

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “세포융합기술을 이용한 첨단육종 소재 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 8월 14일

주관연구기관명 : (주)농우바이오

주관연구책임자 : 한 지 학

연 구 원 : 정 민

연 구 원 : 신 종 섭

연 구 원 : 장 인 창

연 구 원 : 손 다 혜

연 구 원 : 채 원 기

연 구 원 : 박 영 수

연 구 원 : 류 영 우

연 구 원 : 이 시 우

요 약 문

I. 제 목

세포융합기술을 이용한 첨단육종 소재 개발

II. 연구성과 목표 대비 실적

- 1.비대칭 세포융합 기술로 기존에 개발한 양배추 세포융합체의 계통화를 추진하여 새로운 CMS 계통들을 발굴함. 또한 당근 핵치환을 통한 당근 융합체를 선발하여 다양한 계통을 발굴함. 이렇게 발굴된 신유전자원 소재를 확장하고 실제 육종에 활용하고자 함.
- 2.양배추 세포융합은 CMS 형질 양배추 개발 후 양배추 8계통(BC₅F₁), 브르콜리 2계통(BC₄F₁), 컬리플라워 1계통 (BC₂F₁) 세대진전 완료, 모계 계통육성
- 3.당근 세포융합은 S당근 55계통, JB 당근 1계통, B당근 8계통, G당근 4도입종 총 67계통 선발, F₁ 9조합 작성함

III. 연구개발의 목적 및 필요성

양배추는 새로운 CMS 형질 유전자원 확보하여 고유 MS 기반 신품종을 개발하며, MS 기간 당근 품종은 세대진전을 통한 유전자원 도입이 어렵기 때문에 세포융합 방법을 통해 임성을 회복시켜 다양한 유전자원을 확보하고 계통 육성하고자함. 세포융합 유래 계통을 이용 품종을 개발하여 우리나라 농업 및 종자 산업 발전에 기여하고자함.

IV. 연구개발 내용 및 범위

- 1.비대칭 세포융합으로 개발한 무 CMS 형질 양배추 전이체의 계통 육성
 - 무 CMS 형질을 양배추에 세포질 치환하여 49점의 양배추 융합체 확보
 - 원예적 형질을 분석하여 MS개체들을 선발
 - MS양배추 융합체의 계통 육성(BC)
 - 향후 이 계통을 이용하여 품종화
- 2.비대칭 핵치환에 의한 당근 융합체 선발
 - 우수인자를 갖는 도입종의 핵을 치환하는 기술을 이용하여 당근 융합체 개발함
 - 융합체 확인을 위한 DNA 마커 활용
 - 당근 융합체의 원예적 형질 분석하여 세대진전
 - 향후 이 계통을 이용하여 품종화

V. 연구개발결과

1. 비대칭 세포융합(세포질치환)으로 개발한 무 CMS 형질 양배추 전이체의 계통 육성 성과가. 무 형질 NWB-CMS 인자의 양배추로 전이된 융합체를 선발하여 CMS 양배추를 개발나. CMS 형질에 대한 형태적 검정과 PCR 검정을 통해 MS개체를 선발다. CMS 양배추 융합체 이용하여 양배추 12계통, 브로콜리 2계통, 컬리플라워 2계통, 콜라비 2계통 총 16 계통 교배를 통한 CMS 계통 교배 및 검정

- 라. 2년차 NWB-CMS 형질의 안정화 확인 후 B line 선발 후 Back cross 모계 육성 착수, 양배추 8계통(BC_5F_1) 종자 확보, 브로콜리 2계통 BC_5F_1 종자 확보(BC_4F_1) 종자 확보, 컬리플라워 1계통(BC_2F_1) 세대진전 완료
- 마. 5년차 과정동안 양배추, 브로콜리, 컬리플라워의 다양한 우수 B line 계통과 backcross 함으로서 양채류 MS 모계계통 육성 전반에 활용

2.비대칭 세포융합(핵치환)에 의한 당근 융합체 선발

가. S당근의 핵을 치환 융합체 선발

- 당근 1차 도입종의 핵치환을 통해 확보된 당근 융합체 163점 확보
- 각 계통 근형, 숙기 별 원예적 특징 비교 후 세대진전
- C_4 세대 가을작형 37계통 선발
- C_4 세대 봄작형 18계통 선발
- C_4 세대 4계통(부계)을 이용하여 총 F_1 9조합 작성

나. JB당근 핵치환을 통한 융합체 선발

- JB 계통의 융합체를 자가수분하여 종자 확보, C_1 3계통 선발
- C_2 1계통 선발, 세대진전 계속

다. B당근의 핵치환하는 기술을 이용하여 당근 융합체들을 개발

- B당근 유래 C_1 세대 8계통 종자 확보
- C_3 세대 종자 확보(2015년 7월), 세대진전 계속

라. G당근의 핵치환하는 기술을 이용하여 당근 융합체들을 개발

- G당근 유래 C_0 세대 3계통 확보
- C_2 세대 3계통 종자 확보(2015년 7월), 세대진전 계속

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

NWB-CMS 양채류 개발은 세대진전 후 CMS의 안정성이 확인되어 다양한 모계계통 육성에 활용 중이며, CMS 품종 기대됨. 도입종 4종 당근을 이용하여 세포융합 유래 계통을 총 67계통 선발하였음, 계통에 따라서 추가 세대진전이 필요하며, 그중에서 4계통은 근형, 근색, 숙기, 추대 안정성을 고려하여 F_1 9조합 작성하였으며, 향후 국내 및 중국 등 해외 시장에서 경쟁력 품종 출시가 될 것으로 기대함. 자사로 기술실시를 통하여 자체 사업화로 예정임

SUMMARY

I. Title

Development of new genetic sources for breeding practice using protoplast fusion technology

II. Research achievement

1. CMS cabbages previously developed by asymmetric protoplast fusion were used to have new CMS lines. In addition, carrot cybrids obtained using carrot nuclear transfer were utilized to get various new lines. Those new lines are very useful to develop new germplasms and genetic sources.
2. Cabbage cybrids were further used to expand more germplasms: CMS cabbage 8 lines(BC_5F_1), broccoli 2 lines(BC_4F_1) and cauliflower 1 line(BC_2F_1). Generation advancement and maternal line breeding have been done with brassica CMS lines.
3. Fused carrots were obtained: S type 55 lines, JB type 1 line, B type 8 lines, G type 4 line and a total of 67 lines were isolated. So far 9 combinations of F_1 have been completed.

III. Goal and necessity of research development

1. In breeding, development of new germplasms is highly recommended. Among many biotechnology techniques, cell fusion technology can be a fascinating tool to transfer cytoplasmic genes of one species to another. Since brassica crops need to have CMS character to produce seeds in secure manner, new CMS germplasms are necessary and finally in this study, CMS lines from cabbage, broccoli, cauliflower have been developed. For the carrot, value-added F_1 hybrids developed by foreign big companies are very popular among farmers due to super quality. However, some of F_1 hybrids are MS and then breeders can not use F_1 seed for their breeding program because MS plant does not contain proper pollen to make F_2 generation. In order to recover the MF character from the MS F_1 hybrid, the nucleus of MS F_1 hybrid can be transferred to MF inbred line where the MS character is not present. In this way, new genetic sources are obtained and it would help generate more germplasms to develop various varieties.

IV. R&D project direction and scope

1. Line breeding of cabbage cybrid developed by asymmetric cell fusion between CMS radish and cabbage.
 - Forty nine cabbage cybrids obtained by transferring radish CMS character to cabbage using cell fusion technology

- Selection of CMS lines after examining the horticultural characteristics
- Line breeding of CMS cabbage cybrids
- Variety selection

2. Carrot cell lines developed by asymmetric protoplast fusion

- Fused carrot development transferring the nucleus from MS F₁ to MF line
- Selection of fused carrot using DNA markers
- Elite line selection by examining the phenotypes and horticultural aspects
- Variety selection

V. R&D results

1. Line breeding of cabbage cybrid developed by asymmetric cell fusion between CMS radish and cabbage

- a. CMS cabbage development using transferring NWB-CMS character of radish to cabbage
- b. Phenotypical test of CMS character as well as PCR analysis
- c. Crosses of CMS cabbage to cabbage 12 lines, broccoli 2 lines, cauliflower 2 lines, kohlrabi 2 lines
- d. After stabilization of NWB-CMS B line, backcross to MS line was established. Seeds from cabbage 8 lines (BC₅F₁), broccoli 2 lines (BC₄F₁), cauliflower 1 line (BC₂F₁) were obtained
- e. For last five years, elite B lines from brassica crops were backcrossed to MS lines to obtain elite A lines

2. Selection of fused carrots by asymmetric cell fusion

a. S type fused carrot

- 163 fused carrots were obtained
- Generation advancement after comparison of horticultural characters
- C₄ generation of autumn specific lines (37)
- C₄ generation of spring specific lines (18)
- C₄ generation of 4 paternal lines and their F₁ 9 combination completion

b. JB type fused carrot

- Selection of C₁ 3 lines after self-fertilization of JB type fused carrot
- Selection of C₂ 1 line obtained and continuous work for the generation advancement

c. B type fused carrot

- Seeds from 8 lines of B type C₁ generation
- C₃ generation was established (July 2015), and generation advancement is undergoing

d. G type fused carrot

- Three lines from G type C₀ generation were obtained

-Three lines of C₂ generation (July 2015) were obtained, and the generation advancement is undergoing

VI. Plans for how to use the research results

- NWB-CMS brassica crops are now utilizing for MS line development
- CMS maternal lines and MF paternal were obtained. Those germplasms would help enhance the F₁ purity and quality

CONTENTS

Chapter 1. R&D project summary and target goal	11
1. Purpose of R&D	11
2. Necessity of R&D	11
3. R&D and Scope	12
4. Research achievement	13
Chapter 2. Technology development status	15
1. Technology development status in Korea	15
2. Technology development status in oversea	15
Chapter 3. Research results	17
1. Line breeding of cabbage cybrids fused with NWB-CMS character of Radish	17
1) Cabbage cybrid development by transferring Radish CMS	17
2) Flower organ analysis of cabbage cybrid lines	18
3) Cross CMS cabbage to normal cabbage lines and selection for CMS	19
4) Generation advancement of CMS cabbage (2nd year)	23
5) Generation advancement of CMS cabbage (3rd year)	25
6) Development of NWB-CMS brassica lines and patent registration	27
7) Generation advancement of CMS cabbage (4th year)	31
8) Generation advancement of CMS cabbage (5th year)	31
9) Conclusion of successful cell fusion project for obtaining NWB-CMS brassica crops	34
2. Development of fused carrots by asymmetric nucleus substitution	35
1) Development of B line containing the nucleus of elite F ₁	35
2) Establishment of cell fusion system and selection of fused carrots	35
3) Flower organ analysis and fertilization of fused carrots	38
4) Fertility test of fused carrots and screening of next generation	40
5) Generation advancement of fused carrots	41
6) JB type fused carrots and new B line	45
7) C ₂ generation of S type fused carrots and performance test	47
8) C ₃ generation of S type fused carrots and performance test	49
9) JB type fused carrots and C ₂ generation	54
10) C ₄ generation of S type fused carrots and performance test	54
11) Conclusion of successful cell fusion project for obtaining new carrot germplasms	59

Chapter 4. Levels of achievement and contribution	-----60
1. Levels of annual achievement of research target and performance	-----60
2. Levels of technical contribution for research target	-----62
Chapter 5. Plans for how to use the research results	-----63
1. Research achievement and plans for usage (technology transfer)	-----63
2. Plans for obtaining patent, publication, variety and IP	-----63
Chapter 6. Science and technology information obtained from oversea	-----65
Chapter 7. Research facility and equipment status	-----66
Chapter 8. Safety management performance of Laboratory	-----67
Chapter 9. Reference	-----68

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표	11
제1절 연구개발의 목적	11
제2절 연구개발의 필요성	11
제3절 주요연구개발 내용 및 범위	12
제4절 연구성과 목표 대비 실적	13
제 2 장 국내외 기술개발 현황	15
제1절 국내 기술개발 현황	15
제2절 국외 기술개발 현황	15
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	17
제1절 비대칭 세포융합(세포질치환)으로 개발한 무 NWB-CMS 형질 양배추 전이체의 계통 육성	17
1. 무 CMS 형질을 도입한 양배추 융합체 개발	17
2. 양배추 융합체 계통의 화기 특성분석	18
3. MS 양배추 융합체와 육성계통간 교배 및 검정	19
4. 무 CMS 형질을 도입한 양배추 융합체 세대진전(2년차)	23
5. CMS 형질을 도입한 양배추 융합체 세대진전(3년차)	25
6. NWB-CMS 양채류 계통 육성의 신유전자원 개발 특허 출원 및 등록	27
7. 양배추 융합체 개발 및 양채류 계통 세대진전(4년차)	31
8. 양배추 융합체 개발 및 양채류 계통 세대진전(5년차)	31
9. 양배추 NWBCMS 인자 도입 세포융합 종합적 결론	34
제2절 비대칭 핵치환에 의한 우수인자 도입 당근의 융합체 선발	35
1. 우수 도입종 F ₁ 당근을 이용 다양한 B line 소재 개발을 위한 세포융합	35
2. 핵치환 당근 융합 시스템 구축 및 융합체 선발	35
3. 당근 융합체의 화기분석 및 자가수분	38
4. 임성 회복한 당근 융합체의 후대검정(1차재배시험)	40
5. 핵치환 당근 융합시스템 구축 및 융합체 선발 및 세대진전	41
6. JB당근 핵치환을 통한 새로운 B line 확보	45
7. S당근 융합체 선발 및 C ₂ 세대 성능 검정 및 세대진전	47
8. S당근 융합체 선발 및 C ₃ 세대 성능 검정 및 세대진전	49
9. JB당근 핵치환을 통한 새로운 C ₂ 세대진전	54
10. S당근 융합체 선발 및 C ₄ 세대 성능 검정 및 세대진전	54
11. 당근 세포융합의 종합적 결론	59
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	60

제1절 연도별 연구목표, 수행 내용 및 달성도 -----	60
제2절 연구목표 수행에 따른 기술 기여도 -----	62
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	63
제1절 연구성과 및 활용 계획(기술실시) -----	63
제2절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 -----	63
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	65
제 7 장 연구시설·장비 현황 -----	66
제 8 장 연구실 안전관리 이행실적 -----	67
제 9 장 참고문헌 -----	68

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제1절 연구개발의 목적

세포융합기술을 양배추와 당근 작물에 적용하여 융합시스템을 확보하며, 신품종육성에 필요한 다양한 신유전자원을 확보하여 계통육성하고 품종화함으로서 우리나라 농업 및 종자 산업 발전에 기여하고자함.

양배추 작물은 무 응성불임 계통(NWB-CMS)의 CMS 특성을 세포융합기술(비대칭 원형질융합: 세포질치환)로서 양배추로 도입된 세포융합체를 확보하여 양배추와 브로콜리의 신소재 계통 최소 3점을 계통 육성을 진행하고, 향후 NWB-CMS 육종 시스템을 가진 독자적인 신품종을 육성하고자함.

당근 작물 또한 세포융합 기술(비대칭 원형질융합: 핵치환)을 적용하여 우수한 형질을 도입할 수 있도록 융합체를 개발하고, 최소 2점의 유전자원을 개발하고자함.

제2절 연구개발의 필요성

최근 종자산업의 중요성이 부각되면서 GSP 연구 사업이 활발히 진행 중으로 각 작물별 수입대체와 내수 점유, 수출을 위한 신품종 개발이 활발히 진행중에 있음. 채소작물 중 십자화과 작물인 양배추나 브로콜리는 세계적인 작물로 다양한 유전자원과 재배지역이 널리 분포되어 있음. 십자화과 작물은 경제적으로 중요한 작물들이 많이 속해 있고 그 종류도 다양함.

세계 채소 재배 면적 5위의 양배추 종자 시장은 5,100억 이상으로 1,700톤이 생산되고 있고, 다양한 기능성 채소로도 각광받고 있음. 중국의 종자 시장이 500톤, 인도의 50톤등 주 재배 지역으로 알려져 있으며, 국내의 양배추시장도 고품질, 내병성 품종이 요구되고 있음. 양채류의 주요 작물인 양배추, 브로콜리, 컬리플라워의 종자시장규모는 약 2억불(각 6천, 7천, 7천만불)로서 매우 크고 우수 품종이 많아서 각 다국적 기업마다 우수한 고유품종을 확보하고 있어 경쟁이 치열하며, (주)농우바이오는 미국, 중국, 유럽까지 수출 다변화를 위하여 기초 육종 체계를 구축하였으며 신품종을 개발을 활발히 추진중임.

대부분의 십자화과 작물에 대한 육종체계나 종자개발 기술이 CMS를 기본으로 발전하고 있으며, 종자의 매출은 CMS 같은 좋은 육종기술을 이용하여 품종을 출시하여야만 유전자원의 유출 없이 안정적 성장이 기대됨. 양배추의 경우 2010년 12월, ogura CMS의 특허가 만료됨에 따라 유전자원의 활용적인 측면에서 자유로워졌으나, 자사에서 개발된 고유의 무의 NWB-CMS 인자를 이용한 양배추 CMS 육성은 독자적인 양배추 품종을 개발하여 유전자원의 유출을 막고 안정적인 시장 진입을 기대하고 있음. 양배추와 브로콜리 계통은 수년내 품종 출시가 가능해졌으며, 컬리플라워와 콜라비도 계통 육성진행.

당근은 베타카로틴, 엽산 함량이 많아 항산화, 항암등의 면역계 질환에 효능이 있는 식생활에 대표적인 작물로 국내 당근은 농우바이오를 포함하여 4-5개사가 육종을 하고 있는 열악한 실정임.

세계 당근 생산량은 현재 23,600,000 톤이며 이중 중국이 8,300,000 ton으로 세계 생산량의 약 28%를 차지할 정도로 크고, 중국의 당근종자 시장은 270억이며, 이중 교배종의 재배면적은 총면적의 20%임에도 불구하고 전체 종자 시장의 80%를 차지함. 향후 중국의 시장 발전 속도를 고려해볼 때 고순도 및 고품질의 교배종 당근으로의 시장 변화가 불가피 하며 결과적으로 교배종 재배면적의 확대로 중국 당근 시장의 발전 가능성 또한 아주 크다고 할 수 있음. 현재 중국 고품질 및 고가 당근 교배종 시장은 국내에서와 같이 일본계 종자회사가 주도하고 있으며, 일본계 종자회사의 SB 품종의 경우 판매비율 1%임에도 종자매출은 30% 차지할 정도로 매우 큰 부가가치를 가지며, 농우바이오는 중국 당근 교배종을 시판중에 있으며 고색소 및 순도면에서 경쟁력이 떨어지는 것이 현실이어서 새로운 유전자원이 절실히 요구됨.

국내 당근 종자시장은 대략 48억원이며, 수출은 26억원으로 주요 채소작물 중 하나임(2013년, 종자협회). 당근의 국내 재배면적은 2010년 현재 2,711ha 재배면적에 생산량은 63,792 ton 임. 이중 일본계 회사의 교배종 당근이 80% 이상을 점유하고 있어서 수입대체가 필요하며, 당근 시장 확대를 위해 고순도, 고색소 등 고품질 품종은 대부분 일본계 품종으로 이를 대체할 수 있는 신품종 육성이 시급한 실정임. 또한 이러한 품종은 MS를 기반으로 육성되었기 때문에 유전자원 활용에 제약이 있으며, 또한 교배를 통해 세대진전하더라도 MS 회복 인자가 없어 유용 자원을 분리해내거나 선발할 수 없음.

당근 육성에서 전통육종방식인 여교배를 통하여 다양한 색소와 근형등 우수한 원예적 형질을 도입할 자원에 한계가 있기 때문에 어려운 실정임. 이러한 당근의 다양한 유전자원을 도입하기 위해서는 MS 인자를 타파하기 위해 세포융합기술을 적용하는것은 매우 효과적인 방법이며, 성공적으로 세포질 인자의 치환하는 융합체가 성공적으로 세대진전할 경우 다양한 형질의 계통을 확보할 수 있고 세대단축을 위한 세포융합 기술을 함께 적용하여 신품종 육성에 활용될 것으로 기대함. 이러한 이유로 일본산을 능가하는 신품종 개발이 어려운 실정임.

제3절 주요연구개발 내용 및 범위

비대칭 세포융합 기술로 기존에 개발한 양배추 세포융합체의 계통화를 추진하여 새로운 CMS 계통들을 육성함. 또한 당근 핵치환을 통한 우수인자 당근 융합체를 선발하고 다양한 계통을 육성하도록 함. 이렇게 발굴된 신유전자원 소재를 확장하고 실제 육종 및 품종개발에 적극적으로 활용하고자 함.

1. 비대칭 세포융합(세포질치환)으로 개발한 무 CMS 형질 양배추 전이체의 계통 육성
 - 무 CMS 형질을 양배추에 세포질 치환하여 양배추 세포융합체를 개발
 - CMS 형질에 대한 형태적 검정과 PCR 검정을 통해 MS개체를 선발
 - MS양배추를 이용한 계통육성을 진행함. 양배추 8계통, 브로콜리 2계통, 컬리플라워 1계통,

콜리비 2계통 backcross를 진행. BC₄F₁의 MS 형질이 안정적으로 유지되고 있으며, BC₅F₁ 종자 확보(작물 계통에 따라 다름)

2. 비대칭 세포융합(핵치환)에 의한 당근 융합체 선발

가. S당근의 핵을 치환하는 기술을 이용하여 당근 융합체들을 개발

- 당근 1차 도입종의 핵치환을 통해 확보된 당근 융합체 163점의 원예적 형질을 분석
- 추대 후 화기 검정을 통해 임성회복한 융합체를 선발함. 자가수분 후 종자 C₁ 12계통을 확보
- C₁ 융합체 12계통을 과중하여 원예적 형질 및 근형 분석하고 우수형질 발현 융합체 선발, 선발된 모근을 저온처리하고, 자가수분하여 C₂세대 종자중 융합체 16계통 선발
- C₂세대 재배를 통해 근형및 근색을 비교하여 우수 3계통 선발
- C₃세대 재배를 통하여 근형과 근색이 우수한 9계통을 선발
- C₄세대 재배를 통하여 120계통 중 37계통 선발(가을작형, C₅ 종자 2015년 7월)
- C₄세대 재배를 통해 72계통 중 18계통 선발(봄작형, C₅ 종자 2015년 11월 예정)
- C₄세대 4계통(부계)을 이용하여 총 9조합 F₁ 작성하여 종자 확보(2015년 7월)
- 9조합 F₁ 성능검정 실시 예정 (2015년 11월), 품종능력 검정

나. JB당근 핵치환을 통한 새로운 B line 확보

- JB 계통의 융합체를 자가수분하여 종자 확보.
- C₁ 3계통 선발
- C₂ 1계통 선발

다. B당근의 핵치환하는 기술을 이용하여 당근 융합체들을 개발

- B당근 유래 C₁세대 8계통 종자 확보
- C₂ 세대 8계통 선발
- C₃ 세대 종자 확보(2015년 7월)

라. G당근의 핵치환하는 기술을 이용하여 당근 융합체들을 개발

- G당근 유래 C₀세대 3계통 확보
- C₁ 세대 2계통 선발, 총 68개체 재배중(2015년 11월 종자확보 예정)
- C₂ 세대 3계통 종자 확보(2015년 7월)
- G 유래 계통은 2-3 세대 추가 세대진전 필요

연구개발 내용	연구 개발 범위
<ul style="list-style-type: none"> 비대칭 세포융합을 통한 전기적 융합 방법으로 원예적/형태적 선발 및 분자마커를 검정 및 무 CMS 형질의 양배추 전이체 계통 육성 	<ul style="list-style-type: none"> 무 CMS 형질을 전이한 양배추 융합체와 모본 양배추, 브로콜리, 교배 조합 종자 확보, 지속적인 backcross 진행 확보 종자의 MS 성능의 형태적 검정 및 종자 생산성 유지, 변이체 형성여부 관찰을 통한 선발
<ul style="list-style-type: none"> 비대칭 세포융합을 통한 당근 핵치환 융합체 선발, 세대진전 및 계통 선발 	<ul style="list-style-type: none"> 우수인자 도입종의 핵치환 융합체 확보 및 후대 종자 확보 후대 종자의 발아 재배 및 분자마커를 이용한 개체별 분석 후대 종자의 우수형질의 발현 및 근형태별, 개체별 선발

제4절 연구성과 목표 대비 실적

1. 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
		출원	등록	품종명 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차년도	목표										
	달성										
2차년도	목표	1						1			
	달성	1									
3차년도	목표	1							1		
	달성	1									
4차년도	목표		0					1			
	달성		1								
5차년도	목표	1				1		1	1		
	달성		1								
계	목표	3	0			1		3	2		
	달성	2	2			0		0	0		

- 국내 특허 출원 1건, 등록1건, PCT 출원 1건, 미국 등록 1건
- 논문은 NWB-CMS 양배추와 당근 세포융합 연구성과로 2편 작성 예정,
- 당근, 양배추 2-4년내 품종출원 예정, 성과도출 예상
- 자사기술실시 예정

가.비대칭 세포융합 기술로 기존에 개발한 양배추 세포융합체의 계통화를 추진하여 새로운 CMS 계통들을 발굴함. 또한 당근 핵치환을 통한 당근 융합체를 선발하여 다양한 계통을

발굴함. 이렇게 발굴된 신유전자원 소재를 확장하고 실제 육종에 활용하고자 함.

나.양배추 세포융합은 CMS 형질 양배추 개발 후 양배추 8계통(BC_5F_1),브르콜리 2계통 (BC_4F_1), 컬리플라워 1계통 (BC_2F_1) 세대진전 완료, 모계 11 계통육성

다.당근 세포융합은 S당근 55계통, JB 당근 1계통, B당근 8계통, G당근 총 4도입종 총 67계 통선발, F_1 9조합 작성함

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내 기술개발 현황

국내 세포융합 기술은 지난 20여년간 유채와 양배추, 브로콜리 등의 CMS 인자를 도입하기 위하여 여러 연구팀에서 시도되어 왔으나 목적에 부합하는 성공적인 연구결과 얻지 못했음. 최근 10년간 비대칭 융합체 개발에 대한 연구에서 중국의 논문들이 몇 점 있으나 초록에 의하면 과거에 발표되었던 내용들 외에 특별히 차별성이 없으며, *Brassica oleracea* var. botrytis와 *B. nigra*와 같이 종(種)이 다른 경우와 *Arabidopsis thaliana*와 *Brassica napus*처럼 속(屬)이 다른 경우도 모두 다 비대칭 융합했다고 발표 됨. 2008년 본 연구팀이 제출한 논문은 무와 양배추의 대칭 융합을 시도하여 얻은 결과를 보고 하였으며, MS 형질을 전이하여 실제 융합체를 계통화하는 과정은 Ogura-CMS, Kosena-CMS 이후 20여 년 만에 본 연구팀이 개발한 세포질치환, 핵치환은 방사선을 이용한 핵 불활성화 방법으로서 기술가치가 매우 높으며, 본 연구팀에서 2006년도 농기평 과제로 진행한 NWB-CMS 인자의 양배추 도입 연구를 시작으로 비대칭 세포융합 기술을 확립하여 2012년 특허 등록 하였으며, 본 연구과제의 수행으로 양배추 CMS 계통을 선별하는데 성공하였음. 이러한 연구결과를 바탕으로 당근 세포융합의 성공적인 시스템을 확립할 수 있었음. 또한 당근 세포융합 기술의 확립은 고순도 당근 개발 및 신유전자원 개발 측면에서 국내 당근 육성에 큰 전환점이라 하겠음.

제2절 국외 기술개발 현황

세포융합 기술은 국외의 경우 20여년 전부터 활용되어 왔음을 짐작할 수 있음. 특히 십자화과의 웅성불임을 이용한 품종의 개발은 외국에서 이미 정립된 육종기술로 국외의 CMS는 현재까지 애기장대, 사탕무, 옥수수 밀, 호밀, 해바라기 등에서 광범하게 활용되고 있으며, 육종적인 측면에서 중요한 십자화과 식물에서는 Polima, Napus, Ogura, Anand CMS가 잘 알려져 있음. 이중 Brassica속에서는 Raphanus속에서 전이한 Ogura와 Kosena CMS가 육종에 이용되고 있음(L'Homme and Brown 1993, Handa et al. 1995, Singh et al. 1996, Cardi and Earle 1997). 이중 Ogura-CMS는 무속(屬) 식물로부터 유래되어 가장 육종적으로 이용이 많이 되는 시스템 중 하나이며, 이 Ogura-CMS를 이용하여 미국의 코넬 대학에서 원형질체 융합으로 Ogura 세포질 웅성불임 형질을 가진 양배추를 1990년에 육성하였고, 유채는 Jourdan 등이 1989년에 만들었으며, 십자화과 작물의 경우는 적양배추와 무의 세포융합을 통하여 CMS인자를 도입하고자 하였으며(Kameya et al., 1989), Hoekstra 등(1990)은 무의 Ogura CMS를 양배추에 원형질체 융합하여 특허 출원함으로써 양채류 MS 품종 시장을 선도함.

당근 작물의 경우도 1976년 Dudits 등이 당근의 원형질체융합을 보고한 이후 1988년 Tanno-Suenaga 등은 당근의 원형질체에 X-선을 처리하고 비대칭세포융합 방법을 이용하여 CMS(Cytoplasmic male sterile) 형질을 도입한바 있음. 일본 육종 회사는 이러한 연구팀과 협력을 바탕으로 당근에서 웅성불임(Male sterility) 모계육성과 웅성불임 F1 생산에 응용하여

품종 육성함으로서 유전자원의 보호 효과와 더불어 고순도, 고품질의 교배종 육성이 가능하였음(Tanno-Suenaga et al., 1988). 당근의 경우도 CMS를 이용한 품종육성이 20여년 전부터 진행되고 있으며, 국내시장의 80% 이상을 점유하는 일본계 품종의 CMS 형질은 품종 자체의 경쟁력을 확보하고 있음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 비대칭 세포융합(세포질치환)으로 개발한 무 NWB-CMS 형질 양배추 전이체의 계통 육성

(1년차)

1. 무 CMS 형질을 도입한 양배추 융합체 개발

국내 십자화과 작물 육종에서는 오래전서부터 Ogura-CMS 계통을 이용하였는데 이는 여러 정황으로 문제가 있어서 이를 대체할 새로운 CMS 계통 육성이 필요하였다. (주)농우바이오에서는 무 NWB-CMS 유전자원을 이용하여 CMS 무 계통을 육성하고 있었기 때문에 무의 CMS 형질을 양배추에 넣어서 새로운 CMS 양배추 개발을 하고자 하였다. 따라서 세포융합을 이용하여 무의 핵을 불활성화 시키고 양배추의 세포질 미토콘드리아를 불활성화 시킨 후 각각의 세포를 전기·화학적으로 융합시켜서 무 세포질의 MS 인자와 양배추 핵을 갖는 MS 양배추의 개발을 시도하였고 아래는 이에 대한 모식도이다(그림 1-1). 융합체의 세대는 C(Cybrid generation)으로 표기하였다.

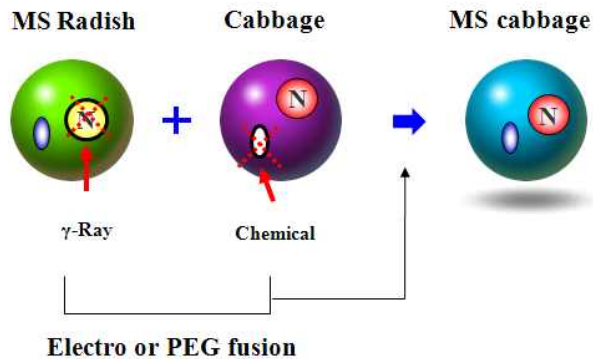


그림 1-1. MS 양배추를 개발하기 위한 세포융합 모식도

전기·화학적방법의 비대칭 세포융합을 통하여 획득한 융합체는 27개의 origin, 49개체의 융합체를 이었으며 추대를 위하여 유리온실로 이식하여 재배하였다(표 1-1).

표 1. 양배추의 전기·화학적 융합체 확보 현황

	Origin	순화개체수
PEG 융합	7	19
Electro 융합	20	30
합 계	27	49

세포융합 후 재분화 식물체 중에서 양배추의 형태적 특징을 나타내는 융합체 3A와 6F를 선발하였고(그림 1-2), 무 세포질의 MS 인자를 가지고 있는지 2종류의 마커를 이용하여 분석한 결과 함께 검출되는 개체를 선발하였다(그림 1- 3). 6D 융합체 경우는 마커상으로 MS 밴드는 확인할 수 있었으나, 형태적으로 모본 양배추와 차이를 보였다(그림 1-2). 향후 작물에 세포융합기술을 적용시 개별 시험에서 융합 효율을 높이는것이 최종 우수 선발 계통을 확보 확률이 크기 때문에 실험적 다양성을 통해 효율을 높일 수 있도록 진행 예정입니다.



그림 1-2. 양배추 융합체 재분화. A: AD126(inbred line); B: 2C; C: 3A; D: 6D; E: 6F

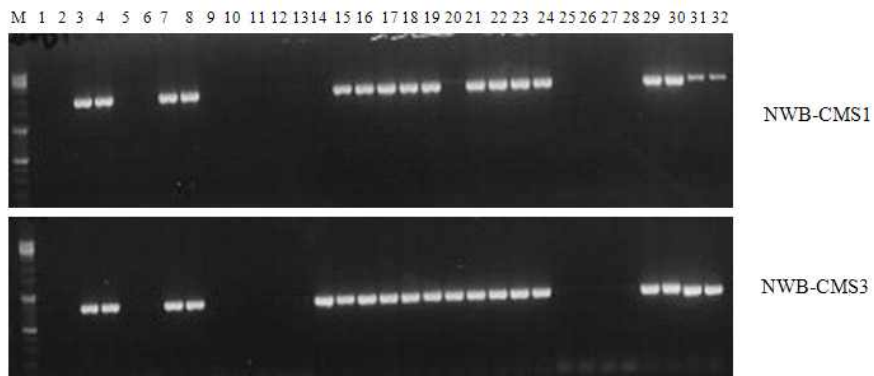


그림 1-3. 무NWB-CMS 특이적인 2종류 마커를 이용한 분석. 1-24 lanes: Fused plants; 25-26: Ogura-CMS Cabbage; 27-28: Cabbage Inbred; 29~30: NWB-CMS Radish; 31-32: Radish inbred

2. 양배추 융합체 계통의 화기 특성분석

양배추 융합체의 화기 검정 및 교배를 위하여 모본의 양배추와 잎 모양과 절간, 꽃의 크기 등을 비교 하여 원예형질에 있어 안정화된 융합체를 선발하여 MS 형질을 보이는 개체에 대하여 교배를 실시하였다. 모본과 교배후 정상적으로 종자가 형성하여 발달하였다(그림 1-4). 18



그림 1-4. 양배추 모본 AD126과 융합체 6F의 재배 모습. 6F 융합체는 MS 형질과 교배가 정상적 이루어짐

특히 3A, EF3, 6F 융합체는 모본 양배추인 AD126과 차이를 보이지 않았으며 수술의 꽃가루 생성여부에 있어서 완전한 MS임을 확인하였다(그림 1- 5).

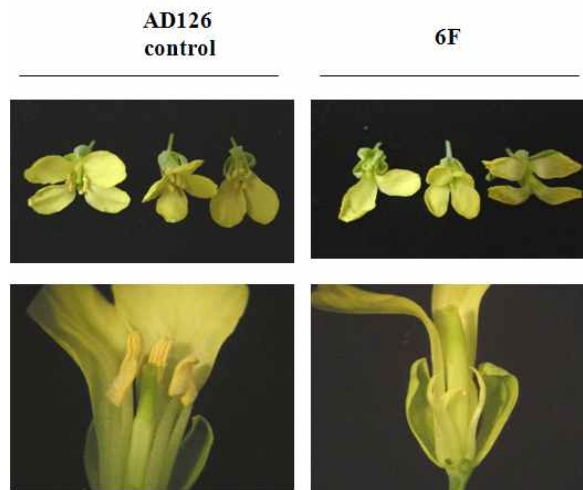


그림 1-5. 양배추 모본 AD 126과 융합체 6F 개체간 화기 구조 비교

3. MS 양배추 융합체와 육성계통간 교배 및 검정

무 MS 인자가 도입된 양배추 융합체의 분자마커와 화기 검정을 통하여 성공적인 MS 양배추 융합체를 확인하였다. 이후 꽃가루를 생성하는 정상적인 양배추 B 계통과 교배를 실시하였다. 또한 양배추와 같은 양채류 그룹 간의 교배가 이루어지는 점을 이용하여 MS 인자를 브로콜리, 컬리플라워, 콜라비의 B 계통

과도 교배를 통하여 도입하고자 하였다(그림 1-6).

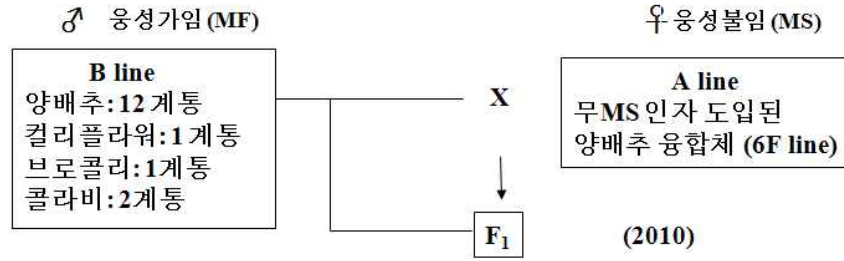


그림 1-6. MS 융합체 6F와 양배추, 컬리플라워, 브로콜리, 콜라비 계통간 교배

융합체와 모본인 양배추 12계통 그리고 브로콜리 1계통, 컬리플라워 1계통, 적색콜라비 1계통, 흰색콜라비 1계통과 교배하여 성공적으로 998점의 종자를 확보하였다(표 1-2).

표 1-2. 융합체 6F와 양채류 육성계통간 교배조합

교배조합	교배번호	파종수	발아	비고
NWC1	NWC6F-1 x 723-42	81	19	양배추
NWC2	NWC6F-1 x 816-41	61	28	"
NWC3	NWC6F-1 x 811-41	138	68	"
NWC4	NWC6F-1 x 814-41	35	14	"
NWC5	NWC6F-1 x 821-41	107	73	"
NWC6	NWC6F-2 x 731-43	121	59	"
NWC7	NWC6F-2 x 778-43	132	62	"
NWC8	NWC6F-2 x 770-43	38	18	"
NWC9	NWC6F-2 x 777-41	20	9	"
NWC10	NWC6F-2 x T2-41	41	20	"
NWC11	NWC6F-2 x 790-43	43	23	"
NWC12	NWC6F-2 x 778-44	64	22	"
NWC13	NWC6F-1 x NU 416	83	41	컬리플라워
NWC14	NWC6F-2 x NU 333	12	3	브로콜리
NWC15	NWC6F-1 x S39-42	2	2	적색콜라비
NWC16	NWC6F-1 x K179-43	21	13	흰색콜라비
합 계		998	474	

이후 채종한 종자를 파종하여 47%, 474점의 발아를 확인하였으며(그림 1-7), 각 개체별로 무MS 특이 마커를 이용하여 분석한 결과 모든 식물체에서 무 NWB-CMS 특이 밴드와 동일한 밴드 패턴이 관찰됨으로서 안정적으로 후대에 전이된 것을 확인하였다(그림 1-8).



그림 1-7. 융합체와 육성 계통 교배 16 조합의 발아 모습(파종 후 25일째)

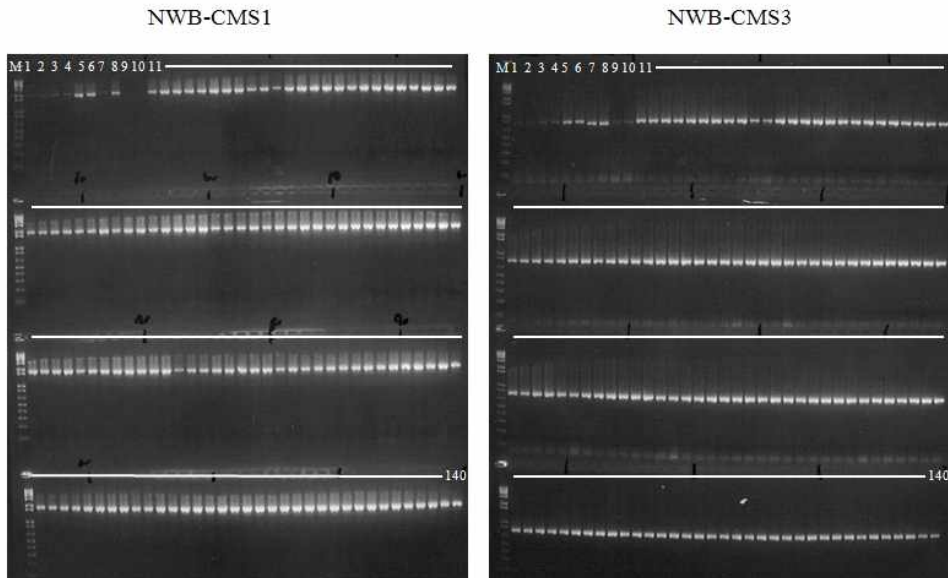


그림 1-8. 양배추 융합체와 교배 조합의 개체별 마커 분석. M: Molecular marker; 1-4 lanes: Cabbage inbred; 5-6 lanes: NWB-CMS Radish; 7-8 lanes: Radish inbred; 9~10 lanes: Ogura-CMS Radish; 11-140: F1 progenies from fused cabbages

마커 분석 완료 후 각 조합별 개체를 육성하우스에 정식하여 재배하였다(그림 1-9). 육성하우스에 정식 후 추대를 위해 동절기 재배기간을 거쳐서 추대를 유도하였다(그림 1-10). 이후 각 조합별 개체들이 추대 후 개화가 이루어졌으며 각 작물별 교배 계통 모두(NWC 1-16)정상 개체와 화기구조를 비교하여 100% 융성불임의 화기 구조가 관찰되었다(그림 1-11).



그림 1-9. 양배추 융합체와 교배 조합의 NWC1~16 정식 모습. A: 정식 4일째; B: 정식 25일째

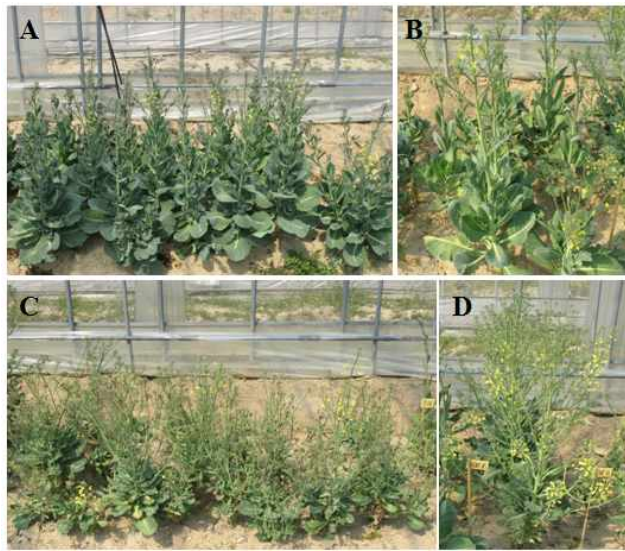
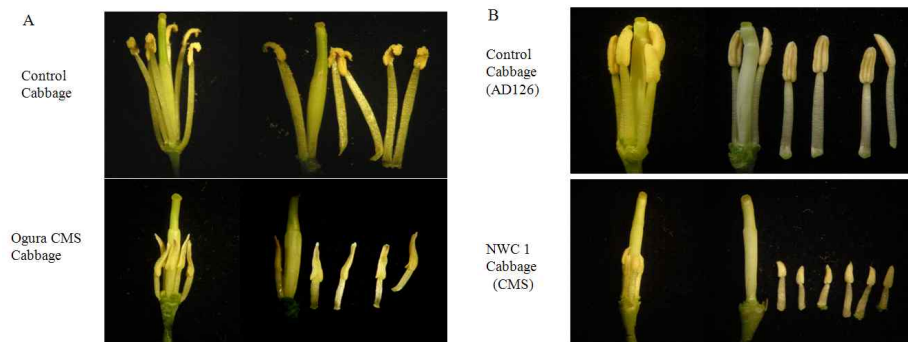


그림 1-10. 양배추 융합체와 교배 조합의 정식 후 200일째 추대 모습. A: NWC6 Cabbage; B: NWC16 Kohlrabi; C: NWC13 Cauliflower; D: NWC14 Broccoli



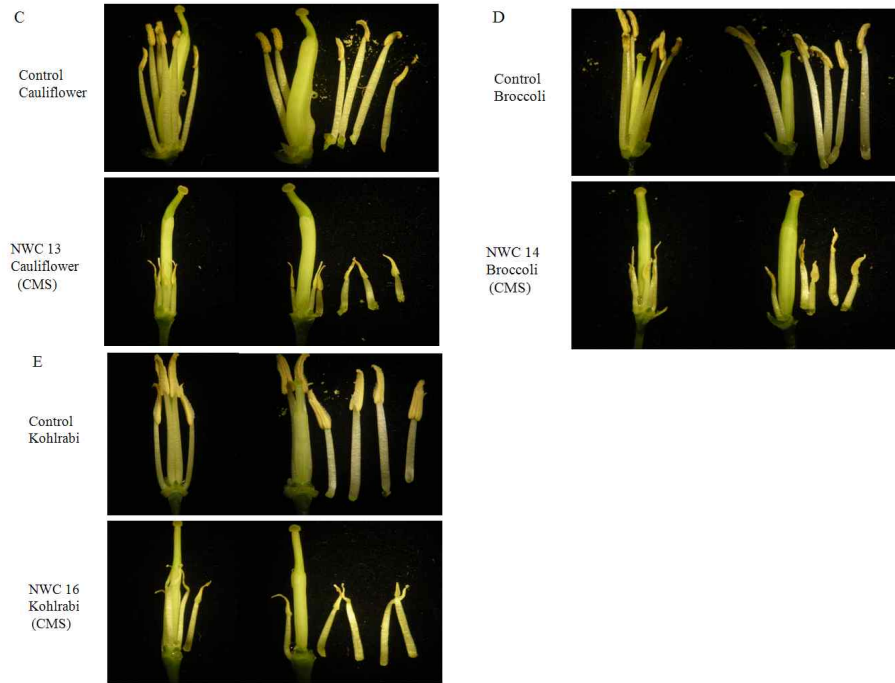


그림 1-11. 양배추 융합체와 교배 조합 F₁ 개체와 작물별 정상적인 개체의 화기 비교 모습. A: Ogura CMS Cabbage; B: NWC-CMS Cabbage(NWC1); C: NWC-CMS Cauliflower(NWC13); D:NWC-CMS Broccoli (NWC14): E: NWC-CMS Kohlrabi(NWC16)

따라서 양배추 및 브로콜리, 컬리플라워, 콜라비로 교배한 F₁ 모든 개체에 무 MS 인자가 안정적으로 전이되어 발현하는 것을 증명하였다. 현재 각 선발된 조합과 양배추 2조합, 컬리플라워 1조합, 브로콜리 1조합을 재선발하여 BC₁F₁ 종자를 확보하였다(2011년 7월).

(2년차)

4. 무 CMS 형질을 도입한 양배추 융합체 세대진전

1년차 연구에서는 융합 C₀ 세대의 CMS 유전인자 및 원예적 형질을 확인하고, 선발된 융합체와 양배추, 컬리플라워, 브로콜리, 콜라비의 우수계통 B line과 교배를 F₁ 종자를 확보한바 있다. 2년차에서는 양배추(NWC 1-12), 컬리플라워(NWB 13), 브로콜리(NWB 14), 콜라비(NWB 15, 16)의 BC₁F₁ 세대진전을 위해 2011년 8월 종자를 과중하여 동절기 저온재배를 통하여 추대를 유도하였다(그림 1-12). 추대된 작물에서 NWC-CMS 마커를 이용해 검정과 육안 검정을 실시한 결과는 마커상 CMS 형질이 전이된 것을 확인하였고, 원예적 형질 및 화기 검정에서도 100% MS임을 확인하였다. 이후 선발된 양배추 2조합(그림 1-13), 컬리플라워 1조합(그림 1-14), 브로콜리 1조합(그림 1-14), 콜라비 2조합(그림 1-15) 계통은 같은 모본과 교배를 수행한 BC₂F₁ 종자를 확보하였다(2012년 7월).

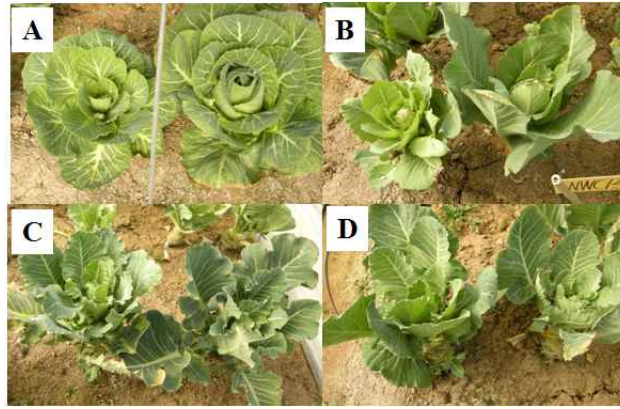


그림 1-12. 양배추 융합체와 조합 BC₁F₁ 계통의 동절기 저온기 재배 모습(2012.1.9). A: 양배추 B: 컬리플라워 C: 브로콜리 D: 콜라비



그림 1-13. MS 양배추 BC₁F₁ 계통의 back cross 진행 모습(2012.4.25). A: control 양배추(MF); B: MS 양배추

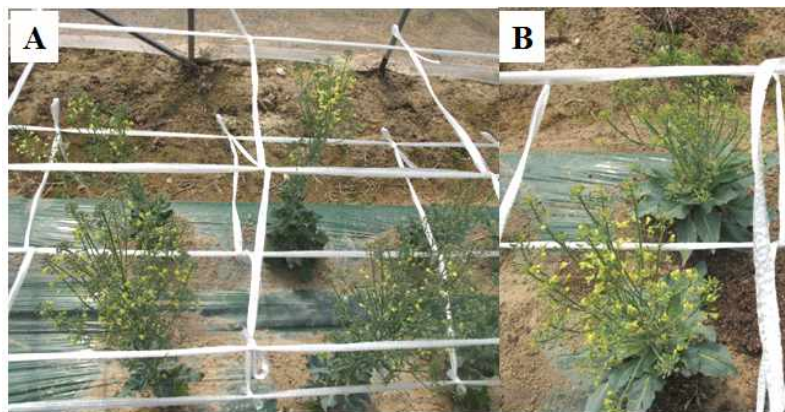


그림 1-14. MS 교배 계통의 추대 모습과 back cross 진행 예정(2012.4.28). A: BC₁F₁ 브로콜리 (MS); B: BC₁F₁ 컬리플라워(MS)

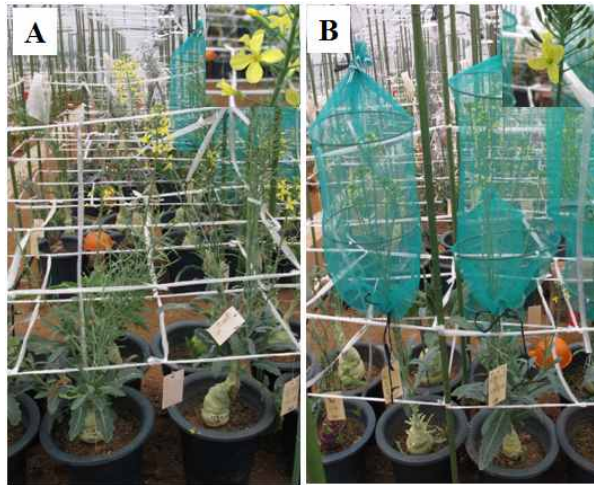


그림 1-15. MS 콜라비 BC₁F₁ 계통의 back cross 진행 모습(2012.4.24). A: control 콜라비(MF); B: 콜라비(MS)

2년차 연구에서 BC₂F₁ 종자를 확보하였으며(그림 1-16), NWB-CMS인자의 특성이 매 세대 안정적으로 발현되어 유지되고 있어 확실한 유전자원을 확보하였으며, 양배추 계통육성에 집중하고, 또한 담당 육성가의 판단으로 양채류의 다양한 우수 B line 계통과 추가적으로 BC 함으로서 양채류 MS 계통 육성 자원으로 활용되고 있다.

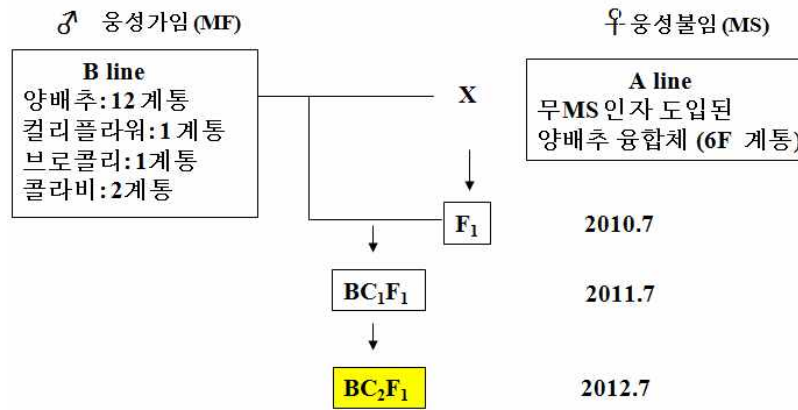


그림 1-16. NWB-CMS 인자가 도입된 양배추와 양배추를 포함한 양채류 간의 back cross를 통한 계통 육성 모식도. 2012년 7월 BC₂F₁ 종자 확보

(3년차)

5. 무 CMS 형질을 도입한 양배추 융합체 세대진전

2차년도 연구에서는 양배추 8계통, 브로콜리 2계통, 컬리플라워 2계통, 콜라비 1계통의 BC₂F₁ 종자를 확보하였고(그림 1-18), 2013년 8월 파종하여 어린 유묘기 때와 재배과정을 통하여 원예적 형질어 우수한 개체를 육안 선발하고 선발된 개체를 동절기 저온재배를 통하여 각 양채류의 모본과 backcross를 진

행하였으며, BC₃F₁세대 종자를 2013년 7월 확보하였다(그림 1-21). 저온재배를 통해 추대된 BC₂F₁ 세대에서 NWB-CMS1 마커를 이용해 PCR 검정한 결과 양배추, 브로콜리, 컬리플라워 모두 NWB-CMS 형질이 전이된 것을 확인하였다(그림 1-19, 1-20).

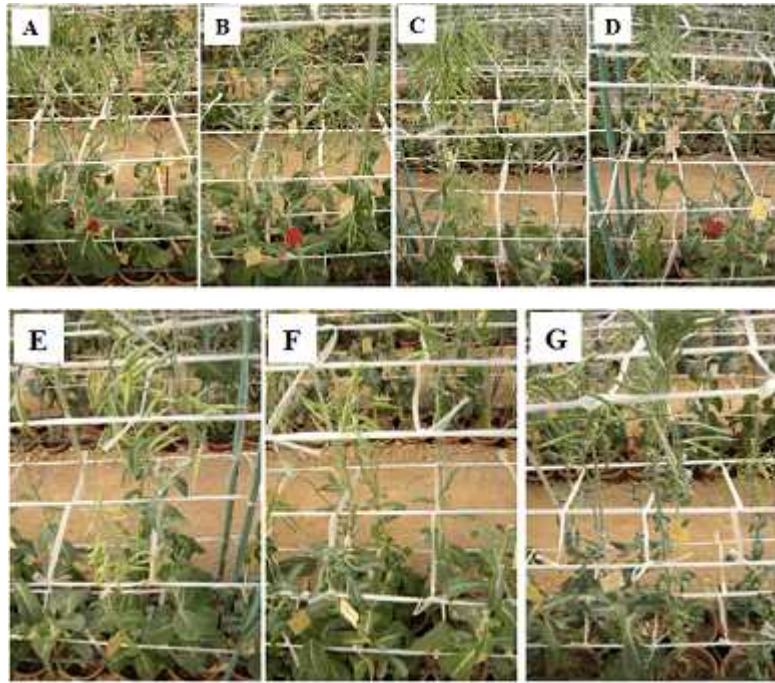


그림 1-18. A line 양배추 육성을 위한 BC₂F₁ 종자확보(2012. 6. 28). A: #1926; B: #1928; C: #1930; D: #1932; E: #1934; F: #1936; G: #1938



그림 1-19. NWB-CMS A line 육성을 위한 BC₂F₁ 세대의 재배 모습. A: 양배추; B: 브로콜리; C: 컬리플라워



NWB-CMS1

그림 1-20. 양채류 육성 계통의 무NWB-CMS 특이적인 마커 분석(BC_2F_1). 1-2: 양배추 B lines; 3-8: 양배추 NWB-CMS lines; 9-10: 브로콜리 B lines; 11-16: 브로콜리 NWB-CMS lines; 17-18: 컬리플라워 B lines; 19-24: 컬리플라워 NWB-CMS lines; 25-26: NWB-CMS 무 27-28: 양배추 inbred B lines.

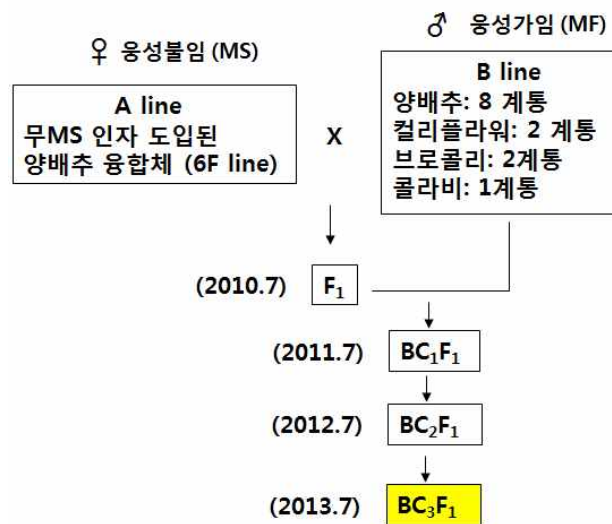


그림 1-21. NWB-CMS 인자가 도입된 양배추와 양배추를 포함한 양채류 간의 BC를 통한 계통육성 모식도. 2013년 7월 BC_3F_1 종자 확보

6. NWB-CMS 양채류 계통 육성의 신유전자원 개발 특허 출원 및 등록

본 연구과제와 관련하여 수년간 무의 CMS 인자를 양배추로 전이시켜 NWB-CMS 마커 분석과 화기검정을 병행하고, 원예적 형질을 비교하여 융합모본 양배추와 가장 유사한 MS 양배추 융합체를 선발하였다. 선발된 MS 융합체와 양배추를 포함한 브로콜리, 컬리플라워, 콜라비에 교배하여 BC_2F_1 세대의 특성검정이 완료되었으며, 이러한 결과에 대하여 2012년 3월 21일 “세포질 융성불임성을 가지는 NWB-CMS 양채류 식물체 및 이의 용도” 로 특허 출원하였으며, 2013년 10월 11일 등록되었다(그림 1-22). 본 특허는 과거 20년전 여러 다국적 종자기업에서 특허를 낸 것과 차별성이 있는 성과로 2013년 1월 21일 PCT 특허를 출원 및 미국에 등록되었다(그림1-23, 24).



특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-1319265 호 (PATENT NUMBER)	출원번호 (APPLICATION NUMBER)	제 2012-0028632 호
	출원일 (FILING DATE:YY/MM/DD)	2012년 03월 21일
	등록일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD)	2013년 10월 11일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)
세포질 융성 불임성을 가지는 NWB-CMS 양채류 식물체 및 이의 용도

특허권자 (PATENTEE)
농업회사법인 주식회사 농우바이오(130111-0*****)
경기도 수원시 영통구 중부대로368번길 8-12 (매탄동)

발명자 (INVENTOR)
등록사함에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록
되었음을 증명합니다.

(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN
INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2013년 10월 11일



특 허 청 장 김 영
COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE



인자등록료 납부일은 출원등록일 이후 4년차부터 매년 10월 11일까지이며 등록원부로 권리관계를 확인바랍니다.

그림 1-22. 세포질 융성불임성을 가지는 NWB-CMS 양채류 식물체 및 이의 용도로 특허 출원(2012년 3월), 등록(2013년 10월)

PCT 출원서

출력(전자적 형태가 원본)

0	수리권청 전용	
0-1	국제출원번호	
0-2	국제출원일자	
0-3	수리권청 명칭 및 "PCT 국제출원"	
0-4	서식 PCT/RO/101 - PCT 출원서	
0-4-1	우측에 기재된 바와 같이 작성되었다.	PCT-SAFE 버전 3.51.057.233 MT/FOP 20130101/0.20.5.20
0-5	신청 아래 서명인은 본 국제출원서가 특허협력조약에 의해 처리될 것을 정중합니다.	
0-6	출원인이 지정한 수리권청	대한민국 특허청 (RO/KR)
0-7	출원인 또는 대리인의 서류참조기호	PCT13001
I	발명의 명칭	세포질 융성 불임성을 가지는 NWB-CMS 양채류 식물체 및 이의 용도
II	출원인	
II-1	이 사람은	오직 출원인 (applicant only)
II-2	우측 지정국에 관한 출원인	모든 지정국 (all designated States)
II-4ko	설명	농업회사법인 주식회사 농우바이오
II-4en	Name:	NONG WOO BIO CO., LTD
II-5ko	주소	대한민국 443-370 경기도 수원시 영통구 중부대로 368번길 8-12
II-5en	Address:	8-12, Jungbu-daero 368beon-gil Yeongtong-gu, Suwon-si Gyeonggi-do 443-370 Republic of Korea
II-6	국적	대한민국 KR
II-7	거주국	대한민국 KR
II-8	전화번호	+82-31-883-7055
II-9	팩스번호	+82-31-884-7065
II-11	출원인 코드	1-1995-002945-3

그림 1-23. 세포질 융성불임성을 가지는 NWB-CMS 양채류 식물체 및 이의 용도로 PCT 특허 출원 (2013년 1월)

Electronic Acknowledgement Receipt	
EFS ID:	20195232
Application Number:	14386701
International Application Number:	PCT/KR2013/000448
Confirmation Number:	1094
Title of Invention:	NWB-CMS BRASSICA GLERACEAHAMING CYTOPLASMIC MALE STERILITY AND USE THEREOF
First Named Inventor/Applicant Name:	CheeHark HARN
Customer Number:	89340
Filer:	Jong Hyun Park
Filer Authorized By:	
Attorney Docket Number:	P50014.GR05
Receipt Date:	19-SEP-2014
Filing Date:	
Time Stamp:	174.559
Application Type:	U.S. National Stage under 35 USC 371

Payment information:

Submitted with Payment	yes
Payment Type	Credit Card
Payment was successfully received in RRM	\$740
RRM confirmation Number	4407
Deposit Account	
Authorized User	

File Listing:

Document Number	Document Description	File Name	File Size(Byte s)/ Message Digest	Multi Part / zip	Pages (if appl.)
-----------------	----------------------	-----------	--------------------------------------	------------------	------------------

그림 1-24. Plant body of NWB-CMS western vegetables having cytoplasmic male sterility and use thereof로 미국 특허 등록, U.S. National Stage under 35 USC 371(2014년 9월)

(4년차)

7. 양배추 융합체 개발 및 양채류 계통으로 세대진전

4차년도 연구에서는 양배추 8계통, 브로콜리 2계통, 컬리플라워 1계통 BC₃F₁ 종자를 파종하여 MS 형질을 확인하였고, 개체별 4개체를 선발, 세대진전하였으며, 2014년 7월에 BC₄F₁ 세대종자를 확보하였다 (그림 1-24).

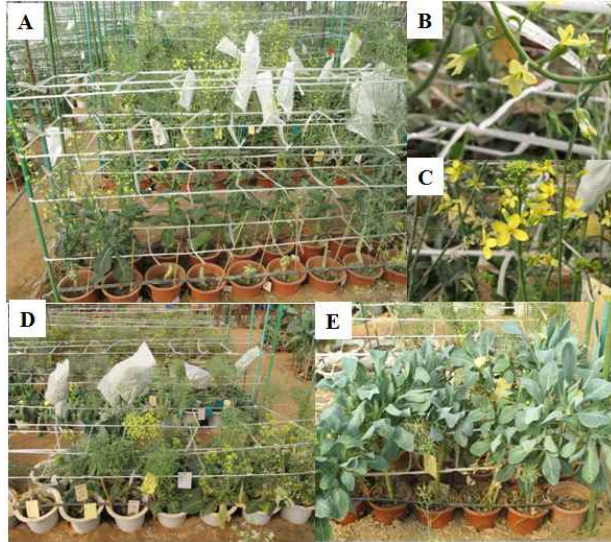


그림 1-24. NWB-CMS A line 육성을 위한 BC₃F₁ 세대의 재배 모습(2014. 4. 25). A: 양배추 B: 양배추 NWB-CMS; C: 양배추 MF; D: 브로콜리 E: 컬리플라워

(5년차)

8. 양배추 융합체 개발 및 양채류 계통으로 세대진전

5차년도 연구에서는 양배추 8계통, 브로콜리 2계통, 컬리플라워 1계통 BC₄F₁ 종자를 파종하여 균일한 특성을 확인하고, 저온 재배를 통하여 교배를 진행중에 있으며(그림 1-25), 2015년 7월에 BC₅F₁세대 종자를 확보하였다. 향후 원예적 형질 (모본 BC line과의 유전적 균일도)과 비교하여 모계계통으로 표현형 및 유전형 검사를 진행하여 모계로 활용하고자한다.

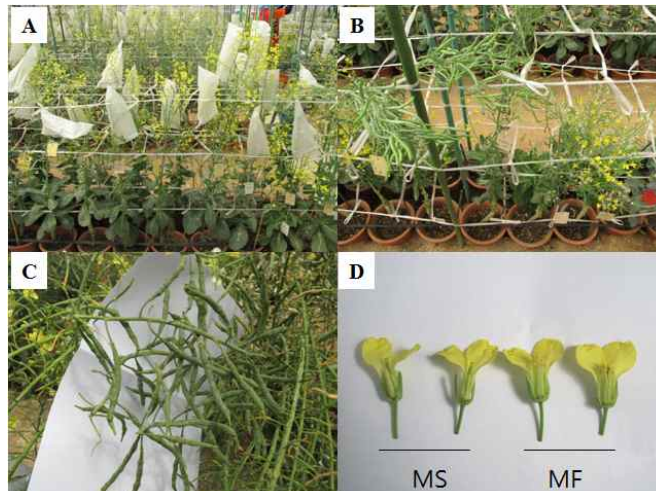


그림 1-25. NWB-CMS A line 육성을 위한 BC₄F₁ 세대의 재배 모습(2015. 4. 28). A: 양배추 교배 진행 B: 양배추 CMS #5063, #5067 C: 브로콜리 #5014 교배 D: CMS #5062(MF: 웅성가임), #5063(MS:웅성불임)

NWB-CMS 양배추, 브로콜리 A 모계 계통에 이용된 B line은 다음과 같다.

가. 양배추 S962: 조생계로 구색(청기강하고, 안토시안 없음)우수하며, 구정형성 및 구내부 엽 배열 우수한 특징



나. 양배추 SV8: 극조생계로 구비대력 우수하며 내서성, 내습성 우수한 특징



다. 양배추 1787: 극조생계, 조기 결구력 우수하며 추대 안정 엽중형 특징



라. 양배추 AD6407: 조생계, 내병성 없으나, 청기 광택, 안토시안 FREE등 고품질계 구내부 황색, 내부 긴도, 엽 배열등 탁월한 특징



마. 양배추 AD6302: 조생계, 비대력이 우수하면서 초형과 구내부 배열이 우수, 특히 추대고 안정, 안토시안 FREE 특징



바. 양배추 SBP: 인도등 서남아용조생계, 위황병저항성과 흑부병 중도 저항성-고온 다습 기후 재배 적합 계통



사. 브로콜리 NU333: 안토시아닌 Free계통, 구정형성이 우수한 조생 모계, 무측지, 초자 입성 특징



9. 양배추 NWBCMS 인자 도입 세포융합 종합적 결론

무 형질 NWB-CMS 인자의 양배추로 전이된 융합체를 선발하여 CMS 양배추를 개발하였다. 이후 융합체와 양채류 계통 간 교배를 통하여 NWB-CMS 융성불임 인자가 안정적으로 유지 및 발현되는 것을 확인하였고, 양채류 작물에 새로운 종류의 NWB-CMS 계통을 성공적으로 선발하였으며, 양배추, 브로콜리, 컬리플라워의 다양한 우수 B line 계통과 backcross함으로서 양채류 MS 모계계통 육성 전반에 활용하고 있다. 콜라비는 BC₂ 세대 계통 확보하였다.

향후 양배추와 브로콜리의 모계 계통 육성을 위해 육성가의 판단으로 추가 BC세대 진행할 예정이며, 각 계통별로 고정정도에 따라서 A line이 완성되면, 각각 모본 B line과 A line의 형태적 유사도와 종자 생산성을 검정하며, 3-4년내로 품종화를 위해서 세대진전 및 조합작성을 진행하여 NWB-CMS 모계친을 이용한 양배추 품종화를 기대한다.

제2절 비대칭 핵치환에 의한 우수인자 도입 당근의 융합체 선발

(1년차)

1. 우수 도입종 당근을 이용 다양한 B line 소재 개발을 위한 세포융합

국내 당근 F₁ 품종 시장은 여전히 수입 의존도가 90% 이상으로 매우 의존도가 높다. 특히 유럽의 신젠타와 일본 다끼사의 우수한 품종력으로 국내 종자회사의 시장진입이 어려운 형편이다. 또한 수십년의 육성연구를 통한 기술력을 바탕으로 MS F₁ 품종을 개발, 시장을 석권하고 있는데 MS F₁은 꽃가루를 만들지 않기 때문에 육성자원으로 사용할 수 없다. 즉 선두 업체는 지적재산권을 보호하고자 MS 품종을 만들어 우수한 인자의 분리 육종을 막고 있는 것이다. 특히 우수한 품종의 경우 100% MS F₁ 품종을 출시하기 때문에 일반적인 육종 방법으로는 MS F₁ 품종을 이용하여 우수한 인자를 도입할 수 없으며, 일부 회복친으로 교배한다 하더라도 후대가 또 MS가 출현하여 유전자원 확보가 매우 어려워 당근의 경우 후발 업체의 품종 경쟁력에 한계가 있다.

또한 당근 육성에 고품질, 고순도의 모계 및 부계 육성이 필요하다. 우수인자의 다양한 B line 소재 개발은 경쟁력을 확보하는데 중요하며 A line과 B line의 순도가 같아야 품종의 순도가 안정적일 수 있다. 현재 현행 육종기술로는 고순도, 고품질의 교배종 육성을 할 수 없기 때문에 세포융합 방법을 이용하고자 하였다. 우수인자 F₁ 도입종을 핵치환하여 선발한 다음 유전적으로 고정함으로써 다양한 계통의 신유전자원 확보가 가능하며 이런 우수 소재를 이용하여 개발하면 향후 국내시장과 고가의 해외수출용 당근 품종개발을 기대할 수 있다.

2. 핵치환 당근 융합 시스템 구축 및 융합체 선발

비대칭 양배추 세포융합방법을 응용하여 당근의 융합시스템을 구축하였다. 당근의 우수형질의 도입품종F₁에 화학처리로 세포질을 불활성화시키고, 세포질 정상의 NW 당근의 핵을 γ -선을 이용하여 불활성화시켜 전기적 융합으로 도입 F₁ 품종의 핵과 정상 세포질을 갖는 새로운 B line을 확보를 목표로하였다(그림 2-1). 본 연구에 사용한 도입품종인 S당근은 근색이 매우 진한 특성으로 상품성이 뛰어난 품종이다. 따라서 도입품종의 S당근의 유전자원을 B line으로 활용하기 위하여 세포융합을 시도하였다. 융합체의 세대는 C(Cybrid generation)으로 표기하였다.

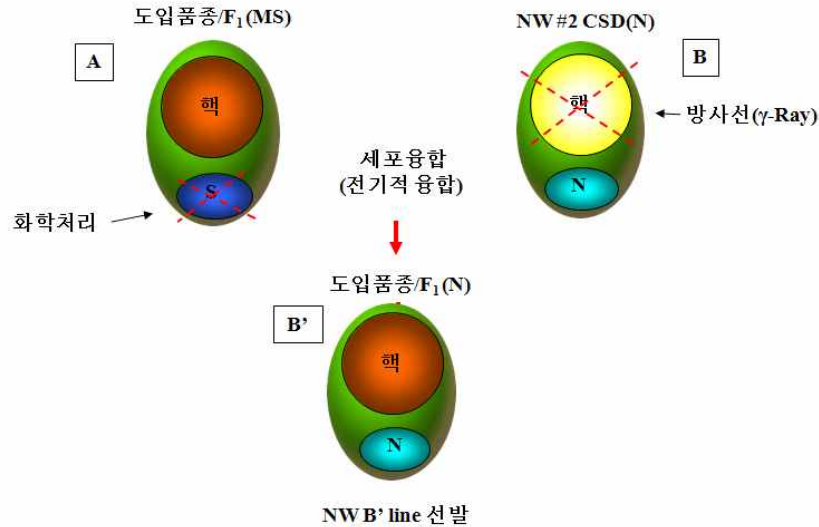


그림 2-1. 당근 세포 융합시스템 모식도. MS: Male Sterility; N: Normal(Male fertility)

비대칭 세포융합을 통하여 S당근 핵과 NWCSD당근 세포질을 갖는 융합체를 선발하였다. 융합세포주를 선발하고 계대배양을 통하여 유식물체로 재분화 시켜서 ziffy pot으로 순화하였다(그림 2-2).

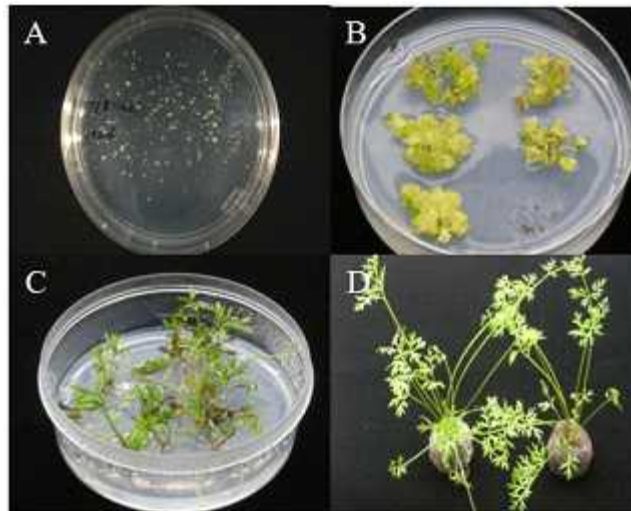


그림 2-2. 도입종 S당근과 NWCSD 계통간 비대칭 세포융합을 통한 융합체 생산. A: Colonies formed 6 weeks after cell fusion; B: 9 weeks; C: 16 weeks D: 24 weeks

각각 선발된 융합체 세포주와 당근 유식물체를 핵구분 마커(GSSR#39)와 세포구분 마커(STS#39)를 이용하여 검정하였다. 핵구분 마커는 도입종 S당근의 2개 밴드 패턴을 보이는 융합체와 세포질구분 마커에서 1.5kb의 밴드 패턴을 함께 보이는 개체를 선발함으로써 도입품종 핵과 정상 세포질 웅성가임(N) 융합체만을 선발하여 총 163점을 확보하였다(그림 2-3, 표 2-1).

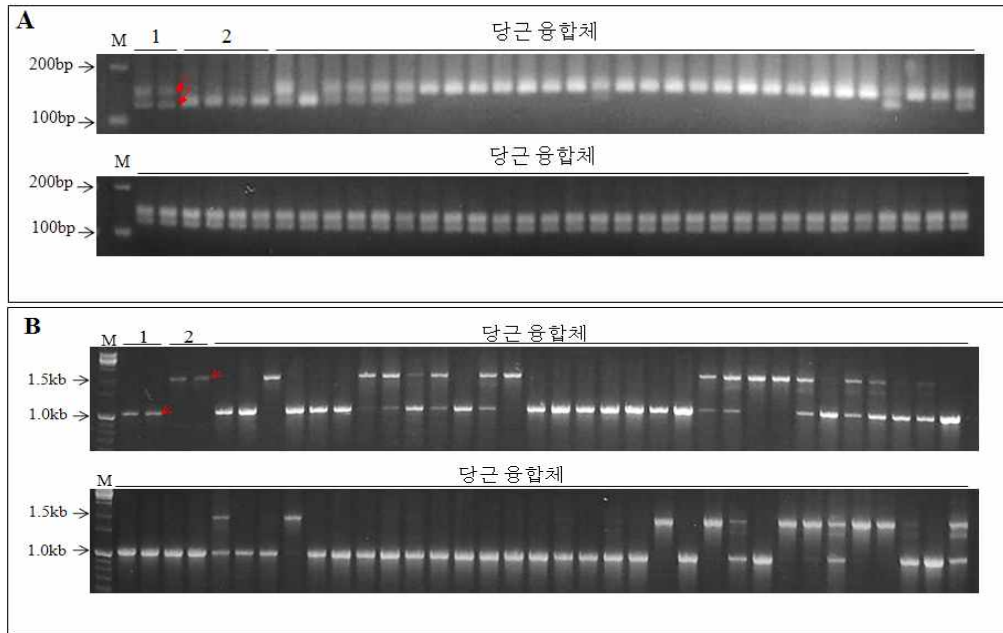


그림 2-3. 당근 융합체의 마커 분석. A: 핵구분 마커(GSSR#39); B: 세포구분 마커(STS#39). 1: S당근 (MS), 2: NWCSD당근(N). MS: Male Sterility; N: Normal(Male fertility)

표 2-1. 당근 융합체의 확보현황

Genotype	순화개체수
S당근 핵 + 세포질 N	163
S당근 핵 + 세포질 (N/MS)	16
S당근 핵 + 세포질 MS	36
합 계	215

마커 검정으로 선발한 식물체를 순화하여 추대를 위한 저온처리를 4℃에서 70일간 처리하여(그림 2-4) 육성하우스로 이식하여 재배하였다(그림 2-5).



그림 2-4. 당근 융합체의 추대를 위한 저온 처리 모습



2-5. 당근 융합체 C₀의 육성하우스 이식 후 재배 모습

3. 당근 융합체의 화기분석 및 자가수분

저온처리가 완료된 융합체는 추대를 통하여 개화가 진행되었다. 정상적인 응성가임 Normal(MF) 당근은 2개의 수술이 형성되며 화분이 관찰되는 반면에 응성불임인 MS 당근에서는 응성기관인 수술이 꽃잎으로 완전히 바뀌어 petaloid type의 MS를 나타낸다. 따라서 육안으로 정상화분과 MS를 쉽게 구분할 수 있었다(그림 2-6).



그림 2-6. 응성가임의 정상적인 N(MF) 당근과 응성불임(MS)당근의 화기 비교

세포질과 핵구분 마커를 통하여 선발된 융합체는 추대를 통하여 정상적인 화분발달로 응성불임이 회복된 것을 확인하였다. #115-4 융합체는 화분이 생성 되었으며 #101-3 융합체는 개화한 꽃 전체에서 수술의 발달을 확인하였다(그림 2-7).



그림 2-7. 임성이 회복한 #115-4, #101-3 융합체의 수술 발달 모습

수술의 발달이 확인된 융합체는 케이지를 씌우고 20-30여 마리의 파리를 이용하여 자가수분 시켰다. 파리를 이용한 교배 후 배가 발달하고 #101-1, #115-4, #116-2의 교배 완료 후 성숙 종자의 겉표면에는 침모양의 조직이 생겨나서 종자가 정상적으로 발달하는 것을 확인하였다(그림 2-8).

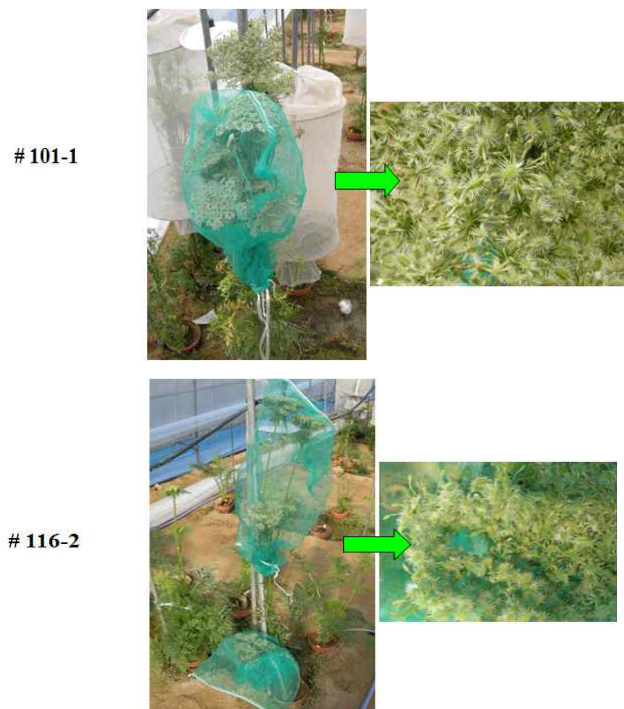


그림 2-8. 임성이 회복한 #101-1, #116-2 융합체의 교배 완료 후 종자 발달 모습

4. 임성 회복한 당근 융합체의 후대검정(1차재배시험)

임성이 회복한 당근 융합체는 정상적인 종자 발달 과정으로 12개체의 종자를 확보하였다. 이중에서 #115-4에서 확보한 종자는 S당근 대조구와 함께 2010년 11월에 육성 하우스에 파종하여 겨울 동안 재배하면서 성능검정을 진행하였다(2-9). 나머지 계통에 대해서는 후대 종자확보가 쉬운 가을 작형을 고려하여 2011년 7월에 파종 하여 검정하였다.



그림 2-9. #115-4 C1의 육성하우스 재배 모습. C: Cybrid generation

융합체 #115-4 C1 세대를 파종하여 정상적인 발아개체 49 개체에 대하여 핵구분 마커와 세포질구분 마커로 검정하였다. 핵구분 마커(GSSR#39)의 경우 S당근과 NWCS D 당근의 밴드 패턴 이외의 밴드가 관찰됨으로 핵내에서 재조합이 일어난 것을 간접적으로 확인할 수 있었다. 또한 세포질 구분 마커(STS#39)의 경우는 #115-4 C₁ 세대 49개체 모두에서 정상적인 세포질 인자로 회복된 것을 확인하였다(그림 2-10).

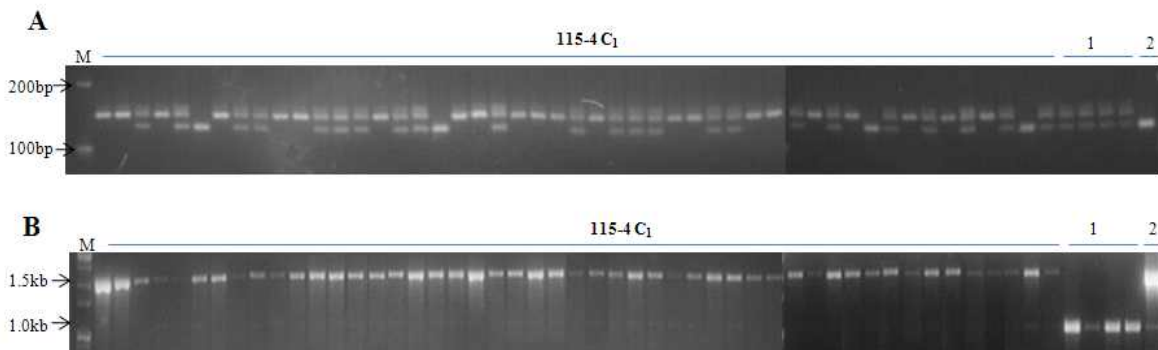


그림 2-10. 당근 융합체 #115-4 C1세대의 마커 분석. A: 핵구분 마커(GSSR#39); B: 세포구분 마커(STS#39). 1: S당근(MS), 2: NWCS D 당근(N). MS: Male Sterility; N: Normal(Male fertility)

1차 재배시험은 2010년 11월에 파종하여 2011년 5월 17일 융합체를 수확하였으며, 근형과 근색 등의 원예적 특성을 조사하였다. 재배기간이 180일로 매우 길었음에도 전체적으로 근비대력이 약한 모습이였다. 융합체는 S당근에 비교해서도 근 비대가 불량하였으며, 형태적으로도 다양한 크기와 모양으로 불안정한 모습을 나타냈다(그림 2-11). 그러나, 수확한 당근을 절단하여 S당근과 #115-4 융합체, NW당근과 근색을 비교한 결과 정상적인 근비대력은 보여주지 못했지만 S당근과 매우 유사한 근색을 보여줌으로서 유전자원으로 가능성을 보여주었다(그림 2-12).



그림 2-11. 융합체 1차 재배 시험 수확 후 근형 비교(180일). A: #115-4 C₁ ; B: S당근



그림 2-12. S당근과 #115-4 C₁ 수확 후 근형 비교 모습(180일)

따라서 1년차 우수인자를 가진 도입종 S당근의 핵치환 융합체를 개발 하였고, 자가수분을 통하여 후대 종자 성공적으로 확보하였으며, #115-4 C₁ 세대 각각의 당근개체에서도 마커 분석으로 임성이 회복된 것을 확인하였다. 향후 이 집단의 근형과 개체별 분리 정도를 확인하여 선발함으로써 성공적으로 우수인자의 B line 계통 자원을 유도하였다.

(2년차)

5. 핵치환 당근 융합시스템 구축 및 융합체 선발 및 세대진전

세포융합에서 핵의 genome을 불활성화시키기 위해서 γ -선을 0-1000Gy 까지 조사하였을 때 미토콘드리아 genome size가 매우 작고 여러 copy를 가지고 있어 영향이 없거나 미미한 것으로 알려져 있다. 당근의 경우 핵 genome size는 470Mb이며 미토콘드리아 genome size는 255Kb로 약 1800배의 차이가 난다. 또한 핵 genome을 불활성화 시킬 수 있는 γ -선 조사선량을 스크리닝하여 100% 치사 선량

을 선정하여 융합하였다. 이후 정상적인 융합체의 발달이 미토콘드리아 DNA가 불활성화되지 않았다는 간접적인 증거가 되었다.

1년차 연구에서 사용한 도입품종인 S당근은 근색이 매우 진하고 균일한 특성으로 상품성이 매우 뛰어난 품종이다. 따라서 도입품종의 S당근의 유전자원을 B line으로 활용하기 위하여 비대칭세포융합 방법으로 총 163점의 융합체를 선발하였다. 선발된 융합체를 순화하여 재배하우스로 이식한 후 75일간 저온 처리하면서 추대를 유도하였다. 당근 융합체는 추대과정을 거쳐 화기모습을 검정하였다. 총 163점 중 수술이 정상적으로 발달한 30여 융합체는 케이지를 씌우고 사육한 과리 20-30마리를 이용하여 자가수분시켰다. 일부는 임성을 회복되었으나 교배과정에서 온전하게 종자의 생성과정에서 퇴화되는 경우가 발생하였고, 총 12개체의 C₁(Cybrid 1 generation)세대의 종자를 확보하였다, 확보된 종자는 1, 2차 재배시험으로 나누어 진행하였다(표2-2).

- 1차 재배시험: 2010년 11월5일 파종, 2011년 5월 17일 수확(1년차 수행)
- 2차 재배시험: 2011년 7월 15일 파종, 2011년 11월 14일 수확

표 2-2. 융합체를 자가수분시켜 확보된 C₁ 종자 현황

개체 번호	교배정도 (상, 중, 하)	C ₁ 종자 확보	비고 (재배시험)
93-6	중	60	2차
101-1	상	80	2차
101-3	하	10	2차
101-5	상	70	2차
106-1	상	135	2차
115-1	상	156	2차
115-4	상	120	1차
115-5	상	350	2차
116-2	상	70	2차
04-2	하	5	2차
423-1	하	5	2차
02-3	하	3	2차

163점 중 일부 개체에서는 수술이 정상이나 꽃가루 형성이 되지 않는 개체가 있었으며, 또는 꽃가루는 형성되나 2-3일 안에 활력을 잃는 개체 등 종자를 확보할 수 없었다. 또한 마커상으로 핵구분마커와 세포질구분마커를 통해 융합체로 판단된 개체들 중에서 #72, #92, #1003, #1005, #105 등 개체에서는 전형적인 petaloid MS와는 다른 형태의 화기구조 개체도 발견되었다. 이런 현상들은 세포융합체로 형성되는 과정에서 다양한 somaclonal variation의 영향을 받은 것으로 판단 된다(data 미제시).

당근 융합체의 선발 효율은 163점 중 12점이 최종 선발되어 7%의 효율을 보였으며, 감마선이 조사된 처리구와 미토콘드리아 DNA를 불활성화시킨 IOA 처리구의 불안정성과 배양과정 중의 변이등의 영향으로 재분화된 식물체의 초형과 근형, 절간의 변이 등 다양한 변이체가 나타났기 때문에 정상적인 융합체 선발의 효율이 7%이지만, 우량 유전자원의 활용 여부에는 관계가 없기 때문에 선발효율은 문제되지 않았다.

2차 재배시험은 나머지 융합체에 대해 2011년 7월에 파종하여 2011년 11월에 수확하는(120일간 재배)

정상적인 작형으로 실시하였다(표 2-2, 그림 2-13). 1차 재배시험에 비하여 S당근과 NW당근 모두 정상적인 근 비대력을 보임으로서 품종 자체의 근형과 융합체를 비교함으로써 크기와 형태, 그리고 근색에 대한 정확한 평가를 하고자 하였다.



그림 2-13. 2차 재배시험 육성하우스 모습(2011년 11월). A: S당근; B: 융합체 C₁; C: 융합체 C₁ 수확 모습(120일).

2차 재배시험에서는 융합체 11계통을 과중한 결과 발아율이 40-90%로 다양하게 나타났으며, 초형에 있어서도 절간과 잎의 분지 형태 등이 짧고 긴 형태 등 3-4 그룹으로 나누어지는 모습을 보였다. #101-5, #106-3, #115-5 융합체는 발아율이 80% 이상 높게 나타났으며 근 비대력도 양호하게 나타났다. 또한 S당근 융합체를 자가수분하였기 때문에 표현형으로 F₁ 품종이 자가교배되어 F₂ 분리 집단의 분리 범위를 예상할 수 있는데, 실제로 근형이 작고 가는 형태와 중간 형태, 크고 긴 형태까지 다양하게 분리되는 것을 확인하였다(그림 2-14A). 또한 수확한 당근의 내부 근색을 비교한 결과 #2(N) 계통의 관다발 조직의 흰색 띠가 선명하게 관찰되는 반면에 #1의 S당근과 #3의 융합체 근색은 균일하게 진한색소로 매우 유사하였다(그림 2-14B).

S당근(F₁)의 융합체인 C₁ 당근 종자는 실제 F₂ 종자 핵형과 같은 유전적 분리집단으로 예상되기 때문에 유용한 유전자원확보가 중요한 단계이며, 구체적인 수량성이나 생육 특성 보다는 근의 형태와 근의 길이 등이 다양하게 분리가 되고 있는나와(그림 2-14A), 우량형질인 진한 근색의 원예형질을 나타나는지는 먼저 조사하였으며(그림 2-14B), 구체적인 포장 성능검정은 세대진전과 함께 고정하고 있다.

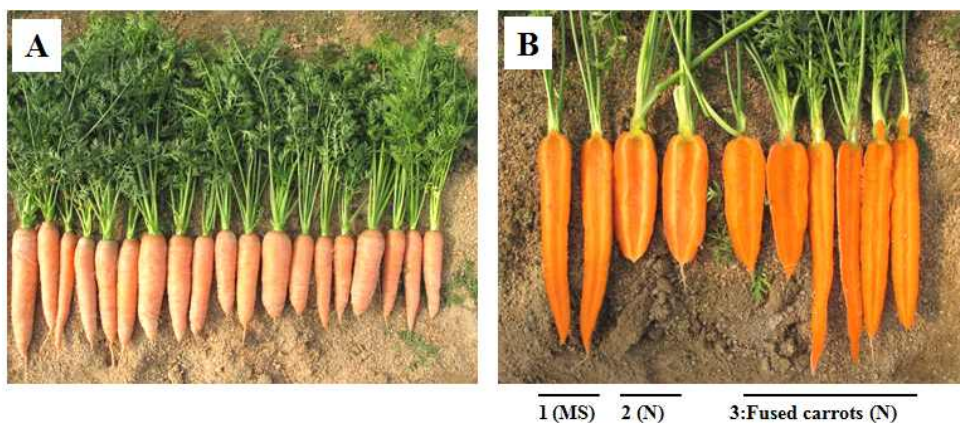


그림 2-14. 2차 재배시험을 통하여 수확 후 근형 및 근색의 비교 모습. A: 융합체 C₁의 근형 및 크기별로 분리; B: 각 계통별 당근내부색의 비교, #1(MS): S당근, #2(N): NW당근(N), #3: 융합체 C₁ 개체.

MS: Male Sterility, N: Normal(Male Fertility)

선발된 C₁ 융합체는 크기와 형태별로 선발하였으며(그림 2-14A), C₂ 종자를 확보하기 위해 pot에 이식하여 70일간 저온처리 후 육성 하우스로 이식하여 재배 중이며 2012년 5월 중순 이후 MS 화기의 육안 재검정과 교배를 통하여 세대진전을 실시하였다(그림 2-15).



그림 2-15. 1차 재배 시험에서 선발된 S당근 15개체 C₁ 융합체 추대 모습(2012.4.21)



그림 2-16. 선발된 당근 융합체 C₁의 교배를 위해 케이지를 설치(A)하고, 임성을 확인하여(B) 자가수분을 진행(2012. 5. 10)

임성이 확인된 C₁ 융합체는 꽃가루의 활력이 정상적 발달하였으며 파리를 이용한 자가수분에서 매우 양호한 종자 형성을 확인하여 #2549, #2551 처럼 성공적으로 융합체의 C₂ 종자를 확보하였다(그림. 2-17).



그림 2-17. 선발된 당근 융합체 #2549, #2551 C₁의 성공적인 교배 모습

우수형질 S당근의 핵치환 세포융합은 두차례 실시된 재배시험에서 근형과 근색, 개체별 분리정도를 확인하였다. 따라서 세포융합 기술로 우수인자가 함유된 새로운 B line 계통을 성공적으로 개발하여 새로운 육종소재로 활용할 수 있게 되었으며 고정과정의 계통 육성을 계속 진행하였다.

6. JB당근 핵치환을 통한 새로운 B line 확보

도입종 JB당근을 B line에 핵치환하여 융합체를 선발하고, 새로운 B line의 유전자원으로 활용하고자 하였다. 확립된 당근 융합시스템을 활용하여 JB당근을 화학처리하여 세포질을 불활성화시키고, 세포질 정상인 NW당근(농우바이오 B 계통)의 핵을 γ -선으로 조사시킨 다음, 전기적 융합으로 도입 JB당근의 핵과 정상 세포질을 갖는 융합체를 선발하였다. JB 융합체를 선발하기 위하여 JB 당근과 세포질 공여체인 NW당근의 핵 구분 마커 5점을 개발하였고, 세포질 구분 마커는 기존에 개발된 STS#4 마커를 이용하였다(그림 2-18).

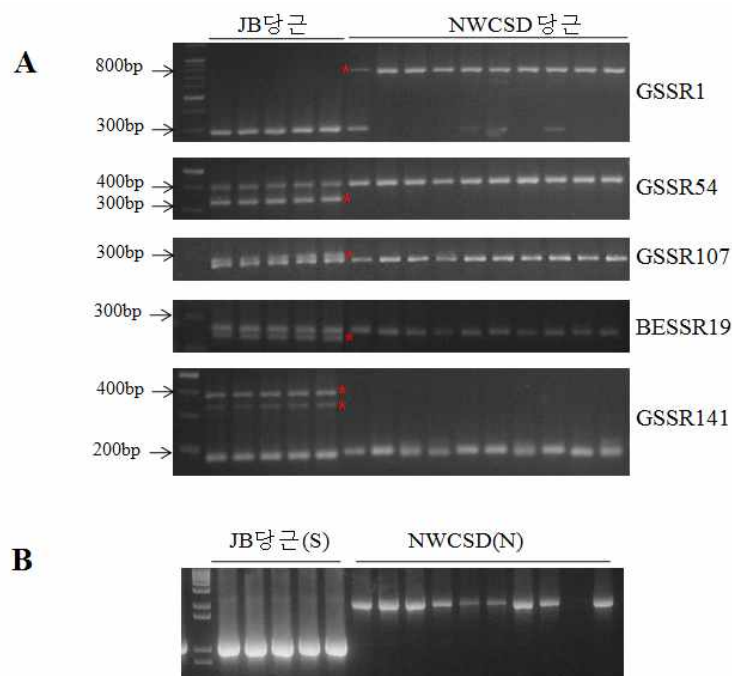


그림 2-18. JB당근과 NWCSD의 핵구분 및 세포질 구분 마커개발. A: 핵구분 마커; B: 세포구분 마커 (STS#4, JB당근(MS), NWCSD당근(N). MS: Male Sterility; N: Normal(Male fertility))

JB 융합체를 선발하여 캘러스 증식상태에서 핵구분 마커는 GSSR#54와 STS#4 2종류 마커를 이용하여 검정하였다. 융합체 #13은 융합 효율이 매우 높아서 대부분 JB 당근의 핵을 가지면서 정상세포질을 갖는 융합체가 많았으며, 세포질이 MS/N가 혼재된 Mix type도 관찰되었다(그림 2-20). 융합체로 선발된 세포주는 재분화시켜서 순화과정을 거쳐 육성하우스로 이식하여 재배하였다. 영양생장을 통해 근의 비대가 이루어진 후 4℃의 저온 재배기를 거쳐 추대를 유도하였다(그림 2-19). 화기 구조의 발달 직전으로 2012년 5월 중순 이후 육안 검정을 통하여 선발하였고 세대진전하였다.

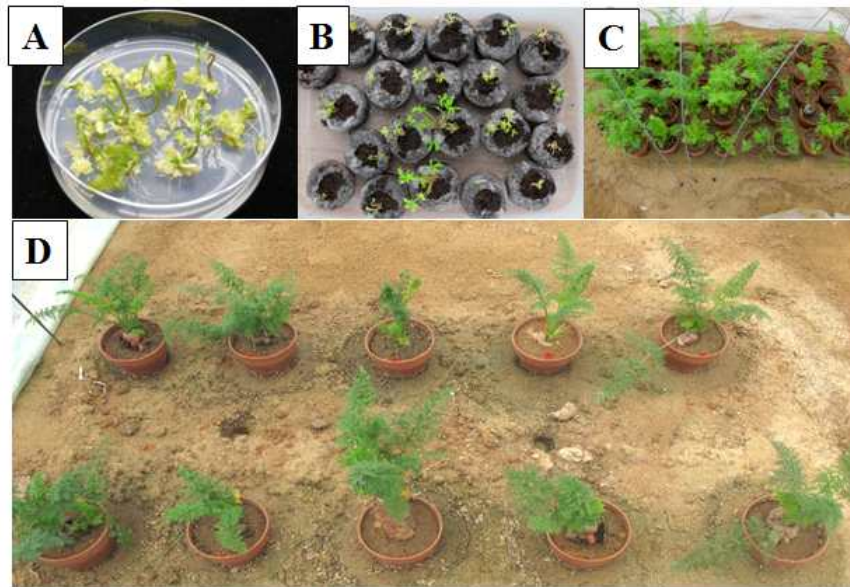


그림 2-19. JB 융합체 선발. A: 융합체의 재분화; B: 융합체 순화; C: 융합체 하우스 이식 재배(저온처리전); D: 융합체의 저온재배 후 추대 유도

2년차에서 우수형질 JB당근의 핵치환 C₀ 세포융합체를 32개체를 선발하여 각각 선발된 개체에 대하여 저온처리 후 추대를 유도하였으며, 임성 확인 하고 자가수분을 진행하였다. 또한 S당근과 더불어 JB 당근의 새로운 B line 으로 사용하기 위해 개체별 세대진전을 수행하였다.

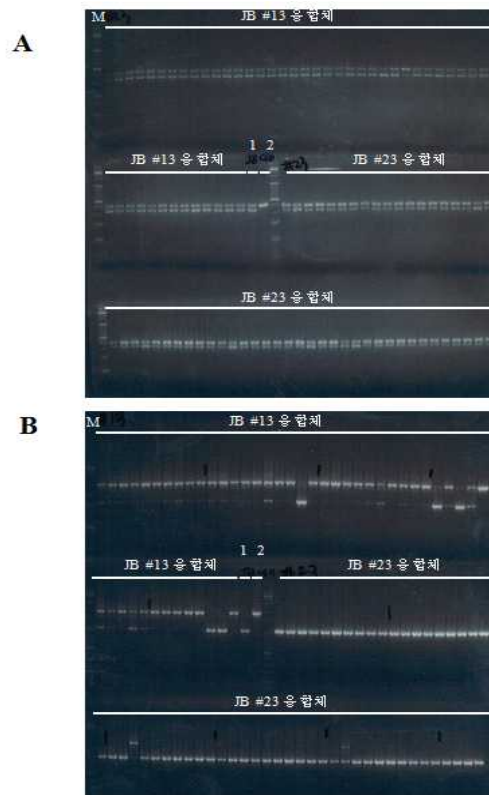


그림 2-20. JB당근과 NWCS의 핵구분 및 세포질 구분 마커 검정. A: 핵구분 마커(GSSR#54); B: 세포구분 마커(STS#4) JB #13 융합체, JB #23 융합체, 1: JB당근(MS), 2: NWCS당근(N). MS: Male Sterility; N: Normal(Male fertility)

(3년차)

7. S당근 융합체 선발 및 C2 종자 16 계통 성능 검정 및 세대진전

3년차 연구에서 확보된 16점 계통을 파종하여 재배시험을 실시하였다(그림 2-21). C₁세대에서 근형과 근장의 크기별로 선발된 모본 당근은 각각 자가수분을 통하여 세대진전시켰으며, C₂세대의 재배시험을 통해 원예적 형질 및 근색의 특성이 검정하고자하였다.

선발된 C₂ 세대 재배시험은 2012년 7월 10일에 파종하여 2012년 11월 15일에 당근을 수확하여 분석하였다. 총 16 계통의 시험결과 근형태와 근색에 따라 단형, 중형 장형의 3 type으로 선발하였고, 각 그룹별로 근형의 분리 정도가 안정된 계통 위주로 #3537, 3539, 3540 선발하였다(그림 2-22). 선발된 계통은 S 당근의 우수형질인 진한 근색을 나타냄으로서 성공적으로 유전자원을 확보하였다.



그림 2-21. 핵치환 융합체 C2 세대의 재배시험시 생육모습. A:#3537; B:#3540

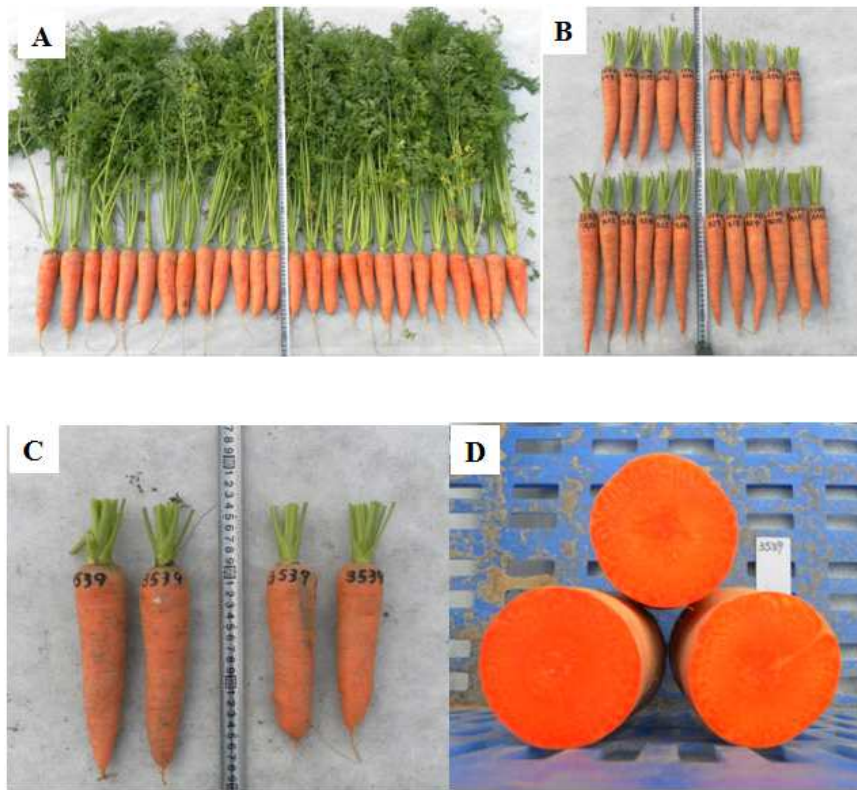


그림 2-22. 핵치환 융합체 C2 세대에서 근형의 크기에 따라 短, 中, 長形의 3 계통 선발. A: #3537; B:#3540; C:#3539; D:#3539

근색이 우수한 S당근은 세포융합 후 C₂세대까지 전개되면서, 형태 및 근장의 길이별로 계통을 선발할 수 있었다. 선발된 각 계통은 모근 별로 자가수분으로 세대진전 하여 C₃ 종자를 확보하였다(그림 2-23).

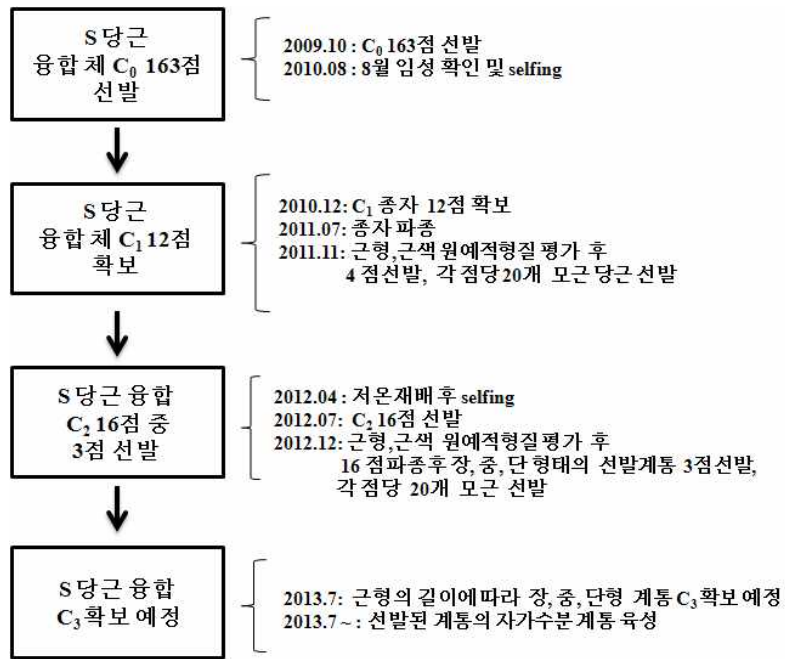


그림 2-23. S당근의 세포융합을 통한 계통 선발 과정 모식도

(4년차)

8. S당근 융합체 선발 및 C₃ 종자 33 계통 성능 검정 및 세대진전

4년차 연구에서는 확보된 33계통의 종자를 2013년 7월에 파종하여 가을 작형 재배시험을 진행하였으며, 2013년 11월에 수확하여 근형별로 분리 작업을 실시하였다(그림 2-24). 각각 계통을 비교 평가한 결과 전체적으로 C₃ 세대 융합체는 C₂ 세대보다 근형의 균일성이 매우 좋아졌으며, 근피가 매끈하며 열피 현상이 매우 적으며 직근성이 우수한 것으로 평가되었다.



그림 2-24. S당근 융합체의 33계통 재배후 조사 모습(2013년 11월)

세포융합 재료로 활용된 S당근 품종과 비교하여 근길이가 짧고 두꺼운것과 비교적 큰 형태까지 다양한 형태의 계통을 선발할 수 있었다(그림 2-25B). 특히 시판 F₁ 품종과의 외형과 비교하였을 때 근형의 크기별로 선발하였다.



그림 2-25. S당근 융합체의 분리 및 9계통 선발(가을작형) A: JB(#5432) ; B:#5438, 5439, 5450, 5452, 5453, 5454, 5455, 5462, 5466 C: S당근 D:농우품종(control)

세포융합 재료로 활용된 S당근과 융합체 선발 계통간에 내부 근색을 비교한 결과 매우 유사하였으며, 농우 대비 품종 보다 외부근색과 내부근색 모두 짙은 붉은색을 나타냈으며, 우수 품질 조합으로 평가되었다(그림 2-26). 특히 근색의 차이를 자세하게 관찰하기 위하여 각 개체별 횡단면을 확대하여 비교하였을 때 대비품종과의 색도차이를 확연히 구분할 수 있었으며, 물관부와 체관부, 형성층의 착색 정도가 매우 뚜렷이 관찰되었다(그림 2-27).



그림 2-26. S당근과 융합체 선발 계통, 대비 품종의 근색 비교1. A: S당근(도입종); B: 융합체 선발 계통 C: 농우 대비 품종(control)

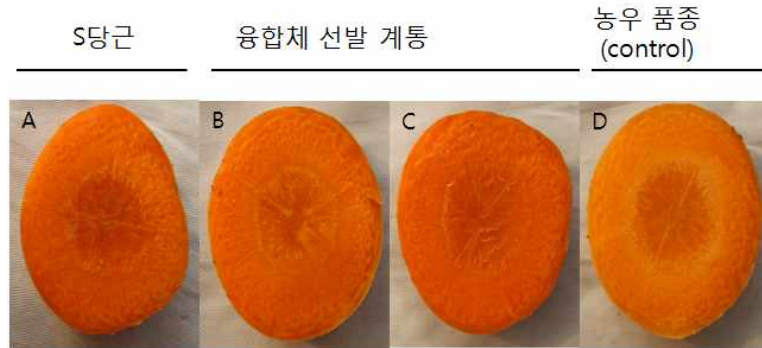


그림 2-27. S당근과 융합체 선발 계통, 대비 품종의 근색 비교2. A: S(도입종); B&C: 융합체 선발 계통 D:농우 품종(control)

융합체 C₃ 세대에서 2013년 11월에 선발된 개체별 사진이며, 대부분 선발 계통에 균일도가 많이 향상된 것을 확인할 수 있었고, 근형의 차이별로 최종 9개 계통을 선발하였다(그림 2-28, 2-29). 그리고, 각 계통별로 50여개체씩 집단내에서 비교한 결과 #5462와 같이 매우 균일도가 향상되어 열피 및 측지 발생 개체가 약 5%내외로 낮아서 재배안정성도 높을 것으로 기대되며(그림 2-30), C₄ 세대 진전을 통하여 형태적인 고정화 단계로 부계친의 유전자원으로 활용하였다. 선발된 각 계통은 저온재배를 위해 pot에 이식하여 재배하였으며, 2014년 4월에 하우스 포장에 재이식을 통하여 추대를 유도하였다. 특히 #5466은 빠른 추대성으로 교배를 진행하였다(그림 2-31).

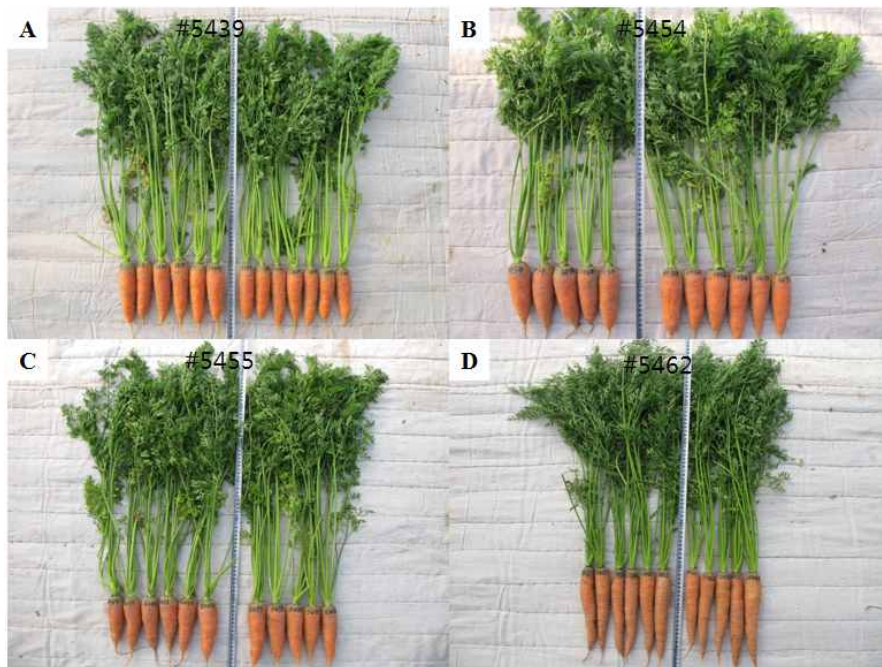


그림 2-28. S당근 C₃ 세대 융합체의 선발 계통. A:#5439; B:#5454; C:#5455; D:#5462



그림 2-29. S당근 C₃ 세대 융합체의 선발 계통. A:#5453; B:#5455; C:#5462; D:#5466

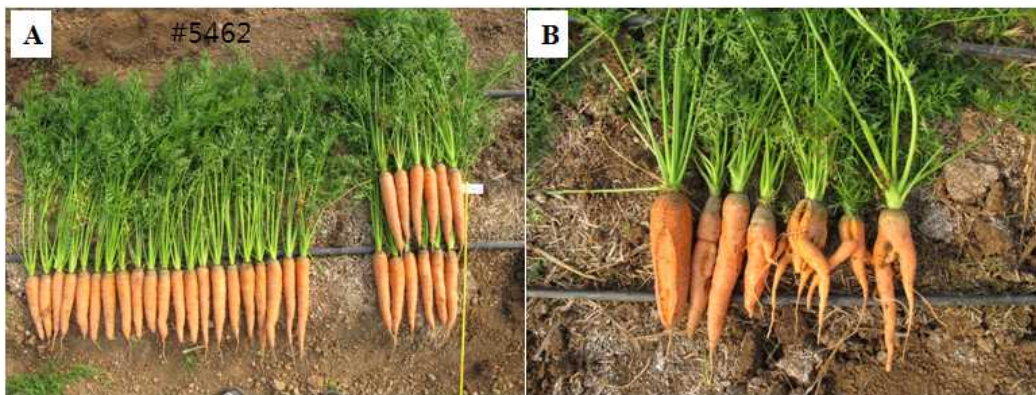


그림 2-30. S당근 C₃세대 융합체의 선발 계통 비교. A:#5462; B: 열근과 측지 발생 개체

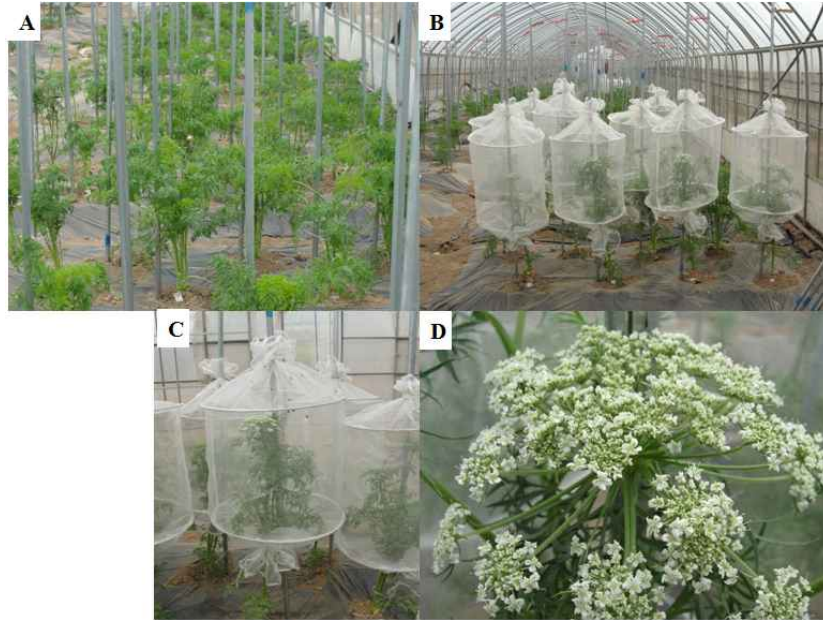


그림 2-31. S당근 C₃ 선발 융합체의 저온처리 후 추대 및 교배 모습. A: 재배 전경; B: 교배 진행; C: 파리를 이용한 교배; D: #5466 계통의 정상적인 수술 발달 모습

4년차 연구에서는 확보된 33계통의 종자를 2013년 7월에 파종하여 가을 작형 재배시험을 진행하여 9계통을 선발하였으며, 선발된 계통 중 8계통을 2014년 2월 봄작형으로 재배시험하였다. 근색은 우수하였으며, 지난 가을작형보다 환경적 요인으로 근장이 작게 선발되었다(그림2-32).



그림 2-32. S당근 C₃ 세대 융합체의 8계통 선발(봄작형 2014년 6월)

우수형질 S당근의 핵치환 세포융합은 C₁ 세대의 두차례 재배시험과 C₂ 와 C₃세대의 재배시험을 통해 근형, 근장, 근색의 농업적 원예형질을 평가하고, 개체별 분리정도를 고려하여 선발하였다. 4차년도 C₃

세대 재배시험에서는 유전적으로 고정율이 높아졌으며, 선발된 당근의 품종화를 위해서 가을작형, 봄작형으로 C₃세대 총 9조합을 선발하였으며 C₄ 종자를 확보하였다. 5차년도는 선발 계통 중 균일도가 상대적으로 높은 계통은 C₅ 세대진전 동시에 F₁ 조합작성도 시도하였으며, 조합성능 검정 단계로 S당근 융합계통을 활용하였다.

9. JB당근 핵치환을 통한 새로운 C₂세대 진전

JB 도입종의 경우 C₀ 융합체 33개체에서 확보하였으며, C₁ 종자의 발아율이 많이 낮은 단점이 있었다. 그러나, C₂ 세대의 6계통을 재배하여 4년차 시험에서 근형이 분리가 적고 근색이 우수한 1계통 선발하였다(그림 2-32).



#428-1

그림 2-32. JB 당근 C₂ 선발 #428-1 계통 선발

(5년차)

10. S당근 융합체 선발 및 C₄ 세대 가을작형 120계통, 봄작형 70계통의 성능 검정 및 세대진전 C₄세대의 경우 근형별 선발된 계통

5년차 연구에서는 확보된 C₄ 세대 선발된 120계통의 종자를 2014년 7월에 파종하여 가을 작형 재배시험을 진행하였으며(그림 2-33), 2014년 11월 수확하여 평가한 결과 전체적으로 C₄세대 융합체는 C₃ 세대보다 근형의 균일성이 매우 좋아졌으며, 조합 작성을 할 정도로 우수한 37계통이 선발하였다(그림 2-35, 2-36). 선발된 계통은 2015년 7월에 C₅세대를 확보하였으며(그림 2-34), 이후에는 조합작성에 다양한 교배친으로 활용할 예정이다. 선발된 계통은 근장이 12~30cm까지 다양하며, 근색도 우수하였다(그림 2-37). 또한 C₄ 세대 중 2015년 2월에 파종하는 봄 작형에서도 70여 계통을 공시하여 2015년

6월에 근형, 근색, 균일도, 추대 안정성을 평가하여 우수한 18계통을 최종 선발하였다.



SB C4 세대 120여 계통 재배 (2014년 가을작형) SB C4 세대 70여 계통 재배 (2015년 봄작형)

그림 2-33. S당근 C₄ 세대 가을작형과 봄작형 재배 모습



S 당근 융합 계통 (C₄) 육성 교배 모습

그림 2-34. S당근 C₄ 세대 가을작형 선발 계통의 교배 모습과 C₅ 종자 확보(2015년 7월)



그림 2-35. S당근 C₄ 세대 근형, 근장별 10계통, 총 37 계통 선발(가을작형 2014년 11월)





그림 2-36. S당근 C₄ 세대에서 선발된 대표적인 계통 사진, #5155, 5156, 5169, 5195, 5197, 5200, 5203, 5205, 5210, 5214, 5215, 5216

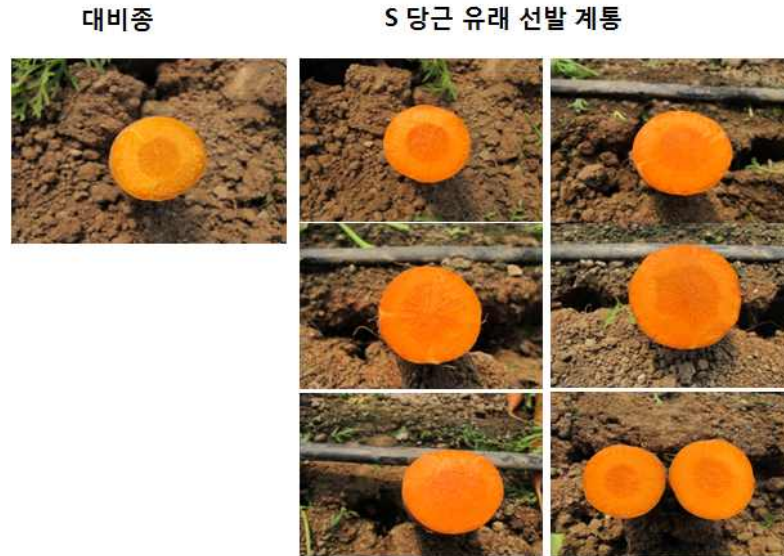
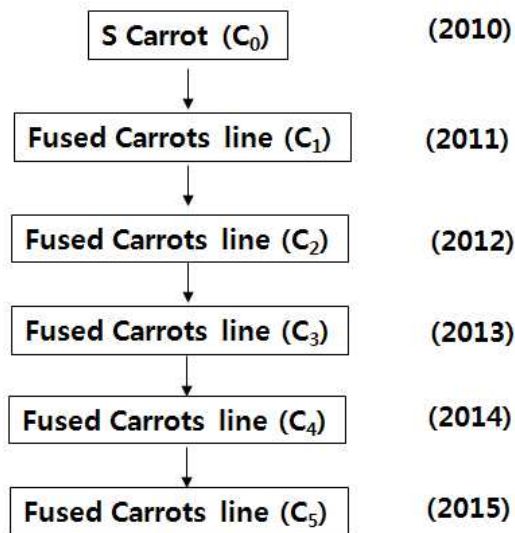


그림 2-37. S당근 C₄ 세대에서 선발된 대표적인 계통의 근색, 선발계통 우수함

S당근 유래 C₅ 세대 55계통 선발과 4계통 이용하여 2015년 9조합의 F₁ 조합작성을 수행하였다. 이 결과를 2015년도 11월 조합 성능 검정을 통하여 후보 품종을 선발하고자한다(그림 2-38).



- S당근 유래 55계통, C₅ 세대 확보
- S당근 유래 4계통 이용 F₁ 9조합 작성

그림 2-38. S당근 유래 55계통 선발 및 4계통 이용 F₁ 조합 작성

11. 당근 세포융합의 종합적 결론

우수형질을 가진 S당근과 JB, B당근, G당근 이용하여 세포융합을 수행하여 우수형질 중 근색과 근형, 재배 안정성, 작형별 숙기, 추대성 등을 고려하여 계통선발을 진행하고 C₂ ~ C₅ 세대진전하였으며 S당근 붐, 가을 작형의 우수한 55계통 C₅세대, J당근 1계통 C₃세대, B당근 8계통 C₃세대, G당근 3계통 C₂ 세대를 진전하여 총 4개 품종 유래 67계통을 선발하였다.

본 연구를 통해 당근 작물에서 세포융합기술을 체계적으로 확립하였으며, 이 기술을 이용하여 유용 유전자원을 확보함으로써 수입품종 비율이 약 90%에 달하는 국내 종자 시장의 경쟁력 확보에 큰 기대를 하고 있다. 더 나아가서 세포융합 기술은 A line 모계 육성시에도 육성연한의 단축을 위해 재적용하고자 하며, 신품종 개발시 강력한 육종기반기술의 하나로 지원함으로써 글로벌 기업과의 기술격차를 크게 줄일 수 있을 것으로 기대한다. 선발된 유전자원을 활용하여 F₁ 9조합 작성 하였고, 앞으로도 다양한 계통에 활용예정이다. 약 2-3년 내 고품질의 당근 신품종 출시가 기대되며, 국내 당근종자시장의 수입대체 뿐만아니라 중국, 인도 수출용 품종으로 경쟁력을 가질 것으로 전망한다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연도별 연구목표, 수행 내용 및 달성도

구분 (연도)	년차별 연구 목표	연구개발 수행내용	달성도
1차 년도 (2010~ 2011)	<ul style="list-style-type: none"> 비대칭 세포융합으로 개발한 무 CMS 형질 양배추 전이체의 검정 및 재배 	<ul style="list-style-type: none"> 양배추 NWB-CMS융합체의 원예적 형질분석 및 교배능력 확인 MS양배추 융합체 확인 및 모본양배추, 브로콜리, 컬리플라워, 콜라비의 교배 F₁조합에서 MS 형질의 안정적 유지 확인 및 모본 BC 	100
	<ul style="list-style-type: none"> 비대칭 핵치환 세포융합에 의한 당근 융합체 선발, 세대진전 	<ul style="list-style-type: none"> 도입종 핵치환기술을 이용한 융합체 163점 확보 당근 융합체의 원예적 형질 분석 및 자식세대 종자 확보 융합체 자식세대의 우수인자 함유 융합체 선발 	100
2차 년도 (2011- 2012)	<ul style="list-style-type: none"> 비대칭 세포융합으로 개발한 무 CMS 형질 양배추 전이체의 계통 육성 세대진전 	<ul style="list-style-type: none"> MS양배추의 계통 육성: back cross 진행 MS양배추 이용 브로콜리, 컬리플라워 콜라비 계통육성 및 MS 형질의 안정적 유지 확인: BC₁의 종자확보 선발된 양채류의 BC₁F₁의 MS 형질 유지 확인 및 교배 진행 중이며 BC₂F₁ 종자확보 (2012.07) 	100
	<ul style="list-style-type: none"> 비대칭 핵치환에 의한 당근 융합체 선발, 세대진전 	<ul style="list-style-type: none"> 핵치환을 이용한 당근 융합체 개발 및 원예적 형질 분석 S당근 융합체의 C₁ 세대 12계통의 재배 시험을 통한 우수형질 검정 및 근형, 분리 정도 확인 JB당근 핵치환을 통한 새로운 B line 32개체 확보 	100

구분 (연도)	년차별 연구 목표	연구개발 수행내용	달성도
3차 년도 (2012- 2013)	◦비대칭 세포융합으로 개발한 무 CMS 형질 양배추 전이체의 계통 육성	<ul style="list-style-type: none"> ◦ MS양배추의 계통 육성; backcrossing 진행 ◦ MS양배추이용 브로콜리, 컬리플라워 콜라비 계통육성 및 MS 형질의 안정적 유지 확인, BC₃F₁의 종자확보 ◦ 선발된 양채류의 BC₂F₁의 MS 형질 유지 확인, 교배 진행 중이며 BC₃F₁ 종자확보(2013. 07) 	100
	◦비대칭 핵치환에 의한 당근 융합체 선발, 세대진전	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 핵치환을 이용한 당근 융합체 개발 및 원예적 형질 분석 및 C₃ 16계통 종자 확보 ◦ JB 융합체 C₀ 개체의 저온 처리 및 추대를 통해서 화기 검정과 자가수분 종자 확보 및 원예적 형질조사 실시함 	100
4차 년도 (2013- 2014)	◦비대칭 세포융합으로 개발한 무 CMS 형질 양배추 전이체의 계통 육성	<ul style="list-style-type: none"> ◦ MS양배추의 계통 육성; backcrossing 진행 ◦ MS양배추이용 브로콜리, 컬리플라워 콜라비 계통육성 및 MS 형질의 안정적 유지 확인; BC₄F₁의 종자확보 ◦ 선발된 양채류의 BC₃F₁의 MS 형질 유지 확인; 교배 진행 중이며 BC₄F₁ 종자확보 예정 (2014. 07) 	100
	◦비대칭 핵치환에 의한 당근 융합체 선발, 세대진전	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 핵치환을 이용한 당근 융합체 개발 및 원예적 형질 분석 및 C₄ 33계통 종자 확보 및 재배 ◦ JB 융합체 C₁ 개체의 저온 처리 및 추대를 통해서 화기 검정과 자가수분 종자 확보, 과중하여 발아율이 10% 낮음. 발아된 최종 14 개체를 선발하여 저온처리하여 재배 중이며, 임성이 회복된 개체 선발을 선발 하여 교배 진행 예정임(2014. 07) 	100
5차 년도 (2014- 2015)	◦비대칭 세포융합으로 개발한 무 CMS 형질 양배추 전이체의 계통 육성	<ul style="list-style-type: none"> ◦ MS양배추의 계통 육성; backcrossing 진행 ◦ MS양배추이용 브로콜리, 컬리플라워 콜라비 계통육성 및 MS 형질의 안정적 유지 확인; BC₅F₁의 종자확보 ◦ 선발된 양채류의 BC₄F₁의 MS 형질 유지 확인; 교배 진행 중이며 BC₅F₁ 종자확보 예정 (2014. 07) 	100
	◦비대칭 핵치환에 의한 당근 융합체 선발, 세대진전	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 핵치환을 이용한 당근 융합체 개발 및 원예적 형질 분석 및 C₄ 재배, C₅종자 확보 ◦ 가을작형 37계통 선발, 봄작형 18계통 선발 ◦ F₁ 9조합 작성, 종자 확보(2015, 11예정) ◦ JB 융합체 C₂ 개1 계통 선발 ◦ B당근 C₂ 8 계통 선발 ◦ G당근 C₂ 3 계통 선발 	100

제2절 연구목표 수행에 따른 기술 기여도

본 관 수행으로 비대칭 핵치환, 세포질치환 세포융합기술의 확립하였으며, 당근과 양배추 작물에 성공적인 성과가 도출됨으로서 육성에 중요한 기반기술로 자리매김할것으로 기대하며, 타 작물로 적용도 가능하다. 특히, 양배추와 당근의 품종이 출시되면 세포융합 기술을 이용한 국내 품종의 첫 사례이며 큰 의미가 있다고 평가된다. 또한 타 작물(배추, 양파등)로 이기술을 적용하여 품종육성에 기여하고자한다.ksrP에서

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제1절 연구성과 및 활용 계획(기술실시)

1. CMS 양배추 융합체 연구성과 활용방안

세대진전이 빠른 양배추 경우 모본 B line 과의 재배를 통해서 형태적 특징과 A line 종자 생산성을 비교 예정이며, 원예적 성능검정 및 조합작성을 진행하여, 국내용과 해외 수출용 NWB-CMS 모계친을 이용한 양배추 품종화 예정임

2.비대칭 세포융합(핵치환)에 의한 당근 융합체 선발

- 가. S당근의 유래계통 C₅ 세대 총 55 계통 선발의 다양한 조합작성 활용. 5년차에 C₄세대 4계통(부계)을 이용하여 총 9조합 F₁ 작성 결과를 2015년 11월 F₁ 성능 검정을 진행할 계획이며, 결과에 따라서 선발된 모계계통의 원종 증식과 함께 품종화 추진
- 나. JB 당근 유래 C₃ 1계통의 세대진전 및 특성 평가, 근색이 우수하고, 균일도를 확보하여 부계 계통의 활용 예정
- 다. B당근 유래 C₂ 8계통의 세대진전 및 특성 평가 예정
- 라. G당근 유래 C₂ 세대 3계통 추가 세대진전 예정

3. 육성가의 평가

NWB-CMS 양채류개발은 세대진전 후 CMS의 안정성이 확인되어 다양한 모계계통 육성에 활용 중이며, CMS 품종 기대함. 도입종 4종 당근을 이용하여 세포융합 유래 계통을 총 67계통 선발하였으며, 계통에 따라서 추가 세대진전이 필요함, 그중에서 10여 계통은 근형, 근색, 숙기, 추대 안정성을 고려하였을 때 조합작성이 가능한 10여 계통이 C₅ 세대에서 선발 되었으며, 이러한 계통을 활용한다면 국내 및 중국 등 해외 시장에서 경쟁력 품종 출시가 될 것으로 기대함

4. 기술실시 예정

세포융합 기술을 활용하여 자체 사업화 예정이며, 융합 계통을 활용한 품종화 기대함

제2절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권

1. 연구성과 지식재산권 확보

- 가. 특허
 - 양배추 세포융합의 경우, 국내 특허 출원 및 등록과 PCT 출원후 미국 등록의 성과를 냄
 - 당근 세포융합의 경우 특허 출원 계획함

출원/등록된 특허				
출원/등록연 도	특허명	출원인	국가	출원,등록번호
2012. 3. 21	세포질 융성 불임성을 가지는 NWB-CMS 양채류 식물체 및 이의 용도	한지학외	국내	10-2012-0028632 (출원)
2013. 01. 17	세포질 융성 불임성을 가지는 NWB-CMS 양채류 식물체 및 이의 용도	한지학외	PCT	PCT/KR2013/000448
2013. 10. 11	세포질 융성 불임성을 가지는 NWB-CMS 양채류 식물체 및 이의 용도	한지학외	국내	10-1319265-0000 (등록)
2014. 09. 19	NWB-CMS BRASSICA OLERACEA HAVING CYTOPLASMIC MALE STERILITY AND	한지학외	미국	14386701 (등록)

나. 품종

- 양배추의 경우 3-4년내 2품종의 출원을 예상함
- 당근의 경우 2-3년내 3품종이상 출원을 예상하며, 5년이내 국내, 중국 인도용으로 매우 다양한 계통으로 활용이 기대됨

다. 논문

- 양배추 융합 관련 내용 1편과, 당근 융합관련 성과로 1편 총 2편의 논문 작성 계획, 논문의 경우는 사업화 진행 및 연구 보안상 특허를 먼저 진행 후 논문화 계획함

라. 학술발표 실적(12건)

	제 목	회의명	발표자	발표 일자	국가명
1	Development of new genetic sources for breeding practice using protoplast fusion technology	한국육종학회	한지학, 정민외	2010. 07	한국
2	Development of CMS Cabbage Constructed by Protoplast Fusion	식물과학협회	한지학, 정민외	2010. 11	한국
3	A new CMS cabbage germplasm constructed by protoplast fusion	한국식물생명공학회	한지학, 정민외	2011. 04	한국
4	A new carrot germplasm constructed by protoplast fusion	한국식물생명공학회	한지학, 정민외	2011. 11.	한국
5	A New CMS Breeding Line Constructed by Protoplast Fusion	IPMB 심포지움	한지학, 정민외	2012. 10	한국
6	A new carrot germplasm constructed by protoplast fusion	한국육종학회	한지학, 정민외	2012. 07	한국
7	A new carrot germplasm constructed by protoplast fusion	한국식물생명공학회	한지학, 정민외	2013. 06.	한국
8	New Breeding Lines developed by asymmetric protoplast fusion	VIPCA Plant genetics Breeding Technologies	한지학, 정민외	2013 .02	오스트리아
9	A new carrot germplasm constructed by protoplast fusion	원예학회	한지학, 정민외	2013. 05	한국
10	A new carrot germplasm constructed by protoplast fusion	육종학회	한지학, 정민외	2013. 07	한국
11	A new carrot germplasm constructed by protoplast fusion	한국식물생명공학회	한지학, 정민외	2014. 05	한국
12	New Breeding Technology: Development of Carrot Germplasm by Protoplast Fusion	한국육종학회	한지학, 정민외	2014. 07.	한국

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

과제 수행중 세포융합 관련 해외 기술 정보 없음

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당사항 없음

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

- 안전 관리는 연구소 내 안전담당자가 안전관리 규정하에 한달에 한번 교육 실시
- 안전에 대한 실험실 매뉴얼은 각 실험실에 배치되어 있으며 기록 중
- 연구소 안전담당자는 일년에 2차례 정규교육 받고 있음
- 폐기물, 유기용매, 안전규정에 있어서 분리 처리 화합물 등은 별도로 용역회사 수거 처리
- 실험실내 배양체와 petridish 등 일체는 autoclave한 다음 1년에 분기별 4회 용역회사가 수거우 소각 처리 시행
- 각 실험실에는 보안장치가 되어 있어 연구원만 출입가능
- hood 설치와 유기용매 보관실은 별도로 배치하고 있음

제 9 장 참고문헌

Cardi T, Earle ED (1997) Production of new CMS *Brassica oleracea* by transfer of 'Anand' cytoplasm from *B. rapa* through protoplast fusion. *Theor Appl Genet* 94: 204-212

Dudits D, Kao KN, Constabel F, Gamborg OL (1976) Embryogenesis and formation of tetraploid and hexaploid plants from carrot protoplasts. *Can. J. Bot.* 54:1063-1067

Handa H, Gualberto JM, Grienberger JM (1995) Characterization of the mitochondrial orfB gene and its derivative, orf224, a chimeric open reading frame specific to one mitochondrial genome of the "Polima" male-sterile cytoplasm in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Curr Genet* 28: 546-552

Jourdan P.S., E. D.Earle and Mutschler M.A. (1989) Synthesis of male sterile, triazine-resistant *Brassica napus* by somatic hybridization between cytoplasmic male sterile *B. oleracea* and atrazine-resistant *B. campestris*. *Theor Appl Genet* 78: 445-455

L'Homme Y, Brown GG (1993) Organizational differences between cytoplasmic male sterile and male fertile *Brassica* mitochondrial genomes are confined to a single transposed locus. *Nucleic Acids Res* 25: 1903-1909

Singh M, Hamel N, Menassa R, Li XQ, Young B, Jean M, Landry BS, Brown GG (1996) Nuclear genes associated with a single *Brassica* CMS restorer locus influence transcripts of three different mitochondrial gene regions. *Genetics* 143: 505-516

Tanno-Suenaga L, Ichikawa H, Imamura J (1988) Transfer of the CMS trait in *Daucus carota* L. by donor-recipient protoplast fusion. *Theor Appl Genet* 76:885-860

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 수출전략기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 수출 전략기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.