

최 종 보 고 서

보안과제(), 일반과제(○)

과제번호 506011-3

과실품질관련 유전자를 이용한 멜론 형질전환체
개발로 GMO 품종 등록

(Development of Transgenic Melon Plant Using Genes
Related with Fruit Quality and Registration of GMO
Varieties)

(주)에프앤피 기술연구소

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “과실품질관련 유전자를 이용한 멜론 형질전환체 개발로 GMO 품종등록” 과제의
보고서로 제출합니다.

2009년 4월 24일

주관연구기관명 : (주)에프앤피

주관연구책임자 : 윤 길 영

연 구 원 : 김 신 제

연 구 원 : 김 창 기

연 구 원 : 김 군 보

연 구 원 : 조 아 영

연 구 원 : 김 신 애

연 구 원 : 김 연 실

연 구 원 : 전 은 현

연 구 원 : 남 회 영

요 약 문

I. 제 목

과실품질관련 유전자를 이용한 멜론 형질전환체 개발로 GMO 품종등록

II. 연구개발의 목표 및 필요성

1. 연구개발의 최종목표

- 과실의 품질관련 유전자를 이용한 형질전환을 통해 고품질 멜론 형질전환체 개발
- 멜론 형질전환체의 기능 분석 및 형질전환체의 분자생물학적 분석
- 과실품질관련 유전자를 이용한 형질전환체의 유망계통 선발 및 증식
- GMO 품종 등록

2. 연구개발의 필요성

- 국내·외 원예산업은 주로 생산량 증대를 위한 연구가 꾸준히 진행되어 왔으나 농산물의 시장이 개방되고 생활수준이 향상되면서 양적인 면보다 질적인 면이 강조되고 있음
- 과실의 품질을 향상시키기 위한 유용 유전자원의 확보가 필요
- 생명공학기술을 이용한 고품질의 과실 생산을 위한 연구 개발이 필요

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 과실품질관련 유전자를 이용한 형질전환

- 과실 품질관련 유전자로 선발된 transcription factor인 Myb1, 2, xyloglucan endoglucantransferase (XET) 그리고 superoxide dismutase (SOD) 등에 대한 overexpression (sense, S) 및 knockdown (RNAi, AS) 식물형질전환용 벡터를 이용하여 *Agrobacterium*-mediated transformation 방법으로 멜론 형질전환을 실시하여 형질전환체 획득
- 이들 형질전환식물 각 라인별 후대 식물체로부터 외부유전자 삽입 여부가 확인된 것만을 선발하여 세대진전

2. 형질전환 식물체의 후대검정

- 형질전환체의 세대별 생육조사를 위하여 (주)에프엔피의 GMO 품종재배 비닐하우스에서 각각의 형질전환체의 재배 생리적 특성 구명
- 특히, 각 형질전환체의 재배 생리적 특성 중 엽록체의 함량을 측정하여 후속이 지연되는 형질전환체 라인 선발을 위한 지표로 활용
- 형질전환체의 후대검증 및 생육조사 결과를 종합하여 세대 확보와 최종선발 후보군 압축

3. 각각의 형질전환 식물체에서 원예형질의 분석

- 각 형질전환체의 과실의 후숙 정도, 과실의 무게, 착과의 개수 등을 측정하여 고품질 및 기능성계통을 선발하기 위한 각 형질전환체의 재배적·생리적 특성 비교

4. 고품질 및 고기능성 신품종의 등록

- 과실의 품질관련 농업형질 결과를 종합하여 최종 품종등록 후보 계통을 선발
- 최종적으로 멜론 형질전환체의 분자생물학적, 생리적 및 원예형질을 분석하여 상품성이 있는 형질전환체선발 및 GMO 품종 등록

IV. 연구개발결과

1. 형질전환 및 후대 식물체의 선발

- 과실품질관련 유전자로 확보된 멜론 transcription factor인 Myb1, 2, xyloglucan endoglucantransferase (XET) 그리고 superoxide dismutase (SOD) 등을 이용하여 과 발현 및 knock-out 식물형질전환용 벡터를 제작하여 멜론 형질전환
- 각각의 벡터를 이용하여 확보한 형질전환체는 CmMyb1 24, CmMyb2 26, CmXET 21, CmSOD 22 개체를 선발하여 총 93개체를 확보하였음
- 발현양상에 따른 형질전환 개체수는 41개의 overexpression (sense, S)과 52개의 knockdown (RNAi, AS) 형질전환체가 선발되었음

2. 형질전환체의 분자생물학적 특성 분석

- 각각의 벡터를 이용하여 형질전환된 식물체는 PCR, southern blot 및 RT-PCR로 분석하여 외부유전자의 도입여부를 확인하였음
- 외부유전자의 도입여부는 형질전환체의 세대진전 과정에서도 PCR과 항생제를 이용한 segregation을 분석하여 확인
- 또한 CmMyb와 상호작용하는 유전자를 확인하기 위해 yeast-two hybridization 분석을 통해 CmMyb2가 chitinase와 상호작용하는 것을 확인하였음
- 과실 품질관련 유전자의 발현특성은 CmMyb2는 과실 발달 초기에만 발현되어 과실 발달과 관련된 downstream 유전자의 조절과 관련이 있음이 확인 되었음
- CmSOD의 promoter region 분석에서 활성화 산소에 반응하는 as1/ocs motif와 Myb-type motif가 존재함이 확인되었음

3. 형질전환체의 농업형질 분석

- 후대검정을 위한 형질전환체는 GMO 품종재배 포장에서 재배하면서 과실의 품질관련 농업형질과 재배생리적 특성을 조사하였음
- 1차로 선발된 1,103개의 형질전환체 중 발달단계에 따른 엽록소 함량변화를 분석하여 Myb1 (S), Myb1 (AS), Myb2 (S), Myb2 (AS) 그리고 XET (AS)를 선발하여 품질관련 농업형질을 분석하였음
- 최종선발된 형질전환체의 특성은 overexpression 개체는 과실의 성숙이 wild type에

비해 빠르게 진행되어 조기 낙과 및 열과 현상이 나타났음

- 반면에 knockout 라인은 낙과 및 후숙이 지연되어 wild type에 비해 5~10일의 발달 단계의 차이가 확인되었음
- CmMyb2 knockout 라인은 개체 당 4~5까지 착과해도 과실의 크기나 생육에 영향이 없어 wild type에 비해 2배 이상의 다수확이 가능성이 확인되었음
- CmXET knockout 라인의 경우도 wild type에 비해 10일 정도의 후숙지연 (낙과)이 확인되었음
- 과실의 경도는 overexpression 라인의 경우 30DAP~35DAP에서는 wild type과 유사하였으나, 40DAP에서는 현저히 감소하여 낙과 및 열과 현상과 관련이 있음이 확인되었음
- Knockout 라인의 경우는 30DAP에서는 약 29% 높았으며, 40DAP에서는 wild type은 현저히 경도가 감소하는 반면 knockout 개체는 다소 감소하여 과실의 후숙이 진행 지연과 밀접한 관계가 있음이 확인되었음
- 에틸렌 발생은 35DAP에서 Myb2 RNAi 라인이 wild type에 비해 약 30% 낮게 나타났음. 이와 같은 결과는 과실 경도, 당도의 변화와 일치하는 것임
- 따라서 형질전환체 Myb2 RNAi 라인은 과실의 후숙 지연에 따른 저장성 및 수송성 향상 뿐만 아니라 다수확에 의한 생산성 향상에도 효과가 있음이 확인 되었음

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 작물의 과실 품질관련 유용 유전자원의 확보 및 활용 체계를 확립

- 기후변화와 바이오에너지에 대한 수요 증가로 유용유전자원의 확보와 이들 유전자를 활용한 산업화를 위한 첫 단계인 유용 유전자원의 확보 체계 확립
- 형질전환 방법에 의한 목표형질이 도입된 새로운 품종개발 과정의 체계 확립

2. 과제 수행기간에 축적된 기술과 인력 인프라의 활용

- 유용유전자를 확보 및 형질전환체 개발 그리고 형질전환체를 검정을 통한 품종개발 체계를 이해하는 인력 및 기술 인프라를 활용한 유용 목표형질이 도입된 신품종 개발
- 확보된 유용 유전자는 특허등록을 하여 지적재산권 확보
- 환경내성 작물, 바이오 에너지 원자재 확보를 위한 바이오매스 증대를 위한 형질전환 작물의 개발 및 세대고정을 통한 품종 개발에 활용하고자 함

3. 확보된 우수한 형질이 도입된 멜론을 이용한 환경위해성 평가 (다음 단계 조치사항)

- 본 연구가 기획되고 진행되는 동안에 이루어진 GMO 품종 등록을 위한 환경위해성 평

가 조항의 신설로 신제품 등록에 필요한 위해성 평가 자료 작성 및 심사신청에 개발된
형질전환체 활용 가능

- 환경위해성 평가를 위한 원재료 “event”로 활용하여 환경위해성 평가를 위한 기술개발
에 이용 가능
- 위해성 평가기술 개발과 축적된 결과는 신제품 등록을 위한 심사자료로 제출하여 신제품
등록
- 축적된 형질전환체의 품질관련 형질의 분석 결과는 품종 등록 후 학술지에 게재

SUMMARY

Title: Development of Transgenic Melon Plant Using Genes Related with Fruit Quality and Registration of GMO Varieties

To development of high quality melon using a genes associated with fruit quality, we cloned a genes by differential expression cDNA library screening and then the selected genes were transformed into melon (*Cucumis melo* cv Reticulatus) by Agrobacterium-mediated transformation. The transgenic plants were evaluated by PCR with inserted gene-specific primer, southern hybridization, RT-PCR and segregation analysis using antibiotics. Among 1,103 primary candidate transgenic plants, we had scelerated five transgenic plants in terms of characters associated with fruit quality such as formation of abscission layer and chlorophyll contents during the developmental stage. We could acquire the suitable transgenic plant that delayed ripening through the analysis of the agricultural characters which are firmness, soluble solid contents and production of ethylene using the five selected transgenic plants. The transgenic plant which was knockout the CmMyb2 shown 30% higher firmness compare to wild type as well as high-yield of fruit per plant. Many plant TFs are known for their specific regulatory functions as well as cross-regulation under different biotic or abiotic conditions. Downstream targets of TFs are not only related to environmental adaptation but they also function in various aspects of growth and development such as pigmentation, cell wall biogenesis, ethylene biosynthesis and fruit ripening. The results suggested that CmMyb2 RNAi plant can be adequate to reduce the cost by increase the period of storage and to increase farmer's income by high-yield. We have been try to registration of this transgenic melon as new variety. Also this line can use to "event" for the environmental risk assessment.

CONTENTS

I. Title	9
Development of Transgenic Melon Plant Using Genes Related with Fruit Quality and Registration of GMO Varieties	
II. Trend of Home and Abroad Technology and Research Purpose	11
III. Research Contents and Results	13
IV. Achievements and Contributions to Related Research	39
V. Results and Application	42
VI. Information of Abroad Technology	43
VII. Reference	44

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	9
제 2 장	국내외 기술개발 현황	11
	1. 국내기술개발 현황	
	2. 세계적 수준	
	3. 국내외의 연구현황	
	.	
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	13
	제 1 절 형질전환 및 후대 식물체의 선발	
	제 2 절 형질전환체의 분자생물학적 특성	
	제 3 절 형질전환체의 농업형질 분석	
	제 4 절 고품질 신품종 후보 선발	
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	39
	제 1 절 기술개발 목표	
	제 2 절 연도별 주요개발 목표 달성도	
	제 3 절 관련분야에의 기여도	
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	42
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	43
제 7 장	참고문헌	44

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적 및 필요성

가. 연구개발의 목적

- 이차대사산물 생합성 관련 유전자, 세포벽 대사에 관여하는 유전자, 과실의 향산화물질 생성에 관여하는 유전자 이용한 멜론 형질전환을 통해 고품질의 식물 품종 육성
- 멜론 형질전환체의 분자생물학적 분석을 통한 기능분석
- 과실품질관련 유전자를 이용한 형질전환체의 유망계통 선발 및 증식
- 유망 계통의 GMO 품종 등록

나. 연구개발의 필요성

(1) 연구개발 기술의 경제적·산업적 필요성

- 국내외 원예산업은 주로 생산량 증대를 위한 연구가 꾸준히 진행되어 왔으나, 농산물의 시장이 개방되고, 사회 경제적으로 국민의 생활수준이 향상되면서 양적인 면보다는 질적인 면이 강조되고 있는 오늘날에는 생산위주의 영농에서 탈피하고, 고품질의 과실 생산을 위한 연구 개발이 필요
- 일반적으로 과실의 품질은 외관, 무게, 색, 당도, texture 등에 의해 좌우되며 이중에서 과실의 색은 시각적인 맛을 증대시키며, texture는 과실의 익은 정도와 저작감을 결정하는 매우 중요한 인자
- 박과 채소는 비타민, 미네랄, 항산화효소, 섬유소를 포함하는 유용한 식물체이기 때문에 고품질의 박과 과실의 생산에 대한 연구는 소비자뿐만 아니라 과실의 상업적 손실을 줄임으로써 생산자에게도 중요
- 특히 과실의 수확 후 손실을 줄일 수 있는 주요 방법은 과실의 연화시기를 조절함으로써 가능. 한편 다양한 유전자를 도입하여 항산화활성, 노화억제활성, 콜레스테롤 저하활성 등 다양한 생리활성이 우수할 뿐만 아니라 변형된 과색을 나타내어 상품적 가치를 높이기 위한 연구가 활발히 진행되고 있음
- 박과 채소 중 멜론은 전형적인 climateric type의 과실로서 ripening에 관한 연구 모델로 활용되었으며, 특히 과실 호흡의 일시적인 증가와 에틸렌의 생성이 급증하며 전분이 분해되어 sucrose로 변하면서 과육의 당도가 단시일만에 급증
- 이시기에 과육의 경도 또한 급격히 감소하고 있어 세포벽의 구조상의 변화가 활발히 진행

되고 세포벽의 분해에 관여하는 효소의 유전자를 식물형질전환을 통하여 그 발현을 조절함으로써 과육연화를 지연시키거나 저장성 및 수송성의 향상을 도모할 수 있음

- 멜론 중 'Charentais'는 유럽이 원산지로서 수확 후, 이틀 만에 ethylene climacteric 및 과육의 연화가 진행되면서 상품성을 잃게 되는 품종
- 따라서 이 품종은 토마토나 사과와는 달리 단기간에 ripening에 관련된 생리의 변화 및 이에 수반되는 유전자들의 발현 기작 등을 연구할 수 있는 모델로 사용되고 있음
- 현재 과실 성숙 시기를 조절하기 위해 다양한 화학적 및 생물적 제제(agent)가 사용되고 있다. 이러한 과실 성숙 시기를 조절하는 제제들은 다양한 목적으로 사용
- 한 가지 목적은 과실의 성숙을 촉진하여 수확시기를 단축하거나 또는 경작지에서 과실의 효과적인 수확을 돕기 위해 과실의 성숙시기를 일치시키는 것이고 다른 목적은 낙과를 방지하여 적합한 성숙시기까지 과실이 식물에 남아있게 하는 것임
- 과실 성숙을 조절하기 위해 이전에 사용한 몇 개의 제제들은 대부분이 합성 제제들로 이들 합성 제제들은 잠재적 독성과 발암성의 문제로 인해 사용이 금지되거나 제품에 대한 상업적 또는 소비자 저항으로 인해 그 사용이 급격히 감소
- 과실 성숙을 향상시키기 위해 현재 가장 많이 사용되고 있는 제제는 Rhone-Poulenc Ag. Co.(Research Triangel, NC, USA)의 에트렐(Ethrel)이란 상표명으로 시판되고 있는 합성 화합물, 에테폰(ethephon) 임
- 멜론 형질전환을 통해 과실의 성숙 시기를 조절하는 것은 식물을 이용한 산업화에 장점을 가지고 있음
- 기존에는 좋은 품질관계형질을 지닌 멜론을 제작하기 위해 다양한 교배를 통한 육종방법이 실시되었으나 이러한 육종방법은 많은 시간과 노동을 요구
- 따라서 과실의 연화 및 항산화와 관련된 유전자를 식물체에 형질전환을 통해 효과적으로 고품질의 상품을 얻을 수 있는 기술이 요구 됨

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내 기술개발 현황

- 멜론의 품질특성에 대한 국내연구는 과실에 축적되는 비환원당인 sucrose와 환원당인 fructose, glucose 등과 같은 가용성 당과 관련하여 유전에 관한 연구 (Kim et al., 1997), 품질관련 형질인 과피색, 과육색, ascorbic산에 대한 유전적 기초정보를 위한 연구가 수행되어왔음 (Kim et al., 1998)
- 본 과제의 연구원은 Biogreen21과제에서 멜론 과육연화에 관련되는 유전자의 형질전환에 관한 연구를 수행하였으며, 특히 'Charentais' 멜론의 형질전환을 성공시키고 형질전환 과실에서 과육의 연화가 지연됨을 확인

2. 세계적 수준

개념정립 단계	○	기업화 단계		기술 안정화 단계	
---------	---	--------	--	-----------	--

- 멜론은 전형적인 climateric 과실로서 ripening중에 수반되는 다양한 생리적인 변화에 관하여는 비교적 잘 알려져 있으며 특히 최근에는 과실의 ripening 중 과육의 연화를 초래하는 세포벽의 펙틴과 헤미셀룰로오스의 구조변화에 관한 분자생물학적 연구가 활발히 진행되었음 (Rose et al., 1998; Brummell and Harpster, 2001)
- 과육의 연화를 초래하는 효소들로는 expansin, polygalacturonases(PGs), xyloglucan endotransglycosylases (XETs) 등 많은 효소들이 관여하는 것으로 알려져 있음
- 이러한 과실의 연화와 관련된 특정유전자를 knock-out시킴으로 과실의 품질을 증대시키고 많은 상업적 가치를 높일 수 있다는 생각으로 다양한 식물에서 연구가 진행되고 있음 (Hamilton et al., 1990; Oeller et al., 1991)
- XET (xyloglucan endotransglycosylase)는 식물에 존재하는 자일로글루칸 사슬을 절단하고 다시 결합시켜 식물 세포가 신장되도록 식물 세포벽을 느슨하게 하는 효소로서 알려져 있고 (Rose et al., 2002), XET는 식물의 형태를 조절하는데 사용된 바 있음 (유럽특허 제 EP562836호)
- 이러한 XET는 양배추(cauliflower), 토마토, 오이, 애기장대, 유럽너도밤나무 등에서 분리되었으며, 키위과실의 성숙 동안에 활성이 증가되는 것이 보고되었음 (Redgwell and Fry, 1993).
- 그러나 현재까지 XET가 멜론 과실의 성숙을 조절한다고 보고 된 바 없고 익스펜신

(expansin)은 세포벽의 신장을 위한 가장 중요한 인자로 여겨지고 있음 (Rose et al., 1997)

- 익스펜신은 셀룰로오스 미세섬유 (microfibril)와 매트릭스 폴리머 사이의 수소결합을 느슨하게 함으로써 세포벽의 변형(wall creep)을 야기하는 것으로 보고 (Keller and Cosgrove 1995; Cosgrove, 1997)
- 익스펜신 유전자는 최초로 클로닝된 이후(Shcherban et al., 1995) 다양한 식물 종으로부터 많은 종류의 유전자들이 동정되었으며 이들은 다중유전자 족 (multigene family)을 형성하는 것으로 알려져 있음 (Sampedro and Cosgrove, 2005)
- 익스펜신 유전자의 발현 패턴은 특히, 벼와 토마토를 대상으로 심도 있게 연구되었으며, 문헌에는 벼에서 세포벽 신장과 빠른 성장이 시작되기 전에 익스펜신 유전자 *OsEXP4*의 전사체 양이 증가한다고 보고 (Kende et al., 2004)
- 토마토에서 초기의 잎 원기가 발생하는 정단 분열조직 세포에서 익스펜신 유전자인 *LeEXP18*이 발현된다고 보고 (Reinhardt et al., 1998)
- 과실의 ripening을 유기하는 에틸렌 생합성에 관여하는 유전자 및 이들의 발현을 유기하는 기작의 구명에 관하여 분자수준의 연구가 활발히 진행되고 있음
- 식물 세포내 신호전달과정을 구명함에 있어서 에틸렌이 세포에 결합한 신호의 전달에 관여하는 유전자들에 관한 연구가 진행되고 있으나, 이러한 기초실험들은 대부분 모델 식물인 애기장대를 사용하고 있어 과실에 적용하기 위한 연구가 추가적으로 진행되어야 할 필요가 있음

3. 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
원예연구소	MPG와 ME에 대한 멜론 형질전환체 개발	해당사항 없음

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 형질전환 및 후대 식물체의 선발

1. 형질전환

- 과실 품질관련 유전자로 멜론 (*Cucumis melo*)의 transcription factor인 CmMyb1과 2, xyloglucan endoglucantransferase (CmXET), expansin 그리고 superoxide dismutase (CmSOD) 등을 이용하여 과발현 (sense) 및 RNAi 식물형질전환용 벡터를 제작하였음
- 형질전환용 벡터는 *Agrobacterium*-mediated transformation 방법으로 멜론 형질전환을 실시한 후 PCR 및 southern blot으로 확인하여 형질전환체를 선발 (Fig. 1)
- 형질전환 식물체는 외부유전자 삽입 여부가 확인된 것만을 선발하여 T1 식물체를 육성하고, T2 및 T3 세대를 확보하면서 과실의 품질관련 농업형질을 분석하였음

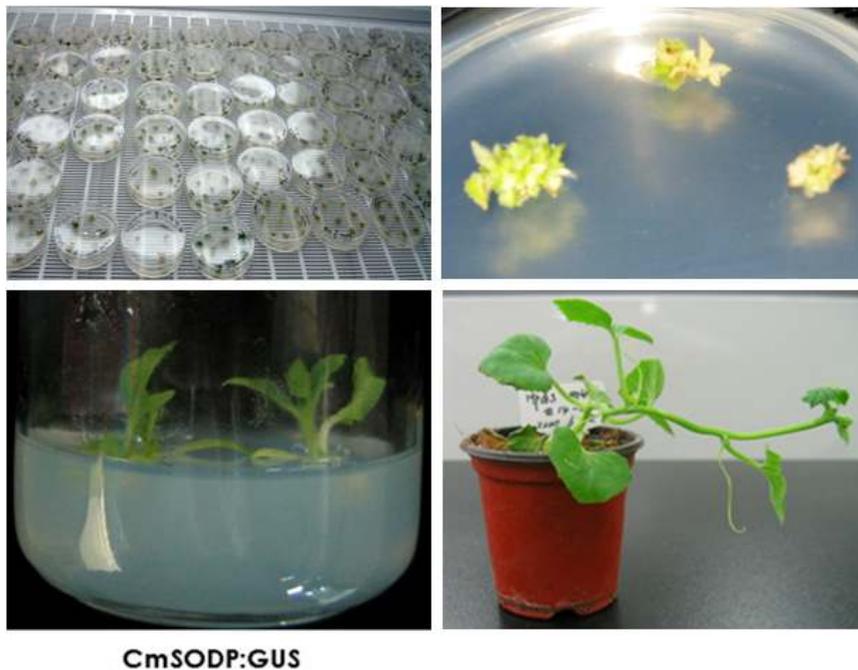


Figure 1. Transformation of melon by gene associated with quality of fruit (CmSOD). A; explants co-cultivation with *Agrobacterium*, B; callus induced by transformation, C; regeneration plant, D; transgenic plant after hardening.

2. 과실품질관련 유전자 CmMyb1, 2의 유전자를 이용한 멜론 형질전환체 개발

- CmMyb1(*Cucumis melo Myb1*)과 CmMyb2 유전자를 이용한 멜론 형질전환체의 개발을 위하여 여러 가지 vector (pCAMBIA2300(35S/NOS)::CmMyb1(over-expression, S),

CmMyb1 (RNAi, AS), pCAMBIA3300 (35S/NOS):: CmMyb1(S), CmMyb1RNAi 그리고 CmMyb2(S), CmMyb2RNAi)를 제작하였음

- CmMyb 1의 경우, pCAMBIA2300 (35S/NOS)::CmMyb1(AS), CmMyb1(S)와 pCAMBIA3300 (35S/NOS): CmMyb1(S), CmMyb1 RNAi로 형질전환된 식물체를 총 24 개를 선발하였음
- CmMyb2의 경우, pCAMBIA3300 (35S/NOS)::CmMyb2(S)에서 12개체, CmMyb2 RNAi에서 14개체를 확보하여 후대 검정을 실시하였음

3. CmXET (*Cucumis melo* Xyloglucan endoglucantransferase) 유전자를 이용한 멜론 형질 전환체 개발

- CmXET 유전자를 이용하여 멜론 형질전환을 위하여 pCAMBIA3300 (35S/NOS):: CmXETRNAi와 35S promoter 대신에 멜론 과실에서 특이적으로 발현이 되는 CmCP(*C. melo* Cucumisin promoter)를 포함하는 pCAMBIA3300 (CmCP/NOS)::CmXETRNAi를 제작
- pCAMBIA3300 (35S/NOS)::CmXETRNAi를 이용하여 형질전환 후 후대 개체를 확보한 것은 모두 에서 12개체임
- Cucumisin promoter를 이용한 멜론 형질전환체는 35S promoter를 이용한 형질전환체보다 초기 형질전환체의 유도가 다소 늦게 진행되었으나, 최종 9개체에서 외부유전자 삽입이 확인되었음

4. CmSOD (*Cucumis melo* Superoxide dismutase) 유전자를 이용한 멜론 형질전환체 개발

- 식물형질전환용 벡터, pCAMBIA3300(35S/NOS)에 CmSOD(S)와 CmSODRNAi를 클로닝하여 *Agrobacterium* LBA4404에 형질전환을 실시한 후, PCR 증폭을 통해서 증폭된 산물을 확인
- pCAMBIA3300(35S/NOS)::CmSOD(S)와 pCAMBIA3300(35S/NOS)::CmSODRNAi로 형질 전환된 *Agrobacterium* LBA4404를 이용하여 멜론의 형질전환을 실시한 결과, pCAMBIA3300(35S/NOS)::CmSOD(S)에서 8개체, pCAMBIA3300(35S/NOS):: CmSOD RNAi는 14개체의 형질전환체를 확보하였음
- 형질전환체는 과실을 수확하여 GMO 품종 등록을 위한 기본요소인 균일성, 우수성 등을 판단하기 위하여 온실에서 재배하면서 과실의 품질관련 농업형질을 조사하였음

제 2 절 형질전환체의 분자생물학적 특성

1. CmMyb1과 2로 형질전환된 식물체의 분자생물학적 특성 분석

- CmMyb1과 2 sense 및 RNAi constructs로 형질전환된 식물체로부터 RNA를 분리하여 유전자 발현 양상을 분석하였고, 그 유전자의 발현 양상이 가장 높은 것과 가장 낮은 것을 각각 1차 후보군으로 선발하였음
- CmMyb1의 경우 형질전환체를 PCR (Fig. 2)과 southern blot을 통하여 확인하였고 이들 식물체들은 후대 검정을 위하여 포장에 재배하여 채종하였음

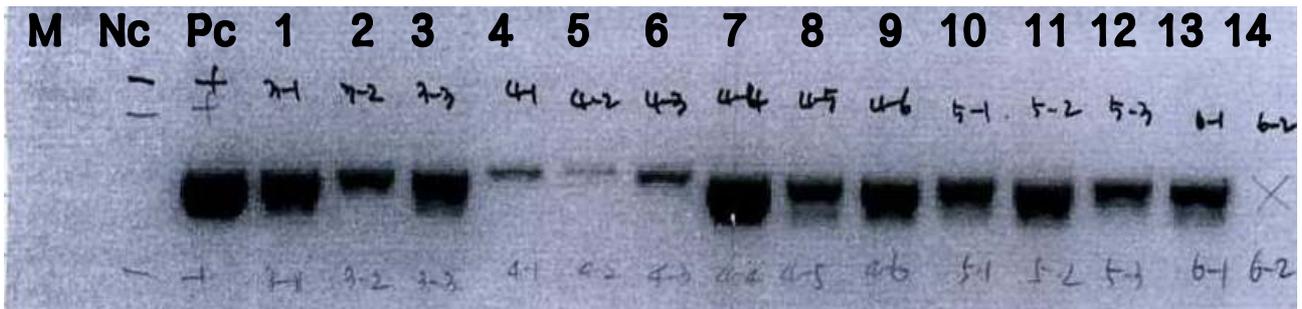


Figure 2. Confirmation of *C. melo* plants transformed by CmMyb1RNAi using Myb1-specific primer. Pc: Positive control, Nc: Negative control, Lane1-14: Transgenic plants (T2 generation)

- Myb1의 localization과 과실 발달단계에 따른 발현양상을 분석하기 위해 CmMyb1 promoter region을 분리하여 담배에 형질전환한 후 GUS assay를 실시
- CmMyb1 upstream region을 확보하기 위하여 CmMyb1의 5' coding region으로부터 primer를 제작하여 genomic DNA (gDNA)를 주형으로 증폭된 산물을 pGEMT-easy vector에 클로닝한 후, sequencing을 통해 CmMyb1의 upstream region을 확인
- CmMyb1 promoter 부위를 *Hind*III와 *Bam*HI 제한효소인식부위를 포함하는 primer를 제작하여 증폭한 후, pCAMBIA2300(GUS/NOS)에 클로닝
- CmXET와 CmSOD의 upstream region의 확보 및 클로닝도 CmMyb1 promoter cloning과 같은 방법으로 수행하여 확보하였음
- pCAMBIA2300(CmMyb1P/ NOS)::GUS로 형질전환된 *Agrobacterium* LBA4404를 이용하여 담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Xanti)에 형질전환하여 이들 식물체의 잎으로부터 histochemical GUS assay를 실시한 결과, 잎에서는 CmMyb1 gene이 발현되지 않음을 확인 (Fig. 3)

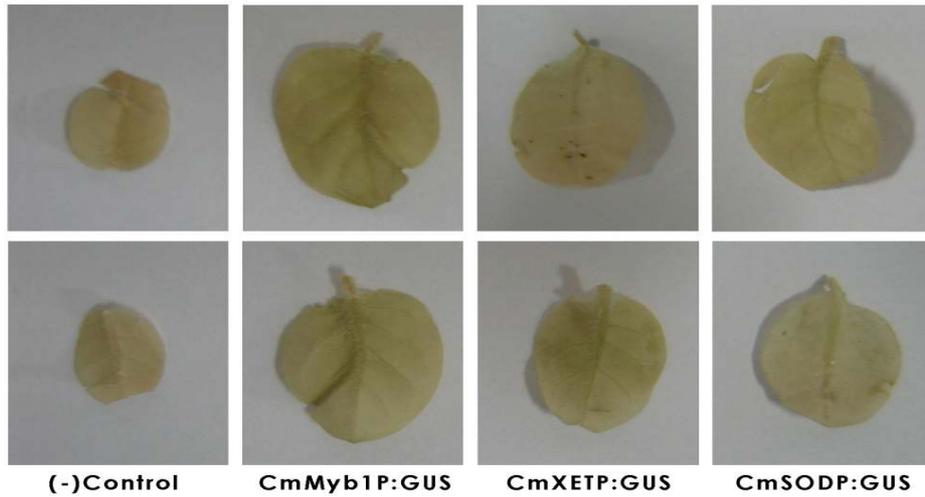


Figure 3. Histochemical GUS assay from leaf transformed by pCAMBIA2300(CmMyb1P/NOS)::GUS, pCAMBIA2300(CmXETP/NOS)::GUS, and pCAMBIA2300(CmSODP/NOS)::GUS

- CmMyb1과 CmMyb2 유전자의 기능을 이해하기 위하여 yeast two-hybrid를 통해 상호작용 유전자를 확인하였음
- Yeast two hybrid 방법에 사용된 라이브러리는 Arabidopsis에서 일차 선발을 위하여 실험을 수행한 결과 CmMyb1과 상호작용하는 유전자는 밝혀지지 않았으나 CmMyb2와 상호작용하는 유전자는 chitinase로 밝혀졌음 (Fig. 4)

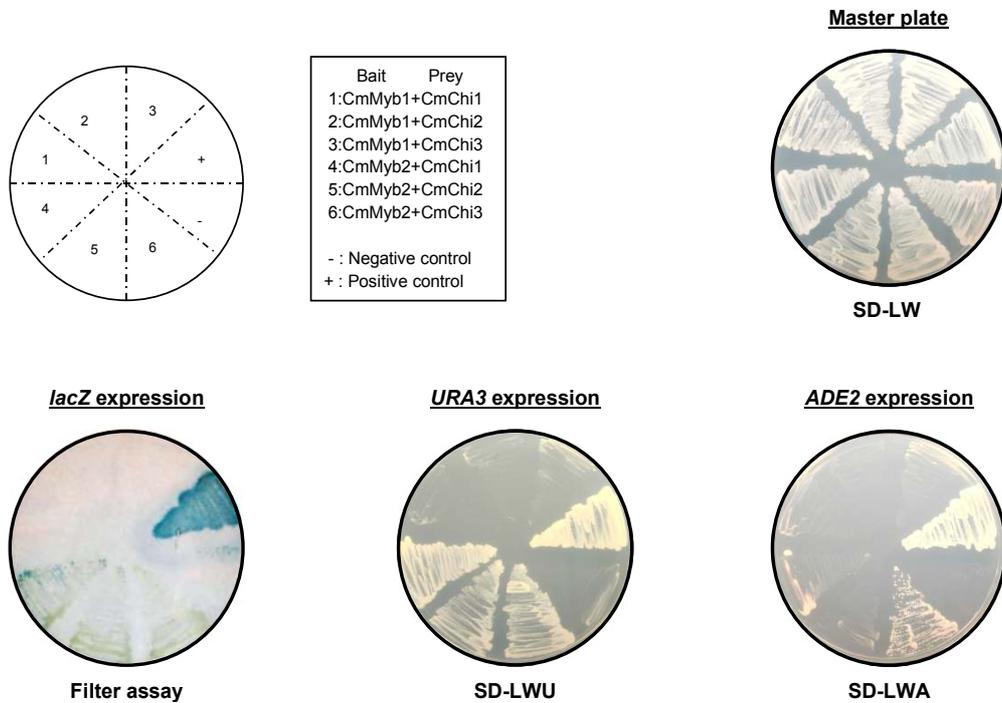


Figure 4. Yeast two-hybridization with CmMyb1 and CmMyb2 using library of Arabidopsis. The Myb2 interact with chitinase 3.

- 과실의 발달과정에 따른 CmMyb의 발현을 조사한 결과, Myb1은 과실의 발달초기에 높게 발현된 후 과실이 성숙함에 따라 점차 감소하는 경향을 나타낸 반면 Myb2는 과실발달 초기에만 발현되었음 (Fig. 5)
- 이러한 발현양상은 Myb1과 Myb2가 모두 과실의 발달에 관여하지만, Myb2는 과실의 성숙 또는 후숙에 관여하는 downstream 유전자를 활성화시킴으로써 과실의 발달에 관여하는 것으로 판단됨

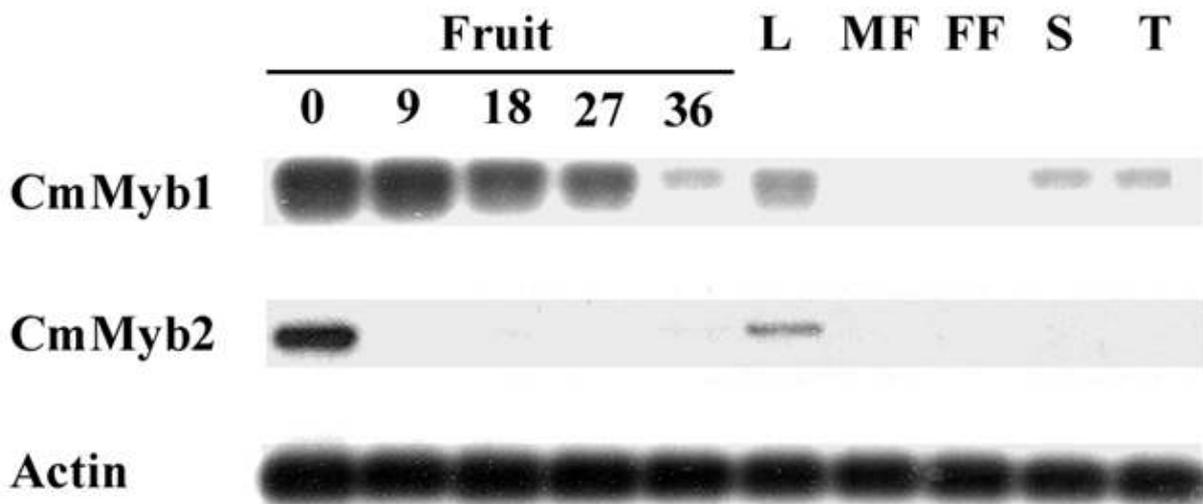


Figure 5. Expression of the CmMyb1 and the CmMyb2 in male flower (MF), female flower (FM), stem (S) and tendril (T). Both of Myb1 and 2 shows highly expression at the early stage of development of fruit but Myb2 was only expressed right after pollination.

2. CmXET (*Cucumis melo* Xyloglucan EndoglucanTransferase) 형질전환체의 분자생물학적 특성 분석

- CmXET유전자로 형질전환된 식물체의 후대에서 관련 유전자의 발현양상을 분석한 결과 PG의 유전자 발현이 현격히 줄어 있음을 알 수 있었음.
- 각각의 construct를 이용한 형질전환체를 개발하였으며, 이들 식물체는 Southern Blot을 통해 형질전환여부를 확인 (Fig. 6)

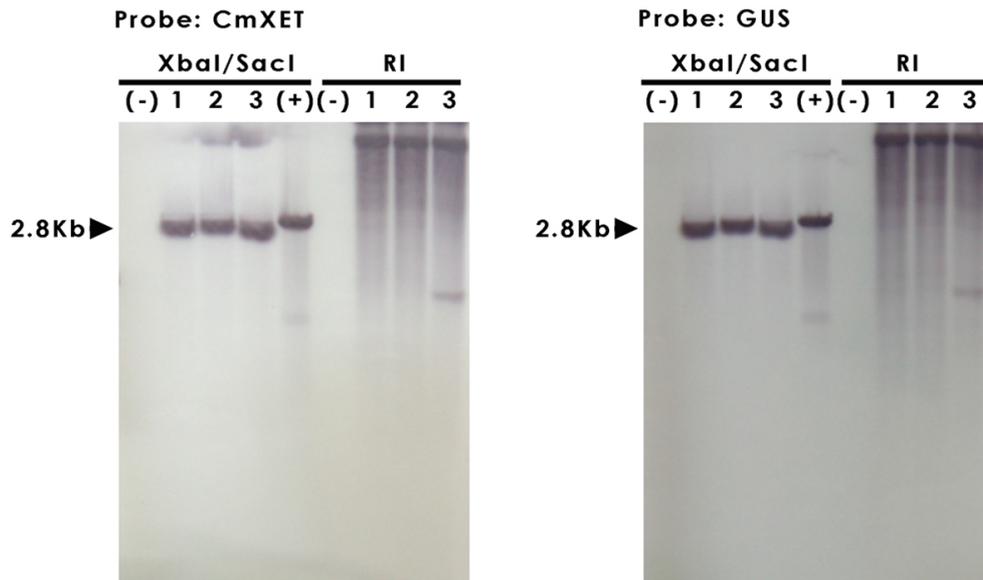


Figure 6. Southern hybridization of *C. melo* plants transformed by pCAMBIA3300 (35S/NOS)::CmXETRNAi using CmXET- and GUS-specific probe

- Southern blot을 통하여 형질전환체임이 확인된 식물체의 과실을 수확하여 후대 식물체를 kanamycin이 들어 있는 배지에서 선발
- 후대를 확보한 것은 이들 식물체로부터 외부 유전자의 삽입이 homozygote한 식물체를 다시 선발한 뒤 과실을 수확하여 후대에서 PCR을 통하여 외부 유전자의 삽입 여부를 확인 (Fig. 7)

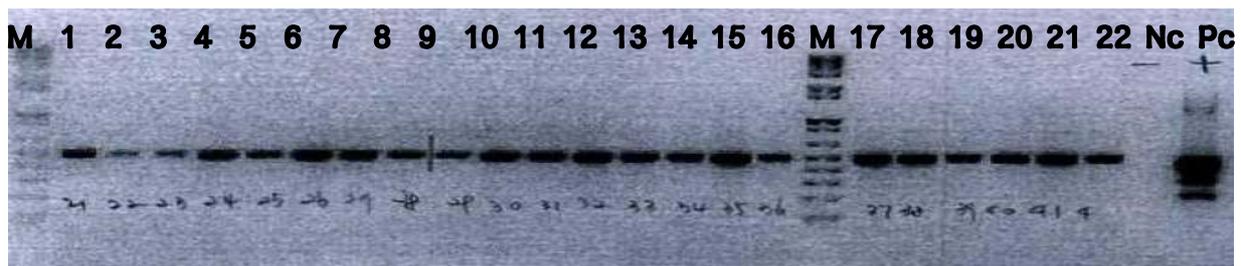


Figure 7. PCR amplification of *C. melo* transformation by pCAMBIA3300 (35S/NOS)::CmXETRNAi (T2 generation). Pc: Positive control, Nc: Negative control, Lane1-14: transgenic plants

3. CmSOD (*Cucumis melo* Superoxide Dismutase) 형질전환체의 분자생물학적 특성분석

- pCAMBIA3300(35S/NOS)::CmSOD(S)와 pCAMBIA3300(35S/NOS)::CmSOD RNAi로 형질전환된 개체의 후대를 외부 삽입유전자와 CmSOD를 이용하여 PCR을 실시한 결과 외부 유전자의 삽입을 확인 (Fig. 8)

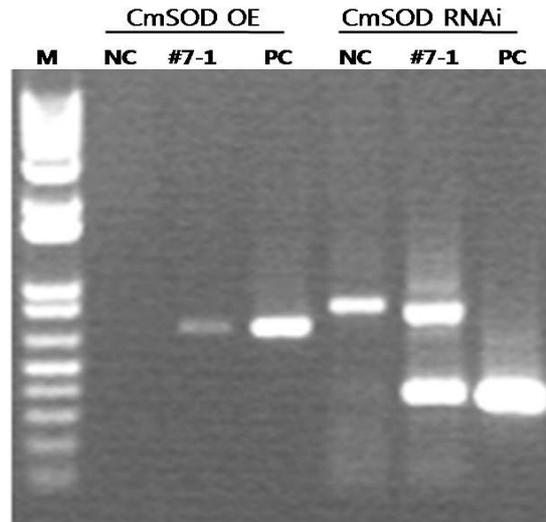


Figure 8. PCR amplification of *C. melo* transformation of pCAMBIA3300 (35S/NOS)::CmSOD(S)와 CmSODRNAi (T2 generation). Pc: Positive control, Nc: Negative control, 7-1: transgenic plants

- CmSOD upstream region을 분리하기 위해 메론 genomic DNA를 주형으로 genome walking을 통해 promoter region을 분리하고 CmSOD의 promoter region의 sequence에 분포되어있는 motif를 분석 (Table 1)
- CmSOD의 promoter region에는 5종류의 transcription factor가 분포하고 있으며 이중 활성화 산소에 반응하는 as1/ocs motif와 ethylene responsive element 그리고 Myb type transcription factor motif가 확인
- 특히, as1/ocs motif는 활성화 산소의 quenching 및 scavenging 유전자 발현과 관련이 있음을 고려할 때, CmSOD 형질전환체에서 생육저조와 미숙종자 생산은 활성화 산소종과 밀접한 관련이 있을 것으로 판단

Table 1. The motif analysis of the promoter region of the CmSOD

Name of cis-element	Type of transcription factor	Database Annotation
TGAC	as1/ocs	Hydrogen peroxide responsive elements
TTCAA	bZIP, TGA-type	Tomato ethylene responsive elements
TTTTTC	GA Myb	Barley pyrimidine-box for GA induction
ACCT	Myb-like	Myb responsive elements
AGGAGATC	Myb2	Tobacco wound responsive elements

제 3 절 형질전환체의 농업형질 분석

1. 후대검정을 위한 형질전환 식물체의 재배

- 본 과제의 1차년도부터 확보된 형질전환체로부터 수확한 T2, T3 세대의 종자의 생육조사를 위하여 (주)에프앤피의 GMO 품종 재배 비닐하우스 (Fig. 9, 10)에서 재배하여 각 형질전환체의 재배적 특성과 생리적 특성을 조사하였으며 후대 검정을 위한 종자를 확보를 위해 과실을 채종하여 종자를 확보



Figure 9. Greenhouse for cultivation of genetically modified organism at the FnP Co., Ltd.



Figure 10. Cultivation of the transgenic melon for the evaluation of the generations

- 각각의 형질전환체에서 채종한 종자는 채종용기에 넣어 (주)에프앤피의 LMO 종자대장에 등재하고 냉암소의 종자보관실에 보관하면서 후대 검정에 사용하였음

- 후대검정을 통해 우수한 품종을 선발하기 위해 7개의 벡터로부터 확보한 34개 라인 총 1,103 개체의 형질전환체를 Table 2와 같이 정식하였으며, 제 2차 및 3차년도에 따라 과실의 후숙 지연에 따른 저장성이 우수한 라인을 선별하기 위해 발달단계에 따라 엽록소 함량을 분석한 후, 최종라인을 선별하여 과실의 품질관련 농업형질을 조사하여 최종 품종을 선발
- 형질전환체는 3월 말에 가온하우스에 파종한 후, 5월 초에 재배하우스에 60Cm 간격으로 정식 하여 세워키우기로 일반 멜론 재배법에 따라 재배하였음
- 개화된 식물체는 인공교배를 실시하여, 농업형질 분석용 개체는 2~3개, 착과능력 검정용 개체는 4~5개의 열매를 착과시켰음
- 재배중인 34개 라인의 형질전환체 중 2차년도 결과에서 1차 후보로 선발된 8개 라인의 엽록소 함량변화와 착과, 생육상태에 따라서 최종적으로 5개의 라인을 선발하여 과실품질관련 농업형질을 분석하였음

Table 2. The list of planting of the transgenic melon for the evaluation of generation in this project.

온실	Line	식물체	정식수	1차후보/최종후보
1동	1	Myb1 OE 1-5	24	선발/선발
		Myb1 OE 1-9	25	
		Myb1 OE 1-11	24	
		Myb1 RNAi 2-2	20	
		Myb1 RNAi 2-7	11	
		Myb1 RNAi 2-18	14	선발/선발
	2	Myb2 OE 3-7	28	선발/선발
		Myb2 OE 3-12	26	선발/도태
		Myb2 OE 3-15	34	
		Control	17	
		Myb1 RNAi 2-18	15	선발/선발
	3	CmSOD 19-2	19	
		CmSOD 19-1-2	32	
		CmSOD 9-3-1	22	
		CmSOD 15-2	31	
		CmSOD 3-3-3	14	
		Control	12	

온실	Line	식물체	정식수	비고
2동	1L	CmXET 5-1-3	43	
		CmXET 5-1-18	40	
		CmXET 5-1	39	
	1R	CmXET 5-3-14	41	선발/선발
		CmXET 5-3-21	43	
		CmXET 5-3-32	39	
	2L	CmME RNAi 9-1-11	43	
		CmME RNAi 9-1-23	43	
		CmME RNAi 9-1-27	37	
	2R	CmME RNAi 9-3-28	43	
		CmME RNAi 9-5-7	38	
		CmME RNAi 9-5-12	40	
		CmME RNAi 9-1-27	3	
	3L	Myb2 RNAi 6-1	41	선발/선발
		Myb2 RNAi 6-18	36	선발/도태
		Myb2 RNAi 6-11	39	선발/도태
		CmXET 5-3-32	3	
		Control	2	
	3R	Myb2 RNAi 7-15	40	
		Myb2 RNAi 11-10	38	
		Myb2 RNAi 12-6	39	
		Control	5	

2. 형질전환 식물체에서 과실품질관련 농업형질 분석

가. 형질전환체의 엽록소 함량 분석

- 형질전환체로부터 엽록소 함량 측정을 위한 시료는 정식 후, 20일부터 15일 간격으로 3회 채취 하였으며, 각 회의 시료는 0.5mm² 잎 3장을 3곳에서 채취하였음
- 엽록소 함량을 분석하기 위해 각각의 잎 disk를 1ml 70% MeOH에 overnight 후 원심분리하여 상등액을 취해 UV/Vis-Spectrophotometer에서 흡광도를 측정하였음
- 엽록소 함량은 Lichtenthaler (1987)의 방법에 따라 측정된 값을 잎의 단위면적 (Cm²)으로 환

산하였음

$$\text{Chlorophyll a} = 0.01261 * A661 - 0.001023 * A534 - 0.00022 * A643$$

$$\text{Chlorophyll b} = 0.02255 * A643 - 0.00439 * A534 - 0.004488 * A661$$

- 형질전환체의 엽록소 함량변화를 측정한 결과, 과실의 후숙과 밀접한 연관이 있음이 2차년도 결과와 같이 3차년도에서도 확인되었음 (Fig. 11)
- Myb2 RNAi 형질전환체의 경우, 엽록소 함량이 발달 단계가 진행되어도 매우 안정화되어 있음이 확인되었으며, overexpression 형질전환체와 대조구에서는 식물체가 노화되어 감에 따라 엽록소 함량의 감소를 보였음
- 이와 같은 엽록소 파괴의 지연은 식물체의 탄소동화작용 기간의 증가로 과실의 발달에 영향을 주는 것으로 판단되며, 과실의 품질 및 발달 관련 유전자 (특히 Myb2)의 RNAi 형질전환체에서 엽록소 함량의 안정화와 과실의 후숙이 지연되고 영양 성장기간을 연장시킬 수 있음을 제시함

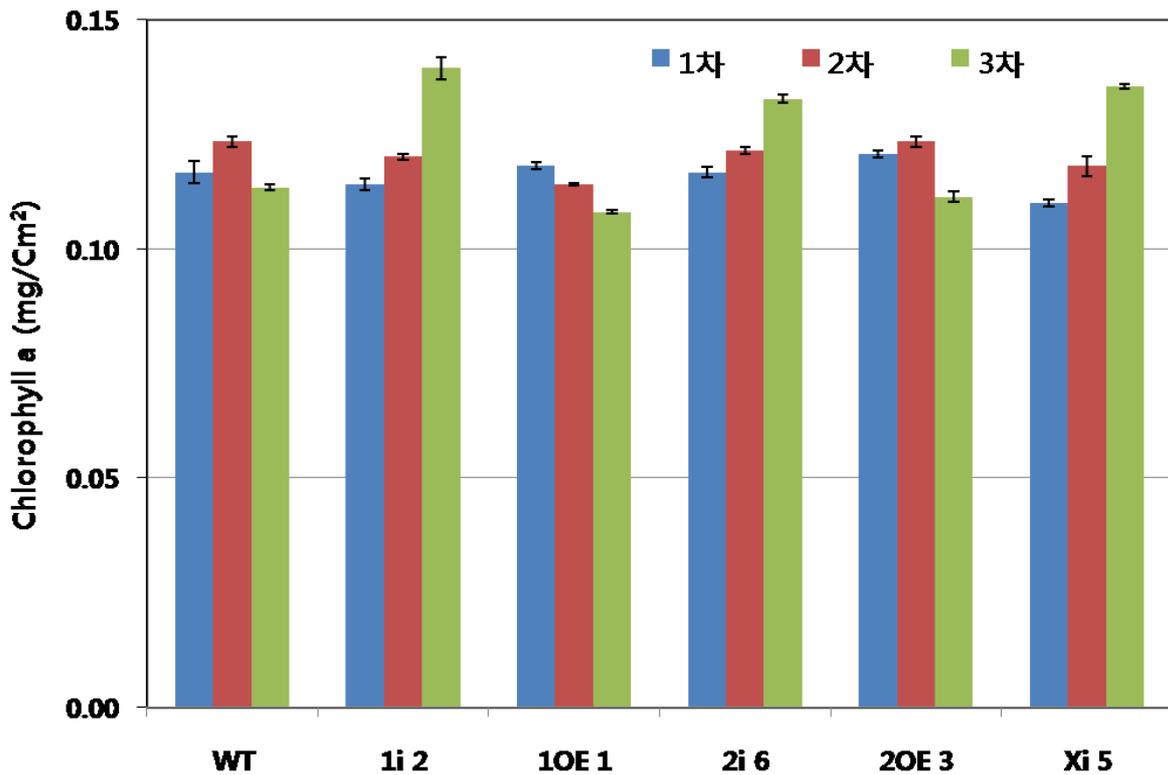


Figure 11. The content of chlorophyll according to the stage of development at each transgenic plants. The overexpression plants shown decrease of chlorophyll at late developmental stage, whereas RNAi plants were delayed decomposition of chlorophyll.

- 따라서 Myb2 RNAi 라인의 농업형질적 특성은 과실의 저장성 개선 및 수송기간의 연장 등 품질 개선 뿐만아니라 생물량 증가에 매우 유용하게 이용될 것으로 판단됨

나. 형질전환체의 과실 성숙과정

- 각 형질전환체의 과실의 후숙 정도, 과실의 크기, 착과의 수 등을 측정하여 고품질 및 기능성 계통을 선발하기 위해 각 형질전환체의 원예형질을 분석
- CmMyb1(S)의 경우 완전히 과실이 숙성되지 않았음에도 이층형성이 빨리 이루어져 조기 낙과 현상이 나타났음 (Fig. 12)

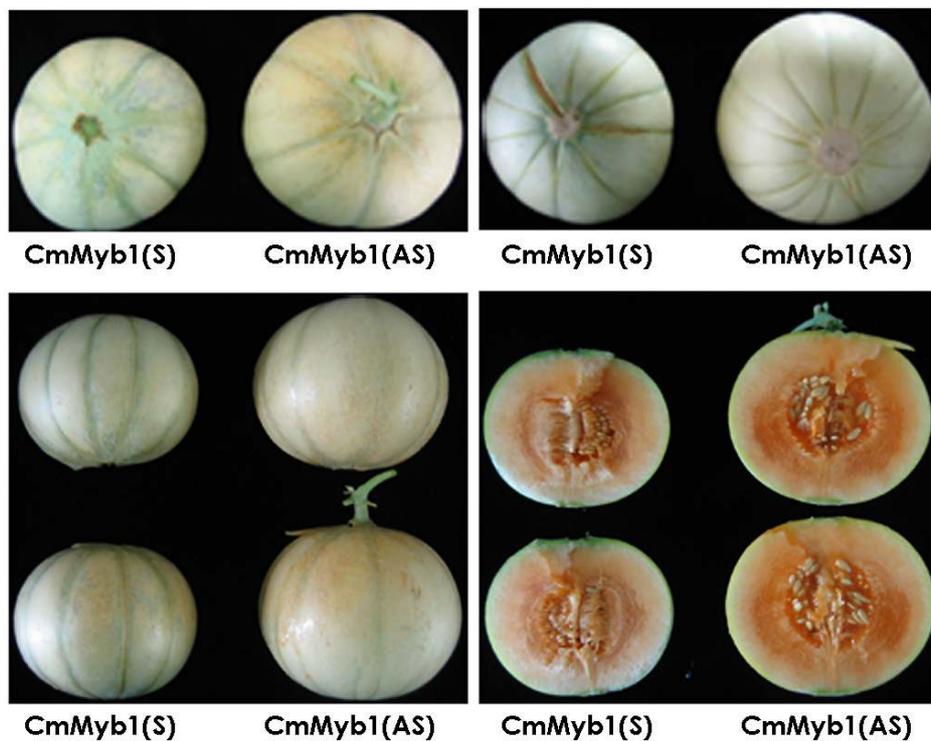


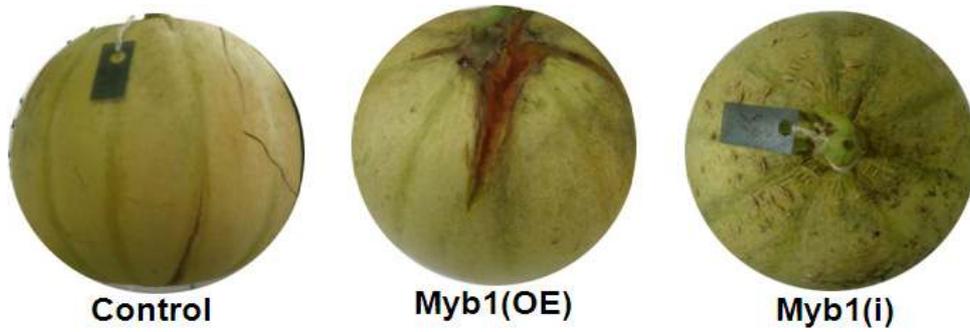
Figure 12. *C. melo* fruit transformed by overexpression of pCAMBIA2300(35S/NOS)::CmMyb1(S) and knockdown of CmMyb1(AS).

- Myb1 유전자의 overexpression과 RNAi 형질전환체의 특징은 overexpression 형질전환체의 경우 과실의 후숙이 대조구에 비해 빠르게 진행되었으며, 수정 후 35일째 (DAP)부터 낙과가 시작되고 과실의 표면이 갈라지는 열과현상이 나타났음 (Fig. 13B, C). 반면에 RNAi 형질전환체는 수정 후 40일째 (DAP40) 까지도 낙과나 열과나 현상이 나타나지 않아 후숙이 진행이 지연되고 있음이 확인 (Fig. 13B, C)

A)



B)



C)

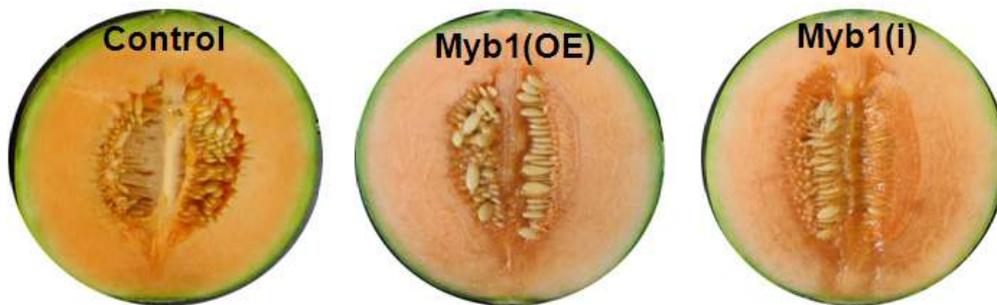


Figure 13. The characterization of transgenic plant transformed by Myb1. A) Transgenic melon growth in the GMO greenhouse, B) and C) ripening difference between the overexpression and the knockdown of Myb1

- 이와 같은 조기낙과는 CmMyb1가 abscission zone형성에 관여하는 유전자의 조절기능을 가지고 있기 때문으로 판단됨
- Myb1 overexpression 라인의 조기 낙과는 본 연구의 1~3차년도에서 획득한 결과에서 모두 동일하게 나타났으며, 후숙이 진행됨에 따라 Myb1의 발현이 점차 감소하는 경향으로 볼 때 (Fig. 5), Myb1 유전자는 과실의 후숙을 촉진하는 downstream의 유전자를 활성화하여 과실의 후숙을 유도하는 것임을 알 수 있음
- 과실의 후숙과 관련된 또 다른 유전자인 Myb2 유전자 형질전환체의 후대검정 결과는 그림 5와 같이 Myb2 유전자의 overexpression과 RNAi 형질전환체의 원예적 특징은 Myb1과 유사하게 나타났음
- Overexpression 형질전환체의 경우 과실의 후숙이 대조구에 비해 빠르게 진행되었으며, 수정후 35일째 (DAP)부터 낙과가 시작되고 과실의 표면이 갈라지는 열과현상이 나타났음 (Fig. 14B, C)
- 특히, 낙과 및 열과현상이 Myb1에 비해 빠르게 진행된 반면 knockdown 형질전환체는 수정 후 45-50일째 (DAP40) 까지도 낙과나 열과나 현상이 나타나지 않아 후숙이 진행이 지연되고 있음이 확인 (Fig. 14B, C)
- 이러한 결과는 Myb1 유전자의 RNAi 형질전환체와 유사하였으나, Myb2 유전자가 과실의 후숙과정에 보다 밀접하게 관련되어 있음을 제시하는 결과임
- 또한 Myb2 knockdown 형질전환체는 개체당 4~5개의 과실이 착과되도 과실의 크기에는 영향이 없었음 (Fig. 15)
- Myb 유전자 형질전환체의 과실 발달에 미치는 영향을 종합해 볼 때, 과실의 후숙과정에서 Myb1 과 2 유전자는 과실의 후숙을 촉진하는 downstream의 유전자의 발현을 조절하는 upstream 인자로서 과실의 후숙을 조절하는 것으로 판단
- 특히, Myb2의 발현은 과실의 초기형성과정에서 transient하게 발현 (Fig. 5)되는 것으로 볼 때, 과실의 발달과 및 후숙을 조절하는 유전자의 발현을 조절하고 있음을 알 수 있으며, Myb 유전자의 발현을 조절하여 과실의 발달과 후숙을 조절함으로써, 고품질 과실과 저장성이 높은 품종을 육성할 수 있을 것으로 판단됨
- CmXETRNAi에 대한 형질전환체의 과실과 비형질전환체와 과실의 생육차이를 교배 후 15일 이후 5일 간격으로 사진촬영과 함께 조사
- 대조구 (wild type)의 경우 교배 후 35일이 경과하면서 후숙이 빠르게 진행되어 36일에 과실의 자연낙과가 이루어졌으나 CmXETRNAi로 형질전환된 식물체의 과실은 45일이 경과하여도 과색의 변화가 일어나지 않으며, 과실의 연화 또한 지연되는 것을 확인 (Fig. 16, 17).

A)



B)



C)

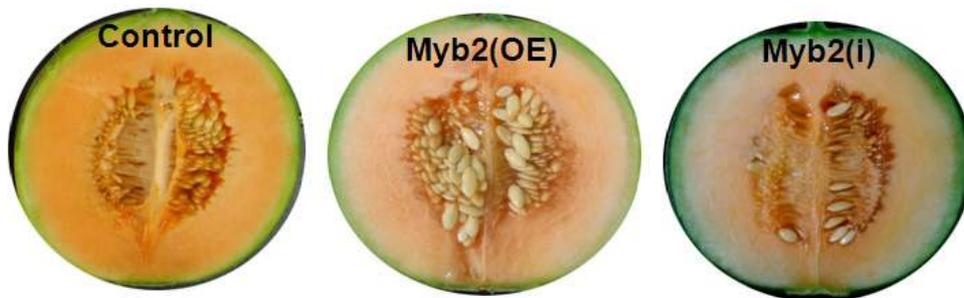


Figure 14. The characterization of transgenic plant transformed by Myb2. A) Transgenic melon growth in the GMO greenhouse, B) and C) ripening difference between the overexpression and the knockdown of Myb2. Myb2 knockdown transgenic plant shows delayed ripening compare to that of overexpression plants.



Figure 15. The melon transformed by Myb2 knockdown shows high-yield. The transgenic melon can bearing 4 or 5 fruits per plant

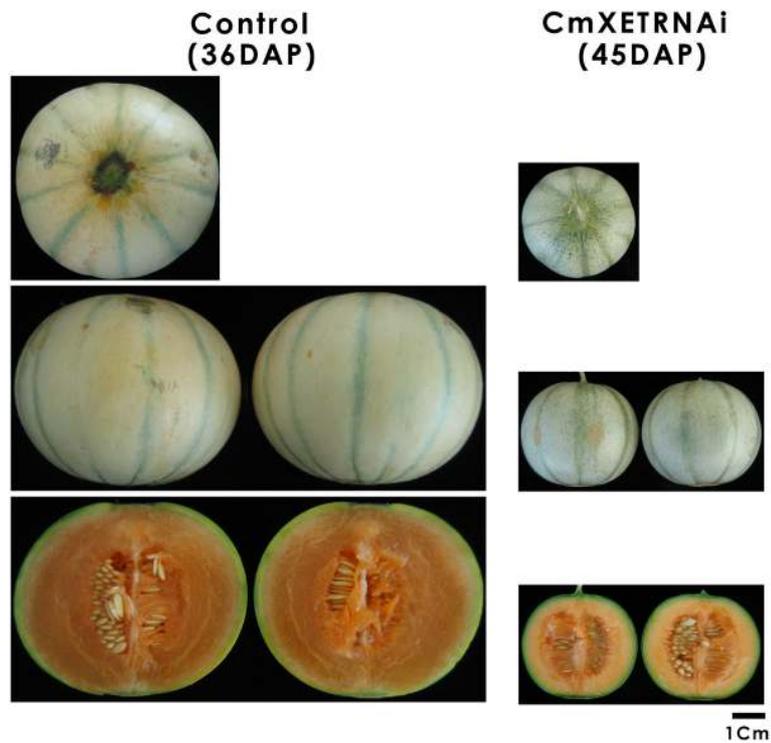
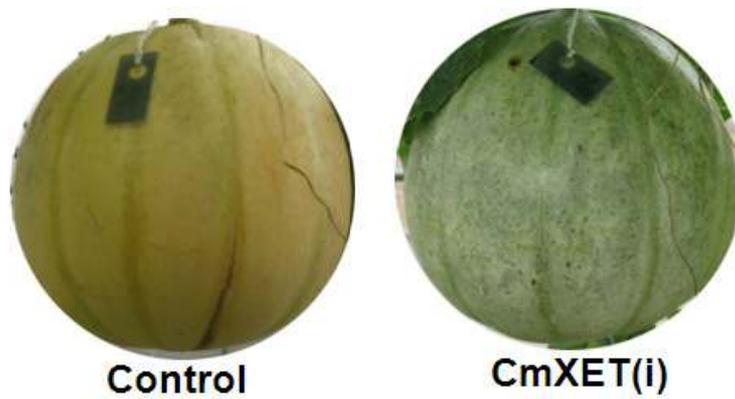


Figure 17. *C. melo* fruit transformed by pCAMBIA2300(35S/NOS):CmXETRNAi.

A)



B)



C)

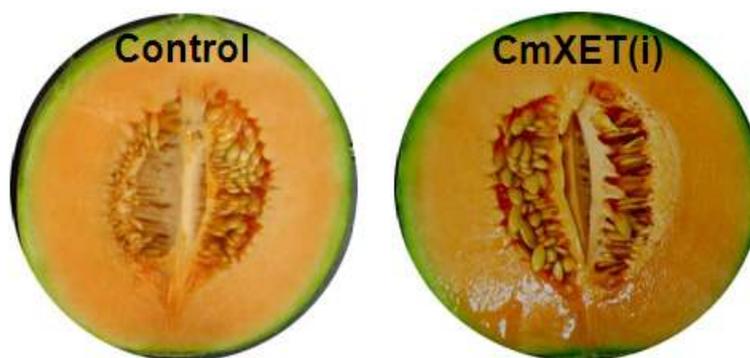


Figure 17. The characterization of transgenic plant transformed by xyloglucan endoglucantransferase (CmXET). A) Transgenic melon growth in the GMO greenhouse, B) and C) different ripening between the overexpression and the knockdown of CmXET.

- CmSOD(S) 유전자가 과발현되는 이들 형질전환체 (Fig. 18)에서는 대조구에 비해 형태적으로 큰 차이를 나타내 주지 않았으나 CmSODRNAi 형질전환체의 경우에는 과실성숙이 제대로 이루어지지 않았음
- 이러한 현상은 항산화효소의 결핍이 되면 과실의 성숙이 제대로 이루어지지 않는 것을 유추해 볼 수 있으며 이들 미성숙 종자로부터 후대 식물체를 확보하기 위하여 기배 배양을 실시
- 약 200립의 미성숙종자를 기내에서 발아를 유도하여 약 30개의 식물체를 확보할 수 있었으며 이들 식물체들 중 약 5개는 외부유전자가 삽입되어 있지 않았고 1개의 식물체는 순화과정 중에 고사
- 16개는 모두 정상적으로 과실이 수확되었으나 5개의 과실에서는 여전히 미성숙종자를 생산하였음

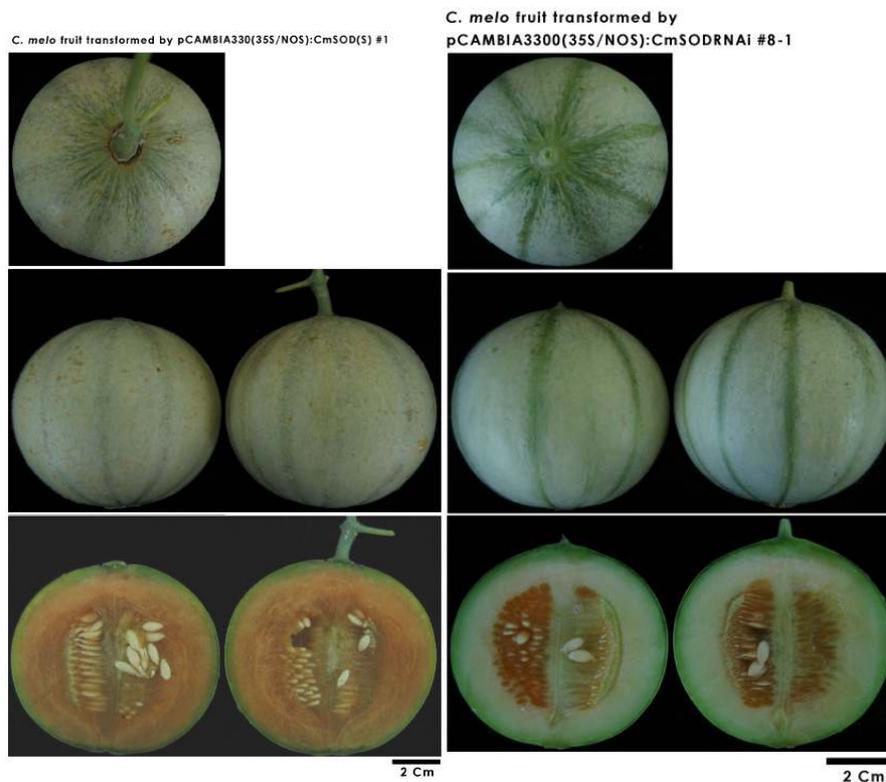


Figure 18. Fruit of melon transformed by pCAMBIA3300(35S/NOS): CmSOD(S) and SOD RNAi.

- 식물체의 물질대사과정 중에 생성되는 활성화 산소는 노화 및 각종 스트레스로 작용하여 세포의 사멸을 촉진하기 때문에 항산화 효소계를 이용하여 이들 활성화 산소를 효과적으로 제거한다면, 과실의 노화를 억제하여 품질을 개선할 수 있을 것으로 판단되어 superoxide dismutase (SOD)를 이용한 형질전환체를 선발

- CmSOD 형질전환체는 미숙종자를 생산하는 등 종자 발달 및 생육이 저조하여 고품질 과실 품종을 개발하는데 다른 유전자에 비해 효율적이지 못한 것으로 판단됨
- 이러한 이유는 멜론이 전형적인 climacteric 과실로 과실의 후숙에 활성화 산소에 의해 생성이 촉진되는 ethylene에 영향을 받기 때문으로 판단되며 또한 CmSOD RNAi 형질전환체는 활성화 산소의 과다 축적으로 유전자 발현 및 물질대사의 교란으로 종자 발달이 억제되기 때문으로 판단됨

다. 과실의 무게

- Myb2 RNAi 형질전환체의 원예형질중의 하나는 과실의 개수와 크기에서 대조구와 overexpression 형질전환체에 비해 차이를 보였음
- 일반적으로 멜론 생산 농가에서 상품성을 높이기 위해 개체당 1-2개의 과실을 수확하고 있으며, 과실의 수가 증가할수록 품질은 현저히 감소
- 그러나 Myb2 RNAi 형질전환체의 경우, 개체당 4-5개의 과실이 착과되어 있어도 과실의 크기에는 영향을 미치지 않았으며, 평균 과실의 무게도 가장 높게 나타나 overexpression 형질전환체에 비해 약 64% 이상 무겁게 나타났음 (Fig. 19).
- CmXETRNAi에 대한 형질전환체의 과실 크기도 대조구에 비해 상당히 작은 것을 확인하였으며 이것은 세포벽 내 헤미셀룰로오스의 변형을 유도함으로써 세포벽의 신장과 과실의 성숙에 관여하는 Xyloglucan endotransglycosylase가 knockout된 결과로 판단됨
- 또한 CmXETRNAi에 대한 형질전환체는 개체당 1개가 착과되어 있을 경우, 과실의 크기는 대조구에 비해 약간 증가하였으나 과실의 표면이 대조구에 비해 굴곡이 나타나는 특성을 보였음 (Fig. 20). 이러한 결과는 CmXET 유전자가 세포벽의 발달과 관련이 있으며, 식물의 형태형성을 조절한다는 보고를 감안해 볼 때, CmXET 유전자 형질전환체 과실표면의 굴곡과 관련이 있는 것으로 판단됨
- 따라서, CmXET 유전자의 발현을 조절하여 과실의 발달과 후숙을 조절할 수 있으나, 과실의 품질을 결정하는 요인 중의 하나인 과피의 표면 상태가 다소 고르지 못하였음

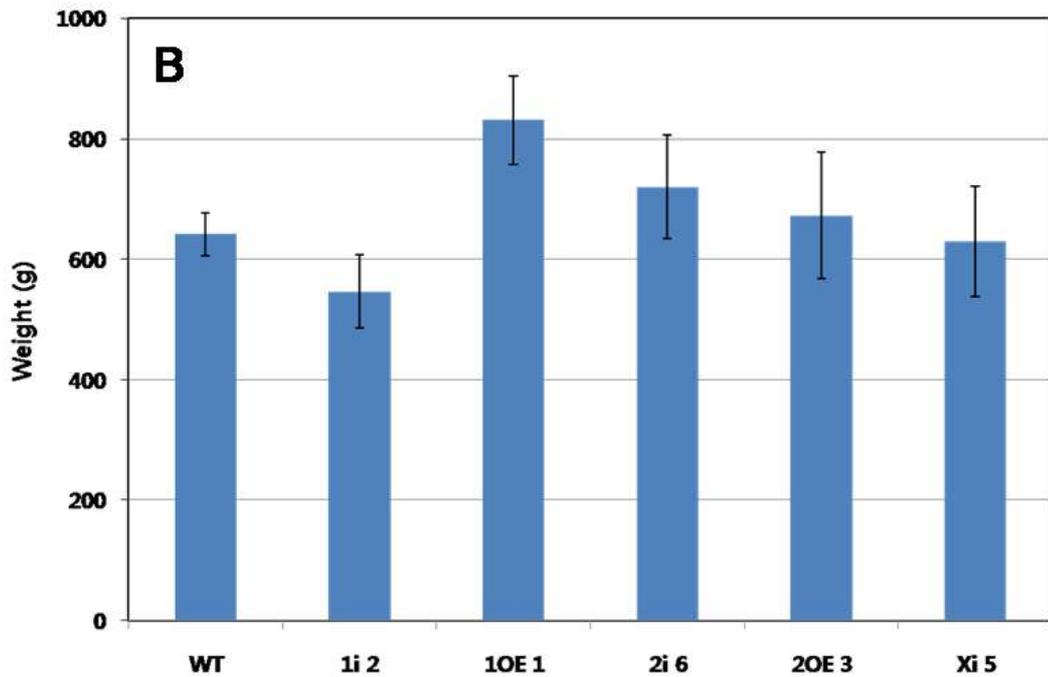
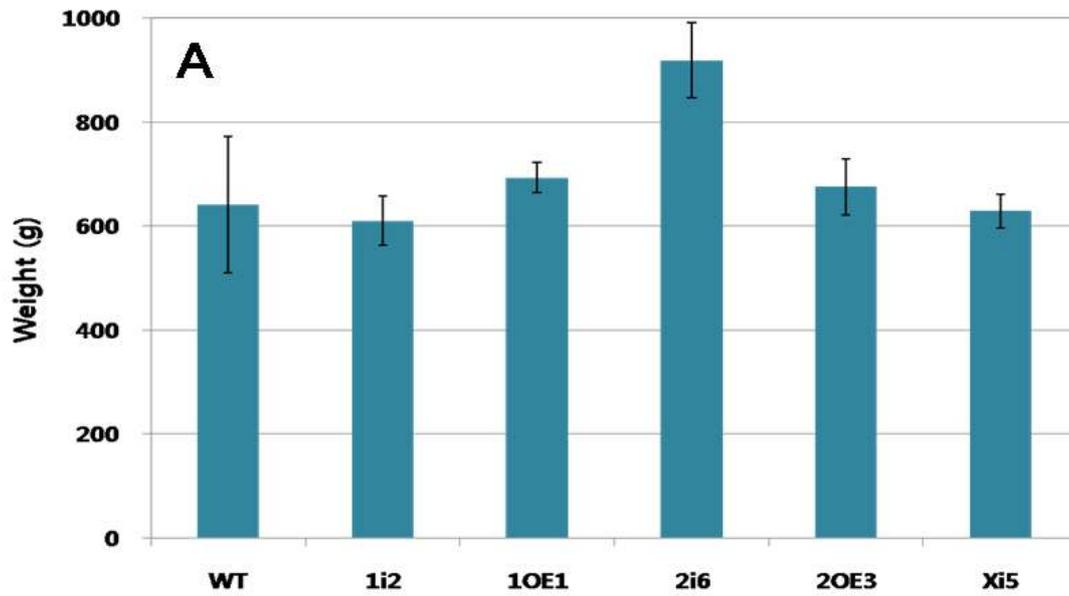


Figure 19. Fruit weight of the melon transformed by each vectors. A; Result from 2007 cultivation, B; Result from 2008 cultivation.

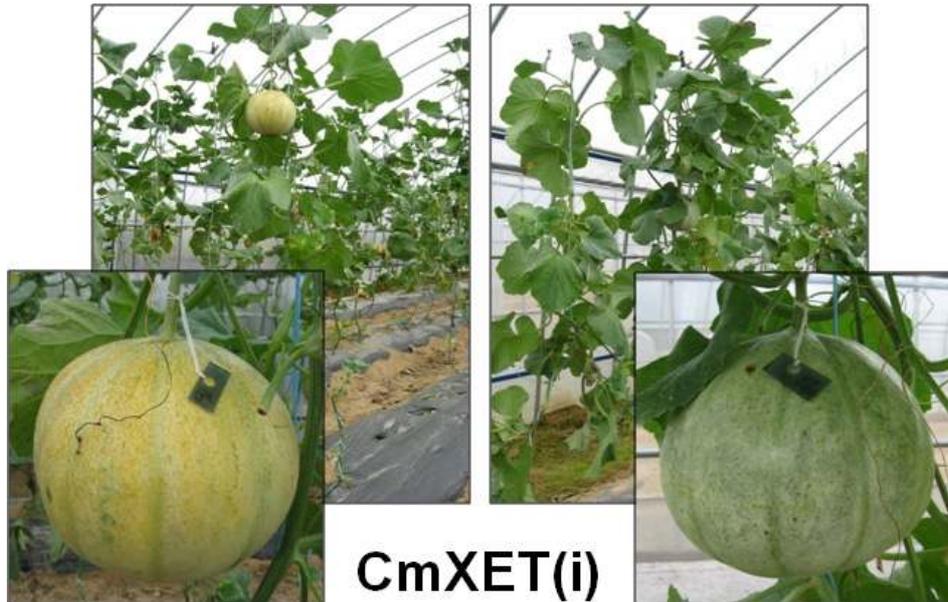


Figure 20. The characterization of transgenic plant transformed by xyloglucan endoglucantransferase (CmXET).

라. 과실의 품질관련 형질의 분석

- 경도 측정을 위해 각 형질전환체의 과실발달 단계 (DAP 30±1, DAP35±1 그리고 DAP40±1)에 따라 3개의 과실에서 경도측정기 (Mitutoyo, 2046S)를 이용하여 과피의 강도를 각각 2회씩 측정
- 형질전환체의 경도는 과실의 후숙과정에서 나타나는 농업형질 (낙과 및 열과현상)과 일치하였으며 (Fig. 21) overexpression 라인의 경우 35DAP의 경도가 wild type의 30DAP와 유사하여 약 5일 정도의 차이를 나타내었음
- 35DAP에서 품질관련 유전자가 overexpression된 형질전환체는 경도가 대조구인 wild type보다 약 10% 정도 낮았으나, Myb1과 2 RNAi 형질전환체의 경우는 대조구보다 높았으며, CmXET RNAi라인은 대조구와 유의차를 나타내지 않았으나, overexpression 라인의 경우 40DAP에서는 과피가 매우 연화되어 경도가 매우 낮았음
- 이와 같은 결과는 Myb 유전자가 과실의 후숙과 관련된 유전자의 활성을 조절함으로써 과실의 성숙 및 후숙에 관여하여 과피의 경도에 영향을 주고 있음을 잘 제시하는 것으로 과실의 성숙과정과 일치하는 것임

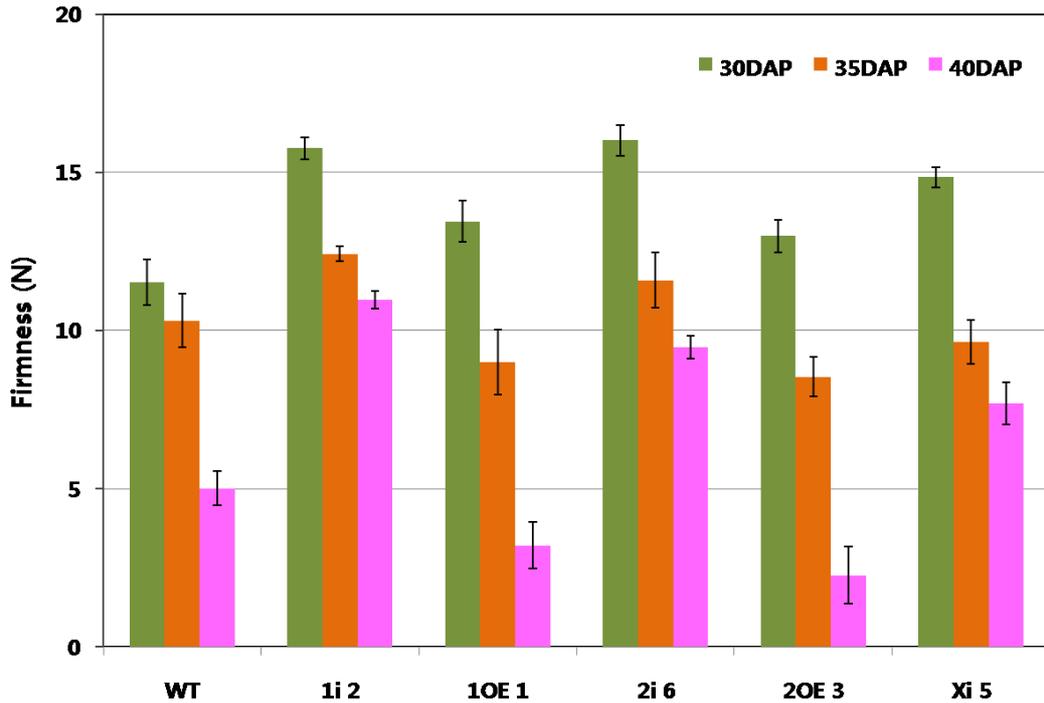


Figure 21. Comparison of the firmness in transgenic plants transformed by Myb1 (1i2 and 1OE1), Myb2 (2i6 and 2OE3) and CmXET (Xi5) during fruit ripening. i; RNAi knockout, OE; overexpression, WT; wild type, number (2, 1, 6, 3, 5); serial number of transgenic plants.

- 당도 측정은 각 형질전환체의 과실발달 단계 (DAP 30±1, DAP35±1 그리고 DAP40±1)에서 무작위로 3개를 수확하여 과실 당 3곳에서 각각 1g의 과육을 채취한 후 과즙을 디지털당도계 (PR-201a/ATAGO)에 떨어트리 측정
- 형질전환체의 당도는 대조구인 wild type에 비해 모두 낮게 나타났으며, wild type과 RNAi라인의 경우 30DAP에서 45DAP까지 당도가 증가하였으나, overexpression의 경우는 30DAP에서 가장 높은 당도를 나타냈음 (Fig. 22)
- 형질전환체가 대조구에 비해 낮은 당도를 나타냈으나 멜론의 당도는 40DAP를 기준으로 점차 감소한다는 보고를 감안하면, RNAi 라인의 경우 45DAP 이후에도 당도가 증가할 것으로 예측
- 45DAP 이후에 최고의 당도를 나타낼 것이라는 예측은 RNAi라인의 경우, 과실 성숙의 지연에 따른 생리적 발달단계의 차이가 엽록소 함량, 경도와 낙과 및 열과의 지연 등이 이미 확인되었기 때문임

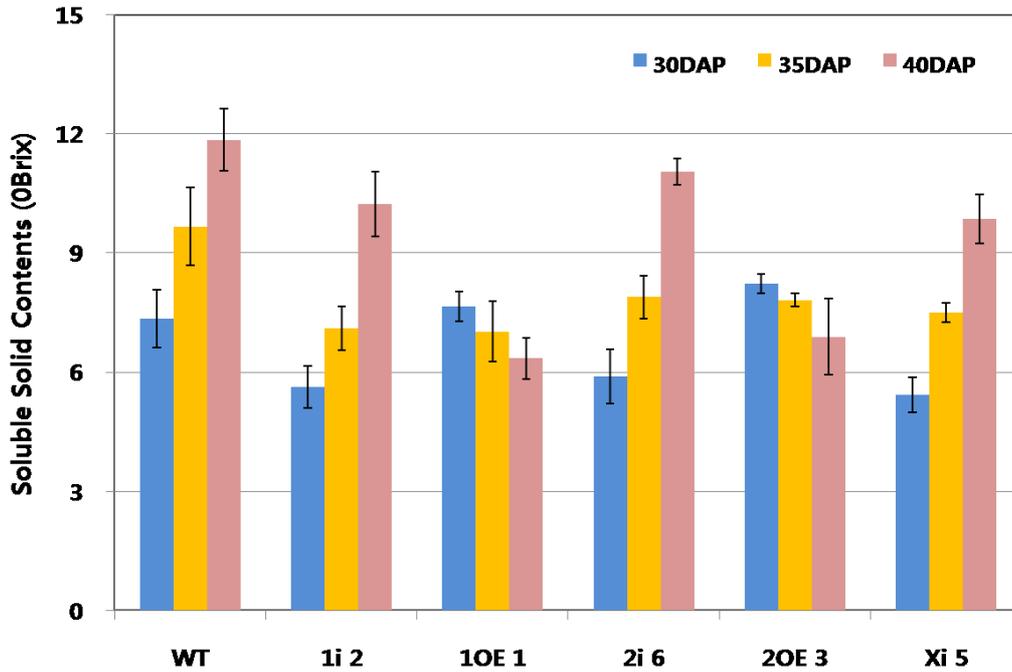


Figure 22. Comparison of the soluble solid contents in transgenic plants transformed by Myb1 (1i2 and 1OE1), Myb2 (2i6 and 2OE3) and CmXET (Xi5) during fruit ripening. i; RNAi knockout, OE; overexpression, WT; wild type, number (2, 1, 6, 3, 5); serial number of transgenic plants.

- 에틸렌 발생량은 5개의 과실 (35DAP±1)을 진공팩에 넣어 상온 (26±1°C)에서 overnight 후, 100ml를 주사기로 채취하여 10ml를 gas chromatography (Aglient 6896N)에 주사하였음
- 분석조건은 oven temp 75°C, FID detector (ethylene-8min), TDC detector (CO₂-6min)에 mobil gas는 He을 사용하였음
- 에틸렌 발생은 Myb1 RNAi 라인에서 가장 높게 나타냈으며, overexpression 라인에서도 wild type보다 낮게 나타났음 (Fig. 23)
- 에틸렌 발생이 가장 낮은 형질전환체는 Myb2 RNAi 라인으로 wild type에 비해 약 30% 정도 낮아 과실 품질관련 형질분석 결과와 일치하였음

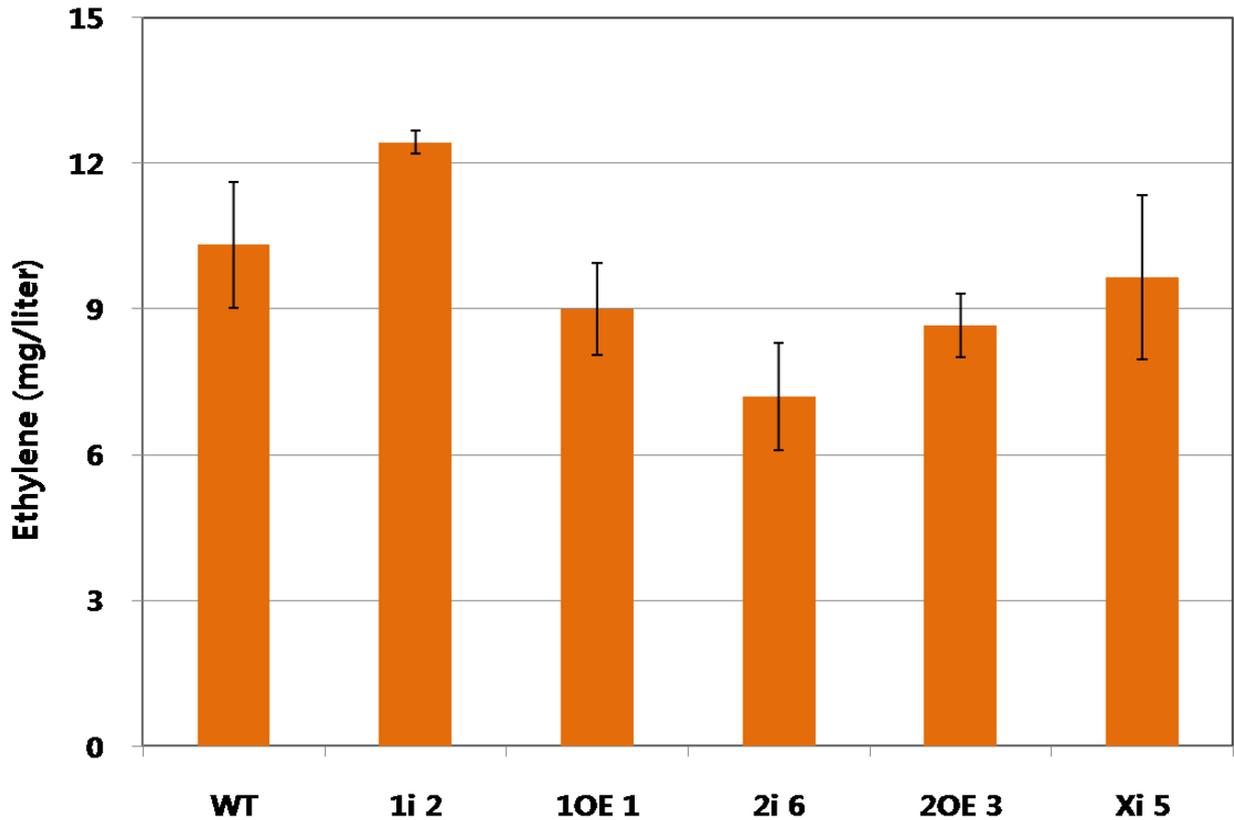


Figure 23. Comparison of the ethylene contents in transgenic plants (35DAP) transformed by Myb1 (li2 and 1OE1), Myb2 (2i6 and 2OE3) and CmXET (Xi5) during fruit ripening. i; RNAi knockout, OE; overexpression, WT; wild type, number (2, 1, 6, 3, 5); serial number of transgenic plants. DAP; days after pollination.

제 4 절 고품질 신품종 후보 선발

1. 고품질 후보 품종의 선발

- 과실의 발달과 품질관련 유전자 형질전환체의 후대검정 및 농업형질 분석을 통해 우수한 형질전환체를 선발하고자 형질전환체의 특성을 분석한 결과는 Table 3과 같음
- 과실의 품질관련 유전자의 RNAi 형질전환체는 과실의 발달 및 후숙을 현저히 지연하는 효과를 나타내어 과실의 품질을 향상시킬 수 있는 저장성이 우수한 품종 개발이 가능하였음
- 최종적으로 선발된 품종 등록 후보는 Myb2 RNAi로 형질전환된 2i6 (품종등록 명칭; 싱그런 멜론)의 재배적 특성은 엽록소의 노화, 과실의 후숙이 지연되어 낙과 및 열과 현상이 없음
- 따라서 저장성이 우수하기 때문에 유통기한의 연장 등의 장점이 있어 농가 소득향상에도 도움이 될 것으로 판단됨

Table 3. Characterization of transgenic plants transformed by genes associated with development of fruit ripening

Transgenic Melon		Cultivation Character	Physiological Character
Myb1	OE#1	Similar to wild type	Premature, Early abscission
	RNAi#2	Similar to wild type	Late ripening
Myb2	OE#3	Similar to wild type	Premature, Early abscission, Open fruit
	RNAi#6	Similar to wild type	Late ripening, High-yield, Bigger fruit
CmXET	RNAi#5	Delayed development at the early stage	Late ripening, Bigger fruit

2. 품종등록 신청

- 과실의 품질관련 유전자를 이용하여 과실의 후숙이 지연되는 형질전환체를 확보하여, 형질전환체의 후대검증 및 생육조사 결과를 종합하고 확보된 채종된 T5 종자를 이용하여 최종 품종등록 후보 계통을 선발
- 최종적으로 저장성이 우수한 멜론 형질전환체를 국립종자원에 품종 등록하고자 하였으나, 2008년 1월부터 “유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률”이 발효되면서, GMO 품종의 등록은 환경위해성 심사후 승인을 얻어야 가능
- 그러나 환경위해성 심사를 위한 자료를 수집하기 위해서는 최소 2~3년이 소요되고 연간 5~10억 원의 예산이 필요한 방대한 연구가 필요함
- 따라서 본 과제에서 개발된 저장성이 우수한 멜론 형질전환체를 품종 등록하지 못하였음

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 기술개발 목표

- 이차대사산물 생합성관련 유전자, 세포벽 대사에 관여하는 유전자, 그리고 항산화물질 생성에 관여하는 유전자를 이용한 멜론형질전환을 통해 고품질의 식물품종육성
- 멜론 형질전환체의 분자생물학적 분석을 이용한 기능분석
- 과실품질관련 유전자를 이용한 형질전환체의 유망계통 선발 및 증식
- 유망 계통의 GMO 품종 등록

제 2 절 연도별 주요개발 목표달성도

구분	연도	연구개발 목표	주요수행 내용	달성도
1차 년도	2006	○ 과실품질관련 유전자의 특성 규명	<ul style="list-style-type: none"> - 과실품질관련 유전자 Myb1, Myb2, CmXET 그리고 CmSOD에 대한 유전적 발현양상등과 특성분석 - CmMyb1 promoter region을 분리해 낸 후, 담배형질전환을 통해 발현되는 localization과 열매 발달 단계별 발현양상을 분석 - 확보된 유전자 중에서 Myb와 상호작용하는 유전자를 알아 보기위하여 yeast two-hybrid를 실시 - CmMyb2의 경우 Chitinase와 상호 연관되어 있다는 새로운 생리학적 연구결과를 도출하였으며 이결과는 세계최초임 	110
		○ 과실품질관련 유전자들에 대한 Sense 및 RNAi vector를 이용한 멜론 형질전환체 개발	<ul style="list-style-type: none"> - CmMyb의 1과 2, CmXET, Expansin, CmSOD의 유전자를 이용한 Sense, Antisense, RNAi vector를 모두construction하였고 이를 이용한 형질전환을 실시하여 유전자별 각 construct 당 9~14개의 형질전환체를 개발하는 데 성공하였음 	100
		○ 멜론 형질전환체의 당대검증 및 분자생물학적 기능분석	<ul style="list-style-type: none"> - CmMyb의 1과 2, CmXET, Expansin, Cm SOD의 유전자를 이용한 형질전환을 시도하여 얻어진 형질전환체는 1차적으로 PCR 방법을 이용하여 형질전환체를 확인하였으며 2차적으로 Southern blot 방법을 이용하여 외부유전자 삽입을 확인 - 형질전환체임이 확인된 개체들은 모두 자가수분하여 후대를 확보하였으며 이들 개체들은 세대진전과 선발단계를 거쳐 재배하면서 과실의 품질관련 농업형질의 특성을 분석하였음 	110

구분	연도	연구개발 목표	평가의 착안점 및 기준	달성도
2차 년도	2007	○ 과실품질관련 유전자를 이용한 지속적인 멜론 형질전환 실시	- 1차년도에 이어 CmSOD 벡터를 이용한 형질전환을 계속 실시하여 추가적인 형질전환체를 확보하였으며, 외부유전자의 삽입을 확인하였음	100
		○ 멜론 형질전환체의 당대검증 및 후대검증	- 1차년도에 확보한 형질전환체 중 PCR 방법을 이용하여 세대진전 과정에서 형질전환체를 확인하였으며, 항생제 저항성 검정을 통한 segregation을 조사하여 homo 라인을 선발하기 위한 분석 - 이들 개체들은 세대진전을 계속하여 대부분 T3 generation에서 재배하여 개체의 확보	100
		○ 육성된 계통의 재배적합성 조사	- 세대 고정정이 이루어진 개체를 이용하여 GMO 재배하우스에 재배하면서 품질관련 형질을 조사 - 조사 형질은 엽록소 함량, 착과 능력, 과실의 무게, 조기 낙과 및 열과 여부를 조사하여 34개라인을 1차 후보로 선정 - 각각의 라인으로부터 종자를 수확하여 세대진전 및 최종 품종 선발에 활용하고자 함	100
3차 년도	2008	○ 과실 품질관련 유전자를 이용한 멜론 형질전환체의 후대검증	- 후대 검정은 2차년도에 확보한 형질전환체 중 PCR 방법을 이용하여 세대진전 과정에서 형질전환체를 확인하였으며, 항생제 저항성 검정을 통한 segregation을 조사 - 이들 개체들은 세대진전을 계속하여 T3 또는 T4 generation 개체의 확보	100
		○ 과실품질관련 유전자를 이용한 형질전환체의 유망계통 선발 및 증식	- 2차년도에 확보된 34라인의 후보 개체를 GMO 재배하우스에 재배하면서 품질관련 형질을 조사 - 발달단계에 따라 엽록소 함량 및 생육 상태를 고려하여 5개의 라인을 최종적으로 선발하여 품질관련 농업형질을 조사 - 조사 형질은 발달단계에 따른 엽록소 함량, 과실의 무게 그리고 후숙과정에 따른 당도와 경도 측정 - 에틸렌 함량을 분석 - 각의 라인으로부터 종자를 수확하여 최종 품종 등록 시 제출하고자 함	100

구분	연도	연구개발 목표	평가의 착안점 및 기준	달성도
3차 년도	2008	○ GMO 품종등록가능성 조사 및 품종등록	<ul style="list-style-type: none"> - 1~3년차의 잡배적 특성과 생리적 특성을 종합하여 과실의 성숙과정에서 조기 낙과 및 열과가 wild type에 비해 10~15일 정도 지연되는 라인을 최종적으로 선발 (품종등록 명칭; 싱그런 멜론) - 2008년 1월에 발효된 “LMO법”에 따라 GMO 품종 등록 시 환경위해성 심사결과를 추가해야하기 때문에 품종 등록이 진행되지 못함 - 본 과제에서 개발된 저장성이 우수한 신품종의 등록 위한 위해성 심사자료 작성을 위한 지원이 필요 	50

제 3 절 관련 분야에의 기여도

- 박과에서 과실의 품질관련 유전자의 클로닝 및 이들 유전자를 이용하기 위한 벡터제작 및 형질 전환체 개발체계 확립
- 생명공학 기법을 이용한 신품종 개발에 필요한 형질전환 세대의 검정 및 후대 검정 방법과 우수한 목표 형질을 고정하기 위한 일련의 과정에 대한 체계 확립
- 과실의 품질과 관련된 농업형질 분석에 의한 고품질 품종 선발 체계
- 유용유전자 cloning 및 활용을 위한 체계 확립으로 유사 연구에 활용 가능
- 형질전환체의 환경위해성 평가를 위한 “event”로 활용 가능

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 작물의 과실 품질관련 유용 유전자원의 확보 및 활용 체계를 확립

- 기후변화와 바이오에너지에 대한 수요 증가로 유용유전자원의 확보와 이들 유전자를 활용한 산업화를 위한 첫 단계인 유용 유전자원의 확보 체계 확립
- 형질전환 방법에 의한 목표형질이 도입된 새로운 품종개발 과정의 체계 확립

2. 과제 수행기간에 축적된 기술과 인력 인프라의 활용

- 유용유전자를 확보 및 형질전환체 개발 그리고 형질전환체를 검정을 통한 품종개발 체계를 이해하는 인력 및 기술 인프라를 활용한 유용 목표형질이 도입된 신품종 개발
- 확보된 유용 유전자는 특허등록을 하여 지적재산권 확보
- 환경내성 작물, 바이오 에너지 원자재 확보를 위한 바이오매스 증대를 위한 형질전환 작물의 개발 및 세대고정을 통한 품종 개발에 활용하고자 함

3. 확보된 우수한 형질이 도입된 멜론을 이용한 환경위해성 평가 (다음 단계 조치사항)

- 본 연구가 기획되고 진행되는 동안에 이루어진 GMO 품종 등록을 위한 환경위해성 평가 조항의 신설로 신품종 등록에 필요한 위해성 평가 자료 작성 및 심사신청에 개발된 형질전환체 활용 가능
- 환경위해성 평가를 위한 원재료 “event”로 활용하여 환경위해성 평가를 위한 기술개발에 이용 가능
- 위해성 평가기술 개발과 동시에 축적된 결과는 신품종 등록을 위한 심사자료로 제출하여 신품종 등록
- 축적된 형질전환체의 품질관련 형질의 분석 결과는 품종 등록 후 학술지에 게재

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

○ Melon Genomic Resources

- Melon의 physical map 작성
- PI X PD DHL92 집단으로부터 BAC library를 제작하여 23,000 clones 획득
- 평균 insert size는 139 kb이며, 6X coverage
- 최근에 Physical map과 genetic map을 integration 시키는 작업을 시작

○ Cucuribit Genomic Database (www.icugi.org)

- Melon의 EST collection
- Melon의 Maps 작성
- Microarray를 통한 functional genomic 지원
- Melon EST Collection version 2.0 (Oct 2007)

Sequences used for assembly	
Total number of high quality ESTs (after cleaning)	34,313
Total number of published genes from GenBank (10/02/07)	138
Total number of sequences used for assembly	34,451
Unigene information	
Total number of contigs (MU3270-MU9721)	6,452
Total number of singletons (MU9722-MU19397)	9,676
Total number of unigenes (MU3270-MU19397)	16,128

- Melon cDNA array (ver 1.0)

The melon cDNA microarray (ver 1.0) was designed based on the melon unigene build version 1.0. The array contains 9,216 spots among which 12 consist of only printing buffer and serve as negative controls, while the remaining 9,204 spots represent 3068 unique genes with each gene printed in triplicate on the array

제 7 장 참고문헌

- Alan B. (1998) Temporal Sequence of Cell Wall disassembly in rapidly ripening Melon fruit. *Plant Physiol.* 117: 345-361
- Brummell DH, MH Harpster (2001) Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 47 (1-2): 311-340
- Cho HT, Kende H. (1998) Tissue localization of expansins in deepwater rice. *Plant J.* 15(6):805-12
- Cosgrove DJ. (1996) Plant cell enlargement and the action of expansins. *Bioessays.* ;18(7):533-40
- Hamilton AJ, Fray RG, Grierson D. (1995) Sense and antisense inactivation of fruit ripening genes in tomato. *Curr Top Microbiol Immunol.* 197:77-89
- Keller Elvira and Cosgrove Daniel J. (1995) Expansins in growing tomato leaves. *The plant Journal* 8(6), 795-802
- Kende H, Bradford K, Brummell D, Cho HT, Cosgrove D, Fleming A, Gehring C, Lee Y, McQueen-Mason S, Rose J, Voesenek LA. (2004) Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant Mol Biol.* 55(3):311-4
- Kim HJ. (1989) Determination of total vitamin C by ion exclusion chromatography with electrochemical detection. *J Assoc Off Anal Chem.* 72(4):681-6
- Kim MS, Chung HD and Kim YK (1997) Inheritance of fruit color, sugar and ascorbic acid content in Melon (*Cucumis melo* L.). *Korean J. Breed.* 29(1):103-108
- Oeller PW, Lu MW, Taylor LP, Pike DA, Theologis A. (1991) Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science.* 18;254(5030):437-9
- Redgwell RJ, Fry SC. (1993) Xyloglucan Endotransglycosylase Activity Increases during Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) Ripening (Implications for Fruit Softening). *Plant Physiol.* 103(4):1399-1406
- Reinhardt D, Wittwer F, Mandel T, Kuhlemeier C. (1998) Localized upregulation of a new expansin gene predicts the site of leaf formation in the tomato meristem. *Plant Cell.* 10(9):1427-37
- Rose Jocelyn K.C, Lee Howard H and Bennett Alan B. (1997) Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Plant biology.* 94, 5955-5960
- Rose Jocelyn K.C., Braam Janet, Fry Stephen C., and Nishitani Kazuhiko (2002) The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell*

Physiol. 43(12): 1421-1435

Sampedro J, Cosgrove DJ. (2005) The expansin superfamily. *Genome Biol.* 6(12):242

Shcherban TY, Shi J, Durachko DM, Gultinan MJ, McQueen-Mason SJ, Shieh M, Cosgrove DJ. (1995) Molecular cloning and sequence analysis of expansins—a highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants.

Proc Natl Acad Sci. 92(20):9245-9

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.