

발간등록번호

11-1543000-000476-01

**바이오매스 생산용 형질전환 식물 개발**  
(Development of transgenic plants for  
biomass production)

포항공과대학교

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “바이오매스 생산용 형질전환 식물 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014 년 6 월 20 일

주관연구기관명 : 포항공과대학교  
주관연구책임자 : 황 일 두  
1세부연구기관명 : 포항공과대학교  
1세부연구책임자 : 황 일 두  
1협동연구기관명 : (주)에프앤피  
1협동연구책임자 : 윤 길 영  
2협동연구기관명 : 서울대학교  
2협동연구책임자 : 박 충 모  
3협동연구기관명 : 전남대학교  
3협동연구책임자 : 김 정 일  
4협동연구기관명 : 서울대학교  
4협동연구책임자 : 김 도 순

# 요 약 문

## I. 제 목

바이오매스 생산용 형질전환 식물 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

화석연료 고갈우려와 지구온난화 등으로 에너지수급이 전 세계적으로 국가과제로 대두된 이래로 각국의 에너지원 다변화노력이 계속되고 있으며, 에너지용 바이오매스 확보가 그 중한 대안이 되고 있음. 단, 전분계 바이오매스가 초래한 국제 곡물가 인상 등의 문제에 대응하기 위한 전략으로 목질계 바이오매스 연구가 필요함. 이를 위해 본 연구팀은 목질계 바이오매스 생산 증대를 위해 각 세부/협동과제별 다음과 같은 목적과 목표를 위해 연구를 진행함.

### [1세부: 식물 줄기 형성층 활성 조절을 통한 바이오매스 증진기술 개발]

- 목질계 바이오매스 증대를 위해서 식물의 부피생장을 담당하는 줄기 형성층의 활성 조절 기술은 다양한 작물의 바이오매스 증대를 위해 가장 근본적인 접근 전략임.
- 바이오매스 증대에 관여하는 유전자를 발굴하고 그 기능을 분석하여, 모델 작물 개발에 활용
- 바이오매스 증대 및 관다발 발달 조절 기작 및 주요 유전자의 기능 분석을 통해 바이오매스 증대를 위해 고려해야할 식물의 발달 조절 시스템 규명

### [1협동: 바이오매스 증대를 위한 포플러 형질전환체 개발]

- 바이오에너지 원자재 확보 방법으로 바이오매스가 증대된 형질전환체 개발
- 바이오매스 증대 관련 유용 유전자의 발굴 및 유용성 검증
- 바이오매스 증대를 통한 바이오연료 원자재로 활용할 수 있는 형질전환체 개발
- 목본류 형질전환체 개발을 위한 조건 규명 및 선발
- 원자재 효용성 검증(바이오매스 전환 공정 성분 분석) 및 형질전환체 선발

### [2협동: Brachypodium 및 Miscanthus를 이용한 바이오매스 증진 식물 개발 연구]

- 바이오매스 증진 연구를 위한 대표적인 대상작물인 Miscanthus(억새)와 바이오에너지 grass 연구를 위한 모델작물인 Brachypodium (숲개밀)의 형질전환 시스템 (벡터, promoter, 형질전환 기법 포함)을 구축하고, 나아가 바이오매스가 증진된 억새 형질전환 식물을 개발하고자 함.
- 바이오에너지 grass 연구의 기술적 난제의 하나인 knockout mutant 확보를 위하여 Artificial Zinc Finger Nuclease 기법을 정립하고, flowering time 유전자의 하나인 *GIGANTEA* 유전자의 knockout mutant를 확보함. 이 mutant는 개화의 지연으로 인하여 바이오매스가 크게 증진될 것으로 예상함.

**[3협동: 억새 (*Miscanthus sinensis*) 형질전환 시스템 구축 및 광 이용성 증대 억새 품종 개발]**

- 억새(*Miscanthus* sp.)는 다년생 식물로서, 높은 셀룰로스 함량을 지니며, 유지관리가 쉽고 경작되지 않은 토양에서도 잘 자라는 등 바이오에너지 작물로서의 큰 장점들을 지니고 있고, 특히 아시아에서 유래되어 국내 재배가 용이하며, C4 식물 탄소대사를 지녀 C3 식물에 비하여 매우 효율적인 광합성을 하기 때문에 성장속도가 빠르며, 현재 바이오에너지 작물들 중에서도 매우 우수한 작물로 평가되고 있음.
- 특히 억새 품질 개량 연구는 아직 초기 단계라 할 수 있으며 선진국인 미국에서조차 시험생산 과정에 있어서, 우리나라 같은 후발국의 입장에서는 개발 가치가 매우 높은 것으로 기대되며, 전통적인 육종방법에 의한 억새의 우수 품종 개발뿐 아니라 생명공학기법을 이용한 우수 품종 개발을 위한 연구가 필요함.
- 이에 본 과제 연구에서는 억새 종자 등을 이용한 조직 배양을 통하여 재분화 및 형질전환 조건을 확립하고, 조건 최적화를 통한 억새 형질전환 효율을 증진시켜, 향후 다양한 유용 유전자를 도입시킬 수 있는 형질전환 체계 확립 및 관련 기술을 개발하고자 함. 특히 식물의 광수용체 파이토크롬 유전자를 억새로 도입시켜 광 이용성이 증대되어 바이오매스 증산 및 이산화탄소 이용 효율이 증대된 생명공학 억새 품종을 개발하고자 함.

**[4협동: 억새(*Miscanthus*)의 유전적 재배 생리생태적 특성평가 및 포장재배법 개발]**

- 국내 자생식물유전자원을 활용한 바이오매스용 작물의 개발에 필요한 기반과 관련 기초기술을 확립하고, 대량생산을 위한 표준기술을 확보가 필요함.
- 국내 자생 식물유전자원 가운데 억새는 높은 바이오매스 생산성과 환경적응성이 우수함에도 불구하고 바이오매스용으로 유전자원이 확보되지도 않았고, 관련 연구가 전무한 실정이었기에 우선적으로 억새 유전자원을 국내·외에서 수집한 후 유전적 생리생태적 특성, 바이오매스 생산특성과 환경 스트레스 내성·지역적응성 등의 평가가 필요하였으며, 선발된 우량 억새와 형질전환기술로 확보된 형질전환체의 포장평가를 통한 바이오매스 우량체 확보가 시급하였음.
- 또한 대량 재배생산을 위한 기본적인 억새 표준 재배법(재식, 재배관리, 수확)을 구축하는 것이 필요함.

**Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위**

**[1세부: 식물 줄기 형성층 활성 조절을 통한 바이오매스 증진기술 개발]**

- 줄기 형성층 활성 조절 유전자 확보 및 형질전환체 표현형 분석
- 관다발 발달 조절 유전자의 기능 분석을 통한 줄기 발달 과정의 에너지 재분배 전략 마련
- 확보된 유용 유전자를 대상으로 포플러 형질전환체 제작 지원(협동1)

**[1협동: 바이오매스 증대를 위한 포플러 형질전환체 개발]**

- 식물의 성장 및 발현 조절 유전자를 이용한 유채 및 포플러의 형질전환
- 형질전환의 생육특성 조사 및 세대진전을 통한 목표형질 고정(안정적인 발현 조사)
- 형질전환 유전자의 분자생물학적 특성분석(도입위치 및 발현양 등)



- 도입형질에 의한 바이오매스 효율 관련 성분 분석
- 선발 형질전환체의 최종 선발 및 증식

**[2협동: Brachypodium 및 Miscanthus를 이용한 바이오매스 증진 식물 개발 연구]**

- HOS1에 의한 CO 단백질 분해에 의한 저온하에서의 개화시기 조절 연구
- NTL6의 핵이동에 의한 SnRK2의 기능 조절 및 가뭄저항성 연구
- Brachypodium 형질전환 기법 정립
- Artificial Zinc Finger Nuclease 기법을 이용한 *GI* knockout mutant 개발.
- Brachypodium으로부터 저온 신호 조절 유전자 연구

**[3협동: 억새 (*Miscanthus sinensis*) 형질전환 시스템 구축 및 광 이용성 증대 억새 품종 개발]**

- 억새 재분화 및 형질전환 조건 확립
- 유용 유전자가 도입된 억새 형질전환체 확보
- 광 이용성이 증대된 생명공학 억새 개발

**[4협동: 억새(*Miscanthus*)의 유전적 재배 생리생태적 특성평가 및 포장재배법 개발]**

- 국내외에서 억새유전자원을 수집하여 유전자원포장을 구축한 후 유전적 생리생태적 특성 및 유전적 특성을 조사 평가
- 바이오매스생산성 및 환경적응성이 높은 핵심 억새 유전자원집단을 선발
- 핵심 유전자원집단을 기반으로 바이오매스생산성 향상을 위한 형질전환억새 개발
- 선발된 계통에 대한 표준 재배관리법 구축을 위해 재식방법, 시비방법, 잡초방제법, 수확방법 등 기본 재배기술의 확립과 이를 바탕으로 대량재배기술 확립을 위한 포장평가연구

**IV. 연구개발결과**

**[1세부: 식물 줄기 형성층 활성 조절을 통한 바이오매스 증진기술 개발]**

- CKI1, ICA2 등 줄기 형성층 활성 증대 기능 확인
- ICA2의 바이오매스 증대 표현형 확인
- CKI1 포플러 형질전환체 확보
- PHD의 줄기 체관 발달 조절 기능 확인

**[1협동: 바이오매스 증대를 위한 포플러 형질전환체 개발]**

바이오매스 증대관련 유전자를 이용한 유채와 포플러의 형질전환 조건 규명

- 형질전환체 후보 개체(200개 이상)를 선발하기 위한 기내 검정 및 생육특성 조사 형질로 분지수, 줄기의 직경 및 수고(높이) 측정
- 기외 순화 후 후보개체의 세대진전을 통한 목표형질 고정(안정적인 발현 조사, 도입형질 및 바이오매스 증대 검정)
- 1차 선발과정에서 3개의 유전자로부터 각각 4개의 후보 개체를 선발하여 총 12개체의 생육

### 특성 및 발현 분석

- 형질전환체의 분자생물학적 분석으로 도입 유전자와 gnomc DNA specific primer를 이용한 도입 유전자의 안정성 분석
- 선발 후보 형질전환체 3개의 도입 유전자 위치(insertion site) 확인 및 BLAST search
- 선발된 포플러 형질전환체의 수령에 따른 도입 유전자의 발현량 비교 분석
- 도입형질에 의한 바이오매스 전환효율 관련 성분으로 리그닌과 cellulose 함량 분석
- 수령에 따른 형질전환체의 해부학적 특성과 도입유전자의 발현량 및 바이오매스 성분 비교 분석
- 형질전환체의 최종 선발 및 증식
- 다년생 목본류 형질전환체의 경우 developmental homeostasis 기작에 의한 성장(바이오매스 증대) 조절존재 확인

### [2협동: Brachypodium 및 Miscanthus를 이용한 바이오매스 증진 식물 개발 연구]

- 생체시계 유전자 alternative splicing에 의한 저온반응성 유도 연구: C C A 1 의 pre-mRNA가 alternative splicing에 의해 MYB domain 하나가 제거된 CCA1 $\beta$  isoform이 생성되고, 이것이 functional isoform으로 알려진 CCA1 $\alpha$ 와 heterodimer를 이룸으로써 CCA1 $\alpha$ 를 negative하게 조절함을 밝힘.
- HOS1 E3 ubiquitin ligase의 식물 발달 조절 연구: HOS1은 E3 ubiquitin ligase로서 뿐만 아니라 다양한 역할을 한다는 사실을 증명함.
- 식물 내 철 이온 검출을 위한 형광 probe 개발: 식물체내 철 이온을 검출할 수 있는 형광 센서를 개발하였음.
- CO alternative splicing 연구: CO $\beta$ 가 PEPi 기작에 의해 CO $\alpha$ 에 대한 dominant negative regulator로 작용하여 개화시기를 조절함.
- CCA1에 의한 개화시기 조절 연구: 생체시계를 조절하는 주요 전사인자인 CCA1의 개화시기 조절 기능 증명.
- 환경스트레스에 의한 생체시계 유전자들의 alternative splicing 조절 연구: 생체시계 관련 유전자들이 대체적으로 alternative splicing을 통해 발현량을 조절한다는 것과 외부 환경에 따라 구성 인자들의 alternative splicing pattern 변화가 분명하다는 것을 확인함.
- 저온 저항성 유전자가 도입된 Brachypodium 형질전환체 연구: Brachypodium 내에도 CBFs가 존재함을 확인하였고, Brachypodium에서 CBF와 상동성이 높은 유전자인 CBF1을 동정.

### [3협동: 억새 (*Miscanthus sinensis*) 형질전환 시스템 구축 및 광 이용성 증대 억새 품종 개발]

- 억새 재분화 및 형질전환 조건 확립 완료: 우선적으로 성숙 종자를 이용한 효율적인 억새 조직배양 및 재분화 조건을 확립. 또한 국내에서 서울대 연구진(제4협동과제)에서 채집한 억새 (*Miscanthus sinensis*) germplam SNU-M-045를 이용하여 Agrobacterium을 이용한 억새 형질전환 조건을 확립. 생명공학 억새 개발 기술을 확보.
- 유용 유전자가 도입된 억새 형질전환체 확보: Agrobacterium을 이용한 억새 형질전환을 통하여 제초제 저항성 억새 형질전환체를 확보. 또한 식물 광수용체 파이토크롬B 유전자

두 종류(*Arabidopsis thaliana* 파이토크롬B = AtPhyB, *Brachypodium distachyon* 파이토크롬B = BdPhyB)가 도입된 억제 형질전환체 및 고효성 파이토크롬 돌연변이인 BdYVB 형질전환체와 선발된 유용 유전자 CaPLA1 형질전환체 확보. 이 외, CaSRP1 등 일부 유용 유전자들은 기능 검증을 위하여 단자엽 모델식물인 *Brachypodium*로 도입시켜 형질전환체를 확보하였고, 이들의 표현형 분석을 통하여 기능을 조사하였다.

○ 광 이용성이 증대된 생명공학 억제 개발

: 억제의 광 이용성을 증대시키기 위하여 파이토크롬B 유전자가 도입된 형질전환체를 확보하여 분석하였다. 여기에는 제4 협동과제 연구진들과 함께 억제 형질전환체들의 LMO 포장시험을 포함하였다. 본 과제 연구에서는 AtPhyB 및 BdPhyB 유전자가 도입된 억제 형질전환체들의 분자생물학적 분석, 엽록소 함량 측정, 식물체 길이 및 개화 시기 조사 등의 분석이 완료되었으며, 이를 통하여 개발된 생명공학 억제 식물체의 바이오매스 증대 가능성을 검증하였다.

**[4협동: 억제(Miscanthus)의 유전적 재배 생리생태적 특성평가 및 포장재배법 개발]**

- 총 390여개의 억제를 한국, 중국, 러시아, 일본 등에서 수집
- 유전자원포장을 조성하여 수집된 억제 유전자원의 다양한 표현형질은 물론 바이오매스 생산성관련 농업형질, 환경스트레스 반응 형질, 분자마커를 이용한 유전형질 비교 등을 실시
- 바이오매스 생산성이 높고, 환경 및 지역적응성이 높은 핵심 유전자원집단 50여종을 선발
- 이들 가운데 우량한 유전자원을 선발하여 타 협동과제와 공동으로 2종의 바이오매스 증대 형질전환체를 개발
- 영국의 연구팀과 ABS계약을 통해 20여종의 유전자원을 공급하여 바이오매스용 억제품종 개발의 기반과 국제적인 상용화의 기반을 마련
- 재식시기, 심도, 시비, 제초, 수확과 관련된 기반기술을 확립하여 표준재배법을 구축
- 선발된 우량억제들을 소규모 포장평가를 통하여 대량재배생산을 위한 기초기술을 확립

**V. 연구성과 및 성과활용 계획**

**[1세부: 식물 줄기 형성층 활성 조절을 통한 바이오매스 증진기술 개발]**

- 바이오매스 증대 유용유전자의 기능 및 조절기술에 대한 특허 출원/등록
- 등록된 특허를 이용하여 바이오매스 관련 기업과 연계하여 기술이전 추진
- 관다발 형성층 및 체관 발달 조절관련 유전자 기능 분석을 통해 유전자원 확보
- 유용 유전자의 기능 분석에 관한 논문 발표

**[1협동: 바이오매스 증대를 위한 포플러 형질전환체 개발]**

- 연구성과: 유용유전자 발굴: 기후변화와 바이오에너지에 대한 수요 증가로 에너지 원자재로 확보에 활용 가능한 유용유전자원의 발굴
  - : 형질전환체 개발 및 선발: 발굴된 유전자를 활용한 산업화 첫 단계인 유전자원의 가능성 검정을 위한 형질전환체 개발 및 형질 발현 특성 규명체계 확립
  - : 형질전환체 평가: 생명공학 기술에 의한 새로운 바이오매스 자원개발과 검정 프로세스 확립에 필요한 단계별 목표 및 확인 세부과정 확립

: 다년생 목본류 형질전환체 특성 규명: 바이오매스 증대를 위한 포플러 형질전환체의 경우, developmental homeostasis 기작에 의한 발달과정(수령)에서의 조절 특성 규명

- 성과활용 계획: 실용화·산업화 계획(기술실시 등): 바이오매스 증대를 위한 형질전환체 개발 및 검정 과정에서 대상숙주(초본과 목본)에 따라 유전자의 발현 특성에 현저한 차이가 확인되어 개발된 형질전환체의 직접적인 활용보다는 형질전환체를 이용하여 목본류에서 수령에 따른 유전자의 발현 특성 연구와 유전자의 발현 조절에 대한 재료로 활용이 적합

: 인력인프라의 활용: 바이오매스 증대 관련 유용유전자 확보 및 형질전환체 개발 그리고 형질전환체를 검정을 통한 바이오매스 자원개발에 이르는 일련의 과정과 체계를 이해하는 인력 인프라를 활용한 유용 목표형질이 도입된 바이오매스 자원을 지속적으로 개발하여 바이오 에너지 원자재 확보를 위한 바이오매스가 증대된 형질전환 식물의 개발 및 세대고정을 통한 새로운 품종 개발에 활용

: 기술인프라의 활용: 확보된 유용 유전자와 형질이 도입된 형질전환체는 특성을 규명하여 지적재산권을 확보하고 바이오에너지 원자재 확보를 위한 원천기술로 활용

: 교육 및 지도: 바이오매스 증대를 위한 형질전환 기술과 형질전환체의 선발 등 유용유전자원을 활용한 산업화 초기단계 진입을 위한 기술과 추진 과정에 대한 기술지도 및 교육을 통해 기술 인력의 확보에 활용

: 추가연구 및 타 연구에 활용: GMO 품종의 산업화를 위한 단계에서 위해성평가(환경 및 인체 위해성)가 신제품 등록에 필수적임으로 위해성 평가 자료 작성 및 심사신청서 작성을 위한 연구가 필요

: 환경위해성 평가를 위한 원재료 “event”로 활용

: 선발된 형질전환체를 이용한 developmental homeostasis 또는 functional mutagenesis 기작연구

## [2협동: *Brachypodium* 및 *Miscanthus*를 이용한 바이오매스 증진 식물 개발 연구]

- 바이오매스 증진 유전자를 발굴하여 이들의 작용 원리를 규명하여 학술논문으로 발표하고, 이들에 대한 지적재산권을 확보함.

- *Brachypodium*으로부터 분리된 저온반응성 유전자 등, 환경스트레스 반응성 관련 유전자를 이용하여 바이오매스 증진 작물 개발 기술 정립.

-유휴경지를 이용한 바이오매스 증진 작물의 재배로 농촌경제의 활성화 및 농가 수익 창출에 기여.

## [3협동: *Miscanthus sinensis* 형질전환 시스템 구축 및 광 이용성 증대 *Miscanthus sinensis* 품종 개발]

- *Miscanthus sinensis* 재분화 및 형질전환 방법

: 본 과제 연구에서 개발한 *Miscanthus sinensis* 성숙 종자를 이용한 조직배양 및 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법에 대한 특허 출원 및 논문 발표. 개발된 *Miscanthus sinensis* 형질전환 기술의 생명공학 회사로의 기술 이전 추진.

- 유용 유전자가 도입된 *Miscanthus sinensis* 형질전환체 확보

: AtPhyB 억제 형질전환체 연구 결과는 논문 투고 중, BdPhyB 억제 형질전환체의 포장형질 분석을 제4 협동과제 연구진이 진행 중. 완료 후 논문 발표 예정.

- 생명공학 억제 품종 개발

: 제4 협동과제 연구진이 수집한 국내 억제 germplasm 중에서 SNU-M-045 라인이 억제 형질전환에 유용하고, 생명공학 억제 품종 개발에 적합함을 확인됨에 따라 품종 등록을 추진. 확립한 억제 재분화 및 형질전환 조건을 이용하여 억제의 상업적 품종인 거대억제(*M. x giganteus*)의 형질전환, 또는 2배체의 생명공학 억제(*M. sinensis*)와 4배체 억제인 *M. sacchariflorus*의 교배를 통한 새로운 거대억제 품종 (3배체) 개발을 위한 추가 연구 과제를 추진 예정.

**[4협동: 억제(Miscanthus)의 유전적 재배 생리생태적 특성평가 및 포장재배법 개발]**

- 선발된 우량 억제유전자원은 바이오매스용 억제 품종 개발에 지속적으로 활용할 예정이며, 확립된 표준재배법은 향후 바이오매스용 억제의 대량재배생산 기술 확립에 적용함으로써 바이오매스 원료 공급 기반확립에도 활용될 것임.

# SUMMARY

## **Title: Development of transgenic plants for biomass production**

To increase biomass as resources of bioenergy, we selected genes related to regulation of procambium activity or vascular development, and generated transgenic plants with *Arabidopsis* and poplar which were analyzed their function in biomass production. CKII and ICA2 overexpression lines showed improve of biomass production by increase of cambial activity. And ICA2 plants regulated biomass production of surrounding wild type plants, which might be caused by volatile signal from ICA2.

On the other hand, we carried out research with search tools and molecular biological technology in the *Brachypodium* which is a model monocot for bioenergy grass studies, such as identification of functional genes and promoters and transformation methods. Based on this study, we established functions of several genes related to flowering and photosynthesis which are major factor to produce biomass.

In addition, we tried to make transgenic *Miscanthus* with useful genes for biomass production and stress resistance. For this approach, first we established *Miscanthus* transformation technique which was the 1<sup>st</sup> on the world, and the most efficient. Transgenic *Miscanthus* showed high yeild on biomass compared to wild type. And also we collected *Miscanthus* on the world, and analyzed their physiological traits, and selected the most appropriate varieties to specific growth conditions.

Our results proposed that various model transgenic plants having useful genes are used to improve biomass on the limited growth condition such as Korea or stress condition such as a savanna. And the standard cultivation method can also be applied to future *Miscanthus* plantation for massive biomass production, which will save our efforts and costs and facilitate our own bioenergy production in the near future. Other outcomes than those mentioned above will be used for various scientific publication as well.

# CONTENTS

Chapter 1 The Overview of Research and Development Project .....	12
Chapter 2 The Trends of Domestic and International Technical Development .....	19
Chapter 3 The Contents and Outcomes of Research and Development .....	25
Chapter 4 The Achievement of Goals and Contribution on Related Field .....	160
Chapter 5 The Application Plan of the Outcomes of Research and Development .....	169
Chapter 6 The international Scientific Informations Obtained during Research and Developmental Period .....	72
Chapter 7 Research Facility and Equipments .....	176
Chapter 8 References .....	<b>178</b>

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	12
제 1절 연구개발의 목적 .....	12
제 2절 연구개발의 필요성 .....	13
제 3절 연구개발 범위 .....	15
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	19
제 1절 국내 현황 .....	19
제 2절 국외 현황 .....	20
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	25
제 1절 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	25
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	160
제 1절 연도별 연구개발 목표 및 달성도 .....	160
제 2절 관련분야의 기술발전예의 기여도 .....	166
제 5 장 연구개발 성과 및 활용계획 .....	169
제 1절 연구개발 성과 .....	169
제 2절 성과 활용 계획 .....	170
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	172
제 7 장 연구시설·장비 현황 .....	176
제 1절 연구시설 현황 .....	176
제 8 장 참고문헌 .....	178



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

### [1세부: 식물 줄기 형성층 활성화 조절을 통한 바이오매스 증진기술 개발]

- 관다발 형성층 활성화 조절 유용 유전자 발굴
- 유용 유전자 기능 분석 및 바이오매스 증대 표현형 분석
- 유용 유전자의 형질전환체 제작 지원
- 관다발 형성층 및 체관 발달 조절 기작 규명

### [1협동: 바이오매스 증대를 위한 포플러 형질전환체 개발]

- 바이오매스를 증대시켜 바이오연료 원자재로 활용할 수 있는 형질전환 포플러 개발
- 식물의 물질대사 및 생장을 조절하는 유전자를 이용한 유채 및 포플러의 형질전환
- 형질전환체의 분자생물학적 특성 검정 및 농업형질 발현 (매스증가) 특성 조사
- 세대진전 및 목표형질 (바이오연료 원자재용) 고정 후보 라인 선발
- 포장 재배실험을 통한 후보 형질전환체의 생산성 조사 및 선발

### [2협동: Brachypodium 및 Miscanthus를 이용한 바이오매스 증진 식물 개발 연구]

- 바이오매스 증진 연구를 위한 대표적인 대상작물인 Miscanthus(억새)와 바이오에너지 grass 연구를 위한 모델작물인 Brachypodium(숲개밀)의 형질전환 시스템(벡터, promoter, 형질전환 기법 포함)을 구축
- 바이오매스가 증진된 억새 형질전환 식물 개발
- 바이오에너지 grass 연구의 기술적 난제의 하나인 knockout mutant 확보를 위하여 Artificial Zinc Finger Nuclease 기법을 정립

### [3협동: 억새 (*Miscanthus sinensis*) 형질전환 시스템 구축 및 광 이용성 증대 억새 품종 개발]

- 생명공학 기법을 이용한 억새의 형질전환 시스템 개발과 우수한 유용 유전자가 도입된 바이오매스 생산용 생명공학 억새 품종을 개발
- 효율적인 억새 조직배양 및 재분화 조건을 확립
- Agrobacterium을 이용한 억새 형질전환 기술 구축
- 유용 유전자가 도입된 억새 형질전환체 확보

### [4협동: 억새(Miscanthus)의 유전적 재배 생리생태적 특성평가 및 포장재배법 개발]

- 한국 및 동아시아 지역을 원산으로 바이오에너지 작물로 각광 받고 있는 억새 유전자원을 국내·외에서 수집
- 유전적 생리생태적 특성, 바이오매스 생산특성과 환경 스트레스 내성 평가 및 지역적응성 등을 평가
- 바이오매스 생산성이 우수한 억새유전자원을 확보
- 유용유전자가 도입된 억새 형질전환체의 바이오매스생산 관련 형질의 재배생리적 특성평가를 통하여 우량 형질전환체를 선발

- 최종 선발된 우량 역세의 대량 재배를 위한 기본적인 역세 표준 재배법(재식, 재배관리, 수확) 구축

## 제 2 절 연구 개발의 필요성

### 1. 지구 온난화와 화석연료의 문제

- 기후변화의 추이는 지난 140년간의 지구의 평균기온 상승 결과와 최근 10년간의 평균 온도 상승을 비교해 볼 때, 급격한 기온상승이 진행되고 있음
- 지구 온난화로 인한 환경 변화에 대한 IPCC 보고에 따르면 지구 평균온도는 지난 100년(1906~2005)간 평균 0.74 °C 상승하였고 해수면은 40년(1961~2003)간 평균 1.8M 상승
- 앞으로 폭염, 열대야, 집중호우 등 극한기후도 더욱 증가할 것으로 예측되고 있으며 그 예로 2011년 한해에만 세계 각 곳에서 다양한 이상기후가 발생되었음(그림 1)
- 지구 온난화의 원인은 급격한 도시화, 산업화에 따른 화석연료 사용과 산림의 무분별한 개발에 의한 온실가스의 발생에 의한 것(그림 2)
- 세계 각국은 기후변화협정을 통하여 지구 온난화의 주범인 이산화탄소의 방출량 감축을 명시
- 바이오연료에서 배출되는 이산화탄소는 화석연료에 비해 훨씬 적고 바이오연료 원료작물의 성장 과정에서 흡수, 고정되어 순 배출이 거의 없는 재생 가능한 청정에너지
- 선진국을 중심으로 바이오에너지에 대한 투자와 개발이 크게 늘어나고 있으며, 국내에서도 온실가스 감축 부담 대응을 위한 바이오연료 개발이 필요한 시점

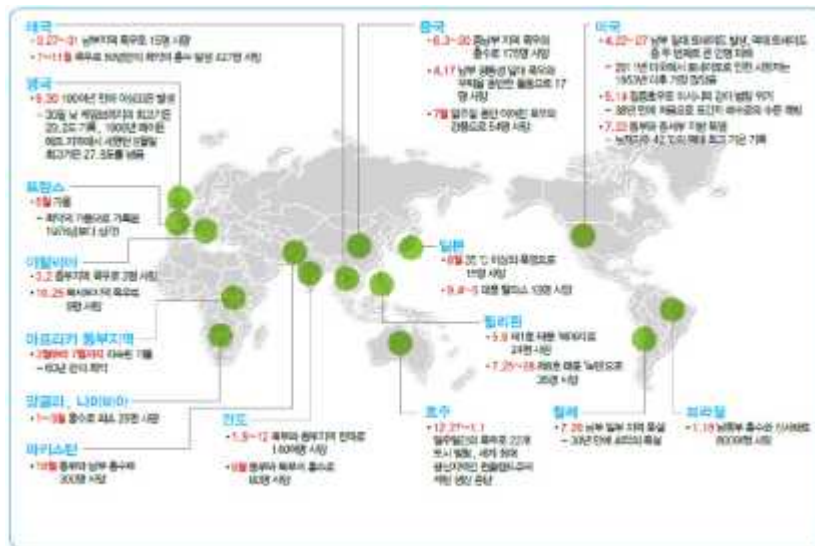


그림 1. 2011년 세계 기후변화 발생도(자료; 2011년 이상기후 보고서, 녹색성장위원회, 기상청).

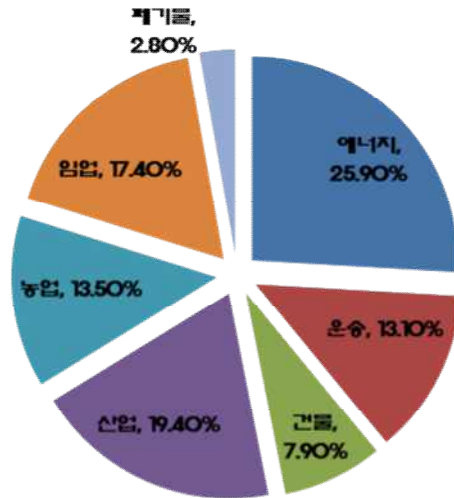


그림 2. 지구온난화의 주요원인인 온실가스 발생 원인별 비중. 산업화에 따른 화석연료의 사용 (운송, 산업, 에너지; 58.4%)이 가장 큰 원인.

## 2. 새로운 에너지원 개발 요구

- 화석연료는 지질학적, 경제적, 환경적으로 한정된 자원
- 최근 화석연료의 수급 불안으로 인하여 원유 가격이 급등과 급락을 반복하는 등 지속 가능하고 안정적인 국가 경제 발전 전략 수립에 큰 불안 요소가 되고 있음
- 또한, 우리나라는 경제성 있는 화석연료의 매장량이 전혀 없고, 해외에서의 화석 연료 개발 사업도 전 세계적인 에너지 부족에 의해 에너지 안보의 중요성이 부각되면서 점차 어려워지고 있음
- 바이오연료는 무한히 수급 가능한 에너지원으로, 바이오연료의 개발은 지구 온난화 등 환경 문제의 해결 뿐 아니라 유한한 화석 연료를 대체하여 안정적으로 에너지를 공급함으로써 에너지 자급을 이루는 데 필수적
- 특히 바이오에너지에서 배출되는 이산화탄소는 화석연료에 비해 훨씬 적고 바이오에너지 원료작물의 성장과정에서 흡수, 고정되어 순 배출이 거의 없는 재생 가능한 청정에너지라 할 수 있어, 현재 전 세계적으로 관심과 연구가 증폭
- 바이오에너지의 경제성은 저렴한 원료조달, 효율적인 생산기술, 보급 및 수급 조절체계, 기술개발을 위한 지원과 다양한 정책 등에 의해 결정될 수 있는데, 우리나라에서는 먼저 한국형 바이오에너지 작물을 개발, 확보하여 지속적이고 안정적인 바이오매스 원료를 공급할 수 있는 체계가 필요하다. 이에 바이오매스 증산을 위한 기술 개발 및 한국형 에너지 작물 개발이 필요하다.
- 기후변화협약에 따른 온실가스 감축 부담 대응 및 바이오연료 수요 급증에 따른 바이오매스의 지속적인 공급을 위한 대비책 마련이 필요

## 3. 기술 개발 필요성

- 역세의 원산지로 유전적 다양성이 높을 것으로 생각되고 있지만 유전자원의 수집은 이루어지지 않고 있음.

- 유전자원의 수집뿐만 아니라 수집한 유전자원들의 유전적 생리생태적 특성평가를 통하여 역대 유전자원들의 재배생리적 특징 등을 파악할 필요가 있음.
- 역사를 작물로서 이용한 적이 없기 때문에 역사 재배에 관한 기본적인 정보가 전무한 상태이므로 이에 대한 재배법(재식, 시비, 관리, 수확) 구축이 필요.
- 수집된 유전자원 중 우량한 역사 유전자원을 선발하여 더욱 우량한 역사 품종 개발을 위한 육종 프로그램 및 관련 연구가 필요.
- 역사(*Miscanthus* sp.)는 다년생 식물로서, 높은 셀룰로스 함량을 지니며, 유지관리가 쉽고 경작되지 않은 토양에서도 잘 자라는 등 바이오에너지 작물로서의 큰 장점을 가짐
- 특히 아시아에서 유래되어 국내 재배가 용이하며, C4 식물 탄소대사를 지녀 C3 식물에 비하여 매우 효율적인 광합성을 하기에 성장속도가 빠르고 이산화탄소를 효율적으로 capture 하여 유기물질로 전환시키는 능력을 갖고 있음.
- 특히 바이오에탄올 생산에서 역사가 옥수수나 Switchgrass에 비하여 매우 효율적이라는 것이 보고됨. (미국 정부는 가솔린의 20%를 바이오에탄올로 대체하겠다는 계획을 지니고 있는데, 만일 옥수수나 Switchgrass를 이용한다면 미국 국토의 약 25%에서 증식해야 하지만, 역사를 이용하는 경우 약 9.3%의 국토가 필요한 것으로 나타났으며, 이는 옥수수나 Switchgrass에 비하여 역사가 같은 증량에서 2.5배의 바이오에탄올을 생산할 수 있는 것에 기인한 것임.)
- 역사 품질 개량 연구는 아직 초기 단계라 할 수 있으며 선진국인 미국에서조차 시험생산 과정 중에 있음
- 우리나라 같은 후발국의 입장에서는 개발 가치가 매우 높으며, 전통적인 육종방법에 의한 역사의 우수 품종 개발뿐 아니라 생명공학기법을 이용한 우수 품종 개발을 위한 연구가 필요함.

### 제 3 절 연구개발 범위

#### [1세부: 식물 줄기 형성층 활성 조절을 통한 바이오매스 증진기술 개발]

- 10000 여개의 애기장대 FOX (Full length over expression) line screening을 통해 관다발 발달 변화 mutant 선별
- 해당 유전자 동정 및 기능 분석(TAIL-PCR)
- 발굴한 유용 유전자의 관다발 발달 관련 표현형 분석(ICA2 등)
- 발굴한 유용 유전자의 바이오매스 증대 관련 표현형 분석
- 바이오매스 증대 형질 유용성 검증(모델 작물)
- 포플러 microarray 분석을 통해 관다발 발달 관련 유전자 선별(PHD 등)
- VIGS를 이용하여 대상 유전자 선별(담배, 애기장대)
- 선별된 유전자의 기능 분석 및 관다발 발달 조절 메커니즘 규명: PHD의 경우 RNA binding motif를 가지고 있으며, 형성층에서 발현되어 체관 형성을 조절하는 것으로 확인됨.
- CK1I 등 관다발 형성층 활성 조절 유전자의 기능성 검증(포플러 형질전환체 제작): 1협동과 연계하여 포플러 CK1I 과발현체 제작 및 표현형 분석

## [1협동: 바이오매스 증대를 위한 포플러 형질전환체 개발]

### 가. 목표형질 및 형질전환체 개발

- 본 과제에서 사용한 목표 형질유전자는 유전자 발현을 조절하는 transcription factor, Myb와 조직의 부피생장과 관련된 CKI1이며, 형질전환 하고자 하는 식물체의 특성에 맞는 유전자를 사용함으로써 맞춤형 형질전환체를 개발하여 바이오매스를 증대시키고자 하였음
- 엽록소 노화 억제제는 대기 중의 이산화탄소 (CO<sub>2</sub>)를 고정을 증대시켜 기후변화 및 온도상승의 원인 물질을 제거하고, 물질대사를 증가에 의한 바이오매스를 증대시켜 바이오 원자재 원료로 사용할 수 있는 1석 2조의 효과를 기대할 수 있어 유채 형질전환에 이용
- 세포의 부피생장 증대와 관련된 형성층 (Cambium) 조직의 분화를 조절하는 CKI1 유전자를 포플러 형질전환에 이용
- CKI1 유전자의 기능은 세포의 비대생장을 촉진하여 생산성 향상, 속성재배, 메스증대 등의 효과가 모델식물체에서 확인 (그림 4)되어 포플러 형질전환에 사용
- 유채와 포플러의 형질전환은 Agrobacterium을 이용한 방법을 다소 변형하여 사용하였음

### 나. 형질전환체의 개발 및 검정

- 유채와 포플러의 형질전환체 개발은 형질전환체의 조기 선발을 위해 기 확보된 유전자 운반체 배양 및 형질전환체 유도를 위한 조건을 이용하는 한편 보다 효율적인 선발방법을 위한 배양방법의 변형을 동시에 진행하였음
- 형질전환체의 검정은 Shooting 단계에서 PCR 및 항생제 내성 검정을 통해 조기 선발하고 1차 선발된 후보를 기관분화를 유도하여 개체 순화하였음
- 기관 분화된 라인의 형질전환 여부를 확인하기 위해 2차적으로 도입 유전자의 발현 (RT-PCR)을 조사하였음

### 다. 형질전환체의 세대고정 및 목표형질의 고정

- 유채의 세대진전 및 형질고정은 이미 시스템이 확보된 (주)에프엔피의 LMO 실험 신고 (LML08-1056) 포장에서 실시하여 안정적이고 빠른 시간에 목표 형질전환체를 선발
- 포플러는 영양번식체이므로 도입형질의 검정과 안정적 발현이 확인되며, 증식을 통해 안정적인 라인을 대량으로 생산
- 각각의 형질이 도입된 후보 라인은 1, 2차년 도에 형질전환체 개발에 집중하여 각각 200라인 이상을 확보
- 후보라인의 목표형질발현 특성 (바이오매스 증가 및 속성성장)을 조사하여 각각의 형질전환체로부터 형질발현이 우수한 3~5개의 라인을 실험포장 재배를 실시하면서 생육 특성 조사
- 후보 형질전환체의 분자생물학적 특성으로 insertion site를 분석하였으며, 해부학적 특성을 조사하였음

### 라. 바이오 연료 원자재용 형질전환체 선발

- 목표 형질에 맞는 바이오 원자재용 형질전환체의 최종선발은 실험포장과 재배포장 (제 20032259호, 2008. 12)에서 생산성 및 목표형질의 발현 특성을 조사하여 최대의 목표형질 발현과 안정적인 유전형질을 갖는 라인을 선발
- 최종라인 선발은 도입된 형질에 따라 바이오매스 증대와 속성생장으로 생산성이 높은 포플

리 선발에 집중

### [2협동: *Brachypodium* 및 *Miscanthus*를 이용한 바이오매스 증진 식물 개발 연구]

- 바이오매스 증진 연구를 위한 대표적인 대상작물인 *Miscanthus*(억새)와 바이오에너지 grass 연구를 위한 모델작물인 *Brachypodium*(숲개밀)의 형질전환 시스템(벡터, promoter, 형질전환 기법 포함)을 구축하고, 나아가 바이오매스가 증진된 억새 형질전환 식물을 개발하고자 함.
- 바이오에너지 grass 연구의 기술적 난제의 하나인 knockout mutant 확보를 위하여 Artificial Zinc Finger Nuclease 기법을 정립하고, flowering time 유전자의 하나인 GIGANTEA 유전자의 knockout mutant를 확보함. 이 mutant는 개화의 지연으로 인하여 바이오매스가 크게 증진될 것으로 예상함.

### [3협동: 억새 (*Miscanthus sinensis*) 형질전환 시스템 구축 및 광 이용성 증대 억새 품종 개발]

- 억새 재분화 및 형질전환 조건 확립: 현재까지 확립되지 않은 억새 형질전환 조건을 확립하기 위하여, 억새 종자 등을 이용한 조직 배양을 통한 재분화 조건을 우선 확립한 후, *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 조건을 구축. 이후 조건 최적화를 통하여 억새 형질전환 효율을 증진시켜 다양한 유용 유전자를 도입할 수 있는 방법과 기술을 개발.
- 유용 유전자가 도입된 억새 형질전환체 확보: 바이오매스를 증대시킬 수 있는 유용 유전자를 발굴하여, 단자엽 모델식물인 *Brachypodium*에서 기능을 검증한 후, 개발된 억새 형질전환 기술을 이용하여 억새로의 형질전환을 수행. 이후 선발된 억새 형질전환체들은 분자생물학적 분석을 통하여 검증하고, 표현형 분석을 통하여 유용 유전자 도입에 따른 형질을 조사.
- 광 이용성이 증대된 생명공학 억새 개발: 보통의 식물은 태양광으로부터 바이오매스로의 전환 효율이 0.1% 정도인데 반하여, 억새는 평균 1%의 전환 효율을 지니기에 높은 바이오매스 생산성과 이산화탄소 이용률을 보이는 등, 억새가 옥수수나 Switchgrass에 비하여 2.5배 높은 바이오에탄올 생산하는 이유로 높은 태양 광 이용 효율이 보고된 만큼, 억새의 광 이용성을 극대화시키기 위한 식물 광수용체인 파이토크롬 유전자를 억새로 도입시켜 광 이용성이 증대된 바이오매스 생산용 생명공학 억새 품종을 개발.

### [4협동: 억새(*Miscanthus*)의 유전적 재배 생리생태적 특성평가 및 포장재배법 개발]

- 억새 유전자원 수집: 해외 및 국내 현지 직접방문을 통한 억새 유전자원 및 정보 수집(국내 각 지방의 억새 군락지 및 생산성이 높을 것으로 보이는 군락지의 억새들을 직접 수집함, 해외는 직접 방문하여 수집함)
- 수집된 유전자원 평가: 야외 포장에서 수집된 억새를 재식하여 바이오매스 생산관련 형질 특성평가 실험 수행(서울대 수원 실험농장내 억새 유전자원포를 구축하여 본 과제 이전에 수집 재식한 억새의 연차별 생육특성, 바이오매스 생산형질을 조사)
- 우량억새의 바이오매스 생산 특성 평가 및 lignocellulose 성분분석: 수량이 높은 억새의 줄기를 화학적 방법으로 분해하여 줄기 성분 분석 수행(각 중별로 선발된 우량억새의 줄기

를 연차별로(3년) 수확하여 화학적으로 분해하여 줄기의 구성성분을 분석(lignin, holocellulose))

- 유전자도입 형질전환 억새의 생육 및 바이오매스 생산특성 평가: 격리된 LMO 포장에 형질전환된 억새를 재식 후 생육특성 평가(바스타저항성과 파이토크롬B가 도입된 형질전환 억새를 격리된 포장에 Non-GM 억새와 함께 재식하여 생육특성을 조사하고 비교 및 증식)
- 억새재배기술 확립: 질소시비, 토양수분, 재식시기에 따른 억새 생육 특성 평가 및 pilot 포장 조성 및 관리(질소시비량, 토양수분, 재식시기에 따른 억새의 생육특성 평가 및 pilot 포장을 조성하여 억새의 군락동태를 평가 및 제초관리 평가)

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1절 국내 현황

#### 1. 기술현황

- 형질전환체 개발과 관련된 핵심기술에 대한 특허는 거대 다국적 종자회사가 독점하고 있으나, 세계적으로 평준화가 되어 있다고 판단되고 우리나라는 90년대 육종기술 위주에서 2000년대부터 형질전환체 출원건수가 증가하고 있어, 바이오에너지 원자재 시장의 규모가 확대됨에 따라 형질전환체 개발 및 특허와 연구개발이 더욱 증가 추세
- 본 과제 개발팀도 다양한 형질전환체 개발 경험과 노하우가 축적되어 연구 목표에 맞는 세대진전과 후대검정 및 고정 그리고 목표형질의 안정적인 발현으로 바이오매스 증대가 향상된 라인의 선발이 연구과제의 성공 여부를 결정할 것으로 판단 됨(특허 등록 10-0933320)
- 국내의 형질전환체 실용화를 위한 연구에서 목표유전자의 특허권 및 형질전환 관련 벡터의 특허에 대한 심도 있는 논의가 있었으며, 세계적으로도 지적 소유권에 대한 보호조치 등이 강화됨에 따라 바이오매스 증대를 위한 실용화를 위해서는 개발단계에서부터 특허권을 고려한 맞춤형 형질전환체 개발이 필요
- 목질계 바이오매스를 비롯한 생명공학 기술을 이용한 바이오 원자재의 확보와 이를 이용한 에너지 산업화과정에서 반드시 해결해야 할 과제가 위해성평가(risk assessment) 임
- 현재, 위해성평가와 관련된 분야에 대한 제도와 법률 및 실험매뉴얼에 대한 관계기관 및 연구자의 이해와 준비가 다양하게 진행되고 있으나 실제적인 활용 측면에서 선결되어야 할 과제가 많은 실정
- 생명공학 기술(형질전환체, LMO)의 산업화를 위한 위해성평가(인체 및 환경)는 많은 연구비용과 시간이 요구되기 때문에 관계기관 및 연구자의 이해와 준비가 필요함
  - 바이오매스기반 바이오에탄올용 역새의 연구가 농촌진흥청 국립식량과학원의 바이오에너지연구센터에서 추진되고 있으며 국내에서 수집한 물억새 가운데 바이오매스 생산성이 높은 물억새를 “거대역새 1호”로 품종 출원한 상태임.
  - 역새를 바이오매스용으로의 연구는 농림수산식품부의 농림기술개발사업의 “바이오매스 생산용 형질전환식물개발”과제의 일환으로 추진되는 바이오매스 생산용 형질전환체 역새 개발과제와 지식경제부의 산업원천기술개발과제인 “녹색성장을 위한 산업용 식물바이오매스 생산기술 개발”과제가 있음.
  - 지식경제부에서 지원하던 “녹색성장을 위한 산업용 식물바이오매스 생산기술개발”과제가 2011년 상반기에 조기 종료되었음.
  - 국내 바이오매스용 역새연구는 농림수산식품부의 농림기술개발사업의 “바이오매스 생산용 형질전환식물개발”과제의 일환으로 추진되는 바이오매스 생산용 형질전환체 역새 개발과제와 농촌진흥청 국립식량과학원의 바이오에너지연구센터에서 추진되고 있는 바이오매스기반 바이오에탄올용 역새연구가 유이함

#### 2. 시장현황

- 국내 바이오에너지 사용량은 2005년 기준 대체에너지 사용량의 3.7%를 차지하였으며, 2030년에는 약 20%까지 시장을 점유할 것으로 전망(2007년, 에너지연구센터)
- 바이오에너지의 요구도는 급격하게 증가되고 있으나 원자재의 공급이 수요를 따라가지 못하는 상황에서 바이오매스가 증대된 식물체 개발은 원자재의 안정적 공급에 따른 직접적인



- 경제효과와 농산업의 부가가치 창출 등 파급효과가 매우 클 것으로 분석됨
- 따라서 바이오매스를 증대시킬 수 있는 유전자를 이용한 식물체(유채, 포플러 등)의 개발은 단위기간 및 면적당 생산성을 높일 수 있기 때문에 주요 바이오 원자재로 공급원이 될 것임
  - 또한, 바이오매스가 증대된 식물의 재배는 일반 작물에 비해 CO<sub>2</sub>의 고정량을 현저히 높일 수 있기 때문에 온실가스 감축(CDM 사업 등)과 바이오원자재 공급원 확보 등 시너지 효과가 매우 큼
  - CO<sub>2</sub> 고정능이 우수한 식물체의 식재는 신규조림, 재조림, 식생 복구 그리고 산림경영 등의 목적으로 활용 등 파급효과가 매우 큰 것으로 기대
  - 국내 바이오에너지 사용 및 보급현황은 현재 BD2의 경유생산/보급하고 있으며, 2009년 약 28만 8000kl의 바이오디젤 사용(2006년 4만 9500ky)
  - 지식경제부의 2차 바이오디젤 중장기 보급계획에 따르면 2012년 바이오디젤 의무혼합제를 시행할 계획이었으나 부분적으로 시행되고 있음
  - 국내의 해외의존형 바이오디젤 원료수급의 72%를 수입산 팜유 및 콩기름에 의존하고 있는 실정이며 2011년 지식경제부 등록 기준 국내 바이오디젤 생산업체 수는 16개사 임
  - 바이오에너지 개발의 첫 단계인 원자재 개발의 일환으로 바이오매스 증대를 위한 작물의 개발은 대량의 원자재 공급뿐만 아니라 예상되는 원자재 가격 상승에 의한 바이오산업 안보 차원에도 매우 중요하며, 국내 지리적 특성상 우수 품종(목표 바이오매스 증대, 적응성 향상)의 확보를 통한 수익 창출 방안 마련이 필요
  - 국내 바이오에너지 사용량은 2005년 기준 대체에너지 사용량의 3.7%를 차지하였으며, 2030년에는 약 20%까지 시장을 점유할 것으로 전망 (2007년, 에너지연구센터)

## 제 2 절 국외 현황

### 1. 기술현황

- 국외 관련분야의 기술 집중현상은 최근 수년간 큰 변화없이 진행되고 있어 생명공학기술을 이용한 형질전환체 개발관련 특허는 거대종자회사가 독점
- 최근의 기술(논문 및 특허 포함)들은 형질전환 효율을 증가시키는 방법(단순화 및 고효율)들과 새로운 유전자를 발굴하여 이용하는 방법이 출원 및 게재되고 있음
- 미국은 형질전환 기술을 이용한 품종개량 분야에서 독보적인 위치를 차지하고 있으며, EU 및 일본 등 기타 국가에서 지리적 특성과 상화에 따라 형질전환 관련 기술이 부분적으로 개발되고 있음
- 형질전환체 개발 기술은 세계적으로 평준화가 되어 있다고 판단되고, 본 과제 개발팀도 다양한 형질전환체 개발 경험과 노하우가 축적되어 연구 목표에 맞는 세대진전과 후대검정 및 고정 그리고 목표형질의 안정적인 발현으로 바이오매스 증대가 향상된 라인의 선발이 연구 과제의 성공 여부를 결정할 것으로 판단됨 (특허 등록 10-0933320)
- 생명공학 기술을 이용한 형질전환체 개발관련 특허는 거대종자회사가 독점하고 있으며, 최근의 기술들은 효율을 증가시키는 방법들과 새로운 유전자를 발굴 이용하는 방법이 출원 또는 등록되고 있음
- 미국은 형질전환 기술을 이용한 품종개량 분야에서 독보적인 위치를 차지하고 있으며, 우리

나라는 90년대 육종기술 위주에서 2000년대부터 형질전환체 출원건수가 증가하고 있어, 바이오에너지 원자재 시장의 규모가 확대됨에 따라 형질전환체 개발 및 특허와 연구개발이 더욱 증가할 것으로 예상됨

- 미국은 DOE는 물론 BP(British Petroleum)에서 투자한 5억\$의 자금을 바탕으로 일리노이주 럽대학의 EBI (Energy Bioscience Institute), Mendel Biotech, Verenum사에 투자하여 역새품종개발, 형질전환체 개발, 재배생산, 바이오리파이너리 등에 관한 연구가 활발히 진행되고 있음.
- 영국은 Aberystwyth대의 IBERS (Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences)가 중심이 되어 역새품종개발이 추진되고 있으며, 대규모 재배생산 관련 연구는 Rothamsted Research Institute에서 진행되고 있음.
- 바이오매스가 증대된 유채의 재배는 일반 작물에 비해 CO<sub>2</sub>의 고정량을 현저히 높일 수 있기 때문에 온실가스 감축(DCM 사업 등)과 바이오원자재 공급원 확보 등 시너지 효과가 매우 큼
- CO<sub>2</sub> 고정능이 우수한 유채와 속성생장이 가능한 포플러의 식재는 신규조림, 재조림, 식생 복구 그리고 산림경영 등의 목적으로 활용 등 파급효과가 매우 큰 것으로 기대됨
- 바이오에너지의 요구도는 급격하게 증가되고 있으나 원자재의 공급이 수요를 따라가지 못하는 상황에서 바이오매스가 증대된 유채와 포플러 신품종 개발은 원자재의 안정적 공급에 따른 직접적인 경제효과와 농산업의 부가가치 창출 등 파급효과가 매우 클 것으로 분석됨
- Brachypodium의 genome 염기서열 분석이 완료되어 논문이 Nature (Vogel et al., 2010)에 in press중으로 full genomic sequence가 공개되면 벼와 Arabidopsis genome project 완료에 버금가는 파급효과를 줄 것으로 예상됨
- Genome project 완료와 더불어 일부 실험실에서 activation tagging 또는 T-DNA insertional mutagenesis가 시작되고 있기 때문에 향후 1-2년 사이에 다수의 유전자 돌연변이체가 확보될 것으로 예상됨
- 본 연구팀은 Brachypodium을 이용한 바이오에너지 관련 연구의 활성화를 도모하고, 국제협력연구 시스템 정립을 위하여 Brachypodium genome project의 리더인 미국 USDA의 John Vogel 박사를 초빙하여 연구발표 및 향후 공동연구 협의를 진행하고자 한다 (2010년 6월 14일-6월 18일 방문 예정).
- 역새 형질전환은 일부 국내외 연구진이 계속 수행하고 있으나 아직 성공 보고가 없음. Brachypodium의 경우 논문 발표가 증대되고 있는 추세로 여겨지며, 향후 에너지 작물 연구에 큰 기여를 할 것으로 추정됨.
- 2010년 Plant and Animal Genomics 학회 참석 결과 유전자 염기서열 분석 기술과 장비의 발전이 급속도로 진행되어, 역새처럼 아직 염기서열 분석이 안 된 작물은 Reference로 쓸 수 있는 EST library 구축, full length cDNA 합성 및 이들의 염기서열분석에 의한 contig 제작이 국제 역새 유전체 연구의 선두권을 확보할 수 있을 것으로 판단됨
- Reference로 쓸 수 있는 역새 또는 숲개밀의 염기서열 분석이 끝나고, 더 이상 염기서열 분석이 Bottle neck이 아니라고 가정할 때, 향후 역새 및 숲개밀의 유전자좌에 있는 allele이 다른 많은 유전자원(또는 돌연변이체)을 많이 확보하는 것이 유전체학(기능, 구조, 비교), 대사체학, 형질전환 연구 그리고 DNA marker(예, SNP marker) 개발에 필수적 요소가 될 것으로 사료됨

- 바이오매스기반 바이오에탄올용 단수수의 연구가 농촌진흥청 국립식량과학원의 바이오에너지연구센터에서 추진되고 있음
- 역사를 바이오매스용으로의 연구는 농림수산식품부의 농림기술개발사업의 “바이오매스 생산용 형질전환식물개발”과제의 일환으로 추진되는 바이오매스 생산용 형질전환체 역사 개발과제가 있음
- 최근 지식경제부의 산업원천기술개발과제인 “녹색성장을 위한 산업용 식물바이오매스 생산기술 개발”과제에서 해외 대규모 재배생산용 역사와 단수수의 품종개발, 대규모 재배생산 및 가공기술 개발에 대한 연구가 진행되고 있음
- 일본은 Hokkaido대에서 NEDO의 지원으로 역사품종개발 연구가 진행되고 있음
- 중국은 미국의 Mendel Biotech사가 직접 투자하여 중국 현지의 역사유전자원 수집 및 품종개발 연구가 진행되고 있음
- 역사 형질전환 연구의 경우, 시작하는 시점(2009년)에서는 국내 및 국외의 여러 연구그룹에서 형질전환기술 개발을 진행 중이었으나 역사 형질전환의 성공사례는 없었음. 국외의 경우, 유럽과 미국 연구진들이 연구를 진행하고 있었는데, 특히 미국 일리노이스 대학에서 미성숙 inflorescence 조직을 이용한 연구가 진행되고 있는 것으로 알려짐. 국내에서는 약 두 개의 연구그룹에서 성숙 종자 유래 embryogenic callus와 뿌리 조직을 이용한 연구가 본 연구진보다 앞서 진행되고 있었음. 이후 2011년도에 일본 홋카이도 대학의 Tamada 교수 연구진이 일본 내 Tanegashima Island에서 채집한 germplasm의 성숙 종자와 particle bombardment를 이용하여 역사 형질전환이 가능함을 보고함(Wang et al., 2011). 국내에서는 역사 형질전환 성공에 대한 사례보고는 없었으며, 최근 갈대(*Phragmites communis* Trinius)의 형질전환에 대한 보고가 있었음(Kim et al., 2013). 하지만 particle bombardment를 이용한 형질전환은 도입된 유전자 수가 다수인 경우가 많고, 세대가 진행되면서 도입된 유전자가 사라지는 등 안정성이 취약한 약점이 있었음. 이에 보다 안정적인 *Agrobacterium*을 이용한 역사 형질전환 방법 개발이 필요하였고, 본 과제 연구를 통하여 국내에서 채집한 germplasm의 성숙 종자와 *Agrobacterium*을 이용한 방법으로 구축한 역사 형질전환 시스템을 세계 최초로 보고할 수 있었음(Hwang et al., 2014). 따라서 향후 역사 형질전환 연구는 본 연구진이 개발한 방법을 이용하여 진행될 것으로 여겨짐.
- 유럽과 미국에서 바이오매스 생산용으로 역사의 연구가 매우 활발히 진행되고 있음.
- 유럽은 영국은 Aberystwyth대의 IBERS (Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences)가 중심이 되어 역사품종개발이 추진되고 있으며, 대규모 재배생산 관련 연구는 Rothamsted Research Institute에서 진행되고 있음.
- 미국은 DOE는 물론 BP(British Petroleum)에서 투자한 5억\$의 자금을 바탕으로 일리노이주립대학의 EBI (Energy Bioscience Institute), Mendel Biotech, Verenum사에 투자하여 역사품종개발, 형질전환체 개발, 재배생산, 바이오리파이너리 등에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며, genome sequencing을 조지아대학의 Prof. Andy Patterson팀이 추진 중에 있음.
- 일본은 Hokkaido대에서 NEDO의 지원으로 역사품종개발 연구가 진행되고 있음.
- 중국은 미국의 Mendel Biotech사가 직접 투자하여 중국 현지의 역사유전자원 수집 및 품종개발 연구가 진행되고 있으며 역사유전자원의 해외반출을 철저히 차단하고 있는 실정임.
- 대만에서는 역사의 분류 진화학적 연구를 집중적으로 진행하고 있음.

## 2. 시장현황

- 바이오에너지 원자재 시장의 변화는 여전히 국제 곡물가격과 기후 그리고 대량생산국의 변화에 의존적이며, 규모가 점점 확대됨에 따라 목표지향적인 형질전환체 개발 및 특허와 연구개발이 더욱 증가할 것으로 예상됨
- 해외 바이오시장은 미국과 브라질을 중심으로 각국에서 미래 산업으로 국가적 차원의 지원을 하고 있으며, 세계 바이오에탄올 생산량은 2000년 이후 연평균 약 20% 이상의 신장을 계속
- 미국은 전분질계 작물인 옥수수를 원료로 에탄올을 생산하여 휘발유 대체연료로 사용함으로써 원유의 수입 대체효과와 농산물 가격 안정이라는 일석이조의 효과를 기대함
- 2004년 기준으로 1,200만 톤의 바이오에탄올을 생산하여 BE10(에탄올 10% 혼합) 또는 BE85(에탄올 85% 혼합)의 형태로 사용함
- BE-10은 기존 차량에 직접 사용 가능하며 BE85는 다목적 연료용으로 생산된 차량(Flexible Fuel Vehicles, FFV)에서 사용 가능함
- 또한, 콩기름을 원료로 바이오디젤을 생산하는 기술도 개발하여 약 20만 톤의 바이오디젤을 생산하여 사용함
- 바이오연료는 2003년에 10M TOE가 소비되었고, 2007년에는 26M TOE로 2.6배가 증가되었고, 바이오디젤은 2003년 0.05M TOE에서 2007년 1.6M TOE로 5년간 연평균 100%를 기록함
- 최근에 바이오매스에너지 설비 용량이 증가하고 있으며 2006년에서 2010년까지 연간 성장률(CAGR : Compound Annual Growth Rate)이 3.1%로 나타남
- EU 연합은 독일의 독보적인 바이오 디젤 생산을 비롯하여 바이오디젤 생산에서 2020까지 수송연료 시장의 35% 점유를 목표로 하고 있음
- EU는 1세대 바이오연료의 수급 불안정성 문제를 극복하기 위해 목질계 바이오매스에 열화학적 전환기술을 적용하여 경유 대체연료로 전환하는 공정을 개발함
- 핵심기술은 바이오매스의 열분해 가스화, 합성가스의 정제, 합성가스의 F-T 디젤 합성기술이며, 2007년 17천kl의 F-T 디젤 생산 파일럿 공정을 개발하여 운영 중에 있음
- 프랑스의 경우 난방이나 연료 생산 바이오가스 에너지원은 프랑스 시장에서 크게 부진하다 재생 가능한 폐기물 중 18%만이 바이오가스 사용에 이용될 뿐이며 바이오가스를 이용한 에너지 생산은 한정되어 있음
- 프랑스 시장에서 실질적으로 가능한 바이오가스 에너지 생산량은 연간 3.5백만 TOE 정도임
- 목재를 이용한 바이오매스 생산 분야는 EU지역 중 선두로써 5백만 이상의 가정이 목재 난방장치 설비를 갖추고 있으며(프랑스 전체의 15%) 목재에너지는 프랑스 에너지 소비의 4% 정도를 차지함
- 영국의 고체 바이오에너지의 전력생산량은 총 전력생산의 0.7%(2006년 기준)이며, 발전량은 대체 연료 중 매년 가장 많은 양의 전기를 생산하고 있음
- 2008년에 바이오매스 원료로 생산되는 전기량은 약 9,300GWh로 전체의 43.1%를 차지하였으며 2000년에 생산된 전기량과 비교할 때 약 2.4배가 증가하였음
- 바이오매스 중 가장 많은 비중을 차지하는 LFG는 매년 꾸준히 증가하고 있으며 2008년에는 4,757GWh의 전기를 생산함
- 특히 바이오매스 중 식물 바이오매스(Plant Biomass)는 2001년 31GWh에서 2008년 568GWh

로 약 18배정도 증가함

- 덴마크에서 소비되는 신재생에너지의 70% 가량이 바이오매스이며 주로 짚, 목재, 재생 폐기물로부터 생산됨
- 덴마크의 바이오매스 분야에는 약 50여개의 업체들이 활동 중이며 이들 업체의 매출액은 총 35억DKK(약 4억 6천만 유로) 규모로 추정됨
- 일본의 경우 목질계 바이오매스 자원의 활용이 용이한 국가와는 달리 우리나라와 같이 바이오매스 자원이 산지에 위치하여 수집 등에 많은 비용이 소요
- 일본은 정부 주도의 기술 개발로 해외에너지 개발에 주력하여 2030년 수송연료의 20% 시장 점유를 목표로 하고 있음
- 일본은 다른 선진국과 마찬가지로(미국은 제외) 교토 협약에서 규정한 이산화탄소 의무 감축량을 달성하기 위해서는 바이오매스 자원의 활용이 필수적이라는 인식하에 바이오매스 자원의 효율적 활용을 위한 마스터플랜을 작성하였으며 2002년 12월 일본 내각에서 'Biomass Japan' 이라는 이름으로 정식 정책으로 채택함
- 위 정책의 목적은 바이오매스 활용을 통해 1) 교토협약에 의한 온실 가스 저감 목표 달성 2) 자원 재순환 사회 실현 3) 신산업 창출 4) 농림 수산업의 활성화 등임
- 도시에서 배출되는 건설 폐목재를 원료로 차량용 연료인 바이오에탄올을 생산하는 기술의 실증을 위해 파일럿 공정의 건설에 착수하여, 3개 민간업체 주도로 설치하였으며 용량은 1,300t/y 임
- 해외 바이오시장은 미국과 브라질을 중심으로 각국에서 미래 산업으로 국가적 차원의 지원을 하고 있으며, 세계 바이오에탄올 생산량은 2000년 이후 연평균 약 20% 이상의 신장을 계속하고 있으며, 브라질과 미국이 주도하고 있음
- EU 연합은 바이오디젤 생산에서 2020까지 수송연료 시장의 35% 점유를 목표로 하고 있으며, 일본의 경우 정부 주도의 기술 개발로 해외에너지 개발에 주력하여 2030년 수송연료의 20% 시장 점유를 목표로 하고 있음
- 따라서 바이오매스를 증대시킬 수 있는 유전자를 이용한 신품종 유채 및 포플러의 개발은 단위기간 및 면적당 생산성을 높일 수 있기 때문에 주요 바이오 원자재로 공급원이 될 것임.

# 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

## 제 1 절 연구개발 수행 내용 및 결과

[1세부: 식물 줄기 형성층 활성 조절을 통한 바이오매스 증진기술 개발]

### 1. 줄기 형성층 활성 증대 돌연변이 애기장대의 선발

약 12,000 여 개의 형질전환체(FOX hunting line)를 이용하여 줄기 내부 관다발 조직에서의 형태적 변이와 줄기 외부에서 나타나는 1차 및 2차 성장의 특징을 살펴보았다. 특히 바이오매스 증가와 직접적인 관련을 가지는 표현형인 xylem differentiation의 증가와 cambial zone의 세포수가 증가하거나 감소한 개체를 확보하였다 (그림 1).

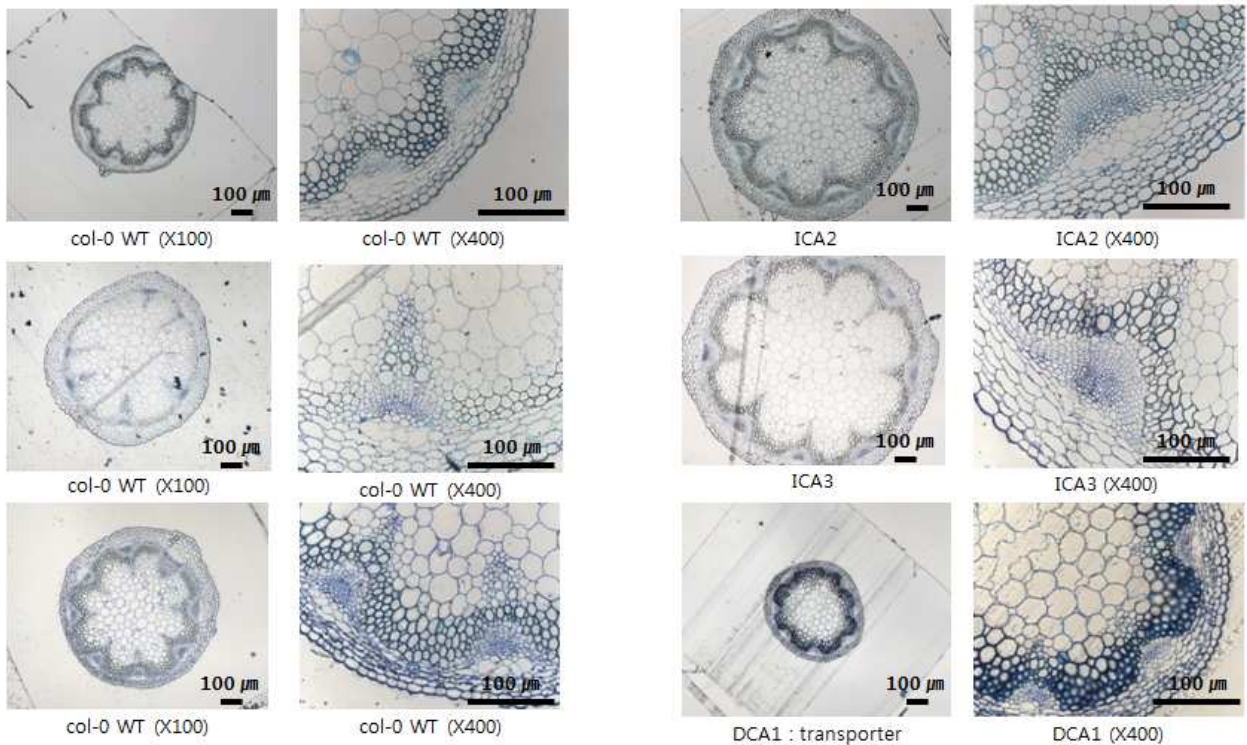


그림 3 줄기의 형성층 및 관다발의 표현형에 변화를 나타내는 돌연변이체들

각 줄기의 단면을 관찰한 결과 야생형에 비해 형성층의 활성이 증가되거나 xylem의 발달이 증대된 24개의 형질전환체(increased cambium activity : ICA)를 확보하였다. 별된 위 형질전환체들은 바이오매스 증대에 중요한 요소인 형성층의 세포수 증가와 더불어 줄기 단면의 두께 또한 증가하는 표현형을 보였다. 반면에 2개의 형질전환체는 형성층의 활성이 감소한 표현형(decreased cambium activity : DCA)이 관찰되었다. 이들 개체 역시 형성층 세포의 수나 층 뿐만 아니라 두께도 영향을 받은 것으로 보인다. 따라서 바이오매스에 직접적인 리그닌, 셀룰로오스 등의 양을 측정하고 줄기 단면에서 이들의 양을 눈으로 관찰할 수 있는 실험을 진행하여 선별된 돌연변이체에서 변화된 바이오매스의 양을 종합적으로 분석할 수 있을 것으로 기대한다.

현재 위와 같은 표현형을 가진 형질전환체들 중 17 개체에서 발현이 증대된 유전자를 동정하였고, 동정된 유전자들의 결함 돌연변이체 또는 과발현체를 확보하는 작업을 진행 중에 있다. 돌연변이체에서 위 FOX line과 반대되는 표현형을 보이고, 과발현체에서 유사한 표현형이

관찰된다면, 동정된 유전자가 위와 같은 표현형을 조절하는 중요한 기능을 수행하고 있다는 것을 증명할 수 있을 것으로 생각된다.

Increased number of Cambium cells	ICA1	glutathione S-transferase
	ICA2	transferase
	ICA3	Senescence related gene
	ICA4	Cytochrome related protein
	ICA5	Plasma membrane associated protein
	ICA6	Membrane lipoprotein
	ICA7	auxin-responsive gene
	ICA8	acetylglucosaminyltransferase
	ICA9	dynamin related protein
	ICA10	tubulin
	ICA11	ERF/AP2 transcription factor (DREB subfamily)
	ICA12	protein reductase
	ICA13~15	unknown protein (3)
ICA16~24	Not identified (9)	
Decreased number of Cambium cells	DCA1	peroxisomal transporter
	DCA2	unknown protein

표 1. 관다발 조직에서 표현형을 보인 개체에서 발현이 증대된 유전자 목록

## 2. *ica2* (increased cambium activity 2)

선별된 형질 전환 식물체 중에서 전형성층 (procambium)의 세포 수와 층 (layer) 수가 모두 가장 많이 증가하는 표현형을 보이며 형성층뿐만 아니라 물관부, 체관부 등의 모든 관다발 조직들이 야생형에 비하여 증가되어 있는 식물체를 *ica2* (Increased Cambial Activity2)로 명명하였다 (그림 2).



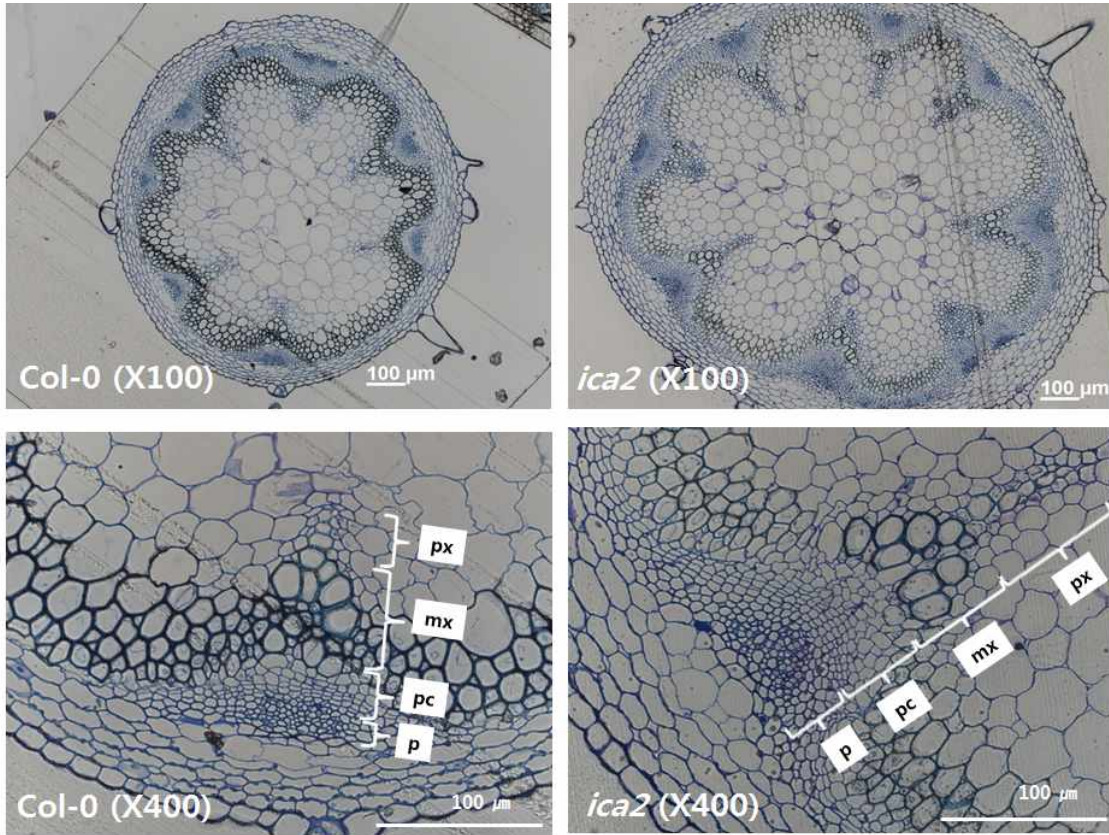


그림 2. 야생형과 *ica2*에서 줄기의 관다발 조직이 변화한 표현형  
(p : phloem, pc : procambium, mx : metaxylem, px : protoxylem)

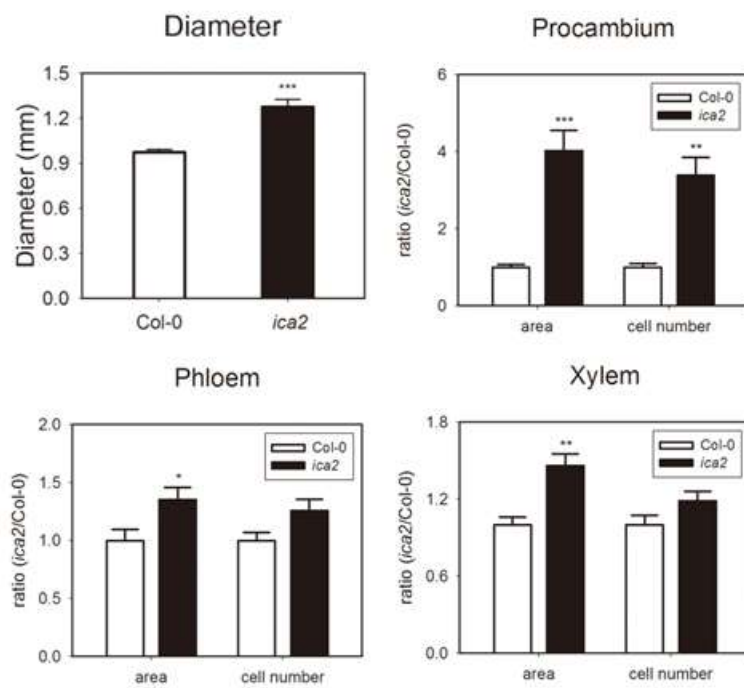


그림 3. 야생형과 *ica2* 형질 전환체에서 두께와 관다발 조직의 정량적 비교



이는 다른 조직으로 분화할 수 있는 분열조직의 특성을 지닌 형성층의 활성이 증가함으로써 보이는 결과로 유추해 볼 수 있을 것이다. 따라서 관다발 조직을 bundle 단위로 나누어서 야생형과 *ica2* 형질 전환체의 물관부, 체관부, 형성층이 차지하는 면적 및 세포 수를 정량적으로 비교했을 때 *ica2* 형질 전환체가 모든 조직에서 면적 및 세포 수가 증가되어 있음을 확인할 수 있었다 (그림 3). 또한 형성층의 경우 차지하는 면적과 세포 수가 다른 관다발 조직에 비해 특이적으로 더 많이 증가된 것으로 보아 *ica2* 형질 전환체가 형성층의 활성이 증가되어 있을 것이라는 가설을 뒷받침해주고 있다. 더불어 전체적인 줄기의 두께 역시 야생형과 비교하여 30% 이상 증가되어 있는 것으로 보아 바이오매스의 증가에 영향을 줄 것이라 예상해 볼 수 있다 (그림 3).

*ica2* 형질 전환체에서 보이는 표현형을 분자적으로 확인하기 위하여 이전의 보고된 발현 패턴을 분석하여 관다발 조직 특이적인 유전자 후보군을 선별하였고 야생형과 *ica2* 식물체 줄기의 각 절간별로 각각의 발현 양을 조사하였다. 그 결과 후보군인 *PXY*, *ATHB8*, *WOX4* (전형성층에 특이적 발현), *XCP2* (물관부에 특이적 발현), *SUC2* (체관부에 특이적 발현)의 발현이 모두 *ica2* 형질 전환체에서 야생형에 비해 증가되는 양상을 관찰할 수 있었다 (그림 4). 이러한 표현형과 발현패턴 분석을 종합해 보면 줄기에서 보이는 표현형이 *ICA2* 유전자에 의한 관다발 조절 유전자들의 발현조절에 의해서 나타난 현상임을 예상해 볼 수 있다.

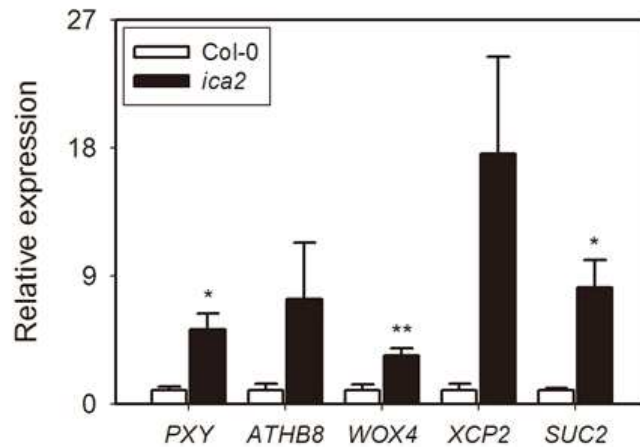


그림 4. *ica2* 형질전환체에서 관다발 조직 특이적 유전자의 발현 증가

*ica2* 형질 전환체는 2차 성장뿐만 아니라 바이오매스 축적이나 성장 속도와 관련하여 다양한 표현형을 보여준다. 애기장대의 줄기는 액색 분열조직을 형성할 수 있는 성장단계 줄기 (vegetative stem)와 씨를 포함하는 꼬투리 (silique)가 형성되는 생식단계 줄기 (vegetative stem)로 구분된다 (그림 5). *ica2* 형질 전환체와 야생형에서 줄기 성장을 비교, 관찰한 결과 *ica2* 형질 전환체의 성장단계 줄기가 야생형에 비해 2배 이상 길어져 있었다 (그림 5). 또한 각 절간별로의 길이는 유사하나 마디의 수에서 줄기의 발달 차이를 확인할 수 있었다. *ica2* 형질 전환체는 마디의 수가 야생형에 비하여 1.9배 증가되었다 (그림 5).

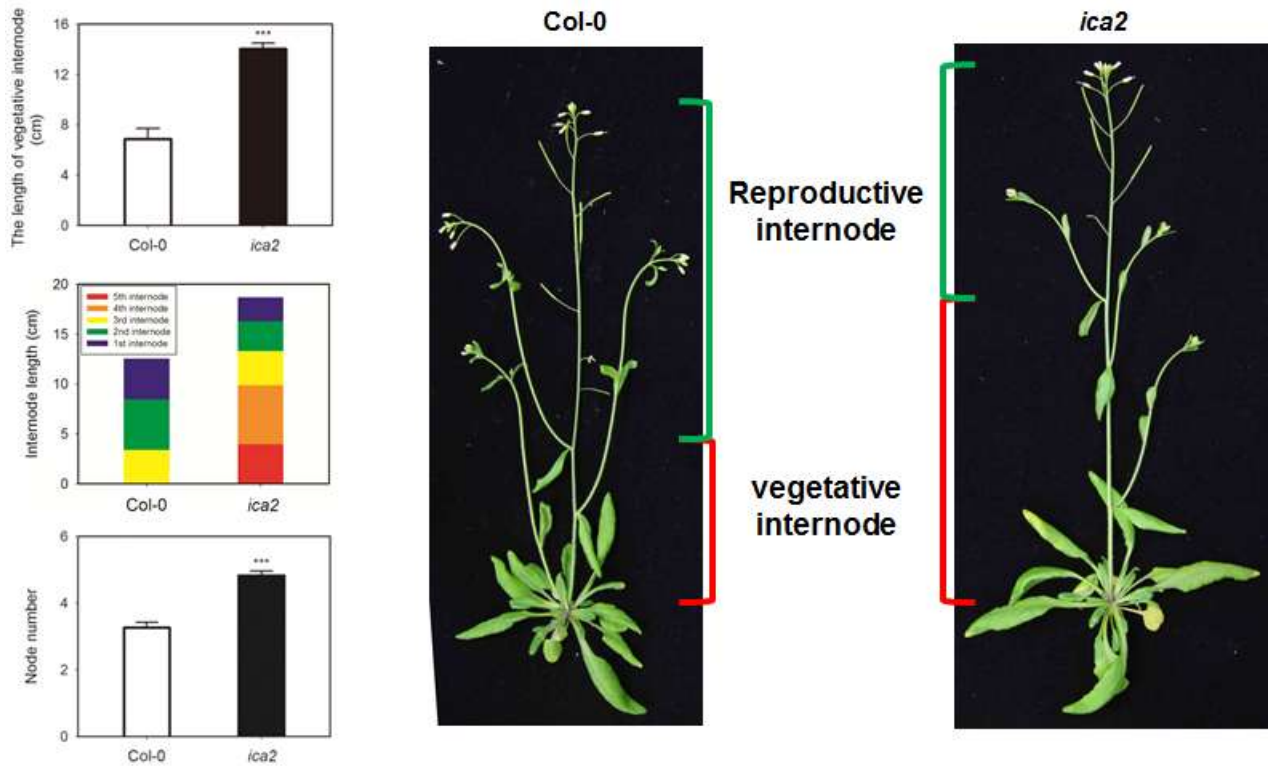


그림 5. *ica2* 형질 전환체에서 성장단계 줄기와 마디 수의 증가

줄기는 정단 분열조직에서 형성되어 점차 위로 성장하므로 성장단계 줄기는 생식단계 줄기보다 오랜 기간 2차 성장을 거치면서 더 많은 바이오매스를 축적할 수 있다. 또한 마디는 액생 분열조직이 형성되는 곳으로 그 수가 많을수록 더 많은 결눈을 가지고 있다. 따라서 길어진 성장단계 줄기와 늘어난 마디의 수는 *ica2* 형질 전환체가 야생형에 비해 한 식물체 당 더 많은 바이오매스를 축적하고 있음을 시사한다.

마디의 수는 개화와 밀접하게 관련되어 있어 개화가 늦어질수록 절간의 수가 늘어난다고 알려져 있다. *ica2* 형질 전환체는 장일 조건에서 야생형에 비해서 개화가 약 4일이 늦어지고 영양 성장 단계가 늘어난 결과로 잎이 4장 더 많아지는 것을 관찰하였다 (그림 6). 개화시기에 대한 표현형의 분자적인 이해를 위해 개화에 중요한 통합 인자로 알려진 *FT*의 발현을 개화 전의 성장단계 동안 확인한 결과 *ica2* 형질 전환체에서 야생형에 비해 지속적으로 낮은 농도로 유지되는 것을 관찰하였다 (그림 6).

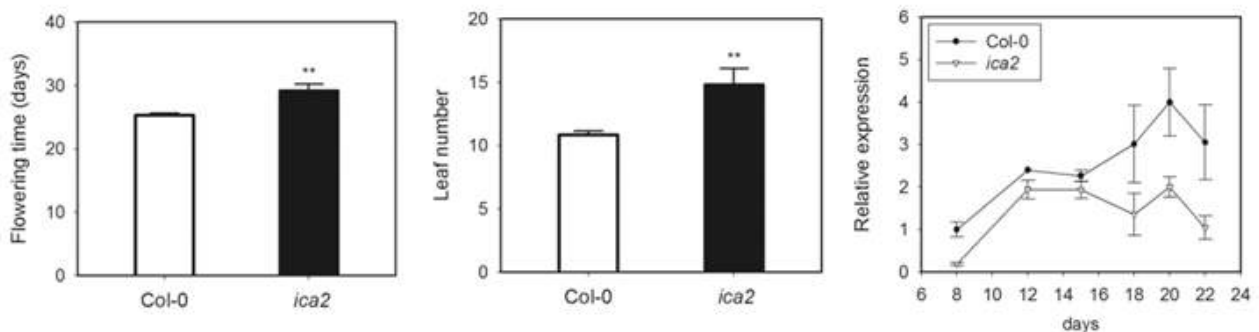


그림 6. *ica2* 형질 전환체에서 늦어진 개화시기와 낮아진 FT의 발현

그러나 24시간 주기로 줄기의 길이를 측정하여 하루 동안 줄기가 자라는 성장속도를 확인하였을 때 *ica2* 형질 전환체가 1.3배 이상 빠른 것으로 보아 (그림 7) 개화가 늦더라도 줄기의 빠른 성장으로 총 길이 성장에도 영향을 줄 것으로 예상되었다. 따라서 줄기의 총 길이를 관찰해보았을 때 예상과 같이 *ica2* 형질 전환체가 야생형에 비해 약간 증가되어 있음을 확인할 수 있었다 (그림 7). 줄기의 총 길이를 성장 단계에 따라 더 세분화하여 확인해 본 결과 총 줄기길이와 마찬가지로 증가된 패턴을 보였다 (그림 7).

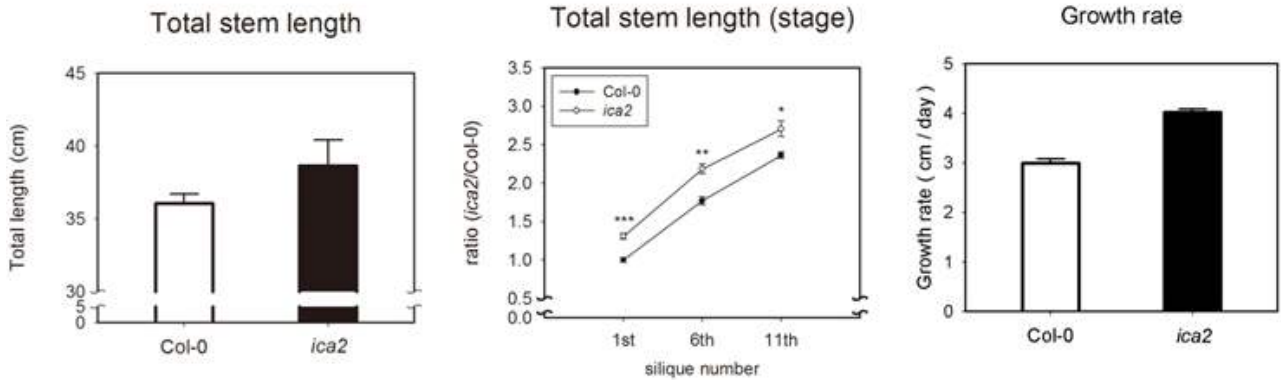


그림 7. *ica2* 형질 전환체에서 빨라진 성장속도 및 증가된 줄기 길이

줄기에 더 많은 바이오매스 축적 가능성을 직접적으로 확인하기 위하여 *ica2* 형질 전환체와 야생형의 줄기무게를 시기별로 나누어서 측정하였다. *ica2* 형질 전환체는 시기에 상관없이 야생형에 비해 더 많은 건조중량 (dry weight)을 나타내었다 (그림 8). 이러한 결과는 줄기의 초기 단계에서 보다 통계적으로 유의미한 차이를 보여주고 있었다 (그림 8). 따라서 이러한 *ica2* 형질 전환체 줄기에서 무게의 증가는 바이오매스 축적의 증가를 직접적으로 뒷받침해줄 수 있는 증거이다. 또한 그 차이가 길이 증가보다 큰 것으로 보아 증가된 바이오매스는 증가된 길이와 두께가 종합적으로 영향을 미쳤다고 예상해 볼 수 있다. 더 나아가 줄기를 더욱 세분화하여 각 부분의 무게 비율을 보았을 때도 마찬가지로 *ica2* 형질 전환체에서 성장단계 줄기의 무게비율이 증가되어 있었다 (그림 8). 또한 *ica2* 형질 전환체는 생식단계 줄기가 야생형에 비해 약간 줄어들기는 하나 결눈이 상대적으로 증가하여 (그림 8) 전체중량에서 각 조직이 차지하는 중량을 비율적으로 비교해봤을 때 줄기의 성장에 있어서 초기단계에서의 바이오매스 축적은 성장단계 줄기의 영향이 가장 큰 것으로 해석할 수 있다. 또 하나의 흥미로운 점은 *ica2* 형질 전환체에서 줄기 잎 (cauline leaves)의 무게 비율이 감소된 패턴을 보였다는 점이다 (그림 8). 이것은 야생형의 줄기 발달과는 다르게 *ica2* 형질 전환체에서 잎과 줄기의 발달 시기의 차이로 인해 줄기 잎보다 성장단계 줄기에 더 많은 바이오매스를 축적한 결과로 보인다. *ica2* 형질 전환체에서 증가된 결눈의 수에 비해 초기단계에서 바이오매스 축적에 있어서의 영향은 미비하나 이러한 현상 역시 발달의 차이로 성장이 끝난 후 각각의 무게를 측정하는 추가 실험을 진행하면 그 차이를 명확히 볼 수 있을 것으로 기대된다.

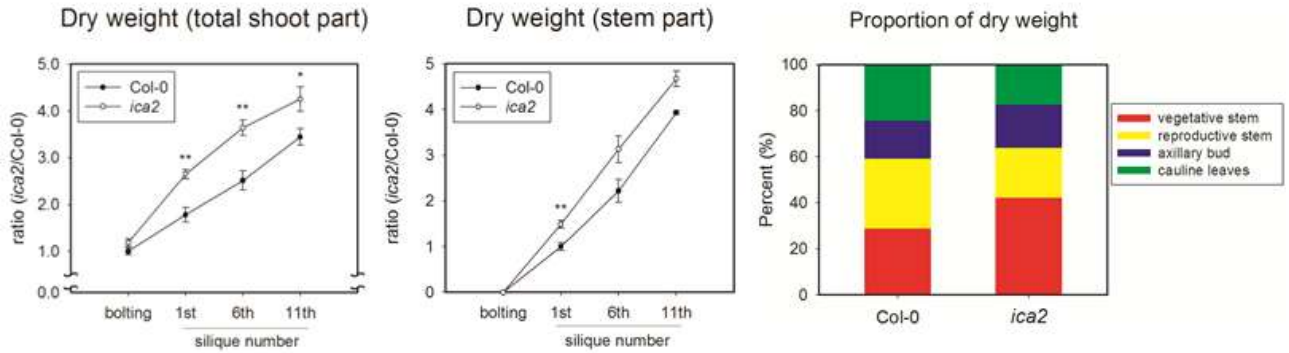


그림 8. *ica2* 형질 전환체에서 증가된 바이오매스 축적과 잎과 줄기의 무게 비율 변화

더욱이 줄기뿐만 아니라 개화시기에 잎을 관찰해 보면 *ica2* 형질 전환체에서 잎의 길이와 크기 모두 야생형에 비해 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다 (그림 9). 따라서 식물의 지상부 중량을 시기에 따라 좀 더 자세히 측정해본 결과 심은 지 14일까지의 초기 어린 시기에는 야생형과 *ica2* 형질 전환체 사이의 차이가 보이지 않으나 그 이후부터는 뚜렷한 차이를 보이며 *ica2* 형질 전환체에서 증가된 양상을 보여주었다 (그림 9). 이러한 증가 패턴은 개화 이후에도 생중량과 건조중량에서 모두 이전과 유사한 패턴이 나타나고 있었다. 잎은 *ica2* 형질 전환체에서 개화이후에도 빠르게 확장되면서 야생형과 뚜렷한 차이가 보이는 것을 확인할 수 있었다 (그림 9). 이러한 줄기, 잎 등의 식물 지상부에서 성장 관련 표현형을 종합해보면 *ica2* 형질 전환체는 줄기의 2차 성장인 측생 분열뿐만 아니라 1차 성장인 길이 성장이나 잎의 성장 등의 식물체 전반적인 성장속도에 관여함으로써 총체적으로 바이오매스의 양을 증가시키는 데에 기여를 할 것으로 생각된다.

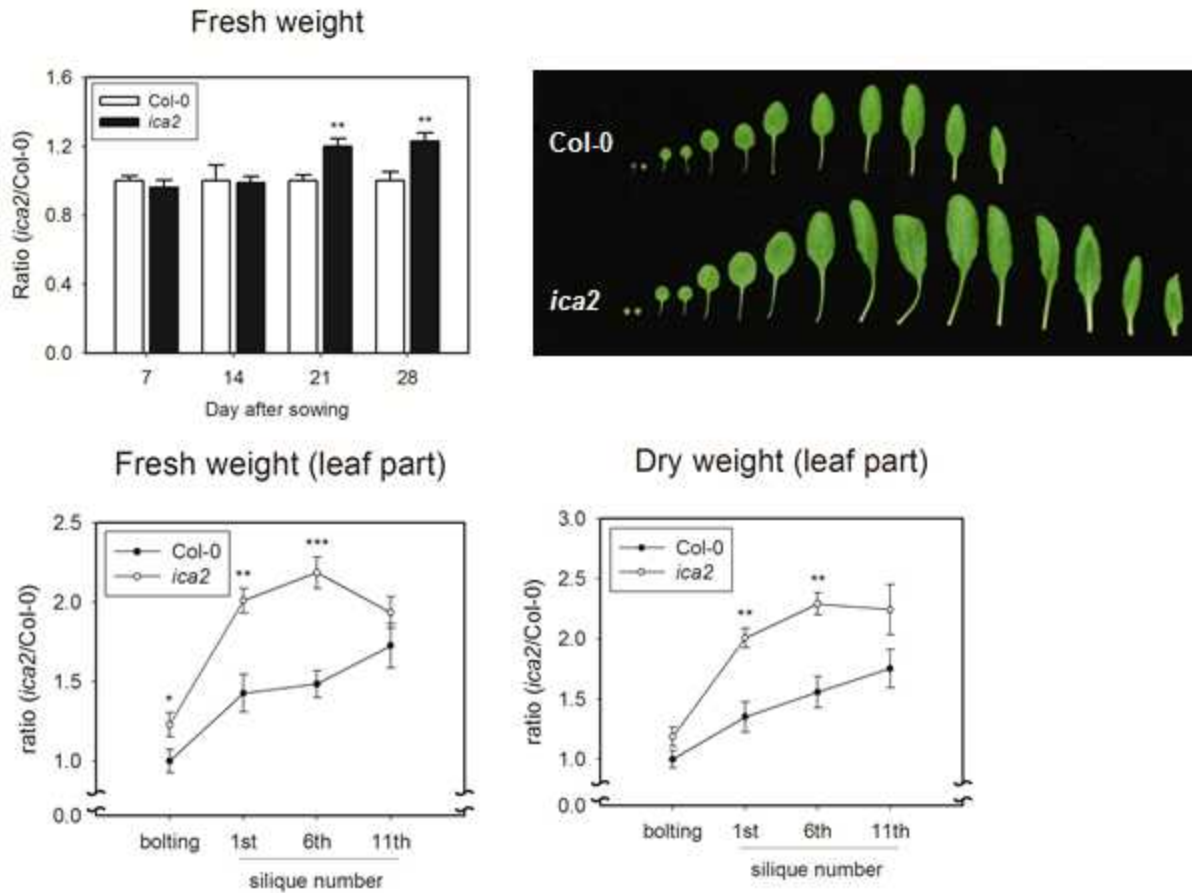


그림 9. *ica2* 형질 전환체에서 증가된 잎의 수와 크기로 인해 바이오매스 증가

식물의 성장 및 발달에는 다양한 호르몬이 관여한다고 알려져 있다. 따라서 *ica2* 형질 전환체에서 표현형 변화를 위해 영향을 미치는 호르몬을 알아보기 위하여 야생형과 *ica2* 형질 전환체의 지상부를 성장단계 줄기, 생식단계 줄기, 결눈, 줄기잎, 잎 등의 조직별로 나누어서 옥신 (auxin: IAA), 사이토키닌 (cytokinin: CK), 지베렐린 (gibberellin: GA), 앱시스산 (abscisic acid: ABA), 자스몬산 (jasmonic acid: JA), 살리실산 (salicylic acid: SA) 등의 호르몬의 농도를 비교 분석하였다. 다양한 호르몬 중에서도 유의미하게 변화되어 있는 CK에 주목하였다 (그림 11). CK는 식물체 내에서 곁사슬(side chain)의 변화를 통하여 N6-(2-isopentenyl)-adenine (iP), trans-zeatin (tZ), cis-zeatin (cZ), dihydrozeatin (DZ) 등의 다양한 종류로 합성되고 iP와 tZ이 많은 양이 존재하며 주요하게 역할하는 것으로 알려져 있다 (그림 10). 더불어 CK 생합성과정을 살펴보면 활성화된 형태는 핵염기만을 가지는 iP, tZ 등이고 5탄당이나 인산염을 가진 형태가 생합성 과정에 있어서 중간 산물이며 glycosylation을 통하여 비활성화된 형태로 저장하거나 분해할 수 있다 (그림 10). 야생형과 *ica2* 형질 전환체에서 CK의 농도를 종류별로 분석해 본 결과 *ica2* 형질 전환체에서 tZ type CK과 cZ type CK의 농도가 증가되어 있고 특정 조직에서 iP type CK이 감소되는 경향성을 확인할 수 있었다 (그림 11). 흥미로운 점은 같은 잎 조직이라도 줄기잎(cauline leaf)과 잎(rosette leaf)에서 tZ type CK 농도의 경향성이 반대로 보인다는 것이다 (그림 11). 따라서 줄기잎은 상대적으로 잎보다 다른 줄기 조직과 유사한 특성을 지니고 있음을 유추할 수 있다. 이러한 결과를 통하여 *ica2* 형질 전환체의 지상부 조직에서 tZ type CK 농도는 잎과 줄기잎을 포함하는 줄기부분으로 나누어서 서로 반대의 패턴을



보이고 있음을 알 수 있다. CK은 종류에 따라서 기능하는 조직이 다르다고 잘 알려져 있고 특히 tZ type CK은 지상부의 발달에 영향을 미치며 형성층 활성화에 관여하고 있다고 보고된 바 있다. 따라서 줄기의 표현형과 호르몬 농도 결과를 종합하여 볼 때 *ica2* 형질 전환체는 CK의 농도 증가가 형성층의 활성이 증대된 표현형을 보여주는 것으로 예상해 볼 수 있다.

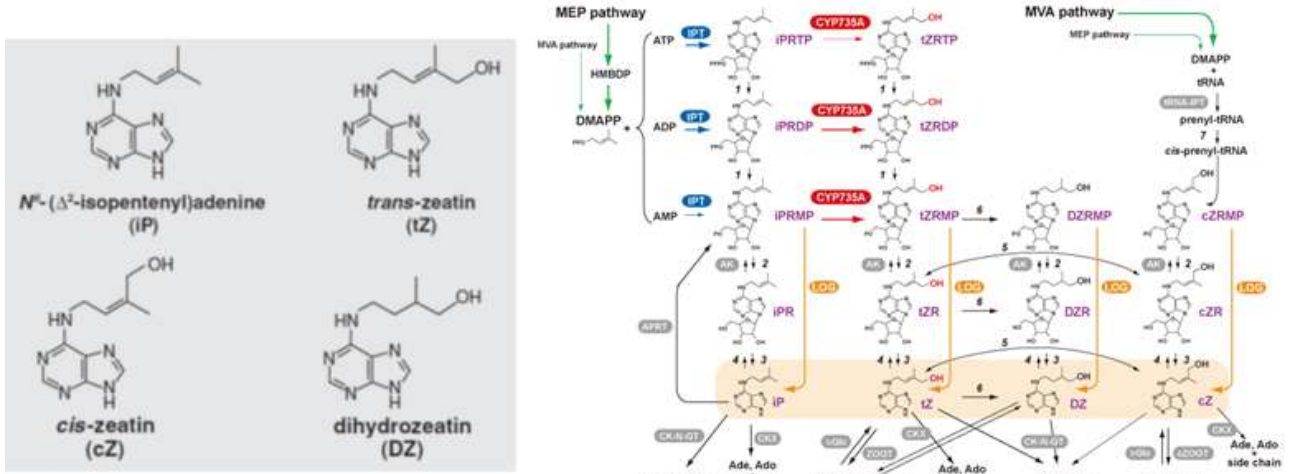


그림 10. 애기장대에서 isoprenoid cytokinin (CK)의 종류 및 생합성 과정 모식도

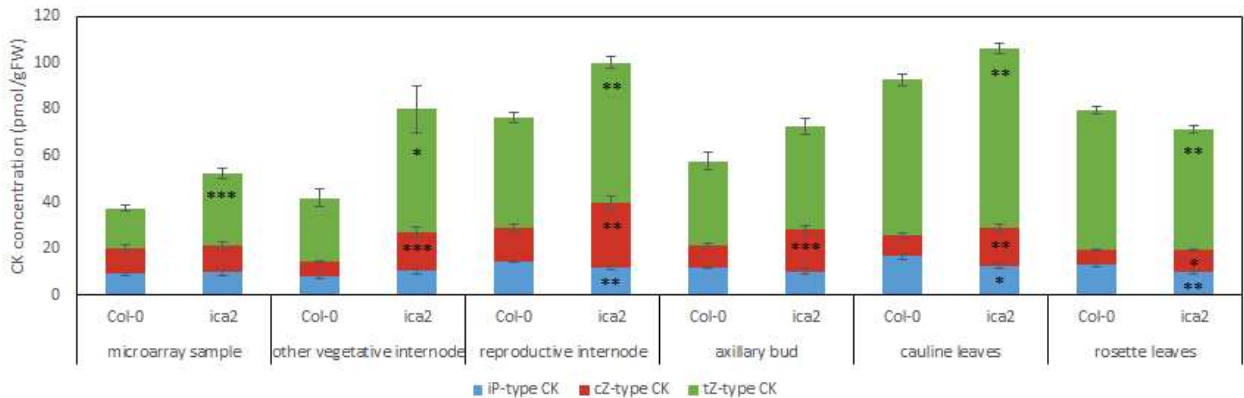


그림 11. *ica2* 형질전환체의 지상부 조직에서 변화되어 있는 CK 농도

*ica2* 형질 전환체에서 직, 간접적으로 영향을 받아 변화된 전사체의 발현 패턴을 총체적으로 확인 및 분석하기 위하여 마이크로어레이 (microarray) 실험을 진행하였다. 개화의 영향을 고려하여 심은 지 7일된 식물체 전체(seedling)와 줄기에 6번째 꼬투리가 발달되었을 때 성장단계 줄기의 가장 윗부분 1cm로 실험샘플을 나누어서 실시하였다. 전체 전사체 분석 결과 *ica2* 형질 전환체에서 CK에 의해 발현이 증가된다고 알려진 유전자군의 상당수가 발현이 증가하였다 (그림 12). 이러한 결과는 앞서 보여준 CK 농도와 일치하는 것으로 증가된 CK 양에 의해서 CK 반응이 더 많이 활성화되고 있음을 시사한다.

Gene_ID	TAIR_ID	Gene_alias	TAIR_desc	Foldchange		Overall p-value		t-test p-value	
				FC_VM	FC_SM	OVP_VM	OVP_SM	TP_VM	TP_SM
25604	AT5G38450	CYP735A1	CYP735A1	0.1330422	0.7646833	0.6555696	0.0618182	0.7165787	0.1565899
5977	AT1G67110	CYP735A2	CYP735A2	0.2425199	0.8956067	0.3001879	0.0464102	0.4729003	0.1448626
7531	AT2G01830	AHK4	WOODEN LEG (WOL)	-0.064669	0.1515275	0.7037737	0.1239717	0.6688651	0.0424349
16215	AT3G48100	ARR5	ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 5 (ARR5)	-0.090111	2.0170746	0.6463595	0.0020668	0.6768012	0.0310584
28287	AT5G62920	ARR6	RESPONSE REGULATOR 6 (ARR6)	-0.081281	1.7132369	0.6480904	0.0221845	0.6518625	0.1852632
1944	AT1G19050	ARR7	RESPONSE REGULATOR 7 (ARR7)	0.1200755	1.2153743	0.5187342	0.0287232	0.500165	0.1416007
5178	AT1G59940	ARR3	RESPONSE REGULATOR 3 (ARR3)	-0.070099	0.4675185	0.7292155	0.2509651	0.7230823	0.3934755
1011	AT1G10470	ARR4	RESPONSE REGULATOR 4 (ARR4)	-0.078107	-0.058946	0.5837229	0.9797165	0.5547768	0.8571288
6807	AT1G74890	ARR15	RESPONSE REGULATOR 15 (ARR15)	0.426628	-0.401946	0.0550852	0.4751612	0.1724677	0.6013447
11258	AT2G40670	ARR16	ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 16 (ARR16)	-0.484476	-0.368415	0.0237942	0.6164393	0.1018513	0.7413799
17178	AT3G57040	ARR9	RESPONSE REGULATOR 9 (ARR9)	0.2077983	0.5285134	0.1135715	0.1751191	0.1303209	0.3025504
11870	AT2G46310	CRF5	CYTOKININ RESPONSE FACTOR 5 (CRF5)	0.2435189	-0.924129	0.3181253	0.0739107	0.5014302	0.2120398
17666	AT3G61630	CRF6	CYTOKININ RESPONSE FACTOR 6 (CRF6)	0.1418307	-0.240558	0.0616239	0.802804	0.0260233	0.8349915
20444	AT4G23750	CRF2	CYTOKININ RESPONSE FACTOR 2 (CRF2)	0.2542007	-0.279637	0.1180671	0.3140224	0.1837895	0.2622453
20705	AT4G26150	CGA1	CYTOKININ-RESPONSIVE GATA FACTOR 1 (CGA1)	-0.022017	-0.704787	0.9182871	0.0777311	0.8354177	0.154864
20900	AT4G27950	CRF4	CYTOKININ RESPONSE FACTOR 4 (CRF4)	0.0924147	0.9347942	0.8819519	0.0498711	0.8937989	0.164569
27253	AT5G53290	CRF3	CYTOKININ RESPONSE FACTOR 3 (CRF3)	0.404191	-0.05192	0.0327699	0.9789429	0.0930227	0.8040055
1682	AT1G16530	ASL9	ASYMMETRIC LEAVES 2 LIKE 9 (ASL9)	-0.129991	3.5281103	0.24842	0.0004922	0.2523347	0.0315574
1012	AT1G10480	ZFP5	ZINC FINGER PROTEIN 5 (ZFP5)	-0.255742	-1.156559	0.1407068	0.1095177	0.2584426	0.3827366
9889	AT2G28160	ATBHLH029	FER-LIKE REGULATOR OF IRON UPTAKE (FRU)	-0.093738	0.793967	0.467693	0.007574	0.4527204	0.0159983
1346	AT1G13420	AT1G13420	SULFOTRANSFERASE 4B (ST4B)	-0.323	2.8787417	0.2800061	0.0040528	0.5834873	0.1105151
5977	AT1G67110	CYP735A2	CYP735A2	0.2425199	0.8956067	0.3001879	0.0464102	0.4729003	0.1448626
11051	AT2G38760	ANNAT3	ANNEXIN ARABIDOPSIS 3 (ANNAT3)	-0.554861	2.1630792	0.0045144	0.0061216	0.0241017	0.0929256
11210	AT2G40230	AT2G40230	transferase family protein	0.3919024	-0.36704	0.1207949	0.3655822	0.3221361	0.4223652
11330	AT2G41310	ARR8	RESPONSE REGULATOR 3 (ATRR3)	0.0233289	-0.083806	0.9916639	0.7769782	0.9022645	0.4210468
10136	AT2G30540	AT2G30540	glutaredoxin family protein	-0.619043	0.7351161	0.0420792	0.1788002	0.2445315	0.4099258
11050	AT2G38750	ANNAT4	ANNEXIN ARABIDOPSIS 4 (ANNAT4)	-0.316244	1.0690686	0.0418964	0.0523339	0.0916392	0.2044715
6199	AT1G69040	ACR4	ACT REPEAT 4 (ACR4)	-0.061647	0.5434141	0.7513475	0.1254348	0.7242434	0.2188406
6252	AT1G69530	AT-EXP1	ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A1 (ATEXPA1)	-0.447115	4.1922141	0.0946953	0.0006572	0.3227177	0.0605231
9293	AT2G22770	NAI1	NAI1	-0.297068	-0.095438	0.1768823	0.4885986	0.3743025	0.1356213
10025	AT2G29490	ATGSTU1	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 1 (ATGSTU1)	-0.047229	0.296173	0.7744646	0.111596	0.6996655	0.0905211
296	AT1G03850	AT1G03850	glutaredoxin family protein	-0.448882	1.9910686	0.0209342	0.009884	0.0783673	0.1204565
17804	AT3G62930	AT3G62930	glutaredoxin family protein	-0.136031	0.6405338	0.5378212	0.1651426	0.6542639	0.3397669
19011	AT4G11190	AT4G11190	disease resistance-responsive family protein / dirigent family pro	-0.433903	0.3186856	0.0676569	0.189214	0.2330084	0.2004793
337	AT1G04240	IAA3	SHORT HYPOCOTYL 2 (SHY2)	0.1345197	0.0638038	0.7023616	0.8477285	0.7756593	0.7452365
19013	AT4G11210	AT4G11210	disease resistance-responsive family protein / dirigent family pro	-0.93879	1.2874472	0.0334345	0.0791504	0.3414101	0.3526313
26998	AT5G50915	AT5G50915	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	0.7633291	2.8731897	0.0199433	0.0134451	0.1710129	0.2562904
1579	AT1G15550	ATGA3OX1	GIBBERELLIN 3-OXIDASE 1 (GA3OX1)	0.4023992	-0.402112	0.0607629	0.6179522	0.1743235	0.7682534
9176	AT2G21650	ATRL2	MATERNAL EFFECT EMBRYO ARREST 3 (MEE3)	0.795733	-0.243158	0.1140001	0.6241666	0.5879566	0.6108382
22095	AT4G39070	AT4G39070	zinc finger (B-box type) family protein	-0.174855	-0.207172	0.2635073	0.6982703	0.3552283	0.6530816

그림 12. CK에 의해 발현이 유도되는 유전자군 중 상당수가 *ica2* 형질 전환체에서 발현 증가

앞서 기술한 바와 같이 *ica2* 형질 전환체는 특정 cDNA의 발현이 증가되어 있는 과발현체이므로 과발현된 유전자를 분리 및 동정하는 실험을 수행하였다. 그 결과 *ica2* 형질전환체는 putative methyltransferase를 합성하는 at5g40830 유전자가 과발현되어 있음을 확인하였고, 해당 유전자를 *ICA2*라고 명명하였다. 또한 *ICA2* (at5g40830) 유전자는 애기장대의 계놈상의 intergenic region에 삽입되었음을 확인하여 유전자 사이에 끼어들어가 삽입 위치에 존재하는 다른 유전자의 불활성화에 의해 표현형이 생길 가능성을 배제할 수 있게 되었다. 더불어 삽입된 위치의 근처 유전자 발현을 확인함으로써 *ICA2* 유전자의 삽입이 주변 유전자의 발현에 미치는 영향에 대해서 알아볼 수 있을 것으로 기대한다. *ICA2* 유전자의 발달시기별, 조직별 발현 패턴을 pICA2-GUS 식물체를 이용하여 분석한 결과 떡잎, 성숙한 잎, 뿌리, 줄기 등 다양한 조직의 관다발 조직에서 발현을 확인하였다 (그림 13). 따라서 앞서 선별한 조직 관다발 조직 특이적 유전자의 promoter를 이용하여 *ICA2* 유전자를 발현시킨 형질 전환체를 제작하여 표현형을 관찰함으로써 한, *ICA2*가 기능하는 위치를 알아보고자 한다.

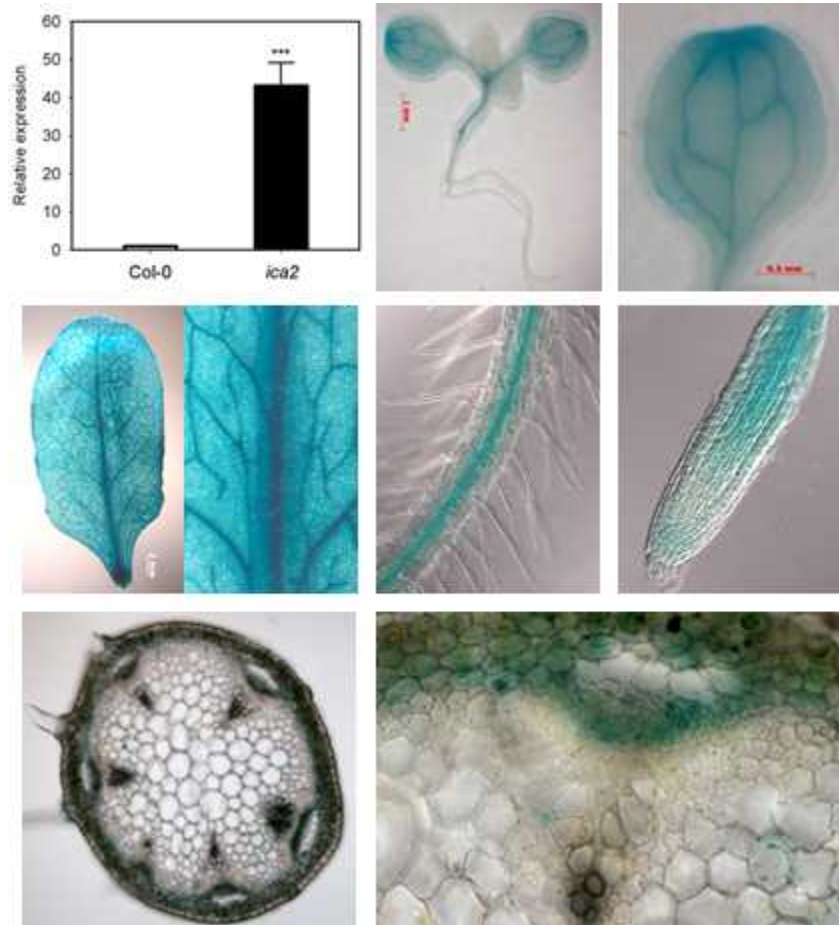


그림 13. *ica2* 형질 전환체에서 발현이 증가된 *ICA2* 유전자 (AT5G40830) 동정 및 *ICA2* 전사체의 관다발 조직 특이적 발현

*ICA2*가 FOX line 에서 선별한 표현형을 유도함을 재차 확인하기 위해서, *ICA2* 유전자 exon에 T-DNA가 삽입된 돌연변이체를 찾아서 표현형을 확인하였다. 통상적으로 T-DNA가 exon에 삽입될 경우 삽입된 유전자의 발현이 없는 돌연변이체(knock-out mutant)를 얻게 되나 *ica2* 돌연변이체는 exon의 C terminal 끝부분에 T-DNA가 삽입되어 truncated form의 mRNA 및 단백질이 일부 합성되는 것으로 확인되었다 (그림 14). 이와 같이 발현이 줄어든 돌연변이체를 이용하여 줄기의 성장에 관련한 표현형을 확인해본 결과 *ica2* 형질전환체와는 반대로 특정시기에서 줄기의 길이, 줄기 두께, 마디의 수, 성장단계 줄기의 길이 등이 감소하는 표현형을 보였고 하루 정도 빠른 개화시기를 관찰할 수 있었다 (그림 14). 더불어 *ICA2*의 과발현체와 RNAi 형질전환체 제작을 추가로 진행하고 있고 앞서 확인한 *ica2* 형질전환체 및 돌연변이체와 성장에 관련한 표현형에 있어서 유사한 결과를 얻는다면 관찰된 표현형이 동정한 *ICA2* 유전자에 의한 것임을 다시한번 검증할 수 있을 것으로 기대한다.



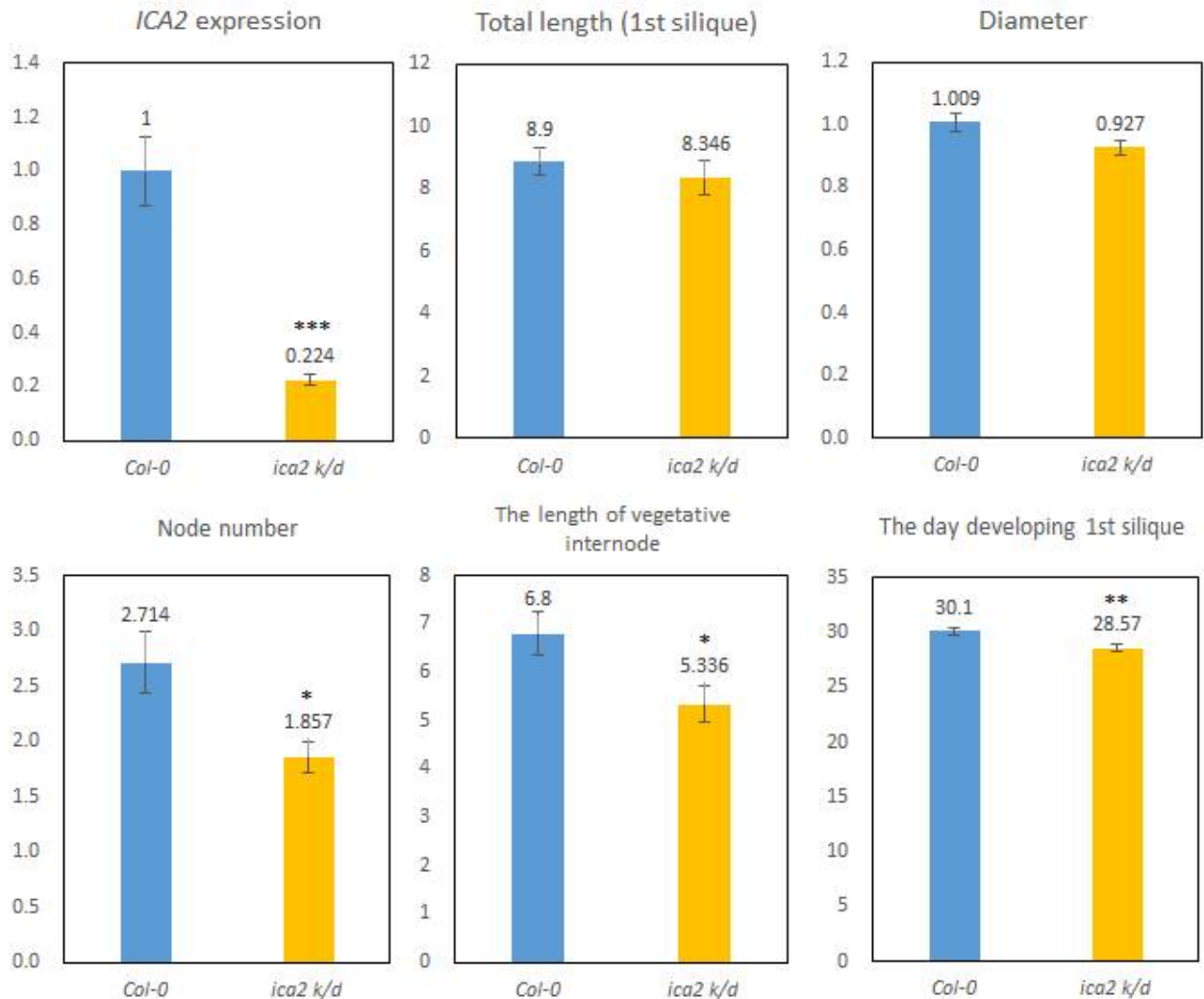


그림 14. *ica2* 돌연변이체에서 감소한 *ICA2*의 발현과 *ica2* 형질전환체와 반대되는 표현형 확인

*ICA2*가 형성층의 활성 및 성장에 관한 표현형을 조절하는 기작을 알아보기 위하여 *ICA2* 단백질의 특성을 조사하였다. *ICA2* 단백질은 하나의 transmembrane domain과 methyltransferase 활성을 가질 것으로 추정되는 domain을 가지고 있었다 (그림 15). 같은 domain을 가진 *QUA3* 단백질이 세포내에서 골지(golgi)에 발현하며 펙틴(pectin)을 기질로 사용하여 methylation 한다는 최근의 보고를 바탕으로 하여 *ICA2* 단백질의 세포내 발현 위치 및 pectin methyltransferase로서의 기능 여부를 확인하고자 한다. 또한 methylated pectin은 demethylation되면서 메탄올을 형성하고 반응의 부산물로 생각되었던 메탄올은 기공을 통해 배출되어서 휘발성 물질로 작용하여 식물의 지상부에 메탄올을 처리할 경우 농도에 비례하여 CK 양이 증가되며 애기장대를 포함한 다양한 종에서 바이오매스가 증가된다고 보고된 바 있다. 이러한 기존의 보고를 종합해 볼 때 *ICA2*가 많은 양의 methylated pectin을 형성함으로써 더 많은 메탄올 형성에 기여하여 식물체 내의 CK의 양을 증가시킬 수 있다는 가설을 세울 수 있었다. 이러한 가설을 검증하기 위하여 메탄올을 처리 시에 CK 신호전달에 관여하는 전사인자들(*Arabidopsis thaliana Responses Regulators: ARRs*)의 발현 변화 및 바이오매스 증가뿐만 아니라 줄기의 2차 성장의 지표인 두께에도 영향을 미치는지를 확인해 볼 예정이다.

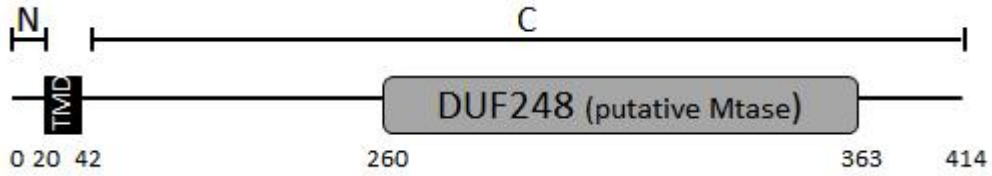


그림 15. ICA2 단백질의 구조

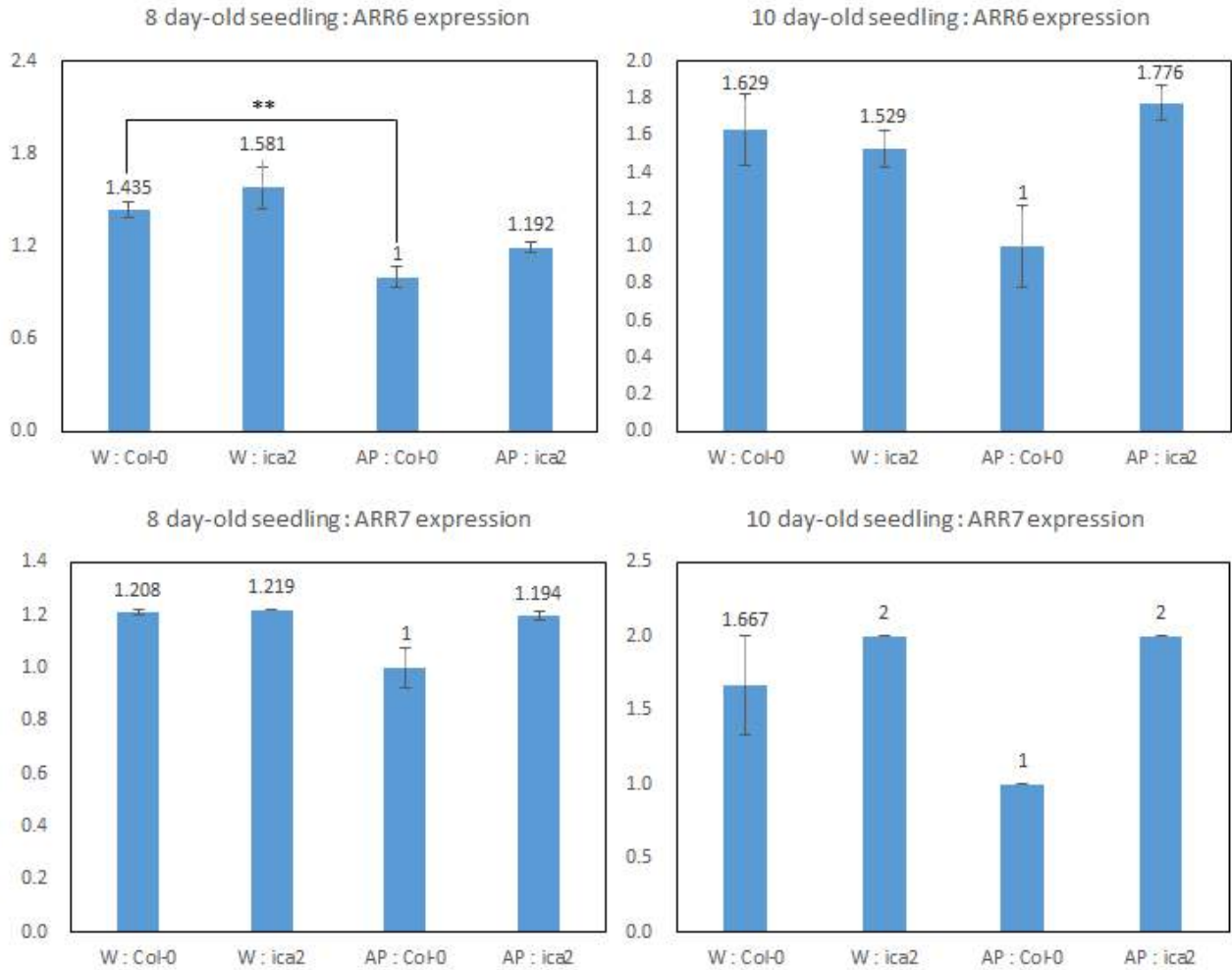


그림 16. *ica2* 형질전환체와 함께 키운 야생형에서 *ARR6*, *7*의 증가된 발현 패턴 확인

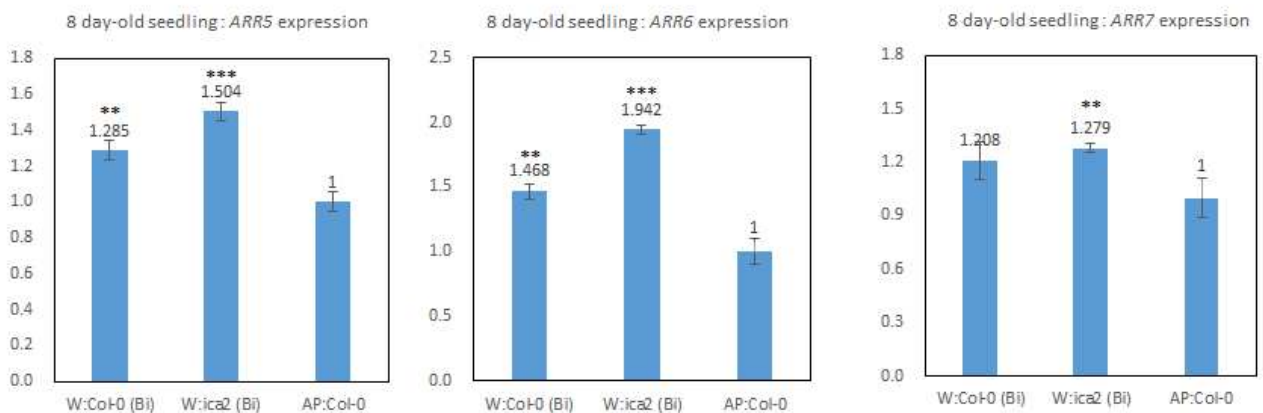


그림 17. 뿌리의 접촉이 차단된 상태에서 *ica2* 형질전환체와 함께 키운 야생형의 *ARR5*, *6*, *7* 발현패턴

메탄올은 휘발성물질로 하나의 식물체 안에서 다른 조직으로의 빠른 신호전달을 위해 사용되는 것뿐만 아니라 주변의 식물체에도 영향을 미칠 수 있어 식물체간의 상호작용에 주요한 역할을 할 것으로 알려지고 있다. 따라서 *ica2* 형질전환체도 더 많이 생성된 메탄올이 스스로 뿐만 아니라 주변의 야생형에도 영향을 미칠 수 있을 것이라는 예상을 확인하기 위하여 *ica2* 형질전환체와 야생형을 따로 심은 대조군과 함께 심은 실험군에서 ARR의 발현 변화를 확인하였다. CK에 의해 발현이 유도된다고 알려진 A-type ARR 중에 *ARR6*과 *ARR7*은 따로 심은 *ica2* 형질전환체(AP:*ica2*)에서 야생형(AP:Col-0)에 비해 발현이 증가됨으로써 microarray와 동일한 실험결과를 확인하였다 (그림 16). 야생형과 함께 키운 *ica2* 형질전환체(W:*ica2*)는 *ARR6*, *7*이 따로 키운 샘플(AP:*ica2*)과 유사한 발현 정도를 보였으나 야생형의 경우 함께 키웠을 때(W:Col-0) 발현 정도가 *ica2* 형질전환체만큼 증가하는 것을 보았다 (그림 16). 휘발성 신호물질은 기공을 통하여 공기중으로 내뿜는 기작 뿐만 아니라 뿌리를 통하여 주기도 한다. 따라서 주변의 식물체에 영향을 뿌리 사이의 상호작용에 의한 결과를 배제하기 위하여 함께 키우지만 뿌리의 접촉이 차단된 상태에서 야생형(W:Col-0(Bi))과 *ica2* 형질전환체(W:*ica2*(Bi))를 키운 뒤 *ARR5*, *ARR6*, *ARR7*의 발현을 확인한 결과 이전 실험결과와 유사하게 증가하는 패턴을 보이는 것으로 보아 이러한 현상은 기공을 통하여 휘발성 물질이 전달됨으로써 나타나는 현상이라고 짐작할 수 있다. 앞서 언급한 세포내 발현 위치, pectin을 기질로 한 methyltransferase 활성 여부, 메탄올 처리시 표현형 및 발현 변화에 대해서 예상되는 결과를 확인할 경우 *ICA2*가 식물체내에서 수행하는 역할 및 작용 기작을 밝힐 수 있을 뿐만 아니라 실제로 상용화했을 때 그 산업적 가치가 클 것으로 예상된다.

### 3. 포플러 microarray 분석 데이터를 이용한 담배에서 관다발 형성 관련 유전자 발굴

체관부 발달과 관련된 유전자 수준의 연구가 매우 미비하므로, PHD 유전자 VIGS 시 일어나는 체관부 발달 변화에 주목하여 깊이 연구를 수행하고자 하였다. PHD 를 VIGS 하였을 때 줄기의 하층부에서 과량의 체관부 세포들이 발달하였는데, 이러한 현상은 줄기의 중간, 상층부에서도 고르게 나타나는 것을 알 수 있었다. 또한, 식물체의 잎자루, 잎맥 등에서도 체관부의 발달이 두드러지게 나타나는 것을 확인하였다 (그림1). 이러한 점으로 미루어 PHD 가 관다발 발달 초기부터 체관부의 발달을 조절하고 있는 것을 알 수 있었다. 체관부의 발달이 형성층에서 조절되는 데, PHD VIGS한 식물체에서 형성층의 활성이 더욱 증가되어 있는 것을 알 수 있었다. 따라서, PHD 가 형성층에서의 체관부 분화 기작을 조절하여 관다발 발달시 체관부의 발달을 저해시키는 것을 알 수 있었다.

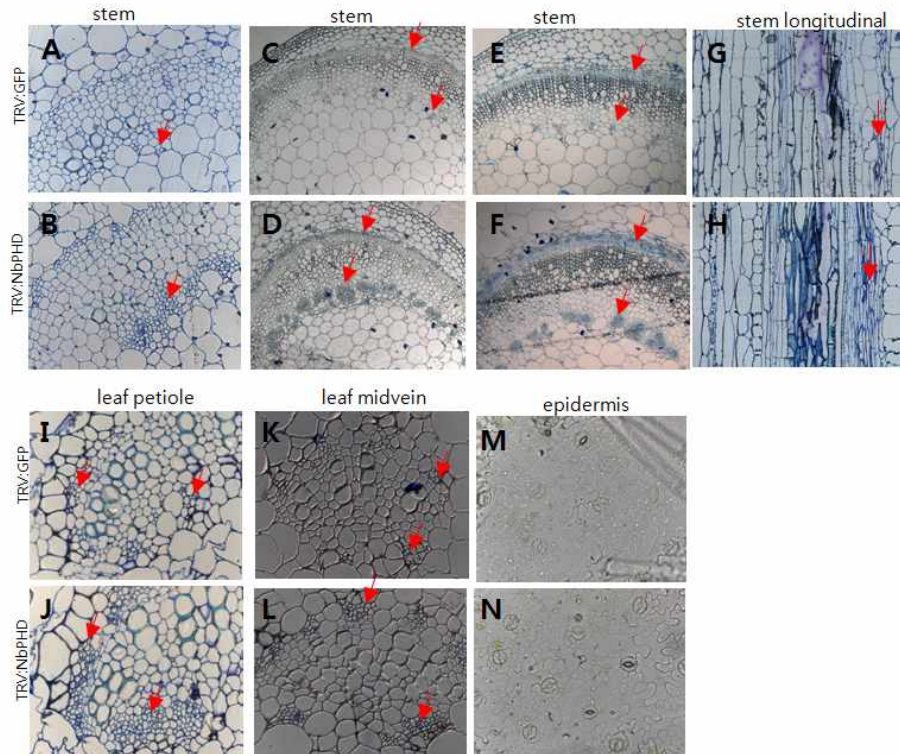


그림 1. PHD 가 silencing 되었을 때 체관부의 발달이 식물체 전반적으로 증가하며 형성층의 활성화도 증가하는 것을 알 수 있다.

이러한 체관부의 발달이 어떠한 기작을 통해 조절되는 지를 살펴보기 위해 형성층과 체관부 발달에 관여한다고 알려진 *WOX4*, *APL*, *BRI1* 의 유전자들과 함께 silencing 하여 PHD VIGS 표현형이 상쇄되는 지를 살펴보았다. 하지만, 이들 유전자들은 PHD VIGS 표현형에 변화를 주지 못하였는데, 이는 PHD 가 이들 유전자의 기능과 독립적으로 체관부의 발달을 조절하는 것을 알 수 있었다 (그림2). 흥미롭게도 *APL* 은 체관부의 정체성을 결정짓는 전사조절인자로 *APL* 이 없을 때 체관부의 발달이 이루어지지 않는데, *APL* 과 PHD를 동시에 silencing 하였을 때 *APL* silencing 의 표현형을 부분적으로 상쇄시키고 잘 자라는 것을 알 수 있었다 (그림 3). 이러한 점으로 미루어 PHD 가 형성층에서 체관부로 분화하기 위해 세포 분열을 하는 과정을 조절하고, 분열된 세포의 정체성을 *APL* 이 결정지어 체관부의 분화가 이루어 질 것으로 생각된다.

PHD 가 체관부를 조절할 때 어떻게 상위에서 조절되는 지를 살펴보고자 다양한 호르몬을 처리하였는데, auxin 의 처리에 의해 PHD 의 발현이 저해되는 것을 알 수 있었다. 또한 PHD 의 발현이 줄기의 상층부에서 가장 많고 하층부에서 적어지는 것으로 보아 하층부에서 auxin 에 의해 발현이 저해되고 이러한 발현 조절은 식물이 성장하면서 체관부가 더욱 발달하는 게 기여할 것으로 생각된다 (그림 4).

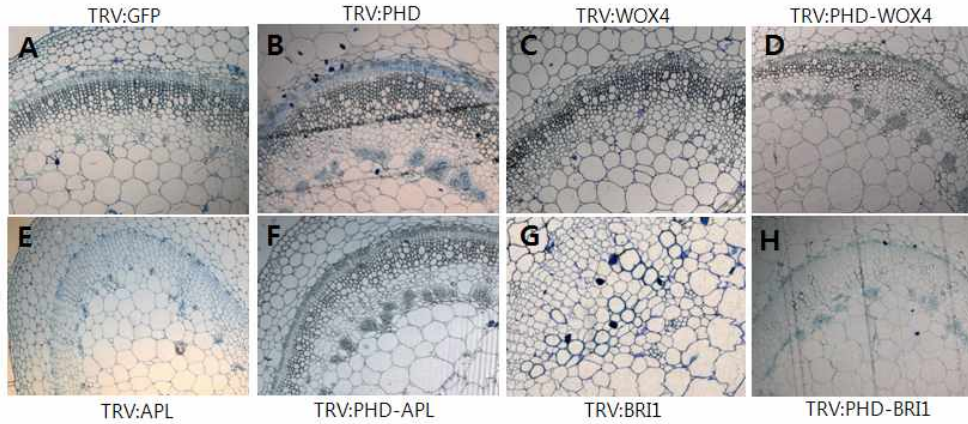


그림 2. PHD 와 WOX4, APL, BRI1 을 같이 silencing 하였을 때 PHD silencing 표현형을 보여 PHD가 이들 유전자들과 독립적으로 체관부를 조절할 것으로 판단된다.

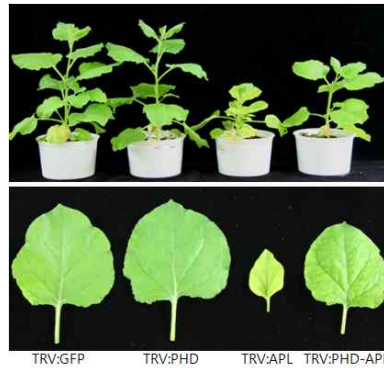


그림 3. APL 과 PHD를 동시에 silencing 하였을 때 APL 의 표현형이 상쇄됨을 통해 PHD 가 APL 유전자발현전에 체관부 발달을 조절할 것으로 판단된다.

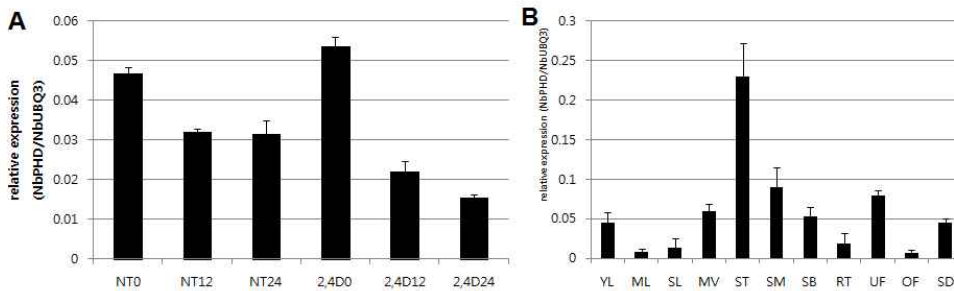


그림 4. PHD 의 발현이 auxin 에 의해 저해되고, 줄기의 상층부에서 가장 많이 발현되며 하층부로 갈수록 적게 발현되는 것을 알 수 있다.

체관부 발달이 PHD 에 어떻게 조절되는 지를 탐색하기 위해 microarray 를 통해 다르게 조절되는 유전자들을 선별하고자 하였다. 이를 통해 sucrose transporter, amino acid transporter 등과 같은 체관부에 존재하는 운반자들의 발현이 증가해 있는 것을 알 수 있었고, APL 유전자의 발현도 증가해 있었다. 또한 ANT, AP3, OBP3 와 같은 전사 조절인자 들의 발현 또한 증가되어 있어 이들 유전자들이 체관부의 발달을 조절할 것으로 예상된다. WOX4 의 발현은 변화가 없는 것으로 보아 PHD 가 WOX4 와는 독립적으로 기능하는 것을 알 수 있었다 (그림 5).



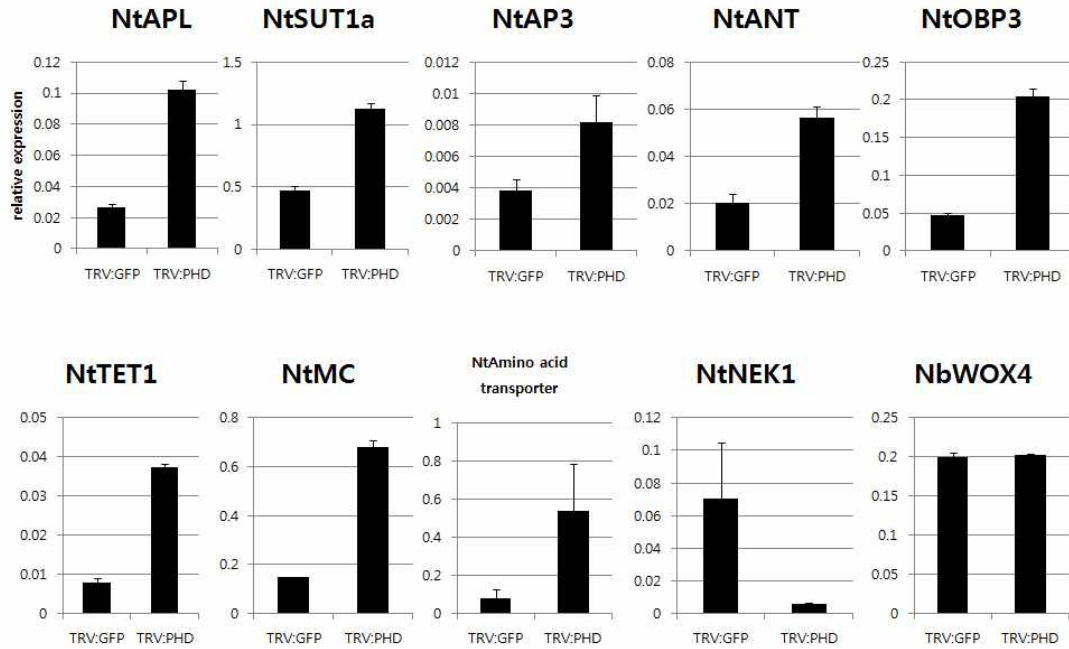


그림 5. PHD에서 발현 증가 또는 감소된 유전자들. 체관부 특이적인 유전자들의 발현이 증가되었고, 전사조절인자들이 증가되어 있어 체관부 발달을 조절할 것으로 예상된다.

담배 줄기 형성층에서의 체관부 분화 기작을 조절하는 것으로 보이는 후보유전자 PHD의 homologue 분석을 통해 얻은 애기장대의 2개의 새로운 유전자를 AtPHD1 그리고 AtPHD2로 명명하였다. 이들 유전자의 분자적 조절 기작을 확인하기 위해 세포내 또는 조직내에서의 발현 양상을 관찰하였다. GFP vector에 클로닝된 AtPHD1 그리고 AtPHD2 construct는 모두 핵과 세포질 전체에서 발현하는 것을 관찰하였다 (그림 6).

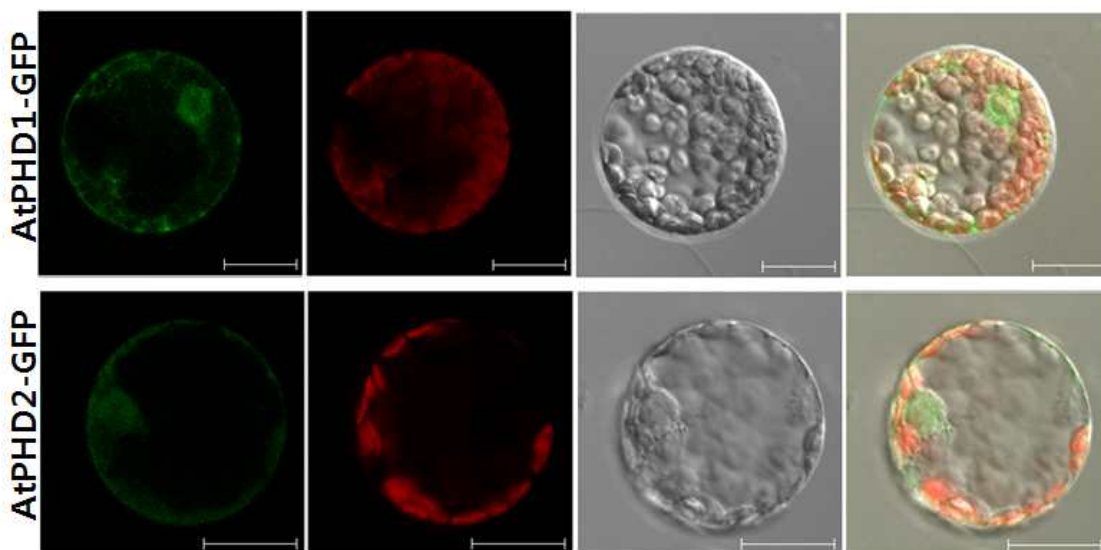


그림 6. 애기장대 PHD homologue 2개, AtPHD1과 AtPHD2는 모두 protoplast 세포 내에서 핵과 세포질에서 발현한다.

AtPHD1과 AtPHD2의 조직 내 발현을 GUS staining을 통해 살펴보면 표현형이 극명하게 나타나는 체관부 조직을 포함한 다양한 발달 과정과 조직에서의 관다발에 발현함을 관찰할 수 있다 (그림 7). 이로써 담배 PHD의 homologue인 애기장대의 AtPHD1과 AtPHD2도 또한 다양한 관다발 조직에 발현하면서 체관부의 발달에 작용할 것으로 생각된다.

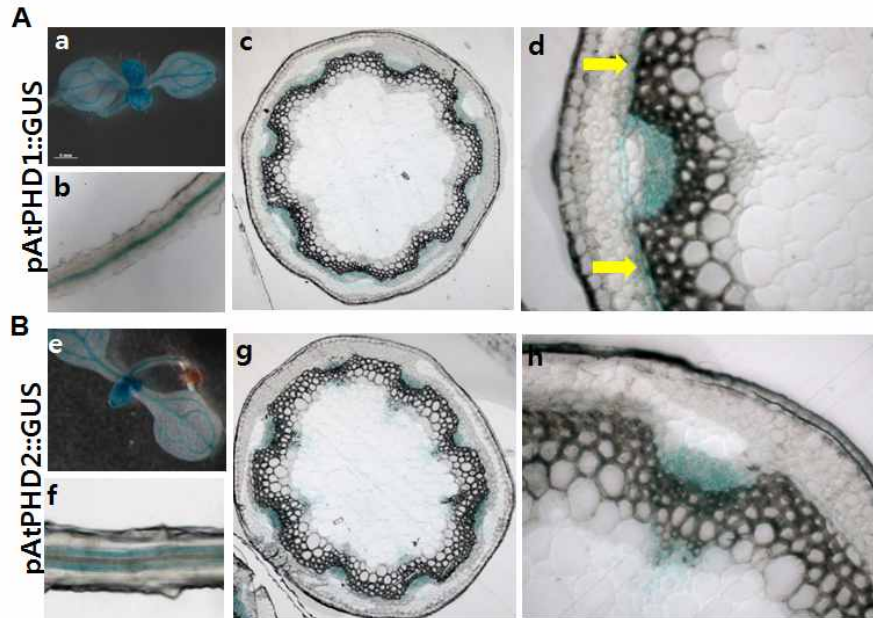
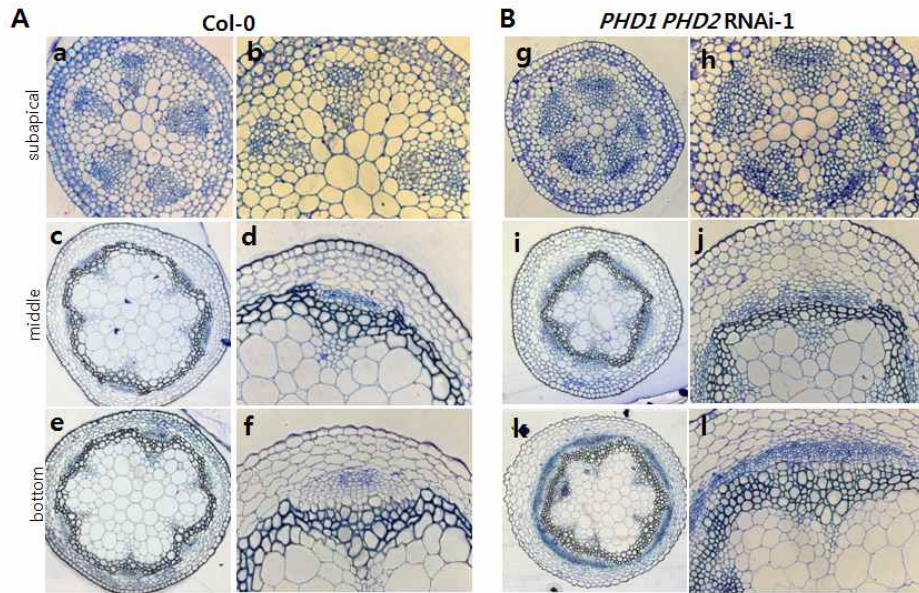


그림 7. AtPHD1과 AtPHD2는 조직 내에서 떡잎과 잎, 뿌리의 관다발에서 발현하며, 특히 줄기 관다발 내의 전형성층 (procambium)을 포함한 체관부, 그리고 interfascicular cambium에서도 발현한다.

애기장대의 AtPHD1과 AtPHD2의 RNAi 방법을 이용한 유전자 결함 돌연변이는 담배 PHD RNAi line과 비슷한 양상으로 체관부의 비정상적인 과발달을 관찰할 수 있게 되는데, 이는 체관부 뿐만 아니라 전체적인 줄기 내 관다발 형성이 비정상적인 비대해지고 나아가 주변 관다발들이 링 구조로 연결되어 있는 듯한 표현형을 나타낸다 (그림 8).



(그림 8) 애기장대 AtPHD1 AtPHD2의 RNAi line의 줄기 단면 표현형은 담배 PHD RNAi line과 유사하게 체관부가 비정상적으로 발달되어 있다.

반면, 애기장대 AtPHD1 또는 AtPHD2의 과발현 식물체는 생장이 지연되고 silique의 발달이 저해되며 rosette leaf의 비정상적인 발달이 계속되는 등의 발달 장애를 나타낸다 (그림 9). 이는 정단분열조직 (SAM)의 형성이 잘 이루어져 있지 않기 때문에 나타나는 표현형으로서, AtPHD의 과발현에 의한 SAM의 활성이 저해되고 있는 것으로 생각된다. 이러한 결함 표현형은 줄기 단면에서도 관찰할 수 있는데, AtPHD1 AtPHD2 RNAi line과는 대조적으로 줄기 관다발 내의 형성층을 포함한 체관, 나아가 물관의 발달 또한 결함이 나타난다 (그림 10).



그림 9. AtPHD1의 과발현 식물체에서는 SAM의 발달이 저해되는 것으로 관찰된다.



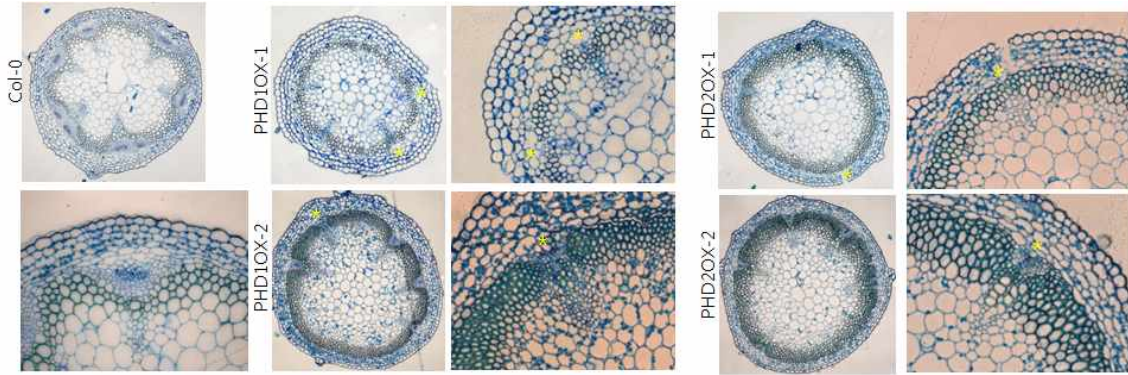


그림 10. AtPHD1과 AtPHD2 과발현 식물체의 줄기 단면 표현형은 RNAi line과 대조적으로 관다발 조직의 결합이 관찰된다.

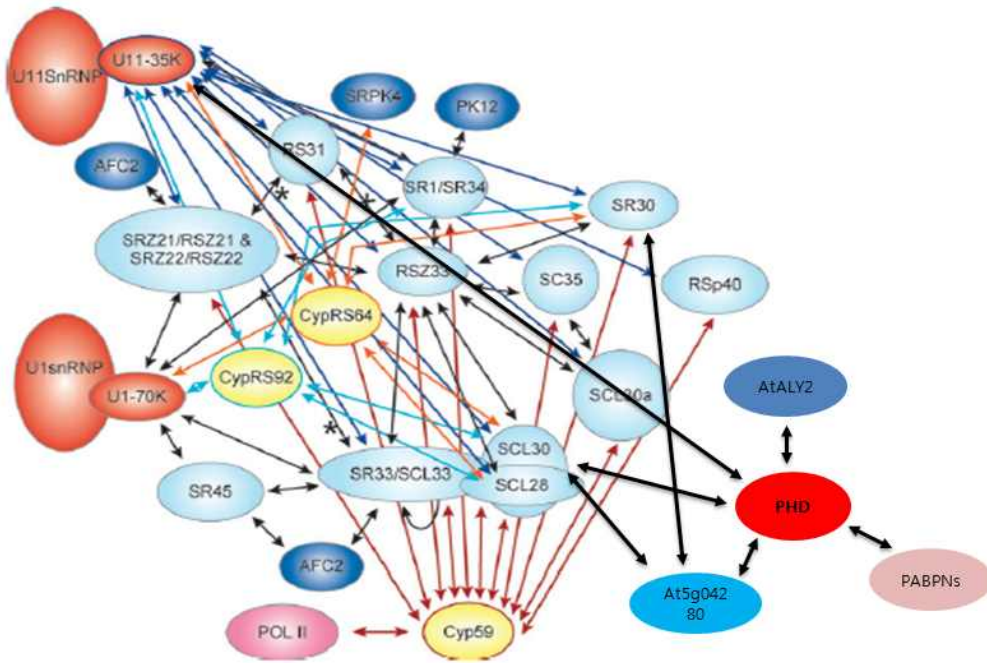


그림 11. PHD와 상호작용하는 단백질의 발굴 모식도.

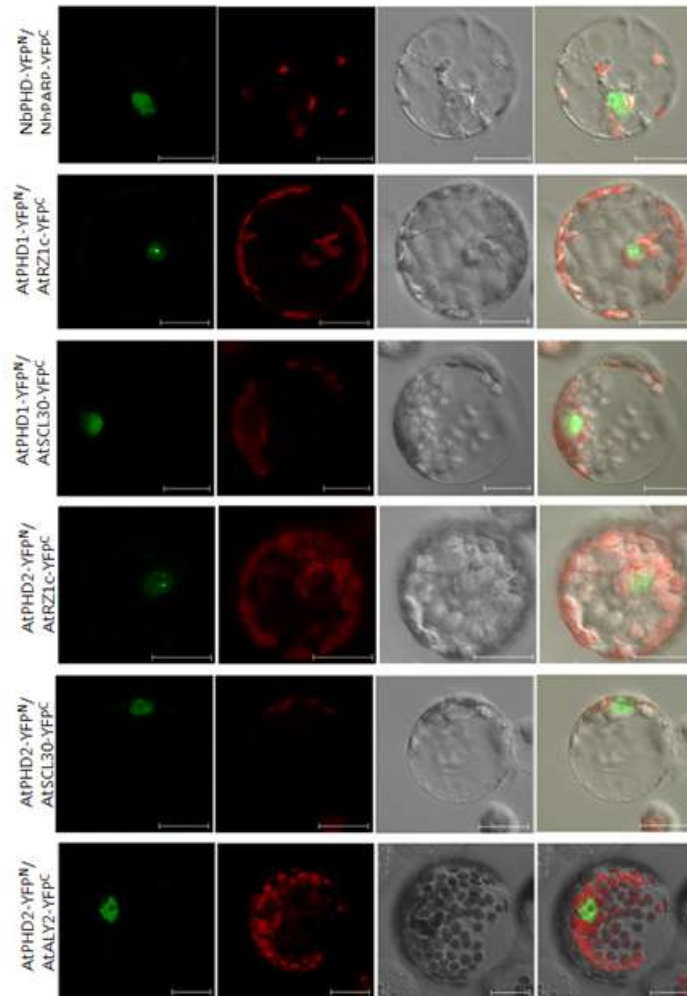


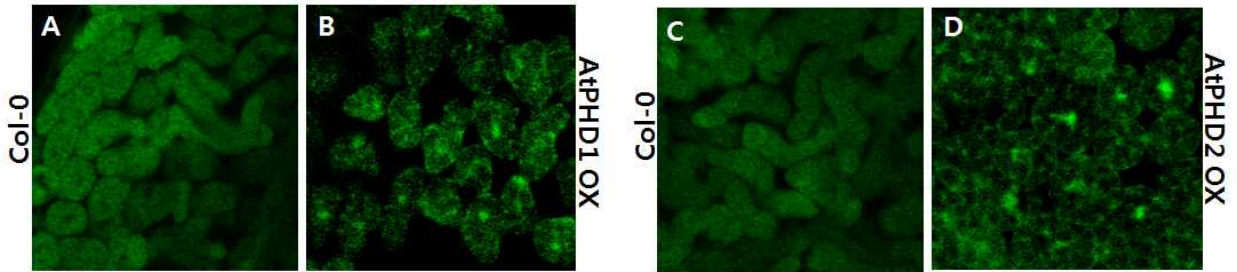
그림 12. PHD와 RNA processing 또는 RNA export에 관련된 단백질과의 상호작용을 BiFC assay를 통해 관찰하였다.

PHD의 조절 기작을 자세히 살펴보기 위해 PHD와 상호작용하는 단백질을 발굴하고자 Yeast two hybrid를 수행하였다. 이로써 PHD와 상호작용하는 후보단백질은 poly (A) -binding protein인 PABP 단백질을 관찰하였다 (그림 11). 더불어 기존 database에 보고된 단백질체 정보를 활용한 PHD와 상호 작용할 가능성이 보고된 다양한 단백질 또한 발굴할 수 있었다 (그림 11).

이들 단백질은 모두 RNA processing 또는 export에 공통으로 관련된 단백질로 알려져 있으며 주요 조절 인자군과의 상호작용을 우선 확인하고자 BiFC (Bimolecular fluorescence complementation) assay를 수행하였다 (그림 12) 이를 통해 NbPHD가 RNA processing 또는 export와 관련된 단백질과 상호작용하여 그와 관련된 기작을 조절할 것으로 생각할 수 있었다.

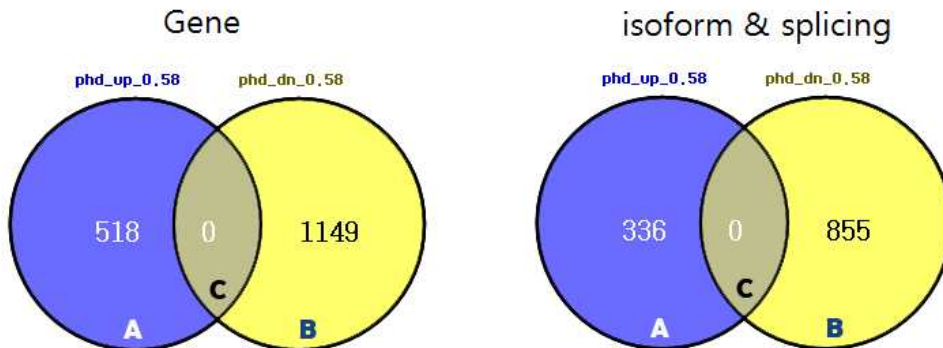
RNA processing과 export에 관여하는지 자세히 살펴보기 위해 poly (A) RNA에 결합하는지를 관찰할 수 있는 poly (A) RNA in situ hybridization을 수행하였다 (그림 13). 야생형에서 관찰할 수 있는 poly (A) tail을 가진 mRNA의 localization이 세포내 분포되어 있는 양상 (그림 13A과 13C)이 AtPHD1 또는 AtPHD2 과발현 식물체에서는 핵 내에 머물러 있음을 관찰할 수 있었다 (그림 13B와 13D). 이는 PHD가 핵에서의 RNA processing 과정 또는 세포

질로의 RNA export를 저해하는 기능을 추측할 수 있게 한다.



(그림 13) 야생형과 대조적으로 AtPHD1과 AtPHD2 과발현 식물체에서 mRNA의 위치가 핵에 머물러 있음을 poly (A) RNA in situ hybridization으로 관찰하였다.

RNA splicing 등과 같은 RNA processing 또는 세포질로의 RNA export에 관련된 기능 분석을 위해 애기장대 PHD RNAi line에서의 RNA sequencing을 수행, 분석하였다 (그림 14). 이로써 AtPHD RNAi와 야생형에서 isoform 또는 RNA splicing에 관련된 유전자군의 발현 변화가 크게 차이남을 관찰할 수 있었다. 즉 PHD는 RNA processing 또는 RNA export에 관련된 단백질과 상호작용하면서 mRNA의 발현변화를 유도함으로써 식물의 발달, 특히 줄기 내 전형성증 및 체관부의 발달 과정을 조절할 것으로 판단된다.



(그림 14) 야생형과 AtPHD RNAi line 간의 RNA sequencing data 결과를 모식도로 나타낸 것.

**[1협동: 바이오매스 증대를 위한 포플러 형질전환체 개발]**

[1차년도]

1. 유채와 포플러의 형질전환 조건 확립

1) 형질전환 재료

- 바이오매스 증대를 위한 형질전환 재료는 유채(*Brassica napus* cv. Jeju Hanla)와 포플러 (*Populus tomentiglandulosa*)를 사용하였음(그림 1)
- 유채는 바이오디젤 원자재의 80% 이상을 차지하는 작물로 국내의 경우 겨울철 휴경농지를 활용할 경우 식량작물과 재배지 경합이 없이 바이오매스 원자재 확보가 가능한 작물임
- 포플러는 목질계 바이오 원자재를 확보하기 위한 재료로 바이오매스를 증대하기 위한 유



전자를 이용하여 속성생장 형질전환체를 개발할 경우, 재배순환기간을 단축하여 SRP(short rotation woody plant)로 활용 가능

- 따라서 바이오매스가 증대된 식물체를 개발하여 바이오디젤과 바이오에탄올 생산의 원자재로 산업화하고자 함



그림 1. 바이오매스 증대를 위한 형질전환체 개발에 사용하는 유채(좌)와 포플러(우).

2) 유채와 포플러 형질전환에 사용한 유전자

- 식물의 생장과 유전자 발현을 조절하는 유전자를 이용한 형질전환 벡터를 Agrobacterium-mediated transformation 방법으로 형질전환 하였음
- 바이오매스 증대를 위해 사용한 유전자와 특성은 표 1과 같음

표 1. 바이오매스 증대를 위해 유채와 포플러 형질전환에 사용한 유전자 및 특성

No.	Gene Name	Characteristics	Reference
FnP501	CKI1 (Cytokinin-independent 1), At2g47430	CKI1 is involved in cytokinin signal transduction, possibly as a cytokinin receptor	Science. (1996) 274(8):982-5
FnP502	PhyA (PHYTOCHROME A), At1g09570	Light-labile cytoplasmic red/far-red light photoreceptor involved in the regulation of photomorphogenesis	Plant J. (2007) 49(6):1064-75
FnP503	Hyperactive PhyA	S598A (mutagenic site)	
FnP504	Bathochromic PhyA	F307R/C371A (mutagenic site)	

FnP505	CaPUB1 ( <i>C. annuum</i> putative U-box protein)	effectively altering cell and tissue growth and also the response to abiotic stresses (water stress and mild salinity)	Plant Physiol. (2006) 142(4):1664-82
FnP506	CaPLA1 ( <i>C. annuum</i> phospholipase A1)	participate in a subset of positive control mechanisms of cell and tissue growth	Plant J. (2008) 53(6):895-908
FnP507	RabG3b (Rab GTPase)	a modulator for cell death progression during pathogen response and senescence process in plants	J. Plant Biol. (2009) 52(3):79-87
FnP05	Myb2 (MYB domain protein 2)	transcription factor Myb2 related to senescence process	Personal communication

### 3) 유채 Callus 형성과 형질전환 최적 조건 구명

- 무균 발아된 유채 소식물체의 자엽과 줄기를 5-10mm 크기의 절편으로 만들어 salt 농도, 탄소원 그리고 호르몬이 다르게 첨가된 배지에 치상하여 25±1°C 배양실에서 암조건과 광조건(45±5 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>)에서 계대배양하면서 callus 형성을 및 기관분화를 조사하였음
- 형질전환체 개발을 위한 적정 salt 및 비타민 농도는 MS 배지가 가장 우수하여, 낮은 salt 농도는 기관분화를 촉진한다는 결과와 다소 차이가 있었으며, 1.0MS와 1.5MS 사이에서는 큰 유의차가 없어 1.0MS로 선정하여 사용(그림 2)

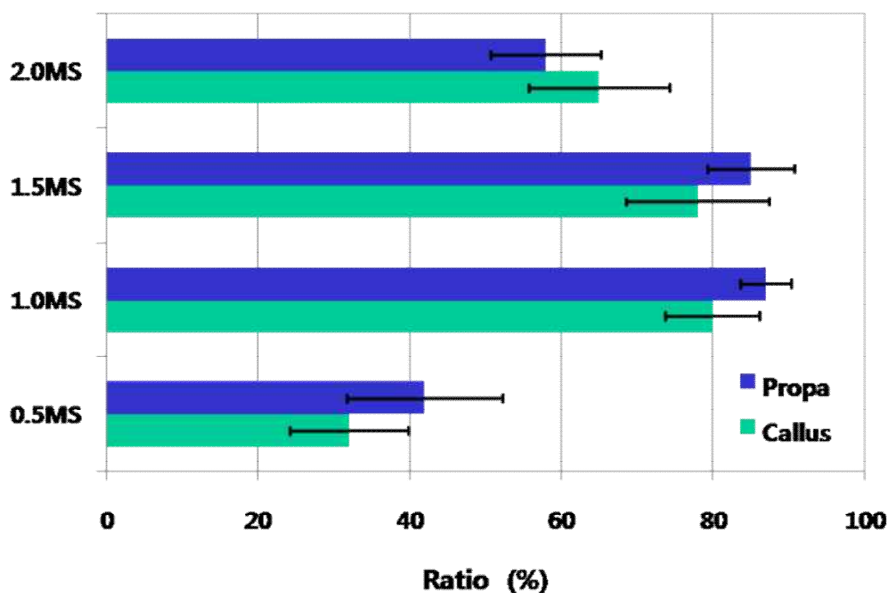


그림 2. 유채 callus 형성 및 생장에 미치는 salt 및 vitamin 농도의 효과. Callus; explant의 callus 형성은 절단부위에서 세포분열 출현율(callus/explant)X100으로 계산. Propa; callus 생장은 4주후 callus가 explant를 완전히 덮을 정도로 성장한 것을 기준(division/callus)X100.

- 성장조절제의 경우 auxin과 cytokinin을 여러 농도로 혼용 처리하여 callus 형성과 기관분

화 효율을 조사한 결과, NAA는 0.5-2 mg/L 범위 그리고 BA는 1-4 mg/L 범위내의 혼용처리가 세포분열 효율이 높았음

- Auxin류와 cytokinin류의 단독처리구의 경우 전혀 세포분열이 이루어지지 않았으며 BA의 상대적 ratio가 증가하면 오히려 세포분열이 감소하였음(표 2)
- 따라서 유체의 callus 형성에 미치는 호르몬의 최적 조합은 auxin과 cytokinin 비율이 1:4에서 가장 왕성하였음
- 또한, explant로부터 callus 형성이 가장 왕성한 호르몬 조합을 이용하여 배양조건에 따른 callus 형성 및 성장을 조사하였음
- 유체의 callus 성장 및 기관분화에 미치는 온도는 27°C에서 다소 높았으나, 배양실의 온도인 25°C와 큰 유의차는 발견되지 않았음(그림 3)

표 2. 호르몬 농도에 따른 유체의 callus 형성 및 성장 효과

Auxin \ Cytokinin	0 mg/L	0.5 mg/L	1.0 mg/L	1.5 mg/L	2.0 mg/L
0 mg/L	-	4 (5.3)*	7 (9.3)	6 (8.0)	5 (6.7)
2 mg/L	3 (4.0)	64 (86.7)	62 (84.0)	55 (73.3)	42 (56.0)
4 mg/L	7 (9.3)	60 (80.0)	58 (77.3)	36 (48.0)	28 (37.3)

\* Callus 형성율은 75 explant (25 explant/plate X 3plate) 중 callus가 형성된 비율

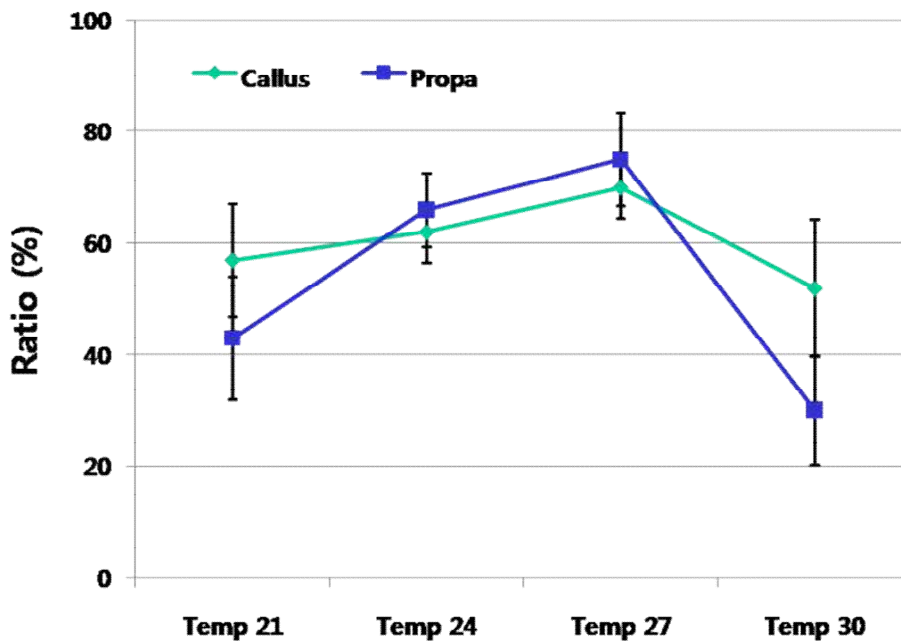


그림 3. 배양온도가 유체 callus 형성 및 성장에 미치는 효과. Callus 형성 및 성장과 온도는 24°C와 27°C에서 의미 있는 유의차는 없었으나 27°C에서 다소 높게 나타났음.

- 광도의 영향을 확인하기 위해 callus 성장과 기관분화에 적합한 호르몬이 첨가된 MS 배지에 explant를 치상하여  $10\text{--}100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  의 광조건에서 callus 형성율을 조사하였음
- Callus 형성 및 생장은  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  의 광조건에서 가장 우수하였으나 배양실의 평상시 광조건과 유의차가 없었음. 따라서 agrobacterium과 coculture 후 2일간 암배양 후 광상태에서 계대배양하면서 기관분화를 유도하였음(그림 4)

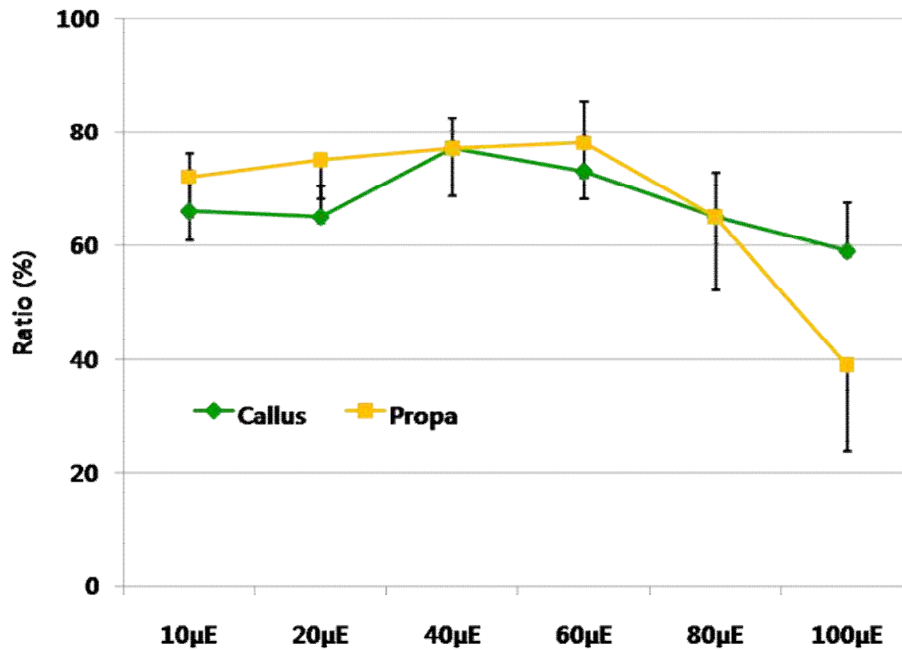


그림 4. 유채 callus 형성 및 성장에 미치는 광도의 효과. Callus 형성에는 40에서 다소 높은 반면에 성장에는 60 이상에서는 억제되는 경향이었음.

- 탄소원으로 sucrose와 glucose가 유채의 callus 형성 및 성장에 미치는 영향을 조사한 결과, 일반적으로 사용하고 있는 3%(w/v) sucrose에서 callus 형성 및 생장이 우수하였음 (그림 5)
- 3%(w/v) 이상의 농도에서는 callus가 급속히 갈변되었고, 낮은 농도에서는 생장이 둔화되어 callus 용적이 작았으며 갈변현상이 나타났음

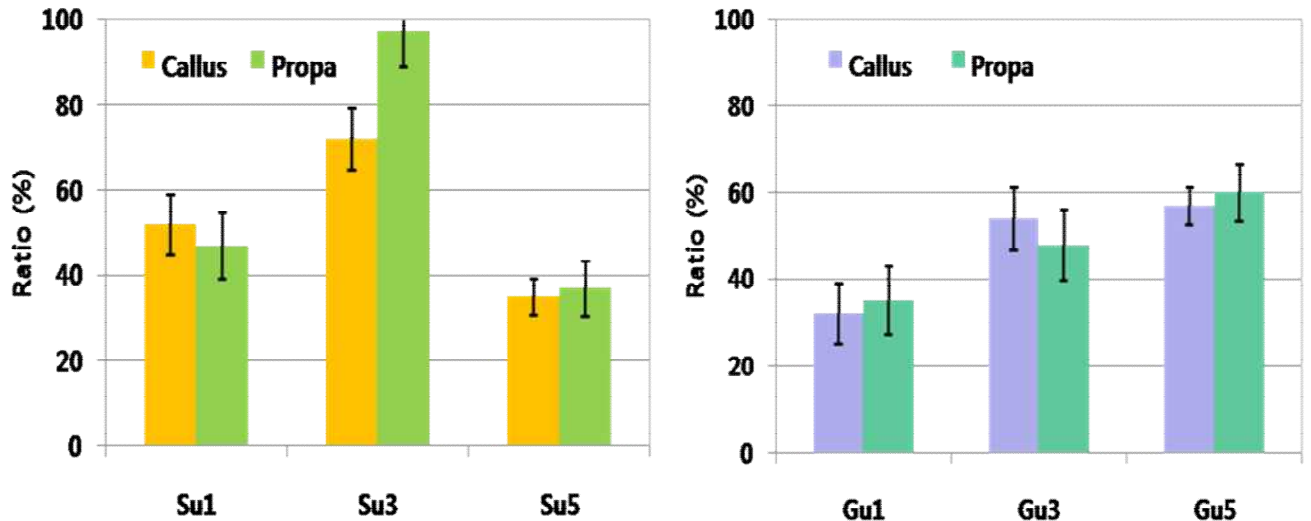


그림 5. 유채 callus 형성 및 성장에 미치는 탄소원의 영향. Callus 형성과 성장에서 모두 3%의 sucrose에서 우수하였음.

- 이상의 결과를 종합하여 유채의 callus 형성 및 성장과 기관분화에 요구되는 요인의 영향을 조사하여 형질전환체 개발조건을 확립하였음
- 따라서 본 배양체계는 본 연구의 고효율의 유채형질전환 및 선발 시스템을 확립을 위해 중요한 요인으로 판단 됨
- 상기의 callus 형성 및 성장조건을 이용하여 본 연구과제의 각 벡터별 유채 형질전환체 유도를 수행하고 있음(그림 6)
- 형질전환체 유도를 위해 agrobacterium과 co-culture 후 암배양 또는 항생제가 포함된 배지에서 초기 광배양 기간에 explant가 갈변되거나 고사되는 경우가 많아 callus 형성 및 기관분화율이 현저히 감소하였으나, callus가 형성된 후 갈변되는 조직에서는 기관분화 및 형질전환체 발생율이 높게 나타났음
- 유채의 형질전환을 위해 co-culture 후 약 3개월에서 5개월 후부터 shoot가 발생하였으며, 이들은 3-5회 계대배양 후 root 유도 배지에 계대하여 형질전환체를 선발하였음

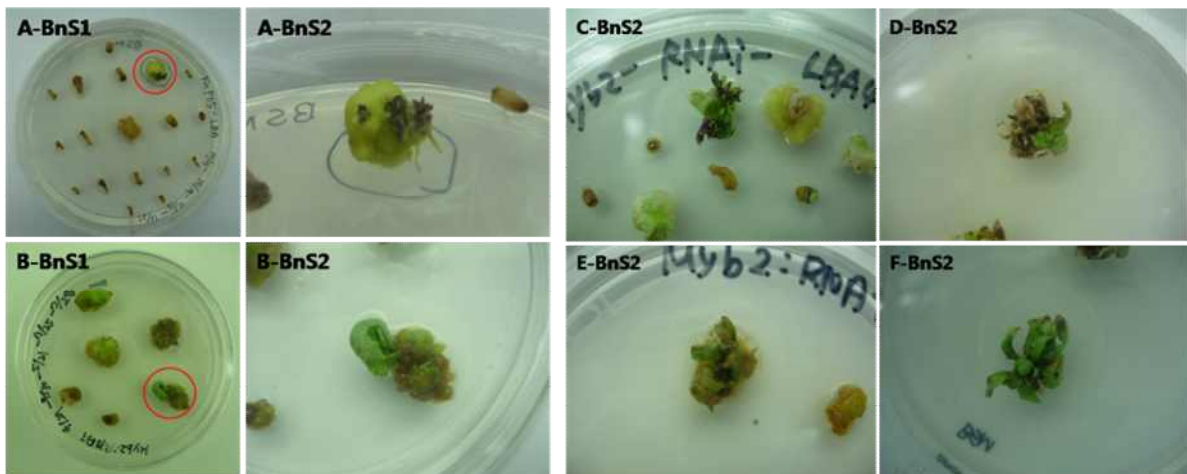


그림 6. 유전자 발현조절 Myb2 벡터를 이용한 유채의 형질전환체 개발. A-F는 형성된 callus



의 origin, S1-S2; callus 발달 단계.

4) 포플러 Callus 형성과 형질전환 최적 조건 구명

- 포플러의 callus 생성 및 형질전환체 유도에 사용한 배지 및 호르몬 조성은 기 보고된 조건(임업연구원, 2002)을 다소 변형하여 사용하였음
- CKI1 유전자를 포함하는 vector를 이용하여 포플러 callus 유도, 성장 및 기관분화를 위한 배양 조건 및 배양체계를 확립하였음(그림 7)
- 또한 Myb2 벡터를 이용하여 포플러 형질전환을 수행하였음(그림 8)
- 1차년도 후반에 추가로 분양받은 각 벡터(표1)를 이용하여 포플러 형질전환체를 유도하였음

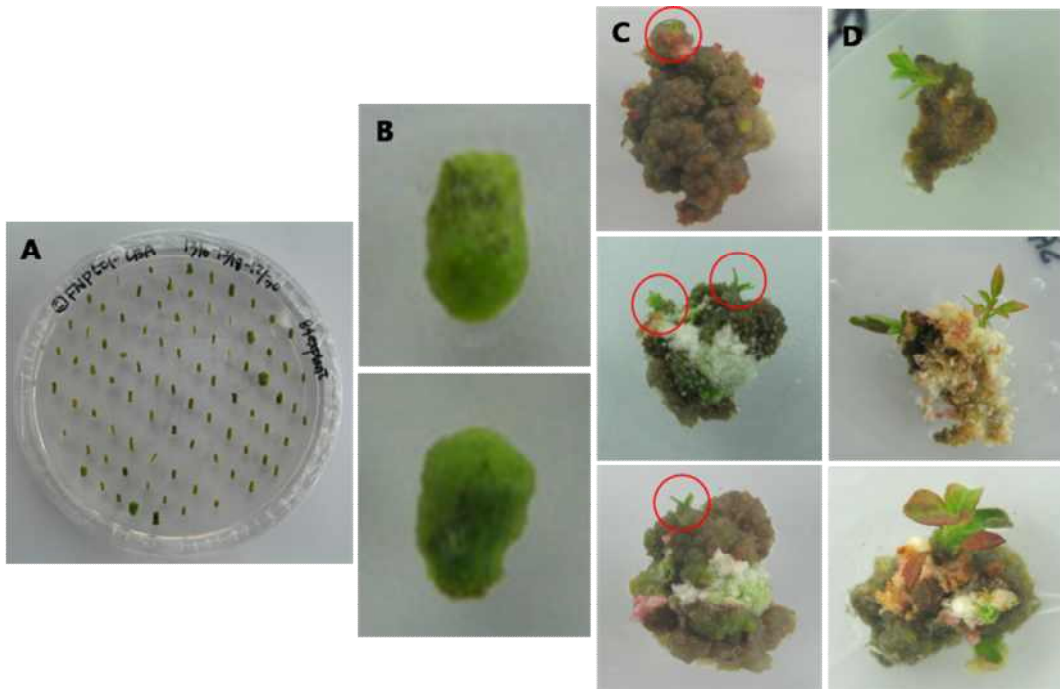


그림 7. 세포생장조절 CKI1 유전자를 이용한 포플러의 형질전환체 개발. A-D; Callus 발달 단계.

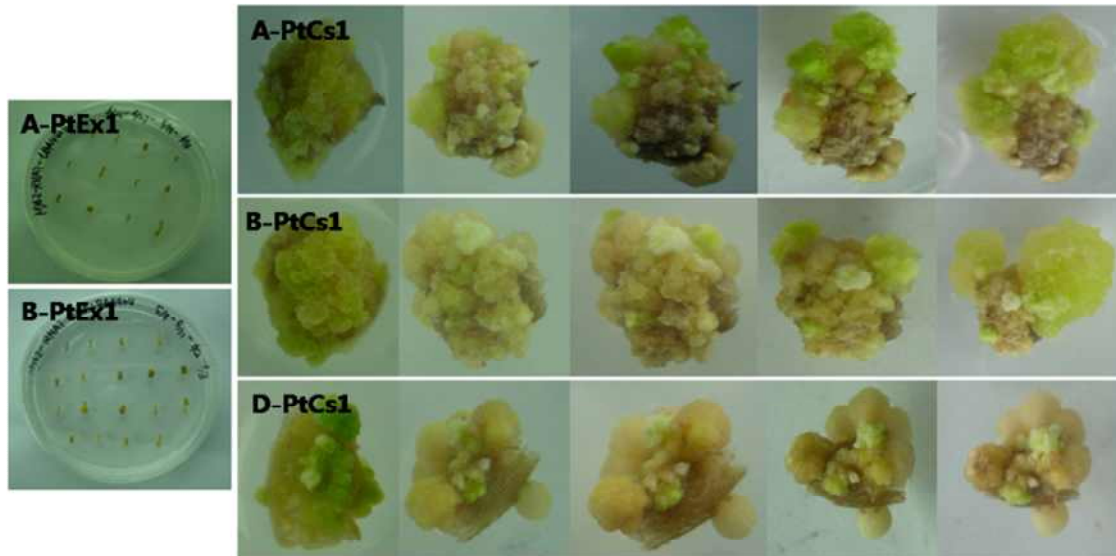


그림 8. Myb2 유전자를 이용한 포플러의 형질전환체 개발. A-D; Callus origin.

5) 유채 및 포플러 형질전환체

가. 유채 형질전환

- 유채의 형질전환 조건 최적화에 사용한 유전자발현을 조절하는 유전자인 Myb2가 포함된 vector를 이용한 형질전환에서 선발된 형질전환체 및 형질전환 후보 개체는 표 3과 같음

표 3. 유전자발현조절 Myb2 유전자 도입 유채 형질전환체 1차 선발 결과

재분화 (shooting)된 개체수	PCR 검정 (PPT-Specific Primer)	shoot 배양 중인 개체	Callus 형성 개체
27*	3	24	62

\* 3개의 vector control 형질전환체 포함

- 기내에서 본 엽이 4-5장 정도 자랐을 때 제 3본 엽을 채취하여 외부 유전자의 삽입여부를 확인하기 위해 항생제 저항성과 target gene-specific primer를 이용한 PCR을 수행하여 1차 검정하였음
- 현재까지 shoot가 유도된 27개체 중에서 shoot가 충분히 자란 후보 개체 10개를 이용한 PCR 검정 결과 약 40%인 4개체에서 외부유전자 specific 밴드가 확인되었음(그림 9)

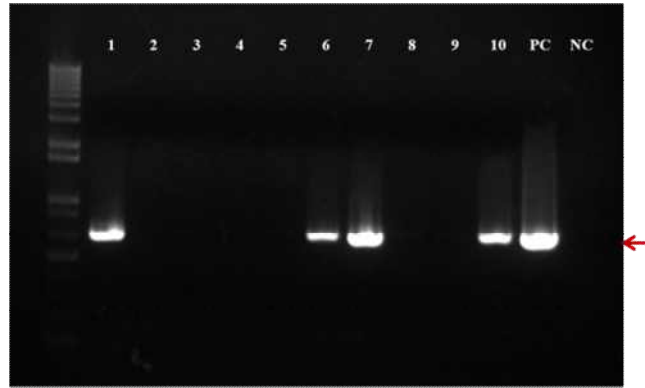


그림 9. Myb2 벡터를 이용한 유채 형질전환 후보 개체의 PCR 검정결과, 4개 라인에서 벡터 특이밴드가 확인되었음. PC; positive control (plasmid DNA), NC; negative control(wild type).

- 제 1차년도에 유채의 형질전환 체계가 확립되었기 때문에 positive 형질전환체의 선발 비율이 높아지고 우수한 형질전환체를 확보가 빠르게 향상될 것으로 전망
- CKI1 vector를 이용한 유채 형질전환을 위해 현재 callus 형성단계에 있는 개체는 약 130 개체 임
- Myb2 유전자를 이용하여 형질전환 조건이 확립된 후에 explant를 치상하여 현재는 callus가 생성되어 생육 중에 있음
- 추가로 분양받은 6종의 vectors(FnP502~507)를 이용한 유채 형질전환체 개발을 위해 각각의 vector를 포함한 agrobacterium과 co-culture된 유채 explant를 치상하여 callus를 유도 하고 있음

#### 나. 포플러 형질전환

- 포플러의 경우, 형질전환 조건 최적화에 사용한 세포생장 및 분열을 조절하는 유전자인 CKI1이 포함된 vector를 이용한 형질전환에서 선발된 형질전환체 및 형질전환 후보 개체는 표 4와 같음

표 4. 세포생장조절 CKI1 유전자 도입 포플러 형질전환체 1차 선발 결과

재분화 (shooting)된 개체수	PCR 검정 (PPT-Specific Primer)	shoot 배양 중인 개체	Callus 형성 개체
16(17*)	1	14	72

\* 1개는 같은 callus에서 유래된 형질전환체.

- 형질전환체 1차 검정을 위해 본 엽이 4-5장 정도 자랐을 때 제 3본 엽을 채취하여 외부 유전자의 삽입여부를 확인하기 위해 항생제 저항성과 target gene-specific primer를 이용한 PCR을 수행하였음

- 현재까지 shoot가 유도된 16개체 중 충분히 유도된 후보 개체 3개를 이용한 PCR 검정 결과 1개체에서 외부유전자 specific 밴드가 확인되었음(그림 10)



그림 10. CKII 벡터를 이용한 포플러형질전환체의 PCR 검정 결과. PC; positive control (plasmid DNA), NC; negative control(wild type).

- CKII 유전자를 이용한 바이오매스 증대용 형질전환 유도 조건이 확립되었고 지속적인 형질전환을 통해 shoot 원기가 유도된 후보 개체가 확보되었고 형질전환체의 선발 비율이 높아질 것으로 확신
- Myb2 vector를 이용한 포플러 형질전환을 위해 현재 callus 형성단계에 있는 개체는 약 120개체 임
- 포플러의 경우도 CKII 유전자를 이용하여 형질전환 조건이 확립된 후에 Myb2 유전자와 co-culture된 explant를 치상하여 현재는 callus가 생성되어 생육 중에 있음
- 또한, 추가로 분양받은 6종의 vectors(FnP502-507)를 이용한 포플러 형질전환체의 경우, 현재 각각의 vector를 포함한 agrobacterium과 co-culture된 포플러 explant를 치상하여 callus를 유도하고 있어 다양한 유전자원으로부터 형질전환체의 개발이 가능할 것임

## [2차년도]

### 1. 포플러 형질전환체 개발

#### 1) 포플러 형질전환에 사용한 유전자

- 식물의 비대생장과 생장관련 유전자 발현을 조절하는 transcription factor를 이용한 형질전환 벡터를 Agrobacterium-mediated transformation 방법으로 형질전환 하였음
- 바이오매스 증대를 위한 형질전환체 개발에 사용한 유전자와 특성은 2차년도에 2개가 추가되어 표 5와 같음

표 5. 바이오매스 증대를 위한 유체와 포플러 형질전환에 사용한 유전자 및 특성

No.	Gene Name	Characteristics	Reference
FnP501	CKII (Cytokinin-independent 1), At2g47430	CKII is involved in cytokinin signal transduction, possibly as a cytokinin receptor	Science. (1996) 274(8):982-5

FnP502	PhyA (PHYTOCHROME A), At1g09570	Light-labile cytoplasmic red/far-red light photoreceptor involved in the regulation of photomorphogenesis	Plant J. (2007) 49(6):1064-75
FnP503	Hyperactive PhyA	S598A (mutagenic site)	
FnP504	Bathochromic PhyA	F307R/C371A (mutagenic site)	
FnP505	CaPUB1 ( <i>C. annuum</i> putative U-box protein)	effectively altering cell and tissue growth and also the response to abiotic stresses (water stress and mild salinity)	Plant Physiol. (2006) 142(4):1664-82
FnP506	CaPLA1 ( <i>C. annuum</i> phospholipase A1)	participate in a subset of positive control mechanisms of cell and tissue growth	Plant J. (2008) 53(6):895-908
FnP507	RabG3b (Rab GTPase)	a modulator for cell death progression during pathogen response and senescence process in plants	J. Plant Biol. (2009) 52(3):79-87
FnP508	RabG3b CA (small GTPase in Arabidopsis)	-A modulator for cell death progression during pathogen response and senescence process in plants - Point mutation of RabG3b (Q67L) - Regulated HR-PCD	J. Plant Biol. (2009) 52(3):79-87
FnP509	CaRma 1H1	<i>Capsicum annuum</i> ring	Sequence only
FnP510	Methyltransferase (At5G40830)	Related to growth (mass)	2차년도 추가
FnP511	PNC2 (At5G27520)	Related to growth (mass)	2차년도 추가
FnP05	Myb2 (MYB domain protein 2)	transcription factor Myb2 related to senescence process	Personal communication

## 2) FnP501 유전자를 이용한 포플러 형질전환

- 줄기의 비대생장과 관련된 CKII 유전자를 포함하는 vector를 이용하여 포플러 형질전환을 하였음

- 1차년도 결과(27개, PCR 확인)를 포함하여 총 94개체를 개발 하였으며 이중 57개체는 실외에서 생육 하면서 생육특성을 조사하였음(그림 11)
- 생육특성 조사를 위해 순화 중 인 형질전환 포플러의 줄기 직경과 경장을 측정하여 바이오매스 관련 형질의 변화를 보이는 형질전환 식물체를 선발하였음(그림 12)

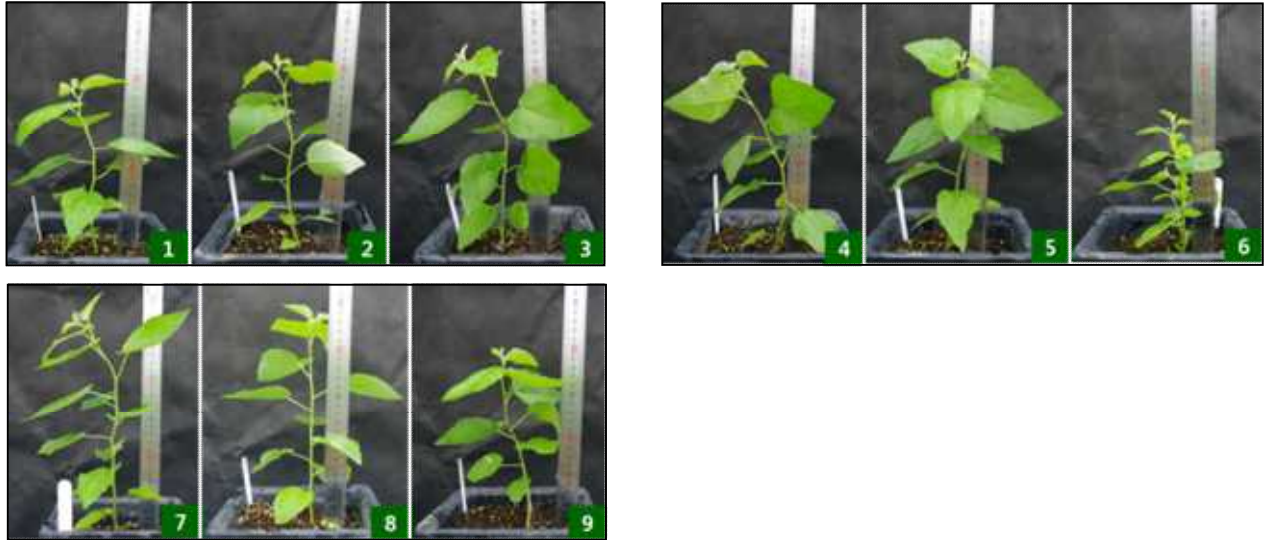


그림 11. FnP501을 이용한 포플러 형질전환체 개발에서 선발하여 순화된 형질전환체(2010년 8월). PCR을 이용하여 형질전환체로 확인된 개체를 온실에 순화하여 생육하였으며, 바이오매스 관련 형질의 변화를 조사하였음.



그림 12. 벡터 특이 프라이머를 이용한 PCR 결과 형질전환체로 확인된 포플러를 하우스 순화하여 생육 특성을 조사하였음(2011년 1월). 하우스에 순화된 58, 96일 그리고 125일된 형질전환 포플러.

### 3) FnP505 유전자를 이용한 포플러 형질전환



- 생육과 개화가 빠르고, 염해, 건조에 관련된 CaPUB1 유전자를 포함하는 vector를 이용하여 포플러 형질전환을 하였음
- FnP505 vector를 이용하여 벡터 특이 PCR로 확인된 1개체는 기관 분화에 성공하였으며, shooting된 4개체를 실내에서 배양 중에 있음(그림 13)
- 선발된 형질전환 식물체가 실외로 순화되면 다른 유전자로 형질전환된 식물체와 생육특성을 비교하고, 줄기의 직경과 경장 등을 측정하여 바이오매스가 증대된 식물체를 선발하고자 하였음

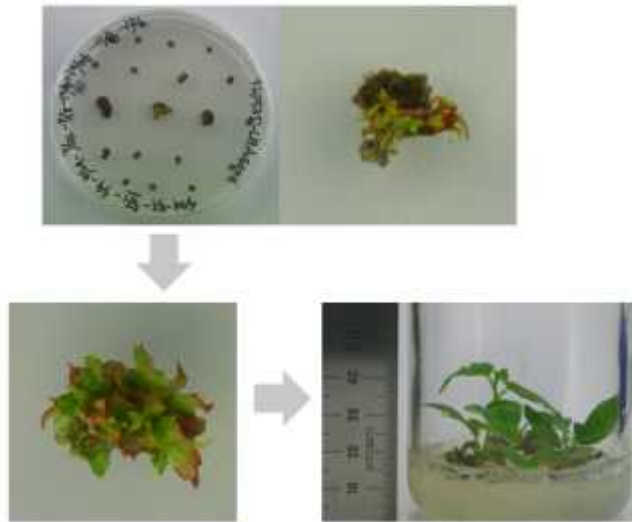


그림 13. FnP505를 이용한 포플러 형질전환체의 유도과정과 선발된 형질전환체(2010년 12월).

#### 4) FnP507 유전자를 이용한 포플러 형질전환

- 식물체의 생물학적 스트레스 저항성과 세포 발달과 관련되어 있으며, 세포의 바이오매스 증대와 과 관련이 있는 RabG3b CA 유전자를 포함하는 vector를 이용하여 포플러 형질전환을 하였음
- FnP507 vector를 이용하여 총 86개체의 포플러 형질전환체를 개발 하였으며, 53개체를 실외에 순화하여 생육 중 이며 대조구 및 다른 유전자로 형질전환된 식물체와 비교하여 생육특성을 조사하였음(그림 14, 15)
- 순화 중 인 포플러는 줄기의 직경과 경장을 측정하여 바이오매스가 증대된 식물체를 선발하였음(그림 16, 표 6)

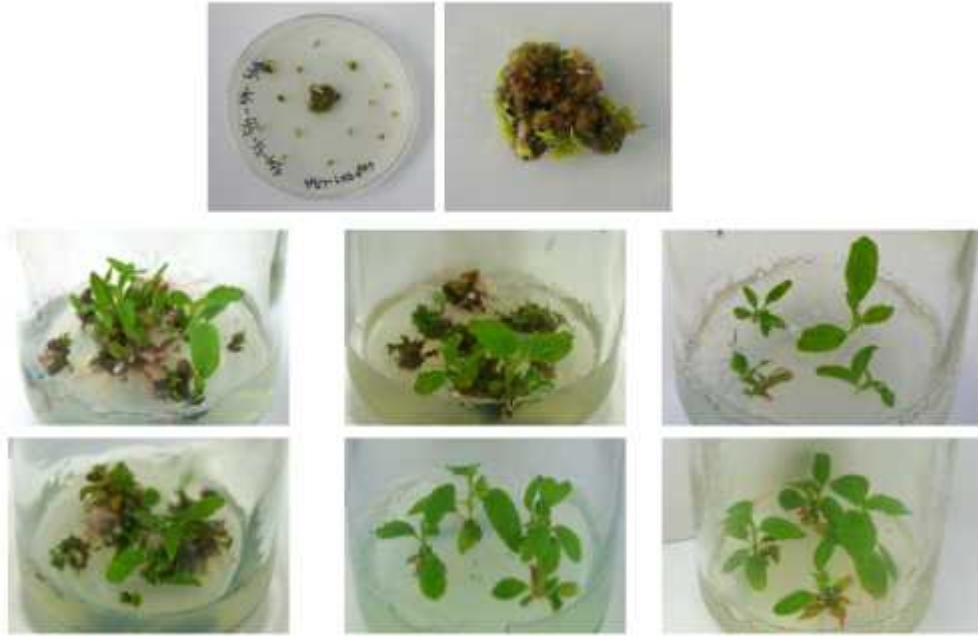


그림 14. FnP507 유전자를 이용한 포플러의 형질전환체 유도과정 및 선발된 형질전환체 (#1)(2010년 11월).

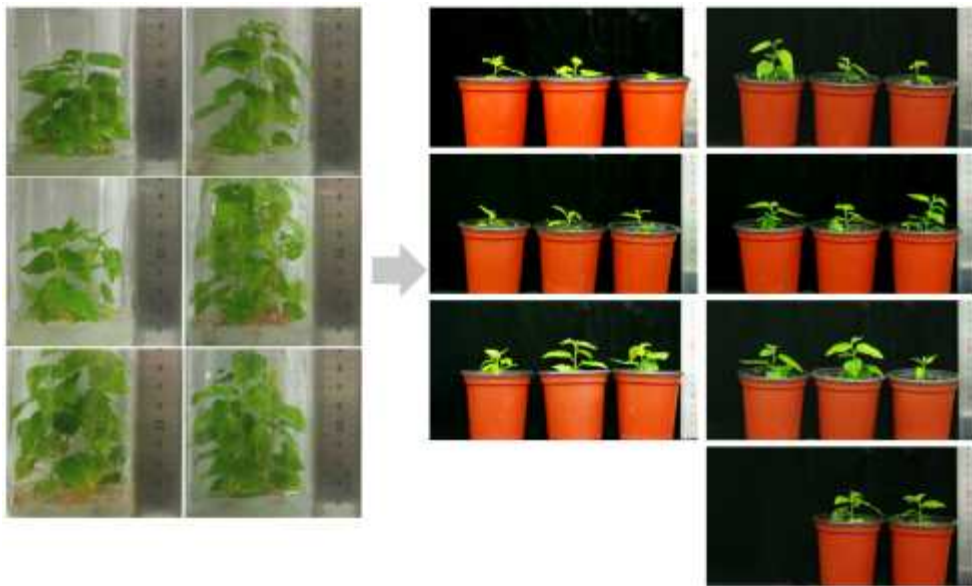


그림 15. FnP507 유전자를 이용한 포플러의 형질전환체(#1)의 실외 순화(2010년 12월).



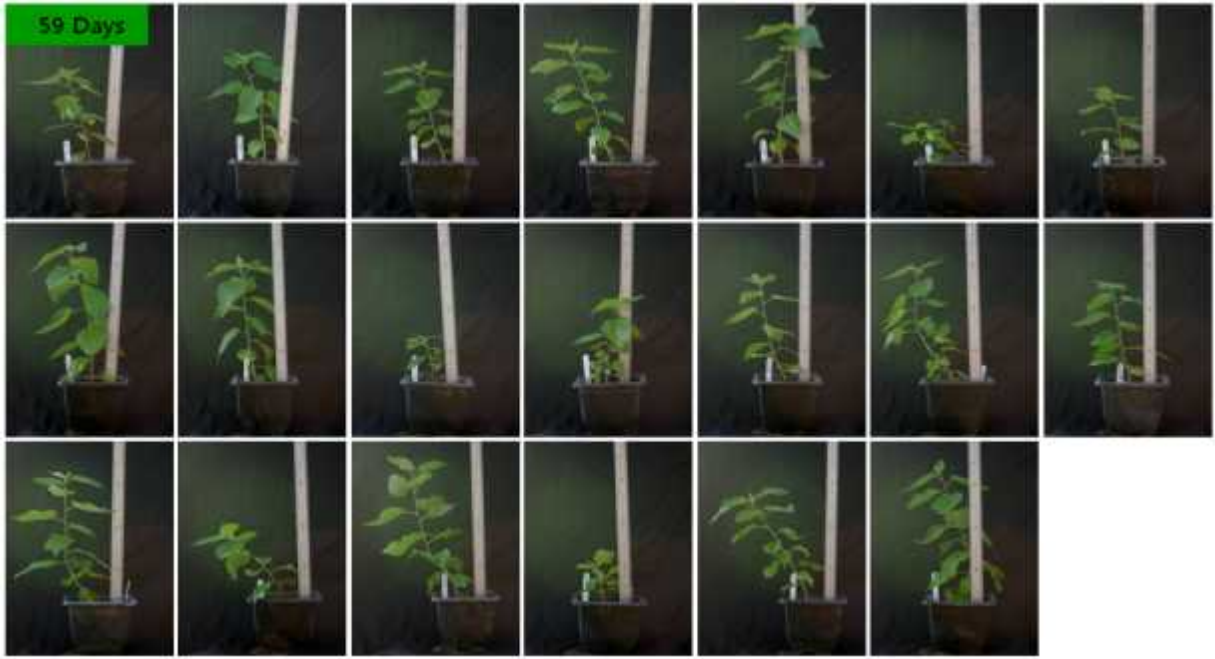


그림 16. FnP507 유전자를 이용하여 형질전환 후 하우스에 순화 중인 포플러 형질전환체 (#1)(2011년 2월).

- FnP507 유전자를 포함하는 vector를 이용하여 형질전환 하여 shoot와 root가 유도된 개체(#2)는 PCR을 통해 검증을 하여 1차 선발하고 순화하여 생육특성을 조사 함(그림 17)
- 또한, FnP507 유전자를 포함하는 vector를 이용하여 형질전환 하여 shoot가 유도된 개체(#3)는 기내에서 root를 유도하고 PCR을 통해 1차 선발하고 순화하여 생육특성을 조사 함(그림 18)

표 6. FnP507 유전자를 이용하여 개발 후 하우스 순화 중인 포플러 형질전환체의 줄기직경과 경장 측정 결과(2011년 2월).

구분	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Stem Diameter</b>	3.97	4.66	3.82	4.48	4.75	2.12	2.94	4.52	4.76	4.19
<b>Height</b>	24.5	27.8	26.2	30.1	35.1	12.9	20.2	34.9	30.9	13.7
구분	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
<b>Stem Diameter</b>	4.40	3.91	4.19	3.91	5.10	3.61	4.74	3.12	4.96	4.61
<b>Height</b>	22.1	28.1	31.4	25.7	32.2	21.5	34.8	12.5	28.8	34.7

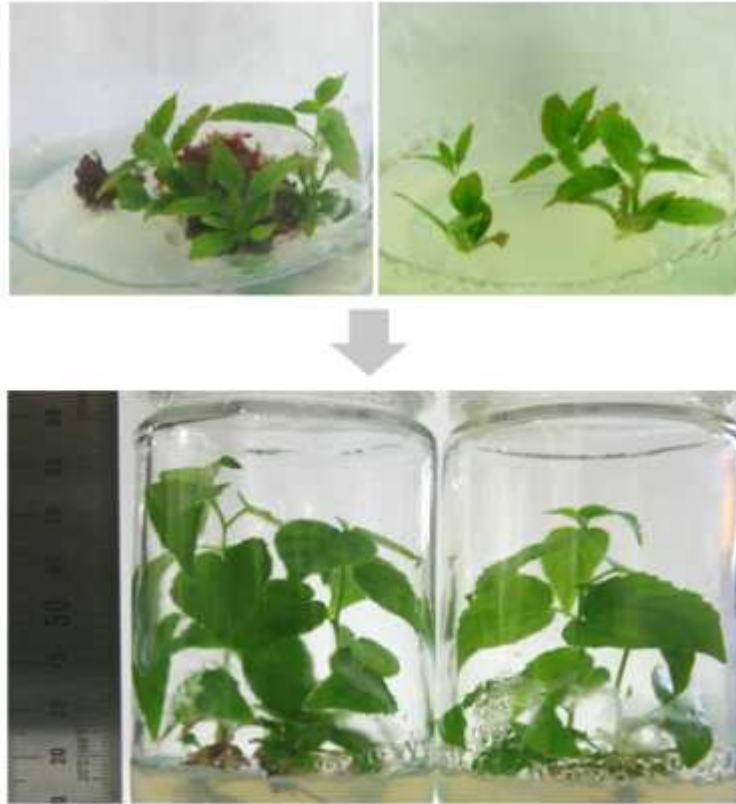


그림 17. FnP507 유전자를 이용하여 재분화된 포플러 형질전환체(#2)(2010년 12월).

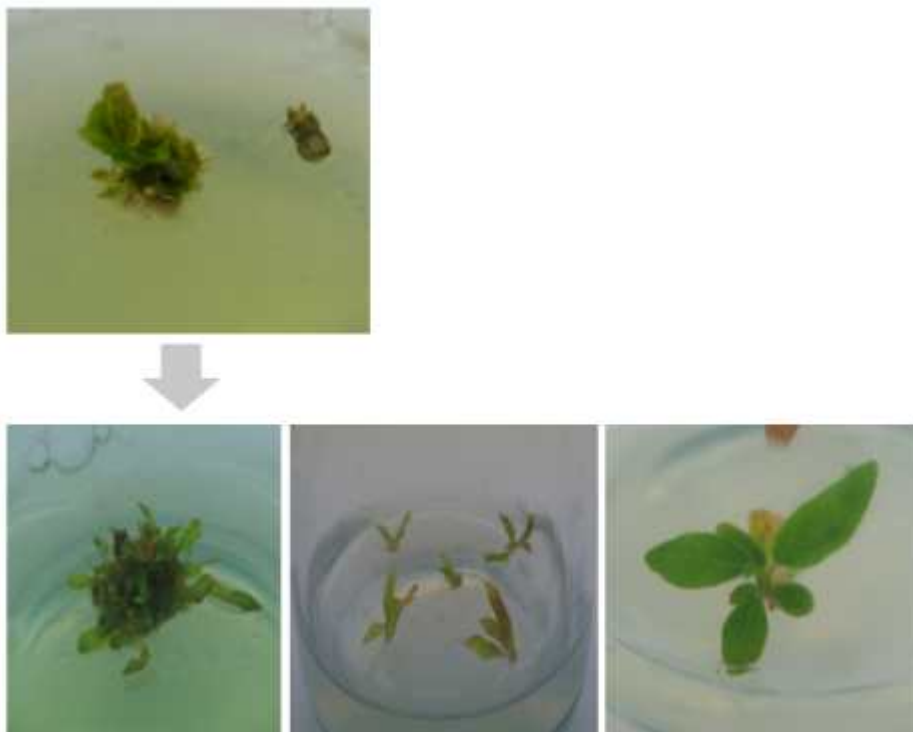


그림 18. FnP507 유전자를 이용하여 shoot를 유도한 포플러 형질전환체(#3)(2010년 1월~2월).

2. FnP501 - FnP511 유전자 Vector를 이용한 포플러 형질전환

- 포플러의 callus 생성 및 형질전환체 유도에 사용한 배지 및 호르몬 조성은 기 보고된 조건(임업연구원, 2002)을 다소 변형하여 최적화하여 사용하였음
- FnP501 - FnP511 vector를 이용하여 포플러 callus 유도, 성장 및 기관분화를 위한 배양 조건 및 배양체계를 확립하였음
- 2차년도에 세부과제로부터 추가로 분양받은 각 벡터를 이용하여 포플러 형질전환체를 유도하였으며, 2차년도 부터 새로운 순수계통을 이용한 유채 형질전환체 개발을 계속하여 진행하였음(그림 19)
- 2차년도에 1차 검증과정을 통해 확인된 유채 및 포플러 형질전환체는 표 7과 같음

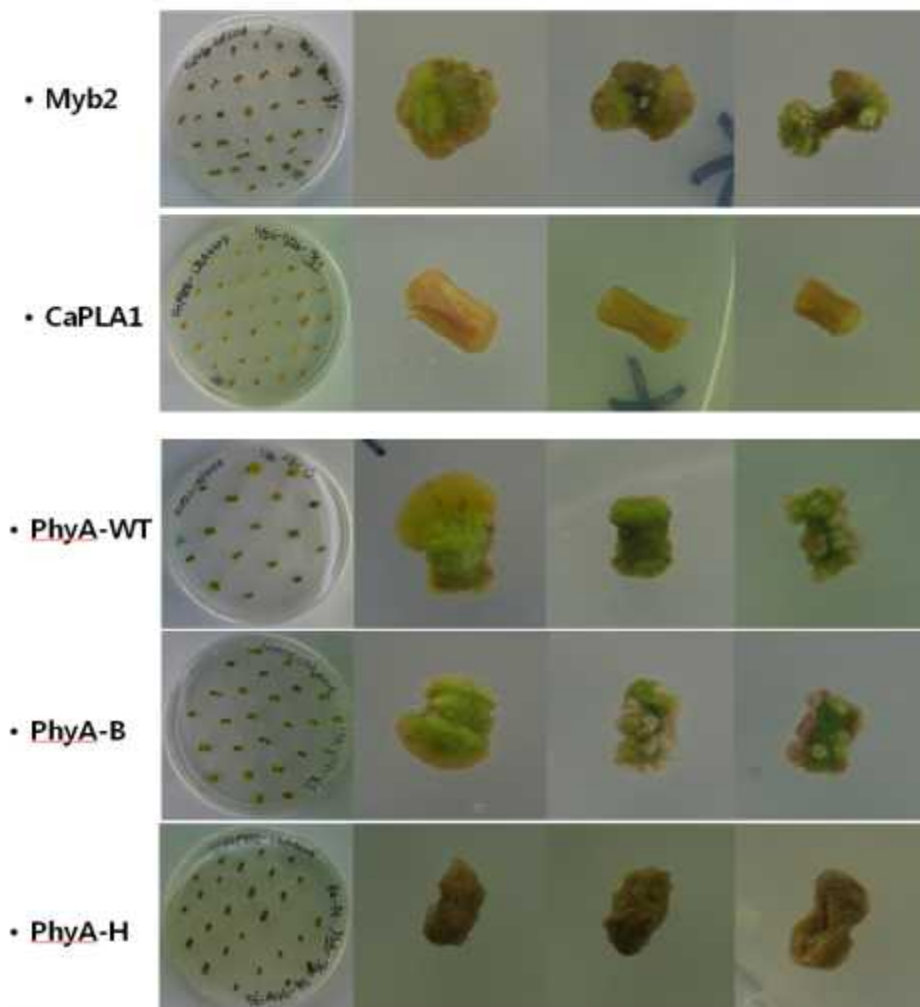


그림 19. FnP501 - FnP511 vector를 이용한 유채 및 포플러의 형질전환체 개발을 위한 탈분화 유도. 각각의 유전자원으로부터 유도된 callus 모습.

표 7. 바이오매스가 증가된 형질전환체 개발을 위한 형질전환체 선발

Gene	Greenhouse	Analysis	<i>In vivo</i>	Sum
CKI1	30	7(Postech)	57	94
CaPUB1	-	-	1	1
RabG3bCA	53	-	33	86

3. FnP501 유전자를 이용한 포플러 형질전환체의 생육 특성

- 줄기의 비대생장과 관련된 FnP501 유전자를 포함하는 vector를 이용하여 포플러 형질전환을 하였고 실외 순화 중 인 포플러는 줄기의 직경과 경장을 측정하여 바이오매스가 증대된 식물체를 선발하고 있음(표 8)
- FnP501 형질전환체와 대조구로 다른 유전자를 이용한 형질전환체(FPM 01) 그리고 wild type(WT)을 순화한지 12일 및 176일 동안 성장한 포플러의 줄기직경과 경장을 측정하여 하였음(표 8)
- FnP501을 이용하여 형질전환된 포플러는 두 대조구의 형질전환체와 초기 생육을 비교한 결과, 바이오매스 증가와 관련된 형태적인 유의차는 보이지 않았음(표 8, 그림 20, 21)

표 8. FbP501을 이용한 형질전환체(CKI1)와 대조구(FPM01, WT)의 줄기직경과 경장(2010년 11월). 식물체는 하우스에 순화된 지 12일 그리고 176일된 형질전환체 및 대조 식물체

Plant		CKI1-1	CKI1-2	CKI1-3	CKI1-4	CKI1-5	CKI1-6	CKI1-7	CKI1-8	CKI1-9	CKI1-10
Stem Diameter (mm)	12 Days	2.71	2.40	2.70	2.72	2.67	3.02	3.26	3.02	2.92	1.87
	176 Days	8.63	8.66	9.73	10.03	9.6	8.84	9.14	10.38	9.82	8.97
Height (Cm)	12 Days	19.25	21.13	23.38	21.92	20.76	15.34	28.02	23.87	19.53	13.77
	176 Days	90.2	89	96	94.2	95.3	70	82	96.8	77	88

Plant	Days	CKI1	FPM01	WT
Stem Diameter (mm)	12 Days	2.74±0.02	2.75±0.02	2.69±0.02
	176 Days	9.38±0.02	9.55±0.03	9.25±0.04
Height (Cm)	12 Days	21.5±0.02	19.5±0.02	18.2±0.12
	176 Days	87.85±0.02	87.9±0.02	87.65±0.09

- 또한, FnP501을 이용하여 형질전환된 포플러 중 초기 생육이 왕성한 7개체는 벡터를 제거한 제 1세부과제에 보내어 분자생물학적인 특성 분석을 수행하였음

- 분자생물학적인 분석결과와 생육특성 분석 결과를 종합하여 바이오매스 증대와 관련된 형질전환포플러를 선발하여 생산성 분석 및 재배특성을 조사하여 "EVENT" 후보로 선발하였음
- 2차년도에 개발되어 순화중인 형질전환체의 경우는 생육이 왕성한 2011년 상반기에 1차 생육조사를 마치고 후보군을 선발하여 벡터를 제공한 세부과제에 보내어 분자생물학적 특성 및 생육특성을 분석하였음

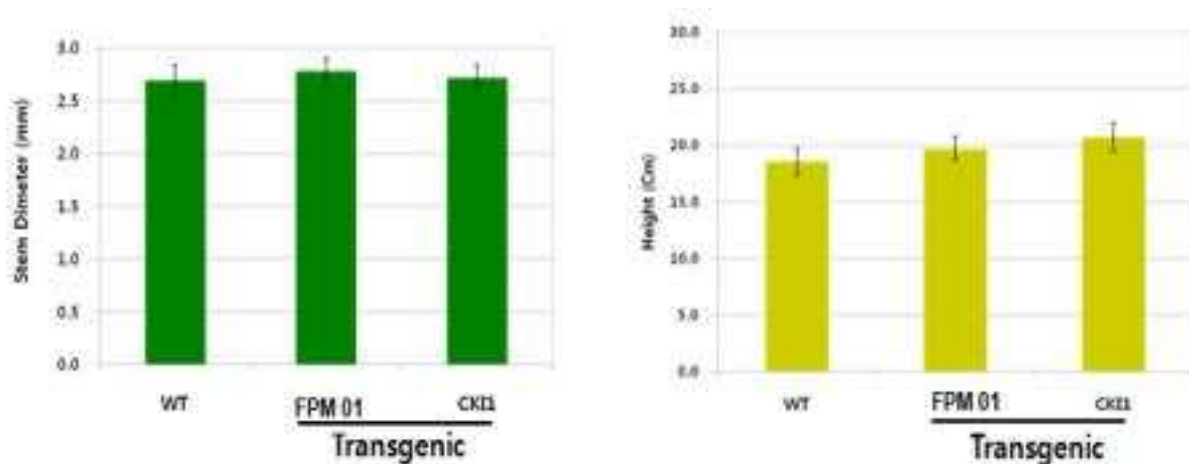


그림 20. 하우스에 순화한지 12일된 식물체 FbP501을 이용한 형질전환체(CKI1)와 대조구(FPM01, WT)의 줄기직경과 경장 비교(2010년 08월).

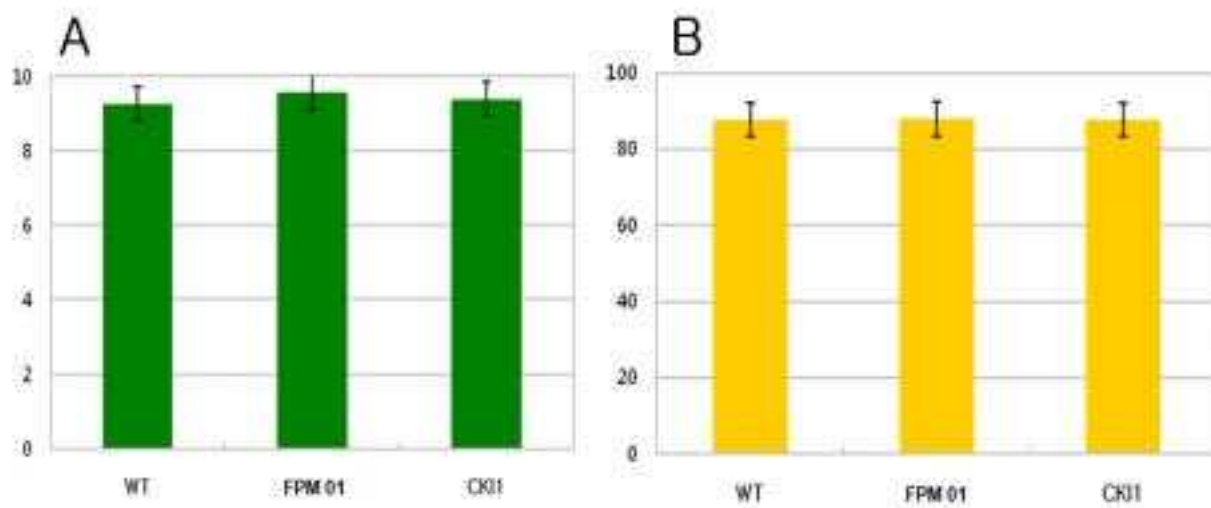


그림 21. 하우스에 순화한지 176일된 식물체 FbP501을 이용한 형질전환체(CKI1)와 대조구(FPM01, WT)의 줄기직경(A)과 경장(B) 비교(2010년 11월).

- 따라서 3차년도 에서는 형질전환된 포플러의 초기(1년 미만) 및 중기(2-3년 생) 생육과정에서 바이오매스 증대와 관련 변화에서 유의성 있는 개체의 선발에 집중하고자 하였음
- 또한, 바이오매스의 증대에서 유의성 있는 개체로 선발된 형질전환체는 분자생물학적 특성을 분석하여 "EVENT" 로 선발하기 위한 조건에 부합되는지를 확인하여 후보 형질전환체를 선발하고자 하였음

[3차년도]

1. 바이오매스 증대를 위한 형질전환체 개발

- 형질전환을 통해 바이오매스가 증대된 형질전환체를 개발하기 위해 유채(*Brassica napus* var. Hanla)와 포플러(*Populus tomentiglandulosa*)를 이용하고자 각각 대상 식물체의 형질전환에 적합한 조건(배지 및 염류 농도, 광조건 등)을 규명하였음(1, 2차년도 완료)
- 3차년도에는 형질전환 대상 식물체를 이용한 지속적인 형질전환체 개발 및 특성을 분석하여 바이오매스가 증대된 형질전환체를 선발하고자 하였음
- 식물의 비대생장과 성장관련 유전자 발현을 조절하는 유전자를 포함한 형질전환 벡터를 *Agrobacterium*-mediated transformation 방법으로 형질전환 하였음
- 바이오매스가 증대된 형질전환체를 개발하기 위해 사용한 유전자 및 특성은 표 9와 같음

표 1. 바이오매스 증대를 위한 유채와 포플러 형질전환에 사용한 유전자 및 특성 목록

No.	Gene Name	Characteristics	Reference
FnP501	CKI1 (Cytokinin-independent 1), At2g47430	CKI1 is involved in cytokinin signal transduction, possibly as a cytokinin receptor	Science. (1996) 274(8):982-5
FnP502	PhyA (PHYTOCHROME A), At1g09570	Light-labile cytoplasmic red/far-red light photoreceptor involved in the regulation of photomorphogenesis	Plant J. (2007) 49(6):1064-75
FnP503	Hyperactive PhyA	S598A (mutagenic site)	
FnP504	Bathochromic PhyA	F307R/C371A (mutagenic site)	
FnP505	CaPUB1 ( <i>C. annuum</i> putative U-box protein)	effectively altering cell and tissue growth and also the response to abiotic stresses (water stress and mild salinity)	Plant Physiol. (2006) 142(4):1664-82
FnP506	CaPLA1 ( <i>C. annuum</i> phospholipase A1)	participate in a subset of positive control mechanisms of cell and tissue growth	Plant J. (2008) 53(6):895-908
FnP507	RabG3b (Rab GTPase)	a modulator for cell death progression during pathogen response and senescence process in plants	J. Plant Biol. (2009) 52(3):79-87
FnP508	RabG3b CA (small GTPase in Arabidopsis)	-A modulator for cell death progression during pathogen response and senescence process in plants - Point mutation of RabG3b (Q67L) - Regulated HR-PCD	J. Plant Biol. (2009) 52(3):79-87



FnP510	Methyltransferase (At5G40830)	Related to growth (mass)	2차년도 추가
FnP511	PNC2 (At5G27520)	Related to growth (mass)	2차년도 추가
FnP05	Myb2 (MYB domain protein 2)	transcription factor Myb2 related to senescence process	Personal communication

## 2. 유체의 형질전환체 개발

- FnP05 vector를 이용하여 유체 callus를 유도 하였고, 성장 및 기관분화를 위한 배양조건 및 배양 체계를 확립하여 지속적인 형질전환체를 개발하였음(그림 22, 표 10)

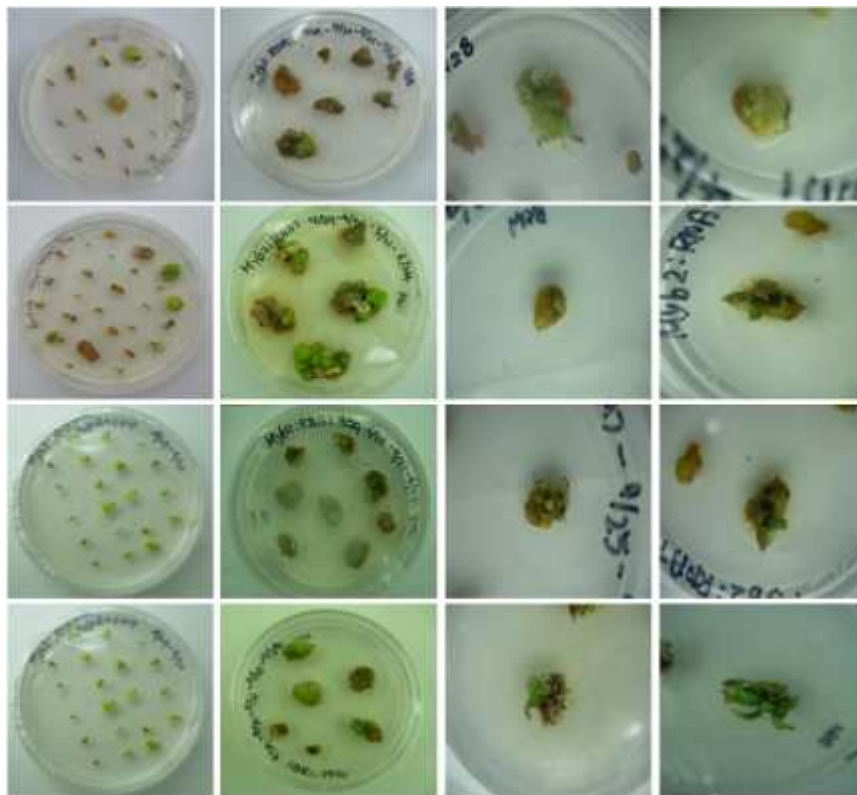


그림 22. FnP05(MYB2) vector를 이용한 유체의 형질전환체 개발을 위한 탈분화 유도.

표 10. 바이오매스가 증가된 유체 형질전환체 개발을 위한 형질전환체 선발

FnP05 (MYB2)	치상	캘러스 유도배지	shoot 유도배지	shoot 확인	순화
	200	80	65	2	-
	200	182	122	-	-
	200	100	70	1	-

	250	100	55	1	-
--	-----	-----	----	---	---

3. 포플러의 형질전환체 개발

○ 포플러 형질전환용 벡터 FnP501 -FnP510 총 10개 벡터 중 FnP508, 509, 510을 제외한 7개 벡터를 이용한 형질전환체 제작을 진행하였음(그림 23, 표 11)

3-1. 형질전환체 유도 및 개발

Vector List	PROCESSING					형질전환 식물체	PCR 분석
FnP501 mass						31개체 확보	분석완료
FnP502 mass						Shoot-4개	-
FnP503 mass						Shoot-6개	-
FnP504 mass						Shoot-8개	-
FnP505 mass						3개체 확보	분석완료
FnP506 mass						Shoot-1개	-
FnP507 mass						59개체 확보	분석완료
FnP509 mass						-	-
FnP510 mass						-	-

그림 23. FnP501 - FnP 510 vector를 이용한 포플러 형질전환체 개발을 위한 탈분화 유도. 보유 벡터

10개에 대한 포플러 형질전환체 개발을 진행하였음.

표 11. 바이오매스가 증가된 형질전환체 개발을 위한 포플러 형질전환체 선발

단계	FnP501	FnP502	FnP503	FnP504	FnP505	FnP506	FnP507	FnP509	FnP510
치상	-	-	-	-	-	-	-	250	250
캘러스 유도배지	53	17	184	217	72	67	48	-	-
shoot 유도배지	17	93	133	93	73	10	16	-	-
shoot확인	2	4	6	8	1	1	3	-	-



순화 후 온실생육	31	-	-	-	3	-	59	-	-
--------------	----	---	---	---	---	---	----	---	---

3-2. FnP501 (CKI1) 유전자를 이용한 포플러 형질전환체의 표현형 분석

- 1차년도와 2차년도에 개발한 FnP501백터의 형질전환 개체는 LMO 재배 비닐하우스에서 생육특성을 조사하였음(그림 24, 25)
- 생육특성 조사로써 성숙된 형질전환 포플러와 야생형 포플러의 표현형을 분석하였음(그림 26, 표 12)
- 형질전환체와 대조구 야생형의 줄기직경은 유의차가 없었으나, FnP501 형질전환체의 경우, 분지수가 약 2배 정도 많은 특성을 가지고 있음(표 12)
- CKI1 형질전환 포플러의 Hardening 후 416일, 387일, 203일에 경장을 측정하였음(그림 27)

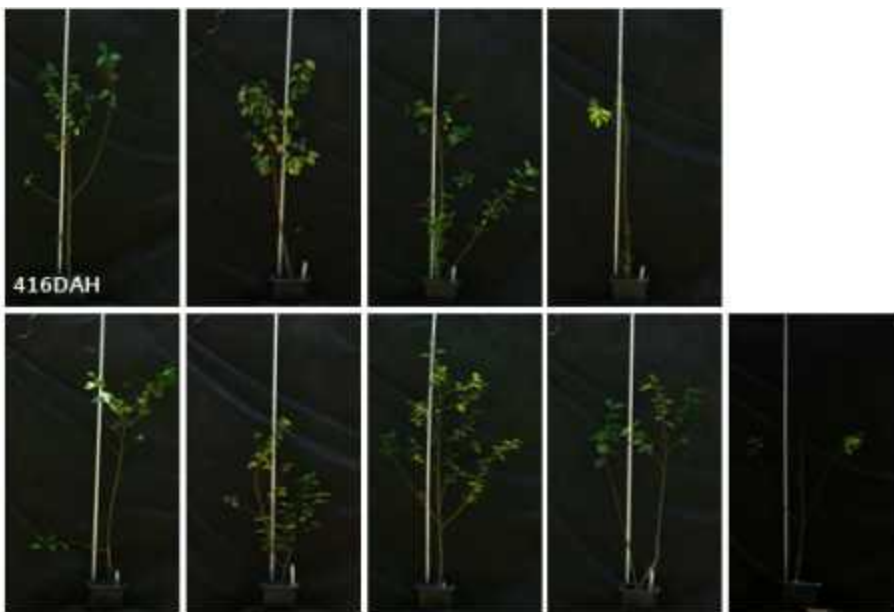


그림 24. 형질전환체 개발에 사용된 FnP501(CKI1) 유전자를 이용하여 제작된 포플러 형질전환체의 Hardening 후 416일의 표현형 분석.



그림 25. FnP501을 이용하여 제작된 포플러 형질전환체의 Hardening 후 387일의 표현형 분

석.

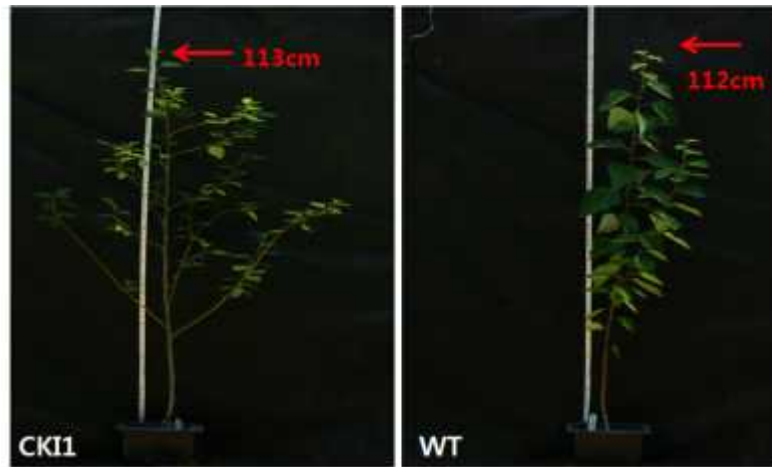


그림 26. Hardening 후 416일이 지난 FnP501(CKI1) 형질전환체와 WT 식물체의 표현형을 비교한 결과, CKI1식물체의 가지 수가 WT 식물체보다 증가 된 것을 확인하였음.

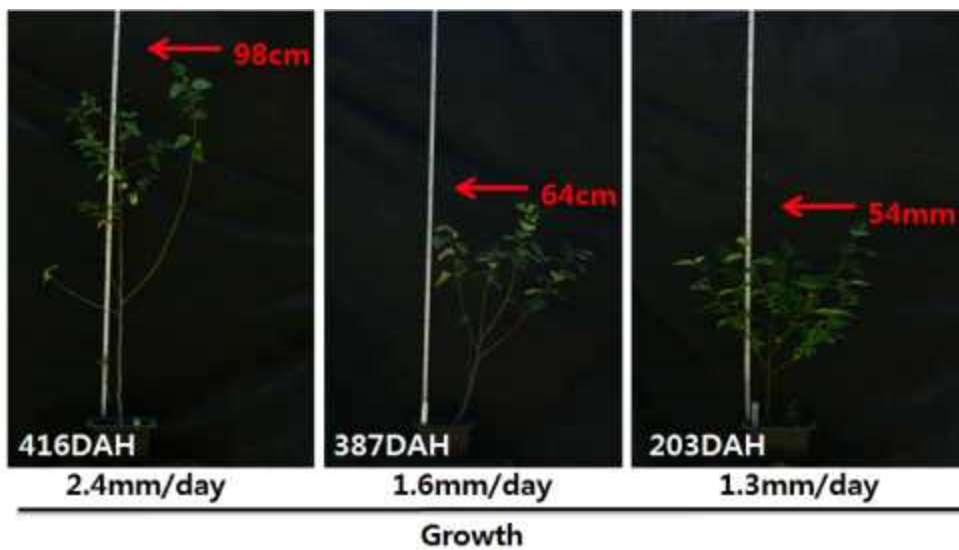


그림 27. FnP501(CKI1) 형질전환 포플러의 Hardening 시기에 따른 성장 패턴을 보기위해 Hardening 후 416일, 387일, 203일에 경장을 측정하였음. FnP501 형질전환체의 일부는 분자 생물학적 분석을 위해 제1세부과제(유전자 공여과제)에 제공하여 형질을 교차확인 하기 위해 분석하였음

표 12. FnP501(CKI1)과 WT 포플러의 지름과 가지 수 비교

Measurement	WT	CKI1
Stem Diameter (mm)	8.59±0.12	8.61±0.13
Number of Branch (EA)	3.70±2.3	6.30±2.5

n=34 of CKI1 and 35 of WT.

### 3-3. FnP507 유전자를 이용한 포플러 형질전환체의 표현형 분석

○ RabG3b CA(FnP507-01, 02, 03) 유전자를 이용한 포플러 형질전환체의 생육 시기에 따른 표현형을 조사하였음(그림 28, 29, 30)



그림 28. RabG3b CA(FnP507-01) 형질전환 포플러에 대한 Hardening 후 218일의 표현형 분석.

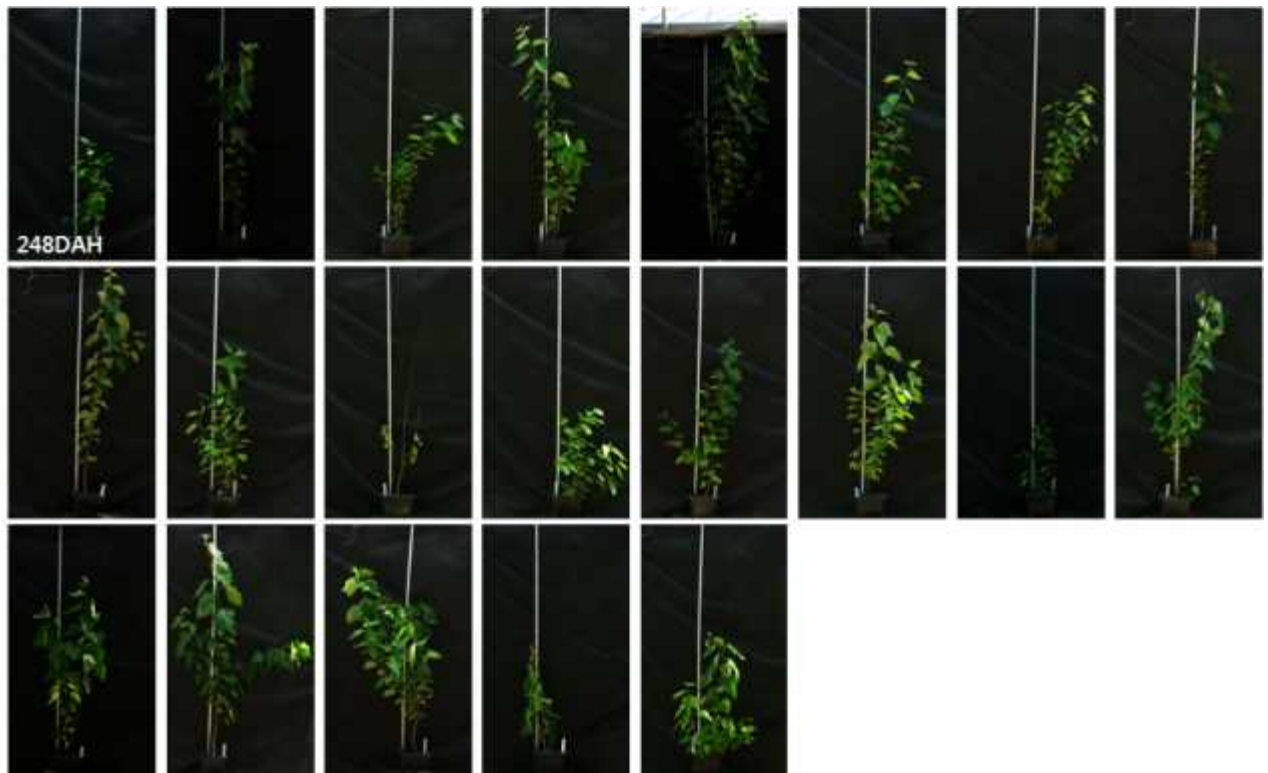


그림 29. RabG3b CA(FnP507-01) 형질전환 포플러의 Hardening 후 248일의 생육 및 표현형 조사.

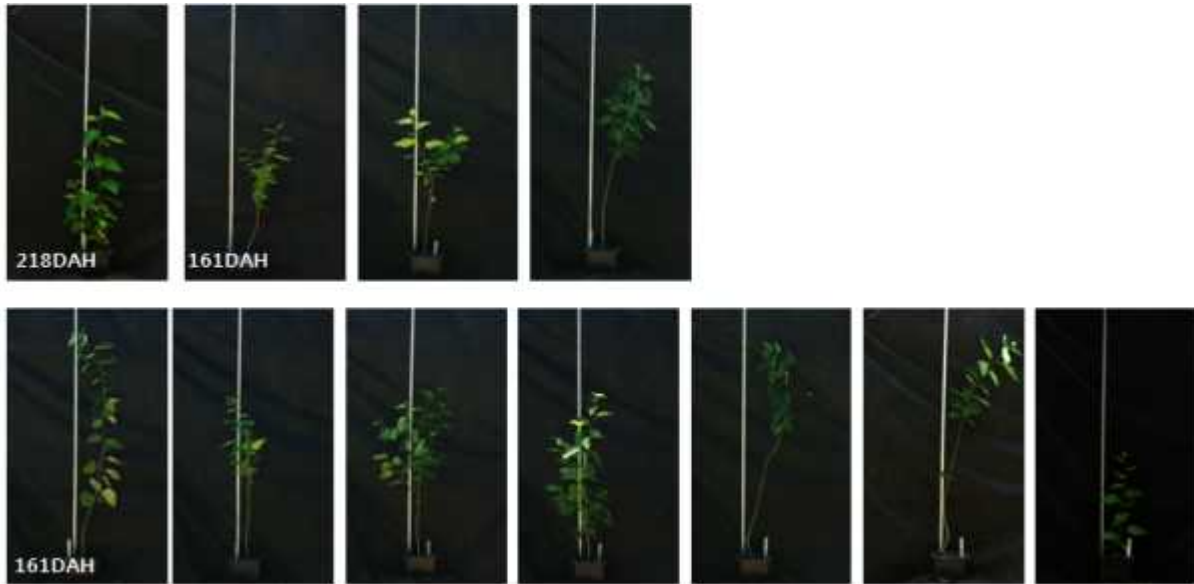


그림 30. RabG3b CA(FnP507-02, Top)와 RabG3b CA (FnP507-03, Bottom)에 대한 생육 시기에 따른 표현형을 조사하였음.

- FnP507 형질전환체의 경우, 대조구와 FnP501 형질전환체에 비해 길이생장이 우수한 특성을 나타내었음(표 13)

3-4. FnP501과 FnP507 포플러 형질전환체의 표현형 비교 분석(그림 31-34, 표 14-15)

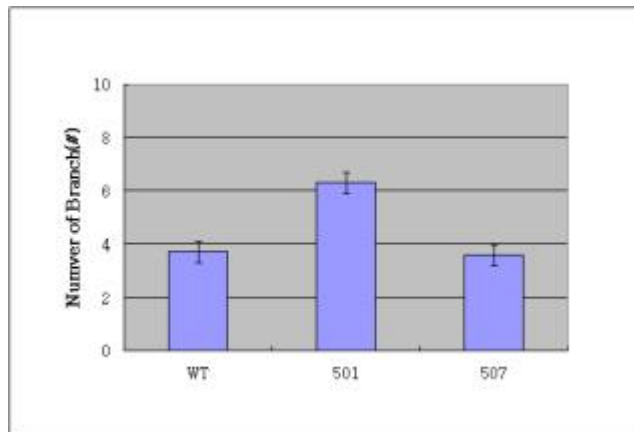


그림 31. FnP501(CKI1)과 FnP507(RabG3b CA) 3개 라인에 대한 가지 수를 비교에서 FnP501 형질전환체의 분지수가 월등히 높아 바이오매스 증대가 기대 됨.

표 13. 야생형 포플러와 형질전환 포플러(CKI1, 507-01.02.03)의 경장 비교

Plant	Average of Length (mm)	Growth ratio (mm/day)
WT	73.8±1.76	2.4±0.17
CKI1	71.8±1.75	2.2±0.17
507-1	82.7±1.83	3.6±0.14
507-2	76.3±2.21	4.3±0.20
507-3	92.8±2.62	5.6±0.20

Mean±SE.

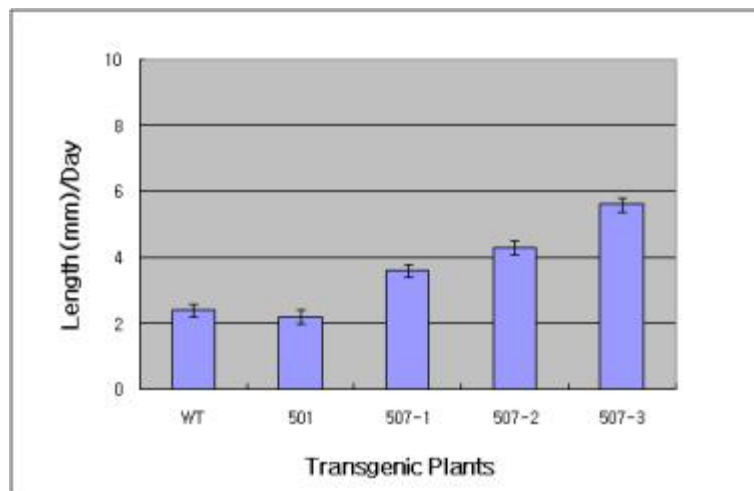


그림 32. FnP501(CKI1)과 507라인들에 길이 생육을 측정 한 결과, FnP507 형질전환체의 길이 생육이 우수하여 지속적인 생육특성을 분석하여 바이오매스 증대용 후보라인을 선발하였음 (그림 24, 표 15).

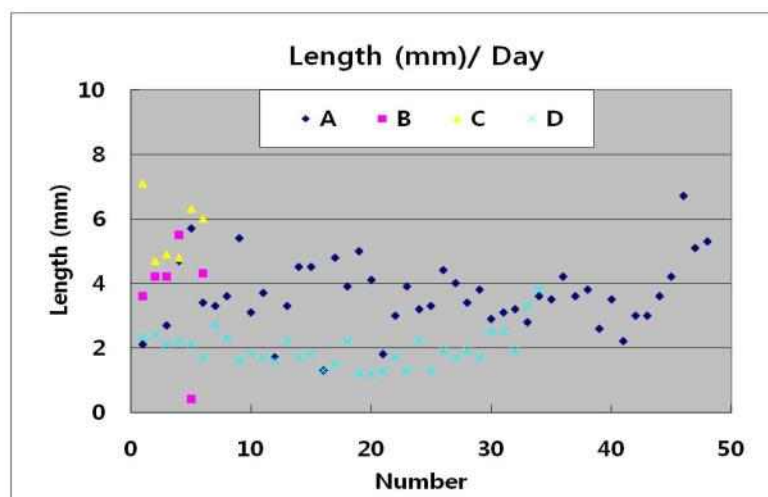


그림 33. 형질전환 포플러의 유전자별(CKI1, RabG3b CA) 1일 길이생장 측정. A; 507-1, B; 507-2, C; 507-3, D; CKI1.

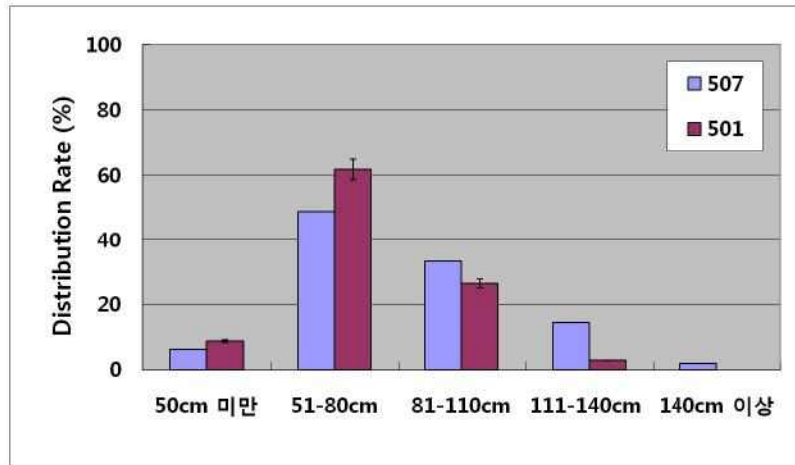


그림 34. 포플러 형질전환체 별(CKI1: 501, RabG3b CA:507)의 길이생육 분포 분석.

### 3-5. FnP505 포플러 형질전환체의 표현형 분석

- CaPUB1(FnP505)에 대한 포플러 형질전환 식물 3개체에 대한 표현형을 분석하였음(그림 35)



그림 35. FnP505(CaPUB1)의 형질전환 포플러를 개발하여 LMO 재배포장에서 생육중인 형질전환체.

### 3-6. FnP501, FnP505, FnP507 포플러 형질전환체에 대한 PCR 검정

- 바이오매스 증대와 관련 있는 유전자를 이용하여 개발된 생육 및 표현형적 특성을 조사 중인 형질전환체의 분자생물학적 특성은 도입유전자의 안정적인 발현과 도입유전자의 삽입부위를 확인하고 있음(그림 36)

표 14. FnP501, FnP507을 이용한 포플러 형질전환체에 대한 줄기 굵기 및 길이생육 관련 표현형

FnP501		
No.	줄기 굵기	길이
1번	11.65	98
2번	10.36	103
3번	8.32	89
4번	9.5	92
5번	9.08	91
6번	9.11	72
7번	11.14	113
9번	9.44	96
10번	10.04	69
11번	6.6	71
12번	10.4	68
13번	9.4	64
14번	10.4	88
15번	10.92	67
16번	9.89	73
17번	7.92	52
19번	8.68	59
20번	11.57	88
22번	10.18	47
23번	9.51	48
25번	7.59	54
26번	7.25	68
27번	8.68	52
28번	9.85	88
29번	7.95	54
30번	7.43	69
32번	8.76	62
36번	6.16	69
39번	6.88	61
42번	6.03	79
43번	5.87	51
44번	5.42	39
45번	5.55	69
46번	5.48	79

FnP507		
No.	줄기 굵기	길이
1번	7.81	53
2번	9.38	106
3번	6.92	67
4번	9.66	117
5번	10.78	143
6번	7.93	85
7번	8.08	82
8번	7.86	91
9번	11.77	134
10번	5.53	79
11번	10.5	93
12번	7.98	44
13번	11.24	83
14번	9.7	112
15번	9.38	113
16번	7.67	33
17번	11.4	120
18번	8.03	98
19번	9.92	124
20번	10.2	104
21번	5.08	46
22번	7.5	67
23번	4.31	68
25번	5.75	71
26번	5.5	72
27번	9.52	98
30번	7.32	89
31번	6.5	76
33번	5.64	83
35번	5.37	64
37번	5.8	69
39번	6.43	70
40번	5.21	62
41번	7.76	79
42번	5.8	77
43번	5.62	93
44번	6.7	79
45번	8.8	83
46번	5.04	58
47번	7.35	78
48번	6.96	49
50번	5.63	66
51번	4.32	67
53번	6.33	79
54번	7.21	68
55번	8.32	108
56번	8.02	83
57번	8.11	86

표 15. FnP501과 FnP507 형질전환체의 길이생장 분포 분석



길이 분포	FnP501		FnP507	
	수량	비율	수량	비율
50cm 미만	3	8.80%	3	6.30%
50-80cm 미만	21	61.80%	21	43.80%
80-110cm 미만	9	26.50%	16	33.30%
110-140cm 미만	1	2.90%	7	14.60%
140cm 이상	0	0	1	2%

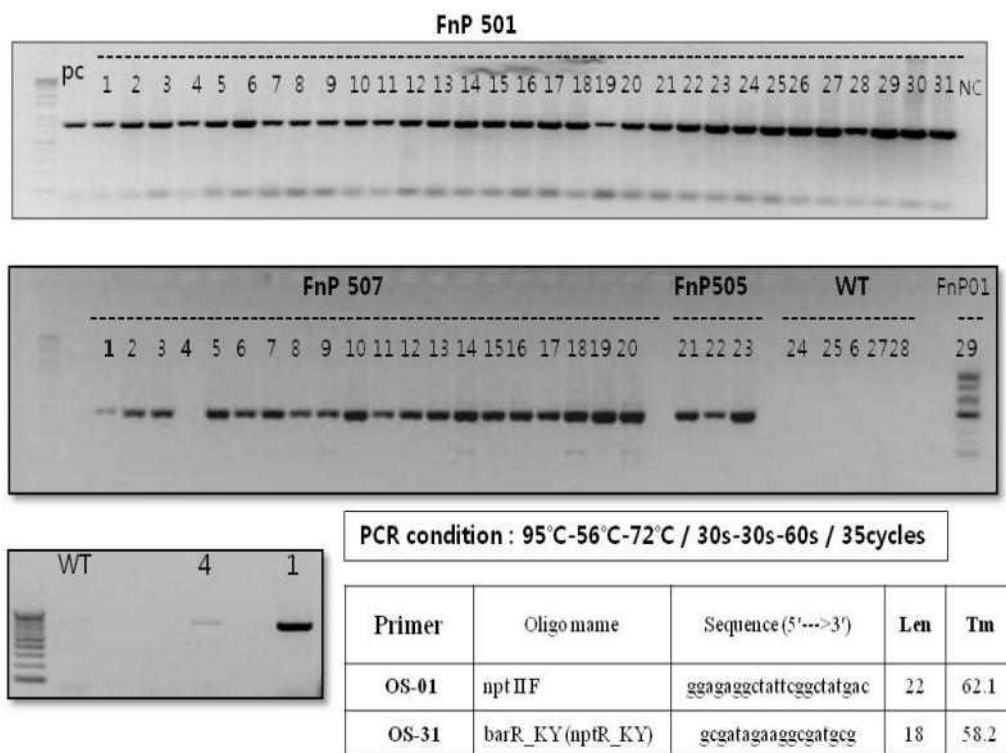


그림 36. FnP501(31개체), FnP505(3개체), FnP507(20개체)에 대한 분자생물학적 분석으로 벡터특이 primer를 이용하여 PCR 분석.

- Hardening 후 포장에서 생육중인 형질전환체의 PCR 검정에서 기내에서 PCR 발된 결과와 일치하여 도입된 유전자가 안정적으로 발현되고 있음을 확인
- 개발된 FnP501, 505, 507 형질전환체의 insertion site를 확인하기 위해 inverse PCR(iPCR)을 수행하여 확보된 산물의 염기서열을 분석하였음
- 형질전환체의 유전자 삽입위치가 확인되면, 유전자의 interfering 여부와 생물학적 기능을 확인하기 위해 유전자 제공 세부과제에 전달하여 분석을 수행함
- 앞으로는 포장에서 추가적인 생육특성과 분자생물학적 특성 분석 결과를 종합하여 바이오매스 증대용 “Event”를 선발하고자 함

[4차년도]

4-1. 선발된 포플러 형질전환체의 도입 유전자 위치 확인 및 안정적인 발현

○ 본 과제 제 1단계(2009-2011)에서 선발된 후보 형질전환체(그림 37)의 산업화를 위한 준비 단계로 이벤트 확정을 위한 본 과제의 연구 개발 내용 및 목표는 그림 38와 같음



그림 37. 바이오매스 증대를 위한 포플러 형질전환체.

산업화 추진 단계	I. 형질전환체 개발	II. 이벤트 선발	III. 위해성 심사
선행결과물 및 당해 목표	- 바이오매스 증대 관련 유전자 확보 - 형질전환체 개발확보	- 목표 형질 발현 분석 - 이벤트 요소 분석 - 포장실험 실시	- 이벤트 확보 - 노지재배실험 승인 및 실험
세부 연구내용 및 결과물	- 바이오매스 증대 관련 형질전환체 개발 - 유전자: CKI1, CaPUB1, RaG3b - 목표 형질발현 분석을 통한 이벤트 후보 선발	- CKI1 포플러 형질전환체의 목표 형질의 유의성 있는 증대 및 안정적 발현 확인 - 삽입 유전자 위치와 copy 수 확인 - 분자생물학적 특성 및 목표형질 발현의 안정성 조사 - 최종 이벤트 확정	- 환경 및 인체 위해성 심사를 위한 자료 수집 - 목표시장에 따라 추가적인 위해성 자료 확보 - 재배 승인 심사서 제출 및 재배 승인
과제 추진 내용	1 단계 3년 결과 완료 [2009-2011]	2단계 2년 추진 [2012-2013]	추가 소요예산 확보 필요

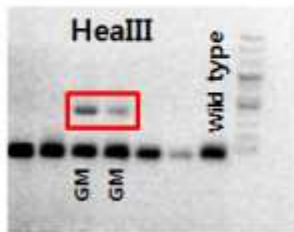
그림 38. 본 과제 2단계(2012-2013)에서는 선발된 형질전환체의 분자생물학적 특성 분석(1세 부과제와 협력)과 안정적인 형질발현 특성 조사를 통해 최종 이벤트를 선발하고자 함.

○ 형질전환체의 도입 유전자의 위치와 안정적인 발현을 조사하기 위해 도입 유전자 specific

primer를 제작하여 분석하였음

- 각 형질전환체의 genomic DNA를 template로 하여 확보한 밴드의 염기서열을 분석하여 insertion site를 확인하였음(그림 39-41)
- Cytokinin-independent 1(CKI1, 501) 유전자 형질전환 포플러로부터 확보한 iPCR 염기서열을 BLAST search하여 포플러의 genomic DNA임을 확인하였음
- 형질전환체 505는 *C. annuum* putative U-box protein (CaPUB1) 유전자가 도입된 포플러로 iPCR 결과 및 flanking region 분석에서 당초 선발된 포플러 형질전환체임이 재확인되었음
- 포플러 형질전환체 507은 Rab GTPase (RabG3b) 유전자가 도입된 형질전환체로 iPCR에 의해 분석하였음

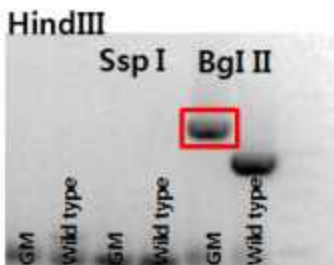
### 501RB (Hea III)



(501RB 방향 174bp)

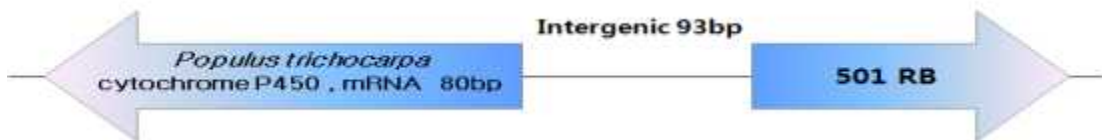
```
GGCCTCTTGAAGATGATTTGAAGGAACACTGTGATAAACAA
GAGGATAAAGATGGCAAGAACATATTGAATGGCACTCATGG
AGTCCGCTTACTGAAAAGCTGGTTAAAAAGCAAACAYTGGGG
TGGTTTAAGMTAAATTTGTGGTGTAAACAAATTGACGCTGGG
GAAAGGGCAG <----- FnP501 RB-----
----->
```

### 501LB (Bgl II)



(501LB 방향) CACAATATATCCT

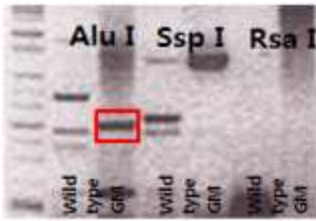
```
GCCACCAGCCAGCCAACAGCTCCCCGACCGGCAGCTCG
GCACAAAATCACCCTCGATACAGGCAGCCCATCAGTCC
<----- FnP501 LB----->
GACGGCGTCAGCGGGAGAGCCGTTGTAAGGCGGCAGAC
TTTGCTCATGTTACCGATGCTATTTCGGAAGAACGGCAACT
AAGCTGCCGGGTTTGAACACGGATGATCTCGCGGAGGG
TAGCATGTTGATTGTAACGATGACAGAGCGTTGCTGCCTG
TGATCAAATATCATCTCCCTCGCAGAGATCCRAATTATCAG
```



*Populus trichocarpa* cytochrome P450 (CYP705B2), mRNA  
 Length=1964  
 Score = 131 bits (144),  
 Expect = 2e-27  
 Identities = 77/80 (96%),  
 Gaps = 0/80 (0%) Strand=Plus/Minus

그림 39. CKI1(501) 유전자 형질전환 포플러의 insertion site 확인 및 주변 염기서열 분석.

### 505RB (Alu I)



(505RB 방향 398bp)

```
AGCTTTTACTATTTACATGAATATTTTCAGCTTTTCTAATTTTATTTTTTATATA
TTTTTATCATTTCATCATCAAATFATAATCAACGGTTATTTAGATTATCCTT
AAACCAACTAGGTTGACTAAACCACGTTAAGAAAATTCCAAATCGTTAATTT
TAAACTTGAGTTGTACAATAAGTCAGCTTGAGAGATTTATTTTTCAATCTCATT
CGTATTTTTTTTTATTAGTTATCTAGTTGTTTTTATATTAACAGGCTAAGTT
GTATTTGAGTAATTTTCGTATGTTTACATTTTAAATCTAGATGGAAAAGAAAAG
ATTTGGGATGAGATATTTTTTCTCTTCAATTTTTTCTGTATCTTTTTTAAC
TAAATTATCTTGAACCTCAAACACTGATAGTTTAAACTGAAGGCGGGAAACGA
CAATCTGATCTGAGCGGAG <----- FnP505 RB ----->
```

*Populus trichocarpa* clone POP064-E05, complete sequence

Length=93762

Score = 89.7 bits (98),

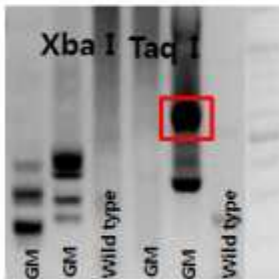
Expect = 2e-14

Identities = 163/232 (70%),

Gaps = 5/232 (2%) Strand=Plus/Plus

그림 40. *C. annuum* putative U-box protein(CaPUB1, 505) 유전자 형질전환 포플러의 insertion site 확인 및 주변 염기서열 분석.

### 507RB (Taq I)



(507 RB 방향 113bp)

```
TKTTAAATATATTTAAAGTTAAATCGACTAAAAGGATAACGAAGTTAA
TCAACTCAAGTCTAGTCAAGGTCAATATTTTTTGTGTGGATCAACTTA
AAACAAGCTAAGGCTCT <----- FnP507 RB ----->
```

그림 41. Rab GTPase(RabG3b, 507) 유전자 형질전환 포플러의 insertion site 확인 및 주변 염기서열 분석.

- iPCR로 확보한 염기서열 분석에서 형질전환체 501과 505는 포플러의 genomic DNA로 확인되었으며, 507은 분석된 염기서열의 정확한 확인을 위해 추가 확보를 위해 계속 분석 중에 있음
- 형질전환체의 insertion site와 flanking region의 분석이 완료되면 이벤트를 선발하기 위한 조건(기능 유전자 내에 삽입되지 않고 intergenic region에 single copy로 삽입)에 부합되는지를 확인하여 이벤트를 선정하고자 함
- 형질전환체의 도입 유전자의 안정적인 발현 여부를 확인하기 위해 iPCR 결과 확보된 genomic DNA 염기서열과 도입 유전자의 염기서열을 이용한 specific primer를 제작하였음
- 두 개의 primer를 조합하여 수행한 PCR 산물을 이용하여 형질전환체 및 안정적 발현을 검정할 수 있음
- 새로 확립된 검정방법을 이용하여 선발된 형질전환체를 분석할 결과, 선발된 형질전환체



모두 도입 유전자가 안정적으로 발현되고 있음이 확인되었음(그림 42)

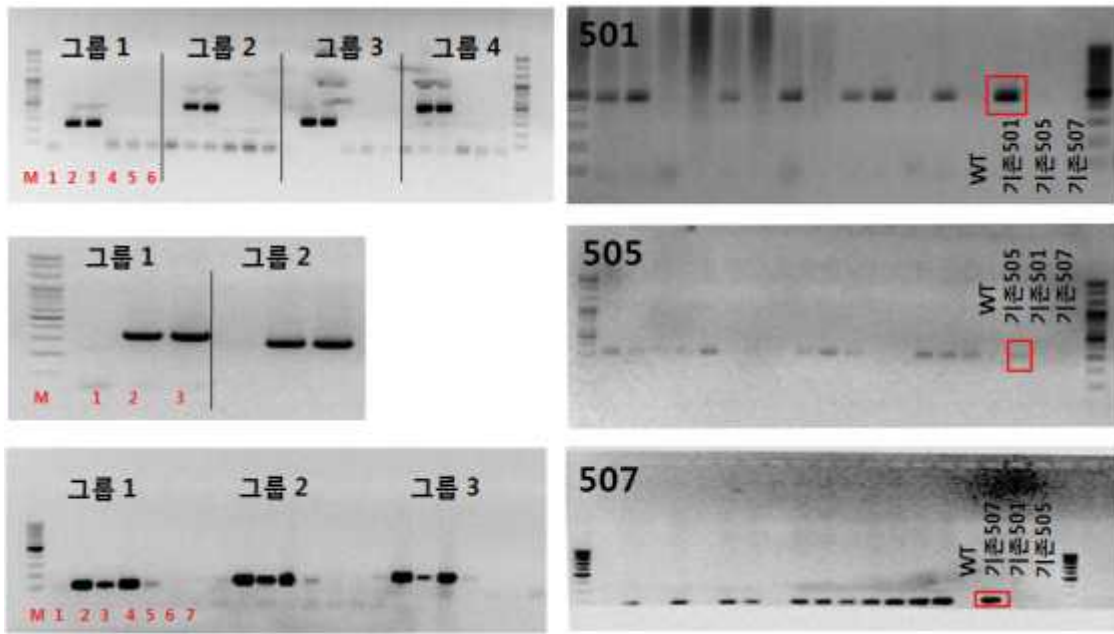


그림 42. 형질전환 벡터와 genomic DNA specific primer 조합(붉은색)을 이용한 형질전환체 검정 및 발현 확인. 벡터 특이 primer 조합(왼쪽) 및 형질전환체 검정 결과(오른쪽).

#### 4-2. 바이오매스 공정효율 검정을 위한 조직 구성성분 분석

- 첫째, 바이오매스 증대는 단위 시간당 총 중량(weight) 또는 총 부피(mass)의 증가와 같은 표현형적인 증가
- 둘째, 바이오매스 증대로는 바이오에너지원으로 전환 가능한 원료의 화학적 조성의 변화에 따른 증가
- 셋째, 성장속도의 단축에 따른 순환 시간의 단축에 따른 증가 등으로 구분할 수 있음
- 따라서, 형질전환 포플러의 바이오매스 전환 공정의 효율성을 확인하기 위하여 선발된 형질전환체의 lignin과 cellulose 함량을 분석하였음
- 형질전환체의 화학적 바이오매스 증대와 관련된 분석의 일환으로 유기원소 구성 요소인 탄소, 수소 그리고 질소의 함량을 형질전환체와 수령에 따라 비교 분석하였음
- 유기원소 함량비교는 표 16에 제시된 바와 같이 형질전환체 간의 약간의 차이는 있으나 유의성은 발견되지 않음

표 16. 형질전환체와 수령에 따른 유기원소의 함량 분석

Sample	WT		501		507	
Year	1	2	1	2	1	2
C	45.3±0.13	46.5±0.08	47.8±0.04	47.5±0.17	45.1±0.04	47.2±0.12
H	6.6±0.10	6.2±0.22	6.6±0.01	6.3±0.07	6.2±0.09	6.4±0.04
N	1.4 ±0.11	1.3 ±0.05	2.2 ±0.04	1.7 ±0.18	1.4 ±0.12	1.5 ±0.11
C:H:N	85:12:3	86:12:2	84:12:4	86:11:3	86:12:3	86:12:3

- 산림 바이오매스를 이용한 공정에서 lignin은 공정의 효율 증대를 위해 적게 함유되어야 하고, 당화과정을 통해 에탄올로 전환되는 cellulose 함량은 높아야 함
- 따라서 바이오매스 공정 효율을 검정하기 위한 1단계 검정으로 lignin과 cellulose 함량을 형질전환체와 수령에 따라 비교하였음
- 먼저, 형질전환체에 따른 바이오매스 공정의 효율성 검정으로 lignin과 cellulose 함량을 비교한 결과, 1년생에서는 형질전환체(501, 507)에서 cellulose 함량이 높았음(그림 43)

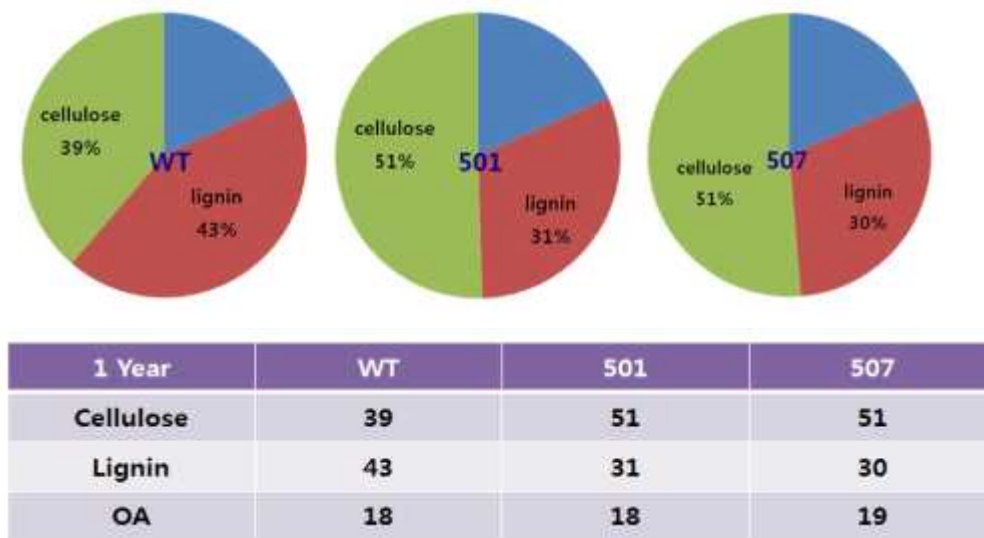


그림 43. 형질전환체에 따른 lignin과 cellulose 함량 비교. 파란색 부분은 유기산(OA) 등 수용성 물질의 함량.

- 2년생 형질전환체를 이용한 lignin 및 cellulose 분석은 그림 50과 같이 형질전환체와 수령에 따라 차이가 확인되었음

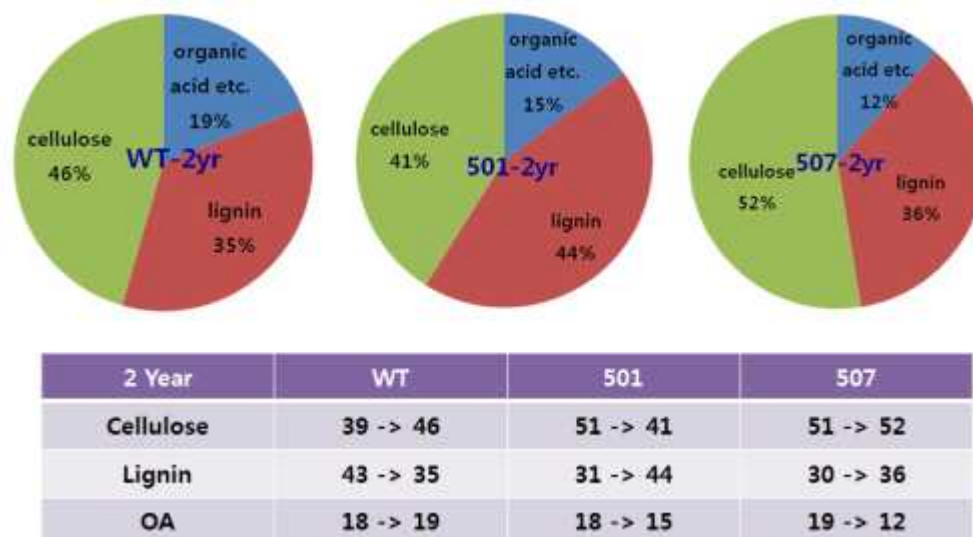


그림 44. 2년생 형질전환체의 lignin과 cellulose 함량 비교. 표의 화살표는 1년생에서 2년생의 변화.



- 대조구는 2년생에서 cellulose의 함량은 7% 증가하였고, lignin의 함량은 8% 감소하여 수령의 증가에 따라 cellulose 함량이 증가하는 것으로 나타났음
- 반면에 501 형질전환체는 cellulose 함량은 감소하고 lignin 함량은 증가하였음
- 507 형질전환체는 2년생에서 lignin과 cellulose 함량이 모두 증가하였음
- 이와 같은 lignin과 cellulose 함량 변화가 형질전환체 또는 수령에 따른 유의성 있는 변화 인지를 지속적으로 분석하여야 할 필요성이 있음
- 다년생 포플러와 일년생 유채의 lignin과 cellulose 함량 비교는 그림 45과 같음

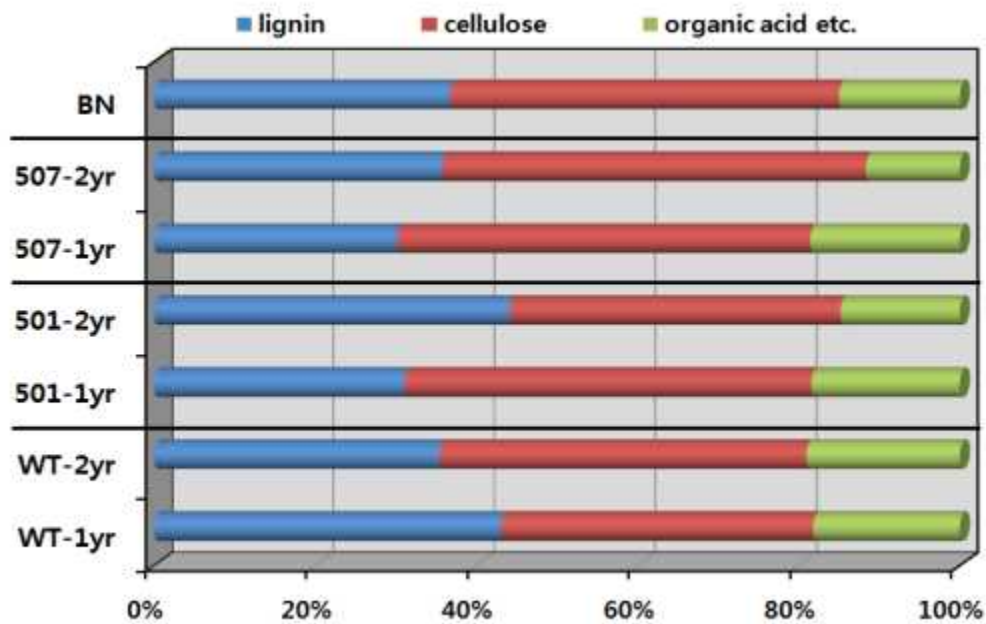


그림 45. 포플러와 유채(BN)의 lignin 및 cellulose 함량 비교.

### 3. 생육특성 분석 및 형질전환체 선발

- 1단계에서 선발된 형질전환체의 표현형적 생육 특성을 조사를 위해 형질전환체 별 직경과 수고를 측정하여 비교하였음
- 각 형질전환체의 직경은 당해 연도 출현한 1년생 가지를 분지 점에서 1cm 부위를 측정하여 비교하였으며, 수고는 토양 표면에서부터 가장 긴 줄기를 측정하였음(표 17, 18)

표 17. 형질전환체 별 직경 비교

Diameter (mm)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Mean	SE
WT	8.54	7.88	8.75	8.69	-	-	-	-	-	8.5	0.2
501	8.65	8.55	8.72	9.02	8.77	7.98	9.12	7.87	8.67	8.6	0.1
505	7.43	8.07	8.55	10.23	8.44	8.63	8.62	10.03	-	8.8	0.3
507	7.62	7.98	7.55	8.13	7.98	8.33	7.54	7.88	-	7.9	0.1

표 18. 형질전환체 별 수고 비교

Height (Cm)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Mean	SE
WT	119.6	109.3	115.8	112.8	-	-	-	-	-	<b>114.4</b>	2.2
501	98.5	122.6	121.7	129.7	118.5	114.3	122.3	112.2	124.3	<b>118.2</b>	3.0
505	176.5	189.6	185.3	166.6	170.2	169.5	177.4	189.7	-	<b>178.1</b>	3.2
507	119.5	121.7	110.3	109.4	106.6	116.2	98.7	124.1	-	<b>113.3</b>	3.0

- 각 형질전환체의 지경과 수고는 도입된 유전자별 형질전환체의 경향을 비교하기 위한 것이며, 최종 선발한 형질전환체의 클론을 만들어 많은 반복수를 이용하여 측정한 후 비교해야 정확한 특성이 파악될 것임
- 형질전환체의 선발은 1단계에서 나타난 각 유전자별 특성을 유지하는 라인을 1차적인 표현형으로 하여 선발하였으며, 분자생물학적 분석에 의해 안정적으로 도입된 유전자를 포함하는 개체를 선발하였음(표 19)
- 선발된 유전자별 형질전환체의 특성과 표현형은 그림 46-48와 같음

표 19. 형질전환체 개발 및 선발과정에서 선발된 개체수

유전자	순화완료	PCR 재검정	선발개체*	최종선발**
<b>CKI1</b>	<b>101</b>	<b>94/101</b>	<b>9</b>	<b>2</b>
<b>CaPUB1</b>	<b>70</b>	<b>58/70</b>	<b>8</b>	<b>3</b>
<b>RabG3b CA</b>	<b>36</b>	<b>34/36</b>	<b>8</b>	<b>3</b>

\* 생육 특성을 검정하여 선발 후보 개체 확정

\*\* 최종 biomass 증대 실험 재료로 Event 조건에 맞는 개체 선발 후 1개 라인을 클론으로 삼목 하여 개체 증식을 하였음



- 대조구에 비해 분지 수 증가

구 분	대조구	501
초 장	114.4±2.2	118.2±3.0



그림 46. 1차 선발된 형질전환체 501 라인의 표현형과 특성.



- 대조구에 영양생장 증가

구 분	대조구	505
초 장	114.4±2.2	113.3±3.0



그림 47. 1차 선발된 형질전환체 505 라인의 표현형과 특성.



그림 48. 1차 선발된 형질전환체 507 라인의 표현형과 특성.

- 각 형질전환체 별로 4개 후보 라인을 선발하였으며 4~5차년도의 연구결과를 종합하여 최종 이벤트를 선발하고자 함
- 최종 이벤트 선발을 위한 생육특성 및 동비 유전자의 안정적인 발현 검정을 매년 실시하여 모니터링하고 바이오매스 공정의 효율성 분석하여 최종적으로 1개의 라인을 이용하여 동일 클론을 대량 증식하여 형질분석 및 위해성 분석에 활용할 수 있도록 하고자 함

#### 4. 형질전환체 개발 계속 및 삼목에 의한 클론 증식

- 1단계에서 확립된 형질전환 방법을 이용한 포플러 형질전환을 계속하여 수행하였음(그림 49)
- 형질전환에 사용하는 유전자는 MTase와 PNC2를 이용하여 수행함(그림 50)



그림 49. 포플러 형질전환 유도. (A) MTase, PNC2 유전자를 포함한 *Agrobacterium*과 공동 배양하고 세척 후 캘러스 유도 배지에 치상한 절편, (B) WT 포플러.



그림 50. 포플러 형질전환체 개발을 위한 치상한 explant와 callus 형성.

- 선발된 형질전환 개체의 1~2년생 가지를 이용한 클론의 증식은 선발 후보 라인의 바이오매스 증식과 관련된 실험을 위해 반드시 필요한 과정임
- 현재 바이오매스 증가 및 공정의 효율성 분석과 생육특성 검정 실험에서 같은 유전자의 형질전환 개체간의 편차를 극복할 수 있는 방안 중의 하나는 같은 형질전환체를 대량 증식하여 사용하는 방법임
- 종자번식 형질전환체는 세대진전 후 고정된 라인의 종자를 이용하여 유의성 있는 결과를 도출할 수 있으나 영양번식체는 삽목 등의 방법이 적합할 것으로 판단 됨
- 따라서 후보 형질전환체를 이용한 클론의 증식은 삽목 방법을 이용하여 증식하고자 온실 하우스에서 삽목 하여 증식 중에 있음(그림 51-53)





그림 51. 대조구 포플러와 501 형질전환 포플러의 삼목에 의한 클론 증식.

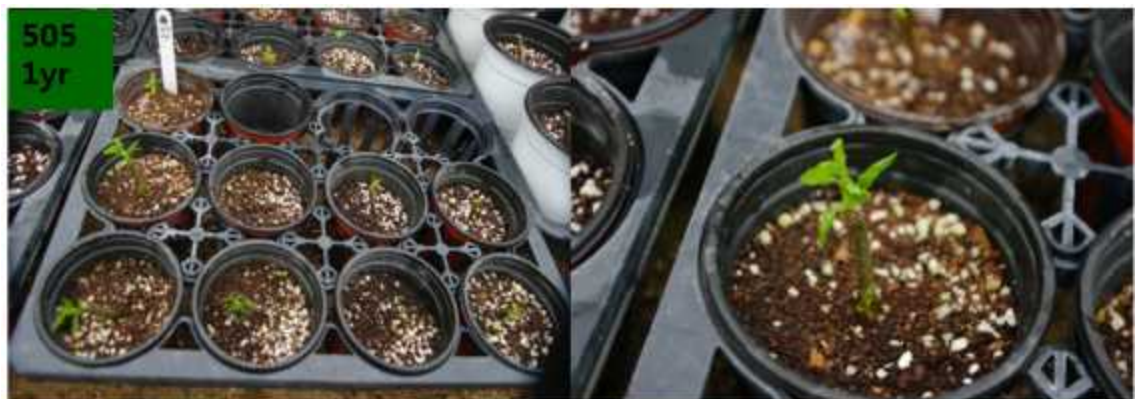


그림 52. 형질전환 포플러 505 및 507 라인의 삼목에 의한 증식.





그림 53. 삽목에 의해 증식된 포플러(WT)와 형질전환 포플러(507)의 생육비교.

[5차년도]

5-1. 선발된 포플러 형질전환체의 도입 유전자 위치 확인 및 안정적인 발현

- 선발된 501 형질전환 개체로부터 획득한 left border 지역의 iPCR 산물의 염기서열을 분석한 다음 확인된 염기서열을 이용하여 BLAST 검색결과 다음과 같이 확인되었음(그림 54)

```
AATGGGGGTTGGKTTGCGSTTCCTTTAGCAGTCTTGCGCCCTGAGTGCTTGCGGCAGCGTGAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGG
GCCCGGTACAAAACCCAGTACTTTAAAAACGTCGCAATGTGTTAAGTTGCTAAGCGTCAATTTGTTTACCCACAMTATATCCT
GCTMCCMGCCAGSACAACAGCTCCCCAACCGGCMGCTCGGTACAAAATCCCCATTGATACAGGSAGCCCATCASYCCGCTGGAGACGCTCA
CCGGGGGGGTTGCCCTCGCCGCTGGGCTGGCGGACGYCTATGGCCCTGCAAAACAAGCCAKAAACGCCATCCAASCCGTGTGATATATACCS
CGGGGGGGATATCCCAGGCTCTGGTGCAAG
```

Seq 1: 501 Vector와 Alignment 결과 90%일치(빨간색 - Left Border)

Sequence ID: Icl49407 Length: 398 Number of Matches: 1

Range 1: 16 to 371 Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
511 bits(566)	3e-148	323/357(90%)	1/357(0%)	Plus/Plus
Query 6594	CGCTTCCTTTAGCAGCCCTTGCGCCCTGAGTGCTTGCGGCAGCGTGAAGCTTATCGATAC	6653		
Sbjct 16	CGSTTCCTTTAGCAGTC-TTGCGCCCTGAGTGCTTGCGGCAGCGTGAAGCTTATCGATAC	74		
Query 6654	CGTCGACCTCGAAGGGGGGGCCCGGTACCAAACCCAGTACTTTAAAAACGTCGCA	6713		
Sbjct 75	CGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCAAACCCAGTACTTTAAAAACGTCGCA	134		
Query 6714	ATGTGTTAATTAAGTTGCTAAGCGTCAATTTGTTTACCCACAATATATCCTGCCACCAG	6773		
Sbjct 135	ATGTGTTAATTAAGTTGCTAAGCGTCAATTTGTTTACCCACAMTATATCCTGCTMCCMS	194		
Query 6774	CCAGCCACAGCTCCCCGACCGGACGCTCGGCACAAAATCACCCTCGATACAGGCAGCC	6833		
Sbjct 195	CCAGSACAACAGCTCCCCAACCGGCMGCTCGGTACAAAATCCCCATTGATACAGGSAGCC	254		
Query 6834	CAICAGTCCACTAGAGACGCTCACCGGGCTGGTTGCCCTCGCCGCTGGGCTGGCGGCCGT	6893		
Sbjct 255	CATCASYCCGCTGGAGACGCTCACCGGGGGGTTGCCCTCGCCGCTGGGCTGGCGGACGY	314		
Query 6894	CTATGGCCCTGCAACCGCCAGAAACGCCCTCGAAGCCGTGTGCGAGACACCAGCGG	6950		
Sbjct 315	CTATGGCCCTGCAAAACAAGCCAKAAACGCCATCCAASCCGTGTGATATATACCSGG	371		

ACWAGAGACGCTACCGGRCTGGTTGCCCTCGCCGCTGGGCTGGCGGCCGTCTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAACGCCGTGAA  
 GCCGTGTGCGAGACACCGCGG//GGGGCATATCCGAGCGCTCGTGTGCATGCGCAGCTCGGGTCTGGGGCAGCCCGATGACAGCGAC  
 CACGCTCTTGAAGCCCTGTGCCTCCAGGGACTTCAGCAGGTGGGTGTAGAGCGTGGAGCCAGTCCCGTGGTGGCGGGGGA  
 GACGTACACGGTCTGACTCGCCGCTCAGTCTGAGGCGTTGCTGCTCCAGGGGCCCGTATGGCGATGCCGGGACCTCGCCGTC  
 ACCTCGGCGACGRGCCAGGGATAGCGCTCCCGCAGACGGACGAGGTGCTCCGCTCCACTCTGGSGKTTCC

**Seq 1: (501 Vector와 Alignment 결과): Left Border지나서 벡터부분과 98% 일치**  
 (\*Left border; 6740~6770bp, CCAGAAACGCCGTGGAAGCCG)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
190 bits(210)	2e-51	106/108(98%)	0/108(0%)	Plus/Plus
Query 6845	ACTAGAGADGCTCACC	GGGCTGGGCTGGCGGCCGTCTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAACGCCGTGAA		6902
Sbjct 1	ACWAGAGACGCTACCGGRCTGGTTGCCCTCGCCGCTGGGCTGGCGGCCGTCTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAACGCCGTGAA		60	
Query 6903	TGCRAACGCGCCAGAAACGCCGTGGAAGCCG	TGCRAACGCGCCAGAAACGCCGTGGAAGCCG		6950
Sbjct 61	TGCRAACGCGCCAGAAACGCCGTGGAAGCCG	TGCRAACGCGCCAGAAACGCCGTGGAAGCCG		108

**Seq 2: 나머지 Sequences는 501 Vector와 Alignment 결과 99% 일치**

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
554 bits(614)	4e-161	312/316(99%)	1/316(0%)	Plus/Plus
Query 5575	CCGCGGGGGGCATATCCGAGCGCTCGTGCATGCGCAGCTCGGTCGTTGGGCAGCCCG		5634	
Sbjct 103	CCGCGGGGGGCATATCCGAGCGCTCGTGCATGCGCAGCTCGGTCGTTGGGCAGCCCG		162	
Query 5635	ATGCACGCGACCCAGCTCTTGAAGCCCTGTGCCTCCAGGACTTCAGCAAGTGGGTGTA		5694	
Sbjct 163	ATGCACGCGACCCAGCTCTTGAAGCCCTGTGCCTCCAGGACTTCAGCAAGTGGGTGTA		222	
Query 5695	AGCCTGAGGCCCACTCCCGTCCGCTGGTGGCGGGGGAGACGTACACGGTCCACTCGCC		5754	
Sbjct 223	AGCCTGAGGCCCACTCCCGTCCGCTGGTGGCGGGGGAGACGTACACGGTCCACTCGCC		282	
Query 5755	GTCCAGTCGTAGGCGTTGCGTGCCTCCAGGGGCCCGGTATGGCGATGCCGGGACCTCG		5814	
Sbjct 283	GTCCAGTCGTAGGCGTTGCGTGCCTCCAGGGGCCCGGTATGGCGATGCCGGGACCTCG		342	
Query 5815	CCCTCCACTCCGCGACGAGCCAGGGATAGCGCTCCCGCAGACGCGAGGTCGTCCTC		5874	
Sbjct 343	CCCTCCACTCCGCGACGAGCCAGGGATAGCGCTCCCGCAGACGCGAGGTCGTCCTC		402	
Query 5875	CACTCCT-CCGCTTC 5899			
Sbjct 403	CACTCCTGGSGKTTCC 418			

그림 54. CKI1(501) 유전자 형질전환 포플러의 insertion site 주변 염기서열 분석 및 BLAST search 결과, 삽입 부위 양쪽에서 벡터의 염기서열과 일치함을 확인.

- border 지역의 iPCR 산물의 염기서열을 분석한 다음 확인된 염기서열을 이용하여 BLAST 검색결과를 기초로 하여 작성한 삽입 위치는 다음과 같이 확인되었음(그림 55)

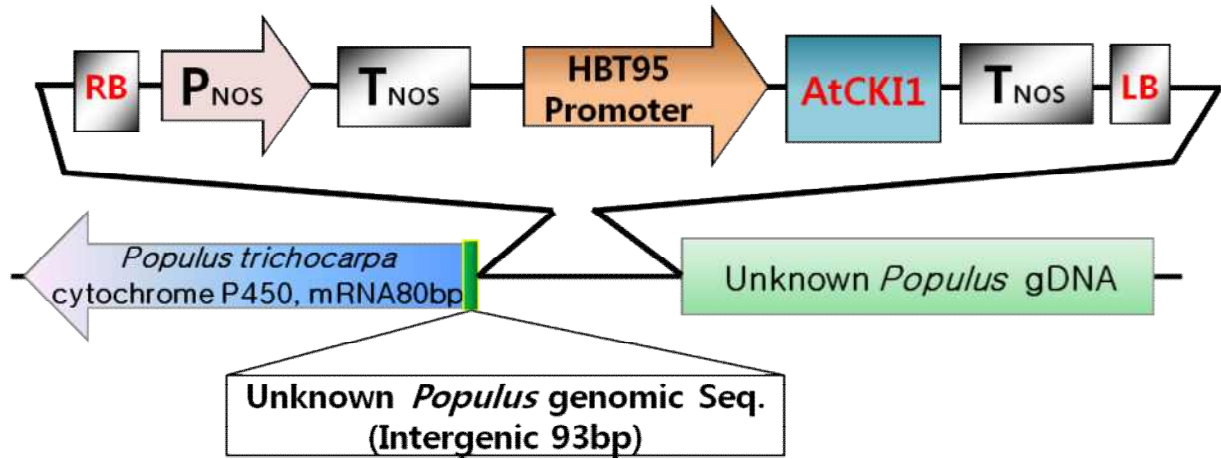


그림 55. CKI1(501) 유전자 형질전환 포플러의 insertion site 주변 염기서열 분석 결과를 이용하여 형질전환체의 유전자 도입을 나타낸 모식도.

## 5-2. 형질전환체의 안정적인 발현 분석

- 최종 선발된 형질전환체로부터 안정적인 도입형질의 발현을 확인하기 위해 도입유전자와 genomic DNA specific primer를 제작하였음(그림 56A)
- 제작된 primer를 이용한 PCR 검정 결과, 형질전환체의 genomic DNA를 template로 사용

한 시료에서 밴드가 확인되어 도입된 유전자가 안정적으로 유지되고 있음이 확인되었음 (그림 56B)

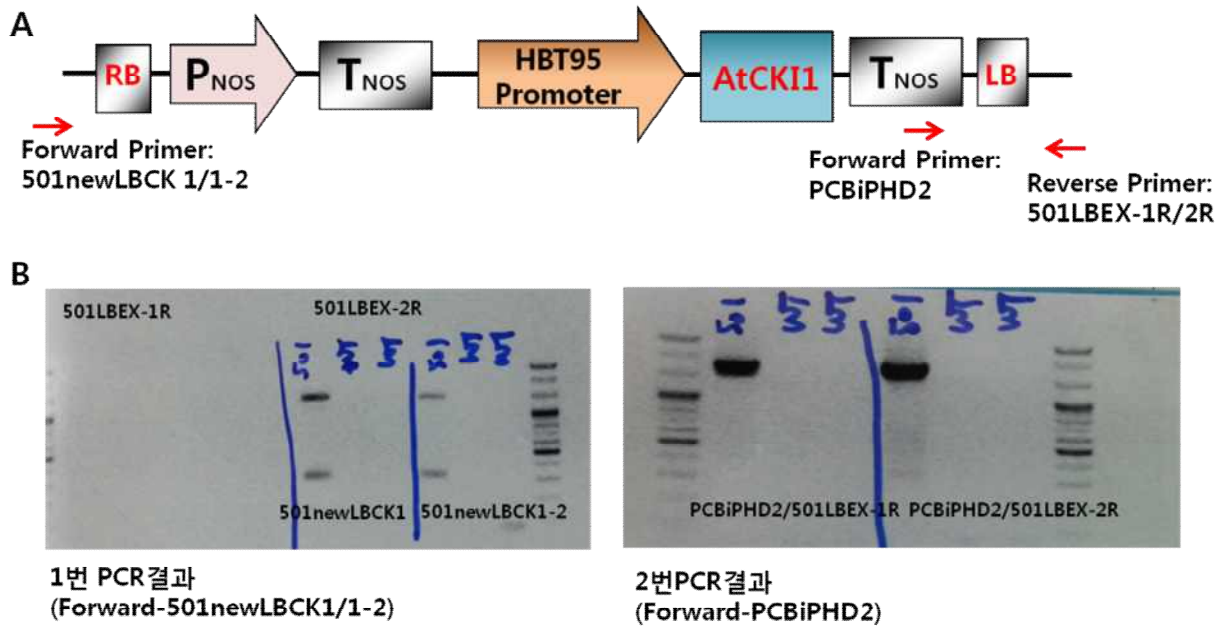


그림 56. 형질전환 포플러의 insertion site 주변 염기서열과 도입 유전자를 이용한 primer 제작 (A)과 이를 이용한 PCR 결과(B).

### 5-3. 수령에 따른 형질전환체의 biomass 구성성분의 변화

- 포플러의 목질계 바이오매스 구성(1-3년생), 생장이 끝난 가을에 시료를 채취하여 황산법으로 분석한 결과, 1년생의 경우 형질전환체에서 cellulose 함량이 높았으나 2, 3년생에서는 대조구와 형질전환체 간의 유의차가 없음
- 따라서 biomass 공정의 성분은 도입된 형질보다는 수령과 개체간의 변이가 더 큰 것으로 확인됨(표 20)
- 본 과제 수행에서 형질전환체의 최종선발과정은 분자생물학적 특성(도입유전자 확인 및 안정적인 발현), 생육특성(성장속도, 부피의 비대 등) 그리고 바이오매스 공정성분 분석(lignin alc cellulose 함량)의 3단계로 대별하여 진행하였음
- 분자생물학적 분석에서 505 형질전환체는 도입 유전자가 안정적으로 발현되고 있음이 확인되었으나, 생육특성분석에서는 줄기의 직경과 경장길이가 대조구에 비해 큰 차이가 나타나지 않은 반면에 낙엽시기 즉 노화가 늦게 진행되는 특성을 나타냈음
- 따라서 505 형질전환체의 특성분석은 바이오매스 공정의 성분 함량 보다는 생육기간의 연장과 같은 생육형질을 비교하는 것이 적합하다고 판단되었음
- 생육특성 비교를 위해서는 영양변식체의 다량 증식이 필요하여 클론을 증식하는 과정에 있음
- 바이오매스 공정성분 분석을 위해 줄기조직의 lignin과 cellulose 함량변화를 수령에 따라 추적한 결과, 1년생의 경우 형질전환체에서 증가하였으나 2-3년생에서는 유의차 없었음
- 이와 같은 원인을 분석하고자 1차적으로 수행한 해부학적 특성 관찰에서 대조구와 형질

전환체의 줄기조직의 비대는 1년생의 경우, 형질전환체 라인 B가 대조구에 비해 CR 조직이 비대해 졌음을 확인되었으나 3년생의 경우, 형질전환체 라인 및 대조구 사이의 해부학적 유의차가 발견되지 않았음

- 또한 수령이 증가함에 따라 대조구와 형질전환체의 세포의 크기, 밀도 등에서 유의차가 발견되지 않음
- 이상의 결과를 종합해 볼 때, 도입된 형질은 바이오매스 증대와 관련하여 초기(1년생)에는 생육을 증대시킴으로 유전자와 표현형이 일치하였으나 수령이 증가함에 따라 생육(발달)과정에서 생육의 균형을 맞추는 쪽으로 유전자의 발현(이어지는 물질대사 포함 예상)이 진행되어 결국은 조직 간 또는 개체 전체의 비대생장(발달)이 균형을 이루는 것으로 판단됨
- 이러한 현상을 developmental homeostasis에 의한 결과로 판단하여 바이오매스 증대를 위한 다년생 목본류(포플러)의 형질전환체 개발의 경우, 도입유전자의 형질발현 특성과 생육특성을 고려하여야 함을 제시하였음

표 20. 포플러의 수령에 따른 바이오매스 구성성분의 함량(%) 변화\*

1 Year	WT	501	507
Cellulose	39	51	51
Lignin	43	31	30
OA	18	18	19
2 Year	WT	501	507
Cellulose	39 -> 46	51 -> 41	51 -> 52
Lignin	43 -> 35	31 -> 44	30 -> 36
OA	18 -> 19	18 -> 15	19 -> 12
3 Year	WT	501	507
Cellulose	39 -> 46 -> 42	51 -> 41 -> 45	51 -> 52 -> 49
Lignin	43 -> 35 -> 40	31 -> 44 -> 39	30 -> 36 -> 33
OA	18 -> 19 -> 18	18 -> 15 -> 16	19 -> 12 -> 18

\* 리그닌과 셀룰로오스의 함량은 황산법으로 정량하였으며, 유기산(OA) 함량을 포함한 전체 함량의 비율로 환산하였음.

\* 수령에 따른 시료 채취는 동일 개체에서 1~2 cm 크기로 3개(약 1g fresh weight)를 사용하였음.



5-5. 수령에 따른 도입형질의 발현량 변화

- 포플러의 수령에 따른 Biomass 구성성분 비율의 변화양상의 원인을 규명하고자, 수령에 따라 도입 형질의 발현량을 qRT-PCR로 분석
- 동일한 유전자가 도입된 다른 라인간의 유전자 발현량을 조사한 결과, 라인에 따른 변이가 확인되었음(그림 57)

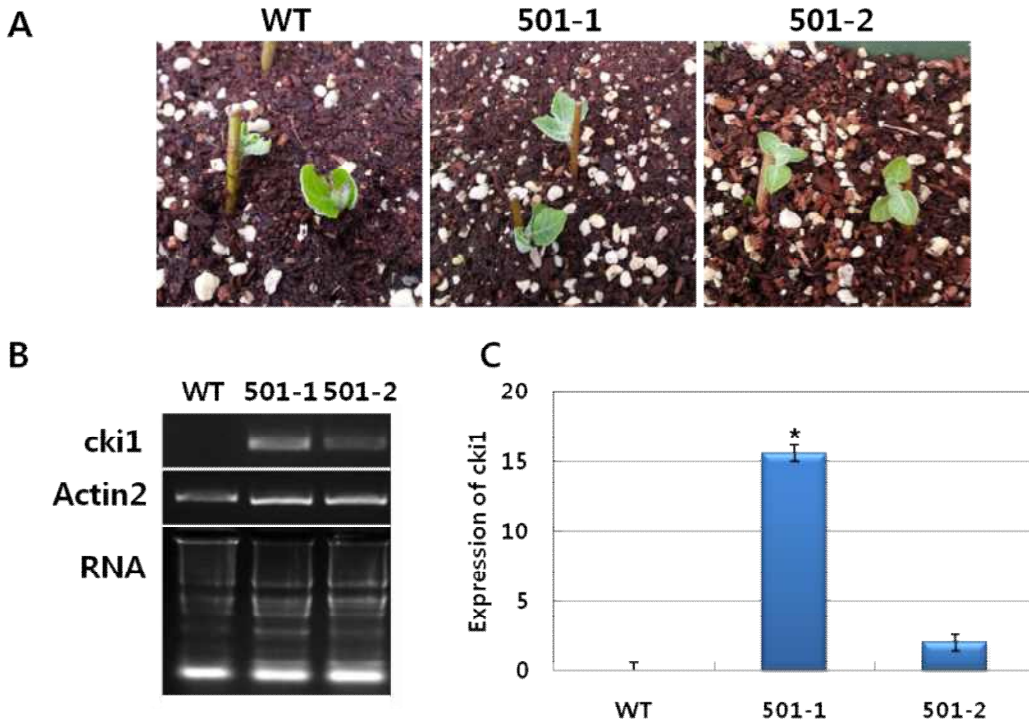


그림 57. 삼목에 의한 형질전환 포플러의 생육과 라인별 도입형질의 발현량 분석. 동일 유전자가 도입된 다른 라인 사이의 현저한 발현량 차이를 보임. Actin2; Internal standard.

- 또한 개체와 수령의 상관관계를 규명하고자, 기내배양을 통해 각 수령에서 신초를 유도한 후 qRT-PCR을 수행하여 발현량을 조사하였음
- 수령에 따른 대조구와 형질전환체의 유전자 발현을 분석한 결과, 구성성분의 함량 변화와 일치하는 결과를 나타내었음(그림 58)
- 이러한 결과는 첫째 도입된 형질은 바이오매스 증대와 관련하여 초기에는 생육을 증대시킴으로 유전자와 표현형이 일치함을 잘 제시하는 결과임
- 둘째는 다년생 목본의 형질전환체는 생육(발달)과정에서 생육의 균형을 맞추는 쪽으로 유전자의 발현이 진행되어 결국은 조직 간의 비대생장(발달)이 균형을 이루는 것으로 예상된다

**A**



**C**

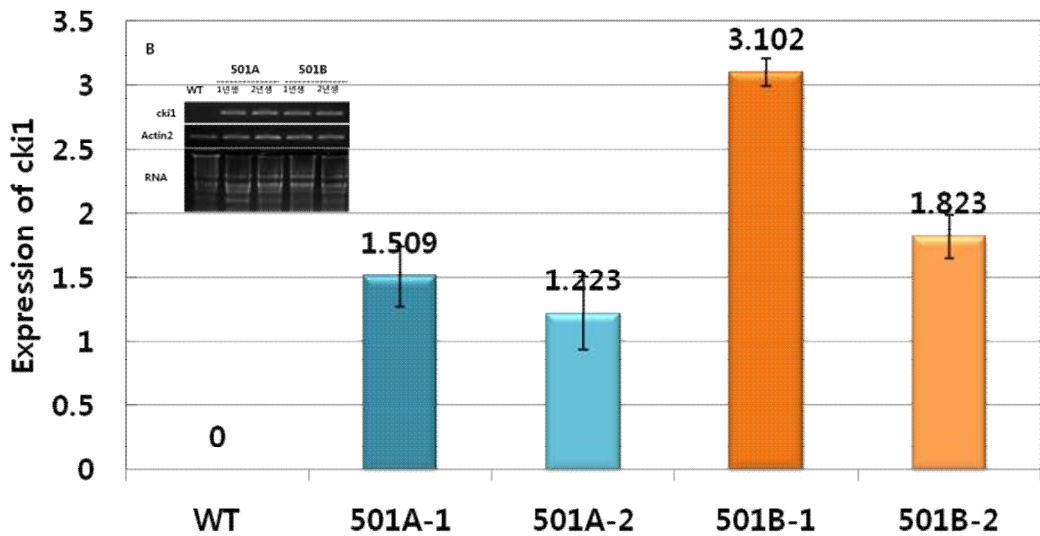


그림 58. 수령에 따른 포플러 대조구(WT)와 형질전환 포플러(501A)의 기내배양(A)과 라인별 도입 형질전의 발현량 분석(B, C). A and B; 라인, 1 and 2; 수령. 동일 유전자가 삽입된 동일 라인(501B-1, 501B-2)에서 수령에 따른 발현량 차이를 보임.

5-6. 수령에 따른 형질전환체의 해부학적 특성 분석

- 수령에 따른 줄기조직의 해부학적 특성을 비교하기 위해 1년생 대조구와 형질전환체의 줄기 조직을 관찰하였음(제 1세부과제)
- 1년생의 경우, 형질전환체 라인 B가 대조구나 형질전환 라인 A에 비해 EM 조직이 비례해 컸음을 확인할 수 있었음(그림 59)



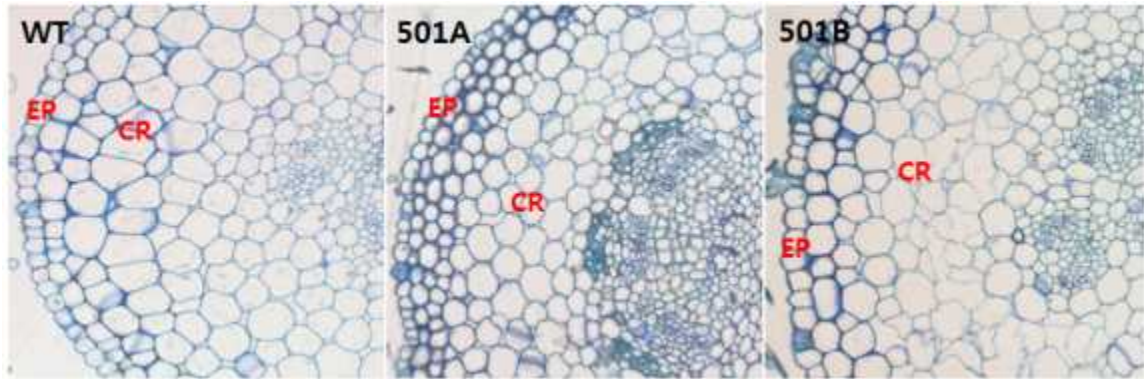


그림 59. CK11 유전자가 삽입된 1년생 포플러 형질전환체의 줄기의 형태학적 분석(40X).

WT; Wild type, 501A and 501B; Transgenic, EP; Epidermis, CR; Cortex.

- 수령 증가에 따른 해부학적 특성을 비교하기 위해 3년생 대조구와 형질전환체의 줄기 조직을 관찰하였음
- 3년생의 경우, 형질전환체 라인 및 대조구 사이의 해부학적 유의차가 발견되지 않았음(그림 60)

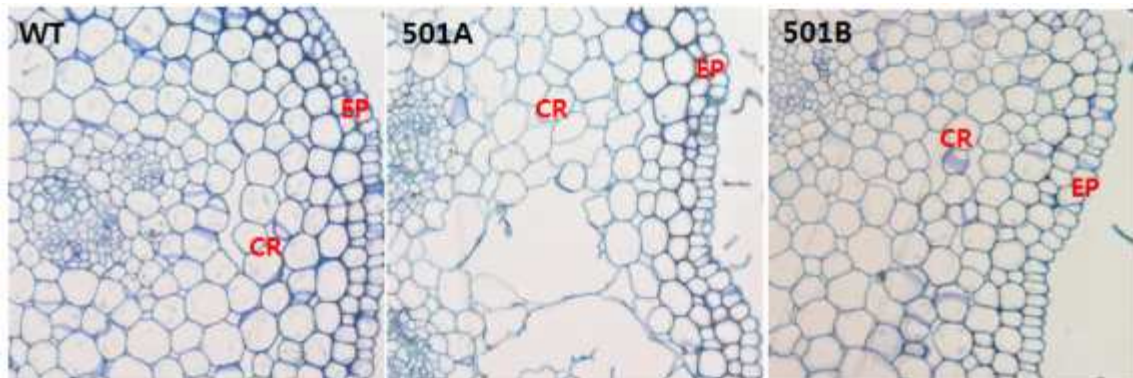


그림 60. CK11 유전자가 삽입된 3년생 포플러 형질전환체의 줄기의 형태학적 분석(40X).

WT; Wild type, 501A and 501B; Transgenic, EP; Epidermis, CR; Cortex.

#### 5-7. 바이오매스 증대를 위한 포플러 형질전환체의 특성 및 요약

- 선발된 후보 형질전환체의 분자생물학적 및 생육특성을 조사하여 최종 “EVENT”를 선정 (501B)하고 삽목방법에 의해 형질전환체의 클론 증식
- 선발 후보 개체 중 501 라인의 insertion site 분석하여 intergenic region에 삽입되었음을 확인
- 형질전환체의 수령에 따른 바이오매스 공정의 효율성 분석 결과, 1년생에서는 도입된 유전자와 표현형이 일치하였으나, 2차년 이후에는 대조구와 형질전환체 간의 유의성 있는 차이가 없음
- 도입유전자의 발현은 1년생에서는 501B 라인에서 2배 이상 높았으나, 2년생 이후에서는 발현량이 현저히 감소하였음
- 해부학적 비교에서도 수령이 증가함에 따라 대조구와 형질전환체의 세포의 크기, 밀도 등에서 유의차가 발견되지 않음
- 따라서 바이오매스 증대를 위한 다년생 목본류(포플러)의 형질전환체 개발의 경우, 도입

유전자의 형질발현 특성과 developmental homeostasis에 의한 생육특성을 고려하여야 함

[2협동: *Brachypodium* 및 *Miscanthus*를 이용한 바이오매스 증진 식물 개발 연구]

가. Membrane-bound transcription factor (MTF, 막결합 전사인자)의 가뭄 저항성 조절 연구

Membrane-bound transcription factor (MTF, 막결합 전사인자)는 세포 내 생체막에 결합되어 있다가 외부 환경 혹은 식물 성장 및 발달 단계의 변화를 인지하여 핵으로 이동한 후 target 유전자의 발현을 조절하는 단백질이다. 막결합 전사인자는 환경변화를 빠르게 인지하여 신속한 세포 내 신호전달을 가능하게 하는 주요 메커니즘인 것으로 생각되고 있다. 본 연구팀에서는 식물에서 최초로 막결합 전사인자를 발견 및 보고하였으며, 지속적인 연구를 통하여 막결합 전사인자의 작용기작과 생물학적 의미를 도출하고 있다. 그 가운데 NTL6 유전자는 저온, 가뭄, 염분, 삼투 스트레스 등 다양한 외부 환경 스트레스에 반응하는 대표적인 막결합 전사인자로서 환경에 따른 막의 물리화학적 성질 변화에 따라 conformational change를 보이는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 NTL6 단백질이 가뭄 저항성에 기여한다는 사실을 발견하였다. NTL6 과량 발현체에서 SnRK2.6, SnRK2.6, COR15a 등과 같은 스트레스 반응성 유전자들의 발현이 증가하였고, 그 결과 가뭄에 대한 저항성을 보였다. SnRK2.8 kinase는 식물 스트레스 반응의 대표적인 상위신호전달 mediator로서, 최근 ABA receptor component로 기능한다는 사실이 보고된 바 있다. 막결합 전사인자와 SnRK 계열 kinase가 공히 초기 신호 인지에 관여한다는 점에 근거하여 NTL6와 SnRK2.8 kinase 간의 상호작용을 확인하였다. NTL6 전사인자와 SnRK2.8 kinase는 서로 상호작용을 하였고, SnRK2.8은 NTL6의 142 Thr residue를 특이적으로 인산화하였다. 이들의 생화학적 기능에서 유추할 수 있듯이 SnRK2.8 과량 발현체는 가뭄 저항성을 보이는 반면, snrk2.8 돌연변이체는 가뭄에 취약하였다. NTL6와 SnRK2.8간의 상호작용은 NTL6 막결합 전사인자의 핵이동에 중요한 기능을 한다.

NTL6가 snrk2.8 돌연변이체에 발현되거나, 142Thr residue가 mutation 되었을 때 NTL6의 핵이동은 억제되었다. NTL6의 가뭄 저항성은 NTL6 과량발현체와 snrk2.8 돌연변이 교배체에서 억제되는 것을 통해 NTL6의 인산화는 가뭄 저항성에 중요한 신호전달 메커니즘임을 제시하였다. 본 연구는 막결합 전사인자의 핵이동 메커니즘을 최초로 제안하였다는 점과 스트레스 신호전달의 초기 단계에 대한 insight를 제공하였다는 점에서 큰 의의가 있다(그림 2).

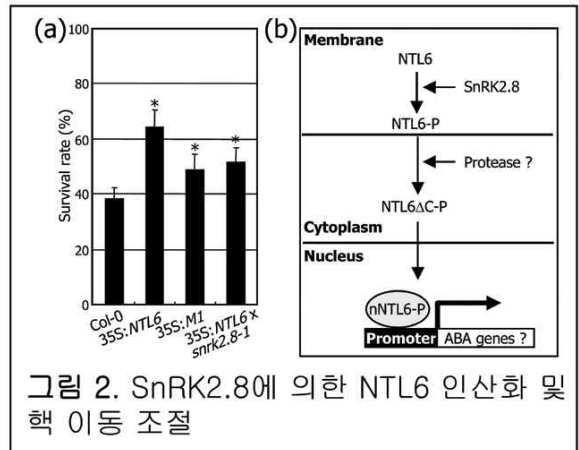


그림 2. SnRK2.8에 의한 NTL6 인산화 및 핵 이동 조절

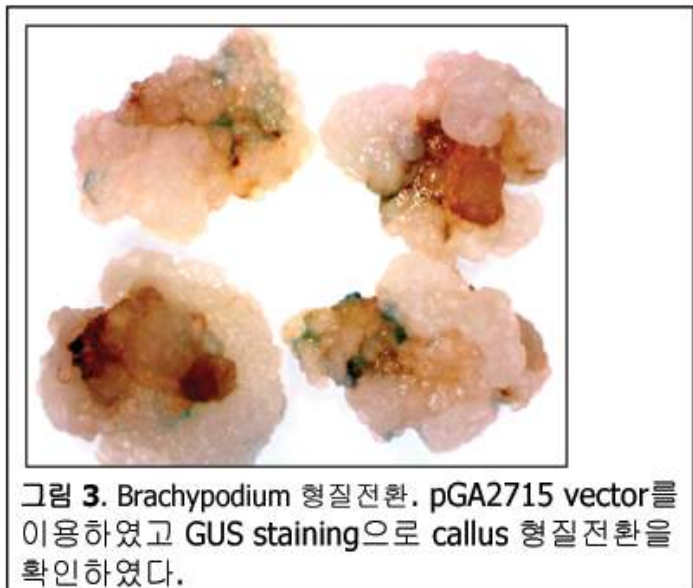
나. *Brachypodium* 형질전환 및 Artificial Zinc Finger Nuclease 기법 정립 연구

*Brachypodium*(숲개밀)은 유전적으로 억새 등의 바이오에너지 grass 작물들과 매우 흡사하

기 때문에 *Brachypodium*에서의 연구 결과는 바로 억새 연구에 이용이 가능하다. 이러한 점에서 *Brachypodium* 연구는 억새 등의 바이오에너지 작물 연구에 필수적이다 (Draper et al, 2001; Garvin et al, 2008; Brkljacic et al, 2011). Grass 연구에 있어서 기술적인 어려움의 하나는 특정 유전자의 과량발현체는 얻기가 용이한 반면, 특정 유전자가 knockout된 돌연변이체를 얻기가 쉽지 않다는 점이다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 Artificial Zinc Finger Nuclease 기법을 도입하고자 한다. 이 기법은 동물에서 이미 보고가 되었고 최근에 애기장대에서도 이 기법의 적용이 성공한 바가 있다 (PNAS 102, 2005). 다만 이 기법의 효과적인 적용을 위해서는 고효율의 *Brachypodium* 형질전환 시스템이 필수적이다. 따라서 다음의 일련의 유기적인 실험들을 수행함으로써 *Brachypodium* 연구시스템을 정립하고 유전학적인 연구 이외에도 형질전환 시스템 구축을 위한 식물조직 배양 관련 연구들도 병행하고자 한다. 본 연구팀은 이미 *Brachypodium* 연구를 시작하였고, 최근에는 향후 분자유전학적 연구에 필수적인 marker 유전자 개발 연구 결과를 발표하기도 하였다 (Hong et al, 2008).

### (1) *Brachypodium* 형질전환 연구

미국 USDA의 Vogel 박사팀으로부터 기술지원을 받아 *Agrobacterium*-mediated 기법을 확보하는 중이다. 먼저 벼를 대상으로 한 activation tagging mutagenesis 연구에 이용되었던 pGA2715 vector(포항공대 안진홍 세부과제팀과 공동연구중임)를 이용하여 *Brachypodium* 형질전환이 진행되고 있으며, 현재 callus에서의 GUS report expression을 확인하였고 (그림 3), 향후 수개월 이내에 형질전환체를 얻을 수 있을 것으로 예상하고 있다. 효율적인 형질전환 시스템이 구축되면, miR156, TOE1 유전자를 이용



한 형질전환 실험을 수행하고자 한다. 또한 벼에서와 같이 activation tagging mutant pool 확보를 위하여 대규모 형질전환 실험도 수행함으로써 향후 *Brachypodium* 연구는 물론 억새와 같은 바이오에너지 grass 연구를 활성화할 수도 있을 것이다.

한편 좀 더 체계적인 *Brachypodium*과 억새의 형질전환 시스템 구축을 위하여 김정일 세부과제팀과 긴밀한 유기적 협력연구 시스템을 운용함으로써 고효율의 형질전환 시스템을 구축하고, 추가로 분리되는 유용유전자들의 형질전환 연구에 이용하고 있다(김정일 4협동과제 참조).

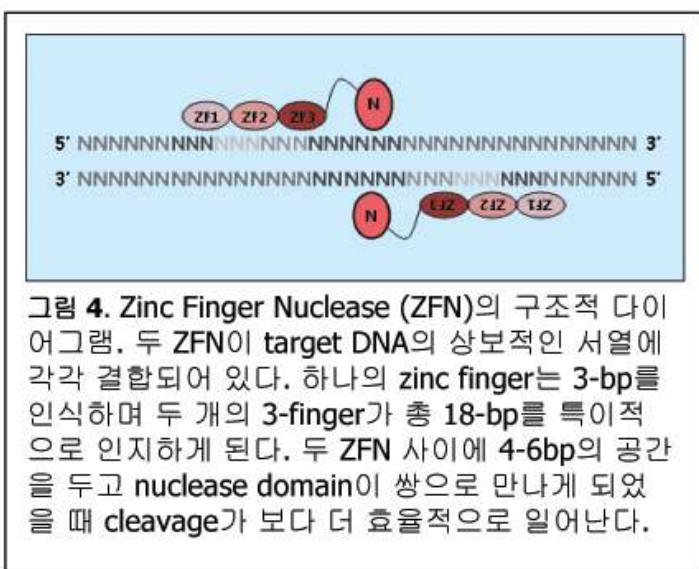
### (2) Artificial Zinc Finger Nuclease 기법을 이용한 GI knockout mutant 개발.

식물의 영양생장(vegetative phase) 증진을 위하여 GIGANTEA 유전자 knockout mutagenesis를 목표로 하고 있으며, 서울대 화학부의 김진수 교수와 공동연구로 시스템을 정립하는 중이다. 현재 *Brachypodium*으로부터 GIGANTEA 유전자를 분리하였고, 애기장대

의 gi mutant를 이용하여 complementation test가 진행 중이다 (Hong et al, 2010). 이 검증 실험이 완료되면 Artificial Zinc Finger Nuclease 기법을 적용하여 Brachypodium과 억새의 GIGANTEA 유전자의 knockout mutant를 확보하기 위한 연구를 수행하고자 있다.

이 Artificial Zinc Finger Nuclease (ZFN) 기법은 동물과 인간을 대상으로 한 유전자 치료 분야에 있어서 최근 각광받고 있는 연구 tool이다. ZFN의 핵심 원리는 우리가 target 으로 삼고자 하는 유전자의 염기서열에 특이적으로 double-strand break를 유도하는 것이다. DNA에 손상이 일어나면 생체 내에서는 자체적으로 강력한 repairing mechanism을 발동시키는 데 그 대표적인 것이 homologous recombination (HR)이다. 특히 ZFN과 더불어 절단된 유전자의 정상적인 염기서열을 donor로 제공해주면 높은 효율로 결함유전자의 자리바꿈이 일어나기 때문에 유전자치료에 이용되기도 한다(그림 4).

기존에는 이러한 원리로 gene correction에 중점을 두고 연구가 진행되었는데 최근에는 유전자치료뿐만 아니라 gene knockout에 도 도입하고자 하는 움직임이 세계 각지에서 활발히 일어나고 있다. 우리도 이 ZFN 기술을 기존에 knockout을 시키기 힘들었던 벼 같은 monocot plant를 비롯하여, 억새와 같은 바이오에너지 grass 작물에 적용하여 향후의 바이오에너지 grass연구에 널리 쓰일 수 있는 핵심 기술로 정착시키고자 노력중이다.



이 연구의 성공을 위해서는 고효율의 형질전환 시스템이 필수적이며, 따라서 이 ZFN 연구는 Brachypodium과 억새의 형질전환 연구와 병행되어야 한다. 본 세부과제 연구에서는 GIGANTEA 유전자를 이용하여 Brachypodium의 gi mutant 분리를 시도하고, 이 기법이 정립되면 다른 유용유전자들에 대한 ZFN 실험도 수행하고자 계획하고 있다. 예상되는 대상 유전자들로는 개화시기 조절 FT 유전자와 LEAFY 유전자 들이다.

### (3) Brachypodium으로부터 저온 신호 조절 유전자 분리

억새는 대부분의 환경스트레스에 대한 저항력이 높기 때문에 추가 유전자조작 실험은 큰 효과가 없을 것이다. 다만 저온은 잎의 노화(leaf senescence) 촉진 및 성장 감소를 유도하기 때문에 저온에 대한 저항력을 증진함으로써 바이오매스를 증가시킬 수 있을 것으로 예상된다. 따라서 Brachypodium으로부터 Subtractive hybridization 기법을 통하여 저온 저항성 조절 유전자를 분리한 후, 억새로부터 gene homologue를 분리하고, 이들을 이용한 형질전환 억새를 개발하고자 한다. 현재 Brachypodium을 이용한 실험이 진행 중이며, 기존에 잘 알려진 CBF 유전자들은 이미 학술논문으로 발표하였고, 이외에도 grass 식물들에 특이적인 저온 저항성 조절 유전자가 다수 분리될 수 있을 것으로 예상하고 있다. (Stockinger et al, 1997; Chinnusamy et al, 2007; Pino et al, 2008)



#### (4) Leaf senescence 시기 조절을 위한 연구

쌍자엽 식물인 애기장대와 단자엽식물인 벼, 옥수수를 이용한 연구를 종합하여 보면 영양생장(vegetative phase)에서부터 생식생장(reproductive phase)으로의 상변화 단계에서 개화 촉진 유전자인 FT (FLOWERING LOCUS T) 유전자의 발현이 급격하게 증가된다. 따라서 FT의 발현이 억제되면 개화가 억제 또는 크게 지연된다. 한편 leaf senescence 유전자인 SAG12는 과량발현시 식물 노화가 촉진된다. 억제의 경우 바이오매스 증진을 위해서는 영양생장이 증가하여야 하지만 개화는 억제 또는 지연되어야 한다.

만약 SAG12의 ORF를 FT 유전자의 promoter에 붙인 pFT-SAG12 합성 유전자의 경우, 이를 과량발현시킨 형질전환 식물에서는 개화 직전 FT의 발현이 촉진될 시기가 되면 SAG12의 발현이 급증함으로써 노화가 촉발될 수 있을 것으로 예상된다. 이러한 형질변이는 바이오매스 증진 작물의 processing에 매우 중요한 요인으로서, leaf senescence의 결과 식물 지상부위로부터 셀룰로오스 성분 이외의 대부분의 물질들이 뿌리도 이동함으로써 식물체의 preprocessing cost를 현저하게 줄일 수 있을 것이다.

본 연구에서는 먼저 pFT-SAG12 합성유전자를 애기장대와 Brachypodium을 대상으로 하여 기능을 검증하고, 그 결과를 학술논문으로 발표하였다.

#### 다. 바이오매스 증진 Miscanthus(억새) 형질전환 연구

억새(Miscanthus)는 현재 세계적으로 널리 연구되고 있는 바이오매스 증진 연구 대상 작물들 중 단위면적당 생산성이 가장 높고, 환경스트레스에 대한 내성이 높아 대부분의 토양에서 경작이 용이하기 때문에 상품화 잠재력이 매우 높은 바이오에너지 grass이다. 본 연구의 최종 목적은 기존의 연구와 Brachypodium 연구를 통하여 검증될 일련의 유전자들을 이용한 억새 형질전환 실험을 수행함으로써 바이오매스가 증진된 형질전환체 억새를 개발하는 것이다.

억새 형질전환은 세계적으로 극히 최근에 연구되기 시작하였기 때문에 최종 형질전환체 식물까지 검증된 보고는 아직 전무하다. 국내에서도 일부 대학 연구실과 기업체에서 형질전환 기법 정립을 위한 연구가 최근에 시작되었다. 그러나 형질전환이 어려운 식물중의 하나인 turfgrass들도 이미 형질전환 시스템이 구축되어 있고, 본 과제제안의 김정일 세부과제팀에 의해서도 형질전환에 가능하다는 사실이 증명되고 있다.

본 연구 과제에서는 두 방향의 연구 접근을 통하여 억새 형질전환 시스템 개발 및 형질전환 실험을 수행하고자 한다. 박충모 세부과제팀에서는 이미 동정되어 있는 유전자를 이용한 억새 형질전환체를 얻기 위하여 형질전환 시스템이 어느 정도 구축되어 있는 전문연구실로부터 연구 기술을 확보하고, miR156 유전자를 대상으로 한 형질전환 실험을 수행하였다.

억새 형질전환 실험을 성공적으로 수행하고 있는 전문연구실의 도움으로 hygromycin resistance marker 유전자를 가지는 pcambia1300 vector 시스템을 이용한 억새 형질전환 실험을 위하여 준비가 진행 중에 있다. 이러한 초기 단계 형질전환에서 이용할 예정인 유전자들로는 miR156 유전자, flowering 억제 유전자인 TOE1 유전자 등이며, 현재 miR156 유전자 cloning 및 Agrobacteria 형질전환 실험을 수행하였다.

라. 생체시계 유전자 alternative splicing에 의한 저온반응성 유도 연구

식물은 발아한 지점에서 일생을 보내는 고착생물로서 최대의 reproductivity를 달성하기 위해 생체 내부의 기작 및 반응들을 외부 환경의 변화 주기에 맞추어야한다. 애기장대에서는 이러한 생체리듬을 조절하는 데 중심적인 역할을 하는 단백질로 MYB domain 전사인자의 일종인 CIRCADIAN

CLOCK-ASSOCIATED 1 (CCA1)의 기능이 알려져 있다 (Wang et al, 1998). 한편 CCA1은 생체리듬 조절뿐만 아니라 과량발현체에서 저온에 대한 식물의 저항성이 증대되고 이것이 저온저항성과 관련된 유전자의 promoter에 직접적으로 결합함으로써 이들의 발현을 조절하기 때문으로 알려져 있다 (Dong et al, 2011). 하지만 저온 특이적인 CCA1의 activity 증가에 대해서는 그 메커니즘이 밝혀지지 않았다.

본 연구실에서는 CCA1의 pre-mRNA가 alternative splicing에 의해 MYB domain 하나가 제거된 CCA1 $\beta$  isoform이 생성되고, 이것이 functional isoform으로 알려진 CCA1 $\alpha$ 와 heterodimer를 이룸으로써 CCA1 $\alpha$ 를 negative하게 조절함을 밝혔다 (그림 1). CCA1 $\alpha$ -CCA1 $\beta$  heterodimer는 CCA1 $\alpha$ -CCA1 $\alpha$  homodimer에 비해 DNA binding affinity가 감소하게 되며, 따라서 CCA1 $\alpha$ 와 CCA1 $\beta$ 의 비율에 따라 CCA1 $\alpha$ 의 활성이 조절되고 그 결과 전체적인 생체 리듬의 주기와 진폭이 결정되는 것이다. 또한 연구 결과,

CCA1 $\alpha$ 와 CCA1 $\beta$ 의 비율이 온도에 따라 달라짐을 확인하였다. 저온에서 CCA1 $\beta$ 의 생성이 저해됨으로써 CCA1 $\alpha$ 에 대한 억제효과가 감소하게 되며, 이렇게 저온에서 증가된 CCA1 $\alpha$ 의 activity가 식물의 저온에 대한 저항성을 높이는 것이다. 실제로 CCA1 $\alpha$  과량발현체가 wild type보다 높은 저온저항성을 보이는 데 반해, CCA1 $\beta$  과량발현체의 경우 wild type보다 저온에 대해 취약함을 확인하였다. 즉, 온도에 따라 CCA1의 alternative splicing 패턴이 변화됨으로써 식물의 온도에 대한 반응성이 조절되는 것이다.

그 밖에도 본 연구실에서는 IDD14 전사인자의 alternative splicing이 저온에 의해 촉진됨을 보고하였으며 이러한 기작이 저온에서의 starch metabolism과 관련이 있음을 밝혔다. 또한 모델 식물인 애기장대 뿐만 아니라 벼 등 다양한 식물에서도 저온에 의한 전사인자의 alternative splicing이 조절되며 이것이 식물의 저온에 대한 반응성을 조절하는 데 중요한 것임을 보고하였다.

마. HOS1 E3 ubiquitin ligase의 식물 발달 조절 연구

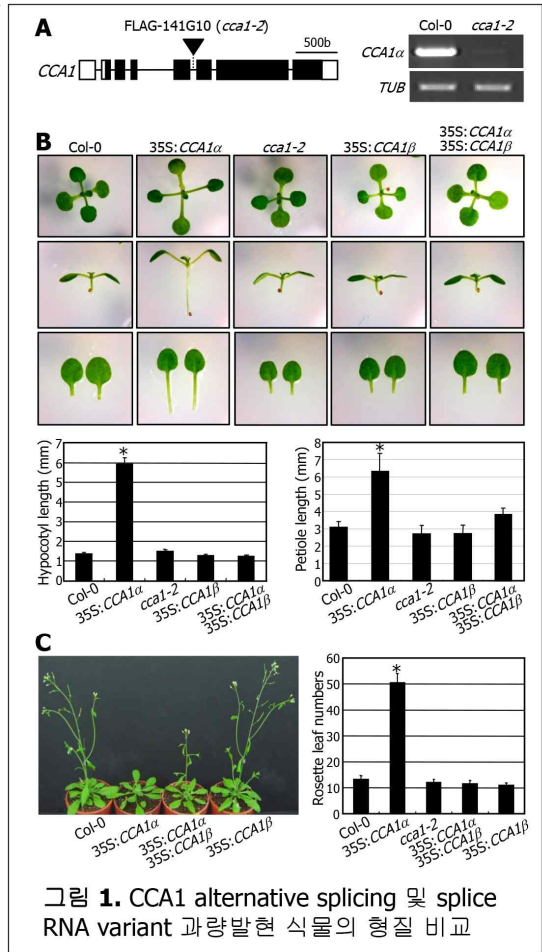


그림 1. CCA1 alternative splicing 및 splice RNA variant 과량발현 식물의 형질 비교



HOS1 단백질은 모델 식물인 애기장대에 존재하는 RING finger type의 E3 ligase로써 target 단백질에 Ubiquitin을 표지함으로써 그 단백질의 분해를 촉진함으로써 다른 단백질의 양을 조절하는 기능을 한다. 특히 이러한 HOS1의 기능은 저온스트레스 하에서 식물의 저항성을 부여하는 ICE1이라는 단백질을 분해하는 데 중요함이 알려져 있었으며 그 외의 기능에 대해서는 밝혀지지 않았다 (Dong et al, 2006).

본 연구실에서는 HOS1의 기능이 저온저항성 뿐만 아니라 다양한 메커니즘을 통하여 식물의 개화 시기에도 중요함을 밝혀냈다. HOS1 단백질이 저온스트레스가 왔을 때 식물의 개화시기를 촉진하는 데 있어 중요한 CONSTANS (CO) 단백질을 ubiquitination하여 개화시기의 지연을 일으킨다는 것이 그것이다. 저온에 의한 CO 단백질의 분해가 촉진되며 이것은 ubiquitin-proteasome pathway에 의한 것으로 나타났으며, 저온에서의 CO 단백질의 ubiquitination이 hos1 knockout mutant에서 사라짐을 확인하였다. 또한 실제 개화시기에 있어서도 wild type의 경우 저온스트레스에 의해 개화시기가 늦어지는 데 반하여, hos1 knockout mutant는 저온스트레스에 의한 개화시기 지연이 일어나지 않음을 밝혀내었다 (Jung et al, 2012). 이러한 기작은 봄이나 가을에 일어나는 잠깐의 기온 저하를 인지함으로써 식물의 개화시기를 정교하게 조절하는 데 기여하는 것으로 생각된다.

또한 알려진 E3 ligase로서의 기능뿐 아니라 HOS1이 chromatin remodeling에 관여함과 그 메커니즘을 밝혀내었다. 개화시기를 억제하는 유전자인 FLC는 정상 온도에서 histone deacetylase의 일종인 HDA6와 FVE에 의해 억제되어 있다가 저온이 왔을 때 HOS1에 의해 FVE와 HDA6의 interaction이 방해되고 따라서 FLC의 발현이 증가되어 개화시기가 지연되는 것이다. 실제로 hos1 mutant에서는 FLC의 발현이 증가되어 있으며, FLC chromatin의 histone acetylation 정도가 변해있음을 증명하였다 (Jung et al, 2013). HOS1이 단순한 저온스트레스 저항성 조절뿐만 아니라, E3 ligase 및 chromatin remodeling factor로써 식물의 온도 반응성 및 developmental process를 조절하는 데 있어 중요한 것으로 생각된다.

전반적으로 HOS1은 E3 ubiquitin ligase로서 뿐만 아니라 다양한 역할을 한다는 사실을 알 수 있다 (그림 2).

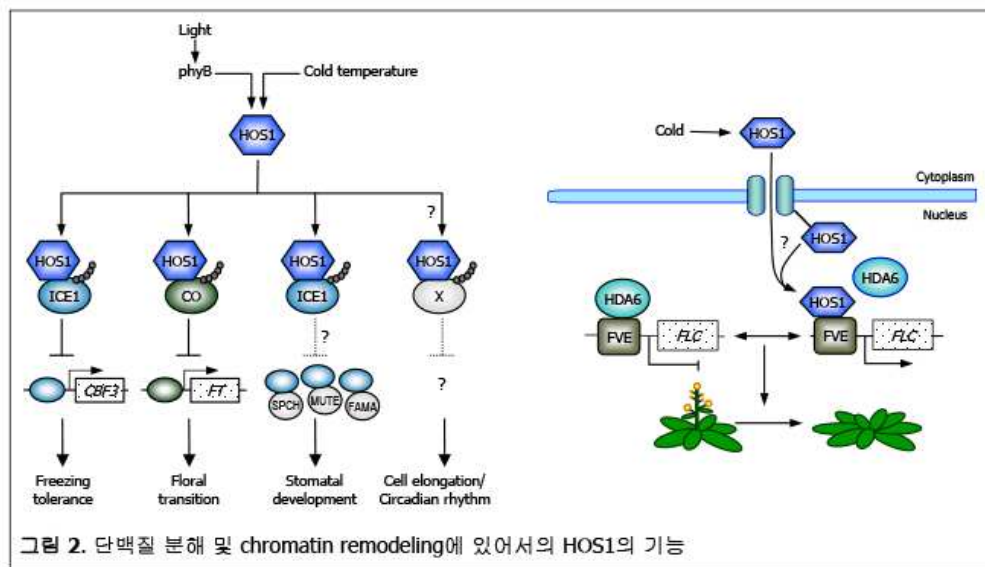
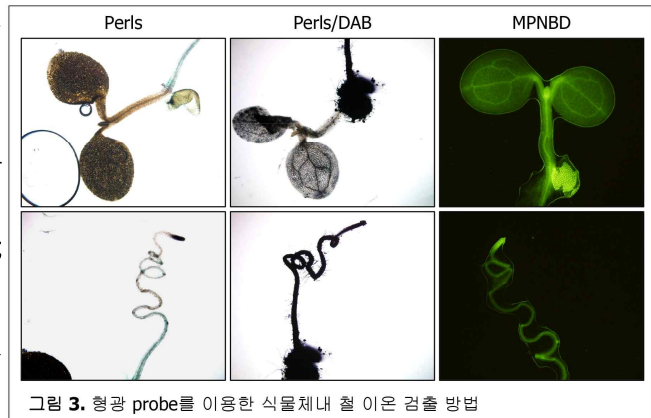


그림 2. 단백질 분해 및 chromatin remodeling에 있어서의 HOS1의 기능

#### 바. 식물 내 철 이온 검출을 위한 형광 probe 개발

식물생리학 연구에 있어서 특정 이온 검출 및 정량은 중요한 분석 시스템을 제공한다.

철 이온은 동물과 식물 모두에게 필요한 필수 영양소 중의 하나이다. 따라서 그 양이 적으면 제대로 살아갈 수 없으며, 그 양이 많아도 철 이온에 의한 활성산소 합성으로 인해 생물체에 독성을 유발하여 그 양이 매우 정교하게 조절되고 있다(Delhaize, 1996; Nakamura et al, 2014). 식물의 경우 철 이온은 엽록소의 합성, 광합성에서의 전자전달, 질소 고정 등 매우 중요한 과정에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.



본 연구실에서는 서울대학교 화학부 이진규 교수 연구팀과의 공동 연구로 식물 체 내 철 이온을 검출할 수 있는 형광센서를 개발하였다. 이 형광센서는 철 이온 (Fe(II), Fe(III)) 과 특이적으로 결합하였을 때 초록색의 형광을 나타낸다 (그림 3). 그 밖에 식물 체 내에 다량으로 존재하는 금속 이온인 칼슘 (Ca), 칼륨 (K), 마그네슘 (Mg), 망간 (Mn) 등과는 반응하지 않음을 밝혀냈다. 또한 철이온 결합에 따른 형광의 세기가 철의 양이 많을수록 비례하여 증가함을 증명하였으며, 따라서 정량적으로 철 이온의 농도를 측정하는 데에 유용할 것으로 기대된다. 실제 모델 식물인 애기장대를 이 센서를 이용하여 관찰한 결과, 철 이온이 많이 존재하는 것으로 알려진 관다발 조직 및 잎의 엽록체에서 초록색의 형광을 관찰할 수 있었다. 이는 기존에 알려진 식물의 철 염색 방법인 Perls staining이 많은 양의 철만을 관찰할 수 있는 데 비하여 적은 양이 철이 분포하는 곳도 염색할 수 있다는 점에서 장점을 갖는다. 또한 Perls staining 보다 적은 양의 철을 검출할 수 있는 것으로 알려진 Perls/DAB/Cobalt 방법 보다 매우 빠르고, 처리를 필요로 하는 화학물질의 양이 적고, 비용이 싸다는 장점을 갖는다. 이 실험 결과는 결정된 논문이 Chemical Communication에서 최종 심사 중이며, 별 문제가 없을 것으로 예상된다.

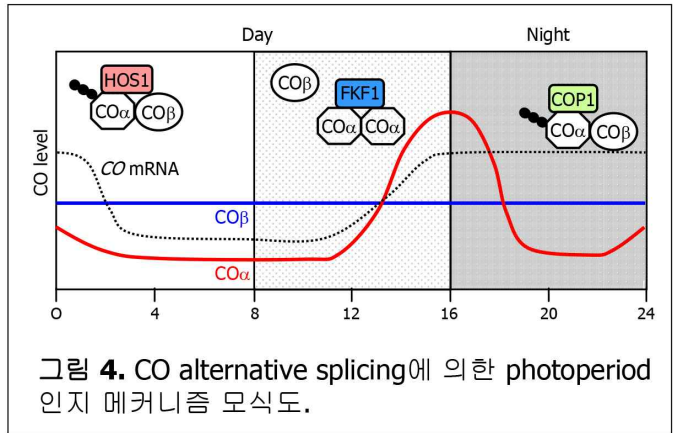
#### 사. 개화시기 조절 유전자인 CONSTANS의 alternative splicing에 의한 광주기 신호 인지 연구

식물의 개화시기는 최적의 reproductive succes를 위해 photoperiodic pathway, vernalization pathway, autonomous pathway, GA pathway 등 다양한 신호에 의해 정교하게 조절된다. CONSTANS (CO)는 이 가운데 photoperiodic pathway에서의 central regulator로 많은 연구가 진행되었다 (Michaels et al, 2009; Turck et al, 2008; Samach et al, 2000).

CO 유전자는 alternative splicing에 의하여 CO $\alpha$ 와 CO $\beta$ , 두 가지 isoform을 생성한다. CO $\alpha$ 의 경우 N-terminal에 단백질-단백질 상호작용과 관련된 B-box domain과 C-terminal에 nuclear localization signal을 갖고 단백질-단백질 상호작용과 관련된 CCT domain, 그리고 이 둘 사이에 transcriptional activation domain이 존재한다. 반면 CO $\beta$ 는 CCT domain이 없는 구조이며 현재까지 그 기능이 보고되지 않았다.

본 연구실에서는 그 기능이 밝혀지지 않은 CO $\beta$ 에 대해 연구하고 있으며, 특히 CO $\beta$ 가 peptide interference (PEPi) 기작에 의해 CO $\alpha$ 에 대한 dominant negative regulator로 작용할 것인지에 집중하고 있다. 실제로 CO $\beta$ 를 과량발현시킬 경우, CO $\alpha$ 의 과량발현체와 반대

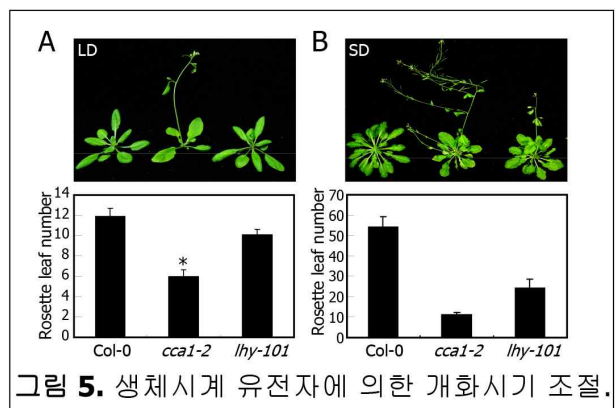
로 개화 시기가 늦어지며, CO $\alpha$  과량발현체에 CO $\beta$ 를 과량발현시키면 빨라진 개화 시기가 다시 늦춰짐을 알 수 있었다 (그림 4). 즉, 개화시기 조절이라는 측면에서 CO $\beta$ 가 CO $\alpha$ 의 활성을 억제한다는 것을 보인 것이다. 또한 CO $\alpha$ 와 CO $\beta$  단백질이 서로 interaction함을 증명하였다. 따라서 CO $\beta$ 가 CO $\alpha$ 와 heterodimer를 이룸으로써 CO $\alpha$ 의 activity를 떨어뜨리는 것으로 생각된다. 한편, 연구 결과 CO $\alpha$ 와 CO $\beta$ 는 단백질의 리듬이 광주기 신호에 대하여 다르게 반응함을 관찰하였으며 이것이 식물의 광주기 신호 인지 및 개화시기에 어떠한 영향을 주는가에 대해 밝히고 곧 학술논문을 투고할 예정이다.



#### 아. 생체시계 조절 전사인자인 CCA1에 의한 개화시기 조절 연구

식물의 개화시기를 조절하는 다양한 pathway 가운데 낮의 길이를 인지하는 photoperiodic pathway의 경우, 이를 구성하는 주요 유전자들인 CONSTANS (CO), GIGANTEA (GI), FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (FKF1), CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1) 등의 유전자의 발현이 생체시계에 의하여 조절된다는 것이 알려져 있다 (Green et al, 2002; Imaizumi, 2010). 또한 생체시계 관련 돌연변이체들이 단일 (short day) 조건에서 이들의 발현 리듬이 달라짐으로써 wild type보다 개화시기가 빨라지는 표현형을 나타낸다는 것이 보고되었다. 이와 같은 사실을 바탕으로 현재까지 생체시계와 개화시기의 관계는 photoperiodic pathway에 집중되어 설명되었다.

본 연구실에서는 생체시계를 조절하는 주요 전사인자인 CCA1의 knockout mutant가 장일 (long day) 조건에서도 wild type에 비하여 개화시기가 빨라져있음을 발견하고 그 메커니즘을 연구하였다 (그림 5). 생체시계와 밀접하게 관련이 있는 photoperiodic pathway와의 관계를 확실히 하고자 그 pathway 상에 있는 유전자들의 발현을 wild type과 비교하였고, 또한 *cca1* knockout mutant에서의 period를 살펴보았다. 결과적으로 단지 CCA1이



photoperiodic pathway의 상위에 있는 생체시계 유전자로서만 개화에 관여한다고는 볼 수 없다는 결론을 내리게 되었으며, 추가적인 실험을 통해 CCA1이 독립적인 하나의 repressor로서 floral integrator인 FT 유전자의 발현에 직접적으로 관여하고 있다는 것을 알 수 있었다.

본 연구를 통해 CCA1이 생체시계를 조절하는 주요 기능 이외에 개화 시기 조절에도 관여하고 있음을 확인 할 수 있었다.

자. 환경스트레스에 의한 생체시계 유전자들의 alternative splicing 조절 연구

alternative splicing은 다양한 mRNA가 생성되게 하는 전사 후 과정으로 다양한 외부 환경에 반응하여 유전자 발현을 조절하는 데 중요한 역할을 하고 있다. 최근에는 생체시계를 구성하는 유전자들이 이러한 alternative splicing에 의해 productive하거나 혹은 non-productive한 mRNA isoform을 생성한다는 보고들이 있어왔다 (James et al, 2012; Wang et al, 2012). 따라서 생체시계를 이루고 있는 central loop, morning loop, 그리고 evening loop에 고르게 분포하도록 6개의 유전자를 선정하여 그 spliced variants를 분석해보았다.

CCA1은 4번째 intron이 retention된 형태의 isoform이 생성되며, ELF3는 2번째 intron의 부분적인 retention으로 다음 exon에서 premature termination codon (PTC)이 발생함을 관찰하였다 (그림 6). ZTL은 두 번째 intron이 retention된 형태로 다른 isoform에 비해 어느 정도 큰 존재 비율을 나타내는 것으로 보인다. PRR7의 경우, PCE event로 인한 PTC를 갖는 isoform을 생성하였다. PRR9은 5'-UTR이 더 긴 형태로 start codon의 위치에서 차이를 보이고 있었으며, TOC1은 4번째 intron의 retention으로 poisoned cassette exon (PCE) event를 갖는 AS가 일어남을 확인하였다. 이 중 ELF3와 TOC1의 isoform만이 nonsense-mediated decay (NMD) pathway의 target으로 예상되는 결과를 얻었으며, CCA1, TOC1, PRR7 그리고 PRR9의 isoform은 protein을 생성할 것으로 보인다. 다양한 환경스트레스 하에 각각의 유전자들의 alternative splicing pattern 변화 또한 다르게 나타났다.

본 연구로 생체시계 관련 유전자들이 대체적으로 alternative splicing을 통해 발현량을 조절한다는 것과 외부 환경에 따라 구성 인자들의 alternative splicing pattern 변화가 분명하다는 것이 확인되었다. 이 후 특별히 큰 변화가 있었던 유전자와 스트레스에 대한 저항성과의 관계도 살펴보았으며, 본 연구결과는 교정된 논문이 심사 중이다.

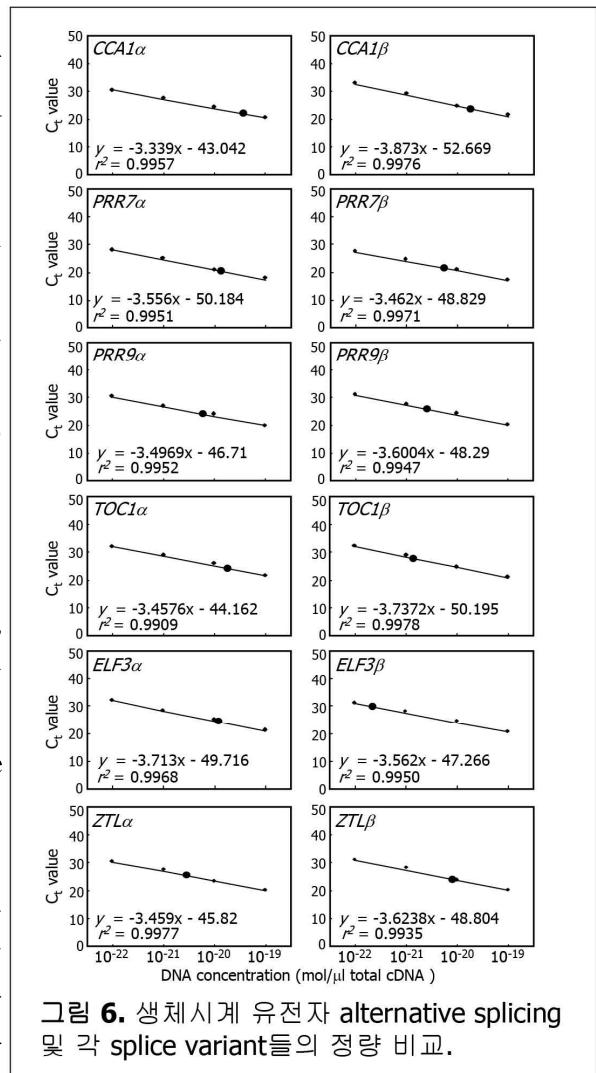


그림 6. 생체시계 유전자 alternative splicing 및 각 splice variant들의 정량 비교.

자. 저온 저항성 유전자가 도입된 Brachypodium 형질전환체 연구

식물의 저온에 대한 반응 및 적응은 식물학적으로 그리고 농업적으로도 매우 중요한 특성으로서 바이오에너지 생산 작물 뿐 만 아니라 식용작물의 재배 과정에서도 생산량에



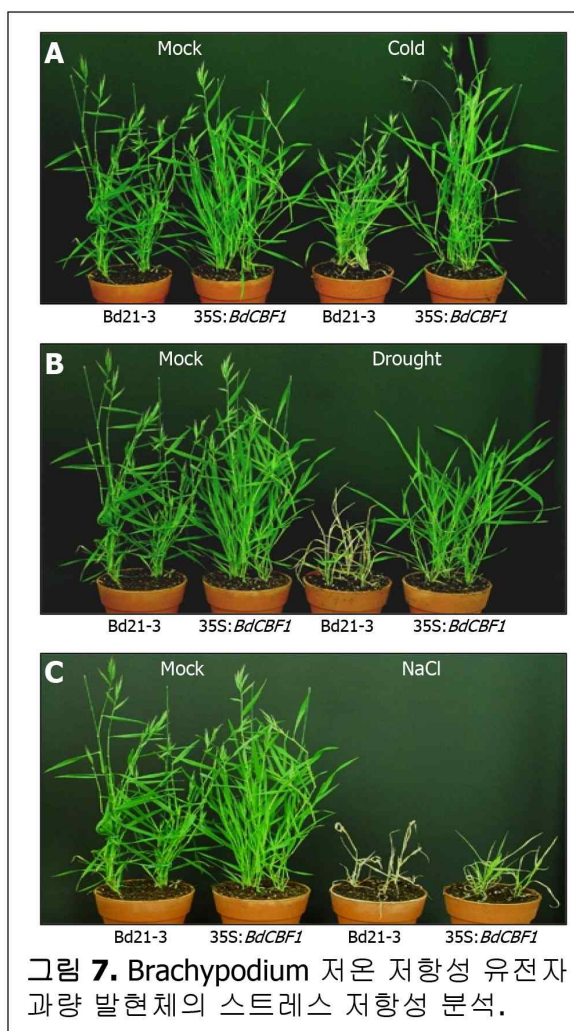
결정적 요인으로 작용한다. 식물체는 식물생장에 부적합한 저온이나 동결과 같은 낮은 온도 조건에서 반응하기 위해 정교한 기작을 진화시켜 왔다. 저온에 일정 기간 노출되면 동결은도에 저항성을 부여하는 많은 유전자들을 발현시켜 이후의 동결조건에서도 살아남도록 적응하는 기전을 가지고 있으며, 이러한 기전은 유전자 발현, 잎의 초미세구조, 효소의 활성화, 당류와 폴리아민류 수준, 이온채널의 활성화 등의 변화를 포함한 식물의 복잡한 생화학적 및 생리적 변화를 통해 환경변화에 대한 적응을 최적화하기 위하여 거미줄처럼 연결된 복잡한 신호전달네트워크 상에서 작동하는 것으로 여겨지고 있다.

Dehydration responsive element (DRE) 혹은 C-repeat (CRT)는 신호전달체계와 식물 스트레스 반응에 관여하는 중요한 전사조절 인자로 알려져 있다(Yamaguchi-Shinozaki et al, 2006). 내한성 유전자로 DRE/CRT 결합단백질인 CBF1 (혹은 DREB1B), CBF2 (혹은 DREB1C), CBF3 (혹은 DREB1A)가 분리되었다. 저온에서 유도되는 CBFs는 DRE/CRT류의 조절에 관여하는데, 과발현시 DRE/CRT류가 지속적으로 발현되며 식물의 저온내성이 증가한다. 또한 CBF1 유사체나 CBF3 과발현은 DRE/CRT류의 지속적인 발현을 야기시키며, 동결에 대한 내성뿐만 아니라 건조 내성도 증가시킨다 (Liu et al, 1998; Gilmour et al, 1998; Jaglo-Ottosen et al, 1998; Thomashow, 1999; Shinozaki et al, 2003; Taji et al, 2002; Sakuma et al, 2006).

본 연구팀에서는 최근 염기 서열이 밝혀진 *Brachypodium* 내에도 CBFs가 존재함을 확인하였고, 이들 유전자는 밀, 보리 등의 단자엽 식물의 CBFs와 유사성이 높음을 확인하였다. RT-PCR 방법을 이용하여 *Brachypodium*에서 CBF와 상동성이 높은 유전자인 CBF1을 동정

했는데, 이 유전자는 672bp의 ORF를 포함하며, 209 아미노산 잔기를 코딩하는 것으로 확인되었다. 또한 multiple sequence alignment 결과 이 유전자는 DREB1 subfamily로 분류되는 것으로 확인되었다 (그림 7). CBF1 과량발현체 *Brachypodium*의 경우, 저온 스트레스에 대한 저항성이 증가되었고, 내성의 증진을 위한 proline 함량, sucrose, glucose 등의 당 증가와 membrane의 유동성이 변화됨을 확인하였다 (Ryu et al, 2014).

본 연구를 통해 식물이 환경스트레스 신호를 인지 전달하여 세포핵 내에서 저온, 결빙 건조 저항성 유전자들을 발현시키는 경로에 참여하는 신호전달 구성성분의 유전자들을 확보하였으며, 단자엽 모델 식물체인 숲개밀 (*Brachypodium*)으로부터 분자생물, 생리 및 유전학적 방법을 이용하여 그 전달 기전을 밝히고, 궁극적으로는 억새 또는 다른 바이오에너지 작물에 형질전환하면 내 저온성과 바이오매스 보존 능력을 갖춘 매우 유용한 바이오 에너지



지 작물을 개발로의 응용성을 모색할 수 있게 되었다.

### [3협동: 억새 (*Miscanthus sinensis*) 형질전환 시스템 구축 및 광 이용성 증대 억새 품종 개발]

#### 1. 억새 재분화 및 형질전환 조건 확립

##### 가. 억새의 조직배양 및 embryogenic callus 유도 조건 확립

: 본 과제 연구에서는 먼저 억새 형질전환 시스템 개발을 위한 억새 조직배양 및 재분화 조건을 탐색하여 확립하고자 하였다. 효율적인 재분화 조건의 확립은 식물 형질전환을 위한 필수적인 요소이기에 다양한 조건을 탐색하여 효율적인 재분화 시스템을 확립하고자 하였다. 조사된 조건들로는 다양한 호르몬 조건, pH, 온도, 여러 첨가물 등이 이용되었다. 또한 종자뿐 아니라 immature stem 조직을 이용하거나 suspension culture를 이용한 조건도 사용하였다. 이때 (주)금오조경개발에서 구입한 억새 종자를 주로 사용하였으며, 이들 조건들에 대한 결과들을 간단히 요약하면 다음과 같다.

먼저 식물호르몬 auxin과 cytokinin의 조합을 2,4-D와 BA 조합을 이용하여 callus 유도율을 조사한 결과 (그림 1A-B), 캘러스 유도율은 2,4-D와 BA를 혼용 처리한 것보다 2,4-D를 단독으로 처리했을 때 높게 나타났으며, BA가 들어가면 callus 유도율이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 본 실험 조건에서는 3 mg/L 2,4-D를 단독 처리한 실험에서 가장 높은 callus 유도율을 보였다. 그리고 pH에 따른 캘러스 유도율을 조사한 결과, pH 5.7 사용이 효율적인 것으로 나타났다. 또한 온도의 경우 28°C에서 가장 좋은 캘러스 유도율을 보였다. 그리고 캘러스의 재분화를 위해서는 callus 유도율보다 embryogenic callus 유도 비율이 중요한데, 본 연구결과 캘러스 유도율이 좋았던 조건에서 embryogenic callus 비율이 높게 나타났다 (그림 1C-D). 최종적으로 pH 5.5-5.9, 온도 25-30°C, 2,4-D와 BA 조합 (2,4-D: BA = 1~3: 0~0.1 mg/L) 조건에서 캘러스 유도율과 embryogenic callus 비율을 조사한 결과, 억새 종자를 이용하는 경우 pH 5.7, 28°C, 3mg/L 2,4-D 단독 처리 조건이 가장 좋은 것을 확인할 수 있었다 (그림 2).

하지만 상기 조건에서는 캘러스 유도율은 약 60% 수준으로 괜찮은 편이었으나 embryogenic callus 비율은 약 30% 이내로 작은 편이었다. 이는 억새의 경우 callus 유도 과정에서 보라색의 polyphenolic compound로 추정되는 물질들을 많이 만들어내기 때문인 것으로 여겨졌다. 이에 이들 화합물의 분비를 줄이고 embryogenic callus 유도 비율을 높이기 위하여, AgNO<sub>3</sub>, activated charcoal, ascorbic acid, L-proline 등을 배지에 첨가하여 callus 유도율을 비교하여 보았다. 그 결과, 다른 첨가물에서는 큰 차이를 발견하지 못하였으나 L-proline이 첨가되는 경우에 embryogenic callus 유도 비율이 높게 향상되는 것으로 확인할 수 있었다 (그림 3). 따라서 본 연구결과에 의하면 callus 유도 배지에 25 mM L-proline을 첨가한 조건에서 캘러스 성장과 더불어 embryogenic callus 유도 비율이 가장 우수함(약 41%)을 확인할 수 있었다. 결론적으로 억새 종자를 이용한 embryogenic callus 유도 최적 조건으로 pH 5.7, 28°C, 3mg/L 2,4-D, 25 mM L-proline이 포함된 배지를 이용하였다.



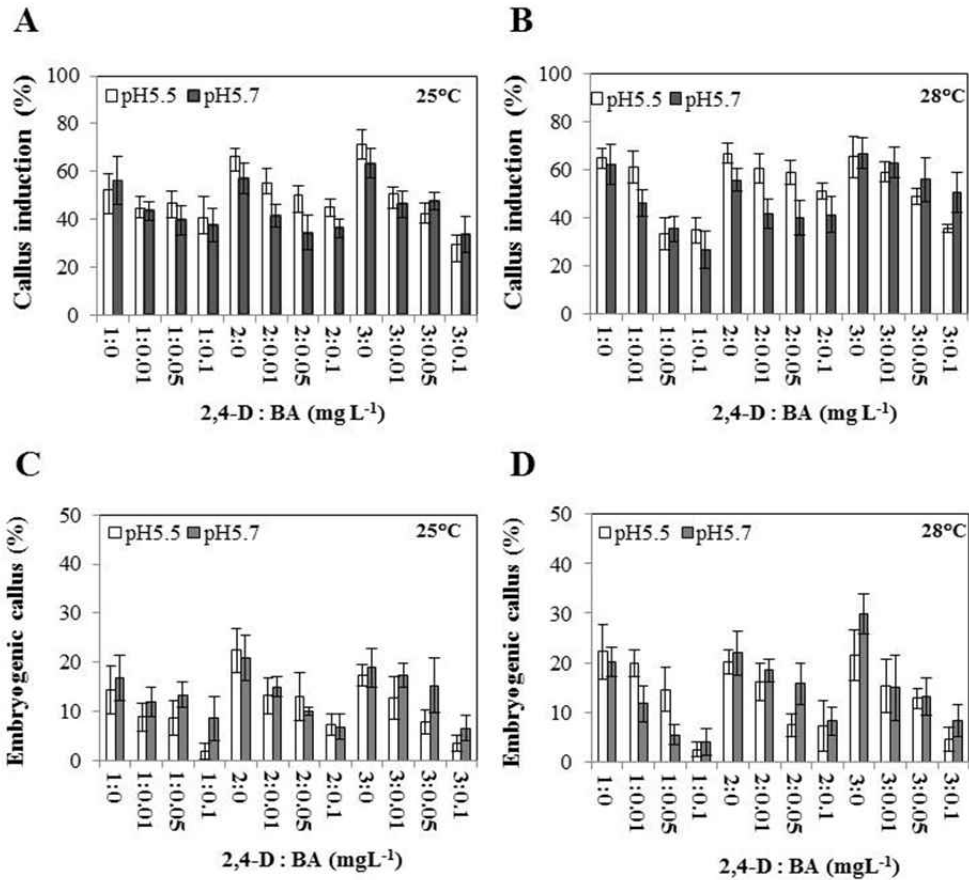


그림 1. Combinatory effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 6-benzyl-adenine (BA), pH and temperature on callus induction or embryogenic callus induction. (A-B) 캘러스 유도율 조사 결과. pH (5.5. or 5.7), 2,4-D와 BA 조합 (2,4-D : BA = 1~3: 0~0.1 mg/L)에서 캘러스 유도율을 25°C (A)와 28°C(B)에서 조사하였다. (C-D) Embryogenic callus 유도 비율 조사 결과. 유도된 캘러스 중에서 재분화능이 있는 embryogenic callus의 비율을 조사하였다. Error bars indicate standard deviations of three replicates.

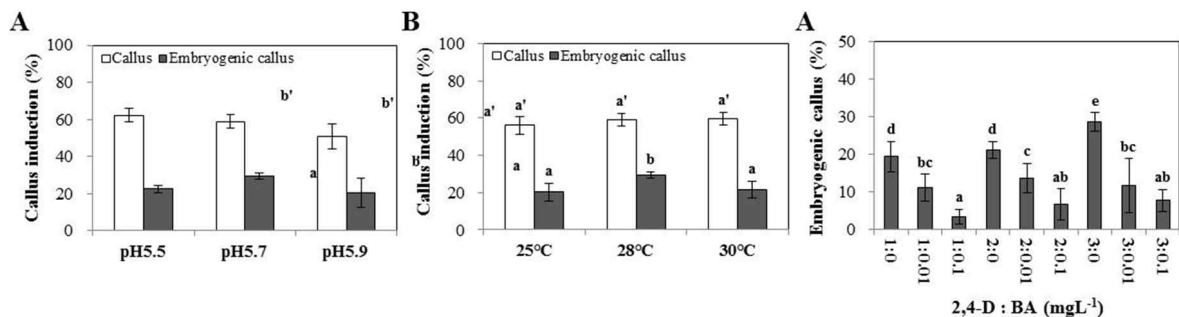


그림 2. Effects of pH, temperature, and combinations of 2,4-D and BA on callus induction or embryogenic callus induction. (A) pH 효과 조사 결과. (B) 온도 효과 조사 결과. (C) 2,4-D와 BA 조합 (2,4-D : BA = 1~3: 0~0.1 mg/L) 효과 조사 결과. Error bars indicate standard deviations of three replicates, and means with

different letters are significantly different at  $P < 0.05$ , using Duncan.

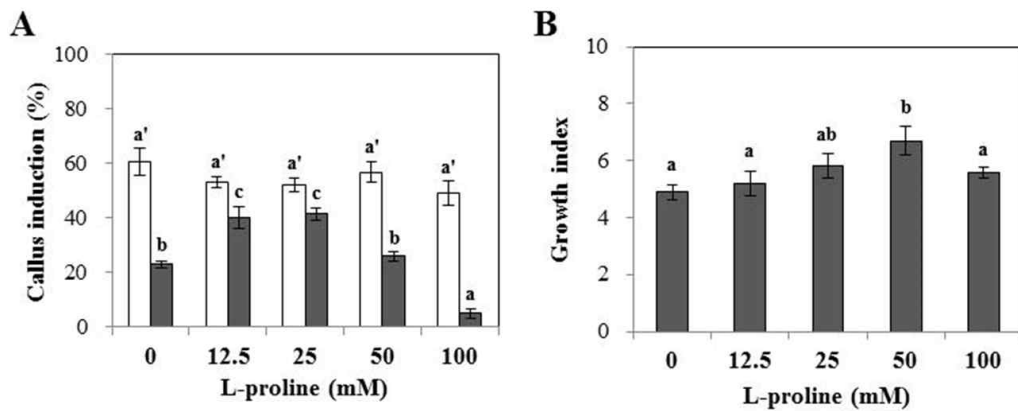


그림 3. Effects of L-proline on embryogenic callus induction and callus growth. (A) Proline에 의한 embryogenic callus 유도 비율 증대 효과. 캘러스 유도 배지에서 배양 6주 후에 캘러스 유도율(open bars)과 embryogenic callus 유도 비율(filled bars)을 조사하였다. (B) 캘러스 성장에서 proline 효과 조사 결과. 캘러스의 growth index는 초기 캘러스 무게와 일정 기간 배양 후 캘러스 무게 차이를 이용하여 계산되었다. Error bars indicate standard deviations of three replicates, and means with different letters are significantly different at  $P < 0.05$ , using Duncan.

상기 연구 결과들은 본 연구진의 다른 단자엽 작물인 잔디의 조직배양 및 재분화 선행 연구 경험을 활용하였기에, 성숙 종자를 이용한 callus 유도 결과들이었다. 하지만 일부 다른 연구진들은 억새의 다른 조직을 이용하여 조직 배양을 하는 것이 알려졌기에, 본 연구진은 immature stem 및 immature inflorescence 조직들을 이용한 callus 유도와 suspension culture를 이용한 embryogenic callus 증식을 시도하였다. 먼저 immature stem 및 immature inflorescence 조직을 이용한 callus 유도에서는 다량의 보라색 polyphenolic compound 물질들이 분비되어 결국에는 callus들이 죽게 되는 것을 관찰하였다. 또한 다양한 첨가물(AgNO<sub>3</sub>, activated charcoal, ascorbic acid 등)도 포함시켜 callus 유도를 진행시켰으나 연구에 사용할만한 좋은 callus를 확보하지 못하였다. 따라서 억새의 경우 immature stem 또는 immature inflorescence 조직으로부터 embryogenic callus 유도는 현실적으로 힘든 것으로 파악되었다. 그리고 suspension culture를 이용한 embryogenic callus 증식을 시도한 결과, 캘러스의 증식은 제대로 진행되었으나 embryogenic callus 유도 효율과 재분화 효율이 낮아지는 경향을 보였다. 결론적으로 다른 조직이나 현탁 배양 등의 조건보다는 억새의 성숙 종자를 이용하여 캘러스를 유도하는 것이 억새 조직배양에 가장 유리한 조건으로 결론지을 수 있었다.

본 과제 연구에서 수행한 억새 조직배양 과정에서 기억할만한 한 가지 중요한 부분으로, 계절에 상관없이 연구가 가능한 성숙 종자를 이용하기 위해 억새 종자 살균 방법을 확립하였다. 이는 억새 종자의 경우, 종자 박피 후 에탄올과 락스를 이용하는 기존의 종자소독 방법을 적용하였을 때 곰팡이 균 오염이 너무 심하여 조직 배양을 진행하기 힘들었기

때문이었다 (아마도 역새 종자의 형태학적 특성으로 채집 종자에 곰팡이 균 오염이 있는 것으로 파악됨). 이에 역새 종자 살균에 효과적인 살균제를 조사한 결과, benomyl 계 농약인 벤레이트 (Benlate, 신젠타에서 구입)를 이용하였을 때 역새 종자 소독이 효율적으로 이루어짐을 확인하였다 (표 1). 따라서 본 연구에서는 역새 종자의 소독 방법으로 역새 종자를 0.1% (0.5 g/L) 벤레이트 용액에서 5시간 정도 처리하여 1차 살균 처리를 진행 한 후, 2차 살균으로 70% 에탄올에서 약 5분, 2% sodium hypochlorite를 함유한 락스 용액에서 약 20분 처리하는 과정을 진행하여, 조직 배양 과정에서 곰팡이 균 오염을 최소화시킬 수 있는 살균 소독 조건을 확립할 수 있었다. 이러한 과정으로 살균한 종자를 이용한 경우, 조직배양을 효율적으로 진행할 수 있었다.

표 1. 벤레이트를 이용한 역새 종자 살균 조건 조사

처리시간 (hour)	처리 농도에 따른 발아율 (%)		곰팡이균 발생 여부
	0.5 g/L	1 g/L	
1	44.7	61.7	○
3	50.0	50.5	○
5	48.8	46.2	×
7	42.8	29.1	×
9	35.9	14.4	×
11	0.0	0.0	×

나. 역새 embryogenic callus를 이용한 재분화 조건 확립

상기의 성숙 종자로부터 확립된 캘러스 유도 조건[MS salts and vitamins, 3% sucrose, 750 mg/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 3 mg/L 2,4-D, 25 mM L-proline, 2% Gelrite, pH 5.7]을 이용하여 embryogenic callus를 유도한 후, 유도된 callus를 재분화 유도 배지[MS salts and vitamins, 2 mg/L kinetin, 30 g/L sucrose, 750mg/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 2g/L Gelrite, pH 5.7]로 옮긴 후 재분화율을 조사하였다. 그 결과, 재분화가 가능한 세 종류의 embryogenic callus type이 확인되었다 (그림 4). 그 중에서 yellowish compact type이 가장 우수한 재분화 효율(75.53%)을 보여 주었으며, 다음으로 whitish friable type이 43.48%, whitish compact type이 33.33%의 재분화율을 보여주었다. 또한 yellowish compact type의 embryogenic callus는 multiple shoot 형성 능력(13.0 plantlets per callus)이 우수하였다. 참조로 whitish friable type과 whitish compact type은 각각 5.7 및 4.3 plantlets per callus 결과를 보여주었다. 따라서 역새 형질전환을 위해서는 캘러스 유도 후, yellowish compact type의 embryogenic callus를 골라 이용하는 것으로 하였다.

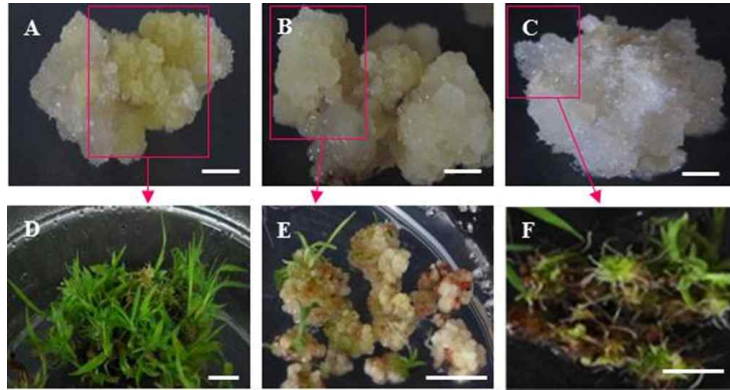


그림 4. Comparison of plant regeneration from different callus types. (A-C) 유도된 embryogenic callus의 세 type들. Bar, 1 mm. (D-F) 세 가지 embryogenic callus type들의 multiple shoot 유도 비교. Bar, 1 cm. (A, D) Yellowish compact type. (B, E) Whitish friable type. (C, F) Whitish compact type.

억새의 재분화는 약 3개월의 시간이 소요되었는데, 한 예로 4월 15일에 callus induction 배지에 종자를 치상하면, 5월 14일 shoot induction media로, 5월 28일 root induction media로 subculture 시킬 수 있었으며, 7월 3일 식물체를 토양으로 이식하여 순화 과정을 진행할 수 있었다.

#### 다. 억새 형질전환을 위한 최적 germplasm 확립

본 연구진은 연구 초기에 (주)금오조경개발에서 구입한 억새 종자를 이용하여 embryogenic callus를 확보하여 억새 형질전환을 수행하였으나 실패하였다 (2년간 시도하였으나 궁극적으로 억새 형질전환 성공하지 못함). 이것은 구입한 종자가 노지에서 채집된 혼합 종이였기에 유도된 캘러스들이 제각각이고 서로 다른 종류가 섞여 있어 형질전환에 적합하지 못할 뿐 아니라 형질전환 효율이 극단적으로 낮아지는 것으로 예측되었다 (아마도 이런 이유로 다른 연구진들도 억새 형질전환을 성공하지 못하는 것으로 여겨짐). 이에 본 과제 내 서울대 김도순 교수 연구진(제4협동과제)에서 수집하여 유지 관리하고 있는 7종의 억새 germplasm 종자들을 이용하기로 하였다 (표 2 & 표 3).

이에 위에서 확립한 조건을 이용하여 germplasm들의 embryogenic callus 유도율과 재분화율을 조사하였다. 먼저 총 7개의 억새 germplasm들(SNU-M-022, SNU-M-025, SNU-M-032, SNU-M-034, SNU-M-03, SNU-M-045, SNU-M-107)의 embryogenic callus 유도율을 측정한 결과, SNU-M-025와 SNU-M-045 라인이 50% 이상으로 높게 관찰되었다 (대조구로 (주)금오조경개발에서 구입한 종자는 약 34.33%였음) (표 4). 다음으로 재분화율을 조사한 결과, SNU-M-022와 SNU-M-045 라인이 각각 82.64%와 86.11%로 우수하게 나왔다 (표 4 & 그림 5). 하지만 SNU-M-022 라인은 재분화 효율이 우수하였으나 조직 배양 과정에서 phenolic compound 분비가 관찰되어 형질전환에는 적합하지 않은 것으로 나타났으며, SNU-M-034 라인은 embryogenic callus 유도율은 좋았으나 shoot 신장이 잘 이루어지지 않는 단점이 관찰되었다. 그에 반해 SNU-M-045 라인은 embryogenic callus 유도율과 재분화율이 우수할 뿐만 아니라 multiple shoot formation도 우수하였다. 이에 결론적으로 SNU-M-045 라인이 형질전환에 가장 적합한 germplasm임을 확인할 수 있었다.

참고로 SNU-M-045 라인은 인천에서 채집된 종으로서 키가 2.45 m, 줄기 두께 5.54 mm, 줄기 밀도가 100 cm<sup>2</sup> 당 18개 정도 되는 억새 종으로 수집되었다 (표 2 & 표 3).

이들 germplasm 중에서 형질전환 가능성을 보인 또다른 라인으로 SNU-M-107이 있었다. 이 라인은 비록 SNU-M-045 라인 보다는 못하지만 어느 정도 캘러스 유도과 재분화가 이루어졌으며, 특히 유도된 캘러스는 성장 속도 면에서 우수하게 나타나 추후 억새 형질전환에 이용하였다 (실제로 형질전환 성공함). 본 과제 연구를 통하여 여러 germplasm을 분석해 본 결과, 억새는 수집된 germplasm 별로 캘러스 유도율이나 재분화율이 매우 다양하게 나타났으며 대체적으로 형질전환이 가능한 다른 작물보다는 낮게 나타났다. 이러한 이유로 현재까지 여러 연구진들이 억새 형질전환을 시도하였으나 아직 성공하지 못하는 것으로 여겨지며, 이는 사용된 종자가 순수 라인이 아닌 채집 혼합 종에 기인하는 것으로 여겨진다. 본 결과에서 유추할 수 있었던 한 가지 흥미로운 점은 높은 고도에서 수집한 germplasm들은 캘러스 유도율이 낮거나 재분화 과정에 문제가 있었으며, 고도가 낮은 곳에서 수집된 억새 germplasm 라인들은 형질전환이 가능하였다는 점이다. 따라서 억새 형질전환에는 낮은 고도에서 수집된 라인의 종자를 이용하는 것이 좋을 것으로 여겨진다.

Germplasm code	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Collecting site
SNU-M-022	N 38° 04'	E 127° 20'	655	Mt. Myung-Seong, Korea
SNU-M-025	N 38° 04'	E 127° 20'	579	Mt. Myung-Seong, Korea
SNU-M-032	N 33° 17'	E 126° 32'	404	Jeju, Korea
SNU-M-034	N 33° 19'	E 126° 36'	359	Jeju, Korea
SNU-M-037	N 33° 26'	E 126° 33'	430	Jeju, Korea
SNU-M-045	N 37° 31'	E 126° 32'	5	Incheon, Korea
SNU-M-107	N 35° 31'	E 128° 53'	86	Milyang, Korea

표 2. Origin of 7 germplasms of *Miscanthus sinensis* used in this study



Germplasm code	Plant height (cm) <sup>†</sup>	No. of Stem (no./100 cm <sup>2</sup> ) <sup>‡</sup>	Stem thickness (mm) <sup>‡</sup>	Stem density (g/cm <sup>3</sup> ) <sup>‡</sup>
SNU-M-022	197.0 ± 3.3 <sup>a</sup>	15.0 ± 2.9 <sup>a</sup>	4.19 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.01 <sup>b</sup>
SNU-M-025	207.0 ± 3.3 <sup>a</sup>	15.0 ± 2.9 <sup>a</sup>	5.72 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>a</sup>
SNU-M-032	275.0 ± 5.8 <sup>d</sup>	15.3 ± 4.3 <sup>a</sup>	7.96 ± 0.47 <sup>d</sup>	0.54 ± 0.04 <sup>d</sup>
SNU-M-034	230.0 ± 5.0 <sup>b</sup>	14.7 ± 4.4 <sup>a</sup>	7.42 ± 0.21 <sup>cd</sup>	0.67 ± 0.01 <sup>c</sup>
SNU-M-037	245.0 ± 2.9 <sup>c</sup>	12.7 ± 4.3 <sup>a</sup>	7.98 ± 0.16 <sup>d</sup>	0.26 ± 0.01 <sup>b</sup>
SNU-M-045	245.0 ± 2.9 <sup>c</sup>	18.0 ± 3.5 <sup>a</sup>	5.54 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.36 ± 0.01 <sup>c</sup>
SNU-M-107	240.0 ± 8.7 <sup>bc</sup>	16.3 ± 4.8 <sup>a</sup>	6.98 ± 0.09 <sup>c</sup>	0.37 ± 0.01 <sup>c</sup>

⌘ 3. Phenotypic characteristics of 7 germplasms of *M. sinensis* used in this study<sup>†</sup>

<sup>†</sup> Average values of plant height, stem thickness and density are shown. Phenotypic characteristics were measured in the third year after planting their rhizomes.

<sup>‡</sup> Means with different letters in each column are significantly different at  $P < 0.05$ , using Duncan.

Germplasm code	Embryogenic callus induction (%) <sup>†</sup>	Regeneration (%) <sup>†</sup>
Geumo	34.33 ± 1.25 <sup>b</sup>	53.09 ± 11.20 <sup>b</sup>
SNU-M-022	31.00 ± 4.08 <sup>b</sup>	82.64 ± 0.98 <sup>a</sup>
SNU-M-025	55.33 ± 3.68 <sup>a</sup>	23.96 ± 5.31 <sup>d</sup>
SNU-M-032	13.33 ± 3.09 <sup>c</sup>	28.82 ± 5.40 <sup>cd</sup>
SNU-M-034	15.91 ± 4.92 <sup>c</sup>	38.89 ± 6.38 <sup>c</sup>
SNU-M-037	8.30 ± 0.94 <sup>c</sup>	5.21 ± 1.70 <sup>e</sup>
SNU-M-045	52.67 ± 5.31 <sup>a</sup>	86.11 ± 8.56 <sup>a</sup>
SNU-M-107	29.00 ± 1.63 <sup>b</sup>	22.20 ± 2.14 <sup>d</sup>

⌘ 4. Comparisons of embryogenic callus induction and plant regeneration among 7 germplasms of *M. sinensis* used in this study

<sup>†</sup> All of the data represent the mean ± SD of three independent experiments.

The data with different letters in each column are significantly different at  $P < 0.05$ , using Duncan.

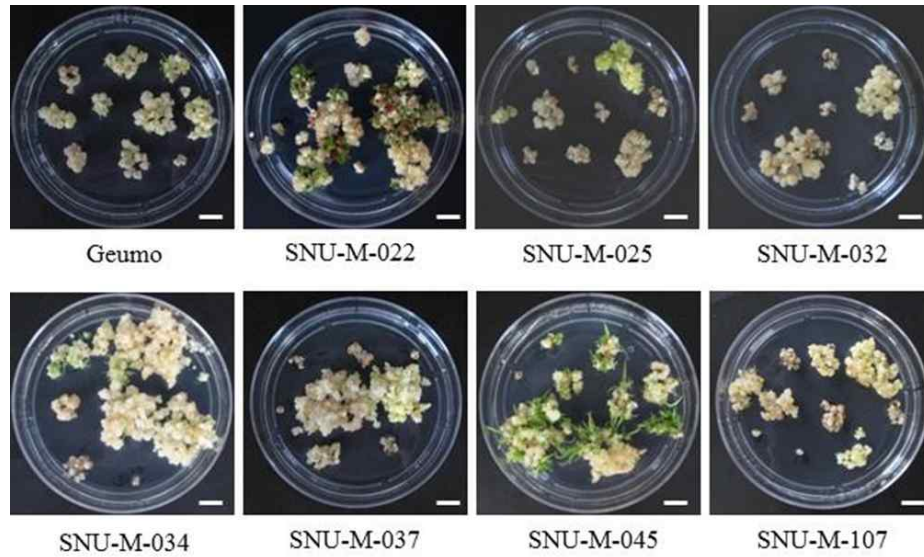


그림 5. Comparisons of plant regeneration potentials in different germplasms. 서울대에서 채집된 7종의 germplasm 종자에서 유도된 embryogenic callus들을 광조건에서 4주간 배양시켜 재분화를 조사하였다. Bar, 1 cm.

#### 라. Agrobacterium을 이용한 역세 형질전환 조건 확립

본 과제 연구에서는 hygromycin 선발 마커를 이용한 Agrobacterium 매개 형질전환 조건을 먼저 확립한 후, 제초제 저항성 선발 마커를 이용한 형질전환 조건을 구축하고자 하였다. 이는 항생제 저항성 마커를 이용하는 경우 형질전환체 선발이 보다 용이하다는 점과 생명공학 작물 개발에는 항생제 저항성 마커보다는 제초제 저항성이 더 좋다는 점이 고려되었기 때문이었다. 이에 pCAMBIA1300 및 pCAMBIA3300 벡터를 기초로 하여 형질전환을 수행하였다 (그림 6).

먼저 hygromycin 항생제 저항성 마커를 이용하여 Agrobacterium 매개 형질전환 조건을 탐색하였다. 이 실험에는 SNU-M-045 종자를 callus 유도 배지에서 6주 이상 배양한 embryogenic callus를 사용하였다. 그리고 실험에 사용된 *Agrobacterium*(strain EHA105)은 maize ubiquitin promotor-eGFP와 선발표지 유전자인 *HPT* 유전자를 포함한 pCAMBIA1300 벡터(그림 6A)를 freeze-thaw 방법으로 도입시킨 균주를 사용하였다. 이후 다양한 pH, acetosyringone 농도, 공동 배양 기간을 적용하여 역세 embryogenic callus를 형질전환시켜 GFP signal을 보이는 캘러스를 조사한 결과, pH 5.2 및 400  $\mu$ M acetosyringone이 포함된 Agrobacterium 접종 조건과 5일 간의 공동 배양 기간을 적용했을 때가 가장 좋은 결과를 보였다 (표 5). 즉, 이 최적 조건에서 형질전환된 callus들이 가장 높은 빈도의 GFP signal을 보여주었다 (그림 7). 그리고 최종적으로 hygromycin 항생제 저항성을 이용하여 역세 형질전환체를 확보할 수 있었다 (그림 8). 이때 형질전환체 선발에는 50 mg/L hygromycin이 포함된 배지가 이용되었고, shoot induction에는 30 mg/L hygromycin이 포함된 배지가 이용되었다. 그리고 root이 형성된 plantlet들은 온실에서 순화되었고, genomic PCR 등

분자생물학적 분석을 통하여 형질전환체가 최종 확인되었다 (그림 9). 여기에는 도입된 유전자 발현 검증을 위한 Northern blot 분석과 도입 유전자 수를 확인하기 위한 Southern blot 분석 등이 포함되었다.

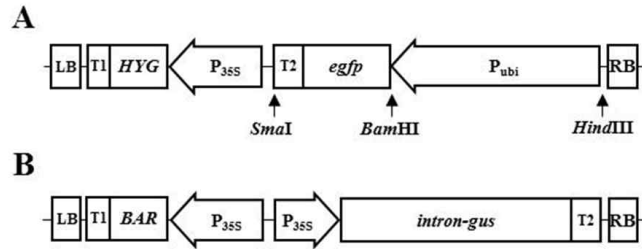


그림 6. T-DNA regions of the binary vectors used for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *M. sinensis*. (A) eGFP 유전자가 클로닝 된 pCAMBIA1300 벡터. LB, left border; RB, right border; P<sub>35S</sub>, CaMV 35S promoter; P<sub>ubi</sub>, Ubiquitin promoter; *HYG*, hygromycin resistance gene (i.e., hygromycin phosphotransferase II, *HPTII*); *egfp*, enhanced green fluorescent protein gene; T1, CaMV 35S terminator; T2, *A. tumefaciens nos* gene terminator. (B) 제초제 저항성 유전자를 포함하는 pCAMBIA3300 벡터. *intron-gus*, GUS coding region with a catalase intron insertion; *BAR*, phosphinothricin acetyltransferase gene.

Inoculation conditions		No. of inoculated calli	No. of calli with GFP expression (%) <sup>†</sup>
pH	5.2	150	5 (3.3)
	5.5	150	2 (1.3)
	5.7	150	2 (1.3)
Acetosyringone (μM)	0	150	0 (0.0)
	200	150	3 (2.0)
	400	150	10 (6.7)
Co-culture period	3 days	150	3 (2.0)
	5 days	150	5 (3.3)

표 5. Optimization of conditions for *Agrobacterium* inoculation and co-cultivation

<sup>†</sup> The percentage was calculated using the number of transformed calli with GFP signal from all infected calli.

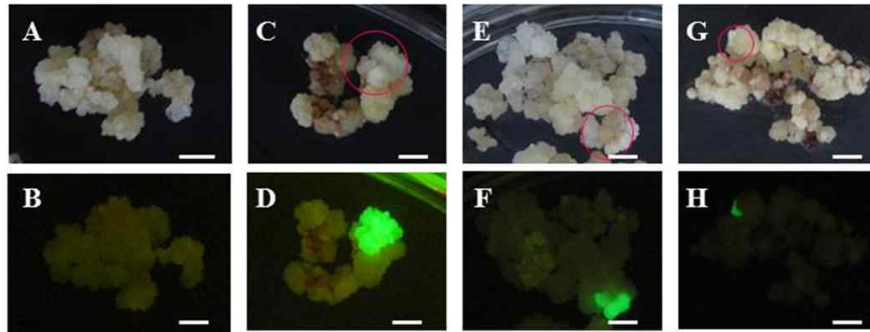


그림 7. GFP expression of transformed calli. (A-B) Non-transformed callus (a negative control). (C-H) pCAMBIA1300/eGFP 형질전환된 callus들. GFP 신호(B, D, F, H)는 암 조건에서 UV 조사 하에서 Illumatool LT-9000 Bright Light system (Lighttools Research)을 이용해서 관찰하였다.

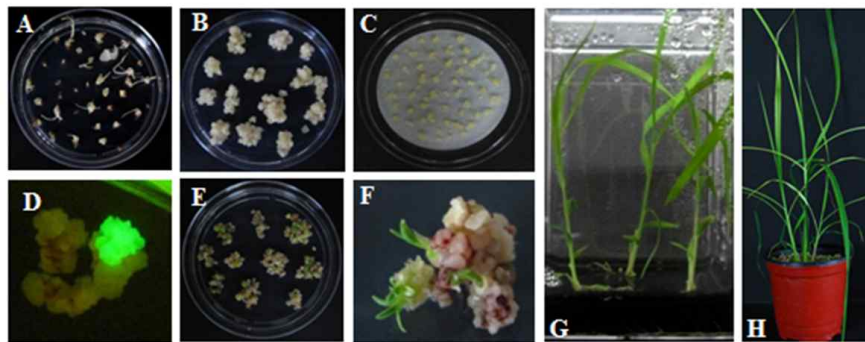


그림 8. Production of transgenic *M. sinensis* plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. (A) Calli induced from mature seeds on callus induction medium. (B) Selection and propagation of embryogenic calli. (C) Co-cultivation of selected embryogenic calli with *Agrobacterium* suspensions. (D) GFP expression on transformed calli. (E) Shoot induction from transformed calli. (F) Amplified picture of induced shoots. (G) Root induction from hygromycin-resistant shoots. (H) Putative transgenic plant grown in greenhouse. Bar, 1 cm.

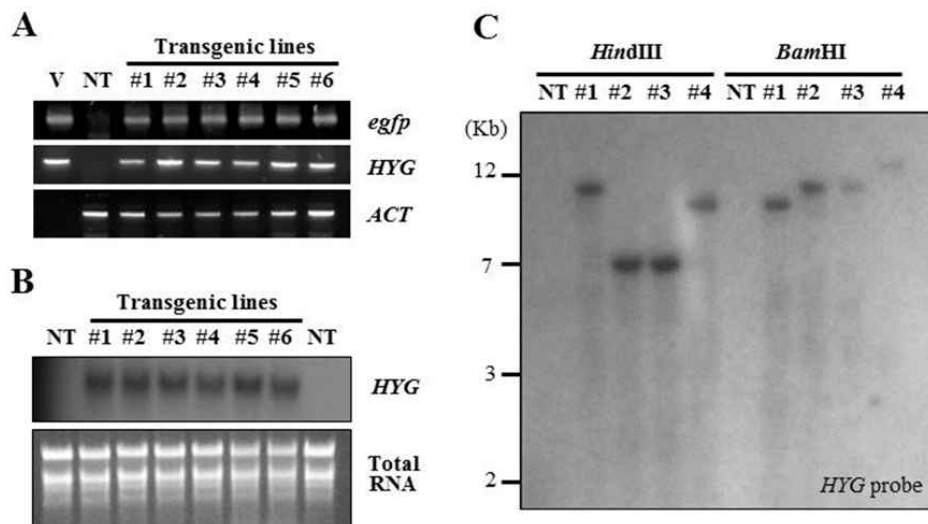


그림 9. Molecular analyses of transgenic *M. sinensis* plants. (A) Genomic PCR

분석 결과. V, 형질전환에 사용된 vector; NT, Non-Transgenic 역세. Actin 유전자(*ACT*)는 loading control로 포함되었다. (B) Northern blot 분석 결과. *HYG* 유전자를 probe로 하여 발현을 조사하였다. Total RNA는 loading control로 포함되었다. (C) Southern blot 분석 결과. Genomic DNA를 *Hind*III 또는 *Bam*HI으로 처리한 후, *HYG*를 probe로 하여 분석을 실시하였다.

다음으로 제초제 저항성 마커를 포함한 벡터(그림 6B)를 이용하여 *Agrobacterium* 매개 형질전환 조건을 탐색하였다. 기본적으로 배지에 BASTA® 제초제 성분인 phosphinothricin (PPT)이 포함되는 경우, 역세 캘러스의 성장이 지연되어 형질전환된 callus 선발이 상당히 지연되었다 (그림 10). 결론적으로 5 mg/L PPT가 포함된 배지에서 형질전환되어 제초제 저항성을 보이는 캘러스 선발이 가능하였고, 3 mg/L PPT가 포함된 배지에서 shoot을 유도시킴으로서 역세 형질전환체를 확보할 수 있었다. 이후 선발된 형질전환체들은 genomic PCR을 통한 도입 유전자 확인과 Northern blot 분석을 통한 도입 유전자 발현 등 분자생물학적 분석을 통하여 검증되었다 (그림 11A-B). 그리고 최종적으로 제초제 저항성 조사를 통하여 획득된 역세 형질전환체들이 제초제 저항성을 지니는 것을 확인하였다 (그림 11C). 통상 역세 재배에서 큰 문제 중 하나가 잡초 제어로 파악되고 있으며, 또한 생명공학 작물의 상업화를 위한 위해성 평가 실험을 진행할 때 항생제 저항성 보다는 제초제 저항성이 용이하다고 알려져 있기에, 본 과제 연구를 통하여 확보한 제초제 저항성 생명공학 역세는 고부가가치 신제품으로 육성 가능할 것으로 여겨진다.

결론적으로 이러한 역세 형질전환 조건 확립 실험을 통하여 (약 100회의 실험을 실시함) 최종적으로 안정적인 역세 형질전환 시스템이 구축되었다 (표 6). 여러 회에 걸친 형질전환 실험을 통하여 형질전환 효율을 계산해 본 결과, 현재까지 hygromycin 항생제 저항성 마커를 이용하는 경우는 약 1.06%, 제초제 저항성 마커를 이용하는 경우는 약 0.52%로 확인되었다 (표 7). 비록 이 수치는 다른 작물의 형질전환 효율에 비해서는 낮은 것으로 평가될 수 있지만, 그동안 성공되지 않았던 *Agrobacterium* 매개 역세 형질전환 방법을 세계 최초로 구축하였고 여러 번에 걸쳐 형질전환을 성공하였기에, 본 과제 연구결과는 안정적인 역세 형질전환 시스템을 제공하여 향후 생명공학 역세 품종 개발에 큰 기여를 할 것으로 여겨진다.



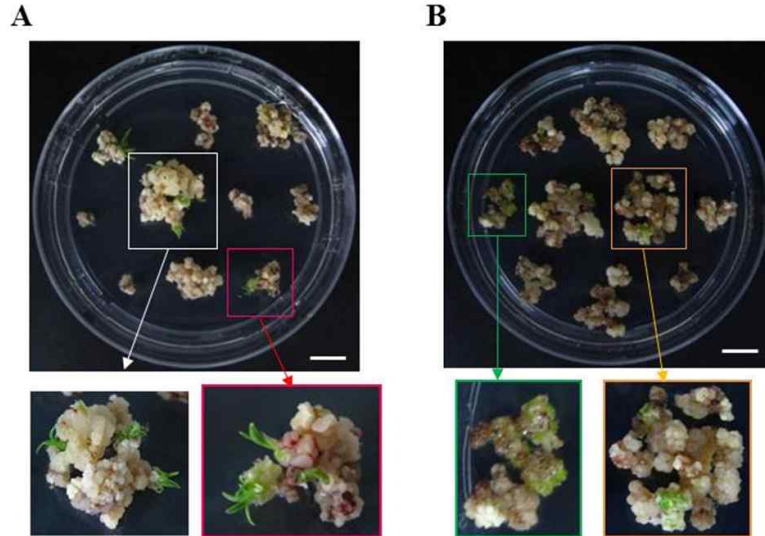


그림 10. Comparison of shoot induction between hygromycin resistance and herbicide resistance selection markers. (A) Hygromycin 항생제 저항성 마커를 이용한 형질전환 캘러스 선발 과정. (B) 제초제 저항성 마커를 이용한 형질전환 캘러스 선발 과정. 사진들은 30 mg/L hygromycin 또는 3 mg/L PPT가 포함된 배지에서 shoot induction이 진행되고 있는 과정을 보여주고 있다. Bar, 1 cm.

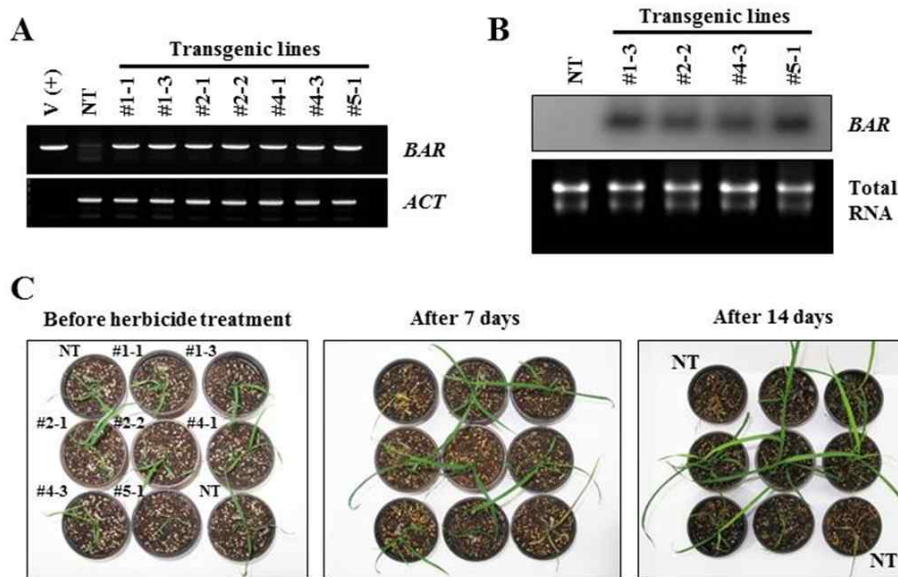


그림 11. Production of transgenic *M.sinensis* plants with herbicide resistance. (A) 역세 형질전환체 내 제초제 저항성 유전자(*BAR*)의 genomic PCR 분석 결과. V, 형질전환에 사용된 vector; NT, Non-Transgenic 역세. Actin 유전자(*ACT*)는 loading control로 포함되었다. (B) Northern blot 분석 결과. *BAR* 유전자를 probe로 하여 발현을 조사하였다. Total RNA는 loading control로 포함되었다. (C) 제초제 저항성 분석 결과. 0.4% BASTA® 제초제 살포 전과 살포 후 7일 및 14일째 역세 식물체 사진을 보여준다. Non-Transgenic 역세(NT)는 노랗게 말라 죽은 반면, 형질전환체들은 제초제에 영향을 받지 않고 정상적인 생육을



보여주었다.

Media	Composition
Callus induction	MS salts and vitamins, 3 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D, 30 g L <sup>-1</sup> sucrose, 750 mg L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 25 mM L-proline, 2 g L <sup>-1</sup> Gelrite; pH 5.7
<i>Agrobacterium</i> inoculation	1/2 MS salts and vitamins, 3 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D, 20 g L <sup>-1</sup> sucrose, 10 g L <sup>-1</sup> glucose, 400 μM acetosyringone; pH 5.2
Co-cultivation	MS salts and vitamins, 3 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D, 20 g L <sup>-1</sup> sucrose, 10 g L <sup>-1</sup> glucose, 400 μM acetosyringone, 3 g L <sup>-1</sup> Gelrite; pH 5.7
Selection	MS salts and vitamins, 3 mg L <sup>-1</sup> 2,4-D, 30 g L <sup>-1</sup> sucrose, 750 mg L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 25 mM L-proline, 250 mg L <sup>-1</sup> cefotaxime, 50 mg L <sup>-1</sup> hygromycin (or 5 mg L <sup>-1</sup> PPT for herbicide-resistant <i>M. sinensis</i> ), 2 g L <sup>-1</sup> Gelrite; pH 5.7
Shoot induction	MS salts and vitamins, 2 mg L <sup>-1</sup> kinetin, 30 g L <sup>-1</sup> sucrose, 750 mg L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 25 mM L-proline, 250 mg L <sup>-1</sup> cefotaxime, 30 mg L <sup>-1</sup> hygromycin (or 3 mg L <sup>-1</sup> PPT for herbicide-resistant <i>M. sinensis</i> ), 2 g L <sup>-1</sup> Gelrite; pH 5.7
Root induction	1/2 MS salts and vitamins, 20 g L <sup>-1</sup> sucrose, 750 mg L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 125 mg L <sup>-1</sup> cefotaxime, 2 g L <sup>-1</sup> Gelrite; pH 5.7

표 6. Optimized conditions for the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *M. sinensis*

No. of experiments	Vector (selection marker)	No. of inoculated calli	No. of transgenic events (plants) <sup>†</sup>	Transformation efficiency (%) <sup>‡</sup>
4	pCAMBIA1300 ( <i>HYG</i> )	1316	14 (29)	1.06 ± 0.19
3	pCAMBIA3301 ( <i>BAR</i> )	1542	8 (36)	0.52 ± 0.32

표 7. Transformation efficiencies of *Agrobacterium*-mediated transformation for *M. sinensis*

<sup>†</sup> Transgenic events represent transformed calli which produce hygromycin- or herbicide-resistant plants.

<sup>‡</sup> Transformation efficiency was calculated using the number of transgenic events from all inoculated calli. The data represent the mean ± SD of three or four independent experiments.

마. 거대 억새(*M. x giganteus*)의 조직배양 및 재분화

본 과제 연구를 통하여 2배체의 *M. sinensis* 억새 종자를 이용한 조직배양을 통한 재분화 및 형질전환 조건을 확립할 수 있었다. 해서 이 조건을 현재 억새의 상업화 품종인 3배체의 *M. x giganteus* 거대 억새로 응용시키는 연구를 수행하였다. 이때 거대억새는 sterile로 종자를 생산하지 못하므로 immature inflorescence (미성숙 화서) 조직을 서울대 수원 포장과 무안 바이오에너지작물센터 포장에서 수집하여 이용하였다. 먼저 어린 1.5 cm 이하의 미성숙 화서들을 확보하여 소독한 후 캘러스를 유도하였다. 캘러스 유도배지는 기존에 알려진 CIM-3 배지 [MS salts and vitamins, 3 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BA, 3% sucrose, 750 mg/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 25 mM L-proline, 0.2% Gelrite, pH 5.5]와 CIM-5 배지 [MS salts and vitamins, 5 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BA, 3% sucrose, 750 mg/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 25 mM L-proline, 0.2% Gelrite, pH 5.5]를 사용하였다. 캘러스를 유도하기 위해 일주일 간격으로 계대 배양하였으며, 4주 후에 캘러스 유도율을 조사하였다. 미성숙 화서를 세 부분으로 나누어 캘러스 유도율을 수행한 결과, 미성숙 화서의 중간 부분(II)과 CIM-5 배지를 이용했을 때 가장 좋은 캘러스 유도율(68.73%)이 관찰되었다 (그림 12A).

다음으로 유도된 embryogenic callus를 이용하여 재분화 효율을 검정하였다. 재분화 유도배지는 2B 배지 [MS salts and vitamins, 1 mg/L 2,4-D, 5 mg/L BA, 3% sucrose, 750 mg/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 25 mM L-proline, 0.3% Phytigel, pH 5.5]와 NB 배지 [MS salts and vitamins, 0.24 mg/L NAA, 5 mg/L BA, 3% sucrose, 750 mg/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 25 mM L-proline, 0.3% Phytigel, pH 5.5]를 사용하였다. 재분화를 유도하기 위해서는 6주차 캘러스를 치상한 다음 4주 동안 배양하였으며, 재분화율은 0.5 cm 이상 자란 shoot이 관찰되는 캘러스를 이용하여 조사하였다. 그 결과, 두 조건에서 50% 내외의 비슷한 재분화율이 관찰되었다 (그림 12B). 하지만 NB 배지의 경우 캘러스에서 빠른 shoot 유도가 관찰되는 대신에 갈변화가 심하게 관찰되는 반면, 2B 배지 조건의 경우 상대적으로 느린 shoot 유도가 관찰되었으나 캘러스의 갈변화 현상이 많이 관찰되지 않았다. 이에 두 조건 중에서 캘러스의 상태가 양호한 2B 배지를 이용하여 향후 실험을 진행하기로 하였다. 재분화 된 식물체는 뿌리 유도 배지 [Root induction, 1/2 MS salts and vitamins, 2% sucrose, 750 mg/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.2% Gelrite, pH 5.5]로 옮겨 뿌리를 유도하였고, 이후 순화과정을 거쳐 토양에서 재배하였다. 이러한 과정을 거쳐 거대 억새의 재분화 과정을 확립할 수 있었다 (그림 13).

이상으로 재분화 조건이 확립되었기에 거대 억새의 형질전환 조건을 탐색하는 연구도 추진하였다. 이때, 미성숙 화서에 직접 아그로박테리움을 감염시킨 후 재분화 시키는 방법과 미성숙 화서 조직에서 embryogenic callus를 유도한 후 아그로박테리움을 감염시키는 두 가지 방법으로 실험을 진행하였다. 형질전환에 필요한 배지 및 조건은 기존에 확립된 *M. sinensis*의 형질전환 조건을 기본으로 하여 실험을 수행하였다. 하지만 *M. x giganteus*의 미성숙 화서나 미성숙 화서 조직에서 유도된 callus를 이용하여 형질전환을 진행하는 과정에서 갈변화가 무척 심하게 관찰되면서, 형질전환체를 확보할 수 없었다 (마지막 년도 실험이었음). 이 갈변화 현상은 형질전환 과정뿐만 아니라 형질전환체를 선발하는 과정에서 조직 또는 캘러스의 성장과 생존을 저해하는 것으로 여겨진다. 따라서 거대 억새의 형질전환을 성공하기 위해서는 형질전환 과정에서 갈변화 현상을 억제하면서 infection이 잘 될 수 있는 조건을 찾는 후속 연구를 통하여 이루어져야 할 것으로 여겨진다.

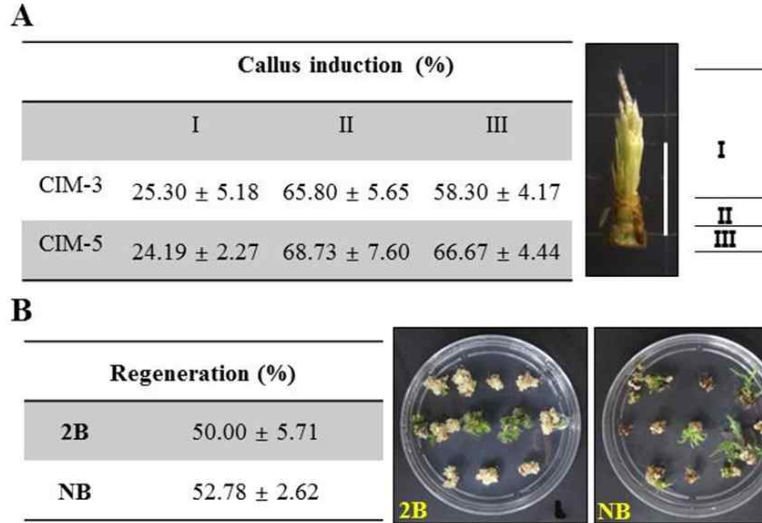


그림 12. Callus induction from immature inflorescences of *M. x giganteus* and its regeneration. (A) 미성숙 화서 조직에서의 캘러스 유도율 조사 결과. 미성숙 화서를 세 부분으로 나눈 후, 두 개의 callus induction 배지 (CIM-3 & CIM-5)에서 캘러스 유도율을 조사하였다. Bar, 1 cm. (B) 미성숙 화서 조직에서 유도된 캘러스의 재분화율 조사 결과. 두 개의 재분화 배지 (2B & NB)에서 재분화율을 조사하였다.

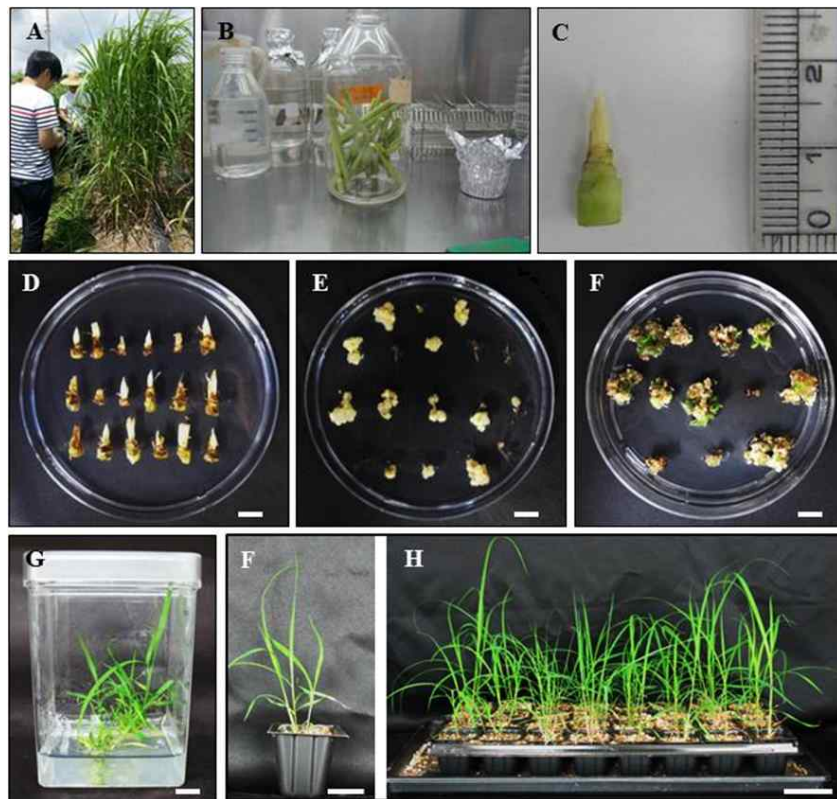


그림 13. Plant regeneration procedures of *M. x giganteus* using induced calli from immature inflorescences. (A) Sampling of immature inflorescences from *M. x giganteus*. (B-D) Immature inflorescences. (E) Callus induction. (F) Shoot

induction. (G) Root induction. (H) Regenerated plantlets in a greenhouse. Bar= 1 cm (D-G) or 5cm (F).

## 2. 유용 유전자가 도입된 억새 형질전환체 확보

### 가. 유용 유전자 선발

본 과제 연구에서는 바이오매스를 증대시킬 수 있는 유용 유전자를 발굴하여 확립된 억새 형질전환 방법을 이용하여 억새 형질전환체를 확보하는 것을 목표로 하고 있었다. 이에 본 연구진은 병 저항성 유전자 (Cho et al., 2011), 활성 ABA 호르몬 생성 유전자 (Han et al., 2012), 고효성 파이토크롬 유전자 (Ganesan and Han et al., 2012), 스트레스 저항성 유전자 (Choi et al., 2013) 등의 기능을 작물에서 검증하여 논문 발표를 완료하였다. 그리고 다른 세부/협동과제에서 발굴한 CKI1, ICA2, miR156, CaPLA1, CaSRP1 등 다양한 유용 유전자들의 활용을 검토하였다. 그 결과, 본 과제 연구에서 우선적으로 억새로 도입시킬 유전자들로 파이토크롬B를 포함하여 고효성 파이토크롬 (hyperactive phytochrome), CaPLA1 (S대 et al., 2008), CaSRP1 (Kim et al., 2010) 등을 선정하였다. 이들은 바이오매스 증대를 위해 식물의 광 이용성 및 광합성 효율을 증대시키거나 (파이토크롬 유전자), 생육을 촉진시킬 수 있는 유전자들(CaPLA1, CaSRP1)이었다. 이들 유전자들은 대부분 쌍자엽 식물에서 유래한 유전자들이기에 단자엽 식물에서의 유전자 기능을 검증하기 위하여, 먼저 단자엽 및 바이오에너지 모델 식물로 평가되는 *Brachypodium distachyon* 식물체로 도입되어 분석되었다.

### 나. 단자엽 모델식물에서의 유전자 기능 검증

#### (1) 파이토크롬 유전자의 기능 검증

억새 형질전환은 까다롭고 시간도 많이 소요되는 작업이기에 억새로 도입할 유전자의 유용성을 신속하고 정확하게 검증하는 시스템이 필요하였다. 이에 본 과제 연구에서는 최종 작물인 억새로 도입할 유전자의 유용성 여부를 단자엽 및 에너지 작물의 모델 식물인 *Brachypodium distachyon* (Opanowicz et al., 2008)으로 형질전환 시켜 유전자의 바이오매스 증대 가능성을 먼저 검증하고자 하였다. 특히 본 과제에서는 광 이용성이 증대된 바이오매스 생산용 억새 품종을 개발하는 것을 목표로 삼고 있고, 이를 위하여 식물 광수용체 파이토크롬 유전자를 이용하기로 하였다. 파이토크롬은 쌍자엽 식물에서는 5종 [파이토크롬A(phyA)~파이토크롬E(phyE)], 단자엽 식물에서는 3종(phyA~phyC)이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 이들 중에서 phyA와 phyB가 식물에서 주요 기능을 하고 있다고 보고되었다. 이에 우선적으로 귀리 phyA와 애기장대 phyB를 과발현 시킨 *Brachypodium* 형질전환체를 만들어 분석하였다.

본 과제 연구를 통하여 확보된 파이토크롬 형질전환체의 순수계통을 살펴보면, 귀리 phyA 유전자(*AsPhyA*)가 도입된 7 라인 (single copy 3개 라인, two copy 2개 라인, three or four copy 각 1개 라인)과 애기장대 phyB 유전자(*AtPhyB*)가 도입된 4 라인 (single copy 3개 라인, two copy 1개 라인) 등이 있었다. 이들은 유전학적 3:1 segregation 조사와 더불어 분자생물학적 분석을 통한 유전자 도입 및 발현 등이 검증된 것이었다. 이들의 표현형 분석 중에서 바이오매스와 관련된 것들만 요약하면 다음과 같다. 먼저 귀리 phyA가 과발현 되는 *Brachypodium* 순수 계통 식물체들 중에서 Western blot 분석을 통하여 파이토크롬 단백질

발현이 비슷한 라인들을 선발하였다 (그림 14A). 이후 광 반응성 분석을 다양한 과장 조건(암 조건, 원적색, 적색, 청색, 백색광)과 phyA가 매개하는 원적색광의 다양한 fluence rate 조건에서 단자엽 식물의 coleoptile length를 측정하는 방법으로 분석하였다. 그 결과, phyA가 과다 발현된 라인의 원적색광 반응성이 증대되어 wild-type *Brachypodium*에 비하여 짧은 coleoptile length가 관찰되었다 (그림 14B-C). 이는 형질전환 *Brachypodium* 내 phyA 활성이 증대되었음을 제시한다. 또한 여러 fluence rate 조건에서의 실험 결과, phyA 과발현 라인들은 조사된 모든 fluence rate 조건에서 wild-type에 비하여 짧은 coleoptile length를 보여 주었다 (그림 14D). 이는 단자엽 모델식물에 phyA가 도입되면 seedling의 광 반응성이 증대됨을 증명하고 있으며, 이것은 단자엽 식물의 초기 생육 및 발달에 좋을 것임을 제시하고 있다. 그리고 phyA 과발현 라인들의 성장 과정에서의 표현형도 조사하였다. 그 결과, secondary leaf 발달 및 개화 시기가 빨라지는 것을 확인할 수 있었다 (그림 15).

그리고 애기장대 phyB 과발현 *Brachypodium* 순수 계통의 표현형을 조사한 결과, 적색광 반응성이 크게 증가된 것을 확인할 수 있었다 (그림 16). 또한 tiller 수가 늘어났고 (그림 17), 개화가 지연되었으며 (그림 18), 종자 수확량이 증대됨을 확인할 수 있었다 (그림 19). 이들 결과를 종합하면 단자엽 식물에서 phyA는 초기 성장에 중요하며 개화를 유도하는 역할을, phyB는 tiller 발달에 중요하며 개화를 억제하는 역할을 하는 것을 유추할 수 있었다. 이 결과는 향후 바이오매스 증대를 위해서는 개화를 촉진시키는 phyA 보다는 개화를 지연시키고 tiller를 늘릴 수 있는 phyB가 유용할 수 있음을 제시한다.

## (2) 고효성 phyB 유전자 확보

본 연구진은 과거 연구를 통하여 다수의 고효성 phyA 유전자를 확보한 바 있었다. 하지만 위 연구 결과에 의하면 단자엽 식물에서는 phyB 과발현이 유용한 것으로 제시되었기에, 고효성 phyB 확보가 필요하였다. 이에 고효성 phyA 확보 경험을 바탕으로, 고효성 phyB를 확보하는 연구를 진행하여 고효성 phyB 돌연변이(YVB)를 확보하였다. 이 돌연변이 phyB는 phyB 분자 내 Tyrosine 잔기 하나가 Valine으로 치환된 것이었다 (Y-to-V in PhyB; YVB라 명명). 통상 파이토크롬은 광 조건에 따라 불활성화 형태인 Pr 또는 활성화 형태인 Pfr form으로 존재하는 데 반하여, YVB는 항상 활성화 형태로 존재함으로써 항상 100% 파이토크롬 활성을 보이는 것으로 확인되었다 (그림 20). 이 돌연변이 phyB는 광 조건에 상관없이 항상 활성을 보이기 때문에 암 조건에서도 마치 광 조건에 자란 것과 같은 표현형을 보일 정도로 활성이 높음을 확인할 수 있었다 (그림 20A). 또한 다양한 적색광 세기(fluence rate)에서도 항상 동일하게 광 조건에서 자란 표현형을 보여주었다 (그림 20B). 따라서 이 고효성 돌연변이는 본 연구진이 십여 년간 파이토크롬 연구를 하면서 개발한 가장 활성이 높은 파이토크롬 돌연변이라 할 수 있었으며, 본 과제 연구의 광 이용성 증대 생명공학 역세 개발에 가장 적합한 유전자로 판단되었다. 이에 *Brachypodium* phyB의 고효성 파이토크롬 유전자(*BdYVB*)를 클로닝 시켜 역세 형질전환용 유전자 벡터를 제조하였으며, 이를 이용하여 역세 형질전환이 진행하도록 하였다. 또한 SNU-M-045 germplasm 이외에 다른 germplasm으로의 형질전환에도 사용하였다. 따라서 역세 형질전환에 사용된 파이토크롬 유전자는 야생형 phyB 유전자와 함께 YVB 유전자를 이용하였으며, 특히 고효성 YVB 유전자는 여러 역세 germplasm으로의 도입이 추진되었다.



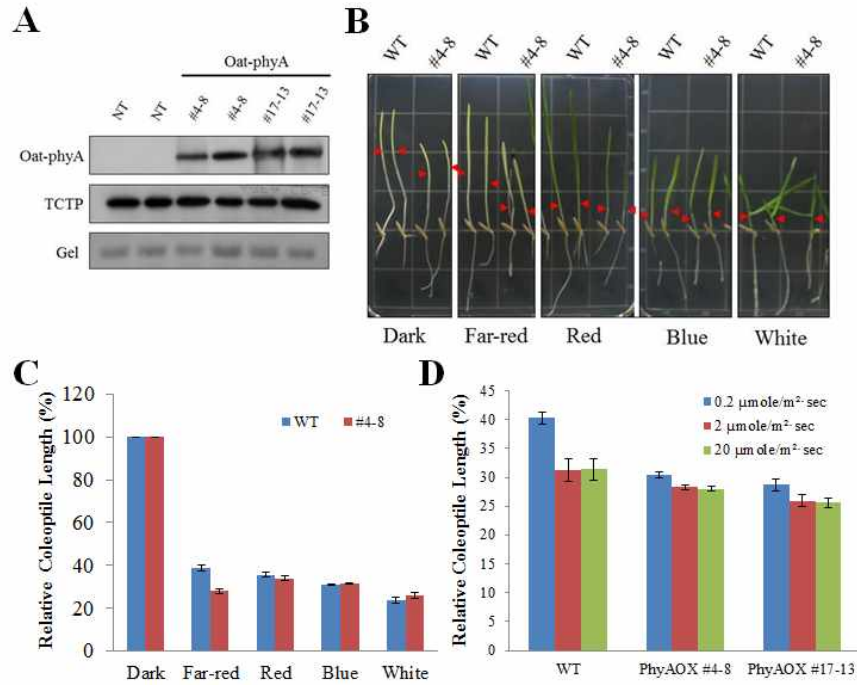


그림 14. 귀리 phyA 유전자가 도입된 Brachypodium 형질전환체의 광 반응성 분석 결과. (A) Western blot 분석 결과. 귀리 phyA 특이적인 항체(oat22)를 이용하여 phyA 단백질 발현을 조사하였다. TCTP 및 gel은 loading control로 포함되었다. (B) 각 과장별 광 조사에 따른 seedling 표현형. Wild-type Brachypodium(WT)과 phyA 도입 순수계통 라인(#4-8)의 광 반응성을 암 조건을 포함하여 White light, red light, far-red light 및 blue light 조건에서 분석하였다. (C) (B) 조건에서의 coleoptile length 조사 결과. Relative coleoptile length는 암 조건에서의 coleoptile length를 100%로 하여 계산되었다. (D) 원적색광 Fluence rate에 따른 coleoptile length 조사 결과. 사용된 fluence rate는 0.2, 2, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  등이었다.

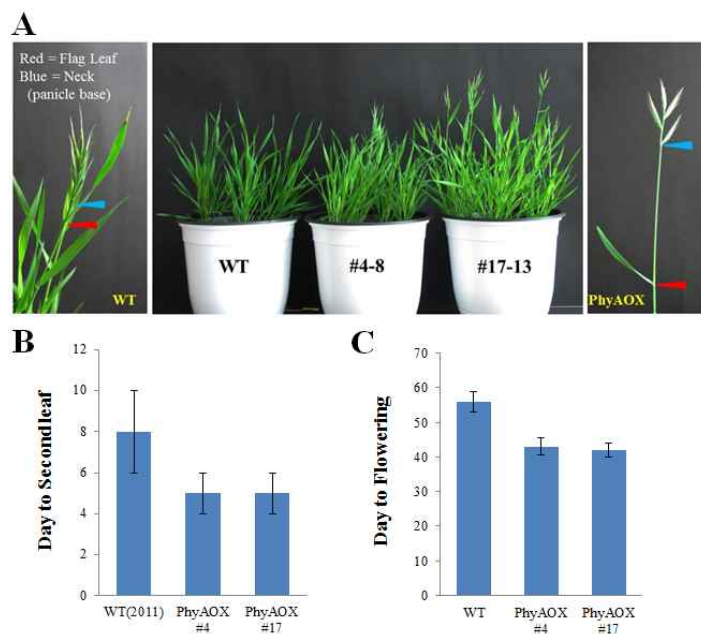


그림 15. 파이토크롬A 과다 발현 Brachypodium 형질전환체의 표현형 분석 결과. (A) 개화 시기의 표현형 비교 결과. Wild-type Brachypodium(WT)에 비해 파이토크롬A 과발현 순수계통 라인들의 secondary leaf 발달이 빠르고 개화도 이르게 됨을 알 수 있었다. (B-C) Secondary leaf 발달 시기 (B) 및 개화 시기 (C) 비교 결과.

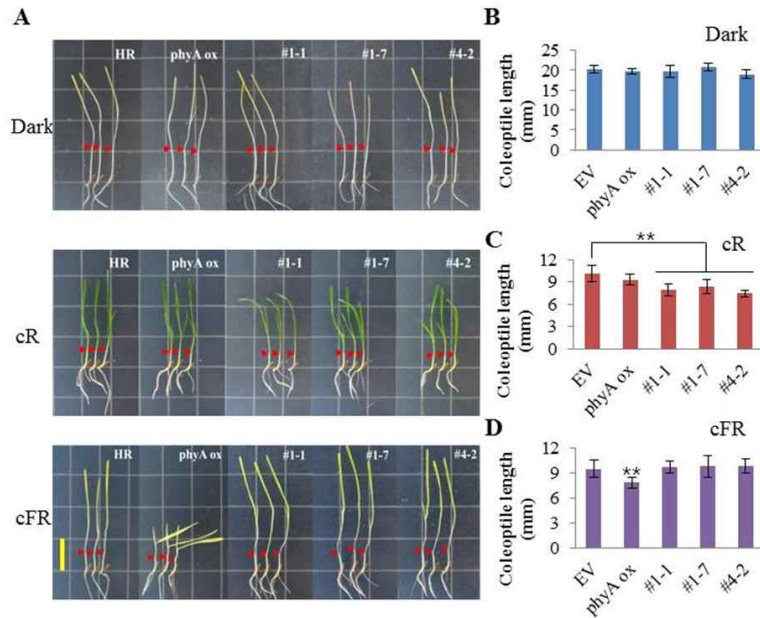


그림 16. 애기장대 phyB 유전자가 도입된 Brachypodium 형질전환체의 광 반응성 분석 결과. (A) 각 과장별 광 조사에 따른 seedling 표현형. HR, empty vector 도입 Brachypodium 식물; phyA ox, 귀리 phyA 과발현 Brachypodium 식물. 화살표는 coleoptile 위치를 표시한다. (B-D) (A) 조건에서의 coleoptile length 조사 결과. 사용된 fluence rate는 cR (continuous red light) 및 cFR (continuous far-red light) 모두  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 였다.

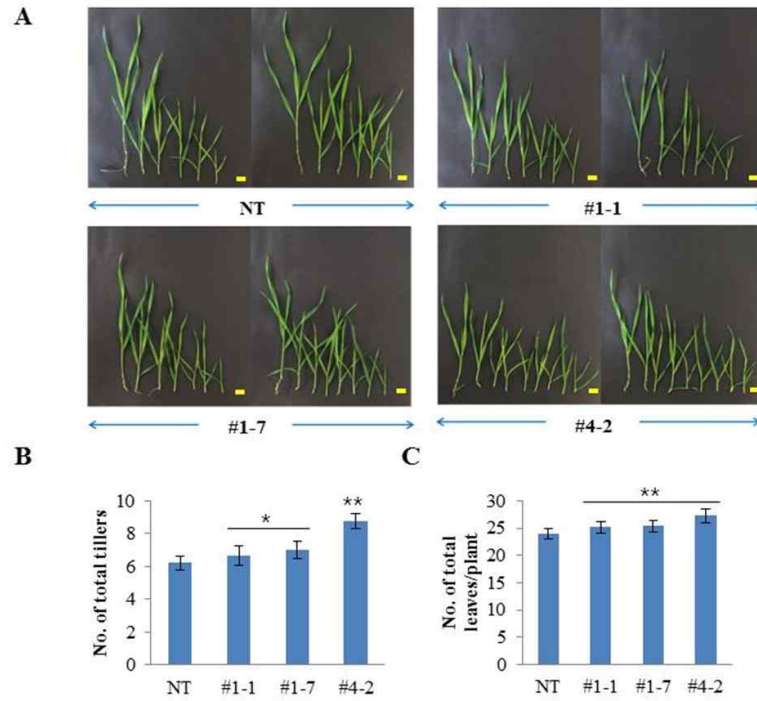


그림 17. AtPhyB 도입된 *Brachypodium* 형질전환체의 tiller 수 조사 결과. (A) 7주 된 식물체의 전체 tiller들. NT, Non-Transformed control plant. (B) Tiller 수 조사 결과. (C) 한 식물체 내 전체 잎 수 조사 결과. Statistically significant changes compared with NT are indicated by \*\* at  $P < 0.01$  and \* at  $P < 0.05$ .

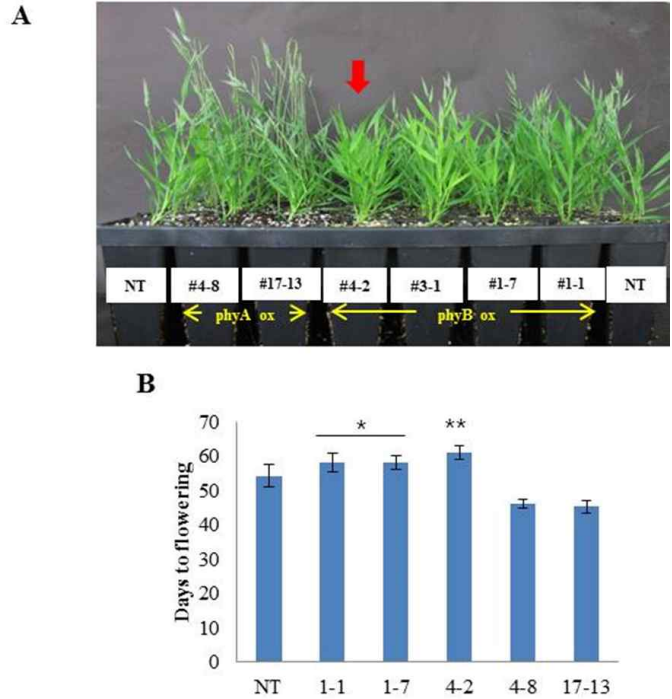


그림 18. AtPhyB 도입된 *Brachypodium* 형질전환체의 개화 시기 조사 결과. (A) 개화 시기의 표현형 비교 결과. Non-transformed 대조구 식물체(NT)에 비해 귀리 phyA 과발현 식물체들(phyA ox)은 조기 개화를, AtPhyB 과발현 식물체들(phyB ox)은 개화 지연 표현형을 보여주었다. (B) 개화 시기 조사 결과. Statistically significant changes compared with NT are indicated by \*\* at  $P < 0.01$  and \* at  $P < 0.05$ .

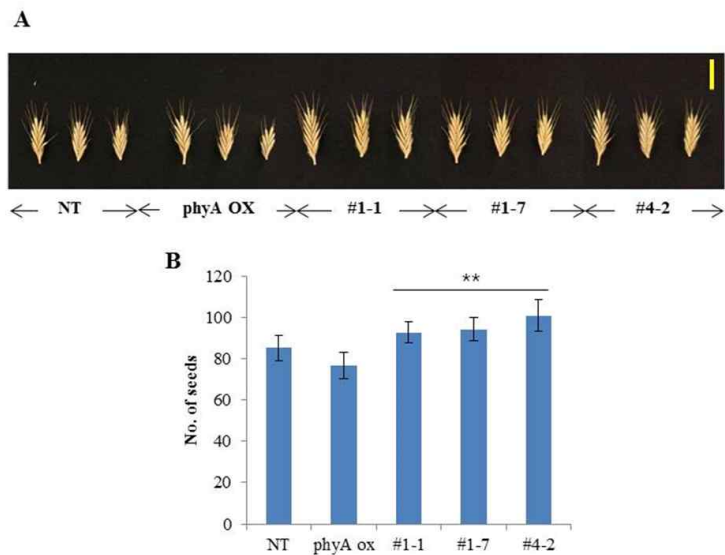


그림 19. AtPhyB 도입된 *Brachypodium* 형질전환체의 종자 수확량. (A) Inflorescence에서 확보한 spikelet들 비교 사진. (B) 한 식물체에서 얻은 종자 수 조사 결과. Statistically significant changes compared with NT are indicated by \*\* at  $P < 0.01$ .

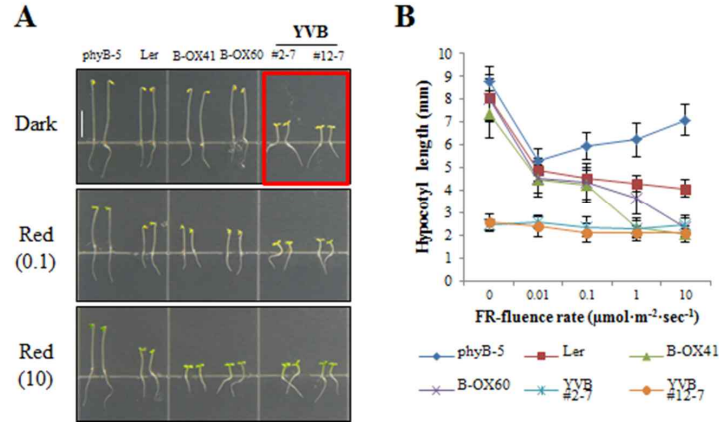


그림 20. 고효성 phyB 유전자(YVB)가 도입된 애기장대 식물체의 광 반응성 분석 결과. (A) 암 조건 및 적색광 하에서의 hypocotyl elongation 조사 결과. phyB-5, phyB 결핍 애기장대; Ler, 야생형 애기장대; B-OX, 정상 phyB 도입 애기장대; YVB, YVB 돌연변이 도입 애기장대. Dark, 암 조건; Red, 적색 광 조건 (괄호 안의 숫자는 fluence rate로 0.1 & 10  $\mu\text{mole}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ 임을 나타낸다). (B) 광 세기(fluence rate)에 따른 hypocotyl length 측정 결과. YVB 형질전환 애기장대는 암 조건을 포함하여 모든 광 세기 조건에서 동일한 hypocotyl length를 보여주었으며, 이는 YVB 고효성 파이토크롬B 돌연변이가 식물체 내에서 100% 파이토크롬B 활성을 지닌다는 것을 제시한다.

### (3) 고추 유전자 CaPLA1 및 CaSRP1의 기능 검증

: 본 과제 연구에서는 타 협동과제 연구를 통하여 확보된 유용 유전자들도 이용하기로 하였다. 이에 우선적으로 고추에서 분리한 CaPLA1 및 CaSRP1 유전자들의 단자엽 식물에서의 기능 검증을 위하여 Brachypodium 형질전환체를 확보하였다. 본 과제 연구기간 동안, CaPLA1은 순수계통이 확보되어 표현형이 일부 분석되었고, CaSRP1은 현재 형질전환체를 확보하여 순수 계통을 선발하고 있는 중이다. 이에 CaSRP1 Brachypodium 형질전환체 분석은 추후 순수 계통이 확보되면 진행될 예정이다. CaPLA1 유전자가 도입된 Brachypodium 형질전환체의 경우, 대조구 Brachypodium 식물체에 비해 tiller 수가 크게 증대되었음을 확인할 수 있었다 (그림 21). 특히 CaPLA1 과발현 형질전환체들은 온실에서의 순화 단계에서부터 tiller 수가 크게 증가하여 bushy한 표현형을 보여 주었으며 (그림 21A), 약 6주 후에는 tiller 수가 더 크게 증대되어 대조구 식물보다 바이오매스가 크게 증대되는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 21B). 이 연구 결과를 통하여 CaPLA1의 단자엽 식물에서의 유용성 검증이 이루어졌으며, 이후 역새로의 형질전환이 진행되었다.



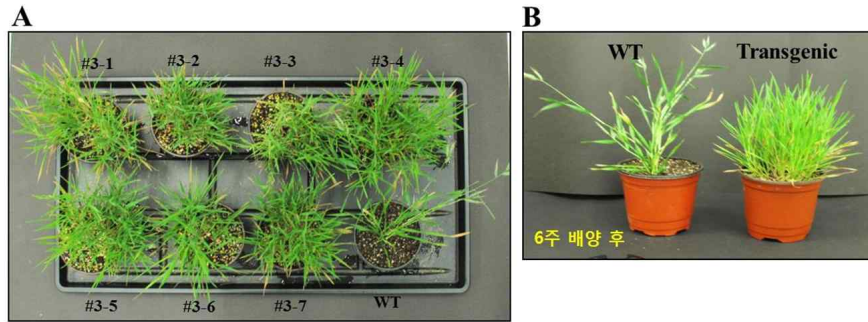


그림 21. CaPLA1 도입 Brachypodium 형질전환체의 표현형 조사 결과. (A) 온실에서 순화 단계의 표현형 비교. Wild-type Brachypodium(WT)에 비해 CaPLA1 형질전환체들이 bushy함을 관찰할 수 있다. (B) 6주 배양 후의 표현형 비교 결과. WT에 비해 Transgenic line의 tiller가 매우 증대되었음을 관찰할 수 있다.

#### 다. 유용 유전자가 도입된 억새 형질전환체 확보

상기 단자엽 모델 식물에서의 유전자 기능 검증을 통하여 억새로 도입시킬 유전자들로 정상 파이토크롬B (phyB), 고향성 파이토크롬B (YVB), CaPLA1 등을 선발하였다. 이에 애기장대 phyB (AtPhyB), Brachypodium phyB (BdphyB), Brachypodium YVB (BdYVB) 및 CaPLA1 유전자들을 억새 형질전환을 위한 vector로 클로닝 하였고, 이들 construct들은 Agrobacterium을 이용한 억새 형질전환을 사용되었다.

먼저 AtPhyB 도입 억새 형질전환체는 제초제 저항성 마커를 지닌 pCAMBIA3301 벡터에 클로닝 되었고 (그림 22A), 이를 이용하여 얻은 억새 형질전환체의 제초제 저항성을 검증하였다 (그림 22B). 그리고 분자생물학적 분석을 통하여 유전자 도입 및 발현, 그리고 도입 유전자 수를 확인할 수 있었다 (그림 22C-E). 결론적으로 본 과제 연구를 통하여 AtPhyB 도입 억새 형질전환체를 5 라인, 총 24개체 식물체를 확보하였으며, 이들은 표현형 검증을 위하여 온실 및 서울대 LMO 포장에 식재되었다. 그리고 BdPhyB 도입 억새 형질전환체들도 항생제 저항성 마커를 이용하여 선발되었다. 이를 위하여 BdPhyB 유전자는 pCAMBIA1300 벡터에 클로닝 되었고 (그림 23A), 분자생물학적 분석을 통하여 유전자 도입 및 발현, 그리고 도입 유전자 수를 확인할 수 있었다 (그림 23B-C). 결론적으로 BdPhyB 억새 형질전환체는 4 라인, 총 23개체가 확보되었으며, 이들은 표현형 검증을 위하여 서울대 LMO 포장에 식재되었다. 따라서 본 과제 연구를 통하여 두 종류의 phyB 유전자가 도입된 억새 형질전환체들을 성공적으로 확보할 수 있었다.

그리고 BdYVB 및 CaPLA1 도입 억새 형질전환체들도 BdPhyB와 동일한 방법으로 선발되었다. 현재 BdYVB 형질전환체 3개체와 CaPLA1 형질전환체 2개체 등을 확보되었으며 (그림 24A-C), 추가 라인 확보를 위한 억새 형질전환을 진행 중에 있다. 또한 BdYVB 유전자의 경우, SNU-M-045 germplasm뿐 아니라 다른 germplasm 종자들을 이용한 억새 형질전환을 실시하였고, 그 결과 SNU-M-107 germplasm 종자를 이용한 형질전환을 통하여 1개 라인, 두 개체의 형질전환체를 획득할 수 있었다 (그림 24D). 따라서 본 과제 연구에서 개발한 억새 형질전환 방법은 SNU-M-045 germplasm에만 적용되는 것이 아니라 다른 억새 germplasm에도 적용 가능함을 검증할 수 있었다. 결론적으로 본 과제 연구에서 목표로 하였던

AtPhyB, BdPhyB, BdYVB, CaPLA1 등의 유전자가 과발현 되는 억제 형질전환체를 모두 확보하였으며, 이들은 생명공학 억제 품종 개발을 위하여 온실과 포장에서 증식이 진행되고 있으며, 다양한 분석을 준비 중에 있다.

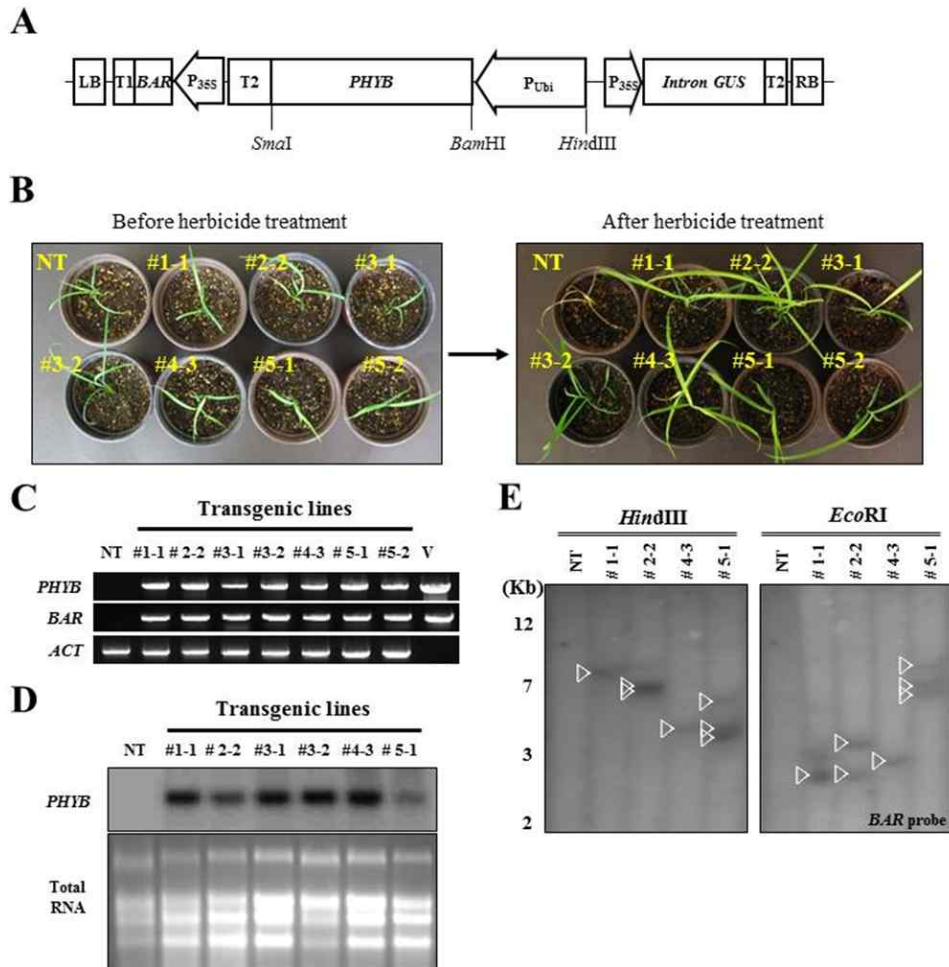


그림 22. AtPhyB 유전자가 도입된 억제 형질전환체 확보 및 분자생물학적 분석 결과. (A) 형질전환에 이용된 벡터. 제초제 저항성 유전자 (*BAR*)와 애기장대 파이토크롬B 유전자 (*AtPhyB*)가 각각 35S promoter와 Ubiquitin promoter 하에 클로닝 되어 있다. (B) 제초제 저항성 조사 결과. 0.8% BASTA 제초제 살포 전후의 사진을 보여주며, 일반 억제(NT, Non-Transgenic)는 제초제 살포 7일 후 고사하는 데 반해 형질전환체들은 제초제에 의해 고사되지 않음을 확인하였다. 제초제 저항성이 확인된 식물체는 총 5 라인, 24 개체였으며 일부만 사진에 포함되었다. (C) Genomic PCR 분석 결과. NT, Non-Transgenic 억제; V, 형질전환에 사용된 vector. Actin 유전자(*ACT*)는 loading control로 포함되었다. (D) Northern blot 분석 결과. 애기장대 *PHYB* 유전자를 probe로 하여 발현을 조사하였다. rRNA는 loading control로 포함되었다. (E) Southern blot 분석 결과. Genomic DNA를 *Hind*III 또는 *Eco*RI으로 처리한 후, 제초제 저항성 *BAR* 유전자를 probe로 하여 분석을 실시하였다.

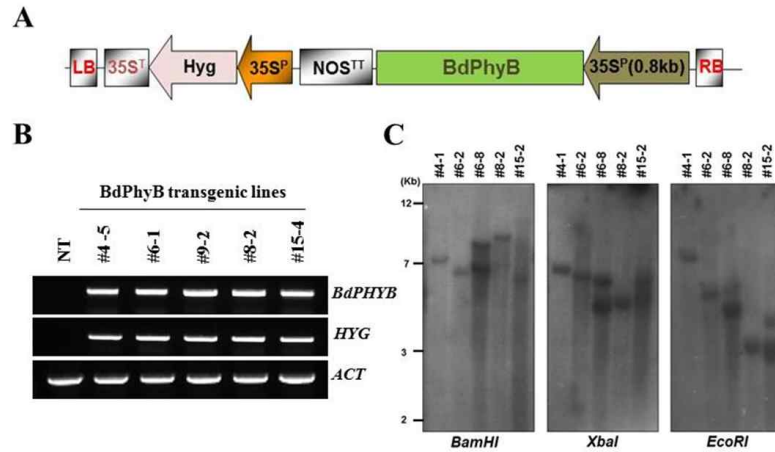


그림 23. BdPhyB 유전자가 도입된 억제 형질전환체 확보 및 분자생물학적 분석 결과. (A) 형질전환에 이용된 벡터. Hygromycin 항생제 저항성을 선발 마커로 활용하고 있으며, 35S promoter 하에 *BdPhyB* 유전자를 포함하고 있다. (B) RT-PCR 분석을 통한 도입 유전자 발현 분석 결과. N, Non-Transgenic 억제. Actin 유전자(*ACT*)는 loading control로 포함되었다. 총 23개 식물체 모두 도입 유전자가 발현됨을 확인하였으며, 본 그림에는 일부 data만 보여준다. (C) Southern blot 분석 결과. Genomic DNA를 *Bam*HI, *Xba*I 또는 *Eco*RI로 처리한 후, *HYG*를 probe로 하여 분석을 실시하였다.

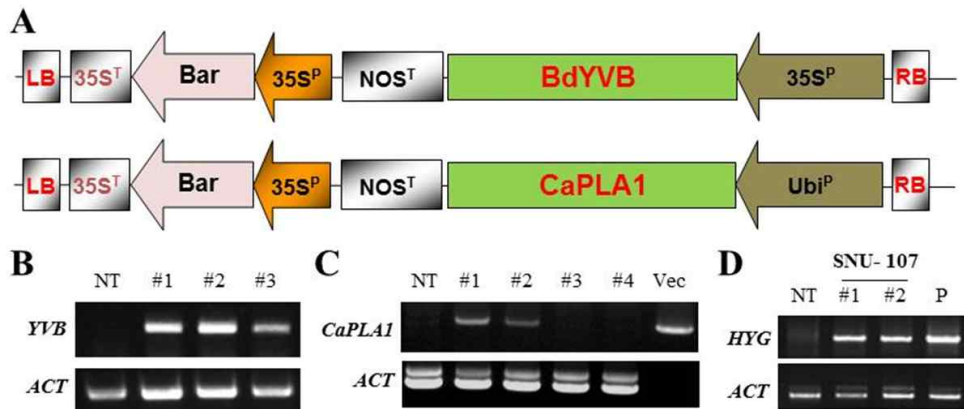


그림 24. BdYVB 및 CaPLA1 도입 억제 형질전환체 확보. (A) 형질전환에 이용된 유전자 벡터들. Brachypodium 고효율성 파이토크롬 (*BdYVB*) 유전자 및 성장 촉진 유전자 *CaPLA1*이 각각 35S promoter 및 Ubiquitin promoter 하에 클로닝 되어 있다. (B) *BdYVB* 유전자가 도입된 억제 형질전환체들의 genomic PCR 분석 결과 (SNU-M-045 germplasm 이용). NT, Non-Transgenic 억제 (as a negative control). Actin 유전자 (*ACT*)는 loading control로 포함되었다. (C) *CaPLA1* 유전자가 도입된 억제 형질전환체들의 genomic PCR 분석 결과. Vec, 형질전환에 사용된 vector (as a positive control). #3 및 #4는 형질전환체가 아닌 것으로 나타났으며, #1 및 #2는 형질전환체로 확인되었다. (D) *BdYVB* 유전자가 도입된 억제 형질전환체들의 genomic PCR 분석 결과 (SNU-M-107 germplasm 이용).

### 3. 광 이용성이 증대된 생명공학 역사 개발

본 과제 연구는 식물의 광수용체 파이토크롬 유전자를 역사로 도입시켜 광 이용성이 증대된 생명공학 역사 품종을 개발하는 목적을 가지고 진행되었다. 참고로 고효율성 BdPHYB 도입 역사 형질전환체는 비교적 최근에 선발되어 증식 중에 있기에, 본 과제 연구에서는 AtPHYB 및 BdPHYB 유전자가 도입된 역사 형질전환체들의 분석에 중점을 두었다. 여기에는 제4협동과제 연구팀과의 공동 연구로 이들 역사 형질전환체들을 서울대 수원 LMO 포장에 식재하여 증식 작업과 더불어 포장 형질을 분석하도록 하였다.

먼저 AtPHYB 도입 역사 형질전환체들의 경우, 포장에서 자라는 식물체가 대조구 식물체에 비하여 진한 녹색을 띄는 것을 확인할 수 있었다. 이에 포장에서 자란 역사 식물체의 잎을 채취하여 엽록소 함량을 분석한 결과, non-transformed 대조구 식물체(NT)에 비하여 엽록소 함량이 증대되어 있음을 확인할 수 있었다 (그림 25). 그리고 또다른 두드러진 표현형으로서 키가 작고, 개화가 지연되는 표현형을 확인할 수 있었다 (그림 26). 이는 phyB 유전자가 과발현 된 담배나 감자 식물에서 길이 생장이 감소하고, 엽록소 증가 및 photosynthetic performance가 좋아진다는 보고와 일치하는 것으로 나타났다. 또한 최근 phyB 과발현 면화에서 apical dominance가 감소되어 키가 작아진 semi-dwarfism 표현형과 생산성이 증대된다는 보고와도 일치되는 결과로 여겨진다 (Rao et al., 2011). 추가로 이들 역사 형질전환체를 이용하는 경우의 바이오에너지 공정 유용성 검증을 위하여 cell wall 함량, lignin 및 cellulose 함량 등을 분석하였으나, 대조구 식물체와 큰 차이를 확인할 수는 없었다. 따라서 AtPHYB 유전자가 도입된 생명공학 역사는 키가 작고 개화가 지연되어 바이오매스 증대가 가능한 표현형을 보여 주었으나 바이오에너지 공정에 유리한 표현형을 제시하지는 못하였다. 그러므로 바이오에너지 공정 유용성을 위해서는 향후 cell wall 생합성 관련 유전자들을 도입시킨 역사 형질전환체를 확보하여 분석해야 할 것으로 여겨진다.

BdPHYB 과발현 역사 형질전환체의 경우, 포장에서 AtPHYB 형질전환체에 대비하여 큰 차이를 보여 주었다. 즉, AtPHYB 형질전환체는 대조구 식물체에 비하여 키가 작는데, BdPHYB 역사 형질전환체는 대조구 식물체보다 상당히 큰 표현형을 보여주었다 (그림 27A). 또한 AtPHYB 형질전환체보다도 훨씬 높은 엽록소 함량을 보여 주었다 (그림 27B). 이것은 BdPHYB 역사 형질전환체의 잎이 두껍고 엽록체 발달이 우수함에 기인하는 것으로 파악되었다 (그림 27C). 특히 BdPHYB 과발현 역사 형질전환체는 키도 크고 잎도 큰 전형적인 바이오매스 증대 표현형을 보여 주었는데, 이를 조사하기 위해서 잎의 길이, 폭, 면적을 3rd leaf 및 flag leaf를 이용하여 조사하였다. 그 결과, BdPHYB 형질전환체들의 잎이 대조구 식물체에 비해 길이, 폭, 면적 모두 증대되어 있었으며, 특히 flag leaf의 길이가 크게 증대되어 있는 것을 확인할 수 있었다 (그림 28). 그 외에도 줄기의 두께도 약간 두꺼워져 있었고, 잎의 중량도 대조구 식물체에 비해 증대되어 있음을 확인할 수 있었다 (그림 29). 마지막으로 AtPHYB 역사 형질전환체가 보여준 개화 지연 표현형을 검증한 결과, BdPHYB 역사 형질전환체에서도 개화 시기가 지연되어 있음을 확인할 수 있었다 (그림 30).

결론적으로 쌍자엽 식물인 애기장대의 phyB가 도입된 역사보다 단자엽 식물인 Brachypodium phyB가 도입된 역사에서 훨씬 우수한 (i.e., 바이오매스 증대 가능한) 표현형을 확인할 수 있었다. 이는 같은 종류의 유전자라도 어떤 식물에서 유래된 것이냐에 따라 성능에서 차이가 있을 수 있음을 시사하고 있으며, phyB를 역사로 도입시키는 경우 단자엽 phyB 유전자를 형질전환시킨 생명공학 역사가 더 좋은 품종이 될 수 있다는 것을 제시할 수

있었다. 따라서 현재 확보되어 있는 *Brachypodium* 고효율성 phyB (YVB) 도입 역사는 더 좋은 형질을 지닌 생명공학 역사로 육성될 수 있을 것으로 기대되고 있다.

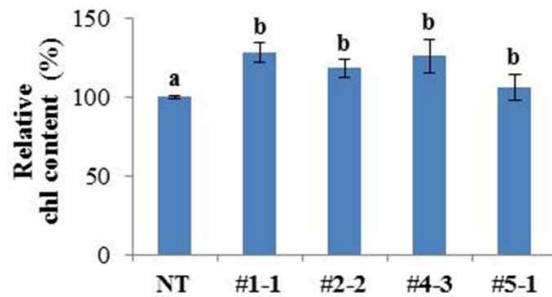


그림 25. AtPhyB 도입 역사 형질전환체들의 엽록소 함량 분석 결과. 대조구 역사 식물체(NT)에 비해 AtPhyB 유전자가 도입된 역사 형질전환체들이 대체로 엽록소 함량이 높다는 것을 확인할 수 있다. Error bars indicate standard errors ( $n = 5$ ), and means with different letters are significantly different at  $P < 0.05$ , using Duncan.

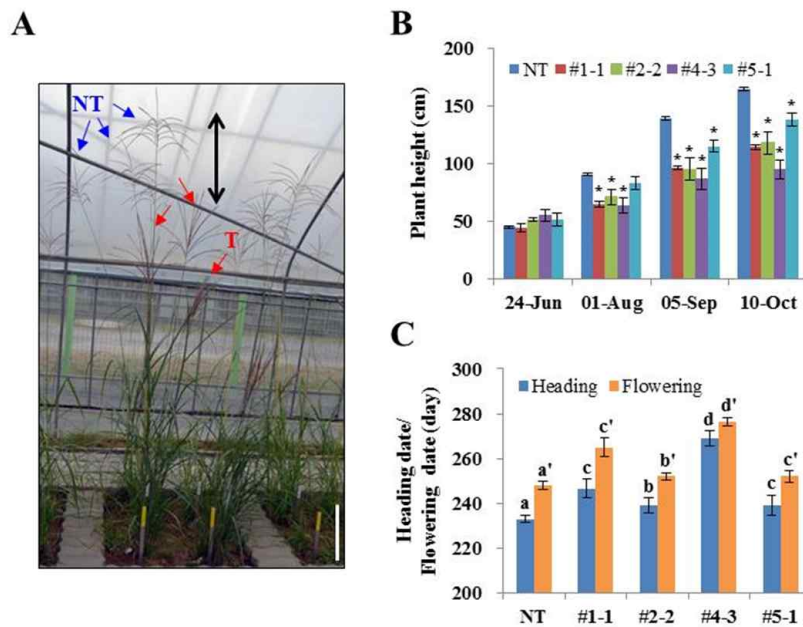


그림 26. AtPhyB 도입 역사 형질전환체들의 포장 형질 분석 결과. (A) LMO 포장에서의 역사 식물체 사진 (at Julian day of 273). 검정 화살표는 대조구 역사 식물체(NT)와 AtPhyB 역사 형질전환체들의 키 차이를 보여준다 (Bar = 20 cm). 파란색 및 빨간색 화살표는 대조구 및 역사 형질전환체의 booting/heading을 보여준다. (B) 포장에서의 역사 식물체 길이 측정 결과. (C) 포장에서의 역사 식물체 개화 시기 조사 결과. Error bars indicate standard deviations ( $n = 3$ ), and means with different letters are significantly different at  $P < 0.05$ , using Duncan.



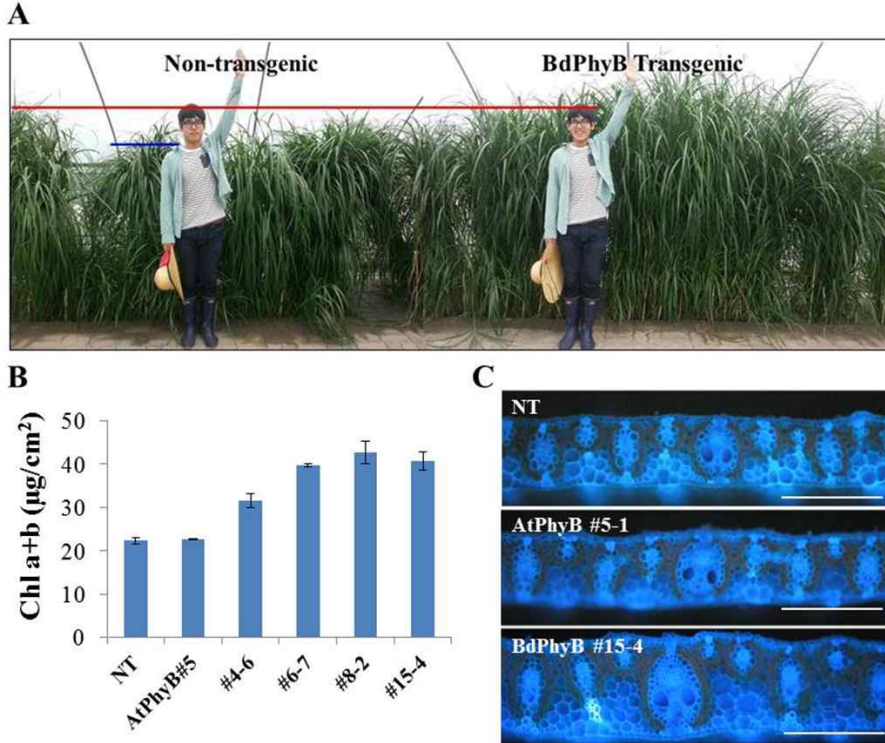


그림 27. BdPhyB 도입 억새 형질전환체들의 포장 형질 및 엽록소 함량 분석 결과. (A) LMO 포장에서 배양중인 억새 식물체 사진. 청색 선은 대조구 억새 식물체(NT)의 높이를, 적색 선은 BdPhyB 억새 형질전환체들의 높이를 보여준다. 파란색 및 빨간색 화살표는 대조구 및 억새 형질전환체의 booting/heading을 보여준다. (B) 엽록소 함량 분석 결과. 대조구 억새 식물체(NT)에 비해 BdPhyB 유전자가 도입된 억새 형질전환체들이 엽록소 함량이 매우 높다는 것을 확인할 수 있었다 (단위면적당 엽록소 함량이 최대 2배까지 높았음). (C) 잎의 Transverse section 현미경 사진. 대조구 억새 식물체(NT)나 AtPhyB 도입 억새 형질전환체에 비해 BdPhyB 형질전환체의 잎이 두껍고 엽록체 (흑색 부분) 발달이 우수함을 확인할 수 있었다. Bar= 500 µm.

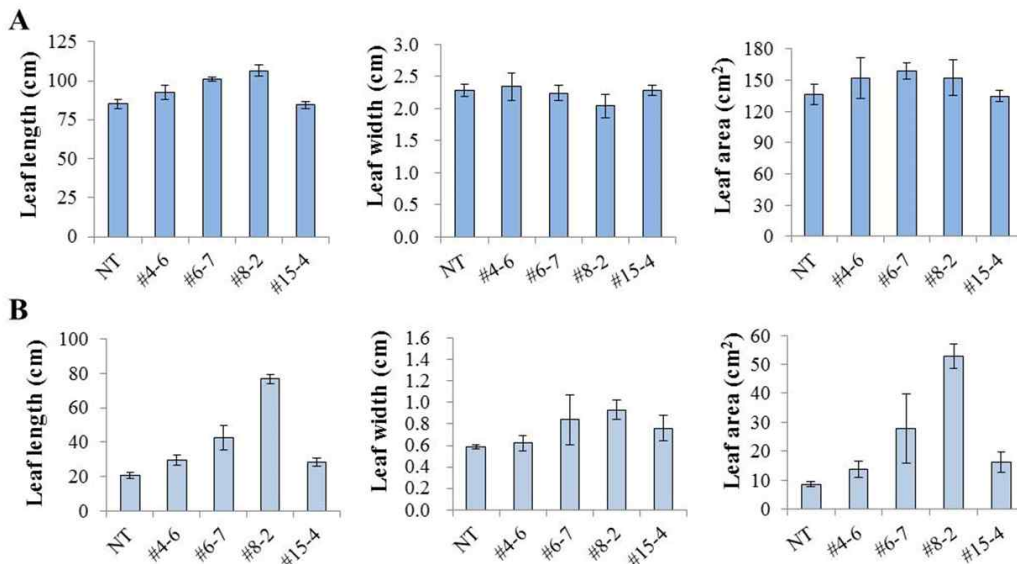


그림 28. BdPhyB 도입 억새 형질전환체들의 잎 표현형 분석 결과. (A) 3rd leaf 분석 결과. (B) Flag leaf 분석 결과. 각 잎의 길이, 폭 및 면적을 측정하였다.

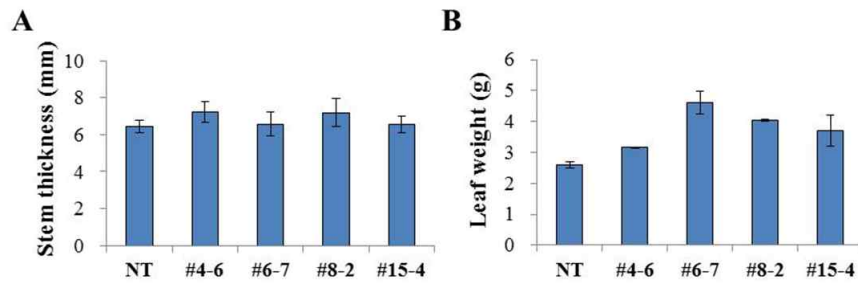


그림 29. BdPhyB 도입 억새 형질전환체들의 줄기 두께 (A) 및 잎 중량 (B) 분석 결과.

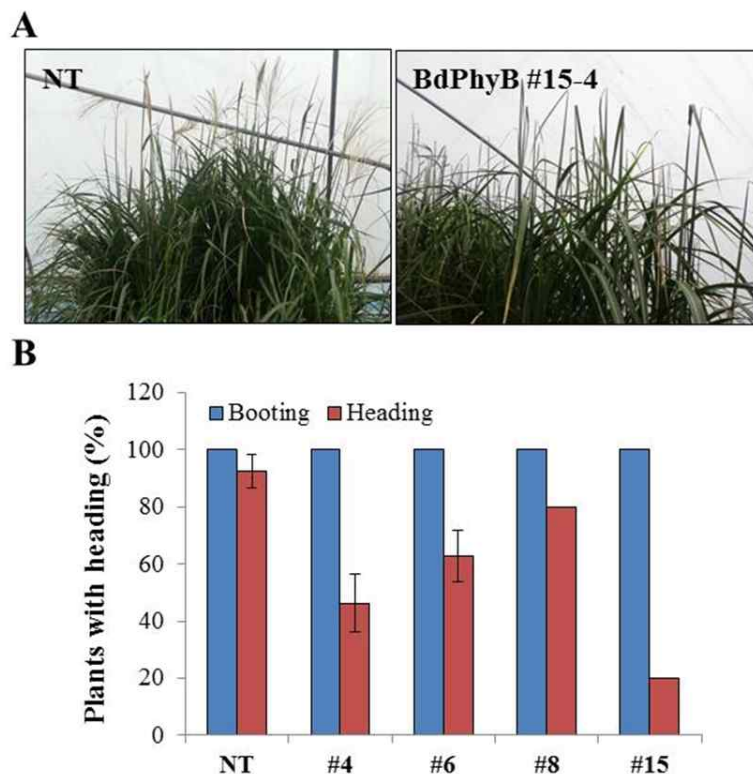


그림 30. BdPhyB 도입 억새 형질전환체들의 개화 시기 분석 결과. (A) LMO 포장에서의 억새 식물체 사진. (B) 포장에서의 억새 식물체 개화 시기 조사 결과. 대조구 억새 식물체(NT)와 BdPhyB 억새 형질전환체들의 booting이 모두 일어난 조건에서 개화를 위한 heading이 형질전환체에서 상당히 지연됨을 관찰할 수 있었다.

[4협동: 억새(Miscanthus)의 유전적 재배 생리생태적 특성평가 및 포장재배법 개발]

1. 억새 유전자원의 수집

가. 2009년부터 2014년까지 국내 및 해외(동북아시아)에서 역사 유전자원을 수집하여 현재 약 391종의 역사 유전자원을 수집 관리하고 있음.

표 1. 국내의 지역별 역사 수집 현황 (2014. 04. 08 현재)

Site	No. of accession	Site	No. of accession	Site	No. of accession
경기	66	강원	41	충남	10
충북	11	경북	18	경남	24
전북	8	전남	86	제주	27
대만	4	러시아	23	미국	1
영국	13	일본	28	중국	31

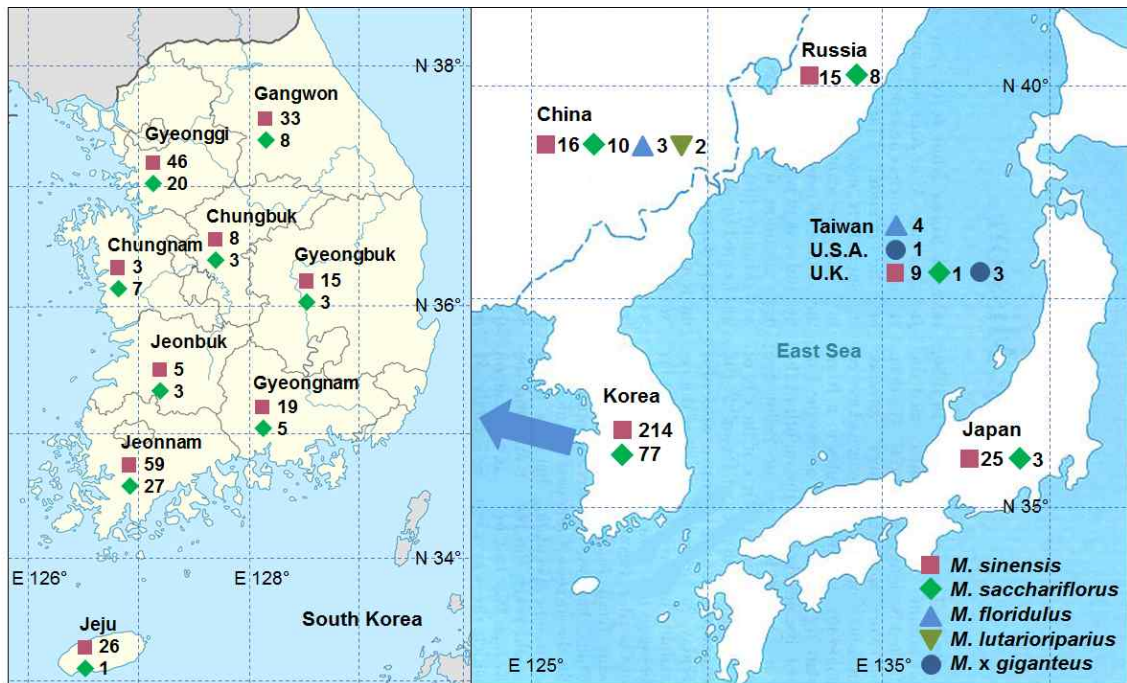


그림 1. 국내의 지역별 · 종별 역사 수집 현황

나. 수집한 역사유전자원들을 유지하고 관리하는 역사유전자원 포장을 수원 서울대학교 농생대 실험농장과 여주 실험 포장에 유전자원 포장을 조성하여 특성을 조사하였으며, 이들 유전자원들은 향후에도 지속적으로 관리하여 바이오매스용 역사품종개발에 활용할 예정이다.





그림 2. 수원과 여주에 조성된 억새 유전자원 포장

## 2. 억새 유전자원의 유전적 생리생태 특성 평가

### 가. 억새의 형태적 특성 비교를 통한 수집 유전자원 분석

#### (1). 억새의 형태적 특성 비교를 통한 다양성 분석 및 유연관계 분석

- (가) 참억새(*M. sinensis*)의 경우 대부분의 엽설이 털과 막의 형태가 혼재해 있는 것을 확인할 수 있었고, 잎 전체적으로 털 및 큐티클에 의해 표면이 거친 것을 확인할 수 있었음.
- (나) 물억새(*M. sacchariflorus*)의 경우 참억새와는 반대로 엽설이 털보다는 막의 형태로 되어 있는 것을 확인할 수 있었고 잎의 표면도 참억새와는 다르게 매끈한 것을 확인할 수 있었음.
- (다) 엽이, 경령(colar)과 엽초의 형태(open, closed, split with overlapping margins)는 종에 상관없이 다양한 형태를 띠고 있는 것을 확인할 수 있었음.
- (라) 줄기의 경우 물억새와 *M. x giganteus*는 절간부분에 측아가 형성되어 성기에는 곁가지가 형성되는 것을 확인할 수 있었으나, 이와 다르게 참억새는 측아가 형성되지 않는 것을 확인할 수 있었으며, 일부 물억새에서는 절간부위에 털이 형성되는 것을 확인할 수 있었음.
- (마) 화서의 경우 곁보기 색이 참억새는 누렇거나 자줏빛을 띠고 물억새와 *M. x giganteus*는 하얗고 은빛을 띠는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 spiklet 밑 부분에 형성되는 callus hair의 색에 의해서 다르게 나타나는 것을 확인할 수 있었음.

(바) 종자에서는 특히나 종간의 차이가 뚜렷했는데 참억새는 spiklet의 상단부분에 까락이 존재했으며 callus hair의 길이도 spiklet의 길이와 비슷함. 하지만 물억새와 *M. x giganteus*는 까락이 존재하지 않으며 callus hair의 길이가 spiklet의 길이보다 2~4배 정도 긴 것을 확인할 수 있었음.

(사) 19개의 형태적 특성을 통해 유전적 다양성을 평가한 결과, 크게 참억새와 물억새 그룹으로 분류되었으며, 일부 참억새의 경우 물억새와 같이 그룹핑되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 추후 표본을 통한 분류를 통해 물억새와 참억새의 중간형이 존재함을 알 수 있었음. 또한 이를 통해 물억새와 참억새를 분류하는 키가 되는 특성들을 찾아낼 수 있었음.

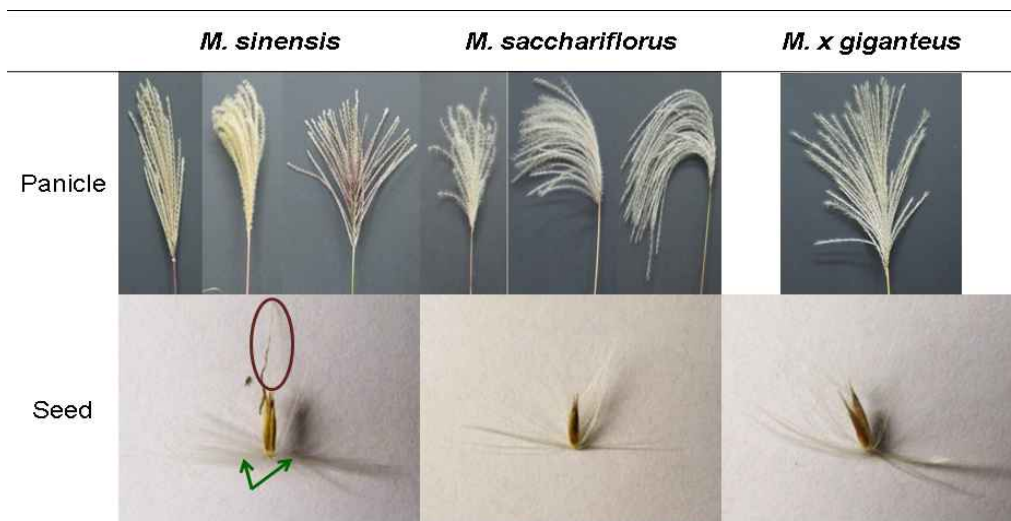
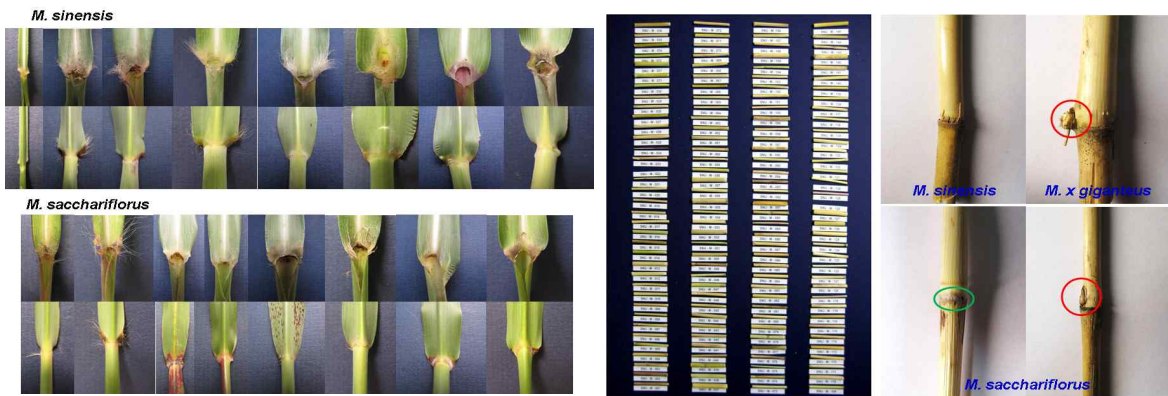


그림 3. 억새의 잎, 줄기, 화서 및 종자의 형태적 특성



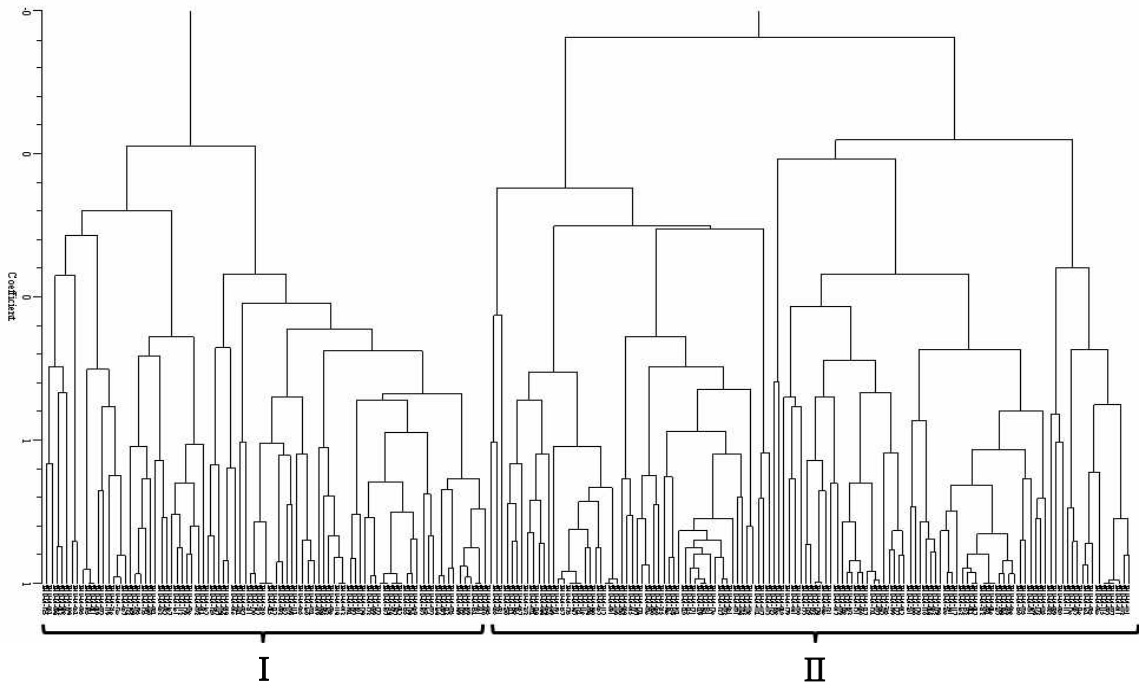


그림 4. 보유 억새 수집종의 19개 형태적 특성을 통한 유연관계 분석

(2). 새로운 억새종 발견(중간형)

- (가) 형태적 특성 및 SSR 마커분석을 통한 유연관계 분석에서 일부 물억새가 참억새 집단에 속하는 것을 확인함.
- (나) 일본의 억새 분류학자인 Dr. Ibaragi와의 분류작업을 통해서 한국에서 보고되지 않았던 *Miscanthus x ogiformis*를 확인함.
- (다) 발견된 새로운 억새를 Journal of Japanese Botany에 게재하였음.

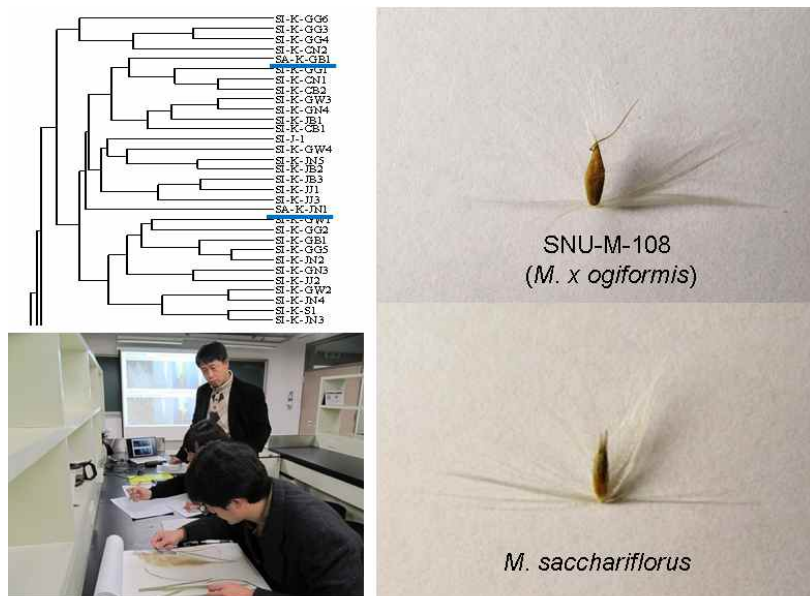


그림 5. 국내에서 보고되지 않은 새로운 억새 종 *Miscanthus x ogiformis* 확인

나. 역세의 SSR마커를 이용한 수집 유전자원 분석

- (1) 역세로부터 제작되고 선발된 14개의 EST-SSR marker를 이용한 국내외 수집 역세 337종에 대한 유전적 유연관계 분석
- (2) SSRs 마커를 이용하여 역세의 유연관계를 분석한 결과, 형태적 특성과 마찬가지로 크게 물억새(*M. sacchariflorus*)와 참억새(*M. sinensis*) 2개의 집단으로 구분되었으며 *M. x giganteus* 의 경우에는 물억새 집단에 속하는 것으로 확인되었음.
- (3) 특히, SSRs 마커를 통한 분석에서는 외국에서 수집된 참억새의 경우 또 다른 집단을 형성하며 grouping 되는 것을 확인하였음.
- (4) 크게 2개의 집단으로 분류되었지만 일부 역세가 섞인 이유는 역세 수집종의 수에 비해 마커의 수가 부족하였고, 모든 마커의 origin이 참억새로 동일하였기 때문일 것이라 사료됨..
- (5) 추후 이러한 한계를 극복하기 위해 프라이머의 수를 증가시키거나, 다양한 기원(물억새, 기타 역세종 및 근연종)의 마커를 활용하는 등 개선된 연구가 필요함.

표 2. 선발된 SSRs 분자표지

SSR name	Primer sequence 5'- 3'	Annealing temp. (°C)	Allele no.	Origin species	Reference
Mgga1336	F: CCTTGTGGTCAAGCAACTGG R: AAGCCCTTCTTTCTGATCGC	61	5	<i>M.sinensis</i>	Unpublished
Mcgc1125	F: GTCAGATGCAGCAGAGCTGG R: TTTTCGTGGACGCCTAAATG	61	5	<i>M.sinensis</i>	Unpublished
Magg134	F: AGGTCTCATCCTCCACCGAG R: GTGACGGCTTCGATCTCCTC	61	6	<i>M.sinensis</i>	Unpublished
Mgac617	F: ATGACATCCGAGGAGTCCGT R: TCAAGCACAGCACAGCACAC	61	4	<i>M.sinensis</i>	Unpublished
Mcag1647	F: CGCGCTCCTACGTCTACAAG R: GTATTTCCCTTTCCCAAGCG	61	7	<i>M.sinensis</i>	Unpublished
Mgag547	F: AGAGGATGCAAAGCCCAAGT R: CTGCACACTTCGATCCAACC	61	8	<i>M.sinensis</i>	Unpublished
Mgcg725	F: GCCGGCTGTACAACAAGAAG R: CCATGTCACCGAAGCTGTTC	61	9	<i>M.sinensis</i>	Unpublished
Mggc338	F: TTCTTGACTIONGCCCACAAAG R: AATCCGGGCTCTTGGAGTTA	61	8	<i>M.sinensis</i>	Unpublished
Mcgg61	F: CTGGCTGTTCCTCGCATAACA R: AAGCCAAGAAGAAGAAGGCG	61	4	<i>M.sinensis</i>	Unpublished
Mgca473	F: AAGCTTCCGAAGAATCTGCC R: CAAGTAGTGGACAGCCCCAA	61	6	<i>M.sinensis</i>	Unpublished
Mcgtg459	F: CTGGCCATGAGTGAATCGTC R: GAGAAGAGACGTGCAGAGCG	61	3	<i>M.sinensis</i>	Unpublished
Matg1077	F: GTGTGGTGGTGACCTCTGGA R: AGAAGCAGAGCACTTGAGCC	61	8	<i>M.sinensis</i>	Unpublished
Mtcg737	F: GAGGACCTCAAGGAGCGGTA R: GCCAAGAAGGGCTGTTGTTA	61	4	<i>M.sinensis</i>	Unpublished
Magc211	F: TAGGCCAGAATGCAGGATGA R: ATGGTGGTCCCTCGTACATCG	61	6	<i>M.sinensis</i>	Unpublished

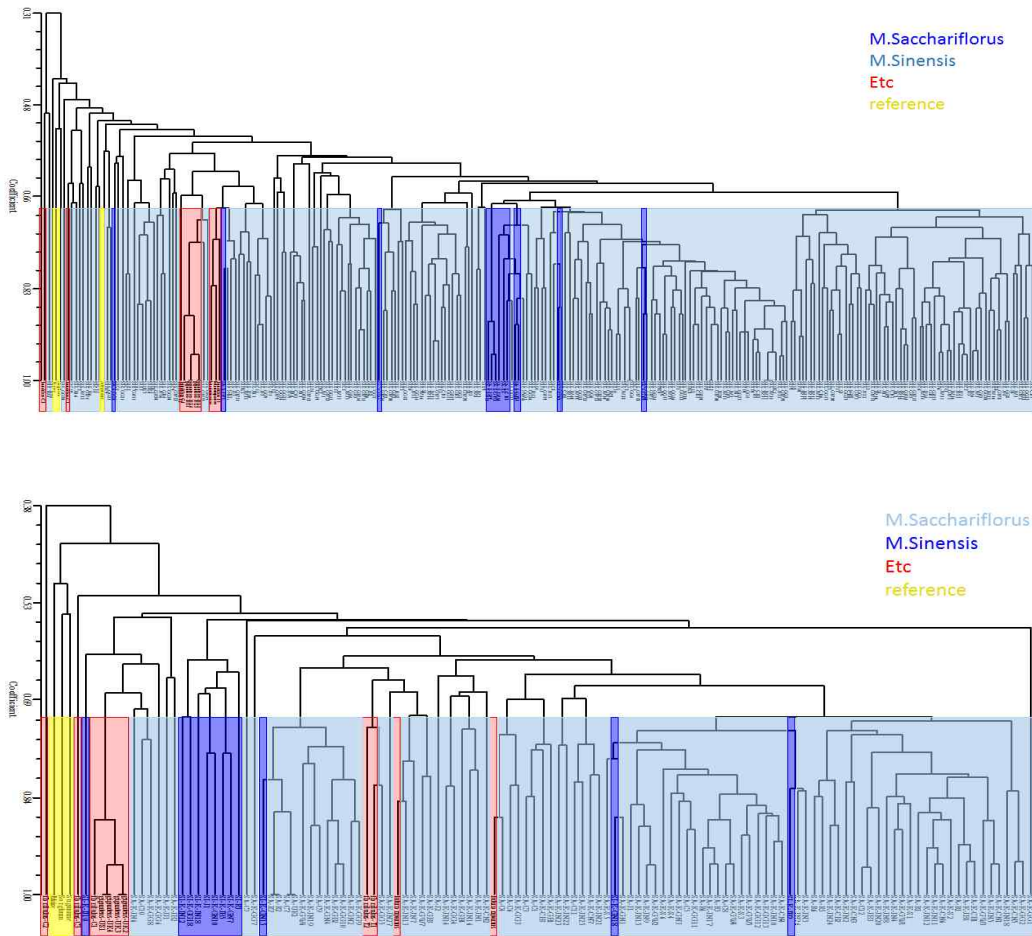


그림 6. 보유 역사 수집종의 14개 SSRs 마커를 통한 유연관계 분석

다. Flow cytometry를 이용한 보유 역사의 배수성 검정

- (1) 잎 샘플을 이용하여 flow cytometry 평가를 통하여 보유 역사의 배수성 검정을 한 결과 참역사는 2배체와 3배체, 물역사는 2배체와 4배체 그리고 *M. × giganteus* 는 3배체로 확인되었음.
- (2) 지역별로 차이는 있지만 3배체 참역사를 제외하고 모든 배수성 역사가 다양하게 분포하는 것을 확인할 수 있었음.
- (3) 위 결과를 토대로 선발한 우량 역사들의 배수성에 따라 육종프로그램에 이용할 수 있을 것으로 기대됨.

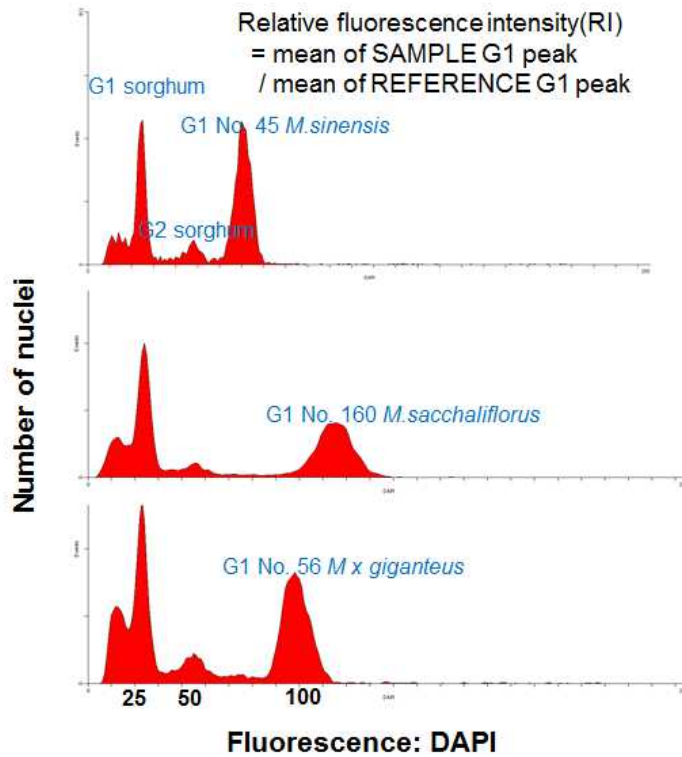


그림 7. 참억새, 물억새 와 *M. × giganteus* 의 flow cytometry 평가를 통한 배수성 차이

표 3. 선발된 억새종의 Flow cytometry 를 통한 배수성 평가

수집 국가 및 지역	<i>M. sinensis</i>		<i>M. sacchariflorus</i>		<i>M. × giganteus</i>	합계
	2배체	3배체	2배체	4배체	3배체	
한국	강원	14		2	2	18
	경기	19		4	6	29
	충북	2		1	2	5
	충남	5			6	11
	전북	5			2	7
	전남	20	2	2	22	46
	경북	3			3	6
	경남	9	1	1	3	14
	제주	16			1	17
	서울	2			4	6
일본	7			1		8
중국	6		7	1		14
러시아	6		3			9
영국	2				2	4
대만	2					2
미국					1	1
합계	118	3	20	52	3	196

라. 억새의 생리생태적 특성 평가

(1) 수집 억새의 출아, 출수·개화 특성평가

(가) 수집된 억새의 출아 및 개화시기(지엽발생, 출수, 개화) 정보를 억새의 수집지대(위도)와 상관분석한 결과 위도와 높은 부(-)의 상관을 갖고 있음을 확인하였음.

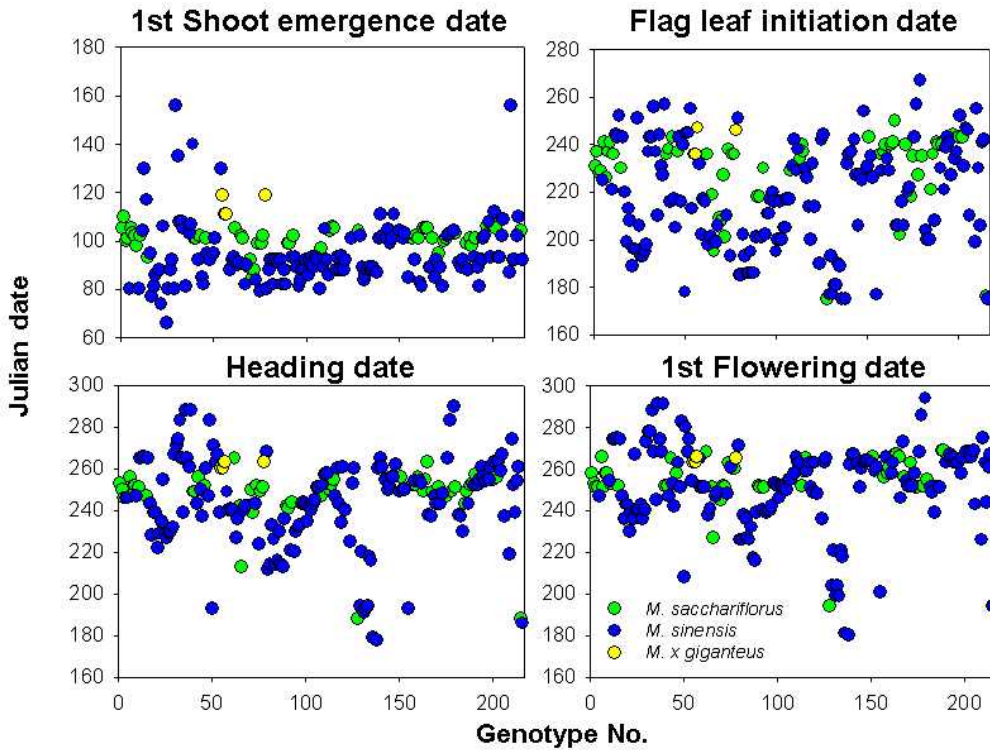


그림 8. 수집된 억새의 출아 및 개화시기

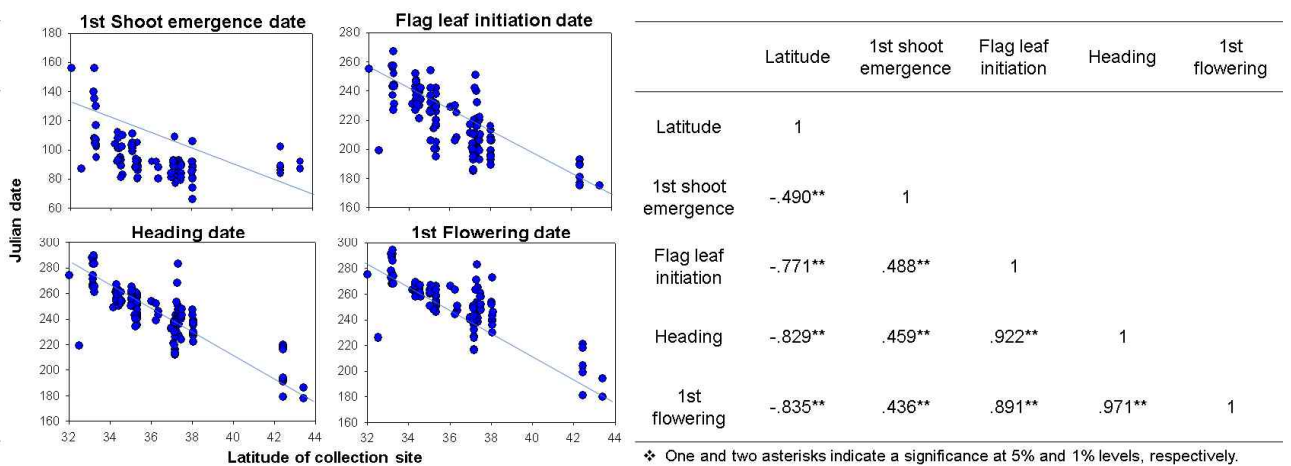


그림 9. 수집된 참억새의 위도별 개화특성(左) 및 각 개화특성간의 상관분석(右)



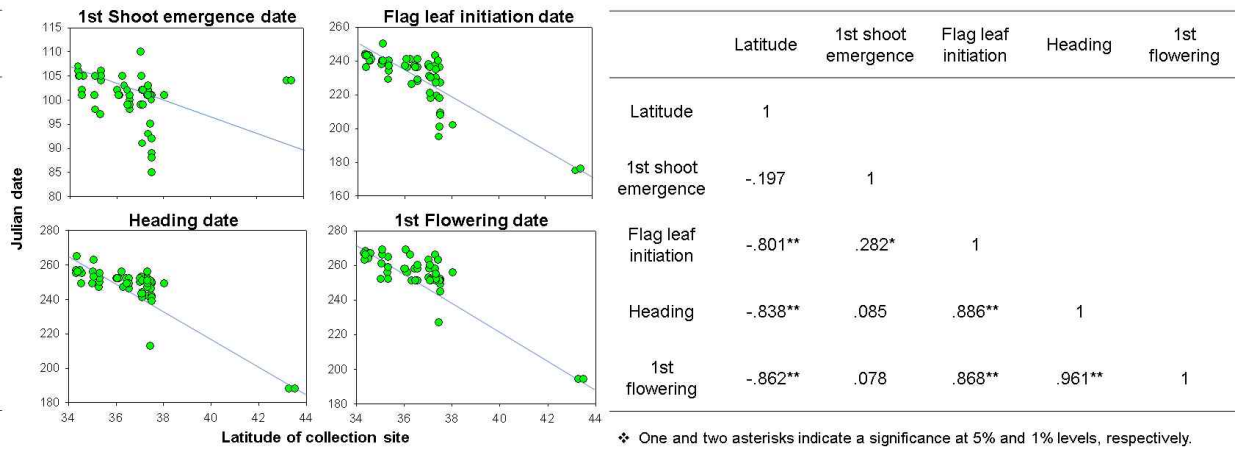


그림 10. 수집된 물억새의 위도별 개화특성(左) 및 각 개화특성간의 상관분석(右)

(2) 수집 억새의 생육특성평가(초장, 엽면적)

(가) 수집된 억새를 재식 후 초장을 연차 별로 조사한 결과 대부분의 억새 종이 크게 연차가 늘어날수록 초장이 크게 증가하는 것을 확인 할 수 있었음.

(나) 엽면적의 경우에는 지엽, 제 1 장엽과 제 2 장엽의 넓이를 측정 한 결과, 연차에 따라 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었고 바이오매스 수량이 높은 것들은 엽면적과 초장이 큰 것으로 확인되었음.

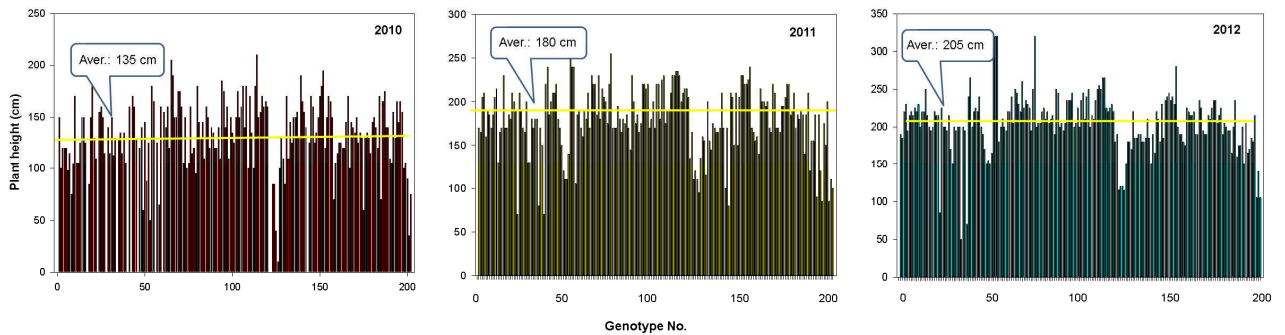


그림 11. 수집된 억새의 재식 후 3년간 초장의 변화 (2010~2012년)

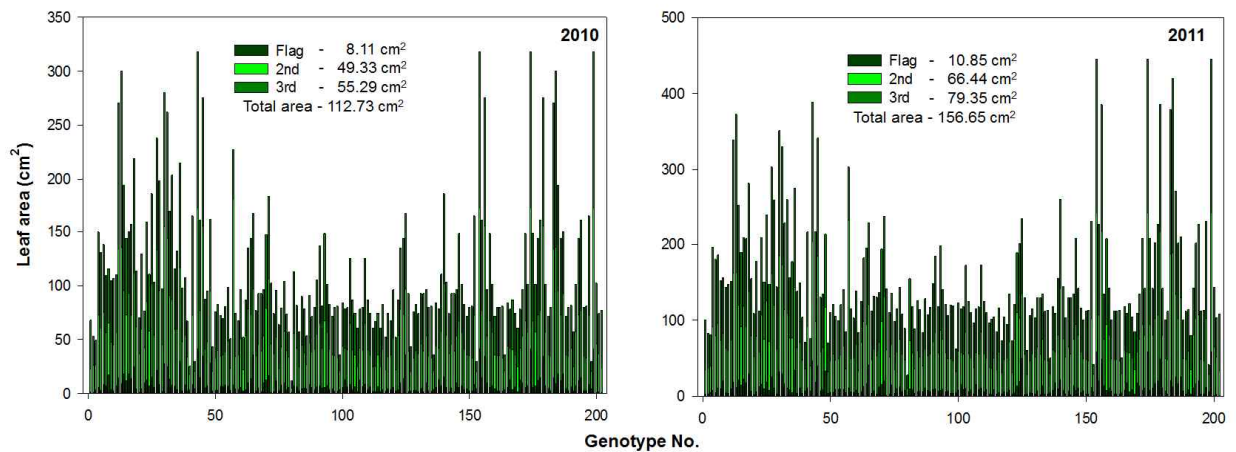


그림 12. 수집된 억새의 재식 후 2년간 엽면적의 변화 (2010~2011년)

마. 억새의 바이오매스 생산 특성, 환경적응성 평가 및 우량억새 선발

(1) 억새의 바이오매스 생산 특성 분석

- (가) 기수집한 200여종 이상의 억새유전자원들을 유럽에서 바이오매스 생산용으로 재배되는 *M. giganteus*를 기준으로 바이오매스 생산성(초장, 생체중, 건물중 등) 등을 평가하였음.
- (나) 그림 11. 과 같이 지역별로 방사형 그래프를 통해 우수 형질을 가진 억새들을 선발하였음.
- (다) 초기에 바이오매스 생산성이 우수한 참억새 4종(그림 14), 물억새 4종(그림 15)을 각각 선발하였음.
- (라) 3년차가 지난 후에는 기 선발된 형질이 우수한 억새와 함께 지역적 분배를 통해 71종의 억새를 추가적으로 선발하여 바이오매스 생산 특성 평가를 시도함.
- (마) 선발된 억새의 농업적 형질을 조사해 본 결과, *M. x giganteus*가 다른 억새보다 초장, 경경에서 월등히 높은 것을 확인할 수 있고 잠재수량 역시 높은 것을 확인할 수 있었음.
- (바) 하지만 경수와 엽면적에 있어서 상대적으로 낮은 것을 확인할 수 있는데 이는 참억새와 물억새에서도 비슷한 경향을 보이는데 초장, 경경과 잠재수량에서는 물억새보다 참억새가 높은 것을 볼 수 있는데, 상관분석을 통해 잠재수량은 경수와 엽면적 보다는 초장과 경경에 영향을 많이 받는다는 것을 알 수 있었음.

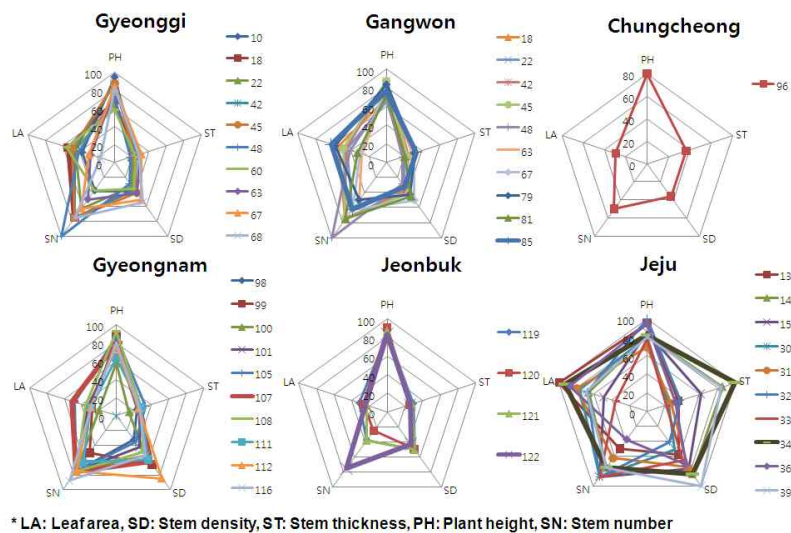
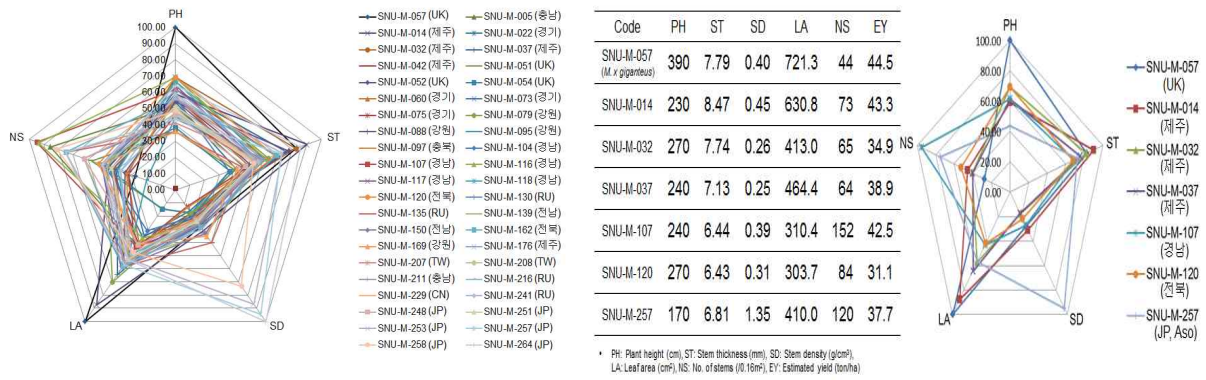
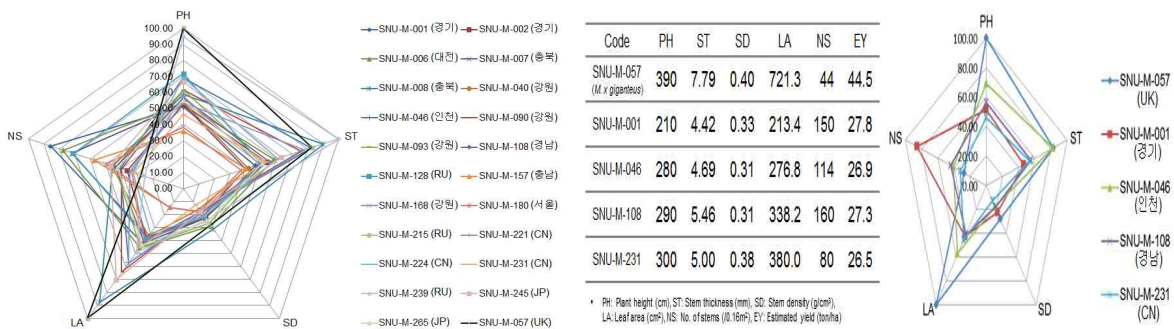


그림 13. 국내 수집 참억새의 바이오매스 생육특성 비교



\* LA: Leaf area, SD: Stem density, ST: Stem thickness, PH: Plant height, NS: No. of stems

그림 14. 국내 수집 참여새의 바이오매스생산관련 형질과 바이오매스 생산성이 우수한 참여새



\* LA: Leaf area, SD: Stem density, ST: Stem thickness, PH: Plant height, NS: No. of stems

그림 15. 국내 수집 물억새의 바이오매스생산관련 형질과 바이오매스 생산성이 우수한 물억새

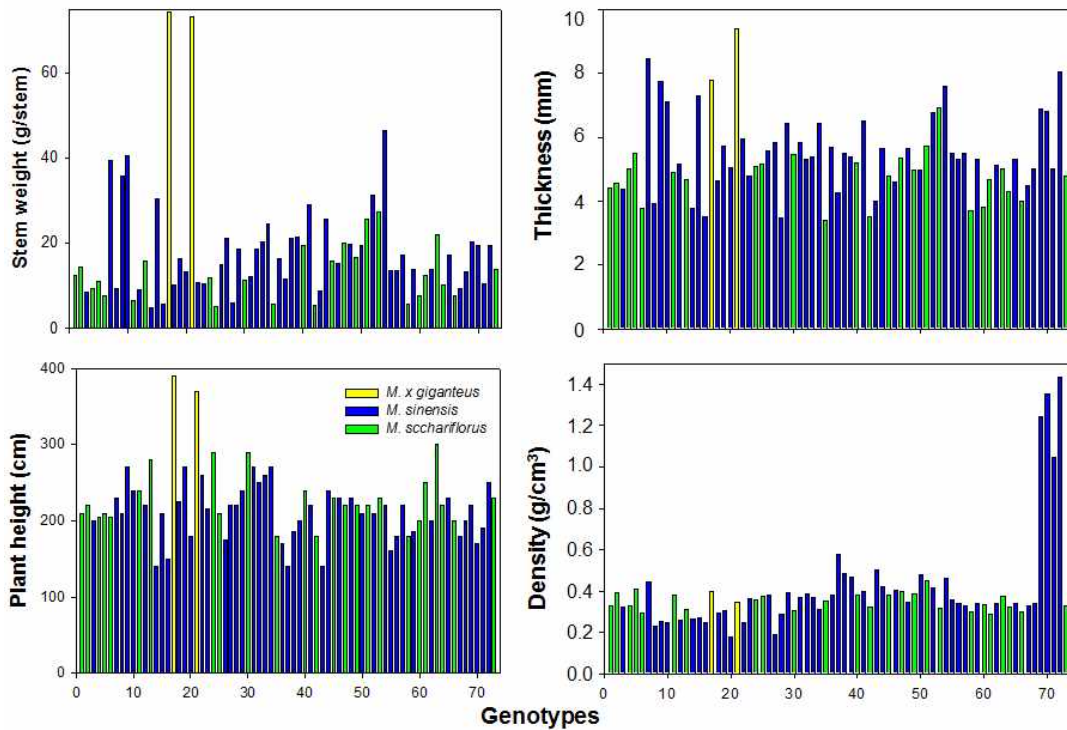


그림 16. 선발된 국내 수집 억새 유전자원의 줄기 성장 특성 비교

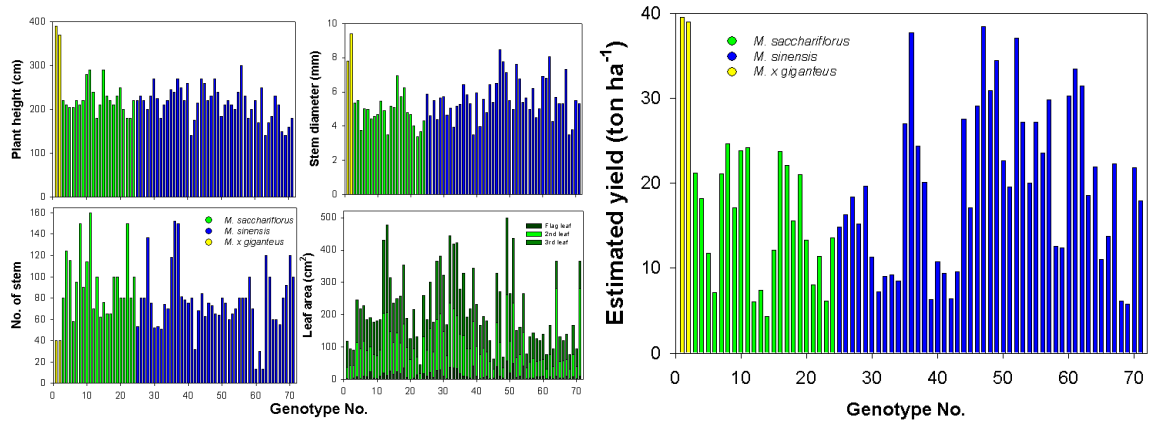


그림 17. 선발된 역새의 농업적 형질 비교(초장, 경경, 경수, 엽면적, 잠재수량)

(1). *M. x giganteus*의 canopy structure 특성 연구

- (가) 역새 재식 후 역새의 canopy 형성에 관련되는 생육지표(초장, 분얼수, 각 분얼의 견체중, rhizome 생육속도를 통한 바이오매스 예측 및 평가) 조사 및 상관·경로 분석 등을 통하여 canopy 형성과 바이오매스 생산성을 예측할 수 있는 모델을 구축할 수 있을 것으로 생각됨.
- (나) 현재 *M. x giganteus*를 통한 3년차까지의 canopy structure 조사 및 분석이 이루어졌으며 4년차 조사 및 *M. x giganteus*의 canopy structure 분석과 함께 참역새 및 물역새의 canopy structure 1-2 년차 조사를 마무리 하여 canopy 형성 및 바이오매스 생산성에 대한 분석 및 중별 특성에 대한 연구가 이루어질 예정이다.
- (다) 연차에 따른 canopy 형성을 살펴보면 중심점으로부터 거리에 따른 역새의 생육지표들의 분포가 정규분포를 따르는 것을 확인 할 수 있었음.

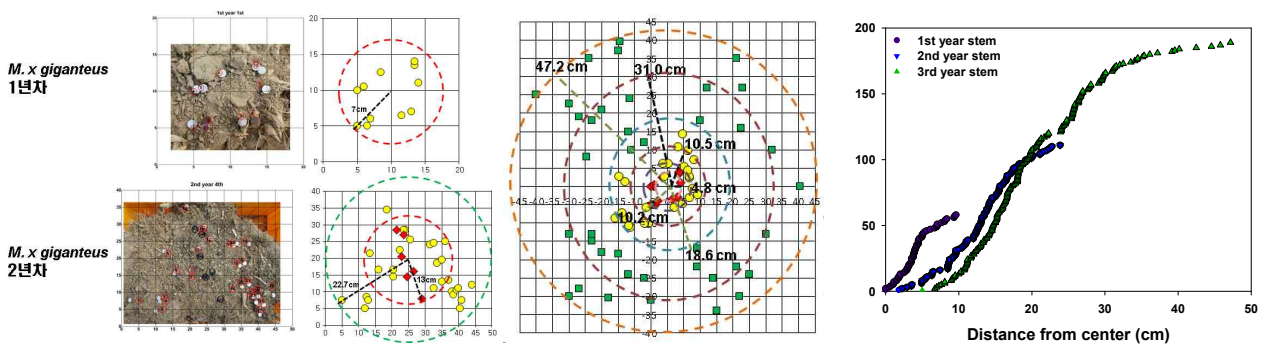


그림 18. *M. x giganteus*의 canopy structure 관련 생육특성

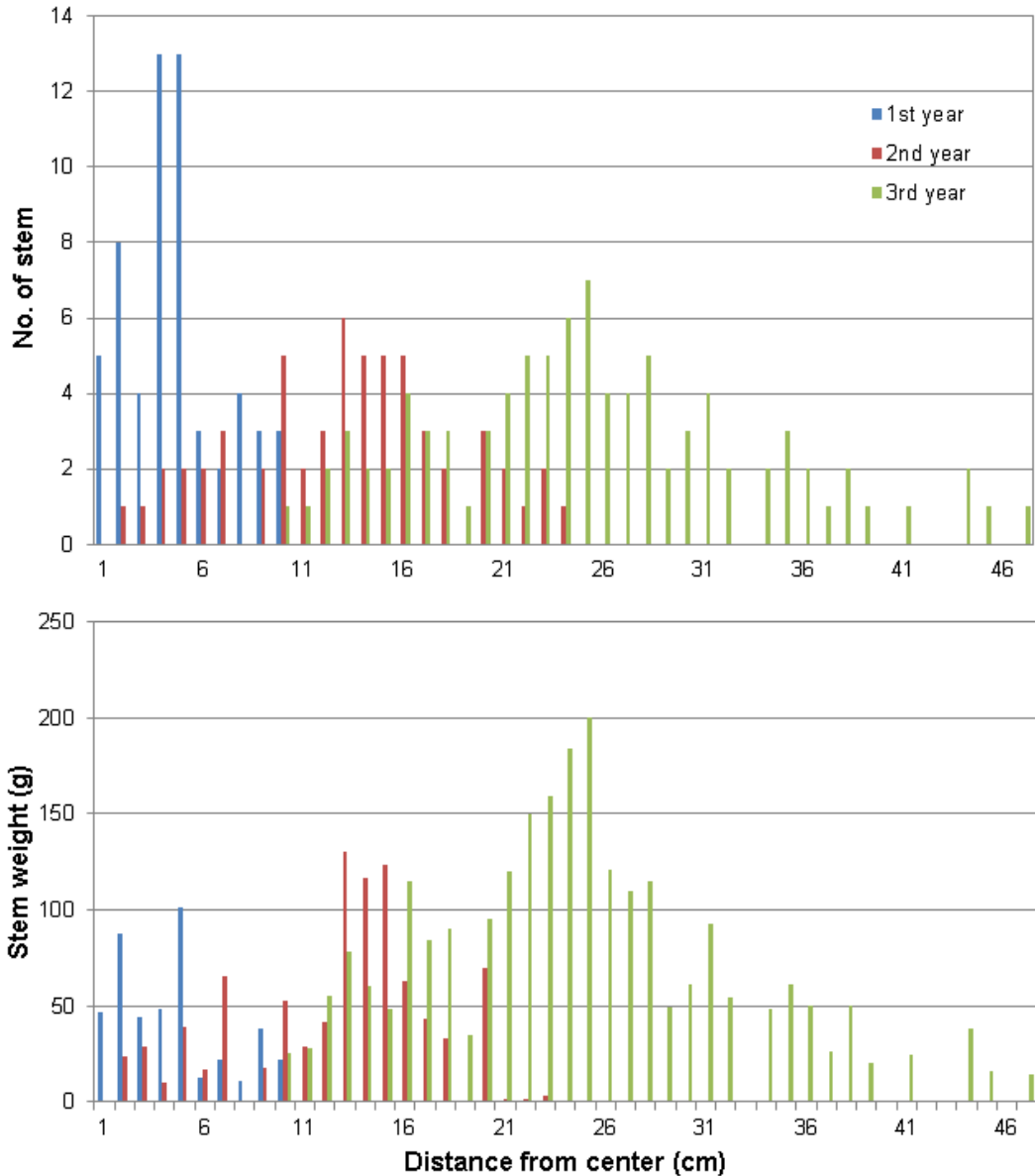


그림 19. 연차별 거리에 따른 줄기 개수(위) 및 건물중(아래)의 공간적 분포

(3). 환경 스트레스에 대한 억새의 적응성 평가 및 우량억새 선발

(가) 한해(drought stress)에 대한 억새의 생리적 반응 연구

- ① 관개량을 달리하여 억새의 생리 성장반응을 평가한 결과, 토양수분 13% 수준에서 현저한 생육 및 광합성 감소가 확인되었으며, 물억새가 가장 민감하였고 참억새와 *M. x giganteus*는 유사한 수준인 것으로 판단되었음.
- ② 한발기간을 달리하여 억새(*M. x giganteus*)의 생리 성장반응을 평가한 결과 토양수분 5%수준에서 20일 경과후 재관수시 생육이 회복함을 확인하였으며, 엽록소형광반응으로 평가한 결과 Fv/Fm, PI (performance index) 등이 민감한 지수임을 확인하여 향후 한발내성 억새 선발에 유용하게 활용할 수 있을 것으로 판단되었음.



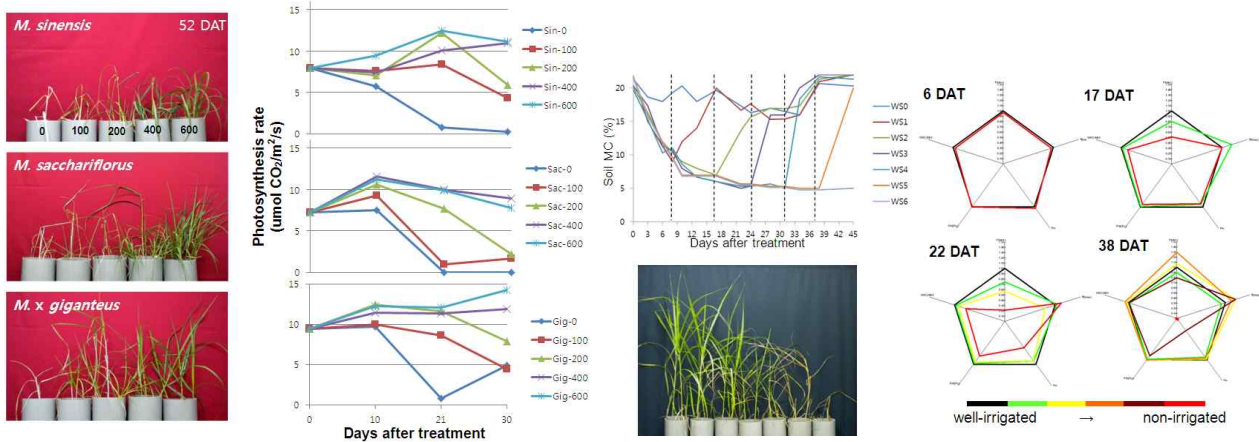


그림 20. 관개량에 따른 역세 반응 평가(左)와 한발기간에 따른 역세의 생리적 반응 평가(右)

(나) 내염성(salt stress tolerance) 역세 선발: 염에 대한 내성을 알아보기 위해 간이 검정

- ① 간이검정법으로 평가한 결과 염에 대한 GR<sub>50</sub> 값과 GR<sub>90</sub> 값을 구할 수 있었음.
- ② 추정한 GR<sub>50</sub> 값과 GR<sub>90</sub> 값을 사용하여 내염성을 가졌을 것이라고 생각되는 역세종들에 대한 염 스크리닝 검사를 실시함.
- ③ 평가한 결과, SNU-M-009, 012, 104, 131이 내염성이 있는 것으로 확인됨.

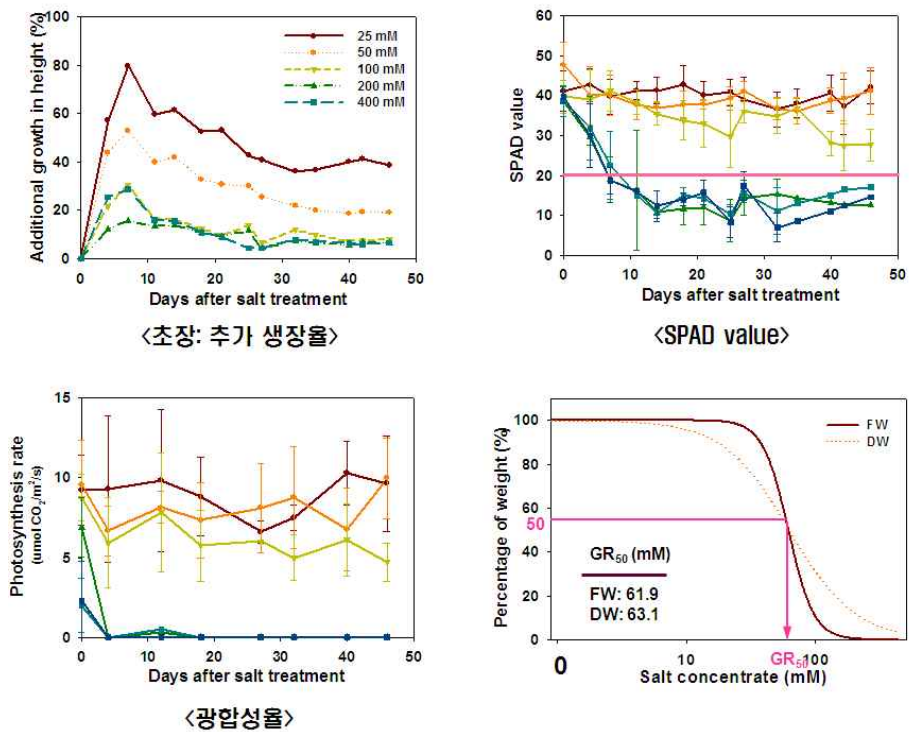


그림 21. 염 농도에 따른 물억새의 생리적 반응

표 4. 수집된 역세의 75 & 150 mM NaCl 농도에서 성장반응 및 내염성 수준

No.	Scientific name	Code	Collection site	% growth			Degree of tolerance
				0 mM	75 mM	150 mM	
1	<i>Miscanthus x giganteus</i>	SNU-M-57					
2	<i>Miscanthus sacchariflorus</i>	SNU-M-4	충남 천안	100	85	40	High
3	<i>Miscanthus sacchariflorus</i>	SNU-M-46	인천	100	75	30	Medium
4	<i>Miscanthus sacchariflorus</i>	SNU-M-90	강원 영월	100	60	50	Medium
5	<i>Miscanthus sacchariflorus</i>	SNU-M-91	강원 영월	100	60	50	Medium
6	<i>Miscanthus sacchariflorus</i>	SNU-M-108	경남 밀양	100	45	25	Low
7	<i>Miscanthus sacchariflorus</i>	SNU-M-188	경북 구미	100	75	45	Medium
8	<i>Miscanthus sacchariflorus</i>	SNU-M-200	전남 고흥	100	50	25	Low
9	<i>Miscanthus sinensis</i>	SNU-M-5	충남 조치원	100	70	40	Medium
10	<i>Miscanthus sinensis</i>	SNU-M-45	인천	100	95	65	High
11	<i>Miscanthus sinensis</i>	SNU-M-48	인천	100	60	50	Medium
12	<i>Miscanthus sinensis</i>	SNU-M-81	강원 중산	100	75	50	Medium
13	<i>Miscanthus sinensis</i>	SNU-M-89	강원 중산	100	75	35	Medium
14	<i>Miscanthus sinensis</i>	SNU-M-97	충북 단양	100	60	35	Medium
15	<i>Miscanthus sinensis</i>	SNU-M-107	경남 밀양	100	40	25	Low

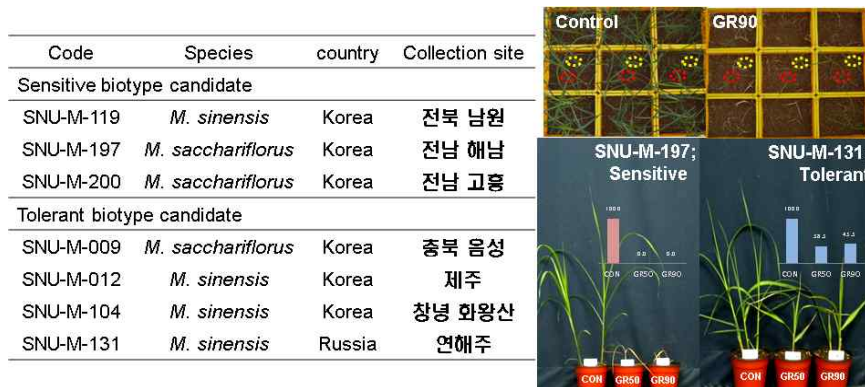


그림 22. 염에 대한 생리적 반응 및 내성을 가진 역세 선발

(다) 역세의 월동성 평가

- ① 지역별 수집 역세의 근경을 심도를 달리하여 월동처리하여 월동성 평가(그림 23.)
  - ㉞ 역세 중간 월동성은 물역새가 가장 높았음.
  - ㉟ 참역새의 경우 남부에서 수집한 역세의 월동성이 낮고, 경기 강원지역에서 수집한 역세의 월동성이 높아 수집지에 따른 월동성의 차이가 큼을 확인하였음.
  - ㊱ 근경의 토중위치가 낮을수록 월동성이 낮았음.
- ② 지역별 수집된 역세의 근경을 5cm 심도에 월동 처리하여 월동성 평가(그림 24.)
  - ㉞ *M. x giganteus*는 월동하지 못하였음.
  - ㉟ 참역새의 경우 남부에서 수집한 역세의 월동성이 낮고, 경기, 강원지역 및 러시아에서 수집한 역세의 발아세가 높은 것으로 확인되었음.

	Air temperature (°C)		Soil temperature (°C)			
			1 cm	5 cm	10 cm	15 cm
Mean	-1.76		-0.45	-0.78	-0.75	-0.33
Maximum	18.70		11.79	8.18	7.42	6.95
Minimum	-17.70		-8.24	-6.34	-5.72	-3.80

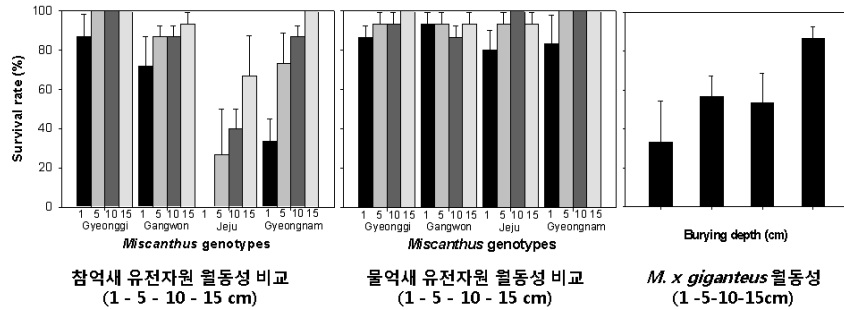


그림 23. 수집된 억새의 지역별, 심도별 월동성 평가

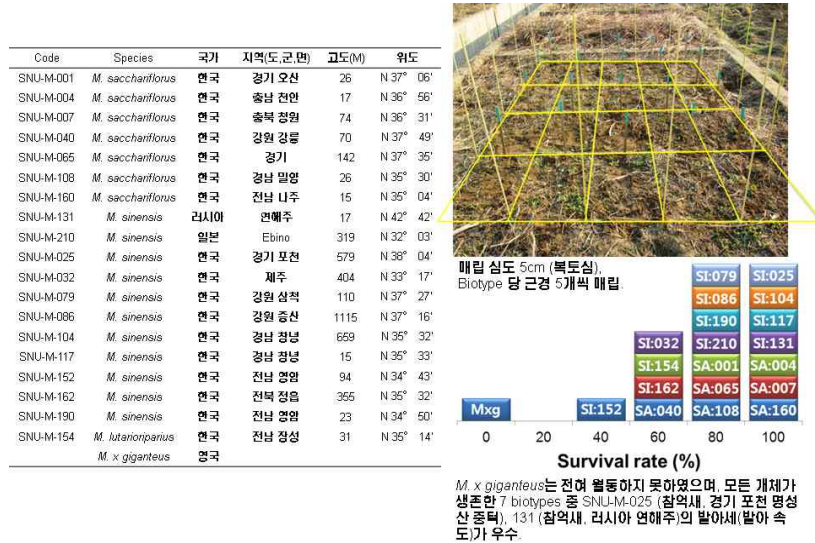


그림 24. 월동에 대한 생리적 반응 및 내성 억새 선발

바. 선발된 우량억새의 러시아 연해주 포장적응성 평가

- (1) 우량억새로 선발된 *M. x giganteus*를 포함한 15개의 유전자원을 러시아 연해주 시험 포장에 재식 후 월동성 평가 및 월동 후 생존 개체의 생육특성을 평가함.
- (2) 각 종에서 입모율, 초장 및 분얼수가 우수한 유전자원들이 있었음
- (3) 특히, 물억새인 SNU-M-108의 경우 연해주 포장에서도 다른 종보다 높은 입모율 및 생육을 보였으며, 2년차 평가에서도 추운 연해주 지방에서 월동하여 살아남았으며 이후 생육에 있어서도 우수한 형질을 보여줌.
- (4) 3년차 평가를 통해 SNU-M-108 말고 다른 종에서도 우수한 형질을 보이는 것이 있는지 살펴보려함.

Code	학명	국가	지역	입도율 (%)	초장 (cm)	엽기	분얼	
	<i>M. x giganteus</i>			60	165.3	12.0	12.7	
SNU-M-001	<i>M. sacchariflorus</i>	한국	경기 오산	20	112.0	13.0	11.0	
SNU-M-002	<i>M. sacchariflorus</i>	한국	경기 평택	40	133.0	12.5	2.0	
SNU-M-014	<i>M. sinensis</i>	한국	제주	40	87.0	7.0	2.5	
SNU-M-032	<i>M. sinensis</i>	한국	제주	20	116.0	9.0	4.0	
SNU-M-037	<i>M. sinensis</i>	한국	제주	80	148.7	11.3	4.7	
SNU-M-040	<i>M. sacchariflorus</i>	한국	강원 강릉	60	129.0	11.7	7.7	
SNU-M-041	<i>M. sacchariflorus</i>	한국	전남 순천	80	130.0	11.3	19.3	
SNU-M-046	<i>M. sacchariflorus</i>	한국	인천	40	133.0	12.5	7.0	
SNU-M-090	<i>M. sacchariflorus</i>	한국	강원 영월	20	170.0	12.0	8.0	
SNU-M-108	<i>M. sacchariflorus</i>	한국	경남 밀양	80	146.7	13.0	28.0	
SNU-M-116	<i>M. sinensis</i>	한국	경남 창원	60	117.7	11.7	9.7	
SNU-M-131	<i>M. sinensis</i>	러시아	연해주	20	54.0	8.0	10.0	
SNU-M-154	<i>M. lutarioriparius</i>	한국	전남 장성	40	154.0	11.0	9.0	
SNU-M-157	<i>M. sacchariflorus</i>	한국	충남 논산	40	135.5	13.5	15.0	



그림 25. 우량역새 러시아 연해주 포장의 우량역새 1년차 포장적응성 평가

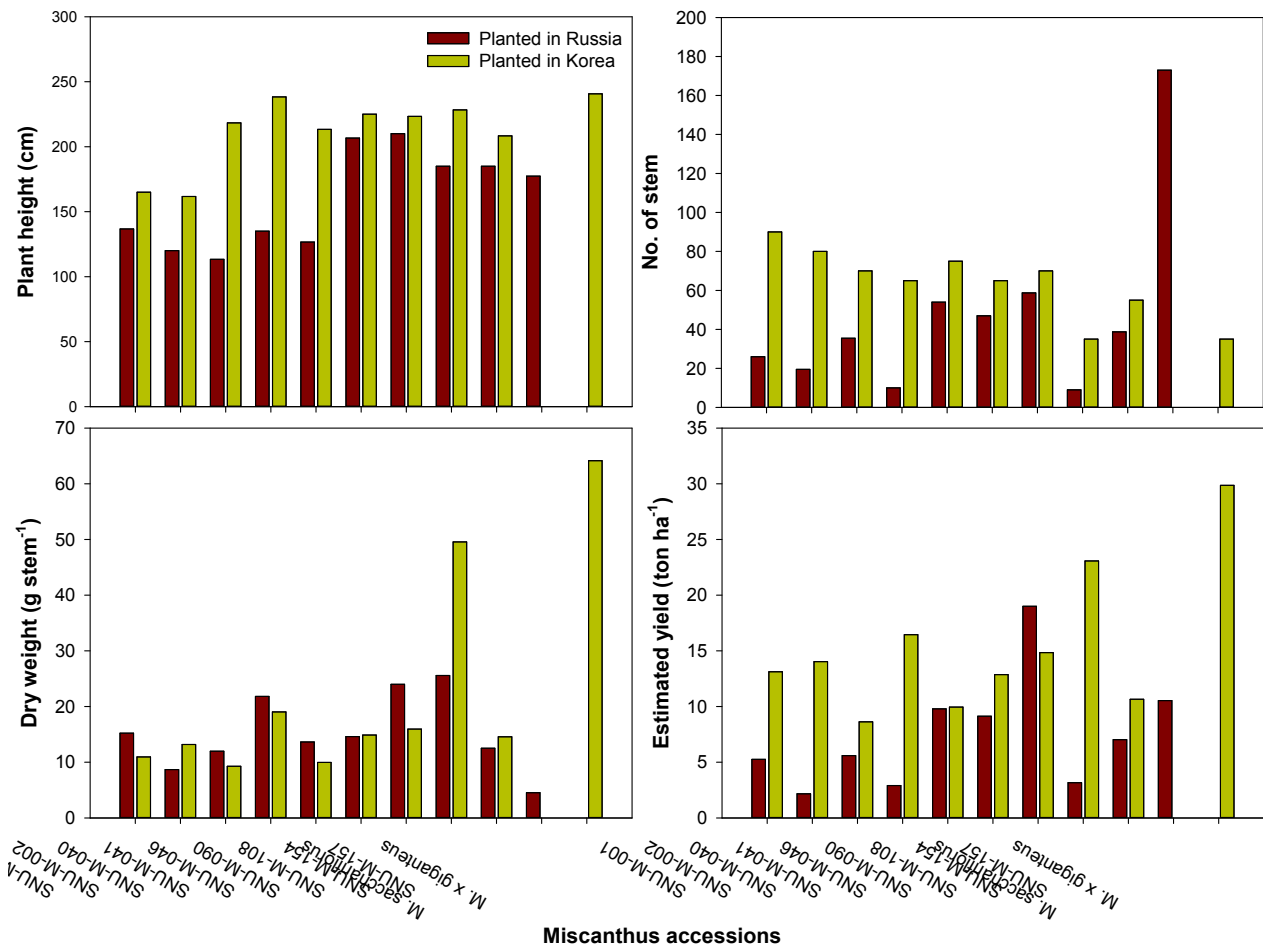


그림 26. 우량역새 러시아 연해주 포장의 우량역새 2년차 포장적응성 평가



사. 억새의 바이오매스 성분 분석

- (1) 억새 줄기의 성분분석을 통해 바이오에너지 작물로서의 효율성을 평가하였는데 바이오에너지작물로서 효율이 높기 위해서는 리그닌보다는 홀로셀룰로오스의 함량이 높아야 하는데 억새의 경우 홀로셀룰로오스의 함량이 70~80 %를 차지하는 것으로 확인되었고, 리그닌 함량은 반대로 20~30%를 차지하는 것으로 확인되었음.
- (2) 종별로 비교하였을때는 *M. x giganteus*가 물억새 참억새보다 리그닌과 홀로셀룰로오스 함량이 높은 것으로 확인되었고, 연차별로 비교해 본 결과 연차가 높아질수록 각 성분의 함량이 높아지는 것을 확인할 수 있었음.
- (3) 이는 억새는 초기재배에 의한 바이오매스 생산보다는 초기 이후의 재배에서 바이오매스 생산성도 높아지며 효율도 높아진다는 것을 확인할 수 있음.
- (4) 홀로셀룰로오스내의 당 분석을 결과 연차가 지나갈수록 단당류인 glucose 함량이 증가하고 다당류인 xylose 함량이 줄어드는 것을 확인할 수 있었음.
- (5) 이는 연차가 지나갈수록 당화과정에서 다당류보다 단당류가 많아지기 때문에 바이오에너지 생산에 있어 효율적으로 진행시킬 수 있음을 의미함.

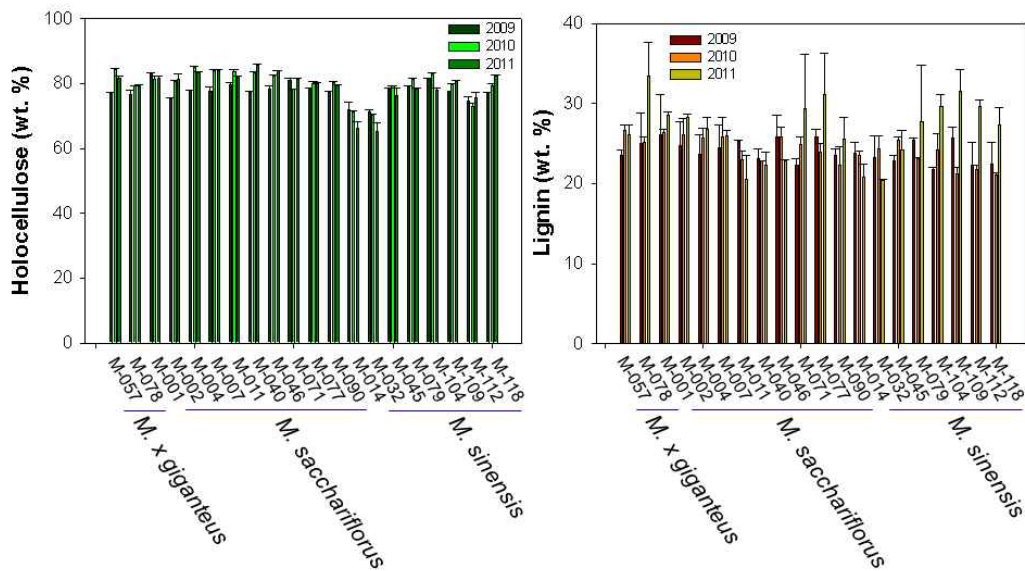


그림 27. 억새 줄기의 연차에 따른 lignocellulose 성분 비교



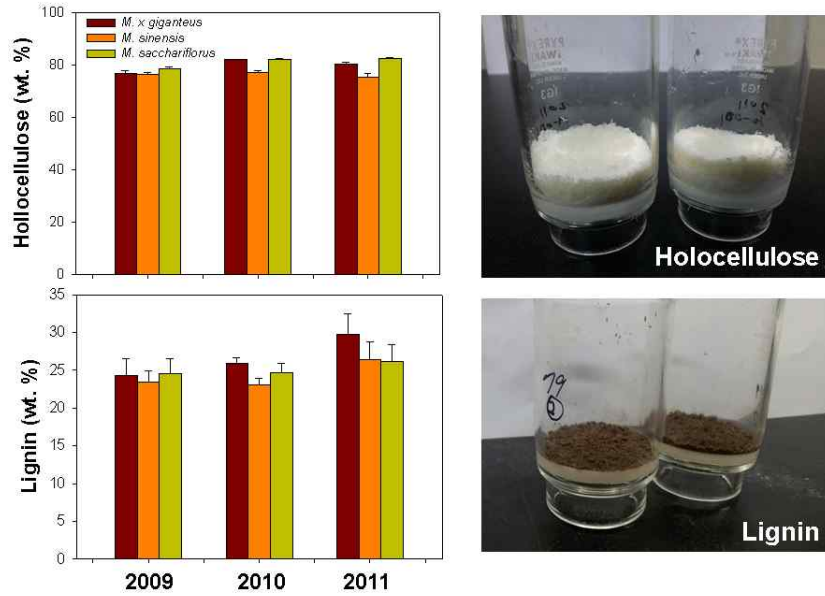


그림 28. 억새 줄기의 종에 따른 lignocellulose 성분 비교

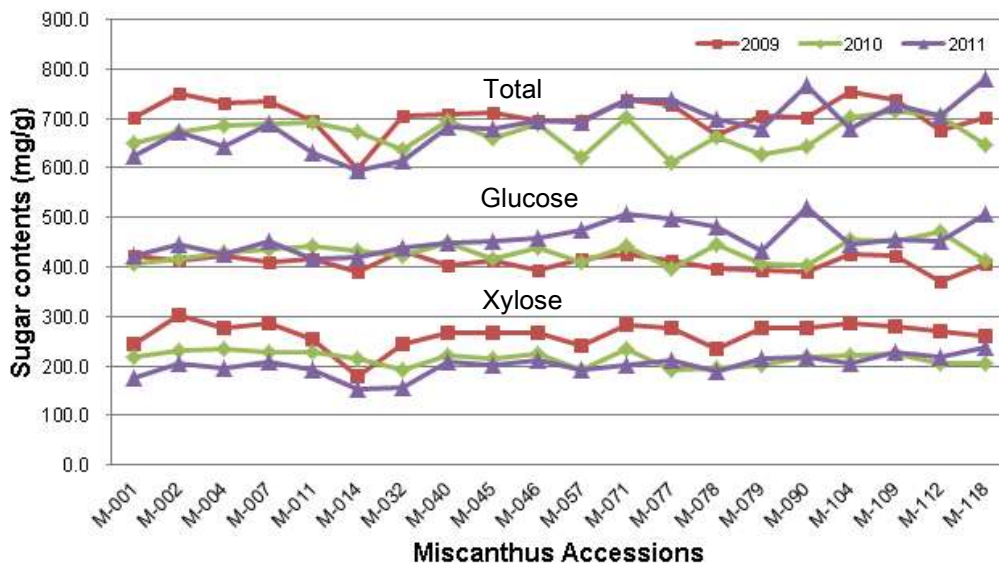


그림 29. 억새의 연차별에 따른 당당류와 다당류 함량 변화.

### 3. 유전자도입 형질전환 억새의 생육 및 바이오매스 생산특성 평가

#### 가. Arabidopsis 피토크롬B 도입 억새의 생육 및 바이오매스 생산특성

- (1) 전남대에서 개발한 형질전환체 4라인 10개체를 격리 포장에 재식하여 특성 평가함.
- (2) 같은 라인 내에서는 개체별로 생육정도의 차이는 없었으나, 라인별로는 생육차이가 큰 것을 확인할 수 있었음
- (3) 초장과 줄기개수의 경우 비형질전환 억새보다 형질전환 억새가 작은 것을 확인할 수

있었으며 이러한 경향은 2년차에서도 비슷하게 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, 2년차에는 비형질전환 억새의 줄기 개수는 크게 늘어난데 비해 형질전환 억새는 그보다 적게 늘어남을 확인할 수 있었음.

(4) 엽록소함량 또한 형질전환 억새가 비형질전환 억새보다 대체적으로 낮았음. 일부 형질전환 억새에서 비형질전환 억새보다 높은 것을 확인할 수 있었으며 다른 형질들과 마찬가지로 2년차에도 경향은 비슷한 것을 확인할 수 있었음.

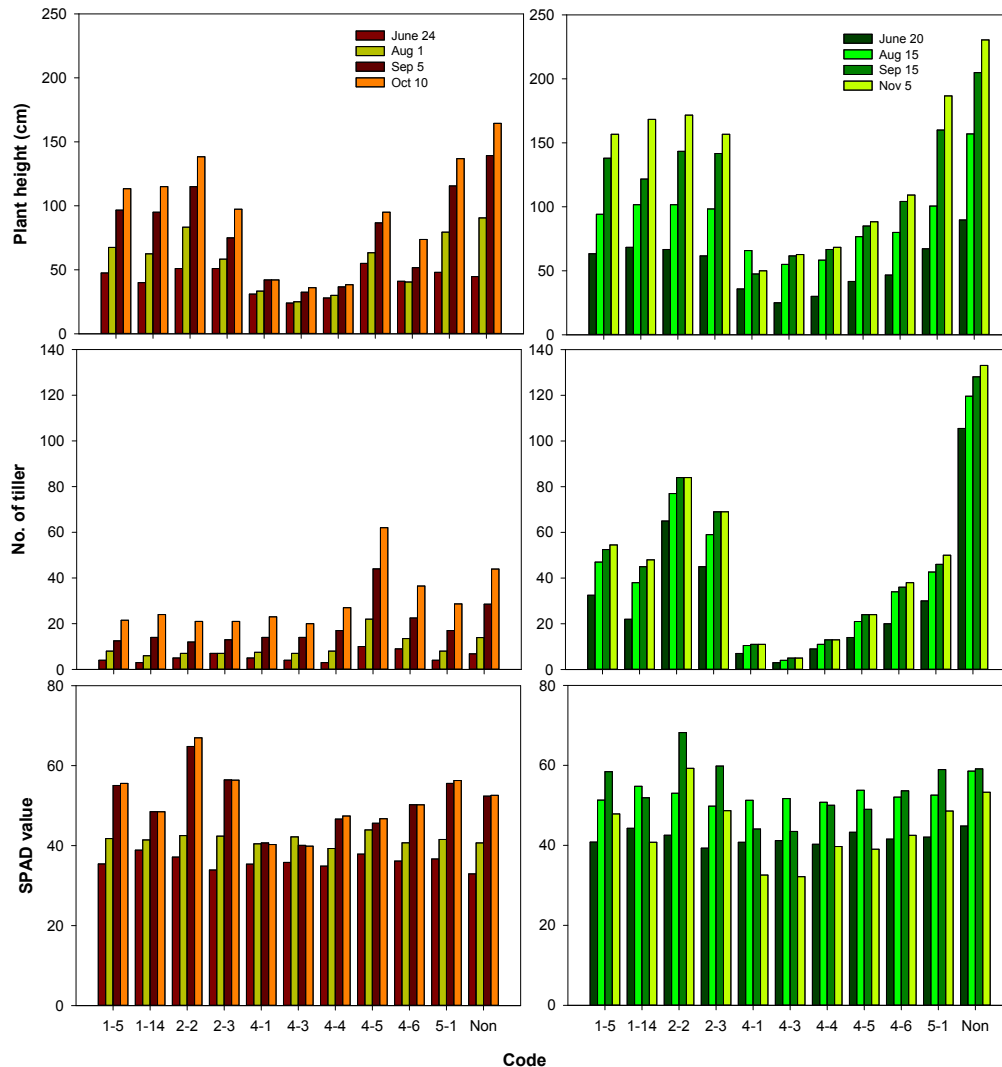


그림 30. Arabidopsis 피토크롬B 도입 형질전환 억새 1년차(左)와 2년차(右) 생육특성

#### 나. Brachypodium 피토크롬B 도입 억새의 생육특성 평가

- (1) 전남대에서 개발한 형질전환체 4라인 10개체를 격리 포장에 재식하여 특성 평가함.
- (2) Brachypodium 피토크롬B 도입 억새의 경우 Arabidopsis 피토크롬B 도입 억새보다 재식시기가 늦었음에도 불구하고 1년차 분얼수와 엽록소함량이 비형질전환 억새보다 높은 것을 확인할 수 있었음.
- (3) 2년차부터 모든 생육특성이 비형질전환 억새의 생육특성보다 월등히 우량한 것을 확인할 수 있었음. 또한 Arabidopsis 피토크롬B 도입 억새와는 달리 라인별, 개체별 생육

특성의 차이가 크지 않은 것을 확인할 수 있었음.

(4) 또한, 1년차에서 2년차가 되면서 생육지표들의 증가가 *Arabidopsis* 피토크롬B 도입 역새와는 달리 큰 증가를 보이는 것을 확인할 수 있었음.

(5) 자료에는 없지만 개화시기의 경우에는 *Arabidopsis* 피토크롬B 도입 역새는 개화시기가 비형질전환 역새보다 늦거나 개화를 하지 않는 것을 확인할 수 있었으나, *Brachypodium* 피토크롬B 도입 역새는 비형질전환 역새와 비슷한 시기에 개화를 하여 교배에 있어서도 유리한 것으로 확인되었음.

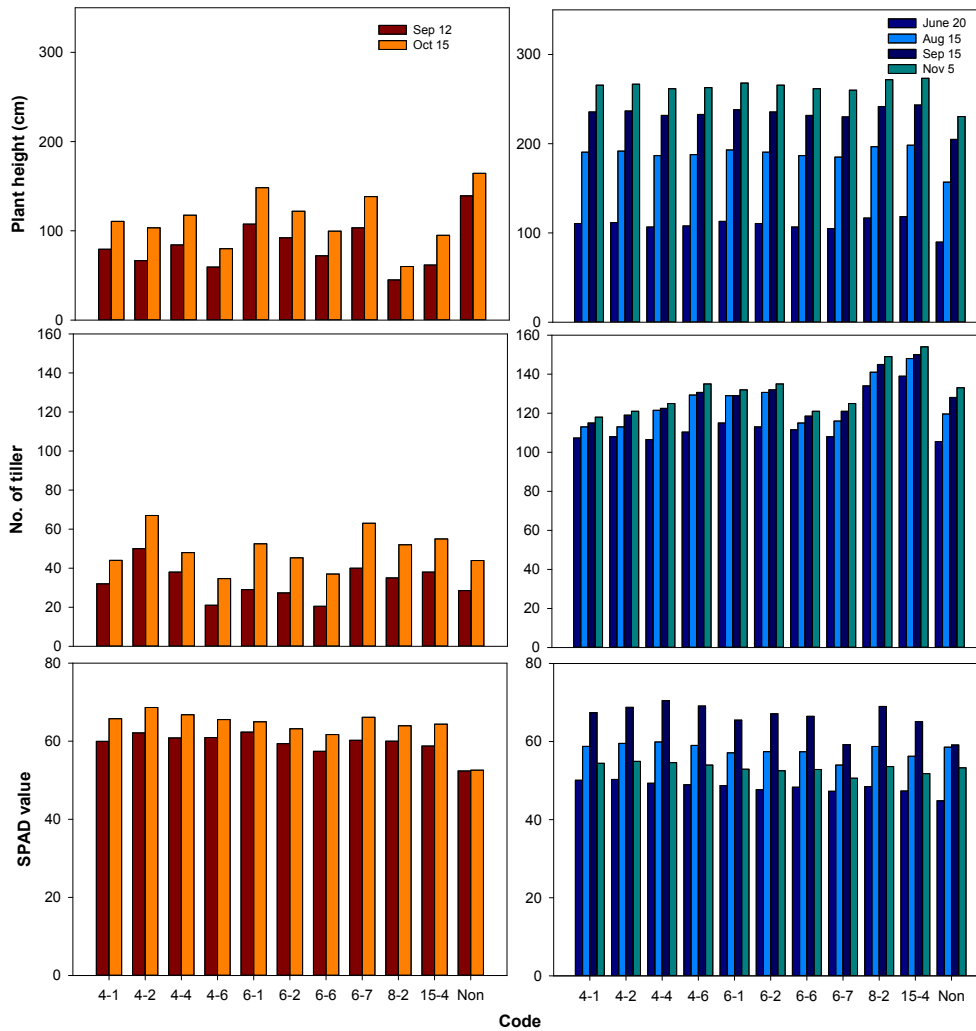


그림 31. *Brachypodium* 피토크롬B 도입 형질전환 역새의역새 1년차(左)와 2년차(右) 생육특성

#### 4. 역새의 표준재배법 연구

##### 가. 질소시비에 따른 역새의 반응 평가

- (1) 질소시비 수준을 0, 30, 60, 120, 240 kg/ha 로 달리하여 *M. x giganteus* 생육반응을 평가하였음.
- (2) 질소시비량 60 kg N/ha수준 이상에서는 엽록소 및 성장반응의 차이가 없어 이 수준

이 적정 시비수준임을 확인하였음.

- (3) 1 ~ 3년차까지 지속적인 시비 및 생육비교를 통해 시비량 및 연차에 따라 생육반응의 차이가 확연히 나타나는 것을 확인하였음.
- (4) 질소시비가 120 kg/ha 의 수준이 넘어서면 3년차 이후 포장에서 역세의 도복현상이 심한 것을 확인할 수 있었음.

표 5. 질소시비 수준에 따른 *M. x giganteus*의 생육특성

Nitrogen level (kg N/ha)	Plant height (cm)	No. of tillers (no. plant <sup>-1</sup> )	Leaf stage	SPAD value	Fm/Fv
0	104.8	3.83	10.17	37.21	0.766
30	101.5	3.42	9.92	39.25	0.768
60	125.4	4.75	10.92	40.39	0.774
120	112.7	4.75	10.75	41.08	0.772
240	122.4	4.75	11.08	42.73	0.778
LSD	6.56**	ns	5.08**	12.03**	ns

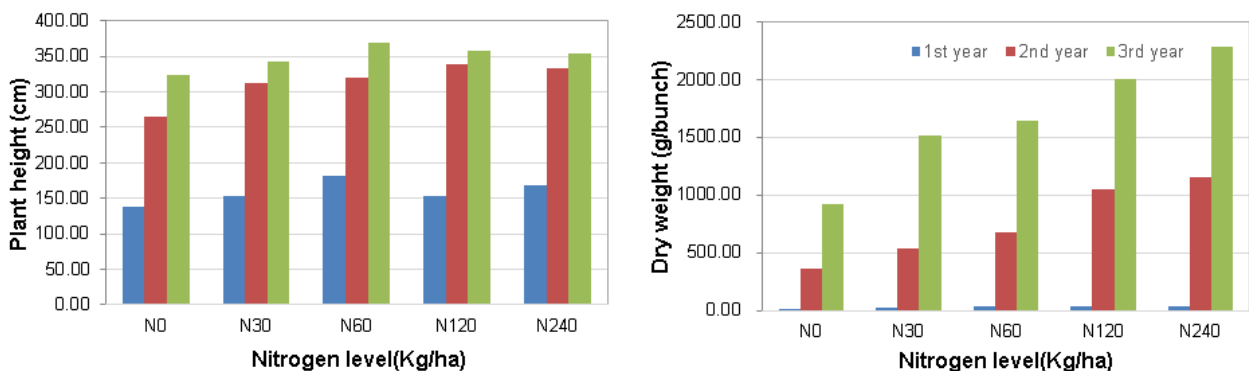


그림 32. 질소시비 수준에 따른 연차별 *M. x giganteus*의 생육특성비교

나. 재식시기 및 심도에 따른 역세의 생육 평가

- (1) 역세의 재식시기 및 재식심도를 달리하여 성장반응을 평가한 결과 재식시기가 늦어질수록, 재식심도가 깊어질수록 성장속도 및 성장량이 낮아지는 것을 확인할 수 있었음.
- (2) 이는 연차가 지나더라도 같은 경향으로 성장량이 지속되는 것을 확인할 수 있었음.
- (3) 3년차까지의 생육 비교를 통해 재식시기의 경우 6월 이후에 재식할 경우 생육에 큰 영향을 끼치는 것으로 나타났으나, 늦은시기에 재식을 하여도 이후에 생존한다면 3년차부터는 바이오매스 생산량은 비슷해짐을 확인할 수 있었음.
- (4) 재식심도의 경우에는 5 ~ 10 cm 정도가 적정 재식심도임을 알 수 있었음.

표 6. *M. x giganteus*의 재식시기 및 심도에 따른 초장(左) 및 분얼수(右) (1년차)

Planting date	Planting depth (cm)			LSD <sub>0.05</sub>	Planting date	Planting depth (cm)			LSD <sub>0.05</sub>
	5	10	20			5	10	20	
June 1	194.8	194.6	195.2	ns	June 1	7.2	6.4	5.0	4.13*
June 16	206.4	202.8	210.8	ns	June 16	9.4	6.2	5.6	5.31*
July 5	181.2	143.0	154.8	ns	July 5	5.0	3.6	3.0	ns
July 18	142.0	133.0	117.4	ns	July 18	4.6	3.0	2.2	ns
August 4	111.6	58.6	68.2	11.16**	August 4	2	1.2	1.6	ns
LSD	12.17**	27.60**	26.62**		LSD	16.58**	13.59**	6.47**	

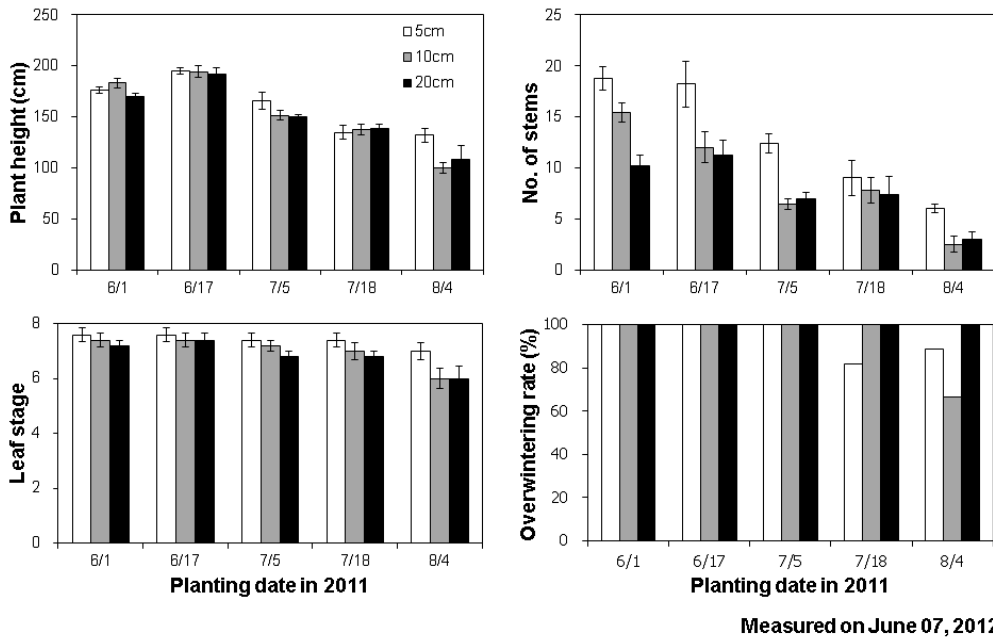


그림 33. *M. x giganteus*의 재식시기 및 심도에 따른 1년생의 생육특성(2년차)

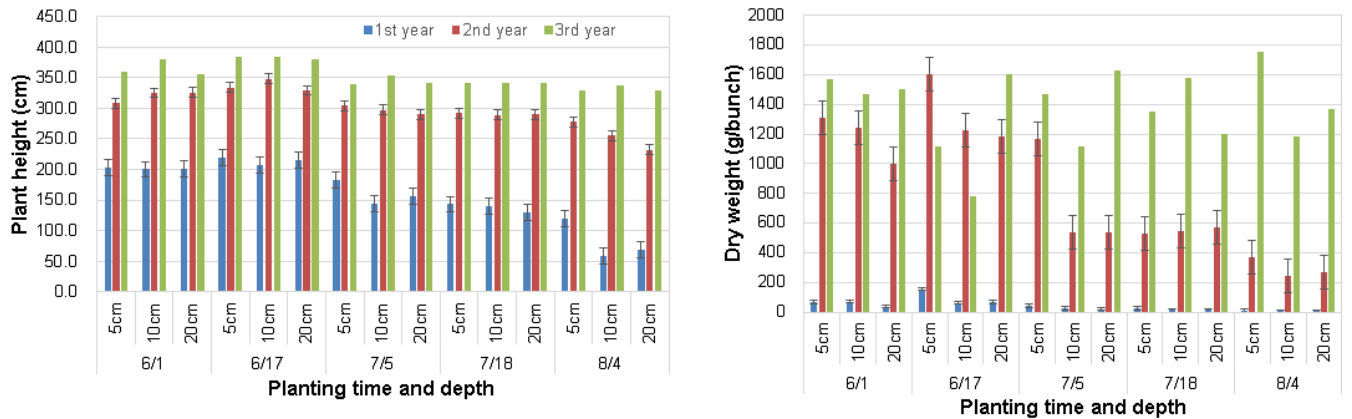


그림 34. *M. x giganteus*의 재식시기 및 심도에 따른 연차별 생육특성(1-3년차)

다. 1년생의 소규모(pilot) 포장평가

- (1) *M. x giganteus*의 소규모 포장을 매년 조성하여 연차에 따른 생육조사를 실시함.
- (2) 현재 4년차까지 조성된 소규모 포장 평가를 살펴보면 연차가 늘어날수록 생육지표 및 건물 생산량이 증가하여 15톤/ha에 달하였으며, 아직도 최대 수량에 도달하지 않아 계속 포장을 유지하여 어느 수준까지 생육지표나 수확량이 증대되는지 지속적인 관리



예정임.

(3) 우량역새로 선발된 6개의 역새계통의 소규모 포장 평가를 위해 여주 역새 유전자원 포장에 pilot 조성하여 2년차 평가완료 하였음.

(4) 수원과 여주 포장의 결과를 비교한 결과 수원에 비해 여주포장의 2년차 바이오매스 생산성이 2배 이상 높아, 4년차에 도달할 경우 수원의 2배인 근 30톤/ha에 달하는 바이오매스 생산성을 확보할 것으로 기대되고 있음. 이러한 차이는 토성의 차이에 기인한 것으로 판단되는데 여주의 포장이 사양토인 반면, 수원 토양이 식양토로서 역새의 번식 및 생육에 있어 사양토가 적합한 것으로 판단된다.

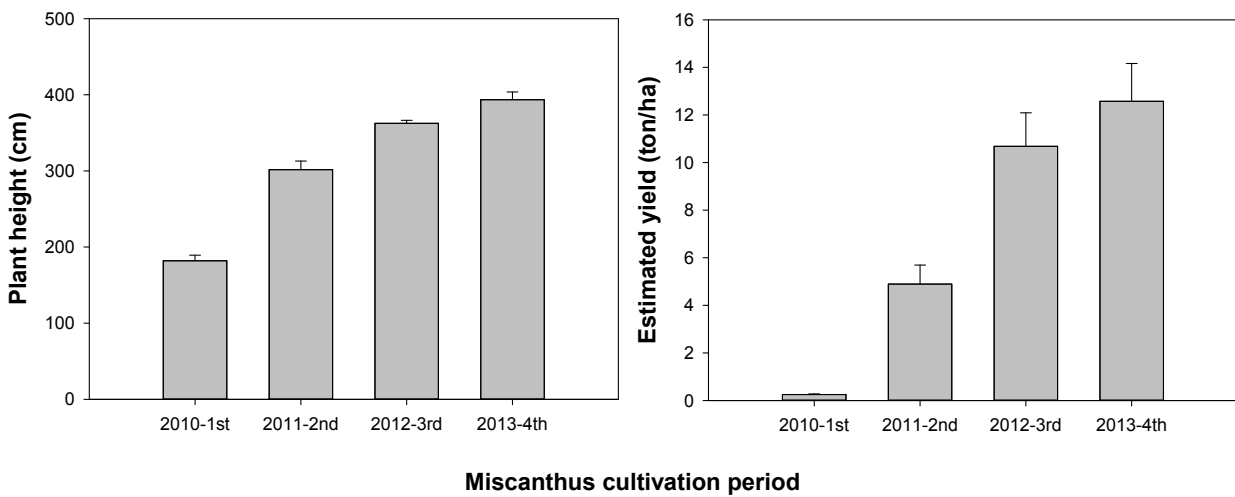


그림 35. *M. × giganteus* pilot 포장 평가에 따른 생육 및 바이오매스 생산성(수원)

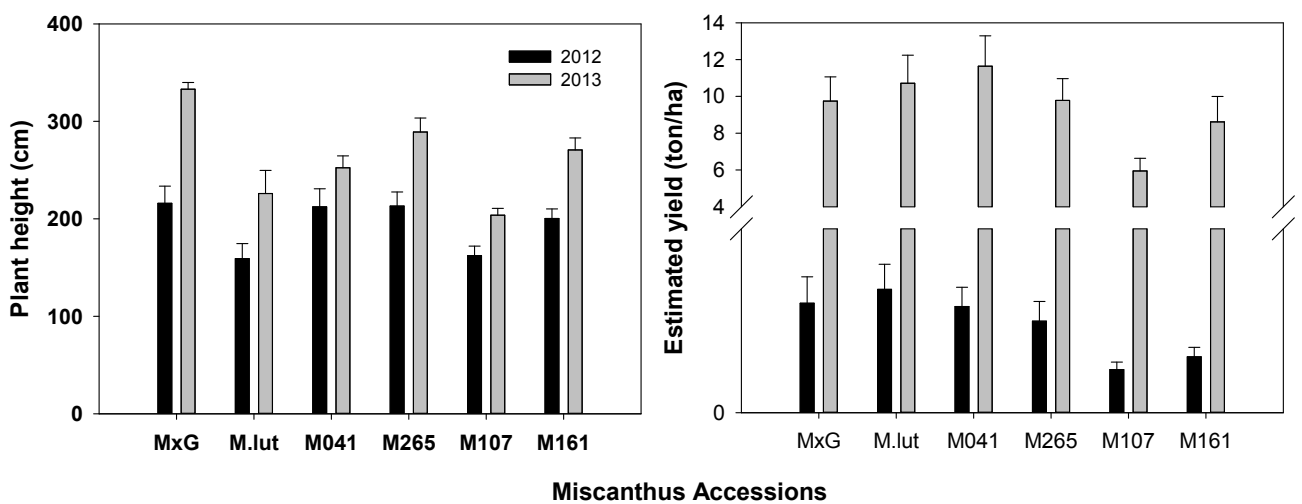
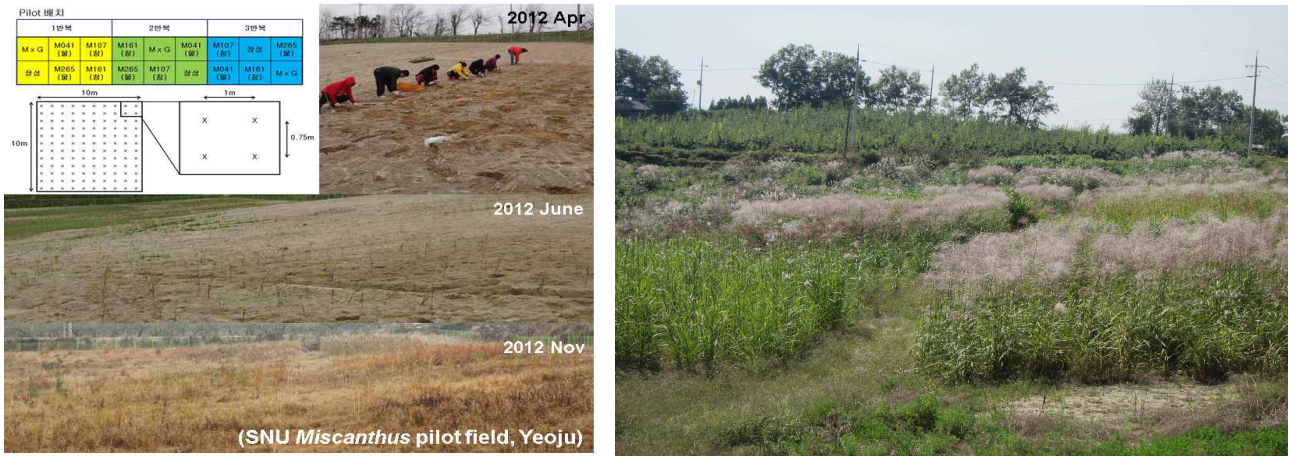


그림 36. 선발된 우량역세의 pilot 포장 평가 여주포장 전경(위), 역세 생육 및 바이오매스 생산성(아래)

라. 역세 재배에 적합한 제초제 선발 평가

- (1) 역세 재배시 초기 잡초 문제를 해결하기 위해 토양 및 경엽 처리 제초제에 대한 스크리닝을 통하여 적합한 제초제 선발 평가를 실시함.
- (2) 토양처리용 제초제 선발: 토양처리용 제초제 7종을 평가한 결과alachlor, s-metolachlor, dithiopyr, pendimethalin이 안전하였으나, PROTOX저해제인 oxadiargyl, oxadiazon, oxyfluorfen은 심각한 약해를 유발하여 안전하지 않음을 확인하였음.
- (3) 경엽처리용 제초제 선발: 경엽처리용 제초제 10종을 평가한 결과 auxin계 제초제인 2,4-D, Dicamba 등과 PSII 저해제인 bentazon, ALS저해제인 thifensulfuron 등 6종의 제초제가 경엽처리용으로 안전하게 사용할 수 있는 제초제로 선발하였음.
- (4) 토양처리용 제초제 살포 후 경엽처리용 제초제를 뿌리는 체계처리에 대한 실험도 진행하였음. 토양처리제나 경엽처리제를 단독으로 살포할 때 보다 잡초방제가 매우 효과적임을 확인하였음(Data not shown).

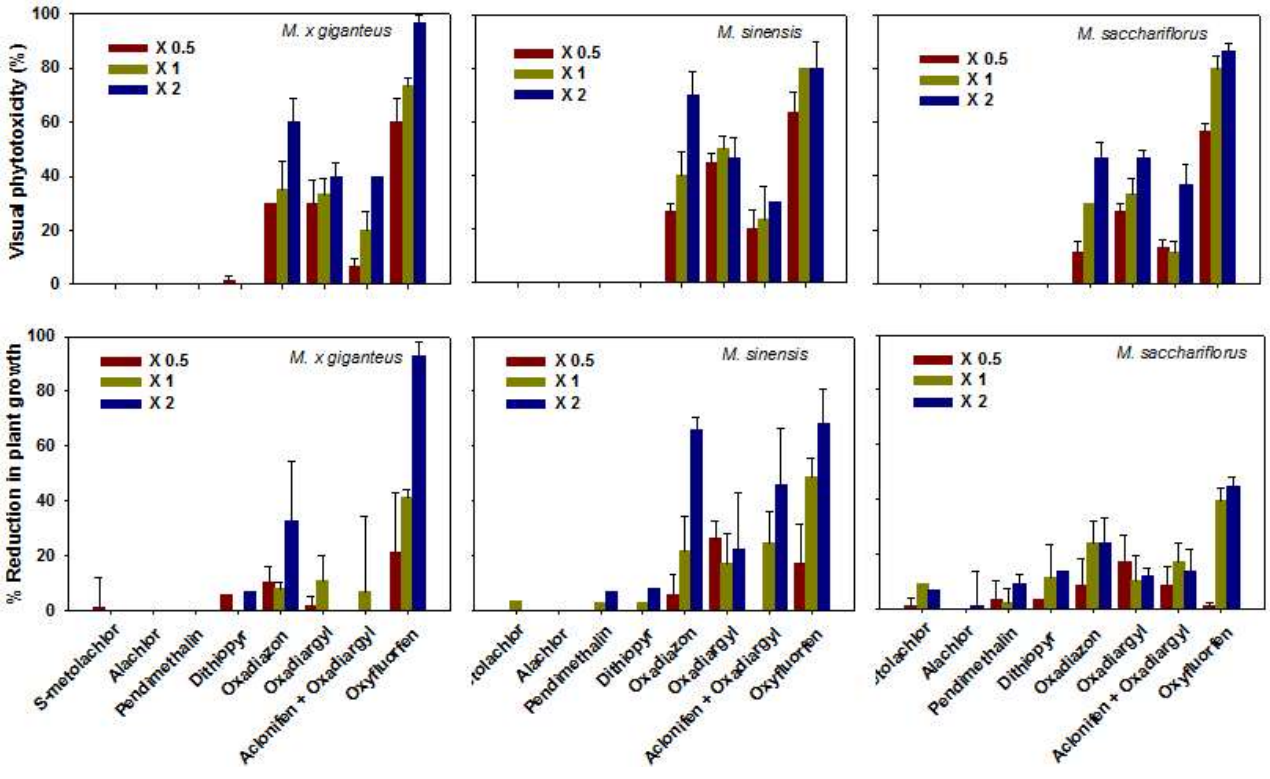


그림 37. 억새에 대한 토양처리 제초제의 약해 및 생육 달관 평가(처리 후 30일)

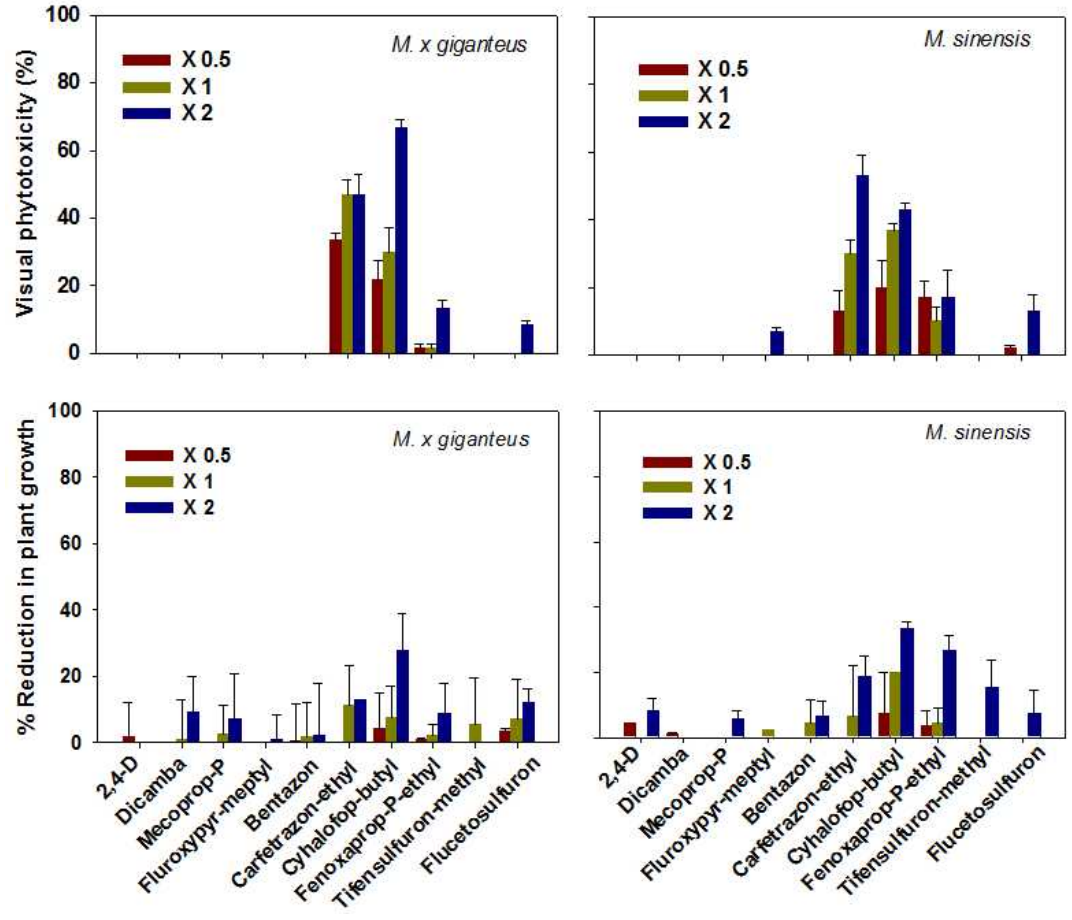


그림 38. 억새에 대한 경엽처리 제초제의 약해 및 생육 달관 평가(처리 후 30일)

마. 토양수분에 따른 소규모 포장에서의 억새의 생육특성 및 수량 반응

(1) 배수가 좋지않은 토양에서는 억새의 생육 지표가 배수가 원활한 곳에 비해 모든 부분에서 저하되는 것을 확인할 수 있었음.

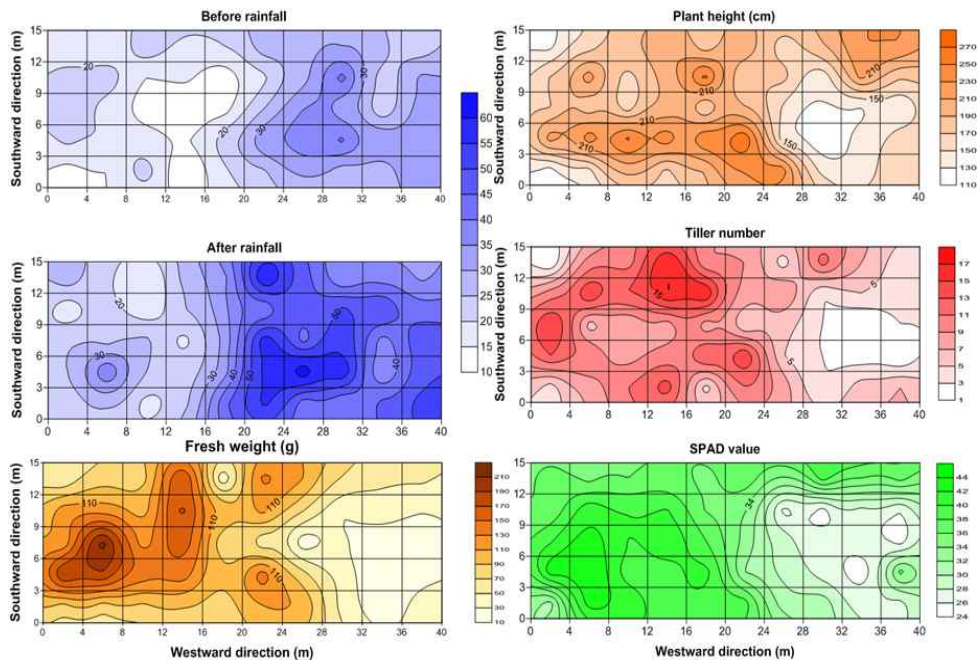


그림 39. 토양수분에 따른 억새(*M. × giganteus*)의 생육 및 수량 반응

바. 바이오매스 생산을 위한 억새의 최적 수확시기 평가

- (1) 억새의 바이오매스 생산을 최적화 할 수 있는 수확시기 결정을 위해 수확시기에 따른 수분함량 조사를 실시함
- (2) 12월 이후 매월 억새를 수확하여 수분함량의 변화와 건물중의 변화를 익년 5월까지 평가한 결과 12월은 수분하량이 30%이상으로 수확에 부적합하였으나 1월부터는 수분함량이 15% 이하로 감소하여 적합한 시기로 판단되었음.
- (3) 그러나 수확이 3월 이후로 늦어질 경우 건물중의 감소가 현저하여, 억새의 수확적기는 1월-3월로 판단되었음.

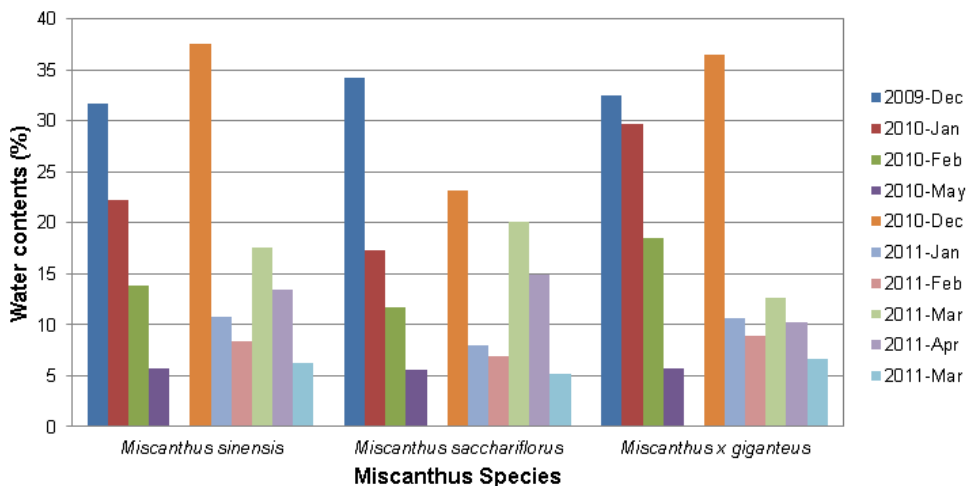


그림 40. 억새의 수확 시기 별 수분함량 변화

# 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

## 제 1절 연도별 연구개발 목표 및 달성도

[1세부: 식물 줄기 형성층 활성 조절을 통한 바이오매스 증진기술 개발]

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1차년도 (2009)	FOX line 표현형 선발(1단계)	줄기단면에서 cambium 및 xylem 발달 변화분석	100
	CKII, AHKs, ARRs 형질전환체 분석 및 CKIIox transcriptome 분석	확보된 유전자들에 대한 형질전환체를 제작하고 줄기발달 표현형을 분석	100
	식물관다발 조직 순수분리 및 transcriptome 분석(1단계)	식물 관다발조직 순수분리 장비도입 및 기술 확보	100
2차년도 (2010)	FOX line 표현형 선발 및 cDNA 동정, 기능분석	cDNA 동정 및 기능분석, 형질전환체 표현형 분석	100
	CKII, AHKs, ARRs 형질전환체 표현형 및 기능 분석	확보된 형질전환체에서 줄기발달 표현형 분석	100
	식물관다발 조직 순수분리 및 조직 특이적 발현 유전자군 선별 및 유용유전자 선발	순수분리된 조직을 이용하여 transcriptome 분석을 수행하고 이를 바탕으로 유전자군을 선별	100
3차년도 (2011)	선별된 유전자의 돌연변이체 확보 및 유전자들의 기능 분석	FOX line에서 동정된 유전자 돌연변이체 확보 및 각 유전자들의 분리	100
	담배유전자의 VIGS 수행	VIGS를 통한 관다발 및 형성층 발달 조절 유전자 동정	100
	ICA2, PHD의 기능성분석	ica2변이체의 생리적 분석 PHD의 체관발달 기능 분석	100
4차년도 (2012)	ica2 표현형 및 조절 기작 분석	ica2의 유용 형질 표현형에 대한 정량적 분석 및 전체 전사체 변화를 이용한 조절 기작 분석	100
	PHD 유전자의 분자생물학적 기능 분석	애기장대 PHD RNAi microarray분석 RNA sequencing분석을 통한 PHD 대상 유전자 분석 Yeast two hybrid를 통한 PHD의 상호 작용 단백질 동정	100
	포플러 형질전환체들의 분자 생물학적, 생화학적 분석	RNAi line 구축 및 변이체에 대한 생리적 분석	100
5차년도 (2013)	ica2 기능 분석 및 조절인자 규명	- 다양한 시기의 식물체 내에 존재하는 auxin, cytokinin, abscisic acid, gibberellin 등의 호르몬 양 측정 - 전사체 분석을 통해 동정된 GA 혹은 광합성 관련 유전자들의 발현 패턴 분석 - 광합성 효율과 바이오매스 증대와의 상관성 분석 - 관다발 조직 특이적인 promoter를 이용하여 ICA2의 기능 위치 분석 - ICA2 과발현체와 ica2 및 homolog RNAi 형질 전환 식물체 제작 및 표현형 분석	100
	PHD 유전자의 분자생물학적 기능 분석	- PHD의 조절 기작 규명과 아울러 관련 네트워크 분석 - PHD 상호작용 단백질들의 공통된 기작 및	100



		주요 조절 인자군들에 대한 기능성 분석 실시 - <i>PHD</i> 관련 변이체의 systems biology 분석을 통한 체관 발달 조절에 있어 핵심 조절 분자 네트워크 규명 - <i>PHD</i> 의 RNA alternative splicing에 관련된 연구 수행 - RNA에 결합하는 <i>PHD</i> 의 역할 규명을 위한 RNA EMSA 수행 - CLIP sequencing을 통한 <i>PHD</i> 단백질의 target RNA 탐색 분석 - <i>PHD</i> -NLS 또는 <i>PHD</i> -NES construct를 이용한 핵과 세포질 각각에서의 <i>PHD</i> 역할 규명 - Rice에서의 <i>PHD</i> homologue 연구 수행	
--	--	--	--

[1협동: 바이오매스 증대를 위한 포플러 형질전환체 개발]

구분	연도	연구개발 목표	주요수행 내용	달성도
1차년도	2009	○ 유채와 포플러 형질전환체 개발 조건 확립	- 형질전환 효율을 높이기 위한 조건 확립	100
		○ 식물의 물질대사를 조절하는 유전자를 이용한 형질전환체 유채 개발	- 유전자 발현을 조절하는 유전자, Myb2 벡터를 이용한 유채의 형질전환	100
		○ 식물의 생장을 조절하는 유전자를 이용한 형질전환 포플러 개발	- 형성증 분화 촉진 및 세포분열을 조절하는 유전자, CKI1 벡터를 이용한 포플러의 형질전환	100
		○ <i>In vivo</i> 확인 형질전환체 각각 20라인 이상 확보	- PCR 확인 5개체 - 기관분화 30개체 확보 및 확인 예정 - Shoot 배양 38개체 확보	100
2차년도	2010	○ 형질전환체의 검정 및 목표형질 (바이오매스 증가) 발현 특성 조사	- 형질전환체를 이용한 초기 생육 특성 조사 - 형질전환 개체의 분자생물학적 특성 분석	100
		○ 식물의 물질대사를 조절하는 유전자를 이용한 형질전환체 유채 개발	- 2차년도에 explant를 계통으로 전환하여 유채의 형질전환체 개발	100
		○ 식물의 생장을 조절하는 유전자를 이용한 형질전환 포플러 개발	- 형성증 분화 촉진 및 세포분열을 조절하는 유전자, CKI1 벡터를 이용한 포플러의 형질전환	100
		○ 지속적인 형질전환체 개발로 30라인 이상 추가 확보	- 온실 순화 90개체 개발 - 기관분화 91개체 확보	120
3차년도	2011	○ 형질전환체의 검정 및 목표형질 (바이오매스 증가) 발현 특성 조사	- 형질전환체를 이용한 초기 생육 특성 조사 - 형질전환 개체의 분자생물학적 특성 분석	100
		○ 식물의 물질대사를 조절하는 유전자를 이용한 형질전환체 유채 개발	- 3차년도에 한라유채를 계통으로 전환하여 유채의 형질전환체 개발	100
		○ 식물의 생장을 조절하는 유전자	- 형성증 분화 촉진 및 세포분열을	100

		를 이용한 형질전환 포플러 개발	조절하는 유전자, 501,505,507 백터를 이용한 포플러의 형질전환	
		○ 지속적인 형질전환체 개발로 30라인 이상 추가 확보	- 온실 순화 93개체 개발 - 기관분화 90개체 확보	120
4 차 년 도	2012	○ 형질전환체 세대진전 및 생육특성 조사	- 1단계에서 개발된 CKII 유전자를 이용한 포플러 형질전환체의 분석(분자생물학적, 목표형질 발현 특성 및 공정 효율성을 위한 성분)을 통한 이벤트를 선별하기 위한 조사 - 확보된 형질전환체를 하우스 및 노지재배 포장에서 지속적인 세대진전 - 목표형질(바이오매스 증가)의 안정적인 발현을 조사	100
		○ 목표형질 고정 후보라인 선발	- 형질전환체의 insertion site 분석 - 바이오매스 공정관련 성분 증대 확인을 위한 성분분석(리그닌 및 셀룰로오스 비율 및 함량 분석) - 형질전환체의 최종목표 형질인 바이오매스가 증가된 3개의 후보라인을 선발하였음	100
5 차 년 도	2013	○ 형질전환체 생육특성 조사 및 바이오매스 공정의 효율성 분석	- 다년생 목본류의 형질전환체의 해부학적 특성 분석 및 규명 - Insertion site 확인과 주변 염기서열 특이 마커를 이용한 도입 유전자의 안정적 발현 조사 - 바이오매스 공정 효율 성분 분석	100
		○ 최종 이벤트 선정 및 선정된 이벤트 개체의 증식	- 선발 후보 개체의 생육특성 조사 - 형질전환체의 수령에 따른 도입 유전자의 발현 특성 조사 - 목표형질이 고정된 이벤트 선정 - 삼목 및 기내배양을 통한 이벤트의 클론 증식	100

[2협동: Brachypodium 및 Miscanthus를 이용한 바이오매스 증진 식물 개발 연구

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2009)	Brachypodium 및 Miscanthus를 이용한 바이오매스 증진 식물 개발 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Brachypodium을 대상으로 Phase change 및 개화 시기 조절 유전자 기능 검증 연구.</li> <li>• Brachypodium 형질전환 시스템 구축.</li> </ul>	100	miR156, TOE1, GI 유전자의 분리 및 phase change와 flowering time 조절 기능 검증 및 Brachypodium 형질전환 기술 정립
2차 년도 (2010)	Brachypodium 및 Miscanthus를 이용한 바이오매스 증진 식물 개발	Artificial Zinc Finger Nuclease 기법을 통한 특정 유전자가 knockout된 식물체 개발 기법 정립	100	IGI유전자를 대상으로 한 ZFN 기법을 정립하고, GI 유전자가 knockout된 mutant 확보 및 형질 분석

				완료 예정
	연구	miR156 과량발현 형질전환체 형질분석 및 바이오매스 증진 검증 연구	100	miR156 형질전환 식물의 개화시기, 영양생장, 노화 발달을 분석하고, biomass를 정량화함으로써 응용 타당성을 검증하고자 함.
3차년도 (2011)	2협동: Brachypodium 및 Miscanthus를 이용한 바이오매스 증진 식물 개발 연구	Brachypodium의 개화 시기 및 phase change 조절 miR156 유전자의 형질전환 및 바이오매스 증진 분석 연구.	100	miR156 형질 전환체를 확보하고, 이 식물에서의 개화 시기 조절 유전자 발현 분석 및 정량적 바이오매스 증진 분석.
		artificial siPEP 기법을 이용한 개화 시기 조절 SOC1 및 AG 전사인자 활성 억제를 통한 바이오매스 증진 연구. 애기장대 이용 개화시기 및 phase change 조작을 통한 바이오매스 증진 연구	100	SOC와 AG 전사인자를 대상으로 artificial siPEP 디자인 및 형질 전환체 확보.
4차년도 (2012)	Brachypodium 및 Miscanthus를 이용한 바이오매스 증진 식물 개발 연구	애기장대 이용 개화시기 및 phase change 조작을 통한 바이오매스 증진 연구	100	CO의 alternative splicing, HOS1-CCA1 상호작용, FCA의 저온저항성, siPEP에 의한 빛반응성 조작 등을 통한 식물 개화시기 및 발달 단계 조작 연구.
		Brachypodium의 개화시기 및 phase transition 조절 유전자 분리 및 개화시기 조절 연구	100	저온저항성 유전자 이용 형질전환 식물 연구, siPEP 이용 개화시기 조절 연구, activation tagging을 통한 돌연변이체 합성 연구 등을 수행함.
5차년도 (2013)	Brachypodium 및 Miscanthus를 이용한 바이오매스 증진 식물 개발 연구	CO 전사인자 유전자 alternative splicing 연구	100	CO splice variant 단백질간의 상호작용에 의한 일주기 인지 메카니즘을 연구함
		FCA에 의해 조절되어지는 고온 저항성 연구	100	FCA HKO 및 OX 식물의 저온 및 고온에 대한 반응성 연구
		기능성 유전자를 이용한 <i>Brachypodium</i> 형질전환체 연구	100	저온 및 개화시기 조절 유전자를 이용한 <i>Brachypodium</i> 형질전환 수행 및 line 확보
		Brachypodium activation tagging mutant pool 확립 연구	100	activation tagging mutant 확보 연구를 계속하며 dir 2000여 line 확보를 목표로 함.
		저온 저항성 유전자가 도입된 <i>Brachypodium</i> 형질전환체 연구	100	저온반응성 유전자 도입 형질전환 <i>Brachypodium</i> 식물의 형질변이 분석 연구를 수행함
		CO에 의한 광주기와	100	photoperiod와 저온반응성간의

		저온저항성 상관관계 연구		상관관계 연구 및 CO 전사인자의 기능 연구를 수행함
--	--	---------------	--	-------------------------------

[3협동: 억새 (Miscanthus sinensis) 형질전환 시스템 구축 및 광 이용성 증대 억새 품종 개발]

당초 목표	개발 내용	달성도 (%)
○ 억새 조직배양 및 재분화 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 억새 종자를 이용한 조직배양 조건 확립 (효율적인 종자 살균 방법 포함)</li> <li>- 억새의 embryogenic callus 유도 조건 확립</li> <li>- Embryogenic callus를 이용한 억새 재분화 조건 확립</li> <li>- 7종의 서울대 germplasm들의 embryogenic callus 유도 및 재분화 효율 분석 완료</li> </ul>	100
○ 억새 형질전환 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agrobacterium 접종 및 공동 배양 조건 최적화</li> <li>- Hygromycin 항생제 저항성 선발 마커를 이용한 Agrobacterium 매개 형질전환 조건 확립</li> <li>- 제초제 저항성 선발 마커를 이용한 Agrobacterium 매개 형질전환 시스템 구축 (논문 발표 및 특허 출원)</li> <li>- 제초제 저항성 억새 형질전환체 확보</li> </ul>	100
○ 유용 유전자 선발 및 억새 형질전환체 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 병 저항성 유전자, 활성 ABA 생성 유전자, 스트레스 저항성 유전자, 고활성 파이토크롬 유전자 등의 작물 내 기능 검증 완료 (논문 4편 발표)</li> <li>- 선발된 유용 유전자들의 단자엽 모델 식물 Brachypodium 형질전환체 확보 및 유전자 기능 분석</li> <li>- 억새 형질전환 목표 유전자 선발 및 형질전환용 유전자 벡터 제조</li> <li>- AtPhyB, BdPhyB, BdYVB, CaPLA1 등의 유전자가 도입된 억새 형질전환체 확보</li> <li>- 확보된 억새 형질전환체들의 분자생물학적 검증 실시</li> </ul>	95
○ 광 이용성 증대 억새 품종 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- AtPhyB 도입 억새 형질전환체의 포장형질 조사 (논문 투고 중)</li> <li>- BdPhyB 도입 억새 형질전환체의 포장형질 조사</li> <li>- PhyB 도입 억새 형질전환 식물체들의 cell wall 성분 분석</li> <li>- BdPhyB 도입 억새 형질전환체의 바이오매스 증대 분석 (제4협동과 공동 연구)</li> <li>- BdYVB 및 CaPLA1 도입 억새 형질전환체 증식</li> </ul>	90

[4협동: 억새(Miscanthus)의 유전적 재배 생리생태적 특성평가 및 포장재배법 개발]

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차	억새(Miscanthus)	● 억새수집, 수집 억새	100	- 억새 100점 추가 확보

연도 (2009)	)의 유전적 재배 생리생태적 특성평가 및 포장재배법 개발	유전자원의 평가 및 선발		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 기 수집된 억새 100종의 생리생태적 특성평가 1년차 완료</li> <li>- 유전분석위한 marker선발완료</li> </ul>
		● 억새의 재배기술 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 소규모 포장 재배법을 위한 기초연구</li> <li>- 염해에 대한 생리적반응 연구</li> </ul>
2차 년도 (2010)	억새(Miscanthus) )의 유전적 재배 생리생태적 특성평가 및 포장재배법 개발	● 억새유전자원 수집 및 이들의 유전적, 생리 생태적 특성 평가 및 우량개체 선발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 해외수집: 50종, 국내수집: 10종</li> <li>- 내염성 억새 선발</li> <li>- 고생산성 억새 선발 및 평가</li> <li>- 수집유전자원의 유전적 유연관계 분석(microsatellite분석)</li> </ul>
		● 근경을 통한 육묘 번식법 연구 및 소규모 포장재배 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 근경을 통한 육묘기술 확립</li> <li>- 선발된 억새의 소규모 포장평가</li> </ul>
3차 년도 (2011)	억새(Miscanthus) )의 유전적 재배 생리생태적 특성평가 및 포장재배법 개발	● 억새유전자원 수집 및 기수집 억새(3-4년차)의 유전적, 생리 생태적 특성 평가 및 우량개체 선발 및 분류	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내외 억새 수집: 50종</li> <li>- 내염성 억새 선발</li> <li>- 내건성 억새 선발</li> <li>- 억새 근경의 월동성 평가</li> <li>- 고생산성 억새 선발</li> <li>- 수집유전자원의 유전적 유연관계 분석(microsatellite 및 형태특성)</li> <li>- 선발된 억새의 형태적 특성 관찰을 통한 분류</li> </ul>
		● 종자/근경을 통한 육묘 번식법 연구 및 소규모 포장재배 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 근경을 통한 육묘기술 확립</li> <li>- 선발된 억새의 소규모 포장평가 실시</li> <li>- 억새의 토양수분 및 질소시비에 따른 영향 평가</li> <li>- 억새재배포장용 제초제 선발 평가</li> </ul>
4차 년도 (2012)	억새(Miscanthus) )의 유전적 재배 생리생태적 특성평가 및 포장재배법 개발	● 억새유전자원 수집 및 기수집 억새(4-5년차)의 유전적, 생리 생태적 특성 평가 및 우량개체 선발, 분류	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내외 억새 신규 수집: 50종</li> <li>- 내염/내건성 억새 선발</li> <li>- 월동성 우수억새 선발</li> <li>- 수집유전자원의 유전적 유연관계 분석(microsatellite분석)</li> </ul>
		● 우량억새의 바이오매스 생산 특성 평가 및 lignocellulose 성분 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 선발된 우량억새의 줄기 성분 분석을 통한 바이오매스 생산 유용성 평가</li> <li>- 우량억새의 종별, 연차별 성분 비교 평가</li> </ul>
		● 유전자도입 형질전환 억새의 생육 및 바이오매스 생산특성 평가 및 물억새와 교배를	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 피토크롬B가 도입된 억새 형질전환체들의 포장 생육 평가 (광합성 효율 평가 및 바이오매스 생산성 평가)</li> </ul>



		위한 준비(전남대 김정일 교수팀과 공동연구)		
		● 억새표준재배법연구와 소규모 포장재배 연구	100	- 선발된 고생산성 억새의 포장 적응성 평가(국내 및 연해주) - 억새의 질소시비에 따른 영향 평가(2년차 평가)
5차 년도 (2013)	억새(Miscanthus)의 유전적 재배 생리생태적 특성평가 및 포장재배법 개발	● 억새유전자원 수집 및 기수집 억새(5-6년차)의 유전적, 생리 생태적 특성 평가 및 우량개체 선발, 분류	100	- 국내외 억새 신규 수집: 30종 - 수집유전자원의 형태적 특성과 SSRs 마커를 통한 유전적 유연관계 분석 - 선발된 억새의 염색체 배수성 관찰을 통한 분류
		● 우량억새의 바이오매스 생산 특성 평가 및 lignocellulose 성분 분석	100	- 선발된 우량억새의 줄기 성분 분석을 통한 바이오매스 생산 유용성 평가 - 우량억새의 종별, 유전자원별 성분 비교 평가
		● 유전자도입 형질전환 억새의 생육 및 바이오매스 생산특성 평가 및 물억새와 교배를 위한 준비(전남대 김정일 교수팀과 공동연구)	100	- 피토크롬B가 도입된 억새 형질전환체들의 포장 평가(광합성 효율 평가 및 바이오매스 생산성 평가) - 형질전환 2배체 참억새와 4배체 물억새의 인공교배 추진
		● 억새표준재배법연구와 소규모 포장재배 연구	100	- 선발된 고생산성 억새의 포장 적응성 평가(국내 및 연해주) - 억새의 질소시비에 따른 영향 평가(3년차 평가) - 억새재배포장용 제초제 선발 및 포장 적용 평가(2년차) - 국내 선발 억새의 러시아 연해주 현지 적응성 평가

## 제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

### [1세부: 식물 줄기 형성층 활성 조절을 통한 바이오매스 증진기술 개발]

- 줄기 관다발 형성층 활성 증대 관련 유전자군 동정 및 ICA2 등의 유용 유전자의 기능분석을 통해 형성층 활성 조절을 통한 바이오매스 증대 전략화에 기여 (특허 등록, 기술이전 추진)
- 체관 발달조절 유전자의 발굴 및 조절 메커니즘 분석으로 현재까지 거의 알려지지 않았던 체관의 발달과정에서의 RNA 조절 메커니즘을 제시할 주목할만한 결과 획득(Nature 급 논문 투고 예정)
- CKI1의 줄기 관다발 형성층 활성 증대 표현형을 확보하여 포플러 형질전환체 제작에 기여(1협동에서 라인 구축 및 기능성 분석)

### [1협동: 바이오매스 증대를 위한 포플러 형질전환체 개발]

- 목본류의 바이오매스 증대관련 유전자의 클로닝 및 이들 유전자를 이용하기 위한 벡터제작

및 형질전환체 개발체계 확립

- 생명공학 기법을 이용한 신품종 개발에 필요한 형질전환 세대의 검정 및 후대 검정 방법과 우수한 목표 형질을 고정하기 위한 일련의 과정(생육 특성 조사, 도입형질의 발현 분석, 형태학적 특성 및 성분 분석 등)에 대한 체계 확립
- 유용유전자 cloning 및 활용을 위한 체계 확립으로 유사 연구에 활용 가능(목본류의 수령에 따른 도입형질의 발현 및 바이오매스 증대 검정)
- 산업화를 위한 형질전환체의 위해성 평가를 위한 “event”로 활용
- 바이오매스 증대를 목적으로 다년생 목본류의 형질전환의 경우, 식물체의 발달과정과 도입유전자의 기능, 발현 특성 등을 고려하여 선택할 필요가 있음을 확인

### [2협동: Brachypodium 및 Miscanthus를 이용한 바이오매스 증진 식물 개발 연구]

- 여러 파이토크롬의 기능분석을 통해 광이용성을 조절할 수 있는 기술의 기반 마련
- 파이토크롬 유전자의 역새 형질전환체 제작에 기여(광이용성 극대화 기대)
- 광주기, 개화시기, 광합성 등 바이오매스 생산량과 직결되는 생리학적 형질들과 관련된 유전자의 기능분석 및 다수의 논문발표를 통해 학술적으로 해당분야에 기여

### [3협동: 역새 (Miscanthus sinensis) 형질전환 시스템 구축 및 광 이용성 증대 역새 품종 개발]

- Agrobacterium을 이용한 역새 형질전환 방법은 본 과제 연구를 통하여 세계 최초로 개발된 기술이라 할 수 있다. 역새는 옥수수나 switchgrass 등 다른 바이오에너지 작물보다 여러 가지 면에서 우수하다고 평가되는 최고의 바이오에너지 작물로 여겨진다. 하지만 현재까지 상업적으로 재배되는 품종은 3배체의 거대 역새 (*M. x giganteus*) 하나뿐인 것으로 파악된다. 이 품종은 종자를 생성하지 않기에 rhizome으로 증식시켜야 하고, 이에 따라 많은 비용이 소요되고 있다. 최근에 이를 해결하기 위해서 새로운 2배체의 *M. sinensis* 품종이나 4배체의 *M. sacchariflorus* 품종을 수집하거나 육종하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 하지만 전통 육종 방법으로 만들 수 있는 품종이 제한적이고 시간이 많이 소요되는 단점이 있기에 생명공학기법을 이용한 역새 품종 개발의 필요성이 증대되고 있는 실정이다. 따라서 본 과제 연구를 통하여 개발한 Agrobacterium 매개 역새 형질전환 시스템을 향후 생명공학 역새 품종 개발에 핵심적인 역할을 할 것으로 여겨진다.
- 특히 본 과제 연구에서 확보한 제초제 저항성 *M. sinensis* 역새는 향후 *M. sacchariflorus*와의 교배 및 육종을 통하여 고부가가치 *M. x giganteus* 신품종을 만들 수 있도록 하는 기술 기반을 제공할 수 있을 것으로 기대된다.
- 학문적으로는 쌍자엽 식물의 phyB와 단자엽 식물의 phyB가 역새로 도입되었을 때 표현형에서 큰 차이를 보여주었다. 아직까지 단자엽 식물의 광신호전달 연구가 활발히 진행되지 않았다는 점에서 이들 결과들은 단자엽 식물에서의 광 반응성 및 광신호전달 체계를 구성하는데 기여할 것으로 여겨진다.

### [4협동: 역새(Miscanthus)의 유전적 재배 생리생태적 특성평가 및 포장재배법 개발]

- 바이오매스용 식물 유전자원의 수집 및 선발 기술 확립에 기여: 본 연구에서 바이오매스용으로 국내외에서 역새 유전자원을 수집하고, 다양한 평가를 통해 유전자원들의 특성을 평

가하고 DB를 구축하며, 이를 통해 핵심집단을 선발하는 과정을 통해 식물유전자원의 수집 및 선발에 관한 독자적인 기반기술을 확립함.

- 바이오매스용 바이오에너지작물 개발 기술에 기여: 선발된 우량 유전자원을 바탕으로 바이오매스 및 환경적응성이 높은 억새 개발 연구를 통해 억새를 기반으로 한 바이오에너지 작물 개발 기술 발전에 기여함..
- 바이오매스 재배생산기술 개발에 기여: 바이오매스용으로 억새를 대량생산하기 위한 주요 재배기술의 표준을 확립함으로써 향후 바이오에너지용 작물의 대량재배생산기술 확립에 적극 활용 가능할 것으로 기대 됨.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1절 연구개발 성과

#### [1세부: 식물 줄기 형성층 활성 조절을 통한 바이오매스 증진기술 개발]

- 바이오매스 증대 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 분석
- CKI1의 줄기 관다발 형성층 비대 기능 확인 및 포플러 형질전환체 제작
- ICA2의 바이오매스 증대 관련 기능 및 기술 특허 (출원/등록)
- PHD의 체관 형성 조절 기능 및 기술 특허 (출원)

#### [1협동: 바이오매스 증대를 위한 포플러 형질전환체 개발]

- 유용유전자 발굴: 기후변화와 바이오에너지에 대한 수요 증가로 에너지 원자재로 확보에 활용 가능한 유용유전자원의 발굴
- 형질전환체 개발 및 선발: 발굴된 유전자를 활용한 산업화 첫 단계인 유전자원의 가능성 검정을 위한 형질전환체 개발 및 형질 발현 특성 규명체계 확립
- 형질전환체 평가: 생명공학 기술에 의한 새로운 바이오매스 자원개발과 검정 프로세스 확립에 필요한 단계별 목표 및 확인 세부과정 확립

#### [2협동: Brachypodium 및 Miscanthus를 이용한 바이오매스 증진 식물 개발 연구]

- 바이오매스 증진 유전자를 발굴하여 이들의 작용 원리를 규명하여 학술논문으로 발표하고, 이들에 대한 지적재산권을 확보함.
- Brachypodium으로부터 분리된 저온반응성 유전자 등, 환경스트레스 반응성 관련 유전자를 이용하여 바이오매스 증진 작물 개발 기술 정립.
- 유희경지를 이용한 바이오매스 증진 작물의 재배로 농촌경제의 활성화 및 농가 수익 창출에 기여.

#### [3협동: 억새 (Miscanthus sinensis) 형질전환 시스템 구축 및 광 이용성 증대 억새 품종 개발]

- 세계 최초로 고효율의 억새 형질전환 기술 확립
- 억새 형질전환 기술 특허 출원 및 논문 발표
- 유용 유전자를 도입한 형질전환 억새 제작
- 형질전환 억새 대상 기능성 분석

#### [4협동: 억새(Miscanthus)의 유전적 재배 생리생태적 특성평가 및 포장재배법 개발]

- 억새유전자원 공급 ABS계약 체결: 영국 Aberystwyth대학 IBERS연구소와 한국에서 수집한 억새유전자원 20여종의 제공과 향후 개발될 억새품종의 상용화에 대한 기술료 지불에 대한 ABS계약을 체결 하였음(2013년 10월 29일)



그림 1. 역사유전자원 공급 ABS계약 체결

- 국제 역사심포지엄 개최: 서울대학교 호암교수회관에서 국내(농림축산식품부, 산업부, 농진청, 대학 등)와 해외(영국, 중국, 일본)의 역사 및 바이오에너지 전문 연사와 150여명의 관련 인사가 참가한 국제 심포지엄을 개최하였음.



그림 2. 국제 역사심포지엄 개최

## 제 2절 성과 활용 계획



### [1세부: 식물 줄기 형성층 활성 조절을 통한 바이오매스 증진기술 개발]

- ICA2의 바이오매스 증대 관련 기능 및 바이오매스 증대 기술 관련 특허(등록)를 기반으로 바이오매스 관련 기업을 대상으로 기술이전 추진
- ICA2의 주변 식물체 바이오매스 증대 효과의 기능성 분석 및 관련 신호 전달 메커니즘 규명을 통해 논문 발표
- ICA2의 주변 식물체 바이오매스 증대 효과에 대한 메커니즘 분석 및 사업화를 위해 후속 연구 과제 신청 추진
- PHD의 형성층 발달 조절 메커니즘 규명을 통해 논문 발표
- PHD의 형성층 발달 조절 기능 및 조절 기술 특허(출원)을 통해 식물의 에너지원 수송기작 및 이를 통한 수량성 증대를 목표로 대상 작물 선정, 유용성 검증
- 그 외, 발굴한 유용 유전자들에 대한 기능 분석을 통해 바이오매스 증대 기술 확립

### [1협동: 바이오매스 증대를 위한 포플러 형질전환체 개발]

- 실용화·산업화 계획(기술실시 등): 바이오매스 증대를 위한 형질전환체 개발 및 건정 과정에서 대상숙주(초본과 목본)에 따라 유전자의 발현 특성에 현저한 차이가 확인되어 개발된 형질전환체의 직접적인 활용보다는 형질전환체를 이용하여 목본류에서 수령에 따른 유전자의 발현 특성 연구와 유전자의 발현 조절에 대한 재료로 활용
- 인력인프라의 활용: 바이오매스 증대 관련 유용유전자 확보 및 형질전환체 개발 그리고 형질전환체를 검정을 통한 바이오매스 자원개발에 이르는 일련의 과정과 체계를 이해하는 인력 인프라를 활용한 유용 목표형질이 도입된 바이오매스 자원을 지속적으로 개발하여 바이오 에너지 원자재 확보를 위한 바이오매스가 증대된 형질전환 식물의 개발 및 세대고정을 통한 새로운 품종 개발에 활용하고자 함
- 기술인프라의 활용: 확보된 유용 유전자와 형질이 도입된 형질전환체는 특성을 규명하여 지적재산권을 확보하여 바이오에너지 원자재 확보를 위한 원천기술로 활용
- 교육 및 지도: 바이오매스 증대를 위한 형질전환 기술과 형질전환체의 선발 등 유용유전자원을 활용한 산업화 초기단계 진입을 위한 기술과 추진 과정에 대한 기술지도 및 교육을 통해 기술 인력의 확보에 활용
- 추가연구 및 타 연구에 활용: GMO 품종의 산업화를 위한 단계에서 위해성평가(환경 및 인체 위해성)가 신품종 등록에 필수적임으로 위해성 평가 자료 작성 및 심사신청서 작성을 위한 연구가 필요
- 환경위해성 평가를 위한 원재료 “event”로 활용
- 선발된 형질전환체를 이용한 developmental homeostasis 또는 functional mutagenesis 기작 연구

### [2협동: Brachypodium 및 Miscanthus를 이용한 바이오매스 증진 식물 개발 연구]

- 기존의 특허들은 작물 형질전환 기법 자체에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 본 연구실 자체적인 형질전환 기법을 통하여 개발된 형질전환 작물 또는 knockout 돌연변이 작물에 대한 특허 취득을 추진하고자 함.
- 특히, 바이오매스 증진 유전자와 바이오매스 증진 형질전환 억새에 역점을 두고자 함.

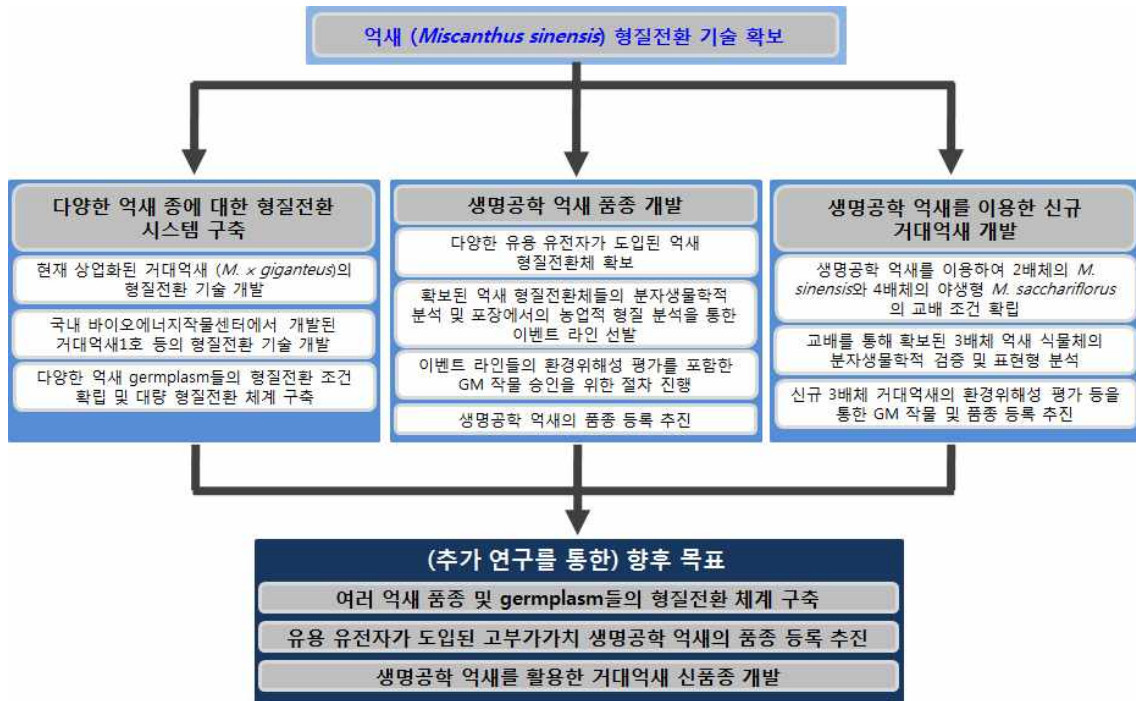
- 본 연구의 주요 대상 작물인 *Brachypodium*과 *Miscanthus* 연구는 세계적으로도 아직 초기 단계에 있기 때문에 국내연구진의 수준을 고려하면 경쟁력이 충분하다고 할 수 있다. 따라서 형질전환 연구, 유전자 발굴, 돌연변이 기법은 모두 학술논문 발표가 가능하다.
- 특히 역점을 두고자 하는 학술논문은 형질전환 기법, 바이오매스 증진 유전자의 기능 검증, 바이오매스 증진 형질전환 작물의 형질변이 분석 등에 관한 논문들이다.
- 바이오에너지 작물 연구는 세계적으로 초기 단계이다. 따라서 현재로서는 시장 규모가 미미하지만 향후 급속도로 증가할 것으로 전망하고 있다. 특히, 바이오매스 증진 유전자, 바이오매스가 보강된 형질전환 작물에 대한 수요는 급증할 것으로 기대한다.
- 제품 후보들로는 바이오매스 조절 유전자, 형질전환 억제, 또는 특정 유전자 KO 억제 등이 다.

### [3협동: 억새 (*Miscanthus sinensis*) 형질전환 시스템 구축 및 광 이용성 증대 억새 품종 개발]

- 본 과제 연구를 통하여 개발한 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 기술 특허는 향후 관심 있는 생명공학 회사로의 기술 이전을 추진할 수 있을 것이다.
- 현재 *AtPhyB* 도입 억새 형질전환체는 논문이 투고 되어 있으며, *BdPhyB* 도입 억새 형질전환체는 제4협동과제와 함께 마무리 실험을 완료하여 논문을 투고할 예정이다. 또한 파이토크롬의 유전자 기능 연구를 위하여 진행한 *Brachypodium* 형질전환체 분석 결과들의 논문 투고도 진행될 수 있을 것이다.
- 본 연구진이 확립한 억새 재분화 및 형질전환 조건을 이용하여 억새의 상업적 품종인 거대 억새(*M. x giganteus*)의 형질전환 조건 확립을 위한 추가 연구 과제나, 또는 본 연구진이 개발한 2배체의 생명공학 제초제 저항성 억새 식물체(*M. sinensis*)와 4배체 억새인 *M. sacchariflorus*의 교배를 통한 새로운 거대억새 품종 개발을 위한 추가 연구를 추진할 수 있을 것으로 여겨진다.

### [4협동: 억새(*Miscanthus*)의 유전적 재배 생리생태적 특성평가 및 포장재배법 개발]

- 본 협동과제의 연구산물은 크게 바이오매스용 억새 품종과 바이오매스 증진 억새의 재배기술로 요약할 수 있다.
- 수집 선발된 억새 핵심 유전자원은 향후 지속적인 바이오매스 증진 억새의 품종 개발에 적극 활용될 예정이며, 품종등록으로 지적재산권 획득 및 상용화가 예상된다.
- 재배생산 관련 기술과 know-how는 향후 억새의 대규모 재배생산을 plantation 구축에도 활용 가능하며, 특히 국내외 바이오매스 생산기지 확보에 활용가능 함.
- 본 연구를 통해 얻은 연구성과는 국제적인 저널에 게재하도록 적극 활용할 예정임.
- 본 연구의 성과를 활용하여 국제협력연구에 적극 활용할 예정임.
- 본 과제 연구를 통하여 확보한 억새 형질전환기술은 거대억새(*M. x giganteus*)를 포함한 다양한 억새 품종 및 germplasm들의 형질전환 체계 구축, 유용 유전자가 도입된 고부가가치 생명공학 억새 품종 개발, 확보된 제초제/항생제 저항성 생명공학 억새를 활용한 교배를 통한 3배체의 거대억새 신품종 개발 등에 활용될 수 있을 것이다 (아래 그림 참조).



### [억새(*Miscanthus*) 바이오매스의 경제성 및 경쟁력 분석]

- 국내에서 바이오매스 생산을 위해 연구중인 대상은 육상에서 재배 생산할 수 있는 초본성 식물인 억새와 목본성 식물인 포플러, 담수 및 해수에서 배양 생산할 수 있는 미세조류(microalgae)와 해양조류(macroalgae)가 있음.
- 억새 바이오매스의 기술경쟁력: 억새는 국내 자생종을 주로 활용하여 개발하므로 본 연구를 통해 품종화 가능한 계통이 확보된 상태로 독자적인 품종확보가 가능하며, 농촌진흥청에서도 억새품종개발 및 국내 생산단지 구축 등의 활발한 연구로 pilot 규모의 생산단지를 확보하고 있음. 반면에 미세조류(microalgae)와 해양조류(macroalgae)의 생산연구는 다수의 후보 조류를 확보하여 연구중에 있으나 주로 소규모 bioreactor 규모의 연구로서 아직 pilot규모의 생산연구에는 도달하지 못하고 있는 것으로 파악됨. 억새 바이오매스나 조류 바이오매스의 연료화 기술의 수준은 비슷한 수준으로 판단됨.
- 억새 바이오매스의 사업경쟁력: 억새는 다년생 초본식물로서 바이오매스 생산성이 높고 비료 등 농자재 투입비용이 적게 소요되며, 1회 재식 후 15년 이상 장기적이고 지속적인 바이오매스 생산이 가능하며, 연해주와 같이 추운 지역에서도 재배생산이 가능하여 연해주 해외영농과 연계할 경우 조기 사업화가 가능할 것으로 기대됨. 반면에 미세조류 및 해양조류의 경우 단위 면적당 생산성은 억새보다 높은 것으로 보고되고 있으나 미세조류의 경우 생산시설 건설비용과 운영비용이 높고 추운 겨울에는 생산이 불가하고 생산시설에 영향을 줄 수 있어 더운 남부지역으로 생산이 국한되는 한계가 있으며, 해양조류의 경우 해양생산 시설 구축 및 pilot규모 생산경험이 전무하고, 생산된 조류 바이오매스의 제염 및 생산물류 비용 등이 예상됨. 즉, 이론적인 단위면적당 생산성은 조류가 높은 것으로 예상되나 조류의 국내 개발단계는 아직 정확한 생산성 및 생산비용을 예단하기에는 어려운 상태이며, 온대지대인 우리의 계절환경을 고려하고 제반 생산 비용을 감안할 때 현재의 사업경쟁력에서 억새만 못한 것으로 판단됨.

- **역새 바이오매스의 경제성:** 이론적으로 역새 20톤/ha 생산시 바이오에탄올 생산량은 ha당 6,000L 생산이 가능할 것으로 예상됨. 역새 바이오매스의 해외 생산 후보지인 연해주의 경우 국내 기업이 이미 대규모 농지(17만 ha)를 확보하고 있어 역새 바이오매스 시장이 형성될 경우 조기 상업생산(최소 규모 10,000ha 규모)이 가능할 것으로 기대됨. 반면에 조류의 경우 소규모 생산시설에 의존한 연구가 전부로 아직도 바이오연료생산을 위한 대규모 생산의 경제성을 평가하기에는 초기단계에 있으며, 국내와 같이 추운 계절이 있는 경우 생산성 저하, 시설관리비용 증가 등이 예상되어 소규모 bioreactor의 연구 결과보다는 훨씬 보수적인 판단이 필요함. 조류를 바이오매스 생산에 연구하는 국가는 주로 대만과 같이 적도에 접하고 있거나 미국과 같이 연중 고온의 사막지대가 있는 경우임을 잘 고려할 필요가 있음.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 식물 뿌리 생장을 보강함으로써 잎과 줄기(바이오매스) 생장을 촉진할 수 있다는 전제하에 뿌리의 생육 증진을 빛이 조절한다는 연구 정보를 가지고 연구를 수행한 결과 잎과 줄기의 빛 매개 생장을 조절하는 HY5 유전자가 뿌리의 발달과 생육을 조절한다는 사실을 관찰하였음. 이 결과를 바탕으로 HY5 유전자를 이용한 애기장대와 *Brachypodium* 형질전환체를 확보중임.
2. *Brachypodium*의 저온반응성을 조절하는 원리가 다른 단자엽 식물과 유사하다는 정보를 바탕으로 이 식물로부터 추출 유전자들을 분리하여 연구를 수행하였으며, 그 결과는 학술 논문으로 발표하였음.
3. *M. sinensis* 역새 형질전환은 particle bombardment를 이용하여 최초 보고되었다. 이것은 일본 홋카이도 대학의 Tamada 교수가 주도하였는데, 작년에 서울대에서 개최된 International Symposium on The Future of Bioenergy “Miscanthus”에서 연사로 함께 만나 이야기를 나누는 결과 실무자가 연구실을 떠났고 *Agrobacterium* 방법은 성공하지 못한 것으로 파악되었다. 따라서 본 과제 연구를 통하여 개발한 *Agrobacterium*을 이용한 역새 형질전환 방법은 다른 연구진이 아직 하지 못하는 기술로 여겨진다. 또다른 주요 연구 그룹으로 미국 일리노이스 대학 연구진이 있는데 이들은 미성숙 화서 조직을 이용하여 거대 역새 (*M. x giganteus*) 형질전환을 수년간 지속적으로 추진하고 있는 것으로 파악되었다. 하지만 국제학회에서 연구 결과가 일부 발표되거나 최근 출판된 저서[A.H. Paterson (ed.), *Genomics of the Saccharinae, Plant Genetics and Genomics: Crops and Models* (2013) Genetic engineering of *Miscanthus*. 11:255-301]에 언급된 것이 전부이고 논문으로 발표되지 않았다.
4. 본 과제 연구 결과와 이들 정보들을 수합하여 보면, 역새 형질전환은 매우 힘든 것으로 파악된다. 이는 역새가 기본적으로 outcross 종이라는데 그 이유가 있는 것으로 여겨진다. 즉, 포장에서 채집하는 역새 종자들은 순수 종이 아니라 혼합 종일 확률이 매우 높다. 이 경우, 조직 배양 과정에서 서로 다른 캘러스가 섞이게 되고 이것은 전체적인 형질전환 확률을 낮추게 되는 요인으로 작용하는 것으로 추정된다. 따라서 상업적으로 구매하거나 노지에서 채집한 역새 종자를 이용한 형질전환은 거의 불가능할 것으로 파악되며, 그나마 germplasm으로 계통이 유지되는 일부 라인들이 형질전환이 가능할 것으로 여겨진다. 예로써 본 연구진이 사용한 SNU-M-045 germplasm이나 홋카이도 대학 연구진이 사용한 Tanegashima island에서 확보한 JM0138 germplasm 등이 있다. 더구나 거대 역새 (*M. x giganteus*) 형질전환은 더욱 힘든데 그것은 미성숙 화서를 얻을 수 있는 기간이 한정되고 (포장에서는 1년에 한번), 수집 양도 제한을 받기 때문이다. 본 연구진도 4년차 연구에서 거대 역새 (*M. x giganteus*)의 미성숙 화서를 제대로 확보하지 못하거나 시점을 놓쳐 연구를 진행하는데 큰 어려움이 있었으며, 5년차에는 제한된 양의 미성숙 화서를 확보하여 재분화 조건까지는 확립할 수는 있었으나 형질전환에는 최종적으로 실패하였다. 따라서 거대 역새 (*M. x giganteus*)의 형질전환을 위해서는 미성숙 화서를 지속적으로 확보할 수 있는 방안이나 매우 효율적인 역새 형질전환 조건이 확립되어야 성공할 수 있을 것으로 판단된다.



# 제 7 장 연구시설·장비 현황

## 제 1 절 연구시설 현황

### 1. 역사유전자원 포장 조성

가. 목적: 수집한 역사유전자원의 유지 및 생육특성 및 연구를 위하여 포장을 조성하여 관리하고 있으며, 유전자원포장의 지속적인 관리 및 유지를 통하여 바이오매스용 역사 품종개발에 활용하기 위함.

나. 위치

(1) 수원 역사유전자원 포장: 경기도 수원시 권선구 서둔동 서울대학교 농업생명과학대학 실험농장

(2) 여주 역사유전자원 포장: 경기도 여주시 능서면 양거리

다. 규모 및 조성일시

(1) 수원 역사유전자원 포장: 1024 m<sup>2</sup> (약 300평), 2009년 4월 7일, 2010년 4월 15일

(2) 여주 역사유전자원 포장: 3200 m<sup>2</sup> (약 900평), 2012년 4월 13일

라. 조성 및 관리비용

(1) 수원 역사유전자원 및 pilot 포장: 4,000,000원 (PE이중벽관 350개-Ø 900 mm, 제조제)

(2) 여주 역사유전자원 및 pilot 포장: 1,000,000원 (유전자원표시용 pole 1,000개, 제조제)

마. 가동현황

(1) 수원 역사유전자원 포장: 현재 324개 유전자원 재식 후 관리 중.

(2) 여주 역사유전자원 포장: 현재 수집한 모든 역사유전자원 재식 후 관리 중.



그림 1. 수원과 여주에 조성된 역사 유전자원 포장

### 2. 역사 소규모(pilot) 포장 조성

가. 목적: 수집한 역사유전자원 중 *M. × giganteus* 와 5개의 선발된 우량역사(참역사 2종, 물역사 3종)을 소규모로 포장을 조성하여 표준재배법에 맞춰서 재식 및 관리하여 생육

특성평가 및 수확량 및 수량에 영향을 미치는 수량구성요소들을 조사 평가하여 대규모 포장 조성 및 관리를 위한 기초자료로 이용하기 위함.

나. 위치

- (1) 수원 억새 pilot 포장: 경기도 수원시 권선구 서둔동 서울대학교 농업생명과학대학 실험농장
- (2) 여주 억새 pilot 포장: 경기도 여주시 능서면 양거리

다. 규모 및 조성일시

- (1) 수원 억새 pilot 포장: 850 m<sup>2</sup> (약 250평), 2009년 4월 7일, 2010년 4월 15일
- (2) 여주 억새 pilot 포장: 1800 m<sup>2</sup> (약 550평), 2012년 4월 13일

라. 가동현황

- (1) 수원 억새 pilot 포장: 현재 *M. × giganteus* rhizome 1000개를 재식하여 포장관리 중.
- (2) 여주 억새 pilot 포장: *M. × giganteus*, 참억새 2종, 물억새 3종의 rhizome 을 120개씩 3반복으로 재식하여 포장관리 중.



그림 2. 수원과 여주에 조성된 억새 pilot 포장

## 제 8 장 참고문헌

[1세부: 식물 줄기 형성층 활성 조절을 통한 바이오매스 증진기술 개발]

- Bhargava, A., et al. (2013). "Identification of cytokinin-responsive genes using microarray meta-analysis and RNA-Seq in Arabidopsis." *Plant Physiol* 162(1): 272-294.
- Cano-Delgado, A., et al. (2010). "Regulatory mechanisms for specification and patterning of plant vascular tissues." *Annu Rev Cell Dev Biol* 26: 605-637.
- Galbally, I. E. and W. Kirstine (2002). "The production of methanol by flowering plants and the global cycle of methanol." *Journal of Atmospheric Chemistry* 43(3): 195-229.
- Kiba, T., et al. (2013). "Side-chain modification of cytokinins controls shoot growth in Arabidopsis." *Dev Cell* 27(4): 452-461.
- Krupkova, E., et al. (2007). "The TUMOROUS SHOOT DEVELOPMENT2 gene of Arabidopsis encoding a putative methyltransferase is required for cell adhesion and co-ordinated plant development." *Plant J* 50(4): 735-750.
- Madhaiyan, M., et al. (2006). "A new insight into foliar applied methanol influencing phylloplane methylotrophic dynamics and growth promotion of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.)." *Environmental and Experimental Botany* 57(1-2): 168-176.
- Matsumoto-Kitano, M., et al. (2008). "Cytokinins are central regulators of cambial activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(50): 20027-20031.
- Miao, Y., et al. (2011). "QUASIMODO 3 (QUA3) is a putative homogalacturonan methyltransferase regulating cell wall biosynthesis in Arabidopsis suspension-cultured cells." *J Exp Bot* 62(14): 5063-5078.
- Mohnen, D. (2008). "Pectin structure and biosynthesis." *Curr Opin Plant Biol* 11(3): 266-277.
- Mouille, G., et al. (2007). "Homogalacturonan synthesis in Arabidopsis thaliana requires a Golgi-localized protein with a putative methyltransferase domain." *Plant J* 50(4): 605-614.
- Nieminen, K., et al. (2008). "Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(50): 20032-20037.
- Ramirez, I., et al. (2006). "Effects of foliar and root applications of methanol on the growth of Arabidopsis, tobacco, and tomato plants." *J Plant Growth Regul* 25(1): 30-44.
- Rieu, I., et al. (2008). "Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in Arabidopsis." *Plant Cell* 20(9): 2420-2436.
- Rieu, I., et al. (2008). "The gibberellin biosynthetic genes AtGA20ox1 and AtGA20ox2 act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the Arabidopsis life cycle." *Plant J* 53(3): 488-504.

Sakakibara, H. (2006). "Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation." *Annu Rev Plant Biol* 57: 431-449.

**[1협동: 바이오매스 증대를 위한 포플러 형질전환체 개발]**

Chang SW, Lee SJ, Je CH. (2005) Phytoremediation of atrazine by poplar trees: toxicity, uptake, and transformation. *J Environ Sci Health B*. 40(6):801-11.

Costa MA, Marques JV, Dalisay DS, Herman B, Bedgar DL, Davin LB, Lewis NG. (2013) Transgenic hybrid poplar for sustainable and scalable production of the commodity/specialty chemical, 2-phenylethanol. *PLoS One*. 26:8(12):e83169.

Couselo JL, Corredoira E, Vieitez AM, Ballester A. (2012) Plant tissue culture of fast-growing trees for phytoremediation research. *Methods Mol Biol*. 877:247-63.

Creux NM, Bossinger G, Myburg AA, Spokevicius AV. (2013) Induced somatic sector analysis of cellulose synthase (CesA) promoter regions in woody stem tissues. *Planta*. 237(3):799-812.

Cseke LJ, Cseke SB, Podila GK. (2007) High efficiency poplar transformation. *Plant Cell Rep*. 26(9):1529-38.

Dalton DA, Ma C, Shrestha S, Kitin P, Strauss SH. (2011) Trade-offs between biomass growth and inducible biosynthesis of polyhydroxybutyrate in transgenic poplar. *Plant Biotechnol J*. 9(7):759-67.

Dinus RJ. (2001) Genetic improvement of poplar feedstock quality for ethanol production. *Appl Biochem Biotechnol*. 91-93:23-34. Review.

Elias AA, Busov VB, Kosola KR, Ma C, Etherington E, Shevchenko O, Gandhi H, Pearce DW, Rood SB, Strauss SH. (2012) Green revolution trees: semidwarfism transgenes modify gibberellins, promote root growth, enhance morphological diversity, and reduce competitiveness in hybrid poplar. *Plant Physiol*. 160(2):1130-44.

Eriksson ME, Israelsson M, Olsson O, Moritz T. (2000) Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. *Nat Biotechnol*. 18(7):784-8.

Giorcelli A, Sparvoli F, Mattivi F, Tava A, Balestrazzi A, Vrhovsek U, Calligari P, Bollini R, Confalonieri M. (2004) Expression of the stilbene synthase (StSy) gene from grapevine in transgenic white poplar results in high accumulation of the antioxidant resveratrol glucosides. *Transgenic Res*. 13(3):203-14.

Gullner G, Kömives T, Rennenberg H. (2001) Enhanced tolerance of transgenic poplar plants overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase towards chloroacetanilide herbicides. *J Exp Bot*. 52(358):971-9.

Hjältén J, Axelsson EP, Whitham TG, LeRoy CJ, Julkunen-Tiitto R, Wennström A, Pilate G. (2012) Increased resistance of Bt aspens to *Phratora vitellinae* (Coleoptera) leads to

increased plant growth under experimental conditions. PLoS One. (1):e30640.

Ko JH, Kim HT, Hwang I, Han KH. (2012) Tissue-type-specific transcriptome analysis identifies developing xylem-specific promoters in poplar. Plant Biotechnol J. 10(5):587-96.

Kuhn A, Ballach HJ, Wittig R.(2004) Studies in the biodegradation of 5 PAHs (phenanthrene, pyrene, fluoranthene, chrysene und benzo(a)pyrene) in the presence of rooted poplar cuttings. Environ Sci Pollut Res Int. 11(1):22-32.

Schoenmuth BW, Pestemer W. (2004) Dendroremediation of trinitrotoluene (TNT). Part 2: fate of radio-labelled TNT in trees. Environ Sci Pollut Res Int. 11(5):331-9.

Thompson PL, Polebitski AS. (2010) Effect of mycorrhizal fungi on the phytoremediation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX). Environ Sci Technol. 1;44(3):1112-5.

Větrovský T, Steffen KT, Baldrian P.(2014) Potential of cometabolic transformation of polysaccharides and lignin in lignocellulose by soil Actinobacteria. PLoS One. 13;9(2):e89108.

Wang K, Yang HY, Xu F, Sun RC. (2011) Structural comparison and enhanced enzymatic hydrolysis of the cellulosic preparation from *Populus tomentosa* Carr., by different cellulose-soluble solvent systems. Bioresour Technol.102(6):4524-9.

Wang K, Yang H, Yao X, Xu F, Sun RC. (2012) Structural transformation of hemicelluloses and lignin from triploid poplar during acid-pretreatment based biorefinery process. Bioresour Technol. 116:99-106.

#### [2협동: *Brachypodium* 및 *Miscanthus*를 이용한 바이오매스 증진 식물 개발 연구]

Brkljacic J, Grotewold E, Scholl R, Mockler T, Garvin DF, Vain P, Brutnell T, Sibout R, Bevan M, Budak H, Caicedo AL, Gao C, Gu Y, Hazen SP, Holt BF 3rd, Hong SY, Jordan M, Manzaneda AJ, Mitchell-Olds T, Mochida K, Mur LA, Park CM, Sedbrook J, Watt M, Zheng SJ, Vogel JP: *Brachypodium* as a model for the grasses: today and the future. Plant Physiol 2011, 157:3 - 13.

Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK: Cold stress regulation of gene expression in plants. Trends Plant Sci 2007, 12:444 - 451.

Delhaize E: A metal-accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol 1996, 111:849-855.

Dong CH, Agarwal M, Zhang Y, Xie Q, Zhu JK: The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. Proc Natl Acad Sci USA 2006, 103:8281 - 8286.

Dong MA, Farré EM, Thomashow MF: Circadian clock-associated 1 and late elongated hypocotyl regulate expression of the C-repeat binding factor (CBF) pathway in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad. Sci USA 2011, 108:7241 - 7246.

- Draper J, Mur LA, Jenkins G, Ghosh-Biswas GC, Bablak P, Hasterok R, Routledge AP: *Brachypodium distachyon*. A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiol* 2001, 127:1539 - 1555.
- Garvin D, Gu Y, Hasterok R, Hazen SP, Jenkins G, Mokler TC, Mur LA, Vogel JP: Development of genetic and genomic research resources for *Brachypodium distachyon*, a new model system for grass crop research. *Plant Genome* 2008, 48:69 - 84.
- Gilmour SJ, Zarka DG., Stockinger EJ, Salazar MP, Houghton JM, Thomashow MF: Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant J* 1998, 16:433 - 442.
- Green RM, Tobin EM: The role of CCA1 and LHY in the plant circadian clock. *Dev Cell* 2002, 2:516-518.
- Hong SY, Lee S, Seo PJ, Yang MS, Park CM: Identification and molecular characterization of a *Brachypodium distachyon* GIGANTEA gene: functional conservation in monocot and dicot plants. *Plant Mol Biol* 2010, 72:485 - 497.
- Hong SY, Seo PJ, Cho SH, Park CM: Preparation of leaf mesophyll protoplasts for transient gene expression in *Brachypodium distachyon*. *J Plant Biol* 2012, 55:390-397.
- Imaizumi T: *Arabidopsis* circadian clock and photoperiodism: time to think about location. *Curr Opin Plant Biol* 2010, 13:83-89.
- Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O, Thomashow MF: *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 1998, 280:104 - 106.
- James AB, Syed NH, Bordage S, Marshall J, Nimmo GA, Jenkins GI, Herzyk P, Brown JW, Nimmo HG: Alternative splicing mediates responses of the *Arabidopsis* circadian clock to temperature changes. *Plant Cell* 2012, 24:961-981.
- Jung JH, Park JH, Lee S, To TK, Kim JM, Seki M, Park CM: The cold signaling attenuator HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENE1 activates FLOWERING LOCUS C transcription via chromatin remodeling under short-term cold stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2013, 25:4378-4390.
- Jung JH, Seo PJ, Park CM: The E3 ubiquitin ligase HOS1 regulates *Arabidopsis* flowering by mediating CONSTANS degradation under cold stress. *J Biol Chem* 2012, 287:43277-43287.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K: Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1998, 10:1391 - 1406.
- Michaels SD: Flowering time regulation produces much fruit. *Curr Opin Plant Biol* 2009,



12:75 - 80.

- Nakamura M, Buzas DM, Kato A, Fujita M, Kurata N, Kinoshita T: The role of *Arabidopsis thaliana* NAR1, a cytosolic iron-sulfur cluster assembly component, in gametophytic gene expression and oxidative stress responses in vegetative tissue. *New Phytol* 2013, 199:925-935.
- Pino MT, Skinner JS, Jeknic Z, Hayes PM, Soeldner AH, Thomashow MF, Chen TH: Ectopic *AtCBF1* over-expression enhances freezing tolerance and induces cold acclimation-associated physiological modifications in potato. *Plant Cell Environ* 2008, 31:393 - 406.
- Ryu JY, Hong SY, Jo SH, Woo JC, Lee S, Park CM: Molecular and functional characterization of cold-responsive C-repeat binding factors from *Brachypodium distachyon*. *BMC Plant Biol* 2014, 14:15.
- Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K: Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* 2006, 18:1292 - 1309.
- Samach A, Onouchi H, Gold SE, Ditta GS, Schwarz-Sommer Z, Yanofsky MF, Coupland G: Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science* 2000, 288:1613 - 1616.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M: Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol* 2003, 6:410 - 417.
- Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF: *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:1035 - 1040.
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K: Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2002, 29:417 - 426.
- Thomashow MF: Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1999, 50:571 - 599.
- Turck F, Fornara F, Coupland G: Regulation and identity of florigen. *FLOWERING LOCUS T* moves center stage. *Annu Rev Plant Biol* 2008, 59: 573 - 594.
- Wang X, Wu F, Xie Q, Wang H, Wang Y, Yue Y, Gahura O, Ma S, Liu L, Cao Y, Jiao Y, Puta F, McClung CR, Xu X, Ma L: SKIP is a component of the spliceosome linking alternative splicing and the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2012, 24:3278-3295.
- Wang ZY, Tobin EM: Constitutive expression of the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (*CCA1*) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell* 1998,

93:1207-1217.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K: Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* 2006, 57:781 - 803.

**[3협동: 억새 (*Miscanthus sinensis*) 형질전환 시스템 구축 및 광 이용성 증대 억새 품종 개발]**

Cho KC, Han YJ, Kim SJ, Lee SS, Hwang OJ, Song PS, Kim YS, Kim JI (2011) Resistance to *Rhizoctonia solani* AG-2-2 (IIIB) Kuhn in creeping bentgrass plants transformed with pepper esterase gene *PepEST*. *Plant Pathology* 60: 631-639

Choi YS, Kim YM, Hwang OJ, Han YJ, Kim SY, Kim JI. (2013) Overexpression of *Arabidopsis* ABF3 gene confers enhanced tolerance to drought and heat stress in creeping bentgrass. *Plant Biotechnol. Rep.* 7:165-173

Ganesan M, Han YJ, Bae TW, Hwang OJ, Chandrasekhar T, Shin AY, Goh CH, Nishiguchi S, Song IJ, Lee HY, Kim JI, Song PS (2012) Overexpression of phytochrome A and its hyperactive mutant improves shade tolerance and turf quality in creeping bentgrass and zoysiagrass. *Planta* 236: 1135-1150

Han YJ, Cho KC, Hwang OJ, Choi YS, Shin AY, Hwang I, Kim JI. (2012) Overexpression of an *Arabidopsis*  $\beta$ -glucosidase gene enhances drought resistance with dwarf phenotype in creeping bentgrass. *Plant Cell Rep.* 31:1677-1686

Hwang OJ, Cho MA, Han YJ, Kim YM, Lim SH, Kim DS, Hwang I, Kim JI. (2014) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Miscanthus sinensis*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 117:51-63

Kim EY, Seo YS, Lee H, Kim WT (2010) Constitutive expression of CaSRP1, a hot pepper small rubber particle protein homolog, resulted in fast growth and improved drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *Planta* 232:71-83

Kim YG, Sharmin SA, Alam I, Kim KH, Kwon SY, Sohn JH, Kim SH, Liu G, Lee BH (2013) *Agrobacterium*-mediated transformation of reed (*Phragmites communis* Trinius) using mature seed-derived calli. *GCB Bioenergy* 5:73-80

Opanowicz M, Vain P, Draper J, Parker D, Doonan JH (2008) *Brachypodium distachyon*: making hay with a wild grass. *Trends Plant Sci.* 13:172-177

Rao AQ, Irfan M, Saleem Z, Nasir IA, Riazuddin S, Husnain T. (2011) Overexpression of the phytochrome B gene from *Arabidopsis thaliana* increases plant growth and yield of cotton (*Gossypium hirsutum*). *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 12:326-334

Seo YS, Kim EY, Mang HG, Kim WT (2008) Heterologous expression, and biochemical and cellular characterization of CaPLA1 encoding a hot pepper phospholipase A1 homolog. *Plant J.* 53:895-908

Wang X, Yamada T, Kong FJ, Abe Y, Hoshino Y, Sato H, Takamizo T, Kanazawa A, Yamada T (2011) Establishment of an efficient *in vitro* culture and particle bombardment-mediated transformation systems in *Miscanthus sinensis* Anderss., a potential bioenergy crop. GCB Bioenergy 3:322-332

김정일, 황옥진, 김도순, 한윤정 (2013) 형질전환 억새 식물체의 제조 방법 및 그에 따른 식물체. 대한민국 특허출원번호 10-2013-0105227

**[4협동: 억새(Miscanthus)의 유전적 재배 생리생태적 특성평가 및 포장재배법 개발]**

SH Lim, JW Kim, SW Kang and DS Kim. 2010. Agronomic characteristics of *Miscanthus* spp. collected in Korea. 한국작물학회. 제 55권 별책 1호. pp. 17.

SW Kang, SH Lim and DS Kim. 2010. Survival of *Miscanthus* rhizomes exposed to winter climate and freezing temperature. 한국작물학회. 제 55권 별책 1호. pp. 65.

MJ Yook, JH Chung, NJ Jung and DS Kim. 2010. Physiological response of *Miscanthus sinensis* and *M. sacchariflorus* to salt stress. 한국작물학회. 제 55권 별책 1호. pp. 66.

정지훈, 임수현, 김진원, 박민원, 강신욱, 육민정, 송종석, 장전걸, 김도순. 2010. 바이오에너지작물로서 억새의 활용. 한국잡초학회 제 30권 별책 1호. 47-49.

육민정, 임수현, 김진원, 정지훈, 김도순. 2010. 염해에 대한 참억새와 물억새의 생리적 반응. 한국잡초학회. 제 30권 별책 1호. 79-81.

DS Kim. 2010. *Miscanthus* as a bioenergy crop. QAU-SNU joint syposium: Agriculture and Biotechnology.

DS Kim, SH Lim, JW Kim, SW Kang, MJ Yook, JS Song and JH Chung. 2010. Characterization of biomass yield of *Miscanthus* species collected in Korea. 2010 Bio Pacific Rim Summit

DS Kim, MJ Yook, SH Lim, MW Park. 2011. Genetic diversity of Korean *Miscanthus* species. Plant and Animal Genome XIX Conference.

MJ Yook, SH Lim, DS Kim. 2011. Microsatellite Analysis for Genetic Diversity in *Miscanthus* species with Different Geographic Origins. Plant and Animal Genome XIX Conference.

JH Chung and DS Kim. 2012. *Miscanthus* as a Potential Bioenergy Crop In East Asia. J. Crop Sci. Biotech. 15 (2): 65-77.

Y Ibaragi, SH Lim, MJ Yook and DS Kim. 2013. Taxonomic Notes on Korean *Miscanthus* × *ogiformis* Honda (Poaceae) - - A New Record from Korea. The Journal of Japanese botany. 88 (3): 184-187.

Y Qin, MA Kabir, HW Wang, YH Lee, SH Hong, JY Kim, MJ Yook, DS Kim, CS Kim, H Kwon, and W Kim. 2013. Assessment of genetic diversity and relationships based on RAPD and AFLP analyses in *Miscanthus* genera landraces. Can. J. Plant Sci. 93 (2): 171-182.

특허공보 제 10-2013-0105227호(2013. 9. 3) “형질전환 억새 식물체의 제조 방법 및 그에 따른 식물체”

OJ Hwang, MA Cho, YJ Han, YM Kim, SH Lim, DS Kim, ID Hwang, JI Kim. 2014. Agrobacterium-mediated Genetic Transformation of *Miscanthus sinensis*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 117 (1): 51-63.

MJ Yook, SH Lim, JS Song, JW Kim, CJ Zhang, EJ Lee, Y Ibaragi, GJ Lee, GJ Nah and DS Kim. 2014. Assessment of genetic diversity of Korean *Miscanthus* using morphological traits and SSR markers. Biomass & Bioenergy. in press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.01.025>.

SH Lim, MJ Yook, JW Kim, JS Song, CJ Zhang, GJ Nah and DS Kim. 2014. Genetic diversity in agronomic traits associated with the biomass production of *Miscanthus* species collected in Northeast Asia. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization. in press. doi:10.1017/S1479262114000604.

## 주 의

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