

발간등록번호
--------

11-1543000-000982-01
----------------------

환경적응형(내병, 내재해, 복합기능성) 작물품종 육성기술  
개발

(Studies on practical use of transgenic watermelon  
root-stock for coping with climate change)

전남대학교

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “환경적응형 (내병, 내재해, 복합기능성) 작물품종 육성기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2015년 11월 2일

주관연구기관명 : 전남대학교

주관연구책임자 : 조 백 호

세부연구책임자 : 조 백 호

연 구 원 : 조 송 미

세부연구책임자 : 양 광 열

연 구 원 : 김 철 수

협동연구기관명 : 전북농업기술원

협동연구책임자 : 노 재 중

# 요 약 문

## I. 제 목

### 환경적응형 (내병, 내재해, 복합기능성) 작물품종 육성기술 개발

## II. 연구성과 목표 대비 실적

본 연구과제를 수행하면서 오이유래 CsGolS1 유전자가 도입된 공대수박 형질전환체에 대한 고온 및 염에 대한 내성 기능을 규명하여 “오이 유래 CsGolS1 유전자를 이용한 고온 또는 염에 대한 내성이 증진된 형질전환 식물체 및 이의 용도”에 관한 특허를 출원하였으며(출원번호 10-2014-0070259), 출원된 특허를 활용하여 (유)명산종묘에 2015년 5월 기술이전을 수행하였다. 그리고 LsRZF1 단백질에 의해 조절되는 AtLPK1 유전자의 병원균 및 수분결핍스트레스 관련 세포 내 기능을 규명하여 “Overexpression of L-type lectin-like protein kinase 1 confers pathogen resistance and regulates salinity response in *Arabidopsis thaliana*” 라는 제목으로 SCI 저널인 Plant Science에 게재하였으며(2013년 4월), 또한 참박으로부터 유비퀴틴 관련 효소인 LsRZF1 단백질의 세포 내 생화학적 기능 동정 및 가뭄스트레스 관련 프롤린 조절을 규명하여 “Heterologous expression of the gourd E3 ubiquitin ligase gene LsRZF1 compromises the drought stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*” 라는 제목으로 역시 SCI 저널인 Plant Physiology and Biochemistry에 게재하였다(2014년 4월). 그리고 참박 E3 ubiquitin ligase LsRZF1 유전자가 형질전환된 공대수박에서 내건성을 확인하여 국내 특허출원을 전남대학교 산학협력단에 위임한 상태이며, 현재 같은 내용을 정리하여 SCI급 논문 게재를 위해 준비 중이다(2015년 4월). 또한 폴리아민 생합성 유전자인 ADC 유전자가 생성하는 프트렛신이 병저항성 및 건조 내성과 밀접한 관련이 있으며 두 개의 *AtADC* 유전자의 발현이 식물의 생물학적 및 비생물학적 스트레스에 의해 활성화 되는 MAPK 신호전달체계의 조절을 받고 있음을 최초로 밝혀 SCI 저널 Biochem. Biophys. Res. Commun에 “Putrescine regulating by stress-responsive MAPK cascade contributes to bacterial pathogen defense in *Arabidopsis*”라는 제목으로 논문을 게재하였다(2013년 8월). 또한 형질전환 공대 수박을 제작하는 과정에서 *ADC* 유전자에 의해 생성되는 폴리아민과 식물생장 호르몬인 지베렐린(GA)의 연관성 때문에 형질전환체 확보가 매우 어려워, 새로운 유전자 후보군을 찾기 위해 가뭄과 같은 환경스트레스에 반응하는 식물의 MAPK 신호전달체계에 의해 조절을 받는 전사조절인자의 연구를 함께 수행하여 SCIE급 저널에 “Involvement of the OsMKK4-OsMPK1 cascade and its downstream transcription factor OsWRKY53 in the wounding response in rice”이라는 제목으로 논문을 게재하였다(2014년 5월). 또한 연구과정에서 수박에서 클로닝한 *LsADC* 유전자가 다른 식물의 *ADC* 유전자에 비해 내건성 효과가 우수하다는 결과를 확인하였기에 그 작용 기작과 관련 연구를 마무리하여 SCI급 저널에 투고를 준비 중에 있다. 그리고 형질전환 수박의 생산성 관련 연구 주제와 관련된 수박의 착과부위 환경개선을 통한 수박의 품질·생산성 향상 관련 연구를 수행한 결과, “Effect of heat treatment around the fruit set region on growth and yield of watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai]” 제목으로

Physiology and Molecular Biology of Plants 저널에 게재하였다(2013년 10월). 그리고 수박의 병충해, 생리장애, 재배법 등에 관한 연구 결과를 토대로 수박 연구자들에게 유용한 기초자료를 제공하고자 “Occurrence of Diseases and Case of Clinical Diagnosis on Watermelon in South Korea, 2008-2012” 라는 제목으로 Research in Plant Disease 저널에 게재하였다(2014년 3월). 또한 수박의 재분화와 관련된 생장조절물질에 대한 연구를 통해 “Effect of plant growth regulators on regeneration from the cotyledon explants in Watermelon (*Citrullus lanatus* (thunb.) Matsum. & Nakai)” 라는 제목으로 Korean J. Plant Research 저널에 게재하였다(2014년 3월). 결과적으로 우수한 SCI급 논문 4편을 이미 게재하였으며 현재 2편의 SCI급 논문을 준비하여 게재할 예정이다. 또한 국외저널을 포함한 비SCI급 논문도 3편 게재하였다. 또한 본 연구과제의 참여기업인 명산종묘에서 참박 형질전환 중간모본이나 부분으로 사용하기 위한 연구를 수행하여 *Lagenaria siceraria* Standley 대목용박 “윈터야무진”과 “썸머야무진” 두 품종을 등록하여 사업화 하였다(2015년 2월). 그리고 본 연구내용과 관련된 여러 연구결과를 “Transgenic watermelon root stock plants overexpressing the cucumber galactinol synthase showed enhanced resistance against fungal pathogen” 및 “The lsrzf1 antisense transgenic line of the novel Ring-type E3 ubiquitin ligase increase proline contents in Gong-dae watermelon cultivar” 그리고 “Cloning and expression analysis of an arginine decarboxylase gene from bottle gourd (*Lagenaria siceraria*)” 등과 같은 제목으로 한국식물생명공학회, 식물학회, 식물병리학회 등의 국내외 여러 학회에 참석하여 20회 이상 발표하였다.

### III. 연구개발의 목적 및 필요성

지구온난화 및 이상기후에 따른 극심한 가뭄 혹은 저온 스트레스에 의해 농작물의 피해가 점점 증대할 뿐만 아니라, 수자원 (물)의 확보 및 작물 재배에 있어서 관수 방법 개발이 세계 모든 국가가 갖고 있는 앞으로의 사회적·산업적인 문제점으로 대두되어지고 있다. 특히 수박은 연작의 피해가 심한 작물이기 때문에 수박에 치명적인 토양전염성 병의 회피 및 품질향상 그리고 수량증대를 위해 내건성, 내습성 및 저온신장성 등과 같은 불량환경에 내성이 강한 대목을 이용한 접목재배가 이루어지고 있는 실정이다. 그러한 이유로 접목친화성이 좋고 토양전염성 병에 강하며 동시에 극심한 가뭄 혹은 저온 스트레스와 같은 불량환경에 내성이 강한 대목이 필요하나 현재 수박 대목으로 많이 이용되고 있는 참박과 공대수박은 각각 대목으로써 단점을 가지고 있으므로 이를 보강해 주기 위한 노력의 일환으로 내병성과 내재해성이 강화된 형질전환 대목의 개발이 필요하였다.

식물의 Raffinose family oligosaccharides(RFOs)의 역할은 씨앗이 건조되거나 물을 흡수할 때 세포의 원래 모습을 보전하고, 탈수상태에서 수명을 연장시키며, 발아하는 동안 에너지 생성을 위한 기질을 제공할 뿐만 아니라 건조스트레스를 받았을 때 식물체에 축적되므로, RFOs 생합성에 필요한 galactinol을 생산하는 galactinol synthase(GoS) 유전자는 건조와 밀접한 연관성이 있다고 알려져 있다. 그리고 단백질 번역 후 ubiquitination 과정에 의한 프롤린 대사 조절 네트워크 기작은 현재까지 규명되지 않았기에, 이러한 단백질 ubiquitination 과정은 식물 성장 및 발달 기작 규명에 필수적인 연구라 할 수 있다. 그리고 프롤린 대사 조절에 따른 유전자의 발현 양상 조사는 프롤린과 식물 발달 간의 연관 관계 혹은 특정 조건하에서 신호 전달 분자로써의 역할을 규명할 수 있다. LsRZF1 단백질에 의한 프롤린 대사 조절 네트워크

규명은 프롤린 생합성 및 분해 경로를 새롭게 밝히는 기작일 뿐만 아니라, 식물 환경스트레스 특히 가뭄 혹은 저온스트레스 내성 강화 작물을 개발할 수 있다. 또한 스트레스 조건하에서 프롤린 유입 및 inter-organ 수송 조절 기작 연구에 새로운 모델을 제시할 수가 있을 것이다. 또한 식물의 폴리아민은 복수의 아미노기를 가지고 있어 DNA, RNA, 인지지방질, 산성 단백질 및 막과 세포벽에 존재하는 많은 음이온을 가진 물질과 강한 친화력을 나타내는 물질로 생물의 성장과 분화에 필수적이며 식물의 성장과정에서 쉽게 노출되는 생물학적 및 비생물학적인 다양한 형태의 스트레스 반응에도 관여되어 있는 것으로 알려져 있어 이러한 폴리아민 생합성 관련 유전자를 이용한 형질전환체 개발 연구가 필요하다 하겠다.

수박시설재배에 있어 관수 조절은 수박 생육전반과 생산량 및 품질에 영향을 주는 중요한 환경요건이다. 또한 재배지 토양 내 수분은 여러 식물의 뿌리나 그 주변에 서식하는 토양진염 병원균이 활동할 수 있는 유리한 환경조건을 만들 수도 있다. 특히 *Ospidium*과 같은 조균류는 물속에서 유주자를 통해 기주 이동과 증식 그리고 Melon necrotic spot virus(MNSV)와 같은 바이러스를 매개할 수 있다. 이 MNSV는 특히 과습된 토양에서 많이 발생하며 발병한 식물은 과육이 검붉게 변하거나 내부에 공동이 생기는 등 상품성이 현저히 떨어지게 된다. 그리고 보통 수확하기 전에는 7-15일 정도 수분공급을 제한함으로써 수박의 당도향상을 유도한다. 따라서 수박 시설재배에 있어 관수조절은 여러 가지 토양 유래의 곰팡이 병이나 곰팡이에 의해 매개되는 바이러스병의 발병환경을 제어할 수 있는 방법으로 이용되고 있다. 현재까지 수박 대목용으로 많이 활용되고 있는 참박은 건조에 약한 특성을 가지고 있어 건조에 강한 수박대목 개발과 이에 대한 적절한 물관리 방법은 수박의 품질을 높이는 중요한 수단이라 할 수 있다.

그러나 대목용 형질전환 수박의 개발이 우리나라에서도 시도된 적은 있지만 현재까지 실용화된 경우는 없기 때문에, 환경스트레스에 강하고 품질을 높일 수 있는 형질전환 대목이 개발될 수 있다면 향후 안정성 및 위해성 심사 후 상품화로 이어질 수 있는 계기가 될 수 있을 것이다.

#### IV. 연구개발 내용 및 범위

내재해성 및 내병성 형질전환 수박대목을 육성하기 위하여 가뭄이나 고염과 같은 환경스트레스 내성 관련 오이 galactinol synthase1(*CsGo1S1*) 유전자와 다양한 작물에서 항균활성이 확인된 고추 defensin(*Pep J1-1*) 유전자가 도입된 공대수박 형질전환체로 보유하고 있는 라인들을 1차 후보 형질전환 대목으로 활용하였다. 선발된 라인들에 대해서는 유전자의 도입과 유전자 발현분석을 실시하였으며 세대진전과정에서 동형접합체 호모라인을 확보하고자 genomic southern 분석과 taq man PCR 분석을 실시하였다. 또한 가뭄과 고염에 대한 내성을 갖는 수박대목을 추가로 개발하기 위하여 프롤린 생합성에 관여되는 참박 유래 LsRZF1 및 폴리아민 생합성에 관련된 참박유래 LsSAMDC, LsADC 유전자들이 식물형질전환 binary vector인 pCAMBIA 1300에 도입된 *Agrobacterium* 균주를 2세부과제로부터 분양받아 공대수박 및 참박에 형질전환 하였다. 이들 형질전환 식물체는 1차적으로 hygromycin이 첨가된 배지에서 선발 과정을 거쳐 발근시켰으며 이후 토양에 순화시켰다. 이후 binary vector 및 도입유전자에 primer를 이용한 genomic PCR분석과 RT-PCR 분석을 통해 유전자의 도입여부를 확인한 후 2세부과제에 인계하였다.

프롤린 대사조절을 통해 수박 내재해성 제어 시스템 기술을 개발하기 위하여, 수박 유식물

체로부터 total RNA 추출 및 cDNA 합성 후, 참박 RING Zinc Finger 1(*LsRZF1*) 유전자를 클로닝 하였다. 건조 스트레스에 대한 *LsRZF1* 유전자의 발현 양상을 살펴보기 위하여, 수박 10-day-old 유식물체로부터 건조스트레스를 2주간 처리한 후, total RNA를 추출하였으며, 또한 *LsRZF1* 단백질의 세포 내 위치를 탐색하기 위하여, *LsRZF1*-CFP construct를 수박 유식물체로부터 추출한 protoplast에 transient transfection을 수행하여 Confocal microscopy로 살펴본 결과, *LsRZF1*은 CFP vector만 형질전환 시킨 원형질체와 마찬가지로 세포질에 발현됨을 알 수 있었다. 건조스트레스는 식물체 내 ABA 호르몬 집적을 유도하고, ABA 신호 전달과 밀접한 연관이 있다는 보고가 되어진 바, 환경스트레스 호르몬인 ABA에 대해 *LsRZF1* 유전자의 발현 양상을 살펴보았으며, 식물체의 생체 내, 참박 *LsRZF1* 유전자의 기능을 알아보기 위하여, 먼저 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 식물체에 과발현 형질전환체들을 제작하였고, 우수 순종 라인(OX18-2 및 OX32-5)들을 분리하여 확보하였다. 애기장대 형질전환체로부터 건조스트레스에 대한 *LsRZF1* 유전자의 생리적 및 분자적 특성을 살펴보았으며, WT 및 각 *LsRZF1* 형질전환체들로부터 건조스트레스 처리 후, 스트레스 관련 마커 유전자들의 발현을 분석하기 위하여, 프롤린 합성 관련 P5CS1, ROS 관련 AOX1a 및 수분결핍 스트레스 관련 ERD15 유전자들의 전사 발현량을 분석하였다. *LsRZF1* 단백질의 세포 내 생화학적 기능을 분석하기 위하여, MBP-*LsRZF1* construct를 클로닝한 후, auto-ubiquitination assay를 수행하였다. 공대수박 대목 형질전환체(T0 세대)들로부터 *LsRZF1* 유전자 도입(antisense 형질전환체) 여부를 분석하기 위하여 RT-PCR을 수행하였으며, *LsRZF1* 공대수박 형질전환체들로부터 genomic DNA-PCR을 통해 총 7종의 우수 순종 라인들을 선발하여 내건성에 대한 표현형을 분석하였다. 폴리아민의 첫 번째 단계인 Putrescine을 합성하는 Arginine decarboxylase(*ADC*)와 S-adenosylmethionine decarboxylase(*SAMDC*) 유전자를 참박으로부터 클로닝하여 형질전환을 시도하였다. 또한 참박 및 공대수박으로의 형질전환의 효율이 높지 않기 때문에 특히 중요한 *LsADC* 유전자의 경우는 애기장대에 형질전환하여 그 생물학적 및 비생물학적 기능을 확인하였다.

CsGolS1 유전자 형질전환체를 확보하여 세대진전을 진행하면서 형태적 특성을 비교하였고 종자를 확보한 후 종자를 파종하여 4일, 8일, 12일 후에 발아율을 조사하였다. 접목 친화성검정은 접목 15일 후의 생존율을 이용하였다. 일반 수박과 접목 후 만장, 절간장, 엽장, 엽폭 등을 조사하였고 수확 후 과 품질을 조사하였다. 또한 Pep J1-1 형질전환체의 대목 활용 가능성은 Pep J1-1 형질전환체와 야생종 수박을 교배하여 얻은 F<sub>1</sub>을 접수로 이용해 접목친화성, 생육특성, 과특성을 조사하였다. 또한, 건조 내성 및 내병성 검정을 위해 교배친 및 F<sub>1</sub>에 대한 chlorophyll content와 추출물을 이용한 *F. oxysporium*의 생육을 조사하였다. 우수 F<sub>1</sub> 생산을 위한 교배조합은 CsGolS1 유전자 형질전환체와 Pep J1-1 형질전환체를 모계로 이용하고 야생 근연종 수박을 부계로 이용하여 교배 후 채종하였고, 환경스트레스 복합내성 F<sub>1</sub> 식물체 작성을 위해 CsGolS1 유전자 형질전환체와 Pep J1-1 형질전환체를 교배하여 종자를 얻었다. 형질전환 대목의 농업현장 실용화 가능성 검토를 위한 물관리 방법 설정을 위해 토양수분조건별로 생육 및 과 특성을 조사하였다. 수분 관리는 센서를 설치하여 오전 8시에서 10시 사이에 15분 간격으로 3분씩 관수하였다. 토양수분조건은 1차 검증시 16±2%, 20±2%, 24±2%, 28±2%으로 실시하였고 2차 검증부터는 24±2%, 28±2%, 32±2%, 36±2%에서 시험하였다.

## V. 연구개발결과

### 1. CsGolS1 유전자 공대수박 형질전환체의 내병성 및 내재해성 계통 선발

CsGolS1 유전자 공대수박 형질전환체에서 수박 만고병균(*Didymella bryoniae*)에 저항성을 보이는 계통은 T3라인 4계통(GolS4-1-2, GolS4-2-2, GolS4-2-3, GolS4-2-5)과 T4라인 4 계통(GolS1-2-3-1, GolS10-21-2-4, GolS10-23-2-2, GolS10-25-4-4, GolS10-25-13-1)을 확보하였다. 또한 이들 계통 중 GolS10-21-2-4, GolS10-25-4-4 계통 덩굴쪄김병균(*Fusarium oxysporinum*)에 대해서도 항균활성이 확인되었다. CsGolS1 유전자 공대수박 형질전환체에서 먼저 NaCl과 고염 처리에 대한 내염성 정도를 클로로필 함량 측정을 통해 분석한 결과 T3라인 GolS4-1-2과 T4라인 GolS10-25-4-1으로 각각 1계통에 대하여 대조구에 비하여 고염에 대한 내성이 다소 차이가 나타남을 확인하였다. 그러나 고염에 대한 내성의 정도가 차이가 적어 추가적으로 CsGolS1 유전자 형질전환체의 고염에 대한 내성을 지닌 T1 라인 3계통(GolS10-1-1, GolS13-1-1, GolS45-3-1)을 선발하였다. 또한 고온에 대한 내성 검정을 실시한 결과 T1 라인 3계통(GolS9-4, GolS13-1, GolS45-3)을 확보할 수 있었다. 이들 계통에 대해서는 세대진전을 통한 T3 라인 3계통 확보하여 동일한 방법으로 고염과 고온에 대한 내성을 검정하였다.

### 2. Pep J1-1 유전자 공대수박 형질전환체의 내병성 및 내재해성 계통 선발

Pep J1-1 유전자 공대수박 형질전환체에서 수박 만고병균(*Didymella bryoniae*)에 저항성을 보이는 계통은 T4라인 17개 계통이 병징 크기에 다소차이가 있지만 모두 대조구에 비교하여 내병성을 있음을 확인하였다. 또한 이들 병원균 중 T4라인 2계통(WJ121-34-24, WJ121-34-36)에 대해서는 탄저병균에 대해서도 저항성을 나타남을 확인할 수 있었다. 또한 이들 계통 중 T4라인 2계통(WJ121-34-14, WJ121-34-15)에서 덩굴쪄김병균(*Fusarium oxysporinum*)에 대해서도 항균활성이 확인되었다. Pep J1-1 유전자 공대수박 형질전환체에서 먼저 NaCl과 고염 처리에 대한 내염성 정도를 클로로필 함량 측정을 통해 분석한 결과 과 T4 라인 2계통(WJ121-34-14, WJ121-34-31)이 염에 대한 내성이 있음을 확인하였다.

### 3. 공대수박 형질전환체 동형접합 호모라인 선발

CsGolS1 유전자 및 Pep J1-1 유전자 공대수박 각 세대 별 형질전환체 선발은 1차적으로 이들 유전자의 도입여부는 pBI121-1 binary vector 내 CaMV 35S promoter 부위와 NPTII 부위에서 primer를 제작하여 확인하였으며 이후 genomic southern 분석과 taq man PCR 분석을 통해 동형접합체 선발실험을 수행하여 최종 2계통(GolS13-1-1, GolS45-3-1)을 선발하였으며, Pep J1-1 유전자 계통에 대하여서도 추가적으로 taq man PCR 분석을 통해 동형접합체 선발 실험을 수행하여 5계통(WJ121-34-2-1-4, WJ121-34-15-1-4, WJ121-34-33-1-1, WJ121-34-33-1-4, WJ121-34-33-1-5)을 선발하였다. CsGolS1 유전자 및 Pep J1-1 유전자 형질전환 교잡종은 2014년 14가지 교배조합 중 최종 3계통(WJ121-34-15-1-4 X GolS10-3-1-1 과 WJ121-34-31-1-2 X GolS45-3-1-1, GolS10-1-1-1 X WJ121-34-2-1-5)을 선발하여 유전자도입 및 내재해성 검정을 진행하고 있다.

#### 4. *Agrobacterium* 매개 *LsRZF1*, *LsADC* 및 *LsSAMDC* 유전자가 도입된 공대수박 및 참박 형질전환체 생산

*LsSAMDC* 유전자가 도입된 형질전환체를 생산하기 위하여 공대수박의 경우 총 1,389개체에 도입하여 이중 989개체가 hygromycin 선발 평균 11.4%, 토양순화 생존 최종개체 확보율은 9개체(0.91%)이었다. 항생제 선발과정을 거치지 않은 개체는 400개체로 이 중 토양순화 생존 개체 수는 32개체(8%)으로 나타났으나 순화 후 생육과정에서 모두 고사되었다. 참박을 대목으로 사용한 경우 총 340개체 중 hygromycin 선발 평균 5.1%로 나타났으나 항생제 선발을 거치지 않은 25개체 포함 모두 순화 과정에서 고사되었다. *LsRZF1* 유전자가 도입된 형질전환체 생산은 공대수박을 사용하여 총 475개체에 도입하여 hygromycin 선발 평균 12%, 토양순화 생존 최종개체 확보율은 2.3%이었다. *LsADC* 유전자의 경우 대목으로 공대수박을 사용한 경우 총 315개체에 도입하여 hygromycin 선발 평균 3.4%, 토양순화 후 생존하는 개체가 없었고, 생육도중에 모두 고사되었다. 참박을 대목으로 사용한 경우 도입 개체수 총 447개체 중 항생제 선발 효율은 24개체(5.3%)였으나 공대수박과 동일하게 토양 순화과정에서 모두 고사되었다. *LsRZF1* 유전자가 도입된 식물체 11개체들에 대하여 CaMV35S promoter 부위와 *LsRZF1* 유전자 부위에서 각각 primer를 제작하여 유전자 도입분석을 실시한 결과 모든개체에서 유전자가 도입되어 있음을 알 수 있었다. 또한 이들 개체에 대하여 *LsRZF1* 유전자의 발현분석을 실시한 결과 모두 강하게 발현됨을 알 수 있었다. 이와 같이 선발된 11계통을 2세부에 인계하였다.

#### 5. *LsRZF1* 유전자 기능 분석 및 공대수박 형질전환체로부터 내건성 확인

*LsRZF1*은 중앙부분에 C3HC4-type zinc finger domain(195-236aa)을 포함하고 있었으며, 건조스트레스에 대한 *LsRZF1* 유전자의 발현 양상은 스트레스 처리 후, 정상 조건보다 5배 정도 감소하는 경향으로 나타났음을 알 수 있었다. 또한, *LsRZF1*은 CFP vector만 형질전환 시킨 원형질체와 마찬가지로 세포질에 발현됨을 알 수 있었다. *LsRZF1* 유전자 전사 발현량은 삼투스 스트레스 조건하에서 1.5배 정도 감소함을 확인 할 수 있었고, ABA 조건하에서 1.1배 정도 감소함을 확인 할 수 있었다. 수분결핍스트레스에 대해 *LsRZF1* 과발현 및 *atrzf1/LsRZF1* 형질전환체들은 매우 감수성임을 알 수 있었다. 정량 분석 결과, *LsRZF1* 형질전환체들은 20% 이하의 자엽이 녹색화 되는 반면, WT은 30%, *atrzf1* 돌연변이체는 무려 80%의 유식물체 자엽이 녹색화됨을 알 수 있었다. 또한, 삼투스스트레스에 대한 *atrzf1/LsRZF1* 형질전환체들의 cotyledon greening 결과로 보아, *LsRZF1* 유전자는 *AtRZF1* 유전자와 생체 내 유사한 기능을 할 것으로 추정되어진다. *LsRZF1* 각 형질전환체들은 WT과 *atrzf1* 돌연변이체 보다 스트레스 마커 유전자들의 전사 유도 증가율이 감소함을 알 수 있었다. 또한, *RAB18*, *RD29A* 및 *RD29B* 유전자들의 전사 발현량을 분석한 결과, *LsRZF1* 각 형질전환체들은 WT과 *atrzf1* 돌연변이체 보다 ABA 마커 유전자들의 전사 유도 증가율이 감소함을 알 수 있었다. *LsRZF1*은 중앙부분에 C3H2C3-type zinc finger domain을 포함하고 있으며, 이러한 C3H2C3-type zinc finger 단백질들은 ubiquitination E3 ligase activity를 가지고 있다는 보고가 된 바 있기 때문에 auto-ubiquitination assay를 수행하였다. Anti-MBP 항체를 이용, auto-ubiquitination assay 결과, *LsRZF1* 단백질은 E1 및 E2 단백질이 존재 하에 ubiquitination이 이루어짐을 알 수 있었다. 이러한 결과는 *LsRZF1* 단백질은 *AtRZF1*과 같이 세포 내 생화학적 기능으로써 E3 ubiquitin ligase임을 알 수 있었다. 현재 11종의 T3세대 *LsRZF1* 공대수박 형질전환체들로부터 총 7종의 우수 순종 라인들을 선발하였으며, K5-5-3, K6-1-6, K7-6-75 및 K9-8-11 라인들은

WT 보다 더 강한 내건성 표현형이 나타남을 알 수 있었다.

6. *LsADC* 및 *LsSAMDC* 유전자 기능 분석 및 애기장대 형질전환체로부터 내건성 확인  
푸트레신을 합성하는 Arginine decarboxylase(*ADC*)와 S-adenosylmethionine decarboxylase (*SAMDC*) 유전자를 참박으로부터 클로닝하여 환경스트레스 관련 기능을 분석한 결과, 건조 및 고염과 같은 비생물학적 스트레스와 만고병과 탄저병과 같은 생물학적 스트레스에 강하게 발현되는 현상을 확인하였다. 따라서 두 유전자를 식물형질전환 벡터에 클로닝한 후 1세대과제와 함께 대량으로 공대수박으로의 형질전환을 끊임없이 시도하였다. 또한 참박 및 공대수박으로의 형질전환의 효율이 높지 않기 때문에 특히 중요한 *LsADC* 유전자의 경우는 애기장대에 형질전환하여 그 기능을 확인하였다. 형질전환 후 기내 배양을 하면서 분자생물학적 기법으로 확인한 몇 종의 잠재적인 형질전환체들은 기내에서 순화 시키는 과정 및 온실에서 순화 시키는 과정에서 대부분이 고사하는 현상을 나타내었다. 아마도 폴리아민의 과다발현으로 인한 식물체내의 호르몬 불균형이 그와 같은 결과를 나타냈을 것으로 생각하고 있다. 그러나 다행스럽게 *LsADC* 유전자가 형질전환된 애기장대 형질전환체는 확보할 수 있었다. 따라서 *LsADC* 유전자 발현 및 푸트레틴 함량이 높은 *LsADC* 과발현 형질전환체들 중 두 개 라인을 선발하여 건조 내성에 대한 검정을 실시하였다. 형질전환 애기장대의 내건성을 분석한 결과 *col-0*에 비해 건조 스트레스에 대한 내성이 높게 관찰되어 *LsADC*에 의해 형성된 푸트레틴의 증가가 건조 내성을 증가시키는 중요한 역할을 했음을 확인하였다. 또한 애기장대 *AtADC* 유전자가 형질전환된 애기장대 형질전환체보다 참박 *LsADC*에 유전자가 형질전환된 애기장대 형질전환체가 형질전환 비율이 4.6배정도 감소하였으나 내건성은 더 우수함을 확인할 수 있었다.

#### 7. 형질전환 대목의 생육 및 특성 분석

*CsGolS1* 유전자 형질전환체를 대목으로 이용하여 접목 했을 때 15일 후 생존율이 95-97.5%였고 *Pep J1-1* 유전자 형질전환체 대목은 8일째 생존율은 97.5%로 두 형질전환체 모두 시판되고 있는 대목 품종들과 유사한 수준을 보였다. 생육과 특성에 있어서는 계통마다 다양한 특성을 보여 계통에 따라 대목으로 충분히 이용할 수 있을 것으로 판단되며, F<sub>1</sub> 교배조합은 *CsGolS1* 유전자 형질전환체 2계통과 *Pep J1-1* 유전자 형질전환체 5계통을 모계로 이용하고 야생근연종 수박 3계통을 부계로 이용하여 15조합에서 종자를 얻었고, *CsGolS1* 유전자 형질전환체 3계통과 *Pep J1-1* 유전자 형질전환체 3계통을 교배하여 12조합에서 종자를 얻었다. *Pep J1-1* 유전자 형질전환체와 *Pep J1-1* 유전자 형질전환체를 모본으로 만든 F<sub>1</sub> 계통에 대해서 토양수분 조건별 생육 및 과 특성을 조사하여 형질전환 대목 물관리 방법에 대해 검토하였다.

### VI. 연구성과 및 성과활용 계획

내재해성 및 내병성 형질전환 수박대목을 육성하기 위하여 고추 defensin(*PepJ1-1*)와 같은 항균활성을 지닌 유전자, 가뭄 및 고염과 같은 환경스트레스 내성 관련 오이 galactinol synthase1(*CsGolS1*) 유전자, 프롤린 생합성 관련 유전자(*LsRZF1*), 그리고 폴리아민 생합성 관련 유전자(*LsADC*, *LsSAMDC*) 등 다양한 유전자원을 활용한 수박 대목 형질전환체 생산 기술은 향후 내병성 및 내재해성 수박대목을 활용한 수박 재배기술 향상과 아직까지 국내에서 미흡한 박과작물 형질전환체 생산 기술에 활용할 수 있을 것이다. 또한 삼투조절물질(프롤린)

조절 기작연구는 식물 발달 최적화 시스템 개발 기술에 활용할 수 있을 뿐만 아니라, 스트레스 조건하에서 프롤린 유입 및 inter-organ 수송 조절 기작 연구에도 새로운 모델을 제시할 수 있을 것이다. 프롤린 대사 네트워크 연구 결과로 인하여 metabolic signaling, redox signaling, 프롤린과 flower transition 관계, embryo 발달 단계에서의 프롤린의 역할 등 프롤린의 생물학적 기능을 규명할 수 있을 것이며, 프롤린은 보습효과가 뛰어난 삼투조절물질로써 가뭄 및 저온 등 식물 환경스트레스에 대한 저항성 강화 식물을 개발하는 기술에 활용할 수 있을 것이다. 따라서 내재해성 강화 작물에 따른 작물의 수확량 개선 및 종자산업의 활성화를 유도할 수 있을 것이다. 또한 식물의 병저항성 및 건조 내성에 대한 프트렛신의 역할을 밝힘으로써 폴리아민을 이용한 식물의 환경스트레스 내성 관련 기초 지식을 습득할 수 있으며 이는 농업 현장에서 응용화 될 수 있는 가능성이 있어 농업 생산성에 기여하게 될 것으로 생각된다. 그리고 건조에 강한 기후변화 대응용 형질전환 수박 대목의 개발은 관수량을 줄일 수 있어 농업용수를 절감하고 관수노동력을 줄일 수 있고, 뿐만 아니라 다습한 환경에서 발생하는 병해충의 발생을 줄일 수 있어 방제에 필요한 약제 및 노동력의 절감으로 생산단가를 낮춰 수박재배 농가의 소득향상에 도움이 될 것으로 판단된다. 또한 작형별 적정 토양수분조건을 밝힘으로써 과중 증가 및 품질 향상이 가능해져 고품질 수박을 생산할 수 있을 것으로 사료된다.

# SUMMARY

## I. Title

Studies on practical use of transgenic watermelon root-stock for coping with climate change

## II. Research results reference

1. Applied for a patent [Transgenic plant with enhanced tolerance to heat stress and salt stress by introducing CsGolS1 gene and use thereof] (South Korea Patent No.10-2014-0070259).(2014. 06)
2. A technology transfer to Myungsan Seed Company, Inc. using the patent application (South Korea Patent No.10-2014-0070259).(2015. 05)
3. Overexpression of L-type lectin-like protein kinase 1 confers pathogen resistance and regulates salinity response in *Arabidopsis thaliana* (2013) Plant Science 203-204, 98-106.
4. Heterologous expression of the gourd E3 ubiquitin ligase gene LsRZF1 compromises the drought stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* (2014) Plant Physiology and Biochemistry 77, 7-14.
5. Putrescine regulating by stress-responsive MAPK cascade contributes to bacterial pathogen defense in *Arabidopsis* (2013) Biochem. Biophys. Res. Commun 437, 502-508.
6. Involvement of the OsMKK4-OsMPK1 cascade and its downstream transcription factor OsWRKY53 in the wounding response in rice (2014) Plant Pathology Journal 30, 168-177.
7. Effect of heat treatment around the fruit set region on growth and yield of watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai](2013), Physiology and Molecular Biology of Plants, 509-514.
8. Occurrence of Diseases and Case of Clinical Diagnosis on Watermelon in South Korea, 2008-2012 (2014), Research in Plant Disease, 8-14.
9. Effect of plant growth regulators on regeneration from the cotyledon explants in Watermelon (*Citrullus lanatus* (thunb.) Matsum. & Nakai) (2014) Korean J. Plant Research 27, 51-59.
10. Several poster presentation; Transgenic watermelon root stock plants overexpressing the cucumber galactinol synthase showed enhanced resistance against fungal pathogen. The Korean Society for Plant Biotechnology, The lsrzf1 antisense transgenic line of the novel Ring-type E3 ubiquitin ligase increase proline cotensts in Gong-dae watermelon cultivar. The Korean Society for Plant Biotechnology, Cloning and expression analysis of an arginine decarboxylase gene from bottle gourd (*Lagenaria siceraria*). The Korean Society fro Plant Pathology, etc.

### III. Importance and objectives of the research

Gourd family (*Lagenaria siceraria*) is one of the most important agricultural crops in the world. Water deficit is the major limiting factor for crop productivity. To improve gourd tolerance to drought stress, identification of abiotic stress tolerance-related genes is important. Proline accumulation is a common physiological response in higher plants exposed to drought and salt stress [1]. Proline is considered to be an important osmolyte that acts as a molecular chaperone to stabilize the structure of proteins, as well as a regulator of cellular redox potential and an antioxidant controlling free radical levels [2]. Plants that are challenged by drought and salt stress recruit ABA as an endogenous signal that initiates adaptive responses [3]. During late embryogenesis, ABA promotes the acquisition of desiccation tolerance and seed dormancy, and inhibits seed germination [4, 5]. The molecular mechanisms underlying ABA-mediated plant tolerance to drought stress are still not fully understood because of the complex nature of the plant response to ABA signaling and drought stress. However, the study of stress-responsive transcription factors has been one of the foci in studies on drought stress tolerance [6]. Protein ubiquitination is an important post-translational modification process that is employed by eukaryotes to regulate diverse cellular and developmental processes [7]. In higher plants, ubiquitinated proteins are involved in abiotic or biotic stress response, hormone response, cell cycle progression and cell differentiation [8, 9, 10, 11]. RING (for Really Interesting New Gene) motif-containing E3 ubiquitin ligase comprises one of the largest gene families in the plant genome. The Cys-rich RING zinc finger was first described in the early 1990s [12]. It was defined as a linear series of conserved Cys and His residues (C3HC/HC3) that bind two zinc atoms in a cross brace arrangement. RING zinc fingers can be divided into two types, C3HC4 (RING-HC) and C3H2C3 (RING-H2), depending on presence of either a Cys or a His residue in the fifth position of the motif [13]. Recently, a number of Arabidopsis RING E3 ubiquitin ligases were shown to be involved in various cellular processes, such as auxin signaling, ABA signaling, brassinosteroid response, seed germination, seedling development, adaptive pathway to nitrogen limitation, and sugar responses [9, 14, 15, 16, 17]. In particular, RING proteins play a key role in the response to environmental stimuli. For example, they participate in photomorphogenesis, defense signaling, senescence, and tolerance mechanisms against cold, drought, salt and osmotic stress [6, 8, 18, 19]. Recently, we described the functional characterization of a C3H2C3-type RING-H2 zinc finger protein, designated Arabidopsis thaliana RING Zinc Finger 1 (AtRZF1) [20]. Functional studies demonstrated that AtRZF1 participates negatively in proline production under drought condition. Water deficit response assays indicated that, while the *atrzf1* mutant was less sensitive to drought, AtRZF1-overexpressing plants were more sensitive, suggesting that AtRZF1 negatively regulates the drought response during early seedling development. Furthermore, our previous data reported that AtRZF1 is a functional ubiquitin E3 ligase [20]. In this research, an ortholog of the AtRZF1 gene in the gourd species *Lagenaria siceraria*, LsRZF1, was cloned to examine the role of LsRZF1 by expression in

Arabidopsis. The gene was reduced in response to drought stress and ABA phytohormone. The response of constitutive expression, leading to both complementation and ectopic expression of *LsRZF1* in the *atrzf1* mutant and transgenic Arabidopsis plants, respectively, against different abiotic stresses was studied. *LsRZF1*-ectopic expressing plants were hypersensitive to osmotic stress in terms of cotyledon development due to the reduction in the contents of proline and regulated the expression of stress-related genes. The physiological processes of the drought induced phenotype began faster in the *LsRZF1*-ectopic expressing lines than in the wild type(WT) and *atrzf1* complementation plants. Additionally, ubiquitin E3 ligase activity and genetic data indicated that *AtRZF1* and *LsRZF1* function in a similar pathway to control proline metabolism in Arabidopsis under drought condition. Bottle gourd has been used as a source of rootstock for watermelon against soil-borne disease and low soil temperature. However, the wilt of cucurbit crops in the field was caused by abiotic stress such as drought. The improved stress tolerance of bottle gourd rootstock will be needed for breeding program. Therefore, we tried to clone an arginine decarboxylase(*ADC*) gene, which is involved in plant putrescine(Put) biosynthesis, from bottle gourd and to analyze its expression in abiotic stress conditions. Transcripts of *LsADC* and *LsSAMDC* in bottle gourd leaves were induced continuously in response to drought and high salt treatment and pathogen infection as well. Taken together, *LsADC* and *LsSAMDC* are stress-responsive genes and could be used as candidate genes for bottle gourd genetic transformation in the future. In addition, polyamines in plants are involved in various physiological and developmental processes including abiotic and biotic stress responses [21,22]. We investigated the expression of ADCs, which are key enzymes in putrescine(Put) biosynthesis, and roles of Put involving defense response in *Arabidopsis*. Finally, the disease susceptibility of the *adc2* mutant was recovered by the addition of exogenous Put [23,24]. Also, we were able to measure putrescine accumulation in transgenic Arabidopsis plants harboring *LsADC* gene compared to wild type. The transgenic *LsADC* Arabidopsis plants confers tolerance to drought stress. These results suggest that Put is believed to have to have an osmoprotectant function in plants cells under water deficit. Management of irrigation in greenhouse is one of environmental factors that affect on watermelon growth and fruit quality. Moreover, soil moisture provides favorable environment for pathogens. Zoospore of oomycete moves to another host and reproduce through water and it can be a vector of *Melon necrotic spot virus*(MNSV). The occurrence of MNSV is mostly observed in high soil moisture. Infected plants showed poor growth led to reproduction of small fruits and sugar content and value of commodities were decreased. Thus, the management of irrigation in greenhouse can reduce the occurrence of fungal diseases as well as virus vectors. The utilization of drought tolerance cultivar is one of methods to decrease water supply. Guard rootstocks have been used for grafting of watermelon are sensitive to dry and high moisture. Therefore, the development of new rootstocks is needed. Since MNSV has been found on watermelon that use guard as rootstocks, the development of rootstocks resistant to MNSV is considered to be crucial.

#### IV. Research contents and results

1. We produced several homozygous transgenic lines using the cucumber galactinol synthase 1(*CsGolSI*) gene and pepper defensin(*Pep J1-1*) gene, respectively, and their enhanced tolerance against several environmental stresses were discussed in these experiments. In order to obtain large pools of transgenic lines that can be developed as resistant root stock for the growth of watermelon against drought and fungal diseases, we continue to produce transgenic Gongdai watermelon and gourd plants using gourd genes such as *LsRZF1*, *LsSAMDC*, and *LsADC*.

2. Several lines of evidence show that AtRZF1 belongs to the C3H2C3-type RING-H2 zinc finger gene family in the complete Arabidopsis genome, and its biochemical functions have reported as one of the negative ubiquitin E3 ligase of stress responses [20]. In an effort to gain an insight into the function of the RING-H2 zinc finger gene in plants, we attempted to isolate the gene in gourd species *L. siceraria* that encodes for sequences similar to the isolated AtRZF1. The isolated cDNA sequence comprised 918 bp and encoded 305 amino acids with a calculated molecular weight of 33.5 kDa. The protein harbored a predicted zinc finger domain as shown by software program. The deduced amino acid sequence displayed a considerable degree of homology with already identified AtRZF1. The *L. siceraria* gene was therefore designated as *LsRZF1*. Overall homology values of 59% identity and 66% similarity were observed between *LsRZF1* and AtRZF1 proteins. *LsRZF1* contains a single RING domain in its central region that is 83% identical to the corresponding region of AtRZF1 proteins. To obtain clues regarding the functions of *LsRZF1*, accumulation of *LsRZF1* mRNA in 14-day-old gourd seedlings was assessed during drought and mannitol treatment using qPCR. *LsRZF1* transcripts were significantly reduced in response to drought and slightly declined during osmotic stress. *LsRZF1* mRNA was reduced 5.1- and 1.5-fold by drought and mannitol treatments, respectively. The AtRZF1 protein is a member of the C3H2C3-type RING-H2 protein and has previously been tested for E3 ligase activity [20]. Thus, it was of interest to test the ability of *LsRZF1* to function as an E3 ligase in the ubiquitination process. Toward this end, *LsRZF1* was tested for E3 ligase activity using in vitro assays. Recombinant MBP-*LsRZF1* protein was produced in *E. coli* and affinity purified using amylose resin. In the presence of E1 and E2, ubiquitinated MBP-*LsRZF1* proteins were detected by immunoblot analysis using anti-Ub antibody. In the absence of either E1 or E2, the ubiquitination activity was not observed with MBP-*LsRZF1*. High-molecular-mass ubiquitinated bands were produced by *LsRZF1*, indicating that *LsRZF1* had Ub E3 ligase activity in vitro. MBP-AtRZF1 protein was used as positive control for in vitro ubiquitin E3 ligase activity. To assess its function in vivo, *LsRZF1* ectopic expression was induced in Arabidopsis under the control of the 35S promoter. Sixteen homozygous lines(T3generation) were obtained. Two lines(OX18-2 and OX32-5) with high levels of transgene expression were selected for phenotypic

characterization. In an effort to further evaluate the function of LsRZF1 in Arabidopsis, a complementation test was done. LsRZF1 gene was ectopically expressed in the *atrzf1* mutant. An independent complementation line was selected and confirmed by RT-PCR. RT-PCR analysis revealed that LsRZF1 transgene was clearly expressed in *atrzf1* complementation T3 transgenic plants. This T3 complementation line was used to analyze stress-related phenotypes. To assess the effects of LsRZF1 expression on dehydration stress, seeds of WT, *atrzf1*, *atrzf1/LsRZF1* and LsRZF1-ectopic expressing plants were germinated on MS medium. Macroscopically, there was little difference in terms of plant growth among the WT, *atrzf1*, *atrzf1/LsRZF1* and LsRZF1-ectopic expressing plants (OX18-2, OX32-5). The germination ratio among WT, *atrzf1*, *atrzf1/LsRZF1* and LsRZF1-ectopic expressing plants was similar and not poor on MS medium. At 400 mM mannitol, approximately 30% of the WT leaves expanded and turned green 10 days after germination, as compared to less than 18% and 6-14% of the *atrzf1/LsRZF1* and LsRZF1-ectopic expressing lines (OX18-2 and OX32-5), respectively. On the contrary, 80% of the *atrzf1* mutant line remained alive at 10 days after germination. To assess water loss from leaves, leaves of similar size, age, and positions on WT, *atrzf1*, *atrzf1/LsRZF1* and LsRZF1-ectopic expressing plants were detached and measured for decreases in fresh weight, as described previously [20]. After detachment, leaves from the *atrzf1/LsRZF1* and LsRZF1-ectopic expressing plants exhibited higher loss of fresh weight than those from WT and *atrzf1* plants under ambient conditions. The difference occurred within 20 min, and became more apparent following detachment. These results indicate that physiological processes of drought induced phenotype began faster in the LsRZF1-ectopic expressing line than in the WT and *atrzf1* plants. Since AtRZF1 participates negatively in proline production under drought condition [20], we determined the proline content in rosette leaves of WT and transgenic plants. To assess whether there were differences in the accumulation of proline among WT, *atrzf1*, *atrzf1/LsRZF1* and LsRZF1-ectopic expressing plants, the proline contents of leaves were determined at 10 days after drought treatment. Before stress, the contents of proline were at similarly low levels in all seedlings. Under drought stress, a significant difference in proline content was observed among WT, *atrzf1*, *atrzf1/LsRZF1* and LsRZF1-ectopic expressing plants. With regard to proline, the *atrzf1* mutant exhibited higher levels than the WT, *atrzf1/LsRZF1* and LsRZF1-ectopic expressing plants. The content of proline was slightly more induced by drought treatment in WT and *atrzf1/LsRZF1* plants than in the LsRZF1-ectopic expressing plants. To identify the association between LsRZF1 and ABA response, accumulation of LsRZF1 mRNA in 7-day-old gourd seedlings was assessed during ABA treatment using qPCR. qPCR results demonstrated that LsRZF1 mRNA showed 4.3-fold reduction by ABA treatment. As the seeds of the WT, *atrzf1*, *atrzf1/LsRZF1* and LsRZF1-ectopic expressing plants (OX18-2 and OX32-5) were germinated on MS medium containing 0 or 1 mM ABA, the relative reduction in the cotyledon greening of the *atrzf1/LsRZF1* and LsRZF1-ectopic expressing lines in response to ABA treatment was more profound than was observed in the WT and

atrzf1 plants at 10 days after germination. In the WT plants, the cotyledon greening efficiency dropped to 26% relative to the untreated plants(100%), whereas the cotyledon greening efficiency of atrzf1/LsRZF1 and LsRZF1-ectopic expressing lines was 19% and 11-14%, respectively, of control levels with the experimental concentration of ABA. However, the cotyledon greening efficiency of atrzf1 mutant lines was reduced to 68% of that of untreated plants with the 1 mM ABA. The transcript levels of stress-inducible genes including RAB18, RD29A and RD29B displayed less induction in atrzf1/LsRZF1 and LsRZF1-ectopic expressing OX18-2 and OX32-5 lines than in the WT and atrzf1 plants following ABA treatment. However, expression of the three genes was more induced by ABA treatment in the atrzf1 mutant lines than in the WT plants.

3. The full length of *LsADC* gene was isolated through RT-PCR using primers designed based on highly conserved region of cucumber ADC gene. Sequence analysis by BLASTX program revealed that the putative amino acid sequence of *LsADC* shared high identities with known ADCs from other plants, such as cucumber(96%), *Nicotiana tabacum*(76%), *Arabidopsis thaliana*(71%) and rice(64%). The *LsADC* contained two well-conserved motifs characteristic of decarboxylase and a potential chloroplast transit peptide in the N-terminal. *LsADC* was expressed at high level in the stem, cotyledon and root, whereas a weak signal could be detected in the leaves. Transcripts of *LsADC* in bottle gourd leaves were induced continuously in response to drought and high salt treatment and pathogen infection as well. Furthermore, the full length of *LsSAMDC* gene was also isolated through RT-PCR using primers designed based on highly conserved region of cucumber SAMDC gene. Sequence analysis by BLASTX program revealed that the putative amino acid sequence of *LsSAMDC* shared high identities with known SAMDCs from other plants, such as cucumber(48%), *Nicotiana tabacum*(71%), *Arabidopsis thaliana*(67%) and rice(55%). The *LsSAMDC* contained one well-conserved PEST domain. *LsSAMDC* was expressed at high level in the stem, cotyledon and root, whereas a weak signal could be detected in the leaves. The expression of ADC2 was highly induced by *Pst* DC3000 inoculation, while the transcript levels of ADC1 were slightly up-regulated. Compared to the WT plant, Put content in the *adc2* knock-out mutant was reduced after *Pst* DC3000 inoculation, and showed enhanced susceptibility to pathogen infection. The *adc2* mutant exhibited reduced expression of PR-1 after bacterial infection and the growth of the pathogen was about 4-fold more than that in the WT plant. Also, we were able to measure putrescine accumulation in transgenic *Arabidopsis* plants harboring *LsADC* gene compared to wild type. The transgenic *LsADC Arabidopsis* plants confers tolerance to drought stress.

4. Generation advancement, investigation of growth characteristics and seed collection was conducted using Galactinol transgenic plant. Collected seeds was seeded and then invested germination rate 4, 8, 12 days after. Grafting compatibility is tested using survival rate 15 days after draft. Fruit qualities and plant height, internode length, leaf length, leaf width

was investigated after grafting with general watermelon. Fruit qualities of watermelon was produced using Defensin transgenic plant as rootstock was investigated. Grafting compatibility, growth characteristics, fruit characteristics of F<sub>1</sub> from crossbreeding between Defensin transgenic plant and wild wild species was investigated. To test dry tolerance and disease endurance, chlorophyll content and growth of *F. oxysporium* on crossing parent and F<sub>1</sub> extract. To develop superior F<sub>1</sub>, Defensin and Galactinol transgenic plants were use as mother plants and wild species of watermelon was used as father plant for crossbreeding. Reciprocal cross between Defensin and Galactinol transgenic plants were conducted. Ultimately, seeds from all crosses were collected. To establish the method of the irrigation management, growth and fruit characteristics on the basis of levels of soil moisture were investigated in Defensin transgenic plant, and F<sub>1</sub> from mother transgenic plant expressing Defensin. Water was supplied for 3min. at every 15min. intervals during 8~10a.m.. Soil moisture content was 16±2%, 20±2%, 24±2%, 28±2% and 24±2%, 28±2%, 32±2%, 36±2%.

## VI. Research scope

In an effort to identify the novel components involved in water deficit response in gourd species *L. siceraria*, we have identified one drought stress-reducible gene, LsRZF1, for functional analysis. The predicted LsRZF1 protein possessed C3H2C3-type RING-H2 zinc finger motif, and phylogenetic analysis revealed indicated that LsRZF1 displays high homology with other RING-H2 zinc finger protein watermelon family genes. RING motif-harboring proteins have been shown to work as ubiquitin E3 ligases. Our self-ubiquitination analyses demonstrate that the LsRZF1 protein is indeed an active E3 ligase based on the occurrence of autoubiquitination of the MBP-LsRZF1 fusion protein in the presence of the E1 and E2 enzymes. As expected, *atrzf1/LsRZF1* and *LsRZF1-ectopic* expressing lines were more sensitive to osmotic stress than the WT, whereas *atrzf1* mutant plants displayed enhanced tolerance to osmotic stress. These data suggest that the biological function of LsRZF1 is a similar with *AtrRZF1* in the drought stress response. Consequently, our study also demonstrates a distinct difference in water loss and proline contents among *atrzf1/LsRZF1*, *LsRZF1-ectopic* expressing and *atrzf1* mutant lines. Although plant RING motif-harboring ubiquitin E3 ligases have concerned much interest as they are involved in diverse cellular and developmental processes, there are only a few reports on the functional correlation between RING motif-harboring E3 ligases and ABA-mediated drought stress responses. Overexpression of *AtAIRP1* (for ABA Insensitive RING Protein 1), encoding an Arabidopsis C3H2C3-type RING E3 ligase, resulted in drought tolerance through enhanced ABA sensitivity during germination [11]. Overexpression of *SDIR1* leads to ABA and salt hypersensitivity during seed germination and stomatal closure, resulting in tolerance to drought stress. Most recently, *RGLG2*(for RING domain Ligase 2), a RING E3 ligase, negatively regulates the drought stress

response by mediating AtERF53 (for Ethylene Response Factor 53) transcriptional activity in *Arabidopsis*. The *atrzf1/LsRZF1* and *LsRZF1*-ectopic expressing plants were hypersensitive to ABA in terms of cotyledon greening, supporting the notion that *LsRZF1* is a component responsible for induction of drought sensitivity through the ABA-dependent process. Furthermore, the transcript levels of ABA-inducible genes including *RAB18*, *RD29A*, and *RD29B* displayed less induction in *atrzf1/LsRZF1* and *LsRZF1*-ectopic expressing lines than in WT and *atrzf1* plants following ABA treatment. Several of the present results support the suggestion that *LsRZF1* can regulate the drought stress response through an ABA-dependent signal transduction pathway. A functional ubiquitin E3 ligase, *LsRZF1*, is involved in drought-regulated seedling growth and act as a negative regulator of the water deficit stress response. In the future, transcriptional profiling analyses may provide additional insights into the mechanisms by which *LsRZF1* exerts its function. Particularly interesting challenges are to identify *LsRZF1*-interacting proteins by yeast two-hybrid screening approach. The results of this experiment will provide a better understanding of the cellular functions of *LsRZF1* E3 ligase with regards to drought stress responses in plants. The polyamine pathway is ubiquitous in living organisms. Polyamines are low molecular weight polycationic molecules, which are thought to play important roles in a number of physiological and developmental processes. Manipulation of polyamine pathway in plants through molecular techniques is possible because of a significant increase in our knowledge about the pathway. Transgenic plants we have generated exhibiting increased tolerance to drought stress will be evaluated in field trials. Development of dry tolerance transgenic rootstock for watermelon can reduce irrigation, so it can lead to reduce the agricultural water use and irrigation labor. In addition to, occurrence of pest and disease caused in high humidity can be reduced by irrigation control. Low incidence of pest and disease conduce to save chemicals and labor for prevention and control. Dry tolerance transgenic rootstock help to improve sugar content through prolongation of water supply cut off period in harvest stage, and so increase high quality watermelon production. In conclusion dry tolerance transgenic rootstock can lower production cost and improve income of watermelon farm.

# CONTENTS

Chaper 1. Outlines of research .....	20
Chaper 2. Current status of related research developed in Korea and other countries.....	24
Chaper 3. Results of research.....	27
Chaper 4. Achievement of aims and contribution to related areas .....	88
Chaper 5. Application of results .....	97
Chaper 6. Information collected from aboard during the research period .....	98
Chaper 7. Research instrumentation and facilities .....	99
Chaper 8. Laboratory safety and management.....	100
Chaper 9. References.....	101

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표 .....	20
제 1 절 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 .....	20
제 2 절 연구성과 목표 대비 실적 .....	22
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	24
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	27
제 1 절 기후변화 대응을 위한 형질전환 수박 대목 실용화 연구 .....	27
제 2 절 내재해성 및 복합기능성 수박 대목 개발 및 실용화 .....	54
제 3 절 내재해성 수박 대목 품종 육성 및 실용화 연구.....	71
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	88
제 1 절 기후변화 대응을 위한 형질전환 수박 대목 실용화 연구 .....	88
제 2 절 내재해성 및 복합기능성 수박 대목 개발 및 실용화 .....	90
제 3 절 내재해성 수박 대목 품종 육성 및 실용화 연구.....	94
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용계획.....	97
제 1 절 추가연구의 필요성 및 타 연구에의 활용.....	97
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	98
제 7 장 연구시설·장비 현황.....	99
제 8 장 연구실 안전관리 이행실적.....	100
제 9 장 참고문헌.....	101
<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서.....	104

# 제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

## 1절. 연구개발의 목적, 필요성 및 범위

지구온난화 및 이상기후에 따른 극심한 가뭄 혹은 저온 스트레스에 의해 농작물의 피해가 점점 증대할 뿐만 아니라, 수자원 (물)의 확보 및 작물재배에 있어서 관수 방법 개발이 세계 모든 국가가 갖고 있는 앞으로의 사회적·산업적인 문제점으로 대두되어지고 있다. 또한, 시설재배지가 증가함에 따라 농업용수의 부족이 현실화되고 있으며, 이에 따라 생육시기별로 정밀한 관수 프로그램과 물을 적게 소모하는 품종개발이 필요하다. 수박의 품질은 수확 전 단수기간에 많은 영향을 받으며 단수기간이 길어지면 당도가 증가하지만 필요이상으로 길어지면 시들음 증상이 발생하기 때문에 품질향상을 위해서는 건조에 강한 대목개발의 연구가 시급하다. 대목용 형질전환 수박의 개발이 우리나라에서도 시도된 적은 있지만 현재까지 실용화된 경우는 없기 때문에, 환경스트레스에 강하고 품질을 높일 수 있는 대목이 개발될 수 있다면 안정성 및 위해성 심사 후 곧 상품화로 이어질 수가 있다. 특히 수박은 연작의 피해가 심한 작물이기 때문에 수박에 치명적인 토양전염성 병의 회피 및 품질향상 그리고 수량증대를 위해 내건성, 내습성 및 저온신장성 등과 같은 불량환경에 내성이 강한 대목을 이용한 접목재배가 이루어지고 있는 실정이다. 그러한 이유로 접목친화성이 좋고 토양전염성 병에 강하며 동시에 극심한 가뭄 혹은 저온 스트레스와 같은 불량환경에 내성이 강한 대목이 필요하나 현재 수박 대목으로 많이 이용되고 있는 참박과 공대수박은 각각 대목으로써 단점을 가지고 있으므로 이를 보강해 주기 위해서는 노력의 일환으로 내병성과 내재해성이 강화된 형질전환 대목의 개발이 필요하다 하겠다.

이러한 내병성과 내재해성 형질전환 수박대목을 개발하기 위해서는 무엇보다 다양한 작물에서 항균활성이나 가뭄 및 저온과 같은 환경스트레스 내성을 유발하는 기능적인 유전자의 도입이 중요하다. 식물 defensin 유전자는 균사의 생육을 억제하고 식물의 세포벽을 강화시키고 세포질 내 칼슘의 농도를 증가시켜 병원균에 저항성을 유도하는 유전자로 최근 알려지고 있다. 그리고 실제 이러한 defensin 유전자가 도입된 *Aspergillus*, 토마토 및 바나나 형질전환체는 병원균이 공격해 왔을 때 식물체 액포내로 targeting 되어 protease와 관련된 방어기능을 하는 것으로 밝혀지고 있다. 그러나 이러한 defensin 유전자가 도입된 박과작물 형질전환체에 관한 연구는 전혀 보고된 바가 없으며 내병성에 관한 기작과 salt stress와 같은 환경스트레스에 관한 연구도 진행된 바가 없다. 또 다른 유전자인 galactinol synthase는 대표적인 raffinose family oligosaccharides(RFO)의 당합성 관련 효소로서 애기장대 식물에서는 가뭄과 고온반응에서 식물세포를 보호하는 역할을 하며 오이에서 분리된 galactinol synthase1(*CsGolSI*)유전자는 식물성 병원균 뿐만 아니라 가뭄 및 고염과 같은 환경스트레스 내성을 유발시킨다고 알려져 있다. 그러나 이러한 오이 galactinol synthase1(*CsGolSI*)유전자가 도입된 수박대목개발에 대한 연구는 전무할 실정이다. 따라서 본 연구과제를 통해 고추 defensin(PepJ1-1)과 오이 galactinol synthase1(*CsGolSI*)유전자가 도입된 공대수박 형질전환체를 이용하여 다양한 병원균과 가뭄, 고염 및 고온에 내성을 보이는 계통들을 선발하고 추가적으로 프롤린 생합성 관련 유전자 (*LsRZF1*)와 폴리아민 생합성 관련 유전자(*LsADC*, *LsSAMDC*)를 이용하여 가뭄과 같

은 환경스트레스에 강한 공대수박 형질전환 수박 대목 품종을 생산하고자 하였다.

식물은 특정 조건하에서의 세포 내 수분 항상성 유지에 식물 성장 및 대사 작용에 매우 중요하기 때문에 삼투조절 기작연구는 작물 발달 최적화 시스템 개발에 매우 중요한 분야이며, 특히 프롤린은 보습효과가 뛰어난 삼투조절물질로써, 가뭄 및 저온 등 작물 환경스트레스에 대해 농작물이 성장하는데 있어서 매우 중요한 물질이다. 또한, 프롤린은 단백질 합성뿐만 아니라, 광합성 효율, 개화시기 및 embryo development에 아주 중요한 신호 분자로 최근 알려지고 있다. 단백질 번역 후 변형 과정은 세포 내 단백질의 올바른 기능을 하기 위해서 매우 중요한 세포학적 과정이고, 그러한 세포학적 기능 연구는 스트레스 조건하에서 식물 성장 및 발달 기작 규명에 아주 중요하나 현재 초보적인 수준이라 말할 수 있다. 특히 세포 내 단백질 번역 후 ubiquitination 과정은 단백질 분해 및 상호결합작용, 효소 활성화 등을 통하여 비생물학적 스트레스 반응, cell cycle progression, 신호 전달, 식물 발달, 노화 과정, 방어 기작 등을 조절하는 매우 중요한 post-translational modification 방법 중 하나이며, 단백질 ubiquitination 조절 변형 시스템에 의한 세포 내 프롤린 대사물질 조절은 현재까지 그 기작이 알려지지 않았고, 더군다나 관련된 유전자들의 상관관계 혹은 기능에 대해서도 얼마 수준에 있다고 볼 수 있다. 즉, 본 연구의 최종 목적은 단백질 ubiquitination 시스템에 의해 유도되어지는 프롤린 대사 네트워크를 이용하여 작물 발달 프로그램을 동정함과 동시에 작물 환경스트레스에 대한 저항성 강화 수박 작물을 개발하고자 하였다. 또한 폴리아민은 복수의 아미노산을 가지고 있어 DNA, RNA, 인지지방질, 산성 단백질 및 막과 세포벽에 존재하는 많은 음이온을 가진 물질과 강한 친화력을 나타내는 물질로 생물의 성장과 분화에 필수적이며 식물의 성장과정에서 쉽게 노출되는 생물학적 및 비생물학적인 다양한 형태의 스트레스 반응에도 관여되어 있는 것으로 알려져 있으며 이러한 폴리아민 생합성 관련 유전자를 이용한 형질전환체가 전 세계적으로 지속적으로 만들어지고 있다. 그러나 이렇듯 세포에서 필수불가결한 구성 성분으로 핵산작용의 조절, 단백질 합성과 막 안정성에 주요한 역할을 수행하는 폴리아민을 이용한 수박 대목 연구는 전 무한 상태이므로 본 연구에서 폴리아민 생합성 관련 유전자를 이용해 수박 대목 형질전환체를 개발하여 내건성, 내병성 및 기능성 물질의 분석 등을 통한 폴리아민의 기능 연구를 수행하여 실용화하고자 하였다.

또한 내재해성 형질전환 대목을 이용하여 시판 수박품종과의 접목친화성, 접목 후 생육특성 및 과 품질특성을 조사하여 내재해성 형질전환 중간모본에 대해 대목으로서의 이용 가능성을 검정하고자 하였으며 형질전환 대목 계통을 이용한 교배조합 작성 및 종자생산, 내재해성 및 접목친화성 검증, 접목 후 수박 품종별 품질 비교를 통해 내재해성 F<sub>1</sub> 대목을 개발하고자 하였다. 또한 형질전환 대목 중간모본과 F<sub>1</sub>을 이용하여 토양수분 함량에 따른 생육 및 과 품질 특성조사를 통해 형질전환대목 실용화를 위한 관수방법을 확립하고자 하였다.

## 2절. 연구성과 목표 대비 실적

본 연구과제를 수행하면서 오이유래 CsGolS1 유전자가 도입된 공대수박 형질전환체 식물에 대한 고온 및 염에 대한 내성 기능을 규명하여 “오이 유래 CsGolS1 유전자를 이용한 고온 또는 염에 대한 내성이 증진된 형질전환 식물체 및 이의 용도”에 관한 특허를 출원하였으며(출원번호 10-2014-0070259), 출원된 관한 특허를 활용하여 (유)명산종묘에 2015년 5월에 기술이전을 수행하였다. 그리고 LsRZF1 단백질에 의해 조절되어지는 AtLPK1 유전자의 병원균 및 수분결핍스트레스 관련 세포 내 기능을 규명하여 “Overexpression of L-type lectin-like protein kinase 1 confers pathogen resistance and regulates salinity response in *Arabidopsis thaliana*” 제목으로 SCI 저널인 Plant Science에 게재하였으며(2013년 4월), 또한 참박으로부터 유비퀴틴 관련 효소인 LsRZF1 단백질의 세포 내 생화학적 기능 동정 및 가뭄스트레스 관련 프롤린 조절을 규명하여 “Heterologous expression of the gourd E3 ubiquitin ligase gene LsRZF1 compromises the drought stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*” 제목으로 역시 SCI 저널인 Plant Physiology and Biochemistry에 게재하였다 (2014년 4월). 그리고 참박 E3 ubiquitin ligase LsRZF1 유전자가 형질전환된 공대수박에서 내건성을 확인하여 국내 특허출원을 전남대학교 산학협력단에 위임한 상태이며 현재 같은 내용을 정리하여 SCI급 논문 게재를 위해 준비 중이다(2015년 4월). 또한 폴리아민 생합성 유전자인 ADC 유전자가 생성하는 프트렛신이 병저항성 및 건조 내성과 밀접한 관련이 있으며 두 개의 *AtADC* 유전자의 발현이 식물의 생물학적 및 비생물학적 스트레스에 의해 활성화 되는 MAPK 신호전달체계의 조절을 받고 있음을 최초로 밝혀 SCI 저널 Biochem. Biophys. Res. Commun에 “Putrescine regulating by stress-responsive MAPK cascade contributes to bacterial pathogen defense in *Arabidopsis*”라는 제목으로 논문을 게재하였다(2013년 8월). 또한 형질전환 공대 수박을 제작하는 연구과정에서 *ADC* 유전자에 의해 생성되는 폴리아민과 식물생장 호르몬인 지베렐린(GA)의 연관성 때문에 형질전환체 확보가 매우 어려운 상황에서 새로운 유전자 후보군을 찾기 위해 가뭄과 같은 환경스트레스에 반응하는 식물의 MAPK 신호전달체계에 의해 조절을 받는 전사조절인자의 연구를 함께 수행하여 SCIE급 저널에 “Involvement of the OsMKK4-OsMPK1 cascade and its downstream transcription factor OsWRKY53 in the wounding response in rice”이라는 제목으로 논문을 게재하였다(2014년 5월). 또한 연구과정에서 수박에서 클로닝한 *LsADC* 유전자가 다른 식물의 *ADC* 유전자에 비해 내건성 효과가 우수하다는 결과를 확인하였으며 그 작용기작과 관련 연구를 마무리하여 SCI급 저널에 투고를 준비 중에 있다. 그리고 형질전환 수박의 생산성 관련 연구 주제와 관련된 수박의 착과부위 환경 개선을 통한 수박의 품질·생산성 향상 관련 연구를 수행한 결과, “Effect of heat treatment around the fruit set region on growth and yield of watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai]” 제목으로 Physiology and Molecular Biology of Plants저널에 게재하였다(2013년 10월). 그리고 수박의 병충해, 생리장애, 재배법 등에 관한 연구 결과를 토대로 수박 연구자들에게 유용한 기초자료를 제공하고자 “Occurrence of Diseases and Case of Clinical Diagnosis on Watermelon in South Korea, 2008-2012” 제목으로 Research in Plant Disease저널에 게재하였다(2014년 3월). 또한 수박의 재분화와 관련된 성장조절물질에 대한 연구를 통해 “Effect of plant growth regulators on regeneration from the cotyledon explants in

Watermelon (*Citrullus lanatus* (thunb.) Matsum. & Nakai)” 제목으로 Korean J. Plant Research 저널에 게재하였다(2014년 3월). 결과적으로 우수한 SCI급 논문 4편을 이미 게재하였으며 현재 2편의 SCI급 논문을 준비하여 게재할 예정이다. 또한 국외저널을 포함한 비SCI급 논문도 3편 게재하였다. 또한 본 연구과제의 참여기업인 명산종묘에서 참박 형질전환 중간모본이나 부분으로 사용하기 위한 연구를 수행하여 *Lagenaria siceraria* Standley 대목용박 “원터야무진”과 “썸머야무진” 두 품종을 등록하여 사업화 하였다(2015년 2월). 그리고 본 연구내용과 관련된 여러 연구결과를 “Transgenic watermelon root stock plants overexpressing the cucumber galactinol synthase showed enhanced resistance against fungal pathogen” 및 “The lsrzf1 antisense transgenic line of the novel Ring-type E3 ubiquitin ligase increase proline cotensts in Gong-dae watermelon cultivar” 그리고 “Cloning and expression analysis of an arginine decarboxylase gene from bottle gourd(*Lagenaria siceraria*)” 등과 같은 제목으로 한국식물생명공학회, 식물학회, 식물병리학회 등의 국내외 여러 학회에 참석하여 20회 이상 발표하였다. 또한 고품질 수박 생산을 위한 재배 기술에 대한 교육 및 컨설팅을 13여 차례 실시하였으며 수박 유전자원 관련된 홍보도 7건 실시하였다. 위의 내용들을 정리한 연구성과 목표 대비 실적을 아래의 표에 나타내었다.

사업화 지표					
성과목표	지식재산권		기술이전	사업화	
	출원	등록		제품화	
최종목표	2		2	3	
달성실적	1		1	2	
달성율(%)	50%		50%	66%	
연구기반 지표					
성과목표	학술성과			교육지도	정책 활용 홍보
	논문		학술 발표		홍보전시
	SCI	비SCI			
최종목표	5	3		3	
달성실적	4	3	20	17	8
달성율(%)	80%	100%		566%	

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

본 연구과제에서 수행하였던 환경내성 수박 형질전환대목 품종육성 도입과 관련된 유전자들의 연구 동향을 살펴보면 먼저 defensin 유전자는 다양한 식물성 병원균들의 병 방어기작에 jasmonic acid나 에틸렌과 연관되어 immune response가 관련되어짐이 제시되고 있다 [25, 26]. 특히 콩과식물에서는 병원균의 군사생육을 억제하면서 항균활성을 갖는다고 알려져 있다. 또한 애기장대 및 대두에서는 cytokinin과 밀접한 관련성을 가지고 건조 및 salt stress tolerance을 유발시킨다는 연구도 보고되고 있다 [27]. 이들 defensin 유전자가 도입된 형질전환식물체 연구 결과를 보면 *Aspergillus giganteus*에서 세포벽의 충실도(integrity)를 높이고 세포질 내에 칼슘( $Ca^{2+}$ )의 농도를 증가시켜 aequorin를 최적화시키고 이를 통해 fungi에 더 민감하게 반응할 수 있도록 한다고 알려져 있다. 최근 고추 defensin 유전자(Pep J1-1)가 도입된 고추 형질전환체는 고추 탄저병균(*C. gloeosporides*)에 대하여 병반형성과 fungal colonization을 감소시켜 저항성을 유발시키며 여러 자스몬산 생합성 유전자와 PR 유전자들의 발현을 증가시킨다고 보고되어 있다. 그러나 이러한 defensin 유전자가 도입된 박과작물 형질전환체에 관한 연구는 전혀 보고된 바가 없으며 내병성에 관한 기작과 salt stress와 같은 환경스트레스에 관한 연구도 진행된 바가 없다. 또한 galactinol synthase 유전자는 애기장대나 담배에서 고염과 삼투스트레스 내성과 관련되어짐이 알려져 있다 [28]. 박과작물인 멜론(*CmGAS2*)과 grape berry(*VvGolSI*) 유전자를 과다발현 시키면 galactinol이 축적되고 heat stress에 내성을 유발시킨다고 보고되고 있다 [29, 30]. 멜론의 galactinol synthase 유전자(*CmGAS2*)는 고온뿐만 아니라 CMV에 감염시켰을 때도 galactinol synthase 효소 활성이 증가된다고 보고되어져 있다. 그러나 이러한 galactinol 유전자가 박과작물에 도입되어 가뭄과 같은 환경스트레스에 내성을 가져오는 형질전환체에 관한 연구는 진행된 바가 없다. 박과작물에 최근 병 저항성을 획득하는 연구들 중 형질전환체에 관한 연구는 멜론에 RNAi법에 의해 멜론의 eukaryotic translation initiation factor(*CmelF4E*)을 도입하여 다양한 종류의 바이러스에 저항성을 유발시키는 방법과 수박 바이러스 coat protein을 PTGS(programed transgene silencing)방법에 의해 수박에 도입하여 바이러스에 저항성을 유도하는 연구들이 알려지고 있다 [31, 32] 그렇지만 이러한 연구들도 초기단계이고 안정적으로 도입유전자가 다음세대로 고정되어질지 불확실하다. 또한 내병성과 건조내성과 같은 기능성을 확신할 수 있는 유전자원을 형질전환체에 도입한 연구라 할 수 없다. 최근 bottle guard를 수박대목으로 사용했을 때 실생수박 뿌리와는 다르게 대목뿌리 주변에 chlorogenic acid와 caffeic acid가 분비되어 이들 물질이 덩쿨썩음병균(*Fusarium oxysporum* f. sp. niveum)의 군사생육을 억제하여 이와 같은 시들음병에 저항성을 갖게 된다는 보고가 있다. 이와 같은 자료를 토대로 본 연구과제를 통해 만들어진 형질전환 공대수박 대목의 뿌리분비물이 갖는 병원균과 환경스트레스에 대한 내성을 유발하는 물질의 존재여부를 추가적으로 연구할 필요가 있을 것이다.

본 연구와 관련되어진 국내 연구 현황을 살펴보면, 국립산림과학원에서 글리신베테인 생합성에 관여하는 대장균의 2개 유전자(*BetA*, *BetB*)를 포플러에 도입하여 염분 및 건조스트레스 내성이 향상된 유전자 도입 포플러를 개발하였으며, 최근 전남대학교에서 유비퀴틴 E3 ligase *AtRZF1* 유전자의 발현을 억제함으로써, 비생물적 스트레스 내성 증진 및 프롤린 함량 변화 기술을 개발하였고, 동 대학교에서 오이 갈락티놀 합성 효소 유전자를 공대수박에 도입한 결과

건조 내성이 향상된 결과를 보고하였다. 또한 농촌진흥청에서 저온스트레스에 대한 호박의 생육과 식물체 내 삼투조절 물질의 반응을 분석한 결과, 삼투조절 물질의 축적은 저온에 대한 내성 증가에 큰 영향을 미쳤으며, 글리신베테인을 엽면에 처리하면 저온 내성이 유도됨을 보고하였다. 현재 국외 연구 개발은 미국 오하이오 주립 대학에서 콩으로부터 프롤린 합성 효소 P5CS 유전자를 분리한 후 담배에 도입하여 수분결핍스트레스에 대해 내성이 향상된 유전자 도입 담배를 개발하였고, 인도 Pune 대학에서 프롤린 합성 효소 P5CSF129A 유전자를 벼에 도입하여 고염스트레스에 대해 내성이 향상된 유전자 도입 벼를 개발하였다. 일본 Hitachi 회사에서 애기장대 및 벼로부터 프롤린 합성 효소 P5CS 유전자를 Petunia에 도입하여 건조 내성이 향상된 유전자 도입 Petunia를 개발한 바 있다. 이러한 삼투조절 프롤린 대사연구는 스트레스 내성 강화 작물 개발에 중요한 연구로 알려져 왔으나, 프롤린의 생물학적 기능에는 여전히 정확한 해답을 찾지 못하고 있다. 또한, 프롤린 생합성 혹은 분해 관련 유전자 및 중간 조절인자의 동정, 스트레스 조건하에서의 프롤린 transporter, 식물 발달과 관련하여 신호 전달 분자로서의 기능, 프롤린 대사에 영향을 미치는 호르몬의 조절 등 아직도 많은 연구가 미비한 실정이다. 즉, 프롤린의 생물학적 의의를 도출하기 위해서는 단순한 단백질의 cataloguing 작업이 아닌, protein-protein interaction, post-translational modification, 특정 조건에서의 proteome의 변화 양상 등 genome level에서 관찰해야 할 것으로 사료되며, 앞으로 이러한 프롤린 대사 네트워크 연구들이 진행되어진다면 metabolic signaling, redox signaling, 프롤린과 flower transition 관계, embryo 발달 단계에서의 프롤린의 역할 등 프롤린의 생물학적 기능을 규명할 수 있을 것이다. 또한 폴리아민 생합성 관련 유전자들을 과다발현시켜 폴리아민의 함량을 높임으로써 내재해성 및 복합기능성에 이용하는 연구들이 주로 모델식물 등을 이용하여 전 세계적으로 꾸준히 활발하게 진행되고 있다. 그 중에서 가장 대표적인 사례를 확인해 보면, 전 세계의 여러 연구 그룹에서 애기장대 및 여러 식물에서 클로닝한 폴리아민의 첫 번째 단계인 푸트레신을 합성하는 효소인 Arginine decarboxylase(ADC) 유전자를 과다발현시켜 가뭄, 저온 등에 내성을 확인한 보고를 하였으며 이러한 결과는 이 유전자를 내재해성 형질전환체 창출에 이용할 수 있음을 의미한다 하겠다. 미국 농무부 농업연구청 연구자들은 토마토에 S-adenosylmethionine decarboxylase(SAMDC) 유전자를 과다발현시켜 내재해성을 향상시킬 뿐만 아니라 과실의 발달에 중요한 역할을 수행하고 토마토의 향산화물질인 Lycopene의 함량이 증가됨을 보고하였다.

수박은 전 세계적으로 재배되고 있는 작물로서, 단위면적당 생산기술은 우리나라가 선진국 수준이라 볼 수 있으며 최근 노지 재배면적이 급격히 감소되고 있는데 그 이유는 매년 착과 후 수박과실 비대시기가 병이나 환경스트레스에 가장 취약한 시기이기 때문이다. 따라서 비교적 안정적 수박 생산을 위해 접목재배 방법이 활발히 연구되어지고 있다. 수박재배 시 대목으로 사용되는 작물은 호박, 박, 안동오이, 동아, 공대수박 등이 있으며, 그 중에서도 공대수박은 수박과의 접목친화력이 강하여 대목으로 사용할 경우 수박의 당도를 높이기 위해 매우 좋은 특성을 가지고 있다. 그러나 공대수박은 흡비력이 약하고 병원균의 감염 및 저온 등에 약하기 때문에 반 축성재배나 조숙재배에서는 사용하기 어려운 실정이다. 현재 육묘장에서 공대수박대목의 사용은 현저하게 줄어들고 있는 것이 사실이다. 고창의 한 육묘장 담당자에 의하면, 수박 총 300만주 중 오작교(공대) 대목은 5만주로 전체사용량의 1.7% 정도를 이용하고 있다고 하였다. 이러한 가장 큰 원인중 하나는 공대수박대목이 정식초기 다습에 약하기 때문에 덩굴마름병의 발생이 많고 현재 널리 사용 중인 참박대목에 비하여 배축이 얇기 때문에 접목 후 쉽게 쓰러

저 재배 경험이 없는 농가에서는 사용을 기피하기 때문이다. 또한 대목종자의 가격이 참박에 비해 최고 2배 [동장군(참박) 25원, 불로장생(참박) 35원 오작교(공대) 45원~50원] 정도 비싸기 때문이다. 그러나 실제로 공대수박대목을 사용한 농가에 의하면, 물 빠짐이 좋지 않은 토양에서는 정식 후 물을 자주 주게 되면 시들음 증상이 심하지만 물 빠짐이 좋은 토양에서는 큰 문제가 되지 않으며 정식초기 덩굴마름병 방제가 적절하게 이루어진다면 비교적 선충에 강하고 건조에도 강해 생육후기에 물관리가 편해서 재배가 수월한 편이고 당도도 높아서 고품질의 수박을 생산할 수 있다고 하였다. 따라서 공대수박대목은 정식초기 덩굴마름병이나 시들음 증상을 줄이는 방법과 물 관리 방법에 대한 연구가 구체적으로 이루어진다면 향후 물 부족 상황에서도 큰 어려움 없이 수박을 재배할 수 있는 대안이 될 수 있으리라 생각되며 이와 관련 연구를 꾸준히 진행되어야 할 것으로 생각한다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1절. 기후변화 대응을 위한 형질전환 수박 대목 실용화 연구

#### 1. 형질전환 수박대목 우량 중간모본 특성분석

##### 가. 연구내용

##### (1) 식물재료

본 실험에서는 공대수박(wild type), 고추 defensin(Pep J1-1) 형질전환 공대수박 3계통(WJ120-10, WJ121-34, WJ121-40)의 120개체, 오이 galactinol synthase1(*CsGolS1*) 형질전환 공대수박 53계통(GolS1 : 13계통, GolS4 : 4계통, GolS10 : 36계통)등 도합 245개체를 사용하였다. 공대수박과 형질전환 계통은 발아를 위해 미지근한 물에 6~8시간 침종한 후 물기를 닦아내고 젖은 타월에 싸서 3일간 30℃ 항온기에 넣어두었다.

##### (2) 내병성 검정

내병성 형질전환체를 스크리닝 하기 위해 수박 토양병원성 균주를 한국 농업미생물자원센터(KACC)로부터 표 1에 제시된 바와 같이 분양 받아 사용하였다. 1차 예비 테스트를 통하여 wild type 공대수박 식물체에 병원성이 있는 균주 *Didymella bryoniae*(KACC40669), *Colletotrichum orbiculare*(KACC40809)를 선발하였다. 배지로는 PDA(potato dextrose agar, Difco)를 사용하였고, 이를 25℃에서 7일간 배양 증식한 후 Potato dextrose broth(PDB)를 이용하여 배지 위에서 균체를 회수하고 멸균된 거즈를 이용하여 균사를 걸러낸 다음 포자만을 회수하였다. Haemocytometer(Marienfeld co, LAUDA-KOENIGSHOFEN, Germany)를 이용하여 접종원의 농도를 맞추었으며, 식물체 감염 시 *Didymella bryoniae* (KACC40669)의 경우  $2.5 \times 10^5$  cfu/ml의 농도로 *Colletotrichum orbiculare*(KACC40809)의 경우  $2 \times 10^6$  cfu/ml의 농도로 포자현탁액을 만들었다. 파종 후 본엽이 2~3매 전개하기 시작할 때 각 식물체 앞에 각 포자현탁액을 20 ul씩 drop 접종하여 병원균을 감염시켰다. 이후 습실 처리된 플라스틱 용기에 넣고 발병 여부를 관찰하였으며 감염 후 3일 경과 후에 병반의 크기를 측정하였다.

표 1-1. 한국농용미생물센터(KACC)로부터의 분양받은 균주 목록

No. KACC	Strain	Host
KACC 40809	<i>Colletotrichum orbiculare</i> (Berkeley &Montagne)	수박
KACC 40903	<i>Colletotrichum orbiculare</i> (Berkeley &Montagne)	수박
KACC 40940	<i>Monosporascus cannonballus</i> Pollack &Uecker	수박
KACC 40669	<i>Didymella bryoniae</i> (Auerswald) Rehm	수박
KACC 40937	<i>Didymella bryoniae</i> (Auerswald) Rehm	수박
KACC 40053	<i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtendahl	오이
KACC 40576	<i>Cladosporium cucumerinum</i> Ellis &Arthur	오이
KACC 40901 R1	<i>Fusarium oxyspoum spp</i>	수박
KACC 40901 R2	<i>Fusarium oxyspoum spp</i>	수박
KACC 40905	<i>Fusarium oxyspoum spp</i>	수박

### (3) 항균활성 검정

만고병균에 내병성이 확인된 오이 galactinol synthase1(*CsGo1S1*) 형질전환체와 고추 defensin (Pep J1-1) 형질전환체들의 잎으로부터 단백질을 추출하여 *Fusarium oxysporum* (KACC40901 R1, KACC40901 R2, KACC40905)에 대한 항균활성 효과를 조사하기 위해 microtiter plate inhibition assay(Cavallain et al., 1998)를 수행하였다. *F. oxysporum* 균주배양 및 접종원의 준비는 상기의 내병성 검정과 동일한 방법으로 수행하였다. 각 형질전환체 및 대조구 공대수박 식물체에서 단백질 추출은 extraction buffer(50mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaCl)를 이용하였으며 추출된 단백질은 정량화하였다. 각 식물체의 단백질 추출물을 이용한 항균활성시험은 96-well microtiter plate내에서 수행하였다. 준비된 각 균주의 포자현탁액을 Potato dextrose broth(PDB) 50 $\mu$ l에 넣고 미리 8시간 포자발아를 시킨 후 흡광도를 측정하였다. 이 후 각 식물체의 단백질 추출물(50 $\mu$ l)이나 buffer를 plate well 넣고 48시간 반응시킨 후 OD, 595nm에 흡광도를 측정하였다.

### (4) 내염성 검정

과종 3~4주 후 전개된 본엽을 채취하여 cork-borer로 천공하고 무게를 측정한 후 250mM NaCl과 mannitol이 5ml씩 포함된 6 well microtiter plate에 넣고 상온에서 5일 정도 배양한 잎으로부터 chlorophyll 함량을 측정하였다. Chlorophyll 추출은 다음과 같이 수행하였다. 1 mg 잎 샘플당 95% EtOH 100ul를 첨가하고 80 $^{\circ}$ C에서 30분간 가열한 후 상등액만을 취하였다. 분광광도계를 이용하여 상등액에 대한 흡광도  $A_{648}$ 과  $A_{664}$ 에서 측정하였다.

### (5) 고온내성 검정

본엽이 4~5개 전개된 식물체를 습도가 90%이상 유지되는 배양기에서 55 $^{\circ}$ C로 3시간 고온 처리를 하고 25 $^{\circ}$ C의 배양실로 옮겨 3일간 배양하였다. 그리고 잎을 채취하여 cork-borer로 천공하고 무게를 측정한 후 chlorophyll을 추출하여 정량함으로써 식물의 고온내성 정도를 분석하였다. Chlorophyll 추출은 다음과 같이 수행하였다. 1 mg 잎 샘플당 95% EtOH 100ul를 첨가하고 80 $^{\circ}$ C에서 30분간 가열한 후 상등액만을 취하였다. 분광광도계를 이용하여 상등액에 대한 흡광도  $A_{648}$ 과  $A_{664}$ 에서 측정하였다.

### (6) PCR 분석

내병성이 확인된 형질전환체들의 잎을 채취하여 genomic DNA를 분리하였고 PCR 분석에 의해 유전자 도입여부를 확인하였다. PCR 분석을 위해서 사용된 primer의 목록은 표 2에 제시된 바와 같다. PCR 수행조건은 Taq polymerase가 첨가된 PCR premix(Bioneer, Korea)를 이용하여 최초 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 pre-denaturation 후 95 $^{\circ}$ C에서 1분, 58 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초간 35회 반응시킨 후 최종적으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 post-extension시켜 PCR를 종료하였다.

표 1-2. Genomic PCR 분석을 위해 사용된 primer 목록

Primer name	Primer sequence	비고
<i>CsGolS1</i> (Reverse)	5'-GGGGTACCGGAATATTTATTTTGTCACT-3'	
<i>PepJ1-1</i> (Forward)	5'-GATATGATGGCGGAGGCAAAG-3'	defensin gene
<i>PepJ1-1</i> (Reverse)	5'-AGAGTTAATTAAGCACAGGGC-3'	defensin gene
CaMV35S(Forward)	5'-GACCTAACAGAAGCTCGCCG-3'	
CaMV35S(Reverse)	5'-ATATAGAGGAAGGGTCTTGCG-3'	
<i>NPTII</i> (Forward)	5'-ACTGAAGCGGAAGGGAC-3'	
<i>NPTII</i> (Reverse)	5'-CAAGAAGGCGATAGAAGGC-3'	
<i>Cl-actin</i> (Forward)	5'-GATA TGATGGCGGAGGCAAAG-3'	
<i>Cl-actin</i> (Reverse)	5'-TCGTAGTTTTTCTCAATGGAGGAAGT-3'	

#### (7) Semi-quantitative RT-PCR 분석

Defensin(*PepJ1-1*) 유전자가 도입된 형질전환체의 발현양상을 조사하기 위해 형질전환체들의 잎을 채취하여 액체 질소로 급속 냉동한 후 -80℃에 보관하여 RNA 분리에 사용하였다. 약 0.1 g의 조직을 액체질소에 급속 냉동시켜 아주 미세하게 파쇄하여 분말화한 후, RNeasy plant mini kit(QIAGEN)를 사용하여 total RNA를 분리하였다. 본 실험을 수행하기 위해 cDNA 합성은 AccuPower RT-premix(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하였고 total RNA는 0.5µg을 정량화하여 사용하였다. Semi-quantitative RT-PCR은 defensin 유전자의 특정부위에서 forward primer(5'-GATATGATGGCGGAGGCAAAG-3')와 reverse primer(5'-AGAGTTAATTAAGCACAGGGC-3')를 제작 하여 사용하였으며, 수박 actin 유전자(Genebank ID : ADD84882.1)의 primer를 forward primer(5'-CATTCTCCGTTTGGACCTTGCT-3')와 reverse primer(5'-TCGTAGTTTTTCTCAATGGAGGAAGT-3')를 제작하여 internal standard로 이용하였다. cDNA 합성 후 유전자의 증폭반응은 25 µl의 반응액을 94℃에서 35초 동안 denaturation을 하였고, 58℃에서 30초 동안 annealing, 72℃에서 1분 동안 extension을 하였으며 35 cycle을 계속해서 PCR을 시행하였다. 이후 PCR 산물을 0.7% agarose gel에서 EtBr 염색을 통해 UV하에서 확인하였다.

#### (8) 클로로필 함량

파종 3~4주 후 전개된 본엽을 채취하여 cork-borer로 천공하여 250 mM NaCl 용액이 3 ml씩 포함된 6-well microtiter-plate에 넣고 엽록소의 누출정도를 관찰하고 5일 정도 경과 후 total chlorophyll 함량을 측정하였다.

### 나. 연구결과

#### (1) CsGolS1 형질전환 공대수박 식물체 분석

만고병균에 대해 고도의 저항성으로 확인된 계통의 유전자도입을 확인하기 위해 각 식물체의 잎을 채취하여 genomic DNA를 추출하였다. 이들 genomic DNA를 이용하여 PCR 분석을 해본 결과 갈락티놀 합성유전자를 도입했던 binary vector(pBI121-1)의 CaMV35S promoter 부위와 kanamycin 선발 마커유전자인 *NPT II* 유전자가 삽입되었음이 확인되었다(그림 1-1).

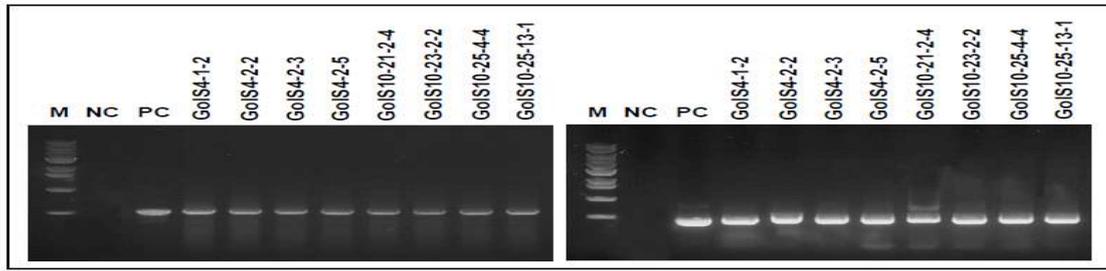
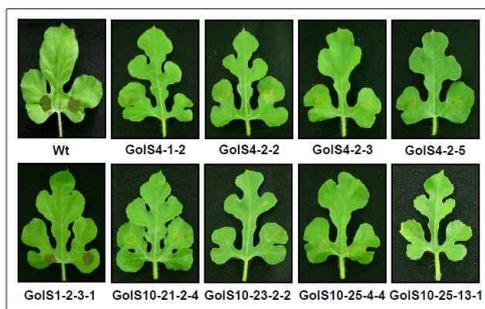


Figure 1-1. Genomic DNA PCR analysis of transgenic Gongdae watermelon plants using the CaMV35S promoter region(left) and NPTII gene(right) specific primers in binary vector pBI121-1. M, size marker (1kb ladder, bioneer). PC, positive control (plasmid); NC, negative control (non-transgenic plant); GolS4-1-2, GolS4-2-2, GolS4-2-3, GolS4-2-5: four independent T3 lines. GolS1-2-3-1, GolS10-21-2-4, GolS10-25-4-4, GolS10-25-13-1: four independent T4 lines, putative transgenic plants.

(2) CsGolS1 유전자 형질전환 공대수박의 만고병에 대한 저항성 검정

만고병균 감염 3일 쯤 병반크기(lesion diameter)를 측정한 결과 대조구인 공대수박의 경우 병반면적이  $43.9 \pm 3.3 \text{mm}^2$ 으로 나타난 반면, CsGolS1 형질전환체 T3라인 4계통(GolS4-1-2, GolS4-2-2, GolS4-2-3, GolS4-2-5), T4라인 4계통(GolS10-21-2-4, GolS10-23-2-2, GolS10-25-4-4, GolS10-25-13-1)은 병반면적이  $0.3 \pm 0.3 \text{mm}^2$  이하로 나타나 저항성으로 확인되었고(그림 1-2), 76계통은 중도저항성( $1.5 \sim 20 \text{mm}^2$  이하), GolS1-2-3-1 라인을 포함한 161계통은 병반면적 ( $\geq 30 \text{mm}^2$ ) 이상인 감수성으로 나타남을 확인하였다(Data 미제시).

A.



B.

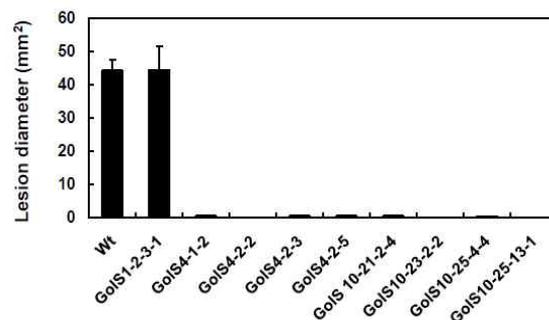


Figure 1-2. Disease resistance induced in T3 and T4 lines of the *CsGolS1*-overexpressing Gongdae watermelon against *D. bryoniae* infection. Induced resistance was estimated by symptoms (A) or by lesion diameter (B) produced with *D. bryoniae* infection. Two-week-old transgenic plants grown on soil in pots were infected with *D. bryoniae*. Wild type: Gongdae watermelon (non-transgenic plant), GolS4-1-2, GolS4-2-2, GolS4-2-3, GolS4-2-5: four independent T3 lines. GolS1-2-3-1, GolS10-21-2-4, GolS10-21-2-4, GolS10-25-4-4, GolS10-25-13-1: five independent T4 lines. Vertical bars indicate  $\pm$  standard deviation.

(3) CsGolS1 유전자 형질전환 공대수박의 내염성 검증

앞서 만고병균에 대한 저항성이 확인된 CsGolS1 유전자 형질전환체가 건조 및 고염에 대해서도 내성을 나타내는지의 여부를 확인하기 위해, NaCl 250mM 용액에 일정한 무게가 측정된 잎을 담근 후 5일이 경과한 다음 동일 잎의 총 클로로필 함량을 측정하였다. 그 결과 대조구인 wild type 공대수박에 비해 갈락티놀 형질전환체인 GolS4-1-2와 GolS10-25-4-4의 2개체에 서 총 클로로필 함량이 더 높게 나타남이 확인되었다(그림 1-3).

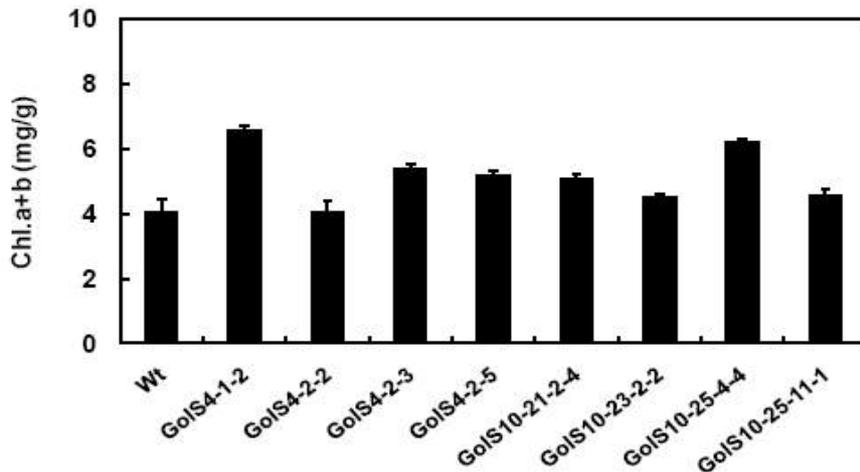


Figure 1-3. Chlorophyll content in leaf discs of T3 or T4 lines of *CsGolS1*-overexpressing Gongdae watermelon 5 days after dipping in the 50 mM NaCl solution. Chlorophyll content in plants in the absence of salt treatment was determined. Wild type: Gongdae watermelon (non-transgenic plant), GolS4-1-2, GolS4-2-2, GolS4-2-3, GolS4-2-5: four independent T3 lines. GolS1-2-3-1, GolS10-21-2-4, GolS10-25-4-4, GolS10-25-13-1: four independent T4 lines Vertical bars indicate  $\pm$  standard deviation.

(4) 선발된 CsGolS1 유전자 형질전환 공대수박 유전자 도입 및 발현 검증

만고병균에 대해 고도의 저항성으로 확인으로 선발된 3계통의 유전자도입을 확인하기 위해 각 식물체를 잎을 채취하여 genomic DNA를 추출하였다. 이들 genomic DNA를 이용하여 PCR 분석을 해본 결과 갈CsGolS1 유전자가 삽입되었음이 확인되었다(그림 1-4). 또한 동일한 3계통의 유전자의 발현 여부를 확인하기 위해 각 식물체의 total RNA를 분리하여 Northern blot 분석을 실시한 결과 대조구인 wildy type 식물체에 비해 CsGolS1 유전자가 발현됨을 확인하였다(그림 1-5).

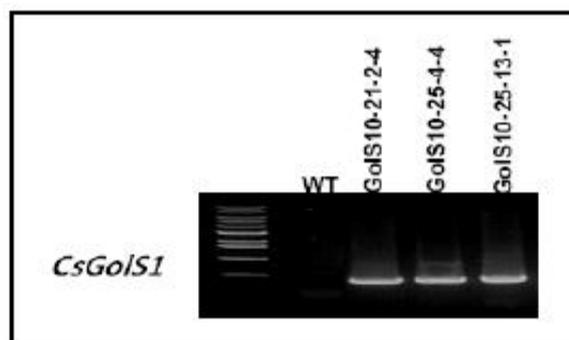


Figure 1-4. Genomic DNA PCR analysis of transgenic Gongdae watermelon plants using the specific primers in the cucumber galactinol synthase 1 gene(*CsGolS1*). M, size marker (1kb ladder, bioneer). WT, wild type (non-transgenic plant); GolS10-21-2-4, GolS10-25-4-4, GolS10-25-13-1: four independent T4 lines, putative transgenic plants.

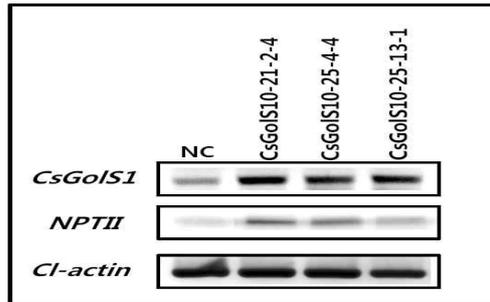


Figure 1-5. A semi-quantitative RT-PCR profile measuring the expression of *CsGolS1* gene and *NPTII* gene specific primers in binary vector pBI121-1 in transgenic Gongdae watermelon and actin gene as a control. NC, negative control (non-transgenic plant); GolS10-21-2-4, GolS10-25-4-4, GolS10-25-13-1: four independent T4 lines, putative transgenic plants.

(5) 선발된 *CsGolS1* 유전자 형질전환 공대수박의 덩굴쪄김병균에 대한 저항성 검정

*CsGolS1* 유전자 형질전환체 3계통에 대하여 덩굴쪄김병균도 저항성 있는지 이를 선발하기 위하여 보유하고 있는 *CsGolS1* 유전자 형질전환체 종자 3계통을 각각 5립씩 총 15립을 침지 후 발아를 유도하였다. 이 중 계통별 적어도 4립씩 총 12립이 발아되어 포트에 옮겨 심었으며 본엽이 2~3매 전개될 때 잎을 채취하여 총 단백질을 추출하고 덩굴쪄김병균에 대해 항균활성정도를 조사하였다. 또한 염 및 건조내성이 있는 *CsGolS1* 유전자 형질전환체를 선발하기 위해 상기 동일계통의 잎을 채취하여 모두 250mM NaCl 용액에 담구어 총클로로필 함량을 측정하였다. *CsGolS1* 유전자 형질전환체 3계통 (GolS10-21-2-4, GolS10-25-4-4, GolS10-25-13-1)에 대해 덩굴쪄김병균 포자 생육억제 밀도를 측정 한 결과 대조구인 공대수박의 경우 덩굴쪄김병균 3가지 균주(KACC 40901 R1, KACC 40901 R2, KACC40905)에 대해 각각 무처리구에 비해 2.5%, 5%, 3% 생육이 억제된 반면 GolS10-21-2-4 계통의 경우 KACC 40901 R1, KACC 40905 균주에 대해서는 11.3%, 3.2%, GolS10-25-4-4의 경우 6.3%, 38%로, GolS10-25-13-1의 경우 KACC 40901 R1 균주에 대해서만 7.8%의 포자생육이 억제됨을 확인하였다. 그러나 모든 계통에 대해 KACC 40901 R2 계통에 대해서는 대조구에 비해 포자생육 억제효과가 나타나지 않음이 확인되었다(그림 1-6).

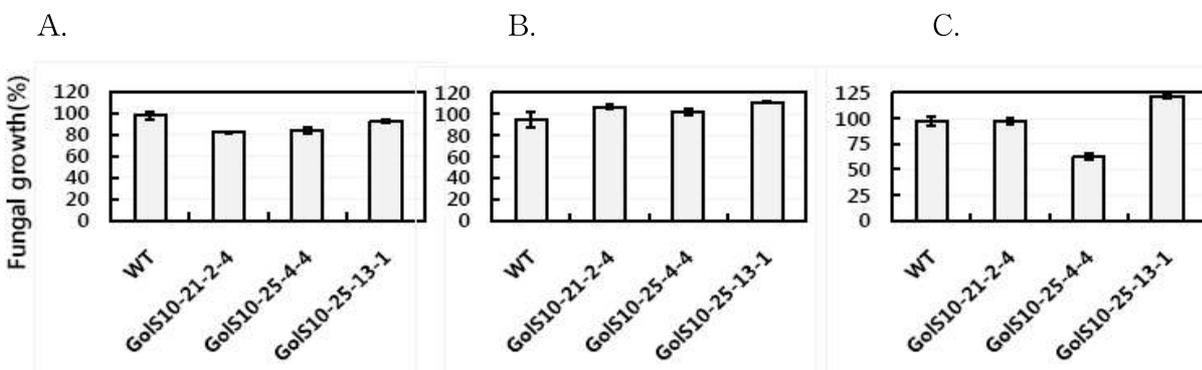


Figure 1-6. Effect of total protein extract of the *CsGolS1*-overexpressing gongdae watermelon(T4 line) on in vitro growth of the fungal pathogen *F. oxysproum* KACC 40901 R1(A), KACC 40901 R2(B) and KACC40905(C). *F. oxysproum* was grown in the presense of protein extracts from transgenic plants. Control sample [Extraction buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl)] + spores ( $1 \times 10^6$ cfu/ml). Fungal growth in the presence of protein extracts from wild type(WT), untransformed gongdae watermelon plants was taken as 100%. GolS10-21-2-4, GolS10-25-4-4, GolS10-25-13-1: three independent T4 lines Vertical bars indicate  $\pm$  standard deviation.

본 연구개발을 통해 최종적으로 내염성 및 만고병과 덩굴쪄김병에 저항성을 보인 *CsGolS1* 유전자 형질전환체는 3계통이었다(표 1-3). 이들 라인들의 종자수를 확인한 결과 wild type인 공대수박의 평균 종자수인 450개에 비해 GolS 10-21-2-4 계통의 종자수는 약 44.6% 정도였으며, GolS 10-25-4-4과 GolS 10-25-13-1 계통의 종자수는 약 70% 수준으로 비교적 종자수가 감소하는 것으로 조사되었다(표1-3).

표 1-3. 선발된 *CsGolS1* 유전자 형질전환체의 종자수와 검정항목

계통명	세대	종자수	검정항목
Gols10-21-2-4	T <sub>4</sub>	201	만고병, 내염성, 덩굴쪄김병
Gols10-25-4-4	T <sub>4</sub>	319	만고병, 내염성, 덩굴쪄김병
Gols10-25-13-1	T <sub>4</sub>	328	만고병, 내염성, 덩굴쪄김병

(6) *CsGolS1* 유전자 형질전환 공대수박의 내염성 라인 추가 선발

1, 2차년에 선발된 GolS 형질전환체 계통들이 염에 대한 내성이 낮게 나타난 것에 대하여 추가적으로 mannitol에 대한 내성검정을 실시하였다. 확인한 결과 GolS1-3, *CsGolS10-1*, GolS13-1 계통이 선발되었고 이 중에서 *CsGolS10-1* 계통은 대조구 비해 총 클로로필 함량이 약 2배 이상 높게 나타남을 확인할 수 있었다(그림 1-7).

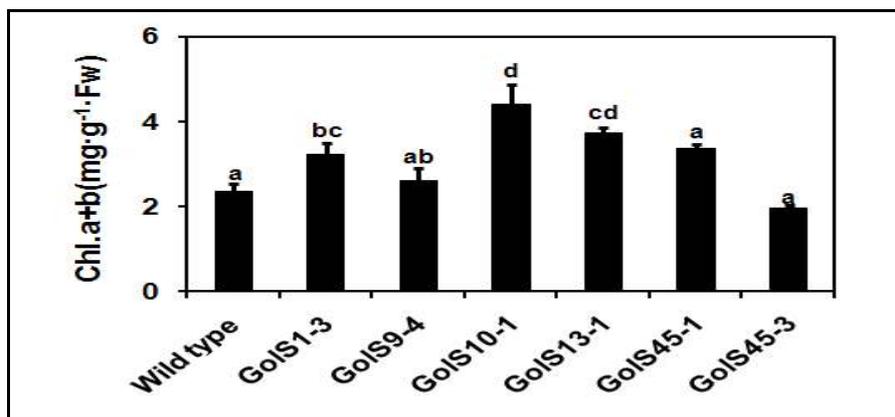


Figure 1-7. Chlorophyll content in leaf discs of T1 lines of the *CsGolS1*-overexpressing Gongdae watermelon 5 days after dipping in 250 mM mannitol solution. Chlorophyll content of plants without salt stress were determined. Wild type: Gongdae watermelon (non-transgenic plant), *CsGolS1-3*, *CsGolS9-4*, *CsGolS10-1*, *CsGolS13-1* *CsGolS45-1*, *CsGolS45-3*: six independent T1 lines Vertical bars indicate  $\pm$  standard deviation.

(7) CsGolS1 유전자 형질전환 공대수박의 고온내성 검정 및 유전자 발현 검정

앞서 고염에 내성을 갖는 CsGolS1 유전자 형질전환체 계통에 대하여 고온에 내성을 보이는 라인들을 선발하기 위하여 heat 스트레스를 처리한후 일정한 무게가 측정된 잎을 이용하여 총 클로로필 함량을 측정하였다. 그 결과 대조구인 wild type 공대수박에 비해 CsGolS1 유전자 형질 전환체인 CsGolS9-1, CsGolS 13-1, CsGolS45-3의 3개체에서 총 클로로필 함량이 유의성 있게 나타남이 확인되었다(그림 1-8). 또한 동일한 식물체에 대하여 고온처리 후 total RNA를 추출하여 고온 내성에 관련 heatshock protein 70(*Clhsp70*) 유전자의 발현양상을 확인하였다. 그결과 대조구인 wild type 공대수박에 비해 GolS 형질전환체인 CsGolS9-4, CsGolS45-3의 3개체에서 Clhsp 70 유전자의 발현이 높게 나타남이 확인되었다(그림 1-9).

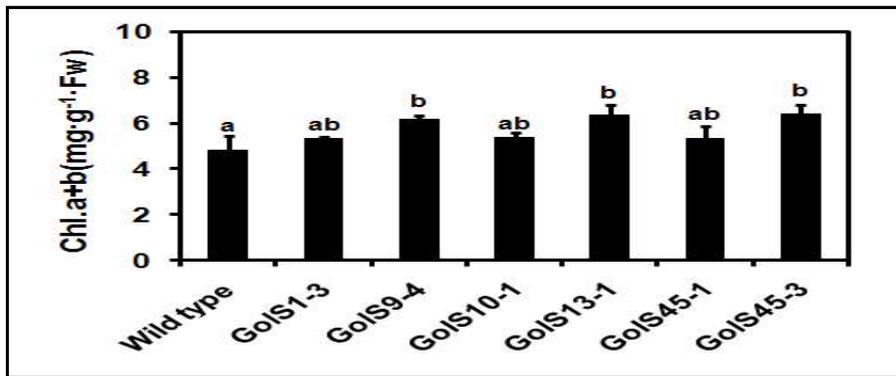


Figure 1-8. Comparison of chlorophyll content between in wild type and in CsGolS1-over-expressing transgenic Gong-dae (T1) lines after heat stress. Heat stress was induced by heat treatment for 3 hr at 55°C and then the seedlings were cultivated under the normal condition (28°C) up to 3 days. Afterward, chlorophyll content was determined. Wild type: Gongdae watermelon (non-transgenic plant), *CsGolS1-3*, *CsGolS9-4*, *CsGolS10-1*, *CsGolS13-1*, *CsGolS45-1*, *CsGolS45-3*: six independent T1 lines. Vertical bars indicate  $\pm$  standard deviation.

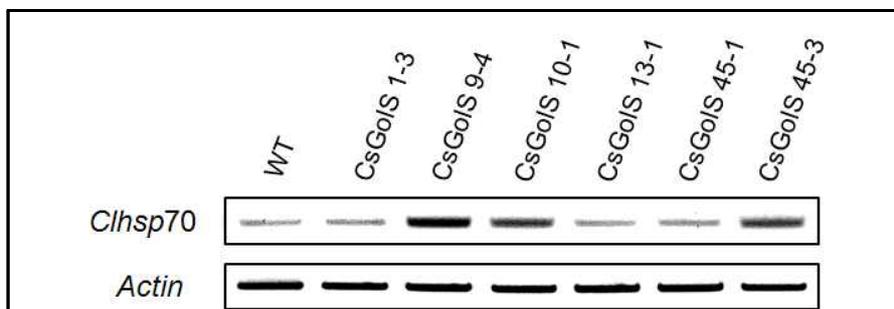


Figure 1-9. A semi-quantitative RT-PCR profile using the *Clhsp70* gene specific primers in the *CsGolS1* transgenic Gongdae watermelon. Wild type(WT): Gongdae watermelon (non-transgenic plant), *CsGolS1-3*, *CsGolS9-4*, *CsGolS10-1*, *CsGolS13-1*, *CsGolS45-1*, *CsGolS45-3*: six independent T1 lines.

(8) CsGolS1 유전자 형질전환 공대수박의 내염성 검정

앞서 만고병균에 대한 저항성이 확인된 CsGolS1 유전자 형질전환체가 고염에 대해서도 내성을 나타내는지의 여부를 확인하기 위해, NaCl 250mM 용액에 일정한 무게가 측정된 잎을 담근 후 5일이 경과한 다음 동일 잎의 총 클로로필 함량을 측정하였다. 그 결과 대조구인 wild type 공대수박에 비해 CsGolS1 유전자 형질전환체에서 총 클로로필 함량이 더 높게 나타남이 확인되었다(그림 1-10).

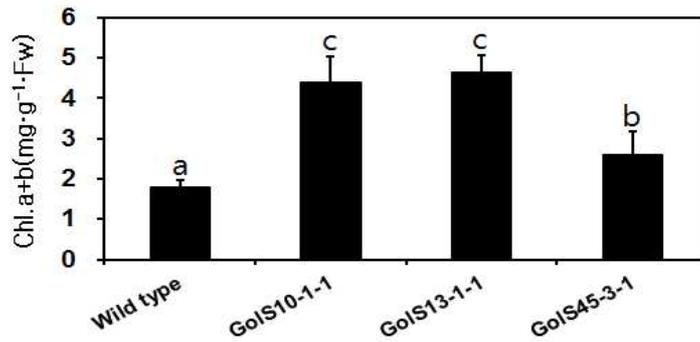


Figure 1-10. Chlorophyll content in leaf discs of T3 lines of the *CsGolS1*-overexpressing Gongdae watermelon 5 days after dipping in the 250 mM NaCl solution. Chlorophyll content of plants without salt stress were determined. Wild type: Gongdae watermelon (non-transgenic plant), *CsGolS10-1-1*, *CsGolS13-1-1*, *CsGolS45-1-1*: Three independent T3 lines. Vertical bars indicate  $\pm$  standard deviation.

(9) CsGolS1 유전자 형질전환 공대수박 고온내성 검정

앞서 만고병균에 대한 저항성이 확인된 CsGolS1 유전자 형질전환체가 고온에 대해서도 내성을 나타내는지의 여부를 확인하기 위해, 55°C로 3시간이 경과한 다음 동일 잎의 총 클로로필 함량을 측정하였다. 그 결과 대조구인 wild type 공대수박에 비해 CsGolS1 유전자 형질전환체에서 총 클로로필 함량이 더 높게 나타남이 확인되었다(그림 1-11).

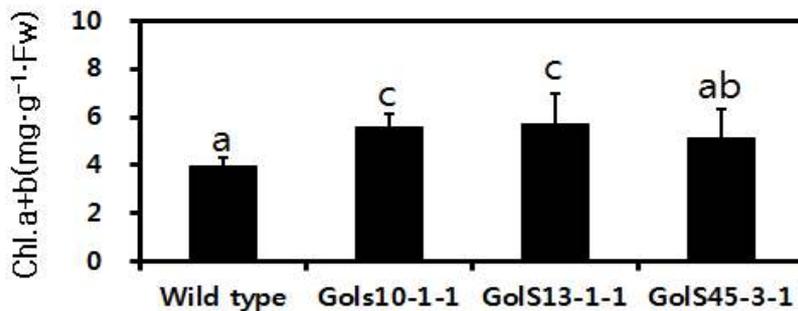


Figure 1-11. Comparison of chlorophyll content between in wild type and *CsGolS1*-over-expressing transgenic Gong-dae (T3) lines after heat stress. Heat stress was induced by heat treatment for 3 hr at 55°C and then the seedlings were cultivated under the normal condition (28°C) up to 3 days. Afterward, chlorophyll content was determined. Wild type: Gongdae watermelon (non-transgenic plant), *CsGolS9-4-1*, *CsGolS13-1-1* and *CsGolS45-3-1*: three independent T3 lines. Vertical bars indicate  $\pm$  standard deviation.

본 연구팀에서 보유하고 있는 CsGolS1 유전자 형질전환체들 중에서 내재해성을 갖는 라인들을 추가적으로 확보하기 위하여 내염성 및 고온내성을 보이는 5계통의 형질전환체들 중에서 3계통을 추가적으로 확보하여 종자수를 확인한 결과 표 1-4에 제시된 바와 같다.

표 1-4. 선발된 CsGolS1 유전자 형질전환체의 종자수와 검정항목

계통명	세대	종자수	검정항목	선발
GolS1-3-1	T <sub>3</sub>	560	내염성	-
GolS9-4-1	T <sub>3</sub>	214	고온내성	-
GolS10-1-1	T <sub>3</sub>	518	내염성	○
GolS13-1-1	T <sub>3</sub>	350	내염성, 고온내성	○
GolS45-3-1	T <sub>3</sub>	289	고온내성	○

(10) 고추 Pep J1-1 유전자 형질전환 공대수박의 만고병 및 탄저병에 대한 저항성의 검정

토양 병해에 강한 형질전환 수박대목의 우수한 중간모본을 선발하기 위해 고추 Pep J1-1 유전자가 도입된 공대수박 형질전환체 3계통 WJ120-10, WJ121-34, WJ121-40을 각각 40립씩 발아 후 파종하였다. 이후 본엽이 2~3매 전개될 때 만고병균(*D. bryoniae*)을 처리 후 3일 째 병반면적을 측정하였던 결과, 대조구인 공대수박의 경우 병반면적이 평균 54.7±11mm<sup>2</sup>에 비해 저항성인 개체들(병반면적 : 1.85 ~ 14.75mm<sup>2</sup>)은 병반면적이 현저히 줄어들었다, 각 계통별로 WJ120-10 계통의 경우 3개체, WJ121-34 계통의 경우 9개체, WJ121-40 계통의 경우 5개체가 선발되었다(그림 1-12).

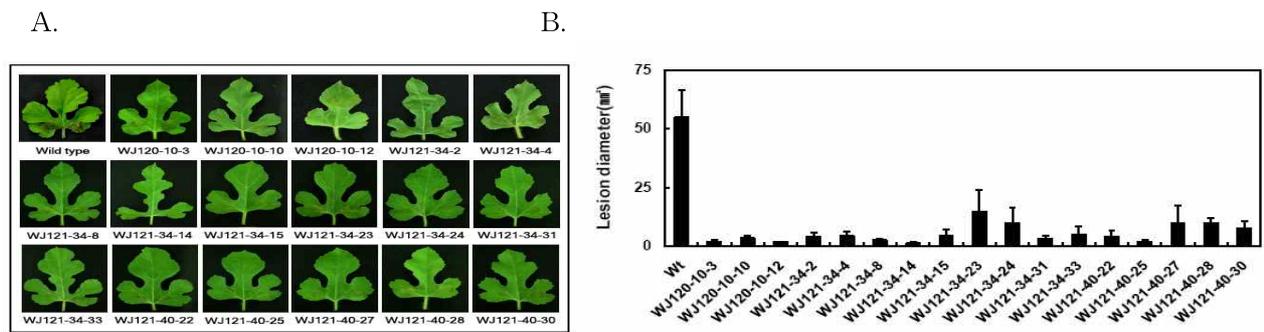


Figure 1-12. Disease resistance induced in T4 lines of the *Pepper* defensin (*J1-1*)-overexpressing Gongdae watermelon against *D. bryoniae* infection. Induced resistance was estimated by symptoms (A) or by lesion diameter (B) produced with *D. bryoniae* infection. Two-week-old transgenic plants grown on soil in pots were infected with *D. bryoniae*. Wild type: Gongdae watermelon (non-transgenic plant), WJ120-10-3, WJ120-10-10, WJ120-10-12, WJ121-34-2, WJ121-34-4, WJ121-34-8, WJ121-34-14, WJ121-34-15, WJ121-34-23, WJ121-34-24, WJ121-34-31, WJ121-34-33, WJ121-40-22, WJ121-40-25, WJ121-40-27, WJ121-40-28, WJ121-40-30: seventeen independent T4 lines. Vertical bars indicate ± standard deviation.

상기 고추 Pep J1-1 유전자가 도입된 공대수박 형질전환체들의 수박탄저병균(*C. orbiculare*)에 대한 저항성을 확인한 결과, 각 계통별로 WJ121-34 계통의 경우 WJ121-34-24, WJ121-34-36의 2개체가 선발되었으며, WJ120-10계통과 WJ121-40 계통의 경우 모두 감수성으로 나타났다(그림 1-13). 이들 개체 중 WJ121-34-24는 만고병균에 대해서 저항성으로 선발된 개체이며 WJ121-34-36의 경우 탄저병균에 대해서만 저항성을 나타내었다.

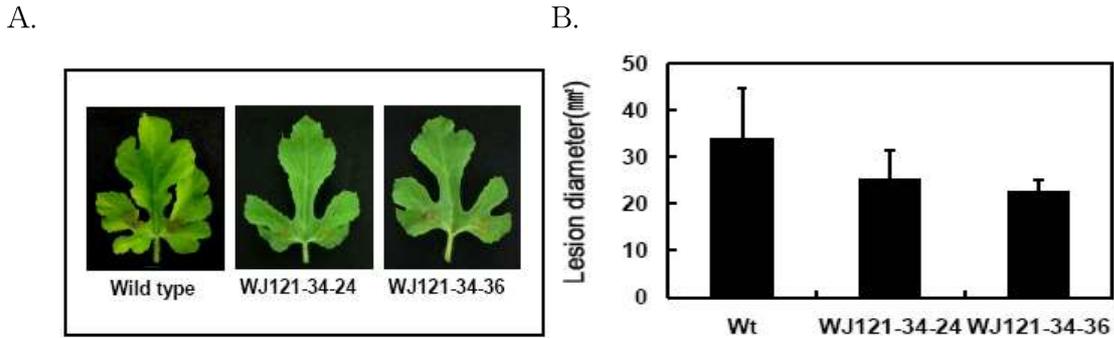


Figure 1-13. Disease resistance induced in T4 lines of the *Pepper* defensin (*J1-1*)-overexpressing Gongdae watermelon against *C. orbiculare* infection. Induced resistance was estimated by symptoms (A) or by lesion diameter (B) produced with *C. orbiculare* infection. Two-week-old transgenic plants grown on soil in pots were infected with *D. bryoniae*. Wild type: Gongdae watermelon (non-transgenic plant), WJ121-34-23, WJ121-34-24, WJ121-34-36 : three independent T4 lines. Vertical bars indicate  $\pm$  standard deviation.

#### (11) 고추 Pep J1-1 유전자 형질전환 공대수박의 유전자 발현 분석

만고병균과 탄저병균에 저항성을 보여주었던 Pep J1-1 유전자가 도입된 공대수박 형질전환체 7계통 WJ120-10-12, WJ120-10-34, WJ121-34-14, WJ121-34-31, WJ121-34-32, WJ121-40-30를 세대진전시켜 각각을 샘플링하여 유전자 발현양상을 확인하였다. 이는 각 식물체의 total RNA를 분리하여 Semi-quantitative RT-PCR 분석을 실시한 결과 대조구인 wildy type 식물체에 비해 Pep J1-1 유전자가 발현이 증대됨을 확인하였다(그림 1-14).

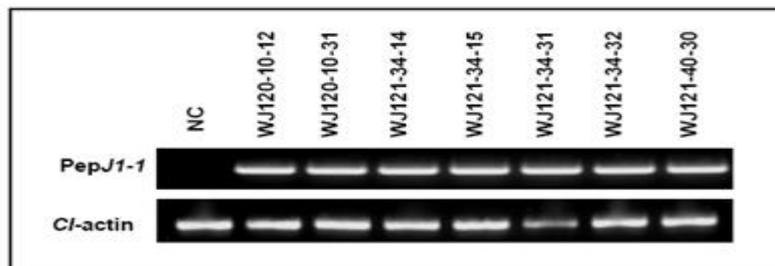


Figure 1-14. A semi-quantitative RT-PCR profile measuring the expression of *PepJ1-1* gene in transgenic Gongdae watermelon. M, size marker (100bp ladder, Bioneer); NC, negative control (non-transgenic plant); WJ120-10-12, WJ120-10-31, WJ121-34-14, WJ121-34-15, WJ121-34-31, WJ121-34-32, WJ121-40-30 : seven independent T4 lines, putative transgenic plants.

(12) Pep J1-1 유전자 형질전환 공대수박의 덩굴쪄김병 저항성의 검정

토양 병해에 강한 형질전환 수박대목의 우수한 중간모본을 선발하기 위해 Pep J1-1 유전자가 도입된 공대수박 형질전환체 3계통 WJ121-34-14, WJ121-34-15, WJ121-34-31을 각각 10립씩 발아 후 파종하였다. 이후 본엽이 2~3매 전개될 때 잎을 채취하여 총 단백질을 추출하고 덩굴쪄김병균에 대해 항균활성정도를 조사하였다. Pep J1-1 유전자 형질전환체 3계통(WJ121-34-14, WJ121-34-15, WJ121-34-31)에 대해 덩굴쪄김병균 포자 생육억제 밀도를 측정된 결과 대조구인 공대수박의 경우 덩굴쪄김병균 3가지 균주(KACC 40901 R1, KACC 40901 R2, KACC40905에 대해 각각 무처리구에 비해 2.5%, 2%, 3% 생육이 억제된 반면 WJ121-34-14 계통의 경우 KACC 40901 R1, KACC 40901 R2 균주에 대해서는 17.5%, 19%, WJ121-34-15의 경우 11%, 13%로, WJ121-34-31의 경우 15%, 17.5%로의 포자생육이 억제됨을 확인하였다. 그러나 모든계통에 대해 KACC 40905 계통에 대해서는 대조구에 비해 포자생육억제효과가 나타나지 않음이 확인되었다(그림 1-15).

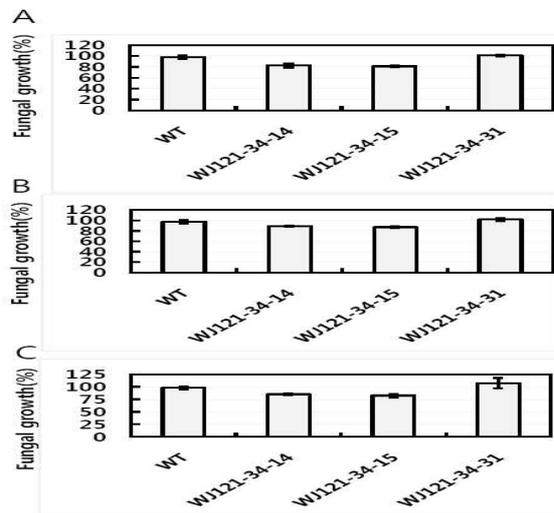


Figure 1-15. Effect of total protein extract of the *PepJ1-1*-overexpressing gongdae watermelon(T4 line) on *in vitro* growth of the fungal pathogen *F. oxysporum* KACC 40901 R1(A), KACC 40901 R2(B) and KACC40905(C). *F. oxysporum* was grown in the presence of protein extracts from transgenic plants. Control sample [Extraction buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl)] + spores ( $1 \times 10^6$ cfu/ml). Fungal growth in the presence of protein extracts from wild type(WT), untransformed gongdae watermelon plants was taken as 100%. WJ121-34-14, WJ121-34-15, WJ121-34-31: three independent T4 lines Vertical bars indicate  $\pm$  standard deviation.

(13) Pep J1-1 유전자 형질전환 공대수박의 내염성 검정

앞서 만고병균 및 덩굴쪄김병균에 대한 저항성이 확인된 Pep J1-1 유전자 형질전환체가 건조 및 고염에 대해서도 내성을 나타내는지의 여부를 확인하기 위해, NaCl 250mM 용액에 일정한 무게가 측정된 잎을 담근 후 5일이 경과한 다음 동일 잎의 총 클로로필 함량을 측정하였다. 그 결과 대조구인 wild type 공대수박에 비해 defensin 형질전환체인 WJ121-34-14와 WJ121-34-31의 2개체에서 총 클로로필 함량이 더 높게 나타남이 확인되었다(그림 1-16).

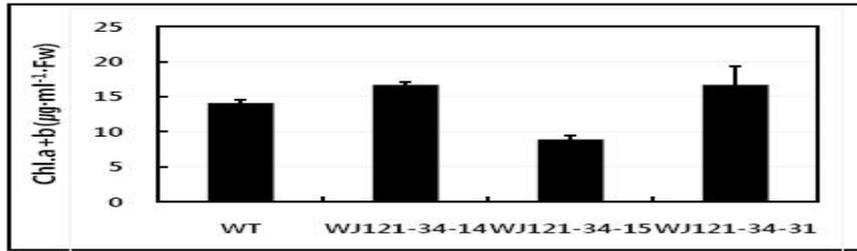


Figure 1-16. Chlorophyll content in leaf discs of T4 lines of *Pepper* defensin (*J1-1*)-overexpressing Gongdae watermelon 5 days after dipping in the 50 mM NaCl solution. Chlorophyll content in plants in the absence of salt treatment was determined. Wild type: Gongdae watermelon (non-transgenic plant), WJ121-34-14, WJ121-34-15, WJ121-34-31: three independent T4 lines Vertical bars indicate  $\pm$  standard deviation.

(14) Pep J1-1 유전자 형질전환 공대수박의 유전자 발현 분석

덩굴쫄김병균에 항균활성을 효과와 NaCl(염)에 내성을 보여주었던 Pep J1-1 유전자가 도입된 공대수박 형질전환체 3계통 WJ121-34-14, WJ121-34-15, WJ121-34-31 계통의 세대진전시켜 각각을 샘플링하여 유전자 발현양상을 확인하였다. 이는 각 식물체의 total RNA를 분리하여 Semi-quantitative RT-PCR 분석을 실시한 결과 대조구인 wildy type 식물체에 비해 Pep J1-1 유전자가 발현이 증대됨을 확인하였다(그림 1-17).

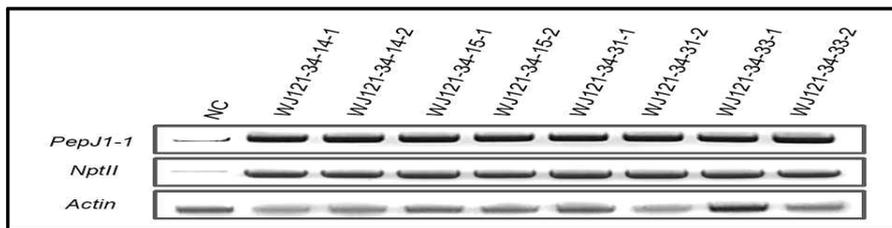


Figure 1-17. A semi-quantitative RT-PCR profile using the PepJ1-1 gene and NPTII gene specific primers in transgenic Gongdae watermelon. NC, negative control (non-transgenic plant); WJ121-34-14, WJ121-34-15, WJ121-34-31, WJ121-34-31: four independent T4 lines, putative transgenic plants.

최종적으로 고추 defensin 공대수박 형질전환체 라인들에 대해 최종적으로 만고병균 저항성 선발계통은 7계통이고, 이중 WJ121-34-14, WJ121-34-15, 그리고 WJ121-34-31, 만할병균(덩굴쫄김병균) 선발계통은 3계통이며 이들 3계통에 대하여서는 염에 대한 내성을 추가적으로 검정하였으며 확보된 종자수 표 1-5에 제시된 바와 같다.

표 1-5. 선발된 Pep J1-1 유전자 형질전환체의 종자수와 검정항목

계통명	세대	종자수	검정항목 <sup>주1)</sup>	선발
WJ120-10-12	T <sub>4</sub>	381	만고병균	○
WJ120-10-31	T <sub>4</sub>	379	만고병균	○
WJ121-34-14	T <sub>4</sub>	326	만고병균, 만할병균, 내염	○
WJ121-34-15	T <sub>4</sub>	316	만고병균, 만할병균, 내염	○
WJ121-34-31	T <sub>4</sub>	395	만고병균, 만할병균, 내염	○
WJ121-34-32	T <sub>4</sub>	285	만고병균	○
WJ121-40-30	T <sub>4</sub>	315	만고병균	○

주1) 병원균저항성 선발계통 7계통, 내염성 선발계통 3계통

## 2. 형질전환 수박대목 동형접합체 선발

### 가. 연구내용

#### (1) Taq man copy number assay

오이 CsGolS1 및 고추 Pep J1-1 유전자 유전자가 도입된 형질전환체의 copy 수를 조사하기 위해 1차적으로 taq man copy number assay를 통해 선별하였다. 형질전환체들의 잎을 채취하여 액체 질소에 급속 냉동한 후 -80℃에 보관하여 gDNA 분리에 사용하였다. 약 0.1 g의 조직을 액체질소에 급속 냉동시켜 아주 미세하게 파쇄하여 분말화 한 후, Plant DNAzol Reagent(invitrogen)을 사용하여 gDNA를 추출하였으며, 5ng/ul로 정량하여 실험에 사용하였다. 또한 본 실험을 수행하기 위해 Applied Biosystems에 의뢰하여 수박의 actin과 NPTII 유전자에 대한 probe를 제작하였다(표 1-3). 각 유전자의 증폭반응은 2x Taq man Genotyping Master Mix(Applied Biosystems)를 사용하여 20ng/ul의 gDNA가 포함된 20μl의 반응액을 94℃에서 10분 동안 Hold 하였고, 95℃에서 15초, 60℃에서 1분 동안 40cycle Roter-Gene qRT-PCR(QIAGEN) 장비를 이용하여 시행하였다.

표 1-6. Taq man copy number assay 수행을 위한 probe 제작

Assay ID	Forward Primer Sequence	Reverse Primer Sequence	Reporter 1 Sequence
Actin_CCMSHAP	GATGCTCTCATGAAGATTCTCACTGA	GCAACATATGCCAGCTTCTCCTT	TCACGGACAATTTCCC
NPTII_CCKAKX6	TGCGGCGGCTGCATA	CGCTCGATGCGATGTTTCG	CCTGCCCATTCGACCACCAAG

#### (2) CsGolS1 유전자 형질전환체의 Genomic Southern blot

환경스트레스 및 병원균에 대한 내성을 보이는 Gols 형질전환체 샘플을 확보하여 -80℃에서 보관하였다가 막자사발을 이용해 충분히 갈아준 후 100mg으로부터 DNAzol® Reagent(invitrogen) solution을 이용하여 gDNA를 추출하였다. 추출한 gDNA 10μg을 EcoRI(TAKARA)으로 enzyme digestion을 수행하였다. 이를 미리 준비한 1.0% agarose gel을 이용하여 100V에서 30분간 loading 한 후 nylon membran에 transfer 하여 UV 하에서 2분간 고정 후 80℃에서 2시간 동안 고정하여 보관하였다. membran은 Gols DIG-labbe probe와 hybridization 시킨 후 필름에 노출시켜 유전자 도입 및 copy수를 확인하였다.

#### (3) CsGolS1 유전자 및 Pep J1-1 유전자 형질전환체 교배라인 생산

앞서 실험을 통해 각 형질전환체의 다양한 환경스트레스에 대한 우수한 내성을 보이는 라인들 대상으로 교잡 형질전환체를 생산하기 위하여 세대진전을 통해 확보된 식물체를 각각 부분과 모본으로 사용하여 2014년 1차 교잡 형질전환체를 생산하였으며, 이들 중 2014년 수확을 통해 확보된 교잡 형질전환체 T0 종자를 이용하여 2015년 세대진전을 통해 T1 종자를 확보하였다.

#### (4) 중간모본 고온 및 저온스트레스 내성검정

명산종묘로부터 분양받은 씬머야무진과 윈터야무진 두 품종에 대해 환경스트레스 내성 비교를 위해 대조구로 사용할 대력과 동장군 포함 총 4품종의 종자를 물에 6~8시간 침종한 후 물기를 닦아내고 젖은 타월에 싸서 3일간 30℃ 항온기에 넣어두었다. 종자가 발아된 후 토양에 심어 약 2주간 생육시켜 고온과 저온 스트레스를 처리 하였다. 씬머야무진은 대력과 함께 고온스트레스 내성 비교를 위해 습도가 90%이상 유지되는 배양기에서 45℃로 3시간씩 3일간 처리 후 25℃의 배양실로 옮겨 3일간 배양하였다. 그리고 잎을 채취하여 cork-borer로 천공하고 무게를 측정 후 chlorophyll을 추출하여 정량함으로써 식물의 고온내성 정도를 분석하였다. Chlorophyll 추출은 다음과 같이 수행하였다. 1mg 잎 샘플당 95% EtOH 100ul를 첨가하고 80℃에서 30분간 가열한 후 상등액만을 취하였다. 분광광도계를 이용하여 상등액에 대한 흡광도  $A_{648}$  과  $A_{664}$  에서 측정하였다. 윈터야무진과 동장군은 동일한 방법으로 4℃ 냉장고에서 3시간씩 3일간처리 후 클로로필 측정을 수행하였다.

### 나. 연구결과

#### (1) CsGolS1 유전자 형질전환체의 genomic southern blot 수행

앞서 선발된 CsGolS1 유전자 T3 형질전환체 3계통에 대한 유전자 도입 확인 및 copy 수 확인을 위해 DIG-labbe probe를 제작하여 southern blot을 수행하였다(그림 1-18). 각 형질전환체의 밴드는 비교적 약하게 발현되는 것으로 나타났으나 유전자의 도입은 1 copy인 것으로 확인되었다.

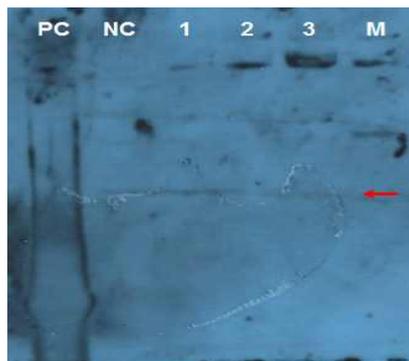


그림 1-18. CsGolS1 유전자 형질전환체의 1copy 동형접합체 확인을 위한 EcoR I enzyme digestion 후 Genomic Southern blot 수행결과.

(PC: CsGolS1 gene PCR product ; NC: non-transgenic plant ; lane1: GolS 1-3-1 ; lane2: GolS 10-1-1 ; lane3: GolS 45-3-1 ; M: DNA molecular weight marker III)

#### (2) Taq man copy number assay를 통한 1copy 동형접합 CsGolS1 유전자 및 Pep J1-1 유전자 형질전환체 선발

덩굴조깅병에 대한 항균활성과 NaCl(내염)에 내성을 보여준 CsGolS1 유전자 형질전환체 3계통(GolS1-3-1, GolS10-1-1, GolS45-3-1)과 Pep J1-1 유전자 형질전환체 4계통(*WJ121-34-2*, *WJ121-34-15*, *WJ121-34-31*, *WJ121-34-33*)의 세대진전으로 확보된 총 7계통의 형질전환체를

대상으로 교잡 형질전환체 제작에 필요한 라인을 선발하기 위한 1copy 동형접합체를 최종 선발하기 위해 taq man copy number assay를 수행하였다. 각 형질전환체 계통의 gDNA 20ng/ $\mu$ l를 이용하여 qRT-PCR을 수행한 결과 CsGolS1 유전자의 경우 WT에 비해 그 발현이 미비한 것으로 나타났으며, Pep J1-1 유전자는 최소 약 0.5 fold 에서 최대 80 fold 까지 발현이 WT에 비해 증가하는 것으로 나타났다. 특히 WJ121-34-33-1 계통의 경우 확인한 4개 라인 중 3개 라인에서 발현이 높게 되는 것으로 나타났다(그림 1-19).

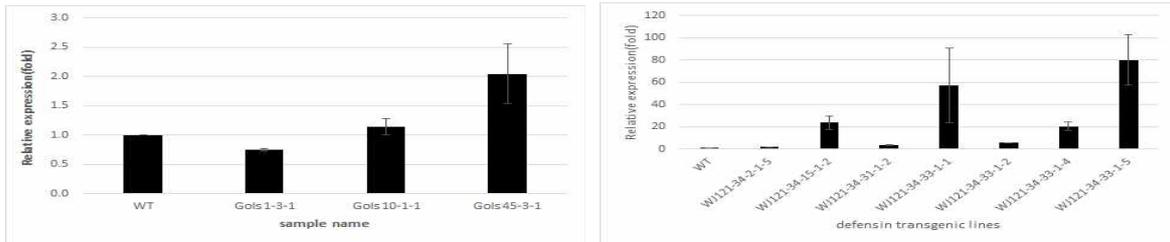


그림 1-19. CsGolS1 유전자, Pep J1-1 유전자 형질전환체의 1 copy 동형접합체 확인을 위한 taqman copy number assay 수행결과

(3) CsGolS1 및 Pep J1-1 유전자의 교잡 형질전환체 생산

내재해성이 우수한 CsGolS1 및 Pep J1-1 유전자의 교잡 형질전환체 생산을 생산하기 위하여 내병성과 내재해성이 확인된 공대수박 Pep J1-1 유전자 형질전환체 라인들과 공대수박 CsGolS1 유전자 형질전환체 라인들을 표 4에 제시된 바와 같이 제 1협동기관인 수박시험장을 통하여 교배하였다. 교배정보는 2014년 Pep J1-1 유전자 형질전환체 WJ121-34-2-1-5, WJ121-34-15-1-4 그리고 WJ121-34-31-1-2의 3계통과 CsGolS1 유전자 형질전환체 GolS1-3-1, GolS10-1-1 그리고 GolS45-3-1의 3계통을 이용한 14개 조합을 교배하여 종자를 확보하였다. 2015년 상반기 이들 교배조합 중 9계통에 대한 증식을 진행하였고 현재 최종 교배조합 2계통 WJ121-34-15-1-4 X GolS10-3-1-1과 WJ121-34-31-1-2 X GolS45-3-1-1, GolS10-1-1-1 X WJ121-34-2-1-5을 선발하여 유전자 도입여부와 내재해성 기능 규명을 진행하고 있다.

표 1-7. CsGolS1 유전자 공대수박 형질전환체(GolS) 및 Pep J1-1 유전자 공대수박 형질전환체 교배라인 목록 및 종자수

연번	2014년 교배라인 계통명 (T4xT3 or T3xT4)	종자수	2015년 교배라인 계통명 (T4xT4)	종자수
1	WJ121-34-2-1-5 X GolS10-1-1	209	-	
2	WJ121-34-2-1-5 X GolS1-3-1	207	-	
3	WJ121-34-2-1-5 X GolS45-3-1	12	-	
4	WJ121-34-15-1-4 X GolS10-1-1	144	WJ121-34-15-1-4 X GolS10-1-1-1	642
5	WJ121-34-15-1-4 X GolS1-3-1	319	WJ121-34-15-1-4 X GolS1-3-1-1	635
6	WJ121-34-31-1-2 X GolS45-3-1	58	WJ121-34-31-1-2 X GolS45-3-1-1	2
7	WJ121-34-31-1-2 X GolS1-3-1	362	WJ121-34-31-1-2 X GolS1-3-1-1	623
8	WJ121-34-31-1-2 X GolS10-1-1	206	WJ121-34-31-1-2 X GolS10-1-1-1	527
9	GolS1-3-1 X WJ121-34-2-1-5	38	GolS1-3-1-1 X WJ121-34-2-1-5	38
10	GolS10-1-1 X WJ121-34-31-1-2	206	-	
11	GolS10-1-1 X WJ121-34-2-1-5	183	GolS10-1-1-1 X WJ121-34-2-1-5	650
12	GolS1-3-1 X WJ121-34-15-1-4	75	GolS1-3-1-1 X WJ121-34-15-1-4	734
13	GolS1-3-1 X WJ121-34-31-1-2	159	GolS1-3-1-1 X WJ121-34-31-1-2	646
14	GolS45-3-1 X WJ121-34-2-1-5	-	-	

2015년 교배라인의 증식을 통해 확보된 총 9계통 중 최종 선발된 2계통의 종자에 대한 종자특성을 조사한 결과 종자의 두께가 wild type인 공대수박에 비해 소폭 감소하는 것으로 조사되었으며, 종자 수는 증가하였으나 발아율이 매우 낮아지는 것으로 나타났다(표 1-8).

표 1-8. CsGolS1 유전자 공대수박 형질전환체 및 Pep J1-1 유전자 공대수박 형질전환체 교배라인 선발예정 계통 종자의 형태적 특성 조사결과

sample name	Seed length(mm)	Seed width(mm)	Seed thickness(mm)	No. seed/fruit	percent germination(%)
WJ121-34-31-1-2 X Gols10-1	13.81	7.66	2.92	527	1/50 (2%)
Gols10-1 X WJ121-34-2-1-5	12.62	7.34	2.63	650	14/50 (28%)
Gong-Dae watermelon(WT)	12.71	7.14	3.18	450	28/30 (93%)
WJ121-34-31-1-2	12.31	6.98	2.83	1025	18/50 (36%)

앞서 확인한 CsGolS1 유전자와 Pep J1-1 유전자 형질전환체의 교배라인에 대한 종자에 대한 특성조사와 더불어 추후 실험진행을 위한 교배라인의 최종 선발을 위해 genomic DNA PCR을 통해 유전자 도입을 확인하였다. 우선적으로 교배라인 Gols10-1 X WJ121-34-2-1-5에 대한 CsGolS1 유전자 및 Pep J1-1 유전자 유전자 발현 확인한 결과 교배라인에서 두 유전자 모두 도입이 된 것으로 확인되었다. 추후 전체 교배라인에 대한 유전자 도입을 확인할 계획이다.

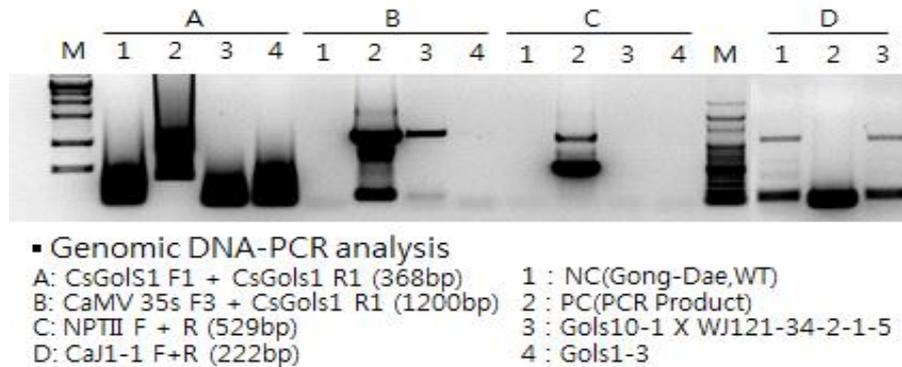


그림 1-20. 선발예정 교배라인의 genomic DNA PCR을 이용한 CsGolS1 유전자 및 Pep J1-1 유전자 도입 검정.

#### (4) 수박대목 중간모본 특성검정

참여기업인 명산종묘로부터 분양받은 중간모본 2품종(품종명: 썸머야무진, 윈터야무진)의 환경스트레스에 대한 내성 검정을 위해 고온과 저온 스트레스에 처리 후 식물체의 형태적 변화를 확인하였다(그림 1-21). 썸머야무진은 고온 및 건조저항성, 윈터야무진은 저온기 신장성이 우수한 품종으로 각각의 대조구로 현재 시판중인 2품종(품종명: 대력, 동장군)과 비교하여 특징을 조사하였다. 먼저 저온 스트레스에 내성을 보일 것으로 예상되었던 윈터야무진과 동장군의 저온 처리 후 생육을 비교한 결과 Injury rating과 Shoot fresh weight, Shoot dry

weight에서 대조구에 비해 우수한 것으로 나타났으며, Root fresh weight, Root dry weight는 동일한 것으로 나타났다. 반면 씬머야무진의 경우는 대조구인 대력에 비해 고온에 대한 Injury rating 및 생육이 전반적으로 떨어지는 것으로 나타났다(표 1-5).



그림 1-21. 중간모본 품종의 고온내성(쌔머야무진-대력) 및 저온내성(윈터야무진-동장군) 스트레스 처리에 대한 phenotype 확인.

표 1-9. 중간모본 품종의 고온 및 저온 스트레스에 대한 생육변화 조사결과

Sample name	Treatment temperature (°C)	Injury rating*	Shoot fresh weight(mg)	Shoot dry weight(mg)	Root fresh weight(mg)	Root dry weight(mg)
동장군	4	1.8	31.10	0.14	26.30	0.01
	25	1	53.30	0.26	39.00	0.02
윈터야무진	4	1.4	33.50	0.15	26.30	0.01
	25	1	65.97	0.37	52.30	0.02
대력	45	2.2	38.27	0.13	33.00	0.02
	25	1	62.33	0.32	56.60	0.03
쌔머야무진	45	4.6	27.90	0.16	30.30	0.01
	25	1	71.90	0.41	74.30	0.04

\*Injury rating scale, 1= normal, 2=trace, 3= slight, 4= moderate, 5= severe injury.

또한 고온 및 저온 스트레스에 대한 Injury rating 및 생육 특성조사와 더불어 식물체내 클로로필함량을 측정하였다. 그 결과 씬머야무진과 윈터야무진의 클로로필 a, b 및 총 함량이 대조구인 대력과 동장군에 비해 소폭 상승하는 것으로 나타났다. 이는 생육 적정온도인 25°C에서도 대조품종에 비해 비교적 높게 측정되었다(표 1-10).

표 1-10. 중간모본 품종의 고온 및 저온 스트레스에 대한 클로로필 함량 조사결과

Sample name	Treatment temperature(°C)	Chl.a (mg/g F.W)	Chl.b (mg/g F.W)	Chla+b (mg/g F.W)
동장군	4	18.08	8.37	26.44
	25	20.34	8.27	28.60
윈터야무진	4	20.08	7.67	27.54
	25	22.30	9.74	32.03
대력	45	22.43	26.69	49.10
	25	18.30	6.98	25.28
쌔머야무진	45	22.43	41.41	65.61
	25	19.15	7.51	26.66

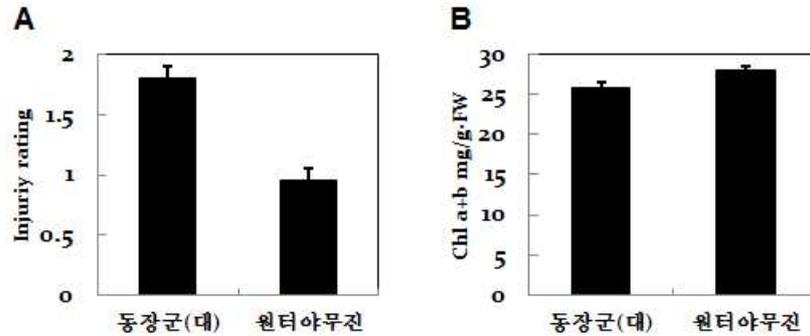


그림 1-22. 중간모본(품종명: 원터야무진)과 대조구(품종명: 동장군)의 4°C 저온처리에 의한 본엽 피해정도와 그에 따른 클로로필 함량 비교결과.(Injury rating scale, 1= normal, 2=trace, 3= slight, 4= moderate, 5= severe injury.)

### 3. *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 수박대목 생산

#### 가. 연구내용

##### (1) 식물재료 및 배양조건

기본 식물인 참박 inbred line은 수박시험장에서 분양 받아 사용하였다. 종자는 embryo에 상처가 나지 않도록 종피를 제거하고 멸균수에 침지하였다가 70% EtOH에 3분간 침지한 다음 Tween 20<sup>TM</sup> 2방울을 떨어뜨린 2% NaOCl에 5분간 침지하여 표면 살균하였다. 표면 살균된 종자를 멸균 증류수로 5회 세척한 후 멸균한 필터페이퍼(110mm Dia, Whatman, USA) 위에 10분간 방치하여 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 종자를 germination medium(GM; MS salt 4.4 g l<sup>-1</sup>, sucrose 30 g l<sup>-1</sup>, 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid(MES) 0.5 g l<sup>-1</sup>, phytigel 3 g l<sup>-1</sup>)에 치상하여 7일간 25°C 암조건에서 발아를 유도하였다(Murashige and Skoog, 1962). 발아한 후 Petri-dish를 광조건 상태로 옮겨 7일 정도 자란 유묘의 자엽은 1 × 0.5cm 정도로 2등분 횡절단 하였고, 배축은 0.5cm 간격으로 절단하여 절편체로 재분화에 사용하였다. 절편은 식물생장조절제의 처리에 따라 petri-dish(SPL, South Korea)당 15개씩 각각 치상하였고 26 ± 2°C, 16시간 광주기, 2000 Lux광도의 배양실에서 배양하였다

##### (2) 성장조절제 처리 및 식물체 순화

기본 배지는 MS기본배지에 30 g l<sup>-1</sup> sucrose, 3 g l<sup>-1</sup> phytigel을 첨가하였으며 pH는 5.8로 조정하였다. 성장조절제는 조직배양에서 많이 사용되는 옥신과 사이토키닌을 사용하였다. 옥신으로는 Indole-3-Acetic Acid(IAA)를 사용하였으며 사이토키닌으로는 BAP를 사용하였다. 배양 4주 후에 분화된 shoot의 수를 조사하였으며 분화된 식물체는 성장조절제로 1 mg l<sup>-1</sup> BA를 단용한 배지에 계대 배양하여 신초를 신장시켰으며 배양병(SPL, Korea)에서 증식하였다. 신초가 3cm이상 증식된 개체를 성장조절제를 첨가하지 않은 MS

배지에 배양하면서 뿌리생성을 유도하였다. 뿌리가 형성된 개체는 멸균된 인공배양토(perlite: 부토, 3:1 v/v)에 이식하여 토양 순화하였다.

### (3) 운반체 재조합 및 *Agrobacterium* 도입

식물세포 형질전환용 binary vector는 항상발현 CaMV 35S promoter와 항생제 kanamycin을 selection marker인 *NPTII* 유전자를 포함하고 있는 pBI121-1을 사용하였다. 공대수박 형질전환에 사용할 *Agrobacterium*은 disarmed Ti-vector를 가지고 있는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 균주를 사용하였다. 제 2 세부과제에서 도출된 각종 유전자들을 binary vector에 재조합하여 *Agrobacterium*에 도입한 후 수박대목 형질전환에 이용하였다.

### (4) 재조합 운반체의 공대수박 및 참박에 도입 및 확인

참박 및 공대수박의 형질전환을 유도하기 위해 *LsADC* 유전자가 포함된 pCAMBIA 1301-Z vector에 도입된 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 균주를 25 µg/ml rifampicin과 50 µg/ml kanamycin이 첨가된 YEP(10g of yeast extract, 20g of bacto peptone) 액체배지에서 배양한 후 참박 및 공대수박 유묘의 자엽 절편과 공동배양하였다. 식물 성장조절제가 첨가되지 않은 MS 기본배지에서 2일간 공동배양후 250 µg/ml carbenicillin과 3 mg/L BAP 및 0.1 mg/L IAA가 첨가된 MS 기본 배지에서 3~4주간 배양하였다. 이후 형성된 신초를 250 µg/ml carbenicillin과 1 mg/L BAP 만 첨가된 MS 기본배지로 길이 신장을 유도하였으며 5~10 µg/ml hygromycin이 첨가된 배지에서 하여 가능성 있는 형질전환체 선발하였다

이러한 형질전환체의 genomic DNA를 분리하여 PCR를 수행하였다. PCR 분석을 위하여 binary vector 내의 CaMV 35S promoter 부위의 forward primer(5'-GACCTAACAGAACTCGCCG-3')와 *LsADC* 유전자의 특정부위에서 reverse primer (5'-CAAATGCCGACTGGAGAGAT-3')제작하여 사용하였다. PCR 수행 조건은 pfu DNA polymerase(Fermentas, USA)를 이용하여 최초 95°C에서 5분간 pre-denaturation후 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 1분30초간 35회 반응시킨후 최종적으로 72°C에서 5분간 post-extension 시켜 PCR를 종료하였다. PCR 산물을 0.7% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

## 나. 연구결과

### (1) 유전자 도입 공대수박 및 참박 형질전환체 생산

참박 및 공대수박 종자를 소독한 후 실험방법에서 기술 한 것처럼 치상하여 발아 시킨 다음 *Agrobacterium*과 공조배양 하였으며 각각의 알맞은 항생배지에서 형질전환체를 선발 하였다. 또한 형질전환 효율을 높이는 방법을 찾기 위해 GUS 유전자를 포함하고 있는 형질전환체를 제작하여 각 단계별로 형질전환 효율을 높이기 위한 실험을 진행하였다(그림 1-23).

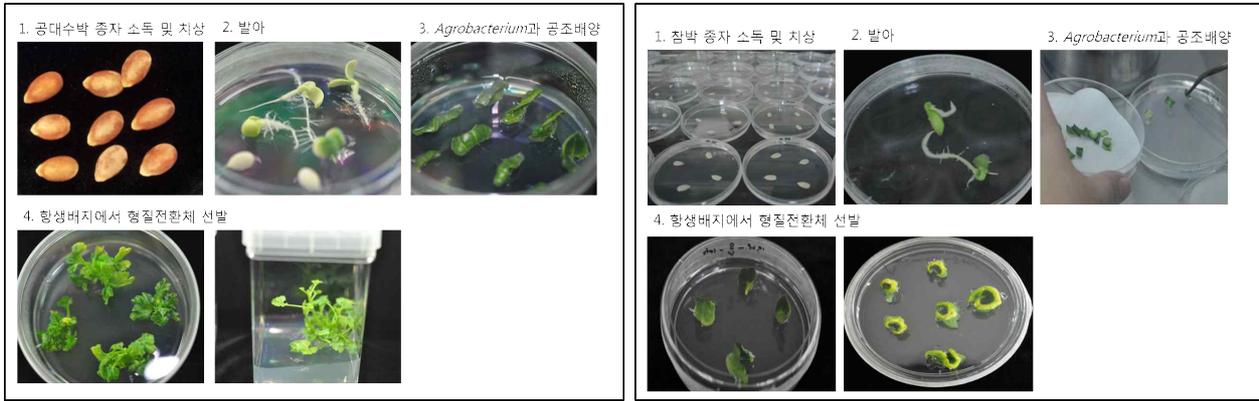


그림 1-23. 공대수박 및 참박 종자를 이용한 형질전환 방법 요약

공대수박 종자를 소독한 후 실험방법에서 기술한 것처럼 치상하여 발아 시킨 다음 2세부에서 제작된 *LsSAMDC*, *LsRZF1*, *LsADC* 유전자가 도입된 *Agrobacterium*과 공조배양과정을 거쳐 250  $\mu\text{g/ml}$  carbenicillin과 3 mg/L BAP 및 0.1 mg/L IAA가 첨가된 MS 기본 배지에서 3~4주간 신초를 형성시켰다. 이후 형성된 신초를 250  $\mu\text{g/ml}$  carbenicillin과 1 mg/L BAP만 첨가된 MS 기본배지로 길이 신장을 유도하였으며 이를 다시 5~10  $\mu\text{g/ml}$  hygromycin를 첨가하여 가능성 있는 형질전환체 선발을 진행하였다. 그 결과 공대수박에 도입된 *LsSAMDC*, *LsRZF1*, *LsADC* 유전자의 hygromycin 선발비율은 표 11에 제시된 바와 같다. 선발하는 과정에서 평균 90% 이상이 갈변되거나 발근되지 못하고 비정상적인 생육되면서 고사되었다(그림 1-24). 특히 *LsSAMDC*나 *LsADC* 유전자의 경우 고사비율이 높아 토양순화 후 생존된 개체의 비율이 각각 0.9%, 0% 일 정도로 낮은 효율을 나타내었다(표 1-11 A and B). 이와 같은 원인을 분석해 본 결과 형질전환체의 선발시 hygromycin 선발 후 형질전환체의 확보율이 매우 낮아지는 것으로 확인하여 추가적으로 형질전환체 선발시 항생제 선발을 수행하지 않고 토양순화를 진행한 결과 약 8%정도의 생존률을 보였으나 최종적으로 모든 라인들이 토양에서 순화하는 과정에서 황화되면서 고사였다 (표 1-11C)

표 1-11. *LsSAMDC*, *LsRZF1*, *LsADC* 유전자가 도입된 공대수박 형질전환체 생산 결과.

(A: 3년차, 4년차 생산결과 종합, B: 3년차 생산결과, C: 4년차 생산결과)

A.

도입유전자	도입개체수	hygromycin 처리 농도에 따른 선발개체수		hygromycin 선발률 (%)	토양순화 개체수 및 선발률 (%)
		5 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$		
<i>LsSAMDC</i>	542	74	-	13.7	9(0.9)
	447	-	39	8.7	
	400	-	-	-	
<i>LsRZF1</i>	260	42	-	16.1	11(2.3)
	215	-	17	7.9	
<i>LsADC1</i>	175	8	-	4.6	-
	140	-	3	2.1	

B.

도입유전자	도입개체수	hygromycin 처리 농도에 따른 선발개체수		hygromycin 선발률 (%)	토양순화 개체수 및 선발률 (%)
		5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$		
<i>LsSAMDC</i>	487	69	-	14.1	9(0.96)
	447	-	39	8.7	
<i>LsRZFI</i>	260	42	-	16.1	11(2.3)
	215	-	17	7.9	
<i>LsADC1</i>	175	8	-	4.6	-
	140	-	3	2.1	

C.

도입유전자	도입개체수	hygromycin 처리 농도에 따른 선발개체수		hygromycin 선발률 (%)	토양순화 개체수 및 선발률 (%)
		5 $\mu\text{g}/\text{ml}$			
<i>LsSAMDC</i>	55	5		0	0(0.0)
	400	-		-	32(8.0)

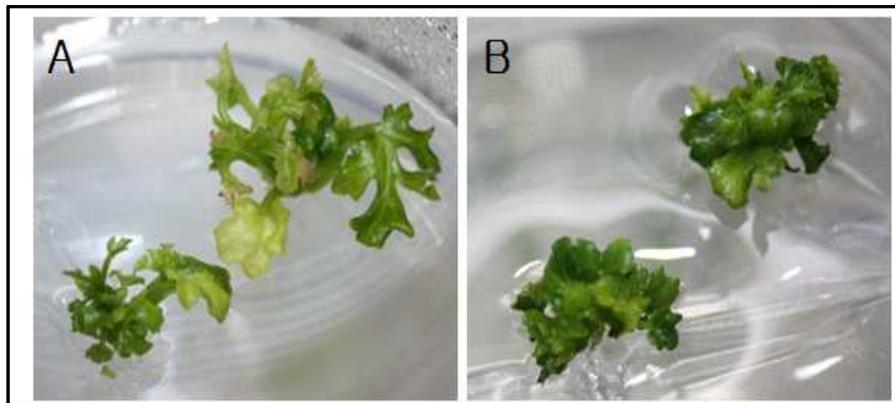


그림 1-24. Hygromcin이 첨가된 선발배지에서 갈변되거나(A) 생존되고(B) 있는 *LsSAMDC* 공대수박 형질전환체

위와 같은 결과로 *LsSAMDC* 및 *LsADC* 유전자 도입 공대수박의 형질전환체 생산에 있어 유전자 도입 후 생존율에 크게 문제가 나타나는 것으로 보여져 추가적으로 참박을 이용한 형질전환체 생산을 진행하였다. 2년에 걸쳐 각 유전자 도입 형질전환체의 생존율을 조사한 결과 공대수박에 비해 오히려 낮은 생존률을 보여주어 형질전환체 생산에 유전자의 영향이 많이 미치는 것으로 판단되었다(표 1-12)

표 1-12. *LsSAMDC*와 *LsADC* 유전자가 도입된 참박 형질전환체 생산 결과.

(A: 3년차, 4년차 생산결과 종합, B: 3년차 생산결과. C: 4년차 생산결과)

A

도입유전자	도입개체수	hygromycin 처리 농도에 따른 선발개체수		hygromycin 선발률 (%)	토양순화 개체수 및 선발률 (%)
		5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$		
<i>LsSAMDC</i>	315	16	-	5.1	-
	25	-	-	-	-
<i>LsADC</i>	447	24	-	5.3	-

B.

도입유전자	도입개체수	hygromycin 선발개체수		hygromycin 선발률 (%)	토양순화 개체수 및 선발률 (%)
		5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$		
<i>LsSAMDC</i>	50	1	-	0.02	-
	25	-	-	-	-

C.

도입유전자	도입개체수	hygromycin 선발개체수	hygromycin 선발률 (%)	토양순화 개체수 및 선발률 (%)
		5 $\mu\text{g}/\text{ml}$		
<i>LsSAMDC</i>	265	15	15(5.6%)	-
<i>LsADC</i>	447	24	24(5.3%)	-

(2) *LsSAMDC*, *LsADC* 및 *LsRZF1* 공대수박 형질전환체의 유전자 도입 확인

재료 및 방법에 기술한 바와 같이 공대수박 및 참박에 도입하여 hygromycin 항생제 첨가 배지에서 선발된 개체들의 유전자의 도입여부를 확인하고자 이러한 형질전환체들의 genomic DNA를 분리하여 PCR를 수행한 결과 *Lsrzf*-antisense 유전자가 도입된 경우 항생제 선발을 거친 59개체 중 11개체가 gDNA-PCR을 통해 최종적으로 확인되었고(그림 1-25), *LsSAMDC* 및 *LsADC* 유전자가 도입된 개체는 확인되지 않았다.



Figure 1-25. Photograph of eleven independent putative T<sub>0</sub> RZF1-antisense (*Lsrzf*) transgenic Gongdae watermelon.

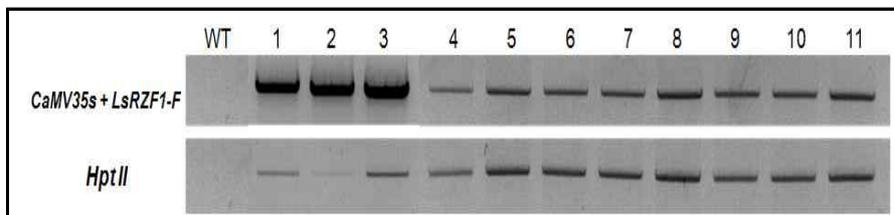


Figure 1-26. Genomic DNA PCR analysis of transgenic Gongdae watermelon plants using the specific primer in watermelon RZF1-antisense gene(*Lsrzf*). M, size marker (1kb ladder, bioneer). WT, wild type (non-transgenic plant); lane 1~11 : putative *Lsrzf* antisense transgenic plants.

gDNA-PCR을 통해 *Lsrzf*-antisense 유전자가 도입이 확인된 11개체의 유전자 발현여부를 확인하기 위해 각 식물체의 total RNA를 분리하여 semi-quantative RT-PCR 분석을 실시한 결과 대조구인 wildy type 식물체에 비해 *LsRZF1* 유전자의 발현이 11개체 모두에서 증가됨을 확인하였다(그림 1-27).

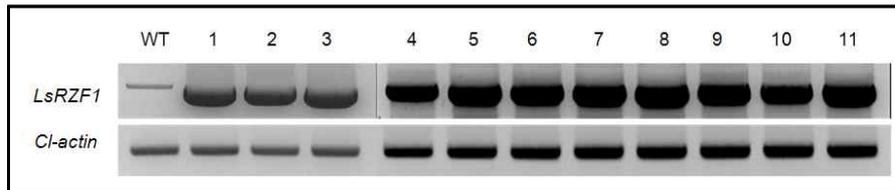


Figure 1-27. A semi-quantitative RT-PCR profile measuring the expression of RZF1-antisense gene(*Lsrzfl*) in transgenic Gongdae watermelon and actin gene as a internal control. WT, wild type (non-transgenic plant); lane 1~11 : putative *Lsrzfl* antisense transgenic plants.

또한 *LsSAMDC* 유전자 도입 공대수박 형질전체의 토양 순화를 통해 총 41개체의 식물체를 확보하였고, 1차적으로 gDNA-PCR을 통해 *hptII* 및 *LsSAMDC* 유전자 도입을 확인하여 2개체를 최종 선발하였다(그림 1-28). 최종 선발된 2개체를 토양에서 유지 관리하였으나, 생육이 크게 진전되지 않고 잎이 황화 되면서 결국 고사되어 *LsSAMDC* 유전자가 식물체의 생육에 많은 영향을 줄 것으로 사료되었다(그림 1-29).

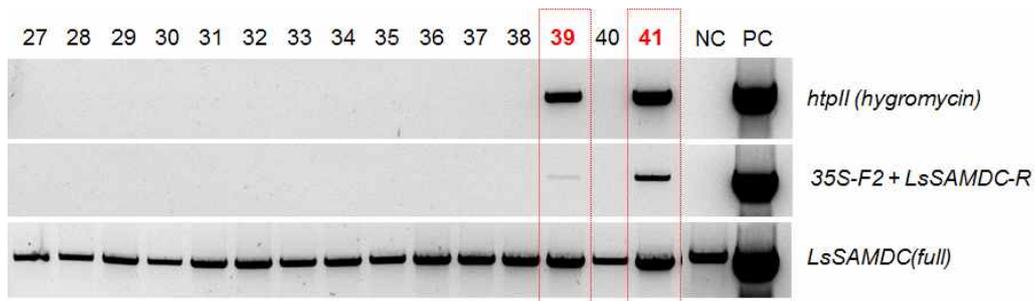


Figure 1-28. Genomic DNA analysis of transgenic Gongdae watermelon plants using the specific primer in watermelon SAMDC(*LsSAMDC*). NC, wild type (non-transgenic plant); PC, *LsSAMDC* plasmid DNA; 2 lane 27~41 : putative *LsSAMDC* transgenic plants.



Figure 1-29. Photograph of eleven independent putative T0 *LsSAMDC* transgenic Gongdae watermelon.

표 1-11 C에서 확인되어지는 항생제 선발을 통해 확보된 *LsSAMDC* 형질전환체 15개체와 *LsADC* 24개체에 대한 유전자 삽입을 확인하기 위해 gDNA-PCR을 수행한 결과, 각각 7개체씩의 *LsSAMDC*와 *LsADC* 형질전환식물체로 의심되는 식물체를 확보할 수 있었다(그림 1-30). gDNA-PCR로 선발된 개체들은 배지상에 따로 분리하여 생육에 지장이 없게 해주었다.



그림 1-30. *LsSAMDC*와 *LsADC* 유전자가 삽입된 참박 형질전환체의 gDNA-PCR 수행결과

배지상에서 gDNA-PCR을 통해 확인된 각 유전자 형질전환체의 생육을 확인한 결과 *LsSAMDC*의 경우 생육은 비교적 잘 진행 되었으나 시간이 지날수록 생육이 줄어들고 잎이 갈변하여 고사하는 것으로 나타나 공대수박과 비슷한 경향치를 보여주었다(자료미제시). *LsADC* 형질전환체는 배지상에서 같은 시기에 심은 WT에 비해 그 생육이 매우 느려지는 것으로 나타났다(그림 1-31). WT 식물체와 비교했을 때 형질전환 식물체의 경우 전체적으로 발달이 늦은 것으로 보여졌으며, 특히 배지상에서 4주 이후의 시간에는 잎이 갈변 되는 것으로 나타났다. 이는 *LsADC* 유전자가 형질전환체 생육에 많은 영향을 주는 것으로 사료되었다.



그림 1-31. *LsADC* 형질전환 식물체의 배지상에서의 생육 결과

다음과 같이 *Agrobacterium*을 이용한 유전자 도입 공대수박 및 참박 형질전환체 생산 결과 종합한 결과는 1-12와 같다. 3가지의 유전자를 이용하여 공대수박과 참박에 약 3,000 개체를 조입했으나, 최종적으로 *LsRZF1* 유전자를 도입한 형질전환체 11개체를 생산하였다. 유전자를 도입한 형질전환체의 생산은 약 10% 이하의 매우 낮은 항생제 선발률을 보였으며, 특히 항생제 선발을 통해 확보된 개체가 토양에 순화될 확률은 2% 이하로 크게 낮아지는 것으로 나타났다(표1-13). 특히 최종선발된 *LsRZF1* 형질전환체는 항생제 선발을 통해 확보한 59개체 중 약 20%에 해당하는 11개체가 토양순화 되었고, 토양순화 된 식물체 전부가 최종 선발됨으로써 항생제 선발 후 토양순화 단계에서 개체수를 많이 확보할 수 있다면 형질전환 개체수를 충분히 선발 할 수 있을 것으로 사료되었다.

표 1-13. *Agrobacterium*을 이용한 유전자 도입 공대수박 및 참박 형질전환체 생산 결과 종합

도입유전자	도입작물	도입개체수	항생제(hyg)선발률 (%)	토양순화율 (%)	최종 선발개체수
<i>LsSAMDC</i>	공대수박	1,389	8.15(113개체)	2.95(41개체)	-
	참박	340	4.70(16개체)	-	-
<i>LsADC</i>	공대수박	315	3.49(11개체)	-	-
	참박	447	5.37(24개체)	-	-
<i>LsRZF1</i>	공대수박	475	12.42(59개체)	2.32(11개체)	11개체
합계		2,966	-	-	11개체

(3) *LsSAMDC* 및 *LsADC* 참박 형질전환체의 호르몬 처리에 의한 발근유도

선행연구를 통해 *LsSAMDC*와 *LsADC* 유전자 도입 형질전환체의 생산에 있어 가장 큰 문제점은 배지 및 토양에서의 발근이 영향을 받는 것으로 보여졌다. 따라서 배지상에서 IBA, NAA 및 IAA 호르몬 처리를 통해 형질전환 식물체의 발근유도 실험을 진행하였다. 참박에 *LsSAMDC* 유전자를 도입한 형질전환체를 이용하여 각 호르몬의 농도에서 2주간 처리한 후 식물체 생존율 및 발근유도 상태를 확인하였다. IBA 1, 3, 5, 10ug/ml 농도에서 발근 유도실험을 한 결과 전 농도에서 발근유도가 되지 않는 것으로 나타났으며, 고농도가 될수록 오히려 생존율까지 낮아지는 것으로 나타났다. NAA 및 IAA 처리 시에도 발근유도 효과가 전혀 나타나지 않았으며, 생존율 또한 낮아지는 것으로 조사되었다(표 14). 각 호르몬 처리구에서의 식물체는 시간이 지날수록 갈변되어 고사되는 것으로 보였다(그림 1-32).

표 1-14. 참박-*LsSAMDC* 유전자 도입 형질전환체의 IBA, NAA 및 IAA 호르몬 처리에 따른 생존 및 발근유도 결과.

IBA 농도(ug/ml)	1	3	5	10
시험개체수	4	6	6	4
생존개체수	3	3	3	1
발근유도개체수	0	0	0	0

NAA 농도(ug/ml)	1	3	IAA 농도(ug/ml)	1	3
시험개체수	5	5	시험개체수	5	5
생존개체수	4	0	생존개체수	1	1
발근유도개체수	0	0	발근유도개체수	0	0

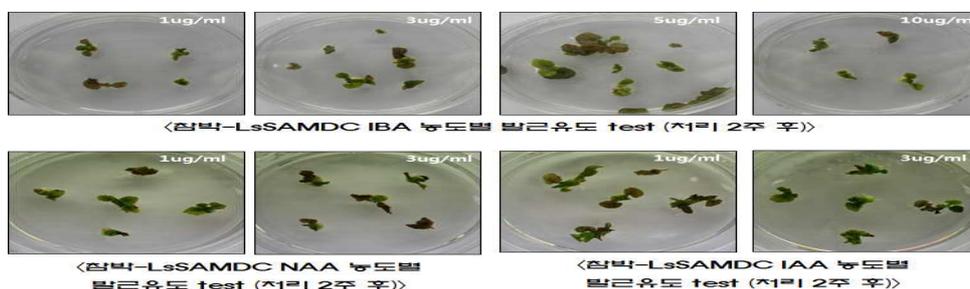


그림 1-32. 참박-*LsSAMDC* 유전자 도입 형질전환체의 IBA, NAA 및 IAA 호르몬 처리에 따른 식물체 변화

동일한 방법으로 *LsADC* 유전자 도입 형질전환체를 이용하여 호르몬 농도에 따른 생존 및 발아유도를 조사한 결과 *LsSAMDC*와 동일한 결과로 농도가 높아질수록 생존률이 낮아졌으며 발근유도 효과를 확인할 수 없었다(표 1-15). 또한 식물체는 처리 2주 후부터 갈변되어 최종적으로 고사하였다(그림 1-33).

표 1-15. 참박-*LsADC* 유전자 도입 형질전환체의 IBA, NAA 및 IAA 호르몬 처리에 따른 생존 및 발근유도 결과.

IBA 농도(ug/ml)	1	3	5	10
시험개체수	6	4	7	7
생존개체수	4	2	2	0
발근유도개체수	0	0	0	0

NAA 농도(ug/ml)	1	3	IAA 농도(ug/ml)	1	3
시험개체수	8	10	시험개체수	8	9
생존개체수	7	0	생존개체수	3	2
발근유도개체수	0	0	발근유도개체수	0	0

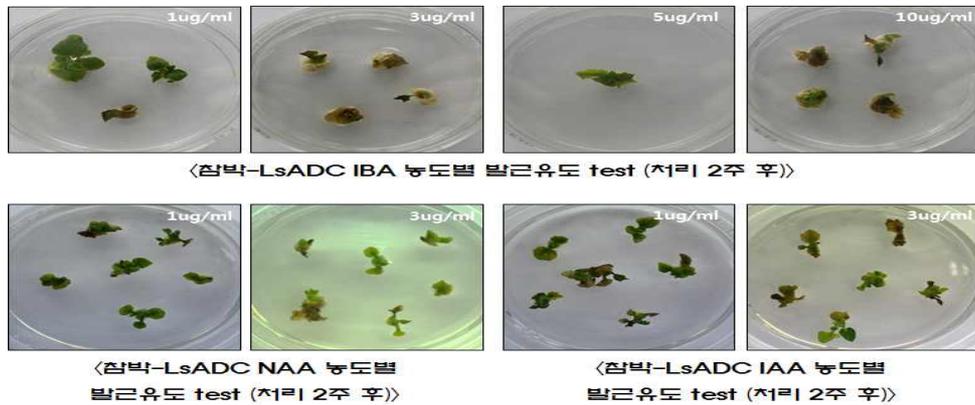


그림 1-33. 참박-*LsADC* 유전자 도입 형질전환체의 IBA, NAA 및 IAA 호르몬 처리에 따른 식물체 변화.

다음과 같은 결과를 종합한 결과 *Agrobacterium*을 통한 유전자 도입 형질전환체 생산은 *Lsrzf-antisense* 유전자 도입 시 총 11 개체를 확보하여 세대진전을 통해 추후 연구를 진행할 수 있었으나, *LsSAMDC*와 *LsADC*의 경우 유전자의 발현이 식물체내 생육에 상당한 영향을 미쳐 발육과 발근이 어려워 추후 대목 생산시에도 문제가 발생 할 것으로 사료되었다.

## 2절. 내재해성 및 복합기능성 수박 대목 개발 및 실용화

### 1. LsRZF1 구조 및 AtRZF1 상동 연관 관계

참박 LsRZF1 단백질은 central region에 RING H2-type zinc finger 도메인 (177-217 aa) (그림 2-1A)이 보존되어 있었으며, 아미노산 서열 분석 결과 애기장대 AtRZF1 단백질과 66% 이상의 상동성 연관(그림 2-1B)이 매우 높았다. 또한, 참박 LsRZF1 및 AtRZF1은 C3H2C3-type의 ring zinc motif가 잘 보존되어 있음을 알 수 있었다(그림 2-1C).

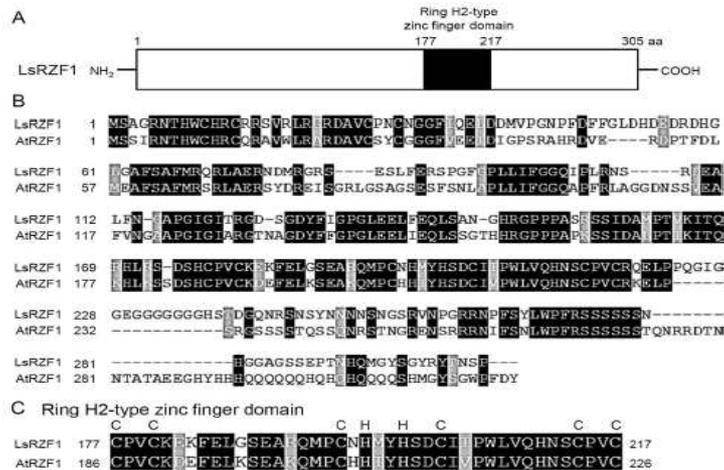


그림 2-1. 참박 LsRZF1과 애기장대 AtRZF1 상동유전자들의 연관 관계도. (A) 참박 LsRZF1의 2차 구조 모식도 (B) 참박 LsRZF1 및 AtRZF1 아미노산 서열 비교 분석 (C) 참박 LsRZF1과 애기장대 AtRZF1 상동유전자들간의 C3H2C3-type의 ring zinc motif 모식도.

### 2. ABA 처리 후, 참박 LsRZF1 유전자의 전사 발현 양상 분석

ABA 호르몬에 대한 참박 LsRZF1 유전자들의 기능을 알아보기 위하여, 우선 quantitative PCR(qPCR)을 통해 LsRZF1 유전자의 발현 양상을 살펴보았다. 발아 후, 10일된 참박 유식물체들을 ABA를 처리하여 qPCR한 결과, LsRZF1 유전자들의 발현 양상은 정상 상태에서 키운 참박 control 보다 감소됨을 알 수 있었다. qPCR을 통한 정량 분석 결과, LsRZF1 유전자 전사 발현량은 ABA 조건하에서 5배 정도 감소함을 확인 할 수 있었다(그림 2-2).

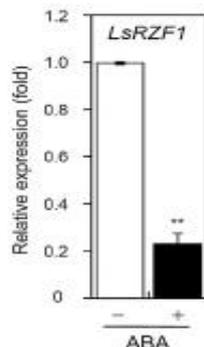


그림 2-2. ABA 처리 후, LsRZF1 유전자들의 발현 양상. 10일된 참박 유식물체로부터 ABA 호르몬 처리 전(control) 혹은 후, total RNA를 추출한 다음 qPCR을 통한 LsRZF1 전사 발현 양상 분석.

### 3. AtRZF1 promoter-GUS 형질전환체로부터 ABA 처리 후, GUS 발현 분석

그림 2-2와 같이, LsRZF1 유전자의 전사 발현이 ABA에 의해 감소됨을 알 수 있었다. 애기장대 AtRZF1 promoter-GUS 형질전환체들을 이용, ABA 처리 후, 형질전환체들로부터 GUS 발현을 살펴 본 결과, GUS 발현 양상은 정상(H<sub>2</sub>O 처리) 상태 보다 감소됨을 알 수 있었다(그림 2-3b 및 2-3c). 또한 기공에서도 GUS가 발현됨을 알 수 있었다(그림 2-3a). 이러한 결과들을 토대로 보았을 때, LsRZF1과 AtRZF1 유전자들은 ABA 반응에 관련됨을 알 수 있었다.

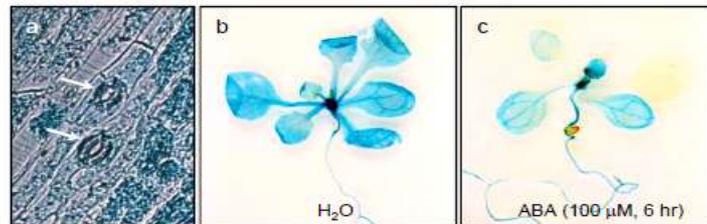


그림 2-3. GUS 발현 분석. (a) AtRZF1 promoter-GUS 형질전환체로부터 기공에서의 GUS 발현 분석 (b 및 c) 2주된 AtRZF1 promoter-GUS 형질전환체로부터 H<sub>2</sub>O 및 ABA 처리 후, GUS 발현 분석.

### 4. LsRZF1 형질전환체들로부터 ABA에 대한 민감성 분석

확보된 각 형질전환체들로부터 ABA에 대한 생리적 표현형을 조사하기 위하여, WT 및 각 형질전환체들의 종자들을 1 μM ABA가 첨가된 MS 식물배지에 파종한 10일 후, 각 유식물체들의 cotyledon greening을 비교 조사하였다. 그림 4A 및 4B와 같이, WT에 비해 *atrzf1* 돌연변이체는 ABA에 대해 내성을 지녔으며, LsRZF1 과발현 및 *atrzf1*/LsRZF1 형질전환체들은 매우 감수성임을 알 수 있었다. 정량 분석 결과, LsRZF1 각 형질전환체들은 20% 이하의 자엽이 녹색화 되는 반면, WT은 25%, *atrzf1* 돌연변이체는 무려 70%의 유식물체 자엽이 녹색화됨을 알 수 있었다(그림 2-4C). 또한, ABA에 대한 *atrzf1*/LsRZF1 형질전환체들의 cotyledon greening 결과로 보아, LsRZF1 유전자는 AtRZF1 유전자와 생체 내 유사한 기능을 할 것으로 추정되어진다.

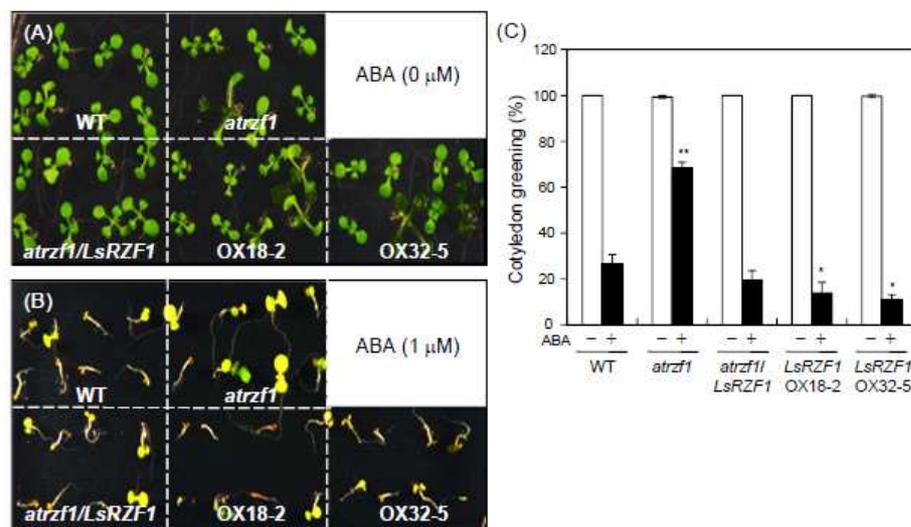


그림 2-4. LsRZF1 형질전환체들로부터 ABA에 대한 내성 분석. (A, B) WT 및 각 LsRZF1 형질전환체들의 종자들을 1  $\mu$ M ABA가 첨가되지 않은 (A) 혹은 첨가된 (B) MS 식물배지에 파종한 10일 후, 각 유식물체들의 cotyledon greening 비교 조사 (C) WT 및 각 LsRZF1 형질전환체들의 종자들을 1  $\mu$ M ABA가 첨가되지 않은 혹은 첨가된 MS 식물배지에 파종한 10일 후, 각 유식물체들의 cotyledon greening 정량 분석.

#### 5. 건조스트레스 처리 후, 스트레스 관련 마커 유전자들의 전사 발현량 분석

WT 및 각 LsRZF1 형질전환체들로부터 건조스트레스 처리 후, 스트레스 관련 마커 유전자들의 발현을 분석하기 위하여, 프롤린 합성 관련 P5CS1, ROS 관련 AOX1a 및 수분결핍 스트레스 관련 ERD15 유전자들의 전사 발현량을 분석하였다(그림 2-5). 건조 처리 후, qPCR를 수행한 결과, LsRZF1 각 형질전환체들은 WT과 *atrzf1* 돌연변이체 보다 스트레스 마커 유전자들의 전사 유도 증가율이 감소함을 알 수 있었다(그림 2-5).

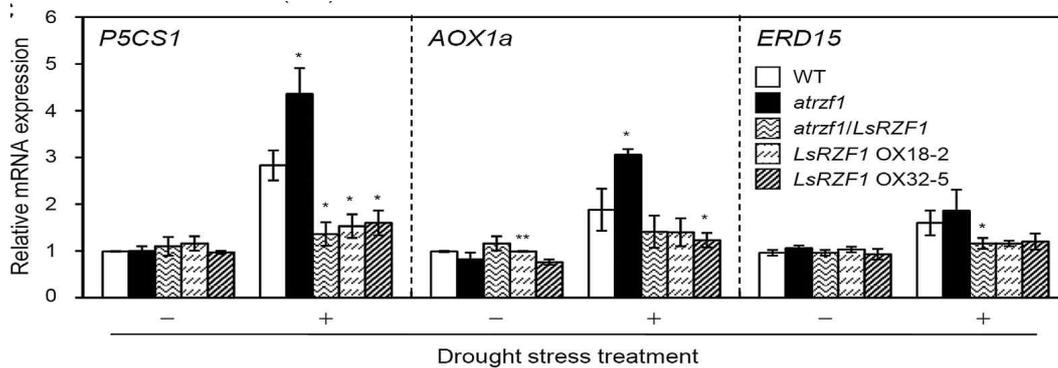


그림 2-5. 건조스트레스 처리 후, 스트레스 관련 P5CS1, AOX1a 및 ERD15 유전자들의 전사 발현량 분석. WT, *atrzf1* 돌연변이체 및 각 LsRZF1 형질전환체들로부터 건조 처리 전 (-) 혹은 후 (+), total RNA를 추출한 다음, qPCR을 통한 스트레스 관련 마커 유전자들의 전사 발현량 분석.

#### 6. ABA 관련 마커 유전자들의 전사 발현량 분석

WT 및 각 LsRZF1 형질전환체들로부터 ABA 처리 후, ABA 유도 증가 마커 유전자들의 발현을 분석하기 위하여, RAB18, RD29A 및 RD29B 유전자들의 전사 발현량을 분석하였다(그림 2-6). ABA 처리 후, qPCR를 수행한 결과, LsRZF1 각 형질전환체들은 WT과 *atrzf1* 돌연변이체 보다 ABA 마커 유전자들의 전사 유도 증가율이 감소함을 알 수 있었다(그림 2-6).

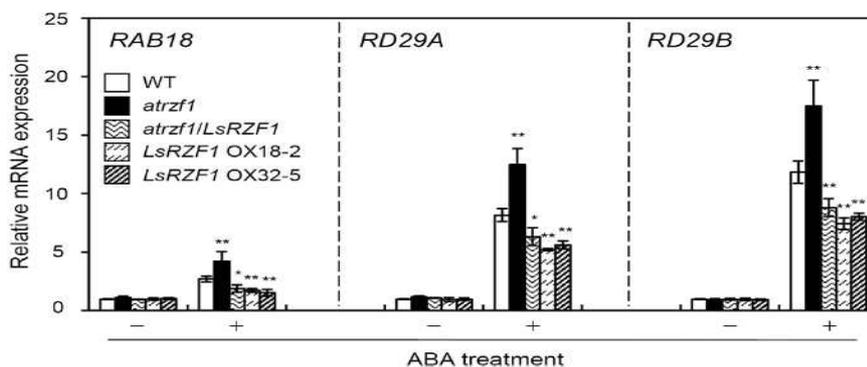


그림 2-6. ABA 처리 후, ABA 유도 증가 관련 RAB18, RD29A 및 RD29B 유전자들의 전사 발현량 분석. WT, atrzf1 돌연변이체 및 각 LsRZF1 형질전환체들로부터 ABA 처리 전 (-) 혹은 후 (+), total RNA를 추출한 다음, qPCR을 통한 ABA 관련 마커 유전자들의 전사 발현 양상 분석.

### 7. LsRZF1 단백질의 세포 내 생화학적 기능 분석

그림 2-1에서와 같이 LsRZF1은 중앙부분에 C3H2C3-type zinc finger domain(177-217 aa)을 포함하고 있으며, 이러한 C3H2C3-type zinc finger 단백질들은 ubiquitination E3 ligase activity를 가지고 있다는 보고가 된바있음. LsRZF1 단백질의 세포 내 생화학적 기능을 분석하기 위하여, MBP-LsRZF1 construct를 클로닝한 후, auto-ubiquitination assay를 수행하였다. 그림 2-7에서와 같이 Anti-MBP 항체를 이용, auto-ubiquitination assay 결과, LsRZF1 단백질은 E1 및 E2 단백질이 존재 하에 ubiquitination이 이루어짐을 알 수 있었다. 이러한 결과는 LsRZF1 단백질은 AtRZF1과 같이 세포 내 생화학적 기능으로써 E3 ubiquitin ligase임을 알 수 있었다.

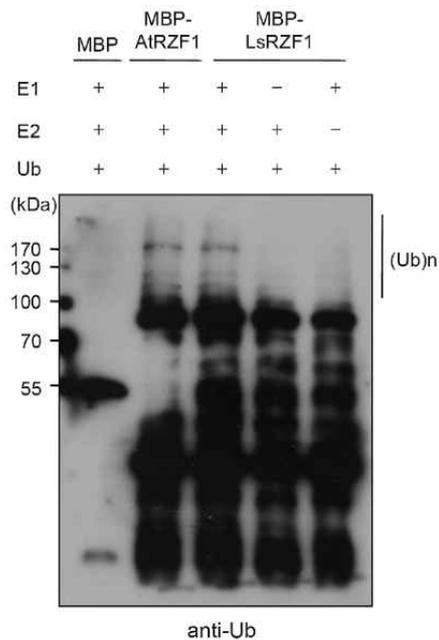


그림 2-7. LsRZF1 단백질의 auto-ubiquitination assay. Amylase resin에 의해 LsRZF1 단백질을 정제한 후, anti-MBP 항체를 이용한 Western을 수행하였다. AtRZF1은 positive control 및 MBP는 negative control 임.

### 8. LsRZF1 유전자 도입 T0 세대 공대수박 대목 형질전환체 검정

제 1 세부과제에 의해 만들어진 공대수박 대목 형질전환체 (T0 세대)들로부터 LsRZF1 유전자 도입 (antisense 형질전환체) 여부를 분석하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 공대수박 대목 10종의 형질전환체 T1-1, T1-2, T1-3, T1-4, T1-5, T1-6, T1-7, T1-8, T1-9, T1-10 및 T1-11(그림 2-8A) 및 공대수박(control, WT)으로부터 T1-10 형질전환체를 제외한 각 형질전환체 total RNA 추출 및 cDNA 합성 후, RT-PCR을 수행한 결과, 공대수박에서는 LsRZF1 PCR products를 볼 수 없었으며, 반면에 10종의 antisense 형질전환체들은 LsRZF1 transcript

bands들을 확인할 수 있었다(그림 2-8B). 또한, 이러한 형질전환 식물체들로부터 건조 처리 후, 프롤린 함량을 측정 한 결과, T1-1, -2, -4, -6, -8 및 -9 형질전환체가 WT(공대수박), T1-3, -5, -7 및 -11 식물체 보다 월등히 프롤린 함량이 높다는 것을 확인할 수 있었다(그림 2-8C). 이러한 결과들을 살펴보았을 때, T1-1, -2, -4, -6, -8 및 -9 형질전환체들은 도입된 LsRZF1 유전자에 의해 프롤린 대사를 조절하는 것으로 여겨진다.

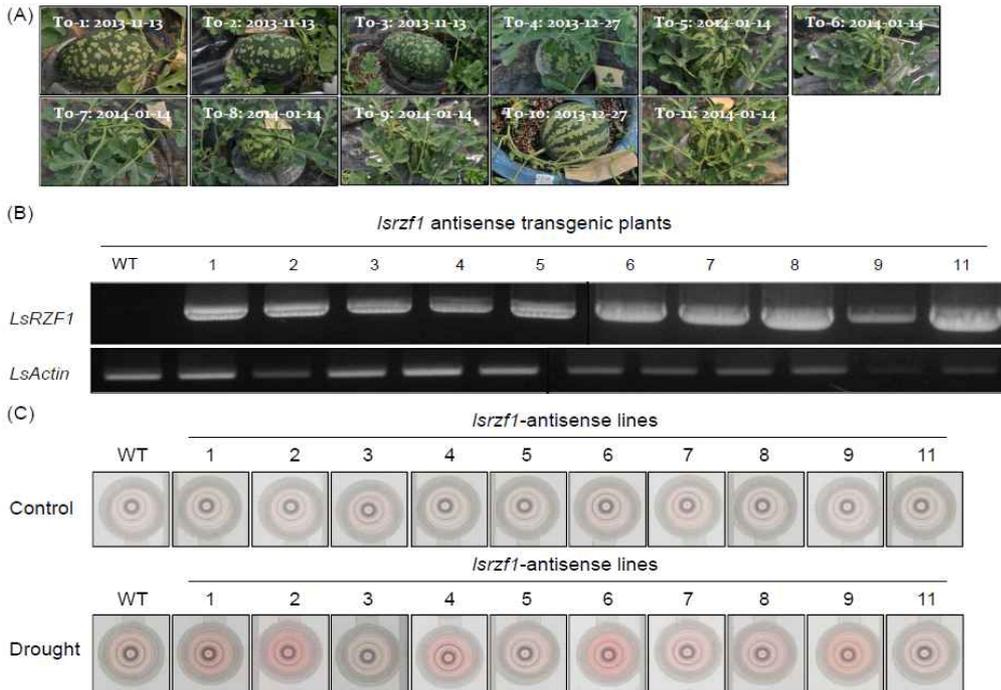


그림 2-8. LsRZF1 유전자 도입 공대수박 대목 형질전환체 검정. (A) LsRZF1 유전자 도입 공대수박 대목 형질전환 T1-1, T1-2, T1-3, T1-4, T1-5, T1-6, T1-7, T1-8, T1-9, T1-10 및 T1-11 식물체 (B) WT (공대수박) 및 각 형질전환체들로부터 total RNA를 추출한 후, RT-PCR을 통한 식물체의 genotype 분석. LsActin 유전자는 loading control 임. (C) WT 및 각 LsRZF1 형질전환 공대수박 식물체들로부터 건조 처리 전 (control) 혹은 후 (Drought), 프롤린 함량 분석.

### 9. LsRZF1 유전자 도입 T2 세대 공대수박 대목 형질전환체 검정

우선 2종의 T2-1 및 T2-3 형질전환체로부터 T2 세대 종자 수확 후, LsRZF1 유전자가 도입이 되었는지를 확인하기 위하여, 각 형질전환체들의 유식물체로부터 genomic DNA 추출 및 35S promoter에 해당하는 한쪽 primer와 LsRZF1 유전자의 한쪽 primer를 가지고 PCR을 수행하였다. 그림 2-9와같이 wild-type(WT)에서는 PCR products를 볼 수 없었으며, 반면에 T2-1 형질전환체의 자식세대 중 T2-1-4를 제외한 5개체에서 모두 PCR products를 볼 수 있었다. T2-3 형질전환체의 자식세대 중 T2-3-2를 제외한 4개체에서 모두 PCR product bands들을 확인할 수 있었다(그림 2-9). 이러한 결과들을 살펴보았을 때, LsRZF1 유전자가 T2 세대로 전전되었으며, 아마도 이 2 종의 T2-1 및 T2-3 형질전환체들은 single copy의 LsRZF1 유전자가 존재할 것으로 여겨진다.

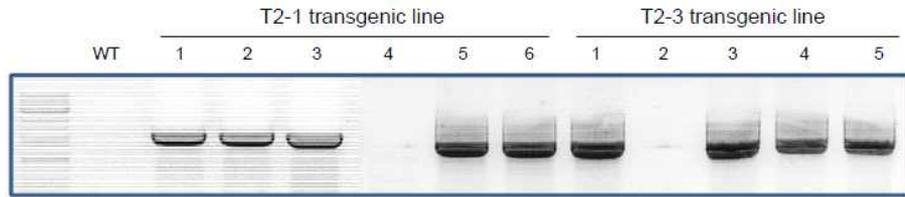


그림 2-9. LsRZF1 유전자 도입 T2 세대 형질전환체 검정. T2-1 및 T2-3 형질전환체들의 자식세대 유식물체로부터 genomic DNA를 추출한 후, PCR을 통한 식물체의 genotype 분석.

10. 11종의 T3세대 LsRZF1 공대수박 형질전환체들로부터 우수 순종 라인 선발

11종의 T3세대 LsRZF1 공대수박 형질전환체들로부터 genomic DNA-PCR을 통해 총 7종의 우수 순종 라인들을 선발하였다(그림 2-10).

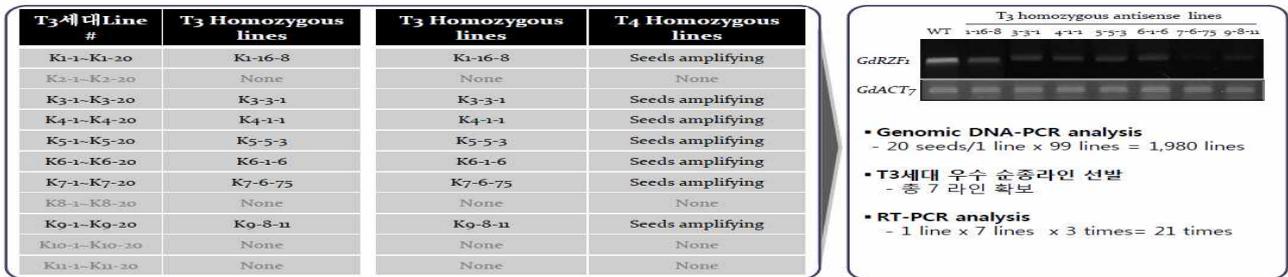


그림 2-10. 11종의 T3세대 LsRZF1 공대수박 형질전환체들로부터 genomic DNA-PCR을 통해 총 7종의 우수 순종 라인들을 선발하였음.

11. 7종의 T3세대 LsRZF1 우수 순종라인으로부터 내건성에 대한 표현형 분석

7종의 T3세대 LsRZF1 우수 순종라인으로부터 내건성에 대한 표현형을 분석한 결과, K1-16-8, K3-3-1 및 K4-1-1 라인들은 대조구인 WT 표현형과 유사한 반면, K5-5-3, K6-1-6, K7-6-75 및 K9-8-11 라인들은 WT 보다 더 강한 내건성 표현형이 나타남을 알 수 있었다(그림 2-11).



그림 2-11. 7종의 T3세대 LsRZF1 우수 순종라인으로부터 내건성에 대한 표현형 분석. 건조 처리 4일 및 6일 후, 내건성 표현형을 분석하였음.

12. 2종의 T3세대 LsRZF1 우수 순종라인으로부터 건조스트레스에 대한 생리적 표현형 분석

K5-5-3과 K6-1-6 순종라인으로부터 건조스트레스 처리 9일 후 생리적 표현형 분석한 결과, 그림 2-12에서 나타난 것과 같이, K5-5-3과 K6-1-6 순종라인들은 대조구인 WT 보다 내건성이 훨씬 좋음을 알 수 있었다. 형질전환 세대별 종자 현황은 표 2-1과 같으며 T4세대 우수 라인으로부터 내건성을 검정한 결과는 표 2-2에 나타내었다.

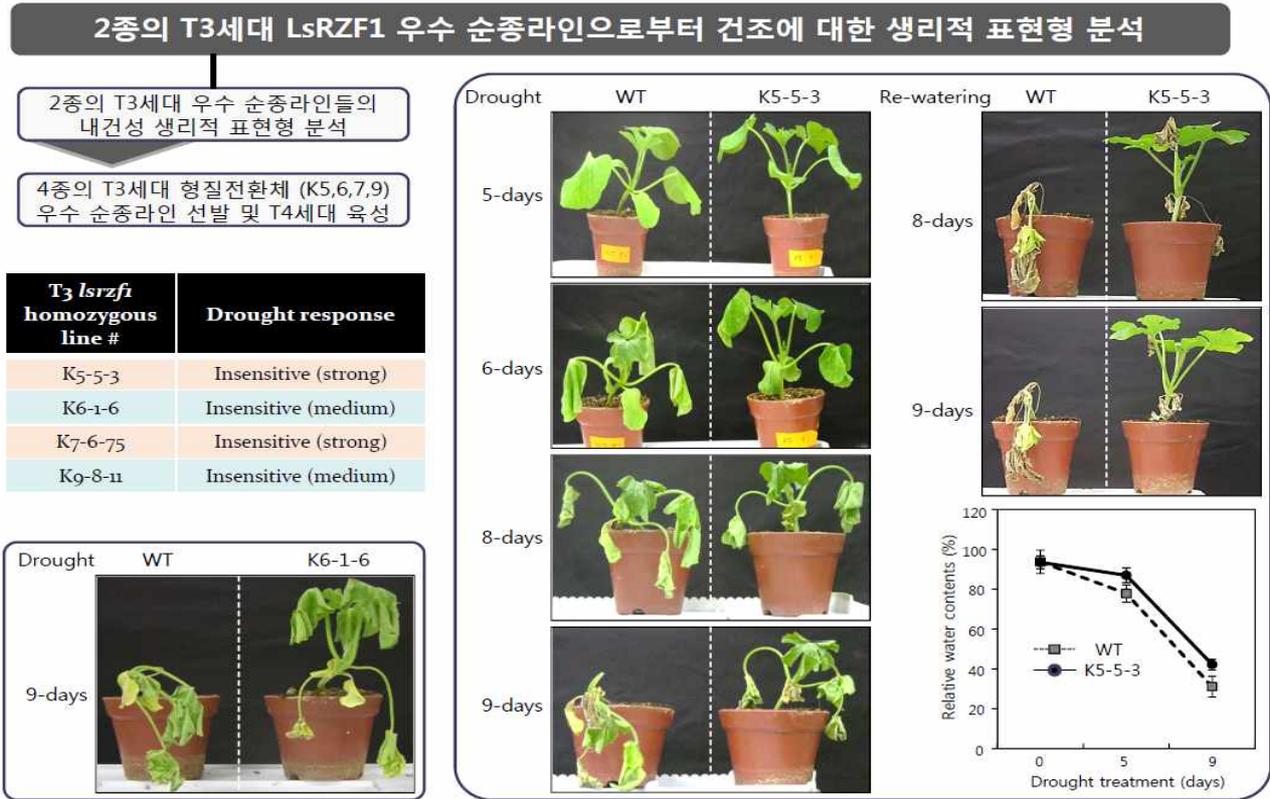


그림 2-12. 2종의 T3세대 LsRZF1 우수 순종라인으로부터 내건성에 대한 표현형 분석. 건조 처리 5-9일 후, 내건성 표현형을 분석하였음.

표 2-1. 형질전환 세대별 종자 현황

**형질전환체 세대별 종자 현황**

T1 세대		T2 세대	
계통명	계통명	분리비	종자수
K1	K1	3:1	107
K2	K2	3:1	110
K3	K3	3:1	173
K4	K4	3:1	141
K5	K5	3:1	207
K6	K6	3:1	186
K7	K7	3:1	45
K8	K8	3:1	167
K9	K9	3:1	229
K10	K10	3:1	162
K11	K11	3:1	158

T3 세대		
계통명	우수 순종 라인	종자수
K1-1~K1-20	K1-16-8	13
K2-1~K2-20	None	-
K3-1~K3-20	K3-3-1	48
K4-1~K4-20	K4-1-1	155
K5-1~K5-20	K5-5-3	142
K6-1~K6-20	K6-1-6	469
K7-1~K7-20	K7-6-75	287
K8-1~K8-20	None	-
K9-1~K9-20	K9-8-11	448
K10-1~K10-20	None	-
K11-1~K11-20	None	-

T4 세대	
계통명	종자수
K1-16-8	924
K3-3-1	1,315
K4-1-1	1,933
K5-5-3	952
K6-1-6	3,741
K7-6-75	2,270
K9-8-11	2,717

표 2-2. T4세대 우수 라인으로부터 내건성을 검정한 결과

**T4세대 우수 순종 라인들로부터 내건성 분석**

건조 내성 분석	
계통명	생리적 표현형
K1-16-8	Similar to WT
K3-3-1	Similar to WT
K4-1-1	Strong > WT
K5-5-3	Strong > WT
K6-1-6	Strong > WT
K7-6-75	Strong > WT
K9-8-11	Medium > WT

13. 폴리아민 생합성 관련 *LsADC* 와 *LsSAMDC* 유전자 클로닝 및 식물발현벡터 제작

폴리아민의 첫 번째 단계인 Putrescine을 합성하는 효소인 Arginine decarboxylase(*ADC*)와 Putrescine과 Spermidine에 aminopropyl group를 제공해 줌으로써 각각 Spermidine과 Spermine이 생성되는데 중요한 역할을 하는 효소인 S-adenosylmethionine decarboxylase (*SAMDC*)는 생물학적 및 비생물학적인 스트레스에 관여되어 있는 것으로 알려져 있어 내재해성 형질전환체를 창출하는데 많이 이용하고 있다. 그래서 본 연구과제에서 처음으로 내재해성이 강화된 형질전환 수박 대목을 창출하기 위해 *ADC* 유전자와 *SAMDC* 유전자를 이용하고자 하였다. 우선 농업 현장에서 수박 대목으로 많이 이용하고 있는 참박으로부터 건조 스트레스를 처리한 후 total RNA 추출 및 cDNA 합성한 다음, 같은 박과 작물인 오이 게놈 데이터베이스로부터 합성된 *ADC* 및 *SAMDC* 유전자의 primer를 이용하여 RT-PCR를 통해 각각 *LsADC* 와 *LsSAMDC* 유전자를 pTOP 벡터에 클로닝하였다. 클로닝된 유전자들의 염기서열과 아미노산 서열을 결정한 결과, *LsADC*는 식물 *ADC* 유전자 집단이 고유적으로 가지고 있는 2개의 pyridoxal phosphate attachment site가 있었으며 또한 *ADC* 단백질이 가공되는 과정에서 잘려 나가는 부위도 존재하고 있었다. 그리고 아미노산 수준에서 상동성을 비교해 본 결과, *LsADC*는 오이의 *CsADC*와 96%, 담배의 *NtADC*와 76%, 애기장대의 *AtADC1*과는 70%, *AtADC2*와는 71%, 그리고 벼의 *OsADC*와는 64%정도 상동성을 나타내었다(그림 2-13).

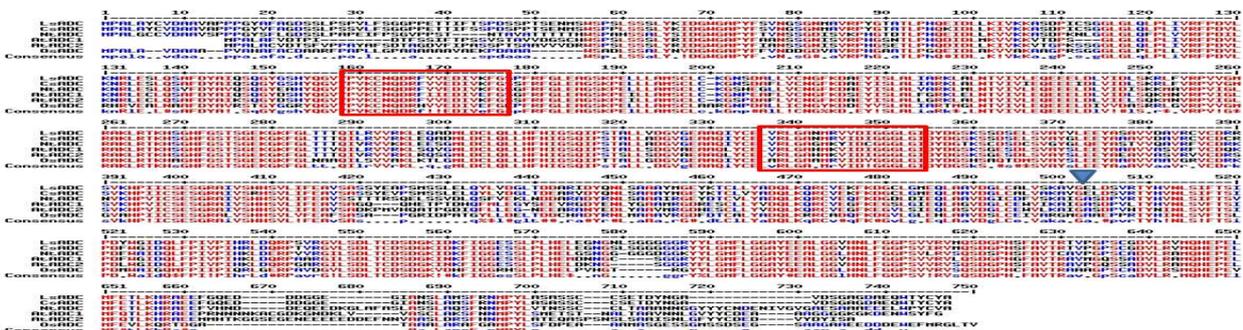


그림 2-13. 클로닝된 *LsADC*의 pyridoxal phosphate attachment site (motif 1과 motif 2: 빨간 상자로 표시)와 ADC 단백질이 가공되는 과정에서 잘려나가는 부위 (파란색 삼각형으로 표시) 모습 및 다른 식물의 ADC와의 상동성 분석 결과.

그리고 *LsSAMDC* 역시 대부분의 SAMDC가 가지고 있는 proenzyme cleavage site가 있었으며 단백질의 분해와 관련되어 있는 PEST domain을 하나 가지고 있었다. 또한 아미노산 수준에서 상동성을 비교해 본 결과, *LsSAMDC*는 수박의 *CISAMDC*와 97%, 담배의 *NtSAMDC*와 71%, 애기장대의 *AtSAMDC1*와는 67%, 벼의 *OsSAMDC1*와는 55%, 그리고 오이의 *CsSAMDC2*와는 48%정도 상동성을 나타내었다(그림 2-14).

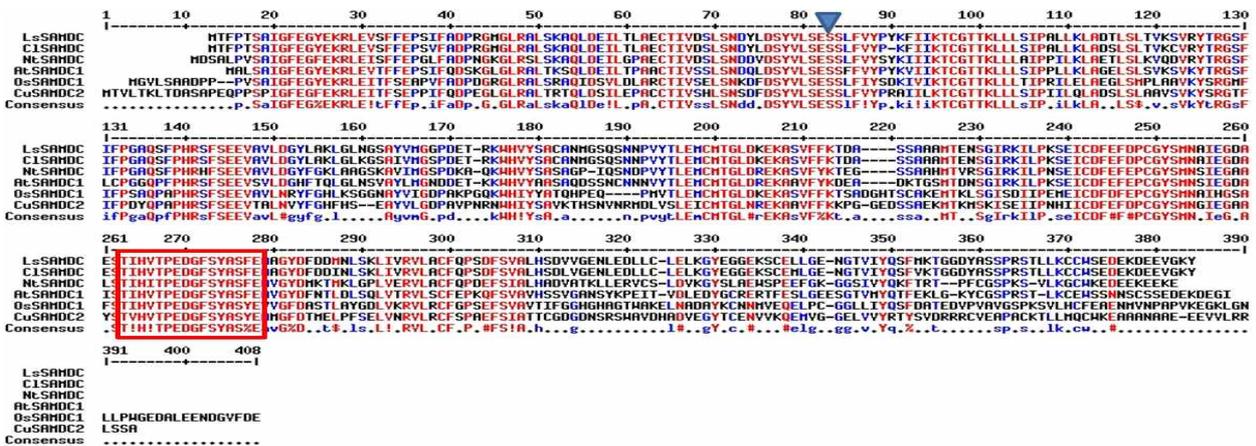


그림 2-14. 클로닝된 *LsSAMDC*의 proenzyme cleavage site (파란색 삼각형으로 표시)와 단백질의 분해와 관련되어 있는 PEST domain (빨간 상자로 표시) 모습 및 다른 식물의 SAMDC와의 상동성 분석 결과.

클로닝하여 아미노산 수준에서 구조적인 특성을 확인한 *LsADC* 와 *LsSAMDC* 유전자의 유전적인 연관성을 좀더 명확하게 확인해 보기 위해 phylogenetic tree를 작성해 본 결과, *LsADC*의 경우는 오이의 *CsADC*와 유전적으로 매우 가까운 반면 *LsSAMDC*는 수박의 *CISAMDC*와 가장 가까운 것으로 확인되었다(그림 2-15).

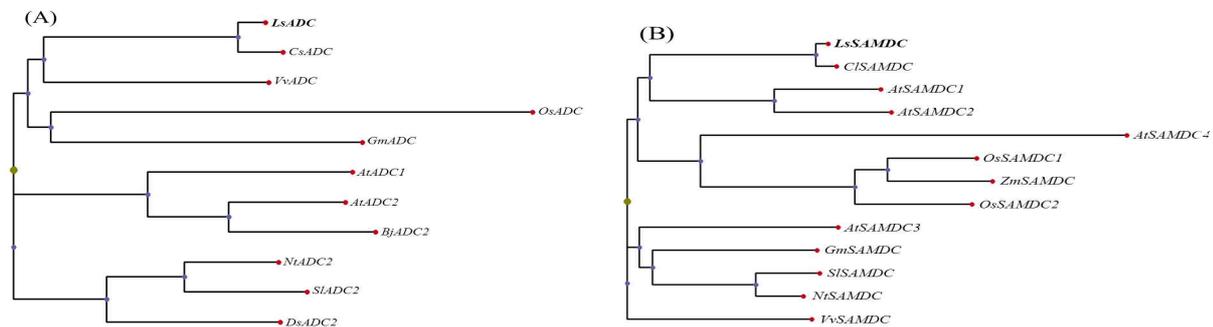


그림 2-15. *LsADC* (A)와 *LsSAMDC* (B)의 phylogenetic tree 결과.

#### 14. 수박 대목 유전자(*LsADC* 와 *LsSAMDC*)의 내재해성 관련 특성 분석

클로닝한 *LsADC* 와 *LsSAMDC* 유전자의 스트레스 반응 특성 및 조직특이적인 발현 양상

을 확인해 보기 위해 참박 10-day-old 유식물체에 건조, 고염, 만고병 및 탄저병을 처리한 후 시간이 경과한 샘플로부터 total RNA를 추출하여 RT-PCR과 quantitative real time PCR (qPCR)을 수행하였으며 조직특이적 발현 양상 확인은 스트레스 처리 없이 참박의 뿌리, 줄기, 잎, 그리고 자엽으로부터 total RNA를 추출하여 동일하게 실험을 수행하였다. 참박의 *Actin* 유전자 primer set를 확보하여 internal control로 사용하였다. 그림 2-16에서와 같이, *LsADC* 유전자는 잎에서의 발현은 다른 조직에 비해 상대적으로 약하게 나타났으나 건조와 고염 스트레스에 대해 강하게 유도되는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 이 유전자의 경우 비생물학적 스트레스 뿐만아니라 만고병 및 탄저병과 같은 생물학적 스트레스에 대해서도 지속적으로 강하게 유도 되고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 본 연구실에서 애기장대의 *AtADC* 유전자가 병저항성에 연관되어 있음을 밝힌 내용을 뒷받침 해주는 것으로 이 유전자를 이용할 경우 내건성 뿐만아니라 내병성에도 도움을 줄 수 있는 내재해성 형질전환 대목을 창출할 수 있으리라 생각되었다.

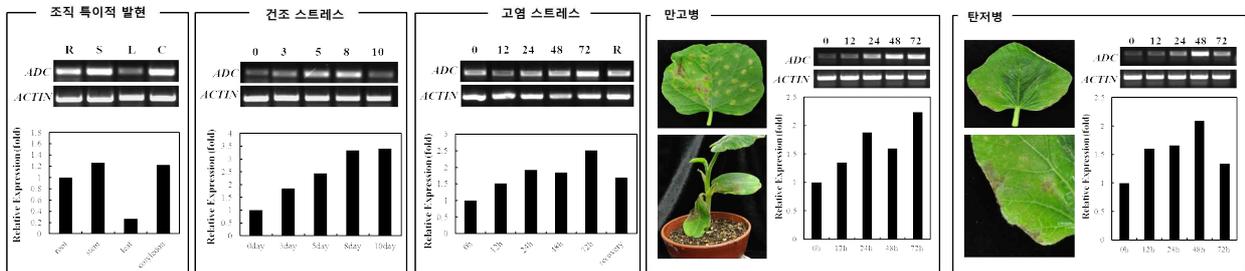


그림 2-16. *LsADC* 유전자의 조직특이적 발현 양상 결과 및 건조, 고염 스트레스와 같은 비생물학적 스트레스 뿐만아니라 만고병 및 탄저병과 같은 생물학적 스트레스에도 반응하여 유도 발현되는 결과.

그러나 *LsSAMDC* 유전자는 *LsADC* 유전자와 다르게 다른 조직에 비하여 잎에서 가장 발현이 강하게 나타났으며 건조 스트레스에 대해서는 건조 처리 후 8일 이후에 강하게 유도되는 것을 확인 할 수 있었다. 그리고 고염과 만고병 및 탄저병에 의한 발현 양상은 *LsADC* 유전자의 발현과 비슷하게 조절되고 있음을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 *LsSAMDC* 유전자 역시 비생물학적 스트레스 뿐만아니라 만고병 및 탄저병과 같은 생물학적 스트레스에 대해서도 지속적으로 강하게 유도 되고 있음을 의미하는 것으로 이 유전자를 형질전환에 이용할 경우 내건성 뿐만 아니라 내병성에도 도움을 줄 수 있는 내재해성 형질전환 대목을 창출할 수 있으리라 생각되었다(그림 2-17).

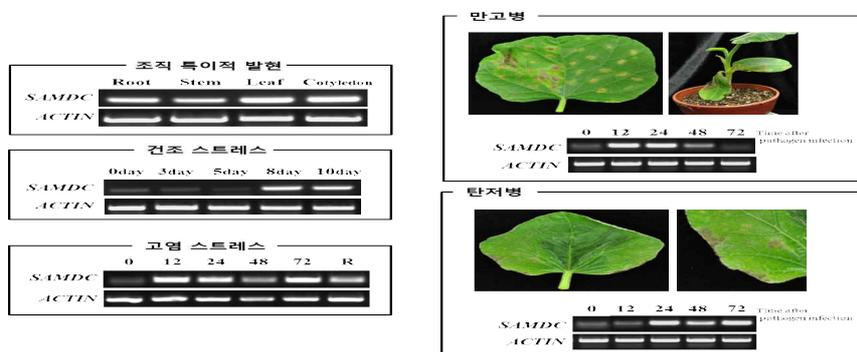
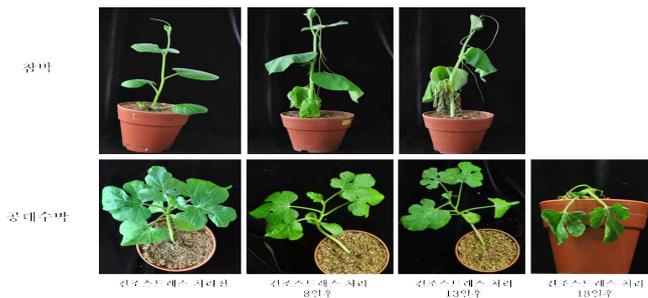


그림 2-17. *LsSAMDC* 유전자의 조직특이적 발현 양상 결과 및 건조, 고염 스트레스와 같은 비생물학적 스트레스 뿐만아니라 만고병 및 탄저병과 같은 생물학적 스트레스에도 반응하여 유도 발현되는 결과.

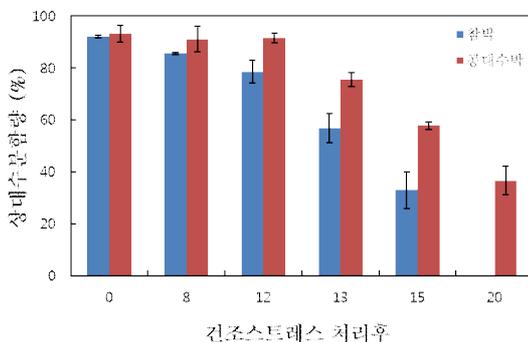
15. 대목용 참박과 공대수박으로부터 건조스트레스 내성 분석

현재 수박 대목으로 가장 많이 사용되고 있는 참박은 건조스트레스가 처리된 8일후부터 마르기 시작하여 15일후에 말라 죽는 반면, 공대수박은 건조스트레스가 처리된 20일후까지 생존하였다(그림 2-18A). 또한 건조스트레스 처리 기간동안 상대수분함량을 측정 한 결과, 참박은 건조스트레스 처리후 15일이 되자 잎의 상대수분함량이 32%로 낮은 수분함량을 보인 반면 공대수박은 건조스트레스가 처리된 15일 후에도 잎의 상대수분함량이 60%을 유지할 정도로 높게 나타났으며 20일이 지나야 수분함량이 30%로 낮아지는 것을 확인하였다(그림 2-18B). 또한 참박에 건조스트레스를 처리한 후 폴리아민을 추출한 결과 프트렛신의 함량이 스트레스 처리 후 증가하는 것으로 나타났으나 다른 식물체에 비해 현저하게 낮게 생성되는 것을 확인하였다(그림 2-18C). 이러한 결과는 참박이 대목으로써 수박과 친화성이 높고 덩굴쪄김병에 강하며 착과와 당도가 높은 장점이 있는 반면에 건조에 매우 취약함을 의미한다 하겠다. 따라서 건조스트레스에 강한 참박이 창출된다면 수박 대목으로 매우 유용하게 이용될 수 있으리라 생각이 되어 본 연구에서는 비생물학적 스트레스 내성과 밀접한 관련이 있는 폴리아민의 첫 번째 단계인 프트렛신 (putrescine)을 합성하는 효소인 Arginine decarboxylase(*ADC*)와 프트렛신과 스퍼미딘(spermidine)에 aminopropyl group를 제공해 줌으로써 각각 스퍼미딘과 스퍼민(spermine)이 생성되는데 중요한 역할을 하는 효소인 S-adenosylmethionine decarboxylase (*SAMDC*)를 이용하여 내재해성, 특히 건조 내성과 병저항성이 강화된 형질전환 수박 대목을 창출하고자 하였다.

A)



B)



C)

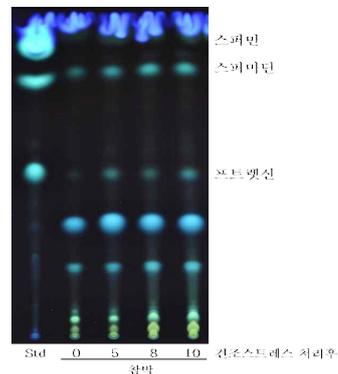
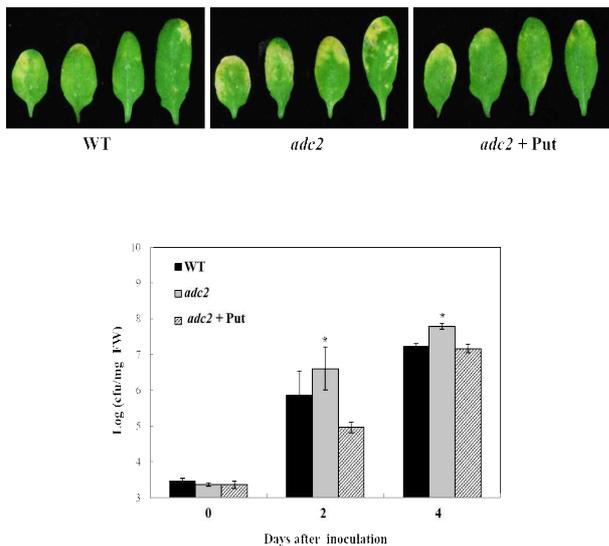


그림 2-18. 수박 대목으로 이용되고 있는 참박과 공대수박에 건조스트레스를 처리한 후 표현형을 확인 한 결과 (A)와 상대수분함량을 측정 한 결과 (B) 및 폴리아민을 TLC로 추출한 결과 (C)

16. 애기장대에서 폴리아민 생합성 관련 *ADC* 유전자의 내병성 및 내건성 기능 분석

비교적 과다발현체를 창출하기가 쉽고 knock-out 돌연변이체를 분양 받을 수 있는 모델 식물인 애기장대에서 *ADC* 유전자의 병저항성 및 건조 내성과 관련된 기능 연구를 수행하였다. 애기장대의 경우는 *ADC1*과 *ADC2* 유전자가 존재하는데 *ADC1*의 경우는 주로 저온에 의해 유도 되는 것으로 알려져 있으나 *ADC2*는 가뭄과 고염, 그리고 상처 등에 의해 유도되어 지는 것으로 알려져 있다. 그러나 아직까지 병원균에 반응하는 *ADC* 유전자의 기능에 대해서는 많은 연구가 진행되지 않은 상태이다. 따라서 본 연구과제에서 애기장대의 두 *ADC* 유전자들 중 세균 병원균인 *Pst* DC3000에 의해 강하게 유도 발현되는 것으로 확인된 *ADC2* 유전자가 knock-out된 *adc2* 돌연변이체를 확보하여 병저항성 여부를 검정하였다. 그 결과 wild-type 식물체에 비해 *adc2* 돌연변이체가 *Pst* DC3000에 대해 감수성을 보였으며 병원균의 생장율도 4 배 정도 높게 나타났다(그림 2-19A). 또한 *adc2* 돌연변이체에 프트렛신을 처리한 후 병원균을 접종한 chemical complementation 실험을 수행한 결과 감수성이었던 표현형이 wild-type과 같은 표현형으로 회복되는 것을 확인할 수 있었다(그림 2-19A). 또한 *ADC1*과 *ADC2* 유전자를 각각 CaMV 35S 프로모터와 결합시켜 *ADC*가 과다발현되는 형질전환체를 만든 후 건조 내성에 대한 검정을 실시한 결과 그림 2-19B에서 확인할 수 있듯이 35S::*ADC1*과 35S::*ADC2* 형질전환체가 wild-type과 *adc2* 돌연변이체에 비해 건조에 대한 강한 내성을 나타내었다. 이러한 결과들을 종합해 보면 애기장대의 *ADC* 유전자가 생성하는 프트렛신이 병저항성 및 건조 내성과 밀접한 관련이 있음을 의미한다 하겠다.

A)



B)

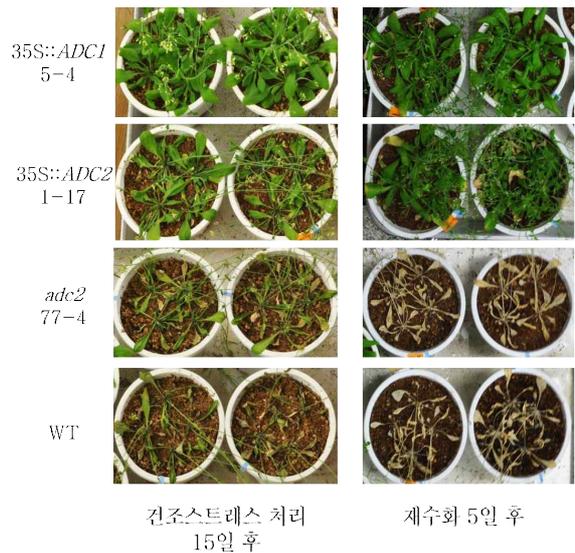


그림 2-19. 애기장대에서 *ADC*의 knock-out 돌연변이체와 *ADC* 과다발현체를 이용해 병원균에 대한 저항성 (A) 및 건조 내성 (B)에 대한 기능 분석을 수행한 결과

17. *LsADC* 와 *LsSAMDC* 과다발현 형질전환 참박 및 공대수박 형질전환체 제작 및 확보

1차년도에 클로닝하여 스트레스 및 조직특이성에 반응하는 발현 양상을 확인한 *LsADC*와 *LsSAMDC* 유전자를 식물형질전환 벡터인 pCAMBIA3301에 클로닝한 다음 1세부과제와 공동으로 참박과 공대수박에 형질전환 하였다. 참박 및 공대수박을 이용해 효율적인 형질전환 조건을 찾기 위해 일주일 간격으로 *Agrobacterium*과 co-culture 조건 및 호르몬의 농도를 바꾸면서 총 3,000개 이상의 참박 자엽과 2,500개 이상의 공대수박 자엽을 이용하여 형질전환을 수행하였다(그림 2-20A). 현재 형질전환 벡터의 특이적인 forward primer(5'-GAC CTA ACA GAA CTC GCC G-3')와 *LsADC* 유전자 특이적인 reverse primer(5'-CAA ATG CCG ACT GGA GAG AT-3')를 이용하여 genomic DNA PCR를 수행한 결과 *LsADC* 과다발현 참박 형질전환체로 생각되는 3개 라인을 선발하여 배양실에서 배양중에 있다 (그림 2-20A 와 2-20B 아랫그림). 그러나 공대수박의 경우는 참박에 비해 형질전환 효율이 높아 당해연도 초기에 genomic DNA PCR를 수행하여 2개의 *LsADC* 과다발현 공대수박 형질전환체를 선발하여 배양실에서 키우다가 현재는 1협동과제가 관리하고 있는 고창 수박시험장의 형질전환 전용 하우스에서 키우고 있는 중이다(그림 2-20A). 특히 이 2개 라인으로부터 잎을 샘플링하여 *LsADC* 유전자 특이적인 forward primer(5'-CTG GGA ATA TGG CTG TTG GT-3')와 reverse primer(5'-CAA ATG CCG ACT GGA GAG AT-3')를 이용하여 RT-PCR를 수행한 결과 wild-type에 비해 전사체가 많이 발현되는 것으로 확인되었다(그림 2-20A와 2-20B 윗그림). 특히 *LsADC2* 잠재적인 형질전환체가 *LsADC1*에 비해 강하게 발현되는 것으로 확인되었다. 이 2개의 라인은 그림 2-20A(화살표)에서 확인 할 수 있듯이 이미 수박이 열린 상태이므로 차년도에는 T1 종자를 확보하여 형질전환체임을 재차 확인 한 다음 내건성 및 내병성 검정을 실시할 수 있으리라 생각한다. 또한 최근에 잠재적인 형질전환체로 생각되는 *LsADC4*, *LsADC6*, *LsADC7*, 그리고 *LsADC11* 라인들도 배양실에서 좀더 키운 후 고창 수박시험장 하우스로 옮긴 후 RT-PCR를 수행하여 *LsADC* 유전자의 발현을 확인할 생각이다. 그리고 현재 *LsSAMDC* 유전자를 이용한 형질전환이 계속적으로 진행중에 있으므로 차년도에는 *LsSAMDC* 형질전환체가 확보되어 내건성을 비롯한 내재해성 관련 연구가 수행될 수 있으리라 생각되었다.

(A)



(B)

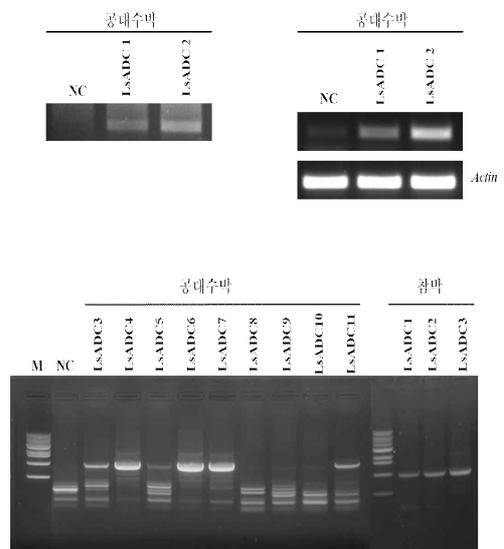


그림 2-20. 참박 및 공대수박에 형질전환하여 기내에서 배양하는 모습 및 고창 수박시험장 형질전환 전용 하우스에서 형질전환체를 재배하고 있는 모습 (A). *LsADC* 유전자의 형질전환 여부를 genomic DNA PCR 또는 RT-PCR를 이용해 확인한 결과 (B)

그러나 공대수박 형질전환의 효율이 매우 낮은 관계로 제1세부과제와 함께 많은 형질전환체 확보를 위해 지속적으로 형질전환에 많은 시간과 노력을 투자하였다. 그림 2-20에서 확인할 수 있듯이 고창 수박시험장에서 재배하던 T1 형질전환체도 확인 과정에서 형질전환체가 아닌 것으로 확인되었으며 형질전환체를 제작하는 과정에서 몇 가지 문제점을 확인 할 수 있었다. 형질전환을 시도한 식물체의 신초 형성이 control에 비해 늦게 형성되며, 신초 성장속도 역시 control과 비교하였을 때 느린 것을 확인 할 수 있었다(그림 2-21). 또 다른 문제점은 1세부과제에서도 서술하였듯이 느린 성장 후에 나타나는 뿌리 유도 혹은 토양 순화에서 대부분의 신초가 갈변되면서 고사해 버린다는 것이다(그림 2-22). 이 같은 현상은 참박 뿐만 아니라 공대수박에서도 나타났다. 애기장대의 경우는 *ADC2* 유전자 과발현 애기장대 형질전환체가 호르몬 생성에 관여하여 낮은 지베렐린 함량으로 dwarf 표현형을 보인다고 보고하였다. 따라서 정확한 원인은 알 수 없지만 참박 및 공대수박의 폴리아민 과다발현 형질전환체 역시 형질전환이 되는 과정에서 내부적으로 호르몬 불균형의 변화가 심해져 형질전환체를 제작하지 못하는 것으로 생각되어졌다.

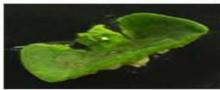
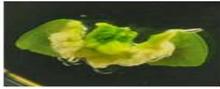
	Control	Transformation
Shoots formation time/day	7-8	11-13
		
		
Shoots growth time/day	13-14	21-23

그림 2-21. *Agrobacterium*을 이용한 참박 형질전환체와 대조구와의 생육 비교.

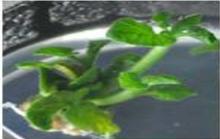
Stage	Control	Transformation
Root induction		  
Soil acclimation		 

그림 2-22. 잠재적인 *LsADC* 형질전환체가 뿌리유도와 토양 순화하는 과정에서 고사되는 현상

이러한 결과는 참박의 *LsADC* 유전자가 과다발현되는 애기장대에서도 나타났다. 참박 및 공대수박에 비해 비교적 과다발현체를 개발하기 쉬운 애기장대에서 형질전환을 수행한 다음 형질전환 효율을 비교해 본 결과, 애기장대 *AtADC* 유전자가 형질전환된 애기장대 형질전환체보다 참박 *LsADC* 유전자가 형질전환된 애기장대 형질전환체가 형질전환 비율이 4.6배정도 감소하였다. 또한 *adc2* knock-out 돌연변이체의 형질전환효율은 상대적으로 폴리아민의 함량이 높게 유지되고 있는 *col-0*에 비해 각각의 유전자 모두 약 2배 높은 형질전환효율을 보였다 (표 2-1). 이는 폴리아민의 농도에 따라 형질전환 비율이 조절되고 있음을 의미하는 결과라고 할 수 있겠다.

표 2-1. 참박 *ADC* 유전자와 애기장대 *ADC2* 유전자의 애기장대로의 형질전환효율 비교.

Plants	Construct	No. of scored seedlings <sup>1</sup>	No. of transformed seedlings	Transformation efficiency (%)
Col-0	35S: <i>LsADC</i>	1000	10	1
<i>adc2</i>	35S: <i>LsADC</i>	1000	21	2.1
Col-0	35S: <i>AtADC2</i>	1000	46	4.6
<i>adc2</i>	35S: <i>AtADC2</i>	1000	55	5.5

<sup>1</sup> T1 seeds of transgenic *Arabidopsis* were selected on MS medium with hygromycin(15mg/ml).

#### 18. *LsADC* 유전자가 과다발현된 형질전환 애기장대를 이용한 내건성 검증

참박과 공대수박으로의 형질전환을 끊임없이 시도하였음에도 불구하고 형질전환체를 확보할 수 없어서 참박으로부터 클로닝한 *LsADC* 유전자를 애기장대에 형질전환하여 그 기능을 확인하고자 하였다. 현재까지 총 *OXLsADC-1*, *OXLsADC-3*, *OXLsADC-5*, *OXLsADC-6* 등 총 4개 라인을 확보하여 T2세대에서 genomic PCR과 RT-PCR를 통해 형질전환체를 확인하였으며 이들 형질전환체로부터 폴리아민을 추출하여 푸트렛신의 증가를 우선 TLC로 확인한 결과 그림 2-23에서 확인할 수 있는 것처럼 WT인 *Col-0*에 비해 푸트렛신의 함량이 많이 생합성되는 *OXLsADC-1*과 *OXLsADC-5* 라인을 확보할 수 있었다. 따라서 추후에 이들 형질전환체의 T3세대에서 homozygous한 종자를 대량으로 확보한 후 내건성을 비롯한 여러 환경 스트레스 내성 여부를 지속적으로 검증하였다. 또한 애기장대의 *AtADC* 유전자와 *LsADC* 유전자의 기능을 각각의 형질전환체를 이용해 비교해 봄으로써 환경 스트레스에 연관된 *ADC* 유전자 또는 푸트렛신의 기능에 대한 폭넓은 이해가 이루어질 수 있으리라 생각한다.

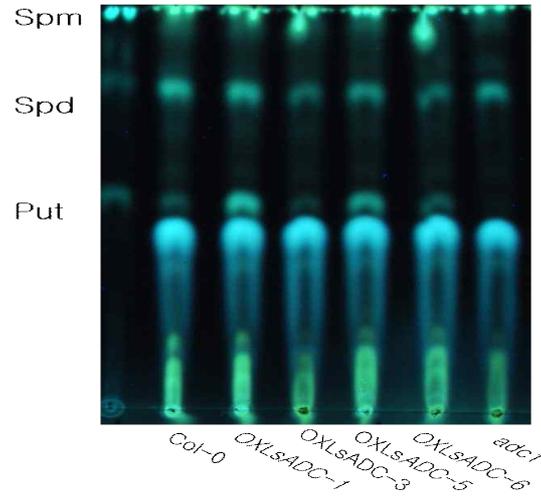
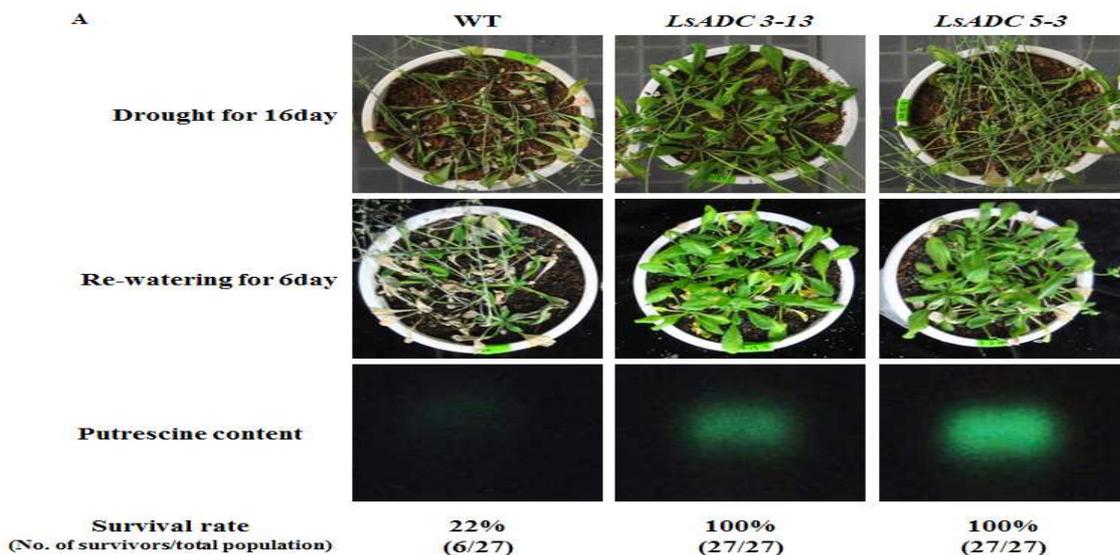


그림 2-23. WT인 Col-0에 비해 푸트렛신의 함량이 많이 생합성되는 *OXLSADC-1*과 *OXLSADC-5* 애기장대 형질전환체를 TLC로 확인한 결과.

푸트렛신 함량이 높은 *LsADC* 과발현 형질전환 여러 라인들 중 두 개 라인을 선발하여 건조 내성에 대한 검정을 실시하였다. 형질전환 애기장대의 내건성을 분석한 결과 col-0에 비해 내건성에 대한 저항성이 높게 관찰되었다(그림 2-24A). 또한 상대수분함량(RWC)을 측정한 결과, 건조 11일 후 *ADC2* 과발현 형질전환체의 상대수분 함량이 60%로 col-0에 비해 더 높게 나타났으며 *adc2* knock-out mutant 경우에는 col-0보다 낮은 수준의 상대수분함량을 확인하였다(그림 2-24). 또한 *LsADC* 과발현 형질전환체인 *LsADC 5-3* 라인과 *AtADC2* 과발현 형질전환체 *AtADC2 15-8* 라인을 각각 선발하여 건조 내성에 대한 검정을 실시하였다(그림 2-25). 그 결과 *AtADC2* 과발현 애기장대 형질전환체보다 *LsADC* 과발현 애기장대 형질전환체가 우수한 내건성을 보였다. 이러한 결과는 *LsADC*에 의해 형성된 푸트렛신의 증가가 건조 내성을 증가시키는데 중요한 역할을 했음을 의미한다 하겠다.



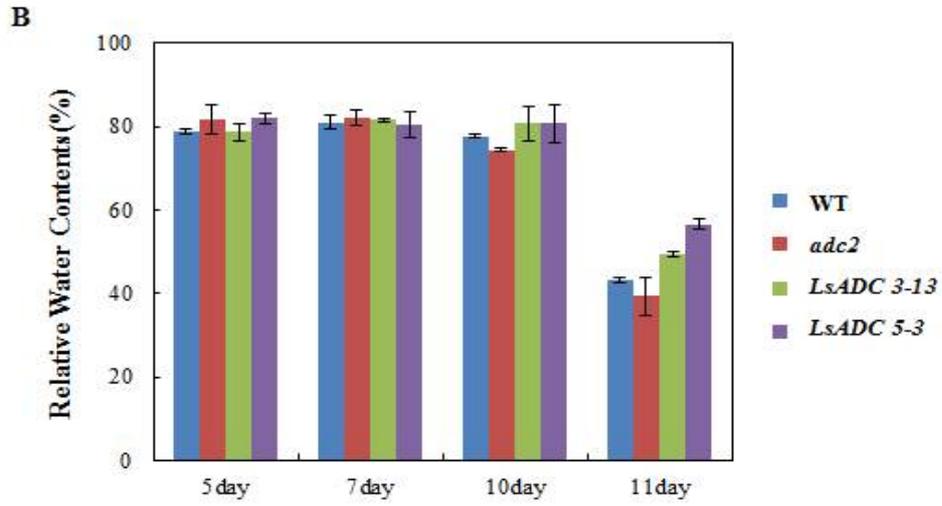


그림 2-24. 건조 스트레스 조건에서 *col-0*와 *LsADC* 형질전환체의 반응과 푸트렛신 함량 비교.

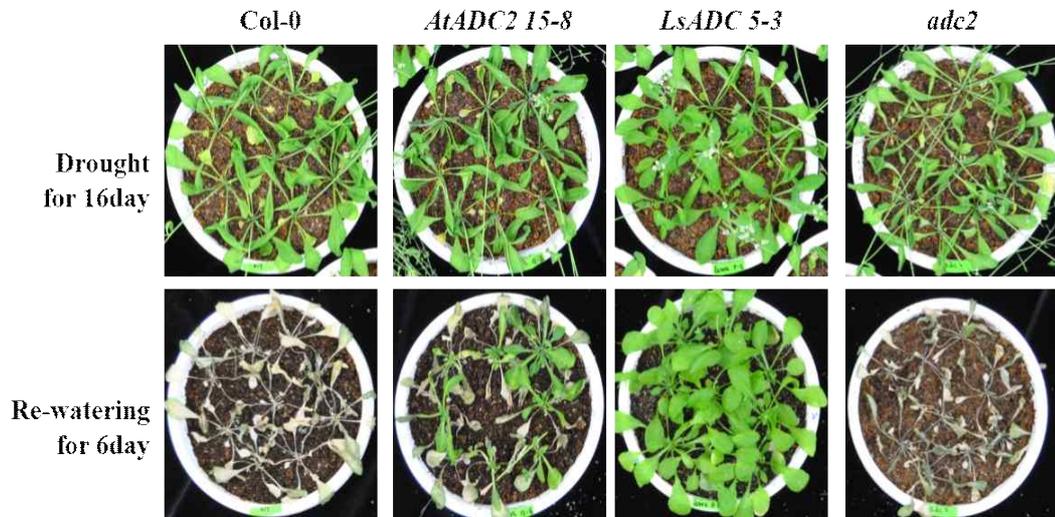


그림 2-25. *LsADC* 과발현 형질전환체인 *LsADC 5-3* 라인과 *AtADC2* 과발현 형질전환체 *AtADC2 15-8* 라인을 각각 선발하여 내건성 비교

### 3절. 내재해성 수박 대목 품종 육성 및 실용화 연구

#### 1. CsGolS1 유전자가 도입된 GolS10 계통 세대진전 및 종자 확보

GolS10 15계통에 대하여 유전자 도입 여부를 확인(그림 3-1)한 후 세대진전을 시켰으며 과실의 특성을 조사하였던 결과, 유전자 삽입된 11계통 중 10계통이 선발되었으며 과육색이나 과형등 형태적 특성은 모든 계통이 유사하였으나 검정줄무늬 형태가 분리되었다(그림 3-2).

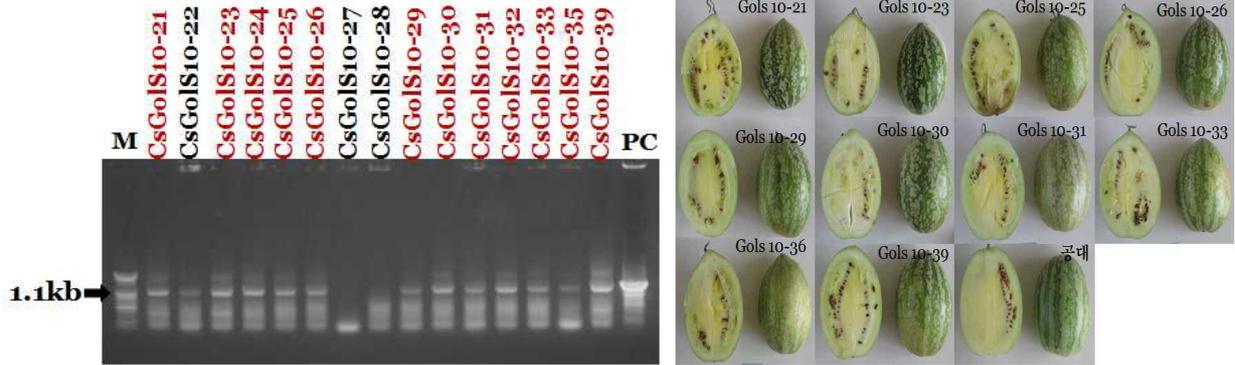


그림 3-1. GolS10 계통의 유전자 삽입 확인

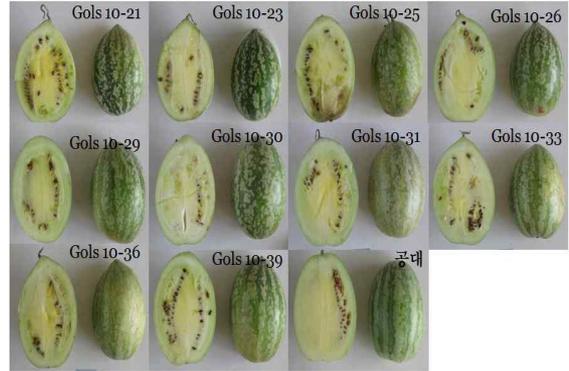


그림 3-2. GolS10 계통의 과일 형태적 특성

#### 2. CsGolS1 유전자가 도입된 GolS10 계통에 대한 발아율 및 접목 후 생존율

유전자 삽입된 10계통의 발아율은 일반 시판 대목품종인 불로장생 대목에 비하여 고르지 않았지만 과종 후 8일째는 거의 비슷한 수준에 이르렀으며(그림 3-3), 접목 후 15일째의 생존율을 역시 일반 시판 대목품종과 거의 유사한 수준을 보였다(그림 3-4).

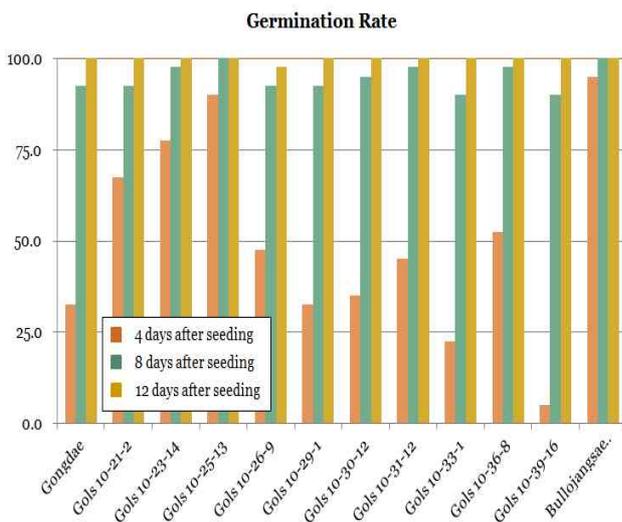


그림 3-3. GolS10 계통의 발아율

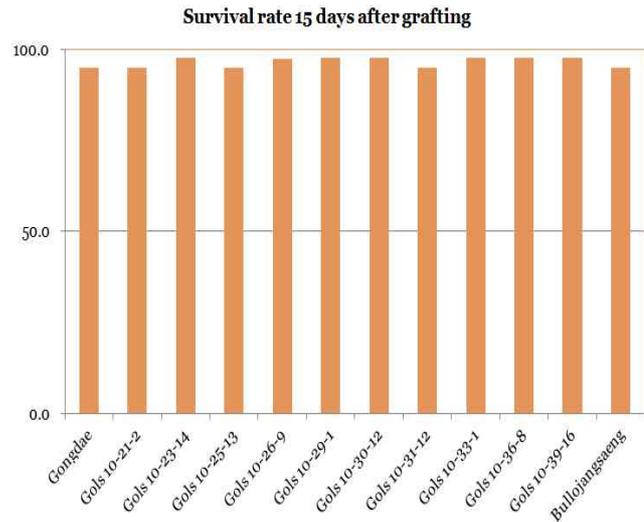


그림 3-4. GolS10 계통의 접목 후 생존율

### 3. F<sub>1</sub> 계통 교배조합 작성 및 종자 확보

Pep J1-1 유전자로 형질전환된 5계통을 모계로 하고 야생근연종 수박 3 계통을 부계로 하여 15개 교배조합을 작성하여 교배한 결과 5개 교배조합에서 F<sub>1</sub> 종자를 280립에서 최고 824립까지 생산하였으며, 종피색이 갈색, 적갈색, 흑적색으로 다양하였다(표 3-1).

표 3-1. F<sub>1</sub> 계통 교배조합 작성 및 종자 확보

모계친(♀)	부계친(♂)	종자 립수	종자 이미지	모계친(♀)	부계친(♂)	종자 립수	종자 이미지
WJ121-34-14	× K044733-1-3-1	824		WJ121-34-31	× K019018-25-8(YF)-A-4-1	366	
WJ121-34-15	× K019018-25-8(YF)-A-4-1	533					
WJ121-34-31	× K909350	529		WJ121-34-33	× K019018-25-8(YF)-A-4-1	280	

### 4. Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 계통 접목 후 과일품질 특성

Pep J1-1 유전자로 형질전환된 계통을 대목으로 이용하고 일반 수박을 접수로 이용하여 수박을 재배한 결과 참박대목인 불로장생에 비하여 3개 계통에서 과중이 무거웠으나 형질전환 재료로 사용한 공대수박이 오히려 과중이 더 무거웠다(그림 3-5).

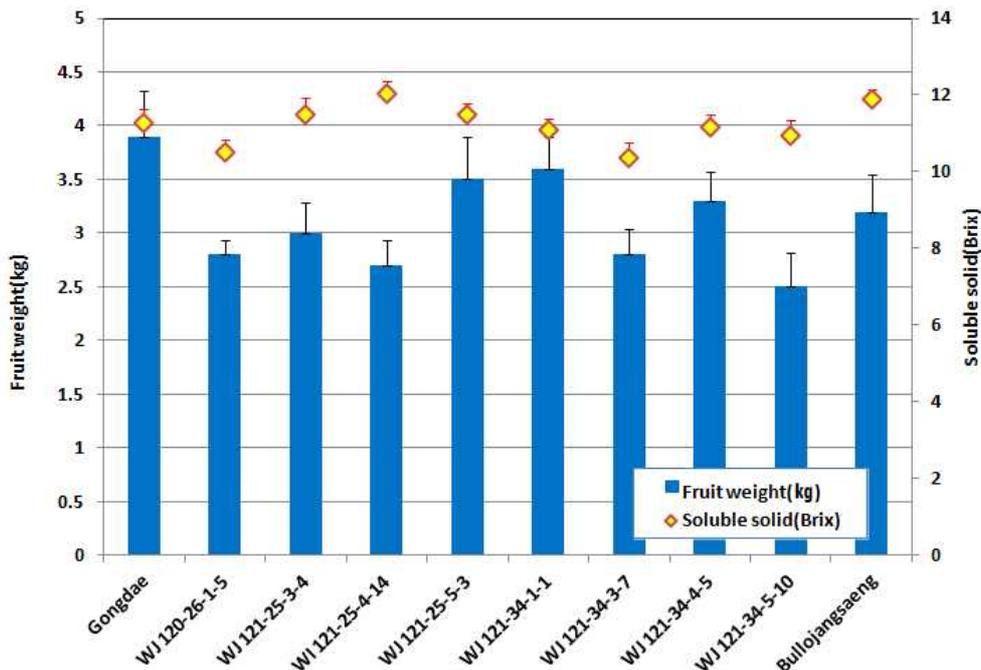


그림 3-5. Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 계통 대목 이용 접목 후 과일품질 특성

5. CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환 계통 접목 후 과일품질 특성

CsGolS1 형질전환 계통과 접목한 일반수박의 과일품질 특성은 Gols10-21-2와 Gols10-25-4, Gols10-25-13에서 참박대목인 불로장생과 wild type인 공대에 비하여 과중이 무겁고 당도도 높게 나타나 대목으로의 이용 가능성을 보였다(그림 3-6).

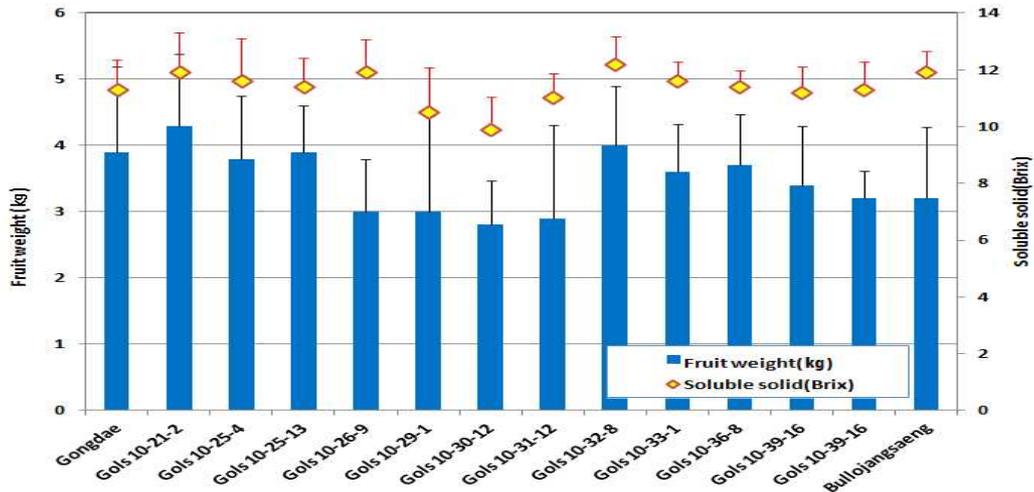


그림 3-6. 갈락티놀 형질전환 계통의 접목후 과일 품질 특성

6. Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 F<sub>1</sub> 계통 접목 후 생존율

F<sub>1</sub> 5계통에 대하여 맞접을 실시한 결과 접목 후 8일째의 생존율은 97.5%로 wild type인 공대와 참박대목인 불로장생과 거의 유사한 수준을 보였다(그림 3-7). 공대수박과 공대수박을 재료로 하여 형질전환한 계통들은 일반 참박대목에 비하여 배축의 두께가 절반정도로 얇기 때문에 접목하는데 불편하며, 공정육묘장에서 사용하는 편엽합접의 경우에도 배축이 가늘어 다소 불편함이 있으나 전년도 수행하였을 때 생존율에는 커다란 차이가 없어 대목으로 사용하기에는 별 문제가 없을 것으로 판단된다.

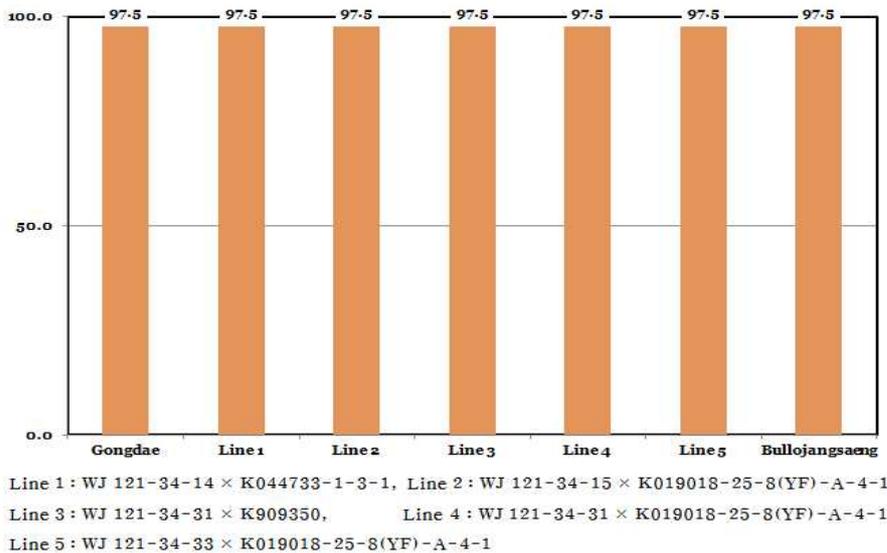


그림 3-7. Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 F<sub>1</sub> 계통의 접목 후 생존율(2013. 2.26 파종, 3.13 접목, 3.21 조사)

7. Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 F<sub>1</sub> 계통 대목 이용 일반수박 접목 후 중간생육조사 결

과(2013. 5.30 조사)

접목 후 격리포장에 정식하여 중간생육을 조사한 결과 일반 참박대목에 비하여 배축의 두께가 얇았으며 생육은 계통에 따라 오히려 참박대목 보다 왕성하기도 하였으며 5절에서의 절간장이나 엽 길이, 엽 폭, 엽병 길이도 다양하게 조사되었다. 이 조사 결과가 대목의 영향 때문 인지는 추후 검토가 필요한 것으로 생각된다.

표 3-2. F<sub>1</sub> 계통 대목이용 접목후 중간생육

Line	Hyphcotyl diameter of rootstock (mm)	Plant height (cm)	Internode length of 5 <sup>th</sup> node (cm)	No. of node	Leaf Length (cm)	Leaf Width (cm)	Petiole Length (cm)
Gongdae	4.7	97.3±4.0	5.5±0.2	13.5±0.5	14.9±0.2	15.2±0.3	8.2±0.2
WJ121-34-14 × K044733-1-3-1	4.5	81.7±4.2	4.8±0.3	13.7±0.9	11.4±0.3	11.5±0.3	8.5±0.2
WJ121-34-15 × K019018-25-8(YF)-A-4-1	4.4	71.7±6.8	7.1±0.6	10.1±0.5	13.6±0.6	14.5±0.6	7.4±0.4
WJ121-34-31 × K909350	4.6	63.6±4.9	5.1±0.4	10.7±0.8	12.5±0.4	12.80.4	6.8±0.3
WJ121-34-31 × K019018-25-8(YF)-A-4-1	5.0	83.1±5.1	4.3±0.3	12.7±0.6	13.0±0.3	13.0±0.3	8.0±0.3
WJ121-34-33 × K019018-25-8(YF)-A-4-1	5.3	111.7±3.0	6.0±0.2	14.8±0.3	15.3±0.3	15.7±0.3	9.1±0.2
Bullojangsaeng	6.4	74.5±4.0	4.1±0.2	14.5±0.6	12.6±0.4	12.3±0.4	7.6±0.4

Values are mean±S.E.

8. Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 F<sub>1</sub> 계통 대목 이용 일반수박 접목 후 과품질 특성

과특성 조사 결과 공대대목에 접목한 수박의 과중이 가장 무거웠으며, 형질전환 계통을 모본으로 하고 일반 고정계통을 부분으로 하여 교배한 F<sub>1</sub> 계통을 대목으로 하였을 때 전반적으로 일반 참박 대목인 불로장생보다 과중이 무거웠고 당도는 불로장생을 대목으로 사용하였을 때 가장 높았다.

표 3-3. F<sub>1</sub> 계통 대목이용 접목후 과품질 특성

Line	Fruit length (cm)	Fruit width (cm)	Fruit weight (kg)	Soluble solid (°Brix)
Gongdae	26.2±0.4	22.2±0.6	9.2±0.5	11.3±0.2
WJ 121-34-14 × K044733-1-3-1	28.0±0.3	21.5±0.5	6.9±0.3	11.1±0.3
WJ 121-34-15 × K019018-25-8(YF)-A-4-1	28.6±0.6	23.1±0.8	8.7±0.5	11.0±0.3
WJ 121-34-31 × K909350	27.1±0.4	22.7±0.6	7.7±0.4	11.2±0.2
WJ 121-34-31 × K019018-25-8(YF)-A-4-1	28.3±0.3	23.0±0.5	7.9±0.4	11.3±0.2
WJ 121-34-33 × K019018-25-8(YF)-A-4-1	26.7±0.4	22.4±0.6	7.1±0.3	11.5±0.3
Bullojangsaeng	29.1±0.4	24.5±0.5	6.9±0.3	11.6±0.3

Values are mean±S.E.

9. CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환 계통 접목 후 생존율

CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환 9계통에 대하여 맞접을 실시한 결과 접목 후 8일째 생존율은 95% 이상으로 wild type인 공대와 일반 시판 참박대목품종인 불로장생과 거의 유사한 수준을 보였다(그림 3-8).

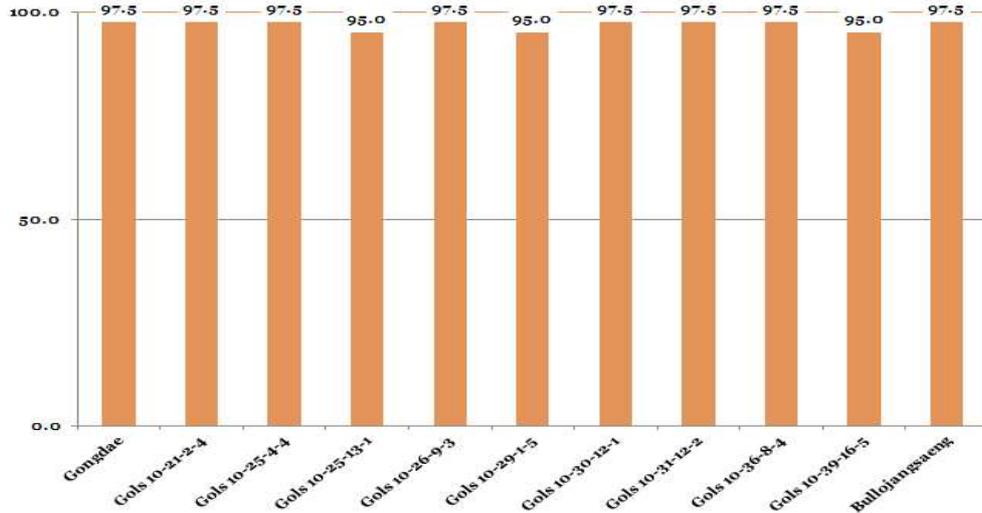


그림 3-8. CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환 계통의 접목 후 생존율과 생육모습(2013. 2.26 파종, 3.13 접목, 3.21 조사)

10. CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환 계통 대목 이용 일반수박 접목 후 중간생육조사 결과

접목 후 격리포장에 정식하여 중간생육을 조사한 결과 일반 참박대목에 비하여 줄기의 두께가 얇았으며 생육은 계통에 따라 오히려 참박대목 보다 왕성하기도 하였으며 5절에서의 절간장이나 엽 길이, 엽 폭, 엽병 길이도 대체로 양호하게 조사되었다. 이 조사 결과가 대목의 영향 때문인지는 추후 검토가 필요한 것으로 생각된다.

표 4. CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환 대목이용 접목 후 중간생육

Line	Stem diameter of rootstock (mm)	Plant height (cm)	Internode length of 5th node(cm)	No. of node	Leaf Length (cm)	Leaf Width (cm)	Petiole Length (cm)
Gongdae	4.7	97.3±4.0	5.5±0.2	13.5±0.5	14.9±0.2	15.2±0.3	8.2±0.2
Gols 10-21-2-4	4.1	57.0±7.3	6.2±0.4	10.5±0.4	13.3±0.5	14.6±0.5	7.2±0.5
Gols 10-25-4-4	3.5	76.6±6.3	5.2±0.3	12.5±1.1	13.2±0.3	13.1±0.4	8.8±0.4
Gols 10-25-13-1	3.8	88.2±8.7	6.5±0.3	13.2±0.6	15.6±0.5	16.4±0.4	9.5±0.3
Gols 10-26-9-3	3.8	94.1±5.4	6.6±0.7	13.1±0.8	15.0±0.4	15.5±0.5	8.9±0.5
Gols 10-26-1-5	4.1	101.2±4.8	5.2±0.4	14.0±0.5	14.6±0.3	14.8±0.3	9.8±1.5
Gols 10-30-12-1	4.1	88.3±6.3	6.5±0.2	11.8±0.6	14.8±0.6	15.4±0.6	8.3±0.3
Gols 10-31-12-2	4.3	98.5±6.7	5.5±0.4	13.5±0.7	14.3±0.5	14.9±0.4	8.0±0.3
Gols 10-36-8-4	4.0	85.3±5.1	7.5±0.5	11.1±0.6	13.7±0.5	14.4±0.6	8.1±0.3
Gols 10-39-16-5	3.7	89.9±10.6	5.9±0.5	14.3±0.7	13.4±0.7	13.5±0.7	8.0±0.5
Bullojangsaeng	6.4	74.5±4.0	4.1±0.2	14.5±0.6	12.6±0.4	12.3±0.4	7.6±0.4

Values are mean±S.E.

11. CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환 계통 대목 이용 일반수박 접목후 과품질 특성조사

과특성 조사 결과 공대 대목에 접목한 수박의 과중이 가장 무거웠으며, 형질전환 계통을 대목으로 하였을 때 전반적으로 일반 참박 대목인 불로장생보다 과중이 무거웠다. 당도는 Gols 10-21-2-5을 대목으로 사용하였을 때 가장 높았는데 갈락티놀 형질전환 대목은 포트실험에서 일반 참박대목에 비하여 건조에 강한 특성을 보였으며 수박이 수확 전 단수 기간을 더 길게 하였을 때 당도를 높일 수 있는 것을 감안한다면 실용화 되었을 때 고당도 수박을 생산 할 수 있을 것으로 생각된다.

표 5. CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환 대목이용 접목 후 과품질 특성

Line	Fruit length (cm)	Fruit width (cm)	Fruit weight (kg)	Soluble solid (°Brix)
Gongdae	26.2±0.4	22.2±0.6	9.2±0.5	11.3±0.2
Gols 10-21-2-5	27.9±0.4	23.4±0.7	8.3±0.4	11.9±0.2
Gols 10-25-4-4	28.5±0.3	23.1±0.6	8.1±0.3	11.1±0.2
Gols 10-25-13-1	45.6±0.3	22.6±0.4	7.1±0.2	11.1±0.2
Gols 10-26-9-3	27.1±0.3	23.5±0.4	7.5±0.5	10.9±0.2
Gols 10-26-1-5	26.3±0.4	22.2±0.6	6.9±0.3	11.2±0.2
Gols 10-30-12-1	26.1±0.6	21.8±1.0	6.8±0.7	10.5±0.2
Gols 10-31-12-2	28.1±0.7	23.9±0.9	8.6±0.9	11.0±0.3
Gols 10-36-8-4	27.3±0.3	22.2±0.7	7.1±0.3	11.0±0.3
Gols 10-39-16-5	28.2±0.6	22.3±0.9	7.6±0.7	10.2±0.2
Bullojangsaeng	29.1±0.4	24.5±0.5	6.9±0.3	11.6±0.3

Values are mean±S.E.

12. Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 교배친 및 F<sub>1</sub> 계통 Chlorophyll content

Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환체와 교배한 F<sub>1</sub> 계통이 건조 및 고염에 대해서도 내성을 나타내는지의 여부를 확인하기 위해, NaCl 250mM 용액에 일정한 무게의 잎을 담근 후 5일이 경과한 다음 동일 잎의 총 클로로필 함량을 측정하였다. 그 결과 대조구인 wild type 공대 수박에 비해 Defensin 형질전환체인 WJ121-34-14와 WJ121-34-33, 교배친인 K044733-1-3-1-2, F<sub>1</sub> 계통인 WJ121-34-31 × K909350 조합에서 총 클로로필 함량이 더 높게 나타남이 확인되었다(그림 3-9). 모계친으로 사용하였던 WJ121-34-15는 발아가 늦어 클로로필 함량을 측정하지 못하였으며, 일반 수박품종의 클로로필 함량이 높게 나타나 반복실험이 필요한 것으로 판단된다.

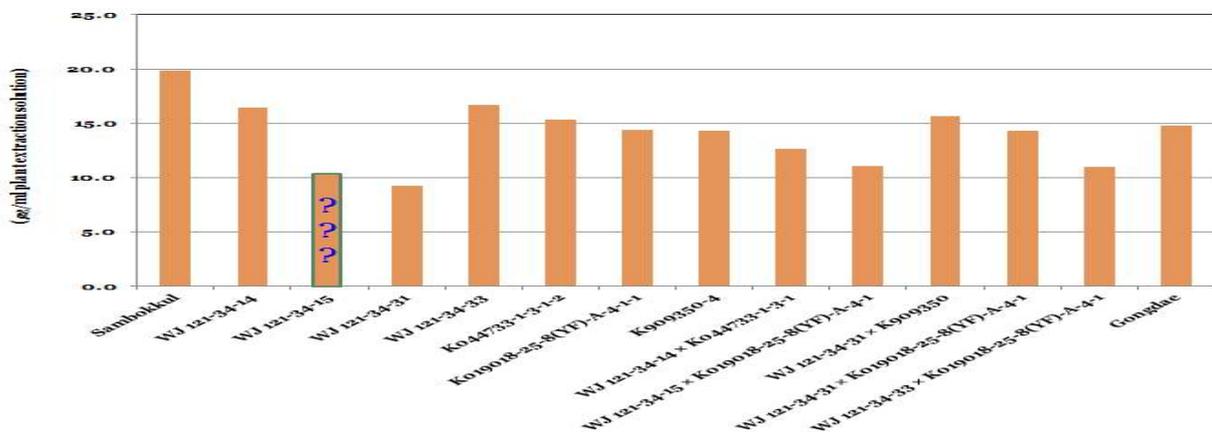


그림 3-9. Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환체와 F<sub>1</sub> 계통의 클로로필 함량

13. Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 교배친 및 F<sub>1</sub> 내병성 검정(Antifungal activity)

항균활성 검정을 위해 각 교배친 3계통과 형질전환 식물체와 교배한 F<sub>1</sub> 계통의 종자를 파종한 후 2주일 뒤 전개된 본엽을 채취하여 total protein을 추출하였다. 병원균은 *F. oxysporium* (KACC 40905, KACC 40901 R1, KACC 40901 R2)으로 균사의 생육정도를 조사하였다. 교배친으로 사용한 3계통 중 K044733-1-2-1은 사용된 3개의 덩굴쪄김병균에 대하여 모두 균사생육 억제효과가 있었지만 교배 후 F<sub>1</sub> 계통들은 wild type에 비하여 전혀 억제효과를 보이지 않았다.(그림 3-10).

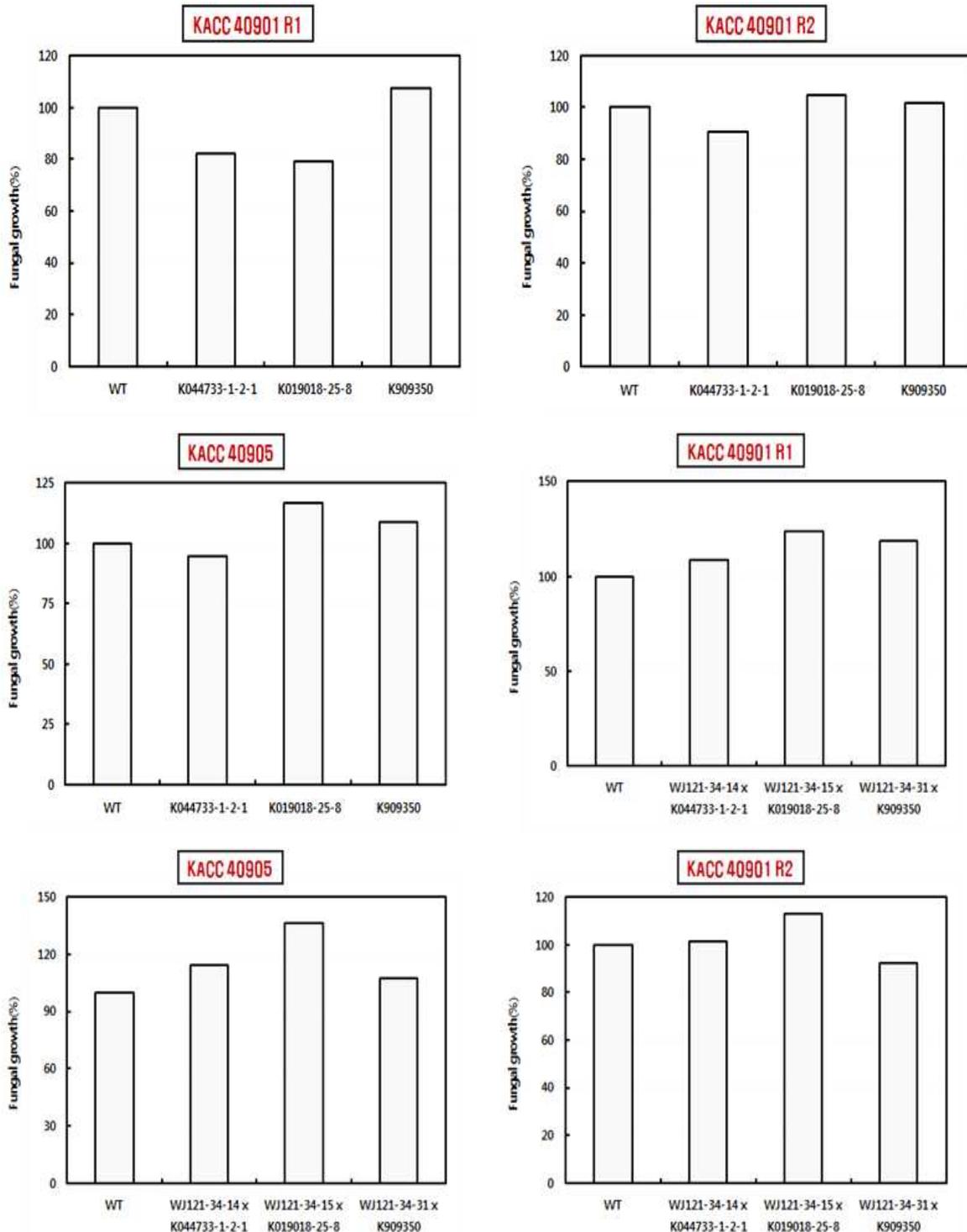


그림 3-10. 교배친 및 Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환체와 교배한 F<sub>1</sub>계통 추출물의  
균사생육 억제효과

14. CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환 계통 세대진전 계통 Chlorophyll content

CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환체 계통이 건조 및 고염에 대해서도 내성을 나타내는지의 여부를 확인하기 위해, NaCl 250mM 용액에 일정한 무게의 잎을 담근 후 5일이 경과한 다음 동일 잎의 총 클로로필 함량을 측정하였다. 그 결과 대조구인 wild type 공대수박에 비해 갈락티놀 형질전환체인 Gols10-21-2-4와 Gols10-25-4-4에서 총 클로로필 함량이 더 높게 나타남이 확인되었다(그림 3-11). 그러나 실험재료로 사용하였던 CsGolS1 형질전환 9계통 중 3계통이 발아가 늦어 클로로필 함량을 측정하지 못하였으며, 일반 수박품종의 클로로필 함량이 높게 나타나 반복실험이 필요한 것으로 판단된다.

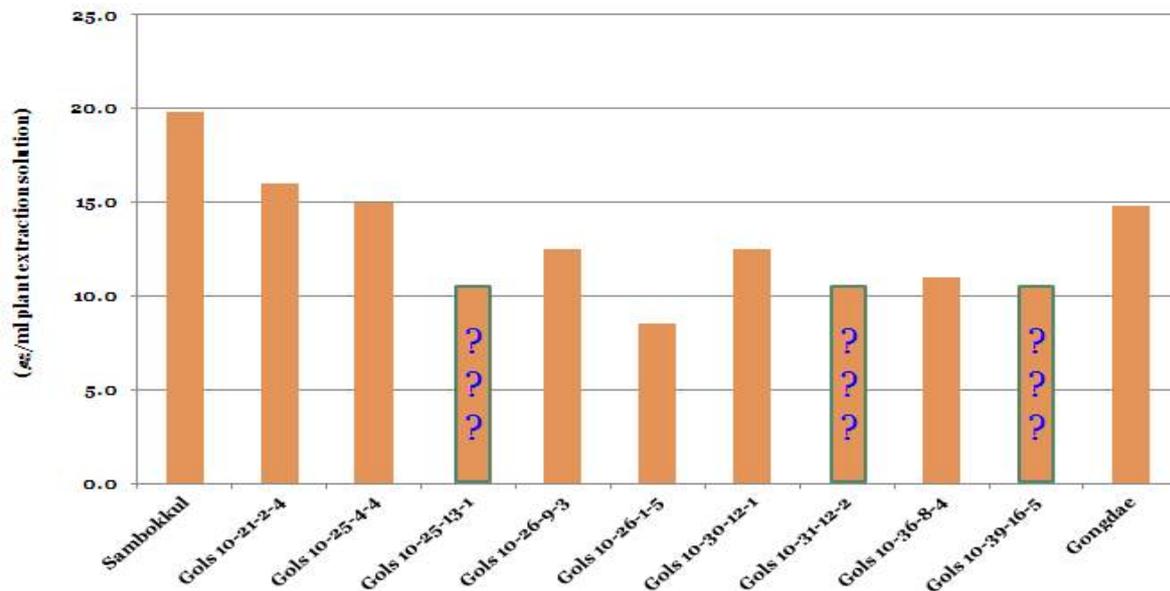


그림 3-11. CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환체 계통의 클로로필 함량

15. 토양수분 함량에 따른 수박 과일 특성(2013년 가을재배)

공대수박은 일반적으로 건조에 강하지만 다습환경에는 약한 것으로 알려져 있다. 따라서 여러 유전자를 형질전환한 공대수박 역시 이와 유사한 특성을 보일 것이며 특히 건조 저항성 유전자인 CsGolS1 유전자를 형질전환 하였을 경우 건조에 더 강한 특성을 보일 수 있을 것이다. 따라서 본 실험은 형질전환된 공대수박을 대목으로 이용하였을 때 토양수분조건을 구명하기 위하여 실시하였으며, 토양 수분 조건을 조성하기 위하여 수분 센서를 지중 10cm와 20cm에 설치한 후 20cm의 수분조건을 ① 건조 16±2%, ② 약간 건조 20±2%, ③ 적습 24±2%, ④다습 28±2%으로 하였다. 수분공급은 3분 유지(관수), 15분 휴지(무관수)의 term으로 오전 8시~10시 사이에 관수할 수 있도록 조건을 설정하였다. 건조조건(16±2%) 처리구에서 WJ121-34-31×K909350(V5)는 wild type인 공대수박(V6)과 시판품종인 오작교(V7)에 비하여 무거웠으며 당도도 높았지만 참박대목인 불로장생에 비하여 과중이 낮았다. 24±2% 처리구에서도 역시 공대수박과 오작교에 비하여 과중이 무거웠으며 당도 역시 높았지만 가을재배의 경우 생육초기 많은 수분이 필요하지만 기온이 낮아지면서 많은 수분을 필요로 하지 않기 때문에 오히려 관수량을 줄여야 하며 이로 인하여 낮은 수분조건에서 수박의 생육이 좋은 것으로 생각된다.

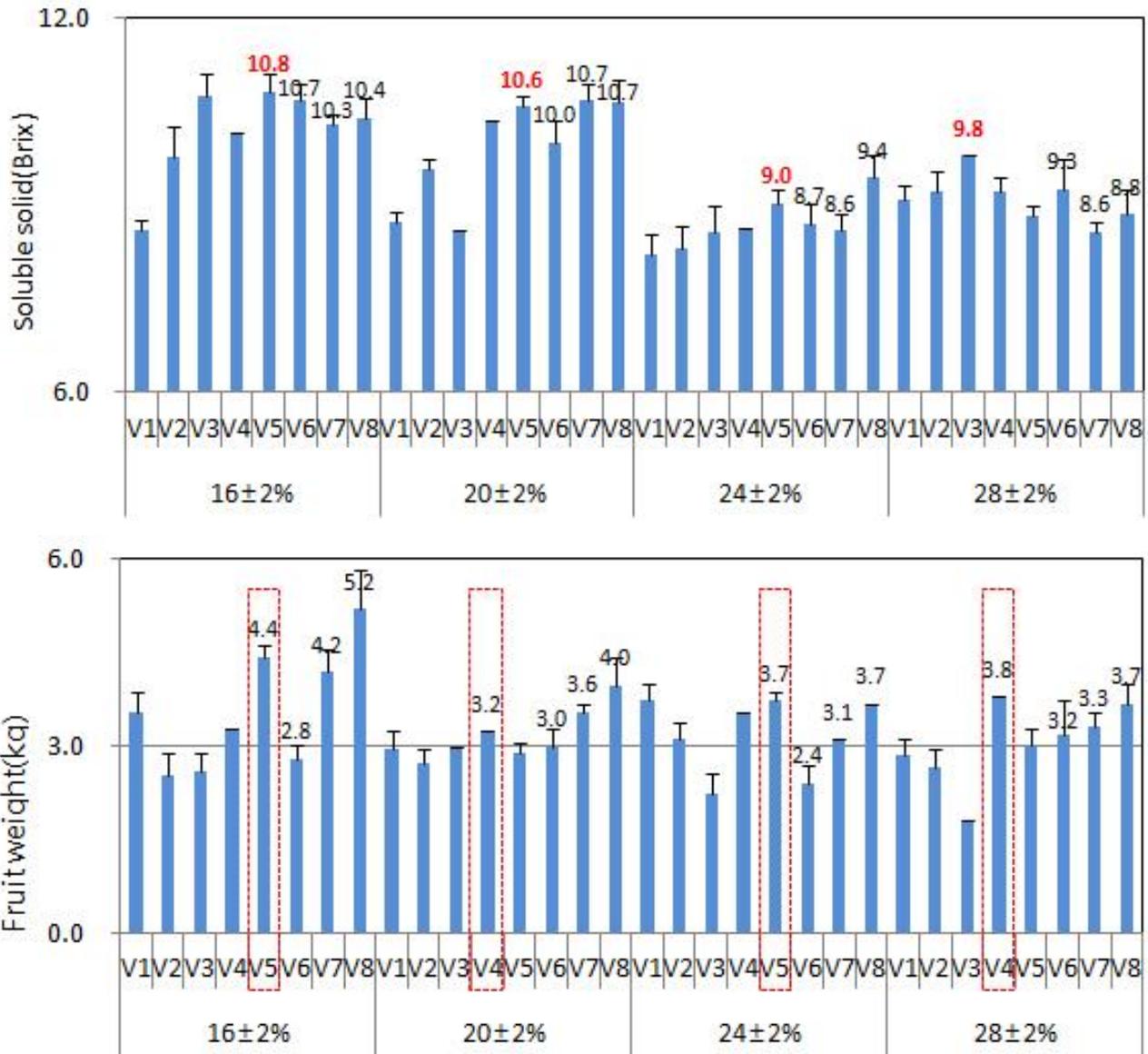


그림 3-12. 토양수분 함량에 따른 수박 과중 및 당도. V1: WJ121-34-33, V2: K044733-1-3-1-2, V3: K909350-4, V4: WJ121-34-14×K044733-1-3-1, V5: WJ121-34-31×K909350, V6: Gongdae, V7: Ojackgyo, V8: Bullojangsaeng

16. 중간모본 및 F<sub>1</sub> 대목 이용 생육특성 비교(2014년 봄재배)

Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 계통과 이들을 모본으로 이용하여 만든 F<sub>1</sub> 계통들의 토양수분 함량별 생육특성을 조사한 결과 모든 수분 조건에서 WJ121-34-33을 대목으로 이용하여 재배한 수박의 엽장과 엽폭이 다른 계통에 비하여 크고 넓은 경향을 보였다. Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 계통과 이들을 모본으로 이용하여 만든 F<sub>1</sub> 계통들의 토양수분 함량별 생육특성을 조사한 결과 16±2% 처리구에서는 WJ121-34-33을 대목으로 이용하여 재배한 수박의 절수가 많았고 초장이 길었으며 20±2%에서는 오작교와 불로장생 대목보다 생육이 좋지 않았으며 24±2% 처리구에서는 WJ121-34-33계통을 대목으로 했을 때 생육이 좋았고 28±2%에서도 비슷한 경향이였다.

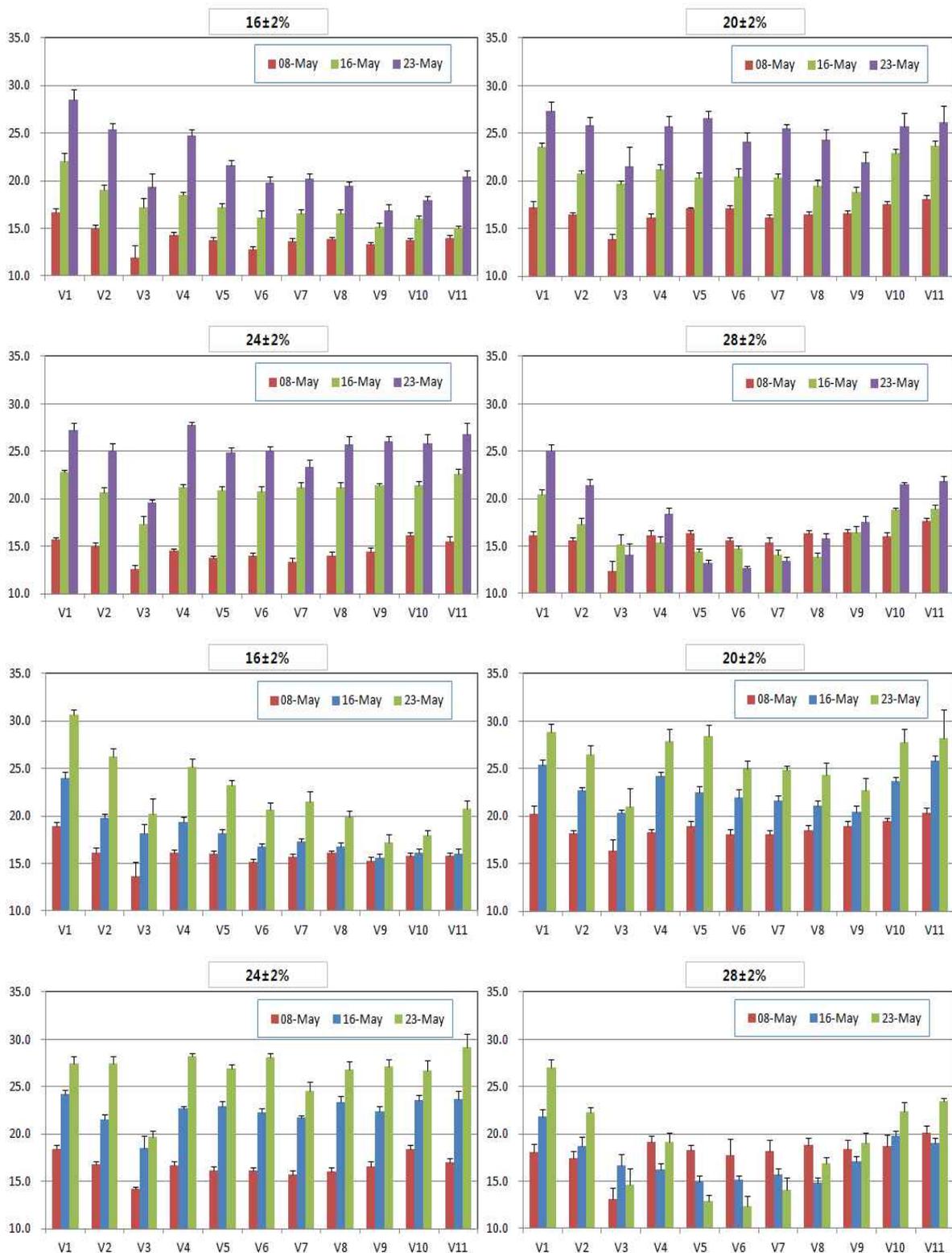


그림 3-13. 토양수분 함량에 따른 형질전환 중간모본 및 F<sub>1</sub> 계통별 잎 생육특성. V1: WJ121-34-33, V2: K044733-1-3-1-2, V3: K909350-4, V4: WJ121-34-14×K044733-1-3-1, V5: WJ121-34-15×K019018-25-8(YF)-A-4-1, V6: WJ121-34-31×K909350, V7: WJ121-34-31×K909350, V8: WJ121-34-33×K019018-25-8(YF)-A-4-1, V9: Gongdae, V10: Ojackgyo, V11: Bullojangsaeng

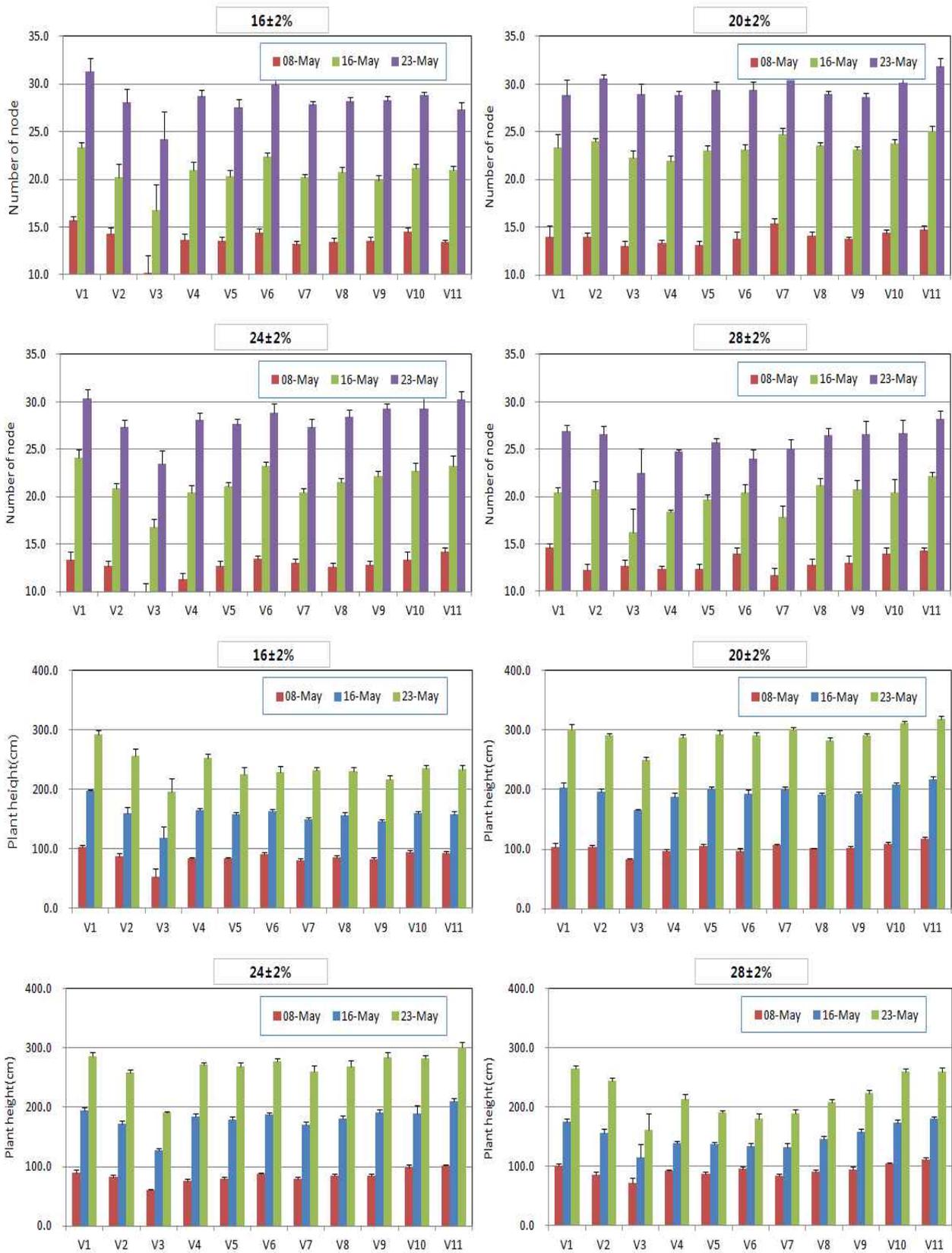


그림 3-14. 토양수분 함량에 따른 형질전환 중간모본 및 F<sub>1</sub> 계통별 생육특성. V1: WJ121-34-33, V2: K044733-1-3-1-2, V3: K909350-4, V4: WJ121-34-14×K044733-1-3-1, V5: WJ121-34-15×K019018-25-8(YF)-A-4-1, V6: WJ121-34-31×K909350, V7: WJ121-34-31×K909350, V8:

WJ121-34-33×K019018-25-8(YF)-A-4-1, V9: Gongdae, V10: Ojackgyo, V11: Bullojangsaeng

17. F<sub>1</sub> 교배조합 작성

안정적인 실험 수행을 위한 충분한 종자확보와 새로운 F<sub>1</sub> 계통을 만들기 위하여 모본으로 Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 2계통(WJ121-34-14, WJ121-34-33)과 CsGolS1 유전자 형질전환 2계통(Gols 10-21-2-4, Gols 10-25-4-4), 부분으로 보유 유전자원 중 형질분리가 일어나지 않는 3계통(K 044733-1-2-1, K 019018-25-8(YF)-A-4-1, K 909350-4)을 교배하여 종자를 수확하였다. 또한 Pep J1-1 유전자 형질전환 3계통과 CsGolS1 유전자 형질전환 3계통을 서로 정역교배하여 종자를 수확하였다.

표 3-6. 형질전환체간 교배조합 작성 및 종자확보 립수

모계친(♀)	부계친(♂)	종자(립)	모계친(♀)	부계친(♂)	종자(립)
WJ121-34-14 × K044733-1-2-1		112	WJ121-34-33 × K044733-1-2-1		781
	K019018-25-8(YF)-A-4-1	56		K019018-25-8(YF)-A-4-1	436
	K909350-4	281		K909350-4	1,574
Gols 10-21-2-4 × K044733-1-2-1		1,250	Gols 10-25-4-4 × K044733-1-2-1		396
	K019018-25-8(YF)-A-4-1	674		K019018-25-8(YF)-A-4-1	1,241
	K909350-4	581		K909350-4	424
WJ121-34-2-1-5 × Gols10-1		626	WJ121-34-15-1-4 × Gols10-1		431
	Gols1-3	828		Gols1-3	638
	Gols45-3	24		Gols45-3	-
WJ121-34-31-1-2 × Gols10-1		206	Gols10-1 × WJ121-34-2-1-5		183
	Gols1-3	362		WJ121-34-15-1-4	-
	Gols45-3	58		WJ121-34-31-1-2	-
Gols1-3 × WJ121-34-2-1-5		75	Gols45-3 × WJ121-34-2-1-5		-
	WJ121-34-15-1-4	226		WJ121-34-15-1-4	-
	WJ121-34-31-1-2	318		WJ121-34-31-1-2	-

18. Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 중간모본 및 F<sub>1</sub> 대목이용 과일특성 비교(2014년 봄 재배)

2014년 봄시험에서 Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 계통과 이들을 모본으로 교배하여 만든 F<sub>1</sub> 계통들을 대목으로 이용하여 토양수분 함량별 과특성을 조사한 결과 WJ121-34-33을 대목으로 이용하여 재배한 수박이 16±2% 처리구를 제외하고 가장 무거웠다. 16±2% 처리구에서의 과중이 다른 처리구에 비해 가벼운 편이었고 24±2% 처리구에서의 과중이 전반적으로 가장 무거운 경향을 보였다. 당도는 토양수분 함량이 높을수록 낮아지는 경향을 보였다. Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 대목은 토양수분조건을 16±2%로 하였을 때 생육초기부터 정상적인 생육이 어려웠고 모든 대목에서 착과초기 급격히 시들음이 발생하여 건조에 강한 특성을 보기가 어려웠다.

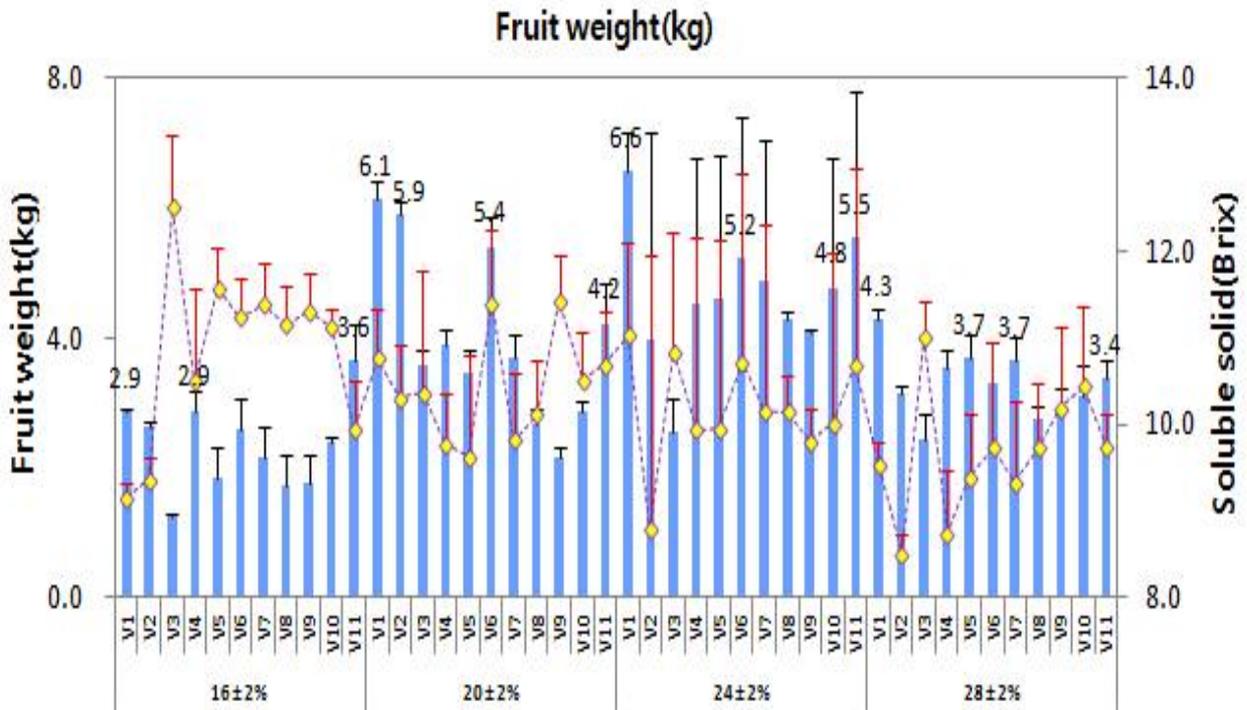


그림 3-15. 토양수분 함량에 따른 형질전환 중간모본 및 F<sub>1</sub> 계통별 과일특성. V1: WJ121-34-33, V2: K044733-1-3-1-2, V3: K909350-4, V4: WJ121-34-14×K044733-1-3-1, V5: WJ121-34-15×K019018-25-8(YF)-A-4-1, V6: WJ121-34-31×K909350, V7: WJ121-34-31×K909350, V8: WJ121-34-33×K019018-25-8(YF)-A-4-1, V9: Gongdae, V10: Ojackgyo, V11: Bullojangsaeng

19. Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 중간모본 및 F<sub>1</sub> 대목이용 잎특성 비교(2014년 가을 재배)

2014년 가을시험에서부터 상반기 시험을 토대로 수분함량을 24±2%, 28±2%, 32±2%, 36±2%로 조절하여 실험을 수행하였다. Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 계통과 이들을 모본으로 이용하여 만든 F<sub>1</sub> 계통들의 토양수분 함량별 생육특성을 조사한 결과 K909350-4을 대목으로 이용하여 재배한 수박이 32±2%처리구를 제외하고 전반적으로 엽장과 엽폭이 다른 계통에 비하여 짧고 작은 경향을 보였다.

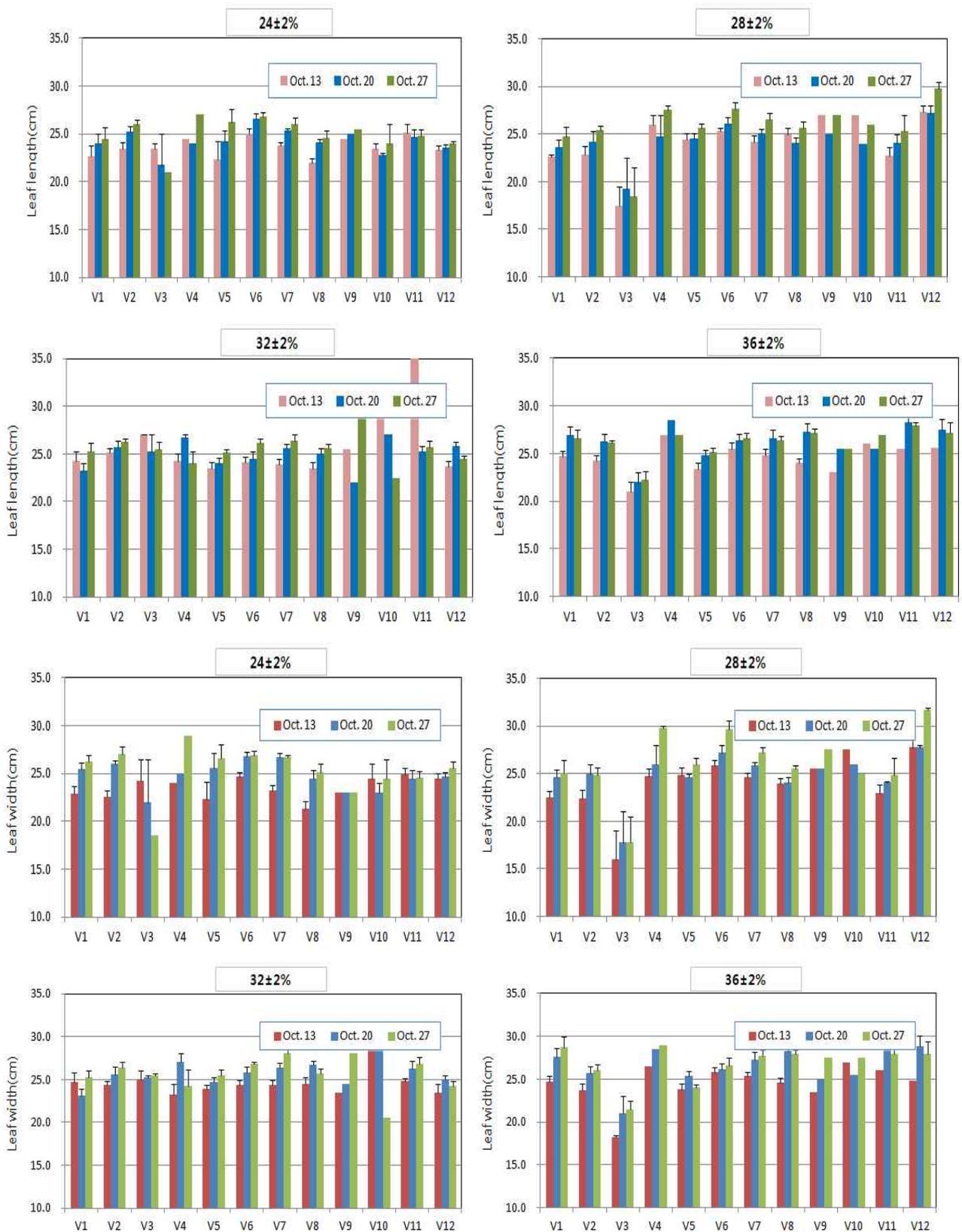


그림 3-16. 토양수분 함량에 따른 형질진환 중간모본 및 F<sub>1</sub> 계통별 생육특성. V1: WJ121-34-33,

V2: K044733-1-3-1-2, V3: K909350-4, V4: WJ121-34-14×K044733-1-3-1, V5: WJ121-34-15×K019018-25-8(YF)-A-4-1, V6: WJ121-34-31×K909350, V7: WJ121-34-31×K019018-25-8(YF)-A-4-1, V8: WJ121-34-33×K019018-25-8(YF)-A-4-1, V9: Gols1-3, V10: Gols45-3, V11: Ojackgyo, V12: Bullojangsaeng

20. Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 중간모본 및 F<sub>1</sub> 대목이용 과일특성 비교(2014년 가을재배)

Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 계통과 이들을 모본으로 교배하여 만든 F<sub>1</sub> 계통들을 대목으로 이용하여 토양수분 함량별 과특성을 조사한 결과 WJ121-34-31×K909350을 대목으로 이용하여 재배한 수박이 3.3~4.2kg으로 과중이 다른 계통에 비해 처리 간 큰 차이가 없었고 무거웠다. 당도는 처리별, 계통별 일정한 경향은 없었지만 전체적으로 볼 때 토양수분 함량이 높을수록 낮아지는 경향을 보였다.

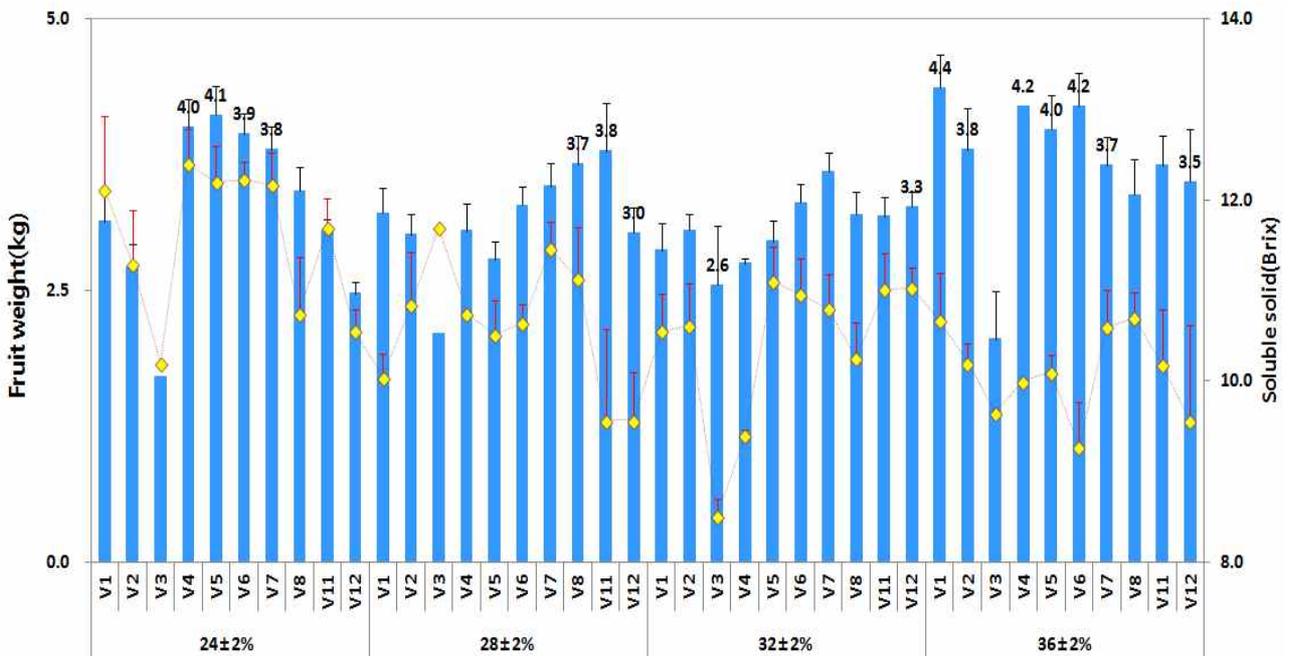


그림 3-17. 토양수분 함량에 따른 형질전환 중간모본 및 F<sub>1</sub> 계통별 과일특성. V1: WJ121-34-33, V2: K044733-1-3-1-2, V3: K909350-4, V4: WJ121-34-14×K044733-1-3-1, V5: WJ121-34-15×K019018-25-8(YF)-A-4-1, V6: WJ121-34-31×K909350, V7: WJ121-34-31×K909350, V8: WJ121-34-33×K019018-25-8(YF)-A-4-1, V9: Gongdae, V10: Ojackgyo, V11: Bullojangsaeng

21. Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 중간모본 및 F<sub>1</sub> 대목이용 잎특성 비교(2015년 봄재배)

Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 계통과 이들을 모본으로 이용하여 만든 F<sub>1</sub> 계통들의 토양수분 함량별 생육특성을 조사한 결과 대부분의 처리구에서 K044733-1-3-1-2와 K909350-4를 대목으로 이용하여 재배한 수박의 생육이 불량하였고 일부는 고사하였다. 엽장과 엽폭은 전반적으로 24±2%에서 다른 처리구보다 짧고 좁았다.

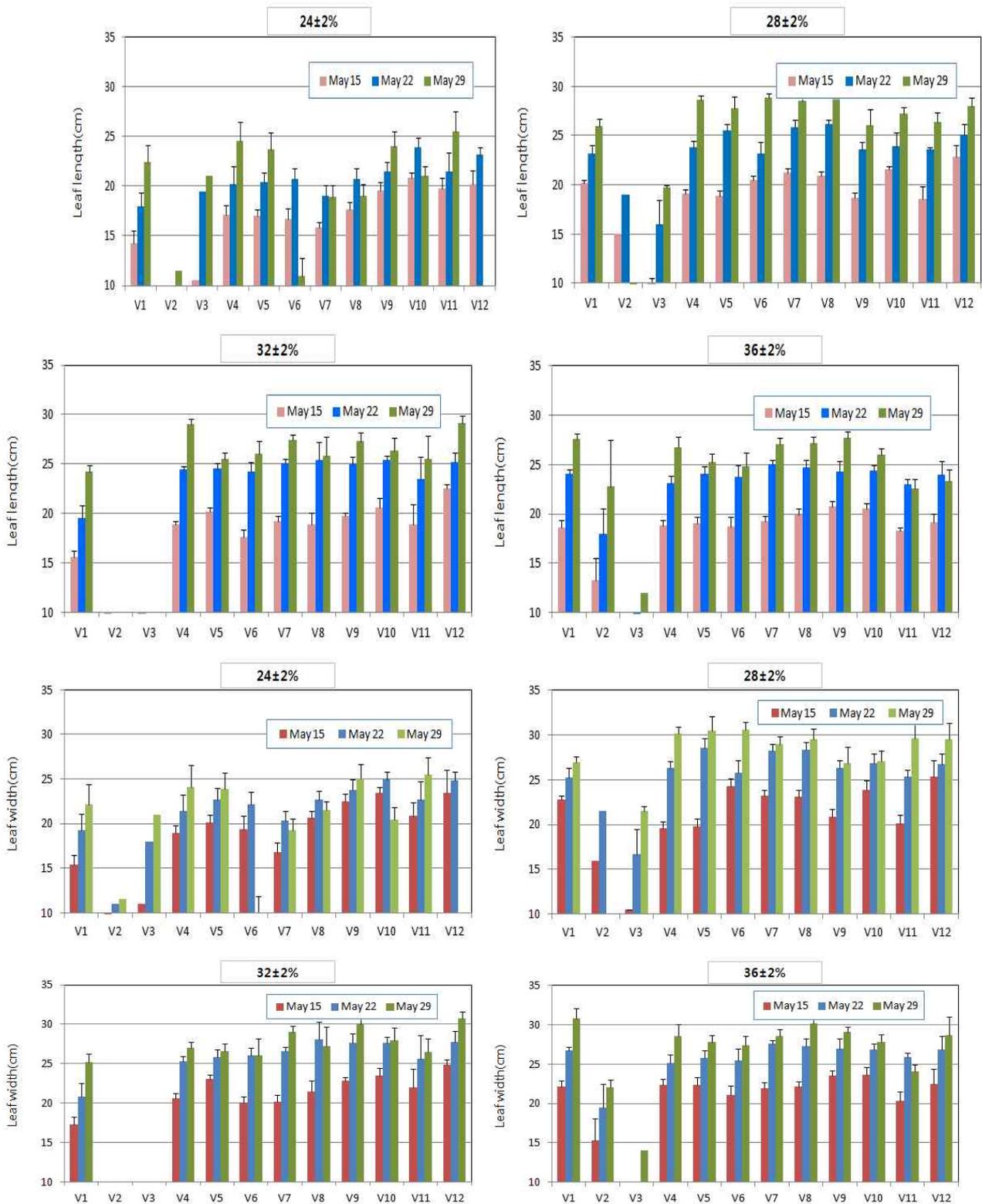


그림 3-18. 토양수분 함량에 따른 형질전환 중간모본 및 F<sub>1</sub> 계통별 생육특성. V1: WJ121-34-33, V2: K044733-1-3-1-2, V3: K909350-4, V4: WJ121-34-14 × K044733-1-3-1, V5: WJ121-34-15 × K019018-25-8(YF)-A-4-1, V6: WJ121-34-31 × K909350, V7: WJ121-34-31 × K019018-25-8(YF)-A-4-1, V8: WJ121-34-33 × K019018-25-8(YF)-A-4-1, V9: Gols1-3, V11: Gongdae, V12: Ojackgyo, V13: Bullojangsaeng

22. Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 중간모본 및 F<sub>1</sub> 대목이용 과일특성 비교(2015년 봄 재배)

Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 계통과 이들을 모본으로 교배하여 만든 F<sub>1</sub> 계통들을 대목으로 이용하여 토양수분 함량별 과특성을 조사한 결과 K044733-1-3-1-2을 대목으로 이용하여 재배한 수박이 2.5~4.9kg으로 과중이 다른 계통에 비해 가벼웠다. 불로장생을 대목으로 이용하여 재배한 수박이 과중이 무거운 편이었으며 당도도 높았다.

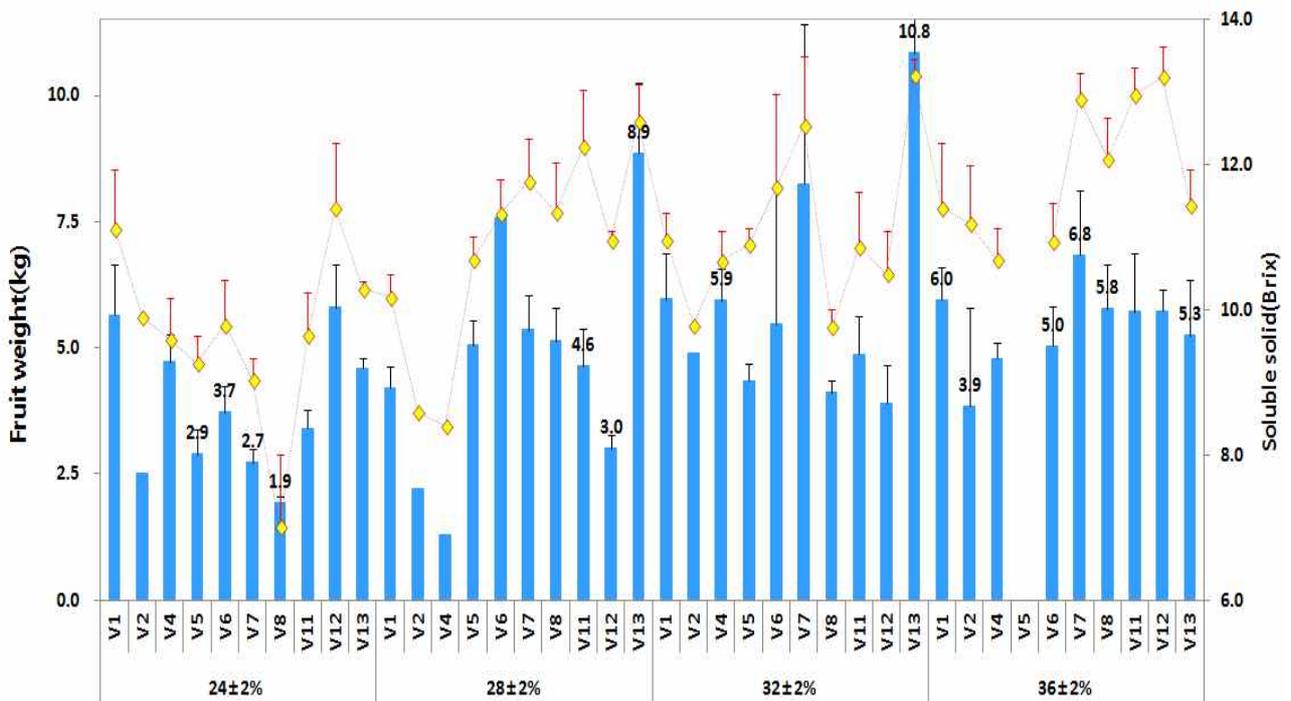


그림 3-19. 토양수분 함량에 따른 형질전환 중간모본 및 F<sub>1</sub> 계통별 과일특성. V1: WJ121-34-33, V2: K044733-1-3-1-2, V3: K909350-4, V4: WJ121-34-14 × K044733-1-3-1, V5: WJ121-34-15 × K019018-25-8(YF)-A-4-1, V6: WJ121-34-31 × K909350, V7: WJ121-34-31 × K019018-25-8(YF)-A-4-1, V8: WJ121-34-33 × K019018-25-8(YF)-A-4-1, V9: Gols1-3, V11: Gongdae, V12: Ojackgyo, V13: Bullojangsaeng

Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 계통은 기본식물이 공대이며, 공대의 특성은 참박대목에 비하여 저온에 약한 특성을 가지고 있다. 이 실험결과를 보면 봄재배시 형질전환체가 다른 야생형 수박대목, 그리고 공대계통을 활용하여 육성한 오작교 대목 모두 불로장생 대목에 비하여 과중이 낮은 경향을 보였으며, 고온기에 정식하는 가을재배의 경우 공대유래 형질전환 대목에서 생육이 비교적 양호한 결과를 보였다. CsGolS1 유전자 삽입 식물체의 경우 초기 생육은 어느정도 이루어졌으나 착과후 생육이 나빠지거나 고사하여 과품질까지 조사하기는 어려웠다. 그러나 다른 형질전환체나 형질전환체의 F<sub>1</sub> 계통들은 시판 품종인 ‘오작교’ 대목과 비슷하거나 더 좋은 결과를 얻었다. 토양수분함량에 따른 생육 및 과일특성은 저온에서 고온으로 변하고 수분요구량이 많은 봄작형은 36±2%, 생육초기는 고온에서 수분요구량이 많아지는 과실비대기에 저온으로 변하는 가을작형은 32±2%에서 좋은 결과를 보여 작형별로 수분요구량이 다를 수 있었다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에서의 기여도

### 1절. 기후변화 대응을 위한 형질전환 수박 대목 실용화 연구

1차년도 연구목표는 CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환체의 우량 중간모본 선발이며 이를 위하여 수박 병원성 균주수집과 병원성검정을 실시하였다. 또한 Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환공대 수박의 병원성 검정 및 동형접합체 선발을 실시하였다. CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환체 우량 중간모본 선발을 위한 병원균은 한국농용미생물센테(KACC)로부터 7개 수박 병원균과 2개의 오이 병원균을 분양받아 이중 병원성이 확인된 탄저병균(KACC 40809)과 만고병균(KACC 40669)을 이용하여 병원성 검정을 실시하였다. 병원성 검정에 앞서 보유하고 있는 CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환체 T3라인 4계통(GolS4-1-2, GolS4-2-2, GolS4-2-3, GolS4-2-5)과 T4라인 4계통(GolS1-2-3-1, GolS10-21-2-4, GolS10-23-2-2, GolS10-25-4-4, GolS10-25-13-1)을 이용하여 pBI121-1 binary vector 내 CaMV 35S promoter 부위와 NPTII 부위에서 primer를 제작하여 유전자 도입분석을 실시하였다. 또한 만고병균 병원성검정 결과 T4라인 1계통(GolS1-2-3-1)을 제외하고 모두 내병성이 있음을 확인하였다. 또한 만고병균에 저항성이 확인된 CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환체 T3라인 4계통과 T4라인 4계통에 대한 내염성 검정을 실시한 결과 T3라인(GolS4-1-2)과 T4라인(GolS10-25-4-1) 각각 1계통에 대하여 대조구에 비하여 내염성이 있음을 확인할 수 있었다. 또한 고추 Pep J1-1 유전자가 도입된 유전자가 도입된 형질전환 공대수박 17개 T4라인에 대하여 만고병균에 대한 병원성 검정 결과 병징 크기에 다소차이가 있지만 모두 대조구에 비교하여 내병성을 있음을 확인하였다. 또한 이들 병원균 중 T4라인 2계통(WJ121-34-24, WJ121-34-36)에 대해서는 탄저병균에 대해서도 저항성을 나타남을 확인할 수 있었다. 또한 프롤린과 ADH1 유전자 형질전환체 제작을 참박과 공대수박 종자를 이용한 발아부터 *Agrobacterium* 공조배양, 형질전환체 선발과정까지 형질전환조건 확립을 실시하였다.

2차년 연구목표는 형질전환체 수박 대목 우량 중간모본 특성 규명 및 내재해성을 검정하고자 하였다. 이를 위하여 CsGolS1 유전자 및 Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환체 T 세대 별 내재해성 유묘검정을 실시하였다. 먼저 수박재배에 가장 문제시 되고 있는 토양유래 병원균인 덩굴쪄김병균을 KACC로부터 3가지(KACC40901 R1, KACC40901 R2, KACC40905)를 분양받아 병원성 검정에 이용하였다. 1차년에 만고병균에 대하여 내병성이 확인된 CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환체 T4라인 3계통(에 대하여 도입유전자의 발현양상 또한 확인하였으며 이들 3계통(GolS10-21-2-4, GolS10-25-4-4, GolS10-25-13-1)에 대하여 덩굴쪄김병균 3가지에 대한 항균활성을 조사하였다. 덩굴쪄김병균 KACC40901 R1에 대하여서는 2 계통(GolS10-21-2-4, GolS10-25-4-4)에서, KACC40905에 대해서는 1개의 계통(GolS10-25-4-4)이 대조구에 비하여 항균활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한 1차년에 만고병균과 탄저병균에 모두에서 저항성을 보였던 Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환계통 T4라인 3계통(WJ121-34-14, WJ121-34-15, WJ121-34-31)에 대하여 상기 덩굴쪄김병균 3가지에 대한 항균활성을 측정된 결과 T4 라인 2계통(WJ121-34-14, WJ121-34-15)에서 모든 병원균 종류에 대하여 항균활성을 보여줌을 확인할 수 있었다. 또한 이들 3개 라인 중 2 계통(WJ121-34-14, WJ121-34-31)이 염에 대한 내성이 있음을 확인하였다. 또한 프롤린 및 ADH1 유전자 형질전

환체 제작을 위하여 *Wmrzfl*, *WmADH1* 유전자가 도입된 형질전환체 제작시험을 수행하였으며 추가적으로 폴리아민 생합성에 관련된 유전자인 *LsADC* 및 *LsSAMDC* 유전자를 도입하여 형질전환체 생산 시험을 수행하였다. 3차년 연구목표는 갈락티놀 형질전환체 및 defensin 형질전환체 수박 대목 우량중간모본 특성규명 및 내재해성 검정과 함께 *Agrobacterium*을 이용한 *LsRZF1*, *LsADC* 및 *LsSAMDC* 유전자가 도입된 형질전환체 생산이다.

3차년도 연구목표는 CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환체 T3 및 T4라인들에 대하여 내염성 반응이 낮게 나타난 것에 대하여 추가적으로 보유하고 있는 T1라인 6계통(GolS1-3, GolS9-4, GolS10-1, GolS13-1, GolS45-1, GolS45-3)에 대하여 내염성 선발을 실시하였다. 그 결과 T1라인 3계통(GolS10-1, GolS13-1, GolS45-3)에 대하여 내염성이 대조구에 비하여 유의하게 나타남을 확인할 수 있었다. 또한 이들 6개의 계통에 대하여 고온에 대한 내성 검정을 실시한 결과 3계통(GolS9-4, GolS13-1, GolS45-3)에 대하여 고온내성이 나타났고 이중 1개 계통(GolS13-1)만이 고염과 고온에 모두 내성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 고온에 대한 내성 검정은 고온내성과 관련된 heatshock protein 70 (*Clhsp70*) 유전자발현을 통해 재차 검정하였다. *Agrobacterium*을 이용한 *LsRZF1*, *LsADC* 및 *LsSAMDC* 유전자가 도입된 형질전환체 생산은 *LsSAMDC* 유전자의 경우 대목으로 공대수박을 사용한 경우 총 934개체에 도입하여 hygromycin 선발 평균 11.4%, 토양순화 생존 최종개체 확보율은 0.96%이었다. *LsRZF1* 유전자의 경우 대목으로 공대수박을 사용한 경우 총 475개체에 도입하여 hygromycin 선발 평균 12%, 토양순화 생존 최종개체 확보율은 2.3%이었다. *LsADC* 유전자의 경우 대목으로 공대수박을 사용한 경우 총 315개체에 도입하여 hygromycin 선발 평균 3.4%, 토양순화 후 생존하는 개체가 없었고, 생육도중에 모두 고사되었다. 이중 *LsRZF1* 유전자가 도입된 식물체 11개체들에 대하여 CaMV35S promoter 부위와 *LsRZF1* 유전자 부위에서 각각 primer를 제작하여 유전자 도입분석을 실시한 결과 모든개체에서 유전자가 도입되어 있음을 알 수 있었다. 또한 이들 개체에 대하여 *LsRZF1* 유전자의 발현분석을 실시한 결과 모두 강하게 발현됨을 알 수 있었다. 이와 같이 선발된 11계통을 2세부에 인계하였다.

4차년의 연구목표는 CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환 공대수박의 내재해성 및 농업적 특성을 규명하고자 genomic southern 분석을 통해 동형접합 CsGolS1 유전자 형질전환체를 확보하는 것이며 병저항성 및 내재해성이 우수한 CsGolS1 유전자 도입 형질전환체를 선발하고자 하였다. 또한 CsGolS1 및 Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환체 교잡을 통해 형질전환체를 육성하고 내재해성 유무를 확인하고자 추가적으로 *Agrobacterium*을 이용한 *LsADC* 및 *LsSAMDC* 유전자가 도입된 형질전환체 생산하였다. 먼저 CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환체 T3 라인 3계통(GolS1-1-1, GolS10-1-1, GolS45-3-1)에 대하여 genomic southern 분석을 실시한 결과 band 패턴이 약하게 나타남을 확인하였고 추가적으로 Taq man PCR 분석을 통해 동형접합체 선발실험을 수행하여 2계통(GolS10-1-1, GolS45-3-1)을 선발하였다. 또한 Pep J1-1 유전자가 도입된 계통에 대하여서도 추가적으로 taq man PCR 분석을 통해 동형접합체 선발실험을 수행하여 총 7계통(WJ121-34-2-1-5, WJ121-34-15-1-2, WJ121-34-31-1-2, WJ121-34-33-1-1, WJ121-34-33-1-2, WJ121-34-33-1-4, WJ121-34-33-1-5)을 선발하였다. CsGolS1 및 Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 교잡종은 2014년 14가지 교배조합으로 계통을 육성하였고 2015년 상반기 9가지 교배조합을 증식하였고 그리고 최종 3계통(WJ121-34-31-1-2 X Gols45-3-1-1, WJ121-34-31-1-2 X GolS10-1-1-1과 GolS10-1-1-1 X WJ121-34-2-1-5)을 선발하였다. *Agrobacterium*을 이용한 *LsADC* 및 *LsSAMDC* 유전자가

도입된 형질전환체 생산하고자 하였다. 먼저 *LsSAMDC* 유전자의 경우 대목으로 공대수박을 사용한 경우 3차년에 확보된 32개체와 함께 4차년에 추가 9개체로 확보하였고 토양 순화를 통해 총 41개체의 식물체를 확보하였고, 1차적으로 gDNA-PCR을 통해 *hptII* 및 *LsSAMDC* 유전자 도입을 확인하여 2개체를 최종 선발하였다. 최종 선발된 2개체를 토양에서 유지 관리하였으나, 생육이 크게 진전되지 않고 잎이 황화 되면서 결국 고사되어 *LsSAMDC* 유전자가 식물체의 생육에 많은 영향을 줄 것으로 사료되었다. 또한 *LsSAMDC* 유전자의 경우 대목으로 참박을 사용한 경우 3년차에 75개, 4년차에 265개로 총 340개체에 도입하여 이중 315 개체는 hygromycin으로 5 $\mu$ g 농도조건에서 선발 시 16개체(5.1%)였으나, 모두 고사되었기 때문에 25개체에 대하여 항생제로 선발하지 않았으나 토양순화 과정에서 모두 고사되었다. *LsADC* 유전자의 경우 참박에 도입된 식물체 중 hygromycin 항생제에 선발되지 않은 상태에서 유전자의 도입 여부를 확인한 결과 4년차에 24개체 중 7개체가 최종적으로 확인되었으나 생육도중에 고사하였다. gDNA-PCR을 통해 확인된 각 유전자 형질전환체의 생육을 확인한 결과 *LsSAMDC*의 경우 생육은 비교적 잘 진행 되었으나 시간이 지날수록 생육이 줄어들고 잎이 갈변하여 고사하는 것으로 나타났다. *LsADC* 형질전환체는 배지상에서 같은 시기에 심은 WT에 비해 그 생육이 매우 느려지는 것으로 나타났다. WT 식물체와 비교했을 때 형질전환 식물체의 경우 전체적으로 발달이 늦은 것으로 보여졌으며, 특히 배지상에서 4주 이후의 시간에는 잎이 갈변 되는 것으로 나타났다. 이는 *LsADC* 유전자가 형질전환체 생육에 많은 영향을 주는 것으로 사료되었다. *LsSAMDC*와 *LsADC* 유전자 도입 형질전환체의 생산에 있어 가장 큰 문제점은 배지 및 토양에서의 발근이 영향을 받는 것으로 보여졌다. 따라서 배지상에서 IBA, NAA 및 IAA 생장조절제 종류별 농도별 식물체의 발근유도 실험을 진행한 결과 참박에 *LsSAMDC* 유전자를 도입한 형질전환체의 경우 어떠한 종류의 생장조절제에서도 발근유도가 되지 않았고, 고농도가 될수록 오히려 생존율까지 낮아지고 식물체는 시간이 지날수록 갈변되어 고사되는 것으로 보였다. 동일한 방법으로 *LsADC* 유전자 도입 형질전환체를 이용하여 생장조절제 종류별 농도별 생존 및 발근유도를 조사한 결과 *LsSAMDC*와 동일한 양상으로 처리 2주 후부터 갈변되어 최종적으로 고사됨을 알 수 있었다. 이는 *LsSAMDC*와 *LsADC* 유전자의 경우 참박이나 공대수박 도입 효율이나 선발효율도 저조하였으며 또한 무엇보다 이들 유전자가 도입된 식물체의 경우 정상적인 생육이 이뤄지지 않아 형질전환체를 제작하는데 어려움이 있기 때문에 그 원인을 규명하는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 2절. 내재해성 및 복합기능성 수박 대목 개발 및 실용화

1차년도 연구목표는 프롤린 대사조절을 통해 수박 내재해성 제어 시스템 기술을 개발하기 위하여, 수박 유식물체로부터 total RNA 추출 및 cDNA 합성 후, 참박 *RING Zinc Finger 1* (*LsRZF1*) 유전자를 클로닝 하였다. 아미노산 서열을 분석한 결과, LsRZF1은 중앙부분에 C3HC4-type zinc finger domain(195-236aa)을 포함하고 있었다. 건조 스트레스에 대한 *LsRZF1* 유전자의 발현 양상을 살펴보기 위하여, 수박 10-day-old 유식물체로부터 건조스트레스 2주간 처리한 후, total RNA를 추출하였다. Quantitative real time PCR(qPCR)을 수행하기 위해 Gongdae Actin 7(GdACT7) 유전자의 primer set를 확보하였고, internal control로 사용하였다. 건조스트레스에 대한 *LsRZF1* 유전자의 발현 양상은 스트레스 처리 후, 정상 조건보다 5

배 정도 감소하는 경향으로 나타났음을 알 수 있었다. 또한 LsRZF1 단백질의 세포 내 위치를 탐색하기 위하여, LsRZF1-CFP construct를 수박 유식물체로부터 추출한 protoplast에 transient transfection을 수행하였다. Confocal microscopy로 살펴본 결과, LsRZF1은 CFP vector만 형질전환 시킨 원형질체와 마찬가지로 세포질에 발현됨을 알 수 있었다.

또한 내재해성이 강화된 형질전환 수박 대목을 창출하기 위해 ADC 유전자와 SAMDC 유전자를 클로닝하고자 하였다. 박과 작물인 오이 게놈 데이터베이스로부터 합성된 ADC 및 SAMDC 유전자의 primer를 이용하여 RT-PCR를 통해 각각 *LsADC* 와 *LsSAMDC* 유전자를 pTOP 벡터에 클로닝하였다. 클로닝된 유전자들의 염기서열과 아미노산 서열을 결정된 결과, LsADC는 식물 ADC 유전자 집단이 고유적으로 가지고 있는 2개의 pyridoxal phosphate attachment site가 있었으며 또한 ADC 단백질이 가공되는 과정에서 잘려나가는 부위도 존재하고 있었다. 그리고 아미노산 수준에서 상동성을 비교해 본 결과, LsADC는 오이의 CsADC와 96%, 담배의 NtADC와 76%, 애기장대의 AtADC1과는 70%, AtADC2와는 71%, 그리고 벼의 OsADC와는 64%정도 상동성을 나타내었다. 그리고 LsSAMDC 역시 대부분의 SAMDC가 가지고 있는 proenzyme cleavage site가 있었으며 단백질의 분해와 관련되어 있는 PEST domain을 하나 가지고 있었다. 또한 아미노산 수준에서 상동성을 비교해 본 결과, LsSAMDC는 수박의 CISAMDC와 97%, 담배의 NtSAMDC와 71%, 애기장대의 AtSAMDC1와는 67%, 벼의 OsSAMDC1와는 55%, 그리고 오이의 CsSAMDC2와는 48%정도 상동성을 나타내었다. Phylogenetic tree를 작성해 본 결과, LsADC의 경우는 오이의 CsADC와 유전적으로 매우 가까운 반면 LsSAMDC는 수박의 CISAMDC와 가장 가까운 것으로 확인되었다. *LsADC* 유전자는 잎에서의 발현은 다른 조직에 비해 상대적으로 약하게 나타났으나 건조와 고염 스트레스에 대해 강하게 유도되는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 이 유전자의 경우 비생물학적 스트레스 뿐만아니라 만고병 및 탄저병과 같은 생물학적 스트레스에 대해서도 지속적으로 강하게 유도되고 있음을 확인할 수 있었다.

제 2차년도 연구목표는 건조스트레스에 대한 수박 대목 LsRZF1 유전자의 생리적 특성 및 반응을 분석하기 위하여, qPCR을 통한 정량 분석 결과, LsRZF1 유전자 전사 발현량은 삼투스 스트레스 조건하에서 1.5배 정도 감소함을 확인 할 수 있었다. 또한, 건조스트레스는 식물체 내 ABA 호르몬 집적을 유도하고, ABA 신호 전달과 밀접한 연관이 있다는 보고가 되어진 바, 환경스트레스 호르몬인 ABA에 대해 *LsRZF1* 유전자의 발현 양상을 살펴본 결과, *LsRZF1* 유전자 전사 발현 양상은 ABA 조건하에서 1.1배 정도 감소함을 확인 할 수 있었다. 식물체의 생체 내, 참박 *LsRZF1* 유전자의 기능을 알아보기 위하여, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 식물체에 과발현 형질전환체들을 제작하였으며, 우수 순종 라인(OX18-2 및 OX32-5)들을 분리하여 확보하였고, 또한 LsRZF1 상동유전자인 애기장대 *AtRZF1* 유전자가 T-DNA 삽입에 의해 결여된 *atrzf1* 돌연변이체를 이용, *LsRZF1* 유전자가 도입된 형질전환체들을 제작하여, 우수 순종 라인 (*atrzf1*/LsRZF1)들을 분리하였다. RT-PCR을 통한 형질전환체들의 *LsRZF1* 유전자 발현을 살펴 본 결과, wild-type(WT) 애기장대 식물체를 제외한 형질전환 식물체들은 전사 발현이 잘 이루어짐을 확인 할 수 있었다. 정상 조건하에서, 이러한 형질전환체들의 종자 발아율 혹은 식물 발달 표현형을 WT 식물체와 비교 분석한 결과, 차이가 나지 않았음을 알 수 있었다. 확보된 각 형질전환체들로부터 수분 결핍 스트레스에 대한 내성 혹은 감수성임을 확인하기 위하여, WT 및 각 형질전환체들의 종자들을 400 mM mannitol이 첨가된 MS 식물배지에 과중한 7일 후, 각 유식물체들의 cotyledon greening을 비교 조사한 결과, WT에 비해 *atrzf1* 돌연변이체는

삼투스트레스에 대해 내성을 지녔으며, *LsRZF1* 과발현 및 *atrzf1/LsRZF1* 형질전환체들은 매우 감수성임을 알 수 있었다. 정량 분석 결과, *LsRZF1* 형질전환체들은 20% 이하의 자엽이 녹색화 되는 반면, WT은 30%, *atrzf1* 돌연변이체는 무려 80%의 유식물체 자엽이 녹색화됨을 알 수 있었다. 또한, 삼투스트레스에 대한 *atrzf1/LsRZF1* 형질전환체들의 cotyledon greening 결과로 보아, *LsRZF1* 유전자는 *AtRZF1* 유전자와 생체 내 유사한 기능을 할 것으로 추정되어진다.

한편, 수박 대목으로 가장 많이 사용되고 있는 참박은 건조스트레스가 처리된 8일후부터 마르기 시작하여 15일후에 말라 죽는 반면, 공대수박은 건조스트레스가 처리된 20일후까지 생존하였다. 또한 건조스트레스 처리 기간동안 상대수분함량을 측정한 결과, 참박은 건조스트레스 처리후 15일이 되자 잎의 상대수분함량이 32%로 낮은 수분함량을 보인 반면 공대수박은 건조스트레스가 처리된 15일 후에도 잎의 상대수분함량이 60%을 유지할 정도로 높게 나타났으며 20일이 지나야 수분함량이 30%로 낮아지는 것을 확인하였다. 또한 참박에 건조스트레스를 처리한 후 폴리아민을 추출한 결과 프트렛신의 함량이 스트레스 처리 후 증가하는 것으로 나타났으나 다른 식물체에 비해 현저하게 낮게 생성되는 것을 확인하였다. 그리고 1차년도에 클로닝하여 스트레스 및 조직특이성에 반응하는 발현 양상을 확인한 *LsADC*와 *LsSAMDC* 유전자를 식물형질전환 벡터인 pCAMBIA3301에 클로닝한 다음 1세부과제와 공동으로 참박과 공대수박에 형질전환 하였다. 참박 및 공대수박을 이용해 효율적인 형질전환 조건을 찾기 위해 일주일 간격으로 *Agrobacterium*과 co-culture 조건 및 호르몬의 농도를 바꾸면서 총 3,000개 이상의 참박 자엽과 2,500개 이상의 공대수박 자엽을 이용하여 형질전환을 수행하였다.

제 3차년도에는 애기장대 형질전환체로부터 건조스트레스에 대한 *LsRZF1* 유전자의 생리적 및 분자적 특성을 살펴본 결과, *LsRZF1* 형질전환체들은 WT과 *atrzf1* 돌연변이체 보다 수분 손실률이 더욱 빨라짐을 알 수 있었으며, 프롤린 함량 또한 *LsRZF1* 형질전환체들은 WT과 *atrzf1* 돌연변이체 보다 더 적음을 알 수 있었다. 이러한 결과들로 말미암아, *LsRZF1* 유전자의 기능은 프롤린 대사 조절을 통한 건조스트레스 반응에 관여할 것으로 추정되어진다. WT 및 각 *LsRZF1* 형질전환체들로부터 건조스트레스 처리 후, 스트레스 관련 마커 유전자들의 발현을 분석하기 위하여, 프롤린 합성 관련 *P5CS1*, ROS 관련 *AOX1a* 및 수분결핍 스트레스 관련 *ERD15* 유전자들의 전사 발현량을 분석하였다. 건조 처리 후, qPCR를 수행한 결과, *LsRZF1* 각 형질전환체들은 WT과 *atrzf1* 돌연변이체 보다 스트레스 마커 유전자들의 전사 유도 증가율이 감소함을 알 수 있었다. 또한, WT 및 각 *LsRZF1* 형질전환체들로부터 ABA 처리 후, ABA 유도 증가 마커 유전자들의 발현을 분석하기 위하여, *RAB18*, *RD29A* 및 *RD29B* 유전자들의 전사 발현량을 분석한 결과, *LsRZF1* 각 형질전환체들은 WT과 *atrzf1* 돌연변이체 보다 ABA 마커 유전자들의 전사 유도 증가율이 감소함을 알 수 있었다. *LsRZF1*은 중앙부분에 C3H2C3-type zinc finger domain을 포함하고 있으며, 이러한 C3H2C3-type zinc finger 단백질들은 ubiquitination E3 ligase activity를 가지고 있다는 보고가 된 바 있기 때문에 *LsRZF1* 단백질의 세포 내 생화학적 기능을 분석하기 위하여, MBP-*LsRZF1* construct를 클로닝한 후, auto-ubiquitination assay를 수행하였다. Anti-MBP 항체를 이용, auto-ubiquitination assay 결과, *LsRZF1* 단백질은 E1 및 E2 단백질이 존재 하에 ubiquitination이 이루어짐을 알 수 있었다. 이러한 결과는 *LsRZF1* 단백질은 *AtRZF1*과 같이 세포 내 생화학적 기능으로써 E3 ubiquitin ligase임을 알 수 있었다. 제 1 세부과제에 의해 만들어진 공대수박 대목 형질전환체 (T0 세대)들로부터 *LsRZF1* 유전자 도입(antisense 형질전환체) 여부를 분석하기 위하여

RT-PCR을 수행하였다. 공대수박 대목 10종의 형질전환체 T1-1, T1-2, T1-3, T1-4, T1-5, T1-6, T1-7, T1-8, T1-9, T1-10 및 T1-11 및 공대수박(control, WT)으로부터 T1-10 형질전환체를 제외한 각 형질전환체 total RNA 추출 및 cDNA 합성 후, RT-PCR을 수행한 결과, 공대수박에서는 *LsRZF1* PCR products를 볼 수 없었으며, 반면에 10종의 antisense 형질전환체들은 *LsRZF1* transcript bands들을 확인할 수 있었다. 또한, 이러한 형질전환 식물체들로부터 건조 처리 후, 프롤린 함량을 측정된 결과, T1-1, -2, -4, -6, -8 및 -9 형질전환체가 WT(공대수박), T1-3, -5, -7 및 -11 식물체 보다 월등히 프롤린 함량이 높다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들을 살펴보았을 때, T1-1, -2, -4, -6, -8 및 -9 형질전환체들은 도입된 *LsRZF1* 유전자에 의해 프롤린 대사를 조절하는 것으로 여겨진다. 우선 2종의 T2-1 및 T2-3 형질전환체로부터 T2 세대 종자 수확 후, *LsRZF1* 유전자가 도입이 되었는지를 확인하기 위하여, 각 형질전환체들의 유식물체로부터 genomic DNA 추출 및 35S promoter에 해당하는 한쪽 primer와 *LsRZF1* 유전자의 한쪽 primer를 가지고 PCR을 수행한 결과, WT에서는 PCR products를 볼 수 없었으며, 반면에 T2-1 형질전환체의 자식세대 중 T2-1-4를 제외한 5개체에서 모두 PCR products를 볼 수 있었다. T2-3 형질전환체의 자식세대 중 T2-3-2를 제외한 4개체에서 모두 PCR product bands들을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들을 살펴보았을 때, *LsRZF1* 유전자가 T2 세대로 진전되었으며, 아마도 이 2 종의 T2-1 및 T2-3 형질전환체들은 single copy의 *LsRZF1* 유전자가 존재할 것으로 여겨진다.

또한 2차년도에 형질전환한 *LsADC* 과다발현 참박 형질전환체로 생각되는 라인을 선발하였으나 공대수박 형질전환의 효율이 매우 낮은 관계로 제1세부과제와 함께 많은 형질전환체 확보를 위해 지속적으로 형질전환에 많은 시간과 노력을 투자하였다. 그리고 비교적 과다발현체를 창출하기가 쉽고 knock-out 돌연변이체를 분양 받을 수 있는 모델 식물인 애기장대에서 *ADC* 유전자의 병저항성 및 건조 내성과 관련된 기능 연구를 수행하였다. 본 연구과제에서 애기장대의 두 *ADC* 유전자들 중 세균 병원균인 *Pst* DC3000에 의해 강하게 유도 발현되는 것으로 확인된 *ADC2* 유전자가 knock-out된 *adc2* 돌연변이체를 확보하여 병저항성 여부를 검정하였다. 또한 *ADC1*과 *ADC2* 유전자를 각각 CaMV 35S 프로모터와 결합시켜 *ADC*가 과다발현되는 형질전환체를 만든 후 건조 내성에 대한 검정을 실시한 결과 35S::*ADC1*과 35S::*ADC2* 형질전환체가 wild-type과 *adc2* 돌연변이체에 비해 건조에 대한 강한 내성을 나타내었다.

제 4차년도에는 11종의 T3세대 *LsRZF1* 공대수박 형질전환체들로부터 genomic DNA-PCR을 통해 총 7종의 우수 순종 라인들을 선발하였으며, 7종의 T3세대 *LsRZF1* 우수 순종라인으로부터 내건성에 대한 표현형을 분석한 결과, K1-16-8, K3-3-1 및 K4-1-1 라인들은 대조구인 WT 표현형과 유사한 반면, K5-5-3, K6-1-6, K7-6-75 및 K9-8-11 라인들은 WT 보다 더 강한 내건성 표현형이 나타남을 알 수 있었다. K5-5-3과 K6-1-6 순종라인으로부터 건조스트레스 처리 9일 후 생리적 표현형 분석한 결과, K5-5-3과 K6-1-6 순종라인들은 대조구인 WT 보다 내건성이 훨씬 좋음을 알 수 있었다.

또한 참박으로부터 클로닝한 *LsADC* 유전자를 애기장대에 형질전환하여 그 기능을 확인하고자 하였다. 총 4개 라인을 확보하여 T2세대에서 genomic PCR과 RT-PCR를 통해 형질전환체를 확인하였으며 그들 형질전환체로부터 폴리아민을 추출하여 푸트렛신의 증가를 우선 TLC로 확인한 결과 WT인 Col-0에 비해 푸트렛신의 함량이 많이 생합성되는 *OXLsADC-1*과 *OXLsADC-5* 라인을 확보할 수 있었다. 푸트렛신 함량이 높은 *LsADC* 과발현 형질전환 여러 라인들 중 두 개 라인을 선발하여 건조 내성에 대한 검정을 실시하였다. 형질전환 애기장대의

내건성을 분석한 결과 col-0에 비해 내건성에 대한 저항성이 높게 관찰되었다. 또한 상대수분 함량(RWC)을 측정한 결과, 건조 11일 후 *ADC2* 과발현 형질전환체의 상대수분 함량이 60%로 col-0에 비해 더 높게 나타났으며 *adc2* knock-out mutant 경우에는 col-0보다 낮은 수준의 상대수분함량을 확인하였다. 또한 *LsADC* 과발현 형질전환체인 *LsADC 5-3* 라인과 *AtADC2* 과발현 형질전환체 *AtADC2 15-8* 라인을 각각 선발하여 건조 내성에 대한 검정을 실시하였다. 그 결과 *AtADC2* 과발현 애기장대 형질전환체보다 *LsADC* 과발현 애기장대 형질전환체가 우수한 내건성을 보였다.

### 3절. 내재해성 수박 대목 품종 육성 및 실용화 연구

1차 년도에는 CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환체인 GolS10 15계통에 대하여 유전자 도입 여부를 확인 한 후 11계통을 세대진전 시켰으며 과실특성 조사결과, 유전자 삽입된 11계통 중 10계통이 선발되었으며 과일의 형태적 특성은 모든 계통이 유사하였다. 유전자가 삽입된 10계통의 발아세는 일반 시판 대목품종인 불로장생 대목에 비하여 고르지 않았고, 과중 후 8일째는 거의 비슷한 수준에 이르렀으며, 접목 후 15일째의 생존율 역시 일반 시판 대목품종과 거의 유사한 수준을 보였다. 또한 형질전환체의 F<sub>1</sub>을 만들기 위하여 Pep J1-1 유전자가 도입된 유전자로 형질전환된 5계통과 야생근연종 3계통을 교배하여 15개 교배조합을 작성하여 5개 조합에서 F<sub>1</sub> 종자를 280립에서 최고 824립까지 생산하였으며, 종피색이 갈색, 적갈색, 흑적색으로 다양하였다.

2차 년도의 가을시험(2012년)에서 Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 8계통을 대목으로 하여 수박을 재배한 결과 참박대목인 불로장생에 비하여 3개 계통에서 과중이 무거웠다. CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환 계통과 접목한 일반수박의 과일품질 특성은 Gols10-21-2와 Gols10-25-4, Gols10-25-13에서 참박대목인 불로장생과 wild type인 공대에 비하여 과중이 무겁고 당도도 높게 나타나 대목으로의 이용 가능성을 보였다. 2013년 봄 시험에서 Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환체의 F<sub>1</sub> 5계통에 대하여 맞접을 실시한 결과 접목 후 8일째의 생존율은 97.5%로 wild type인 공대와 참박대목인 불로장생과 거의 유사한 수준을 보였고, 공정육묘장에서 사용하는 편엽합접의 경우에도 배축이 가늘어 다소 불편함이 있었으나 생존율에는 커다란 차이가 없어 대목으로 사용하기에는 별 문제가 없을 것으로 판단되었다. 접목 후 중간생육 조사 결과 생육은 계통에 따라 오히려 참박대목 보다 왕성하기도 하였으며 5절에서의 절간장이나 엽 길이, 엽 폭, 엽병 길이도 다양하게 조사되었다. Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 F<sub>1</sub> 계통 대목 이용 일반수박 접목 후 과품질 특성을 조사한 결과 공대대목에 접목한 수박의 과중이 가장 무거웠으며, 형질전환 계통을 모본으로 하고 일반 고정계통을 부분으로 하여 교배한 F1 계통을 대목으로 하였을 때 전반적으로 일반 참박 대목인 불로장생보다 과중이 무거웠고 당도는 불로장생을 대목으로 사용하였을 때 가장 높았다. 2013년 봄 시험에서 CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환 9계통에 대하여 맞접을 실시한 결과 접목 후 8일째 생존율은 95% 이상으로 wild type인 공대와 일반 시판 참박대목품종인 불로장생과 거의 유사한 수준을 보였다. 접목 후 격리포장에 정식후 중간생육을 조사한 결과 일반 참박대목에 비하여 줄기의 두께가 얇았지만 전반적인 생육은 양호하였다. CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환 계통 대목을 이용하여 일반수박에 접목후 과품질을 조사한 결과 공대 대목에 접목한 수박의 과중이

가장 무거웠으며, 형질전환 계통을 대목으로 하였을 때 전반적으로 일반 참박 대목인 불로장생보다 과중이 무거웠다. 당도는 Gols 10-21-2-5을 대목으로 사용하였을 때 가장 높았는데 CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환 대목은 포트실험에서 일반 참박대목에 비하여 건조에 강한 특성을 보였으며 수박이 수확 전 단수 기간을 더 길게 하였을 때 당도를 높일 수 있는 것을 감안한다면 실용화 되었을 때 고당도 수박을 생산 할 수 있을 것으로 생각된다.

Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환체와 교배한 F<sub>1</sub> 계통의 내건성 및 내염성을 확인하기 위해, NaCl 250mM 용액에 있을 침지한 뒤 5일 후 잎의 총 클로로필 함량을 측정하였다. 그 결과 대조구인 wild type 공대수박에 비해 Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환체인 WJ121-34-14와 WJ121-34-33, 교배친인 K044733-1-3-1-2, F<sub>1</sub> 계통인 WJ121-34-31 × K909350 조합에서 총 클로로필 함량이 더 높게 나타남이 확인되었다. *F. oxysporium* (KACC 40905, KACC 40901 R1, KACC 40901 R2)에 대하여 항균활성을 검정한 결과 교배친으로 사용한 3계통 중 K044733-1-2-1은 사용된 3개의 덩굴쪼김병균에 대하여 모두 균사생육 억제효과가 있었지만 형질전환체 F<sub>1</sub> 계통들은 wild type에 비하여 억제효과를 보이지 않았다. CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환체 계통 잎의 총 클로로필 함량은 대조구인 wild type 공대수박에 비해 CsGolS1 유전자가 도입된 형질전환체인 Gols10-21-2-4와 Gols10-25-4-4에서 더 높게 나타남이 확인되었다.

3차 년도의 가을시험(2013년)은 형질전환된 공대수박 대목의 토양수분조건을 구명하기 위하여 실시하였으며, 토양깊이 20cm의 수분조건은 ① 건조 16±2%, ② 약간 건조 20±2%, ③ 적습 24±2%, ④다습 28±2%으로 하였다. 건조조건(16±2%)에서 WJ121-34-31×K909350는 wild type인 공대수박과 시판품종인 오작교에 비하여 무거웠으며 당도도 높았지만 참박대목인 불로장생에 비하여 과중이 낮았다. 24±2% 처리구에서도 역시 공대수박과 오작교에 비하여 과중이 무거웠으며 당도 역시 높았는데 가을재배의 경우 생육초기 많은 수분이 필요하지만 기온이 낮아지면서 많은 수분을 필요로 하지 않기 때문에 오히려 관수량을 줄여야 하며 이로 인하여 낮은 수분조건에서 수박의 생육이 좋은 것으로 생각된다.

2014년 봄시험에서 Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 계통과 이들과 교배한 F<sub>1</sub> 계통들을 대목으로 이용하여 토양수분 함량별 과특성을 조사한 결과 WJ121-34-33을 대목으로 이용하여 재배한 수박이 16±2% 처리구를 제외하고 가장 무거웠다. 16±2% 처리구에서의 과중이 다른 처리구에 비해 가벼운 편이었고 24±2% 처리구에서의 과중이 전반적으로 가장 무거운 경향을 보였다. Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 대목은 토양수분조건을 16±2%로 하였을 때 생육초기부터 정상적인 생육이 어려웠고 모든 대목에서 착과초기 급격히 시들음이 발생하여 건조에 강한 특성을 보기가 어려웠다.

4차 년도 가을시험(2014년)은 수분함량을 24±2%, 28±2%, 32±2%, 36±2%로 조절하여 실험을 수행하였다. Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 계통과 이들과 교배한 F<sub>1</sub> 계통들의 토양수분 함량별 생육특성을 조사한 결과 K909350-4을 대목으로 이용하여 재배한 수박이 32±2%처리구를 제외하고 전반적으로 엽장과 엽폭이 다른 계통에 비하여 짧고 작은 경향을 보였다. 토양수분 함량별 과특성을 조사한 결과 WJ121-34-31×K909350을 대목으로 이용하여 재배한 수박이 3.3~4.2kg으로 과중이 다른 계통에 비해 대부분의 처리구에서 무거웠다. 당도는 처리별, 계통별 일정한 경향은 없었지만 전체적으로 볼 때 토양수분 함량이 높을수록 낮아지는 경향을 보였다.

2015년 봄 시험에서는 토양수분 함량별 생육특성을 조사한 결과 대부분의 처리구에서 K044733-1-3-1-2와 K909350-4를 대목으로 이용한 수박의 생육이 불량하였고 일부는 고사하

였다. 엽장과 엽폭은 전반적으로  $24\pm 2\%$ 에서 다른 처리구보다 짧고 좁았다. 과일 품질특성은 K044733-1-3-1-2을 대목으로 이용하여 재배한 수박이  $2.5\sim 4.9\text{kg}$ 으로 과중이 다른 계통에 비해 가벼웠으며, 참박대목인 불로장생을 이용하여 재배한 수박이 과중이 무거운 편이었으며 당도도 높았다.

Pep J1-1 유전자가 도입된 형질전환 계통은 기본식물이 공대이며, 공대의 특성은 참박대목에 비하여 저온에 약한 특성을 가지고 있다. 이 실험결과를 보면 봄재배시 형질전환체가 다른 야생형 수박대목, 그리고 공대계통을 활용하여 육성한 오작교 대목 모두 불로장생 대목에 비하여 과중이 낮은 경향을 보였으며, 고온기에 정식하는 가을재배의 경우 공대유래 형질전환 대목에서 생육이 비교적 양호한 결과를 보였다. CsGolS1 유전자가 도입된 식물체의 경우 초기 생육은 어느 정도 이루어졌으나 착과 후 생육이 나빠지거나 고사하여 과 품질까지 조사하기는 어려웠다. 그러나 다른 형질전환체나 형질전환체의  $F_1$  계통들은 시판 품종인 ‘오작교’ 대목과 비슷하거나 더 좋은 결과를 얻었다. 토양수분함량에 따른 생육 및 과일특성은 저온에서 고온으로 변하고 수분요구량이 많은 봄작형은  $36\pm 2\%$ , 생육초기는 고온에서 수분요구량이 많아지는 과실비대기에 저온으로 변하는 가을 작형은  $32\pm 2\%$ 에서 좋은 결과를 보여 작형별로 수분요구량이 다름을 알 수 있었다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1. 추가연구의 필요성 및 타 연구에의 활용

내재해성 및 내병성 형질전환 수박대목을 육성하기 위하여 고추 defensin(*PepJ1-1*)와 같은 항균활성을 지닌 유전자, 가뭄 및 고염과 같은 환경스트레스 내성 관련 오이 galactinol synthase1(*CsGolSI*) 유전자, 프롤린 생합성 관련 유전자(*LsRZF1*), 그리고 폴리아민 생합성 관련 유전자(*LsADC*, *LsSAMDC*) 등 다양한 유전자원을 활용한 수박 대목 형질전환체 생산 기술은 향후 내병성 및 내재해성 수박대목을 활용한 수박 재배기술 향상과 아직까지 국내에서 미흡한 박과작물 형질전환체 생산 기술에 활용할 수 있을 것이다. 또한 삼투조절물질(프롤린) 조절 기작연구는 식물 발달 최적화 시스템 개발 기술에 활용할 수 있을 뿐만 아니라, 스트레스 조건하에서 프롤린 유입 및 inter-organ 수송 조절 기작 연구에도 새로운 모델을 제시할 수 있을 것이다. 프롤린 대사 네트워크 연구 결과로 인하여 metabolic signaling, redox signaling, 프롤린과 flower transition 관계, embryo 발달 단계에서의 프롤린의 역할 등 프롤린의 생물학적 기능을 규명할 수 있을 것이며, 프롤린은 보습효과가 뛰어난 삼투조절물질로써 가뭄 및 저온 등 식물 환경스트레스에 대한 저항성 강화 식물을 개발하는 기술에 활용할 수 있을 것이다. 따라서 내재해성 강화 작물에 따른 작물의 수확량 개선 및 종자산업의 활성화를 유도할 수 있을 것이다. 특히 본 연구과정을 통해 그 기능이 확인된 *LsRZF1* 유비퀴틴에 따른 뿌리 생성 및 발달 조절 기작의 연구는 작물 뿌리 기능 개선 및 변형 기술에 적용할 수 있으리라 사료되어지며, 프롤린 합성 혹은 반응 관련 식물 발달 영향 연구는 식물 조직배양 기술 연구에 가속화 시킬 뿐만 아니라, 세포배양 기술 발달에 따른 이차대사산물 생산 분야에 새로운 전기가 이루어질 것으로 전망되어진다. 또한 *LsRZF1* 유비퀴틴 과정에 의해 조절되어지는 하부 유전자들의 분리 및 기능 연구를 통해 신 기능성 유전자 자원 확보 및 지적 재산을 보유할 수가 있고, 측근 발달 조절 기작의 연구는 미네랄과 물을 더 효율적으로 흡수할 수 있기 때문에 작물의 수확량을 개량할 수 있는 잠재력이 있을 것으로 본다. 또한, 식물유래 이차대사산물의 세포배양에 의한 대량 생산이 이룩됨으로써 인류가 당면하고 있는 인구 증가에 따른 식량부족, 환경오염 및 에너지 부족 등의 문제를 해결하는 데에 중요한 연구가 될 것이다. 또한 식물의 병저항성 및 건조 내성에 대한 프트레신의 역할을 밝힘으로써 폴리아민을 이용한 식물의 환경스트레스 내성 관련 기초 지식을 습득할 수 있으며 이는 농업 현장에서 응용화 될 수 있는 가능성이 있어 농업 생산성에 기여하게 될 것으로 생각된다. 다만 프트레신이 식물체 호르몬의 생성에 미치는 영향에 대한 추가연구가 수행되어진다면 식물체내에서 호르몬간의 상호작용에 대한 기초작료가 제공될 수 있을 것이며 폴리아민이 과다발현되는 형질전환체의 생산이 간으할 수 있으리라 생각한다. 그리고 건조에 강한 기후변화 대응용 형질전환 수박 대목의 개발은 관수량을 줄일 수 있어 농업용수를 절감과 관수노동력을 줄일 수 있고, 뿐만 아니라 다습한 환경에서 발생하는 병해충의 발생을 줄일 수 있어 방제에 필요한 약제 및 노동력의 절감으로 생산단가를 낮춰 수박재배 농가의 소득향상에 도움이 될 것으로 판단된다. 또한 작형별 적정 토양수분 조건을 밝힘으로써 과중 증가 및 품질 향상이 가능해져 고품질 수박을 생산할 수 있을 것으로 사료된다.

## 제 6 장 연구개발과정에서의 수집한 해외과학기술정보

세포 내 단백질 유비퀴틴 과정은 단백질 분해 및 상호결합작용, 효소 활성화 등을 통하여 신호 전달, 식물 발달, 노화 과정, cell cycle, 방어 기작 등을 조절하는 매우 중요한 post-translational modification 방법 중 하나이며, 많은 연구진들이 식물 환경스트레스에 대한 유비퀴틴 E3 ligase 단백질의 기능과 신호 전달 경로를 연구하고 있다. 현재까지 AtRZF1 단백질 유비퀴틴 과정에 의한 프롤린 대사과정 연구는 전혀 보고된 바 없으나, 본 연구를 통해 pca 돌연변이체 확보 및 기능 분석을 통해 프롤린 대사과정의 분자적 네트워크를 규명할 것으로 사료된다. 지난 수년간, 국내·외적으로 단순한 단백질의 cataloguing 작업이 아닌, protein-protein interaction, post-translational modification, 특정 조건에서의 proteom의 변화 양상 등 genome level에서 관찰하지 못하는 proteom의 특징적인 부분을 확인하는 방향으로 모든 기술적 지향성의 초점이 맞추어져 진행되고 있다. 단일 proteomics 수행방법의 기술적 응용도를 높여가고, 또한 개별적인 proteomics 수행 방법들 간의 결합 및 단백질에 대한 분리 차원 (dimension)을 획기적으로 늘리는 연구들이 진행되고 있으며, 이러한 단백질의 기능과 조절을 밝히는 직접적인 연구 분야로써 단백질의 생화학적 활성 분석 연구 분야, 단백질 상호작용과 복합체에 대한 연구 및 단백질 프로파일링이 필요할 것으로 사료된다.

## 제 7 장 연구시설·장비 현황: 해당사항 없음

## 제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

분자생물학적 분석 연구함에 있어서 방사성 동위원소를 사용함에 따라, 매년 연구원들이 방사선 안전교육을 참석하고 건강검진을 받도록 하고 있다. 또한, 대학의 연구종사자 안전교육 참석을 독려하고 관련 자료를 공개하고 있으며, 정기적으로 연구실 자체 안전점검을 실시하고 있다.

## 제 9 장 참고문헌

- [1] A. Delauney, D.P.S. Verma, Proline biosynthesis and osmoregulation in plants, *Plant J.* 4 (1993) 215-223.
- [2] P.D. Hare, W.A. Cress, J. Van Staden, Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction, *J. Exp. Bot.* 50 (1999) 413-434.
- [3] J.K. Zhu, Salt and drought stress signal transduction in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* 53 (2002) 247-273.
- [4] M. Koornneef, L. Bentsink, H. Hilhorst, Seed dormancy and germination, *Curr. Opin. Plant Biol.* 5 (2002) 33-36.
- [5] C.P. Song, M. Agarwal, M. Ohta, Y. Guo, U. Halfter, P. Wang, J.K. Zhu, Role of an Arabidopsis AP2/EREBP-type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses, *Plant Cell* 17 (2005) 2384-2396.
- [6] Y. Fujita, M. Fujita, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants, *J. Plant Res.* 124 (2011) 509 - 525.
- [7] B.T. Dye, B.A. Schulman, Structural mechanisms underlying posttranslational modification by ubiquitin-like proteins, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36 (2007) 131-150.
- [8] A. Craig, R. Ewan, J. Mesmar, V. Gudipati, A. Sadanandom, E3 ubiquitin ligases and plant innate immunity, *J. Exp. Bot.* 60 (2009) 1123-1132.
- [9] A. Santner, M. Estelle, Recent advances and emerging trends in plant hormone signaling, *Nature* 459 (2009) 1071-1078.
- [10] K. Marrocco, M. Bergdoll, P. Achard, M.C. Criqui, P. Genschik, (2010) Selective proteolysis sets the tempo of the cell cycle, *Curr. Opin. Plant Biol.* 13 (2010) 631 - 639.
- [11] M.Y. Ryu, S.K. Cho, W.T. Kim, The Arabidopsis C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>C<sub>3</sub>-type RING E3 ubiquitin ligase AtAIRP1 is a positive regulator of an abscisic acid-dependent response to drought stress, *Plant Physiol.* 154 (2010) 1983-1997.
- [12] P.S. Freemont, I.M. Hanson, J. Trowsdale, A novel cysteine-rich sequence motif, *Cell* 64 (1991) 483 - 484.
- [13] P.S. Freemont, Ubiquitination: RING for destruction?, *Curr. Biol.* 10 (2000) R84 - R87.
- [14] S.L. Stone, L.A. Williams, L.M. Farmer, R.D. Vierstra, J. Callis, KEEP ON GOING, a RING E3 ligase essential for Arabidopsis growth and development, is involved in abscisic acid signaling, *Plant Cell* 18 (2006) 3415 - 3428.
- [15] M. Peng, C. Hannam, H. Gu, Y.M. Bi, S.J. Rothstein, A mutation in NLA, which encodes a RING-type ubiquitin ligase, disrupts the adaptability of Arabidopsis to nitrogen limitation, *Plant J.* 50 (2007) 320 - 337.
- [16] Q. Bu, H. Li, Q. Zhao, H. Jiang, Q. Zhai, J. Zhang, X. Wu, J. Sun, Q. Xie, D. Wang,

- C. Li, The Arabidopsis RING finger E3 ligase RHA2a is a novel positive regulator of abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development, *Plant Physiol.* 150 (2009) 463 - 481.
- [17] Y. Huang, C.Y. Li, D.L. Pattison, W.M. Gray, S. Park, S.I. Gibson, SUGAR INSENSITIVE 3, a RING E3 ligase, is a new player in plant sugar response, *Plant Physiol.* 152 (2010) 1889 - 1900.
- [18] J. Yan, J. Wang, Q. Li, J.R. Hwang, C. Patterson, H. Zhang, AtCHIP, a U-box-containing E3 ubiquitin ligase, plays a critical role in temperature stress tolerance in Arabidopsis, *Plant Physiol.* 132 (2003) 861 - 869.
- [19] O.G. Smirnova, I.L. Stepanenko, V.K. Shumnyia, The role of the COP1, SPA, and PIF proteins in plant photomorphogenesis, *Biology Bulletin Reviews* 1 (2011) 314 - 324.
- [20] H.W. Ju, J.H. Min, M.S. Chung, C.S. Kim, The *atrzf1* mutation of the novel RING-type E3 ubiquitin ligase increases proline contents and enhances drought tolerance in Arabidopsis, *Plant Science* 203-204 (2013) 1-7.
- [21] R. Alcázar, F. Marco, J.C. Cuevas, M. Patron, A. Ferrando, P. Carrasco, A.F. Tiburcio, T. Altabella, Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress, *Biotechnol. Lett.* 28 (2006) 1867-1876.
- [22] S.S. Hussain, M. Ali, M. Ahmad, K.H.M. Siddique, Polyamine: Natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants, *Biotech. Advances*, 29 (2011) 300-311.
- [23] K. Urano, Y. Yoshida, T. Nanjo, T. Ito, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, *Arabidopsis* stress-inducible gene for arginine decarboxylase AtADC2 is required for accumulation of putresine in salt tolerance, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313 (2004) 369-375.
- [24] J.C. Cuevas, R. López-Cobollo, R. Alcázar, X. Zarza, C. Koncz, T. Altabella, J. Salinas, A.F. Tiburcio, A. Ferrando, Putrescine is involved in Arabidopsis freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature, *Plant Physiol.* 148 (2008) 1094-1105.
- [25] P. Meng, S. Yang, C. Shen, K. Jiang, M. Rong, R. Lai. The first salamander defensin antimicrobial peptide, *PloS one* 8(12) (2013) e83044.
- [26] M. Tesfaye, K.A. Silverstein, S. Nallu, L. Wang, C.J. Botanga, S.K. Gomez, L.M. Costa, M.J. Harrison, D.A. Samac, J. Glazebrook, F. Katagiri, G. Marcos, F. Jose, K. Vandenbosch. Spatio-temporal expression patterns of Arabidopsis thaliana and Medicago truncatula defensin-like genes, *PloS one* 8(3) (2013) e58992.
- [27] D.T. Le, R. Nishiyama, Y. Watanabe, R. Vankova, M. Tanaka, M. Seki, L.H. Ham, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, L.S.P. Tran, C. Schönbach. Identification and Expression Analysis of Cytokinin Metabolic Genes in Soybean under Normal and Drought Conditions in Relation to Cytokinin Levels (Cytokinin Metabolism in Soybean under Drought, 7(8) (2012) e42411.
- [28] C. Zhuo, T. Wang, S. Lu, Y. Zhao, X. Li, Z. Guo. A cold responsive galactinol synthase gene from Medicago falcata(MfGolS1) is induced by myo inositol and confers

- multiple tolerances to abiotic stresses, *Physiologia Plantarum* 149(1) (2013) 67–78.
- [29] G. Lidor, B.A. Julius, T. Robert, W. Shmuel. Effect of CMV infection and high temperatures on the enzymes involved in raffinose family oligosaccharide biosynthesis in melon plants. *Journal of Plant Physiol.* 169(10) (2012) 965–970.
- [30] J. Pillet, A. Egert, P. Pieri, F. Lecourieux, C. Kappel, J. Charon, E. Gomès, F. Keller, S. Delrot and D. Lecourieux. VvGOLS1 and VvHsfA2 are Involved in the Heat Stress Responses in Grapevine Berries, *Plant and Cell Physiol.* 53(10) (2012) 1776–1792.
- [31] G. Ana M, Blanca, S. Raquel N, B. Lorenzo, A. Miguel A. and T. Verónica. Melon RNA interference (RNAi) lines silenced for CmeIF4E show broad virus resistance, *Mol. Plant Pathol.* 13(7)(2012) 755–763.
- [32] Y. Lin, H.M. Ku, Y.H. Chiang, H.Y. Ho, T.A. Yu and F.J. Jan. Development of transgenic watermelon resistant to Cucumber mosaic virus and Watermelon mosaic virus by using a single chimeric transgene construct, *Transgenic Research* 21(5)(2012) 983–993.
- [33] N. Ling, W. Zhang, D. Wang, J. Mao, Q. Huang, S. Guo, Q. Shen. Root exudates from grafted-root watermelon showed a certain contribution in inhibiting *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum, *PloS one* 8(5) (2013) e63383.

## <첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

### 1. 특허

구 분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등 록			기 타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
발명특허	오이유래 CsGolS 유전자를 이용한 고온 또는 염에 대한 내성이 증진된 형질전환식물체 및 이의 용도	대한민국	전남 과학대학교 산학협력단	2014. 06. 10	제10-2014-0070259				

### 2. 논문게재

게재 연도	논문명	저자			학술지 명	Vol.(No.)	국내 외 구분	SCI구 분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	Overexpression of L-type lectin-like protein kinase1 confers pathogen resistance and regulates salinity response in Arabidopsis thaliana	Ping Huang	Cheol Soo Kim	Hyun-Woo Ju, Ji-Hee Min, Xia Zhang, Su-HyunKim, Kwang-Yeol Yang	Plant Science	203-204	국외	SCI
2013	Putrescine regulating by stress-responsive MAPK cascade contributes to pathogen defense in Arabidopsis	Su-Hyun Kim	Kwang-Yeol Yang	Sun-Hwa Kim, Seung-Jin Yoo, Kwang-Hyun Min, Seung-Hee Nam, Baik Ho Cho	BBRC	437(4)	국외	SCI

계재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내 외 구분	SCI구 분
		주저자	교신저 자	공동저자				
2013	Effect of heat treatment around the fruit set region on growth and yield of watermelon [ <i>Citrullus lanatus</i> (Thunb.) Matsum. and Nakai]	Jaejong Noh	Jaejong Noh	Jeong Man Kim, Sameena Sheikh, So Geun Lee, Jeong Hyeon Lim, Moon Ho Seong, Gi Tai Jung	Physiology and Molecular Biology of Plants	19(4)	국외	비SCI
2014	Heterologous expression of the gourd E3 ubiquitin ligase gene LsRZF1 compromises the drought stress tolerance in <i>Arabidopsis thaliana</i>	Ji-Hee Min	Cheol Soo Kim	Hyun-Woo Jua, Kwang-Yeol Yang, Jung-Sung Chung, Baik-Ho Cho	Plant Physiology and Biochemistry	77	국외	SCI
2014	Involvement of the OsMKK4-OsMPK1 cascade and its downstream transcription factor OsWRKY53 in the wounding response in rice	Seung Jin Yoo	Kwang-Yeol Yang	Su-Hyun Kim, Min-Jeong Kim, Choong Min Ryu, Yeong Cheol Kim, Baik Ho Cho	Plant Pathology Journal	30(2)	국내	SCIE
2014	Occurrence of Diseases and Case of Clinical Diagnosis on Watermelon in South Korea, 2008-2012	Jaejong Noh	Jaejong Noh	Ju-Hee Kim, Jeong Hyeon Lim, Tae Bok kim, Mun Ho Seong, Gi Tai Jung, Jeong Man Kim, Seong-Soo Cheong, Nam Ki Oh, Wang-Hyu Lee	Research in Plant Disease	20(1)	국내	비SCI
2014	Effect of Plant Growth Regulators on Regeneration from the Cotyledon Explants in Watermelon ( <i>Citrullus lanatus</i> (thunb.) Matsum. & Nakai)	Song-Mi cho	Song-Mi cho	Sang Bin Park, Sang A Oh, Yong Soo Choi	한국자원 식물학회지	27(1)	국내	비SCI

### 3. 시장분석 보고서

#### 1) 국내 제품생산 및 시장 현황

작물명	품종명칭등록	품종보호권등록품종
대목용 박	142	2
수박	553	52
대목용 수박	2	2
형질전환 수박	0	0

※ 자료출처 : 국립종자원 홈페이지

#### 2) 국외 제품생산 및 시장 현황

Field trails of GM(GM 수박의 포장시험)

	EU	Worldwide
Applications	1	14
Country	Italy	USA
Period	1999	1994-2006
Traits	Yield increases	Virus resistance, seedless fruits
Perspectives	No immediate commercial use of GM-water melon is expected	

※ 자료출처 : [http://www.gmo-compass.org/eng/database/plants/72.water\\_melon.html](http://www.gmo-compass.org/eng/database/plants/72.water_melon.html)

## 주 의

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