

발간등록번호

11-1543000-001500-01

# 농생명산업기술개발 R&D Report

안전성과

상품성을

확보한

기후변화

저항성

벼 품종

개발

최종보고서

2016

농림축산식품부

## 안전성과 상품성을 확보한 기후변화 저항성 벼 품종 개발 최종보고서

2016.12.19.

주관연구기관 / 서울대학교

농림축산식품부

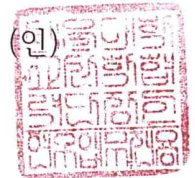
# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “안전성과 상품성을 확보한 기후변화 저항성 벼 품종 개발”(개발기간 : 2011.09. ~ 2016.09.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016. 12. 19.

주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단장



주관연구책임자 : 정종주

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라  
보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	111076-5	해당단계 연구기간	2011.09.23.- 2016.09.22	단계구분	1 / 1
연구사업명	중사업명				
	세부사업명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	안전성과 상품성을 확보한 기후변화 저항성 벼 품종 개발			
연구책임자	정종주	해당단계 참여 연구원 수	총: 26명 내부: 15명 외부: 11명	해당단계 연구개발비	정부:450,000천원 민간:     천원 계:450,000천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총:26명 내부:15명 외부:11명	총연구개발비	정부:450,000천원 민간:     천원 계: 450,000천원
연구기관명 및 소속부서명	서울대학교 식품바이오융합연구소			참여기업명	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
<b>요약</b> ○ 애기장대 유전자 <i>AtMYB44</i> 를 벼에 전이하여 가뭄저항성이 크게 향상된 형질전환 식물체 3 라인을 개발하였다. ○ 전이 대상 품종을 현재 재배, 유통 중인 일미벼로 하여 차후 교배과정 없이 그대로 상품성을 유지하도록 하였다. ○ 전이과정에 필요한 선별유전자로서 toxoflavin lyase 유전자인 <i>tflA</i> 를 사용함으로써 안전성에 대한 소비자들의 불안과 우려를 최소화하도록 하였다. ○ 향후 안전성 시험과 품종 등록을 추진하여 실용화함으로써, 급격히 진행되고 있는 기후변화에 대한 대비책으로 활용할 수 있기를 기대하고 있다.				보고서 면수	50

## 요 약

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<p>본 연구과제의 최종목표는 기후변화로부터 오는 환경스트레스에 대하여 저항성이 강화된 형질전환 벼를 개발하는데 있다. 상품성을 최대한 확보하기 위하여 국내 유통 중인 벼 품종을 대상으로 하며, 다른 대사에 영향을 주지 않고 특이적으로 가뭄저항성을 부여하는 기능이 검증된 애기장대 유전자를 목적유전자로 사용한다. 항생제 또는 제초제 저항성 유전자가 아닌 국내에서 개발한 선별 마커를 사용함으로써 안전성에 대한 우려와 국제 지적재산권 분쟁의 야기 가능성을 최소화 한다.</p>					
연구개발성과	<p>애기장대 전사인자 유전자 <i>AtMYB44</i>를 아그로박테리움 전이방법을 이용하여 벼(품종 일미)에 전이하였다. 전이용 T-DNA는 toxoflavin 분해효소를 암호화하는 <i>tflA</i> 유전자를 포함하도록 제작하였다. Toxoflavin은 빛에 의하여 활성화되는 식물독소이므로, 유전자전이가 이루어진 식물체를 암소에서 발아시킨 후 빛을 공급함에 따라 관찰할 수 있는 뿌리발달 저항성의 수준을 기준으로 하여 성공적인 전이 식물체를 선별하였다. 각 식물체 별로 전이유전자의 삽입 여부, 발현량, 삽입 개수 등을 측정함으로써 동질접합체 라인을 확정하였다. Adaptor-ligation PCR을 시행하여 얻은 DNA 조각의 측위 염기서열을 공개된 web 도구를 사용하여 분석함으로써 전이 T-DNA의 염색체 상 위치를 조사하여, 유전자 간(intergenic) 전이위치가 확인된 3라인의 벼를 선발하였다. 이들 형질전환 벼들은 발아 생장 시킨 후 3일 간 수분공급을 중단하였을 때 비전이 야생형 벼(0-10%)에 비하여 매우 높은(50-100%) 생존율을 보였다. 포장에서 재배하여 수확한 유전자 전이 벼들은 야생형 비전이 벼에 비하여 발달과정이나 농업형질, 그리고 종자의 생화학적 일반성분, 아미노산 및 지방산 조성에서 큰 변화를 보이지 않았다.</p>					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>가뭄(저수분, 염분 농도 증가) 스트레스에 대한 내재해성 형질을 확보한 형질전환 벼 품종 개발에 응용함으로써 농업생산 기반의 안정을 기대할 수 있다. 유용한 형질전환 작물의 개발은 가까운 미래의 국제 경쟁력 제고에 대한 적극적인 전략방안이 된다. 단위면적 당 생산 효율을 높여 농지면적 감소에 대한 대안이 될 수 있다. 본 과제 수행으로 개발된 형질전환 벼는 항생제 또는 제초제 저항성 선별 마커나 GUS 보고유전자가 없으므로 유전자변형 작물 및 식품에 대한 소비자들의 불신과 우려를 불식시킬 수 있다. 우리나라 고유의 품종의 벼를 모본으로 하였고 국내에서 개발한 선별마커를 사용하였으므로 국제적 지적재산권 분쟁을 최대한 피할 수 있다. 향후 식품 및 환경 안전성 시험 단계를 거쳐 품종 등록을 통한 상품화 단계로 진입하도록 추진할 계획이다.</p>					
중심어 (5개 이내)	기후변화 저항성	벼	유전자 전이	안전성	상품성	

## 〈 SUMMARY 〉

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	<p>The aim of this research project was to develop our own marketable and stress-tolerant genetically modified (GM) rice lines by transforming a gene that confers a climate change stress-tolerance response without affecting other aspects of the metabolism, and using a none-antibiotic or herbicide selection system that avoids an apprehension for safety and an international conflict over intellectual property rights.</p>					
Results	<p>The <i>Arabidopsis</i> transcription factor gene <i>AtMYB44</i> was transformed into rice plants (cv. Ilmi) using the <i>Agrobacterium</i>-mediated procedure. The T-DNA construct used contained <i>tflA</i> cDNA encoding a toxoflavin lyase. Toxoflavin is a photosensitizing phytotoxin, and thus transgenic plantlets were selected based on their tolerance for root development under light conditions. Three homozygous lines with successful transformation were confirmed by determining the integration, expression level and copy number of the <i>AtMYB44</i> gene. Genomic locations of the inserted T-DNA were determined by adaptor-ligation PCR and analysis using an open access web tool used to localize the flanking sequences of the transgene. Transgenic lines with successful intergenic transformation of <i>AtMYB44</i> exhibited significantly enhanced tolerance to drought stress compared with wild-type plants. The <i>AtMYB44</i>-transgenic lines (50-100%) had higher survival rates than wild-type plants (0-10%) during 3 days of water deprivation. In a field growth test, none of the <i>AtMYB44</i>-transgenic lines showed a difference in developmental progression compared with wild-type plants. Seeds of the transgenic lines showed little, if any, difference in chemical composition, amino acid content, and fatty acid composition.</p>					
Expected Contribution	<p>The transgenic rice plants developed in this research project will increase agricultural productivity under extreme drought conditions caused by climate change. Further, by creating novel breeds with important agronomic traits, national competitiveness in the international seed market will be increased. The transgenic plants contain no antibiotics- or herbicide-resistance selection marker and GUS reporter genes, to overcome consumer distrust and worry related to genetically modified (GM) crops and foods. In addition, application of the mother crop variety (Ilmi) and the <i>tflA</i>-toxoflavin selection system developed in our country would make us to avoid conflicts with patents possessed by foreign entities. The transgenic crops obtained from this research project would be subjected to food and environmental safety tests in preparation for commercialization.</p>					
Keywords	climate-change tolerance	rice	gene transformation	safety	marketability	

# CONTENTS

1. Outline of the research project .....	7
2. Current status of the related research area .....	9
3. Content and results of the research project .....	11
4. Accomplishments and contributions to the related research area	41
5. Prospective for the future .....	43
6. Overseas information collected during the research period .....	44
7. Security grade of outcome of the research project .....	47
8. Research facilities and equipments registered in the National Science and Technology Information System .....	47
9. Performance record of safety conduct for the research project ...	48
10. Representative achievement of the research project .....	49
11. The other subjects .....	49
12. References .....	50

## 〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의개요 .....	7
2. 국내외 기술개발 현황 .....	9
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	11
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	41
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	43
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	44
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	47
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	47
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	48
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	49
11. 기타사항 .....	49
12. 참고문헌 .....	50

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

코드번호

D-03

## 제 1 절 연구개발 목적

- 안전성과 상품성을 최대한 확보하면서, 극심한 가뭄(한발, drought) 등 기후변화로부터 오는 환경스트레스에 대하여 저항성이 강화된 형질전환 벼 품종을 개발한다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

- 지구 온난화 등 기후변화와 이에 따른 작물재배 환경의 파괴는 우리나라 뿐 만 아니라 세계적인 추세로서, 긴박하게 해결책을 모색해야 하는 중대 과제로 부상하고 있다. 급격한 세계적 인구증가 추세에 반하여, 지구 기후 및 생태환경 변화와 경지면적의 감소로 식량 확보는 점차로 심각한 위기에 처하게 되었다. 세계주요 곡물의 연간 생산량의 증가율은 1970년대를 정점으로 이후 해마다 둔화되었으며, 이를 극복하기 위한 전통적 육종은 그 한계에 이르렀다. 이에 따라 생산효율의 증가를 위한 새로운 농업형질의 품종을 개발하기 위한 연구가 절실히 요구되고 있다.
- 특히 세계적인 추세를 살펴보면, 2030년경에는 최악의 식량난이 예상된다. 현재 개발도상국은 인구증가와 소득수준 향상으로 식량 수요가 계속 증가하고 있으며, 선진국들 또한 저출산에 따른 노동력 감소, 산업시설 확충에 따른 농지의 감소 등으로 식량 생산량이 매년 줄어들고 있다. 2030년경의 식량난은 무엇보다도 지구온난화로 인한 자연 재해 및 생산량 감소가 요인이 될 것으로 분석된다. 따라서 온난화를 대비한 가뭄, 염해, 냉해 등 기후변화로부터 오는 다양한 환경스트레스에 대하여 저항성이 강한 작물 품종의 개발을 통해 식량난을 미리 대비해야 한다.
- 최근 유용유전자 이식을 통한 형질전환 기술의 적용이 식량작물에 대해서도 보편화 되었고, 21세기 식량문제 해결에 밑거름이 될 것으로 전망된다. 이러한 추세에 편승하여, 생명공학 기법을 통하여 다양한 환경스트레스 저항성 유전자를 전이함으로써 가뭄, 염해 등 광범위한 환경재해에 대하여 그 영향을 최소화할 수 있는 품종을 개발하고자 하는 연구가 세계적으로 활발히 진행되고 있다.
- 단지 작물에의 유용유전자 이식 기술 적용에 있어 선별마커로 사용하는 항생제 및 제초제 저항성 유전자에 의해 야기되는 소비자들의 안전성 불안과 우려가 매우 큰 논쟁의 대상이 되어 있다. 그리고 실험용 품종에 대한 소비자 기호도 등의 문제가 현실화 되어 있으며, 이를 극복하기 위해서 개발한 GM품종과 상품성 품종과의 교배를 시도하게 되는데 너무 많은 시간을 요하는 기술적인 문제가 있다. 그러므로 상품성이 충분히 있는 품종의 벼로부터 callus를 제작하고, 여기에 다른 대사를 교란시키지 않으면서 특이 저항성 반응만을 부여할 수 있는 우리 고유 특허의 유전자를 전이하는 일이 매우 중요하다.
- 그리고 국제적으로 종자전쟁이라고 할 만큼 경쟁이 심화되어 있어, 유전자 자체 및 선별마커 등에 대한 세계 각국의 지적재산권 행사를 피하기 위하여 우리 고유의 유전자와 전이기술을 사용하고자 하는 개발 노력이 절실한 시점이다.



### 제 3 절 연구개발 범위

- 저항성 기능이 검증된 애기장대(Arabidopsis) 전사인자 유전자 *AtMYB44*를 사용한다. 본 연구실에서 *AtMYB44* 과발현 애기장대 형질전환체를 제작하여, 이 식물체가 ABA에 의한 기공 폐쇄(stomatal closure) 속도 향상을 보이며, 그 결과로 가뭄 및 염해에 대한 뚜렷한 저항성 증진 현상을 보이는 것을 관찰하였다(Jung et al., 2008).
- *AtMYB44* 전사인자 유전자를 전이하여 형질전환 시킨 콩(soybean)도 현저하게 향상된 가뭄 및 염분 저항성을 보임을 확인하였다(Seo et al., 2012). 형질전환 콩의 아미노산 및 지방산 조성은 크게 변화하지 않았다. 이는 발현된 *AtMYB44*가 다른 대사에는 영향을 미치지 않고, 저항성 반응에 관여하는 유전자들 만 특이하게 발현시킨 것으로 해석된다.
- 위에 언급한 애기장대와 콩은 쌍떡잎(dicot)식물인데 반하여 벼는 외떡잎(monocot)식물이다. 이 두 부류의 식물은 일반적인 생리나 분자생물학적 세포반응이 확연하게 다르다. 본 연구에서는 애기장대 유전자를 벼에 전이하여 가뭄저항성이라는 동일한 세포반응을 유도하는데 목적을 두고 과제를 수행하였다. 애기장대의 경우에는 전이유전자를 탑재한 아그로박테리움을 종자형성 시기에 감염시키는 방법을 사용하며, 콩 유전자 전이에서는 떡잎마디(cotyledonary node)에 감염시켰다. 이에 반하여 벼의 경우에는 벼 무정형 조직인 callus를 제작하여 이에 아그로박테리움을 처리하는 방법을 사용하기로 하였다.
- 벼의 경우 일반적으로 높은 유전자 전이효율(transformation efficiency)과 성공적인 재생과정(regeneration)의 효율을 높일 목적으로, 전이에 적합한 품종인 동진벼, 낙동벼 등을 사용하여 전이실험을 수행한다. 성공할 경우 다른 상품성 품종과 수년간의 전통식 교배를 통하여 원하는 형질의 새 품종을 얻게 된다. 본 연구에서는 현재 농가에서 재배되고 시장에서 유통되고 있는 '일미벼'에 직접 전이를 시도함으로써 상품성을 유지하도록 한다.
- 유전자 전이 과정에는 성공적으로 전이가 이루어진 세포만을 선발하는 선별과정(selection)이 필요하게 된다. 현재 대부분의 경우 제초제 저항성 유전자인 *bar*를 선별마커로 사용하고 있다. 이 유전자의 경우 지적재산권 지정기간은 종료되어 높은 특허비용 지출 문제는 해결되었으나, 최근 제초제 저항성 마커에 대한 소비자들의 막연한 불안감이 주는 안정성 시비의 소지가 있다. 본 제안과제 연구에서는 *tflA* 유전자(Koh et al., 2010)를 선별마커로 사용하고자 한다. 이 유전자가 성공적으로 이입된 식물체는 toxoflavin이 함유된 배지에서 이 독소를 분해하게 되어 생존하게 된다. 이 유전자를 이용하게 되면 제초제 및 항생제 저항성 유전자에 대한 거부감을 완화할 수 있고, 외국 기업과의 지적재산권 문제에 대한 쟁의의 부담을 줄일 수 있게 된다.
- 벼의 유전자 전이, 종자 파종, 재배 및 수확 등 일련의 실험을 효율적으로 수행하기 위하여 이 분야 전문가인 명지대학교 생물정보학부 송상익 교수 연구팀을 과제에 참여시켰다. 형질전환 GM벼를 실제 포장에 파종하고 규모 있는 실험재배를 수행하면서, 발달과정, 수확량 등을 면밀히 점검하는 단계가 필요하다. 포장시험은 경상북도 군위에 소재한 경북대학교 GM포장의 협조를 얻어 수행할 계획이다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04
------	------

### 제 1 절 생명공학을 통한 분자 육종

- 동종 식물 간의 교배(intra-species cross)에 의존한 품종 개발 방법은 유전자원의 고갈로 한계에 이르렀다. 최근 유용유전자 이식을 통한 형질전환 기술의 적용이 식량작물에 대해서도 보편화 되어, 21세기 식량문제 해결에 밑거름이 될 것으로 전망된다. 이러한 추세에 편승하여, 생명공학 기법을 통하여 다양한 환경스트레스 저항성 유전자를 전이함으로써 한발, 염해 등 광범위한 환경재해에 대하여 그 영향을 최소화할 수 있는 품종을 개발하고자 하는 연구가 세계적으로 활발히 진행되고 있다.
- 생명공학을 통하여 개발된 일부 유전자변형(GM) 작물은 1996년부터 상품화되었고, 최근 들어 그 개발과 보급이 급진전을 이루어 2015년에는 세계적으로 1억7,970만 (179.7 million) ha에 이르는 경지 면적에서 재배되었다(James, 2015). 이는 생명공학작물의 상업화가 처음 시작된 1996년의 170만 헥타르에서 100배 이상 증가한 수치이다.
- 2015년 유전자변형 작물별 재배 면적 현황을 보면, 콩이 9,210만 ha로서 세계 총 재배 면적 1억7,910만 ha 중 51%를 차지하였으며, 옥수수 5,360만 ha (30%), 면화 2,400만 ha (13%), 카놀라 850만 ha (5%)의 순서였다. 전체 재배면적 중 GM 품목이 차지하는 비중은 콩의 경우 83%, 면화가 75%, 옥수수는 29%, 그리고 카놀라는 24%로 나타났다.

### 제 2 절 유전자변형(GM) 작물의 개발 효과

- ISAAA(James, 2014)의 자료에 따르면, 2014년 새롭게 실시된 글로벌 메타분석을 통해 지난 20년간 생명공학작물이 여러가지 중요한 혜택을 제공하였음이 확인되었다. 전세계의 147개 생명공학관련 연구논문을 메타분석한 결과 지난 20년간 “생명공학기술 채택으로 인해 평균 농약사용이 37% 절감되었고, 수확량이 22% 증가했으며, 농가 수익은 68% 증대되었다”는 것이 확인되었다.
- 최신 임시 데이터는1996년부터 2013년까지 생명공학작물이 식량안보, 지속가능성 그리고 환경 및 기후변화에 다음과 같이 기여하였음을 보여주었다. 즉, 1,330억 달러 규모의 작물생산 가치 향상; 1996년부터 2012년까지 유효성분기준으로 약 5억 kg의 농약사용 절감으로 더 나은 환경 제공; 2013년 단독으로 최대 1,240만대의 차가 일년간 도로에 달리는 것에 상응하는 이산화탄소 양인 280억 kg의 이산화탄소 배출 감소; 1996년부터 2013년까지 1억 3,200만 헥타르 상당의 토지를 지켜냄으로써 생물다양성 보존; 그리고 전세계 6,500만 이상에 달하는 최빈곤층의 일부인 1,650만 명 이상의 영세농업인구를 도와 빈곤 완화에 기여한 것 등이다. 생명공학작물은 꼭 필요한 것이지만 모든 문제의 해결책은 아니므로, 관행작물의 재배 시와 마찬가지로 윤작 및 저항성관리 등의 이로운 농법을 병행하는 것도 중요하다.
- 개발도상국과 산업 선진국 시장 모두에서 주요작물의 채택율(90-100%)이 이미 높기 때

문에 연간수익 증가가 조심스럽지만 낙관적으로 예측되고 있다. 미래 파이프라인은 향후 5년 내에 이용 가능한 새로운 생명공학작물로 가득하며, 70여개 이상의 상업화 가능성 품목의 목록은 ISAAA보고서에 수록되어 있다. 여기에는 새롭고 다양한 작물과 형질이 포함되어 있고, 병해충 저항성 및 제초제 내성 특징을 모두 가진 품목들도 포함되어 있다. 황금쌀의 포장시험이 진행되고 있으며, 방글라데시, 인도네시아, 인도에서는 감자역병 저항성 감자의 포장시험이 진행되고 있다. 미국에서는 이미 Simplot사가 역병 저항성과 저환원당의 특징을 가진 Innate™감자에 대한 승인요청을 한 상태이다. 특히 아프리카에서는 영양강화 바나나와 해충저항성 동부콩 등 빈곤 경감 작물의 전망이 밝아 보인다. 민관 협력(Public-Private Partnership; PPP)을 통한 생명공학작물의 개발 및 승인이 비교적 성공적으로 이루어졌으며, 네 개의 민관협력(Public-Private Partnership) 사례연구(남쪽에 위치한 세 개 대륙의 여러 작물과 형질에 대해 다루고 있음) 내용 또한 ISAAA 보고서에서 찾아 볼 수 있다.

### 제 3 절 형질전환 벼 개발

- 현재 연간 세계 벼 생산량은 약 6억t으로서 1966년 2억5700만t에 비하여 2배를 훨씬 넘어섰다. 이는 많은 벼 육종학자들의 노력의 결실로 평가 받고 있다. 이러한 벼 생산의 증가는 쌀을 주식으로 삼고 있는 아시아지역 저개발 국가들의 기아문제 해결에 큰 역할을 했다. 그러나 저개발 국가들은 아직도 기아에 허덕이고 있으며, 현재 수요를 가늠하기 어려울 만큼 심각한 식량난에 빠져 있다. 아프리카, 중국내륙 등은 온난화 등 기후변화에 의한 토양의 사막화가 진행되어 주곡인 쌀이나 밀은 고사하고, 구황작물에 대한 생산도 기대하기가 어려운 실정이다.
- 개발도상국은 인구증가와 소득수준 향상으로 식량 수요가 계속 증가하고 있으며, 선진국들은 저출산에 따른 노동력 감소, 산업시설 확충에 따른 농지의 감소 등으로 식량 생산량이 매년 줄어들고 있다. 2008년 발생한 아시아 등 저개발 국가의 식량난은 미국의 바이오연료 정책과 식량거래과정에서 큰 이익을 챙기려는 투기자본들의 잘못된 행위로 촉발되었던 것으로 분석하고 있다.
- 전문가들은 2030년경에 최악의 식량난이 도래할 것으로 예상하고 있다. 예상되는 미래의 식량난은 기후변화와 지구온난화로 인한 자연 재해 및 생산량 감소와 앞에서 지적한 수요증가 등 복합적인 요인이 작용 할 것으로 보고 있다. 세계 각국의 식량생산과 관련된 연구를 진행하고 있는 기관들은 2030년을 대비 부단히 노력을 경주하고 있다. 특히 지구 온난화를 대비한 기후변화에 강한 작물, 재해에 강한 품종 육성과 초다수성 품종의 개발을 통해 식량난을 미리 대비하고 있다.
- 현재 유전자자변형을 통한 GM벼의 개발은 세계적으로 매우 활발하게 진행되고 있다. 비타민A를 강화할 수 있는 황금쌀, 가뭄저항성 슈퍼벼 등 많은 개발 결과들이 발표되고 있다. 그러나 모두 연구결과 발표와 실용화를 위한 단계에 있으며 실제 재배되어 상품화 된 경우는 없다.

### 제 3 장 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

#### 제 1 절 유전자 전이용 DNA construct 제작

##### 1. DNA construct 제작

형질전환을 위한 DNA construct는 LMO 안전성과 지적재산권 문제를 고려하여 설계 (design)하였다. 전이 목적유전자로서 본 연구실에 특허권이 기 확보 되어 있는 애기장대 *AtMYB44* 유전자 (Jung et al., 2008) cDNA를 증폭하여 사용하였다.

목적유전자에 융합한 프로모터(promoter)는 특허권이 2014년 소멸되는 CaMV35S 프로모터를 사용하였다. 정지신호(terminator)로 사용한 Tnos도 특허권이 2011년에 소멸되었다. CaMV35S 프로모터에 의한 과발현이 *AtMYB44*의 특이 기능에 영향을 주지 않음을 콩 형질 전환 연구에서 관찰하였다(Seo et al., 2012). 선별마커는 toxoflavin 저항성 유전자인 *tflA*를 사용하였다.

기본 vector는 royalty 문제가 없는 pCAMBIA1300 벡터를 일부 변형한 pCAMLA 벡터를 서울대학교 농생명공학부 황인규 교수로부터 얻어 사용하였다. pCAMLA는 T-DNA 내부에 hygromycin phosphotransferase) 저항성 유전자 ( $Hyg^R$ )를 포함하고 있으며 T-DNA 외부에 카나마이신(kanamycin) 저항성 유전자를 갖고 있다. 그리고 Right border 쪽 35S에 연결된 MCS (multi-cloning sites)에는 제한효소 절단 염기서열인 *XbaI*, *BamHI*, *SmaI*, *KpnI*, *SacI* 이 있다. 본 연구에서는 이 벡터를 제한 효소 *XbaI*과 *XpnI*으로 절단하고, 이 부위에 5' 쪽에 *XbaI* 절단서열, 3' 쪽에 *XpnI* 절단서열을 가진 *AtMYB44* 유전자를 PCR로 증폭하여 결합(ligation)하였다. *AtMYB44*-pCAMLA를 제한효소 *XhoI*으로 절단하고 이 부위에 *XhoI* 절단염기서열을 양측 말단에 갖도록 증폭한 *tflA* 유전자를 결합(ligation)하였다. 완성된 DNA construct는 그림 1과 같다.

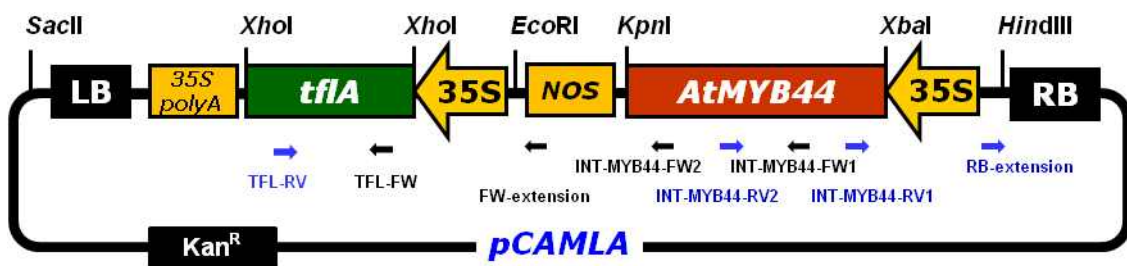


그림 1. *tflA:AtMYB44* construct

##### 2. DNA construct 염기서열 확인

삽입한 유전자 insert들의 염기서열을 분석하여 정확한 DNA construct의 완성을 확인하

였다. 정방향, 역방향의 primer들을 합성하여 염기서열 분석을 시행한 후, 각 염기서열 분석 결과를 BLAST하여 해당 유전자의 염기서열 정확도를 확인하였다. *AtMYB44*의 AGI number는 At5g67300 이다. 결과로서 *AtMYB44* 및 *tflA* 유전자의 정확도와 결합 부위, 그리고 주변 vector 염기서열의 정확도를 확인하였다. 아래 염기서열(그림 2)에서 insert DNA의 염기서열은 굵은 (bold) 활자를, vector 염기서열은 일반 활자를 사용하였고, 제한효소 *XbaI* (TCTAGA), *KpnI* (GGTACC), *XhoI* (CTCGAG)는 밑줄로 표시하였다. 염기서열 분석에 사용한 primer 들의 염기서열은 아래 표 1에 정리하였다.

>pMYB44-Tf1A-CAMBIA

AAATGGACGAACGGATAAACCTTTTCACGCCCTTTTAAATATCCGTTATTCTAATAAACGCTCTTTTCTCTCTAGGTTTAC**TAAACGCTCTTTTCTCTTAGGTTTAC**CCGCCAATATATCCTGTCAAACACTGATAGTTTAACTGAAGGCGGGAAACGACAATCTGATCCAAGCTCAAGCTGCTCTAGCATTCCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCAAGGCTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCTGCAGGTCCCCAGATTAGCCTTTCAATTTAGAAAAGATGCTAACCACAGATGGTTAGAGAGGCTTACGCAGCAGGTCTCATCAAGACGATACCCGAGCAATAATCTCCAGGAAATCAAATACCTTCCCAAGAAAGTTAAAGATGCAGTCAAAAGATTCAGGACTAACTGCATCAAGAACACAGAGAAAGATATATTTCTCAAGATCAGAAGTACTATTCCAGTATGGACGATTCAAGGCTTGCCTCACAAACCAAGGCAAGTAATAGAGATTGGAGTCTCTAAAAAGGTAGTTCCCACTGAATCAAAGGCCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGAGGACCTAACAGAACTCGCCGTAAAGACTGGCGAACAGTTCATACAGAGTCTCTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTTCGTC AAC**ATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTGGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCACGAGGAGCATCGTGGAAAAA GAAGACGTTCCAACCACGCTTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCCTATCCTTCGCAAGACCTTCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGAACACGGGGACT**TCTAGA**ATGGCTGATAGGATCAAAGGTCCATGGAGT**CCTGAAGAAGACGAGCAGCTTCGTAGGCTTGTTGTTAAATACGGTCCAAGAACTGGACAGTATTAGCAATCTATTC**CCGGTAGATCGGGAAATCGTGT**CGTTACGGTGGTGCAACCAGCTTTCGGTCAAGTTGAGCATCGGCCGTTTTTCGGCTGAGGAAGACGAGCATCGCAGCTCAGCTCAGTTCGGTAATAAATGGGCGACGATTGCTCGTCTTCAACGGTCGTACGGACAACGCCGTGAAGAATCAC**TGGA**ACTCGACGCTCAAGAGGAAATGCGGCGGTTACGACCATCGGGTTACGATGGTTCGGAGGATCATCGGCCGGTTAAGAGATCGGTGAGTGC**GGGATCTCCACTGTTGTTACTGGGCTTTACATGAGCCCAGGAAGCCCAACTGGATCTGATGTCAGT**GATTCAAGTACTATCCC**GATATTACCTTCCGTTGAGCTTTTCAAGCCTGTGCCTAGACCTGGT**GCTGTTGTGCTACCGCTTCTATCGAAACGTCGTCTTCTCCGATGATCCACCGACTTCGTTAAGCTTGTCACTTCC**TGGTGCCGACGTAAGCGAGGAGTCAAACCGTAGCCACGAGTCAACGAATATCAACAACACC**ACTTCGAGCCGCCACAACCACAACAATACGGTGTGTTTTATGC**CGTTTAGTGGTGGGTTTAGAGGTGCGATTGAGGAAATGGGGAAGTCTTTTCCCGGTAACGGAGGCGAGTTTATGGCGGTGGTGAAGAGATGATTAAGCGGAAGT**GAGGAGTTACATGACGGAGATGCAACGGAACAATGGTGGCGGATTCGT**CGGAGGATTCATTGATAATGGCATGATTCCGATGAGTCAAATGGAGTTGGGAGAATCGAGTAGGGTACC**GAGCTCGAATTTCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTTCTTAAGATTGAATCCGTTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGTTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATA GAAAAAAAATATAGCGCGCAA**ACTAGGATAAATATCGCGCGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATCGGGA**ATTTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCCTGTGTGAAAATGTTATCCGCTCACAATTCACACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGCTAGAGCAGCTTGCCAACATGGTGGAGCACGACACTCTCGTCTACTCCAAGAATATCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGCTATTGAGACTTTTTCAACAAAGGGTAATATCGGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTT**CATCAA**AGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCACCTACAAA TGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCGTTCAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCACCCAGGAGACATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGAACATGGTGGAGCAGCAC**CTCGTCTACTCCAAAGATACAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGCTATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCGGGAAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGTACTGTGCATCAA**AAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCACCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCGTTCAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACAGACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCAC****

AATCCCACTATCCTTCGCAAGACCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCAATTTGGAGAGGACACGCTGA  
 AATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCT**CTCGAGATGACTTCGATTA**AAACAGCTTACATTGTATACG  
 GCCGAGCTTGACCGGATGCTAGCATTTTATACGAATATGCTTGGTGCAGCATGTGCATGAGCAAGCAGA  
 TGCCTTTACGATCCAGCTAGGAGTATCACAGATTCAATTTTCGTGCAGCTGCTGATGGAACAAAGCCCTTTT  
 ACCATATTGCTATCAATATCGCGCAAACCATTTTCAAGAGGGAAAAGCCTGGCTCAGCGGCTTTGGTGAA  
 TTGCTAACGGAAAATGATGAAGATCAGGCATACTTCCCTTCTTTAACGCGTACTCCTGTTATGTAGAAGA  
 CCCGTCTGGTAATATTATTGAACATCTCGCGTCAGCAAGCTGCACCTGTACTGGATAAGCCCTTCTCAG  
 CGGATCAGCTACTAAGCATCGGTGAGATTAATATAACAACCAGCGATGTAGAGCAAGCTGCAACACGATTA  
 AAGCAAGCAGAAGCTGCCTGTAAAGCTAGACCAGATTGAGCCAGCAGGCTTAAATTTTATCGGTGATCAGGA  
 TTTGTTCCCTGCTGCTGGGTCCCTCCAGGACGACGCTGGTATTTTTCAGAACGCGTAGCCGTGATCTATCCGT  
 TACAGATGGAGCTGGATAACGGCGTCAGTCTGGCGATTACAGAGACAGGTGAACTGGTGATCTA**ACTCGAG**  
**TTTCTCCATAATAATGTGTGAGTAGTCCAGATAAGGGAATTAGGGTTCCTATAGGGTTTCGCTCATGTG**  
**TTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGTATTTGTATTTGTAAAATACCTTCTATCAATAAAAATTTCTAATTC**  
**CTAAAACCAAATCCAGTACTAAAATCCAGATCCCCGAATTA**ATTCGGCGTTAATTCAGTACATTAATAAAA  
 CGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATT**TGTTTACACCACAATATATCTGCCA**CCAGCCA  
 GCCAACAGCTCCCCGACCGGAGCTCGGCACAAAATCACCCTCGATACAGGCAGCCCATCAGTCCGGGAC  
 GCGCTCAGCGGGAGAGCCGTTGTAAGG

Right Border (RB) **TAAACGCTCTTTTCTTAGGTTAC**

Left Border (LB) **TGTTTACACCACAATATATCTGCCA**

Enzyme sites : 검은색 bold 밑줄

*Xba*I **TCTAGA**      *Kpn*I **GGTACC**      *Xho*I **CTCGAG**      *Eco*RI **GAATTC**

CaMV35S promoter : 초록색      *AtMYB44* : 빨간색      *tflA*: 파란색

NOS / 35S polyA : 주황색      pCAMBIA : 검은색

그림 2. T-DNA construct의 염기서열

표 1. T-DNA construct 염기서열 분석에 사용한 primer sets

INT-MYB44-FW-1	CGGCGGTTACGACCATCGGGGTTAC
INT-MYB44-FW-2	TAACGGAGGCGAGTTTATGGCGGTG
INT-MYB44-RV-1	GATGCTCAACTTGC GGCGAAAGCTG
INT-MYB44-RV-2	GCTTAACGAAGTCGGTGGATCATCG
TFL-FW	GAGGGAAAAGCCTGGCTCAGCGGC
TFL-RV	GCCTGCTGGCTCAATCTGGTCTAG
RB-extension	GGAGATTATTGCTCGGGTAGATCG
FW-extension	CACTGCCCCTTTCCAGTCGGG

### 3. Agrobacterium에의 유전자 적재

pCAMLA vector (kanamycin resistant)에 삽입된 *tflA* 유전자와 *AtMYB44* 유전자를 *Agrobacterium*으로 적재하였다. DNA construct를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (tetracycline resistant)에 electroporation을 시켜 kanamycin을 함유한 AB-KT 고체배지에 도말하고 28°C 배양기에서 3일간 배양하였다. *Agrobacterium*으로 유전자가 도입된 것을 확인하기 위해 AB-KT 선별 배지에서 자란 single colony 12개를 선택하여 cell-PCR을 수행

하였다. *AtMYB44* 유전자의 일부를 PCR 할 수 있는 primer인 INT-Myb44-FW-1 primer (5'-cggcggttacgaccatcggggttac-3')와 Myb44-C primer (5'-ctcgattctcccaactccaatttg-3')로 cell-PCR 하여 agarose gel에서 확인한 결과 모든 colony에서 예상된 size인 약 600 bp의 PCR product를 확인할 수 있었다(그림 3). 이 중 첫 번째와 두 번째 colony를 co-cultivation에 사용하였다.

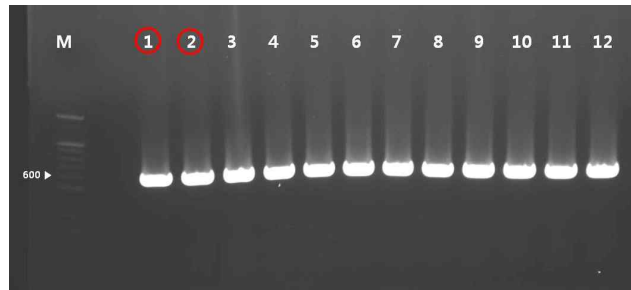


그림 3. *Agrobacterium*에서 추출한 T-DNA construct (PCR products)

이와 별도로 아그로박테리움에 전이된 *AtMYB44*의 염기서열을 확인하는 실험을 시행하였다. 유전자가 전이된 세균을 kanamycin (50 mg/L)이 첨가된 LB 배지에서 선별하였다. 선별된 colony를 액체 배지에서 키우고 여기에서 추출한 plasmid를 template로 하여 PCR로 증폭함으로써 insert DNA의 존재를 확인하였다(data 생략). 선별된 plasmid를 template로하고 *AtMYB44* 염기서열의 양쪽 말단에 *Bam*HI site를 연결한 primer를 가지고 증폭한 후, pGEM-4G vector (Promega)에 삽입하고 SP6 및 T7 primer를 가지고 염기서열을 분석하였다. 결과로서 100% 정확한 *AtMYB44*의 염기서열을 확인하였다. (염기서열 분석 data 생략)

## 제 2 절 유전자 전이

### 1. 캘러스 준비

*Agrobacterium*을 매개로 하는 벼 유전자 전이를 위해서는 벼 조직으로부터 캘러스 (callus)를 유도하여야 한다. 본 연구에서는 캘러스를 유도하기 위해 상품성 벼 품종으로 알려진 일미벼(*Oryza sativa*. cv Ilmi)의 mature embryo를 사용하였다.

벼 종자로부터 형질전환의 재료인 캘러스를 얻어내기 위해 실험 당 약 200개의 종자의 껍질을 벗겨내었다. 이들을 멸균된 삼각플라스크에 담아 70% 에탄올 100 mL을 부어 5분간 세계 흔들어 씻어준 후, 50% 락스 100 mL을 넣고 120 rpm의 진탕기 위에서 15분간 소독하고, 멸균수로 5-6회 씻어내었다. 멸균된 종자를 2N6 캘러스 유기 배지에 치상하고 28°C 배양기에서 4주간 암배양 하였다. 4주후 embryo로부터 유기된 캘러스 (그림 4, 왼쪽)를 얻었다. 이들 중 직경 1-3mm 정도의 캘러스를 선별하여 새로운 2N6 고체배지로 계대배양 하였고 옮긴지 4일된 캘러스를 유전자 전이 실험에 사용하였다(그림 4 오른쪽). 실험에 사용한 배지의 조성을 표 2에 정리하였다.

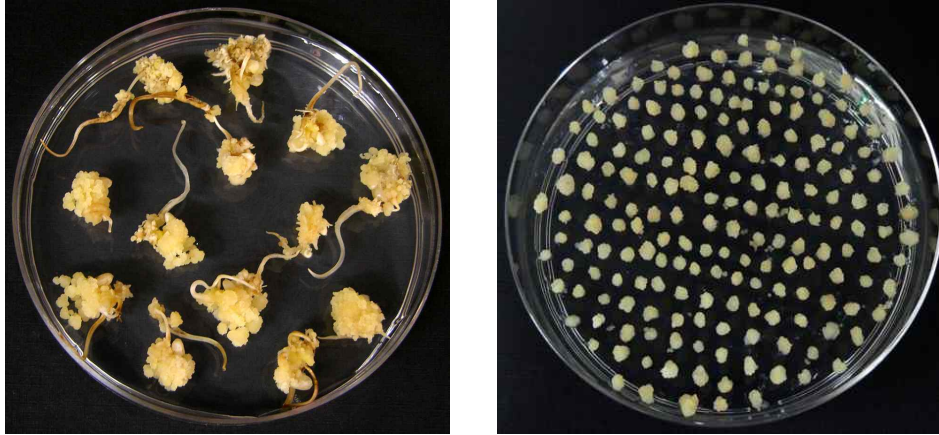


그림 4. 일미벼 callus 유도

표 2. 벼 유전자 전이실험 배지 조성표

Medium	Composition (per liter)
AAM	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0.44 g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.17 g, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.37 g, FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 28 mg, Na <sub>2</sub> EDTA 37 mg, MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 16.9 mg, ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 8.6 mg, H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 6.2 mg, CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O 0.025 mg, Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0.25 mg, CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O 0.025 mg, KI 0.83 mg, glutamine 0.89g, aspartic acid 0.27 g, arginine 0.23 g, glycine 80 mg, nicotinic acid 0.05 mg, thiamine.HCl 0.01 mg, pyridoxine 0.05 mg, KCl 2.94 g, casamino acids 500mg, sucrose 68.5 g, glucose 36g, pH 5.2
AB	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3 g, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 g, NH <sub>4</sub> Cl 1 g, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.3 g, KCl 0.15 g, CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 13.25 mg, FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 2.5 mg, glucose 5 g, bacto-agar 15 g
AB-KT	AB medium plus kanamycin 10 mg, Tetracycline 10 mg
2N6	Chu (N <sub>6</sub> ) Basal Salt Mixture 4 g, casamino acid 0.3 g, L-proline 0.5 g, L-glutamine 0.5 g, sucrose 30 g, 2,4-D 2 mg, phytigel 2.5 g, pH 5.8
2N6-AS	2N6 medium plus glucose 10 g, acetosyringone 200 μM, DTT 150 mg, Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 250 mg, AgNO <sub>3</sub> 5 mg, phytigel 3 g, pH 5.2
2N6-C	2N6 medium plus cefotaxime 250 mg, pH 5.8
2N6-CT	2N6 medium plus cefotaxime 250 mg, toxoflavin 19 mg, pH 5.8
Nutrient	nutrient powder 8 g, bacto-agar 15g
MS	MS medium-vitamins 4.4 g, MES 0.5 g, sucrose 30 g, NAA 1 mg, kinetin 5 mg, phytigel 4 g, pH 5.8
MS-CT	MS medium plus cefotaxime 250 mg, toxoflavin 10 mg, pH 5.8
MS-T	MS medium plus toxoflavin 10 mg, pH 5.8

## 2. 유전자 전이

Co-cultivation시 *Agrobacterium*의 농도는  $3-5 \times 10^9$  cell/mL일 때 유전자 전이가 가장 효율적인 것으로 알려져 있다(Hiei *et al*, 1994). *Agrobacterium*의 농도가  $10^9$  cells/mL이 되도



록 하기 위해 *tHA* 유전자와 *AtMYB44* 유전자가 삽입된 LBA4404 (colony 1 또는 2)를 ABKT 고체배지에 전체적으로 골고루 자라도록 도말하였다. 그리고 28°C 배양기에서 3일 동안 배양한 후 루프로 잘 긁어모아 모두 취하여 AAM 액체배지 20 mL에 풀어주었다. 이중 100  $\mu$ L를 취해 물 900  $\mu$ L에 섞어 spectrophotometer로 측정했을 때 O.D<sub>600</sub>에서 0.5가 되도록 세포 농도를 맞춰주었다. 농도가 맞춰진 AAM 세포 용액에 acetosyringone 200  $\mu$ M을 넣어준 다음, 여기에 4일간 계대배양한 캘러스를 담근 후 30분간 infection 시켜주었다. 그 후 AAM 세포 용액을 filter paper로 완전히 제거한 다음 캘러스를 2N6-AS 고체배지에 옮겨주어 25°C 배양기에서 1일, 23°C 배양기에서 2일간 암배양 하였다(co-cultivation). 총 여섯 번에 걸친 실험으로 총 2800개의 캘러스를 형질전환 실험에 사용하였다.

### 3. 선별(selection) 및 재생(regeneration)

감염 후 3일 동안 co-cultivation한 캘러스로부터 *Agrobacterium*을 분리해 내기 위하여 *Agrobacterium* 치사항생제인 cefotaxime(250 mg/L)이 들어 있는 멸균수로 캘러스를 2-3회 씻어낸 후 2N6-C 1차 선별 고체배지에 옮겨 28°C 배양기에서 2주 동안 암배양하였다. 2주 후 갈변되지 아니하고 왕성하게 분열한 캘러스만을 선별하였는데 최초 2800개의 캘러스 중 1,670개의 캘러스를 선별하였으며 이것은 약 60%의 1차 선별효율을 나타내었다(그림 5, 왼쪽 사진).

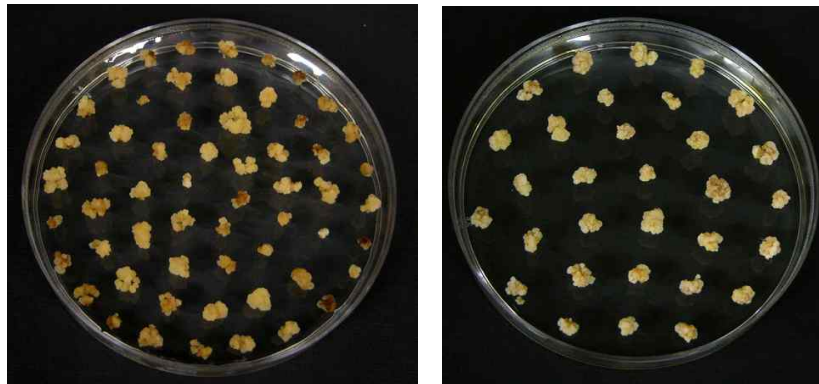


그림 5. 선별과정

1차 선별된 캘러스에서 형질전환된 캘러스를 선별하기 위해 2N6-CT 2차 선별 고체배지로 옮겨 28°C 배양기에서 2주간 명배양 하였다. 2주 후 1차 선별된 1,670개의 캘러스 중 하얗고 왕성하게 분열한 395개의 캘러스를 선별해내었다. 이는 최초 사용된 캘러스에 대해 약 14%의 2차 선별결과를 보였다(그림 5, 오른쪽 사진).

### 3. 재분화 과정

2차선별 배지에서 하얗고 왕성하게 자란 캘러스만을 선별하여 MS-CT 재분화 고체배지로 옮겨 28°C 배양실에서 3주간 명배양으로 재분화를 유도하였다. 그 후 왕성하게 분열하는

캘러스를 3주마다 MS-T 재분화 배지로 옮겨주면서 지속적으로 재분화를 유도하였다(그림 6). 그 결과 1, 2차 선발을 거친 395개의 캘러스 중에서 73개의 캘러스로부터 재분화가 일어났으며, 이는 최초 사용된 캘러스에 대해 2.6%에 해당된다.

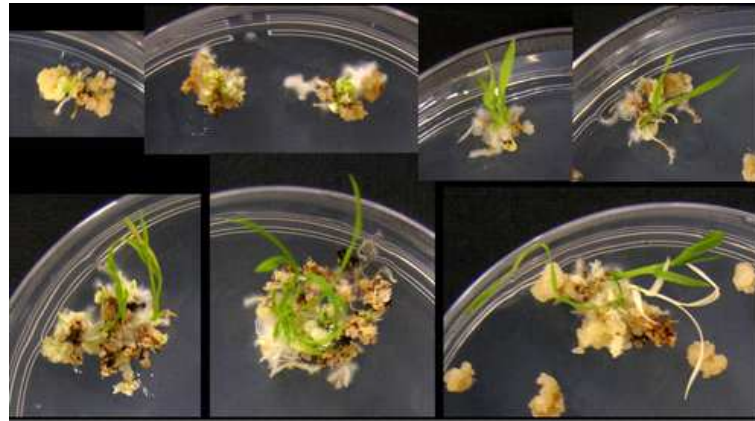


그림 6. 형질전환 식물체의 재분화

#### 4. 온실 생육

배양실에서 재분화된 벼 형질전환체는 재분화 촉진 호르몬인 NAA와 kinetin이 없는 MS<sub>0</sub> 고체배지에 옮겨 10일간 배양한 다음 배지를 제거한 뒤 수경 상태로 온실에서 1일간 적응시켰다. 그 후 상토로 옮겨 심어주어 온실에서 정상적으로 생육하였다(그림 7).

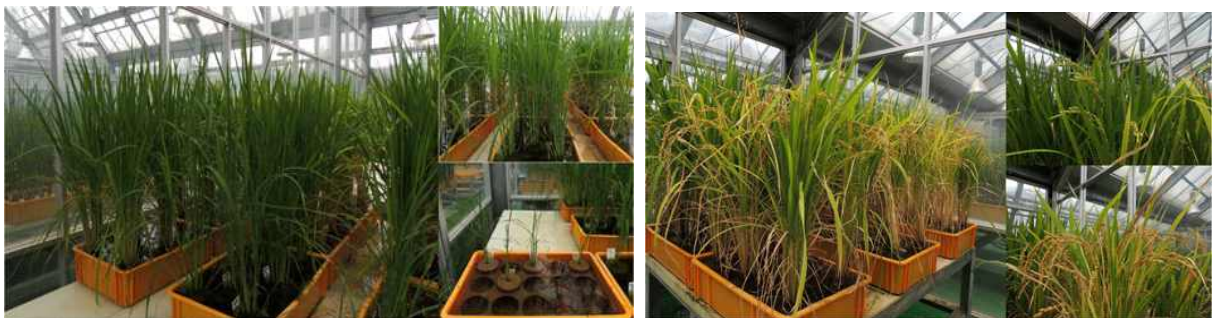


그림 7. 벼 형질전환체 (T0 식물체)의 온실 생육

#### 5. T1 종자 수확

온실에서 성체로 생육한 총 73개의 재분화 개체 중 59개의 개체로부터 T1 종자를 수확하였다. 대부분 50 - 100 개 이상의 이삭을 수확하였으며, 일부는 20개 미만의 이삭이 수확되었다. 종자를 충분히 건조할 수 있도록 실내에 보관하였다. 일부 이삭의 외관이나 형태가 충실하지 못한 라인은 차후 실험에서 배제하였다. 50개 이상의 이삭을 수확한 59 계통의 벼 종자를 차후 실험에 사용하기로 하였다.

유전자 전이부터 T1 종자 수확까지의 과정을 표 3에 요약하였다.

표 3. *AtMYB44* 운반체의 벼 형질 전환 실험 (요약)

Experiments	Co-cultivation	First selection	Second selection	Toxoflavin resistant plants	
1	400	190 (47.5%)	32 (8%)	4 (1%)	
2	400	200 (50%)	37 (9%)	4 (1%)	
3	450	250 (55.5%)	45 (10%)	7 (1.5%)	
4	550	390 (71%)	126 (23%)	26 (4.7%)	
5	500	310 (62%)	70 (14%)	15 (3%)	
6	500	330 (66%)	85 (17%)	17 (3.4%)	
		2800	1670 (60%)	395 (14%)	73 (2.6%)

### 제 3 절 유전자 전이 벼의 세대전개

#### 1. T1 종자의 toxoflavin 배지 선별

T1 종자를 가지고 10 mg/L의 toxoflavin을 함유한 MS<sub>0</sub> 고체배지에서 일차 선별을 시도 하였다. 종자들을 배지에 놓고 4일간 암흑, 이후 2일간 빛을 주면서 발아시켰다. 야생형(NT) 종자의 toxoflavin 배지에서의 생장을 아래 사진에 나타내었다(그림 8). Toxoflavin은 발아 자체에는 큰 영향을 주지 않았으나 생장, 특히 뿌리의 발달에 큰 영향을 주는 것으로 나타났다. 이 표현형을 기준으로 하여 toxoflavin에 대한 저항성을 판단하였다.



그림 8. Wild type (NT) 종자의 toxoflavin 배지에서의 생장  
[왼쪽: MS<sub>0</sub>, 오른쪽: MS<sub>0</sub> + 10 mg/L Toxoflavin]

각 계통 별로 toxoflavin에 저항성을 보이는(positive) 종자의 개수를 측정하였다(표 4). 일부 50%를 상회하는 선별효율(selection efficiency)을 보이는 라인도 있었으나, 대부분 예상보다 낮은 20% 내외의 효율을 보였다. 29번 라인에서는 단 1 개의 저항성 개체도 발견하지 못하였다.

표 4. T1 종자의 선별 효율 및 파종현황

	line	시험 종자 개수	positive	selection efficiency (%)	T1 파종갯수
야생형	NT	30	0	0	8
AtMyb44_Ilmi	2	30	23	76.7	8
	3	30	8	26.7	8
	4	30	10	33.3	8
	5	30	13	43.3	8
	6	30	8	26.7	8
	8	30	5	16.7	5
	9	30	13	43.3	8
	10	30	8	26.7	8
	11	30	7	23.3	7
	12	30	7	23.3	7
	13	30	10	33.3	8
	14	30	15	50.0	8
	15	30	6	20.0	6
	17	30	6	20.0	6
	18	30	7	23.3	7
	19	30	10	33.3	8
	20	30	2	6.7	2
	21	30	4	13.3	4
	22	30	3	10.0	3
	23	30	2	6.7	2
	24	30	1	3.3	1
	25	30	3	10.0	3
	26	30	7	23.3	7
	27	30	3	10.0	3
	28	30	3	10.0	3
	29	30	0	0	0
	30	30	11	36.7	8
	31	30	2	6.7	2
	32	30	3	10.0	3
	33	30	3	10.0	3
	34	10	2	20.0	2
	35	30	2	6.7	2
	36	30	4	13.3	4
	37	30	7	23.3	7
	38	30	3	10.0	3
	39	30	6	20.0	6
	40	30	4	13.3	4

	41	30	6	20.0	6
	42	30	9	30.0	8
	44	30	3	10.0	3
	46	30	3	10.0	3
	48	30	4	13.3	4
	49	30	1	3.3	1
	50	30	3	10.0	3
	51	30	7	23.3	7
	52	30	7	23.3	7
	53	13	4	30.8	4
	55	13	2	15.4	2
	56	30	5	16.7	5
	57	30	5	16.7	5
	58	30	9	30.0	8
	59	30	5	16.7	5
	62	30	10	33.3	8
	64	30	16	53.3	8
	65	30	10	33.3	8
	66	30	13	43.3	8
	68	30	15	50.0	8
	71	30	6	20.0	6
	72	30	12	40.0	8
계 (NT 제외)		1,716	386	22.5 (평균)	315

## 2. 선별 T1 종자의 파종 및 재배

Toxoflavin 배지에서 저항성을 보인 개체들(58계통)을 토양에 옮기고 온실에서 3주간 생장시킨 후, 2013년 5월 31일 경상북도 군위에 소재한 경북대학교 GM 포장에 이양(모내기)하였다(그림 9). 이양 개수는 라인별로 최대 8개이며, toxoflavin 선별 결과 8개 이하인 라인은 모두 이양하였다. 야생형(NT, non-transgenic) 8 개체 포함 총 323개체를 이양 재배하였다.

이양 당시에는 모든 유전자전이 개체들이 야생형(NT) 식물체에 비하여 뚜렷이 왜소한 크기를 보였으나, 이는 유전자전이 개체들이 toxoflavin을 함유한 MS<sub>0</sub> 고체배지에서 발아 및 성장하는 과정 중 스트레스를 받아 정상적인 생육을 하지 못한 때문인 것으로 생각된다. 2차년도 보고서 작성 당시 현재 (2013년 7월 15일) 식물체 자체의 성장과정이나 외관은 재배 개체 모두 의미 있는 차이를 보이지 않고 있다.

## 3. T2 종자의 수확

포장에서 성체로 생육한 총 58계통 315개체(야생형 포함 323개체)의 식물체로부터 T2 종자를 수확하였다. 대부분 100-200 개 정도의 이삭을 수확하였으며, subline 별로 종자를 충분히 건조할 수 있도록 실내에 보관하였다.



그림 9. T1 종자의 파종 및 재배 (경북 군위 GM 포장)

#### 4. T2 종자의 toxoflavin 2차선별

충분히 건조된 T2 종자를 10 mg/L의 toxoflavin을 함유한 MS 고체배지에서 발아시키면서 2차선별을 시도하였다. 종자들을 배지에 놓고 3일간 암흑, 이후 4일간 빛을 주면서 발아시켰다. 1차 시험과 비교할 때 뿌리 발달을 좀 더 세밀히 관찰하기 위하여 빛에서 2일을 더 성장시켰다. 1차시험에서와 마찬가지로 toxoflavin은 발아 자체에는 큰 영향을 주지 않았으나 성장, 특히 뿌리의 발달에 큰 영향을 주는 것으로 나타났다. 이 표현형을 기준으로 하여 toxoflavin에 대한 저항성을 판단하였다.

1차년도 선별시험에서 상대적으로 높은 효율을 보였던 20 계통의 각 T1 종자 별로 3개의 subline을 선발하고 각각 30개씩의 종자를 시험하였다(표 5). 2, 9, 13, 14 라인들은 평균 50% 넘는 선별율을 보였다(그림 10). 특히 2-1, 2-3, 9-2, 13-2, 13-3, 14-2, 14-3 subline들은 모두 70% 이상의 positive 반응을 보여 T1 종자가 homozygote일 확률이 높은 것으로 추측된다. 그러나 각 계통별로 유전자(*TAA*)의 이입 위치 (insert location)가 다르고, 또는 유전자의 cop[y 수가 달라서 이에 따라 발현량의 정도에서 크게 차이가 난 탓일 수도 있다.

표 5. T2 종자의 toxoflavin 2차선별

T1 line	T2 subline	발아 종자 개수	positive 종자 개수	선별효율(%)	효율 평균(%)	T2 종자 파종
NT	NT-1	30	1	3.3	3.4	8 (무선별)
		28	0	0		
		29	2	6.9		
2	2-1	30	28	93.3	81.1	8
	2-2	30	15	50.0		8
	2-3	30	30	100.0		8
3	3-1	29	10	34.5	37.1	8

	3-2	30	12	40.0		8
	3-3	30	11	36.7		8
4	4-1	28	8	28.6	38.4	8
	4-2	30	12	40.0		8
	4-3	30	14	46.7		8
5	5-1	30	10	33.3	31.0	8
	5-2	28	8	28.6		8
	5-3	29	9	31.0		8
6	6-1	30	10	33.3	35.3	8
	6-2	27	8	29.6		8
	6-3	28	12	42.9		8
9	9-1	30	17	56.7	58.9	8
	9-2	30	21	70.0		8
	9-3	30	15	50.0		8
10	10-1	29	9	31.0	33.5	8
	10-2	30	12	40.0		8
	10-3	27	8	29.6		8
13	13-1	30	20	66.7	72.2	8
	13-2	30	24	80.0		8
	13-3	30	21	70.0		8
14	14-1	30	17	56.7	70.0	8
	14-2	30	23	76.7		8
	14-3	30	23	76.7		8
19	19-1	26	8	30.8	41.4	8
	19-2	30	12	40.0		8
	19-3	30	16	53.3		8
30	30-1	28	12	42.9	40.1	8
	30-2	30	14	46.7		8
	30-3	26	8	30.8		8
42	42-1	24	6	25.0	33.6	6
	42-2	30	12	40.0		8
	42-3	28	10	35.7		8
53	53-1	30	12	40.0	35.5	8
	53-2	30	10	33.3		8
	53-3	30	10	33.3		8
58	58-1	26	6	23.1	32.1	6
	58-2	30	12	40.0		8
	58-3	30	10	33.3		8
62	62-1	28	8	28.6	30.9	8
	62-2	26	8	30.8		8
	62-3	24	8	33.3		8
64	64-1	30	12	40.0	36.7	8
	64-2	30	11	36.7		8
	64-3	30	10	33.3		8
65	65-1	30	12	40.0	34.7	8
	65-2	27	8	29.6		8
	65-3	26	9	34.6		8
66	66-1	30	12	40.0	35.1	8
	66-2	30	10	33.3		8

	66-3	28	9	32.1		8
68	68-1	30	12	40.0	46.7	8
	68-2	30	14	46.7		8
	68-3	30	16	53.3		8
	72-1	30	12	40.0		8
72	72-2	30	14	46.7	43.3	8
	72-3	30	13	43.3		8

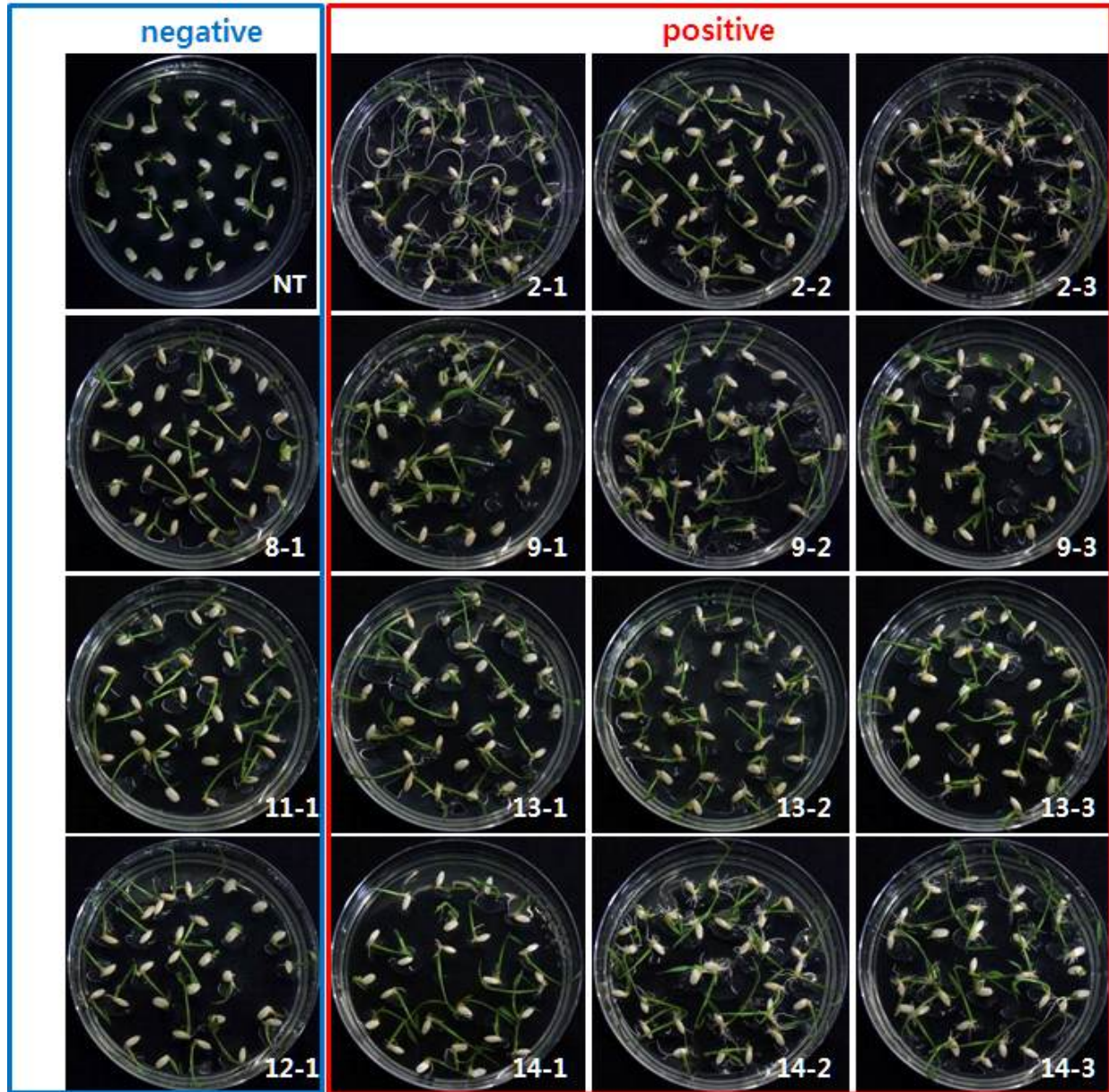


그림 10. T2 종자의 toxoflavin 2차선별 (일부)



## 5. T2 종자의 파종 및 재배

Toxoflavin을 함유한 MS 고체배지에서 발아한 각 계통의 T2 종자를 토양에 이식하여 온실에서 3주간 생육한 후, 2014년 5월 30일 경상북도 군위에 소재한 경북대학교 GM 포장에 8 개체씩 이양하였다. 선별 시 생존 개체가 8개가 되지 못하는 것들은 생존 최대 개수를 이양하였다(선별 표 5 참조). 이양 당시에는 모든 유전자전이 개체들이 야생형(NT) 식물체에 비하여 뚜렷이 왜소한 크기를 보였으나, 7월 16일 현재 성장과정이나 외관은 이양 개체 모두 야생형과 비교할 때 의미 있는 차이를 보이지 않고 있다. 이는 유전자전이 개체들이 toxoflavin을 함유한 MS 고체배지에서 발아 및 성장하는 과정 중 스트레스를 받아 초기에는 정상적인 성장을 하지 못한 때문인 것으로 생각된다.

## 6. 형질전환 식물체의 도입유전자 검출

20계통의 subline에 대하여 전이 유전자 *AtMYB44*의 발현량을 측정하였다. 이 실험에는 1차년도에 유전자 전이 후 T1 종자를 받기 전에 채취, 냉동 저장 중이던 T<sub>0</sub> 식물체 조직을 가지고 *AtMYB44* 특유의 primer set 2 가지를 사용하여 도입유전자를 증폭하였다(표 6). 이 실험에서 reference로서 사용한 SPS primer는 TaqMan quantitative RT-PCR에 사용하는 것으로서 벼 내재 유전자 reference로 사용되는 sucrose phosphate synthase gene의 primer set이다(Yang et al., 2005). 선별, 발현량 시험 등에서 확실히 우월한 성적을 보인 2, 9, 13, 14 라인들을 가지고, 식물체의 도입유전자 검출 및 가뭄 저항성을 관찰하였다. 먼저 2, 9, 13, 14 번 계통 식물체의 도입유전자 integration 여부를 일반 PCR로 증폭하여 가시화함으로써 확증하였다(그림 11, 오른쪽). 그 결과 2, 9, 13, 14 라인의 T<sub>0</sub> 식물체의 genomic DNA로부터 정확한 size의 PCR product가 증폭되었다. Control로 사용한 벼 내재 유전자 *SPS*는 NT 및 negative (Line 15 및 38) 식물체에서도 증폭되고 있다.

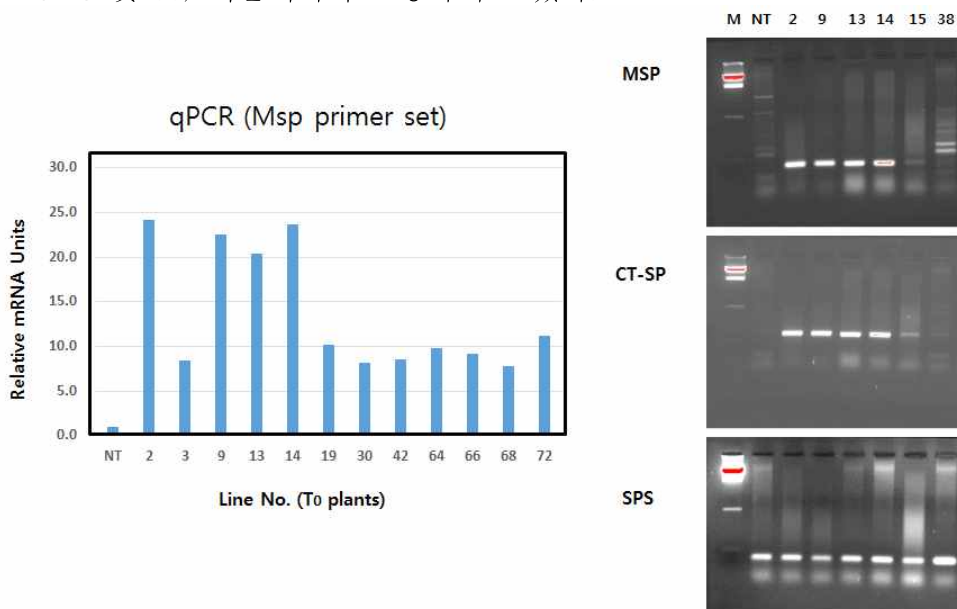


그림 11. 도입 유전자의 발현 (qPCR and RT-PCR)

표 6. 도입유전자 발현 검출 시험에 사용한 primer set

Gene source	primer	sequence	PCR product size (bp)
<i>AtMYB44</i>	MSP-FW	GTGCCGACGTAAGCGAGGAGTC	95
	MSP-RV	CGACACCGTATTGTTGTGGTTG	
<i>AtMYB44</i>	CT-SP-FW	CGTTTAGTGTTGGGTTTAGAGG	204
	CT-SP-RV	CAACTCCAATTTGACTCATCGG	
<i>SPS</i>	SPSF	TTGCGCCTGAACGGATAT	80
	SPSR	CGTTGATCTTTTCGGGATG	

### 7. T3 종자 확보, 선별, 파종

3차년도 (2014년) 봄에 경상북도 군위 소재 경북대학교 포장에 파종한 20 계통 3 subline x 8 개체의 종자를 2014년 10월 30일과 11월 5일 두 차례에 걸쳐 수확하였다. 대부분 100-200 개 정도의 이삭(T3 종자)을 수확하였으며, subline 별로 종자를 충분히 건조할 수 있도록 실내에 보관하였다.

3차년도에 실시한 toxoflavin 선별시험에서 나타난 저항성 정도, 도입유전자 검출 성적, 가뭄저항성 반응 시험 결과 을 토대로 하여 4차년도 실험의 대상으로 10개의 라인을 선정하였다. 선정된 라인의 T3 종자를 toxoflavin 선별시험을 거치지 않고 명지대학교 벼 전용 온실에 파종하여 모를 얻은 후 2015년 5월 29일 경북 군위의 포장에 이양하였다.

생장 중인 10계통의 벼 조직을 가지고 도입유전자 integration 여부를 PCR로 검증하였다. 3차년도 실험에 사용한 *AtMYB44* 특유의 primer set 2 가지를 사용하여 도입유전자를 증폭하였다. 이 실험에서 reference로서 사용한 SPS primer는 TaqMan quantitative RT-PCR에 사용하는 것으로서 벼 내재 유전자 reference로 사용되는 sucrose phosphate synthase gene의 primer set이다(Yang et al., 2005). 그 결과 라인별 8개 식물체의 조직에서 8개 모두 *AtMYB44* 유전자가 증폭된 subline을 homozygote로 판단하였다(표 7).

표 7. 도입유전자 integration의 PCR 검증

T1 line	T2 subline	발아 종자 개수	Toxo 저항성 종자 개수	T2선별효율(%)	효율 평균(%)	T2 종자 파종	T3 종자 파종	PCR positive
NT	NT-1	30	1	3.3	3.4	8 (무선별)	8	0
		28	0	0				
		29	2	6.9				
2	2-1	30	28	93.3	81.1	8	8	8
	2-2	30	15	50.0		8	8	8
	2-3	30	30	100.0		8	8	8
3	3-1	29	10	34.5	37.1	8	8	6

	3-2	30	12	40.0		8	8	8
	3-3	30	11	36.7		8	8	7
4	4-1	28	8	28.6	38.4	8	8	8
	4-2	30	12	40.0		8	8	8
	4-3	30	14	46.7		8	8	6
9	9-1	30	17	56.7	58.9	8	8	8
	9-2	30	21	70.0		8	8	8
	9-3	30	15	50.0		8	8	8
13	13-1	30	20	66.7	72.2	8	8	8
	13-2	30	24	80.0		8	8	8
	13-3	30	21	70.0		8	8	8
14	14-1	30	17	56.7	70.0	8	8	8
	14-2	30	23	76.7		8	8	8
	14-3	30	23	76.7		8	8	8
19	19-1	26	8	30.8	41.4	8	8	6
	19-2	30	12	40.0		8	8	7
	19-3	30	16	53.3		8	8	8
30	30-1	28	12	42.9	40.1	8	8	8
	30-2	30	14	46.7		8	8	6
	30-3	26	8	30.8		8	8	8
68	68-1	30	12	40.0	46.7	8	8	6
	68-2	30	14	46.7		8	8	8
	68-3	30	16	53.3		8	8	5
72	72-1	30	12	40.0	43.3	8	8	7
	72-2	30	14	46.7		8	8	8
	72-3	30	13	43.3		8	8	8

## 제 4 절 도입유전자 분석

### 1. 도입유전자 발현량 분석

PCR 검정시험에서 homozygote로 확증된 라인들 중 저항성 시험 성적이 우수했던 sub-line들의 식물체를 가지고 real time PCR (실시간 유전자증폭 시험; qPCR)을 실시하여 도입 유전자 (*AtMYB44* 및 *T1A*)의 발현량을 측정하였다.

먼저 first strand cDNA 합성은 5 µg total RNA를 template로 사용하면서 oligo(dT)<sub>18</sub> primer를 가지고 시행하였다. 이 실험에는 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)를 사용하였다. 1/3 농도로 희석한 cDNA synthesis reaction mixture 1 µL, 2X

real-time PCR Pre-Mix, 20X Evagreen (Sol-Gent)을 혼합한 후 PCR 반응을 시작하였다. Thermocycling과 fluorescence detection은 Mx3000p Real-Time PCR machine (Stratagene)으로 실시하였다. PCR reaction은 95°C 10분, 40 cycles의 of 95°C 30초, 55°C 30초 and 72°C 30초의 조건으로 실시하였다. 실험구는 각각 3 반응씩을 수행하였고, 실험측 정치는 항시 발현 대조구인 *OsUbi1* 유전자의 발현 값으로 normalization하였다. qRT-PCR 분석에 사용한 primer들은 표 8과 같다.

표 8. 도입유전자 발현량 측정 qPCR 시험에 사용한 primer set

Gene source	primer	sequence	PCR product size (bp)
<i>AtMYB44</i>	MYB44-RT-FW	GACGTAAGCGAGGAGTCAAAC	312
	MYB44-RT-RV	CTCGATTCTCCCAACTCCAATTTG	
<i>TflA</i>	TFL-FW	GAGGGAAAAGCCTGGCTCAGCGGC	294
	TFL-RV	GCCTGCTGGCTCAATCTGGTCTAG	
<i>OsUbi1</i>	OsUbi1-FW	ATGGAGCTGCTGCTGTTCTA	187
	OsUbi1-RV	TTCTTCCATGCTGCTCTACC	

3번 라인에서의 전이 유전자 *AtMYB44*와 *TflA*의 발현량을 기준으로 상대적인 발현 배수 (fold)를 계산하였을 때, 공히 2, 9, 13, 14번 라인에서 다른 라인에 비해 높은 발현량을 보였으며, 3, 4, 30, 68, 72번 라인들은 상대적으로 그 발현량이 낮게 나타났다(그림 12).

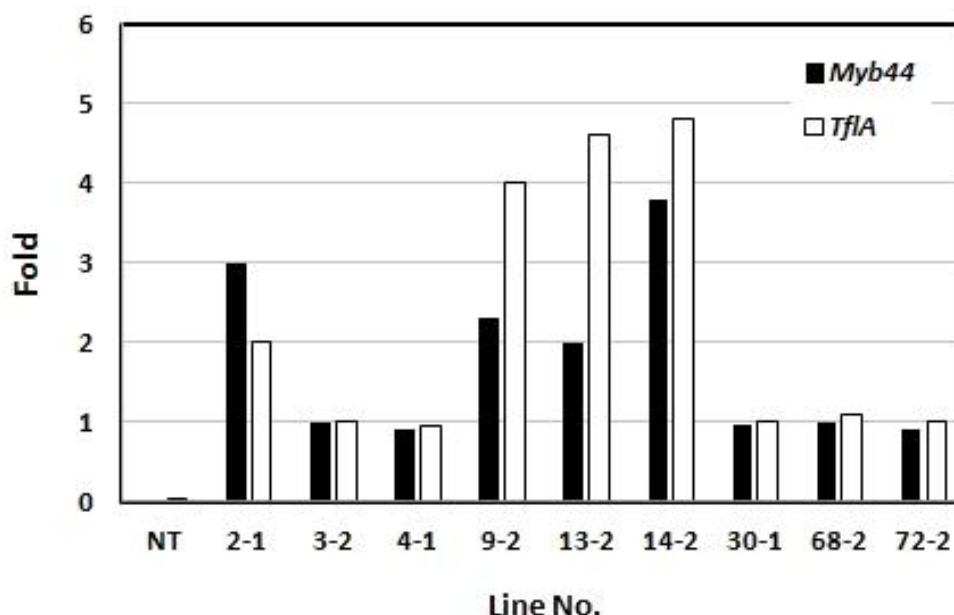


그림 12. 도입유전자 발현량 측정 qPCR 시험

2, 9, 13, 14번 라인 식물체로부터 추출한 RNA를 cDNA로 변환하여 일반 PCR로 증폭한 후 전기영동하여 가시화한 실험의 결과는 그림 13과 같다.

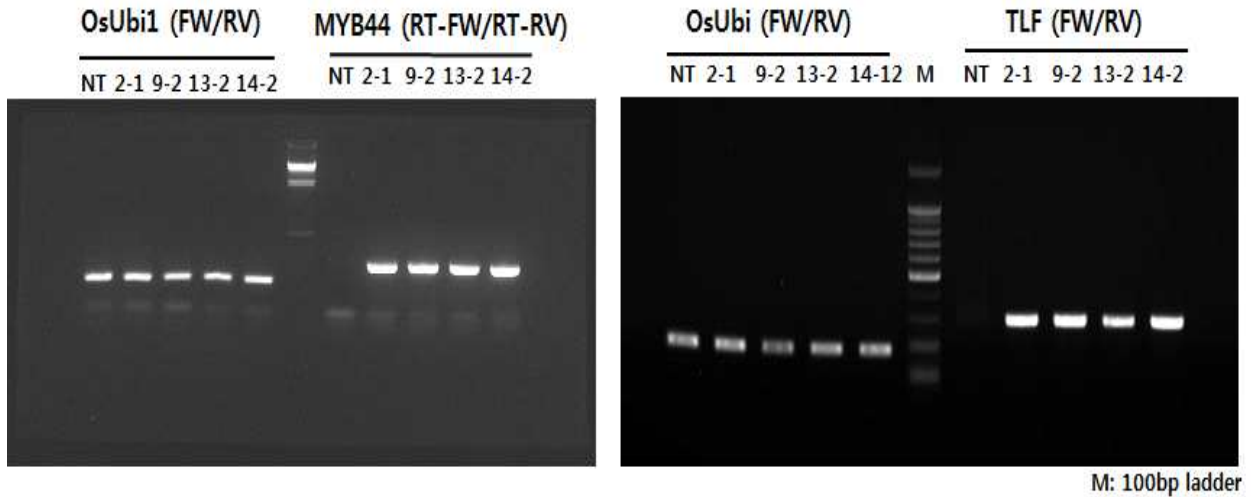


그림 13. 도입유전자 발현량 측정 qPCR 시험

## 2. 전이유전자 copy 수 분석 (Southern blotting)

각 라인의 전이유전자 copy 수를 알아보기 위하여 Southern blot 분석을 시행하였다(그림 14). 5 µg의 genomic DNA를 BamHI restriction enzyme으로 자르고 이를 0.8% agarose gel에서 분리하였다. Nylon membrane에 옮겨 digoxigenin (DIG, Roche Diagnostics, Germany)으로 labeling 한 *tflA* cDNA 로 probing 하였다. 그 결과 네 개 라인 모두 1 밴드로 나타났다. 2-1, 9-2, 13-1은 1 밴드가 보이므로 single copy일 확률이 높은 것으로 생각된다. 14-2번의 경우 9-2 및 13-1 번 보다 밴드의 intensity가 강하게 나타났는데, 혹여 2개의 밴드가 겹쳐 보이는 것이 아닌가 생각 되었다.



그림 14. 전이유전자 copy 수 분석 (Southern blotting)

### 3. 전이유전자 삽입위치 분석 (Flanking sequencing)

전이 유전자의 삽입 위치를 조사하기 위하여 flanking sequencing 분석을 단행하였다. 라인별 식물체의 genomic DNA를 추출하여 *Hae*III 제한효소로 자른 후, 생성된 DNA fragment에 adapter를 연결하였다. 전이 DNA (T-DNA)와 adaptor의 염기서열을 가지고 design한 primer set를 이용하여 PCR로 증폭하였다.

아래 gel 사진(그림 15)에서 빨간 표식이 있는 band는 추출하여 염기서열 분석에 성공한 것들을 표시한 것이고, 파란색은 band size가 30 bp 이하로 너무 작아 염기서열을 얻지 못한 것이며, 하얀색으로 표식된 밴드는 염기서열 분석이 불가능 하였던 경우를 나타내고 있다.

2-1번 라인 식물체는 LB 쪽에서는 2개의 PCR 밴드를 얻었다. 이들은 Os06t0576600-00 upstream 12.855kb부터 12.978kb에 이르는 부위에 삽입되어 있는 것으로 해석된다. 각각의 LB 부위를 서로 반대 방향으로 하여 RB쪽이 인접하여 같은 곳에 위치하고 있음을 나타낸다. 이 경우 Southern blot 분석에서는 single band로 나타나는 것이 정상이다. RB쪽에서는 PCR product를 얻지 못하였는데 이는 RB 부위의 염기서열이 변형되었기 때문인 것으로 생각된다. T-DNA가 유전체에 삽입될 때 RB쪽 염기서열이 변형되는 것은 일반적으로 흔히 발생하는 현상이다. 9-2번의 경우는 LB 쪽에는 문제가 없었으나 RB 쪽의 경우에는 근접한 두 밴드가 증폭되었는데 분리해서 염기서열 분석을 시도하였다. 염기서열 분석이 원활하지 않았는데, 이 경우에도 T-DNA가 삽입될 때 RB 쪽에서 변형이 발생한 것으로 추론된다.

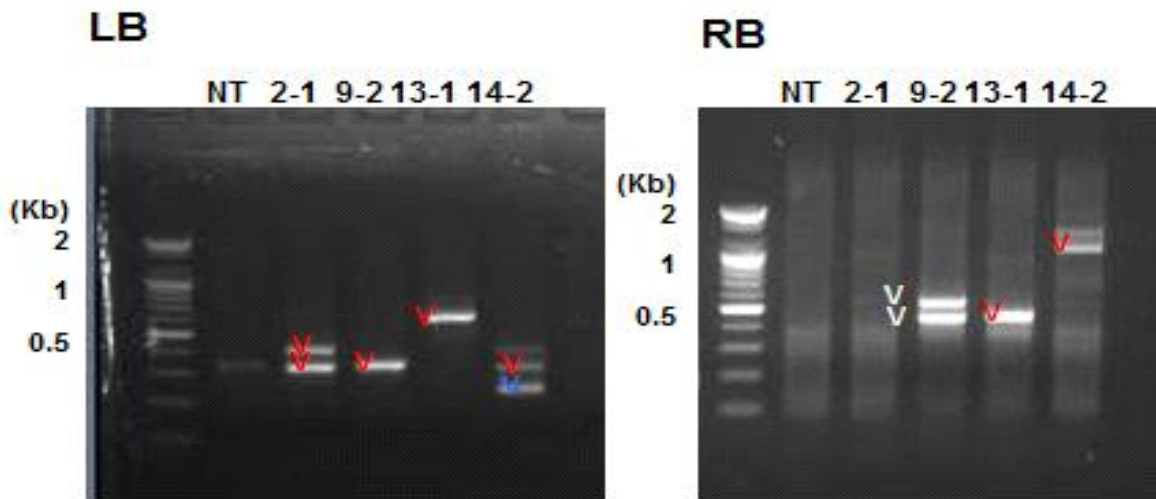


그림 15. 전이유전자 삽입위치 분석 (Flanking sequencing band gel)

유전체 상의 위치는 bulk flanking sequence tags를 cover하는 FSTVAL program (Kim et al., 2012)을 이용하여 결정하고, 그 결과를 아래의 표 9에 정리하였다. 13-1라인은 2개의 LB와 RB 삽입위치가 일치했으며, 14 라인의 경우는 LB 삽입위치가 RB와 다른 것으로 보아 2 곳 이상에서의 T-DNA 삽입이 추론되며 2 곳 모두 유전자 앞 promoter 부위에 삽입되어 있는 것으로 나타났다. 이 결과를 종합하여 2, 9, 13번 라인이 intergenic 인 것으로 결론하였다.

표 9. FSTVAL program을 이용한 T-DNA insert의 유전체 상의 위치

Query Name	A/NA	Read length (bp)	T-DNA end	Insert from	Insert to	Adapter start	Insert length (bp)	Chr.	mapping (%)	mapping length	query start	query end	chr start	chr end	type	gene_id	description
2_1_H3_L_A	A	353	45	46	330	331	285	chr 06	99.7	284	46	329	23252584	23252867	Intergenic	Os06t0576600-00 upstream 12.855kb	Hypothetical conserved gene.
2_1_H3_L_B	A	219	62	63	219	-1	157	chr 06	100	141	78	218	23252461	23252321	Intergenic	Os06t0576600-00 upstream 12.978kb	Hypothetical conserved gene.
9_2_H3_L	A	703	113	114	264	265	151	chr 05	100	151	113	263	25635469	25635619	Intergenic	Os05t0515200-01 upstream 4.818kb	Cytochrome P450 family protein.
13_1_H3_L	A	570	131	132	544	545	413	chr 02	100	412	132	543	12393338	12392927	Intergenic	Os02t0313400-01 upstream 6.715kb	Apoptosis inhibitory 5 family protein.
13_1_M_R	A	390	292	293	355	356	63	chr 02	100	63	292	354	12393346	12393408	Intergenic	Os02t0313400-01 upstream 6.707kb	Apoptosis inhibitory 5 family protein.
14_2_H3_L_A	A	265	127	128	232	233	105	chr 03	100	54	127	180	18190642	18190695	5'Upstream-1000	Os03t0421700-00 upstream 0.062kb	Similar to fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 1.
14_2_M_R	A	433	278	279	433	-1	155	chr 06	100	155	278	432	25281209	25281055	5'Upstream-1000	Os06t0611900-01 upstream 0.827kb	Similar to Glycine decarboxylase P subunit.

## 제 5 절 유전자 전이 일미벼의 형질

### 1. 가뭄저항성

가뭄저항성 능력이 향상되었는지 확인해 보았다. 2, 9, 13, 14 라인의 각 3 subline들의 4주 성장한 식물체들을 가지고 가뭄저항성 시험을 시행하였다. 유전자 전이 벼 종자들을 먼저 toxoflavin 선별배지에 올려서 키우고, (성장속도 편차를 줄이기 위하여) 대조구 NT 일미는 4일 후 MS<sub>0</sub> 배지에서 발아를 시작하였다. 식물체들은 배지에서 선별을 마친 후 이를 토양에 옮겨 온실에서 4주간 성장시켰다. 그럼에도 불구하고 야생형 일미벼가 다소 큰 키(약 48 cm)로 성장하였다. 일반적으로 식물체의 크기가 작으면 증산율이 낮아 가뭄 등 저수분에서의 수분이탈이 적어 저항성이 다소 높게 측정 된다.

4주 된 벼 식물체가 성장하고 있는 pot에서 수분을 제거 한 후 3일간 풍건(air-dry) 조건에 두었다. 이 후 급수(watering)을 재개하고 12일 후에 생존율을 측정하였다. 아래 그림 16에서 보는 것처럼 풍건 상황에서 3일 후 모든 식물체가 성장에 크게 영향을 받는 상태를 보였다. 급수 재개 12일 후 야생형 벼는 성장을 회복하지 못하였다. 이에 비하여 시험한 유전자 전이 라인들은 모두 50-100%의 생존율을 보였다.

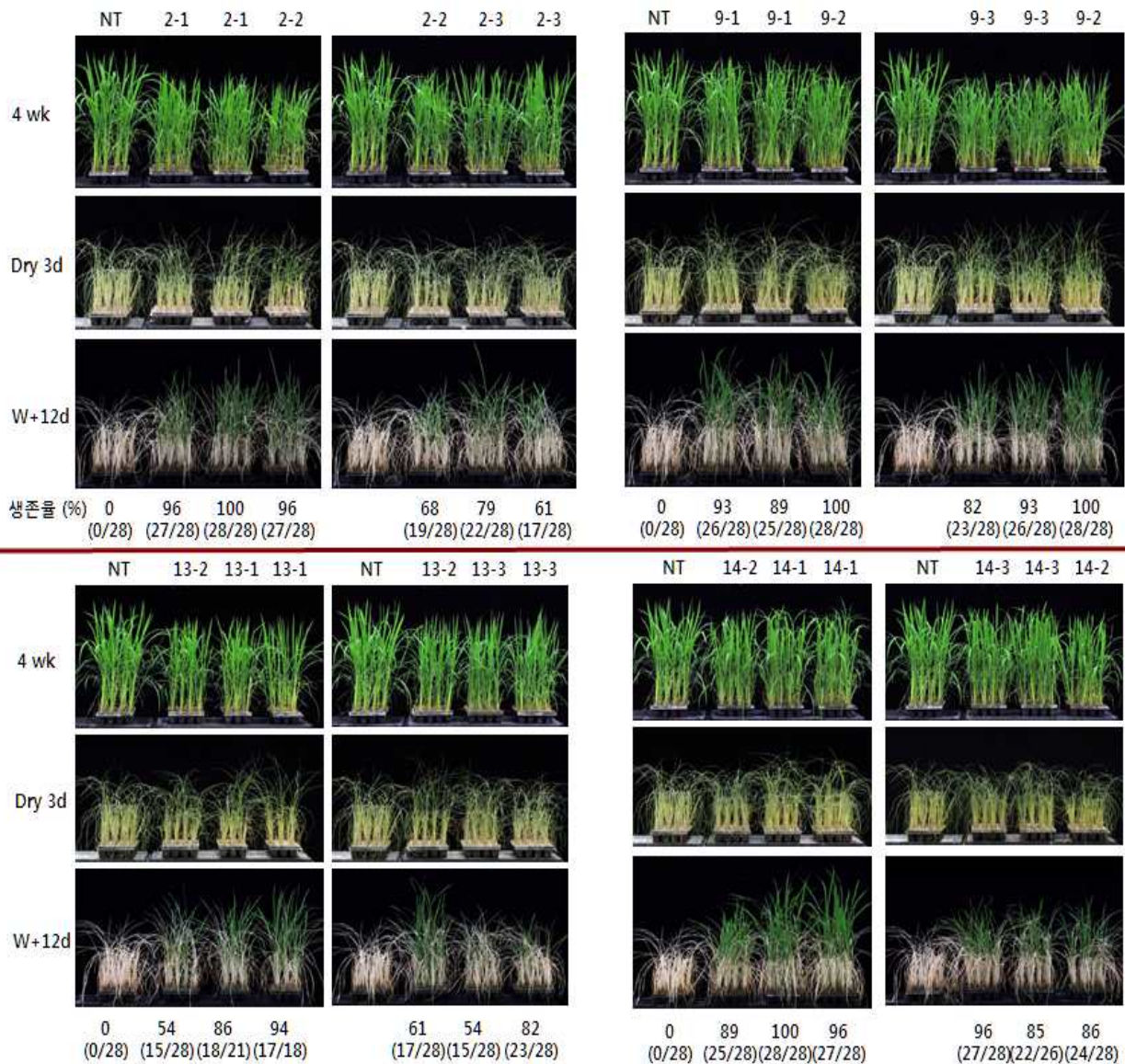


그림 16. AtMYB44 전이 일미벼의 가뭄저항성 시험

## 2. T3 plants의 농업형질

AtMyb44-Ilmi 형질전환 식물의 line 2, 9, 13, 14에 대한 농업적 특성을 대략적으로 파악해 보기 위해 2014년 경북대학교 GMO 시험포장에서 재배한 T3 세대를 대상으로 9가지 농업 형질을 측정하였다. 표 10은 NT 및 형질전환체의 T3 라인 별로 농업형질 값에 대한 평균(AVER)과 표준편차(SD)를 나타낸 것이고, NT의 평균값을 100%로 하여 각 형질전환 라인의 평균값을 백분율(%)로 환산하였다.



표 10. AtMyb44 전이 일미벼의 농업형질

Sublines	T2 plants					T3 seeds			
	CL (cm)	PL (cm)	NP	NSP	TNS	NFG	FR (%)	TGW (g)	1000GW (g)
NT	68.8±3.0	18.8±1.1	11.4±1.5	104.0±13.1	1184.9±188.4	1099.2±187.4	92.6±2.6	25.9±5.6	23.5±1.9
2-1	59.0±1.7	18.3±0.6	9.7±0.6	119.9±8.9	1159.3±122.1	1046.0±126.0	90.1±1.7	22.6±3.8	21.6±1.6
2-2	66.0±4.6	19.0±0.0	11.0±2.0	115.7±5.5	1265.7±173.6	1140.0±141.5	90.2±2.1	24.0±2.8	21.1±1.4
2-3	59.0±1.0	18.7±1.2	9.3±1.5	108.8±21.8	996.7±93.8	858.0±84.1	86.1±4.0	18.1±2.2	21.0±1.2
9-1	66.3±2.1	19.0±0.0	10.0±1.7	117.7±11.6	1180.0±256.9	1073.7±221.6	91.1±2.1	24.1±4.8	22.5±0.5
9-2	65.0±4.2	19.0±1.4	13.0±1.4	96.0±12.0	1239.5±20.5	1151.0±18.4	92.9±0.1	26.0±2.3	22.5±1.6
9-3	67.0±2.7	18.3±3.1	11.3±0.6	122.6±13.0	1392.0±192.2	685.7±100.8	49.2±0.8	16.2±3.4	23.4±1.6
13-1	74.0±1.0	18.3±0.6	13.0±1.0	102.1±3.9	1328.7±125.5	1185.3±126.2	89.1±1.2	25.3±3.6	21.3±0.9
13-2	68.7±3.2	18.7±0.6	11.0±1.7	98.6±5.8	1077.3±101.1	969.0±93.8	89.9±0.9	20.0±2.0	20.6±0.1
13-3	67.0±2.7	19.3±1.5	10.7±2.1	105.8±11.3	1123.3±202.9	1014.3±174.9	90.4±0.9	20.3±3.5	20.1±0.7

CL, culm length (cm); PL, panicle length (cm); NP, number of panicles per plant; NSP, number of spikelet per panicle; TNS, total number of spikelet; FR, filling rate (%); NFG, number of filled grains; TGW, total grain weight (g); 1000 GW, 1000 grain weight (g).

위 표에서 얻은 백분율(%) 값을 이용하여 NT와 형질전환체 라인 별로 농업형질을 비교해보기 위해 다음과 같이 스파이더그램으로 나타내었다(그림 17).

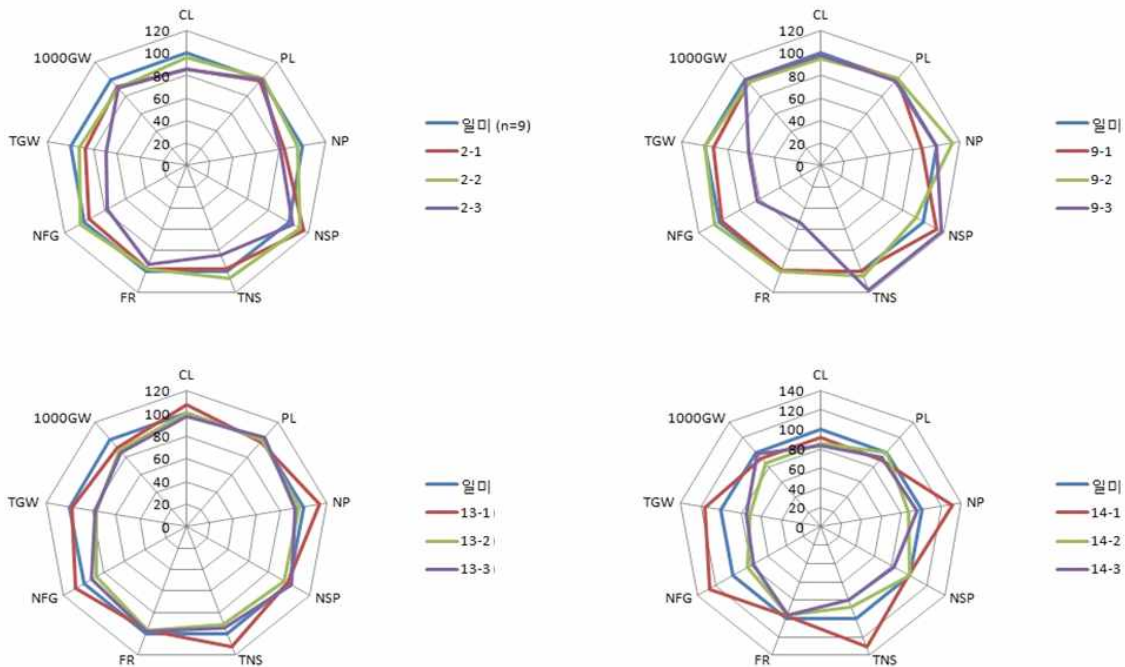


그림 17. AtMyb44 전이 일미벼의 농업형질 (spidergram)

그 결과 형질전환체의 line 2의 2-3은 NT에 비해 NFG(number of filled grains)가 80% 밖에 되지 않았으며, line 9의 9-3은 NT 대비 TNS(total number of spikelet)가 120%로 높았으나 NFG(number of filled grains), FR(filling rate), TGW(total grain weight)가 60%에 불과했다. 또한 line 13의 13-2와 13-3은 TGW(total grain weight)가 NT의 80%로 나타났다. 이러한 결과를 통해 2-3, 9-3, 13-2, 13-3의 농업생산성이 NT 및 다른 라인에 비해 현저히 떨어지는 것을 확인하였다.

Line 14의 경우 14-1의 NP(number of panicles per plant), TNS(total number of spikelet), NFG(number of filled grains), TGW(total grain weight)이 NT에 비해 120% 이상 높게 나타났다. 그러나 flanking sequencing 결과 line 14는 T-DNA가 intragenic region에 삽입된 것으로 확인되어 상품성 검증을 위한 추후의 분석에 포함시키지 않기로 하였다.

### 3. T4 종자 대량 수확

2015년 봄에 T3 종자를 경북 군위에 소재한 경북대학교 GM포장에 파종하고 같은 해 10월 말에 수확하였다(그림 18). 각 라인 별로 3-5 kg을 확보하였다. 이 종자들은 향후 생화학 성분분석, 염해 및 출수기 가뭄저항성 시험, 그리고 연계된 향후 안전성시험 등에 사용하기 위하여 냉장 보관하고 있다.



그림 18. AtMYB44 전이 일미벼 종자 (T4)

#### 4. 출수기 가뭄 저항성 시험

AtMyb44-Ilmi 형질전환 식물의 가뭄저항성 증가가 가뭄 스트레스시 수확량 변화에 어떠한 영향을 미치는지 실험해 보았다. 약 12주된 NT (일미) 및 형질전환체 line 2, 9, 13에 대한 T3 (2-1-1, 9-2-2, 13-1-3) 식물체를 온실에서 키웠다 (그림 19).

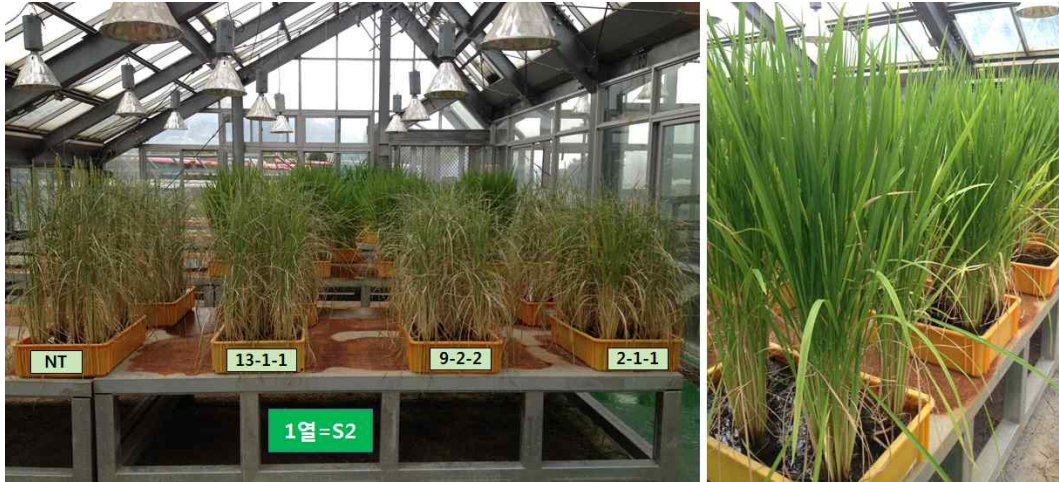


그림 19. 출수기 가뭄 저항성 시험

일반적으로 벼 꽃의 수정기에 가뭄 스트레스를 받게 되면 벼의 생산량이 크게 저하된다. 각 라인당 24개의 개체를 심은 후 8개씩 3 그룹으로 나누어 처리 따라서 벼꽃의 수정이 이루어질 것이라 예상되는 시기인 8월 중순경에 NT 및 TG 라인에 2일 및 3일 동안 가뭄 스트레스를 처리하였다(normal/S2/S3). 그 후 re-watering 하여 벼 식물체가 아예 고사하지 않도록 하여 생존율은 100%가 되게 하였다. 10월경에 종자를 수확하여 NT 및 TG 라인에서 normal 및 가뭄 스트레스 조건 하에서 종자 생산량에 어떠한 차이를 보이는 지 측정 비교하였다(그림 20, 표 11). 결론적으로 생장이 완료된 식물체에 생존에 큰 영향을 주지 않는 범위에서 가뭄조건을 부여했을 경우 NT나 형질전환체 간의 수확량 차이는 미미하였다.

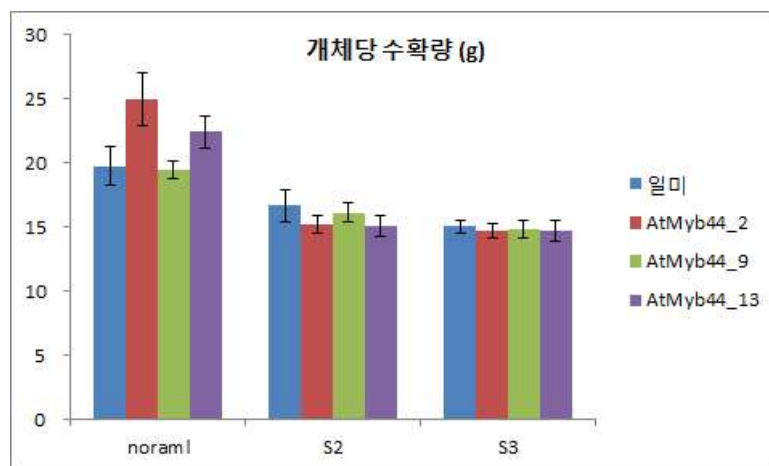


그림 20. 출수기 가뭄 저항성 시험 결과

표 11. 출수기 가뭄 저항성 시험 결과

	Normal				Stress_2d (S2)				Stress_3d (S3)			
	일미	AtMyb44_Ilmi			일미	AtMyb44_Ilmi			일미	AtMyb44_Ilmi		
		2	9	13		2	9	13		2	9	13
개체 당 확량 (g)	21.72	26.19	19.93	20.56	16.6	14.92	15.12	14.81	15.18	15.56	15.01	15.91
	19.13	22.09	18.67	22.35	15.71	15.35	14.92	14.85	15.07	14.31	15.32	15.18
	20.02	26.23	19.5	20.93	15.61	15.18	16.91	13.84	15.62	15.26	14.35	15.07
	19.78	25.84	19.19	22.1	16.67	14.24	16.01	16.11	14.69	14.41	13.62	15.07
	18.15	23.01	19.72	23.88	16.86	15.99	16.5	14.93	14.43	14.18	14.81	13.93
	18.66	23.48	20.45	23.19	17.72	14.64	16.56	16.5	15.95	15.15	15.82	14.39
	18.51	27.88	18.48	23.73	18.95	16.47	17.09	14.93	14.94	14.19	15.1	13.63
	22.18	-	-	22.52	15.22	14.9	16	14.6	14.55	14.75	14.9	-
Total	158.2	174.7	135.9	179.3	133.3	121.7	129.1	120.6	120.4	117.8	118.9	103.2
AVER	19.77	24.96	19.42	22.41	16.67	15.21	16.14	15.07	15.05	14.73	14.87	14.74
SD	1.49	2.11	0.70	1.21	1.22	0.72	0.79	0.85	0.52	0.54	0.66	0.79

### 5. 염해저항성

가뭄상황 하에서는 수분 함량이 감소함에 따라 염분 농도가 상대적으로 증가하게 된다. 그러므로 가뭄조건으로서 토양의 수분을 제거하고 건조시키는 방법으로 이미 염해를 측정할 것과 다름이 없다. 단지 간척지 등 염분 농도가 많은 토양에서도 생장이 증가되었을 가능성을 시험해 보았다.

AtMyb44-Ilmi 형질전환 식물의 염해저항성을 확인하기 위해 NT (일미) 및 형질전환체 line 2, 9, 13에 대한 T3 (2-1-1, 9-2-2, 13-1-3) 종자를 받아서 온실에서 3주간 키운 후 300 mM NaCl solution을 3일간 처리 (0-3 d) 후 소금물을 제거하고 re-watering (+1-+32 d) 하였다. AtMyb44-Ilmi 형질전환 식물의 염해저항성을 확인하기 위해 NT (일미) 및 형질전환체 line 2, 9, 13에 대한 T3 (2-1-1, 9-2-2, 13-1-3) 종자를 받아서 온실에서 3주간 키운 후 300 mM NaCl solution을 3일간 처리 (0-3 d) 후 소금물을 제거하고 re-watering (+1-+32 d) 하였다.

그 결과 소금물을 처리하는 동안 TG에 비해 NT에서 잎의 엽록체가 약간 더 빠르게 파괴되는 것이 관찰되었고, re-watering 동안에는 NT에 비해 TG 라인들이 약간 더 빠르게 살아나는 것을 확인할 수 있었다(그림 21). 또한 약 한달 간의 re-watering (+32 d) 후에도 NT 식물체들은 TG 라인에 비해 보다 큰 성장저해를 나타내었다.

그러나 그 결과가 수치화하여 비교할 만큼 유의성이 있는 정도는 아니었다. 이러한 결과를 통해 AtMyb44-Ilmi 형질전환체에서 염해 스트레스에 대한 저항성이 크게 증가되지 않은 것으로 결론하였다.

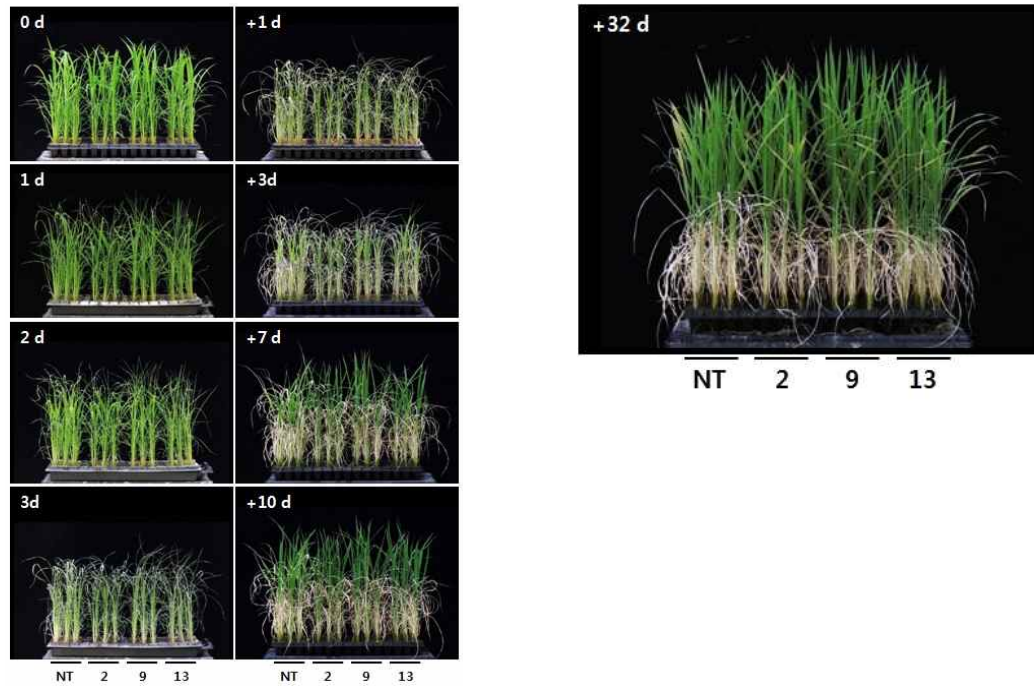


그림 21. 염해 저항성 시험 결과

## 6. 생화학 성분 분석

AtMYB44 전이 벼 T4 종자들의 생화학 성분을 분석하여 대조구인 일미벼와 비교하였다(표 12). 일반성분(general composition) 중, 수분(moisture)은 식품공전(2015)에 명기된 상압가열건조법, 지방(crude lipid)은 식품공전(2015)의 에테르추출법, 단백질(crude protein)은 Kjeldahl법, 회분(ash)은 식품공전(2015)의 회분시험법, 그리고 식이섬유(diet fiber)는 Enzymatic-gravimetric 법으로 정량하였다.

아미노산 조성은 HPLC analytical method로 분석하였다. 시료 분말을 0.05% (w/v) 2-mercaptoethanol을 함유한 6N HCL과 함께 110°C에서 24시간 가열함으로써 산분해를 시행하였다. 분석에는 High Speed Amino Acid Analyzer L-8900 (Hitachi, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 시료를 산으로 일차분해 하였으므로 tryptophan, asparagine, 및 glutamine 은 분석 되지 않았고, 또한 cystine도 별도로 분석하지 않았다.

그리고 지방산 조성은 AOAC Official Method 963.22 (1980) 방법인 gas chromatography로 분석하였다. Methylesterification 과정은 시료 분말을 0.5 N NaOH (in methanol)과 14% BF<sub>3</sub>-methanol solution로 처리하여 시행하였다. 결과로서 얻어진 fatty acid methyl-esters (FAMES)를 isoctane으로 추출하였는데, 이때 0.5 mg/mL C<sub>11:0</sub> triundecanoic acid methylester를 internal standard로서 함유하게 하였다. FAME analysis 분석은 gas chromatograph (6890N; Agilent, Santa Clara, CA)로 시행하였는데, flame ionization detector (FID)를 연결하고, HP-FFAP (polyethylene glycol-terephthalic acid; 25 m × 0.32 mm × 0.5 μm) column (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA)을 장착하였다. 이때 oven

temperature는 150°C 로 1 min하다가 4°C/min의 속도로 200°C까지 증가시킨 후 이 조건에서 10 min 동안 유지시켰다. Injector temperatures는 250°C로, 그리고 detector temperature는 260°C로 조절하였다. Hydrogen을 carrier gas 로 사용하면서 flow rate을 30 mL/min으로 고정하였다.

결과적으로 항목 간 다소의 차이는 있었지만 실제로 실험 오차범위를 보이는 경우는 찾기 어려웠다. 따라서 *AtMYB44*의 전이와 과발현이 일미벼의 생화학적 조성에 관련한 일반적인 대사에는 큰 영향을 주지 않았다고 결론하였다.

표 12. 생화학 성분 분석 결과

	NT (일미)	MYB44-2	MYB44-9	MYB44-13	비고	
General composition (g/100g)						
Moisture	6.3	6.5	6.3	6.0		
Lipid	2.7	2.2	2.7	2.6		
Proteins	7.1	6.7	6.9	6.8		
Ash	1.3	1.2	1.4	1.4		
Diet fiber	6.1	6.1	6.4	6.1		
Amino acid composition (mg/100g)						
Aspartic acid	654.5	629.4	656.1	635.6		
Threonine	236.7	231.4	240.7	229.3		
Serine	342.0	325.9	332.5	332.9		
Glutamic acid	1345.2	1320.1	1371.5	1309.2		
Proline	257.3	248.6	251.1	252.2		
Glycine	333.4	321.0	333.0	324.8		
Alanine	404.0	393.9	411.8	406.0		
Valine	312.0	331.1	362.0	308.7		
Methionine	117.6	119.0	121.6	113.4		
Isoleucine	214.4	225.8	249.5	207.1		
Leucine	568.7	563.6	590.5	553.4		
Tyrosine	98.6	77.7	88.3	78.5		
Phenylalanine	343.2	340.9	360.1	335.5		
Lysine	273.7	260.7	276.4	261.3		
Histidine	160.7	157.6	167.1	154.3		
Arginine	431.8	434.2	468.3	420.5		
Total	6,093.8	5,980.9	6,280.5	5,922.7		
Fatty acid composition (%)						
Saturated fatty acid	C14:0	0.1	0.2	0.2	0.2	마리스트산
	C16:0	16.8	16.2	16.9	17.0	팔미트산
	C18:0	1.6	1.6	1.6	1.6	스테아르산
	C20:0	0.6	0.6	0.5	0.5	아라키드산

	C24:0	0.6	0.6	0.7	0.5	리그노세르산
	Total	19.7	19.2	19.9	19.8	
Un-saturated fatty acid	C16:1	0.1	0.1	0.1	0.1	팔미톨레산
	C18:1	42.6	43.5	41.4	40.6	올레산
	C18:2	35.7	35.3	36.8	37.5	리놀레산
	C18:3	1.3	1.3	1.3	1.4	리놀렌산
	C20:1	0.6	0.6	0.5	0.5	가드올레산
	Total	80.3	80.8	80.1	80.1	
Unknown		0.0	0.0	0.0	0.1	
Total		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

## 제 6 절 연구개발성과

### 1. 연구성과물

- 과제 협약 시 제시하였던 목표를 효율적으로 달성하여 단일 copy, homozygote, intergenic insert가 확증되고 현저한 가뭄저항성이 증명된 3개의 라인의 형질전환 일미벼를 개발하였다.
- 각 라인의 T4 종자 3 kg 썩을 확보하고 있으며, T5 종자를 수확하고 있다(2016년 11월 초순).



T4    NT    2-1    9-2    13-1

### 2. 논문게재 성과

- 아래 표와 같이 12편의 논문을 발표하였으며, 현재 1편의 논문을 작성하여 제출하고 심사 중이다.

논문(국내외 전문학술지) 게재							
번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI 여부
1	Quadruple 9-mer-based Protein Binding Microarray Analysis of the <i>Arabidopsis</i> Transcription Factor AtMYB77	J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.	Nam Iee Oh	55(6), 819-822, 2012	대한민국	한국응용생명화학회	
2	Quadruple 9-mer-based protein binding microarray analysis confirms AACnG as the consensus nucleotide sequence sufficient for the specific binding of AtMYB44	Mol. Cells	Choonkyun Jung	34(6), 531-537, 2012	대한민국	한국분자세포생물학회	SCI
3	Overexpression of the 3'(2'),5'-Bisphosphate Nucleotidase Gene <i>AtAHL</i> Confers Enhanced Resistance to <i>Pectobacterium carotovorum</i> in <i>Arabidopsis</i>	J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.	Hyon Jin Park	56(1), 21-26, 2013	대한민국	한국응용생명화학회	SCI(E)
4	Rice ASR1 has function in abiotic stress tolerance during early growth stages of rice	J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.	Joungsu Joo	56(3), 349-352, 2013	대한민국	한국응용생명화학회	SCI(E)
5	Abiotic stress responsive rice ASR1 and ASR3 exhibit different tissue-dependent sugar and hormone-sensitivities	Mol. Cells	Joungsu Joo	35(5), 421-435, 2013	대한민국	한국분자세포생물학회	SCI
6	A transcriptional repressor of the ERF family confers drought tolerance to rice and regulates genes preferentially located on chromosome 11	Planta	Joungsu Joo	238(1), 155-170, 2013	국제	Springer	SCI
7	Over-expression of <i>BvMTSH</i> , a fusion gene for maltooligosyltrehalose synthase and maltooligosyltrehalose trehalohydrolase, enhances drought tolerance in transgenic rice.	BMB Reports	Joungsu Joo	47(1), 27-32, 2014	대한민국	한국생화학분자생물학회	SCI(E)
8	Overexpression of the rice basic leucine zipper transcription factor OsbZIP12 confers drought tolerance to rice and makes seedlings hypersensitive to ABA	Plant Biotech. Rep.	Joungsu Joo	8(6), 431 - 441, 2014	대한민국	한국식물생명공학회	SCI(E)
9	RiceCatA,CatB,andCatCareInvolvedinEnvironmentalStressResponse,RootGrowth,andPhotorespiration,Respectively	J. Plant Biol.	Joungsu Joo	57(6), 375-382, 2014	대한민국	한국식물학회	SCI(E)
10	Rice ASR1 regulates sugar levels and participates in sugar signaling in roots	J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.	Joungsu Joo	58(2), 161 - 167, 2015	대한민국	한국응용생명화학회	SCI(E)
11	Detection of early intermediates of glycosylphosphatidylinositol anchor in liquid-cultured <i>Arabidopsis</i>	J. Appl. Biol. Chem.	Jong-Joo Cheong	58(1), 9-11, 2015	대한민국	한국응용생명화학회	
12	determination of the consensus sequence for FUS3-specific binding by protein binding microarray analysis	J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.	Yeon-Ki Kim	58(5), 723-728, 2015	대한민국	한국응용생명화학회	SCI(E)



### 3. 특허성과

- 국내특허 1편을 작성하고 있는 중이다. 본 연구과제의 선행연구결과로서 본 연구책임자가 등록한 기존 국내특허의 유효기간이 2016년 09월까지이므로, 그 동안 새로운 특허를 출원하지 못하였다. 과제 종료 직후 출원하도록 준비 중이다.
- 기존특허 (재등록 포기로 2016년 9월 30일 등록취소)
  - 대한민국 특허등록 10-0792169-0000 (2007.12.31)
  - 출원인: 재단법인 서울대학교 산학협력재단
  - 발명자: 정종주, 최양도, 정춘균, 구연중, 서준성
  - 제목 : 전사인자 AtMYB44의 유전자 전이를 통하여 광엽화, 개화지연 및 환경스트레스 저항성 식물체를 제조하는 방법

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
------	------

### 제 1 절 목표달성도

구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2011-2012)	일미 벼 callus 확보	100	일미 벼 callus 대량 확보 성공
	DNA construct 제작	100	<i>tflA::AtMYB44::pCAMLA</i> 제작
	유전자 전이	100	아그로박테리움 이용 유전자 전이
	조직배양	100	toxoflavin 선별 조직 배양
	성체 확보	100	shoot, root 발달 유도 후 73개 성체로 배양
2차 년도 (2012-2013)	T1 종자 확보	100	59 계통 종자 확보
	T1 종자 선별	100	Toxoflavin 저항성 58계통 선별
	종자파종 및 세대전개	100	58 계통, 총 699 개체 파종, 재배
	일차 표현형 검정 (8월)	100	외관, 생장과정 관찰
	T2 종자 수확 (10월) 준비	100	추수 계획, 저장 준비
3차 년도 (2013-2014)	T2 종자 확보	100	58 계통 종자 확보
	T2 종자 선별 및 파종	100	Toxoflavin 저항성 기준 선별 및 20계통 파종, 재배
	T2 식물체 저항성 검정	100	선발 계통들의 가뭄저항성 측정
	도입유전자 검정	100	선발 계통들의 도입유전자 증폭(PCR) 시험 시행
	T3 종자 수확 (10월) 준비	100	20계통 각 sub라인별 종자 수확
4차 년도 (2014-2015)	T3 종자 확보, 선별, 파종	100	10 계통 3 subline x 8 개체 종자 수확 파종
	도입유전자 분석	100	PCR 도입유전자 검정 (Homozygote 확정) qPCR (line 별 유전자 발현량 측정)
	유전체 도입부 분석	100	Flanking sequencing으로 intergenecity 확인 Southern blotting (copy 수 확정)
	T3 식물체 농업형질 분석	100	라인별 표현형 및 수확량 측정
	T4 종자 수확 준비 (추수)	100	3개 우수 라인별 종자 3kg 이상
5차 년도 (2015-2016)	T4 종자 확보, 선별, 파종	100	4 계통 3 subline x 8 개체 종자 수확 파종
	가뭄저항성 시험	100	출수기 가뭄저항성 시험 완료
	염해저항성 시험	100	염해저항성 시험 완료
	식품 생화학 성분 분석	100	라인별 표현형 및 수확량 측정
	T5 종자 수확 준비 (추수)	100	3개 우수 라인별 종자 수확 예정 (11월 초)

## 제 2 절 관련분야 기여도

- 저수분, 염분 저항성을 조절하는 기능을 가진 유전자에 관한 연구를 조사하여 분석하여 본 결과, 기존 논문에서 사용한 유전자들은 다소 비특이적(non-specific)으로 작용하여 다른 대사를 촉발 또는 억제시키는 부작용을 갖는 경우가 많다. 결과로서 형질전환 작물의 영양성분이나 물성 등이 변화되어 상품성을 잃는 경우가 많다. 전이 후 표현형과 생화학 성분 분석을 통하여 본 연구에 사용한 AtMYB44의 기능 특이성이 애기장대, 콩 등의 dicot 뿐 아니라 벼(monocot)에 대한 전이 실험에서 입증되었다.
- AtMYB44는 식물저항성 반응을 유도하는 호르몬 abscisic acid (ABA)에 의하여 기공(stomata)의 개폐를 조절함으로써 수분 증산을 막는 역할을 한다. 빛이나 기타 요인으로 기공개폐를 유도하는 전사인자는 일부 발표되었으나, 현재까지 ABA에 의하여 작용을 하는 전사인자로서는 AtMYB44가 독보적이다.
- 전이할 목적유전자들에 대한 지적재산권들이 청구되어 있는 바, 이들을 사용할 경우 기존 특허권 보유자와의 분쟁이 필연적이다. 본 연구에 사용한 *AtMYB44*는 본 연구실에서 발굴하여 논문과 특허를 제출하였으므로 우리 고유의 연구개발 성과로 만들어 갈 수 있다.
- 벼 유전자전이에 실험용으로 쓰는 품종들은 전이효율이 높고 재분화 조건이 잘 잡혀 있어 개발에 용이하지만, 상품성이 없는 경우가 대부분이다. 본 연구에서는 상품성이 있는 국내 품종 '일미'에서 callus를 확보하여 재분화를 시행하였으므로, 상품성 품종과의 교배 단계를 축소할 수 있다.
- 식물 형질전환 연구개발에 필수적으로 사용해야 하는 선별유전자의 지적재산권을 외국 또는 다국적 기업이 갖고 있는 경우가 대부분이다. 따라서 품종 개발 후 높은 royalty에 대한 문제와 허가 등의 문제로 인하여 국제시장에 진출하기가 어렵게 된다. 본 연구에서는 국내 과학자가 지적재산권을 보유하고 있는 유전자를 법적 허락 하에 선별시험에 사용함으로써 위와 같은 문제를 최소화하였다.
- 기존 특허는 벼 유전자 전이 단계에서 선별마커로서 주로 항생제 또는 제초제 저항성 유전자를 사용한다. 이 경우 상품화 단계에서 소비자들의 안전성에 관련한 거부감에 부딪치게 된다. 본 연구과제에서는 독성물질을 분해하는 효소의 유전자를 선별마커로 사용함으로써 안전성에 대한 우려를 최소화 할 수 있도록 하였다.

## 제 5 장 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

### 제 1 절 연구개발결과의 활용방안

- 본 연구에서 개발된 내재해성 형질전환 벼는 안전성 시험, 품종개발 등의 실용화 과정을 거쳐 농가에 보급할 수 있는 방안을 모색한다.
- 과제 수행의 결과를 논문으로 발표하고, 특허를 출원하여 지적재산권을 확보함으로써, 종자특허와 제작기술을 직접 시장에 출시하도록 추진한다.

### 제 2 절 품종화를 위한 안전성 시험 계획

- 본 연구에서 개발된 내재해성 형질전환 벼를 실용화하기 위해서는 안전성 시험의 단계를 거쳐 품종등록을 해야 한다.
- 한국생물공학연구원 안전성평가센터에 질의하여 안전성 시험에 소요되는 기간과 연구비를 예단하여 보았다. 회신에 따르면 2년, 총 13억이 소요될 전망이다. 연구재단이나 농기평, 농진청 등에 연구팀을 구성하여 연구비 신청한다고 가정하고, 간접비 포함해서 대략적으로 계산해 본 결과이다.

#### 가. 농업형질 평가 (2년, 3억)

- 3개 지역 포장시험 : 1.5억 x 2년 = 3억
- 가뭄저항성 시험용 온실 규모 실험
- 미질 평가를 위한 물성 시험

#### 나. 인체위해성평가 (2년, 3억)

- 단백질 생산 정제, 단회 경구투여 독성시험 : 5천만원
- 대리단백질과 식물단백질의 상동성 검정 (N말단 분석 등) : 5천만원
- 90일 반복투여 독성시험 : 벼 종자 이용, 1억원
- 벼 종자 영양성분 및 항영양성분 분석: 1억원

GM벼, 대조품종, 참조품종 (3개 지역 생산)

#### 다. 환경위해성평가 (2년, 7억)

- 유전자이동성 평가: 7천 x 2년 = 1.4억
- 잡초화 가능성 평가: 7천 x 2년 = 1.4억
- 곤충상 조사: 7천 x 2년간 실시 = 1.4억
- 토양미생물상 조사: 7천 x 2년간 실시 = 1.4억
- 식물별 발생 조사: 7천 x 2년간 실시 = 1.4억

- 일반적으로 인체 및 환경위해성평가 만 수행하는 과제는 2년 이상 진행한다고 한다. 참고로 이 연구센터에서 파악한 바, 현재 진행 중인 농진청 바이오그린21의 GM개발사업단 과제의 경우 과제 당 2년간 약 14억 정도의 연구비를 책정한다고 한다.

## 제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호

D-08

### 제 1 절 기후변화

지구 온난화 등 기후변화와 이에 따른 작물재배 환경의 파괴는 우리나라 뿐 만 아니라 세계적인 추세로서, 긴박하게 해결책을 모색해야 하는 중대 과제로 부상하고 있다. 급격한 세계적 인구증가 추세에 반하여, 지구의 기후 및 생태환경 변화와 경지면적의 감소로 식량 확보는 점차로 심각한 위기에 처하게 되었다.

기상 예측 전문가들의 공통된 의견으로서, 2060년경 지구 평균기온이 4°C 상승할 것으로 전망된다. 지구가 1,000만년 만에 가장 더워진다는 것을 의미한다. 또 2100년에는 해수면이 지금보다 1.8m 상승, 해안지대에 살던 수억 명의 주민들이 이재민이 된다. 바다의 상당부분은 데드존으로 변할 것이며 빙하와 산호초 대부분이 사라질 것으로 예측하고 있다. 현재의 적응력으로는 버틸 수 없을 만큼 강력한 환경 재앙의 도래를 우려하는 목소리가 높다.

다른 작물들과 마찬가지로, 벼 재배에 있어 수확량을 결정하는 가장 결정적인 요인은 가뭄, 냉해, 고온 등 기후조건과 염분, 토양 등 재배지역의 영양조건이다. 최적 환경조건을 인위적으로 조성하는 것은 불가능하기 때문에, 열악한 환경조건 하에서도 최대의 수량을 만들어 낼 수 있는 저항성 품종의 개발은 매우 중요하다.

### 제 2 절 생명공학을 통한 분자 육종

동종 식물 간의 교배(intra-species cross)에 의존한 품종 개발 방법은 유전자원의 고갈로 한계에 이르렀다. 최근 유용유전자 이식을 통한 형질전환 기술의 적용이 식량작물에 대해서도 보편화 되어, 21세기 식량문제 해결에 밑거름이 될 것으로 전망된다. 이러한 추세에 편승하여, 생명공학 기법을 통하여 다양한 환경스트레스 저항성 유전자를 전이함으로써 한발, 염해 등 광범위한 환경재해에 대하여 그 영향을 최소화할 수 있는 품종을 개발하고자 하는 연구가 세계적으로 활발히 진행되고 있다.

생명공학을 통하여 개발된 일부 유전자변형(GM) 작물은 1996년부터 상품화되었고, 최근 들어 그 개발과 보급이 급진전을 이루어 2015년에는 세계적으로 1억7,970만 (179.7 million) ha에 이르는 경지 면적에서 재배되었다(James, 2015). 이는 생명공학작물의 상업화가 처음 시작된 1996년의 170만 헥타르에서 100배 이상 증가한 수치이다.

구분	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
콩	25.8	33.3	36.5	41.4	48.4	54.4	58.6	58.6	65.8	69.2	73.3	75.4	80.7	84.5	90.7	92.1
옥수수	10.3	9.8	12.4	15.5	19.3	21.2	25.2	35.2	37.3	41.7	46.8	51.0	55.1	57.4	55.2	53.6
면화	5.3	6.8	6.8	7.2	9.0	9.8	13.4	15.0	15.5	16.1	21.0	24.7	24.3	23.9	25.1	24.0
캐놀라	2.8	2.7	3.0	3.6	4.3	4.6	4.8	5.5	5.9	6.4	7.0	8.2	9.2	8.2	9.0	8.5
전체	44.2	52.6	58.7	67.7	81.0	90.0	102.0	114.3	125.0	134.0	148.0	160.0	170.3	175.3	181.5	179.7

(단위: million ha)

2015년 기준으로 전세계 28개국 1,800만 명의 농민들이 생명공학작물을 재배하고 있으며, 이 중 90%는 개발도상국의 영세한 농민들이 차지하고 있다. 특히 생명공학작물을 재배하는 국가 중 개발도상국의 성장세가 두드러졌으며 2015년에는 쿠바 대신 베트남이 여기에 가세하였다. 28개국 중 8개국은 미국 등 산업 국가였고 21개국은 개발도상국이다. 세계 인구의 60%에 이르는 약 40억의 인구들이 이들 30개의 개발도상국가에 살고 있다. 생명공학작물을 재배하는 상위 5개국은 미국, 브라질, 아르헨티나, 인도 그리고 캐나다의 순으로 조사되었다. 미국은 총 7,090만 헥타르에서 옥수수(93%), 콩(94%), 면화(96%)와 같은 주요작물이 90% 이상의 채택율을 보이며, 생명공학작물 재배를 선도하는 것으로 나타났다. 브라질과 아르헨티나는 각각 4,420만 헥타르, 2,450만 헥타르의 재배면적으로 미국의 뒤를 이었다. 특히, 2014년에는 기후변화 대응작물의 중요성이 인식되면서, 미국에서는 가뭄에 견디는 생명공학 옥수수가 전년도보다 약 5배 이상 증가한 27만 5천 헥타르의 농경지에서 재배되는 등 미국 농민들의 높은 관심도를 확인할 수 있었다.

2015년 유전자변형 작물별 재배 면적 현황을 보면, 콩이 9,210만 ha로서 세계 총 재배 면적 1억7,910만 ha 중 51%를 차지하였으며, 옥수수 5,360만 ha (30%), 면화 2,400만 ha (13%), 카놀라 850만 ha (5%)의 순서였다. 전체 재배면적 중 GM 품목이 차지하는 비중은 콩의 경우 83%, 면화가 75%, 옥수수는 29%, 그리고 카놀라는 24%로 나타났다.

작물	전체 재배면적* (A)	LMO 재배면적 (B)	비중(B/A) (%)
콩	111	92.1	83
면화	32	24.0	75
옥수수	185	53.6	29
유채(카놀라)	36	8.5	24
합계	364	178.2	49

자료 ISAAA(2015) (단위: 백만 ha)

형질 별로 보면, 제초제 저항성은 콩, 옥수수, 캐놀라, 면화, 알팔파에 적용되어 2015년 세계 유전자변형 작물 총 재배면적의 54%인 5,850만 ha에서 재배되었다. 해충저항성 작물은 2,520만 ha (13%), 제초제 및 해충 저항성이 복합된 후대교배종 식물은 4,710만 ha (33%)를 차지하였다. 이 외 가뭄 및 염해 등 재배 환경 스트레스 저항성 품종을 개발하고자 하는 노력은 세계적 경쟁 속에서 꾸준히 진행 되어 왔으나, 현재 이러한 환경 스트레스 저항성 작물이 상품화된 바는 그 사례를 찾을 수 없다.

### 제 3 절 유전자변형(GM) 작물의 개발 효과

ISAAA(James, 2014)의 자료에 따르면, 2014년 새롭게 실시된 글로벌 메타분석을 통해 지난 20년간 생명공학작물이 여러가지 중요한 혜택을 제공하였음이 확인되었다. 전세계의 147개 생명공학관련 연구논문을 메타분석한 결과 지난 20년간 “생명공학기술 채택으로 인해 평균 농약사용이 37% 절감되었고, 수확량이 22% 증가했으며, 농가 수익은 68% 증대되었다”는 것이 확인되었다.

최신 입시 데이터는 1996년부터 2013년까지 생명공학작물이 식량안보, 지속가능성 그리고 환경 및 기후변화에 다음과 같이 기여하였음을 보여주었다. 즉, 1,330억 달러 규모의 작물생산 가치 향상; 1996년부터 2012년까지 유효성분기준으로 약 5억 kg의 농약사용 절감으로 더 나은 환경 제공; 2013년 단독으로 최대 1,240만대의 차가 일년간 도로에 달리는 것에 상응하는 이산화탄소 양인 280억 kg의 이산화탄소 배출 감소; 1996년부터 2013년까지 1억 3,200만 헥타르 상당의 토지를 지켜냄으로써 생물다양성 보존; 그리고 전세계 6,500만 이상에 달하는 최빈곤층의 일부인 1,650만 명 이상의 영세 농업인구를 도와 빈곤완화에 기여한 것 등이다. 생명공학작물은 꼭 필요한 것이지만 모든 문제의 해결책은 아니므로, 관행작물의 재배 시와 마찬가지로 윤작 및 저항성관리 등의 이로운 농법을 병행하는 것도 중요하다.

개발도상국과 산업 선진국 시장 모두에서 주요작물의 채택율(90%-100%)이 이미 높기 때문에 연간수익 증가가 조심스럽지만 낙관적으로 예측되고 있다. 미래 파이프라인은 향후 5년 내에 이용가능한 새로운 생명공학작물로 가득하며, 70여개 이상의 상업화 가능성 품목의 목록은 ISAAA보고서에 수록되어 있다. 여기에는 새롭고 다양한 작물과 형질이 포함되어 있고, 병해충 저항성 및 제초제 내성 특징을 모두 가진 품목들도 포함되어 있다; 황금쌀의 포장시험이 진행되고 있으며, 방글라데시, 인도네시아, 인도에서는 감자역병 저항성 감자의 포장시험이 진행되고 있다. 미국에서는 이미 Simplot사가 역병 저항성과 저환원당의 특징을 가진 Innate™ 감자에 대한 승인요청을 한 상태이다. 특히 아프리카에서는 영양강화 바나나와 해충저항성 동부콩 등 빈곤 경감 작물의 전망이 밝아 보인다. 민관 협력(Public-Private Partnership; PPP)을 통한 생명공학작물의 개발 및 승인이 비교적 성공적으로 이루어졌으며, 4개의 민관협력(Public-Private Partnership) 사례연구(남쪽에 위치한 세 개 대륙의 여러 작물과 형질에 대해 다루고 있음) 내용 또한 ISAAA보고서에서 찾아 볼 수 있다.

## 제 7 장 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 특별히 보안을 요하는 내용은 없음.		

## 제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10		
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호



## 제 9 장 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호

D-11

- 연구 활동 종사자 환경안전교육 실시
  - 가. 정기교육 및 온라인 교육: 환경안전관리 외 14과목(전공별 12과목 수강)
    - 정기교육 기간: 2월, 8월
    - 온라인교육 기간: 3월, 9월
  - 나. 수시교육: 수시(기관의 요청에 의해 실시)
  - 다. 병원체 및 LMO 실험실 안전교육 (기간: 2월 - 8월)
    - 내용: 생물안전에 관한 이론교육(3시간) 및 실무교육 병행
  - 라. 방사선 안전교육: (2월) 방사선안전이론교육(6시간)과 방사선취급 실습교육 병행
- 실험실 안전점검
  - 가. 실험 특성에 따라 유형별로 분류하여 일상점검, 정기점검, 특별안전점검, 정밀안전진단 실시
  - 나. 실험실 분류기준:
    - A형 : 미생물 및 동물(LMO), 방사성동위원소 물질 등을 사용하는 실험실
    - B형 : 화학약품 등을 사용하는 실험실
    - C형 : 기계·전기 설비 등 사용 실험실
    - D형 : 실험·실습을 수행하지 않는 설계·컴퓨터 관련 등의 실험실
- 실험실 안전사고 대응 및 예방
  - 가. 화학약품 누출 대응 장비함을 소속 17개 기관 34개를 설치함
  - 나. 실험실 안전사고 대응조직을 설치하여 대응 및 처리 매뉴얼 보완 및 사고 대응 훈련 실시하여 유사사고 발생 시 대응능력 향상
  - 다. 실험실 안전사고 사례를 이-메일을 통해 전파
  - 라. 실험실 사고처리 흐름도 및 비상연락스티커 제작 배포
- 실험실 환경개선사업 실시
  - 교과부에서 지원하는 실험실 환경개선사업을 통해 밀폐형 시약장과 인화성 화학약품 저장 캐비닛을 각 기관에 배포하여 실험실 환경 개선 유도
- 실험폐기물관리 강화:
  - 실험폐수 관리를 위해 처리의뢰부터 반출까지의 이력을 추적 관리하는 실험폐수처리 의뢰 프로그램 구축, 실험폐기물 발생 저감을 위해 환경안전교육 실시
- 공기오염도 조사 실시 (9월 - 12월)
  - 내용 : 미세먼지, 휘발성유기화합물, 포름알데히드, 이산화탄소 등 7가지 항목
- 실험실 통합관리 프로그램 구축
  - 전 실험실 대상 기관별, 건물별, 층별, 실험실별로 위험요소 및 안전관리 현황을 파악하여 실험실 안전사고를 예방하고, 쾌적한 실험실 환경을 조성
- 연구활동 종사자 특수건강검진 실시 및 보험가입
  - 「특수건강진단 대상 유해인자」 및 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구활동 종사자를 모니터링하여 특수건강검진 실시
  - 매년 정기적으로 보험가입 및 갱신처리를 지속적으로 이행함

## 제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	코드번호		논문게 재일 /특허 등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사 항 (SCI여 부/인용 횟수 등)
						Impact Factor	D-12			
1	논문	Quadruple 9-mer-based protein binding microarray analysis confirms AACnG as the consensus nucleotide sequence sufficient for the specific binding of AtMYB44	서울 대학교	교신 저자	Molecules and Cells	2.670	2012. 12.31	중복사사	SCI	
2	논문	Overexpression of the 3'(2'),5'-Bisphosphate Nucleotidase Gene <i>AtAHL</i> Confers Enhanced Resistance to <i>Pectobacterium carotovorum</i> in <i>Arabidopsis</i>	서울 대학교	교신 저자	Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry	0.655	2013. 02.28	중복사사	SCIE	
3	논문	Abiotic stress responsive rice ASR1 and ASR3 exhibit different tissue-dependent sugar and hormone-sensitivities	명지 대학교	교신 저자	Molecules and Cells	2.670	2103. 05.31	단독사사	SCI	
4	논문	A transcriptional repressor of the ERF family confers drought tolerance to rice and regulates genes preferentially located on chromosome 11	명지 대학교	교신 저자	Planta	3.239	2013. 04.19	단독사사	SCI	
5	논문	Over-expression of <i>BvMTSH</i> , a fusion gene for maltooligosyltrehalose synthase and maltooligosyltrehalose trehalohydrolase, enhances drought tolerance in transgenic rice.	명지 대학교 (공동연 구원)	교신 저자	BMB Reports	2.782	2014. 01.31	단독사사	SCIE	

## 제 11 장 기타사항

	코드번호	D-13
○ 없음		

## 제 12 장 참고문헌

코드번호

D-14

- AOAC (1980) Official methods of analysis, (13rd ed.) Association of Official Analytical Chemists. Washington DC, USA.
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Plant J 6:271 - 282.
- James C (2014) Global status of commercialized biotech/GM crops: 2014, ISAAA.
- James C (2015) Global status of commercialized biotech/GM crops: 2015, ISAAA.
- Jung C, Seo JS, Han SW, Koo YJ, Kim CH, Song SI, Nahm BH, Choi YD, Cheong J-J (2008) Overexpression of *AtMYB44* enhances stomata closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic Arabidopsis. Plant Physiol 146:623 - 635.
- Kim JS, Kim J, Lee T-H, Jun KM, Kim TH, Kim Y-H, Park H-M, Jeon J-S, An G, Yoon U-H, Nahm B-H, Kim Y-K (2012) FSTVAL: a new web tool to validate bulk flanking sequence tags. Plant Methods 8:19.
- Koh S, Kim H, Kim J, Goo E, Kim Y-J, Choi O, Jwa N-S, Ma J, Nagamatsu T, Moon JS, Hwang I (2011) A novel light-dependent selection marker system in plants. Plant Biotechnol J 9:348 - 358.
- Seo JS, Sohn HB, Noh K, Jung C, An JH, Donovan CM, Somers DA, Kim DI, Jeong S-C, Kim C-G, Kim HM, Lee S-H, Choi YD, Moon TW, Kim CH, Cheong J-J (2012) Expression of the *Arabidopsis AtMYB44* gene confers drought/salt-stress tolerance in transgenic soybean. Mol Breed 29:601 - 608.
- 식품공전 (2015) <http://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/index.jsp>, 식품의약품안전처

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.