot_mock_0h / 104_shoot_mock_3d	25,503	255,037,810	242	212,328	16,427		
	106_shoot_mock_0h / 106_shoot_mock_3d	34,603	346,045,982	176	172,273	9,291	328	208
	165_shoot_mock_3d / 165_shoot_Fo_3d	36,508	365,086,944	263	221,191	12,667		235
위험병 저항성	101_shoot_mock_0h / 101_shoot_mock_3d	28,221	282,223,444	231	218,291	17,099		
	102_shoot_mock_0h / 102_shoot_mock_3d	28,978	289,784,420	265	227,766	18,567		
	105_shoot_mock_0h / 105_shoot_mock_3d	36,890	368,910,086	281	233,514	18,144	173	114
	14R_shoot_mock_3d / 14R_shoot_Fo_3d	32,750	327,512,038	215	193,681	9,060		141

㉒ 병을 처리하지 않은 조건에서 저항성 3품종과 감수성 2품종 발현체를 비교하고 그리고 5 품종에 Foc을 처리시 mock control에 비해 시들음병에 의해서 유도되는 발현체 간의 특이적인 그룹을 나누어서 그림 16에 벤다이어그램으로 나타내었고 표 4-2에 상세히 나타내었다. 병 처리 후 시들음병 특이적인 108개 발현체에서 저항성 품종에 의한 특이적인 발현체와 감수성 품종에 의한 병 특이적인 발현체를 Functional function과 Biological Process를 비교해 본 결과 multi organism process가 시들음병 감수성에서 특이적으로 보이고

response에 의한 자극, biological process에 의한 조절, biological regulation이 감수성 품종에 비해 10% 높은 발현체를 보였고 molecular function은 유사한 pattern으로 보인다.

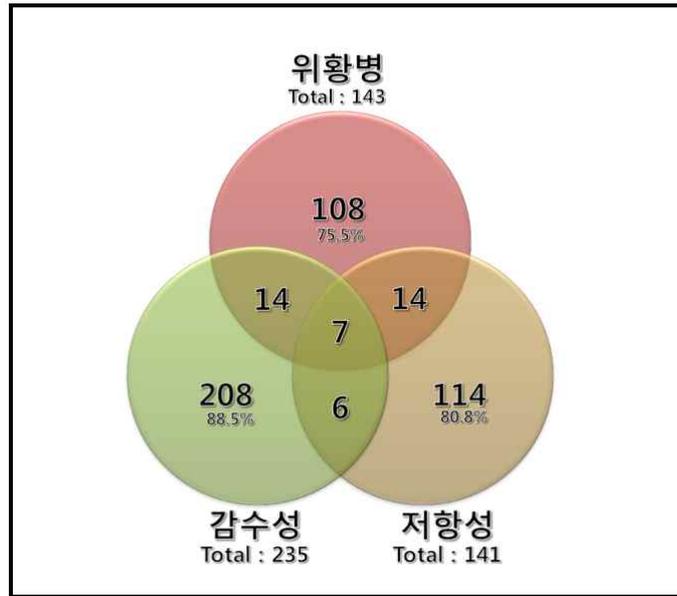


그림 4-8. 시들음병 저항성 품종과 감수성 품종 그리고 병 특이적인 유전자군

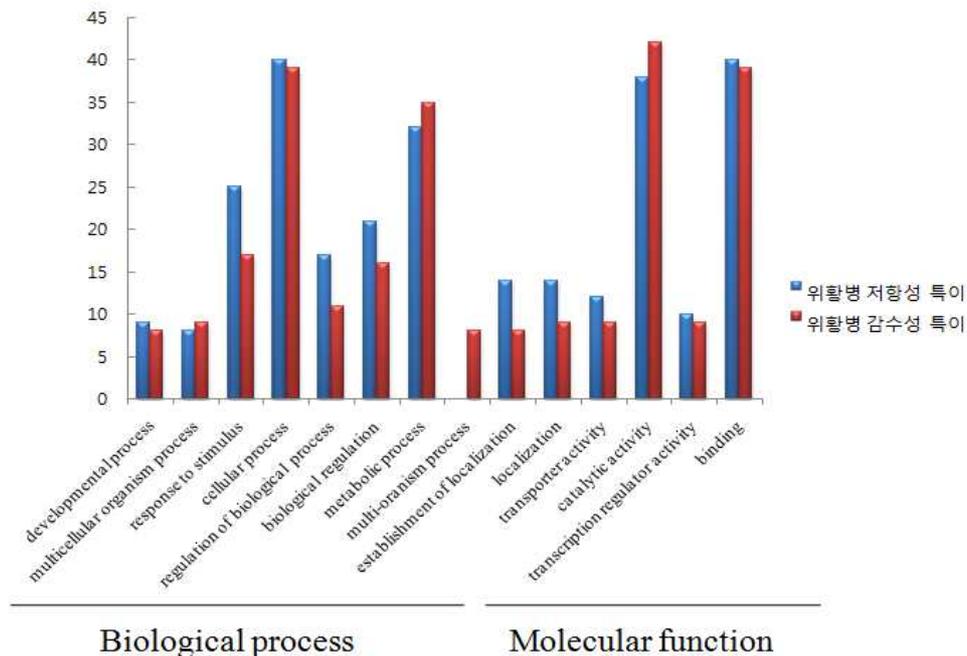


그림 4-9. Up-regulation되는 유의한 유전자 후보군의 Functional function과 Biological Process

표 4-3. 시들음병 저항성 품종과 감수성 품종 그리고 병 특이적인 발현체

시들음병, 감수성, 저항성 공통 : 7

Gene Name	GI number	Description	Identity %	Coverage %	Match
104_c22125_c0_s1_3156	15241361	Respiratory burst oxidase-C [Arabidopsis thaliana]	86.61	87.7	926
104_c39542_c0_s3_2681	15224883	iron regulated 1 protein [Arabidopsis thaliana]	86.23	58.03	523
16s_c46771_c0_s58_2866	334186717	K ⁺ uptake permease 9 [Arabidopsis thaliana]	75.12	85.48	824
106_c43273_c0_s25_3028	42572227	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 41 [Arabidopsis thaliana]	84.06	49.3	508
16s_c48710_c1_s22_3517	297840159	hypothetical protein ARALYDRAFT_475010 Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	83.11	25.73	302
104_c28935_c0_s3_2208	42568291	aspartyl protease family protein [Arabidopsis thaliana]	88.42	51.58	380
16s_c47656_c0_s72_5116	334186525	CRM family member 3B [Arabidopsis thaliana]	73.71	51.23	928

시들음병, 감수성 공통 : 14

Gene Name	GI number	Description	Identity %	Coverage %	Match
104_c36147_c0_s2_2824	7657877	AtPP protein [Brassica napus var. napus]	93.2	37.46	353
16s_c38094_c0_s9_1667	15241862	RCD one 5-like protein [Arabidopsis thaliana]	90.38	28.01	156
104_c41010_c0_s9_3433	297834336	integral membrane single C2 domain protein [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	74.07	69.7	829
106_c31600_c0_s1_1995	240256229	mate efflux domain-containing protein [Arabidopsis thaliana]	91.47	70.47	469
104_c34759_c0_s4_2631	42573265	calcium-dependent lipid-binding domain-containing protein [Arabidopsis thaliana]	89.09	57.43	504
104_c40627_c0_s5_3312	297808311	hypothetical protein ARALYDRAFT_910322 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	93.39	20.35	227
104_c37422_c0_s23_3285	30698186	Wound-responsive family protein [Arabidopsis thaliana]	77.81	29.74	329
104_c40921_c0_s3_1655	297792565	hypothetical protein ARALYDRAFT_331608 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	88.55	87.85	498
104_c41942_c0_s25_4581	297846438	zinc finger family protein [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	70.5	30.49	522
104_c25775_c0_s2_2439	297850466	opc-8:0 CoA ligase1 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	89.8	56.66	461
16s_c44691_c3_s6_1137	15222028	dehydration-responsive element-binding	80.29	52.68	208

		protein 1F [Arabidopsis thaliana]			
104_c32936_c0_s1_1526	297849930	hypothetical protein ARALYDRAFT_471694 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	82.1	75.62	391
104_c36772_c0_s7_1815	297821551	hypothetical protein ARALYDRAFT_481182 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	88.89	66.88	405
104_c39364_c0_s19_170 8	297807341	hypothetical protein ARALYDRAFT_488138 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	74.73	32.08	186

시들음병, 저항성 공통 : 14

Gene Name	GI number	Description	Identity%	Coverage%	Match
102_c47104_c0_s1_2672	297793233	ATPAP28/PAP28 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	84.05	43.86	395
105_c36767_c0_s3_1706	5902385	AC009322_27 Hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]	77.94	23.5	136
105_c40754_c0_s1_4121	312282905	unnamed protein product [Thellungiella halophila]	84.97	64.18	885
102_c54879_c0_s23_355 1	334184648	uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana]	73.87	59.02	727
101_c53278_c0_s33_313 5	297816182	hypothetical protein ARALYDRAFT_485311 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	87.76	13.55	147
104_c26911_c0_s2_1745	297796581	hypothetical protein ARALYDRAFT_918856 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	85.52	88.99	518
105_c33803_c0_s1_3059	297845902	zinc ion binding protein [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	90.76	42.03	433
102_c57556_c0_s13_271 1	22331873	C2 domain and GRAM domain-containing protein [Arabidopsis thaliana]	88.92	39.24	361
106_c45193_c0_s19_492 8	82749770	At3g12550-like protein [Boechera stricta]	86.57	20.37	335
102_c47788_c0_s2_1886	79320314	uncharacterized protein [Arabidopsis thaliana]	81.03	73.75	464
102_c57380_c0_s4_3610	297792419	hypothetical protein ARALYDRAFT_495173 [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	87.69	71.1	861
101_c49080_c0_s5_2077	297808769	mitochondrial substrate carrier family protein [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	92.14	32.73	229
105_c46723_c1_s34_240 9	9759337	arsenite translocating ATPase-like protein [Arabidopsis thaliana]	83.33	12.66	102
102_c47685_c0_s5_3668	15237162	putative inactive receptor kinase [Arabidopsis thaliana]	81.98	52.8	655

감수성, 저항성 공통 : 6

Gene Name	GI number	Description	Identity%	Coverage%	Match
-----------	-----------	-------------	-----------	-----------	-------

104_c41967_c0_s37_260 4	334183377	3'-5' exonuclease domain-containing protein [Arabidopsis thaliana]	79.21	62.86	558
16s_c46775_c0_s17_330 5	30685736	golgin candidate 2 [Arabidopsis thaliana]	78.78	58.78	674
16s_c47952_c0_s8_2826	1064889	SLR3-1 [Brassica oleracea var. acephala]	99.14	36.9	348
16s_c45782_c0_s8_2197	334188581	ZAP - like protein [Arabidopsis thaliana]	87.54	40.37	297
104_c44499_c2_s30_170 0	297827535	kinase family protein [Arabidopsis lyrata subsp. lyrata]	77.05	10	61
104_c44324_c0_s34_410 9	15233753	Ca ²⁺ -transporting ATPase [Arabidopsis thaliana]	93.44	77.87	1067

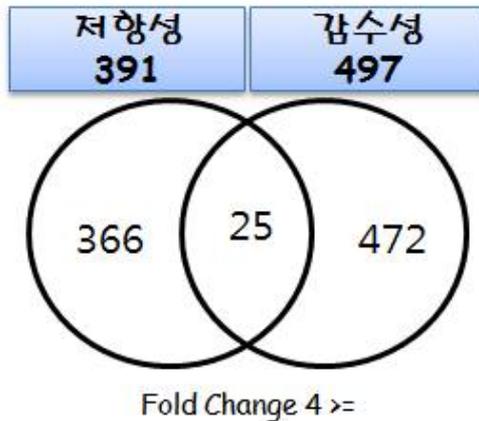


그림 4-10 RNAseq data 분석을 통해 특이 유전자군 추출

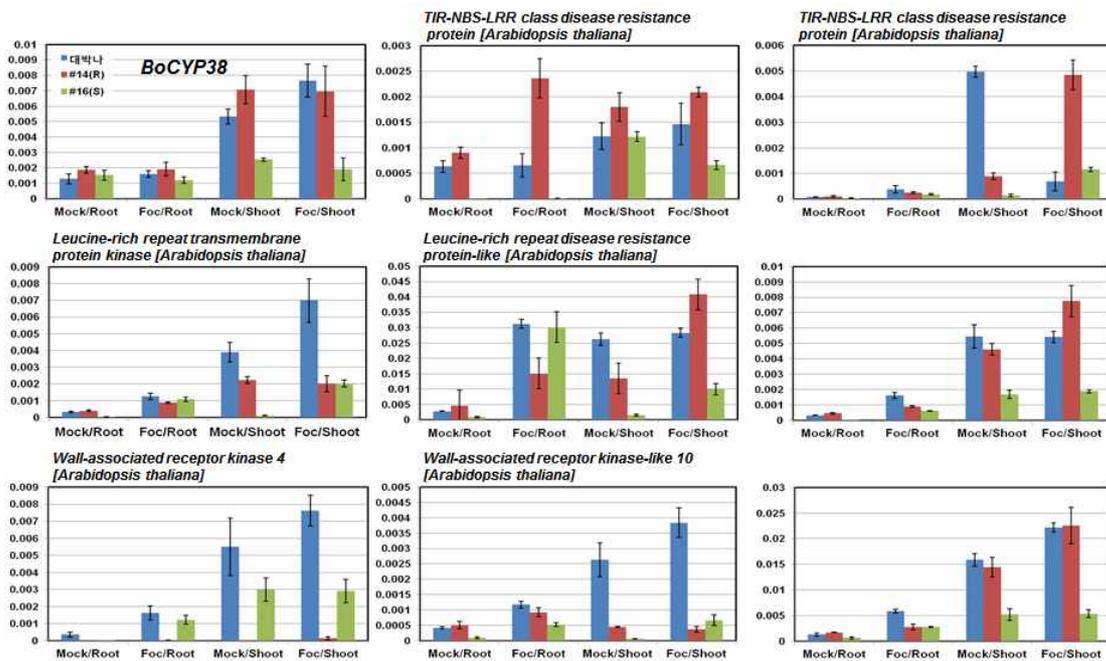


그림 4-11 RNAseq data에서 추출된 유전자 군의 실험적 검증.

④ 십자화과 제능 염기서열 비교를 통해서 시들음병과 뿌리혹병 처리에 의해서 발현되는 병 특이 발현 마커 유전자 확보

㉞ 기존에 애기장대에서 분리된 병 특이 발현 유전자 (*PR genes*)와 문헌 검색을 통해 애기장대에서 발표된 시들음병 원인균 *Fusarium oxysporium*과 뿌리혹병 원인균 *Plasmodiophora brassicae* 관련 유전자들을 확보하고, 이들의 염기서열 정보로부터 primer를 합성하여, 양배추 cDNA로부터 9개의 병 발현 특이 유전자 단편 9개를 확보하였다. 이들의 발현을 정량하기 위하여 Q-RT-PCR 용 primer를 확보하고, 병 처리후 시간별 9개 유전자의 발현을 분석 하였다 (그림 4-12).

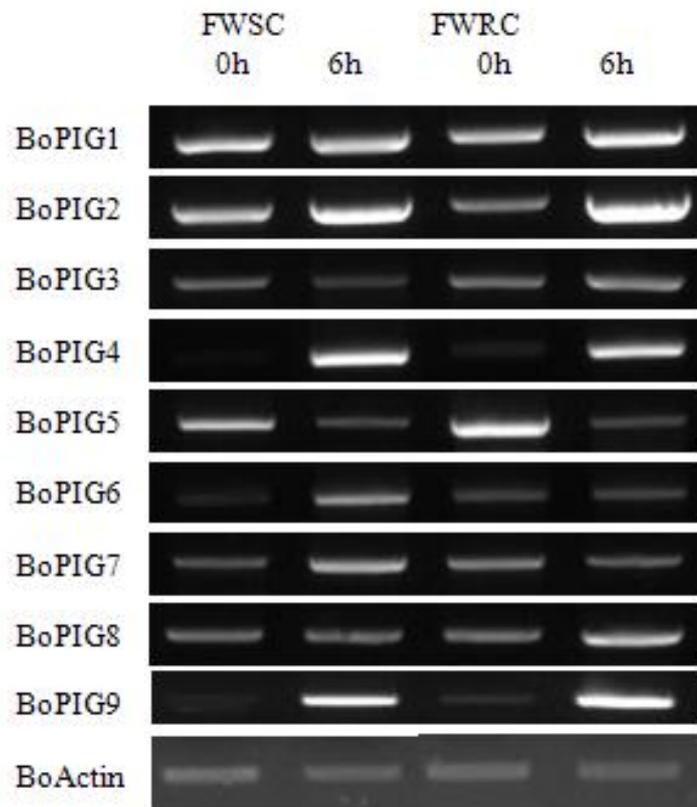


그림 4-12. *Fusarium oxysporium* 처리에 유도되는 *Brassica oleracea* PIGs 유전자

㉞ 시들음병 처리시 유도되는 candidate 유전자 발현 탐색

ㄱ. 시들음병 품종에서 *Fusarium oxysporium*에 의한 양배추 시들음병처리 모니터링을 위해서 0, 3, 6, 24, 72시간 접종후 지상부와 지하부를 나누어서 샘플링을 하여 Q PCR을 수행하였다. 시들음병 처리 72h에 BoPIG 1 유전자 발현의 형태가 저항성 품종에서 강하게 Induction되었고 반대로 시들음병 감수성 품종에서는 감소되는 발

현을 관찰하였다(그림 4-13). 그 결과 BoPIG 1이 가장 강한 발현을 보이는 14 품종과 가장 약한 16 품종 계통 라인을 선정하여 시들음병 처리에 대한 좀 더 자세한 모니터링을 위해서, mock 처리와 *F. oxysporium*을 접종한 후 0, 5, 10, 15, 21일 샘플을 지상부와 지하부로 나누어 채취하여 지상부에서 유전자 발현을 조사하였다.

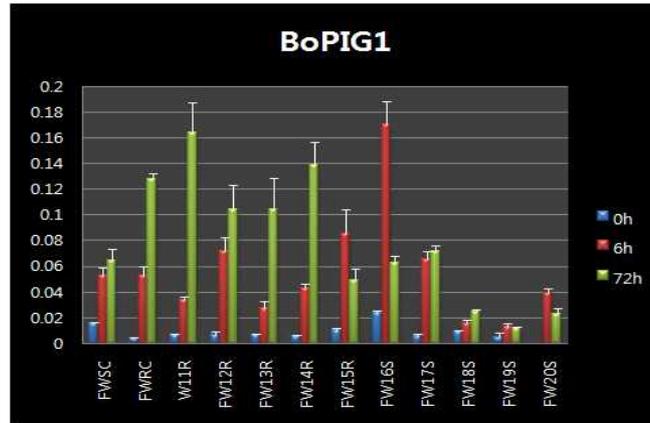


그림 4-13. *F. oxysporium* 처리 품종에서 BoPIG 1 발현 비교

- ㄴ. 접종 후 10일전까지는 저항성 품종 14번이 감수성 품종 16번보다 *F. oxysporium*에 감수성의 phenotype이 관찰되었으나 10일 후에는 14번이 뚜렷한 저항성의 성장 형태를 보였다 (그림 4-14).
- ㄷ. 저항성과 감수성 라인에서 비교적 빠른 시간 (6시간 후)에서 유전자 발현의 차이를 알기가 어려워 *F. oxysporium* 접종 후 10일째 식물에서부터 RNA를 분리하여, *BoPIGs* 유전자들의 발현을 Q RT-PCR을 통해 조사한 결과 (그림 4-15), 감수성 품종에서는 *BoPIG 1, 2, 3, 4, 9*들의 발현이 저항성에 비해 강하게 발현되었고, *BoPIG 5, 6*의 발현은 감수성 품종에서 감소되었다. *BoPIG 8*은 저항성, 감수성 품종 모두에서 *F. oxysporium* 처리를 하더라도 발현에는 큰 차이가 없는 것으로 관찰되었다. *BoPIG 7*은 오히려 mock 처리에서 저항성, 감수성 품종간의 발현 차이가 뚜렷하게 보이고 *F. oxysporium* 처리에도 동등한 발현 양상이 보이는 것으로 *BoPIG 7*이 시들음병 저항성과 감수성 품종을 결정하는 중요한 유전자일 가능성을 추측할 수 있다.

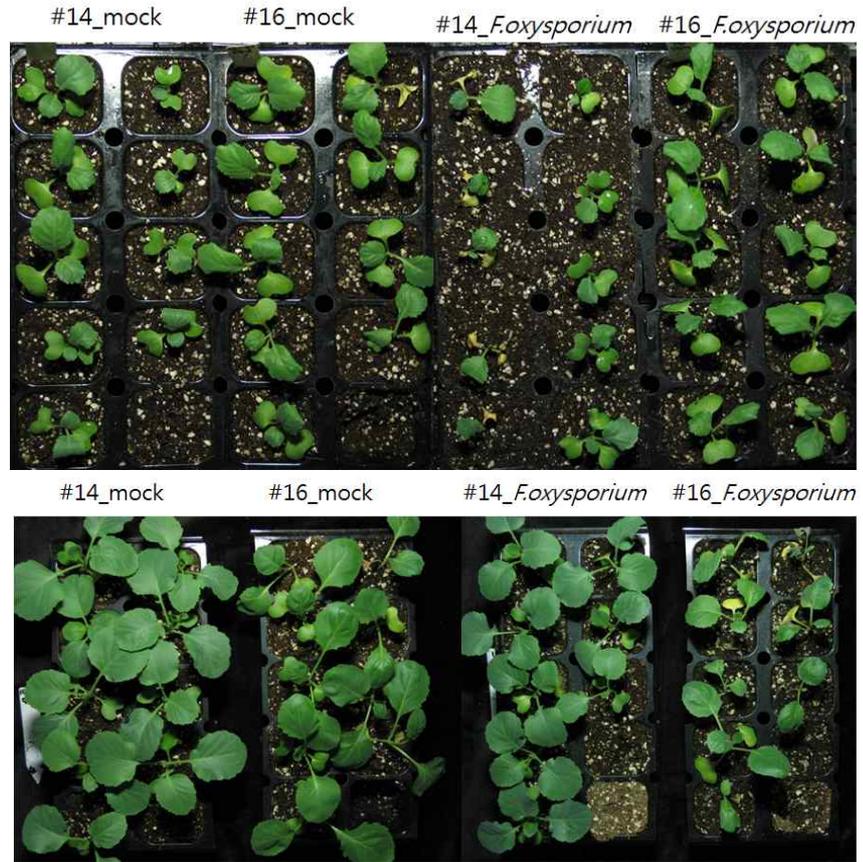


그림 4-14. *F. oxysporium* 접종 후 10일(위)과 15일(아래)

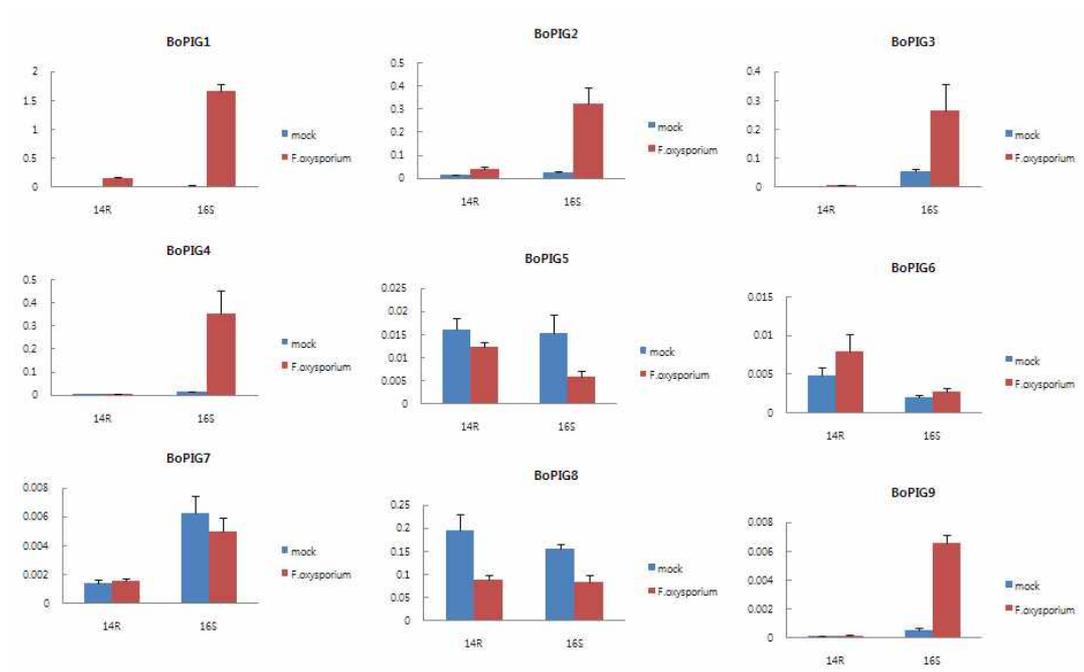


그림 4-15. *F. oxysporium* 처리 10일후 저항성과 감수성 품종에서 BoPIGs 발현

㉔ 뿌리혹병 처리시 유도되는 candidate 유전자 발현 탐색

ㄱ. 양배추 뿌리혹병 처리 모니터링을 위해서 0, 3, 6, 24, 72시간 접종한 양배추 지상부와 지하부를 나누어서 샘플링을 하여 PCR을 수행하였다. 시들음병 처리에서 BoPIG 1의 발현이 강하게 보이는 반면 뿌리혹병 처리 품종에서는 72시간에도 매우 약한 발현이 보여서 timepoint를 *Plasmodiphora brassicae* 접종 후 5, 10, 15, 25, 35일에서 저항성 품종(no.22)과 감수성 품종(no.26)에서 유전자 발현을 조사하였다. 뿌리혹병 품종은 병리검정 5주까지 지상부의 생육은 mock 처리와 *P. brassicae*처리에 차이를 관찰 할 수 없었으며(그림 4-16), 지하부의 샘플을 채취하여 *P. brassicae*에 의해 유도되는 유전자 발현 비교를 수행하였다.



그림 4-16. *P. brassicae* 접종 후 5일후 양배추 품종

ㄴ. 시들음병 처리 품종에서 강하게 발현되었던 BoPIG 1-5의 발현은 뿌리혹병 처리 품종에서는 발현이 약하지만 저항성과 감수성 품종의 비교에서는 뚜렷한 차이가 관찰되었다. BoPIG 8과 BoPIG 9에서도 저항성과 감수성 품종에서 *P. brassicae* 접종에 의해서 뚜렷하게 차이를 보이는 발현 양상을 관찰 하였다(그림 4-17).

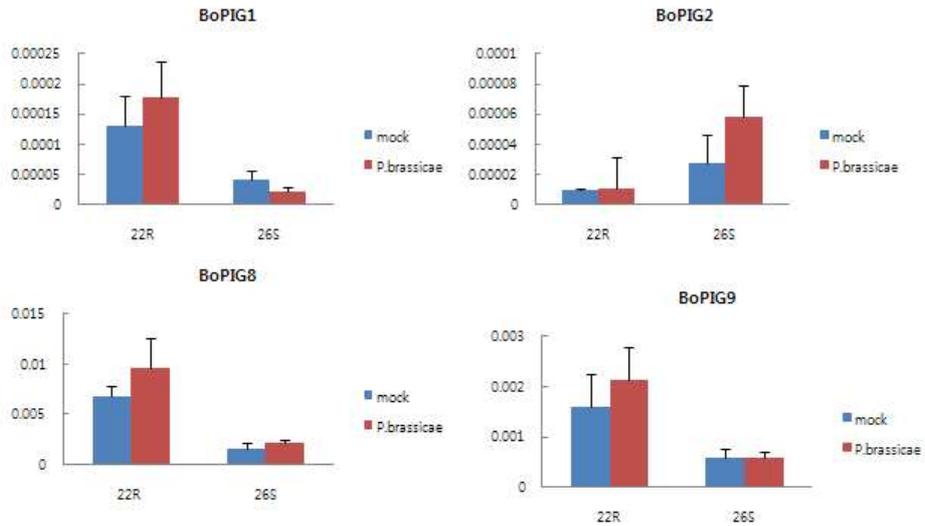


그림 4-17. *P. brassicae* 접종 10일후 저항성과 감수성 품종에서 BoPIGs 발현

ㄷ. 또한 애기장대 연구에서 *P. brassicae* 접종 후 저항성과 감수성 줄기에서 관찰되는 단백질 발현 차이 연구로부터 발견된 저항성 관련 단백질 정보로부터 만들어진 *BoPIG 10*과 *BoPIG 11* 유전자들의 발현을 조사한 결과 (그림 4-18), *BoPIG 10*과 *BoPIG 11*은 *P. brassicae*에 의해 저항성과 감수성 모두에서 감소하였고, *BoPIG 10*은 감수성 품종에서 mock에서 발현과 비교해서 감소 차이가 크게 관찰되었다. 이 결과는 애기장대 *P. brassicae*에 의해 유도되는 유전자 profiling과 어느 정도 일치되는 결과를 보이며, 절대 기생균인 *P. brassicae*에 의한 저항성 반응에 있어, 시들음병이나 다른 병 저항성 기작과는 달리 auxin, cytokinin 등의 식물 호르몬이 더 중요한 작용을 하는 것으로 보인다. 이 결과로부터 *BoPIG 10*과 *11*을 뿌리혹병 처리 모니터링을 위한 유전자 마커로 이용 할 수 있을 것으로 생각된다.

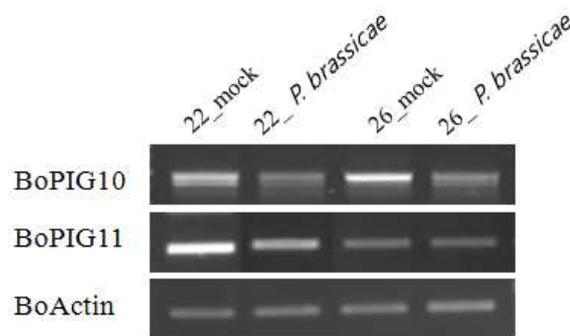


그림 4-18. *P. brassicae* 접종 10일후 BoPIG 10과 BoPIG 11 발현

나. 전사체 비교분석을 통한 내서성, 석회결핍 둔감형 관련 유용 유전자군 확보

① 석회(칼슘) 결핍 생리 장애 관련 RNA-seq 분석을 통한 유용 유전자군 발굴

㉠ 석회결핍 조건에서 발현되는 유전자 분석 및 양배추 표준 유전자 세트 구축 (위탁과제((주)시더스)와 공동으로 진행)

ㄱ. 석회결핍 둔감형 및 표준형 양배추를 대상으로 칼슘 결핍 조건 및 정상 처리구에서 생육시킨 식물체 및 다양한 조직(잎, 뿌리, 유묘, 및 꽃)으로부터 RNA를 추출하고 전사체 분석을 NGS 방법으로 수행함.

ㄴ. 대량의 전사체 정보를 생물정보학적 방법으로 분석하여 양배추의 표준 유전자 세트를 구축할 수 있었으며, 동시에 조직별 특이 발현 유전자를 선별하고 석회결핍 조건에서 특이적인 발현을 보이는 다량을 유전자를 확보할 수 있었음.

㉡ 모델식물을 이용한 석회결핍 관련 유전자 기능연구

ㄱ. 동일한 과(科)에 속한 애기장대를 이용하여 석회결핍과 관련된 유전자의 기능연구를 수행하고자 하였음. 애기장대의 다양한 호르몬 관련 돌연변이체를 대상으로 석회결핍에 대한 반응을 조사한 결과, salicylic acid (SA)와 관련된 돌연변이에서 석회결핍에 대한 반응을 나타내어 관련 연구를 수행하였음.

ㄴ. 애기장대에서 다양한 스트레스와 관련되어져 있다고 알려진 DREB 유전자들의 발현이 칼슘결핍 조건에서 반응하는 것을 확인하여, 해당 유전자의 돌연변이체를 이용한 다양한 연구를 수행하였음.

㉢ 사업단 참여기업인 삼성종묘와 아시아종묘로부터 분양받은 다양한 양배추품종을 칼슘 부족배지에 키워 각각의 칼슘결핍에 대한 표현형 (뿌리길이, 생체중, tipburn)을 분석 하였다. 그 결과 18, 19, 20번 품종이 칼슘결핍에 대해 가장 둔감성을 나타냄을 알게 되었다 (그림 4-19).

㉓ 석회(칼슘) 결핍 생리 장애 관련 RNA-seq 분석을 통한 유용 유전자 군 발굴

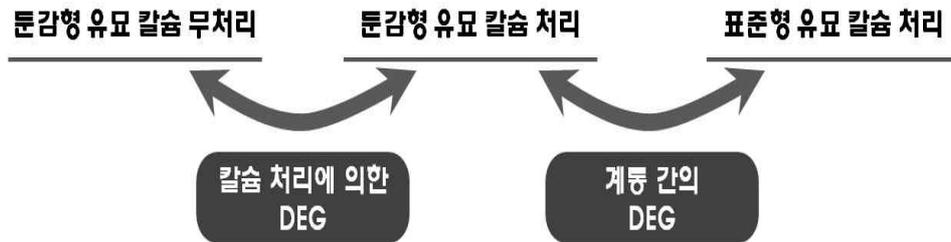


그림 4-21. 석회 결핍 생리 장애 관련 유용 유전자 후보군을 선별하기 위한 비교 모식도

㉔ 석회 결핍 생리 장애와 관련된 것으로 예측되는 유전자 후보군(DEG) 선별

- ㄱ. Bowtie 프로그램을 이용하여 표준 유전자 세트에 조직별 short reads의 mapping 수행
- ㄴ. Fisher's exact test를 이용하여 비교대상 간 발현이 유의한 유전자 (Differentially Expressed Genes)를 선별

표 4-4. 석회 결핍 관련 처리구 간 비교 결과, 1차 선별된 DEG 개수

	대 조 군 Up-regulated genes 개수	대 조 군 Down-regulat ed genes 개 수
석회 결핍 생리 장애 둔감형 유묘 칼슘 처리구 (대조군) vs 석회 결핍 생리 장애 표준형 유묘 칼슘 처리구 (비교군)	3,044	3,207
석회 결핍 생리 장애 둔감형 유묘 칼슘 처리구 (대조군) vs 석회 결핍 생리 장애 둔감형 유묘 칼슘 무처리구 (비교군)	1,111	851

㉕ 1차 선별된 DEG의 보다 정확한 발현값 측정 및 필터링(filtering)을 위해 DESeq, TC (total count) normalization method를 적용하여 비교함.

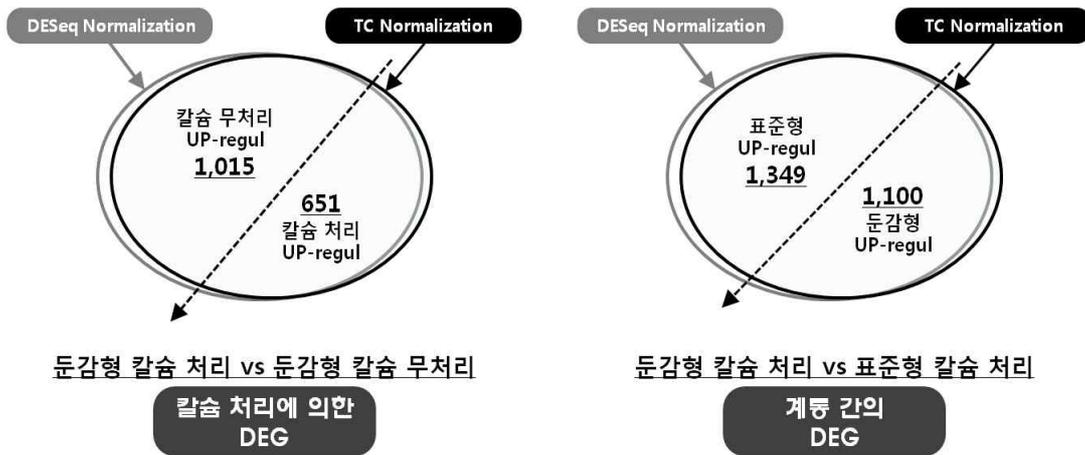


그림 4-22. DESeq, TC normalization method을 적용해 선발한 DEG 개수

- ㉠ 기존에 적용한 RPKM method에 비해 DESeq, TC(total count) normalization method가 유전자의 발현량을 보다 정확하게 대변하므로(단, method간 일부의 편차는 존재함). DESeq와 TC method를 적용하여 칼슘 처리/무처리 간 DEG 1,666개, 계통 간의 DEG 2,449개 DEG 후보군을 선발함.

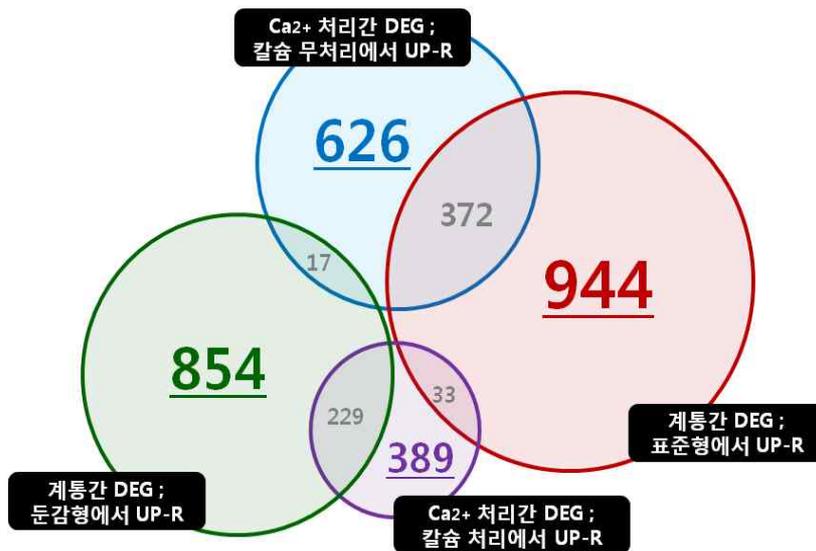


그림 4-23. 최종 선발된 DEG 후보군의 벤다이어그램

- ㉠ 칼슘 처리에 의한 DEG 1,666개와 계통 간의 DEG 2,449개 DEG 후보군을 이용하여 벤다이어그램을 작성함. Ca²⁺ 처리에 의해서만 유의한 발현량을 보이는 DEG 1,015개(칼슘 무처리에서 Up-regulation; 626, 칼슘 처리에서 Up-regulation; 389)와 계통 간 유의한 발현량을

보이는 DEG 1,798개(표준형 유묘에서 Up-regulation; 944, 둔감형 유묘에서 Up-regulation; 854)만을 선발하여 기능 분석을 수행함.

② 조건별 석회 결핍 생리 장애 관련 선발된 유전자군(DEG)의 Gene Ontology(GO) 및 SNP 분석을 통한 유용 유전자군 선발

- ㉠ David Gene Ontology Tool (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/tools.jsp>)을 이용하여 3가지 카테고리(Biological Process, Cellular Component, Molecular Function)로 분류함.
- ㉡ 석회 결핍 상황에서 [석회 결핍 생리 장애 둔감형 유묘 칼슘 처리구] vs [석회 결핍 생리 장애 둔감형 유묘 칼슘 무처리구] 간 선발된 DEG의 GO 분석 및 SNP 유무 검정

표 4-5. 칼슘 처리구/무처리구 간 DEG의 Functional category 정보 (Biological Process 2)

Category	Term	칼슘 무처리 Up	칼슘 처리 Up
GOTERM_BP_2	response to external stimulus	16	14
GOTERM_BP_2	cellular response to stimulus	-	35
GOTERM_BP_2	secondary metabolic process	29	-
GOTERM_BP_2	response to biotic stimulus	-	21
GOTERM_BP_2	response to endogenous stimulus	-	38
GOTERM_BP_2	regulation of biological quality	-	16
GOTERM_BP_2	response to abiotic stimulus	65	29
GOTERM_BP_2	pigment metabolic process	23	-
GOTERM_BP_2	regulation of biological process	-	66
GOTERM_BP_2	cellular homeostasis	14	-
GOTERM_BP_2	biosynthetic process	123	-
GOTERM_BP_2	oxidation reduction	64	-
GOTERM_BP_2	response to stress	77	58
GOTERM_BP_2	regulation of cellular process	-	65
GOTERM_BP_2	cellular metabolic process	211	-
GOTERM_BP_2	regulation of metabolic process	-	46
GOTERM_BP_2	response to chemical stimulus	-	65

표 4-6. 칼슘 처리구/무처리구 간 DEG의 Functional category 정보 (Cellular Component 2)

Category	Term	칼슘 무처리 Up	칼슘 처리 Up
GOTERM_CC_2	organelle membrane	65	-
GOTERM_CC_2	membrane-bounded organelle	296	-
GOTERM_CC_2	intracellular organelle	299	-
GOTERM_CC_2	intracellular part	311	-
GOTERM_CC_2	external encapsulating structure	-	26
GOTERM_CC_2	apoplast	16	14
GOTERM_CC_2	intracellular organelle part	147	-
GOTERM_CC_2	membrane part	-	56
GOTERM_CC_2	membrane	164	-
GOTERM_CC_2	organelle part	147	-
GOTERM_CC_2	intracellular	315	-
GOTERM_CC_2	organelle envelope	79	-

표 4-7. 칼슘 처리구/무처리구 간 DEG의 Functional category 정보 (Molecular Function 2)

Category	Term	칼슘 무처리 Up	칼슘 처리 Up
GOTERM_MF_2	oxidoreductase activity	73	33
GOTERM_MF_2	tetrapyrrole binding	20	-
GOTERM_MF_2	cofactor binding	22	-
GOTERM_MF_2	transcription factor activity	-	38
GOTERM_MF_2	oxygen binding	11	-
GOTERM_MF_2	ion binding	-	65
GOTERM_MF_2	lyase activity	16	-
GOTERM_MF_2	signal transducer activity	-	19
GOTERM_MF_2	transmembrane transporter activity	34	-

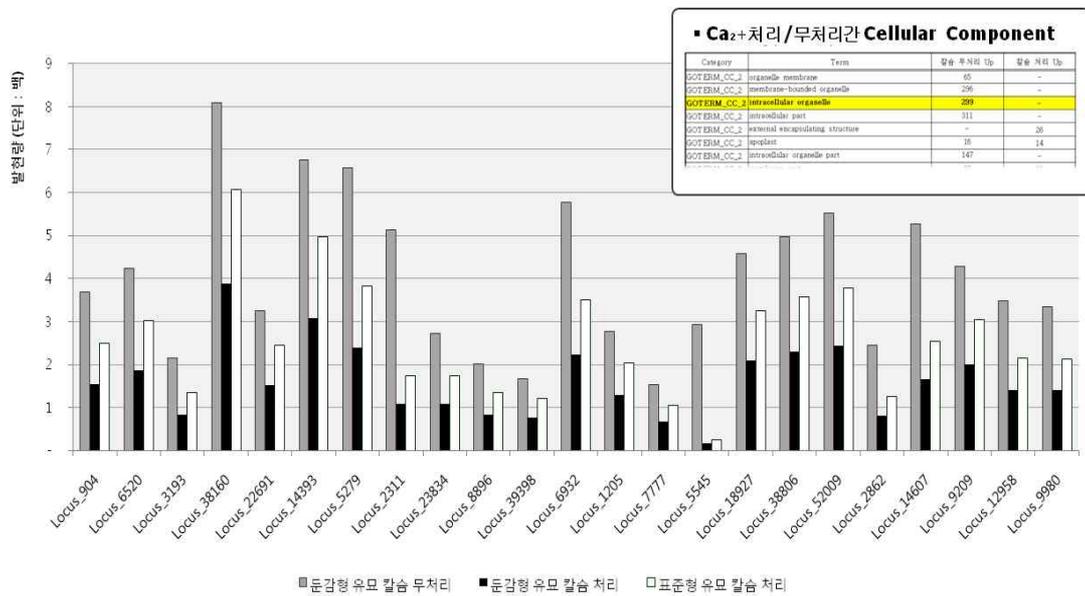


그림 4-24. 시료 별 Intracellular organelle(Cellular component) 관련 DEG의 발현량 비교 (일부 결과)

- ㄱ. 칼슘 처리에 의해 유의한 발현을 보이는 DEG 1,015개 중 intracellular organelle 관련 유전자의 발현량을 분석하여 위 그림과 같은 결과를 얻음. 칼슘을 처리한 둔감형 유묘와 표준형 유묘에 비해 칼슘을 처리하지 않은 둔감형 유묘가 큰 발현량을 보이며, 칼슘을 처리한 둔감형 유묘에 비해 표준형 유묘가 더 큰 발현량을 나타냄.
- ㄴ. BWA 및 Samtools 프로그램을 이용하여 비교 대상 간 SNP를 조사
- ㄷ. 칼슘 처리에 의해 유의한 발현을 보이는 DEG의 분자 표지 (molecular marker) 후보군 발굴을 위한 SNP 분석 결과, 아래 표와 같은 결과를 얻음.

표 4-8. 칼슘 처리구/무처리구 간 DEG에서 탐색된 SNP 정보

양배추 locus	SNP 개수	양배추 locus의 Functional Description
Locus_904	1	dual specificity protein phosphatase (DsPTP1) family protein
Locus_6520	-	rotein of unknown function (DUF399 and DUF3411)
Locus_3193	-	mitochondrial carrier protein, putative, expressed
Locus_38160	-	chloroplast signal recognition particle component (CAO)
Locus_22691	2	Ribosomal protein S10p/S20e family protein
Locus_14393	-	Peptidase M50 family protein
Locus_5279	5	myb-like HTH transcriptional regulator family protein
Locus_2311	-	Lycopene beta/epsilon cyclase protein
Locus_23834	-	dual specificity protein phosphatase (DsPTP1) family protein

Locus_8896	-	senescence-inducible chloroplast stay-green protein 1, putative, expressed
Locus_39398	1	dihydroflavonol 4-reductase
Locus_6932	3	bifunctional thioredoxin reductase/thioredoxin, putative expressed
Locus_1205	1	zinc finger protein 1
Locus_7777	9	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein
Locus_5545	-	myb domain protein 28
Locus_18927	-	pheophytinase
Locus_38806	10	cytochrome P450 97B2, putative, expressed
Locus_52009	-	acyltransferase, putative, expressed
Locus_2862	3	thylakoid lumenal 17.9 kDa protein, chloroplast
Locus_14607	-	Uncharacterised protein family (UPF0114)
Locus_9209	3	monogalactosyl diacylglycerol synthase 1
Locus_12958	1	SPA (suppressor of phyA-105) protein family
Locus_9980	3	proteinaceous RNase P 1

㉔ 석회 결핍 상황에서 [석회 결핍 생리 장애 둔감형 유묘 칼슘 처리구] vs [석회 결핍 생리 장애 표준형 유묘 칼슘 처리구] 간 선발된 DEG 의 GO 분석 및 SNP 유무 검정

표 4-9. 석회결핍 생리장애 둔감형과 표준형 간 DEG의 Functional category 정보 (Biological Process 2)

Category	Term	표준형 유묘 Up	둔감형 유묘 Up
GOTERM_BP_2	response to external stimulus	24	-
GOTERM_BP_2	negative regulation of biological process	21	-
GOTERM_BP_2	secondary metabolic process	0	30
GOTERM_BP_2	response to endogenous stimulus	43	42
GOTERM_BP_2	cellular response to stimulus	0	41
GOTERM_BP_2	regulation of biological quality	0	27
GOTERM_BP_2	oxidation reduction	0	48
GOTERM_BP_2	immune response	17	17
GOTERM_BP_2	cell death	0	16
GOTERM_BP_2	cell communication	11	-
GOTERM_BP_2	negative regulation of cellular process	13	-
GOTERM_BP_2	response to abiotic stimulus	50	51
GOTERM_BP_2	response to stress	102	99
GOTERM_BP_2	catabolic process	0	47
GOTERM_BP_2	response to biotic stimulus	0	41
GOTERM_BP_2	regulation of response to stimulus	16	-
GOTERM_BP_2	response to other organism	0	37
GOTERM_BP_2	response to chemical stimulus	80	83

표 4-20. 석회결핍 생리장애 둔감형과 표준형 간 DEG의 Functional category 정보 (Cellular Component 2)

Category	Term	표준형 유묘 Up	둔감형 유묘 Up
GOTERM_CC_2	apoplast	-	20
GOTERM_CC_2	intracellular part	350	-
GOTERM_CC_2	intracellular organelle	316	-
GOTERM_CC_2	external encapsulating structure	-	35
GOTERM_CC_2	intracellular organelle part	95	-
GOTERM_CC_2	membrane-bounded organelle	309	-
GOTERM_CC_2	membrane	-	185
GOTERM_CC_2	organelle part	95	-
GOTERM_CC_2	intracellular	356	-
GOTERM_CC_2	membrane part	-	109

표 4-21. 석회결핍 생리장애 둔감형과 표준형 간 DEG의 Functional category 정보 (Molecular Function 2)

Category	Term	표준형 유묘 Up	둔감형 유묘 Up
GOTERM_MF_2	oxidoreductase activity	-	61
GOTERM_MF_2	tetrapyrrole binding	-	22
GOTERM_MF_2	lipid binding	-	14
GOTERM_MF_2	oxygen binding	-	13
GOTERM_MF_2	ion binding	-	135
GOTERM_MF_2	protein binding	132	-

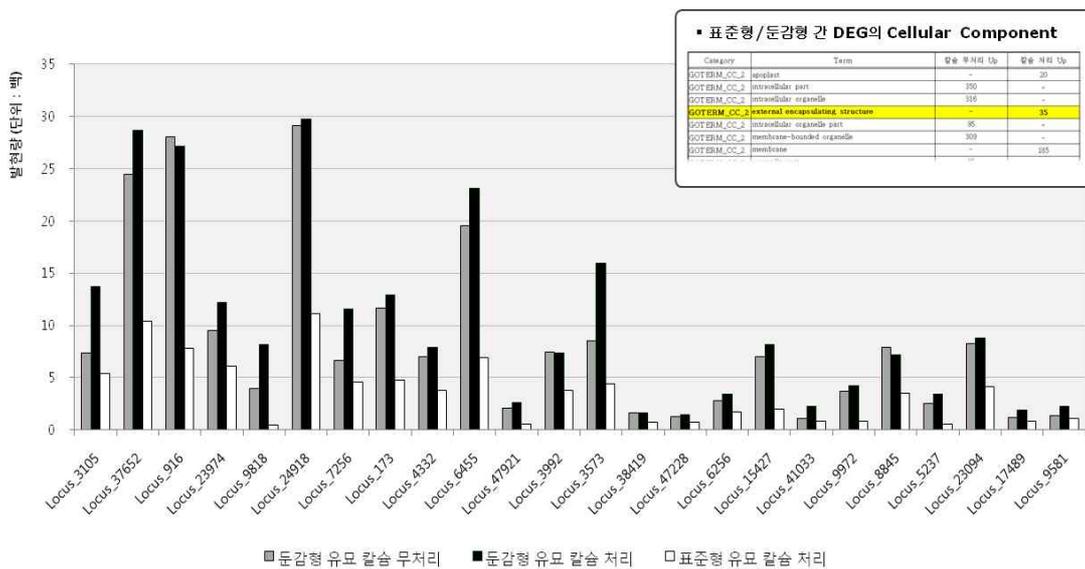


그림 4-25. 시료 별 External encapsulating structure (Cellular component) 관련 DEG의 발현량 비교 (일부 데이터)

- ㄱ. 계통 간 유의한 발현을 보이는 DEG 1,798개 중 external encapsulating structure 관련 유전자의 발현량을 분석하여 아래 그림과 같은 결과를 얻음. 전반적으로 칼슘결핍에 둔감한 둔감형 유묘가 표준형에 비해 유묘에 비해 큰 발현량을 보임. 그리고 칼슘 처리에 의해 영향을 받지 않는 유전자와 발현차이를 보이는 유전자를 존재함을 확인함.
- ㄴ. BWA 및 Samtools 프로그램을 이용하여 비교대상 간 SNP를 조사
- ㄷ. 석회 결핍 생리 장애 둔감형과 표준형 시료 간 DEG에서 분자표지 (molecular marker) 후보군 발굴을 위한 SNP 분석 결과, 아래 표와 같은 결과를 얻음.

표 4-22. 석회결핍 생리장애 둔감형과 표준형 간 DEG에서 탐색된 SNP 정보

양배추 locus	SNP 개수	양배추 locus의 Functional Description
Locus_3105	-	DnaK family protein, putative, expressed
Locus_37652	-	alpha-xylosidase 1
Locus_96	-	Os1bglu1 - beta-mannosidase/glucosidase homologue, expressed
Locus_23974	2	S-adenosylmethionine synthetase 1
Locus_9818	18	HEAT SHOCK PROTEIN 89.1
Locus_24918	-	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 24
Locus_7256	9	heat shock protein, putative, expressed
Locus_173	1	Peroxidase superfamily protein
Locus_4332	-	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 9
Locus_6455	3	Eukaryotic aspartyl protease family protein
Locus_47921	-	Endomembrane protein 70 protein family
Locus_3992	-	glycosyl hydrolases family 16 protein, protein, expressed
Locus_3573	3	Glycosyl hydrolase family protein with chitinase insertion domain
Locus_38419	-	Ribosomal protein L4/L1 family
Locus_47228	4	Endomembrane protein 70 protein family
Locus_6256	31	formin homology5
Locus_15427	6	Eukaryotic aspartyl protease family protein
Locus_41033	-	mitochondrial HSO70 2
Locus_9972	8	expansin precursor, putative, expressed
Locus_8845	2	thaumatin, putative, expressed
Locus_5237	12	Os1bglu1 - beta-mannosidase/glucosidase homologue, expressed
Locus_23094	5	Plant L-ascorbate oxidase
Locus_17489	-	germin-like protein 5
Locus_9581	25	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein

㉔ 문헌정보 기반 석회 결핍 생리 장애 관련 유전자 분석

ㄱ. 칼슘 이온 이동(transporter) 관련 유전자의 발현량 분석

1. 문헌조사를 통하여 Ca^{2+} transporter에 해당하는 TAIR 유전자 86개를 수집함.
2. BLASTX를 이용하여 수집한 86개 TAIR 유전자와 연결되는 양배추 표준 유전자 선발 및 발현량 분석

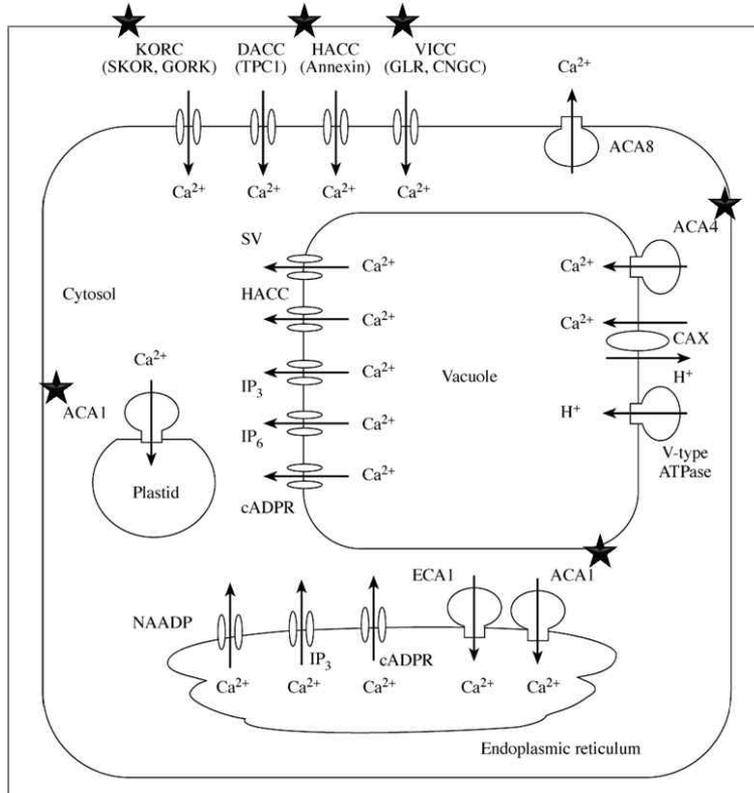


그림 4-26. 애기장대 Ca^{2+} transporter의 subcellular localization (출처 : The subcellular location of Ca^{2+} transporters in *Arabidopsis thaliana*. Ann Bot 2003;92:487-511)

3. 문헌을 통해 찾은 애기장대 Ca^{2+} transporter의 channels 관련 유전자 58개와 ATPase & antiporter 관련 유전자 28개를 양배추 유전자의 발현량을 분석함. 그 결과 Channels 관련 유전자와 ATPase and antiporters 관련 유전자의 발현양상이 다르게 나타남을 확인함.

ㄴ. Channel 관련 유전자의 발현량 분석: Channels 관련 유전자의 발현은 둔감형 칼슘 무처리 샘플이 칼슘처리 샘플에 비해 Up-regulation(붉은색) 되었고, 둔감형 양배추에 비해 표준형 양배

추 샘플에서 보다 많은 유전자가 Up-regulation 됨. ATPase and antiporters 관련 유전자의 발현은 둔감형 갈습 처리 샘플에서 Up-regulation 되었고, 표준형에 비해 둔감형 갈습 처리 샘플에서 보다 많은 유전자가 down-regulation(푸른색) 됨. 샘플 간 유의하게 발현되는 유전자 중 SNP 발생 여부를 조사함.

Other names	GO Cellular Component	Locus	length	cabbage	length	C - I	read count			2 fold change		SNP
							둔감형 유묘 갈습	둔감형 유묘 갈습	표준형 유묘 갈습	둔감형 유묘 갈습 / 표준형 유묘 갈습	표준형 유묘 갈습 / 둔감형 유묘 갈습	
hyperpolarization-activated Ca²⁺ channels :HACC												
ANNEXIN 1	located in apoplast, cell wall, chloroplast, chloroplast stroma, cytosol, membrane, mitochondrion, nucleus, plasma membrane, plasmodesma, thylakoid, vacuolar membrane, vacuole	AT1G35720	318	Locus_759_Transcript_19/39_Confidence_0.000_Length_2220	317	1	6113	3577	3593	0.77	0.01	32
ANNEXIN 4	cell surface, chloroplast, plasmodesma	AT2G38750	320	Locus_9223_Transcript_6/8_Confidence_0.000_Length_1268	299	21	879	621	220	0.50	-1.50	
voltage-insensitive cation channels :VICC												
GLR												
GLR2.5	membrane	AT5G11210	830	Locus_40129_Transcript_4/6_Confidence_0.000_Length_2639	842	-12	190	93	115	1.03	0.30	
GLR3.1; GLR2	extracellular region, membrane	AT2G17260	952	Locus_9465_Transcript_1/1_Confidence_1.000_Length_3215	912	40	184	88	82	1.07	-0.10	12
GLR3.5; GLR6	integral to membrane, membrane, plasma membrane	AT2G32390	896	Locus_39077_Transcript_5/7_Confidence_0.000_Length_3335	886	10	327	196	388	0.74	0.98	
CNGC												
CNGC2,DND1	plasma membrane	AT5G15410	727	Locus_3343_Transcript_3/10_Confidence_0.000_Length_3569	716	11	1181	259	1370	2.19	2.41	5
CNGC3	membrane, plasma membrane	AT2G46430	707	Locus_9925_Transcript_4/8_Confidence_0.000_Length_2348	703	4	208	204	425	0.03	1.06	16
CNGC4,DND2,HLM1	membrane, plasma membrane	AT5G54250	695	Locus_12051_Transcript_4/4_Confidence_0.000_Length_2343	696	-1	374	113	133	1.73	0.23	
CNGC19	chloroplast, membrane	AT3G17690	730	Locus_11502_Transcript_2/2_Confidence_0.000_Length_2382	743	-13	50	286	36	-2.53	-2.99	13
Ca²⁺-permeable outward rectifying K⁺ channels :KORC,												
AKT2, AKT2/3, AKT3, KT2/3, POTASSIUM TRANSPORT 2/3	membrane, plasmodesma	AT4G22200	803	Locus_1561_Transcript_4/11_Confidence_0.000_Length_2543	772	31	858	199	175	2.11	-0.18	
SKOR	membrane, nucleus	AT3G02850	829	Locus_4283_Transcript_2/2_Confidence_1.000_Length_3834	829	0	155	56	127	1.47	1.18	1

그림 4-27. Ca²⁺ 수송 channel 관련 유전자의 발현량 분석

Ca3+-ATPases_P-type ATPases/ P2B ATPases/Ca											
Protein Name	Sub-localization	Arabidopsis Genome Initiative Name	length	cabbage	length	read count			2 fold change		SNP
						둔감형 유무 / 칼슘	둔감형 유무 / 칼슘	표준형 유무 / 칼슘	둔감형 유무 / 칼슘	표준형 유무 / 칼슘	
ACA1/PEA1	chloroplast inner membrane, endoplasmic reticulum, membrane, plasma membrane	AT1G27770	1021	Locus_11446_Transcript_10/10_Confidence_0.000_Length_3887	985	418	864	691	-1.05	-0.32	
ACA4	chloroplast, membrane, plant-type vacuole, plant-type vacuole membrane, vacuolar membrane, vacuole	AT2G41560	1031	Locus_1906_Transcript_12/16_Confidence_0.000_Length_3592	994	1350	1259	2465	0.10	0.97	12
ACA10	membrane, plasma membrane, plasmodesma	AT4G29900	1070	Locus_5940_Transcript_15/29_Confidence_0.000_Length_3885	1072	1060	2119	1298	-1.00	-0.71	3
ACA11	Golgi apparatus, chloroplast, plant-type vacuole membrane, plasma membrane, vacuolar membrane, vacuole	AT3G57330	1026	Locus_24106_Transcript_5/5_Confidence_0.000_Length_3299	1025	394	1164	583	-1.56	-1.00	7
ACA12	membrane	AT3G63380	1034	Locus_3589_Transcript_5/10_Confidence_0.000_Length_3900	1033	107	351	185	-1.72	-0.93	
Ca2+/cation antiporters(CaCAs)_Front Plant Sci. 2012; 3: 1. Published online 2012 January 13.											
Alternative/ published name	Sub-localization	Arabidopsis Genome Initiative Name	length	cabbage	length	read count			2 fold change		SNP
						둔감형 유무 / 칼슘	둔감형 유무 / 칼슘	표준형 유무 / 칼슘	둔감형 유무 / 칼슘	표준형 유무 / 칼슘	
AtCCX1 (AtCAX7)	integral to membrane	AT5G17860	571	Locus_5564_Transcript_5/6_Confidence_0.000_Length_2062	575	77	128	40	-0.74	-1.68	3
AtCCX2 (AtCAX8)	integral to membrane	AT5G17850	560	Locus_15178_Transcript_3/3_Confidence_0.000_Length_1918	541	16	45	58	-1.49	0.37	
AtCCX5 (AtCAX11)	integral to membrane, nuclear periphery, plasma membrane	AT1G08960	547	Locus_5564_Transcript_4/6_Confidence_0.000_Length_2062	575	68	119	45	-0.81	-1.42	3
AtCAX1	chloroplast, integral to membrane, membrane, plant-type vacuole membrane, vacuolar membrane, vacuole	AT2G38170	464	Locus_22686_Transcript_5/17_Confidence_0.000_Length_1467	439	520	1831	1294	-1.82	-0.50	0
AtCAX3	integral to membrane, plant-type vacuole membrane, vacuolar membrane, vacuole	AT3G51860	460	Locus_8033_Transcript_5/7_Confidence_0.000_Length_1796	461	242	465	230	-0.94	-1.02	12
AtEFCAX2	extracellular region, vacuole	AT1G29020	565	Locus_9962_Transcript_2/4_Confidence_0.000_Length_2057	584	104	37	4	-1.49	-3.21	0

그림 4-28. Ca²⁺ ATPase and transporter 관련 유전자의 발현량 분석

③ 전사체 비교분석을 통한 내서성 저항성 후보 유전자군 선발

㉞ 내서성에 대한 저항성 양배추 품종 ('HO') 과 민감성 양배추 품종 ('JK') 간의 마이크로어레이 분석

㉟. Genechip 분석 개요

1. 내서성에 강한 저항성 품종과 약한 민감성 품종을 선정하고 두 품종의 heat stress 에 따른 다른 발현 양상을 나타내는 유전자들을 후보 유전자군으로 선발하였다. 유전자군을 선별하기 위하여 Agilent 사의 Brassica GE 2 x 105k probe Chip을 사용하였다 (그림 4-29).

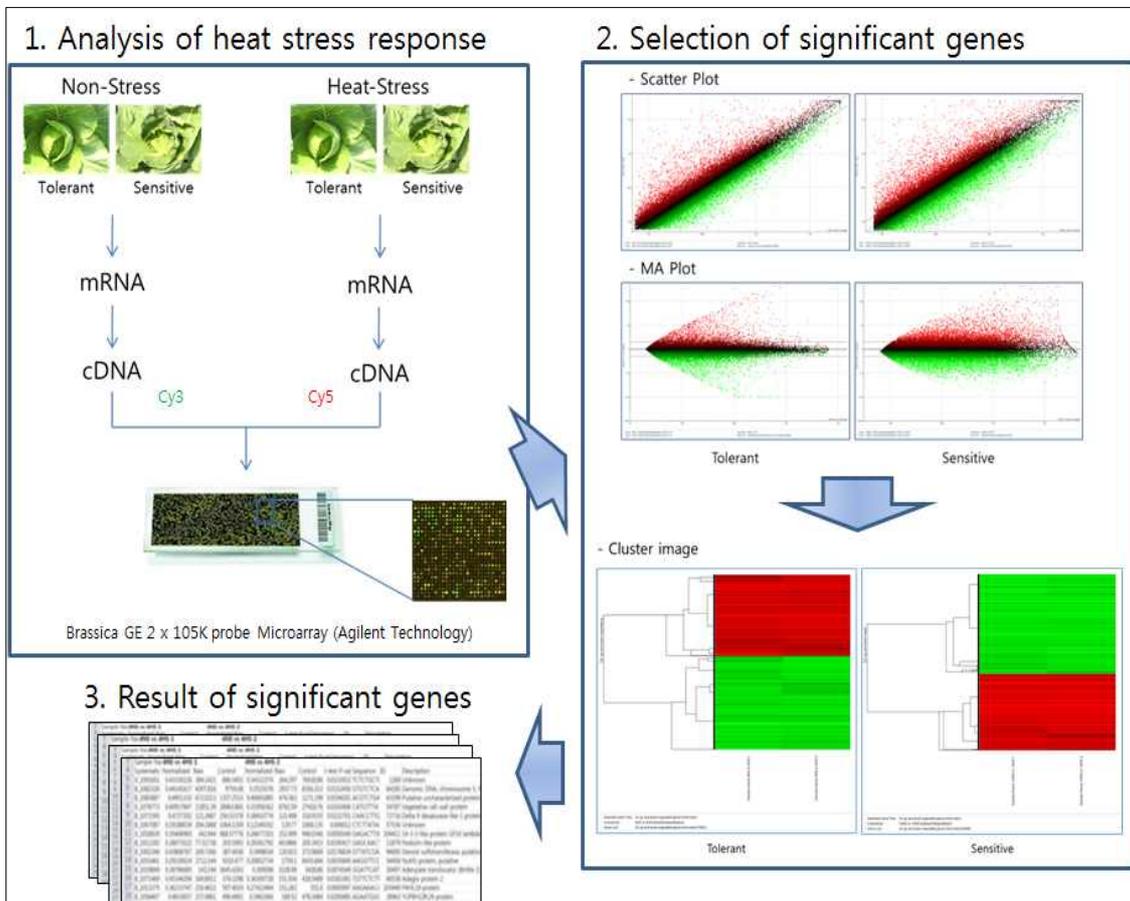


그림 4-29. 내서성 형질간 후보유전자 선발 방법의 전체 개요

㊱. Genechip 분석 결과

1. Genechip 데이터에 대한 정보는 위의 표 3과 같다. 주요한 발현 양상의 차이를 보이는 유전자들은 2반복을 통해서 선정되었고, 두 실험간의 반복에 대한 신뢰도를 확인하기 위하여 t-test를 수행하여 검정되어다 ($p \leq 0.05$). 또한 Scatter plot과 MA plot을 통하여 probe들의 signal intensity 값을 통하여 민감성과 저항성 각각의 heat stress 처리 전과 후의 발현차이가 2배 이상

- 나는 유전자들만을 주요한 유전자로 선발 하였다 (그림 4-30).
2. 예로 4NS vs 4HS 의 normalized된 데이터의 Systematic의 수는 91,854개 (103,748개) 전체이며 이 때, 4 line(저항성) 유전자의 발현이 2배 이상 증가된 Systematic의 수는 3,579개, 2배 이상 감소된 Systematic의 수는 4,112개로 확인이 되었다.
 3. 또한 10 line(민감성) 유전자의 발현이 2배 이상 증가된 Systematic의 수는 3,518개이며, 2배 이상 감소된 Systematic의 수는 4,580개로 나타났다.
 4. 저항성과 민감성 품종에서 heat stress 처리에 발현차이를 보이는 저항성 heat response 유전자는 7,691개, 민감성 유전자는 8,098 개 였다. 공통된 유전자들이 많이 확인 되었으며, up-regulate 된 유전자 중 두 품종 공통으로 확인된 유전자는 2412개로 확인 되었으며, down-regulate 된 유전자 중 두 품종 공통으로 확인 된 유전자는 3193개로 확인되었다.

표 4-23. 전체 Microarray Data의 통계치

No	Name	Normalized data	# of Systematics	
			Up-regulated genes	Down-regulated genes
1	4NS vs 4HS	91,854	3,579	4,112
2	10NS vs 10HS	91,854	3,518	4,580

* **4-NS** : heat stress 저항성 계통 ('HO') 무처리, **10-NS** : heat stress 민감성 계통 ('JK') 무처리, **4-HS** : heat stress 저항성 계통 heat stress 처리, **10-HS** : heat stress 민감성 계통 heat stress 처리

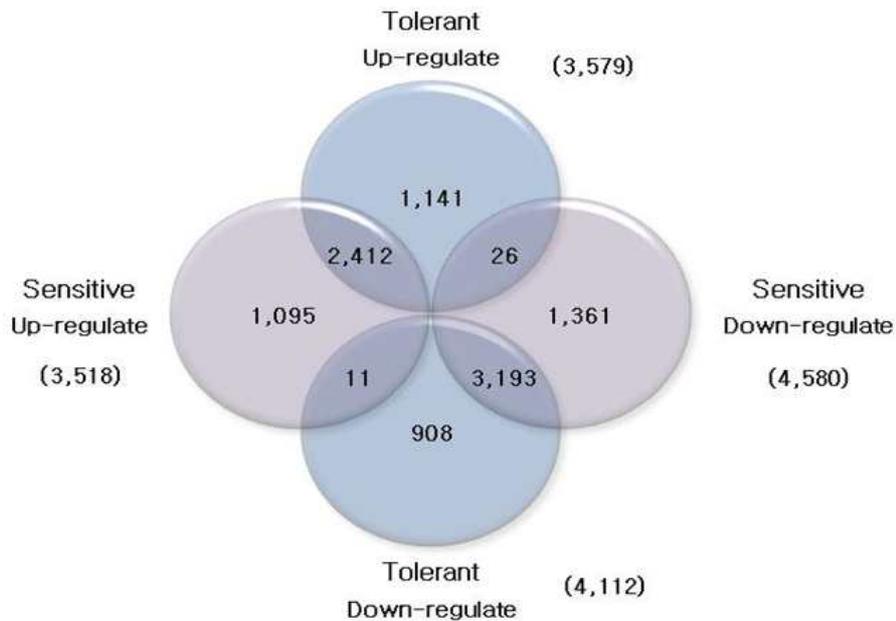


그림 4-30. 저항성과 민감성 품종간 중요한 차이를 보이는 유전자들의 밴다이어그램 분석

ㄷ. 내서성에 계통 간 GO 분석

1. 두 품종 각각의 유전자들을 agriGO 웹 툴을 이용하여 GO enrichment 분석을 수행 하였다. 먼저 4배 이상의 발현변화를 나타내는 양배추 유전자를 선별하고, Arabidopsis gene (TAIR10) 정보를 이용 annotation하였다. AgriGO 에서 제공하는 Gene Ontology flash chart를 사용하여 그래프로 나타내었다 (그림 4-31).
2. Gene Ontology의 정보는 agriGO의 분류에 따라 Biological Process(BP), Cellular Component (CC), Molecular Function (MF) 정보로 구분하였고, Thresholds는 기능별 유전자 count가 최소 2 이상, Benjamini ≤ 0.1 을 적용하였다.
3. 양배추 두 라인의 유전자들은 normal condition에 비해 heat stress 에서 significant한 차이를 보이는 것들에 화살표로 표시 하여 나타내었으며, up-regulation에서는 주로 response to stimulus, signaling process, regulation of biological process, transcription regulator activity에서 두드러진 차이를 나타내었으며, down-regulation에서는 주로 cellular component organization, reproductive process, development process, membrane-enclosed luman, macromolecular complex, organelle

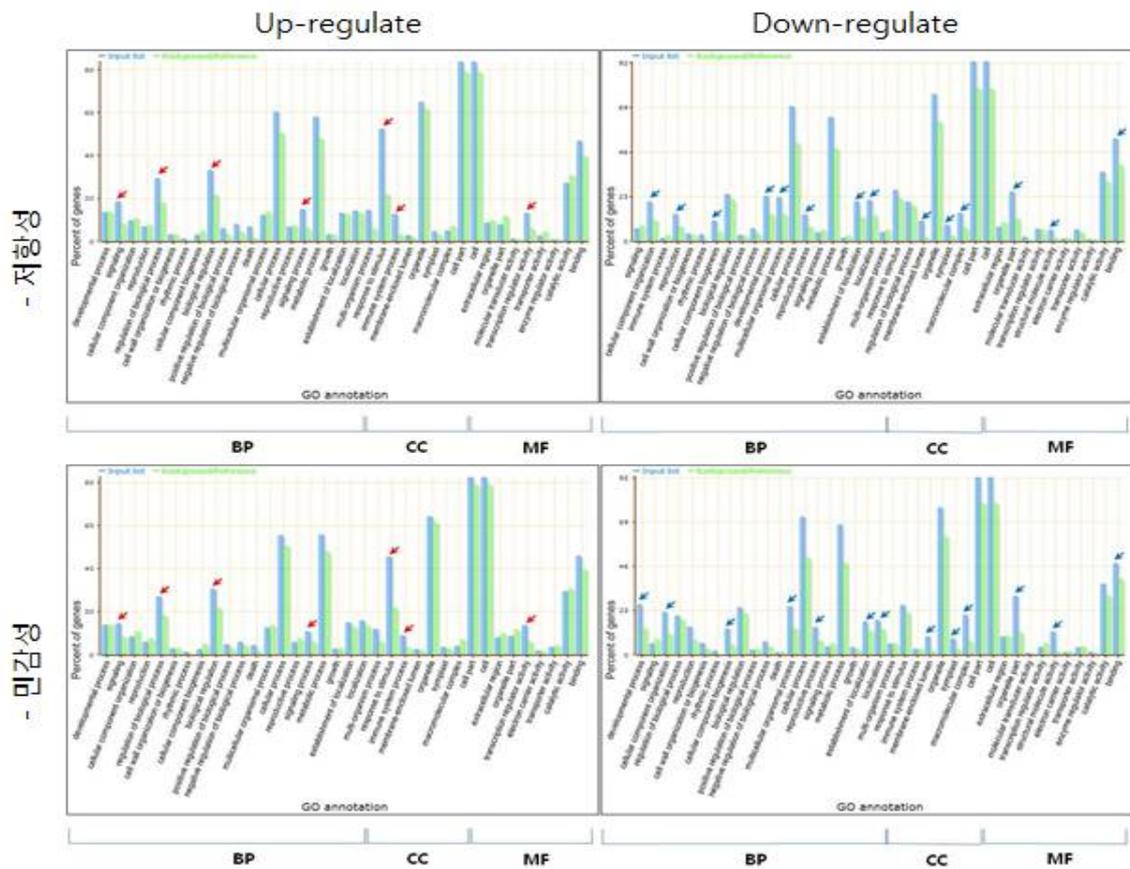
part, structural molecular activity, binding에서 두드러진 enrichment를 나타내었다.

4. 두 양배추 라인에서 heat stress response하는 유전자들의 차이는 크게 나타나지 않았다 (그림 4-32).

ㄷ. 내서성 계통 간 고온 스트레스 반응 GO 비교 분석

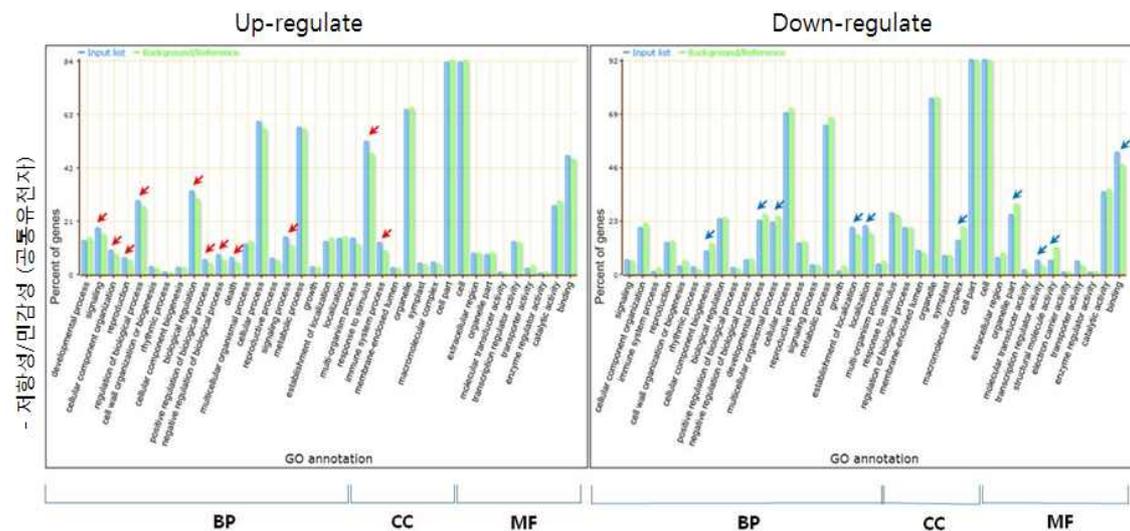
1. 같은 GO 카테고리에서 저항성과 민감성 line간 차이를 나타내는 것들을 화살표를 이용하여 나타내었다. up-regulated 카테고리는 response to stimulus, signaling process, biological regulation 등에서 민감성 line이 높은 경향을 나타내었으며, down-regulated 된 카테고리는 cellular component biogenesis, reproductive process, organelle part, structural molecule activity등에서 민감성 line이 높은 경향을 나타내었다.

2. 결과적으로 저항성 품종은 민감성 품종에 비해 response to stimulus 중에서도 response to heat에서 significant한 차이를 보였으며, transcription regulation active에서도 유의한 차이를 나타내었다. 그래서 주요한 차이를 나타내는 두 카테고리에서 확인된 유전자들에 대해 두 품종간의 heat stress에 대한 반응의 차이를 확인 하였다. 이 유전자들이 저항성 품종과 감수성 품종을 구분하는데 유익한 정보를 제공 할 것으로 생각된다.



※ BP : Biological Process, CC : Cellulose Component, MF : Molecular Function
 $FC \geq 2$ and $FC \leq -2$ ($p \leq 0.05$)

그림 4-31. 내서성 저항성과 민감성 계통에 대한 GO 분석



※ BP : Biological Process, CC : Cellulose Component, MF : Molecular Function
 $FC \geq 2$ and $FC \leq -2$ ($p \leq 0.05$)

그림 4-32. Heat stress에 반응하는 내서성 계통 간 유전자에 대한 GO 분석
 □. 내서성 계통 간 heat stress 반응에 대한 기능적 차이에 대한 비교

분석

1. Mapman 분석

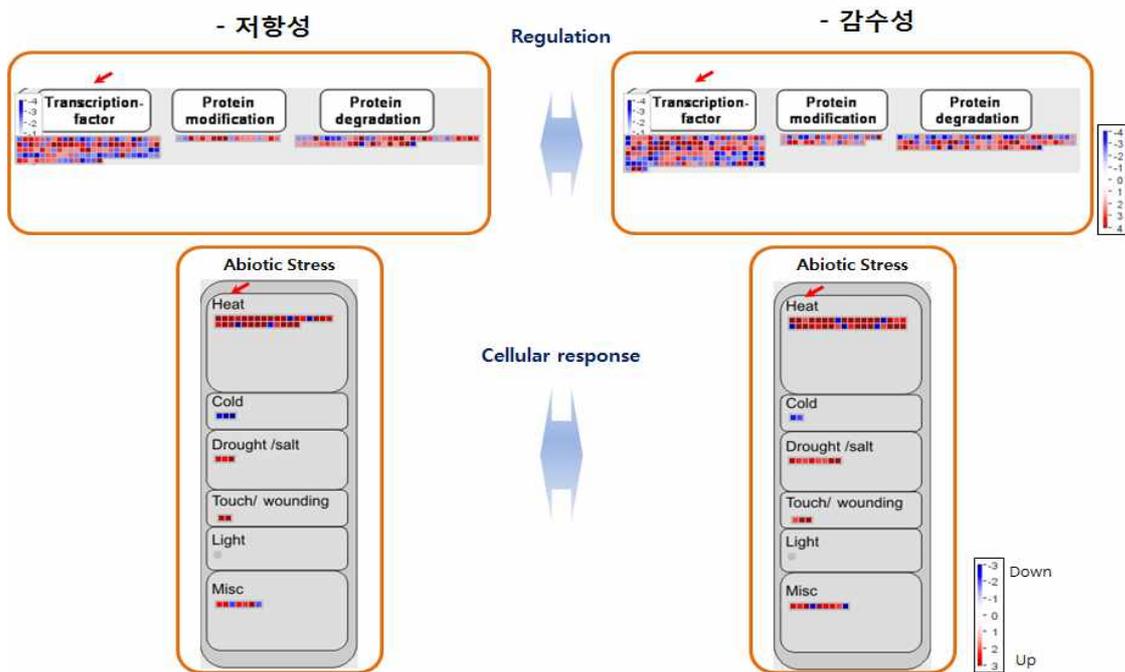


그림 4-33. 내서성 계통 간 MapMan을 통한 heat stress 반응에 대한 유전자들의 비교 분석

2. GO 분석에서 중요한 차이를 보였던 유전자들에 대한 두 양배추 품종에서 기능적 분류를 MapMan을 통해 분석하였다. 잘 알려져 있듯이, 식물의 heat stress 관련 major Heat-responsive genes인 Heat shock proteins (HSPs)과 Heat-stress transcription factors (Hsf)들에서 두 양배추 품종 간의 차이를 보이는 유전자들 비교하였다 (그림 4-34).

ㄴ. MapMan에 의한 고온 스트레스 관련 후보유전자 탐색

1. 그림에서는 발현 값과 유전자 정보를 그래픽으로 보여주며, 색깔을 가지는 각각의 작은 네모칸이 하나의 유전자를 나타낸다. 그 상세한 정보는 아래에 설명되어있으며, 표 4-24과 25에 나타내었다.

2. 두 양배추 계통에 대한 기능적 분류에서 heat-stress response에 주요한 차이를 나타내는 HSP들의 연관 유전자를 비교 분석하였다. 즉, Heat shock protein 관련 유전자들을 DNA chip으로부터 분류 하였으며, 저항성과 민감성 각각의 heat stress에서 4배 이상의 뚜렷한 차이를 나타내는 유전자들을 선별하여 정리하였다. 주황색의 background가 저항성에서 더 높은 발현을 나타내

는 유전자들이며, 연두색의 background가 민감성에서 더 높은 발현을 나타내는 유전자들로 확인되었다. 대부분의 HSP들이 up-regulate로 나타났으며, down-regulate는 2개의 유전자만이 확인되었다.

3. 두 양배추 계통에 대한 기능적 분류에서 heat-stress responsive에 주요한 차이를 나타내는 Hsf들의 연관 유전자들을 비교 분석하였다. heat responsive transcription factor 관련 유전자들이 많이 확인 되었으며, 특히 heat stress transcription factor들과 연관된 유전자만을 선별하여 정리하였다. 주황색의 background가 저항성에서 더 높은 발현을 나타내는 유전자들이며, 연두색의 background가 민감성에서 더 높은 발현을 나타내는 유전자들이었다. 모든 Hsf들이 up-regulate로 나타났으며, 4배 이상의 결과에서는 down-regulate 되는 유전자는 없었다.

표 4-24. 내서성 계통 간 HSPs 연관 유전자들의 발현비교

Classification	ProbeName	TAIR_ID	Description	HO	JK	
				(HS/NS)	(HS/NS)	
				FC	FC	
Up-regulate						
hsp100	B_1084558	AT1G74310	Clp/Hsp100 (Heat shock protein 101)	7.90	6.90	
	B_1078483	AT1G74310	Clp/Hsp100 (Heat shock protein 101)	6.07	5.96	
	X_1024246	AT1G74310	Clp/Hsp100 (Heat shock protein 101)	3.00	2.77	
	B_1047985	AT1G74310	Clp/Hsp100 (Heat shock protein 101)	7.05	7.12	
	B_1045948	AT5G15450	ClpB heat shock protein-like	4.20	5.17	
	B_1026871	AT5G15450	ClpB heat shock protein-like	3.81	4.10	
hsp70	B_1058880	AT1G16030	HSP70b (Heat shock protein Hsp70)	5.28	5.94	
	B_1067101	AT2G32120	HSP70T-2 (70 kD heat shock protein)	3.61	4.11	
	B_1048388	AT3G12580	HSP70 (70 kDa heat shock protein)	7.11	7.08	
	B_1047992	AT3G12580	HSP70 (Heat shock protein 70)	6.51	6.75	
	B_1071737	AT4G24280	CPHSC70-1 (Chloroplast HSP70)	2.57	2.52	
	B_1020203	AT4G24280	CPHSC70-1 (Hsp 70-like protein)	2.47	2.09	
	X_1034152	AT5G02500	HSC70-1 (Heat shock cognate 70 kDa protein 1)	3.29	2.33	
	B_1085663	AT5G02500	HSC70-1 (Heat shock cognate protein 70)	2.25	-	
	B_1051923	AT5G09590	HSC70-5 (Heat shock protein 70)	4.58	4.24	
	B_1002974	AT5G09590	HSC70-5 (Heat shock protein 70)	3.13	2.69	
	B_1001993	AT5G09590	HSC70-5 (Heat shock protein 70)	2.63	2.44	
	hsp90	B_1046678	AT5G52640	Heat shock protein 81-1	5.53	5.88
		B_1060380	AT5G56030	Heat shock protein 81-2	4.41	4.32
shsp	B_1022192	AT3G17350	17.5 kDa class I heat shock protein	3.58	3.36	
	X_1001732	AT5G12020	17.6 kDa class II heat shock protein	6.51	6.72	
	X_1077107	AT5G12020	17.6 kDa class II heat shock protein	6.29	6.18	
	X_1084898	AT5G12030	17.6 kDa class II heat shock protein	5.61	6.11	
	B_1055398	AT5G59720	Hsp18.2 (Heat shock protein 18)	7.72	8.61	
	X_1064115	AT5G59720	Hsp18.2 (Heat shock protein 18)	7.12	6.92	
	B_1071667	AT5G59720	Hsp18.2 (Heat shock protein 18)	6.53	8.62	
	B_1052943	AT4G27670	Putative heat shock protein 21	8.50	8.66	
	B_1001981	AT4G10250	22.0 kDa class IV heat shock protein precursor	6.67	6.78	
	B_1047320	AT4G10250	AtHSP22.0 precursor	9.17	9.08	

	B_1056315	AT4G25200	Heat shock 22 kDa protein, mitochondrial precursor	6.57	6.66
	B_1015145	AT5G51440	Mitochondrial heat shock 22 kd protein-like	2.29	2.13
	B_1050062	AT5G51440	Mitochondrial heat shock 22 kd protein-like	2.13	2.09
	B_1082795	AT2G19310	Putative small heat shock protein	4.79	4.50
	B_1033013	AT2G29500	Cytosolic class I small heat shock protein 3B	5.11	5.00
	B_1055192	AT2G29500	Putative small heat shock protein	3.26	2.85
unclassified	B_1081966	AT1G54050	Heat-shock protein, putative	5.74	6.07
	B_1066881	AT2G20560	Putative heat shock protein	6.78	6.45
	B_1013334	AT2G35330	Putative heat shock protein	2.65	3.34
Down-regulate					
hsp70	B_1050323	AT4G37910	Heat shock protein 70 like protein	-3.07	-3.31
	B_1054152	AT4G37910	Heat shock protein 70 like protein	-3.05	-2.98

표 4-25. 내서성 계통 간 HSFs 연관 유전자들의 발현비교

Classification	ProbeName	TAIR_ID	Description	HO (HS/NS)	JK (HS/NS)
				FC	FC
Up-regulate					
	B_1065889	AT2G26150	HsfA2 (Heat stress transcription factor A-2)	6.39	6.09
	B_1018750	AT2G26150	HsfA2 (Heat stress transcription factor A-2)	6.04	6.37
	B_1004068	AT2G26150	HsfA2 (Heat stress transcription factor A-2)	5.52	5.01
	B_1019012	AT3G51910	HsfA7a (Heat stress transcription factor A-7a)	2.99	4.62
	B_1024396	AT3G51910	HsfA7a (Heat stress transcription factor A-7a)	5.79	5.50
	B_1023370	AT3G51910	HsfA7a (Heat stress transcription factor A-7a)	4.49	5.31
	X_1078901	AT3G51910	HsfA7a (Heat stress transcription factor A-7a)	4.53	4.83
	X_1062243	AT4G36990	HsfB1 (Heat stress transcription factor B-1)	4.28	3.79
	B_1066120	AT4G11660	HsfB2b (Heat stress transcription factor B-2b)	3.62	5.42
	B_1050506	AT4G11660	HsfB2b (Heat stress transcription factor B-2b)	4.92	5.16
	X_1043486	AT3G24520	HsfC1 (Heat stress transcription factor C-1)	3.84	3.69

다. 배추좀나방 저항성 관련 대사체 확보

① 배추좀나방 저항성, 감수성 양배추의 대사체 수준 비교

㉠ FT-IR 스펙트럼 데이터의 대사체 수준 비교 분석하여 저항성계통과 감수성계통, F1간의 차이가 큰 대사체군 선발하였음 (그림 4-34).

㉡. 그림 4-34의 A(absorbance) 결과를 보면 저항성 계통(P1)과 감수성 계통(P2)의 구분이 가능한 것으로 보임.

㉢. 그림 4-34의 B(PCA plot) 결과를 보면 더 명확하게 P1과 P2가 그룹이 되어 있으며 F1의 구분이 가능한 것으로 보임. 총 PC 값은 29.6%로 다소 낮았으나 저항성 형질이 저항성 계통과 감수성 계통이 혼재할 때는 가식정도(좀나방 피해정도)가 표현형에서 현저하게 차이가 있으나 저항성 계통만 있을 경우 저항성 계통도 가식함으로 인해 완전저항성이라기 보다는 부분저항성으로 이해하고 있음. 그

럼에도 불구하고 대사체에서 차이가 있고 구분이 가능하다는 결과는 매우 고무적임. 차이를 구분하기에는 PC1의 결과가 더 크게 작용한 것으로 나타남.

- ㄷ. 그림 4-34의 C (Loading value)결과를 보면 FT-IR 스펙트럼의 전체적인 부위에서 대사체 변화가 크게 이루어지고 있으며 특히 FT-IR 스펙트럼 1000-1200 cm^{-1} , 1300-1500 cm^{-1} 및 1600-1700 cm^{-1} 부위에서 변화가 이루어짐. 이들 영역은 carbohydrate, phenolic compounds 및 amide 계열의 물질들을 감지할 수 있는 파장으로 이들 물질들의 조성이 차이가 있다는 것을 의미하는 것임.
- ㄹ. P1과 P2가 서로 다른 그룹을 형성하고 있고 F1이 중간에 위치하는 것을 볼 수 있어 이들 시료간의 차이를 구별 할 수 있을 것으로 판단됨.
- ㅁ. 배추좁나방 저항성 형질을 가지고 있는 양배추 저항성계통과 감수성 계통 및 F1을 이용하여 분석한 FT-IR 스펙트럼 데이터의 차이로 계통수를 그려 유사도를 검정한 결과에서도 3가지의 시료를 구분할 수 있음을 확인하였음 (그림 4-34, 그림 4-35).

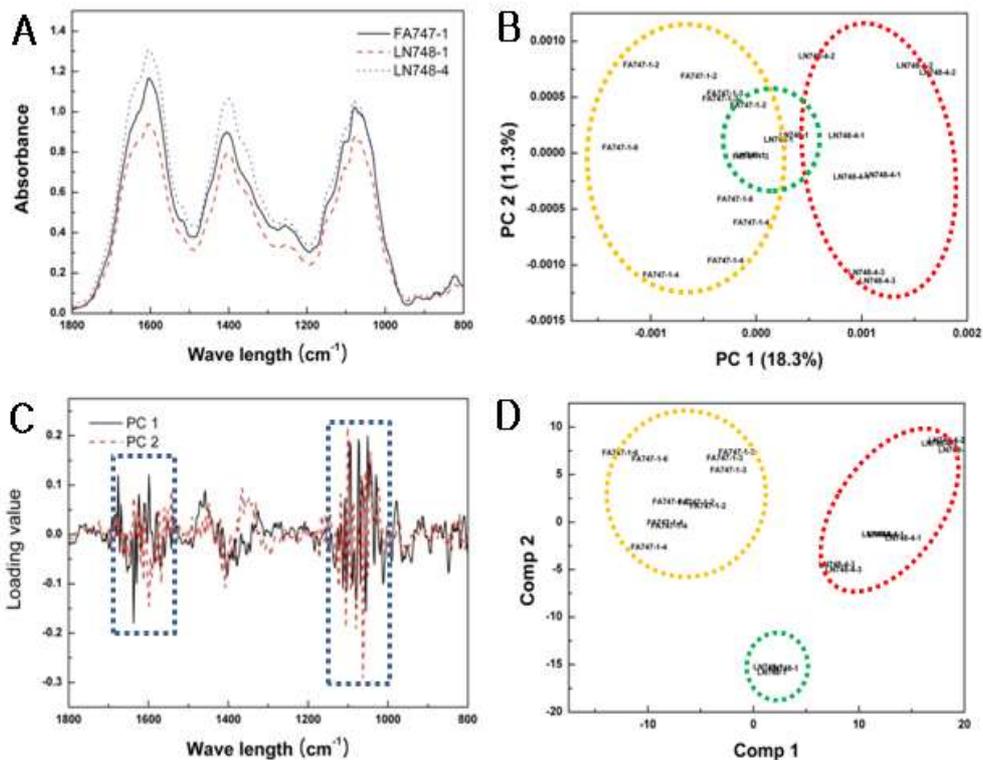


그림 4-34. 배추좁나방 저항성 형질을 가지고 있는 양배추 DS계통과 감수성 형질의 CT계통 및 F1를 이용하여 FT-IR 스펙트럼 데이터의 대사체 수준 비교 (Control).

A : absorbance, B : PCA plot, C : Loading value, D : PLS-DA plot

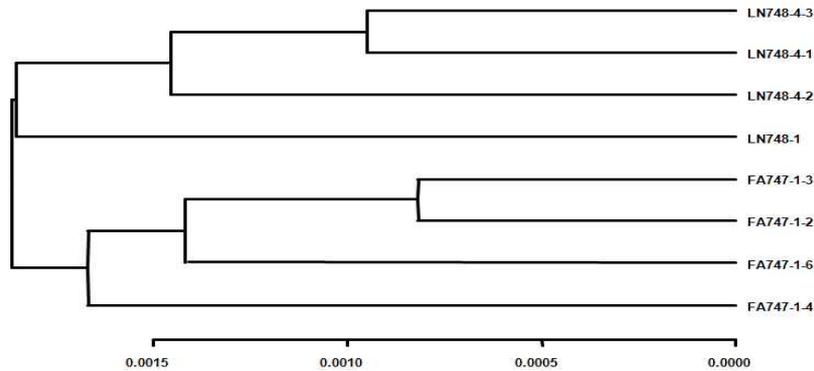


그림 4-35. 배추좁나방 저항성 형질을 가지고 있는 양배추 DS계통과 감수성 형질의 CT계통 및 F1을 이용하여 분석한 FT-IR 스펙트럼 데이터의 차이로 유사도 검정.

- ㉓ 추후 FT-IR 스펙트럼 데이터에서 DS계통과 CT계통, F1간의 대사체에 서 차이가 크게 나타나는 스펙트럼 영역($1000-1200\text{ cm}^{-1}$, $1300-1500\text{ cm}^{-1}$ 및 $1600-1700\text{ cm}^{-1}$)에 해당하는 물질(carbohydrate, phenolic compounds 및 amide 계열)을 세분화 할 수 있는 분석을 수행하여 목 표형질에 영향을 준 대사체군에 해당하는 주요 물질을 밝히고자 함.

② GC-TOFMS이용한 metabolite profiling

- ㉔ 배추좁나방 저항성 계통, 감수성 계통과 이들 두 계통간의 교배로 만 든 F1 계통이 FT-IR 스펙트럼 조사로 대사체 수준에서 비교 분석하 여 차이가 있어 구분이 가능함을 작년 실험 결과에서 나타났었음. 이 를 통해 저항성, 감수성 계통간에서 스펙트럼의 전체적인 부위에서 대사체 변화가 크게 이루어지는 것을 확인하였고, 특히 스펙트럼 $1000-1200\text{ cm}^{-1}$, $1300-1500\text{ cm}^{-1}$ 및 $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ 부위에서 차이가 많이 나는 것을 확인 하였음. 이들 스펙트럼 영역은 carbohydrate, phenolic compounds 및 amide 계열의 물질들을 감지할 수 있는 파장 으로 이들 물질들의 조성이 차이가 있다는 것을 의미하는 것이었음. 그러나 이들 대사체군에서 어떠한 물질이 식물 계통을 나누었는지, 배추좁나방 저항성 형질과 연관된 물질이 무엇인지는 알 수가 없었 음. 따라서 저항성, 감수성 계통간에 차이가 크게 나는 대사체군을 세 분화 하고자 하였음.

㉕ GC-TOFMS 분석

1. GC-TOFMS 분석을 위해 배추좁나방 저항성, 감수성 계통 및 F1 시료는 육묘용 트레이에 파종 후 30일 되었을 때 야외 포장에 정식 하였고, 정식 후에 2달 된 식물체의 잎을 수확하였음. 시료는 채취 하자마자 액체 질소에 급속 동결한 후 동결건조기로 건조하였음.

완전히 건조된 식물체는 파쇄기로 분쇄하여 고운 가루 상태로 만들어 초저온 냉동고에 보관하였음.

ㄴ. GC-TOFMS 분석위해 극성 대사산물 추출위해 건조한 시료 100mg에 1 mL의 추출액 (2.5:1:1 v/v/v methanol:water:chloroform)을 넣어 잘 섞어주었고 Ribitol (60 μ L, 0.2 mg/mL)을 internal standard (IS)로 사용하였다. thermomixer comfort (Model 5355, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)를 이용하여 37°C에서 30분간 추출을 하였음. 원심분리기에서 16,000 x g로 3분간 원심분리하여 새로운 튜브에 0.8ml의 추출된 상층액을 수거하고, 0.4ml의 물을 첨가한 후 다시 16,000 x g로 3분간 원심분리하였음. 친수성 대사산물을 함유한 methanol/water 액을 centrifugal concentrator (CVE-2000, Eyla, Japan)로 2시간 건조시킨 후 16시간동안 동결 건조하였다. GC-TOFMS 분석을 위해 추출한 대사산물을 methoxyamine hydrochloride (20 mg/mL, 80 μ L)에 녹여 30°C에서 90분간 oximation, 80 μ L의 *N*-methyl-*N*-(TMS)-trifluoroacetamide (MSTFA)을 첨가해 30°C에서 30분간 trimethylsilyl (TMS) etherification을 시켜 시료 준비를 완료하였음. 장비는 Agilent 7890A gas chromatograph (Agilent, Atlanta, GA, USA)를 사용하였음. 시료 1 μ L이 30 m \times 0.25 mm I.D. fused-silica capillary column에서 분리되었고, 헬륨 가스 유동율은 1.0 mL/min였음. 분할 비율은 1:25였으며 injector 온도는 230°C였음. 온도 프로그램은 초기 온도 80°C에서 2 분에서 시작하여 320°C까지 15°C/min로 증가하였으며 320°C에서 10분간 유지하였음. mass range 85 - 600 *m/z* 영역을 스캔하였고 detector voltage는 1700 V였음.

ㄷ. 양배추 데이터의 가공 및 통계분석

ㄷ. 정량분석은 Internal standard의 피크 범위에 대해 상대적인 비율을 기반으로 하였음. GC-TOFMS에서 데이터의 상대적인 정량분석은 다변량 데이터의 그룹들 사이에 유사도와 차이도에 관하여 관계성을 평가하기위해 PCA(Principal component analysis), PLS-DA(Partial least squares discriminant analysis) (SIMCA-P version 13.0; Umetrics, Umeå, Sweden) 분석을 수행하였음. 산출된 결과는 시료들간에 유사도를 대조한 결과를 score plot으로 보여주고, 구분되는 정도를 loading plot으로 설명해 주었음.

㉠ GC-TOFMS를 이용한 양배추 계통간의 대사산물 기초자료 분석

ㄱ. 1차 대사산물은 식물의 유전자형을 대사체 수준에서 구별하는데 있어 유용한 지표 중 하나임. GC-TOFMS는 대사체 분석에서 가장 많이 사용되는 분석방법 중 하나로 아미노산, 유기산, 당과 같은 1

차대사산물을 결정할 수 있음. 이 분석방법은 시료속에 있는 저분자량 친수성 성분을 측정하고 동정할 수 있는 장점이 있음. 총 46 종류의 대사산물 (19종류 아미노산, 15 종류 유기산, 8종류 당, 3종류의 당알코올, 1 종류의 amine 이 양배추 잎에서 검출되었다. (표 4-27).

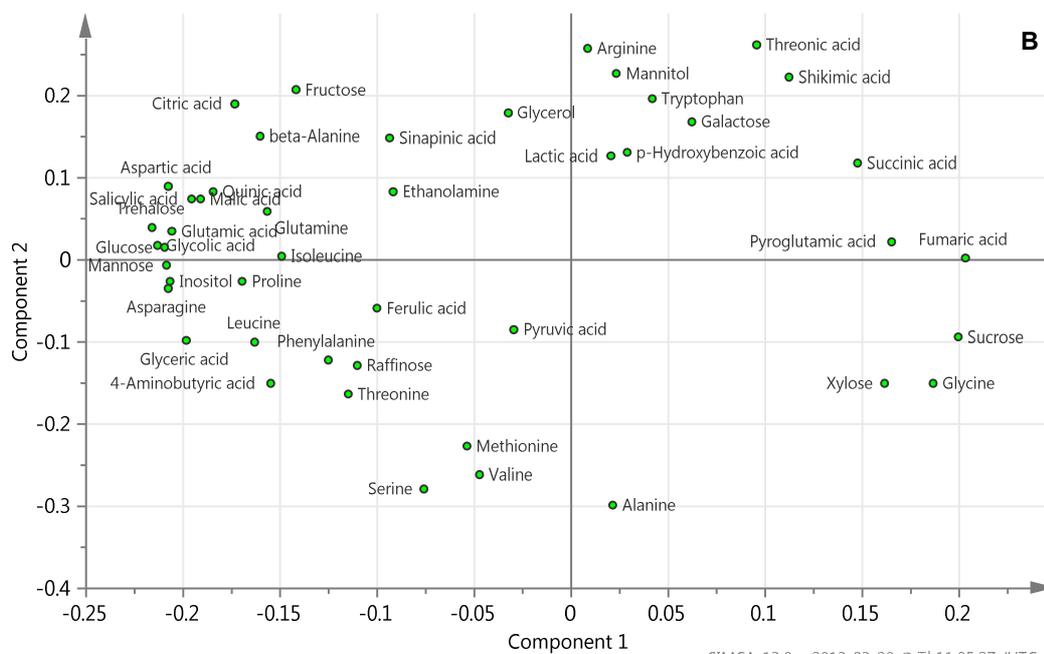
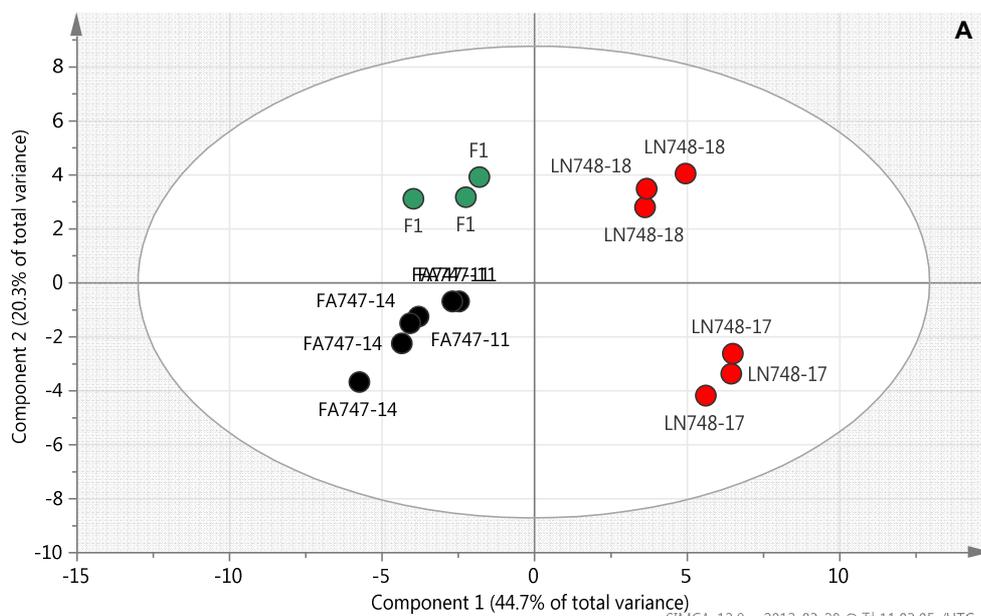
표 4-27. DBM 감수성 양배추 추출물에서 GC-TOFMS chromatograms 으로 분석한 대사산물

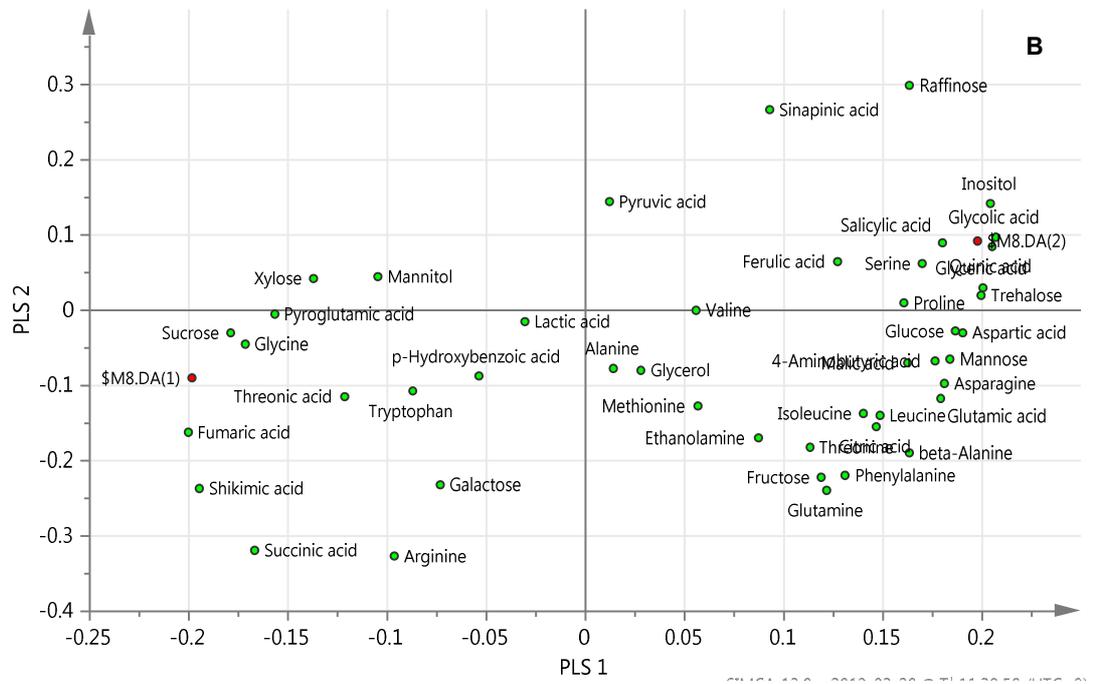
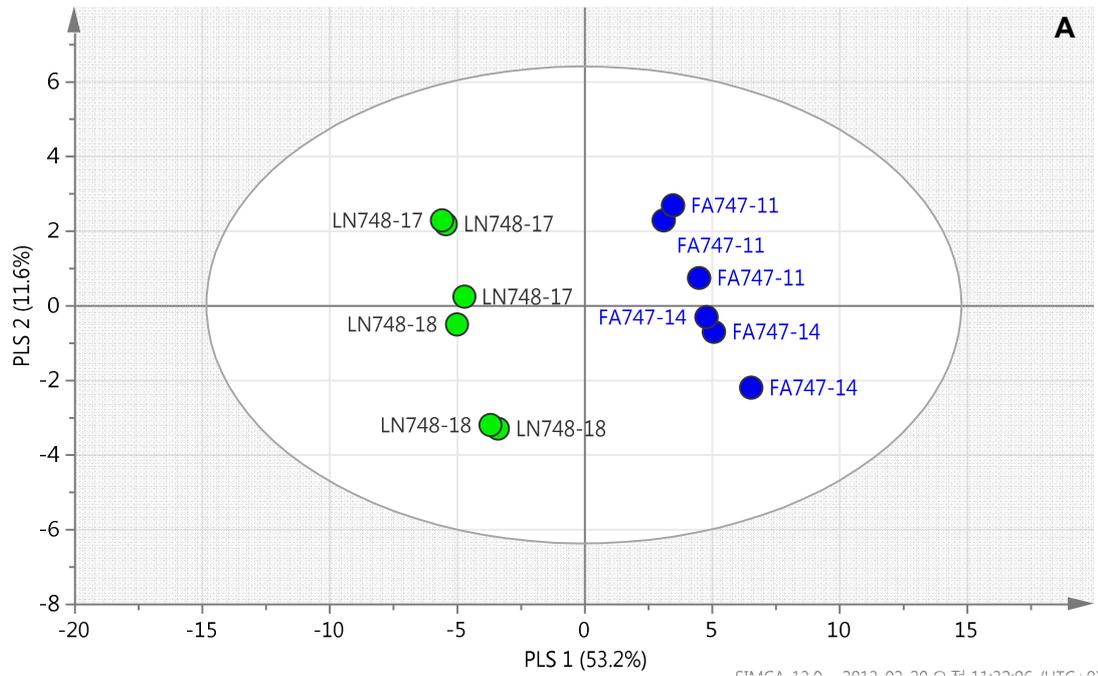
No. ^a	compound	RT ^b	RRT ^c	quatication ion ^d
1	pyruvic acid	4.53	0.425	174
2	lactic acid	4.63	0.433	147
3	valine	5.02	0.470	146
4	alanine	5.13	0.480	116
5	glycolic acid	6.23	0.584	147
6	serine	6.79	0.636	116
7	ethanolamine	6.86	0.643	174
8	glycerol	6.89	0.645	147
9	leucine	6.90	0.647	158
10	isoleucine	7.12	0.667	158
11	proline	7.20	0.675	142
12	glycine	7.26	0.680	174
13	succinic acid	7.33	0.687	147
14	glyceric acid	7.44	0.697	147
15	fumaric acid	7.68	0.719	245
16	threonine	7.96	0.746	219
17	β -alanine	8.38	0.785	174
18	malic acid	8.88	0.832	147
19	salicylic acid	9.13	0.855	267
20	aspartic acid	9.14	0.856	100
21	methionine	9.18	0.861	176
22	pyroglutamic acid	9.23	0.865	156
23	4-aminobutyric acid	9.26	0.867	174
24	threonic acid	9.41	0.882	147
25	arginine	9.90	0.928	142
26	glutamic acid	9.94	0.931	246
27	phenylalanine	10.06	0.943	218
28	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	10.08	0.945	223
29	xylosse	10.15	0.951	103
30	asparagine	10.34	0.969	116
IS	ribitol	10.67	1.000	217
31	glutamine	11.11	1.041	156
32	shikimic acid	11.30	1.058	204
33	citric acid	11.39	1.067	273
34	quinic acid	11.64	1.090	345
35	fructose	11.72	1.098	103
36	galacose	11.86	1.111	147
37	glucose	11.91	1.116	147

38	mannose	12.04	1.129	147
39	mannitol	12.15	1.139	319
40	ferulic acid	12.18	1.142	338
41	inositol	13.19	1.236	305
42	tryptophan	14.03	1.315	202
43	sinapinic acid	14.20	1.330	338
44	sucrose	16.13	1.511	217
45	trehalose	16.66	1.561	191
46	raffinose	19.70	1.846	217

㉔ GC-TOFMS 데이터 이용 PCA결과

- ㄱ. 46 종류의 대사산물의 정량분석 데이터로 저항성, 감수성 계통의 대사체군의 차이를 검정하고자 PCA 분석을 수행하였음.
- ㄴ. 그림 20과 같이 PCA score plot에서 배추좁나방 저항성 계통, 감수성 계통, F₁의 구분이 가능한 것으로 보임. 이 각각 분리되어 그룹을 형성하였으며, PC1과 PC2가 대사체군의 변이율에 대해서 각각 44.7%, 20.3%를 관여하고 있음을 나타냈음.
- ㄷ. 3종류의 시료의 서로 다른 그룹화를 확인하였으므로 그룹핑에 관여하는 요인을 찾아보고자 저항성, 감수성 두 계통만을 가지고 PLS-DA 분석을 수행하였음. score plot에서 배추좁나방 저항성 계통과 감수성 계통이 확연하게 좌우로 구분이 되었음 (그림 4-37). 구분이 가능하게 한 변이에 대한 기여도를 VIP (variables important in the projection) 값으로 나타내는데 1보다 큰 수치는 그룹핑 결과에 보다 영향력 있음을 나타냄 (그림 4-38). 25 종류의 대사산물 (glycolic acid, quinic acid, inositol, fumaric acid, glyceric acid, trehalose, shikimic acid, and aspartic acid, glucose, mannose, asparagine, glutamic acid, salicylic acid, sucrose, succinic acid, 4-aminobutyric acid, raffinose, glycine, serine, beta-alanine, malic acid, proline, pyroglutamic acid, leucine, citric acid)이 통계적으로 유의한 ($P < 0.0001$) 수치를 나타냈음.





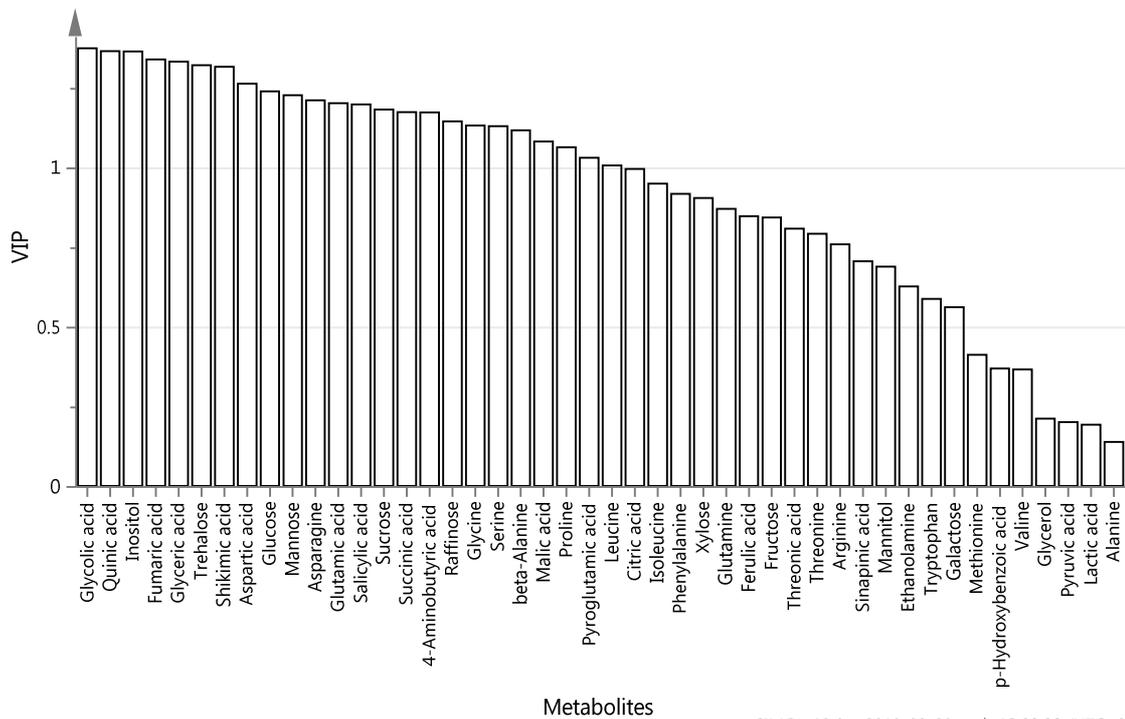
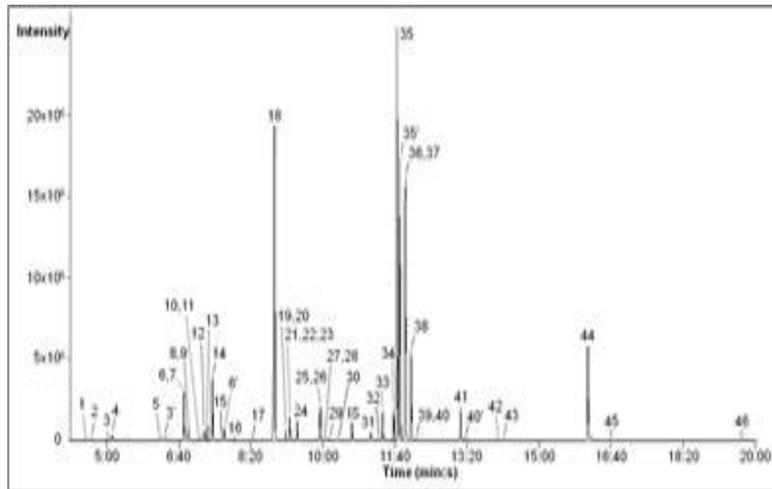


그림 4-38. 대사산물의 variable importance in the proection (VIP) 수치

르. 식물은 다양한 초식성 동물과 미생물의 공격에 반응하는 여러 방법을 가지고 있으며 각기 다른종의 공격자에 대해 방어기전에는 공통점과 특이점이 있다. Widarto 등 (2006)은 배추 가식 특화종인 배추좁나방과 일반종인 파밤나방을 이용, 유충 연령대 별로 나누어 *rassica rapa*를 갇아 먹게 하고 각기 특화종과 일반종, 연령별로 갇아 먹는 행동이 배추에서 어떤 대사산물에 변화를 주었는지를 *Brassica rapa*의 대사산물에 변화를 NMR로 조사하였다. 제2령과 4령의 가식에 의해 배추가 반응하는 대사산물의 종류에 차이가 있었으며 이들 물질은 alanine, threonine, glucose, sucrose, feruloyl malate, sinapoul malate, gluconapin 이라고 보고하였으나 이들 물질의 역할에 대해서는 언급하지 않았다. 25 종류의 대사산물 중에서 salicylic acid (SA)는 13번째로 변이가 큰 물질이었다. SA는 식물호르몬 중에 하나로 식물이 곤충의 방어기전에도 작용하는 것으로 알려져 있다. 곤충이 잎을 갇아 먹었을 때 식물은 식물호르몬 중에 jasmonic acid (JA)를 분비하고 이 식물호르몬이 자극제로 사용되어 방어기전이 유도되는데 SA가 많이 축적되면 곤충이 갇아 먹어도 JA에 의한 방어 기작을 방해 (인식하지 못함)하는 것으로 보고되었음 (Erb et al., 2012). 페놀화합물 또한 식물 방어 기작에 관여하는 것으로 보고되었다. Stout 와 Chapple (2004)는 애기장대 옛 ferulic acid, sinapic acid가 세포벽에 변형에 관여하여 방어기작

을 나타낸다고 보고하였으며, Grant and Langevin (2002)는 이 물질들이 가문비나방의 산란 기피제로 작용한다고 보고하였다. 변이율에 관여하는 VIP 값에서 두 번째로 높은 성분은 quinic acid로 이 성분은 국화 (Chrysanthemum) 및 곤충저항성 (Thrips, 총채벌레)에 관여한다는 것이 NMR 분석으로 보고되었다 (Leiss et al., 2009b). 본 연구의 결과는 quinic acid가 식물(국화)에서 곤충 저항성에 관여할 뿐만 아니라 양배추에서 배추좀나방 저항성 형질에도 관여할 수 있다는 것을 제시하였다. 곤충에 대한 공격에 맞서 식물은 방어기전 중에 하나로 대사산물을 변화시켰는데, 이는 NMR 뿐만 아니라 FT-IR, GC-TOFMS 기기분석 방법이 식물에 있어 배추좀나방 저항성 형질에 관여하는 대사산물 성분검정에 유용한 기술임을 제시하였다. 또한 쉽고 빠른 FT-IR 방법과 보다 정확한 물질탐색에 GC-TOFMS 방법을 견비해서 사용하는 방법은 식물 육종에서 저항성 형질 연관/함유 자원 선발에 유용한 접근법임을 제시하였다.

- ㉞ 배추좀나방 저항성 계통과 감수성 계통간의 대사체군 조사 및 비교
- ㄱ. 배추좀나방 유충이 양배추 잎을 갉아먹는(섭식) 피해정도가 다른 두 가지 형태의 양배추를 각기 저항성 계통, 감수성 계통이라 명칭하였으며, 이들 저항성 계통(A)과 감수성 계통(B)의 좀나방 섭식에 대한 정도(표현형)는 그림 3과 같이 육안으로 현저하게 차이가 남을 볼 수 있었다. 좀나방 섭식에 대한 두 계통간의 표현형적 차이를 나타내는 원인을 알고자 배추좀나방에 저항성 계통, 감수성 계통과 이들 두 계통간의 교배로 만든 F1 계통을 1차 대사산물의 차이를 GC-TOFMS 로 분석하였다(그림 2-45). GC-TOFMS는 대사체 분석에서 가장 많이 사용되는 분석방법 중 하나로 1차대사산물을 결정할 수 있으며, 이 분석방법은 시료속에 있는 저분자량 친수성 성분을 측정하고 동정할 수 있는 장점이 있으며 실제로 대사체군에 변화가 있음을 작년에 확인하였다. 총 46 종류의 검출한 대사산물 중에서 Aspartic acid, Glyceric acid, Glycolic acid, Inositol, Quinic acid, Trehalose 는 감수성 계통에서 저항성 계통보다 많이 존재함을 알 수 있었으며, Fumaric acid, Shikimic acid는 저항성 계통에서 감수성 계통보다 더 많이 존재함을 알 수 있었다(그림 4-39).



<그림 4-39. GC-TOFMS chromatograms 분석으로 대사체 검출>

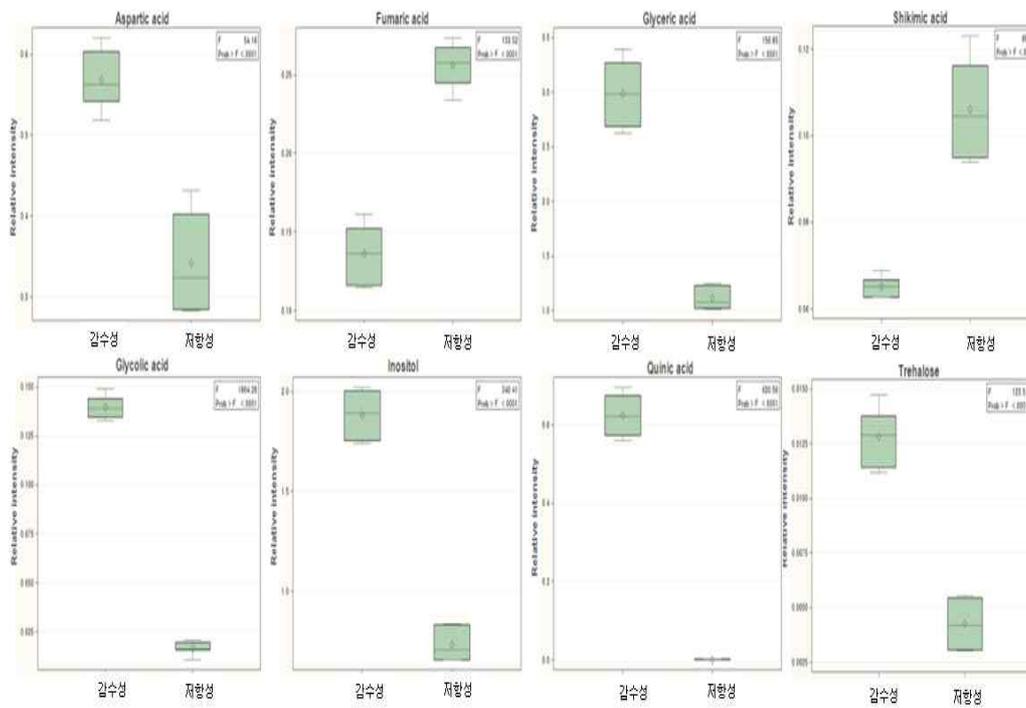


그림 4-40 .저항성, 감수성 계통간 구분되는 대사체, $P < 0.0001$

5. 양배추류 개량에 적용 가능한 유용 유전자군 개발

가. 병저항성 및 스트레스 저항성 관련 유전자군 발굴

① 내서성 조절 기작연구 및 관련 특이 유전자군 발굴

㉞ 내서성 저항성 후보 유전자의 내서성 양배추 계통 간 생물학적 검증

㉟. Genechip 결과 분석에 의한 유전자의 발현 양상이 정확성을 갖는지 확인하기 위해 heat stress 시 up 또는 down 되는 유전자를 대상으로 quantitative RT-PCR 분석.

1. 고온 스트레스에 반응하는 *splicing factor*, *GRAS*, *HsfA2*, *Hsp70*, *HsfA1a* 유전자는 정상 조건에 비해 고온 스트레스 시 대부분 내서성 계통 'HO' 와 'JK' 모두에서 유전자발현이 현저하게 증가 되었고, down-regulated 유전자 *Myb TF*, *pectate lyase*, *ATP synthase* 유전자는 고온 스트레스 시 정상 조건에서 보다 현저히 발현이 감소됨을 확인하였다 (그림 5-1).

2. 이의 결과로부터 genechip 분석 결과가 qRT-PCR을 통해 입증되었고 내서성 관련 후보유전자군의 유전자발현 비교를 위한 조건을 충족하였다.

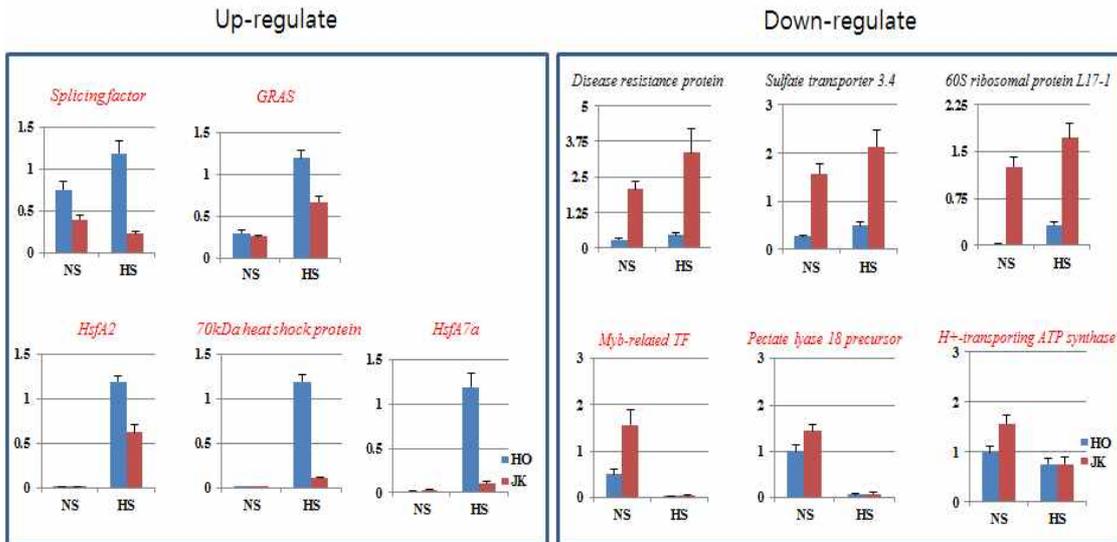


그림 5-1. 내서성 계통 간 발현차이를 보이는 후보 유전자군의 qRT-PCR 결과

㊱. 여러 내서성 형질 계통 간 실험실 내 고온 스트레스 표현형 분석

1. 육종 현장에서 개발된 내서성 형질 계통에 대한 실험실 내 고온 스트레스 표현형 분석
2. 아시아 종묘의 육종법에 의해 최근 까지 개발된 내서성 형질 강 /약 계통 8개를 분양 받아 재배 현장에서와 내서성에 대한 표현형이 일치하는지를 분석하였다.

3. 내서성에 강한 계통 (HTCLs)은 'HO', 'KK', 'RK', '401' 4개 계통을 분양 받았고 내서성에 약한 계통 (HSCLs)은 'EB', 'JK', 'NB', '402' 4개 계통을 분양 받았다.
4. 기내발아를 통한 일주일된 seedling을 대상으로 42도에서 5시간 heat stress를 준 후 24도 정상 조건에서 4일간 recovery 하여 표현형을 관찰하였다. 대조구로 전 과정을 24도 정상 조건에서 배양하여 생장을 관찰하였다.
5. 모든 내서성 강 계통에서 약 계통에 비교해 강한 고온스트레스 저항성 표현형을 나타 내었다. 즉 내서성에 약한 계통들은 heat stress 후 recovery 과정에서 엽록소 분해에 의한 necrosis를 보여 green cotyledon을 관찰하기 어려웠으며 결국엔 괴사하였지만 내서성 강 계통은 모두 heat stress 처리 후에도 green cotyledon을 유지하였고 생존력을 보여 주었다 (그림 5-2a).
6. 또한 토양 조건에서의 유 식물체를 대상으로 고온 스트레스에 대한 실험실 조건에서의 표현형을 관찰하였다. 토양에서 종자를 발아한 후 2주된 유식물체를 대상으로 고온 스트레스를 42도에서 4시간 처리 후 24도에서 3일 간 recovery하여 관찰한 결과 내서성 약'402' 계통은 정상 조건에서와는 달리 고온 스트레스 시 잎이 시들고 줄기가 꺾이며 건조되는 현상을 보여준 반면, 내서성에 강한 '401' 계통은 고온스트레스에 저항성을 보여 주었다 (그림 5-2b).
7. 이 결과로부터 내서성 형질간 실험실 조건에서의 고온 스트레스 표현형이 확인 되었으며 후보 유전자발현 비교분석의 대상 유용 자원으로서의 활용성이 검증되었다.

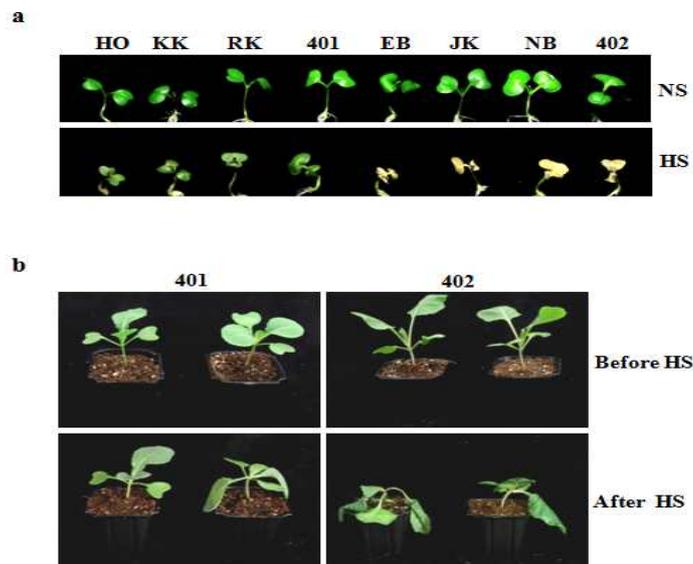


그림 5-2. 여러 내서성 계통 간 실험실 조건에서의 고온 스트레스 표현형 분석

㉞ 후보 유전자군의 여러 내서성 형질 계통에서의 유전자발현 비교 분석
 ㄱ. BoHSPs 유전자 발현분석

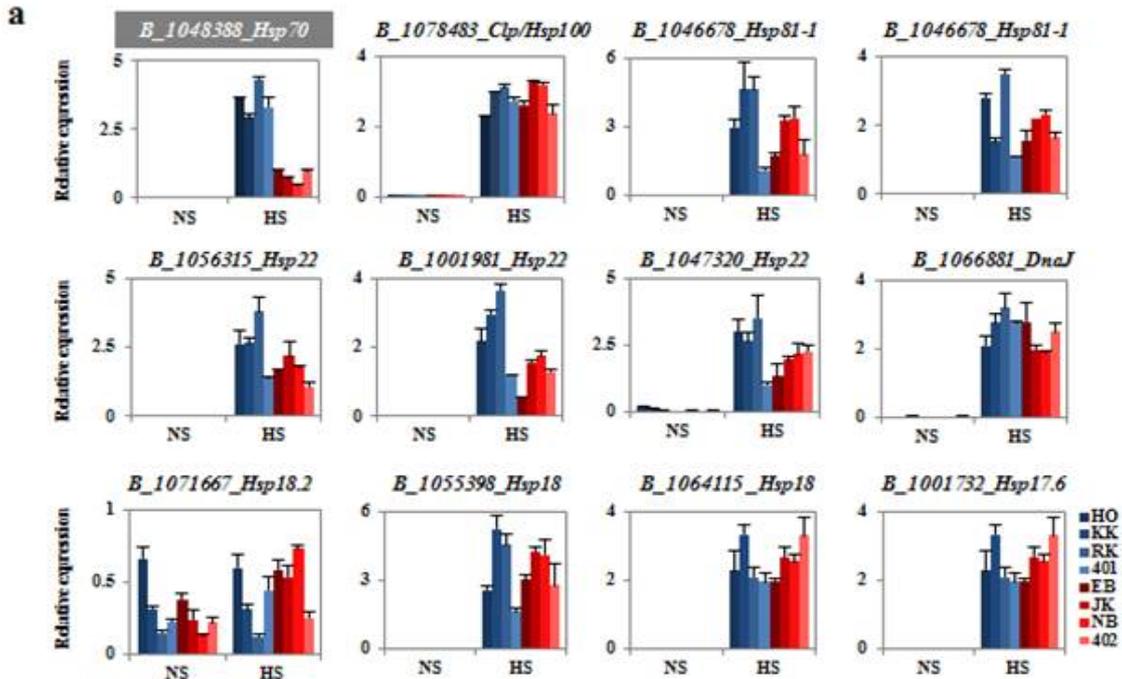


그림 5-3. 내서성 강 (HTCLs) 계통과 내서성 약 (HSCLs) 계통 간 양배추 HSPs 유전자발현 qRT-PCR 분석 결과

ㄴ. *BoHsp18.2*를 제외한 모든 Hsp 후보유전자군은 정상조건에서는 거의 발현 되지 않고 고온 스트레스 시 현저히 발현이 증가되는 특이적 양상을 나타내었으나 *BoHsp70* (*Hsp70-4*)을 제외하고는 내서성 강/약 형질 계통간 특이성을 보이지는 않았다. 반면 *BoHsp70*은 내서성에 강한 모든 4개 계통 ('HO', 'KK', 'RK', '401')에서 약한 계통과 비교하여 고온 스트레스 시 유전자발현이 3배 이상 증가되는 일관성을 보여 주어 내서성 검증을 위한 분자마커로서의 후보유전자 가능성을 나타내었다 (그림 5-3). *BoHsp22s*의 경우 약간의 계통 간 차이는 있지만 세 개의 다른 유전자가 모두 내서성 강/약 형질에 대한 유전자발현 차이를 나타내어 후보 유전자로서의 가능성이 확인되었다.

ㄷ. BoHSFs 유전자 발현 분석: 대부분의 Hsfs 또한 *HsfA1a*를 제외하고는 고온 스트레스에 유전자발현이 증가하였으나 내서성 형질을 구분하기에는 계통 간 변이차가 크게 나타나 후보유전자로서의 특이성을 검증 할 수 없었다. 반면 *BoGRAS* (*SCL13-1*) 유전자발현의 경우, *BoHsp70*에서와 같이 내서성에 강한 모든 계통에서 고온 스트레

스 시 유전자발현이 약한 계통에 비해 3배 이상 증가하여 후보유전자로서의 가능성이 입증되었다 (그림 5-4). *BoHsfA7a* 또한 유전자발현의 차이는 크게 증가 되지 않았지만 내서성 형질간 일치성을 나타내었다.

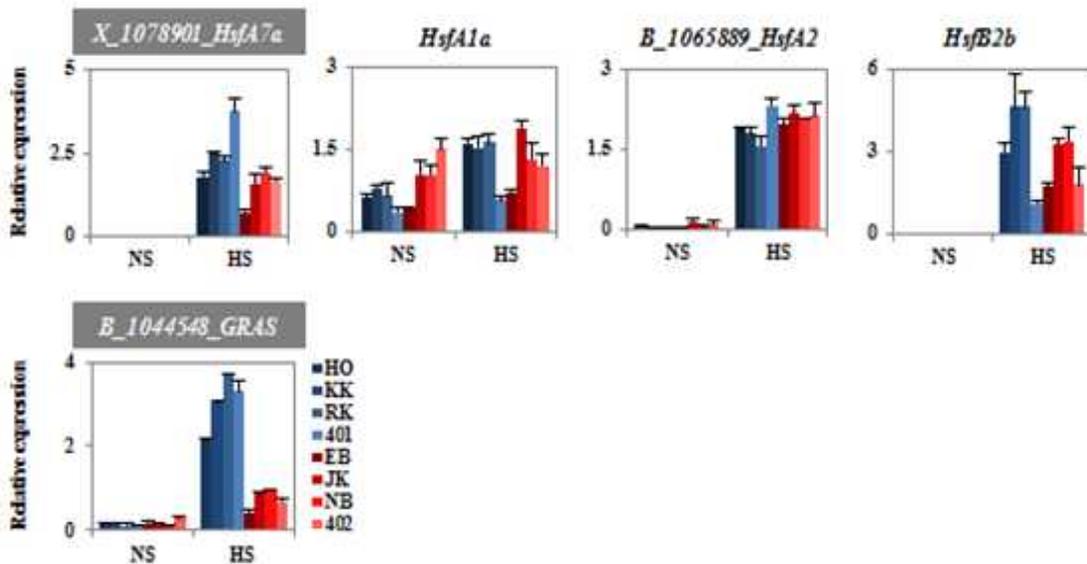


그림 5-4. 내서성 강 (HTCLs) 계통과 내서성 약 (HSCLs) 계통 간 양배추 HSFs 유전자발현 qRT-PCR 분석 결과

ㄷ. *BoHsp70 family* 유전자와의 발현 비교를 통해 *BoHsp70* 유전자발현이 내서성 형질에 특이성 검증.

1. Genechip에 의한 고온 스트레스 반응 *BoHsp70 family* 유전자 *BoHsp70b*, *BoHsp70T-2*, *BoHSC70-1*, *BoHSC70-5*, *BoCPHSC70-1* 유전자발현을 비교하였다.
2. *BoHsp70 (70-4)* 유전자를 제외하고는 다른 *BoHsp70 family* 유전자발현은 내서성 형질간 특이성을 보이지 않았으며, *BoHsp70*의 경우, 위의 그림 12에서 오는 다른 primer (유전자의 다른 부위) 조건에서도 내서성 형질간 뚜렷한 발현 차이를 나타내어 분자표지 개발을 위한 후보 유전자로서의 가능성을 재확인 하였다 (그림 5-5).
3. *BoGRAS family* 유전자와의 발현 비교를 통해 *BoSCL13-1* 유전자 발현이 내서성 형질에 특이성을 나타내는지 확인하였다.
4. GRAS family 중 *SCL13-1* 유전자의 발현이 내서성 형질 특이성을 보여주어 고온 스트레스에 반응하는 두 종류의 *BoSCL13* 유

전자의 발현을 비교하였다.

- 그림 5-5 결과에서의 *BoSCI13-1*의 경우, *BoHsp70* 에서와 같이 유전자의 다른 부위를 인식하는 primer 조건에서도 내서성 강 계통에서만 3배 이상의 유전자발현이 증가된 반면, *BoSCI13-2* 유전자발현은 내서성 형질 계통 간 특이성이 나타나지 않았다.

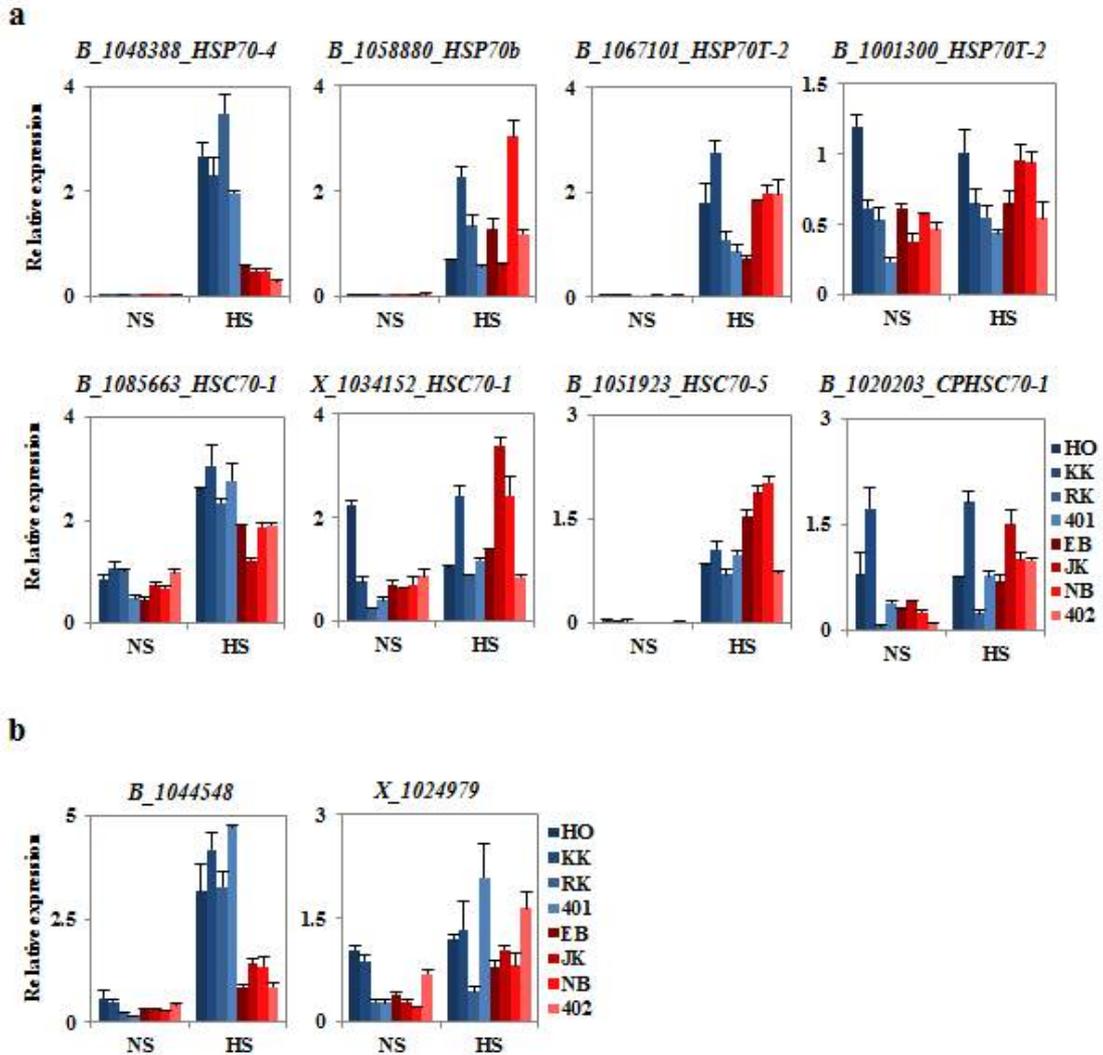


그림 5-5. 내서성 강 (HTCLs) 계통과 내서성 약 (HSCLs) 계통 간 양배추 HSP, GRAS family 유전자군의 유전자발현 qRT-PCR 분석 결과

㉑. 내서성 계통 간 고온 스트레스 반응 유전자 발현 차이 후보 유전자 선별

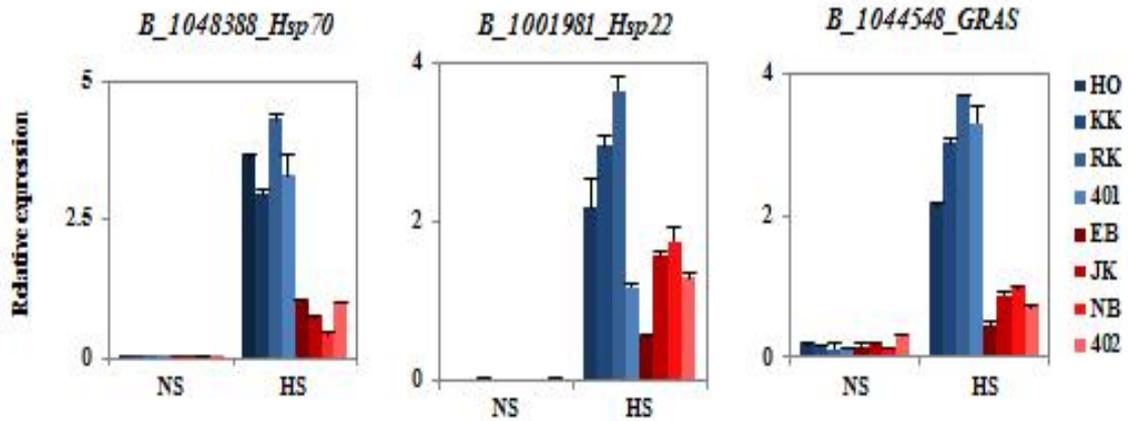


그림 5-6. 내서성 강/약 계통에서의 고온스트레스 반응 유전자의 heat shock stress에 대한 유전자 발현 차이. HO, KK, RK, 401, 내서성 강 계통; EB, JK, NB, 402, 내서성 약 계통들

㉒. 이상의 결과로부터 genechip분석에 의한 내서성 형질 구분 후보 유전자 중 *BoHsp70*과 *BoSCL13-1* 유전자 발현은 내서성 형질에 대한 차이를 보여 주었으며 family의 다른 유전자발현 비교 분석에서도 특이성을 나타내어 양배추 내서성 초기 검증에 이용 가능한 유전자임을 확인하였다.

② 내서성 저항성 후보 유전자군의 프로모터 영역 염기서열 분석

㉠ 유전자발현 차이를 보이는 후보 유전자군을 대상으로 내서성 계통 간 프로모터 영역을 조사함으로써 gDNA에서의 유전자마커 가능성을 분석하고자 하였다.

㉡ BoHSP22 (Bo3g044590)

ㄱ. BoHSP22 유전자의 CDS의 up stream 1 kb 영역의 genomic DNA 염기서열을 분석하고자 제1핵심 제1세부과제로부터 생성된 re-sequencing data를 기반으로 primer를 제작함.

ㄴ. 8개 계통에 대한 PCR 분석으로 1 kb 프로모터 영역의 genomic DNA 염기서열을 분석하였음.

ㄷ. 8 계통의 염기서열 비교분석 결과, 8개의 SNP가 발견 되었으나 내서성 강/약 형질간의 연관성은 없는 것으로 판단 됨 (그림 5-7).

㉢ BoGRAS (Bo1g052870)

ㄱ. 앞의 BoHSP22 유전자에서와 같이 BoGRAS 유전자의 CDS 및 up stream 0.5 kb 영역을 포함하는 1kb genomic DNA 염기서열을 분석하고자 제1핵심 제1세부과제로부터 생성된 re-sequencing data를 기반으로 primer를 제작하고 8개 계통에 대한 PCR 분석으로 0.5 kb 프로모터 영역의 genomic DNA 염기서열을 분석하였음.

ㄴ. 8계통의 염기서열 비교분석 결과, 내서성 강/약 형질간의 염기서열 변화를 발견하지못함

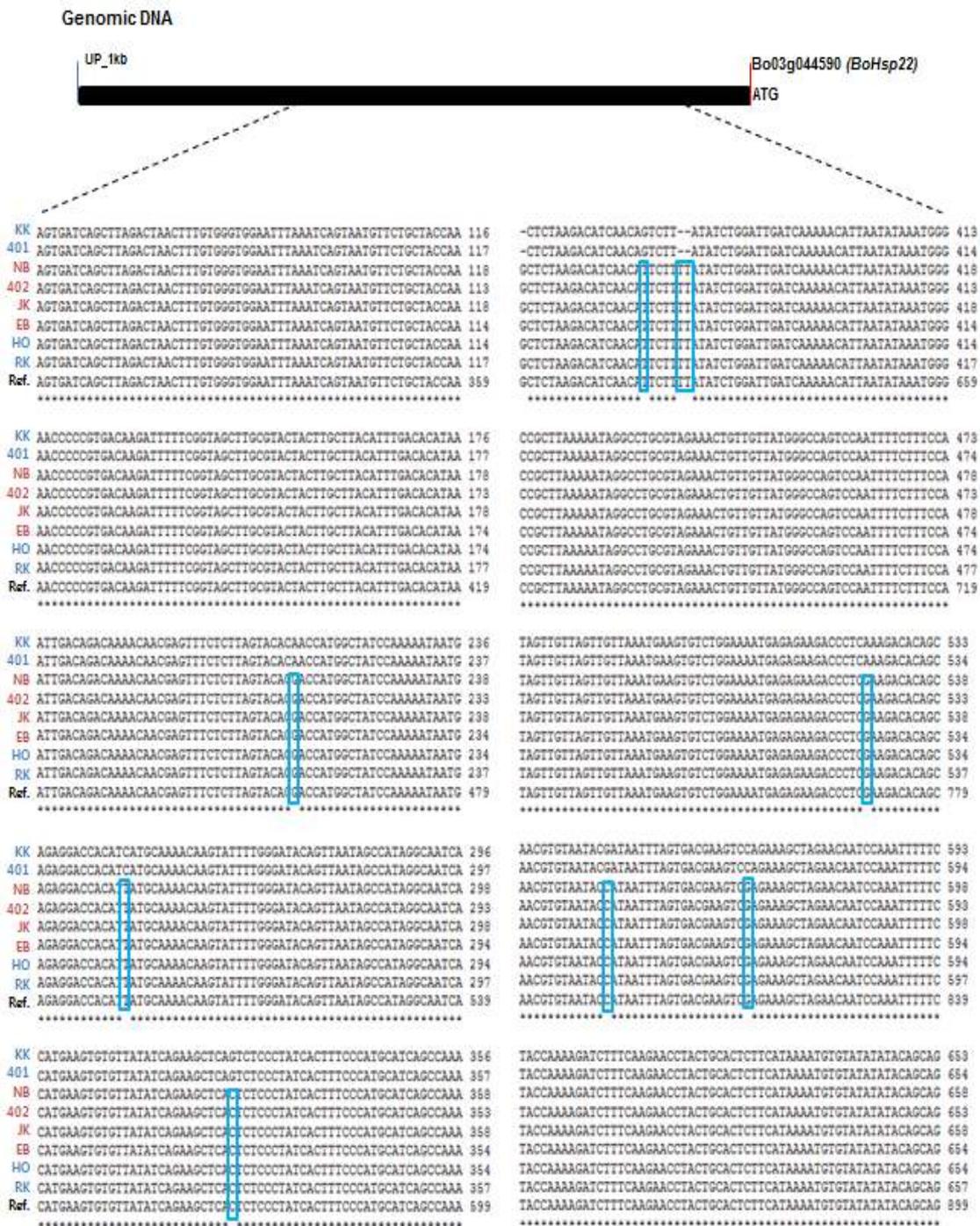


그림 5-7. 내서성 강/약 8 계통에 대한 BoHSP22 유전자의 1 kb 프로모터 영역 염기서열 비교분석. bright-blue open box: putative SNPs



그림 5-8. 내서성 강/약 8개 계통에 대한 BoGRAS 0.5 kb 프로모터 영역을 포함하는 DNA 염기서열 비교분석. Red open box: ATG start nucleotide

㉠ BoHSP70 (Bo1g139130)

- ㄱ. BoHSP70 유전자의 CDS 및 up stream 영역을 포함하는 1kb genomic DNA 염기서열을 분석하고자 제1핵심 제1세부과제로부터 생성된 re-sequencing data를 기반으로 primer를 제작하고 8개 계통에 대한 PCR 분석으로 1kb 프로모터 영역의 gDNA 염기서열을 분석하였음 (그림 5-9).
- ㄴ. 8 계통으로부터 BoHSP70 유전자의 프로모터 영역 1 kb 염기서열 비교분석 한 결과, 크게 3 개의 그룹으로 분류 되었다 (그림 5-10).
- ㄷ. 그림 55에서와 같이 BoHSP90 프로모터는 크게 3개 그룹으로 확연히 구분

되었고 내서성 강 3 계통은 특정 프로모터 부위에 23개 정도 nucleotide가 제거된 In-Del 현상을 나타내고 있다.

ㄹ. 따라서, 본 연구팀은 In-Del 부위의 cis-elements 가능성을 확인하였다.

ㄱ. 내서성 계통간 BoHSP70 프로모터 영역의 cis-elements 분석

1. In-Del을 포함하는 두 프로모터 영역을 대상으로 유전자발현에 영향을 미치는 cis-elements의 존재를 조사하였다.

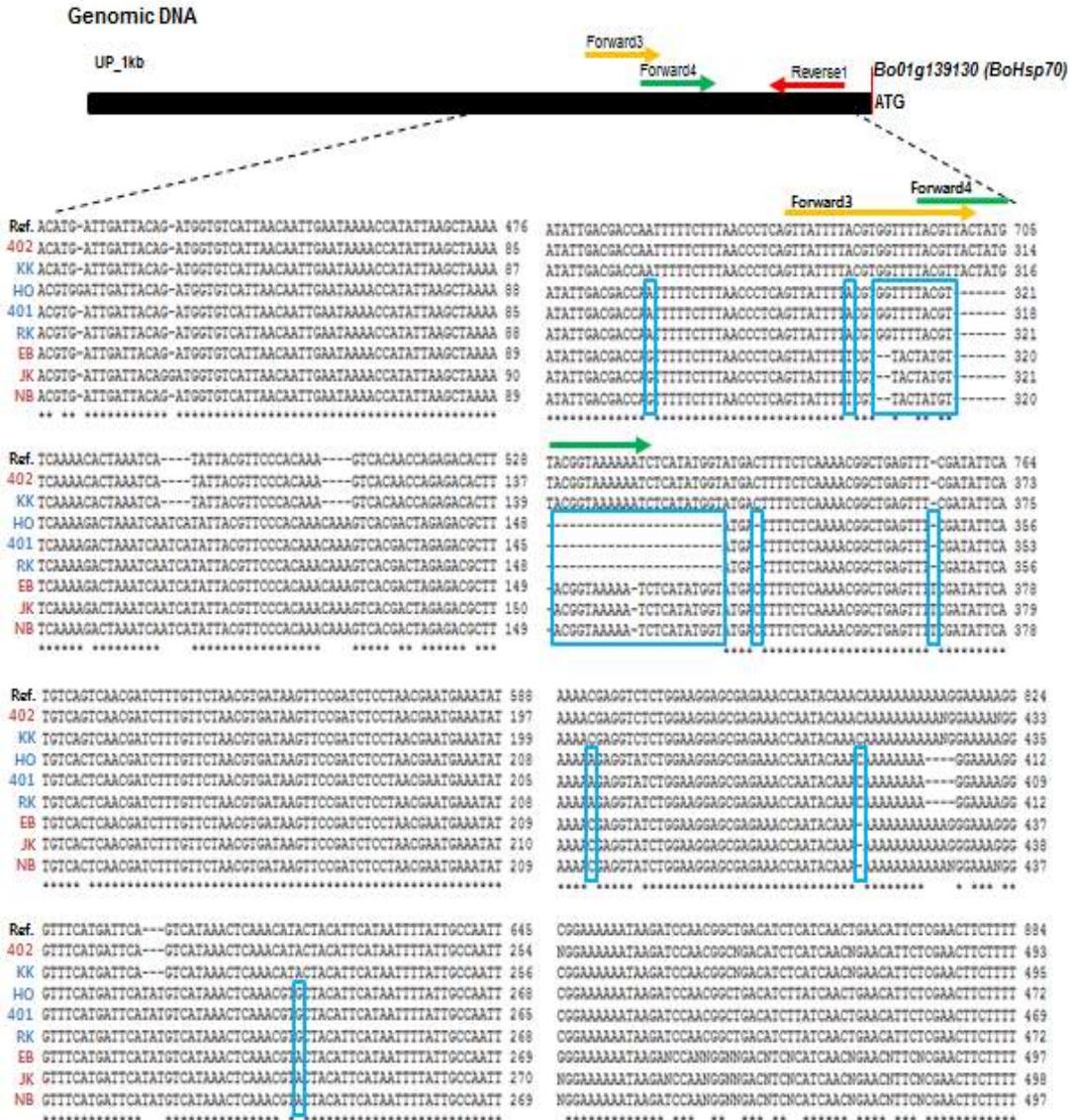


그림 5-9. 내서성 강/약 8개 계통에 대한 BoHSP70 1 kb 프로모터 영역 염기서열 비교분석. Bright blue open box: 내서성 강/약 형질에 대한 putative SNPs and in-dels. Forward 3, 내서성 강 특이적 primer; Forward 4, 내서성 약 특이적 primer; Reverse 1, 내서성 형질 구분을 위한 BoHSP70 유전자의 reverse primer.

> Bo1g139130_UP 1kb (HSP70)

내서성 강 : KK / HO / 401 / RK

내서성 약 : 402 / EB / JK / NB



그림 5-10. BoHSP70 유전자의 프로모터 영역 염기서열 비교분석에 따른 내서성 계통간 분류 group. Group I, Reference genome을 포함한 내서성 강 401과 내서성 약 KK 계통; Group II, 내서성 강 HO, 401, RK 계통; Group III, 내서성 약 EB, JK, NB 계통. Bright-blue open box, 내서성 약 계통간 염기서열 상동성 부분. Black open box, 내서성 강 계통 간 염기서열 상동성 부분.

- ㉓ 내서성 형질간 특이적 cis-element는 구분하기 어려웠으나 내서성 강외의 경우, ACGTABOX, ACGTATERD1 element가 특이적으로 존재하였다 (그림 5-11).

>tolerance

ttttacgtggttttacgtatgatttt

RESULTS OF YOUR SIGNAL SCAN SEARCH REQUEST

.../tmp/sigscan//signalseqdone.19736: 26 base pairs
Signal Database File: user.dat

Factor or Site Name	Loc.(Str.)	Signal Sequence	SITE #	
ABRELATERD1	site	5 (+) ACGTG	S000414	dehydration, dark-induced senescence
ACGTABOX	site	14 (+) TACGTA	S000130	sugar-repression
ACGTABOX	site	14 (-) TACGTA	S000130	
ACGTATERD1	site	5 (+) ACGT	S000415	dehydration, dark-induced senescence
ACGTATERD1	site	15 (+) ACGT	S000415	
ACGTATERD1	site	5 (-) ACGT	S000415	
ACGTATERD1	site	15 (-) ACGT	S000415	
ARR1AT	site	20 (+) NGATT	S000454	cytokinin
MYB1AT	site	8 (-) WAACCA	S000408	dehydration, ABA signaling

>sensitive

ttttcgttactatgtacggtaaaaatctcatatggtagactttt

RESULTS OF YOUR SIGNAL SCAN SEARCH REQUEST

.../tmp/sigscan//signalseqdone.19719: 46 base pairs
Signal Database File: user.dat

Factor or Site Name	Loc.(Str.)	Signal Sequence	SITE #	
ARR1AT	site	25 (-) NGATT	S000454	cytokinin
CACTFTPPCA1	site	9 (+) YACT	S000449	mesophyll, C4
CATATGGMSAIR	site	30 (+) CATATG	S000370	auxin
CATATGGMSAIR	site	30 (-) CATATG	S000370	
CCATATLHCB1	site	22 (+) AAMAATCT	S000149	phytochrome
CURECORECR	site	15 (+) GTAC	S000493	copper, oxygen
CURECORECR	site	15 (-) GTAC	S000493	
DOFCOREZM	site	42 (-) AAAG	S000265	
EBOXBNNAPA	site	30 (+) CANN TG	S000144	
EBOXBNNAPA	site	30 (-) CANN TG	S000144	
GT1CONSENSUS	site	19 (+) GRWAAW	S000198	light, SA
GT1CONSENSUS	site	1 (-) GRWAAW	S000198	
GT1GMSCAM4	site	1 (-) GAAAAA	S000453	pathogen, salt
MYCCONSUSAT	site	30 (+) CANN TG	S000407	dehydration, ABA, cold
MYCCONSUSAT	site	30 (-) CANN TG	S000407	
S1FBOXSORPS1L21	site	33 (+) ATGGTA	S000223	down regulating plastid ribosomal protein
SEF4MOTIFGM7S	site	21 (-) RTTTTT	S000103	storage protein
WBOXHVS01	site	39 (+) TGACT	S000442	sugar signaling (isoamylase)
WBOXNTERF3	site	39 (+) TGACY	S000457	wounding-ERF3(repressor) activation
WRKY71OS	site	39 (+) TGAC	S000447	GA, pathogen

그림 5-11. 내서성 강/약 계통간 BoHSP70 프로모터 In-Del 염기서열 부위 및 대상 영역의 cis-element 분석 결과.

③ 시들음병, 뿌리혹병 저항성 관련 유전자 연구

㉠ 시들음병, 뿌리혹병 저항성 관련 유전자 군과 유전자원 확보

ㄱ. 문헌 정보를 통하여 시들음병과 뿌리혹병 저항성 관련 유전자원을 확보하였다. 이는 후에 양배추와 모델 식물과의 저항성 조절메커니즘의 비교 연구를 위해서 중요할 것으로 사료된다.

ㄴ. 시들음병 감수성 ecotype으로 Ws, Ler, Ty-o를 확보하고, 논문에 시들음병 저항성 유전자로 알려진 애기장대의 rfo1 돌연변이체 라인을 확보하였다. RFO1 (Resistance to Fusarium Oxysporum1)은 애기장대 *F. oxysporum*에 저항성을 부여하는 유전자로 receptor-like kinase를 encoding 하고 있다. WALK group WALK 1, 2, 4, 5, 6, 8 10, 13, 18 돌연변이체를 확보하여 양배추 *F. oxysporum* strain에 대한 저항성을 보고자한다.

ㄷ. 뿌리혹병에서는 애기장대 Col-0와 Bur-0가 각 저항성과 감수성 ecotype임을 확인하고 뿌리혹병과 trehalose 저항성에서 생리학적인 연관 관계를 확인하였다. 6% glucose에서 뿌리혹병 감수성 Bur-0가 저항성 Col-0 (86%)보다 발아율이 12.5%로 낮게 관찰되었고, 80mM Trehalose 배지에서는 저항성 Col-0에서 anthocyanine 축적이 높고 root growth 저해가 크게 관찰되었다. 이러한 결과는 위 대사체 분석 결과와 유사하게 뿌리혹병 저항성과 관련하여 대사체의 다른 패턴과 연관성이 있음을 시사하고 있다. 뿌리혹병 양배추 저항성과 감수성 품종에서도 3% sucrose배지에서 anthocyanine 축적의 차이가 저항성과 감수성의 양상으로 구분되었다.

㉡ 병저항성 관련 주요 식물 호르몬 돌연변이체 분석과 감수성 양배추 계통에 호르몬을 전 처리한 후 병원균에 대한 저항성 반응을 관찰

㉢ 다양한 생물 및 비생물적 스트레스 관련 돌연변이 애기장대를 확보하고 이를 이용하여 양배추에 병을 일으키는 *F. oxysporum* strain의 식물체 저항성 조절 메커니즘을 밝히고자 하였다. 2주된 애기장대 식물체에 *F. oxysporum*을 soil inoculation 방법을 이용하여 접종하고 3주 후 잎이 마르거나 growth가 억제된 phenotype을 관찰하였다 (그림 5-12). Ws, Ler, Ty-o은 감수성 Col-0는 저항성을 보이는 ecotype임을 확인하였으며 jar1-1, eds5-1, pad4-1, npr1-1, rfo1(col-0)에서 감수성 phenotype을 보이는 것으로 애기장대-F. oxysporum 상호연관에 ethylen, jasmonic acid signalling pathway가 관여할 것으로 생각된다.

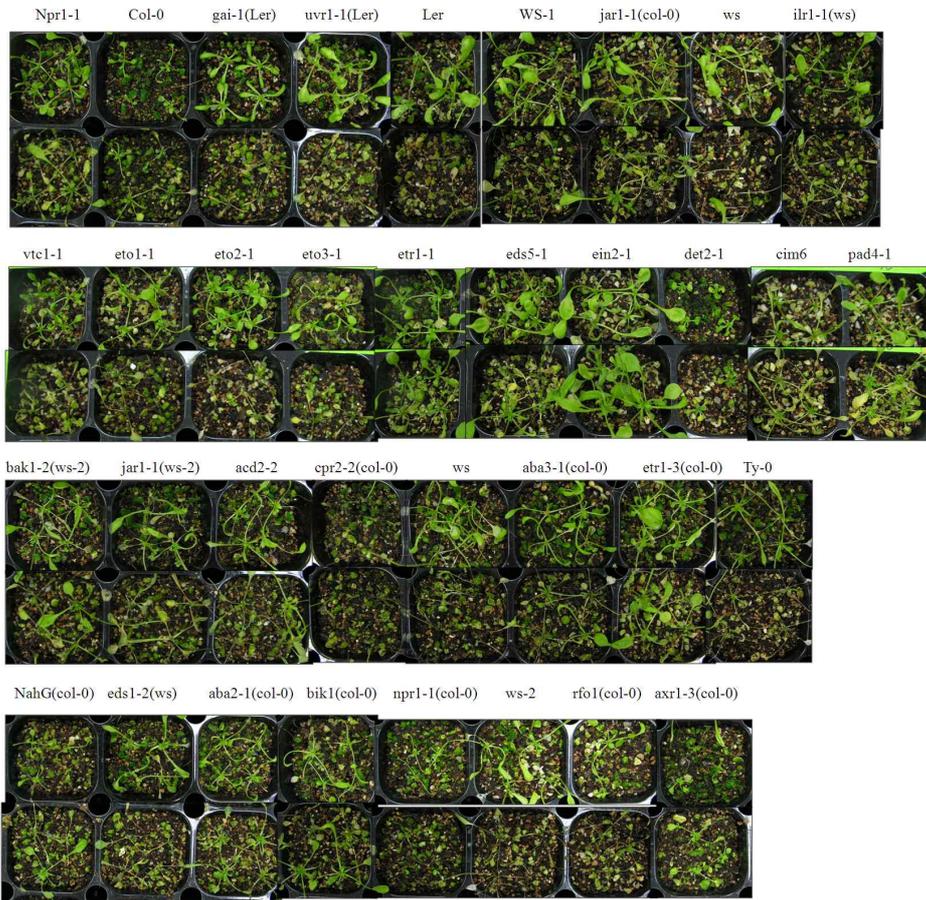
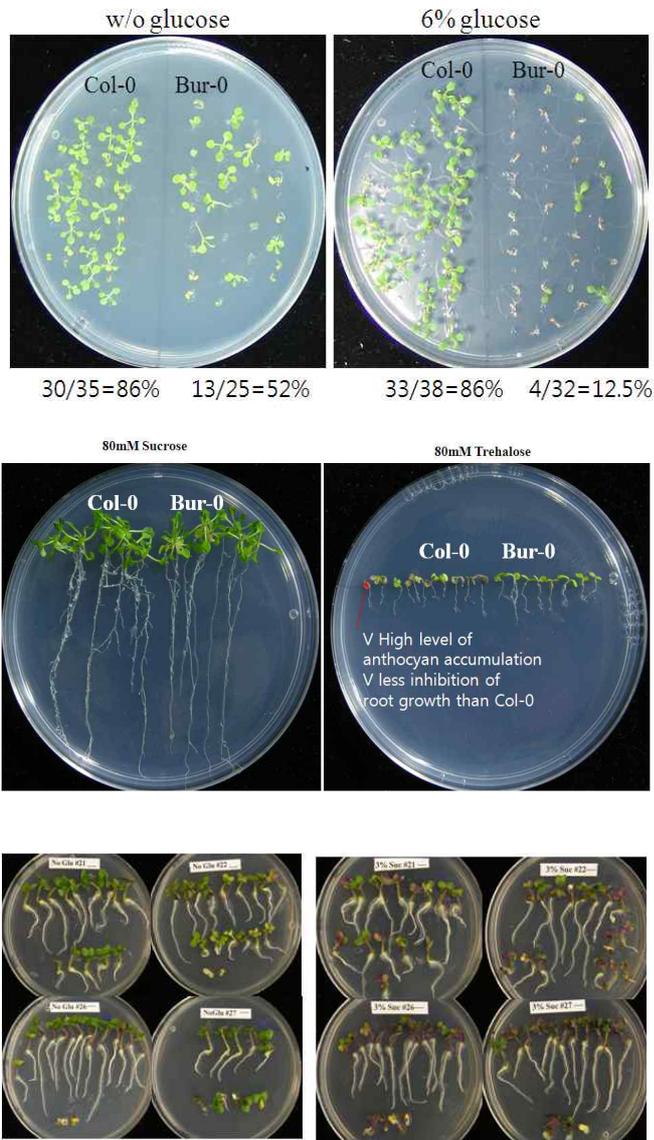


그림 5-12. 애기장대 돌연변이체에 *F. oxysporum*을 처리한 후 phenotype



Anthocyanin unit

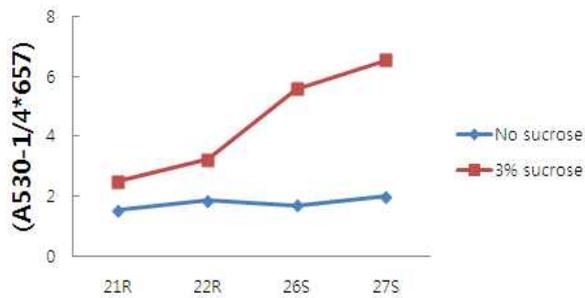
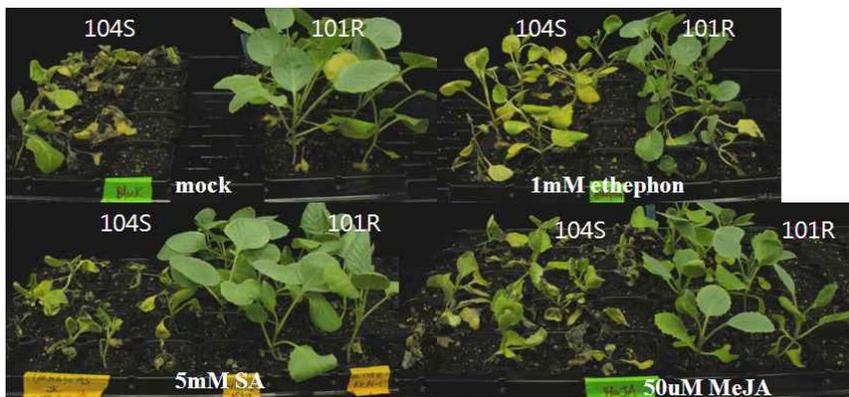


그림 5-13. 시들음병과 뿌리혹병 저항성 감수성 식물의 당 대사와 생리학적인 연관 관계

㉔ 병 저항성 관련 식물 호르몬 전 처리 후 감수성 양배추의 병 저항성 관찰

ㄱ. SA, ethylene, MeJA은 식물의 병 저항성 반응에 중요한 기능을 가진 식물호르몬으로 알려져 있다. 양배추의 시들음병 감수성 품종에서 저항성 관련 식물 호르몬 처리시 병 저항성 변화를 관찰하기 위하여 5 mM SA, 1 mM ethephon, 50 uM MeJA를 하루 전에 식물체에 처리하여 *F. oxysporum* 병 발병도를 mock 처리와 비교하였다.

ㄴ. 저항성 계통 (101R)에 비해 병 저항성이 증가하는 것은 아니지만 감수성 양배추 계통에서 mock 처리한 대조구에 비해서 50uM MeJA 와 1mM ethephon을 전처리한 양배추의 병 저항성 반응이 크게 증가하는 것을 관찰하였다 (그림 5-14). 이와 같은 결과는 위의 애기장대 결과와 더해서 양배추의 시들음병 저항성 기작에서 ethylene과 MeJA가 중요한 기능을 한다는 것을 알려주는 결과 이



다.

그림 5-14. 호르몬 전처리후 시들음병 병징 관찰

㉕ 시들음병 저항성 관련 유전자 BoCYP38 연구

ㄱ. Proteomics 분석을 통해서 시들음병에 의해서 유도되거나 차이가 나는 단백질 spots들을 찾았다. 품종간 또는 시들음병 처리간 차이가 나는 80여개의 spot 단백질을 MALDI-TOF/TOF MS방법으로 분리된 단백질을 gel상에서 트립신을 처리를 한 후, 트립신 처리된 펩타이드들의 질량을 분석함으로써 그 단백질이 무엇인지 동정하였다 (표 5-1).

표 5-1. MALDI-TOF/TOF MS 분석으로 동정한 단백질

20	D7L9P5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	197	3E-13	48.18/5.06	K.LEAGMQDMLKIVEDR.K(31) K.IKDNPNIEDCVFR.I(49) R.IVLDGYNAPVTAGNFVDLVER.H(66) R.HFYDGMIEQR.S(18)	37%	Arabidopsis lyrata subsp. Lyrata
21	D7L9P5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	320	1.5E-25	48.30/4.97	K.LEAGMQDMLKIVEDR.K(31) K.IKDNPNIEDCVFR.I(86) R.IVLDGYNAPVTAGNFVDLVER.H(86) R.HFYDGMIEQR.S	37%	Arabidopsis lyrata subsp. Lyrata
22	D7L9P5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	285	4.7E-22	48.30/4.97	K.LEAGMQDMLKIVEDR.K(22) K.IKDNPNIEDCVFR.I(43) R.IVLDGYNAPVTAGNFVDLVER.H(95) R.HFYDGMIEQR.S(28) K.AQVMLPFNAFGTMAMAR.E(17)	35%	Arabidopsis lyrata subsp. Lyrata
37	D7L9P5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	134	5.9E-32	48.30/4.97	K.LEAGMQDMLKIVEDR.K(55) K.IKDNPNIEDCVFR.I(54) R.IVLDGYNAPVTAGNFVDLVER.H(98) K.AQVMLPFNAFGTMAMAR.E(41)	36%	Arabidopsis lyrata subsp. Lyrata
38	D7L9P5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	358	2.40E-29	48.30/4.97	K.LEAGMQDMLKIVEDR.K(64) K.IKDNPNIEDCVFR.I(61) R.IVLDGYNAPVTAGNFVDLVER.H(107) R.HFYDGMIEQR.S(34) K.AQVMLPFNAFGTMAMAR.E(19) K.ESELTSPNSNILDGR.Y(10)	33%	Arabidopsis lyrata subsp. Lyrata
39	D7L9P5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	315	4.70E-25	48.30/4.97	K.LEAGMQDMLKIVEDR.K(28) K.IKDNPNIEDCVFR.I(49) R.IVLDGYNAPVTAGNFVDLVER.H(90) R.HFYDGMIEQR.S(38) K.AQVMLPFNAFGTMAMAR.E(19)	42%	Arabidopsis lyrata subsp. Lyrata

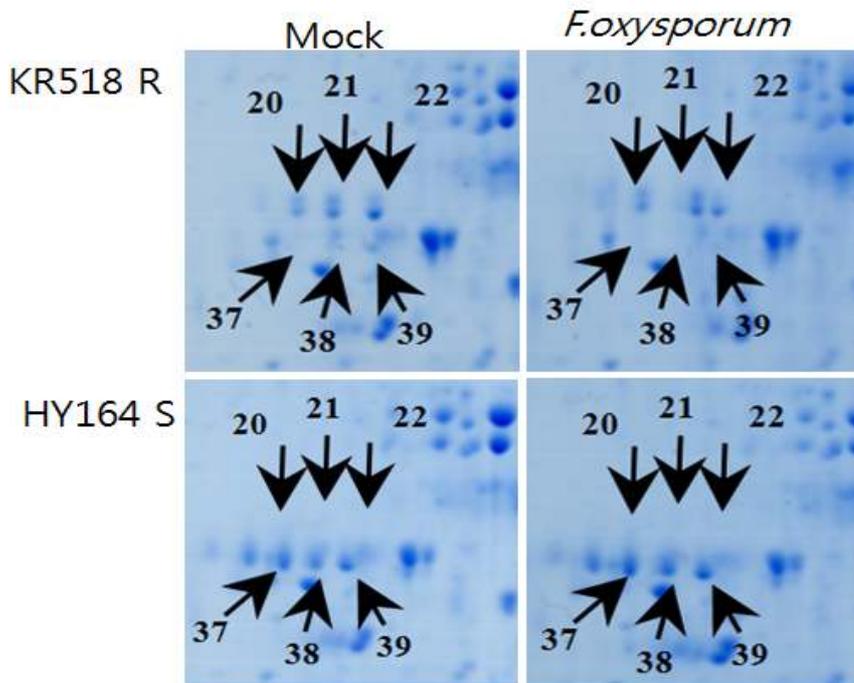


그림 5-15. Image Master Program 분석에서 gel spots의 volumn을 비교

- ㄴ. Spot No. 20, 21, 22, 37, 38, 39 이 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (CYP38)로 동일한 단백질을 확인하였고 시들음병 저항성 품종에서는 spot No. 20, 21, 22이 발현하고 감수성 품종에서는 No. 37, 38, 39 spots이 발현하는 것으로 두 품종간 다른 단백질의 양상을 관찰하였다 (그림 5-15). spot. 21은 저항성 mock 처리구에서 보다 Foc 처리구에서 인산기에 의한 phosphorylation 되는 pattern을 관찰 하였고 no. 22는 Foc 처리구에서 단백질의 발현이 감소하는 양상을 보였다.
- ㄷ. 엽록체 단백질인 시클로필린 38 (cyclophilin 38; CYP38)은 애기장대의 다양한 시클로필린 중 하나로 시클로필린 도메인과 E-루프 (E-loop)를 가지고 있고, 엽록소 단백질 47 (chlorophyll protein 47)과 결합하여 엽록체 내의 틸라코이드에서 광계 II (photosystem II) 복합체의 안정성을 조절하는 조절자로서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 또한, 애기장대 시클로필린 38은 펩티딜-프롤릴 시스-트랜스이소머라아제 (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) 유전자 서열이 보존되어 있음에도 불구하고, 다른 시클로필린 단백질과는 달리 펩티딜-프롤릴 시스-트랜스이소머라아제 효소 기능이 없는 것으로 보고되었다. CYP38은 여러 비생물학적 스트레스 반응에 있어 중요 기능을 수행하는 것으로 알려져 있으나, 아직까지 본 발명에 제시된 생물학적 병 저항성에 대한 기능은 보고된 바가 없다. 이러한 이유로 BoCYP38 단백질이 시들음병에 의한 조절 유전자임을 양배추 저항성과 감수성 품종을 구분하는 후보 단백질로 선택하여 연구를 진행하였다.
- ㄹ. 양배추 (*Brassica oleracea*)의 BoCYP38 유전자는 애기장대 AtCYP38 (At3g01480) 유전자와 염기서열이 84% 일치하는 유전자이다. 시들음병 저항성 품종과 감수성 품종에서 확보한 BoCYP38 cDNA를 비교한 결과 BoCYP38R 저항성 유전자 염기서열에서 선택적 스플라이싱이 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 같은 유전자일지라도 선택적인 스플라이싱이 일어나 다른 mRNA들이 생성될 수 있으며, 따라서 다른 단백질이 만들어질 수 있다. BoCYP38 저항성 유전자는 감수성 유전자와 비교했을 때, 4번째 인트론에서 선택적 스플라이싱 일어나서 BoCYP38S와는 다른 mRNA가 생성되는 것으로 확인되었다. 선택적 스플라이싱 결과 감수성 BoCYP38 유전자에 비해 75 bp (25개 아미노산)가 더 긴 cDNA가 합성되었으며 (그림 5-16), 이는 양배추에서 시들음병 저항성을 부여하는 단백질이 BoCYP38 유전자의 선택적 스플라이싱에 의해서 생성된다는 것을 나타낸다.
- ㅁ. 시들음병 저항성 양배추 품종에서 특이적으로 발현되는 CYP38

cDNA 염기서열을 확보하였고, Q-RT-PCR을 통해 저항성 품종의 *CYP38* mRNA가 감수성 품종에는 존재하지 않는다는 것을 확인하였다. 또한 이러한 시들음병 저항성 특이적 *CYP38* mRNA가 저항성 양배추 품종과 감수성 양배추 품종 *CYP38* 게놈 DNA에 존재하는 엑손과 인트론의 선택적 스플라이싱에 의해서 나타남을 확인하였다.

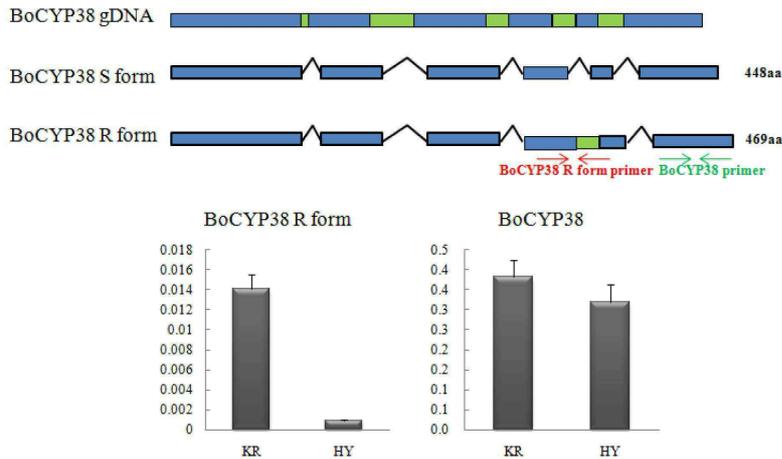


그림 5-16. 선택적 스플라이싱이 일어나는 BoCYP38R form

㉞ 모델 식물에의 도입을 통한 *cyp38*의 기능 연구

ㄱ. 엽록체 단백질인 시클로필린 38 (cyclophilin 38; CYP38)은 애기장대의 다양한 시클로필린 중 하나로 시클로필린 도메인과 E-루프 (E-loop)를 가지고 있고, 엽록소 단백질 47 (chlorophyll protein 47)과 결합하여 엽록체 내의 틸라코이드에서 광계 II (photosystem II) 복합체의 안정성을 조절하는 조절자로서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 또한, 애기장대 시클로필린 38은 펩티딜-프롤릴 시스-트랜스이소머라아제 (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) 유전자 서열이 보존되어 있음에도 불구하고, 다른 시클로필린 단백질과는 달리 펩티딜-프롤릴 시스-트랜스이소머라아제 효소 기능이 없는 것으로 보고되었음. CYP38은 여러 비생물학적 스트레스 반응에 있어 중요 기능을 수행하는 것으로 알려져 있으나, 아직까지 본 생물학적 병 저항성에 대한 기능은 보고된 바가 없음. 이러한 이유로 #14(시들음병 저항성), #16(시들음병 감수성) *cyp38* 유전자의 시들음병 관련 기능 연구를 수행하기 위해 저항성, 감수성 품종에서 각각 genomic DNA, cDNA를 분리하고 이들을 식물 발현벡터에 도입 하였음.

ㄴ. 애기장대 형질 전환체에서 시들음 병균을 처리하고 이들의 병저항

성 반응을 확인 한 결과 감수성 *cyp38* 유전자가 도입된 현이질 전환체가 병원균에 대해 더 저항성이 줄어든 것을 확인 할 수 있었다. 반면, 저항성 개체로부터 분리된 CYP38이 도입된 개체는 대조군과 같은 저항성을 보였는데, 이는 형질전환체 애기장대내에 가진 기존의 CYP38이 있기 때문에 그 영향을 관찰하기 어려운 것이 아닌가 사료 된다.

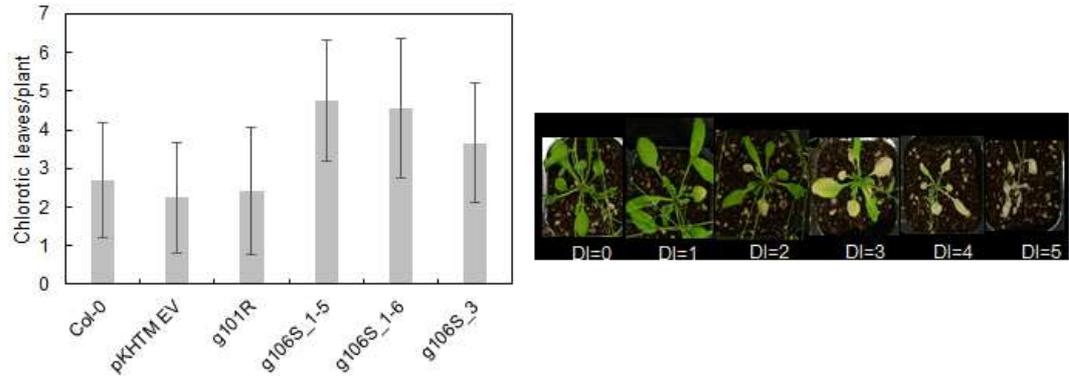


그림 5-17 양배추의 CYP38 유전자가 도입된 애기장대 형질전환체의 시들음병 저항성을 관찰 함.

④ 병 관련 chitinase 유전자 연구

㉑ 병 관련 chitinase 유전자의 동정

다른 식물들에서 많은 수의 키틴가수분해효소(chitinase) 유전자들이 발견되고 분리되었는데, 이들의 발현은 식물병원균에 의한 감염뿐만 아니라 비생물적인 요인들 즉 물리적인 상처와 염류, 자외선 등의 환경적인 요인들, 여러 가지 식물 성장조절물질들을 포함하는 화학물질의 처리에 대해서도 그 발현이 유도되는 것으로 알려져 있다. 본 연구실은 배추 유래 완전장 cDNA library로부터 선행연구를 통해 약 3,500 개의 clone 염기분석을 통하여 3개의 chitinase 유전자를 동정하였다 (*BrCLP1*, *BrCLP2*, *BrCLP3*)(그림 5-18).

이들 동정된 배추 유래 3개의 chitinase 유전자들의 물리적 구조를 확인하기 위하여 *BrCLP1*, *BrCLP2*, *BrCLP3* 유전자 각각에 대하여 primer (*BrCLP1*-F: 5'-ATG GCT CTC ACA AAA TTA TCC T-3', *BrCLP1*-R: 5'-CGA ATA ACT CTT TAG CAG CTA AG-3', *BrCLP2*-F: 5'-GCT ATG GTG ACG ATC CGT AGC-3', *BrCLP2*-R: 5'-GTT GGA GAC TTA CGA GGA AGA G-3', *BrCLP3*-F: 5'-TGC TTG TTA AGC TAT GGT GAC GA-3', *BrCLP3*-R: 5'-CGT TCA TGG TGG TAC CAA AAG T-3')를 합성하여 PCR로 증폭하였다. PCR 증폭산물은 TA cloning하여 sequencing하여 염기를 분석하였다. 그 결과 *BrCLP1* 유전자는 2개의 exon과 1개의 intron을 가진 유전자이었으며, *BrCLP2* 유전자는 5개의 exon과 4개의 intron으로 구성되어 있었다. 또한, *BrCLP3* 유전자는 3개의 exon과 2개의 intron으로 구성된 유전자이었다(그림 5-19). 동정된 3개의 chitinase 유전자들은 기존의 보고된 chitinase 유전자들과의 상동성을 비교하였다. *BrCLP1* 과 4개의 보고된 chitinase 유전자들(*Galega orientalis*(AAP03085), *Vitis vinifera*(AAB65776), *Brassica napus*(Q06209), *Arabidopsis thaliana*(CAA74930))과의 상동성 비교는 그림 5-20a에 나타내었으며, *BrCLP2* 및 *BrCLP3*와 기존의 보고된 chitinase 유전자들(*Gossypium hirsutum*(AAP80801, AAQ56599, AAQ56598))과의 상동성 비교는 그림 5-20b에 나타내었다. 동정된 3개의 chitinase 유전자들은 기존의 보고된 chitinase 유전자들과 아미노산 수준에서 50% 이상의 높은 상동성을 나타내었다. 또한 chitinase 유전자들은 7개의 class로 분류되는데 새롭게 배추에서 동정된 3개의 chitinase 유전자들 중 *BrCLP1* 유전자는 class IV에 속하였고, *BrCLP2* 및 *BrCLP3* 유전자는 class VII에 속하였다(그림 5-21).

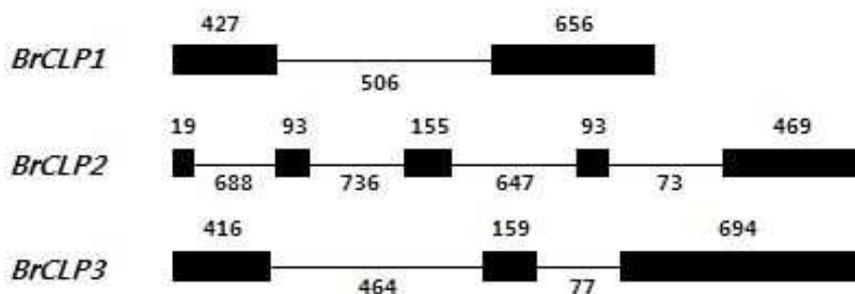


그림 5-19. 동정된 3개의 chitinase 유전자들의 물리적 구조

a)

```

10      20      30      40      50      60      70      80
BrCLP1  -----MALTKLSLVFLCFLGLYS-----ETVKSQHCCGCAPNLCCSQFYCGSTDAYCGTGGRSGPCRSPGGTPSPPGGGEVGSIVTQ 78
AAB65776.1 -----MAAKLLTVLLVGALFG-----AAVAQHCCGCAGLCCSKYYCGTGSDYCGDGQOSGPCDS-----SGSSVSSDIVTQ 66
AAP03085.1 -----MTMMGNKLOSISIVGFAIFLIMIIVPINVSAQHCCGAGVCCSQYYCGNGDPYCGTGKOGPCYGS-----T-LSSSVADIVTP 81
Q06209.2 -----MALTKLSLVFLCFLGLYS-----ETVKSQHCCGCAPNLCCSQFYCGSTDAYCGTGGRSGPCRSPGGTPSPPGGGEVGSIVTQ 78
CAA74930.1 MLTPTISKSISLVTILLVLQAFSN-----TTKAQHCCGSSEELCCSQFHFCNTSDYCGVGQQGPCFAP----PPANGVVAEIVTQ 78

100     110     120     130     140     150     160     170
BrCLP1  AFTNGIINQAGGGCAGKNYTRDSIHAANTFPNAN---SVTRREIATMANFTHETG-HFCYIEEINGASRDYCDENNROYPCAPGK 163
AAB65776.1 SFDGIISQAASSCAGKNYTRAALLSALNSYSGGGNDGSDANKREIAAFANVTHETG-HFCYIEEINGASHNYCDSNTOYPCVSGQ 155
AAP03085.1 AFTNGIINQAGSSCAGKNYTRAALLHALNSYNOGKGGSLDDTKREIAAFANFTHETG-HFCYMEEINGASHNYCDTKTOYPCAPGK 170
Q06209.2 AFTNGIINQAGGGCAGKNYTRDSIHAANTFPNAN---SVTRREIATMANFTHETG-HFCYIEEINGASRDYCDENNROYPCAPGK 163
CAA74930.1 EFTNGIISQAASSCAGHREYSRGALELDSYSSRGRVGSDDDSREIAAFANVTHETGRHFCYIEEIGASKDYCDENATOYPCNHHK 160

190     200     210     220     230     240     250     260
BrCLP1  GYFGRGRIQLSWHYGACQSLLHLNLGPELVSSHPTVARTGLWYWMNSYRPYLNQGFGATIRAINH-GMECHGGHSGRSMOGLVYYR 252
AAB65776.1 NYFGRGRLQLTWHYGAAQNSIGFNGLSNPCIYATDVVTSKTALFWYWMNYNSYIGQGFGATIRAINHGAVCHGGHTAAVNARVOYYK 245
AAP03085.1 GYFGRGPLQITWHYGPATDNGFDGKSPEYANHAVISKTALFWYWMKYNSYVNQGFGATIRAINSICHGGHSNAVOARVNYYIT 259
Q06209.2 GYFGRGRIQLSWHYGACQSLLHLNLGPELVSSHPTVARTGLWYWMNSYRPYLNQGFGATIRAINH-GMECHGGHSGAVNARIRYYR 252
CAA74930.1 GYFGRGRIQLSWHFYGPAGTAIGFDGLNAPEYATDPVISKTALFWYWYTRQOPYISQGFGATIRAINHGALEGDGATATQORVRYYIT 258

280
BrCLP1  DYGGOLGVDPGNLSC 260
AAB65776.1 DYGSOLGASPGNLTC 261
AAP03085.1 QYGSOLGVAPGNLKC 275
Q06209.2 DYGGOLGVDPGNLSC 260
CAA74930.1 DYGRDLGVDGHNLTC 274

```

b)

```

10      20      30      40      50      60      70      80
BrCLP3  MVTIRSVSVFIIVLLAISSALVANGE---DKTIKVKKVKKVKTOGWECVWWSEYCCHTISSBYFQVYQFEQFAKRHTPIAHAVGFW 87
BrCLP2  MVTIRSVSVFIIVLLAVSTALVANGE---DKTIKVKKVKKVKTOGWECVWWSEYCCHTISSBYFQVYQFEQFAKRHTPIVHAVGFW 87
ACD93719.1 ---METKSMCLVLSVFVMVSIVDAD---TSPVVKKIKGRVYQDGWECKGWSEYCCHLTISBYFQVYQFENLFAKRHTPIVHAVGFW 84
AAQ56599.1 ---MEAKWLVLSVAAMVALANCO---ESLKPLVKKVKKKLQRGWECKGWSKYCCHTISSBYFQVYQFEDLFAKRHTPIVHAVGFW 83
AAQ56598.1 ---MEAKWLCFTMAALMAVSHGO---ESVKKPLVKKVKKKLQRGWECKGWSKYCCHTISSBYFQVYQFENLFAKRHTPIVHAVGFW 82
AAP80801.1 MADFKKKATALITVALLVNALMVDADGDDDKIRVRKKKEQIGWECVWSKYCCNKTVSDVYQVYQFEDLFAKRHTPIVHAVGFW 90

100     110     120     130     140     150     160     170
BrCLP3  DYQSEFITAAALFEPLGFGTTGKLMGQKEMAAFLGHVASKTCCGYGVATGGPLAWGLCYNREMSPMQSYCDETWKYYPCSPGAEYYGRG 177
BrCLP2  DYQSEFITAAALFEPLGFGTTGKLMGQKEMAAFLGHVAS-TSCGYGVATGGPLAWGLCYNREMSPSQSYCDETWKYYPCSPGAEYYGRG 176
ACD93719.1 DFKSFITASNIYQPLGFGTTGKLOMLEVAAFLAVGSOTSCGYGVATGGPLAWGLCYNREMSPMQSYCDENYKYYPCAPGAVYYGRG 174
AAQ56599.1 DYHSFITAAAQYQHGFGTTGKLQSMKEVAAFLAVGSKTSCGYGVATGGPLAWGLCYNREMSPSKIYCDYYKYYPCTPGVSHGRG 173
AAQ56598.1 DYHSFITAAAQYQHGFGTTGKLQSMKEVAAFLAVGSKTSCGYGVATGGPLAWGLCYNREMSPSKIYCDYYKYYPCTPGVSHGRG 172
AAP80801.1 DYHSFILAASIFEPLGFGTTGKLRMQKEVAAFLAVGSKTSCGYGVATGGPLAWGLCFFREMSPSQYCDYYKYYPCAPGAOYYGRG 180

190     200     210     220     230     240     250     260
BrCLP3  ALPIYWNHYFGAAGEALKADLLNHPEYIQRAILAFQAAIWWMTPIKKADPSANDIEVGNWKPTKNDLSKVAQLLVPP----- 257
BrCLP2  ALPIYWNHYFGAAGEALKADLLNHPEYIQRASLAFQAAIWWMTPIKKADPSANDIEVGNWKPTKNDLSKRGPTFTIMNVLYGEYTC 266
ACD93719.1 ALPIYWNHYFGYIGBCIKADLLLNHPEYLQHATLAFQAAIFQWITPLKGLPSANDCMVYSKFRTKNDLSNRVPGGTIMNILYGERTC 264
AAQ56599.1 ALPIYWNHYFGETGEALKVLLLLNHPEYLQHATLAFQWIWMTPKKKQPSANDIEVGNWKPTKNDLAKRVPGGTIMNILYGEQVE 263
AAQ56598.1 ALPIYWNHYFGETGDALKVLLLLNHPEYLQHATLAFQALWWMTPKKKQPSANDIEVGNWKPTKNDLAKRVPGGTIMNILYGEQVE 262
AAP80801.1 ALPIYWNHYFGAAGGIVLLLLLNHPEYLQHATIAFQAAIWWMTPIKKADPSANDIEVGNWKPTKNDLERRGTIGSIMNVLYQYTC 270

280     290     300     310     320
BrCLP3  GGGIEPMMNIVSHYYLDLGVGREEAGPHEESSAEQKAENPTAPTSSSSS 320
BrCLP2  GGGIEPMMNTIITHVYYLDLMGVEAGPHEVTCAEQKPTPNPSTKBSDSSS 318
ACD93719.1 GGGDSSMMNMIISHVYYLDLGVGREAGPHDMTCEEQPTVSPSATSSSS 316
AAQ56598.1 GGGVDTMNMIISHVYYLDLMGVEAGPHEVTCEEQKPTVSPSASSSSSSS 318
AAP80801.1 GGGIEPMMNIISHVYYLDLGVGREEAGPHEESSAEQKAENPTAPPAASSS 325

```

그림 5-20. 동정된 3개의 chitinase 유전자들과 보고된 chitinase 유전자간 상동성 비교

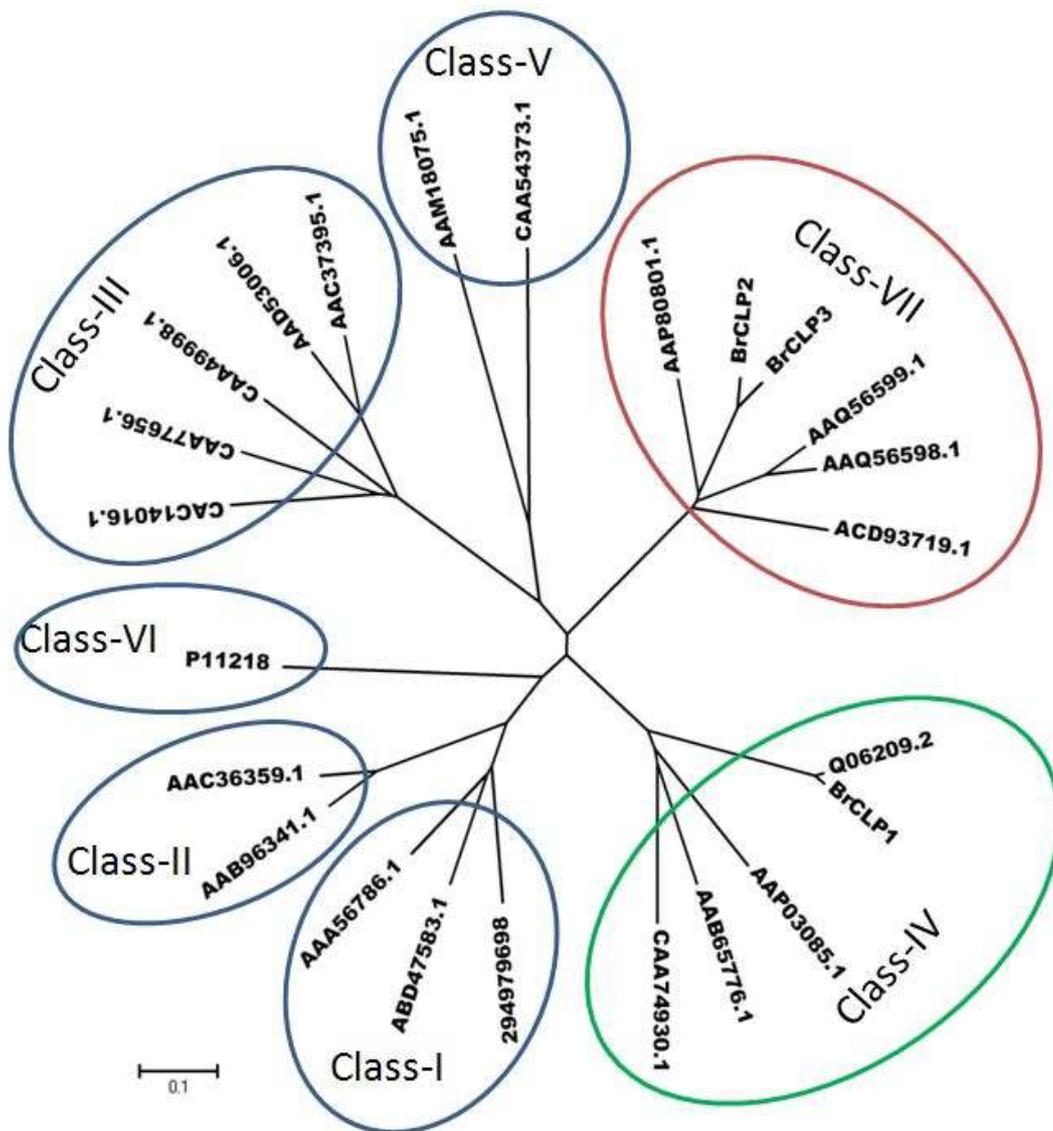


그림 5-21. 동정된 3개의 chitinase 유전자의 계통수

㉔ Chitinase 유전자의 발현 분석

동정된 3개의 chitinase 유전자들의 발현 분석을 위하여 뿌리(R), 줄기(S), 잎(L), 꽃봉오리(Fb)로부터 total RNA를 추출하여 cDNA를 합성하여 이용하였다. 또한, 각각의 유전자들에 대하여 특이적 primer(BrCLP1-FW: 5'-GTT CCA CCG ACG CTT ATT GT-3', BrCLP1-RV: 5'-GGA AAG TAT TTG CGG CGT TA-3', BrCLP2-FW: 5'-CGC CTT ACC CAT TTA CTG GA-3', BrCLP2-RV: 5'-CAC GTT TGG ACA ACG TAT CG-3', BrCLP3-FW: 5'-ATG GGA ATG TGT CTG GTG GT-3', BrCLP3-RV: 5'-GGC AGC CAT TTC TTT CTG TC-3')를 합성하여 RT-PCR을 수행하였다. Control로는 Brassica의 Actin 유전자(BrActin-FW: 5'-ATG GTT GGG ATG GGT CAA AAA-3', BrActin-RV: 5'-TCT TTA ATG TCA CGG ACG ATT-3')를 이용하였다. RT-PCR을 이용한 이들 3개의 유전자에 대한 발현 분석 결과 *BrCLP1*, *BrCLP2*, *BrCLP3* 유전자 모두는 뿌리(R), 줄기(S), 잎(L), 꽃봉오리(Fb)에서 모두 발현하였지만 *BrCLP1* 유전자는 꽃봉오리(Fb)에서의 발현이 약하였다(그림 5-22A). 농촌진흥청의 배추 microarray data를 이용한 *BrCLP1*, *BrCLP2*, *BrCLP3* 유전자들의 발현 분석 역시 RT-PCR 결과와 동일함을 나타내었다(그림 5-22B). 또한, microarray data를 이용한 이들 3개의 유전자들에 대한 생육별 발현 분석으로부터 이들 3개의 chitinase 유전자들은 모든 생육 단계에서 발현하였다(그림 5-22C).

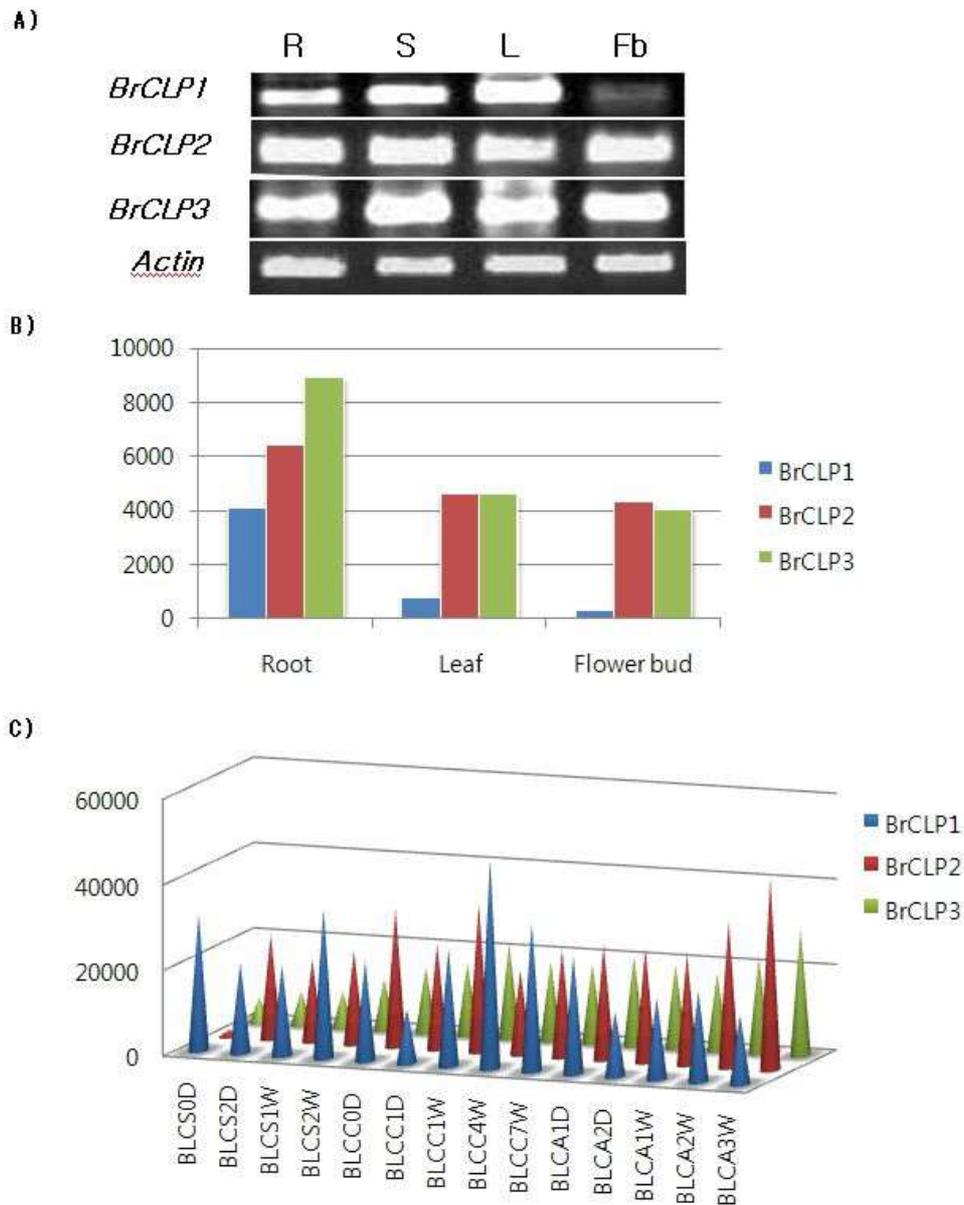


그림 5-22. RT-PCR 및 microarray를 이용한 chitinase 유전자들의 발현 분석 (A, B) chitinase 유전자들의 기관별 발현분석 (C) chitinase 유전자들의 생육별 발현 분석

BLCS0D: seed, mature; BLCS2D: seedling, 2-days-old; BLCS1W: whole plant, 1-week old vegetative stage, 7 days-old; BLCS2W: whole plant, 2-week old vegetative stage, 14 days-old); BLCC0D: whole plant, 1 day after light-chilled at 4°C, 21 days-old; BLCC1D: whole plant, 1 day after light-chilled at 4°C, 22 days-old; BLCC1W: whole plant, 1 week after light chilled at 4°C, 28 days-old; BLCC4W: whole plant, 4 weeks after light chilled at 4°C, 56 days-old; BLCC7W: whole plant, 7 weeks after light chilled at 4°C, 70 days-old; BLCA1D: whole plant, 1 day after green house growth, 71 days-old; BLCA2D: whole plant, 2

days after green house growth, 72 days-old; BLCA1W: whole plant, 1 week after green house growth, 77 days-old; BLCA2W: whole plant, 2 weeks after green house growth, 84 days-old; BLCA3W: whole plant, 3 weeks after green house growth, 91 days-old.

㉔ Database를 이용한 배추 chitinase 유전자의 동정

선행연구를 통해 배추 완전장 cDNA library로부터 동정된 3개의 chitinase 유전자 이외에 배추에 있어서 chitinase 유전자가 더 존재하는 것을 확인하기 위하여 Brassica database(BRAD)를 이용하여 탐색하였다. 그 결과 배추에는 본 실험실에서 동정한 3개의 chitinase 유전자를 포함하여 총 30개의 chitinase 유전자가 존재하였다. 이들 30개의 chitinase 유전자들과 기존에 보고된 chitinase 유전자들간의 계통수를 분석한 결과 7개의 class 중 배추 30개의 chitinase 유전자들은 class I, IV, V, VII에 각각 분포하였지만 class II, III, VI에는 분포하지 않았다(그림 5-23). 또한, 이들 30개의 chitinase 유전자들의 도메인을 검색한 결과 chitin binding domain만을 포함하는 유전자들, transmembrane domain과 chitin binding domain을 가진 유전자들, glycoside hydrolase domain만을 가진 유전자들, transmembrane domain과 glycoside hydrolase domain을 가진 유전자들, transmembrane domain만을 가진 유전자들로 구분되었다(그림 5-24).

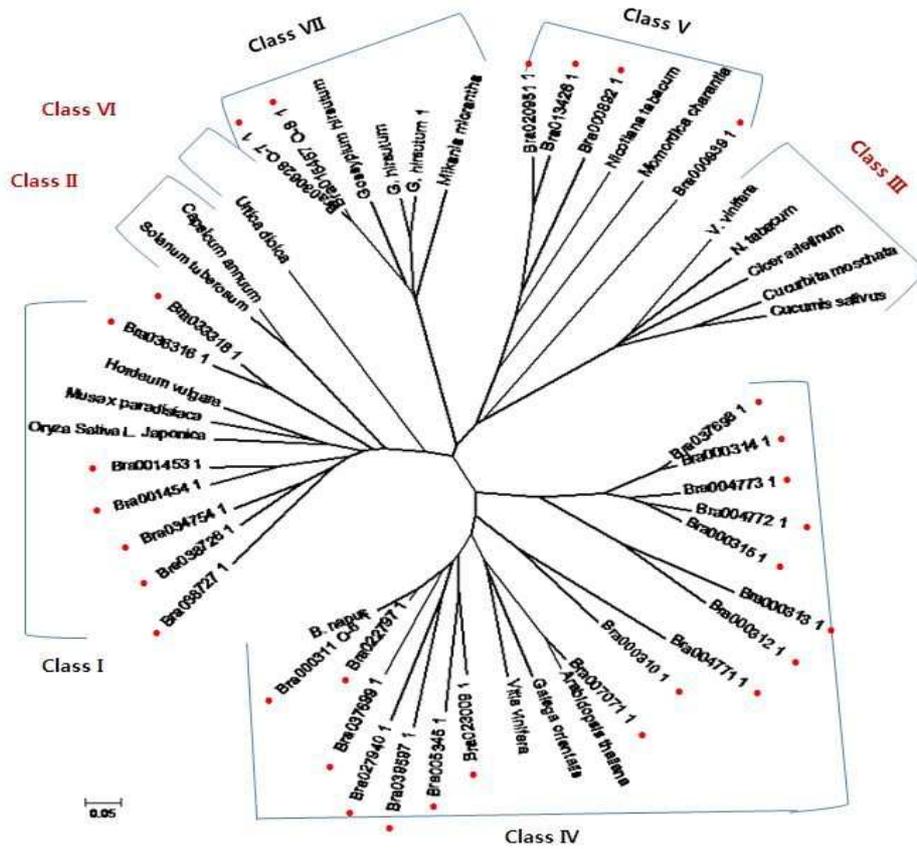


그림 5-23. 동정된 30개의 chitinase 유전자의 계통수



그림 5-24. 동정된 30개의 chitinase 유전자들에 대한 도메인 검색

㉠ Chitinase 유전자의 해석

선행연구를 통해 배추 완전장 cDNA library로부터 동정된 3개의 chitinase 유전자 이외에 Brassica database(BRAD)를 이용하여 30개의 배추 chitinase 유전자를 동정한 후 30개의 chitinase(BrCLP1~30) 유전자를 이용하여 각각의 유전자에 대한 배추의 기관별(뿌리, 줄기, 잎, 꽃봉우리) 발현 양상을 확인하기 위하여 특이적 primer를 디자인한 후 이를 이용하여 RT-PCR 실험을 수행하였다(표 5-2). 그 결과 30개의

chitinase 유전자는 전 기관에서 발현하는 유전자들, 뿌리 특이적으로 발현하는 유전자들 및 꽃봉우리 특이적으로 발현하는 유전자들 등의 다양한 발현 양상을 나타내었다(그림 5-25).

표 5-2. Chitinase 유전자의 기관별 RT-PCR 발현 분석용 primer 염기서열

Gene names	Primer sequences	
	Forward	Reverse
<i>BrCLP1</i>	GTTCCACCGACGCTTATTGT	TCTAATGGTGGCTCCAAACC
<i>BrCLP2</i>	GCAAGGATGGGAATGTGTCT	TTCTTGATCGGTGTCATCCA
<i>BrCLP3</i>	CGGGGAAGACAAGACGATTA	GTA CT CGGGGTGGTTCAAGA
<i>BrCLP4</i>	GCTTGTC CCGCTAGAGGTTT	ACCGTAACCCGTAATCTCC
<i>BrCLP5</i>	CTGCCCCAACAATCTATGCT	GTCTTCTCCAATGGCTGCTC
<i>BrCLP6</i>	GCTGCTCTCCAATCCTATGC	GCTCTAATGGTGGCTCCAAA
<i>BrCLP7</i>	TCCACGTGGTACCATAGCAA	GAGGTTGGTTCCAGGAGTGA
<i>BrCLP8</i>	TGGAGGCTACAAGGTGGTTC	GACTCGTCCATCTCCTGGAA
<i>BrCLP9</i>	CAATGCCGCTAAGTCTTTCC	TCCAATTCTATCCGCGACTC
<i>BrCLP10</i>	TGCAGTCAGTTCGGTTCTTG	TGGCCTTACGCTATTCATCC
<i>BrCLP11</i>	TACAACCCAAGCCGAAAGTC	CACACCAAGCTGCTCACAAT
<i>BrCLP12</i>	GCGGTGGAATCGCTAATAAA	AGTGGTGGCTGCGTAATAGC
<i>BrCLP13</i>	GACTGGGAGTATCCGAGCAG	CTCCAACCACCGAGGAGTTA
<i>BrCLP14</i>	CGGTTTCTGCGGTAACACTT	GGCGGTCTTGAAGGATATGA
<i>BrCLP15</i>	ATTGCGGTAATGGACCAGAC	GCTCCAAATCCTTGGTTCAG
<i>BrCLP16</i>	TAGAAGTGCAAATGGTGTCA	CAA ACTGCCTACAGAACTCC
<i>BrCLP17</i>	AACCACACCTATCCCACCAA	AAGACGGGACGAACATTTTG
<i>BrCLP18</i>	CCTGATCCTAACCGTTTCCA	CTCCCTCGTTCAGGTCTCTG
<i>BrCLP19</i>	AACTTCCCACGAAACCACTG	TCCAGGATCAACACCAAACA
<i>BrCLP20</i>	ACCTGAAGAGCCAAGGGAAT	TTCTTGCCAGGCTTGAATCT
<i>BrCLP21</i>	CTCAAATCGACCGTAGTAGC	GATCATA CAGAGCAGCAGGT
<i>BrCLP22</i>	AGGACCCACACCTGTCTCAC	CCACCGTTGATCTTCTTGT
<i>BrCLP23</i>	CTGCAGCAGATGGGGATATT	CCACATGGCACATTTGAAAG
<i>BrCLP24</i>	GATTACTGCGGATTCTTTTG	GATCCATA CAGAAATGAGC
<i>BrCLP25</i>	ATCGTTGTTCAAACGCATCA	TAACCCCAAGGATCTTGCAC
<i>BrCLP26</i>	GCAGCAAATGGGGT TACTGT	AAGCGGTTTTGAAAGCAAGA
<i>BrCLP27</i>	AAAGCCCATCTGAGCTTGTG	AGGGTCCACACCAAGTTGTC
<i>BrCLP28</i>	GACCTTGCCATGAGGAAGAA	AAACGGCCTTTGATTGTCAC
<i>BrCLP29</i>	TTTGGCTCAGATTT CACACG	CCAGCTATCCCGCATTCTAA
<i>BrCLP30</i>	CACGAGACTACTGCGACGAG	GGGTCTACACCAAGCTGTCC
<i>Br-Actin</i>	ATGGTTGGGATGGGTCAAAAA	TCTTTAATGTCACGGACGAT

T

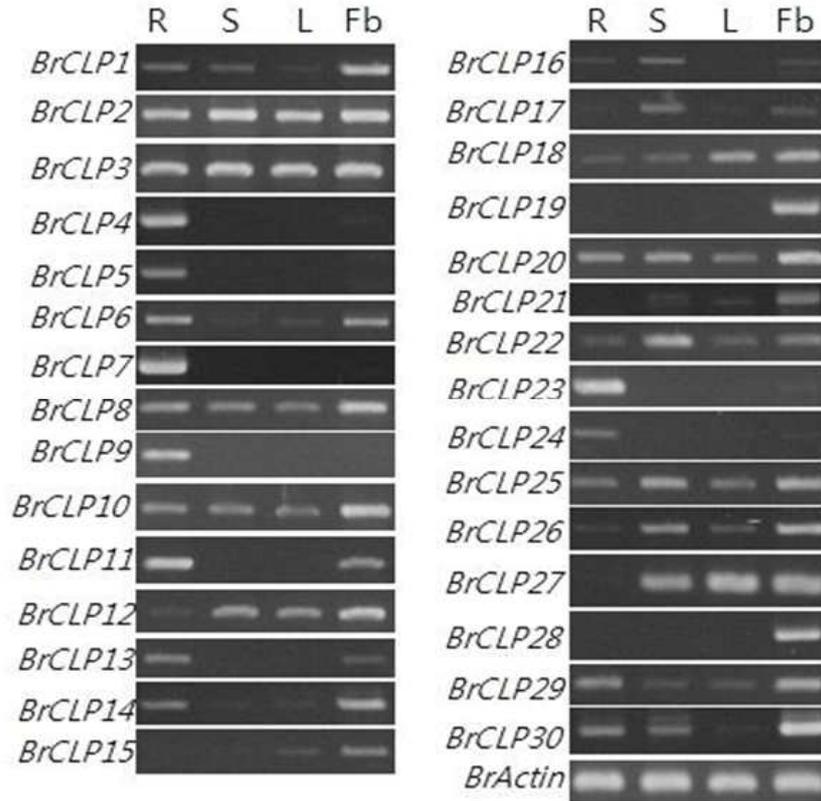


그림 5-25. Chitinase 유전자의 기관별 발현 분석(R: roots, S: stems, L: leaves, Fb: flower buds)

Chitinase 유전자는 식물병원균에 의한 감염뿐만 아니라 비생물적인 요인들 즉 물리적인 상처와 염류, 자외선 등의 환경적인 요인들, 여러 가지 식물 성장조절물질들을 포함하는 화학물질의 처리에 대해서도 그 발현이 유도되는 것으로 알려져 있다. 따라서 배추로부터 30개의 동정된 chitinase 유전자가 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*에 의해 발생하는 양배추 시들음병에 어떠한 발현 반응을 나타내는지 확인하기 위하여 배추 및 양배추의 유묘(파종 후 13일된 유묘)에 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*를 감염 시켰다. 감염은 채소병리검정지원사업단에 의뢰하여 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* 처리 및 무처리 후 0 hour, 3 hour, 6 hour, 24 hour, 6 days, 8 days, 11 days의 각 시간대 별로 2번엽 또는 3번엽을 채취하여 total RNA 추출을 하였다. 우선 기관별 발현 분석에 이용된 30 조합의 특이적 primer를 이용하여 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* 처리 및 무처리된 각각의 RNA에 대하여 RT-PCR을 수행하여 30개의 chitinase 유전자의 발현 양상을 확인하였다.

그 결과 배추의 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* 처리 및 무처리

된 재료에서는 발현 양상이 동일함을 확인하였다. 그러나 양배추의 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* 처리 및 무처리된 재료를 이용한 RT-PCR 발현은 처리구와 무처리구에서 *BrCLP1*, *BrCLP8*, *BrCLP10*, *BrCLP15*, *BrCLP17*, *BrCLP18*, *BrCLP30*의 7개의 유전자들에 대한 발현이 상이함을 나타내었다(그림 5-26). 이들 7개 유전자들의 발현을 더욱 정확하게 확인하기 위하여 각각의 유전자들에 대하여 새롭게 특이적인 primer를 합성하여 Real-time PCR로 발현을 분석하는데 이용하였다(표 5-3). 그 결과 7개(*BrCLP1*, *BrCLP8*, *BrCLP10*, *BrCLP15*, *BrCLP17*, *BrCLP18*, *BrCLP30*) 유전자는 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*가 무처리된 재료인 0 hour, 3 hour, 6 hour, 24 hour, 6 day에서는 발현양이 매우 적었다. 그러나 8 days 및 11 days의 늦은 시간의 재료에서 급격하게 발현양이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*가 무처리된 재료와는 반대로 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*가 처리된 재료에서는 빠른 시간(3 hour 및 6 hour)에서 발현양이 증가한 후 이후에는 발현양이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(그림 40). 또한 양배추 사업단의 양배추 EST database를 이용하여 이들 7개 유전자들과 상동성이 높은 4개의 양배추 EST(BOLC01533, BOLC03121, BOLC08914, BOLC10189)의 염기를 확보하여 Real-time PCR용 특이적인 primer를 합성한 후 이들 재료를 이용하여 발현 양상을 확인하였다(표 4). 그 결과 BOLC10189를 제외한 BOLC01533, BOLC03121, BOLC08914는 배추의 chitinase 유전자들의 발현 양상과 동일하게 무처리 재료에서는 늦은 시간에 발현양이 증가하였지만 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* 처리된 재료에서는 빠른 시간(3 hour 및 6 hour)에서 발현양이 증가한 후 그 이후에는 발현양이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(그림 5-27).

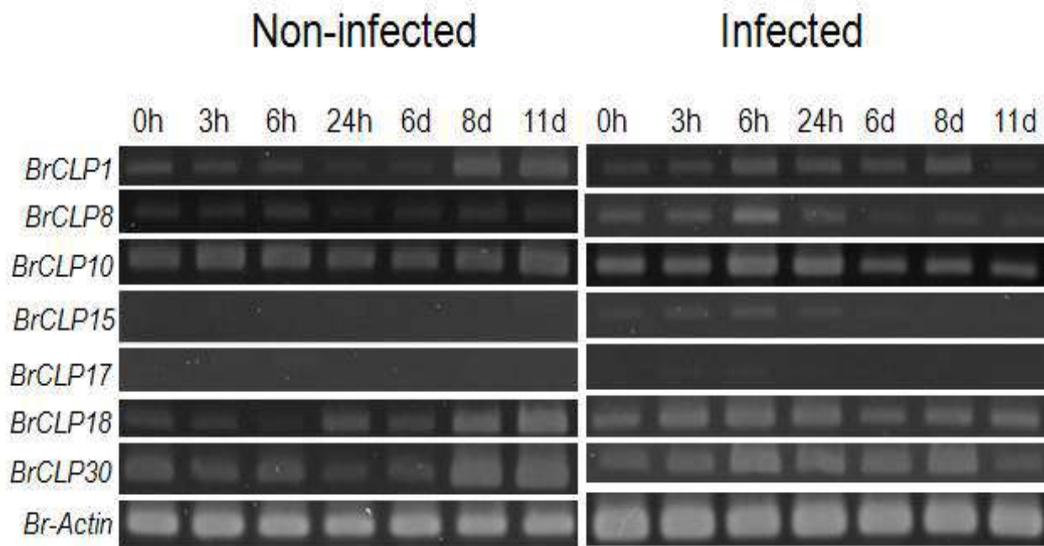


그림 5-26. 양배추의 유묘에 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* 처리 및 무처리 후 RT-PCR을 이용해 배추에서 동정된 chitinase 유전자들의 발현 분석

표 5-3. Chitinase 유전자의 Real-time PCR 발현 분석용 배추 유래 primer 염기서열

Gene names	Primer sequences	
	Forward	Reverse
<i>BrCLP1</i>	GGTCCGATTCAACTATCATG	TCTAATGGTGGCTCCAAACC
<i>BrCLP8</i>	TGGAGGCTACAAGGTGGTTC	CCACTCCGTATTTGAAGC
<i>BrCLP10</i>	TGCAGTCAGTTCGGTTCTTG	TGAAAGAGTCGTGAGTGTAG
<i>BrCLP15</i>	CACCAGGCAAAACCTACTAC	GCTCCAAATCCTTGGTTCAG
<i>BrCLP17</i>	GGTCCTATCCAAATCACATG	AAGACGGGACGAACATTTTG
<i>BrCLP18</i>	CTTCTTTGCTCACGTTGC	CTCCCTCGTTCAGGTCTCTG
<i>BrCLP30</i>	AGCTCTCTGGTTTGGATG	GGGTCTACACCAAGCTGTCC
<i>Br-actin</i>	ATGGTTGGGATGGGTCAAAAA	TCTTTAATGTCACGGACGATT

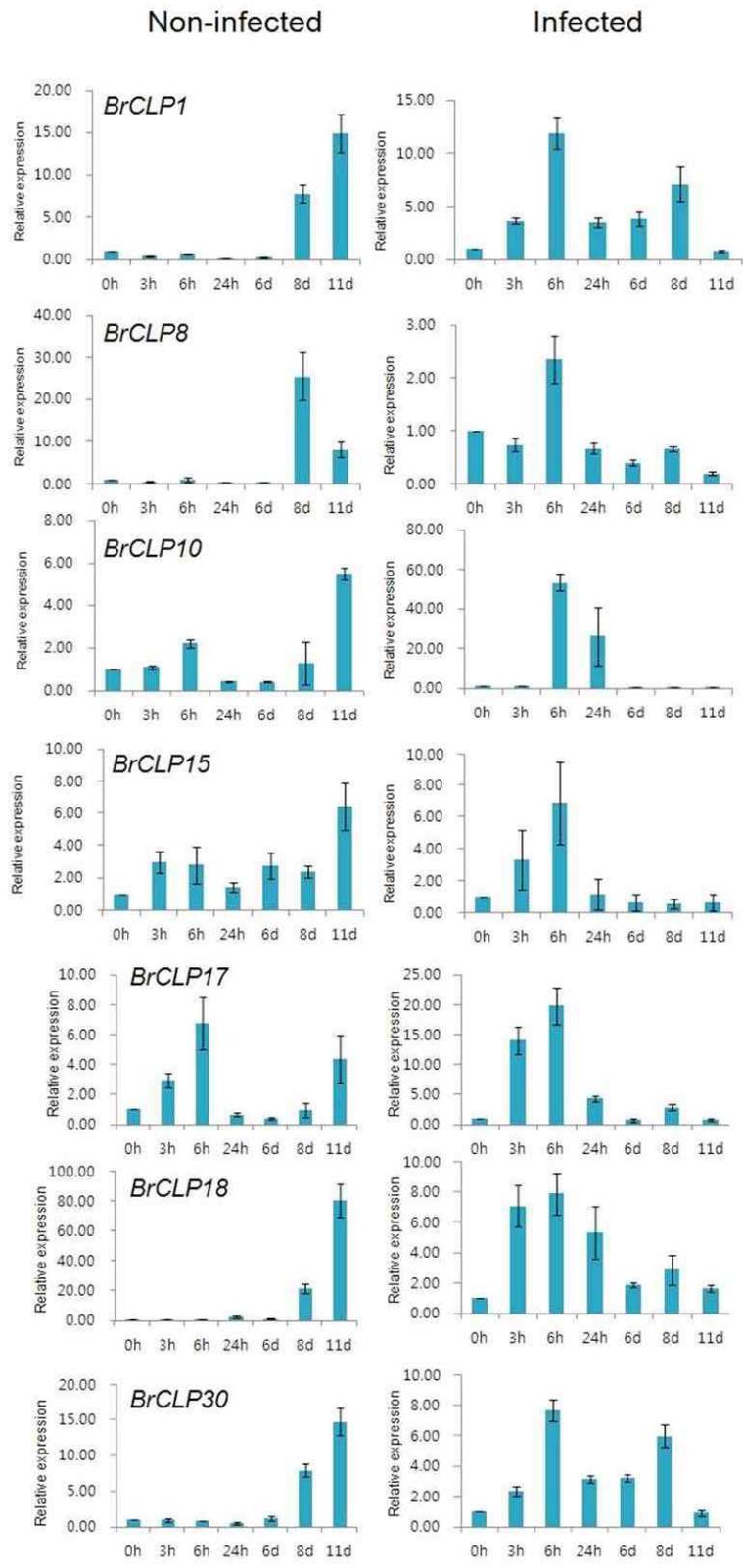


그림 5-27. 양배추의 유묘에 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* 처리 및 무처리 후 Real-time PCR을 이용해 배추에서 동정된 chitinase 유전자들의 발현 분석

표 5-4. 양배추 Chitinase 유전자의 Real-time PCR 발현 분석용 primer 염기서열

Gene names	Primer sequences	
	Forward	Reverse
BOLC01533	AAGAGGTCCCATTCAACTTT	CAAGACGGTTTAGGAGTCTG
BOLC03121	ACTGTGGTCAGACAGAGGAC	CATCTCTTGCTTGGCTTATT
BOLC08914	CTAGGCATAAATGGAAATCG	TGGAGAAAACCTCACTTGTT
BOLC10189	CCAAGTGTAGCTTTCAGGAC	ACCAAGCTGCTCACAATACT

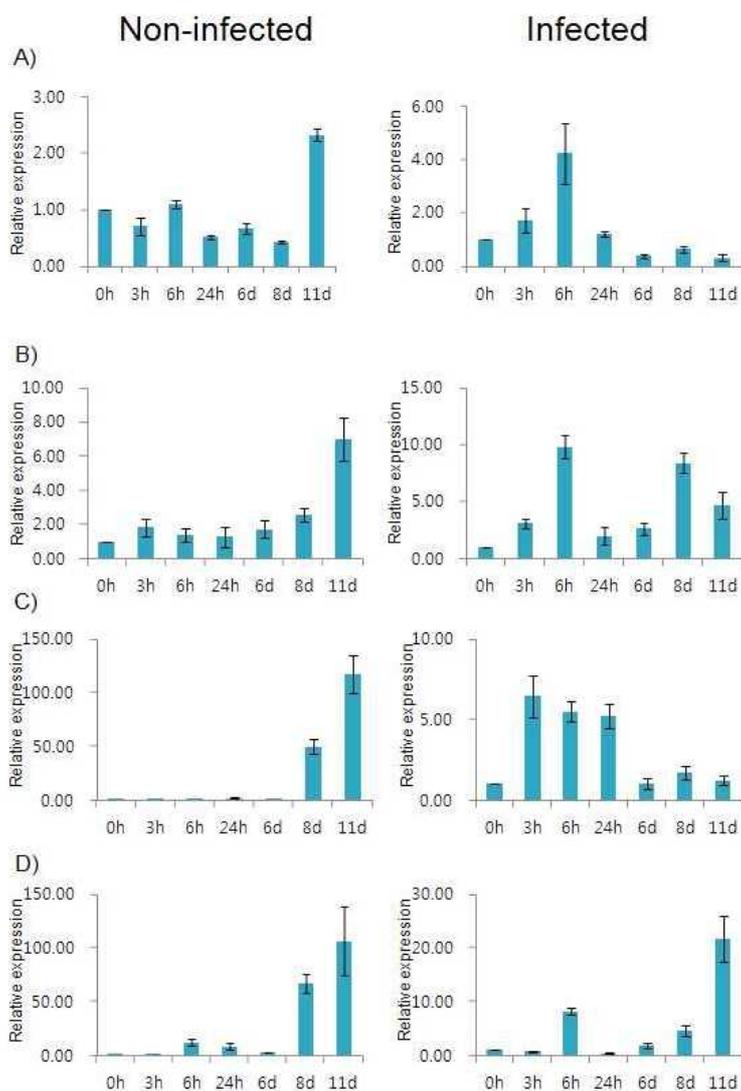


그림 5-28. 양배추의 유묘에 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* 처리 및 무처리 후 real-time PCR을 이용해 양배추 EST 정보로부터 동정된 chitinase-like 유전자들의 발현 분석 (양배추 EST acc. no. (A)BOLC01533, (B)BOLC03121, (C)BOLC08914, (D)BOLC10189)

Chitinase 유전자는 식물병원균에 의한 감염뿐만 아니라 비생물적인 요인들에 대해서도 그 발현이 유도되는 것으로 알려져 있기 때문에 30개의 chitinase 유전자들에 대하여 염, 건조, PEG 등의 스트레스 처리 후 이들 유전자들에 대한 발현 양상을 확인하였다. 그 결과 염 스트레스에 반응하여 발현양이 증가하는 유전자들로는 *BrCLP19*, *BrCLP22*, *BrCLP28*이 있었다(그림 5-29). 또한 건조 스트레스에 반응하는 유전자들은 *BrCLP6*, *BrCLP8*, *BrCLP10*, *BrCLP19*, *BrCLP26*, *BrCLP27*, *BrCLP28*이었으며, PEG 스트레스에 반응하는 유전자들은 *BrCLP7*, *BrCLP8*, *BrCLP22*, *BrCLP23*이었다(그림 5-30, 31).

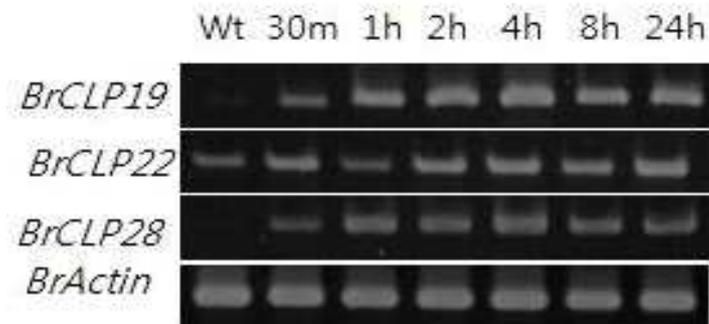


그림 5-29. 염 스트레스 처리 후 chitinase 유전자의 RT-PCR 발현 분석

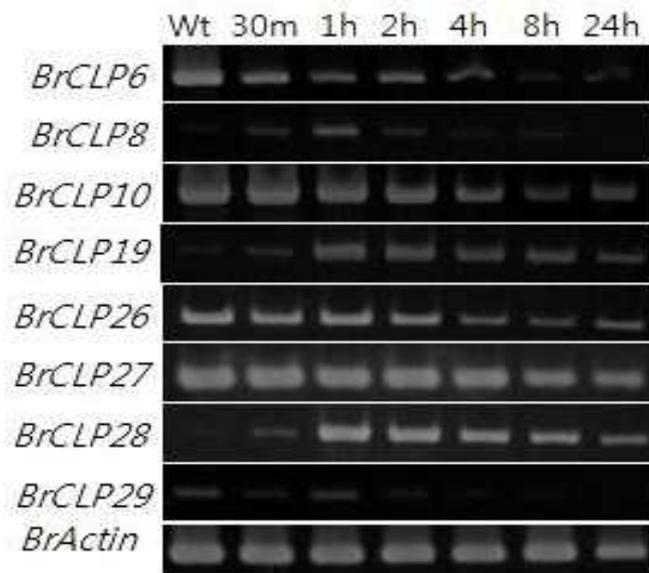


그림 5-30. 건조 스트레스 처리 후 chitinase 유전자의 RT-PCR 발현 분석

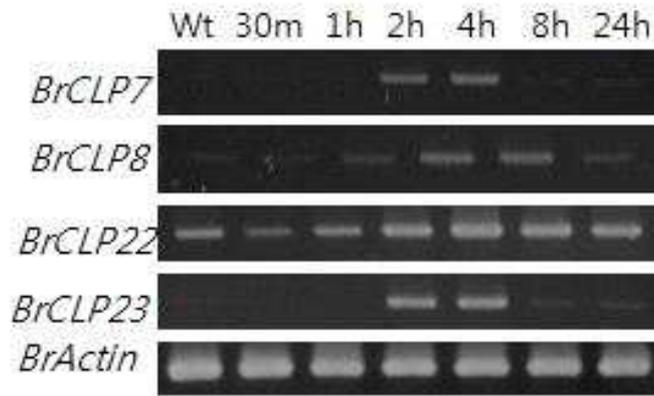


그림 5-31. PEG 스트레스 처리 후 chitinase 유전자의 RT-PCR 발현 분석

2차년도에서 동정한 30개의 배추 chitinase 유전자를 이용하여 유사성 분석을 수행하였다(표 5-5). 총 30개의 chitinase 유전자에서 각 유전자 당 2개의 Top matched clones에 대하여 각각이 속해 있는 Class는 Class I이 10개, Class II가 4개, Class IV가 27개, Class IVa가 7개, Class VII이 4개로 구성되어 있었다. 기능적인 측면으로는 알려져 있지 않은 유전자가 11개, antifungal activity한 것이 5개, enhance fungal resistance가 7개, interaction with pathogen이 10개, responsive to abiotic stresses가 1개, responsive to *Botrytis cinerea*가 2개, responsive to *Fusarium graminearum*이 1개, responsive to pathogen infection이 3개, responsive to *Phoma lingam*이 14개, responsive to *Xanthomonas campestris*가 6개로 다양한 생물학적 스트레스에 관여하며 비생물학적 스트레스에도 반응을 보이는 것을 알 수 있었다.

표 5-5. Chitinase 유전자의 유사성 분석

Gene	Top matched clones	Classes of chitinase	Identity (%)	Functions
<i>BrCLP1</i>	Q06209	Class IV	99	Responsive to <i>Phoma lingam</i>
	ACJ24349	Class IVa	62	Enhance fungal resistance
<i>BrCLP2</i>	AAP80800	Class VII	74	-
	AAP80801	Class VII	74	-
<i>BrCLP3</i>	AAP80800	Class VII	72	-
	AAP80801	Class VII	72	-
<i>BrCLP4</i>	AAF69773	Class I	69	Interaction with pathogen
	AAF69780	Class I	66	Interaction with pathogen
<i>BrCLP5</i>	AAF69773	Class I	79	Interaction with pathogen
	AAF69792	Class I	77	Interaction with pathogen
<i>BrCLP6</i>	Q06209	Class IV	69	Responsive to <i>Phoma lingam</i>

Gene	Top matched clones	Classes of chitinase	Identity (%)	Functions
	CAA74930	Class IV	53	Responsive to <i>Xanthomonas campestris</i>
<i>BrCLP7</i>	Q06209	Class IV	52	Responsive to <i>Phoma lignam</i>
	ACJ24349	Class IVa	52	Enhance fungal resistance
<i>BrCLP8</i>	NP192079	Class II	86	–
	CAA57773	Class II	74	Responsive to <i>Botrytis cinerea</i>
<i>BrCLP9</i>	AAF69773	Class I	89	Interaction with pathogen
	AAF69792	Class I	86	Interaction with pathogen
<i>BrCLP10</i>	Q06209	Class IV	69	Responsive to <i>Phoma ligam</i>
	CAA74930	Class IV	47	Responsive to <i>Xanthomonas campestris</i>
<i>BrCLP11</i>	Q06209	Class IV	71	Responsive to <i>Phoma ligam</i>
	CAA74930	Class IV	57	Responsive to <i>Xanthomonas campestris</i>
<i>BrCLP12</i>	CAA54373	Class V	56	Antifungal activity
	CAA54374	Class V	56	Antifungal activity
<i>BrCLP13</i>	CAA54373	Class V	60	Antifungal activity
	CAA54374	Class V	60	Antifungal activity
<i>BrCLP14</i>	NP191010	Class IV	92	–
	CAA74930	Class IV	91	Responsive to <i>Xanthomonas campestris</i>
<i>BrCLP15</i>	Q06209	Class IV	78	Responsive to <i>Phoma ligam</i>
	CAA74930	Class IV	57	Responsive to <i>Xanthomonas campestris</i>
<i>BrCLP16</i>	Q06209	Class IV	51	Responsive to <i>Phoma ligam</i>
	ACJ24349	Class IVa	50	Enhance fungal resistance
<i>BrCLP17</i>	Q06209	Class IV	49	Responsive to <i>Phoma ligam</i>
	ACJ24349	Class IVa	49	Enhance fungal resistance
<i>BrCLP18</i>	AAB01665	Class IV	96	Responsive to pathogen infection
	NP181885	Class IV	77	–
<i>BrCLP19</i>	AAF69773	Class I	68	Interaction with pathogen
	AAF69792	Class I	67	Interaction with pathogen
<i>BrCLP20</i>	NP192013	Glycosyl 18 family	85	–
	XP002523373	Chitinase protein	59	–
<i>BrCLP21</i>	3AQUA	Class V	58	Responsive to abiotic stresses
	CAA54373	Class V	46	Antifungal activity
<i>BrCLP22</i>	Q06209	Class IV	52	Responsive to <i>Phoma ligam</i>
	ACJ24349	Class IVa	50	Enhance fungal resistance
<i>BrCLP23</i>	Q06209	Class IV	53	Responsive to <i>Phoma ligam</i>

Gene	Top matched clones	Classes of chitinase	Identity (%)	Functions
	ACJ24349	Class IVa	52	Enhance fungal resistance
<i>BrCLP24</i>	AAB01665	Class IV	39	Responsive to pathogen infection
	Q06209	Class IV	38	Responsive to <i>Phoma ligam</i>
<i>BrCLP25</i>	Q06209	Class IV	38	Responsive to <i>Phoma ligam</i>
	AAD28733	Class IV	40	Responsive to <i>Fusarium graminearum</i>
<i>BrCLP26</i>	AAB01665	Class IV	69	Responsive to pathogen infection
	CAA74930	Class IV	55	Responsive to <i>Xanthomonas campestris</i>
<i>BrCLP27</i>	Q06209	Class IV	57	Responsive to <i>Phoma ligam</i>
	NP191010	Class IV	45	-
<i>BrCLP28</i>	AAF69773	Class I	71	Interaction with pathogen
	AAF69787	Class I	68	Interaction with pathogen
<i>BrCLP29</i>	NP_192079	Class II	82	-
	ADF87393	Class II	80	Responsive to <i>Botrytis cinerea</i>
<i>BrCLP30</i>	Q06209	Class IV	92	Responsive to <i>Phoma ligam</i>
	ACJ24349	Class IVa	68	Enhance fungal resistance

그 따라서 chitinase 유전자를 비생물학적인 측면에서 더 자세하게 발현 양상을 알아보기 위하여 과종 후 3주된 배추를 가지고 저온, abscisic acid (ABA), 건조, 염 및 polyethylene glycol (PEG) 스트레스를 시간 대별로 처리하지 않은 wild type과 스트레스를 처리한 후 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 24시간으로 나누어 tRNA를 추출하고 cDNA를 합성하여 발현실험을 수행하였다. 저온 스트레스 하에서는 *BrCLP9* 유전자의 경우 wt부터 1시간 처리 까지는 발현이 약하였다가 2시간 과 4시간 처리 구간에서 높은 발현을 보이다가 8시간과 24시간 처리 구간에서 감소하는 양상을 보였으며, *BrCLP18* 유전자의 경우 wt에서는 발현 양이 적었다가 30분과 1시간 사이에 발현 양이 많아지다가 적어 지는 경향을 보였다. *BrCLP19*은 전체적으로 적은 발현 양을 보이고 있지만 24시간에 가서 발현양이 떨어지는 것을 볼 수 있었다. ABA 스트레스 처리 하에서는 *BrCLP3* 유전자, *BrCLP5* 유전자와 *BrCLP17* 유전자는 wt부터 1시간 처리까지 발현 양이 많았다가 2시간에서 8시간 처리 구간에서는 발현양이 줄어드는 것을 볼 수 있었으며, *BrCLP11* 유전자는 wt과 전 처리 구간에서 발현 양이 모두 높았지만 특히 1시간에서 2시간 처리 구간에서 더 발현양이 높은 것을 확인할 수 있었다. *BrCLP16* 유전자와 *BrCLP21* 유전자는 wt과 처리 30분에서는 발현 양이 적었으나 1시간에서 2시간 처리 사이에서 발현 양이 많아 졌으며 그 이후 처리 시간대에서는 다시 발현 양이 감소하는 것을 볼 수 있었

다. 염 스트레스 처리 하에서는 BrCLP1 유전자가 2시간과 4시간 처리 구간에서만 발현을 보이고 있으며 BrCLP5 유전자와 BrCLP10 유전자는 발현양이 스트레스 처리 후 점점 감소하는 추세이다. 반면엔 BrCLP29 유전자는 처리 시간 후반에 발현이 증가하고 있음을 볼 수 있었다. 건조 스트레스 처리 하에서는 BrCLP7 유전자, BrCLP19 유전자와 BrCLP21 유전자에서 모두 처리 후 발현양이 감소하였으며 특히 BrCLP19 유전자와 BrCLP21 유전자는 처리 후 24시간 후 급격히 발현양이 감소하였음을 알 수 있었다. PEG 스트레스 처리 하에서는 BrCLP16 유전자, BrCLP19 유전자, BrCBLP24 유전자에서 발현양이 증가함을 볼 수 있었으며, BrCLP26 유전자와 BrCLP29 유전자도 스트레스에 반응하여 2시간에서 4시간 처리 구간에서 발현양이 증가하였다가 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이와 같은 발현 실험을 통해 chitinase 유전자가 다양한 비생물학적인 스트레스에도 반응을 보이는 것을 확인 할 수 있었다(그림 5-32, 33, 34, 35, 36).

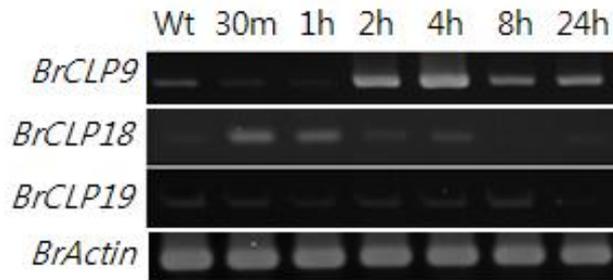


그림 5-32. 저온(4°C) 스트레스 하에서 chitinase 유전자의 발현 양상

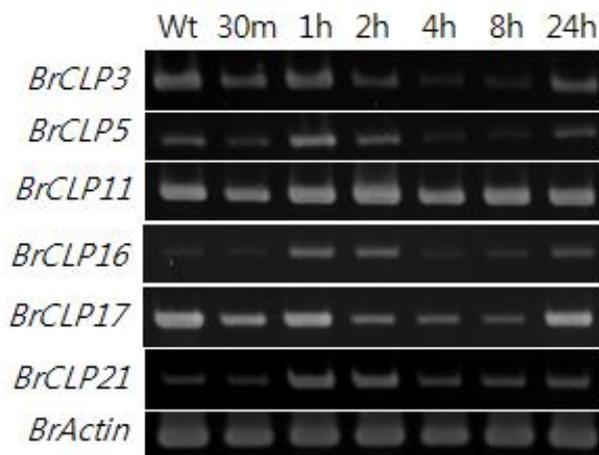


그림 5-33. ABA(100mM) 스트레스 하에서 chitinase 유전자의 발현 양상

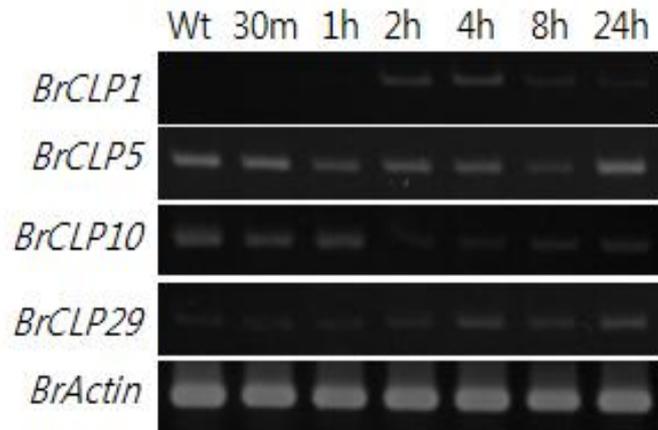


그림 5-34. 염(250mM NaCl) 스트레스 하에서 chitinase 유전자의 발현 양상

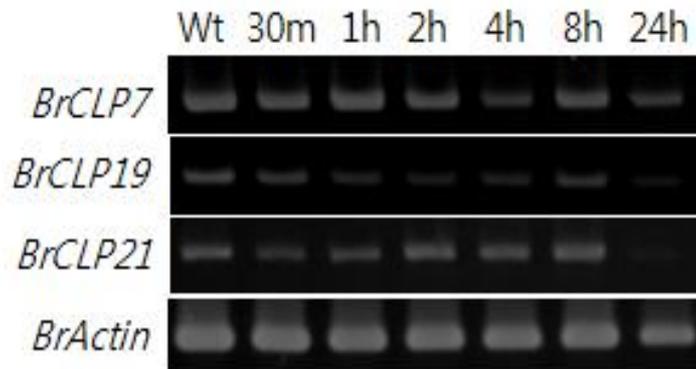


그림 5-35. 건조(seedling on the filter paper) 스트레스 하에서 chitinase 유전자의 발현 양상

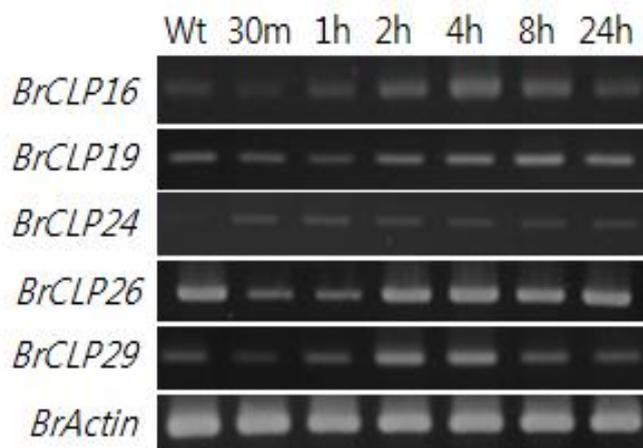


그림 5-36. PEG(10% polyethylene glycol) 스트레스 하에서 chitinase 유전자의 발현 양상

⑤ 스트레스 관련 유전자 *Thaumatococcus*, *Dirigent* 유전자 연구

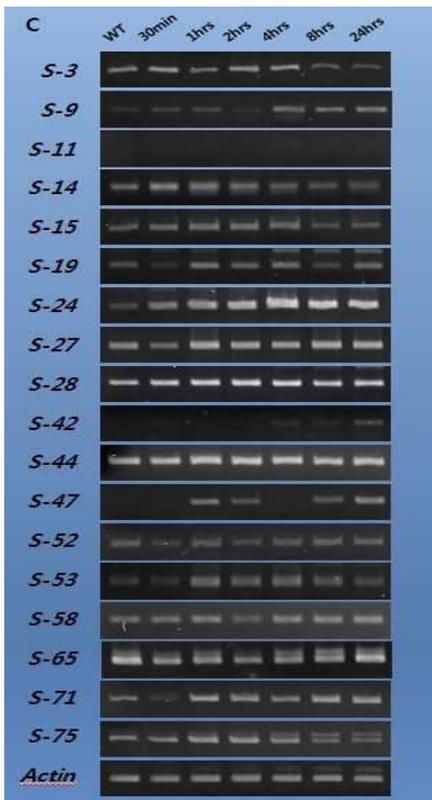
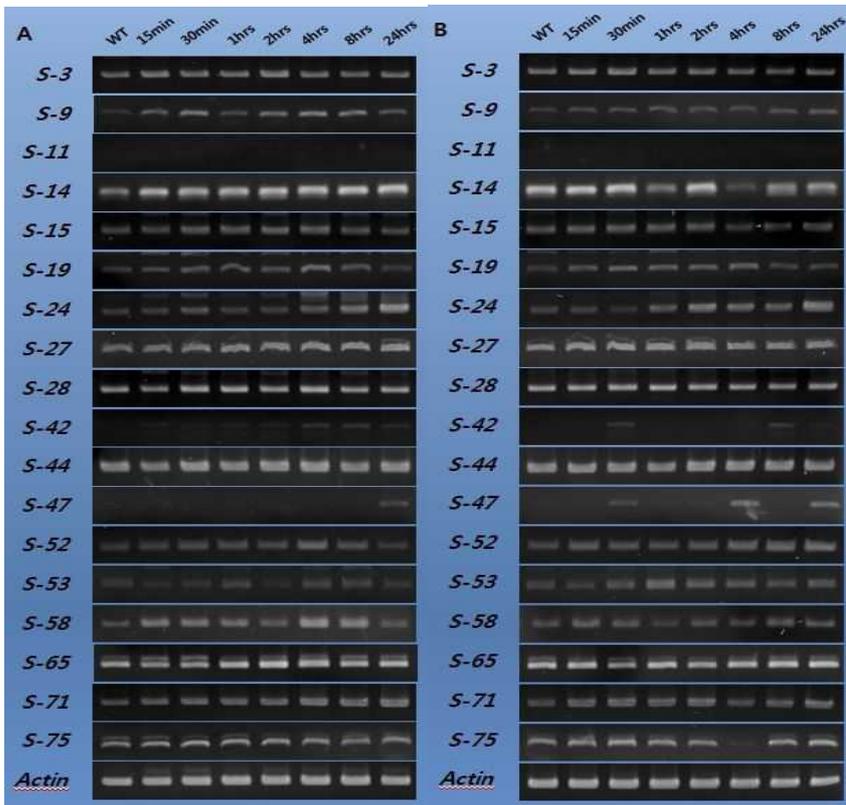
㉞ 선형연구를 통해 배추 완전장 cDNA library로부터 동정된 abiotic 관련 유전자 60개를 동정하였다. 이들 유전자들에 대하여 비생물학적 처리 시의 발현 분석을 확인하기 위하여 각각의 스트레스(cold, salt, drought, ABA, water, PEG)를 처리 후 0min, 15min, 30min, 1hrs, 2hrs, 4hrs, 8hrs, 24hrs의 시간대 별로 sample을 채취하여 total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA를 이용하여 cDNA를 합성 후 RT-PCR 실험에 이용하였다. 또한 각각의 유전자들에 대한 특이적 primer들은 표 6에 나타내었다. RT-PCR 결과 60개의 유전자들 중 18개의 유전자들은 cold, salt, drought, ABA, water, PEG 스트레스 처리에 반응하였다(그림 5-37).

표 5-6. RT-PCR에 이용된 primer 염기

Genes	Forward primer	Reverse primer
S-1	AAATCGGCCATCACGACAAC	GATAGTCAGGTTACAGAAC
S-2	TTTCTCACTGCTCTCTTGC	TTCAGCTTCTCGTTCTCTC
S-3	TGTGGGAATGGACTACTC	GGCTTTAACAACCGTGAC
S-9	AAATCGGCCATCACGAAC	CAAAGACTATCCCTTCCTAC
S-10	CACACAGATTCTCCTCTCTC	CTGCGTTTGTGTCTCATC
S-11	CCATCACGACAAGTTTCC	TAAGAGTCAACAACCCTTGG
S-12	TTGGCTGTGTTTCGAGAAG	AATGGCTGAGTCATCAGAG
S-13	AGAACCTCGTGAAGAAGTG	ATAACCTTCTCGACCTTGTC
S-14	AAATCGGCCATCACGATG	GCTGAGATCGTTACAAACTG
S-15	TCTTGAACGAAGGTGATGG	ACCAAAGCGACACATCTC
S-16	TTACAAGACTCTCCGTGAC	GCATCATCATCACCAACC
S-18	GAACCAGAGCTTCTTTCC	GAAAGAGCCAAGCACAAG
S-19	GATTCTCTTAGGCGAAAGC	CAAGAGGATGACCATCATG
S-20	TAACACAACCTCTCCCTCTC	CTTCTGCGCATCAATTTCG
S-21	AAGCCTTTGAGGGAATACG	ACAGCCAAGGTATGTCTC
S-22	GCCATCACGAGATATTTTCG	GTTGCGTTTGTGATCGTGAG
S-23	TCTGTACGCTTACCTTTCTC	GTGAATGGTTCGCTAAACG

S-24	CACGGCCAATCAAAACAC	GATGTTCATTAAGGGGGAAC
S-25	CAATAGACTCCTACACCTAC	TTCACTTGGCTGAGTACAG
S-26	CCGTTAGACAAGTGGAAG	GAAGTTACAGGTTCTCTCTC
S-27	AGTAACCGGCCAATGAAC	CCGATGAAGACATTCAACAC
S-28	GTTGAGAGTCATGGCTAC	TTTGGCTGTTGGGTGATC
S-29	GTACGAGATTGCTTCTTTCC	CTGGTAACTATTTGCCGAAG
S-30	ATGGCAGCATCTTTTCGTAG	GATGAGAACTTGGGAAGAGAG
S-31	CCGCTTACCGTAAATTAGC	CCTGTTTTCTCACTCTCTTC
S-34	GAACCCTTCAAGCTATGG	CCAAGAGTGTTGGAGATG
S-37	TACTATTGGTCGTCCAGAC	G TTCACGAGCTTGATTGTAC
S-39	CAGGCTGTATTTTGCTAGG	GGCCAGAAAAC TTTGAAGG
S-40	CTTCATCTTTGGCCTCAG	GTTTGCCTCCATAACACTTC
S-42	ATAGAGGGAAAGAAGCTCAG	GTTTGCTGGAAAGCTGTAC
S-44	ACATCTGCCAAGAGAAGG	CCTCATCATCAACTCTGATC
S-45	TCTCTAGCAATGGAAGGAAC	CACCAATGCAGCATATAACC
S-46	TTAAACTCGCCTACGAAGC	CCTCGAGTATATCCACCTTC
S-47	GATAGTCTCAATCCTCGAAG	CGCATCATCACACATTCC
S-48	CAACAAAGAGCAGCTCTC	GCATTTACACTCTGAGATGC
S-50	TCATGTCGTTCTCCTTAGC	TTTCATCTATCCCGCTCTTC
S-51	ACAATCCGCTTACCGTAC	ATCACCGTTGTTTACCCTAG
S-52	GTCCAGTTTCAACTCGTAC	CCAACAAGTCTGACACAAG
S-53	ACGTACTCCGGAATCATC	ACATGATCTCCACAGTACC
S-54	TAGTTTCCCTTGCTCAGATG	ACCCCTCTTCAAGTAACAG
S-55	AAAGAACATGGCCCTATCTC	CGCAGTAAGAACACCAAC
S-56	GTAAAACCACCAGCCAAG	TTAGAGCTCTCAGCTTCTG
S-57	CCCCATTAACGAAAGATGTC	ATTCCGAAGTTGGAGAGAAG
S-58	GAACCCAAAGAAGCTCATG	CAAAGCCCTTTCTGTATCTC

S-59	CTGCCACAATGAACATGTG	ACAGATACTGGCAGAGAG
S-65	CCAAGAATCCAACGTACC	GCTCTCTTTAAACCGAAGG
S-66	AATCACTATGGGATGGGAAC	GCGGTTTAAACGAACAAGAG
S-70	GAGCGCTGAAGATTTTCAG	CTCTGTTCCTTCAGCTTC
S-71	TGCTCAGTCACTACACTG	GAGACTAGTAGCCAAACG
S-75	TATCCGCACGATCAAGATC	TCCACAGGCAAATCAGAG



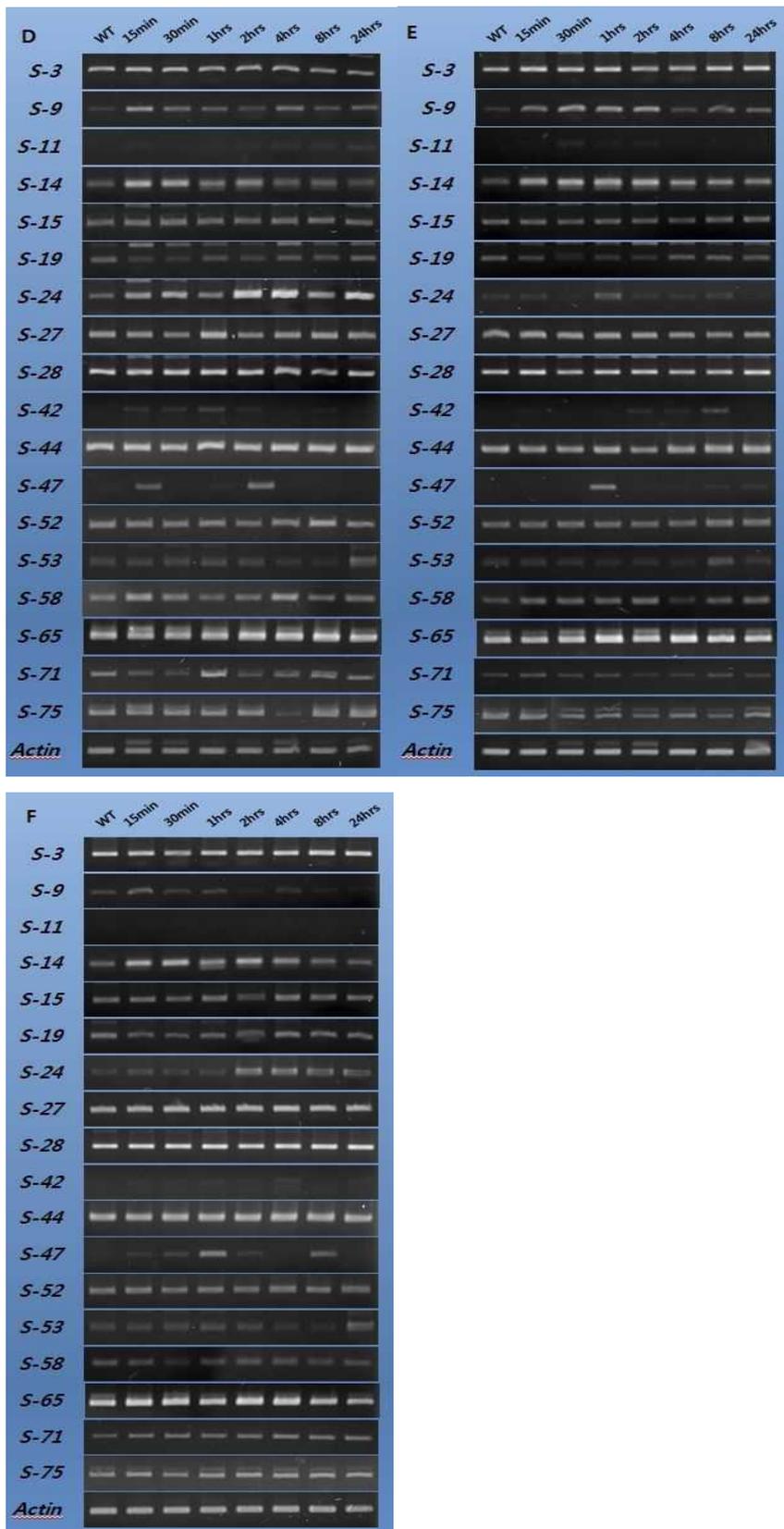


그림 5-37. 시간별 비생물학적 처리에 의한 유전자들의 발현 분석 (A) Cold 처리 (B) Salt 처리 (C) Drought 처리 (D) ABA 처리 (E) Water 처리 (F) PEG 처리

- ㉔ Thaumatin 유전자의 해석: *Thaumatococcus danielli* (Bennett) Benth로 부터 처음 동정된 Thaumatin 단백질은 PR-5 class 단백질이며 병원균 및 비생물적인 요인들에 대한 식물 방어 기능을 갖는다. 본 연구에서는 선행연구를 통해 배추 완전장 cDNA library로부터 동정된 2개의 Thaumatin 유전자 이외에 배추에 있어서 Thaumatin 유전자가 더 존재하는 가를 확인하기 위하여 Brassica database(BRAD)를 이용하여 탐색하였다. 그 결과 배추에서는 본 실험실에서 동정한 2개의 Thaumatin 유전자를 포함하여 총 20개의 Thaumatin 유전자가 배추 게놈 상에 존재함을 확인하였다. 이들 20개의 Thaumatin 유전자들과 기존에 보고된 Thaumatin 유전자들의 아미노산 정보를 이용하여 계통수를 분석한 결과 3개의 그룹으로 분류됨을 확인하였다(그림 5-38). 또한 DNA 염기를 이용하여 이들 20개의 Thaumatin 유전자들에 대한 물리적 구조를 분석한 결과 20개의 유전자는 1~3개의 intron을 포함하고 있었다(그림 5-39).

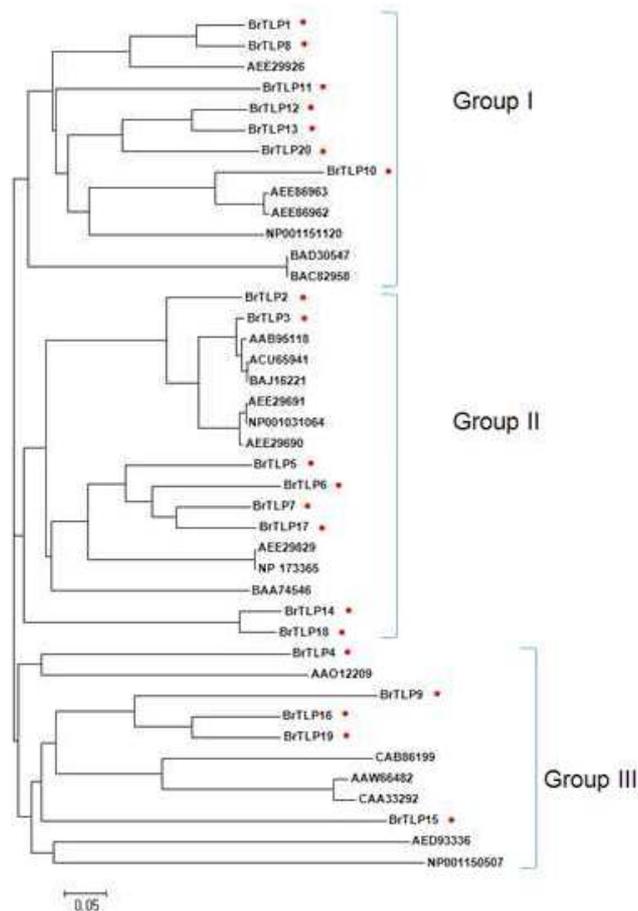


그림 5-38. 동정된 Thaumatin 유전자의 계통수(배추유래 유전자에 적색 표시하였음)



그림 5-39. 동정된 20개의 Thaumatin 유전자들의 물리적 구조(exon, intron, gene size)

동정된 20개의 Thaumatin 유전자를 이용하여 각각의 유전자에 대한 배추의 기관별(뿌리, 줄기, 잎, 꽃봉우리) 발현 양상을 확인하기 위하여 특이적 primer를 디자인한 후 이를 이용하여 RT-PCR 실험을 수행하였다(표 5-7). 그 결과 20개의 Thaumatin 유전자들은 전 기관에서 발현하는 유전자들, 꽃 봉우리 특이적으로 발현하는 유전자들 등의 다양한 발현 양상을 나타내었다(그림 5-40).

표 5-7. Thaumatin 유전자의 기관별 RT-PCR 발현 분석용 primer 염기서열

Gene names	Primer sequences	
	Forward	Reverse
<i>BrTLP1</i>	CAGTCGATGGGTTGTA AAAAG	ACTCAATCTGACGTCGTTCT
<i>BrTLP2</i>	AAGCTGGTTCACAGTCTTCT AG	TACTACCTGCTTCCCGTCAC
<i>BrTLP3</i>	GGCTTCACTAAACCTCTTCA AC	GTGCCGGTACAACAGTACTG
<i>BrTLP4</i>	GAATCCAATCTAGCTCCCTA	GTCCTTCTTTGTT CACAACC
<i>BrTLP5</i>	CAGAACA ACTGCCCTTACAC	AACGTCATCGAGTAAGTCGT
<i>BrTLP6</i>	GTCTTCGTTTTGGAGAACAG	GTAGCTGTAAGCGCTAGGAC
<i>BrTLP7</i>	CCACCGTCTTCACTTTACA	CTTAAACATCGCCGAGTAAC
<i>BrTLP8</i>	GGTTATCAGCAGGAGTTGAA	GAGTACGACGACGGTTTACA
<i>BrTLP9</i>	GGTCCGAATCAGCTAGAGTA	ACTGGTCGGATCATCATAAG
<i>BrTLP10</i>	CTTTCAGAAGTTGAGCCTGT	GTTAAGCAGGAGAAAGAACC

<i>BrTLP11</i>	AGCTTCCTCTTCTTCTACGG	CAATACTCCGGACTACCAA
<i>BrTLP12</i>	TACTCTCTGCACACAAGACG	ACTTGGGTTAGGAGAAGGAC
<i>BrTLP13</i>	CCGAAAGTTTACTTGTGTC	GAGATGCAGCAGAGTAGCTT
<i>BrTLP14</i>	CTGTGCAATCTTCTTCCTTC	TCTCTCTTCACTTCCAAAGC
<i>BrTLP15</i>	CACCACTGGATTTGCTTTAG	CCATCGTCGAAAGTAGTAGC
<i>BrTLP16</i>	TCACCGAGGATCTTGTTACT	CACTCCTACACGAAACCACT
<i>BrTLP17</i>	GCGAATCTCTCCAGTATTCA	GTACAACAAAACCTCCGGTGA
<i>BrTLP18</i>	TGCAACTCTCTTCCTTGTCT	CACTCTCCCATCTCTCTTCA
<i>BrTLP19</i>	CGTGAACATCATGTAACCAAG	ACTGGTCGGATCATCATAAG
<i>BrTLP20</i>	ACCGGTTTCTCCTTAAACTC	GAAGAAACCAGCGTACTCAC
<i>Br-actin</i>	ATGGTTGGGATGGGTCAAAA	TCTTTAATGTACGGACGAT
	A	T

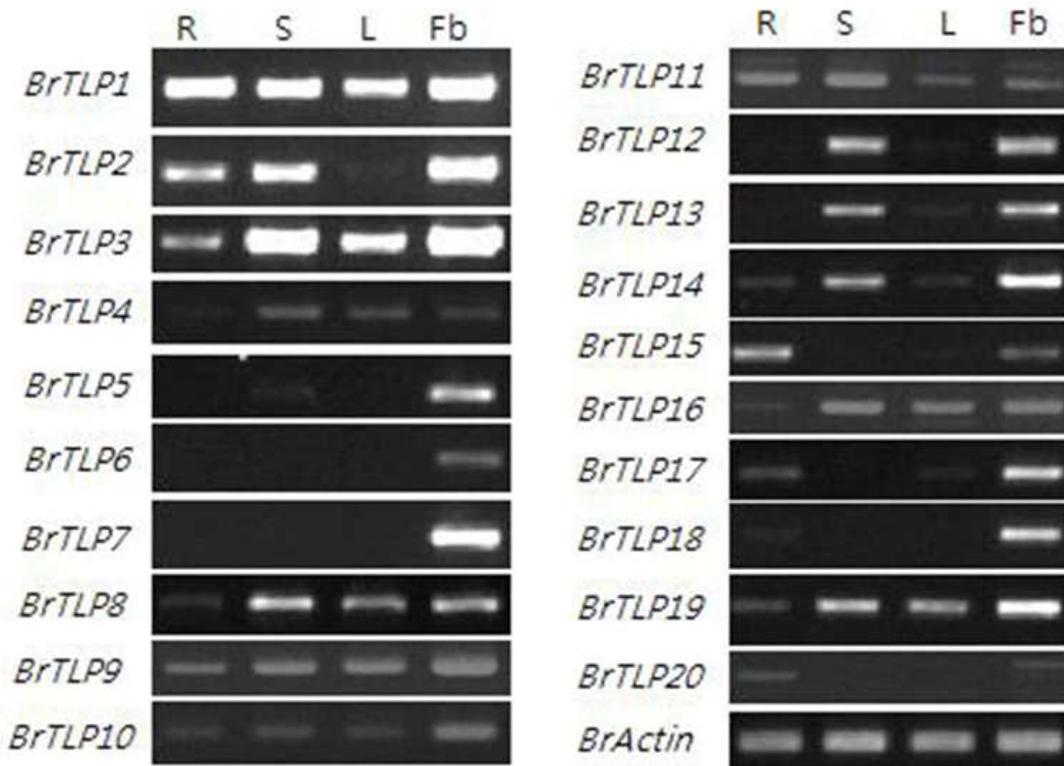


그림 5-40. Thaumatin 유전자의 기관별 발현 분석(R: roots, S: stems, L: leaves, Fb: flower buds)

Thaumatococcus danbakkil jeong beongwongun-e uihan gamyeombeonman aninara biseongmuljeogin yo-indeul-e daehan sikmul bang-eo gineung-eul gatgi daemune 20gae-ui thaumatococcus yujeonjadedeul-e daeha-eo jeo-eun, yeom, geonjo, aba deung-ui steureuseu cheori hu-eul yujeonjadedeul-ui balhyeonyangsang-eul real-time PCR-eul tongha-eo huogin ha-yoetda. real-time PCR-eung puraim-eoneu saerupge teukijeog-euro dizeinha-eo saeungha-yoetda(bo 5-8). real-time PCR balhyeon-e saeungdeun primer-neu giganbyeol balhyeon bunseok-e i-yongdeun geot-eul i-yongha-yoetda. geu gyeolga jeo-eun steureuseu-e ban-eungha-neu yujeonjadedeul-eun *BrTLP2*, *BrTLP3*, *BrTLP13*, *BrTLP19*ie-yoetdeumyeo, yeom steureuseu-e ban-eungha-neu yujeonjadedeul-eun *BrTLP1*, *BrTLP2*, *BrTLP8*, *BrTLP13*ie-yoetda(geurim 5-41, 5-42). geonjo steureuseu-e ban-eungha-neu yujeonjadedeul-eun *BrTLP1*, *BrTLP14*, *BrTLP19*ie-yoetdeumyeo, aba steureuseu-e ban-eungha-neu yujeonjadedeul-eun *BrTLP1*, *BrTLP8*, *BrTLP12*, *BrTLP13*ie-yoetda(geurim 5-43, 5-44).

bo 5-8. yangbaechu thaumatococcus yujeonjadedeul-ui real-time PCR balhyeon bunseok-eung primer yeomgiseseul

Gene names	Primer sequences	
	Forward	Reverse
<i>BrTLP1</i>	TTTGACCTAACCATGTCTCC	ACTCAATCTGACGTCGTTCT
<i>BrTLP2</i>	GACGTCAGCCTCGTTGATG	TACTACCTGCTTCCCGTCAC
<i>BrTLP3</i>	ATAATGCCGGTGAAAGGTAG AG	GTGCCGGTACAACAGTACTG
<i>BrTLP8</i>	GTCGACGGAGTGAAACAG	GAGTACGACGACGGTTTACA
<i>BrTLP12</i>	GTTTGCAACGCCGGACAC	ACTTGGGTTAGGAGAAGGAC
<i>BrTLP13</i>	CTTACGACGATGGAAGTAGC	GAGATGCAGCAGAGTAGCTT
<i>BrTLP14</i>	AATGACACTAGGCTCATCGT	TCTCTCTTCACTTCCAAAGC
<i>BrTLP19</i>	GAAGGTGATTTTCGTGTAGGA	ACTGGTCCGGATCATCATAAG

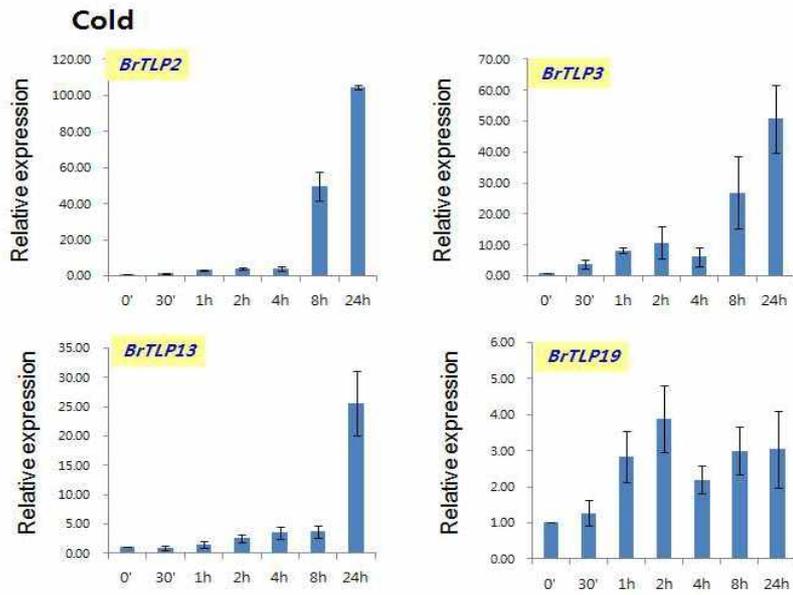


그림 5-41. 저온 스트레스 처리 후 Thaumatin 유전자의 Real-time PCR 발현

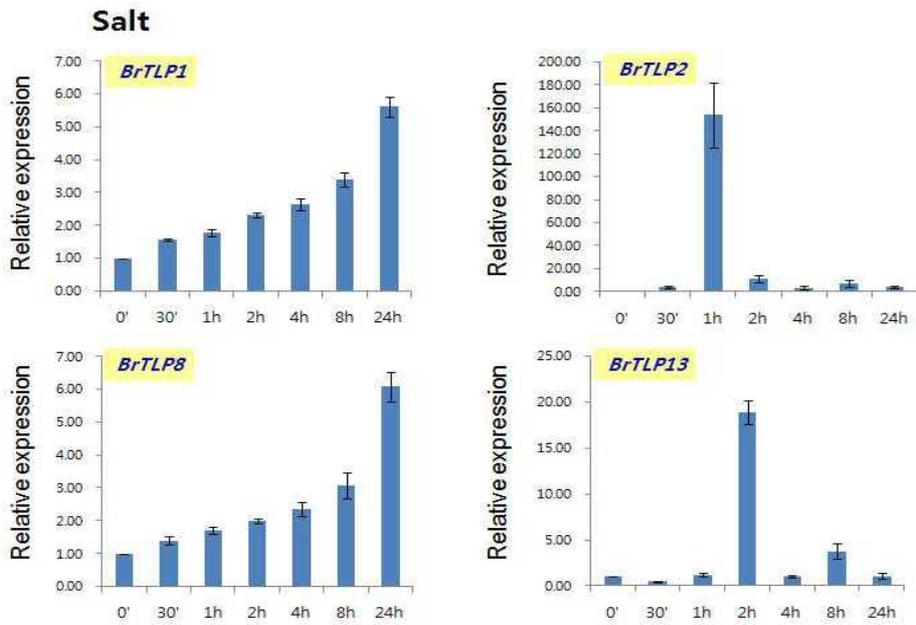


그림 5-42. 염 스트레스 처리 후 Thaumatin 유전자의 Real-time PCR 발현

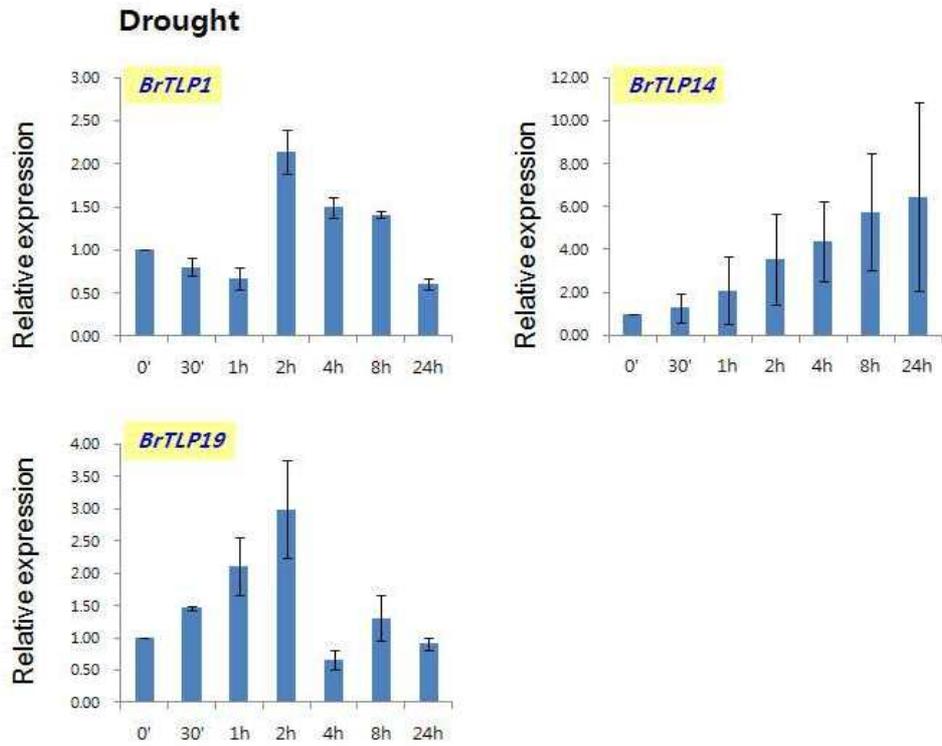


그림 5-43. 건조 스트레스 처리 후 Thaumatin 유전자의 Real-time PCR 발현

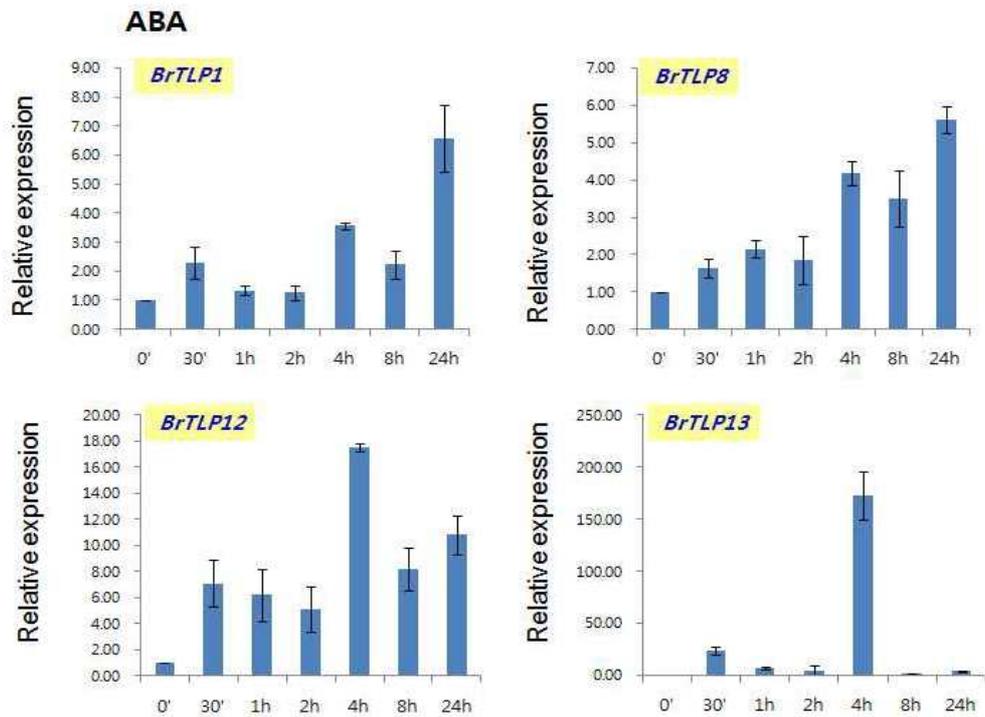


그림 5-44. ABA 스트레스 처리 후 Thaumatin 유전자의 Real-time PCR 발현

2차년도에서 동정한 20개의 thaumatin-like 유전자에 대해서 유사성 분석을 수행한 결과 thaumatin-like protein (TLP)로 7개가 검색되었으며, pathogenesis related thaumatin-like protein (PR TLP)로 16개가 검색되었다. TLP 유전자들은 대부분 애기장대와 높은 유사성을 보였으며 삼나무와 담배와도 유사성을 보이는 유전자가 있었다(표 5-9).

표 5-9. thaumtin-lke 유전자의 유사성 분석

Gene	Top matched clones	Name of protein	Identity	E-value	Top homologous species
BrTLP1	NP177708	PR TLP	85%	0.0	<i>A. thaliana</i>
BrTLP2	NP177503	PR TLP	94%	3e-155	<i>A. thaliana</i>
BrTLP3	NP173261	TLP	90%	2e-155	<i>A. thaliana</i>
	BAA74546	TLP	55%	5e-84	<i>Nicotiana tabacum</i>
BrTLP4	NP198818	PR TLP	85%	8e-162	<i>A. thaliana</i>
BrTLP5	NP177642	PR TLP	77%	1e-128	<i>A. thaliana</i>
BrTLP6	NP177641	PR TLP	74%	9e-122	<i>A. thaliana</i>
BrTLP7	NP177640	TLP	82%	9e-145	<i>A. thaliana</i>
BrTLP8	NP177708	PR TLP	86%	0.0	<i>A. thaliana</i>
BrTLP9	NP177893	PR TLP	84%	4e-89	<i>A. thaliana</i>
	BAD90814	TLP	51%	2e-47	<i>Cryptomeria japonica</i>
BrTLP10	NP195579	PR TLP	83%	7e-54	<i>A. thaliana</i>
BrTLP11	NP194149	TLP	87%	4e-161	<i>A. thaliana</i>
BrTLP12	NP195325	PR TLP	87%	8e-170	<i>A. thaliana</i>
BrTLP13	NP195325	PR TLP	89%	1e-174	<i>A. thaliana</i>
BrTLP14	NP195834	PR TLP	90%	1e-151	<i>A. thaliana</i>
BrTLP15	AAD02499	PR TLP	44%	2e-50	<i>A. thaliana</i>
BrTLP16	NP177893	PR TLP	75%	2e-152	<i>A. thaliana</i>
	BAD90814	TLP	54%	2e-84	<i>Cryptomeria japonica</i>
BrTLP17	AAB71214	TLP	85%	2e-150	<i>A. thaliana</i>

Gene	Top matched clones	Name of protein	Identity	E-value	Top homologous species
BrTLP18	NP195834	PR TLP	91%	3e-156	<i>A. thaliana</i>
BrTLP19	NP177893	PR TLP	81%	1e-144	<i>A. thaliana</i>
BrTLP20	NP179376	PR TLP	80%	2e-142	<i>A. thaliana</i>

※ PR TLP : Pathogenesis related thaumatin-like protein

배추 잎의 주맥의 아래 1/3 부분에 상처를 주어 무름병균을 감염시켜 0시간, 6시간, 12시간, 24시간(1일), 72시간(3일)을 처리한 샘플을 가지고 tRNA를 추출한 후 cDNA를 합성하여 TLP 유전자에 대하여 발현 실험을 수행하였다. 그 결과 BrTLP3 유전자, BrTLP12 유전자, BrTLP13 유전자 및 BrTLP19 유전자에서 무름병에 대한 반응을 보였다. BrTLP3 유전자와 BrTLP19 유전자는 0h에서 발현양이 많았다가 6h 처리구에서 급격히 발현양이 감소했다가 12시간 처리 이후에서는 더 많이 발현양이 감소하였다. BrTLP12 유전자는 6시간 처리에서 발현양 급격히 증가하였으며, BrTLP13 유전자에서는 0h과 6h 처리구에서 발현양이 많았다가 12시간 이후에서는 발현양이 감소하였다. 이는 이 4가지 TLP 유전자들이 무름병에 관련된 배추의 유전자임을 알 수 있었다(그림 5-45).

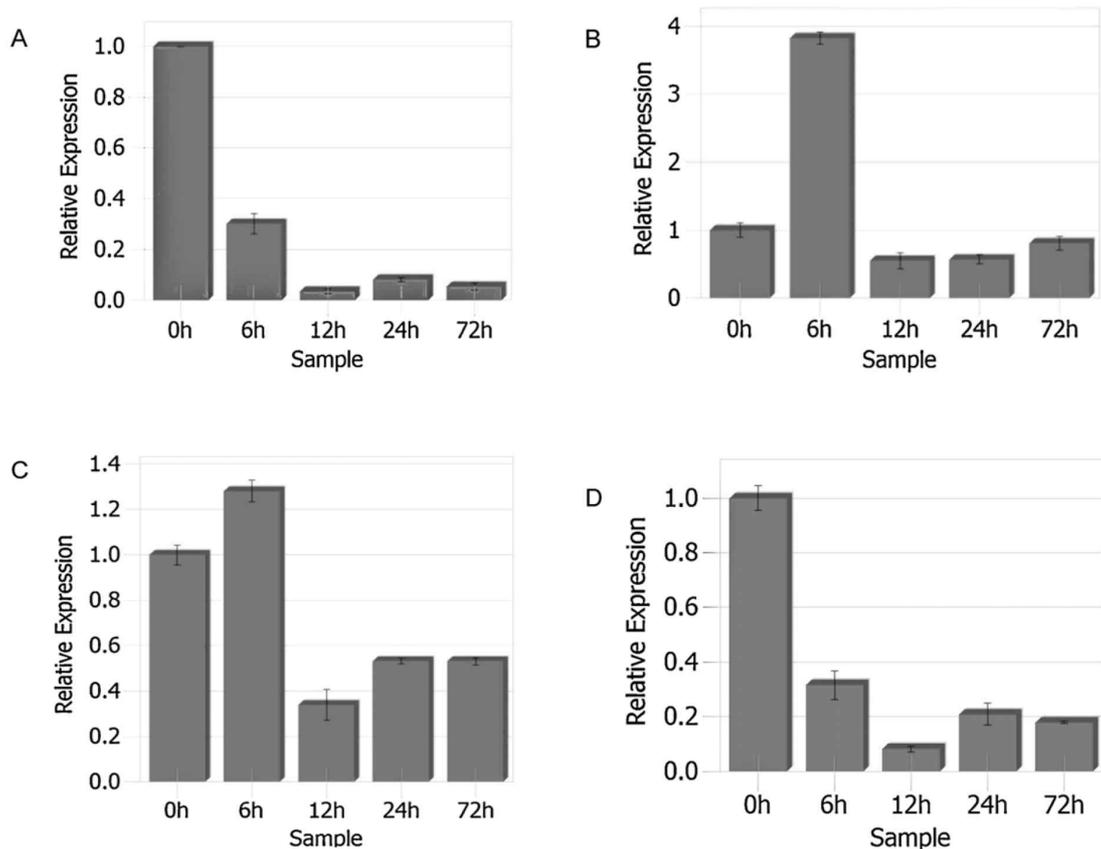


그림 5-45. 무름병에 대한 *thaumatin* 유전자의 발현 분석

(A) BrTLP3 유전자, (B) BrTLP12 유전자, (C) BrTLP13 유전자, (D) BrTLP19 유전자

㉔ Dirigent 유전자의 해석

Dirigent 유전자는 애기장대의 병 저항성 유전자군에 속하는 것이 기존 연구들에 의하여 보고되었다. 본 연구에서는 선행연구를 통해 배추 완전장 cDNA library로부터 동정된 1개의 Dirigent 유전자 이외에 배추에 있어서 Dirigent 유전자가 더 존재하는 가를 확인하기 위하여 Brassica database(BRAD)를 이용하여 탐색하였다. 그 결과 배추에는 기 동정한 1개의 Dirigent 유전자를 포함하여 총 30개의 Dirigent 유전자가 배추 게놈상에 존재하였다. 이들 30개의 Dirigent 유전자들과 기존에 보고된 Dirigent 유전자들의 아미노산 정보를 이용하여 계통수를 분석한 결과 4개의 그룹으로 분류됨을 확인하였다(그림 5-46). 또한 DNA 염기를 이용하여 이들 20개의 Thaumatin 유전자들에 대한 물리적 구조를 분석한 결과 30개의 유전자는 모두 특이하게 한 개의 intron도 포함하고 있지 않았다.

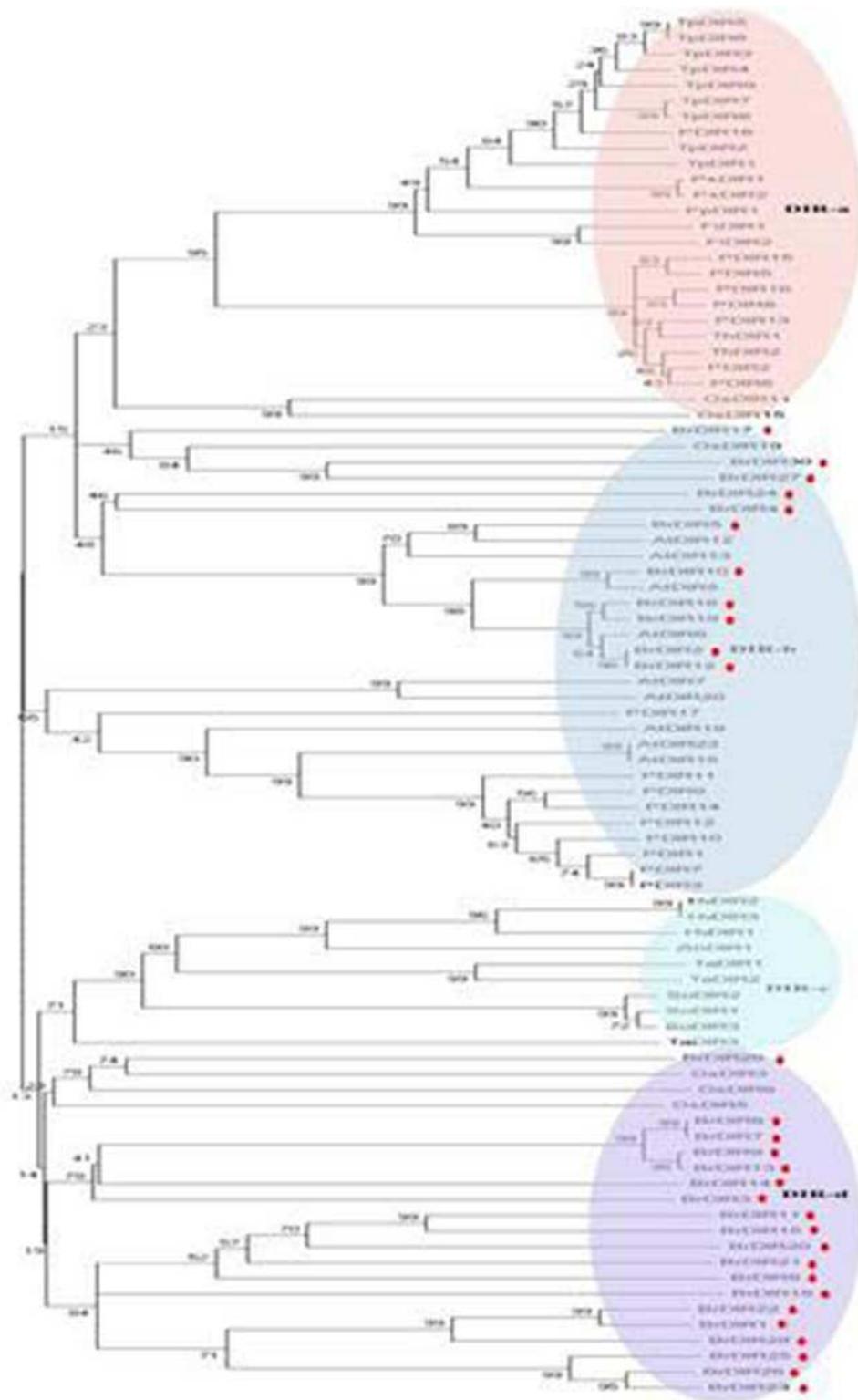


그림 5-46. 동정된 Dirigent 유전자의 계통수(배추유래 유전자에 적색 표시하였음)

동정된 30개의 Dirigent 유전자를 이용하여 각각의 유전자에 대한 배추의 기관별(뿌리, 줄기, 잎, 꽃봉우리) 발현 양상을 확인하기 위하여 특이적인 primer를 이용하여 RT-PCR 실험을 수행하였다(표 5-10). 그 결과 30개의 Dirigent 유전자는 전 기관에서 발현하는 유전자들, 뿌리 특이적으로 발현하는 유전자들, 꽃봉우리 특이적으로 발현하는 유전자들 등의 다양한 발현 양상을 나타내었다(그림 5-47).

표 5-10. Dirigent 유전자의 기관별 RT-PCR 발현 분석용 primer 염기서열

Gene name	Primer sequences	
	Forward	Reverse
<i>BrDIR1</i>	CAAACCAACTCCACAGAAAC	ACATAGCCTCTAGCAAATCG
<i>BrDIR2</i>	TCCTCACTACTCGTCTAG	TAGCCCCTTGAAATAGATCC
<i>BrDIR3</i>	CGGCTCGACTTCTTGATGAAG	GCCACTTAAAGCCGGGTTC
<i>BrDIR4</i>	ATTTTCCTCATCGCCGTCTC	TAACACGGTAAGTGGTTACAG
<i>BrDIR5</i>	CCAAACACATTTTGTCTTCG	GAGACGGAAATACTTACTGC
<i>BrDIR6</i>	CACCTGAAGACCCGATTTTCG	CAAAGAATCTCTGCTCCATC
<i>BrDIR7</i>	CAAGACCCATTACTGGTTTGC	GAAGGAATCAAGGGCCTAACC
<i>BrDIR8</i>	CTCATATCCTTCGCCCTCTC	GTGACATTGTACTCGACAAC
<i>BrDIR9</i>	GACCCCATTTTTCGAACTCTAC	CACAAAATGTTGACCAGATGG
<i>BrDIR10</i>	CCTTGCAAAAACCTTCGTCC	CCCTAAAATACTTCGCACCTTC
<i>BrDIR11</i>	CGTCGCCGTTACAGAATCC	CAACCACGGCATTTAACC
<i>BrDIR12</i>	CAACTCTTCAAAGCCCTCTTC	CCATCTTAACACGGAAATACC
<i>BrDIR13</i>	CAATCTTCTTGCTCACACTTG	GTTGAGGTTGTCGTTGTACTC
<i>BrDIR14</i>	GTCGCAACAACAACCTCCAAC	GGCTAGTTCATCCAATGAAC
<i>BrDIR15</i>	GTTCTCAGCTCTTCTTCTTGC	AGACATTGTACTCAACCACAG
<i>BrDIR16</i>	CTCTTCGATACCGTTTATTCG	ACGGAAATACTTAGCCCCTTG
<i>BrDIR17</i>	TCCCATACTGTTTCCGTGTTC	CGGAAATACCTTAACCCTTC
<i>BrDIR18</i>	GTTACAGCGAATAGCGATTCC	GTAAACAGTAGCATCGTAACG
<i>BrDIR19</i>	CAACTCCTTAAGTCCCTCTT	ACGGAAATACTTAGCCCCTTG
<i>BrDIR20</i>	CTCTCTTCTGTAGCACTTCC	GACATGTGTTCTTGCCTGAAC
<i>BrDIR21</i>	TGGCCAAGCTCATTTTCTTCC	GTTACGAGTCCACTTTGTTCG
<i>BrDIR22</i>	TGGCTAAGGTCATTATCTTCC	CAGATCAACCCACTTTGTTCG

<i>BrDIR23</i>	TGGCCAAGCTCATTTTCTTCC	CACCGTTCTTGAGATTAAACC
<i>BrDIR24</i>	ATACCACTGGCTGCTCAAGG	GGTCGAACCAATGGGTCTG
<i>BrDIR25</i>	TGGCTAAGCTCATTTTCTTCC	CAGTTTTGTACGAGCCTCAAC
<i>BrDIR26</i>	TGCAAATCTTCCTCCTCATCG	GTACTIONAACAGTAGCATCAC
<i>BrDIR27</i>	ATGGCAAAGCTCATCCTCATC	GACGTAACAGCTGTACTIONCTAG
<i>BrDIR28</i>	AAGCTCATCCTTATCCTTGTC	GAGCCTCGACATAACCTCTAG
<i>BrDIR29</i>	TCATTCTAATCCTCGCCGTAC	GTTATACTIONCAACGGTGGCATC
<i>BrDIR30</i>	AAATCCTCCTCCTCGCCATC	GATCGAACGACTTAGTCCTAG
<i>Br-actin</i>	ATGGTTGGGATGGGTCAAAAA	TCTTTAATGTCACGGACGATT

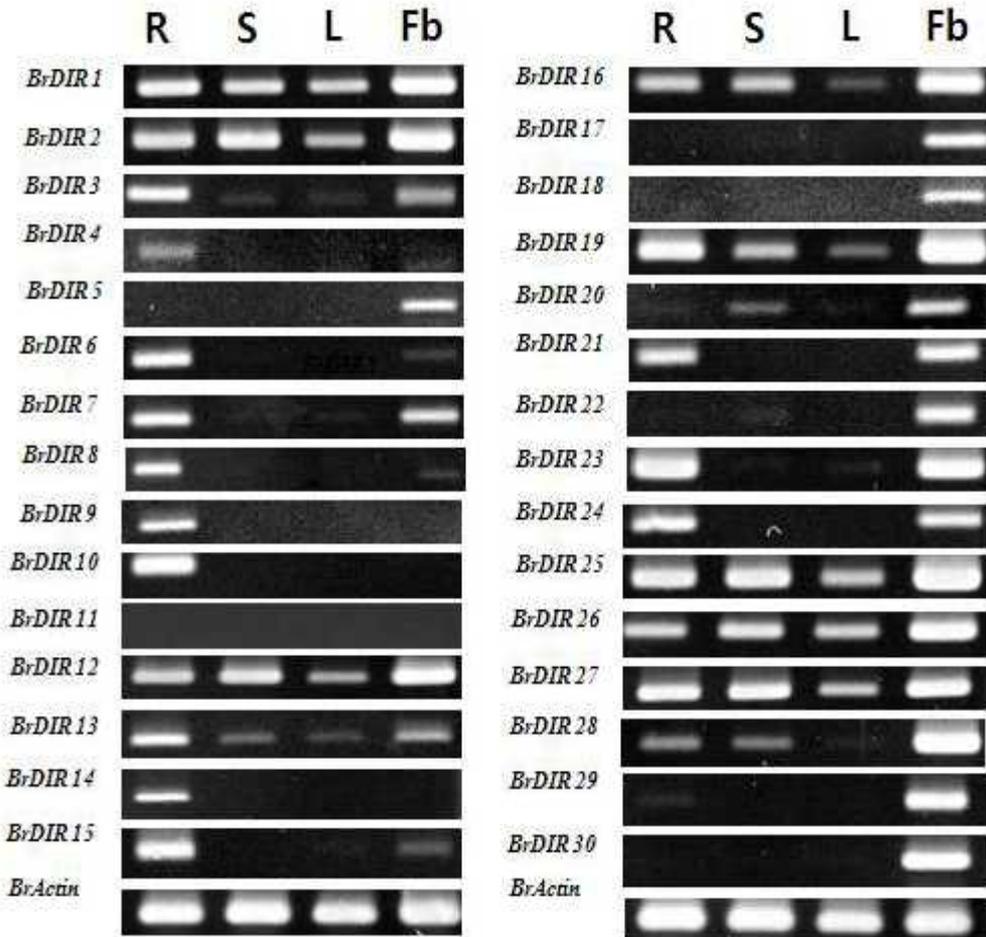


그림 5-47. Dirigent 유전자의 기관별 발현 분석(R: roots, S: stems, L: leaves, Fb: flower buds)

30개의 Dirigent 유전자들에 대하여 저온, 염, 건조, ABA, water, PEG 등의 스트레스 처리 후 이들 유전자들의 발현양상을 Real-time PCR 을 통하여 확인하였다. Real-time PCR 발현에 사용된 primer는 기관 별 발현 분석에 이용된 것을 이용하였다. 그 결과 저온, 염, 건조, ABA, PEG 스트레스 등에 Dirigent 유전자는 반응을 나타내지 않았다. 오직 water 스트레스에만 *BrDIR2*, *BrDIR6*, *BrDIR7*, *BrDIR9*, *BrDIR10*, *BrDIR15*, *BrDIR16*, *BrDIR19*, *BrDIR24* 유전자가 반응하였으며 24시간 스트레스 처리한 재료에서 급격히 발현양이 증가하는 것을 확인하였다(그림 5-48).

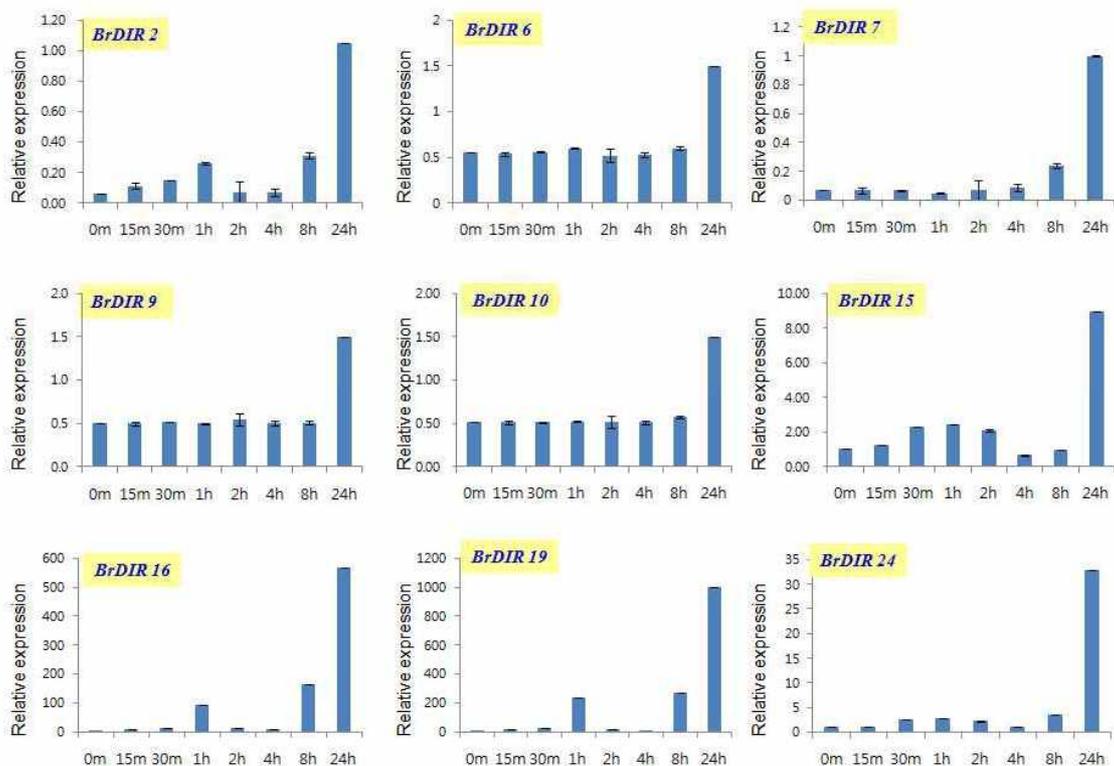


그림 5-48. Water 스트레스 처리 후 Dirigent 유전자의 Real-time PCR 발현

차년도에서 dirigent 유전자에 대해서 동정을 하여 이어 배추에서 29개의 dirigent 유전자를 대상으로 유사성을 분석하였다. Top homologous한 식물로는 *A. thaliana*, *A. lyrata* subsp. *lyrata*, *T. halophila*, *Zea mays* 가 있었으며, 그 기능으로는 disease resistance responsive family protein (DRRP), lignan biosynthetic process (LBP), defense response (DR)로 이루어져 있어 식물에 있어서 dirigent 유전자는 병에 저항성을 가지는 유전자임을 알 수 있었다 (표 5-11).

표 5-11. dirigent 유전자의 유사성 분석

Name	Subfamily	Top matched clones	Identity (%)	Top homologous sp.	Function
BrDIR1	DIR-g	AK353489	89	<i>T. halophila</i>	DRRP
BrDIR2	DIR-a	NM_118500	92	<i>A. thaliana</i>	LBP, DR
BrDIR3	DIR-g	XM_002880957	89	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	DRRP
BrDIR4	DIR-a	XM_002863706	83	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	Unknown
BrDIR5	DIR-a	XM_002872510	83	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	DRRP
BrDIR6	DIR-g	NM_117432	90	<i>A. thaliana</i>	Unknown
BrDIR7	DIR-g	XM_002870327	91	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	DRRP
BrDIR8	DIR-g	NM_127681	84	<i>A. thaliana</i>	DR
BrDIR9	DIR-g	NM_113307	92	<i>A. thaliana</i>	Unknown
BrDIR10	DIR-a	XM_002887871	92	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	DRRP
BrDIR11	DIR-g	AK117592.1	73	<i>A. thaliana</i>	Unknown
BrDIR12	DIR-g	NM_113307	90	<i>A. thaliana</i>	Unknown
BrDIR13	DIR-g	NM_115381	85	<i>A. thaliana</i>	DR
BrDIR14	DIR-g	AK117592	84	<i>A. thaliana</i>	Unknown
BrDIR15	DIR-a	NM_118500	90	<i>A. thaliana</i>	LBP, DR
BrDIR16	DIR-g	NM_118500	82	<i>A. thaliana</i>	LBP, DR
BrDIR17	DIR-g	XM_002868810	83	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	Unknown
BrDIR18	DIR-a	NM_118500	91	<i>A. thaliana</i>	LBP, DR
BrDIR19	DIR-g	XM_002886660	84	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	Unknown
BrDIR20	DIR-g	AK353489	85	<i>T. halophila</i>	DRRP
BrDIR21	DIR-g	AK353489	89	<i>T. halophila</i>	DRRP
BrDIR22	DIR-g	AK353489	87	<i>T. halophila</i>	DRRP
BrDIR23	DIR-a	XM_002880310	87	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	Unknown
BrDIR24	DIR-g	AK353489	86	<i>T. halophila</i>	DRR
BrDIR25	DIR-g	AK353489	87	<i>T. halophila</i>	DRR
BrDIR26	DIR-g	DQ245667	88	<i>Zea mays</i>	Unknown
BrDIR27	DIR-g	NM_112213	79	<i>A. thaliana</i>	LBP, DR
BrDIR28	DIR-g	XM_00288279	83	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	DRRP

Name	Subfamily	Top matched clones	Identity(%)	Top homologous sp.	Function
		0			
BrDIR29	DIR-g	NM_112212	82	<i>A. thaliana</i>	DRRP

※ DRRP : Disease resistance responsive family protein

LBP : Lignan biosynthetic process

DR : Defense response

29개의 dirigent 유전자에 대한 아미노산 염기서열을 분석하여 본 결과 5개의 motifs로 이루어져 있으며 각각의 motif들은 잘 보존되어 있음을 확인할 수 있었다(그림 5-49). dirigent 유전자는 병 저항성 유전자로 알려져 있어 시들음병을 처리한 양배추 샘플을 가지고 발현 실험을 수행하였다. BrDIR2 유전자의 발현실험을 위하여 forward primer로 5'-TCC TCA CTA CTC GTC TCT AG-3'와 reverse primer로 5'-GCC GAG GTT GCG TTT GCT AC-3'를 사용한 결과 BrDIR2 유전자는 시들음병 처리에 의해 발현의 양상이 달라짐을 볼 수 있었다. 특히 처리구에서 비처리구에 비해 3시간에서 6일까지 점차적으로 발현양이 증가함을 볼 수 있었다. 이와 같은 결과 dirigent 유전자는 식물 병에 있어서 유용한 유전자임을 확인하였다. 또한 양배추에서의 dirigent 유전자에서도 시들음병에 대한 발현 양상을 알아보기 위하여 배추에 dirigent 유전자의 염기와 유사성이 높은 4개의 ESTs (BOLC06620, BOLC07339, BOLS23847, BOLS24786)를 선발하였다. 이를 각각 BoDIR1-4로 칭하였으며, 발현실험을 위하여 BoDIR1 유전자는 forward primer로 5'-ACC ATG GCC ACT TTT CTC TC-3'와 reverse primer로 5'-AAC CTG TTG CTC CTG TGT AG-3'를, BoDIR2 유전자는 forward primer로 5'-TAA TGG GTG CGG ATT TGA TG-3'와 reverse primer로 5'-CTG TGC GTC AAC ACA CAA G-3'를, BoDIR3 유전자는 forward primer로 5'-TTC GTC CCG AAA AAC ATT GG-3'와 reverse primer로 5'-AGG GGT TCC GAT AGA TAG TTC-3'를, BoDIR4 유전자는 forward primer로 5'-GCC GAC AGT GAC AAA TCT C-3'와 reverse primer로 5'-CAG AAT TCT TCC CGA TCA TGC-3'를 사용하였다. 특히 BoDIR2 유전자의 염기서열은 BrDIR2 유전자와 91%의 높은 유사성을 보였으며 시들음병 처리하에서의 발현 양상도 비슷한 경향을 나타냄을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과 dirigent 유전자는 생물학적 스트레스에 반응함을 알 수 있었다(그림 5-50).

	Motif-I	Motif-II	Motif-III
BrDIR1	: LTHFKVYWHDIISG	FGAISMIDNALT	STVLCQAQGFY
BrDIR2	: CKHFSFYFHDIIYD	FGKFVIFDGPIT	SEPVARAQGFY
BrDIR3	: DHTLVFFMHDIIIG	FGTMTVIDDEL	SGLLGKAQGY
BrDIR4	: LFSFSLYVQQTQIP	GGGALIFRRTL	SRIVEKAEGEI
BrDIR5	: CKSFVLYQHNTAYD	FGKFVIFDNPVT	SKPVARAQGF
BrDIR6	: --IFELYMHDIIIG	FGTITVIDDIIT	SQPLEKAQGVY
BrDIR7	: --IFELYMHDIIIG	FGTITVIDDIIT	SQPLEKAQGVY
BrDIR8	: VTNLHFFEHDTISG	FGSLLAIDDP	SEKIENVRGM
BrDIR9	: --IFELYMHDIIIG	FGTITVIDDILT	SQPLEKAQGVY
BrDIR10	: CKNFVLYYHDIMFG	FGKLVIFDDPVT	SEPVARAQGFY
BrDIR11	: LTHLHFYFHDVITG	FCVVMIADDP	SKEVGRAQGM
BrDIR12	: --IFELYMHDIIIG	FGTITVIDDILT	SQPLEKAQGVY
BrDIR13	: LPVLEFFMHDVIG	FGTITVVDDDEL	SAIIGRAQGFY
BrDIR14	: LTHLHFYFHDIVSG	FGMVVVIDDP	SAIIGRAQGFY
BrDIR15	: CKHFSFYFHDIIYD	FGKFVIFDGPIT	SEPLARAQGFY
BrDIR16	: CKQFSFYHDIYD	FGKLVIFDDPIT	SEYVARAQGFY
BrDIR17	: VTRLRFYLHDIISG	FGSLFAMDDP	SEKIENVRGM
BrDIR18	: CKHFSFYFHDIIYD	FGKFVIFDGPIT	SEPLARAQGFY
BrDIR19	: LTHFRVYWHDIIDG	FGLTRMIDNPL	SKMVGRAQGFY
BrDIR20	: LTHFKVYWHDMISG	FGGISMIDNALT	STLIGKAQGFY
BrDIR21	: LTHFKVYWHDIISG	FGGINMIDNALT	STLIGKAQGFY
BrDIR22	: LTHFKVYWHDIISG	FGGITMIDNALT	STLVGQAQGFY
BrDIR23	: VTNLQFYFHDITISG	FGSVFMVDDAL	SKLVGRAQGLY
BrDIR24	: LTHFKVYWHDIISG	FGGVTMFDNALT	SKLVGRAQGLY
BrDIR25	: LTHFKVYWHDIISG	FGGITMIDNALT	STLIGKAQGFY
BrDIR26	: LTFFRVYWHDIQSG	FGAVTVIDNRL	STLVGQAQGLY
BrDIR27	: LTFFRVYWHDIQSG	FGSISMMDDAL	STLVGQAQGLY
BrDIR28	: LTHLRVYWHDIISG	FGSITMIDNALT	STLVGQAQGFY
BrDIR29	: LTHLRVYWHDIRSG	FGSITMIDNALT	STLVGQAQGFY
Consensus	: LTHF-LYAHDILUG	FGSTCLIDCSLT	SPHVG-AQGFY

	Motif-IV	Motif-V
BrDIR1	: --AMNFAFKTGKYNSTITILGRN	REMPIVGGSGLFRFARGYVEAR
BrDIR2	: -FSFTLVFNSTEHKG-TLNIMCAD	RDLSVVGGTGDFFMARGIATFV
BrDIR3	: ----TAMFESSGGYED-SISFFC--	SHLGVMGGTGKYNARGFAIVK
BrDIR4	: --NFNVIYLTLESPEYTGVSIRS	EVMEVVGGTGAFAFARGIAMFA
BrDIR5	: -VACTLVFNSTQHKG-IFTIMDAN	RDLSIVGGTGDFFMTRGIATFK
BrDIR6	: ----TAMLEGGGEYND-NLNFYC--	SHLSVTGGTGRFKNACGFAEVR
BrDIR7	: ----TAMLEGGGEYND-NLNFYC--	SHLSVTGGTGRFKNACGFAEVR
BrDIR8	: --YVDFGFTSGLFNSSFTVFSRN	RELAVVGGGRGRFRMATGVAQLN
BrDIR9	: ----TAMLEGGGEYND-NLNFYC--	SHLSVTGGTGRFKNACGFAEVR
BrDIR10	: -FSYTLVFNSTQHKG-TLNIMCAD	RDLSVVGGTGDFFMARGIATFV
BrDIR11	: --VFNLVETEGEFKGSTVALYGRN	REMPIIGGTGAFRFARGYAQAR
BrDIR12	: ----TAMLEGGGEYND-NLNFYC--	SHLSVTGGTGRFKNACGFAEVR
BrDIR13	: TVLFHGEHDDHDTLDDAISFFC--	SHIADVGGTCKFEHAKGYAVVE
BrDIR14	: --AFNLVETKGEFAGSTASLYGRN	REMPIIAGTCAFRFGRGYAQAR
BrDIR15	: -FCYTLVFNSTEHKG-TLNIMCAD	RDLSVVGGTGDFFMARGIATFV
BrDIR16	: -ICLTLVFNSTEHKG-TLNIMCAD	RDIPVVGGTGDFFMARGIATVE
BrDIR17	: --YADLAFTTGKFNSSISVFSRN	REIGIVGGGRGKFRMARGEVKIK
BrDIR18	: -FCYTLVFNSTQHKG-TLNIMCAD	RDLSVVGGTGDFFMARGIATFV
BrDIR19	: --AMNFAILEGKYNSTITIVFGRN	REMPVIGGSGLFRFARGYVQAR
BrDIR20	: --AMNFVFKIGKYNSTITILGRN	REMPIVGGSGLFRFARGYVEAR
BrDIR21	: --AMNFAFKRGKYNSTITILGRN	REMPIVGGSGLFRFARGYVEAR
BrDIR22	: --AMNFVFKTGKYNSTITILGRN	REMPIVGGSGLFRFARGYVEAR
BrDIR23	: --AMSFCFEDGPYKDSITISMIKKN	REMPIVGGTGMFRMARGYAIAC
BrDIR24	: --GMNFAFKTGKYNSTITILGRN	REMPIVGGSGLFRFARGYVEAR
BrDIR25	: --AMNFAFKTGKYNSTITILGRN	REMPIVGGSGLFRFARGYVEAR
BrDIR26	: --VMNFAFKTGKYNSTISILGRN	REMPVIGGSGLFRFARGYVEAR
BrDIR27	: --VMNFAFKTGKYNSTITILGRN	REMPVIGGSGLFRFARGYVEAR
BrDIR28	: --AMNFAFKTGKYNSTITILGRN	RKMSVVGSGIFRFARGYVELR
BrDIR29	: --AMTFAFKTGEYKGNSTITILGRN	REMPVVGSGIFRFARGYVEAR
Consensus	: --SSSFSFSPSGCASGSTLOIHGRN	REMUUVGGTCTCFRAARGYACSR

그림 5-49. dirigent 유전자의 아미노산 염기서열에서 motifs (I-V)

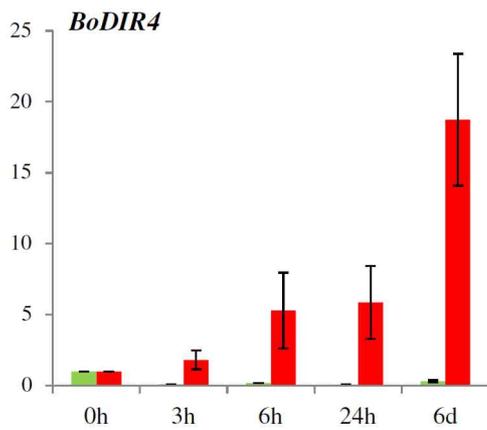
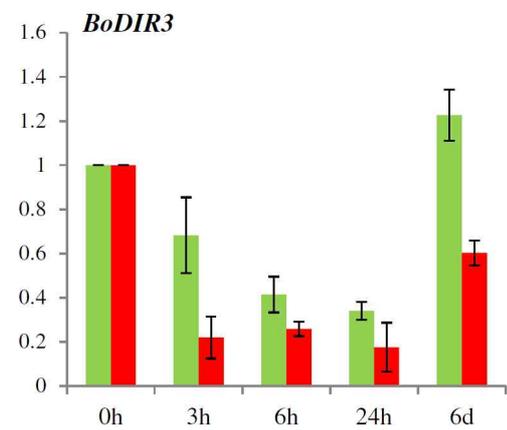
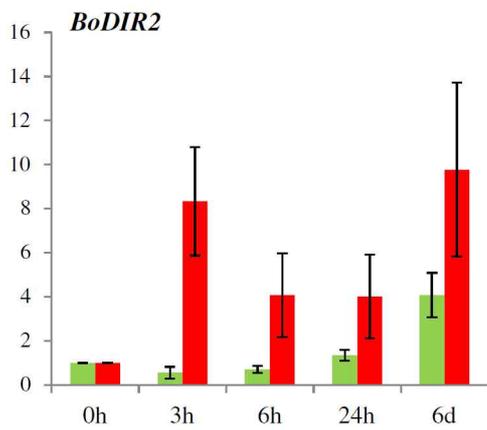
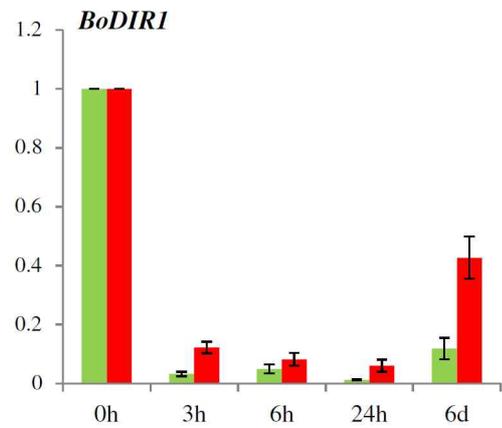
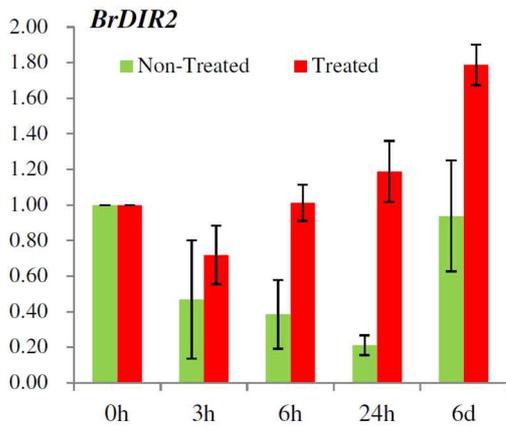


그림 5-50. 시들음병균을 처리한 양배추에 있어서 dirigent 유전자의 발현 분석

Dirigent 유전자에 대한 계통수를 그려보기 위하여 *Brassica rapa* (Br), *Picea glauca*, *P. sitchensis* or *P. glaucaengelmannii* (P), *Tsuga heterophylla* (Th), *Thuja plicata* (Tp), *Arabidopsis thaliana* (At), *Oryza sativa* (Os), *Hordeum vulgare* (Hv), *Triticum aestivum* (Ta), *Saccharum officinarum* (So), *Pisum sativum* (Ps), *Forsythia inter-media* (Fi), *Podophyllum peltatum* (Pp) 를 포함하여 이들의 아미노산 염기서열을 이용하여 계통수를 그려 본 결과 크게 6개의 그룹 (DIR-a, DIR-b/d, DIR-c, DIR-e, DIR-f, DIR-g)으로 나뉘어졌다(그림 5-51). 이전 연구에서 DIR-a family에 대해서만 dirigent 유전자임이 밝혀졌었다. 그 외의 DIR-b/d, DIR-c, DIR-e, DIR-f, DIR-g 그룹의 유전자에 대해서는 생화학적인 기능이 아직 밝혀져 있지 않아서 현재 BrDIR2, 4, 5, 10, 15, 18과 23 유전자가 진정한 dirigent 유전자(그림 5-52)라고 말할 수 있으며, 나머지 22개의 BrDIR 유전자들은 dirigent like 유전자(그림 5-53)라고 말할 수 있다. 또한 DIR-a 그룹과 DIR-g 그룹은 공통의 dirigent 유전자에서 유래된 것으로 알려져 있어 dirigent like 유전자 역시 dirigent 유전자와 비슷한 기능을 할 것이다.

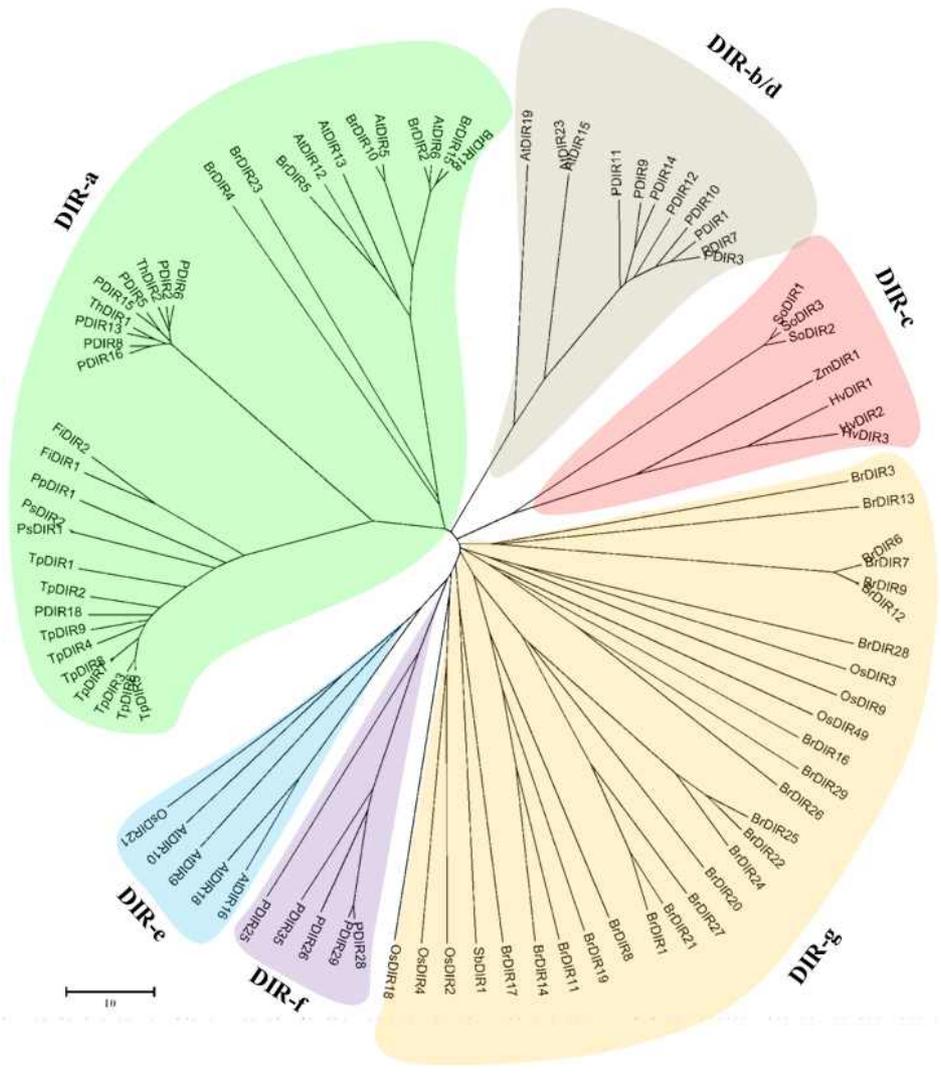


그림 5-51. dirigent 유전자에 대한 계통수

BrDIR	BrDIR2	: PCRHFSFYEHDLIYDGDNVANATSAAIVSPPGLGNFKFKGFVI FDGQITMDKNYLSEPVARAQGFYFYDMKTDNFNSWESFTLVENSTP
	BrDIR4	: -LFS-SLYVQQTQIPSSSYISRRSQRMAETHRRGGGGGALIRRTLTGEGPNNRSRIVGKAEGFLIPHEDFANGSNFVYITLSESP
	BrDIR5	: PCRSFVLYCHNTAYDSNDTNDATSATILNPLGLGNFLFKGFVI FDNFVTMDQNYLSKPVARAQGFYFYDMKNDYNWACTLVENSTQ
	BrDIR10	: PCRNFVLYYHDIMFGVDDVQNTSAAVTNPPGLGNFKFKGLVIFDDPVTLDKNYQSEPVARAQGFYFYDMKNDYNWACTLVENSTQ
	BrDIR15	: PCRHFSFYEHDLIYDGDNVANATSAAIVSPPGLGNFKFKGFVI FDGQITMDKNYLSEPLARAQGFYFYDMKTDYNWFCYTLVFNSTP
	BrDIR18	: PCRHFSFYEHDLIYDGDNVANATSAAIVSPPGLGNFKFKGFVI FDGQITMDKNYLSEPLARAQGFYFYDMKTDYNWFCYTLVFNSTQ
DIR-a	AtDIR5	: PCRNFVLYYHDIMFGVDDVQNTSAAVTNPPGLGNFKFKGLVIFDDPMTLDKNYQSEPVARAQGFYFYDMKNDYNWFCYTLVFNSTQ
	AtDIR6	: PCRHFSFYEHDLIYDGDNVANATSAAIVSPPGLGNFKFKGFVI FDGQITMDKNYLSEPLARAQGFYFYDMKTDYNWFCYTLVFNSTQ
	AtDIR12	: PCRNFVLYYCHNTAYDGDNVANATSAAITLVKPLGLGHSFCGLIINNFVTLIDQNYLSKPVARAQGFYFYDMKTDYNWFCYTLVFNSTQ
BrDIR	BrDIR2	: HKGTLNIMCADIM-MEPTRDLSVVGGTGDFEMRGIATFVNDLFC---CAKYRVRVMDIKI
	BrDIR4	: YTGVSIRSRDMA-HKLEEVMEVVGGTGDFAFARGIAMEAEVGAQ---EEAVTTYRVRKLLI
	BrDIR5	: HKGTFITMDANPI-MEPTRDLSIVGGTGFDMTRGIATFRSDLIQ---GSKYERLRKMDIDI
	BrDIR10	: HKGTLNIMCADIM-MEPTRDLSVVGGTGDFEMSRGIATFVNDLFC---CAKYRVRVMDIKI
	BrDIR15	: HKGTLNIMCADIM-MEPTRDLSVVGGTGDFEMRGIATFVNDLFC---CAKYRVRVMDIKI
	BrDIR18	: HKGTLNIMCADIM-MEPTRDLSVVGGTGDFEMRGIATFVNDLFC---CAKYRVRVMDIKI
DIR-a	AtDIR5	: YRDSTISIGKNSAMNEVREMEIVGGTGMFRMARGYATIAQHHWFDPKTCDAIVGYNVITVH
	AtDIR6	: HKGTLNIMCADIM-MVQSRDLSVVGGTGDFEMSRGIATFVNDLFC---CAKYRVRVMDIKI
	AtDIR12	: HKGTFITMDANPFGLQPARDLSIVGGTGFDMTRGIATFRKILTC---GSKYECVEMNIKI

그림 5-52. dirigent 유전자에 대한 DIR-a 그룹의 아미노산 염기서열 비교

BrDIR like	BrDIR1	: ---KLT HL FKVY WHD IL --- SG PN PS STM Q PP VK N ---TSYF CA SM ID NA L TAR V FM - NS TV LC QA GG F Y AG AAQ KE L	
	BrDIR3	: ---Q NG N NG N GN LN --- GL PV ANG GO IP SG SA LQ M---LM FG TL TV IDD LT EG HE L-G SL LE KA GG YV VA SA VD GT	
	BrDIR6	: ---L SG TAF---S Q Q NL NG HT Q TL GP DG LS---L GF GL TV IDD LT SG PD L-G SQ PL KA GG YV VA SS AD GS	
	BrDIR7	: ---L SG TAF---S Q Q NL NG HT Q TL GP DG LS---L GF GL TV IDD LT SG PD L-G SQ PL KA GG YV VA SS AD GS	
	BrDIR8	: ---V VT N LH FF FF HL TL ---S CR DP SA VL AK PH LT AE - N SS SP TP FG SL A IDD PL TL GP DP -K SE IG EN V RC M YV SS SG K H VP	
	BrDIR9	: ---L SG TAY---S Q Q NL NG HT Q TL GP DG LS---L GF GL TV IDD LT SG PD L-G SQ PL KA GG YV VA SS AD GS	
	BrDIR11	: ---KLT HL HF YF HD VI ---T GD K PT AR WA AP PT N---S SE VS FC VM TD DD PL TE GP DP-S S KE IV CR AG CM YV VS TD M TL	
	BrDIR12	: ---L SG TSY---S Q Q NL NG HT Q TL GP DG LS---L GF GL TV IDD LT SG PD L-G SQ PL KA GG YV VA SS AD GS	
	BrDIR13	: AN TV IQ NT NG NS Q GS L SS N---N L P FV TA GO PP AA AL QQ ---L M FG TL TV DD PL TE GH EL -G SA IG RA GG F Y AG AAQ KE L	
	BrDIR14	: ---KLT HL HF YF HD IV ---S CA KE PT TA IV AV GP TT N ---T S AS A FG YV VD DD PL TV GP PI -T SE EV CR AG CM Y VA SS AD Q KS F	
	BrDIR16	: ---P CK Q F S F Y Y HD I Y DG AD NA AN AT S AA I N PP GL GN---F K FG KL V H DD PL TD M T NY -L SE Y VA RA GG F Y F Y D KK L GV	
	BrDIR17	: ---K VT RL R F Y L HD IL---S CR NP SA VR WA HAN LT G---G AD SA V GG FS F AM DD PL TV GP GK-K SE IG EN GR CM Y VA SS AD SK DI R	
	BrDIR19	: ---KLT HL FR VY W HD IL---D CK DP TS VS IM N PS K NY ---T G AT GF GL TR M ID N PL TA PE L-SS R M VC RA GG F Y AA AS KE EV	
	BrDIR20	: ---KLT HL FKVY WHD MI---S CP NP TS SH I Q PP VK Y ---S - T TY FG GL SM ID NA L TAK V SR-N ST IL CA GG F Y AG AAQ KE L	
	BrDIR21	: ---KLT HL FKVY WHD IL---S CP NP TS SM I Q PP IT N ---S T Y FG GL SM ID NA L TAK VSR-N ST IL CA GG F Y AG AAQ KE L	
	BrDIR22	: ---KLT HL FKVY WHD IL---S CP NP TS SM I Q PP V TK S---T TY FG GL SM ID NA L TAK V SR-N ST IL CA GG F Y AG AAQ KE L	
	BrDIR24	: ---KLT HL FKVY WHD IL---S CP K PS STR IK KE PV TN---S - T SY FG GL SM ID NA L TAK V SR-N ST IL CA GG F Y AG AAQ KE L	
	BrDIR25	: ---KLT HL FKVY WHD IL---S CP NP TS STR IK Q PP VAN---S - T TY FG GL SM ID NA L TAK V SR-N ST IL CA GG F Y AG AAQ KE L	
	BrDIR26	: ---KLT HL FRVY WHD IQ---S CS NP TS V VR PP LS N---S S FG CA TV ID N RL TV GP VN-N ST IL CA GG F Y AG AAQ KE L	
	BrDIR27	: ---TL HL RL Y W HD SI---S CP NP TS TV RR Q PP V SN ---S SL FG SL SM DD AL TD VMK-N ST IV VC AG GI Y AG AAQ GE I	
	BrDIR28	: ---KLT HL RVY WHD IL---S CR NP SA VR WA KK H AKH---S---F GS TL SM ID NA L TS DV PI -N ST IL VC AG GI Y AG AAQ HE T	
	BrDIR29	: ---KLT HL RVY WHD IR---S CP NP TS SM I Q PP VK Y ---S - T TY FG GL SM ID NA L TS DV PI-N ST IV VC AG GI Y AG AAQ QR L	
	OsDIR3	: ---P VR ML Y W HD VI---D CP Q TA TR I W GA GP PH AS MP -G RA FG DT V AD DD VT EG PS I-AS AA VR AG CM Y VA SS Q RE A	
	OsDIR9	: ---P VR LR Y W HD IT---S CP Q TA TR I W GA GP PH AS MP -G RA FG DT V AD DD VT EG PS I-AS AA VR AG CM Y VA SS Q RE A	
	OsDIR49	: ---T TT HT R F Y M HD IT VT AS AS GG CP AA TA VR VR GV AA AL P G DA V NR FG DL Y AD DD PL TD GA DA AS SA AV CR AG CM Y VA SS RT DS	
	BrDIR like	BrDIR1	: G--FL M AM NE FA FK TG KY NG ST IT LG R NT AL SE V--R EM PI V GG S GL FR FR GM VE AR T K WIN-----L KN G DA VE Y SC Y VL
		BrDIR3	: SQT MA FT AM FE---S GG Y ED S IS FF GV H RT A ES H SV GG CK M V NR GR AI V KT FG SS GT Q Q Q PH Q FT D GL ET VD C T V Y LSY
		BrDIR6	: TQ MA FT AM LEG---G EY ND N NF Y GI R IG S AM SH SV GG CR FK NA CC AE VE PL IP -----A G Q H V D GA E IL RI IV H Y KY
BrDIR7		: TQ MA FT AM LEG---G EY ND N NF Y GI R IG S AM SH SV GG CR FK NA CC AE VE PL IP -----S G Q H V D GA E IL RI IV H Y KY	
BrDIR8		: --TL MY V D E G FT S GL NG SS PT V FR NT ITE KE--R EA V Y GG CR FR FM T CV A QL N Y SVN-----L LN G DA VE Y N V Y YH	
BrDIR9		: TQ MA FT AM LEG---G EY ND N NF Y GI R IG S AM SH SV GG CR FK NA CC AE VE PL IP -----S G Q H V D GA E IL RI IV H Y KY	
BrDIR11		: S--FT M V N V N L V FT E GE FK G ST V AY GR N P I M S KV--R EM PI V GG S GL FR FR GM VE AR T K WLN-----G LN --A V VE Y N V Y YH	
BrDIR12		: TQ MA FT AM LEG---G EY ND N NF Y GI R IG S AM SH SV GG CR FK NA CC AE VE PL IP -----S G Q H V D GA E IL RI IV H Y KY	
BrDIR13		: SQT LS LT VL EH GE H HD TL DD AS FF GV H RT A SH ASH AV VG GG CK SE H CK MA V VE L HN -----Q ED Q H V T D GR DT D H FS I Y Y	
BrDIR14		: G--L F V A F N L V FT K GE FA GT AS Y GR N P V M S K V--R EM PI V GG S GL FR FR GM VE AR T K WLN-----T T S G NA V VE Y N V Y YH	
BrDIR16		: NAW IC L TV EN ST ---E HR GT LN MG AD LM RE PT--R D EP V V GG IG DS FM RC LA TV ED ATE G-----L RY F FR K MD IK LI --	
BrDIR17		: K FT I V MY AD L A FT T GR KG SS IS V FR NP VA E E AG ERE H GI V GG CR GR FR FM TC V K I KH Q ID-----M K T G DA V Y RN D AT Y YH	
BrDIR19		: G--L L M AM NE AI LE G K Y NG ST IT VG R NS V F DKV--R EM PI V GG S GL FR FR GM VE AR T K WLN-----I K T G NA V VE Y N V Y YH	
BrDIR20		: G--L L M AM NE AI LE G K Y NG ST IT VG R NS V F DKV--R EM PI V GG S GL FR FR GM VE AR T K WLN-----I K T G NA V VE Y N V Y YH	
BrDIR21	: G--FL M AM NE FA FK R G K Y NG ST IT LG R NT AM SE V--R EM PI V GG S GL FR FR GM VE AR T K WLN-----L K TL DA VE Y SC Y VL		
BrDIR22	: G--FL M AM NE FA FK R G K Y NG ST IT LG R NT AM SE V--R EM PI V GG S GL FR FR GM VE AR T K WLN-----L K TL DA VE Y SC Y VL		
BrDIR24	: S--F L V G M N FA FK T G R Y NG ST IT LG R NP V L SKV--R EM PI V GG S GL FR FR GM VE AR T K WLN-----L KN G DA VE Y SC Y VL		
BrDIR25	: G--F F M AM NE AI LE G K Y NG ST IT LG R NT AM SE V--R EM PI V GG S GL FR FR GM VE AR T K WLN-----F Q N G DA V VE Y SC Y VL		
BrDIR26	: S--A L M V M N FA FK T G R Y NG ST IT LG R NE V L TKV--R EM PI V GG S GL FR FR GM VE AR T K WLN-----Q K T G DA V VE Y SC Y VL		
BrDIR27	: S--L L M V M N FA FK T G R Y NG ST IT LG R NA V ME KA--R EM PI V GG S GL FR FR GM VE AR T K WLN-----I K S G V A VE Y N V Y YH		
BrDIR28	: S--F L V AM NE AI LE G K Y NG ST IT VG R NS V F DKV--R EM PI V GG S GL FR FR GM VE AR T K WLN-----Q Q S G DA V VE Y N V Y YH		
BrDIR29	: G--F L M AM TE AF KT GE Y K NG ST IT LG R NT V L SEV--R EM PI V GG S GL FR FR GM VE AR T K WLN-----L L K L DA V VE Y N V Y YH		
OsDIR3	: V L V V A I T V AL T S AG GP Y NS N L V AG R DR V R DE T--R EA V Y GG CR AL FC AC VM VE AK V-----W SE I H M DEL D V HA SV		
OsDIR9	: V F V V S I T V L T DG--P Y K G ST IL AG R DD I SEV--R EA V Y GG CR AL FC AC VM VE AK V-----E SP V H M DEL D V HA SV		
OsDIR49	: A LL F SA T ME ET AG --V H R G GA VS L AR DA IL D EV --R EM PI V GG S GL FR FR GM VE AR T K WLN-----A T T NA V DEL D V HA SV		

그림 5-53. dirigent 유전자에 대한 DIR-g 그룹의 아미노산 염기서열 비교

⑥ Defensin 및 Betv1AFP 유전자 연구

㉑ 병 저항성 유전자에 속하는 *Defensin(DLFP)* 유전자 및 *Betv1AFP* 유전자는 각각 PR-12 class 및 PR-10 class에 속한다. 선행연구를 통해 배추 완전장 cDNA library로부터 동정된 *BrDLFP* 유전자 및 *BrBetv1AFP* 유전자는 매우 작은 아미노산 코돈으로 구성되어 있었다. 또한 *BrDLFP*는 9개의 cysteine 잔기가 기 보고된 DLFP 유전자들과 잘 보존되어 있었다(그림 5-54). *BrDLFP* 유전자 및 *BrBetv1AFP* 유전자는 뿌리에서는 발현을 하지 않았고 줄기, 잎, 꽃봉우리에서 발현하는 것을 확인하였다(그림 5-55).

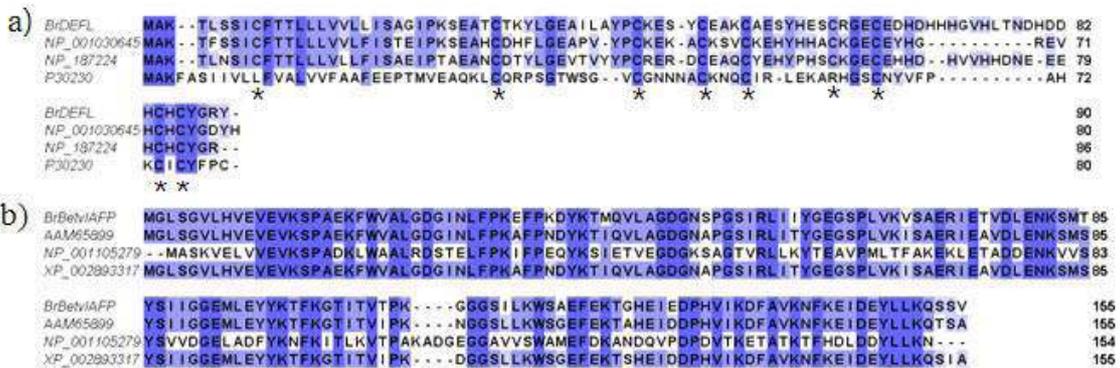


그림 5-54. BrDLFP 및 BrBetv1AFP의 아미노산 코돈 비교

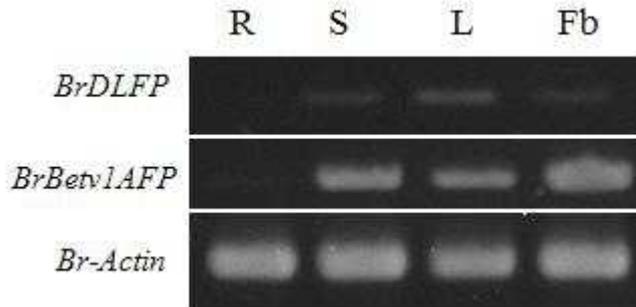


그림 5-55. *BrDLFP* 및 *BrBetv1AFP* 유전자의 기관별 발현 분석 (R: roots, S: stems, L: leaves, Fb: flower buds)

BrDLFP 유전자 및 *BrBetv1AFP* 유전자가 병원균에 대한 반응을 나타내는지를 확인하기 위하여 여러 종류의 병원균 처리 후 얻어진 농촌진흥청의 microarray 데이터를 도입하였다. 이들 데이터 중 *BrDLFP* 유전자 및 *BrBetv1AFP* 유전자는 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*에 대하여 반응하였다. *BrDLFP* 유전자는 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 감염 후 시간이 지날수록 발현양이 증가

하였으며, *BrBetvAFP* 유전자는 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 감염 후 시간이 지날수록 발현양이 급격히 감소하였다(그림 5-56). 또한 *BrDLFP* 유전자 및 *BrBetvAFP* 유전자에 대하여 저온, 건조, 염, ABA 스트레스 처리 후 이들 유전자들의 발현양상을 확인한 결과 2개의 유전자들은 모든 스트레스에 대하여 반응하였다(그림 5-57, 5-58).

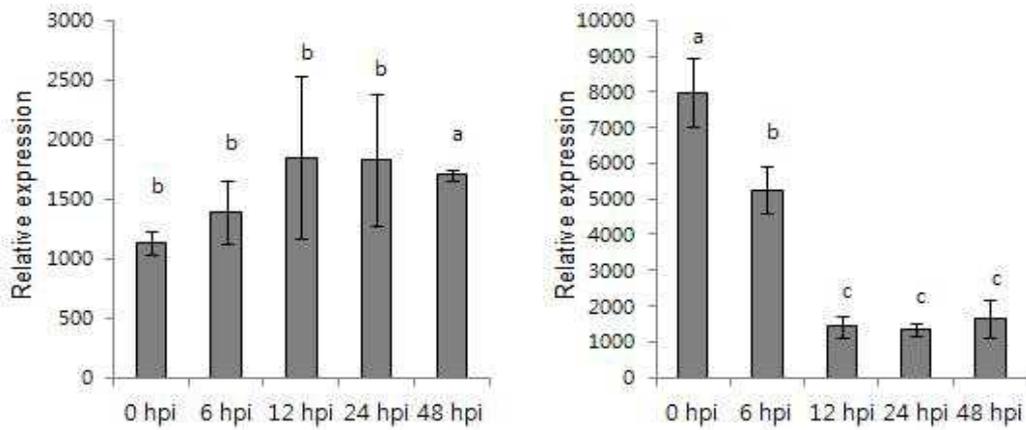


그림 5-56. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 감염 후 *BrDLFP* 유전자(왼쪽) 및 *BrBetvAFP* 유전자(오른쪽)의 발현

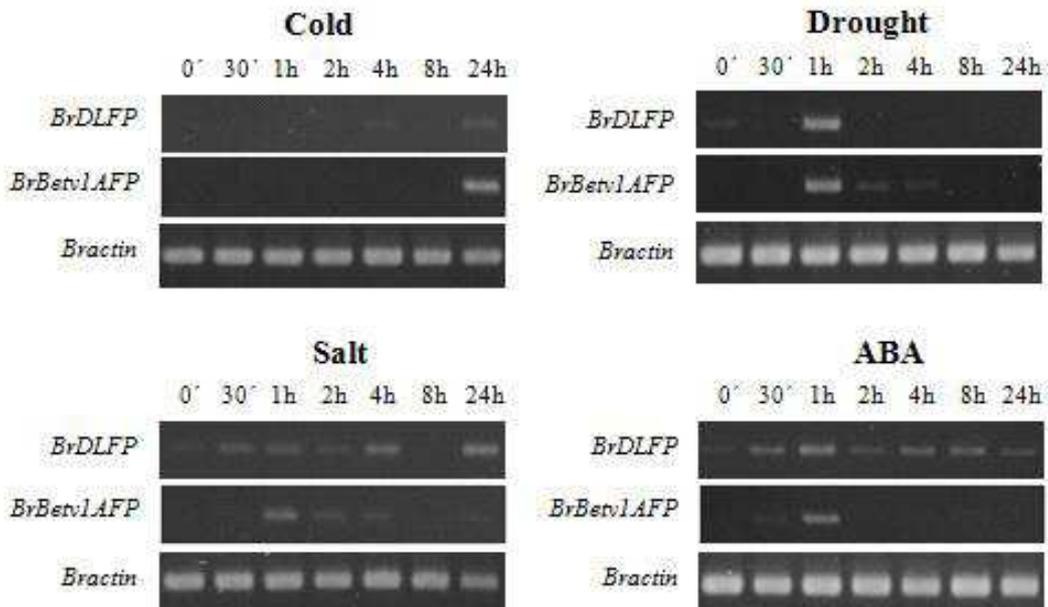


그림 5-57. 스트레스 처리 후 *BrDLFP* 유전자 및 *BrBetvAFP* 유전자의 RT-PCR 발현

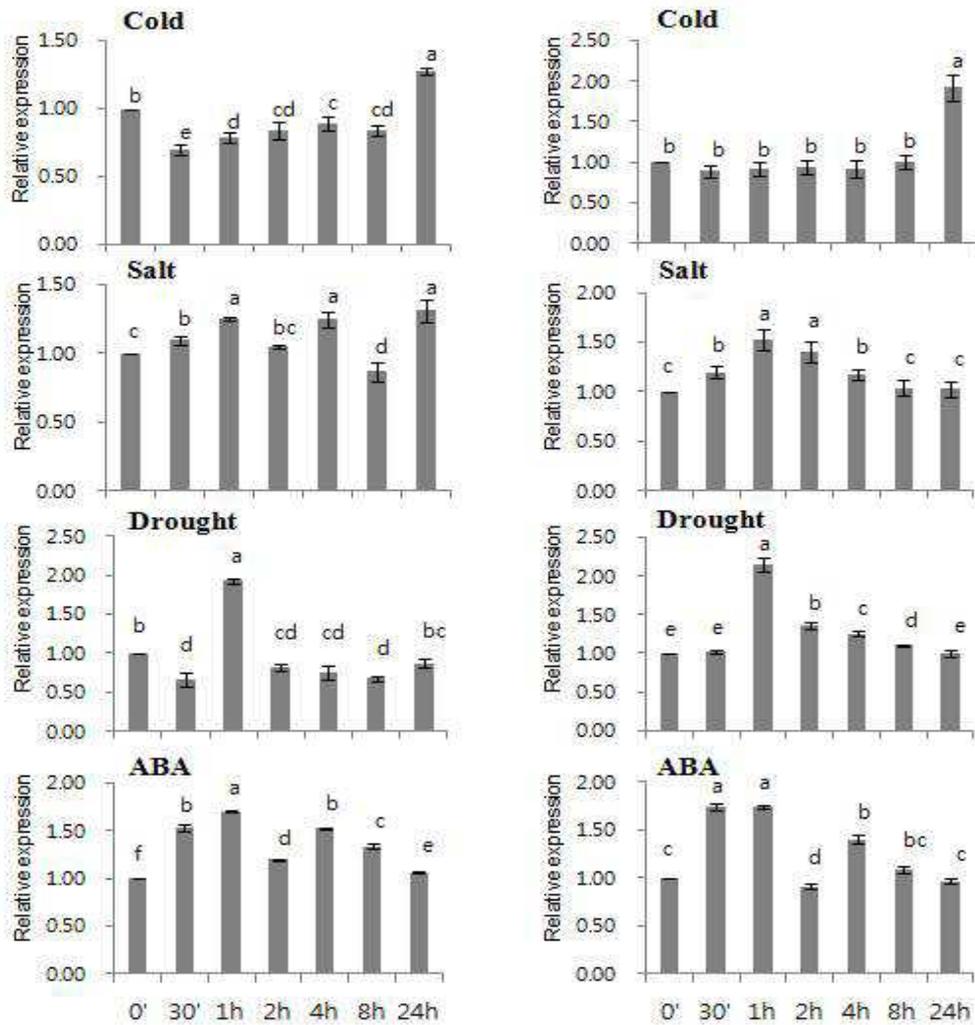


그림 5-58. 스트레스 처리 후 *BrDLFP* 유전자(왼쪽) 및 *BrBetvIAFP* 유전자(오른쪽)의 Real-time PCR 발현

⑦ WRKY 유전자 연구

㉠ 고등식물에 있어서 WRKY 유전자는 매우 큰 전사인자 유전자군을 이루고 있으며 식물발달, 물질대사, 생물학적 및 비생물학적 스트레스에 복합적인 반응을 나타내는 유전자군이다. 배추의 WRKY 유전자들을 동정하기 위하여 *Brassica rapa* database(<http://brassicadb.org/brad/index.php>)를 이용하였으며 검색방법으로는 "WRKY" 키워드를 사용하여 검색하였으며, WRKY 도메인 분석을 위하여 SMART 프로그램(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)을 사용하였다. 또한, 유전자의 주요 구조(길이, 분자량, 등전점) 분석을 위해 ExPasy(http://au.expasy.org/tools/pi_tool.html)를 사용하였으며, 배추 염색체 상의 WRKY 유전자 위치는 MapChart v2.2

(<http://www.wageningenur.nl/en/show/Mapchart.htm>)를 사용하여 표기하였다. Brassica rapa database로부터 145개의 배추 WRKY 유전자를 동정하였으며 이들 유전자들을 이용하여 다른 종들과의 상동성 검색을 수행한 결과 51개의 유전자들이 다른 종에서 생물학적(곰팡이)인 스트레스에 연관성이 높은 것으로 보였으며, 42개의 유전자들은 다른 종에서 비생물학적 스트레스에 연관성이 높은 것으로 보였다. 또한 48개의 유전자들은 생물학적 및 비생물학적 스트레스 모두에 연관성이 높았으며, *BrWRKY46, 85, 129, 138*의 4개 유전자들은 생물학적 스트레스 및 비생물학적 스트레스에 직접적인 상동성이 없었다(표 5-12). 이와 같은 상동성 검색 결과 WRKY 유전자들은 다양한 생물학적 및 비생물학적 스트레스에 관련된 유전자로 판단된다.

표 5-12. 145개의 WRKY 유전자에 대한 상동성 분석

Gene name	Top matched clones	% Identity	e-value	Top homologous species	Function
BrWRKY1	AHB33824	76%	7e-129	<i>Brassica napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04203	45%	6e-55	<i>Jatropha curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY2	AGQ04215	46%	8e-74	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
	AAS13378	79%	2e-175	<i>Brassica rapa subsp. chinensis</i>	-
BrWRKY3	ACI14384	99%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04233	63%	2e-128	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY4	ACI14393	84%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	ADU52524	47%	8e-47	<i>Cucumis sativus</i>	Enhances cold, drought & salinity tolerances
BrWRKY5	XP002867796	89%	0.0	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	-
	ACQ76807	68%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY6	ACI14394	75%	8e-153	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04236	70%	3e-42	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY7	ACQ76808	98%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	ABN79278	74%	3e-160	<i>Noccaea caerulescens</i>	Responsive to NaCl, drought, cold and SA.
BrWRKY8	XP002869730	94%	7e-81	<i>A. lyrata subsp. lyrata</i>	-
	ACI14406	85%	5e-71	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY9	BAB61056	50%	2e-112	<i>Nicotiana tabacum</i>	-
	ADU52508	50%	4e-109	<i>C. sativus</i>	Responsive to cold, salt and drought
BrWRKY10	ACI14387	94%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	ACD80361	43%	2e-112	<i>Triticum aestivum</i>	Responsive to drought, salinity and freezing
BrWRKY11	XP002890885	78%	0.0	<i>A. lyrata subsp. lyrata</i>	-

	ACH99804	56%	5e-118	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY12	ACH99808	58%	8e-161	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	XP002871650	59%	3e-157	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
BrWRKY13	AAK28310	79%	2e-117	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-
	ACY69975	33%	1e-22	<i>Vitis pseudoreticulata</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY14	ACI14391	92%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	ACD80357	49%		<i>T. aestivum</i>	Enhance drought, salinity and freezing tolerances
BrWRKY15	ACH99808	78%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04226	46%	4e-49	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY16	XP002874078	65%	1e-120	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	ACY69975	36%	1e-21	<i>V. pseudoreticulata</i>	Responsive to powdery mildew and enhanced salt and cold tolerances
BrWRKY17	XP002874078	59%	2e-105	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	AAF61864	44%	3e-18	<i>N. tabacum</i>	Responsive to tobacco mosaic virus
BrWRKY18	ACI14392	99%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	NP001267594	40%	2e-47	<i>C. sativus</i>	Responsive to drought, salinity and cold stresses
BrWRKY19	AGQ04223	49%	7e-65	<i>J. curcas</i>	Responsive for drought, salinity, P-starvation and N-starvation
	NP001234802	42%	1e-54	<i>Solanum lycopersicum</i>	Responsive to root-knot nematodes (RKN)
BrWRKY20	NP001237777	51%	1e-65	<i>Glycine max</i>	-
	AGQ04212	61%	1e-37	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY21	ACI14398	76%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04224	38%	4e-49	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY22	ACQ76806	97%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04215.1	55%	4e-49	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY23	XP002874078	47%	3e-26	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	ABI13398	39%	7e-15	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	Responsive to cold and drought
BrWRKY24	AAK28310	37%	2e-22	<i>A. thaliana</i>	-
	AGQ04250	30%	4e-49	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY25	AAK28310	40%	5e-30	<i>A. thaliana</i>	-
	ACY69975	29%	5e-19	<i>V. pseudoreticulata</i>	Responsive to powdery mildew and enhanced salt and cold tolerances
BrWRKY26	XP002872545	71%	2e-154	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	ABN79278	53%	4e-101	<i>N. caerulea</i>	Responsive to drought, salinity and cold stresses
BrWRKY27	ACI14410	79%	2e-179	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04214	53%	4e-49	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY28	NP178433	78%	0.0	<i>A. thaliana</i>	-
	ACI14395	76%	7e-119	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET

BrWRKY29	AEO31516	53%	4e-60	<i>Dimocarpus longan</i>	-
	AGQ04211	46%	4e-49	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY30	ACI14408	85%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04202	53%	4e-49	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY31	ACH99807	98%	7e-119	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04202	49%	4e-49	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY32	XP0028649 23	77%	5e-96	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	AGQ04200	54%	1e-37	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY33	ACI14409	100%	3e-105	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	ACH88751	70%		<i>Fragaria ananassa</i>	Responsive to <i>C. acutatum</i> in strawberry.
BrWRKY34	ACH99808	99%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04230	49%	8e-135	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY35	ACQ76801	77%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	ADU52508	60%	3e-146	<i>C. sativus</i>	Enhance drought, salinity and cold tolerances
BrWRKY36	XP0028675 53	66%	0.0	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	ACI14387	64%	5e-116	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY37	XP0028810 94	81%	0.0	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	ACI14390	80%	5e-116	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY38	XP0028792 70	74%	9e-168	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	ACI14390	73%	5e-116	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY39	ACH99805	98%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGJ52160	45%	8e-135	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY40	ACI14397	95%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGJ52154	49%	8e-135	<i>J. curcas</i>	Responsive for drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY41	XP0028798 88	75%	1e-160	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	AGQ04249	39%	8e-135	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY42	NP181607	70%	2e-160	<i>A. thaliana</i>	-
	ACQ76810	45%	5e-116	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY43	XP0028819 79	79%	2e-170	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	AGQ04204	57%	8e-135	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY44	ADM32893	71%	4e-131	<i>B. campestris</i> ssp. <i>chinensis</i>	Responsive to ABA, cold, drought and salinity.
	AGQ04246	41%	8e-135	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY45	ACQ76807	99%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04246	51%	8e-135	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY46	AAL29431	48%	0.0	<i>A. thaliana</i>	-

BrWRKY47	XP0028844 57	82%	0.0	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	–
	AGQ04230	53%	8e–135	<i>J. curcas</i>	Responsive for drought, salinity, P–starvation and N–starvation
BrWRKY48	ACI14383	91%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGJ52158	55%	8e–135	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P–starvation and N–starvation
BrWRKY49	ACI14393	99%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04214	50%	8e–135	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P–starvation and N–starvation
BrWRKY50	XP0028697 75	83%	1e–175	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	–
	ACI14394	84%	5e–116	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY51	ABN79278	76%	5e–165	<i>N. caerulea</i>	Enhance drought, salinity and cold tolerances
	ACQ76808	73%	4e–148	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY52	ACI14406	97%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04230	55%	5e–114	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P–starvation and N–starvation
BrWRKY53	AEK65121	96%	2e–104	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>	–
	ACI14387	96%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY54	ACH99803	45%	4e–129	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	BAA86031	47%	4e–103	<i>N. tabacum</i>	Elicitor–responsive transcription of defense genes in tobacco
BrWRKY55	ACI14387	78%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	ACD80361	41%	4e–107	<i>T. aestivum</i>	Enhance drought, salinity and freezing tolerances
BrWRKY56	NP567862	61%	4e–140	<i>A. thaliana</i>	–
	ACI14396	65%	5e–116	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY57	ACQ76798	79%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGJ52155	61%	8e–135	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P–starvation and N–starvation
BrWRKY58	AAX76840	99%	0.0	<i>B. rapa</i> subsp. <i>chinensis</i>	–
	ACN89257	95%	5e–116	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY59	ADM32893	50%	5e–81	<i>B. campestris</i> subsp. <i>chinensis</i>	Responsive to cold, salt and dehydration stress tolerance
	AGQ04246	38%	2e–159	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P–starvation and N–starvation
BrWRKY60	XP0028764 76	86%	6e–154	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	–
	ACI14405	90%	5e–116	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY61	ACQ76810	77%	2e–144	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04251	45%	2e–159	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P–starvation and N–starvation
BrWRKY62	XP0028798 88	48%	2e–80	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	–
	AGQ04249	43%	2e–159	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P–starvation and N–starvation
BrWRKY63	ACN89258	100%	6e–107	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04209	80%	3e–77	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P–starvation and N–starvation
BrWRKY64	XP0028804 04	78%	2e–98	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	–

	AGQ04201	50%	2e-25	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY65	XP002878677	78%	7e-163	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	--
	ACI14385	91%	5e-116	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY66	ACQ76799	96%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	ADU52502	46%	6e-74	<i>C. sativus</i>	Enhance drought, salinity and cold tolerances
BrWRKY67	ACI14390	93%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGJ52153	43%	2e-159	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY68	NP565703	69%	9e-161	<i>A. thaliana</i>	-
	ACI14388	76%	1e-159	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY69	ACH99804	78%	3e-165	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04240	50%	3e-77	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY70	ACI14397	79%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGJ52153	50%	2e-159	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY71	XP002879888	71%	2e-139	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	AGQ04249	44%	2e-159	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY72	NP181607	70%	1e-150	<i>A. thaliana</i>	-
	ACQ76810	49%	5e-116	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY73	XP002881979	89%	2e-83	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	AGQ04204	52%	1e-32	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY74	NP182248	71%	2e-140	<i>A. thaliana</i>	-
	AGQ04210	60%	4e-69	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY75	NP182248	73%	2e-137	<i>A. thaliana</i>	-
	ADU52532	47%	6e-48	<i>C. sativus</i>	Responsive to drought, salinity and cold stresses
BrWRKY76	ADM32893	99%	0.0	<i>B. campestris</i> subsp. <i>chinensis</i>	Responsive to ABA, drought, salinity and cold stresses
	AGQ04246	38%	2e-42	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY77	NP181607	70%	2e-161	<i>A. thaliana</i>	-
	ACQ76810	45%	1e-61	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY78	XP002881979	89%	1e-125	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	AGQ04204	55%	2e-66	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY79	ACI14397	77%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGJ70092	77%	0.0	<i>B. oleracea</i> var. <i>italica</i>	-
BrWRKY80	NP181263	75%	0.0	<i>A. thaliana</i>	-
	ACH99805	77%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY81	ACH99804	93%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	XP002890885	61%	6e-139	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-

BrWRKY82	ACI14388	97%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04228	57%	2e-66	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY83	XP0028810 94	80%	0.0	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	ACI14390	80%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY84	XP0028945 13	48%	1e-130	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	AGJ52156	40%	1e-31	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY85	AAL29431	72%	4e-172	<i>A. thaliana</i>	-
BrWRKY86	XP0028945 13	47%	2e-102	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	ACD80356	35%	2e-29	<i>T. aestivum</i>	Enhance drought, salinity and freezing tolerances
BrWRKY87	ACI14399	93%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AFH35047	55%	2e-167	<i>Gossypium barbadense</i>	WRKY gene could also be induced SA, MeJA and ACC.
BrWRKY88	ACH99808	44%	8e-46	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04225	43%	2e-43	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY89	XP0028649 23	80%	1e-106	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	AGQ04200	54%	1e-46	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY90	NP568439	73%	8e-152	<i>A. thaliana</i>	-
	AGQ04247	48%	3e-52	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY91	XP0028743 03	80%	4e-78	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	ACH99807	79%	7e-78	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY92	ACI14408	99%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	NP_198217	85%	0.0	<i>A. thaliana</i>	-
BrWRKY93	ADL36864	44%	9e-65	<i>Malus domestica</i>	-
	AGQ04211	49%	2e-60	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY94	ACI14395	94%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AFH35047	59%	5e-160	<i>G. barbadense</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY95	ACI14410	82%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04214	55%	7e-56	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY96	ADL36863	47%	1e-58	<i>M. domestica</i>	-
	AGQ04203	54%	6e-60	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY97	ACQ76810	79%	1e-150	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AAM64939	43%	e-135	<i>A. thaliana</i>	-
BrWRKY98	ACI14400	88%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04215	55%	3e-99	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY99	NP0012377 77	50%	1e-70	<i>G. max</i>	-
	AGQ04212	47%	1e-65	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY10	AGQ04223	49%	1e-73	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-

0					starvation and N-starvation
	NP001234802	41%	7e-55	<i>S. lycopersicum</i>	Responsive to root-knot nematodes (RKN)
BrWRKY101	NP001237777	50%	1e-63	<i>G. max</i>	-
	AGQ04212	44%	6e-63	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY102	ACI14398	93%	8e-180	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY103	XP002890835	69%	8e-106	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	AGQ04214	60%	9e-54	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY104	ACI14400	97%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04215	54%	2e-101	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY105	XP002894513	50%	1e-135	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	BAA86031	35%	8e-32	<i>N. tabacum</i>	Elicitor-responsive transcription of defense genes in tobacco
BrWRKY106	XP002894513	55%	2e-20	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	AGJ52155	42%	1e-22	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY107	ACI14394	100%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	XP002869775	84%	3-168	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
BrWRKY108	AEO31524	49%	2e-69	<i>D. longan</i>	-
	ACN89257	76%	8e-152	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY109	XP003588631	57%	9e-115	<i>Medicago truncatula</i>	-
	ACQ76798	79%	5e-179	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY110	ACI14396	95%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGJ52149	50%	2e-109	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY111	XP002867553	80%	0.0	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	ACI14387	78%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY112	ADL36863	48%	6e-62	<i>M. domestica</i>	-
	AGQ04203	47%	1e-59	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY113	ACI14404	98%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04241	57%	1e-75	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY114	ACH99808	40%	1e-72	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	XP003609019	40%	2e-67	<i>Medicago truncatula</i>	-
BrWRKY115	XP002890032	77%	0.0	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	ACI14399	80%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY116	ACI14389	96%	1e-180	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	XP002872898	86%	1e-178	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
BrWRKY117	XP002874963	80%	0.0	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	AGQ04218	45%	3e-111	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation

BrWRKY11 8	ADL36864	51%	3e-60	<i>M. domestica</i>	-
	AGQ04211	49%	1e-55	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY11 9	XP002874303	75%	2e-66	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	ACH99807	73%	1e-64	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY12 0	NP_568439	68%	5e-140	<i>A. thaliana</i>	-
	AGQ04247	51%	2e-53	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY12 1	XP002864923	78%	1e-83	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	--
	AGQ04200	50%	3e-37	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY12 2	NP198972	65%	1e-71	<i>A. thaliana</i>	-
	ACN89258	69%	1e-69	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY12 3	NP198972	68%	9e-75	<i>A. thaliana</i>	-
	ACN89258	68%	4e-70	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY12 4	ACI14403	98%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	XP002886480	85%	0.0	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
BrWRKY12 5	XP002862895	65%	7e-116	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	AGQ04227	41%	6e-48	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY12 6	ACI14410	98%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04214	60%	4e-55	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY12 7	ACQ76807	80%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	XP002867796	60%	3e-176	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
BrWRKY12 8	AAK28310	75%	1e-127	<i>A. thaliana</i>	-
	AGQ04250	34%	5e-23	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY12 9	XP002890835	72%	7e-115	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	AFK27602	46%	8e-57	<i>Vitis amurensis</i>	-
BrWRKY13 0	ACI14404	81%	3e-147	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AAS79556	83%	4e-139	<i>A. thaliana</i>	-
BrWRKY13 1	ACI14407	100%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	XP002878082	71%	5e-125	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
BrWRKY13 2	ACI14405	98%	6e-170	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	XP002876476	87%	3e-149	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
BrWRKY13 3	ADF45433	40%	4e-51	<i>Hevea brasiliensis</i>	-
	AGQ04210	35%	7e-44	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY13 4	XP002880404	78%	9e-94	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	AGQ04201	47%	4e-25	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-starvation and N-starvation
BrWRKY13 5	ACH99808	43%	8e-70	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04225	39%	1e-73	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P-

					starvation and N-starvation
BrWRKY13 6	XP0028900 32	80%	0.0	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	AFH35047	58%	4e-161	<i>G. barbadense</i>	WRKY gene could also be induced SA, MeJA and ACC.
BrWRKY13 7	ACQ76801	99%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGJ52156	49%	0.0	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P- starvation and N-starvation
BrWRKY13 8	XP0028740 78	67%	1e-128	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	AAL35288	69%	5e-121	<i>A. thaliana</i>	-
BrWRKY13 9	XP0028716 50	82%	0.0	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	ACH99808	81%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
BrWRKY14 0	ACI14409	87%	4e-87	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	ACH88751	69%	9e-59	<i>F. ananassa</i>	Responsive to <i>C. acutatum</i> in strawberry
BrWRKY14 1	ACI14403	74%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	XP0028864 80	74%	0.0	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
BrWRKY14 2	ACN89259	95%	0.0	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	XP0028844 57	78%	1e-173	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
BrWRKY14 3	ACH99806	99%	4e-103	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AFH02532	75%	1e-51	<i>G. barbadense</i>	-
BrWRKY14 4	ACI14393	82%	1e-176	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET
	AGQ04214	53%	5e-56	<i>J. curcas</i>	Responsive to drought, salinity, P- starvation and N-starvation
BrWRKY14 5	XP0028908 85	76%	0.0	<i>A. lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	-
	ACH99804	59%	1e-125	<i>B. napus</i>	Responsive to fungal pathogen and ABA, BAP, JA, SA and ET

㉔ Microarray는 세계적으로 전사체를 분석하는 유용한 도구로 사용되고 있으며, 유전자의 발현 양상 쉽게 알아 볼 수 있다. 본 연구실에서 보 유중인 지부와 권심을 이용하여 4°C, 0°C, -2°C, -4°C의 저온처리한 microarray data를 이용하여 145개의 배추 WRKY(BrWRKY) 유전자 들을 분석하였다. 그 결과 BrWRKY 유전자는 크게 3가지 그룹(I, II, III)로 나뉠 수 있었다. 이 중 그룹 II는 다시 다섯 개의 하위그룹 (IIa-e)으로 분류되었다(그림 5-59). 그룹 I, IIa와 IId는 매우 높은 다른 발현 양상을 나타내었으며, 그룹 I 중 13개의 BrWRKY 유전자들은 발현 이 아주 낮거나 발현하지 않았다. 반면에, BrWRKY10, 46, 48, 85, 87, 105와 111은 높은 발현을 보였으나 발현 양상에서 특별한 차이가 없 었다. 하위그룹 IIc 중 BrWRKY8는 매우 낮은 발현을 보였다. 또한 하위그룹 IIb 중 BrWRKY5, 45, 102, 114, 117, 124와 141은 지부와 권심 간에 낮거나 중간 정도의 발현 양상의 차이를 보였다. 하위그룹 IIc는 대다수의 유전자들이 발현을 보이지 않았지만 BrWRKY20, 31, 32,

49, 63, 74, 75, 78, 91, 93, 99, 101, 118, 119와 121 유전자는 지부와 권심 간에 발현의 차이를 보였다. 특히 BrWRKY143은 두 계통 간 다른 발현 양상을 나타내었다. 하위그룹 IIe은 낮거나 거의 발현을 보이지 않았으며, BrWRKY18, 60, 113, 116과 132는 지부와 권심 간에 낮거나 중간 정도의 발현량에 차이를 나타내었다. 그룹 III에서는 대부분의 유전자들이 중간에서 높게 발현량의 차이를 보였으며, BrWRKY23, 25, 44, 62, 71, 90, 120과 138은 전 저온처리 과정에서 가장 낮은 발현을 보였다. BrWRKY16과 17은 권심에서 발현을 하지 않았으나, BrWRKY23, 25와 62는 지부와 권심 간에 발현의 차이가 없었다. 이와 같은 결과 권심보다 지부에서 발현량이 높은 41개의 WRKY 유전자들을 선발하였으며, 이에 대한 microarray 결과는 그림 5-59와 같다. BrWRKY 유전자들이 저온처리 하에서 높은 발현량에 차이를 보이는 것은 이들 유전자들이 저온 스트레스에 반응하는 유전자들이라고 판단된다.

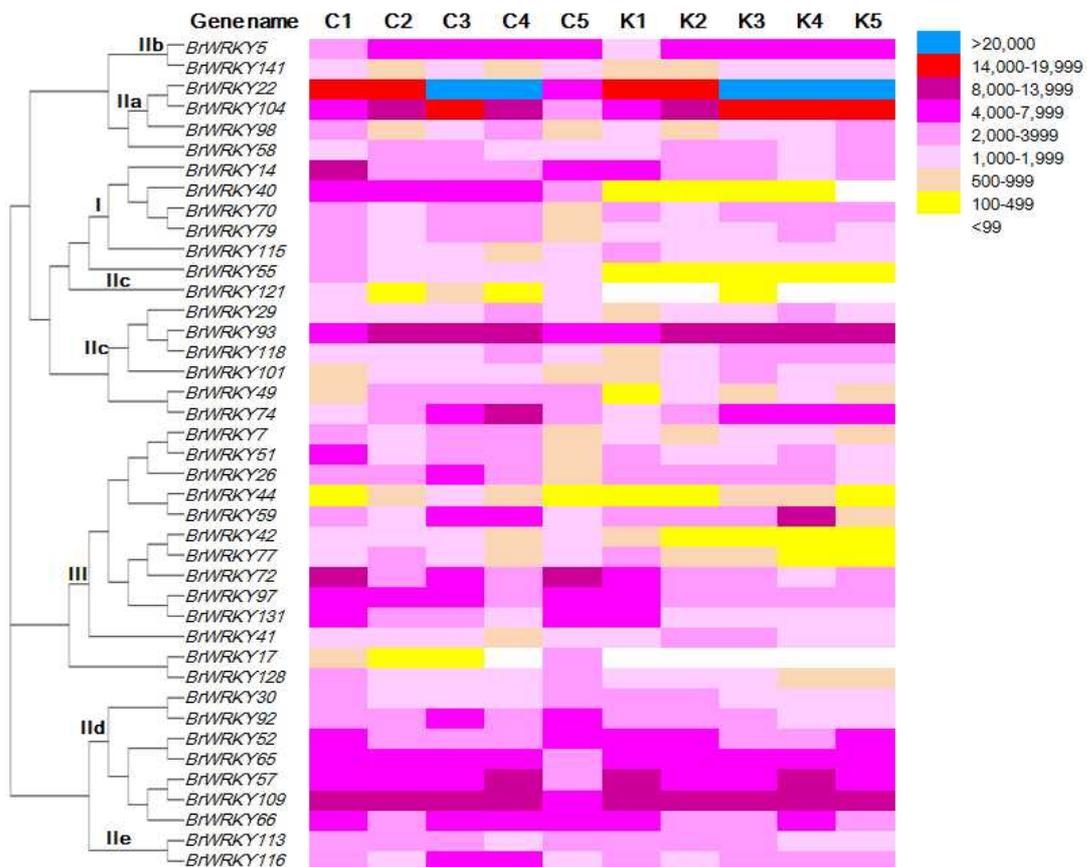


그림 5-59. 저온 저항성, 감응성 배추 계통을 이용한 저온처리 하에서 microarray 분석 (C: 지부, K: 권심, C1/K1: 22°C, C2/K2: 4°C, C3/K3: 0°C, C4/K4: -2°C, C5/K5: -4°C)

㉔ WRKY 유전자들의 기관 특이적 발현 분석을 위하여 배추의 뿌리, 줄기, 잎, 꽃봉오리에서 RNA를 추출한 후 RT-PCR을 수행하였다. 모든 BrWRKY 유전자들은 최소 1개 또는 최대 4개의 기관들에 걸쳐 발현하였다(그림 5-60). 14개의 유전자들은(BrWRKY7, 30, 40, 42, 49, 51, 57, 65, 66, 72, 92, 97, 104와 116) 실험한 모든 기관들에서 발현을 나타내었다. 또한 대부분의 유전자들이 꽃봉오리에서 발현량이 높았으며, BrWRKY30, 42, 49, 66과 97은 상대적으로 줄기에서 높은 발현을 나타내었다. 반면에 BrWRKY5, 41, 44, 51, 59, 77, 98, 101과 115에서는 매우 낮은 발현량을 나타내었으며 BrWRKY5, 101, 113과 121은 뿌리에서만 발현하였고, BrWRKY56는 꽃봉오리에서만 발현하였다. BrWRKY55, 118과 128은 꽃봉오리를 제외한 모든 기관에서 발현하였다.

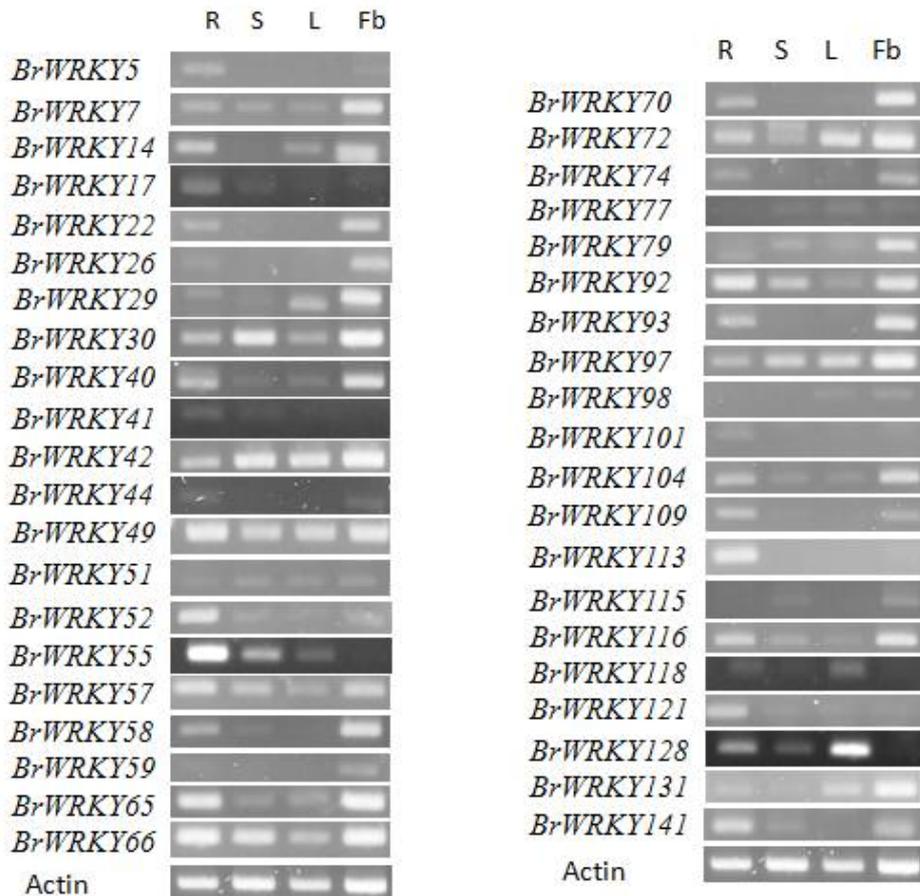


그림 5-60. BrWRKY 유전자의 기관 특이적 RT-PCR 결과
(C: 지부, K: 권심, C1/K1: 22°C, C2/K2: 4°C, C3/K3: 0°C, C4/K4: -2°C, C5/K5: -4°C)

㉔ Microarray 분석 결과로부터 선발된 41개의 BrWRKY 유전자들을 이용하여 특정 저온, 염분 및 건조 스트레스 처리하에서 지부와 권심에 대한 발현을 분석하였다(그림 5-61). 특히, 지부에서 BrWRKY22, 26, 42, 44, 59, 65, 70, 72, 77, 79, 92, 109, 116과 141은 저온 스트레스에서 발현 차이를 보였는데, 대부분의 유전자들이 0시간에서 1시간 사이의 매우 이른 시간대에 발현량이 증가하였으며, 12시간까지는 감소하였다. 그러나 스트레스 처리 12시간 이후에는 다시 발현양이 증가하였다. 또한, BrWRKY70, 72와 77은 0시간에서 4시간까지 발현량이 증가한 후 감소하였으며, 12시간과 24시간에는 다시 증가하였다. BrWRKY22, 44와 79는 0시간에서 8시간까지 발현량이 증가하였으며, 그 후 크게 감소하였다. BrWRKY65와 66은 12시간과 24시간까지 점차적으로 발현량이 증가하였다. BrWRKY92와 141은 0시간에서 1시간 사이 발현량이 증가하였으며, 12시간까지는 점차적으로 감소한 후 조금 증가하였다. 또한 BrWRKY26, 42, 59, 109와 116은 지부에서 1시간까지 발현량이 증가하였으며, 8시간까지 발현량이 감소하였고 12시간까지는 다시 증가한 후 다시 감소하였다. BrWRKY22, 44, 70, 72와 77 유전자들은 지부에서 각각 대조구(22°C)에 비해 175배, 32배, 54배, 42배, 24배 더 많은 발현량을 나타내었다.

대부분의 유전자들은 저온처리 하에서 권심은 유의적인 발현량 증가를 찾을 수 없었다. 그러나 BrWRKY26과 79는 권심에서 높은 발현을 보였다. BrWRKY79는 30분 이내에서 빠른 발현을 보였으며, 그 이후에는 12시까지 감소하였고, 24시간에서는 가장 높은 발현량을 보였다. 저온처리 하에서 15개의 유전자들이 발현양상에 차이를 보였으며, 이들은 대부분 권심보다 지부에서 높은 발현량을 보였다. 이러한 결과는 이들 유전자들이 내한성에 관련된 유전자일 것으로 생각되어진다(그림 5-62).

염분 스트레스 하에서 BrWRKY17, 57과 58은 대조구에 비해 염분 스트레스 처리 후 48시간에 5배, 2배, 3배의 매우 높은 발현량을 나타내었다. BrWRKY22 유전자는 빠르게 발현하여 1시간까지 증가한 후 24시간까지 감소하고 다시 48시간까지 빠르게 증가하였다. BrWRKY65 유전자는 지부에서 30분 전까지 발현량이 증가하였다가, 24시간에 감소하였으며 48시간에는 대조구에 비해 약 3배 증가하였다. BrWRKY40, 49, 58, 72와 97은 권심에서 30분 이내에 발현하였으며, 그 이후에 점차적으로 감소하였다. BrWRKY57과 113은 0시간에서 1시간 사이에 발현량이 증가하였으며, 그 이후에는 점차적으로 감소하였다. BrWRKY65는 1시간째에 매우 높은 발현을 보였으며, 12시간까지는 일정하다가 감소하였다. BrWRKY17는 4시간째에 매우 높은

발현량을 보였으며, 그 이후 급격히 감소하였다. 염분 스트레스 하에서 권심은 지부에 비해 높은 발현량을 나타내었다(그림 5-63).

선발한 유전자들 중 BrWRKY7을 제외한 모든 유전자들은 건조 스트레스를 처리한 지부에서 발현량이 유의적으로 증가하였다. BrWRKY14, 72, 66, 97과 131은 0시간에서 1시간 사이에 발현량이 증가하였으며 BrWRKY40, 57과 113에서는 4시간까지 발현량이 증가하였다가 이후 점차적으로 발현량이 감소하였다. BrWRKY51, 65, 98, 104와 109는 30분 이내에 가장 높은 발현량을 보였으며, BrWRKY49는 8시간까지 증가하였다가 느리게 감소하였다. 지부에서 BrWRKY51, 65, 98과 104는 30분 이내에 가장 높은 발현을 보였으며, 이는 대조구에 비해 각각 85배, 15배, 18배, 36배의 높은 발현량을 나타내었다. BrWRKY7은 전체적으로 발현량이 감소하였다. 권심에서 BrWRKY109와 113은 0시간에서 4시간까지 발현량이 증가하였으며 이후 감소하였다. BrWRKY7과 14는 건조 스트레스 처리 후 4시간에서 지부에 비해 권심에서 각각 45배, 7배 높은 발현량을 보였다. BrWRKY51, 72, 97과 131은 건조 스트레스 하에서 지부와 권심이 다른 발현 양상을 나타내었으며 BrWRKY7과 14는 권심에서 높은 발현을 나타내었다(그림 5-64).

BrWRKY 유전자들은 저온 및 건조 스트레스를 처리한 샘플이 권심에 비해 지부에서 높은 발현량을 나타내었다. 반면에 염분 스트레스를 처리한 샘플에서는 지부보다 권심에서 높은 발현량을 보였다. BrWRKY65와 72는 저온, 염분 및 건조 스트레스 하에서 모두 발현에 반응을 보였으며, BrWRKY66과 109는 저온과 건조 스트레스에 반응을 나타내었다. BrWRKY40, 49, 57, 97과 131은 염분과 건조 스트레스 하에서 반응을 나타내었으며 BrWRKY22는 저온과 염분 스트레스에서만 반응을 나타내었다. 이는 BrWRKY 유전자들이 비생물학적 스트레스에 반응한다는 것을 나타낸다.

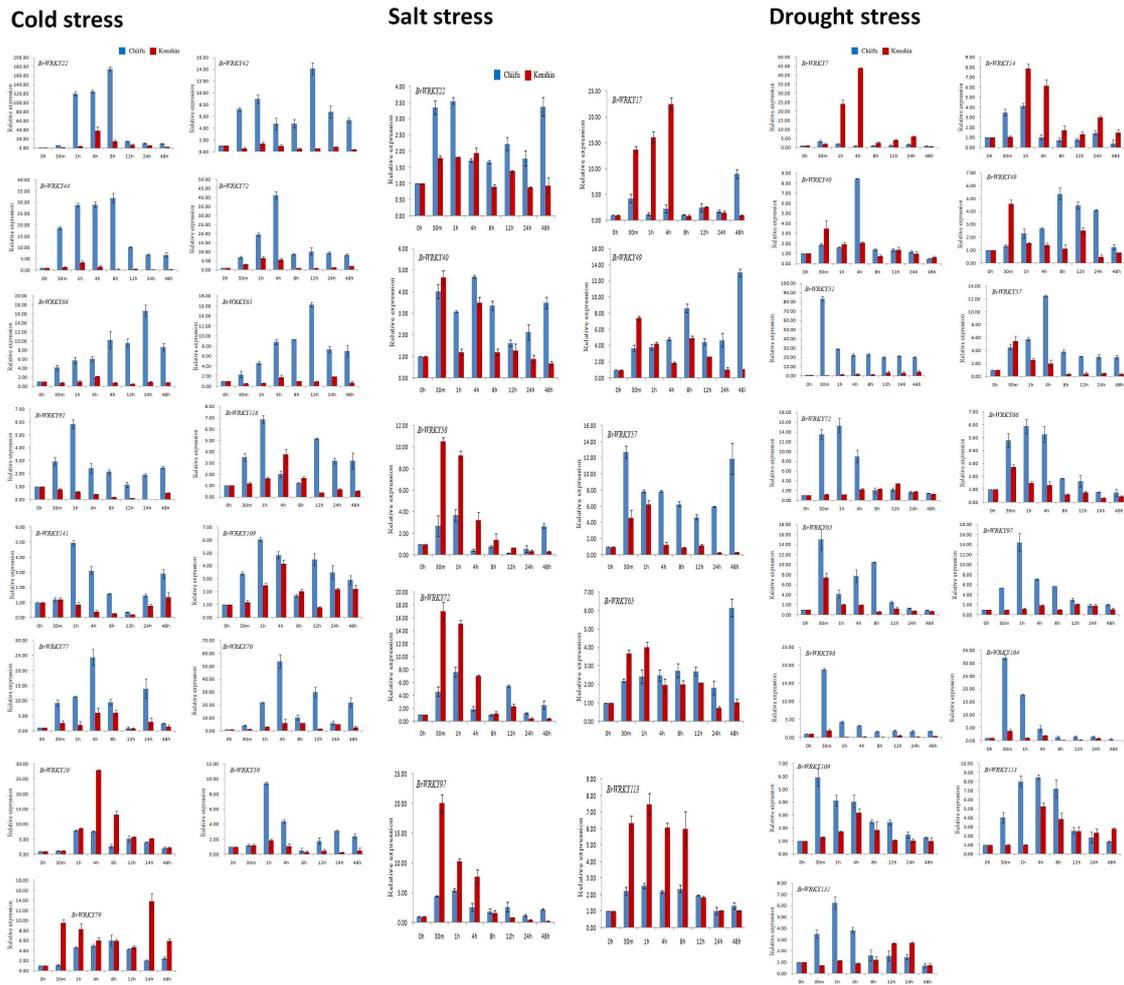


그림 5-61. 비생물학적 스트레스 처리 하에서 BrWRKY 유전자의 발현 분석

㉓ WRKY 유전자는 이미 식물에서 생물학적 스트레스에 관여하는 중요 유전자로 보고되어져 있다. 따라서 동정된 BrWRKY 유전자들에 대한 생물학적 스트레스의 발현을 분석하기 위해 *F. oxysporum* f.sp. *conglutinans*와 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*에 감염 시킨 샘플을 사용하여 RT-PCR을 수행하였다(그림 5-62, 5-63). *F. oxysporum* f.sp. *conglutinans*는 식물체에 시들음병을 유발하는 병원균으로 시들음병균을 처리한 샘플에서 BrWRKY4, 65, 72, 97, 133과 141이 병원균 감염 이후 매우 높은 발현량을 보였는데, 감염 후 6일째에 감염 시키지 않은 샘플과 각각 8배, 6 배, 6배, 3배, 5배의 발현량이 차이가 났다. 병원균 감염 이후 모든 유전자들은 발현량이 증가하였으며, 6일째 되는 날이 가장 높은 발현을 보였고 그 이후에는 감소하였다.

P. carotovorum subsp. *carotovorum*은 세균성 무름병을 일으키는

병원균으로서 이는 배추에 심각한 피해를 일으키는 주요 병 중에 하나이다. 실험에 이용된 모든 BrWRKY 유전자들은 세균성 무름병에 감염시킨 후 7일째에서 매우 높은 발현을 보였다. 대부분의 유전자들은 0시간에서 3일째까지 매우 낮은 발현을 보였으며, 이후 급격히 증가하여 7일째에서 가장 높았다. 반면에 BrWRKY4, 79와 141은 감염 후 6시간에 발현량이 높았으며, 3일째까지 비슷한 발현량을 보이다가 7일째에 더 증가하였다. BrWRKY141은 감염 후 7일째에 감염시키지 않은 샘플에 비해 180배 높은 발현량을 보였다. BrWRKY65는 0시간에서 12시간까지 발현량이 감소하였으며, 3일째 이후 약간 증가하였다. BrWRKY133은 일직 발현량이 감소하였으며 이 후에 증가하다가 점차 감소하였으며 다시 한번더 증가하였다. BrWRKY72와 97은 감염 직후, 발현량이 점차 증가하였다. 모든 유전자들은 감염시키지 않은 식물 샘플에서 매우 낮은 발현량을 나타내었다.

이와 같은 결과, BrWRKY4, 65, 72, 97, 133과 141이 시들음병과 세균성 무름병 모두에서 매우 높은 발현을 보였으며 이들 유전자들은 생물학적 스트레스에 중요한 역할을 할 것으로 판단된다.

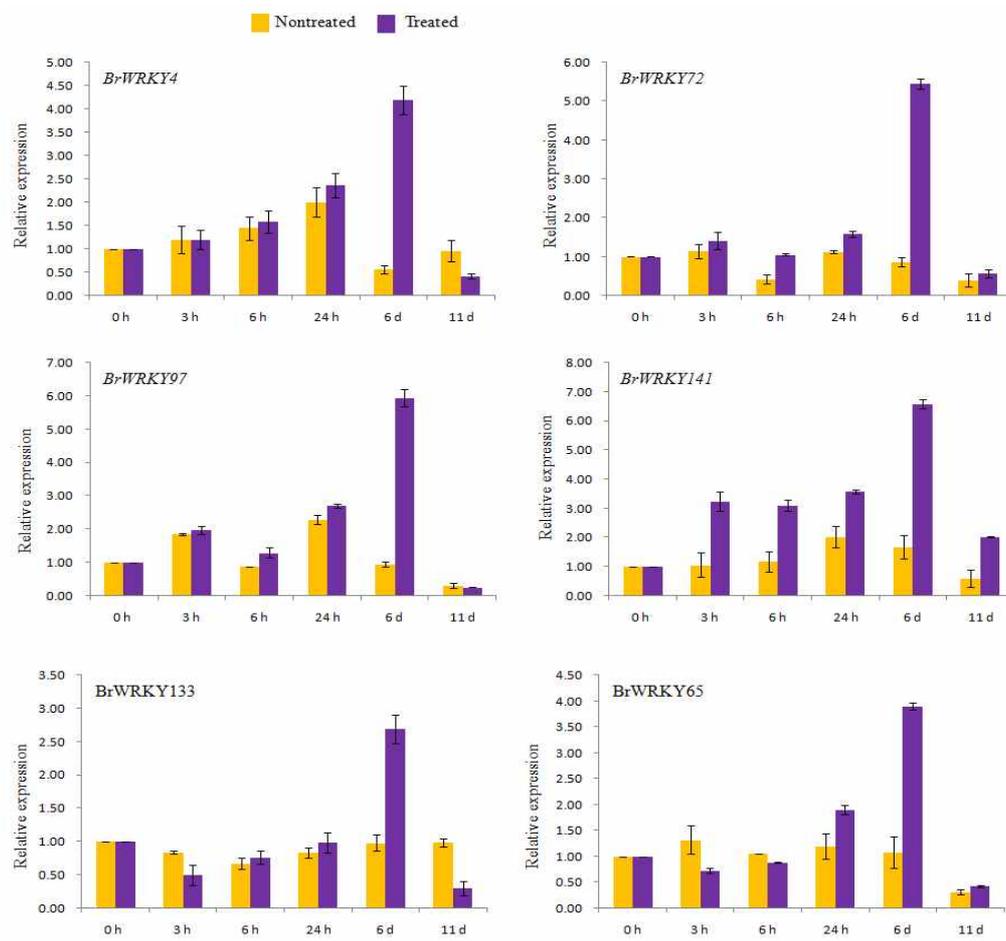


그림 5-62. 시들음병(*F. oxysporum* f.sp. *conglutinans*) 처리 후의 RT-PCR

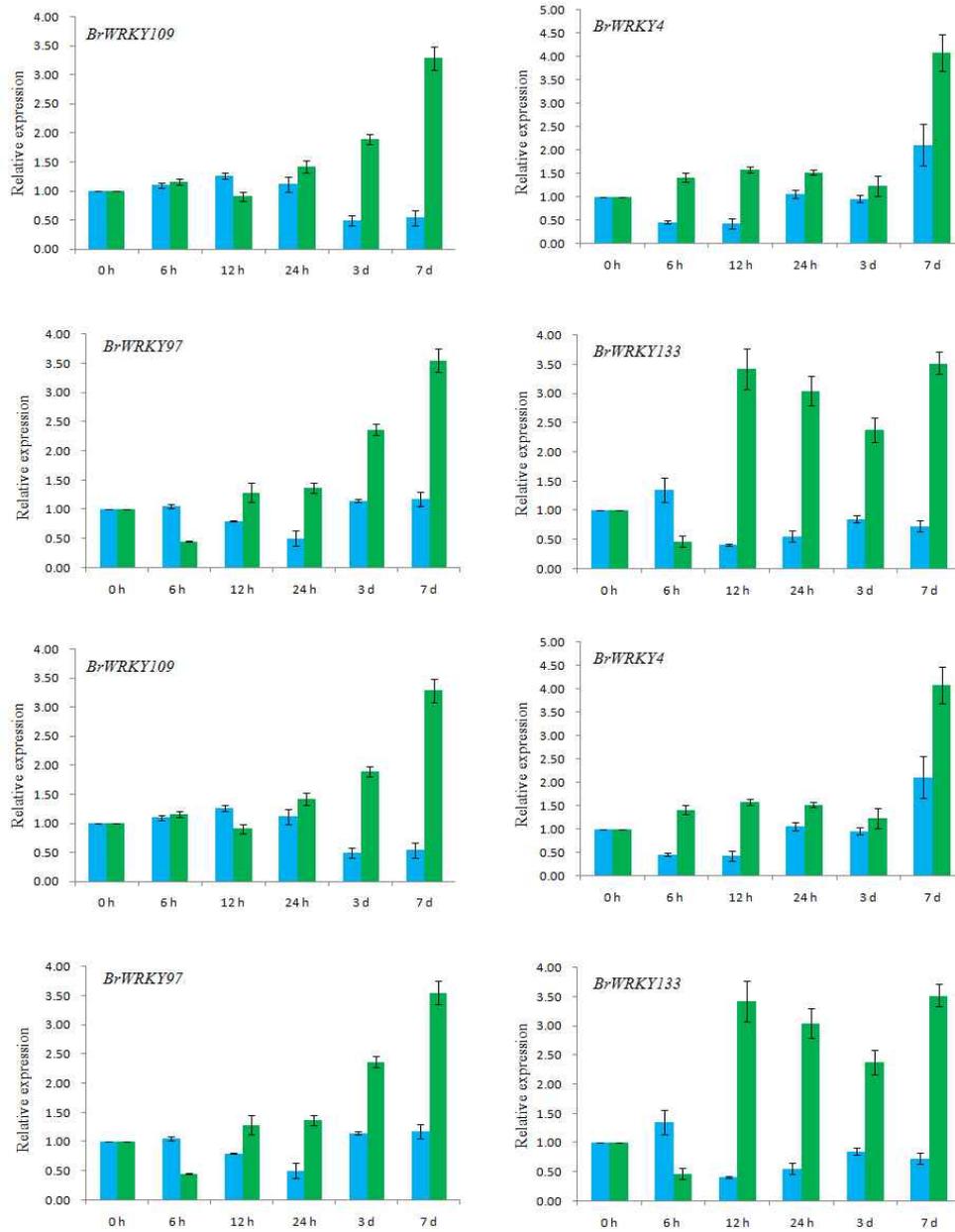


그림 5-63. 세균성 무름병(*P. carotovorum* subsp. *carotovorum*) 처리 후의 RT-PCR

⑧ Alfin-like TF family 유전자의 동정 및 해석

㉑ Alfin-like TF family 유전자들은 식물의 성장과 뿌리 발달, 뿌리털의 신장, 성장점의 발달 및 염분 스트레스에 관여하고 있는 유전자이다. 따라서 alfin-like TF family 유전자들은 병 및 비생물학적 스트레스에 저항성을 가지는 유용 유전자가 될 수 있다. 양배추에서 12개의 Alfin-like TF family 유전자들을 동정하였으며, 이 유전자군들은 크게 4개의 그룹으로 나뉘었고, 양배추에 대하여 배추 및 애기장대의 alfin 유전자군들과의 계통수를 분석해 본 결과 group I에서 애기장대에서는 *ATAL6*, 7, 배추에서는 *BrAL6*, 8, 9, 11, 12, 양배추에서는 *BolAL3*, 6, 11이 속해 있었다. Group II에서 애기장대에서는 *ATAL1*, 2, 배추에서는 *BrAL1*, 4, 5, 14, 양배추에서는 *BolAL1*, 4, 9, 10이 속해 있었다. Group III에서 애기장대에서는 *ATAL3*, 5, 배추에서는 *BrAL2*, 13, 15, 양배추에서는 *BolAL2*, 8가 속해 있었다. 그리고 group IV에서 애기장대에서는 *ATAL4*, 배추에서는 *BrAL3*, 7, 10, 양배추에서는 *BolAL5*, 7, 12가 속해 있었다.(그림 5-64). 양배추 *Alfin* 유전자군을 가지고 기관 특이적 발현 실험을 수행한 결과 root, stem, leaf, flower bud 모두 전체적으로 발현을 하고 있었다(그림 5-65).

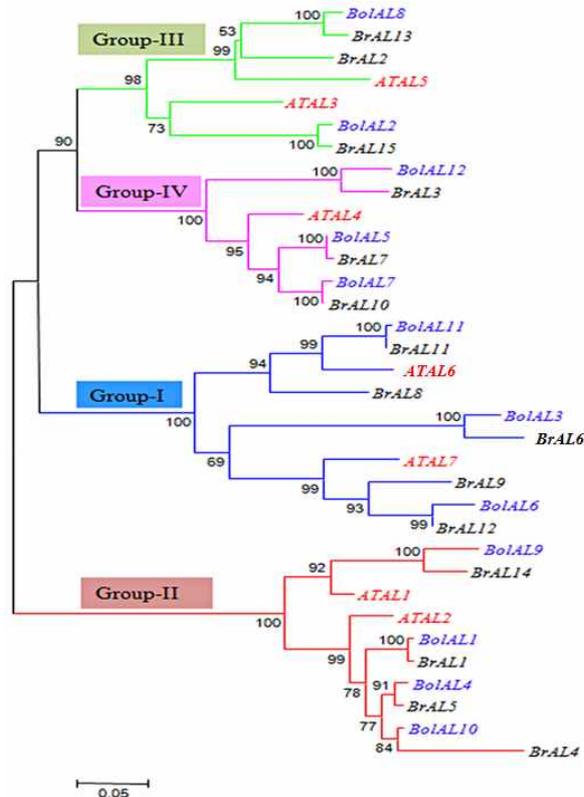


그림 5-64. 양배추, 배추 및 애기장대 *Alfin* 유전자의 계통수 분석 (BoAL: blue color, BrAL: black color, AtAL: red color)

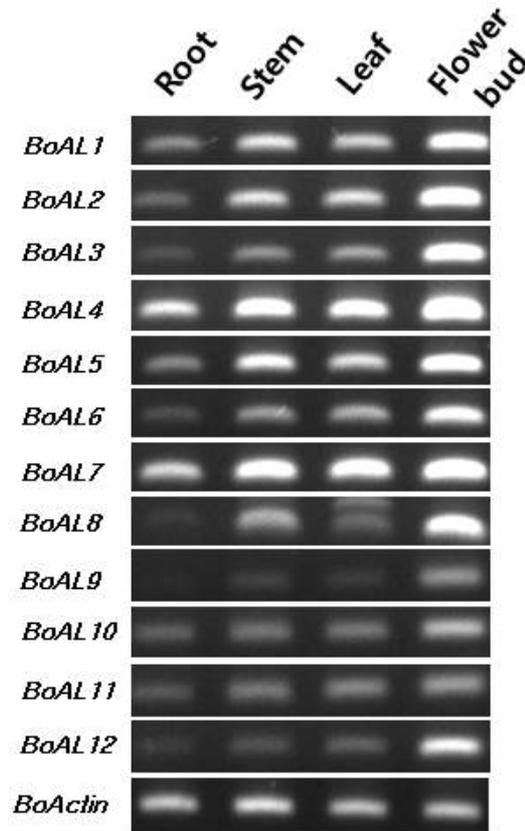


그림 5-65. 양배추 *Alfin* 유전자에 대한 조직 특이적 발현 실험

㉞ 양배추 12개의 *Alfin* 유전자군에 대하여 비생물학적 스트레스를 처리한 양배추에 대한 발현실험을 수행한 결과, 저온에 강한 'Bo106' 계통과 저온에 약한 'Bo107' 계통을 가지고 저온 처리한 후 발현을 알아본 결과, *BoAL1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 12*의 거의 대부분의 유전자들이 저온에 약한 Bo107보다 저온에 강한 Bo106에서 발현양이 더 높았다. 반면에 *BoAL11* 유전자는 저온 처리 후 1h에서 저온에 약한 Bo107에서의 발현양이 높았으며, *BoAL2, 4, 6* 유전자들은 두 계통 간에 차이가 미미하였다(그림 5-66).

염분 스트레스에 대하여 *BoAL1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12* 유전자들은 발현양이 증가하였으며, *BoAL3, 9, 11* 유전자들은 발현양의 차이가 없었다(그림 84). 건조 스트레스에 대하여 *BoAL1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12* 유전자들은 발현양이 증가하였으며, *BoAL3, 11* 유전자들은 발현양의 차이가 거의 없었다(그림 5-67). ABA 스트레스에 대하여 *BoAL1, 2, 4, 6, 7, 10, 12* 유전자들은 발현양이 증가하였다가 6h 이후에는 감소하는 경향을 보였으며, *BoAL3, 5, 8, 9, 11* 유전자들은 스트레스 하에서 발현양이 감소하였다(그림 5-68).

양배추 무름병에 대한 *Alfin* 유전자의 발현을 분석한 결과 BoAL8 및 12에서 mock treated 대비 treated 샘플에서 발현양이 높게 나왔다(그림 5-69).

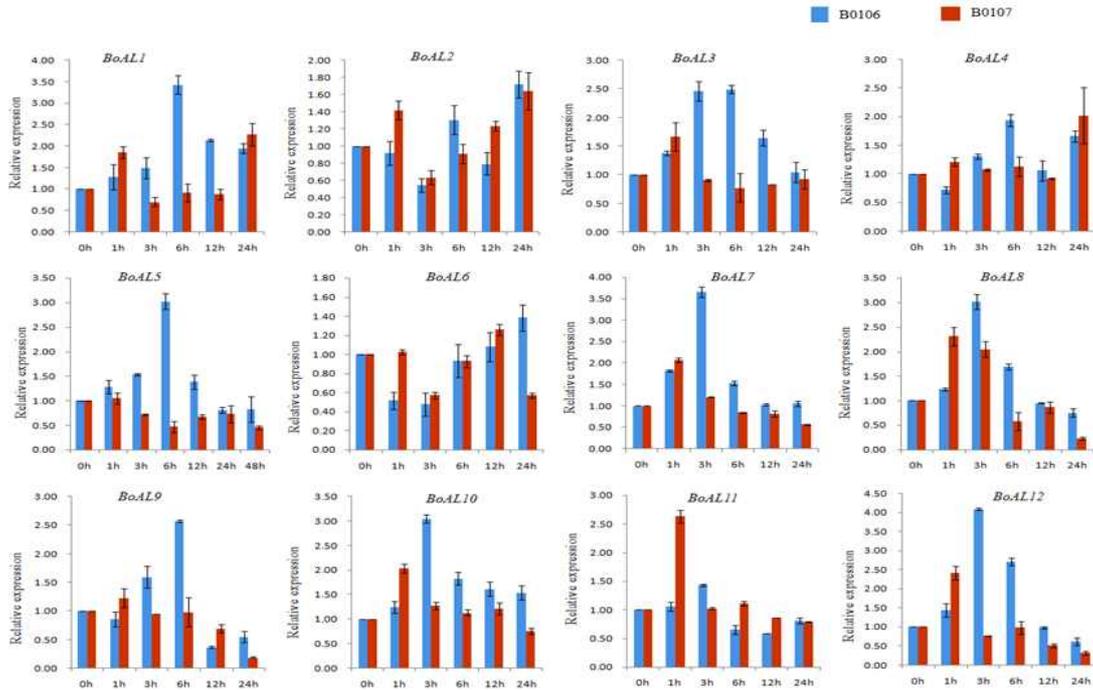


그림 5-66. Cold stress에 대한 양배추 *Alfin* 유전자의 발현 분석

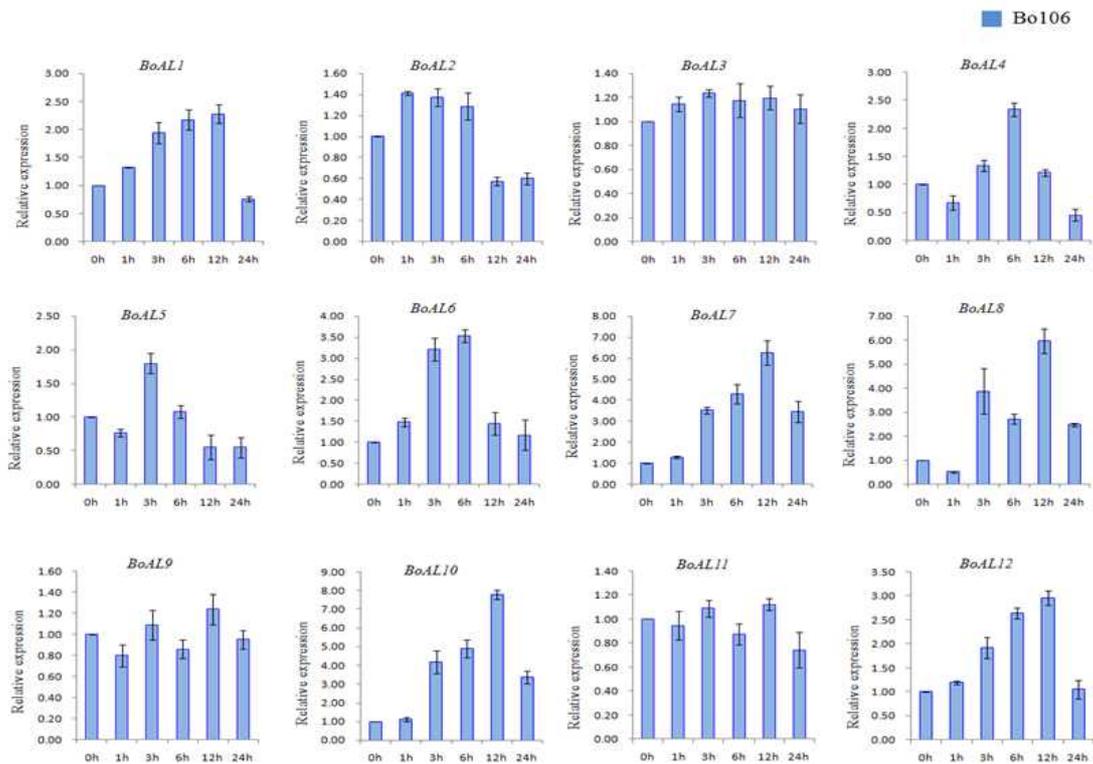


그림 5-67. Salt stress에 대한 양배추 *Alfin* 유전자의 발현 분석

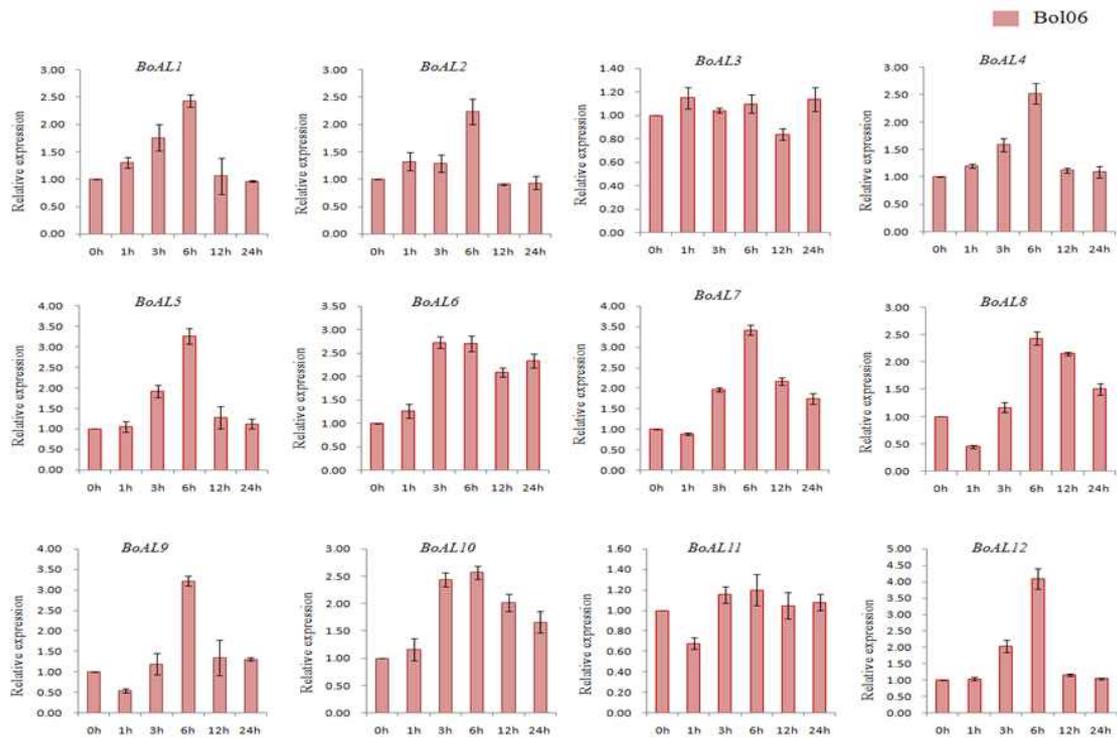


그림 5-68. Drought stress에 대한 양배추 *Alfin* 유전자의 발현 분석

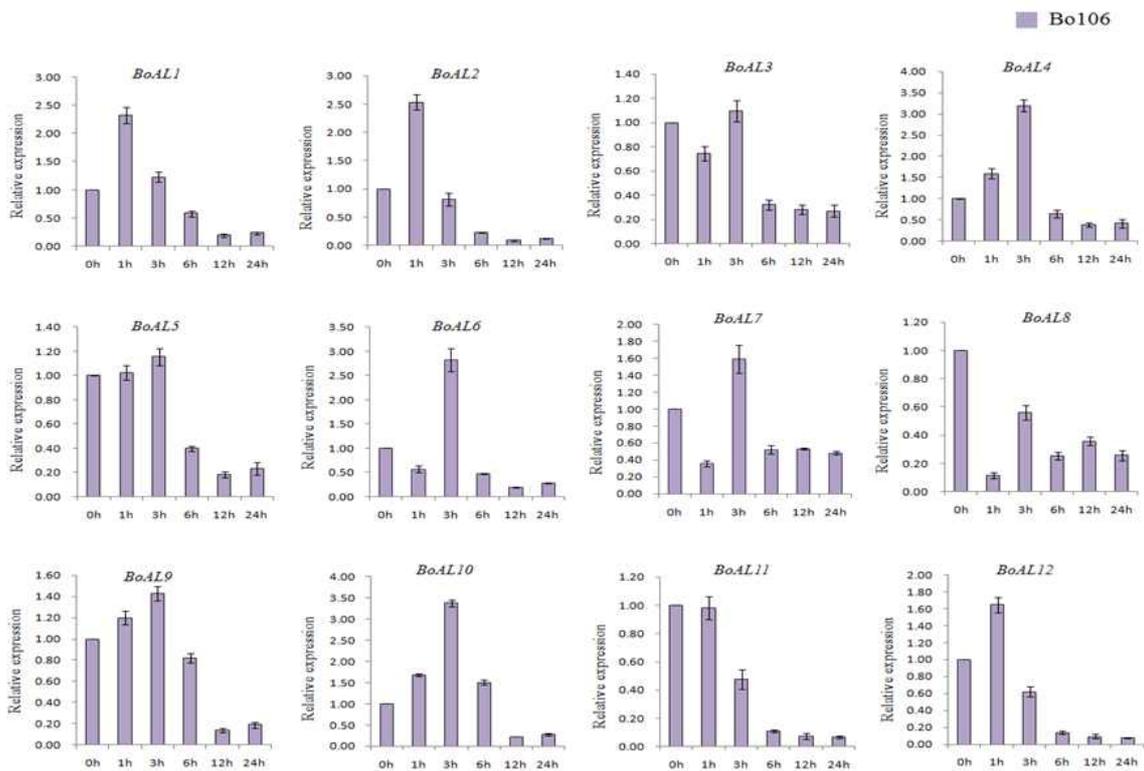


그림 5-69. ABA stress에 대한 양배추 *Alfin* 유전자의 발현 분석

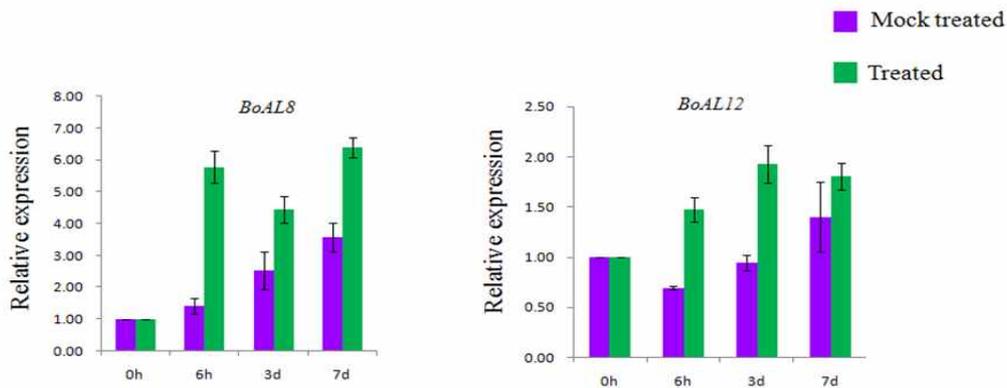


그림 5-70. 양배추 무름병에 대한 양배추 *Alfin* 유전자의 발현 분석

나. 석회결핍 둔감형 관련 tip-burn 저항성 연관 유전자군 발굴 및 기작 연구

① 애기장대를 이용한 석회결핍 관련 기작 연구

㉠ Salicylic acid (SA)와 칼슘결핍과의 연관성

ㄱ. 식물호르몬과 칼슘 결핍과의 연관성: 식물호르몬과 칼슘결핍과의 연관성을 알아내고자 잘 알려진 다양한 식물호르몬관련 돌연변이체를 칼슘결핍배지에 배양 후 각각의 성장정도로 연관성을 평가하였다. 그 결과 칼슘결핍현상은 여러 식물호르몬이 관련이 있을 것으로 추측이 되었다. 그 중 SA와 관련 있는 돌연변이체의 성장변화가 가장 현저한 차이를 보여 SA에 대해 보다 심도 있는 연구를 수행하였다 (그림 5-71).

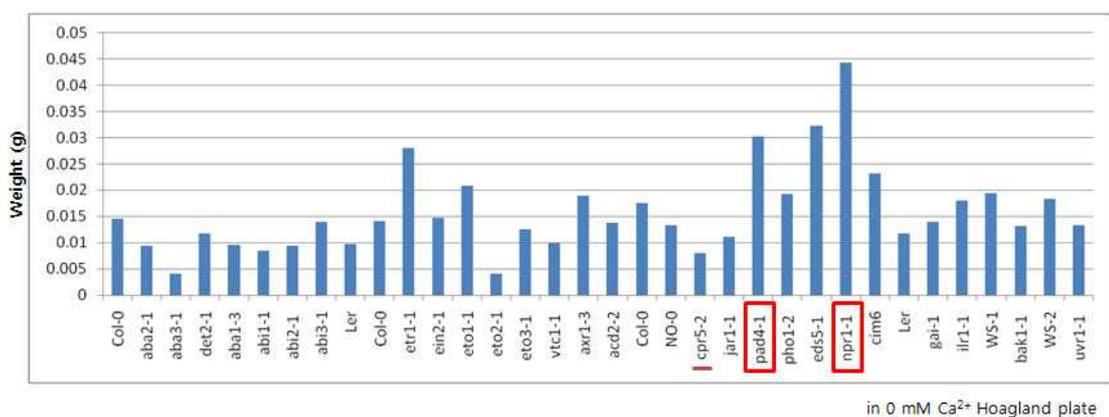


그림 5-71. 애기장대 호르몬관련 돌연변이체를 이용한 칼슘부족 저항성 돌연변이체 선발

㉔ SA와 칼슘결핍과의 연관성

ㄱ. SA와 칼슘결핍과의 연관성을 알아내기 위해 SA가 생체내부에 존재하지 않는 형질전환체인 NahG를 칼슘결핍배지에서 키워본 결과 NahG가 대조구에 비해 칼슘결핍배지에서 현저히 더 생장을 잘한다는 사실을 알게 되었다. 또한 칼슘은 포함되어있지 않으나 SA를 포함한 배지에서 키웠을 때 대조구에 비해 상대적으로 생장이 좋았던 pad4의 생장이 억제되었으나 NahG와 npr1은 생장억제를 나타내지 않았다 (그림 5-72).

ㄴ. 칼슘결핍현상에 의해 SA down stream의 유전자가 조절 받는지 확인하기 위해 PR2, PR4, AHG2, WAK2의 발현을 조사한 결과, 칼슘결핍에 의해 SA에 의해 조절받는 유전자들의 변화가 유발됨을 확인하였다. 이는 칼슘결핍이 SA 신호전달체계와 깊은 연관성이 있음을 시사해주는 결과라 할 수 있을 것이다 (그림 5-73).

㉕ 다양한 칼슘관련단백질과 칼슘결핍과의 관계: 다양한 Calcium binding protein, Calcium transporter를 칼슘결핍현상과의 연관성을 알아내고자 이들의 발현패턴을 Real-time PCR을 이용하여 칼슘결핍에 의해 어떠한 발현변화를 나타내는지 알아보았다. 그 결과 변화를 보이지 않는 유전자도 상당수 있었으나 칼슘결핍에 강하게 반응하는 유전자도 상당히 많이 있었다. 이는 칼슘결핍조건에서 다양한 Calcium binding protein, Calcium transporter등이 칼슘부족을 극복하기 위해 반응하는 것으로 여겨진다 (그림 5-74).

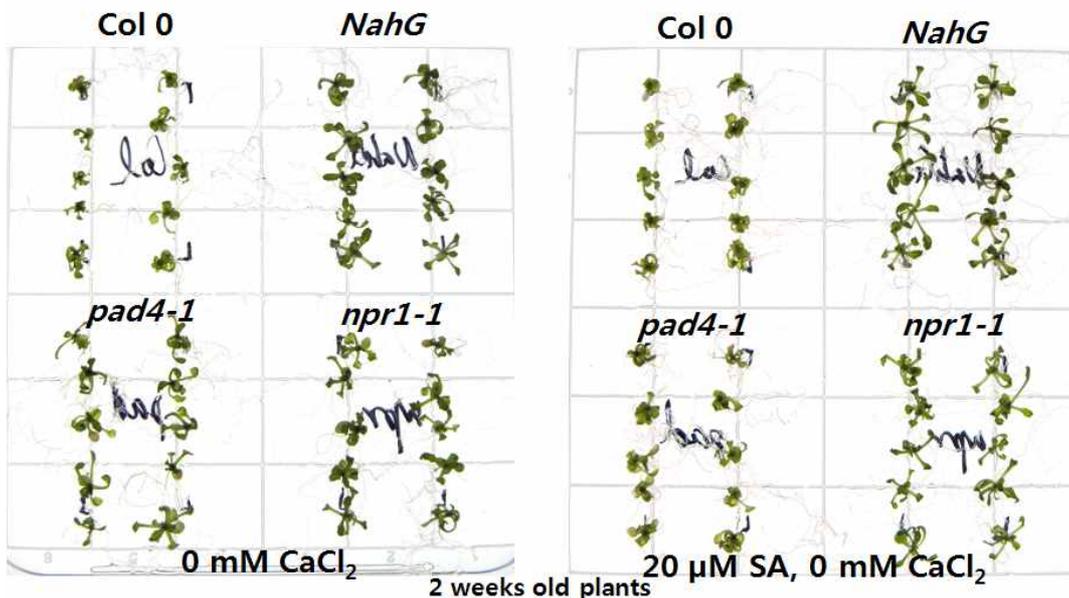


그림 5-72. 칼슘결핍현상과 SA관련 애기장대 돌연변이체와의 연관성

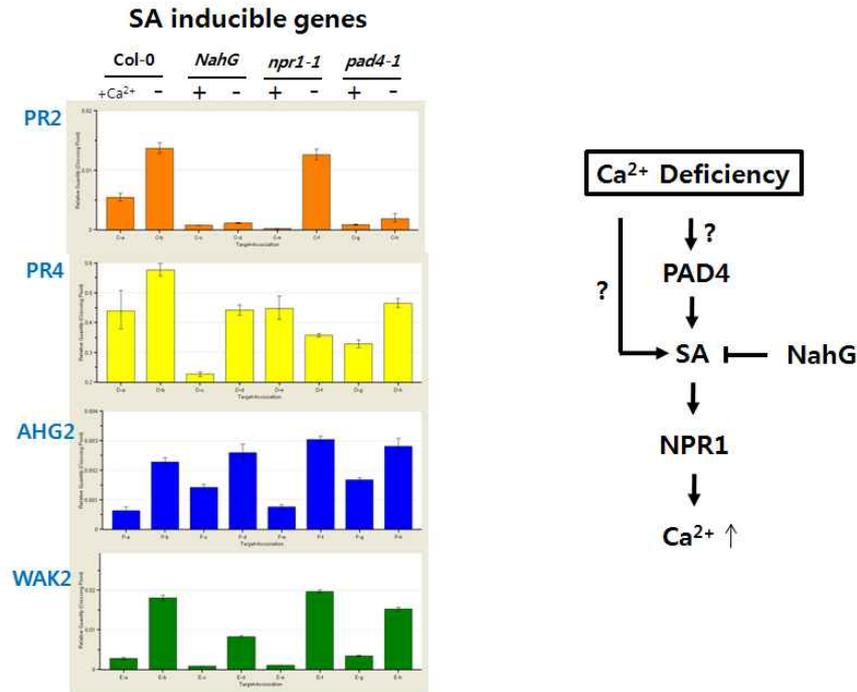


그림 5-73. 칼슘결핍현상과 SA와의 연관성

Gene	AGI	Col-0		NahG		npr1-1		pad4-1		Gene	AGI	Col-0		NahG		npr1-1		pad4-1	
		-Ca ²⁺	+Ca ²⁺			-Ca ²⁺	+Ca ²⁺												
ACA1	AT1G27770	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9	CNGC5	AT5G57940	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	
ACA10	AT4G29900	66.8	3.8	50.4	0.3	57.1	3.4	41.8	CRT1a	AT1G56340	1.2	0.0	1.2	0.1	1.7	0.0	1.2	1.2	
ACA11	AT3G57330	11.1	0.8	8.3	0.4	9.1	0.7	7.3	CRT1b	AT1G09210	2.6	0.0	2.8	0.1	3.1	0.1	2.4	2.4	
ACA12	AT3G63380	9.0	0.6	8.8	1.3	10.4	0.6	8.1	CRT3	AT1G08450	0.9	0.0	0.4	0.0	0.8	0.0	0.5	0.5	
ACA13	AT3G22910	4.8	0.5	2.9	0.9	2.5	0.2	1.1	ECA1	AT1G07810	18.8	1.6	21.4	0.7	26.0	1.1	26.8	26.8	
ACA4	AT2G41560	16.7	1.2	15.3	0.5	18.0	1.0	18.7	ECA2	AT4G00900	7.3	1.7	8.0	0.9	9.4	1.0	6.0	6.0	
ACA7	AT2G22950	1.1	0.2	1.0	0.8	0.4	0.0	1.0	ECA3	AT1G10130	42.4	8.1	51.3	1.4	55.1	7.0	48.8	48.8	
ACA8	AT5G57110	27.6	2.7	30.5	0.6	45.9	2.4	33.5	ECA4	AT1G07670	38.1	4.0	37.4	0.9	48.0	4.4	23.4	23.4	
ACA9	AT3G21180	4.7	0.4	4.1	1.3	5.0	0.5	5.0	GLR3.2	AT4G35290	2.2	0.6	2.9	1.1	3.3	0.7	2.6	2.6	
AHG2	AT1G55870	3.6	2.3	4.1	1.2	4.8	2.7	4.5	GLR3.4	AT1G05200	8.9	2.9	8.7	1.3	10.1	5.2	11.7	11.7	
AT1G01070	AT1G01070	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	GRP3	AT2G05520	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
AT1G12080	AT1G12080	0.6	0.1	0.8	0.1	0.7	0.1	0.7	HIPP22	AT1G22990	1.1	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0	
AT1G79520	AT1G79520	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	LHT1	AT5G40780	1.1	1.0	1.0	0.9	1.0	0.9	1.0	1.0	
AT4G08300	AT4G08300	0.9	0.3	0.9	0.3	0.8	0.5	0.9	MCA1	AT4G35920	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
CAX10	AT1G54110	0.4	0.1	0.4	0.2	0.6	0.1	0.5	MCA2	AT2G17780	1.0	0.5	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0	1.0	
CAX11	AT1G08960	1.1	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0	1.1	MCA23.2	AT5G47700	1.1	1.1	1.0	1.1	1.1	1.1	1.0	1.0	
CBL1	AT4G17615	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9	0.9	MCA23.24	AT5G47900	1.0	1.1	1.0	1.0	1.1	1.2	1.0	1.0	
CIPK7	AT3G23000	1.1	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1	1.1	MLO2	AT1G11310	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
CML12	AT2G41100	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.7	1.0	OPR1	AT1G76680	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
CML21	AT4G26470	0.6	0.1	0.6	0.3	0.5	0.1	0.4	OPT4	AT5G64410	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
CML23	AT1G66400	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	PR1	AT2G14610	0.7	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.1	0.1	
CML35	AT2G41410	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	PR2	AT3G57260	2.5	0.1	0.2	0.0	2.3	0.2	0.3	0.3	
CML42	AT4G20780	1.1	1.0	1.1	1.5	1.0	1.0	0.9	PR3	AT3G12500	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
CML5	AT2G43290	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	PR4	AT3G04720	1.3	0.5	1.0	1.0	0.8	0.8	1.1	1.1	
CNGC15	AT2G28260	2.5	0.5	3.6	1.8	4.5	0.7	4.0	PR5	AT1G75040	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
CNGC4	AT5G54250	5.9	0.6	6.1	0.8	7.5	3.4	8.1	SOT1	AT2G03760	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
TCH3	AT2G41100	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	STP1	AT1G11260	15.5	3.2	13.3	0.7	11.7	3.0	11.3	11.3	
WAK2	AT1G21270	6.5	0.3	3.0	0.4	7.1	1.2	5.5	SULTR2.1	AT5G10180	2.5	0.8	4.2	0.6	4.2	0.6	2.9	2.9	

그림 5-74. 칼슘관련 유전자군의 칼슘부족현상에 대한 발현패턴 분석 (Real-Time PCR)

② 칼슘부족현상에 대한 유전자 발현패턴 분석

- ㉑ Microarray를 이용하여 칼슘부족현상에 대한 유전자발현패턴을 분석하고자 표준형과 둔감형 양 배추에 각각 칼슘부족을 2주간 유발 시킨 후 그 발현변화를 각각 확보하였다. (2반복 실험 수행함)

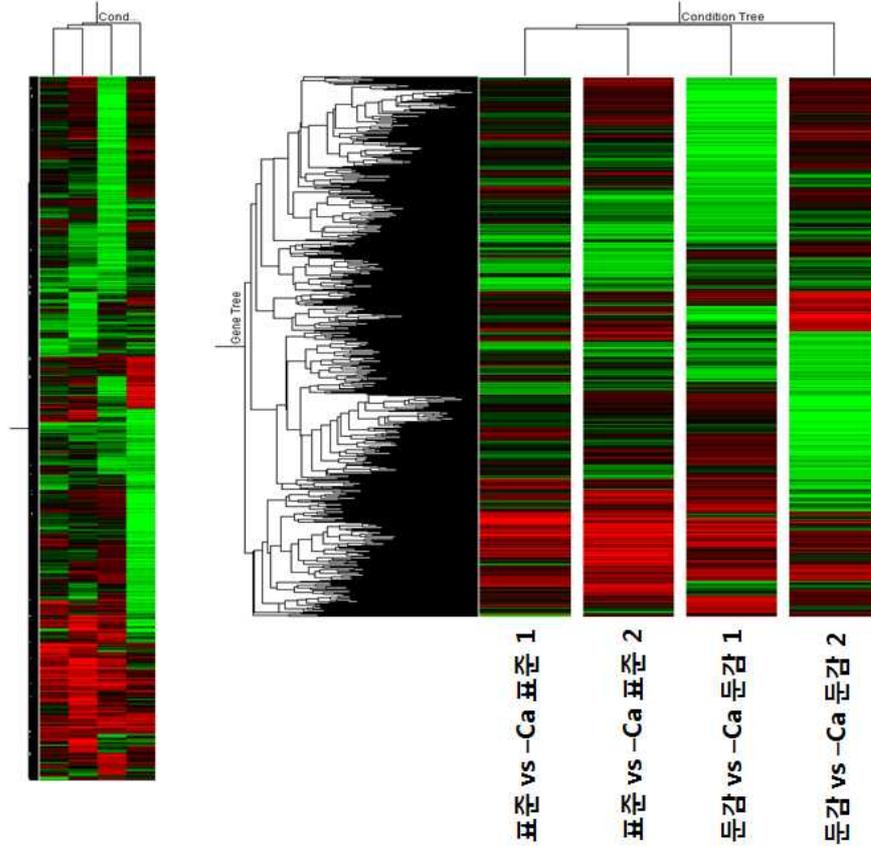


그림 5-74. 칼슘관련 유전자군의 칼슘부족현상에 대한 발현패턴 분석 (Real-Time PCR)

표 5-13. 칼슘부족현상에 대해 발현 증가된 대표적 유전자

Array ID	Gene description	Fold ratio			
		표준-C a Set1	표준-C a Set2	둔감-C a Set1	둔감-Ca Set2
5575	Lipoxygenase, chloroplast precursor	12.95	3.91	8.69	1.69
7092	Ethylene responsive element binding factor-related	9.70	13.41	11.09	8.95
11573	Lipoxygenase 2	14.47	3.91	18.86	2.23
13526	Drought induced protein, putative; 79797-80444	27.25	23.76	10.02	1.62
14725	Ethylene-responsive transcription factor ERF088	4.65	1.49	2.66	1.57
22066	Transcription factor DREBIII-1	3.15	2.73	1.98	2.03
22081	Water-soluble chlorophyll protein	66.74	41.47	22.55	1.69
36970	Putative tyrosine aminotransferase	151.33	9.15	17.24	3.10
38864	Leucoanthocyanidin dioxygenase-like protein	44.37	3.31	15.07	4.04

42536	T22I11.4 protein	41.74	13.54	21.85	2.41
50289	Myrosinase-associated protein	8.29	6.16	8.72	3.38
50338	Unknown	21.21	14.67	10.31	9.89
51723	Putative alcohol dehydrogenase	6.51	2.27	15.07	1.74
53167	Ethylene-responsive transcription factor ERF088	3.83	2.48	2.89	2.23
59707	Ethylene-responsive transcription factor ERF035	3.76	1.24	2.47	1.88
63160	Ethylene-responsive transcription factor ERF038	3.09	1.67	2.15	1.68
66994	Subtilisin-like protease precursor	15.49	10.71	10.08	10.57
70109	Ethylene-responsive transcription factor ERF011	25.96	23.21	14.44	17.42
83784	Chlorophyllase 1	10.18	2.01	9.04	2.51
90290	AtPP protein	13.60	10.03	34.96	5.71
10026 2	Ethylene-responsive transcription factor ERF113	139.47	2.70	16.78	1.31

표 5-14. 칼슘부족현상에 대해 발현 감소된 대표적 유전자

Array ID	Gene description	Fold ratio			
		표준-C a Set1	표준-Ca Set2	동감-Ca Set1	동감-Ca Set2
7144	PREDICTED: similar to adenomatosis polyposis coli 2	0.29	0.34	0.21	0.13
7227	Putative uncharacterized protein	0.31	0.31	0.23	0.45
8182	Cax51	0.24	0.26	0.17	0.13
11144	Inorganic phosphate transporter 1-3 (AtPht1;3) (H+)/Pi cotransporter)	0.12	0.03	0.20	0.77
19730	AT5g60530/muf9_180	0.08	0.42	0.26	0.32
20582	Vacuolar cation/proton exchanger 3 (Ca(2+)/H(+)) exchanger 3) (Ca(2+)/H(+)) antiporter CAX3)	0.19	0.26	0.12	0.09
20722	Lhcb2 protein	0.16	0.39	0.28	0.63
48927	O-acetylserine(Thiol) lyase precursor	0.55	0.59	0.32	0.27
60805	Germin-like protein subfamily 1 member 7 precursor	0.22	0.07	0.16	0.08
61052	Putative bHLH transcription factor	0.30	0.66	0.28	0.60
63944	Aldose reductase-like protein	0.15	0.43	0.14	0.26
67306	Putative uncharacterized protein At3g51950	0.39	0.42	0.25	0.42
80140	Pectinesterase-like protein	0.27	0.42	0.17	0.36
84443	Vacuolar cation/proton exchanger 1 (Ca(2+)/H(+)) exchanger 1) (Ca(2+)/H(+)) antiporter CAX1)	0.26	0.30	0.19	0.12
85273	Cytokinin dehydrogenase 4 precursor	0.31	0.17	0.26	0.46
85729	Putative caltractin	0.33	0.26	0.32	0.18
89351	Protein disulfide isomerase	0.62	0.29	0.11	0.22
93399	Putative glutathione S-transferase	0.40	0.25	0.20	0.06
95838	CTP synthase, putative/UTP--ammonia ligase, putative	0.25	0.44	0.29	0.36
10291 6	Putative chitinase	0.69	0.56	0.31	0.44

③ DREB2와 칼슘결핍과의 관계

㉓ 가뭄, 저온, 고온 등 환경스트레스와 관련이 있다고 알려진 DREB와 그 관련유전자인 ERF family 유전자들이 칼슘결핍에 반응함을 microarray를 통해 알게 되었으며 실제 애기장대에서 DREB2 group의 유전자가 집단적으로 칼슘결핍에 반응함을 확인하였다. 또한 DREB2C를 과다발현시킨 형질전환 식물체가 칼슘결핍배지에서 대조구에 비해 현저히 생장이 촉진됨을 밝혀 내었다 (그림 5-75).

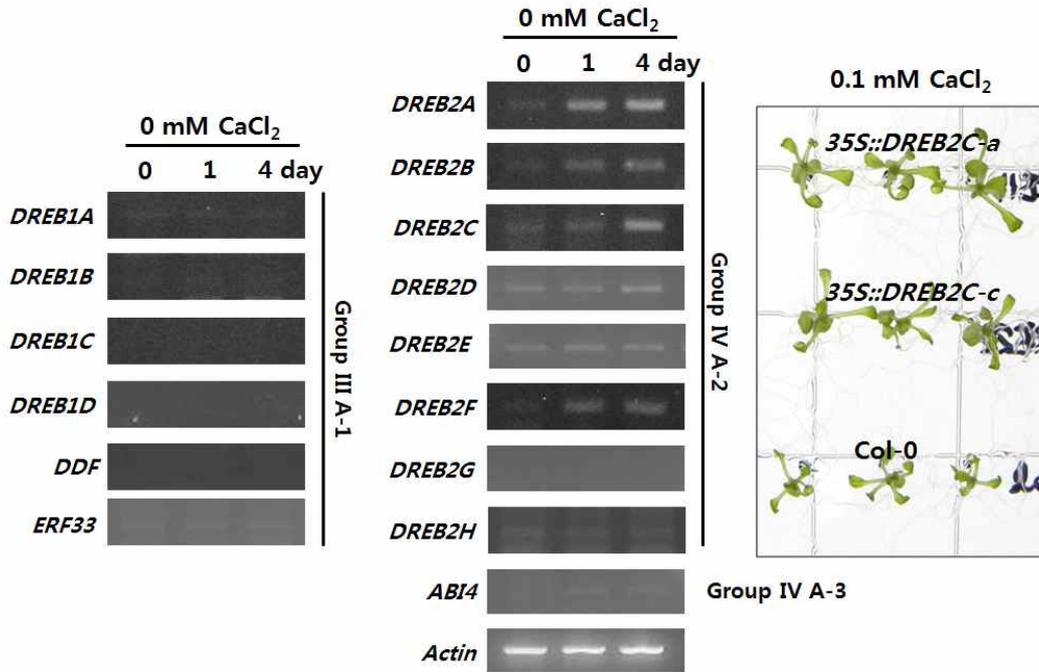


그림 5-75. 칼슘결핍현상과 ERF family와의 연관성

㉔ 애기장대결과의 양배추에 대한 적용성

ㄱ. 애기장대의 결과를 토대로 식물은 칼슘결핍에 대해 식물호르몬 (SA)과 칼슘결합단백질, 칼슘펌프, 그리고 전사조절인자인 DREB2를 조절시켜 적극적으로 칼슘결핍을 극복해내고자 하는 메커니즘을 발달시켜왔음을 알게 되었다.

ㄴ. 이를 토대로 몇몇 대표적 칼슘내성관련 유전자가 앞서 밝혀낸 양배추의 칼슘 저항성품종에서 어떤 발현패턴을 나타내는지 ortholog를 찾아 확인하고 이들의 발현마커로서의 가능성을 타진해 보았다 (그림 5-76). 그 결과 발현마커로서의 활용가능성이 충분해 보였으며, 앞으로 더 많은 칼슘내성관련 유전자의 양배추에서의 발현패턴을 조사하여 칼슘내성 양배추품종 선별에 있어 중요한 기준이 되는 마커를 개발할 수 있을 것으로 기대되었다.

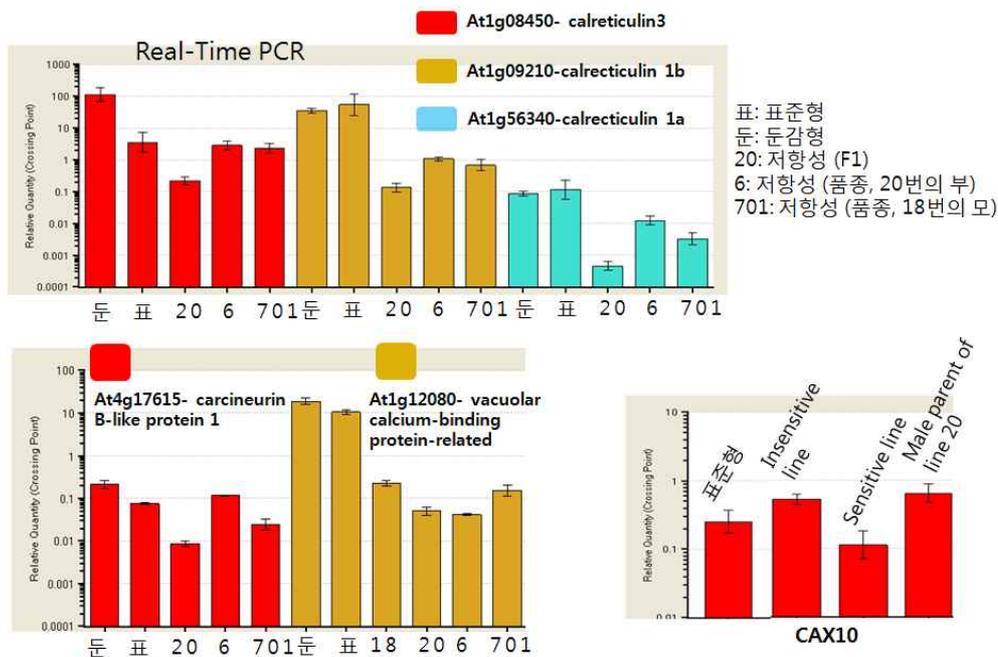


그림 5-76. 칼슘결핍 저항성관련 유전자들의 저항성 양배추계통에서의 발현변화

④ 애기장대를 이용한 칼슘제한 조건 특이 유전자 기능 연구

- ㉑ 칼슘 결핍 또는 제한 조건에서 양배추를 대상으로 식물의 성장을 조사한 방법과 마찬가지로 CaCl₂이 5 mM로 처리된 정상조건 칼슘결핍 조건 (0 mM CaCl₂)에서 애기장대의 성장을 비교하고, 처리된 식물체에서 DREB 유전자의 발현을 RT-PCR로 확인하였다 (그림 5-77).
- ㉒ 칼슘결핍조건에서 애기장대의 생장은 정상조건 (5 mM CaCl₂)에서 성장한 식물체에 비해 생중량은 20배 이상 감소하였으며, 칼슘 제한에 의해 생장이 크게 감소하는 것으로 나타났다 (그림 5-78A). 또한 동일한 칼슘 결핍조건에서 애기장대를 성장시킨 후 여러 종류의 환경스트레스에 기능하는 것으로 알려진 DREB 유전자의 발현변화를 살펴본 결과, DREB2A, DREB2B, DREB2C 및 DREB2F의 발현이 변화되는 것이 확인되었다 (그림 5-78B).
- ㉓ 칼슘결핍조건에서 DREB2 계열의 유전자 발현이 증가한 결과를 바탕으로 AtDREB2A, 2C 및 2F 유전자의 과발현 형질전환체(T3)를 구축하고, 이들의 칼슘 결핍조건에서 이들의 성장을 관찰한 결과 (그림 5-79) 비형질전환체에 비해 식물체의 생장이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 칼슘결핍조건에서 9일 동안 성장된 형질전환체의 생장은 DREB2C 유전자 도입 식물체의 경우 비형질전환체에 비해 40%이상 증가되었음을 확인할 수 있었다.

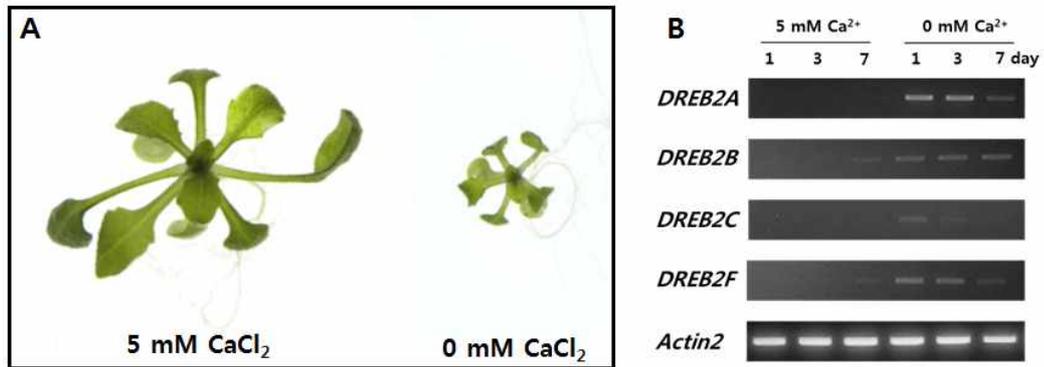


그림 5-77. 칼슘결핍 조건에서 애기장대의 성장 (A, 처리후 20일 경과) 및 DREB 유전자의 발현변화 (B).

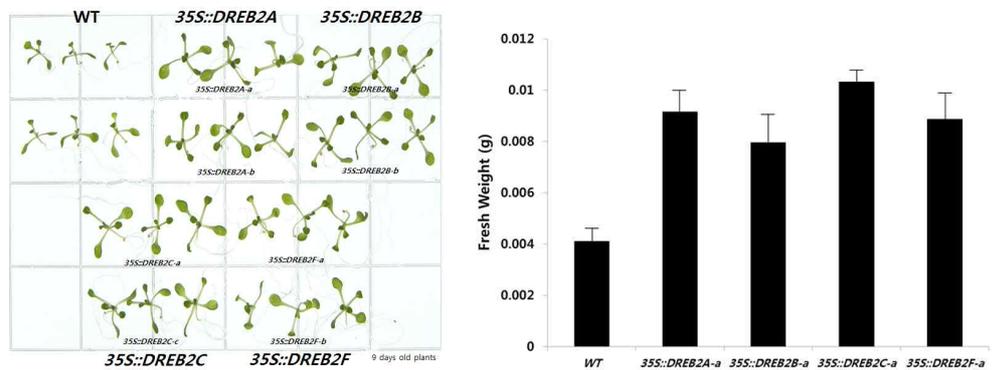


그림 5-78. 칼슘결핍조건에서 AtDREB2A, 2C 및 2F 도입 형질전환체의 성장

⑤ Microarray 분석을 통한 칼슘결핍조건에서의 유전자 발현 변화 분석

- ㉠ 비형질전환체 및 형질전환체에서 칼슘결핍에 따른 유전자 발현 변화를 조사하기 위해, 칼슘결핍조건 및 정상조건에서 1일, 3일 및 7일간 성장한 식물체를 대상으로 Agilent 사의 ARA 44K chip을 사용하여 분석하였다. Microarray 분석을 위한 재료 및 반복 실험을 위한 실험 디자인은 <그림 5-79>과 같다.
- ㉡ 각 샘플간 발현변화를 살펴본 결과 (그림 5-80) 비형질전환 식물체와 AtDREB2C-a에서 발현변화를 보이는 유전자군 및 칼슘결핍에 따른 유전자 발현변화를 확인할 수 있었다.
- ㉢ 칼슘 결핍에 따라 발현이 증가되는 유전자를 GO term에 따라 분류한

결과 (그림 5-81), <Cellular component> 중 <Endomembrane systems>로 분류되는 유전자들 및 <Molecular function> 중 <Cation binding>으로 분류되는 유전자들의 발현증가가 다른 유전자군에 비해 많음을 확인할 수 있었다.

1 ST Slide		2 ND Slide	
DREB2C	DREB2C	- Calcium	- Calcium
1 st Repetition WT 0 d + 35S::DREB2C-a	2 nd Repetition WT 0 d + 35S::DREB2C-c	1 st Repetition WT 5 mM 7 d + WT 0 mM 7 d	2 nd Repetition WT 5 mM 1 d + WT 0 mM 1 d
1 st Repetition WT 5 mM 1 d + WT 0 mM 1 d	1 st Repetition WT 5 mM 3 d + WT 0 mM 3 d	2 nd Repetition WT 5 mM 3 d + WT 0 mM 3 d	2 nd Repetition WT 5 mM 7 d + WT 0 mM 7 d
- Calcium	- Calcium	- Calcium	- Calcium

Sample No.	treatment
1	wild type (WT)
2	35S::DREB2C-a
3	35S::DREB2C-a
4	WT 0 mM, 1 day
5	WT 0 mM, 3 day
6	WT 0 mM, 7 day
7	WT 5 mM, 1 day
8	WT 5 mM, 3 day
9	WT 5 mM, 7 day
10	WT 0 mM, 1 day
11	WT 0 mM, 3 day
12	WT 0 mM, 7 day
13	WT 5 mM, 1 day
14	WT 5 mM, 3 day
15	WT 5 mM, 7 day

그림 5-79. 칼슘결핍조건에서 애기장대의 유전자 발현 변화 분석 실험 디자인

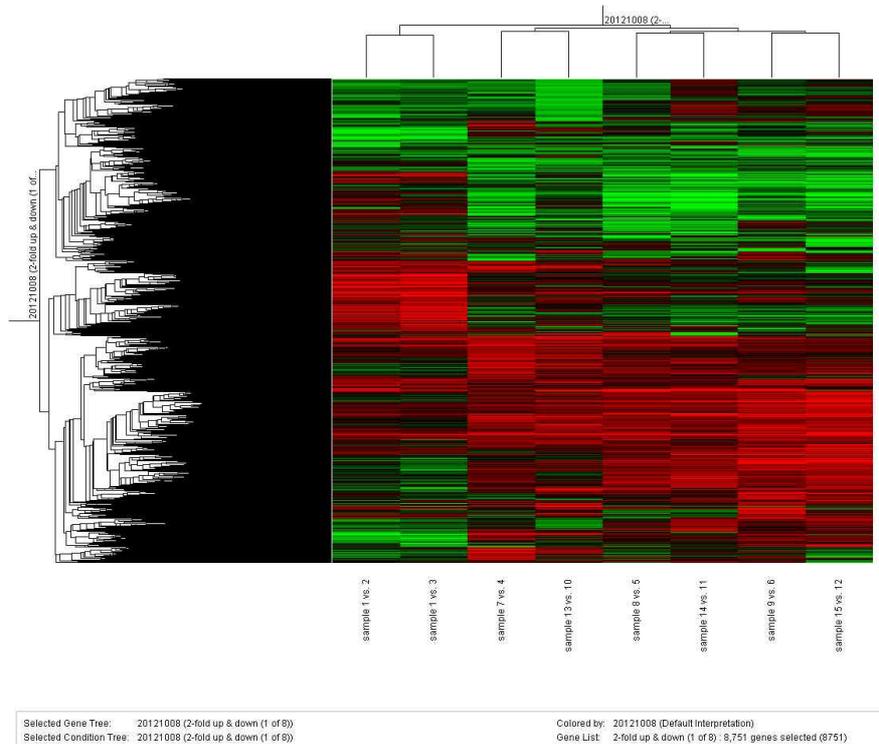


그림 5-80. 처리에 따른 유전자 발현 변화(발현 증가 및 감소)를 Hierarchical clustering으로 나타낸 그림

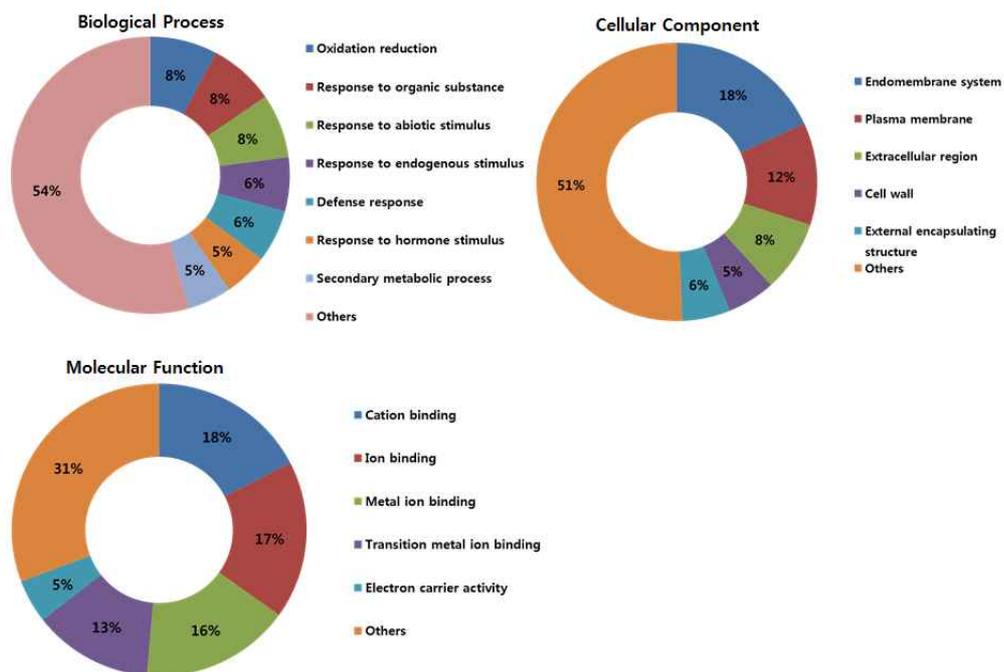


그림 5-81. 칼슘결핍에 따라 발현이 증가되는 유전자의 GO term에 따른 분류

- ㉔ 칼슘결핍조건과 DREB2C 식물체에서 공통적으로 발현이 변화되는 유전자들은 약 500여개의 유전자로 확인되었으며 이들을 GO term으로 분류한 결과 (그림 6), 칼슘결핍에 따라 발현증가를 나타내었던 <Cellular component> 중 <Endomembrane systems>로 분류되는 유전자들 및 <Molecular function> 중 <Cation binding>으로 분류되는 유전자들이 공통적으로 많이 분포하고 있음을 확인할 수 있었다.
- ㉕ 양배추에서 DREB 유전자 및 석회결핍 관련 유전자의 발현 분석
- ㄱ. 칼슘제한 조건 관련 전사조절인자 기능 연구
 1. <그림 26>에서와 같이 정상조건 (5 mM CaCl₂) 및 칼슘 제한 조건 (0 mM CaCl₂)에서 애기장대의 경우 전사조절인자의 발현 변화를 확인한 바 있다. 칼슘결핍조건에서 애기장대의 생장은 정상조건보다 생장이 크게 감소하며, 다양한 환경스트레스에서 기능하는 것으로 알려진 DREB 유전자의 발현이 변화되는 것을 확인하였다.
 2. 애기장대에서 알려진 57개의 DREB 유전자와 유사한 양배추의 유전자 서열을 중국 및 캐나다 그룹에서 확보한 양배추 유전체 정보에서 추출하기 위해 각 그룹에서 유전자로 annotation된 유전자들과 비교하였다(그림 33, 서울대 양태진 교수팀의 협조를 통해 확보함). 캐나다 그룹에서 분석된 양배추 유전체 정보로부터 292개, 중국 그룹에서 분석된 양배추 유전체 정보로부터 246개의 DREB 유사 서열을 확보할 수 있었다.

ㄴ. 이들 중 발현변화가 크게 증가하거나 감소하며 (log2 Fold Change) 공공 DB (TAIR) 에 존재하는 유전자와 유사성을 갖는 양배추 유전자를 각각 5 종류씩 선택하여(표 5-16), 유전자 발현 분석을 RT-PCR을 통해 확인하고자 하였다.

표 5-15. 칼슘처리 및 계통에 따른 DEGs

	DEGs	No. of genes	Log2 fold change >2
둔감형 유묘-칼슘 처리 ¹	Down	851	238
	Up	1,111	257
표준형 유묘-둔감형 유묘 ²	Down	3,206	1,730
	Up	3,043	1,853

¹둔감형 유묘-칼슘 처리, 둔감형 유묘 칼슘 무처리/둔감형 유묘 칼슘 처리

²표준형 유묘-둔감형 유묘, 표준형 유묘 칼슘 처리/둔감형 유묘 칼슘 처리

표 5-16. RT-PCR을 통한 발현분석을 위해 선발한 유전자 정보

둔감_무처리_Down							
id	log2FoldChange	TAIR10_name	TAIR10_symbol	TAIR10_define	Rice_name	Rice_symbol	Rice_define
Locus_33344	-6.82263	AT1G48130.1	ATPER1,PER1	1-cysteine peroxiredoxin 1			
Locus_33332	-6.27372	AT5G40420.1	OLE2,OLEO2	oleosin 2			
Locus_33293	-5.74859	AT1G27110.1		Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein			
Locus_33260	-5.59738	AT3G17520.1		Late embryogenesis abundant protein (LEA) family protein			
Locus_33288	-5.30665	AT1G27110.1		Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein			
둔감_무처리_Up							
id	log2FoldChange	TAIR10_name	TAIR10_symbol	TAIR10_define	Rice_name	Rice_symbol	Rice_define
Locus_23553	6.008754	AT2G36750.1	UGT73C1	UDP-glucosyl transferase 73C1			
Locus_40652	5.745012	AT1G54730.1		transporter family protein, putative, expressed			
Locus_52529	5.684799	AT2G15020.1		expressed protein			
Locus_10470	5.594812	AT1G76340.1	GONST3	golgi nucleotide sugar transporter 3			
Locus_13192	5.509157	AT2G24220.1	ATPUP5,PUP5	purine permease 5			
표준_처리_Down							
id	log2FoldChange	TAIR10_name	TAIR10_symbol	TAIR10_define	Rice_name	Rice_symbol	Rice_define
Locus_504	-9.77266	AT3G51730.1		saposin B domain-containing protein			
Locus_631	-9.48457	AT4G26870.1		tRNA synthetases class II domain containing protein, expressed			
Locus_6837	-9.39225	AT1G50960.1	ATGA2OX7,GA2OX7	gibberellin 2-oxidase 7			
Locus_11451	-9.27971	AT1G11270.1		F-box and associated interaction domains-containing protein			
Locus_23024	-9.2311	AT1G76610.1		Protein of unknown function, DUF617			
표준_처리_Up							
id	log2FoldChange	TAIR10_name	TAIR10_symbol	TAIR10_define	Rice_name	Rice_symbol	Rice_define
Locus_34086	9.859022	AT1G74670.1		Gibberellin-regulated family protein			
Locus_49446	9.806623	AT1G10320.1		Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein			
Locus_52325	9.799948	AT5G03480.1		RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein			
Locus_53396	9.460237	AT1G17190.1	ATGSTU26,GSTU26	glutathione S-transferase tau 26			
Locus_52425	9.392562	AT1G31280.1	AGO2	Argonaute family protein			

ㄷ. 유전자 발현분석은 삼성종묘(주)에서 석회결핍 둔감형과 민간형 계통을 선발하고 이들의 교배를 통해 확보된 F3 개체 약 500 종류를 대상으로 하였으며, 이들 재료로부터 개체별로 RNA를 분리하고 40~46 샘플을 pooling하여 발현분석을 진행하였다. RT-PCR 분석을 위해 선발된 유전자 및 프라이머 정보는 <표 5-17>와 같다.

표 5-17. 석회결핍 조건 및 계통간 발현변화를 조사하기 위한 유전자 및 프라이머

Oligo Name	Sequence (5'-3')	Size
Dd_33344_F(364bp)	CGATGGGAAAATACGCTCAT	20
Dd_33344_R	CAGTTAACCGGAGTGGCAAT	20
Dd_33332_F(317bp)	TGCCATAGCCGGTTTACTTC	20
Dd_33332_R	CGTCATGGGCTTTATCCTGT	20
Dd_33293_F(248bp)	CCCTTATTGGAGCTTGGACA	20
Dd_33293_R	CTTAGGGGTGACCCTCCTTC	20
Dd_33260_F(272bp)	CGCTAAGGTGAGGTTGGAAG	20
Dd_33260_R	TCTTTGACTTCTGCGACACG	20
Dd_33248_F(232bp)	AGTGGGCTCGACAGTGATCT	20
Dd_33248_R	GAGCCAGTCGCGGAGTATTA	20
Du_52529_F(356bp)	CTTAGTCCGGACACGTGGTT	20
Du_52529_R	CCGATCTTGTCGATGAACCT	20
Du_40652_F(317bp)	ACTCATCACCCGTTTCAGTCC	20
Du_40652_R	CTGCCAATCAAATCGGAAAT	20
Du_23553_F(301bp)	TGATCCCCATGGTCGATATT	20
Du_23553_R	CAGTTTGGCCTTGGTTCAAT	20
Du_13192_F(297bp)	ACGCATGTCGCAATGTATGT	20
Du_13192_R	GAATGGCAACCCAAGAGAAA	20
Du_10470_F(225bp)	CTGCAGGAAGAAACCTCCAC	20
Du_10470_R	TGCTTCATCAAGCCTCTGTG	20
Pd_23024_F(211bp)	CAGCCATCTGCGAGTCATTA	20
Pd_23024_R	ATGACGGTGACCGAAGAAAG	20
Pd_11451_F(397bp)	TGGTCATCGACAAGTGTGGT	20
Pd_11451_R	AACTTTGGTGCCATCTGGTC	20
Pd_6837_F(329bp)	GCGACTGAGACCTTGGAGAC	20
Pd_6837_R	GTGTCGGGAGCAGAAGAGAC	20
Pd_631_F(304bp)	AAGTTCCTTTGGGCACCTTT	20
Pd_631_R	GGCTGGCAGTAGTGAAGGAG	20
Pd_504_F(309bp)	ACTCCAAGATCCCGACACAC	20
Pd_504_R	GCTGCGTTAGAACCGTTTTTC	20
Pu_53396_F(211bp)	AAGGATCAGAGGGGAGCATT	20
Pu_53396_R	AAGATGGCTTTGGCTGAGAA	20
Pu_52425_F(362bp)	TCTTTCAGGTCACGGAGCTT	20
Pu_52425_R	CCTGATAAAGGCGGTGTTGT	20
Pu_52325_F(325bp)	GCTTCCGGAAAAGGATAAGG	20
Pu_52325_R	TTAAGGGGTATGACGCCAAG	20
Pu_49446_F(360bp)	CCGGGTGATGAAGAAAAGAA	20
Pu_49446_R	TTCACTCGAGTCTCCCTCGT	20
Pu_34086_F(391bp)	AACGGAAGACATGGCAAAAC	20
Pu_34086_R	AGCACAACACTTTTGGCAGA	20

*둔감형 계통에서 칼슘결핍에 의한 발현 감소(Dd), 둔감형 계통에서 칼슘결핍에 의한 발현 증가(Du), 표준형에서 발현이 감소(Pd) 및 표준형에서 발현이 증가(Pu)된 유전자

- ㄷ. 유전자 발현분석은 삼성종묘(주)에서 확보된 F3 집단 (498 점)을 대상으로 진행하였다(그림 5-83). 선발된 유전자 중 표준형 양배추에서 둔감형 양배추와 비교하여 발현이 감소하는 유전자 (locus_6837)의 경우 표준형보다 발현이 실험적으로 감소되는 계통이 있음을 확인할 수 있었으며, 표준형에서 발현이 둔감형보다 증가된 유전자 (locus_49446)의 경우 둔감형에서 발현이 실험적으로 증가되었음을 확인하였고 계통 중에도 발현이 증가되는 것이 있는 것으로 나타났다.
- ㄹ. 각 pool에 포함된 개체별로 분석을 진행하고 해당 발현변화를 보이는 라인의 석회결핍에 대한 반응을 검토를 삼성종묘(주)에 의뢰할 예정이며, 성장특성과 유전자 발현 변화가 일치할 경우 유전자 마커로서 활용할 수 있을 것이다.

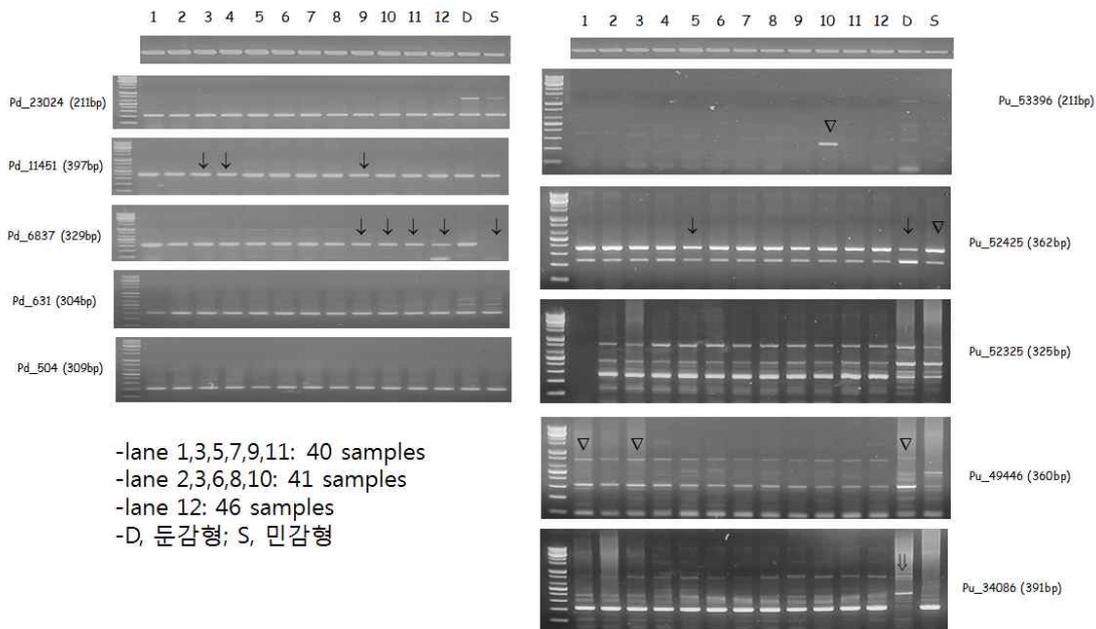


그림 5-83. DEG 선발을 통해 확보된 유전자의 발현 분석. 각 라인으로부터 RNA를 추출한 후 40~46라인을 pooling하여 RT-PCR을 수행하였으며, DEG 분석 결과와 RT-PCR 결과가 유사한 경우 표시함.

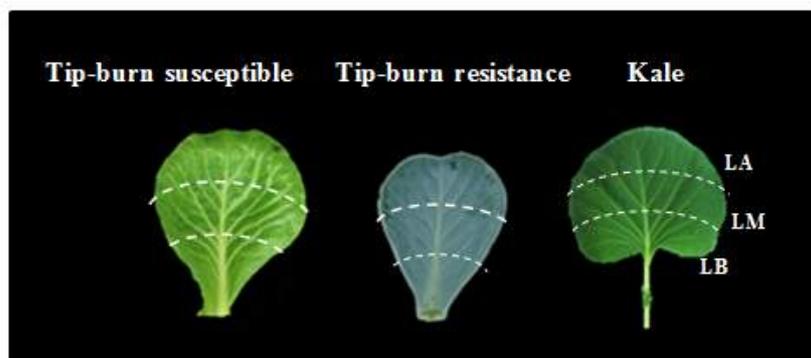
⑥ 석회결핍 둔감형 관련 tip-burn 저항성 연관 유전자군 발굴 및 칼슘 수송유전자의 기작 연구

㉓ 석회결핍 둔감형질에 대한 후보유전자를 발굴하고 양배추에서 칼슘과 관련되어 어떤 기작이 나타나는지 알아보기 위하여, 칼슘결핍 현상인 tip-burn이 나타나는 석회결핍 표준형과 같은 환경에서 재배했을 때 tip-burn 현상이 나타나지 않는 석회결핍 둔감형 양배추 계통을 (3-2 세부 제공) 실험재료로 선택하였고, 칼슘 함량이 높은 케일을 비교 샘플로 추가하였다 (그림 5-84).



그림 5-84. 실험재료로 사용된 석회결핍 표준형, 둔감형 양배추 및 케일

㉔ 석회결핍 표준형, 둔감형 양배추와 케일의 칼슘 함량을 잎 부위별로 LA, LM, LB로 나누어 측정 한 결과, 선행결과와 마찬가지로 석회결핍 표준형보다 둔감형 양배추에서 칼슘과 칼륨 함량이 1.5~2배 높았으며, 케일은 양배추 석회 결핍 저항성 계통보다 칼슘 함량이 2~4배 이상 높은 것으로 나타났다 (그림 5-85).



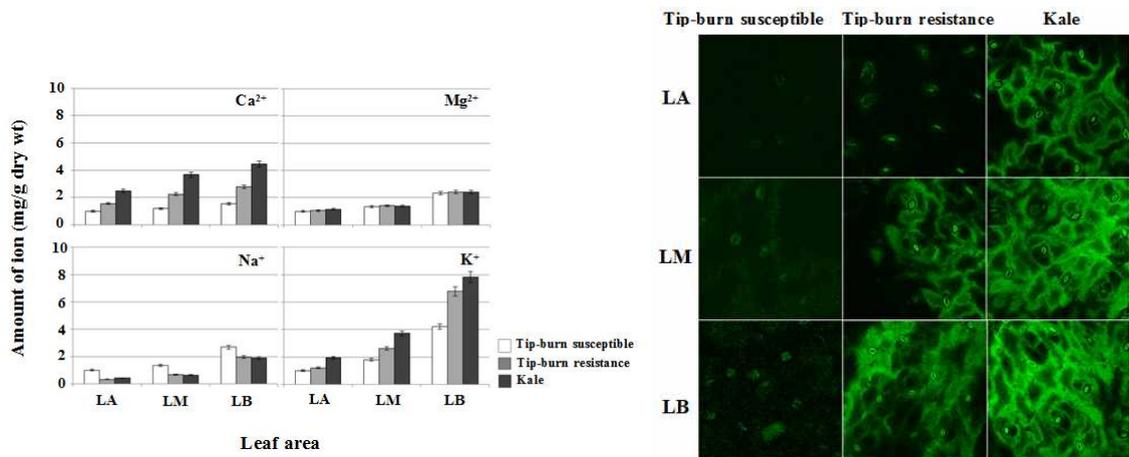


그림 5-85. 석회결핍 표준형, 둔감형 양배추 및 케일 잎에서의 이온 함량 분석 결과

㉔ 칼슘 함량에 결정적인 영향을 주는 유전자 군은 찾기 위하여, 석회결핍 표준형, 둔감형의 양배추 및 케일 잎 (LA, LM, LB)으로부터 NGS cDNA library를 제작한 후 Illumina 사의 HiSeq2000을 사용하여 paired end 방법으로 101 base의 길이로 sequencing하였다. 각 샘플 별로 총 3.3~4.4 Gb 양의 염기서열이 생산되었으며, 32,349,766 (석회결핍표준형 LM)~43,705,284개의 (석회결핍 표준형 LB) NGS reads로 총 33.6 Gb의 transcriptome이 생산 되었다. 생산된 reads들을 quality (Q < 20)에 따른 trimming을 통해 평균 약 80 bp의 길이와 약 79%의 reads를 확보하였다. 또한 약 71%의 reads가 pair로 존재함을 확인하였다. 위의 high-quality paired-end sequence를 Velvet (ver. 1.2.06)과 Oases (ver. 0.2.08)을 이용하여 assemble 한 결과 58,096개의 transcriptome을 얻었다 (표 5-18).

표 5-18. NGS transcriptome의 assembly 결과

Item	Numbers
Total number of preliminary contigs	205,046
Total number of contigs (all isoforms)	154,785
Length	Min. 200
	Max. 15,158
	Avg. 1,283
Total number of unigenes	58,096
Number of isoforms	Min. 1
	Max. 140
	Avg. 2.66

㉓ 위의 transcriptome을 reference로 9개의 library로부터 나온 read들을 BWA algorithm을 이용하여 mapping 하고, DEGSeq package를 이용하여 transcriptome profile을 수행 하였다. Differently expressed gene (DEG)를 분석하기 위하여 칼슘 함량이 가장 낮은 양배추 석회 결핍 표준형의 LB의 expression과 비교하여 log ratio 2 이상의 값을 갖는 transcriptome을 분석 한 결과 총 27,876개의 transcriptome을 얻었다. 칼슘과 칼륨이온의 함량이 가장 낮았던 석회결핍 표준형 양배추 잎의 가장자리 (LA)를 기준으로 2배 이상 발현이 증가 또는 감소한 유전자는 아래 그림3과 같다. 석회결핍 표준형보다 둔감형과 케일에서 2배 이상 발현이 변한 유전자의 수가 더 많았다 (그림 5-86). 이 중 발현이 특이적으로 변하는 유전자를 각각 선발하여 분석하였다.

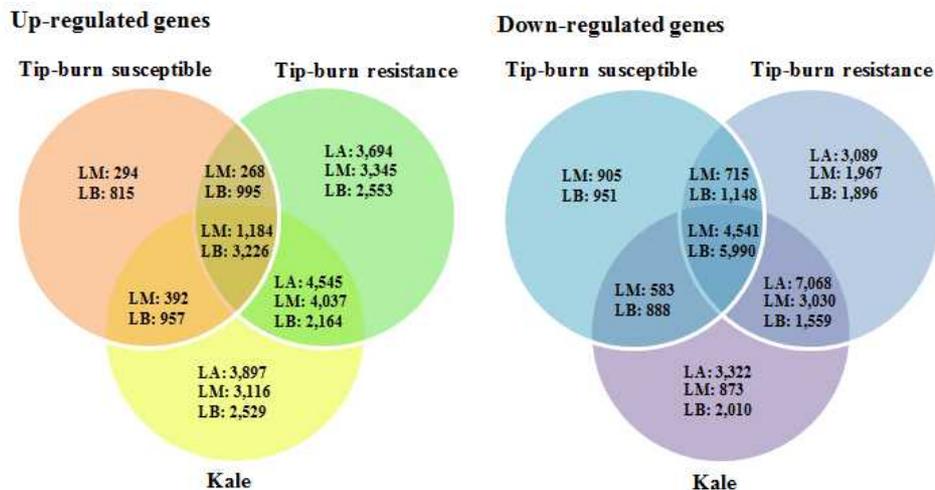


그림 5-86. 석회결핍 표준형, 둔감형 양배추 및 케일에서 2배 이상 발현이 증가 또는 감소한 유전자의 벤다이어그램

㉔ 석회결핍 표준형의 잎 가장자리 (LA)를 기준으로 발현 변화를 분석하여 genotype specific하기 발현이 변한 유전자 1,844개를 선발하였고, 이들을 4개 그룹으로 clustering하였다. Arabidopsis (ver. TAIR10)에 align 하여 annotation 한 결과 석회결핍 표준형 특이적으로 발현이 증가한 cluster 1은 16개 유전자 중 4개가 양배추 특이적인 유전자였다. 석회결핍 둔감형과 케일에서 공통적으로 발현이 증가한 747개 유전자 (cluster 2) 중 133개는 Arabidopsis와 상동성을 갖지않는 유전자였고, 이 중 케일 특이적으로 발현이 증가한 1,035개 유전자 (cluster 3) 중 267개도 No Arabidopsis counterpart 유전자였다. 석회결핍 표준형 LA보다 모든 부위에서 발현이 증가한 46개 유전자가 속

하는 cluster 4에는 8개가 No Arabidopsis counterpart였다 (그림 5-87).

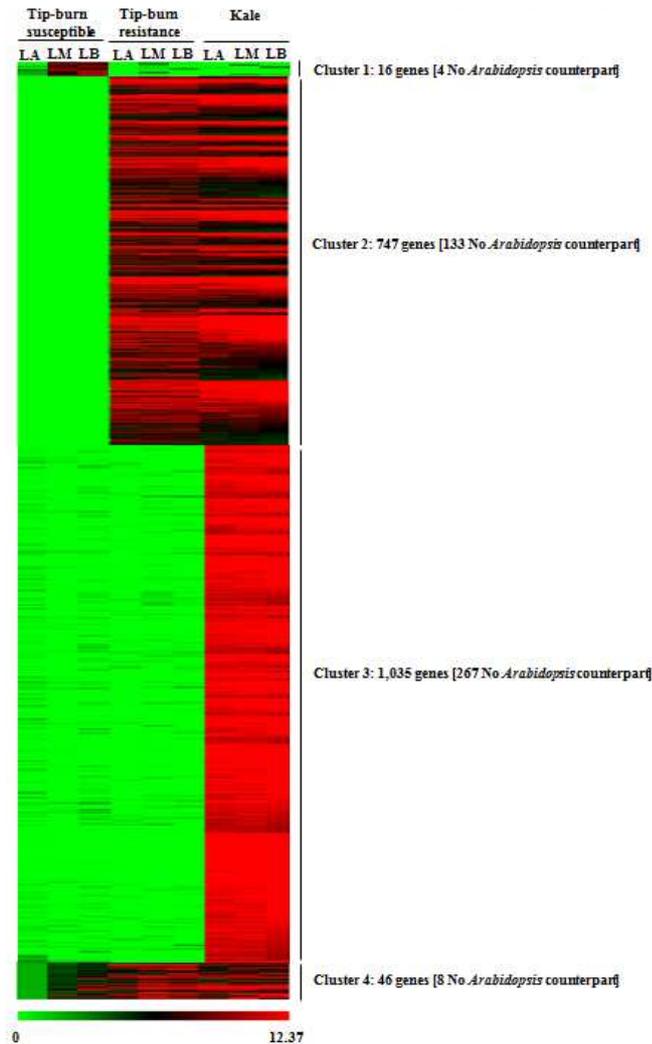


그림 5-87. Genotype-specific하게 발현한 1,844개 유전자의 hierarchical cluster 결과

- ㉔ Genotype-specific하게 발현한 1,844개 유전자를 GO annotation을 한 결과, 칼슘 및 칼륨 이온의 함량이 높았던 석회결핍 둔감형과 케일에서 발현이 증가한 유전자가 transporter activity를 갖거나 response to abiotic or biotic 그룹에 속하는 결과를 얻었다 (표 5-19, 5-20). Transport activity를 갖는 유전자는 cluster 2 즉, 칼슘함량이 많은 석회결핍 둔감형 양배추와 케일에 가장 많았고, 케일에서 특이적으로 발현하는 유전자인 cluster 3에도 약 8%정도 존재하였다. 스트레스 관련 유전자는 cluster 3, 케일 특이적으로 발현이 증가한 유전자에 가장 많았고, cluster 2, 석회결핍 둔감형 양배추와 케일에서 공통적으로 발현이 증가한 그룹에도 10%이상 차지한다. 이들을 기능별로 자

세히 분류해보면 ABC transporter, potassium transporter, cation exchanger, vacuolar transporter 및 기타 ion transporter가 다양하게 분포하였다 (표 5-19). 스트레스 관련 유전자 53개에는 heat-shock stress, defense 관련 유전자, cold stress, drought stress 등 다양한 abiotic stress와 관련된 유전자가 포함된다 (표 5-20). 이는 식물체가 보유하는 칼슘이온의 함량과 stress 저항성과 관련이 있을 것으로 예상된다.

표 5-19. Genotype 특이적으로 발현한 유전자의 transporter activity category 분류

Functional category	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4
Ca ²⁺ activated outward rectifying K ⁺ channel	1	1		
Intracellular protein transport		11	5	4
ABC transporter		2	1	1
Lipid transporter		1	1	1
Phosphate transporter		1	1	1
MATE efflux family		4	3	
Sugar transporter		3	1	
K ⁺ transporter		3	1	
Vacuolar protein sorting-related		2	1	
Vesicle transport protein		1	1	
Nodulin MtN21 / EamA-like transporter		1	2	
Aluminium activated malate transporter		1		
Cation/H ⁺ exchanger		1		
ATP/ADP transporter		2		
Iron-regulated transporter		1		
Heavy metal transport		1		
UDP-galactose transporter		1		
Urea transmembrane transporter		1		
Zinc ion transporter		1		
Anion channel			1	
Calcium ion transport			1	
Inositol transporter			1	
Manganese tracking factor			1	
Nitrate transmembrane transporter			1	
Nuclear transporter			1	
Peptide transporter			1	
Phosphatidylinositol transfer protein				1
Magnesium transporter				1
Total	1	39	24	9

표 5-20. Genotype 특이적으로 발현한 유전자의 response to stress category 분류

Functional category	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4
Heat-shock stress related		6	3	1
Disease resistance protein		4	10	5
Abiotic stress related		2	2	2
Osmotic stress		3	4	
Light stress related		2	4	
Cold-stress and salt responsive protein		1	1	
Photooxidative stress related		1		
Drought stress related			1	
Cold-stress related			1	
Total	0	19	26	8

㉠ 따라서 석회결핍 표준형, 둔감형, 케일에서 스트레스 저항성이 다른지 알아보기 위해서 흙에서 약 4주 자란 식물체를 재료로 고온, 저온 및 건조 스트레스를 처리하였다. 칼슘과 칼륨 함량이 높았던 석회결핍 둔감형과 케일 식물체가 석회결핍 표준형 양배추보다 고온, 저온 및 건조 스트레스에 강한 표현형을 보였고, 석회결핍 표준형은 스트레스 처리 후 회복되지 못하였다 (그림 5-88). 스트레스와 관련된 9개 유전자의 발현 변화를 real-time PCR을 통하여 알아본 결과 Locus_9666 (PLAT/LH2 family protein), Locus_15334 (BTB-POZ protein), Locus_1906 (TPR-like protein), Locus_16469 (DnaJ)의 발현양은 스트레스 처리 전부터 석회결핍 둔감형과 케일에서 높았고, 스트레스에 의해 발현양의 큰 변화는 보이지 않았다. Locus_22894 (GAST1 protein)은 케일 특이적으로 발현양이 높았고 저온 스트레스에 의해 발현이 증가하였으며, Locus_6468 (HSP20)은 발현양이 매우 낮았다. Locus_21191 (Low temperature and salt responsive protein)은 고온, 저온, 건조 스트레스에 의해 발현이 증가하였는데, 석회결핍 표준형보다 둔감형과 케일에서 증가한 정도가 더 컸다. 고온 스트레스에 의해 발현이 증가한 Locus_6525 (HSP89.1)는 석회결핍 둔감형과 표준형에서 발현양이 높았다 (그림 5-89).

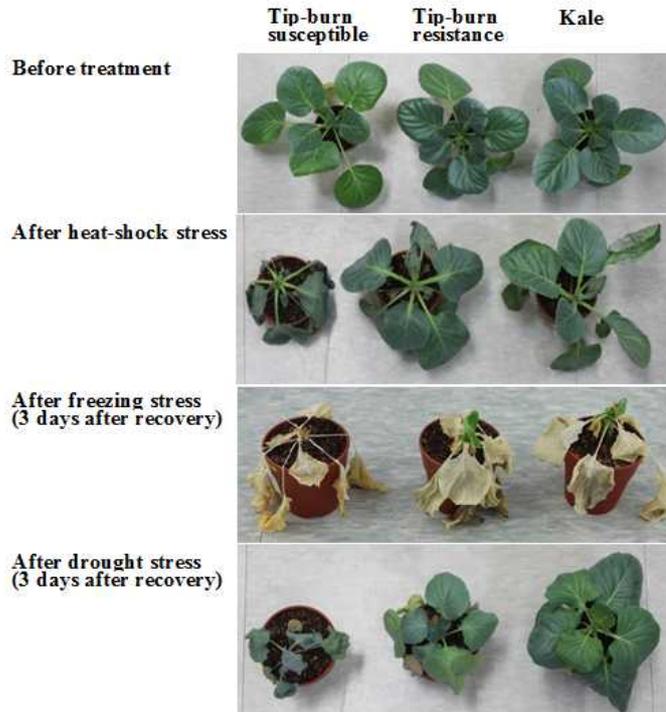


그림 5-88. 석회결핍 표준형, 둔감형, 케일 식물체에 고온, 저온 및 건조 스트레스 처리한 사진

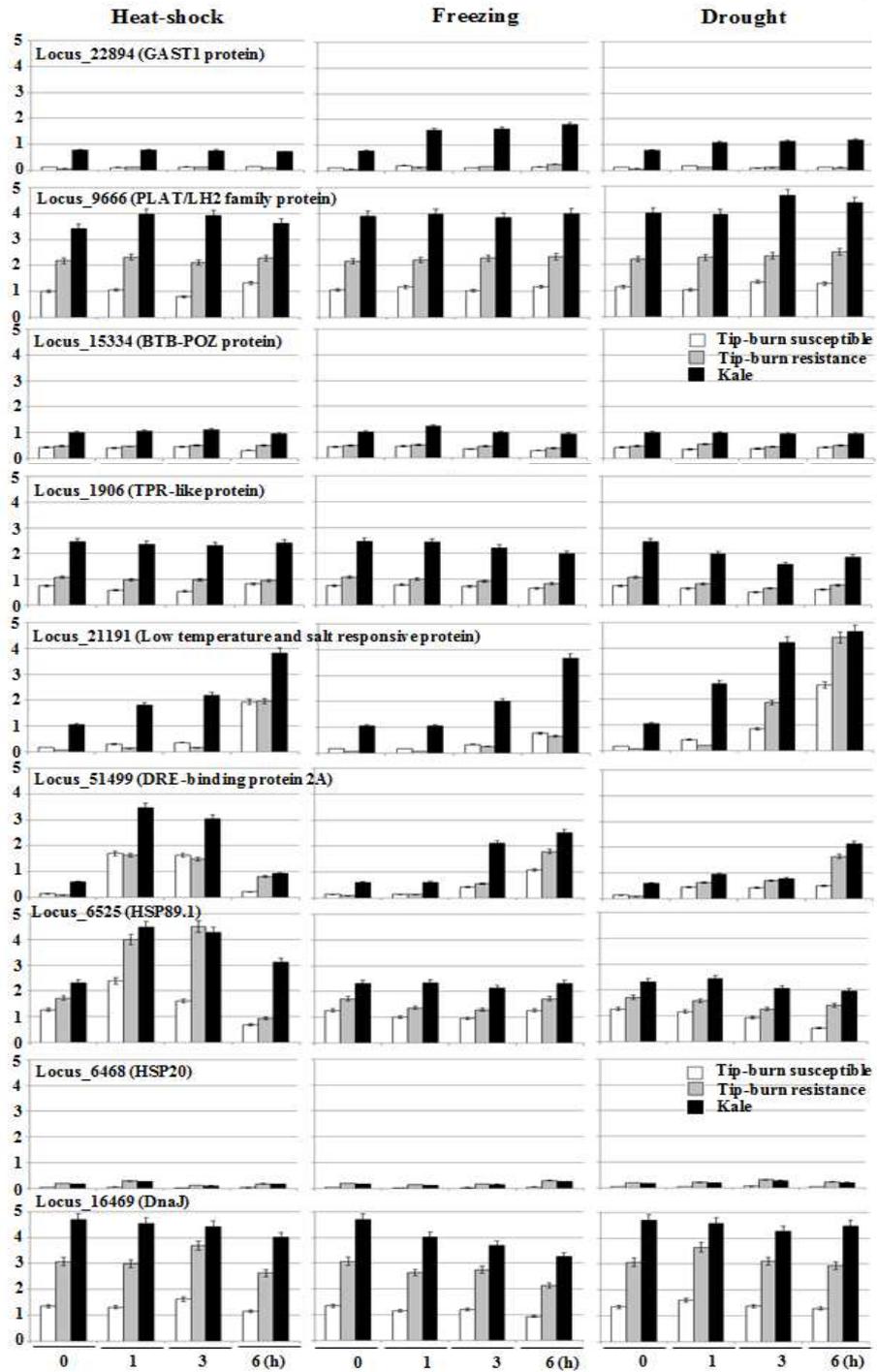


그림 5-89. 석회결핍 표준형, 둔감형, 케일 식물체에 고온, 저온 및 건조 스트레스 처리하여 스트레스와 관련된 9개 유전자의 발현양 조사

㉔ 칼슘 함량의 변화와 연관된 유전자 군을 찾기 위하여 칼슘 함량의 변화와 정비례 또는 반비례하는 유전자 군 및 잎 부위별 칼슘 함량과 연관된 유전자 군으로 나누어 비교하였다 (표 5-21). 특히 각 계통 별로 칼슘과 칼륨 함량에 dependent하게 발현이 증가 또는 감소하는 유전자 중 석회결핍 표준형 양배추보다 둔감형 양배추, 석회결핍 둔감형 양배추보다 케일에서 발현이 증가 또는 감소하는 유전자 165개를 선별하였고, 이들을 clustering하여 6개의 그룹으로 나누었다 (그림 5-90).

표 5-21. 칼슘 함량과 비례하여 발현이 변한 유전자 조사

	Up-regulation		Down-regulation			
	No.	(%)	No.	(%)		
석회결핍 표준형 양배추	1,473	[281]	5.28	14,048	[3,522]	50.39
석회결핍 둔감형 양배추	5,296	[920]	19.00	7,353	[1,918]	26.38
케일	5,302	[1,125]	19.02	4,787	[1,035]	17.17
석회결핍 둔감형 양배추, 케일 공통	1,186	[194]	4.25	1,383	[344]	4.96
석회결핍 표준형, 둔감형 양배추, 케일 공통	138	[19]	0.36	908	[243]	3.26

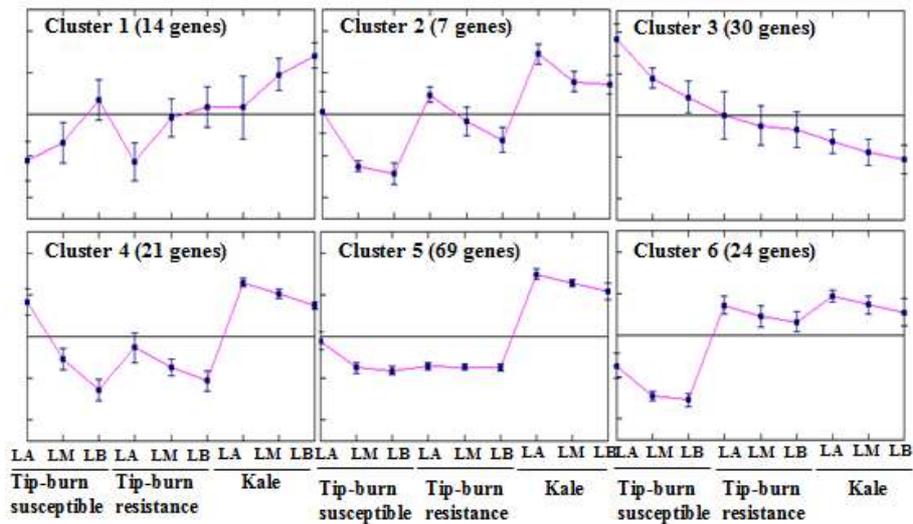
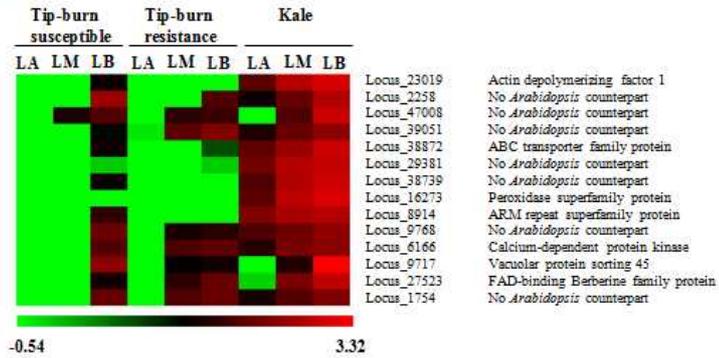


그림 5-90. 칼슘함량에 비례하여 발현이 변화한 유전자의 K-means clustering

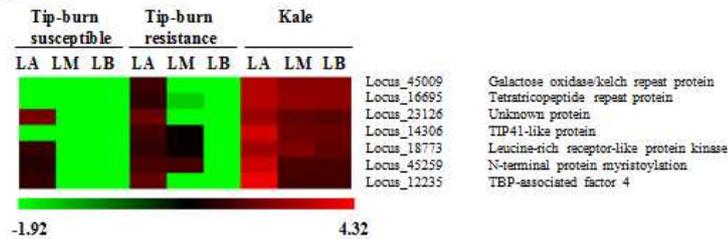
㉔ 칼슘 함량에 dependent하게 발현이 증가하는 cluster 1에 속하는 14개의 유전자는 ABC transporter, calcium-dependent protein kinase, vacuolar protein, ion transporter가 나왔고, 상당수의 유전자가 Arabidopsis와 상동성을 찾을 수 없는 No Arabidopsis counterpart gene이었다. 유전자 발현양이 감소한 5개 그룹의 hierarchical cluster 결과로부터 발현패턴과 유전자를 확인할 수 있다 (그림 5-91). 식물

세포 내 칼슘, 칼륨과 관련된 유전자를 pathway상에 표시하였고, 이러한 결과가 앞으로 칼슘 요구도를 높이는 연구의 기반이 될 수 있을 것으로 예상된다.

Cluster 1



Cluster 2



Cluster 3

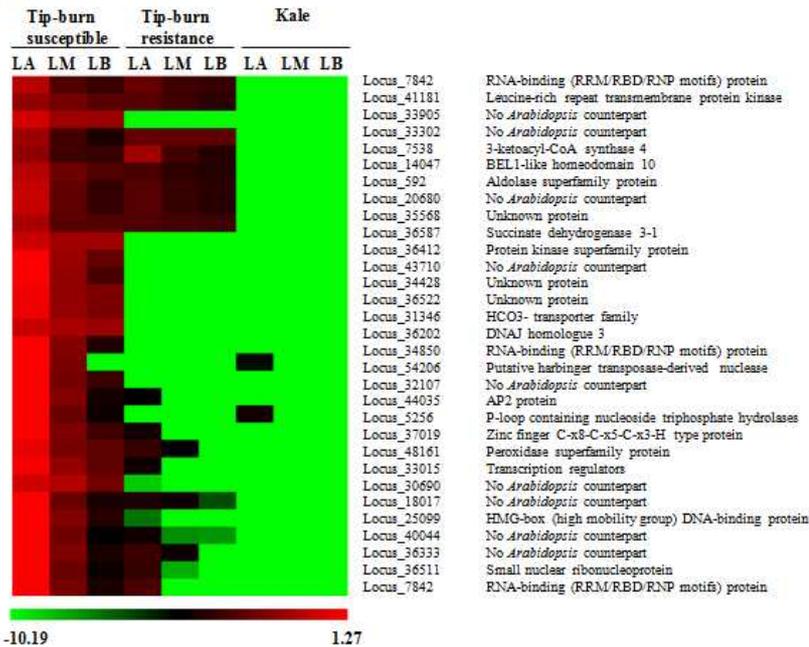
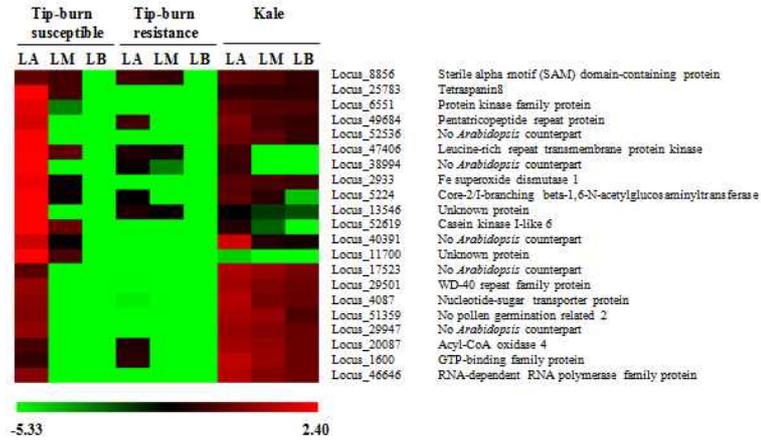


그림 5-91. 칼슘함량에 비례하여 발현이 변화한 165개 유전자의 hierarchical cluster 결과

Cluster 4



Cluster 5

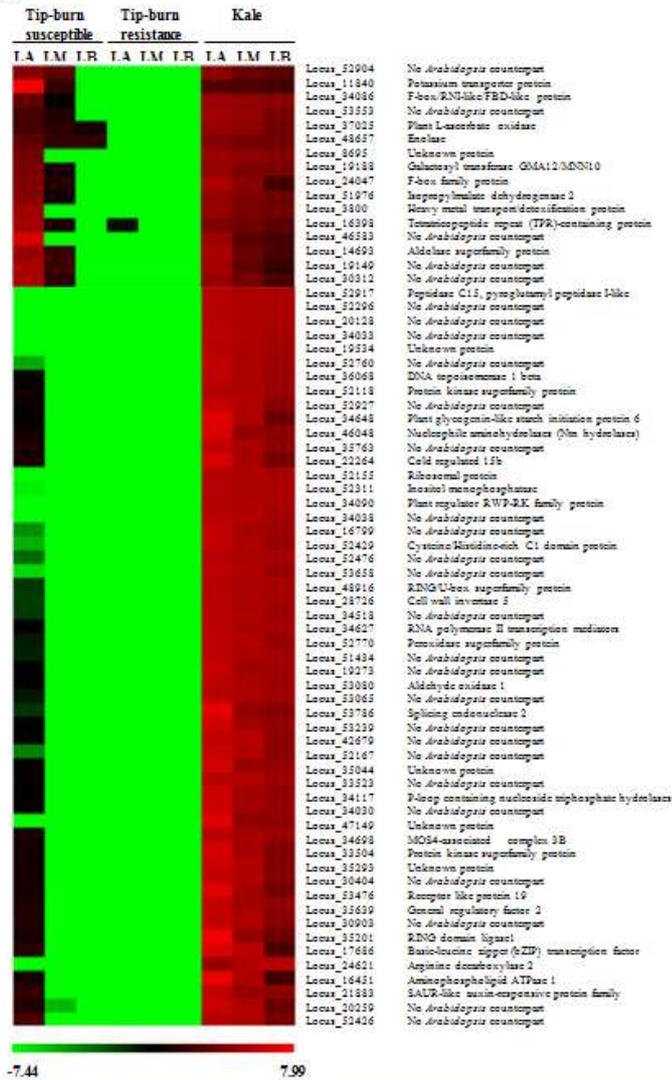


그림 5-91. 칼슘함량에 비례하여 발현이 변화한 165개 유전자의 hierarchical cluster 결과 (계속)

Cluster 6

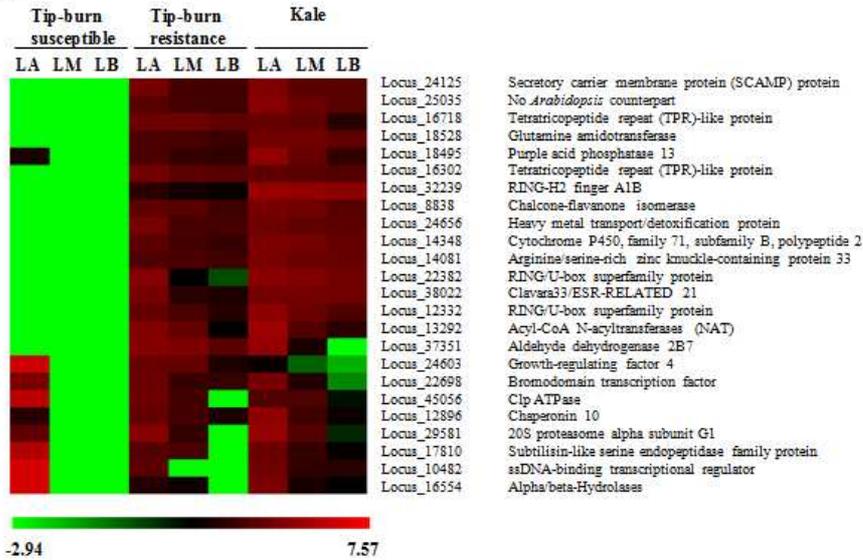


그림 5-91. 칼슘함량에 비례하여 발현이 변화한 165개 유전자의 hierarchical cluster 결과 (계속)

㉑ 석회결핍 표준형, 둔감형 및 케일 잎으로부터 얻은 transcriptome 결과 중 석회결핍 목표형질과 관련된 유전자를 선별하기 위해서 transporter, calcium-related protein, transcription factor의 발현 패턴을 따로 비교 분석하였다. Sequencing 결과에서 기능에 따라 transporter 510개, calcium-related gene 172개, transcription factor 324개 유전자를 분류할 수 있었다. 이 중 케일, 표준형 및 둔감형에서 공통적으로 발현되는 정도가 너무 낮아 의미가 없을 것으로 생각되는 클론을 제거하였다. 또한 잎에서의 칼슘이온 함량이 케일 > 석회결핍 둔감형 > 석회결핍 표준형 순으로 감소하므로, 유전자의 transcript level이 케일에서 가장 높고 표준형에서 가장 낮으며, 잎의 부위별로 비교하였을 때 bottom of leaf > middle of leaf > upper of leaf으로 보여지는 클론을 목표형질과 관련된 후보 유전자일 것으로 예상하였다. Transporter 9개, calcium-related gene 11개, transcription factor 13개를 석회결핍 형질과 관련된 유전자 후보군으로 분류하였다. 이 중 PDR2 (putative cation-transporting ATPase)는 plasma membrane에 localization하며 칼슘 이온을 세포 내로 수송하는 유전자이다. 칼슘이온 뿐만 아니라 potassium 수송 유전자의 발현도 의미 있게 변화하여 칼슘이온 농도에 따른 다른 양이온의 변화도 생각해볼 수 있는 결과이다. Transcription factor 중 At1g67120과 orthologous한 유전자로 ATPase의 기능을 하는 클론이나, calcium-related gene 중 plasma membrane type의 calcium-transporting ATPase 기능을 하는

유전자 또는 sodium/calcium exchanger protein은 기능 검증이 필요한 석회결핍 둔감형질과 관련된 유력한 후보 유전자로 발굴되었다. 따라서 양배추 석회결핍 표준형과 둔감형의 tip-burn에 대한 표현형 차이는 잎에서 칼슘 이온을 함유하는 정도에 차이가 있을 것으로 예상하였고, 잎의 부위별로 칼슘 이온을 포함한 양이온의 함량 변화와 칼슘 이온 수송 유전자 CAXs의 발현의 차이가 있음을 알아보았다. 현재까지 plasmamembrane에 위치하는 칼슘 이온 수송 유전자의 기능 연구가 활발히 진행되고 있기 때문에, 액포에 위치하는 칼슘 이온 수송 유전자의 기능 연구를 위하여 14개 유전자의 knock-out 돌연변이체 18개 라인을 분양받았다. 각 돌연변이체 별로 T-DNA가 삽입된 위치를 파악한 후 유전자 특이적 primer를 이용하여 homozygous line과 heterozygous line을 선발한 후 표현형 분석을 수행하였다 (표 5-22).

표 5-22. 칼슘 이온 수송 유전자 관련 애기장대 T-DNA knock-out 돌연변이체 목록 및 프라이머 서열

Gene name	T-DNA mutant number	Forward primer	Reverse primer
<i>AtCAX1</i>	SALK_002897	GGTGAATTGGACCTAACTAACG	GGGTCCACCAAGGCAACTTC
<i>AtCAX2</i>	SALK_037320	CACGTTGCGTTCAATAGACCAC	CAATAGGTGCAAATAATGGCGG
<i>AtCAX3</i>	SALK_042383	CATTCGGGAATGTGACAGAGC	AGAACGAAGAACTTCTGCCGA
<i>AtCAX4</i>	SALK_072116	GTTGAACGCGACTTGTGGAAAC	CTGAGCATGCTGGAGCCATCAT
	SALK_119863	GATCTCCAGAGTTCGTTGGGAGT	CGATTCTAGCGGTTGGGCAA
<i>AtCAX5</i>	CS871004	GGTTATATGCATGCAACGAGTGC	CTCACCGCTATGACTGTCCACG
<i>AtCAX7</i>	SALK_001913	TTCTACCTGGGCCTGAATAAG	GAGCAATTGCGGTCGATAAA
<i>AtCAX9</i>	SALK_079997	CACAAGTGCCCAAAGCAAGC	AGGTTTGGATGGATCCGGAG
	CS25426	CGACACCACAAGCTTGGAGACT	CTCGCATTGATCAGCATAAACC
<i>AtCAX10</i>	SALK_030725	CACCTAATGGTTGATCGTATCG	GAATGTGGCATTCCCTATGATCAG
<i>AtCAX11</i>	SALK_126991	GAAGGGCTTCCCAGGTTACTT	AAGCTATGACGCTGATCCCTC
<i>CAX-interacting protein 4</i>	SALK_073669	CACATTTGGATATCGGTTTATCTGG	GATCTATGCAGCGCCGTTTC
<i>CAX-interacting protein 2</i>	SALK_112215	CTATGCACCCGATTGTTTGCG	CCACATTCTCTCCGCATAACT
	SALK_035077	GACGGAGCTGTGTCACGGAGT	CCATACCGTGTACGGAAGTCC
<i>CAX-interacting protein 1</i>	SALK_125902	CCAAGCAACTCCAAGTGTGTA	AGCCACAGACACTCAGTGCAG
<i>AtACA4</i>	CS93990	GTAGTCAAGTAGCGTCAATGCAATC	GACAGAATGGTTCTGAAACACC
<i>AtACA11</i>	CS86277	GTAGTCAAGTAGCGTCAATGCAATC	GACAGAATGGTTCTGAAACACC
	SALK_112019	ACGGACAGTTTGATCAATGCC	TCATGCAATGCAGGAGCATCA

현재까지 plasmamembrane에 위치하는 칼슘 이온 수송 유전자의 기능 연구가 활발히 진행되고 있기 때문에, 액포에 위치하는 칼슘 이온 수송 유전자 *ACA4*의 기능 연구를 위하여 TILLING 돌연변이체 18개 라인을 분양받았다. 각 돌연변이체 별로 point mutation된 위치를 파악하고 아미노산 치환 여부를 조사하였다 (그림 5-92, 표 5-23). 아미노산이 치환된 mutant line은 11개였고, 이들은 모두 3번째 exon 부위가 mutation 된 것을 확인하였다. 이들의 표현형 분석을 위하여 현재 Col-0와 흡에 파종하여 성장 속도 및 각 기관의 표현형을 관찰하고 있다.

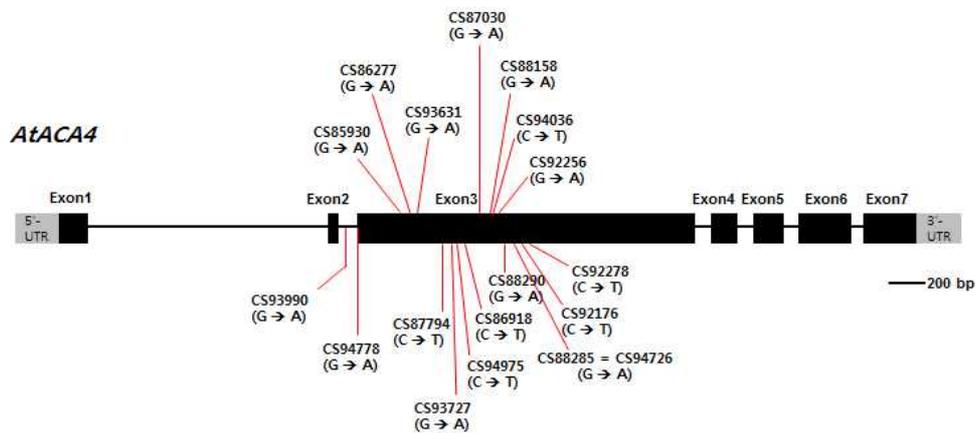


그림 5-92. *ACA4* 유전자의 구조 및 18개 TILLING mutant line의 polymorphic sequence 변화

표 5-23. *ACA4* 유전자의 TILLING mutant line 조사

TILLING mutant	Polymorphism	Polymorphic sequence	Amino acid change
CS85930	aca4a_98B5	G --> A	G --> S
CS86277	aca4a_102E8	G --> A	x
CS86918	aca4a_111F1	C --> T	x
CS87030	aca4a_112D6	G --> A	D --> N
CS87794	aca4a_126C4	C --> T	S --> F
CS88158	aca4a_132B7	G --> A	G --> R
CS88285	aca4a_134A5	G --> A	G --> E
CS88290	aca4a_134F5	G --> A	x
CS92176	aca4a_194H7	C --> T	x
CS92256	aca4a_195E8	G --> A	G --> D
CS92278	aca4a_196H2	C --> T	L --> F
CS93631	aca4a_187E4	G --> A	S --> N
CS93727	aca4a_188G7	G --> A	D --> N
CS93990	aca4a_191G6	G --> A	x
CS94036	aca4a_192B4	C --> T	x
CS94726	aca4a_202A4	G --> A	G --> E
CS94778	aca4a_203E2	G --> A	A --> T
CS94975	aca4a_206A2	C --> T	x

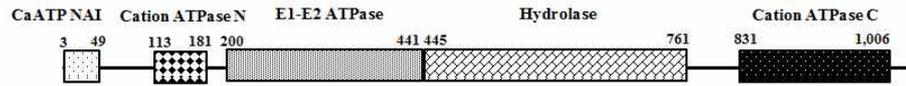
Homozygous line으로 선발된 돌연변이체를 장일조건에서 키우며 wild-type 과 비교해보았을 때 잎의 모양이 휘거나 (SALK_001913, SALK_079997, 및 SALK_112215), 잎 끝이 노랗게 변하였고 (SALK_112215), 잎이 진녹색을 띠는 표현형 (SALK_125902), 및 개체 크기가 작고 petiole의 길이가 짧으며 바깥쪽으로 휘는 표현형 (CS93990 및 CS86277)이 관찰되었다 (그림 5-93). Wild-type과 다른 표현형을 보인 유전자 중 지금까지 보고된 기능 연구가 덜 되어 있는 *AtACA4* 유전자의 기능 연구를 진행하였다.



그림 5-93. 칼슘 이온 수송 유전자 관련 애기장대 T-DNA knock-out 돌연변이체의 표현형 분석

*AtACA4*의 단백질은 1,006개의 아미노산으로 이루어져있고, CaATP NAI, cation ATPase N, E1-E2 ATPase, hydrolase 및 cation ATPase C 도메인으로 구성되어 있다 (그림 5-94A). Col-0 애기장대의 다양한 조직 및 기관에서 *AtACA4*의 발현양을 알아본 결과 24시간 imbibed seed, 7일된 유묘의 자엽 및 20일 자란 식물의 로젯잎에서 발현양이 높았고, 꽃 기관에서는 발현이 감소하였다 (그림 5-94B). 이를 통해 *AtACA4*의 발현은 특정시기 보다는 발아부터 노화시기 전 까지 계속됨을 알 수 있었다.

A



B

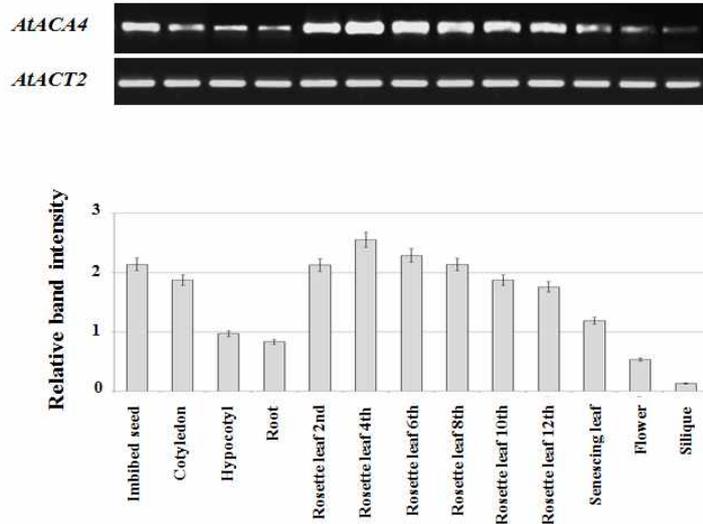


그림 5-94. AtACA4 단백질의 구조 (A) 및 애기장대 조직 · 기관별 *AtACA4*의 발현양 측정 (B) 발현양 측정을 위한 total RNA는 24시간 imbibed seed, 자엽, 하배축, 7일 자란 유묘, 20일 자란 식물체의 로젯잎, 35일 자란 식물체의 노화된 잎과 꽃, 45일 자란 식물체의 실리크를 이용하였고, *AtACT2*를 loading control로 사용하였다.

AtACA4 knock-out mutant는 intron에 T-DNA가 삽입된 CS93990과 세 번째 exon에 T-DNA가 삽입된 CS86277을 선발하였고, 식물세포의 주요한 칼슘 저장소인 액포에 위치하는 *AtCAXs*와 *AtACAs*의 발현양을 비교해보았다 (그림 5-95). 그 결과 *AtCAX1*, *AtCAX3*, *AtCAX7*, 및 *AtCAX9*에서 발현양이 변화하였고, 따라서 *AtACA4*의 기능이 redundant할 것으로 예상할 수 있었다.

AtACA4 knock-out mutant의 개체 크기가 Col-0보다 작았기 때문에 개체 크기에 영향을 준 요인이 세포의 크기 때문인지 세포 수의 차이인지를 알아보기 위해서 로젯잎의 표피세포를 관찰하였다 (그림 5-96A). CS86277과 CS93990 mutant 모두 Col-0보다 표피세포의 크기가 작아진 것을 관찰하였고 (그림 5-96B), 잎의 길이는 Col-0보다 mutant에서 증가하였지만 잎의 너비는 감소하였다. 또한 표피세포의 넓이도 50% 이상 감소한 결과를 관찰하였다 (그림 5-96C). 따라서 세포의 크기가 작아짐에 따라 *aca4* mutant 개체 크기 및 로젯잎의 모양이 바뀌었다고 예상할 수 있다.

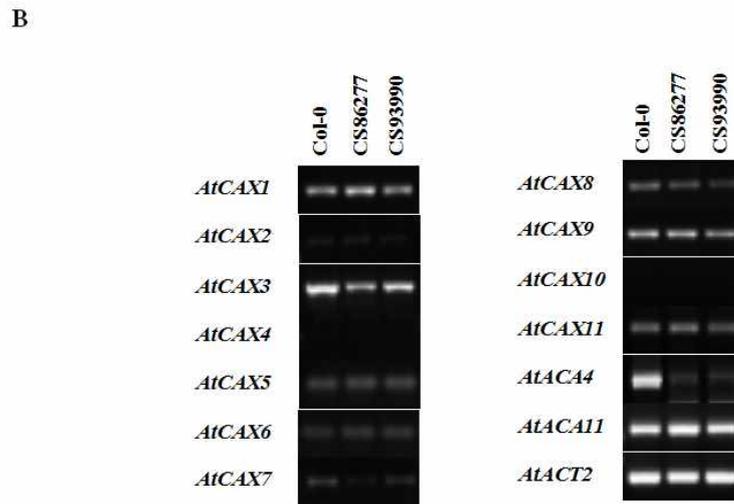
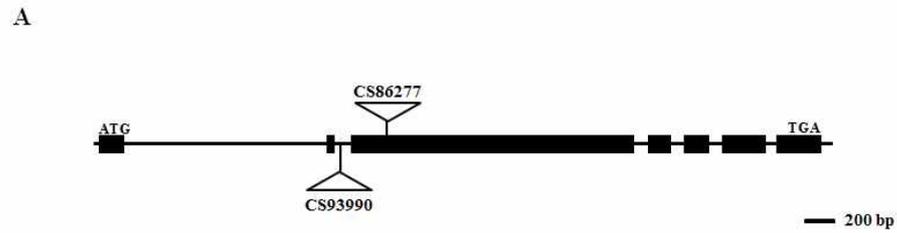


그림 5-95. *AtACA4* knock-out mutant (CS86277 and CS93990)의 genomic DNA상 T-DNA 삽입된 위치 (A) 및 Col-0와 *AtACA4* knock-out mutant에서 *AtCAXs*와 *AtACAs*의 발현양 분석 (B) RT-PCR을 위한 total RNA는 0.5X MS plate에서 약 2주간 자란 식물체에서 추출하였고, *AtACT2*를 control로 사용하였다.

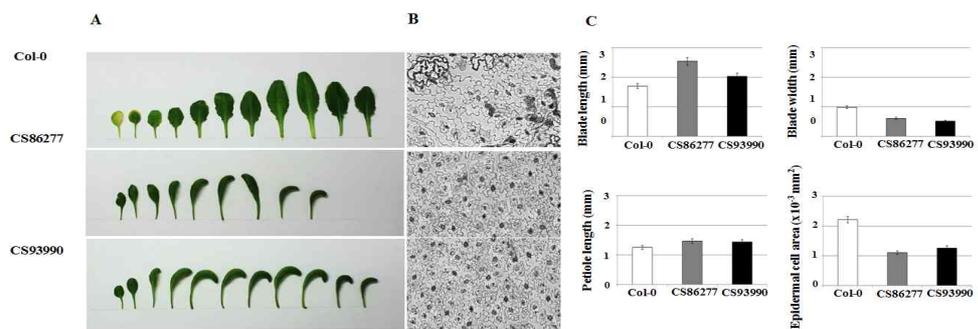


그림 5-96. *AtACA4* knock-out mutant (CS86277 and CS93990) 로켓잎의 표현형 분석

AtACA4 knock-out mutant의 전체적인 표현형이 생장과 관련이 있기 때문에 칼슘 이온의 수송에도 문제가 있을 수 있다. 따라서 Col-0와 *aca4* mutant의 shoot 조직을 이온크로마토그래피를 수행하여 양이온 함량을 비교해보았다. 그 결과 나트륨 이온과 칼륨 이온의 함량은 *aca4* mutant에서 많았고, 마그네슘 이온은 함량의 차이가 없었으며 칼슘 이온은 *aca4* mutant에서 20% 적었다 (그림 5-97). 따라서 *AtACA4*가 knock-out 됨으로써 칼슘 이온 함량이 변화하고, 그로인해 식물 생장에 여러 변화가 나타난 표현형일 것으로 예측되었다.

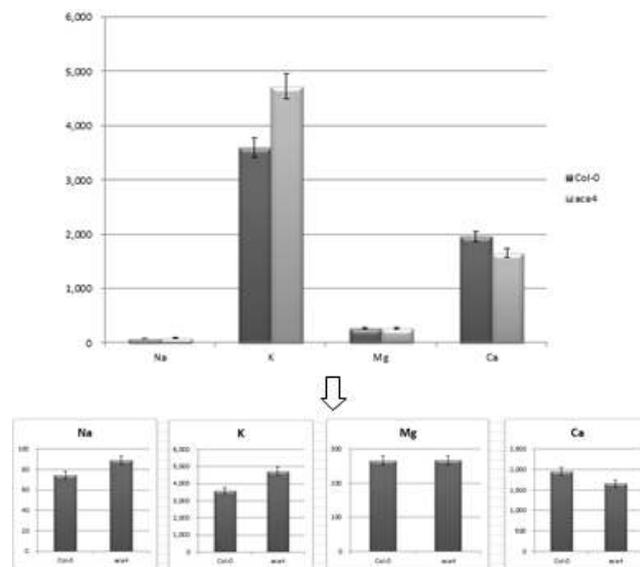


그림 5-97. *AtACA4* knock-out mutant (CS86277)의 양이온 함량 분석

*AtACA4*의 발현양이 24시간 imbibition 시킨 종자에서 높았기 때문에 종자의 크기와 무게 및 발아율을 비교해보았다 (그림 5-98). Col-0와 비교했을 때 *aca4* mutant의 종자 크기가 약 25%정도 작고 (그림 16B), 껍질 색이 연한 갈색을 갖는다. 종자 1,000개의 무게를 비교했을 때도 15%정도 감소하였다. 종자의 결함이 표현형으로 관찰되었기 때문에 발아율 실험을 수행한 결과 exon에 T-DNA가 삽입된 *aca4* mutant는 0.5X MS plate에서 100% 발아율에 도달하지 못하였고, 1 uM ABA를 처리하였을 때 Col-0와 intron에 T-DNA가 삽입된 *aca4* mutant의 발아율은 차이가 없었다. 따라서 *aca4* mutant에서 발아율이 낮은 것은 호르몬의 영향이 아닌 것으로 생각할 수 있었고, 50 mM의 NaCl을 처리하였을 때 *aca4* mutant가 100% 발아하지 못하였다. 따라서 *aca4* mutant 종자 크기 및 무게의 결함으로 100% 발아하지 못하였으며 NaCl과 관련되었음을 알 수 있었다.

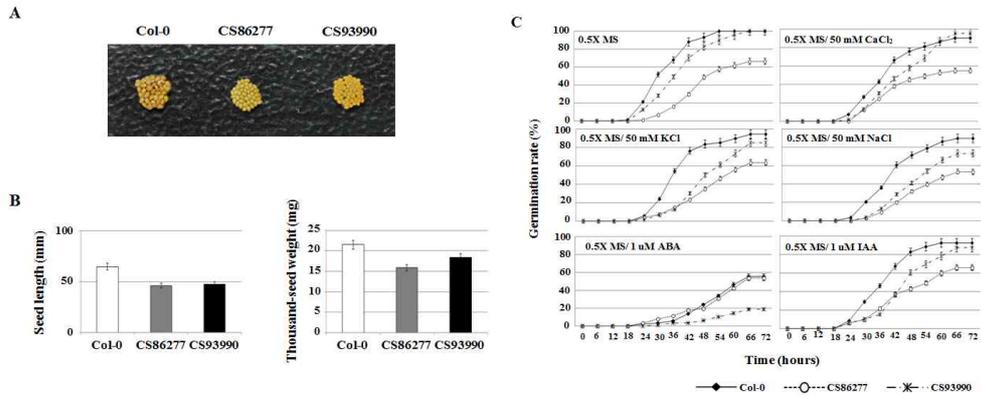


그림 5-98. *AtACA4* knock-out mutant (CS86277 and CS93990)의 종자관련 표현형 분석 및 발아율 측정

AtACA4 knock-out mutant의 종자관련 표현형이 wild-type과 달랐기 때문에 꽃 기관과 실리크를 관찰하였다. 꽃 기관의 구조가 달라진 것은 없었고, 실리크의 길이가 짧고 두꺼워졌다 (그림 5-99). 이것은 *AtACA4* 유전자가 knock-out됨으로 해서 보이는 2차적인 표현형일 것으로 생각한다.

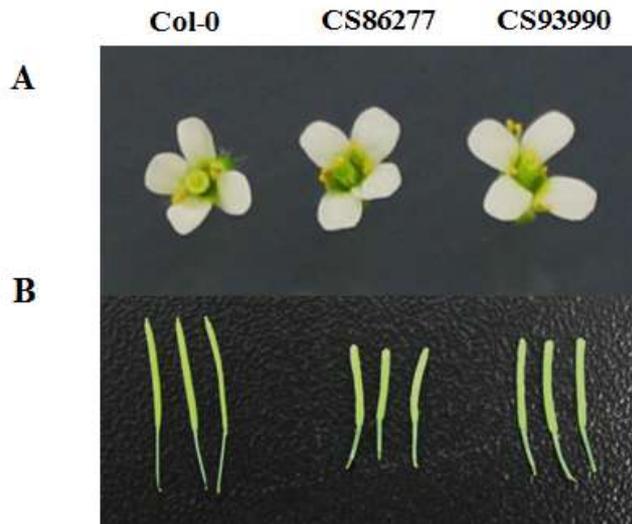


그림 5-99. *AtACA4* knock-out mutant (CS86277 and CS93990)의 꽃과 실리크 관찰

칼슘 이온 수송 유전자 *AtACA4*가 knock-out되면서 여러 성장 단계에서 wild-type과 다른 표현형이 관찰되었다. 따라서 transcriptome 분석을 통하여 발현의 차이를 보이는 유전자군을 선별하고자 하였다. 0.5X MS plate에서 약 2주간 자란 식물체의 shoot와 root로 나누어 실험을 진행하였고, 4개 샘플 데이터에서 각 조직별 wild-type을 기준으로 하여 유의하게 발현되었다고 판단되는 유전자를 *aca4* mutant에서 선별하였다. 추출의 방법은 각 gene의 read가 비울적으로 2배 이상 발현되거나 2배 이하의 발현되어 발현의 차이를 보

이는 유전자를 선택하는 fold change 방법과 adjust p-value인 FDR \leq 0.01 을 만족하는 t-Test 방법을 동시에 사용하였다. *aca4* mutant의 shoot 조직에서 특이적으로 발현이 증가한 유전자 681개, root에서만 발현이 증가한 유전자 1,365개, shoot와 root에서 공통으로 발현이 증가한 유전자 269개가 선발되었다. 반대로 *aca4* mutant의 shoot 조직에서 특이적으로 발현이 감소한 유전자 1,170개, root에서만 발현이 감소한 유전자 637개, shoot와 root에서 공통으로 발현이 감소한 유전자 503개가 선발되었다 (그림 5-100).

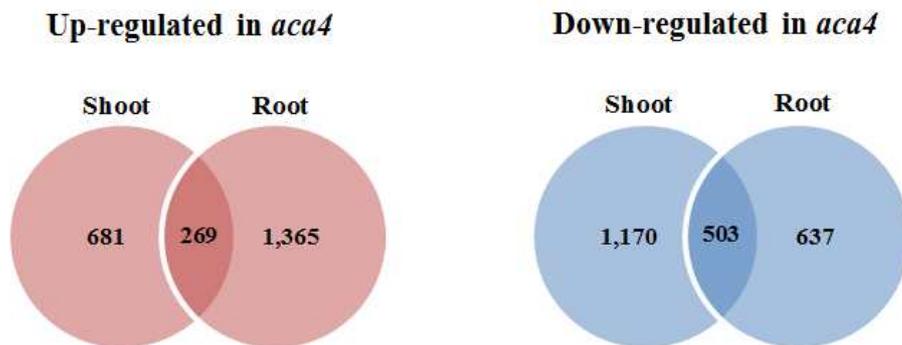


그림 5-100. *AtACA4* knock-out mutant (CS86277) transcriptome 분석 결과 shoot와 root에서 선발된 유전자군 벤다이어그램

발현이 증가한 유전자는 electron transport or energy pathways 및 structure molecule activity를 갖는 유전자가 많고, 발현이 감소한 유전자는 signal transduction, protein metabolism, transferase activity, kinase activity를 갖는 유전자가 많았다 (그림 5-101). 관찰된 표현형과 관련된 기능으로 nutrient transport, cell expansion, seed germination 관련, cell elongation, 식물 호르몬 및 꽃 기관 형성과 관련된 유전자의 발현을 비교하였다 (표 22). Nutrient transport와 관련된 plasma membrane type의 calcium-transporting ATPase 발현이 감소하였고, sulfate transporter와 phosphate translocator의 발현은 증가하였다. *aca4* mutant의 세포 크기가 감소하였는데 cell expansion에 관여하는 *AtWAK1*의 발현이 뿌리에서 감소하였다. 특히 cell elongation에 관여하는 많은 expansin 유전자 (*EXLB1*, *EXLA2*, *EXLA3*, *EXP3*, *EXPA5*, *EXPA7*, *EXPA10*, *EXPA11*, *EXPA17*, 및 *EXPA18*)의 발현이 shoot에서 감소하였다 (표 5-24).

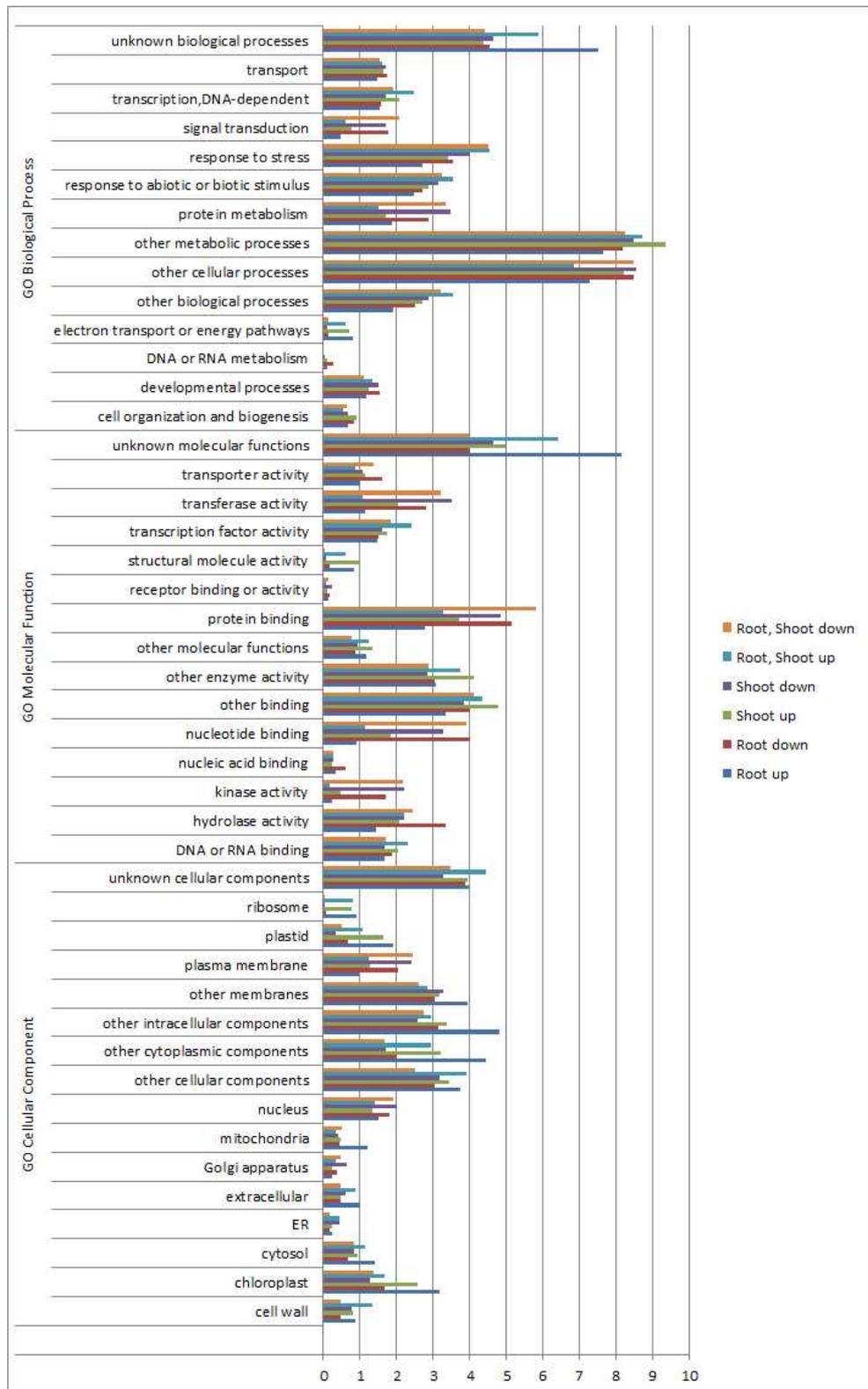


그림 5-101. *AtACA4* knock-out mutant (CS86277) transcriptome 분석 결과 shoot와 root에서 선발된 유전자의 GO annotation

표 5-24. 칼슘 이온 수송 유전자 *aca4*에서 발현양이 크게 변한 유전자 목록

Accession	Description	log ₂ Fold Change	
		Shoot	Root
Mineral nutrient transport			
At3g63380	Calcium-transporting ATPase	1.09	0.96
At3g22910	Calcium-transporting ATPase, plasma membrane-type	-1.58	-1.65
At1g78000	Sulfate transporter (Sultr1; 2)	1.51	0.14
At4g37640	Calcium-transporting ATPase 2	-1.66	-0.84
At1g61800	Phosphate translocator	1.22	6.92
At4g08620	Sulfate transporter family protein	-0.01	2.39
At1g27770	Calcium-transporting ATPase, plasma membrane-type	-2.90	-1.67
At3g28600	ATPase 3	-2.82	-2.43
At1g17260	Plasma membrane ATPase	-0.39	-4.14
At1g01790	Potassium efflux antiporter protein	-0.60	-1.49
At5g17850	Sodium/calcium exchanger protein	-2.24	-1.70
At3g58810	Cation efflux family protein	0.99	1.29
Cell expansion protein			
At1g21250	Arabidopsis thaliana wall-associated receptor kinase 1 (WAK1)	1.99	-1.15
At3g29810	Arabidopsis thaliana COBRA-like protein 2 (COBL2)	0.82	1.08
At1g26250	Arabidopsis thaliana Proline-rich extensin-like family protein	0.64	1.57
Seed			
At5g44120	CRA1, 12S seed storage protein CRU4	1.59	-0.14
At2g15050	LTP7, non-specific lipid-transfer protein 7	0.39	3.03
At3g18280	LTP, protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein	2.82	1.39
Shoot meristem & leaf primordia			
At2g45190	YAB, Axial regulator YABBY 1	0.41	3.66
Root			
At1g77690	LAX3, auxin transporter-like protein 3	-1.70	-0.04
Architecture & cell elongation			
At3g02150	Arabidopsis thaliana transcription factor TCP13 (PTF1)	1.23	3.05
At1g30210	TCP family transcription factor 24, putative, expressed	0.08	-1.96
At5g60970	TCP family transcription factor 5, putative, expressed	1.34	-0.14
At1g21310	EXT3, extensin 3	2.31	0.27
At1g76930	EXT4, extensin 4	2.60	0.37
At3g45970	Arabidopsis thaliana expansin-like A3 (EXLA3)	-1.83	-1.37
At2g18660	Arabidopsis thaliana EG45-like domain-containing protein 2 (PNP-A)	2.14	-0.14
At3g45960	Arabidopsis thaliana expansin-like A3 (EXLA3)	-2.88	-2.14
At4g38400	Arabidopsis thaliana expansin-like A2 (EXLA2)	-1.39	-1.07
At3g29030	Arabidopsis thaliana expansin A5 (EXPA5)	-1.50	-0.14
At1g20190	Arabidopsis thaliana expansin-A11 (EXPA11)	-1.65	0.01
At4g17030	Arabidopsis thaliana expansin-like B1 (EXLB1)	-2.82	0.30
At2g37640	Arabidopsis thaliana expansin-A3 (EXP3)	-1.55	0.46
At1g26770	Arabidopsis thaliana expansin A10 (EXPA10)	0.60	1.16
At2g39700	Arabidopsis thaliana expansin A4 (EXPA4)	-0.26	1.40
At1g12560	Arabidopsis thaliana expansin A7 (EXPA7)	-0.01	2.31
At1g62980	Arabidopsis thaliana expansin A18 (EXPA18)	-0.01	2.64
At4g01630	Arabidopsis thaliana putative expansin-A17 (EXPA17)	-0.01	2.44

Hormone			
At3g23050	auxin-responsive protein IAA7	-1.35	-0.01
At4g14550	auxin-responsive protein IAA14	-1.21	0.40
At3g15540	auxin-responsive protein IAA19	-2.31	-0.91
At1g04240	<i>Arabidopsis thaliana</i> auxin-responsive protein IAA3 (SHY2)	-0.55	-1.54
Flower organ			
At5g20240	PI, Floral homeotic protein PISTILLATA	1.52	1.63
At3g58780	SHP1, agamous-like MADS-box protein AGL1	-0.94	-7.05
Stomata			
At5g53210	SPCH, transcription factor SPEECHLESS	1.34	0.86

Transcriptome 분석을 통하여 칼슘 이온 수송 유전자 및 세포 신장과 관련된 유전자군의 발현이 변화한 것을 알 수 있었고, AtACA4 단백질과 상호작용하는 단백질을 선별하기 위하여 yeast two-hybrid를 수행하였다. AtACA4 단백질이 transmembrane helix domain을 갖고 있기 때문에 cytosolic한 부분 3 곳을 bait로 이용하였다 (그림 5-102).

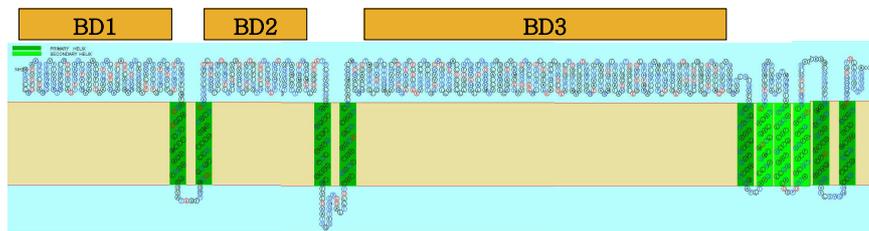


그림 5-102. Yeast two-hybrid에 이용한 AtACA4 단백질의 bait 1, 2, 3

Bait 3개를 이용하여 *Arabidopsis* seedling library에서 AD transformation을 통해 얻은 107개 (BD1 33개, BD2 41개, BD3 33개)를 선별하여 염기서열을 분석한 결과 각각의 bait와 interaction할 것으로 예상되는 유전자 BD1은 17개, BD2는 24개, BD3은 34개를 얻었다 (그림 5-103). Gene to gene in yeast 단계를 통하여 bait2와 interaction할 것으로 생각되는 유전자 8개, bait3과 interaction할 것으로 생각되는 유전자 9개를 얻었다 (표 5-25).

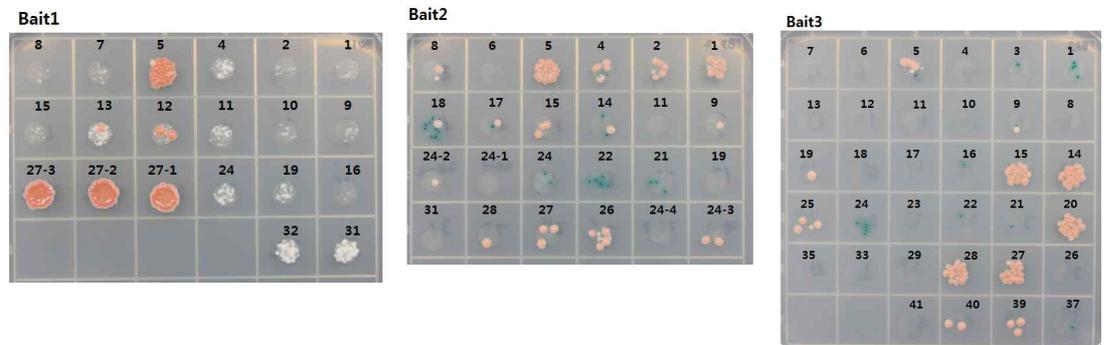


그림 5-103. Yeast two-hybrid 과정으로 AtACA4 단백질을 BD, *Arabidopsis* seedling library를 AD로 이용하여 선별한 후보 단백질 75개

표 5-25. Yeast two-hybrid를 통해 선발한 AtACA4와 상호작용 할 것으로 예상되는 후보 단백질 목록

	Bait	At locus	Predicted gene function
BD2	2-4	At3g47600	Arabidopsis thaliana myb domain protein 94 (MYB94)
	2-14	At1g11410	Arabidopsis thaliana putative S-locus lectin protein kinase
	2-17	At5g15200	Arabidopsis thaliana ribosomal protein S4
	2-18	At1g51950	Arabidopsis thaliana auxin-responsive protein IAA18 (IAA18)
	2-21	At5g52760	Arabidopsis thaliana heavymetal transport/detoxification super family protein
	2-22-1	At1g07600	Arabidopsis thaliana mRNA for metallothionein-like protein
	2-24-1	At3g59900	Arabidopsis thaliana auxin-inducible protein (ARGOS)
	2-27	At5g54160	Arabidopsis thaliana Quercetin 3-O-methyltransferase 1 (OMT1)
BD3	3-1	At5g16300	Arabidopsis thaliana Vps51/Vps67 family (components of vesicular transport) protein
	3-3-1	At5g42680	Arabidopsis thaliana uncharacterized protein
	3-5	At5g11090	Arabidopsis thaliana serine-rich protein-like protein
	3-9	At3g60690	Arabidopsis thaliana SAUR-like auxin-responsive protein
	3-16	At5g13440	Arabidopsis thaliana Ubiquinol-cytochrome C reductase iron-sulfur subunit
	3-21	At1g29930	Arabidopsis thaliana putative photosystem II type I chlorophyll a/b binding protein
	3-22	At5g01530	Arabidopsis thaliana chlorophyll a-b binding protein CP29.1 (LHCB4.1)
	3-24	At4g02380	Arabidopsis thaliana senescence-associated protein (SAG21)
	3-37	At4g37200	Arabidopsis thaliana thioredoxin-like protein HCF164

후보로 선발된 유전자 중 transcription factor와 auxin과 관련된 단백질을 우선 BiFC construct 제작하여 담배에 infiltration 후 단백질을 추출하여 N-terminal과 C-terminal에 tagging되어 있는 HA와 Myc 항체를 이용하여 western blot을 수행하였다 (그림 5-104). *In vivo* 상에서도 각 단백질이 interaction하는지 확인하기 위하여 담배에 infiltration된 잎의 YFP signal을 confocal 현미경으로 관찰하였다 (그림 5-105). 그 결과 4개 단백질 모두 AtACA4와 interaction 하였으며 특히 AtARGOS와 AtSAUR의 interaction 정도가 강하였다. 따라서 지금까지의 결과로 액포에 위치하는 AtACA4는 칼슘의 상위 신호를 전달받아 auxin 등 식물 호르몬과 관련된 전반적인 식물 생장에 영향을 미치는 것으로 예상할 수 있다.

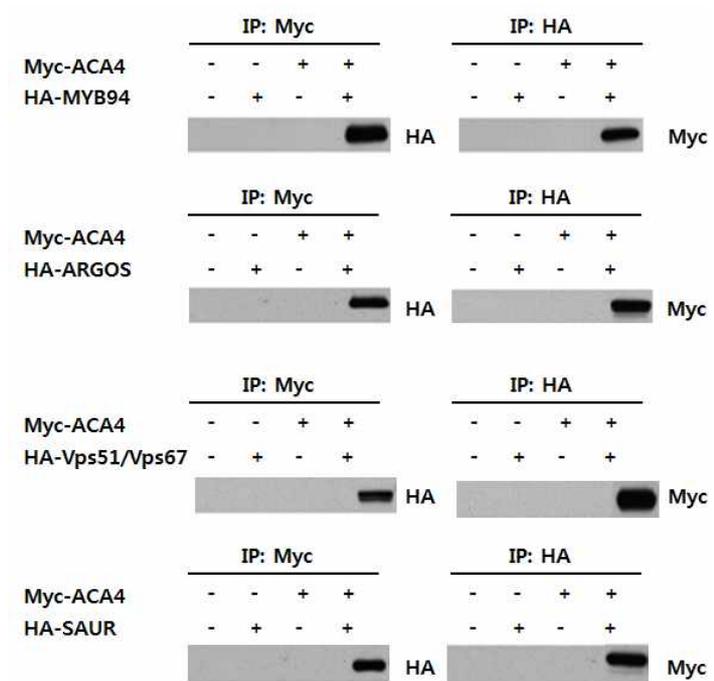


그림 5-104. Yeast two-hybrid로 선발된 4개 단백질과 AtACA4 단백질이 상호작용하는지 *in vitro* 알아보기 위한 immunoprecipitation 결과임

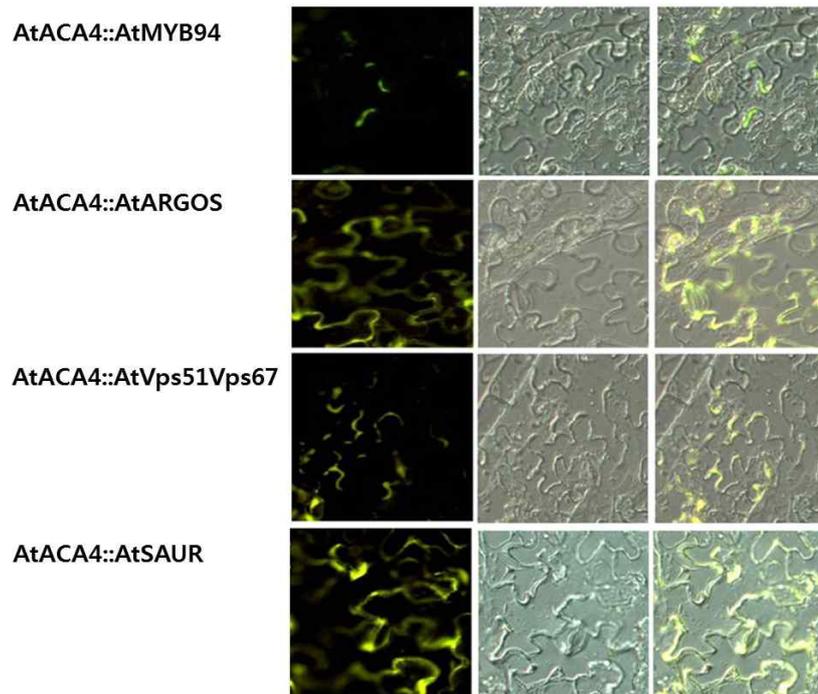


그림 5-105. BiFC 실험 결과로 yeast two-hybrid로 선발된 4개 단백질과 AtACA4 단백질이 상호작용하는지 담배에서 *in vivo*로 알아본 결과임

다. 배추좀나방저항성 관련 유용 유전자군 발굴

① 저항성 유전자 바이오맵 구축

㉞ 기존에 보고되어있는 병충해저항성 (질병저항성) 유전자 및 글루코시노레이트 (Glucosinolate) 대사관련 유전자의 전체 pool을 확보하고 확보된 유전자간 또는 유전자와 화합물간, 상호관계를 파악하고자 Bio Googling 방법으로 전체 바이오 맵 (그림 5-106)을 구축하였으며 관련 연구데이터는 홈페이지에 (www.BioMapstore.com) 보관중이며 1년간 열람가능하다.

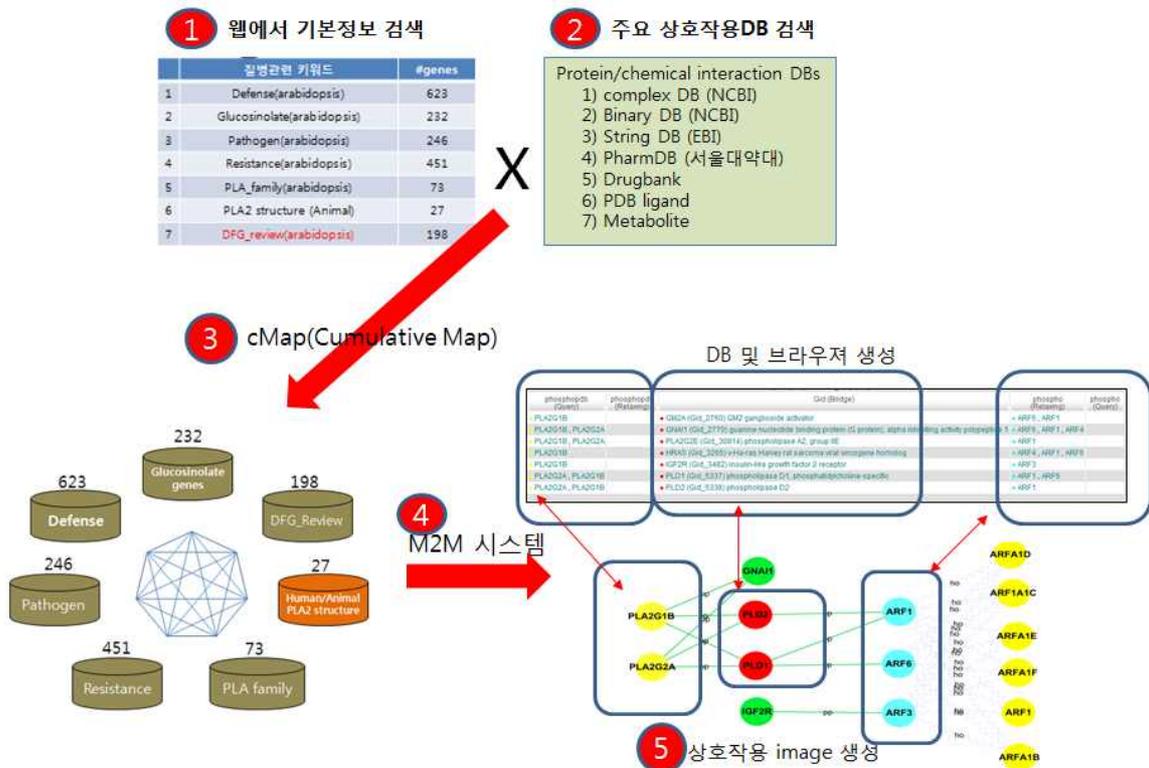


그림 5-106. 7가지 질병연관 모음 맵 생성 및 DB 생성

질병연관 유전자 (방어기작, 글루코시노레이트, 병 저항성, 저항성, PLA2 family, PLA 구조 및 인삼에서 분리동정된 방어기작 관련 유전자리스트) 등을 총 망라하여 데이터 베이스를 구축 (1) 후 주요 상호작용 DB를 단백질수준 및 화합물, 대사물질 수준에서 검색 (2) 하여 (1) 과 (2)에서 얻어진 상호관계 맵을 구축 (3). 이를 바탕으로 구축된 맵과 맵간의 관계인 Map to Map (M2M)을 도식화 할 수 있음 (4)

㉞ 구축되어진 데이터베이스는 아래 flow-chart에서 제시된 방법에의해 해석될 수 있으며, 각 키워드에 해당하는 부분을 클릭하여 얻어지는 유전자 집단은 개별적으로 다시 세분화하여 정리하였다.

ㄱ. 방어기작 관련 유전자 Cumulated map (cMAP): “Defense” 라는 키워드로 보고된 모든 저항성 관련 유전자를 대표적인 모델식물인 애기장대에서 검색하여 그에 관한 총 623개의 유전자를 찾았으며 그 일부는 아래와 같다.

cMap 2 cMap		cMap - Defense(arabidopsis)													
Back Main		Clear Query		Enter a symbol		Search Map (takes a few seconds)		Search Indirect		Search Bridge		Search Direct		Search Biori	
cMap ID	Gene ID	Symbol	Description	Disease Evidence (PM)	Interaction Stat				PPI		PCI				
					indirect	bridge	direct	Pfam	Chain	Pf_Ch		Chain			
Defense(arabidopsis)	Gid_3767941	(homolog)	LCR76	putative defensin-like protein 9		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defense(arabidopsis)	Gid_3768007	(homolog)	LCR75	defensin-like protein 7		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defense(arabidopsis)	Gid_3768036	(homolog)	LCR73	defensin-like protein 8		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defense(arabidopsis)	Gid_5007688	(homolog)	AT1G12663	hypothetical protein		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defense(arabidopsis)	Gid_814714	(homolog)	WOL	histidine kinase 4		6	1	1	6	0	0	0	0	0	0
Defense(arabidopsis)	Gid_814741	(homolog)	LCR69	defensin-like protein 2	PM_17317660	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defense(arabidopsis)	Gid_814743	(homolog)	PDF2.1	defensin-like protein 4		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defense(arabidopsis)	Gid_814744	(homolog)	LCR68	defensin-like protein 1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defense(arabidopsis)	Gid_814745	(homolog)	LCR72	defensin-like protein 10		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defense(arabidopsis)	Gid_814803	(homolog)	WHY3	ssDNA-binding transcriptional regulator	PM_15708347	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defense(arabidopsis)	Gid_814822	(homolog)	GSTF3	glutathione S-transferase 16	PM_17317660	0	0	0	3	0	0	0	0	2	0
Defense(arabidopsis)	Gid_814836	(homolog)	MED8	mediator subunit 8	PM_19671879	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Defense(arabidopsis)	Gid_815147	(homolog)	AT2G05940	kinase-like protein		0	0	0	12	0	0	0	0	0	0
Defense(arabidopsis)	Gid_815414	(homolog)	MRP11	multidrug resistance-associated protein 11		0	0	0	9	0	0	0	0	0	0
Defense(arabidopsis)	Gid_815864	(homolog)	ALD1	AGD2-like defense response protein 1	PM_15447647, PM_18266921	0	0	0	0	0	0	0	0	21	0
Defense(arabidopsis)	Gid_815893	(homolog)	AT2G14080	TIR-NBS-LRR class disease resistance protein		0	0	0	20	0	0	0	0	0	0
Defense(arabidopsis)	Gid_815941	(homolog)	SRP2	serpin-Z2		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Defense(arabidopsis)	Gid_815943	(homolog)	LURP1	LURP1 protein	PM_18346188	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defense(arabidopsis)	Gid_815949	(homolog)	PR1	pathogenesis-related protein 1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defense(arabidopsis)	Gid_815990	(homolog)	AT2G15010	putative thionin-2.3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defense(arabidopsis)	Gid_815997	(homolog)	RLP19	receptor like protein 19		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defense(arabidopsis)	Gid_816001	(homolog)	AT2G15130	basic secretory protein family protein		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defense(arabidopsis)	Gid_816005	(homolog)	AT2G15170	basic secretory protein family protein		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defense(arabidopsis)	Gid_816011	(homolog)	AT2G15220	basic secretory protein family protein		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defense(arabidopsis)	Gid_816085	(homolog)	MEE14	maternal effect embryo arrest 14 protein		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ㄴ. 저항성 관련 유전자 cMAP: “Resistance” 라는 키워드로 보고된 모든 저항성 관련 유전자를 대표적인 모델식물인 애기장대에서 검색하여 그에 관한 총 451개의 유전자를 찾았으며 그 일부는 아래와 같다.

cMap 2 cMap		cMap - Resistance(arabidopsis)													
Back Main		Clear Query		insect		Search Map (takes a few seconds)		Search Indirect		Search Bridge		Search Direct		Search Biori	
cMap ID	Gene ID	Symbol	Description	Disease Evidence (PM)	Interaction Stat				PPI		PCI				
					indirect	bridge	direct	Pfam	Chain	Pf_Ch		Chain			
Resistance(arabidopsis)	Gid_2745551	(homolog)	AT2G20142	Toll-Interleukin-Resistance domain-containing protein		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_2745746	(homolog)	AT1G07730	disease resistance-responsive, dirigent domain-containing protein		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_2769734	(homolog)	AT3G58090	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_814860	(homolog)	AT2G01320	ABC transporter G family member 7		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_814863	(homolog)	WRKY3	WRKY DNA-binding protein 3	PM_12704242, PM_18570649	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_815414	(homolog)	MRP11	multidrug resistance-associated protein 11		0	0	0	9	0	0	0	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_815864	(homolog)	ALD1	AGD2-like defense response protein 1	PM_15447647, PM_18266921	0	0	0	0	0	0	0	0	21	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_815893	(homolog)	AT2G14080	TIR-NBS-LRR class disease resistance protein		0	0	0	20	0	0	0	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_815943	(homolog)	LURP1	LURP1 protein	PM_18346188	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_815949	(homolog)	PR1	pathogenesis-related protein 1	PM_1392589, PM_15293050...	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_816200	(homolog)	MEE15	tetracycline transporter-like protein 1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_816201	(homolog)	AT2G16980	major facilitator protein		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_816232	(homolog)	HSK	homoserine kinase	PM_15986928, PM_19622802	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_816249	(homolog)	MLO7	MLO-like protein 7		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_816254	(homolog)	MLO8	MLO-like protein 8		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_816290	(homolog)	ARAC1	Rac-like GTP-binding protein ARAC1		4	0	0	7	105	6	128	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_816291	(homolog)	HK1	histidine kinase 1	PM_18441212	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_816330	(homolog)	MPK7	mitogen-activated protein kinase 7	PM_17908155	2	1	1	14	19	2	509	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_816341	(homolog)	COAD	phosphopantetheine adenylyltransferase	PM_18621975	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_816428	(homolog)	HMA4	Cd2+/Zn2+-exporting ATPase	PM_15670847	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_816550	(homolog)	RIN13	RPM1 interacting protein 13	PM_15722472, PM_17158583	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_816645	(homolog)	AT2G21100	disease resistance-responsive, dirigent domain-containing protein		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_816646	(homolog)	AT2G21110	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_816762	(homolog)	SR1	calmodulin-binding transcription activator 3		1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_816765	(homolog)	CYP79B3	tryptophan N-hydroxylase 2	PM_16167893, PM_19095898	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resistance(arabidopsis)	Gid_816847	(homolog)	NRAMP3	metal transporter Nramp3	PM_19121106	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

㉔. 병원균 관련 유전자 cMAP: “Pathogen” 라는 키워드로 보고된 모든 저항성 관련 유전자를 대표적인 모델식물인 애기장대에서 검색하여 그에 관한 총 246개의 유전자를 찾았으며 그 일부는 아래와 같다.

cMap 2 cMap		cMap - Pathogen(arabidopsis)											
Back Main		Clear Query Enter a symbol		Search Map (takes a few seconds)		Search Indirect		Search Bridge		Search Direct		Search Biori	
cMap ID	Gene ID	Symbol	Description	Disease Evidence (PM)	Interaction Stat			PPI			PCI		
					indirect	bridge	direct	Pfam	Chain	Pf_Ch		Chain	
Pathogen(arabidopsis) Gid_815862	(homolog) SERK4	serk4	somatic embryogenesis receptor kinase 4		0	0	0	4	0	0	0	0	
Pathogen(arabidopsis) Gid_815943	(homolog) LURP1	LURP1	LURP1 protein	PM_18346188	0	0	0	0	0	0	0	0	
Pathogen(arabidopsis) Gid_815949	(homolog) PR1	PR1	pathogenesis-related protein 1	PM_1392589, PM_15293050...	0	0	0	0	0	0	0	0	
Pathogen(arabidopsis) Gid_816235	(homolog) CPK6	CPK6	Calcium-dependent protein kinase family protein		0	0	0	7	0	0	0	0	
Pathogen(arabidopsis) Gid_816290	(homolog) ARAC1	ARAC1	Rac-like GTP-binding protein ARAC1		4	0	0	7	105	6	128		
Pathogen(arabidopsis) Gid_816330	(homolog) MPK7	MPK7	mitogen-activated protein kinase 7	PM_17908155, PM_17933903	2	1	1	14	19	2	509		
Pathogen(arabidopsis) Gid_816436	(homolog) FRK1	FRK1	senescence-induced receptor-like serine/threonine-protein kinase		0	0	0	29	0	0	0	0	
Pathogen(arabidopsis) Gid_816847	(homolog) NRAMP3	NRAMP3	metal transporter Nramp3	PM_19121106	0	0	0	1	0	0	0	0	
Pathogen(arabidopsis) Gid_816931	(homolog) CNGC6	CNGC6	cyclic nucleotide gated channel	PM_11782485	0	0	0	0	0	0	0	0	
Pathogen(arabidopsis) Gid_816997	(homolog) CNGC14	CNGC14	cyclic nucleotide gated channel	PM_11782485	0	0	0	0	0	0	0	0	
Pathogen(arabidopsis) Gid_817039	(homolog) WRKY60	WRKY60	putative WRKY transcription factor 60	PM_10785665, PM_12068113...	4	1	1	0	0	0	0	0	
Pathogen(arabidopsis) Gid_817049	(homolog) SDF2	SDF2	stromal cell-derived factor 2-like protein		4	0	0	3	0	0	0	13	
Pathogen(arabidopsis) Gid_817197	(homolog) PLA2A	PLA2A	phospholipase A 2A	PM_16297072	0	0	0	0	0	0	0	0	
Pathogen(arabidopsis) Gid_817293	(homolog) AT2G27480		putative calcium-binding protein CML48		0	0	0	0	0	0	0	0	
Pathogen(arabidopsis) Gid_817372	(homolog) CNGC15	CNGC15	cyclic nucleotide-gated channel 15	PM_11782485	0	0	0	0	0	0	0	0	
Pathogen(arabidopsis) Gid_817494	(homolog) GSTU5	GSTU5	glutathione S-transferase 103-1A	PM_12090627, PM_9449849	0	0	0	0	0	0	0	0	
Pathogen(arabidopsis) Gid_817519	(homolog) ASA2	ASA2	anthranilate synthase component I-2	PM_1392592	0	0	0	8	0	0	0	0	
Pathogen(arabidopsis) Gid_817575	(homolog) WRKY25	WRKY25	putative WRKY transcription factor 25	PM_15990873, PM_17214894...	3	1	1	1	0	0	0	0	
Pathogen(arabidopsis) Gid_817708	(homolog) CPK24	CPK24	calcium-dependent protein kinase 24		0	0	0	7	0	0	0	0	
Pathogen(arabidopsis) Gid_818190	(homolog) AT2G36180		putative calcium-binding protein CML31		0	0	0	0	0	0	0	0	
Pathogen(arabidopsis) Gid_818429	(homolog) WRKY33	WRKY33	putative WRKY transcription factor 33	PM_10785665, PM_12704242...	2	1	1	2	0	0	0	0	
Pathogen(arabidopsis) Gid_818435	(homolog) LTP2	LTP2	non-specific lipid-transfer protein 2		0	0	0	0	0	0	0	0	
Pathogen(arabidopsis) Gid_818476	(homolog) CPK20	CPK20	calcium-dependent protein kinase 20		0	0	0	7	0	0	0	0	
Pathogen(arabidopsis) Gid_818549	(homolog) BIK1	BIK1	serine/threonine-protein kinase BIK1	PM_16339855	2	2	1	8	0	0	0	0	
Pathogen(arabidopsis) Gid_818581	(homolog) COI1	COI1	Coronatine-insensitive protein 1	PM_12509529, PM_16732289...	17	1	1	18	14	0	3		

㉕. 글루코시노레이트 관련 유전자 cMAP: “Glucosinolate” 라는 키워드로 보고된 모든 저항성 관련 유전자를 대표적인 모델식물인 애기장대에서 검색하여 그에 관한 총 232개의 유전자를 찾았으며 그 일부는 아래와 같다.

cMap 2 cMap		cMap - Glucosinolate(arabidopsis)											
Back Main		Clear Query Enter a symbol		Search Map (takes a few seconds)		Search Indirect		Search Bridge		Search Direct		Search Biori	
cMap ID	Gene ID	Symbol	Description	Disease Evidence (PM)	Interaction Stat			PPI			PCI		
					indirect	bridge	direct	Pfam	Chain	Pf_Ch		Chain	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100193712	(homolog) PCO109372	LOC100193712	LOC100193712	N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100245351	(homolog) LOC100245351	cytochrome P450 83B1-like		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100249057	(homolog) LOC100249057	isoflavone 2'-hydroxylase-like		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100249138	(homolog) LOC100249138	isoflavone 2'-hydroxylase-like		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100249616	(homolog) LOC100249616	phenylalanine N-monooxygenase-like		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100250484	(homolog) LOC100250484	cytochrome P450 83B1-like		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100250687	(homolog) LOC100250687	uncharacterized LOC100250687		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100251035	(homolog) LOC100251035	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 1-like		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100252777	(homolog) LOC100252777	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 1-like		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100252786	(homolog) LOC100252786	nitrile-specifier protein 5-like		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100253077	(homolog) LOC100253077	medium-chain-fatty-acid-CoA ligase-like		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100254242	(homolog) LOC100254242	isoflavone 2'-hydroxylase-like		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100255106	(homolog) LOC100255106	uncharacterized LOC100255106		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100257928	(homolog) LOC100257928	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 1-like		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100260154	(homolog) LOC100260154	phenylalanine N-monooxygenase-like		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100260341	(homolog) LOC100260341	UDP-glycosyltransferase 74B1-like		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100260432	(homolog) LOC100260432	UDP-glycosyltransferase 74B1-like		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100260935	(homolog) LOC100260935	cytochrome P450 83B1-like		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100266526	(homolog) LOC100266526	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 3-like		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100280499	(homolog) LOC100280499	2-isopropylmalate synthase B		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100281397	(homolog) LOC100281397	acyl-activating enzyme 11		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100283661	(homolog) LOC100283661	bile acid sodium symporter		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100284183	(homolog) LOC100284183	indole-3-acetate beta-glucosyltransferase		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100284450	(homolog) LOC100284450	disulfide oxidoreductase/monooxygenase		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	
Glucosinolate(arabidopsis) Gid_100284902	(homolog) LOC100284902	3-isopropylmalate dehydratase large subunit 2		N/A	0	0	0	0	0	0	0	0	

□. Phospholipase A 관련 유전자 cMAP

Back		Main		Clear Query		Enter a symbol		Search Map (takes a few seconds)		Search Indirect		Search Bridge		Search Direct		Search Biori			
cMap ID	Gene ID	Symbol	Description	Disease Evidence (PM)	Interaction Stat	PPI	PCI												
					indirect	bridge	direct	Pfam	Chain	Pf_Ch	Chain								
DFG_review(arabidopsis)	Gid_814770 * (homolog)	GSTZ1	glutathione S-transferase zeta-class 1		1	1	0	0	0	0	0	0	5						
DFG_review(arabidopsis)	Gid_814822 * (homolog)	GSTF3	glutathione S-transferase 16		0	0	0	3	0	0	0	2							
DFG_review(arabidopsis)	Gid_814828 * (homolog)	RNS1	ribonuclease 1		0	0	0	0	0	0	0	3							
DFG_review(arabidopsis)	Gid_815626 * (homolog)	CRCK3	calmodulin-binding receptor-like cytoplasmic kinase 3		0	0	0	0	0	0	0	0							
DFG_review(arabidopsis)	Gid_816061 * (homolog)	AT2G15680	calmodulin-like protein 1		0	0	0	0	0	0	0	0							
DFG_review(arabidopsis)	Gid_816390 * (homolog)	AT2G18750	Calmodulin-binding protein		0	0	0	0	0	0	0	0							
DFG_review(arabidopsis)	Gid_816540 * (homolog)	AT2G20210	leucine-rich repeats-ribonuclease inhibitor domain-containing protein		0	0	0	0	0	0	0	0							
DFG_review(arabidopsis)	Gid_816762 * (homolog)	SR1	calmodulin-binding transcription activator 3		1	0	0	1	0	0	0	0							
DFG_review(arabidopsis)	Gid_816922 * (homolog)	AT2G23900	Pectin lyase-like protein		0	0	0	0	0	0	0	0							
DFG_review(arabidopsis)	Gid_817048 * (homolog)	AT2G25100	Ribonuclease H2 subunit A		0	0	0	1	370	2	0	0							
DFG_review(arabidopsis)	Gid_817159 * (homolog)	AT2G26190	calmodulin-binding-like protein		0	0	0	0	0	0	0	0							
DFG_review(arabidopsis)	Gid_817245 * (homolog)	CAM5	calmodulin 5		9	1	1	8	110	25	12								
DFG_review(arabidopsis)	Gid_817428 * (homolog)	AT2G28790	pathogenesis-related thaumatin-like protein		0	0	0	0	0	0	0	1							
DFG_review(arabidopsis)	Gid_817494 * (homolog)	GSTU5	glutathione S-transferase 103-1A		0	0	0	0	0	0	0	0							
DFG_review(arabidopsis)	Gid_817636 * (homolog)	GSTF9	glutathione S-transferase		0	0	0	1	0	0	2								
DFG_review(arabidopsis)	Gid_817637 * (homolog)	GSTF10	glutathione S-transferase ERD13		1	0	1	0	0	0	2								
DFG_review(arabidopsis)	Gid_818462 * (homolog)	AT2G38800	calmodulin-binding protein-like protein		0	0	0	0	0	0	0	0							
DFG_review(arabidopsis)	Gid_818563 * (homolog)	RNS2	Ribonuclease 2		0	0	0	0	0	0	0	0							
DFG_review(arabidopsis)	Gid_818708 * (homolog)	AT2G41090	calmodulin-like protein 10		94	1	1	13	109	25	12								
DFG_review(arabidopsis)	Gid_818709 * (homolog)	TCH3	calmodulin-like protein 12		73	1	1	9	59	25	0								
DFG_review(arabidopsis)	Gid_818710 * (homolog)	CAM2	calmodulin 2		9	1	1	10	101	25	12								
DFG_review(arabidopsis)	Gid_818785 * (homolog)	PGAZAT	Polygalacturonase ADPG2		0	0	0	0	0	0	0	0							
DFG_review(arabidopsis)	Gid_818920 * (homolog)	AT2G43190	ribonuclease P-like protein		0	0	0	0	0	0	0	0							
DFG_review(arabidopsis)	Gid_818931 * (homolog)	MSS3	calmodulin-like protein 5		0	0	0	16	53	43	4								
DFG_review(arabidopsis)	Gid_818959 * (homolog)	CHI	chitinase class 4-like protein		0	1	0	0	0	0	2								

㉔ 맵 기반 상호관계 맵 구축을 통한 양배추 육종에 이용

ㄱ. 바이오 맵 구축을 통해 상호간 protein-protein interaction (PPI), protein-chemical interaction (PCI) map을 구축할 수 있는데, 이는 일반 단 순한 유전자간의 hierarchy 관계만 파악해서 연구목적을 실현하는데 한계 가 있음을 인지 단백질-단백질 간 또는 단백질과-화합물간의 상호작용 가 능성에 대한 전반적인 이해를 통한 육종의 소재로 이용하고자 하기 위함 임.

ㄴ.상기 바이오 맵 구축을 통해 아래와 같은 서로 상호간 관계가 있는 유전자 집단을 전부 모집할 수 있었다.

ㄷ.단백질의 구조를 바탕으로 저항성관련 유전자 간의 분자 상호작용 네트워크를 Cytoscape 2.8.1 (www.cytoscape.org) 프로그램을 이용하여 구축 되 어질 수 있다. 본 연구 결과는 방법에서부터 각각 목적하는 유전자간 (대 사생합성 관련 유전자와-저항성 관련 유전자, 스트레스관련 유전자-병저항 성 관련 유전자, 글루코시노레이트 화합물-저항성 관련 유전자 등)의 관계 에 대한 특정 상호작용 관계를 주석과 함께 시각화하여 발표 되어질 예정 임. 일례로 PLA 단백질의 구조에 관한 모든 맵과, PLA 유전자의 모든 맵 간의 상호작용 맵을 시각화 하였을 경우 아래와 같은 관계 모식도를 얻을 수 있었음 (그림 2). 이는 저항성에 연관이 있다고 보고된 PLA 유전자가 ARF (Auxin Response Factor) 즉, 식물 호르몬 옥신의 신호전달체계와 연 관되어 있음을 시사한다. 본 내용은 차년도에 그 관련성을 실험적으로 (좁 나방 저항성 Bioassay) 테스트 될 예정임.

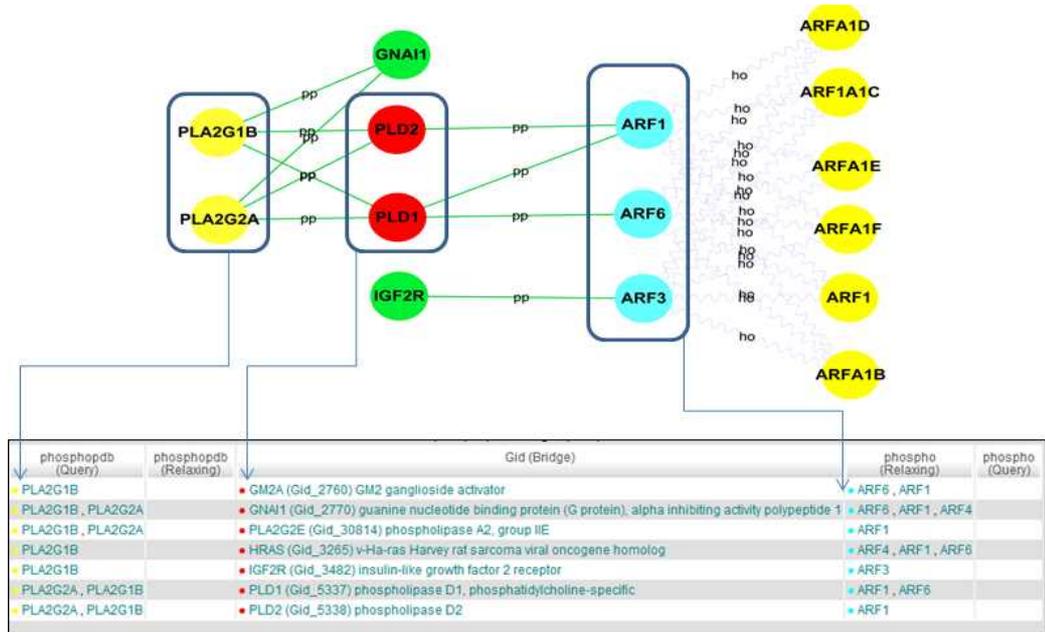


그림 5-107. PLA 단백질의 구조에 관한 모든 맵과, PLA 유전자의 모든 맵간의 상호작용 맵

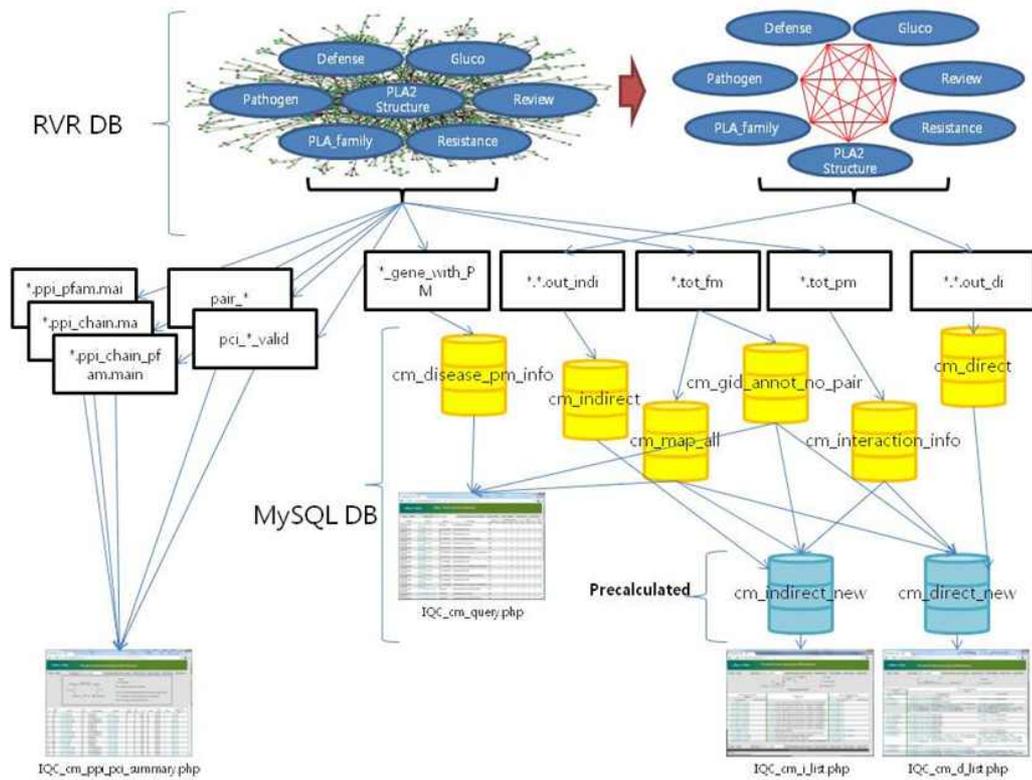


그림 5-108. CMAP_arabidopsis 전체 스키마

② 배추좀나방저항성 관련 유전자 PLA

㉑ 좀나방 저항성 유전자 screening을 위한 EST library 구축: 곤충 애벌레 저항성 유전자의 pool을 얻기 위한 방편으로 일반적으로 많이 쓰여지는 elicitor인 MeJA을 처리해서 50 μ M가 생리적으로 유의한 농도임을 확인 (그림 5-109) 하였음. 이를 바탕으로 8주 자란 *Brassica oleracea* var. *capitata*를 대조구와 처리구 간 transcript의 차이를 분석 양배추 육종에 응용하고자 함. 대표적으로 glucosinolate 생합성관련 유전자인 FMO (Flavin-containing monooxygenase)와 CYP79F1 (N-hydroxylase for short chain methionine derivative)의 mRNA을 처리 후 확인한 결과 유의하게 증가함을 확인하였음.

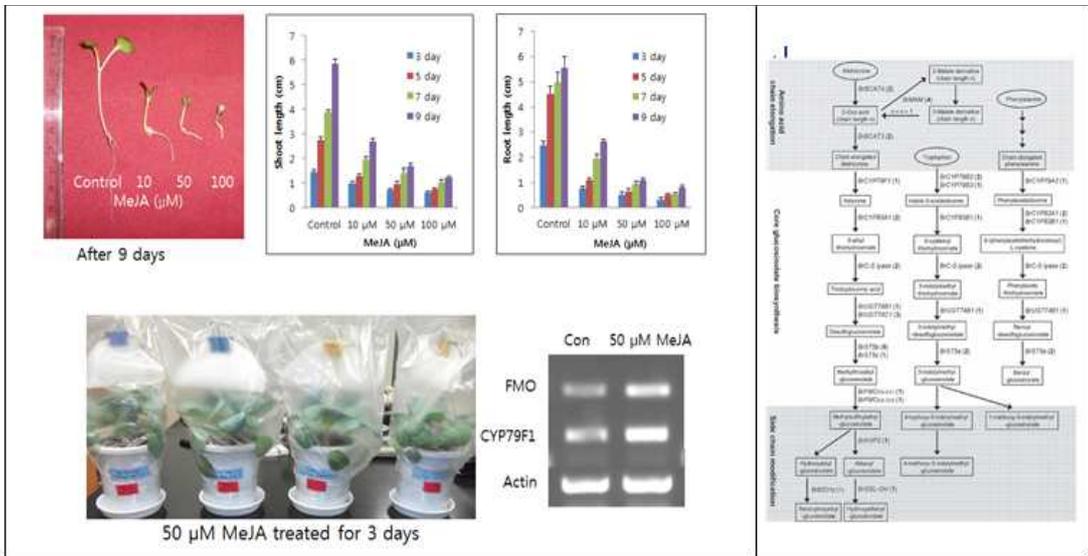


그림 5-109. MeJA 처리에따른 생합성관련 유전자 변화 (좌)와 생합성 경로 (우)

㉒ FMO 와 CYP79F1을 비롯 몇가지 glucosinolate 생합성 단계에 해당하는 유전자의 스트레스 감응정도를 측정한 바 모두 유의하게 증가하였음을 확인하였다 (그림 5-110). 비처리구인 대조구의 경우 Read count가 275,570 이었으며, 전체 읽은 염기는 121,806,456로 평균 읽힌 염기의 길이는 443 bp였다. MeJA 처리구에선 Read count가 266,457 이었으며, 전체 읽은 염기는 119,569,048로 평균 읽힌 염기의 길이는 448 bp였다. 현재는 raw data를 확보한 상태로 추후 분석이 이뤄질 예정이다. 본 연구결과는 차 후 양배추의 복합저항성 품종 육성에 (특히 가뭄이나 저온에 저항성을 가진 품종)을 육성하는데, 활용 가능하다 하겠다.

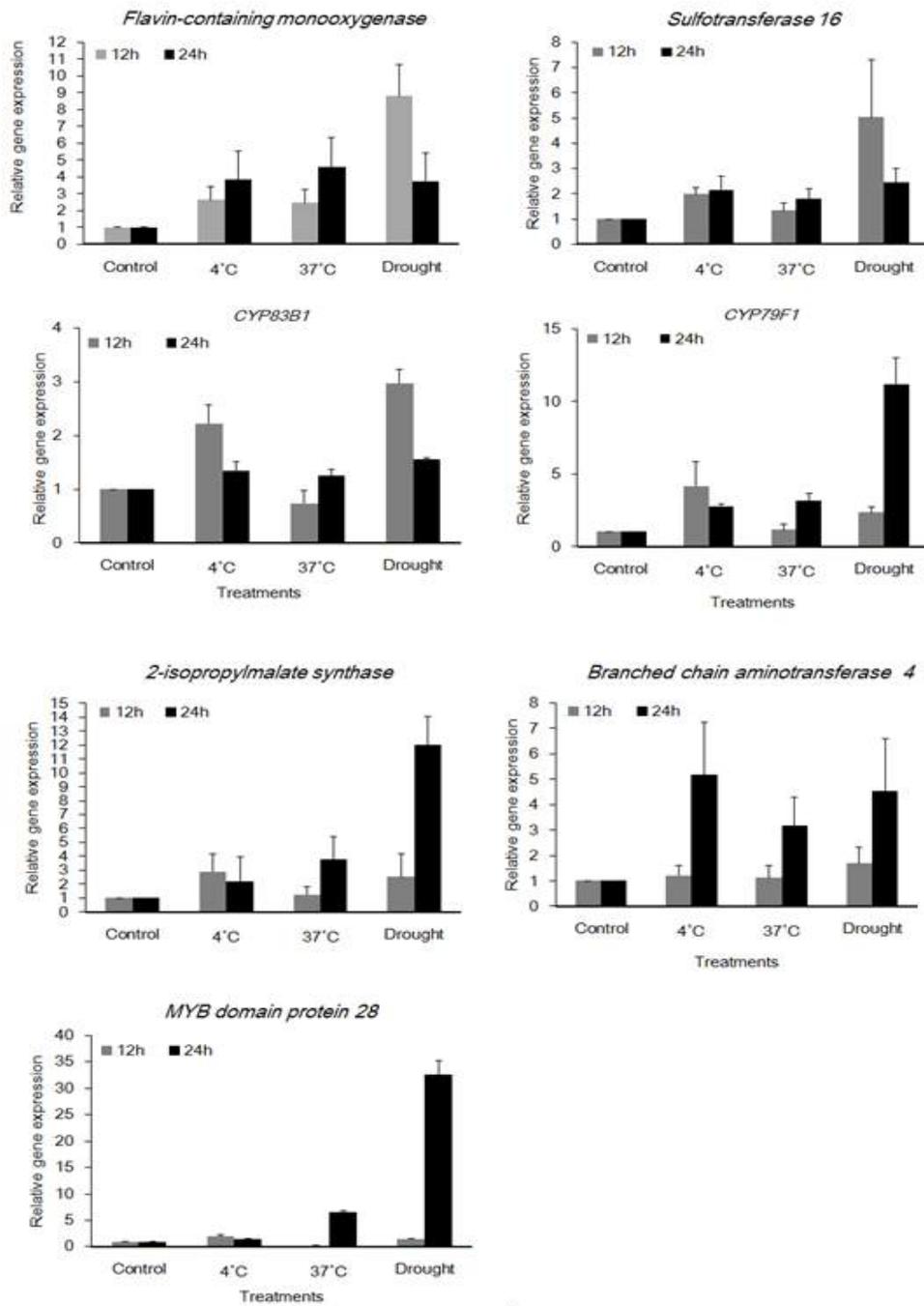


그림 5-110. Glucosinolate 생합성단계에 해당하는 유전자의 온도 및 가뭄 스트레스에 대한 감응도

- ㉔ 애기장대의 경우 PLA₂ 활성을 갖는다고 보고된 유전자는 PLA₂ 특이적인 네종류의 sPLA₂s (PLA₂α,β,γ,δ) 및 PLA₁와/또는 PLA₂ 활성을 가지고 있다고 보고된 patatin-like PLA 유전자가 있다. pPLAIIIa 유전자 과발현체는 pPLA-IIIδox의 경우에서 이미 보여준바와 같이 Wax 층이 증가 (C29 alkane and C29 ketone in stem cuticles)되어 나타나는 표현형을 보였는데, 일차적인 배추 좀나방에별레 저항성 검정에서도 대조구에 비해 더 저항성이 강하게 나타났다 (그림 5-111).



그림 5-111. 배추좀나방저항성 관련 유전자 PLA 과발현 애기장대 형질전환체

③ 글루코시놀레이트 생합성 관련 유전자의 전사량 조사

- ㉔ 식물 재료: 본 실험에 사용된 종자는 삼성 종묘 회사로부터 배추 좀나방에 저항성과 감수성이 있는 양배추를 분양받아서 실험을 하였다. 또한, 그림 5에서 보듯이 과종 후 약 8주 된 양배추에 인위적으로 상처를 입혀 wounding과 ethephon 처리에 사용하였으며, 유전자 발현 실험을 위해서 양배추를 충남대학교 유리 온실에서 재배한 후 실험 재료로 사용하였다.

㉞ 글루코시놀레이트 분석 방법: 글루코시놀레이트 추출 방법은 ISO 9167-1(1992)에 의하여 DEAE-Sephadex A-25를 통하여 H⁺ 형태로 활성화 한 뒤, aryl sulfatase에 의해 desulfation하여 분석하는 방법이 널리 알려져 있기 때문에 본 과제의 연구에서도 위와 같은 방법을 이용하여, 다음과 같은 추출 방법을 확립하였다. 2.0 mL tube에 100 mg씩 평량한 분말시료에 boiling(약 70°C) 70%(v/v) MeOH(1.5 mL)를 넣고 진동혼합(vortex)을 한 후 항온수조(water bath)(70°C)에 2분 동안 넣어두었다. 2분 후에 진동혼합을 한 번 더하고 항온수조에 3분 동안 넣어둔 후 원심분리(12,000 rpm, 10 min, 4°C)하여 상층액을 수거하였다. 이 과정을 2번 더 반복하여 각 상층액을 합하였다. Mini-column 충전용 DEAE-Sephadex A-25(30 g dry wt.)는 초순수에 녹여 분액여두에 넣은 다음 약 1.5배(v/v)의 초순수를 흘려 보내고 거의 빠져나간 후, sodium acetate(0.5 M, 102 g/1.5 L)를 넣어 H⁺ 형태로 활성화 시키고, 다시 초순수로 세척하였다. Mini-column 제작은 1 mL pipette tip 끝을 탈지면으로 막고 상기의 활성화된 DEAE-Sephadex A-25(약 40 mg dry wt.)를 기포가 생기지 않게 주의하면서 pasteur pipette으로 조금씩 넣은 다음(약 4cm) GSL 조추출 물을 pasteur pipette으로 로딩 하였다. 추출물이 모두 빠져나가면, 초순수로 세척하여 중성 및 양이온을 세척하여 흘려 보낸 다음, column 아래 부분을 paraffin film으로 막고 aryl sulfatase solution(115 mg/5 mL, desulfation) 75 µL을 수평으로 로딩하였다. 그리고 column 윗부분을 paraffin film으로 막고 충분한 효소반응을 위하여 실험실 상온에서 다음 날(약 16 ~ 18시간)까지 정치한다. 초순수를 0.5 mL씩 흘려서 desulfo-GSLs를 2.0 mL tube에 용출(0.5 mL씩 총 3회)시켰다. 용출시킨 시료는 0.45 µm hydrophilic PTFE millipore filter(직경 13 mm)로 필터한 후 HPLC용 vial병에 넣어 냉장보관하였다. HPLC에 의한 글루코시놀레이트 분석은 Inertsil ODS-3 column(150 × 3.0 mm i.d., particle size 3 µm)을 장착한 Agilent 1260 Series HPLC Systems로 분석하였다.

㉞ 배추좁나방 저항성과 감수성 양배추에 wounding 후 글루코시놀레이트 생합성 관련 유전자들의 전사량 조사

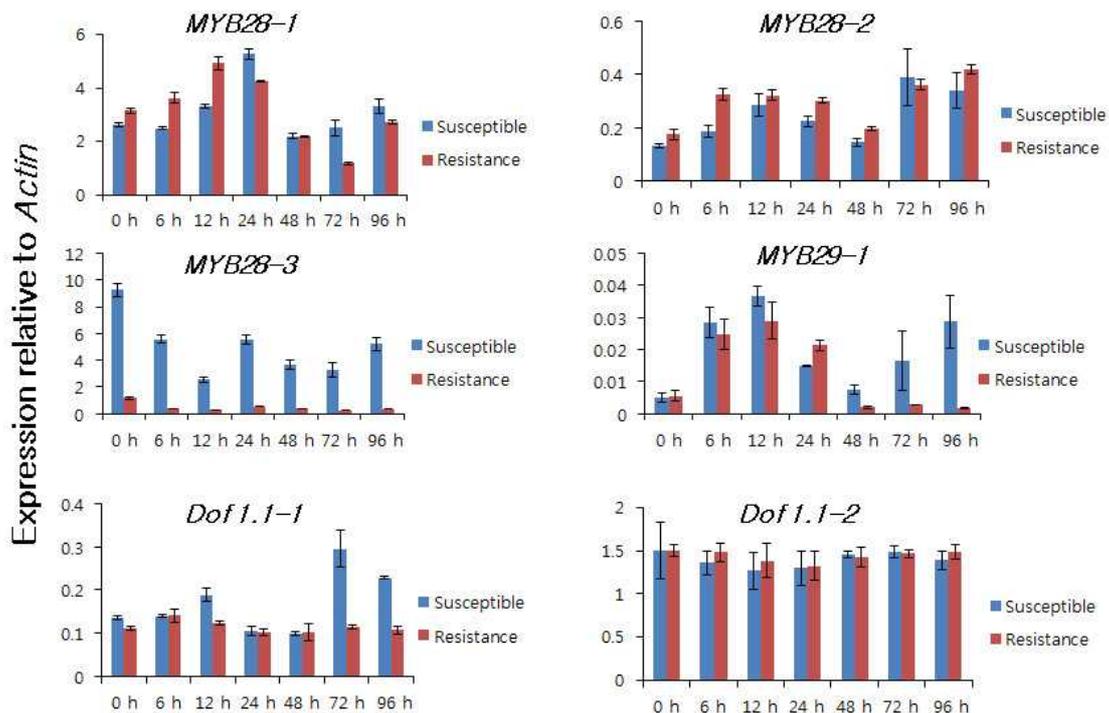
ㄱ. Aliphatic GSL 생합성에 관련된 Transcription Factors(TFs) BoMYB28, BoMYB29, Dof1.1은 감수성과 저항성 양배추의 유전자 발현량이 각각 다른 패턴을 보였다. BoMYB28-1는 wounding 후 6h부터 24h 까지 감수성 양배추는 증가하는 패턴을 보였다. 반면에 저항성은 wounding 후 12h 까지 증가하다가 72h까지 감소하는 발현패턴을 보였다. BoMYB28-2는 저항성과 감수성이 비슷한 패턴을

보였다. 하지만, BoMYB28-3은 감수성 양배추는 저항성보다 높은 유전자 발현 패턴을 보였다. BoMYB29-1은 BoMYB28-1처럼 wounding 후 12h에 가장 높은 패턴을 보였고 감수성과 저항성은 48h 까지 감소 하다가 감수성은 96h 까지 다시 증가하였다. BoDof1.1-1과 BoDof1.1-2는 감수성과 저항성 양배추의 유전자 발현 패턴은 비슷하였다. Aliphatic GSL에 관련된 생합성 유전자 BoMYB28, BoMYB29, BoDof1.1 중에서 BoMYB28-3은 BoMYB28-1, BoMYB28-2, BoMYB29-1, BoDof1.1-1, BoDof1.1-2보다 발현량이 더 높았다. Indole GSL 생합성에 관련된 BoMYB51, BoMYB34, BoMYB122, BoIQD1-1의 유전자 발현을 발현을 본 결과 MYB51-1은 감수성 72h에서 가장 높은 발현을 보였다 하지만 저항성은 wounding 후 6h에서 가장 높았다. 반면에 MYB51-2는 저항성 양배추가 감수성 양배추보다 유전자 발현이 3배 이상 높은 발현 패턴을 보였다.

표 5-26. Primers used for real-time RT-PCR.

Primers	Sequence (5' to 3')	Amplicon (bp)
BoDof1-1-1-RT(F)	TAGCTGCAACAAATGGCAATTATTG	233
BoDof1-1-1-RT(R)	ATTGTTTCTATATTGCTCT CGTTCTGG	
BoDof1-1-2-RT(F)	GCTGCCACTAATGGCAACAACC	183
BoDof1-1-2-RT(R)	CGTCGTTGGATCGAAGAGACTG	
BoIQD1-1-1-RT(F)	TCTCCTCCACAGTTTGAGGTCAGA	225
BoIQD1-1-1-RT(R)	TGTAGACTGGATGAACATGGCAGCT	
BoIQD1.1-2-RT(F)	TCCTCAGTTTGAGGTCAGAGTTGATG	181
BoIQD1.1-2-RT(R)	CTGGATAAAGATGGCAGCTGCTTC	
BoMYB28-1-RT(F)	ATTCCCTTGCTGCGCCTAGTTC	235
BoMYB28-1-RT(R)	GTAGTAGCGCTCAAGCTACCTTCCA	
BoMYB28-2-RT(F)	CCGAGTTCGATCCCTTCCTCC	137
BoMYB28-2-RT(R)	CATGTAGTGCTCCTCATTAT GGTTGC	
BoMYB28-3-RT(F)	CGGTCAAGCTCAATGCCTCC	165
BoMYB28-3-RT(R)	AGTGGCCTTAGCAGCAAC	
BoMYB29-1-RT(F)	ACAGTGATGAGACACCGAGAAACAATG	147
BoMYB29-1-RT(R)	ATCCTTCCATGGAAGCTGAAAGC	
BoMYB29-2-RT(F)	AGCAACCGTGATGAGGTACCGAG	134
BoMYB29-2-RT(R)	CCTTCCATGGACGCTGATATGATA	
BoMYB34-1-RT(F)	GCGGTGCGACTTAAATCGGGATC	222
BoMYB34-1-RT(R)	AAGGCCAACATGATCGTCACTCA	
BoMYB34-2-RT(F)	GACGTAAACCGGGATCTACTAACCG	210
BoMYB34-2-RT(R)	GTATACATATCAGAGATCTCTTCGTTGCT	
BoMYB34-3-RT(F)	CGGTGATTCAAACCGGGAT	179
BoMYB34-3-RT(R)	CGACGTGTTGTTCTGAATCGATATG	
BoMYB34-4-RT(F)	GACTTACTAACCGGAATCATCATCGG	220

BoMYB34-4-RT(R)	AGAATAGGTC GAGATTGTCG GCTAA	
BoMYB51-1-RT(F)	CAAGAAAGGTGTTGATCCGGTTACTC	173
BoMYB51-1-RT(F)	TTCCGAACCTATTAGCTACTCTGTTC	
BoMYB51-2-RT(F)	AAGGTGTCGATCCGGTTACACAC	241
BoMYB51-2-RT(R)	CTTCCGATAA TCTCAGACAG AACGCT	
BoMYB51-3-RT(F)	ACGTTTGATCAAGAAAGGTGTCGAC	222
BoMYB51-3-RT(R)	CCAACCCTATTTGCTACCTTGTTCA	
BoMYB122-1-RT(F)	GATCAAGTCCTTCCTTCGTATGATCC	222
BoMYB122-1-RT(R)	CGTGAAGTTGGACGTAGGCGA	
BoMYB122-2-RT(F)	CTTTGATCTATCACCAGACCACAACAA	206
BoMYB122-2-RT(R)	CTCCTTCACCGTGATGTTGAACG	
BoGAD1-RT(F)	TCTCTCACGCCGCATCGGATTC	332
BoGAD1-RT(R)	TCCTAGCGGAGCATTGAATAGATGT	
BoGAD2-RT(F)	TTCTAAGTCGAGCGGCCACC	330
BoGAD2-RT(R)	GAGGCGCATTGAACAGTCGA	
BoGAD4-RT(F)	AAACGGTGTTCATTAGTGCCGT	252
BoGAD4-RT(R)	TTAGCGTGAACCCTTGCCGGA	
BoGAD5-RT(F)	CAATTTGTTCCATGCTCCCATGG	141
BoGAD5-RT(R)	GTAGGTAGACCTTGAGCTCTTCTCCTC	
BoActin-RT(F)	CTATTGAGCATGGTGTGTGAGC	186
BoActin-RT(R)	TAGCTGGAGAGTTGAAGGTTTCG	



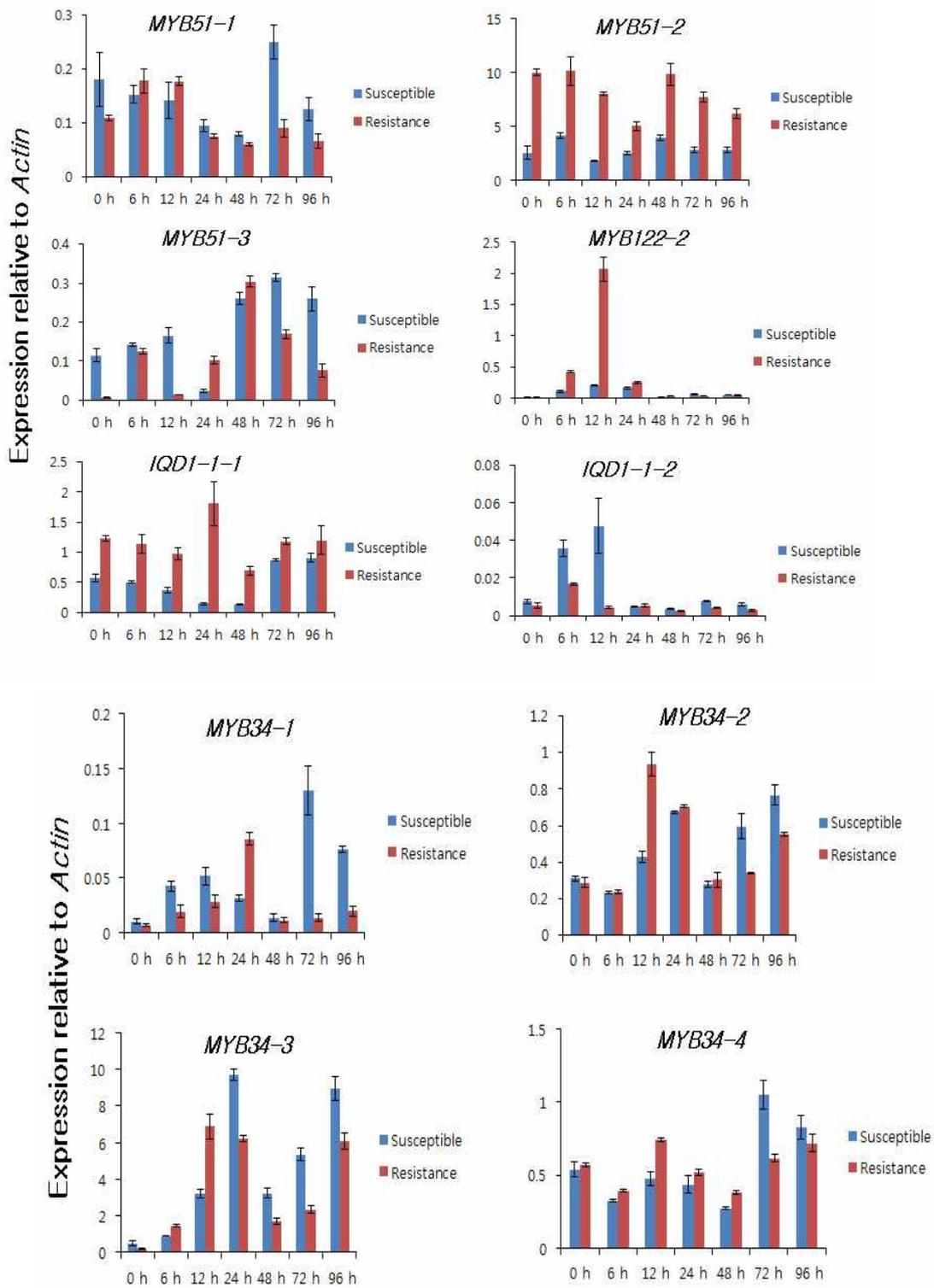
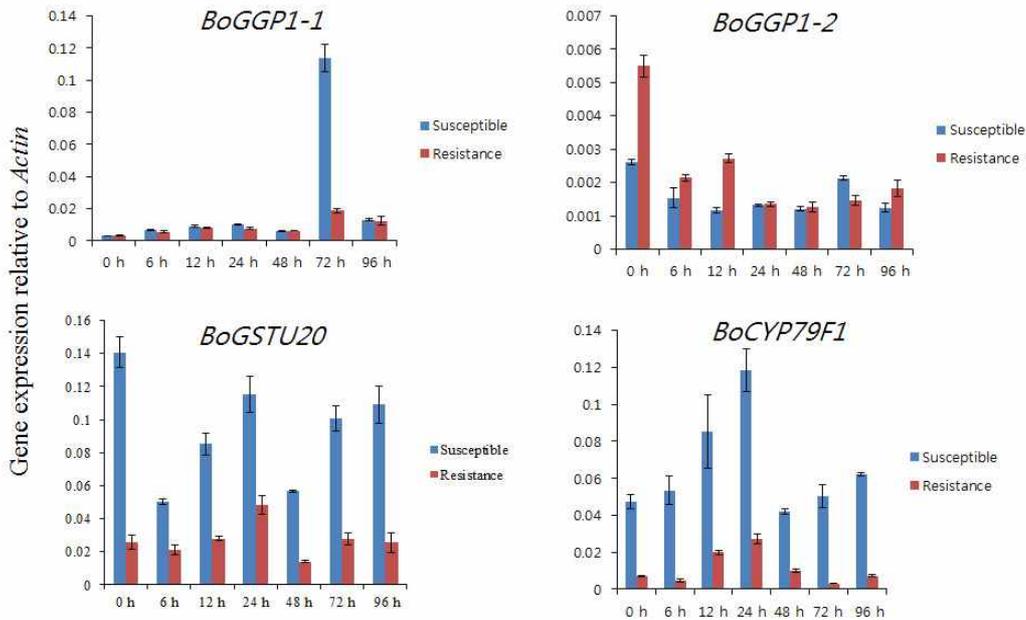


그림 5-109. 배추 좀나방 저항성과 감수성 양배추에 wounding 후 Transcription Factors qRT-PCR 결과

ㄴ. Wounding 후 저항성의 경우 6h부터 24h까지 감소하다가 다시 48h에 증가되었고 96h까지 감소하는 패턴을 보였다. 반면에 MYB51-3은 저항성 양배추는 48h에 가장 높았고 감수성은 72h에 가장 높았다. MYB121-1은 발현이 너무 낮아서 PCR이 안되었다. 반면에 MYB122-2는 wounding 후 12h에 저항성은 감수성보다 거의 10배나 높게 발현되었다. IQD1-1-1은 IQD1-1-2와 상당히 다른 유전자 발현 패턴을 보였다. IQD1-1-1은 저항성 양배추가 감수성 양배추보다 비교적 높은 발현 패턴을 보였다. 특히 wounding 후 24h에 저항성은 감수성에 비해 거의 10배나 높은 발현량을 보였다. BoMYB34은 총 4개의 isoform이 있는데 이 중에서 MYB34-3의 유전자 발현은 MYB34-1, MYB34-2, MYB34-4보다 발현량이 높았다. 특히 MYB34-3은 wounding 후 감수성은 24h 까지 증가하였고 다시 48h 부터 96h 까지 증가하는 패턴을 보였다. 이 패턴은 저항성 양배추와 같았다. MYB34-1은 wounding 후 72h에 가장 높았고 저항성은 24h에 가장 높았다. MYB34-4에서 감수성과 저항성 양배추는 wounding 후 비슷한 발현 패턴을 보였다.



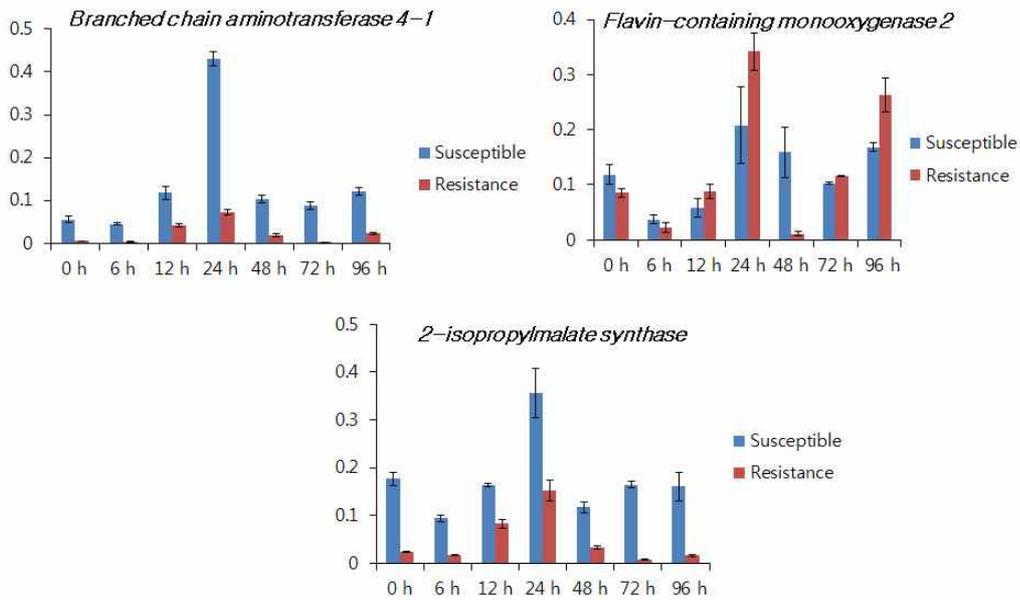


그림 5-110. 배추 줘나방 저항성과 감수성 양배추에 wounding 후 글루코시놀레이트에 관련된 유전자들의 qRT-PCR 결과

ㄷ. 글루코시놀레이트 합성은 크게 3단계 즉, Side chain elongation, Core glucosinolate biosynthesis, Secondary modification, 거쳐서 최종적으로 합성이 된다. QRT-PCR 실험에 사용된 유전자 GGP-1, GSTU20, CYP79F1은 Core glucosinolate biosynthesis 단계에 있는 유전자이고, Flavin-containing monooxygenase 2(FMOGS-OX2), Branched chain aminotransferase 4-1(BCAT4-1)과 2-isopropylmalate synthase(IPMS2)은 Side chain elongation 단계에 관여하는 대표적인 유전자이다. 그림 xxx에서 보듯이 GGP는 2개의 isoform이 존재하는데 GGP-1은 감수성 72h만을 제외하고 저항성과 거의 비슷한 발현패턴을 보였다. 반면에 GGP-2는 저항성이 감수성보다 다소 높은 발현패턴을 보였다.

Core glucosinolate biosynthesis 단계에 있는 GSTU20와 CYP79F1은 wounding 후 감수성 양배추는 6h-24h 시간까지 증가하는 패턴을 보이다가 다시 감소하였고 다시 48h-96h 시간까지 증가하는 추세를 보여 두 유전자가 같은 발현 패턴을 보였다. 특히 감수성 양배추는 저항성 양배추에 비해 비교적 높은 유전자 발현 패턴을 보였다. Side chain elongation 단계에 관여하는 BCAT4-1과 IPMS2는 감수성이 저항성보다 발현 패턴이 높았다. 특히 감수성과 저항성 양배추는 wounding 후 24h에 가장 높은 발현 패턴을 보였다. 반면에 Secondary modification 단계에 관여하는 유전자, FMOGS-OX2는 저항성이 감수성보다 12h, 24h, 96h에서 다소 높았고 다른 유전자 처럼 6h-24h까지 증가하는 유전자 발현 패턴을 보였다.

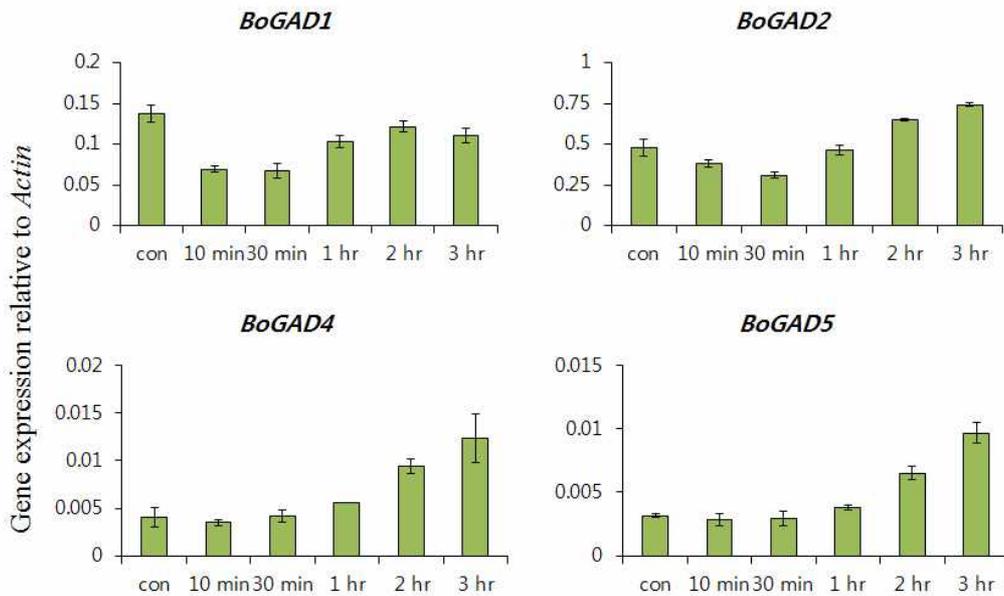


그림 5-111. Wounding 후 GABA 생합성 관련 유전자 GAD 유전자 발현

르. 양배추 transcriptome으로부터 곤충방어 물질인 GABA 생합성에 관여하는 BoGAD 유전자를 확보하여 QRT-PCR을 진행하였다. 삼성종료로부터 분양받은 배추 줄나방 저항성과 감수성 양배추에 상처를 입힌 후 GAD 유전자를 이용하여 wounding 후 6h-96h 까지 QRT-PCR을 한 결과 BoGAD1,2,4,5 모두 유전자 발현이 너무 낮았다. 따라서 그림 6과 같은 크기의 양배추에 인위적으로 상처를 입힌 후 10min부터 3h 까지 조사를 하였다. 그 결과 GAD1을 제외하고 GAD2, GAD4, GAD5는 wounding 한 후 시간이 흐를수록 점점 더 유전자 발현이 control에 비해 증가하는 패턴을 보였다. 반면에 GAD1은 control이 가장 높은 패턴을 보였고 wounding 후 10 min에서 감소하였다가 2h 까지 증가하였다. 위에서 언급했듯이 GABA 합성은 cytosolic enzyme인 GAD에 의해 촉매작용을 한다 (Breitkreuz and Shelp, 1995).

GAD는 세포질에서 H^+ (Carroll et al., 1994; Crawford et al., 1994) 또는 Ca^{2+} (Arazi et al., 1995; Snedden et al., 1995)의 농도 증가 의해서 활성화된다. 기계적 자극은 세포질에서 Ca^{2+} 농도를 빠르게 증가시킨다는 결과가 보고된바 있다 (Knight et al., 1991). 콩 잎에 기계적인 상처를 입힌 후 1 min-4 min 사이에 GABA 함량은 10-25 배 증가함을 보였다(Ramputh and Bown, 1996).

③ 배추 즙나방 저항성과 감수성 양배추의 글루코시놀레이트, 유리아미노산 분석

㉞ HPLC, LC-MS 등 분석기기를 이용하여 양배추 내 글루코시놀레이트를 분석한 결과 glucoiberin, progoitrin, glucoraphanin, sinigrin, gluconapin, 4-hydroxyglucobrassicin, glucocochlearin, glucobrassicin, 4-methoxyglucobrassicin, gluconasturtiin, neoglucobrassicin를 포함한 총 11종의 글루코시놀레이트가 존재함을 알 수 있었다. 감수성 양배추는 wounding 후 24h에 glucoiberin, progoitrin, glucoraphanin, sinigrin, gluconapin에서 가장 높은 함량을 보였다. Glucoiberin는 저항성 양배추에서 wounding 후 24h까지 증가함을 보였고 glucoraphanin은 control에서는 분석되지 않았지만 wounding 후 6h-72h 까지 증가하는 패턴을 보였다. 4-methoxyglucobrassicin은 wounding 후 12h-96h까지 차차 감소하였다. 반면에 neoglucobrassicin은 wounding 6h-96h 까지 점차 증가하는 패턴을 보였다. 저항성 양배추에 비해 감수성 양배추의 글루코시놀레이트 함량은 wounding 후 아주 불규칙한 함량 패턴을 보였다. Wounding 후 저항성과 감수성 양배추의 글루코시놀레이트 함량을 분석한 결과 저항성 양배추는 총 94.12 $\mu\text{mol/g dry weight}$ 이었고, 감수성 양배추는 65.08 $\mu\text{mol/g dry weight}$ 으로 저항성 양배추보다는 훨씬 낮은 함량을 보였다. QRT-PCR 처럼 wounding 후 time-course 시간 간격을 더 좁혀서 샘플을 채취한 후 글루코시놀레이트를 분석하였다. 몇 가지 해충 저항성에 더 효과를 보인 aliphatic 글루코시놀레이트 (glucoraphanin, sinigrin, glucocochlearin) 함량은 저항성 양배추에서 더 높은 함량을 보였다. 총 글루코시놀레이트 함량도 저항성 양배추가 감수성보다 훨씬 높은 함량을 보였다. 따라서 유전자 발현과 글루코시놀레이트 함량은 서로 연관성이 있는 것으로 판단된다.

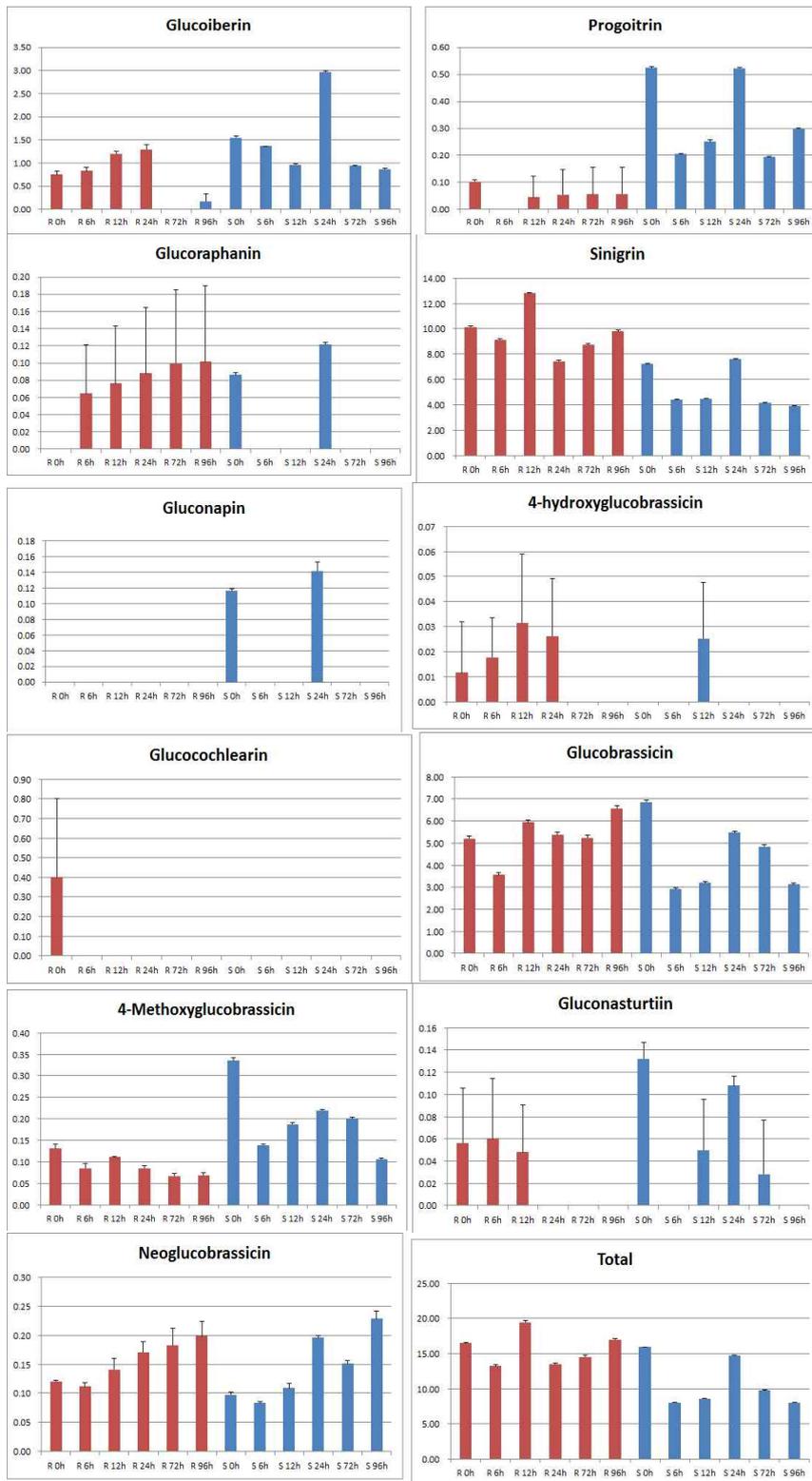


그림 5-112. 배추 좀나방 저항성과 감수성 양배추에 wounding 후 글루코시놀레이트 함량 (R-저항성, S-감수성)

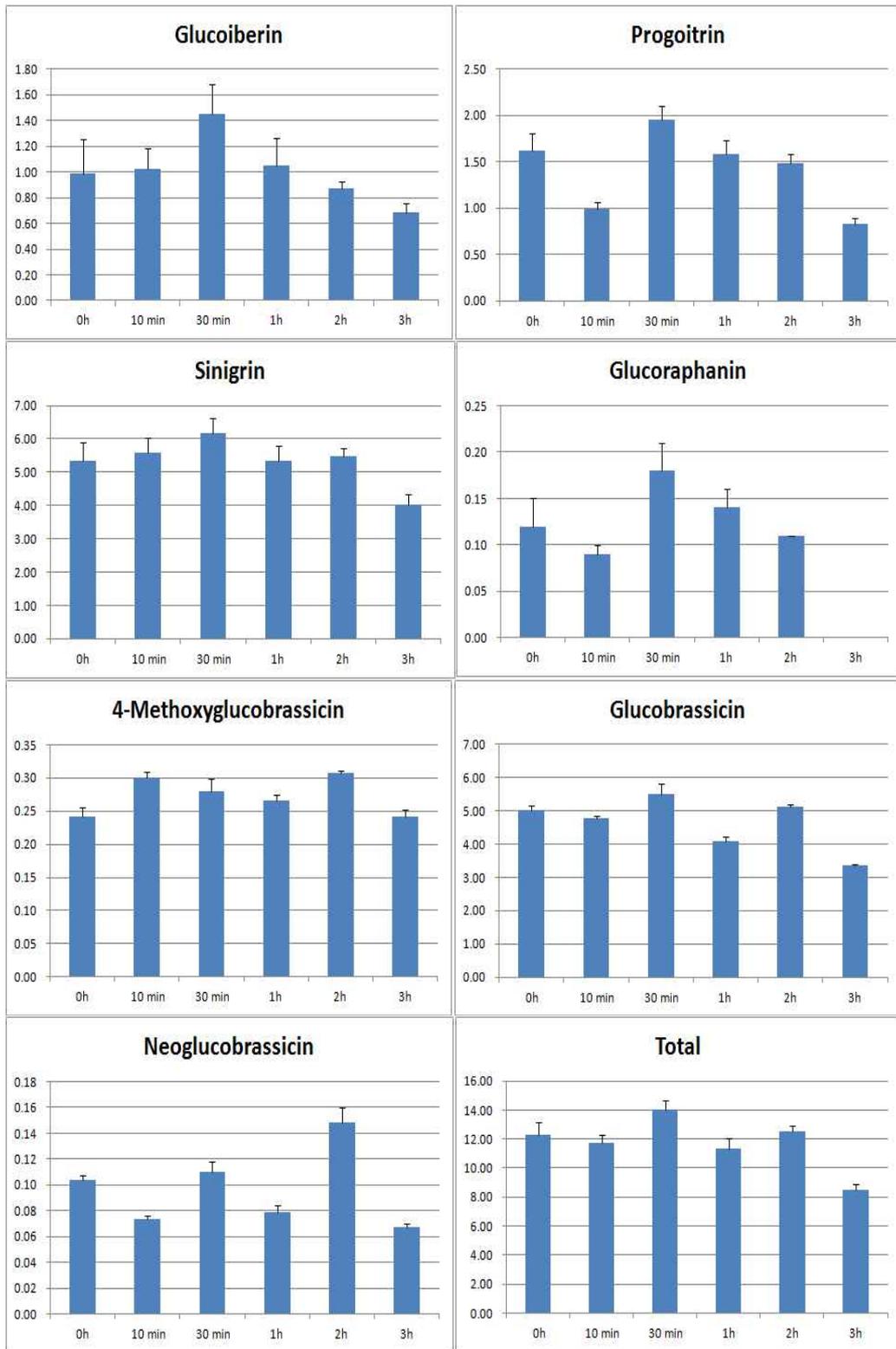


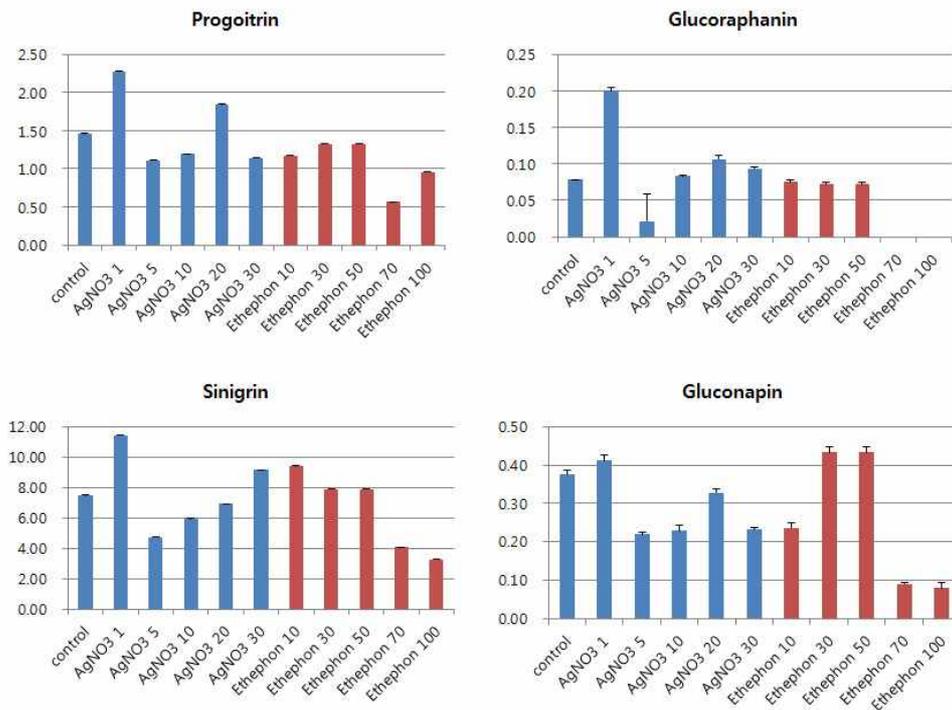
그림 5-113. 약 8주된 양배추에 Wounding 후 10 min-3h 까지 글루코시놀레이트 함량

- ㉠ 약 8주된 양배추에 Wounding 후 10 min에서 3h 까지 글루코시놀레이트 함량을 분석한 결과 총 7개, glucoiberin, progoitrin, sinigrin, glucoraphanin, 4-methoxyglucobrassicin, glucobrassicin, neoglucobrassicin이 분석되었다. 이 중 4-methoxyglucobrassicin과 neoglucobrassicin만을 제외하고 모두 wounding 후 30 min에서 가장 높은 함량을 보였다. Glucoibrerin, progoitrin, sinigrin, glucoraphanin은 30 min 이후부터 3h 까지 감소하는 경향을 보였다.
- ㉡ 배추 줄나방 저항성과 감수성 양배추 wounding 후 유리아미노산 분석: Phenylalanine과 lysine은 wounding 후 12h 부터 96h 시간까지 감소하였다. 감수성과 저항성 양배추는 wounding 후 유리아미노산의 함량차가 각각 큰 차이를 보이지 않았고 아미노산마다 다양한 값 차이를 보였다. 하지만 곤충 방어물질인 GABA의 총 함량에서 저항성 양배추는 감수성보다 1.75배 높았고 유리아미노산의 총 함량은 저항성 양배추가 감수성보다 6배나 높은 함량을 보였다.



그림 5-114. 배추 줌나방 저항성과 감수성 양배추 wounding 후 유리아미노산 함량

㉔ Abiotic stress: Ethephon과 AgNO₃ 농도별 처리 후 글루코시놀레이트 분석: 총 9가지, progoitrin, glucoraphanin, sinigrin, gluconapin, glucocochlearin, glucobrassicin, 4-methoxyglucobrassicin, gluconastrutiin, neoglucobrassicin 이 분석되었다. Glucobrassicin과 neoglucobrassicin의 경우 AgNO₃ 20 mg/L에서 가장 높은 함량을 보였다. 반면에, glucobrassicin, 4-methoxyglucobrassicin, sinigrin, glucoraphanin의 경우 ethephon 10 mg/L에서 가장 높은 함량을 보였다. AgNO₃와 ethephon은 농도별 글루코시놀레이트 별 각각 다른 농도를 보였다. 총 함량의 글루코시놀레이트를 조사한 결과 AgNO₃의 경우 20 mg/L, Ethephon의 경우 10 mg/L에서 가장 높은 함량을 나타내었다. 따라서, time-course 실험을 하기 위해서 본 실험에서는 이 농도를 정하여 처리한 다음 글루코시놀레이트를 분석하였다.



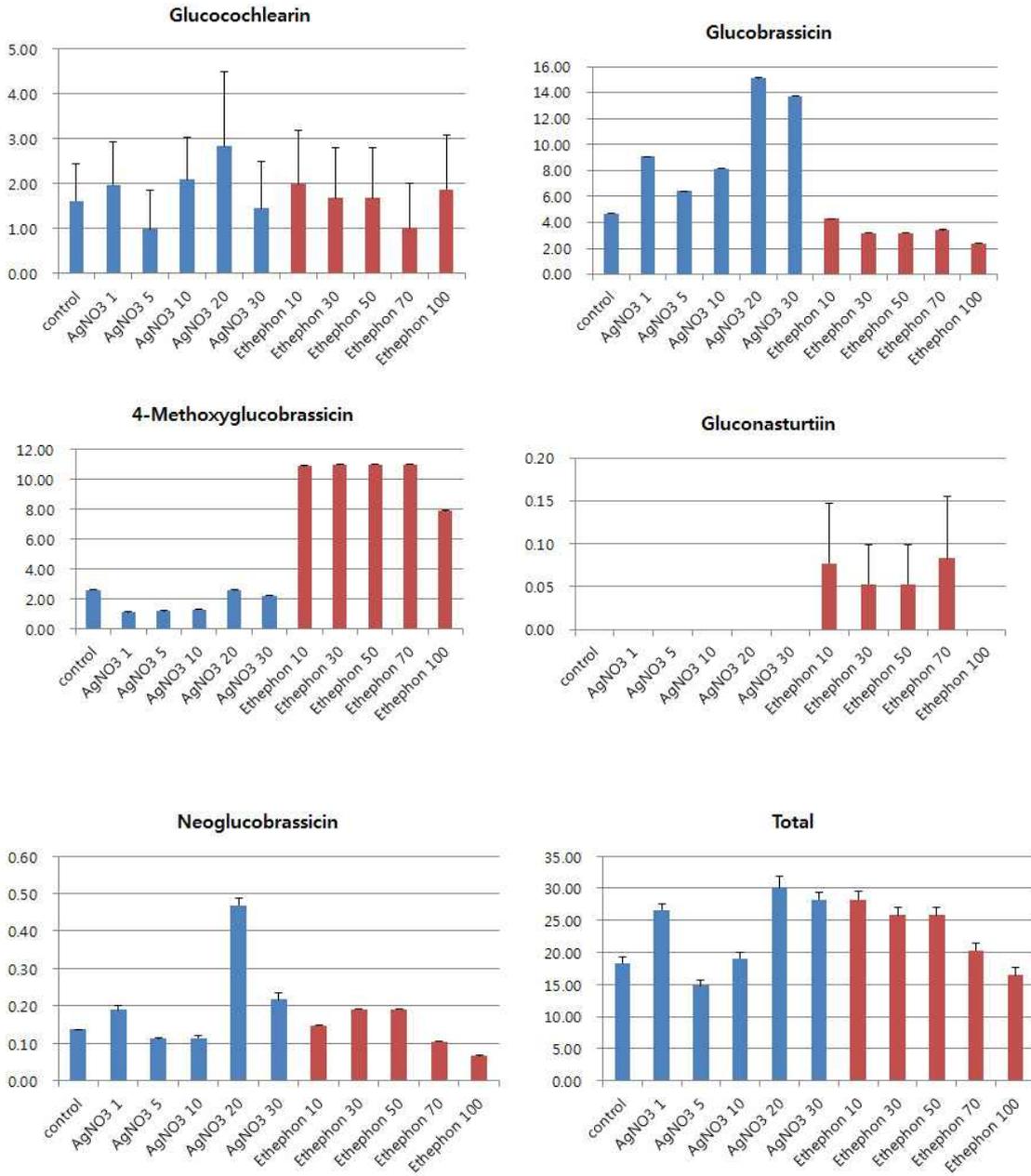


그림 5-115. 농도별 AgNO₃와 Ethephon에 따른 글루코시놀레이트 함량

㉓ Abiotic stress: Ethephon과 AgNO₃ 처리 후 유전자 발현: Ethephon과 AgNO₃를 처리 한 후 QRT-PCR을 통해서 유전자 발현을 조사하였다. 글루코시놀레이트 생합성에 관련된 transcription factors 중에서 8개의 유전자가 이용되었다. Aliphatic 글루코시놀레이트 생합성에 관련된 유전자는 MYB29-1와 MYB28-2가 이용되었다. MYB29-1의 경우 ethephon 처리 후 3h에서 가장 높게 발현되었고 control과 비교했을 때 거의 30배 이상 높았다. 반면에 MYB28-2는 AgNO₃ 처리 후 6h에

서 가장 높게 발현되었다. MYB51-1과 MYB51-3은 각각 다른 발현 패턴을 보였다. MYB51-1은 ethephon 처리 후 12h부터 72h까지 점차 증가하는 경향을 보였고 MYB51-3은 AgNO₃ 처리 후 12h부터 48h까지 점차 증가하는 경향을 보였다.

MYB122-2는 ethephon 처리 후 control에 비해 5배에서 최대 30배까지 증가한 경향을 보였다. 하지만 AgNO₃ 처리 후 6h에 가장 높게 발현되었고 점차 감소하는 경향을 보였다. MYB34-3은 AgNO₃는 ethephon 처리보다 높은 발현 패턴을 보였는데 처리 후 3h-48h까지 점차 증가하는 경향을 보였다. MYB34-4는 ethephon 처리 후 3h에 가장 높은 발현을 보였고 control보다 3배 높은 발현을 보였다.

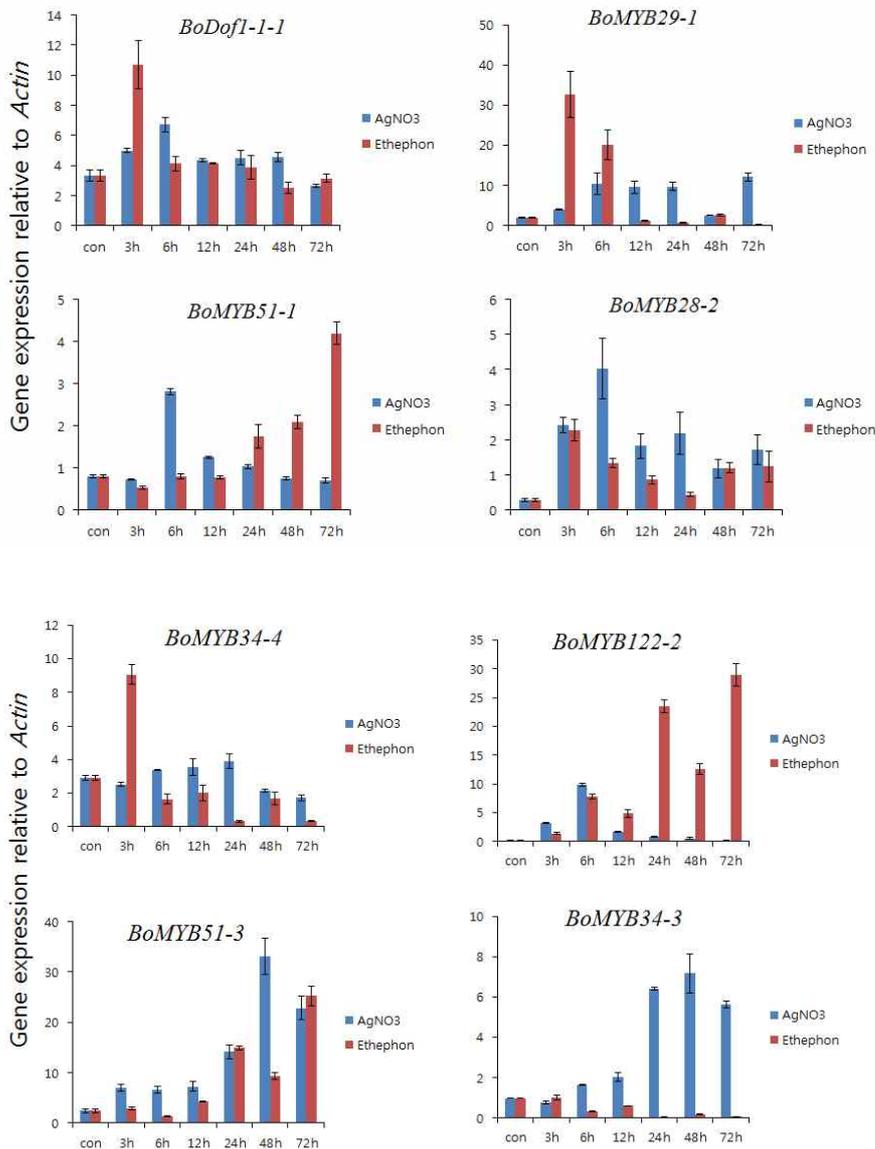
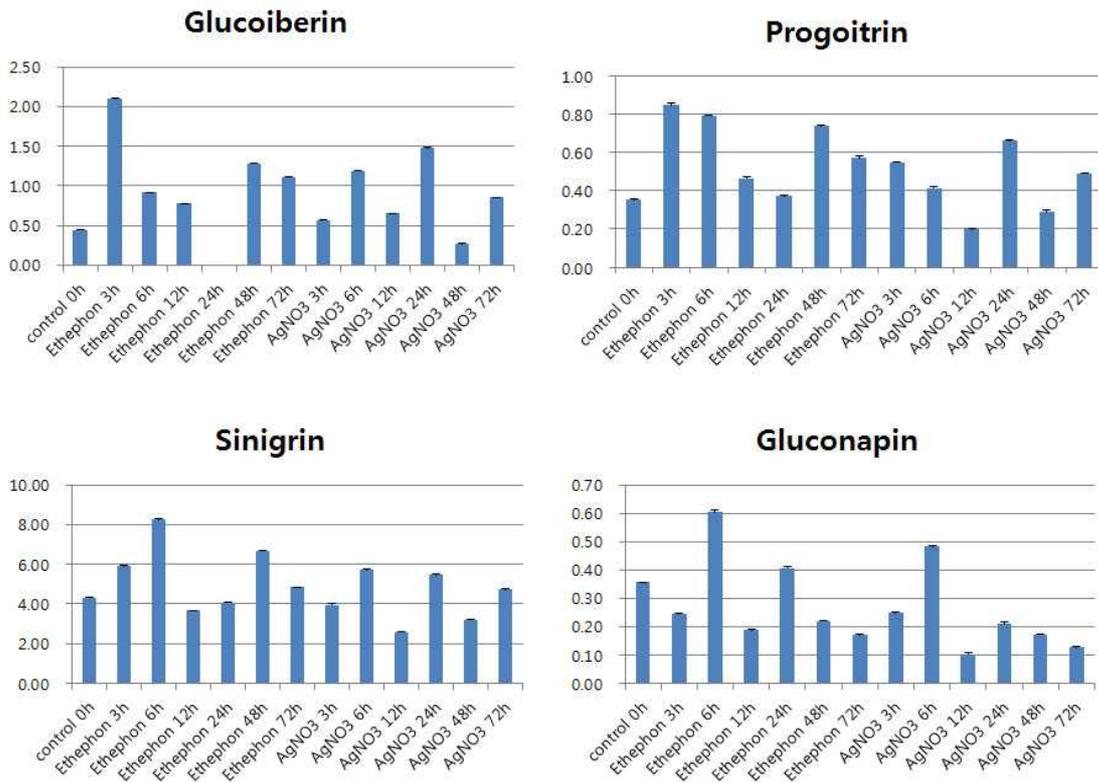


그림 5-116. Ethephon과 AgNO₃ 처리 후 유전자 발현

㉑ Abiotic stress: Ethephon과 AgNO₃ 처리 후 글루코시놀레이트 함량 분석: Ethephon 처리 3h 후 glucoiberin과 progoitrin는 가장 높은 함량을 보였고 AgNO₃는 처리 후 24h에 가장 높은 함량을 보였다. 하지만, sinigrin과 gluconapin은 Ethephon과 AgNO₃ 처리 후 6h에 가장 높은 함량을 보였다. 4-hydroxyglucobrassicin과 4-methoxyglucobrassicin의 경우 ethephon 처리 후 24h에서 72h까지 증가하는 경향을 보였고 glucobrassicin과 neoglucobrassicin은 AgNO₃ 처리 후 12h에서 72h까지 점차 증가하는 경향을 보였다. 이상하게 gluconastrutiin은 ethephon 처리 후 72h에서만 측정되었다. 글루코시놀레이트 총 함량을 조사하였을 때 ethephon 처리 후 3h과 6h 까지 증가했다가 다시 12h에서 72h까지 점차 증가하는 경향을 보였다. AgNO₃는 처리 후 글루코시놀레이트 총 함량이 72h에서 가장 높음 함량을 보였다. 결론적으로, elicitor(ethephon과 AgNO₃) 처리 후 글루코시놀레이트에 관련된 유전자의 발현과 글루코시놀레이트 함량이 증가하였다.



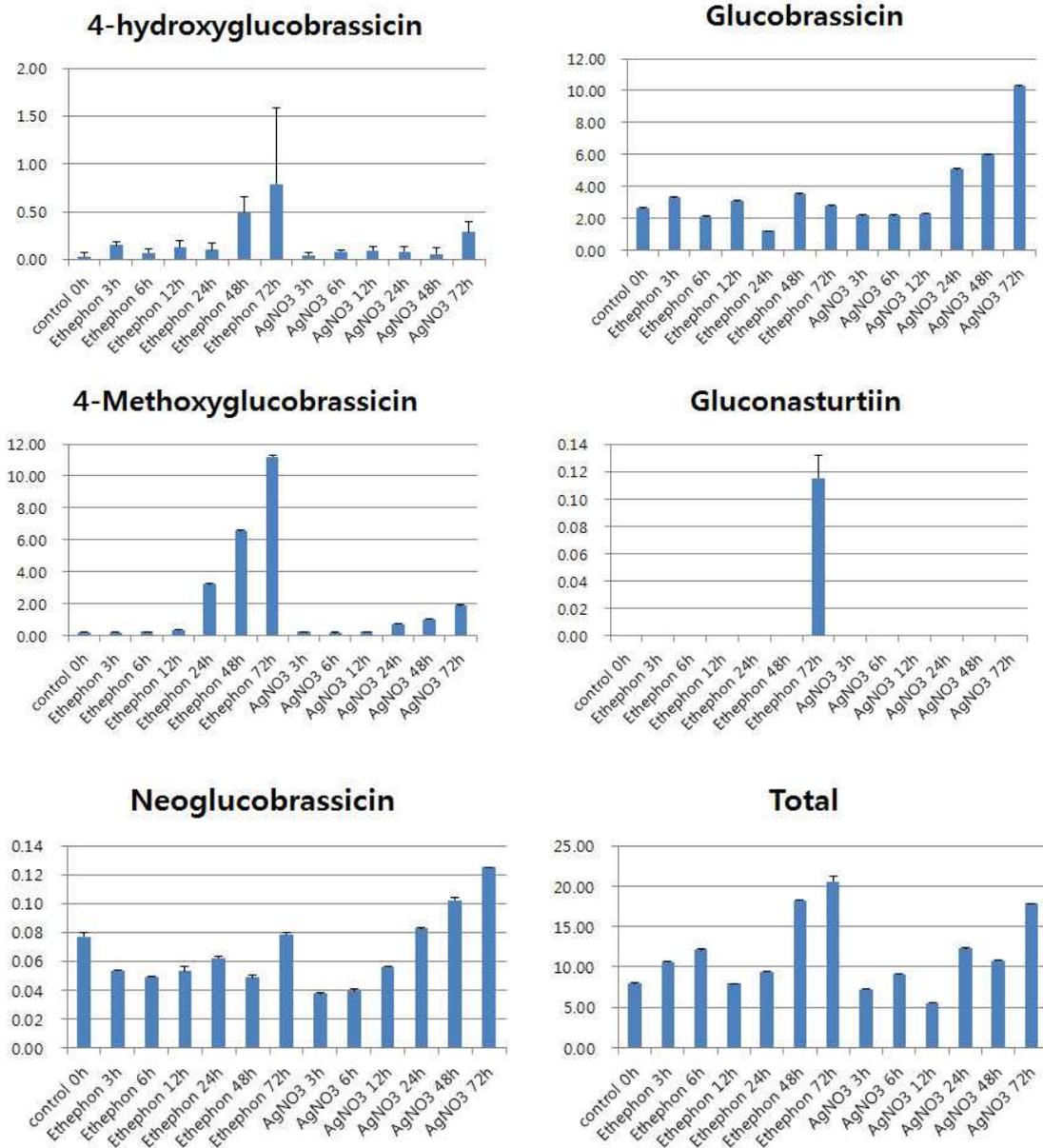


그림 5-117. Ethephon과 AgNO3 처리 후 Time course 별 글루코시놀레이트 함량

④ 양배추 글루코시놀레이트 및 GABA 합성 관련 전사인자 과다발현 형질전환체 제작

㉞ 양배추의 글루코시놀레이트 합성 관련 전사인자인 BoMYB29-1, BoMYB29-2, BoIQD1, BoIQD2와 GABA 합성을 조절하는 중요한 유전자인 BoGAD2를 과다발현한 형질전환체를 제작하여 좀나방 저항성이 증가된 라인을 확보하고자 하였다. 이를 위해 CaMV 35s promoter를 가진 pK2WG7 vector에 이 유전자들을 클로닝하였고 양배추와 같은 십자화과인 애기장대에 형질 전환하였다 (그림 5-118).

- ㉔ 현재 35s::BoMYB29-1, 35s::BoMYB29-2, 35s::BoIQD1, 35s::BoIQD2 라인은 T1 세대, 35s::BoGAD2 라인은 T2 세대까지 라인을 확보하였으며 homozygote line을 선발하여 물질을 분석하고 있다.

35S::BoGAD2

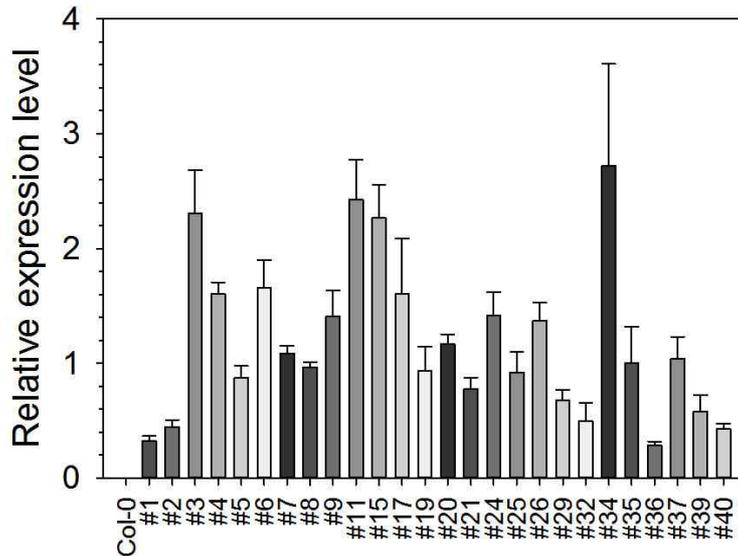


그림 5-118. 35s::BoGAD2 형질전환체의 BoGAD2 유전자 발현

⑤ 배추 글루코시놀레이트 합성 관련 전사인자가 과다발현된 모상근 제작

- ㉔ 실험실에서 이미 확보하고 있는 배추의 글루코시놀레이트 합성관련 유전자를 이용하여 양배추의 줌나방 저항성 라인을 개발하는데 활용하고자 하였다. 양배추와 배추의 글루코시놀레이트 합성관련 유전자는 염기서열 상동성이 매우 높기 때문에 이를 이용하여 양배추 글루코시놀레이트 합성을 조절하는 주요 유전자를 선발하는데 활용하고자 하였다. 이를 위해 35s::BrMYB29-1, 35s::BrMYB29-2, 35s::BrIQD1, 35s::BrIQD2 모상근 라인을 제작하였고 유전자가 과다발현된 라인을 선발하였다 (그림 5-119).
- ㉔ 선발한 모상근 라인에서 모두 글루코시놀레이트 합성관련 유전자의 발현량이 크게 증가한 것을 확인하였다. 현재 글루코시놀레이트 함량을 분석하고 있고 이를 활용하여 양배추유전자 선발에 이용할 계획이다.

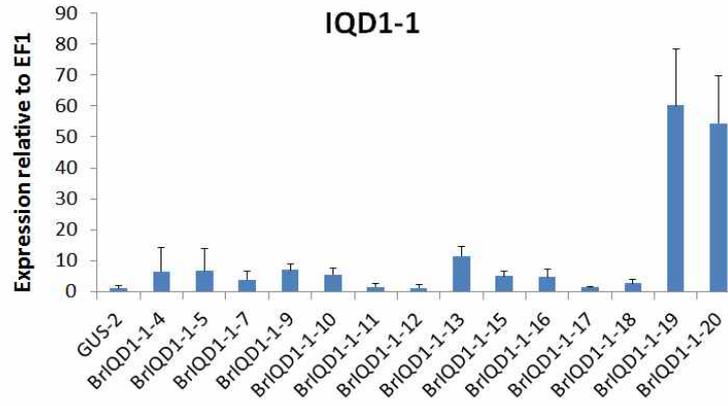
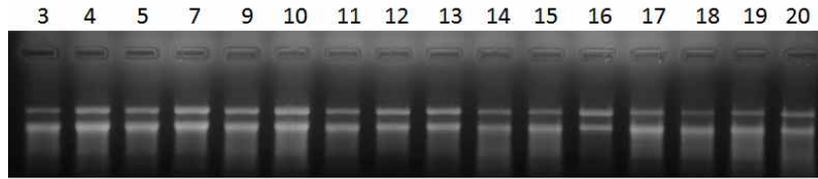


그림 5-119. 35s::BrIQD1 모상근 라인 선발

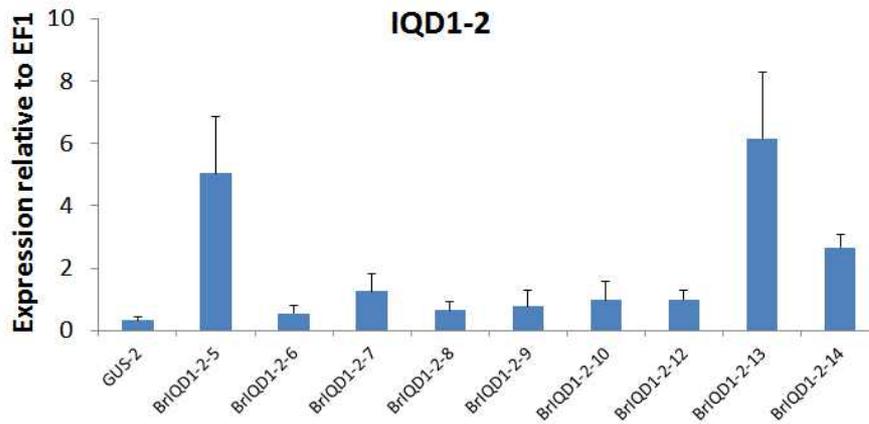
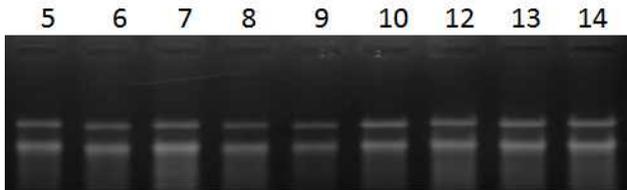


그림 5-120. 35s::BrIQD2 모상근 라인 선발

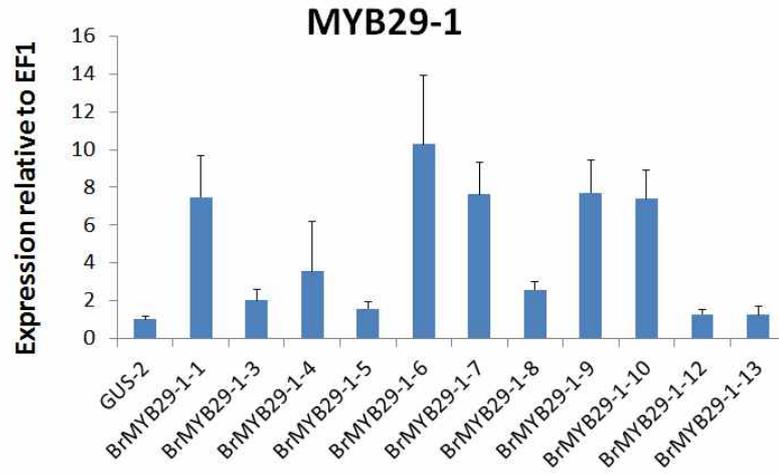
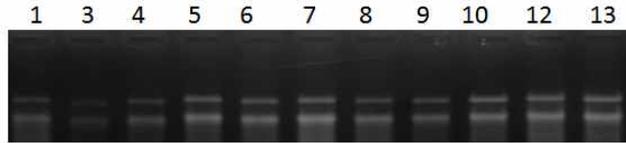


그림 5-121. 35s::BrMYB29-1 모상근 라인 선발

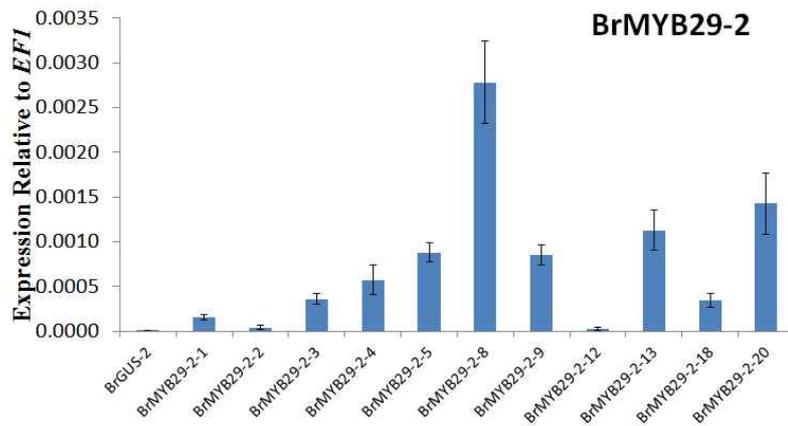
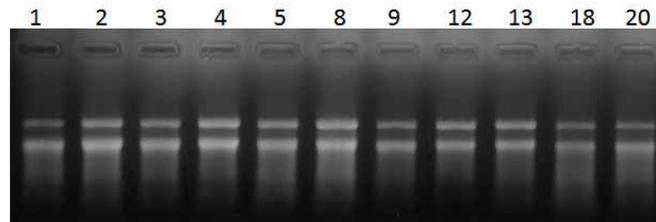


그림 5-122. 35s::BrMYB29-2 모상근 라인 선발

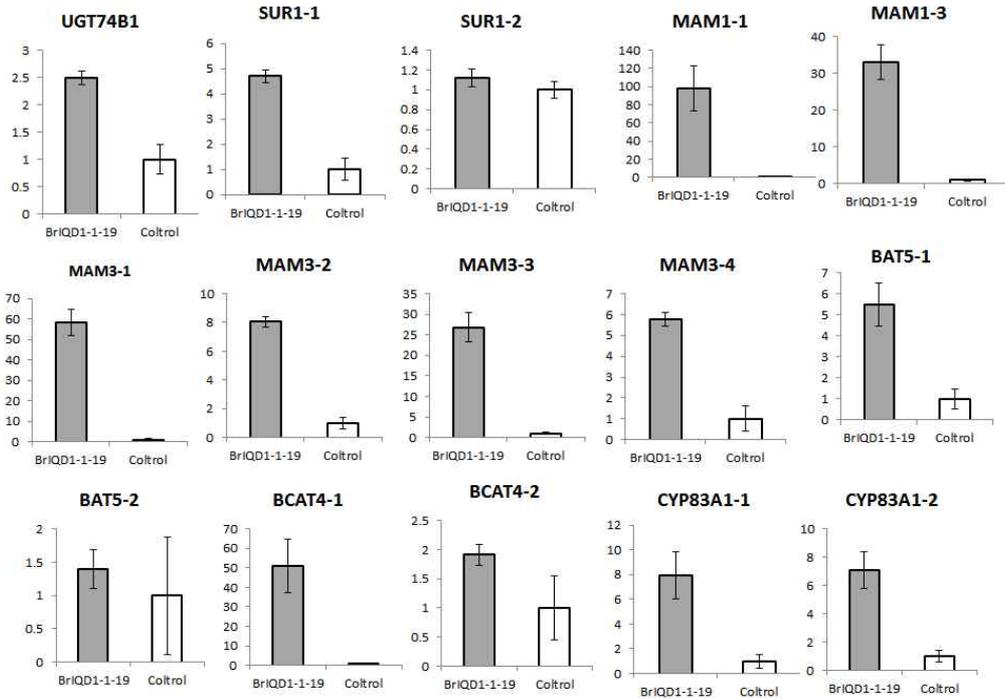


그림 5-123. 35s::BrIQD1 모상근 라인에서 글루코시놀레이트 합성 관련 유전자 발현 분석

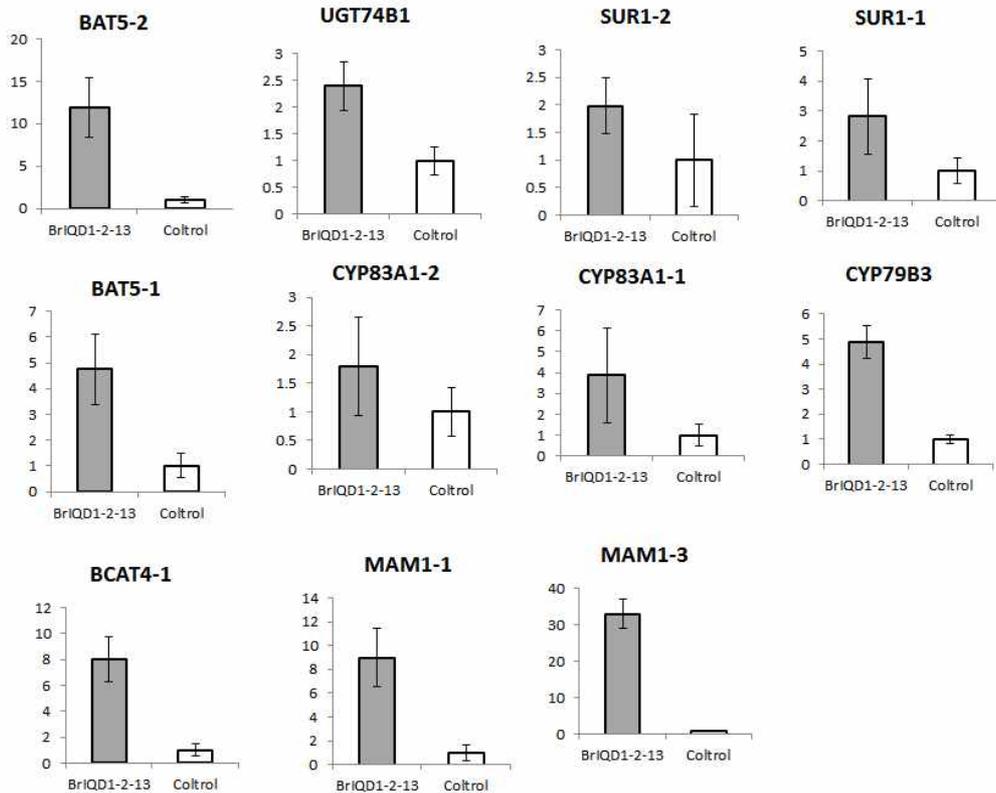


그림 5-124. 35s::BrIQD2 모상근 라인에서 글루코시놀레이트 합성 관련 유전자 발현 분석

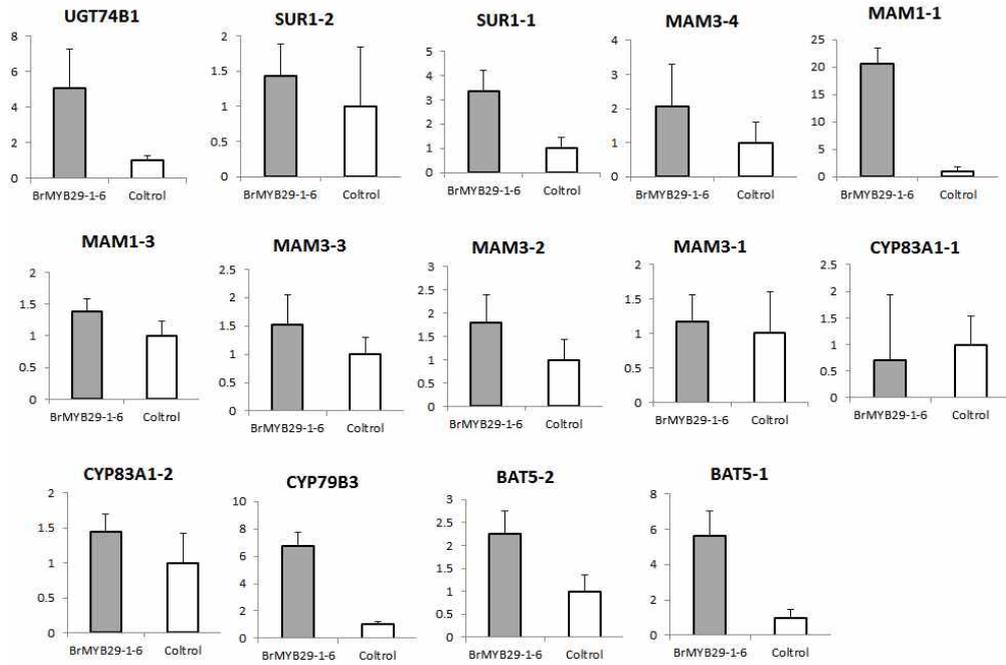


그림 5-125. 35s::BrMYB29-1 모상근 라인에서 글루코시놀레이트 합성 관련 유전자 발현 분석

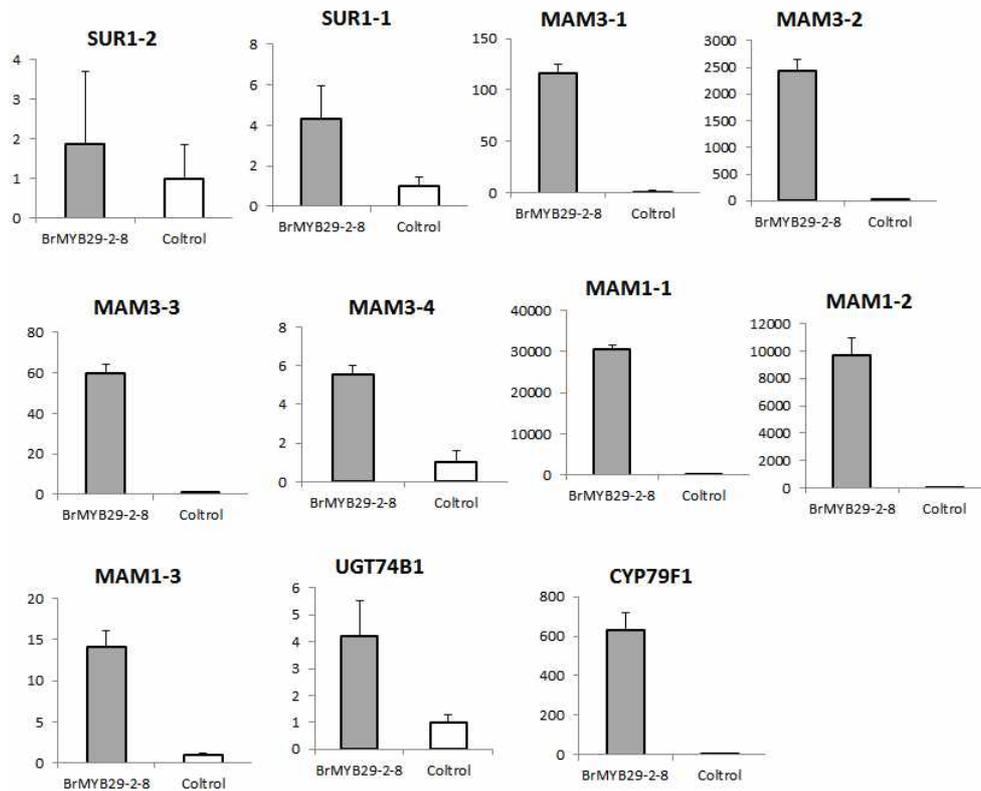


그림 5-126. 35s::BrMYB29-2 모상근 라인에서 글루코시놀레이트 합성 관련 유전자 발현 분석

6. 양배추류 유전자원 수집 및 육종 소재 개발

가. 형질 전환용 multiplex 벡터 construct 제작

① Multiplex 벡터 construct 제작

본 연구팀은 녹색꽃양배추 및 양배추의 복합저항성 형질전환체를 개발하기 위하여 강발현용 35S promoter를 사용하여 유전자 발현 construct를 제작하였다. 적용 유전자로는 제초제 저항성 유전자(Bar gene), 내병성 관련 유전자(배추 유래 Chitinase 유전자), 내충성 유전자(Crystal protein I Ab(Cry I Ab), Crystal protein I Ac(Cry I Ac), Crystal protein II A(Cry II A))이며 이들에 대한 construct의 제작은 다음과 같다.

㉔ Multiplex 벡터 construct 제작 과정

- ㄱ. Bar 유전자가 들어있는 vector (pHm43GW)를 이용해서 Bar 유전자를 PCR로 증폭하기 위하여 Forward primer(5'-GGC CCG GGA TGA GCC CAG AAC GAC G-3')의 5' 영역에 *Sma* I site(밑줄로 표시함)를 붙여 primer를 합성하였고, Reverse primer(5'-GAG CTC TCA GAT CTC GGT GAC GG-3')는 5' 영역에 *Sac* I 제한효소 site(밑줄로 표시함)를 붙여 primer를 합성한 후 Bar 유전자를 증폭하였다(PCR product : 564 bp). 증폭된 산물은 TA 벡터에 cloning하여 염기를 확인 후 사용하였다.
- ㄴ. 모vector로 사용할 pBI121 vector에 제한효소 *Sma* I과 *Sac* I으로 cutting한 후 전기영동하여 GUS 영역이 제거된 pBI121 벡터만을 Gel에서 회수하였다.
- ㄷ. TA 벡터에 cloning하여 염기가 확인된 Bar 유전자의 clone을 배양하여 plasmid를 추출한 후 GUS 영역이 제거된 pBI121 벡터에 ligation하기 위하여 제한효소 *Sma* I과 *Sac* I으로 cutting하고 전기영동하여 Bar 유전자만을 회수하였다.
- ㄹ. *Sma* I과 *Sac* I으로 cutting한 Bar 유전자와 pBI121 vector를 ligation한 후 *DH5a*에 형질전환 시켰다.
- ㅁ. 형질전환한 벡터를 colony PCR로 Bar 유전자가 정확히 들어갔는지를 확인하였고, 확인된 colony는 sequencing을 통하여 재확인하였다(그림 6-1).

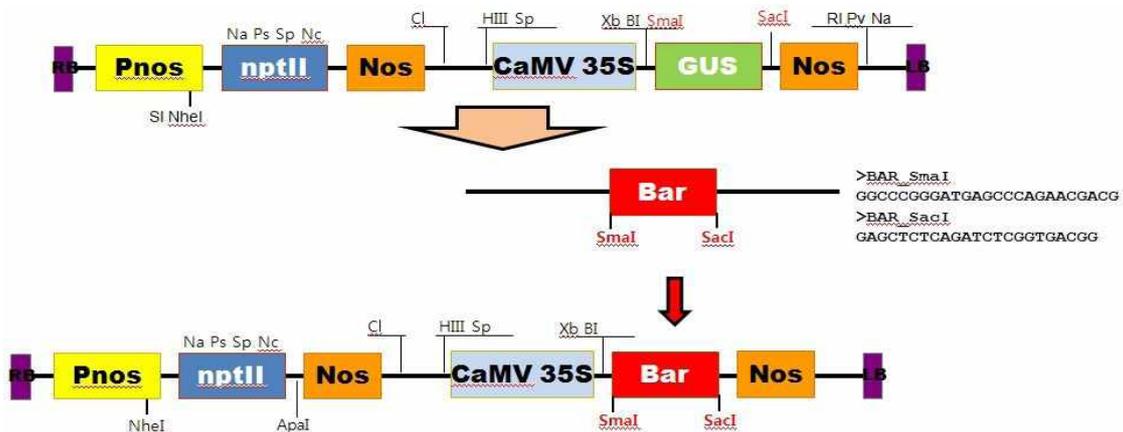


그림 6-1. pBI121 벡터에 제초제 저항성 유전자(Bar gene)의 삽입

- ㄷ. 위의 제초제 저항성 유전자(Bar 유전자)가 삽입된 pBI121 벡터에 내병성 관련 유전자(배추 유래 Chitinase 유전자, BrCLP1과 BrCLP2), 내충성 유전자(Crystal protein I Ab(Cry I Ab), Crystal protein I Ac(Cry I Ac, Crystal protein II A(Cry II A))들을 삽입하기 용이하기 위하여 Gateway system을 도입하였다. 우선 pBI121 벡터에서 cloning에 이용할 수 있는 제한효소 site가 거의 없어서 promoter, terminator, ccdB를 각각 ligation할 제한효소 site를 찾기가 힘들었다. 따라서 ccdB 유전자를 포함한 promoter, terminator를 PCR을 이용해서 한번에 증폭시킨 후 ligation에 이용하였다. PCR 증폭을 위하여 Forward primer(5'-AAG CTT AGG TCA CTG GAT TTT GGT T-3')에 *Hind* III 제한효소 site(밑줄로 표시함)를 붙여 primer를 합성하였고, Reverse primer(5'-CGA TCG ATA GAG CCA AGC TGA TCT CC-3')의 5' 영역에 *Cla* I 제한효소 site(밑줄로 표시함)를 붙여 primer를 합성한 후 Gateway system이 들어있는 vector(pB2GW7)를 template로 이용해서 promoter, ccdB, terminator를 동시에 증폭하였다(PCR product: 3,013 bp). 증폭된 산물은 TA 벡터에 cloning하여 염기를 확인 후 사용하였다.
- ㄸ. Bar 유전자가 삽입된 pBI121 벡터에 제한효소 *Cla* I과 *Hind* III로 cutting하고, TA 벡터에 cloning하여 염기가 확인된 P35s-GW-T35s의 clone을 배양하여 plasmid를 추출한 후 이들을 각각 제한효소 *Cla* I과 *Hind* III로 cutting하고 전기영동하여 pBI121-Bar 및 P35s-GW-T35s 영역을 Gel로부터 회수하였다.
- ㄹ. Gel로부터 회수된 pBI121-Bar 및 P35s-GW-T35s 영역을 ligation한 후 ccdB subway competent cell에 형질전환 하였다(ccdB 유전자를 포함한 vector는 일반 competent cell 사용이 불가능함)(그림 6-2). 그 후 형질전환된 벡터를 colony PCR로 P35s-GW-T35s영역이 정확히 들어갔는지를 확인하였고 확인된 colony는 sequencing을 통하여 재확인하였다(그림 6-3).

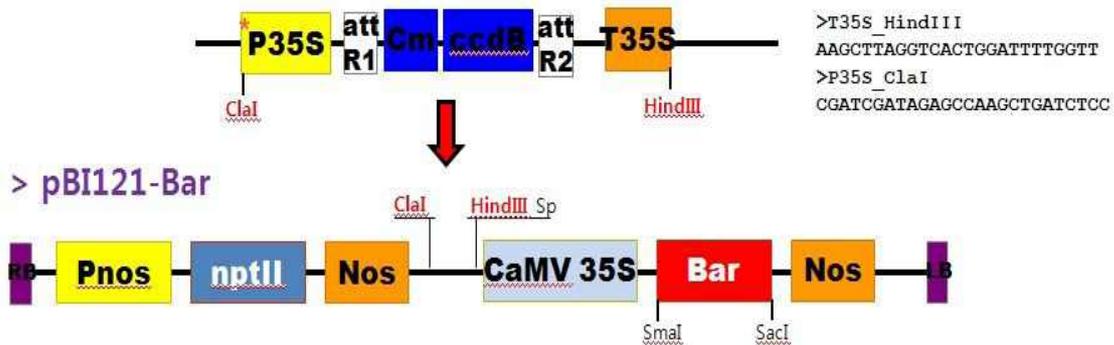


그림 6-2. Bar 유전자가 삽입된 벡터에 Gateway system 과정

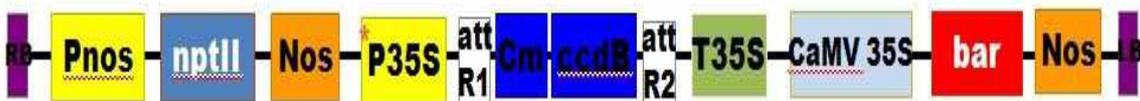


그림 6-3. Bar 유전자가 삽입된 벡터에 Gateway system이 도입된 벡터

- ㄷ. Gateway system이 도입된 pBI121-Bar 벡터에 내병성 관련 유전자(배추 유래 Chitinase 유전자(BrCLP1, BrCLP2) 및 내충성 유전자(Crystal protein I Ab(Cry I Ab), Crystal protein II A(Cry II A) 유전자를 삽입하기 위하여 각각의 유전자들의 특이적 primer에 attB site를 붙여 합성한 다음 PCR로 증폭하였다.
- ㄸ. 각각의 유전자에 대한 증폭된 산물은 pDONR vector와 BP reaction 후, DH5a에 형질전환 시켰다.
- ㄹ. BP 형질전환한 vector들은 sequencing하여 염기를 정확하게 확인하였다.
- ㅅ. BP reaction한 vector와 제작한 Gateway vector를 LR reaction 후, DH5a에 형질전환하여 형질전환용 벡터를 완성시켰다. 그 과정은 아래의 그림 6-4와 같다.

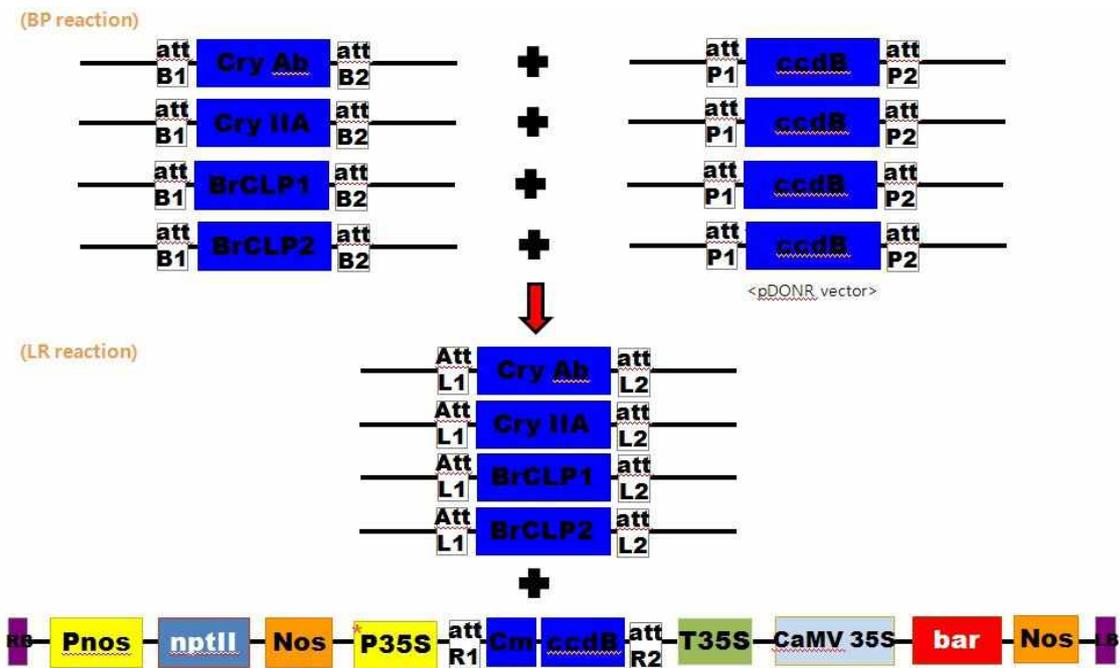


그림 6-4. 도입 유전자들의 BP 반응 및 LR 반응 후 Gateway에 도입과정

- ㅈ. 최종적으로 Gateway system을 이용하여 완성된 형질전환용 벡터 5종과 기존 본 실험실에서 보유중인 벡터 1종의 총 6종을 형질전환용 벡터로 이용하였다 (그림 6-5).

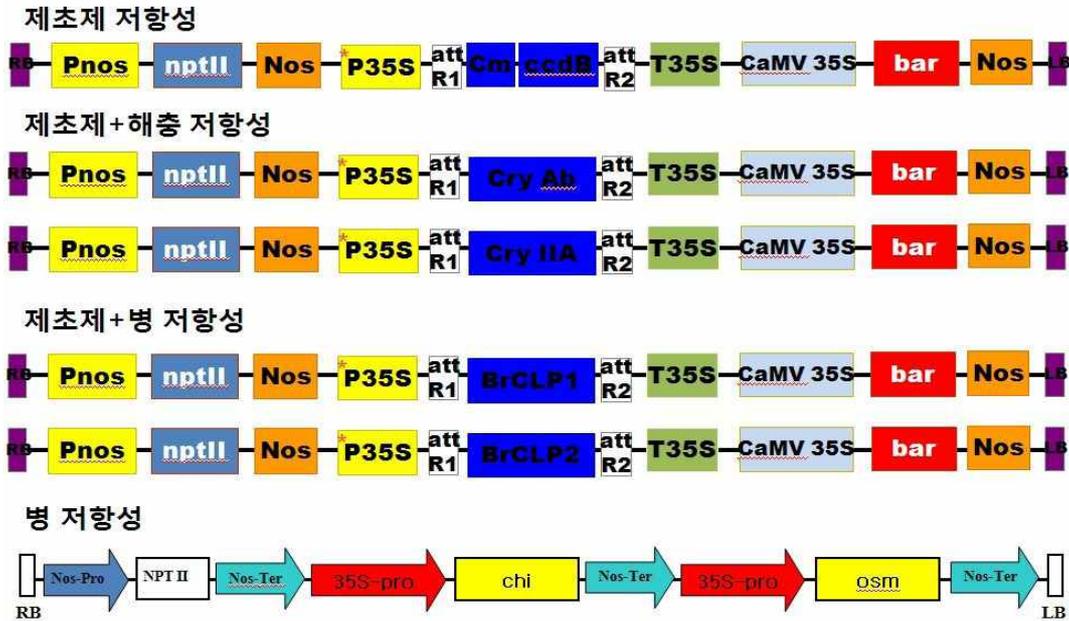


그림 6-5. 형질전환에 사용한 벡터

② 항생제 무선탐용 벡터 구축

㉠ 현재 농촌진흥청에서 시행중인 차세대바이오21사업 중 GM작물실용화사업단에서 요구되는 조건 중 하나가 형질전환체 선발 마커인 항생제(Kanamycin 또는 Hygromycin 등)를 사용하지 않고 형질전환체를 작제하는 것이다. 따라서 본 연구에서는 해충 및 제초제 저항성 유전자가 도입된 무선탐용(Kanamycin 또는 Hygromycin 등의 형질전환체 선발 마커를 사용하지 않음) 벡터를 제작하여 녹색꽃양배추 및 양배추의 형질전환에 사용하였다(그림 6-6).

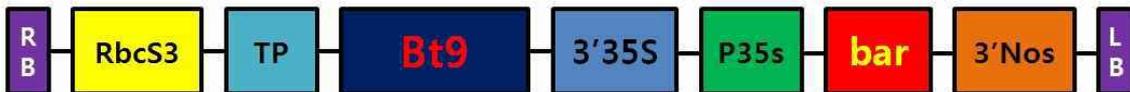


그림 6-6. 형질전환에 사용된 항생제 무선탐용 벡터

나. 양배추류 유전자원 수집 및 고정

① 양배추류 핵심집단 증식 및 사업단 기탁

㉠ 영국수집(1차) 핵심집단 증식

ㄱ. 핵심집단의 증식을 위해 한국 생명공학 연구원(주관과제 책임자)이 영국에서 수집한 브로콜리, 컬리플라워, 케일 등 45계통의 종자를 2012년 8월 11일 지베렐린 처리 후 1차 파종하였다. 분양 받은 계통들은 대체적으로 발아력이 매우 약하여 31% 수준의 발아율을 보였고 발아된 개체들은 저온처리를 거쳐 재배·증식하였다(표 6-1, 그림 6-7). 핵심집단 개체들은 2013년 3월 중순부터 5월 중순까지 Bud Selfing 교배 하였고, 교배 후 생산된 종자는 1세부과제에 기탁하였다.

표 6-1. 1차 핵심집단 재배·증식

*과종 : 2012년 8월 11일

B.N	품종명	계통명	총 종자	과종	발아 수	잔여량	채종량
CB01	BI88908	Broccoli	3	3	1	0	15
CB02	Cal18b	Broccoli	5	3	2	2	280
CB03	Cor12b	Broccoli	5	3	0	2	0(미발아)
CB04	GDDH33	Broccoli	5	3	0	2	0(미발아)
CB05	HRIGRU004705 DH1	Broccoli	5	3	2	2	0
CB06	HRIGRU004872 DH2	Broccoli	5	3	0	2	0(미발아)
CB07	HRIGRU004885 DH2	Broccoli	5	3	1	2	0
CB08	HRIGRU011802 DH3	Broccoli	5	3	0	2	0(미발아)
CB09	MarDH34	Broccoli	5	3	0	2	0(미발아)
CB10	Sho5a	Broccoli	5	3	0	2	0(미발아)
CB11	HRIGRU005416 DH1	Broccoli	2	2	0	0	0(미발아)
CB12	HRIGRU005419 DH4	Broccoli	3	3	0	0	0(미발아)
CB13	HRIGRU007514 DH3	Broccoli	3	3	0	0	0(미발아)
CB14	Ner9b	Broccoli	3	3	1	0	0(고사)
CB15	HRIGRU002400 DH1	Broccoli	5	3	0	2	0(미발아)
CB16	HRIGRU004707 DH1	Broccoli	5	3	0	2	0(미발아)
CB17	HRIGRU005295 DH6	Broccoli	5	3	1	2	0(고사)
CB18	HRIGRU005557 DH6	Broccoli	3	3	0	0	0(미발아)
CB19	HRIGRU011800 DH2	Broccoli	5	3	0	2	0(미발아)
CB20	HRIGRU002403 DH1	Broccoli	3	3	0	0	0(미발아)
CB21	AC582	Brussels sprout	5	3	0	2	0(미발아)
CB22	Sir5a	Cauliflower	5	3	0	2	0(미발아)
CB23	HRIGRU008266 DH1	Cauliflower	3	3	1	0	450
CB24	HRIGRU006797 DH5	Cauliflower, autumn	5	3	1	2	550
CB25	HRIGRU011729 DH2	Cauliflower, autumn	3	3	0	0	0(미발아)
CB26	HRIGRU004854 DH5	Cauliflower, green	3	3	0	0	0(미발아)
CB27	HRIGRU004861 DH2	Cauliflower, romanesco	5	3	0	2	500
CB28	HRIGRU004991 DH1	Cauliflower, summer	3	3	0	0	0(미발아)
CB29	Sur186a	Cauliflower, summer?	5	3	0	2	0(미발아)
CB30	Wom38a	Cauliflower, summer?	3	3	2	0	96
CB31	HRIGRU002891 DH1	Cauliflower, winter	5	3	2	2	800
CB32	HRIGRU004821 DH2	Cauliflower, winter	5	3	1	2	0(고사)
CB33	HRIGRU004293 DH1	Kale	5	3	0	2	0(미발아)
CB34	HRIGRU008202 DH2	Kale	4	3	1	1	0(고사)
CB35	HRIGRU009846 DH4	Kale	5	3	0	2	0(미발아)
CB36	HRIGRU013023 DH1	Kale	5	3	0	2	0(미발아)

CB37	HRIGRU007543 DH5	Kale, Chinese	3	3	0	0	0(미발아)
CB38	A12DHd	Kale, Chinese white	5	3	1	2	2
CB39	Senna	Kale, Chinese white	5	3	0	2	0(미발아)
CB40	HRIGRU005108 DH2	Kale, Chinese white	5	3	0	2	0(미발아)
CB41	HRIGRU007544 DH1	Kale, Chinese white	4	3	1	1	33
CB42	HRIGRU009845 DH7	Kale, Chinese white hybrid	3	3	1	0	260
CB43	HRIGRU005389 DH3	Kohl rabi	3	3	1	0	0(고사)
CB44	HRIGRU008267 DH2	Kohl rabi	5	3	0	2	0(미발아)
CB45	HRIGRU011446 DH8	Tronchuda cabbage	5	3	0	2	0(미발아)

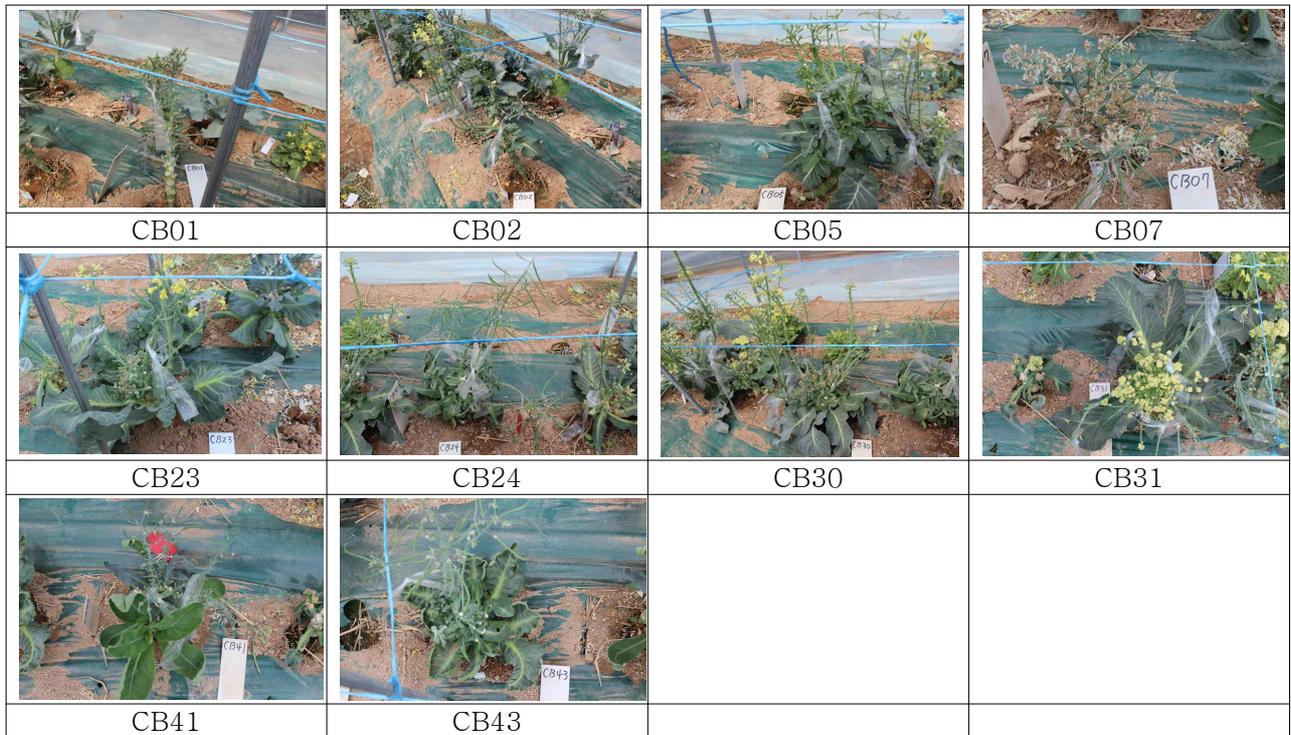


그림 6-7. 1차 핵심집단 교배 및 종자 증식 전경

ㄴ. 4차년도에는 핵심집단의 증식을 위해, 3차년도에 소량 증식된 브로콜리, 컬리 플라워, 케일 등 8계통의 종자를 2013년 8월 6일 재 파종하였다. 분양 받은 계통들은 대체적으로 68% 수준의 발아율을 보였고 발아된 개체들은 2013년 8월 22일 노지 정식 후 저온처리를 거쳐 재배 및 교배 후 채종하였다(표 6-2, 그림 6-8). M26 계통은 미발아 하였고 M27, M28 계통은 늦가을 조기 추대로 인해 가을 채종을 진행하였다. 그 외 핵심집단 개체들은 Bud Selfing (2014년 2월

18일 ~ 4월 11일)을 통해 종자 꼬투리를 형성하였고 채종 후 1세부과제에 기
탁하였다.

표 6-2. 1차 핵심집단 재 증식

*과종 : 2013년 8월 6일

BN	Line name	Species	과종 수	발아 수	증식 수	교배일	채종량	비고
M21	CB01	Broccoli	2	2	2	3/3	200	
M22	CB02	Broccoli	21	8	2	2/18	108	
M23	CB23	Cauliflower	21	17	2	4/11	320	
M24	CB30	Cauliflower, summer	21	14	2	3/30	400	
M25	CB31	Cauliflower, winter	21	19	2	4/2	320	
M26	CB38	Kale, Chinese white	2	0	0	-	-	
M27	CB41	Kale, Chinese white	21	10	2	12/2	35	조기추대
M28	CB42	Kale, Chinese white hybrid	21	19	2	12/2	550	조기추대

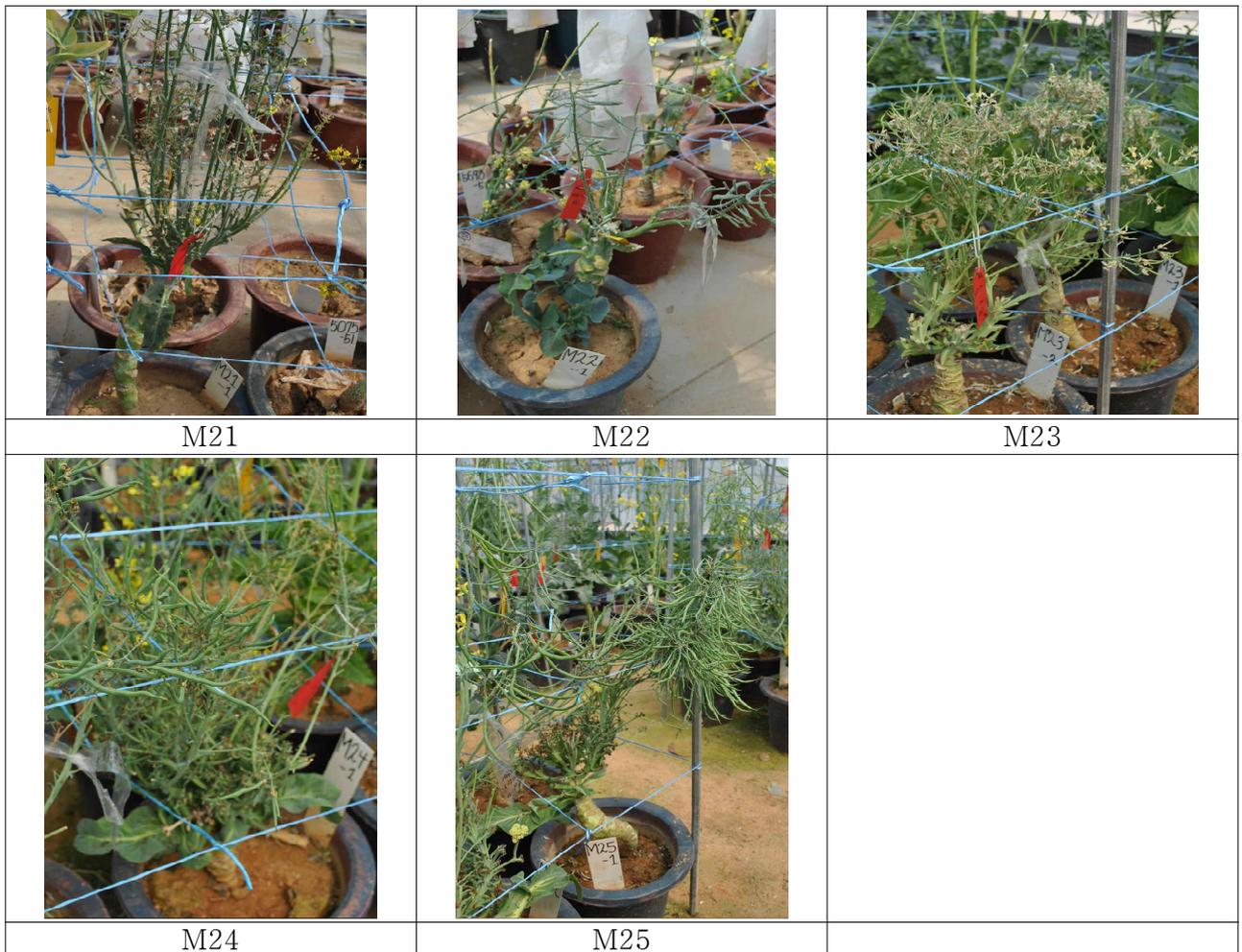


그림 6-8. 1차 핵심집단 재 증식 전경

ㄷ. 5차년도에는 4차년도에 증식 채종한 7계통의 세대 진전을 위해 2014년 8월 6일 파종하여 정식·재배하였다. 봄 추대를 위해 저온처리를 거친 개체들은 2015년 봄 교배를 통해 종자를 채종하였고(표 6-3, 그림 6-9) 채종된 종자는 제1세 부과제에 전달하였다.

표 6-3. 1차 핵심집단 세대진전

*파종 : 2014년 8월 6일

BN	Line name	Species	교배일	채종량
16	CB01-1-2	Broccoli	3/23~4/23	80
17	CB02-1-2	Broccoli	3/23	29
18	CB23-1-2	Cauliflower	4/15~4/21	550
19	CB30-1-2	Cauliflower, summer	4/18	350
20	CB31-1-2	Cauliflower, winter	4/8	450
21	CB41-1-1	Kale, Chinese white	3/23	19
22	CB42-1-1	Kale, Chinese white hybrid	5/6~5/20	500

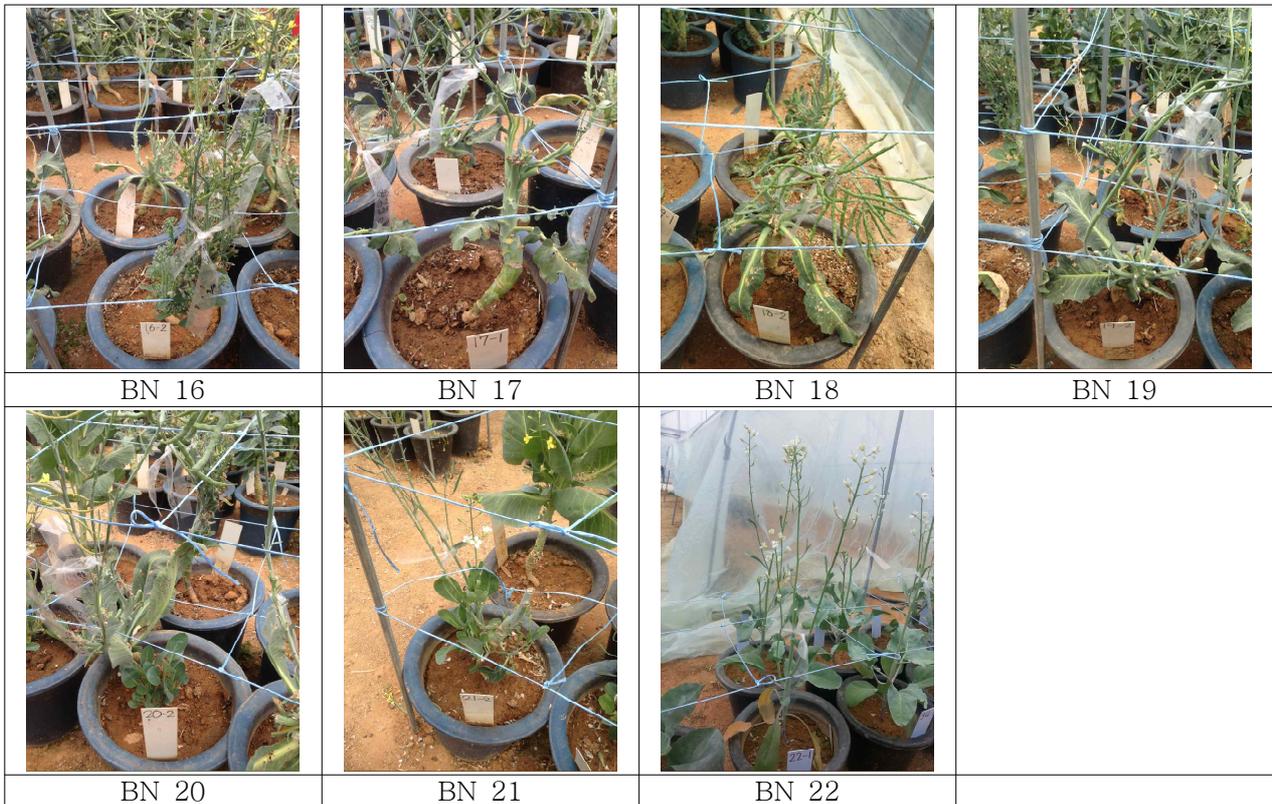


그림 6-9. 1차 핵심집단 세대진전 전경

㉔ 독일수집(2차) 핵심집단 증식

ㄱ. 영국 수집 핵심 집단의 경우 낮은 발아율과 저조한 생육으로 종자 증식을 위한 작업을 수행하기 어려워 2차로 독일에서 수집한 계통을 추가로 증식하였다. 핵심집단의 증식을 위해 한국 생명공학 연구원이 독일에서 수집한 브로콜리, 컬리플라워, 콜라비, 케일 등 58계통의 종자를 2012년 8월 30일 지베렐린 처리 후 파종하였다. 분양 받은 58계통은 1차 핵심집단 계통과는 달리 1계통(CG49)을 제외한 나머지 계통들은 전부 우수한 발아율을 보였다. 발아된 개체들은 추대를 위해 저온처리를 거쳐 재배하였고 교배·채종 과정을 거쳐(표 6-4, 그림 6-10) 생산된 종자는 1차 핵심집단 종자와 함께 1세부과제에 전달하였다.

표 6-4. 2차 핵심집단 재배·증식

*파종 : 2012. 08. 30

BN	작물명	특징	종자량	파종립수	채종량
CG01	Robertiana		5	5	0(미추대)
CG02	cabbage		5	5	0(미추대)
CG03	kale	Red&White Peacock	5	5	320
CG04	kale		5	5	250
CG05	palm leaf kale		5	5	430
CG06	palm leaf kale		5	5	900
CG07	palm leaf kale	Negro Romano	5	5	1000
CG08	palm leaf kale	Lacinato	5	5	900
CG09	thousand head		5	5	700
CG10	thousand head	and-headed Kale	5	5	350
CG11	borecole	warf Blue Scotch	5	5	250
CG12	borecole	Dwarf Siberian	5	5	1000
CG13	borecole	Frosty	5	5	600
CG14	chinese kale	White Flowered	5	5	80
CG15	chinese kale	Full White	5	5	77
CG16	chinese kale		5	5	500
CG17	cauliflower		5	5	500
CG18	cauliflower	Rosalind	5	5	300
CG19	cauliflower	Palla di Neve	5	5	400
CG20	cauliflower	Napoli-Natalino	5	5	650
CG21	broccoli	Wartburgland	5	5	450
CG22	broccoli		5	5	50
CG23	broccoli		5	5	500
CG24	broccoli	Purple Broccoli	5	5	450
CG25	cabbage	prouting Broccoli	5	5	550
CG26	cabbage		5	5	700
CG27	cabbage		5	5	250
CG28	cabbage		5	5	1300
CG29	cabbage		5	5	700
CG30	cabbage	Jersey Queen	5	5	700
CG31	red cabbage	Red Danich	5	5	0(미추대)
CG32	red cabbage	Red Hollander	5	5	650

CG33	savoy cabbage		5	5	800
CG34	savoy cabbage	Drumhead Early	5	5	250
CG35	savoy cabbage	Gelba	5	5	850
CG36	savoy cabbage	Rheinherbst	5	5	800
CG37	brussels sprouts		5	5	250
CG38	brussels sprouts		5	5	400
CG39	brussels sprouts	Mezzo Nano	5	5	700
CG40	brussels sprouts	Prominent	5	5	900
CG41	brussels sprouts	Landora	5	5	170
CG42	kohl rabi		5	5	1300
CG43	kohl rabi		5	5	800
CG44	kohl rabi	GALANT	5	5	400
CG45	kohl rabi	ROBLAU	5	5	250
CG46	gladis		5	5	0(미추대)
CG47	Gladis		5	5	0(미추대)
CG48	viridis	Ovari	5	5	46
CG49	Medullosa	headed, Milles Tetes Anglais	5	5	0(미추대)
CG50	medullosa		5	5	1000
CG51	Viridis	Cavalier	5	5	500
CG52	viridis		5	5	600
CG53	Viridis	send Head Kale Dwarf Canson	5	5	800
CG54	Constata		5	5	150
CG55	Viridis	cavolo	5	5	600
CG56	gladis		5	5	350
CG57	Costata		5	5	300
CG58	medullosa		5	5	500

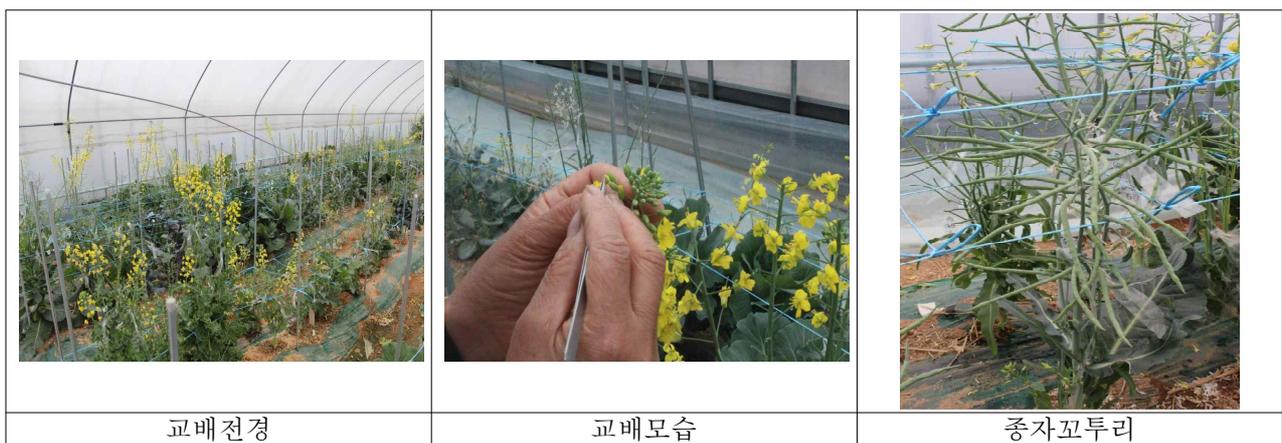


그림 6-10. 2차 핵심집단 교배 및 종자증식 전경

ㄴ. 4차년도에는 3차년도에 증식한 52계통의 세대진전을 위해 2013년 8월 6일 파종하고 8월 22일에 노지 정식하였다. 파종한 52계통은 우수한 발아율을 보였고 발아된 개체들은 추대를 위해 저온처리 과정을 거친 후 교배·채종하였다(표 6-5, 그림 6-11).

표 6-5. 4차년도 2차 핵심집단 재배·증식(세대진전)

BN	Line name	Species	파종 수	발아 수	증식 수	교배일	채종량
M29	CG03	kale	21	19	2	3/20	300
M30	CG04	kale	21	16	2	3/17	400
M31	CG05	palm leaf kale	21	19	2	3/21	700
M32	CG06	palm leaf kale	21	21	2	3/17	1600
M33	CG07	palm leaf kale	21	20	2	3/25	800
M34	CG08	palm leaf kale	21	19	2	3/8	950
M35	CG09	Thousand head	21	15	2	3/17	400
M36	CG10	thousand head	21	3	2	4/4	300
M37	CG11	borecole	21	14	2	4/1	470
M38	CG12	borecole	21	20	2	4/11	1100
M39	CG13	borecole	21	18	2	4/2	200
M40	CG14	chinese kale	21	19	2	12/4	400
M41	CG15	chinese kale	21	18	2	12/3	2000
M42	CG16	chinese kale	21	13	2	12/3	1200
M43	CG17	cauliflower	21	13	2	3/20	2300
M44	CG18	cauliflower	21	17	2	3/17	270
M45	CG19	cauliflower	21	17	2	4/11	300
M46	CG20	cauliflower	21	16	2	3/30	540
M47	CG21	broccoli	21	19	2	3/30	600
M48	CG22	broccoli	21	17	2	12/6	150
M49	CG23	broccoli	21	18	2	2/18	98
M50	CG24	broccoli	21	17	2	4/4	59
M51	CG25	cabbage	21	15	2	-	0
M52	CG26	cabbage	21	11	2	4/4	600
M53	CG27	cabbage	21	18	2	3/25	230
M54	CG28	cabbage	21	19	2	4/11	400
M55	CG29	cabbage	21	15	2	4/1	300

M56	CG30	cabbage	21	14	2	4/2	250
M57	CG32	red cabbage	21	20	2	4/11	500
M58	CG33	savoy cabbage	21	21	2	4/11	250
M59	CG34	savoy cabbage	21	18	2	4/1	180
M60	CG35	savoy cabbage	21	9	2	4/4	250
M61	CG36	savoy cabbage	21	18	2	4/1	800
M62	CG37	brussels sprouts	21	19	2	4/1	100
M63	CG38	brussels sprouts	21	15	2	4/1	100
M64	CG39	brussels sprouts	21	19	2	4/1	460
M65	CG40	brussels sprouts	21	18	2	4/4	470
M66	CG41	brussels sprouts	21	15	2	3/27	250
M67	CG42	kohl rabi	21	11	2	3/20	150
M68	CG43	kohl rabi	21	16	2	3/17	170
M69	CG44	kohl rabi	21	15	2	3/28	630
M70	CG45	kohl rabi	21	14	2	4/11	220
M71	CG48	viridis	21	19	2	3/28	68
M72	CG50	medullosa	21	21	2	3/28	1100
M73	CG51	Viridis	21	17	2	3/26	280
M74	CG52	viridis	21	16	2	3/17	540
M75	CG53	Viridis	21	15	2	4/3	150
M76	CG54	Constata	21	15	2	3/25	400
M77	CG55	Viridis	21	18	2	3/28	400
M78	CG56	gladis	21	14	2	3/18	410
M79	CG57	Costata	21	8	2	3/26	380
M80	CG58	medullosa	21	17	2	3/25	550

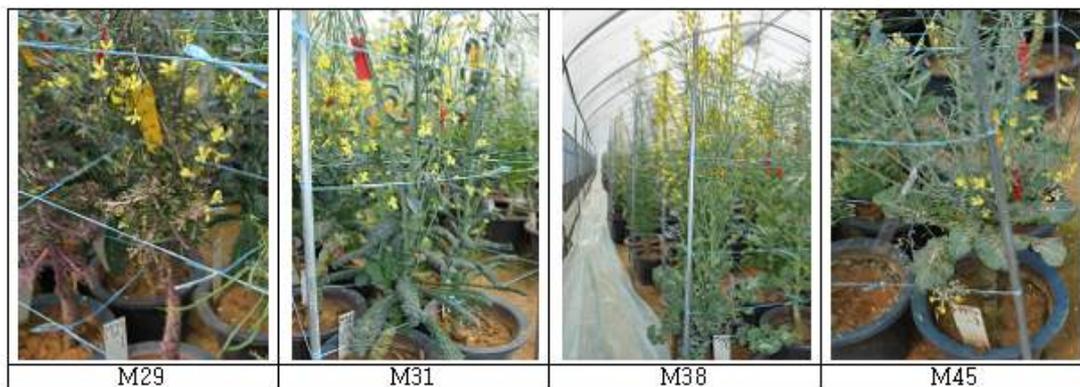




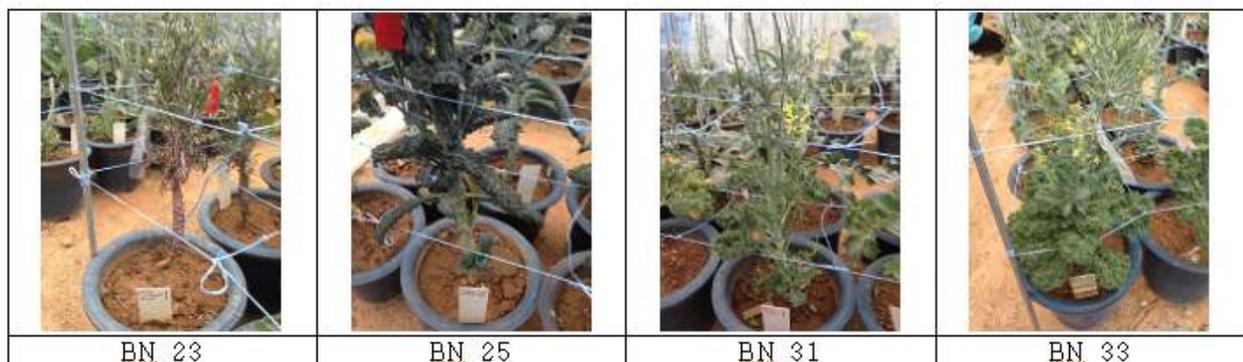
그림 6-11. 4차년도 2차 핵심집단 재배·증식(세대진전) 전경

- ㄷ. 5차년도에는 4차년도에 증식한 51계통의 세대진전을 위해 2014년 8월 6일 파종하고 8월 22일에 노지 정식하였다. 파종·발아·정식한 개체들은 가을재배 후 추대를 위해 저온처리 과정을 거쳐, 2015년 봄 교배를 통해 종자를 채종하였다 (표 6-6, 그림 6-12). 채종한 종자는 제1세부과제에 전달하였다.

표 6-6. 5차년도 2차 핵심집단 재배·증식(세대진전)

BN	Line name	Species	교배일	채종량
23	CG03-3-2	kale	3/30~4/11	300
24	CG04-2-2	kale	3/22	18
25	CG05-2-1	palm leaf kale	3/24~4/9	200
26	CG06-2-1	palm leaf kale	4/4/~4/8	250
27	CG07-3-1	palm leaf kale	4/3~4/4	400
28	CG08-3-2	palm leaf kale	3/24~4/15	85
29	CG09-1-2	Thousand head	3/24~3/25	55
30	CG10-2-2	thousand head	4/9~4/17	1100
31	CG11-2-2	borecole	4/12	600
32	CG12-1-2	borecole	4/12	200
33	CG13-4-1	borecole	4/9	900
34	CG14-2-1	chinese kale	5/6~5/20	400
35	CG15-1-1	chinese kale	5/6~5/20	100
36	CG16-3-1	chinese kale	5/6~5/20	66
37	CG17-1-1	cauliflower	3/23	1300
38	CG18-2-2	cauliflower	3/23~4/2	200
39	CG19-2-1	cauliflower	4/2~4/9	41
40	CG20-4-2	cauliflower	4/18	400
41	CG21-2-1	broccoli	4/9	550
42	CG22-3-1	broccoli	3/6	0
43	CG23-3-1	broccoli	3/23~3/26	130
44	CG24-3-1	broccoli	4/9~4/18	100
45	CG26-2-1	cabbage	4/9	700
46	CG27-3-1	cabbage	4/6~4/7	210
47	CG28-1-2	cabbage	4/9~4/17	800
48	CG29-1-1	cabbage	4/6~4/9	500
49	CG30-1-2	cabbage	4/6	53
50	CG32-1-2	red cabbage	4/9~4/17	950
51	CG33-1-2	savoy cabbage	4/12	650
52	CG34-2-2	savoy cabbage	4/12~4/17	200
53	CG35-2-2	savoy cabbage	4/12	100

54	CG36-3-1	savoy cabbage	4/12~4/17	200
55	CG37-1-2	brussels sprouts	4/9~4/21	23
56	CG38-2-1	brussels sprouts	4/12	136
57	CG39-3-1	brussels sprouts	4/6	450
58	CG40-4-1	brussels sprouts	4/12	500
59	CG41-2-1	brussels sprouts	4/6~4/12	400
60	CG42-1-1	kohl rabi	3/6~3/23	100
61	CG43-3-1	kohl rabi	3/6	0
62	CG44-3-2	kohl rabi	4/9	700
63	CG45-2-1	kohl rabi	4/12~4/28	26
64	CG48-1-2	viridis	4/12	3
65	CG50-2-2	medullosa	4/9	29
66	CG51-1-1	Viridis	4/6~4/9	109
67	CG52-2-2	viridis	3/24	44
68	CG53-2-1	Viridis	4/17	100
69	CG54-2-1	Constata	-	-
70	CG55-2-1	Viridis	4/4	400
71	CG56-4-2	gladis	3/27	200
72	CG57-1-1	Costata	4/4~4/6	73
73	CG58-1-1	medullosa	3/30	100



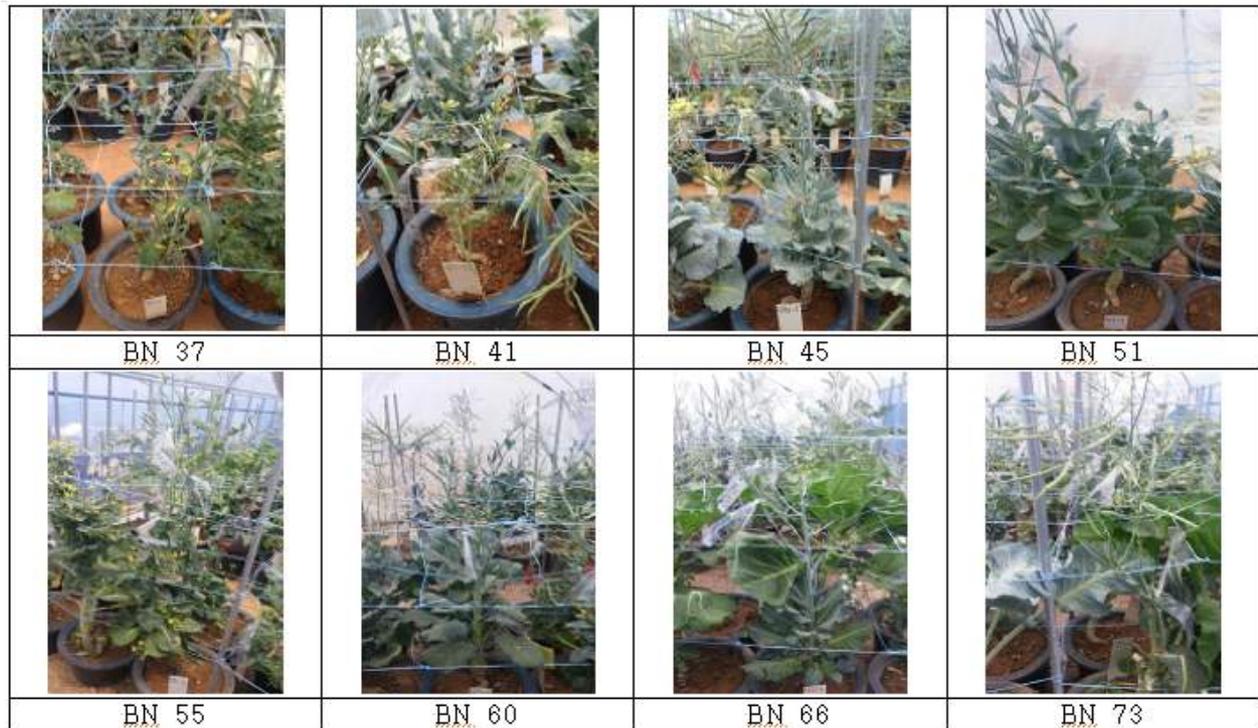


그림 6-12. 5차년도 2차 핵심집단 재배·증식(세대진전) 전경

㉔ 핵심집단의 소포자 배양

ㄱ. 유전집단의 소포자 배양과 마찬가지로 핵심집단 또한 무병주 생산, 생육연한 단축 및 염색체 배가를 통한 고정된 동형접합체 유기를 기대하며 소포자 배양을 실시하였다. 영국 수집 계통의 경우 대부분 Doubled Haploid(DH)이고 저조한 발아율과 추대로 인해 독일 수집 계통의 소포자 배양 실험만을 수행하였다. 실험 방법은 유전집단 소포자 배양과 동일하게 이루어졌고 실험 수행 개체 수 또한 동일한 이유로 10계통에서만 수행할 수 있었다. 10계통 중 CG06, CG57 계통은 생장배지 1, 30℃처리 조건에서 배가 형성되었고 CG45, CG50계통은 생장배지 2, 30℃처리 조건에서 배가 형성되었으며 CG45는 가장 많은 수의 배 발생을 확인할 수 있었다.(표 6-7, 그림 6-13).

표 6-7. 핵심집단 소포자 배양결과

BN	작물명	배양 개수(petridish)	생장배지*	온도처리	배 발생	MS 배지치상
CG06	Palm leaf kale	30	1번	30℃	7	7
CG18	Cauliflower	30	1번	30℃		
CG27	Cabbage	30	1번	30℃		
CG41	Brussels sprouts	30	1번	30℃		
CG45	Kohl rabi	30	2번	30℃	68	68
CG50	Medullosa	30	2번	30℃	9	9
CG51	Viridis	30	1번	30℃		
CG54	Constata	30	1번	30℃		

CG55	Viridis	30	1번	30℃		
CG57	Constata	30	1번	30℃	13	13

* 1번배지: NLN+Sucrose13%+AgNO₃ 1.0mg/ml+NAA0.5mg/ml+BAP0.5mg/ml (PH6.0)
 2번배지: NLN+Sucrose13%+AgNO₃ 1.0mg/ml+NAA1.0mg/ml+BAP1.0mg/ml (PH6.0)

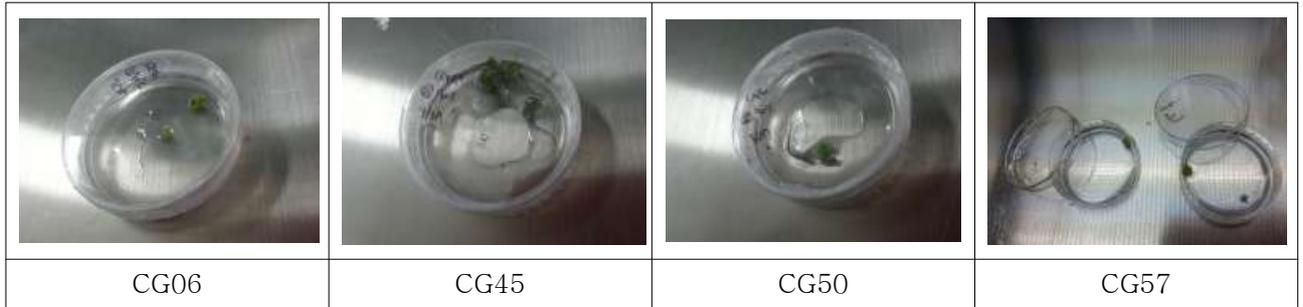


그림 6-13. 핵심집단 소포자 배양을 통한 배 발생 모습

② 석회결핍, 배추좀나방 계통 및 조합 선발

㉠ 석회결핍증 내성 계통 선발: 1차 년도는 과제의 출범과 함께 시험에 착수하였으나 실제적 과제의 출발이 늦어져 2010년 8월 7일에 기 보유 계통 및 수집 자원의 특성 검정을 위하여 380계통을 파종하여 발아가 진행된 210계통 중 주수가 충분히 확보된 68계통을 동년 9월 14일에 플라스틱하우스 내에 정식하고 정상관수 후 2주간의 단수를 2차례 실시하여 칼슘결핍증 발현을 유도하였다. 비배관리는 정식 하우스에 석회를 시용하지 않고 질소를 증시하여 칼슘결핍증 발생환경을 조장하였다. 조사는 결구 이후 구를 횡단하여 조사하였다. 조사에서 칼슘결핍증이 발현된 계통과 발현되지 않은 계통의 구분은 가능하였으나 발현 정도의 차이는 파악이 어려웠다. 따라서 본 시험에서는 칼슘결핍증에 민감한 계통이 확인되었다고 할 수 있다. 칼슘결핍에 민감한 반응을 나타낸 계통은 102045, 102119, 107173, 100466, 100610, 100625, 111658 등 7계통이었다. 이들 계통 중 102119 계통이 가장 민감한 것으로 조사되었다. 이후 2차 봄 시험은 2011년 2월 26일 76계통을 파종하여 동년 3월 5일에 단일플라스틱 포트에 원예상토를 사용하여 정식하고 생육을 진전시켜 관수조절하고 상토비절 후 시비조절을 통해 칼슘결핍증을 유도하였다.



㉔ 2차 년도에 1차 158점 2차 120점에 대한 평가를 수행하였다. 1차는 158점을 2011년 8월 5일에 파종하여 육묘한 유묘를 2011년 9월 5일에 직경 12cm 플라스틱 포트에 시판원예상토(원조믹스)를 사용하여 이식하여 관리하고 10월 2일부터 10월 7일까지와 10월 23일부터 10월 28일까지 두 차례에 걸쳐 단수를 실시하여 건조 스트레스 조건을 제공하였다. 조사는 11월11일에 석회결핍이 전혀 발생하지 않은 것을 1로하고 매우 심하게 발생한 것을 9로 하여 1~9단계로 달관조사에 의하여 실시하였다. 공시된 계통은 유전자원 특성 평가와 동일한 자원으로 동시에 육묘된 묘를 시험에 사용하였으며 공시번호 도 동일하다.

내성을 보이는 1~3계급에 속하는 계통이 123계통, 중간그룹인 4~6계급에 속하는 계통이 10계통 그리고 민감성을 보이는 7~9계급에 속하는 계통이 25계통으로 조사되었다. 이들 가운데 강한 내성을 보인 1등급에 속하는 계통은 94계통, 민감하게 반응한 9등급에 속하는 계통은 9계통이었다. 이는 석회결핍에 민감한 계통이 기존의 계통선발과정에서 어느 정도 도태되어 석회결핍에 둔감한 재료들이 주로 육성되어 온 결과로 이해된다. 석회결핍에 민감하게 반응한 9등급에 속한 계통들은 공시번호 25(107173), 공시번호 35(198201), 공시번호 45(198258), 공시번호 67(100401), 공시번호 181(193047), 공시번호 187(193109), 공시번호 217(197305), 공시번호 229(197321), 공시번호 249(199331) 이었다.

그러나 본 과제와 관련하여 보다 내성이 강한 계통의 선발이 요구되므로 2차 선발시험에서는 좀 더 강도 높은 선발을 수행할 필요성이 있다고 판단되어 이를 고려하여 2차 시험을 수행하였다. 1차 년도에 석회결핍에 민감한 것으로 확인되어 내성계통과 조합을 작성한 F1조합은 성숙모본 상태에서 월동하여 F2 종자를 획득하였다. 이후 획득된 F2 종자는 제2핵심 과제에 제공되었다. 2차 년도에도 1차 년도와 마찬가지로 민감형 계통과 둔감형 계통의 종자를 제2핵심 과제에 제공하였으며 이후 과제 진행에 소요될 종자를 확보하기 위해 둔감형 107140계통의 종자를 다량 확보하였으며, 민감형 102119계통의 종자를 다량 확보하기 위해 별도의 증식교배를 진행하였다. 102119계통의 종자확보를 통해 민감형과 둔감형 그리고 이들 사이의 F1과 F2 세대의 종자를 언제든지 제2핵심에 충분히 제공할 수 있게 되었다. 내성계통과 민감형계통 사이의 조합 107140 x 102119은 2011년 가을 유전자원 원예적특성검정 포장시험에 공시하여 포장에서의 석회결핍 발현을 조사하였는데 내성계통 107140을 석회결핍 증상이 전혀 발생하지 않은 반면 민감계통 102119는 전 개체에서 석회결핍 증상이 심하게 발생한 것이 확인되었다. 이 두 계통사이의 F1은 전 개체에서 석회결핍 증상이 발현하였으나 그 발생 정도는 민감형 102119 계통보다는 그 발생 정도가 덜하였다. 본 조합에서의 석회결핍증 발현은 조합의 생육상황에서도 예상 가능하였는데 내성계통 107140은 생장이 늦고 구내부 결구긴도가 낮은데 반해 민감형 102119는 생장이 초세는 약하나 생장이 빠르고 결구긴도가 높았으며, 조합은 초세도 강하고 생장도 빠를 뿐 아니라 숙기가 102119보다는 늦고 107140보다는 빨라 결구긴도도 양친계통의 중간 정도로 나타났다.

㉔ 3차년도 1차 석회결핍증 선발 시험은 기 보유계통과 수집자원 그리고 분리중인 재료 등 71점을 파종용 상자에 조파하고 발아 후 105구 트레이에 이식하여 육묘하였다. 2012년 9월 9일에 파종하여 육묘하고 9월 28일에 직경 12cm 플라스틱 포트에 모래를 사용하여 정식하였다. 시험구 배치는 4주 2반복으로 배치하였다. 모래를 사용하였으므로 매일 관수를 실시하였다. 10월 2일, 10월 6일 10월 11일 3차례에 걸쳐 질소질 함량이 높아 생육촉진 효과가 큰 시판 제4종 복합비료 두배나강력2호(30-10-10) 500배액을 관주하였다. 10월 29일 경부터 일부 계통에서 칼리결핍 증상이 보였다. 칼리결핍 증상을 심하게 나타낸 계통은 계통번호 112332-와 112338-인데 이는 신규수집 재료로 <표 5>의 원예적특성 검정 공시번호 322과 328에 해당하는 계통이다.

석회결핍증은 정식 후 40일이 되는 11월05일 경 이후부터 확인되었다. 석회결핍증상은 초기에 신엽의 신장이 저조하여 외엽과 신엽의 차이가 두드러지게 나타나는 증상을 보였으며 이후 신엽의 엽연이 제대로 퍼지지 못하고 비후되는 듯 한 증상을 나타내었으며 이후 생육이 진행됨에 따라 엽연의 괴사가 발생하였다. 식물체를 모래에 정식하여 식물체 생육이 왕성하지 못하므로 생육상태에 따른 증상이 명확하지 않았다. 따라서 엽연의 괴사가 발생하는 것을 지표로 내성의 강약을 조사하였다. 내성을 보이는 강한 그룹에 속하는 7계통, 중간 그룹에 속하는 5계통, 중약 그룹에 속하는 5계통 그리고 약한 그룹에 속하는 32계통으로 조사되었다. 이 외에 계통들은 분리 중인 세대를 포함하여 내성 특성이 개체 간 차이를 보여 정확히 판단되지 않았다. 강한 그룹에 속하는 계통은 <표 5>의 공시번호 10(107140-), 97(100491-), 111(100561-), 243(199347-), 273(199380-), 330(198242-), 338(198295-)에 해당하는 계통 이었다. 2차년도 칼슘결핍증 내성 검정 결과 대부분의 계통들이 어느 정도의 내성을 보유한 것으로 조사되어 보다 강선발이 필요할 것으로 판단되었으므로 모래에 정식하여 강선발을 수행하였다.

2차 시험은 차대검정이 필요한 계통가운데 시험 가능한 종자량이 확보된 42계통을 2013년 3월 8일에 72구 트레이포트에 시판 원예상토(주식회사 농경의 원조믹스)를 사용하여 파종하여 육묘하고, 2013년 4월 9일에 직경 12cm 플라스틱 포트에 모래를 사용하여 정식하였다. 시험구 배치는 4주 2반복으로 배치하였다. 1차 선발과정에서 정식 후 40일이 경과한 후에야 내성을 판단할 수 있는 엽연 괴사 증상이 발현하므로 보다 조기에 증상을 발현시키기 위한 방법이 요구되는 것으로 판단하였다. 이에 따라 2차 석회결핍증 내성 검정시험은 72구 트레이포트에 육묘하여 정식시 묘의 상태가 큰 묘를 사용하였으며 뿌리 부위의 원예상토를 물에 세척하여 제거 후 정식하였다. 정식 후 일주차인 4월16일에 시판 제4종 복합비료 두배나강력2호(30-10-10) 500배액을 관주하였다.



석회결핍증 내성 검정



석회결핍증 내성

중간

석회결핍증 민감성

그림 6-18. 석회결핍증 검정 시험(직경 12cm 포트에 강모래를 이용하여 정식)

㉞ 4차 년도 석회결핍증 내성 검정 시험은 기 보유계통과 분리중인 재료 등 86점을 2013년 8월 9일에 파종용 상자에 조파하고 발아 후 동년 동월 17일에 105구 트레이에 이식하여 육묘하여 2013년 9월 5일에 직경 12cm 포트에 모래를 사용하여 정식하였으며 시험구 배치는 4주 2반복으로 하였다. 정식 후 매일 관수를 실시하였다. 9월 23일, 9월 30일 10월 07일 3차례에 걸쳐 일주일 간격으로 질소질 함량이 높아 생육촉진 효과가 큰 시판 제4종 복합비료 두배나강력2호(30-10-10) 500배액을 관주하였다. 9월 20일 경부터 일부 계통에서 칼슘결핍 증상이 조사 가능할 정도로 나타났다.

석회결핍증상은 초기에 신엽의 신장이 저조하여 외엽과 신엽의 차이가 두드러지게 나타나는 증상을 보였으며 이후 신엽의 엽연이 제대로 퍼지지 못하고 비후되는 듯한 증상을 나타내었으며 이후 생육이 진행됨에 따라 엽연의 괴사가 발생하였다. 식물체를 모래에 정식하여 식물체 생육이 왕성하지 못하므로 생육상태에 따른 증상이 명확하지 않았다. 따라서 엽연의 괴사가 발생하는 것을 지표로 내성의 강약을 조사하였다.

내성을 보이는 강한 그룹에 속하는 27계통, 중간 그룹에 속하는 18계통, 약한 그룹에 속하는 1계통으로 조사되었다. 이 외에 계통들은 분리 중인 세대를 포함하여 내성 특성이 개체 간 차이를 보여 정확히 판단되지 않았다.

㉞ 5차 년도는 기 시험성적을 바탕으로 형질이 고정된 고세대 계통 중 원예적형질이 우수하고 석회결핍증 내성이 강한 26계통과 조합성능이 우수한 조합의 양친 중 앞의 26 계통에 포함되지 않는 2계통 그리고 조합성능이 우수한 8조합과 시판 2품종(일본 다끼이종묘 YR湖月, Green coronet) 등 38점을 대상으로 실시하였다. 2014년 7월 25일에 파종상자에 조파하여 발아 후 105구 트레이에 이식하여 육묘하고 동년 8월 25일에 직경 15cm 포트에 시판원예상토를 사용하여 정식하였다. 직경 15cm 포트에 시판원예상토를 사용하여 정식한 것은 그 동안의 모래를 이용한 재배보다 식물체를 크게 성장시켜 반응을 조사하기 위한 조치였다. 시험구 배치는 4주 2반복으로 하였다. 정식 후 매일 관수를 실시하였으며 햇볕이 강한 날에는 하루 두차례 관수하였다. 9월 16일, 9월 23일 9월 30일 3차례에 걸쳐 일주일 간격으로 질소질 함량이 높아 생육촉진 효과가 큰 시판 제4종 복합비료 두배나강력2호(30-10-10) 500배액을 관주하였다. 10월 6일 경부터 칼슘결핍 증상이 조사하기에 적합한 정도로 발현하여 10월 10일에 조사를 수행하였다. 칼슘결핍증의 발현 시기는 모래를 이용하여 정식하는 시험의 경우 정식 후 40일령에 증상발현이 나타나는 것과 같았다. 따라서 보다 큰 직경 15cm포트에 원예상토를 이용하여 정식하고 성장량을 크게 하는 것이 칼슘결핍증 내성 선발에 보다 용이할 것으로 판단하였다. 4차 년도까지 내성을 보이는 것으로 평가 된 26계통은 1과 2에 속하는 내성을 나타내었으며 26계통에 포함되지 않은 2계통은 3에 속하는 반응을 나타내었다. 공시된 8조합은 1에 속하는 계통과 3에 속하는 계통 사이의 조합으로 2에 속하는 정도의 반응을 보였으며 그 정도가 대비품종 YR湖月, Green coronet가 4에 속하는 것에 비해 강하였다. 공시된 8조합이 1에 속하는 계통과 3에 속하는 계통 사이에 작성된 조합으로 2에 속하는 것으로 조사된 것은 2차 년도 내성계통인 170140과 민감성계통인 102119 사이의 조합에서 확인된 양상과 같은 반응을 나타내는 것으로 확인되었다.

5차년도 검정시험 조사는 그 동안 적용한 9점 척도를 적용하기 어려워 5점 척도를 적용하여 조사하였다. 초기 시험에서는 내성 정도의 편차가 커서 9점 척도의 적용이 무리가 없었으나 내성계통 선발이 진행되면서 민감성 계통이 도태되고 내성계통으로 변이의 폭이 좁아지면서 9점 척도를 적용하여 판별하기 어려웠다. 따라서 양배추의 석회결핍증 내성 판단척도로서 5점 척도를 확립하였다.

				
1: 증상없음	2: 잎선단마름약간	3: 잎선단마름심함	4: 잎발육장애	5: 잎발육장애심함

그림 6-19. 석회결핍증 내성 검정 시험 내성평가 기준(5점척도)

㉔ 배추좁나방 내성 계통 선발: 1차 년도는 과제의 출범과 함께 시험에 착수하였으나 실제적 과제의 출발이 늦어져 2010년 8월 7일에 기 보유 계통 및 수집 자원의 특성 검정을 위하여 380계통을 파종하여 발아가 진행된 210계통 중 주수가 충분히 확보된 68계통을 플라스틱하우스 내에 정식하여 재배하면서 배추 재배포장에서 채집한 좁나방을 방사하여 내성조사를 실시하였으나 가을 기온이 빨리 낮아지면서 배추좁나방의 활동이 이루어지지 않아 정상적인 차이를 파악할 수 없었다. 2011년 봄 시험은 2011년 2월 26일에 76계통을 파종하여 동년 3월 5일에 단일포트에 이식하였다. 본엽 8매기인 6월 7일 배추를 기주로 사육된 배추좁나방을 집단방사하여 산란을 유도한 후 저항성 정도는 산란 유도 후 20일에 식혼을 보고 판정하였다.



그림 6-20. 검정용 육묘 및 간이 배추좁나방사육상

<표 6-8> 석회결핍증 및 배추좁나방 내성 검정 계통의 일반 특성(2010년 가을 작형)

No	계통명	구형*	납질**	No	계통명	구형	납질	No	계통명	구형	납질	No	계통명	구형	납질
1	102003	3	5	25	107175	2	3	244	100590	2	3	620	199380	2	3
2	102043	4	3	29	107178	2	3	248	100598	2	3	654	101748	3	5
3	102045	2	7	31	108088	3	3	254	100604	3	6	656	101750	3	3
4	102049	3	7	115	199286	3	5	264	100609	3	3	658	101752	3	5
5	102049	3	5	127	198293	2	3	266	100610	3	4	660	101756	3	7
6	102005	2	3	141	100401	3	5	283	100623	3	5	682	101796	3	5
7	102119	3	3	159	100420	3	7	284	100625	3	7	683	101796	3	5
8	102119	3	3	163	100425	3	7	294	100635	3	6	687	101802	3	7
9	107140	3	7	167	100426	3	5	296	100646	3	4	706	101836	3	5
11	106146	3	7	179	100466	3	7	331	192039	3	5	708	198242	2	4
13	106148	3	5	183	100473	3	7	381	195491	3	5	711	198273	3	3
15	107152	2	3	185	100476	3	7	385	195497	2	3	723	198295	2	3
17	107154	2	3	187	100479	3	6	399	197277	1	5	749	199351	3	7
18	107172	2	3	195	100490	3	7	424	197286	2	3	751	110089	3	6
20	107173	2	3	197	100491	3	3	459	198437	2	3	752	110089	3	6
21	107173	2	3	215	100537	2	5	534	199331	2	4	753	110090	3	6
23	107174	2	3	228	100563	3	6	608	199371	3	8				

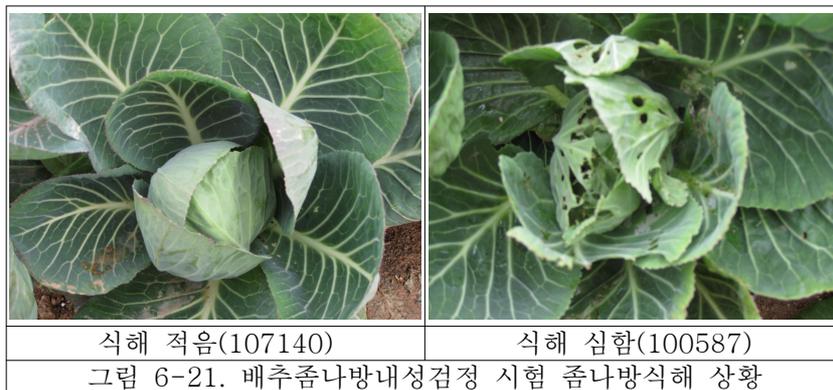
* 구형(구 세로 자른면의 모양); 1. 누운 좁은 타원형, 2. 누운 타원형, 3. 원형, 4. 넓은 타원형, 5. 넓은 도란형, 6. 넓은 난형, 7. 모난 난형 : 국립종자원 양배추 특성 조사 기준 17.

** 납질(바깥잎 납질); 1. 없거나 매우 약하다, 3. 약하다, 5. 중간, 7. 강하다, 9. 매우 강하다 : 국립종자원 양배추 특성 조사 기준 14.

㉠ 2차 년도에 1차 139점 2차 90점에 대한 평가를 수행하였다. 좀나방내성 검정 시험에 공시된 계통은 유전자원 특성 평가와 동일한 자원으로 동시에 육묘된 묘를 시험에 사용하였으며 공시번호 도 동일하다.

좀나방내성 검정을 위해 미리 파종하여 50구 플러그트레이 포트에서 육묘한 25일령 묘를 2011년 9월 2일 10시부터 15시까지 5시간 동안 좀나방 사육 하우스에 배치하여 산란 유도 후 좀나방내성 시험용 하우스의 양 가장자리에 일렬 배치하여 토양에 정식하여 좀나방 인공접종을 준비하고 준비된 플라스틱하우스에 2011년 8월 5일에 72구 플러그트레이에 파종하여 육묘한 유묘를 2011년 9월 5일에 직경 12cm 플라스틱 포트에 시판원예상토(원조믹스)를 사용하여 이식한 양배추 139점을 좀나방 산란 배추의 안쪽에 배치하여 관리하였다. 좀나방 성충의 발생이 확인된 초초 일자는 2011년 9월 21일로 산란일로부터 19일 차에 확인되었다. 최초 발생이 확인된 좀나방 성충은 성체의 크기가 다소 작았다. 이후 9월 말경부터 성충의 발생이 활발하여 10월 5일경에 대량의 성충이 발생하여 활동하였다. 좀나방내성 조사는 좀나방 성충 발생이 활발했던 2011년 10월 5일로부터 1개월 후인 2011년 11월 4일에 실시하였다. 조사는 좀나방에 의한 식해가 전혀 발생하지 않은 것을 1로하고 매우 심한 식해 현상을 보인 것을 9로 하여 1~9단계로 달관조사에 의하여 실시하였다.

내성을 보이는 1~3계급에 속하는 계통이 29계통, 중간그룹인 4~6계급에 속하는 계통이 61계통 그리고 민감성을 보이는 7~9계급에 속하는 계통이 49계통으로 조사되었다. 이들 가운데 좀나방에 의한 식해가 전혀 발생하지 않은 1등급에 해당하는 계통을 없었으며 2등급으로 조사된 계통이 공시번호 53번(198275) 1계통이며 나머지 28계통은 3등급에 속하는 것으로 조사되었다. 내성 표준계통으로 선정한 공시번호 11번(107140)계통도 3등급으로 조사되었다. 식해 정도가 매우 심한 9등급에 속하는 계통은 8계통이었으며 이들 계통은 공시번호 125(100587), 공시번호 127(100587), 공시번호 137(100607), 공시번호 145(100612), 공시번호 147(계통명 미부여), 공시번호 173(199313), 공시번호 177(193050), 공시번호 267(199360) 이었다.



* 인위적 접종에 의해 내염발생 초기에 어린잎을 식해한 후 생장시킨 상태로 식혼이 명나방 등에 의한 식해로 오인될 수 있는 상태임



* 하우스 양 측면에 산란이 유도된 배추가 정식되어 있음

2차 시험은 100점을 2012년 3월 7일에 상자에 조파하고 3월13일에 72구 플러그트레이에 시판 원예상토(원조믹스)를 사용하여 이식하였다. 관행육묘를 실시하고 4월17일에 시판 원예상토(원조믹스)를 사용하여 직경15cm 플라스틱 포트에 정식하였다. 1차 시험보다 큰 15cm 플라스틱 포트를 채택하여 생육의 안정도를 높이고 포기 사이를 확보하여 1차 시험보다 개체 차이에 의한 오류를 줄일 수 있었다.



3차 년도 배추좁나방 내성 검정 시험은 기 보유계통과 수집자원 그리고 분리중인 재료 등 71점을 2012년 8월 9일에 파종용 상자에 조파하고 발아 후 105구 트레이에 이식하여 육묘하였다. 육묘 후 2012년 9월 28일에 직경 15cm 플라스틱 포트에 시판상토(원조믹스)를 사용하여 정식하였다. 시험구 배치는 4주 2반복으로 배치하였다. 계통별로 확보된 묘를 칼슘결핍 내성 검정에 우선 사용하였으므로 배추좁나방 내성 검정 시험에 사용된 계통은 30계통이었다.

배추좁나방은 좁나방 사육실에 직경 12cm 포트에 심겨진 배추를 2012년 9월19일에 좁나방 성충을 키운 망실에 6시간 동안 배치하여 산란을 유도하고 배추좁나방 유충이 부화한 포트를 배추좁나방 내성 검정용 망실에 배치하였다. 배추에서 성장한 배추좁나방이 우화 후 양배추에 산란하고 산란한 알에서 깨어난 유충의 식해 정도를 비교하여 상대적 내성을 조사하였다. 후반기 기온이 낮아 배추좁나방의 활동이 활발하지 못하였다. 따라서 배추좁나방 내성 조사는 주로 배추좁나방 유충의 초기 식해에 의한 피해가 판단의 근거로 작용하였다. 공시된 30계통 중 내성이 강한 그룹에 속하는 3계통, 중간에 속하는 3계통, 중약 그룹에 속하는 1계통과 약한 그룹에 속하는 17계통으로 조사되었다. 나머지 6계통

은 개체 간에 피해정도가 상이하게 나타나 정확한 판단을 할 수 없었다. 이번 시험에서 배추좀나방 성충이 최초로 확인될 날은 2012년 10월 12일로 산란 유도 후 20일째 날이었다. 따라서 배추좀나방이 산란 후 성충이 우화하기까지의 사이클이 최소 20일 소요된 것으로 조사되었다. 다량의 성충이 확인 된 것은 2012년 10월 16일로 산란부터 우화까지 24일 정도 소요되는 것으로 파악되었다.

배추좀나방 내성검정 시험에서 내성이 강한 것으로 조사된 계통은 <표 5>의 공시번호 10(107140-), 227(199331-), 350(112360-)에 해당하는 3계통이었다. 2차년도 검정에서 배추좀나방 내성이 강한 것으로 조사되고 포장에서도 강한 것으로 조사된 199324- 계통은 종자 확보량이 적어 본 시험에 공시되지 못하였다. 반면 2차년도 검정 시험에서 내성이 약한 것으로 조사된 계통들은 금 번 시험에서도 낮은 내성을 나타내는 것으로 조사되었다. 진행 중인 양배추의 배추좀나방 내성은 진정저항성의 개념이 아니라 배추좀나방의 선호도가 낮은 계통을 선발하기 위함이다. 따라서 BT 등의 형질전환을 통해 저항성 품종을 개발하려는 시도와는 다르다. 그러므로 본 시험에서 배추좀나방 내성은 상대적 개념으로 이해하여야 한다. 그러나 중도 내성 정도로 재배적으로 그 효과성이 인정될 수 있는 품종이 육성된다면 매우 중요한 의미를 가질 수 있다. 현재 내성이 강한(배추좀나방의 선호도가 낮은) 것으로 조사된 계통과 내성이 약한 배추좀나방의 선호도가 높은 계통 간에 현격한 차이가 존재하므로 그 가능성이 높게 예상된다. 그러나 아직 배추좀나방 내성과 관련한 정확한 특성과 그 유전양식에 대한 정보가 없어 선발 계통이 얼마나 효과적으로 품종 육성에 기여하는지는 아직 확실치 않다.



그림 6-24. 배추좀나방 내성 검정 시험

3차 년도 2차 배추좀나방 내성 검정 시험은 차대검정이 필요한 계통가운데 시험 가능한 종자량이 확보된 42계통을 72구 트레이포트에 시판 원예상토(원조믹스)를 사용하여 2013년 3월 8일에 파종하고 2013년 4월 9일에 직경 15cm 플라스틱 포트에 시판 원예상토(주식회사 경농의 원조믹스)를 사용하여 정식하였다. 시험구 배치는 4주 2반복으로 배치하였다. 배추좀나방은 증식을 거쳐 2013년 05월 하순에 산란을 유도하였다.

4차 년도 배추좀나방 내성 검정 시험은 기 보유계통과 수집자원 그리고 분리중인 재료 등 86점을 2013년 8월 9일에 파종용 상자에 조파하고 발아 후 8월 17일에 105구 트레이

에 이식하여 육묘하였다. 직경 15cm 포트 정식은 동년 9월 13일에 실시하였으며 시험구 배치는 4주 2반복으로 배치하였다. 배추좁나방은 좁나방 사육실에 직경 12cm 포트에 심겨진 배추를 2013년 8월20일에 좁나방 성충발생이 많은 갖 시험채종 이후 방치한 망실에 3시간 동안 배치하여 산란을 유도하고 배추좁나방 유충이 부화한 포트를 배추좁나방 내성 검정용 망실에 배치하였다. 배추에서 성장한 배추좁나방이 우화 후 양배추에 산란하고 산란한 알에서 깨어난 유충의 식해 정도를 비교하여 상대적 내성을 조사하였다. 3차년도 시험에서 후반기 기온이 낮아 배추좁나방의 활동이 활발하지 못한 점을 고려하였다. 조사에서 내성이 강한 그룹에 속하는 15계통, 중간에 속하는 4계통, 약한 그룹에 속하는 4계통으로 조사되었다. 3차년도 검정 시험에서 내성이 약한 것으로 조사된 계통들은 금 번 시험에서도 낮은 내성을 나타내는 것으로 조사되었다.

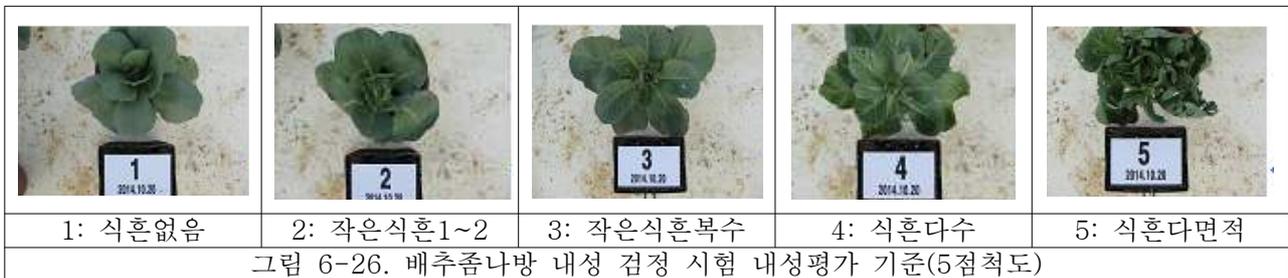


그러나 배추좁나방 내성과 관련한 정확한 특성과 그 유전양식에 대한 신뢰할 만한 정보가 부족하여 선발 계통이 얼마나 효과적으로 품종 육성에 기여하는지는 아직 확실히 예단할 수 없다.

5차 년도는 석회결핍증 내성 검정 시험과 동일하게 기 시험성적을 바탕으로 형질이 고정된 고세대 계통 중 원예적형질이 우수하고 석회결핍증 내성이 강한 26계통과 조합성능이 우수한 조합의 양친 중 앞의 26 계통에 포함되지 않는 2계통 그리고 조합성능이 우수한 8조합과 시판 2품종(일본 다끼이종묘 YR湖月, Green coronet) 등 38점을 대상으로 실시하였다. 2014년 7월 25일에 파종상자에 조파하여 발아 후 105구 트레이에 이식하여 육묘하고 동년 8월 25일에 직경 15cm 포트에 시판원예상토를 사용하여 정식하였다. 정식한 포트는 미리 준비된 배추좁나방 유지 하우스에 3주 2반복으로 배치하였다. 최초의 배추좁나방 성충 발견은 9월 16일 이었으며 충분한 밀도의 성충이 발견된 시기는 9월 20일 이후였다. 일반 관리 후 10월 13일과 15일 두 차례에 걸쳐 피레스계 급성독제와 탈피억제제 그리고 접촉 및 식독제 살충제를 살포하여 배추좁나방을 박멸하고 10월 20일에 식해 정도를 조사하였다.

석회결핍증 내성검정 시험과 동일한 재료를 배추좁나방 내성 검정에 사용한 것은 최초

본 과제의 선행연구에서 107140 계통이 석회결핍증과 배추좀나방에 복합 내성을 가지고 있는 것으로 판명되었고 품종 육성에 있어서도 석회결핍증과 배추좀나방에 의한 피해가 저위도 지역에서 재배시 보다 피해가 크므로 복합 내성 품종의 육성이 보다 합리적이므로 석회결핍증 내성 계통을 중심으로 배추좀나방에도 내성을 나타내는 계통의 선발과 이를 이용한 조합의 선발을 위하여 동일 재료를 사용하였다. 칼슘결핍증 내성과 배추좀나방 내성 사이에 관계는 계통에 따라 달랐다. 107140계통의 경우 잎표면에 납질이 많고 질감이 역세며 복합내성을 나타내는 반면 100587 계통은 배추좀나방에는 매우 민감성을 나타내었으나 칼슘결핍증에는 중간 정도의 반응을 나타내었고, 199324 계통의 경우는 배추좀나방에는 내성을 나타내지만 칼슘결핍증에는 중간 정도의 반응을 나타내었다. 칼슘결핍증에 민감성인 199331 계통은 배추좀나방에 대하여 강한 내성을 나타내었으며, 칼슘결핍증에 민감한 102119 계통은 배추좀나방에 대해 중강 정도의 내성을 나타내어 칼슘결핍증과 배추좀나방 내성 사이에 일관된 경향은 찾을 수 없었다.



본 과제를 통해 3회 이상 공시되어 파악된 주요 계통의 석회결핍증과 배추좀나방 내성 검정의 결과를 종합하면 <표 6-9>와 같다.

<표 6-9> 주요 계통의 석회결핍증 및 배추좀나방 내성

계통번호	Ca	DBM	계통번호	Ca	DBM	계통번호	Ca	DBM
102045	5	3	102119	5	2	107173	5	4
100466	5	2	100625	5	3	111659	5	4
193109	5	4	197305	5	3	197321	5	3
199331	5	1	107140	1	1	100491	1	3
100561	1	2	199347	1	3	199380	1	2
198242	1	3	198295	1	2	199275	3	1
112360	2	1	199324	3	1	100587	4	5
199597	3	5	100607	3	5	100612	3	5
199313	3	5	193050	3	5	199360	2	5

* 1차 년도부터 5차 년도 까지의 성적을 종합하여 정리함

* 9점 척도로 조사된 성적은 5점 척도로 환산하였음(1,2 : 1 / 3,4 : 2 / 5 : 3 / 6,7 : 4 / 8,9 : 5)

③ 보유자원 및 수집유전자원 원예적특성 평가 및 선발

㉑ 1차 년도는 성숙모본 선발용 원예적특성 평가 시험은 2010년 08월 07일에 380계통을 파종하여 육묘상에서 210계통을 확보하였다. 파종은 자원 중에 종자의 세력이 약할 것으로 판단되는 자원이 많아 혹서기를 피하여 다소 늦게 파종하였다. 동년 9월 27일에 포장에 정식하였다. 정식기 또한 잦은 강우로 인해 본포의 준비가 늦어져 정식이 지연되었다. 동년 11월 9일에 반성숙 상태에서 선발을 수행하여 계통 당 2~10주를 선발하고 월동하우스에 정식하고 소형터널을 설치하고 비닐과 부직포로 피복 관리하여 월동하였다.



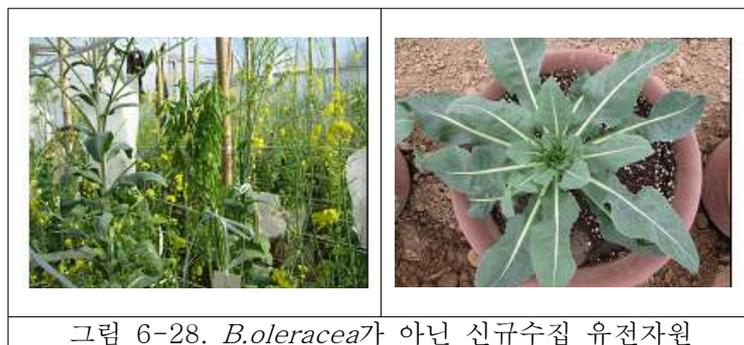
그림 6-27. 선발계통 월동 및 교배장면

* 본 연구진은 교배하우스 지주로 친환경적인 대나무를 사용함

㉒ 2차 년도에 유럽수집종 20점 포함 총 176점에 대한 원예적특성 검정을 수행하였다. 기 보유계통 및 수집자원의 원예적특성검정을 위하여 MS유기계 포함 360점을 2011년 8월 5일에 파종하고 2011년 9월 3일에 정식하였다. 이들 중 2011년에 인공교배에 의해 획득한 종자는 종자 수확 및 조제과정에서 오랜 기간 지속적 강우로 인해 진균류에 오염이 심해 파종 전 베노람 500배액에 30분 침지 후 수세 건조하여 파종하였다. 파종 및 육묘는 진균류 오염으로 인한 발아율의 저하를 우려하여 파종상자에 조파 후 72구 플러그트레이에 이식하여 육묘하였다. 정식은 노지포장에 N-P-K를 10a 당 10-13-9kg 기비로 사용하고 퇴비는 시판 구드래퇴비를 900kg 사용하였다. 이후 3차례의 추비를 통해 N-K를 18-16kg 사용하였다. 정식 포장은 70x40 2조식으로 준비하여 MS 유기계 10주 유기계 20주씩 재배하였다. 공시된 재료들에 대하여 달관 조사에 의한 원예적 특성을 조사하였으며 형태적 유사도가 높은 MS 유기 개체를 선발하기 위해 MS친을 동시에 공시하였기 때문이다. MS 계통 육성에서 MS 계통의 특성은 반복친인 화분친의 특성에 의존하므로 별도의 특성 조사를 실시하지 아니하였다.

재배시험을 통해 360계통 중 MS 유기계를 제외한 176계통에 대한 원예적 특성을 조사하였으며 아울러 MS유기계통의 형질치환 정도를 평가하였다. 이 가운데 150계통에 대하여 모본 선발을 수행하였으며 선발된 모본은 플라스틱하우스에 옮겨 월동관리 후 인공교배에 의해 후대를 유기하였다.

*잎 모양은 꽃양배추(Cauliflower) 형태이며 꼬투리는 미선형 냉이꼬투리 모양임



<표 6-10> 유전자원 원예적특성 검정(2011년 가을 작형)

公試 番號	草勢	葉色	凹凸	球形	熟期	備考	公試 番號	草勢	葉色	凹凸	球形	熟期	備考
3	極強	灰綠	中	球	極晚		4	中	灰綠	少	球	晚	
5	中	灰綠	少	頭尖	중		6	中強	綠	中少	低球	中早	
7	中強	灰綠	中少	高球	晚		9	弱	綠	極少	球	中早	小球種
11	中強	灰綠	中少	高球	晚		13	中	灰綠	中少	高球	中早	
15	中	綠	中少	球	中早		17	強	濃綠	中少	低球	晚	
19	強	淡綠	中	低球	晚		21	強	濃綠	中	球	晚	耐寒強
23	強	綠	中少	扁球	中晚	外葉大	25	中強	綠	中少	扁球	中	
27	中	濃綠	中	頭尖	早		29	中弱	濃綠	中	球	中早	
31	中強	灰綠	中	-	極晚		33	中	灰綠	中少	球	中早	
35	中弱	綠	中少	低球	中		37	中	灰綠	中少	低球	中早	
39	中	灰綠	中	低球	中		41	中強	灰綠	中少	低球	中晚	
43	強	灰綠	少	球	晚		45	中	灰綠	少	低球	中晚	
47	中	綠	中少	低球	中		49	中	灰綠	中少	低球	中晚	
51	中弱	灰綠	中少	低球	中		53	中弱	灰綠	中少	低球	中	
55	中弱	綠	少	低球	早		57	弱	綠	少	低球	早	
59	弱	綠	少	低球	早		61	中強	灰綠	中	低球	中早	
63	中	灰綠	中少	低球	中早		65	弱	綠	中少	低球	中早	小球種
67	弱	綠	中少	球	早	小球種	69	中	灰綠	中少	高球	中晚	
71	中	濃綠	中	球	中		73	中弱	灰綠	中	頭尖	中早	
75	中	灰綠	中	球	中晚		77	強	灰綠	中少	高球	晚	
79	中強	灰綠	少	球	晚		81	弱	灰綠	少	球	中早	
83	中	淡綠	中少	頭尖	中		85	中	灰綠	中少	低球	中	
87	強	灰綠	中少	高球	中晚		89	強	灰綠	中少	球	中晚	
91	強	灰綠	中少	高球	中晚		93	中強	灰綠	中少	高球	中晚	
95	中強	灰綠	少	低球	中晚	蠟質多	99	弱	灰綠	少	低球	中晚	
101	弱	灰綠	少	球	中	小球種	103	中	灰綠	少	球	中早	
105	中強	灰綠	中少	低球	中晚		107	中強	灰綠	少	高球	晚	
108	中強	灰綠	中	低球	中晚		111	中	灰綠	中	球	中晚	
113	強	灰綠	中	球	晚	耐寒強	115	中	濃綠	中少	低球	中	
117	中	濃綠	中	球	中		119	中強	灰綠	中少	低球	中晚	
121	中弱	濃綠	中	扁球	中		123	中強	濃綠	中	頭尖	中	
125	強	濃綠	中	扁球	中	大球系	127	強	灰綠	中少	低球	中晚	
129	中	綠	中少	低球	中		131	中	灰綠	中少	球	中	

133	中弱	綠	中	球	中晚		135	弱	濃綠	中少	球	晚	
136	中	綠	中	低球	中		139	強	灰綠	中少	低球	中晚	
140	中	淡綠	中	扁球	中		143	中強	灰綠	中少	扁球	中	
145	強	濃綠	中	球	晚		147	強	灰綠	中	球	極晚	
149	弱	灰綠	中少	扁球	晚		151	中強	灰綠	中	球	中	
153	中	灰綠	中少	扁球	中晚		155	中	灰綠	中少	低球	中早	
157	強	灰綠	中少	高球	中晚		159	中	濃綠	中少	低球	中	
161	弱	灰綠	少	低球	中		163	中	灰綠	中少	扁球	中晚	
165	中	灰綠	中	扁球	中晚		167	中	灰綠	少	球	中晚	
169	中弱	灰綠	少	球	晚		171	中	灰綠	少	低球	中	
173	中強	濃綠	多	高球	晚		175	中強	淡綠	中少	低球	中晚	

公試 番號	草勢	葉色	凹凸	球形	熟期	備考	公試 番號	草勢	葉色	凹凸	球形	熟期	備考
177	中	灰綠	中	低球	中晚	外葉短	179	中	綠	中	低球	中	外葉短
181	中	灰綠	中多	球	中		183	中弱	濃綠	中	球	中晚	
186	中	濃綠	凸	低球	早		191	中強	濃綠	中	低球	中	
193	中弱	濃綠	中	球	中		195	中	綠	中	低球	中	
197	中	淡綠	中少	低球	中		199	中	灰綠	中少	低球	中	
201	弱	灰綠	少	球	中	小球系	203	弱	綠	中少	球	早	
205	弱	濃綠	中	球	早		207	中強	綠	少	球	晚	
209	中	灰綠	中少	球	晚	耐寒強	211	中	灰綠	中少	低球	晚	
213	中弱	灰綠	少	低球	中早		215	中	灰綠	中	球	中	
217	中	綠	中少	低球	中		219	中	綠	中少	低球	中晚	
221	中	綠	中	球	中		223	弱	灰綠	中	球	中晚	小球系
225	強	灰綠	少	低球	晚		229	中	濃綠	中	球	早	
231	中	灰綠	中多	低球	早		233	中	灰綠	中	球	早	
235	中	濃綠	中少	球	早		237	中	灰綠	中	低球	中晚	
241	中弱	淡綠	少	球	中		243	弱	濃綠	少	球	中早	
245	弱	濃綠	少	球	中早		247	中弱	濃綠	少	球	中晚	
249	弱	灰綠	少	球	中早		251	弱	綠	少	球	中晚	
253	中	灰綠	少	球	晚		255	中強	灰綠	少	低球	晚	
257	中	濃綠	中	球	中		259	強	綠	少	高球	極晚	
261	強	綠	少	球	極晚		263	中強	濃綠	少	球	極晚	
265	中	濃綠	中	球	晚		267	中弱	濃綠	少	球	早	
268	中	濃綠	中少	球	早		270	中弱	灰綠	中少	球	早	
272	弱	灰綠	中少	球	早	小球系	274	中	灰綠	少	球	中早	
276	中	灰綠	少	球	中		278	弱	濃綠	少	球	中晚	小球系
280	中	灰綠	少	球	中晚	蠟質多	282	中弱	濃綠	中少	球	中	
284	中弱	濃綠	中少	球	早		286	中弱	濃綠	中少	球	早	
288	中弱	濃綠	中少	球	早		290	弱	綠	中少	球	早	
292	中弱	綠	少	球	早		294	中弱	綠	少	球	早	
296	中	灰綠	中少	低球	中		298	弱	濃綠	少	球	中早	
300	弱	灰綠	少	球	中早		301	弱	濃綠	少	球	中晚	

304	中強	灰綠	中少	球	中晚		308	中	綠	中少	低球	中	
310	中弱	濃綠	中	球	早		314	中強	濃綠	中少	低球	中晚	
316	中	灰綠	中	頭尖	中早		318	中強	灰綠	中	球	晚	
320	中強	灰綠	中	球	中晚		322	中	灰綠	中少	球	中早	
324	中	灰綠	中少	球	中早		326	弱	濃綠	少	高球	中	
328	中	綠	中少	低球	中		330	中弱	濃綠	少	低球	中晚	
332	中	灰綠	少	高球	晚		334	中	灰綠	少	高球	晚	
336	強	綠	少	球	晚		338	中弱	灰綠	少	球	中早	
340	中弱	綠	中	低球	中		342	中弱	灰綠	中少	球	中	
344	中	綠	中少	低球	中早		346	中弱	灰綠	中少	低球	中早	
348	弱	濃綠	中少	球	早		350	中	淡綠	中少	球	中	
352	中弱	濃綠	中少	頭尖	早		354	強	灰綠	中多	-	極晚	
355	強	灰綠	中多	-	極晚	葉柄長	357	強	灰綠	中多	-	極晚	
359	強	灰綠	中	-	極晚		360	中強	灰綠	中少	低球	中早	

㉔ 3차 년도는 기 보유계통 및 수집자원의 원예적특성검정을 위하여 MS유기계 포함 352점 (유지계 182점)을 2012년 7월 25일에 시판 72구 플러그트레이에 파종하였다. 이 중 발아가 되지 않은 계통을 제외한 338점을 2012년 8월 24일에 본포에 정식하였다. 정식은 노지포장에 N-P-K를 10a 당 10-13-9kg 기비로 시용하고 퇴비는 시판 구드래퇴비(부여버섯영농조합)를 900kg 시용하였다. 이후 3차례의 추비를 통해 N-K를 18-16kg 시용하였다. 정식 포장은 70x40 2조식으로 준비하여 MS 유기계 10주 유지계 20주씩 재배하였다. 일반 관리는 관행재배에 따랐다. 정식 전 후 지속적인 강우로 초기 생육이 부진하였으며 생육 전반기 고온으로 전반적으로 외엽이 큰 경향을 보였다. 생육 후기에는 기온이 평년보다 낮아 전반적으로 결구비대가 지연되는 현상을 나타내었다. 공시된 재료들에 대하여 달관 조사에 의한 원예적 특성을 조사하였으며 이 가운데 초세, 엽색, 엽면요철, 구형, 숙기, 심고 등의 특성은 첨부된 표와 같다.

기 보유계통은 내서성이 있는 재료를 중심으로 전개하였으며 수집자원(공시번호 283~328)의 경우도 내서성이 있는 것으로 품종 특성관련 정보에 나타난 품종 위주로 원예적 특성검정을 위해 전개하였다. 내서성이 있는 재료 위주로 특성검정을 실시한 것은 석회결핍증과 배추좁나방에 의한 피해가 저위도 지역에서 상대적으로 크게 나타나므로 석회결핍증 및 배추좁나방 내성 품종 육종시 저위도 지역에 적응하는 품종의 육성이 본 과제의 성격에 부합하는 것으로 판단하여 내서성 위주의 시험을 수행하였다. 양배추와 같은 결구형 채소의 내서성은 복잡한 양상을 나타내는데 단순 고온스트레스에 대한 내성뿐 아니라 고온스트레스에 의해 파생되는 생리적 현상들과 연관된다. 고온 조건에서 결구가 진행되어 목적물이 수확 가능해야 하므로 고온스트레스 이외에 보다 다양한 요인들이 작용하는 것으로 판단되며 이 같은 현상으로 인해 내서성에 대한 정의나 판단 기준이 명확하지 않으며 지속적으로 논란이 되어 왔다. 본 과제에서 다루어진 재료들의 내서성은 기본적으로 저위도 지역의 품종에서 유래한 계통이며 고온 조건에서 생육과 결구가 양호한 것들을 지속적으로 선발한 후대들에 해당한다. 따라서 내서성에 대한 정의에 상관없이 실용적 측면에서 어느 정도 내서성 품종 육성에 유용한 특성을 보유한 것으로 이

해할 수 있는 계통들이다.

2012년의 가을 기온이 초기에는 예년보다 높은 경향을 나타내었으며 후기에는 예년보다 일찍 저온 현상을 나타내어 후기 결구 비대가 늦은 경향이었으며, 숙기가 빠른 계통의 경우 자온의 영향으로 결구가 조속히 진행되어 구 크기가 작게 나타나는 경향을 보였다. 재배시험을 통해 338계통 중 MS 유기계를 제외한 160계통에 대한 원예적 특성을 조사하였으며 아울러 MS유기계통의 형질치환 정도를 평가하였다. 경쟁력 있는 품종 육성을 위해 경영적 차원의 품종 관리를 고려하여 웅성불임성을 이용한 품종을 육성하고자 하여 MS 계통을 육성하였다. 현재 양배추에 도입된 웅성불임성은 무에서 유래한 웅성불임성으로 웅성불임성 세포질을 도입하여 양배추에서는 완전한 세포질웅성불임(CMS)를 나타내므로 육성계통의 여교배를 통하여 웅성불임성 계통을 육성한다. 따라서 매년 선발된 모본을 웅성불임성 유기 계통에 여교배하여 핵치환된 웅성불임성 계통을 육성하고 있다. 계통의 원예적 특성 검정 시험에 웅성불임계통과 웅성가임 계통을 동시에 공시하여 달관법에 의해 육안으로 형질 치환 정도를 평가하고 있다. 본 시험에서 공시한 웅성불임성 계통의 경우 여교배 7세대 이상으로 원예적형질 치환 정도가 만족스러워 웅성불임성 계통으로 활용 가능한 것으로 판단되는 계통은 25계통이었다. 웅성불임성 계통은 원예적형질 치환도가 높은 개체를 1~2주 선발하였으며, 화분친 계통은 이들 전 계통에 대하여 1~8주의 모본 선발을 수행하였다. 선발된 모본은 플라스틱하우스에 옮겨 월동관리 온풍난방기를 이용한 가온 하에서 인공교배를 통해 후대를 유기하였다.

<표 6-11> 웅성불임성 계통의 주요 특성(2012 가을)

계통번호	주요 특성
M 102043-	납질이 많고 형태 갖춤이 빠르다
M 102119-	엽육이 두껍고 구가 작다. 칼슘결핍증에 민감하다
M 107140-	납질이 많고 구고가 높으며 내엽의 비대가 늦다. 칼슘결핍증에 내성이 있다
M 106148-	엽장이 짧으며 저온기 안토시아닌 발현이 적다
M 107152-	엽색이 짙고 엽육이 두꺼우며 내동성이 강하다
M 107154-	엽색이 옅고 숙기가 늦으며 구가 크다
M 107173-11-	엽수가 적고 엽병이 길며 형태 갖춤이 빠르다
M 107173-21-	엽연에 파선이 있으며 엽병이 길다
M 107174-	초세가 약하고 구두가 뽀족한 편이다
M 107175-1-	엽육이 연하며 숙기가 빠르고 Savoy가 있다
M 107175-11-	엽육이 연하며 숙기가 빠른편이다
M 107178-	엽병이 길고 극만생이며 엽수분화는 많다
M 108088-	납질이 많고 외엽이 늘어지며 엽육이 질기다
M 198201-	엽육이 두껍고 내엽의 비대력이 강하다
M 198232-	엽이 부드럽고 엽장이 짧으며 엽수분화가 많다
M 198234-	고구형으로 형태 갖춤이 빠르며 구가 크다
M 198245-	초세가 강하고 내동성이 강하며 숙기는 중만생이다
M 198247-	엽연에 거치가 심한 장엽형으로 형태갖춤이 빠르다
M 198258-	엽육이 얇고 납질이 많으며 엽장이 짧고 엽수분화가 많다

M 198259-	엽육이 두껍고 다즙성이며 내엽의 비대가 빠르다
M 198261-	저온기 안토시안닌 발현이 적으며 대엽형으로 숙기는 중간이다
M 100411-	엽색이 짙고 엽장이 짧으며 숙기가 빠르다
M 100435-	엽육이 두껍고 엽수분화가 적으며 형태갓춤이 빠르나 구비대는 늦다
M 100490-	엽폭이 좁으며 엽장도 짧아 구두가 벌어진다
M 100621-	외엽에 납질이 많으며 구고가 낮은 편구형이며 구면에 각이 있다

<표 6-11>의 응성불임성 계통들은 품종선발을 위한 조합작성에 모계친으로 이용되며 이들 응성불임성 계통을 모계로 하여 기존의 연구 수행과 예비시험을 통하여 파악되고 축적된 계통의 성능을 고려하여 일반조합능력이 우수한 계통을 이용하여 조합작성을 진행하고 있다. 조합작성 종자는 조합선발 시험에 활용되었다.

<표 6-12> 계통특성 조사표(2012년 가을)

공시 번호	초세	엽색	엽면 요철	구형	숙기	심고 /구고	Ca 결핍증	좀나방 내성
2	강	회농록	소	정구	극만	0.3		
3	중	회담록	소	정구	만	0.3		
4	중	회록	소	첨두	중	0.4		
5	중강	녹	중소	저구	중조	0.4		
6	중강	회록	중소	고구	만	0.25	약	약
8	약	녹	극소	정구	중조	0.3		
10	중강	회록	중소	고구	만	0.25	강	강
12	중	회록	중소	고구	중조	0.4		
14	중	녹	중소	정구	중조	0.25		
16	강	농녹	중소	저구	만	0.3	약	약
18	강	담록	중	저구	만	0.25		
20	강	농록	중	정구	만	0.25	약	약
22	강	녹	중소	정구	중만	0.5		
24	중강	녹	중소	고구	중	0.6		
26	중	농록	중	정구	조	0.5		
28	중약	농록	중	정구	중조	0.5		
30	중강	회담록	중	저구	극만	0.2	약	
32	중	회록	중소	정구	중조	0.3		
34	중약	녹	중소	저구	중	0.4	약	
36	중	회록	중소	저구	중조	0.3		
38	중	회록	중	저구	중	0.3		
40	중강	회록	중소	저구	중만	0.3		
42	강	회록	소	정구	만	0.3	중	
44	중	회록	소	저구	중만	0.3	약	약
46	중	녹	중소	저구	중	0.3		
48	중	회록	중소	저구	중만	0.3		
50	중약	회록	중소	저구	중	0.4		
52	중약	회농록	중소	저구	중	0.3		
54	중약	녹	소	첨두	조	0.6		
56	약	녹	소	첨두	조	0.6		
58	중약	농녹	중소	저구	중	0.4		
60	중강	회농록	중	저구	중조	0.6	약	약
63	약	회록	중소	저구	중조	0.4		

65	약	녹	중소	정구	중조	0.25		
67	중	회록	중소	고구	중만	0.3		
69	중	농녹	중	정구	중조	0.3		
71	중약	회농록	중	첨두	중	0.5		
73	중	회록	중	정구	중만	0.4		
75	강	회록	중소	고구	만	0.3		
77	중강	회록	소	정구	만	0.3	중약	
79	약	회농록	소	정구	중조	0.3		
81	중	담록	중소	첨두	중	0.6		
83	중	회농록	중소	저구	중	0.4		
85	강	회록	중소	고구	중만	0.4		
89	강	회록	중소	정구	중만	0.3		
91	강	회록	중소	고구	중만	0.4		
93	강	회록	중소	고구	중만	0.35		
95	중강	회록	극소	저구	중만	0.4		
97	약	회록	소	저구	극만	0.3	강	
101	약	회녹	소	정구	중	0.3		
공시 번호	초세	엽색	엽면 요철	구형	숙기	심고 /구고	Ca 결핍증	좁나방 내성
103	강	회농록	소	정구	중조	0.4		
105	중강	회록	중소	저구	중만	0.3		
107	중강	회록	소	고구	중조	0.4		
109	강	회록	중	저구	중만	0.4		
111	중	회록	중	정구	중만	0.3	강	
113	약	회농록	중	정구	중조	0.3		
115	강	회농록	중소	저구	만	0.35	약	
117	중약	농녹	중	정구	중	0.3		
119	강	회록	중소	저구	중만	0.3		
121	중약	농녹	중	편구	중만	0.6		
123	중강	농록	중	정구	중	0.4		
125	중약	농녹	중	저구	중	0.5		
127	강	회록	중소	저구	만	0.3		
129	중	회록	중소	저구	중	0.4		
131	강	회록	중소	정구	만	0.4		
133	중강	녹	중	정구	중만	0.3		
135	강	회담록	중소	정구	만	0.4		
137	강	녹	중	저구	중	0.6		
139	강	회록	중소	저구	중만	0.5		
141	중	담록	중	편구	중	0.4	약	
143	중강	회록	중소	편구	중조	0.6		
145	중	회록	중	정구	만	0.4		
147	강	회록	중	정구	극만	0.4		
149	약	회록	중소	편구	만	0.4		
151	중강	담록	중	정구	중	0.3		
153	중약	회록	중소	편구	중만	0.4		
155	중	회록	중소	저구	중조	0.5		
157	강	회록	중소	고구	중만	0.4	약	
159	중	농록	중소	저구	중	0.4	중	
161	중약	회록	소	저구	중	0.4		
163	중	회록	중소	편구	중만	0.3		
167	중	회록	소	저구	중만	0.4		
169	중	농록	소	정구	만	0.4		

171	중약	회록	소	정구	만	0.3		
173	중강	농록	소	정구	중만	0.3		
175	중강	농록	다	고구	만	0.4		
177	중	담녹	중소	저구	중만	0.3		
179	중	회농록	중	저구	중만	0.3	중	
181	중	회농록	중다	정구	중	0.3	약	약
183	중약	회농록	중	정구	중만	0.3		
185	중	담록	중	저구	중만	0.3		
187	중	농록	중다	저구	조	0.4	중약	
191	약	농록	중	편구	조	0.3		
193	중약	농록	중	정구	중	0.3		
195	중	녹	중	저구	중	0.3	약	
197	중약	농록	중소	정구	중만	0.25	약	약
199	중	회록	소	저구	중	0.3		
201	중약	회록	소	정구	중	0.3		
203	중	녹	중소	정구	조	0.25		
205	약	농록	중	정구	조	0.4		
207	중	녹	소	정구	만	0.3		
209	중	회록	중소	정구	중조	0.3		

공시 번호	초세	엽색	엽면 요철	구형	숙기	심고 /구고	Ca 결핍증	좀나방 내성
211	중강	회담록	중소	저구	만	0.3		
213	중약	회록	소	저구	중조	0.3		
215	중약	회록	중	정구	조	0.4		
217	중	회록	중소	저구	중	0.35	중약	
219	중	회록	중소	저구	중만	0.3		
221	중	녹	중	정구	중조	0.3	약	약
223	약	회농록	중	정구	중만	0.4	약	중
225	강	회록	소	저구	만	0.35		
227	중약	농록	중	정구	조	0.3	약	강
229	중	회농록	중다	저구	조	0.35		
231	중	회록	중	정구	조	0.3		
233	중	회농록	중소	정구	조	0.4		
235	중	회록	중	고구	중만	0.3		
239	중	담록	소	저구	만	0.4		
241	중	회농록	소	정구	중조	0.5	약	
243	약	농록	소	정구	중조	0.4	강	
245	중약	회농록	소	정구	만	0.4	중약	
247	중	회담록	소	정구	극만	0.4		
249	중	회록	소	정구	중만	0.3	약	약
251	중약	회록	소	정구	조	0.6		
253	중강	회록	소	저구	중조	0.3		
255	중약	농록	중	정구	중조	0.4		
257	중	녹	소	고구	만	0.5	약	약
259	중	회록	소	정구	중조	0.3	약	약
261	중강	농록	소	정구	중만	0.4		
263	약	농록	중	정구	중만	0.4	중	
265	중약	회농록	소	정구	중조	0.45		
267	중	회농록	중소	정구	중조	0.4		
269	약	회록	중소	철두	조	0.5		
271	약	회록	중소	정구	조	0.6	약	약
273	약	회농록	소	정구	조	0.4	강	

275	중	회록	소	정구	중조	0.4		
277	약	농록	소	정구	중만	0.3		
281	중	회록	소	정구	중만	0.35	약	중
283	약	농록	중소	정구	중	0.4	약	약
285	약	농록	중소	정구	조	0.4	약	중
288	중약	농록	중소	정구	중조	0.5		
292	약	회록	중소	정구	조	0.4		
294	중약	녹	소	정구	조	0.4		
296	중약	녹	소	정구	조	0.3	중약	
298	중	회록	중소	저구	중조	0.4	약	
300	중	회농록	중소	저구	중	0.3		
302	약	농록	소	정구	중만	0.3		
304	중강	회록	중소	정구	중만	0.4		
306	중약	농록	소	저구	중	0.3		
308	중	녹	중소	저구	중	0.4	중	
310	중약	회농록	중	정구	조	0.4		
312	중	회록	중소	저구	중	0.3		
314	중강	농록	중소	저구	중만	0.4		
316	중	회록	중	정구	중조	0.4		
318	중강	회록	중	정구	만	0.3		
320	중강	회록	중	정구	중조	0.45		
공시 번호	초세	엽색	엽면 요철	구형	숙기	심고 /구고	Ca 결핍증	좁나방 내성
322	중	회록	중소	정구	중조	0.4		
324	중	회록	중소	정구	중조	0.4		
326	약	회농록	소	고구	중	0.45		
328	중약	회록	중소	저구	중	0.4	약	
330	중	농록	소	저구	중조	0.3	강	
332	중	회록	소	고구	만	0.4	약	중약
334	중	회록	소	고구	만	0.3	약	약
336	강	녹	소	정구	만	0.4		
338	중약	회농록	소	정구	중조	0.3	강	
341	중약	녹	중	저구	중	0.4		
343	중약	회록	중소	정구	중	0.4		
345	중	농록	중소	저구	중조	0.5	약	약
347	중약	회록	중소	저구	중조	0.4		
350	중	담록	중소	정구	중	0.4		강

㉔ 계통의 원예적 특성 검정 과정에서 저온이 일찍 시작되어 저온 조우시 안토시아닌이 발현하는 특성이 잘 나타나 저온 조우시 안토시아닌 발현이 적은 계통을 선발 할 수 있었다. 저온 조우시 안토시아닌 발현이 적은 우수 계통은 위 표의 공시번호 44(198258-), 50(198275-), 58(198293-), 249(199358-)에 해당하는 계통 이었다. 불량 환경에서 안토시아닌 발현이 억제되는 품종에 대한 시장의 요구가 점차 강해질 것으로 예상되므로 향 후 본 시험에서 선발된 계통의 후대에 대하여 고온 건조 조건에서의 안토시아닌 발현 양상에 대한 검토를 수행할 계획이다. 고온 건조 조건에서의 안토시아닌 발현 양상은 갈습결핍 증 내성 검정 시험과 동시에 수행이 가능할 것으로 판단된다.

갈습결핍증 내성 검정과 배추좁나방 내성 검정 시험을 통해 내성 계통으로 조사된 계통들에 대하여는 응성불입성 유기를 위해 여교배를 실시하여 내성계통을 MS화 하였다. 우수한 내성 계통의 보안 유지뿐 아니라 내성 형질이 열성으로 작용할 경우 내성 품종 육성을 위해 반드시 필요한 작업이다.

㉕ 3차 년도 유전자원 검정은 자체 확보한 유전자원 가운데 특이성 및 유용성이 있어 유전자원 기탁용으로 증식하고자 하는 자원과 사업단 차원에서 수집하여 증식을 요하는 자원을 대상으로 하였다. 유전자원 기탁용 증식은 케일 1점과 정확한 학명을 알 수 없는 양배추속 1점이다. 사업단에서 입수한 자원 10점은 사업단으로부터 식물체를 인수하여 증식을 수행하였다. 일부 추대개화가 빠른 계통은 교배 및 종자수확을 완료하였으며 추대가 늦은 계통(HRIGRU 009386)은 종자확보를 하지 못하고 식물체를 유지하였다. 특히 HRIGRU 009386 계통은 제1핵심과제에서 4차 년도 연구에 이용하고자 하므로 가능한 한 많은 종자를 확보하고자 하였으나 추대경의 신장이 제대로 이루어지지 않고 생식생장이 불충분하여 만족스런 정도의 종자 확보에 다소 어려움이 따를 것으로 예상된다. 사업단에서 입수한 야생종 자원(*Brassia macrocarpa*)은 화뢰가 출뢰하였으나 매우 적은 수의 화뢰가 출현하였을 뿐 아니라 교배에 의해서 착협이 제대로 이루어지지 않았다. 야생종 자원(*Brassia macrocarpa*)은 입수 후 3년 째 증식을 시도하였으나 개화를 유도하지 못해 식물체를 유지해 온 것으로 초기에는 저온처리가 충분하지 못한 것으로 판단하였으며, 충분한 저온 처리 후에도 개화가 진행되지 않아 일장이 개화의 제한 요인으로 작용하는 것으로 판단하여 사업단으로부터 식물체 인수 후 24시간 연속조명을 3개월간 실시하였으나 화뢰의 출현을 볼 수 없었다. 이 후(2013년 3월 25일 이후) 24시간 연속 조명을 중단 하였으며, 2013년 04월 18일 화뢰의 출현이 확인되었다. 그러나, 지금까지의 개화 제한 요인이 무엇이었는지에 대하여는 명확한 답을 얻을 수 없다. 증식 후 다수의 개체를 확보하여 시험을 수행하여 여러 가지 추대와 관련된 요인들을 종합적으로 검토하여야 할 것으로 생각된다.





㉞ 4차 년도 기 보유계통 및 수집자원의 원예적특성검정을 위하여 MS유기계 포함 378점(180계통)을 2013년 7월 29일에 시판 72구 플러그트레이에 파종하였다. 이 중 발아가 되지 않은 19계통을 제외한 359점(172계통)을 2013년 8월 27일에 본포에 정식하였다. 정식은 노지포장에 N-P-K를 10a 당 10-13-9kg 기비로 사용하고 퇴비는 시판 구드래퇴비(부여버섯영농조합)를 900kg 사용하였다. 이후 3차례의 추비를 통해 N-K를 18-16kg 사용하였다. 정식 포장은 70x40 2조식으로 준비하여 MS 유기계 10주 유지계 10주씩 재배하였다. 정식 후 관리는 관행재배에 따랐다. 정식 후 생육 중기에 가뭄으로 생육이 다소 지연되었다. 생육 후기에는 기온이 평년보다 높았으나 중기 가뭄으로 인해 전반적으로 결구비대가 지연되는 현상을 나타내었다. 공시된 재료들에 대하여 달관 조사에 의한 원예적 특성을 조사하였으며 이 가운데 초세, 엽색, 엽면요철, 구형, 숙기, 심고 등의 특성은 <표 6-14>과 같다. 이들 공시된 172계통은 숙기를 기준으로 구분 할 때 정식 후 55일 이내에 수확 가능한 조생종이 10계통, 중생종이 145계통 그리고 정식 후 85일 이후에 수확 가능한 만생종이 17계통으로 조사되어 중생종 계통이 84%를 차지하였다. 구형을 기준으로 구분 할 때 편형 13계통, 중간형 117계통, 원형 37계통 그리고 침두형(우심형/pointed head) 5계통으로 조사되어 중간형 계통이 68%를 차지하는 것으로 확인되었다. 조생종 계통 중에는 중간형이 3계통 원형이 7계통이었으며, 중생종 145계통 가운데는 편형이 11계통, 중간형이 105계통, 원형이 24계통, 침두형이 5계통으로 조사되었다. 마지막으로 정식 후 85일 이후에 수확이 가능한 만생종 가운데는 편형이 2계통, 중간형이 9계통, 원형이 6계통으로 조사되었다. 이 같이 숙기와 구형을 기준으로 구분해 볼 때 중생종이며 중간형인 계통이 105계통으로 전체의 61%에 달해 절대적 다수를 차지하였으며, 다음으로 중생종이며 원형인 계통이 24계통으로 14% 순 이었다.

2013년의 가을 기온이 생육 중기에 예년보다 가뭄 경향을 나타내었으며 후기에는 예년보다 늦게까지 기온이 높게 유지되어 후기 결구 비대가 양호한 경향이였다. 재배시험을 통해 378계통 중 MS 유기계를 제외한 180계통에 대한 원예적 특성을 조사하였으며 아울러 MS유기계통의 형질치환 정도를 달관법에 의해 육안으로 평가하였다. 경쟁력 있는 품종 육성을 위해 경영적 차원의 품종 관리를 고려하여 융성불임성을 이용한 품종을 육성

하고자 하여 MS 계통을 육성하였다. 현재 양배추에 도입된 웅성불임성은 무에서 유래한 웅성불임성으로 웅성불임성 세포질을 도입하여 양배추에서는 완전한 세포질웅성불임(CMS)를 나타내므로 육성계통의 여교배를 통하여 웅성불임성 계통을 육성한다. 따라서 매년 선발된 모본을 웅성불임성 유기 계통에 여교배하여 핵치환된 웅성불임성 계통을 육성하고 있다. 계통의 원예적 특성 검정 시험에 웅성불임계통과 웅성가임 계통을 동시에 공시하여 형질 치환 정도를 평가하고 있다. 본 시험에서 공시한 웅성불임성 계통의 경우 여교배 7세대 이상으로 원예적형질 치환 정도가 만족스러워 웅성불임성 계통으로 활용 가능한 것으로 판단되는 계통은 28계통으로 조사되었다. 웅성불임성 계통은 원예적형질 치환도가 높은 개체를 1~2주 선발하였으며, 화분친 계통은 이들 전 계통에 대하여 1~8주의 모본 선발을 수행하였다. 선발된 모본은 플라스틱하우스에 옮겨 월동관리 후 현재 온풍난방기를 이용한 가온 하에서 인공교배로 후대를 유기하였다.

<표 6-13> 웅성불임성 계통의 주요 특성(2013년 가을)

계통번호	주요 특성
M 102043-	납질이 많고 형태 갓춤이 빠르다
M 102119-	엽육이 두껍고 구가 작다. 칼슘결핍증에 민감하다
M 107140-	납질이 많고 구고가 높으며 내엽의 비대가 늦다. 칼슘결핍증에 내성이 있다
M 106148-	엽장이 짧으며 저온기 안토시아닌 발현이 적다
M 107152-	엽색이 짙고 엽육이 두꺼우며 내동성이 강하다
M 107154-	엽색이 옅고 숙기가 늦으며 구가 크다
M 107172-	엽장이 짧고 엽육이 두꺼우며 엽맥이 굵다.
M 107173-11-	엽수가 적고 엽병이 길며 형태 갓춤이 빠르다
M 107173-21-	엽연에 파선이 있으며 엽병이 길다
M 107174-	초세가 약하고 구두가 뽀족한 편이다
M 107175-1-	엽육이 연하며 숙기가 빠르고 Savoy가 있다
M 107175-11-	엽육이 연하며 숙기가 빠른편이다
M 107178-	엽병이 길고 극만생이며 엽수분화가 많다
M 108088-	납질이 많고 외엽이 늘어지며 엽육이 질기다
M 198201-	엽육이 두껍고 내엽의 비대력이 강하다
M 198232-	엽이 부드럽고 엽장이 짧으며 엽수분화가 많다
M 198234-	고구형으로 형태 갓춤이 빠르며 구가 크다
M 198245-	초세가 강하고 내동성이 강하며 숙기는 중만생이다
M 198247-	엽연에 거치가 심한 장엽형으로 형태갓춤이 빠르다
M 198258-	엽육이 얇고 납질이 많으며 엽장이 짧고 엽수분화가 많다
M 198259-	엽육이 두껍고 다즙성이며 내엽의 비대가 빠르다
M 198261-	저온기 안토시아닌 발현이 적으며 대엽형으로 숙기는 중간이다
M 198293-	엽장이 짧고 엽육이 두껍다. 엽색이 진하고 엽 가장자리에 큰 물결무늬가 있다.
M 100411-	엽색이 짙고 엽장이 짧으며 숙기가 빠르다
M 100425-	정구형으로 숙기가 빠르고 결구긴도가 높다.
M 100435-	엽육이 두껍고 엽수분화가 적으며 형태갓춤이 빠르나 구비대는 늦다
M 100490-	엽폭이 좁으며 엽장도 짧아 구두가 벌어진다
M 100621-	외엽에 납질이 많으며 구고가 낮은 편구형이며 구면에 각이 있다

<표 6-13>의 응성불입성 계통들은 품종선발을 위한 조합작성에 모계친으로 이용되며 이들 응성불입성 계통을 모계로 하여 기존의 연구 수행과 예비시험을 통하여 파악되고 축적된 계통의 성능을 고려하여 일반조합능력이 우수한 계통을 이용하여 조합작성을 진행하고 있다. 조합작성 종자는 7월 5차 년도 조합선발 시험에 활용되었다. 본 과제 수행 팀은 중생종과 중만생종 위주의 계통을 확보하고 있으므로 중생종과 중만생종 위주의 조합을 설계하였다. 조합구성은 육성자의 판단에 따라 각 계통을 원예적 특성을 고려하여 교배조합을 설계하였다. 본 과제 수행 팀은 중생종과 중만생종 위주의 육성 계통을 확보하고 있어 전체 조합의 구성은 중생종과 중만생종 위주의 조합이 작성되었다.

<표 6-14> 계통특성 조사표(2013년 가을)

공시 번호	초세	엽색	엽면 요철	구형	숙기	심고 /구고	Ca 결핍증	좁나방 내성
2	강	회농록	소	중간	극만	0.3		
3	중	회담록	소	중간	중	0.3		
4	중	회록	소	첨두	중	0.3		
5	중	녹록	중소	중간	중조	0.4		
6	중	회록	중	고구	만	0.25		
8	약	녹	극소	정구	중조	0.3	강	중강
10	중	회록	소	고구	만	0.3		
12	중	회록	중소	중간	중	0.4	강	
14	중	농녹	중소	정구	중조	0.3		
16	강	농녹	중소	중간	만	0.3		
18	강	담록	중	편구	만	0.25	약	강
20	강	농록	중	정구	만	0.3		
22	강	녹	중소	중간	중	0.5	중약	강
24	중강	녹	중소	중간	중	0.5		
26	중	녹	중	중간	조	0.5		
28	중약	녹	중	정구	중조	0.5		
30	중강	회담록	중	결구불	극만	0.2		
34	중약	녹	중소	중간	중	0.4		
36	중	회록	중소	중간	중조	0.3	중	
38	중	회록	중	중간	중	0.3		
40	강	회록	중소	편구	만	0.3		
42	강	회록	소	중간	만	0.3	중	중
44	중	회록	소	중간	중	0.3	강	강
46	중약	회록	중소	중간	중	0.3		
48	중	회록	중소	중간	중	0.3		
50	중약	회록	중소	중간	중	0.4		
52	중약	회농록	중소	중간	조	0.4		
54	약	녹	소	정구	조	0.6		
56	약	농녹	소	중간	조	0.6		
58	약	농녹	중소	중간	중	0.4		
60	약	회농록	중	중간	중조	0.6		
62	약	회록	중소	중간	조	0.4		
64	중	회록	중소	고구	중	0.3		
66	중	농록	중	중간	중조	0.3		
68	중약	회농록	중	첨두	중	0.5		
70	중	회록	중	중간	중	0.4		
72	강	회록	중소	중간	만	0.4		

74	강강	회록	소	중간	만	0.3		
76	약	회농록	소	중간	중조	0.4	중강	
78	중약	답록	중소	정구	조	0.5	강	
80	중	회농록	중소	중간	중	0.4		
82	강	회록	중소	정구	중만	0.4		
84	강	회록	중소	중간	중만	0.3		
86	강	회록	중소	중간	중만	0.4		
88	강	회록	중소	중간	중만	0.4		
90	중강	회록	극소	중간	중만	0.4		
92	중강	회록	극소	정구	중	0.4		
94	약	회록	소	중간	만	0.3		
96	강	회록	소	정구	중조	0.3		
98	중강	농록	중소	침두	중만	0.4		
100	중강	회록	소	고구	중조	0.4		
공시 번호	초세	엽색	엽면 요철	구형	숙기	심고 /구고	Ca 결핍증	좁나방 내성
102	중강	회록	소	고구	중조	0.4		
104	강	회록	중	편구	중만	0.3		
106	중강	회록	소	중간	중	0.4	중약	
108	강	회록	중	편구	중만	0.4		
110	중	회록	중	중간	중만	0.3	중강	
112	약	회농록	중	정구	중조	0.3		
114	강	회농록	중소	중간	만	0.35		
116	중약	농록	중	중간	중	0.3		
118	강	회록	중소	중간	중만	0.3		
120	중약	농록	중	편구	중만	0.6		
122	중강	농록	중	정구	중	0.4		
124	중약	농록	중	중간	중	0.5		
126	강	회록	중소	중간	만	0.3		
128	중	회록	중소	중간	중	0.4		
130	강	회록	중소	중간	만	0.4		
132	중강	녹	중	중간	중만	0.3		
134	강	회답록	중소	정구	만	0.4		
136	강	녹	중	중간	중	0.6		
138	강	회록	중소	중간	중만	0.5	중	
140	중	답록	중	편구	중	0.4		
142	중강	회록	중소	편구	중조	0.6		
143	중	회록	중	정구	중만	0.4		
145	강	회록	중	중간	극만	0.4		
147	약	회록	중소	편구	중만	0.4		
149	중강	답록	중	중간	중	0.3		
151	중약	회록	중소	편구	중만	0.4		
153	중	회록	중소	중간	중조	0.5		
155	강	회록	중소	고구	중만	0.4		
157	중	농록	중소	중간	중	0.4	중	
159	중약	회록	소	중간	중	0.4	중	
161	중	회록	중소	편구	중만	0.3		
163	중	회록	소	중간	중만	0.4		
165	중	농록	소	중간	중만	0.4		
167	중약	회록	소	중간	중만	0.3		
169	중강	농록	소	정구	중만	0.3		
171	중강	농록	다	고구	중만	0.4		

173	중	담녹	중소	중간	중만	0.3		
175	중	회농록	중	중간	중만	0.3		
177	중	회농록	중다	정구	중	0.3	중약	
179	중약	회농록	중	중간	중만	0.3		
181	중	담록	중	중간	중만	0.3	중	강
183	중	농록	중다	정구	조	0.4		
185	약	농록	중	정구	조	0.3		
187	중약	농록	중	정간	중	0.3		
189	중	녹	중	중간	중	0.3	중약	
191	중약	농록	중소	중간	조	0.25		
193	중	회록	소	중간	중	0.3		
195	중약	회록	소	중간	중	0.3	중	
197	중	녹	중소	중간	조	0.25	강	강
199	약	농록	중	중간	중	0.4		
201	중	녹	소	중간	중만	0.3		
203	중	회록	중소	정구	중조	0.3		
공시 번호	초세	엽색	엽면 요철	구형	숙기	심고 /구고	Ca 결핍증	좀나방 내성
205	중강	회담록	중소	중간	중만	0.3		
207	중약	회록	소	중간	중조	0.3		
209	중약	회록	중	중간	중	0.4		
211	중	회록	중소	중간	중	0.35		
213	중	회록	중소	중간	중만	0.3		
215	중	녹	중	정구	중조	0.3		
217	약	회농록	중	중간	중만	0.4	강	
219	강	회록	소	중간	중만	0.35		
221	중약	농록	중	정구	중	0.3	강	강
223	중	회농록	중다	중간	중	0.35	강	강
224	중	회록	중	정구	중	0.3		
226	중	회농록	중소	중간	중	0.4		
228	중	회록	중	중간	중만	0.3	강	약
230	중	담록	소	중간	중만	0.4		
232	중	회농록	소	정구	중조	0.5		
234	약	농록	소	정구	중조	0.4		
236	중약	회농록	소	중간	중만	0.4		
238	중	회담록	소	중간	중만	0.4		
240	중	회록	소	중간	중만	0.3		
242	중약	회록	소	정구	중	0.6		
244	중강	회록	소	중간	중조	0.3	강	
246	중약	농록	중	정구	중조	0.4	중강	
247	중	녹	소	중간	중만	0.5	강	
249	중	회록	소	정구	중조	0.3		
251	중강	농록	소	중간	중만	0.4	강	강
253	약	농록	중	중간	중만	0.4		
255	중약	회농록	소	정구	중조	0.45		
257	중	회농록	중소	중간	중조	0.4		
259	약	회록	중소	침두	중	0.5	강	강
261	약	회록	중소	정구	중	0.6	강	강
263	약	회농록	소	정구	중	0.4		
265	중	회록	소	정구	중조	0.4	중	
267	약	농록	소	중간	중만	0.3		
269	중	회록	소	중간	중만	0.35		

273	약	농록	중소	중간	중	0.4	강	강
275	약	농록	중소	중간	중	0.4		
279	중약	농록	중소	중간	중조	0.5	강	중
281	약	회록	중소	중간	중	0.4	강	강
283	중약	녹	소	중간	중	0.4	강	중
286	중약	녹	소	중간	중	0.3		
288	중	회록	중소	중간	중조	0.4		
290	중	회농록	중소	중간	중	0.3	강	
292	약	농록	소	중간	중만	0.3		
294	중강	회록	중소	중간	중만	0.4	강	
296	중약	농록	소	중간	중	0.3		
298	중	녹	중소	중간	중	0.4		
300	중약	회농록	중	중간	중	0.4		
302	중	회록	중소	중간	중	0.3		
305	중강	농록	중소	중간	중만	0.4		
307	중	회록	중	정구	중조	0.4	중강	
308	중강	회록	중	중간	중만	0.3		
310	중강	회록	중	중간	중조	0.45		
공시 번호	초세	엽색	엽면 요철	구형	숙기	심고 /구고	Ca 결핍증	좀나방 내성
312	중	회록	중소	중간	중조	0.4		
314	중	회록	중소	중간	중조	0.4		
316	약	회농록	소	중간	중	0.45		
318	중약	회록	중소	중간	중	0.4		
320	중	농록	소	중간	중조	0.3		
322	중	회록	소	고구	중만	0.4		
324	중	회록	소	고구	중만	0.3	강	
326	강	녹	소	중간	중만	0.4	중약	
328	중약	회농록	소	중간	중조	0.3	강	강
330	중약	녹	중	중간	중	0.4	강	강
332	중약	회록	중소	중간	중	0.4		
334	중	농록	중소	중간	중조	0.5	중	
336	중약	회록	중소	중간	중조	0.4		
338	중	담록	중소	중간	중	0.4		
340	중	농록	소	편구	중	0.4		
342	중	회록	소	중간	중	0.4	강	강
344	중	녹	중소	중간	중조	0.3		
346	중강	농록	소	중간	중만	0.3	강	약
347	중강	녹	중소	편구	중	0.5	강	약
348	중강	회록	소	중간	중	0.4	강	약
350	중강	회록	소	중간	중	0.4		
352	중	농회록	소	중간	중	0.4		
354	중강	농록	중소	중간	중	0.5		
356	중강	녹	중소	중간	중	0.4		
358	중강	회록	소	중간	중	0.4		
359	중	녹	중소	중간	중	0.4		
360	중	회록	소	침두	중	0.5		
362	중강	녹	소	중간	중	0.3		
364	중	회록	소	중간	중	0.4		
366	강	회록	중소	편구	중만	0.3		
367	중	회농록	소	중간	중	0.3		
368	강	녹	소	중간	중만	0.3		

369	중	녹자	중다	중간	중조	0.4		
371	중강	농록	중다	중간	중	0.3		
375	중	회록	다	중간	중	0.4		
376	중	녹	소	중간	중	0.5		
377	중약	농록	소	중간	중조	0.4		

㉔ 4차 년도에도 3차 년도와 같이 저온기 안토시아닌 발현이 적은 계통을 조사하였다. 안토시아닌 발현이 없는 우수 계통은 <표 6-14>의 공시번호 44(198259-), 213(198446-)이었으며 이와 반대로 공시번호 70(100416-) 계통은 저온기 안토시아닌 발현력이 매우 강했다. 불량 환경에서 안토시아닌 발현이 억제되는 품종에 대한 시장의 요구가 점차 강해질 것으로 예상되므로 향 후 본 시험에서 선발된 계통의 후대에 대하여 고온 건조 조건에서의 안토시아닌 발현 양상에 대한 검토를 수행하고자 한다. 한편 3차 년도에 저온기 안토시아닌 발현이 적은 계통으로 선발된 198258-, 198275-, 198293-, 199358- 계통은 고온과 건조스트레스 조건에서도 안토시아닌 발현이 적은 것으로 확인되었다.

칼슘결핍증 내성 검정과 배추좁나방 내성 검정 시험을 통해 내성 계통으로 조사된 계통들에 대하여는 응성불임성 유기를 위해 여교배를 실시하여 내성계통을 대상으로 한 MS화 작업을 추진하였다. 이는 우수한 내성 계통의 보안 유지뿐 아니라 내성 형질이 열성으로 작용할 경우 내성 품종 육성을 위해 반드시 필요한 작업이다.

5차 년도 기 보유계통 및 수집자원의 원예적특성검정을 위하여 MS유기계 포함 391점(226계통)을 2014년 7월 25일에 시판 72구 플러그트레이에 파종하였다. 이 중 발아가 되지 않은 6계통을 제외한 386점(221계통)을 2014년 8월 26일에 본포에 정식하였다. 정식은 노지포장에 N-P-K를 10a 당 10-13-9kg 기비로 사용하고 퇴비는 시판 퇴비를 900kg 사용하였다. 이후 3차례의 추비를 통해 N-K를 18-16kg 사용하였다. 정식 포장은 70x40 2조식으로 준비하여 MS 유기계 10주 유지계 10주씩 재배하였다. 정식 후 관리는 관행재배에 따랐다. 정식 후 생육은 전반적으로 순조로웠다. 공시된 재료들에 대하여 달관 조사에 의한 원예적 특성을 조사하였으며 이 가운데 초세, 엽색, 엽면요철, 구형, 숙기, 심고 등의 특성은 <표 6-16>와 같으며, 여교배에 의해 응성불임성 계통이 완성된 고세대 주요계통의 특성은 <표 6-15>과 같다.

재배시험을 통해 MS 유기계를 제외한 221계통에 대한 원예적 특성을 조사하였으며 아울러 MS유기계통의 형질치환 정도를 달관법에 의해 육안으로 평가하였다. 경쟁력 있는 품종 육성을 위해 경영적 차원의 품종 관리를 고려하여 응성불임성을 이용한 품종을 육성하고자 하여 MS 계통을 육성하였다. 현재 양배추에 도입된 응성불임성은 무에서 유래한 응성불임성으로 응성불임성 세포질을 도입하여 양배추에서는 완전한 세포질응성불임(CMS)를 나타내므로 육성계통의 여교배를 통하여 응성불임성 계통을 육성한다. 따라서 매년 선발된 모본을 응성불임성 유기 계통에 여교배하여 핵치환된 응성불임성 계통을 육성하고 있다. 계통의 원예적 특성 검정 시험에 응성불임계통과 응성가임 계통을 동시에 공시하여 형질 치환 정도를 평가하고 있다. 본 시험에서 공시한 응성불임성 계통의 경우 여교배 7세대 이상으로 원예적형질 치환 정도가 만족스러워 응성불임성 계통으로 활용 가능한 것으로 판단되는 계통은 28계통으로 조사되었다. 여교배 6세대로 치환율이 높아 균일도가 우수한 계통이 21계통이었다. <표 8>의 계통 중 M102043은 우수조합으로 선발

되어 품종보호출원된 SC-901 품종의 모계친으로 사용되었으며, M107140은 SC-902의 모계친으로 사용되었다. 채종시험에서 종자생산량은 M102043이 4,000주/ha 정식 기준으로 주당 34g 이었으며 M107140은 양호한 32g으로 양호한 생산력이 확인되었다.

품종보호출원된 SC-901 조합은 모계친인 M102043이 부계친인 107152보다 5~7일 정도 개화가 빨랐으며 착협율이 높았다. SC-902 조합은 모계친인 M107140이 부계친인 199324보다 10일 개화가 빨랐으며 화지가 길게 발달하여 개화 후기에 화지기 꺾이는 현상이 발생하였다. 채종시험의 경우 높은 단가를 적용하여 최상의 관리 상태를 유지하므로 높은 생산성을 보였으나 상업적 생산 시 유인이 필요할 것으로 판단되어 채종비의 상승압력으로 작용할 것으로 예측되며 개화기 관리가 부실할 경우 수량 감소의 요인으로 작용할 것으로 예상된다. 특히 SC-902의 모계친인 M107140 계통은 저온감응 묘령이 본엽 25매 이상 줄기직경 1.5cm 정도로 파악되는 반면 저온감응 기간은 짧은 것으로 파악되어 저온감응과 관련하여 일반적인 양상이 아닌 독특한 반응을 보이므로 채종 시 주의가 요구된다. SC-901의 모계친인 M102043의 꼬투리는 길이가 8~9cm 정도이며 꼬투리당 종자수가 14~20립 정도 인데 반해 SC-902의 모계친인 M107140은 5~6cm으로 짧으며 꼬투리 당 종자수도 10~16립 정도 이다.

<표 6-15> 육성불임성 계통(여교배 고세대 고정 계통)의 주요 특성(2014년 가을)

계통번호	주요 특성
M 102043-	납질이 많고 형태 갖춤이 빠르다. 결구건도가 강하다.(SC-901 ♀)
M 102119-	엽육이 두껍고 구가 작다. 칼습결핍증에 민감하다. 결구건도가 강하다.
M 107140-	납질이 많고 구고가 높으며 내엽의 비대가 늦다.(SC-902 ♀)
M 106148-	엽장이 짧으며 저온기 안토시아닌 발현이 적다. 내엽비대가 빠르다.
M 107152-	엽색이 짙고 엽육이 두꺼우며 내동성이 강하다. 만생이다.
M 107154-	엽색이 옅고 숙기가 늦으며 구가 크다. 엽이 크고 내엽비대가 늦다.
M 107172-	엽장이 짧고 엽육이 두꺼우며 엽맥이 굵다. 내동성이 강하다.
M 107173-11-	엽수가 적고 엽병이 길며 형태 갖춤이 빠르다. 내서력이 강하다.
M 107174-	초세가 약하고 구두가 뽀족한 편이다. 엽질이 부드럽다.
M 107175-1-	엽육이 연하며 숙기가 빠르고 Savoy가 있다. 구 단면에 각이 심하다.
M 107175-11-	엽육이 연하며 숙기가 빠른편이다. 결구건도가 약하다.
M 107178-	엽병이 길고 극만생이며 엽수분화는 많다. 구형성이 늦다.
M 108088-	납질이 많고 외엽이 늘어지며 엽육이 질기다. 숙기가 빠르고 정구형이다.
M 198201-	엽육이 두껍고 내엽의 비대력이 강하다. 엽색이 옅다.
M 198232-	엽이 부드럽고 엽장이 짧으며 엽수분화가 많다. 구내부 황색이 강하다.
M 198234-	고구형으로 형태 갖춤이 빠르며 구가 크다. 내엽비대가 늦다.
M 198245-	초세가 강하고 내동성이 강하며 숙기는 중만생이다. 엽육이 두껍다.
M 198258-	엽육이 얇고 납질이 많으며 엽장이 짧고 엽수분화가 많다. 숙기가 빠르다.
M 198259-	엽육이 두껍고 다즙성이며 내엽의 비대가 빠르다. 엽장이 짧다.
M 198261-	저온기 안토시아닌 발현이 적으며 대엽형으로 숙기는 중간이다. 엽육이 두껍다.
M 198293-	엽장이 짧고 엽육이 두껍다. 엽색이 진하고 엽 가장자리에 큰 물결무늬가 있다.
M 199286-	외엽장이 짧고 정구형이며 숙기가 빠르다.
M 100411-	엽색이 짙고 엽장이 짧으며 숙기가 빠르다.
M 100401-	정구형으로 숙기가 빠르다. 구 단면에 각이 있다.
M 100404-	고구형으로 형태갖춤이 빠르나 내엽비대가 늦은 만생종이다.

M 100411-	정구형으로 외엽색이 짙고 구가 작다.
M 100416-	외엽에 납질이 많다. 구내부 황색이 강하다.
M 100425-	정구형으로 숙기가 빠르고 결구건도가 높다.
M 100426-	정구형으로 숙기가 빠르다. 저온기 안토시아닌 발현이 없다.
M 100435-	엽육이 두껍고 엽수분화가 적으며 형태갓춤이 빠르나 구비대는 늦다
M 100463-	고구형으로 형태갓춤은 빠르나 내엽비대는 늦다. 외엽에 납질이 많다.
M 100467-	정구형으로 형태갓춤이 빠르다. 내엽비대가 늦은 만생종이다.
M 100473-	정구형으로 초세가 강하다. 내한성이 강한 만생종이다.
M 100490-	엽폭이 좁으며 엽장도 짧아 구두가 벌어진다 구내부 황색이 강하다.
M 100497-	구형 갓춤이 빠르다. 중대구종으로 저온기 안토시아닌 발현이 없다.
M 100500-	극만생종으로 내엽의 엽폭이 좁고 입성이다.
M 100531-	정구형으로 중만생 숙기에 내동성이 강하다. 안토시아닌 발현이 없다.
M 100538-	엽육이 두껍고 내동성이 강하다. 외엽의 길이가 짧고 안토시아닌 발현이 없다.
M 100555-	엽색이 짙고 엽육이 얇다. 구형갓춤은 빠르나 내엽비대는 늦은 만생종이다.
M 100561-	구고가 약간 낮은 구형으로 중생종이다. 엽육이 두껍고 내부황색이 강하다.
M 100563-	정구형으로 조생종이다. 외엽이 크다.
M 100587-	외엽이 크고 부드럽다. 편구형 대구계로 내엽의 황색이 강하다.
M 100598-	중소구종으로 엽육이 두껍고 저온기 안토시아닌 발현이 없다.
M 100604-	외엽이 부드럽고 비대가 빠르면 구가 작다.
M 100608-	외엽이 큰 대구종이다. 구내부 황색이 강하고 저온기 안토시아닌 발현이 없다.
M 100610-	외엽에 납질이 많다. 내엽의 비대는 늦고 저온기 안토시아닌 발현이 없다.
M 100621-	외엽에 납질이 많으며 구고가 낮은 편구형이며 구면에 각이 있다
M 195469-	엽맥이 굵다. 다즙성이다. 당도가 높다(8 Brix)
M 195507-	엽병길고 극만생이다. 내동성이 강하고 코아의 길이가 짧다.
M 195506-	초형이 입성이며 숙기는 만생이다. 내동성이 강하다.

<표 6-16> 계통특성 조사표(2014년 가을)

공시 번호	초세	엽색	엽면 요철	구형	숙기	심고 /구고	Ca 결핍증	줄나방 내성
2	중강	회록	소	중간	극만	0.3		
8	약	농록	극소	구	중조	0.3		
10	강	회록	소	고구	만	0.3	1	1
12	중	회록	소	중간	중조	0.3		
14	중강	농록	중소	구	만	0.3		
16	강	담록	중	중간	만	0.3	2	3
18	중강	농록	중소	구	만	0.4		
20	중강	회록	중소	편	중	0.5		
22	중강	회록	중소	편	중	0.5		
24	중약	농록	중	중간	중	0.5		
25	중	농록	중	중간	조	0.4		
27	중	농록	중	중간	조	0.5		
29	강	회록	중소	중간	극만	0.5		
31	중	회록	중	구	조	0.4		
33	중	담록	중	중간	조	0.3	1	3
35	중	녹	중	중간	중	0.3		
37	강	담록	중	중간	극만	0.2		
39	중강	녹	중소	중간	중만	0.3		
41	중	농록	소	중간	중	0.3		
43	중	농록	중	중간	중	0.3		

45	중강	회록	중소	중간	중만	0.3		
47	중강	회록	중소	중간	중	0.3		
49	중	농회록	소	중간	중조	0.4		
51	중약	농록	소	구	조	0.3		
53	약	농록	중소	구	조	0.3		
55	중약	농록	중소	중간	중	0.4		
57	중약	녹	중소	중간	중조	0.6		
59	중강	회록	중소	중간	중만	0.4	1	4
61	중약	농록	중	구	조	0.5		
63	강	회록	소	고구	만	0.3		
65	약	농록	중소	구	조	0.4		
67	강	회록	중소	중간	만	0.4	2	2
69	강	회록	중소	중간	중만	0.3	2	3
71	강	녹	소	중간	만	0.3		
73	중강	녹	소	구	만	0.3		
75	중	농록	중소	구	중조	0.4		
77	중	녹	소	구	중	0.4		
79	중	녹	소	중간	중	0.3		
81	중강	녹	소	고구	중만	0.3		
83	중강	녹	소	고구	중만	0.3		
86	강	회록	중소	구	만	0.3		
88	극강	농록	중소	구	만	0.3		
90	중	회록	중소	중간	중만	0.3	2	4
92	중	담록	중소	중간	중	0.4		
94	중강	녹	중소	중간	중만	0.4		
96	극강	회록	중소	중간	극만	0.3	1	2
98	강	회록	중소	중간	만	0.3		
100	중	회록	중소	구	중만	0.3		

* Ca결핍증, 배추좁나방 내성 5점 척도(1: 내성 ~ 5: 민감성)

공시 번호	초세	엽색	엽면 요철	구형	숙기	심고 /구고	Ca 결핍증	좁나방 내성
102	중	농록	소	중간	만	0.3		
104	약	농록	극소	구	중조	0.3		
106	강	농록	소	중간	만	0.3		
108	중	회록	소	구	중	0.3		
110	중약	농록	중소	구	조	0.4		
112	강	회록	중	중간	중만	0.3	1	3
114	중강	회록	중소	편	중만	0.6		
116	강	회록	중소	편	중만	0.5	1	4
118	강	회록	중소	편	중만	0.5	2	3
120	중	농록	중	중간	중	0.4		
122	중약	농록	중	중간	조	0.4	2	2
124	중	농록	중	중간	조	0.5		
126	강	농록	중소	중간	만	0.3		
128	강	녹	중소	중간	중만	0.3		
130	강	담록	중	중간	중만	0.3		
132	중	녹	중	중간	중	0.3		
134	중강	녹	중	중간	중만	0.3		
136	중강	녹	중소	중간	중만	0.3		
138	강	회록	소	중간	만	0.3	1	3
140	중	농록	중	중간	중	0.3		
141	중	녹	중	중간	중	0.3		

143	중	농록	중소	중간	중	0.3		
144	중약	농록	중소	중간	중조	0.4		
145	중	농록	중소	편	중	0.5		
147	중	농록	중소	구	중조	0.4		
149	중	농록	소	중간	중	0.3		
151	중	회록	중소	편	중	0.6	1	2
153	중강	회록	중소	중간	중	0.4		
155	중	담록	중	중간	중	0.4		
157	중약	회록	중소	고구	중	0.3	3	1
159	중	농록	중소	중간	중	0.4		
161	중	담록	중	중간	중만	0.3		
163	중강	회록	중	중간	중	0.3	1	2
165	중강	농록	중	편	중	0.5		
167	중강	농록	중	편	중	0.4	3	1
169	중	농록	중	편	중조	0.4		
171	중	농록	다	중간	중	0.4		
173	중	녹	중	구	중	0.3		
175	중약	농록	중	구	조	0.5		
177	중	농록	중	구	중조	0.4		
179	중강	회록	중소	중간	중만	0.3	2	4
181	중강	농록	중	구	중조	0.5		
183	중	회록	중소	중간	중	0.4	2	3
185	중약	담록	중소	중간	극조	0.4		
187	중약	회록	중소	중간	극조	0.4		
189	강	회록	소	중간	중만	0.3		
191	강	농록	소	중간	극만	0.3		
193	중강	회록	중소	편	중만	0.5	1	3
195	중강	회록	소	중간	중	0.5		

* Ca결핍증, 배추좁나방 내성 5점 척도(1: 내성 ~ 5: 민감성)

공시 번호	초세	엽색	엽면 요철	구형	숙기	심고 /구고	Ca 결핍증	좁나방 내성
197	강	농록	중소	중간	만	0.3		
199	중	농록	중	중간	중	0.4		
201	중	농록	소	중간	중	0.3		
203	중	농록	중소	중간	중	0.4		
205	중	회록	중다	중간	중	0.4	1	2
207	강	회록	중소	중간	중만	0.3	2	2
209	중	녹	중소	구	조	0.4		
211	중	회록	중소	중간	중	0.4	2	3
213	중	회록	중소	중간	중	0.5	2	1
215	중강	농록	소	구	중	0.3		
217	중약	농록	소	구	조	0.3		
219	중	농록	중소	구	조	0.3		
221	중	농록	중소	구	중조	0.3		
223	중강	농록	중소	구	중조	0.3		
225	강	담록	중소	중간	중만	0.3		
227	강	회록	중	중간	중만	0.3	1	4
229	강	회록	중소	편	극만	0.3	2	3
231	중	농록	중	중간	중	0.4		
233	중약	농록	중	중간	중조	0.4		
235	중	농록	중	중간	중	0.4		
236	중	회록	중소	고구	중만	0.3		

238	강	회록	중소	구	중만	0.3	1	2
240	강	회록	중소	구	중만	0.4		
241	중	농록	소	-	만	-		
243	중강	담록	소	첨구	중조	0.4		
245	약	농록	소	구	조	0.5		
247	중약	농록	중소	구	중조	0.5		
249	중약	녹	중소	구	중조	0.4		
251	중약	담록	중소	구	중조	0.4		
253	중	회록	중	중간	중	0.3	2	1
255	중	농록	소	구	중	0.3		
257	중	농록	중	중간	중	0.3		
259	중	녹	중	구	중조	0.3	1	4
261	중약	농록	중	구	조	0.5		
263	중약	담록	중	구	조	0.4		
265	중	농록	중	구	중조	0.5		
267	중	농록	중소	중간	중	0.4		
269	약	농록	소	구	중조	0.3		
271	약	농록	소	구	중조	0.5		
273	중약	농록	소	구	중	0.4		
275	중	회록	중소	중간	중	0.3		
277	중강	농록	중소	중간	중	0.3		
278	중강	농록	중소	중간	만	0.3		
280	중강	녹	중소	중간	중	0.4		
282	중약	농록	중	구	조	0.4		
284	중약	농록	중	구	조	0.4		
286	중	농록	중다	중간	중	0.3		
288	중강	회록	중소	중간	중만	0.3		
290	중강	농록	중소	중간	중만	0.3		
292	중강	회록	중소	중간	중만	0.3	1	3
293	중	녹	소	중간	중조	0.3		
공시 번호	초세	엽색	엽면 요철	구형	숙기	심고 /구고	Ca 결핍증	좁나방 내성
294	약	농록	중소	편	조	0.6		
296	중	회	중소	구	중	0.4		
298	중	농록	소	중간	중	0.3		
300	강	회록	중소	중간	만	0.3		
302	강	회록	중소	중간	만	0.25		
304	강	회록	중소	중간	만	0.25	1	2
306	중강	회록	중소	구	중	0.3		
308	중강	회록	중소	구	중	0.4		
310	중강	회록	중소	중간	만	0.3		
312	강	회	소	구	극만	0.3		
314	중약	농록	소	구	중	0.3		
316	중약	농록	소	구	중	0.3		
318	중	농록	중	편	중조	0.5		
320	중강	농록	중소	구	중조	0.4		
322	중강	농록	중소	중간	중조	0.4		
324	중	회록	중	중간	중만	0.3	1	2
326	중약	녹	중소	구	조	0.4		
328	중약	회록	중소	구	중조	0.4		
330	중약	회	중	구	중조	0.4		
332	강	회	중소	중간	극만	0.3		

334	강	회록	중소	중간	극	0.3		
335	약	농록	소	구	중조	0.3		
336	약	농록	소	구	중조	0.3		
337	중약	농록	소	구	중조	0.4		
338	중약	농록	소	구	중조	0.4		
339	중	농록	중소	중간	중	0.4		
340	중	녹	중소	중간	중	0.4		
342	중약	회록	중소	구	중조	0.4		
343	중약	녹	중소	구	중조	0.4		
345	중약	담록	소	구	중	0.4		
347	중	농록	소	구	중	0.4		
348	중	농록	중소	구	중	0.4		
350	중	녹	중	중간	중	0.4		
352	강	농록	중소	중간	극만	0.3	2	2
353	중	녹	소	구	중	0.4		
354	강	녹	소	중간	만	0.3		
355	중강	농록	Savoy	구	만	0.7		
356	강	농록	Savoy	구	만	0.8		
357	상	농록	Savoy	구	만	0.7		
358	중	농록	소	중간	중	0.4		
359	중	농록	중	중간	중	0.5		
360	중	농록	중	중간	중	0.5		
361	중강	회록	중소	중간	중만	0.3	1	2
362	중강	녹	중소	중간	만	0.4		
363	중약	녹	소	구	조	0.4		
364	중약	농록	소	구	중조	0.3		
365	강	농록	중다	중간	극만	0.3	2	1
366	중강	농록	중소	중간	중만	0.3		
367	중강	회록	중소	중간	중만	0.3	1	2

㉠ 우수 형질의 양배추 품종 육성을 위해 2010년부터 국내를 비롯한 중국, 인도, 일본, 대만, 터키, 미국 등에서 양배추 유전자원을 총 215품종을 수집하였다. 수집된 유전자원은 매해 내서성 및 내병이 우수한 품종들로서 원예적 형질인 구형, 숙기, 엽장, 엽폭, 외엽수, 구중, 구고, 구폭, 코어길이를 검정하였다. 검정하여 선발된 개체들은 본 연구과제를 진행함에 좋은 육성재료로 이용되었다. 또한 5차년도에 이들을 재검정하여 각 품종 당 1 ~ 3개까지의 개체를 선발하였으며, 선발된 총 개체수는 287개체이다. 특성 검정을 통해 선발된 품종들은 열구가 매우 늦고 포장저장성이 매우 우수하여 국내는 물론 인도를 비롯한 동서남아시아 지역에 적용할 수 있는 품종, 구폭이 짧아 밀식재배가 가능하고 다수확을 필요로 하는 지역에 적용할 수 있는 품종, 빠른 숙기를 필요로 하는 중국과 같은 지역에 적용할 수 있는 품종들이 포함되어 있다. 또한, 구중, 구폭, 구고에 비해 코어 길이가 비교적 짧아 식용부위가 넓은 품종들도 확보되어 신품종 육성의 재료로 활용할 수 있다.

1차년도에는 연구개발 목표에 적합한 육성재료를 확보하기 위하여 중국, 일본, 인도 및 미국에서 다양한 양배추 유전자원 46품종을 수집하였다. 구형별로 원형계 32품종, 편형계 14품종을 수집하였으며, 위황병과 뿌리혹병 저항성 관련 유전자원 “신람”, “과일”, “YCR다혜”, “YCR이념”, “선감336” 등을 수집하였다. 수집

된 유전자원 및 대비종을 포함한 원형계 42품종과 편형계 18품종 등 60품종을 공시하여 2010년 7월 16일에 105구 트레이에 파종하였고 25일 육묘한 후 본밭에 주간간격 40cm로 정식하였다. 정식된 유전자원은 포장검정을 통하여 시험대비종 및 육성재료로 활용하기 위하여 특성, 숙기, 열구, 엽장, 엽폭, 외엽수, 구중, 구고, 구폭, 코아, 순도 등을 국립종자원 작물특성 조사기준을 적용하여 조사한 다음 우수한 계통을 선발하였다. 선발된 계통은 현재 중국 및 인도 등 해외에서 일반적으로 재배되고 있는 품종특성을 고려하였으며 구 모양, 숙기, 열구 등을 조사한 후 양배추 신품종육성을 위한 육성재료로 이용하기 위하여 형태적 특성이 우수한 66개체의 성숙모본을 선발하였다. NO1 ~ NO17은 중국에서 수집한 품종들로 숙기가 정식 후 48일부터 75일로 다양하였고 NO9는 중국농업과학원에서 옹성불임을 이용하여 개발한 “중감18호(CMS)”인데 조직이 매우 치밀하고 열구가 늦었으며 코아가 짧아 우수하였다. 일반적으로 코아 길이는 양배추 품질을 결정하는 중요한 요인 중 하나로 코아 길이가 5cm 이하 이면 매우 우수하다고 할 수 있다. NO.11은 세미니스의 “린다”라는 품종인데 내서성과 연부병에 강하였으며 열구가 늦어 포장저장성이 매우 강하였다. 내서성 양배추를 육성하는데 매우 중요한 유전자원으로 판단되었다. NO.18 ~ NO.25는 인도에서 수집한 품종들이다. NO23은 Golden seed가 판매하고 있는 “Goody Ball”이라는 품종인데 코아 길이가 짧고 결구긴도가 매우 우수하였으며 포장저장성도 탁월한 품종이었다. 인도 수출용 품종육성에 적극 활용할 예정이다. NO32는 스리랑카에서 수집한 “Early mountain”이라는 품종인데 구는 1kg 내외의 소구형으로 외엽이 작아 밀식재배에 유리한 품종이었으며 숙기에 비해 열구도 안정된 품종이었다. 인도의 소형양배추 품종육성에 적합한 유전자원으로 보였다. NO52는 일본 사카타종묘사가 개발한 “신람”이라는 양배추인데 위황병과 뿌리혹병에 강한 복합내병성 품종으로 숙기가 빠르고 결구긴도가 매우 우수하여 편형계 조생종 양배추 품종육성에 중요한 유전자원이라고 할 수 있다. NO54 ~ NO57은 일본의 일본농림사가 개발한 YCR품종들로 위황병과 뿌리혹병 접종시험 결과 내병성을 가지고 있다는 것이 확인되었다. 내병성 계통육성에 매우 중요한 유전자원으로 판단된다. NO58 ~ NO60은 일본 노자끼종묘사의 월동양배추인데 내한성과 포장저장성이 매우 우수하였고 저온기에 안토시아닌 발생이 거의 없는 품종들이었다. 월동양배추 품종육성에 적극 활용하였다.

2차년도에는 중국, 일본, 인도 및 미국에서 연구개발 목표(내서성 및 내병성 품종)에 적합한 다양한 양배추 유전자원을 49품종을 수집하였다. 구형별로 원형계 17품종, 편형계 32품종을 수집하였다. 수집된 유전자원 및 1차년도 선발계통, 대비종을 포함한 원형계 품종과 편형계 품종 50여 품종을 공시하여 2011년 7월 19일에 105구 트레이에 파종하였고 24일 육묘한 후 본밭에 주간간격 40cm로 정식하였으며, 관행에 준하여 재배하였다. 선발한 우수계통은 현지(중국 및 인도 등)에서 일반적으로 재배되고 있는 품종특성을 고려하였으며 구 모양, 숙기, 열구 등을 감안하여 형태적 특성이 우수한 34개체의 성숙모본을 선발하였다. 사카타의 “춘란”과 NO8 중국 슈얼리의 “춘풍”은 우심형(Pointed cabbage) 양배추로

결구색은 진한녹색이며 숙기가 빠르고 저온결구력이 강한 품종이다. 우심형 양배추 육성시에 매우 중요한 유전자원이라고 할 수 있다. NO70 ~ NO75는 중국에서 수집한 원형계 품종들로 숙기가 정식 후 48일 전후의 극조생종 품종들이다. 대체적으로 중국에서 육성한 극조생종 품종들은 내병성 및 포장저장성(열구)에는 약한 단점을 가지고 있으나 구색이 진하고 식미가 양호한 특성을 보였다. 그중 NO70 “녹노관”은 “중감 11호”형의 웅성불임을 이용하여 개발한 품종으로 “중감 11호”에 비해 순도가 좋고 열구가 약간 늦었다. NO74는 중국에서 조생계 원형양배추로 많이 재배되고 있는 “8398”이라는 품종이다. 도입종중 숙기가 가장 빨랐으나 열구에는 매우 민감하였다. NO.75는 중국 농업과학원에서 웅성불임을 이용하여 개발한 “중감11호(CMS)”인데 “중감11호(SI)”보다 순도가 우수하고 열구가 늦었으며 코아가 짧아 우수하였다. 일반적으로 코아 길이는 양배추 품질을 결정하는 중요한 요인 중 하나로 코아 길이가 5cm 이하 이면 매우 우수하다고 할 수 있다. NO78은 인도 Namdhari seed의 “Shighjra”라는 품종으로 내서성이 강하고 결구건도가 매우 우수한 특성을 보여 인도 수출용 품종육성에 적극 활용할 예정이다. NO77은 동부한농의 “DC-14”라는 품종인데 몬산토가 인도에 판매하는 “세인트”계의 품종군이었다. NO.22는 중국 Jingtian의 “극조 2호” 품종인데 구는 1kg 내외의 녹색이 진한 소구형으로 외엽이 작아 밀식재배에 유리한 품종이었으며 숙기에 비해 열구도 안정된 품종이었다. 중국의 조생계 원형양배추 품종육성에 적합한 유전자원으로 판단되었다. 중국 온주시에서 도입한 NO94의 “초급 녹풍”과 NO35의 “초급 동풍”은 고온결구력이 강한 편형계 대구형 양배추이다. 동남아 수출용 양배추 품종육성에 활용 가능한 품종이다. NO.97~NO.100은 러시아로부터 도입한 유전자원들로 NO98의 BHNNCCOK의 “15”와 NO99의 “1305”는 매우 단단히 결구하고 열구도 안정되어 있으며 코아 길이도 적당하여 식용부위가 많은 품종육성에 유용한 유전자원으로 생각 된다. NO101 다끼이의 “오키나”는 위황병에 저항성을 지니고 있으며 숙기가 빠르고 결구건도가 매우 우수하여 국내와 중국에서 인기가 있는 품종이다. 편형계 조생종 양배추 품종육성에 중요한 유전자원이라고 할 수 있다. 대만에서 수집한 NO103 “夏安”은 내서성(고온 결구력)과 연부병에 매우 강한 품종으로 내서성 육종에 유망한 유전자원으로 판단되었다. 일본에서 수집한 위황병에 저항성이 있는 다끼이 품종 NO105는 외엽이 작아 밀식재배에 유리한 품종이었으며 숙기에 비해 열구도 안정된 품종이었다. NO90은 일본 사카타가 개발한 “신람”이라는 양배추인데 위황병과 뿌리혹병에 강한 복합내병성 품종으로 숙기가 빠르고 결구건도가 매우 우수하여 편형계 조생종 양배추 품종육성에 중요한 유전자원이다. NO93은 일본의 일본 농림사가 개발한 YCR품종으로 위황병과 뿌리혹병 접종시험 결과 내병성을 가지고 있다는 것이 확인되었다.

3차년도에는 중국, 일본, 인도 및 러시아에서 다양한 양배추 유전자원 35품종을 수집하였다. 구형별로 원형계 25품종, 편형계 10품종을 수집하였다. 수집된 유전자원 및 대비종을 포함한 원형계와 편형계 품종을 공시하여 2012년 7월 18일에 105구 트레이에 파종하였고 25일 육묘한 후 본밭에 주간간격 40cm로 정식하였

다. 양배추 신품종육성을 위한 육성재료로 이용하기 위하여 형태적 특성이 우수한 41개체의 성숙모본을 선발하였다. NO124 ~ NO133은 중국에서 수집한 품종들로 숙기가 정식 후 49일에서 63일이었으며 NO6과 NO132는 중국의 “용안”과 “CB-864”로서 조직이 매우 치밀하고 코아가 짧아 우수하였다. 일반적으로 코아 길이는 양배추 품질을 결정하는 중요한 요인 중 하나로 코아 길이가 5cm 이하이면 매우 우수하다고 할 수 있다. NO134 ~ NO138은 인도에서 수집한 품종들이다. 대체로 결구건도가 매우 우수하였으며 포장저장성도 탁월하고 내서성이 강하여 인도 수출용 품종육성에 활용할 예정이다. NO139 ~ NO143은 일본에서 수집한 품종들이다. 특히 이 중 NO143은 일본 농원에서 개발한 “극조010”으로 위황병과 연부병 등에 강한 품종으로 숙기가 빠르고 코어가 짧아 조생종 양배추 품종육성에 중요한 유전자원이라고 할 수 있다. NO144 ~ NO128은 러시아에서 수집한 품종들로 숙기가 정식 후 54일부터 64일로 다양하였고 대체로 내한성이 강한 품종이었으며 특히 23은 코아가 짧고 조직이 매우 치밀해 우수하였다. NO149 ~ NO158은 편형계양배추 수집 품종으로서 숙기가 정식 후 71~90일로 다양하였으며 NO149은 상대적으로 구의 높이와 폭이 커서 무게가 많이 나가는 품종이었으며 NO153의 경우 코어가 짧은 특징이 있었다. NO155는 일본에서 수입한 YR 한옥 1925라는 품종으로 위황병과 내한성에 강한 품종으로 확인되어 월동계 계통육성에 매우 중요한 유전자원으로 판단된다.

4차년도에는 원형계 22품종과 편형계 10품종 등 모두 32품종의 양배추 유전자원을 수집하였다. 수집한 유전자원의 특성을 검정하기 위하여 2013년 7월 18일에 편형계 품종들을 공시하여 105구 트레이에 파종하였고 28일간 육묘한 후, 8월 15일에 본밭에 40cm 간격으로 정식하였다. 한편 원형계 품종들은 7월 22일에 편형계 품종들과 같은 방법으로 파종하여 25일간 육묘하였으며 8월 16일에 정식하였다. 정식 후, 2주 간격으로 추비를 시행하였고, 제초 작업 및 방제 등 일반적인 관리를 시행하였다. BN13-1부터 BN13-8은 중국에서 수집한 품종들로 숙기가 정식 후 50일에서 72일이었으며 BN13-6은 중국 황청하의 “춘회”로 정식후 50일 전후가 숙기이며, 초세는 보통이었으나 코아 길이가 짧아 그 형질을 활용할 가능성이 커서 선발하였다. BN13-8은 중국 슈얼리사의 “전구60” 품종으로 숙기는 60일 전후였으며 구중이 1.3kg 내외로 코아가 짧아 우수하였다. 일반적으로 코아 길이는 양배추 품질을 결정하는 중요한 요인 중 하나로 코아 길이가 5cm 이하이면 매우 우수하다고 할 수 있다. BN13-9부터 BN13-17은 인도에서 수집한 품종들로 대체로 결구건도가 우수하였으며 포장저장성도 탁월하고 내서성이 강하여 인도 수출용 품종육성에 활용해 갈 계획이다. BN13-9는 인도 세미니스에서 시판중인 “Diamond Express”로 숙기가 50~55일로 조생종 품종이고 수확적기의 구중이 0.9kg내외로 알려져 있다. 2013년도 특성조사 시에는 숙기가 57일 정도로 나타났고, 구중은 1.0kg 정도였다. 숙기가 빠르고 인도의 더위에도 잘 견디는 특성을 갖고 있어 향후, 내서성 및 조생종 품종육성에 유용할 것으로 기대된다. BN13-11은 사카타의 “Vantage Point”로 위황병에 강한 만생종으로 판매되고 있어 유전자원으로 도입하였다. BN13-18부터 BN13-21은 일본에서 수집한 품종들

이다. 특히 이중 BN13-21은 일본 다끼이의 “Golden Cross”로 구는 작지만 짙은 녹색으로 상품성이 우수하고 정식후 40일에 수확이 가능한 극조생 품종이다. 내서성은 보통이지만 구색이 특히 우수하여 수집하였다. 또한 숙기가 빠르고 코아가 짧아 조생종 양배추 품종육성에 중요한 유전자원이라고 할 수 있다. BN13-22는 러시아에서 수집한 품종으로 숙기가 정식 후 78일 정도로 내한성이 강한 품종이었으며 코아가 짧고 조직이 매우 치밀해 우수하였다. BN13-23 ~ BN13-32는 편형계양배추 수집 품종으로서 숙기가 정식 후 60~86일로 다양하며 BN13-23은 다끼이사의 “Grand K-K Cross”는 내서성이 매우 강한 품종으로 정식후 60일을 전후하여 수확이 가능한 품종이므로 편형계 양배추의 내서성 육종에 매우 중요한 자원이다. 또한 BN13-24는 “Green Fighter”라는 품종으로 내서성도 강할 뿐만 아니라 위황병에 강한 저항성을 가지고 있어 내서성 및 내병성 품종 육성에 활용해 갈 계획이다.

5차년도에는 중국, 일본, 인도, 미국, 대만 및 러시아에서 다양한 양배추 유전자원 25품종을 수집하였다. 구형별로 원형계 15품종, 편형계 10품종을 수집하였다. 수집된 유전자원은 원형계와 편형계 품종을 공시하여 2014년 7월 18일에 105구 트레이에 파종하였고 25일 육묘한 후 본밭에 주간간격 40cm로 정식하였다. 정식된 유전자원은 포장검정을 통하여 시험대비종 및 육성재료로 활용하기 위하여 숙기, 엽장, 엽폭, 외엽수, 구중, 구고, 구폭, 코아 등의 특성을 국립종자원 작물 특성 조사기준을 적용하여 조사한 다음 우수한 계통을 선발하였다. 현재 중국 및 인도 등 해외에서 일반적으로 재배되고 있는 품종특성을 고려하였으며 구모양, 숙기, 열구 등을 조사한 후 양배추 신품종육성을 위한 육성재료로 이용하기 위하여 형태적 특성이 우수한 37개체의 성숙모본을 선발하였다. 그리고 수집된 전체 유전자원을 대상으로 재검정을 실시하여 내서성 강 64품종, 내병성 강 35품종, 내서성 강 + 내병성 강 1품종을 선발하여 양배추 신품종 육성에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.



<1차년도>



<2차년도>



<3차년도>



<4차년도>



<5차년도>

그림 6-29. 양배추의 유전자원 특성검정

표 6-17. 수집 유전자원의 특성 검정

NO	도입 번호	구형	숙기	엽장	엽폭	외엽수	구중	구고	구폭	코어	선 발
			(정식후)	(mm)	(mm)	(매)	(kg)	(mm)	(mm)	(mm)	
1	BN10-01	원형	55	340	370	11	1.64	160	150	67	1
2	BN10-02	원형	50	320	335	11	1.4	140	140	70	2
3	BN10-03	원형	53	285	300	12	1.1	145	145	55	1
4	BN10-04	원형	65	320	310	14	1.8	160	180	72	1
5	BN10-05	원형	60	280	300	13	1.7	160	150	60	1
6	BN10-06	원형	57	290	305	13	1.44	155	145	60	1
7	BN10-07	원형	55	345	340	11	1.52	150	150	70	1
8	BN10-08	원형	58	380	370	12	1.6	168	165	85	1
9	BN10-09	원형	50	290	300	12	1.3	145	155	50	1
10	BN10-10	원형	48	265	270	11	1.1	150	150	65	1
11	BN10-11	원형	70	360	385	13	1.6	150	180	90	3
12	BN10-12	원형	68	280	320	16	1.86	180	170	40	1
13	BN10-13	원형	65	325	385	14	1.74	165	175	75	1
14	BN10-14	원형	55	350	335	15	1.42	150	170	70	1
15	BN10-15	원형	60	310	345	15	1.5	160	160	67	1
16	BN10-16	원형	65	310	350	10	1.7	155	165	64	1
17	BN10-17	원형	75	350	300	12	2.2	180	175	75	1
18	BN10-18	원형	60	300	280	14	1.5	165	170	82	1
19	BN10-19	원형	65	310	300	13	1.5	140	150	50	1
20	BN10-20	원형	53	320	360	13	1.4	160	160	65	1
21	BN10-21	원형	55	360	400	15	1.56	170	190	65	2
22	BN10-22	원형	58	320	350	13	1.6	160	175	105	1
23	BN10-23	원형	60	380	335	12	1.5	170	157	53	2
24	BN10-24	원형	65	310	370	11	1.6	160	165	70	2
25	BN10-25	원형	50	315	330	13	1.2	140	145	60	1
26	BN10-26	원형	55	340	360	9	1.5	155	168	64	1
27	BN10-27	원형	59	295	310	12	1.72	164	155	82	1
28	BN10-28	원형	54	285	270	15	1.46	167	160	76	1
29	BN10-29	원형	68	280	310	16	1.86	175	180	110	1
30	BN10-30	원형	65	340	355	15	1.68	158	175	80	2
31	BN10-31	원형	50	300	280	17	1.06	150	142	90	2
32	BN10-32	원형	50	265	290	12	1.1	150	140	50	2
33	BN09-45	원형	58	300	360	16	1.62	165	175	60	1
34	BN09-46	원형	52	295	300	13	1.2	155	150	58	1
35	BN09-47	원형	69	290	330	14	2.2	175	180	100	1
36	BN09-48	원형	55	290	330	17	1.4	135	140	55	2
37	BN09-49	원형	51	315	330	12	1.26	155	150	50	1
38	BN09-50	원형	54	280	310	11	1.48	147	160	68	1
39	BN09-51	원형	55	330	350	13	1.62	180	170	85	1
40	BN08-18	원형	48	290	260	12	1.22	150	155	60	2
41	BN07-22	원형	50	300	320	10	1.52	150	150	65	2
42	BN06-18	원형	55	300	310	9	1.2	154	160	70	1
43	BN06-21	편형	72	350	305	18	2.2	134	217	65	2
44	BN06-22	편형	80	395	350	18	1.7	130	186	60	1
45	BN08-13	편형	80	360	375	18	1.4	132	215	60	1
46	BN08-17	편형	90	405	398	15	1.3	148	209	73	1
47	BN10-51	편형	80	360	380	19	0.7	115	170	40	1
48	BN10-52	편형	80	370	390	17	0.8	117	162	54	1
49	BN10-53	편형	68	365	340	15	1.1	110	235	50	1
50	BN10-54	편형	70	325	366	15	1.6	115	234	67	1
51	BN10-55	편형	73	405	390	19	1.5	145	226	50	1

52	BN10-56	편형	70	325	338	20	1.3	106	205	51	5
53	BN10-57	편형	80	368	385	17	1.5	116	180	55	1
54	BN10-58	편형	67	276	307	14	1.4	125	185	74	3
55	BN10-59	편형	73	287	280	15	0.6	120	150	63	1
56	BN10-60	편형	70	280	275	22	0.6	100	145	56	2
57	BN10-61	편형	72	268	290	20	0.8	125	163	70	3
58	BN10-62	편형	80	404	312	14	0.9	130	185	60	1
59	BN10-63	편형	90	404	364	14	0.7	145	195	60	1
60	BN10-64	편형	80	330	370	15	1.1	120	190	55	1
61	BN634	원형	60	370	362	13	750	143	120	49	1
62	BN635	원형	65	362	389	12	800	145	127	61	1
63	BN636	원형	54	417	370	23	480	119	110	42	1
64	BN637	원형	68	362	382	13	1000	152	160	64	2
65	BN638	원형	51	325	247	19	680	129	128	60	1
66	BN639	원형	54	370	340	16	660	125	128	66	1
67	BN651	우심형	50	425	333	12	1600	209	182	96	1
68	BN652	우심형	55	467	416	10	1460	237	205	98	1
69	BN653	편형	59	404	352	14	900	117	185	55	1
70	BN654	원형	54	382	345	11	1430	172	178	84	1
71	BN655	원형	68	367	320	12	1400	160	172	80	2
72	BN656	원형	65	438	379	12	1810	187	203	97	1
73	BN657	원형	50	352	366	12	1300	179	162	91	2
74	BN658	원형	50	381	366	13	1380	196	189	98	1
75	BN659	원형	69	382	342	10	1420	169	163	86	1
76	BN660	우심형	55	422	436	13	1510	228	223	98	1
77	BN661	원형	51	378	375	17	610	154	140	68	1
78	BN662	원형	54	367	390	14	1040	157	141	72	3
79	BN663	원형	55	480	414	19	840	138	149	60	1
80	BN664	원형	48	442	358	19	640	170	152	54	2
81	BN665	원형	50	405	380	17	910	152	155	66	2
82	BN666	원형	55	345	341	14	680	130	145	52	4
83	BN667	원형	50	373	340	12	650	134	130	59	3
84	BN2379	편형	72	412	425	17	1483	123	190	67	2
85	BN2380	편형	90	434	423	22	2150	162	206	63	1
86	BN2381	편형	80	445	406	16	1400	129	193	65	1
87	BN2382	편형	68	480	406	14	950	132	173	68	2
88	BN2383	편형	70	450	412	19	1230	140	181	59	1
89	BN2384	편형	80	504	475	12	2077	128	239	83	1
90	BN2385	편형	70	430	418	16	1150	115	180	61	1
91	BN2386	편형	72	490	418	19	800	122	165	60	3
92	BN2387	편형	80	370	366	16	1950	154	182	73	1
93	BN2388	편형	90	452	397	18	1450	137	198	80	1
94	BN2401	편형	90	399	411	9	2100	152	225	102	1
95	BN2402	편형	80	522	437	15	2000	142	245	78	1
96	BN2403	편형	68	411	343	15	1090	128	179	72	1
97	BN2404	편형	70	447	362	19	1150	195	155	165	1
98	BN2405	편형	73	624	495	11	1640	202	200	89	2
99	BN2406	편형	80	463	488	18	1150	180	176	84	1
100	BN2407	편형	90	-	-	-	-	-	-	-	0
101	BN2408	편형	80	446	372	17	1400	126	169	67	2
102	BN2409	편형	72	-	-	-	-	-	-	-	0
103	BN2410	편형	67	360	391	10	1660	125	188	71	1
104	BN2411	편형	73	468	410	12	830	122	179	63	1
105	BN2412	편형	70	394	385	12	1520	134	202	84	1
106	BN2413	편형	72	386	352	13	1360	154	171	75	2
107	BN2414	편형	72	419	408	10	1440	125	217	63	1
108	BN2415	편형	80	467	408	14	2050	146	249	72	1

109	BN2416	편형	90	492	446	20	1140	118	193	58	1
110	BN2417	편형	80	367	387	12	1540	124	212	73	1
111	BN2418	편형	70	398	422	12	1760	122	214	78	1
112	BN2419	편형	72	406	402	11	1280	123	187	71	1
113	BN2420	편형	80	428	446	11	1620	130	197	74	2
114	BN2421	편형	67	429	417	14	1410	129	194	84	2
115	BN2422	편형	73	408	408	11	2000	148	216	104	2
116	BN2423	편형	70	509	434	15	1320	142	177	64	1
117	BN2424	편형	80	489	578	12	2750	169	232	102	2
118	BN2425	편형	80	383	368	13	1780	124	212	82	0
119	BN2426	편형	80	476	458	11	1100	158	140	57	1
120	BN2427	편형	68	492	414	16	700	153	118	66	0
121	BN2428	편형	70	498	531	14	1310	114	123	59	0
122	BN2429	편형	73	454	422	18	850	119	150	47	1
123	BN2430	편형	72	517	472	18	1580	128	192	68	1
124	BN-1	원형	56	345	365	12	1.74	170	160	66	1
125	BN-2	원형	52	340	330	12	1.5	150	145	68	2
126	BN-3	원형	56	285	300	13	1.2	155	155	54	1
127	BN-4	원형	63	330	310	15	1.9	150	170	71	1
128	BN-5	원형	61	285	305	14	1.8	170	160	59	1
129	BN-6	원형	57	300	310	14	1.54	165	155	45	1
130	BN-7	원형	60	340	340	12	1.62	140	140	69	1
131	BN-8	원형	55	375	370	13	1.5	158	155	84	1
132	BN-9	원형	52	295	305	13	1.2	135	145	49	1
133	BN-10	원형	49	275	270	12	1	140	140	64	1
134	BN-11	원형	70	360	385	14	1.5	140	170	87	3
135	BN-12	원형	69	285	320	17	1.76	170	160	39	1
136	BN-13	원형	64	320	385	13	1.64	175	185	74	1
137	BN-14	원형	58	345	350	14	1.32	160	180	69	1
138	BN-15	원형	59	315	335	14	1.6	170	170	66	1
139	BN-16	원형	67	315	355	9	1.6	165	175	63	1
140	BN-17	원형	77	355	275	11	2.3	190	185	74	1
141	BN-18	원형	63	310	275	13	1.4	175	180	81	1
142	BN-19	원형	62	305	295	12	1.6	130	140	49	1
143	BN-20	원형	55	315	355	12	1.3	150	150	50	1
144	BN-21	원형	59	365	405	16	1.66	160	180	63	2
145	BN-22	원형	59	335	355	14	1.5	150	165	104	1
146	BN-23	원형	61	380	340	13	1.6	160	147	49	2
147	BN-24	원형	64	310	360	12	1.7	150	155	68	2
148	BN-25	원형	54	315	320	14	1.3	150	155	59	1
149	BN-26	편형	71	355	295	19	2.3	144	227	65	1
150	BN-27	편형	83	390	355	19	1.8	140	196	60	2
151	BN-28	편형	82	360	380	17	1.3	142	225	60	1
152	BN-29	편형	90	405	390	14	1.4	158	219	73	1
153	BN-30	편형	84	365	375	18	0.8	125	180	39	1
154	BN-31	편형	81	370	335	16	0.9	127	172	53	1
155	BN-32	편형	69	360	345	14	1.2	100	225	49	1
156	BN-33	편형	71	325	370	14	1.7	125	244	66	1
157	BN-34	편형	76	405	380	18	1.4	135	216	49	1
158	BN-35	편형	74	330	340	19	1.3	116	215	46	5
159	BN13-1	원형	65	255	225	12	1	140	130	48	1
160	BN13-2	원형	54	274	255	13	1.09	141	158	60	1
161	BN13-3	원형	60	245	287	17	1.16	146	137	60	1
162	BN13-4	원형	62	318	292	22	1.07	138	157	56	2
163	BN13-5	원형	58	352	274	20	1.23	141	163	62	1
164	BN13-6	원형	50	246	265	18	1.14	133	137	44	1
165	BN13-7	원형	72	329	306	17	1.55	137	189	74	1

166	BN13-8	원형	60	329	279	19	1.31	149	152	66	1
167	BN13-9	원형	57	312	326	18	1.01	154	160	63	2
168	BN13-10	원형	66	310	317	19	1.44	152	146	59	1
169	BN13-11	원형	70	311	309	14	1.06	143	131	57	1
170	BN13-12	원형	63	252	332	10	1.09	153	142	53	1
171	BN13-13	원형	60	272	249	13	0.93	152	152	59	1
172	BN13-14	원형	58	304	295	15	1.2	141	149	59	1
173	BN13-15	원형	65	343	352	17	1.24	141	144	62	1
174	BN13-16	원형	55	338	357	20	1.11	168	137	56	1
175	BN13-17	원형	67	275	267	12	1.9	156	148	49	1
176	BN13-18	원형	75	216	279	14	1.1	144	133	47	2
177	BN13-19	원형	80	300	320	14	1.35	135	155	55	1
178	BN13-20	원형	76	336	316	17	1.31	141	156	66	2
179	BN13-21	원형	63	374	324	19	0.86	114	162	53	1
180	BN13-22	원형	78	316	326	15	1.13	131	171	57	1
181	BN13-23	편형	60	380	300	16	1.7	120	200	60	1
182	BN13-24	편형	65	320	280	13	1.45	114	190	55	1
183	BN13-25	편형	76	370	330	18	1.9	110	225	60	1
184	BN13-26	편형	80	360	360	15	1.15	110	187	55	1
185	BN13-27	편형	83	409	407	17	2.68	172	229	72	1
186	BN13-28	편형	71	357	315	13	1.55	137	198	71	1
187	BN13-29	편형	75	325	375	14	1.85	130	200	55	1
188	BN13-30	편형	68	340	310	18	1.1	100	185	47	1
189	BN13-31	편형	70	317	358	14	2.35	149	221	76	2
190	BN13-32	편형	86	379	354	13	1.5	121	204	42	1
191	BN173	원형	60	329	279	19	1.3	149	152	66	2
192	BN174	원형	57	312	326	18	1	154	160	63	1
193	BN175	원형	66	310	317	19	1.4	152	146	59	2
194	BN176	원형	70	311	309	14	1.1	143	131	57	1
195	BN177	원형	63	252	332	10	1.1	153	142	53	1
196	BN178	원형	60	272	249	13	0.9	152	152	59	1
197	BN179	원형	58	304	295	15	1.2	141	149	59	2
198	BN180	원형	65	343	352	17	1.2	141	144	62	1
199	BN181	원형	55	338	357	20	1.1	168	137	56	2
200	BN182	원형	67	275	267	12	1.9	156	148	49	1
201	BN183	원형	75	216	279	14	1.1	144	133	47	2
202	BN184	원형	80	300	320	14	1.4	135	155	55	2
203	BN185	원형	76	336	316	17	1.3	141	156	66	1
204	BN186	원형	63	374	324	19	0.9	114	162	53	2
205	BN187	원형	78	316	326	15	1.1	131	171	57	1
206	BN193	편형	60	380	300	16	1.7	120	200	60	2
207	BN194	편형	65	320	280	13	1.45	114	190	55	1
208	BN195	편형	76	370	330	18	1.9	110	225	60	2
209	BN196	편형	80	360	360	15	1.15	110	187	55	1
210	BN197	편형	83	409	407	17	2.68	172	229	72	2
211	BN198	편형	71	357	315	13	1.55	137	198	71	1
212	BN199	편형	75	325	375	14	1.85	130	200	55	2
213	BN200	편형	68	340	310	18	1.1	100	185	47	1
214	BN201	편형	70	317	358	14	2.35	149	221	76	2
215	BN202	편형	86	379	354	13	1.5	121	204	42	1
216	대비종 (대박나)	편형	73	362	354	17	1.6	122	195	65	
217	대비종 (YR호남)	편형	85	415	387	20	1.9	146	196	61	
218	대비종 (M-3)	편형	81	403	392	18	1.5	136	201	60	
219	대비종	편형	80	369	368	17	1.4	134	169	62	

	(한춘4호)										
220	대비종 (중감11호)	원형	50	300	270	13	1.3	160	160	61	
221	대비종 (희망)	원형	55	335	341	12	1.2	147	135	57	
222	대비종 (Green Challenger)	원형	60	270	250	13	1	157	155	60	
223	대비종 (CT-44)	원형	55	305	312	9	1.2	156	162	69	
224	대비종 (CT-55)	원형	66	312	281	14	1.4	168	162	63	

㉔ 기존 분리계통에서 선발한 계통들을 편형계와 원형계로 분류하고 파종, 정식하여 숙기, 엽색, 열구, 결구 긴도, 포장저장성, 내서성, 내병성, 내한성 등을 검정하였다.

표 6-18. 우량계통 선발을 위한 특성 검정

연구년도	편형계				원형계			
	계통수	파종일	정식일	선발 개체수	계통수	파종일	정식일	선발 개체수
1차년도	120	7월 16일	8월 6일	150	130	7월 24일	8월 17일	160
2차년도	250	7월 19일	8월 12일	320	250	7월 25일	8월 18일	308
3차년도	60	7월 20일	8월 14일	88	60	7월 24일	8월 19일	75
4차년도	65	7월 18일	8월 15일	85	35	7월 22일	8월 16일	56
5차년도	80	7월 14일	8월 9일	102	75	7월 20일	8월 18일	79

㉔ 선발된 우량계통을 신속하게 고정 계통으로 육성하기 위해 1차년도부터 계속 1,000여 개체의 다양한 미숙모본을 대상으로 세대진전을 실시하였다. 포장검정을 실시하여 목적형질을 가진 우량 계통의 경우, 선발하여 여교잡을 실시하여 우수 교배친을 육성하였다. 단립계통육종법(SSD)에 의한 계통 육성의 대표적인 개체들은 일본 사카타종묘의 “신람”, 일본농림사의 “과일양배추”, “YCR이념”, 제주도 월동재배 산지에서 수집한 “하루타마”, “한옥1925”, 중국과 인도의 조생종 품종개발을 위한 “춘광주”등이다.



성능검정



계통교배
<1차년도>



SSD교배



성능검정



계통교배
<2차년도>



SSD교배



성능검정



계통교배
<3차년도>



SSD교배



성능검정



계통교배
<4차년도>



SSD교배



성능검정



계통교배
<5차년도>



SSD교배

그림 6-30. 양배추의 우량계통 분리 및 육성

㉔ 내서성 검정: 세계적인 양배추 주산지인 인도 및 중국 남부와 동남아시아 지역에서는 30℃ 이상의 고온기가 지속되어 내서성 품종의 요구가 높다. 또한 강한 햇빛이 6시간 이상 지속되기 때문에 고온 결구력이 좋고 포장저장성이 양호하고 열구가 잘 안되며 내서성이 강하고 순도가 높은 품종이 요구된다.

최근, 세계적인 급격한 기후변화로 인해 온난화가 진행되면서 양배추를 비롯한 작물 재배지가 점점 북상하고 있으며 이에 따라 작물 생육단계의 변화가 예상된다. 또한 이와 더불어 새로운 병·해충 출현 가능성이 높아지고, 건조·고온·저온·염 등 환경스트레스에 대한 작물의 노출 확률 또한 높아지고 있다. 특히 서늘한 기후에서 재배가 적합한 양배추는 본래 고온 다습한 환경에서 생육이 불량하고 저온 및 건조 스트레스 등 기후변화에 민감하다. 또한 양배추는 그 동안 활발한 연구와 품종육성으로 사시사철 재배할 수 있게 작형 분화가 비교적 잘 되어 있는 작물이지만 인도, 파키스탄, 중국남부, 동남아 등의 열대지방에서 주로 재배되는 내서성에 강한 품종은 1970 ~ 1980년대에 일본에서 개발한 품종들(다끼이사의 “KK Cross”, “KY Cross”, “Green Coronet” 등)로 신품종이 지속적으로 육성 개발되지 않아 이들 시장에서의 품종대체 요구도가 매우 크고 내서성 품종이 시장에서 높은 가격으로 유통되고 있기 때문에 내서성을 갖춘 품종의 육성이 시급하다고 판단된다.

내서성 검정은 현재 관행적으로 일사가 강하고 일조시간이 길며 온도가 높은 시기의 하절기인 8월 초에 하우스 및 노지에 정식하여 인도 및 동남아에서 내서성이 강하여 많이 재배되는 “NS-43”, “K-K Cross”, “하야도리”, “대박나”, “경풍1호” 등에 비해 고온에도 불구하고 결구력, 열구, 포장저항성 및 순도가 우수한 특성을 보이는 계통들을 선발하였다(1:극약, 3:약, 5:중간, 7:강, 9:극강). 내서성이 강한 3계통(“154”, “146”, “164”), 3품종(“CT-16”, “CT-17”, “CT-18”)과 내서성이 약한 2계통(“8S8-7”, “JK-2”), 2품종(“8398”, “중감18호”)을 2-1세부과제(한국생명공학연구원)에 실험실 내 고온 스트레스 처리 조건 개발 및 분자표지 탐색, 고온 스트레스 내성/민감성 양배추 선발을 위한 실험재료로 제공하였고, 이를 활용하여 “내서성 양배추 품종의 조기 선별을 위한 바이오 마커 및 이의 용도”라는 특허를 출원(10-2011-0039356) 하였으며, 양배추 50계통을 공시하여 바이오 마커로 분석한 결과, 내서성 정도가 강인 20계통, 내서성 정도가 중인 8계통, 내서성 정도가 약인 22계통으로 구분되었으며, 이를 이용하여 교배 조합을 작성하였다. 특히 원예적 형질이 우수하고 내서성이 강한 계통(“P6-1”, 모계로 사용)과 내서성이 중간인 계통(“164”, 부계로 사용)을 조합인 “CT-180”이 우수하여 품종보호 출원(출원 2011-557)하였다. 개발 중인 분자마커의 유용성 검토 및 내서성 계통 선발을 위해 내서성 강한 3계통(“301”, “302”, “305”), 2품종(“308”, “310”)과 내서성이 약한 2계통(“303”, “304”), 2품종(“306”, “307”)을 2-1세부과제(한국생명공학연구원)에 의뢰하였다.

표 6-19. 양배추 내서성 유전집단 양성을 위한 종자내역

BN	품종명	계통명	교배번호	조제번호	종자량	내서성	특성
301	NS-43	2446-51	2446-51	5124	10립	강	계통
302	Green challenger	636-51	3814-51	7877	10립	강	계통
303	407	407-51	3749-51	7728	10립	약	계통
304	얼리볼	1464-51	3754-51	7740	10립	약	계통
305	하란비록	2418-51	3867-51	8022	10립	강	계통
306	8398	8398-2	3707-51	7629	10립	약	계통
307	중감11호	중국	#1445		10립	약	F1
308	CT-16	아시아	#1454		10립	강	F1
309	CT-10	아시아	#1434		10립	약	F1
310	CT-44	아시아	#1428		10립	강	F1

표 6-20. 양배추 조합의 내서성 검정

BN	계통명	특성	F ₁ /BC ₁	교배개수
3307-51×3837-51	584-S6-8×308-S6-10	강(♀)×약(♂)	F ₁	20
3307-51×3833-51	584-S6-8×961-S6-7	강(♀)×약(♂)	F ₁	30
3333-51×3833-51	229-S6-4×961-S6-7	강(♀)×약(♂)	F ₁	30
3309-51×3307-51	247-S7-13×477-S7-9	강	BC ₁	30
3309-51×3490-51	247-S7-13×625-S7-1	강	BC ₁	20
3334-51×3335-51	204-S7-10×842-S7-8	강	BC ₁	29
3334-51×3333-51	204-S7-10×961-S7-4	강	BC ₁	35



<3307-51>



<3307-51 x 3833-51>



<3307-51 x 3837-51>



<3309-51>



<3309-51 x 3307-51>



<3309-51 x 3490-51>



<3334-51>



<3334-51 x 3333-51>

그림 6-31. 양배추 내서성 유전집단 양성을 위한 교배

또한 내서성이 강한 계통 중 BN2106, BN2113, BN2116, BN2122, BN3288, BN3690, BN3305, BN3306은 열구가 강하고 포장저항성이 우수한 특징이 있었으며, BN2134, BN2147, BN2154, BN2159, BN2163, BN2186, BN2216, BN3121, BN3125, BN3127, BN3128, BN3131, BN3481은 내서성이 강하면서 고온결구력이 뛰어나며 열구가 강하고 포장저항성이 우수한 계통이었다. 내서성이 약한 계통 중 BN2107, BN2119, BN2137, BN2169, BN2185, BN2194, BN3280, BN3067, BN3180, BN3391, BN3181, BN3396은 고온에 극히 약했으며 동시에 결구력과 내열구성이 불량한 계통이었다.

표 6-21. 내서성 및 결구, 열구, 포장저장성, 순도 검정

No	계통명 또는 조합명	결구력 (9:강)	열구 (9:강)	포장저장성 (9:강)	순도 (9:우수)	내서성	선발
1	3001	5	3	7	9	약	
2	3261	3	1	7	7	약	
3	3013	5	5	7	9	약	
4	3264	5	3	7	7	약	
5	3015	5	1	5	7	극약	
6	3272	5	1	5	7	극약	
7	3019	5	1	5	7	극약	
8	3277	5	1	5	7	극약	
9	3016	7	7	9	9	극강	○
10	3666	7	9	9	9	강	○
11	3020	3	1	5	7	극약	
12	3280	3	1	3	5	극약	
13	3055	3	1	7	9	강	○
14	3670	3	3	7	9	강	○
15	3021	3	1	3	7	극약	
16	3297	3	1	3	7	극약	
17	3024	5	1	3	7	극약	
18	3298	5	1	3	5	극약	
19	3081	5	5	7	9	강	○
20	3671	5	5	7	8	극강	○
21	3082	3	5	5	9	강	○
22	3672	3	5	5	9	강	○
23	3083	7	9	9	9	극강	○
24	3681	7	7	9	9	극강	○
25	3084	7	9	9	9	극강	○
26	3684	7	9	7	9	극강	○
27	3085	5	5	3	9	강	○
28	3685	5	5	3	9	강	○
29	3086	5	5	3	9	강	○

30	3686	5	5	3	7	강	○
31	3045	5	1	3	9	약	
32	3308	3	1	3	9	약	
33	3087	5	5	3	9	강	○
34	3689	5	5	3	9	강	○
35	3088	7	9	9	9	극강	○
36	3690	7	9	9	9	극강	○
37	3089	7	9	9	9	극강	○
38	3691	7	7	9	9	극강	○
39	3090	3	5	5	9	강	○
40	3732	3	5	5	9	강	○
41	3091	7	7	9	9	극강	○
42	3733	7	7	9	9	극강	○
43	3094	7	9	9	9	극강	○
44	3734	7	9	9	9	극강	○
45	3095	7	9	9	9	극강	○
46	3096	7	9	9	9	극강	○
47	3050	3	3	5	9	약	
48	3325	3	3	5	9	약	
49	3097	3	5	5	9	강	
50	3053	3	3	5	9	약	
51	3333	3	3	3	9	약	
52	3098	7	7	9	9	극강	○
53	3301	7	9	9	9	극강	○
54	3302	7	7	9	9	극강	○
55	3064	3	3	7	7	약	
56	3339	3	3	7	7	약	
57	3067	3	1	5	7	극약	
58	3341	5	3	5	7	극약	
59	3303	3	5	5	9	강	○
60	3304	3	5	5	9	강	○

61	3108	3	3	5	9	약	
62	3347	3	3	5	9	약	
63	3305	7	9	9	9	극강	○
64	3306	7	9	9	9	극강	○
65	3109	3	3	7	7	약	
66	3371	1	5	9	7	약	
67	3307	3	5	7	7	강	○
68	3149	3	3	7	9	약	
69	3384	3	3	7	9	약	
70	3501	7	9	9	9	극강	○
71	3502	7	7	9	9	극강	○
72	3503	9	7	9	9	극강	○
73	3156	3	3	7	9	약	
74	3386	3	3	9	9	약	
75	3504	3	5	7	7	강	○
76	3180	3	1	3	7	극약	
77	3391	3	2	3	7	극약	
78	3181	3	1	3	7	극약	
79	3396	3	1	3	7	극약	
80	3183	3	7	3	7	극약	
81	3406	3	7	3	7	극약	
82	3505	3	5	3	9	강	○
83	3506	3	3	3	9	강	○
84	3187	5	3	3	9	약	
85	3416	5	3	3	9	약	
86	3119	9	9	9	9	극강	○
87	3120	9	9	9	9	극강	○
88	3190	5	1	3	7	극약	
89	3421	5	1	3	7	극약	
90	3121	9	9	9	9	극강	○
91	3125	9	9	9	9	극강	○

92	3193	3	3	7	9	약	
93	3426	3	3	7	9	약	
94	3203	5	1	3	7	극약	
95	3428	5	3	3	7	극약	
96	3209	5	1	3	7	극약	
97	3433	5	1	3	7	극약	
98	3215	5	1	3	7	극약	
99	3439	5	2	5	7	극약	
100	3126	9	7	9	9	극강	○
101	3127	9	9	9	9	극강	○
102	3128	9	9	9	9	극강	○
103	3129	3	3	7	9	강	
104	3130	9	9	9	9	극강	○
105	3131	9	9	9	9	극강	○
106	3481	9	9	9	9	극강	○
107	3482	3	3	7	9	강	○
108	3483	9	9	9	9	극강	○
109	3217	5	3	5	9	약	
110	3457	5	3	3	9	약	
111	3484	9	9	9	9	극강	○
112	3485	9	7	9	9	극강	○
113	3241	3	1	7	7	극약	
114	3458	3	3	7	7	극약	
115	3246	3	5	7	9	약	
116	3460	1	5	7	9	약	
117	3486	5	3	3	7	강	○
118	3487	5	5	3	9	강	○
119	3488	5	5	3	9	강	○
120	2101	5	5	3	9	강	○
121	2102	5	5	3	9	강	○
122	2103	5	5	3	7	강	○

123	2104	3	1	7	9	강	○
124	2105	3	3	7	9	강	○
125	2106	9	9	9	9	극강	○
126	2107	5	1	3	7	극약	
127	2108	3	1	3	7	극약	
128	2109	5	1	3	7	극약	
129	2110	5	1	3	7	극약	
130	2111	3	3	7	9	강	○
131	2112	7	7	9	9	극강	○
132	2113	7	9	9	9	극강	○
133	2114	7	7	3	9	강	○
134	2115	7	7	9	9	극강	○
135	2116	7	9	9	9	극강	○
136	2117	7	9	9	9	극강	○
137	2118	3	5	7	7	강	○
138	2119	3	7	3	7	극약	
139	2120	3	5	5	9	강	○
140	2121	5	5	3	9	강	○
141	2122	7	9	9	9	극강	○
142	2123	5	1	5	7	극약	
143	2124	9	9	9	9	극강	○
144	2125	7	5	7	9	강	○
145	2126	3	3	5	9	약	
146	2127	3	1	5	7	극약	
147	2128	3	3	7	9	약	
148	2129	7	9	9	9	강	○
149	2130	5	3	5	9	약	
150	2131	3	1	3	7	극약	
151	2132	5	1	5	7	극약	
152	2133	5	3	3	7	강	○
153	2134	7	9	9	9	극강	○

154	2135	7	7	9	9	극강	○
155	2136	7	9	7	9	극강	○
156	2137	3	1	7	7	극약	
157	2138	3	3	3	9	강	○
158	2139	5	3	3	9	약	
159	2140	7	7	9	9	극강	○
160	2141	3	5	5	9	강	○
161	2142	7	7	9	9	극강	○
162	2143	5	9	7	7	강	○
163	2144	5	1	3	5	극약	
164	2145	3	1	3	7	극약	
165	2146	3	5	5	9	강	○
166	2147	9	9	9	9	극강	○
167	2148	7	7	9	9	극강	○
168	2149	9	9	9	9	극강	○
169	2150	5	1	5	7	극약	
170	2151	3	3	5	9	약	
171	2152	5	3	3	7	극약	
172	2153	3	3	5	9	약	
173	2154	7	9	9	9	극강	○
174	2155	3	1	3	7	극약	
175	2156	3	7	3	7	극약	
176	2157	9	9	9	9	극강	○
177	2158	3	3	7	9	강	○
178	2159	9	9	9	9	극강	○
179	2160	3	9	5	9	강	○
180	2161	7	7	9	9	극강	○
181	2162	7	7	7	9	강	○
182	2163	9	9	9	9	극강	○
183	2164	9	7	9	9	극강	○
184	2165	5	7	7	9	강	○

185	2166	5	5	7	9	극강	○
186	2167	3	3	7	7	약	
187	2168	7	9	9	9	극강	○
188	2169	5	1	5	7	극약	
189	2170	3	1	7	7	극약	
190	2171	7	5	7	7	강	○
191	2172	3	5	5	9	강	○
192	2173	3	5	7	7	강	○
193	2174	3	1	5	7	극약	
194	2175	3	3	7	9	약	
195	2176	5	3	3	9	약	
196	2177	7	7	9	9	극강	○
197	2178	5	5	7	7	강	○
198	2179	9	9	9	9	극강	○
199	2180	9	5	7	9	강	○
200	2181	5	5	3	9	강	○
201	2182	3	3	7	9	약	
202	2183	1	5	9	7	약	
203	2184	7	7	7	9	강	○
204	2185	5	3	5	7	극약	
205	2186	9	9	9	9	극강	○
206	2187	3	5	3	9	강	○
207	2188	9	9	9	9	극강	○
208	2189	5	1	3	7	극약	
209	2190	3	5	7	7	강	○
210	2191	7	9	9	9	극강	○
211	2192	7	9	9	9	극강	○
212	2193	3	1	3	7	극약	
213	2194	5	1	5	7	극약	
214	2195	3	3	9	9	약	
215	2196	3	3	7	9	약	

216	2197	7	9	9	9	극강	○
217	2198	5	5	3	9	강	○
218	2199	5	1	3	7	극약	
219	2200	3	3	7	9	약	
220	2201	5	5	7	9	강	○
221	2202	3	3	5	9	약	
222	2203	7	9	9	9	극강	○
223	2204	9	7	9	9	극강	○
224	2205	7	9	9	9	극강	○
225	2206	3	1	3	7	극약	
226	2207	3	1	3	7	극약	
227	2208	3	5	5	9	강	○
228	2209	7	9	9	9	극강	○
229	2210	3	5	5	9	강	○
230	2211	9	7	9	9	극강	○
231	2212	5	3	3	9	약	
232	2213	5	7	5	9	강	○
233	2214	3	1	3	5	극약	
234	2215	3	5	5	9	강	○
235	2216	9	9	9	9	극강	○
236	2217	7	9	9	9	극강	○
237	2218	3	1	3	7	극약	
238	2219	5	5	3	9	강	○
239	2220	5	5	3	9	강	○
240	141	7	3	5	7	약	
241	142	3	7	5	9	약	
242	143	3	3	7	7	약	
243	144	5	7	7	9	강	○
244	145	7	7	9	9	극강	○
245	146	7	9	9	9	극강	○
246	147	3	1	3	5	극약	

247	148	3	3	7	9	약	
248	149	9	5	7	9	강	○
249	150	5	1	3	7	극약	
250	151	5	5	3	9	강	○
251	152	7	9	9	9	극강	○
252	153	5	5	3	9	강	○
253	154	3	3	7	9	약	
254	155	7	9	9	9	극강	○
255	156	9	5	7	9	강	○
256	157	5	3	3	7	극약	
257	158	7	7	9	9	극강	○
258	159	3	5	7	7	강	○
259	160	3	3	7	9	강	○
260	161	5	3	3	7	강	○
261	162	5	1	3	5	극약	
262	163	7	7	9	9	극강	○
263	164	7	9	9	9	극강	○
264	165	3	3	7	9	약	
265	166	3	1	7	7	극약	
266	167	7	7	9	9	극강	○
267	168	5	5	3	9	강	○
268	169	3	1	1	1	극강	○
269	170	5	7	7	3	극약	
270	171	3	5	7	7	강	○
271	172	7	9	7	3	극약	
272	173	5	7	3	3	약	
273	174	7	7	3	3	극약	
274	175	7	5	5	1	강	○
275	176	3	5	5	9	강	○
276	177	5	9	7	3	극약	
277	178	7	9	7	3	극약	

278	179	5	7	7	1	약	
279	180	9	9	9	9	극강	○
280	181	5	5	7	7	강	○
281	182	9	7	9	9	극강	○
282	183	7	7	9	9	극강	○
283	184	5	5	7	3	강	○
284	185	3	3	5	9	약	
285	186	9	5	3	1	약	
286	187	7	5	5	1	강	○
287	188	5	5	7	1	강	○
288	189	7	7	9	9	극강	○
289	190	7	7	3	3	약	
290	191	5	5	7	1	강	○
291	192	7	7	3	1	약	
292	193	3	1	3	7	극약	
293	194	3	5	5	9	강	○
294	195	7	9	9	9	극강	○
295	196	5	5	7	1	강	○
296	197	5	1	5	7	극약	
297	198	7	7	3	3	극약	
298	199	7	7	5	1	약	
299	200	5	5	7	1	강	○
300	201	7	9	9	9	극강	○
301	202	1	3	1	1	극강	○
302	203	3	3	1	1	극강	○
303	204	5	9	7	7	강	○
304	205	1	5	9	7	약	
305	206	7	7	3	1	약	
306	207	7	7	5	1	약	
307	208	7	5	9	9	강	○
308	209	7	5	5	1	강	○

309	210	5	1	3	5	극약	
310	211	7	7	3	3	약	
311	212	3	1	3	5	극약	
312	213	5	7	7	3	강	○
313	214	9	9	9	9	극강	○
314	215	7	7	1	1	약	
315	216	5	5	7	3	강	○
316	217	5	5	3	9	강	○
317	218	9	9	9	9	극강	○
318	219	7	5	3	1	약	
319	220	7	7	3	1	약	
320	221	3	7	3	7	극약	
321	222	3	1	1	1	극강	○
322	223	3	3	1	1	극강	○
323	224	5	3	3	9	약	
324	225	7	5	5	1	강	○
325	226	3	5	5	9	강	○
326	227	7	5	5	1	강	○
327	228	3	7	5	9	강	○
328	229	5	9	7	3	극약	
329	230	3	3	7	9	약	
330	231	7	9	5	3	극약	
331	232	9	9	9	9	극강	○
332	233	7	7	9	9	극강	○
333	234	1	1	1	1	극강	○
334	235	3	3	1	1	극강	○
335	236	5	3	3	7	강	○
336	237	7	7	5	1	약	
337	238	3	3	7	9	약	
338	239	3	1	3	7	극약	
339	240	5	5	7	1	강	○

340	241	7	5	5	1	강	○
341	242	5	7	7	9	강	○
342	243	7	5	5	1	강	○
343	244	3	3	5	9	약	
344	245	1	1	1	1	극강	○
345	246	7	7	9	9	극강	○
346	247	5	9	7	7	강	○
347	248	1	3	5	7	약	
348	249	5	1	3	7	극약	
349	250	3	1	1	1	극강	○
350	251	9	9	9	9	극강	○
351	252	3	5	3	9	강	○
352	253	1	1	1	1	극강	○
353	254	3	1	3	7	극약	
354	255	7	7	3	1	강	○
355	256	7	7	5	1	약	
356	257	7	5	5	1	강	○
357	258	5	3	3	9	약	
358	259	3	1	7	9	약	
359	260	7	5	5	1	강	○
360	YR5057 51-G2 x 3074-52-G2	9	6	9	9	강	○
361	S842-58MS x 08BMC-14-G3	5	7	8	9	약	
362	S842-58MS x 08BMC-9-G2	6	6	7	8	중	
363	S842-58MS x 08BMC-142-G3	7	6	7	6	강	○
364	97-496BM5 x 47-59S-51	7	8	6	7	약	
365	S621MS x 723-525-G3	9	9	9	9	강	○
366	2409-51M5BC4 x P15-41-G2	4	5	3	5	약	
367	2409-51MSBC4 x P15-41-G2	8	7	7	9	극강	○
368	97-496BMS x 08BMC-141-G3	9	5	7	9	강	○
369	97-496BMS x 08BMC-142-G3	8	1	3	7	강	○
370	47-59S-51 x 2409-51S-G2	5	5	6	9	극강	○

371	2409-51MS8C4 x 723-525-G3	9	9	9	9	강	○
372	2409-51MS8C4 x 8S8-7	5	5	3	8	강	○
373	26-1MSx농C1-IS-G3	5	6	7	9	약	
374	90-51-MS x 농C1-IS-G3	7	9	9	9	중	
375	225 MS x YR677-62-G6	9	7	7	8	강	○
376	225 MS x P55-41-51	8	3	6	7	강	○
377	337MS x P55-41-51	7	7	8	8	중	
378	2418-51-MSBC4 x CT-5-51	9	5	7	6	강	○
379	621MS x 2483-51-51	9	6	7	9	강	○
380	689-52-51-51-51 x 9074-52-G3	5	3	3	7	중	
381	2418MSBC6 x 754-52-51-51-51-51	5	1	3	5	강	○
382	S84258MS x 689-52-51-52-51	7	7	9	9	약	
383	90-51MS x 2384-51-51-51-51	8	6	7	7	극강	○
384	90-51MS x YR677-54-G8	4	6	7	9	강	○
385	90-51MS x 754-52-51-51-51-51	5	3	7	7	중	
386	90-51MS x 689-52-51-52-51	7	7	9	9	강	○
387	2409-51MSBC5 x 689-52-51-51-51	5	5	7	9	극강	○
388	2418MSx 5646-51-51-51-52-51-51- 51	5	3	7	7	강	○
389	337MS x P15-41	7	7	7	3	강	○
390	90-51MS x P15-41	4	3	7	7	강	○
391	2418MS x P15-41	7	9	7	6	강	○
392	2409-51MS x 5646	6	7	3	5	강	○
393	741-51S-51 x 689-51-52	7	7	3	9	중	
394	2345MS x DWB25	8	7	5	2	강	○
395	2409-51MS x 689-51	4	6	5	9	중	
396	225MS x P15-41	5	9	7	3	강	○
397	2418MS x 407	8	9	7	3	강	○
398	337MS x YR677-62-G6	5	7	7	6	강	○
399	krantiMS x 755-51S	9	9	9	9	강	○



<대조군>



<BN2106>



<BN2113>



<BN2116>



<BN2122>



<BN2134>



<BN2147>



<BN2154>



<BN2159>



<BN2163>



<BN2186>



<BN2216>

그림 6-31. 내서성이 강한 대표적인 계통

㉑ 위황병 검정: 위황병 접종에 사용된 균주는 농촌진흥청 국립유전자원센터에서 *Fusarium owyспорum* f. sp. *conglutinans*를 분양받아 Potato Dextrose Agar(PDA)에 증식하여 사용하였다. 위황병 균주접종에 이용된 식물체는 50cm×30cm 파종 상자에 5cm 줄간격으로 파종한 후 2주일된 유묘를 사용하였다. 접종에 사용된 균주는 2×10^7 conidia/ml의 농도로 조제하여 사용하였다. 균주 접종은 파종상의 유묘를 뽑아내어 뿌리에 약 30초 침지 처리한 다음 105구 트레이에 이식한 후 48시간 70% 차광처리 하였다. 위황병 접종 10일 정도 후 1차 발병정도를 조사하였고, 1차 조사 5일 후 2차 발병정도를 조사하였다. 조사기준은 1: 정상적인 것, 3: 자엽은 시들고 본엽은 정상적인 것, 5: 자엽, 본엽 시들고 약간 황화한 것, 7: 본엽이 황화하여 시들은 것, 9: 고사한 것 등 총 5단계로 나누어 조사하였으며, 1~3단계는 내병성, 5~9단계는 이병성으로 분류하였다. 위황병 접종을 위하여 사용된 양배추 계통은 기존 보유계통 중에서 위황병 내병성 계통, 이병성 계통 및 F₂, F₃, F₄세대, 고정계통 등8) 총 1,020계통과 내병성계통 x 내병성계통 조합, 내병성계통 x 이병성 계통 조합, 이병성 계통 x 이병성 계통 조합 총 45조합을 대상으로 위황병 저항성 여부를 조사하였다.

No1 ~ No11은 중국 우한지역에서 4월 수확용으로 인기가 있는 “사월미”라는 품종의 F₂ 분리계통들인데 거의 모두가 이병성이었다. No28 ~ No47은 일본농림사의 “YCR 이념”의 F₂ 분리계통들인데 거의 모든 계통에서 매우 높은 저항성을 보여 양친이 내병성 계통간의 조합으로 추측되었다. 또한 “과일양배추”와 “신람” 양배추의 F₂ 분리계통(No12 ~ No27)에서는 내병성과 이병성의 분리비가 거의 3:1로 분리하는 것으로 보아 내병성계통과 이병성계통의 조합구성으로 판단되었다. F₆세대 이상의 계통(No80 ~ No96)에서는 대부분 100% 또는 0%로써 이병성 또는 내병성이 상당히 고정이 되어 가고 있다는 것을 알 수 있었으며 F₂, F₃, F₄세대는 세대가 경과할수록 이병성과 내병성의 구분이 뚜렷해졌다. 이와 같은 현상은 세대가 진전될수록 유전자 고정이 되기 때문인 것으로 생각된다. 이처럼 고정계통의 이병성 및 내병성의 구분이 뚜렷히 나타나는 이유를 Walker는 양배추 위황병은 단인자 우성 유전자에 의해 지배되기 때문으로 보고하였다. 또한 위황병 저항성 계통과 이병성 계통간의 조합을 작성하여 검정한 결과 내병성 계통 x 내병성계통의 조합(No149 ~ No153)과 내병성계통 x 이병성계통의 조합(No156 ~ No157)은 모든 조합에서 고도의 저항성을 나타내어 큰 차이가 없다는 것이 확인 되었다. No154, No155는 이병성 계통간의 조합으로 모두 이병성을 나타내었다. 이와 같은 결과를 통하여 위황병 저항성 유전자가 우성으로 작용한다는 것을 본 실험에서도 알 수 있었다. 수집 유전자원의 검정결과 “선감336”, “8398”, “NS-43” 등은 이병성 품종이었고, “TI-086”, “중감18호”, “YR모에미” 등은 내병성이 강하였다. No263 ~ No276은 YCR품종인 “신람”의 F₃분리세대로 초기세대에서 위황병이 상당히 고정되어 가고 있음을 보여주었다. No277 ~ No284는 중국 월동재배산지에서 수집 분리한 품종들의 F₃분리세대인데 이들 분리계통에서 내병성이 강한 개체를 선발하였다. No285 ~ No294는 “과일” 양배추의 소포자배양으로 부터 얻어진 DH계통들도 위황병 내병성인자가 확실하게 들어있음

을 확인할 수 있었으며 내병성계통육성에서 소포자배양이 매우 효과적이라는 것을 알 수 있었다. 이들 고정된 내병성계통을 이용하여 다양한 내병성조합을 작성하였다. No295 ~ No342은 도입유전자원들의 분리계통이다. 내병성으로 분리되고 있는 계통들은 F₁의 양친이 내병성계통으로 구성되어 있을 것으로 추측되며 아직 활발히 분리하고 있는 계통들은 내병성과 이병성 간의 조합으로 판단이 된다. No343 ~ No373은 “신람”과 “과일” 및 “YCR이념”의 SSD에 의해 분리 고정하고 있는 계통들로 이들 계통에 위황병을 접종하여 내병성 개체를 선발하였다. No378 ~ No412는 전년도 접종에서 선발한 개체의 종자를 받아 금년에 재접종한 분리 계통들이다. 거의 모든 계통들이 위황병에 매우 강하였으며 세대가 진전될수록 내병성이 상당히 고정이 되어 가고 있다는 것을 알 수 있었다. 또한 위황병 저항성 계통과 이병성 계통간의 조합을 작성하여 검정한 결과 내병성계통 x 내병성계통의 조합(No413, No414, No420)과 내병성계통 x 이병성계통의 조합(No415, No416, No423, No425, No428, No429, No432)은 모든 조합에서 고도의 저항성을 나타내어 큰 차이가 없다는 것이 확인 되었다. 이병성계통간의 조합들인 No417, No418, No419, No424, No426, No427, No430 ~ No435은 모두 이병성을 나타내었다. 이와 같은 결과를 통하여 위황병 저항성 유전자가 단인자 우성으로 작용한다는 것이 본 실험에서도 증명되었다. 수집 유전자원의 검정결과 중국에서 수집하여 중국에서 육성한 품종으로 판단이 되는 “초급녹풍”, “초급동풍”, “강춘”, “하패왕”, “하우”, “강하”, “하광”, “조광”, “녹노관”, “중감 11호”, “8398”, “초급춘풍” 등은 모두 이병성 품종들로 확인되었다. 이것으로 보아 중국에서는 아직은 내병성육종이 활발하지 않은 것으로 추측되며 “YR동승리”, “하루타마”, “초조 2호”, “극조 2호”, “오키나”, “하이큐 2호” 등 일본에서 육성한 품종들은 대부분이 위황병 내병성품종들로 양배추 내병성 육종수준이 매우 높다는 것을 알 수 있었다. Y1 ~ Y350은 “신람”, “과일”, “YCR이념” 등의 SSD에 의해 분리 고정되고 있는 계통을 위황병 시험을 통하여 조사한 결과이다. 이들 중 Y129 ~ Y150은 전년도 접종에서 선발한 계통에 세대진전을 시킨 후 위황병을 접종하여 내병성여부를 검정하였다. Y295 ~ Y300은 “과일” 양배추의 소포자 배양으로 얻어진 DH계통들로 전년도 결과에 이어 이번 결과에서도 확실하게 내병성임을 확인하였다. Y424 ~ Y533은 중국, 일본, 인도, 러시아 등에서 수집한 유전자원에 위황병 저항성을 검정한 결과이다. 중국, 러시아, 인도에서 수집한 품종들은 저항성인 품종들도 포함되어 있었으나, 대체로 이병성 품종들이 많은 것으로 확인되어 이들 국가에서는 아직은 내병성 육종이 활발하지 않은 것으로 추측되며, 일본에서 육성한 품종들은 대부분 위황병 내병성 품종들로 양배추 육종수준이 매우 높다는 것을 알 수 있었다. F1 ~ F201은 “신람”, “과일”, “YCR이념” 등의 SSD에 의해 분리 고정되고 있는 계통을 위황병 시험을 통하여 조사한 결과이다. 이들 중 FO21 ~ FO53은 전년도 접종에서 선발한 계통에 세대진전을 시킨 후 위황병을 접종하여 내병성여부를 조사하였다. F70 ~ F77 또한 Y295 ~ Y300과 동일하게 “과일” 양배추의 소포자 배양으로 얻어진 DH계통들로 전년도 결과에 이어 이번 결과에서도 확실하게 내병성임을 확인함으로써 내병성인자가

확실하게 들어있음을 확인하였다.

또한, 분자 생물학적 분석을 통한 양배추 위황병 저항성 반응의 정량화, 양배추 위황병 처리 모니터링을 위한 분자 표지 개발을 위하여 위황병 저항성 2계통 ("501", "503", "504", "506", "507", "518", "517", "F6", "F15", "F19", "F22")과 3품종("508", "510", "대박나", "CT-45", "그랜드마트") 및 위황병 이병성 2계통 ("164", "JK-2", "F142", "F145", "F150", "F169")과 3품종("CT-12", "CT-16", "CT-18")의 종자를 1-1세부과제(한국생명공학연구원)에 실험의 재료로 제공하였다.



<위황병 접종>

<위황병내성계통 선발>

<위황병 시험 병발생 정도>

그림 6-32. 양배추 위황병 저항성 검정

표 6-22. 양배추 위황병 저항성 유전집단 양성을 위한 종자내역

BN	품종명	계통명	교배번호	조제번호	종자량(립)	위황병	특성
501	NS-43	660-52	660-52	7000	10	강	계통
502	시월미	2433-52	2433-52	5100	10	약	계통
503	과일	P15-41-1	84-1	4022	10	강	계통
504	과일	P15-31-1	597-1	4862	10	강	계통
505	Hinstrel	621-51	3829-51	7927	10	약	계통
506	Quisto	IB14-51	3863-51	8006	10	강	계통
507	Saint	265-1-51	3865-51	8013	10	강	계통
508	아시아불	아시아	#1416		10	강	F ₁
509	CT-2	아시아	#1437		10	약	F ₁
510	대박나	아시아	#1452		10	강	F ₁

표 6-23. 양배추 조합의 위황병 저항성 검정

BN	계통명	특성	F ₁ /BC ₁	교배일	교배 개수
3326-51 x 3490-51	842-S7-7 x 625-S7-1	강(♀) x 약(♂)	F ₁	2012.04.12	31
3326-51 x 3833-51	842-S7-7 x 338-S7-5	강(♀) x 약(♂)	F ₁	2012.04.12	20
3328-51 x 3490-51	272-S6-2 x 625-S7-1	강(♀) x 약(♂)	F ₁	2012.04.16	28
3328-51 x 3833-51	272-S6-2 x 338-S7-5	강(♀) x 약(♂)	BC ₁	2012.04.16	30
3327-51 x 3536-51	625-S6-8 x 594-S7-7	강	BC ₁	2012.04.24	25
3327-51 x 3326-51	625-S6-8 x 526-S6-7	강	BC ₁	2012.04.24	13



<3326-51>



<3326-51 x 3490-51>



<3326-51 x 3833-51>



<3327-51>



<3327-51 x 3536-51>



<3327-51 x 3326-51>



<3328-51 x 3490-51>



<3328-51 x 3833-51>

그림 6-33. 양배추 위황병 유전집단 양성을 위한 교배

표 6-24. 양배추 위황병 접종 후 이병을 조사

No	BN (계통명,조합명)	이병정도					총 주수	이병주 수	내병주 수	이병률 (%)	선발
		1	3	5	7	9					
1	9099-1				3	12	15	15	0	100	
2	9099-3				5	8	13	13	0	100	
3	9099-5				8	9	17	17	0	100	
4	9099-6				5	14	19	19	0	100	
5	9099-9				5	8	13	13	0	100	
6	9099-11					7	7	7	0	100	
7	9099-12				2	19	21	21	0	100	
8	9099-14		1	1	2	11	15	14	1	93	
9	9099-15		3		2	3	8	5	3	63	
10	9099-16				1	10	11	11	0	100	
11	9099-19	4		2	1	4	11	7	4	64	1
12	9100-7		4		3	6	13	9	4	69	1
13	9100-8	2	6		2	4	14	6	8	43	1
14	9100-9	1	5	1		1	8	2	6	25	1
15	9100-10	3	9	2	3	1	18	6	12	33	1
16	9100-14	8	4		2		14	2	12	14	1
17	9100-16	5	5	4	1		15	5	10	33	1
18	9100-20	10	9		1		20	1	19	5	2
19	9102-1	1	7	1	2		11	3	8	27	1
20	9102-2	5	9		2		16	2	14	13	1
21	9102-3	16	2			2	20	2	18	10	2
22	9102-4	12	5	2	1	1	21	4	17	19	2
23	9102-5	6	5	4	2		17	6	11	35	1
24	9102-6	10	5	3		2	20	5	15	25	2
25	9102-13	14	4	1	1	1	21	3	18	14	2
26	9102-17	9	7		2	3	21	5	16	24	2
27	9102-19	10	5		1	2	18	3	15	17	2
28	9103-1	7	10	2	1	1	21	4	17	19	2
29	9103-2	4	6	5	2		17	7	10	41	1
30	9103-3	15	2	3			20	3	17	15	2
31	9103-4	14	4		1		19	1	18	5	2
32	9103-5	8	13				21	0	21	0	2
33	9103-6	12	7				19	0	19	0	2
34	9103-7	11	8				19	0	19	0	2
35	9103-8	11	7				18	0	18	0	2
36	9103-9	9	10				19	0	19	0	2
37	9103-10	13	8				21	0	21	0	2
38	9103-11	14	7				21	0	21	0	2
39	9103-12	12	8				20	0	20	0	2
40	9103-13	17	3				20	0	20	0	2
41	9103-14	15	5			1	21	1	20	5	2
42	9103-15	12	5	1	2		20	3	17	15	2
43	9103-16	19	2				21	0	21	0	2
44	9103-17	17	3			1	21	1	20	5	2
45	9103-18	14	4				18	0	18	0	2
46	9103-19	10	9				19	0	19	0	2

47	9103-20	11	8				19	0	19	0	2
48	9101-4	14	1		2	2	19	4	15	21	2
49	9101-8	6	2		1		9	1	8	11	1
50	9101-12	8	1	4	4		17	8	9	47	1
51	9101-3	15	2				17	0	17	0	2
52	9101-7	9	7		1		17	1	16	6	2
53	9101-20	8	3		2		13	2	11	15	1
54	9101-16	8	8	2	1		19	3	16	16	2
55	9101-11	9	1				10	0	10	0	1
56	9101-10	6	3		1	2	12	3	9	25	1
57	9101-19	9	5				14	0	14	0	1
58	9101-1	10	3	4			17	4	13	24	1
59	9101-17	11	4	1			16	1	15	6	2
60	9101-9	10	3	2			15	2	13	13	1
61	9101-12	9	2	1	1	4	17	6	11	35	1
62	9101-15	10	5	1		1	17	2	15	12	2
63	9101-13	13	1	1		1	16	2	14	13	1
64	9101-2	14	2	1			17	1	16	6	2
65	9101-18	9	4	2	3	1	19	6	13	32	1
66	9101-6	9	2	2	1	1	15	4	11	27	1
67	9101-5	9	3	3	3		18	6	12	33	1
68	W10-3	1			2	14	17	16	1	94	
69	W10-5	7	7	5	1		20	6	14	30	1
70	W10-4	7	9	5			21	5	16	24	2
71	W10-2	12	3	1			16	1	15	6	2
72	W09-2	11	4	2			17	2	15	12	2
73	W09-9	16	3				19	0	19	0	2
74	W09-26	19	1				20	0	20	0	2
75	W09-27	19	1			1	21	1	20	5	2
76	W09-27	3	9	2	2		16	4	12	25	1
77	W09-33	5	4	1	3	3	16	7	9	44	1
78	51-G2				4	10	14	14	0	100	
79	76-G2		3	9	2	3	17	14	3	82	
80	P15-31-G5	16	4				20	0	20	0	2
81	P15-34-G5	15	1	1			17	1	16	5	2
82	P15-36-G5	8	9				17	0	17	0	2
83	P15-37-G5	7	3				10	0	10	0	1
84	P15-41-G5	13	5	2			20	2	18	10	2
85	P15-43-G5	15	1	1			17	1	16	5	2
86	08B-142-G6				1	14	15	15	0	0	
87	08B-145-G6					7	7	7	0	100	
88	08B-147-G6			3	6		9	9	0	100	
89	08B-148-G6					5	5	5	0	100	
90	08B-149-G6				3	5	8	8	0	100	
91	08B-150-G6			1		2	3	3	0	100	
92	09B-152-G6	17	2	1			20	1	19	5	2
93	09B-153-G6	5	12				17	0	17	0	2
94	09B-154-G6	9	7				16	0	16	0	2
95	09B-155-G6	5	9	2			16	2	14	12	1
96	09B-157-G6	11	4				15	0	15	0	2

97	2394-G2	3	4	2	2		11	4	7	36	
98	2552-G2		4	4	3	5	16	12	4	75	
99	2557-G2	2	6	4		5	17	9	8	53	
100	636-G2	2	8	3		1	14	4	10	29	1
101	723-G3	3	12	4	2		21	6	15	29	
102	724-G3	6	13	1			20	1	19	5	1
103	728-51-G2	7	1				8	0	8	0	1
104	728-52-G2	4	9	6		2	21	8	13	38	
105	742-51-G2	13	6				19	0	19	0	
106	742-52-G2	12	4		1		17	1	16	6	1
107	743-51-G2	1	3	4	4	1	13	9	4	69	
108	743-52-G2	1		1	1		3	2	1	67	
109	748-51-G2	12	2	1	1	1	17	3	14	18	1
110	748-52-G2	9	6				15	0	15	0	2
111	748-53-G2		2	9		2	13	11	2	85	1
112	748-54-G2	6	5		2	4	17	6	11	35	1
113	748-55-G2	12	3			1	16	1	15	6	2
114	753-G3	8	8			1	17	1	16	6	2
115	754-G3	10	3	2	3	3	21	8	13	38	
116	755-G3	13	5			2	20	2	18	10	2
117	758-53-G2	2	17				19	0	19	0	2
118	758-54-G2	7	10				17	0	17	0	1
119	759-G3		3	2		7	12	9	3	75	
120	769-52-G2	1	11			1	13	1	12	8	1
121	769-53-G2		2	4		6	12	10	2	83	
122	769-56-G2		8	1	2	3	14	6	8	43	1
123	774-G3	1	14	1			16	1	15	6	2
124	775-51-G2		5	5	3		13	8	5	62	
125	775-52-G2		5	5	1	6	17	12	5	71	
126	775-53-G2		5	11		4	20	15	5	75	
127	775-54-G2		9	2	1	2	14	5	9	36	
128	775-55-G2			3	1	8	12	12	0	100	
129	2412-G4		19				19	0	19	0	2
130	2429-51-G3	4	14				18	0	18	0	2
131	2429-52-G3		18				18	0	18	0	2
132	2429-53-G3	2	16				18	0	18	0	2
133	2429-54-G3	13	4				17	0	17	0	2
134	2429-52-G3	8	7			1	16	1	15	6	2
135	2429-53-G3	10	4	1			15	1	14	7	1
136	2430-51-G3	3	12				15	0	15	0	2
137	2430-52-G3	1	7			5	13	5	8	38	1
138	2431-G4	5	8	5			18	5	13	28	1
139	337-1	12	3				15	0	15	0	2
140	83-2	16	4				20	0	20	0	2
141	517-1	17	4				21	0	21	0	2
142	518-1	17	2				19	0	19	0	2
143	26-1	13	4				17	0	17	0	2
144	8S8-7				5	16	21	21	0	100	
145	1464-1				15	4	19	19	0	100	
146	154-1			3	10	7	20	20	0	100	

147	164-2			1	7	9	17	17	0	100	
148	JK-2			2	1	13	16	16	0	100	
149	1954 x 2322			3	7	4	14	14	0	100	
150	42-1 x 38-2			1	6	2	9	9	0	100	
151	2418-51 x 5649-52			9	5	4	18	18	0	100	
152	83-2 x 403-1	1	17				18	0	18	0	2
153	2322-51 x 2325-52	4	11				15	0	15	0	
154	H2-1 x 2418-51	10	8				18	0	18	0	2
155	2418-51 x CT5-1	14	3		2		19	2	17	11	2
156	164-2 x P6-1	21					21	0	21	0	2
157	222-51 x P6-1	8	1		2		11	2	9	18	1
158	선감 336	13	2	1	1		17	2	15	12	2
159	8398	16	3				19	0	19	0	2
160	NS-43	15	3		1	1	20	2	18	10	2
161	TI-086	14	2	1	2	1	20	4	16	20	2
162	중감 18호	20					20	0	20	0	2
163	9101-20-1	14	3		2		19	2	17	11	2
164	9101-16-1	21					21	0	21	0	2
165	9101-11-01	8	1		2		11	2	9	18	1
166	9101-10-01	13	2	1	1		17	2	15	12	1
167	9101-19-1	16	3				19	0	19	0	2
168	9014-02-01	15	3		1	1	20	2	18	10	2
169	9101-17-1	14	2	1	2	1	20	4	16	20	2
170	9101-09-01	20					20	0	20	0	2
171	9101-12-01	18		2			20	2	18	10	2
172	YR 모예미	18		2			20	2	18	10	2
173	9101-13-1	18	1	1	1		21	2	19	10	2
174	9101-2-1	20	1				21	0	21	0	2
175	9101-18-1	17	1			3	21	3	18	14	2
176	9101-6-1	18	3				21	0	21	0	2
177	9101-5-1	20	1				21	0	21	0	2
178	우한10-5-1	15	8	1	1	1	26	3	23	12	1
179	우한10-2-1	18	1	1			20	1	19	5	1
180	09우한-2-1	16	3		1		20	1	19	5	1
181	09우한-9-1	9	3	2			14	2	12	14	
182	09우한-26-1	10	4	1	3		18	4	14	22	1
183	09우한-27-1	18	2				20	0	20	0	1
184	09우한-33-1	13	1	2		2	18	4	14	22	
185	09우한-40-1	16	2	1			19	1	18	5	2
186	P15-31-1	16	1				17	0	17	0	1
187	P15-34-1	19	1				20	0	20	0	2
188	P15-36-1	21					21	0	21	0	2
189	P15-37-1	14	1				15	0	15	0	1
190	P15-41-1	14	2				16	0	16	0	2
191	P15-43-1	17	2				19	0	19	0	2
192	158-M-2-1	12	6				18	0	18	0	2
193	158-M-4-1	12	6				18	0	18	0	2
194	158-M-6-1	15	6				21	0	21	0	2
195	158-M-13-1	8	12				20	0	20	0	1
196	2394-52-1	7	2			1	10	1	9	10	

197	636-53-1	18				1	19	1	18	5	2
198	628-51-1	6	9		5	1	21	6	15	29	2
199	631-51-1	2	2	9	7	1	21	17	4	81	
200	636-51-1	12		1		5	18	6	12	33	1
201	636-52-1	8	2			1	11	1	10	9	1
202	677-51-1	3					3	0	3	0	1
203	688-51-1	18	1				19	0	19	0	2
204	701-51-1	17					17	0	17	0	2
205	701-52-1	8	6	2	1	2	19	5	14	26	
206	702-51-1	10	1				11	0	11	0	1
207	702-52-1	9	2			3	14	3	11	21	1
208	704-51-1	15	1			4	20	4	16	20	2
209	704-52-1	6	1				7	0	7	0	
210	712-52-1	15	1		1	1	18	2	16	11	2
211	712-53-1	20			1		21	1	20	5	2
212	715-51-1	20	1				21	0	21	0	2
213	715-52-1	9		3	3	5	20	11	9	55	
214	715-53-1	4	2	1		2	9	3	6	33	
215	716-51-1	9	6			6	21	6	15	29	1
216	719-51-1	9	11			1	21	1	20	5	2
217	721-51-1	11	7		2	1	21	3	18	14	2
218	2361-51-1	12			3	1	16	4	12	25	1
219	2362-51-1	7	6			1	14	1	13	7	1
220	2363-51-1	9	10			2	21	2	19	10	2
221	2366-51-1	6	8				14	0	14	0	1
222	2366-52-1	15	4				19	0	19	0	2
223	2369-51-1	12	4	1			17	1	16	6	2
224	2371-52-1	12	5	2			19	2	17	11	2
225	2374-51-1	7	2				9	0	9	0	1
226	2386-51-1	15	1			2	18	2	16	11	1
227	2390-51-1	17	3				20	0	20	0	2
228	2390-52-1	15	4	1			20	1	19	5	2
229	2392-51-1	15	6				21	0	21	0	2
230	2392-52-1	21					21	0	21	0	2
231	2393-51-1	21					1	0	21	0	2
232	2395-51-1	13	3	1		1	18	2	16	11	1
233	2395-52-1	18	2				20	0	20	0	2
234	2404-51-1	16	1	2	2		21	4	17	19	2
235	2404-52-1	21					21	0	21	0	0
236	2404-53-1	19	1		1		21	1	20	5	2
237	2405-51-1	19	1			1	21	1	20	5	2
238	2405-52-1	11	3	2	1		17	3	14	18	1
239	2405-53-1	13	3				16	0	16	0	1
240	2406-52-1	21					21	0	21	0	2
241	2609-51-1	20	1				21	0	21	0	2
242	2411-51-1	19	1			1	21	1	20	5	2
243	2412-51-1	16					16	0	16	0	2
244	2468-53-1	8	4				12	0	12	0	1
245	994-1-평1-1	7	14				21	0	21	0	2
246	994-1-평2-1	9	2				11	0	11	0	1

247	994-1-평3-1	11	7				18	0	18	0	2
248	994-1-평4-1	11	10				21	0	21	0	2
249	994-2-평3-1	9	11			1	21	1	20	5	2
250	994-3-평2-1	8	12				20	0	20	0	2
251	994-3-평3-1	11	7				18	0	18	0	2
252	994-3-평5-1	11	10				21	0	21	0	2
253	994-5-평5-1	9	9				18	0	18	0	2
254	995-2-평1-1	12	7				19	0	19	0	2
255	995-2-평4-1	16	4				20	0	20	0	2
256	995-1-평2-1	20	1				21	0	21	0	2
257	995-1-평3-1	12	3				15	0	15	0	2
258	995-3-평1-1	7	7		1	3	18	4	14	22	1
259	995-5-평1-1	17	1				18	0	18	0	2
260	995-6-평2-1	13	2	2		2	19	4	15	21	2
261	평164-3-1	18	2	1			21	1	20	5	2
262	평165-1-1	18	3				21	0	21	0	2
263	평166-1-1	16	2		1		19	1	18	5	2
264	평166-2-1	2	7	3		3	15	6	9	40	
265	평166-3-1	14	3	1	1	1	20	3	17	15	2
266	평167-1-1	13	7				20	0	20	0	2
267	평169-1-1	13	7				20	0	20	0	2
268	평169-2-1	11	9				20	0	20	0	2
269	2468-53-1	11	2				13	0	13	0	1
270	994-3-해2-1	19					19	0	19	0	2
271	994-6-해2-1	18	1				19	0	19	0	2
272	994-6-해3-1	19	2				21	0	21	0	2
273	해167-1-1	18	3				21	0	21	0	2
274	해169-1-1	16	5				21	0	21	0	2
275	2340-53-1				1	13	14	14	0	100	
276	2345-52-1	19	1				20	0	20	0	2
277	2345-52-1	7					7	0	7	0	1
278	2346-51-1R-1	17	3				20	0	20	0	2
279	2346-52-1R-1	21					21	0	21	0	2
280	2346-52-2R-1	15	1			1	17	1	16	6	2
281	2353-51-1R-1	14	1			1	16	1	15	6	2
282	2463-56-1R-1	20					20	0	20	0	2
283	2501-51-1R-1	13	5				18	0	18	0	2
284	2501-53-1	12	2				14	0	14	0	1
285	2503-51-1	21					21	0	21	0	2
286	2505-51-1	12	5				17	0	17	0	2
287	2505-53-1	13	2				15	0	15	0	2
288	2511-52-1	17	1	1			19	1	18	5	2
289	2514-51-1	8	8	1	1		18	2	16	11	2
290	2514-53-1	6	6				12	0	12	0	1
291	2412-53-1	20	1				21	0	21	0	2
292	신야-4-51-51-1	14	3				17	0	17	0	2
293	신야-4-51-52-1	21					21	0	21	0	2
294	1039-1-51-1R-1	7	7				14	0	14	0	1
295	1039-1-51-2R-1	11	5				16	0	16	0	2
296	2472-52-1	9	6				15	0	15	0	2

297	2523-51-1	16	1				17	0	17	0	2
298	2424-51-1	21					21	0	21	0	2
299	2424-51-1	11	1				12	0	12	0	1
300	2427-51-52-51-1	18	1				19	0	19	0	2
301	2427-51-52-51-1	14	1	1			16	1	15	6	1
302	09우환-09-1	21					21	0	21	0	2
303	09우환-05-1	19	2				21	0	21	0	2
304	09우환-08-1	14	3				17	0	17	0	2
305	09우환-13S-1	14					14	0	14	0	1
306	09우환-20-1	18	2				20	0	20	0	2
307	09우환-22-1	19	1				20	0	20	0	2
308	09우환-23-1	6					6	0	6	0	1
309	09우환-24-1	17	3				20	0	20	0	2
310	09우환-25-1	17	1				18	0	18	0	2
311	09우환-26-1	9					9	0	9	0	1
312	09우환-36-1	10	4	1	2		17	3	14	18	1
313	09우환-39-1	12	7	1		1	21	2	19	10	2
314	Y1	6	1	3			10	3	7	30	
315	Y2	3	1	2	3	8	17	13	4	76	
316	Y3	4	3	3	3	3	16	9	7	56	
317	Y4	4	3	3	3	3	16	9	7	56	
318	Y5	1	4	4	2	7	18	13	5	72	
319	Y6		1	1	1	3	6	5	1	83	
320	Y7	6	4			7	17	7	10	41	1
321	Y8				2	5	7	7	0	100	
322	Y9		8		3	4	15	7	8	47	
323	Y10	1	4	2	3	6	16	11	5	69	
324	Y11		10	5	1	3	19	9	10	47	1
325	Y12		1		4	14	19	18	1	95	
326	Y13	7	2	3	3		15	6	9	40	
327	Y14	6	3	1	2	2	14	5	9	36	
328	Y15	1	1	2	1	6	11	9	2	82	
329	Y16		1	7	2	3	13	12	1	92	
330	Y17					20	20	20	0	100	
331	Y18			1		16	17	17	0	100	
332	Y19		1			17	18	17	1	94	
333	Y20					21	21	21	0	100	
334	Y21	1	2	2	4	10	19	16	3	84	
335	Y22					21	21	21	0	100	
336	Y23	1	1			17	19	17	2	89	
337	Y24		1	3	2	3	9	8	1	89	
338	Y25		1	1	2	14	18	17	1	94	
339	Y26	1	2	3	3	6	15	12	3	80	
340	Y27			1		13	14	14	0	100	
341	Y28	2	1	3	2	8	16	13	3	81	
342	Y29			3	4	13	20	20	0	100	
343	Y30					19	19	19	0	100	
344	Y31	4	1	2		12	19	14	5	74	
345	Y32		1	3	2	13	19	18	1	95	
346	Y33					21	21	21	0	100	

347	Y34			2	1	11	14	14	0	100	
348	Y35			1	13	12	26	26	0	100	
349	Y36	2	3	3	1	7	16	11	5	69	
350	Y37			2	1	12	15	15	0	100	
351	Y38	1		3	1	3	8	7	1	88	
352	Y39		6	2	2	2	12	6	6	50	1
353	Y40		3	6	2		11	8	3	73	
354	Y41	4	4	3	2	3	16	8	8	50	1
355	Y42	3	4	2	2	8	19	12	7	63	1
356	Y43	4	2	3	2	5	16	10	6	63	1
357	Y44		3	3	3	8	17	14	3	82	
358	Y45			4	2	14	20	20	0	100	
359	Y46	1	3	4	2	2	12	8	4	67	
360	Y47		2	3	2	5	12	10	2	83	
361	Y48	3	4	4	6		17	10	7	59	1
362	Y49		3	5	7		15	12	3	80	
363	Y50		3	9	4		16	13	3	81	
364	Y51		5	8	4		17	12	5	71	1
365	Y52		3	7	6		16	13	3	81	
366	Y53	1	8	6	2		17	8	9	47	1
367	Y54		1	9	8	4	22	21	1	95	
368	Y55	1	4	8	4	2	19	14	5	74	1
369	Y56			6	11		17	17	0	100	
370	Y57			4	14	3	21	21	0	100	
371	Y58				2	15	17	17	0	100	
372	Y59		4	2	9	4	19	15	4	79	1
373	Y60					21	21	21	0	100	
374	Y61			1	1	17	19	19	0	100	
375	Y62					21	21	21	0	100	
376	Y63		1		1	19	21	20	1	95	
377	Y64					21	21	21	0	100	
378	Y65					21	21	21	0	100	
379	Y66	2		3	2	6	13	11	2	85	
380	Y67					21	21	21	0	100	
381	Y68	2	3	1		6	12	7	5	58	1
382	Y69					10	10	10	0	100	
383	Y70					19	19	19	0	100	
384	Y71				1	10	11	11	0	100	
385	Y72				1	19	20	20	0	100	
386	Y73			1	2	17	20	20	0	100	
387	Y74					9	9	9	0	100	
388	Y75			2	1	13	16	16	0	100	
389	Y76		1		1	5	7	6	1	86	
390	Y77		2	5	2	12	21	19	2	90	
391	Y78					19	19	19	0	100	
392	Y79			2	1	7	10	10	0	100	
393	Y80		1	2	3	4	10	9	1	90	
394	Y81		1	2	1		4	3	1	75	
395	Y82	5	8	3	1	1	18	5	13	28	2
396	Y83	6	2	4		4	16	8	8	50	1

397	Y84	5	3	4	2	5	19	11	8	58	1
398	Y85		3	5		2	10	7	3	70	
399	Y86	2		1	2	6	11	9	2	82	
400	Y87	1	3	4	1	1	10	6	4	60	1
401	Y88			7		12	19	19	0	100	
402	Y89	2	4	4	5	4	19	13	6	68	1
403	Y90					17	17	17	0	100	
404	Y91		1		5	14	20	19	1	95	
405	Y92					19	19	19	0	100	
406	Y93					21	21	21	0	100	
407	Y94				3	16	19	19	0	100	
408	Y95	3			5	6	14	11	3	79	
409	Y96	2	2	3	2	4	13	9	4	69	1
410	Y97			2		11	13	13	0	100	
411	Y98					17	17	17	0	100	
412	Y99		1	2		13	16	15	1	94	
413	Y100					21	21	21	0	100	
414	Y101	5	2	3	2	7	19	12	7	63	1
415	Y102	2	3	3	4	6	18	13	5	72	1
416	Y103		1	3		15	19	18	1	95	
417	Y104					21	21	21	0	100	
418	Y105					21	21	21	0	100	
419	Y106		1	3		14	18	17	1	94	
420	Y107		1	11	2	7	21	20	1	95	
421	Y108			1		19	20	20	0	100	
422	Y109					21	21	21	0	100	
423	Y110		2	3	7	6	18	16	2	89	
424	Y111		1	1		19	21	20	1	95	
425	Y112					21	21	21	0	100	
426	Y113			3		17	20	20	0	100	
427	Y114	3	3	5	2	2	15	9	6	60	1
428	Y115					20	20	20	0	100	
429	Y116		1	1		18	20	19	1	95	
430	Y117					21	21	21	0	100	
431	Y118			2	2	17	21	21	0	100	
432	Y119	4	2	4	2		12	6	6	50	1
433	Y120					21	21	21	0	100	
434	Y121			2		17	19	19	0	100	
435	Y122				1	20	21	21	0	100	
436	Y123			2	1	7	10	10	0	100	
437	Y124		3	2	8	4	17	14	3	82	1
438	Y125	2	3	3	4	7	19	14	5	74	1
439	Y126			1	1	19	21	21	0	100	
440	Y127				4	15	19	19	0	100	
441	Y128	3	10	1			14	1	13	7	2
442	Y129					18	18	18	0	100	
443	Y130		1	1	1	16	19	18	1	95	
444	Y131					20	20	20	0	100	
445	Y132					21	21	21	0	100	
446	Y133					19	19	19	0	100	

447	Y134				3	17	20	20	0	100	
448	Y135				1	19	20	20	0	100	
449	Y136				2	19	21	21	0	100	
450	Y137	1	8	3	1		13	4	9	31	1
451	Y138			2		19	21	21	0	100	
452	Y139					10	10	10	0	100	
453	Y140					7	7	7	0	100	
454	Y141				2	16	18	18	0	100	
455	Y142					18	18	18	0	100	
456	Y143			1		9	10	10	0	100	
457	Y144			2	1	17	20	20	0	100	
458	Y145			1	2	18	21	21	0	100	
459	Y146	1	2			17	20	17	3	85	1
460	Y147		1	3		6	10	9	1	90	
461	Y148		1	1		4	6	5	1	83	
462	Y149		1	3	2	6	12	11	1	92	
463	Y150			7	2	9	18	18	0	100	
464	Y151	4		3	2	7	16	12	4	75	1
465	Y152	1	2	7	3	5	18	15	3	83	1
466	Y153	6	3	2	2	5	18	9	9	50	1
467	Y154	6	3	5	2	5	21	12	9	57	1
468	Y155			1		3	4	4	0	100	
469	Y156					21	21	21	0	100	
470	Y157					21	21	21	0	100	
471	Y158		9	3	3	2	17	8	9	47	
472	Y159	4	11	2	2	2	21	6	15	29	2
473	Y160					21	21	21	0	100	
474	Y161				1	18	19	19	0	100	
475	Y162			2	2	15	19	19	0	100	
476	Y163				2	19	21	21	0	100	
477	Y164		3	2		4	9	6	3	67	1
478	Y165			4		15	19	19	0	100	
479	Y166				1	6	7	7	0	100	
480	Y167				3	7	10	10	0	100	
481	Y168		1	3	1	15	20	19	1	95	
482	Y169					21	21	21	0	100	
483	Y170					20	20	20	0	100	
484	Y171					17	17	17	0	100	
485	Y172			4		12	16	16	0	100	
486	Y173	3	2	2	1	7	15	10	5	67	1
487	Y174		1	4		9	14	13	1	93	
488	Y175			2	3	13	18	18	0	100	
489	Y176				2	18	20	20	0	100	
490	Y177					1	1	1	0	100	
491	Y178		1	3	2	10	16	15	1	94	
492	Y179		5	3	6	7	21	16	5	76	1
493	Y180				2	17	19	19	0	100	
494	Y181		2	1	2	15	20	18	2	90	
495	Y182				1	20	21	21	0	100	
496	Y183			1	1	19	21	21	0	100	

497	Y184					21	21	21	0	100	
498	Y185				2	19	21	21	0	100	
499	Y186					18	18	18	0	100	
500	Y187		2		5	6	13	11	2	85	
501	Y188					20	20	20	0	100	
502	Y189	6	6	3	2	3	20	8	12	40	2
503	Y190				2	18	20	20	0	100	
504	Y191		5		2	13	20	15	5	75	1
505	Y192	5	1	1	2	11	20	14	6	70	1
506	Y193		1	4		16	21	20	1	95	
507	Y194	1	1	2	1	13	18	16	2	89	1
508	Y195	6	3		4	7	20	11	9	55	1
509	Y196	15	2		1	1	19	2	17	11	2
510	Y197			4	2	4	10	10	0	100	
511	Y198			6		13	19	19	0	100	
512	Y199					10	10	10	0	100	
513	Y200			2	2	16	20	20	0	100	
514	Y201		11			3	14	3	11	21	2
515	Y202				1	16	17	17	0	100	
516	Y203		6	3		8	17	11	6	65	
517	Y204	6	7	2			15	2	13	13	2
518	Y205		3	3	10	4	20	17	3	85	1
519	Y206				1	20	21	21	0	100	
520	Y207				2	19	21	21	0	100	
521	Y208				2	15	17	17	0	100	
522	Y209				8	1	9	9	0	100	
523	Y210				2	19	21	21	0	100	
524	Y211					19	19	19	0	100	
525	Y212				3	10	13	13	0	100	
526	Y213		1	1	4	13	19	18	1	95	
527	Y214	2	1	2		14	19	16	3	84	1
528	Y215			2	1	16	19	19	0	100	
529	Y216					19	19	19	0	100	
530	Y217		2	4		12	18	16	2	89	
531	Y218	1	2	2		15	20	17	3	85	1
532	Y219		4	2		14	20	16	4	80	1
533	Y220			4	3	12	19	19	0	100	
534	Y221				1	16	17	17	0	100	
535	Y222			5	3	11	19	19	0	100	
536	Y223		15	3	1		19	4	15	21	2
537	Y224		2	1	5	12	20	18	2	90	
538	Y225				1	18	19	19	0	100	
539	Y226	16	2	1	1	1	21	3	18	14	2
540	Y227			2		18	20	20	0	100	
541	Y228	7	3	2	5	1	18	8	10	44	2
542	Y229			4	2	14	20	20	0	100	
543	Y230				1	6	7	7	0	100	
544	Y231				4	14	18	18	0	100	
545	Y232		3		5	8	16	13	3	81	1
546	Y233		8	3	7		18	10	8	56	1

547	Y234		1	5	2	12	20	19	1	95	
548	Y235	3	5	2	3	7	20	12	8	60	
549	Y236				2	17	19	19	0	100	
550	Y237					21	21	21	0	100	
551	Y238	4	8		3	1	16	4	12	25	2
552	Y239					21	21	21	0	100	
553	Y240		1	4		16	21	20	1	95	
554	Y241		3	7		11	21	18	3	86	1
555	Y242				2	18	20	20	0	100	
556	Y243	2	5	5	3	4	19	12	7	63	1
557	Y244	2	2	4	3	8	19	15	4	79	1
558	Y245		8	2	7	4	21	13	8	62	1
559	Y246	8	4	3	3	2	20	8	12	40	2
560	Y247	8	4	3	3	2	20	8	12	40	2
561	Y248	9		2	4	3	18	9	9	50	1
562	Y249	1			2	16	19	18	1	95	
563	Y250				1	19	20	20	0	100	
564	Y251	5		2	7	4	18	13	5	72	1
565	Y252	8			9	3	20	12	8	60	1
566	Y253		9		2	7	18	9	9	50	1
567	Y254		2	2		16	20	18	2	90	
568	Y255					7	7	7	0	100	
569	Y256				3	1	4	4	0	100	
570	Y257					4	4	4	0	100	
571	Y258				8	13	21	21	0	100	
572	Y259		1		3	6	10	9	1	90	
573	Y260				1	20	21	21	0	100	
574	Y261				2	19	21	21	0	100	
575	Y262			4	1	5	10	10	0	100	
576	Y263	2	5		1	2	10	3	7	30	1
577	Y264		6	7	5		18	12	6	67	1
578	Y265					21	21	21	0	100	
579	Y266	12	4		2	2	20	4	16	20	2
580	Y267	12	5	3			20	3	17	15	2
581	Y268	7	3	5	3	2	20	10	10	50	2
582	Y269				7	2	9	9	0	100	
583	Y270	2	4	2	2	6	16	10	6	63	1
584	Y271	3	2		3	6	14	9	5	64	1
585	Y272		13	3	3	2	21	8	13	38	2
586	Y273			10	3	1	14	14	0	100	
587	Y274		1	3	2	14	20	19	1	95	
588	Y275					18	18	18	0	100	
589	Y276				3	17	20	20	0	100	
590	Y277					15	15	15	0	100	
591	Y278					21	21	21	0	100	
592	Y279				4	14	18	18	0	100	
593	Y280				6	15	21	21	0	100	
594	Y281				5	15	20	20	0	100	
595	Y282				6	12	18	18	0	100	
596	Y283				5	14	19	19	0	100	

597	Y284				2	15	17	17	0	100	
598	Y285			5	4	12	21	21	0	100	
599	Y286				3	11	14	14	0	100	
600	Y287			4	2	9	15	15	0	100	
601	Y288		3				3	0	3	0	1
602	Y289	1		1	3	15	20	19	1	95	
603	Y290		1		3	15	19	18	1	95	
604	Y291	2	1	3		10	16	13	3	81	1
605	Y292				2	13	15	15	0	100	
606	Y293				1	16	17	17	0	100	
607	Y294					3	3	3	0	100	
608	Y295					20	20	20	0	100	
609	Y296				3	5	8	8	0	100	
610	Y297					21	21	21	0	100	
611	Y298					21	21	21	0	100	
612	Y299				4	14	18	18	0	100	
613	Y300		5	3	12	1	21	16	5	76	1
614	Y301		8		10	2	20	12	8	60	1
615	Y302		14	3	1	1	19	5	14	26	2
616	Y303	2			7	12	21	19	2	90	
617	Y304		2	4	3	12	21	19	2	90	
618	Y305	12	1			1	14	1	13	7	2
619	Y306	14	2	1	1	2	20	4	16	20	2
620	Y307	8	5	4	1		18	5	13	28	2
621	Y308					18	18	18	0	100	
622	Y309	1	2	5	2	5	15	12	3	80	
623	Y310	3	6	3	2	2	16	7	9	44	1
624	Y311		1	2	1	14	18	17	1	94	
625	Y312	16	3				19	0	19	0	2
626	Y313	13	2	1			16	1	15	6	2
627	Y314		7	2	2	10	21	14	7	67	1
628	Y315		1	1		19	21	20	1	95	
629	Y316					15	15	15	0	100	
630	Y317	6	5	3	2	5	21	10	11	48	2
631	Y318			6	3	12	21	21	0	100	
632	Y319	13	4	3	1		21	4	17	19	2
633	Y320	10	6	5			21	5	16	24	2
634	Y321		1	4	1	14	20	19	1	95	
635	Y322	18	3				21	0	21	0	2
636	Y323		9	9	3		21	12	9	57	1
637	Y324		2	7	7		16	14	2	88	
638	Y325	19	1		1		21	1	20	5	2
639	Y326		5			14	19	14	5	74	1
640	Y327		13		1	6	20	7	13	35	2
641	Y328	9	6	3	1		19	4	15	21	2
642	Y329	10	7	3			20	3	17	15	2
643	Y330	8	6	3	1		18	4	14	22	2
644	Y331			8		13	21	21	0	100	
645	Y332	6			4	5	15	9	6	60	1
646	Y333	1	1	1	1	14	18	16	2	89	

647	Y334					13	13	13	0	100	
648	Y335		1	4	2	1	8	7	1	88	
649	Y336					21	21	21	0	100	
650	Y337		3	6	2	3	14	11	3	79	1
651	Y338	1	2	8	3	1	15	12	3	80	1
652	Y339					18	18	18	0	100	
653	Y340	3	11				14	0	14	0	2
654	Y341					21	21	21	0	100	
655	Y342				2	15	17	17	0	100	
656	Y343					17	17	17	0	100	
657	Y344					20	20	20	0	100	
658	Y345					21	21	21	0	100	
659	Y346		7	4	2	5	18	11	7	61	1
660	Y347				3	11	14	14	0	100	
661	Y348		1	1	4	14	20	19	1	95	
662	Y349			2		17	19	19	0	100	
663	Y350		6	2	1	4	13	7	6	54	1
664	Y351		1	2	1	6	10	9	1	90	
665	Y352				2	17	19	19	0	100	
666	Y353			2	5	13	20	20	0	100	
667	Y354			3	2	12	17	17	0	100	
668	Y355				1	14	15	15	0	100	
669	Y356					19	19	19	0	100	
670	Y357					7	7	7	0	100	
671	Y358	1	11	4	2	3	21	9	12	43	2
672	Y359				2	19	21	21	0	100	
673	Y360	1	1	6	2	6	16	14	2	88	
674	Y361			5	1	10	16	16	0	100	
675	Y362					16	16	16	0	100	
676	Y363	1	1		2	7	11	9	2	82	
677	Y364				5	15	20	20	0	100	
678	Y365		1	1	4	13	19	18	1	95	
679	Y366				6	12	18	18	0	100	
680	Y367	8	1	3	4	2	18	9	9	50	1
681	Y368	17	1	1	1	1	21	3	18	14	2
682	Y369	4	3		3	7	17	10	7	59	1
683	Y370	13	1	1		3	18	4	14	22	2
684	Y371	10	1				11	0	11	0	2
685	Y372	4	1	2			7	2	5	29	1
686	Y373	4	3			2	9	2	7	22	1
687	Y374	14	6				20	0	20	0	2
688	Y375	1	1	2	4	10	18	16	2	89	
689	Y376	6	1		2		9	2	7	22	1
690	Y377	6	5	3	1		15	4	11	27	1
691	Y378	2	2	4	3	6	17	13	4	76	
692	Y379	1	5	5	2	7	20	14	6	70	2
693	Y380	7	7	3	3		20	6	14	30	1
694	Y381					18	18	18	0	100	
695	Y382					19	19	19	0	100	
696	Y383	1	2		4	7	14	11	3	79	

697	Y384	3	1		1		5	1	4	20	
698	Y385	13	4				17	0	17	0	2
699	Y386	3	6	2	4	5	20	11	9	55	1
700	Y387	3				17	20	17	3	85	
701	Y388	2	1	2	1	3	9	6	3	67	
702	Y389	8		3	3	6	20	12	8	60	1
703	Y390	4		3	3		10	6	4	60	
704	Y391	7	3	3		2	15	5	10	33	2
705	Y392	8	4	5	1	1	19	7	12	37	2
706	Y393	3	3	4	2	4	16	10	6	63	1
707	Y394	3	8	9			20	9	11	45	2
708	Y395					15	15	15	0	100	
709	Y396			7		14	21	21	0	100	
710	Y397			5		14	19	19	0	100	
711	Y398	8	2	6	1		17	7	10	41	2
712	Y399				1	20	21	21	0	100	
713	Y400	12	6			2	20	2	18	10	2
714	Y401	4	6	7	2	2	21	11	10	52	2
715	Y402	7	2				9	0	9	0	1
716	Y403	10	1	3			14	3	11	21	2
717	Y404	2				1	3	1	2	33	
718	Y405	1	1	3	1	10	16	14	2	88	
719	Y406	5	3	1	2	10	21	13	8	62	1
720	Y407	15	1	3	1	1	21	5	16	24	2
721	Y408			11	2	1	14	14	0	100	
722	Y409		6	11	4		21	15	6	71	1
723	Y410	1	5	2	6	7	21	15	6	71	1
724	Y411		6	5		6	17	11	6	65	1
725	Y412			9		11	20	20	0	100	
726	Y413	10	4	3	1	1	19	5	14	26	2
727	Y414	10	4	1	1	5	21	7	14	33	2
728	Y415	4	6	1		1	12	2	10	17	2
729	Y416	8	2	1	1	1	13	3	10	23	2
730	Y417	7	3	4			14	4	10	29	2
731	Y418	7	2	3	1	1	14	5	9	36	1
732	Y419			10		11	21	21	0	100	
733	Y420	6			1	4	11	5	6	45	1
734	Y421	15	1	2			18	2	16	11	2
735	Y422	11	3	2			16	2	14	13	2
736	Y423		1	2		9	12	11	1	92	
737	Y424	1		2	1		4	3	1	75	
738	Y425	5	2	7	4	3	21	14	7	67	1
739	Y426	10	4	5			19	5	14	26	2
740	Y427			6		15	21	21	0	100	
741	Y428					21	21	21	0	100	
742	Y429					21	21	21	0	100	
743	Y430	5			2		7	2	5	29	1
744	Y431	1	3	2			6	2	4	33	1
745	Y432	6	5	6	4		21	10	11	48	2
746	Y433					21	21	21	0	100	

747	Y434	4	3	3		11	21	14	7	67	1
748	Y435					4	4	4	0	100	
749	Y436	4		3		12	19	15	4	79	
750	Y437	11	3	3	1		18	4	14	22	2
751	Y438	14					14	0	14	0	2
752	Y439	12	2	5			19	5	14	26	2
753	Y440	13	6	1	1		21	2	19	10	2
754	Y441					19	19	19	0	100	
755	Y442			7		14	21	21	0	100	
756	Y443	7	3	11			21	11	10	52	2
757	Y444	6	4	5	1		16	6	10	38	2
758	Y445	4					4	0	4	0	
759	Y446	3	2	3			8	3	5	38	1
760	Y447		8	5	3	5	21	13	8	62	1
761	Y448	17	1	3			21	3	18	14	2
762	Y449	11		1	3	6	21	10	11	48	1
763	Y450	13	1				14	0	14	0	2
764	Y451				2	19	21	21	0	100	
765	Y452	21					21	0	21	0	2
766	Y453	7	4	3	2	5	21	10	11	48	1
767	Y454	18					18	0	18	0	2
768	Y455	10	1	3			14	3	11	21	1
769	Y456	11	4	2	2	1	20	5	15	25	2
770	Y457	21					21	0	21	0	2
771	Y458	10	3	6			19	6	13	32	2
772	Y459	8	3	4	1		16	5	11	31	1
773	Y460	4	4		2	3	13	5	8	38	1
774	Y461	11	3	3	1	3	21	7	14	33	2
775	Y462	11	4	3	3		21	6	15	29	2
776	Y463				2	19	21	21	0	100	
777	Y464	15	3	2	1		21	3	18	14	2
778	Y465	10	2	9			21	9	12	43	1
779	Y466	18	3				21	0	21	0	2
780	Y467	21					21	0	21	0	2
781	Y468	9	3	9			21	9	12	43	2
782	Y469	18	3				21	0	21	0	2
783	Y470	19	1	1			21	1	20	5	2
784	Y471	11	3	3	2	2	21	7	14	33	2
785	Y472	18	1	1			20	1	19	5	2
786	Y473	14	3	4			21	4	17	19	2
787	Y474	9	8			4	21	4	17	19	2
788	Y475			4		10	14	14	0	100	
789	Y476					21	21	21	0	100	
790	Y477	12	6	3			21	3	18	14	2
791	Y478				10	11	21	21	0	100	
792	Y479				2	19	21	21	0	100	
793	Y480	10	7	4			21	4	17	19	2
794	Y481		2	6		12	20	18	2	90	
795	Y482			3		18	21	21	0	100	
796	Y483	4	2	5			11	5	6	45	

797	Y484		2	4		15	21	19	2	90	
798	Y485					20	20	20	0	100	
799	Y486				1	5	6	6	0	100	
800	Y487				4	17	21	21	0	100	
801	Y488	14	7				21	0	21	0	2
802	Y489					21	21	21	0	100	
803	Y490	8	2	1	5	5	21	11	10	52	1
804	Y491	9	2	3	3	2	19	8	11	42	2
805	Y492	6	2			13	21	13	8	62	1
806	Y493	11	4	4		2	21	6	15	29	2
807	Y494	11	5	1			17	1	16	6	2
808	Y495	19	1	1			21	1	20	5	2
809	Y496	20			1		21	1	20	5	2
810	Y497		6	14			20	14	6	70	1
811	Y498	20		1			21	1	20	5	2
812	Y499				5	16	21	21	0	100	
813	Y500	13	4	3			20	3	17	15	2
814	Y501	11		3		5	19	8	11	42	2
815	Y502			9		12	21	21	0	100	
816	Y503	4	7	10			21	10	11	48	2
817	Y504	13		2	3	3	21	8	13	38	2
818	Y505	3	4	1	1	9	18	11	7	61	1
819	Y506	13	4		2	2	21	4	17	19	2
820	Y507	16	2	1	1	1	21	3	18	14	2
821	F1		17				17	0	17	0	2
822	F2		15		1	5	21	6	15	29	2
823	F3		1				1	0	1	0	
824	F4		18	3			21	3	18	14	2
825	F5		12	7			19	7	12	37	2
826	F6	3	18				21	0	21	0	2
827	F7		2	14			16	14	2	88	
828	F8			19	2		21	21	0	100	
829	F9			15	1	1	17	17	0	100	
830	F10	17	4				21	0	21	0	2
831	F11			10	11		21	21	0	100	
832	F12			15	5		20	20	0	100	
833	F13			14	7		21	21	0	100	
834	F14			21			21	21	0	100	
835	F15		20			1	21	1	20	5	2
836	F16	1	2	18			21	18	3	86	
837	F17		17	3	1		21	4	17	19	2
838	F18	2	19				21	0	21	0	2
839	F19		19				19	0	19	0	2
840	F20	1	2				3	0	3	0	
841	F21		15	5			20	5	15	25	2
842	F22		20				20	0	20	0	2
843	F23		20				20	0	20	0	2
844	F24		19	2			21	2	19	10	2
845	F25		15	6			21	6	15	29	2
846	F26		17	3			20	3	17	15	2

847	F27		15	3	2		20	5	15	25	2
848	F28		15	5	1		21	6	15	29	2
849	F29		10	0			10	0	10	0	2
850	F30		13	7			20	7	13	35	2
851	F31		15	5			20	5	15	25	2
852	F32		19				19	0	19	0	2
853	F33	1	17	3			21	3	18	14	2
854	F34			8	8	4	20	20	0	100	
855	F35		19	2			21	2	19	10	2
856	F36		15				15	0	15	0	2
857	F37		7	1			8	1	7	13	1
858	F38		16	4	1		21	5	16	24	2
859	F39		12	9			21	9	12	43	2
860	F40		17	2	2		21	4	17	19	2
861	F41		12	4			16	4	12	25	2
862	F42	1	13	7			21	7	14	33	2
863	F43		17	4			21	4	17	19	2
864	F44		17	2	1		20	3	17	15	2
865	F45		18	3			21	3	18	14	2
866	F46		11	10			21	10	11	48	2
867	F47	5	15				20	0	20	0	2
868	F48		13	8			21	8	13	38	2
869	F49		19				19	0	19	0	2
870	F50		14	7			21	7	14	33	2
871	F51		1	4	2	14	21	20	1	95	
872	F52		17	3			20	3	17	15	2
873	F53		16	4			20	4	16	20	2
874	F54			20	1		21	21	0	100	
875	F55		1	20			21	20	1	95	
876	F56			21			21	21	0	100	
877	F57			21			21	21	0	100	
878	F58		8	17			25	17	8	68	1
879	F59			21			21	21	0	100	
880	F60			21			21	21	0	100	
881	F61		17	4			21	4	17	19	2
882	F62			19			19	19	0	100	
883	F63			20	1		21	21	0	100	
884	F64		1	19			20	19	1	95	
885	F65		7	14			21	14	7	67	1
886	F66		2	18			20	18	2	90	
887	F67		21				21	0	21	0	2
888	F68		2	12	2	5	21	19	2	90	
889	F69			18			18	18	0	100	
890	F70		16	4			20	4	16	20	2
891	F71	2	14			1	17	1	16	6	2
892	F72		13	3	2		18	5	13	28	2
893	F73		19	2			21	2	19	10	2
894	F74		19				19	0	19	0	2
895	F75		19	1			20	1	19	5	2
896	F76		12	7			19	7	12	37	1

897	F77		14	5	1		20	6	14	30	2
898	F78		9	11	1		21	12	9	57	1
899	F79				1	20	21	21	0	100	
900	F80		3	9	2	1	15	12	3	80	
901	F81		11	4			15	4	11	27	2
902	F82		8	6			14	6	8	43	1
903	F83		4	17			21	17	4	81	
904	F84		10	11			21	11	10	52	2
905	F85		13	3		5	21	8	13	38	2
906	F86		16	5			21	5	16	24	2
907	F87			18		2	20	20	0	100	
908	F88			21			21	21	0	100	
909	F89			19			19	19	0	100	
910	F90		15	5			20	5	15	25	2
911	F91			21			21	21	0	100	
912	F92			21			21	21	0	100	
913	F93		4	15			19	15	4	79	
914	F94		4	16		1	21	17	4	81	
915	F95			21			21	21	0	100	
916	F96			21			21	21	0	100	
917	F97			21			21	21	0	100	
918	F98			11			11	11	0	100	
919	F99		20				20	0	20	0	2
920	F100			21			21	21	0	100	
921	F101			14	3		17	17	0	100	
922	F102		3	18			21	18	3	86	
923	F103			21			21	21	0	100	
924	F104		3	17			20	17	3	85	
925	F105		4	15			19	15	4	79	1
926	F106		20				20	0	20	0	2
927	F107			12	8		20	20	0	100	
928	F108			11	9		20	20	0	100	
929	F109		13	7			20	7	13	35	2
930	F110		7	8	1		16	9	7	56	1
931	F111			13	8		21	21	0	100	
932	F112				19		19	19	0	100	
933	F113		3	5	0	9	17	14	3	82	1
934	F114	2	17				19	0	19	0	2
935	F115			16	5		21	21	0	100	
936	F116		2	5	2	8	17	15	2	88	
937	F117			16	2	1	19	19	0	100	
938	F118			6	6	2	14	14	0	100	
939	F119		3	3	4	3	13	10	3	77	
940	F120		5	11	2	2	20	15	5	75	1
941	F121			9	10		19	19	0	100	
942	F122			9	12		21	21	0	100	
943	F123		12	7			19	7	12	37	2
944	F124			4	7		11	11	0	100	
945	F125			2	3		5	5	0	100	
946	F126			1		17	18	18	0	100	

947	F127				3	17	20	20	0	100	
948	F128			7	8	6	21	21	0	100	
949	F129			6	9	6	21	21	0	100	
950	F130				2	17	19	19	0	100	
951	F131	4	16				20	0	20	0	2
952	F132	12	2	1	5		20	6	14	30	2
953	F133			11	10		21	21	0	100	
954	F134			3	1	17	21	21	0	100	
955	F135			4	4	13	21	21	0	100	
956	F136			14		7	21	21	0	100	
957	F137			1		20	21	21	0	100	
958	F138			20	1		21	21	0	100	
959	F139			6	4	10	20	20	0	100	
960	F140			4	1	14	19	19	0	100	
961	F141		1	1		19	21	20	1	95	
962	F142					21	21	21	0	100	
963	F143		4		6	10	20	16	4	80	1
964	F144			1		20	21	21	0	100	
965	F145					21	21	21	0	100	
966	F146			11	10		21	21	0	100	
967	F147			2		19	21	21	0	100	
968	F148		3			18	21	18	3	86	
969	F149			4	1	16	21	21	0	100	
970	F150					21	21	21	0	100	
971	F151			18	2	1	21	21	0	100	
972	F152			1	3	17	21	21	0	100	
973	F153			20			20	20	0	100	
974	F154			4	6	11	21	21	0	100	
975	F155			6	3	12	21	21	0	100	
976	F156			18	1	2	21	21	0	100	
977	F157		17	4			21	4	17	19	2
978	F158			18		2	20	20	0	100	
979	F159			17	1		18	18	0	100	
980	F160				7	14	21	21	0	100	
981	F161				2	19	21	21	0	100	
982	F162			3	2	16	21	21	0	100	
983	F163			18		3	21	21	0	100	
984	F164			6	3	12	21	21	0	100	
985	F165			12	2	7	21	21	0	100	
986	F166			21			21	21	0	100	
987	F167			17		4	21	21	0	100	
988	F168					21	21	21	0	100	
989	F169		16	3	1		20	4	16	20	2
990	F170			2	1	18	21	21	0	100	
991	F171					20	20	20	0	100	
992	F172				3	18	21	21	0	100	
993	F173					21	21	21	0	100	
994	F174		21				21	0	21	0	2
995	F175		21				21	0	21	0	2
996	F176		14	6	1		21	7	14	33	2

997	F177					21	21	21	0	100	
998	F178		21				21	0	21	0	2
999	F179			5	8	8	21	21	0	100	
1000	F180			4		16	20	20	0	100	
1001	F181					21	21	21	0	100	
1002	F182			2	2	17	21	21	0	100	
1003	F183				3	18	21	21	0	100	
1004	F184			18		3	21	21	0	100	
1005	F185					21	21	21	0	100	
1006	F186		5	16			21	16	5	76	1
1007	F187					21	21	21	0	100	
1008	F188			17			17	17	0	100	
1009	F189		11				11	0	11	0	2
1010	F190				1	18	19	19	0	100	
1011	F191		11	8			19	8	11	42	2
1012	F192					21	21	21	0	100	
1013	F193		11	2			13	2	11	15	2
1014	F194		19	2			21	2	19	10	2
1015	F195		17				17	0	17	0	2
1016	F196				3	15	18	18	0	100	
1017	F197					14	14	14	0	100	
1018	F198				5	13	18	18	0	100	
1019	F199			18	3		21	21	0	100	
1020	F200			18	2		20	20	0	100	
1021	1954 x 2322	16	5				21	0	21	0	2
1022	42-1 x 38-2	15	6				21	0	21	0	2
1023	2418-51 x 5649-52	10	8				18	0	18	0	2
1024	83-2 x 403-1	17	4				21	0	21	0	2
1025	2322-51 x 2325-52	16	3				19	0	19	0	2
1026	H2-1 x 2418-51			2		3	5	5	0	100	
1027	2418-51 x CT5-1			3	6	9	18	18	0	100	
1028	164-2 x P6-1	14	7				21	0	21	0	2
1029	222-51 x P6-1	13	5				18	0	18	0	1
1030	517(R) x 2325(R)	19	2				21	0	21	0	2
1031	517(R) x 09우환-42(R)	21					21	0	21	0	2
1032	09우환-42(R) x 2437(S)	15	6				21	0	21	0	2
1033	09우환-42(R) x 09우환-38(S)	7	14	0	0	0	21	0	21	0	2
1034	1950(S) x 우-2(S)			2	5	14	21	21	0	100	
1035	2345(S) x DWB(S)					21	21	21	0	100	
1036	2418(S) x CT5(S)			1	1	19	21	21	0	100	
1037	337(R) x 2325(R)	18	3				21	0	21	0	2
1038	2409(S) x 407(S)				1	13	14	14	0	100	
1039	90(S) x 농C1(S)			2	1	18	21	21	0	100	
1040	842(S) x YR677-62(R)	17	4				21	0	21	0	2
1041	496(S) x 744(S)				2	18	20	20	0	100	
1042	2418(S) x 26(R)	16	4				20	0	20	0	2

1043	496(S) x 2522(S)					21	21	21	0	100	
1044	2409(S) x JK15(S)			1		20	21	21	0	100	
1045	2418(S) x 5649R	13	8				21	0	21	0	2
1046	2409(S) x 99-225(R)	11	10				21	0	21	0	2
1047	2409(S) x 723(S)			4	2	15	21	21	0	100	
1048	24091(S) x 8S8-7(S)				1	20	21	21	0	100	
1049	337(R) x JK15(S)	14	7				21	0	21	0	2
1050	621(S) x 723(S)				1	13	14	14	0	100	
1051	621(S) x 2483(S)			1		20	21	21	0	100	
1052	2409(S) x 756(S)			3	7	11	21	21	0	100	
1053	2418MS x 5646-51-51-51-52 -51-51-51					21	21	21	0	100	
1054	2409-51MS x 689-51		21				21	0	21	0	2
1055	90-51MS x PI15-41		21				21	0	21	0	2
1056	97-496BMS x 744-51		21				21	0	21	100	2
1057	2409-51MS x 5646-51-51-51-52 -51-51-51					21	21	21	0	100	
1058	741-51S-51 x 689-51-52					21	21	21	0	100	
1059	2437-51S x 09우한-45			5	8	8	21	21	0	100	
1060	2345MS x DWB-25					21	21	21	0	100	
1061	225MS x PI15-41			18		3	21	21	0	100	
1062	2418MS x 407					21	21	21	0	100	
1063	337MS x YR677-62-G6		5	16			21	16	5	76	
1064	KrantoMS x 751-51s					21	21	21	0	100	
1065	1925-54 x 1925-56			2	1	18	21	21	0	100	
1066	대박나	16	3				19	0	19	0	대비R
1067	YR호남	17	3				20	0	20	0	대비R
1068	중감11호					20	20	20	0	100	대비S



그림 6-34. 선발된 대표적 위황병 저항성 양배추계통

㉔ 뿌리혹병 검정: 뿌리혹병 내병성 검정을 위하여 대비종으로 내병성품종의 YCR품종(위황병과 뿌리혹병의 복합저항성 품종)인 일본 농림의 “YCR이념”과 이병성 품종의 일본 다끼이의 “오키나” 등을 공시하였다. 뿌리혹병 접종시험에는 “과일양배추”, “신람”, “YCR 이념” 등의 F₂, F₃, 및 F₄의 분리계통들과 “과일”양배추로부터 얻어진 소포자배양 DH계통들을 공시하였으며, 대비품종을 포함한 총 284계통 및 조합에 접종하여 병발생 양상을 조사하였다. 뿌리혹병균은 경기도 안성시에서 채집한 뿌리혹병 균주(Race4)를 이용하였다. 뿌리혹병 균주(Race) 판별은 Williams 판별기주 4종인 “Jersey Queen(WCD1)”, “Badger Shipper(WCD2)”, “Laurentian(WCD3)”, “Wilhelmsburger(WCD4)”를 사용하여 Race판별을 수행하였다. 그 결과, Race 판별종 host WCD1, WCD2, WCD3, WCD4 모두에서 사용 균주에 대하여 이병성을 나타내고 있음을 확인하였다. 따라서 안성에서 채집하여 본 저항성 검정 시험에서 사용한 균주가 Race4임을 확인하였다. 뿌리혹병 접종에 이용된 식물체는 50cm×30cm 파종상자에 5cm 줄 간격으로 매해 8월 초에 파종하고 7 ~ 9일 뒤에 접종하여 약 40 ~ 50일 후에 조사 및 선발을 실시하였다. 병원균 접종에 사용된 균주는 4×10⁸ spores/pot의 농도의 현탁액으로 조제하여 1분 동안 파종상에서 뽑아낸 유묘의 뿌리를 침지한 후 트레이에 이식한 후 관리하였다. 뿌리혹병 조사기준은 저항성, 이병성 등 1, 3, 5, 7, 9단계로 나누어 조사하였다



<뿌리혹병 접종>

<뿌리혹병내성계통 선발>

<Race 판별 및 발생 정도>

도>

그림 6-35. 양배추 위황병 저항성 검정

뿌리혹병 병원균 접종결과 내병성 품종으로 공시한 일본 농림사의 “과일”, “YCR이념”은 접종균주에 내병성이 강하였으며, 이병성 대조군으로 공시한 일본 다끼이종묘사의 “오키나”는 100% 이병성을 나타내어 시험의 객관성을 입증하였다.

우선 “과일”양배추(No2 ~ No7)와 “신람”양배추(No8 ~ No16)의 F₃ 분리계통들과 “신람”, “과일”, “YCR이념” 등의 F₂ 분리세대(No37 ~ No55)에서 내병성계통을 선발하였다. 또한 “과일” 양배추(No63 ~ No71, No77 ~ No79)와 “YCR이념” 양배추(No80 ~ No82)의 F₃ 분리계통들과 “신람”(No73 ~ No76, No90 ~ No97)의 F₃ 분리세대에서 내병성계통을 집중 선발하였다. 다음으로 “과일” 양배추(No118 ~ No120, No154, No183, No187)와 “YCR이념” 양배추(No101, No105, No106, No112, No113, No121 ~ No144, No155, No157, No188 ~ No199)의 F₃, F₄ 분리계통들과 “과일, 신람”양배추 (No102, No103, No107 ~ No110) F₅분리세대, 그리고 “신람”(No114 ~ No118, No159 ~ No164, No171, No178, No180, No181)의 F₄ 분리세대에서 내병성계통을 주로 선발하였다. 한편, No98 ~ No107 과 No145 ~ No153은 과일양배추로부터 얻어진 DH계통들로 상당수 계통들이 뿌리혹병에 내병성을 가지고 있었다. 양배추 뿌리혹병의 경우 유전양식이 완전히 규명되지는 않았지만 일단 단일자 우성이 아닌 것으로 보이기 때문에 소포자 배양이 매우 효과적일 것이라고 판단된다. No202 ~ No204, No208, No209는 “과일 양배추”의 F₄ 분리 계통들로 모두 뿌리혹병에 강한 내병성을 나타냈다. No201, No205 ~ No207, No211, No212 등은 “YCR이념”의 F₄ 분리 계통들로 이들 역시 강한 내병성을 보였다. 또한 “신람” 양배추의 분리세대들인 No228 ~ No234 들 역시 내병성을 보였다. 또한 “과일양배추”에서 소포자 배양을 통해 획득한 No270 ~ No273 4계통은 뚜렷한 내병성을 보여 향후, 뿌리혹병 내병성 품종 육종에 중요한 자원으로 이용이 가능할 것으로 판단된다. 뿌리혹병 내병성 계통으로 선발된 No201, No202, No204, No280과 내병성 판별품종인 “과일” 양배추, 이병성으로 결정된 No255, No276과 이병성 판별품종인 “오키나”의 종자들을 2-1세부과제에 뿌리혹병 조절 기작 연구를 위한 소재로 제공하였다. 양배추 뿌리혹병의 경우 유전양식이 완전히 규명되지는 않았지만 일단 단일자 우성이 아닌 것으로 보이기 때문에 소포자배양이 매우 효과적일 것이라고 판단된다. 선발된 내병성계통들을 이용하여 조합작성을 실시하여 뿌리혹병 내병성 품종 육성에 활용하고자 한다. 이와 같이 “과일”, “신람”, “YCR 이념”의 F₂, F₃, F₄, F₅ 분리 계통에서 뿌리혹병 내병성계통들을 집중적으로 선발하였으며 총 308개체를 최종선발하였다.

아울러, 분자 생물학적 분석을 통한 양배추 뿌리혹병 저항성 반응의 정량화, 양배추 뿌리혹병 처리 모니터링을 위한 분자 표지 개발을 위하여 뿌리혹병 저항성 5품종(신람, 과일, YCR 이념, YCR 다혜)과 뿌리혹병 이병성 3품종(CT-12, CT-18, 8398)을 1-1세부과제(한국생명공학연구원)에 실험재료로 종자를 제공하였다.

표 6-25. 양배추 뿌리혹병 접종 후 이병율 조사

No	BN (계통명, 조합명)	이병정도					총 주수	이병 주수	내병 주수	이병율 (%)	선발
		1	3	5	7	9					
1	2468-G2	8				3	11	3	8	27	1
2	994-1-G1	14		2		2	18	4	14	22	1
3	994-2-G1	9		4		1	14	5	9	35	1
4	994-3-G1	10		4		2	16	6	10	37	1
5	994-4-G1	13		3		3	19	6	13	31	1
6	994-5-G1	12		1		4	17	5	12	29	1
7	994-6-G1	12				5	17	5	12	29	1
8	995-1-G1	10		2		2	14	4	10	28	1
9	995-2-G1	14		1		3	18	4	14	22	1
10	995-3-G1	9		3			12	3	9	25	1
11	995-4-G1	8				12	20	12	8	60	1
12	995-5-G1	8		3		4	15	7	8	46	1
13	995-6-G1	13		2		2	17	4	13	23	1
14	995-7-G1	14				4	18	4	14	22	1
15	995-8-G1	11				8	19	8	11	42	1
16	995-9-G1	3				14	17	14	3	82	
17	164-1					18	18	18	0	100	
18	164-3					14	14	14	0	100	
19	165-1					3	3	3	0	100	
20	166-1					17	17	17	0	100	
21	166-2	7				10	17	10	7	58	1
22	166-3					8	8	8	8	100	1
23	167-1	13		5			18	5	13	27	1
24	168-1	6				13	19	13	6	68	1
25	169-1					12	12	12	0	100	
26	169-2	10				3	13	3	10	23	1
27	2468-G2			5		10	15	15	0	100	
28	994-3-G1					12	12	12	0	100	
29	994-6-G1	9				4	13	4	9	30	1
30	994-6-G1	10				9	19	9	10	47	1
31	995-1-G1					11	11	11	0	100	
32	995-2-G1					16	16	16	0	100	
33	995-6-G1					6	6	6	0	100	
34	167-1	12		3		3	18	6	12	33	1
35	169-1	11		1			12	1	11	8	1
36	2468-53-G1	7		4		2	13	6	7	46	1
37	9101-07	15				5	20	5	15	25	2
38	9101-08	14				5	19	5	14	26	1
39	9101-09	11				4	15	4	11	26	1
40	9101-10	15		1		3	19	4	15	21	2
41	9101-14	8		2		1	11	3	8	27	1
42	9101-16	7				11	18	11	7	61	1
43	9101-20	6				10	16	10	6	62	1
44	9102-01	12				5	17	5	12	29	1
45	9102-03	11				4	15	4	11	26	1
46	9102-04	12		2		2	16	4	12	25	1

47	9102-05	12		3		3	18	6	12	33	1
48	9102-06	16		1		3	20	4	16	20	2
49	9102-13	13		5			18	5	13	27	1
50	9102-17	15		3		2	20	5	18	25	2
51	9102-19	13				4	17	4	13	23	1
52	9103-01	15		1		4	20	5	15	25	2
53	9103-02	8		1		2	11	3	8	27	1
54	9103-03	16		3		1	20	4	16	20	2
55	Apr-03	12		1		2	15	3	12	20	1
56	8S8-7					19	19	19	0	100	
57	1464-1					15	15	15	0	100	
58	154-1					17	17	17	0	100	
59	164-2					20	20	20	0	100	
60	JK-2					16	16	16	0	100	
61	신람-1					16	16	16	0	100	
62	YCR이념-1	13	1				14	0	14	0	1
63	994-1-G2	14		1			15	1	14	7	1
64	994-6-G2	13					13	0	13	0	1
65	995-5-G2	7		6		6	19	12	7	63	1
66	167-1-G2	14		1		6	21	7	14	33	1
67	168-1-1	13		4			17	4	13	24	1
68	169-2-1	10					10	0	10	0	1
69	994-6-해2-1	13					13	0	13	0	1
70	994-6-해-1	10		1		1	12	2	10	17	1
71	해167-1-1	5		7		1	13	8	5	62	
72	해169-1-1	8					8	0	8	0	1
73	9101-07-01	12		2		1	15	3	12	20	1
74	9101-08-01	15		2		1	18	3	15	17	2
75	9101-09-01	14		2		1	17	3	14	18	1
76	9101-16-1	9		1		2	12	3	9	25	1
77	9102-01-01	6		3		2	11	5	6	45	1
78	9102-05-01	5				4	9	4	5	44	1
79	9102-06-01	8					8	0	8	0	1
80	9103-04-01	14				2	16	2	14	13	1
81	9103-05-01	13				2	15	2	13	13	1
82	9103-06-01	15					15	0	15	0	2
83	9103-07-01	18					18	0	18	0	2
84	9103-08-01	11		4		1	16	5	11	31	1
85	9103-09-01	17					17	0	17	0	2
86	9103-10-01	11					11	0	11	0	1
87	9103-11-01	12				3	15	3	12	20	1
88	9103-12-01	15					15	0	15	0	2
89	9103-14-1	20					20	0	20	0	2
90	9103-17-1	14					14	0	14	0	1
91	9103-18-1	12					12	0	12	0	1
92	9103-20-1	16					16	0	16	0	2
93	9101-04-01					13	13	13	0	100	
94	9102-20-1	13		6		2	21	8	13	38	1
95	9101-10-01					15	15	15	0	100	
96	9101-19-1					17	17	17	0	100	

97	9101-06-01					18	18	18	0	100	
98	P15-31			13		4	17	17	0	100	
99	P15-34	13				0	13	0	13	0	1
100	P15-36	13				0	13	0	13	0	1
101	YCR이념-1-1	8	3				11	0	11	0	2
102	994-6-G2-1	5	6				11	0	11	0	2
103	995-5-G2-1	5	3	1	2	0	11	3	8	27	1
104	평168-1-1-1	7	4				11	0	11	0	1
105	평169-2-1-1	7	6				13	0	13	0	1
106	평168-2-1-2	6	6				12	0	12	0	1
107	994-6-해2-1-1	9	6		1		16	1	15	6	2
108	994-6-해2-1-2	7	8				15	0	15	0	2
109	994-6-해3-1-1	6	4				10	0	10	0	1
110	994-6-해3-1-2	5	5				10	0	10	0	1
111	해167-1-1-1	9	7				16	0	16	0	2
112	해169-1-1-1	7	3				10	0	10	0	1
113	해169-1-1-2	6	7				13	0	13	0	1
114	9101-7-1-2	5	3				8	0	8	0	1
115	9101-8-1-1	3	3				6	0	6	0	1
116	9101-9-1-1	10	5	1			16	1	15	6	2
117	9101-9-1-2	12	4				16	0	16	0	2
118	9102-1-1-1	1	10			3	14	3	11	21	1
119	9102-6-1-1	12			1		13	1	12	7	1
120	9102-6-1-2	4	2		1	1	8	2	6	25	1
121	9103-4-1-1	4	12				16	0	16	0	2
122	9103-4-1-2	7	4				11	0	11	0	1
123	9103-5-1-1	4	9				13	0	13	0	1
124	9103-5-1-2	8	9			1	18	1	17	5	2
125	9103-6-1-1	7	4				11	0	11	0	1
126	9103-11-1-1	6	7				13	0	13	0	1
127	9103-6-1-2	7					7	0	7	0	1
128	9103-7-1-1	6	8				14	0	14	0	1
129	9103-7-1-2	6	6				12	0	12	0	1
130	9103-8-1-1	9	7				16	0	16	0	2
131	9103-9-1-2	12	6				18	0	18	0	2
132	9103-10-1-1	11	3				14	0	14	0	1
133	9103-10-1-2	4	10				14	0	14	0	1
134	9103-11-1-2	3	4				7	0	7	0	1
135	9103-12-1-1	6	4				10	0	10	0	1
136	9103-12-1-2	4	4				8	0	8	0	1
137	9103-14-1-1	10	4				14	0	14	0	1
138	9103-14-1-2	13	2				15	0	15	0	2
139	9103-17-1-1	4	2				6	0	6	0	1
140	9103-17-1-2	6	9		1		16	1	15	6	2
141	9103-18-1-1	3	2				5	0	5	0	1
142	9103-18-1-2	4	8				12	0	12	0	1
143	9103-20-1-1	12	2				14	0	14	0	1
144	9103-20-1-2	7	5				12	0	12	0	1
145	P15-34-1	2	3				5	0	5	0	1
146	P15-31-1	6	2			1	9	1	8	11	1

147	P15-36-1	4	4				8	0	8	0	1
148	158-M-2-1	9	4				13	0	13	0	1
149	158-M-2-2	14	3				17	0	17	0	2
150	158-M-6-1	12	1				13	0	13	0	1
151	158-M-13-2	2	2		2	1	7	3	4	42	
152	158-M-13-1	2	14				16	0	16	0	2
153	158-M-16-2	7	8				15	0	15	0	2
154	548-1	7	7				14	0	14	0	1
155	549-1	6	7				13	0	13	0	1
156	2409-51-51-51	2	10				12	0	12	0	1
157	9101-12-51-51	5	12				17	0	17	0	2
158	9101-3-51-51	6	4	2	3		15	5	10	33	1
159	9101-7-51-51	4	2		4	1	11	5	6	45	
160	9101-20-51-51	10	10				20	0	20	0	2
161	9101-16-51-51	5	4	2	4		15	6	9	0.4	
162	9104-2-51-51	6	3		2	2	13	4	9	30	
163	9101-15-51-51	1	3				4	0	4	0	1
164	9101-7-51-51	4	9				13	0	13	0	1
165	9101-16-51-51	1	5		1		7	1	6	14	1
166	9101-20-51-51	2	5	1	2	1	11	4	7	36	1
167	9102-3-51-51	8	4		1		13	1	12	7	1
168	9102-4-51-51	8	6				14	0	14	0	1
169	9102-5-51-51	7	8				15	0	15	0	2
170	9102-6-51-51	11	4				15	0	15	0	2
171	9102-17-51-51	4	6				10	0	10	0	1
172	9103-1-51-51	7	6				13	0	13	0	1
173	9103-1-51-52	12	2				14	0	14	0	1
174	9103-2-52-51	1	3				4	0	4	0	
175	9103-4-51-51	7	4				11	0	11	0	1
176	9103-5-51-51	14	2				16	0	16	0	2
177	9103-6-51-51	6	11				17	0	17	0	2
178	9103-9-51-51	4	7				11	0	11	0	1
179	9103-12-51-51	5	5				10	0	10	0	1
180	9103-13-51-51	2	5				7	0	7	0	1
181	9103-14-51-51	4	2				6	0	6	0	1
182	9103-15-51-51	4	4				8	0	8	0	1
183	9103-19-51-51	3	10				13	0	13	0	1
184	2362-51-51-51		3	2	6	2	13	10	3	76	
185	9101-8-52-51	2		6	2		10	8	2	8	
186	9101-7-51-52		5		1	4	10	5	5	5	1
187	9101-11-51-51	4		1	4	2	11	7	4	63	
188	9101-10-51-51	4	3	4	4		15	8	7	53	1
189	9104-2-52-51				2		2	2	0	100	
190	9101-9-51-51	1	6	6	3	3	19	12	7	63	1
191	9101-12-51-51		5	1	4	1	11	6	5	54	1
192	9101-13-51-51		3	6	2		11	8	3	72	
193	9101-2-51-51	1	7	6	1	3	18	10	8	55	1
194	9101-18-51-51	3	3	3	3	3	15	9	6	60	1
195	9101-6-51-51	2		10	2		14	12	2	85	
196	9101-6-52-51	2	2	7	7		18	14	4	77	

197	9101-5-51-51	4		10	2		16	12	4	75	
198	9101-14-51-51	1	7	6		3	17	9	8	52	1
199	9102-1-51-51	4	2	1	10		17	11	6	64	1
200	YCR이념-1-1-1	3	8				11	0	11	0	1
201	994-6-평1-1-1-1	6	6				12	0	12	0	1
202	995-5-평1-1-1-1	5	10	3	1		19	4	15	21	2
203	995-5-평1-1-1-2	6	4				10	0	10	0	1
204	평168-1-1-1-2	3	7	2	4		16	6	10	38	1
205	평169-2-1-1-2	12	4				16	0	16	0	2
206	평169-2-1-2-3	9	10				19	0	19	0	2
207	994-6-해3-1-1-2	13	5				18	0	18	0	2
208	994-6-해3-1-2-3	7	7			1	15	1	14	7	1
209	해167-1-1-1-3			3		5	8	8	0	100	
210	해169-1-1-1-3	11	5				16	0	16	0	2
211	해169-1-1-2-3	16	4				20	0	20	0	2
212	9101-9-1-1-2	5	12	1			18	1	17	6	2
213	9102-1-1-1-1	7	6				13	0	13	0	1
214	9103-4-1-2-1	2	4	5	2	3	16	10	6	63	1
215	9103-6-1-1-2	14	2				16	0	16	0	2
216	9103-7-1-2-2	8	3	2	2	3	18	7	11	39	1
217	9103-10-1-1-1	15	2	1			18	1	17	6	2
218	9103-10-1-2-2	6	4	1		1	12	2	10	17	1
219	9103-12-1-1-1	7	5	2	4		18	6	12	33	1
220	9103-14-1-2-2	16	3			1	20	1	19	5	2
221	9103-17-1-2-2	5	10	4	2		21	6	15	29	2
222	9103-20-1-1-1	9	7		1		17	1	16	6	2
223	9103-20-1-2-2	14	3				17	0	17	0	2
224	158-M-13-1-2	4	10	1			15	1	14	7	1
225	549-1-1	5	11	2			18	2	16	11	2
226	2409-51-51-51-2	11	6				17	0	17	0	2
227	9101-12-51-51-3	9	8				17	0	17	0	2
228	9101-20-51-51-1	6	6		1		13	1	12	8	1
229	9101-16-51-51-2	3	2	7	3	4	19	14	5	70	1
230	9101-9-51-51-2	6	7	1			14	1	13	7	1
231	9101-13-51-51-1	6	7	2		3	18	5	13	28	1
232	9101-6-52-51-1	4	8	3	2	2	19	7	12	37	1
233	9101-14-51-51-1	5	4		3		12	3	9	25	1
234	9102-1-51-51-1	0	7	4	3		14	7	7	50	1
235	9102-4-51-51-1	6	10	2	2		20	4	16	20	2
236	9102-17-51-51-1	10	3				13	0	13	0	1
237	9103-1-51-51-2	12	7				19	0	19	0	2
238	9103-4-51-51-1	9	4	1			14	1	13	7	1
239	9103-9-51-51-1	12	1	2			15	2	13	13	1
240	9103-15-51-51-1	9	5				14	0	14	0	1
241	9103-12-1-2-1	6	9	1	1		17	2	15	12	2
242	9101-3-51-51-51	10	3	1	2		16	3	13	19	1
243	9101-20-51-51-51	6	8		3		17	3	14	18	1
244	9101-10-51-51-51	14	5	1			20	1	19	5	2
245	9101-9-51-51-51	8	8	1	1		18	2	16	11	1
246	9101-2-51-51-51	5	3	5	3	4	20	12	8	60	1

247	9101-16-51-51-51	14	4	2			20	2	18	10	2
248	9103-1-51-52-51	14	5				19	0	19	0	2
249	9103-2-52-51-51	6	8	1	1		16	2	14	13	1
250	9103-12-52-51-51	13	4				17	0	17	0	2
251	994-1-평2-51-51-51	16	4				20	0	20	0	2
252	995-2평1-51-51-51	13	2	3	1		19	4	15	21	2
253	995-1-평2-52-51-51	4		6	5	1	16	12	4	79	
254	995-1-평2-52-52-51			3	5	10	18	18	0	0	
255	995-5-평1-51-51-51	6	7	2	3		18	5	13	28	1
256	995-6-평1-51-51-51	3	11	2	2		18	4	14	22	1
257	평166-3-51-52-51	5	6	3		1	15	4	11	27	1
258	995-1-해2-51-51-51	7	6	3	1	2	19	6	13	32	1
259	995-5-평1-1-1-51	2		3			5	3	2	60	
260	994-6-해2-1-2-51	4	3	1	1	1	10	3	7	30	1
261	해169-1-1-1-51	12	5	1			18	1	17	6	2
262	9103-4-1-1-51	8	4	2			14	2	12	14	1
263	9103-7-1-1-51	16	4				20	0	20	0	2
264	9103-9-1-2-51	10	6	1			17	1	16	6	2
265	9103-12-1-1-51	2					2	0	2	0	1
266	9103-18-1-1-51	6	5				11	0	11	0	1
267	P15-31-1-1-51	5	7	2		4	18	6	12	33	1
268	P15-36-1-1-51	9	9	2			20	2	18	10	2
269	158-M-2-2-51	16	3		1		20	1	19	5	2
270	158-M-13-1-51	4	6	3	1	1	15	5	10	29	1
271	158-M-14-2-51	16	2				18	0	18	0	2
272	158-M-16-2-51	13	5	1	1		20	2	18	10	2
273	549-1-51	11	2				13	0	13	0	1
274	995-2-1R-1-1-51	4	3	3	5	3	18	11	7	61	1
275	9101-20-51-51-51	1		6	5		12	11	1	93	
276	9101-20-51-51-51 x 9103-12-52-51-51	6	4	5	4		19	9	10	47	1
277	995-5-평1-52-51-51 x 995-1-평2-52-51-51	5	3	12	1		21	13	8	62	1
278	158-M-14-G2 x 9101-3-51-52-51	4	4	6	6		20	12	8	60	1
279	9101-11-1-1-51 x 해169-1-1-1-51	10	3	1			14	1	13	7	2
280	9101-11-1-1-51 x 9103-8-1-1-51	5	3	4	1		13	5	8	38	1
281	995-2-1R-1-1-51 x 9103-8-1-1-51	3	3	2	5	5	18	12	6	67	1
282	과일	16					16	0	16	0	대비R
283	Norin(YCR이념)	14					14	0	14	0	대비R
284	Takii(오키나)					14	14	14	0	100	대비S



<대조군>



<No201>



<No202>



<No204>



<No212>



<No217>



<No222>



<No228>



<No238>



<No257>



<No272>



<No274>

그림 6-36. 선발된 대표적 뿌리혹병 저항성 양배추 계통

다. 브로콜리 수집품종, 시험조합 특성 검정

① 수집품종과 시험조합의 특성검정

㉠ 수출 및 국내용 품종 개발을 위해 수집된 품종과 기 보유 조합의 평가항목으로 잎자세, 엽절수, 잎길이, 잎너비, 잎몸 가장자리 물결모양, 잎몸의 모용유무, 잎몸 색깔 등을 최고생육기에 조사하였고 화뢰의 특성은 수확기에 숙기를 판단하였으며, 화경, 화뢰 폭, 화뢰 중, 화뢰 색, 단단한 정도, 구조, 안토시아닌 유무, 화뢰 소화의 크기, 화뢰 아래쪽 분지길 이를 조사하였다(표 6-26, 6-27, 그림 6-37).

한국, 일본, 미국, 중국, 유럽(네덜란드)에서 수집된 조합 및 품종의 숙기는 조생종 9, 중조생종 3, 중생종 4, 중만생 5, 만생종이 4품종으로 나타났으며, 특성조사의 종합적인 결과 육성목표로서 조생종이며 엽특성 및 화뢰특성이 우수하여 연구과제 수행시 육성조합 대비품종으로 BN104(코요시), BN105(베리돔), BN109(그레이스돔)으로 결정하였다. BN102, BN103, BN113, BN116은 만생종으로 나타났으며, 겨울철 이상한파로 인하여 화뢰의 특성은 조사할 수 없었다.

2011년 봄 F₁ 성능검정 시험은 BN101, 104, 105, 108, 109, 110, 114, 116, 120 9품종과 새롭게 수집된 6품종(BN K101, K102, K105, K107, K114, K115) 3조합(BN K116, K117, K118)을 2011년 3월 14일에 파종하여 3월 30일에 50구 트레이에 가식하였으며 본엽이 6~7매 정도 확보된 4월 20일에 (주) 코레콘 육종연구소 봄 노지 포장에 정식하여 엽 최고생육기 및 수확기 화뢰 특성조사를 실시하였다(Fig. 4). 정식 후 43일 ~ 70일에 화뢰특성 조사가 완료되었으며, 불리한 환경조건(이상저온)에도 불구하고 유럽(네덜란드)에서 수집된 BN K115 품종은 중생종이며 화뢰입자가 균일하고 형태적 특성이 다른 품종들에 비하여 특히 우수하여 대비품종으로 선발하였으며 연구수행에 있어 육성 조합 선발 대비품종으로 사용하였다(Table 3, 4).

표 6-26. 유전자원 수집 및 조합의 최고 생육기 특성(2010년 가을)

항목 BN	수집 국가	숙기	^z 잎자세 (초자)	엽절수	잎:길이 (cm)	잎:너비 (cm)	잎몸: ^y 가장자리	잎몸: 색갈
101	일본	만생	3	4	62	22	7	회초록
102	일본	만생	2	4	58	24	9	회초록
103	일본	만생	3	5	60	25	9	회초록
104	일본	조생	2	3	59	23	4	회초록
105	일본	중조생	3	4	59	24	4	회초록
106	한국	중생	3	5	65	23	8	청록
107	한국	조생	3	3	59	22	6	회초록
108	일본	중조생	3	4	66	24	5	회초록
109	유럽	조생	3	4	57	20	7	회초록
110	일본	중만생	3	4	60	23	7	회초록
111	일본	중만생	3	4	60	23	6	회초록
112	미국	중조생	3	4	67	23	8	회초록
113	일본	중만생	3	4	61	22	5	회초록
114	중국	중생	3	7	65	25	7	회초록
115	일본	중생	3	4	60	22	6	초록
116	일본	만생	3	4	58	19	5	회초록
117	유럽	중만생	3	4	61	21	6	초록
118	유럽	중만생	3	4	59	22	7	회초록
119	중국	조생	3	3	63	24	6	회초록
120	유럽	조생	3	5	65	25	7	회초록
121	유럽	조생	3	6	56	24	5	회초록
122	일본	중생	3	3	67	25	9	회초록
123	조합	극조생	2	6	66	24	5	회초록
124	조합	극조생	3	6	76	22	9	회초록
125	조합	조생	3	4	65	23	8	회초록

^z잎자세(구형성초기) : semi-erect-3, horizontal-5, semi-pendulous-7.

^y가장자리 물결모양 : absent or very weak 1, weak 3, medium 5, strong 7, very strong 9.

표 6-27. 유전자원 수집 및 조합의 수확기 화뢰(Head) 특성(2010년 가을)

항목 BN	아래쪽 분지길 이(mm)	화경 (mm)	화뢰 폭 (mm)	화뢰 중 (g)	화뢰 색	^y 단단함 (firmness)	^z 구조	안토시아 닌유무	^x 소화 크기
101	20	46	121	375	농녹	7	3	무	3
102	-	-	-	-	-	-	-	-	-
103	-	-	-	-	-	-	-	-	-
104	24	49	123	405	농녹	7	3	무	4
105	38	38	123	296	농녹	7	5	무	5
106	44	31	123	210	농녹	5	3	유(약간)	7
107	24	48	120	400	농녹	7	3	무	3
108	44	40	128	311	농녹	7	3	무	5
109	37	32	134	355	농녹	7	3	무	5
110	30	30	127	300	농녹	6	4	무	5
111	43	45	119	390	농녹	7	3	무	3
112	33	32	128	360	농녹	7	3	무	3
113	-	-	-	-	-	-	-	-	-
114	37	38	139	430	농녹	7	3	무	3
115	43	37	127	316	농녹	5	5	유(약간)	4
116	-	-	-	-	-	-	-	-	-
117	24	31	110	242	농녹	6	3	무	3
118	20	40	95	330	농녹	6	3	무	3
119	32	40	132	374	농녹	7	3	무	4
120	31	41	127	440	농녹	6	3	무	5
121	35	37	145	342	농녹	5	5	무	6
122	21	32	120	310	농녹	5	5	무	5
123	53	33	150	310	농녹	5	7	유	7
124	42	35	152	378	농녹	5	7	유	7
125	44	32	125	276	농녹	5	7	유	6

^z구조 - texture : very fine 1, fine 3, medium 5, coarse 7, very coarse 9.

^y구(단단함) - firmness : loose 3, medium 5, firm 7.

^x소화크기 : small 3, medium 5, large 7.

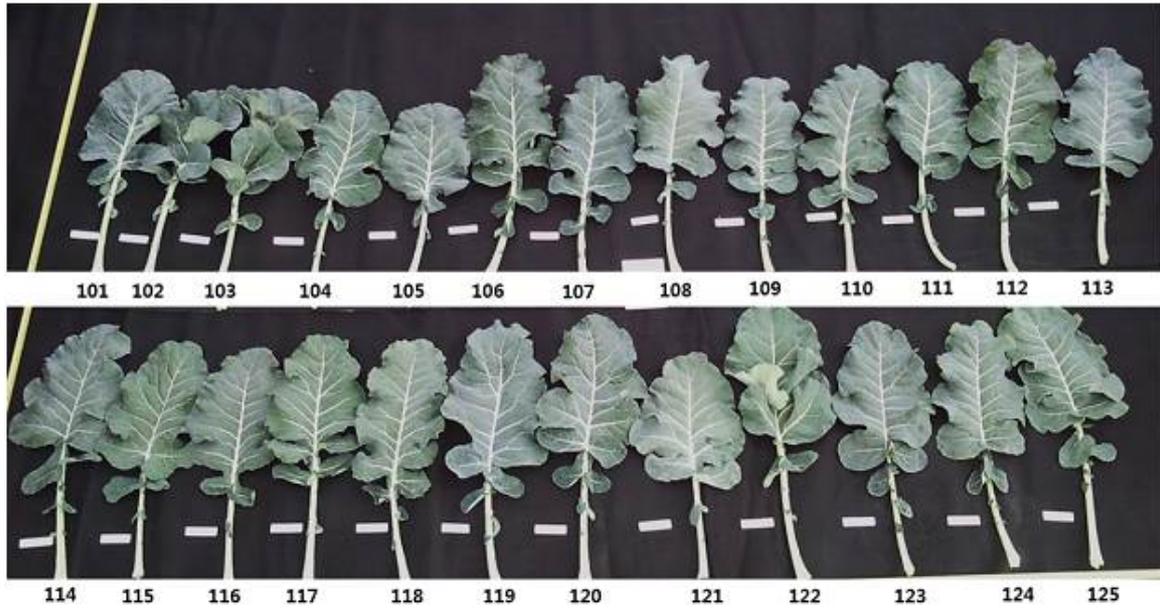


그림 6-37. 수집 품종(22점) 및 조합(3점)의 엽 및 화퇴 특성(1차년도)

표 6-28. 2011년 봄 작형 유전자원 수집 및 조합의 최고 생육기 특성(정식 후 51일)

항목 BN	수집국가 (조합)	숙기	2010년 가을 BN	초장 (cm)	앞:길이 (cm)	앞:너비 (cm)	앞몸: ² 가장자리 물결모양	앞자루 (cm)
K101	일본	중생	-	70	56	27.5	4	23
K102	유럽	중만생	-	68	57	24	5	23.5
K103	일본	중조생	105	61.5	56.5	23	7	27
K104	유럽	중조생	120	74	56.5	28.5	6	20.5
K105	유럽	중조생	-	66	54.5	27.5	6	21.5
K106	일본	중조생	104	75	58	23	5	25
K107	일본	조생	-	73	53.5	25	6	27
K108	유럽	중조생	109	71	58	25	6	25
K109	일본	중조생	108	62	57	25	6	25
K110	일본	중조생	116	70	55.5	24	5	23
K111	중국	중조생	114	60	60	23	6	24
K112	일본	중생	110	67	56	25	6	22
K113	일본	만생	101	73.5	61	25	7	23
K114	중국	만생	-	62	62	27	6	27.5
K115	유럽	중생	-	65	54	26.5	5	25
K116	조합	극조생	123	61	54	20	6	24.5
K117	조합	극조생	124	73	51	19.5	6	23.5
K118	조합	조생	125	61	51	19	6	25

²가장자리 물결모양 : absent or very weak 1, weak 3, medium 5, strong 7, very strong 9.

표 6-29. 2011년 봄 작형 유전자원 수집 및 조합의 수확기 화퇴(Head) 특성 (정식 후 43일 ~

70일)

Part SN	아래쪽 분지길이(mm)	화경 (mm)	화뢰폭 (mm)	화뢰 중 (g)	^y 단단한정도 (firmness)	^z 구조 (texture)	^x 소화 크기
K101	29	45	139	461	5	4	3
K102	24	43	123	445	6	5	4
K103	26	49	136	425	5	2	4
K104	20	47	129	446	7	4	4
K105	19	41	136	465	6	4	4
K106	30	46	132	438	6	4	5
K107	37	31	124	358	4	4	5
K108	20	42	120	416	6	4	3
K109	31	43	120	391	6	4	2
K110	25	36	124	395	6	4	3
K111	20	53	121	434	6	3	3
K112	26	38	129	368	6	3	3
K113	40	38	123	345	6	4	4
K114	24	41	128	390	5	4	4
K115	19	40	139	499	6	1	4
K116	40	34	137	400	3	5	6
K117	32	38	124	407	4	4	5
K118	46	33	133	358	3	5	6

^z구조 - texture : very fine 1, fine 3, medium 5, coarse 7, very coarse 9.

^y구(단단함) - firmness : loose 3, medium 5, firm 7.

^x소화크기 : small 3, medium 5, large 7.

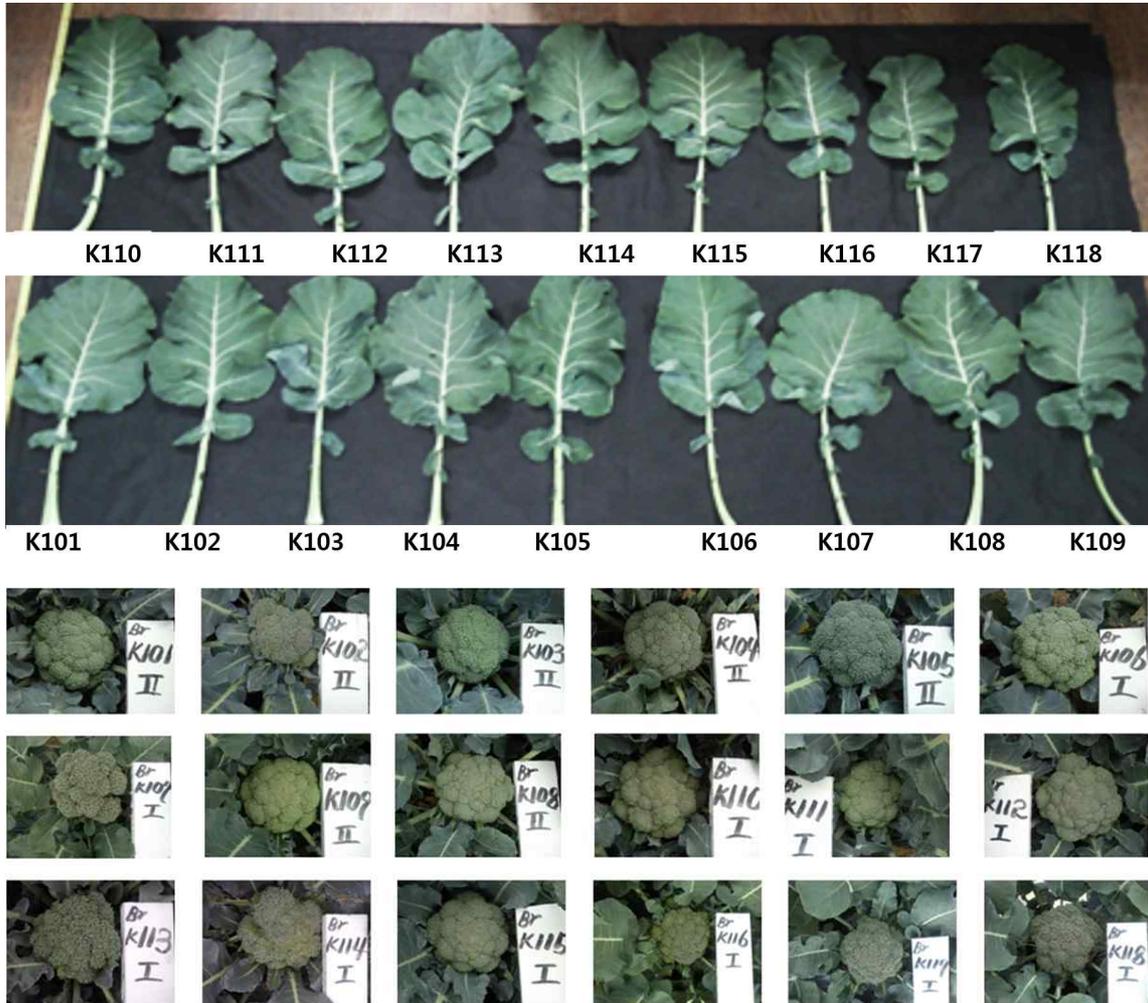


그림 6-38. 2011년 봄 수집 품종(15점) 및 조합(3점)의 엽 및 화퇴 특성

라. 브로콜리 소포자 유래 계통 육성

① 약(소포자) 유래 계통 육성을 위한 연구방법 및 소재 확보

- ㉔ 약(소포자) 배양의 목적은 녹색꽃양배추 육성 F₁ 조합 종자에서 반수체를 획득하고, 자연배가에 의한 homo화된 계통을 얻어 육종연환을 단축하고 신품종 개발에 좋은 재료를 얻기 위해 실시하였다. 약유래 계통을 확보하기 위해서는 먼저 녹색꽃양배추에 적합한 실험조건을 설정해야하므로 우선적으로 실험재료 및 약배양 효율성 검정(적용배지, 치상방법, 배양 조건 등)을 실시하였으며, 배발생된 개체를 가지고 발근유도 및 순화과정을 거쳐 배수성 검정을 통해 약유래 계통으로서 적용하였다(그림 6-39).

배지는 Modified B₅ 배지(Keller and Armstrong, 1983)에 성장조절제 NAA 0.1ppm, Sucrose 14%, AgNO₃ 125mg/L의 농도들을 첨가하여 Autoclave에서 121℃, 15분간 멸균한 후 Petri dish에 분주 하여 사용하였다. 뿐만 아니라 치상하는 약의 크기(1/4, 1/2, 3/4) 및 배양기간을 계절별로 실험을 진행하여 적합한 약배양 조건을 결정하였다. 약(Aanther)을 70% ethanol로 20초 동안 표면살균한

후에 Calcium Hypochlorite 4.2% 용액에 5분간 살균하고 멸균수로 3회 수세한 후 약을 분리하여 치상하였다. 치상 즉시 35°C에서 24시간 경과한 후 25°C에서 배(胚)를 유기하였으며, 유기된 배는 다시 MS배지에 성장조절제 NAA 0.02ppm + BAP 1.0 ppm을 첨가한 성장배지로 옮겨 정상식물체를 유도하였다.

표 6-30. 계절별 채취한 약(Anther)에서의 배발생 결과

Season	No. of anthers inoculated (A)	No. of anthers embryogenesis (B)	B/A(%)
Spring (Feb. - Apr.)	5,400	291	5.4
Summer (Jul. - Aug.)	8,600	16	0.2
Autumn (Oct. - Nov.)	2,700	32	1.2

표 6-31. 약배양에 적합한 약의 크기에 대한 결과

BN	Combinati on /cultivar	Ratio of petal to anther length	No. of anthers inoculated (A)	No. of anthers embryogenesis (B)	B/A (%)
		1/4	500	1	0.2
BN 105	BD/03	1/2	600	9	1.5
		3/4	600	10	1.7
		1/4	500	0	0.0
BN 113	NR1/14	1/2	600	38	6.3
		3/4	600	31	5.2
		1/4	500	4	0.8
BN 126	Marathon	1/2	600	21	3.5
		3/4	600	26	4.3

㉞ 배양시기에 따른 배양 효율을 확인하기 위하여 2009년 봄(2월~4월), 여름(7월~8월), 가을(10월~11월) 세차례 걸쳐 약을 채취하여 약배양을 실시하였다. 그 결과, 배발생은 봄(5.4%), 여름(0.2%), 가을(1.2%)로 나타나 봄에 약배양을 하였을 때 가장 높은 효율을 보였다(표 6-30). 이와 더불어 개체에 따라 화퇴 길이의 변이가 크기 때문에 꽃잎과 약의 상대적 길이에 따른 비교가 필요하여 실험을 진행하였다. 결과적으로, 꽃잎과 약의 비율이 BN105의 경우에는 1/4일 때 0.2%, 1/2일 때 1.5%, 3/4일 때 1.7%로 나타났으며, BN113은 1/2비율에서 가장 높은 6.3%, BN126에서는 3/4에서 4.3%로 가장 높았다. 따라서 본 실험에서는 녹색꽃

양배추에서의 적합한 꽃잎과 약의 비율이 1/2~3/4의 범위가 적합하다고 결정하였다(표 6-31). 약을 치상한 후 고온(35°C)처리 일수가 배발생에 미치는 효과를 조사한 결과, 실험에 사용된 모든 품종에서 24시간 처리가 48시간 처리보다 더 효과적인 것으로 나타났다(표 6-32). 본 실험에서 적용된 실험개체들의 배발생률의 차이는 모본식물의 유전자형에 따라 약배양 효율이 다르게 나타난다는 대부분의 연구와 같은 결과를 보였다(Arnison et al. 1990, Dietert et al. 1982, Lee 1994, Nam et al. 1999, Ockendon and Sunderland 1987, Roulund et al. 1990). 배의 형성은 약의 기부나 중간 부위에서 약강을 뚫고 배가 출현 하였으며, BN128의 경우에는 배 발생 이후 캘러스가 형성되거나 직접 배가 형성되는 두 가지 다른 형태로 관찰되었다. 그 결과, 전체적인 배발생률은 12.2%로 나타났으며, BN105에서 400개의 약을 치상하였을 때 배가 발생된 약 반응률은 4.5%로 나타났고 26개의 배를 획득하였다. BN110에서는 600개의 약을 치상하였을 때 배가 발생된 약 반응률은 2.0%로 나타나 가장 낮은 배발생을 보였으며, BN126과 BN127에서는 각 400개의 약을 치상하였을 때, 각 27.3%, 27.5%로 나타나 높은 배 발생률을 보였다(표 6-33, 그림 6-39).

표 6-32. 고온(35°C)처리 일수가 배발생에 미치는 효과

BN	Combination /cultivar	Duration (hr)	No. of anthers inoculated (A)	No. of anthers embryogeneses (B)	B/A (%)
BN 105	BD/03	24	1,200	33	2.8
		48	1,200	25	2.1
BN 113	NR1/14	24	1,200	109	9.1
		48	1,200	87	7.3
BN 126	Marathon	24	1,200	68	5.7
		48	1,200	39	3.3

표 6-33.. 배(Embryo)가 발생된 약 반응을 결과

BN	Combination /cultivar	No. of anthers inoculated (A)	No. of anthers embryogenesis (B)	B/A (%)	No. of embryos
BN 102	GR/01	600	54	9.0	76
BN 105	BD/03	400	18	4.5	26
BN 109	GrD08	200	44	22.0	53
BN 110	NJ/11	600	12	2.0	13
BN 113	NR1/14	200	26	13.0	32
BN 116	GM/20	200	14	7.0	36
BN 120	BB/21	200	8	4.0	22

BN 126	Marathon	400	109	27.3	276
BN 127	JB5005	400	110	27.5	227
BN 128	Belstar	200	11	5.5	29
Total		3,400	406	12.2	790

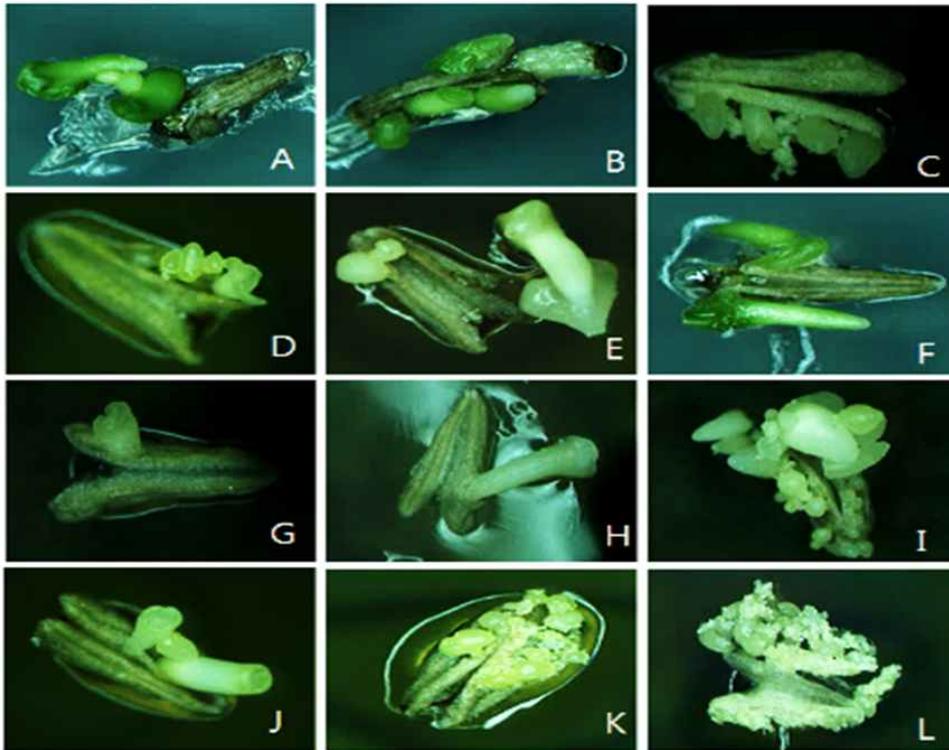


그림 6-39. 약배양 배(Embryo)발생 결과 (A: BN102, B: BN105, C: BN109, D: BN110, E: BN113, F: BN116, G: BN120, H: BN126, I-J: BN127, K-L: BN128)

- ㉔ 발근 및 정상식물체를 유도하기 위하여 IBA, Kinetin을 첨가한 배지에 10-15개이 어린 Shoot를 이식하여 계대배양을 하였으며, 이후 정상적인 식물체를 순화장치를 이용하여 순화시켰다. 그 결과, 약배양 유래 평균 순화율은 94.2%였으며, 그 중에서도 BN109, BN110의 순화율이 98%, 97%를 보였고, BN113은 65%로 가장 낮게 나타났다(표 6-34, 그림 6-40). 약배양 유래 개체의 순화율에도 개체간의 차이가 있음을 확인하였다. 약배양 유래된 유식물체는 순화과정을 거쳐 (주)코레콘 육종연구소 3중 난방시설하우스에 정식하였다. 정상적으로 활착이 된 1,795개체에 대하여 Flow Cytometry로 배수성을 검정한 결과, 반수체 발생률은 BN109에서 16.2%로 가장 낮게 나타났고, BN128에서 46.3%로 가장 높은 반수체 발생률을 보였다. 계통 육성에서 가장 중요한 자연배가 2배체 발생률은 BN113에서 71.4%로 가장 높게 나타났고, BN105에서 21.4%로 가장 낮게 나타나 품종에 따른 배수체 발생빈도의 차이를 확인하였다. 약배양에서 유전자형 간에 차이가 있

으니 전체적으로 반수체가 28.6%, 2배체 52.8%, 4배체 7.1%, 혼배체(X+2X, 2X+4X) 11.5%로 다양한 배수체들이 출현하였다. 반수체는 육안 관찰로 충분히 확인할 수 있었는데 배수체에 비하여 초세가 약하고, 개화가 이루어지지 않은 꽃봉오리도 많았으며 개화 시에 화색이 흰색이고, 꽃 크기도 정상개체에 비해 1/4수준이며, 약내 화분형성이 이루어지지 않았다.

약배양시 자연적인 염색체 배가는 소포자의 핵내 유사분열과 복제 또는 핵융합에 의한 것으로 보고되었다(Sunderland et al., 1974, Keller and Armstrong 1978). 양배추의 소포자 배양에서 자연적으로 2배체가 되는 비율이 21-67%로 나타난 결과(Rudolf and Hansen 1990)와 유사하였다(표 6-35).

표 6-34. 배 발생에 의해 순화된 개체율 결과

BN	No. of embryos	No. of plantlets (A)	No. of acclimatized plantlets (B)	B/A (%)
BN 102	76	232	226	97.4
BN 105	26	59	56	94.9
BN 109	53	157	154	98.1
BN 110	13	40	39	97.5
BN 113	32	75	49	65.3
BN 116	36	71	67	94.4
BN 120	22	45	43	95.6
BN 126	276	557	536	96.2
BN 127	227	613	571	93.1
BN 128	29	56	54	96.4
Total	790	1,905	1,795	94.2

표 6-35. 배수성 검정 결과

BN	No. of Plants	Haploid (x)		Diploid (2x)		Tetraploid (4x)		Mixoploid	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
BN 102	226	52	23.0	124	54.9	22	9.7	28	12.4
BN 105	56	21	37.5	12	21.4	11	19.6	12	21.4
BN 109	154	25	16.2	89	57.8	10	6.5	30	19.5
BN 110	39	9	23.1	211	53.8	5	12.8	4	10.3
BN 113	49	10	20.4	35	71.4	1	2.0	3	6.1
BN 116	67	21	31.3	44	65.7	1	1.5	1	1.5
BN 120	43	9	20.9	23	53.5	5	11.6	6	14.0
BN 126	536	171	31.9	322	60.1	6	1.1	37	6.9
BN 127	571	203	35.6	286	50.1	15	2.6	67	11.7
BN 128	54	25	46.3	21	38.9	2	3.7	6	11.1
Total	1,795	546	28.6	977	52.8	78	7.1	194	11.5

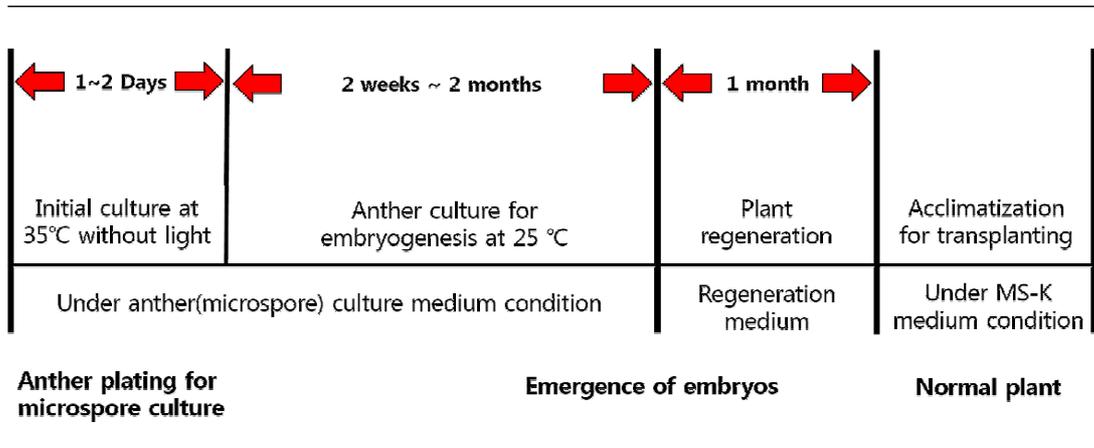


그림 6-40. 약(소포자) 배양 과정



그림 6-41. 약(소포자)배양에 의한 정상식물체 획득 과정



그림 6-42.. 약(소포자)배양에 의한 계통의 세대진전(1차년도)

- ㉔ 정상식물체의 수를 증가시키기 위해 배발생에 의해 나온 식물체별로 계대배양을 실시하였고 보유 및 수집된 8점(BN102, 105, 107, 109, 110, 113, 116, 120) 약(소포자)에서 유래된 1,000여 개체를 순화과정을 거쳐 2010년 9월 14일, 10월 8일, 11월 9일에 3중 난방시설하우스에 정식하였다. 정식된 1,000여 개체 중 임성이 있는 400여 개체 종자획득을 위해 뇌수분 및 개화수분을 실시하여 세대진전 하였고(그림 6-43), 수집된 8점 중 BN107을 제외한 7조합/품종에서 88계통, 선행연구로 얻어진 3점 (BN126, BN127, BN128)에서 유래된 62계통으로 총 150계통을 확보하였다(표 6-36), 연구기간동안 순도 확인 및 특성검사, 내병성 검정, 세대진전 및 조합용으로 연구 실험하였으며, 여기서 선발된 계통은 사업단과 연계하여 병 저항 유전자 발굴에 소재로 제공하였다.

표 6-36. 약(소포자) 배양 유래 우량계통 세대진전 확보내역

Mother plant	1st year line ($A_0^z-A_1^y$)	2nd year line ($A_1^y-A_2^x$)	3rd year line ($A_2^x-A_3^w$)	4th year line ($A_3^w-A_4^v$)
102	29	28	3	3
105	9	8	1	0
109	5	4	1	0
110	3	2	1	0
113	9	9	2	0
116	19	18	4	0
120	14	12	2	1
126	35	35	16	3
127	16	13	4	2
128	11	11	6	2
합계	150	140	39	11

^zA₀: Anther-derived original generation

^yA₁: Anther-derived firstly self-generation

^xA₂: Anther-derived secondly self-generation

^wA₃: Anther-derived thirdly self-generation

^vA₄: Anther-derived fourthly self-generation

㉠ F₂, F₃ 세대 약(소포자) 배양 유래 계통 확보: 1차년도에서 확보된 150계통 중 140계통 A₂세대진전 하였다(표 6-37). 140계통 모두 자연배가 된 2배체 순계통임을 시험 재배 포장에서 확인하였으며, 약배양에서 유래된 다양한 계통을 확인하였고 BS(뇌수분) 방식으로 인공교배를 실시하여 종자조제를 완료하였다. 계통육성을 위해 1차년도에 F₂ 분리개체를 선발하여 우수한 계통을 고정시킬 목적으로 연구를 진행하였으나 연구과제 평가 중 분리계통육성 보다는 F₂ 세대를 약배양을 통한 순계 육성(DH)을 자문을 통해 일시에 우량한 계통을 고정하는 것으로 2차년도부터 연구계획을 수정하였다. 고정된 계통을 얻기 위해 F₂세대 3조합/품종(BN104, 수집품종, BN105)을 모본으로 유래된 개체를 선발하여 약(소포자)배양을 실시하였으며(그림 6-43), 3조합/품종 소포자 배양 유래 중 59개 배발생에서 유래된 개체의 배수성을 검정하였다(Fig. 12, 13). 자연배가 된 2배체 발생비율은 1차년도 결과와 비슷한 62.1%로 나타났으며 141 개체 중 140계통을 확보하였다.

환경에 민감하지 않고 내병성과 내한성이 좋은 유럽계 F₃세대(2품종 분리계)와 품질이 우수한 일본 계(2품종 분리계) 와 중국에서 현재 시판되고 있는 녹롱 2호 품종의 F₂ 세대를 약(소포자)배양 모본으로 하여 약배양을 진행하였다. 배수성검정 및 순화과정과 세대진전(인공교배)과정을 통해 10품종/조합에서 A₂세대 140계통 중에서 내병성과 우량형질을 지닌 39계통을 선발하였다.



그림 6-43. 약(소포자)배양을 통한 다양한 (엽분, 모양, 숙기) A₂ 순계 확보

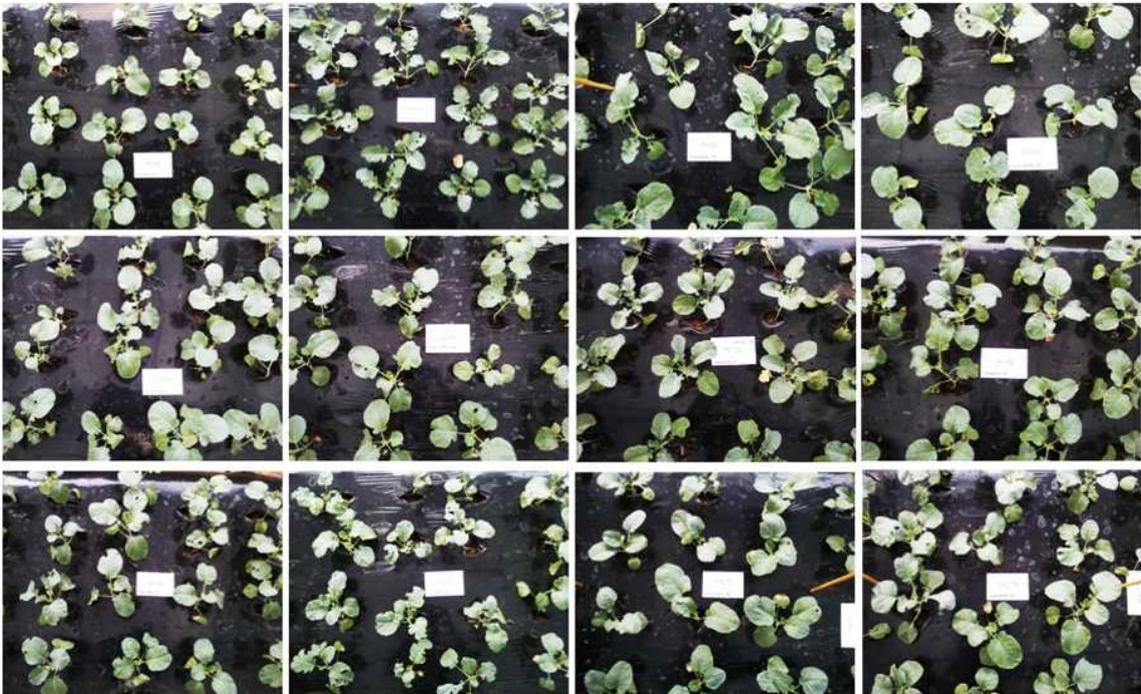


그림 6-44. BN 116 품종 유래 다양한 계통의 A₂ 세대

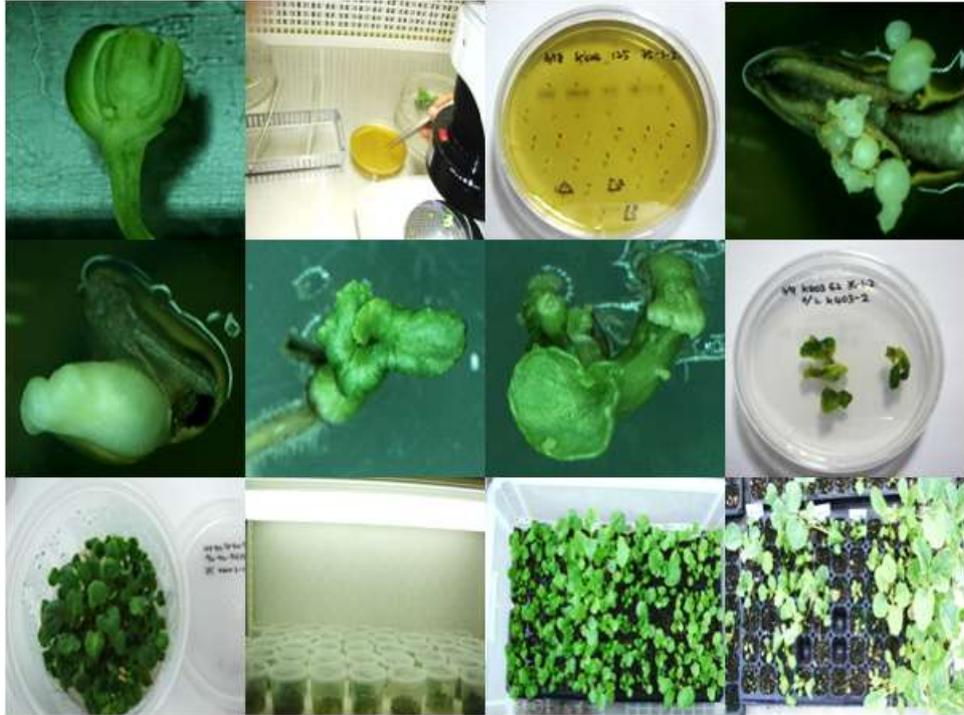


그림 6-45. 3품종 F₂, F₃ 약(소포자)배양 과정 (배 발생 및 순화)



그림 6-46. 3품종 F₂, F₃ 약유래 세대 계통확보

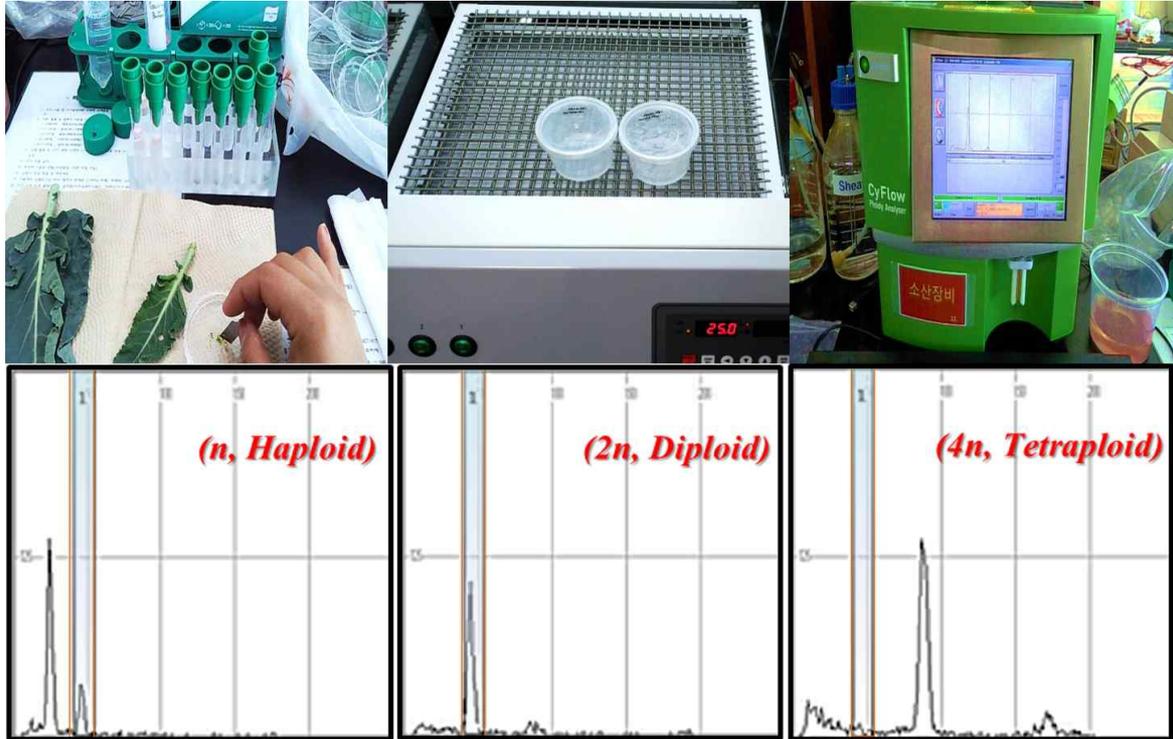


그림 6-47. 3품종 F₂, F₃ 약유래 세대 배수성 검정(n, 2n, 4n)

② 약유래 계통 세대진전 및 우수계통선발

㉠ 2차년도에서 선발된 39계통을 세대진전 및 조합작성을 하였고(표 6-36), F₂ 약유래 세대진전도 표 6-37과 같이 총 4계통이 진행하였다. 5품종 분리계에서 표 6-38과 같이 3품종에서 순화된 81개체에서 현재 6계통 세대진전을 통하여 종자를 확보하였다.

③ 약유래 우수계통 최종선발

㉠ 약배양 유래계통을 총 11계통으로 선발(표 6-36)하였으며, 우량계통을 확보함으로 조합하고자 하는 계통간의 품종가능성을 더욱 높이고자 하였다. 뿐만 아니라 F₂ 세대(4계통) 및 F₂, F₃세대(6계통)의 원예학적 형질 및 내병성 검증을 통하여 조합 가능성이 있는 계통을 선발(표 6-37, 6-38)하였으며, 조합 작성하여 현재 종자 조제하였다. 내병성을 가진 F₂, F₃세대 약유래 계통을 품종가능성여부를 두고 조합능력을 평가하고 있으나 조합하는 능력이 평균적으로 약하다고 판단되어 세대진전을 통해 유전자원을 유지할 지에 대한 여부를 5차년도 가을성능검정에서 재확인하였다(그림 6-48). 이는 F₁ 조합능력 뿐만 아니라 계통의 세대진전에서도 꽃가루가 잘 형성되지 않아 세대진전의 효율성이 현저히 떨어지는데 이는 세대가 진전될수록 계통을 유지하기 어려운 측면이 있어 현재의 계통으로는 연구를 진행하기 어렵다고 결정하여 도태하였다.

표 6-37. 3조합/품종 F₂ 세대 약유래 계통 세대진전 (2~5차년도)

Mother plant	Embryo genesis	The number of embryo	Acclimatization	Haploid doubling	4th year generation	5th year generation
403 F ₂	43	7	72	42	1	0
404 F ₂	78	42	115	73	1	0
405 F ₂	67	10	40	26	2	0
총계	188	59	227	141	4	0

표 6-38. 3조합/품종 F₂, F₃ 세대 약유래 계통 세대진전(2~5차년도)

Mother plant	The number of Anther	Embryo genesis	Line	Acclimatization	4th year generation	5th year generation
EU402 F ₃	2,100	28	902-6 2	22	0	0
JAK101 F ₂	1,275	20	904-2	43	6	0
CAK111 F ₂	1,125	3	905-3	16	0	0
총계	4,500	51		81	6	0



그림 6-48. F₂, F₃ 약유래 세대진전

마. 목표형질 관련 RIL 또는 F₂ 분리 집단 작성

① 양배추류 유전집단(F₁ 및 F₂) 양성

㉠ 유전집단 양성

ㄱ. 양배추류의 유전집단 양성 및 증식을 위해 한국생명공학연구원에서 수집 및 보유하고 있던 19계통을 2012년 8월 10일 파종·육묘 후 2012년 9월 19일에 정식하여 재배하였다. 각각의 계통들은 위황병, 내서성, 칼슘 결핍 둔/민감 및 흑부병 등의 특성 형질을 가진 계통들로 교배 조합을 이용한 유전집단 양성을 위해 재배·증식하였다(표 6-39). 현재 거의 모든 개체들은 교배(2013년 3월 16일 ~ 현재) 후 꼬투리 생성을 통한 종자 증식 과정을 거치고 있고(그림 6-49) CM01, CM02 계통은 발아가 되지 않았지만 아시아종묘(주) 생명공학육종연구소에서 보유하고 있던 유사 형질의 계통 3270, 3272로 대체하여 증식하였다. 또한 CM14는 정식 후 영양생장은 이루어졌지만 추대를 하지 못했고 CM18은 10개체 모두 발아를 하지 못했다.

표 6-39. 유전집단 계통의 증식

BN	계 통 명	형 질	파종립 수	개체수	종자증식 유·무
CM01	#14-KR 518(3270)*	위황병 강	5	0(1)	유
CM02	#15-OK 517(3272)*	위황병 강	10	0(1)	유
CM03	#103-MT-621	위황병 약	10	10	유
CM04	#17-JK	위황병 약	4	2	유
CM05	JK-2	위황병 약	5	2	유
CM06	#107-HO-154	내서성 강	10	5	유
CM07	#5-KK-146	내서성 강	10	10	유
CM08	#108-EB-8S8-7	내서성 약	10	9	유
CM09	#10-JK-JK-2	내서성 약	5	5	유
CM10	#105-RK-P6-1	내서 강, 위황병 강	10	8	유
CM11	#106-HY-164	내서 중, 위황병 약	10	7	유
CM12	#701 CT-12	칼슘 결핍 둔감	10	9	유
CM13	HRIGRU009386	칼슘 결핍 민감	10	9	유
CM14	케일FB	칼슘 결핍 민감	10	6	무(추대실패)
CM15	케일5333	칼슘 결핍 민감	10	7	유
CM16	Badger Inbred 16	흑부병강	식물체 2개	0	유
CM17	Bajrang	흑부병약	10	10	유
CM18	TO 1000	Rapid cycle	10	0	무(미발아)
CM19	225-52	양배추 우수계통	10	7	유

* #14-KR 518, #15-OK 517 계통의 고사로 인해 3270, 3272 계통으로 대체



그림 6-49. 유전집단 계통의 재배 및 증식 전경



그림 6-49. 유전집단 계통의 재배 및 증식 전경(계속)

ㄴ. 2013년도(4차년도)에는 양배추류의 유전집단 양성 및 증식을 위해 전년도 수집 계통 중 충분한 증식이 되지 못한 10계통과 전년도 교배조합 F1 종자를 2013년 8월 16일에 파종·육묘 후 2013년 8월 22일 정식하여 재배하였다. 각각의 계통들은 위황병, 내서성, 칼슘 결핍 둔/민감 및 흑부병 등의 특성 형질을 가진 계통들로 교배 조합을 이용한 유전집단 양성을 위해 재배·증식하였다. 또한 전년도 교배조합 종자(F1)는 F2양성을 위해 재배·증식하였다(표 6-40, 그림 6-50).

표 6-40. 유전집단 증식

BN	계통(조합)명	특징	파종 수	발아 수	증식 수	진행상황		비고
						교배일	교배수*	
M01	CM01	위황병 강	21	21	2	3/27	○ ○	
M02	CM01 × CM03	위황병 강 × 위황병 약	21	21	2	3/27	○ ○	F2 양성
M03	CM01 × CM04	위황병 강 × 위황병 약	5	5	2	4/3	○ ○	F2 양성
M04	CM01 × CM05	위황병 강 × 위황병 약	3	3	2	4/4	○ ○	F2 양성
M05	CM02	위황병 강	21	15	2	3/26	○ ○	
M06	CM02 × CM04	위황병 강 × 위황병 약	6	6	2	4/1	○ ○	F2 양성
M07	CM02 × CM05	위황병 강 × 위황병 약	21	21	2	4/1	○ ○	F2 양성
M08	CM04-2	위황병 약	21	14	2	4/1	○ ○	
M09	CM06 × CM08	내서성 강 × 내서성 약	21	17	2	3/27	○ ○	F2 양성
M10	CM06 × CM09	내서성 강 × 내서성 약	14	18	2	3/27	○ ○	F2 양성
M11	CM07 × CM09	내서성 강 × 내서성 약	12	1	1	3/17	○ ○	F2 양성
M12	CM11-4	내서성 중, 위황병 약	21	21	2	4/4	○ ○	
M13	CM12 × CM13	칼슘결핍둔감 × 결핍 민감	21	18	2	3/25	○ ○	F2 양성
M14	CM13-3	칼슘결핍민감	21	10	2	4/4	○ ○	
M15	CM14	칼슘결핍민감	21	21	2	4/4	○ ○	
M16	CM15 × CM13	칼슘결핍민감 × 결핍 민감	21	20	2	3/20	○ ○	F2 양성
M17	CM16	흑부병 강	21	19	2	4/1	○ ○	
M18	CM18	조숙(Rapid cycle)	20	0	0	4/7	○ ○	종자분양
M19	CM19-4	양배추 우수계통	21	19	2	4/1	○ ○	
M20	CM11 × CM10	내서성 중, 위황병 약 × 내서성 강, 위황병 강	21	20	2	3/27	○ ○	F2 양성
M81	CM17	흑부병 약	21	17	2	4/4	○ △	추대 늦음

* 교배(개)수 : ○(30개 이상), △(20-30개), ×(0개)

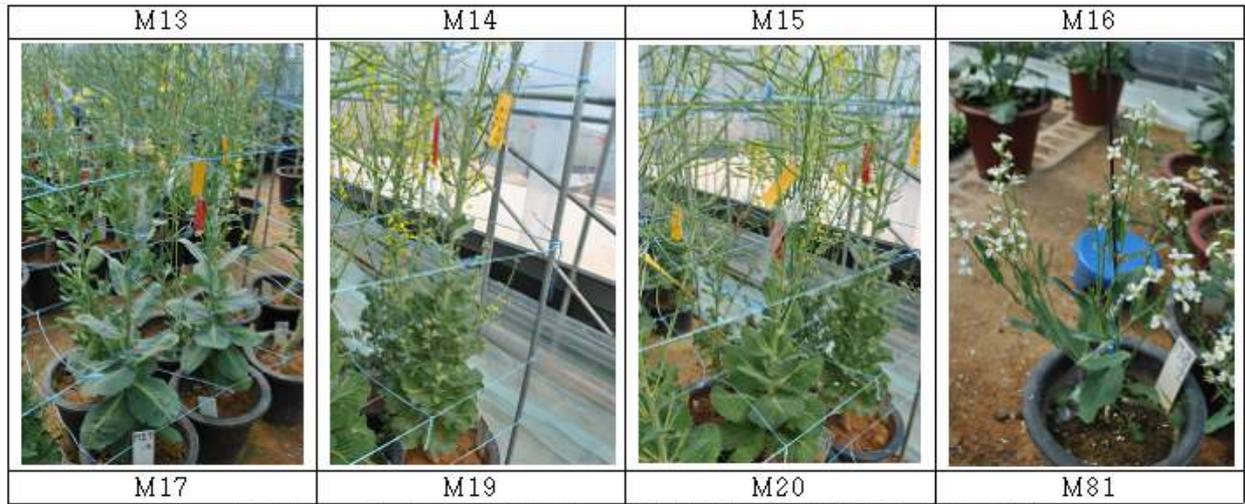


그림 6-50. 유전집단 계통 및 교배조합(F1)의 재배 및 증식 전경

② 유전집단 교배조합 및 F₁, F₂ 종자 생산

㉔ 2013년 봄에는 춘화처리를 거친 유전집단 19계통 중 위황병 저항성×위황병 감수성, 내서성 강×내서성 약, 칼슘 결핍 둔감×칼슘 결핍 민감, 흑부병 저항성×흑부병 민감성 등 목적형질에 부합하는 15 교배조합을 작성(표 6-41)하여 교배 후 종자 증식하였다.

표 6-41. 목적 형질 별 교배조합

교배번호	교 배 조 합	교 배 형 질	비고
101	3270 × #103-MT-621	위황병 강 × 위황병 약	F1
102	3270 × #17-JK		
103	3270 × JK-2		
104	3272 × #103-MT-621		
105	3272 × #17-JK		
106	3272 × JK-2		
107	#107-HO-154 × #108-EB-8S8-7	내서성 강 × 내서성 약	
108	#107-HO-154 × #10-JK-JK-2		
109	#5-KK-146 × #108-EB-8S8-7		
110	#5-KK-146 × #10-JK-JK-2		
111	#701 CT-12 × HRIGRU009386	칼슘결핍 둔감 × 칼슘결핍 민감	
112	케일FB × HRIGRU009386	칼슘결핍 민감 × 칼슘결핍 민감	
113	케일5333 × HRIGRU009386		
114	Badger Inbred 16 × Bajrang	흑부병 강 × 흑부병 약	
115	TO 1000 × 225-52	조숙 × 양배추 우수계통	

㉔ 위황병 저항성 × 위황병 민감성 6조합을 작성(표 6-42)하여 2013년 3월 16일 ~ 4월 24일까지 각각의 개화시기를 맞추어 Bud cross를 실시하여 F1종자를 생산·기탁하였다(그림 6-51).

표 6-42. 위황병 교배조합 및 채종

교배번호	교배조합	특성	교배방법	교배일	교배수	채종량	비고
101	3270 × #103-MT-621	위황병 강 × 위황병 약	Bud Cross	2013. 03.16.~ 04. 24	20	79	F1
102	3270 × #17-JK				17	21	
103	3270 × JK-2				15	10	
104	3272 × #103-MT-621				14	2	
105	3272 × #17-JK				16	22	
106	3272 × JK-2				27	250	

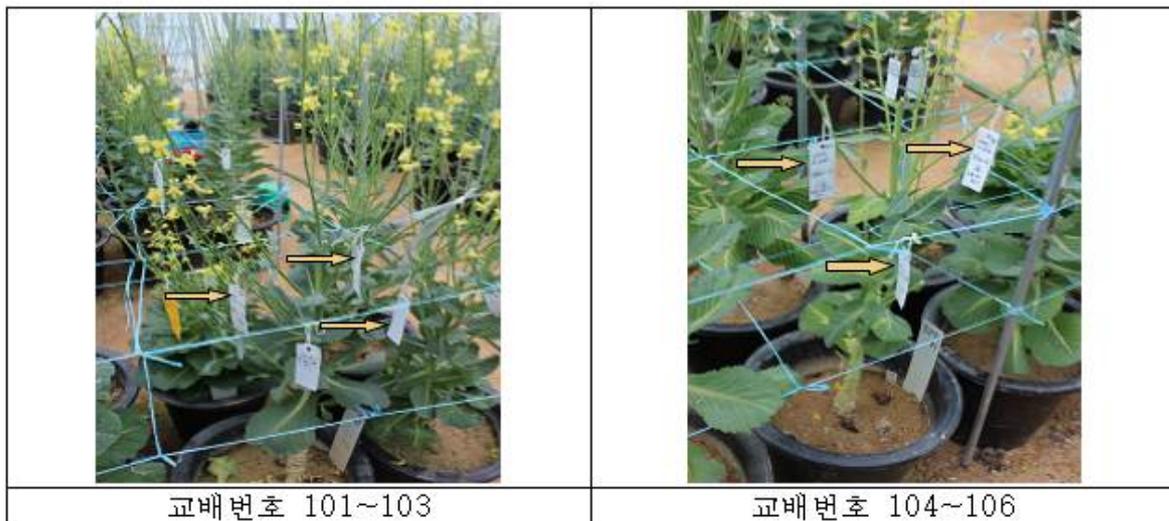


그림 6-51. 위황병 교배조합 교배 및 채종 (화살표 : 각각의 교배 조합)

㉔ 내서성 강 × 내서성 약 4조합을 작성(표 5)하여 2013년 3월 16일 ~ 4월 24일까지 각각의 개화시기를 맞추어 Bud cross를 실시하였다(그림 6-52). 4조합 중 107, 108, 109조합은 종자꼬투리를 형성하여 F1종자를 생산·기탁한 반면, 교배번호 109조합은 모계인 #5-KK-146 계통의 Bud가 부족하여 원종 증식만 수행하였고 Bud Cross 조합의 종자를 생산할 수 없었다.

표 6-43. 내서성 교배조합 및 채종

교배번호	교배조합	특성	교배방법	교배일	교배개수	채종량	비고
107	#107-HO-15 4 × #108-EB-8S 8-7	내서성 강 × 내서성 약	Bud Cross	2013. 03.16.~ 04. 24	31	150	F1
108	#107-HO-15 4 × #10-JK-JK- 2				22	54	
109	#5-KK-146 × #108-EB-8S 8-7				#5-KK-146 계통 Bud 부족		
110	#5-KK-146 × #10-JK-JK- 2				15	45	

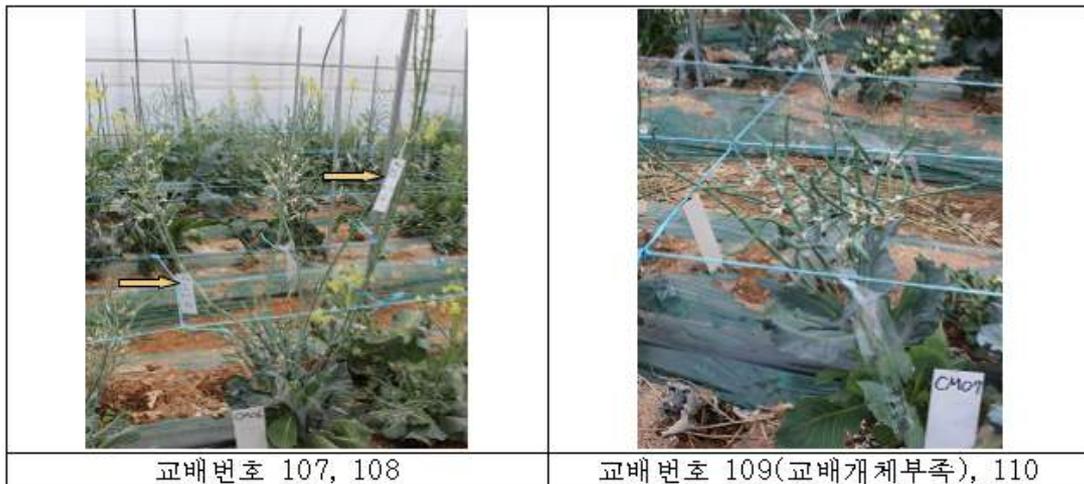


그림 6-52. 내서성 교배조합 교배 및 채종 (화살표 : 각각의 교배 조합)

- ㉔ 칼슘결핍둔감× 칼슘결핍민감, 칼슘결핍민감× 칼슘결핍민감 3조합을 작성(표 6-6) 하여 2013년 3월 16일 ~ 4월 24일까지 각각의 개화시기를 맞추어 Bud cross를 실시하였다(그림 6-53). 현재 3조합 중 111, 113조합은 종자꼬투리를 형성하여 5월 중으로 F1종자를 생산하여 기탁할 예정인 반면, 교배번호 112조합은 모계인 케일FB 계통의 추대가 이루어지지 않아 증식 및 교배 작업을 수행할 수 없었다.

표 6-44. 칼슘 결핍 민감/둔감 계통 교배조합 및 채종

교배번호	교배조합	특성	교배방법	교배일	교배개수	채종량	비고
111	#701 CT-12 × HRIGRU00938 6	칼슘결핍둔감 × 칼슘결핍민감	Bud Cros s	2013. 03.16.~ 04. 24	31	122	F1
112	케일FB × HRIGRU00938 6	칼슘결핍민감 ×			-	-	
113	케일5333 × HRIGRU00938 6	칼슘결핍민감			34	74	



그림 6-53. 칼슘결핍 민/둔감 교배조합 교배 및 채종 (화살표 : 각각의 교배 조합)

- ㉓ 흑부병 강 × 흑부병 약 교배 조합의 경우 모계인 Badger Inbred 16 계통이 종자가 아닌 식물체의 형태로 2012년 7월 23일 입고되어 2012년 9월 25일 ~ 10월 4일 사이에 교배를 완료하고 11개의 종자를 수확하였다. 초기 영양생장이 끝난 상황에 인계되어 저온처리를 통한 추대 시기를 앞당겨 수확한 종자를 다시 파종·재배하여 부계인 Bajrang과 교배시기를 맞출 계획이었으나 종자 수확 후 다시 재배할 기간이 짧아 차년도 재배를 통해 교배 조합을 확인하고 F1종자를 수확할 예정이다.
- ㉔ 조숙 × 양배추 우수계통 1조합의 경우 TO 1000 계통의 미발아로 인해 교배 조합을 확인할 수 없었고 차년도 연구를 통해 조합을 확인할 예정이다.
- ㉕ 2014년(4차년도) 봄에는 3차년도 연구 과제를 통해 작성한 15교배 조합 중 교배 및 채종이 되지 못한 3개 조합(교배번호 112, 114 및 115)을 재교배하여 채종하였다. 또한 3차년도에 조합 작성되어 교배한 F1 종자는 F2양성을 위해 재배·증식하였다.

표 6-45. 유전집단 교배 및 채종현황

교배번호	교배조합	특성	교배방법	교배일	교배수	채종량	비고
112	케일FB(M15) × HRIGRU009386(M14)	칼슘결핍 둔감 × 칼슘결핍 민감	Bud Cross	2014. 03.26 .~ 현재	42	100	F1
114	Badger Inbred 16(M17) × Bajrang(M81)	흑부병 강 × 흑부병 약			24	80	
115	TO 1000(M18) × 225-52(M19)	조숙 × 양배추 우수계통			60	150	

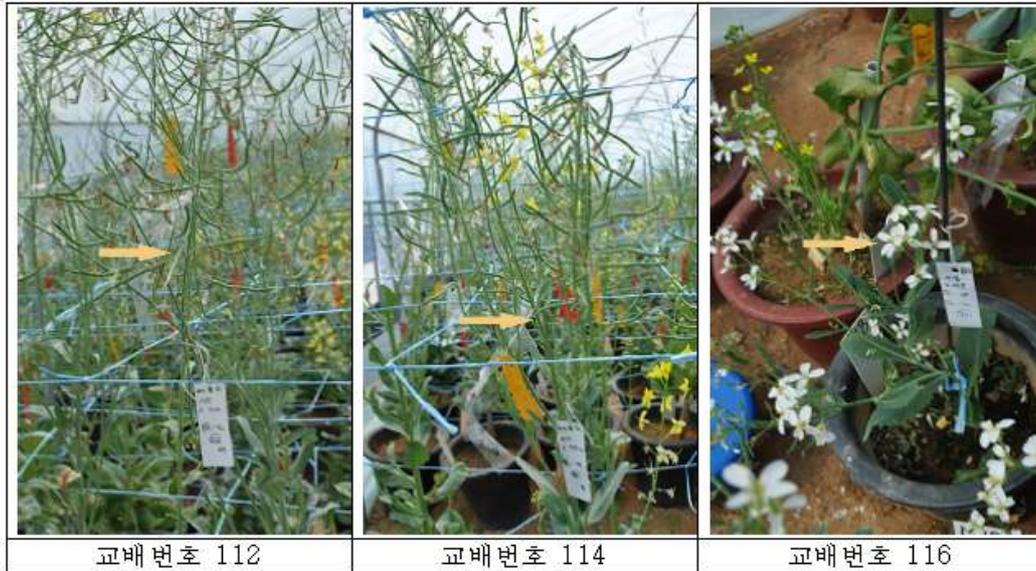


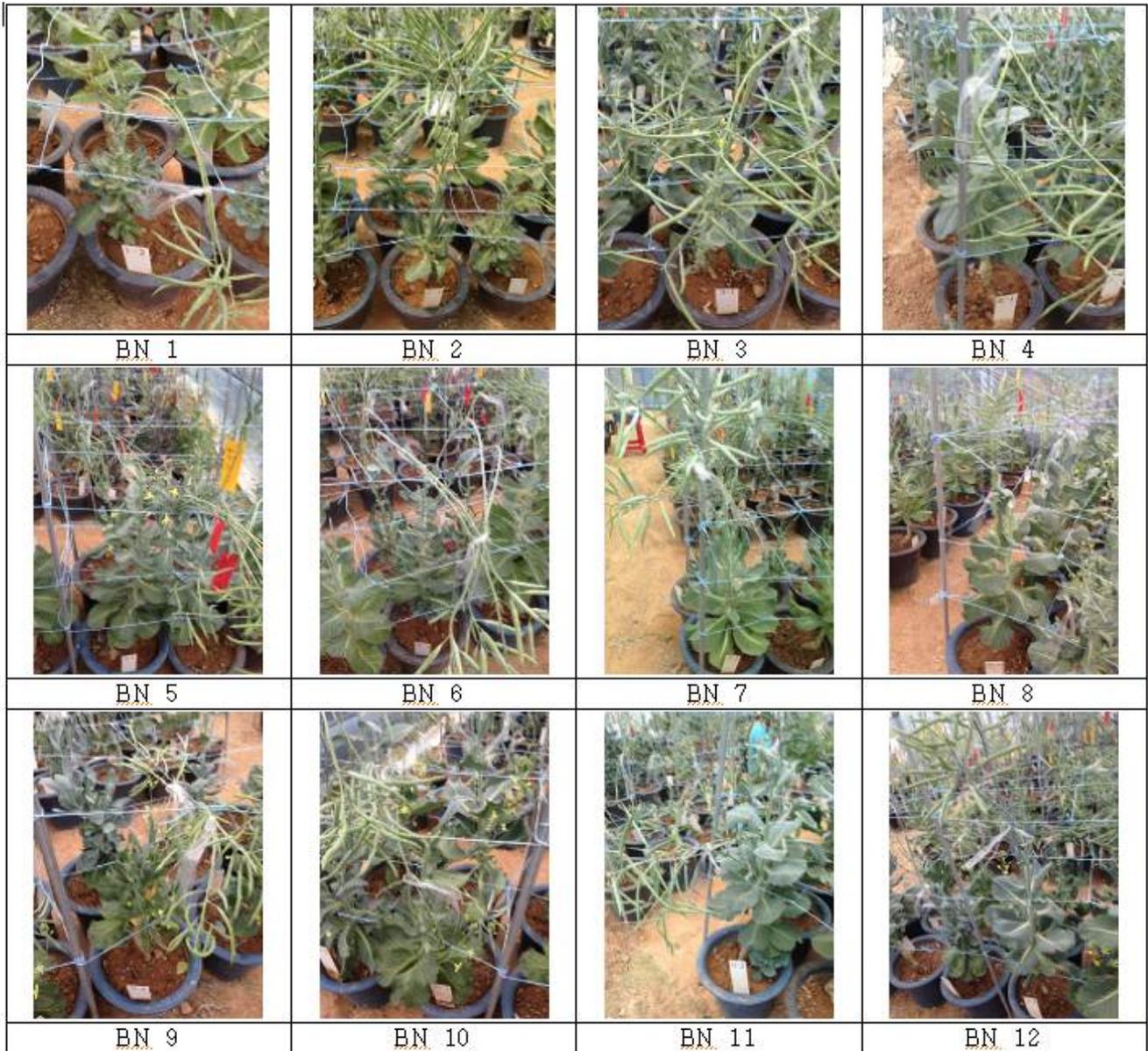
그림 6-54. 교배조합 교배 및 채종

㉠ 5차년도에는 3, 4차년도에 조합 작성·교배하여 채종한 F1, F2 종자의 F2, F3 종자 양성을 위해 2014년 8월 6일 파종하여 정식·재배하였다. 저온처리를 거친 개체들은 2015년 봄 교배를 통해 종자를 채종(표 6-46, 그림 6-47)하였고 채종된 F2 및 F3종자는 제1세부과제에 전달하였다.

표 6-46. 유전집단 교배조합 종자(F2 및 F3) 양성

BN	조합명	특징	교배일	채종량	비고
1	CM01 × CM03	위황병 강 × 위황병 약	4/2~4/6	600	F3 양성
2	CM01 × CM04	위황병 강 × 위황병 약	4/2~4/6	1200	F3 양성
3	CM01 × CM05	위황병 강 × 위황병 약	4/11	800	F3 양성
4	CM02 × CM04	위황병 강 × 위황병 약	4/11~5/4	350	F3 양성
5	CM02 × CM05	위황병 강 × 위황병 약	4/11~5/4	300	F3 양성
6	CM06 × CM08	내서성 강 × 내서성 약	4/17	900	F3 양성
7	CM06 × CM09	내서성 강 × 내서성 약	4/9~4/11	1000	F3 양성
8	CM07 × CM09	내서성 강 × 내서성 약	3/22~3/30	700	F3 양성
9	CM11-4	내서성 중, 위황병 약	4/11	50	증식 및 교배용
10	CM12 × CM13	칼슘결핍둔감 × 결핍 민감	4/11	1200	F3 양성
11	CM14 × CM13 (M15 × M14)	칼슘결핍민감 × 결핍 민감	4/15	2000	F2 양성
12	CM15 × CM13	칼슘결핍민감 × 결핍 민감	4/1~4/11	1000	F3 양성

13	CM16 × CM17 (M17 × M81)	흑부병 강 × 흑부병 약	4/18~4/28	800	F2 양성
14	CM18 × CM19 (M18 × M19)	조숙(Rapid cycle) × 양배추 우수계통	3/6~3/22	1500	F2 양성
15	CM11 × CM10	내서성 중, 위황병 약 × 내서성 강, 위황병 강	4/8	650	F3 양성



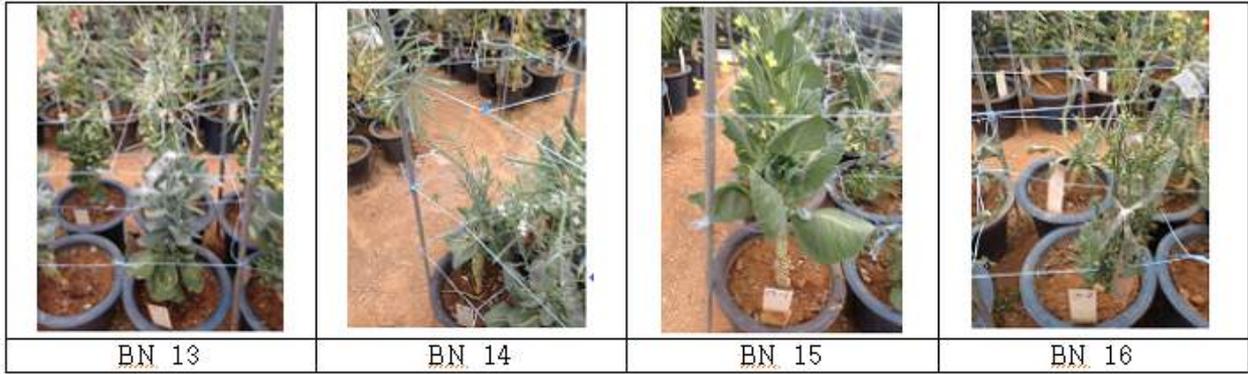


그림 6-55. 유전집단 교배조합 종자(F2 및 F3) 증식 전경

③ 유전집단 소포자 배양

㉠ 소포자 배양은 배추과 작물의 경우 무병주 생산, 생육연한 단축 및 염색체 배개로 4~6세대를 반복 고정된 동형접합체를 유기할 수 있는 효과를 기대할 수 있으며, 유용한 배추 유전자원을 육성하기 위해서 전통적인 교배 육종과 더불어 소포자 배양을 병행하는 것이 F1 양배추의 높은 순도와 뛰어난 저항성을 갖춘 신품종을 육성하는데 유리하다. 이런 이유로 양배추의 소포자 배양 기술을 이용하여 Doubled Haploid(DH)의 식물을 생산하기 위하여 F1 계통의 실험을 시작하였다. 실험은 개화가 시작된 Bud를 채취하여 화엽의 길이가 주두의 길이의 1/2~1/3 가량이 되는 화뢰 만을 선택하여 사용하였다. 활력을 위해 날씨가 맑은 오전 9~10시에 시료를 채취하였다. 화뢰들은 70% ethyl alcohol에 10초 정도 담갔다가 빼준다. Sodium Hypochlorite 1% 용액에 15분간 침지하고, 멸균된 증류수에 넣어 3분간 3회 Shaking 해주며 소독해준다. 살균된 시료를 막자사발에 1C 배지를 넣고 곱게 갈아 준 다음 sieve 45 μ m로 소포자를 걸러 주었다. 걸러진 소포자를 centrifuge tube 50ml에 넣고 1000rpm으로 3분간 3회 원심분리 해준다. Washing배지는 1C배지를 사용하였고, 생장배지는 NLN에 Sucrose 130g/L, NAA, BAP를 각각 0.5mg/ml, 1.0mg/ml 넣은 1, 2번 배지를 사용하였다. 소포자와 활성탄, 호르몬을 넣은 생장배지를 60 \times 15mm petridish 에 한 Bud당 2.5ml 씩 분주해 주고 랩과 parafilm을 이용하여 sealing 해준다. 30 $^{\circ}$ C, 32.5 $^{\circ}$ C에서 1, 2일간 암 처리 후 25 $^{\circ}$ C에서 17일간 암 배양을 해준다. 그 다음 Orbital shaker 80rpm에서 진탕 배양을 해주며 배 형성을 관찰하였고, 배가 나오면 발근 유도를 위해 MS배지에 옮겨 재분화를 유도하였다. 하지만 유전 집단의 경우 적은 종자로 인한 재배 개체수가 많지 않아 증식 및 조합을 위한 교배가 우선시 되었고, 발아 및 추대가 이루어지지 못한 개체를 제외한 19개 계통 중 2계통만이 소포자 배양 실험을 수행할 수 있었다. 소포자 배양을 수행한 CM12, CM17 계통 중 CM12만이 2번 배지, 32.5 $^{\circ}$ C에서 2일간 암 처리 암배양을 한 조건에서 배가 발생하였다(표 6-47, 그림 6-56).

표 6-47. 유전집단 소포자 배양결과

BN	계통명	배양 개수(petridish)	배지*	온도처리	배 발생	MS 치상
CM12	#701 CT-12	30	2	32.5°C 2d	2	1
CM17	Bajrang	30	2	30°C	-	-

* 1번배지: NLN+Sucrose13%+AgNO₃ 1.0mg/ml+NAA0.5mg/ml+BAP0.5mg/ml (PH6.0)
 2번배지: NLN+Sucrose13%+AgNO₃ 1.0mg/ml+NAA1.0mg/ml+BAP1.0mg/ml (PH6.0)



그림 6-56. 소포자 배양 과정 및 배 발생 사진

바. 양배추류 국제 표준 유전집단 증식

- ① 집단 'BoITBDH의 150DH계통 유전자원의 종자 증식
 - ㉠ 2011년 10월 1일에 5립씩 50공 플러그용 트레이에 파종하였음.
 - ㉡ 2011년 10월 6일에 발아율을 조사하였으며 평균 4.2립이 발아 하였음.
 - ㉢ 2011년 11월 12일 유전자지도 작성용 DNA 추출용 시료를 확보하면서 각 계통당 최대 3주씩 지름 15내지 20cm의 화분으로 이식하여 재배 하면서 나머지 식물은 4°C 저온고에서 춘화처리 시작하였음.
 - ㉣ 계통간의 차이는 있었으나 빠른 계통은 파종후 4주부터 별도의 춘화처리 없이 추대 및 개화하기 시작하였고 개화된 식물은 봉투를 씌워 자가수정을 유도 하였음 (그림 6-57).
 - ㉤ 총 152계통 중 149계통에서 교배 후 꼬투리 등숙 중 및 수확 후 종자 정선 중이며 3계통은 교배중임.



<그림 6-57. BoITBDH 집단의 교배진행 모습 (개화/교배/꼬투리 생성 후 등숙)>

② 유전자 지도 작성용 집단의 종자 증식

㉠ 영국의 HRI에서 분양 받은 집단 'BoITBDH의 150DH계통 유전자원의 종자 증식 및 집단의 부분, 모본인 'TO1000DH3'와 'Early Big', 약배양으로 생성한 분리집단 150계통 중 증식한 종자량이 부족한 것을 추가 증식하고자 하였다.

㉡. 2013년 9월 5일에 5립씩 50공 플러그용 트레이에 파종하였다.

㉢. 2013년 9월 27일에 각 계통당 3주씩 지름 18cm의 화분으로 이식하여 재배 하였으며 식물 생육 및 종자의 충실도를 높이고자 1-2차례 추비를 했다.

㉣. 계통간의 차이는 있었으나 별도의 춘화처리 없이 추대 및 개화하였고 개화된 식물은 봉투를 씌워 자가수정을 유도 하였다. 11월부터 교배를 진행하였으며 교배 후 꼬투리의 발달 및 생육이 부실한 계통에 대해서는 지속적으로 교배를 진행하였다.

㉤. 전년도에 교배 및 수확한 종자를 정선을 한 결과, 총 135계통에서 종자를 확보하였으며 이 중 11 계통에서는 10립 미만의 종자를 수확하였다(표 6-48). 추 후 연구에 사용하기 위해서 계통 당 100립 이상의 종자를 확보하고자 하였다. 종자확보를 목적으로 100립 미만인 62계통에 대해서 추가로 증식하고자 하였다(표 6-49). 기타 집단은 10월 말부터 교배를 시작하였으며 현재 종자 등숙 정도에 따라 꼬투리 수확 및 종자 건조를 하였다.

<표 6-48. 유전자지도 작성용 2014년 BoITBDH 집단의 종자 증식 완료 목록>

Line ID	종자수확				총립수	비고
	①	②	③	④		
TBDH 002	26	178	217		421	증식완료
TBDH 003	2	46	103		151	증식완료
TBDH 004	141				141	증식완료
TBDH 05.2	7	181			188	증식완료
TBDH 0064	10	91			101	증식완료
TBDH 007	8	131	462		601	증식완료
TBDH 011	83	88			171	증식완료
TBDH 016	226	299			525	증식완료
TBDH 028	92	456			548	증식완료
TBDH 031	14	218			232	증식완료
TBDH 034	79	257	321		657	증식완료
TBDH 036	2	21	68	215	306	증식완료
TBDH038.2	50	89			139	증식완료
TBDH 039	20	162			182	증식완료
TBDH 045	164	300			464	증식완료
TBDH 047	112	286			398	증식완료
TBDH 050	222	636			858	증식완료
TBDH 051	9	176	213		398	증식완료
TBDH 052	124	250			374	증식완료
TBDH 056	190	408	88		686	증식완료
TBDH 057	16	233	238		487	증식완료
TBDH 058	28	56	292		376	증식완료
TBDH 063	18	97			115	증식완료

Line ID	종자수확							총립수	비고
	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦		
TBDH 185	1	40	127					168	증식완료
TBDH 144	4	25	118					147	증식완료
TBDH 117	39	44	59					142	증식완료
TBDH 146.2	1	1	122					124	증식완료
TBDH 125	52	54						106	증식완료
TBDH 176	102	171	216					489	증식완료
TBDH 191	49	135						184	증식완료
TBDH 195	193							193	증식완료
TBDH 198	213	423						636	증식완료
TBDH 202	151	182	223	282				838	증식완료
TBDH 203	13	64	173					250	증식완료
TBDH 209	4	54	178					236	증식완료
TBDH 215	6	32	105	253				396	증식완료
TBDH 217	50	85	87					222	증식완료
TBDH 220	39	47	64					150	증식완료
TBDH 314	74	314						388	증식완료
TBDH 315	185	193						378	증식완료
TBDH 325	19	49	66					134	증식완료
TBDH 334	108	4						108	증식완료
TBDH 337	124							124	증식완료
TBDH 340	177							177	증식완료
TBDH 342	93	111						204	증식완료
TO1000DH3	4	7	27	55	57	10	145	399	증식완료

TBDH 066	1	22	345		368	증식완료	TBDH 221	561							561	증식완료
TBDH 073	50	143			193	증식완료	TBDH 223.2	573							573	증식완료
TBDH 078	2	71	112		185	증식완료	TBDH 234	48	167						215	증식완료
TBDH 080	23	94	398		515	증식완료	TBDH 242	1	174						175	증식완료
TBDH081.2	130	343	424		897	증식완료	TBDH 244	290	522						812	증식완료
TBDH 083	19	430			449	증식완료	TBDH 245	34	150	516					700	증식완료
TBDH093.2	11	31	134		176	증식완료	TBDH 251	171							171	증식완료
TBDH 103	10	92	410	653	1165	증식완료	TBDH 256	222							222	증식완료
TBDH 128	50	200	697		947	증식완료	TBDH 260	10	60	137	170	43			814	증식완료
TBDH 160	214	271	302		787	증식완료	TBDH 262	189	285						474	증식완료
TBDH 148	166	214	288		668	증식완료	TBDH 265	398	494	864					1756	증식완료
TBDH 179	9	591			600	증식완료	TBDH 266	72	105						177	증식완료
TBDH 157	161	190			351	증식완료	TBDH 269	542							542	증식완료
TBDH 097	4	67	269		340	증식완료	TBDH 271	1	7	179	235				422	증식완료
TBDH 099	1	5	321		327	증식완료	TBDH 275	11	101						112	증식완료
TBDH 118	1	37	267		305	증식완료	TBDH 282	131	243	330					704	증식완료
TBDH 138	141	154			295	증식완료	TBDH 286	5	75	403					483	증식완료
TBDH 127	18	23	246		287	증식완료	TBDH 287	28	165						193	증식완료
TBDH 187	77	157			234	증식완료	TBDH 296	40	168	305					513	증식완료
TBDH 105	231				231	증식완료	TBDH 298	26	71	131					228	증식완료
TBDH 110	15	19	57	101	192	증식완료	TBDH 303	73	366						439	증식완료
TBDH 147	33	147	2		182	증식완료	TBDH 307	147	220	329					696	증식완료

<표 6-49. 유전자지도 작성용 BoITBDH 집단의 2014년 2차 종자 증식 진행 목록>

Line ID	종자수확			총 립수	비고
	①	②	③		
Early Big				0	재배중
TBDH 021				0	종자 등숙
TBDH 027	4	31		35	종자 등숙
TBDH 033				0	종자 등숙
TBDH 035	3			3	종자 등숙
TBDH 037	7	66		73	종자 등숙
TBDH 042	2			2	종자 등숙
TBDH 046.2	2	25	29	56	종자 등숙
TBDH 048	1	4	4	9	종자 등숙
TBDH 049.2	86			86	종자 등숙
TBDH 053	4			4	종자 등숙
TBDH 061	56			56	종자 등숙
TBDH 072	3			3	종자 등숙
TBDH 094.2	1			1	종자 등숙
TBDH 095	25			25	종자 등숙
TBDH 096	7	11		18	종자 등숙
TBDH 100	3	6	40	49	종자 등숙
TBDH 101				0	종자 등숙
TBDH 102	11	8		19	종자 등숙
TBDH 104				0	종자 등숙
TBDH 106.2	5	24		29	종자 등숙
TBDH 107				0	종자 등숙

Line ID	종자수확			총 립수	비고
	①	②	③		
TBDH 155				0	종자 등숙
TBDH 156	15	18		33	종자 등숙
TBDH 159	26			26	종자 등숙
TBDH 162	4	17	20	41	종자 등숙
TBDH 164	10	81		91	종자 등숙
TBDH 181	12	24	51	87	종자 등숙
TBDH 182.2	22			22	종자 등숙
TBDH 183				0	종자 등숙
TBDH 197	4	2		6	종자 등숙
TBDH 199	17	24		41	종자 등숙
TBDH 200				0	종자 등숙
TBDH 238	28	30		58	종자 등숙
TBDH 247.2	54			54	종자 등숙
TBDH 248	52			52	종자 등숙
TBDH 255				0	종자 등숙
TBDH 261	5	49		54	종자 등숙
TBDH 264	2	6		8	종자 등숙
TBDH 267	15			15	종자 등숙
TBDH 278	25			25	종자 등숙
TBDH 285				0	종자 등숙
TBDH 290				0	종자 등숙
TBDH 293				0	종자 등숙

TBDH 109	9	13		22	종자 등숙
TBDH 112	6	8	61	75	종자 등숙
TBDH 113	10	78		88	종자 등숙
TBDH 122	7			7	종자 등숙
TBDH 126				0	종자 등숙
TBDH 137	16	33	35	84	종자 등숙
TBDH 139.3				0	종자 등숙
TBDH 142	1	18	32	51	종자 등숙
TBDH 151	1			1	종자 등숙

TBDH 310	12	25			37	종자 등숙
TBDH 312	40				40	종자 등숙
TBDH 320	21	41			62	종자 등숙
TBDH 323	31	52			83	종자 등숙
TBDH 328	11	32			43	종자 등숙
TBDH 329	1	43	47		91	종자 등숙
TBDH 330					0	종자 등숙
TBDH 335					0	종자 등숙
TBDH 345	2	5			7	종자 등숙

㉔ 2014년도에 2차 증식용 시료에서 종자를 수확하였다(표 6-50).

ㄱ. 종자확보를 목적으로 100립 미만인 62계통에 대해서 2014년도에 추가로 2차 증식하고자 하였다. 수확한 종자를 정선을 한 결과, 총 40계통에서 종자를 확보하였다.

㉔ 영국의 HRI에서 분양 받은 집단 'BoITBDH의 150DH계통 유전자원의 종자 증식 및 집단의 부분,모본인 'TO1000DH3'와 'Early Big', 약배양으로 생성한 분리집단 150계통 중 증식한 종자량은 확보하였으나, 발아력이 매우 저조하여 추가 증식하고자 하였다. 종자의 충실도를 높이고자 화분에 정식 및 관리할 때 아시아종묘의 자문을 통해 수행하였다.

ㄱ. 2014년 7월 25일에 5립씩 50공 플러그용 트레이에 파종하였다.

ㄴ. 2014년 8월 28일에 각 계통당 기본 1주씩, 'TBDH126'은 2주씩, 'TBDH093.2'와 'TBDH251'는 3주, TBDH256'은 4주씩 지름 25cm의 화분으로 이식하여 재배하였다. 식물 생육 및 종자의 충실도를 높이고자 객토와 상토 7:3으로 혼합한 토양에 이식하였으며 정식 후, 추대 전까지 1-2차례 추비를 했다.

ㄷ. 계통간의 차이는 있었으나 별도의 춘화처리 없이 추대 및 개화하였고 개화된 식물은 봉투를 씌워 자가수정을 유도하는 방법과 뇌수분을 동시에 진행 하였다. 11월부터 교배를 진행하였으며 교배 후 꼬투리의 발달 및 생육이 부실한 계통에 대해서는 지속적으로 교배를 진행하였다.

ㄹ. 2015년도에 수확한 종자를 정선을 한 결과, 총 125계통에서 종자를 확보하였다.이 중 11 계통에서는 100립 미만의 종자를 수확하였고, 100립 이상의 계통에서는 평균 526립의 종자를 수확했다(표 6-51).



<그림 6-57. BolTBDAH 집단의 종자 증식, 파종/생육/교배/수확>

<표 6-50. 유전자지도 작성용 2014년 2차 BolTBDAH 집단의 종자 증식 진행 목록>

Line ID	종자수확 자가수분					총 립수	비고
	①	②	③	④	⑤		
TBDH 021	211	136				347	증식완료
TBDH 033	7	10	19			36	증식완료
TBDH 037	423	48	125			596	증식완료
TBDH 046.2	51					51	증식완료
TBDH 048	40					40	증식완료
TBDH 049.2	184					184	증식완료
TBDH 061	177	201	24			402	증식완료
TBDH 064	84	34	367			485	증식완료
TBDH 072	470	14	31			515	증식완료
TBDH 095	475	155				630	증식완료
TBDH 100	11					11	증식완료
TBDH 104	113	114				227	증식완료
TBDH 106.2	166	159	156			481	증식완료
TBDH 109	352	111	22			485	증식완료
TBDH 113	160					160	증식완료
TBDH 126	34	11				45	증식완료
TBDH 137	44	348				392	증식완료
TBDH 139.3	14					14	증식완료
TBDH 142	12					12	증식완료
TBDH 147	262	205	136			603	증식완료
TBDH 159	159	16	27			202	증식완료
TBDH 162	19	4	5			28	증식완료
TBDH 181	85	214	130			429	증식완료
TBDH 183	76	121				197	증식완료
TBDH 197	306	414	182			902	증식완료

TBDH 199	87					87	증식완료
TBDH 238	169					169	증식완료
TBDH 248	196	4	250			450	증식완료
TBDH 261	115					115	증식완료
TBDH 264	178	142				320	증식완료
TBDH 270	26					26	증식완료
TBDH 285	29	46	151			226	증식완료
TBDH 290	33	66	58	37	298	492	증식완료
TBDH 293	67	33	29	9		138	증식완료
TBDH 310	12	24				36	증식완료
TBDH 320	50					50	증식완료
TBDH 323	361					361	증식완료
TBDH 328	251	15	154			420	증식완료
TBDH 329	86					86	증식완료

<표 6-51.. 유전자지도 작성용 2015년 BoITBDH 집단의 종자 증식 완료 목록>

Line ID	종자수확							총립수	비고
	뇌수분				자가수분				
	①	②	③	④	①	②	③		
TBDH 002	101	153			134			388	증식완료
TBDH 004	658				372			1030	증식완료
TBDH 005.2	14	111						125	증식완료
TBDH 007	206				163			369	증식완료
TBDH 011	138	186			140			464	증식완료
TBDH 028	512				285			797	증식완료
TBDH 031	44	15			22			81	증식완료
TBDH 034	124				5			129	증식완료
TBDH 036	15	218			238			471	증식완료
TBDH 037	24	73	108	45	54			304	증식완료
TBDH 038.2	190	139	105		154			588	증식완료
TBDH 039	35	39	63	129	142			408	증식완료
TBDH 045	58	45			151			254	증식완료
TBDH 046.2	28				56			84	증식완료
TBDH 048	110	10			12			132	증식완료
TBDH 049.2	170				70			240	증식완료
TBDH 050	123				50			173	증식완료
TBDH 051	177	49			146			372	증식완료
TBDH 052	37				21			58	증식완료
TBDH 056	127	25	21					173	증식완료
TBDH 057	342				251			593	증식완료
TBDH 058	43				57			100	증식완료
TBDH 061	461				152			613	증식완료
TBDH 063	118	43	141					302	증식완료
TBDH 064	174	34						208	증식완료
TBDH 066	478	285						763	증식완료
TBDH 072	16	15	215		70			316	증식완료
TBDH 073	308	100			179			587	증식완료
TBDH 078	334				301			635	증식완료
TBDH 080	340	528						868	증식완료
TBDH 081.2	218				110			328	증식완료

Line ID	종자수확							총립수	비고
	뇌수분				자가수분				
	①	②	③	④	①	②			
TBDH 117	165	70			32		267	증식완료	
TBDH 118	225				115		340	증식완료	
TBDH 122	75	130	172		53		430	증식완료	
TBDH 125	54	61			61		176	증식완료	
TBDH 126	15						15	증식완료	
TBDH 127	462	181			208		851	증식완료	
TBDH 128	469				252		721	증식완료	
TBDH 137	94	342			92		528	증식완료	
TBDH 138	249	406			151		806	증식완료	
TBDH 142	349				366		715	증식완료	
TBDH 144	215				106		321	증식완료	
TBDH 146.2	250	210			10		470	증식완료	
TBDH 147	243						243	증식완료	
TBDH 148	193	340			176		709	증식완료	
TBDH 156	61	108	112				281	증식완료	
TBDH 157	759	179			137		1075	증식완료	
TBDH 159	31	140			4	54	229	증식완료	
TBDH 160	180	153			112		445	증식완료	
TBDH 162	250	137	85		10		482	증식완료	
TBDH 164	226	867					1093	증식완료	
TBDH 176	151	27	26				204	증식완료	
TBDH 179	90	25			83		198	증식완료	
TBDH 181	133				79		212	증식완료	
TBDH 182.2	4				5		9	증식완료	
TBDH 183	233	337			38		608	증식완료	
TBDH 187	39	148	159				346	증식완료	
TBDH 191	81	13	130				224	증식완료	
TBDH 195	267				180		447	증식완료	
TBDH 197	33	22			1		56	증식완료	
TBDH 199	235	125			85		445	증식완료	
TBDH 202	168	496	98		28		790	증식완료	

TBDH 083	141	320						461	증식완료
TBDH 093.2	481				323			804	증식완료
TBDH 095	108	66						174	증식완료
TBDH 096	804				499			1303	증식완료
TBDH 097	259				80			339	증식완료
TBDH 099	244	82						326	증식완료
TBDH 100	461	283						744	증식완료
TBDH 102	399				72			471	증식완료
TBDH 103	314	352						666	증식완료
TBDH 105	1263							1263	증식완료
TBDH 106.2	26				55			81	증식완료
TBDH 109	336	243			338			917	증식완료
TBDH 110	11	70	45					126	증식완료
TBDH 112	114	79			13			206	증식완료

TBDH 209	383	381				222		986	증식완료
TBDH 215	556					228		784	증식완료
TBDH 217	16	26	13	65	83			203	증식완료
TBDH 220	195					113		308	증식완료
TBDH 221	63	215	30			263		571	증식완료
TBDH 223.2	562	652						1214	증식완료
TBDH 238	18	19	14					51	증식완료
TBDH 242	314	269						583	증식완료
TBDH 244	42	54				154		250	증식완료
TBDH 245	137					54		191	증식완료
TBDH 247.2	229	223						452	증식완료
TBDH 248	159	331				30		520	증식완료
TBDH 248	184							184	증식완료
TBDH 251	500					724		1224	증식완료

Line ID	증자수확								총 탑 수	비 고
	뇌수분					자가수분				
	①	②	③	④	⑤	①	②	③		
TBDH 256	732	482							1214	증식완료
TBDH 260	53	78				41			172	증식완료
TBDH 262	293	82				20	143		538	증식완료
TBDH 264	2	7	65	84	104				262	증식완료
TBDH 265	472	1247				743			2462	증식완료
TBDH 266	206	393	57			49			705	증식완료
TBDH 267	374					161			535	증식완료
TBDH 269	18	113	79	116					326	증식완료
TBDH 271	174	1323	224			315			2036	증식완료
TBDH 275	3					1			4	증식완료
TBDH 282	185	347	187						719	증식완료
TBDH 285	30	87	119	132	147	35			550	증식완료
TBDH 287	142	125	10			44			321	증식완료
TBDH 296	498	325				352			1175	증식완료
TBDH 298	196					19			215	증식완료
TBDH 303	386	617							1003	증식완료
TBDH 307	228					259			487	증식완료
TBDH 310	427					274			701	증식완료
TBDH 314	474	508							982	증식완료
TBDH 320	63								63	증식완료
TBDH 323	426								426	증식완료
TBDH 325	249	172							421	증식완료
TBDH 328	85	112				97			294	증식완료
TBDH 329	51	44							95	증식완료
TBDH 334	298					131			429	증식완료
TBDH 335	238					105			343	증식완료
TBDH 337	113	28	272	210		32			655	증식완료
TBDH 340	210					227			437	증식완료
TBDH 342	138	279							417	증식완료
TBDH 345	627								627	증식완료
Early Big	248	672							920	증식완료
TBDH 093.2-1	573					288			861	증식완료
TBDH 093.2-2	149	42							191	증식완료
TBDH 093.2-3	89	200							289	증식완료

TBDH 126-1	105							105	증식완료
TBDH 126-2	15							15	증식완료
TBDH 251-1	8	254						262	증식완료
TBDH 251-2	138	327	360					825	증식완료
TBDH 251-3	289	85						374	증식완료
TBDH 256-1	23					122		145	증식완료
TBDH 256-2	78					213		291	증식완료
TBDH 256-3	146							146	증식완료
TBDH 256-4	194							194	증식완료

7. 국내기반 형질전환 발현 시스템 구축

가. 양배추의 고효율 형질 전환 시스템 구축

① 배축법을 이용한 형질전환

㉠ 공시재료: 형질전환에 사용된 재료로는 아시아종묘(3-4세부)로부터 분양받은 양배추 3074계통(내서성이 강한 원형의 인도 수출용 계통), 621계통(구색이 녹색으로 원형의 중국 수출용 계통)과 녹색꽃양배추 42계통(만생종으로 화퇴 입자가 작고 치밀한 계통), 865계통(조생종으로 화퇴 입자가 작고 치밀한 계통), 코레곤(3-3세부)에서 분양받은 녹색꽃양배추 10GH06계통(조생종으로 돛형이며 화퇴 밀도는 중간 정도이며 위황병에 강한 계통), 10GH27계통(중만생종으로 화퇴 밀도는 강하며 위황병에 강한 계통), 10GH30계통(중생종으로 돛형이며 위황병에 강한 계통)을 이용하였다. Bacterial 계통은 *Agrobacterium tumefaciens* (EHA101)에 구축된 vector 6종을 형질전환시켜 사용하였다.

㉡ *Agrobacterium*의 배양: 저장(-80℃) 글리세롤 스톱을 꺼내어 항생제(Kanamycin 50mg·L⁻¹)가 들어 간 YEP 한천배지에 streaking하여 28℃, 암소에서 48시간 배양하였다. 4℃에 저장하였다가 절출 하루 전날 항생제(Kanamycin 50mg·L⁻¹)가 첨가된 YEP 액체배지 15ml에 완전한 colony를 접종한 후, 28℃, 180 rpm에서 진탕시켜 OD₆₈₀값이 0.9~1.0이 될 때까지 배양하였다.

㉢ 식물 형질전환 방법(배축법)

ㄱ. 종자멸균 및 파종: 티백(6cm×4.5cm)에 종자(200립 정도)를 넣어 봉한 다음 75% ethanol에 넣어 2분간 각반한 후 1% 차아염소산 용액에 15분간 각반하여 소독하였다. 그 다음 멸균수가 들어있는 비커에 티백을 옮기고 1분씩 3회 세척하였다. 티백을 샐레에 옮기고 3방향으로 메스를 이용해 자른 후, 한 개의 애그리포트에 18립 정도 1cm 간격으로 phytoagar 0.6%의 1/10 MS 배지[1/10 MS salts stock, 1/10 vitamins, pH 5.8]에 치상하였다. 치상한 종자는 22~25℃에서 16/8시간 일장으로 직광을 피하여 7일간 배양하였다.

ㄴ. 절출: 0.6%의 한천이 첨가된 MS-1[MS salt, MS vitamins, 200mg·L⁻¹ KH₂PO₄, 1mg·L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D), 3%(W/V) sucrose, pH 5.8]에 담배 현탁 배양액을 1.5ml씩 분주하고 간극이 생기지 않도록 잘 펼친 후 멸균한

- 여지를 공기가 들어가지 않도록 깔았다. 식물체를 애그리포트에서 핀셋으로 자엽을 잡고 취한 후 끊어지지 않도록 뽑아 샤프에 놓고 생장점을 완전히 제거했다. 배축을 5~7mm 정도로 자른 후 한 개의 샤프에 50절편씩 나열했으며 샤프는 써지컬 테이프로 봉해서 24시간 동안 25℃로 암소 배양하였다.
- ㄷ. 감염: *Agrobacterium*의 배양액이 탁하게 보인 후 OD값을 측정하였다. OD₆₈₀에서 1.0이 될 때까지 배양한 후 아세토시링곤을 포함한 액체 MS-1배지(pH 5.2) 9ml과 배양액 1ml를 샤프에 천천히 기울여 혼합하였다. 한 샤프당 배축 100분을 넣고 파라필름으로 봉한 후 실온에서 40 rpm으로 30분간 진탕 배양하였다. 배양 후 피펫으로 배지를 흡수하여 버리고, 배축 200분당 타올 1매를 사용하여 배축에 남은 *Agrobacterium* 배양액을 닦아내었다. 배축을 본래의 MS-1 배지에 50분씩 나누어 치상한 후 파라필름으로 봉한 뒤 3일간 25℃에서 암소 배양하였다.
- ㄹ. 캘러스 유도 배지에 계대: B5-1배지[B5 salts, B5 vitamins, 1mg·L⁻¹ 2,4-D, 3%(W/V) sucrose, 500mg·L⁻¹ carbenicillin, 0.6%(W/V) agar, pH 5.8]의 샤프 1매에 40분씩 나열하였다. 배축이 흑색을 띄거나 신장하였거나, 담배 현탁 배양액이 증식하여 여지위로 올라와도 관계없다고 판단되었다. Callus 유도 배지는 써지컬 테이프로 봉하여 25℃에서 16시간 일장으로 callus가 충분히 유도되도록 10일간 배양하였다.
- ㅁ. 재분화 배지에 계대: B5-BZ배지[B5 salt 및 vitamins, 3mg·L⁻¹ 6-benzylamino purine (BA), 1mg·L⁻¹ zeatin, 500mg·L⁻¹ carbenicillin, 50mg·L⁻¹ Kanamycin, 1%(W/V) sucrose, 0.6%(W/V) agar, pH 5.8]에 계대하였다. 샤프 1매당 배축을 30분씩 나열하였다. 계대배양은 7일 후에 1회, 14일 후에 2회씩 총 3회 실시하였다. AgNO₃는 최초 계대 배양 7일 동안만 첨가하였으며 항생제의 농도는 Kanamycin은 10mg·L⁻¹를 시작으로 10mg·L⁻¹씩 높여가며 최종적으로 50mg·L⁻¹까지 높여서 선발하였다. 2회째의 계대시는 21분, 3회째는 14분을 한 샤프에 나열하였다. Callus에서 신장해 있는 반투명인 신초, 컴팩트한 엽의 형을 하고 있지 않은 신초는 escaping이 많았다.
- ㅂ. 성숙 배지에 계대: 신초를 callus로부터 절출하여 B5-O배지[B5 salts 및 vitamins, 1%(W/V) sucrose, 50mg·L⁻¹ Kanamycin, 500mg·L⁻¹ carbenicillin, 0.6%(W/V) agar, pH 5.8]의 샤프 1매에 신초를 4~5개씩 치상하였다. 치상 후 써지컬 테이프로 봉하여 3주간 배양하였고, 3주가 지나도 자라지 않은 신초는 다시 한 번 B5-O 배지에 계대하였다.
- ㅅ. 발근 배지에 계대: B5-O배지에서 신장한 신초의 남아있는 callus를 완전히 제거한 후 B5-R[B5 salts 및 vitamins, 1mg·L⁻¹ indole-3-butyric acid(IBA), 3%(W/V) sucrose, 50mg·L⁻¹ Kanamycin, 500mg·L⁻¹ carbenicillin, 0.6%(W/V) agar, pH 5.8]배지에 계대하였다. B5-R에 옮길 때는 격자 상의 상처를 내어서 계대하는 등 근을 자르지 않도록 주의하였다. 3주가 지나도 발근하지 않는 경우는 callus가 남아 있을 가능성이 있는 신초이기 때문에 뿌리 부분을 잘라 새로운 B5-R배지에 옮겼다. 제초제 저항성 Bar gene/pBI121, 제초제 및 해충저항성

Cry IIA+Bar gene/pBI121, 병 저항성 Chi+Osm/pBI121 벡터를 도입한 형질 전환체들을 발근배지에 계대배양 하였으며, 발근된 식물체는 상토에 옮겨 심은 후 순화시켜 온실로 옮겼다(그림 7-1).

T0의 형질전환체 선발

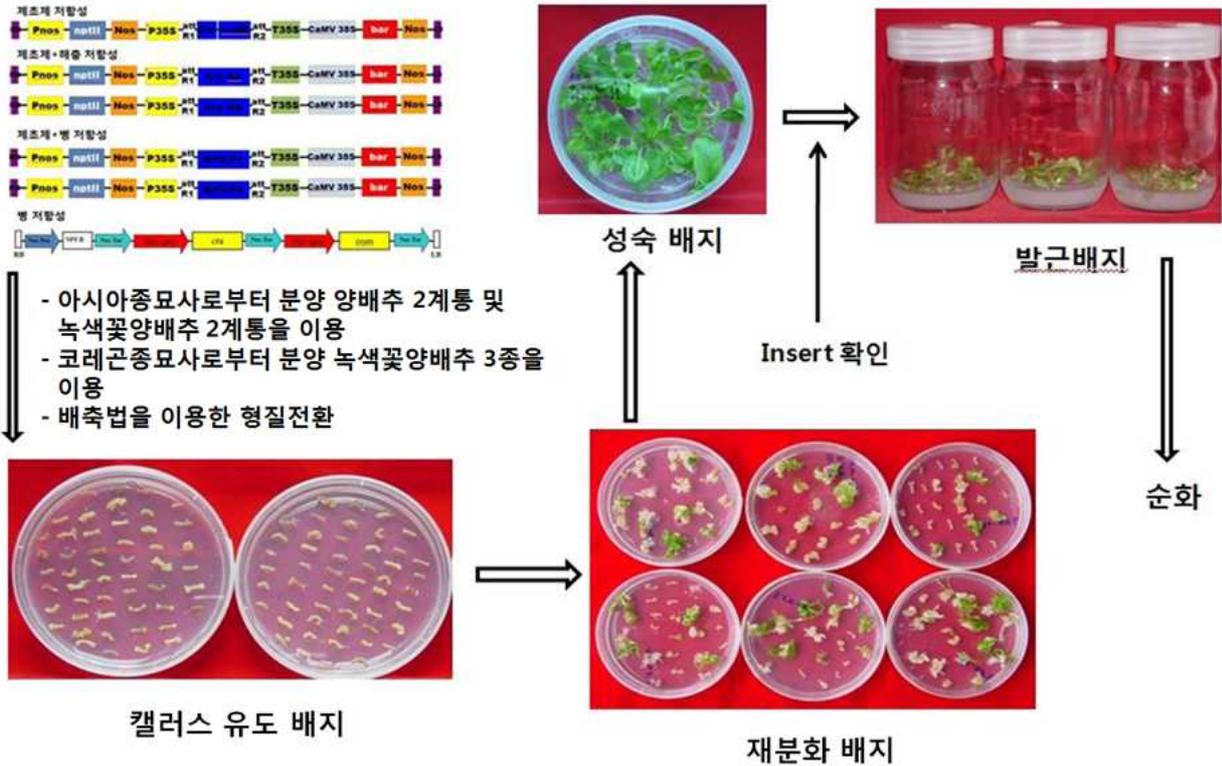


그림 7-1. 배축법을 이용한 형질전환 과정

㉔ PCR 분석에 의한 형질전환체의 확인

ㄱ. 제초제 저항성 Bar gene/pBI121, 제초제 및 해충저항성 Cry IIA+Bar gene/pBI121, 병 저항성 Chi+Osm/pBI121 벡터가 도입된 형질전환체(T0)의 유전자 도입 여부는 genomic DNA를 잎으로부터 추출하여 PCR분석에 의하여 확인하였다. genomic DNA를 추출하기 위하여 성숙배지에서 발근배지로 옮기는 과정에서 0.1g 정도의 잎을 채취하여 추출하였다. 제초제 저항성 Bar gene/pBI121가 도입된 형질전환체의 도입 유전자 확인을 위하여 Bar 유전자 영역의 Bar-F (5'-CAA GAT GGA TTG CAC GCA GG-3') 및 Bar-R (5'-GAA GAA CTC GTC AAG AAG GCG-3') primer를 합성하여 이용하였다. 해충 및 제초제 저항성 Cry IIA+Bar gene/pBI121가 도입된 형질전환체의 도입 유전자 확인을 위하여 Cry IIA 유전자 영역의 Cry IIA-F (5'-CAA GAT GGA TTG CAC GCA GG-3') 및 Cry IIA-R (5'-GAA GAA CTC GTC AAG AAG GCG-3') primer를 합성하여 이용하였다. 그리고 병 저항성 Chi+Osm/pBI121가 도입된 형질전환체의 도입 유전자 확인을 위하여 Osm 유전자 영역의 Osm-F (5'-CAA GAT GGA TTG CAC GCA GG-3') 및 Osm-R (5'-GAA GAA

CTC GTC AAG AAG GCG-3') primer를 합성하여 이용하였다. Bar gene/pBI121 벡터가 도입된 36개의 식물체에서 Bar 유전자 특이적 primer를 이용하여 PCR로 확인한 결과 21개의 식물체에서 Bar 유전자의 밴드가 확인되었다(그림 7-2A). Cry IIA+Bar gene/pBI121 벡터가 도입된 32개의 식물체를 Cry IIA 특이적 primer를 이용하여 PCR로 확인한 결과 13개의 식물체에서 Cry IIA 유전자의 밴드가 확인되었고(그림 7-2B), Chi+Osm/pBI121 벡터가 도입된 40개의 식물체를 Osm 유전자 특이적 primer를 이용하여 PCR로 확인한 결과 21개의 식물체에서 Osm 유전자의 밴드가 확인되었다(그림 7-2C).

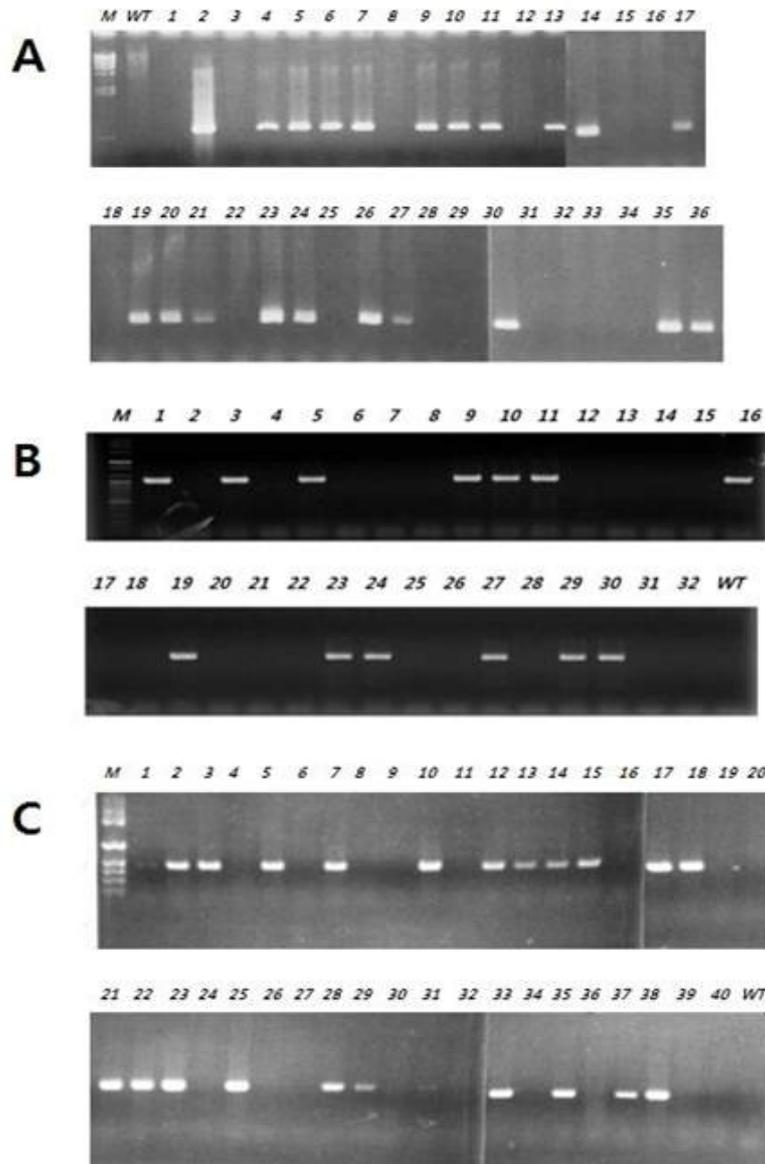


그림 7-2. PCR을 이용한 형질전환체의 도입유전자의 확인 (A) Bar gene/pBI121 벡터 도입, (B) Cry IIA+Bar gene/pBI121 벡터 도입, (C) Chi+Osm/pBI121 벡터 도입

② 고효율 녹색꽃양배추 및 양배추의 형질전환 시스템 개발

본 연구에서는 녹색꽃양배추 및 양배추의 복합저항성 형질전환체를 개발하기 위하여 1차년도에 제작한 강발현용 35S promoter에 해충 및 제초제 저항성 유전자를 도입한 벡터를 제작하여 녹색꽃양배추와 양배추에 배축법을 이용하여 형질전환을 시켰다. 그러나 녹색꽃양배추 및 양배추의 형질전환율이 낮아 새로운 형질전환 체계를 구축하였다. 이 새로운 형질전환체계는 자엽을 이용한 형질전환 시스템으로서 Prem과 Mohan이 2008년 Nature protocol에 발표한 방법이다. 이 형질전환법을 기본으로 하여 형질전환율을 더 높이기 위하여 호르몬 조성 등을 개발하여 새로운 형질전환 시스템을 구축하였다. 새로운 형질전환법은 다음과 같다(그림 7-3, 7-4).

가. 형질전환 절차

(1) 종자 파종 <1일 짜>

- ① 1.2% sodium hypochlorite에 20분간 종자를 소독한다.
멸균수로 5번 세척한다.
세척한 종자들을 필터 페이퍼에 놓아 물기를 말린다.
- ② Seed germination 배지에 종자를 치상하여 4일간 25℃에서 암 배양
(1L seed germination 배지
: 0.5×MS major salts, 0.5ml MS minor salt stock, 0.5ml CaCl₂ stock, 0.5 KI stock, 10g sucrose, pH 5.8, 4g phytigel)
- ③ 고체 LB(with antibiotic) 배지에 형질전환용 agrobacterium을 streaking하여 28℃에 이틀간 배양한다.

(2) Agrobacterium 배양 <3일 짜>

- ④ 고체 LB(with antibiotic) 배지에 streaking해 놓은 agrobacterium 중 single colony를 취하여 15ml 액체 LB(with antibiotic) 배지에 28℃에서 36시간 동안 250rpm에서 배양한다.

(3) 자엽 절단 및 감염 <4일 짜>

- ⑤ 현탁 배양한 agrobacterium을 5,500×g에서 10min간 RT로 원심분리한다.
- ⑥ 클린벤치 안에서 액체 LB 배지를 제거하고 MS minimal organic liquid 배지를 첨가하여 최종 OD₆₅₀이 0.05가 되도록 한다.
(1L MS minimal organic liquid 배지
: 1×MS major salts, 1ml MS minor salt stock, 2.9ml CaCl₂ stock, 1ml KI stock, 1ml vitamin stock, 20g sucrose, pH 5.8)
- ⑦ 자엽 밑 부분의 1~2mm 정도 부근을 예리한 메스로 절단한다. 단, 성장점이 들어가지 않도록 한다.
- ⑧ 자엽 절편을 agrobacterium suspension에 30초 동안 담구어 감염시킨다.
- ⑨ 자엽 절편을 필터 페이퍼에 놓아 agrobacterium suspension이 붙은 부분을 살짝 건조시킨다.

- ⑩ 자엽 절단면이 Cocultivation 배지에 수직이 되도록 하여 심는다. 25°C의 dim light(약 600 lux)에서 2일간 배양한다.

(1L Cocultivation 배지

: 1×MS major salt, 1ml MS minor salt stock, 2.9ml CaCl₂ stock, 1ml KI stock, 1ml vitamin stock, 20g sucrose, pH 5.8, 5mg AgNO₃, 0.75mg BAP, 0.2mg NAA, 0.01mg GA₃)

(4) Callus 유도 <6일 짜>

- ⑪ 자엽 절편을 Callus induction 배지에 옮겨 25°C의 dim light에서 7일간 배양한다.

(1L Callus induction 배지

: 1×MS major salts, 1ml MS minor salt stock, 2.9ml CaCl₂ stock, 1ml KI stock, 1ml vitamin stock, 20g sucrose, pH 5.8, 5mg AgNO₃, 0.75mg BAP, 0.2mg NAA, 0.01mg GA₃, 0.5g carbenicillin)

(캘러스 유도를 위하여 dim light지만 이보다 더 적은 양의 광을 주어 지상부보다 캘러스가 더 잘 자라도록 하였다.)

(5) Shoot 유도 <13일 짜>

- ⑫ 자엽 절편을 Shoot initiation 배지에 옮겨 25°C의 light(16h, ~3,300 lux)에서 4주간 배양한다. 2주 후에 한 번 더 계대배양 한다.

(1L Shoot initiation 배지

: 1×MS major salts, 1ml MS minor salt stock, 2.9ml CaCl₂ stock, 1ml KI stock, 1ml vitamin stock, 20g sucrose, pH 5.8, 5mg AgNO₃, 0.75mg BAP, 0.2mg NAA, 0.01mg GA₃, 0.5g carbenicillin, 25mg antibiotic)

(6) Shoot 성장 <41일 짜>

- ⑬ 자엽 절편을 Shoot outgrowth 배지에 옮겨 25°C의 light(16h, ~3.300 lux)에서 2주간 배양한다.

(1L Shoot outgrowth 배지

: 1×MS major salts, 1ml MS minor salt stock, 2.9ml CaCl₂ stock, 1ml KI stock, 1ml vitamin stock, 20g sucrose, 40mg adenine hemisulfate, 0.5g PVP 40,000, pH 5.8, 0.0125mg BAP, 0.5g carbenicillin, 25mg antibiotic)

(7) 형질전환체 선발 <55일 짜>

- ⑭ 자엽 절편에서 자엽과 캘러스를 완전히 제거 한 후에 Transformant selection 배지에 옮겨 25°C의 dim light에서 2주간 배양한다.

(1L Transformant selection 배지

: 1×MS major salts, 1ml MS minor salt stock, 2.9ml CaCl₂ stock, 1ml KI stock, 1ml vitamin stock, 10g sucrose, 40mg adenine hemisulfate, 0.5g PVP 40,000, pH 5.8, 0.0125mg BAP, 0.5g carbenicillin, 50g antibiotic)

(8) 뿌리 유도 <69일 짜>

- ⑮ 살아남은 shoot를 Root initiation 배지에 옮겨 25°C의 light(16h, ~3,300 lux)에서 2주간 배양한다. 이때 다시 한 번 자라난 캘러스를 완전히 제거한다.

(1L Root initiation 배지

: 0.5×MS major salts, 0.5ml MS minor salt stock, 1.95ml CaCl₂ stock, 0.5ml KI stock, 10g sucrose, pH 5.8, 0.1mg IBA)

(뿌리 유도를 위하여 적은 농도의 IBA를 첨가하고, carbenicillin을 첨가하지 않는다.)

(9) 순화 <83일 짜>

- ⑯ 뿌리가 잘 자란 식물체를 토양으로 옮겨 1주일 간 비닐봉지를 씌워 습도 조건을 유지하면서 순화시킨다.

(10) 춘화처리 <90일 짜>

- ⑰ 5°C에서 약 1개월간 처리 후 개화를 유도한다.

◆ Stock solutions

- 1L 10×MS major salts (store : 4°C)

: 16.5g NH₄NO₃, 19g KNO₃, 3.7g MgSO₄·7H₂O, 1.7g KH₂PO₄, 430mg ferric-EDTA

- 100ml MS minor salts (store : -20°C)

: 620mg boric acid, 2.23g MnSO₄, 860mg ZnSO₄·7H₂O, 25mg Na₂MoO₄·2H₂O, 2.5mg CuSO₄·5H₂O, 2.5mg CoCl₂·6H₂O

- 100ml Vitamin stock (store : -20°C, up to 3~4months)

: 0.1g nicotinic acid, 1g thiamine hydrochloride, 0.1g hydrochloride, 10g myo-inositol

- 100ml CaCl₂ stock (store : 4°C, up to 3~4months) : 15g CaCl₂·2H₂O

- 100ml KI stock (store : 4°C, up to 1~2months, dark glass bottle) : 75mg KI

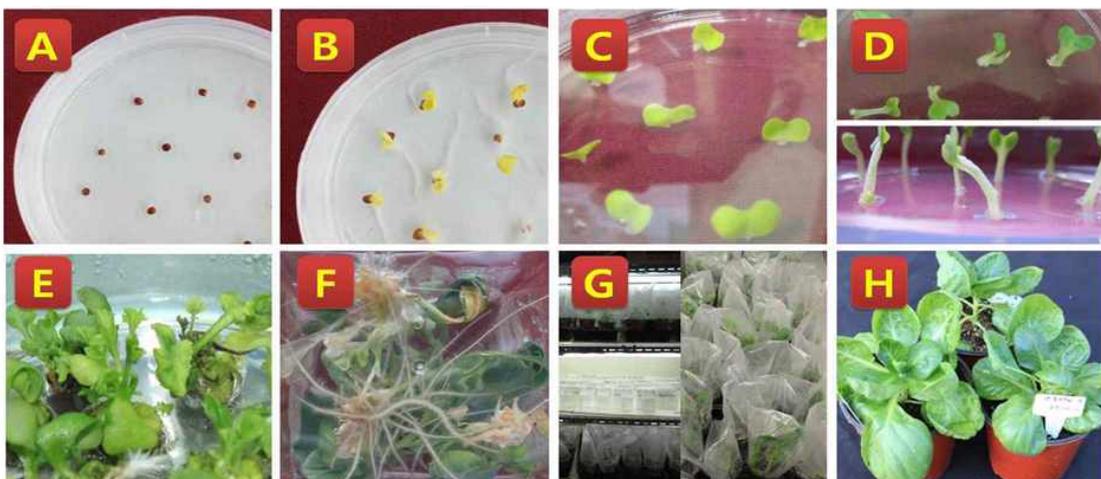


그림 7-3. 자엽법을 이용한 형질전환 과정

(A:종자파종, B:파종 후 4일째의 식물체, C:공동배양, D:캘러스 유도, E:슈트 성장, F:뿌리 유도, G:순화, H:온실로 나온 식물체)

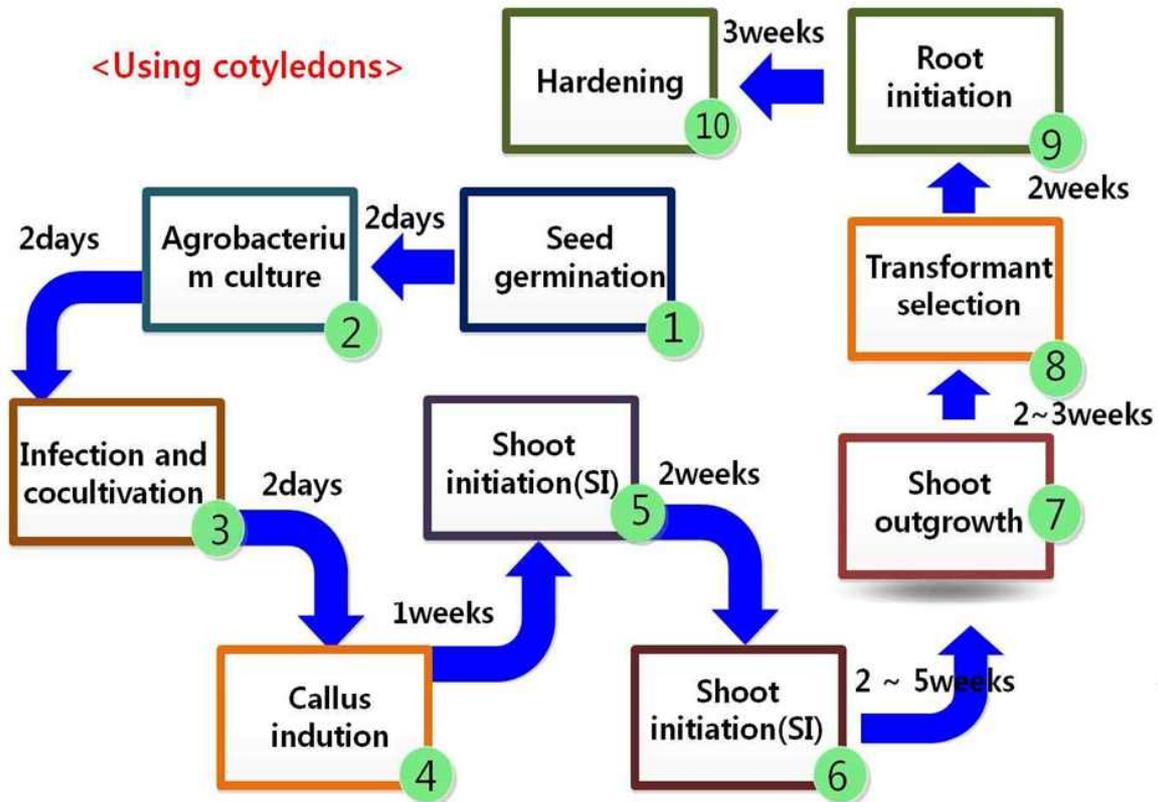


그림 7-4. 새로 개발된 형질전환 실험단계 모식도(자엽 이용법)

나. 자엽법을 이용한 녹색꽃양배추 및 양배추의 형질전환을 검정

본 연구에서 개발한 “자엽을 이용한 형질전환을 검정”에 사용된 재료로는 아시아종묘(3-4세부)로부터 분양받은 양배추 고정계통 3074(내서성이 강한 원형의 인도 수출용 계통), 621(구색이 녹색으로 원형의 중국 수출용 계통)와 녹색꽃양배추 고정계통 B42(만생종으로 화뢰 입자가 작고 치밀한 계통), B865(조생종으로 화뢰 입자가 작고 치밀한 계통) 및 코레곤(3-3세부)에서 분양받은 녹색꽃양배추 고정계통 10GH06(조생종으로 돛형이며 화뢰 밀도는 중간 정도이며 위황병에 강한 계통), 10GH27(중만생종으로 화뢰 밀도는 강하며 위황병에 강한 계통), 10GH30(조생종으로 돛형이며 위황병에 강한 계통)을 이용하였다. 먼저 새롭게 개발된 형질전환 시스템에 의하면 형질전환은 각 계통에 따라서 차이를 나타내었다. 아시아종묘로부터 분양 받은 양배추 C621 및 C3074 계통의 형질전환율은 3.8~4.4% 이었고, 녹색꽃양배추 B42, 10GH06, 10GH27 및 10GH30 계통의 형질전환율은 5.6~8.7%로 매우 높았다. 단, B865 계통은 1.8%로 매우 낮은 형질전환율을 나타내었다(표 7-1). 따라서 본 연구에서 새롭게 개발된 형질전환 시스템은 녹색꽃양배추 및 양배추에 있어서 배축법을 이용한 형질전환을 보다 훨씬 높은 형질전환율을 나타내었으며 또한 배축법을 이용한 형질전환 시스템보다 오염율이 현저히 낮았다. 따라서 자엽을 이용한 형질전환은 녹색꽃양배추 및 양배추의 형질전환체 작성을 위한 매우 좋은 형질전환 시스템임을 확인하였다.

표 7-1. 종묘회사로부터 분양받은 녹색꽃양배추 및 양배추 계통의 형질전환을 검정

계통명	자엽 절편체 수	선발된 형질전환체 수	형질전환율 (%)	도입유전자
C621	500	22	4.4	CraIIA+Bar
C3074	500	19	3.8	CraIIA+Bar
B42	600	52	8.7	CraIIA+Bar
B865	450	8	1.8	CraIIA+Bar
10GH06	450	26	5.8	CraIIA+Bar
10GH27	600	47	7.8	CraIIA+Bar
10GH30	450	25	5.6	CraIIA+Bar

다. 녹색꽃양배추 및 양배추의 해충 및 제초제 저항성 형질전환체 작성 및 육성: 형질전환에 사용된 재료로는 시중에 판매되고 있는 양배추 YR Hero 품종, 3074계통, 621계통과 녹색꽃양배추 B42계통, B865계통, 10GH06계통, 10GH27계통, 10GH30계통으로 총 8 품종/계통을 이용하였으며, 형질전환용 벡터로는 CraIIA+Bar와 Bt9+Bar 유전자(해충 및 제초제 저항성 유전자)를 가진 벡터를 이용하였다. 이들 재료 및 벡터를 이용하여 개발된 자엽법 형질전환 시스템에 의해 형질전환체를 작성하였다. 형질전환체는 1차적으로 callus 유도 배지 및 shoot 성장 배지에 항생제를 첨가하여 도입유전자가 삽입된 형질전환체 만을 선발하였다(항생제 무선택용 벡터를 이용한 형질전환체는 제외). 선발된 형질전환체는 2차적으로 도입된 각 유전자별 특이적 primer를 이용하여 도입유전자의 유무를 PCR로 확인한 결과, 각 계통별로 random으로 선발된 형질전환체는 모두 도입유전자가 확인되었다. 또한 이들 형질전환체로부터 RNA를 추출하여 도입유전자의 발현 여부를 RT-PCR로 확인한 결과, 도입유전자들이 발현되고 있음을 확인하였다.



Explants in shooting medium



Transgenic plantlets in rooting medium



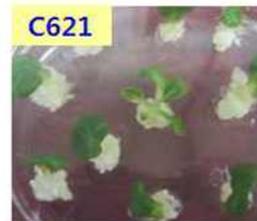
Acclimatization in phytotrone



Transgenic plants in green house

그림 7-5. 자엽법을 이용한 녹색꽃양배추 및 양배추의 형질전환 과정

Cabbage from Asia Seed Co.



Broccoli from Asia Seed Co.



Broccoli from Koregon Seed Co.



그림 7-6. 녹색꽃양배추 및 양배추 계통별 callus 유도

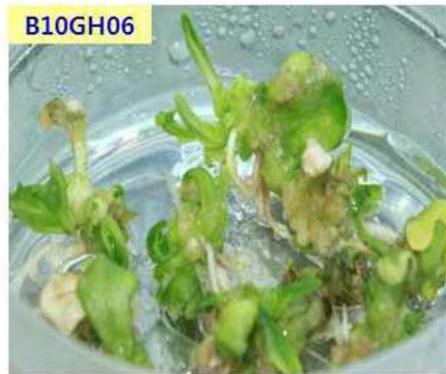


그림 7-7. 녹색꽃양배추 및 양배추 계통별 shoot 성장

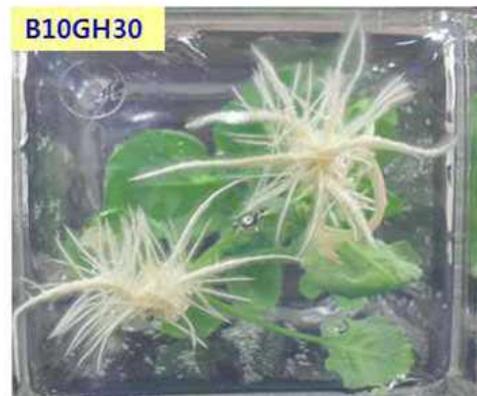


그림 7-8. 녹색꽃양배추 및 양배추 계통별 뿌리 유도

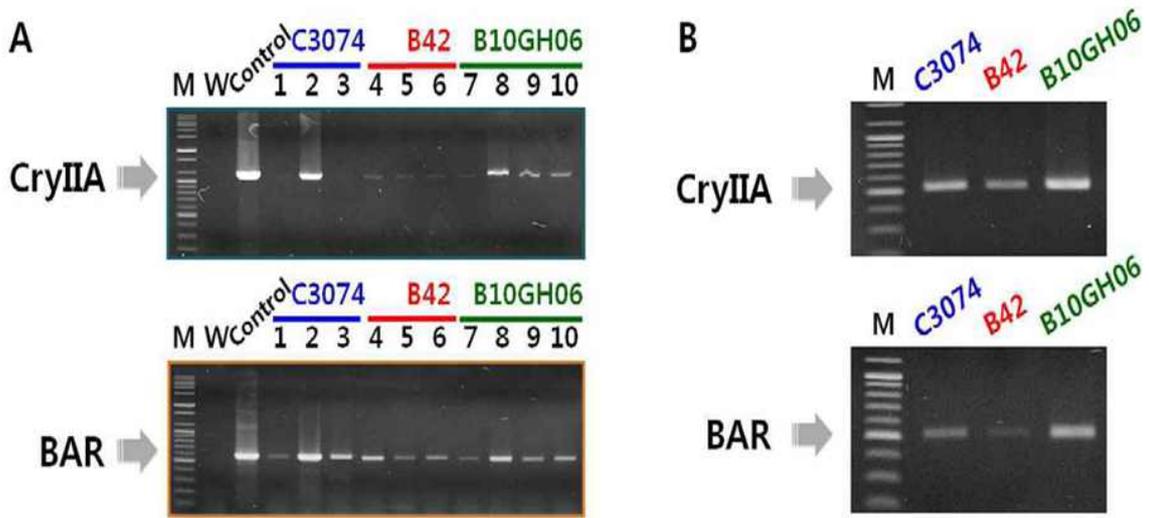


그림 7-9. 도입된 유전자들의 삽입 및 발현 분석



그림 7-10. 온실에서 육성 중인 각 유전자가 도입된 양배추 및 녹색꽃양배추의 형질전환체(T0)

라. 재분화율이 높은 녹색꽃양배추 및 양배추의 계통 선발: 재분화율을 조사하기 위하여 사용된 재료로는 녹색꽃양배추 계통 B42, B865, 10GH06, 10GH27, 10GH30 등으로 5 계통, 양배추 계통 C621, C3074 등으로 2계통을 아시아종묘, 코레곤종묘로부터 분양 받아 사용하였다. 이와 같은 7계통을 가지고 재분화율을 조사 해본 결과 재분화율이 녹색꽃양배추에서는 B42 계통이 88%로 가장 높았으며 10GH06 계통과 10GH27 계통도 각각 65.2%와 50%로 비교적 높은 재분화율을 나타내었다. 양배추에서는 C3074 계통이 71.4%로 재분화율이 가장 높았으며, C621 계통이 33.3%로 나타났다. 따라서 형질전환용으로서 녹색꽃양배추의 B42 계통 및 양배추의 C3074 계통이 가장 적합할 것으로 판단되었다(그림 7-11).

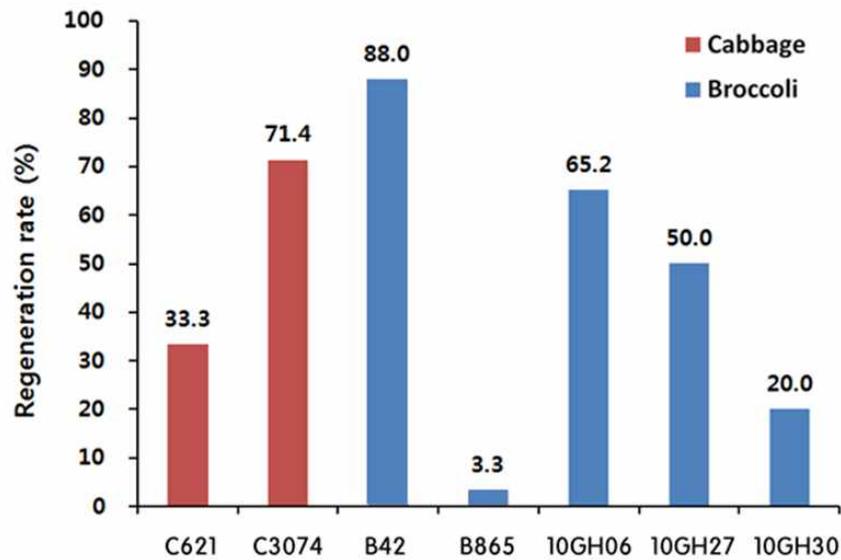


그림 7-11. 녹색꽃양배추 및 양배추의 계통 간 재분화율(%)

마. 녹색꽃양배추 및 양배추 형질전환체의 single copy 식물 선발

형질전환시킨 녹색꽃양배추 및 양배추로부터 수확된 T1종자를 받아 항생제(kanamycin)가 들어간 배지에서 선발을 하여 유전자가 1 copy가 들어간 식물체를 선발하였다. 처음에는 T1종자를 kanamycin 농도 100mg/L에 선발하였지만 배지에서 모두 살아남아 kanamycin 농도를 2배 높인 200mg/L에서 3:1로 분리되는 1 copy인 Line을 선발하였으며, 또 다른 녹색꽃양배추 및 양배추 형질전환체들을 동일한 200mg/L 농도에서 형질전환체 재확인 및 분리비를 확인하였다(그림 7-12, 7-13, 7-14)

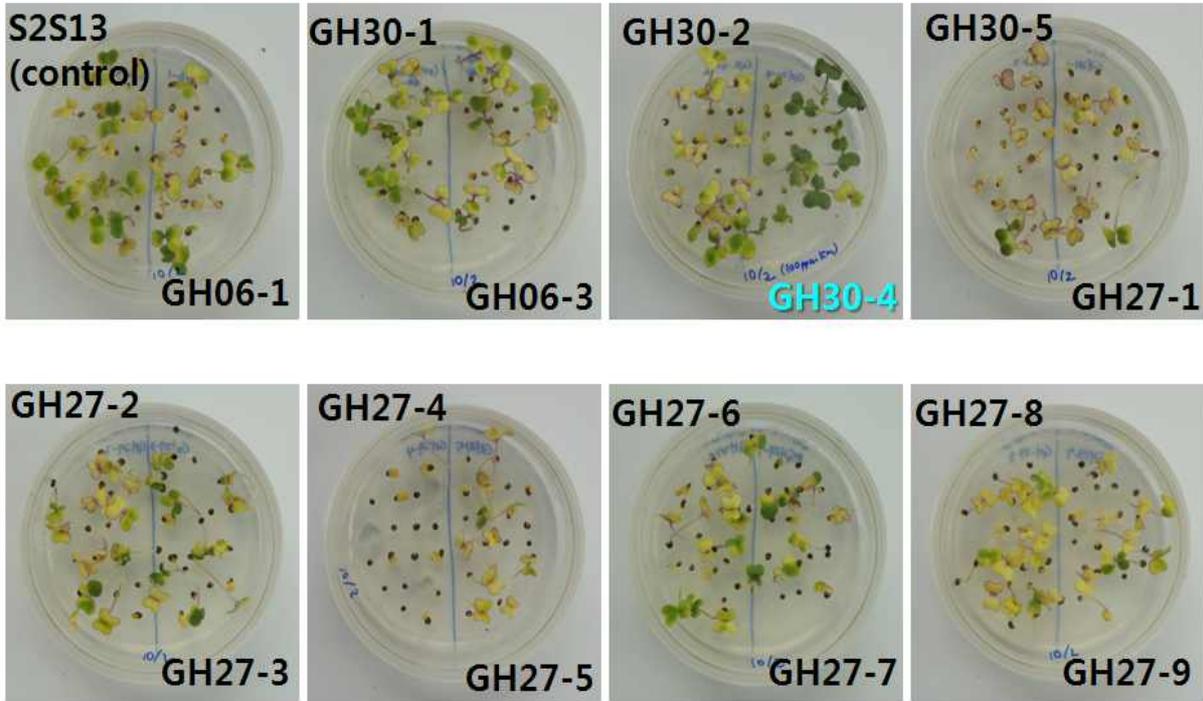
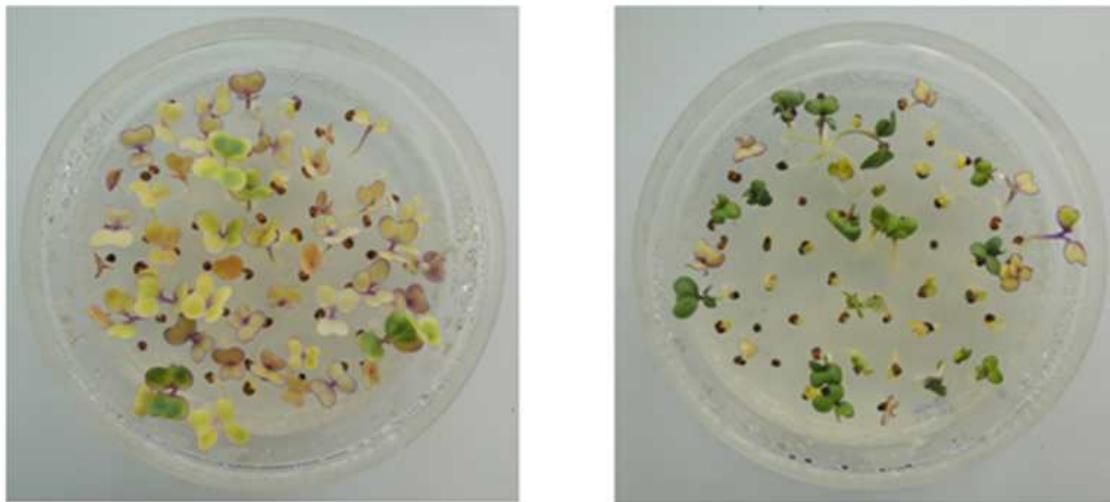


그림 7-12. 형질전환 T1 종자를 kanamycin(200mg/L)을 넣은 배지에서 선발



S2S13(Wild type)
All die

GH30-4(형질전환체)
3:1 분리

그림 7-13. 형질전환 T1 종자를 kanamycin(200mg/L)을 넣은 배지에서 분리비 확인



그림 7-14. 녹색꽃양배추 및 양배추 형질전환 T1 종자를 kanamycin(200mg/L) 배지에서 선발 전경

바. Rapid cycle 양배추 형질전환체 개발

(1) Rapid cycle 양배추 '25051'의 형질전환체 선발을 위한 PPT의 적정 농도

본 연구에 사용된 형질전환 소재로는 생육주기가 상당히 짧은 rapid cycle을 지니면서, self-compatible인 '25051'을 이용하였다. rapid cycle self-compatible 양배추를 이용하는 것은 형질전환을 통해 다음 세대의 종자를 얻기까지 빠르시기에 얻을 수 있으며, 기내에서도 꽃이 피고 스스로 종자를 맺기 때문에 쉽게 형질전환체를 획득할 수 있는 장점이 있다. 25051 line에서 형질전환체의 선발을 위한 phosphinothricin (PPT)의 적정 농도를 알아보기 위해, PPT를 첨가하지 않은 control과 PPT 농도를 각각 1.0 mg/L, 1.5 mg/L, 2.0 mg/L로 나누어 실험을 진행한 결과 1.5~2.0 mg/L에서 형질전환체 선발을 위해 적정한 농도이었다(그림 7-15).

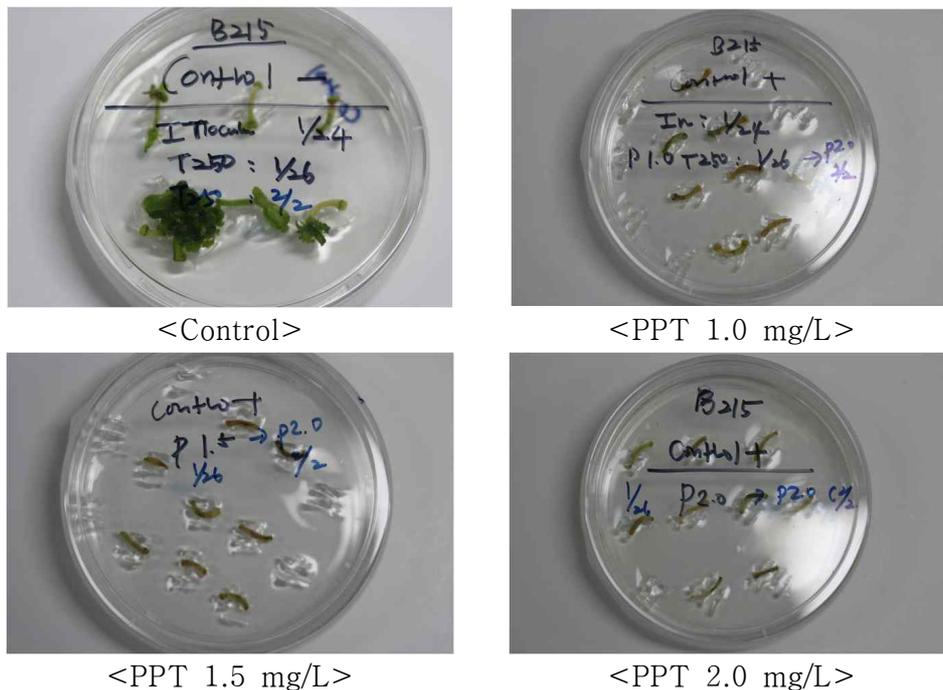


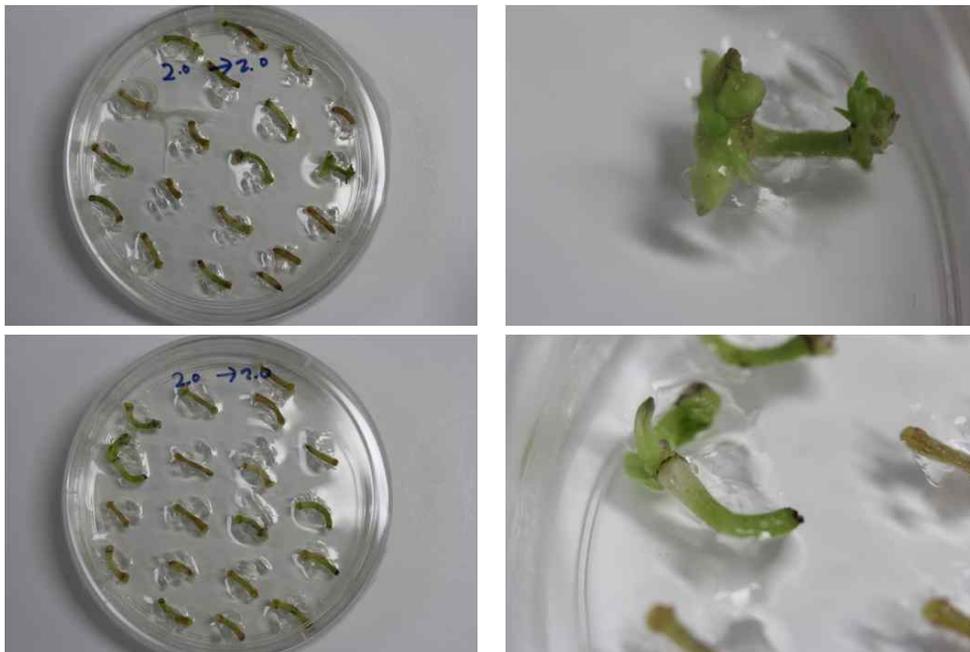
그림 7-15. 25051 line에 대한 형질전환체 선발을 위한 PPT의 적정 농도

(2) 내한성 증진을 위한 bar 선발용 벡터

식물의 내한성을 증진시키기 위하여 과발현 promoter인 35S에 배추 유래 내한성 유전자인 *BrCBF1*을 가지고 있으며, 항생제 대신해 제초제 저항성 유전자인 *bar*가 첨가된 벡터를 사용하여 rapid cycle 양배추에 형질전환을 수행하였다(그림 7-16, 7-17).



그림 7-16. 내한성 증진을 위한 bar 선발용 벡터맵



<PPT 2.0 mg/L>

<선발된 형질전환체>

그림 7-17. PPT 2.0 mg/L에서 선발한 형질전환체

③ 녹색꽃양배추 및 양배추의 형질전환체 T2 세대에서 도입 유전자(*CraIIA*)의 발현 확인 및 제초제 검정

- ㉠ 녹색꽃양배추에서는 총 42개의 형질전환체 T2 세대 중 28개의 Line에서 도입 유전자(*CraIIA*)가 발현되는 것을 확인하였다. 양배추에서는 총 5개의 형질전환 T2 세대 중 4개의 Line에서 도입 유전자(*CraIIA*)가 발현되는 것을 확인하였으며(그림 7-18, 7-19), 제초제를 넣은 배지를 이용하여 도입 유전자(*bar*)에 대한 검정을 수행하였으며, T2 homo 개체를 육성하였다 (그림 7-20, 7-21).

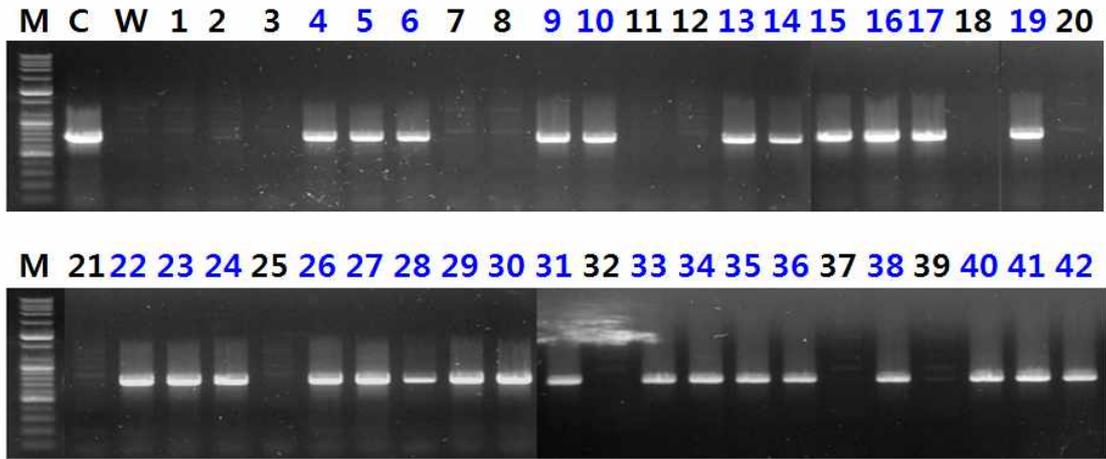


그림 7-18. 녹색꽃양배추 T2 세대에서 도입 유전자(CraIIA)의 발현 확인

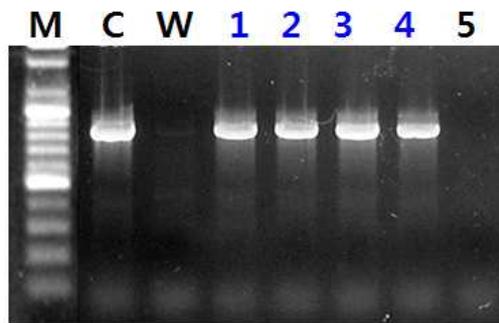


그림 7-19. 양배추 T2 세대에서 도입 유전자(CraIIA)의 발현 확인

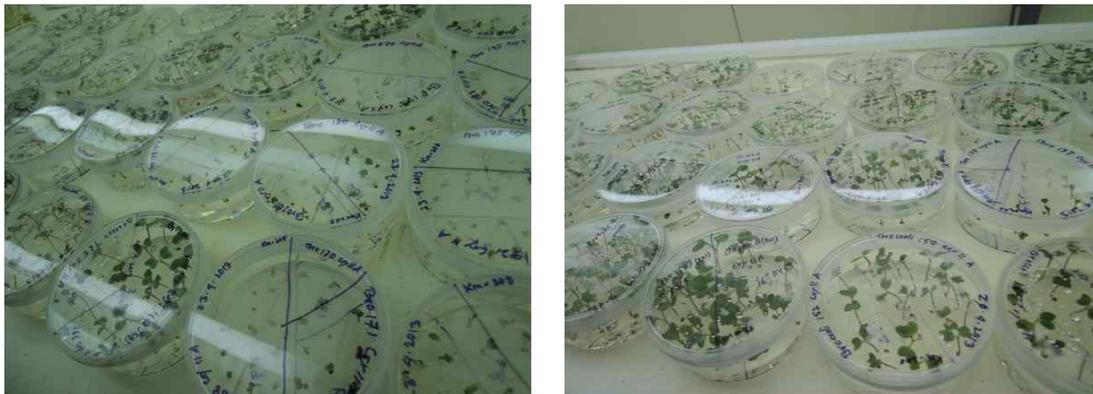


그림 7-20. 녹색꽃양배추 및 양배추 T2 세대에서 도입 유전자(bar)의 제초제에 대한 검정



그림 7-21. 온실에서 육성한 브로콜리 T2 homo 개체

④ 형질전환체의 세대 진전 및 도입 유전자의 발현 분석

㉠ T2세대에서 T3 종자 수확: 형질전환시킨 녹색꽃양배추 및 양배추로부터 선발된 1 copy가 삽입된 Line들로부터 T2 종자를 수확하여 형질전환체 재확인 및 분리비를 재확인하였으며, 선발된 개체들은 삽입된 유전자의 발현 또한 확인하였다 (그림 7-22). 확인된 개체들로부터 T3 종자를 수확하였다.



그림 7-22. T2 세대에서 T3 세대의 종자를 수확하기 위해 키우고 있는 녹색꽃양배추 및 발현 분석(좌: CryIIA+bar, 우: Bt9+bar)

나. 배추 유래 병저항성 유전자 관련 promoter 분석

① 병 저항성 유전자 관련 promoter의 동정 및 해석을 통한 형질전환용 vector 구축

㉠ *BrCLP1*, *BrCLP2*, *BrCMPG1*, *BrDRRP2* 유전자의 promoter 영역 cloning: 본 과제 수행을 통하여 자체적인 병 관련 promoter를 확보하기 위하여 본 실험실에서 보유 중인 배추 유래 완전장 cDNA library로부터 선행연구를 통해 약 3,500개의 clone 염기분석을 통하여 확보된 15개의 병 관련 유전자들 중 4개의 유전자(*BrCLP1*, *BrCLP2*, *BrCMPG1*, *BrDRRP2*)에 대한 promoter 영역을 cloning하였다. 각각의 promoter 영역을 cloning하기 위하여 *BrCLP1*-F (5'-AAG CCT GAA CAG GTT CTG TTA CAA AAG CTG-3'), *BrCLP1*-R (5'-GTC GAC GTT TTG TGT AAT TGT ATT GTA GAT-3'), *BrCLP2*-F (5'-GGT ACC ATC CTA ACC ACA TAC AAA AGA CAC-3'), *BrCLP2*-R (5'-GTC GAC AGC TTT ACA ACT ATG GAG CAA AGT-3'), *BrCMPG1*-F (5'-GGT ACC TTT CAC TGA TTT AGT TTG ACC AAT-3'), *BrCMPG1*-R (5'-GTC GAC TTA AAC GAG TTT GGA ATA CAC AGA-3'), *BrDRRP2*-F (5'-GGT ACC CAT CTA AGC AAT TTA CAT TCA GAT-3'), *BrDRRP2*-R (5'-GTC GAC AAT TAG CTA GAG ACG AGT AGT GAG-3') primer를 디자인 하였다. 각 primer의 밑줄친 부분은 제한효소 *Kpn* I, *Sal* I, *Hind* III site를 나타내었다. 이들 디자인된 primer를 이용하여 PCR로 증폭하였고 증폭된 산물은 전기영동으로 밴드를 확인 한 후 밴드는 Gel 추출하여 TA cloning 하였다(그림 7-23). 이들 4개의 cloning된 promoter 영역은 sequencing하여 염기를 확인하였다(그림 7-24, 7-25, 7-26, 7-27). 이들 promoter들은 식물체에서 시간적·공간적 발현을 분석하기 위하여 promoter::GUS 벡터를 제작 하였다.

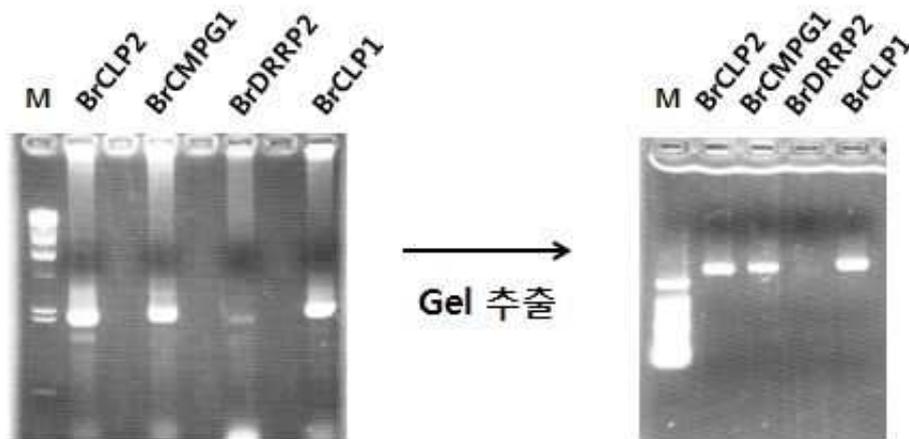


그림 7-23. Promoter 영역의 PCR 증폭 및 Gel 추출

CATCTAAGCAATTTACATTCAGATGGCATT TTTTATTTGGTCATCAGTTCATGTGCCAATTCGATATCATTGTAGTCTAAGTTTAAATTTATTT
 AGTCTCGTCTAGATAAATGGCGGATGACGAGAGAAAAATGAAATCATGAAAGGTCGTCATGTTAATACAATCTCGTTTACAATACATCATGATCCAT
 ATGTCACACAATCTACAAAAATCTGACTTATAGACTTAATGAATATGAAGTCTAATCCCAGACACCGTACATCTTTATTAATTAATTTTCTTCA
 GGAAAGTAGAACTCCCCCAAATAAATCAAGTTTGGCATCCCTTAATTTAATTTAGGTAATCCAAGAGTTTCAGACACTACGCTAATCTTCGTA
 GCTTTAAAATTTAACGAAGTTAGAAGTGAAGTTGTTTTTTCATGAACAAAAGCCGCTACTTTTCGACATGGGTCTACTTTTAAATCATTAAAGGGAC
 AAAAGAGCAGTTAGGCAACTAAACCCCTTTGAACTGTTTTAAAGAAAAAATCCTCTGTTGACTTTTTGCCATTTGTGCTTTTATTTACAGTGT
 AGGAAAAGGAGTTAGTGACAATAGTATTGACTCTTATCTAGTTTTTAAAATAAATATTAGAAAATACGATTTCTTAATTGATTGAAAAGTTTTATT
 TTCTGGTATGTTGAAATTAATTGATTGGAAGTTTCTCGGATGTTTCTTTGTACGTTTGTCTTACACCGAAAAGTAAAGCGAGAGAGGGAATAATTA
 CTCTCCATGAGATGGCCATGTATTAACATAATTTATCCTGAAACACACAATAATCATATAAAAATAAGTTAGATATACAAACCTGATCCTTTTCTGT
 CAACAATACAAGTTTGGTTCGTGATTTAAGTAATAAAAAAAGTTTTTCGGTAACAAAAAATTTGTTGTCTTTAGTTTATATACGTATCTAAAAT
 CTGAGATCAATTAGTTTTGTTGCAAACTATGAAATCTCTTTGAAAAGCTATCGTTCAACCAAAACAAGCAATCCATAAACGTTAGGTTCTAGAAT
 GTATAAACCAATCAATTATACATTCTATTCTCTGATTTTCGCATGTTTGGTATGAGTAGAGTTCGTTACAGCCCAACCACAATACTATTGTATG
 TCGGGTGGAGTTTTATTTTCATATCTTTATATTTTCTTATAACTAAATGAATCAACAATATCCTAATAGGAATGTTCAAGATACTAAGATTAGAC
 TTCAAGATACTACAAAAGTGGATTTGAAAAATAGTAATAGAAAAATTAGAATGCGCAAAATAACAAAAAACAAGTTAGTATAAAAAATATATAAA
 AATATTTTATGTGATTCTAAACCGATAGTTTTGTTGACTAAACCGCTATCTGATTTGTTCAAAAAAATTTGTTGAAAAAAGCTTGAACGTGCC
 TAGGTTTGGTGAATTTATTTGACAAGTCACCTATACTTTAACCCTGACCCGCATGCGGTGATGGGCGTTCGTAATCGTAATACTAACTACTAAG
 GCAATGTTCTAAACTTTCTCTTCAATAACTGCTCTTTTCAATTTTCGCTTAACACATTCTTTTTCTATGTCAATTTATGTCTTATCAGCCT
 CGACTTTATGCTTAATAGATTGGACCAACAGTGATACCAAAACGGTTTTAATAGTATTAATCATTAAATCTTTGAGAAAAGTGAATTAACCTGTC
 ACCAACCCCGGTTTACTTCTTACGCTAATTTTGATTTAAAATAAATTTGAGAAAACATCAACAACCCATTTAGAAGACCCATAAAGCTTTTAAA
 TTTTCTCATTATCCAAATAAATCTCTTAATTAATCAAGTGAATAACACTTCTATATAAATGGGTTTAGAAGATCTTCATTTTACATATCCTC
 ACTACTCGTCTCTAGCTAATT

그림 7-24. *BrDRRP2* 유전자의 promoter 영역의 염기확인(-1,941 bp)

GAACAGGTTCTGTTACAAAAGCTGGACAAAGCTATAAAGTTTTACCAAAATCGAGTTGGCCAGTGACAAAAGAGACTGCTAGTAGCCTTCTGCTGTC
 GGCCGGATTCATTCATGTTAGAAAAAATCTTTATAATTTTTGGATTCTCACAAAGAGGTGAAACCATTTTTTATCAAAAAGAGCTATAAAGTT
 TTGAAAGATCCAAAAAATCAAAACAGGATGAAGTCATACAATCCATAGAGTTTTTTTGACAAAGTACAATCCAGAGAGTTAATCATTACAAATCC
 AGAGAGTTAACCATCATAACTATACTGCTTATGATCTCAACAATCTTTTTGGTTATATTATGGTGGATGACTCGTTCCGAATCTTCGTGAACCCA
 TTATTTTTACACATATTGATTGATCGCATGTTTATTTCCATAAACCCATCGACTGTAAGATTTTTTATTTTCTTATAAAAAATATATTTTGGTTATA
 TTATGGTGGATGATTCGTTCCGAATCTTCGTGAACCCATTATTTTTACACATATTGATTGATCGTATGTTTATTTCCATAAACCCATCGACTGTA
 AGATTTTTTATTTTCTTATAAAAAGATATATTATTTCTCCTTTAGTTTTTATTTTATGAATTGCATATTATTTCAATTTATATCCTTCTTAGGAAA
 TTAGTACACATGGTCTGTGAGACATGAATATGTATTACTAGTACTTTTTTATTTGCTAAATATATTTATGATTTGTGTATAGGATTAAAGAAAAAT
 GTAATACATCTATGGAGAAGAAATATCAAAATGGCTGGAATTGAATCGTAAACTTAAACTTAGATTTATATTAATCGAATTTGAATAGCCAGATAG
 TGGACCAACCAATGGCTCACATGGTACCAATATTTATAGTGAATATGCGACTTTTCTTCTCAGGGCCGCTTGGCTCACATGGTGCCAAGACT
 TATGTGACATATGCGACTTCACTTCTTAGGGCCGCTTTAGGAAACCCTAGACGAGTTAGCTACTGGTCAAGTAACAAGATAAGCTAATTTTTTTG
 TGTAACGTTAAGTTCAAAAAAATTTGTGAAACGTAACACTTTTTTAAACGTTTACTAATGTACCAAGTTAAAATGTCAAAACGTGAAGCAAATGGT
 TGCATCATAAGTTCGATGAATAAAATTTGATAGAAATTTGGCATTCTCTGAAATATTACCATTTAAACGAAAAAGTGGAAATTTTTTTTTTGTAACTGAA
 AAAGTGGAAATATTTCTTCACTTTTTCTGAAAAAAGTGGATTTTTAACAATACTAGCTCCTTTTTTTGTTATCATGCTATTTGTTAGAAGAATG
 ACAAAATCGTTCGTTCAATTCGGCTGAAAACCTATATAAAAACACCTTTAAATTTGAAATTTAGTACAAATAAAAAGGCATTTCTTTGTAAGGCATTT
 CTTTGTAAATACCTAAATCGTTCGTTCAATTCGGCTGAAAACCTATACAAAACAACCTTTAAATTTGAAATTTAGTACATATAATATGAGAGTTTCAA
 AAAAGATTGATAGGTTCTTACAAGAAAAAGACCAAAATACAGTTTATTGTGTTTTACCTAATTAATGGCTCCCTTGCCCTCAGAAGGAAGATGA
 CATCAAATCCTAGTCTCAAATTTGCAAGAAGAGGTAGGTGTTCTGCCACTTTGCCAGTACAGAGTCTCGAGAACCAGTTCAGATTTGTGTCCGC
 TATTTGCTCTATAGAGTTTCGTACAAACATGAATTAATAGATTAATAATACATCAACTTATATGTTTCGATCATTTTTTAAAGCAACTTATATTGT
 TCCATCATATGCAAAATCAAATAAGTTATCAAAACAAAAGATATTTAATTTGTAAATTTATAAAAACAAAAGTGAAGAACAGTAATACTGTAATACA
 TAACTATCTGTTTGTAAAAGAAAATTTGAGTTCTCTCATTATAGACCAAAATCCAAAGTATTTATCTTGGGCAAGAGCAAGACTAAACGCGCGTCA
 AACTCGTTTTACAAATACATAAATATATTTAAAATGCTATTATAGATAAAAACAACCTTTTTATTTACAAAAGTAAATGACAAAACCTACCCAACA
 TTTATCCCTATATATAGCTCACACCCTCTTCTTCCCATCTACAATACAATTACACAAAAC

그림 7-25. *BrCLP1* 유전자의 promoter 영역의 염기확인(-2,173 bp)

㉔ *BrCLP*, *BrTLP*, *BrDIR* 유전자의 promoter 영역 동정 및 해석: 병 관련 유전자의 promoter를 동정하기 위하여 위에서 설명한 Chitinase 유전자, Thaumatin 유전자, Dirigent 유전자의 기관별 발현 분석으로부터 특이적으로 발현하며, 발현양이 많은 유전자들을 선택하였다. Chitinase 유전자들에서는 뿌리에서만 특이적으로 발현하는 *BrCLP7*, 전 기관에서 발현하는 *BrCLP3*, 꽃봉우리에서만 특이적으로 발현하는 *BrCLP19*, 뿌리에서는 발현하지 않고 줄기, 잎, 꽃봉우리에서 발현하는 *BrCLP27* 유전자의 프로모터 영역 약 2kb를 동정하였다. Thaumatin 유전자들 중에는 전 기관에서 발현하는 *BrTLP1*과 꽃봉우리에서만 특이적으로 발현하는 *BrTLP7* 유전자의 promoter 영역 약 2kb를 동정하였다. 또한 Dirigent 유전자들 중에서도 전 기관에서 발현하는 *BrDIR1*과 꽃봉우리에서만 특이적으로 발현하는 *BrDIR30* 유전자의 promoter 영역 약 2kb를 동정하여 각각의 promoter 영역 뒤에 GUS 유전자를 붙인 벡터를 구축하였다(그림 95). 또한 동정된 8개의 promoter 영역을 분석한 결과 모든 promoter 영역은 다양한 스트레스 관련 *cis*-acting regulatory element들을 포함하고 있었다(표 7-2).

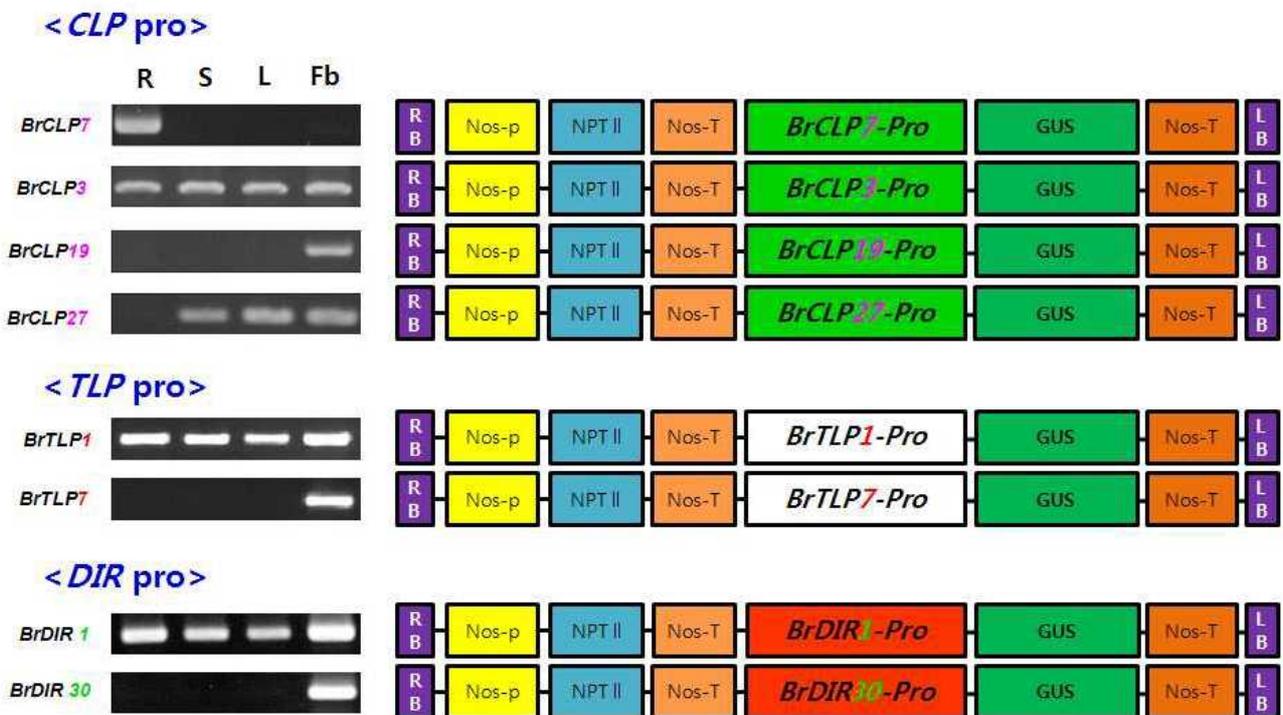


그림 7-28. Promoter의 GUS assay를 위한 벡터 구축

표 7-2. 8종 promoter 영역의 *cis*-acting regulatory elements 분석

<i>Cis</i> -acting elements	<i>BrCLP7</i>	<i>BrCLP3</i>	<i>BrCLP19</i>	<i>BrCLP27</i>	<i>BrTLP1</i>	<i>BrTLP7</i>	<i>BrDIR1</i>	<i>BrDIR30</i>
ABA	ABRE(+403)	ABRE(-589,+621)	ABRE(+615)	ABRE(-1437,+1440,+1438)	ABRE(-1437,+1440,+1438)	ABRE(-1437,+1440,+1438)		ABRE(+526,+749,-747,+1751)
Low-temperature		LTR(-1119)			LTR(-158)	LTR(+487)	LTR(+255,+1270,+1560)	LTR(+255,+1270,+1560)
Heat stress			HSE(-451)	HSE(+351)	HSE(+240,+1710,+1765)	HSE(+1387,+1958)	HSE(+1387,+1958)	HSE(-676,-541,+1387,+1958)
Dehydration, Low-temp, Salt stresses								DRE(+379)
Drought	MBS(+143,+1852)	MBS(+1584)		MBS(-216)	MBS(+550,-1512,-1745)	MBS(-429)	MBS(-40,-1055,-1445)	MBS(+482)
Cold & Dehydration						C-repeat/DRE(+1717)	C-repeat/DRE(+1717)	C-repeat/DRE(+1717)
Salicylic acid	TCA-element(+539)	TCA-element(-102,+153,+947,-1979)	TCA-element(+523)	TCA-element(-909,-1984)	TCA-element(-1782)	TCA-element(-938,-942)	TCA-element(-938,-942)	TCA-element(-938,-942)
Defense & Stress	TC-rich repeats(+37,+93,+1230)	TC-rich repeats(+37,+93,+1230)	TC-rich repeats(+37,+93,+1010,+1230)	TC-rich repeats(+1133,-1618)	TC-rich repeats(+1133,-1618)	TC-rich repeats(+1133,-1618)		TC-rich repeats(+206,-599)
Wound			WUN-motif(+600)	WUN-motif(+679)	TC-rich repeats(+1686,-1762)	TC-rich repeats(+168,-1762)	TC-rich repeats(+168,-1762)	TC-rich repeats(+168,-1762)
Fungal	Box-W1(-236,+391,+1026,+1872)	Box-W1(-236,+391,+1026,+1872)	Box-W1(-236,+391,+1026,+1872)	Box-W1(-236,-382,+391,+1026,-1545,+1872)	Box-W1(+996,+1674)	Box-W1(+828,-1412)	Box-W1(+828,-1412)	Box-W1(+828,-1412)
Auxin	TGA-element(-719)		AuRR-cor(+1759)	AuRR-core(+1759)	AuRR-core(+1759)	TGA-element(-824,-843)	TGA-element(-824,-843)	TGA-element(-824,-843)
Gibberellin	GARE-motif(-595,+1278)	GARE-motif(+183)	GARE-motif(-595,+1278)	GARE-motif(-595,+601,+1635,-797,-1831,+1278)	GARE-motif(-187,+1199,-1602,-1590)	GARE-motif(+1911)	GARE-motif(-1586)	GARE-motif(-1586)
Ethylene	P-box(+335,-541,+560) TATC-box(+132,+1770)	ERE(-26,-935)	P-box(+335,-541,+560) TATC-box(+132,+1770)	P-box(+335,-541,+560) TATC-box(+132,+1770)		P-box(+121,-1548)		P-box(-1512)

㉔ *BrCBL8*, *BrCLP28* 유전자의 promoter 영역 분석: 비생물학적 및 생물학적 스트레스에 관련된 *BrCBL8* 및 *BrCLP28* 유전자의 프로모터 분석을 위하여 구축한 각각의 promoter::GUS 벡터를 사용하여 그림 96과 같은 floral dipping법을 이용하여 애기장대에 형질전환 시킨 후 T1 형질전환체를 이용하여 GUS 발현 분석을 수행하였다. 그 결과 *BrCBL8* 및 *BrCLP28* promoter의 GUS 발현은 뿌리에서만 발현하였다(그림 7-29). 따라서 이들 각각의 promoter는 배추과의 뿌리 발달, 뿌리에서 발현하는 유전자들의 기능연구 등의 벡터 구축용 promoter로 이용 가능할 것으로 판단된다.

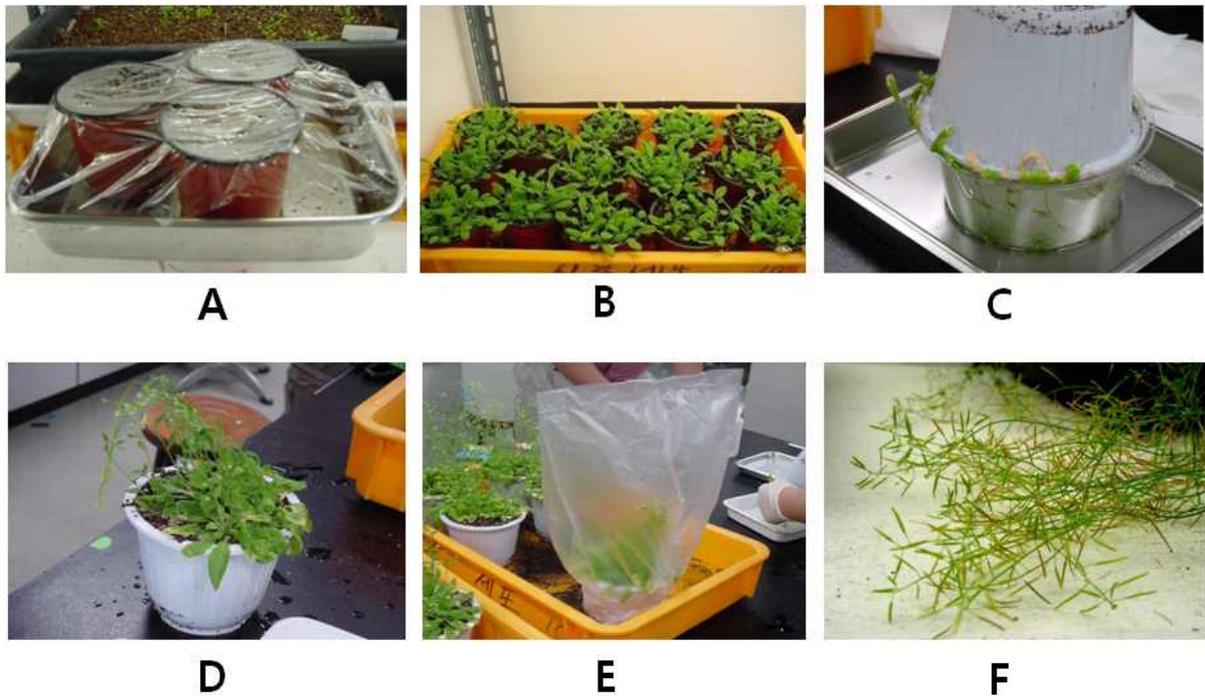


그림 7-29. Floral dipping법에 의한 Arabidopsis의 형질전환 과정
 (A : 저온처리, B : 과중 3주 후의 식물체, C : 감염, D : 감염 직후의 식물체,
 E : 공존배양, F : T1종자 확보)

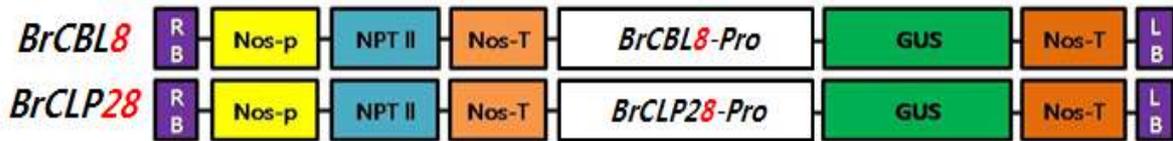


그림 7-30. Promoter assay를 위한 벡터를 이용한 GUS 분석

8. 유전체 육종 기반 신품종 개발

가. 목표형질 관련 양배추 신품종 개발

① 시들음병, 내서성 보유 양배추 품종 개발

- ㉠ 내서성이 강하고 고온결구력이 우수한 양배추 조합을 선발하기 위해 내서성 선발 및 기 보유 고정계통을 이용하여 총 220조합을 작성하였다. 이들과 대비품종으로는 동남아에서 많이 재배하고 있는 “K.K”, “하야도리”양배추와 아시아종묘가 육성한 “대박나”, “YR호남”, 일본 마루다네종묘사의 “M-3”, 노자끼종묘사의 “동승”, 다끼이종묘사의 “한성”, 사카타종묘사의 “동람”, 중국 농업과학원의 “경풍 1호” 등을 공시하였다.

결구엽이 진한 녹색으로 숙기가 빠르며 대비종인 “KK”, “하야도리”양배추 보다 내서성 및 고온결구력이 강하고 열구가 늦은 BN2402 조합, 대비종인 “대박나”, “경풍 1호”양배추 보다 내서성 및 고온결구력이 강하고 열구가 늦은 15조합 (BN2304, BN2314, BN2374, BN2351, BN3497, BN3498, BN3541, BN3547, BN3548, BN3651, BN3652, BN541, BN553, BN554, BN2330)이 선발되었다. 각 조합별로 살펴보면, BN590은 구색이 짙은 녹색으로 조직이 치밀하고 코아가 짧으며 숙기에 비해 열구가 늦어 선발하였다. BN2402 조합은 위황병 접종시험에서 내병성 품종으로 확인되어 중국, 태국 등의 해외 적응성 시험을 실시하였다. BN2303은 중국남부와 태국에서 많이 재배되는 “하야도리”형의 양배추로 중국에서 인기 있는 “강력 50”에 비해 숙기가 2~3일 빠르고 열구가 늦으며 내서성 및 위황병에 강하여 선발하였고 시험채종결과 종자생산성이 양호하여 “씨티-180”(출

원번호: 출원-2011-557)으로 품종보호를 출원하였고 2014년 7월 3일에 품종보호 등록(제5074호) 되었다. “씨티-180”은 인도 캘커타 재배산지에서 여름 우기작형에 많이 재배되는 인도 Namdhari가 판매하는 “NS-43”과 중국남부에서 인기 있는 “강력 50”을 대체할 수 있을 것으로 기대 되어 이들 지역에 적극 시작할 예정이다. BN2314 조합은 인도 및 동남아에서 인기가 있는 일본 다끼이의 “K-K Cross”를 대체하기 위하여 선발한 조합이다. 내서성 및 고온결구력이 강하고 연부병에 강하여 선발하였다. BN2374 조합은 중국의 “경풍 1호”를 대체하기 위하여 선발한 조합으로 “경풍 1호”에 비해 내서성 및 내병성이 강한 조합이다. BN2351과 BN2353은 중만생종의 구의 조직이 치밀하며 Core가 짧고 열구가 늦은 편형 양배추로서 내서성에 강하였으며 1-1세부과제 (한국생명공학연구원)에서 개발한 내서성 분자마커를 사용하여 내서성을 검증하였다. 또한 BN2351은 내한성 및 내병성(위황병, 연부병)에도 강하고 시험채종결과 종자생산성이 양호하여 “씨티-207”(출원번호: 출원-2013-53)으로 품종보호를 출원하였고 2015년 5월 11일에 품종보호등록(제5499호) 되었다. 씨티-207품종은 내서성 양배추 수요가 높은 인도지역에 적합할 것으로 사료됨으로 인도지역에 수출 가능하다. BN2353은 시험채종 결과 종자생산성이 양호하여 이 조합을 “씨티-262”(출원번호: 출원-2013-55)으로 품종보호를 출원하였고 2015년 5월 11일에 품종보호등록(제5492호) 되었다. 씨티-262품종은 내병성 양배추 수요가 높은 중국지역에 적합할 것으로 여겨진다. BN553은 중만생종으로 구의 조직이 치밀하며 코아가 짧고 열구가 늦은 원형 양배추로서 내서성에 강하였으며 뿐만 아니라 내한성 및 내병성(위황병, 연부병)에도 강하고 시험채종결과 종자생산성이 양호하여 “CT-301, 인디칸”(출원번호: 출원-2014-45)으로 품종보호를 출원하였다. “CT-301, 인디칸”품종은 내서성 양배추 수요가 높은 인도지역에 적합할 것으로 판단된다. BN554는 구가 작아 밀식재배가 가능한 조생종으로써 구의 조직이 치밀하며 코아가 짧고 열구가 늦은 편형 양배추로서 위황병에 강할 뿐만 아니라 연부병과 내서성에도 강한 특징이 있었다. 또한 시험채종 결과 종자생산성이 양호하여 이 조합을 “CT-302, 인디아아몬드”(출원번호: 출원-2014-44)로 품종보호를 출원하였다. BN516은 구중 1.0 ~ 1.3kg의 원형으로 식물체가 작아 밀식재배가 가능하고 식미가 우수하며 내서성 및 시들음병에 강한 특성을 보였다. 그리고 정식 후 55일 정도에 수확이 가능한 조생종의 특성을 보여 “씨티-403”(출원번호: 출원-2015-46)으로 품종보호를 출원하였다. 또한 2015년 조합인 BN2353은 구중 1.7 ~ 2.0kg인 편구형으로서 정식 후 70일 정도에 수확이 가능하며, 초세가 강하여 비교적 재배가 용이하였으며 수중성이 좋고 신선도가 오랫동안 유지되는 특성이 있어 “씨티-410”(출원번호: 출원-2015-45)으로 품종보호를 출원하였다.

표 8-1. 양배추 조합 성능 검정

BN	조합/품종	엽장 (mm)	엽폭 (mm)	외 엽 수	구중 (kg)	구고 (mm)	구폭 (mm)	코어 (mm)	숙기	열구	내성
590	842MS x 677	380	355	17	1.3	157	159	62	52일	20일	강
637	Express Ball (아시아)	325	305	16	1.1	136	138	64	50일	10일	중
643	아시아볼 (아시아)	340	325	21	1.2	141	151	76	65일	30일 이후	중강
644	희망 (사카타)	337	295	15	1.1	137	142	65	50일	10일	약
645	녹구 (농우)	366	374	17	1.4	165	164	79	53일	12일	약
646	인두 (Semini)	340	325	21	0.9	145	149	63	68일	30일 이후	강
647	YR미미조생 (미카도교와)	330	335	12	1.2	152	137	65	52일	12일	약
2303	164-54MS x P6-1	408	386	9	1.8	144	232	86	65일	25일	강
2314	2450-51 x 580s-52	452	368	15	1.3	126	1492	75	65일	25일	강
2374	1950-51 x 우-2	403	367	18	1.9	141	214	55	70일	25일	강
2379	대박나 (아시아)	412	425	17	1.5	123	190	67	70일	25일	중강
2384	경풍1호 (중국농업과학원)	504	475	12	2.0	128	239	83	72일	25일	중강
2380	YR호남 (아시아)	434	423	22	2.1	162	206	63	80일	30일 이후	중
2381	M-3 (마루다네)	445	406	16	1.4	129	193	65	80일	30일 이후	약
2396	춘수 (정티안)	481	485	20	2.0	151	212	75	85일	30일 이후	약
2395	동람 (사카타)	458	431	17	1.4	136	194	58	85일	30일 이후	약
2383	한성 (다끼이)	450	412	19	1.2	140	181	59	85일	30일 이후	약
2402	164MS x P10-1	340	395	17	1.7	140	220	55	65일	25일	강
2413	대박나 (아시아)	350	305	18	2.2	134	217	68	70일	25일	중강

2414	YR호남 (아시아)	395	350	18	1.7	130	186	60	80일	30일 이후	중
2415	M-3 (마루다네)	360	375	18	1.4	132	215	60	80일	30일 이후	약
2416	동승 (노자끼)	405	398	15	1.3	148	209	73	90일	30일 이후	약
2417	K.K (다끼이)	370	380	16	1.5	130	210	70	68	15일	강
2418	춘수 (징티안)	370	390	17	1.1	117	162	58	85일	30일 이후	약
2439	하야도리 (코바야시)	350	405	18	1.6	145	200	65	70	20일	중강
2440	동랍 (사카타)	365	340	15	1.5	110	215	65	85일	30일 이후	약
2441	한성 (다끼이)	360	380	19	1.2	115	170	50	85일	30일 이후	약

표 8-2. 기 보유 계통을 이용한 위황병 저항성 조합 선발

BN	조합	저항성		이병성			저항성 개체수	이병성 개체수	선발
		1	3	5	7	9			
BN170	337MS x PI15-41		21				21	0	○
BN171	90-51MS x PI15-41		21				21	0	○
BN172	2418MS x PI15-41	2	19				21	0	○
BN2353	2483-515 x 47-595	17	4	■	■	■	21	0	○
Y409	2418M5BC5 x 741-515	20	1	■	■	■	21	0	○
Y411	2514-51MSBC3 x DB-25	21		■		■	21	0	○
Y418	90-51MS x 농G-1S-G3	15	3	■	■	3	18	3	○

표 8-3. 기 보유 계통을 이용한 내서성 조합 선발

BN	조합	결구력 (9:강)	열구 (9:강)	포장저항성 (9:강)	순도 (9:우수)	내서성	선발
BN541	2418-51MSBC5 x P15-41-G2	7	7	9	9	극강	○
BN553	90-51MS x PI15-41	7	9	9	9	극강	○
BN554	2418MS x PI15-41	7	7	9	9	극강	○
BN2330	225MS x 9101-6-51-51-51	7	9	9	9	극강	○
BN2351	97-496B x P15-41-G2	7	7	9	9	극강	○
BN3497	2409-51MSBC4 x P15-41-G2	7	7	9	9	극강	○
BN3498	S26-1MS x P15-41-G2	7	7	9	9	극강	○
BN3541	2418-51MSBC5 x P15-41-G2	7	9	9	9	극강	○
BN3547	90-51MS x 714-51-51-51-51	7	7	9	9	극강	○
BN3548	225MS x 995-6-해1-51-51	7	9	9	9	극강	○
BN3651	2446-51S-51 x P15-41-52-51	7	9	9	9	극강	○
BN3652	517-56MS x P15-41-G2	7	9	9	9	극강	○



<씨티-180(BN2303), 위황병 저항성 선발>
 대비품종 : 대박나(BN2379)



씨티-207(BN2351)
 대박나(BN2354)
 <씨티-207, 내서성 선발>

씨티-262(BN2353) 대박나(BN2354)
 <씨티-262, 위황병 저항성 선발>



<씨티-301(인디칸), 내서성 및 위황병 저항성 선발>



<씨티-302(인다이아몬드), 내서성 및 위황병 저항성 선발>



<씨티-403(BN516), 내서성 및 위황병 저항성 선발>

대비품종 : 베이스볼(BN530)



<씨티-410(BN2353), 내서성 및 위황병 저항성 선발>

대비품종 : 대박나(BN2432)

그림 8-1. 내서성 및 위황병 우수 조합 선발 후 품종보호출원



선발 : BN590



대비 : BN644 - 희망(사카타)
 BN645 - 녹구(농우바이오)
 BN647 - YR미미조생(미카도)



선발 : BN2303



대비 : BN2379 - 대박나(아시아종)

BN2384 - 경풍1호(중국농업과학)

료)
 원)



선발 : BN2314

묘)

원)



대비 : BN2379 - 대박나(아시아종

BN2384 - 경풍1호(중국농업과학



선발 : BN2374

묘)

원)



대비 : BN2379 - 대박나(아시아종

BN2384 - 경풍1호(중국농업과학



선발 : BN2402



대비 : BN2417 - K.K.(다끼이)

BN2439 - 하야도리(고바야시)

그림 8-2. 양배추 선발조합의 특징 및 대비종과 비교

- ㉔ 기보유 계통의 내병성 검정 및 선발: 내병성 검정을 위하여 기보유계통에서 시들음병에 강한 12계통만을 선발한 뒤, 시들음병 검정과 뿌리혹병 검정을 실시하여 복합 내병성 결과 data를 확보하였다(표 8-4, 그림 8-3, 그림 8-4). 시들음병에 강한 계통으로 유지해온 12계통 모두 1년차 시험에서도 시들음병 저항성 계통으로 나타났으며, 시들음병과 뿌리혹병에 강한 저항성을 계통이 모두 6계통 (BN KO-002, KO-003, KO-006, KO-008, KO-009, KO-011)으로 나타났으며, 뿌리혹병에 이병성인 계통은 Fig. 15에 표시된 부분과 같이 6계통(BN KO-001, KO-004, KO-005, KO-007, KO-010, KO-012)으로 조사되었다.

표 8-4. 기보유계통 내병성 검정(1차년도)

BN	Line	^z Maturity	Fusarium wilt	Clubroot	Note
KO-001	10GH04	E	0	2	A분리 고정계
KO-002	10GH05	E	0	0	L분리 고정계
KO-003	10GH06	E	0	0	A분리 고정계
KO-004	10GH07	E	0	1	A분리 고정계
KO-005	10GH09	E	0	4	A분리 고정계
KO-006	10GH10	ME	0	0	L분리 고정계
KO-007	10GH13	ME	0	1	A분리 고정계
KO-008	10GH22	ME	0	0	A분리 고정계
KO-009	10GH24	ML	0	0	L분리 고정계
KO-010	10GH27	ML	0	3	M분리 고정계
KO-011	10GH30	E	0	0	L분리 고정계
KO-012	10GH33	M	0	2	A분리 고정계

0: No symptoms 1: weak. 3: medium, 5: death.

^zMaturity : Early(E), Medium(M), Late(L), Medium-Early(ME), Medium-Late(ML)

A분리 고정계 : ARCADIA 분리 고정계, L분리 고정계 : Lancelot 분리 고정계

M분리 고정계 : Marathon 분리 고정계



그림 8-3. 기보유 12계통 시들음병 검정



그림 8-4. 기보유 12계통 뿌리혹병 검정

- ㉔ 약유래/기보유/웅성불임 계통의 내병성 검정 및 선발: 1차년도에서 시들음병/뿌리혹병에 대하여 복합저항성을 나타낸 기보유 12계통과 수집된 8계통, 약유래계통과 웅성불임유기 중인 12계통에 대한 병리검정을 실시하였다. 시들음병 병리검정은 파종 14일 후 유묘를 *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*의 포자현탁액(1×10^7 spores/pot)에 침지하여 접종한 후 25°C에서 재배하여 접종 3주 후에 각 식물체의 발병도를 조사하여 저항성을 Resistance(R), 감수성을 Sensitivity(S), 중도저항성을 Medium Resistance(MR)으로 표시하였다. 뿌리혹병 병리검정은 파종 14일 후 유묘에 강릉에서 채집하여 증식한 뿌리혹병균(race 9)을 9.8×10^8 spores/pot가 되도록 접종하였으며, 20°C에서 1주간 배양한 후 온실에서 재배하였다. 접종 5주 후에 발병도를 조사하였다.

시들음병 저항성 검정 대비종으로는 일반적으로 알려진 감수성 품종‘레드마트’와 저항성 품종‘YR호남’을 사용하였고 녹색꽃양배추 품종 중 저항성품종이라고 알려진‘그랜저’,‘필그림’ 두 품종을 대비종으로 하였다. 녹색꽃양배추 시험결과‘레드마트’는 감수성,‘YR호남’은 저항성으로 나타났고,‘그랜저’,‘필그림’ 두 품종은 중도저항성(MR)으로 나타났다. 따라서 저항성과 중도저항성으로 나타난 계통들을 선발기준으로 하였고 그 결과 BN2Br01, 2Br02, 2Br11 3계통에서 시들음병에 대한 저항성(R)계통, BN2Br03의 12계통에서 시들음병 중도저항성을 나타내어 선발하였다. 웅성불임 유기 12계통 중 BC₂F₁ BN505, BN511에서 저항성을 나타냈으며, 9계통에서 중도저항성, 1 계통‘BN503’에서 감수성으로 나타났다. 뿌리혹병 저항성 검정은 배추품종 중 감수성인‘노랑김장’과 저항성인‘CR황록’을 대비종으로 하였으며, 녹색꽃양배추는 시판품종과‘아오시마’ 품종을 대비종으로 하였고 그 결과, 녹색꽃양배추 대비종 2품종은 감수성(S)으로 나타났으며, BN2Br10계통에서 뿌리혹병 중도저항성(MR)을 나타내어 선발 및 조합작성(BN607, 609, 612)에 사용되었고, 웅성불임 유기 계통 중 BC₂F₁ BN510에서 중도저항성을 나타냈다. 약(소포자)유래 140계통 중 내병성 검정을 위한 충분한 종자가 확보된 80계통에 대하여 내병성 검정을 실시하여 시들음병 저항성 계통 28계통, 뿌리혹병 저항성 10계통을 확보하였다.

표 8-5. 기보유계 및 수집계통 내병성 검정 (2차년도)

BN	^z Line	^y Maturity	^x Resistance Level		Selection
			Fusarium wilt	Clubroot	
2Br01	10GH04	E	R	S	선발(BN609 부계)
2Br02	10GH05	E	R	S	선발
2Br03	10GH06	E	MR	S	선발(웅성불임계 유기 반복친)
2Br04	10GH07	E	MR	S	선발(웅성불임계 유기 반복친, BN607 부계)
2Br05	10GH09	E	MR	S	선발
2Br06	10GH10	ME	S	S	
2Br07	10GH13	ME	MR	S	선발(웅성불임계 유기 반복친)
2Br08	10GH22	ME	MR	S	선발
2Br09	10GH24	ML	MR	S	선발(웅성불임계 유기 반복친, BN607 모계)
2Br10	10GH27	ML	S	MR	선발 (BN609 모계)
2Br11	10GH30	ML	R	S	선발(웅성불임계 유기 반복친, BN612 부계)
2Br12	10GH33	ME	MR	S	선발 (BN612 모계)
2Br13	CL	E	S	S	
2Br14	CL	E	MR	S	
2Br15	CL	E	MR	S	선발
2Br16	CL	E	MR	S	선발
2Br17	CL	E	MR	S	
2Br18	CL	E	MR	S	
2Br19	CL	E	MR	S	선발
2Br20	CL	E	S	S	

^zLine : Collected line (CL)

^yMaturity : Early(E), Medium(M), Late(L), Medium-Early(ME), Medium-Late(ML), Extremely-Early(EE)

^xResistance level : Resistance(R), Sensitivity(S), Medium Resistance(MR)

표 8-6. 웅성불임계 유기 12계통 내병성검정(2차년도)

BN	1st year BC	^z Resistance level		2nd year BC
		Fusarium wilt	Clubroot	
501	BC ₂ F ₁	MR	S	BC ₃ F ₁
502	BC ₂ F ₁	MR	S	BC ₃ F ₁
503	BC ₂ F ₁	S	S	BC ₃ F ₁
504	BC ₂ F ₁	MR	S	BC ₃ F ₁
505	BC ₂ F ₁	R	S	BC ₃ F ₁
506	BC ₂ F ₁	MR	S	BC ₃ F ₁
507	BC ₂ F ₁	MR	S	BC ₃ F ₁
508	BC ₂ F ₁	MR	S	BC ₃ F ₁
509	BC ₂ F ₁	MR	S	BC ₃ F ₁
510	BC ₂ F ₁	MR	MR	BC ₃ F ₁
511	BC ₁ F ₁	R	S	BC ₂ F ₁
512	BC ₁ F ₁	MR	S	BC ₂ F ₁

^zResistance Level : Resistance(R), Sensitivity(S), Medium Resistance(MR)

표 8-7. 약유래계통(A₁-A₂) 내병성검정 결과 : (2차년도)

Line	No. of line	No. of testing	Fusarium wilt ^z (R)	Clubroot ^z (R)	Note
약(소포자) 배양 유래계	140	80	28	10	-

^z(R): The number of plant with resistance

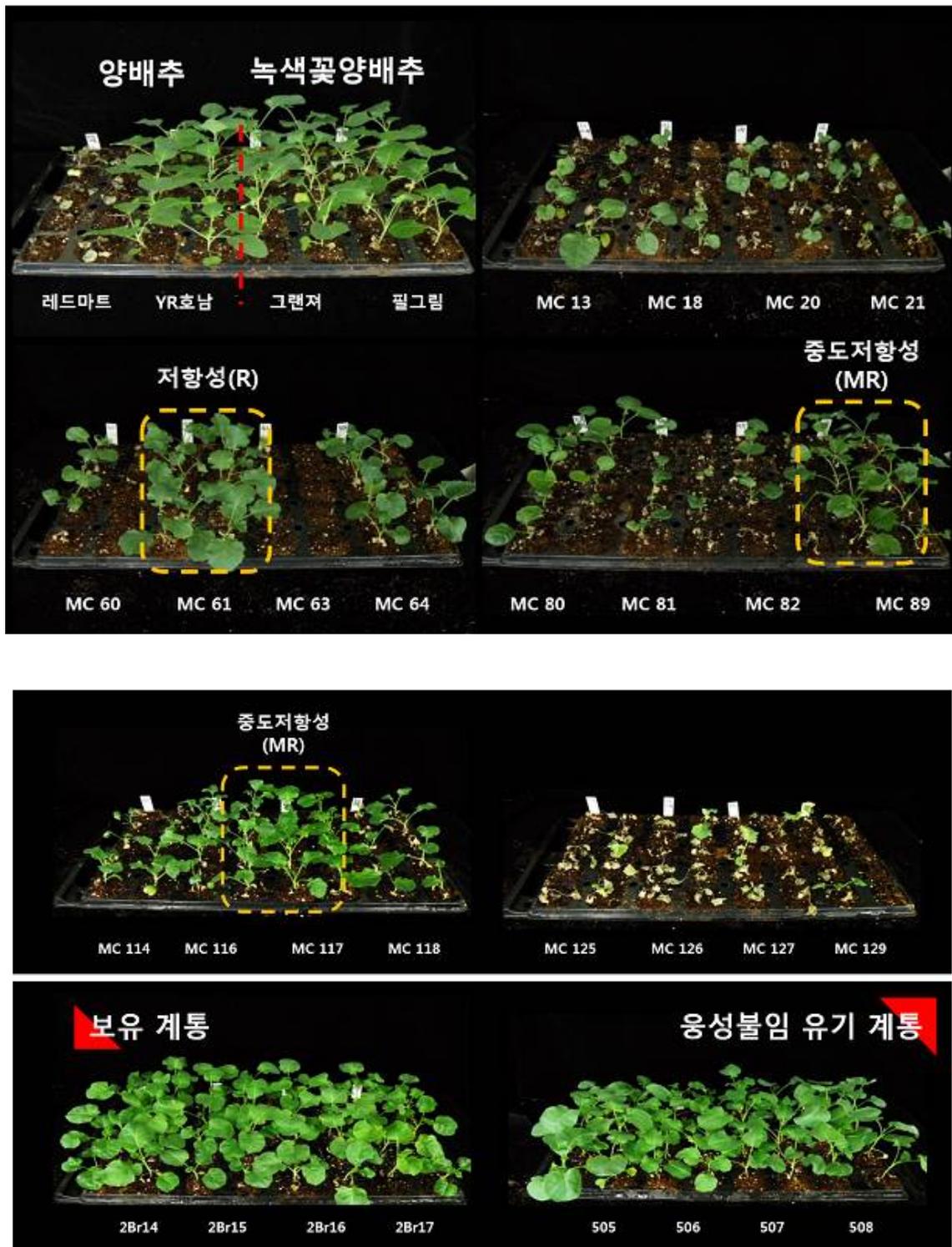


그림 8-5. 약유래/기보유/응성불임계통의 내병성(시들음병) 검정결과 (2차년도)

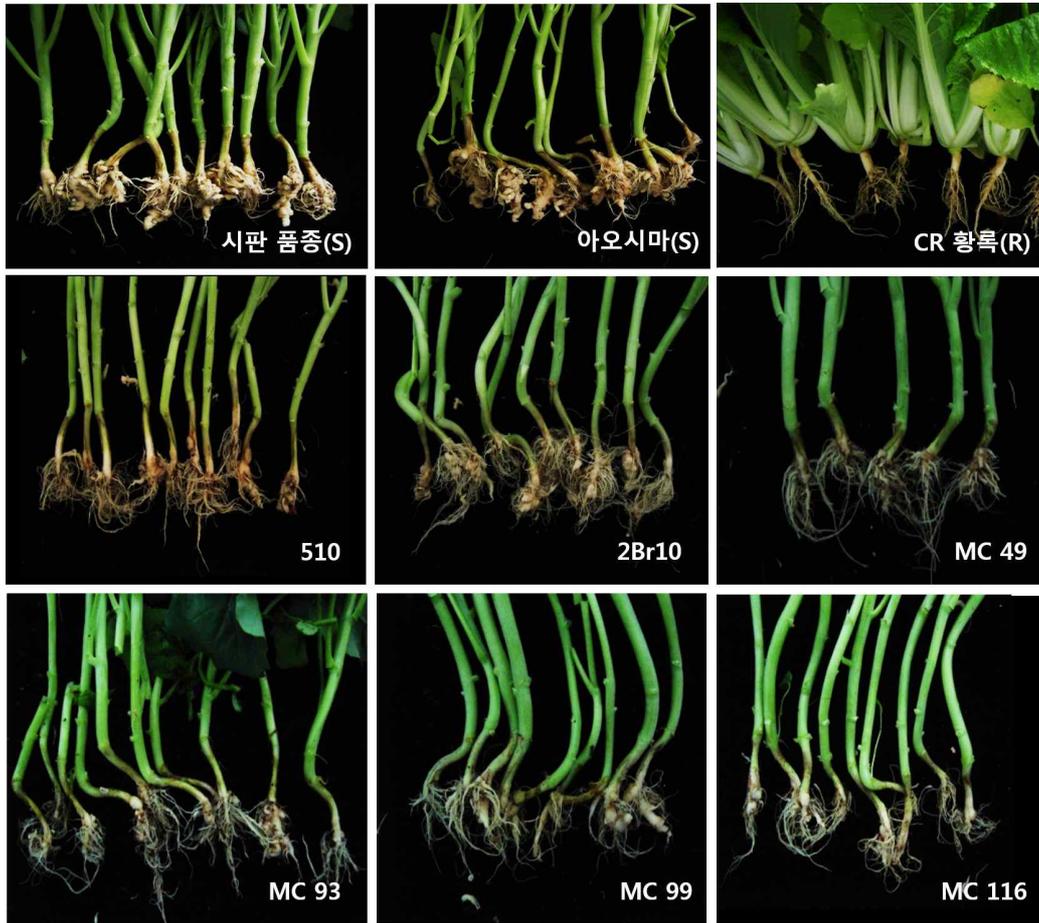


그림 8-6. 약유래/기보유/웅성불임계통의 내병성(뿌리혹병) 검정결과 (2차년도)

- ㉔ 약유래/기보유/웅성불임계통 및 조합의 내병성검정 및 선발: 세대진진 및 약배양 유래 계통에 대한 병리검정을 채소병리검정지원사업단에서 진행하였다. 뿌리혹병 병리검정은 파종 14일 후 유묘에 강릉에서 채집하여 증식한 뿌리혹병균(race 9)을 9.8×10^8 spores/pot가 되도록 접종하였으며, 20℃에서 1주간 배양한 후 온실에서 재배하였다. 접종 5주 후에 발병도를 조사하였다. 저항성을 Resistance(R), 감수성을 Sensitivity(S), 중도저항성을 Medium Resistance(MR)으로 표시하였다(Fig. 20). 뿌리혹병 저항성 검정을 위하여 대조품종으로 사용한 'CR황록배추'는 저항성을, '노랑김장배추'는 감수성을 보였다. 녹색꽃양배추 대조품종으로 실험한 '아오시마', '베리돔'은 감수성을 나타내었다. 그 결과 시들음병 저항성 BN3324의 7계통, 뿌리혹병 저항성계통은 없었으며 BN3305의 1계통에서 중도저항성이 나타났다(표 8-8).

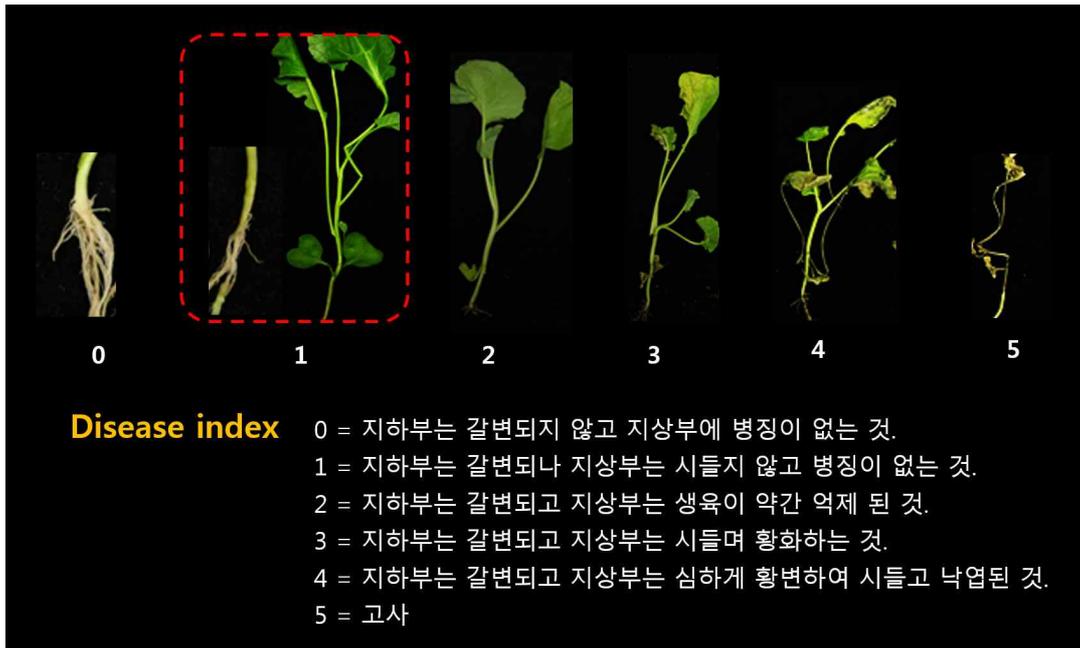


그림 8-7. 브로콜리 시들음병 병리검증 index (3차년도)

표 8-8. 약(소포자) 배양 유래 선발계통(DH) 시들음병, 뿌리혹병 검정결과 (3차년도)

BN	Mother plant	Line	² Resistance level		Note
			^y F	^y C	
3301	102	MC 5-G ₁	-	-	종자발아불량
3302	102	MC 10-G ₁	S	S	
3303	102	MC 25-G ₁	S	S	
3304	105	MC 33-G ₁	MR	S	
3305	109	MC 43-G ₁	MR	MR	
3306	110	MC 46-G ₁	MR	S	
3307	113	MC 49-G ₁	S	S	
3308	113	MC 55-G ₁	S	S	
3309	116	MC 61-G ₁	S	S	
3310	116	MC 64-G ₁	MR	S	
3311	116	MC 70-G ₁	S	S	
3312	116	MC 72-G ₁	MR	S	
3313	120	MC 75-G ₁	MR	S	
3314	120	MC 78-G ₁	S	S	
3315	126	MC 89-G ₁	S	S	
3317	126	MC 93-G ₁	S	S	
3318	126	MC 99-G ₁	S	S	

3319	126	MC 101-G ₁	MR	S	
3320	126	MC 102-G ₁	S	S	
3321	126	MC 103-G ₁	MR	S	
3322	126	MC 104-G ₁	MR	S	
3323	126	MC 106-G ₁	S	MR	
3324	126	MC 107-G ₁	R	S	
3325	126	MC 108-G ₁	R	S	
3326	126	MC 112-G ₁	R	S	
3327	126	MC 116-G ₁	MR	S	
3328	126	MC 117-G ₁	R	S	
3329	126	MC 121-G ₁	S	S	
3330	126	MC 122-G ₁	R	S	
3331	127	MC 124-G ₁	S	S	
3332	127	MC 127-G ₁	MR	S	
3333	127	MC 133-G ₁	S	S	
3334	127	MC 138-G ₁	R	S	
3335	128	MC 140-G ₁	R	S	
3336	128	MC 141-G ₁	R	S	
3337	128	MC 143-G ₁	S	-	종자발아불량
3338	128	MC 148-G ₁	S	-	종자발아불량
3339	128	MC 150-G ₁	S	S	

²Resistance Level : Resistance(R), Sensitivity(S), Medium Resistance(MR)

^yF: Fusarium wilt, C: Clubroot

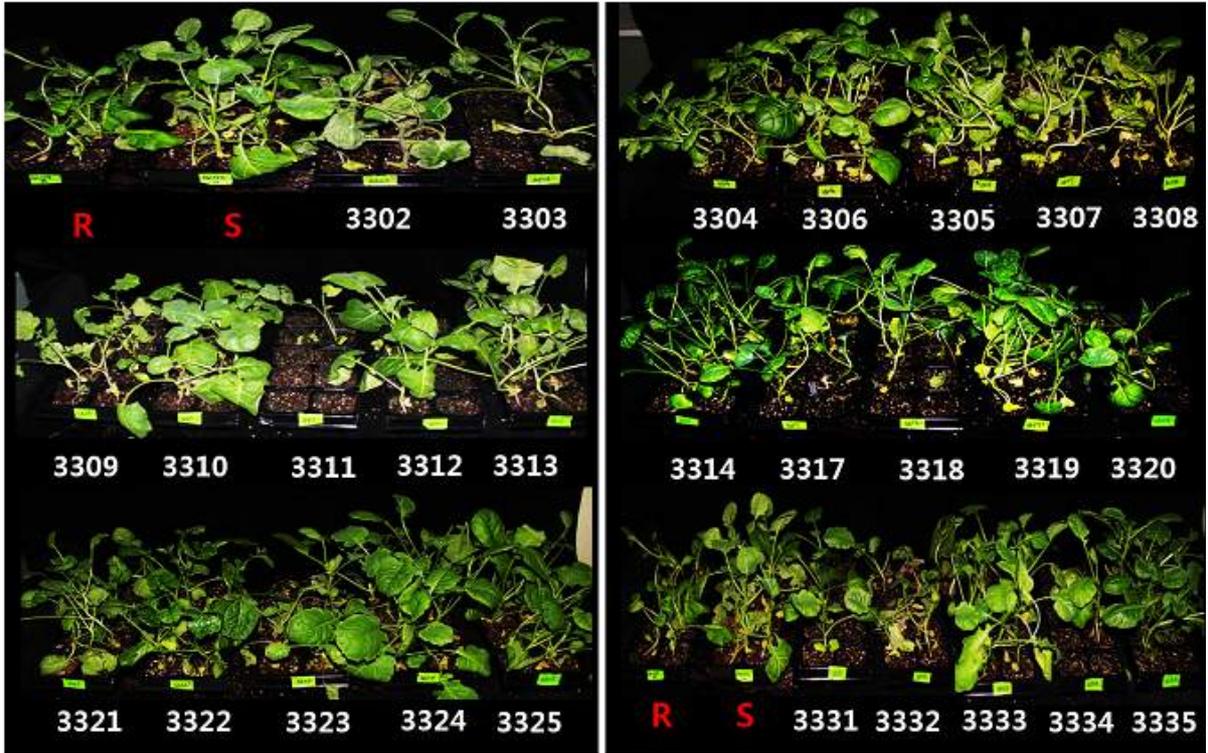


그림 8-8. 약(소포자) 배양 유래 선발계통(DH) 시들음병 검정결과 (3차년도)

㉞ 기보유 계통 시들음병, 뿌리혹병 검정결과: 세대진전된 기보유 계통들의 복합 내병성(시들음병, 뿌리혹병) 유지여부를 확인하고자 채소병리검정사업단에 의뢰하였다. 시들음병의 경우에는 1차 채소병리검정지원사업단에 의뢰하였을 때 발아불량으로 인하여 확인이 어려웠던 시료들을 2차로 한국생명공학연구원의 박정미 박사님팀에 의뢰하여 결과를 재확인하였다. 그 결과 기보유 7계통(BN3340-3342, BN3345, BN3350-3353)에서 저항성이 유지되고 있으며, 2계통에서는 중도저항성을 보였다(표 8-9, 그림 8-8). 뿌리혹병은 채소병리검정지원사업단에 의뢰하여 2계통(BN3340, BN3341)에서 저항성이 확인되었으며, 3계통(BN3345, BN3348, BN3349)에서 중도 저항성을 나타내었다. 이를 바탕으로 조합작성이 가능한 기보유계통을 선발하였다(표 8-10, 그림 8-9).

표 8-9. 기보유 선발계통(DH) 시들음병, 뿌리혹병 검정결과 (3차년도)

BN	Line	Resistance level		Note
		^y F	^y C	
3340	2Br01	—	R	F-발아불량
3341	2Br02	R	R	
3342	2Br03	R	S	
3343	2Br04	—	—	발아불량
3344	2Br05	MR	S	
3345	2Br07	R	MR	
3346	2Br08	—	—	발아불량
3347	2Br09	—	—	발아불량
3348	2Br10	S	MR	
3349	2Br11	MR	MR	

3350	2Br12	R	S	
3351	2Br15	R	S	
3352	2Br16	R	S	
3353	2Br19	R	S	

²Resistance Level : Resistance(R), Sensitivity(S), Medium Resistance(MR)

^yF: Fusarium wilt, C: Clubroot



그림 8-9. 기보유 계통 시들음병 검정결과 (3차년도)



그림 8-10. 기보유계통 뿌리혹병 검정결과 (3차년도)

㉞ 약유래 및 기보유 F₁ 조합 내병성 검정결과: 약유래와 기보유계통간의 조합을 작성하여 내병성 여부를 확인하기 위해 채소병리사업단에 병리검정을 요청하였다. 시들음병의 경우, 저항성(R)은 7개체, 중도저항성(MR)은 3개체가 확인되었다(표 8-10, 그림 8-10). 뿌리혹병 검정결과, 저항성은 10개체, 중도저항성은 11개체로 확인되었다(표 8-11, 그림 8-11).

표 8-10. 약유래 선발계통(DH) 시들음병, 뿌리혹병 검정결과 (3차년도)

²Resistance Level : Resistance(R), Sensitivity(S), Medium Resistance(MR)

BN	Combination	^z Resistance level		Selection
		^y F	^y C	
3501	MC2 × MC49	S	S	O
3502	MC3 × MC43	S	MR	O
3503	MC3 × 2Br03	S	MR	
3504	MC3 × MC 89	S	MR	
3505	MC3 × MC121	S	S	
3506	MC4 × MC 91	S	MR	
3507	MC7 × MC140	-	S	
3508	MC7 × 2Br09	S	S	
3509	MC7 × MC 72	S	S	
3510	MC7 × MC112	S	S	
3511	MC11 × MC101	S	S	
3512	MC24 × MC103	S	S	
3513	MC24 × 2Br12	-	S	
3514	MC29 × MC104	S	R	
3515	MC33 × MC66	S	R	
3516	MC33 × MC12	S	R	
3517	MC33 × 2Br19	MR	S	
3518	MC33 × MC54	R	S	
3519	MC33 × MC43	R	S	
3520	MC33 × MC111	S	S	
3521	MC33 × MC5	S	R	
3522	MC43 × MC129	S	R	
3523	MC43 × MC105	S	MR	
3524	MC43 × MC112	S	MR	
3525	MC43 × MC5	S	MR	
3526	MC46 × MC2	S	S	
3527	MC46 × MC64	S	S	
3528	MC46 × MC61	S	S	
3529	MC46 × MC25	S	R	
3530	MC49 × MC75	S	S	
3531	MC49 × MC95	S	S	
3532	MC49 × MC16	S	S	
3533	MC49 × MC59	S	S	
3534	MC49 × MC4	S	S	O

3535	MC49 × MC99	S	S	O
3536	MC50 × 2Br04	S	S	O
3537	MC52 × MC125	S	MR	
3538	MC55 × MC70	S	S	O
3539	MC55 × MC89	MR	S	O
3540	MC61 × MC8	S	S	
3541	MC61 × MC29	S	S	O
3542	MC61 × MC91	S	S	
3543	MC64 × 2Br12	S	S	
3544	MC64 × MC142	S	S	
3545	MC64 × MC13	S	S	O
3546	MC70 × 2Br15	S	S	O
3547	MC70 × MC150	S	S	
3548	MC70 × MC10	S	-	O
3549	MC70 × MC49	S	R	O
3550	MC72 × MC89	S	S	
3551	MC72 × MC99	S	S	
3552	MC74 × MC31	S	S	O
3553(A301)	MC75 × MC25	R	S	O
3554(A302)	MC75 × MC10	R	S	O
3555	MC76 × MC141	S	S	O
3556	MC78 × MC41	S	S	
3557	MC78 × 2Br19	S	S	
3558	MC78 × MC48	S	S	
3559(A303)	MC89 × MC10	R	S	O
3560(A309)	MC89 × MC43	R	S	O
3561(A310)	MC89 × MC46	MR	S	O
3562	MC90 × MC48	S	S	O
3563	MC91 × MC2	S	S	
3565	MC93 × MC56	S	S	
3566	MC93 × MC68	S	S	
3567	MC94 × MC52	S	S	
3568	MC96 × MC140	S	S	
3569	MC96 × MC143	S	S	
3570	MC98 × MC64	S	S	
3571	MC99 × 2Br02	S	S	

3572	MC99 × MC64	S	S	
3573	MC99 × MC62	S	S	
3574	MC99 × MC13	S	S	O
3575	MC101 × MC25	S	S	O
3576	MC101 × MC43	S	MR	O
3577	MC102 × MC49	S	S	
3578	MC102 × MC41	S	S	O
3579	MC103 × MC72	S	S	
3580	MC103 × MC90	S	S	
3581	MC106 × 2Br11	S	S	
3582	MC106 × 2Br15	S	S	O
3583	MC106 × MC138	S	S	
3585	MC107 × MC30	S	S	
3586	MC107 × MC10	S	S	O
3587	MC107 × MC25	S	S	O
3588	MC107 × MC27	S	S	
3589	MC108 × MC28	S	S	O
3590	MC108 × MC35	S	S	
3591	MC108 × MC53	S	S	
3593	MC112 × MC148	S	S	
3594	MC116 × MC10	S	S	
3596	MC116 × MC25	S	S	
3597	MC116 × MC50	S	S	
3598	MC116 × MC89	S	S	
3599	MC116 × MC8	S	S	
3600	MC117 × MC6	S	S	
3601	MC121 × MC6	S	S	
3602	MC121 × MC95	S	S	
3603	MC121 × 2Br10	S	S	
3604	MC121 × 2Br11	S	S	
3605	MC121 × MC43	S	S	
3606	MC121 × MC46	S	S	
3607	MC121 × MC49	S	S	
3608	MC122 × MC6	S	MR	
3611	MC122 × MC99	S	S	
3612	MC123 × MC11	S	S	O

3613	MC123 × MC41	S	S	
3614	MC123 × MC149	S	S	
3616	MC124 × MC92	S	S	
3617	MC127 × MC116	S	S	
3618	MC127 × MC148	S	S	
3619	MC127 × MC10	S	S	O
3620	MC133 × MC25	S	S	O
3621	MC138 × MC5	S	S	O
3622	MC138 × MC116	S	MR	
3623	MC138 × MC76	S	S	O
3624	MC140 × MC25	S	S	O
3625	MC140 × MC43	S	S	O
3626	MC140 × MC46	S	S	
3629	MC141 × MC55	S	S	
3630	MC141 × MC61	S	S	
3631	MC141 × MC69	S	S	
3632	MC142 × MC4	S	S	O
3633	MC143 × MC3	S	S	O
3634	MC146 × MC18	S	S	O
3635	MC147 × MC44	S	S	
3636	MC149 × MC2	S	S	
3637	MC150 × MC68	S	S	
3638	MC150 × MC76	S	S	O
3639(A311)	MC150 × MC75	R	R	O
3640	2Br01 × 2Br10	S	R	O
3641	2Br01 × MC37	S	S	O
3642	2Br05 × MC99	S	S	O
3643	2Br05 × MC131	S	S	O
3644	2Br09 × MC41	S	R	O
3645	2Br09 × 2Br04	S	S	O
3646	2Br10 × MC100	S	S	
3647	2Br11 × MC131	S	S	
3648	2Br16 × MC88	S	-	

^yF: Fusarium wilt, C: Clubroot

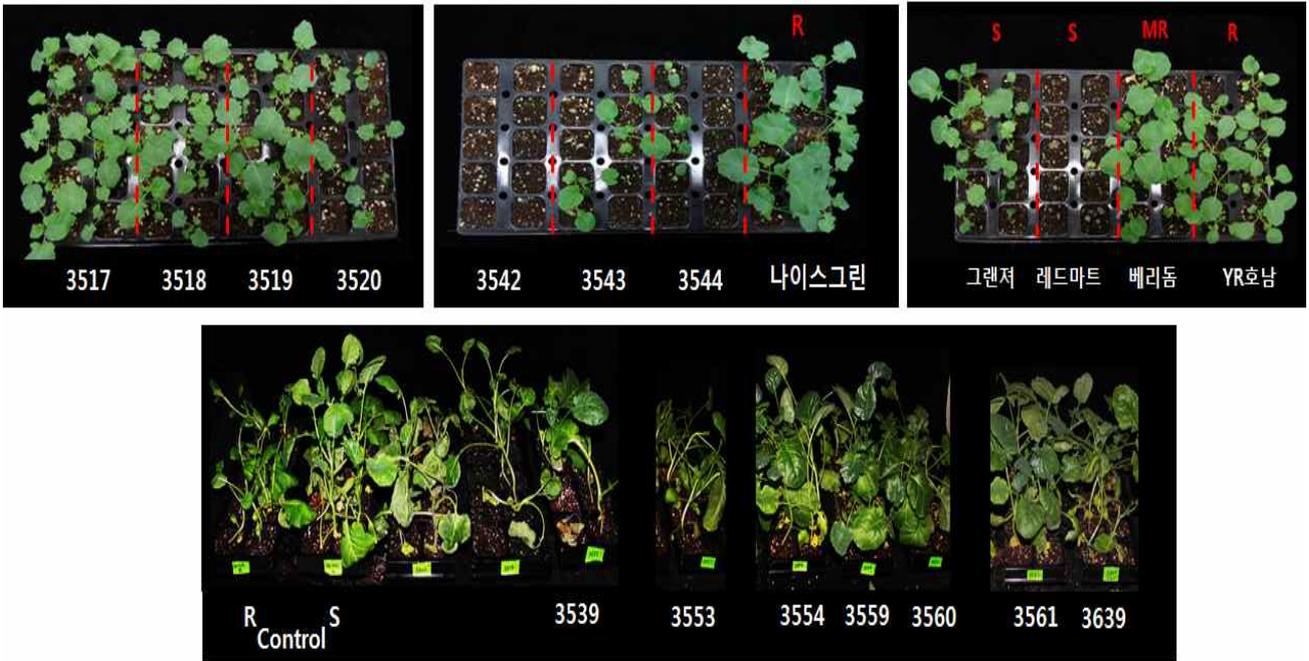


그림 8-11. 약배양 및 기보유 조합 시들음병 검정결과 (3차년도)

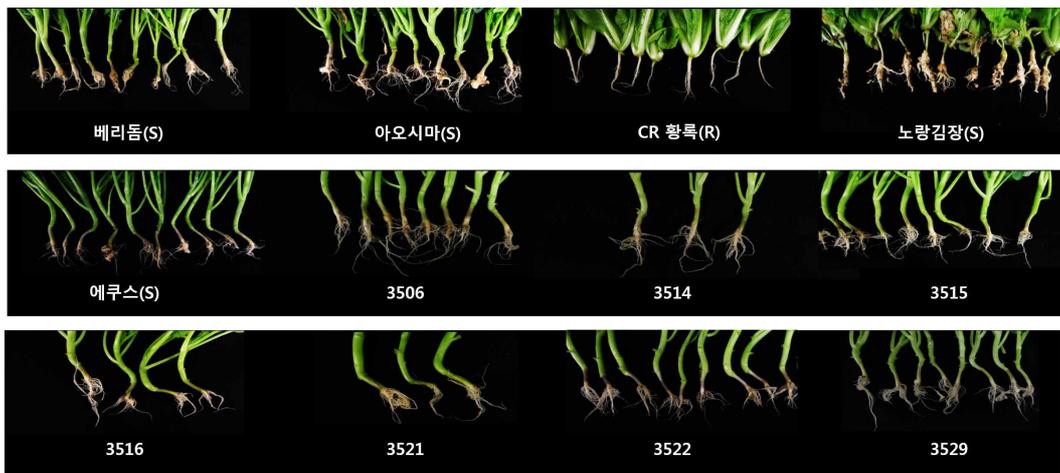


그림 8-12. 약배양 및 기보유 조합 뿌리혹병 검정결과 (3차년도)

- ㉔ 약유래/기보유/응성불임 계통 및 F₁ 조합 내병성 검정결과: 약배양계통으로서 현재까지 선발되어온 총 11계통(표 8-11)에 대하여 시들음병, 뿌리혹병 병리검정을 채소병리지원사업단에 의뢰하여 실시하였다. 그 결과, 약배양유래 11계통에 대하여 시들음병 병리검정 결과 총 5계통에 대하여 저항성(BN4305, 4307, 4310, 4311), 중도저항성(BN4304)을 나타내었으며, 감수성으로 확인된 BN4302는 원예학적 형질의 우수성에 의해 선발되었다(그림 8-12).

표 8-11. 약유래 선발계통(DH) 시들음병 검정결과(4차년도)

BN	Mother plant	Line	^z Resistance level	Selection
			^y F	
4301	102	MC 5-G ₂	S	
4302	102	MC 10-G ₂	S	○
4303	102	MC 25-G ₂	S	
4304	120	MC 75-G ₂	MR	○
4305	126	MC 89-G ₂	R	○
4306	126	MC 99-G ₂	S	
4307	126	MC 107-G ₂	R	○
4308	127	MC 133-G ₂	S	
4309	127	MC 138-G ₂	S	
4310	128	MC 143-G ₂	R	○
4311	128	MC 150-G ₂	R	○

^zResistance Level : Resistance(R), Sensitivity(S), Medium Resistance(MR)

^yF: Fusarium wilt, C: Clubroot



그림 8-13. 약유래계통(DH) 시들음병 병리검정결과 (4차년도)

- ㉠ 약유래 선발계통 내병성(뿌리혹병) 포장검정 결과: 시들음병에 대한 내병성 검정 방법은 이전 년차의 내병성검정과过程和 동일하게 이루어졌으나 뿌리혹병에 대한 *In vivo* 내병성 검정(Lab)은 계통별로 년차간 저항성 정도가 달라 재실험에 착수 하였으며 재배현장 저항성을 보기위해 강릉원주대학교 김병섭교수님 실험실에서 포장검정을 의뢰하여 진행되었다. 포장검정은 강릉원주대학교 시험포장에서 실시되었으며, 1.4×10^5 spores/ml 농도의 휴면포자 현탁액을 시험구 포장 전면에서 접종하였으며, 1달간 육묘한 브로콜리와 레이스 판별품종을 통해 저항성을 확인

하였다. 그 결과, 약유래 선발 계통 중 BN3305, BN3338에서 저항성(R)을 가지고 있으며, BN4306 - BN4310는 중도저항성(MR)을 나타내었다(표 8-12, 그림 8-13).

표 8-12. 약유래 선발계통(DH) 뿌리혹병(포장) 검정결과(4차년도)

BN	Mother plant	Line	² Resistance level		Note
			%	Level	
4302	102	MC 10-G ₂	32	S	
4304	120	MC 75-G ₂	28	S	
4306	126	MC 99-G ₂	8	MR	
4308	127	MC 133-G ₂	13	MR	
4309	127	MC 138-G ₂	6	MR	
4310	128	MC 143-G ₂	10	MR	
3305	109	MC 43-G ₂	3	R	종자부족으로 3차년도 종자 불출함.
3338	128	MC 148-G ₂	3	R	

²Resistance Level : Resistance(R), Sensitivity(S), Medium Resistance(MR)



4302 - 지상부

4302 - 뿌리



4304 - 지상부

4304 - 뿌리



4306 - 지상부

4306 - 뿌리



4311 - 지상부

4311 - 뿌리



3305 - 지상부

3305 - 뿌리



3338 - 지상부

3338 - 뿌리



4308 - 지상부

4308 - 뿌리



4309 - 지상부

4309 - 뿌리



4310 - 지상부

4310 - 뿌리

그림

8-14.

약유래계통(DH) 뿌리혹병(포장) 병리검정결과 (4차년도)

- ㉔ 기보유 선발계통 내병성(시들음병, 뿌리혹병) 검정결과: 1차년도부터 3차년도까지 연구 기간동안 지속적으로 내병성 및 우수형질에 대해 검정하고 선발한 결과, Table 23과 같이 기보유 2계통을 선발하였으며, 교배조합작성을 위해 내병성 유지결과를 확인하고자 채소병리검정사업단에 시들음병을, 강릉원주대학교 김병섭 교수님 연구실에 뿌리혹병(포장) 검정을 진행하였다. 그 결과, 시들음병에서는 2계통 모두 저항성(그림 8-14)을 나타내었으나, 뿌리혹병에서는 모두 감수성을 나타내었다.

표 8-13. 기보유 선발계통 내병성 검정결과(4차년도)

4 th yr BN	2 nd yr BN	Line	² Resistance level		Note
			^y F	^y C	
4312	2Br04	10GH07	R	S	O
4313	2Br09	10GH24	R	S	O

²Resistance Level : Resistance(R), Sensitivity(S), Medium Resistance(MR)

^yF: Fusarium wilt, C: Clubroot



그림 8-15. 기보유선발계통 시들음병 검정결과 (4차년도)

- ㉔ 웅성불임계통 내병성(시들음병, 뿌리혹병) 검정결과: 웅성불임 11계통과 약유래 계통간의 조합작성을 위하여 웅성불임계통의 내병성 여부를 확인하고자 병리검정을 진행하였다. 그 결과, 시들음병에서 11계통 모두 저항성(R)을 나타내었으며 (Fig. 28), 뿌리혹병에서는 저항성 1계통(BN4111)과 중도저항성 2계통(BN4108, BN4109)을 확인할 수 있었다(Fig. 29). 확인된 내병성 유지 여부를 가지고 조합작성을 하는 기준으로 적용하였다(표 8-14).

표 8-14. 응성불임계통 내병성(시들음병, 뿌리혹병) 검정(4차년도)

BN	Backcross	^z Resistance level		Note
		^y F	^y C	
4101	BC ₄ x 10GH06	R	S	
4102	BC ₄ x 10GH13	R	S	
4103	BC ₄ x 10GH11	R	S	
4104	BC ₄ x 10GH31	R	S	
4105	BC ₄ x 10GH07	R	S	
4106	BC ₄ x 10GH06	R	S	
4107	BC ₄ x 10GH31	R	S	
4108	BC ₄ x 10GH32	R	MR	
4109	BC ₄ x 10GH07	R	MR	
4110	BC ₃ x 10GH30	R	S	
4111	BC ₃ x 10GH24	R	R	

^zResistance Level : Resistance(R), Sensitivity(S), Medium Resistance(MR)

^yF: Fusarium wilt, C: Clubroot

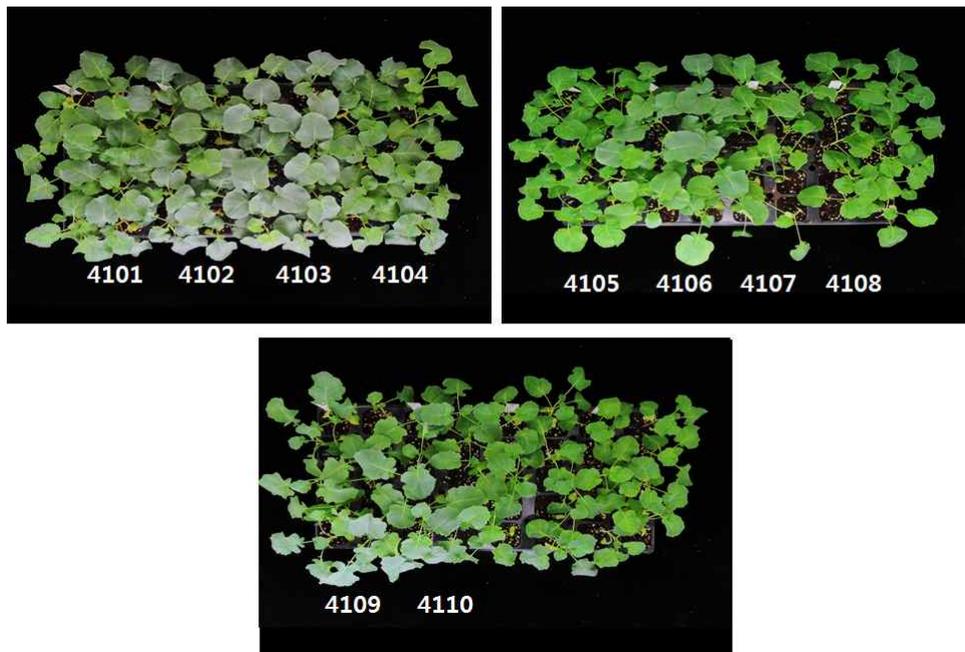


그림 8-16. 응성불임 11계통 시들음병 검정결과 (4차년도)

그림 8-17. 응성불임 11계통 뿌리혹병 검정결과 (4차년도)

㉠ 약유래 및 기보유 F₁ 조합 내병성(시들음병, 뿌리혹병) 검정 결과: 약유래 및 기



4108 - 지상부

4108 - 뿌리



4109 - 지상부

4109 - 뿌리



4111 - 지상부

4111 - 뿌리

보유 세대진전을 진행하여 조합하기에 적합한 계통을 선발하였고 이를 바탕으로 F₁ 조합을 진행하였다. 선발 계통의 대부분은 시들음병, 뿌리혹병에 저항성을 가지고 있으며, 성능검정을 통해 형태학적인 특성들을 확인하여 F₁ 조합 작성에 부합되는 계통들을 위주로 적용하였다. 이러한 과정을 통해 조합작성된 F₁ 15조합들의 내병성 검정을 진행한 결과, 총 5조합(BN 4802, 4805, 4807, 4810, 4812(A311))에서 저항성(R)을 나타내었으며, 중도저항성(MR)도 3조합(BN 4801(A302), 4806, 4813)이 확인되었다(표 8-15, 그림 8-17). 뿌리혹병(포장검정)에서는 모두 감수성을 나타내었다(그림 8-18). 이를 바탕으로 성능검정을 통해 F₁ 조합을 선발하였다.

표 8-15. 약유래 및 기보유 F₁ 조합 내병성(시들음병, 뿌리혹병) 검정(4차년도)

BN	Combination	^z Resistance level		Note
		^y F	^y C	
4801	MC75 x MC10	MR	S	A302
4802	MC89 x MC43	R	S	A309
4803	MC90 x MC48	S	S	
4804	MC99 x MC13	S	S	
4805	MC100 x 2Br04	R	S	

4806	MC107 x MC10	MR	S	
4807	MC123 x MC11	R	S	
4808	MC133 x MC25	S	S	
4809	MC138 x MC5	S	S	
4810	MC143 x MC3	R	S	
4811	MC146 x MC18	-	S	
4812	MC150 x MC75	R	S	A311
4813	MC150 x MC76	MR	S	
4814	2Br09-62 x MC41	-	S	
4815	2Br09-63 x 2Br04	-	S	A313

^zResistance Level : Resistance(R), Sensitivity(S), Medium Resistance(MR)

^yF: Fusarium wilt, C: Clubroot

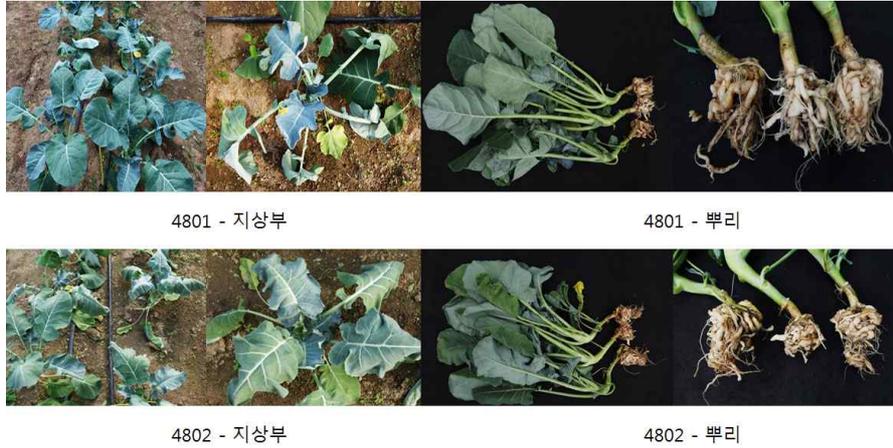


그림 8-18. 약유래 및 기보유 F₁ 조합 시들음병 검정결과 (4차년도)

그림 8-19. 약유래 및 기보유 F₁ 조합 뿌리혹병 검정결과 (4차년도)

- ㉑ 세포질 응성불임성을 이용한 F₁ 조합 내병성(시들음병) 검정: 기보유 응성불임성 계통과 약배양 유래 및 기보유 계통을 총 56조합 작성하였으며, 내병성 여부를 확인하고자 하였다. 그 결과, 시들음병에서 38조합이 저항성(R)을 나타내었으며 중도저항성(MR)은 9조합을 보였다(표 8-16, 그림 8-19, 8-20).

표 8-16. 응성불임계통과 기보유/약배양 계통간 F₁ 조합 내병성 검정결과 (4차년도)



^zResistance Level : Resistance(R), Sensitivity(S), Medium Resistance(MR)
^yF: Fusarium wilt, C: Clubroot

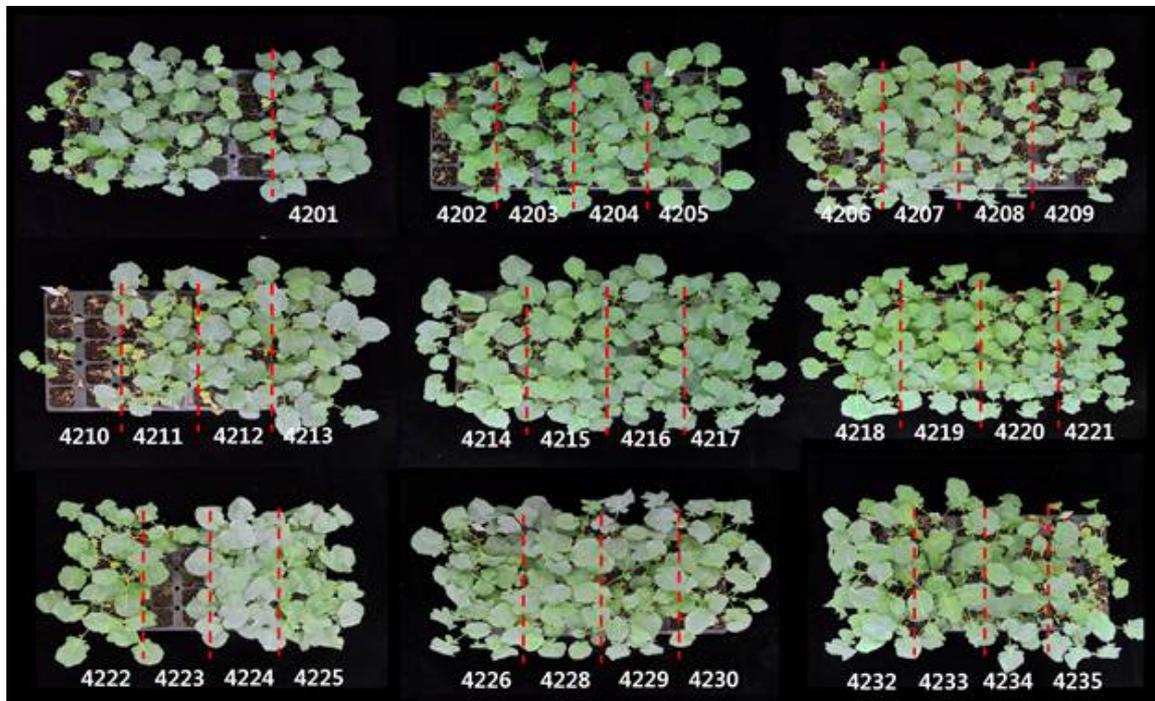


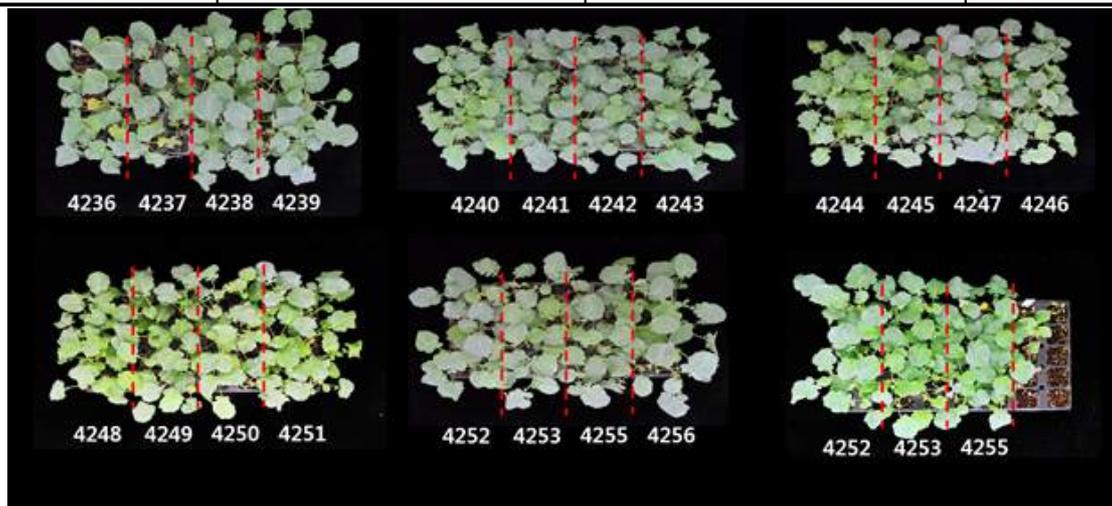
그림 8-20 세포질 응성불임성 F₁ 조합 시들음병 병리검정결과 (4차년도)

그림 8-21. 세포질 응성불임성 F₁ 조합 시들음병 병리검정결과 (4차년도)

Ⓣ 세포질 응성불임성을 이용한 F₁ 조합 내병성(뿌리혹병) 포장 검정: 뿌리혹병에 대한 1차 병리검정에서의 결과가 모두 감수성으로 확인되어 연구평가 시에 조언해

BN	Combination	^z Resistance level	Selection
		^y F	
4201	3101 x 3306	R	0
4202	3101 x 3313	S	
4203	3101 x 3318	R	0
4204	3102 x 3302	MR	0
4205	3102 x 3313	MR	0
4206	3102 x 3303	MR	0
4207	3102 x 3306	R	0
4208	3102 x 3318	MR	0
4209	3102 x 3333	MR	0
4210	3103 x 3348	S	
4211	3103 x 3301	S	
4212	3103 x 3306	S	
4213	3103 x 3313	R	0
4214	3105 x 3302	MR	0
4215	3106 x 3326	R	0
4216	3106 x 3335	R	0
4217	3106 x 3341	R	0
4218	3106 x 3308	R	0
4219	3106 x 3338	R	0
4220	3106 x 3334	MR	0
4221	3106 x 3321	R	0
4222	3107 x 3303	R	0
4223	3107 x 3302	R	0
4224	3108 x 3306	R	0
4225	3108 x 3301	R	0
4226	3108 x 3309	R	0
4228	3108 x 3343	R	0
4229	3108 x 3315	R	0
4230	3108 x 3318	R	0
4232	3108 x 3302	R	0
4233	3109 x 3315	R	0
4234	3109 x 3313	R	0
4235	3109 x 3348	S	
4236	3109 x 3306	S	

4237	3109 x 3302	S	
4238	3109 x 3305	R	O
4239	3109 x 3321	R	O
4240	3109 x 3334	R	O
4241	3109 x 3335	R	O
4242	3110 x 3321	R	O
4243	3110 x 3334	R	O
4244	3110 x 3309	R	O
4245	3110 x 3338	R	O
4246	3110 x 3302	R	O
4247	3110 x 3306	R	O
4248	3110 x 3305	R	O
4249	3110 x 3348	R	O
4250	3111 x 3318	MR	O
4251	3111 x 3352	R	O
4252	3111 x 3306	MR	O
4253	3111 x 3334	R	O
4255	3111 x 3333	S	
4256	3111 x 3303	R	O
4258	3112 x 3302	S	
4259	31121 x 3338	R	O
4260	31121 x 3335	R	O



주셨던 뿌리혹병 포장검정을 2차적으로 실시하였다. 실험은 강릉원주대학교 김병섭 교수님 실험실에서 진행되었다. 그 결과, 응성불임 조합 중 BN4209, 4219에서 중도저항성(MR)을 나타내었다(표 8-17, 그림 8-21, 8-22). 이는 성능검정을 통해 모든 조건을 고려하여 선발하고자 하였다.

표 8-17. 세포질 응성불임성 조합 뿌리혹병(포장) 병리검정결과 (4차년도)

BN	Combination	² C Resistance Level		Note
		%	Level	
4205	3102 x 3313	50	S	
4208	3102 x 3318	43	S	
4209	3102 x 3333	12	MR	O
4218	3106 x 3308	34	S	
4219	3106 x 3338	22	MR	O
4238	3109 x 3305	38	S	
4241	3109 x 3335	28	S	
4245	3110 x 3338	62	S	
4248	3110 x 3305	53	S	
4259	31121 x 3338	67	S	
4260	31121 x 3335	52	S	

²Resistance Level : Resistance(R), Sensitivity(S), Medium Resistance(MR)

그림 8-22. 세포질 응성불임성을 이용한 F₁ 조합 뿌리혹병(포장) 병리검정결과 (4차년도)

그림 8-23. 세포질 응성불임성을 이용한 F₁ 조합 뿌리혹병(포장) 병리검정결과 (4차년도)

㉠ 응성불임성을 이용한 F₁ 조합의 내병성 검정결과: 선발된 조합 및 새로 작성된 총 83조합에 대하여 내병성 검정을 진행하였다. 그 결과, 시들음병에서 15조합이 저항성을(BN5024, 5048, 5049, 5063, 5067, 5069, 5071, 5073, 5080, 5081, 5092, 5097, 5102, 5108, 5110) 나타내었으며, 37조합에서는 중도저항성(MR)을 확인하였다. 그러나 뿌리혹병에서는 저항성을 확인할 수 없었다(표 8-18, 그림 8-23, 8-24).

표 8-18. 응성불임성을 이용한 F₁ 조합 시들음병, 뿌리혹병 병리검정 (5차년도)

BN	Combination	² Resistance Level		Selection
		F	C	
5020	31121 x 3338	MR	S	
5021	31121 x 3335	MR	S	
5022	3110 x 3338	S	S	
5023	4101 x 4302	MR	S	



4205 - 지상부



4205 - 뿌리



4208 - 지상부



4208 - 뿌리



4209 - 지상부



4209 - 뿌리



4218 - 지상부



4218 - 뿌리



4219 - 지상부



4219 - 뿌리

5057	4105 x 4503	MR	S	
5058	4105 x 4506	MR	S	
5059	4106 x 4302	MR	S	
5060	4106 x 4304	MR	S	



4238 - 지상부



4238 - 뿌리



4241 - 지상부



4241 - 뿌리



4245 - 지상부



4245 - 뿌리



4248 - 지상부



4248 - 뿌리



4259 - 지상부



4259 - 뿌리

번호	길이 x 폭	수	비	비고
5093	4109 x 3305	MR	S	O(품종보호)
5094	4110 x 4302	MR	S	
5095	4110 x 4304	MR	S	
5096	4110 x 4306	MR	S	
5097	4110 x 4506	R	S	
5098	4111 x 4302	MR	S	

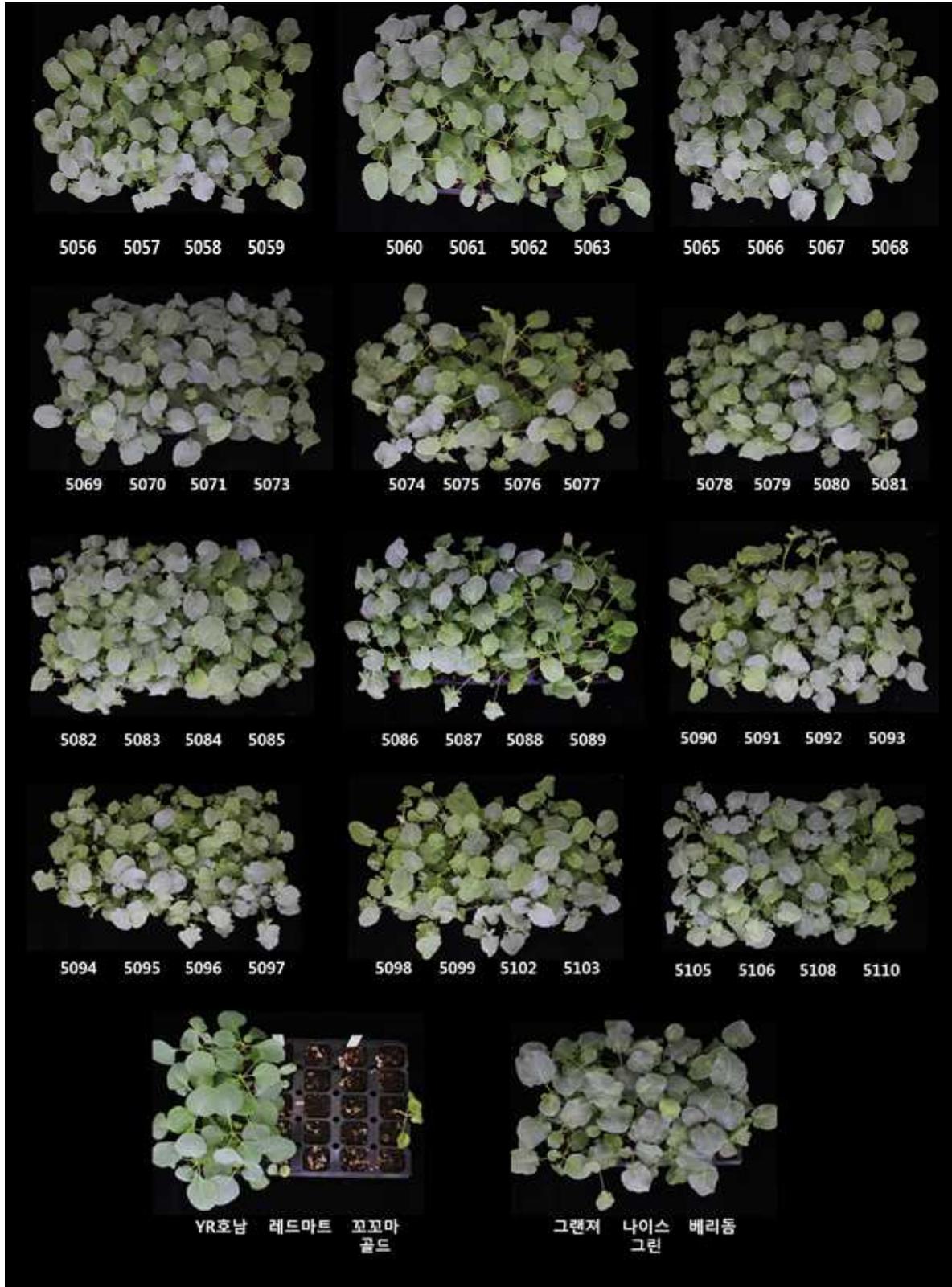
5099	4111 x 4306	MR	S	○
5102	4111 x 4310	R	S	
5103	4111 x 4311	MR	S	
5105	4111 x 4506	MR	S	
5106	4112 x 4302	MR	S	
5108	4112 x 4311	R	S	
5110	4108 x 3338	R	S	

²Resistance Level : Resistance(R), Sensitivity(S), Medium Resistance(MR)



그림 8-24. 응성불임성을 이용한 F₁ 조합 시들음병 병리검정 (5차년도)

그림 8-25. 응성불임성을 이용한 F₁ 조합 시들음병 병리검정 (5차년도)



㉞ 고순도, 고품질 1대 잡종 품종 육성: 녹색꽃양배추 품종개발을 위한 기보유계통 및 수집된 재료의 계통 평가항목으로 숙기, 엽특성, 잎자세, 구모양을 조사하였다(표 8-19, 그림 8-25). 위황병에 강한 기보유계통 12점과 수집계통 8점의 숙기

는 조생종이 14계통, 중조생이 4계통, 중만생종이 2계통으로 나타났다. 시들음병과 뿌리혹병에 강하며 화퇴(Head)모양 및 엽 특성 평가 결과 KO-002 계통이 가장 우수한 것으로 나타났다. 20계통 모두 세대진전을 실시하여 2년차에 조합 및 세대진전용으로 사용하였다.

표 8-19. 기보유 및 수집 계통 특성조사 (1차년도)

BN	^z Line	^y Maturity	^x Leaf attitude	Plant height (cm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	^w Leaf: Undulation of margin	^v Leaf: Dentation of margin	^u Head shape
KO-001	10GH04	E	4	76	60	28	5	3	4
KO-002	10GH05	E	4	58	43	23	7	3	5
KO-003	10GH06	E	3	74	62	22	6	2	4
KO-004	10GH07	E	3	65	49	17	6	2	4
KO-005	10GH09	E	4	75	58	25	6	3	3
KO-006	10GH10	ME	3	75	64	29	8	1	4
KO-007	10GH13	ME	3	69	55	23	6	3	4
KO-008	10GH22	ME	4	60	52	20	6	3	4
KO-009	10GH24	ML	3	62	45	18	6	3	5
KO-010	10GH27	ML	4	62	57	25	5	1	5
KO-011	10GH30	E	3	69	53	23	7	2	3
KO-012	10GH33	ME	3	75	56	23	6	3	4
KO-013	CL	E	4	67	45	16	6	2	3
KO-014	CL	E	4	55	42	19	4	1	3
KO-015	CL	E	4	70	50	17	6	3	3
KO-016	CL	E	3	71	55	20	6	3	4
KO-017	CL	E	4	70	57	22	6	3	3
KO-018	CL	E	4	65	53	20	6	3	4
KO-019	CL	E	4	67	52	22	6	3	4
KO-020	CL	E	4	61	47	21	7	2	3

^zLine: collected line(CL)

^yMaturity : Early(E), Medium(M), Late(L), Medium-Early(ME), Medium-Late(ML), Extremely-Early(EE)

^xLeaf attitude : semi-erect 3, horizontal 5, semi-pendulous 7.

^wUndulation of margin : absent or very weak 1, weak 3, medium 5, strong 7, very strong 9.

^vDentation of margin : weak 3, medium 5, strong 7.

^uHead shape : Horizontal type 1 , dome type 5.



그림 8-26. 기보유 및 수집계통의 잎 및 화퇴비교 (1차년도)

② 석회결핍둔감형 보유 양배추 품종 개발

- ㉠ Mapping population 집단 양성: Mapping population 집단 양성은 본 연구사업단이 유전체육종지원사업단으로 본 사업단의 목적을 위하여 양배추에서 유전체 육종을 지원할 수 있는 Mapping population 양성의 필요성이 제기되어 본 과제에서 수행키로 하여 추가된 항목이다. 칼슘결핍증 내성 계통(107140-)과 칼슘결핍 민감성 계통(102119-) 간의 교잡 후 대 종자를 확보하는 단계로 F2 600개체를 육묘하여 월동과 동시에 저온감응을 유도해 화아분화를 유발하고자 2012년 9월 10일에 105구 플러그트레이에 시판원예상토(원조믹스)를 사용하여 파종하고 2012년 10월 2일에 플라스틱 하우스 내에 정식하여 생육을 도모하였다. 2012년 10월 2일 정식시에는 주간 20cm으로 정식을 실시하였다. 11월부터 터널을 설치하여 야간에 플라스틱 필름 피복을 통해 보온하였다. 2012년 11월 20일 주간 15cm으로 좁혀 이식하고 플라스틱 필름 외부에 부직포를 덮어 야간 보온하였다. 교배모본 확보를 위한 육묘는 400주 이상의 F3 종자 획득이라는 목표 달성을 위한 효과성을 위해 600주 육묘 후 교배모본 500주 정식을 계획하였으며, 목표를 능률적으로 달성하기 위해 완전한 성숙모본을 양성하지 않고 늦게 파종하여 저온감응 요령에 도달한 후 최소의 면적에서 월동하는 것으로 설계하였다. 월동 후 2013년 3월 26일에 F3 종자 획득을 위한 교배를 위해 무작위로 선정한 500주를 주간 40cm 으로 최종 정식하였다. 월동 후 최종 정식을 3월 26일로 다소 늦게 시행한 것은 전반적으로 추대경의 신장이 시작된 시점에 이식을 통해 과도한 성장을 억제하고 안정적인 생식생장을 유도하여 교배의 편의성을 도모하기 위함이었다. Mapping population 집단 양성은 인위적인 형질선발을 배제하고 무작위를 유지해야 하는데, 성숙 상태의 결구묘를 양성할 경우 육성자의 선호에 따른 선발의 치우침이 작용할 수 있으며 후기 관리에 좀 더 노력이 요구된다. 파종부터 최종 정식 시까지 육종가의 선발효과가 미치지 않도록 도태나 선발이 행해지지 않도록 하였다. 현재 온풍난방기를 이용한 가온 상태에서 교배를 수행하였다. 칼슘결핍증과 관련한 Mapping

population 집단 양성은 최종 400주 이상의 라인을 확보하고자 한다.



그림 8-27. Mapping population 집단 양성

3차년도에 F3 종자를 확보하고 4차 년도인 2013년 9월 11일에 504점을 파종하였다. 이후 각 1개체씩 확보하고 현재 F4 종자를 획득하기 위한 인공교배를 수행하였다. 본 Mapping population 양성은 본 과제 종료 후에도 진행하여 최종적으로 F7~8 세대에서 400라인 이상 확보를 목표로 추진할 것이다. 목표를 능률적으로 달성하기 위해 완전한 성숙모본을 양성하지 않고 늦게 파종하여 저온감응 묘령에 도달한 후 최소의 면적에서 월동하는 것으로 설계하였다. Mapping population 집단 양성은 인위적인 형질선발을 배제하고 무작위를 유지해야 하는데, 성숙 상태의 결구묘를 양성할 경우 육성자의 선호에 따른 선발의 치우침이 작용 할 수 있으며 후기 관리에 좀 더 노력이 요구된다. 파종부터 최종 정식 시까지 육종가의 선발효과가 미치지 않도록 도태나 선발이 행해지지 않도록 하였다. 온풍난방기를 이용한 가온 상태에서 교배가 진행하여 4차 년도에 480라인에 대한 교배를 완료하여 F4 종자를 획득하였다.

5차 년도에 464라인에 대한 F4 식물체를 확보하여 인공교배를 통해 423라인의 F5 종자를 확보하였다.

- ㉠ 조합성능검정 및 조합선발: 석회결핍증과 내성 품종과 배추좀나방 내성 품종을 육성하기 위한 조합성능검정 시험은 4차 년도인 2013년 7월 26일에 파종하여 2013년 8월 26일에 노지포장에 정식하여 수행하였다. 대비품종을 포함하여 총 113조합을 공시하였다. 정식은 노지포장에 N-P-K를 10a 당 10-13-9kg 기비로 사용하고 퇴비는 시판 구드래퇴비(부여버섯영농조합)를 900kg 사용하였다. 이후 3차례의 추비를 통해 N-K를 18-16kg 사용하였다. 정식 포장은 70x40 2조식으로 준비하여 10주 2반복으로 재배하였다. 정식 후 관리는 관행재배에 따랐다. 정식 후 생육 중기에 가뭄으로 생육이 다소 지연되었다. 생육 후 기에는 기온이 평년보다 높았으나 중기 가뭄으로 인해 전반적으로 결구비대가 지연되는 현상을 나타내었다. 공시된 재료들에 대하여 원예적 특성을 조사하였다. 조합성능검정용 조합작성은 웅성불임성이 유기된 계통을 모계친으로 사용하여 조합을 작성하였으며 부계친의 경우 계통순화가 완료된 고정계통을 화분친으로 사용하여 조합을 작성하였다. 조합 구성은 육성자의 판단에 따라 각 계통을 원예적 특성을 고려하여 교배조합을 설계하였다. 본 과제 수행 팀은 중생종과 중만생종 위주의 육성 계통을 확보하고 있어 전체 조합의 구성은 중생종과 중만생종 위주의 조합이 작성되었다. 조생종의 경우 정식 후 55일에

수확 가능한 정도의 숙기를 가지는 조합으로 작성되었으며 50일 이내의 조합은 없었다. 특히 이들 조합 가운데 공시번호 7번과 47번 조합은 숙기 85일 정도의 월동용으로 활용 가능성이 있을 것으로 판단되며, 공시번호 75번 조합은 안토시아닌 발현이 없고 포장저장성이 매우 우수하여 인도지역 수출용으로 가능성이 있을 것으로 판단되었다.

<표 8-20> 유망조합특성 조사표(2013년 가을)

공시 번호	초세	엽색	엽면 요철	구형	숙기	심고 /구고	구중	긴도	비고
7	강	회농록	소	중간	만	0.4	2.8	중	석회결핍내성조합
13	강	회농록	소	중간	중만	0.4	2.6	중상	석회결핍내성조합
15	강	회록	소	중간	중만	0.5	2.5	중상	석회결핍내성조합
22	중강	녹	중소	중간	중	0.4	2.3	중상	석회결핍내성조합
34	중	녹	중	정구	중	0.3	2.4	상	석회결핍내성조합
35	중	녹	소	중간	중조	0.6	2.7	상	석회결핍내성조합
47	강	회록	중소	중간	만	0.3	2.3	중하	좀나방내성조합
70	중	회록	중소	중간	중만	0.3	2.3	중	좀나방내성조합
71	중	회록	중소	정구	중	0.3	1.2	중	좀나방내성조합
72	중약	회록	중소	정구	중조	0.3	1.5	극상	좀나방내성조합
75	중약	회록	중	정구	중조	0.3	1.6	상	좀나방내성조합
76	중약	회록	중	정구	중조	0.3	1.5	상	좀나방내성조합
YR호월	강	회록	중소	중간	중	0.3	2.6	상	일본 다키이

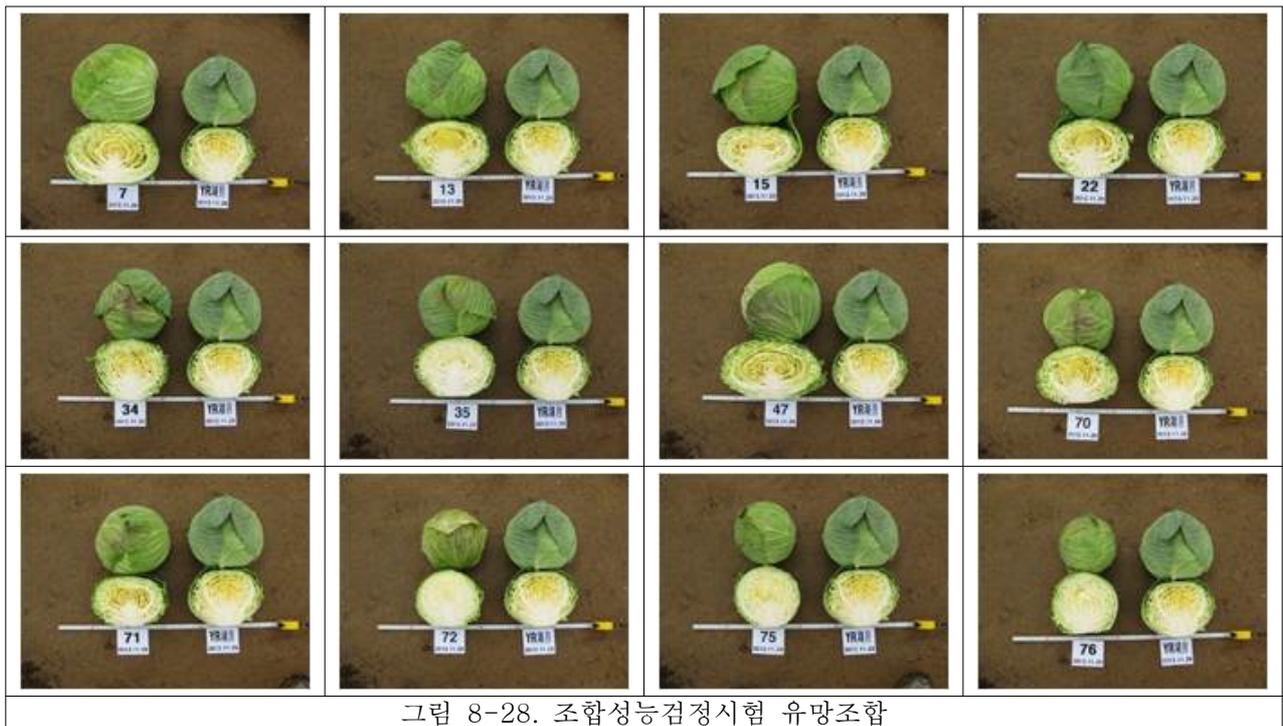


그림 8-28. 조합성능검정시험 유망조합

위 조합가운데 11조합은 2013년 9월 11일에 파종하여 채종모본을 확보하고 소형 망실에 서 채종시험을 수행하였다. 채종시험에서 확보된 종자를 사용하여 조합의 차대검정을 실시하고 최종 선발조합을 대상으로 품종보호출원을 실시코자 하였다.

5차 년도 석회결핍증과 내성 품종과 배추즙나방 내성 품종을 육성하기 위한 조합성능검정 시험은 2014년 7월 25일에 파종하여 2014년 8월 22일에 포장에 정식하였다. 대비품종을 포함하여 총 118조합을 공시하였다. 정식은 노지포장에 N-P-K를 10a 당 10-13-9kg 기비로 사용하고 퇴비는 시판 퇴비를 900kg 사용하였다. 이후 3차례의 추비를 통해 N-K를 18-16kg 사용하였다. 정식 포장은 70x40 2조식으로 준비하여 10주 2반복으로 재배하였다. 정식 후 관리는 관행재배에 따랐다. 정식 전 지속된 강우로 정식 당시 포장이 습한 상태였다. 정식 이후 생육 상태는 양호하였으나 생육 중기 아침 저온 현상으로 전반적인 숙기 지연이 있었다. 조합성능검정용 조합작성은 응성불임성이 유기된 계통을 모계친으로 사용하여 조합을 작성하였으며 부계친의 경우 계통순화가 완료된 고정계통을 화분친으로 사용하여 조합을 작성하였다. 조합구성은 육성자의 판단에 따라 각 계통을 원예적 특성을 고려하여 교배조합을 설계하였다. 본 과제 수행 팀은 중생종과 중만생종 위주의 육성계통을 확보하고 있어 전체 조합의 구성은 중생종과 중만생종 위주의 조합이 작성되었다. 조생종의 경우 정식 후 55일에 수확 가능한 정도의 숙기를 가지는 조합으로 작성되었으며 50일 이내의 조합은 없었다.

<표 8-21> 유망조합특성 조사표(2014년 가을)

공시 번호	초세	엽색	엽면 요철	구형	숙기	심고 /구고	구중	긴도	비고
27	중강	회농록	소	편	중	0.4	1.8	중	석회결핍내성조합
28	중강	회농록	소	편	중	0.4	2.2	중상	석회결핍내성조합
79	중강	회농록	소	중간	만	0.3	2.8	중상	석회결핍내성조합
80	중강	회농록	소	중간	만	0.4	2.6	중상	석회결핍내성조합
89	중강	농록	중소	중간	중만	0.3	2.4	중상	석회결핍내성조합
110	중강	농록	소	중간	중만	0.4	2.2	중상	석회결핍내성조합
111	강	녹	소	중간	중만	0.4	2.5	중상	석회결핍내성조합
117	중강	농록	중	중간	중만	0.3	2.0	중상	석회결핍내성조합
19	중강	회록	소	중간	중만	0.3	2.6	중상	즙나방내성조합
32	중	회록	소	중간	중	0.3	2.3	중상	즙나방내성조합
40	중	회록	소	중간	중만	0.3	1.8	중	즙나방내성조합
95	중강	회농록	중소	중간	중만	0.3	2.2	중상	즙나방내성조합
104	중강	회록	소	구	중만	0.3	2.0	상	즙나방내성조합
114	중강	회농록	소	중간	중만	0.4	2.2	중상	즙나방내성조합
YR호월	강	회록	소	중간	중	0.3	3.2	상	일본 다키이

조합성능검정 시험에서 대체로 우수한 성능을 나타낸 조합은 중만생계 조합이었다. 이들 조합 가운데 대비품종 YR湖月 보다 석회결핍증 및 배추즙나방 내성이 강하고 숙기가 늦은 2 조합을 최종 선발하여 채종시험을 실시하고 채종시험 종자의 검정을 거쳐 품종보호출원 하였다. 품종보호출원 한 최종선발조합은 공시번호 110(M102043 x 107152)와 공시번호 114(M107140 x 199324)였다. 공시번호 110번은 SC-901로 명명하였으며, 공시번호 114는 SC-902로 명명하였다. 두 조합 모두 중만생종으로 대비종 YR湖月보다 숙기가 늦어 월동형 작형에 유리할 것으로 판단하였다.

품종보호출원한 SC-901(M102043 x 107152)는 석회결핍증 내성이 2, 배추좀나방 내성 4로 대비품종 YR湖月の 석회결핍증 내성 4, 배추좀나방 내성 4 대비 석회결핍증에서 강한 내성을 보였으며, SC-902(M107140 x 199324)는 석회결핍증 내성 2, 배추좀나방 내성 3으로 대비품종 YR湖月の 석회결핍증 내성 4, 배추좀나방 내성 4 대비 우수한 내성을 보였다.



그림 8-29. 품종보호출원 조합

㉔ 다양한 세포질웅성불임성(CMS; Cytoplasmic male sterility)계통의 육성을 위하여 2010년부터 가을 성능검정에서 선발한 우수계통 45계통에 대하여 생산성이 우수한 기존 웅성불임계통을 이용한 여교잡을 실시하였다. 여교잡 종자는 가을 포장 시험에 공시하여 교잡친과 최대한 표현형이 같은 계통을 선발하여 고정시켰다. 웅성불임계통의 육종은 비교적 자가불화합성이 약한 계통이 여교잡이 쉽고 종자 생산성이 높기 때문에 자가불화합성이 약한 계통을 위주로 육성해 나가는 것이 유리하다. 또한 웅성불임성을 이용하면 조합시험에서 탁월한 성능을 나타내었으나 자가불화합성이 약하여 종자생산을 할 수 없기 때문에 폐기되었던 조합들도 웅성불임을 이용하여 살릴 수 있다.

Female은 자가불화합이 약한 웅성불임계통이고 male은 자가불화합이 강하여 개화기간이 긴 계통으로 조합구성이 된다면 종자생산에 많은 이점이 있을 것으로 사료된다. 그리고 웅성불임 육종에서 가장 중요한 것은 웅성불임 꽃이 기형이 아닌 정상화이면서 꽃에 넥타(꿀)가 있는지 초기세대에서 확인해야 한다는 것이다. 6 ~ 7년에 걸쳐 웅성불임계통을 육성한 다음 채종시험 결과 벌이 교배를 하지 않아 채종에 실패한다면 많은 시간과 예산을 낭비하게 된다. 계통을 고정시키기 전에 먼저 벌통을 투입하여 벌이 잘 가는지를 점검해 보는 것이 꼭 필요하다. 따라서 신규육성 웅성불임계통에 대해서 벌을 투입하여 웅성불임꽃의 넥타여부와 벌이 정상적으로 꽃에 잘 가는지를 확인하였다.



<1차년도>



<2차년도>



<3차년도>



<4차년도>



<5차년도>

그림 8-30. 세포질웅성불임 계통을 이용한 여교잡 작성

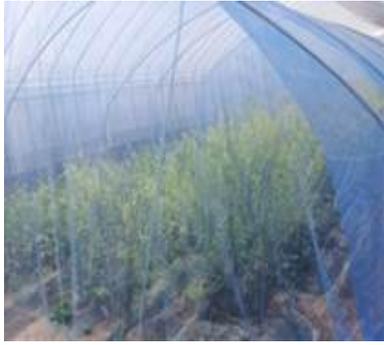
- ㉔ 2011년부터 시작종자 확보 및 종자생산력 검정을 위하여 전년도 모본 성능검정에서 선발한 성숙모본을 이용하여 그 해 봄 망실 하우스에 정식한 후 벌을 이용하여 시험채종을 실시하였다. 교배모본은 60 x 30cm 간격으로 2줄로 정식을 하였고 7월 초순에 예취하여 종자를 생산하였다. 종자생산력 검정 대상 조합은 내서성 및 위황병 저항성 선발 조합으로 40조합을 검정한 결과 “164MS x P6-1”, “2450-51 x 580s-52”, “1950-51 x 우-2”, “97-496B x P15-41-G2”, “2418-51MSBC5 x P15-41-G2”, “2418M5BC5 x 741-515”, “2514-51MSBC3 x DB-25”, “90-51MS x 농G-1S-G3”에서 주당 20g의 생산성을 보여 경제성이 충분한 것으로 확인되었다.



<2차년도>



<3차년도>



<4차년도>



<5차년도>

그림 8-31. 망실 하우스에서 벌을 이용한 시험채종

나. 목표형질 관련 브로콜리 신품종 개발

① 기보유 우수형질 및 내병계 계통 선발

㉞ 1차년도에서 세대진전된 20계통을 약(소포자)유래 계통간에 시험조합용으로 사용하였고, 내병성을 고려하여 13계통을 선발하고 차후에 응성불임계통 및 약배양 유래 계통과 조합 예정이다(Table 30). 1, 2차년도에서 10품종(조합)에서 약(소포자)유래된 A₁ 세대 140계통(MC 1 - MC 150) 및 기보유 내병계 20계통(2Br01 - 2Br20) 간에 조합을 작성하였으며 시들음병 내병계 조합, 뿌리혹병 내병계 조합, 복합내병성이 모두 있는 계통간의 조합 등 총 593조합을 작성하였다.

표 8-22. F₁ 조합작성 및 세대진전을 위한 기보유 계통 선발

BN \ List	Line	1st year BN	Selection
2Br01	10GH04(G ₆)-61	KO-001	O
2Br02	10GH05(G ₆)-67	KO-002	O
2Br03	10GH06(G ₆)-64	KO-003	O
2Br04	10GH07(G ₆)-61	KO-004	O

2Br05	10GH09(G ₆)-61	KO-005	○
2Br06	10GH10(G ₆)-68	KO-006	
2Br07	10GH13(G ₆)-65	KO-007	
2Br08	10GH22(G ₆)-71	KO-008	○
2Br09	10GH24(G ₆)-63	KO-009	○
2Br10	10GH27(G ₆)-68	KO-010	○
2Br11	10GH30(G ₆)-65	KO-011	○
2Br12	10GH33(G ₆)-71	KO-012	○
2Br13	BR1002(G ₂)-61-65	KO-013	
2Br14	BR1002(G ₂)-62-68	KO-014	
2Br15	BR1002(G ₂)-(63-62)	KO-015	○
2Br16	BR1003(G ₂)-61-61	KO-016	○
2Br17	BR1003(G ₂)-62-68	KO-017	
2Br18	BR1003(G ₂)-63-70	KO-018	
2Br19	BR1004(G ₂)-61	KO-019	○
2Br20	BR1004(G ₂)-62-72	KO-020	

㉔ 우수형질 약유래/기보유 계통 조합작성 및 성능검정 (3차년도)

1차년도에서 세대진전된 기보유 20계통을 약(소포자)유래 계통간에 시험조합용으로 사용하였고, 2차년도에 선발되어진 기보유 14계통에 대하여 3차년도에 세대진전을 하여 꼬투리(莢)수확 및 종자조제를 완료하였으며, F₁ 조합용으로 사용하였다(표 8-23). 약배양유래 선발계통(DH) 39계통을 세대진전 하였고, 내병계 14계통과 교배조합을 작성하여 종자조제를 완료하였다. 약(소포자)배양 및 기보유 유래 계통의 세대진전을 통해 수출 및 국내용 품종 개발에 적합한 계통을 확보하기 위하여 다음과 같은 특성조사를 실시하였다. 잎자세(Leaf attitude), 잎길이(Leaf length), 잎너비(Leaf width), 잎몸 가장자리 물결모양(undulation margin), 잎몸의 모용(Leaf hair) 유무, 잎몸 색깔(Leaf color)등을 최고생육기에 조사하였으며(그림 8-31), 화퇴특성을 통해 수확기에 숙기를 판단하였고, 화경(Peduncle), 화퇴 폭(Head width), 화퇴중(Head weight), 화퇴색(Head color), 단단한 정도(Compactness), 안토시아닌 유무(Anthocyanin coloration), 화퇴 소화(Bud size)의 크기, 화퇴 아래쪽 분지길이 등을 조사하였다. 뿌리혹병 내병계 검정 및 생육조사를 통하여 측지성, 잎성 등을 바탕으로 조합선발을 하였다. 뿐만 아니라 복합내병성을 가지고 있는 약배양 및 기보유 계통에서 60조합/ 대비종 6품종을 추가적으로 선발/작성하여 성능검정을 완료하였다.

표 8-23. 내병계 기보유 계통 세대진전

3 rd year BN	2 nd year BN	Line
3340	2Br01	10GH04(G ₆)-61-0
3341	2Br02	10GH05(G ₆)-67-0
3342	2Br03	10GH06(G ₆)-64-0
3343	2Br04	10GH07(G ₆)-61-0
3344	2Br05	10GH09(G ₆)-61-0
3346	2Br08	10GH22(G ₆)-71-0
3347	2Br09	10GH24(G ₆)-63-0
3348	2Br10	10GH27(G ₆)-68-0
3349	2Br11	10GH30(G ₆)-65-0
3350	2Br12	10GH33(G ₆)-71-0
3351	2Br15	BR1002(G ₂)-(63-62)-0
3352	2Br16	BR1003(G ₂)-61-0
3353	2Br19	BR1004(G ₂)-61-0

표 8-24. 선발된 약배양 유래 39계통 및 기보유 14계통의 엽 및 화뢰 특성 조사

BN	Line	^z Maturity	Plant height (cm)	Head width (cm)	Head weight (g)	^y Compactness	^x Bud size	Note
3301	MC 5	ME	61.5	11.5	176	5	5	
3302	MC 10	ML	62.5	11.9	206	5	5	
3303	MC 25	ME	65.0	12.1	188	5	3	
3304	MC 33	ME	51.0	10.6	228	7	6	
3305	MC 43	E	40.0	12.1	315	5	6	
3306	MC 46	E	42.5	12	144	6	7	
3307	MC 49	ML	58.0	12.6	252	5	4	
3308	MC 55	M	56.0	13.1	473	7	4	
3309	MC 61	ML	69.0	12.4	221	7	3	
3310	MC 64	ML	57.0	12	235	7	3	
3311	MC 70	L	49.0	12.8	136	4	3	
3312	MC 72	M	60.0	13.7	229	5	3	
3313	MC 75	M	60.0	12.9	319	7	5	
3314	MC 78	M	77.0	11.8	267	7	4	

3315	MC 89	ML	67.5	-	-	-		
3316	MC 91	ML	45.0	13.9	236	6	3	
3317	MC 93	L	52.0	-	-	-		
3318	MC 99	E	61.0	107.	202	5	3	
3319	MC 101	ME	46.0	-	-	-		
3320	MC 102	ML	61.0	12.2	204	6	3	
3321	MC 103	E	44.0	10.9	286	7	3	
3322	MC 104	L	45.0	-	-	-		
3323	MC 106	ME	52.0	11.9	230	5	3	
3324	MC 107	L	61.0	-	-	-		
3325	MC 108	L	58.0	-	-	-		
3326	MC 112	ME	50.5	12.1	213	5	5	
3327	MC 116	M	50.5	12.6	203	6	3	
3328	MC 117	L	47.0	-	-	-	-	
3329	MC 121	L	57.0	-	-	-	-	
3330	MC 122	ML	40.5	11.6	136	3	3	
3331	MC 124	ML	60.5	13.1	230	6	3	
3332	MC 127	M	65.0	11.6	258	7	3	
3333	MC 133	M	60.5	11.9	242	6	3	
3334	MC 138	M	57.5	12.1	260	7	3	
3335	MC 140	E	35.5	11.4	280	6	3	
3336	MC 141	E	41.5	12.7	285	5	5	
3337	MC 143	E	38.0	12	236	7	5	
3338	MC 148	E	40.0	10.7	262	6	6	
3339	MC 150	E	40.5	11.4	244	6	6	
3340	2Br01	E	47	11.8	210	5	4	
3341	2Br02	E	40	13.5	253	5	5	
3342	2Br03	E	54	11.6	169	5	4	
3343	2Br04	E	40	11.6	175	5	5	
3344	2Br05	E	50	12.1	179	5	5	
3345	2Br07	ME	50	11.4	225	5	5	
3346	2Br08	ME	50	12.4	260	4	5	
3347	2Br09	ME	40	11.4	220	6	5	
3348	2Br10	ME	50	12.2	257	5	6	
3349	2Br11	E	48	12.8	136	5	6	
3350	2Br12	E	51	11.4	221	3	5	
3351	2Br15	E	46	12.2	207	5	4	
3352	2Br16	ME	48	13.5	253	5	5	
3353	2Br19	E	40	12.6	168	4	5	

²Maturity : Early(E), Medium(M), Late(L), Medium-Early(ME), Medium-Late(ML)

³Compactness : loose 3, medium 5, firm 7.

^xBud size : small 3, medium 5, large 7.



그림 8-32. 약(소포자) 배양 및 기보유 계통 엽 특성 비교 (3차년도)
(순차적으로 배열되어 있음.)



그림 8-33. 선발계통 화퇴특성 (3차년도)

표 8-25. 선발 약유래 계통 (DH) 세대진전

Mother plant	1 st year line No, (A ₀ ^z -A ₁ ^y)	2 nd year line No, (A ₁ ^y -A ₂ ^x)	2 nd year BN	3 rd year line No, (A ₂ ^x -A ₃ ^w)	4 th year line No, (A ₃ ^w -A ₄ ^v)
102	29	28	MC1 ~ 29	3	3
105	9	8	MC30 ~ 38	1	0
109	5	4	MC39 ~ 43	1	0
110	3	2	MC44 ~ 46	1	0
113	9	9	MC47 ~ 55	2	0
116	19	18	MC56 ~ 74	4	0
120	14	12	MC75 ~ 88	2	1
126	35	35	MC89 ~ 123	16	3
127	16	13	MC124 ~ 139	4	2
128	11	11	MC140 ~ 150	5	2
합계	150	142		39	11

^zA₀: Anther-derived original generation

^yA₁: Anther-derived firstly self-generation

^xA₂: Anther-derived secondly self-generation

^wA₃: Anther-derived thirdly self-generation

^vA₄: Anther-derived fourthly self-generation

Combination Selecting



Selected line crossing

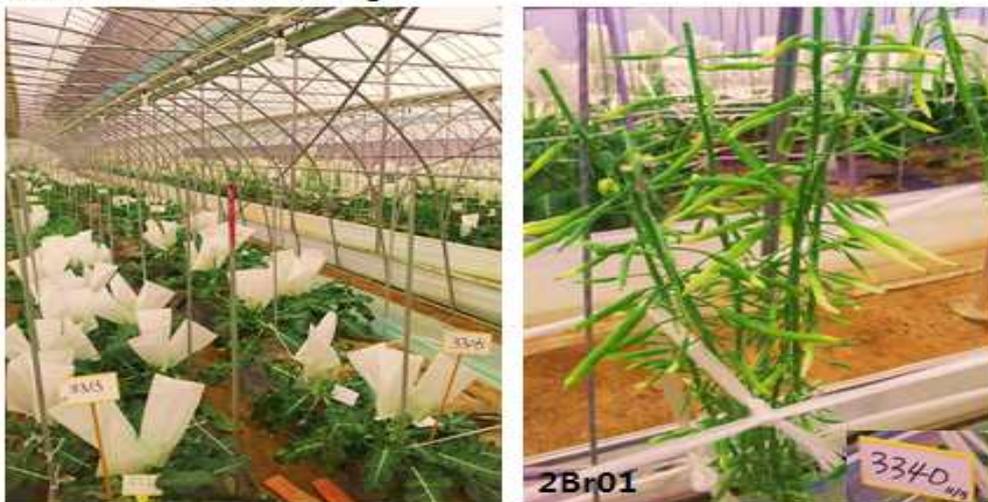


그림 8-34. 선발계통간 조합작성 (3차년도)

㉔ 약배양/기보유계통 세대진전 및 특성조사 (4차년도)

1차년도부터 내병성검정을 통해 선발된 기보유 2계통(BN4312, BN4313)과 약유래 11계통을 응성불임을 이용한 F₁ 조합 작성하는데 적용하고 있다. 이렇게 작성된 조합들에 대하여 지속적인 내병성 검정과 조합성능검정을 함으로 F₁ 선발을 통해 약배양, 기보유계통 세대진전에 대한 여부를 결정함과 동시에 새로운 교배조합을 작성하는데 매우 중요한 유전자원으로서 유지하고 있다. 선발된 기보유계통과 약배양계통의 시들음병, 뿌리혹병에 대한 저항성뿐만 아니라 원예학적인 특성을 아래와 같이 최고생육기에 조사하여 조합작성이 가능한 계통을 선발하였으며, 세대진전을 진행하였다.

표 8-26. 내병계 기보유 계통 세대진전 (4차년도)

BN	Line	2 nd year BN	3 rd year BN	^z Resistance Level(^y F)	Note
4312	10GH07(G ₆)-61-0	2Br04	3343	R	교배조합 작성
4313	10GH24(G ₆)-63-0	2Br09	3347	R	교배조합 작성

^zResistance Level : Resistance(R), Sensitivity(S), Medium Resistance(MR)

^yF: Fusarium wilt, C: Clubroot

표 8-27. 선발된 약유래 10계통 및 기보유 2계통의 엽 및 화퇴 특성 조사

BN	Line	^z Maturity	Plant height (cm)	Head width (cm)	Head weight (g)	^y Compactness	^x Bud size	Note
4301	MC 5-A ₁	ML	60	12	180	5	5	
4302	MC 10-A ₁	L	61	12	210	5	5	A302 Male line
4303	MC 25-A ₁	ML	64	12	190	5	5	
4304	MC 75-A ₁	M	60	13	300	7	5	A302 Female line, A311 Male line
4305	MC 89-A ₁	L	-	-	-	-	-	도태
4306	MC 99-A ₁	M	60	12	200	5	3	
4307	MC 107-A ₁	L	-	-	-	-	-	도태
4308	MC 133-A ₁	ML	61	12	243	6	3	
4309	MC 138-A ₁	ML	58	12	274	7	3	
4310	MC 143-A ₁	ML	40	12	235	7	5	
4311	MC 150-A ₁	E	41	12	273	7	5	A311 Female line
4312	2Br04	E	40	13	200	5	5	
4313	2Br09	ML	40	13	230	6	5	

^zMaturity : Early(E), Medium(M), Late(L), Medium-Early(ME), Medium-Late(ML)

^yCompactness : loose 3, medium 5, firm 7.

^xBud size : small 3, medium 5, large 7.

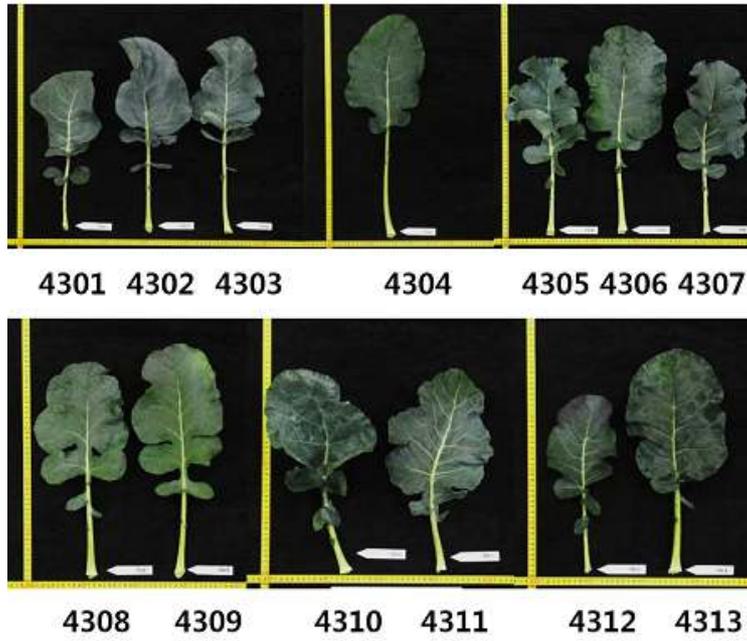


그림 8-35. 약배양 및 기보유 계통의 엽 특성조사 (4차년도)

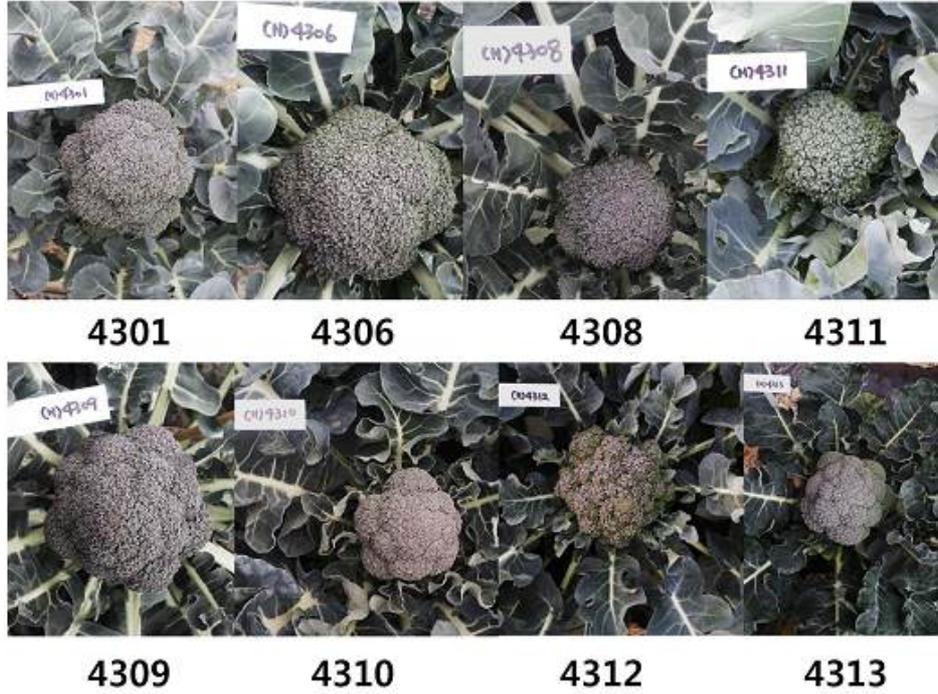


그림 8-36. 약배양 및 기보유 계통의 화퇴 특성조사 (4차년도)



그림 8-37. 선발된 약유래/기보유계통의 세대진전 (4차년도)

㉔ 내병계 우수품종 육성을 위한 F₁ 조합 성능검정 및 선발
가. 수집품종 및 시험조합 성능검정 (1차년도)

수출 및 국내용 품종개발을 위해 수집된 품종 및 기보유 시험 조합의 평가항목으로 잎자세, 엽절수, 잎길이, 잎너비, 잎몸 가장자리 물결모양, 잎몸의 모용 유무, 잎몸 색깔 등을 최고생육기에 조사하였고, 화퇴의 특성은 수확기에 숙기를 판단하였으며, 화경, 화퇴 폭, 화퇴 중, 화퇴 색, 단단한 정도, 구조, 안토시아닌 유무, 화퇴 소화의 크기, 화퇴 아래쪽 분지길이를 조사하였다.

한국, 일본, 미국, 중국, 유럽(네덜란드)에서 수집된 조합 및 품종의 숙기는 조생종 9, 중조생종 3, 중생종 4, 중만생 5, 만생종이 4품종으로 나타났으며, 특성조사의 종합적인 결과 육성목적인 조생종이며 엽특성 및 화퇴특성이 우수하여 연구과제 수행시 육성조합 대비품종으로 BN104, BN105, BN109을 선발하였다. 2011년 봄 성능검정 시험은 기보유 9 점 (BN101, 104, 105, 108, 109, 110, 114, 116, 120) 과 새롭게 수집된 6점 (BN K101, K102, K105, K107, K114, K115) 3조합(BN K116, K117, K118)을 2011년 3월 14일에 파종하여 3월 30일에 50구 트레이에 가식하였으며 본엽이 6~7매 정도 확보된 4월 20일에 육종연구소 봄 노지 포장에 정식하여 엽 최고생육기 및 수확기 화퇴 특성조사를 실시하였다.

정식 후 43일~70일에 화퇴 특성 조사가 완료되었으며, 불리한 환경조건(이상저온)에도 불구하고 유럽(네덜란드)에서 수집된 BN K115(레이톤) 품종은 중생종이며 화퇴입자가 균일하고 형태적 특성이 다른 품종들에 비하여 특히 우수하여 대비품종으로 선발하였으며 연구수행에 있어 육성 조합 선발 대비품종으로 사용하였다.

표 8-28. 수집품종 및 시험조합의 최고 생육기 특성 (1차년도)

BN	Country	^z Maturity	^y Leaf attitude	Peduncle (mm)	Head width (mm)	Head weight (g)	Head color	^x Compactness	^w Bud size
101	JAP	L	3	46	121	375	Gray Green	7	3
102	JAP	L	2	-	-	-	-	-	-
103	JAP	L	3	-	-	-	-	-	-
104	JAP	E	2	49	123	405	Gray Green	7	4
105	JAP	ME	3	38	123	296	Gray Green	7	5
106	KOR	M	3	31	123	210	Gray Green	5	7
107	KOR	E	3	48	120	400	Gray Green	7	3
108	JAP	ME	3	40	128	311	Gray Green	7	5
109	EU	E	3	32	134	355	Gray Green	7	5
110	JAP	ML	3	30	127	300	Gray Green	6	5
111	JAP	ML	3	45	119	390	Gray Green	7	3
112	USA	ME	3	32	128	360	Gray Green	7	3
113	JAP	ML	3	-	-	-	-	-	-
114	CHI	M	3	38	139	430	Gray Green	7	3
115	JAP	M	3	37	127	316	Gray Green	5	4
116	JAP	L	3	-	-	-	-	-	-
117	EU	ML	3	31	110	242	Gray Green	6	3
118	EU	ML	3	40	95	330	Gray Green	6	3
119	CHI	E	3	40	132	374	Gray Green	7	4
120	EU	E	3	41	127	440	Gray Green	6	5
121	EU	E	3	37	145	342	Gray Green	5	6
122	JAP	M	3	32	120	310	Gray Green	5	5
123	^u Comb.	EE	2	33	150	310	Gray Green	5	7
124	^u Comb.	EE	3	35	152	378	Gray Green	5	7
125	^u Comb.	E	3	32	125	276	Gray Green	5	6

^zMaturity : Early(E), Medium(M), Late(L), Medium-Early(ME), Medium-Late(ML), Extremely-Early(EE)

^yLeaf attitude : semi-erect 3, horizontal 5, semi-pendulous 7.

^xCompactness : loose 3, medium 5, firm 7.

^wBud size : small 3, medium 5, large 7.

^uComb. : Combination

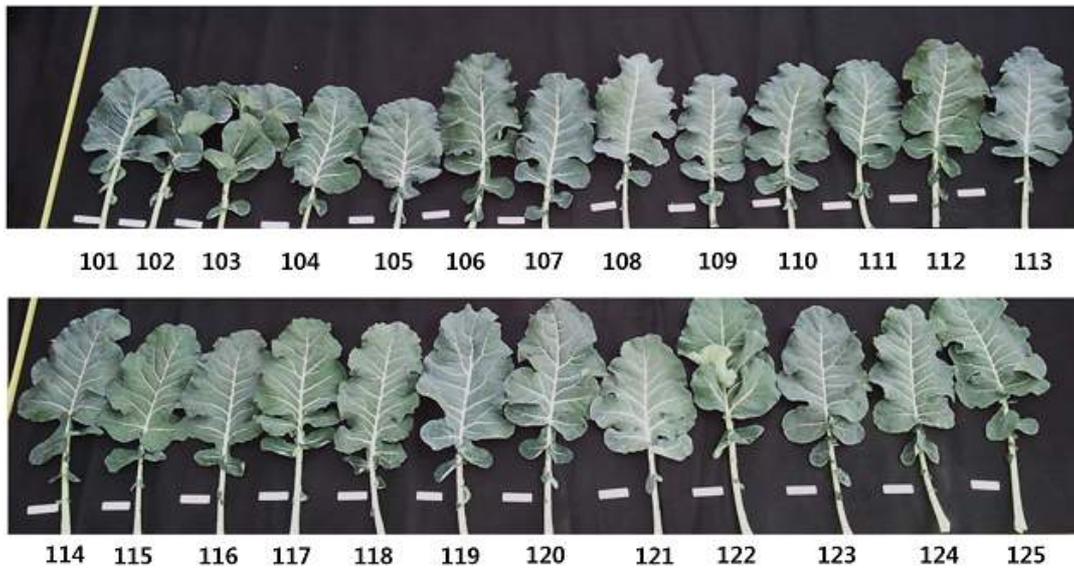


그림 8-38. 수집품종(22점) 및 조합(3점)의 엽 특성 (1차년도)



그림 8-39. 수집품종(22점) 및 조합(3점)의 화퇴특성 (1차년도)

표 8-29. 2011년 봄 작형 수집품종 및 조합 성능검정 (정식 후 51일)

BN	Country	^x Maturity	2010y BN	Plant height (cm)	Heat width (mm)	Head weight (g)	^y Compactness	^z Bud size	Selection
K101	JAP	M		70	45	461	5	3	
K102	EU	ML		68	43	445	6	4	
K103	JAP	ME	105	61.5	49	425	5	4	O
K104	EU	ME	120	74	47	446	7	4	
K105	EU	ME		66	41	465	6	4	
K106	JAP	ME	104	75	46	438	6	5	O
K107	JAP	E		73	31	358	4	5	
K108	EU	ME	109	71	42	416	6	3	O
K109	JAP	ME	108	62	43	391	6	2	
K110	JAP	ME	116	70	36	395	6	3	
K111	CHI	ME	114	60	53	434	6	3	
K112	JAP	M	110	67	38	368	6	3	
K113	JAP	L	101	73.5	38	345	6	4	
K114	CHI	ML		62	41	390	5	4	
K115	EU	M	Leyton	65	40	499	6	4	O
K116	^w Comb.	EE	123	61	34	400	3	6	
K117	^w Comb.	EE	124	73	38	407	4	5	
K118	^w Comb.	E	125	61	33	358	3	6	

^zBud size : small 3, medium 5, large 7.

^yCompactness : loose 3, medium 5, firm 7.

^xMaturity : Early(E), Medium(M), Late(L), Medium-Early(ME), Medium-Late(ML),
Extremely-Early(EE)

^wComb. : Combination



그림 8-40. 1차년도(2011) 봄 수집 품종(15점) 및 조합(3점)의 화퇴 특성조사



그림 8-41. 1차년도(2011) 봄 수집 품종(15점) 및 조합(3점)의 엽 특성조사

㉞ 기보유계통 간 F₁ 조합 성능검정 (2차년도)

기보유계통 중 내병계 간에 조합 작성을 실시하여 15조합을 완성하여 2011년 8월 4일에 파종하여 8월 30일에 정식하였다. 엽 특성 조사는 10월 17일 경에 초장, 엽장, 엽폭, 엽색, 잎자루 길이 등을 조사하였고, 화퇴 특성 조사는 2011년 11월 7일부터 11월 28일 까지 수확시기가 된 F₁ 조합 순으로 화퇴 중, 화퇴 경, 화퇴 크기, 돛 형태, 화퇴 색, 화퇴 밝기, 분지길이, 화퇴 입자 크기, 화퇴 구의 단단함, 균일성 등을 조사하였다. 총 15조합 중 선발조합 수는 3조합이며, BN607, BN609, BN612이다.

표 8-30. 2011년 가을 조합성능검정 (2차년도)

BN	^w Comb.	^z Maturity	Plant height (Cm)	Head width (Cm)	Head weight (g)	^y Comp actness	^x Bud size	Selecti on
601	KO 001 × KO 002	E	75	12.1	290	3	4	
602	KO 001 × KO 006	E	78	12.0	250	6	6	
603	KO 001 × KO 006	E	77	12.1	254	4	4	
604	KO 003 × KO 006	E	72	12.0	240	4	5	
605	KO 004 × KO 009	E	77	12.3	280	6	5	
606	KO 008 × KO 009	E	72	13.0	268	5	5	
607	KO 009 × KO 004	E	73	13.6	413	6	3	O
608	KO 010 × KO 001	M	69	11.8	242	5	5	

609	KO 010 × KO 001	ME	75	11.7	290	6	5	O
610	KO 010 × KO 011	E	81	13.2	385	6	5	
611	KO 011 × KO 010	ME	84	12.2	230	5	5	
612	KO 012 × KO 011	E	82	13.4	310	6	5	O
613	31×32	E	85	12.7	305	3	6	
614	32×31	E	75	12.6	290	4	7	
615	34 × KO 001	E	75	11.7	260	3	6	
616	Leyton(K115)	E	77	12.9	350	7	5	
617	K106	E	83	13.7	423	7	4	
618	K103	E	70	12.2	460	7	3	
619	K108	E	72	13.2	320	6	4	
620	SK3-085	L	82	13.3	370	7	3	
621	Greendas E	E	80	13.0	300	6	4	
622	Greendas 1	E	71	13.1	380	7	3	
623	Greendas 2	E	72	13.2	320	6	3	

^zMaturity : Early(E), Medium(M), Late(L), Medium-Early(ME), Medium-Late(ML)

^yCompactness : loose 3, medium 5, firm 7.

^xBud size : small 3, medium 5, large 7.

^wComb. : Combination

특히 BN607의 경우 품질이 우수한 녹색꽃양배추 품종인 '베리돔'과 '그레이스돔' 수준의 화퇴 구와 엽 특성을 보였으며, 숙기가 조생이며, 화퇴가 균일하고 돔 형태(Dome type)이 우수하여 중국수출용으로 상품가능성이 있는 것으로 나타났으며, BN609 조합의 경우 일본 종묘회사 '타바타 종묘' 관계자, BN612 조합의 경우 회사 내부 영업개발 담당자의 달관조사를 토대로 잎모양과 잎자세 화퇴 모양(Dome type)등에서 현재 녹색꽃양배추를 선호하는 품종 추세와 맞아 국내용 수입대체 품종으로 가능성을 보인다는 평가를 받았다. 따라서 BN607, BN609, BN612 등 총 3조합을 선발하였으며, 2012년 봄 재배 조합성능검정을 위해 2월 15일 파종, 시설재배 하우스에 4월 2일 정식하였으며 녹색꽃양배추 품종 중 품질이 뛰어난 조생종 '베리돔' 과 중생종 '레이톤'을 대비종으로 하였다. 봄 성능검정 결과 두 조합 모두 수출용 품질과 내수용 품질에는 미치지 못하였으나 2핵심과제에 BN607, 609 조합을 시들음병 검정을 의뢰한 결과 2조합 모두 시들음병 저항성 품종인 것으로 나타났다. 따라서 두 조합은 가을에 적합한 품종으로 확인하였다.

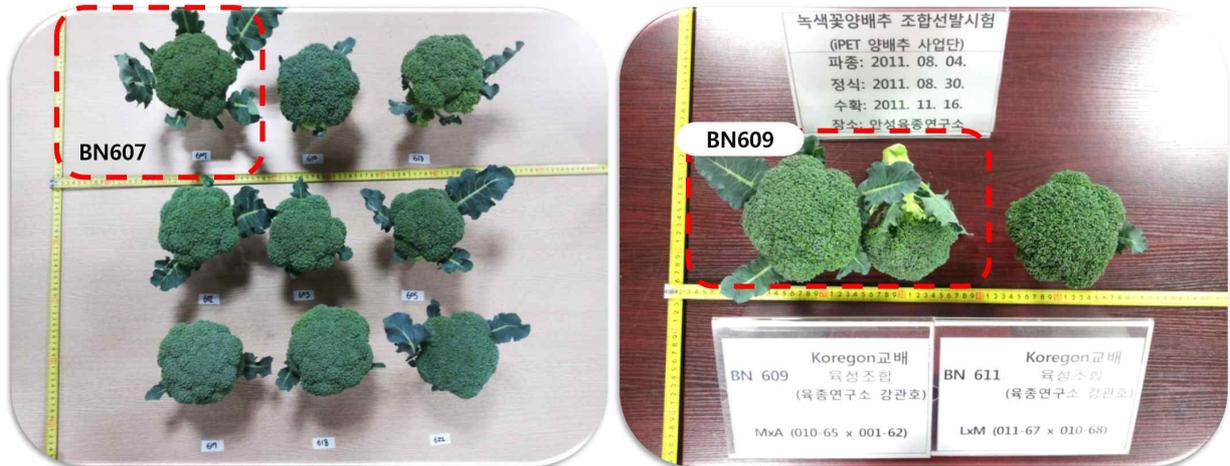


그림 8-42. 2차년도 F₁ 조합 능력 검정 결과 선발된 조합 (BN 607 좌, BN 609 우)

㉞ 약유래 및 기보유 계통 간 F₁ 조합 성능검정 (3차년도)

약유래에서 얻은 내병계 계통 및 기보유 내병계 계통을 이용하여 조합 작성을 실시하여 142조합을 완성하여 2012년 7월 26일에 파종하여 9월 3일에 정식하였고 구당 20주 2반복으로 배치하여 특성조사를 실시하였다. 엽 특성 조사는 10월 25일 경에 초장, 엽장, 엽폭, 엽색, 잎자루 길이 등을 조사하였고, 화퇴 특성 조사는 2012년 11월 15일부터 12월 5일 까지 수확시기가 된 F₁ 조합 순으로 화퇴 중, 화퇴 경, 화퇴 크기, 돛 형태, 화퇴 색, 화퇴 밝기, 분지길이, 화퇴 입자 크기, 화퇴 구의 단단함, 균일성 등을 조사하여 Table 39의 특성과 내병성결과를 바탕으로 형질이 우수한 BN3501을 비롯한 43조합을 선발하였다. 2013년 2월 19일에 파종하여 4월 1일 정식한 후 현재 봄 성능시험을 진행하였으며, 성능이 우수한 조합을 선발하였다.

표 8-31. 2012년 가을 조합성능검정 및 선발 (3차년도)

BN	Combination line	^z Maturity	Side Shoot	Uniformity	^v Bud size	^w Compactness	Selection	Note
3501	MC2 × MC49	M	Few	Good	4	6	0	
3502	MC3 × MC43	M	Few	Good	4	6	0	
3503	MC3 × 2Br03	E	Many	Bad	5	5		
3504	MC3 × MC 89	M	Many	Bad	5	5		
3505	MC3 × MC121	L	Many	Bad	4	5		
3506	MC4 × MC 91	L	Many	Bad	5	3		
3507	MC7 × MC140	L	Many	Bad	5	5		
3508	MC7 × 2Br09	L	Many	Bad	5	5		
3509	MC7 × MC 72	L	Many	Bad	5	5		
3510	MC7 × MC112	L	Many	Bad	5	4		
3511	MC11 × MC101	L	Many	Bad	5	5		

3512	MC24 × MC103	M	Many	Bad	5	4		
3513	MC24 × 2Br12	L	Many	Bad	5	4		
3514	MC29 × MC104	L	Many	Bad	5	4		
3515	MC33 × MC66	L	Many	Bad	5	6		
3516	MC33 × MC12	ML	Many	Bad	5	6		
3517	MC33 × 2Br19	L	Many	Bad	4	4		
3518	MC33 × MC54	L	Many	Bad	5	5		
3519	MC33 × MC43	M	Many	Bad	5	5		
3520	MC33 × MC111	ML	Many	Bad	3	5		
3521	MC33 × MC5	L	Many	Bad	5	6		
3522	MC43 × MC129	L	Many	Bad	4	6		
3523	MC43 × MC105	L	Many	Bad	5	6		
3524	MC43 × MC112	ML	Many	Bad	5	5		
3525	MC43 × MC5	ML	Many	Bad	4	4		
3526	MC46 × MC2	M	Many	Bad	4	5		
3527	MC46 × MC64	ML	Many	Bad	5	5		
3528	MC46 × MC61	L	Many	Bad	5	5		
3529	MC46 × MC25	L	Many	Bad	5	5		
3530	MC49 × MC75	L	Many	Bad	3	5		
3531	MC49 × MC95	L	Many	Bad	5	5		
3532	MC49 × MC16	L	Many	Bad	4	5		
3533	MC49 × MC59	L	Many	Bad	5	6		
3534	MC49 × MC4	M	Few	Good	3	6	O	
3535	MC49 × MC99	M	Few	Good	3	6	O	
3536	MC50 × 2Br04	M	Few	Good	3	6	O	
3537	MC52 × MC125	L	Many	Bad	5	7		
3538	MC55 × MC70	M	Few	Good	3	6	O	
3539	MC55 × MC89	M	Few	Good	3	6	O	A30 8
3540	MC61 × MC8	M	Few	Bad	5	6		
3541	MC61 × MC29	M	Few	Good	3	6	O	
3542	MC61 × MC91	L	Many	Bad	5	5		
3543	MC64 × 2Br12	ML	Many	Bad	5	5		
3544	MC64 × MC142	M	Few	Good	5	5	O	
3545	MC64 × MC13	L	Many	Bad	3	5		
3546	MC70 × 2Br15	M	Few	Good	4	5	O	
3547	MC70 × MC150	EL	Many	Bad	5	5		
3548	MC70 × MC10	M	Few	Good	3	6	O	
3549	MC70 × MC49	M	Few	Good	3	6	O	

3550	MC72 × MC89	L	Many	Bad	5	5		
3551	MC72 × MC99	M	Many	Bad	5	5		
3552	MC74 × MC31	M	Few	Good	4	4	O	
3553	MC75 × MC25	M	Few	Good	4	6	O	A30 1
3554	MC75 × MC10	M	Few	Good	4	7	O	A30 2
3556	MC78 × MC41	L	Many	Bad	5	4		
3557	MC78 × 2Br19	L	Many	Bad	5	4		
3558	MC78 × MC48	ML	Many	Bad	4	4		
3559	MC89 × MC10	M	Few	Good	4	6	O	A30 3
3560	MC89 × MC43	M	Few	Good	4	5	O	A30 9
3561	MC89 × MC46	M	Few	Good	4	6	O	A31 0
3562	MC90 × MC48	M	Few	Good	5	6	O	
3563	MC91 × MC2	L	Many	Bad	5	4		
3565	MC93 × MC56	L	Many	Bad	5	4		
3566	MC93 × MC68	ML	Many	Bad	5	5		
3567	MC94 × MC52	ML	Many	Bad	5	5		
3568	MC96 × MC140	ML	Many	Bad	5	5		
3569	MC96 × MC143	M	Many	Bad	4	4		
3570	MC98 × MC64	M	Few	Bad	4	4		
3571	MC99 × 2Br02	ME	Many	Bad	5	4		
3572	MC99 × MC64	L	Many	Bad	5	4		
3573	MC99 × MC62	L	Many	Bad	5	4		
3574	MC99 × MC13	M	Few	Good	4	5	O	
3575	MC101 × MC25	M	Few	Good	4	5	O	
3576	MC101 × MC43	M	Few	Good	4	5	O	
3577	MC102 × MC49	L	Many	Bad	4	3		
3578	MC102 × MC41	M	Few	Good	4	6	O	
3579	MC103 × MC72	ML	Many	Bad	5	6		
3580	MC103 × MC90	ML	Many	Bad	5	6		
3581	MC106 × 2Br11	E	Many	Bad	5	4		
3582	MC106 × 2Br15	E	Few	Good	5	5	O	
3583	MC106 × MC138	L	Many	Bad	5	5		
3585	MC107 × MC30	L	Many	Bad	5	5		
3586	MC107 × MC10	M	Few	Good	4	6	O	
3587	MC107 × MC25	M	Few	Good	4	6	O	
3588	MC107 × MC27	L	Many	Bad	5	5		

3590	MC108 × MC35	ML	Many	Bad	5	5		
3591	MC108 × MC53	ML	Many	Bad	5	5		
3593	MC112 × MC148	ML	Few	Bad	5	5		
3594	MC116 × MC10	ML	Many	Bad	5	5		
3596	MC116 × MC25	M	Many	Bad	5	5		
3597	MC116 × MC50	M	Few	Bad	4	5		
3598	MC116 × MC89	L	Many	Bad	5	5		
3599	MC116 × MC8	M	Few	Bad	5	5		
3600	MC117 × MC6	M	Many	Bad	5	5		
3601	MC121 × MC6	ML	Many	Bad	5	5		
3602	MC121 × MC95	ML	Few	Bad	3	4		
3603	MC121 × 2Br10	L	Few	Bad	5	4		
3604	MC121 × 2Br11	L	Few	Bad	5	4		
3605	MC121 × MC43	ML	Many	Bad	4	5		
3606	MC121 × MC46	L	Many	Bad	5	5		
3607	MC121 × MC49	ML	Few	Bad	5	5		
3608	MC122 × MC6	L	Many	Bad	5	5		
3611	MC122 × MC99	ML	Many	Bad	5	5		
3612	MC123 × MC11	M	Some	Good	3	6	0	
3613	MC123 × MC41	L	Many	Bad	5	6		
3614	MC123 × MC149	L	Few	Bad	5	5		
3616	MC124 × MC92	ML	Many	Bad	5	5		
3617	MC127 × MC116	L	Many	Bad	5	5		
3618	MC127 × MC148	L	Many	Bad	5	5		
3619	MC127 × MC10	M	Few	Good	3	5	0	
3620	MC133 × MC25	M	Few	Good	3	6	0	
3621	MC138 × MC5	M	Few	Good	3	6	0	
3622	MC138 × MC116	L	Many	Bad	5	6		
3624	MC140 × MC25	M	Few	Good	3	6	0	
3625	MC140 × MC43	M	Few	Good	3	6	0	
3626	MC140 × MC46	L	Many	Bad	5	4		
3629	MC141 × MC55	ML	Many	Bad	4	6		
3630	MC141 × MC61	ML	Few	Bad	5	6		
3631	MC141 × MC69	ML	Many	Bad	5	4		
3632	MC142 × MC4	M	Few	Good	3	6	0	
3633	MC143 × MC3	M	Few	Good	3	6	0	
3634	MC146 × MC18	M	Few	Good	3	6	0	
3635	MC147 × MC44	ML	Many	Bad	5	5		

3636	MC149 × MC2	L	Many	Bad	5	5		
3637	MC150 × MC68	M	Few	Bad	5	5		
3638	MC150 × MC75	M	Few	Good	3	6	O	
3639	MC150 × MC76	M	Few	Good	2	7	O	A31 1
3640	2Br01 × 2Br10	E	Few	Good	3	6	O	A31 2 (609)
3641	2Br01 × MC37	E	Some	Good	3	6	O	
3642	2Br05 × MC99	E	Few	Good	3	6	O	
3643	2Br05 × MC131	E	Few	Good	3	6	O	
3644	2Br09 × MC41	EE	Few	Good	3	6	O	
3645	2Br09 × 2Br04	E	Few	Good	4	6	O	A31 3 (607)
3646	2Br10 × MC100	ML	Many	Bad	5	4		
3647	2Br11 × MC131	L	Few	Bad	5	4		
3648	2Br16 × MC88	M	Few	Good	5	5		
3649	Leyton	E	Few	Good	3	6		
3650	코요시	E	Few	Good	3	7		
3651	그레이스덤	E	Few	Good	3	6		
3652	베리덤	E	Few	Good	3	7		
3653	녹룡2호	M	Few	Good	3	6		
3654	에이스덤	E	Few	Good	2	6		

^zHarvest Maturity : Early(E), Medium(M), Late(L), Medium-Early(ME), Medium-Late(ML)

^yBud Size : small 3, medium 5, large 7.

^xCompactness : loose 3, medium 5, firm 7.

2012년 가을 143조합 중 조합작성에 사용된 계통이 자가불화합성이 강하고, 조합의 종자생산량이 많으며 초기 생육이 왕성하고, 측지 발생이 다소 적고 원예학적 특성 형질이 뛰어난 13조합을 따로 선발하여 비닐하우스에서 원예학적특성을 검정하였다. 선발된 13조합 중 A302는 대조품종인 코요시/녹룡2호/에이스덤 과 비교하여 돔형태와 화뢰크기 및 화뢰입자의 균일성 및 화경의 굵어 상품가치가 높게 나타났으며, A311은 균일한 돔 형태와 화경이 매우 굵고 화뢰입자(소화크기)가 작아 상품성이 높은 조합으로 나타났다. 원예학적 형질에 의해 13조합 중에서 4조합을 도태시켰으며, 나머지 총 9조합 중 상품성이 우수한 2조합(Fig. 49 : 적색 둥근 원형으로 체크함)을 선발하였다. 2013년도 봄 성능검정은 선발된 9조합을 포함하여 57조합 및 대비종 6품종의 성능검정을 노지포장과 비닐하우스 포장에서 실시하였다.

표 8-32. 약배양 및 기보유 F₁ 우수조합 선발

BN	Combination	^z Maturity	Plant height (Cm)	Head width (Cm)	Head weight (g)	^y Compactness	^x Bud size	Selection
A301	MC75 × MC25	M	83	12.6	303	6	3	O
A302	MC75 × MC10	E	87	12.0	310	6	3	O
A303	MC89 × MC10	E	70	10.5	262	7	3	O
A304	MC33 × MC43	E	66	11.8	245	7	3	도태
A305	MC46 × MC64	—	—	—	—	—	—	도태
A306	MC46 × MC25	—	—	—	—	—	—	도태
A307	MC49 × MC75	M	88	13.3	361	6	2	도태
A308	MC55 × MC89	M	67	13.0	410	7	2	O
A309	MC89 × MC43	ME	67	12.7	332	7	3	O
A310	MC89 × MC46	L	59	11.7	301	5	4	O
A311	MC150 × MC75	E	73	11.2	359	7	3	O
A312 (BN 609)	2Br01 × 2Br10	E	72	11.4	266	7	2	O
A313 (BN 607)	2Br09 × 2Br04	E	64	11.5	130	6	3	O
대비종	레이톤	E	79	12.0	269	7	3	
대비종	코요시	E	82	12.9	305	7	3	
대비종	그레이스 돔	E	80	12.2	288	7	3	
대비종	베리돔	E	82	11.2	290	7	3	
대비종	녹룡 2호	M	88	13.4	340	6	3	

^zMaturity : Early(E), Medium(M), Late(L), Medium-Early(ME), Medium-Late(ML)

^yCompactness : loose 3, medium 5, firm 7.

^xBud size : small 3, medium 5, large 7.

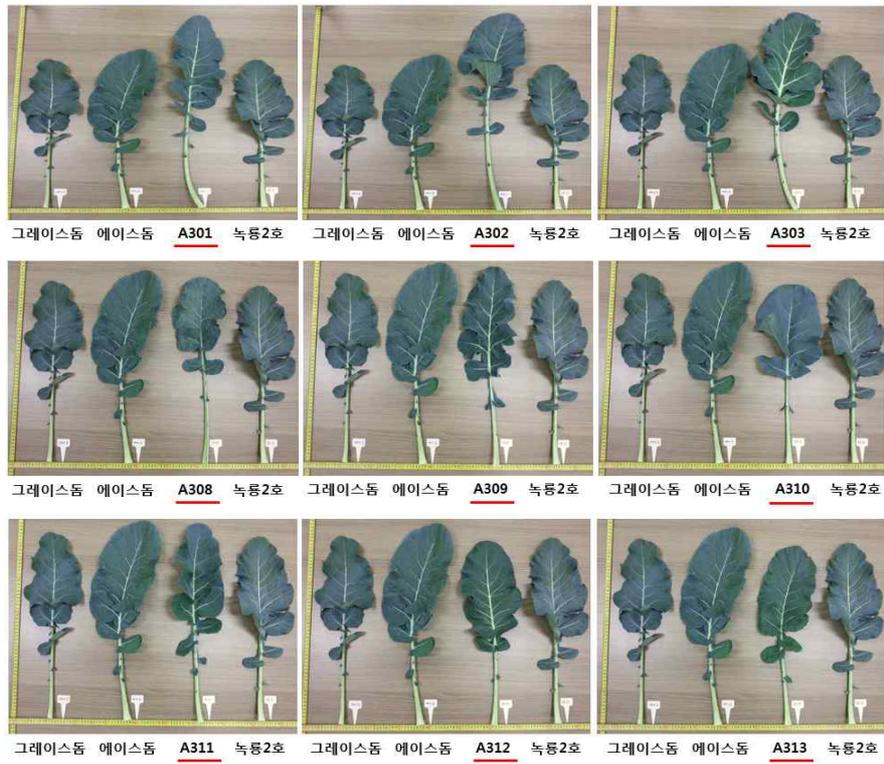


그림 8-43. 약배양 및 기보유 계통 간 F₁ 조합 엽 특성조사 (3차년도)

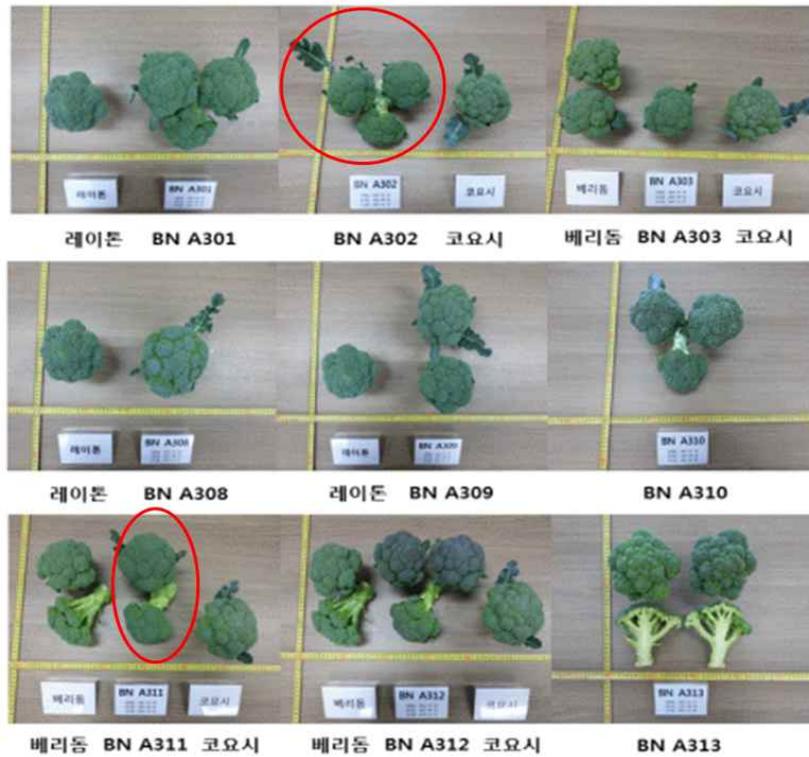


그림 8-44. 약배양 및 기보유 계통 간 F₁ 조합 화퇴 특성조사 (3차년도)

표 8-33. 녹색꽃양배추 선발조합 (대비종 6품종) 성능검정(2013년 봄)

2013y BN	2012y BN	Combination	Note	Selection
3801	3501	MC2-63 x MC49		
3802	3502	MC3-62 x MC43		
3803	-	MC4-64 x MC83		
3805	-	MC10-72 x MC75		
3806	-	MC25-36 x 2Br11		
3807	-	MC25-63 x MC64		
3808	-	MC25-71 x MC89		
3810	-	MC49-64 x MC59		
3811	3535	MC49-73 x MC99		
3812	3534	MC49-75 x MC4		
3813	-	MC50-61 x MC89		
3814	3536	MC50-64 x 2Br04		
3815	3538	MC55-63 x MC70		
3816	3539	MC55-64 x MC89	A308	
3817	3541	MC61-63 x MC29		
3818	3545	MC64-63 x MC13		
3819	-	MC69-61 x MC88		
3820	3546	MC70-62 x 2Br15		
3821	3548	MC70-63 x MC10		
3822	3549	MC70-64 x MC49		
3824	3552	MC75-63 x MC25	A301	
3825	3554	MC75-64 x MC10	A302	O
3826	-	MC76-64 x MC11		
3827	3559	MC89-63 x MC10	A303	
3828	3560	MC89-64 x MC43	A309	O
3829	3561	MC89-65 x MC46	A310	
3830	3562	MC90-64 x MC48		O
3831	3574	MC99-74 x MC13		O
3832	-	MC100-64 x 2Br04		O
3833	3575	MC101-62 x MC25		
3834	3576	MC101-63 x MC43		
3835	3578	MC102-64 x MC41		
3836	3582	MC106-64 x 2Br15		

3837	3586	MC107-72 x MC10		O
3838	3587	MC107-73 x MC25		
3839	3589	MC108-64 x MC28		
3840	-	MC117-62 x MC89		
3841	3612	MC123 x MC11		O
3842	3619	MC127-71 x MC10		
3843	3620	MC133-64 x MC25		O
3844	3621	MC138-63 x MC5		O
3845	-	MC138-61 x MC108		
3846	3624	MC140-63 x MC25		
3847	3625	MC140-64 x MC43		
3848	3632	MC142-64 x MC4		
3849	3633	MC143-64 x MC3		O
3850	3634	MC146-72 x MC18		O
3851	3638	MC150-64 x MC75		O
3852	3639	MC150-64 x MC76	A311	O
3853	3640	2Br01-63 x 2Br10-61	A312	
3854	3641	2Br01-64 x MC37		
3855	3642	2Br05-63 x MC99		
3856	3643	2Br05-64 x MC131		
3857	-	2Br08-64 x 2Br15-61		
3858	3644	2Br09-62 x MC41		O
3859	3645	2Br09-63 x 2Br04	A313	O
3860	-	2Br10-64 x 2Br04		
3861		코요시	대비종	
3862		에이스 돔	대비종	
3863		녹룡 2호	대비종	
3864		베리돔	대비종	
3865		그레이스돔	대비종	
3866		레이톤	대비종	

㉔ 약배양 및 기보유 F₁ 조합 성능검정 (4차년도)

3차년도에 기보유(내병성) 및 약유래(내병성) 계통의 조합(BN4701~BN4707: New combination, BN4801~BN4815)을 작성하였으며, 이를 가을 F₁ 성능검정에서 원예학적 특성 및 내병성 검정을 통해 선발(BN4901~BN4906)하여 봄 성능검정[과종: 2월25일, 정식: 4월1일(House), 4월 8일(Field)]을 진행하였다. 원예학적인 특성 기준은 품종가능성이 있는 화퇴특성과 숙기조사를 우선시하여 선발하였다. 뿐만 아니라 현재 품종가능성 있는 우수 조합으로서 3차년도부터 선발된 시들음병에 강한 저항성 조합인 BN4902(A311, BN4812)을 품종보호출원 (2014년 5월 출원)하였으며, 5차년도에 BN4901(A302, BN4801)에 대한 지역

적응성 시험 및 생산력 검정을 진행하여 품종보호출원 (2014년 10월 출원)하였다.

표 8-34. 2013년 가을 조합성능검정(대비 6품종) 및 선발 (4차년도)

BN	Combination	^z Maturity	Side Shoot	Uniformity	^y Bud size	^x Compactness	Selection	Note
4701	MC75 x MC43	L	Few	Good	4	7		
4702	MC10 x MC150	M	Few	Good	3	7	O	
4703	MC10 x MC43	L	Few	Good	4	6		
4704	MC49 x MC150	L	Few	Good	4	6		
4705	MC61 x MC150	M	Few	Good	2	7	O	
4706	MC43 x MC150	ME	Few	Good	3	7	O	
4707	MC33 x MC150	ME	Many	Good	4	6		
4801	MC75 x MC10	ML	Few	Good	3	7	O	A30 2
4802	MC89 x MC43	L	Few	Good	3	5		
4803	MC90 x MC48	M	Few	Good	3	7		
4804	MC99 x MC13	M	Few	Good	3	6		
4805	MC100 x 2Br04	ML	Few	Good	3	5		
4806	MC107 x MC10	L	Few	Good	3	6		
4807	MC123 x MC11	L	Many	Good	4	5		
4808	MC133 x MC25	M	Few	Good	4	7		
4809	MC138 x MC5	M	Few	Good	3	7		
4810	MC143 x MC3	L	Few	Good	3	7		
4811	MC146 x MC18	-	-	-	-	-	-	도태
4812	MC150 x MC75	ME	Few	Good	3	7	O	A31 1
4813	MC150 x MC76	ME	Few	Good	3	7	O	
4814	2Br09 x MC41	-	-	-	-	-	-	도태
4815	2Br09 x 2Br04	-	-	-	-	-	발아불량	
4817	녹룡2호						발아불량	
4818	에이스돔	E	Few	Good	3	7		
4819	베리돔	M	Few	Good	4	7		
4820	코요시	E	Few	Good	3	7		
4821	레이톤	ME	Few	Good	3	7		
4822	나이스그린	ME	Few	Good	3	7		
4823	빅그린	M	Few	Good	3	7		

^xCompactness : loose 3, medium 5, firm 7.

^yBud Size : small 3, medium 5, large 7.

^zMaturity : Early(E), Medium(M), Late(L), Medium-Early(ME), Medium-Late(ML)

표 8-35. 녹색꽃양배추 선발조합 (대비종 6품종) 2014년 봄 성능검정(4차년도)

2014y 봄 BN	2013y 가을 BN	조합/품종	Note
4901	4801	MC75 x MC10	'A302' 중생종
4902	4812	MC150 x MC75	'A311' 중조생종
4903	4813	MC150 x MC76	중조생
4904	4702	MC10 x MC150	New Comb. 1 중생종
4905	4705	MC61 x MC150	New Comb. 2 중생종
4906	4706	MC43 x MC150	New Comb. 3 중조생종
4926	-	그레이스돔	봄, 가을 조생종
4927	-	슈퍼그레이스	봄, 가을 조생종
4928	-	에이스돔	봄, 가을 조생종
4929	-	유일2호	봄, 가을 조생종
4930	-	코요시	봄, 가을 극조생종
4931	-	나이스그린	봄, 가을 조생종
4932	-	빅그린	봄, 가을 중조생종

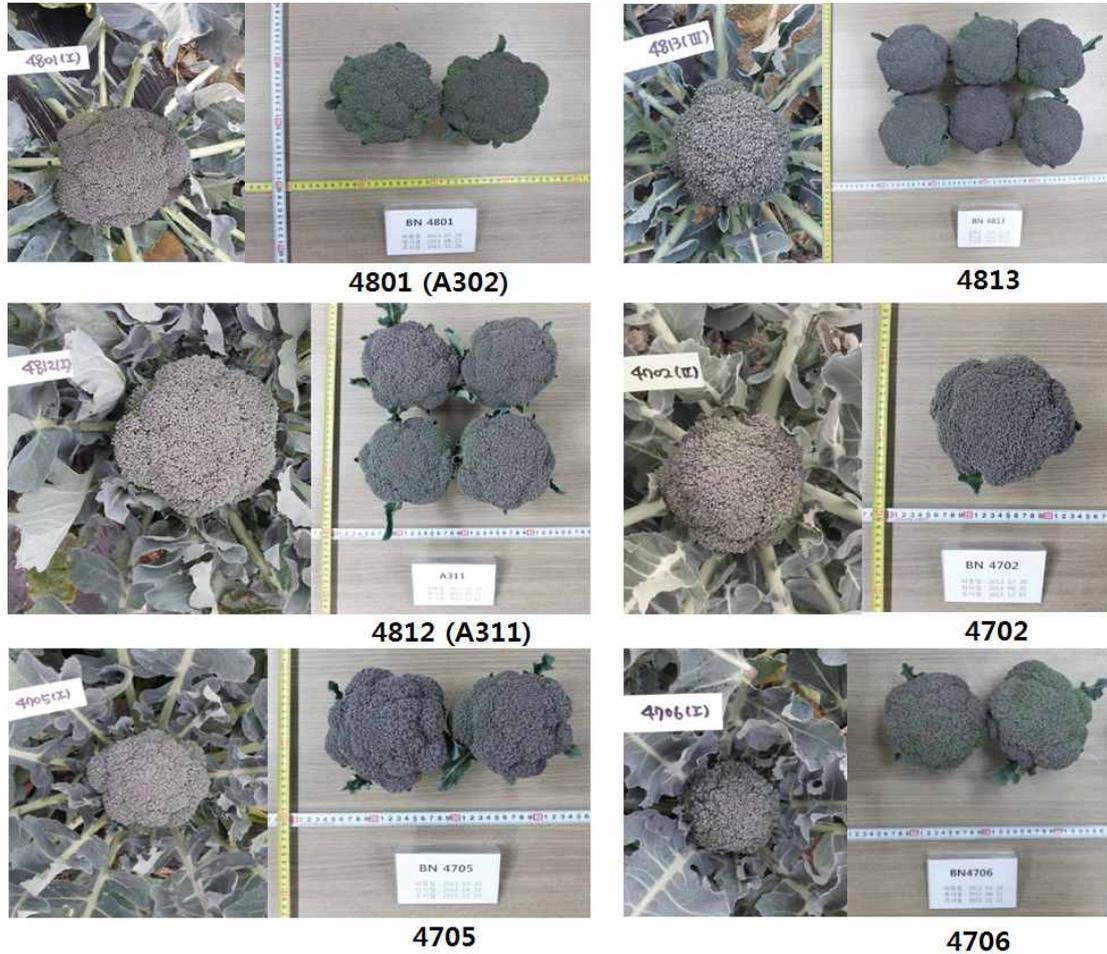


그림 8-45. 가을 성능검정 우수조합 선발 및 화뢰조사 (4차년도)

② 세포질 응성불임성(CMS) 계통 육성 및 조합성능검정

㉑ 세포질 응성불임성 계통 육성

2010년도부터 2012년까지 5계통 30분리개체를 확보하여 시들음병, 뿌리혹병에 강하고 우수형질을 가진 5계통을 반복친으로 여교배를 진행하였다. 반복친의 특성은 내병성결과를 확인하여 시들음병에 중도저항성이며 화뢰 모양과 잎자루 형태에 의해 선발되어 사용되었다. 3차년도에는 분리개체에서 반복친을 여교잡하여 선발된 BC_3F_1 (10계통)과 BC_2F_1 (2계통)에서 여교배(戻交配: Back Cross)를 통해 세대진전을 하였으나, 개체의 정확성을 위해 CMS형 응성불임에 대한 분자마커분석을 진행하였다. 그 결과, BN3104를 제외한 나머지 개체에서 Ogura-CMS형으로, BN3104는 Polima-CMS형으로 확인되었다. 고온에 민감한 Polima type CMS인 BN3104는 계통유지 및 조합작성에서 도태하기로 결정하였다. 4차년도에는 총 11계통에 대하여 세대진전 및 F_1 조합작성(약유래, 기보유계통간)을 진행하였다. 성능검정을 통하여 선발된 조합들의 모계친 응성불임계통들을 조합작성에 적용가능한 계통으로 선발하였으며, 선발되지 않은 계통들에 대해서도 지속적으로 여교배를 하였다. 5차년도에는 CMS계통 고정(안정화)을 위해 여교잡을 실시하였으며, 검정교배를 통하여 고정여부 및 순도를 판단하여 응성불임계통을 과제가 마무리된 후에도 계속 유지하고자 한다.

표 8-36. 응성불임계 유기 12계통 CMS Type

5yr BN	4yr BN	3yr BN	2 nd year BC	3 rd year BC	4 th year BC	5 th year BC	CMS type	Note
5401	4101	3101	BC ₃	BC ₄	BC ₅	BC ₆	Ogura	
5402	4102	3102	BC ₃	BC ₄	BC ₅	BC ₆	Ogura	
5403	4103	3103	BC ₃	BC ₄	BC ₅	BC ₆	Ogura	
-	-	3104	BC ₃	BC ₄	BC ₅	BC ₆	Polima	도태
5404	4104	3105	BC ₃	BC ₄	BC ₅	BC ₆	Ogura	
5405	4105	3106	BC ₃	BC ₄	BC ₅	BC ₆	Ogura	
5406	4106	3107	BC ₃	BC ₄	BC ₅	BC ₆	Ogura	
5407	4107	3108	BC ₃	BC ₄	BC ₅	BC ₆	Ogura	
5408	4108	3109	BC ₃	BC ₄	BC ₅	BC ₆	Ogura	
5409	4109	3110	BC ₃	BC ₄	BC ₅	BC ₆	Ogura	
5410	4110	3111	BC ₂	BC ₃	BC ₄	BC ₅	Ogura	
5411	4111	3112	BC ₂	BC ₃	BC ₄	BC ₅	Ogura	

표 8-37. 세포질응성불임성(CMS) 계통육성을 위한 여교배 반복친의 특성

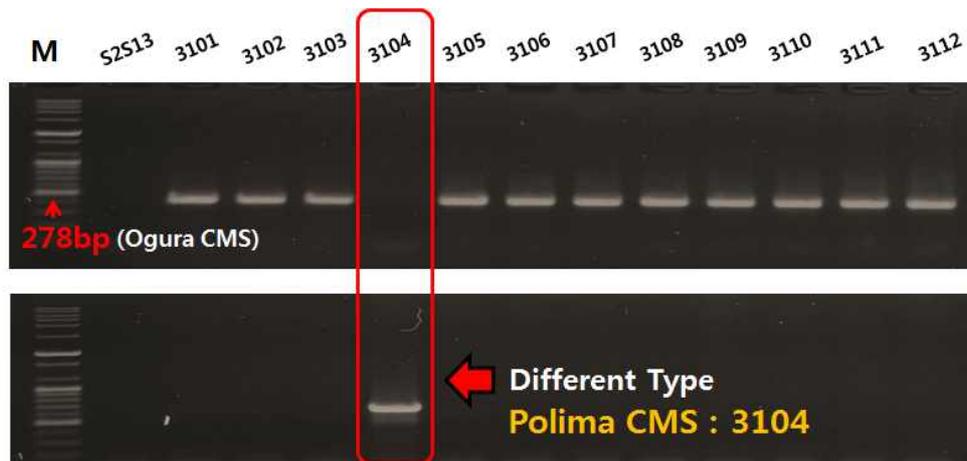
BN	Line	^z Maturity	^y Resistance level		The characters on Repeat parents	Note
			F	C		
5413	10GH06-G ₇	E	MR	S	화퇴모양이 dome형에 가깝고, 잎자루가 긴편	A분리 고정계
5414	10GH07-G ₇	E	MR	S	화퇴모양 dome형에 가깝고, 잎자루길이 중간	A분리 고정계
5416	10GH13-G ₇	ME	MR	S	화퇴모양이 dome형에 가깝고, 잎자루길이 중간	A분리 고정계
5417	10GH24-G ₇	ML	MR	S	화퇴모양이 dome형, 잎자루길이가 중간	L분리 고정계
5419	10GH30-G ₇	E	R	S	화퇴모양이 dome형, 잎자루가 긴편	L분리 고정계

^zMaturity : Early(E), Medium(M), Late(L), Medium-Early(ME), Medium-Late(ML),
Extremely-Early(EE)

^yResistance(R), Sensitivity(S), Medium Resistance(MR) / F: Fusarium wilt, C: Clubroot



그림 8-46. 세포질웅성불임성(CMS) 계통 유기를 위한 여교배 (3차년도)



S2S13: 대조구 브로콜리

※ 결과

Ogura-like CMS : 3101, 3102, 3103, 3105, 3107, 3108, 3109, 3110, 3111, 3112

그림 8-47. 세포질웅성불임성(CMS) 계통 Type 검정(3차년도)

㉔ 세포질 융성불임성을 이용한 조합성능검정 (4차년도)

3년차에 Polima-CMS type으로 도태시킨 1계통을 제외한 나머지 융성불임 11계통에 대하여 여교배를 통해 융성불임계통을 5차년도까지 지속적으로 유지하였고, 내병계 계통과의 조합작성을 진행하여 조제하였다. 2013년 가을성능검정 시에 진행된 융성불임을 이용한 F₁ 60조합에 대하여 원예학적인 특성과 내병성 검정을 통해 총 11조합을 선발하였고, 봄 성능검정을 완료하였으며, 융성불임을 이용한 종자 생산력 검정을 위해 'BN4248'조합에 대하여 망실에서 벌을 이용하여 채종 시험하였다.

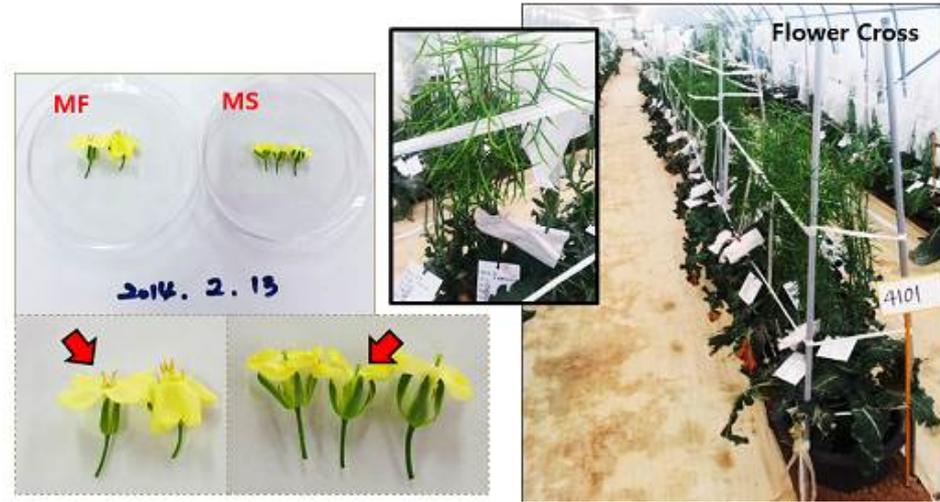


그림 8-48. 세포질융성불임성(CMS)을 이용한 조합작성 (4차년도, 가을)



그림 8-49. 세포질융성불임성(CMS)을 이용한 F₁ 조합 성능검정 (4차년도, 가을)

표 8-38. 세포질용성불임(CMS) 계통과 우수 내병계통 간의 F₁ 조합 성능검정(4차년도, 가을)

BN	Combination	^z Maturity	Side Shoot	Unifor- mity	^y Bud size	^x Compa- ctness	Selec- tion	Note
4201	3101 x 3306	E	Many	Bad	4	3		
4202	3101 x 3313	ML	Few	Good	3	5		
4203	3101 x 3318	L	Many	Good	3	5		
4204	3102 x 3302	L	Few	Good	3	5		
4205	3102 x 3313	ME	Few	Good	3	7	0	
4206	3102 x 3303	ML	Many	Good	3	5		
4207	3102 x 3306	ME	Many	Bad	4	3		
4208	3102 x 3318	M	Few	Good	3	7	0	
4209	3102 x 3333	M	Few	Good	2	7	0	
4210	3103 x 3348	M	Many	Good	3	5		
4211	3103 x 3301	M	Many	Good	3	5		
4212	3103 x 3306	E	Many	Good	3	5		
4213	3103 x 3313	L	Few	Good	3	5		
4214	3105 x 3302	L	Few	Good	3	5		
4215	3106 x 3326	M	Many	Bad	3	5		
4216	3106 x 3335	ML	Few	Good	3	5		
4217	3106 x 3341	ML	Many	Good	3	5		
4218	3106 x 3308	M	Few	Good	3	7	0	
4219	3106 x 3338	M	Few	Good	3	7	0	
4220	3106 x 3334	ML	Few	Good	3	5		
4221	3106 x 3321	ML	Many	Good	3	5		
4222	3107 x 3303	ME	Many	Bad	5	4		
4223	3107 x 3302	L	Few	Good	3	5		
4224	3108 x 3306	ME	Many	Bad	4	5		
4225	3108 x 3301	L	Many	Good	3	5		
4226	3108 x 3309	L	Many	Good	3	5		
4227	3108 x 3335	ML	Few	Good	3	5		도태
4228	3108 x 3343	M	Many	Bad	5	5		
4229	3108 x 3315	ML	Many	Bad	3	5		
4230	3108 x 3318	M	Many	Bad	5	5		
4231	3108 x 3341	ME	Many	Bad	5	5		도태
4232	3108 x 3302	L	Few	Good	3	5		
4233	3109 x 3315	ML	Many	Bad	5	5		
4234	3109 x 3313	L	Few	Good	3	5		
4235	3109 x 3348	M	Many	Bad	5	5		
4236	3109 x 3306	ME	Many	Bad	5	5		
4237	3109 x 3302	L	Few	Good	3	5		
4238	3109 x 3305	L	Few	Good	3	7	0	

4239	3109 x 3321	L	Many	Good	3	5		
4240	3109 x 3334	ML	Many	Bad	5	5		
4241	3109 x 3335	M	Few	Good	2	7	O	
4242	3110 x 3321	L	Many	Good	3	5		
4243	3110 x 3334	ML	Few	Good	3	5		
4244	3110 x 3309	ML	Many	Good	3	5		
4245	3110 x 3338	ME	Few	Good	3	7	O	
4246	3110 x 3302	L	Few	Good	3	5		
4247	3110 x 3306	ME	Many	Bad	4	5		
4248	3110 x 3305	ME	Few	Good	2	7	O	
4249	3110 x 3348	ML	Many	Good	3	5		
4250	3111 x 3318	ML	Many	Good	3	5		
4251	3111 x 3352	ML	Many	Good	3	5		
4252	3111 x 3306	ME	Many	Bad	6	5		
4253	3111 x 3334	ML	Many	Bad	3	5		
4254	3111 x 3309	ML	Many	Bad	3	5		도태
4255	3111 x 3333	ME	Few	Good	3	5		
4256	3111 x 3303	L	Many	Good	3	5		
4257	3111 x 3335	ME	Few	Bad	3	5		도태
4258	3112 x 3302	L	Few	Good	3	5		
4259	31121 x 3338	M	Few	Good	3	7	O	
4260	31121 x 3335	ME	Few	Good	2	7	O	

^zMaturity : Early(E), Medium(M), Late(L), Medium-Early(ME), Medium-Late(ML)

^yCompactness : loose 3, medium 5, firm 7.

^xBud size : small 3, medium 5, large 7.

㊤ 응성불임을 이용한 F₁ 조합 성능검정 (5차년도)

우수 내병계통과 응성불임계통간 작성된 F₁ 88조합에 대하여 가을성능검정을 실시하였다. 화퇴 특성이 조밀하고 단단하며 돔형태를 가지고 균일성이 좋은 것을 우선하여 진행하였다. 그 결과, 품종의 기준에 부합되는 F₁ 7조합(BN5034, BN5052, BN5075, BN5078, BN5085, BN5093, BN5099)을 가선발하였다. 가선발된 조합을 계절별 특성을 확인하고자 2015년 봄 성능검정에 적용하였으나 가선발 조합 모두 가을에 적합한 품종임을 확인하였다. 가을 성능검정 시에 가선발된 조합 중 최종 선발된 BN5093의 경우 조생종이며, 화퇴입자가 작고 돔형태로 단단함이 좋으며, 경경(평균4cm이상)도 굵어 결과적으로 상품성에서 화퇴의 형태 다음으로 중요시되는 중량에서도 긍정적인 측면이 많아 “KD93”으로 명명하여 품종보호출원을 진행하였다.

표 8-39. 세포질용성불임(CMS) 계통과 우수 내병계통 간의 F₁ 조합 성능검정(5차년도, 가을)

BN	Combination	^z Maturity	Side Shoot	Uniformity	^y Bud size	^x Compactness	Selection
5020	3112 x 3338	L	Many	Good	3	5	
5021	3112 x 3335	ML	Few	Good	3	5	
5022	3110 x 3338	M	Many	Bad	5	5	
5023	4101 x 4302	ML	Many	Good	3	5	
5024	4101 x 4304	M	Many	Good	5	5	
5025	4101 x 4306	ME	Many	Good	5	5	
5026	4101 x 4308	L	Few	Good	3	5	
5027	4101 x 4309	ML	Many	Good	5	5	
5028	4101 x 4310	M	Many	Good	5	6	
5030	4101 x 4503	ME	Many	Good	3	5	
5031	4101 x 4506	L	Many	Good	3	5	
5032	4102 x 4304	L	Many	Good	5	5	
5033	4102 x 4306	L	Many	Bad	3	6	
5034	4102 x 4308	L	Few	Good	2-3	7	0
5035	4102 x 4302	L	Many	Good	5	6	
5036	4102 x 4311	L	Many	Good	2-3	5	
5037	4103 x 4302	L	Many	Good	3	5	
5038	4103 x 4304	ML	Few	Good	3	5	
5039	4103 x 4306	M	Many	Good	2-3	5	
5040	4103 x 4308	ML	Many	Good	3	5	
5041	4103 x 4309	M	Many	Good	5	5	
5042	4103 x 4310	ME	Many	Good	2-3	5	
5043	4103 x 4311	L	Few	Good	3	5	
5044	4103 x 4503	ML	Many	Bad	5	5	
5045	4103 x 4506	ML	Many	Good	2-3	6	
5046	4104 x 4302	M	Many	Good	2-3	6	
5047	4104 x 4309	ML	Many	Good	5	6	
5048	4104 x 4310	M	Many	Good	3	6	
5049	4104 x 4311	ME	Many	Good	3	5	
5050	4105 x 4302	ML	Many	Good	3	5	
5051	4105 x 4304	ML	Many	Good	3	6	

5052	4105 x 4306	M	Few	Good	2-3	7	0
5053	4105 x 4308	L	Many	Bad	3	6	
5054	4105 x 4309	L	Many	Good	2-3	5	
5055	4105 x 4310	L	Many	Good	2-3	6	
5056	4105 x 4311	ML	Many	Good	2-3	6	
5057	4105 x 4503	L	Many	Good	3	6	
5058	4105 x 4506	L	Many	Good	3	6	
5059	4106 x 4302	L	Many	Good	5	6	
5060	4106 x 4304	L	Many	Good	2-3	6	
5061	4106 x 4306	L	Many	Good	3	6	
5062	4106 x 4308	L	Many	Good	2-3	6	
5063	4106 x 4310	M	Many	Bad	2-3	6	
5065	4106 x 4503	ME	Many	Bad	2-3	6	
5066	4106 x 4506	M	Many	Good	2-3	6	
5067	4107 x 4302	L	Many	Good	2-3	6	
5068	4107 x 4304	L	Many	Good	2-3	6	
5069	4107 x 4306	L	Many	Good	2-3	6	
5070	4107 x 4308	ME	Many	Good	3	6	
5071	4107 x 4310	L	Many	Good	3	6	
5073	4107 x 4503	L	Many	Good	3	6	
5074	4107 x 4506	L	Many	Good	3	6	
5075	4108 x 4302	L	Few	Good	2-3	7	0
5076	4108 x 4304	ML	Few	Bad	3	6	
5077	4108 x 4306	ML	Few	Good	3	6	
5078	4108 x 4308	L	Few	Good	2-3	7	0
5079	4108 x 4309	M	Many	Good	3	6	
5080	4108 x 4310	ME	Many	Good	3	6	
5081	4108 x 4311	ML	Many	Good	3	6	
5082	4108 x 4503	ML	Many	Good	3	6	
5083	4108 x 4506	ML	Many	Good	2-3	5	
5084	4109 x 4302	ME	Many	Good	2-3	5	
5085	4109 x 4304	E	Few	Good	2-3	7	0
5086	4109 x 4306	ME	Few	Good	3	6	

5087	4109 x 4308	ME	Many	Good	3	6	
5088	4109 x 4309	ME	Many	Good	3	6	
5089	4109 x 4310	ME	Many	Good	3	6	
5090	4109 x 4311	ME	Many	Good	2-3	6	
5091	4109 x 4503	ME	Many	Good	2-3	6	
5092	4109 x 4506	ME	Many	Good	3	6	
5093	4109 x 3305	MR	E	Few	2-3	7	품종보호
5094	4110 x 4302	ML	Many	Good	2-3	6	
5095	4110 x 4304	ML	Many	Good	2-3	6	
5096	4110 x 4306	ML	Few	Good	5	6	
5097	4110 x 4506	ME	Many	Good	2-3	6	
5098	4111 x 4302	ML	Many	Good	2-3	6	
5099	4111 x 4306	M	Few	Good	2-3	7	0
5100	4111 x 4308	ME	Many	Good	2-3	6	
5101	4111 x 4309	ME	Many	Good	2-3	6	
5102	4111 x 4310	ME	Many	Good	2-3	6	
5103	4111 x 4311	ML	Many	Good	2-3	6	
5104	4111 x 4503	M	Many	Good	3	6	
5105	4111 x 4506	ML	Many	Good	3	6	
5106	4112 x 4302	ML	Many	Good	3	6	
5107	4112 x 4304	ML	Many	Good	3	6	
5108	4112 x 4311	M	Many	Good	3	6	
5109	4112 x 4506	M	Many	Good	3	6	
5110	4108 x 3338	ME	Many	Good	3	6	

^zMaturity : Early(E), Medium(M), Late(L), Medium-Early(ME), Medium-Late(ML)

^yBud size : small 3, medium 5, large 7.

^xCompactness : loose 3, medium 5, firm 7.

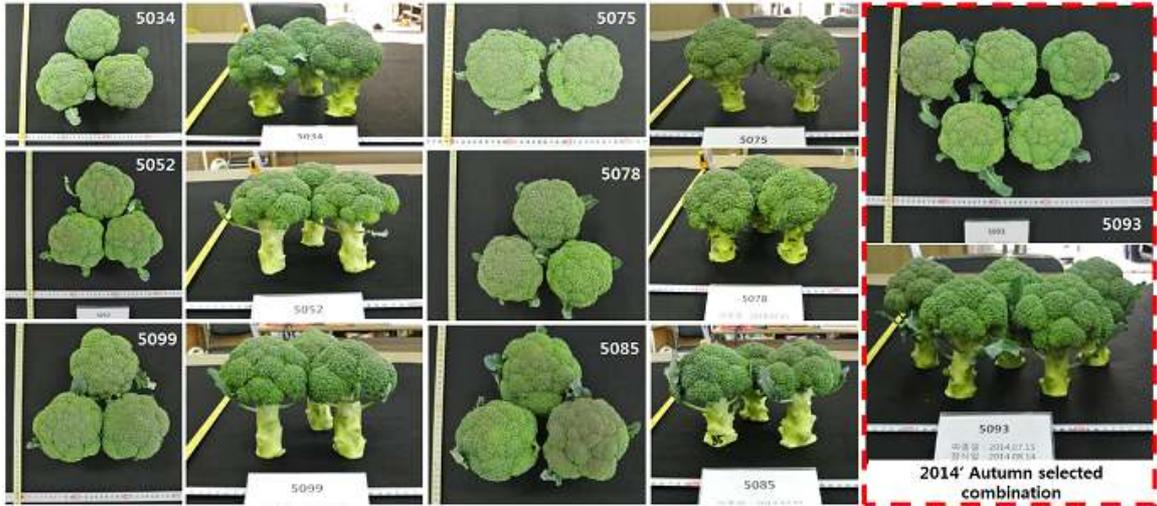


그림 8-50. 세포질용성불임성(CMS) 이용한 F₁ 조합 화퇴조사 (5차년도, 가을)

③ 선발 조합의 품종보호출원

㉔ 약(소포자)유래 계통간 F₁ 조합 선발 및 출원(A302, A311)

가. 약(소포자)유래 계통간 F₁ 조합 선발 및 출원(A302, A311)

시들음병에 저항성이며 원예학적 형질(덤형태, 화퇴중, 경경, 분지길이, 소화입자, 단단함 등)이 우수하고, 숙기가 중생종인 'A311'은 국립종자원에 품종보호출원을 하였다. 시들음병에 중도저항성이고 A311보다 입자가 작고 치밀한 'A302'를 5차년도에 품종보호출원하였으며, 숙기는 중만생종으로 초형이 입장형, 화퇴가 단단하여 상품성이 높은 품종으로서 육성되었다.

표 8-40. 약유래 F₁ 품종(A302, A311) 특성 (2012.07.01. - 2015. 06. 30)

BN	Combination	^z Maturity	Side Shoot	Weight (g)	Circumference(cm)	^y Bud size	^x Compactness
A302	MC75 x MC10	ML	Few	360	4.99	2	7
				350	4.83	2	7
				380	5.05	2	7
A311	MC150 x MC75	M	Many	360	5.25	2-3	7
				340	4.97	2-3	7
				370	5.38	2-3	7

^zMaturity : Early(E), Medium(M), Late(L), Medium-Early(ME), Medium-Late(ML)

^yCompactness : loose 3, medium 5, firm 7.

^xBud size : small 3, medium 5, large 7.

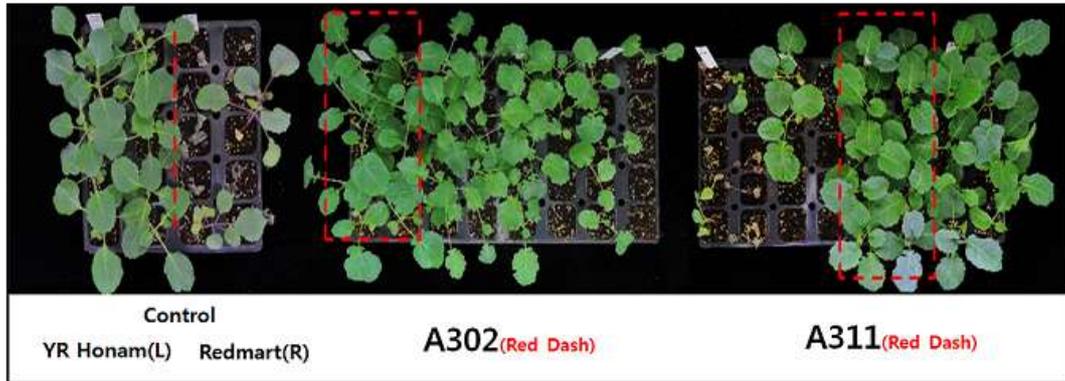


그림 8-51. 선발조합의 시들음병 저항성 검정

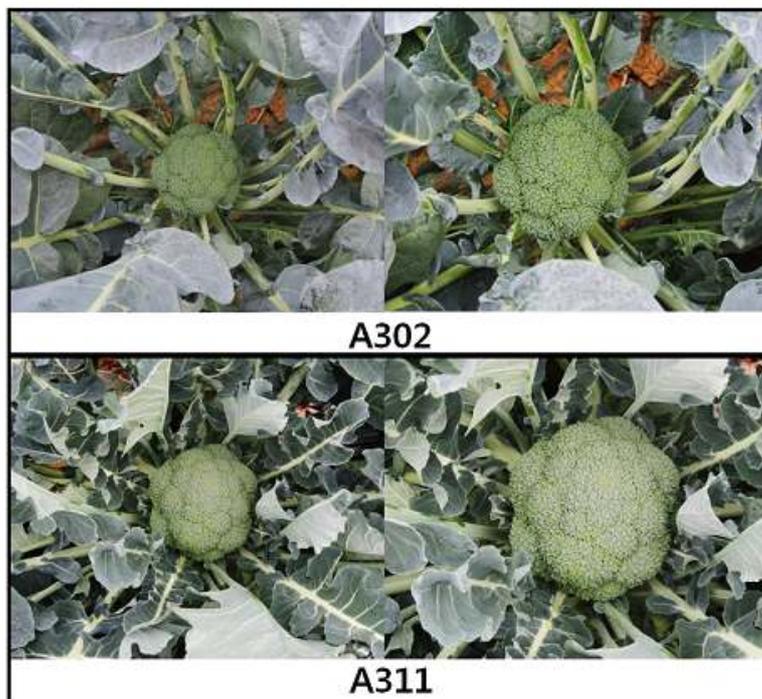


그림 8-52. 선발조합의 화퇴 특성
(A302: 5차년도 품종보호출원, A311: 4차년도 품종보호출원)

㉔ 응성불임계통과 약유래계통간의 F₁ 조합 선발 및 출원(KD93)

시들음병에 중도저항성이며, 조생종으로 화퇴의 특성이 품종에 적합하여 가을용 브로콜리 품종으로 선발하였다. 화퇴의 색은 진녹색이며 Knobbling이 선명한 편으로 품종의 특성이 뚜렷하다. BN5093을 “KD93”으로 명명하여 국립종자원에 품종보호신청을 진행하였으며, 2015년 7월 6일에 출원번호(2015-434)를 부여 받았다. 뿐만 아니라, 복합내병성(시들음병에 강하고, 뿌리혹병에 중강)을 지닌 BN4209에 대하여 추가적으로 특성 및 생산성 검증을 진행한 후에 최종적으로 선발 여부를 결정하고자 현재 진행 중에 있다.

표 8-41. 응성불임성 F₁ 품종(KD93) 특성 (5차년도)

BN	Combination	^z Maturity	Side Shoot	Weight (g)	Circumference(cm)	^y Bud size	^x Compactness
KD93	4109 x 3305	E	Few	300	3.91	2	7
				300	3.90	2-3	7
				335	4.21	2	7

^zMaturity : Early(E), Medium(M), Late(L), Medium-Early(ME), Medium-Late(ML)

^yCompactness : loose 3, medium 5, firm 7.

^xBud size : small 3, medium 5, large 7.



그림 8-53. 선발조합의 화퇴 특성 (KD93: 5차년도 품종보호출원)



그림 8-54. 응성불임성을 이용한 F₁ 조합의 추가 선발예정(화퇴특성)

④ 해외 적응성 시험

중국 수출용 품종으로서 적합한지 여부를 확인하기 위하여 해외 적응성 검정을 진행하였다. 지역은 중국 북진성으로 “A302, A311”에 대하여 2014년 가을에 실시하였다. 그 결과, 대비종과 비교하여 화퇴특성에서 크게 차이나는 부분은 없었으나, 검정이 늦게 이루어짐에 의해 수확이 1월26일에 진행되어 검정이 진행된 품종들 모두 안토시아닌이 착색되었다. 정확한 검정결과를 확인하기 위하여 2015년 가을에 2차 해외적응성검정 진행을 준비하고 있다.



그림 8-55. 선발조합의 해외적응성 시험 (중국 복건성)

제4장 목표달성도 및 관련 분야에의 기여도

1절. 연구개발의 목표의 달성도

연구개발 목표	연구개발내용	달성도 (%)
<p>□ 최종목표</p> <p>○ 유전체 정보 가공 시스템 구축 및 유전체 정보 생산</p> <p>○ 신품종 개발에 활용 가능한 tool 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 시들음병, 뿌리혹병 저항성, 석회 결핍 둔감형, 내서성, 배추좀나방 저항성 검정용 연관 분자표지 또는 바이오마커 개발 - F₁ 품종 순도검정, 계통 고정 검정 분자표지, 여교배 선발용 SNP 분자표지 개발 - 양배추류 기본 유전자 지도 작성 및 QTL 지도 작성 - 신규 마커 개발용 데이터베이스 구축 	<ul style="list-style-type: none"> - NGS resequencing 기술을 이용하여, 효율적인 유전체 정보 생산 시스템을 구축하고, 유전체 정보의 가공 및 genetic variants 발굴 파이프라인 작성 - 양배추 및 브로콜리의 효율적인 RNA sequence (transcriptome)와 miRNA 정보 생산 시스템 구축 및 유전자 발현 profiling, 유용유전자 발굴, 조절 유전자 동정 분석 파이프라인 구축 - 35,274개의 locus가 annotation 된 53,562 locus를 양배추 표준 유전자 세트로 개발하고, functional category 별 annotation 함 - 목표형질관련 저항성 및 감수성 보유 계통 29계통 으로부터 총 586Gb의 high quality 유전체 정보 생산 (12~88X genome coverage) - FocBo1 유전자위 관련 양배추의 시들음병 저항성 및 이병성 판별용 우성 PCR 형태의 분자표지 개발 및 113점 검정을 통한 육종가 지원 - 석회결핍 둔감형 연관 유전자로 DREB 유전자 발굴 및 발현 분자표지로 개발 - 내서성 검정용 연관 분자표지로 BoHsp70과 BoSCL13-1 유전자를 조기검정에 이용 가능한 유전자로 발현마커화 하였고, BoHSP70 유전자위 관련 PCR 형태의 분자표지화 (출원 품종 7품종 검정에 활용) - 배추좀나방 저항성 감수성 계통의 1차 대사체 분석을 통해 8개의 함량 차이를 보이는 대사물질을 규명해 배추좀나방 저항성 연관 바이오마커로 개발 - F₁ 품종 순도검정 분자표지로 12개의 SNP 마커 (1-2마커/염색체)를 fluidigm system 기반으로 개발 (570점 순도 검정을 통한 육종가 지원) - 계통 고정 검정용으로 24개의 SNP (2-5마커/염색체)를 fluidigm system기반의 분자표지로 개발 (560점 검정을 통한 육종가 지원) - 여교배 선발용 분자표지를 2-5Mb genome distance로 384개의 SNP 개발 (fluidigm system) - 양배추류 국제 표준 유전집단인 BolTBDH 집단을 	100

- 이용하여 총 350개의 마커가 지도화 된 887.5cM (1 마커/2.5cM)의 기본 유전자 지도 작성 및 배추잡나방저항성 형질의 분리 집단에서 염색체 3번 4번에 QTL 지도화
- 신 마커 개발 및 육종 지원을 위해 29계통의 resequencing 데이터를 기반으로 21,781 SSR 마커, 58,158 SNP 마커, 992,012 InDel 마커 및 증폭인자, 기존에 보고된 양배추 유전자지도 8개가 통합된 통합 유전자지도, 양배추 genome browser, 형질별 특이 마커, genetic variable block의 데이터가 탑재된 데이터베이스 구축
 - *B. rapa*, *B. oleracea*, *B. napus*, *A. thaliana*의 CDS, ESTs, Transcriptome 데이터로부터 unigene 분석 및 annotation 하고, 진화적인 유연관계가 Brassicaea의 genomic block 정보로 통합되어진 가 A, C genome의 유전자 기능 및 진화연구용 exome 데이터베이스 구축
 - 육종가의 주요 엘리트 양배추 계통 12계통의 SNP 분자표지 및 증폭인자를 개발하여 육종가의 필요에 맞게 활용하도록 함
- 품종개발 관련 유용형질의 실험적 진단 기법 구축
- 뿌리혹병 병리 검정 실험실 처리 조건을 과종 후 10일된 유묘에 뿌리혹병균을 4.0×10^8 spores/pot 가 되도록 접종하였으며, 20°C에서 5주간 배양한 후 발병도를 0-4범위로 조사하고, control로 오조라 감수성 품종과 중도 저항성의 대박나를 사용
 - 시들음병 병리 검정은 과종 후 14일된 유묘의 양배추 뿌리를 씻고 시들음병균을 1×10^7 conidia/ml의 농도로 30분 동안 침지 후 이식하여 25°C에서 3주 동안 배양 한 후 발병도를 저항성, 감수성으로 조사하고, control로 저항성으로 YR호남과 감수성 품종인 레드마트를 사용 (107점 병리 검정 지원)
 - 시들음병과 뿌리혹병 특이적인 genomic DNA oligomer를 합성하여, 양배추에 감염된 fungi의 biomass를 측정하여 뿌리혹병, 시들음병 저항성 반응의 정량화 검정법 확립
 - 내서성 검정 처리 조건은 과종 후 2주된 유묘를 42°C에서 하루 2시간씩 일주일간 처리하고 계통간 표현형의 차이를 분석함
 - 0.3mM $[Ca^{2+}]$ 조건의 기내 배양을 통해 tip-burn이 나타나는 정도를 기반으로 석회 결핍 둔감형을 조기에 진단함.
 - 여교배 선발용 SNP는 Fluidigm 기반, F₁ 품종 순도

<p>○ 유용형질 관련 유전자 확보 및 양배추류 개량에 적용 가능한 유용 유전자군 발굴</p>	<p>검정 및 계통 고정 검정 분자표지는 Fluidigm과 HRM 기반, 시들음병 저항성 검정 마커는 PCR 기반으로 검정 시스템 구축</p> <ul style="list-style-type: none"> - 단백질 발현 비교 분석을 통해 시들음병 저항성 관련 유용 유전자 47개, 뿌리혹병 저항성 특이 유전자 22개 선별하여 유용 유전자를 확보 - 전사체 비교분석을 통해 내서성 관련 유용 유전자 6개 및 석회결핍 둔감형 관련 유용 유전자군 165개 확보 - 배추좁나방 저항성 관련 1차 대사체 분석을 통해 저항성 관련 대사체 25종 확보 - 바이오맵 구축을 통해 병저항성 및 스트레스 저항성 관련 유전자군 129,743개 발굴하여 데이터베이스화 - 석회결핍 둔감형 관련 tip-burn 저항성 연관 유전자군으로 칼슘수송유전자 발굴 및 기작 연구 		
<p>○ 양배추류 유전자원 수집 및 육종 소재 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 제초제 저항성 유전자 (bar), 내병성 관련 유전자 (chitinase), 내충성 유전자 (Cry I Ab, Cry I Ac, Cry II A)를 이용한 형질 전환용 multiplex 벡터 construct 제작 및 이를 이용한 형질 전환 양배추 및 브로콜리 소재 제작 - 목표형질 관련 re-sequencing 재료 증식, 수집 계통 9계통 증식, 수집종 58종 세대 진전, 수집종 4종으로부터 소포자 배양체 97개체 확보 - F₁ 25품종으로부터 총 7조합/품종과 3품종에서 약 배양 유래된 총 150계통 확보 및 내병성 우량형질 보유 39계통 선별 - 시들음병, 내서성, 석회결핍둔감형 관련 유전집단 각각 5집단, 4집단, 3집단 작성하여 F₂ 또는 F₃ 분리집단 종자 확보 - 양배추류 국제 표준 유전집단인 BolTBDDH 집단 150 계통과 모본 부분의 증식 - 유전자원 792점 수집 및 유용형질 특성 검정 - 양배추 및 브로콜리의 자엽을 이용하여 형질전환율 3.8~8.7%의 고효율 형질 전환 시스템 구축 - 배추 유래 병저항성 유전자 관련 promoter 분석을 통해 뿌리, 꽃봉오리, 식물체 전체에 특이적인 프로모터 발굴 		
<p>○ 개발 분자표지의 현장 검증 및 유전체 육종 기반의 신품종 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 시들음병, 내서성 보유 양배추 품종 7종 개발 - 석회결핍둔감형 보유 양배추 품종 2종 개발 - 시들음병 저항성 보유 브로콜리 품종 3종 개발 		
<p>1차년도</p>	<p>○ 여교배 선발용 SNP chip 개발 파이프라인 구축</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 유용형질 보유 등 유전자원 7점 확보 - 5계통의 genomic DNA를 1-2세부에 제공 	<p>100</p>

<ul style="list-style-type: none"> ○ 엑솜 데이터 수집 및 DB 프레임 구축 ○ Genome Browser 개발 체계 확립 ○ 사업단 홈페이지 구축 및 유용 정보 게시 체계 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - SNP chip 개발 체계 구축 - <i>Brassica</i> A,C genome (<i>B. oleracea</i>, <i>B. rapa</i>, <i>B. napus</i>)의 EST set 1,017,392개 확보 및 unigene assemble 214,831개 - 연구상의 편의를 위한 <i>Arabidopsis</i> Unigene set 정보 확보 (39,640 cDNA) - 엑솜 비교 연구용 DB 구축 - 오픈 source의 알고리즘 검토 및 비교 - GMOD 시스템 사용 계획 확립 - 사업단 홈페이지(https://cgc.kribb.re.kr/)의 전체적인 구조를 갖추고, 게시체계 확립 - 사업단 홈페이지에 사업단 내부 연구교류 및 소통 	
<ul style="list-style-type: none"> ○ NGS 시스템을 이용한 양배추 우수계통 resequencing 및 표적영역 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - NGS-resequencing 기술을 이용한 양배추 5계통에 대한 genome sequence 생산 - 비교 유전체 기술을 활용한 genetic variantes 발굴 (SNP, INDEL) - Genetic variants 표적영역 연구를 위한 증폭인자 개발 	
<ul style="list-style-type: none"> ○ 내서성 형질 계통 간 실험실 내 고온 스트레스 처리 조건 확립 ○ 내서성 형질 계통 간 고온 스트레스 형질 검증 ○ 고온 스트레스 모니터링 용 분자 표지 개발 ○ 석회결핍 둔감성 계통의 특성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 양배추 유식물체의 고온 스트레스 처리조건을 확립하기 위해, 온도별, 처리기간별 조건을 분석 - 제3핵심 아시아종묘로부터 육종을 통해 개발된 내서성 형질 계통을 분양 받아 실험실 조건에서의 고온 스트레스 표현형을 관찰하고 육종현장의 내서성 형질과 동일한 결과인지 조사 - 양배추 cDNA 정보를 search하고 고온 스트레스에 반응하는 유전자군을 대상으로 내서성 형질 모니터링용 분자표지를 발굴 - 실험실에서 석회결핍 둔감성 특성 조사방법 확립 - 석회결핍 둔감성 계통의 특성 분석 	
<ul style="list-style-type: none"> ○ 좁나방저항성에 대한 biomarker 탐색 및 선발 ○ 배추과 작물 metabolite 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 일반 양배추와 좁나방 저항성 양배추간의 Mass profile을 통계적 비교하는 heat map을 작성. - 2D PCA 분석 및 3D PCR 분석을 수행. - 두 품종간 분석 결과 확인 후 bio marker 가능성 있는 mass fragment 선발. - 일반 양배추 품종 및 좁나방 저항성 양배추 품종의 잎, 줄기, 뿌리 부분의 시료를 준비. - 추출 및 분석 조건 확립. - Mass analysis를 수행. - DB를 통하여 동정된 물질을 확인하고, Mass profile 작성. 	

<ul style="list-style-type: none"> ○ Glucosinolate, Isothiocyanate 기능성 기저물질의 library화 	<ul style="list-style-type: none"> - 브로콜리의 Metabolite의 MS2 library 제작을 위한 물질 분석 - 각 물질별 mass profiles의 통계적 비교 및 D/B화 - Column Chromatography을 이용하여 표준품 분리 후 Mass 및 NMR Interpretation을 통하여 구조적 특성구명
<ul style="list-style-type: none"> ○ Multiplex vector 4종 구축 ○ T0의 형질전환체 선발 (30점 선발) ○ 병저항성 관련 유전자의 promoter영역 cloning(3종) 	<ul style="list-style-type: none"> - 제초제 저항성 벡터 구축 1종 - 병 저항성 및 제초제 저항성 벡터 구축 2종 - 해충 저항성 및 제초제 저항성 벡터 구축 2종 - 병 저항성 벡터 구축 1종 - 제초제 저항성 벡터가 도입된 형질전환체 21점 - 제초제 저항성 및 해충 저항성 벡터가 도입된 형질전환체 13점 - 병 저항성 벡터가 도입된 형질전환체 21점 - 배추 유래 병 관련 유전자 동정 - 동정된 병 관련 유전자의 promoter 영역 4종 cloning(<i>BrCLP1</i>, <i>BrCLP2</i>, <i>BrCMPG1</i>, <i>BrDRRP2</i> promoter 영역)
<ul style="list-style-type: none"> ○ 수집 및 보유 유전자원 원예적 특성평가 ○ 석회결핍증 내성 선발 체계 확립 ○ 배추좁나방 내성 선발 체계 확립 	<ul style="list-style-type: none"> - 수집 및 보유자원 210점 원예적 특성 평가 - 69자원 석회결핍증 내성 검정 - 69자원 배추좁나방 내성 검정
<ul style="list-style-type: none"> ○ 유전자원수집 ○ 수집유전자원 내병성/특성검정 ○ 약배양을 통한 계통확보 	<ul style="list-style-type: none"> - 유전자원수집(25점) - 복합내병성검정 및 특성검정 - 기보유계통 (시들음병 저항성 6계통, 뿌리혹병 저항성 6계통) 확보 - 약배양유래 계통확보
<ul style="list-style-type: none"> ○ 양배추 유전자원 및 정보수집 ○ 수집유전자원 및 기보유계통 특성평가 및 선발 ○ 내서성 및 내병성 검정 ○ 고정된 기보유계통을 이용한 목적 품종의 F₁ 조합작성 및 우수조합 선발 	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 및 해외 우수 유전자원 20점 이상 수집 - 기존 고정계통 및 분리계통에서 선발된 계통 포장 시험 - 우수계통 선발 - 내서성 검정 및 선발 - 위황병 저항성 검정 및 선발 - 뿌리혹병 저항성 검정 및 선발 - 기보유계통에서 선발된 계통을 이용한 F₁ 조합작성 및 1조합 이상 선발(원형계 및 편형계) - 생산성이 우수한 응성불임 계통을 이용한 여교잡작성

2차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 계통간 consensus region 발굴 ○ 양배추 계통간 변이 마커의 발굴 및 유전자 관련군 분류 ○ 엑솜 분석 tool 확립 및 데이터 추가 작성 ○ 목표형질 관련 유전자 후보군 개발 ○ Genome Browser frame 작성 ○ 양배추의 기본 유전자 지도 작성 및 마커 지도화, 대사체 QTL 분석 체계 구축 	<ul style="list-style-type: none"> - 계통간 consensus region 100 region 발굴 - 계통간 변이 마커 발굴: 2,000점 - 발굴 마커 발현군 비발현군 분류 - 발굴 마커 validation - 신규 엑솜 데이터 10,000점 이상 추가 - 엑솜 분석을 통한 목표형질 관련 유전자 후보군 개발 - Genome Browser frame 작성 후 resequencing, exome 데이터 align - 집단 증식 - 양배추 유전자지도 작성 및 형질 관련 마커 지도화 (마커 150점) - 대사체 QTL 분석 체계 구축 	100
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 양배추 계통간의 염기서열 정렬 및 변이 인자 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> - 양배추 25계통에 대한 표적영역 genome sequence 생산 - Genetic variants sequence를 이용한 분자표지 마커 후보개발 	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 석회결핍 둔감성 계통의 추가 선발 ○ 칼슘관련 유전자 동정 및 발현 분석 ○ 양배추 조직별 발현 유전체정보 생산 및 분석 ○ 양배추 표준 유전자 세트 구축 ○ 결구에 의한 내서성 형질의 고온스트레스 처리조건 및 표현형 비교분석 ○ 고온 스트레스 유전자발현의 유전학적 검증 ○ 선발 고온스트레스 유전자발현분석의 활용성 검증 ○ Genechip 분석에 의한 내서성 형질 분자표지 후보 유전자군 선발 ○ 시들음병, 뿌리혹병, 	<ul style="list-style-type: none"> - 칼슘결핍 조건에서 생장이 양호한 계통의 선발 - 세포내외로 칼슘의 이동과 관련된 양배추 유전자 확인 및 발현 분석 - 석회결핍 둔감형 및 표준형을 대상으로 조직 및 처리별 발현유전체 정보 생산 및 분석 - 발현유전체 정보 분석을 통한 양배추 표준유전자 세트 구축 - 비닐하우스조건에서의 결구에 의한 내서성형질계통 재검증 - 실험실 조건에서의 계통간 고온스트레스 표현형 검증 및 유전자발현 비교 분석 - 내서성형질의 유전학적 검증을 위한 내서성 강약부,모친과 F1 세대에서의 실험실 조건 고온스트레스 표현형 비교분석 - 고온스트레스 표현형에 따른 유전자발현 비교분석 - 양배추 품종에서의 HSP70, HSP90, HsFA 유전자 발현 정도와 고온스트레스 표현형의 비교분석에 따른 선발유전자의 활용성을 조사 - 내서성 강/약 형질 계통 간 Brassica genechip을 이용한 유전자발현 차이 분석으로 후보 유전자군 선발 - 대사체 분석을 통한 양배추 계통간의 발현물질 차 	

<p>저항성 감수성 양배추 계통간 발현체 비교연구</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 내병성 관련 중요 기능성 유전자군 발굴 ○ 유전자 칩을 이용한 양배추의 발현 profiling 분석 	<p>이 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - 단백질 분석을 통한 병 특이, 병 저항성 특이 단백질 분석 - 당해 발현체 연구결과의 통합 분석을 통한 내병성 특이 기능성 유전자 군 확보 - Agilent Brassica chip을 이용하여 병 처리된 양배추 계통의 유전자 발현을 뿌리와 shoots 부분으로 나누어 분석 	
<ul style="list-style-type: none"> ○ 생물 스트레스 저항성 유전자의 양배추내 병충해저항성 검정 ○ 양배추 이차대사산물 생합성 관련 유전자 클로닝 	<ul style="list-style-type: none"> - 생물스트레스, 병저항성, 방어 연관 유전자 전체 DB 구축 및 기능연구 - 양배추 이차대사산물 생합성 관련 유전자 DB 구축 	
<ul style="list-style-type: none"> ○ 형질전환체 작성 및 형질 전환체의 확인(도입유무, 발현) ○ 병 관련 유전자의 동정 및 발현 분석 ○ 배추 유래 병 저항성 유전자 관련 promoter 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 아시아 및 코레곤 종묘로부터 분양 받은 녹색꽃양배추 5계통, 양배추 2계통 및 시중에서 판매되고 있는 양배추 1품종의 종자를 이용하여 형질전환체 243개체를 온실에서 육성함 - 형질전환체의 도입 유전자 확인 및 도입유전자의 발현을 확인 - 항생제 무선발용 벡터(해충 및 제초제 저항성)를 새로 구축하여 형질전환에 이용 - 고효율 녹색꽃양배추 및 양배추의 형질전환을 새롭게 구축 - 병 관련 Chitinase 유전자 분석 - 병 관련 Thaumatin 유전자 분석 - 병 관련 Dirigent 유전자 분석 - 병 관련 Defensin 유전자의 해석 - 병 관련 Betv1AFP 유전자의 해석 - Chitinase, Thaumatin, Dirigent 유전자의 뿌리, 줄기, 잎, 화아 기관 특이적으로 발현하는 8개 유전자에 대한 promoter 영역을 동정하여 벡터 구축 - 동정된 promoter 영역의 cis-element 분석 - 애기장대에 형질전환 T0 종자 수확 및 선발배지 파종 	
<ul style="list-style-type: none"> ○ 수집 및 보유 유전자원 원예적 특성평가 ○ 석회결핍증 내성 선발체계 이용 자원 선발 ○ 배추좁나방 내성 선발 체계 이용 자원선발 	<ul style="list-style-type: none"> - 수집 및 보유자원 176점 원예적 특성 평가 - 159자원 석회결핍증 내성 검정 - 159자원 배추좁나방 내성 검정 	
<ul style="list-style-type: none"> ○ 유전자원의 내병성, 특성 	<ul style="list-style-type: none"> - 유전자원의 복합내병성, 특성검정 	

<p>검정 후 선발</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 내병성 F₁ 조합작성 및 선발 (특성, 내병성) ○ SI 검정 후 우량순계 확보 ○ CMS 계통, 기보유, 약배양 육성 	<ul style="list-style-type: none"> - 기보유계통(시들음병 저항성 3계통, 중도저항성 12계통, 뿌리혹병 저항성 1계통) 확보 - 응성불임계통(시들음병 저항성 2계통, 중도저항성 9계통, 뿌리혹병 중도저항성 1계통) 확보 - 약유래계통(시들음병 저항성 28계통, 뿌리혹병 저항성 10계통) 확보 - 우량순계 확보(5품종에서 50계통) - 시험조합성능검정(수집22점, 조합3점) - CMS 계통육성(50 분리계통)
<ul style="list-style-type: none"> ○ 양배추 유전자원 및 정보수집 ○ 수집유전자원 및 1차년도 선발계통 특성평가 및 검정 ○ 내서성 검정 및 유전집단 양성 ○ 내병성(위황병 및 뿌리혹병) 검정 및 유전집단 양성 ○ 고정된 기 보유 계통을 	<ul style="list-style-type: none"> - 1년차 세계 각국으로부터 양배추의 다양한 유전자원 및 정보수집 (내서성, 내병성품종 위주 수집) - 수집유전자원 및 1차년도 선발계통의 특성검정 및 우수계통 선발 - SSD 및 성숙모본 선발에 의한 계통육성 계속 - 편형계 및 원형계 계통 선발 및 순화 고정 - 내서성 검정 및 내서성 계통선발 - 내서성 관련 10계통/품종을 분자마커 개발을 위해 제공(2-1세부과제) - 내서성 분자마커의 유용성 검토 및 내서성 계통선발을 위한 품종/계통 2-1세부과제에 제공 (9계통/품종) - 내서성 연구의 재료제공을 위한 양친(P1, P2), F₁ (내서성 강×내서성약), BC₁F₁(P1, P2)의 유전집단 양성(2-1세부과제 제공) - 위황병 검정 및 우수 계통 선발 - 위황병 분자마커 개발을 위해 위황병 관련 8계통/품종을 2-2세부과제에 제공 - 분자마커 유용성 검토를 위한 품종/계통 2-2세부과제에 제공 (10계통/품종) - 위황병(6계통)의 양친(P1, P2), F₁(위황병 강×위황병 약), BC₁F₁(P1, P2) 유전집단 양성(2-2세부과제 제공) - 뿌리혹병 검정 및 우수 계통 선발 - 생물학적 분석을 위한 뿌리혹병 관련 품종을 2-2세부과제에 제공 (8품종) - 분리세대를 고정하여 분자마커 실험용으로 제공 예정(2-2세부과제) - 내서성 및 고온 결구력이 강한 60 조합 작성 및

	<p>이용한 목적 품종의 F₁ 조합작성 및 우수조합 선발</p> <p>○ 선발조합의 채종시험</p>	<p>조합 성능검정</p> <ul style="list-style-type: none"> - 내서성 및 내병성 우수 조합 선발 - 내서성 및 위황병에 강한 씨티-180 품종보호출원 (출원번호: 출원-2011-557) - 음성불임을 계통을 이용한 여교잡 - 작년 선발조합의 종자생산력 검정을 위한 시험채종 	
3차년도	<p>○ 29계통 SNP 분석 및 2차년도 SNP validation</p> <p>○ 29계통 resequencing data 분석을 통한 계통간 consensus region validation</p> <p>○ 목표형질 관련 후보 유전자군 발굴 및 엑손 칩 초기 작성</p> <p>○ Genome Browser, DB update</p> <p>○ 양배추 기본 유전자 지도 마커 추가 및 대사체 QTL 분석을 위한 metabolite profiling</p> <p>○ 양배추류 유전자원 창성 및 증식</p> <p>○ 우수계통의 유전체 수준의 fingerprint 작성</p> <p>○ 모델식물을 이용한 갈습관련 유전자의 기능분석</p> <p>○ 석회결핍 조절기작 연구</p> <p>○ 양배추의 계통 및 처리에 따른 발현변화 유전자 발굴</p> <p>○ 내서성 형질 후보유전자군의</p>	<p>2차년도 발굴 SNP validation</p> <ul style="list-style-type: none"> - 29계통 resequencing data로부터 SNP 분석, validation, annotation - 29 계통간 consensus region 발굴 - 발굴 region validation - 목표형질 관련 후보 유전자군 발굴 (2형질) - 발굴 유전자 관련 SNP 개발 - 발굴 유전자 SNP 증폭인자 개발 - 29계통 resequencing 데이터, 형질별 transcriptome, SNP 데이터 탑재 - 기본 유전자 지도 마커 추가 (100점) - 배추 즙나방 저항성 관련 집단 양친 metabolite profiling - 표준 집단 계통, 목표형질, 유용 형질 관련 양친 계통, 수집자원 계통증식 - 수집자원 고정 - 목표형질, 유용형질 관련 F₁ 집단 작성 - 양배추 2계통 (내서성 및 위황병)의 transcripts sequence 생산 - 내서성 및 위황병 계통간의 유전자 구조 및 발현 차이 발굴 - 갈습결핍 조건에서 애기장대의 성장분석 및 genechip을 이용한 발현유전자 분석 - 모델식물을 이용한 석회결핍 관련 유전자 발굴 및 기능 분석 - 석회결핍 조건에서 유의한 발현변화를 보이는 유전자 발굴 및 조직별 발현량의 차이를 보이는 유전자 선발 - Genechip 분석에 의한 내서성 형질 계통 간 고온 스트레스 관련 유전자의 선발 및 후보 유전자의 	100

<p>고온스트레스</p> <p>유전자발현 분석</p> <p>○ 후보 유전자의 내서성 계통 간 비교유전체</p> <p>유전정보 비교분석</p> <p>○ 내서성 관련 후보유전자의 계통 간 활용성 검증</p> <p>○ 내서성 계통 간 RNA-Seq 실시</p>	<p>생물학적 검증</p> <p>- 제1핵심 연구팀의 계통 간 비교유전체 정보로부터 대상 후보 유전자의 genomic DNA 구조 분석 (Intergrated genomics-transcriptomics)</p> <p>- 제3핵심 육종 현장에서의 내서성 계통 간 고온 스트레스 관련 유전자발현을 통한 후보 유전자군의 활용 가능성 조사</p> <p>- 내서성 형질 계통 간 transcriptome 분석을 위해 강/약 5 계통으로부터 mRNA를 분리하고 RNA-Seq을 실시</p>
<p>○ 통합 엑소믹스 분석을 통한 양배추 내병성 유전자 마커 선별</p> <p>○ 선별된 유전자군의 기능연구</p> <p>○ RNA-seq을 이용한 병원균-기주 상호작용 연구</p>	<p>- 시들음병 저항성 품종에서 shoot 310개, root 293개, 뿌리혹병 저항성 품종에서 shoot 328개, root 261개의 up regulation 되는 발현체를 후보 유전자로 선별.</p> <p>- 병 특이 발현 유전자의 분자생물학적 기능연구를 통해 유용 유전자 특허 출원 1건, SNP 마커 특허 출원 1건.</p> <p>- 양배추 시들음병 저항성 3품종(101, 102, 105)과 감수성 2품종(104, 106)의 병원균 처리 후 초고밀도 발현체 분석</p> <p>- 시들음병: 108 , 저항성: 114, 감수성: 208 개의 유전자 확보</p>
<p>○ 데이터베이스 구축 및 분석을 통한 병충해 저항성 유전자군 선별</p> <p>○ 양배추 MeJA 처리와 무처리간의 EST library 구축 및 분석을 통한 transcripts 확보</p> <p>○ 좀나방저항성 유용 형질 전환체 바이오 검정</p>	<p>- 생물스트레스, 병저항성, 방어 연관 유전자 전체 DB 구축 및 기능연구를 위한 유전자 집단 확보</p> <p>- 양배추 transcriptome 확보 및 in silico 데이터 분석</p> <p>- 뱀의 toxin과 상동성이 높은 PLA2a 유전자와 다른 계열의 PLA 유전자인 pPLAIIIa의 과발현체 확보 및 바이오 검정 수행중</p>
<p>○ 형질전환체의 세대진전 및 생물검정</p> <p>○ 병 및 비생물학적 관련 유전자 동정 및 해석</p> <p>○ 병 관련 promoter의 발현 해석 및 형질</p>	<p>- T₁ 종자 및 T₂ 종자 획득</p> <p>- T₁ 및 T₂의 형질전환체 확인(계통간 항생제 내성 분석)</p> <p>- T₂ 종자의 homo-event화 (PCR 확인) 및 계통화</p> <p>- homo-event화된 계통에 대한 도입 유전자의 발현 정도 확인</p> <p>- 제조제를 넣은 배지를 이용한 제조제 내성 확인</p> <p>- Chitinase 유전자 해석</p> <p>- Thaumatin 유전자 해석</p> <p>- Dirigent 유전자 해석</p> <p>- Km 선발배지에 T0 종자를 과종한 후 형질전환체 선발</p>

<p>전환용 vector 구축</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 선발된 형질전환체의 T1 종자 수확 - T1종자를 Km 선발배지에 파종 후 형질전환체를 선발하여 GUS assay 분석 - GUS 발현량이 높은 promoter를 이용하여 형질전환용 vector 구축
<p>○ 수집 및 보유 유전자원 원예적 특성평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> -수집 및 보유자원 182점 원예적 특성 평가
<p>○ 석회결핍증, 배추 줄나방 내성 자원 선발</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 71자원 석회결핍증 내성 검정
<p>○ 내성선발계통 차대검정 및 조합작성</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 71자원 배추줄나방 내성 검정
<p>○ 기보유 및 소포자 유래 내병성 계통 육성</p> <p>○ 내병성 CMS 계통의 순계화</p> <p>○ 내병성 F₁ 조합작성(SI), 선발 (내병성/특성)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 기보유 및 소포자 유래 내병성 계통육성 (기보유 13계통, 약배양 39계통) - 기보유계통(시들음병 저항성 7계통, 중도저항성 2계통, 뿌리혹병 저항성 2계통, 중도저항성 3계통) 확보 - 약유래계통(시들음병 저항성 7계통, 뿌리혹병 중도저항성 1계통) 확보 - 내병성 CMS 계통의 순계화(12계통) - 내병성 F₁ 조합작성(143조합) 및 선발
<p>○ 양배추 유전자원 및 정보수집</p> <p>○ 수집유전자원과 기 선발 계통 특성 평가 및 순계 조기육성</p> <p>○ 내서성 검정 및 유전집단 양성</p> <p>○ 내병성 (위황병 및 뿌리혹병) 검정 및 유전집단 양성</p> <p>○ 고정된 기 보유 계통을 이용한 목적 품종의 F₁ 조합작성 및 우수조합 선발</p> <p>○ 선발조합의 채종시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 세계 각국으로부터 양배추의 다양한 유전자원 및 정보수집(내서성, 내병성품종 위주 수집) - 수집유전자원 특성검정 - SSD 및 성숙모본 선발에 의한 계통육성 계속 - 편형계 및 원형계 계통 선발 및 순화 고정 - 내서성 검정 및 내서성 계통선발 - 위황병 검정 및 우수 계통 선발 - 뿌리혹병 검정 및 우수 계통 선발 - 내서성 및 고온 결구력이 강한 조합 작성 및 성능 검정 - 내병성이 강한 조합 작성 및 조합 성능검정 - 내서성 및 내병성 우수 조합 선발 - 내서성 및 위황병에 강한 씨티-207, 씨티-262, 품종보호출원(출원번호: 출원-2013-53. 출원-2013-55) - 작년 선발조합의 종자생산력 검정을 위한 시험채종

4차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전년도 발굴 SNP validation 및 보완 ○ 2-3Mb distance 수준의 genome wide (GW) SNP set 개발 및 초기형태 바이오칩 개발 ○ 계통간의 consensus region 발굴 및 validation (전년도에 이어 계속) ○ 목표형질 관련 핵심 유전자 발굴 및 기능 연구 ○ 육종지원을 위한 통합 Genome Browser 및 데이터베이스 신규 작성 데이터 추가 ○ 양배추 기본 유전자 지도 보완 및 SNP 마커 추가 및 유용형질 QTL 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - Read quality 보완 및 SNP 발굴 strategy 개선을 통한 데이터의 quality를 향상 - HRM 기법과 Fluidigm 시스템 기반의 개발된 SNP validation - 2-3Mb 간격의 genome wide 수준의 SNP 마커 96개 개발 및 Fluidigm 기반의 칩 제작 및 validation - 계통 순도검정마커 set (24개) 개발 및 현장 적용 - F1순도검정마커 set (12개) 개발 및 현장 적용 - Consensus region 발굴 - Genome wide 수준의 highly, 또는 rarely variable region 발굴 - Validation - 목표형질 (칼슘결핍둔감형) 관련 transcriptome 분석을 통한 핵심유전자 발굴 - 각 형질별 genome SNP 분석을 통해 형질 관련 SNP 군 발굴 및 데이터베이스화 - 모델식물을 이용한 발굴 유전자 기능 연구 - 웹인터페이스의 통합 데이터베이스 개발 - 신규 마커 및 genetic variants 데이터 추가 - Transcriptome 데이터 통합 - Public genetic map 통합 및 마커 통합 (insilico integrated genetic map 작성) - SNP, SSR, INDEL 증폭인자 개발 및 탑재 - highly variable region 정보 탑재 - 양배추 유전체 정보 이용 디자인한 SNP 프라이머 200개를 HRM으로 다형성 검정, TBDH 집단이용 양배추 유전자 지도 작성을 위해 총 187개의 마커 선발 - 양배추 표준유전자지도에서 선발한 마커를 지도화 - 선발한 마커 중 91개를 이용하여 BolTBDH 분리집단에서 유전자형 분석 및 genotyping 추가 진행 중 - BolTBDH 집단으로 분석이 완료된 마커를 대상으로 하여 유전자 지도 작성, 총 258개의 마커 포함하는 지도 작성 - 개발마커 추가 양친 survey 및 지도화 - 좁나방 저항성 계통과 감수성 계통간에 GC-TOFMS를 이용하여 조사한 대사체 군에서 차이가 나는 후보 물질의 8개 선발 - 배추좁나방 저항성 형질 분리하는 F2 집단 재배 및 대사체 분석 위한 시료 준비 - F2 분리집단에서 배추좁나방 저항성 형질 표현형 	100
------	--	---	-----

<ul style="list-style-type: none"> ○ 양배추류 유전집단(F₁, F₂, BC₁F₁) 양성, 핵심집단, 수집자원, 표준유전집단 BoITBDH 증식 및 고정 	<p style="text-align: center;">조사 및 QTL 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - 유전집단 작성을 위한 F₁, F₂, BC₁F₁ 작성 - 수집자원 고정 - 표준유전집단 추가 증식 (62계통) - 양배추류 핵심집단의 증식 (고정)
<ul style="list-style-type: none"> ○ 형질별 특이 유전자 구조 및 발현차이를 가진 유전자 마커 후보 발굴 	<ul style="list-style-type: none"> - 양배추 2계통 (흑부병 및 석회결핍)의 cDNA sequence 생산 - 흑부병 및 석회결핍 계통간 구조 및 발현차이를 보이는 후보 유전자군 발굴 - 질병별 4계통간의 구조 및 발현 차이를 보이는 후보 유전자군 발굴
<ul style="list-style-type: none"> ○ 내서성 형질 계통 간 유전자발현 차이를 보이는 고온스트레스 반응 유전자의 프로모터 구조 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 제1 세부과제에서 resequencing 에 의한 내서성 계통간 (강 3, 약 2계통) genome sequence 정보를 토대로 유전자의 ORF upstream > 1 kb 영역의 프라이머를 제작 - 8개 계통에 대한 각 유전자별 PCR product를 모두 sequencing
<ul style="list-style-type: none"> ○ 후보 유전자군의 GenomicDNA 영역 분석을 통한 후보 유전자 마커 선발 	<ul style="list-style-type: none"> - PCR 방법을 이용해 각 gDNA 영역을 클로닝하고 염기서열을 분석을 실시하여 SNP, InDel 발굴
<ul style="list-style-type: none"> ○ 내서성 형질 계통 간 F2 분리 유전집단 구축 	<ul style="list-style-type: none"> - 제3핵심 아시아 종묘에 내서성 강/약 parent 계통에 대한 F1 품종의 selfing을 의뢰 함
<ul style="list-style-type: none"> ○ 내서성 형질 구분 유전자마커의 활용성 검증 	<ul style="list-style-type: none"> - 내서성 형질 구분 유전자마커의 활용성 검증
<ul style="list-style-type: none"> ○ 뿌리혹 병 발현 마커 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 전년도에 선별된 뿌리혹병 저항성 관련 발현체 후보 중 140개의 후보를 생물정보학 연구를 통해 선별하고 이들의 발현을 Q-RT-PCR을 통해 검증. - 32개의 유전자 마커를 PCR 결과에서 발현 특이 패턴을 확인
<ul style="list-style-type: none"> ○ RNA-seq을 이용한 시들음병 마커 개발 및 검증 	<ul style="list-style-type: none"> - RNAseq 분석 data의 생물정보학적 분석을 통해 3개의 시들음병 저항성 품종 특이 유전자군 366개, 두 개의 감수성 품종 특이 유전자군 477개 확보. - 우선 순위의 유전자 140개에서 두 번의 독립적인 실험을 통해 54개의 시들음병 관련 발현 특이 분자 마커 확보 - RNAseq data 분석으로부터 3개의 저항성 품종특이 발현을 보이는 15개의 발현마커 확보
<ul style="list-style-type: none"> ○ 선별된 유전자군의 	<ul style="list-style-type: none"> - 뿌리혹병 저항성 관련 양배추 유전자의 분리

<p>기능연구</p>	<p>-시들음병 저항성 관련 양배추 유전자 분리 -AKT1 유전자 기능 연구</p>	<p>-시들음병 저항성 관련 양배추 유전자 분리 -AKT1 유전자 기능 연구</p>
<p>○ 저항성 양배추와 감수성 양배추 wounding 처리에 따른 곤충 방어물질인 글루코시놀레이트 관련 유전자군 선발</p> <p>○ Wounding 처리 후 글루코시놀레이트 및 GABA 생합성 관련 유전자 gene expression</p> <p>○ wounding 처리 후 양배추 이차대사산물 분석</p> <p>○ 양배추 잎에 Ethephon 처리 후 글루코시놀레이트 및 GABA 함량 분석 및 유전자 발현 분석</p>	<p>- 글루코시놀레이트 생합성에 관여하는 transcription factor 유전자 확보</p> <p>- wounding 처리 후 글루코시놀레이트 및 GABA 생합성 관련 유전자들의 gene expression 분석</p> <p>- 글루코시놀레이트 및 GABA 함량 분석</p> <p>- 양배추 잎에 Ethephon 처리 후 글루코시놀레이트 및 GABA 함량 분석 및 유전자 발현 분석</p>	<p>- 글루코시놀레이트 생합성에 관여하는 transcription factor 유전자 확보</p> <p>- wounding 처리 후 글루코시놀레이트 및 GABA 생합성 관련 유전자들의 gene expression 분석</p> <p>- 글루코시놀레이트 및 GABA 함량 분석</p> <p>- 양배추 잎에 Ethephon 처리 후 글루코시놀레이트 및 GABA 함량 분석 및 유전자 발현 분석</p>
<p>○ 형질전환체의 세대 진전 및 도입 유전자의 발현 분석</p> <p>○ 배추 유래 병 및 비생물학적 관련 유전자 해석</p> <p>○ 병 관련 promoter의 발현 해석 및 형질전환용 vector 구축 및 형질전환</p>	<p>- T1 종자 및 T2 종자 획득 - T1 및 T2의 형질전환체 확인 - T2 종자의 homo-event화(PCR 확인) 및 계통화 - homo-event화된 계통에 대한 도입 유전자의 발현 정도 확인 - 데이터베이스를 이용한 배추 유래 비생물학적 스트레스 및 병 관련 유전자 동정 - 배추과 작물의 cold-resistance line과 cold-sensitive line을 이용한 동정된 유전자들의 발현 분석 - 배추과 작물에 병균(무름병 및 위황병) 접종하여 실험재료 준비 - 동정된 유전자들의 발현 분석</p> <p>- T0의 형질전환체 확인(antibiotics, PCR) - T0의 순화 및 T1 종자 획득</p>	<p>- T1 종자 및 T2 종자 획득 - T1 및 T2의 형질전환체 확인 - T2 종자의 homo-event화(PCR 확인) 및 계통화 - homo-event화된 계통에 대한 도입 유전자의 발현 정도 확인 - 데이터베이스를 이용한 배추 유래 비생물학적 스트레스 및 병 관련 유전자 동정 - 배추과 작물의 cold-resistance line과 cold-sensitive line을 이용한 동정된 유전자들의 발현 분석 - 배추과 작물에 병균(무름병 및 위황병) 접종하여 실험재료 준비 - 동정된 유전자들의 발현 분석</p> <p>- T0의 형질전환체 확인(antibiotics, PCR) - T0의 순화 및 T1 종자 획득</p>
<p>○ 수집 및 보유 유전자원 원예적 특성평가</p> <p>○ 석회결핍증, 배추좁나방 내성 자원 선발</p> <p>○ 석회결핍증, 배추좁나방 내성 조합</p>	<p>-수집 및 보유자원 172점 원예적 특성 평가</p> <p>-조합 포함 86자원 석회결핍증 내성 검정</p> <p>-조합 포함 86자원 배추좁나방 내성 검정</p>	<p>-수집 및 보유자원 172점 원예적 특성 평가</p> <p>-조합 포함 86자원 석회결핍증 내성 검정</p> <p>-조합 포함 86자원 배추좁나방 내성 검정</p>

	<p>성능검정</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ CMS 계통 육성에 의한 고순도 F₁ 채종방법개발 ○ 고품질 복합 내병성 F₁ 품종육성 ○ 기보유, 약유래, 응성불임계통의 내병성 검정 실시 및 확보 ○ 양배추 유전자원 및 정보수집 ○ 수집유전자원과 기 선발 계통 특성 평가 및 순계 조기육성 ○ 내서성 검정 및 유전집단 양성 ○ 내병성 (위황병 및 뿌리혹병) 검정 및 유전집단 양성 ○ 고정된 기 보유 계통을 이용한 목적 품종의 F₁ 조합작성 및 우수조합 선발 ○ 선발조합의 채종시험 	<ul style="list-style-type: none"> - CMS F₁ 조합성능검정(60조합) 및 선발 - 선발조합의 채종시험검정(3조합) - 내병성 F₁ 조합(SI)작성(22조합) 및 선발 - 품종보호신청(A311) - 기보유 계통(시들음병 저항성 2계통) - 응성불임계통(시들음병 저항성 11계통, 뿌리혹병 저항성 1계통, 중도저항성 2계통)확보 - 약배양계통(시들음병 저항성 5계통, 중도저항성 1계통, 뿌리혹병 저항성 2계통, 중도저항성 5계통)확보 - 세계 각국으로부터 양배추의 다양한 유전자원 및 정보수집(내서성, 내병성품종 위주 수집) - 수집유전자원 특성검정 - SSD 및 성숙모본 선발에 의한 계통육성 계속 - 편형계 및 원형계 계통 선발 및 순화 고정 - 내서성 검정 및 내서성 계통선발 - 위황병 검정 및 우수 계통 선발 - 뿌리혹병 검정 및 우수 계통 선발 - 내서성 및 고온 결구력이 강한 조합 작성 및 조합 성능검정 - 내병성이 강한 조합 작성 및 성능검정 - 내서성 및 내병성 우수 조합 선발 - 내서성 및 위황병에 강한 품종보호출원 2건 - 작년 선발조합의 종자생산력 검정을 위한 시험채종 	
5차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 신품종 개발에 활용 가능한 분자표지 개발 ○ 계통간의 consensus region 발굴 및 validation (전년도에 이어 계속) ○ 목표형질 관련 핵심 유전자 발굴 및 기능 연구 ○ 육종지원을 위한 통합 Genome Browser 및 데이터베이스 신규 작성 데이터 추가 	<ul style="list-style-type: none"> - Fuidigm 기반의 여교배 선발용 칩 제작: 총 386 SNP (2-3Mb 간격) - 계통 순도검정마커 set (2-5마커/염색체, 24개) 현장 적용 - F₁순도검정마커 set (1-2마커/염색체, 12개) 현장 적용 - 29계통의 genome variants 분석을 통한 variable 및 consensus region 발굴 및 마커 개발 - 데이터베이스 탑재 - 각 형질별 genome SNP 분석을 통해 형질 관련 SNP, SSR, INDEL 군 발굴 및 데이터베이스화 - 웹인터페이스의 통합 데이터베이스 개발 - validation 마커 및 증폭인자 정보, in silico genotyping 정보 추가 - highly variable region 정보 보완 	100

<ul style="list-style-type: none"> ○ 양배추 기본 유전자 지도 작성 및 유용형질 QTL 분석 ○ 양배추류 유전집단 (F₂, F₃, BC₁F₂) 양성, 핵심집단, 수집자원, 표준유전 집단 BoITBDH 증식 및 고정 	<ul style="list-style-type: none"> - 양배추 유전체 정보 이용 디자인한 SNP 프라이머 375쌍으로 다형성 검정, TBDH 집단이용 양배추 유전자 지도 작성을 위해 총 215개의 마커 선발, 182개 유전분석 완료 - 양배추 집단으로 분석이 완료된 481개 마커를 대상으로 하여 유전자 지도 작성, 총 350개 마커 포함하는 유전자지도 작성 - 좀나방 저항성 형질 관련 표현형 데이터 조사 및 QTL 분석 - Tip-burn 형질에 대한 표현형 조사 - 유전집단 작성을 위한 F₂, F₃, BC₁F₂ 작성 - 수집자원 고정 - 표준유전집단 추가 증식 (150계통) - 양배추류 핵심집단의 증식 (고정) 	
<ul style="list-style-type: none"> ○ 브로콜리의 발현체 조절 인자 및 분자마커 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 브로콜리 2계통의 cDNA sequence 및 transcriptome analysis - 브로콜리 2계통의 small RNA 정보생산 및 분석 - 브로콜리와 양배추 계통간의 유전학적 고유성 및 차이점 발굴 	
<ul style="list-style-type: none"> ○ RNA-Seq. DEG에 의한 후보 유전자군의 유전자발현 분석 ○ 내서성 형질 계통 간 RNA-Seq. 후보유전자의 프로모터 구조 분석 ○ RNA-Seq 후보 유전자군의 유전자 마커 선발 ○ F₁ 품종대상 후보유전자 마커의 활용성 검증 	<ul style="list-style-type: none"> - 내서성 계통 간 (5 계통 대상) 유전자발현 차이 DEG 분석 및 후보 유전자군 선발, 유전자발현 비교분석 - 유전자발현 비교 분석에 의한 후보 유전자군의 genomic DNA 프로모터 영역 구조 분석 - PCR 방법을 이용해 각 gDNA 영역을 클로닝하고 염기서열을 분석을 실시하여 SNP, InDel 발굴 - 제3핵심에서 개발된 F₁ 양배추 품종을 대상으로 선 발된 유전자마커의 활용성을 blind test 	
<ul style="list-style-type: none"> ○ 발굴된 타겟 유전자의 기능 연구 (계속) ○ 뿌리혹병, 시들음병 저항성 형질 관련 통합 오믹스 시스템의 소재 개발 활용도 시험 및 개선 ○ 다른 양배추류의 뿌리혹병, 시들음병 	<ul style="list-style-type: none"> -CYP38 형질 전환체 실험 -FocBo1 유전자 발현분석 -개발된 마커를 활용하여 다른 계통 및 F2에서 활용 가능한지 실험. -발현 뿐 아니라 genomic DNA 수준에서 사용가능한 지 실험 - 개발된 마커의 브로콜리 작물에의 활용도 실험. 	

저항성 소재 개발에의 활용도 실험.	
<ul style="list-style-type: none"> ○ 애기장대 형질전환체 제작을 통한 유전자 기능 분석 ○ 확보된 형질전환체의 해충 저항성 특성 검정 ○ 양배추 줄나방 및 기타 생물 스트레스에 대한 저항성 바이오 검정법 구축 	<p>확보한 양배추 transcription factor 유전자를 애기장대에 도입</p> <p>글루코시놀레이트 합성관련 유전자 발현 변화 조사</p> <p>형질전환체에서 병해충 저항성 특성 검정</p> <p>줄나방 및 기타 생물 스트레스에 대한 저항성 정도를 판별 할 수 있는 검정법 개발</p>
<ul style="list-style-type: none"> ○ 형질전환체의 세대 진전 및 도입 유전자의 발현 분석 ○ 양배추 내한성 관련 유전자 해석 ○ 양배추 병 관련 유전자 해석 	<ul style="list-style-type: none"> - 형질전환체를 이용한 제초제 저항성 검정 - Rapid cycle 양배추를 이용한 형질전환체 개발 - Alfin 유전자의 ABA, Salt, Cold, Drought 반응 여부 확인 - Alfin 유전자의 무름병 반응 여부 확인 - 시들음병 저항성 및 이병성 판별 마커 개발
<ul style="list-style-type: none"> ○ 수집 및 보유 유전자원 원예적 특성평가 ○ 석회결핍증 내성조합 차대검정 및 보호출원 ○ 배추줄나방 내성조합 차대검정 및 보호출원 	<ul style="list-style-type: none"> -수집 및 보유자원 226점 원예적 특성 평가 - 선발조합 포함 38점 석회결핍증 내성 검정 및 우수조합 차대검정 / 1품종 보호출원(SC-901) - 선발조합 포함 38점 배추줄나방 내성 검정 및 우수조합 차대검정 / 1품종 보호출원(SC-902)
<ul style="list-style-type: none"> ○ 고품질 내병성 F₁ 품종 육성 ○ 품종보호출원 ○ 해외 적응성 시험 및 채종시험 	<ul style="list-style-type: none"> - 지역적응성 및 생산량 검정시험(2조합) - CMS F₁ 조합성능검정(83조합)/1조합선발 - 품종보호신청(A302, KD93)
<ul style="list-style-type: none"> ○ 수집유전자원과 기 선발계통 특성 평가 및 순계 조기육성 ○ 내서성 검정 및 유전집단 양성 ○ 내병성 (위황병 및 뿌리혹병) 검정 및 유전집단 양성 ○ 고정된 기 보유 계통을 이용한 목적 품종의 F₁ 	<ul style="list-style-type: none"> - 수집유전자원 및 1~4차년도 선발계통의 특성 재검정 - SSD 및 성숙모본 선발에 의한 계통육성 계속 - 편형계 및 원형계 계통 선발 및 순화 고정 - 내서성 검정 및 내서성 계통선발 - 위황병 검정 및 우수 계통 선발 - 뿌리혹병 검정 및 우수 계통 선발 - 내서성 및 고온 결구력이 강한 조합 작성 및 조합 성능검정

	<p>조합작성 및 우수조합 선발</p> <p>○ 선발조합의 채종시험</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 내병성이 강한 조합 작성 및 성능검정 - 내서성 및 내병성 우수 조합 선발 - 내서성 및 위황병에 강한 씨티-403, 씨티-410 품종 보호출원(출원번호: 출원-2015-46. 출원-2015-45) - 작년 선발조합의 종자생산력 검정을 위한 시험채종 	
--	---	--	--

2절. 관련분야의 기술발전예의 기여도

1. 양배추의 NGS resequencing 기술을 이용하여, 효율적인 유전체 정보 생산 시스템을 구축하고, 유전체 정보의 가공, genetic variants 발굴 효율적인 RNA sequence (transcriptome)와 miRNA 정보 생산 시스템 구축 및 유전자 발현 profiling, 유용유전자 발굴, 조절유전자 동정 분석을 위한 파이프라인 작성을 하여 양배추뿐만 아니라 다른 유용 작물의 유전체 정보 생산 가공 및 활용 기술을 확보하였다고 판단된다.
2. 본 연구팀에서 개발된 시들음병 저항성 검정 분자표지, 내서성 검정 분자표지, 여교배 선발용 SNP 분자표지, F₁ 품종 순도검정 분자표지, 계통 고정 검정 분자표지는 양배추의 신품종 개발시 선발, 순도검정, 원종의 순도 향상 등에 기여하며 보다 효율적이고 정확한 육종을 하는데 기여할 것이라고 판단한다. 뿌리혹병 저항성, 시들음병 저항성, 내서성, 석회결핍 둔감형 등을 실험적 진단할 수 있는 기법 또한 육종 현장에 유용하게 사용될 것으로 기대된다.
3. Genome Browser, 통합 유전자 지도, 29양배추류 계통의 유전체 정보와 분자표지 정보, 형질관련 분자표지 정보, highly variable region 등의 정보가 탑재된 양배추 품종 개발 지원용 데이터베이스는 추후 육종가가 필요한 분자표지 개발 및 양배추 품종개발 관련 연구의 기반으로 역할할 것이다.
4. 본 연구팀에서 개발한 양배추류의 육종소재는 일부 공공 기탁이 되어 있고 이외에도 다양한 소재들이 개발되어 양배추 신품종 개발에 있어 좋은 기반이 될것으로 기대된다.
5. 개발된 유용 유전자들은 추후에 심화 연구를 통해 양배추 개량 및 유전자의 기능 연구의 자원으로 역할을 할 것이며, 이는 관련 연구분야의 발전에 기여하는 것으로 사료된다.
6. 구축된 양배추 및 브로콜리의 고효율 형질전환 시스템은 추후 양배추 유용 유전자의 기능연구의 기반으로서의 역할을 할 것이다.
7. 양배추 유전연구에 있어 근간이 될 유전자 지도를 개발하여 추후 연구의 근간을 구축하였다.
8. 널리 재배되는 YR湖月 보다 내성이 강한 석회결핍증 내성 중만생계 품종 SC-901과 배추좁나방 내성 중만생계 품종 SC-902를 육성하여 품종보호출원 함으로써 월동용 재배 지역에 석회결핍증 및 배추좁나방 내성이 기존 판매되는 품종 보다 강한 우수 품종을 보급할 수 있다
9. 석회결핍증내 내성인 107140계통과 민감성인 102119계통을 교배하고 그 후대를 양성하여 5차 년도 현재 F5 423라인을 확보하였다. 본 재료는 향후 양배추에서 석회결핍증 관련 연구를 추가로 수행코자 할 경우 분자생물학적 접근을 용이하게 하는 귀중한 재료로 활용될 것이다.
10. 육종연한을 단축하기 위하여 약배양을 통한 품종육성기술을 안정화하였으며, 반수체 육종법을 체계화시켰다. 현재 약배양유래 계통을 확보하는데 까지는 많은 연구기관에서 진행되어오고 있으나 약배양계통간의 조합작성을 통해 품종화한 경우는 없었다. 이에 본 연구에서는 약배양유래 계통간의 조합을 작성하여 품종화(품종보호출원 2건)하

였으며 더 나아가 채종시에 발생하는 문제점을 해결하기 위하여 응성불임성을 가진 계통과 약배양계통간의 조합을 시도하였고 품종화(품종보호출원 1건)하였다. 결과적으로 약배양을 이용한 녹색꽃양배추 육종연한을 단축하여 품종화하는 기술력을 확보하므로 타 작물에서의 적용 가능성을 확대할 수 있는 계기를 마련하였다.

제5장 연구개발 성과 및 성과 활용계획

1절. 연구개발 성과

1. 연차별 정량 목표대비 성과

(단위 : 건수)

구분		특허		신품종			유전자원 등록		논문		기타
		출원	등록	품종명 등록	품종보호		유전정보 자원	식물자 원	SCI	비SCI	
					출원	등록					
1차년도	목표							15			
	달성	3						15	2	1	12
2차년도	목표						10,020	15	7	1	
	달성	1		1	1		12,020	13	3	5	10
3차년도	목표	4					5,010	27	6		
	달성	4	2	2	2		5,965	28	5		12
4차년도	목표	7	5	3	3		5,010	27	6	1	
	달성	4	5	3	3		18,150	68	10		9
5차년도	목표	4	7	6	6	3	5,010	29	6	2	
	달성	4	3	7	7	3	29,060	18	5		9
계	목표	15	12	9	9	3	25,050	113	25	4	
	달성	16	10	13	13	3	65,195	142	25	6	52

2. 연구결과 활용 목표대비 성과

(단위 : 건수)

구분		기술실시 (이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	10	9		4	7	
	달성	8 (2건 추가 추진중)	8 (기술 실시 이후 추가 진행 계획중)		4	10	

2절. 연구개발 성과 내역

1. 특허 성과

출원된 특허의 경우					
출원연도	구분 (출원/등록)	특허명	출원/등록인	출원/등록국	출원/등록번호
2011	출원	배추, 양배추, 유채(A, C, AC genome) 유전자의 진화 및 기능 연구를 위한 발현 유전체 비교 분석 시스템 구축 방법	한국생명공학연구원	대한민국	10-2011-00393570
2011	출원	내서성 양배추 품종의 조기 선별을 위한 바이오 마커 및 이의 용도	한국생명공학연구원	대한민국	10-2011-0039356
2011	출원	프로모터를 이용한 친환경 바이오 소재 모니터링 시스템 및 이의 용도	한국생명공학연구원	대한민국	10-2010-0120740
2012	출원	석회 결핍 둔감 형질 양배추 분자 진단 방법	한국생명공학연구원	대한민국	10-2012-00543630
2013	출원	양배추 시들음병 저항성 또는 감수성 품종 선별용 SNP 마커 및 이의 용도	한국생명공학연구원	대한민국	10-2013-0048135
2013	등록	십자화과 작물의 유전자의 진화 및 기능 연구를 위한 발현 유전체 비교 분석 시스템 구축 방법	한국생명공학연구원	대한민국	10-1289403
2013	출원	재배종으로부터 한국 품종 계통인 곳감 참외 품종을 선별하기 위한 바이오 마커 및 이의 용도	한국생명공학연구원	대한민국	10-2013-0028119
2013	출원	재배종으로부터 한국 품종 계통인 곳감 참외 품종을 선별하기 위한 휘발성 물질 특이적 바이오 마커 및 이의 용도	한국생명공학연구원	대한민국	10-2013-0032584
2013	출원	양배추 시들음병 저항성 유전자 BoCYP38 및 이의 용도	한국생명공학연구원	대한민국	10-2013-0048140
2013	등록	내서성 양배추 품종의 조기 선별을 위한 바이오 마커 및 이의 용도	한국생명공학연구원	대한민국	10-1301922
2014	등록	석회 결핍 둔감 형질 양배추 분자 진단 방법	한국생명공학연구원	대한민국	10-1448074
2014	등록	재배종 참외 품종으로부터 한국 품종 계통인 곳감 참외 품종을 선별하기 위한 바이오 마커 및 이의 용도	한국생명공학연구원	대한민국	10-1447112
2014	등록	재배종 참외 품종으로부터 한국	한국생명공학연구원	대한민국	10-1459038

		재래종 계통인 곳감참외 중을 선별하기 위한 품종발성 물질 특이적 바이오 마커 및 이의 용도			
2014	출원	PIG15 프로모터를 이용한 친환경 바이오소재 모니터링 시스템 및 이의 용도	한국생명공학 연구원	대한민국	10-2014-0010270
2014	출원	PIG6 프로모터를 이용한 친환경 바이오소재 모니터링 시스템 및 이의 용도	한국생명공학 연구원	대한민국	10-2014-0010265
2014	출원	양배추의F1순도검정을위 한단일염기다형성마커세 트및이의용도	한국생명공학 연구원	대한민국	10-2014-0156817
2014	출원	양배추의 계통순도검정과 조기고정 계통 선발을 위한 단일염기다형성 마커 세트 및 이의 용도	한국생명공학 연구원	대한민국	10-2014-0156822
2014	등록	프로모터를 이용한 친환경 바이오소재 모니터링 시스템 및 이의 용도	한국생명공학 연구원	대한민국	10-1365927
2014	등록	PIG6 프로모터를이용한친환경 바이오소재모니터링시스 템및이의용도	한국생명공학 연구원	대한민국	10-1375593
2014	등록	PIG15 프로모터를이용한친환경 바이오소재모니터링시스 템및이의용도	한국생명공학 연구원	대한민국	10-1375598
2014	등록	양배추시들음병저항성또 는감수성품종선별용SNP 마커및이의용도	한국생명공학 연구원	대한민국	10-1464247
2014	출원	내서성양배추품종의선별 을위한특이프라이머및 이의용도	한국생명공학 연구원	대한민국	10-2014-0051314
2014	출원	벼 유래 OsCYP18-2 유전자를 이용한 환경스트레스에 대한 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조 방법	한국생명공학 연구원	대한민국	10-2014-0015774
2014	등록	벼 유래 OsCYp19-4 유전자를 이용한 환경 스트레스에 대한 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조 방법	한국생명공학 연구원	대한민국	10-1412555
2015	출원	십자화과시들음병저항성 품종을판별하기위한분자 마커및이의용도	한국생명공학 연구원	대한민국	10-2015-0103618
2015	출원	뿌리 특이적 프로모터	순천대학교 산학협력단	대한민국	10-2015-0099595

2. 신제품 성과

순번	성과내역	작물명	품종명	출원/등록인	출원/등록일자
1	출원	양배추	CT-180	아시아종묘	2011.12.6
2	출원	양배추	CT-207	아시아종묘	2013.1.22
3	출원	양배추	CT-262	아시아종묘	2013.1.22
4	출원	녹색꽃양배추	A311	(주)코레곤	2014.05.09
5	출원	양배추	CT-301	아시아종묘	2014.1.27
6	출원	양배추	CT-302	아시아종묘	2014.1.27
7	출원	녹색꽃양배추	A302	(주)코레곤	2014.10.06
8	등록	양배추	CT-180	아시아종묘	2014.7.3
9	출원	녹색꽃양배추	KD93	(주)코레곤	2015.07.06
10	출원	양배추	CT-403	아시아종묘	2015.1.5
11	출원	양배추	CT-410	아시아종묘	2015.1.5
12	등록	양배추	CT-207	아시아종묘	2015.5.11
13	등록	양배추	CT-262	아시아종묘	2015.5.11
14	출원	양배추	SC-901	삼성종묘	2015.6.22
15	출원	양배추	SC-902	삼성종묘	2015.6.22

3. 유전자원 등록 성과

순번	임시번호	작물명	육성 특기 사항	제공자	취득자원형태	육성년도	기탁년도
1	K173350~K173351	양배추	육성계통	백남권	순계	2010	2011
2	K173139	녹색꽃양배추	육성계통	강관호	종자	2010	2011
3	K173140	녹색꽃양배추	육성계통	강관호	종자	2010	2011
4	K173141	녹색꽃양배추	육성계통	강관호	종자	2010	2011
5	K166211	양배추	고정종	송준호	종자	2010	2011

6	K166212	양배추	고정종	송준호	종자	2010	2011
7	K166213	양배추	고정종	송준호	종자	2010	2011
8	K166214	양배추	고정종	송준호	종자	2010	2011
9	K166215	양배추	고정종	송준호	종자	2010	2011
10	K166216	양배추	고정종	송준호	종자	2010	2011
11	K166217	양배추	고정종	송준호	종자	2010	2011
12	K166218	양배추	고정종	송준호	종자	2010	2011
13	K166219	양배추	고정종	송준호	종자	2010	2011
14	K166220	양배추	고정종	송준호	종자	2010	2011
15	K191079	녹색꽃양배추	F1	강관호	종자	2010	2012
16	K191080	녹색꽃양배추	F1	강관호	종자	2010	2012
17	K175578	양배추	고정종	송준호	종자	2011	2012
18	K175579	양배추	고정종	송준호	종자	2011	2012
19	K175580	양배추	고정종	송준호	종자	2011	2012
20	K175581	양배추	고정종	송준호	종자	2011	2012
21	K175582	양배추	고정종	송준호	종자	2011	2012
22	K175583	양배추	고정종	송준호	종자	2011	2012
23	K175584	양배추	고정종	송준호	종자	2011	2012
24	K175585	양배추	고정종	송준호	종자	2011	2012
25	K175586	양배추	고정종	송준호	종자	2011	2012
26	K175587	양배추	고정종	송준호	종자	2011	2012
27	K175588	양배추	고정종	송준호	종자	2011	2012
28	K209433	녹색꽃양배추	F1,웅성불입	강관호	종자	2010	2013
29	K209434	녹색꽃양배추	F1,웅성불입	강관호	종자	2010	2013
30	K209435	녹색꽃양배추	F1,웅성불입	강관호	종자	2010	2013
31	K209436	녹색꽃양배추	F1,웅성불입	강관호	종자	2010	2013
32	K209437	녹색꽃양배추	F1,웅성불입	강관호	종자	2010	2013
33	K209438	녹색꽃양배추	F1,웅성불입	강관호	종자	2010	2013
34	K209439	녹색꽃양배추	F1,웅성불입	강관호	종자	2010	2013
35	K209440	녹색꽃양배추	F1,웅성불입	강관호	종자	2010	2013
36	K209441	녹색꽃양배추	F1,웅성불입	강관호	종자	2010	2013
37	K209442	녹색꽃양배추	F1,웅성불입	강관호	종자	2010	2013
38	K209443	녹색꽃양배추	F1,웅성불입	강관호	종자	2010	2013
39	K209444	녹색꽃양배추	F1,웅성불입	강관호	종자	2010	2013

40	K209445	녹색꽃양배추	F ₁ ,웅성불입	강관호	종자	2010	2013
41	K209446	녹색꽃양배추	F ₁ ,웅성불입	강관호	종자	2010	2013
42	K209447	녹색꽃양배추	F ₁ ,웅성불입	강관호	종자	2010	2013
43	K204450	양배추	고정종	송준호	종자	2012	2013
44	K204451	양배추	고정종	송준호	종자	2012	2013
45	K204452	양배추	고정종	송준호	종자	2012	2013
46	K204453	양배추	고정종	송준호	종자	2012	2013
47	K204454	양배추	고정종	송준호	종자	2012	2013
48	K204455	양배추	고정종	송준호	종자	2012	2013
49	K204456	양배추	고정종	송준호	종자	2012	2013
50	K204457	양배추	고정종	송준호	종자	2012	2013
51	K204458	양배추	고정종	송준호	종자	2012	2013
52	K204459	양배추	고정종	송준호	종자	2012	2013
53	K243293	녹색꽃양배추	F ₁ ,웅성불입	강관호	종자	2011	2014
54	K243294	녹색꽃양배추	F ₁ ,웅성불입	강관호	종자	2011	2014
55	K243295	녹색꽃양배추	F ₁ ,웅성불입	강관호	종자	2011	2014
56	K243296	녹색꽃양배추	F ₁ ,웅성불입	강관호	종자	2011	2014
57	K243297	녹색꽃양배추	F ₁ ,웅성불입	강관호	종자	2011	2014
58	K243298	녹색꽃양배추	F ₁ ,웅성불입	강관호	종자	2011	2014
59	K243299	녹색꽃양배추	F ₁ ,웅성불입	강관호	종자	2011	2014
60	K222918	양배추	고정종	송준호	종자	2013	2014
61	K222919	양배추	고정종	송준호	종자	2013	2014
62	K222920	양배추	고정종	송준호	종자	2013	2014
63	K222921	양배추	고정종	송준호	종자	2013	2014
64	K222922	양배추	고정종	송준호	종자	2013	2014
65	K222923	양배추	고정종	송준호	종자	2013	2014
66	K222924	양배추	고정종	송준호	종자	2013	2014
67	K222925	양배추	고정종	송준호	종자	2013	2014
68	K222926	양배추	고정종	송준호	종자	2013	2014
69	K222927	양배추	고정종	송준호	종자	2013	2014
70	K222928	양배추	고정종	송준호	종자	2013	2014

71	BP1230916 ~BP123096 5	양배추	육성계통	백남권	순계	2014	2015
72	K248199	녹색꽃양배추	F ₁ ,육성불입	강관호	종자	2012	2015
73	K248200	녹색꽃양배추	F ₁ ,육성불입	강관호	종자	2012	2015
74	K248201	녹색꽃양배추	F ₁ ,육성불입	강관호	종자	2012	2015
75	K248202	녹색꽃양배추	F ₁ ,육성불입	강관호	종자	2012	2015
76	K248203	녹색꽃양배추	F ₁ ,육성불입	강관호	종자	2012	2015
77	K248204	녹색꽃양배추	F ₁ ,육성불입	강관호	종자	2012	2015
78	K248205	녹색꽃양배추	F ₁ ,육성불입	강관호	종자	2012	2015
79	K246351	양배추	고정종	송준호	종자	2014	2015
80	K246352	양배추	고정종	송준호	종자	2014	2015
81	K246353	양배추	고정종	송준호	종자	2014	2015
82	K246354	양배추	고정종	송준호	종자	2014	2015
83	K246355	양배추	고정종	송준호	종자	2014	2015
84	K246356	양배추	고정종	송준호	종자	2014	2015
85	K246357	양배추	고정종	송준호	종자	2014	2015
86	K246358	양배추	고정종	송준호	종자	2014	2015
87	K246359	양배추	고정종	송준호	종자	2014	2015
88	K246360	양배추	고정종	송준호	종자	2014	2015
89	K246361	양배추	고정종	송준호	종자	2014	2015

4. 생명정보자원 등록 성과

순번	등록필증 번호	작물명	생명정보 형태	등록내용	등록건수	등록년도	등록자
1	NS-0022-000 01~20	양배추	gene	칼슘 수송 유전자	20	2012	김혜란
2	NS-0412-000 001~000010	양배추	gene	양배추 칼슘함량 증가 관련 유전자	10	2013	김혜란
3	KN1305_0000 001 ~ KN1305_0005	양배추	gene	위황병 감수성, 내서성 계통관련 유전자	5,955	2013	김대수

	955						
4	KN1405_0013 272 ~KN1405_001 8140	양배추	gene	칼슘 결핍 저항성 양배추 유전자	4,869	2014	김대수
5	KN1405_0000 001 ~KN1405_001 3271	양배추	gene	칼슘 결핍 감수성 양배추 유전자	13,271	2014	김대수
6	KBRS2015062 9_0000001	브로콜리	gene	양배추 석회결핍관련 유전자	29,060	2015	김대수

5. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자		학술지명	Vol.(No.)	국내 외 구분	SCI(E) 구분
		주저자	교신저자				
2011	양배추로부터 β -sitosterol과 phytol의 분리	김수연	백남인	생명자원과학 연구논문집	30	국내	비SCI
2012	A novel gibberellin 2- oxidase gene <i>CaGA2ox1</i> in pepper is specifically induced by incompatible plant pathogens	이연	박정미	Plant Biotechnol. Rep.	6(4)	국외	SCI
2012	Advances in regeneration of the Brassicaceae crop plants	박종인	노일섭	Journal of Plant Biotechnology	39	국내	비SCI
2012	Brassica A genome의 최근 연구 동향	최수련	권수진	J Plant Biotechnol	39	국내	비SCI
2012	Identification and characterization of stress resistance related genes of Brassica rapa	Nassar Uddin Ahmed, 박종인	노일섭	Biotechnology letters	34	국외	SCI
2012	Identification and expression analysis of chitinase genes related to biotic stress resistance in Brassica	Nasar Uddin Ahmed,	노일섭	Molecular Biology Reports	39	국외	SCI
2012	Molecular characteriation of stress resistance-related chitinase genes of Brassica rapa	Nasar Uddin Ahmed, 박종인	노일섭	Plant Physiology and Biochemistry	58	국외	SCI
2012	Progress in genetic manipulation of the Brassicaceae	Nasar Uddin Ahmed	노일섭	Journal of Plant Biotechnology	39	국내	비

2012	The rice thylakoid luminal cyclophilin OsCYP20-2 confers enhanced environmental stress tolerance in tobacco and Arabidops	김세경	조혜선	Plant Cell Report	31(2)	국외	SCI
2012	Three Brassica rapa metallothionein genes are differentially regulated under various stress conditions	안영옥	곽상수	Molecular Biology Reports	39	국외	SCI
2012	작물의 생합성 칼슘함량 증대 연구 현황	이정여	김혜란	Journal of Plant Biotechnology	39	국내	비SCI
2013	A rice immunophilin gene, OsFKBP16-3, confers tolerance to environmental stress in Arabidopsis and rice	박현지	조혜선	IJMS	14(3)	국외	SCI
2013	Development of SSR markers by next-generation sequencing of Korean landraces of chamoe (Cucumis melo var. makuwa)	박인규	김혜란	MOLECULAR BIOLOGY REPORTS	40(12)	국외	SCI
2013	Gene ontology based characterization of Expressed Sequence Tags (ESTs) of <i>Brassica rapa</i> cv. Osome	Senthil Kumar Thamil Arasan,	노일섭	Indian Journal of Experimental Biology	51	국외	SCIE
2013	Identification of Novel Pepper Genes Involved in Bax- or INF1-Mediated Cell Death Responses by High-Throughput Virus-Induced Gene Silencing	이정희	박정미	International Journal of Molecular Sciences	14	국외	SCI
2013	Metabolic Differentiation of Diamondback Moth (<i>Plutella xylostella</i> (L.)) Resistance in	김재광	김혜란	Journal of Agricultural and Food	61	국외	SCI

	Cabbage (<i>Brassica oleracea</i> L. ssp. capitata)			Chemistry			
2013	MYB transcription factors regulate glucosinolate biosynthesis in different organs of Chinese cabbage (<i>Brassica rapa</i> ssp. pekinensis)	김연복	김혜란	MOLECULES	18(7)	국외	SCIE
2013	Organic fertilizer application increases biomass and proportion of fungi in the soil microbial community in a minimum tillage Chinese cabbage field	이영한	김혜란	Canadian Journal of Soil Science	93	국외	SCI
2013	Regulation of the major vacuolar Ca ²⁺ transporter genes, by intercellular Ca ²⁺ concentration and abiotic stresses, in tip-burn resistant <i>Brassica oleracea</i>	이정여	김혜란	Molecular Biology Reports	40	국외	SCI
2013	Use of heat stress responsive gene expression levels for early selection of heat tolerant cabbage (<i>Brassica oleracea</i> L.)	박현지	조혜선	IJMS	14(6)	국외	SCI
2014	Accumulation of anthocyanin and related gene expression during the development of cabbage seedlings.	Xiaohua Li	Sang Un Park	Process Biochemistry	49(7)	국외	SCI
2014	Analysis of <i>S</i> -locus and expression of <i>S</i> -allele of self-compatible rapid-cycling <i>Brassica oleracea</i> 'TO1000DH3'	정희정, Nasar Uddin Ahmed	노일섭	Molecular Biology Reports	41	국외	SCI
2014	Functional innovations of three chronological mesohexaploid <i>Brassica rapa</i> genomes	김정은	김혜란	BMC genomics	15	국외	SCI
2014	High-Throughput Sequencing and De Novo Assembly of	김현아, 임찬주	권석윤	PLoS ONE	9(3)	국외	SCI

	Brassica oleracea var. Capitata L. for Transcriptome Analysis							
2014	Phenotypic profiling and gene expression analyses for aromatic and volatile compounds in Chamoos (Cucumis melo)	이정여	김혜란	Molecular Biology Reports	41	국외	SCI	
2014	RNA-Seq analysis and de novo transcriptome assembly of Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus Linne)	정원용	조혜선	PLoS ONE	9(11)	국외	SCI	
2014	Rpi-blb2-mediated late blight resistance in Nicotiana benthamiana requires SGT1 and salicylic acid-mediated signaling but not RAR1 or HSP90	오상근	김혜란 최도일	FEBS LETTERS	588(7)	국외	SCI	
2015	Differentiated cuticular wax content and expression patterns of cuticular wax biosynthetic genes in bloomed and bloomless broccoli (Brassica oleracea var. italica)	이정여	김혜란	Process Biochemistry	50	국외	SCI	
2015	Expression of <i>Fusarium</i> wilt resistant gene, <i>FocBo1</i> , in association with disease resistant phenotypes of cabbage breeding lines	박은지	박정미	한국육종학회 지	(accepted)	국내	비SCI	
2015	NPR1 is Instrumental in Priming for the Enhanced flg22-induced MPK3 and MPK6 Activation	이소영	권석윤	Plant Path J	31	국내	SCIE	

6. 인력 양성 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
18	7	8	3		7	11	2	10	6

7. 기타

가. 전시회 및 박람회 참여

No	일시	유형	행사명칭	주최기관	장소
1	2011.10.01 ~ 2011.10.16	전시회	2011 고양 국제 특산품 페스티벌	고양시	일산 호수공원
2	2011.10.13 ~ 2011.10.15	전시회	2011 생명산업대전	농림수산물식품부/ 농림수산물식품기술기획 평가원	aT센터
3	2011.10.25 ~ 2011.10.27	박람회	2011 대한민국우수상품박람회	경기도, 전국센터협의회/ 경기중소기업종합센터	KINTEX
4	2011.12.11 ~ 2011.12.14	박람회	중국 제10회 광저우 종자박람회	중국광동성, 중국종자협회	중국광저우농 업기술원
5	2011.10.16 ~ 2011.10.18	박람회	2011 헝가리 유럽종자협회 연례회의 및 국제종자박람회	유럽종자협회	헝가리 부다페스트
6	2011.11.1 ~ 2011.11.04	박람회	2011 터키 Growtech 유라시아 국제농자재박람회	유라시아농자재협회	터키 안탈야
7	2011.11.8 ~ 2011.11.11	전시회	TAMAS2011	KOTRA 대전무역전시관	대전시

나. 학회발표내용

순번	학회	발표제목	발표년도	과제책임자
1	한국식물생명공학회	양배추 내서성 모니터링용 분자표지 개발	2011	권석윤
2	한국식물생명공학회	Screening of sensitive/insensitive cabbage lines to calcium limitation	2011	권석윤
3	한국식물생명공학회	양배추 유전체 육종 지원 사업단 소개	2011	김혜란
4	한국식물생명공학회	Comparative analysis of defense signaling pathway in four <i>Brassicaceae</i> species	2011	김혜란
5	한국식물생명공학회	배추, 양배추, 유채 유전자의 진화 및 기능 연구를 위한 발현 유전체 데이터베이스	2011	김혜란
6	The Korean Society of Plant Pathology	A noble Gibberellin 2-oxidase induced by ethylene and salicylic acid modulate active GA contents during pathogen resistance responses in pepper	2011	박정미
7	The Korean Society of Plant Pathology	Separation of the silencing suppression and avirulence functions of the <i>TunipCrinkle Virus</i> coat protein	2011	박정미
8	제95차 추계 한국원예	Identification and Characterization of	2011	노일섭

	학회	Thaumatins-like Genes Related to Stress Resistance in Brassica		
9	Plant & Animal Genomes XIX Conference	Identification and expression analysis of genes in response to stresses in Brassica	2011	노일섭
10	Plant & Animal Genome	Cabbage genomics assisted breeding supporting center	2012	김혜란
11	Plant & Animal Genome	Characterization of vacuolar Ca ²⁺ transporter genes in Brassica oleracea	2012	김혜란
12	한국작물학회	Construction and characterization of two bacterial artificial chromosome libraries as Cucurbitaceae crop genomic resources	2012	김혜란
13	한국작물학회	Distribution of intercellular Ca ²⁺ in the leaves of tip-burn resistant Brassica oleracea	2012	김혜란
14	10 th international congress on Plant Molecular Biology	A Proteomic Approach: Analysis of Changes in Aerial Part of Susceptible and Resistance Cabbage Inbred Line After Inoculation with <i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>conglutinans</i>	2012	박정미
15	제96차 추계 한국원예학회	Characterization of Stress Resistance Related Chitinase like Genes of Brassica	2012	노일섭
16	Plant & Animal Genomes XX Conference	Characterization of Brassica Thaumatins-like Genes Related to Stress Resistance	2012	노일섭
17	Plant & Animal Genomes XX Conference	Cabbage Genomics assisted breeding supporting Center	2012	노일섭
18	10th International Congress on Plant Molecular Biology	Analysis of Expression Profile of Chitinase Gene Family Related to Stresses in Brassica rapa	2012	노일섭
19	10th International Congress on Plant Molecular Biology	Analysis of Expression Profile of Stress Related Thaumatins-like Gene Family in Brassica rapa	2012	노일섭
20	6th International symposium on brassica and 18th crucifer genetics workshop	Identification and Characterization of Cold Responsive Genes in Brassica	2012	노일섭
21	국제식물분자생물학회	Relationship between tip-burn and intercellular Ca ²⁺ concentration in the leaves of <i>Brassica oleracea</i>	2013	김혜란
22	국제식물분자생물학회	Genomic resources for Cucurbitaceae genetics and breeding	2013	김혜란

23	국제식물유전자원유 전체 심포지엄	Genome complexity of <i>B. rapa</i> based on synteny to the <i>A. thaliana</i> genome	2013	김혜란
24	국제식물유전자원유 전체 심포지엄	Development and validation of SSR markers in oriental melon	2013	김혜란
25	국제식물유전자원유 전체 심포지엄	Regulation of the major vacuolar Ca ²⁺ transporter genes, by intercellular Ca ²⁺ concentration and abiotic stresses, in tip-burn resistant <i>Brassica oleracea</i>	2013	김혜란
26	국제식물유전자원유 전체 심포지엄	Volatile metabolite profiling for the discrimination of the native and cultivar Chamoes and expression study of aromatic compound biosynthetic genes	2013	김혜란
27	The Korean Society of Plant Pathology	Comparative proteomic analysis in clubroot-susceptible and resistant cabbage inbred lines	2013	박정미
28	한국식물생명공학회	Virtual screening of non-host pathogen-specific pepper genes and analysis of their promoter activity during plant-pathogen interaction	2013	박정미
29	제99차추계한국원예 학회	Genome Wide Identification and Expression Analysis of the WRKY Gene Family in <i>Brassica rapa</i>	2013	노일섭
30	제99차추계한국원예 학회	Genome-wide Identification of Cold and Freezing Stress Responsive Genes of <i>Brassica oleracea</i>	2013	노일섭
31	한국원예학회	Phenotypic Characteristics in Broccoli (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i>) Progeny Derived from Anther Culture	2013	강관호
32	제101차추계한국원예 학회	MYB Transcription Factor Family: Characterization and Expression Profiling against Stresses in <i>Brassica rapa</i>	2014	노일섭
33	Plant & Animal Genome XXII Conference	Genome-Wide Identification and Characterization of WRKY Gene Family of <i>Brassica</i>	2014	노일섭
34	PAGXXIII	Comparative proteomic analysis in clubroot-susceptible and resistant cabbage inbred lines	2015	박정미
35	한국식물생명공학회	Development of a molecular marker of Fusarium wilt resistant gene <i>FocBo1</i> in cabbage breeding line	2015	박정미

8. 연구결과 활용 목표 달성 내역

가. 기술이전

- 기술이전 5건 (양배추 품종 CT-180, CT-207, 인디아아몬드, 인디칸 CT-262)

- 기술이전 진행중 2건 (브로콜리 품종 A311, A302)
- 추가 기술이전 추진중 3건 (양배추 품종 SC-901, SC-902, 브로콜리 품종 KD93)

나. 교육지도

- 2010년 11월 11일 ‘배추과작물 개량 네트워크’ (총 교육 인원 100명)
- 2011년 4월 26일 ‘배추과작물의 분자마커 성분분석 및 진단 방법’ (총 교육 인원 35명)
- 2014년 물질이전계약 (한국생명공학연구원-순천대학교 산학협력단) 2건

다. 언론홍보

No	홍보일자	홍보유형	국내외	매체명	제목
1	2011.09.06	월간잡지	국내	주말농장 35호	생명공학육종연구소개소
2	2011.11.06	월간잡지	국내	주말농장 36호	생명공학육종연구소 개소식 열려..
3	2011.03.17	월간잡지	국내	주말농장 32호	제주 월동양배추 품종평가회
4	2011.02.16	인터넷기사	국내	농민신문	아시아종묘, 월동 양배추 품종평가회
5	2011.09.21	인터넷기사	국내	농민신문	아시아종묘, 이천에 5만m ² 규모 육종연구소 완공
6	2011.11.01	월간잡지	국내	디지털농업 11월호	세계인 입맛 잡을 양배추 개발한다
7	2011.04.18	중앙전문지	국내	농업정보신문	2011년 종자 수출 목표 550만불
8	2011.10.31	중앙TV	국내	MBC	양배추 연구
9	2011.09.19	인터넷기사	국내	한국농어민신문	생명공학육종연구소 내달 개소
10	2010.11.10	인터넷기사	국내	충청일보 등 16매체	양배추유전체육종지원 사업단 개소

라. 수상내역

- 한국무역협회 주관 수출액 관련 수상 2건



제48회 무역의 날 “300만불 수출의 탑”



제51회 무역의 날 “500만불 수출의 탑”

- 한국식물생명공학회 정기 학술발표회 및 총회(2015.6.18.-19) 우수포스터상 수상
“Development of a molecular marker of Fusarium wilt resistant gene *FocBo1* in cabbage breeding line”

3절. 연구개발 성과 활용 및 연구 종료 후 활용 계획

- 양배추 오믹스 데이터로부터 확보 된 결과를 정리하여 2건의 논문을 추가 발표할 예정이며, 현재 두건의 논문이 심사 중에 있다
 - 실험 중에 발견한 양배추의 시들음병 저항성 유전자 FocBo1의 발현과 저항성의 상관 관계를 바탕으로 FocBo1 단백질의 항체를 기반으로 한 저항성 식물 진단 기법을 추가로 연구 해 보고자 한다.
 - 개발된 마커의 일부가 브로콜리 작물에도 적용 되는 관계로 다른 배추과 작물에 개발된 마커를 적용해보고자 한다.
 - 본 과제를 통해 육성되어 품종보호출원된 SC-901, SC-902 두 품종은 기술실시를 통해 삼성종묘(주)에서 자체 실용화하여 채종을 거쳐 2017년부터 시판코자 한다
 - 본 과제를 통하여 육성되어 기탁된 유전자원 142점은 누구에게나 분양한 조건으로 기탁하였으므로 관심있는 연구자의 이용이 열려있다.
 - 석회결핍증 관련 RIL 라인은 향후 F7세대 400라인 확보를 목표로 세대를 진전시켜 분자유종 재료로 활용될 수 있도록 확보할 계획임
 - 연구과정에서 획득한 웅성불임계통과 약배양 유래 계통, 기보유 계통들 간의 합성조합을 계속 수행할 예정이며, 중국 수출용 품종육성에 활용될 것이다. 품종보호 신청한 “A311”, “A302”, “KD93”은 중국 및 네팔 등지에서 상용화하고자 계획 중에 있으며, 네팔의 거래처에서 이미 판매요구를 받은 상황이다.
- 이와 더불어 2015년 ISF(International Seed Federation)에 (주)코레콘 해외영업부 및 연구소가 참가하여 다양한 나라의 종자업체들과의 미팅을 통해 녹색꽃양배추(브로콜리)의 현재 국제시장동향에 대해 확인할 수 있었다. 인도, 필리핀, 중국, 스리랑카, 미국 등의 재배환경 및 개발 중인 품종과 경향 등을 파악하고 각 나라별로 주로 선호되는 회사의 품종들에 대한 정보를 확인하였다. 그 과정에서 녹색꽃양배추(브로콜리) 시교검정을 할 수 있는 계기를 마련하였다.
- 연구결과로 품종보호출원 및 등록된 품종(CT-180, CT-207, CT-262, CT-301, CT-302, CT-403, CT-410)들을 대상으로 상품화를 진행하여 국내 양배추 시장의 안정화 및 해외 수출을 통한 외화획득에 기여할 것이다.
 - 육성계통들은 특히 인도, 중국 등 아시아 지역에서 요구되는 형질을 갖추고 있으나, 유럽 등 전 세계 양배추 시장을 개척할 수 있는 가능성도 가지고 있어 신품종 육성에 적극적으로 활용할 것이다.
 - 본 과제의 연구결과로 개발된 우수 품종들은 중국, 인도 등의 거대 수출시장 공략에 이용할 경우 50톤 이상의 종자수출을 통한 500만 불 이상의 외화획득을 예상해 볼 수 있다.
 - 홍보활동(전시회, 박람회, 언론 등)에 참여하여 개발된 품종들을 알리는데 주력할 것이며, 그에 따른 수익 창출을 유도할 것이다.
 - 신품종 개발의 과정에서 획득한 우수 형질의 계통들은 해당 형질을 타겟으로 하는 분자마커의 개발을 위해 타연구기관 및 타연구과제에 재료로 사용될 수 있도록 제공할

것이다.

- 수집된 유전자원 및 기 보유계통들은 연구종료 후에도 훌륭한 육종 소재로 사용될 것이므로 지속적으로 보존하면서 우량 품종 육성에 활용될 것이다.
- 본 과제의 연구결과로 개발된 품종들은 골든씨드프로젝트 원예종자사업단 연구과제인 “양배추 시범포 운영에 의한 육종방향 분석 및 국내 품종 보급률 향상”프로젝트에도 활용될 수 있다.
- 시들음병 저항성 분자표지, F₁ 순도검정 마커, 계통고정검정마커, 여교배선발용SNP 마커: GSP 사업단 또는 서비스 가능 기관에 기술이전 및 서비스화 계획
- 본과제에서 개발된 엘리트 계통의 SNP 분자표지는 참여기업에서 추후 품종 개발에 활용할 예정임
- 본과제에서 개발한 데이터베이스는 논문 발표후 공공화를 위한 기탁 계획이며, 유용 유전자는 추후 심화 연구에 활용계획이다.

제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보

- 국제학술대회 “Plant & Animal Genomes XIX Conference” 참가 및 발표(2011년 1월 15일-19일) 노일섭, 김혜란
식물 및 동물의 유전체 연구를 주제로 미국, 캐나다, 일본, 프랑스, 영국, 스페인, 이탈리아, 인도, 터키, 헝가리, 한국 등 50여개국의 전문가들이 모여 구두 및 포스터 발표를 하면서 학술교류를 행하는 국제 학술행사이었으며, 수행 중인 본 과제의 결과를 발표하여 전문가들의 견해를 취득하였음. 또한 양배추 작물의 육종현황 및 장래의 연구 관심사에 대한 정보를 획득하였음.
- 국제학술대회 “Plant & Animal Genomes XX Conference” 참가(2012년 1월 14-18일) 노일섭
양배추류의 스트레스(내병충성, 내서성, 내한성, 내건성 등) 관련 육종기술의 정보를 획득하였음. 양배추류의 재분화, 형질전환체계, 마커개발 등의 세계적인 연구수준을 파악하여 분석하였음. 수행 중인 과제의 결과 발표를 통하여 세계 우수 전문가들의 견해를 획득하였음.
- 국제학술대회 “Plant & Animal Genomes XXII Conference” 참가(2014년 1월 11-18일) 노일섭
양배추 연구의 세계적인 연구 동향을 파악하고 양배추의 스트레스 및 형질전환 연구의 세계적인 연구 방향을 파악하여 본 연구 과제에 적용성을 검토하였음. 양배추류의 기능성 유전자 탐색 및 이에 이용에 대한 연구 동향을 파악하였음.
- 2013년 12월 터키에서 개최된 “Growtech Eurasia 2013”에 참가하여 개발 중에 있던 양배추 품종들이 터키를 비롯한 전 세계 소비시장의 요구에 부응하고 있는 지를 검토하고 타국가 및 타업체의 양배추 육성 기술에 대한 정보를 수집함.
- 2014년 2월 인도에서 개최된 “India Sedd Congress 2014”에 참가하여 세계적으로 큰 양배추 시장을 지닌 인도의 양배추 품종 개발 수준 및 시장요구도를 조사함. 그리고 전 세계 소비시장을 타겟으로 개발된 품종들의 특성을 부합하기 위한 해외 육성 기술에 대한 정보를 수집함.

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당사항 없음

제 8 장 참고문헌

- Abeles FB, Bossart RP, Forrence LE, Habig WH (1971) Preparation and purification of glucanase and chitinase from bean leaves. *Plant Physiol* 47: 129-134
- Achar PN (2002) A study of factors affecting embryo yields from anther culture of cabbage. *Plant Cell Tiss Org Cult* 69: 183-188
- Adams Z, Clarke AK (2002) Cutting edge of chloroplast proteolysis. *Trends Plant Sci* 7: 451-456
- Adamson RM (1965) Self- and Cross-Incompatibility in early round headed cabbage. *Ca J Plant Sci* 45: 493-497
- Agache S, de Buyser J, Henry Y, Snape JW (1989) Studies of the genetic relationship between anther culture and somatic tissue culture abilities in wheat. *Plant Breeding* 100: 26-33
- Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Sahi C, Gallie DR, Grover A (2001) Arabidopsis thaliana Hsp100 proteins: kith and kin. *Cell Stress Chaperones* 6: 219-224
- Ahmed NU, Park JI, Jung HJ, Kang KK, Hur YK, Lim YP, Nou IS (2012) Molecular characterization of stress resistance-related chitinase genes of Brassica rapa. *Plant Physiol and Bioch* 58: 106-115
- Ahmed NU, Park JI, Jung HJ, Kang KK, Lim YP, Hur YK, Nou IS (2013) Molecular characterization of thaumatin family genes related to stresses in Brassica rapa. *Sci Hort* 152: 26-34
- Ahmed NU, Park JI, Jung HJ, Seo MS, Kumar TS, Lee IH, Nou IS (2012) Identification and characterization of stress resistance related genes of Brassica rapa. *Biotechnol Lett* 34: 979-987
- Ahmed NU, Park JI, Seo MS, Kumar TS, Lee IH, Park BS, Nou IS (2012) Identification and expression analysis of chitinase genes related to biotic stress resistance in Brassica. *Mol Biol Rep* 39: 3649-3657
- Ahmed SU, Zuberi MI (1971) Inheritance of seed coat color in Brassica campestris L. variety Toria. *Crop Sci* 11:30
- Ahn YJ, Claussen K, Zimmerman JL (2004) Genotypic differences in the heat-shock response and thermotolerance in four potato cultivars. *Plant Sci* 166: 901-911
- Alvim FC, Carolino SM, Cascardo JC, Nunes CC, Martinez CA, Otoni WC, Fontes EP (2001) Enhanced accumulation of Bip in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiol* 126: 1042-1054
- Armstrong GM, Armstrong JK (1966) Races of Fusarium oxysporum f. conglutinans; race 4, new race; and a new host for race 1, Lychnis chalconica. *Phytopathology* 56: 525-530
- Arnison PG, Donaldson P, Jackson A, Semple C, Keller WA (1990) Genotype specific

- response of cultured broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) anther to cytokinins. *Plant Cell Tiss Org Cult* 20: 217-222
- Arnison PG, Donaldson P, Hoh LCC, Keller WA (1990) The influence of various physical parameters on anther culture of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) anther to cytokinins. *Plant Cell Tiss Org Cult* 20: 147-155
- Baik SY, Kim JC, Jang KS, Choi YH, Choi GJ (2011) Development of efficient screening method for resistance of cabbage to *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*. *Res Plant Dis* 17: 13-18
- Bak S, Tax FE, Feldmann KA, Galbraith DW, Feyereisen R (2001) CYP83B1, a cytochrome P450 on the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 101-111
- Baniwal SK, Bharti K, Chan KY, Fauth M, Ganguli A, Kotak S, Mishra SK, Nover L, Port M, Scharf KD, Tripp J, Weber C, Zielinski D, Koskull-Doring P (2004) Heat stress response in plants: a complex game with chaperone and more than twenty heat transcription factors. *J Biosci* 29: 471-487
- Barro F, Fernandez-Escobar JM, Vega De la, Martin A (2003) Modification of glucosinolate and erucic acid contents in doubled haploid lines of *Brassica carinata* by UV treatment of isolated microspores. *Euphytica* 129: 1-6
- Barro F, Martin A (1999) Response of different genotypes of *Brassica carinata* to microspore culture. *Plant breed* 118: 79-81
- Bartel B, Fink GR (1994) Differential regulation of an auxinproducing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6649 - 6653
- Basha E, O'Neill H, Vierling E(2012) Small heat shock proteins and α -crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends Biochem Sci* 37: 106-117
- Bateman AJ (1955) Self-incompatibility systems in angiosperms. III. Cruciferae. *Heredity* 9: 53-67
- Beck FX, Grunbein R, Lugmayr K, Neuhofer W (2000) Heat shock proteins and the cellular response to osmotic stress. *Cell Physiol Biochem* 10: 303-306
- Beintema JJ (1994) Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. *FEBS Lett* 350: 159-163
- Bekesiova B, Hraska S, Libantova J, Moravcikova J, Matusikova I (2008) Heavy metal stress induced accumulation of chitinase isoforms in plants. *Mol Biol Rep* 35: 579-588
- Bhalla PL, Singh MB (2008) Agrobacterium-mediated transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*. *Nat protoc* 3: 181-189
- Biggs AG (1985) Vegetable seed production. In: Principles of vegetable crop production. ed. by Fordham R. pp. 198-209
- Bishop JG, Dean AM, Mitchell-Olds T (2000) Rapid evolution in plant chitinases: molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5322-5327

- Blank LM (1937) Fusarium resistance in Wisconsin all seasons cabbage. *J Agric Res* 55: 407-510
- Bolle C (2004) The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* 218: 683-692
- Bown AW, Shelp BJ (1989) The metabolism and physiological roles of 4-aminobutyric acid. *Biochem* 8: 21-25
- Bown AW, Shelp BJ (1997) The metabolism and functions of γ -aminobutyric acid. *Plant Physiol* 115: 1 - 5
- Bravo JM, Campo S, Murillo I, Coca M, San Segundo B (2003) Fungus- and wound induced accumulation of mRNA containing a class II chitinase of the pathogenesis-related protein 4 (PR-4) family of maize. *Plant Mol Biol* 52: 745-759
- Breiteneder H (2004) Thaumatin-like proteins - a new family of pollen and fruit allergens. *Allergy* 59: 479-481
- Breiteneder H, Pettenburger K, Bito A, Valenta R, Kraft D, Rumpold H, Scheiner O, Breitenbach M (1989) The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J* 8: 1935-1938
- Breitkreuz KE, Shelp BJ (1995) Subcellular compartmentation of the 4-aminobutyrate shunt in protoplasts from developing soybean cotyledons. *Plant Physiol* 108: 99-103
- Brown DW, Proctor RH (2013) *Fusarium : genomics, molecular and cellular biology*, Norfolk, Caister Academic Press
- Bukau B, Weisman J, Horwich A (2006) Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 125: 443-451
- Burch EM, Rosano G, Ceccarelli EA (2012) Chloroplastic Hsp100 chaperones ClpC2 and ClpD interact in vitro with a transit peptide only when it is located at the N-terminus of a protein. *BMC Plant Biol* 12: 57
- Burlat V, Kwon M, Devin LB, Lewis NG (2001) Dirigent proteins and dirigent sites in lignifying tissues. *Phytochemistry* 57: 883-897
- Cao B, Lu Y, Chen G, Lei J (2010) Functional characterization of the translationally controlled tumor protein (TCTP) gene associated with growth and defense response in cabbage. *Plant Cell Physiol* 103: 217 - 226
- Carro11 AD, Fox GG, Laurie S, Phillips R, Ratcliffe RG, Stewart GR (1994) Ammonium assimilation and the role of γ -aminobutyric acid in pH homeostasis in carrot cell suspensions. *Plant Physiol* 106: 513-520
- Celenza JL, Quiel JA, Smolen GA, Merrikh H, Silvestro AR, Normanly J, Bender J (2005) The Arabidopsis ATR1 Myb transcription factor controls indolic glucosinolate homeostasis. *Plant Physiol* 137: 253-262
- Chang YY, Liu HC, Liu NY, Chi WT, Wang CN, Chang SH, Wang TT (2007) A heat-inducible transcription factor, HsfA2, is required for extension of acquired thermotolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol* 143: 251-262

- Chen BY, Jørgensen RB, Cheng BF, Heneen WK (1997) Identification and chromosomal assignment of RAPD Markers linked with a gene for seed colour in a *Brassica campestris-alboglabra* addition line. *Hereditas* 126: 133-138
- Chen L, Zhang L, Yu D (2010) Wounding-induced WRKY8 is involved in basal defense in *Arabidopsis*. *Mol Plant-Microbe Interact* 23: 558-565
- Chen SX, Glawischnig E, Jørgensen K, Naur P, Jørgensenb, Olsence, Hansench, Rasmussenh, Pickett JA, Halkier BA (2003) CYP79F1 and CYP79F2 have distinct functions in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant J* 33: 923 - 937
- Chen WP, Chen PD, Liu DJ, Kynast R, Friebe B, Velazhahan R, Muthukrishnan S, Gill BS (1999) Development of wheat scab symptoms is delayed in transgenic wheat plants that constitutively express a rice thaumatin-like protein gene. *Theor Appl Genet* 99: 755-760
- Cheng F, Liu S, Wu J, Fang L, Sun S, Liu B, Wang X (2011) BRAD, the genetics and genomics database for Brassica plants. *BMC Plant Biol* 11: 136
- Cho SK, Ryu MY, Song C, Kwak JM, Kim WT (2008) *Arabidopsis* PUB22 and PUB23 are homologous U-Box E3 ubiquitin ligases that play combinatory roles in response to drought stress. *Plant Cell* 20: 1899 - 1914
- Choi SR, Teakle GR, Plaha P, Kim JH, Allender CJ, Beynon E, Piao ZY, Soengas P, Han TH, King GJ, Barker GC, Hand P, Lydiate DJ, Batley J, Edwards D, Koo DH, Bang JW, Park BS, Lim YP (2007) The reference genetic linkage map for the multinational *Brassica rapa* genome sequencing project. *Theor Appl Genet* 115: 777-792
- Choi MY, Jeong HW, Lee SS (1996) Establishment of a method for ploidy estimation in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) by the number of chloroplasts in the guard cells. *Kor J Hort Sci* 14: 540-541
- Ciolkowski I, Wanke D, Birkenbihl RP, Somssich IE (2008) Studies on DNA -binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function. *Plant Mol Biol* 68: 81-92
- Cohen-Kupeic R, Chet I (1998) The molecular biology of chitin digestion. *Curr Opin Biotechnol* 9: 270-277
- Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad K (1993) Plant chitinase. *Plant J* 3: 31-40
- Collins GB, Leg PD (1974) The use of haploids in breeding allopolyploid species. in; K.J. Kasha (ed.) *Haploids in Higher plants Advances and Potential* 231-247
- Cormack RS, Eulgem T, Rushton PJ, Kochner P, Hahlbrock K, Somssich IE (2002) Leucine zipper containing WRKY proteins widen the spectrum of immediate early elicitor-induced WRKY transcription factors in parsley. *Biochem Biophys Acta* 1576: 92-100
- Cota IE, Troncoso-Rojas R, Sotelo-Mundo R, Sa´nchez-Estrada A, Tiznado-Herna´ndez ME (2007) Chitinase and b-1, 3-glucanase enzymatic activities in response to infection by

- Alternaria alternata* evaluated in two stages of development in different tomato fruit varieties. *Sci Hortic* 2591: 1-9
- Crawford LA, Bown AW, Breitskreuz KE, Guinel FC (1994) The synthesis of γ -aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH. *Plant Physiol* 104: 865-871
- Daniel-Vedele F, Filleur S, Caboche M (1998) Nitrate transport: a key step in nitrate assimilation. *Curr Opin Plant Biol* 1: 235 - 239
- Datta K, Velazhahan R, Oliva N, Ona I, Mew T, Khush GS, Muthukrishnan S, Datta SK (1999) Over-expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhances environmental friendly resistance to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease. *Theor Appl Genet* 98: 1138-1145
- De Maio, A (1999) Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock* 11: 1-12
- Decout E, Dubois T, Guedira M, Dubois J, Audran JC, Vasseur J (1994) Role of temperature as a triggering signal for organogenesis or somatic embryogenesis in wounded leaves of chicory cultured in vitro. *Journal of Experimental Botany* 45: 1859-1865
- Di Laurenzio L, Wysocka-Diller J, Malamy JE, Pysh L, Helariutta Y, Freshour G, Hahn, MG, Feldman KA, Benfey PN (1996) The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. *Cell* 86: 423-433
- Dietert MF, Barron SA, Yoder OC (1982) Effects of genotype on in vitro culture in the genus Brassica. *Plant Sci Lett* 26: 233-240
- Dong J, Chen C, Chen Z (2003) Expression profile of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol* 51: 21-37
- Du L, Chen Z (2002) Identification of genes encoding receptor like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA -binding proteins in Arabidopsis. *Plant J* 24: 837-847
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE (2000) The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* 5: 199-206
- Eulgem T, Somssich IE (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr Opin Plant Biol* 10: 366-371
- Fabijanski SF, Altosaar I, Arnison G (1991) Heat shock response during anther culture of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*). *Plant Cell Tiss Org Cult* 26: 203-212
- Fan J, Wang H, Feng D, Liu B, Liu H, Wang J (2007) Molecular characterization of plantain class I chitinase gene and its expression in response to infection by *Gloeosporium musarum* Cke and Masee and other abiotic stimuli. *J Biochem* 142: 561-570
- Fang W, Leng B, Xiao Y, Jin K, Ma J, Fan Y, Feng J, Yang X, Zhang Y, Pei Y (2005) Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. *Appl Environ Microbiol* 71: 363-370
- Fierens E, Rombouts S, Gebruers K, Goesaert H, Brijs K, Beaugrand J, Volckaert G, Van Campenhout S, Proost P, Courtin CM, Delcour JA (2007) TLX1, a novel type of

- xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*) belonging to the thaumatin family. *Biochem J* 403: 583-591
- Filleur S, Daniel-Vedele F (1999) Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta* 207: 461 - 469
- Fowler TJ, Bernhardt C, Tierney ML (1999) Characterization and expression of four proline-rich cell wall protein genes in *Arabidopsis* encoding two distinct subsets of multiple domain proteins. *Plant Physiol* 121: 1081 - 1092
- Frary A, Nesbitt TC, Grandillo S, Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert KB, Tanksley SD (2000) fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* 289: 85-88
- Frendo P, Didierjean L, Passelegue E, Burkard G (1992) Abiotic stresses induce a thaumatin-like protein in maize; cDNA isolation and sequence analysis. *Plant Sci* 85: 61-69
- Frydman, J (2001) Folding of newly translocated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* 70: 603-647
- Futamura N, Tani N, Tsumura Y, Nakajima N, Sakaguchi M, Shinohara K (2006) Characterization of genes for novel thaumatin-like proteins in *Cryptomeria japonica*. *Tree Physiol* 26: 51-62
- Gaetan SA (2005) Occurrence of *Fusarium* wilt on canola caused by *Fusarium oxysporum* F. sp. *conglutinas* in Argentina. *Plant Dis* 89: 432
- Gerhardt LBA, Sachetto-Martins G, Contarini MG, Sandroni M, de P Ferreira R, de Lima VM, Cordeiro MC, de Oliveira DE, Margis-Pinheiro M (1997) *Arabidopsis thaliana* class IV chitinase is early induced during the interaction with *Xanthomonas campestris*. *FEBS Lett* 419: 69-75
- Ghosh R, Chakrabarti C (2008) Crystal structure analysis of NP24-I: a thaumatin-like protein. *Planta* 228: 883-890
- Giamoustaris A, Mithen R (1996) Genetics of aliphatic glucosinolates 4 Side-chain modification in *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet* 93: 1006 - 1010
- Giamoustaris A, Mithenr (1995) The effect of modifying the glucosinolate content of leaves of oilseed rape *Brassica napus* ssp. *oleifera* on its interaction with specialist and generalist pests. *Ann Appl Biol* 126: 347 - 363
- Gigolashvili T, Berger B, Mock HP, Müller C, Weisshaar B, and Fluittge UI (2007a) The transcription factor HIG1/MYB51 regulates indolic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 50: 886 - 901
- Gigolashvili T, Engqvist M, Yatusевич R, Müller C, and Fluittge UI (2008) HAG2/MYB76 and HAG3/MYB29 exert a specific and coordinated control on the regulation of aliphatic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 177: 627 - 642
- Gigolashvili T, Yatusевич R, Berger B, Müller C, and Fluittge UI (2007b) The

- R2R3-MYB transcription factor HAG1/MYB28 is a regulator of methionine-derived glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 51: 247 - 261
- Giorno F, Wolters-Arts M, Grillo S, Scharf K, Vriezen WH, Mariani C (2010) Developmental and heat stress-regulated expression of HsfA2 and small heat shock proteins in tomato anthers. *J Exp Bot* 61: 453-462
- Glawischnige, Hansenbg, Olsence, Halkier BA (2004) Camalexin is synthesized from indole-3-acetaidoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8245 - 8250
- Grison R, Grezes-Besset B, Schneider M, Lucante N, Olsen L, Leguay JJ, Toppan A (1996) Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. *Nat Biotechnol* 4: 643-646
- Grubb CD, Abel S (2006) Glucosinolate metabolism and its control. *Trends Plant Sci* 11: 89-100
- Gu HH, Zhou WJ, Hagberg P (2003) High frequency spontaneous production of doubled haploid plants in microspore cultures of *Brassica rapa* ssp. *chinensis*. *Euphytica*
- Guha S, Maheshwari SC (1964) In vitro production of embryos from anthers fo *Datura*. *Nature* 204: 497
- Gupta VK, Misra AK, Gupta A, Pandey BK, Gaur RK (2010) RAPD-PCR of trichoderma isolates and in vitro antagonism against *Fusarium* wilt pathogens of *Psidium guajava* L. *J Plant Protect Res* 50: 256-262
- Halkier BA, Gershenzon J (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol* 57: 30
- Hamel F, Bellemare G (1995) Characterization of a class I chitinase gene and of wound-inducible, root and flower-specific chitinase expression in *Brassica napus*. *Biochim Biophys Acta* 1263: 212-220
- Hamel F, Boivin R, Tremblay C, Bellemare G (1997) Structural and evolutionary relationships among chitinases of flowering plants. *J Mol Evol* 44: 614-624
- Hasegawa T, Yamada K, Kosemura S, Yamamura S, Hasegwa K (2000) Phototropic stimulation induces the conversion of glucosinolate to phototropism-regulating sub-stances of radish hypocotyls. *Phytochemistry* 54: 275 - 279
- He H, Dong Q, Shao Y, Jiang H, Zhu S, Cheng B, Xiang Y (2012) Genome-wide survey and characterization of the WRKY gene family in *Populus trichocarpa*. *Plant Cell Rep* 31: 1199-1217
- Hejgaard J, Jacobsen S, Svendsen I (1991) Two antifungal thaumatin-like proteins from barley grain. *FEBS Lett* 291: 127-131
- Hendrick, JP, Hartl F (1993) Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Ann Rev Biochem* 62: 349-384
- Hirai MY, Sugiyama K, Sawada Y, Tohge T, Obayashi T, Suzuki A, Araki R, Sakurai N, Suzuki H, Aoki K, Goda H, Nishizawa OI, Shibata D, and Saito K (2007) Omics-based

- identification of Arabidopsis Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 6478 - 6483
- Hirsch S, Oldroyd GE (2009) GRAS-domain transcription factors that regulate plant development. *Plant Signal Behav* 4: 698-700
- Hong JK, Hwang BK (2002) Induction by pathogen, salt and drought of a basic class II chitinase mRNA and its in situ localization in pepper (*Capsicum annuum*). *Physiol Plant* 114: 549-558
- Iba K (2002) Acclimative response to temperature stress in higher plants: approach of genetic engineering for temperature tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 53: 225-245
- Itoh, H.; Shimada, A.; Ueguchi-Tanaka, M.; Kamiya, N.; Hasegawa, Y.; Ashikari, M.; Matsuoka, M. Overexpression of GRAS protein lacking the DELLA domain confers altered gibberellins responses in rice. *Plant J.* 2005. 44, 669-679.
- Iyengar RB, Smits P, Ouderaa F, Wel H, Brouwershaven J, Ravesteyn P, Richters G, Wassenaar PD (1979) The complete amino-acid sequence of the sweet protein thaumatin. I *Eur J Biochem* 96: 193-204
- Jiang Y, Deyholos MK (2009) Functional characterization of Arabidopsis NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses. *Plant Mol Biol* 69: 91-105
- Johnson SC, Kolevski B, Smyth DR (2002) TRANSPARENT TESTA GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of Arabidopsis, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell* 14: 1359-1375
- Kalmar B (2009) Greensmith, L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv Drug Deliv Rev* 61: 310-318
- Kasha KJ, Ziauddin A, Cho UH (1990) Haploids in cereal improvement: anther and microspore culture. In *Gene Manipulation in Plant Improvement II*, ed JP Gustafson, PP 213-235, Plenum Press. New York
- Kaur S, Gupta SK, Sukhija PS, Munshi SK (1990) Accumulation of glucosinolates in developing mustard *Brassica juncea* L seeds in response to sulfur application. *Plant Sci* 66: 181 - 184
- Kayum MA, Jung HJ, Park JI, Ahmed NU, Saha G, Yang TJ, Nou IS (2015) Identification and expression analysis of WRKY family genes under biotic and abiotic stresses in *Brassica rapa*. *Mol Genet Genomics* 290: 77-95
- Keeler S, Boettger CM, Haynes JG, Kuches KA, Johnson MM, Thureen DL, Keeler Jr CL, Kitto SL (2000) Acquired thermotolerance and expression of the HSP100/ClpB genes of Lima bean. *Plant Physiol* 123: 1121-1132
- Keller WA, Armstrong KC (1977) Embryogenesis and plant regeneration in *Brassica napus* anther cultures. *Can J Bot* 55: 1383-1388
- Keller WA, Armstrong KC (1979) Stimulation of embryogenesis and haploid production in *Brassica campestris* anther cultures by elevated temperature treatments. *Theor Appl*

Genet 55: 65-67

- Keller WA, Armstrong KC (1983) Production of haploids via anther culture in *Brassica campestris*. *Can J Genet Cytol* 17: 655-666
- Kellmann JW, Kleinow T, Engelhardt K, Philipp C, Wegener D, Schell J, Schreier PH (1996) Characterization of two class II chitinase genes from peanut and expression studies in transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol* 30: 351-358
- Kezuka Y, Kitazaki K, Itoh Y, Watanabe J, Takaha O, Watanabe T, Nishizawa Y, Nonaka T (2004) Crystallization and preliminary X-ray analysis of plant class I chitinase from rice. *Protein Pept Lett* 11: 401-405
- Kilian J, Whitehead D, Horak J, Wanke D, Weinl S, Batistic O, D'Angelo C, Bornberg-Bauer E, Kudla J, Harter K (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J* 50: 347-363
- Kim MZ, Kim YR (1984) Basic studies on the induction of microspore-originated calluses or embryos in the anther culture of *Capisum annuum* L. *Korean J Plant Tissue Culture* 12: 75-122
- Kitajima S, Kamei K, Taketani S, Yamaguchi M, Kawai F, Komatsu A, Inukai Y (2010) Two chitinase-like proteins abundantly accumulated in latex of mulberry show insecticidal activity. *BMC Biochem* 11: 6
- Knight MR, Campbell AK, Smith MS, Trewavas AJ (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352: 524-526
- Koiwa H, Kato H, Nakatsu T, Oda J, Yamada Y, Sato F (1999) Crystal structure of tobacco PR-5d protein at 1.8 °A resolution reveals a conserved acidic cleft structure in antifungal thaumatin-like proteins. *J Mol Biol* 286: 1137-1145
- Krishnaveni S, Liang GH, Muthukrishnan S, Manickam A (1999) Purification and partial characterization of chitinases from sorghum seeds. *Plant Sci* 144: 1-7
- Kwak JH, Park MY, Lee JG, Park SH, Kim DY, Lim YP, Yoon MK (2012) Development of new broccoli varieties from elite lines obtained by microspore cultivation method. *CNU Journal of Agricultural Science* 39: 497-502
- Lagace M, Matton DP (2004) Characterization of a WRKY transcription factor expressed in late torpedo-stage embryos of *Solanum chacoense*. *Planta* 219: 185-189
- Lai Z (2008) Roles of *Arabidopsis* WRKY3 and WRKY4 transcription factors in plant responses to pathogens. *BMC Plant Biol* 8: 68
- Lawrence SD, Novak NG (2006) Expression of poplar chitinase in tomato leads to inhibition of development in colorado potato beetle. *Biotechnol Lett* 28: 593-599
- Ledesma NA, Kawabata S, Sugiyama N (2004) Effect of high temperature on protein expression in strawberry plants. *Biol. Plantarum* 48: 73-79
- Lee J, Lim YP, Han CT, Nou IS, Hur Y (2013) Genome-wide expression profiles of

- contrasting inbred lines of Chinese cabbage, Chiifu and Kenshin, under temperature stress. *Genes Genom* 35: 273-288
- Lee JH, Jo EJ, Jang KS, Choi YH, Kim JC, Choi GJ (2014) Evaluation of Cabbage- and Broccoli-genetic Resources for Resistance to Clubroot and Fusarium Wilt. *Res. Plant Dis* 20: 235-244
- Lee GJ, Vierling E (2000) A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactive a heat-denatured protein. *Plant Physiol* 122: 189-198
- Lee J, Song H, Han CT, Lim YP, Chung SM, Hur Y (2010) Expression characteristics of heat shock protein genes in two comparable inbred lines of Chinese cabbage, Chiifu and Kenshin. *Genes Genom* 32: 247-257
- Lee KS (1994) Factors efficiency of anther culture and anther culture and anther-derived F1 hybrid breeding in Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) Ph. D. Thesis, Seoul City Univ.
- Lee MH, Kim B, Song SK, Heo JO, Yu NI, Lee S, Kim M, Kim DG, Sohn SO, Lim CE, Chang, KS, Lee MM, Lim J (2008) Large-scale analysis of the GRAS gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 67: 659-670
- Lee U, Rioflorido I, Hong SW, Lurkindale J, Waters ER, Vierling E (2007) The Arabidopsis ClpB/Hsp100 family of proteins: chaperones for stress and chloroplast development. *Plant J* 49: 115-127
- Levy M, Wang Q, Kaspi R, Parrella MP, and Abel S (2005) Arabidopsis IQD1, a novel calmodulin-binding nuclear protein, stimulates glucosinolate accumulation and plant defense. *Plant J* 43: 79 - 96
- Li DM, Staehelin C, Wang WT, Peng SL (2010) Molecular cloning and characterization of a chitinase-homologous gene from *Mikania micrantha* infected by *Cuscuta campestris*. *Plant Mol Biol Rep* 28: 90-101
- Li E, Wang G, Yang Y, Xiao J, Mao Z, Xie B (2015) Microscopic analysis of the compatible and incompatible interactions between *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* and cabbage. *Eur J Plant Pathol* 141: 597-609
- Li HL, Zhang LB, Guo D, Li CZ, Peng SQ (2012) Identification and expression profiles of the WRKY transcription factor family in *Ricinus communis*. *Gene* 503: 248-253
- Li J, Liu JY (2003) A novel cotton gene encoding a new class of chitinase. *Acta Bot Sin* 45: 1489-1496
- Li WL, Faris JD, Muthukrishnan S, Liu DJ, Chen PD, Gill BS (2000) Isolation and characterization of novel cDNA clones of acidic chitinases and b-1, 3-glucanases from wheat spikes infected by *Fusarium graminearum*. *Theor Appl Genet* 102: 353-362
- Li Q, Guy CL (2001) Evidence for non-circadian light/dark-regulated expression of Hsp70s in spinach leaves. *Plant Physiol* 125: 1633-1642
- Libantova J, Kamarainen T, Moravcikova J, Matusikova I, Salaj J (2009) Detection of chitinolytic enzymes with different substrate specificity in tissues of intact sundew

- (*Drosera rotundifolia* L.): chitinases in sundew tissues. *Mol Biol Rep* 36: 851-856
- Lin BL, Wang JS, Liu HC, Chen RW, Meyer Y, Barakat A, Delseny M (2001) Genomic analysis of the hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones* 6: 201-208
- Ling J, Jiang W, Zhang Y, Yu H, Mao Z, Gu X, Huang S, Xie B (2011) Genome-wide analysis of WRKY gene family in *Cucumis sativus*. *BMC Genom* 12: 471
- Liu JJ, Sturrock R, Ekramoddoullah AKM (2010) The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Rep* 29: 419-436
- Lou P, Zhao J, Kim JS, Shen S, Carpio DPD, Song X, Jin M, Vreugdenhill D, Wang XW, Koornneef M, Bonnema G. (2007) Quantitative trait loci for flowering time and morphological traits in multiple populations of *Brassica rapa*. *J Exp Bot* 58: 4005 - 4016
- Lowe AJ, Moule C, Trick M, Edwards KJ (2004) Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in *Brassica* crop species. *Theor Appl Genet* 108: 1103-1112
- Majeti N, Kumar R (2000) A review of chitin and chitosan application. *React Funct Polym* 46: 1-27
- Malitsky S, Blum E, Less H, Venger I, Elbaz M, Morin S, Eshed Y, and Aharoni A (2008) The transcript and metabolite networks affected by the two clades of *Arabidopsis* glucosinolate biosynthesis regulators. *Plant Physiol* 148: 2021 - 2049
- Manici LM, Lazzeri L, Palmieri S (1997) In vitro fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. *J Agri Food Chem* 45: 2768-2773
- Mari M, Iori R, Leoni O, Marchi A (1993) In vitro activity of glucosinolate-derived isothiocyanates against postharvest fruit pathogens. *Ann Appl Biol* 123: 155-156
- Martin N, Muller C (2006) Induction of plant responses by a sequestering insect: relationship of glucosinolate concentration and myrosinase activity. *Basic Appl Ecol* 8: 13 - 25
- Maruyama-Nakashita A, Nakamura Y, Tohge T, Saito K, and Takahashi H (2006) *Arabidopsis* SLIM1 is a central transcriptional regulator of plant sulfur response and metabolism. *Plant Cell* 18: 3235 - 3251
- Matsuoka H, Toda Y, Yoneyama K, Uda Y (1998) Formation of raphanusanins depends on extraction procedure and solvent. *Phytochemistry* 47: 975 - 977
- McGregor LJ, MacHuguen A (1990) The influence of various cultural factors on anther culture of four cultivars of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Can J Plant Sci* 70: 183-191
- Mewis I, Appelhm, Homa, Raina R, Schultz JC (2005) Major signaling pathways modulate *Arabidopsis* glucosinolate accumulation and response to both phloem-feeding and chewing insects. *Plant Physiol* 138: 1149 - 1162

- Michielse CB, Rep M (2009) Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Pathol* 10: 311-324
- Mikkelsen MD, Naur P, Halkier BA (2004) Arabidopsis role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. *Plant J* 37: 770-777
- Miller G, Mittler R (2006) Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? *Ann Bot* 98: 279-288
- Mishra SK, Tripp J, Winkelhaus S, Tschiersch B, Theres K, Nover L, Scharf KD (2002) In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes Dev* 16: 1555-1567
- Mizuno R, Itoh Y, Nishizawa Y, Kezuka Y, Suzuki K, Nonaka T, Watanabe T (2008) Purification and characterization of a rice class I chitinase, OsChia1b, produced in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 893-895
- Moon YK, Kim WJ, Cho WD, Sung JM (2001) Occurrence of *Fusarium* wilt on cruciferous vegetable crops and pathogenic differentiation of the causal fungus. *Res Plant Dis* 7: 93-101
- Munis M, Hussain F, Tu L, Deng F, Tan J, Xu L, Xu S, Long L, Zhang X (2010) A thaumatin-like protein gene involved in cotton fiber secondary cell wall development enhances resistance against *Verticillium dahliae* and other stresses in transgenic tobacco. *Biochem Biophys Res Commun* 393: 38-44
- Na H, Kwak JH, Chun CH (2011) Microspore derived embryo formation and doubled haploid plant production in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) according to nutritional and environmental conditions. *African J Biotechnol* 10: 12535-12541
- Nam SC, Youn GH, Pack KY (1999) Factors affecting efficiency of anther culture and phenotype characteristics of anther-derived progeny in broccoli. *Kor J Plant Tiss Cult* 26: 185-189
- Neuhaus JM, Fritig B, Linthorst HJM, Meins F Jr, Mikkelsen JD, Ryals J (1996) A revised nomenclature for chitinase genes. *Plant Mol Bio Rep* 14: 102-104
- Nitsch C (1981) Production of isogenic lines: basic technical aspects of androgenesis. In: Thorpe TA (ed) *Plant Tiss. Cul. methods and applications in agriculture*. Academic Press, New York pp 241-252
- Nover L, Bharti K, Döring P, Mishra SK, Ganguli A, Scharf KD (2001) Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: How many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones* 6: 177-189
- Ockendon DJ, Sunderland RA (1987) Genetic and non-genetic factors affecting anther culture of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) *Plant Cell Tiss Org Cult* 74: 566-570
- Ogawa D, Yamaguchi K, Nishiuchi T (2007) High-level overexpression of the Arabidopsis HsfA2 gene confers not only increased thermotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. *J Exp Bot* 58: 3373-3383

- Ohnuma T, Numata T, Osawa T, Mizuhara M, Lampela O, Juffer AH, Skriver K, Fukamizo T (2011) A class V chitinase from *Arabidopsis thaliana*: gene responses, enzymatic properties, and crystallographic analysis. *Planta* 234: 123-137
- Olli S, Kirti PB (2006) Cloning, characterization and antifungal activity of defensin Tfgd1 from *Trigonella foenumgraecum* L. *J Biochem Mol Biol* 39: 278-283
- Ono K, Hibino T, Kohinata T, Suzuki S, Tanaka Y, Nakamura T, Takabe T, Takabe T (2001) Overexpression of DnaK from a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* enhances the high-temperature tolerance of tobacco during germination and early growth. *Plant Sci* 160: 455-461
- Orsel M, Krapp A, Daniel-Vedele F (2002) Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in *Arabidopsis*. Structure and gene expression. *Plant Physiol* 129: 886 - 896
- Ospina-Giraldo MD, Mullins E, Kang S (2003) Loss of function of the *Fusarium oxysporum* SNF1 gene reduces virulence on cabbage and *Arabidopsis*. *Curr Genet* 44: 49-57
- Park JI, Kumar TS, Ahmed NU, Nou IS (2010) Construction of full-length cDNA library and investigation of potential genes in *Brassica rapa*. *J Basic Life Res Sci* 10: 6-11
- Park S, Yu HJ, Mun JH, Lee SC (2010) Genome-wide discovery of DNA polymorphism in *Brassica rapa*. *Mol Genet Genomics* 283: 135-145
- Patel S, Latterich M (1998) The AAA team: related ATPases with diverse function. *Trends Cell Biol* 8: 65-71
- Petre B, Major I, Rouhie N, Duplessis S (2011) Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar. *BMC Plant Biol* 11: 33
- Pickering RA, Devaux P (1992) Haploid production : approaches and uses in plant breeding. In *Genetics, Molecular Biology and Biotechnology*, ed PR Shewry, pp511-539, Barley CAB International Wallingford
- Pratt WB, Krishna P, Olsen LJ (2001) Hsp90-binding immunophilins in plants: the protein movers. *Trends Plant Sci* 6: 54-58
- Pu ZJ, Shimizu M, Zhang YJ, Nagaoka T, Hayashi T, Hori H, Matsumoto S, Fujimoto R, Okazaki K (2012) Genetic mapping of a fusarium wilt resistance gene in *Brassica oleracea*. *Mol Breeding* 30: 809-818
- Pysh LD, Wysocka-Diller JW, Camilleri C, Bouchez D, Benfey PN (1999) The GRAS gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J* 18: 111-119
- Queitsch C, Hong SW, Vierling E, Lindquist S (2000) Heat stress protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 479-492
- Queitsch C, Sangster TA, Lindquist S (2002) Hsp90 as a capacitor phenotypic variation. *Nature* 417: 618-624
- Rajam MV, Chandola N, Goud PS, Singh D, Kashyap V, Choudhary ML, Sihachakr D (2007) Thaumatin gene confers resistance to fungal pathogens as well as tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. *Biol Plant* 51: 135-141

- Ralph S, Park JY, Bohlmann J, Mansfield SD (2006) Dirigent proteins in conifer defense: gene discovery, phylogeny and differential wound- and insectinduced expression of a family of DIR and DIR-like genes in spruce (*Picea* spp.), *Plant Mol Biol* 60: 21-40
- Ramamoorthy R, Jiang SY, Kumar N, Venkatesh PN, Ramachandran S (2008) A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments. *Plant Cell Physiol* 49: 865-879
- Ramputh AI, BownRapid AW (1996) [γ]-Aminobutyric Acid Synthesis and the Inhibition of the Growth and Development of Oblique-Banded Leaf-Roller Larvae. *Plant Physiol* 111: 1349 - 1352
- Rasmussen U, Bojsen K, Collinge DB (1992) Cloning and characterization of a pathogen-induced chitinase in *Brassica napus*. *Plant Mol Biol* 20: 277-287
- Reintanz B, Lehnen M, Reichelt M, Gershenzon J, Kowalczyk M, Sandberg G, Godde M, Uhl R, Palme K (2001) Bus, a bushy arabidopsis CYP79F1 knockout mutant with abolished synthesis of short-chain aliphatic glucosinolates. *Plant Cell* 13: 351 - 367
- Reintanz B, Szyroki A, Ivashikina N, Ache P, Godde M, et al. (2002) AtKC1, a silent Arabidopsis potassium channel α -subunit modulates root hair K⁺ influx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4079 - 4084.
- Reiss E, Schubert J, Scholze P, Kramer R, Sonntag K (2009) The barley thaumatin-like protein Hv-TLP8 enhances resistance of oilseed rape plants to *Plasmodiophora brassicae*. *Plant Breed* 128: 210-212
- Ren X, Chen Z, Liu Y, Zhang H, Zhang M, Liu Q, Hong X, Zhu JK, Gong Z (2010) ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in Arabidopsis. *Plant J* 63: 417-429
- Reynolds TL, Crawford RL (1997) Effects of light on the accumulation of abscisic acid and expression of an early cysteine-labeled metallothionein gene in microspores of *Triticum aestivum* during induced embryogenic development. *Plant Cell Rep* 16: 458-463
- Richter K, Buchner J (2001) Hsp90: chaperoning signal transduction. *J Cell Physiol* 188: 281-290
- Robatzek S, Somssich IE (2002) Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev* 16: 1139-1149
- Robinson SP, Jacobs AK, Dry IB (1997) A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. *Plant Physiol* 114: 771-778
- Roby D, Toppan A, Esquerre-Tugaye MT (1989) Systemic induction of chitinase activity and resistance in melon plants upon fungal infection or elicitor treatment. *Physiol Mol Plant Pathol* 33: 409-417
- Rogers LA, Campbell MM (2004) The genetic control of lignin deposition during plant growth and development, *New Phytol* 164: 17-30
- Roulund N, Hansted LS, Andersen B, Farestveit B (1990) Effect of genotype, environment and carbohydrate on anther culture response in head cabbage (*Brassica oleracea* L. var.

- capitata(L. Alef.)) *Euphytica* 49: 237-242
- Rudolf K, Hansen M (1999) Microspore culture of white cabbage, *Brassica oleracea* var. capitata L. : Genetic improvement of non-responsive cultivars and effect of genome doubling agents. *Plant bree* 118: 237-241
- Sahin-Çevik M (2012) A WRKY transcription factor gene isolated from *Poncirus trifoliata* shows differential responses to cold and drought stresses. *Plant Omics J* 5: 438-445
- Sakamoto Y, Watnabe H, Nagai M, Nakade K, Takahashi M, Sato T (2006) *Lentinula edodes* *tlg1* encodes a thaumatin-like protein that is involved in lentinan degradation and fruiting body senescence. *Plant Physiol* 141: 793-801
- Satyanarayan V, Nair PM (1990) Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. *Phytochemistry* 29: 367 - 375
- Searle LM, Chamberlain K, Rausch T, Butcher DN (1982) The conversion of 3-Indolylmethylglucosinolate to 3-Indolylacetonitrile by myrosinase, and its relevance to the clubroot disease of the Cruciferae. *J Exp Bot* 33: 935 - 942
- Shimizu M, Fujimoto R, Ying H, Pu ZJ, Ebe Y, Kawanabe T, Saeki N, Taylor JM, Kaji M, Dennis ES (2014) Identification of candidate genes for fusarium yellows resistance in Chinese cabbage by differential expression analysis. *Plant Mol Biol* 85: 247-257
- Shimizu M, Pu ZJ, Kawanabe T, Kitashiba H, Matsumoto S, Ebe Y, Sano M, Funaki T, Fukai E, Fujimoto R (2015) Map-based cloning of a candidate gene conferring Fusarium yellows resistance in *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet* 128: 119-130
- Silver JT, Noble EG (2012) Regulation of survival gene hsp70. *Cell Stress Chaperones* 17: 1-9
- Simões-Araújo JL, Rumjanek NG, Margis-Pinheiro M (2003) Small heat shock proteins genes are differentially expressed in distinct varieties of common bean. *Braz J Plant Physiol* 15: 33-41
- Skirycz A, Reichelt M, Burow M, Birkemeyer C, Rolcik J, Kopka J, Zanor MI, Gershenzon J, Strnad M, Szopa J, Mueller-Roeber B, Witt I (2006) DOF transcription factor AtDof1.1 (OBP2) is part of a regulatory network controlling glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 47: 10 - 24
- Smith R (1930) Effect of environmental factors upon, the resistance of Cabbage ta yellows. *J Agric Res* 41: 1-15
- Sønderby IE, Hansen BG, Bjarnholt N, Ticconi C, Halkier BA, and Kliebenstein DJ (2007) A systems biology approach identifies a R2R3 MYB gene subfamily with distinct and overlapping functions in regulation of aliphatic glucosinolates. *PLoS ONE* 2: e1322
- Song JH, Kim YW, Cho JY (1996) Varietal difference and inheritance of Cabbage yellows (*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* Synder et Hansen) resistance in cabbage. *Korean J Breed Sci* 28: 171-177
- Song KM, Osborn TC, Williams PH (1988) *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) I. Genome evolution of diploid and

- amphidiploid species. *Theor Appl Genet* 75: 784-794
- Song KM, Suzuki JY, Slocum MK, Williams PH, Osborn TC (1991) A linkage map of *Brassica rapa* (syn. *campestris*) based on restriction fragment length loci. *Theor Appl Genet* 82: 296-304
- Stringam GR (1980) Inheritance in seed color in turnip rape. *Can J Plant Sci* 60: 331-335
- Sun C, Palmqvist S, Olsson H, Boren M, Ahlandsberg S, Jansson C (2003) A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar responsive elements of the iso1 promoter. *Plant Cell* 15: 2076-2092
- Sunderland N, Collins GB, Dunwell JM (1974) The role of nuclear fusion in pollen embryogenesis of *Datura innoxia* Mill. *Plants* 114: 224-241
- Sung DY, Vierling E, Guy CL (2001) Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 gene family. *Plant Physiol* 126: 789-800
- Taira T, Toma N, Ichi M, Takeuchi M, Ishihara M (2005) Tissue distribution, synthesis stage, and ethylene induction of pineapple (*Ananas comosus*) chitinases. *Biosci Biotechnol Biochem* 69: 852-854
- Takahata Y, Keller WA (1991) High frequency embryogenesis and plant generation in isolated microspore culture of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) *Plant science Limerick* 74: 235-242
- Tanaka N, Niikura S, Takeda K (2008) Relationship between earliness of head formation and developmental characteristics of cabbage (*Brassica oleracea* L.) in two different growing seasons, autumn and spring. *Breeding Sci* 58: 31-37
- Tang J, Wang F, Hou X, Wang Z, Huang Z (2014) Genome-wide fractionation and identification of WRKY transcription factors in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) reveals collinearity and their expression patterns under abiotic and biotic stresses. *Plant Mol Biol Rep* 32: 781-795
- Tantikanjana T, Mikkelsen MD, Hussain M, Halkier BA, Sundaresan V (2004) Functional analysis of the tandem-duplicated P450 genes SPS/BUS/CYP79F1 and CYP79F2 in glucosinolate biosynthesis and plant development by Ds transposition-generated double mutants. *Plant Physiol* 135: 840 - 848
- Tantikanjana T, Yongjwh, Letham DS, Griffith M, Hussain M, Ljung K, Sandberg G, Sundaresan V (2001) Control of axillary bud initiation and shoot architecture in *Arabidopsis* through the SUPERSHOOT gene. *Genes Dev* 15: 1577 - 1588
- Telmer CA, Simmonds DH, Newcomb W (1992) Determination of developmental stage to obtain high frequencies of embryogenic microspores in *Brassica napus* *Physiol Plant* 84: 417-424
- Thamil-Arasan SK, Park JI, Ahmed NU, Jung HJ, Hur YK, Kang KK, Lim YP, Nou IS (2013) Characterization and expression analysis of dirigent family genes related to stresses in *Brassica*. *67*: 144-153
- Thatcher LF, Manners JM, Kazan K (2009) *Fusarium oxysporum* hijacks COI1 mediated

- jasmonate signaling to promote disease development in *Arabidopsis*. *Plant J* 58: 927-939
- Theologis A, Ecker JR, Palm CJ, Federspiel NA (2000) Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 816-820
- Tian C, Wan P, Sun S, Li J, Chen M (2004) Genome-wide analysis of the GRAS gene family in rice and *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 54: 519-532
- Timperio AM, Eqidi MG, Zolla L (2008) Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins(HSP). *J Proteomics* 71: 391-411
- Torres-Galea P, Huang LF, Chua NH, Bolle C (2006) The GRAS protein SCL13 is a positive regulator of phytochrome-dependent red light signaling, but can also modulate phytochrome A responses. *Mol Genet Genomics* 276: 13-30
- Trick M, Cheung F, Drou N, Fraser F, Lobenhofer EK, Hurban P, Magusin A, Town CD, Bancroft I (2009) A newly-developed community microarray resource for transcriptome profiling in Brassica species enables the confirmation of Brassica-specific expressed sequences. *BMC Plant Biol* 9: 50
- Tripathi P, Rabara RC, Langum TJ, Boken AK, Rushton DL, Boomsma DD, Rinerson CI, Rabara J, Reese RN, Chen X, Rohila JS, Rushton PJ (2012) The WRKY transcription factor family in *Brachypodium distachyon*. *BMC Genom* 13: 270
- Troedsson UM, Terefework Z, Jarl-Sunesson CI (2006) Cloning of four chitinase genes and a lectin gene in *Galega orientalis*. *Symbiosis* 42: 25-37
- Trusov Y, Chakravorty D, Botella J (2013) *Fusarium oxysporum* Infection Assays in *Arabidopsis*, p. 67-72 In: Running, MP (ed.) *G Protein-Coupled Receptor Signaling in Plants* Clifton, NJ: Humana Press.
- Underhill EW, Chisholm MD, Steck W (1980) E-5, Z-7-Dodecadienal, a sex-pheromone component of the western tent caterpillar, *Malacosoma californicum* Lepidoptera, Lasiocampidae *Can Entomol* 112: 629 - 641
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CM (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44: 135-162
- Vandermarliere E, Lammens W, Schoepe J, Rombouts S, Fierens E, Gebruers K, Volckaert G, Rabijns A, Delcours JA, Strelkov SV, Courtin CM (2010) Crystal structure of the noncompetitive xylanase inhibitor TLX1, member of the small thaumatin-like protein family. *Proteins* 78: 2391-2394
- Veinger L, Diamant S, Buchner J, Goloubinoff P (1998) The small heat-shock protein IbpB from *E. coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperones network. *J Biol Chem* 273: 11032-11037
- Vicente JG, Dias JS (1996) Production of embryos from microspore cultures of portuguese tronchunda cabbage landraces. *Acta Horticulturae* 407: 219-226
- Walker J (1953) Cauliflower, cabbage, and others. *Plant Dis* 1: 425-430
- Walker JC, Wellman FL (1927) Development of Three Midseason Varieties of Cabbage

- resistant to Yellowings(*Fusarium con-glutinans* Woll.). *J Agric Res* 35
- Wang F, Hou X, Tang J, Wang Z, Wang S, Jiang F, Li Y (2012) A novel cold inducible gene from Pak-choi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*), BcWRKY46, enhances the cold, salt and dehydration stress tolerance in transgenic tobacco. *Mol Biol Rep* 39: 4553-4564
- Wang F, Dong Q, Jiang H, Zhu S, Chen B, Xiang Y (2012) Genome-wide analysis of the heat shock transcription factors in *Populus trichocarpa* and *Medicago truncatula*. *Mol Biol Rep* 39: 1877-1886
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A (2004) Role of plant heat shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci* 9: 244-252
- Webber S, Unker F, Friedt W (2005) Improved doubled haploid production protocol for *Brassica napus* using microspore colchicine treatment in vitro and ploidy determination by flow cytometry *Plant breed* 124: 511-513
- Wei K, Chen J, Chen Y, Wu L, Xie D (2012) Molecular phylogenetic and expression analysis of the complete WRKY transcription factor family in Maize. *DNA Res* 19: 153-164
- Wong RSC, Zee SY, Swanson EB (1996) Isolated microspore culture of Chinese flowering cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Rep* 15: 396-400
- Wu KL, Guo ZJ, Wang HH, Li J (2005) The WRKY family of transcription factors in rice and *Arabidopsis* and their origins. *DNA Res* 12: 9-26
- Wu R, Wang L, Wang Z, Shang H, Liu X, Zhu Y, Qi D, Deng X (2009) Cloning and expression analysis of a dirigent protein gene from the resurrection plant *Boea hygrometrica*. *Prog Nat Sci* 19: 347-352
- Wu C (1995) Heat stress transcription factors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 441-469
- Xie Z, Zhang ZL, Zou X, Yang G, Komatsu S, Shen QJ (2006) Interactions of two abscisic-acid induced WRKY genes in repressing gibberellin signaling in aleurone cells. *Plant J* 46: 231-242
- Xiong W, Xu X, Zhang L, Wu P, Chen Y, Li M, Jiang H, Wu G (2013) Genome-wide analysis of the WRKY gene family in physic nut (*Jatropha curcas* L.). *Gene* 524: 124-132
- Young JC, Moarefi I, Hartl FU (2001) Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol* 154: 267-273
- Zaki AM, Dickinson HG (1990) Structural changes during the first divisions of embryos resulting from anther and free microspore culture in *B. napus*. *Protoplasma* 56: 149-162
- Zhang C, Qifeng C (1993) Genetic studies of rice (*Oryza sativa* L.) anther culture response. *Plant Cell Tissue Org Cult* 34: 177-182
- Zhang D, Hrmova M, Wan CH, Wu C, Balzen J, Cai W, Wang J, Densmore LD, Fincher GB, Zhang H, Haigler CH (2004) Members of a new group of chitinase-like genes are expressed preferentially in cotton cells with secondary walls. *Plant Mol Biol* 54:

- Zhao YD, Hull AK, Gupta NR, Goss KA, Alonso J, Ecker JR, Normanly J, Chory J, Celenza JL (2002) Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev* 16: 3100 - 3112
- Zheng Z, Mosher SL, Fan B, Klessig DF, Chen Z (2007) Functional analysis of Arabidopsis WRKY25 transcription factor in plant defense against *Pseudomonas syringae*. *BMC Plant Biol* 7: 2
- Zhou J, Lee C, Zhong R, Ye ZH (2009) MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in Arabidopsis, *Plant Cell* 21: 248-266
- Zhu L, Zhang X, Tu L, Zeng F, Nie Y, Guo X (2007) Isolation and characterization of two novel dirigent-like genes highly induced in cotton (*Gossypium barbadense* and *G. hirsutum*) after infection by *Verticillium dahliae*. *J Plant Pathol* 89: 41-45
- Zhuo D, Okamoto M, Vidmar JJ, Glass AD (1999) Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (Nrt2;1At) in roots of Arabidopsis thaliana. *Plant J* 17: 563 - 568.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 첨단생산기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 첨단생산기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.