GOVP1200101288

635.61
L283 7

최 종
연구보고서

교배육종과 분자육종에 의한 참외류의 발효과 감소 및 당도증진에 관한 연구

Elevation of sugars and reduction of fermenting fruit by using a combination research of classical breeding and molecular breeding

주식회사 농우바이오

농 림 부

대한민국
기증등록
2001. 2. 20
856885
국회도서관

최 종 보 고 서

2000년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 교배육종과 분자육종에 의한 참외류의 발효과 감소 및 당도증진에 관한 연구에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

2000 년 12 월 29 일

주관연구기관 : (주) 농우바이오

총괄연구책임자 : 이 용 수(인)

주관연구기관장 : 조 대 현(직인)

농 림 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "교배육종과 분자육종에 의한 참외류의 발효과의감소 및 당도증진에 관한 연구" 과제)의 최종보고서로 제출합니다.

2000 년 12 월 29 일

주관연구기관명 : (주)농우바이오

총괄연구책임자 : 이 용 수

협동연구기관명 : 원예연구소

협동연구책임자 : 엄 영 현

위탁연구기관명 : 건국대학교

위탁연구책임자 : 김 두 환

위탁연구기관명 : 한국과학기술원

위탁연구책임자 : 정 원 일

요 약 문

Ⅰ. 제 목

교배육종과 분자육종에 의한 발효과의 감소 및 당도증진에 관한 연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

최근 국내에서 재배되고있는 박과 채소의 면적은 수박 33,533 ha, 참외 10,412 ha, 오이 7,894 ha, 호박 7,701 ha 순이고 기타의 박과 채소류로는 멜론, 박, 동아, 수세미, 여주 등이 재배되고 있다. 전 세계적으로는 전체 채소재배 면적의 16.8%에 달하는 중요한 채소이다. 이 중 참외는 국내에서 수박 다음으로 중요한 박과 채소로서 재래적인 육종방법에 의하여 품종을 개발하고 있으며, 주로 색택, 당도, 발효과의 감소 및 내병성 정도 등을 숙련된 육종가 개인의 관능적 평가 수준에 머물고 있어 객관적 평가를 통한 기술의 축적이 어려운 실정이다.

따라서 본 연구는 재래 육종 방법인 교배육종을 효율적으로 할 수 있도록 참외와 관련된 주요 품질 요소인 당 함량을 대상으로 기존의 분석법의 한계를 극복할 수 있는 신속, 간이 분석기술을 개발하는 것과 분자수준에서의 데이터를 이용하여 육종효율을 높이고 육종기간을 단축시키고자 최근 가장 용이하게 이용하는 RAPD marker의 분석 최적조건을 확립하고 또한 참외와 멜론의 유연관계를 분석하며 유전자지도 작성을 위한 양친을 선발하는데 기초자료로 삼고 유용형질과 연관된 marker를 선발하고자 한다. 또한, 재래종 참외는 이뇨제 등의 약리성분이 있고 향수를 불러이르킬 수 있다는 장점은 있으나 당도가 낮아 상품성이 낮아 재래종 참외를 대상으로 분자생물학적 기법을 이용하여 참외 과육 중의 당도를 증진시키고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

가. 교배육종 방법으로 품종을 개발하고자 육종 재료의 수집 및 평가와 우수 계통을 조기에 고정시키고자 당사의 인도네시아 포장에서 세대단축을 하였으며, 발효과가 적은 품종을 개발하기 위하여 발효과 발생이 없는 재래종 참외를 육종 재료로 이용하였다.

나. NIRS를 이용한 참외의 품질관련 성분의 신속, 간이 분석법의 정립하여 참외와 멜론의 품질육종 시 관련 형질의 선발 효율 증대하고자 하였다.

다. 참외와 멜론의 RAPD 분석 최적조건 확립하여 근연관계를 분석하고, 유전자 지도 작성을 위한 SSD(single seed descent)에 의한 RILs(F8 세대) 육성하여 DNA marker(AFLP)를 이용한 유전자 지도 작성 및 연관 Marker 탐색하고자 하였다.

라. 당도가 증진된 재래종 참외의 신품종을 개발하기 위한 목적으로, 당도 관련 유전자 중 AGPase 유전자를 분리하였다. 그리고 이 유전자의 발현을 참외에서 억제하기 위해 AGPase antisense vector를 제작하였고, 참외의 형질전환체 생산 system도 확립하였다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

가. 계통육성을 이용하여 발효과 발생이 거의 없고 당도가 높으며 과피가 진한 황 색이며 육질이 단단하고 외형이 우수한 계통을 이용하여 작성된 조합중 발효과 발생이 없고 외관이 우수하고 당도가 높은 99OM008조합은 진한금참외로, 중국수출용으로 99OM045번은 왕감2호로 품종생산.수입판매신고를 완료하였으며 판매용 종자를 생산하여 2002년부터 시판할 계획이다.

나. 참외 당도와 관련된 NIRS 분석기준식을 확립하였으며, 개발된 기술을 관련 민간 육종회사나 연구소에 전수하여 참외는 물론 멜론, 수박, 고추, 토마토 등 과채류

품질관련 육종의 기간 단축기술로 활용하게 한다.

다. DNA marker를 이용한 marker-assisted breeding의 이용으로 육종효율을 증대하고 육종기간을 단축하고 확립된 DNA marker 개발방법을 다른 박과 작물의 marker 개발에 이용한다.

라. 유전공학 기법에 의해 당도가 크게 향상되었지만, 외형적인 단점도 발견되었으므로 이들 단점을 보완하여 농가에 보급할 수 있는 품종을 개발할 것이다. 고당도 참외 품종개발은 단맛을 선호하는 우리 국민의 기호에 맞는 참외를 생산함은 물론 참외의 대외(특히, 일본 및 중국) 경쟁력도 제고시킬 수 있다.

여 백

Summary

Title

Elevation of sugars and reduction of fermenting fruit by using a combination research of classical breeding and molecular breeding

Purpose and significance of Research

Cucurbitaceae is one of major vegetable crop in world and its cultivation area covers 16.8% of total vegetable crop planted annually. In Korea, *Cucurbitaceae* is also important vegetable and it includes watermelon, oriental melon, cucumber, wax gourd, white flowered gourd and sponge. The cultivation area for watermelon is 33,533 ha which is the largest followed by melon (10,412 ha), cucumber (7,894 ha) and pumpkin (7,701 ha). The oriental melon is the second to watermelon in terms of marketing value and sales. It has usually been bred and cultivated by classical breeding method. Studies for enhancement of levels of sweetness, color gloss, disease resistance and reduction of fermenting fruit are limited because the evaluation of such characters are mainly dependent upon breeder's experience. Therefore breeding technology of oriental melon is surely necessary.

This research aims for several accomplishments: Firstly, development of fast and easy analysis techniques for measuring the sugar content in oriental melon; secondly, establishment of optimum conditions for RAPD markers which has been used to increase the breeding efficiency; thirdly, investigation of correlation between oriental melon and melon by useful genes and markers to construct a genetic map in future; enhancement of sugar content in wild oriental melon by molecular biology.

Results

1. In order to develop varieties of the oriental melon, we have collected various breeding materials. In addition, acceleration of generation and

fixing useful line earlier were performed in Indonesia. Especially to reduce the fermenting fruit line, the wild oriental melon which does not carry the fermenting character was used as a breeding material.

2. We have set up a fast and easy method to analyze components related to good quality by using NIRS so that it would help the selection efficiency of useful character in breeding melon and oriental melon.

3. Optimum conditions for RAPD analysis was established to investigate the relationship of melon and oriental melon. RILs was raised up to 8 generations by SSD (single seed descent) and AFLP was performed to find DNA markers for a ground work of constructing linkage map.

4. In order to develop a new variety holding the high levels of sugars from wild oriental melon, AGPase gene which converts sugar to starch was isolated from oriental melon. AGPase antisense vector was constructed to inhibit the expression of AGPase so that it would direct sugar flow to sucrose biosynthesis or accumulation instead of starch formation. In addition, the tranformation system of oriental melon was established.

Discussion and suggestion

1. From a combination of two parental lines of which one has no fermenting character, high sugar content and golder pericarp and the other carries hard texture and good appearance, several varieties holding high sugar and no fermenting have been selected. 990M008 was named as golder oreintal melon; BN123 was selected for exporting to China and it has been notified as Wanggam2, and seeds of this variety would be on market in 2002.

2. NIRS analysis related to sugar content was settled and it would help to use breeding technology of other fruits such as melon, watermelon, hot pepper and tomato.

3. DNA markers that we have identified could be applied to marker-assisted breeding to enhance breeding efficiency of melon as well as other *Cucurbitaceae*.

4. The sugar content increased by antisense blocking of AGPase. However, the phenotype and appearance was not good enough as a commercial cultivar. Therefore, it should be backcrossed further to other lines to obtain a stable and useful genetic background. Development of the oriental melon that contains high concentration sugar would be one of major vegetable crop competitive to other varieties from China and Japan.

여 백

대한민국국회도서관장

CONTENTS

Chapter 1. Introduction ---------- 15
I. Necessity of Research----------
1. Technological Background ---------- 15
2. Economical and Industrial Background ---------- 16
3. Social and Cultural Background ---------- 17
II. Objectives and Contents ---------- 17

Chapter 2. Major 19
I. Collection of Genetic Sources and their Characters upon Cultivation, and Reduction of Fermenting Fruit and Enhancement of Sugar Content---------- 19
1. Introduction ---------- 19
2. Results and Discussion ---------- 20
1) Reduction of Fermenting Fruit of the Oriental Melon and Development of Cultivars toward High Content Sugars---- 20
2) Collection of Genetic Sources by Ovary Culture---------- 54
3) Test for Disease Resistance---------- 55
3. Summary ---------- 58
II. Determination of Optimum Analytical Conditions of Sugar Content in Oriental Melon ---------- 59
1. Introduction ---------- 59
2. Collection of Oriental Melon Samples---------- 59
3. Establishment of HPLC Analytical Conditions for Sugar Content---------- 60
4. Establishment of Analytical Conditions for NIRS--------- 61
5. Development of NIRS method for Sugar Contest -------- 65
6. NIRS Calibration Equation Measuring Sucrose Content---- 69
7. NIRS Calibration Equation Measuring Glucose Content---- 74
8. NIRS Calibration Equation Measuring Fructose Content---- 78
9. NIRS Calibration Equation Measuring Total Sugar Content- 82
10. Determination of Sucrose Content by NIRS ---------- 86
11. Determination of Glucose Content by NIRS ---------- 87
12. Determination of Fructose Content by NIRS ---------- 88
13. Determination of Total Sugar Content by NIRS --------- 90
14. Summary ---------- 91

Ⅲ. Reseach for Application of DNA Markers to Breeding---- 92
1. Introduction---------- 92
2. Establishment of Optimum Conditions for RAPD Marker Analysis of Oriental Melon and Melon---------- 94
3. Analysis of Genetic Relationship between Oriental Melon and Melon by using RAPD Marker---------- 97
4. Development of RILs (F_8) by Single Seed Descent------- 104
5. Evaluation of Morphological Characteristics for RILs (F_8)-- 104
6. Construction of Genetic Map Using AFLP Markers and Investigation of Markers Linked to the Morphological Traits---------- 109
7. Summary ---------- 121
Ⅳ. Cloning of AGPase Gene and Control of its Expression--- 122
1. Introduction ---------- 122
2. Results ---------- 123
3. Summary ---------- 136
Ⅴ. Literature Cited ---------- 137
Research Productivity ---------- 143

목 차

제 1 장 서 론 ---------- 15

제 1절 연구개발의 필요성 ---------- 15
1. 기술적 측면 ---------- 15
2. 경제 · 산업적 측면 ---------- 16
3. 사회 · 문화적 측면 ---------- 17
제 2절 연구개발의 목표와 내용 ---------- 17

제 2 장 주요 연구수행내용 및 결과 ---------- 19

제 1절 재료수집 및 재배적 특성평가와 계통육종에 의한 발효과 감소 및 당도증진 ---------- 19
1. 서설 ---------- 19
2. 결과 및 고찰 ---------- 20
가. 참외의 발효과 감소 및 고당도계 품종육성 ---------- 20
나. 자방배양에 의한 유전자원 확보 ---------- 54
다. 내병성 검정 ---------- 55
3. 결과 요약 ---------- 58
제 2절 NIRS를 이용한 참외의 품질의 신속간이 분석방법 확립 ---------- 59
1. 서설 ---------- 59
2. 시료의 수집 ---------- 59
3. 참외의 당함량 습식분석(HPLC) 조건 설정 ---------- 60
4. 근적외선 분석법 개발을 위한 분석조건 설정 ---------- 61
5. 참외 당함량분석을 위한 근적외선 분석식 개발방법 ---------- 65
6. Sucrose 함량측정을 위한 근적외선 분석식 작성 ---------- 69
7. Glucose 함량측정을 위한 근적외선 분석식 작성 ---------- 74
8. Fructose 함량측정을 위한 근적외선 분석식 작성 ---------- 78
9. 총 당함량측정을 위한 근적외선 분석식 작성 ---------- 82
10. 근적외선 분석법에 의한 sucrose 함량분석 ---------- 86
11. 근적외선 분석법에 의한 glucose 함량분석 ---------- 87
12. 근적외선 분석법에 의한 fructose 함량분석 ---------- 88
13. 근적외선 분석법에 의한 총 당함량 함량분석 ---------- 90
14. 결과 요약 ---------- 91

제 3절 DNA marker의 육종활용을 위한 연구 ---------- 92
1. 서설 ---------- 92
2. 참외와 멜론의 RAPD marker 분석을 위한 최적조건 확립 -------- 94
3. 참외와 멜론 계통의 RAPD marker에 의한 근연관계 분석 -------- 97
4. SSD(Single seed descent)에 의한 RILs(F_8세대) 육성 ---------- 104
5. F_8계통의 특성조사 ---------- 104
6. DNA marker(AFLP)를 이요한 유전자지도작성 및 연관 marker 탐색 109
7. 결과 요약 ---------- 121
제 4절 AGPase 유전자의 cloning과 발현제어에 관한 연구 ---------- 122
1. 서설 ---------- 122
2. 연구내용 ---------- 123
3. 결과요약 ---------- 136
제 5절 참고문헌 ---------- 137
연구성과 ---------- 143

제 1 장 서 론

최근 국내에서 재배되고있는 박과 채소의 면적은 수박 33,533 ha, 참외 10,412 ha, 오이 7,894 ha, 호박 7,701 ha 순이고 기타의 박과 채소류로는 멜론, 박, 동아, 수세미, 여주 등이 재배되고 있다(농수산 통계연보 1999). 전 세계적으로는 전체 채소재배 면적의 16.8%에 달하는 중요한 채소이다. 이 중 참외는 국내에서 수박 다음으로 중요한 박과 채소로서 재래적인 육종방법에 의하여 품종을 개발하고 있으며, 주로 색택, 당도, 발효과의 감소 및 내병성 정도 등을 숙련된 육종가 개인의 관능적 평가 수준에 머물고 있어 객관적 평가를 통한 기술의 축적이 어려운 실정이다. 따라서 재래적인 교배육종과 신기술에 해당하는 품질분석 및 분자육종방법의 접목으로 발효과의 발생이 감소되고 당도가 증진된 품종을 개발하고자 하였다.

제 1절 연구개발의 필요성

1. 기술적측면

- 재래종 참외는 전통적인 기호식품으로 각광을 받을 수 있음에도 불구하고 육종의 소홀로 육질에는 분질이 많고 당도가 낮아 소비자에게 외면당하고 있다.
- 참외재배시 문제가 되는 만할병등의 피해를 감소시키기 위한 방법으로 대목을 이용하고 있으나 내병성 참외를 육종함으로써 대목의 사용을 줄일 필요성이 있다.
- 유전자 조작에 의한 신기능성 형질전환체 개발은 차세대 농업의 성패를 가름할 핵심기술로 부각되고 있다. 특히, 외래유전자 도입에 의한 것이 아닌 antisense rDNA를 이용함으로써 더욱 효율적으로 육종에 이용할 수 있을 것이다.

- 우리나라 종묘업계에서 참외류의 신품종을 개발할 때 탄수화물, 아미노산의 함량 등, 품질에 관련한 특성의 조사없이 관능검사와 달관조사에만 의존하고 있는 실정이다.
- NIRS(Near Infra Red Spectrophotometer ; 근적외선분광광도계)를 이용한 당함량, 육질등의 신속간이분석방법을 확립함으로써 품질개발의 효율를 증대시켜야 된다.
- RAPD표지인자를 이용한 분자유전자 지도작성과 당도, 육질등 중요형질과의 밀접한 연관을 이용하여 선발효율을 증대시키고 순도검정체계를 구축할 수 있다.
- 자방배양에 의해 만들어진 반수체 개체를 이용하여 Homozygote한 이배체 개체를 빠른 기간 내에 확보하여 육종재료의 다양화 및 육종기간을 최대한 줄일 수 있다.

2. 경제 · 산업적 측면

- 현재 한국농업은 WTO에 의한 외국의 농산물 수입으로 어려움에 직면하고 있다. 그러므로 이에 대체하기 위해서는 고부가가치 작물의 개발, 노동생산성의 증대, 다수확, 고품질의 농산물 생산이 절실히 요구된다.
- 우리나라에서 재배되고 있는 메론은 대부분 일본품종에 의존하고 있으며, 특히 UR의 타결로 메론종자의 수입이 증가(1991 ; 244천불 →1992 ; 502천불, 한국종묘협회자료) 되고 있다.
- 가까운 일본에는 1,000억원 정도의 메론종자 시장이 형성되어 있다고 추정되며, 메론의 가격이 고가로 판매되어서 종자의 수출시장의 확보는 물론이고, 우리나라 농가에서 메론을 재배하여 수출도 가능하다.

3. 사회·문화적 측면

- 우리나라 농산품의 차별화 및 특성화에 중점을 두고 이에 부합할 수 있는 품종을 개발하여 국가간의 위상을 높일 수 있다.
- 소득의 증가와 함께 수요가 증가되는 박과작물의 고품질화를 통해 농가 소득을 증진시킴으로써 WTO 체제에서 농업을 지켜나가는 역할을 할 것이다.
- 시설재배에 적합한 품종의 개발로 농촌경제를 활성화한다.
- 참외, 메론은 그 독특한 맛으로 인해 그 수요가 확대되고 있어 고품질의 종자를 개발하여 농가에 보급한다면 농가특성산업화를 이룩할 수 있다.

제 2 절 연구개발의 목표와 내용

1. 교배육종에 의한 고품질 참외 품종개발

가. 여주연구소에서 당도가 높고 발효과의 발생이 적은 계통을 모·부계로 작성한 조합을 공시하여 기존의 시판종보다 발효과 발생이 적으면서 당도가 높은 우수조합 2개이상 선발

나. 참외 재배의 주산지인 경북 성주와 경기 이포지역에서 농가실증시험

다. 농가 현지에서 실용적인 특성과 농가 재배포장 적응성을 검정하기 위하여 농가실증 시험 후 성적이 우수한 2 조합에 대하여 품종화

라. 수출을 위한 국외 농가 실증시험(중국 2개소)

마. 바이러스, 만할병, 만고병 검정

바 자방배양으로 육종소재 확보

2. 참외 당함량의 습식 분석 및 NIRS 이용 당함량 분석 기준식 보완

가. 재래종, 은천계 및 메론의 당함량을 HPLC로 분석(sucrose, glucose,

fructose, 총당함량)

나. 분석식 작성을 위한 시료 선발

다. 각 성분에 대한 분석범위 확대 및 분석식의 정확성 보완

라. NIRS 분석식의 정확성 검정

마. 대상시료에 대한 당함량 측정

3. 유전자지도 작성 및 연관 Marker 탐색

가. 유전자지도 작성을 위한 형태적 특성조사

(시각적 평가, 실제적 평가, 내병성 검정)

나. DNA marker를 이용한 유전자지도 작성

(DNA 추출, primer screening, AFLP marker를 이용한 유전자 지도 작성)

다. 유용한 형질과 연관된 DNA marker 탐색

(형태적 특성과의 DNA marker 탐색)

라. 영구 유전자지도 작성을 위하여 SSD(single seed descent)에 의한 RILs(F_8) 생산

4. AGPase 유전자의 cloning과 발현제어

가. 참외 genomic library 제작

나. 해당 genomic DNA 확보

다. 염기서열 결정 및 promoter 분리

라. AGPase의 과일 특이 발현 제어용 vector 제작

제 2 장 주요 연구수행내용 및 결과

제 1 절 재료수집 및 재배적 특성평가와 계통육종에 의한 발효과 감소 및 당도증진

1. 서설

우리나라에 참외가 재배되기 시작한 것은 삼국시대 이전으로 기록되어 있으나 현재 주로 재배되고 있는 품종들은 예전에 재배하던 것과는 많은 차이가 있다.

현재 우리나라에서 재배되고 있는 참외류는 대부분 은천계 참외로 재래종 참외와는 과형이나 과피색, 과육색 육질 등이 많은 변화를 해왔고 특히 당도면에서 기존의 재래종참외가 10도미만을 나타내고 있으나 교배육종에 의해 은천계 참외들은 12도에서 15도정도의 상당한 수준까지 당도를 향상시켰으며 소비자의 욕구을 충족시켜 왔다. 이로 인하여 소비가 늘고 농가의 소득도 향상되어 참외 재배면적이 점차 늘어나고 참외농가의 재배기술도 향상되어 최근 참외재배가 1982년 14,965ha를 정점으로 1990년 8,160ha까지 줄었다가 최근 다시 증가하기 시작하여 10,000ha를 넘어서고 있으며 80년대 노지재배에서 90년대 이후 하우스 재배로 거의 전환되고 있으며, 파종시기를 앞당겨 조기 출하에 많은 비중을 두면서 농가 소득도 향상되었으나 일부농가에 있어서 그해의 환경조건에 따라서 발효과 발생으로 농가의 어려움을 가중시키고 있는 실정이다.

그리하여 여러 기관이나 학계, 종묘회사등에서 발효과 발생에 대한 원인을 구명하고 대책을 찾기 위하여 많은 노력을 하고 있으나 뚜렷한 원인과 방제 대책이 미흡한 실정이므로 본 과제에서는 교배육종으로 발효과 발생이 없거나 줄일 수 있는 계통을 확보하고 이들 계통을 이용한 조합작성과 성능검정을 통하여 발효과 발생이 없는 품종을 농가에 보급함으로서 농가의 피해를 줄이고 소비자가 믿고 찾을 수 있도록 함으

로서 소비를 촉진시켜 참외 재배농민의 소득을 향상시킬 수 있도록 하고자 본시험을 수행하게 되었다.

2. 결과 및 고찰

가. 참외의 발효과 감소 및 고당도계 품종육성

1) 1차년도

가) 유전자원 수집 및 계통 특성 파악

(1) 참외

(가) 국내 재래종 수집 : 유전자원의 확보를 위하여 우리나라에서 전통적으로 재배되었던 성환, 곶감, 깐치, 먹, 개구리 참외 등 80여 품종을 과채류시험장, 원예연구소, 농촌진흥청 종자은행 및 농가로부터 수집하였다.

(나) 국외 재래종 수집 : 중국에서 야생하고 우리나라 환경에 적합하다고 생각되는 은천계 계통의 참외를 3 계통 수집하였다.

(다) 국내 F_1 품종 수집 : 국내에서 현재 재배되고 있는 일대잡종 10품종을 수집하였다.

(2) 멜론

(가) 국내 수집 : 과 품질이 우수한 특성을 지닌 고정계통의 확보를 위하여 국내 종묘사에서 개발한 히트멜론외 3품종을 수집하였다.

(나)국외 수집 : 일본에서 수입판매되는 품질이 우수한 로란(神田)등 25 품종을 수집하였다.

(3) 참외 특성파악 : 현재재배하고 있는 재래종참외들의 당도를 측정하여 발효과가 발생하지 않은 계통과 당도가 높고 식미가 우수한 계통을 선발 하였다. (그림1-3 참조)

도입된 재래종 참외의 특성은 같으나 이름이 다른 것과 일반종이 분리되는 것이 있어 이에 대한 분류 및 고정화작업을 하였다.

(2) 멜론 특성파악 : 황피계 중 당도가 높고 발효과 발생이 적은 조생계 8계통과 육질이 단단하고 착과력이 우수한 3개체 및 당도가 높고 재배가 쉬운 네트멜론 12계통을 선발하였으며 주요 외국 수집종에 대한 특성은 표1에서와 같다.

<그림 설명>

A(청) : 초세가 강하고 측지 및 암꽃발생이 빠르며 착과력이 우수하면서 과가 크고 균일하며 과육색이 청색으로 호박향이 나며 육질은 사각사각하나 분질이고 태좌부가 빨리 파괴된다.

B(홍) : 초형은 곶감참외와 유사하며 착과력은 보통이다. 유과는 단타원형이며 주름이 약하게 나타나고 꽃잎이 길다. 과육은 아삭하고 새콤한 맛이 있으며 후기에 분질이 되는 경향이다.

C(열골) : 초세는 중 정도이며 암꽃발생이 잘 되고 착과력이 우수하다. 과형은 곶감참외와 유사하며 육질은 분질이고 발효과 발생이 많다.

D(곶감참외) : 초형은 줄기가 가늘고 절간이 길며 암꽃발생이 좋다. 암꽃은 주두가 안정되어 기형과 발생이 적고 꽃가루가 잘 나옴. 과비대가 잘 되고 균일하며 조합능력이 우수하다. 과육색은 적색이나 녹색 반점이 있으며 수확기가 되면 향이 진하게 나며 후기 육질은 점차 분질이 되며 태좌부가 약해진다.

E(성환 I) : 측지 발생은 빠르나 암꽃발생이 늦고 불량하다. 육질은 사각사각하나 후기 분질이 되고, 당도가 높고 감참외향이 있어 식미가 우수하다.

F(성환Ⅱ) : 성환1에 비해 엽색이 진하고 형태가 다르다. 암꽃은 자만에서도 착생하고 안정되어 있으며 착과력이 우수하다. 과형은 조선6과 유사한 호피무늬가 있으며 육질이 단단하고 즙이 많으나 후기 태좌부가 물러지고 분질이 된다.

G(성환Ⅲ) : 초기 초세는 약하나 후기 초세가 극히 강하며 잎이 두껍고 크다. 암꽃발생은 늦고 작으며 유과에 작은 모용이 밀생한다. 후기에 갈수록 과비대가 잘되며 대과이다. 과면은 요철이 많고 숙기가 늦으며 저장력이 떨어진다.

H(개구리) : 초장이 크고 초세가 강하다. 암꽃발생이 잘 되고 암꽃이 장타원형이며 숫꽃발생이 적은 편이다. 과형은 장타원형의 호피무늬가 있으며 대과이다. 과육은 완전한 분질이며 쉽게 물러지고 향이 진하게 난다.

I(조선Ⅵ) : 초형이나 과형은 성환2와 유사하며 과 크기가 다소 작은편이다. 육질은 분질기가 적고 쓴맛이 있다.

J(춘향) : 재래종 참외 중 초세가 다소 약한 편이다. 암꽃발생이 잘되고 착과력이 우수하다. 과피색이 진한 농황색이며 숙기가 매우빠르다. 과육은 사각사각하고 약간 신맛이 있으며 태좌부가 제리와 유사하고 후기 분질이 되는 경향이 있다.

K(김제) : 초세는 중 정도이며 측지 및 암꽃발생이 잘되고 착과력이 뛰어 나다. 과크기는 아주 작은 소과로 특이하며 과육은 백색이며 쓴맛이 있고 점질이나 당도가 낮아 식미는 떨어지며 기형과 발생이 전혀 없다.

L(중국참외4) : 초세가 다소 약하며 잎이 작다. 암꽃착생이 자만 및 손만에서

잘 되며 착과력도 우수하다. 과형은 타원형으로 균일하며 과골에 트는 현상이 나타나며 과육이 청색이며 육질은 분질이나 식미가 좋고 종피가 적색으로 독특하다.

그림 1. 주요 재래종 참외의 형태적 특성

그림 2. 주요 재래종 참외의 형태적 특성

그림 3. 주요 재래종 참외의 형태적 특성

표 1. 주요 메론 품종의 특성

품 종	초세	숙기	과피색	과육색	1과중 (Gr)	과장 (Cm)	과경 (Cm)	과육두께 (Cm)	화탁크기 (Cm)	당도 (Brix)	Net		외형	특 성
											밀	솟		
ルイス (タキイ)	7	5	G	YG	1,280	14.0	13.3	4.0	2.5	16.0	9	6	7	암꽃 발생우수 과면 요철이 없고 식미우수
ロラン (小林)	8	5	LG	YG	1,160	13.1	12.0	3.6	1.8	15.3	9	6	6	과가 작고 수확기 열과 많으나 재배가 쉽다.
Volga (サカタ)	8	5	LG	YG	1,270	14.3	12.3	3.6	1.8	17.1	8	7	6	Net의 밀도가 균일하지 못하나 식미는 우수
モナコ (小林)	8	5	LG	YG	1,360	13.5	14.0	3.0	2.0	13.8	8	6	7	재배하기 쉽고 외형이 좋으나 식미가 떨어짐
シャロン 2號 (Nanto)	6	5	LG	YG	910	11.6	13.5	2.6	2.0	16.4	7	6	5	Net발생 잘되고 균일하나 과가 작고 과피 황변이 심함
NO61 (神田)	8	5	LG	YG	1,270	13.1	14.8	4.2	1.8	16.5	8	6	6	암꽃발생 좋으나 과형, Net 모양이 균일하지 못함
カソサス (サカタ)	8	5	LG	YG	1,850	16.0	15.0	4.2	2.1	16.1	7	6	6	과비대는 우수하나 Net가 균일하지 못함
E-202 (小林)	8	6	G	YG	1,580	13.7	15.2	3.4	1.6	15.8	9	6	6	Net가 조밀하고 균일하나 과가 편편형이다.
ルイ3 (小林)	7	5	LG	YG	1,190	12.8	14.7	3.9	2.1	14.7	9	6	6	Net발생 잘되고 균일하나 과가 작고 과피황변이 심함
眞珠200 (ヤエ)	8	8	G	YG	1,370	13.0	15.1	3.5	2.6	14.7	7	8	7	어얼스계형으로 솟구침이 약하며 향이 있고 식미가 우수함
Bird Red (MIKADO)	7	6	LG	R	1,600	16.3	15.2	4.4	2.8	15.5	8	7	6	과형이 H형으로 솟구침이 약하며 향이 있고 식미가 우수함
HN-30 (サカタ)	6	6	LG	R	1,090	11.2	13.6	3.1	2.0	17.0	9	6	5	적육계이나 과가 작고 발효과 발생이 많다.
중국멜론 (合肥)	8	6	G	R	1,680	16.2	13.5	4.2	2.0	15.2	7	6	5	식미는 좋으나 과피황변이 많고 Net 폭이 좁다.

1)초세:약(1)-강(9) 2)숙기:조(1)-만(9) 3)과피색:백색(W),녹피얼룩(GS), 진황색(DY) 4)과육색:백색(W),연한적육(LR)

5)Net 밀:약(1)-강(9), 솟:약(1)-강(9), 6)외형:불량(1) 양호(9)

표2. 수집종의 재배적 특성

품 종 명	초세	숙기	과피색	과육색	1과중	과장	과경	과육 두께	화흔부 크기	당도	비 고 (고정여부)
은향밀G3	5	중	BY	W	420	10.5	8.3	1.7	1.8	10.4	고
삼리둔 백	5	중	BY	W	460	11.0	9.0	2.3	1.2	9.6	고
중형은천	7	중	DY	W	500	17.0	12.0	3.0	2.0	11.4	고
금노 F6	8	중조	DY	W	480	11.0	9.5	2.0	0.9	11.2	분
대팔리 G2	6	중	G	G	380	10.2	8.5	1.8	0.9	10.3	고
백사밀 G2	5	중	G	RR	450	11.2	8.7	1.9	3.2	12.0	고
성개화 G2	5	중	G	RR	660	11.5	10.7	2.7	1.5	5.2	분
백당관 G2	5	중	G	WR	580	12.3	10.7	2.2	1.5	8.6	분
백청과 G2	4	중	W	W	430	8.5	9.5	2.0	2.0	13.0	고
삼아백피	5	조	W	W	420	9.0	9.7	2.2	1.5	11.0	고
백리과 G2	7	중조	Y	W	620	11.2	10.4	2.5	1.4	12.6	고
삼중	4	조	WY	W	900	11.0	11.0	2.5	0.5	12.2	고
085	8	중만	W	W	1,230	14.5	13.7	3.3	1.2	13.8	고
105	6	중만	W	W	1,670	15.5	14.9	4.0	3.2	14.4	고
백조 G4	6	중	W	W	980	13.7	9.3	2.7	2.1	11.5	분
백피/KS F7	4	중조	W	W	560	13.3	8.4	2.1	0.5	13.6	분
〃	4	중조	W	W	520	11.3	8.5	1.7	0.4	11.4	분
신강경육 G3	9	중	W	W	1,500	14.9	15.0	4.0	4.5	10.0	분
WH-1 F6	6	중만	YW	R	1,320	14.7	14.2	3.6	2.3	12.4	분
청백피 청육	4	중만	GW	G	1,680	16.6	14.8	4.7	1.7	13.8	분
〃	3	중만	GW	G	1,590	16.2	14.0	4.2	1.5	14.0	분
삼아백피	6	조	W	G	1,420	14.3	14.7	4.0	2.3	12.2	분
서부 아리스	7	중	GW	G	1,720	17.1	15.2	4.3	1.3	14.5	분
청향 F3	7	중	GW	G	1,450	13.9	14.8	3.6	2.7	12.7	분
광명 황백	5	중만	DY	G	2,380	21.0	15.4	4.0	1.0	6.6	고
〃	4	만	DY	G	1,660	16.7	14.2	3.9	1.0	12.0	고
Honey Dew G3	5	중	Y	G	1,620	16.0	14.5	4.2	1.4	12.4	고
황하밀	5	중조	DY	G	2,350	20.7	16.0	4.0	0.9	7.0	고
EL2	6	조	WY	G	1,240	13.5	12.9	3.2	3.1	9.7	분
황적 G3	8	중조	DY	R	1,000	13.0	10.7	3.0	1.0	10.5	고

※ 초세:(약)1-(강)9. 과피색:연황(BY), 황(Y). 진황(DY), 녹색(G),연록(GW).백(W)

과육색: 백(W), 녹(G), 진한적육(RR). 적육(R), 연한적육(WR)

<그림 설명>

그림 4-A(조선참외Ⅲ) : 육색이 백육이며 육질이 아주 시원하다. 초세가 강한 편이고 착과성이 양호하다.

그림 4-B(깐치참외) : 내한성이 강하고 착과력이 우수하며 H형의 과형과 식미(食味)가 좋아 상품성이 높을 것으로 사료된다.

그림 4-C(중국참외4) : 초세는 중정도이며 과형이 균일하고 과골이 독특하다. 종피색이 적갈색이며 식미가 우수하다.

그림 4-D(성환) : 초세가 강하고 착과력 및 과비대력이 좋으며 과표면이 독특하다.

그림 5-A(중국참외) : 국내의 은천계통과 유사하며 초세가 강하고 저온신장성이 좋다. 단타원형으로 과골이 깊으며 육질이 아삭아삭하고 당도가 높아 식미가 좋다.

그림 5-B(중국참외) : 과골이 없는 황피계로 숙기가 빠르며 당도가 높고 발효과 발 생이 전혀없어 계통을 고정시킨 후 우수한 품종의 개발소재로 사용하고자 한다.

그림 5-C(SCF_4) : 당사에서 시판중인 고향참외의 분리계로써 수량성이 좋으며, 육질이 단단하고 향이 있어 식미가 좋다.

그림 5-D(백/K F_7) : 백피계의 골이 있는 백참외형으로 과피가 깨끗하고 만할병에 강하다.

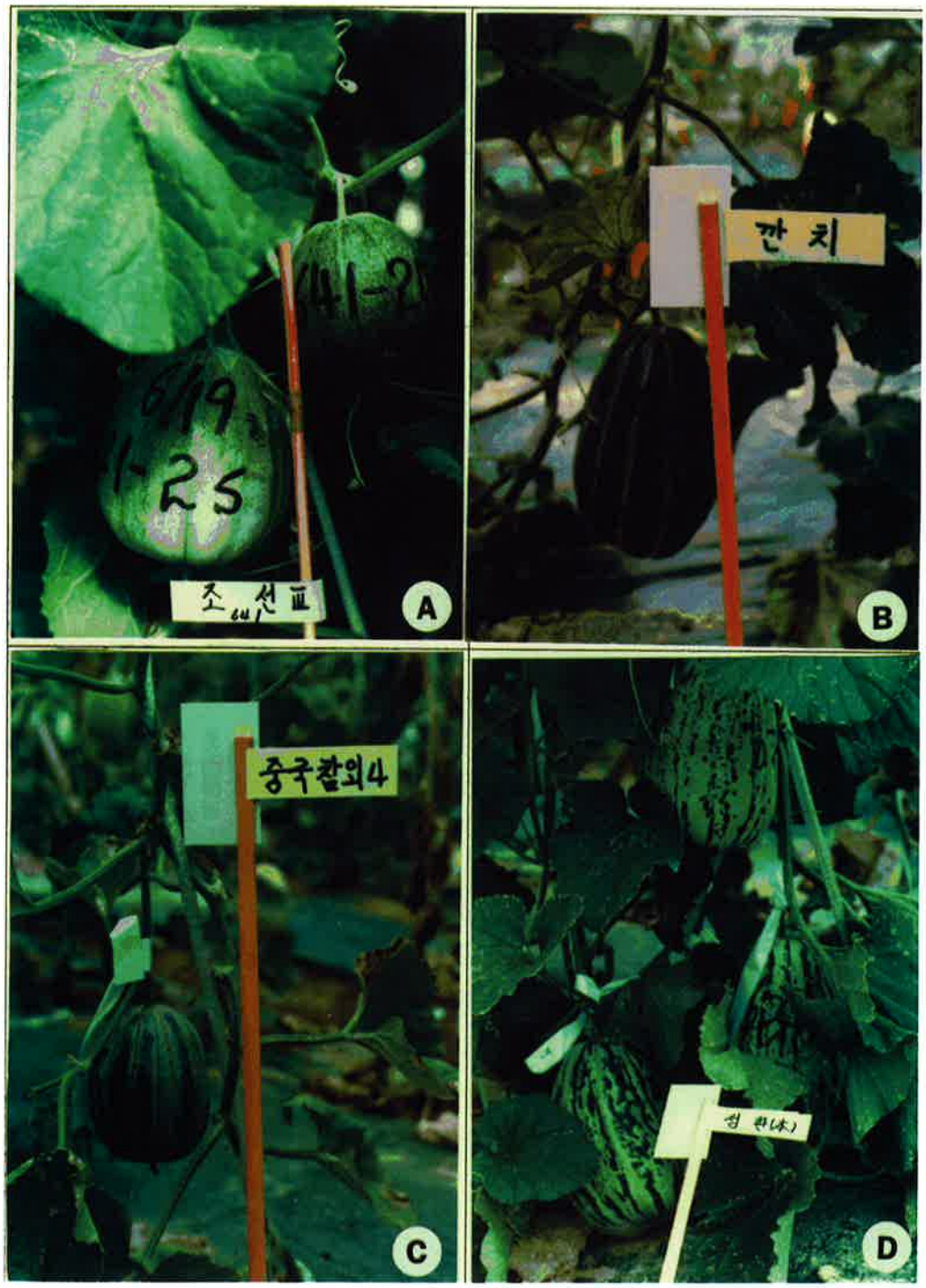


그림 4 계통육성에 의하여 선발된 계통의 형태적 특성

그림 5.계통육성에 의하여 선발된 분리계통의 형태적특성

2) 2차년도

가) 유전자원 수집 및 특성파악

(1) 2차년도에서는 국내의 종묘회사에서 개발한 신품종과 다양한 형태의 유전자원이 있는 중국에서 수집하는데 역점을 두었다. 그 결과 국내에서 개발한 5점과 중국에서 70여점을 수집하여 특성을 검정하였다.(표2참조)

나) 우수계통육성 및 세대단축

재래종 참외의 경우 과피색이 녹색이거나 얼룩형인 것이 대부분이며 육질은 분질이고 과육색은 적육, 청육색이다. 또한 재래종의 맛은 향기가 진한 특색을 갖고 있으나 당도가 6~9° 이내로 낮아 소비자들의 기호를 따라가지 못하는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 수집종에 대한 특성검정과 세대단축에 의하여 착과성이 우수하고 과형이 균일하게 안정된 고정계통(그림4)과 유용한 특성이 있는 분리계통(그림5)을 선발하였다. 특히 재래종중에서 당도가 9° (Brix) 정도로 높고 조합능력이 뛰어난 꽃감참외(그림 6의 A)와 메론중에서 적육의 특성을 갖고 향기가 있으며 당도가 13~15° 로 높은 계통을 이용하여 조합을 작성한 결과 F_1 에서 과피색이 아주 진한 농녹색에 육색이 적육이며 당도가 13-15° 전후로 높았다. 그러나 숙기가 40~45일전후로 만생종이며 후기 열피현상이 발현되는 단점을 갖고 있어 F_1을 상품화 하는데는 다소 문제가 있을 것으로 판단되어 F_1을 분리하여 유망계통을 선발하고자 F_2를 전개하였다.

F_2에서는 과피색이 청색 혹은 농록색으로 분리하거나 과표면에 골이 있는 것과 있고 과골의 흔적만 남는 것 등으로 분리의 양상이 다양하게 나타났다(그림 6의 B). F_2에서는 참외의 육성목표에 부합되는 과피색이 농록색이면서 과표면에 골이 있으며 당도가 15° 내외의 계통을 선발하였다. 이후 이들의 분리계통을 순화하여 F_4 세

대까지 진전시켰으며, 초세가 강하고 연청피(과표면이 연한 청색) 백육(과육색이 백색)의 고당도계통(16.8°)(그림 8-C), 농녹피조(과표면이 농록색이며 줄이 있는것)의 적육(과육색이 적색)계로 고당도(15.5) 계통(그림 6-D)을 분리선발하여 순화 고정화를 위한 세대를 진전시켰다.

또한 (중국참외4)계통(표 3-2)은 착과습성이 자만, 손만 모두에서 착과되는 특성을 갖고 있으며, 종자의 종피색이 적색을 띠는 것이 독특하다. 한편 곶감참외, 중국참외와 그밖의 유망한 재래종 계통을 이용한 분리계통의 주요 특성은 표3와 같다.

다) 발효과 감소

발효과의 발생이 적은 품종을 육성하기 위하여 국내 및 중국수집종으로부터 발효과 발생이 전혀 없는 70계통을 선발하였으며, 선발계통중에서 과형과 육질이 좋은 10계통을 선발하여 고정계통은 조합작성에 이용하고 분리계통은 인도네시아 농장을 활용하여 세대단축한 후 고정되면 육종에 이용할 것이다.

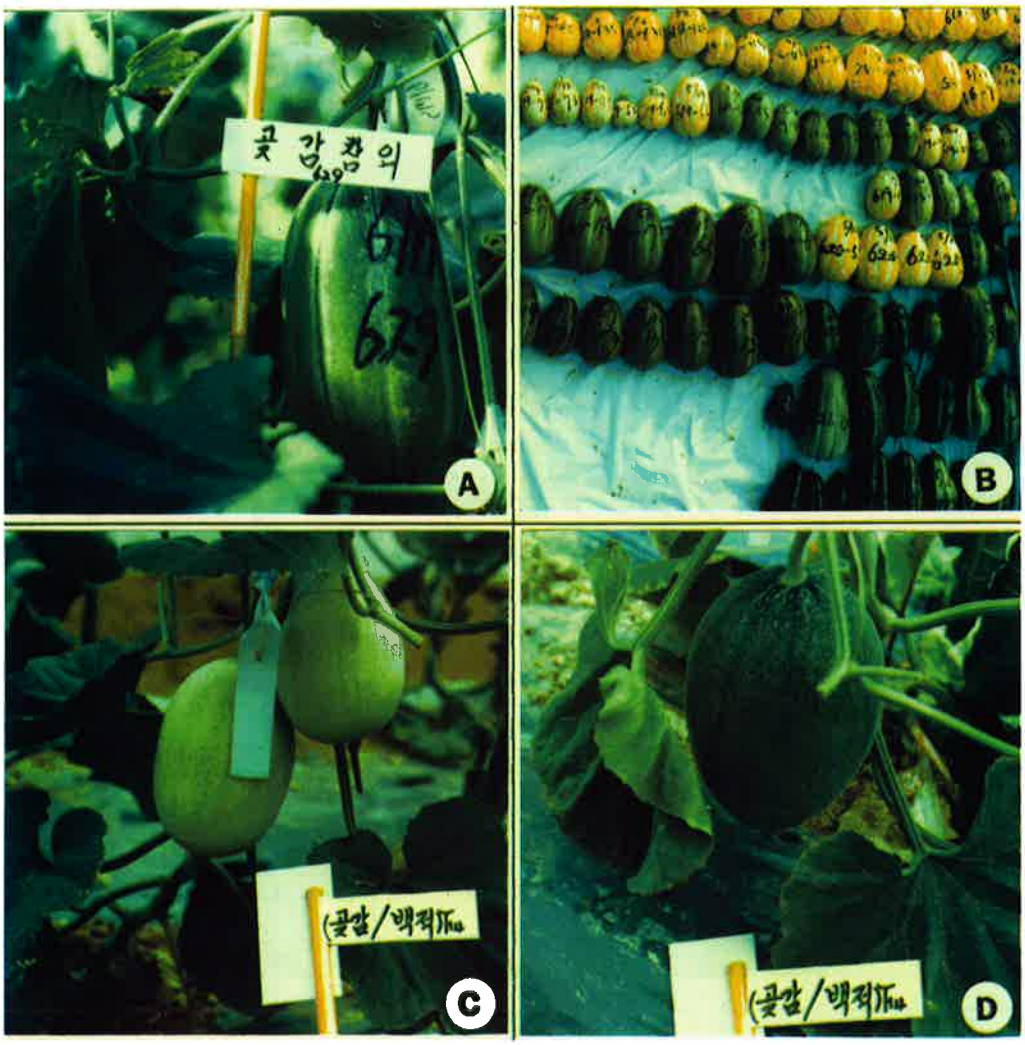


그림 6. 계통육성에 의해서 선발된 계통의 형태적 특성

표 3-1. 참외 유망계통 특성표

계 통 명	초세	숙기	과피색	과육색	1과중 (g)	과장 (cm)	과경 (cm)	과육 두께 (cm)	화흔부 크기 (cm)	당도 (Brix)	발효과발생율 (%)	비고
K09-3	8	조	진황	백	540	12.3	10.0	2.0	2.0	11.4	0	
신은(우)	7	조	황	〃	720	11.5	9.7	1.5	2.9	9.0	0	
U황은(木)	7	중	연황	〃	440	13.0	8.0	1.5	0.5	14.6	0	
Kiss1	6	중조	진황	〃	470	11.5	8.0	1.7	0.4	13.4	0	
Kiss2	6	중	연황	〃	330	10.0	7.0	1.5	0.6	13.6	0	
신계통1	7	중	황	〃	310	9.7	7.2	1.6	1.7	15.4	0	
신계통2	4	중	진황	〃	480	15.4	8.0	1.4	0.3	9.0	0	
GS2(우)	6	중만	연황	〃	330	10.5	6.0	1.0	0.5	13.4	0	
SW_3	6	중	황	〃	480	15.4	8.0	2.0	0.5	12.6	0	
GRS F_5	7	중	농황	〃	500	11.5	9.0	2.0	0.4	13.6	0	
〃	7	중조	〃	〃	560	12.0	8.8	1.5	0.4	11.4	0	
〃	5	중	백	〃	1,090	16.0	12.0	2.5	0.3	9.8	0	
〃	5	중조	농황	〃	340	9.0	8.0	1.5	0.4	14.2	0	
〃	5	〃	〃	〃	320	9.0	8.4	1.3	0.5	14.2	0	
GRS F_6	5	〃	〃	〃	440	11.2	8.9	2.0	0.2	12.0	0	
〃	5	〃	〃	〃	780	13.0	9.1	1.9	0.5	12.8	0	
고향참외 F_4	5	〃	〃	〃	680	11.8	9.3	2.0	0.3	11.8	0	
〃	7	〃	농녹	청육	1,620	19.2	12.0	3.2	1.0	12.4	0	
곶감참외	7	중만	〃	청띠 적육	960	18.9	9.5	2.7	1.7	10.6	0	
깐치	7	〃	〃	백	380	14.7	8.3	2.0	1.0	8.3	0	
감	7	〃	〃	청띠 적육	540	15.0	8.3	1.5	1.0	9.0	0	
〃	7	〃	〃	〃	640	16.2	8.0	1.9	1.7	9.0	0	
〃	7	〃	〃	〃	420	13.0	9.0	2.0	1.0	10.2	0	
이천	7	중	은백	〃	1,200	21.0	11.0	2.5	1.5	6.0	0	
조선	7	〃	농록	〃	400	12.0	8.2	1.7	1.0	10.6	0	
〃	8	중만	녹반점	〃	1,040	11.0	12.0	2.0	2.2	9.6	0	
선과녹	7	〃	황지 녹조	〃	520	14.4	7.5	1.7	1.7	10.4	0	
성환	7	〃	녹	〃	400	11.0	8.2	2.0	1.0	10.0	0	
〃	7	〃	녹얼룩	〃	500	11.8	9.0	2.0	1.0	10.0	0	
사탕	7	〃	녹	〃	465	12.0	8.2	1.7		11.0	0	

표 3-2. 참외 유망계통 특성표

계 통 명	초세	숙기	과피색	과육색	1과중 (g)	과장 (cm)	과경 (cm)	과육 두께 (cm)	화흔부 크기 (cm)	당도 (Brix)	방효과 발생율 (%)	비고
(은야/S.P.)F_4	8	만	녹반점	백	440	11.5	8.5	2.0	1.9	11.0	0	
중국참외4	7	중만	농록	백록	400	9.7	8.6	2.0	1.0	9.0	0	
음성개구리	5	〃	황지 얼룩	청띠 적육	260	8.3	7.7	1.9	1.2	9.0	0	
중국참외	5	중조	진황	백육	400	11.0	9.3	1.8	1.2	13.0	0	
〃	5	중조	〃	〃	400	10.5	8.9	2.5	0.7	13.0	0	
〃	5	중조	〃	〃	320	19.0	8.9	1.5	1.1	13.0	0	
〃	7	〃	진황	백	400	11.5	8.0	2.0	1.6	10.0	0	
〃	7	〃	〃	〃	860	13.0	9.5	2.0	1.0	10.0	0	
중국참외	6	〃	농황	〃	640	12.0	10.0	1.8	1.0	11.0	0	
〃	6	조	〃	〃	500	10.5	9.0	1.5	0.5	11.4	0	
〃	6	〃	〃	〃	400	11.0	8.5	1.1	0.8	13.0	0	
〃	7	〃	〃	〃	740	10.5	11.6	2.4	1.0	13.0	0	
〃	7	〃	〃	〃	300	9.0	7.0	1.4	0.5	12.0	0	
미광은천	7	중조	황	〃	460	11.5	8.3	2.0	2.0	17.5	0	
한강대형(우)	8	〃	〃	〃	1,080	15.5	11.5	2.0	1.0	9.0	0	
TK-1	5	중만	〃	〃	120	11.0	5.1	1.0	0.2	5.2	0	
TK-2	6	〃	녹	〃	100	7.7	5.0	0.8	0.2	6.4	0	
〃	6	〃	〃	〃	300	10.4	7.7	1.7	0.5	12.6	0	
금지계F_2	5	중조	진황	〃	880	12.7	10.6	2.2	0.5	12.0	0	
〃	5	〃	〃	〃	460	11.0	9.4	2.5	1.0	9.8	0	
〃	5	〃	〃	〃	740	11.5	9.9	2.0	0.2	10.2	0	
(곶감×白赤)	7	중만	백	적	760	12.0	11.0	3.0	0.5	15.5	0	
〃	8	〃	〃	백	620	13.0	11.5	3.0	1.0	16.8	0	
〃	8	〃	〃	청	1,050	15.5	11.4	3.0	0.4	12.0	0	
〃	6	〃	농록	적	690	12.0	13.0	3.5	1.9	15.5	0	

초세:약(1)-강(9)

3) 3차년도

가) 분리계통의 세대단축

(1) 여주연구소

당사의 여주연구소에는 1차로 4세대 이상 진전된 계통을 '98년 2월 25일에

파종하여 5월 초에 교배하였고 6월 20일 과형질 조사 후 선발하였다. 선발 기준으로는 과형태, 과육색, 식미(食味)면에서는 시판중인 은천계 참외와 다른 독특한 계통을 선발하였으며, 그밖에 내병성, 과의 무게, 초세, 당도, 발효과 발생정도 등도 고려하였다. 또한 8세대 이상 진전되었으면서 원예적 형질이 변이가 없는 계통은 고정계통으로 선발하였다.

공시한 62개의 계통 중에서 형질이 우수한 150개의 분리계통과 36개의 고정계통을 선발하였다.

특히 재래종중에서 당도가 9° (Brix) 정도로 높고 조합능력이 뛰어난 곶감참외와 메론중에서 적육의 특성을 갖고 향기가 있으며 당도가 13~15° 로 높은 계통을 이용하여 조합을 작성한 결과 F_1 에서 과피색이 아주 진한 농녹색에 육색이 적육이며 당도가 13-15° 전후로 높았다. 그러나 숙기가 40~45일전후로 만생종이며 후기 열피현상이 발현되는 단점을 갖고 있어 F_1을 상품화 하는데는 다소 문제가 있을 것으로 판단되어 F_1을 분리하여 유망계통을 선발하고자 F_4세대까지 진전시켰다. 한편 고정된 은천계와 재래종을 대상으로 10개 조합을 작성하여 차년도에 성능검정 하였다.

한편, 6월에 선발된 계통 중 유망한 22개의 고정 계통을 2차로 7월 10일 파종하여 10월 초에 원예적 형질을 조사하고 수확중에 숙기가 빠른 계통에 대해서는 채종하였다. 은천계 참외의 구비요건인 과피색이 진한 농황색이며 과장이 짧은 단타원형이면서 과골이 깊은 고당도계 15계통을 선발하였으며, 이들의 계통을 이용하여 20 조합을 작성하여 여주연구소에서 차년도에 성능검정을 하였다. 한편 재래종은 그 특성이 독특하고 조합능력이 뛰어난 계통을 이용하여 원예적 형질이 고정된 KW (곶감참외×백피적육)을 이용한 조합을 '99년 반촉성 작형에 성능검정을 하였다. 특히 재래종과 멜론을 교배한 분리 계통은 과형과 과육이 재래종과 유사하며 당도가 13도

이상의 분리계통을 선발 할 수 있었으며 향은 멜론 향을 내었다.

(2) 인도네시아

당사의 인도네시아 농장에는 주로 2 ~ 3세대 진전된 계통(참외 : 250계통, 메론 : 182계통)을 '98년 3월 18일에 파종하여 6월 18일 수확하였으며 이 때 참외는 SSD 방법으로 250계통을 선발하였으며, 메론은 분리계통 선발법에 의하여 268계통을 선발하였다. 또한, 선발한 계통을 7월 하순경에 파종하여 10월 30일 인도네시아에 출장하여 계통을 선발하였다.

나) 발효과 감소 및 당도증진 계통선발

발효과의 발생이 적은 품종을 육성하기 위하여 국내 및 중국수집종으로부터 발효과 발생이 전혀 없으며 당도가 12 °(Brix) 이상인 50계통을 선발하여 교배조합 작성에 이용하였다(표 4, 표 5).

다) 고정된 계통에 대한 조합작성 및 조합 능력 검정

'98년 봄 고정이되고 발효과 발생이 없는 재래종 계통과 당도가 높은 은천계간 10조합을 작성하였으며, '97년도에 작성한 조합에 대하여 조합능력을 검정한 결과 표 6과 같다.

SW3 × ko 9-3 조합과 GRS × ko 9-3 조합은 저온신장성이 우수하고 착과력이 공시한 대비품종 및 조합중에서 가장 우수하며 숙기가 가장 빠르고, 과피색이 진하며 당도가 높아 식미가 우수하여 유망조합으로 선발하였다. 또한 SW3× 중국참외4 조합은 과면골이 선명하게 나타나 신선한 느낌을 주어 선발하였다. 한편 이 이외의 조합은 당도가 극히 높고 발효과의 발생은 전혀 없었으나 숙기가 늦고 착과력이 떨어지는 단점이 있어 도태하였다.

표 4-1. 참외 세대단축계통으로부터 선발한 고정 및 분리계통의 원예적 특성 및 발효과 발생 현황(봄 재배)

계 통 명	세대진전수	초세	과피색	과육색	1과중(g)	과장(cm)	과경(cm)	과육두께(cm)	화혼부크기(cm)	당도(Brix)	발효과발생율(%)	비고
ko 9-3	고정	7	진황	백	840	14.4	10.5	2.8	2.0	11.0	0	
유황은(본)	고정	8	연황	백	460	11.5	7.7	1.7	1.2	16.0	0	
kiss 1	고정	5	진황	백	340	8.3	9.5	1.9	1.2	12.0	0	
kiss 2	고정	5	연청	백	300	9.0	10.0	1.7	1.2	12.2	0	
신계통 1	고정	5	연황	백	340	9.5	7.4	1.5	1.2	15.3	0	
신계통 2	고정	5	진황	백	560	12.2	8.0	2.0	0.3	9.4	0	
SW 3 F_8	고정	5	농황	백	460	14.0	7.2	2.2	1.8	14.2	0	
〃	고정	6	진황	백	300	9.2	7.0	1.5	0.3	12.0	0	
〃	고정	6	진황	백	460	10.0	8.1	2.0	0.5	13.0	0	
〃	고정	6	진황	백	300	9.6	7.5	1.5	0.4	13.0	0	
GRS	고정	7	진황	백	400	11.0	8.0	2.2	0.5	10.4	35	도태
〃	고정	7	진황	백	640	10.2	9.6	2.7	0.5	14.0	0	
〃	고정	7	진황	백	520	13.2	8.6	1.5	1.0	11.0	0	
〃	고정	7	농황	백	460	11.0	8.2	2.6	0.6	13.3	0	
〃	고정	8										도태
〃	고정	7	농황	백	700	12.0	9.5	1.7	0.6	11.4	0	
〃	고정	7	농황	백	740	14.0	9.2	2.0	0.5	14.4	0	
(HJE × KSLG)F_5	5	5	농황	백	600	12.0	9.0	1.6	0.5	11.0	0	
금지게F_5	5	8	농황	백	540	12.0	8.9	2.5	0.9	11.4	0	
〃	5	7	황	백	440	11.6	8.0	1.5	0.5	14.8	0	
〃	5	5	연황	백	380	12.2	6.6	1.5	0.3	14.8	0	
COM F_6	6	6	진황	백	590	12.2	9.0	2.4	1.5	10.0	0	
〃	6	6										도태
〃	6	6										도태
〃	6	6	진황	백	420	9.2	8.6	1.2	1.5	13.4	0	
〃	6	6	진황	백	400	9.0	7.8	2.2	1.2	14.2	0	
〃	6	6	진황	백	420	10.0	8.5	2.0	1.3	11.0	0	
〃	6	6	황	백	700	12.5	11.0	2.0	0.5	12.0	0	
〃	6	6	농황	백	720	11.5	10.0	2.0	2.0	13.4	0	
〃	6	4	농황	백	300	9.2	7.2	1.6	1.2	13.4	0	
〃	6	6										도태
〃	6	6	농황	황	300	9.0	7.7	1.3	1.2	13.4	0	
〃	6	6	농황	백	260	8.7	8.0	2.0	1.0	13.0	0	
〃	6	6	농황	백	280	8.2	7.0	1.5	1.0	13.2	0	
은광은천(⇧)	고정											도태
DWT F_5	5	7	황	연노랑	640	11.0	10.2	2.2	1.4	12.4	0	
〃	5	4									80	도태

표 4-2

계 통 명	세대진전수	초세	과피색	과육색	1과중(g)	과장(cm)	과경(cm)	과육두께(cm)	화흔부크기(cm)	당도(Brix)	발효과발생율(%)	비고
DWT F_5	5	8									60	도태
〃	5	8									60	도태
〃	5	8									50	도태
KGM × WR(곶감 × 백적)F_4	4	5	백	적	560	11.0	9.2	2.2	1.0	15.4	30	도태
〃	4	5	백	적	500	11.5	8.7	2.5	0.5	12.0	30	도태
〃	4	5									50	도태
〃	4	5									50	도태
〃	4	5	농록	적	1000	15.2	10.5	3.0	0.8	14.2	0	
〃	4	5	청	청	540	9.5	9.8	2.4	1.6	9.0	0	
〃	4	5	연청	청백	1060	16.8	11.0	3.5	0.6	12.0	0	
〃	4	5	연청	연적	700	10.0	10.5	2.4	0.6	13.8	0	
곶감참외	고정	5	녹	연적	480	14.0	7.0	2.3	0.5	12.0	0	
성환참외	고정	5	청	연청	1270	17.3	7.4	3.5	2.5	9.0	0	
깐치	고정	6	농록	연청	400	14.0	7.0	1.5	1.3	7.0	0	
사탕	고정	5	황	백	300	9.7	7.5	1.5	1.0	14.0	0	
이천	고정	6	농록	적	500	14.8	6.4	1.5	1.0	7.8	0	
청	고정	5	녹	청	450	14.5	7.0	1.6	.5	10.8	0	
감	고정	3	농록	적	180	8.7	6.0	1.0	1.0	10.0	0	
COM F_6	고정	5	농록	백	300	9.5	7.7	2.0	1.5	11.0	0	

초세:약(1)-강(9)

표 5. 참외 고정 계통의 원예적 특성 및 발효과 발생 현황(가을 재배)

BN	계통명	초세	숙기	과피색	과육색	1과중 (g)	과장 (cm)	과경 (cm)	과육두께 (cm)	화흔부 크기 (cm)	당도 (Brix)	경도	발효과발생율(%)
1601	KISS1	5	4	진황	백	360	14.0	8.5	2.4	0.3	10.2	1.2	0
1603	SW3	5	4	진황	백	385	10.5	8.5	2.4	0.5	13.0	1.7	0
1604	SW3	5	3	진황	백	361	10.1	8.0	2.0	0.1	10.1	1.9	0
1605	GRS	5	3	농황	백	435	10.5	9.5	2.0	0.2	11.4	1.5	0
1606	GRS	5	3	농황	백	680	15.0	9.5	2.5	1.0	14.2	1.0	0
1608	KGG	6	4	농황	백	640	12.4	9.5	2.0	0.2	13.2	1.7	0
1609	KGG	6	4	농황	백	450	15.0	7.7	1.5	1.0	14.0	1.0	0
1611	DWT	7	3	연황	황	500	12.2	9.0	2.1	0.9	9.6	1.5	0
1613	KW	4	6	백	연적	335	9.0	8.3	1.5	0.7	10.6	1.3	0
1614	KW	5	6	유백	연적	370	9.0	8.6	1.9	0.9	11.0	1.4	0
1615	KW	4	6	농녹	청띠적육	720	13.5	10.5	3.0	1.7	12.6	2.1	0
		4	6	〃	〃	830	13.0	11.0	3.0	0.5	13.2	0.8	0
		6	6	백	적육	775	13.0	10.0	3.0	1.0	10.2	1.1	0
1616	KW	4	7	백조	연청	690	14.0	10.2	2.0	0.6	8.6	1.3	0
		6	6	농녹조	적육	760	12.0	11.1	2.5	1.0	12.8	1.4	0
		4	6	농녹조	청띠적육	535	12.0	11.0	2.5	1.0	8.0	1.0	0
		4	6	농녹조	적육	575	11.5	9.5	2.0	0.2	14.0	1.0	0
		6	6	녹조	연적	1250	15.4	12.5	2.4	1.4	8.6	1.5	0
1617	곶감참외	5	5	농녹조	연녹적	500	12.0	8.0	2.0	1.8	7.6	1.6	0
1620	중국참외4	5	5	농녹	연청	380	13.0	8.0	2.0	3.0	5.0	0.9	0
1619	깐치	6	6	농녹조	연청	470	14.7	6.6	1.5	2.4	7.0	1.5	0
		6	6	농녹조	연청	490	12.6	8.5	2.3	2.6	10.6	1.0	0

※ 초세 1(약) - 9(강)

숙기 1(조) - 9(만)

표 6. 교배조합의 원예적 특성

계 통 명	초세	숙기	과피색	과육색	1과중 (g)	과장 (cm)	과경 (cm)	과육두께 (cm)	화흔부 크기 (cm)	당도 (Brix)	발효과 발생율 (%)	비고
금싸라기 II	6	5	진황	백	400	11.0	7.4	1.8	0.5	14.0	10	대비
금노다지	6	4	〃	〃	460	12.3	8.2	2.0	0.5	13.6	10	대비
97-15	7	4	농황	〃	280	10.6	7.7	2.1	0.4	15.0	0	대비
황진이	7	4	〃	〃	480	12.3	9.0	2.0	0.5	13.4	0	대비
황감참외	6	5	진황	〃	400	11.1	7.7	1.7	0.5	13.4	0	대비
SW3 × ko 9-3	6	3	농황	〃	320	10.7	8.3	2.2	0.5	15.0	0	선발
GRS × ko 9-3	6	3	〃	〃	360	11.0	7.4	2.0	0.5	14.8	0	선발
GRS×유황은(본)	7	5	진황	〃	350	11.0	7.5	1.8	0.4	16.5	0	도태
SW3×중국참외4	7	5	농록	〃	420	11.2	8.1	1.6	0.8	12.0	0	선발
파파× 엘리자베스 F_5	7	6	진황	〃	400	11.0	9.4	2.0	1.0	18.6	0	도태
엘리자베스 F_5 × HRS	신토좌와 친화성이 없으며 황변과의 발생으로 생육 초기에 도태											

4) 4차년도

가) 계통육성 및 성능검정

(1) 봄 계통육성결과

은천계 조합작성을 위한 모계는 과피색이 진하고 과골이 깊으며 당도가 높은 BN 607 외 9개의 계통을 선발하였고 부계로 이용코자 하는 은천계는 과형이 배가 부른 원통형으로 육질이 아삭아삭하고 참외의 향이 강하게 나며 과비대가 좋은 BN 601 외 5 계통을 선발하였다. 또한 발효과 발생을 감소시키기 위하여 숙기가 빠르고 태좌부가 안정된 BN 618외 5계통을 선발하였다(표 7). 한편, 과피색이 진하고 과골이 선명하며 식미(食味)가 우수할 것으로 사료되는 은천계 9조합과 중국 수출용으로 과비대가 우수하며 숙기가 빠른 7조합을 작성하였다.

표 7. 봄 계통육성에 있어서의 원예적 형질

BN	초세	숙기	과피색	1과중 (g)	과장 (cm)	과경 (cm)	과육두께(cm)	화흔부 (cm)	당도 (Brix)	과골	비 고
601	7	4	황	520	11.0	9.0	1.7	1.7	12.8	4	
602	5	6	진황	380	10.4	7.5	2.0	0.4	10.0	5	
603	7	5	황	360	10.2	7.1	1.5	2.2	11.8	4	
607	4	4	진황	440	10.5	9.0	2.0	0.3	14.8	7	
608	6	6	진황	450	10.2	9.0	1.5	0.5	13.8	7	
609	6	6	진황	460	11.7	8.1	1.5	0.5	10.2	7	
611	6	6	진황	680	13.0	9.2	2.0	1.6	14.8	7	
612	5	5	진황	400	10.5	8.0	1.4	0.7	10.7	5	
615	7	5	진황	600	11.0	10.0	2.5	0.5	12.0	7	
618	5	4	농황	290	10.5	6.8	1.5	0.7	15.5	4	
632	7	7	녹	480	10.8	8.6	1.7	1.7	9.0	4	
633	6	6	녹	340	10.0	7.2	1.5	2.3	8.7	5	
636	7	8	얼록	1,000	19.5	9.5	2.5	2.0	7.8	2	
637	7	8	회록	450	15.0	7.2	1.5	1.2	9.2	4	
639	5	6	농녹	450	11.0	8.0	1.7	0.8	9.4	4	
643	4	4	황	360	9.6	9.0	2.0	0.8	8.6	4	
649-2	6	7	연청	520	14.7	8.1	1.9	0.5	13.2	4	
649-6	6	7	연청	420	13.0	8.0	2.2	0.4	14.0	3	
650-1	6	6	백	330	10.0	7.5	1.7	0.3	9.8	8	
650-2	6	6	백	400	11.7	8.0	2.0	0.4	12.2	8	
650-3	6	6	백	350	10.0	7.5	2.0	0.3	13.2	8	

※ 1)초세:약(1)-강(9), 숙기:조(1)-만(9),과골: 1(저)-9(심)

(2) 가을 계통육성결과

가을 계통육성시험에서 과형이 안정되고 과색이 진하며 과골이 깊은 BN1612번 계통 외 3계통과 과피색이 진하고 숙기가 빠른 BN 1619계통 외 2계통을 모계로 선발하고, 이들 계통을 이용하여 상품적 가치가 있을 것으로 사료되는 은천계 8 조합을 작성하였다. 중국 수출용으로 과비대가 좋고 육질이 아삭아삭한 부계로 이용할 6 계통을 선발하였다.(표8)

표 8. 가을 계통육성에 있어서의 원예적 형질

BN	초세	숙기	과피색	1과중 (g)	과장 (cm)	과경 (cm)	과육두께(cm)	화흔부 (cm)	당도 (Brix)	과골	비 고
1601	7	5	황	570	12.0	9.7	1.4	1.4	13.0	4	
1602	6	6	진황	420	12.0	8.5	1.5	0.3	12.0	5	
1603	6	5	황	310	9.5	6.3	1.0	1.0	11.2	3	
1605	5	5	진황	430	12.5	7.5	1.5	0.4	13.4	7	
1606	5	5	진황	540	12.0	9.2	1.4	0.5	13.0	7	
1609	6	6	진황	630	16.0	9.0	2.0	0.6	11.8	7	
1610	6	7	진황	560	12.5	9.7	2.0	0.8	13.0	6	
1611	7	5	진황	470	12.0	8.5	2.0	0.5	13.6	6	
1612	7	5	진황	580	12.8	9.2	1.9	0.3	14.0	7	
1613	7	5	농황	300	12.5	6.4	1.2	0.3	17.0	5	
1614	7	6	연황	750	20.0	8.4	1.9	1.8	10.4	4	
1615	7	5	황	570	13.0	8.8	2.0	0.5	15.2	5	
1617-1	5	6	백	530	13.5	9.5	2.5	1.0	15.0	2	
1617-6	5	6	백	750	14.0	10.0	3.0	0.6	15.6	2	
1618-1	6	6	백	950	16.3	11.0	2.0	0.3	13.2	2	
1618-2	6	6	백	550	15.5	9.1	2.0	0.3	16.0	2	
1619	7	4	농황	430	15.5	9.3	2.0	0.5	16.0	5	
1622	6	6	백	520	15.5	8.0	2.0	0.4	13.0	7	
1623	7	6	연황	550	14.0	9.0	3.0	1.1	14.8	7	
1624	7	5	농황	400	14.5	8.5	1.5	0.9	12.0	5	
1625	7	6	연황	310	13.0	7.9	1.5	0.4	11.0	4	
1626	5	6	황	450	11.0	8.6	2.0	1.0	14.8	4	
1627	5	4	황	320	9.5	9.7	2.4	1.0	11.2	3	
1628	7	6	황	820	13.5	13.8	3.0	1.4	14.0	3	

※ 1)초세:약(1)-강(9), 숙기:조(1)-만(9),과골: 1(저)-9(심)

(3) 여주연구소 참외 조합 성능검정

98년도에 참외 조합을 작성하여 농우종묘(주) 육종연구소에서 조합 성능검정 결과는 표9와 같다. 대체적으로 여주에서 재배가 정상적으로 되어 원예적 형질을 잘 조사할 수 있었다.

- F_1 조합 성능검정에서의 조합들은 대비품종인 금노다지와 비교하여 과피색이

진하고 과골이 깊으며 과형이 단타원형으로 나타나 농가에서 선호하는 과 형태로 나타났다(그림 7). 당도에 있어서도 계통 육성한 고당도계를 모계로 이용하여 1~2도(brix) 정도 높아졌으며, 과 육질의 경도도 다소 단단하였다.

- 본 과제의 연구팀, 개발부 직원, 가락시장의 상인들로 구성된 평가팀을 만들어 평가한 결과 98OM166조합을 선발하였다.

- 공시한 조합들의 모·부계를 발효과의 발생이 없는 계통으로 이용하였고, 수확 후 공시한 조합들은 태좌부위에 공간이 약간 비어 있어 태좌부가 꽉차는 대비품종보다는 발효과 발생조건하에서 발효과의 발생이 감소될 것으로 판단한다.

- 재래종형 참외의 경우 초기 초세가 약하나 착과가 잘되고 기형과 발생이 적었으 며 과형이 균일하고 과비대도 양호하였다. 그러나 후기 열과가 심하고 과육이 물러지는 현상이 심하여 저장성이 떨어지고, 참외의 향이 아닌 멜론향으로 발현되며 태좌부의 종자가 커서 일반 참외처럼 먹을 수 없는 점이 단점으로 지적되었다.

표 9. 농우종묘 여주연구소에서의 참외 조합성능검정 성적

농우번호	조합 및 품종명	과피색	1과중	과장	과경	과육두께	화흔부	당도	경도	총수량	비고
98OM161	Kiss1/HK	7	350	10.5	8.5	1.9	0.4	12.0	1.4	29,200	
98OM079	SW3/KGG	7	440	9.3	8.3	2.3	0.4	14.2	1.3	17,800	
98OM166	SW3/KGG	7	370	10.5	8.2	2.2	0.5	14.2	1.5	19,900	
98OM169	GRS/HK	7	350	9.0	8.0	1.7	0.7	13.5	1.0	25,300	
98OM170	GRS/KGG	7	420	10.6	8.6	2.0	0.8	12.4	1.3	22,500	
98OM173	GRS/SW3	7	490	12.3	8.3	2.2	0.5	15.5	1.4	18,400	
금노다지	농우	5	450	11.4	7.3	1.8	0.5	12.3	1.3	14,200	대비
수퍼금싸라기	홍농	6	420	12.0	8.5	2.5	0.7	13.7	1.4	11,700	
금지게	한농	8	580	11.6	8.8	2.3	0.5	16.2	1.5	13,800	
황진이	농우	8	490	11.5	8.3	1.9	0.4	13.1	1.5	7,300	
98OM179	중국참외/97A2		700	13.5	9.5	2.1	0.5	12.4	1.2	6,600	
고향참외	농우		530	14.6	8.8	2.3	0.5	12.5	1.3	18,700	
깐치	재래종		470	13.8	8.3	1.9	2.1	7.8	1.2		
깐치	형질전환		280	8.3	7.4	1.5	3.2	12.6	0.9		

과피색:1(연황)-9(진황), 화흔부:은천계는 모두 단성화, 발효과:없음.

(3) 농가실증시험

- 공시된 조합중 98OM166조합이 현재 시판되고 있는 품종과 대비하여 볼 때 그 특성이 뚜렷하여 품종적 가치가 있을 것으로 판단되어 금 후 재배농가와 시교량을 확대하고자 시교종자를 획득하였다.

- 시교 98OM166(그림 8)

공시조합들은 금노다지에 비해 대체적으로 골이 깊고 과피색이 진한 황색이었으며, 특히 98OM166조합은 초세가 강하고 과비대가 양호하며, 골이 깊고 과피색이 진한 황색으로 과경이 금노다지 : 7.6cm, 98OM166 : 8.8cm로 굵고 균일하여 상품성이 높았다 (표 10). 육질은 금노다지에 비해 단단하며 아삭한편이고, 태좌부는 백색으로 깨끗하며 태좌부에 약간의 공동이 있어 발효과 발생을 줄일 수 있을 것으로 판단되며 고온기에서는 육

질변화가 적을 것으로 판단되며 연장 재배에서 그 특성이 우수하리라 판단되어 98OM166조합에 대한 원종증식을 하였다.

- 공시된 조합들은 대비인 금노다지에 비해 과피색이 진하고 과골이 깊으며 육질이 다소 단단한 특성이 있었다.

- 재래종형 참외조합은 착과가 불량하여 과가 지나치게 비대되어 정상적인 특성이 발현되지 않았지만 대비인 고향참외와 비교하여 과형이 개구리참외와 유사하고 과육이 연한 적색이며 당도가 대비에 비해 높고 식미가 비교적 양호한 98OM179조합을 선발하였다.

표 10. 참외 주산지인 경북 성주군에서의 참외 농가실증시험 성적

농우번호	조합 및 품종명	과피색	1과중	과장	과경	과육두께	당도	경도	총수량	비 고
98OM161	Kiss1/HK	7	470	13.7	9.0	2.3	14.1	2.1	4,900	
98OM079	SW3/KGG	7	430	12.3	8.6	2.2	15.8	2.2	4,300	
98OM166	〃	7	480	12.6	8.8	2.6	15.3	2.2	4,880	
98OM168	GRS/GRS	7	300	12.2	7.3	1.9	16.7	2.1	2,940	
98OM169	GRS/HK	7	430	13.3	8.7	2.0	16.6	2.0	4,300	
98OM170	GRS/KGG	7	450	12.3	8.7	2.3	16.0	2.1	4,500	
금노다지	농우	5	380	12.7	7.6	1.9	15.7	1.9	3,800	
98OM176	곶감/97A2		610	17.4	9.5	2.9	13.0	2.0		화흔부 0.4
98OM179	중국참외/97A2		640	18.0	8.9	2.3	13.4	1.8		0.4
	고향참외		620	20.3	9.6	2.1	9.5	1.5		0.4
	깐치		570	15.5	8.3	2.1	6.6	2.2		2.2
	깐치형질전환		410	13.3	10.1	2.1	11.4	2.8		2.8

과피색:1(연황)-9(진황), 화흔부:은천계는 모두 단성화, 발효과:없음.

그림 7. 참외 조합 성능 검정

그림 8. 농가실증시험에 의하여 선발된 우수 조합(98OM 166)

(4) 2000년에 성능검정 할 조합들에 대한 예비성능검정

예비성능 검정은 중국 수출용 참외 개발을 위한 것으로 금노다지 품종이 중국에서 재배적인 면이나 맛에 대해서는 상당한 호평을 받고 있으나 무게를 달아 판매하기 때문에 생산량이 낮다는 문제가 있어 메론의 친을 이용하여 이를 보완한 조합의 예비성능 검정을 실시한 결과 BN1631(99OM002)과 BN1632(99OM003)(그림 9)가 금노다지에 비하여 과비대가 월등하고 과피색이 깨끗하며 과골이 은백색으로 선명하여 외형이 우수하게 나타났으며 중국 현지 적응시험에서도 충분히 가능성이 있는 것으로 검증되었다.

그러나 대부분의 재배가 저온기인 봄재배로 이루어지기 때문에 2000년 시교사업을 통해 재검정하고 가능성이 있는 계통(1628)을 이용하여 다양한 조합작성과 기작성된 조합에 대한 성능검정도 중국농가와 병행하였다.

재래종참외 개발은 기보유하고 있는 계통들이 향은 좋으나 기형과 발생이 많고 육질이 분질이며 쉽게 물러져 저장성이 떨어지는 문제가 쉽게 해결되지 않고 있으나 현재 유전자 지도 작성을 위해 세대단축하고 있는 계통들이 표현형이 고정화 단계에 있으므로 국내에서 수확이 되는 즉시 인도네시아에 세대단축 및 조합작성을 의뢰하고 백피계 참외 개발을 위한 노력도 계속해 나가고 있다.

그림 9. 중국 수출용으로 기대되는 조합

5) 5차년도

가)계통육성 및 조합작성

(1) 봄 계통육성

전년도 조합의 성능검정결과에서 외형이나 과피색은 농가의 선호도에 접근된 상태이나 과육이 다소 단단하고 향이 떨어지는 문제점이 지적되어 이를 보완할 수 있는 계통을 이용하여 다양한 조합을 작성하였으며 당도를 높이기 위한 방법으로 유전자를 형질전환하여 당도를 증진시킨 깐치계는 화기 구조가 불량하고 착과 후 열과 발생이 많아 조합을 작성하기에는 다소 문제가 많을 것으로 판단되어 과형 및 초형을 안정된 상태로 유지시키고 양친으로 이용하고자 여교잡을 실시하였다.

현재 계통육성은 착과후 기존의 대비품종인 금노다지 양친보다 분리 선발한 계통(GRS,HK,KGG...)들이 착색이 빠르고 과피색이 진하며 과피표면이 다소 단단

한 것은 발효과를 일으키는 원인을 억제시켜 발효과를 감소시키는 것으로 판단되며 이러한 계통을 이용한 조합들에 대하여는 금년 봄 성능검정 결과에서 실제로 발효과가 감소되는 것으로 나타났으므로 보유하고 있는 계통들을 이용하여 다양하게 조합을 작성하였다.

(2) 여주연구소 참외 조합 성능검정

-99년도에 작성된 조합과 99년 성능검정에서 선발된 조합의 성능검정결과는 표11과 같고 99년에는 대형 하우스에서 재배를 하였고 2000년은 일반 재배농가와 비슷한 하우스 구조에서 재배를 하였다.

전년도에 퇴비가 많아 초세가 강하여 올해는 화학비료는 전혀 시용하지 않고 퇴비만 2t/100평 정도 넣고 재배를 하였으나 다소 초세가 강하게 재배되었다.

F_1 조합 성능검정에서 대비품종인 금노다지에 비해 조합들은 대체로 과피색이 진하고 과골이 깊으며 과형이 현재 농가에서 선호하고 있는 단타원형으로 나타났고 숙기가 다소 빠른 것으로 나타났다. 육색은 대비에 비해 깨끗한 흰색이며 육질은 다소 단단한 형태로 나타나 식미에 있어서는 다소 떨어지는 단점으로 나타나 보완해야 할 것으로 판단된다.

본 과제의 연구팀, 개발부 직원, 각지점 직원, 독농가들로 구성된 평가팀을 만들어 평가한 결과 99OM008, 99OM091, 99OM042, 99OM045조합을 선발하였고 98M166조합은 과면의 골이 균일하지 못하고 골이 합쳐져 과형이 불량해 상품성을 떨어뜨리는 원인이 되어 시교사업을 더 하여 생산.판매를 검토하고자 한다. 또한 98OM173조합은 과색, 육질, 당도등은 좋으나 과형이 다소 길고 과골이 균일 하지 못하여 상품성이 없고 이러한 재래종참외의 개발은 앞으로 분리계통의 성능을 검토하고 고정화된 후에 조합작성을 하고자 한다.

공시한 조합들의 양친은 과피색이 농황색으로 진하고 과골이 깊으며 과피가 질기고 육질이 단단하며 육색이 깨끗한 흰색으로 태좌부가 안정되어 발효과의 발생이 상대적으로 적게 나타나 계통에 따른 발효과 발생이 유전적으로 보완될 수 있을 것으로 판단된다.

재래종참외 개발은 현재 보유하고 있는 유전자원이 우수성이 떨어지고 조합능력도 떨어지므로 신계통이 고정될 때까지 보류하고자 하며, 중국 수출용에 대한 조합이 대비인 풍감1호에 비해 과비대가 월등하고 과피색이 진하며 육질에 즙이 많고 당도가 높아 식미가 우수하여 국내 남부지방에도 적합할 것으로 판단된다. 또한 발효과 발생이 전혀 없으므로 발효과 발생이 많아 메론재배를 하고 있는 고령 성산지역에도 좋은 반응을 보일 것으로 판단된다.

표 11. 여주연구소에서 수행한 참외 성능검정

품종.농우		숙기	1과중 (g)	과장 (cm)	과경 (cm)	과육두께(cm)	화흔부 (cm)	당 도 (Brix)	경도	수 량 성(%)	발효과율(%)	비 고
금노다지		5	420	11.8	7.5	1.7	0.4	15.6	1.8	100	31.6	대비
금황		6	510	12.2	8.3	1.7	0.6	15.0	1.8	128	53.7	
슈퍼금싸		6	500	12.2	8.3	1.7	0.5	15.2	1.7	128	53.0	
금괴		5	430	13.0	7.8	1.6	0.6	13.8	1.7	114	40.0	
99OM008	SW3×HK	4	435	11.0	8.5	1.5	0.4	15.0	1.9	125	0	국내 시교
99OM091	GRS×금연	3	425	11.2	8.4	1.35	0.65	15.0	1.8	82	18	〃
풍감1호		4	450	12.9	8.1	1.75	0.6	12.1	1.45	84	0	대비
왕감1호	KiSS1×풍비	4	470	12.3	8.6	2.0	0.6	13.5	1.3	114	0	중국 판매
99OM045	GRS×삼중	4	550	12.5	9.0	2.2	0.3	16.5	1.7	96	0	중국 시교
99OM042	HK×삼중	4	820	14.8	10.1	2.2	0.7	16.8	1.65	124	0	〃

숙기:1(早)-9(晩)

98OM008(진한금참외)　　금노다지

그림 10. 성능검정 시험에서 대비인 금노다지와 98OM008과의 비교

(3) 농가실증시험(표 12)

《98OM166》

(가) 금노다지에 비해 전체적인 초세는 다소 약한편이며 그 이외는 유사한 것으로 판단됨.

(나) 과형은 저온기 재배(3월이전에 수확)되는 것은 과장이 짧고 과면 골이 균일하게 발생되지 않고 없어지거나 흔적만 남는 현상이 약 30%정도 발생되고 있었지만 후기 4월 이후 수확되는 것은 기형과(골이 없거나 흔적만 남는 현상) 발생이 거의 없음.

(다) 육질은 저온기 수확된 것은 극히 단단(경도:금노다지-1.7, 98OM166-2.0)하고 4월이후 수확되는 것은 육질이 약간 연해지는 것으로 나타남.

《98OM008》

98OM166조합이 저온기에 재배될 경우 과육이 단단해지고 과골이 없어지는 단점이 있으나 98OM008의 경우는 과골이 없어지는 현상이 없었으며 과육도 다소 연한 것으로 나타났고 과피색이 진한황색이며 과육색도 흰색으로 깨끗하여 발

효과의 염려도 거의 없을 것으로 판단되 본 과제의 수행목적에도 부합되어 이를 진한 금참외로 생산.판매신고를 하였다.

※농가반응

대체적으로 과피색, 과형, 당도는 좋은 평가을 하였으나 과육이 단단하여 금노다지에 비해 식미는 다소 떨어지는 것으로 평가하고 고온기에 수확될 경우 기존의 시판품종(금노다지계,금지계)이 육질이 물러지고 식미가 떨어지고 있어 98OM166,98OM008의 경우는 충분히 가능성이 있을 것으로 평가하였고 전년도에 재배한 농가에서도 과장이 길어지지 않고 과골이 선명하며 과육이 물러지지 않으면서 당도가 좋았으며 농가실증시험을 한 농가에서 과형, 과색, 육색등이 아주 우수하게 나타나 다시 한번 해보고 싶다고 시료종자를 요청해 왔다.

표 12. 농가 실증시험 결과

품종. 농우	조 합 명	숙기	1과중 (g)	과장 (cm)	과경 (cm)	과육두께(cm)	화흔부 (cm)	당 도 (Brix)	경도	수량성 (%)	발효과율(%)	비 고
금노다지		5	340	11.4	7.5	1.9	0.4	18.0	1.7	100	17	
금황		5	350	11.6	8.3	1.8	0.4	17.5	1.7	108	22	
98OM008	SW3×HK	5	320	11.0	8.5	2.1	0.4	18.0	1.9	105	0	
98OM166	SW3×KGG	5	320	10.8	8.6	2.2	0.4	17.5	2.0	98	0	

숙기:1(早)-9(晩)

(4) 중국 지역연락시험(표 13)

중국에서 시판되고 있는 풍감1호(합비풍락)나, 자사의 왕감1호를 대비로하여 본연구소에서 보유하고 있는 멜론 형질을 이용하여 작성된 조합들이 저온기 과비대가 좋고 과형이 우수하며 육질이 사각하고 시원한 맛을 내며 특히 BN123은

과피색이 아주 진하고 과골이 선명하며 식미가 우수하여 대비에 비해 상품성이 있을 것으로 판단되며 중국 현지 판매상으로부터 시교 종자 요청을 받았다.

표 13. 중국 세농 지역연락시험

품종.농우		숙기	1과중(g)	과장(cm)	과경(cm)	과육두께(cm)	화흔부(cm)	당도(Brix)	경도	수량성(%)	발효과율(%)	비고
풍감1호		4	520	13.6	8.9	2.2	0.7	12.7	1.3	100	0	대비
왕감1호	KiSS1×풍비	4	520	13.3	9.4	2.4	0.6	13.5	1.3	114	0	
99OM045	GRS×풍비	4	560	14.2	9.0	2.2	0.4	15.5	1.7	106	0	
99OM042	GRS×삼중	5	980	15.8	9.8	2.5	0.7	15.8	1.65	104	0	

(5) 가을 계통육성

분리중인 재래종형의 계통들을 순화시켜 어느정도 원예적형질을 고정화시켰으며 성능검정 및 농가실증시험에서 선발된 98M008조합과 BN123번의 시교생산 및 원종증식을 실시하고 이를 품종화하기 위하여 특성조사를 실시하여 00년 12월 진한금참외(신고번호:02-0007-2000-21,품종명칭등록출원번호:명칭2000-1225)및 왕감2호((신고번호:02-0007-2000-22,품종명칭등록출원 번호:명칭 2000-1226)로 품종생산·수입 판매신고를 하였다.

나. 자방배양에 의한 유전자원 확보

자방배양 유래 식물체 150여 개체를 얻어 0.3% 콜리친을 처리하여 60여개의 배가된 식물체를 확보하였으나 재배적 특성 검정한 결과 기형이거나 원예적 특성이 불량하게 나타나서 양친으로 바로 사용하기는 어렵고 중간 모본으로 활용하고자 한다.

염색체의 검경은 뿌리 생장점으로부터 5mm 정도로 자른 propio-orcein으로 염색하여 1,000배의 광학현미경하에서 관찰하였다(그림 11).

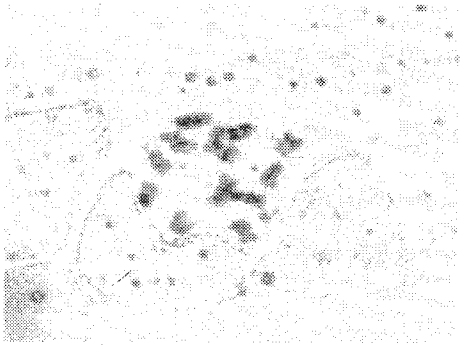


그림 11. 콜리친처리에 의하여 염색체가 배가된 자방배양 유래 식물체 (2n=2X=22)

다. 내병성 검정

1) 만고병 저항성 검정

메론 줄기에 병원균을 직접 감염시켜 포자를 형성시킨 다음 1×10^5 포자/ml 농도로 맞추어 5년간 고정된 90계통에 대하여 저항성 검정을 한 결과 3계통에서만 중도저항성 나타내고 나머지 계통에서는 모두 이병성으로 나타나 만고병에 저항성인 유전자원을 확보하지 못하였다.

2) CMV 저항성 검정

농우바이ㅎ종묘에서 보유하고 있는 참외 계통 중 90계통에 대하여 CMV 저항성 유무를 파악하고자 CMV 접종시험을 실시하였다. 참외 자엽이 완전히 전개되었을 때 carborundum (600mesh)법으로 CMV를 접종하였는데, 이때 사용한 바이러스원은 농업과학기술원에서 분양받은 CMV를 오이에 접종하여 증식시킨 후 이용하였다.

CMV 접종 후, 일차적으로 virus 증상이 나타나는 계통들은 도태시키고, 증상이 없는 계통들을 육안 선발하였다. 선발된 계통들의 상위엽을 채취(약 0.2 - 0.4g)하여 homogenizer로 잘 마쇄한 후 1㎖의 마쇄용 완충액을 첨가하고, 이 조즙액을 1.5㎖의 micro tubes로 옮긴 후 5,000rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 10배로 희석하여 HDLP에 의한 바이러스의 이병성 유무를 확인한 결과 본 시험에 이용된 계통들은 모두 이병성인 것으로 나타났다.

3) WMV 저항성검정

농우바이오에서 보유하고 있는 참외 계통 중 90계통에 대하여 WMV 저항성 유무를 파악하고자 WMV 접종시험을 실시하였다. 참외 자엽이 완전히 전개되었을 때 carborundum (600mesh)법으로 WMV를 접종하였는데, 이때 사용한 바이러스원은 서울대학교 바이러스연구실에서 분양받은 WMV를 오이에 접종하여 증식시킨 후 이용하였다.

WMV 접종 후, 일차적으로 virus 증상이 나타나는 계통들은 도태시키고, 증상이 없는 계통들을 육안 선발하였다. 선발된 계통들의 상위엽을 채취하여(약 0.2 - 0.4g)하여 homogenizer로 잘 마쇄한 후 1㎖의 마쇄용 완충액을 첨가하고, 이 조즙액을 1.5㎖의 micro tubes로 옮긴 후 5,000rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 10배로 희석하여 HDLP에 의한 바이러스의 이병성 유무를 확인한 농우바이오에서 보유하고 있는 모든 계통들은 모두 이병성인 것으로 나타났다. 금 후 바이러스에 저항성인 품종을 개발하기 위하여 당사에서 보유하고 있는 바이러스에 저항성인 야생종과 여교잡하고자 한다.

4) 만할병 저항성 검정

병원균 농도를 10^6spore/ml로 조절하여 균 현탁액을 만들었다. 파종 후 10일경 된

묘를 뽑아 흙을 잘 털고 균 현탁액에 30분 정도 침지한 후 폿트에 심어 저항성 정도를 관찰한 결과 표 14와 같이 참외 및 멜론류에 저항성 검정을 실시한 결과 시판중인 참외는 만할병에 아주 약한 것으로 나타났으나, 멜론에 있어서는 6계통, 5개의 F_1 조합을 선발하였다.

표 14. 참외 및 멜론의 만할병 저항성 검정결과

BN	품종명	접종주수	이병지수
801	황진이	32	5.0
802	금싸라기	32	5.0
803	GRS×HMS11108	32	4.88
804	GRS×JVA	32	2.25
805	GRS×S25	32	2.63
806	GRS×EBP	32	4.5
807	GRS	32	5.0
808	"	32	5.0
809	"	32	5.0
810	베스트	32	5.0
811	홈런스타	32	4.56
812	HMS11108×97A2	32	5.0
813	HMS11108×97A1	32	1.0
814	HRS-Ⅰ×HRS-Ⅱ	32	4.94
815	백피적육×97A1	26	1.06
816	NHTA×97A2	32	1.0
817	97A1×HRS-Ⅱ	32	1.0
818	97A1×설향F7	32	1.0
819	HMS11108	32	3.88
820	97A1	32	1.31
821	97A1	32	1.06
822	HRS-Ⅰ	29	4.17
823	HRS-Ⅱ	7	5.0
824	백피적육	16	4.63
825	NHTA	32	4.81
826	설향F8	10	5.0
827	S 25	32	4.63
828	ESP	32	1.25
829	올림픽	32	1.0
830	강영 F1	32	1.0
831	강영 F2	64	2.0
832	건각 F1	28	1.0
833	건각 F2	64	1.0
834	JVA	32	1.25
835	JVB	32	5.0

3. 결과요약

가. 현재 국내에서 재배되고 있는 재래종 품종들은 과형이나, 과피, 과육, 향, 육질 등에서 아주 다양한 차이를 나타내고 있었으며 이들을 이용하여 당도를 향상시키는 것은 재래종의 당도가 10도이하로 낮기 때문에 이를 고당도계인 은천계와 교배조합을 작성하여 조합의 성능을 검정한 결과 기존의 재래종보다 당도를 3 °이상 증가시켰다.

나. 현재 시판되고 있는 은천계품종의 발효과발생은 재배시 여러 가지 기후조건이 나 관리기술에 따라 차이가 있고 또한 유전적으로 과피가 다소 질기거나 육질이 단단하며 숙기의 차이에 따라서 발효과의 발생에 영향을 주는 것으로 나타났다.

다. 계통육성을 이용하여 발효과 발생이 거의 없고 당도가 높으며 과피가 진한 황색이며 육질이 다단하고 외형이 우수한 계통을 이용하여 작성된 조합중 발효과 발생이 없고 외관이 우수하고 당도가 높은 99OM008조합은 진한금 참외로, 중국 수출용으로 99OM045번은 왕감2호로 품종생산 · 수입판매신고를 하였다

제 2 절 NIRS를 이용한 참외 품질의 신속간이분석방법 확립

1. 서설

최근 우리 나라의 국민소득 수준의 향상과 더불어 고품질 채소에 대한 관심이 점차 증가하고 있다. 그러나 채소 품질의 구성하는 요인이 다양하고 복잡함에도 불구하고 그 평가는 관능적인 방법이나 간이한 기기를 이용하는 수준에 머물고 있어서 심도있는 연구를 위해서는 보다 간편하고 정확한 분석방법이 필요하다. 특히 우량한 품종의 개발을 목적으로 할 경우에는 다수의 유전재료를 다루어야 하기 때문에 효율적인 방법의 개발이 더욱 절실하다.

근적외선 분석법은 1960년초 미국 농무성(USDA)의 Karl Norris 박사가 곡물의 수분함량을 측정하는데 성공적으로 적용한 이후 이의 활용 가능성에 대한 많은 연구가 수행되고 있다. 이 방법은 시료의 전처리 과정이 단순하여 시약을 필요로 하지 않고, 측정시간이 매우 짧으며, 여러 성분의 함량을 동시에 측정할 수 있는 장점을 가지고 있다. 그러나 분석을 하고자 하는 성분에 대한 검정식(혹은 검량식 : calibration equation)의 개발과정이 어렵고, 동일한 성분이라도 대상 작물이나 시료의 형태가 다르면 적용할 수 없는 단점이 있다.

본 연구에서는 참외류의 당(sucrose, glucose 및 fructose)함량을 신속, 간이하게 측정하기 위한 방법으로서 近赤外線 分析法(NIRS method : Near Infrared Reflectance spectroscopy)의 활용가능성을 알아보고자 수행하였다.

2. 시료의 수집

당 함량에 대한 변이가 다양한 참외를 대상으로 근적외선 분석식을 개발하여 분석식의 활용도를 높이기 위하여 농우바이오(주) 육종연구소에서 수집, 교배하여 육성중인 은천계, 재래종 참외 및 멜론을 대상으로 시험을 수행하였으며 그 수집내용은 표 1 및 그림 1과 같다.

표 1. 연도별 참외 수집 내역

수 집 년 도	시 료 점 수	비 고
'97	120	재래종, 은천계, 메론
'98	110	〃
'99	224	〃
2000	284	재래종, 은천계, 메론의 조합후대

그림 1. 수집된 여러 종류의 참외

3. 참외의 당 함량 습식분석(HPLC) 조건 설정

당 함량 측정을 위하여 사용한 HPLC(High Performance Liquid Chromatograph)의

분석조건은 표 2와 같으며, 그 결과 sucrose, glucose 및 fructose의 순으로 검출되었다(그림 2).

표 2. 참외 과실의 당 함량을 측정을 위한 HPLC 분석 조건

Instrument	Pump	Waters 510 pump
(HPLC model)	Injecter	U6K injector
	Detector	Waters 410 (RI detecter)
Mobile phase		De-ionazed water(Ca-EDTA:0.5mg/L)
Flow rate		0.5 mℓ/min
Column		SugarPak I (Waters)

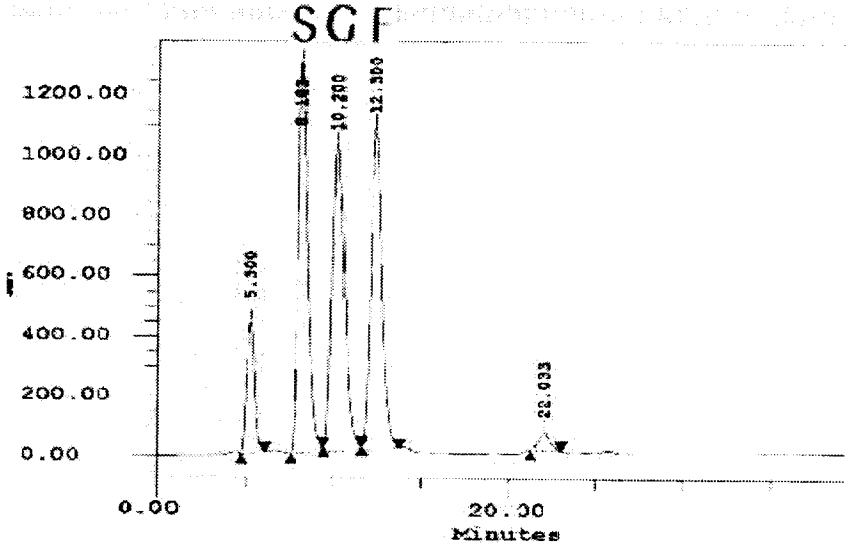


그림 2. HPLC에 의한 참외 당 분석 chromatogram

S : sucrose, G : glucose, F : fructose

4. 근적외선 분석법 개발을 위한 분석 조건 설정

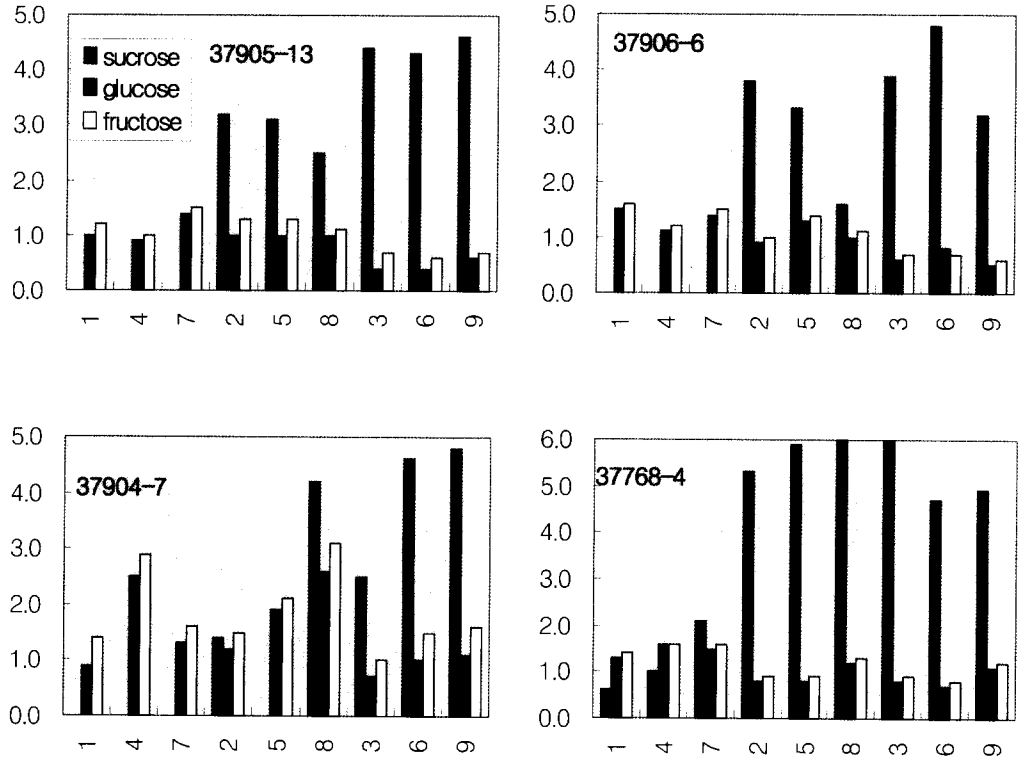
근적외선 분석법은 액체, 고체 및 반고체 등 다양한 시료형태로 적용이 가능하기

때문에 본 연구의 목적에 부합할 수 있는 시료 조건 및 형태를 결정하는 하는 것이 일차 과제였다. 가장 편리한 방법은 과실을 파괴하지 않고 시료의 표면에서 목적으로 하는 성분을 측정하는 것인데, 이 형식을 채택하기에는 몇 가지 전제 조건을 필요로 한다. 예를 들어 측정이 되는 부위의 면적과 깊이에서 얻어지는 결과가 전체 시료를 어느 정도의 대표하는 지 여부이다. 이를 알아보기 위하여 참외 과실의 부위별 당 조성과 함량을 조사하였다.

가. 참외 과실의 부위별 당함량

참외 과실을 과육(과피쪽, 태좌쪽), 태좌 그리고 과탁에서 꽃자리까지 세 부분 총 아홉 등분하여 당의 종류와 함량을 측정하였다(그림 3). 참외 당은 sucrose, glucose 및 fructose로 구성되었는데 부위별로 그 함량과 분포가 차이를 보였다. 총당 함량은 태좌, 태좌쪽 과육, 과피쪽 과육의 순으로 높았고 sucrose는 태좌와 태좌쪽 과육에 주로 존재하였으며, 과피쪽 과육에는 없거나 적었다. glucose와 fructose는 과실 전체에 분포하였으나 과육에 그 함량이 약간 높았다. 이는 참외의 엽에서 광합성에 의하여 축적된 탄수화물이 sucrose의 형태로 과실에 이동 축적되고, 과실의 성장을 위하여 glucose와 fructose의 형태로 분해되는 사용되는 것으로 생각된다(그림 3).

이러한 결과를 종합하여 볼 때 참외는 부위별로 당의 종류와 함량이 달라 특정부위를 대상으로 당 함량을 측정하는 것은 과실 전체를 대표할 수 없다는 결론을 얻었다. 보다 균일한 시료의 형태로 대표성을 부여하기 위하여 참외 과실을 착즙하고 이를 근적외선 분석에 이용하였다.



(함량 단위 : %)

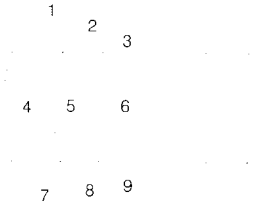


그림 3. 참외 부위별 당의 종류와 함량

나. 참외 과즙의 근적외선 투과 흡광도 측정

액체 상태인 참외 과즙의 근적외선 흡광도를 측정하기 위하여 근적외선 분광광도계(NIRsystem 6500)의 시료 장착 모듈을 투과 전용으로 설치하였고 시료를 약 1cm 두께의 액체 cuvette에 부어 약 1분간 흡광도를 측정하였다(그림 4).

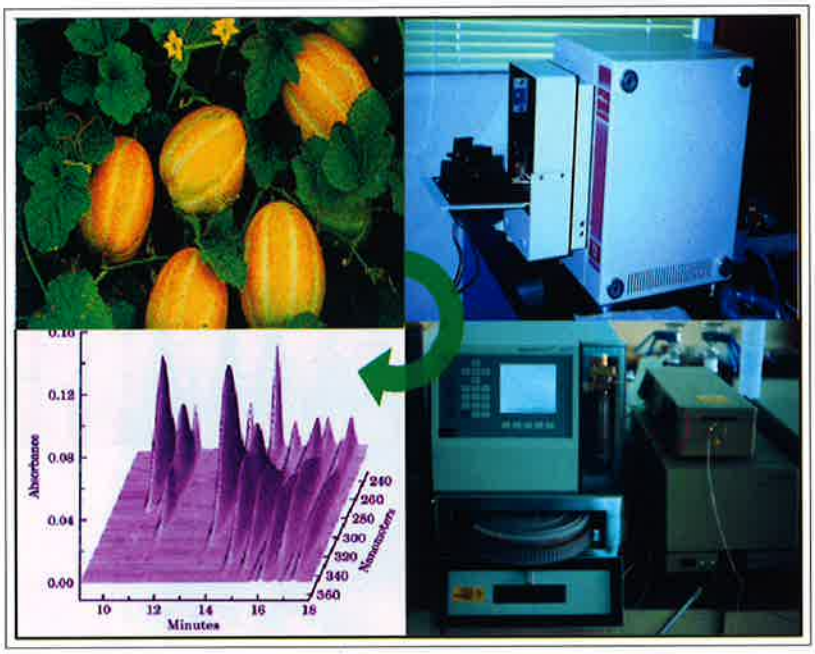


그림 4. 근적외선 분석 과정

근적외선 분석기 NIRSystem 6500(좌상), HPLC의 UV Detector

근적외선 1100 ~ 2500nm 파장범위에서 2nm 간격으로 시료의 흡광도를 측정하였는데, 근적외선 스펙트럼에서 2000nm 이후의 장파장 영역에서 흡광도가 심한 변화를 보이는 것은 액체시료 내의 부유물에 의한 혼탁도에 기인하는 것으로 판단되었다. 이러한 현상은 개발될 근적외선의 안정성을 감소시킬 것으로 판단되어 착즙 시료를 원심분리한 후 상층부만 이용하는 방법으로 어느 정도 해결할 수 있었다(그림 5).

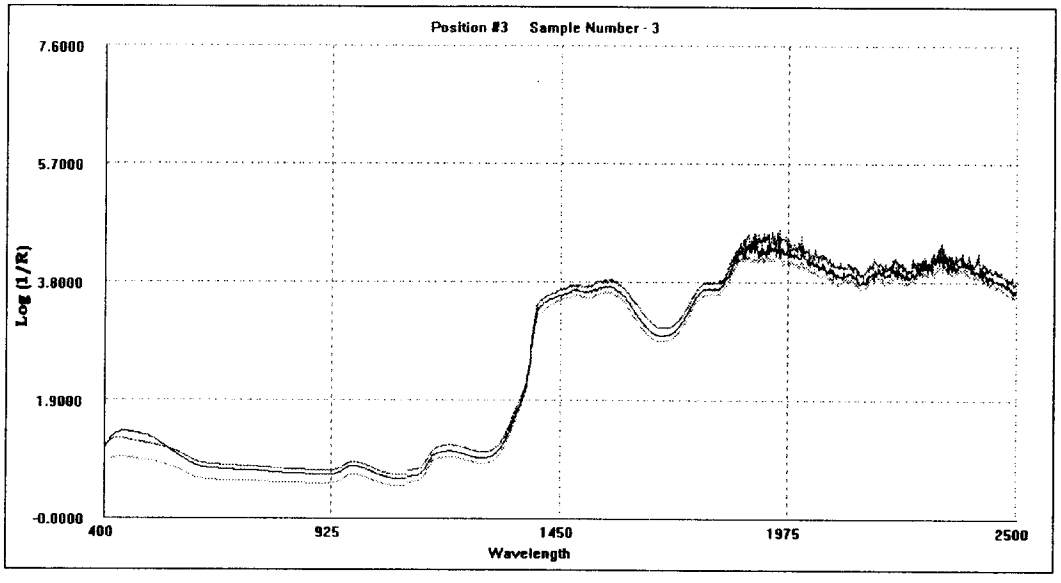


그림 5. 참외 과즙의 가시광선 및 근적외선 영역 투과 흡광도

5. 참외 당함량 분석을 위한 근적외선 분석식 개발 방법

가. 근적외선 분석식 개발 과정

근적외선 분석식의 개발 과정은 크게 전체 집단을 고려한 시료 수집, 근적외선 흡광도 측정, 목적 성분의 함량 측정, 성분 함량의 변화와 상관이 높은 파장 탐색, 이를 이용한 분석식의 작성, 새로운 시료를 대상으로 분석식 검정 그리고 개발된 분석식을 이용한 일상분석(routine analysis)으로 나눌 수 있다.

개발된 분석식의 최종평가는 분석식 작성에 사용되지 아니한 시료 집단을 이용하여 그 정확도를 검정하고, 그 결과가 기대수준 이하의 경우에는 시료를 추가하여 조정, 보완하였다(그림 6).

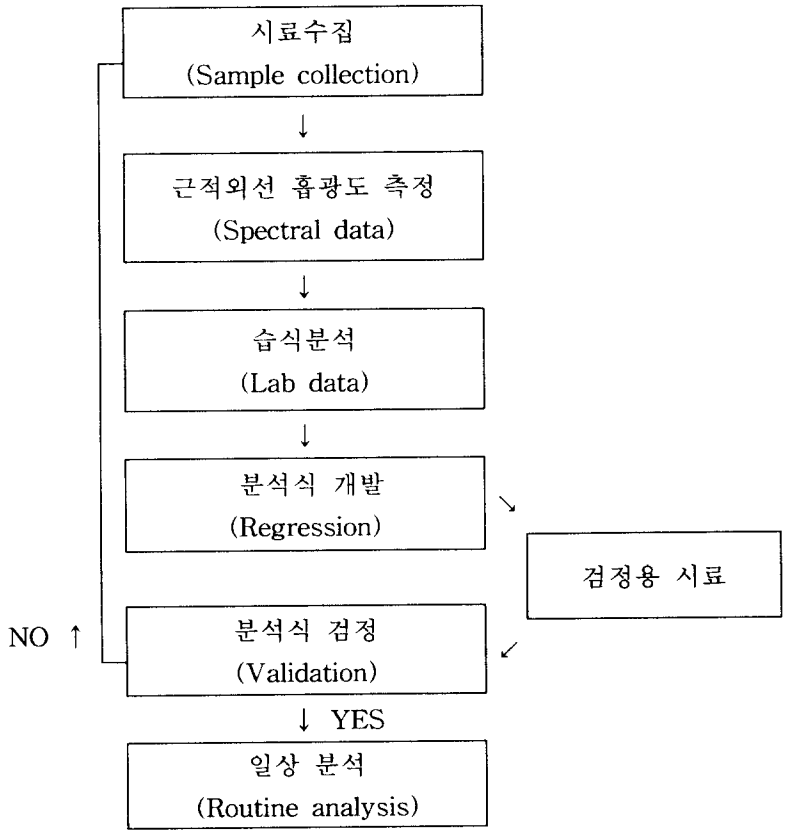


그림 6. 근적외선 분석식 개발 과정

나. 근적외선 분석식 개발을 위한 고려 사항

1) 시료의 수집

근적외선 분석식을 개발하는 데 가장 적합한 시료는 분석 대상으로 하는 성분의 함량 변이가 낮은 시료에서부터 높은 것까지 골고루 분포하는 집단이다. 분석 대상이 되는 작물의 일반적인 특성상 원칙적으로는 정규분포를 하나, 집단이 큰 경우 몇 개의 정규분포 집단으로 나누어져 구성되어 질 수 있다. 그러나 실제 시료 수집 시 나타나는 경향은 위의 예측을 벗어나는 경우가 많아 정규분포도 하지 않고, 변이의 특정부분에 해당하는 시료가 부족하기도 하였다. 그러나 이는 연차별로 수집시료의 점수가 많아짐에 따라 어느 정도 해결되었다.

2) 근적외선 흡광도 측정과 스펙트럼의 수처리(math treatment)

시료의 근적외선 흡광도를 파장별로 측정한 결과(그림 5)를 시료의 흡광도 스펙트럼(spectrum)이라고 하며 이를 바로 기준분석(본 실험에서는 HPLC)의 결과와 비교하여 근적외선 분석식을 계산하기도 하지만 미분을 통하여 잠재적인 관련파장을 분리하고 시료의 물리적인 변동 요인을 감소시키기도 한다. 이를 원래의 스펙트럼(original spectrum)에 대한 수처리(math treatment) 혹은 monochromator math라고 하는데 그 최종결과의 좋고 나쁨은 일반적으로 시행착오 과정 및 연구자의 경험을 통해 얻어진다. 본 실험에서는 여러 가지의 수처리 방법 즉 1차, 2차, 및 3차 미분을 통하여 가장 좋은 결과를 보인 경우를 채택하였다.

3) 분석식 작성을 위한 시료의 선발

3년 동안('97~'99년) 수집된 시료를 대상으로 근적외선 분석식을 개발하였는데 그 진행 과정은 첫해에 수집된 시료를 대상으로 일차적으로 분석식을 작성하고, 분석식의 정확성을 검정한 후 다음 2회('98~'99)의 연차 동안 추가로 수집된 시료와 합하여 가며 기 개발된 분석식을 보완하였다. 그 이유로는 이러한 과정을 반복함으로서 부족한 시료 집단부분의 보완과 더불어 연차 변이로 내재될 수 있는 편차를 극복하기 위해서였다.

분석식 작성을 위하여 시료를 선발하는 방법으로는 크게 두 가지를 병행하였다. 첫째로 HPLC에 의해 분석한 각 당 성분별로 함량에 따라 적당한 점수의 시료를 선발하는 방법, 둘째로 HPLC 결과에 관계없이 시료의 NIRS 스펙트럼 자체만 이용하여 시료를 선발하는 방법이었다. 두 번째 방법은 수집된 모든 시료를 집단의 개념으로 파악하여 필요 없이 중복되는 시료를 줄이고 선발의 밀도를 고르게 하려는 통계적인 방법으로 본 연구에서는 주성분 분석(PCA : Principle Component Analysis)을 이용하였다. 본 연구에서는 이 두 방법의 각각의 효과가 상황에 따라 달라 어떤 방법이 더 좋은가 하는 결론은 얻을 수 없었다.

4) 분석식 작성시 사용한 회귀분석 방법

근적외선 스펙트럼과 기준분석(HPLC) 결과의 회귀분석을 위하여 근적외선 분석기 개

발회사에서 제공하는 프로그램인 ISI(Infrasoft international)을 사용하였는데 이 프로그램에서 지원하는 회귀분석 방법으로는 다중회귀 분석(MLR : Multi-Linear Regression)으로 Step-up regression, Step-wise regression이 있으며, 다중변형법(Multi-variant)으로 Principle Component Analysis(PCA : 기본요소분석법), Partial Least Square(PLS ; 부분최소제곱법) 등 여러 가지가 있는데 본 연구에서는 Step-wise regression과 Partial Least Square를 사용하였다.

5) 연차별 시험 추진과정

가) 1년차('97년)에는 근적외선 분석법 개발을 위하여 목적성분의 기준 분석방법을 채택하고, 대상작물의 특성을 고려하여 근적외선 분석에 적합한 시료의 형태를 결정하며 각 성분별로 초기 분석식을 구하여 가능성을 고찰하였다.

나) 2년차('98년)에는 시료의 수집을 통하여 초기 분석식의 적용범위를 확대하고 재구성하였다.

다) 3년차('99년)을 개발된 분석식을 다량의 시료 집단에 적용하여 그 정확성을 검정하고 분석식의 보완하였다.

라) 4년차(2000년)에는 보완 개발한 분석식을 실제 일상분석을 통하여 이용하여 보고 그 활용성에 대한 평가를 하였다.

6. Sucrose 함량 측정을 위한 근적외선 분석식 작성

가. '97년도 시험 결과

'97년 수집한 시료 120점을 HPLC로 분석한 결과 sucrose함량의 변이 폭은 0.68~4.84%였으며, 이 중에서 20점의 시료를 선발하였다. 이 시료들의 근적외선 스펙트럼은 1100~2500nm까지 2nm 간격으로 측정된 것이지만 실제로 그 절반 수준인 4nm의 간격의 흡광도를 이용하였다.

시료 각각의 고유스펙트럼(original spectrum)을 가지고 회귀식을 유도하였으나 원하는 수준의 결과를 얻을 수 없었는데 이는 목표로 하는 성분과 관련된 파장대역이 다른 기본적인 요인, 즉 물리적 요인이나 시료에 더 많이 함유된 성분에 영향을 받는 것으로 추정되었다. 이 스펙트럼을 일차 미분하였는데, 이는 다른 성분과의 중첩(overlap)된 흡광도를 분리하고 물리적인 원인에 의한 스펙트럼의 Base-line의 변화를 보정해 주는 효과를 위한 것이었다.

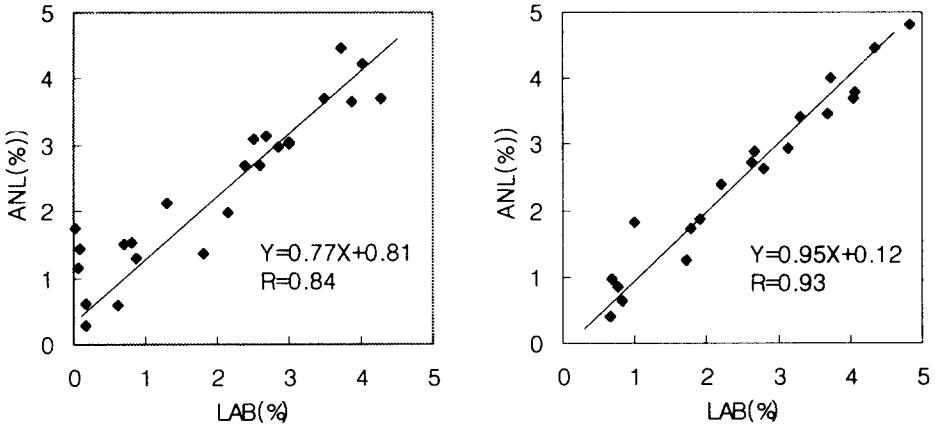
회귀분석 방법으로는 step-up regression방법을 사용하여 sucrose함량 변화와 상관도가 높은 파장 순으로 1692, 1728, 1504, 2292 및 2244nm를 선정하였으며 각각의 흡광도를 변수로 하여 분석식을 계산하였다. 각 파장에 대한 계수(coefficient)는 표 3과 같다.

위의 과정을 통하여 얻은 근적외선 분석식의 정확도는 R^2(multiple correlation coefficient)로 볼 때 0.93였으며, 근적외선 분석식 작성시 사용하지 않은 24점의 시료를 대상으로 정확성을 검증한 결과 0.84의 정확도를 보였다(표 3, 그림 7). 이러한 결과로 판단하여 보면 한해 동안의 시료 수집으로는 다양한 변이를 내포하지 않은 상태임에도 불구하고 어느 정도의 가능성을 보여준 것으로 생각되었다.

표 3. 참외의 sucrose 함량 측정을 위한 근적외선 분석식 작성과 검정 결과

Used wavelength (nm)	Coefficient	Calibration		Prediction	
		R^2	SEC	R^2	SEP
	20.44				
1692	-189.73				
1728	320.32	0.93	0.35	0.84	0.57
1504	204.32	(20)*		(24)*	
2292	-44.18				
2244	-68.45				

Math treatment: 1, 4, 4, 1(derivative, gap size, segment 1, segment 2)
* :Number of samples used
R^2: Multiple correlation coefficient between known sugar content and NIR estimation value
SEC: Standard error of calibration
SEP: Standard error of prediction



(Calibration) (Prediction)

그림 7. NIRS와 HPLC에 의한 참외의 sucrose함량 측정 비교

(LAB : HPLC, ANL: NIRS)

나. '98년도 시험결과

'97년도에 수집한 시료에 약 110점을 추가하여 약 230점을 가지고 시험을 수행하였으며, 그 중에서 다시 HPLC로 측정한 sucrose함량을 기초로 분석식 작성에 이용할 시료 113점을 선발하였다. 선발된 시료의 sucrose함량 범위는 '97년도의 0.68~4.84보다 넓은 0.1~6.41%이며 그 평균이 2.11%였다. 이 시료들의 고유스펙트럼(original spectrum)을 '97년도와 같이 1차 미분하여 분석식을 추정하여 보았으나 기대하는 수준에 미치지 못하여 미분 2차 미분으로 변형하였다.

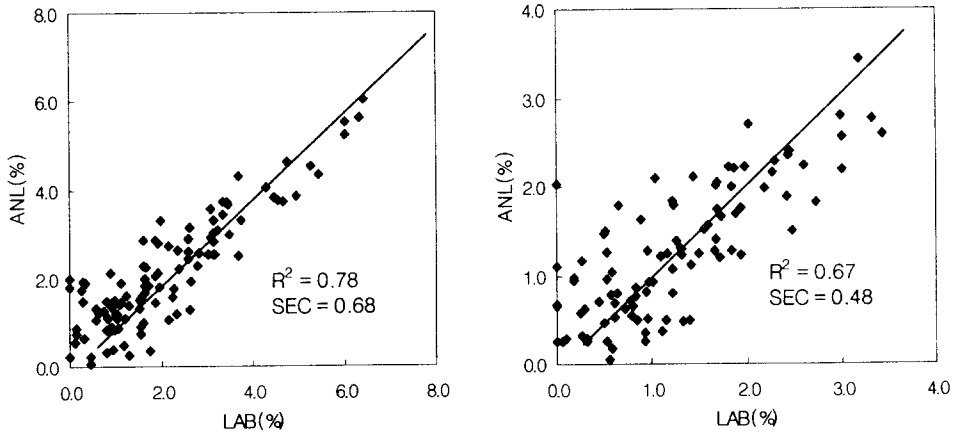
회귀분석은 step-wise regression 방법을 사용하였는데 이는 step-up regression방법이 회기식 기여도가 개별적으로 높은 변수의 순서로만 구성되는 방식인데 비하여 변수 간의 상호작용을 높이는 방식이기 때문이었다. 그 결과로 1940, 1032, 1900, 1284 및 1190nm의 흡광도가 sucrose의 함량변화를 잘 추정할 수 있는 것으로 나타났다(표 8).

이 분석식의 정확도는 R^2(multiple correlation coefficient)값으로 볼 때 0.78이였으며, 분석식 작성 시 사용하지 않은 109점의 시료를 대상으로 그 정확성을 알아 본 결과 R^2 값이 0.67이었다. R^2값으로 살펴본 분석식은 기대보다 낮았지만 대부분의 시료들이 ±1.0%의 편차 범위 내에 분포하고 있었고 sucrose함량이 낮은 범위에서 편차가 심한 것으로 보아 활용상으로 큰 문제가 없을 것으로 판단하였다(그림 4).

표 4. 참외의 sucrose 함량 측정을 위한 근적외선 분석식 작성과 검정 결과

Used wavelength (nm)	Coefficient	Calibration		Prediction	
		R^2	SEC	R^2	SEP
	-187.82				
1940	10.11				
1032	-28945.00	0.78	0.68	0.67	0.48
1900	-13.65	(113)*		(109)*	
1284	48384.13				
1190	-33518.73				

Math treatment : 2, 4, 4, 1 (derivative , gap size, segment 1, segment 2)



(Calibration) (Prediction)

그림 8. NIRS와 HPLC에 의한 참외의 sucrose함량 측정 비교

(LAB : HPLC, ANL: NIRS)

다. '99년도 시험결과

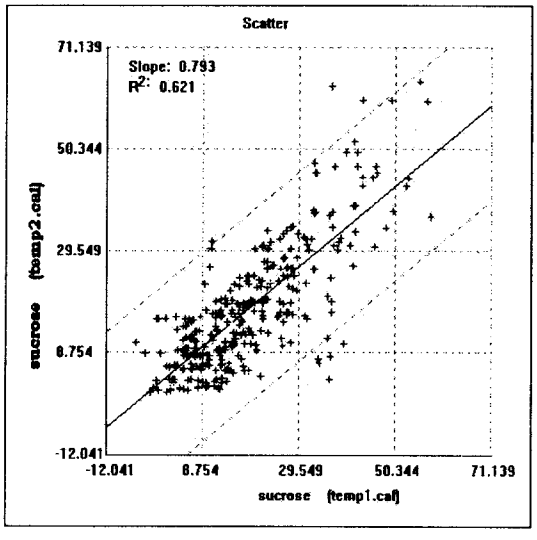
'97~'98년도에 수집된 시료와 더불어 총 450여점의 폭넓은 시료를 대상으로 근적외선 분석식의 활용성을 알아보고, 분석식을 보완하였다. '98년에 얻은 근적외선 분석식의 정확성을 높이기 위하여 기존의 113점을 대상으로 재 계산을 하였으며 그 정확성(R^2 값)을 0.78에서 0.89로 높였다.

회귀식 재 계산시 고유스펙트럼(original spectrum)을 2차 미분한 것은 '98년과 동일하며 회귀식에 이용한 변수는 증가하였다. 회귀분석은 step-wise 방법을 사용하였으며 1228nm 등의 흡광도가 sucrose의 함량변화와 관련이 높은 것으로 나타났다(표 5). 분석식 작성시 사용되지 않은 341점의 시료를 대상으로 분석식의 정확성을 검정한 결과 R^2 값이 0.62였으며 대부분의 시료들이 ±1.0%의 편차 범위 내에 분포하고 있어 300점이상의 다량의 시료들에서도 적용이 가능함을 알 수 있었다(그림 9).

표 5. 참외의 sucrose 함량 측정을 위한 근적외선 분석식 작성과 검정 결과

Used wavelength (nm)	Coefficient	Calibration		Prediction	
		R^2	SEC	R^2	SEP
	65.58				
1228	57161.70				
2104	-82.27	0.89	0.46	0.62	0.82
1174	36035.26	(113)*		(341)*	
1208	-62012.71				
1652	-665.78				

Math treatment : 2, 4, 4, 1 (derivative , gap size, segment 1, segment 2)



(Prediction) (단위 : mg/g)

그림 9. NIRS와 HPLC에 의한 참외의 sucrose함량 측정 비교

7. Glucose 함량측정을 위한 근적외선 분석식 작성

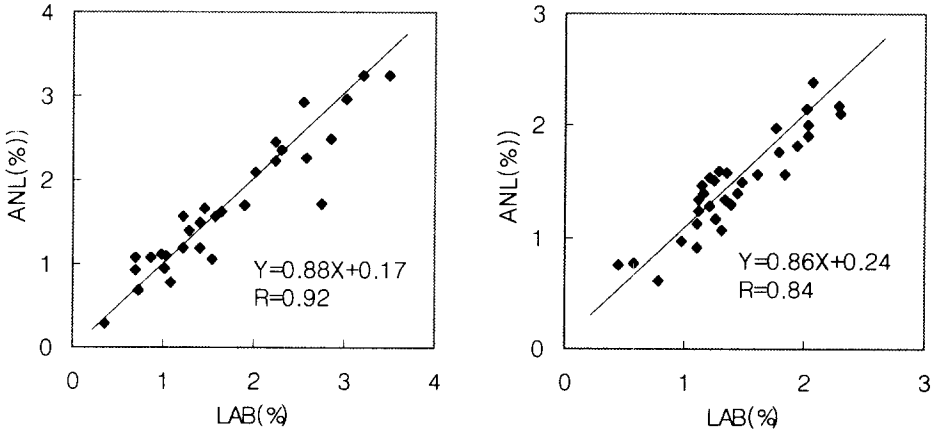
가. '97년도 시험결과

'97년도 glucose 분석을 위한 근적외선 분석식 작성에 있어서도 sucrose와 동일한 파장대역(1100~2500nm)과 스펙트럼 수처리 방법을 이용하였는데 glucose함량의 변이를 고려하여 sucrose 분석를 위한 시료와 다른 30점의 시료를 선발하였다.
glucose함량 변화와 관련있는 흡광도를 보이는 파장은 1712, 2344, 1480, 1596 및 1612nm이었으며 이들 요소로 계산한 회기식의 정확성(R^2)은 0.92였다. 이 분석식은 다른 32점의 시료를 대상으로 검정하여 0.84정도의 정확성을 보였다(표 6, 그림 10).

표 6. 참외의 glucose 함량 측정을 위한 근적외선 분석식 작성과 검정 결과

Used wavelength (nm)	Coefficient	Calibration		Prediction	
		R^2	SEC	R^2	SEP
	-7.79				
1712	-383.18				
2344	30.44	0.92	0.24	0.84	0.19
1480	-114.75	(30)*		(32)*	
1590	-164.55				
1612	135.48				

Math treatment : 1, 4, 4, 1 (derivative, gap size, segment 1, segment 2)



(Calibration) (Prediction)

그림 10. NIRS와 HPLC에 의한 참외의 glucose 함량 측정 비교

(LAB : HPLC, ANL: NIRS)

나. '98년도 연구결과

'98년에는 HPLC로 측정한 glucose함량을 기초로 근적외선 분석식 작성에 필요한 대상 시료 114점을 선발하였는데 선발된 시료의 glucose함량 범위는 0.11~2.82%이며 그 평균이 1.26%로 시료의 점수가 증가한 것에 비해서는 그 함량 범위가 늘지 않았다.

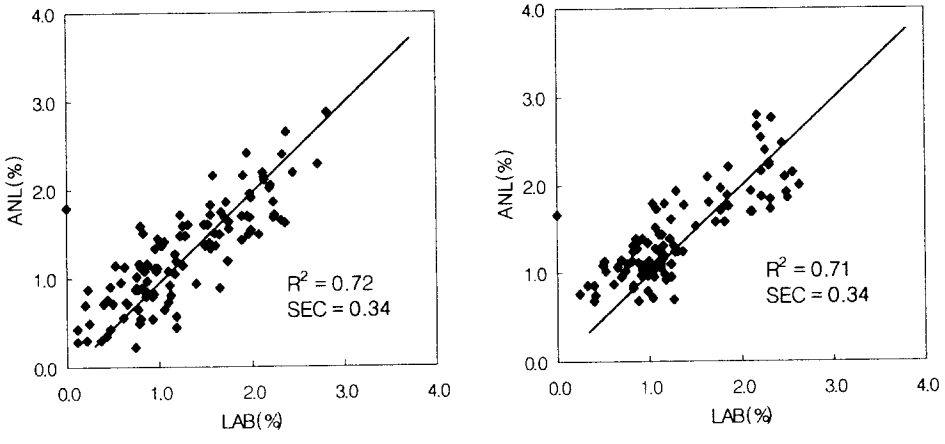
'97년과는 다르게 고유 스펙트럼(original spectrum)을 2차 미분하여 변형하였으며, 회귀분석은 step-wise 방법을 사용하였다. 1984, 1820, 1940, 1018 및 1174nm의 흡광도가 glucose의 함량변화와 관련이 높은 것으로 나타나 이를 회귀식에 이용하였다(표 7).

결과로 얻어진 분석식의 정확도(R^2)는 0.72이였으며 분석식 작성시 사용되지 않은 109점의 시료를 대상으로 분석식의 정확성을 검정한 결과 R^2 값이 0.71이었고. 또한 대부분의 시료들이 ±0.5%의 잔차 범위 내에 분포하고 있어 그 활용성이 높을 것으로 판단되었다(그림 11).

표 7. 참외의 glucose 함량 측정을 위한 근적외선 분석식 작성과 검정 결과

Used wavelength (nm)	Coefficient	Calibration		Prediction	
		R^2	SEC	R^2	SEP
	-187.82				
1984	6.39				
1820	-36.23	0.72	0.34	0.71	0.34
1940	-5.86	(114)*		(109)*	
1018	39034.84				
1174	-24760.68				

Math treatment : 2, 4, 4, 1 (derivative, gap size, segment 1, segment 2)



(Calibration) (Prediction)

그림 11. NIRS와 HPLC에 의한 참외의 glucose 함량 측정 비교

(LAB : HPLC, ANL: NIRS)

다. '99년도 연구 결과

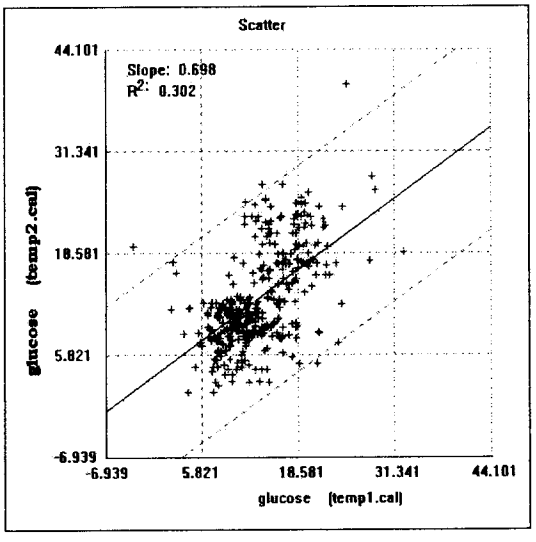
'99년에는 3개년간 수집한 약 450점의 시료를 대상으로 재구성하여 근적외선 분석식 작성에 필요한 대상 시료 112점을 선발하였다. 선발된 시료의 glucose함량범위는 0.2~2.9%이며 그 평균이 1.4%였다. 시료를 증가하였음에도 불구하고 그 변이 폭은 증가하지 않아 분석식의 정확도가 예상외로 감소하는 결과를 보였다.

회귀분석은 step-wise 방법을 사용하였으며 2210nm 등의 흡광도가 glucose의 함량변화와 관련이 높은 것으로 나타났다(표 8). 그 결과 분석식의 정확도(R^2)는 0.63이였으며, 분석식 작성시 사용되지 않은 341점의 시료를 대상으로 분석식의 정확성을 검정한 결과 R^2 값이 0.30이었다(그림 12). 이는 참외의 glucose함량 및 그 분포가 다른 성분들 보다 낮으며 변이 폭이 좁은 것에 기인하는 것으로 생각되었다. 그러나 두 분석방법 간의 결과가 ±1.0%내에 분포하였고 다수가 ±0.5%내에 존재하기 때문에 실용상 큰 무리가 없을 것으로 판단되어 다음 연차의 시험을 통하여 채택 여부를 결정하기로 하였다.

표 8. 참외의 glucose 함량 측정을 위한 근적외선 분석식 작성과 검정 결과

Used wavelength (nm)	Coefficient	Calibration		Prediction	
		R^2	SEC	R^2	SEP
	-87.51				
2210	34.64				
2104	65.92	0.63	0.40	0.31	0.54
1728	-409.08	(112)*		(341)*	
1134	-5251.56				

Math treatment : 2, 4, 4, 1 (derivative, gap size, segment 1, segment 2)



(Prediction) (단위 : mg/g)

그림 12. NIRS와 HPLC에 의한 참외의 glucose 함량 측정 비교

8. Fructose 함량측정을 위한 근적외선 분석식 작성

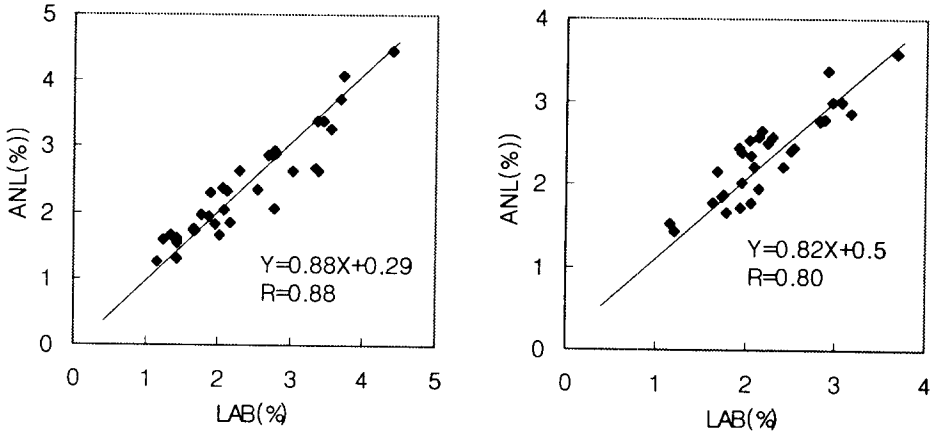
가. '97년도 연구결과

'97년 fructose 함량의 범위가 1.0~4.0%인 35점을 선별하여 근적외선 분석식을 작성한 결과, fructose의 함량변화와 관련된 파장은 1672, 2356, 1768, 1964 및 2300nm였으며 이를 변수로 작성한 회귀식은 정확성(R^2)이 0.86이었다. 다른 30점의 시료를 대상으로 검정한 정확성은 0.80이었다(표 9, 그림 13).

표 9. 참외의 fructose 함량 측정을 위한 근적외선 분석식 작성과 검정 결과

Used wavelength (nm)	Coefficient	Calibration		Prediction	
		R^2	SEC	R^2	SEP
	6.41				
1672	-273.33				
2356	-37.41	0.88	0.32	0.80	0.28
1768	-92.54	(35)*		(30)*	
1964	33.09				
2300	-19.28				

Math treatment : 1, 4, 4, 1 (derivative, gap size, segment 1, segment 2)



(Calibration) (Prediction)

그림 13. NIRS와 HPLC에 의한 참외의 fructose 함량 측정 비교

(LAB : HPLC, ANL: NIRS)

나. '98년도 연구결과

'98년에는 '97년 시료에 추가하여 약 220점 중에서 HPLC로 측정한 fructose함량을 기초로 회귀식 작성에 필요한 시료 114점을 선발하였다. 선발된 시료의 fructose함량

범위는 0.34~3.50%이며 그 평균이 1.47%이었다.

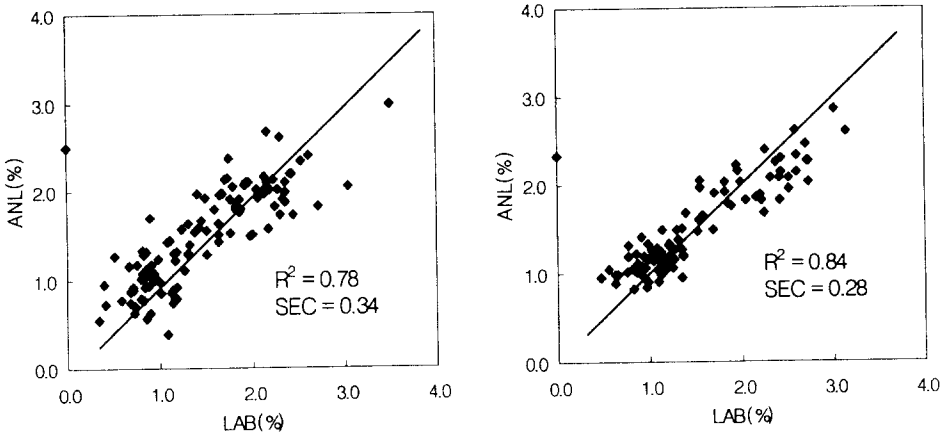
고유 스펙트럼(original spectrum)은 2차 미분하여 변형하였고, 회귀분석은 step-wise 방법을 사용하였으며 1698, 1002 및 1172nm의 흡광도가 fructose의 함량 변화와 관련이 높은 것으로 나타났다(표 10).

새로 작성된 분석식의 정확도(R^2)는 0.78이였으며 검정을 위해 109점의 시료를 분석한 결과 R^2값이 0.84이었다. 또한 대부분의 시료들이 ±0.5%의 잔차 범위 내에 분포하고 있어 상당히 안정적인 식을 얻었음을 알 수 있었다(그림 14).

표 10. 참외의 fructose 함량 측정을 위한 근적외선 분석식 작성과 검정 결과

Used wavelength (nm)	Coefficient	Calibration		Prediction	
		R^2	SEC	R^2	SEP
1698 1002 1172	-187.82 281.09 19914.13 -21663.31	0.78 (114)*	0.34	0.84 (109)*	0.28

Math treatment : 2, 4, 4, 1 (derivative, gap size, segment 1, segment 2)



(Calibration) (Prediction)

그림 14. NIRS와 HPLC에 의한 참외의 fructose 함량 측정 비교

(LAB : HPLC, ANL: NIRS)

다. '99년도 연구결과

'99년도에는 3개년간 수집된 약 450점을 이용하여 분석식을 보완하였다. 근적외선 분석식 작성에 필요한 대상 시료는 스펙트럼을 근거로 주성분분석(PCA)을 수행하여 불필요하게 중복된 유사 시료를 제외하고 112점을 선발하였다. 선발된 시료의 fructose함량범위는 0.6~3.5%이며 그 평균이 0.58%였다.

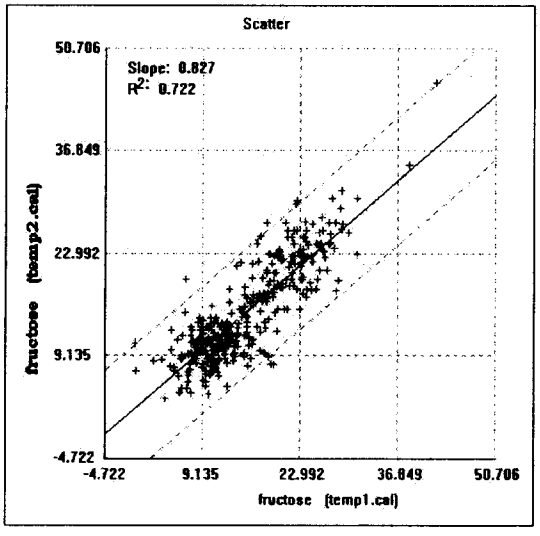
고유스펙트럼(original spectrum)은 2차 미분하여 변형하였고, 회귀분석은 step-wise 방법을 사용하였으며 1280nm 등의 흡광도가 fructose의 함량변화와 관련이 높은 것으로 나타났다(표 11).

그 결과 얻어진 분석식의 정확도(R^2)는 0.86이였으며, 남은 341점의 시료를 대상으로 분석식의 정확성을 검정한 결과 R^2값이 0.72이었다(그림 15).

표 11. 참외의 fructose 함량 측정을 위한 근적외선 분석식 작성과 검정 결과

Used wavelength (nm)	Coefficient	Calibration		Prediction	
		R^2	SEC	R^2	SEP
	-87.51				
1280	8022.26				
1666	487.84				
2264	-20.12				
1684	-579.80	0.86	0.25	0.72	0.37
1342	4300.96	(112)*		(341)*	
1112	-39579.11				
1170	-17695.14				
2120	39.28				
1180	19076.82				

Math treatment : 2, 4, 4, 1 (derivative, gap size, segment 1, segment 2)



(Prediction) (단위 : mg/g)

그림 15. NIRS와 HPLC에 의한 참외의 fructose 함량 측정 비교

9. 총 당 함량측정을 위한 근적외선 분석식 작성

가. '98년도 시험결과

'98년도에는 참외 총당 함량에 대한 분석식을 개발하였는데, 총당 함량은 sucrose, glucose 및 fructose를 합한 유리당의 성분량으로 계산하였다. 참외 과즙 스펙트럼을 주성분분석(PCA)을 이용하여 근적외선 분석식 작성에 필요한 대상 시료 91점을 선발하고, 선발된 시료의 스펙트럼에서 총당함량 변화와 상관이 높은 파장을 이용하여 함량측정 회귀식을 계산하였다. 선발된 시료의 함량범위는 0.25~12.7%이며 그 평균이 5.18%였다.

시료의 총당 함량과 관련된 파장을 다른 간섭요인들과 분리한 상태에서 찾기 위하여 다른 경우처럼 고유스펙트럼(original spectrum)을 2차 미분하여 변형하였다.

회귀분석방법으로는 다변량 분석의 한 종류인 MPLS(modified partial least square)방법을 사용하였다. 그 결과 얻어진 분석식의 정확도(R^2 : multiple correlation

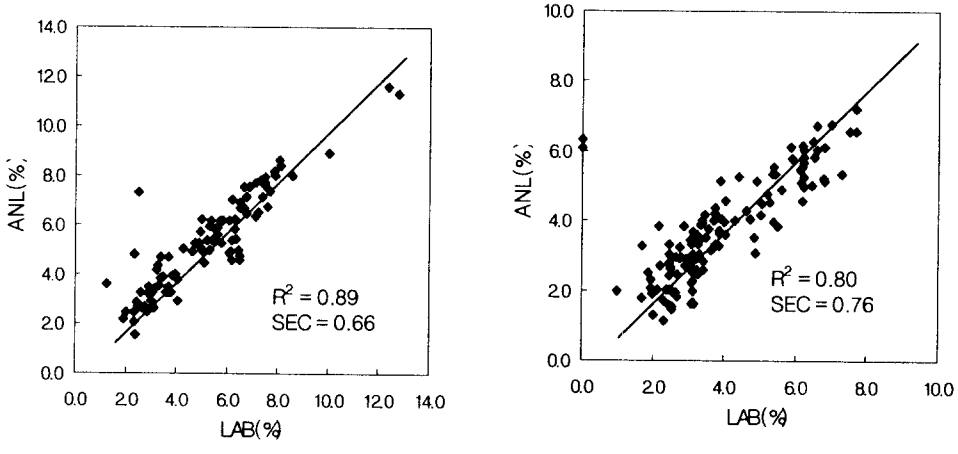
coefficient)는 0.89였으며, 분석식 작성시 사용되지 않은 127점의 시료를 대상으로 분석식의 정확성을 검정한 결과 R^2값이 0.80이었다(표 12). 대부분의 시료들이 ±1.0%의 잔차 범위 내에 분포하고 있어 시료의 분석시 발생할 수 있는 소수의 이상치(outliers)를 고려한다면 R^2값이 더 높을 것으로 판단된다(그림 16).

표 12. 참외의 총당 함량 측정을 위한 근적외선 분석식 작성과 검정 결과

Used wavelength (nm)	Calibration		Prediction	
	R^2	SEC	R^2	SEP
920 - 2000, 2 (1050)**	0.89 (91)*	0.66	0.80 (127)*	0.76

Math treatment : 2, 4, 4, 1 (derivative, gap size, segment 1, segment 2)

** : Number of wavelength used



(Calibration) (Prediction)

그림 16. NIRS와 HPLC에 의한 참외의 총당 함량 측정 비교

(LAB : HPLC, ANL: NIRS)

나. '99년도 연구결과

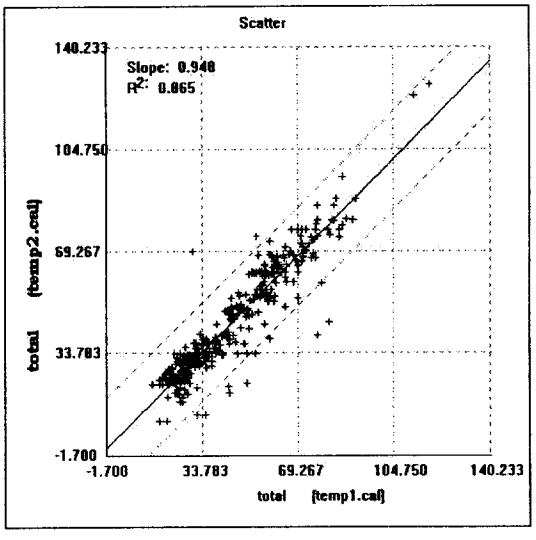
3년간 수집된 457점의 시료 중 약 1/4에 해당하는 112점을 선발하여 근적외선 분석식 작성에 필요한 대상시료로 하였는데, 이는 목적성분의 연차변이와 함량변이를 모두 포함할 것을 기대하였기 때문이었다. 선발된 시료의 스펙트럼에서 총당함량 변화와 상관이 높은 파장을 이용하여 함량측정 회귀식을 계산하였다. 선발된 시료의 총당함량 범위는 1.7~12.7%이며 그 평균이 4.8%였다. 시료의 목표 성분함량과 관련있는 파장을 다른 간섭요인들과 분리한 상태에서 찾기 위하여 고유스펙트럼(original spectrum)을 2차 미분하였다.

회귀분석방법으로는 전년에 이용한 MPLS(modified partial least square)방법 대신에 step-wise방법을 사용하여 진전된 결과를 얻을 수 있었다. 그 결과 분석식의 정확도(R^2 : multiple correlation coefficient)는 0.90였으며 분석식 작성시 사용되지 않은 341점의 시료를 대상으로 분석식의 정확성을 검정한 결과 R^2값이 0.87이었다(표 13). 대부분의 시료들이 ±1.0%의 잔차 범위 내에 분포하고 다른 성분들 보다 함량이 많으며 변이가 다양하여 매우 정확한 분석식이 얻어진 것으로 판단된다(그림 17).

표 13. 참외의 총당 함량 측정을 위한 근적외선 분석식 작성과 검정 결과

Used wavelength (nm)	Coefficient	Calibration		Prediction	
		R^2	SEC	R^2	SEP
	-87.51				
1758	158.22				
1354	-5171.53	0.95	0.47	0.87	0.70
1262	-36121.89	(112)*		(341)*	
1112	-42787.61				
1240	-52909.87				

Math treatment : 2, 4, 4, 1 (derivative, gap size, segment 1, segment 2)



(Prediction) (단위 : mg/g)

그림 17. NIRS와 HPLC에 의한 참외의 총당 함량 측정 비교

10. 근적외선 분석법에 의한 sucrose 함량 분석

근적외선 분석식에 의한 측정결과와 HPLC분석에 의한 결과 사이에는 R^2값이 0.85로 정확도가 높았으며 22점 중 1점이 2.0%의 편차를 보인 것을 제외하고 모든 시료가 ±0.5 %사이에 있어 이를 고려한다면 실제로 더욱 정확하다고 판단되었다(그림 18).

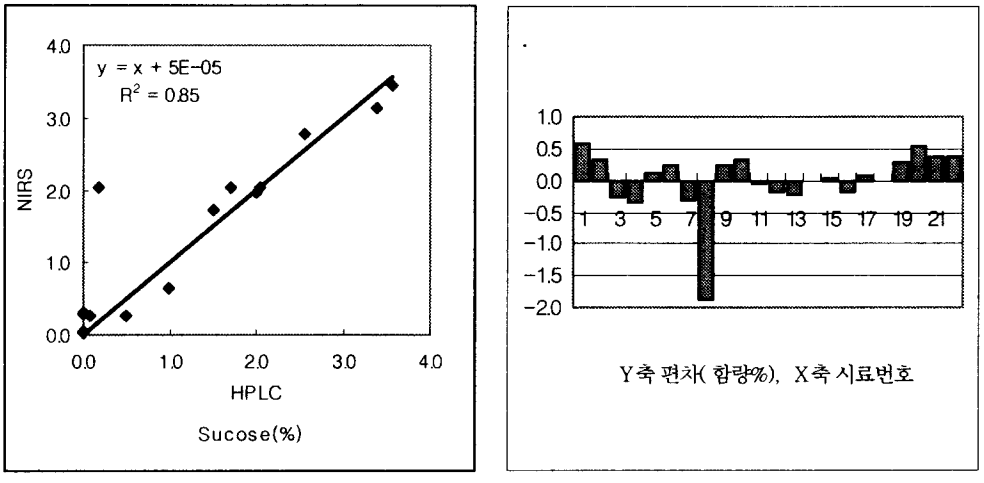


그림 18. 개발된 근적외선 분석식에 의한 sucrose함량 측정의 정확도
(좌 : NIRS와 HPLC의 결과 비교, 우 : 두 분석법간의 시료별 편차)

284점에 대한 근적외선 분석결과를 그림 19에 개괄적으로 나타내었는데 sucrose함량범위가 0~7.2%이었으며 특이한 점은 시료의 sucrose가 적거나 거의 없는 때에는 근적외선 분석법 특성상 음의 값으로 계산되는 경우가 있었다.

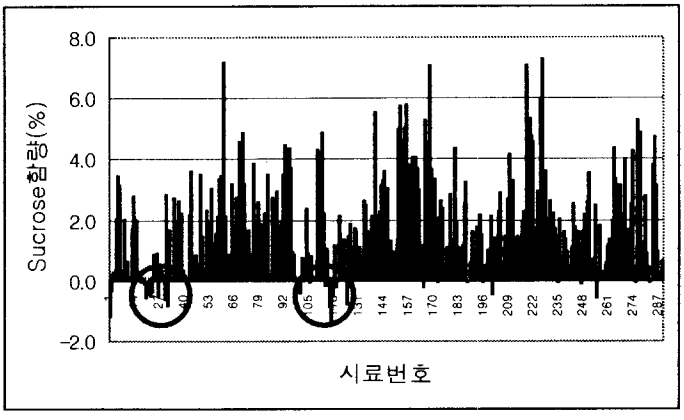
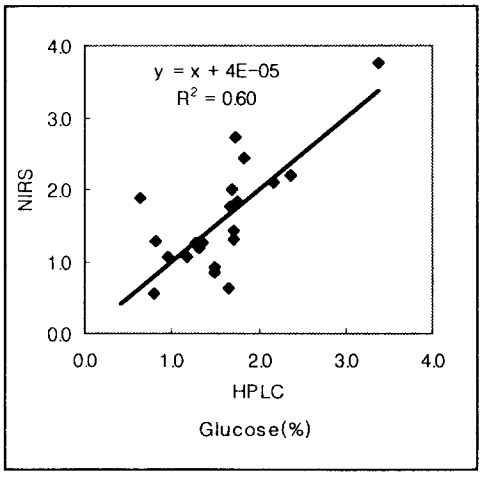


그림 19. 참외의 근적외선 분석법에 의한 sucrose함량 측정

11. 근적외선 분석법에 의한 glucose 함량 분석

''99년까지 개발된 근적외선 분석식으로 glucose 함량을 측정하고, 그 중 22점을 선택하여 정확성을 알아보았는데, 그림 20에서 보는 바와 같이 잔차가 한 시료을 제외하고 모두 ±1.0%내에 그중 16점은 ±0.5%내에 존재하였고, R^2가 0.6인 것은 소수의 큰 편차를 보인 시료가 영향을 미친 것으로 본 분석식의 이용상 큰 문제가 없는 것으로 생각된다.



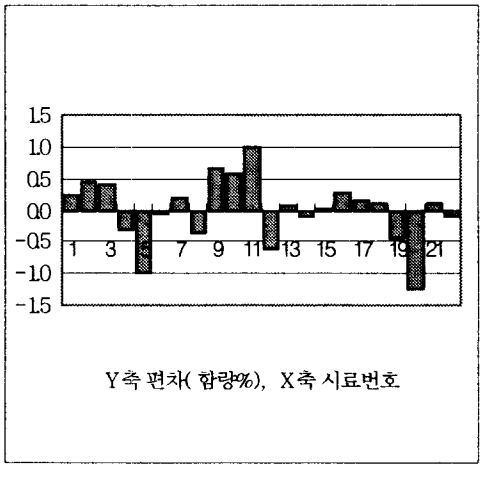


그림 20. 개발된 근적외선 분석식에 의한 glucose함량 측정의 정확도
(좌 : NIRS와 HPLC의 결과 비교, 우 : 두 분석법간의 시료별 편차)

284점에 대한 근적외선 분석결과 sucrose함량 범위가 0~7.2%인 것에 비하여 glucose는 0~3.5%로 좁았으며 glucose성분이 검출되지 않은 시료는 없었다(그림 21).

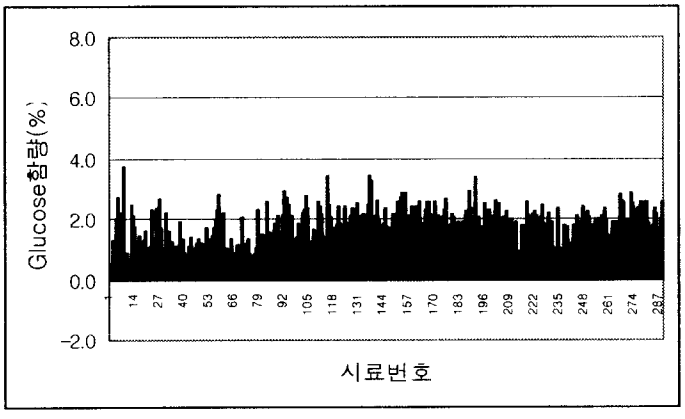


그림 21. 참외의 근적외선 분석법에 의한 glucose함량 측정

12. 근적외선 분석법에 의한 fructose 함량분석

'99년까지 개발된 fructose에 대한 근적외선 분석식은 그림 22에서 보는 바와 같이 잔차가 모든 시료에 있어서 ±1.0%내에 있었고, 그중 18점은 ±0.5%내에 존재하였다. R^2도 0.76으로 fructose를 신속, 간이하게 분석에 이용 가능할 것으로 판단되었다.

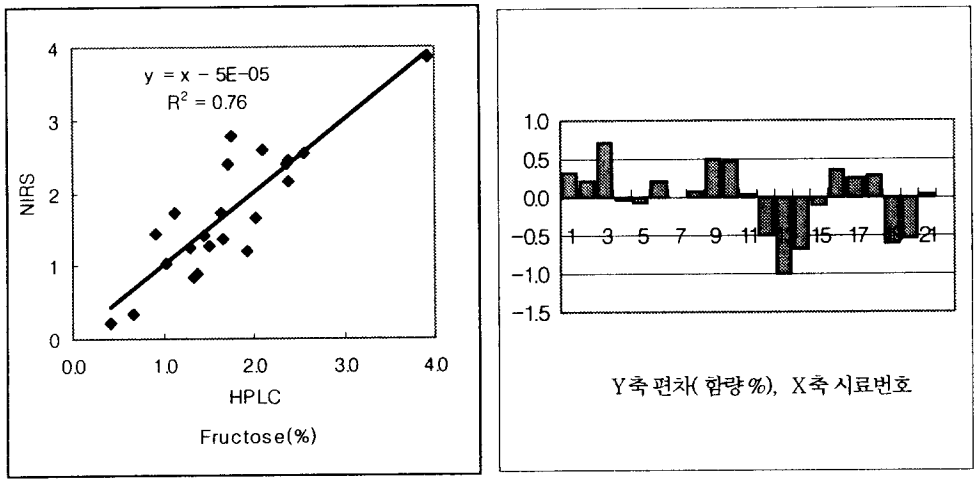


그림 22. 개발된 근적외선 분석식에 의한 fructose 함량 측정의 정확도
(좌 : NIRS와 HPLC의 결과 비교, 우 : 두 분석법간의 시료별 편차)

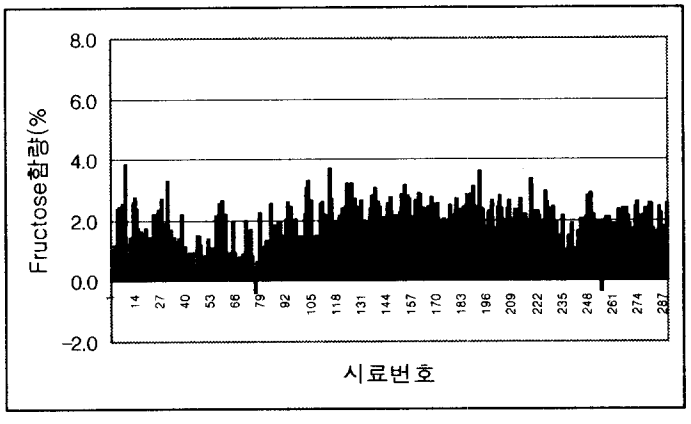


그림 23. 참외의 근적외선 분석법에 의한 fructose함량 측정

284점에 대한 근적외선 분석결과 sucrose함량 범위가 0~7.2%인 것에 비하여 fructose는 0~3.7%였으며, glucose의 함량과는 상당히 유사한 변이를 보였다(그림 23).

13. 근적외선 분석법에 의한 총당 함량 분석

총당 함량에 대한 결과는 그림 24에서 보는 바와 같이 두 방법간의 잔차가 1점을 제외하고 모든 시료에 있어서 ±1.0%내에 있었고, 그중 17점은 ±0.5%내에 존재하였다. R^2도 0.95로 높아 총당 함량을 신속, 간이하게 분석하기에 매우 활용도가 높을 것으로 판단된다.

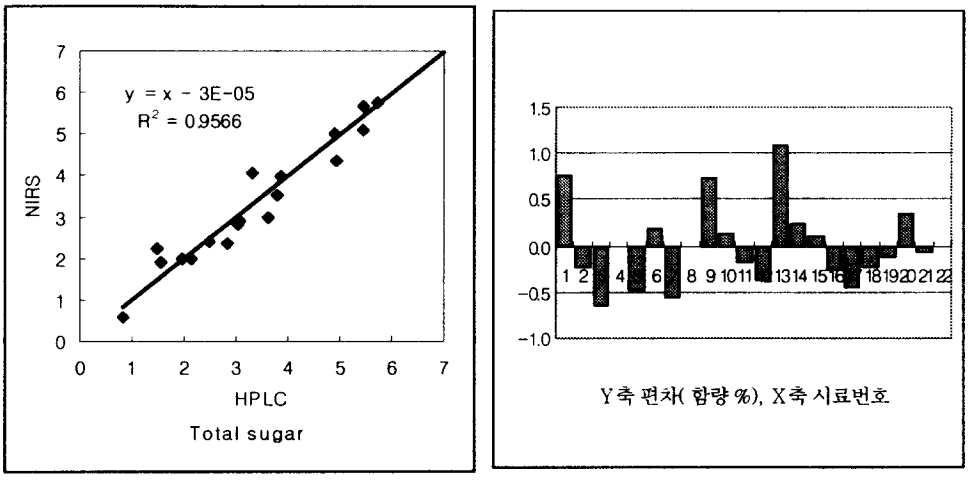


그림 24. 개발된 근적외선 분석식에 의한 총당 함량 측정의 정확도
(좌 : NIRS와 HPLC의 결과 비교, 우 : 두 분석법간의 시료별 편차)

참외 284점에 대한 근적외선 분석결과 총당 함량 범위가 0~7.2%인 것에 비하여 fructose는 0.2~12.9%였다(그림 25).

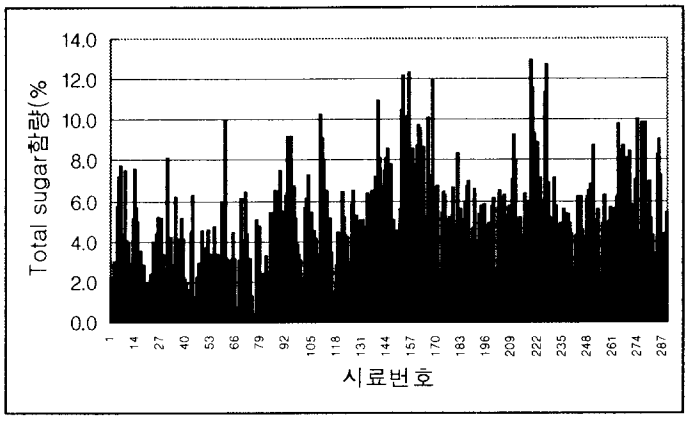


그림 25. 근적외선 분석법을 이용한 참외의 총당 함량 측정

14. 결과 요약

가. 개발된 근적외선 분석식으로 수집한 284점의 참외를 대상으로 일상분석(routine analysis)을 수행하였다.

나. 근적외선 분석법으로 sucrose함량을 측정한 결과 R^2 값이 0.85로 정확도가 높았으며 22점 중 1점이 2.0%의 편차를 보인 것을 제외하고 모든 시료가 ±0.5%사이에 있었다.

다. Glucose의 경우에는 잔차가 한 시료을 제외하고 모두 ±1.0%내에 그중 16점은 ±0.5%내에 존재하였고, R^2가 0.6 이었지만 실용상 문제는 없었다.

라. Fructose에 있어서는 모든 시료에 있어서 잔차가 ±1.0%내에 있었고, 그중 18점은 ±0.5%내에 존재하였다. R^2도 0.76으로 신속, 간이 분석법으로 이용이 가능하였다.

마. 총당 함량에 대한 결과는 잔차가 1점을 제외하고 모든 시료에 있어서 ±1.0%내에 있었고, 그중 17점은 ±0.5%내에 존재하였다. R^2도 0.95로 높아 총당 함량을 신속, 간이하게 분석하기에 매우 활용도가 높을 것으로 판단되었다.

제 3 절 DNA marker의 육종활용을 위한 연구

1. 서 설

참외와 멜론(Cucumis melo L.)의 원산지는 분명치 않으나 이집트북부와 인도지방으로 알려져 있으며 이들은 원산지로부터 전파되는 과정에서 분포지역의 환경조건에 적응된 생태형으로 발전되어 서양계 멜론과 동양계 멜론으로 분리되었다(표 등. 1996). 우리나라에서는 참외가 삼국시대에 만주를 걸쳐 들어온 것으로 추측되며 재배가 쉽고 참외과실의 독특한 향기, 시원한 맛, 아삭아삭한 육질 등이 국민들의 기호에 맞아 멜론보다 더욱 많이 선호되고 있다. 최근에는 국민들의 소득수준이 높아짐에 따라 고품질 참외가 요구되어 여러 공공연구소와 육종회사에서 이를 위한 품종육성이 활발히 이루어져 왔다.

품종육성에 있어 새로운 유전적 조합을 위하여 육종재료를 선택할 때 유전자원의 다양성에 대한 정보와 종이나 집단의 유전적 연관성에 대한 평가는 매우 중요하다(백 등. 1997). 분자 표지 유전자들이 개발되기 전까지 식물 유전학의 연구는 주로 표현형 마커들을 위주로 하여 행하여 졌는데 이들 표현형 마커들의 수는 상당히 제한적이어서 이들을 이용하여 식물의 게놈을 연구하는 데는 상당히 어려운 점들이 있어서 식물의 유전자 지도의 작성은 옥수수, 토마토 등 극히 일부의 작물에서 이용되었다. 이후 생화학적인 방법으로 동위효소를 이용하였으나 그리 활발하지 못하였다. 분자유전학적인 기법으로 처음에 개발된 것은 RFLP 기법으로서 이 방법은 분석하고자 하는 생물체의 게놈 DNA를 추출하여 여러 가지 제한효소로 절단 후 절단된 단편의 차이를 특정한 탐침 유전자를 이용하여 분석하는 방법으로서, 절차가 복잡하며 다량의 DNA가 소요되며 분석을 위해서는 클로닝 된 DNA 단편이 꼭 있어야 하는 단점이 있다.

최근에는 DNA 연쇄중합반응 (PCR ; polymerase chain reaction)의 발견 등으로 진핵생물의 게놈 분석이 한층 용이하여 졌는데 PCR을 이용한 기법들은 기존의 RFLP

방법의 단점을 보완할 수 있으며 간편하여 식물 유전자의 마커 기술은 상당히 빠른 속도로 진보하고 있다. PCR을 이용한 마커 기법에는 여러 가지가 있는데 대표적인 방법들로는 RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA), SSRP(Simple Sequence Repeat Polymorphism), AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)등이 있다.

RAPD 방법은 인위적으로 합성된 oligo-nucleotide(random primer)를 이용하여 DNA 특정부위를 Polymerase Chain Reaction(PCR)을 이용하여 증폭시키는 것이다. 증폭된 DNA 단편들의 다형성(polymorphism)을 통해 작물의 분류(Fukuoka 등. 1992; Tinker 등. 1993) 및 유전적 다양성, 유전자원 평가(Tinker 등. 1993), 외래유전자 도입확인(Devos 등, 1992; Grsy 등, 1994). 유용 유전형질을 탐지할 수 있는 표지인자 개발(Fukuoka 등 1992) 및 유전자연관지도 작성(Grsy 등. 1994) 등에 이용되어왔다.

AFLP는 RAPD의 간편성과 RFLP의 재현성이 합해진 방법으로서 최근에 개발된 분석방법이다. 분석하고자 하는 게놈의 DNA를 두 개의 제한효소로 절단하고 adaptor를 ligation 시킨 후 이들 adaptor에 특이한 primer를 이용하여 절단된 단편들을 증폭시켜 sequencing 젤로 분리 후 분석하는 방법으로 이때 사용되는 primer는 adaptor의 염기서열과 통상 완전히 상보적인 약 15개 정도의 염기로 구성된 5' 부위 (Constant Region)와 3'끝의 몇 개의 염기로 구성된 selectable sequence로 구성되어 있는데 이 selectable 염기들의 구성에 따라 제작이 가능한 primer set는 무수히 많으며 각 primer set 당 생성되는 증폭단편들이 다르므로 분석 범위가 상당히 넓다. 그리고 이때 생성되는 단편들의 수도 통상 50개에서 100여 개 정도가 되며 계통간의 변이 정도도 심하므로 마커 개발에 아주 유용하다.

본 실험에서는 참외와 멜론의 RAPD조건을 확립하고 RAPD를 이용한 품종분류 및 유전적 다양성에 대한 분석과 AFLP marker에 의하여 RILs의 F8 집단을 이용한 유전자지도를 작성하고 유용형질과 연관된 marker를 탐색하고자 한다.

2. 참외와 멜론의 RAPD marker 분석을 위한 최적조건 확립

가. 연구목적

참외의 Genomic DNA를 이용한 PCR(PCR running시 Primer, dNTP, Tag polymerase 등의 적합 농도 결정과 PCR 최적 반응 온도 및 시간 결정) 최적조건을 확립하고자 한다.

나. 재료 및 방법

1) Genomic DNA 추출(20% SDS방법)

어린잎을 막자사발에 넣고 조직이 녹지 않도록 액체질소를 공급하면서 곱게 간 후 1.5ml tube에 넣어 DNA extraction buffer(0.25M EDTA 200ml, 20% SDS 62.5ml, 1M tris cl(pH8.0)100ml, 5M Nacl 100ml)를 700㎕ 넣어 흔들어 주고 여기에 동량의 phenol/chloroform (phenol : chloroform : isoamylalchol = 25: 24: 1)을 넣고 10분 정도 손으로 흔들어 준 후 70℃ incubator에 10분간 넣어 준 뒤 12,000 rpm에서 15분간 돌려주었다. 이 중 상등액 500㎕를 다른 tube에 덜어내어 동량의 chloroform을 넣어 주고 다시 5분간 원심분리를 시켜서 상등액을 뜬 후 동량의 isopropanol을 넣어 -20℃에서 2시간 보관한다. 2시간이 지난 후 12,000rpm에서 30분간 원심분리 한 후 tube의 상등액을 조심히 버렸다. Tube에 99% 에탄올 800㎕를 첨가하여 10분간 원심분리 후 상등액을 버리고 80% 에탄올로 한번 더 수세한 뒤 air dry 시켰다. Pellet이 건조되면 0.1X TE buffer를 300㎕ 넣어주고 RNase(1mg/ml)를 3㎕넣어 잘 흔들어 준 뒤 50-60℃ 되는 incubator에 넣어 DNase를 제거시키고 37℃에서 1시간 정도 두었다. DNA를 추출한 후 DNA순도가 1.6이상이 되는 것을 이용하였다.

2) RAPD 최적조건 규명

PCR setting과정으로 2단계 프로그램(35cycle)을 확립하기 위하여 DNA denaturation 온도 (94℃)와 시간 (30초), 그리고 primer extension온도 (72℃)와 시간 (1분 30초)을 고정시킨 후 primer annealing 온도와 시간의 여러 조합을 시행하여 비교하였다.

annealing온도 : 37℃, 35℃, 39℃, 41℃ → 4×3=12조합

annealing 시간 : 각 30초, 40초, 50초

PCR running시 primer, dNTP, enzyme 등의 적합 농도와 양 그리고 PCR 적합 cycle 수를 결정하기 위하여 다른 작물에서 적합 농도, 양과 cycle 수를 결정시 농도와 양으로 시행하여 비교하였다. 또한 전기영동시 EtBr staining을 전기영동 전과 전기영동 후에 하여 적합 staining시기를 실험하였다.

DNA 농도 1ng, 5ng, 10ng, 20ng

primer 농도 2.5ng, 5ng, 10ng, 20ng

dNTP 농도 370μM, 480μM, 740μM, 1,000μM

enzyme 농도 0.25unit, 0.5unit, 1unit, 1.5unit

PCR cycle 수 35cycle, 40 cycle, 45 cycle, 50 cycle

위의 비교 실험을 할 때 기준 점으로 DNA 농도는 20ng, primer 농도는 10ng, dNTP 농도는 740μM, enzyme은 0.5unit, cycle 수는 40 cycle로 실험하였고, DNA는 2종류(곶감참외, 감참외)이고 primer는 10-mer로서, 종류 (#3, 237번, CGACCAGAGC)를 이용하였다. 또한 전기영동시 agarose gel의 부피에 따른 적정 EtBr량을 1.5% agarose gel 20ml에 EtBr 1μl, 2μl, 3μl을 넣어 비교하여 보았다.

3) PGAE(polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용한 marker 분석

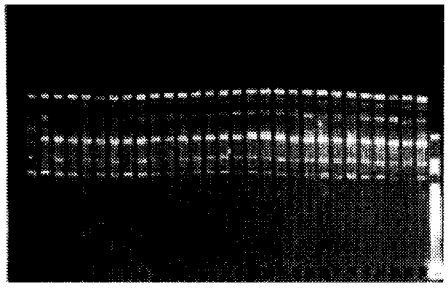
PCR running 최적조건을 통해 전기영동시 agarose gel을 이용하여 품종간의

polymorphism을 발견하기 어려웠다. 이것을 극복하기 위해 PGAE (polyacrylamide gel electrophoresis)하여 staining을 EtBr대신 silver nitrate(silver staining)를 이용하였다.

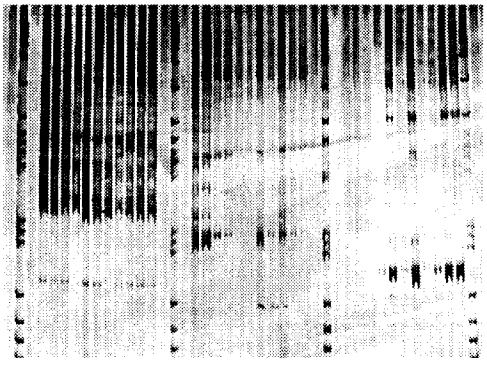
다. 결과 및 고찰

실험결과를 보면 PCR 분석이 primer annealing 온도와 시간이 39℃와 40초에서 가장 선명하였고 DNA 농도는 10ng, primer 농도는 270nM, dNTP농도는 200μM, enzyme 농도는 1.5 unit, PCR cycle 수는 40 cycle에서 가장 선명하고 많은 band 수가 보였다. 또한, 1.5% agarose gel 20ml에서 적정 EtBr의 volume은 1μl임을 보였다.

Agarose gel상의 polymorphic band를 선발하는 것은 band 수가 작고 band의 정확한 위치가 불명확하여 band간의 겹침으로 band가 두꺼워짐으로써 비슷한 크기의 band에서 나타나는 이유 등으로 그 효율이 낮아 그 선발효율을 높이기 위해 polyacrylamide gel을 이용한 silver staining으로 agarose gel의 EtBr 염색 문제점을 극복하였다(Fig. 1). 그러나 silver staining법과 PAGE gel 만들 때의 적정농도, 전기영동시간, 전압정도 등이 agarose gel과 ErBr staining보다 훨씬 까다로웠다. PCR running조건도 PAGE와 silver staining이 DNA band에 대해서 agarose gel electrophoresis와 EtBr staining보다 훨씬 sensitive하기 때문에 기존의 running 조건과 달랐다. 그 조건을 보면 DNA 농도는 5ng, primer 농도는 5ng, enzyme 농도는 1 unit으로 보였고 전기영동시 250V/ 4시간이 지금까지 가장 적당한 것으로 보였다.



(a)



(b)

Fig.1. RAPD results from agarose gel electrophoresis and polyacrylamide gel electrophoresis

3. 참외와 멜론계통의 RAPD marker에 의한 근연관계 분석

가. 연구목적

RAPD marker를 이용한 멜론계통 및 재래종 참외계통의 품종분류 및 유전적 다양성에 대한 분석을 통하여 참외육종의 기본자료로 삼고자 한다.

나. 재료 및 방법

1) Genomic DNA 추출(20% SDS방법)

DNA 추출 방법은 제2절과 동일하며 멜론계통과 참외계통의 종류는 표1과 같다.

Table 1. List of the 52 melon lines and cultivars used for RAPD analysis.

Group	Names of lines and cultivars
한국 재래종	곳감참외(1)[z], 깐치(2), 먹(3), 감 1(4), 감 2(5), 감 3(6), 청(7), 이천(8), 홍(9), 조선 1(10), 조선 2(11), 선과(녹, 12), 선과(노랑, 1), 성환 1(14), 성환 2(15), 성환 3(16), 은성개구리(17), 사탕(18), 신감로(19), V-3-6(20), 춘향(21), 한국 No18(22), 노랑(23), 열골(24), 중국참외(25), 중국참외 4(35)
은천 계통	Ko-9-3(28), Kiss 1(29), Kiss 2(30), 신계통 1(31), 신계통 2(32), 신계통 3(33), SW3(34)
Net melon 계통	HMS139(36), 농협시교(37), 인니산(38), HMS11044(40), HMS11066(41), F42(42), 적육 R328(43), 이수(44), Joo(45)
No-net melon line	HMS11108(39), 백피적육(47), 백합(48), 백피(46), AJ(49), Sapode-oro(50), 홍합(51), 황피적육(52)
F_1 hybrid	고향(26), 금노다지(27)

[z]Number within parenthesis is the genotype number at Fig. .

2) PCR 기기조건 및 반응용액 조건

PCR 반응용액은 template DNA 30ng, primer(Canada의 British Columbia University에서 인위 합성된 random primer #237) 270nM, dATP, dCTP, dGTP, 및 dTTP 각각 200uM, Dynazyme(Thermus brockianus, finnzymes, finland) 0.25unit, 10X reaction buffer 1.5㎕ 그리고 나머지는 DEPC처리된 3차 증류수로 충당하여 총 반응 용액 량을 15㎕로 하였다. PCR기기는 MJ Research의 PTC-100을 사용하였다. 최종 반응물은 agarose gel과 polyacrylamide gel을 사용하여 반응물의 band수와 선명도를 비교하였다. agarose gel의 경우 1㎕의 EtBr이 첨가된 1.3% agarose gel을 사용하여 100V에서 2시간 45분 반응시킨 후 polaroid 상으로 현상하여 polymorphism을 조사 분석하였고 polyacrylamide gel의 경우 6% polyacrylamide gel (총 30ml 중30% acrylamide -bisacrylamide(2:1) 5.985ml, 5X TBE buffer 6ml, dH2O 17.805ml, 10% ammonium persulfate 0.021g, temede 10.5ul)을 사용하여 250V에서 5시간 반응시킨 후 silver staining 시켜 gel을 말려서 polymorphism을 조

사 분석하였다.

PCR 기기는 denaturation 94℃ 30초, annealing 39℃ 30초, extension 72℃ 60초를 40cycle로 하였다.

3) 유연관계 분석

모든 마커는 증폭된 DNA 밴드가 있으면 1, 없으면 0으로 표시하였다. 각 계통들 간의 비유사계수(dissimilarity)수치와 각 근연관계를 분석하기 위해 Sneath와 Sokal(1973)에 의해 개발된 microcomputer program인 UPGMA(unweighted pair group method with arithmetic mean)를 사용하였다.

유전자원간의 genetic similarity(F)는 Nei와 Li의 방법으로 계산하였다 (F=2MXY/MX+MY). 여기서 MX와 MY는 X와 Y 유전자원 각각에서 나타난 DNA 밴드의 총수를 표시한 것이며 MXY는 X와 Y 유전자원 식물체에서 공통으로 나타난 DNA 밴드 즉, 같은 분자량 위치의 밴드 수를 나타낸다. 유전자원간의 유전적 변이정도를 나타내기 위하여 Dissimilarity value(genetic distance, 1-F)를 계산하였으며 이 수치를 UPGMA program에 입력하여 군집 분석하였다.

다. 결과 및 고찰

1) UBC에서 구입한 random primer(10-mer) 중 set no. 3(#201-300) 100개를 검색한 결과 반응이 일어난 primer는 50여 개이나 이중 다양성이 나타나면서 확실한 band를 나타낸 primer는 12개였다. 일반적으로 RAPD에 있어서 primer의 염기구성이 DNA 증폭에 많은 영향을 미치며(Williams 등 1990). 특히 전체 10-mer 중 G. C의 구성비율이 높을수록 DNA 증폭이 잘 일어난다고 보고(Devos 등 1992)되었는데 본 실험에서도 12개 primer 중 11개 primer의 G와 C의 구성비율이 60%

이상으로 나타났다(Table 2).

Table 2. List of 12 arbitrary 10-mer primers used for the PCR reaction

Primer	Sequence(5′ → 3′)	GC content(%)
203	CAC GGC GAG T	70
212	GCT GCG TGA C	70
220	GTC GAT GTC G	60
232	CGG TGA CAT C	60
254	CGC CCC CAT T	70
261	CTG GCG TGA C	70
262	CGC CCC CAG T	80
273	AAT GTC GCC A	50
275	CCG GGC AAG C	80
285	GGG CGC CTA G	80
287	CGA ACG GCG G	80
295	CGC GTT CCT G	70

2) RAPD에 사용된 12개 primer에 의하여 생성된 polymorphic band들은 모두 재현성이 있고 분명하여 참외와 멜론의 유전적 다양성을 평가할 수 있었다. 123개의 band 중 25개(20%)가 polymorphic band를 나타냈다. 각 primer에서 얻을 수 있었던 band 수는 6개에서 15개(#295)로 다양하게 나타났으며 평균 10.3개였고, primer당 polymorphic band는 1개에서 4개(#295)로 나타났으며 평균 2.1개이었다. 위에서 언급한 25개의 polymorphic band들은 다른 작물에 비해 적지만 모두 재현성 실험을 했을 때 명확하고 재현성 있는 band들로 분석되었다.

3) 참외와 멜론은 UPGMA program을 이용한 분석에 의하여 크게 재래종 참외그룹과 멜론 그룹으로 나뉘었으며 그중 멜론 그룹은 다시 net melon과 no-net melon으로

나뉘었다. 은천계 참외 중 4개 계통은 재래종 참외 그룹에 속하였으며 3개 계통은 멜론 그룹에 속한 것으로 나타났다(Fig. 2).

재래종 참외 그룹내의 총 polymorphic band 수는 19개로 나타났으며 깐치와 조선Ⅱ간의 polymorphic band가 11개(F=0.674)로 가장 원연관계로 나타났고 곶감참외와 선과, 먹과 성환Ⅲ, V-3-6과 노랑간에 polymorphic band가 하나도 없어 아주 가까운 근연관계임을 보였다.

멜론 그룹 중 no-net melon 그룹과 net melon 그룹내의 총 polymorphic band 수는 각각 16개와 13개로 나타났으며 no-net melon 그룹에서는 백합과 Sapodeoro 간에. net melon 그룹에서는 인니산과 F42간에 polymorphic band가 각각 1개(F=0.103). 1개(F=0.092)로 가장 가까운 근연관계로 나타났고 no-net melon 그룹에서는 백피와 AJ간에, net melon 그룹에서는 HMS139와 적육R328 간의 polymorphic band가 각각 11개(F=0.5), 8개(F=0.289)로 가장 원연관계로 나타났다. 또한 no-net melon 그룹과 net melon 그룹간의 총 polymorphic band 수는 21개로 나타났으며 재래종 참외그룹과 멜론그룹간에는 25개로 나타났다. 이러한 결과를 통해 그룹내의 유전적 변이보다 그룹간의 유전적 변이가 크다는 것을 알 수 있었고 보다 많은 primer를 이용하면 좀 더 자세한 유연관계를 알 수 있으리라 사료된다. 홍과 박(1996)도 밀에서 조합간의 polymorphic band 수가 조합간의 polymorphic band 수보다 적었다고 보고하였으며 Yang과 Qurios(1993)는 23개 celery종을 이용하여 근연관계를 나타낸 결과 종내 polymorphic band 수가 종간 polymorphic band 수보다 적었다고 보고하여 본 실험결과와 같은 양상을 보였다.

RAPD 분석에 의해 생성된 25개의 polymorphic band 중 8개 polymorphic band(273-1, 273-2, 273-3, 203-1, 220-1, 285-2, 295-3, 232-1)에 의해 재래종 참외 그룹과 멜론 그룹이 구분되었으며 멜론 그룹내의 net melon 그룹과 no-net melon 그룹

은 3개 polymorphic band(212-1, 261-2, 287-1)에 의해 구분되었다(Fig 2. 3). 홍과 박(1996)은 밀에서 11개의 RAPD marker를 이용하여 NILs 조합들을 구분하였으며 Shin 등(1996)은 39개의 수박품종에서 몇 개의 품종을 구별할 수 있는 8개의 marker를 선발하였다고 보고하였다.

이상의 결과로 어느 정도 그룹간 구별이 marker에 의해 가능하나 좀더 많은 수의 primer를 선발하여 이용하면 더욱 정확한 그룹간 및 그룹내 구분이 가능할 것으로 사료된다.

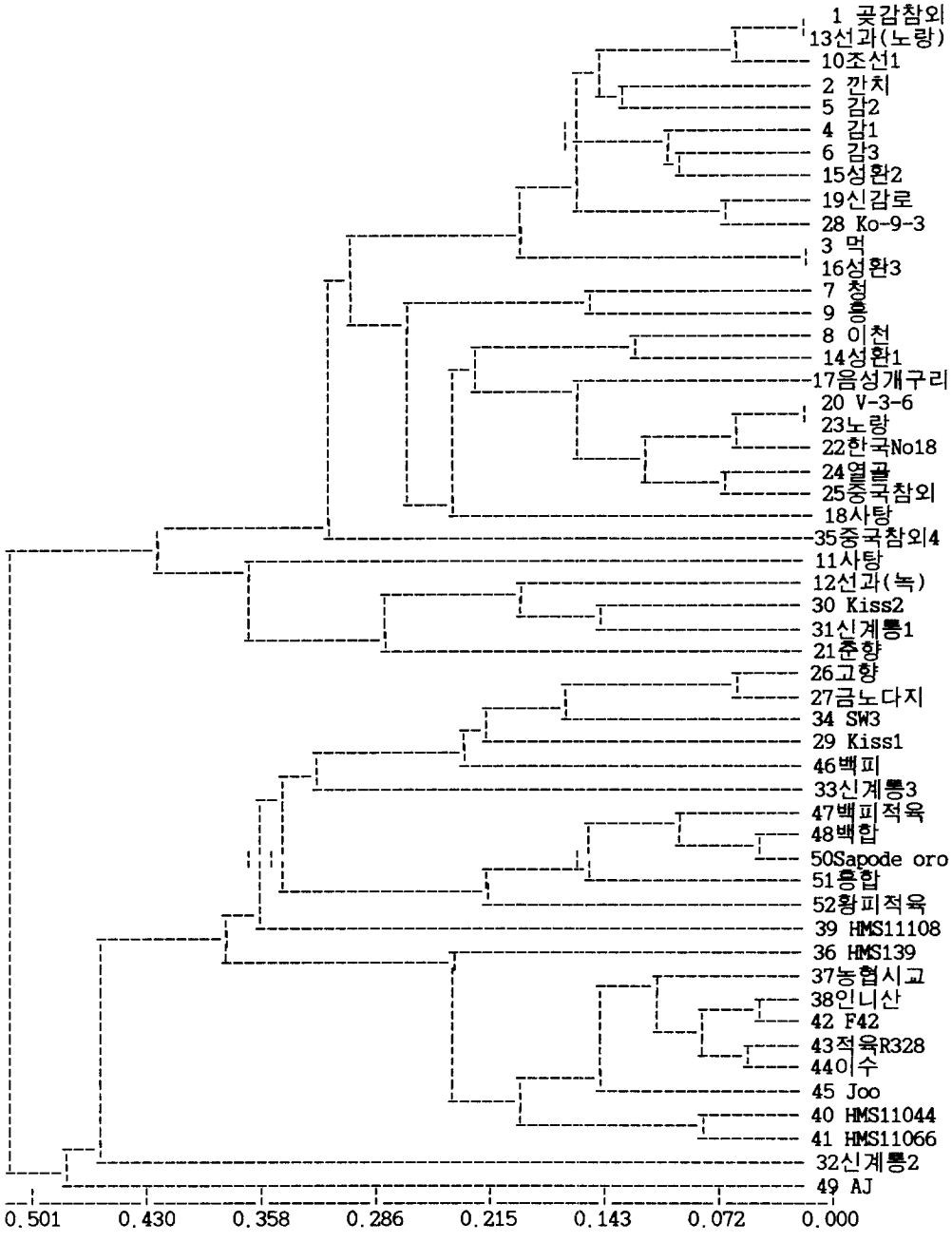


Fig.2 Dendrogram obtained from the UPGMA cluster analysis based on Cosine similarity coefficient by using 24 RAPD band of 52 melon cultivars.1-25,35;참외재래종/26,27;F_1/28-34;은천계/36-45;net melon/46-52; no net melon

4. SSD(single seed descent)에 의한 RILs(F_8 세대) 육성

가. 연구목적

유전자 지도 작성을 위하여 BCF1 집단, Double Hybrid 집단 등이 사용되기도 하나 본 실험에서는 RILs를 육성하여 유전자지도를 작성하고자 한다.

나. 재료 및 방법

참외 중 '곶감참외'를 모본으로 하고 멜론계통인 '백피적육'을 부본으로 하여 교배한 후 F1을 자가 수정시켜 F2 150개 계통을 작성한 후 각 계통마다 1개의 종자를 이용하여 다음 F3세대로 진전시키고 F3세대 120개 계통도 마찬가지로 각 계통마다 1개의 종자를 이용하여 다음세대로 진전시키는 SSD(single seed descent)방법에 의해 RILs를 작성하였다.

다. 결과 및 고찰

SSD(single seed descent)방법에 의해 RILs를 작성하기 위하여 여름에는 (주)농우종묘회사에서 세대를 진전시켰고 겨울에는 세대단축을 위하여 인도네시아에 종자를 보내어 현재 RILs F8 세대를 작성하였다.

5. F_8 계통의 형태적 특성 조사

가. 연구목적

유전자지도 작성을 위한 양친 및 F8세대의 형태적 특성을 조사하고자 한다.

나. 재료 및 방법

P1(곶감참외, 재래종 참외), P2(백피적육, 멜론계통)의 두 양친에 의한 F8 110개 계통들의 형태적 특성을 시각적 평가 등급(1~9) 또는 실제 측정치로 조사하였다.

⇒ 시각적 평가 등급

①엽톱니: 톱니수가 많을수록 1→9

②엽물결모양: 물결모양이 강할수록 1→9

③엽색: 엽색이 진할수록 1→9

④엽요철: 잎의 요철이 많을수록 1→9

⑤자방모양: 자방모양이 둥굴수록 1→9

⑥자방털길이: 털의 길이가 길수록 1→9

⑦자방골 : 자방의 골이 깊을수록 1→9

⑧과피색 : 과피의 색이 진할수록 1→9

⑨과육색 : 농적색, 적색, 연적색, 농청색, 청색, 연청색

⑩과실요철 : 有, 無

⇒ 실제 측정치

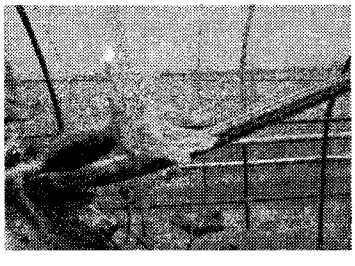
: 암술배치 모양, 수꽃수, 착과력(암꽃 3개 수분시 수확가능한 과실수), 배꼽크기, 과중, 과경, 과폭, 과피두께, 과육두께, 굴절당도계에 의한 당도(태좌,과육)와 HPLC에 의한 sucrose · fructose · glucose 함량, 경도(외경도, 내경도), 종자길이, 종자폭, 종자두께

다. 결과 및 고찰

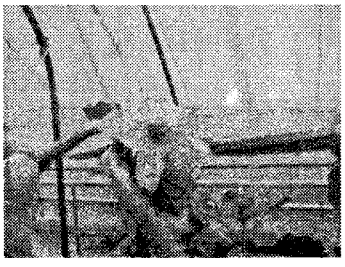
1) 양친(P1:곶감참외 X P2:백피적육)의 형태적 분석 비교

형태적 특성	P1	P2	F_1	F_8 범위	형태적 특성	P1	P2	F_1	F_8 범위	형태적 특성	P1	P2	F_1	F_8 범위
엽톱니	8	4	5	4-7	수꽃수	10	2	3	2-7	과육두께 (mm)	25	15	20	14-30
엽색	5	8	6	4-7	착과력	1	3	2	1-2	종자길이 (mm)	10.6	6.2	8.6	7.8-11.1
엽물결모양	4	7	5	5-7	과피색	2	7	8	1-9	종자폭 (mm)	4	3.3	3.3	3.2-4.5
엽요철	7	5	6	5-7	과실요철	2	7	4	1-9	종자두께 (mm)	1.1	0.5	1.5	0.9-2.1
자방모양	8	3	5	5-8	배꼽크기 (cm)	1.1	2	2	4.2-3.6	태좌당도	13	12	12	7-18
암꽃색	3	7	5	2-8	과중(g)	990	920	1280	560-2050	과육당도	14	13	11	7-15.2
자방골	1	9	4	1-9	과경(cm)	14.2	17.8	19.8	10.7-20.2	과실외경도	3.15	2.4	2.2	2.2-3.6
자방털길이	7	3	7	3-8	과폭(cm)	12	9.9	10.4	7.6-15	과실내경도	1.7	1.8	1.5	1.1-2.2
암술배치	7	3	5	3-8	과피두께 (mm)	7	2.5	6	2-10	HPLC에 의한 당도	3.99	6.78	5.23	3.41-9.47

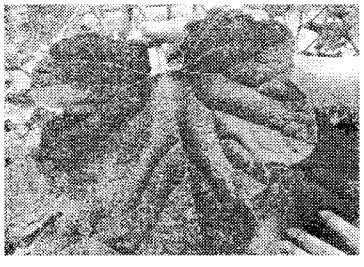
가) 자방골, 자방털길이, 자방모양(왼쪽; 곶감참외: 오른쪽; 백피적육)

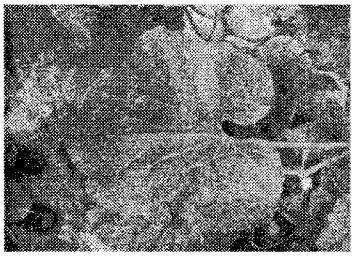


나) 암술배치(왼쪽: 곶감참외; 오른쪽: 백피적육)

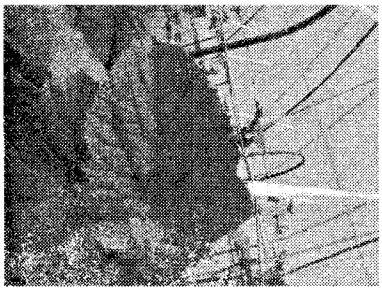


다) 엽색, 엽물결모양, 엽요철(왼쪽: 곶감참외; 오른쪽: 백피적육)

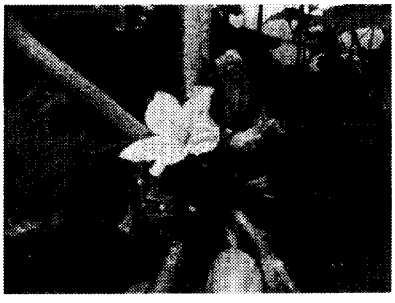




라) 엽톱니(왼쪽: 곶감참외; 오른쪽: 백피적육)



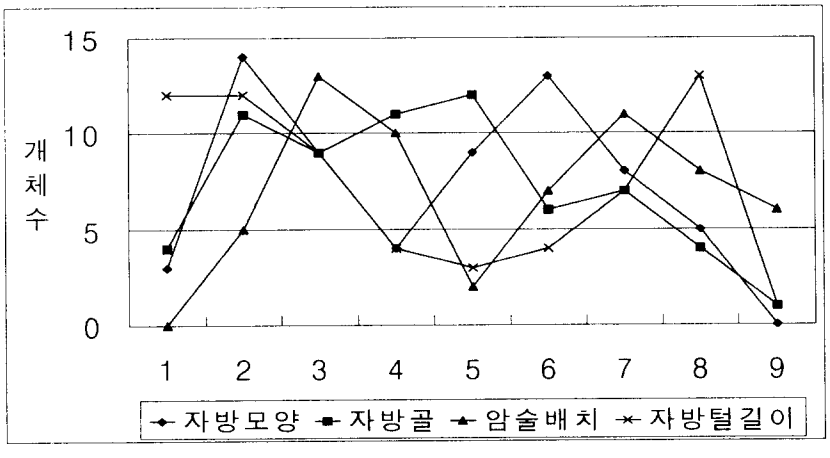
마) 수꽃수(왼쪽: 곶감참외; 오른쪽: 백피적육)



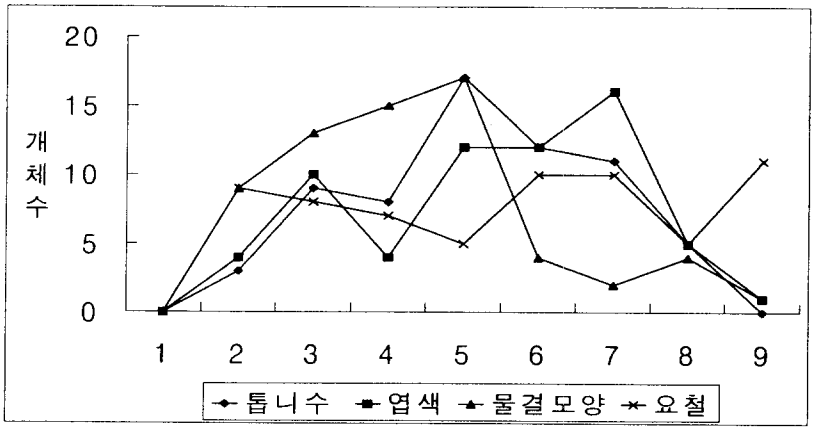
2) F_8 110개 계통의 형태적 특성 분포

: P1(곶감참외, 재래종 참외), P2(백피적육, 멜론계통)의 두 양친에 의한 F_8 110개 계통의 형태적 특성을 시각적 평가 등급(1~9) 또는 실제 측정치로 조사한 결과 양친을 중심으로 모여드는 형질과 정규분포를 이루는 형질로 나타나는 경향을 보였다.

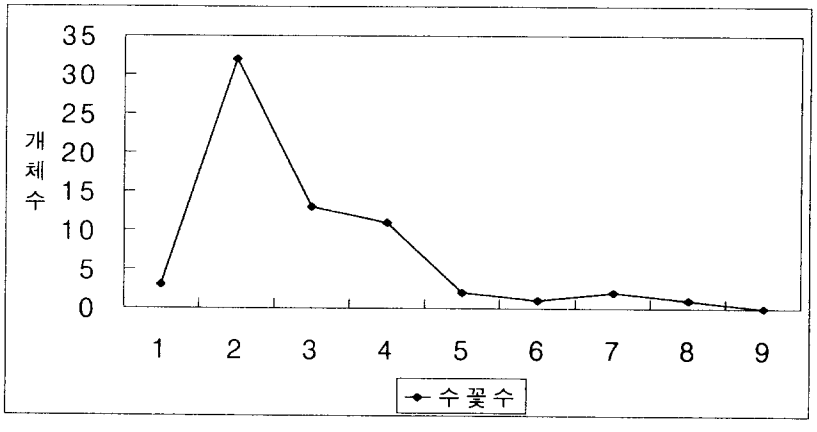
가) 자방모양, 자방골, 암술배치, 자방털길이



나) 톱니수, 엽색, 물결모양, 요철



다) 수꽃수



6. DNA marker(AFLP)를 이용한 유전자지도 작성 및 연관 Marker 탐색

가. 연구목적

DNA marker(AFLP)를 이용하여 곶감참외 x 백피적육(멜론)의 유전자지도를 작성하고 형태적 특성과 연관된 marker를 탐색하고자 한다.

나. 재료 및 방법

1) 유전자지도를 작성하기 위하여 양친(곶감, 백피적육)과 DNA 순도(UV spectrometer 260nm/280nm)가 1.8이상인 F_8 110개 계통을 선택하여 AFLP 분석을 수행하였다. 여기서 이용한 계통은 앞에서 조사된 형태적 특성조사계통과 동일한 계통이다.

2) Genomic DNA 추출(20% SDS방법)

20% SDS방법을 이용하여 앞의 RAPD에서와 같이 동일한 방법으로 양친(곶감, 백피적육)과 F_8 110개 계통의 DNA를 추출하였다.

3) AFLP marker 분석

가) Genomic DNA를 이미 확립된 방법에 의하여 digestion(EcoR I , Mse I restriction enzyme)과 ligation을 수행하였다.

나) Pre-amplication시 1-selective primer(EcoR I - A primer, Mse I -T primer) 이용

- 반응용액(총 volume 50ul):

DNA 2.5ng, dNTP 200uM, primer 200nM, polymerase 0.8unit, MgCl2 2mM, 10X buffer 5ul

- 반응조건(35cycle)

94℃ 30초, 56℃ 30초, 72℃ 1분(→10분)

다) Second-amplication시 3-selective primer 이용

- 반응조건(총 volume 20ul):

DNA 5ul(Pre-amplication 후 반응용액을 100배 희석시켜 사용), EcoR

I primer 50nM, Mse I primer 300nM, dNTP 200uM, polymerase 0.8unit, MgCl2 2mM, 10X buffer 2ul

- 반응조건(39cycle)

94℃ 30초, 67℃30초(→ 67℃에서 56℃까지 0.7℃씩 down시키면서 15cycle을 돌린다), 72℃ 60초/ 94℃ 30초, 56℃ 30초, 72℃ 60초 (30cycle)

- 증폭된 산물은 5.5% polyacrylamide gel에서 90W로 3시간 전기영동하여 silver staining으로 band의 다양성을 관찰하였다.

라)Primer screening

: 양친(곶감참외, 백피적육)을 재료로 총 80개 primer 조합(10개 EcoR I , 8개 Mse I)을 screening 하였다(Table 3).

Table 3. Number of polymorphic band for the each primer combination.

*EcoR I primer : 5′- GAC TGC GTA CCA ATT C ATC - 3′ ⇒ ⇒ -ATC 로 표기

selective sequence

*Mse I primer : 5′ - GAT GAG TCC TGA GTA A TGG - 3′ ⇒ ⇒ -TGG 로 표기

selective sequence

*Mse I primer \ *EcoR I primer	-GTT	-ATC	-GTA	-GCC	-AGA	-GCA	-GAG	-AAG	-ACT	-ACA
-TGG	4	0	11	2	0	7	X	X	X	X
-TAC	16	17	12	13	9	10	12	14	16	13
-CCC	6	5	6	1	2	6	3	11	8	10
-CGT	X	6	0	4	1	12	X	8	7	4
-TCC	4	4	3	6	16	20	6	2	2	2
-TCT	7	5	2	11	6	18	11	12	8	8
-TTT	8	5	4	10	17	14	11	21	14	13
-TGA	7	4	6	11	8	5	6	4	4	3

마) AFLP marker 분석 및 유전자지도 작성

'곶감참외' X '백피적육' 교배조합의 F_8 세대 110계통으로부터 17개의 primer 조합을 이용하여 AFLP 분석에 의해 선발된 144개 marker를 사용하였다. Mapmaker version 2.0과 Mapmanager program에 의해 유전자지도를 작성하였다. Mapmaker 프로그램의 logarithm of odds(LOD)>4 과 recombination fraction(θ) = 0.25를 조건으로 marker들을 분석하여 연관군을 형성하였다. 그중 연관 marker들의 수가 많은 group부터 시작하여 3-5개의 marker를 중심으로 Mapmaker 프로그램의 "compare"

명령어에 의해 가장 좋은 marker의 배열순서를 찾은 후, 배열순서의 적합성을 검정하기 위해 "ripple" 명령어에 의해 LOD>2.0인 값을 보인 경우에만 그 배열순서를 채택하여 지도를 작성하였다. 또한 형태적 특성과 연관프로그램을 이용하여 연관마커를 탐색하였다.

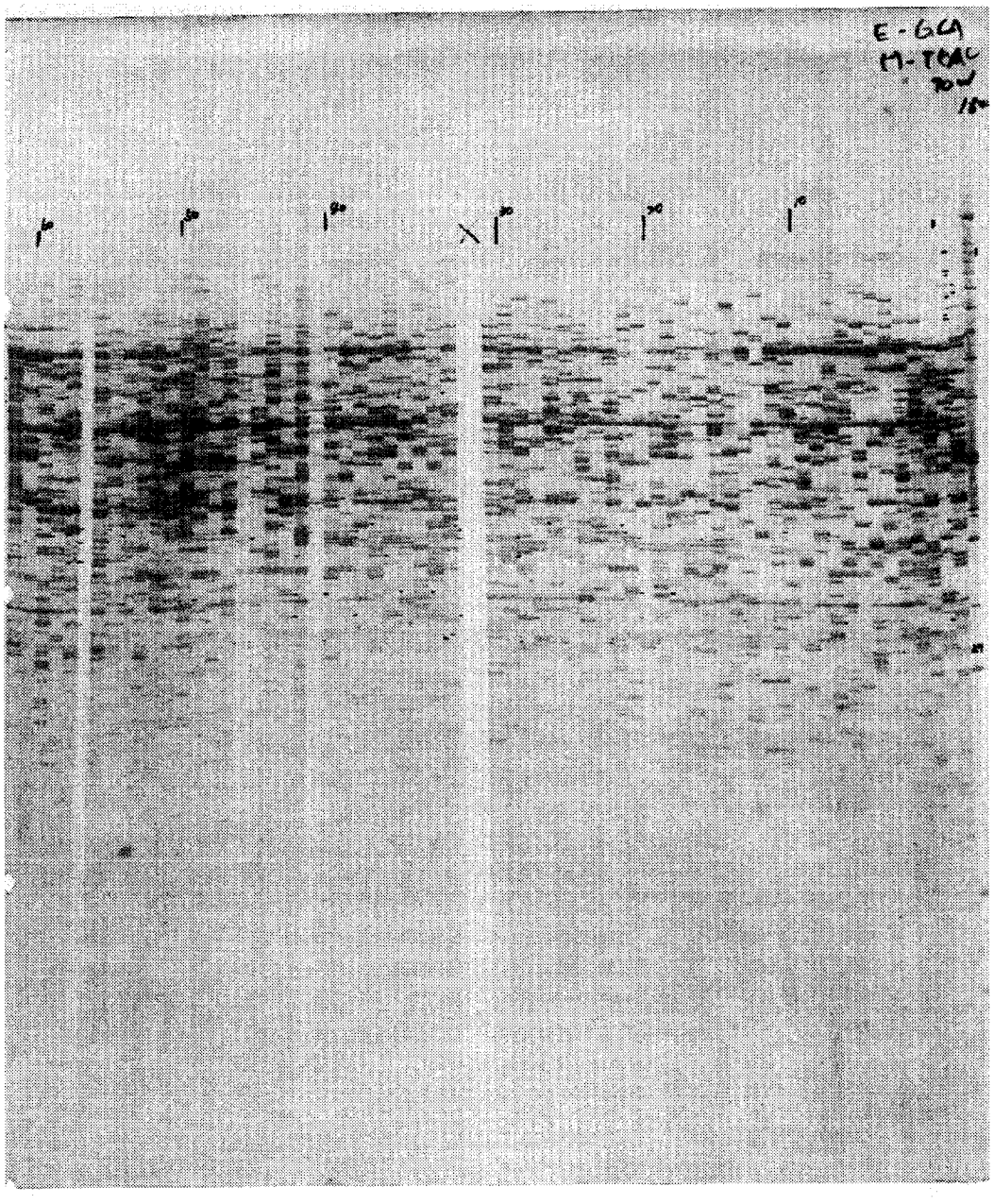
다. 결과 및 고찰

1) Primer screening 및 AFLP marker 분석

3-selective primer 80개 조합을 screening하여 양친간 polymorphism이 높고 band가 매우 선명한 17개 조합을 선발하여 AFLP marker를 분석한 결과 총 302개의 polymorphic bands 중 분리비가 3:1이고 band가 선명하여 유전자지도 작성에 적합한 144개 marker를 선발하였으며 이를 이용하여 유전자지도를 작성하였다.

→E-GCC + M-TGG : 27 polymorphic bands
E-GCC + M-TAC : 23 polymorphic bands
E-GCC + M-TCT : 31 polymorphic bands
E-GTT + M-TGG : 15 polymorphic bands
E-GTT + M-TAC : 26 polymorphic bands
E-GTT + M-TCT : 29 polymorphic bands
E-GAG + M-TGG : 6 polymorphic bands
E-GAG + M-TAC : 17 polymorphic bands
E-GCA + M-TGG : 18 polymorphic bands
E-GCA + M-TAC : 38 polymorphic bands
E-GCA + M-CGT : 7 polymorphic bands
E-GCA + M-TCT : 32 polymorphic bands
E-GGT + M-TAC : 2 polymorphic bands
E-GTG + M-CGT : 11 polymorphic bands
E-GAA + M-TGG : 8 polymorphic bands
E-GGA + M-CGT : 4 polymorphic bands
E-GAT + M-TAC : 8 polymorphic bands

가) EcoR I 3-selective primer(E-GCA)와 Mse I 3-selective primer(M-TAC)를 이용하여 AFLP한 전기영동결과이다.

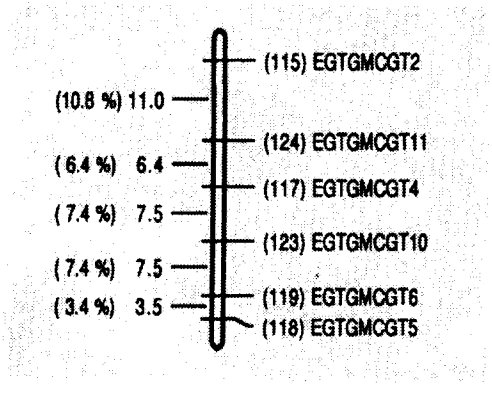


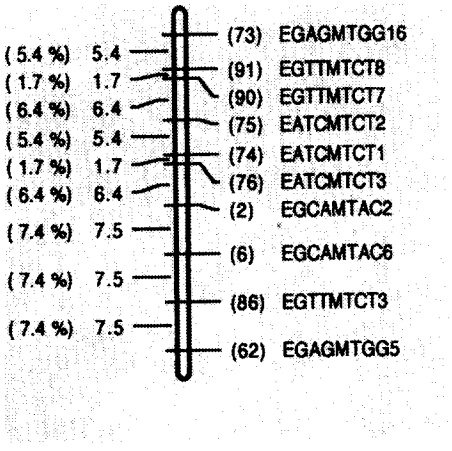
2) 유전자지도 작성

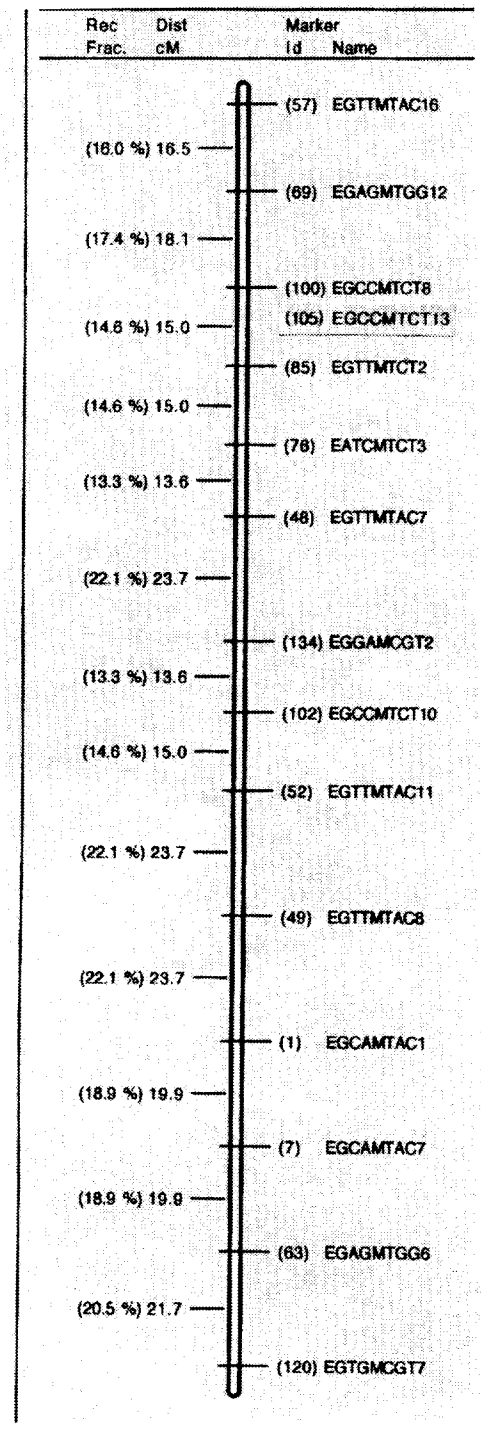
'곶감참외' X '백피적육' 교배조합의 F_8 세대 110개 계통으로부터 17개의 primer 조합을 이용하여 AFLP 분석에 의해 선발된 144개 marker를 사용하였다. Mapmaker version 2.0과 Mapmanager program에 의해 유전자지도를 작성하였다. Mapmaker 프로그램의 logarithm of odds(LOD)>4 과 recombination fraction(θ) = 0.25를 조건으로 marker들을 분석하여 연관군을 형성하였다. 그중 연관 marker들의 수가 많은 group부터 시작하여 3-5개의 marker를 중심으로 Mapmaker 프로그램의 "compare" 명령어에 의해 가장 좋은 marker의 배열순서를 찾은 후, 배열순서의 적합성을 검정하기 위해 "ripple" 명령어에 의해 LOD>2.0인 값을 보인 경우에만 그 배열순서를 채택하여 지도를 작성하였다.

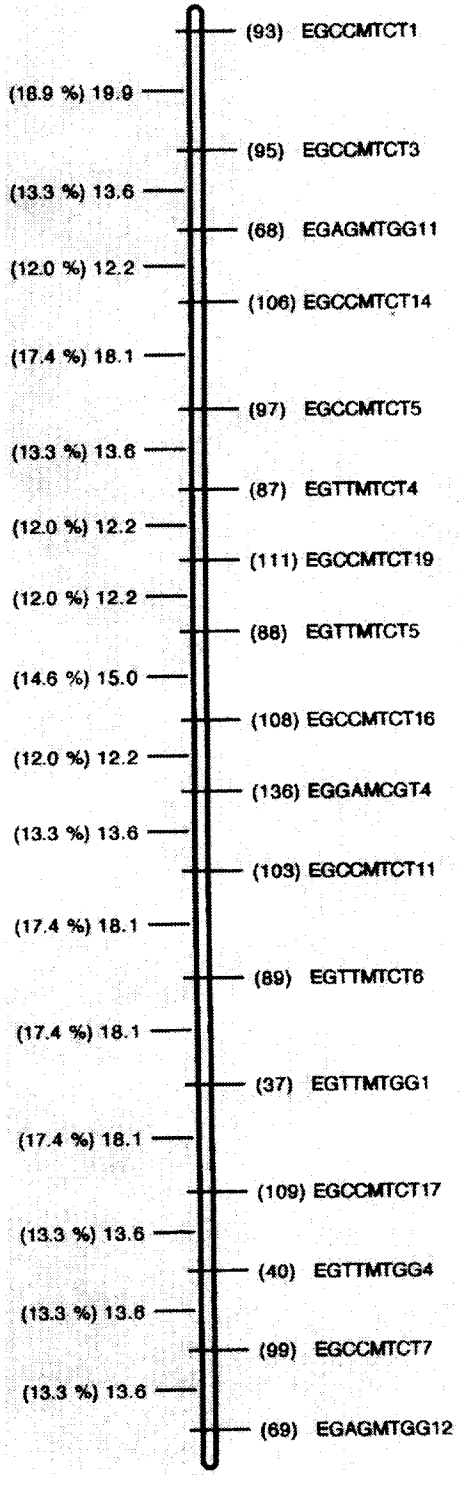
그 결과 참외 염색체수 n=12 중 6개의 연관군이 작성되었으며 144개 marker 중 66개의 marker가 연관군에 포함되었다.

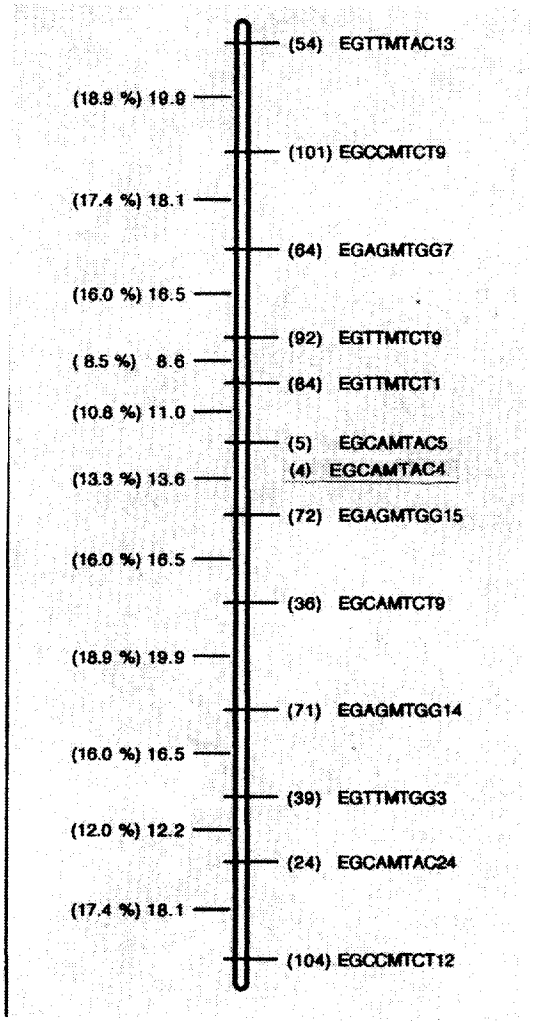
가) 유전자 연관 그룹

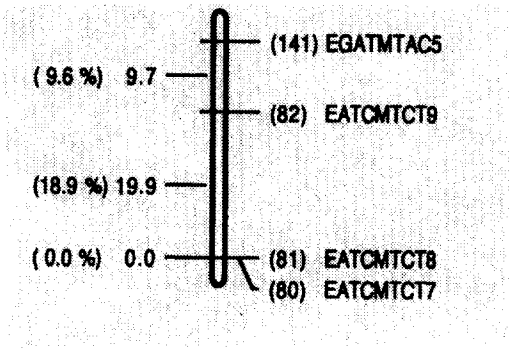



(73) EGAGMTGG16
(91) EGTTMTCT8
(90) EGTTMTCT7
(75) EATCMTCT2
(74) EATCMTCT1
(76) EATCMTCT3
(2) EGCAMTAC2
(6) EGCAMTAC6
(86) EGTTMTCT3
(62) EGAGMTGG5
(5.4 %) 5.4
(1.7 %) 1.7
(6.4 %) 6.4
(5.4 %) 5.4
(1.7 %) 1.7
(6.4 %) 6.4
(7.4 %) 7.5
(7.4 %) 7.5
(7.4 %) 7.5


Rec Frac.
Dist cM
Marker Id Name
(57) EGTTMTAC16
(16.0 %) 16.5
(69) EGAGMTGG12
(17.4 %) 18.1
(100) EGCCMTCT8
(105) EGCCMTCT13
(14.8 %) 15.0
(85) EGTTMTCT2
(14.6 %) 15.0
(78) EATCMTCT3
(13.3 %) 13.6
(48) EGTTMTAC7
(22.1 %) 23.7
(134) EGGAMCGT2
(13.3 %) 13.6
(102) EGCCMTCT10
(14.6 %) 15.0
(52) EGTTMTAC11
(22.1 %) 23.7
(49) EGTTMTAC8
(22.1 %) 23.7
(1) EGCAMTAC1
(18.9 %) 19.9
(7) EGCAMTAC7
(18.9 %) 19.9
(63) EGAGMTGG6
(20.5 %) 21.7
(120) EGTGMCGT7


(93) EGCCMTCT1
(18.9 %) 19.9
(95) EGCCMTCT3
(13.3 %) 13.6
(68) EGAGMTGG11
(12.0 %) 12.2
(106) EGCCMTCT14
(17.4 %) 18.1
(97) EGCCMTCT5
(13.3 %) 13.6
(87) EGTTMTCT4
(12.0 %) 12.2
(111) EGCCMTCT19
(12.0 %) 12.2
(88) EGTTMTCT5
(14.6 %) 15.0
(108) EGCCMTCT16
(12.0 %) 12.2
(136) EGGAMCGT4
(13.3 %) 13.6
(103) EGCCMTCT11
(17.4 %) 18.1
(89) EGTTMTCT6
(17.4 %) 18.1
(37) EGTTMTGG1
(17.4 %) 18.1
(109) EGCCMTCT17
(13.3 %) 13.6
(40) EGTTMTGG4
(13.3 %) 13.6
(99) EGCCMTCT7
(13.3 %) 13.6
(69) EGAGMTGG12


(54) EGTTMTAC13
(18.9 %) 19.9
(101) EGCCMTCT9
(17.4 %) 18.1
(64) EGAGMTGG7
(16.0 %) 16.5
(92) EGTTMTCT9
(8.5 %) 8.6
(84) EGTTMTCT1
(10.8 %) 11.0
(5) EGCAMTAC5
(4) EGCAMTAC4
(13.3 %) 13.6
(72) EGAGMTGG15
(16.0 %) 16.5
(36) EGCAMTCT9
(18.9 %) 19.9
(71) EGAGMTGG14
(16.0 %) 16.5
(39) EGTTMTGG3
(12.0 %) 12.2
(24) EGCAMTAC24
(17.4 %) 18.1
(104) EGCCMTCT12



나) 형태적 특성과 AFLP marker 간의 연관 marker

RILs 집단으로부터 20여개의 형태적 특성을 AFLP marker와 연관 분석한 결과 5개의 형질이 4개의 AFLP marker 즉, 과실요철(ph-12)이 EGTTMTAC16 marker(A57)와, 배꼽크기(ph-13)가 EGCAMTAC7 marker(A7)와, 과중(ph-14)이 EGTTMTCT11 marker(A94)와, 과폭(ph-16)과 과피두께(ph-17)가 EGAGMTGG16 marker(A73)와 상당히 유의성 있게 밀접하게 연관되어 있는 것으로 나타났다(Table 4). 유용형질과는 연관된 marker가 발견되지 않았지만 좀더 많은 marker를 개발하여 유용형질과 연관된 marker를 찾고자 한다.

Table.4 Linked marker Between traits and AFLP marker

traits	연관마커	Peak LOD	F-value	P-value	R^2	모본	부본
						계통수 (평균)	계통수 (평균)
ph-12	A57	2.02	3.74	0.0595	7.8	5(3.00)	41(2.12)
ph-13	A7	2.04	-11.02	-0.0018	20.0	10(0.54)	36(1.33)
ph-14	A94	2.38	14.36	0.0004	24.6	13(1160.0)	33(790.6)
ph-16	A73	1.98	-8.56	-0.0054	16.3	6(8.73)	40(10.4)
ph-17	A73	2.71	-15.97	-0.0002	26.6	6(1.83)	40(2.86)

7. 결과 요약

1. 참외와 멜론계통의 DNA 추출은 0.5% SDS 방법이 가장 순수하고 많은 DNA를 얻을 수 있었으며 DNA 증폭시 최적반응조건은 총 volume 15ul 중 DNA 농도는 10ng, primer 농도는 270nM, dNTP농도는 200μM, Dynozyme 농도는 o.5 unit, buffer 1.5ul이었으며 나머지는 3차 증류수로 보충된다.

2. PCR 기기의 최적 setting은 DNA denaturation 94℃ 30초, primer annealing 39℃ 30초, primer extension 72℃ 30초이며 최적 증폭 횟수는 40 cycle 이었다.

3. 사용된 12개의 RAPD band 중 신뢰도가 높은 25개(20%)의 polymorphic band를 선발하여 이용하였으며 평균 band 수는 2.1개로 나타났고 그룹내 polymorphic band 수가 그룹간보다 적어 그룹내의 유전적 변이가 적음을 보여주었다. 군집분석 결과 크게 참외와 멜론 그룹으로 나뉘었고 멜론그룹은 다시 net melon과 no net melon으로 나뉘었으며 이러한 결과는 기존의 표현형질에 의한 분류와 일치하였다. 재래종 참외와 멜론 그룹은 8개의 marker에 의해 구분되었고 net melon 그룹과 no net melon 그룹은 4개의 marker에 의해 구분되었다.

4.. 유전자지도 작성을 위하여 SSD(single seed descent)에 의하여 곶감참외 x 백피적육 멜론 교배조합으로부터 RILs(F_8 세대)를 육성하였으며 이를 이용하여 유전자지도를 작성하였다.

5. AFLP marker를 분석하기 위하여 3-selective primer 80개 조합을 screening하여 양친간 polymorphism이 높고 band가 매우 선명한 17개 조합을 선발하여 총 302개의 polymorphic bands 중 분리비가 3:1이고 band가 선명하여 유전자지도 작성에 적합한 144개 marker를 선발하였으며 이를 이용하여 유전자지도를 작성하였다.

6. Mapmaker version 2.0과 Mapmanager program에 의해 참외 염색체수 n=12 중 6개의 연관군이 작성되었으며 144개 marker 중 66개의 marker가 연관군에 포함되었다. 형태적 특성과 AFLP marker간의 연관 marker를 탐색한 결과 과실요철(ph-12)이 EGTTMTAC16 marker(A57)와, 배꼽크기(ph-13)가 EGCAMTAC7 marker(A7)와, 과중(ph-14)이 EGTTMTCT11 marker(A94)와, 과폭(ph-16)과 과피두께(ph-17)가 EGAGMTGG16 marker(A73)와 상당히 유의성 있게 밀접하게 연관되어 있는 것으로 나타났다

제 4 절 AGPase 유전자의 cloning과 발현제어에 관한 연구

1. 서설

값싼 농산품 수입에 대비하여, 우리나라 농산물의 차별화 및 특성화에 중점을 두고 이에 부합할 수 있는 고 부가가치 농산물의 개발이 시급한 실정에 있다. 참외는 우리나라의 대표적인 원예 농산물 중이므로, 소비자의 다양한 기호에 맞는 고품질의 신품종 개발은 우리 종묘 산업의 발전을 위해서 매우 중요한 일이다.

참외 품종의 차별화 요소 중의 하나는 당도이다. 당도 결정에 관련된 생화학적 기작 및 관련 유전자의 연구는 감자 등(Müller-Röber et al., 1992)의 연구를 통해 어느 정도 이해되고 있으나, 참외류를 비롯한 과일류의 당도관련 유전자들의 분리 및 그 이용에 의한 당도증진 관련 연구는 그 중요성에도 불구하고 미진한 실정이다.

주지하는 바와 같이, 유전자원의 확보 및 활용은 Biotechnology의 주축을 이루고 있으며, 이를 이용한 고부가가치의 생산은 세계적인 추세이다. 따라서 참외에서 당도관련 유전자의 분리, 발현조절을 위한 유전자재조합 기술의 확립, 그리고 식물형질전환체 유도 및 그들의 기능해석은 종묘산업의 경쟁력 제고를 위한 기술적 초석이 될 수 있다.

이에 본 연구팀은 식물의 당도대사관련 유전자 중 전분 생합성과정에서 중추적 역할을 하는 것으로 알려진 AGPase 유전자의 인위적 발현조절을 통해 당도가 증진된 참외 육종기술을 확보하는데 연구의 목적을 두었다.

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
제1차년도 (1995)	○ AGPase 유전자의 분리	○ 참외 AGPase 유전자의 cDNA 확보
제2차년도 (1996)	○ AGPase 유전자의 발현 억제	○ AGPase antisense vector 제작
제3차년도 (1997)	○ 형질전환 식물체 유도	○ 재분화식물체 유도법 확립 ○ 형질전환 식물체 유도법 확립
제4차년도 (1998)	○ 과육특이발현 promoter 확보 ○ 우량계통 선발	○ 과육특이발현 cDNA 분리 ○ 농가 위탁 재배 ○ 당도 분석
제5차년도 (1999)	○ 과육특이발현 promoter 개발 ○ 우량계통 선발	○ 과육특이발현 genomic DNA 확보 ○ 과육특이발현 promoter 분리 ○ 형질전환체 중 우량계통 선발

2. 연구내용

가. AGPase 유전자의 분리

참외 과육 cDNA library로부터 AGPase small subunit 1종류와 large subunit 2종류를 암호화하는, 염기서열이 다른 세 종류의 cDNA를 분리하여 GenBank에 등록하였다(GenBank Accession AF030382, AF030383, AF030384; Park et al., 1998). 먼저, AGPase의 small subunit를 암호화하는 cDNA clone의 크기는 2027nt(nucleotide)로서 98nt의 5′ UTR(untranslated region)과 1578nt의 ORF(open reading frame), 356nt의 3′ UTR로 구성되어 있었다(그림 1). 따라서, AGPase의 small subunit의 유전자는 525개의 아미노산으로 구성된 폴리펩티드를 암호화하고 있는 것으로 확인하였다.

그리고 AGPase의 large subunit를 암호화하고 있는 두 종류의 cDNA clone은 크기가 2009nt(large subunit I, 그림 2)와 2227nt(large subunit II, 그림 3)이었다. 이 중 large subunit I는 153nt의 5′ UTR과 1668nt의 ORF, 188nt의 3′ UTR로 구성되어 있었고, large subunit II는 345nt의 5′ UTR과 1557nt의 ORF, 325nt의 3′ UTR로 구성되어 있었다. 따라서, AGPase의 large subunit의 유전자는 555개와 519개의 아미노산으로 구성된 폴리펩티드를 암호화하고 있는 것으로 해석되었다.

나. AGPase 유전자의 발현 억제용 vector의 제작

참외에서 발현하는 AGPase 유전자의 발현을 억제하기 위해, AGPase antisense vector를 제작하였다. 이를 위해 AGPase의 small subunit와 large subunit cDNA가 들어있는 pBluescript vector로 부터 cDNA만을 분리한 후, GUS 유전자가 제거된 식물형질전환용 vector인 pBI121(Jefferson et al., 1987)의 35S promoter 아래에 연결하여 vector를 제작하였다(그림 4A). 이 vector를 *E. coli*에서 증폭한 후, *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환하였다(그림 4B).

```
   1 cacgagctga tctctgcttc tttttcattt tttccggcga cttgctaatc ggagaagatt
  61 accggatatc gttgttttgg atttgaattg atcgtctaat ggcgtcttct atggctgcag
 121 ttggagttct cagactcccg acgtcgtcgt cgtcgtcgtc ttcatcgtcc aatggtggaa
 181 ccaaccgtgc taggagaact agccttcgaa gcctctcatt cggtgcgtct caaatttctg
 241 gtgataagat tgactttaga ggttttggtt tgggatcacg acgtgtttct ggtggtagag
 301 tggctccctc gatcgtttct cctaaagcgg tttctgattc caagaactct cagacttgcc
 361 tcgatcccga tgctagccgg agtgtgcttg ggattattct gggcggtggt gctggaactc
 421 ggctctatcc gcttactaag aaacgagcga aggctgctgt tcctcttgga gcgaactata
 481 gaaagattga tattcctgtt agcaactgtc tcaacagcaa tatttcaaag atttatgttc
 541 tcacgcaatt caattctgct tctcttaatc gtcatctttc ccgagcttat gcagtaatat
 601 ggtggttaca gaatgaagga tttgttgagg ttctagccgc tcagcagagt ccagagaatc
 661 caaattggtt ccagggcaca gctgatgcag ttagacagta cttgtggtta tttgaagagc
 721 agaatgtgtt ggagtatctt gttcttgctg gcgatcattt gtatcgaatg gattacgaga
 781 gatttattca agcacacagg gagactgatg cagatatcac tgtagctgct ctaccaatgg
 841 atgaaaagcg tgcaactgca tttggtttga tgaagattga tgaagaggga cgcataattg
 901 agtttgcaga gaaaccgaaa ggagagcaat tgaaagcgat gaaggttgat actactattt
 961 tgggtcttga cgatgagaga gcgaaagaga tgccgtacat agctagcatg ggtatatacg
1021 ttatcagcaa ggatgtgatg ctcaatcttc ttagagataa atttcccgga gcaaatgatt
1081 ttgggagtga agttattcct ggtgcaactt ccattggaat gagggtgcaa gcttacttgt
1141 atgatggtta ctgggaagat attggtacca ttgaagcttt ttacaatgca aatctgggga
1201 tcacaaagaa gccagtacca gattttacct tctatgatcg ttcgtctccg atctacaccc
1261 aacctcgtta tttgccgcca tcaaaaatgc ttgatgccga tatcacggac agtgttattg
1321 gtgagggatg tgtcattaag aactgcaaga ttcaccactc tgtcgtgggc attcgaactt
1381 gcatatccga aggtgcaatc atagaagata cgttactgat gggtgcagat tattatgaga
1441 cggatgccga ccgtaggtta ttggcggcaa agggtagtgt accaattgga attggtagaa
1501 actctcacat caagagagct atcattgaca aaaatgctcg catcggtgaa aatgttaaga
1561 tagtgaatgg agacaacgtg caagaagcag caagagagac agatggttac ttcataaaga
1621 gtgggattgt gacagttatc aaggatgctt tgattcccag cggcactatc atctaaacca
1681 ccagaacaca tcacacttca ctcaactggt gccactctct ctctctctct ctctctctct
1741 ctctctctct ctctctcaat tttgtgtctg ccttggttca atcccaccca ttatgtccac
1801 atgcattccc ttttggtagt aaatggcaaa ggcttaggaa gagaatccct cactccgaga
1861 gtccacacta tacccactgt tacttttaac ttatgatgat gattatgtaa atgtctcccc
1921 ccctcccccc ccctcccctc ccctcctctg ctttgaatag tttcatttcc ttttctttta
1981 acccataaat aaattcaatt tcctggggca aaagtggtat tatgaat
```

그림 1. AGPase small subunit(GenBank Accession AF030382)의 염기서열

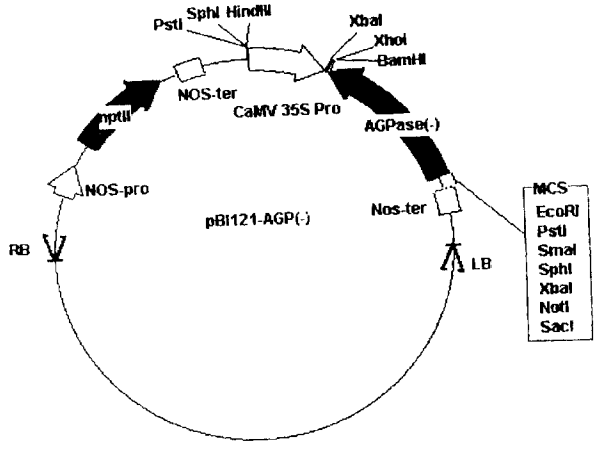
```
   1 tgcgagctcc accgcggtgc gccgctctag aactagtgga tcccccgggc tgcaggaatt
  61 cggcacgagc cgccttcttc atcactcaca tttttcactc ccttttcccc tttctctctt
 121 cttctgcttt tgatccgttt cctcttttga gatatggttg cgatggattc ctgctttgtc
 181 tctttgaaat ccaataccca attgatgaag ggtaattggg gaggtttgga tcgttgtgag
 241 aatggattta tggtcgagaa agttagagga ggttttaatg aaaatgtttg gattaagagt
 301 ttgaaatatg agaagaaagc tttgaagctt accccaaatg ttgcttatgc tgtgacgcct
 361 aatgtttcaa agcagcctat gaccattcaa gttccaacag ttcctaaagt aaaagcgaat
 421 cccaaaaatg ttgcttcaat catattggga gggggtgctg ggactcacct gtttccgctt
 481 actaaaagat cagcaacgcc cgctgttcca gccggaggat gctataggct tatagatatt
 541 ccaatgagca actgcatcaa cagtgggatc aacaaaatat ttgtgcttac ccagttcaac
 601 tctgcttctt tgaatcgtca tatctcgcgg acatactttg gaaatggtgt cacttttaag
 661 gaaggatttg tggaggttct tgcagccaca caaacatctg gggaatccgg tatgtactgg
 721 ttccaaggaa ctgcagatgc tgtgagacaa tttatttggg tatttgagga tgccaagaac
 781 agaaatgttg agaacattct aattttggca ggggatcaca tgtacagaat gggctatatg
 841 gactttgttc agaatcacat tgatcgcaat gctgatattt caatctcgtg tgcagctgtg
 901 gatgacagcc gcgcatcaga ctacggattg gtgaaattag atagtagagg tcgaattatc
 961 cagttttctg aaaagccaaa gggtgccaat ttgaatcgaa tgcgagtaga tacaacttca
1021 tttggtctgt ctcgggagga gtctttgaag tctccttaca ttggatcaat gggagtttat
1081 gttttcaaaa cggatgtttt gctaaacctt ttgaagtgga gatatccttc atctaatgac
1141 ttcggctctg aaatcattcc tgcagctata aaggaccaca atgtccaagc atttatgttt
1201 agagattatt gggaggacat tggaacaata aagactttct atgatgcaaa cttggccctt
1261 cacgggaacg tttctaagtt tgaattttat gaccccaaga cacctttcta tacgtctcct
1321 cgattcttac ccccgaccaa gatcgacagg tgtcagattg tcgatgcaat aatctcacat
1381 ggatgctttt tgagagaatg tagtatccaa cattcgatag tcggtgaacg gtcaagatta
1441 gactatggtg ttgaacttaa ggatacgata atgatgggtg cagacaatta ccaaaccgaa
1501 tctgaaatta caggtctgct agcagaggga aaagtccctg tagggattgg accaaacacg
1561 aaaatcagga agtgtataat cgataagaat gcaaaaattg ggaaggatgt tatcattatg
1621 aacaaagatg gcgtccaaga agcagatcgg cctgaacagg gattctacat tcgctcggga
1681 atcaccattg taatggaaaa ggcaacaatc gaagatggca ccgttatatg aacagaactc
1741 aaaatcctca atcttggttt ggaagacatg ttagaggagg aaggaaaatg gtgtgaagtt
1801 ggctttcatg agactgccta aactgtggca gctgaagaat cagcattgta gcttgagaaa
1861 aaggagaaag gatttgatta tggacgattg agtttaaagc ttcttttcag atctttagag
1921 atagctttta agaggttcga caaaaaggaa gctccacatg gagaagagag tctaaatctt
1981 agtgtaattc tgttcaataa gaatggcta
```

그림 2. AGPase large subunit I(GenBank Accession AF030383)의 염기서열

```
   1 gagaagctga aagaatcggt cccatcccgt ttgcgaaaca ctcttattgc cgccgtgttc
  61 aactcccaaa gcggccctct catgagaaaa aaatcaagat cgccagactt ttccatggct
 121 ccccaaaccc aaataattta atcacgctaa tttccatacc tttcacattc atcttctcct
 181 tcactcgatc tttcatcttt ctcccattcc cgcctttctt cttccctcct acactcttca
 241 ttctacattc tctcgtcctt cttcttaggt gccactgatc taccccgttt tgggtcactt
 301 catttcacca atggattcct ttggcgtcgc ctgaacccca atacgatgca taagatcagt
 361 agtcaggaga agaatcaatg ctttgggttt tggggagaca gtagtcttgg aagaaacgga
 421 aggtggaaac agatacagag gaatgcctcc tcgcggaaca attctgattc ttcttcttct
 481 agcagggcta gaagcttgca cccggagttg cttattctgt tctcatgttc agaagttaat
 541 gaggaaacaa cgactttaca ggcccctata tttgaagctc caagagctga tccgaaaaag
 601 gttgcttcga ttatactggg tggaggtgct ggaactcgtt tgtttcctct taccagtcag
 661 cgagccaaac cagcggttcc tattggaggt tgttataggt tgatcgacat acccatgagt
 721 aactgcatca atagtggcat cgaaaagata tcgtctaacg cagttaactc attttctctc
 781 aatcgtcacc ttgctcgtat ttataatttt ggtaatggag tcaattttgg cgatggattc
 841 gtggaggttc tagctgccac tcagacttcg ggtgaaactg gaaaaaaatg gttccaagga
 901 actgctgatg ctgtcaggcc atttatatgg ttatttgagg atgctcagac caaaaatgtt
 961 gagcacactc taattttgtc tggcgatcac ctttaccgga tggactacat ggattttgtg
1021 cagagacata ttgacacaaa tgcagatatt actgtttcat gcatacccat ggatgatagc
1081 cgtgcatcag attacggtct catgaaaata gatgatacag gacgtattat acatttttca
1141 gagaaaccaa agggatctga cctggaagaa atgcaagttg acactgcagt tctaggactt
1201 tcagatgaag atgctagaaa aaatccttat attgcttcaa tgggagtcta catattcaga
1261 acagatcttc tattaaagct tttgacatgg agttatcctg cgtgcaatga ctttggctca
1321 gaaattattc ctgcggctgt taaagactac aaagttcaag catatctatt caatgactac
1381 tgggaggaca ttggaacagt aaaatcattt tttgatgcca acttagcact aacggagcag
1441 cccccaaaat ttgagttcta tgatcccaag actccatttt atacctcacc tagatcttgc
1501 ccccttcta aagttgaaaa atgcaggatt gtagatgcaa ttatctccca cggttgcttc
1561 ctccgagagt gtactgttga accacttatt gttggcgtgc gctctcgact ggagtatggt
1621 gtggagctta aggataccat gatgatgggt gcttactact accagacgga atctgaaatt
1681 gcatctctcc ttgctgaagg aaagatccca attggcattg gagagaacac caaaatcagg
1741 aattgcataa ttgacaagaa tgccaagatc ggaagaaatg tggttattgc aaatactgat
1801 gacgttcaag aagcagatag accagaagaa ggtttttata taaggtccgg tatcacagtc
1861 acgttgaaga atgcaacaat aaaagatgga accattattt aaaatccaaa ggcagcctcc
1921 cattcaggtc aagagatagc taagagttgg aaggaagcaa ttgctagagg ctttcaacct
1981 acaatgctcg gcaacgagta atagcgtata acttccctta atgtaaaata ctagtttctt
2041 ttcatatatg taaaaagtag gaaggcaaca catttccatc ctgagtaata acaactcctt
2101 atatcataag agaacaattt tcaaagccat ttgacattag cttcttggat gagcaaatct
2161 catctctgtg aaagagttac tctcttaaaa ctcacaagtt atattaagtt gttaatattt
2221 gcttggc
```

그림 3. AGPase large subunit II(GenBank Accession AF030384)의 염기서열

A.



B.

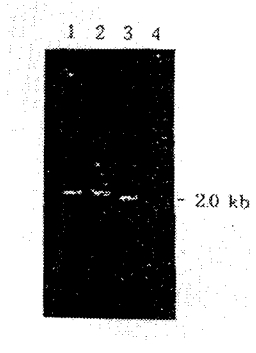


그림 4. AGPase 발현제어용 vector의 *Agrobacterium*으로의 형질전환

A: AGPase antisense vector의 개략도

B: Antisense 유전자에 대한 PCR 산물의 전기영동 양상

lane 1: small subunit cDNA에 대한 PCR 산물

lane 2: large subunit cDNA에 대한 PCR 산물

lane 3: GUS 유전자에 대한 PCR 산물

lane 4: λ/HindIII size marker

다. 형질전환 참외 식물체 유도

1) 재분화 식물체 유도

참외의 형질전환 식물체를 효율적으로 유도하기 위한 기초 실험으로, 자엽을 재료로 참외의 재분화 조건을 먼저 확립하였다. 이를 위해 먼저 MS 표준배지와 B5배지에 식물생장 조절제의 종류(BAP, Kinetin 및 Zeatin)와 농도(mg/l; 0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0)를 달리하였다. 그 결과 BAP(0.1-1mg/l)가 들어간 B5 medium에서, 전개 중의 자엽을 재료로 사용한 시험구에서, shoot가 가장 많이 형성됨을 알았다(표 1).

표 1. 참외 식물 재분화 배지 조건(B5 medium)

PGR	Conc.(mg/l)	미전개중의 Cotyledon			전개완료된 Cotyledon		
		Callus	Shoots	Roots	Callus	Shoots	Roots
BAP	0	-	-	-	-	-	-
	0.1	+	++	-	+	-	-
	0.5	+	+++	-	+	-	-
	1	+	++	-	+	+	-
	5	+	-	-	-	-	-
Kinetin	0	-	-	-	-	-	-
	0.1	-	-	-	-	-	-
	0.5	-	-	-	-	-	-
	1	+	+	-	+	-	-
	5	+	+	-	+	-	-
Zeatin	0	-	-	-	-	-	-
	0.1	-	-	+	-	-	-
	0.5	-	-	-	-	-	-
	1	+	-	-	+	-	-
	5	+	+	-	+	-	-

2) 형질전환 식물체 유도

위에서 확인한 식물체 재분화 조건에서, 앞에서 제작한 AGPase 유전자의 antisense vector를 이용하여, 통상의 방법인 Agrobacterium-mediated transformation 방법(Lloyd et al., 1986)으로 참외(깐치)의 형질전환체를 유도한 결과, kanamycin이 100mg/l가 들어간 배지에서도 살아남는 식물체를 모두 5개체 얻을 수 있었다(그림 5).

3) 형질전환체의 확인

위에서 얻은 형질전환체로 추정되는 깐치의 잎으로부터 DNA를 분리하고, 통상의 방법으로 NPTII 유전자(kanamycin 내성유전자)에 대한 PCR 검정을 한 결과, AGPase 유전자의 small subunit의 antisense vector로 형질전환시킨 실험구에서, 5개의 clones이 형질전환되었음을 확인하였다(그림 6). 그리고 이들 식물을 포장에 옮기고 과일의 생산을 유도한후, 당도를 측정하였다.

4) 형질전환된 과일의 당도 측정 및 과일의 특성

위에서 PCR 기법으로 형질전환이 확인된 깐치 참외에서, 과일의 결실을 유도하고 당도를 측정한 결과 당도가 크게 향상(6 °Brix에서 11 °Brix 이상)되었음을 확인하였다(표 2). 그러나 형질전환체에서 얻은 과일의 표면에 열과 현상을 관찰할 수 있었다(그림 7). 그 정확한 원인은 현재 알수 없지만, 과일의 생육초기부터 전분의 함량이 낮고, 환원당의 농도가 높아 생리장애를 일으킨 것으로 사료된다.

이 문제를 해결하기 위하여 과일의 생육후기에 과육특이적으로 AGPase 활성을 억제하기 위한 수단으로 과육특이발현용 promoter의 개발을 시도하고 있다.

표 2. 깐치 형질전환체와 깐치 대조구의 비교

품종명	1과중	과장	과경	과육두께	당도	경도
깐치(대조구)	570	15.5	8.3	2.1	6.6	2.2
깐치형질전환	410	13.3	10.1	2.1	11.4	2.8

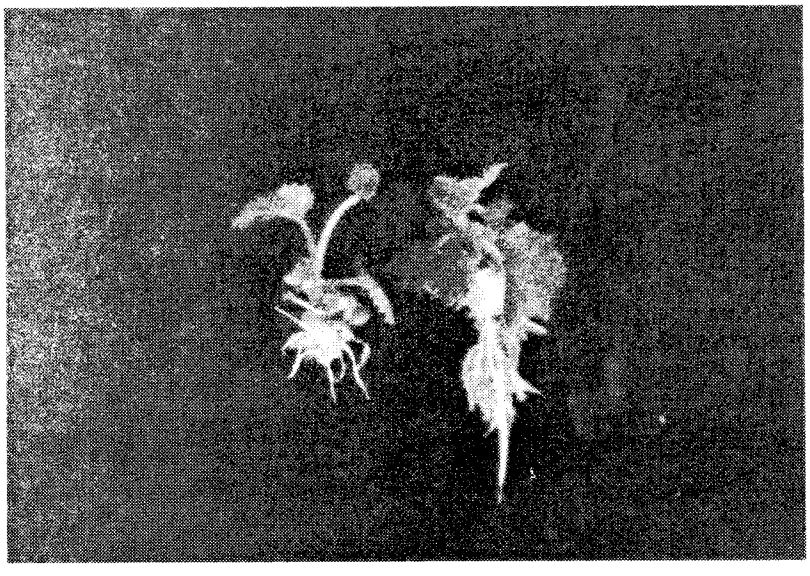


그림 5. 형질전환 참외 유식물체

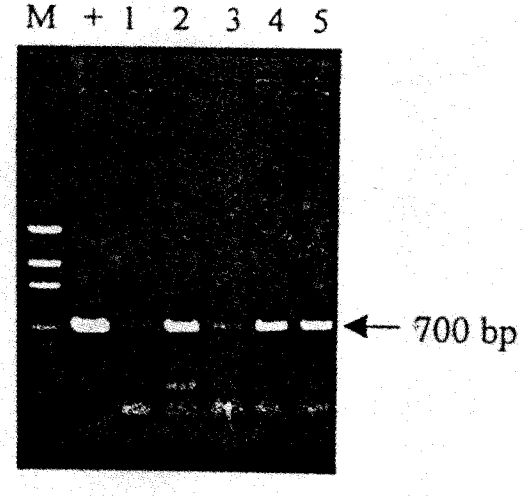


그림 6. 참외 AGPase의 small subunit에 대한 antisense 유전자로 형질전환된 참외 식물체로부터 NPTII 유전자에 대한 PCR 증폭산물의 전기영동 양상
M: λ/HindIII size marker, 1-5: 형질전환 식물체 후보군

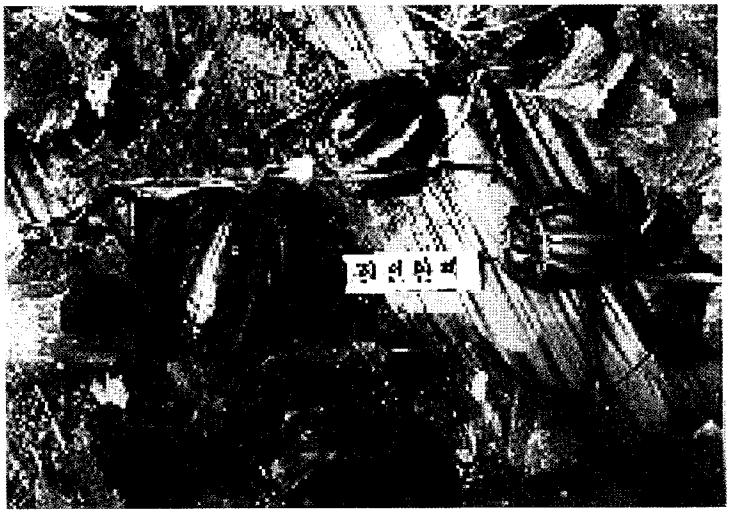


그림 7. 깐치형질전환체에서 나타나는 열과현상

라. 과육특이발현 promoter 개발

1) 과육특이발현 유전자(cDNA) 분리

Differential screening을 통해 참외 과육 cDNA library로부터 과육에서 특이적으로 발현되는 것으로 추정되는 유전자 후보군을 찾은 후, northern blot을 수행하여 목적에 가장 잘 부합하는 유전자를 선발하였다. 그리고 분리된 cDNA의 전체 염기서열을 결정하여(그림 8A), 다른 유전자의 염기서열과 비교해본 결과 ASR(ABA, stress, and ripening-regulated) gene의 일종임을 알 수 있었다. Northern blot을 통한 발현 분석은 이 유전자가 과육의 발달단계에 따라 발현량이 달라지는 것을 관찰할 수 있었고, 잎과 엽병, 뿌리에서는 전혀 발현되지 않았다(그림 8B). 따라서 본 연구의 목적에 잘 부합되는 유전자로 확인되어, 그 genomic DNA를 분리하고 promoter 부위를 얻는 실험이 수행 중에 있다.

2) 과육특이 발현 유전자의 promoter의 분리

참외의 잎으로부터 genomic DNA를 분리하여, genomic DNA library를 만들고, 앞에서 분리한 참외 과육특이발현 유전자의 cDNA를 probe로 사용하여 3개의 genomic clone을 얻을 수 있었다(그림 9). 현재 이들에 대한 염기서열결정이 이루어지고 있으며, 이를 통해 이 genomic DNA 내에 과육특이발현 유전자의 genomic DNA와 promoter 부의를 포함하고 있는지를 확인한 후, promoter 부위만을 PCR을 통해 분리할 것이다. 이렇게 하여 분리된 promoter는 참외 과육특이 발현용 vector의 제작에 사용될 것이다.

3) 참외 과육특이 발현용 vector의 제작

AGPase 유전자의 발현을 과육특이적으로 억제시키기 위해 위에서 분리한 과육특이 발현 promoter를, AGPase antisense vector의 35S promoter에 대체하여 참외 과육특이 발현용 vector를 제작할 것이다.

A.

GAGCCCTCAAAACCATGGCAGAAGAAGAGCAAGGCCATCACCATCACCACCTTTTCCACCACCACAAGGAAGGAGAAGA
GAGCTCTGATGTTGTCGACTACAAGAAAGAGAAGAAGCACCACAAGCACCTCGAACACCTTGGTGAGCTCGGTGCCGCC
GCAGCCGGTGCCTATGCTCTGCATGAGAAGCACGAGGCGAAAAAAGACAGCGAACACAGCCATGAGCACAAGATCAAGG
AGGAAGTTGGAGCGGCGGTGGTGGCCGGGGCCGCGGGATTTGTGCTCCATGAGCATCATGAAAAGAAGGAAGCAAAGAG
AGAAGAGAAAGAGGAACATCACCACCATCTTTTTTGAAAAACTTTGCCTTTCATATTTATATATGATGGGGTTTAATTG
NTTGCTTTTCTTTTGGCTTTGGTTGTGATGTTTTGGGTTTTAAGAGTTTAATCTATTAAGTGGTTTGTAAAATAAATTT
GAAATGCTCAAGCNAATAAGAAGATTGAGAAAAAAA

B.

L P R SP F1 F2 F3 F4

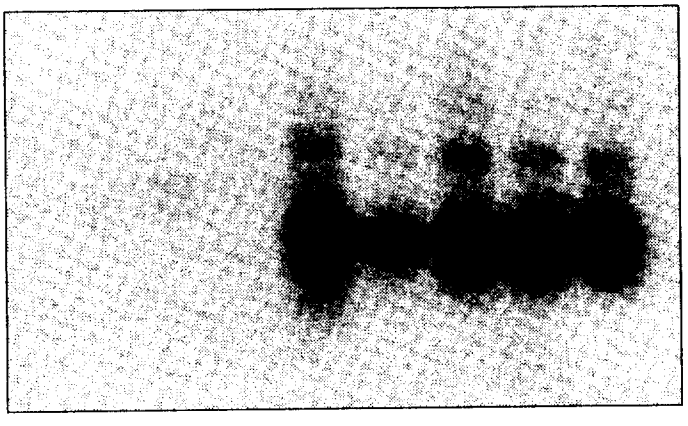


그림 8. 과육특이 발현 유전자의 염기서열(A)과 조직별/과육단계별 발현양상(B)
L ; leaf P ; petiole R ; root SP ; seed and placenta
F1 ~ F4 ; fruit ripening stage 1 to 4

G1 G2 G3

SM SI SSII SII SI SSII SII SI SSII SII SM

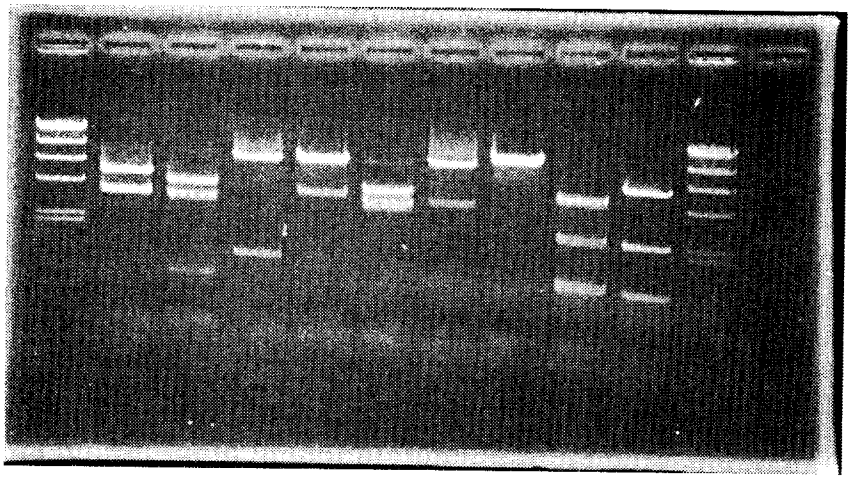


그림 9. 참외 genomic DNA library로부터 분리한 과육특이 발현 genomic clones(G1, G2, G3)의 DNA를 제한효소로 처리한 산물의 전기영동 양상. SI: SalI, SII: SacII, SSII: SalI+SacII, SM: λ/HindIII size marker

마. 우량계통의 선발

현재 깐치 형질전환체의 T2 세대가 농가(경북 성주군 초전면 백노기씨)에서 포장 재배 중이며, 형질전환체의 안정성을 검정 중에 있다. 앞으로 2-3세대를 더 거쳐 도입 형질을 고정한 후, 농가 보급용 종자의 모본으로 사용할 예정이다.

3. 결과 요약

과일의 당도제어 관련 유전자 중, glucose를 전분으로 전환하는데 key enzyme으로 작용하는 AGPase를 coding하는 유전자들(small subunit 1종류와 large subunits 2종류)을 참외 과육 cDNA library로부터 cloning하였다. 그리고 이들 유전자들을 식물형질전환에 범용적으로 사용되고 있는 pBI121 vector의 35S promoter 아래에 antisense 방향으로 연결하여, AGPase 발현 억제용 vector를 제작하였다. 이 vector를 참외 식물체에 도입하기 위해 먼저 *Agrobacterium*에 도입한 후, 이를 이용하여 형질전환 참외(깐치) 식물체를 유도하였다. AGPase의 발현이 억제된 참외(깐치)와 대조구 참외(깐치)의 당도를 비교해보았을 때, 당도가 6 °Brix에서 11 °Brix이상으로 증가되었음을 확인하였다. 그러나 과일표면에 균열이 생성되는 부작용도 발견되어, 이를 방지하기 위한 기술로서 AGPase 유전자의 발현을 과육특이적으로 제어하기 위한 promoter의 개발이 시도되고 있다. 즉, 이를 위해 참외 과육 cDNA library로부터 differential screening을 통해 과육에서 특이/우세하게 발현되는 cDNA를 얻었고, genomic DNA도 분리하였다. 현재 이 genomic DNA의 염기서열을 분석 중에 있다.

참고문헌

Baudracco-Arnas S. and M. Pitrat(1996) A genetic map of melon(Cucumis melo L.) with RFLP, RAPD, isozyme, disease resistance and morphological markers. Theor Appl Genet 93:57-64

Bianco, V. V. 1997. Compositional Changes in Muskmelons during Development and in Response to Ethylene Treatment. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 102(2):127-133.

조래광 등. 1991. 근적외 분광분석법에 의한 분말 고추중의 씨앗 및 꼭지 혼입량의 신속한 측정. Kor. J. Food. Sci. Technol. 23(4) : 447-451.

Devos KM, Gale MD 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. Theor. Appl. Genet. 84:567-572

Fritsch, P., M. A. Hanson, C. D. Spore, P. E. Pack, and L. H. Rriseberg. 1993. Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plants. Plant Molecular Biology 11:10-20.

Fukuoka S, Hosaka K, Kamijima O 1992. Use of random amplified polymorphic DNAs(RAPDs) for identification of rice acessions. Jpn. J. Genet. 67:243-252.

Giangiacomo, R. et al.1981. Predicting Concentrations of Individual Sugars in Dry Mixture by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. J. of food Sci. 46:531-534.

Grsy L, Rayburn AL, Mujeeb-Kawi A 1994. Development of DNAmarkers based on randomly amplified polymorphic sequences in *Treticum aestivum* L. × *Thinopyrum bassarabicum* amphiloid. J. Genet. Breed. 48:1-6.

홍병희, 박철수. 1996. RAPD표식인자를 이용한 밀 간장 근동질 계통의 유전변이 분석. 한육지. 28(4):420-428

Hong, T. 1989. Determination of Pepper Fruit Capsaicin Content by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. Progress Report, AVRDC. 217-219.

Hymowitz, T., et al. 1974. Estimations of Protein and Oil Concentration in Corn, Soybean, and Oat Seed by Near-Infrared Light Reflectance. Crop Sci. 14 : 713-715.

Iwamoto, M., et al. 1984. Near Infrared Reflectance Spectrum of Red Pepper and Its Applicability to Determination of Capsaicin Content. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. 32(2):120-125.

Iwamoto, M., et al. 1986. Analysis of Protein and Amino Acid Contents in Rice Flour by Near-Infrared Spectroscopy. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. 33(12):848-853.

Iwamoto, M., et al. 1986. Determination of Ash Content in Home-grown Wheat Flour in Japan by Near-Infrared Diffuse Analysis. Nippon Shokuhin Kogyo

Gakkaishi. 33(12):842-847.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W. (1987) GUS fusion: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO J. 6: 3301-3307.

Katzir. N., Y. Danin-Poleg, G. Tzuri, Z. Karchi, U. Lavi and P. B. Cregan(1996) Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species. Theor Appl Genet 93:1282-1290

Kim Hyun-Ock, P. C. Williams. 1990. Determination of Starch and Energy in Feed Grains by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. J. Agric. Food. Chem. 38:682-688.

Lanza, E. and B. W. Li. 1984. Application for Near-Infrared Spectroscopy for Predicting the Sugar Content of Fruit Juices. J. of food Sci. 49:995-998.

Lin JJ, Kuo JK, Saumders JA, Beard HS, MacDomald MH, W Kenworthy, Ude GN and BF Matthews 1996. Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD, and AFLP DNA mapping techniques. Plant Mol. biol. Rep. 14: 156-169

Lloyd, A.M., Barnason, A.R., Rogers, S.G., Fraley, R.T., and Horsch, R.B. (1986)

M. Pitrat(1991) Linkage Groups in Cucumis melo L. Journal of Heredity 82:406-411

Müller-Röber, B., Bonnezald, U., and Willmitzer, L. (1992) Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes lead to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. The EMBO J. 11(4): 1229-1238.

Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. J. of Food Sci. 49: 17-20.

Norris, K. H. and P. C. Williams. 1984. Optimization of Mathematical Treatments of Row Near-Infrared Signal in the Measurement of Protein in Hard Red Spring Wheat. I. Influence of Particle Size. Creal Chemistry. 61:154-165.

오은경. 1992. 근적외선 반사분광법에 의한 정육 및 그 구성성분의 반사 spectra에 관한 연구. Kor. J. Food Sci. 24(5): 404-407.

Osborne, B. G. 1986. Near Infrared Spectroscopy In Food Analysis. 1-193.

Park, S.W., Kahng, H.Y., Kim, I.J., Park, J.O., and Chung, W.I. (1998) Molecular cloning and characterization of small and large subunits of ADP-glucose pyrophosphorylase from Oriental Melon. J. Plant Res. 111: 59-63.

Pieter Vos, Rene Hogers, Marjo Bleeker, Martin Reijans, Theo van de Lee, Miranda Hornes, Adrie Frijters, Jerina Pot, Johan Peleman, Martin Kuiper and Marc Zabeau(1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. Vol. 23. No 21 4407-4414.

Scharma, S. K., M. R. Knox, and T.H.N. Ellis. 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of Lens and its comparison with RAPD analysis. Theor. Appl. Genet 93:751-758

Shenk, J. S. 1991. Population Definition. Sample Selection, and Calibration Procedures for Near Infrared Reflectance Spectroscopy. Published in Crop Sci. 31: 469-474.

Sin, G. Y. 1989. 1대 잡종 참외의 당 축적양상. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 30(4): 257-261.

Tinker NA, Fortin MG, Mather DE1993. random amplified polymorphic DNAs(RAPDs) and pedigree relationships in spring barley. Theor. Appl. Ginet. 86:365-370

Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *A. tumefaciens*. Sci. 234: 464-466.

Wang Y.-H, C. E. Thomas and R. A. Dean(1997) A genetic map of

melon(*Cucumis melo L.*) based on amplified fragment length polymorphism(AFLP) markers. Theor Appl Genet 95:791-798

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms ampligied by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.

Williams, P. C., et al. 1978. The Application of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy to Protein-testing in Pulse Breeding Programmes. J. Sci. Fd Agric. 29:285-292.

Yang X, Quiros C 1993. Idemtification and classification of celery cultivars with RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 86:205-212.

Yoo, K. C. 1989. 참외에 축적되는 당의 종류 및 축적양상의 품종간 차. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 30(1):1-6.

Yu LW, Nguyen HT 1994. Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars(*Oyiza Sativa* L.) Theor. Appl. Ginet. 87:668-672.

예일특허법률사무소®
YEIL PATENT & TRADEMARK LAW FIRM
예일특허 상표종합방
yeil patentmart

135-080
서울시 강남구 역삼동 700-19
역삼빌딩 2층
2nd FL, YORKSAM BLDG.
700-19
YORKSAM-DONG
KANGNAM-KU
SEOUL 135-080,
KOREA

전 화 82 2 555-1717
Telephone.
팩 스 82 2 555-1784
Fax.
휴대폰 82 011 730-1716
H.P
E-mail : yeildr @ chollian.
dacom. co. kr
Web Site : http // www.
patentmart. co. kr

예 일 99-03174 1999. 3. 23.

수 신 : 농우종묘(주)
양승균 부장님

제 목 : 출원 완료 보고

당소에 의뢰하신 하기 건의 출원을 완료하였기에 그 내역을 아래와 같이 알려드립니다.

권 리 : 특허
출 원 인 : 농우종묘 주식회사
출 원 일 자 : 1999년 3월 16일
출 원 번 호 : 제 99-8820 호
명 칭 : 재래종 참외로부터 분리한 AGPase 유전자 및 그를 이용한 고당도 참외 생산방법
심 사 청 구 : 유
우 선 권 주 장 : 무
조기 공개 신청 : 무
국내 우선 기한 : 2000년 3월 16일
해외 출원 기한 : 2000년 3월 16일
보 정 기 한 : 2000년 6월 16일

상기 출원과 관련하여 특허청에 제출한 출원 서류 사본, 출원번호통지서를 동봉합니다.

본건 출원에 대한 추후 진행 사항은 발생하는 대로 알려 드리겠습니다.

예일특허법률사무소
대표변리사 공학박사 이 덕 록

결재	계	주임	장	소장	부사장	사장

동 봉 물 : 1. 출원서류 사본 및 출원번호통지서 각 1부.

학회발표

모숙연, 임성희, 고관달, 안종문, 김두환. 1998. 참외와 멜론의 유전적 다양성에 대한 RAPD 분석. 원예과학기술지. Vol. 16. No. 1 P.21-24

모숙연, 안종문, 김두환. 1999. DNA marker를 이용한 참외의 Genetic Map 작성. 2000년 춘계 원예학회 포스터 발표

이우문, 유주현, 안종문, 고관달, 조용섭. 1998. 참외과실의 성숙일수에 따른 부위별 당 축적양상. 한국원예학회 발표요지(춘계 포스터). p149.

Park S. W., H. Y. Kahng, I. J. Kim, J. O. Park, and W. I. Chung. 1998. Molecular Cloning and Chacterization of Small and Large Subunits of ADP-Glucose Pyrophosphorylase from Oriental Melion J. Plant Res. 111: 59-63.