

11-1543000  
-001918-01

난쟁이  
표현형 유전자 발현 억제  
방법을 이용한 관상용  
난쟁이 형질전환식물  
개발 및 산업적 응용  
최종보고서

2017

농림축산식품부

# 농생명산업기술개발사업 R&D Report

발간등록번호

11-1543000-001918-01

## 난쟁이 표현형 유전자 발현 억제 방법을 이용한 관상용 난쟁이 형질전환식물 개발 및 산업적 응용 최종보고서

2017.09.09.

주관연구기관 / 경희대학교 산학협력단  
협동연구기관 / 우리꽃

농림축산식품부

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “난쟁이 표현형 유전자 발현 억제 방법을 이용한 관상용 난쟁이 형질전환 식물 개발 및 산업적 응용” (개발기간 : 2012.08.10. ~ 2017.08.09.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017년 9월 9일

주관연구기관명 : 경희대학교 산학협력단



참 여 기 관 명 : 우리꽃



주관연구책임자 : 이 윤 형

협동연구책임자 : 최 근 원

참여기관책임자 : 박 공 영

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	112019-5	해당 단계 연구 기간	2012.08.10.~ 2017.08.09.	단 계 구 분	1/1
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세 부 과 제 명	난쟁이 표현형 유전자 발현 억제 방법을 이용한 관상용 난쟁이 형질전환식물 개발 및 산업적 응용			
연구책임자	이윤형	해당단계 참 여 연구원 수	총: 35명 내부: 23명 외부: 12명	해당단계 연구개발 비	정부: 900,000천원 민간: 300,000천원 계: 1,200,000천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 35명 내부: 23명 외부: 12명	총 연구 개발비	정부: 900,000천원 민간: 300,000천원 계: 1,200,000천원
연구기관명 및 소속부서명	경희대학교 산학협력단			참여기업명: 우리꽃	
위탁연구	(해당 없음)			연구책임자:	

*Echinacea*, *Coreopsis* 관상작물 유래 난쟁이 표현형 유전자를 분리하고 형질전환 난쟁이 식물체 확보를 위한 RNAi 벡터시스템을 구축한 후 *Echinacea*, *Coreopsis* 관상작물 형질전환 및 재분화 체계를 확립함. *Echinacea*, *Coreopsis* 관상작물의 RNAi 벡터시스템 형질전환 연구를 수행하여 RNAi 벡터시스템이 도입된 형질전환 *Echinacea*, *Coreopsis* 식물체를 확보하고 난쟁이 관상작물 형질전환체의 유전분석 및 기능분석 연구를 수행함. RNAi 벡터시스템이 도입된 형질전환 *Echinacea*, *Coreopsis* 식물체는 대조군에 비해 크기가 20 ~ 60% 정도 감소된 난쟁이 표현형을 보였고 난쟁이 표현형 유전자의 발현은 대조군에 비해 감소하였으며 BR 호르몬의 생성에도 차이를 보였음. 난쟁이 표현형 단백질의 *in vitro* 활성을 검증하고 난쟁이 표현형 유전자를 과 발현하는 식물체를 확보하고 유전정보 분석, 표현형 분석 및 BR metabolite 함량 비교 분석 등의 연구를 통해 관상작물 유래 난쟁이 표현형 유전자의 기능을 확인함. 관상작물 자원을 수집하고 재배 특성 및 증식 체계를 확립하였으며 해외 유명 전시회 및 세미나를 방문하여 세계시장의 관상식물과 정원식물 등의 해외시장 동향을 파악하였음. 또한 해외 로열티 체결 및 관리시스템을 구축하기 위해 로열티 체결에 대한 정보를 교환하고 로열티 체결 프로세스 구축하였음. 이상의 연구를 통해 국내외학술지 논문게재 8건, 특허 및 품종보호출원 8건, 기술이전 2건, 국외학술대회 발표 2건, 국내학술대회 발표 7건, 전시회 및 박람회 참가 6건, 홍보실적 5건, 유전자 등록 (NCBI) 9건의 연구개발성과를 도출함.

보고서 면수: 283

## 국문 요약문

		코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용	<p>세계적으로 인기 있는 품종으로 많이 이용되며 현재 왜성화 품종의 선호가 증가된 장기개화형 국화과 식물 <i>Echinacea</i>, <i>Coreopsis</i> 관상작물을 브라시노스테로이드 생합성 및 신호 전달 관련 유전자 발현 억제 방법으로 왜성화시켜 조경, 분화 및 관상용 난쟁이 형질전환체로 개발하고 국내 소비 및 해외 수출 품종으로 상품화가 가능한 난쟁이 관상작물로 개발하고자 함.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Echinacea</i>, <i>Coreopsis</i> 관상작물 난쟁이 표현형 관련 유전자 분리 및 형질전환 시스템 개발</li> <li>• 관상작물 난쟁이 표현형 관련 유전자 기능 규명</li> <li>• 장기개화형 식물 <i>Echinacea</i>, <i>Coreopsis</i> 관상작물의 재분화 및 형질전환 체계 확립, 타겟 유전자의 발현이 억제된 형질전환체 확보, 순화, 선발 및 환경위해성 평가심사서 작성 검토</li> <li>• 생명공학적으로 변형된 난쟁이 관상작물 개발 및 고품질, 고부가가치 난쟁이 관상작물의 실용화, 상품화</li> </ul>		
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Echinacea</i>, <i>Coreopsis</i> 관상작물 유래 난쟁이 표현형 유전자를 분리하고 형질전환 난쟁이 식물체 확보를 위한 RNAi 벡터시스템을 구축함</li> <li>• 관상작물 유래 BR 생합성관련 단백질을 미생물 발현시스템을 통해 발현시키고 <i>in vitro</i> 활성을 검증함</li> <li>• 관상작물 유래 난쟁이 표현형 유전자를 과 발현하는 식물체를 확보하기 위한 식물발현 벡터시스템을 구축하고 애기장대 및 담배 식물체에 형질전환시킨 후 난쟁이 표현형 유전자를 과 발현하는 식물체를 확보하고 유전정보 분석, 표현형 분석, BR metabolite 함량 비교 분석 등의 연구를 통해 관상작물 유래 난쟁이 표현형 유전자의 기능을 확인함</li> <li>• <i>Echinacea</i>, <i>Coreopsis</i> 관상작물 형질전환 및 재분화 체계를 확립함</li> <li>• <i>Echinacea</i>, <i>Coreopsis</i> 관상작물의 RNAi 벡터시스템 형질전환 연구를 수행하여 RNAi 벡터시스템이 도입된 형질전환 <i>Echinacea</i>, <i>Coreopsis</i> 식물체를 확보하고 난쟁이 관상작물 형질전환체의 유전분석 및 기능분석 연구를 수행함</li> <li>• RNAi 벡터시스템이 도입된 형질전환 <i>Echinacea</i>, <i>Coreopsis</i> 식물체는 대조군에 비해 크기가 20 ~ 60% 정도 감소된 난쟁이 표현형을 보임</li> <li>• 난쟁이 표현형을 보이는 형질전환 개체의 난쟁이 표현형 유전자의 발현은 대조군에 비해 감소하였고 BR 호르몬의 생성에도 차이를 보임.</li> <li>• 난쟁이 관상작물 <i>Echinacea</i>, <i>Coreopsis</i> 형질전환체를 토양에 순화시키고 토양에서 성장 중인 관상작물 형질전환체의 특성을 파악하고 영양번식을 통한 대량증식 체계를 확립함</li> <li>• 관상작물 자원을 수집하고 재배 특성 및 증식 체계를 확립함</li> <li>• 해외 유명 전시회 및 세미나를 방문하여 세계시장의 관상식물과 정원식물 등의 해외시장의 동향을 파악함</li> <li>• 해외 로열티 체결 및 관리시스템을 구축하기 위해 로열티 체결에 대한 정보를 교환하고 로열티 체결 프로세스를 구축함</li> <li>• 이상의 연구결과를 통해 국내외학술지 논문게재 8건, 특허 및 품종보호출원 8건, 기술이전 2건, 국외학술대회 발표 2건, 국내학술대회 발표 7건, 전시회 및 박람회 참가 6건, 홍보실적 5건, 유전자 등록 (NCBI) 9건의 연구개발성과를 도출함</li> </ul>		



<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 본 과제에서 획득한 <i>Echinacea</i>, <i>Coreopsis</i> 난쟁이 형질전환체는 안정화된 조경 및 분화용으로 개발되어 수입대체 및 해외 수출 상품으로 활용될 것임</li> <li>• <i>Coreopsis</i>는 분화 및 조경용 신품종 개발 역사가 짧지만 세계적인 인기를 얻고 있으므로 본 과제에서 확보한 왜성화 품종은 상업화 가치가 크며 나아가 로열티를 획득하고 수출의 길을 열 수 있을 것으로 기대됨</li> <li>• 본 과제에서 확보한 난쟁이 관상작물은 해외시장을 선점할 수 있는 우수한 품종으로 개발이 가능하며, 시장 요구도가 높고 지속적이기 때문에 최고의 품종으로 상품화될 것임</li> <li>• 본 연구를 통해서 축적된 관상작물 형질전환, 재분화, 대량 증식 등의 기술들은 여러 식물관련 분야에 광범위하게 활용될 수 있을 것임</li> </ul>				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>난쟁이</p>	<p>관상작물</p>	<p>브라시노스테로이드 관련 유전자</p>	<p>형질전환</p>	<p>유전자 발현억제</p>

## 영문 요약문

### < SUMMARY >

	코드번호	D-02
Purpose & Contents	<p>Long-term flowering asteraceae plants, <i>Echinacea</i> and <i>Coreopsis</i>, have been widely used as a popular variety in the world. The preference of the dwarf variety has been increasing. We intend to produce the dwarf <i>Echinacea</i> or <i>Coreopsis</i> transgenic plants via RNA interference suppressing the expression of brassinosteroid-biosynthesis-related genes. These will be developed as the dwarf ornamental crop that can be commercialized as domestic consumption and exported varieties.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Isolation of genes related to dwarf phenotype in <i>Echinacea</i> and <i>Coreopsis</i>, and development of RNAi vector system</li> <li>• Identification of gene functions related to dwarf phenotype</li> <li>• Establishment of the transformation and regeneration system</li> <li>• Ensure transformants to suppress the expression of target genes</li> <li>• Commercialization of high valuable dwarf <i>Echinacea</i> and <i>Coreopsis</i> plants</li> </ul>	
Results	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dwarf phenotype genes were identified from <i>Echinacea</i> and <i>Coreopsis</i>. RNAi vectors were constructed to generate transgenic dwarf plants.</li> <li>• Dwarf phenotype genes were expressed in <i>E. coli</i> expression and their <i>in vitro</i> activities were investigated.</li> <li>• Plant expression vectors were constructed to generate transgenic <i>Arabidopsis</i> or tobacco plant over-expressing dwarf phenotype genes. Genetic analysis, phenotypic change analysis, and BR analysis were performed to estimate the functions of dwarf phenotype genes in transgenic plants.</li> <li>• Transformation and regeneration methods of <i>Echinacea</i> and <i>Coreopsis</i> were established.</li> <li>• Transgenic <i>Echinacea</i> and <i>Coreopsis</i> plants were generated after transformation with RNAi vector construct and regeneration experiments. The genetic and functional analysis were performed in transgenic plants.</li> <li>• Transgenic <i>Echinacea</i> and <i>Coreopsis</i> plants displayed a dwarf phenotype. Their sizes were reduced by 20 ~ 60% compared to those of wild type.</li> <li>• The expressions of dwarf phenotype genes were reduced in transgenic <i>Echinacea</i> and <i>Coreopsis</i> plants showing a dwarf phenotype. BR profiles were also changed in transgenic plants.</li> <li>• The characteristics were identified in transgenic <i>Echinacea</i> and <i>Coreopsis</i> plants growing in soil. A mass propagation method was established using a vegetative propagation method.</li> <li>• Plant resources were collected, and their cultivation characteristics and growth conditions were accessed.</li> <li>• We participated in overseas famous exhibitions and seminars to identify</li> </ul>	

	<p>trends in foreign markets such as corn plants and garden plants in the world market.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• To establish an overseas royalty related contracting and management system, we exchanged informations on royalty agreements and established a royalty concluding process</li> <li>• With these researches, we deducted 8 articles in domestic and overseas journals, 8 patents and varieties protection applications, 2 technology transfers, 2 international conference presentations, 7 domestic conference presentations, 6 participations in exhibition and fair, 5 public relations, and 9 gene registrations.</li> </ul>				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>• The <i>Echinacea</i> and <i>Coreopsis</i> dwarf plants obtained in this project will be developed for stabilized landscape and differentiation and will be used as import substitute and export products.</li> <li>• <i>Coreopsis</i> has a short history of development of new varieties for differentiation and landscape, but it is gaining popularity around the world. Therefore, it is expected that the cultivars obtained from this project will have a high commercialization value and will be able to acquire royalties and pave the way for exports.</li> <li>• Dwarf plants secured in this project can be developed into superior varieties that can be exported in the overseas market, and will be commercialized as the best varieties because the market demand is steady and high.</li> <li>• Techniques such as transformation, regeneration, and mass proliferation accumulated through this study will be widely used in various plant-related fields.</li> </ul>				
Keywords	Dwarfism	Ornamentals	Brassinosteroid-related genes	Transformation	Gene silencing

## < CONTENTS >

1. Outline of Research and Development Project .....	9
2. Status of domestic and overseas technology development .....	13
3. Research contents and results .....	16
3-1. Contents and method of R & D .....	16
3-2. First year research results .....	22
3-3. Second year research results .....	70
3-4. Third year research results .....	134
3-5. Fourth year research results .....	181
3-6. Fifth year research results .....	229
3-7. R & D achievement .....	264
4. Achievement of goal and contribution to related field .....	267
5. Plan to utilize research results .....	269
6. Overseas science and technology information collected during the research process .....	270
7. Security rating of R & D achievement .....	271
8. Research facilities registered in National Science and Technology Comprehensive Information System .....	271
9. Implementation of safety measures in laboratories due to R & D tasks .....	271
10. Representative research achievements of R & D tasks .....	272
11. The others .....	272
12. References .....	272

<An accompanying sheet> Self-assessment opinion

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	9
2. 국내외 기술개발 현황 .....	13
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	16
3-1. 연구개발 추진 내용 및 방법 .....	16
3-2. 1차년도 연구결과 .....	22
3-3. 2차년도 연구결과 .....	70
3-4. 3차년도 연구결과 .....	134
3-5. 4차년도 연구결과 .....	181
3-6. 5차년도 연구결과 .....	229
3-7. 연구개발성과 .....	264
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	267
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	269
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	270
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	271
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	271
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	271
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	272
11. 기타사항 .....	272
12. 참고문헌 .....	272

<별첨> 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

## 1-1. 연구개발 목적

세계적으로 인기 있는 품종으로 많이 이용되며 현재 왜성화 품종의 선호가 증가된 장기개화형 국화과 식물 *Echinacea*, *Coreopsis* 관상작물을 브라시노 스테로이드 생합성 및 신호전달 관련 유전자 발현 억제 방법으로 왜성화시켜 조경, 분화 및 관상용 난쟁이 형질전환체로 개발하고 국내 소비 및 해외 수출 품종으로 상품화가 가능한 난쟁이 관상작물로 개발하고자 함.

- *Echinacea*, *Coreopsis* 관상작물 난쟁이 표현형 관련 유전자 분리 및 형질전환 시스템 개발
- 관상작물 난쟁이 표현형 관련 유전자의 기능 규명
- 장기개화형 식물 *Echinacea*, *Coreopsis* 관상작물의 재분화 및 형질전환 체계 확립, 타겟 유전자의 발현이 억제된 형질전환체 확보, 순화, 선발 및 환경위해성 평가심사서 작성 검토
- 생명공학적으로 변형된 난쟁이 관상작물을 개발하여 고품질, 고부가가치 난쟁이 관상작물의 실용화, 상품화

## 1-2. 연구개발의 필요성

### ○ 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성

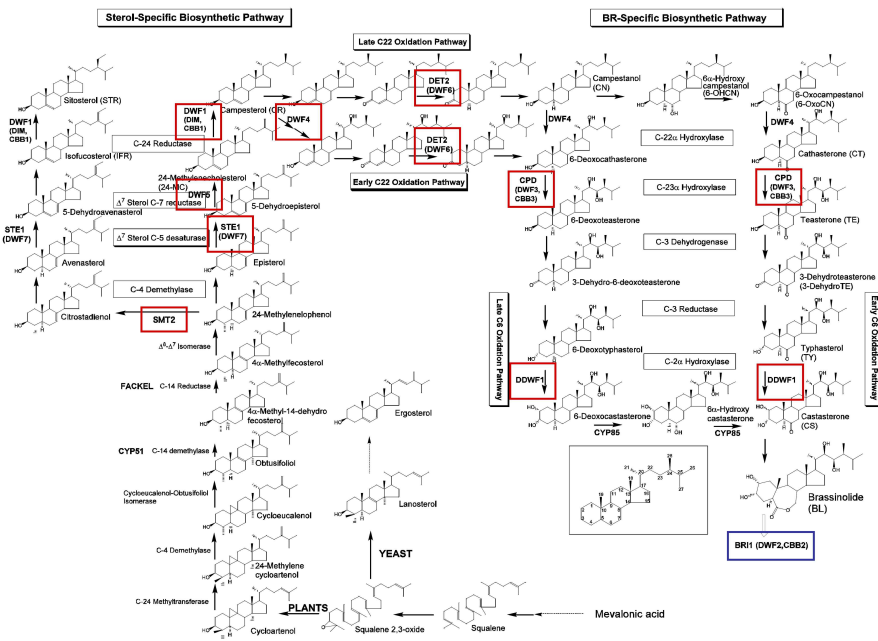
- WTO, DDA, FTA 등 시장개방으로 국내외 농업사정이 급변하고 있어 이에 대응하기 위한 유용형질을 가진 고부가가치의 경쟁력 있는 품종의 개발이 요구되고 있음. 난쟁이 관상작물의 개발 및 육성은 국내소비의 증가와 더불어 해외로의 수출 가능성을 높일 수 있어 농가의 고수익을 창출할 수 있음.
- 식물 왜성화에 따른 일반적인 경제적·산업적 이점은 과도한 초세에 따른 상품성 하락 방지, 취급과 채취의 용이성 향상, 도복저항성 증가, 그리고 병해충의 피해 감소, 실내외 유희(遊休) 공간의 장식 및 화단의 입체화를 위한 식물의 다양성 증가, 관상용이나 교육용·실험용·전시용 등 다양한 용도의 가치를 창출할 수 있음.
- 본 연구에서 대상으로 하는 *Echinacea*는 그 초장이 1 ~ 1.5 m 내외로 키가 비교적 큰 초화류로 화단용 또는 절화용으로 이용되는 수입 관상작물이며 이에 대한 국내외 시장규모는 점차 그 선호도가 증가하는 추세임.
- 세계시장에서 가장 최근에 개발되어 선풍적인 인기로 대형 로열티 품종으로 인정받고 있는 *Coreopsis* (*Coreopsis rosea* 'Heaven's Gate')는 그 초장이 30 ~ 60 cm 내외로 *Echinacea*에 비해 비교적 작은 크기이기는 하지만, 크기가 더 작은 분화용 상품

요구도가 매우 높기 때문에, 이에 부합하는 왜소형 난쟁이 *Coreopsis*는 세계 최고의 품종이 될 것임.

- 이들 식물들은 현재 국내소비의 전량을 수입에 의존하고 있어 국내 자체 품종 육성이 요구되고 있으며 본 연구를 통해 이들 화훼작물들의 난쟁이 형질전환체가 개발된다면 조경용, 분화용으로써 한층 이용 폭을 넓힐 수 있고 이들 작물들의 수입대체효과 뿐 아니라 미국, 일본, 유럽으로의 수출도 가능하기 때문에 농가 소득 증대에 큰 역할을 할 것으로 기대됨.

○ 연구개발의 필요성

- 식물호르몬의 하나인 브라시노 스테로이드 (brassinosteroid, BR)는 세포신장, 세포분화와 같은 식물의 성장과 발달에 관여하는 중요한 생리활성 물질임.
- 유전학적으로 볼 때 브라시노 스테로이드 생합성 및 신호전달 돌연변이체는 애기장대의 경우 매우 특징적인 난쟁이 표현형을 보임.
- BR 난쟁이는 야생형에 비해 그 키가 20 ~ 30% 정도에 불과하며 난쟁이 표현형의 정도가 상대적으로 약한 돌연변이체는 씨를 맺을 수도 있지만 그 정도가 심한 경우에는 수술대가 암술대의 길이만큼 자라지 않아 열매를 맺지 못함.
- 생합성 경로에 결함이 생겨 식물 내재 BR양이 현저히 감소되어 난쟁이 표현형을 보이는 돌연변이체들은 생합성 경로의 순서대로 *dwf7*, *dwf5*, *dwf1*, *de-etiolated2/dwf6*, *dwf4*, *cpd/dwf3* 등이 있음.



Brassinosteroid biosynthesis pathway

- 이들은 각각 C5 desaturation, C7 reduction, C24 reduction, C4 reduction, C22 hydroxylation, 그리고 C23 hydroxylation 단계에 결함을 유발함. 이들 단계 중 *DWF4*가 매개하는 C22 hydroxylation은 생합성의 속도 조절 단계로 알려져 있음.
- BR 신호전달에 결함이 있는 돌연변이들의 일부는 생합성 난쟁이들과 표현형이 같지만 BR에 의해 그 표현형이 회복되지 않음. 현재까지 밝혀진 신호전달 돌연변이체로는 *brassinosteroid-insensitive 1(bri1)/dwf2*, *bin2/ucu1/dwf12*, *bzr1*, *bes1/bzr2* 등이 있음.
- 식물의 생장은 다양한 식물호르몬의 작용에 의해 섬세하게 조절되는데 그중 BR은 산업적인 응용 가능성을 가지고 있음.
- BR 관련 난쟁이 유전자를 사용하여 식물의 전체적인 크기를 작게 만들 수가 있음. 앞에 기술한 BR 생합성에 관여하는 여러 유전자 중에서 *DWF4*, *DET2* 그리고 BR 신호전달에 관여하는 *DWF3* 등은 BR 생합성 및 신호전달에 특히 중요한 유전자임. 실제로 이들 유전자는 애기장대 등에서 유전자의 정보가 밝혀져 있어 관상식물에서 클로닝이 가능하며 이들 유전자의 발현 조절을 통해 난쟁이 식물체의 제작이 가능함. 특히 RNA interference (RNAi) 기법을 이용하여 복합적으로 상기 유전자의 발현을 억제하거나 BR 대사관련 negative regulator 유전자를 과발현하는 등의 발현 조절을 시도하면 난쟁이 식물체를 만들 수 있음.
- 식물이 왜성화될 때에는 식물세포가 작고 밀집되고 절간 사이의 간격이 짧고 굽어져 보다 튼튼하게 됨. 따라서 일반 식물보다 도복저항성이 강해지고 그에 따라 병해충에도 강해져 꽃이나 과실이 보다 충실해짐.
- 본 연구에 이용될 화훼류의 경우는 주로 절화용으로 쓰이던 종들을 화단용, 조경관상용, 분화용 등 그 용도를 다양화 할 수 있게 될 것임.
- 관행 육종에 있어 식물의 왜성화를 유발하는 유전자는 일반적으로 열성 유전자로 알려져 있어 교잡육종 시 그 조작과 유지가 어려워 왜성 품종을 개발하여도 보다 안정화시킬 수 있는 방법이 필요함.
- 본 연구에서 시도되는 생명공학적인 접근은 이러한 관행 육종방법의 단점을 해결해 줄 수 있고 품종 획득기간도 매우 단축시킬 수 있을 것으로 생각됨.

### 1-3. 연구개발 범위

#### ○ 제1세부과제 : 난쟁이 관련 유전자 분리 및 기능분석

- 관상작물 유래 난쟁이 표현형 *DWF3* 유전자 발현 억제용 RNAi 벡터시스템 구축 및 *DWF3* 유전자의 기능 분석
- *DWF3* 유전자 발현 억제 관상작물 형질전환체의 환경위해성 평가심사서 작성
- 관상작물 유래 난쟁이 표현형 유전자 (*DWF4*, *DET2*, *SMT2* 등) 분리 및 기능 분석



- 관상작물 유래 난쟁이 표현형 *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자 발현 억제용 RNAi 발현 시스템 구축
- 관상작물 유래 난쟁이 표현형 유전자 (*DWF4*, *DET2*, *SMT2* 등) 기능 분석, 관상작물 형질전환체의 유전 분석, 환경위해성 평가 심사 준비 및 환경위해성 평가심사서 작성

○ 제2세부/제1협동과제 : 관상작물 형질전환 체계 확립, 난쟁이 관상식물 개발 및 실용화 연구

- 관상작물의 재분화 및 형질전환 체계 확립
- 관상작물 유래 *DWF3* 유전자 발현 억제 관상작물 형질전환체 확보, 순화, 후대검증 및 대량 번식 체계 확립
- 관상용 유전자원의 수집, 특성 검증 및 대량 번식 체계 확립
- 난쟁이 표현형 다중 유전자 발현 억제 관상작물 형질전환체 확보 순화, 후대검증 및 대량 번식 체계 확립
- *DWF3* 유전자 발현 억제 관상작물 형질전환체와 난쟁이 표현형 다중 유전자 발현 억제 관상작물 형질전환체의 실용화 및 상품화 기초 연구

## 2. 국내외 기술개발 현황

코드번호 D-04

### 2-1. 연구개발대상 기술의 국내외 현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
Salk Institute (Joanne Chory)	애기장대에서 브라시노 스테로이드 신호 전달 과정의 돌연변이인 <i>bzr1</i> , <i>bin1</i> 유전자와 브라시노 스테로이드 생합성 돌연변이인 <i>det2</i> 유전자의 발견 및 연구	애기장대에서 브라시노 스테로이드 신호 전달과 생합성에 관련된 돌연변이를 발견하고 난쟁이 표현형을 연구하였으나 실질적으로 관상용 식물에 적용하지는 않음
S.D Clouse and K.A Feldmann	애기장대에서 브라시노 스테로이드 생합성 돌연변이인 <i>dwf5</i> , <i>dwf7</i> , <i>dwf1</i> , <i>dwf4</i> , <i>cpd</i> , <i>dwf8</i> 의 유전자들의 발견 및 난쟁이 표현형 연구	애기장대에서 브라시노 스테로이드 생합성 관련 난쟁이 표현형을 나타내는 돌연변이 유전자들을 찾았으나 실질적으로 관상용 식물에 적용하지는 않음
Carnegi Institution (Zhiyong Wang)	애기장대에서 브라시노 스테로이드의 신호 전달에 관한 <i>BZR1</i> , <i>BZR2</i> , <i>BAK1</i> , <i>BIN2</i> , <i>BES1</i> 유전자들의 발굴 연구	애기장대에서 브라시노 스테로이드 신호전달과 세포발달 관계 연구만 하고 있음
나고야 대학 생명농학 연구과 (Kitano Hidemi)	BR합성 유전자를 분리하여 antisense 기법으로 벼에서 발현 억제	왜성 초형을 갖는 도복 저항성 벼 개발
서울대학교 (최성화)	애기장대에서 브라시노 스테로이드의 대사 및 신호 전달에 결함이 있는 난쟁이 및 키다리 표현형을 보이는 돌연변이의 분리 및 유전학 연구	난쟁이 및 키다리 표현형을 가지는 애기장대를 이용한 유전학적 연구는 하고 있으나 관상용 식물에 적용하지는 않음

### 2-2. 국내 제품생산 및 시장 현황

- 2008년 현재 우리나라 화훼산업은 재배면적 7952 ha, 생산액은 1조 100억 원으로 2004년에 비해 9.6% 증가하면서 처음 1조 원대를 돌파하였으며, 수출액은 약 5223만 불, 수입은 약 2857만 불로 주요 생산국으로 부상 중에 있음.
- UPOV (국제신품종보호연맹) 가입, 육성품종권리보호에 따른 신품종의 로열티 지불요구 증대로 국산품종의 중요성이 부각되기 시작하고 있음. 그러나 현재 로열티 지급으로 연간 124억 원 이상이 들고 있음. 2000년 이후 현재 유전·육종연구의 비중이 재배·번식연

구를 상회하기 시작하여 약 70%를 유전육종연구가 차지하게 되었음.

- 국립종자원에 품종보호 출원된 화훼작물과 품종 수를 보면 장미 등 총 44 작목에서 1,900 품종이 보호 출원되었고 그 중 1,151 품종이 보호 등록되었으며 172 품종이 거절되었음. 이 중 외국 품종은 1,097 품종을 출원하였고 714 품종을 등록하여 각각 57.7%, 62%를 차지하고 있어 채소와 과수에 비해 외국 품종 출원 및 등록비율이 매우 높음.
- ‘우리꽃’은 2010년 9월 이천시농업기술센터와 화훼협회를 통해 화훼 신품종 보급을 위한 양해각서를 교환, ‘우리꽃’에서 개발한 신화훼품종을 농가에 보급하여 농가소득이 향상되도록 협약하였음. 외국산 품종을 높은 가격에 수입하여 재배하는 현실에서 국내화훼품종 브랜드화를 통하여 이미지를 향상하고 국내육성품종의 개발활성화를 기대하고 있음. 농가에 고소득을 거둘 수 있는 고품질의 신품종개발육성 필요성이 더욱 높아짐.

### 2-3. 국외 제품생산 및 시장 현황

- 해외에서는 오랜 기간 역사와 기술이 축적된 민간 주도로 품종 개발이 이루어지고 있음. 미국과 유럽권 (영국, 네덜란드)의 수많은 민간기업에서는 본 연구진이 개발하고자 하는 *Coreopsis* 속에 속하는 수백여 종 품종에 대한 육종 실험이 지속적으로 이루어지고 있으며, 이는 곧바로 상품화로 이루어져 시장에서 상품성에 대한 평가가 이루어지고 있는 실정임. 특히 일본의 (주)하쿠산, 네덜란드의 다윈플랜츠, 미국의 테라노바, 썬라이징농장 등 다수 다국적 원예조경회사들은 이미 다수의 개발 품종들을 전세계에 수출하고 있음. 또한 대형 종묘 무역회사의 네트워크를 통해 상품성 검증이 확인된 종들은 빠르게 국제 시장으로 유통되고 있음.

#### ○ 에키나세아 (*Echinacea*)의 시장 현황

- 에키나세아는 해외에서 매우 각광받고 있는 조경용 화훼식물로서, 세계적으로도 많은 품종이 개발되고 있으며 계속적으로 신품종 수요가 늘어나고 있는 품종임. 화색 범위가 흰색, 노란색, 주황색, 보라색, 분홍색, 초록색으로 선택의 범위가 넓고, 화형이 독특하며, 재배가 쉽기 때문에 소비자 선호도가 매우 높은 화훼임. 하지만, 에키나세아가 가지고 있는 생육 특성이 키가 크고, 잘 쓰러지는 경향이 있고 화단용, 분화용으로 소비자 요구도가 점차 커지고 있는 왜성 에키나세아도 현재까지는 키가 60~70 cm 정도로 분화용으로 크게 적합하지 않음. 또한, 왜성으로 유통되는 품종임에도 불구하고, 재배환경에 따라 90~100 cm로 높이가 원종과 같이 복구되어 성장하는 비율이 매우 높아, 안정적인 왜성화 신품종 작물 개발이 필요함.

#### ○ 코레옵시스 (*Coreopsis*)의 현황

- 2001년 품종 보호 등록된 Sweet dreams (흰색과 자주색)와 Limerock Ruby (짙은 적자색)를 선두로 *Coreopsis rosea* 속 시장이 시작되었다. 이후로 Limerock Plant Farm과 Sunny Border Nursery에서 이 두 품종을 대조품종으로 한 신품종을 등록하기 시작하였음. 2005년도 heaven's gate (분홍색)이 출시된 이후로 주로 핑크색 계열이 신품종이 2007,8년 간 4건 등록되었음.
- *Coreopsis rosea* 속은 일반 금계국 속의 화색이 노란색인 반면, 흰색에서 핑크색 사이의 파스텔 톤의 색과 하늘거리는 잎 모양 때문에 조경가치를 크게 인정받은 최근 대두된 화훼임. 그러나 조사결과에서 보듯이, 신품종 등록 수는 연간 5건에도 미치지 못하고 있다. 이는 종자가 불임성이므로, stem cutting에 의한 영양번식을 이용하여 증식시키기 때문으로 사료됨.

### 3. 연구수행 내용 및 결과

	코드번호	D-05		
<p>3-1. 연구개발 추진 내용 및 방법</p> <p>1. 1차년도 (2012.08.10. ~ 2013.08.09.)</p> <p>○ 제1세부과제 : 난쟁이 관련 유전자 분리 및 기능분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 관상작물 유래 BR 생합성관련 난쟁이 표현형 유전자 <i>DWF3</i>의 발현을 억제하기 위한 형질전환용 식물 RNAi 발현 벡터시스템 제작 ; <i>Echinacea</i>, <i>Coreopsis</i> <i>DWF3</i> 유전자의 sense, anti-sense DNA 절편을 PCR 방법으로 확보하고 CaMV35S promoter와 OCS 3' terminator를 지니는 pFGC5941 벡터의 CHSA intron 사이에 클로닝하여 <i>DWF3</i> 유전자의 발현을 억제하기 위한 RNAi 벡터시스템을 구축</li> <li>• RACE PCR을 통한 full length <i>DWF3</i> 유전자 확보 ; Full length <i>Echinacea</i>, <i>Coreopsis</i> <i>DWF3</i> 유전자를 확보하기 위해 <i>Echinacea</i>와 <i>Coreopsis</i>에서 RNA (또는 mRNA)를 추출하고 cDNA를 합성한 후 RACE PCR 방법으로 5' UTR 및 3' UTR을 포함하는 <i>DWF3</i> 유전자 및 염기서열 정보를 확보</li> <li>• 미생물 단백질 발현시스템을 통한 재조합 <i>DWF3</i> 단백질 발현, 분리 정제 및 <i>in vitro</i> 활성 측정 ; Full length <i>DWF3</i> 유전자 염기서열을 지니는 <i>DWF3</i> 유전자를 PCR 방법으로 증폭시키고 미생물 발현 벡터인 pET-21 벡터에 클로닝하여 <i>DWF3</i> 유전자 발현 미생물 발현벡터를 확보한 후 미생물 세포에 형질전환시켜 <i>DWF3</i> 단백질을 발현하는 미생물 세포를 확보. 형질전환된 미생물 세포에서 <i>DWF3</i> 단백질의 발현을 Western blot 분석 방법으로 확인하고 affinity chromatography 방법으로 분리 정제한 후 <i>DWF3</i> 단백질의 활성을 측정</li> <li>• <i>DWF3</i> 유전자가 과발현된 식물체 (또는 식물세포)를 확보하기 위한 식물 발현시스템 구축 ; <i>Beet curly top virus</i> (BCTV) replicon과 CsVMV promoter를 지니는 pBCTV 벡터에 <i>Echinacea</i>, <i>Coreopsis</i> <i>DWF3</i> 유전자를 클로닝하여 pBCTV-<i>DWF3</i> 벡터를 확보하고 <i>Agrobacterium</i>에 형질전환시켜 pBCTV-<i>DWF3</i> 벡터가 형질전환된 <i>Agrobacterium</i>을 확보</li> </ul> <p>○ 제1협동과제 : 관상작물 형질전환 체계 확립, 난쟁이 관상작물 개발 및 실용화 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 장기개화형 관상작물 <i>Echinacea</i>, <i>Coreopsis</i>의 재분화 체계 확립 : 배지종류선정, 줄기, 뿌리 형성을 위한 다양한 auxin 및 cytokinin 계열 성장조절제 종류 및 농도 구명,</li> </ul>				

처리시간 및 방법 등 적정 배양조건 규명 등을 실시

- 항생제 감응성 검정 : 각 식물의 자엽 또는 줄기 등 절편체 채취부위 대상으로 사용되는 항생제의 적정 사용 농도를 규명
- *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 체계 확립 : strain별, cocultivation 처리 조건 등 다양한 형질전환 조건 구명
- 관상작물 유래 *DWF3* RNAi 벡터시스템이 형질전환된 *Agrobacterium* 확보 : 제1세부과제에서 *DWF3* RNAi 벡터시스템이 도입된 *Agrobacterium*을 분양받아 사용할 예정임
- 관상작물 *Echinacea*, *Coreopsis*에 *Agrobacterium*을 이용한 *DWF3* RNAi 벡터시스템 형질전환 : 선정된 재분화 체계, 항생제 감응성 정도, 형질전환 체계를 이용해 *Echinacea*, *Coreopsis*에 형질전환을 실시함
- 관상용 유전자원 수집 : 미국, 유럽 등 현지 유관기관을 이용하거나 직접 방문을 통해 다양한 종들을 수집함
- 관상용 유전자원의 특성 검정 : 국내 순화 및 지역적응시험을 통해 각 수집 종들의 초장, 화경장, 화폭, 엽장 및 엽폭, 개화지속일수, 개화시기 등 조사

## 2. 2차년도 (2013.08.10. ~ 2014.08.09.)

### ○ 제1세부과제 : 난쟁이 관련 유전자 분리 및 기능분석

- *DWF3* 유전자가 과발현된 식물체 (식물세포) 확보 및 *DWF3* 유전자 기능 분석  
; pBCTV-DWF3 벡터가 형질전환된 *Agrobacterium*을 담배 및 애기장대에 감염시켜 pBCTV-DWF3 벡터가 형질전환된 식물체 (또는 식물세포)를 확보하고 BR 생합성 관련 metabolites의 함량을 비교하여 *DWF3* 유전자 기능을 분석
- RT-PCR 및 RACE PCR을 통한 full length 관상작물 유래 난쟁이 표현형 유전자 (*DWF4*, *DET2*, *SMT2* 등) 확보  
; 난쟁이 표현형 유전자 (*DWF4*, *DET2*, *SMT2* 등)를 확보하기 위해 *Echinacea*와 *Coreopsis*에서 RNA (또는 mRNA)를 추출하고 cDNA를 합성한 후 RACE PCR 방법으로 5' UTR 및 3' UTR을 포함하는 난쟁이 표현형 유전자 (*DWF4*, *DET2*, *SMT2* 등)의 염기서열 정보를 확보
- 미생물 단백질 발현시스템을 통한 재조합 *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 단백질 발현, 분리 정제 및 *in vitro* 활성 측정  
; 난쟁이 표현형 유전자 (*DWF4*, *DET2*, *SMT2* 등)를 PCR 방법으로 증폭시키고 미생물 발현 벡터인 pET-21 벡터에 클로닝하여 난쟁이 표현형 유전자 (*DWF4*, *DET2*, *SMT2* 등)를 발현하기위한 미생물 발현벡터를 확보한 후 미생물 세포에 형질전환시켜 난쟁이 표현형 단백질 (*DWF4*, *DET2*, *SMT2* 등)을 발현하는 미생물 세포를 확보한다. 형질전환된 미생물 세포에서 각 단백질의 발현을 Western blot 분석 방법으로 확

인하고 affinity chromatography 방법으로 분리 정제한 후 단백질의 활성을 측정

- *DWF3* 유전자 발현 억제 관상작물 형질전환체의 환경위해성 평가심사서 작성 의뢰 ; 1협동과제에서 확보하게 될 *DWF3* 유전자 발현 억제 관상작물 형질전환체에 대한 환경위해성 평가심사서 작성 검토

○ 제2세부과제 : 관상작물 형질전환 체계 확립 및 난쟁이 관상작물 개발

- 관상작물 *Echinacea*, *Coreopsis*에 *Agrobacterium*을 이용한 *DWF3* RNAi 벡터시스템 형질전환 : 1차년도에 이어 *DWF3* RNAi 벡터시스템이 도입된 *Agrobacterium*을 이용해 형질전환 계속 실시
- *DWF3* 유전자의 발현이 억제된 관상작물 형질전환체 확보 : 1차 선발된 개체들 중 제 1세부과제에 유전자 분석 의뢰하여 *DWF3* 유전자의 발현 억제 여부를 확인
- *DWF3* 유전자의 발현이 억제된 관상작물 난쟁이 형질전환체의 순화 및 특성조사

○ 제1협동과제 : 난쟁이 관상작물 실용화 연구

- 관상용 유전자원 수집 : 미국, 유럽 등 현지 유관기관을 이용하거나 직접 방문을 통해 다양한 종들을 수집
- 관상용 유전자원의 특성 검정 : 국내 순화 및 지역적응시험을 통해 각 수집 종들의 초장, 화경장, 화폭, 엽장 및 엽폭, 개화지속일수, 개화시기 등 조사
- 관상용 유전자원의 번식체계 확립 : 무성 및 실생 번식시험을 통한 대량 증식 체계 확립

3. 3차년도 (2014.08.10. ~ 2015.08.09.)

○ 제1세부과제 : 난쟁이 관련 유전자 분리 및 기능분석

- 관상작물 유래 BR 생합성관련 난쟁이 표현형 유전자 *DWF4*, *DET2*, *SMT2*의 발현을 억제하기 위한 형질전환용 식물 RNAi 발현 벡터시스템 제작 ; *Echinacea*, *Coreopsis* 난쟁이 표현형 유전자 *DWF4*, *DET2*, *SMT2*의 sense, anti-sense DNA 절편을 PCR 방법으로 확보하고 CaMV35S promoter와 OCS 3' terminator를 지니는 pFGC5941 벡터의 CHSA intron 사이에 클로닝하여 *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자의 발현을 억제하기 위한 RNAi 벡터시스템을 구축
- *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자가 과발현된 식물체 (또는 식물세포)를 확보하기 위한 식물 발현시스템 구축 ; pBCTV 벡터에 *Echinacea*, *Coreopsis* 난쟁이 표현형 *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자

를 클로닝하여 pBCTV-DWF4, pBCTV-DET2, pBCTV-SMT2 벡터를 확보하고 *Agrobacterium*에 형질전환시켜 각각의 벡터가 형질전환된 *Agrobacterium*을 확보

- *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자가 과발현된 식물체 (식물세포) 확보 및 기능 분석 ; pBCTV-DWF4, pBCTV-DET2, pBCTV-SMT2 벡터가 형질전환된 *Agrobacterium*을 담배 및 애기장대에 감염시켜 각각의 벡터가 형질전환된 식물체 (또는 식물세포)를 확보하고 BR 생합성 관련 metabolites의 함량을 비교하여 *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자 기능을 분석

○ 제2세부과제 : 관상작물 형질전환 체계 확립 및 난쟁이 관상작물 개발

- 관상작물 유래 *DWF4*, *DET2*, *SMT2* RNAi 벡터시스템이 형질전환된 *Agrobacterium* 확보 : *DWF4*, *DET2*, *SMT2* RNAi 벡터시스템이 도입된 *Agrobacterium*을 제1세부과제에서 분양받아 사용
- 관상작물 *Echinacea*, *Coreopsis*에 *Agrobacterium*을 이용한 *DWF4*, *DET2* 형질전환 : 1, 2차년도에 개발된 각 작물별 형질전환시스템을 바탕으로 *DWF4*, *DET2* 유전자별 최적 형질전환 방법 개발
- *DWF4*, *DET2* 유전자의 발현이 억제된 관상작물 형질전환체 확보 : 1차 선발된 개체들 중 제1세부과제에 유전자 분석 의뢰하여 *DWF4*, *DET2* 유전자의 발현억제 여부 확인

○ 제1협동과제 : 난쟁이 관상작물 실용화 연구

- 관상용 유전자원의 번식체계 확립 : 무성 및 실생 번식시험을 통한 대량 증식 체계 확립
- 관상작물 유래 *DWF3* RNAi 벡터시스템이 형질전환된 난쟁이 형질전환체 대량번식 : 각 작물에서 적용된 대량번식 방법 중 가장 효율적인 무성 및 실생 번식방법을 선정하여 증식

4. 4차년도 (2015.08.10. ~ 2016.08.09.)

○ 제1세부과제 : 난쟁이 관련 유전자 분리 및 기능분석

- *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자가 과발현된 식물체 (식물세포) 확보 및 기능 분석 ; pBCTV-DWF4, pBCTV-DET2, pBCTV-SMT2 벡터가 형질전환된 *Agrobacterium*을 담배 및 애기장대에 감염시켜 각각의 벡터가 형질전환된 식물체 (또는 식물세포)를 확보하고 BR 생합성 관련 metabolites의 함량을 비교하여 *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자 기능을 분석



- *DWF3* 유전자 발현 억제에 의해 유도되는 난쟁이 관상작물 형질전환체의 유전 분석 및 기능 분석  
; 1협동과제의 2, 3년차 연구에서 확보하게 될 *DWF3* 유전자 발현 억제 관상작물 형질전환체의 Southern blot, RT-PCR 및 Northern blot 분석 등을 이용한 유전 분석 및 BR 생합성 관련 metabolites의 함량 비교를 통한 기능 분석 연구를 수행

○ 제2세부과제 : 관상작물 형질전환 체계 확립 및 난쟁이 관상작물 개발

- 관상작물 *Echinacea*, *Coreopsis*에 *Agrobacterium*을 이용한 *DWF4*, *DET2*, *SMT2* RNAi 벡터시스템 형질전환 : 3차년도에 이어 *DWF4*, *DET2*의 지속적 형질전환 실시 및 *SMT2* RNAi 벡터시스템이 도입된 *Agrobacterium*을 이용해 형질전환 실시
- *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자의 발현이 억제된 관상작물 형질전환체 확보 및 *DWF3* 특허출원 준비: 1차 선발된 개체들 중 제1세부과제에 유전자 분석 의뢰하여 *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자의 발현억제여부 확인, 형질전환체를 확보하고 제1세부과제와 연계, *DWF3* 특허출원을 준비
- *DWF4*, *DET2* 유전자의 발현이 억제된 관상작물 난쟁이 형질전환체의 순화 및 특성조사

○ 제1협동과제 : 난쟁이 관상작물 실용화 연구

- 관상작물 유래 *DWF3* RNAi 벡터가 형질전환된 관상작물 난쟁이 형질전환체 특성 및 지역 적응성 검증 : 국내 순화 및 지역적응시험을 통해 초장, 화경장, 화폭, 엽장 및, 엽폭, 개화지속일수, 개화시기 등 조사
- 선발된 난쟁이 형질전환체 대량 번식 : 각 작물에서 적용된 대량번식 방법 중 가장 효율적인 무성 및 실생 번식방법을 선정하여 증식

5. 5차년도 (2016.08.10. ~ 2017.08.09.)

○ 제1세부과제 : 난쟁이 관련 유전자 분리 및 기능분석

- *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자 발현 억제에 의해 유도되는 관상작물 난쟁이 형질전환체의 유전 분석 및 기능 분석  
; 1협동과제의 3, 4년차 연구에서 확보하게 될 *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자 발현 억제에 의해 유도되는 관상작물 형질전환체의 Southern blot, RT-PCR 및 Northern blot 분석 등을 이용한 유전 분석 및 BR 생합성 관련 metabolites의 함량 비교를 통한 기능 분석 연구를 수행

- *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자 발현 억제 관상작물 형질전환체의 환경위해성 평가심사서 작성 의뢰  
; *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자 발현 억제에 의해 유도되는 관상작물 형질전환체에 대한 환경위해성 평가심사서 작성 검토

○ 제2세부과제 : 관상작물 형질전환 체계 확립 및 난쟁이 관상작물 개발

- *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자의 발현이 억제된 관상작물 형질전환체 선발  
; 4차년도에 제1세부과제에 유전자 분석 의뢰하여 *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자의 발현억제여부 확인된 개체들의 선발, 후대검정
- *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자의 발현이 억제된 관상작물 난쟁이 형질전환체의 순화 및 특성조사  
; 형질전환개체를 대상, 환경 조건 조절(온도, 광 등)을 통한 보다 효율적인 순화방법 확립 및 생육시기 별 왜성화율 조사
- 관상작물 유래 *DWF4*, *DET2*, *SMT2* RNAi 벡터가 형질전환된 관상작물 난쟁이 형질전환체 특성 및 지역 적응성 검정  
; 국내 순화 및 지역적응시험을 통해 초장, 화경장, 화폭, 엽장 및, 엽폭, 개화지속일수, 개화시기 등 조사

○ 제1협동과제 : 난쟁이 관상작물 실용화 연구

- 선발된 난쟁이 형질전환체 대량 번식 : 각 작물에서 적용된 대량번식 방법 중 가장 효율적인 무성 및 실생 번식방법을 통한 안정적 생산방법 확립
- 연구결과의 비교 평가분석, 품종 등록 및 실용화 방안 도출

### 3-2. 1차년도 연구결과

#### 3-2-1. 제1세부과제 : 난쟁이 관련 유전자 분리 및 기능 분석

1. 관상작물 유래 BR 생합성관련 난쟁이 표현형 유전자 *DWF3*의 발현을 억제하기 위한 형질전환용 식물 RNAi 발현 벡터시스템 제작

#### ○ Degenerate PCR

애기장대 (*Arabidopsis thaliana*), 쑥 (*Artemisia annua*), 백일홍 (*Zinnia elegans*)의 *DWF3* 유전자 [애기장대, AtDWF3 (NM001085066); 쑥, AaDWF3 (DQ363132); 백일홍, ZeDWF3 (AB231153)]를 비교 분석하여 유사성이 높은 C-terminal 부위에서 degenerate PCR primer (forward primer, 5'-GCTCTTGCD CARCTYAAGGAAGAGCATG-3'; reverse primer, 5'-GGRTACCGYTTYTG YGTYCTTGTMGTYGG-3')를 제작하고 본 연구과제의 대상 작물인 *Echinacea*에서 확보한 cDNA를 주형으로 한 PCR 반응을 통해 약 500 bp의 PCR 산물을 확보함 (그림 1A). PCR 산물은 pGEM-T easy 벡터 (Promega)에 클로닝하였고 염기서열 분석을 통해 유전자 염기서열 정보를 확보함 (그림 1B). 또한, *Coreopsis*의 *DWF3* 유전자를 확보하기 위한 degenerate PCR을 위와 같은 방법으로 수행하여 degenerate PCR 산물을 확보하였고 염기서열 분석을 통해 유전자 염기서열 정보를 확보함 (그림 1C & D).

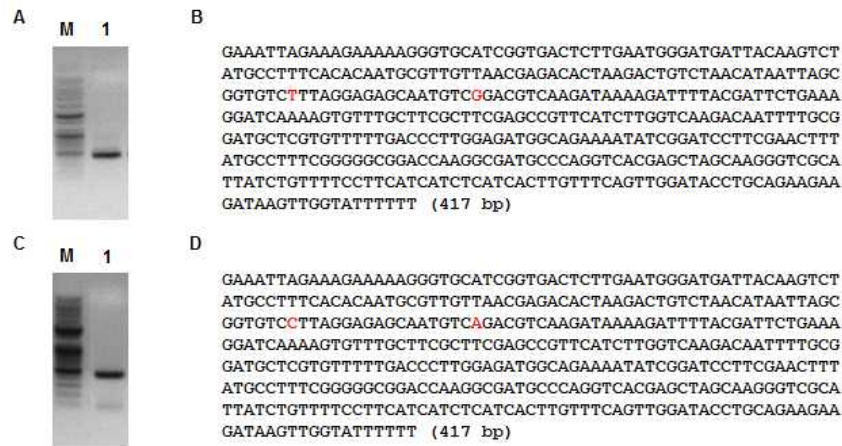


그림 1. *Echinacea* (A & B) 및 *Coreopsis* (C & D)에서 애기장대, 쑥, 백일홍 *DWF3* 유전자와 높은 유사성을 지니는 *DWF3* 유전자의 degenerate PCR 산물 (A & C)을 얻고 염기서열을 분석함 (B & D).

Degenerate PCR을 통해 확보한 *Echinacea* 및 *Coreopsis* *DWF3* 유전자는 애기장대 *AtDWF3* 유전자의 571-999 염기, 쑥 *AaDWF3* 유전자의 943-1359 염기, 백일홍

*ZeDWF3* 유전자의 882-1298 염기와 높은 유사성을 지니고 있어 (그림 2) 본 연구에서 확보한 degenerate PCR 산물은 *Echinacea*, *Coreopsis*의 *DWF3* 유전자일 것으로 예측됨.

AtDWF3	571	AAATTAGGCAATGAAGAGTG-ATTCGTATAGCTCTTGAATGGACTGATTACAAGTCAAT
AaDWF3	943	GAATTAGAGCCAAAAAGGCGCATCGGTA-ECTCTTGAATGGGACGATTACAAGTCTAT
ZeDWF3	882	CAAATTACAAAGGAAAGAAAGGGGCATTTGGTA-ECTCTTGAATGGGATGATTACAAGTCTAT
EpDWF3		GAAATTAGAAAGAAAAGGGTGCATCGGTG-ACTCTTGAATGGGATGATTACAAGTCTAT
CrDWF3		GAAATTAGAAAGAAAAGGGTGCATCGGTG-ACTCTTGAATGGGATGATTACAAGTCTAT
AtDWF3	630	GCCATTACACACAATGCTGCTTAAAGGAGACGCTACGAGTGCCTAACATCATCCGCGGTGT
AaDWF3	1002	GCCTTTACACACAATGCTGTTGTTAACGAGACCTTAAGACTCTCCAAATATATTAGTGGTGT
ZeDWF3	941	GCCTTTACACACAATGCGTTGTTAACGAGACGCTAAGACTCTCTAACATAAATTAGTGGTGT
EpDWF3		GCCTTTACACACAATGCGTTGTTAACGAGACACTAAGACTGTCTAACATAAATTAGCGGTGT
CrDWF3		GCCTTTACACACAATGCGTTGTTAACGAGACACTAAGACTGTCTAACATAAATTAGCGGTGT
AtDWF3	690	TTTCAGACCGTGCAATGACCGATGTTGAGATCAAAGTTATAAAATTCCAAAGGTGGAA
AaDWF3	1062	TTTTAGGAGAGCAATGACTGACGTCAGATTAAGATTATACAAATTCCAAAGGAGCAAA
ZeDWF3	1001	CTTTAGGAGAGCAATGACCGACGTCAGATTAAGATTATACAAATTCCAAAGGATCAAA
EpDWF3		CTTTAGGAGAGCAATGCTCGACGTCAGATAAAAGATTTTACGATTTGAAAGGATCAAA
CrDWF3		CTTTAGGAGAGCAATGCTCGACGTCAGATAAAAGATTTTACGATTTGAAAGGATCAAA
AtDWF3	750	AGTATTTCTCATCGTTTAGAGCGGTTTCATTTAGACCCAAACCACTTCAAAGATGCTCGCAC
AaDWF3	1122	AGTGTTCACCTCGCTTCGTTGCTGTCATCTTGATCAAGATAATTTTGAGGATGCTCGTGT
ZeDWF3	1061	AGTGTTCGCTTCGCTTCGAGCTTTCATCTTGATCTAGAAAATTTGAGGATGCTCGTGT
EpDWF3		AGTGTTCGCTTCGCTTCGAGCGTTCATCTTGCTCAAGACAATTTGCGGATGCTCGTGT
CrDWF3		AGTGTTCGCTTCGCTTCGAGCGTTCATCTTGCTCAAGACAATTTGCGGATGCTCGTGT
AtDWF3	810	TTTCAACCCTTGGAGATGGCAGAAACAACCTCGGTAACCAACAGCCCTTCTAATGTGTTTAC
AaDWF3	1182	TTTTCAATCCTTGGAGATGGCAGAA-----AACATCCGATTCAGCAAGC---TTTAT
ZeDWF3	1121	TTTTTAACTTGGAGATGGCAGAA-----AATATCGGATCCGGCAAAC---TTTAT
EpDWF3		TTTTGACCCTTGGAGATGGCAGAA-----AATATCGGATCCTTCGAAC---TTTAT
CrDWF3		TTTTGACCCTTGGAGATGGCAGAA-----AATATCGGATCCTTCGAAC---TTTAT
AtDWF3	870	ACCGTTTGGTGGAGGCCCAAGGCTATGTTCCCGGTTACGAGCTGGCTAGGGTTGCATCTC
AaDWF3	1230	GCCATTTGGAGGTGGCCAGGAGATGCCAGGTCACGAGCTAGCGAGGGTTGCTTTTTC
ZeDWF3	1169	GCCTTTGGGGGGCGGACCAAGGCGATGCCCTGGTCACGAGCTCGCAAGGGTTGCCATATC
EpDWF3		GCCTTTGGGGGGCGGACCAAGGCGATGCCAGGTCACGAGCTAGCAAGGGTTCGATTATC
CrDWF3		GCCTTTGGGGGGCGGACCAAGGCGATGCCAGGTCACGAGCTAGCAAGGGTTCGATTATC
AtDWF3	930	TGTTTTCTTCCACCCCTACTGACAGGCTTTCAGTTGGTTTCTGCAGAGCAAGAACAAGCT
AaDWF3	1290	TGTTTTCTTCCACCATCTCATCACTCATTTTCAGTTGGAACCCGGCGAAGAAGATAAAGT
ZeDWF3	1229	GGTCTTCTTTCATCATCTCATCACTCGTTTCAGTTGGATACCCGCAGAAGAAGATAAGTT
EpDWF3		TGTTTTCTTCCATCATCTCATCACTTGTTCAGTTGGATACCTGCAGAAGAAGATAAGTT
CrDWF3		TGTTTTCTTCCATCATCTCATCACTTGTTCAGTTGGATACCTGCAGAAGAAGATAAGTT
AtDWF3	990	GGTTTTCTTT
AaDWF3	1350	GGTTTTTTTC
ZeDWF3	1289	GGTATTTTTC
EpDWF3		GGTATTTTTT
CrDWF3		GGTATTTTTT

그림 2. *Echinacea*, *Coreopsis*에서 확보한 degenerate PCR 산물의 염기서열과 애기장대, 쑥, 백일홍 *DWF3* 유전자 염기서열의 유사성 확인함.

#### ○ RNAi 벡터 구축

*Echinacea*, *Coreopsis* *DWF3* 유전자의 발현을 억제하기 위한 RNA interference (RNAi) 벡터를 구축하기 위해 위에서 확보한 *Echinacea* degenerate PCR 산물의 염기서열을 기초로 한 PCR primer를 디자인하고 sense, anti-sense PCR 산물을 확보함. Sense, anti-sense *DWF3* PCR 산물은 CaMV35S (*Cauliflower mosaic virus* 35S) promoter, CHSA intron, OCS (octopine synthase) 3' terminator와 BAR (phosphinothricin acetyl transferase gene) 선별유전자를 지니는 RNAi 벡터, pFGC5941의 *AscI/SwaI*, *XbaI/SmaI*

제한효소 위치에 클로닝하여 pFGC9541/shEpDWF3 벡터를 구축하였고 sense, anti-sense *DWF3* 유전자의 삽입 여부는 제한효소 절단 및 염기서열 결정법으로 확인하였음 (그림 3).

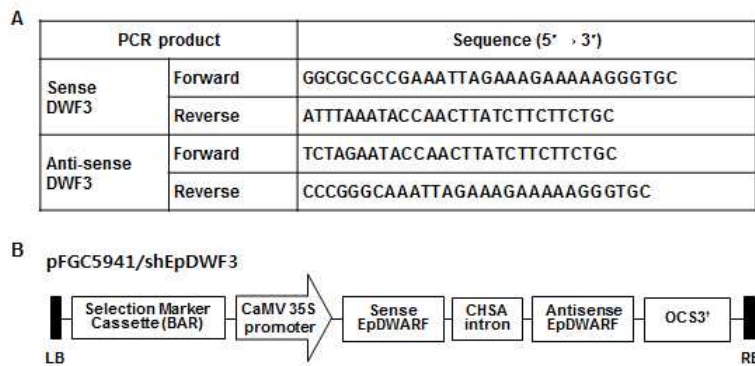


그림 3. *Echinacea DWF3* 유전자의 sense, anti-sense PCR 산물을 확보하기 위한 PCR primer (A) 및 *Echinacea, Coreopsis DWF3* 유전자의 발현을 억제하기 위한 pFGC5941/shEpDWF3 RNAi 벡터 (B)의 모식도.

## 2. RACE PCR을 통한 full length *DWF3* 유전자 확보

### ○ 3' RACE PCR

*Echinacea DWF3* 유전자의 5', 3'-untranslated region (5'-UTR, 3'-UTR) 및 amino acid coding region의 유전정보를 확보하기 위해 5', 3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) PCR을 수행하였음. *Echinacea*에서 추출한 3 µg의 total RNA에 10 µM adaptor primer (AP, 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') 1 µL를 첨가하고 70°C에서 10분간 반응시켜 RNA를 변형시킨 후 ice에 5분 이상 식혀 AP의 결합을 유도하였음. 10x PCR buffer 2 µL, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 2 µL, 10 mM dNTP mixture 1 µL, 0.1 M DTT 2 µL를 첨가하고 42°C에서 3분간 둔 후, SuperScript™ II RT 1 µL를 첨가하였고 42°C에서 50분 동안 반응시켜 3'-RACE cDNA의 합성을 유도하였음. 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA 합성을 종료하였으며 RNase H 1 µL를 첨가하고 37°C에서 20분간 반응시켜 RNA를 제거하였고 *Echinacea DWF3* 3'-RACE PCR 산물을 확보하기 위한 cDNA로 이용하였음. *Echinacea DWF3* 3'-RACE cDNA, GSP1 (*Echinacea DWF3* gene specific primer 1), abridged universal amplification primer (AUAP, 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'), HotstarTaq PCR premixture kit (Qiagen)를 이용한 PCR을 수행하여 첫 번째 PCR 산물을 확보하였고 두 번째 PCR의 주형으로 이용하였으며 GSP2, A USP primer를 이용한 두 번째 nested PCR에서 약 400 bp의 3'-RACE 산물을 확보하였음 (그림 4C). 실험에 이용된 primer 염기서열, PCR 조건은 그림 4A, 4B와 같음. 3'-RACE 산물은 PCR 산물 결합 벡터인 pGEM-T easy 벡터에 결합시킨



후 미생물 DH5a strain에 형질전환시켰고 제한효소 절단 및 염기서열 결정법으로 3'-RACE PCR 산물의 유전자 정보를 확인함. 3'-RACE PCR 산물은 translation stop codon (TAA) 및 3'-UTR을 지니는 것으로 확인됨 (그림 4D).

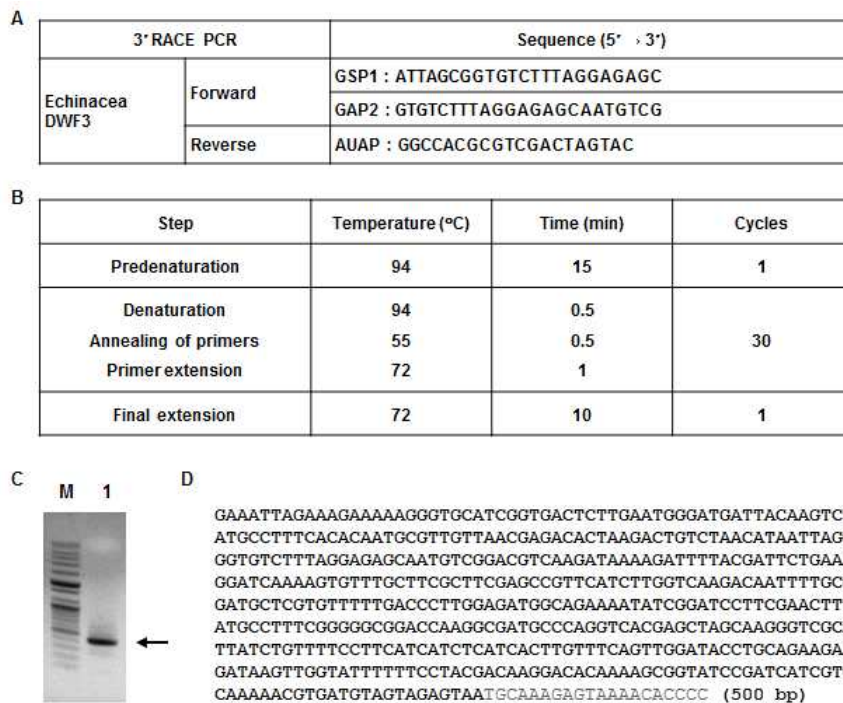


그림 4. (A, B) *Echinacea DWR3* 3'-RACE PCR에 이용된 primer 염기서열 (A) 및 PCR 조건 (B). (C) *Echinacea DWR3* 3'-RACE PCR 산물 (M, 100 bp DNA ladder; 1, 3'-RACE PCR product of *Echinacea DWF3*). (D) *Echinacea DWF3* 3'-RACE PCR 산물의 염기서열 정보.

#### ○ 5' RACE PCR

*Echinacea DWF3* 유전자의 5'-UTR 및 amino acid coding region의 유전정보를 확보하기 위해 5' RACE PCR을 수행하였음. *Echinacea*에서 추출한 3 µg의 total RNA에 2.5 µL GSP1 (1 pmole/µL)을 첨가하고 70°C에서 10분간 두어 RNA를 변성시킨 후 ice에 5분 이상 식혀 GSP1의 결합을 유도하였음. 10x PCR buffer 2.5 µL, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 2.5 µL, 10 mM dNTP mixture 1 µL, 0.1 M DTT 5 µL를 첨가하고 42°C에서 3분간 둔 후, SuperScript™ II RT 1 µL를 첨가하였고 42°C에서 50분 동안 반응시켜 5'-RACE cDNA의 합성을 유도하였음. 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA 합성을 종료하였으며 RNase H 1 µL를 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시켜 RNA를 제거하고 S.N.A.P column을 이용하여 cDNA를 분리하였음. cDNA에 TdT를 tailing하기 위해 DEPC-treated water 6.5 µL, 5x tailing buffer 5 µL, 2 mM dCTP 2.5 µL, S.N.A.P-purified cDNA를 섞어준 후, 94°C에서 3분간 반응시키고 ice에 넣어 1분 이상 식혀주었고 1 µL TdT 첨가

후 37°C에서 10분, 65°C에서 10분간 처리하여 dC-tailed cDNA를 확보하였으며 5' RACE PCR cDNA로 활용함. *Echinacea DWF3* 5'-RACE cDNA, AUAP, GSP1, HotstarTaq PCR premixture kit를 이용한 PCR을 수행하여 첫 번째 PCR 산물을 확보하였고 두 번째 PCR의 주형으로 이용하였으며 AUAP, GSP2 primer를 이용한 두 번째 nested PCR에서 약 800 bp의 5'-RACE 산물을 확보하였음 (그림 5C). 5'-RACE 산물은 PCR 산물 결합 벡터인 pGEM-T easy 벡터에 결합시킨 후 미생물 DH5a strain에 형질전환시켰고 제한효소 절단 및 염기서열 결정법으로 5'-RACE PCR 산물의 유전자 정보를 확인함. 5'-RACE PCR 산물은 translation initiation codon 및 5'-UTR을 지니는 것으로 확인됨 (그림 5D).

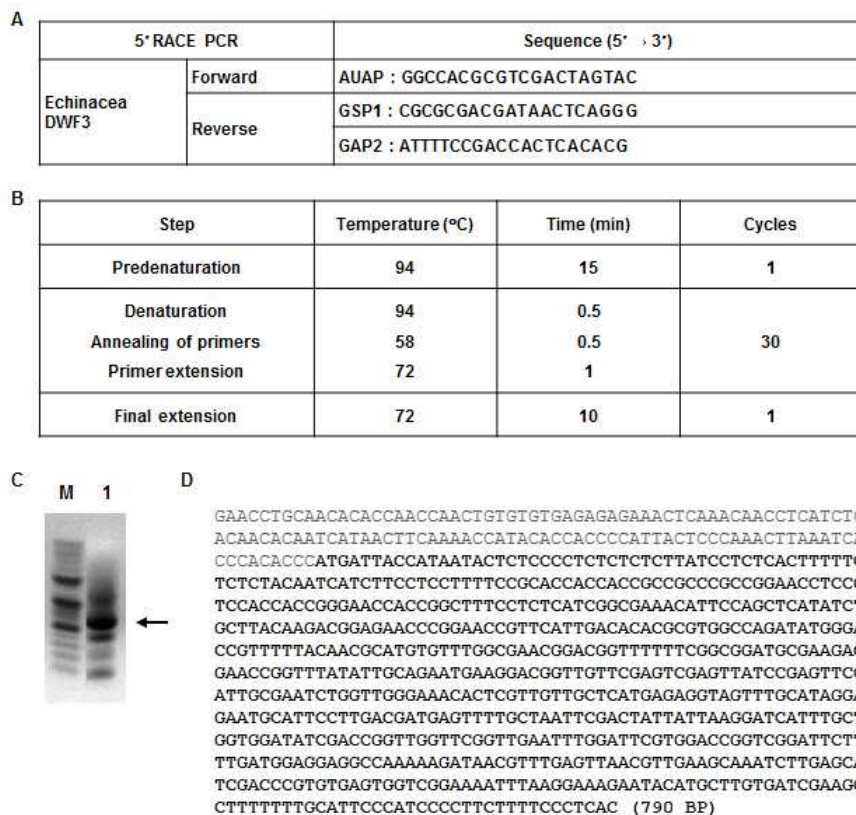


그림 5. (A, B) *Echinacea DWR3* 5'-RACE PCR에 이용된 primer 염기서열 (A) 및 PCR 조건 (B). (C) *Echinacea DWR3* 5'-RACE PCR 산물 (M, 100 bp DNA ladder; 1, 5'-RACE PCR product of *Echinacea DWF3*). (D) *Echinacea DWF3* 5'-RACE PCR 산물의 염기서열 정보.

○ Full length *Echinacea DWF3* 유전자 확보

Degenerate PCR, 5', 3'-RACE PCR을 통해 확보한 *Echinacea DWF3* (putative *DWF3*) 유전자의 염기서열 정보를 기초로 하여 전체 유전자를 증폭시킬 수 있는 PCR primer를 더

자인하고 PCR을 통해 *Echinacea DWF3* 유전자를 확보하였음. *Echinacea DWF3* PCR 산물은 pGEM-T easy 벡터에 결합시킨 후 미생물 DH5a strain에 형질전환시켰고 제한효소 절단 및 염기서열 결정법으로 *Echinacea DWF3* PCR 산물의 유전자 정보를 확인함. PCR에 확보한 *Echinacea DWF3* 유전자는 1,561 bp이며 125 bp의 5'-UTR, 20 bp의 3'-UTR, 1,416 bp의 amino acid coding region을 지니며 471개의 amino acid를 coding하는 것으로 예측됨 (그림 6).

```

1      GAACCTGCAACACACCAACCAACTGTGTGTGAGAGAGAACTCAAACAACCTCATCTCACAAACAATCATAACTTCAAA 80
1      CTTGGACGTTGTGTGGTTGGTTGACACACACTCTCTCTTTGAGTTTGTGGAGTAGAGTGTGTGTTAGTATTGAAGTTT 80
          M I T I I L S P L S L I
81     ACCATACACCACCCCTACTFCCCAAACCTAAATCACCCACACCCATGATTACCATAAATACTCTCCCCTCTCTCTTAT 160
81     TGGTATGTGGTGGGGTAATGAGGGTTTGAATTTAGTGGGTGTGGGTACTAATGGTATTATGAGAGGGGAGAGAGAATA 160
          L S L F L S T I I F L L F R T T T A A R R N L R P P
161    CCTCTCACTTTTCTCTTACAATCATCTTCCCTCTTTCCGCACCACCACCGCCGCCGCGGAACCTCCGTCACCAC 240
161    GGAGAGTGAAAAAGAGAGATGTTAGTAGAAGGAGAAAAGGCGTGGTGGTGGCGCGGGCGCCCTGGAGGCAGTGGTG 240
          P G T T G F P L I G E T F Q L I S A Y K T E N P E P F
241    CGGGAACCACCGGCTTTCCTCTCATCGCGGAAACATTCAGCCTCATATCTGCTTACAAGACGGAGAACC CGGAACCGTTC 320
241    GCCCTTGGTGGCCGAAAGGAGTAGCCGCTTTGTAAGGTCGAGTATAGACGAATGTTCTGCCCTTTGGGCCTTGGCAAG 320
          I D T R V A R Y G T V F T T H V F G E R T V F S A D A
321    ATTGACACACCGGTGGCCAGATATGGGACCGTTTTTACAACGCATGTGTTGGCGAACGGACGGTTTTTTCGGCGGATGC 400
321    TAACTGTGTGGCCACCGGTCTATACCCCTGGCAAAAATGTTGCGTACACAAAACCGCTTGCTGCCAAAAAAGCCGCTACG 400
          K T N R F I L Q N E G R L F E S S Y P S S I A N L V
401    GAAGACGAACCGGTTTATATGTCAGAATGAAGGACCGTTGTTTCGAGTCGAGTTATCCGAGTCCATTGCGAATCTGGTTG 480
401    CTTCTGCTTGGCCAAAATAAACGCTTACTTCTGCAACCAAGCTCAGCTCAATAGGCTCAAGGTAACGCTTAGACCAAC 480
          G K H S L L L M R G S L H R R M H S L T M S F A N S T
481    GGAAACACTCGTTGTTGCTCATGAGAGGTAGTTTGCATAGGAGAAATGCATTCCTTGACGATGAGTTTGCCTAATTCGACT 560
481    CCTTGTGAGCAACAACGAGTACTCTCCATCAACAGTATCCTCTTACGTAAGGAACTGCTACTCAAACGATTAAGCTGA 560
          I I K D H L L V D I D R L V R L N L D S W T G R I L L
561    ATTATTAAGGATCATTGCTGGTGGATATCGACCGGTTGGTTCGGTTGAATTTGGATTGCTGGACCGGTCGGATTCTTTT 640
561    TAATAATTCCTAGTAAACGACCACCTATAGCTGGCAACCAAGCCAACTTAAACCTAAGCACCTGGCCAGCCTAAGAAAA 640
          M E E A K K I T F E L T L K Q I L S I D P C E W S E
641    GATGGAGGAGCCAAAAAGATAACGTTTGAAGTTAAGCAATCTGAGCATCGACCCGTTGAGTGGTGGGAAA 720
641    CTACCTCCTCCGGTTTTTCTATTGCAAACTCAATTGCAACTTCGTTTAGAAGTCTGAGTGGGACACTCACCAGCCTTT 720
          N L R K E Y M L V I E G F F C I P I P F F S L T Y R R
721    ATTTAAGGAAAGATAACATGCTGTGATCGAAGGCTTTTTTGCATTCCCATCCCCTTTTTCCTCCTACTTATCGTGC 800
721    TAAATTCCTTTCTTATGTACGAACACTAGCTTCCGAAAAAAGCTAAGGGTAGGGGAGAAAAGGGAGTGAATAGCAGCG 800
          A I Q A R K R V T E A L H L V V C E R R V E R E K G L
801    GCGATTACGGCACGAAAAGGGTACTGAGGCATTACATTTGGTGGTGTGTGAGCGCGGGTAGAAAAGGAAAAGGGTT 880
801    CGCTAAGTCCGTGCTTTTTCCCACTGACTCCGTAATGTAACCACACACACTCGCCGCCATCTTTCCCTTTTCCCAA 880
          K K N D M L A A L F D S D C D D D D E I V D L L V S L
881    GAAGAAGAACGACATGTTGGCAGCATTGTTTACAGTGTATTGATGATGACGAGATCGTGGATTGTTGGTGTCTTTGC 960
881    CTTCTTCTGCTGTACAACCGTGTAAACAACTGCTACTAACAACACTACTGCTCTAGCACCTAAACACACAGAAAACG 960
          L V A G Y D T T S T M T L A V K F L T D T P S A L A
961    TGGTTGCGGGTTATGACACCACATCAACCACCATGACTCTTGGCGTTAAATTTCTCACGGATACACCTTCGGCTCTTGT 1040
961    ACCAACGCCCAATACTGTGTGTAGTTGGTGGTACTGAGAACGGCAATTTAAAGAGTGCCTATGTGGAAGCCGAGAACGA 1040
          Q L K E E H E E I R K K K G A S V T L E W D D Y K S M
1041    CAGCTTAAAGGAAAGCATGAGGAAATTAGAAAAGAAAAGGGTGCATCGGCTGACTCTTGAATGGGATGATTACAAGTCTAT 1120
1041    GTCGAATTCCTTCTGTACTCCTTAAATCTTTCTTTTCCACGCTAGCCACTGAGAACTTACCCTACTAATGTTTCTAGATA 1120
          P F T Q C V V N E T L R L S N I I S G V F R R A M S
1121    GCCTTTCACAAATGCGTTGTTAACGAGACACTAAGACTGTCTAACATAATTAGCGGTGTCTTTAGGAGAGCAATGTCGG 1200
1121    CGGAAAGTGTGTTACGCAACAATGCTCTGTGATTCTGACAGATTGTATTAATCGCCACAGAAATCCTCTCGTTACAGCC 1200
          D V K I K D F T I L K G S K V F A S L R A V H L G Q D
1201    ACGTCAAGATAAAAAGATTTTACGATTCTGAAAGGATCAAAGTGTGTTGCTTCGCTTCGAGCCGTTCACTTGGTCAAGAC 1280
1201    TGCAGTCTATTTTCTAAAATGCTAAGACTTTCCTAGTTTTTCAAAAACGAAGCAGCTCGGCAAGTAGAACCACTTCTG 1280
          N F A D A R V F D P W R W Q K I S D P S N F M P F G G
1281    AATTTTGGGATGCTCGTGTGTTTTGACCCCTGGAGATGGCAGAAAATATCGGATCCTCGAACTTTATGCCTTTTCGGGG 1360
1281    TTAACACGCCCTACGAGCACAAAACCTGGGAACCTCTACCGTCTTTTATAGCCTAGGAAGCTTGAATAACGGAAAGCCCCC 1360
          G P R R C P G H E L A R V A L S V F L H H L I T C F
1361    CGGACCAAGCGATGCCAGGTACAGACTAGCAAGGGTGCATTTATCTGTTTTCCTTTCATCATCTCATCTGTTTCA 1440
1361    GCCTGGTTCGGCTACGGGTCAGTGTGCTGCTTCCAGCGTAATAGACAAAAGGAGTAGTAGTAGTAGTGAACAAAAGT 1440
          S W I P A E E D K L V F F P T T R T Q K R Y P I I V Q
1441    GTTGGATACCTGCAGAGAAGATAAGTTGGTATTTTTTCTACGACAAGGACACAAAAGCGGATCCGATCATCTGTCGA 1520
1441    CAACCTATGGACGCTTCTTCTATTCACCAATAAAAAGGATGCTTCTCTGTTTTCGCCATAGGCTAGTAGCACGTT 1520
          K R D V V E *
1521    AAACGTGATGTAGTAGTAATGCAAGAGTAAACACCC 1561
1521    TTTGCACTACATCATCTCATTACGTTTCTCAATTTGTGGGG 1561

```

그림 6. Degenerate PCR, 5', 3'-RACE PCR을 통해 확보한 *Echinacea DWF3* 유전자의 염기서열 및 amino acid 서열 정보.



본 연구에서 확보한 *Echinacea DWF3* 유전자의 유전정보는 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 등록하였음 (GeneBank accession number : KF170019) (그림 7).

```

LOCUS      KF170019                1561 bp    mRNA    linear    PLN 30-MAY-
2013
DEFINITION Echinacea purpurea EpCPD mRNA for steroid 23-alpha-hydroxylase.
ACCESSION  KF170019
VERSION
KEYWORDS
SOURCE     Echinacea purpurea
ORGANISM   Echinacea purpurea
           Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
           Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; core eudicotyledons;
           asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae;
           Heliantheae alliance; Heliantheae; Echinacea.
REFERENCE  1 (bases 1 to 1561)
AUTHORS    Zhao,J., Fu,Y.-Y., Park,J.-H., Lee,Y.-H. and Chung,I.S.
TITLE      Echinacea purpurea EpCPD for steroid 23-alpha-hydroxylase
JOURNAL    Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 1561)
AUTHORS    Zhao,J., Fu,Y.-Y., Park,J.-H., Lee,Y.-H. and Chung,I.S.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (30-MAY-2013) Department of Genetic Engineering and
           Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University, 1732
           Deogyong-daero, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 446-701, Korea
COMMENT    Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:1.

           ##Assembly-Data-START##
           Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
           ##Assembly-Data-END##
FEATURES   Location/Qualifiers
           source          1..1561
                       /organism="Echinacea purpurea"
                       /mol_type="mRNA"
                       /db_xref="taxon:53751"
           CDS             126..1541
                       /codon_start=1
                       /translation="MITIILSPLSLILSLFLSTIIFLLFRTTTAARNLRPPPGTTF
           PLIGETQLISAYKTENPEPFIDTRVARYGTVFTTHVFGERTVFSADAKTNRFILQNE
           GRLFESSYPSSIANLVGKHSLLMRGSLHRMHSLTMSFANSTIIKDHLLVDIDLVR
           LNLDSWTGRILLMEAKKTFELTLKQILSIDPCEWSENLRKEYMLVIEGFFCIPIPF
           FSLTYRRAIQARKRVTEALHLVVCERRVEREKGLKKNMLAALFSDCDDDEIVDLLV
           SLLVAGYDTSITMTLAVKFLTDTPSALAQLKEEHEEIRKKKGASVTLEWDDYKSMFP
           TQCVVNETLRLSNIISGVFRAMSDVKIKDFTILKGSKFVAFSLRAVHLGQDNFADARV
           FDPWRWQKISDPSNFMPPFGGGPRRCPGHELARVALSVFLHLLITCFSWIPAEEDKLVF
           FPTTRTKRYPYIIVQKRDDVVE"
BASE COUNT 417 a   354 c   363 g   427 t
ORIGIN
1 gaacctgcaa cacaccaacc aactgtgtgt gagagagaaa ctcaaacac ctcatotcac
61 aacacaatca taacttcaaa accatacacc accocattac tcccaaacctt aaatcaccca
121 caccatgat taccataata ctctccccto tctctcttat cctctcaactt tttctctcta
181 caatcatott cctccttttc cgcaccacca ccgcccgcgc cgggaacctc cgtccaccac
241 cgggaaccoc cggctttcct ctcatcggcg aaacattcca gctcatatct gcttacaaga
301 cggagaaccc ggaaccgttc attgacacac cgggtggccag atatgggacc gtttttaaca
361 cgcattgtgt tggcgaacgg acggtttttt cggcggatgc gaagacgaac cggtttataat
421 tgcagaatga aggaacggtt ttcgagtcga gttatccgag ttccattgag aatctggttg
481 ggaaacactc gttgttgctc atgagaggtg gtttgcatag gagaatgcat tccctgacga
541 tgagttttgc taattcgact attattaagg atcatttgct ggtggatctc gaccggttg
601 ttcggttgaa tttggattcg tggaccggtc ggattctttt gatggaggag gccaaaaaga
661 taacggttga gttaacggtt aagcaaatct tgagcatoga cccgtgtgag tggctggaaa
721 atttaaggaa agaatacatg cttgtgatcg aaggcttttt ttgcatctcc atcccctct
781 tttccctcac ttatcgtcgc gcatctcagg caccgaaaag ggtgactgag gcattacatt
841 tgggtgtgtg tgagcggcgg gtgagaaggg aaaaagggtt gaagaagaac gacatgttg
901 cagcattggt tgacagtgat tgtgatgatg acgagatcgt ggattgttg gtgtctttgc
961 tgggtgocgg ttatgacacc acatcaacca ccatgactct tgcogttaa tttctcaccg
1021 atacaccttc ggctcttgcg cagcttaagg aagaacatga ggaattaga aagaaaaagg
1081 gtgcatcggg gactcttgaa tgggatgatt acaagtctat gcctttcaca caatcogttg
1141 ttaacgagac actaagactg tctaacataa ttacgggtgt ctttaggaga gcaatgtcgg
1201 acgtcaagat aaaagatttt acgattctga aaggatcaaa agtggttgct tcgcttcgag
1261 ccggtcactc tggcgaagac aattttgcgg atgctcgtgt ttttgacct tggagatggc
1321 agaaaatata ggatccttcg aactttatgc ctttcggggg cggaccaagc cgatcccgag
1381 gtcacgagct agcaagggtc goattatctg tttctctca tcatotcatc actgttttca
1441 gttgatgacc tgcagaagaa gataagttgg tattttttcc tacgacaagg acacaaaaag
1501 ggtatccgat catcgtgcaa aaacgtgatg tagtagagta atgcaagag taaaacacc
1561 c
//

```

그림 7. *Echinacea DWF3* 유전자의 유전정보를 NCBI에 등록함 (GeneBank accession number : KF170019).

*Echinacea DWF3* 유전자에서 발현될 것으로 예측되는 amino acid 서열을 기존에 알려진 다른 식물체의 DWF3 (또는 CPD, constitutive photomorphogenesis and dwarfism; CYP, cytochrom P450) 단백질의 amino acid 서열과 비교한 결과, EpDWF3 단백질은 백일홍 ZeCPD1, 쑥 AaCYP와 90% 이상의 높은 유사성을 지니는 것으로 확인됨 (그림 8).

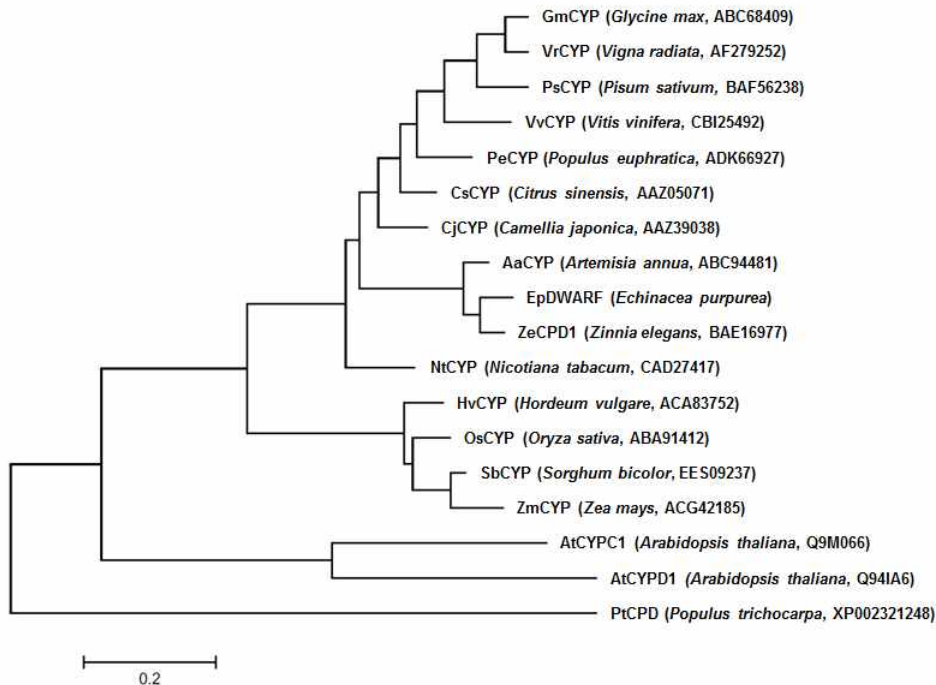


그림 8. *Echinacea DWF3*의 phylogenetic analysis.

### 3. 미생물 단백질 발현시스템을 통한 재조합 EpDWF3 단백질 발현 및 분리 정제

#### ○ 미생물 발현시스템 구축

*Echinacea DWF3* 단백질을 미생물 단백질 발현시스템을 통해 발현시키기 위해 *EcoRI*, *XhoI* 제한효소 염기서열을 지니는 primer (forward primer, 5'-GAATTCATGATTACCATAAT ACTCTCCCCTCTC-3', reverse primer 5'-CTCGAGCTCTACTACATCACGTTTTTGCAC-3')를 이용한 PCR 방법으로 *EpDWF3* 유전자를 증폭시키고 pGEM-T easy 벡터에 클로닝한 후 염기서열 분석을 통해 확인함. pGEM-T easy 벡터에 클로닝된 *EpDWF3* 유전자를 *EcoRI*, *XhoI* 제한효소로 절단하여 확보하고 미생물 발현벡터 pET-28a의 *EcoRI*, *XhoI* 제한효소 위치에 삽입하여 pET-28a/*EpDWF3* 벡터를 확보함 (그림 9). *EpDWF3* 유전자의 삽입은 제한효소 절단 및 염기서열 결정을 통해 확인함.

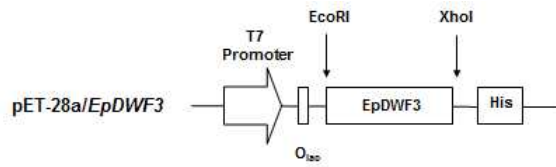


그림 9. *Echinacea* DWF3 단백질을 발현시키기 위한 미생물 발현 벡터 pET-28a/EpDWF3의 모식도.

○ *Echinacea* DWF3 단백질 발현 확인

pET-28a/EpDWF3 벡터를 *E. coli* BL21(DE3) 세포에 형질전환시키고 50 µg/mL kanamycin이 포함된 LB 배지에서 선별하여 pET-28a/EpDWF3 벡터가 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3) 세포주들을 확보하고 재조합 EpDWF3 단백질 발현에 이용함. *E. coli* BL21(DE3) 세포를 OD<sub>600</sub>가 0.6이 될 때까지 배양을 한 후, IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)를 최종 농도 1 mM이 되도록 첨가하고 3시간 동안 37°C에서 배양함. 세포 회수 후 PBS (pH7.4)로 현탁하고 단백질 추출물을 확보하였으며 SDS-PAGE 후 Coomassie brilliant blue 염색 및 anti-His 항체를 이용한 Western blot 분석을 통해 EpDWF3 단백질의 발현을 확인함 (그림 10). 미생물 세포에서 발현된 EpDWF3 단백질은 약 50 kDa이었고 *in vitro* 활성 측정을 위한 분리, 정제 연구를 진행함.

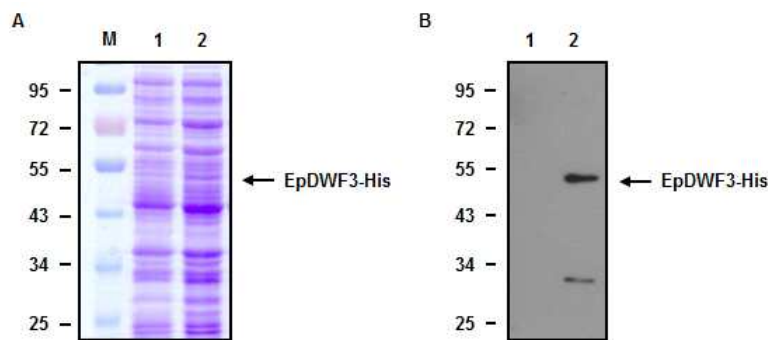


그림 10. pET-28a/EpDWF3 벡터가 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3) 세포에서 EpDWF3 단백질의 발현을 Coomassie brilliant blue 염색 (A) 및 anti-His 항체를 이용한 Western blot 분석 (B)을 통해 확인함 (M, prestained protein marker; 1, *E. coli* BL21(DE3) cells transformed with pET-28a; 2, *E. coli* BL21(DE3) cells transformed with pET-28a/EpDWF3).

4. *in vitro* 활성 측정

○ BR 추출

미생물에서 발현시킨 EpDWF3 단백질의 *in vitro* 활성을 측정하기 위한 기질을 확보하기 위해 *Echinacea* 잎에서 BR을 추출하고 gas chromatography (GC) 분석 연구를 수행함. *Echinacea* 잎 3 g을 *n*-hexane (30 mL)으로 3번 반복 추출하여 hexane 추출물 (58.5 mg)을 확보하고 추출물 3.4 mg 당 1 M KOH/EtOH 용매 1 mL을 첨가하여 1시간 동안 saponincation 반응을 진행하였음. 반응물에 동량의 *n*-hexane을 혼합한 후 hexane 분획물을 확보하였고 농축 후 pyridine 용매에 용해시켰으며 *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA)를 첨가하고 80°C에서 1시간 동안 trimethylsilylation (TMS) 반응을 유발시켜 GC (Shimadzu GC-MS-QP2010) 분석을 위한 BR 추출물 시료를 확보하였음. GC 분석에 사용한 column은 silica capillary column (DB-5: 30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m, USA)이었고 column 온도는 초기 온도가 60°C이었고 2분간 유지하다가 1분에 15°C씩 320°C까지 올리고 320°C에서 10분간 유지하였음 (그림 11).

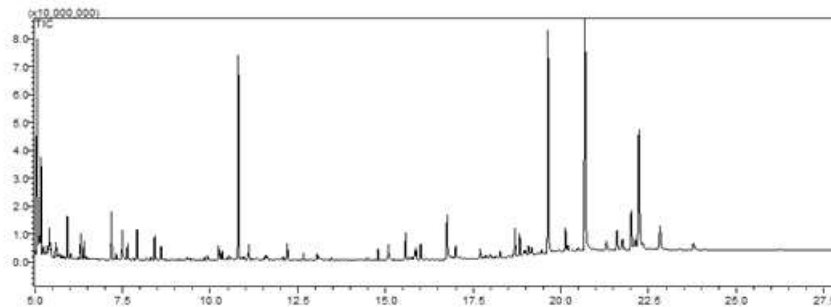


그림 11. *Echinacea*에서 추출한 BR 추출물의 GC spectrum.

#### ○ *in vitro* 활성 분석

미생물에서 발현시킨 EpDWF3 단백질의 *in vitro* 활성을 측정하기 pET-28a 및 pET-28a/EpDWF3 벡터가 형질전환된 세포에서 단백질 추출물을 확보함. 50 mL의 LB 배지에 pET-28a 및 pET-28a/EpDWF3 벡터가 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3) 세포를 OD<sub>600</sub>가 0.6이 될 때까지 배양한 후, 0.25 mM IPTG를 첨가하고 20°C에서 18시간 동안 현탁배양하였음. 원심분리 후 세포를 회수하고 5 mL의 PBS (pH 7.4)에 현탁하였으며 sonication하여 세포를 파쇄한 후 원심분리하여 단백질 추출물을 확보함.

단백질 추출물 1 mg을 3 mg의 BR 추출물과 혼합하고 실온에서 3시간 동안 반응한 후 1 M KOH/EtOH 용매 1 mL을 첨가하여 1시간 동안 saponincation 반응을 진행하였고 위에서 언급한 것과 같이 GC 분석용 시료를 확보 후 GC 분석을 통해 BR 함량 변화를 확인함. 그림 12에서와 같이 pET-28a/EpDWF3 벡터가 형질전환된 세포의 단백질 추출물이 첨가된 경우 대조군과 다른 BR spectrum을 보였으며 이는 미생물에서 발현된 EpDWF3 단백

질의 활성에 의해 유도되는 것으로 생각되며 변형된 BR 화합물의 종류 및 함량 분석을 위한 분석 연구를 진행함.

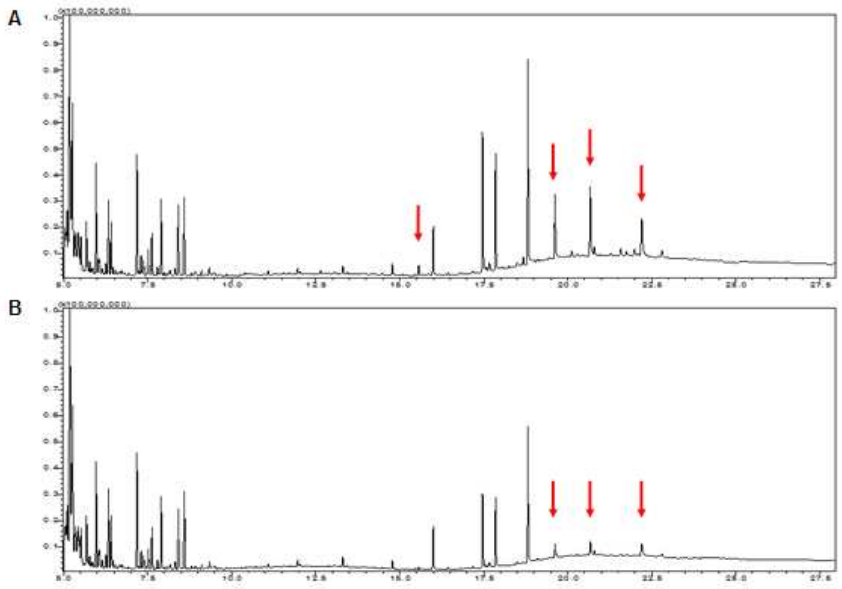


그림 12. pET-28a (A) 및 pET-28a/EpDWF3 (B) 벡터가 형질전환된 세포에서 단백질 추출물을 확보하고 BR 추출물과 반응 후 BR spectrum의 변화를 GC 분석을 통해 확인함.

5. *DWF3* 유전자가 과발현된 식물체 (또는 식물세포)를 확보하기 위한 식물 발현시스템 구축

○ 식물 발현시스템 구축

*EpDWF3* 유전자가 과발현된 식물체를 확보하기 위한 식물 발현벡터를 구축하였음. *XbaI*, *SmaI* 제한효소 염기서열을 지니는 primers (그림 13A)를 이용한 PCR 방법으로 증폭시켰고 pGEM-T easy 벡터에 클로닝한 후 염기서열 분석을 통해 확인함. pGEM-T easy 벡터에 클로닝된 *EpDWF3* 유전자를 *XbaI*, *SmaI* 제한효소로 절단하여 확보하고 *Beet curly top virus* (BCTV) replicon과 CsVMV (*Cassava vein mosaic virus*) promoter를 지니는 식물 발현벡터 pBCTV 벡터의 *XbaI*, *SmaI* 제한효소 위치에 삽입하여 pBCTV/EpDWF3 벡터를 확보함 (그림 13). *EpDWF3* 유전자의 삽입은 제한효소 절단 및 염기서열 결정을 통해 확인함.

또한 *EpDWF3* 유전자를 과발현하는 식물체를 확보하기 위한 식물 발현벡터 pPZP2Ha3를 구축하기 위해 *XbaI*, *XhoI* 제한효소 염기서열을 지니는 PCR primer (그림 14A)를 이용한 PCR 방법으로 *DWF3* 유전자를 증폭시켰고 pGEM-T easy 벡터에 클로닝한 후 염기서

열 분석을 통해 확인함. pGEM-T easy 벡터에 클로닝된 *EpDWF3* 유전자를 XbaI, XhoI 제한효소로 절단하여 확보하고 CaMV 35S promoter를 지니는 식물 발현벡터 pPZP2Ha3 벡터의 XbaI, XhoI 제한효소 위치에 삽입하여 pPZP2Ha3/*EpDWF3* 벡터를 확보함 (그림 14B). *EpDWF3* 유전자의 삽입은 제한효소 절단 및 염기서열 결정을 통해 확인함.

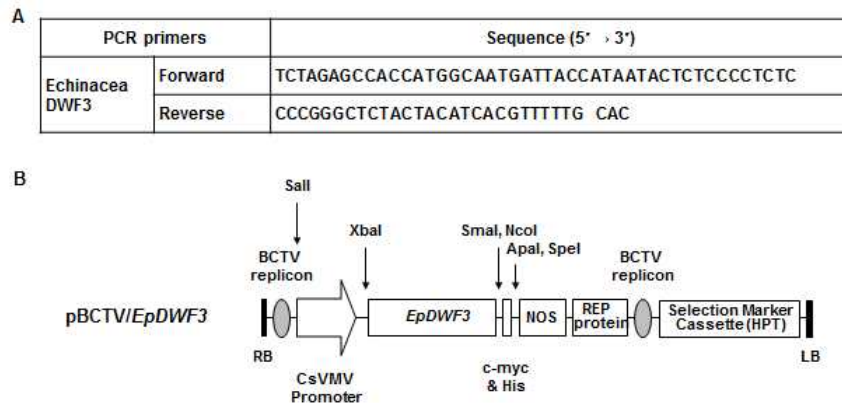


그림 13. *Echinacea DWF3* 유전자가 과발현된 식물체를 확보하기 위한 식물 발현벡터 pBCTV/*EpDWF3*의 모식도.

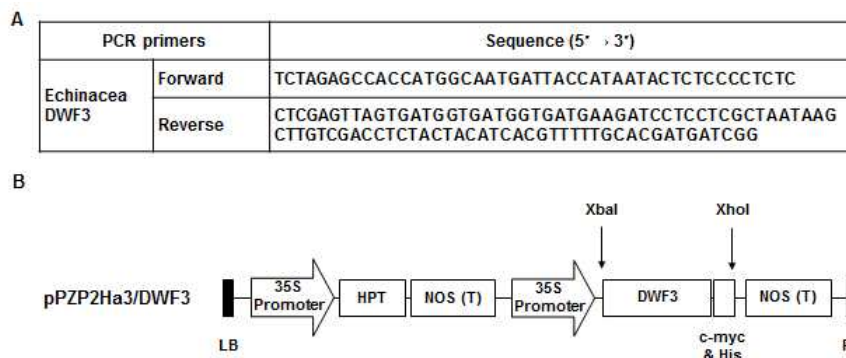


그림 14. *Echinacea DWF3* 유전자가 과발현된 식물체를 확보하기 위한 식물 발현벡터 pPZP2Ha3/*EpDWF3*의 모식도.

### ○ 재조합 *Agrobacterium* 확보

pBCTV/*EpDWF3* 및 pPZP2Ha3/*EpDWF3* 벡터가 형질전환된 *Agrobacterium* 세포를 확보하기 위해 재조합 미생물에서 추출한 각각의 벡터를 electroporation 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, LBA4404 세포에 형질전환시키고 50 µg/mL kanamycin / 50 µg/mL gentamycin 또는 50 µg/mL kanamycin / 25 µg/mL rifampicin 항생제가 포함된 LB 배지에서 선별하여 pBCTV/*EpDWF3* 및 pPZP2Ha3/*EpDWF3* 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, LBA4404 세포를 확보하였음. 재조합 *Agrobacterium* 세포를 항생제가 포함된 LB broth 배지에서 2일 동안 (28°C) 배양하



고 pBCTV/EpDWF3 및 pPZP2Ha3/EpDWF3 plasmid DNA를 추출하였고 PCR을 통해 pBCTV/EpDWF3 및 pPZP2Ha3/EpDWF3 벡터의 존재를 확인하였음 (그림 15 & 16).

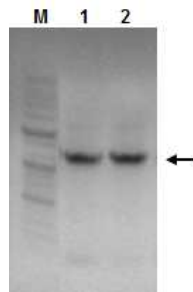


그림 15. 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (lane 1), LBA4404 (lane 2) strain에서 plasmid DNA를 추출하고 PCR을 통해 pBCTV/EpDWF3 벡터의 존재를 확인함.

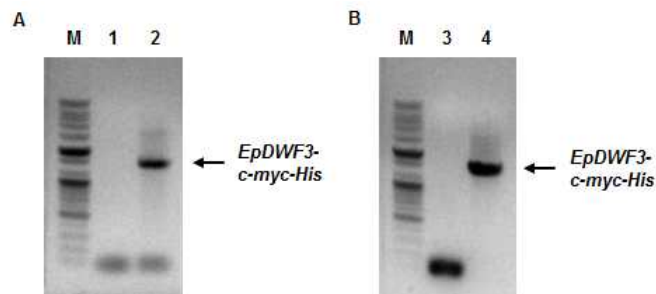


그림 16. 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (lane 1, pPZP2Ha3; lane 2, pPZP2Ha3/EpDWF3), LBA4404 (lane 3, pPZP2Ha3; lane 2, pPZP2Ha3/EpDWF3) strain에서 plasmid DNA를 추출하고 PCR을 통해 pPZP2Ha3/EpDWF3 벡터의 존재를 확인함.

3-2-2. 제1협동과제 : 관상작물 형질전환 체계 확립, 난쟁이 관상작물 개발 및 실용화 연구

1. 관상작물 유래 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템이 형질전환된 *Agrobacterium* 확보

제1세부과제 연구과제에서 구축한 *Echinacea*, *Coreopsis* 관상작물 *DWF3* 유전자 발현 억제용 pFGC9541/shEpDWF3 벡터가 형질전환된 *Agrobacterium* 세포주를 확보하기 위해 재조합 미생물에서 추출한 pFGC9541/shEpDWF3 벡터를 electroporation 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, LBA4404 세포에 형질전환시키고 50 µg/mL kanamycin / 50 µg/mL gentamycin 또는 50 µg/mL kanamycin / 25 µg/mL rifampicin 항생제가 포함된 LB 배지에서 선별하여 pFGC9541/shEpDWF3 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, LBA4404 세포를 확보하였음. 재조합 *Agrobacterium* 세포를 각각의 항생제가 포함된 LB broth 배지에서 2일 동안 (28°C) 배양하고 pFGC9541/shEpDWF3 plasmid DNA를 추출하였고 PCR을 통해 pFGC9541/shEpDWF3 벡터의 존재를 확인하였음 (그림 17).

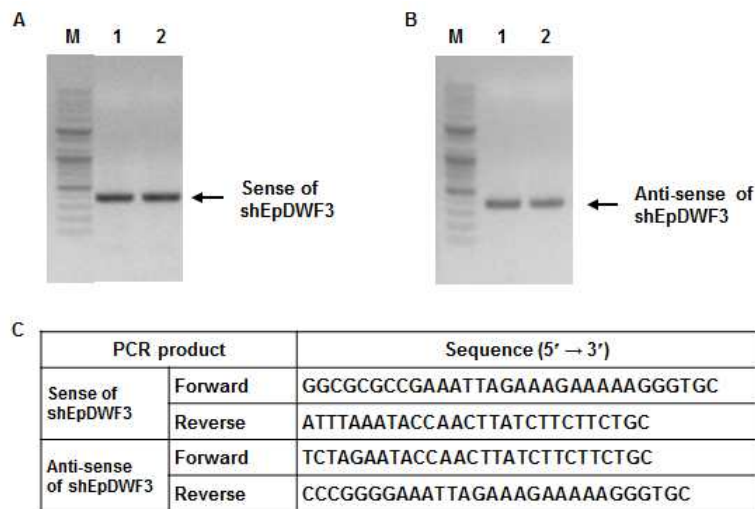


그림 17. (A, B) 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (lane 1), LBA4404 (lane 2) 세포에서 plasmid DNA를 추출하고 PCR을 통해 shEpDWF3 sense (A), anti-sense (B) 유전자의 존재를 확인함. (C) PCR에 이용된 primer 염기서열.

2. 장기개화형 관상작물 *Coreopsis*의 재분화 체계 확립 및 재조합 *Agrobacterium*을 이용한 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템 형질전환

(1) 장기개화형 관상작물 *Coreopsis*의 재분화 체계 확립 (배지종류선정, 줄기, 뿌리 형성을 위한 적정 성장조절제 종류 및 농도 구명, 적정 배양조건 규명)



## ○ 무균화를 위한 소독방법 개발

본 연구에서 사용되는 *Coreopsis* 속 식물의 경우 "우리꽃" 종묘에서 연구, 육성한 품종들로 구성되어 있는데, 종자가 불임성을 보여 종자번식이 불가능하기에 주로 줄기삽목을 통한 영양번식을 통해 개체를 확보하고 있음. 본 연구에서도 기내배양 및 형질전환 등에 필요한 무균 식물체를 얻기 위해서는 영양번식을 통해 획득된 개체들을 소독하여 사용하는 것이 필수적임. 그러나 이러한 소독방법은 모주의 재배 환경, 생육단계 및 연령, 식물체 형태 및 건전성 등에 따라서 차이가 날 수 있음. 따라서 본 실험에서는 기존의 보고된 소독 방법을 토대로 보다 효율적이고 현재 적용 가능한 소독 방법 개발을 위한 실험을 진행하였음.

공시 재료는 포트상태로 *Coreopsis* 재배 전업농가에서 분양받아 이용하였는데, 재료의 연령은 모주에서 채취된 삽수를 cell tray에서 발근시킨 후 포트에 이식하여 2개월 이상 온실에서 재배된 것을 대상으로, 그 형태는 초장 약 20~25 cm 정도, 줄기 직경은 0.5 cm 이상, 잎은 전체 20매 이상 분화되었고 개화되지 않은 것을 이용하였음. 본 소독 실험에 사용된 삽수는 약 2cm 크기로 절단한 줄기에 잎이 2개씩 달리도록 조제하여 이용하였음. 소독용액은 NaOCl (sodium hypochlorite) 용액 2, 3, 4%에 용액 100 mL 당 Tween 20을 10  $\mu$ L 씩 첨가하였으며, 소독시간은 NaOCl 2 및 3%의 경우 15분간, NaOCl 4%의 경우 10, 15, 20, 25분간 처리하였음. 처리된 개체들은 멸균수로 3회 이상 세척한 후 MS (Murashige & Skoog medium) 배지에 치상하였으며 총 14일간 그 생존 및 오염정도 등을 조사하였음.

NaOCl 2 및 3%를 사용하는 경우 치상 초기에는 오염이 크게 발생하지 않으나, 치상 10일 이후부터 오염이 번지기 시작하여 최종적으로 오염율이 70% 이상으로 높아졌으며, 생존율은 22% 이하로 저조하게 나타났음. 하지만 농도를 4%로 높이는 경우 오염율은 22% 이하로 현저히 줄어들었고, 생존율은 2 및 3%를 사용한 것에 비해 40% 이상 향상되었음 (표 1). 그러나 NaOCl 4%를 사용한 경우 그 소독 시간이 길어질수록 식물체의 말단 및 절단된 부분부터 백화현상이 나타났으며, 소독 시간이 20분 이상으로 지속되는 경우 식물체 백화뿐만 아니라 전체적인 시들음 현상이 나타났고, 치상 이후 결국 고사하는 등 NaOCl에 의한 피해가 현저히 두드러졌음. 소독 시 식물체의 백화현상이 나타난 면적이 전체의 1/10 이하인 경우 이후 재분화 및 뿌리 발근에 큰 영향을 미치지 않았으나, 그 이상인 경우 비록 치상 초기 생존하였다 하더라도 대부분 뿌리 발육이 제대로 되지않아 결국 고사하였음 (그림 18).

따라서 본 실험에서 *Coreopsis* 소독에 있어 적정 처리방법으로는 NaOCl 4%로 10분간 처리하는 것이 오염을 최소화하고 NaOCl에 의한 과도한 백화현상을 줄이는 데 효과적일 것으로 생각됨. 이러한 조건의 실험을 통해 250개체 이상의 건전한 기내식물체를 획득할 수 있었고, 이를 계속적으로 기내에서 증식시켜 차후 실험에 필요한 재료로 사용하였음.

표 1. NaOCl 소독 농도 및 처리 시간에 따른 'Uridream' 줄기 삽수의 기내 생존 정도.

소독농도 (%)	처리시간 (min.)	생존율 (%)	고사율(%)	오염율(%)
2	15	13	0	86
3	15	22	6	72
4	10	61	17	22
	15	50	30	20
	20	22	78	0
	25	17	83	0

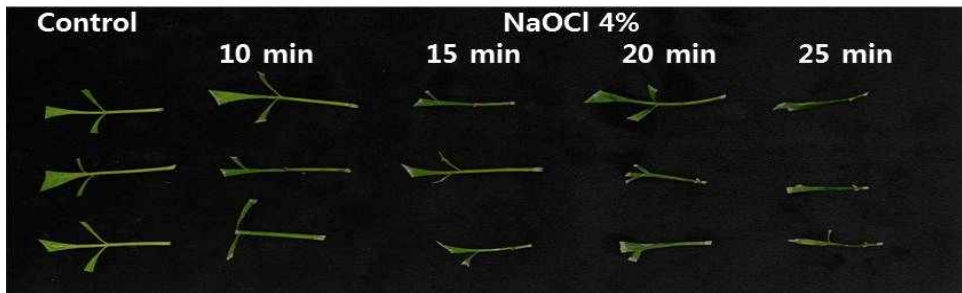


그림 18. NaOCl 4% 처리시간 별 'Uridream' 줄기 삽수의 변화 정도.

○ 기내 삽목 조건 구명

본 연구에서 사용되는 *Coreopsis rosea*는 캐나다의 Nova Scotia에서 미국의 Maryland에 이르는 북아메리카 동부 연안에서 자생하는 식물로써, 긴 여름 동안 각 줄기의 끝부분에서 계속적으로 개화하며, 장일 및 따뜻한 온도에 민감하게 반응하여 쉽게 화아분화하는 것으로 알려져 있음. 이러한 광 및 온도에 의해 쉽게 화아분화 및 개화하는 특성은 조경용 지피 식물로써는 큰 장점으로 작용하지만 본 연구와 같이 제한된 환경 하에서 진행되는 식물형질 전환 등에 필요한 건전하고 어린 무균 식물체를 지속적으로 획득하는 데에는 다소 어려움으로 작용될 수 있음. 따라서 본 실험에서는 필요한 무균절편체를 얻기 위한 선행조건으로 기내 삽목을 계속적으로 실시하는 경우, 노화를 방지하고 건전한 개체를 확보할 수 있는 기내 삽목 방법을 알아보려고 하였음.

기내 삽목에 사용된 삽수는 기내에서 유지되고 있는 *Coreopsis* 중 개화가 시작되지 않은 개체 및 꽃대가 올라와 개화가 이미 진행된 개체를 대상으로, 녹색을 띄는 줄기부분을 약 1.5 cm로 절단하고 잎이 2매 이상 달리도록 조제하였으며, 이때 꽃대는 삽수에 포함되지 않도록 모두 제거한 후 사용하였다. 조제된 삽수는 'Uridream'의 경우 MS 배지, 'Heaven's Gate'는 1/2 MS 배지가 담겨진 culture incu vessel (SPL, 72×72×100 mm<sup>3</sup>)에 용기 당 2개씩 수직으로 치상하였고, 총 21일간 그 생육 정도를 조사하였음. 배양환경은 12시간 일장, 23±2°C이 계속 유지되는 조건과, 일장은 동일하나 주간은 25±2°C, 야간에는 18±2°C로 변온된 상태로 조절되는 2가지 조건으로 하였음.

생존율의 경우 삽수의 채취 시기 및 특정 배양조건에 따른 차이가 크게 나타나지 않았으

나, 그 외 생육정도는 처리조건에 따른 차이를 극명하게 보였음. 개화 이전의 모주에서 채취한 삽수는 개화된 모주에서 채취한 것에 비해 줄기 증가량, 발근 정도 및 뿌리 개수 등에서 양호한 결과를 나타냈음. 또한 일정한 온도에서 계속 배양하는 것이 주야간 변온에서 배양한 경우보다 영양생장에 유리한 것으로 조사되었음 (표 2). 반면 개화 이후의 모주에서 채취된 것이거나, 그렇지 않다 하더라도 변온에서 계속적으로 노출된 개체들의 경우 발근이 매우 저조하거나, 아예 발근이 되지 않은 채 바로 꽃대가 올라오고 개화하는 개체가 다수 확인되었음. 이렇게 빨리 노화된 개체들의 경우 줄기와 잎의 생장 및 뿌리 분화가 되기도 전에 node 부분에서 꽃대가 올라와 개화해버리기 때문에 그 초장이 5 cm 미만에 미치고 결국 고사하였음. 이러한 기내 삽목 개체의 급속한 퇴화현상은 'Uridream'의 경우가 'Heaven's Gate'에 비해 더 심하게 나타났음 (그림 19 & 20).

따라서 적정 기내 삽목 조건으로는 개화되지 않은 개체에서부터 삽수를 채취하여 사용하되, 기내환경은  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 12시간 일장조건 하에서 연속 배양하는 것이 초기 생육 및 영양생장을 빠르게 하기 때문에 상대적으로 생식생장 후의 급속한 퇴화현상을 늦추어 향후 실험을 위한 활력있는 무균절편체 공급에 보다 유리할 것으로 생각됨.

표 2. 삽수 채취 시기 및 배양환경에 따른 'Uridream'의 생육 정도 비교.

생육정도	삽수 채취시기		배양환경	
	개화이전	개화이후	일정온도	변온
생존율 (%)				
줄기증가량 (cm)	87	75	87	75
발근정도*	1.0	0.5	1.6	0.7
뿌리 개수 (ea/개체당)	상	하	상	하
개화정도*	2.7	0.3	2.7	0.5
	중	상	중	상

\*발근 및 개화정도: 상- 50% 이상 발근 또는 개화됨, 중-50% 이하 발근 또는 개화됨, 하-발근되지 않음 또는 개화되지 않음



그림 19. 개화되지 않는 개체에서 채취한 삽수를 배양한 경우 'Uridream' (A)과 'Heaven's Gate' (B)에서의 줄기 및 뿌리 발육 정도.

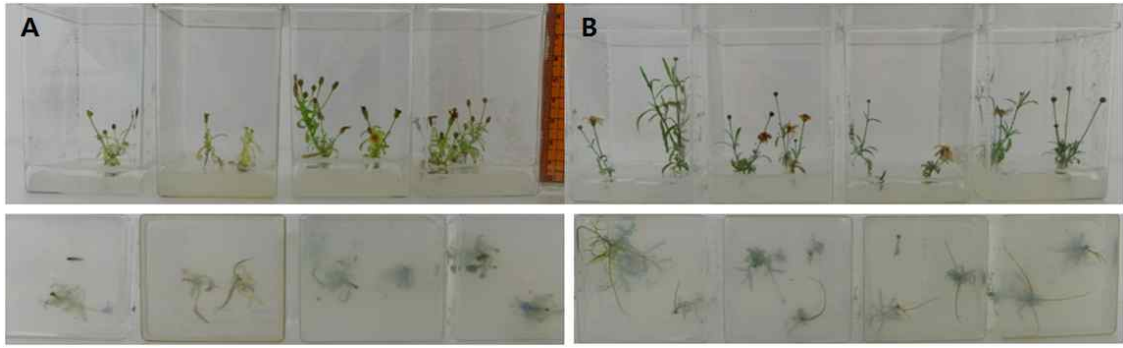


그림 20. 개화된 개체에서 채취한 삽수를 변온조건에서 배양한 경우 'Uridream' (A)과 'Heaven's Gate' (B)에서의 줄기 및 뿌리 발육 정도.

○ 암처리 효과에 따른 절편체 종류, 크기 및 발달 단계

본 연구에서 이용된 *Coreopsis rosea*의 경우 다른 화훼류 식물에 비해 조직이 연하고, 줄기의 마디마디마다 잎이 발달하는데, 잎의 모양은 가늘고 하늘거리는 모양임. 또한 줄기는 길고 가는 편인데 정아부분에는 꽃대가 나와 개화하는 형태를 띄고 있음. 줄기 내 마디의 길이는 품종별로 상이한데, 본 실험에 사용된 품종들의 경우 기내 배양 시 통상 1~2 cm 내외임. 따라서 본 실험에서는 *Coreopsis* 속 식물의 형태, 생육 특성 및 기존 연구결과를 바탕으로 조직배양 및 기내분화에 있어 이용 가능한 절편체 종류, 적정 절편체 크기 및 채취부위별 발육정도 등을 보다 자세히 알아보려고 실시하였음.

절편체 종류는 잎 또는 줄기를 대상으로 하였고 잎 절편체는 1.0 cm 정도로 조제하였으며, 줄기 절편체의 경우 총생한 잎은 모두 제거하고 줄기부분만을 사용하였는데, 크기는 1.0 cm 수준으로 하였음. 또한 절편체의 채취 부위는 잎은 기부와 끝부분을 잘라내고 잎의 중간부분만을 대상으로 1.0 cm 정도로 하였고, 줄기의 경우는 초록색을 띄는 정단부 부위를 중심으로 마디가 포함 또는 포함되지 않도록 각각 구분한 후 사용하였음. 조제된 절편체는 'Uridream'과 'Heaven's Gate' 모두 BA (benzyladenine) 2.0 mg/L + IAA (indoleacetic acid) 1.0 mg/L가 포함된 MS 배지에 치상하였으며 총 21일간 그 생육 정도를 조사하였음 (그림 21).

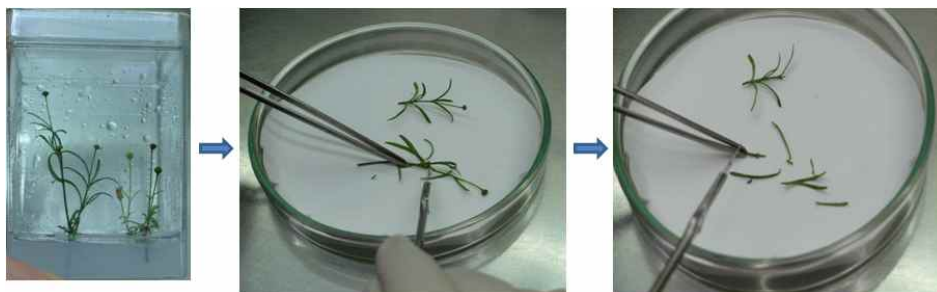


그림 21. 'Heaven's Gate'에서 줄기 절편체의 채취 모습.

잎 및 줄기 절편체 중에서는 줄기에서만 재분화가 관찰되었음. 잎 절편체는 매우 얇아 식물체로부터 채취 즉시 위조되는 경우가 많았으며, 위조되지않은 절편체라 하더라도 callus가 약간 분화될 뿐, 배양 10일 이후부터 검게 변하기 시작하여 21일 후에는 대부분 고사하였음 (그림 22). 줄기 절편체 채취 시 마디부분이 포함되지 않은 경우, 보통 15일 이내에 callus가 형성되고 이러한 callus에서 shoot primordia가 나타난 후 shoot와 root가 차례로 발육하여, 보통 6주 정도면 완전한 식물체의 형태를 이루었음. 절편체에 마디가 포함된 경우, 두드러진 callus의 발달은 관찰되지 않았고, 보통 10일 이내에 multiple shoot가 나오고 3주 이내에 뿌리가 발달하였음 (그림 23). 따라서 재분화 정도, 실험의 작업 효율을 모두 고려한 경우 절편체 채취는 줄기를 대상으로, 크기는 약 1 cm 정도로 하는 것이 바람직할 것으로 생각됨. 또한 이렇게 조제된 절편체의 생장 및 발근까지는 평균 4주, 완전한 식물체로 진행되는 데에는 평균 6주 정도가 소요되는 것으로 조사되었기에 *Coreopsis rosea*의 기내 생장 stage를 고려하여 계대배양 기간 조정 및 단계적 실험 설계가 필수적일 것으로 생각됨.

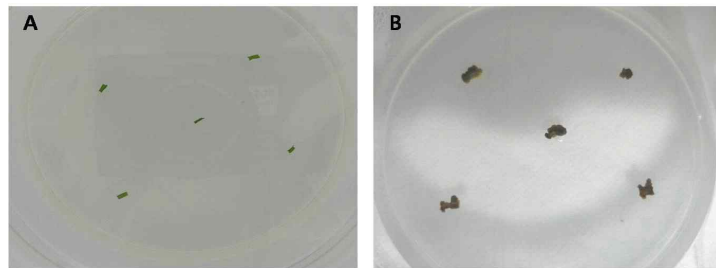


그림 22. 'Heaven's Gate'에서 잎 절편체의 배양 직후 (A) 및 배양 3주후 (B) 변화.



그림 23. 'Uridream' (A) 및 'Heaven's Gate' (B)의 줄기 절편체 이용 시 stage 별 생육 과정.

표 3. 암처리 기간에 따른 재분화율

암처리 기간		조직배양 (암처리기간조절)							
		줄기				잎			
		생존	캘러스	Shoot	Root	생존	캘러스	Shoot	Root
10일차	0일	100%	100%	0%	0%	85%	85%	0%	0%
	2일	100%	100%	33%	0%	93%	93%	0%	0%
	4일	100%	100%	47%	0%	100%	100%	0%	0%
21일차*	0일	75%	75%	0%	0%	생존율 0%			
	2일	87%	87%	53%	33%	생존율 0%			
	4일	100%	100%	67%	53%	생존율 0%			

\*21일차 최종조사 잎 절편체 모두 고사하였음.

○ TDZ 처리 효과

Thidiazuron (TDZ)는 목본류, 초본류, 구근류 등 다양한 화훼작물에서 callus 분화, multiple shoot 생성 등 주로 cytokinin 계통 성장조절제 물질들이 나타내는 효과를 보다 강력하게 나타내는 것으로 알려져 있으며, 특히 낮은 농도에서 분열조직의 형성 및 신초 증식을 촉진시키는 효과가 큰 것으로 보고되었음. 따라서 본 실험에서는 *Coreopsis* 속 식물의 줄기 절편체 이용 시 모주의 상태 및 채취 부위에 따라 재분화 효율 편차가 심하기에 이를 극복하고자 기존의 성장조절물질 조성 이외 TDZ의 이용 가능성 등을 조사하고자 하였음.

TDZ의 농도는 각각 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/L로 단용 또는 IAA 1.0 mg/L와 혼용으로 사용하였고 식물 재료는 *Coreopsis* 'Heaven's Gate'의 줄기 절편체를 이용하였음.

TDZ 처리의 경우 이용된 절편체가 바람직하지 않다 하더라도 기존 재분화 배지로 적용하였던 BA 2.0 mg/L + IAA 1.0 mg/L 첨가에 비해 다소 빠른 callus 분화를 보였으며, callus의 모양도 진한 녹색을 띄었음. TDZ 단용 처리는 일부 절편체에서만 녹색의 callus를 형성하였고 그 모양도 불규칙한 경우가 많았으나, TDZ와 IAA를 혼용하여 사용한 경우 지름 0.5~1.0 cm 정도의 비교적 크고 고른 모양의 callus의 분화가 일정하게 관찰되었음. TDZ의 농도별 차이는 크게 두드러지지 않았으나, 0.4 mg/L를 첨가한 경우가 다른 처리구에 비해 비교적 큰 편차없이 고른 녹색을 띄는 callus의 형성을 나타내었음 (그림 24).

따라서 *Coreopsis* 조직배양에 있어 불량한 조건의 절편체를 이용, 빠른 callus 분화를 요구하는 경우 TDZ를 사용하는 것이 가능하며, 그 농도는 0.4 mg/L정도로 낮은 것이 적절할 것으로 생각되었다. 그러나 TDZ를 이용한 경우 direct shoot 또는 callus 생성 후 multiple shoot의 생성은 관찰되지 않아 차후 이를 보강하는 일련의 실험이 필요할 것으로 생각됨.



표 3. TDZ 처리에 따른 효과 검정

	생존	캘러스	캘러스 크기			
			0.5cm 미만	0.5cm - 1.0cm	1.0cm 초과	
Control	생존율 0%					
TDZ 단용	0.2mg/L	생존율 0%				
	0.4mg/L	0.07%	0.07%	/	0.07%	/
	0.6mg/L	생존율 0%				
	0.8mg/L	생존율 0%				
	1.0mg/L	생존율 0%				
TDZ + IAA (1.0mg/L)	0.2mg/L	100%	100%	20%	80%	/
	0.4mg/L	100%	100%	20%	67%	13%
	0.6mg/L	100%	100%	27%	73%	/
	0.8mg/L	100%	100%	40%	60%	/
	1.0mg/L	100%	100%	47%	53%	/



그림 24. BA 2.0 mg/L + IAA 1.0 mg/L (A), TDZ 0.4 mg/L (B), TDZ 0.4 mg/L + IAA 1.0 mg/L (C) 처리에 따른 callus 발생 정도.

### ○ 발근 배지 조성

*Coreopsis*의 경우 관행적인 온실 내 삽목 시 보통 4주 정도면 굵은 주근이 나와 포트 전체로 자라고, 기내 삽목의 경우 보통 2주 이내, 절편체를 이용한 조직배양의 경우 통상 4주 이내 발근이 시작되었음. 뿌리의 형태는 품종별로 약간 상이하나, 보통 녹색을 띠는 직근이 여러개 나오고 이것이 점차 신장하면서 다른 측근들도 발생하는 과정을 거쳤음. 따라서 본 실험에서는 기내 배양 시 발근을 보다 빠르고 왕성하게 할 수 있는 적정 배지 조성을 알아보기 위해 실시하였음.

배지는 호르몬이 첨가되지 않은 MS 및 1/2 MS 배지와 BA 2.0 mg/L + IAA 1.0 mg/L을 포함하는 1/2 MS 배지로 구분하여 사용하였고, 식물재료는 *Coreopsis* 'Heaven's Gate' 로써 shoot가 5개 이상 분화되었고 그 초장도 2 cm 이상 되었으나, 아직 발근되지 않은 개

체를 대상으로 하였음. 각각의 개체들은 culture incu vessel (72×72×100 mm<sup>3</sup>)에 용기 당 1개씩 수직으로 치상하였고, 총 21일간 그 생육 정도를 조사하였음.

배지 구성에 따른 발근 차이를 살펴보면, 뿌리의 발생 및 길이 신장정도 모두 식물생장조절제를 첨가하지 않은 1/2 MS를 사용하는 경우가 MS를 사용하는 것에 비해 약 20% 이상 양호한 결과를 나타내었음. 줄기 생성 및 신장 정도도 식물생장조절제를 첨가하지 않은 1/2 MS를 사용한 경우가 보다 더 유리하게 관찰되었음 (그림 25). 또한 기존 *Coreopsis* 기내 배양에 사용되었던 BA 2.0 mg/L + IAA 1.0 mg/L가 첨가된 배지를 사용하는 경우, 식물생장조절제 무첨가 배지에 비해 오히려 발근율이 저조하여 생존율이 점차 떨어지고, 후기 생장도 제대로 이루어지지 않는 것으로 관찰되었음 (데이터 미제시).

따라서 'Heaven's Gate'의 경우 왕성한 발근 및 이후 지상부 및 지하부의 균형 잡힌 생육을 위해서는 기존 'Uridream'의 발근에 사용되었던 MS 배지보다는 1/2 MS 배지가 더 좋을 것으로 생각되었고, 성장조절제의 첨가는 불필요할 것으로 사료됨.

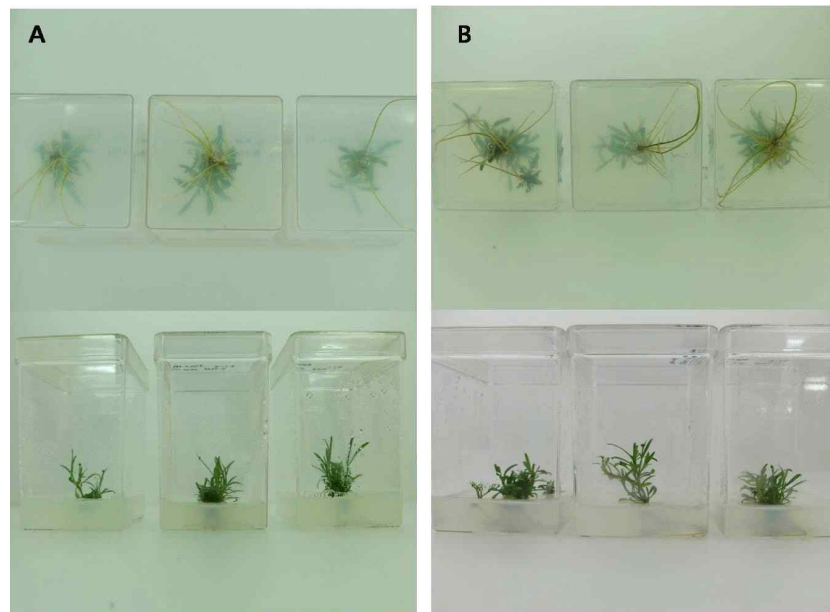


그림 25. MS (A) 및 1/2 MS (B)의 배지 구성에 따른 지하부 및 지상부 발육 정도.

#### ○ 항생제 감응성 검정

형질전환식물체의 선발시 일반적으로 사용해온 항생제 내성 유전자는 효과적으로 형질전환체를 선발할 수 있는 장점을 가지나 항생제 내성 표지유전자들이 환경 중에 노출되었을 때의 안전성 문제, 그리고 일반 소비자들의 형질전환체에 대한 거부감이 느껴지게 할 수 있음. 이러한 문제점들은 항생제 내성 표지유전자를 제거하거나 새로운 표지유전자로 대체하는 방법을 사용하여 해결할 수 있을 것으로 생각됨. Cefotaxime은 제 3세대 세팔로스포린계 항생제 중에서 가장 널리 사용되고 있는 약제로써 *Agrobacterium*을 이용한 식물체의 형질전환 후 계균 등에 광범위하게 사용되고 있음. 따라서 본 실험에서는 DWF 유전자 삽입을



위한 *Coreopsis* 속 식물의 줄기 절편체 형질전환 시 효과적으로 이용 가능한 적정 cefotaxime의 농도를 알아보기 위해 실시함.

Cefotaxime은 0, 200, 300, 400 mg/L의 4 수준으로 하여 재분화 배지에 첨가하여 이용하였고 식물 재료는 'Heaven's Gate'의 줄기 절편체를 이용하였음.

Cefotaxime은 그 농도가 200에서 400 mg/L까지 올라가도 생존율 및 callus와 shoot 형성 정도 등에서 무처리구에 비해 크게 차이하지 않았음. Shoot의 형성율과 개체 당 shoot의 개수는 cefotaxime 200 mg/L을 사용하는 것이 가장 양호한 결과를 보여주었다 (표 4). 그러나 그 배양기간이 6주 이상 경과한 경우 cefotaxime 400 mg/L를 처리한 개체들은 잎의 황화 또는 줄기 생장 지연 등이 관찰되었고, 200 mg/L 처리구의 경우 몇몇의 개체들에서 꽃눈 분화가 일찍 일어나 영양생장이 느려지는 등 바람직하지 못한 결과가 나타나기도 하였음. 따라서 후기 생육의 경우, cefotaxime 300 mg/L 처리구가 가장 양호한 결과를 보여주었음 (그림 26). 그러나 해당 농도에서 지속적으로 계대배양을 하는 경우 일부 개체에서는 뿌리 생장이 다소 지연되는 등의 현상이 관찰되기도 하였음 (그림 27). 따라서 형질전환된 *Coreopsis*의 초기 *Agrobacterium*의 제균 및 형질전환체의 후기 생육을 모두 고려한다면 300 mg/L를 사용하는 것이 좋을 것으로 여겨짐. 그러나 형질전환체를 계속적으로 계대 배양하는 경우 cefotaxime의 첨가는 오히려 뿌리 생장이 지연되기도 하기 때문에 cefotaxime의 사용은 초기 selection 단계에서만 사용하는 것이 바람직할 것으로 판단됨.

표 4. Cefotaxime 처리에 따른 효과 검정

처리농도 (mg/L)	생존율 (%)	Callus 형성율 (%)*	Shoot 형성율 (%)**	Shoot 개수***
0	100	100	62	4.4
200	100	100	87	6.7
300	100	100	62	5.1
400	90	90	62	4.3

\*Callus 형성율은 0.5 cm 이상 크기의 callus가 재분화된 개체의 비율임

\*\*Shoot 형성율은 0.5 cm 이상 크기의 shoot가 재분화된 개체의 비율임

\*\*\*Shoot 개수 = shoot 숫자/재분화된 개체 1개당

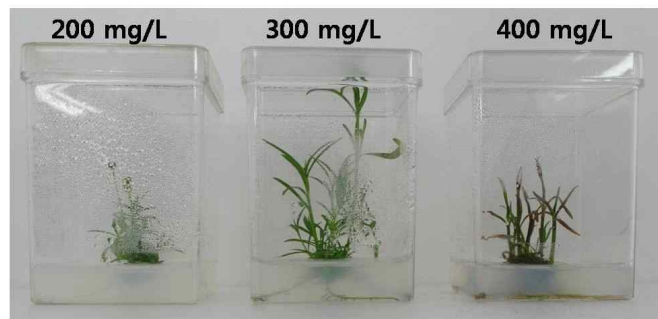


그림 26. 배양 6주 이상 경과 시 cefotaxime 농도별 성장 정도.



그림 27. Cefotaxime 무첨가 (A) 및 cefotaxime 300 mg/L 첨가 (B) 배지를 이용하여, 지속적으로 계대배양 시 지상부 및 뿌리 발육 정도.

○ 형질전환 시 전처리 및 공동배양기간에 따른 검정

식물체의 형질전환 효율을 결정하는 요인으로는 유전자 운반체가 외래유전자를 세포내로 도입시킬 수 있는 능력, 형질전환된 세포에 대한 효과적인 선발, 형질전환된 세포로부터의 재분화 그리고 식물체 genome 안으로 투입된 DNA의 안정성 등을 들 수 있음. 이러한 것을 충족시키는 방법으로 *Agrobacterium*을 이용한 방법이 제시되고 있음. 그러나 효과적인 형질전환을 위해서는 *Agrobacterium*과의 공동배양 기간 및 기타 여러 가지 조건들의 검정이 선행되어야 함. 본 실험에서는 *Coreopsis* 형질전환을 통한 신품종 육성을 위한 조건으로 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 있어 적정 공동배양 기간 및 공동배양 이전 전처리 등의 요인이 미치는 영향을 알아보고자 실시하였음.

*Coreopsis*의 전처리는 'Uridream'과 'Heaven's Gate' 줄기 절편체를 이용하여  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  암상태에서 각각 0, 3, 7, 9일간 실시하였음. *Agrobacterium*과의 공동배양은  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  암상태에서 각각 2일 및 3일 동안 진행하였고 공동배양한 절편체는 cefotaxime 300 mg/L가 첨가된 액체 배지로 세정하여 *Agrobacterium*을 제공한 후 BA 2.0 mg/L, IAA 1.0 mg/L, PPT 1 mg/L, cefotaxime 300 mg/L이 첨가된 MS 배지에서 선별을 위해 21일간 배양하였음.

전처리 효과는 두 품종 모두 그 기간이 길어질수록 갈변하여 고사하는 경우가 많아 생존율이 점차 떨어졌음. 또한 처리기간 중 정상적인 callus 또는 shoot가 아닌 기형조직들이 관찰되기도 하였으며, 일단 황화된 절편체는 이후 광조건 하에서 배양 또는 형질전환에 사용하여도 결국 고사하였음 (표 5, 그림 28). 따라서 공동배양 기간에 따른 검정은 전처리를 하지

얇은 'Heaven's Gate' 절편체들을 대상으로 진행하였으며, 그 결과는 표 6과 같음. 생존율과 callus 형성율은 공동배양 기간에 따른 차이가 명확히 나타나지 않았으나, shoot 형성율의 경우 2일 처리구가 3일 처리구에 비해 양호한 결과를 보여주었고, 발생한 shoot의 개수도 좋은 편이었다.

따라서 암상태에서의 전처리는 *Coreopsis*의 경우 오히려 생존율을 떨어뜨리는 등 단점으로 작용할 수 있어 생육 및 작업 효율성 정도를 고려한다면 처리하지 않는 것이 나을 것으로 생각됨. 형질전환 시 이용 가능한 공동배양 기간은 shoot 재분화 정도를 고려하여 2일 정도가 적당할 것으로 여겨짐.

표 5. 전처리 기간에 따른 효과 검정.

전처리 기간 (day)	Uridream		Heaven's Gate	
	생존율 (%)	기형조직분화율 (%)	생존율 (%)	기형조직분화율 (%)
0	66	0	87	0
3	50	28	53	14
7	13	7	50	26
9	0	0	13	13

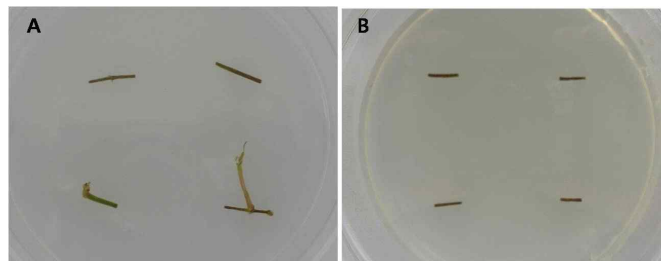


그림 28. 전처리 7일 (A) 및 9일 (B) 경과 직후 'Uridream'의 모습.

표 6. 공동배양 기간에 따른 'Heaven's Gate'의 효과 검정.

공동배양기간 (day)	생존율 (%)	Callus 형성율 (%)*	Shoot 형성율 (%)**	Shoot 개수***
2	54	48	23	3.1
3	53	50	14	2.7

\*Callus 형성율은 0.5 cm 이상 크기의 callus가 재분화된 개체의 비율임

\*\*Shoot 형성율은 0.5 cm 이상 크기의 shoot가 재분화된 개체의 비율임

\*\*\*Shoot 개수 = shoot 숫자/재분화된 개체 1개당

○ 형질전환 체계 개발

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법은 기존의 유전자총 등 유전자 직접도입법에 비해 경제적이며 genome 내 1~2 copy의 적은수의 copy number로 도입되며 특히 거대분자의 DNA도 안정적으로 도입하는 것을 가능케 하는 등 매우 효율적인 유전자 삽입 기법으로 알려져 왔음. 이러한 장점들을 바탕으로 쌍자엽, 단자엽 초본식물 및 목본류, 구근류 등 다양한 식물에서 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환이 성공적으로 실시되고 있으며 *Coreopsis rosea*와 동일한 국화과에 속하는 치커리 및 국화에서도 동일한 실험이 활발하게 이루어졌음.

- Transgene과 형질전환용 벡터 및 재조합 *Agrobacterium*

본 실험에 사용된 형질전환용 vector는 주관기관인 제1세부에서 분양받아 이용하였음. *DWF* 유전자는 *Echinacea*에서 분리한 것으로써, 사용된 vector의 구성은 발현 vector인 pFGC5941에 *DWF* 유전자를 35S promoter와 함께 제작하였고, 선발표지로는 박테리아의 선발을 위한 kanamycin 및 rifampicin 저항성 유전자와 식물체 선발을 위한 PPT 유전자가 각각 도입되어 있음 (제1세부과제 연구내용 그림 3B 참조). 또한 형질전환 실험에 이용한 재조합 *Agrobacterium*은 pFGC9541/shEpDWF3 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 세포를 이용하였음 (제1협동과제 연구내용 그림 17 참조).

- 형질전환 과정 및 재분화

*Coreopsis rosea*의 형질전환을 위해 O.D<sub>600</sub> 값이 0.7-0.8 정도의 농도로 조정된 재조합 pFGC9541/shEpDWF3 벡터를 포함하는 재조합 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 현탁액을 접종에 사용하였음. 기내 배양을 통해 신선하게 유지되고 있는 녹색의 줄기를 약 1 cm 정도로 절단하여 절편체로 이용하였고, 이를 약 10-15분간 재조합 *Agrobacterium* 용액에 접종시킨 후, 멸균된 여과지에서 과도한 용액을 제거하고, BA 2.0 mg/L + IAA 1.0 mg/L가 첨가된 MS 배지에서 2일간 공동배양하였음. 공동배양을 마친 절편체는 300 mg/L cefotaxime이 첨가된 액체 MS 배지로 절편체 표면에 묻어있는 재조합 *Agrobacterium*을 깨끗이 세척하였음. 그 후 MS 배지에 BA 2.0 mg/L, IAA 1.0 mg/L, PPT 1 mg/L, cefotaxime 300 mg/L이 함유된 1차 선발배지에 치상하여 신초를 유기하였다. 이후 약 2주간격으로 계속적인 계대배양을 실시하였음 (그림 29).

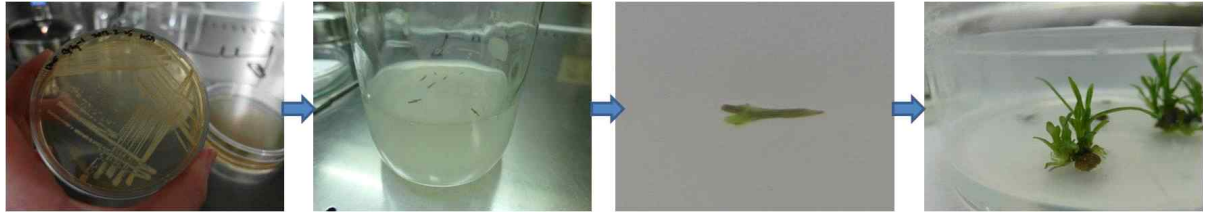


그림 29. 재조합 *Agrobacterium* 배양 및 형질전환 과정과 계대배양 이후의 재분화.

- 발근 및 순화

1차 선발배지에서 재분화된 신태들은 1/2 MS 배지가 담긴 Culture incu vessel (72×72×100 mm<sup>3</sup>)에 치상하여 발근을 유도하였음. 여러 차례의 계대배양을 거쳐 뿌리가 유기되고 성장한 개체들은 순화를 유도하였는데, 일단 용기에서 꺼내어 뿌리에 붙어있는 배지 성분을 흐르는 물에 씻어 제거하고 ‘바로커’ 상토 (Seoul Bio Co., Korea)가 담긴 12 cm크기의 비닐화분에 옮겨 심은 후, 투명한 비닐봉투 (50×50 cm<sup>2</sup>)에 담아 밀봉하고, 16시간 일장, 22±2°C로 유지되는 배양실에서 순화시켰음. 식물체가 담겨 있는 비닐봉투에는 순차적으로 구멍을 뚫어 각각의 개체들이 비교적 저습의 환경에 잘 적응하도록 하였으며, 식물체의 상태를 고려하면서 약 14-20일 후 비닐을 완전히 제거하고 유리온실로 옮겨주는 방식을 채택하였음 (그림 30).

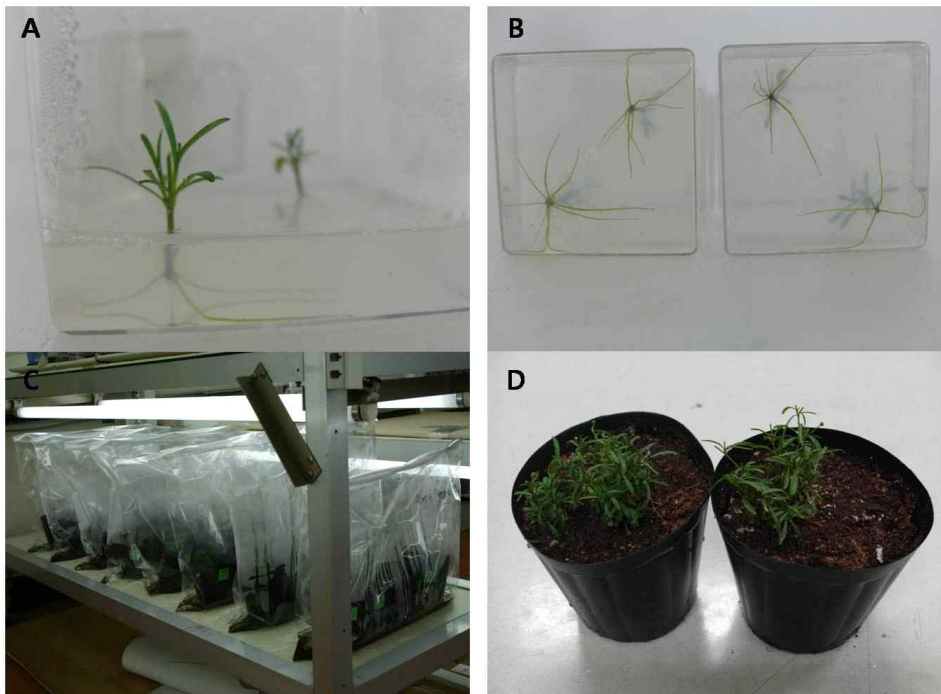


그림 30. 형질전환 후 발근된 개체들 (A, B)와 이를 순화하여 (C) 획득된 소식물체 (D).

- 형질전환

앞서 서술된 형질전환 과정에 따라 실시한 실험을 통해 선별배지에 치상한 절편체 중 약 15~20%에서 shoot가 발생되었으며, 이 중 발근이 된 10여개의 'Heaven's Gate' 및 'Uridream' 개체를 확보하였고 이를 대상으로 순화, genomic DNA 분리 및 PCR 등을 진행함.

3. 장기개화형 관상작물 *Echinacea*의 재분화 체계 확립 및 재조합 *Agrobacterium*을 이용한 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템 형질전환

(1) 장기개화형 관상작물 *Echinacea*의 재분화 체계 확립 (배지종류선정, 줄기, 뿌리 형성을 위한 적정 성장조절제 종류 및 농도 규명, 적정 배양조건 규명)

○ 배지 종류의 선정

국화과 식물인 *Echinacea*의 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 체계를 개발하기 위한 선행 작업으로 *Echinacea purpurea* 재분화 체계를 확립하기 위해서 잎 절편체를 이용한 조직 배양을 실시하였으며, 배지종류 선정을 위하여 어린잎 절편체를 1 cm<sup>2</sup> 크기로 하여 *Echinacea* 식물 생장에 관련하여 널리 사용되는 기본 조성인 E8 배지 (MS salts, 100 mg/L myo-inositol, 0.5 mg/L glycine, 2% sucrose, 0.7% microagar, pH 5.8)를 사용하였음.

○ 신초 형성을 위한 적정 성장조절제 종류, 농도 및 배양조건 규명

신초 형성을 유도하기 위하여 1-naphthaleneacetic acid (NAA)를 0.01~0.02 mg/L 범위의 농도와 6-benzylaminopurine (BA)를 0.5~1.0 mg/L 범위의 농도 내에서 최적의 신초 형성 조합을 찾고자 하였으며, 결과적으로 NAA 0.01 mg/L와 BA 1.0 mg/L의 조합으로 사용하는 경우 배양 3주 후부터 캘러스 생성 및 약 5주 후부터 신초의 생성을 확인하였으며, 총 336개의 절편체에서 41개의 신초가 발생하여 12.2%의 높은 신초 형성율을 보였음. 그 외의 다른 조합들 (NAA 0.01 mg/L와 BA 0.5 mg/L, NAA 0.02 mg/L와 BA 1.0 mg/L, NAA 0.02 mg/L와 BA 1.0 mg/L)에서는 캘러스 및 신초의 생성이 확인되지 않았음. 기내 환경은 원활한 식물 성장 및 일주성을 고려하여 광조건으로는 16시간 명조건, 8시간 암조건으로 고정하였으며, 에키네시아 생육환경에 적합한 24℃에서 배양하였음.



○ 뿌리 형성을 위한 적정 성장조절제 종류 및 농도와 배양조건 규명

뿌리 분화를 위한 적정 성장조절제 종류 및 농도 검정을 위하여 뿌리 분화를 목적으로 많이 사용되는 WPM 배지 (2.5 g/L Woody Plant Medium, 1.5% Sucrose, pH 5.8)를 기본 조성으로 하였음. 뿌리 형성을 위한 적정 성장조절제 종류를 규명하기 위하여 indole-3-butyric acid (IBA)와 1-naphthaleneacetic acid (NAA)를 각각 1.5 mg/L로 사용한 결과 성장조절제 NAA를 1.5 mg/L로 사용한 30개체 중에서 뿌리가 형성된 개체가 없었으며, 1.5 mg/L의 IBA를 사용하는 경우 2주후부터 뿌리가 분화되는 것을 확인하였음. 총 45개의 신태 중에서 42개의 뿌리분화가 진행되어 매우 높은 뿌리분화율 (95.6%)를 나타내었음. 그리고 16시간 명조건, 8시간 암조건, 온도는 24℃에서 배양하여 뿌리의 형성을 유도함.

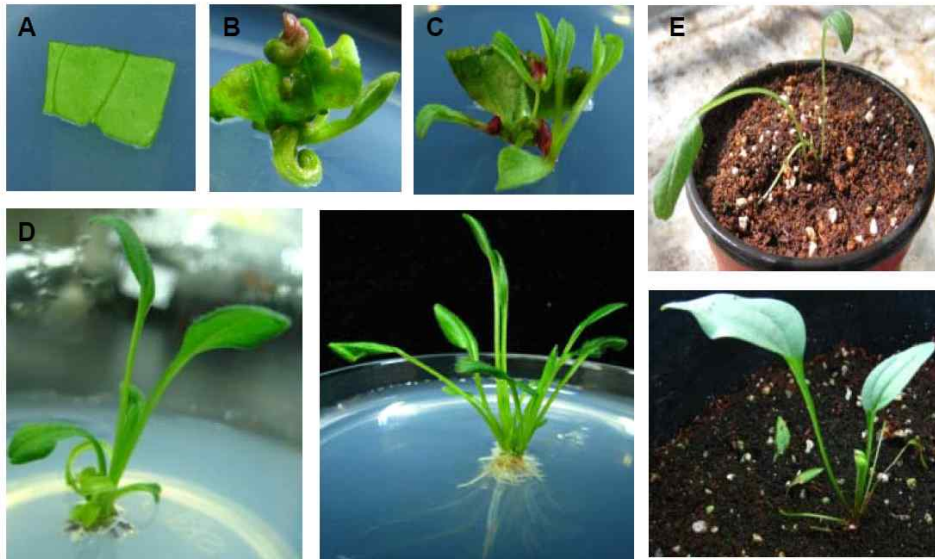


그림 31. *Echinacea*의 절편체 (A)에서 캘러스 (B) 및 신태 (C)의 유기가 이루어졌으며, 뿌리 분화용 배지에 신태를 옮긴 후 (D) 기내에서 토양으로 순화시켜 (E) 재분화된 개체를 획득하였음 (E).

(2) 관상작물 *Echinacea*에 재조합 *Agrobacterium*을 이용한 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템 형질전환

*Echinacea*를 무균상태에서 기내 발아시키기 위해 *Echinacea* 종자의 외피를 제거하고 70% ethanol 용액에 1분, 1% NaOCl 용액에 20분간 침지시킨 후 멸균수로 10회 세척하여 남은 NaOCl 잔여물을 제거하였고 E1 agar 배지 (100 mg/L myo-inositol, 2 mg/L

glycine, 1.5% sucrose, 0.7% micro agar, 2 ml/L plant preservation mix., pH 5.8)에 파종하였음. *Echinacea* 종자는 16시간 명상태, 8시간 암상태, 24°C 배양 조건에서 배양하였으며, 약 6주에서 8주 후 생성된 어린잎을 약 1 cm<sup>2</sup> 크기로 잘라 잎 절편체를 확보하고 재조합 *Agrobacterium*을 이용한 *DWF3* RNAi 벡터의 형질전환 실험에 사용하였음. pFGC9541/shEpDWF3 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium* LBA4404 세포를 50 µg/mL kanamycin, 25 µg/mL rifampicin이 포함된 LB broth 배지에서 이틀간 배양한 후 세포를 회수하였고 3% sucrose가 함유된 MS (Murashige & Skoog medium) broth 배지를 이용해 OD<sub>600</sub> 0.6 ~ 0.8 값으로 희석하여 사용하였음. 재조합 *Agrobacterium* 희석액에 잎 절편체를 10분간 침지시킨 후 여분의 재조합 *Agrobacterium* 희석액을 제거하고 E1 agar 배지에 치상하였고 이틀 동안 암상태에서 배양하였음. 신초 형성을 위해 잎 절편체를 E8 agar 배지 (MS salts, 100 mg/L myo-inositol, 0.5 mg/L glycine, 2% sucrose, 0.7% microagar, BAP 1.0 mg/L, NAA 0.01 mg/L)로 옮겨 배양하였음. 형질전환된 신초의 선별을 위한 항생제 감응성 검정을 위하여 DL-phosphinothricin (PPT)을 0 ~ 1 mg/L 농도 범위에서 규명한 결과 0.6 mg/L의 농도에서 형질전환된 신초 발생에 악영향을 주지 않았으며 후기 생육에도 가장 적합한 것으로 판단되었음. 따라서 형질전환된 잎 절편체는 0.6 mg/L PPT가 포함된 E8 agar 배지에 치상한 후 16시간 명상태, 8시간 암상태, 24°C 배양 조건에서 배양하였음. 4주에서 6주 정도 지난 후부터 신초의 발생을 확인할 수 있었음 (그림 32).

뿌리 재분화를 위해 WPM 배지 (2.5 g/L Woody Plant Medium, 1.5% sucrose, 1.5 mg/L IBA, 0.4% phytagal)에 치상한 후 16시간 명상태, 8시간 암상태, 24°C 배양 조건에서 배양하여 뿌리의 발달을 유도하였음. 뿌리 재분화를 위해 NAA 호르몬도 사용하였으나 IBA 호르몬이 뿌리 재분화에 더욱 효율적이었으며 뿌리 재분화 배지에 옮긴 후 2주 이후에 뿌리의 생성을 확인할 수 있었음 (그림 33). 약 2달 정도의 뿌리 생성 기간을 거친 후 토양에 옮겨 심어 형질전환 식물체의 성장을 유도하였음 (그림 34).



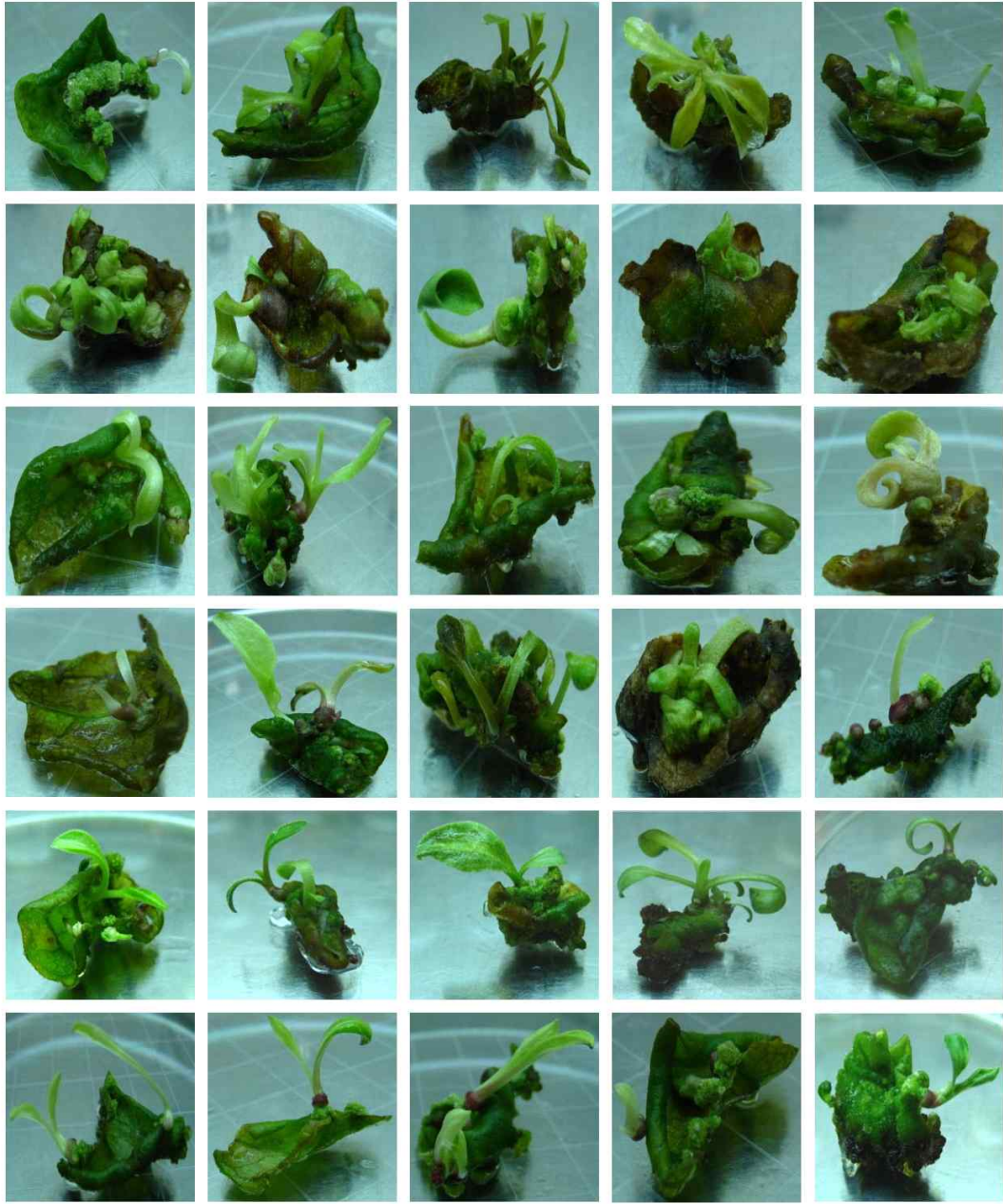


그림 32. *EpDWF3* RNAi 벡터시스템이 형질전환된 재조합 *Agrobacterium* LBA4404 세포를 이용한 *Echinacea* 잎 절편체 형질전환 후 신초 생성이 유도된 형질전환 개체.

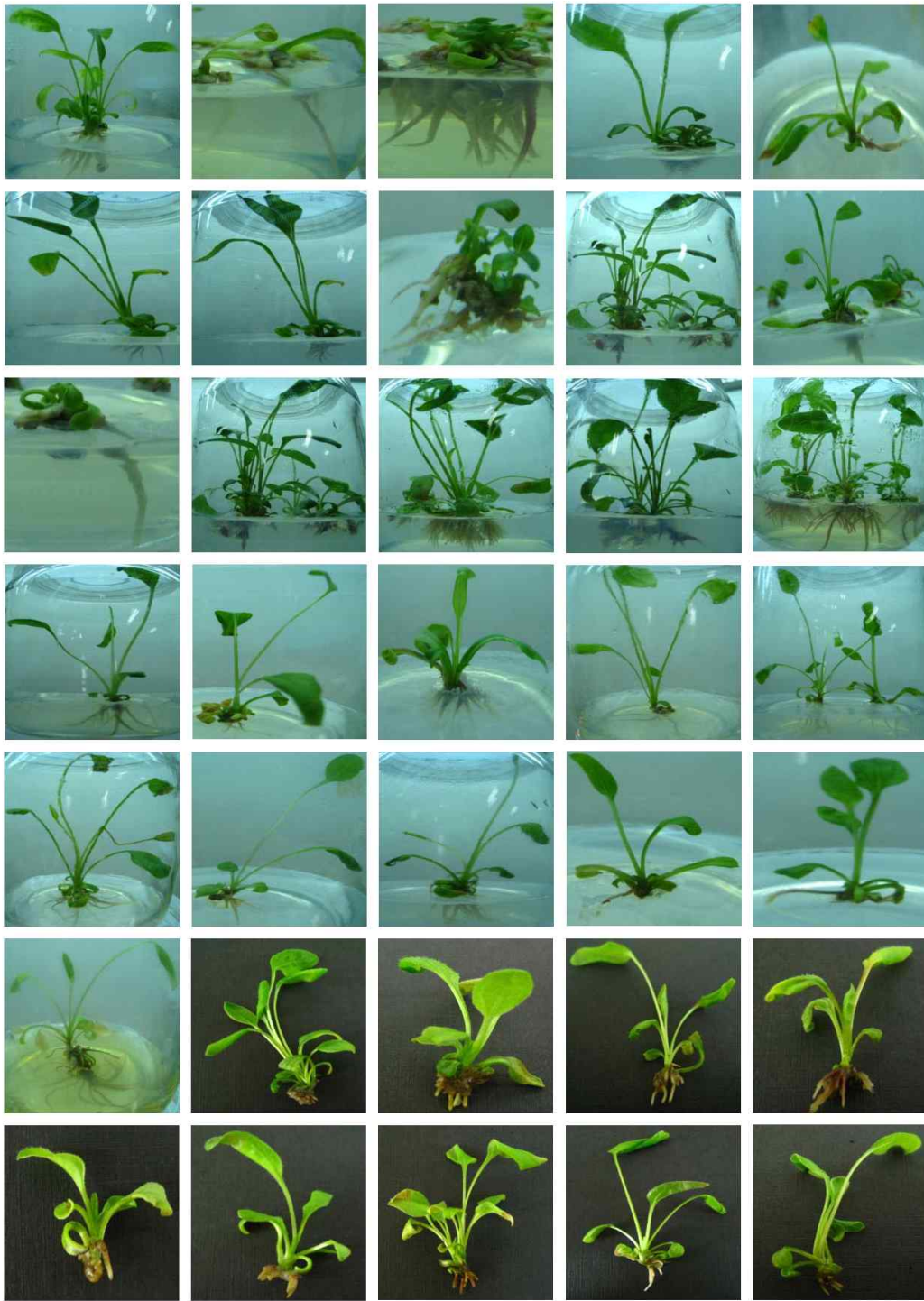


그림 33. *EpDWF3* RNAi 벡터시스템이 형질전환된 재조합 *Agrobacterium*을 이용한 *Echinacea* 잎 절편체 형질전환 후 생성된 신초에서 뿌리 분화가 유도된 형질전환 개체.





그림 34. 뿌리 분화가 유도된 형질전환 개체를 토양으로 옮겨 순화중인 형질전환 식물체.

*EpDWF3* RNAi 벡터시스템이 도입된 *Echinacea* 형질전환체를 확보하기 위한 형질전환 및 재분화 연구에서 현재 뿌리의 생성이 확인되고 토양으로 옮겨 순화중인 잎 절편체의 형질전환 실험이 진행되었던 2012년 9월부터 2013년 1월까지의 형질전환 실험의 재분화 연구결과는 표 7과 같음. 5개월 동안 4,630 개의 잎 절편체를 재조합 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 실험에 이용하였고 약 395 개의 신초가 생성된 개체를 확보하였고 뿌리 형성 배지에 옮긴 후 뿌리의 분화가 유도된 64개의 개체를 확보하였음 (신초 생성율 : 10.5%, 뿌리 생성율 : 16.2%). 이중 40여 개체를 토양에 옮겨 순화 중에 있음.

표 7. 2012년 9월부터 2013년 1월까지 진행된 형질전환 실험 개체의 재분화 연구 결과.

잎 절편체	신초 생성 개체	뿌리 생성 개체	토양 순화 개체
4,630	487	64	40

(3) 형질전환 *Echinacea* 개체의 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템 도입 여부 확인

pFGC9541/shEpDWF3 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium* LBA4404 세포를 이용한 *Echinacea* 형질전환 및 재분화 연구를 통해 확보한 형질전환 개체 중 토양에 순화 중인 10개의 형질전환 개체 (T1, T3, T5, T6, T8, T10, T12, T17, T18, T22)에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 genomic DNA에 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음. 형질전환 개체의 잎 (~ 1 g)을 LN<sub>2</sub>와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하고 GeneAll Exgene Plant SV mini kit (GeneAll Inc., Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였음. 250 ng genomic DNA, pFGC9541/shEpDWF3 벡터의 CHSA intron 및 *Echinacea* 18s rRNA 유전자에 특이적으로 결합하는 primer를 이용한 PCR을 수행하고 CHAS intron PCR 산물의 존재를 통해 *DWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음 (그림 35).

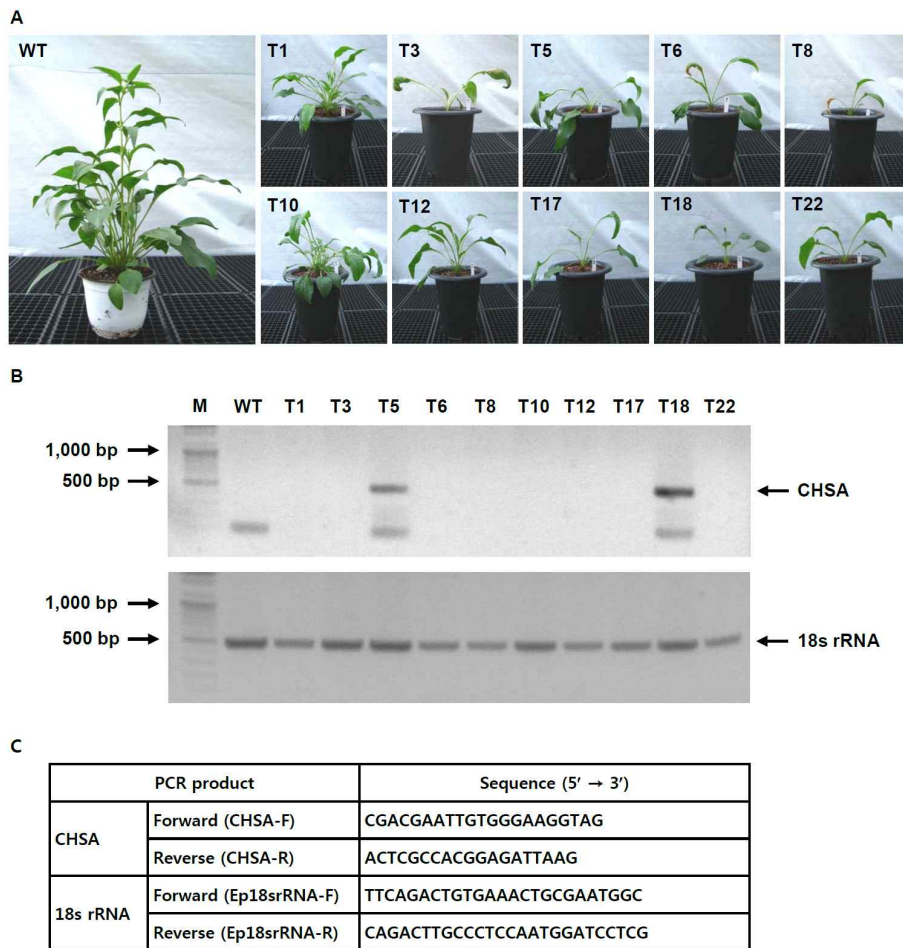


그림 35. 토양에 순화 중인 형질전환 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (WT: wild type *Echinacea*) (B) CHSA intron, 18s rRNA genomic DNA PCR 산물 (C) PCR에 이용된 primer 염기서열.

실험에 이용된 형질전환 개체 중 T5, T18 개체의 genomic DNA를 이용한 CHSA intron PCR에서 약 450 bp의 CHSA intron PCR 산물이 존재하는 것으로 확인되었음. 이는 실험에 이용된 10개의 형질전환 후 재분화 된 개체 중 T5, T18 두 개체가 도입된 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템을 지니고 있다는 것을 의미함. 확보된 개체들은 wild-type에 비해 성장 속도가 느리며 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템이 도입된 T5, T18 개체의 경우 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템이 도입되지 않은 T1, T10 개체에 비해 약간 더딘 성장 속도를 보임 (그림 36). *EpDWF3* RNAi 벡터시스템 도입에 의한 난쟁이 관상작물 생성은 형질전환 개체의 꽃대 생성 및 꽃의 개화 후 표현형 비교를 통해 확인할 수 있을 것으로 판단됨.



그림 36. 토양에 순화 중인 형질전환 T1, T5, T8, T18 개체 사진.

#### 4. 관상용 유전자원 수집 및 특성 검증

##### (1) 다양한 유전자원의 수집 및 특성조사 결과

해외시장에서 전통적으로 오랫동안 높은 판매율을 보이는 대형 관상작물군을 대상으로 자원을 수집하고, 각 개체의 특성을 조사함. 6개 속 100여 품종을 수집하였으며, 이 중 왜성화가 요구되는 클레마티스, 가우라, 에키나세아 속의 품종 및 종자로부터 확보한 개체를 우리 꽃 농장의 노지에 식재하여 장기간 모니터링을 실시하고 있으며 1차년도 모니터링 결과는 다음과 같음.

1) 클레마티스

- ▶ 속명 : Clematis
- ▶ 일반특성 : 국내 자생식물로는 큰꽃으아리를 비롯한 16종이 존재하고, 세계적으로는 300여 종이 넘음. 낙엽성 또는 반낙엽성의 덩굴성 또는 직립성의 목본 다년생초본임. 클레마티스는 배수가 잘되는 토양에서 잘자람. 토양에 피트와 석회 2~6 g/L를 섞어 용토를 준비하거나 Osmocote 5~6 M 또는 완효성 혼합비료를 섞음. 토양 수분을 적정량 유지해야함. 클레마티스는 덩굴식물이나 지지대를 하지 않을 경우, 지피식물로도 활용이 가능함.
- ▶ 특성조사 : 클레마티스 41 품종을 폴란드의 클레마티스 농장에서 수입하여 노지에 1미터 간격으로 식재하여 연 생장 및 주요 특성을 조사하였음. 조경을 하였을 때 품종별로 효과를 예측할 수 있도록 클레마티스가 덩굴로 피복하는 정도와 개화시기, 개화시 꽃의 개체수를 조사하였음. 헨리, 안나, 크림과 같은 품종은 밀도가 높은 덩굴형태를 가지면서 30개체 이상 개화하는 특성을 나타냄. 베로니카, 멀티블루, 안드로메다는 겹꽃으로 일자로 올라가는 덩굴형태이며, 6월 초순 개화가 관찰되었음. 개화조사 당시 각각 39개, 20개, 3개체의 꽃이 관찰되었음. 이밖에 안드로메다, 카키오, 프레지던트, 카넷 등 11개 품종은 장기개화하는 특성을 나타내었으며, 와일드파이어, 키트니, 도로타, 와스키, 폴 등 9개 품종은 장마철 이후에도 최소 5개체 이상 개화가 유지되었음. 하지만 장마철 이후에 만개가 되는 품종은 나타나지 않았음. 꽃 색은 크게 흰색, 빨간색, 보라색, 분홍색, 노란색이 주된 색이었으며, 화피 내부에 분홍색과 보라색으로 무늬색이 발현되는 경우도 있었음. 41개 품종의 RHS 칼라는 모두 다르게 나타났음.

표 8. 특성표의 설명

번호	1	2	3
개화시기	5월중순 개화	6월 초순 개화	6월 하순~7월초 개화
덩굴형태	일자로 올라가는 형태	덩굴이 밀도가 낮게 형성	덩굴 밀도가 높음
꽃수	조사시점의 개화한 꽃의 개체수가 10개 이내로 적음	조사시점의 개화한 꽃의 개체수가 10개 ~30개 이내	조사시점의 개화한 꽃의 개체수가 30개 이상으로 많음

표 9. 조사 품종의 특성표

번호	품종명	개화시기			덩굴형태			꽃 수		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	와일드파이어		o			o			o	

2	안드로메다		o						
3	헨리		o			o			o
4	테스			o		o	o		
5	디블리		o		o			o	
6	카피		o		o			o	
7	러플		o		o		o		
8	베티	o	o	o		o	o		
9	키트니			o					
10	카나비		o	o	o			o	
11	도로타			o					
12	쥬빌레		o	o	o			o	
13	카넷		o	o	o			o	o
14	마리아		o	o	o				o
15	와스키		o					o	
16	카키오		o	o	o				o
17	파이어웍스		o			o		o	
18	시스코			o	o				o
19	크림	o					o		o
20	테레사		o	o			o		o
21	하글리		o	o	o				
22	하니아		o			o		o	
23	폴								
24	폴		o				o	o	
25	줄카		o		o			o	
26	모니코		o		o			o	
27	러플								
28	바바라			o		o	o		
29	마리아					o		o	
30	후딘		o		o		o		
31	안나	o				o			o
32	툼슨		o	o			o		
33	문라이트	o				o		o	
34	아스코		o	o					o
35	버마스타		o					o	
36	멀티블루								
37	프레지던트(빨)		o	o	o				o
38	넬리		o				o	o	
39	프레지던트(파)		o		o				
40	베로니카		o						
41	선셋		o			o		o	



표 10. 조사 품종의 화색 특성표

번호	품종명	꽃 색						
		흰색	빨간색	보라색	분홍색	줄무늬 (분홍)	줄무늬 (보라)	노란색
1	와일드파이어						○	
2	안드로메다					○		
3	헨리	○						
4	테스		○		○			
5	디블리					○		
6	카피			○				
7	러플					○		
8	베티				○			
9	키트니			○				
10	카나비					○		
11	도로타			○				
12	쥬빌레					○		
13	카넷		○	○				
14	마리아	○						
15	와스키			○	○			
16	카키오		○					
17	파이어웍스						○	
18	시스코			○				
19	크림	○						
20	테레사				○			
21	하글리				○			
22	하니아		○					
23	폴					○		
24	폴					○		
25	줄카						○	
26	모니코			○			○	
27	러플					○		
28	바바라		○					
29	마리아	○						
30	후던	○						
31	안나	○						
32	톱슨						○	
33	문라이트							○
34	아스코			○				
35	버마스타						○	
36	멀티블루			(파란색)				
37	프레지던트(빨)		○					
38	넬리					○		
39	프레지던트(파)			○				
40	베로니카				○			
41	선셋		○					



일자형  
(베로니카)

덩굴이 밀도가 낮게 형성  
(베티)

덩굴이 밀도가 높게 형성  
(헨리)

그림 37. 덩굴의 성장형태

## 2) 가우라

▶ 속명 : *Gaura*

▶ 일반특성 : *Gaura*속 식물은 해외에서 매우 각광받고 있는 조경용 화훼식물로서, 세계적으로도 많은 품종이 개발되고 있으며 계속적으로 신품종 수요가 늘어나고 있는 품종임. 화형과 생육품이 독특하며, 매우 우아한 느낌의 식물임. 또한, 재배가 쉽기 때문에 소비자 선호도가 매우 높은 화훼임. 하지만, *Gaura* 속 식물이 가지고 있는 생육 특성이 줄기가 길게 성장하며, 잘 쓰러지는 경향이 있고, 화색이 단조로움. 화단용, 분화용으로 소비자 요구도가 점차 커지고 있는 왜성 *Gaura* 품종도 왜성으로 유통되는 품종임에도 불구하고, 재배환경에 따라 높이가 원종과 같이 복구되어 성장하는 비율이 매우 높아, 안정적인 신품종 개발이 필요함.

*Gaura lindheimeri*  
'Whirling Butterflies'



*Gaura lindheimeri*  
'Red Butterflies'



*Gaura lindheimeri*  
'Ruby ruby'



*Gaura lindheimeri*  
'Siskiyou Pink'



그림 38. 우리꽃에서 수집한 *Gaura* 품종

▶ 성장 형태의 관찰 : *Gaura lindheimeri*의 품종에서 나타나는 줄기생육 형태를 다음의 그림으로 나타내었음 (그림 39). 초장은 왜성의 경우 50 cm 내외로 나타났으며, 대부분 100 cm 내외로 자랐으며, 150 cm 까지 성장하는 경우도 있었음. 포기 하단부에서 상단부로 올라오면서 잎의 길이와 너비, 그리고 밀도에서 개체별 차이가 발생하였음.

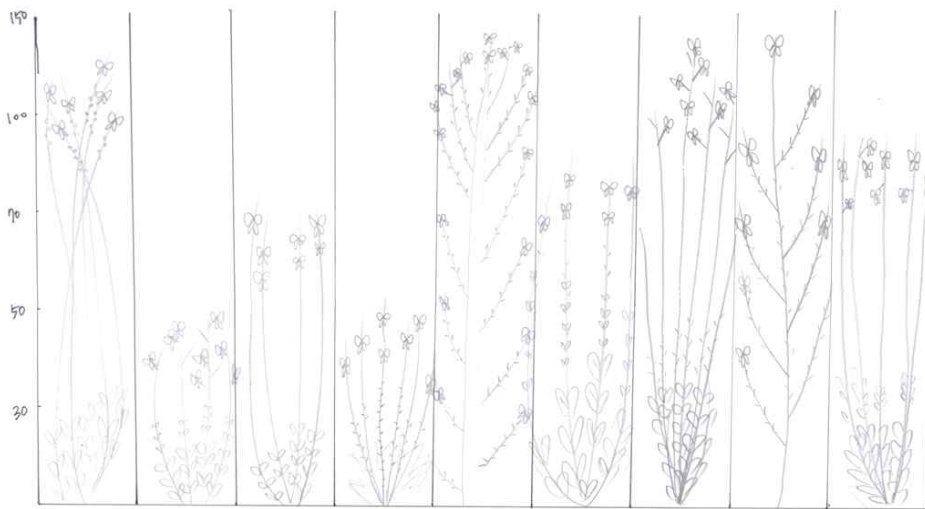


그림 39. 개체별 줄기 생장의 차이점

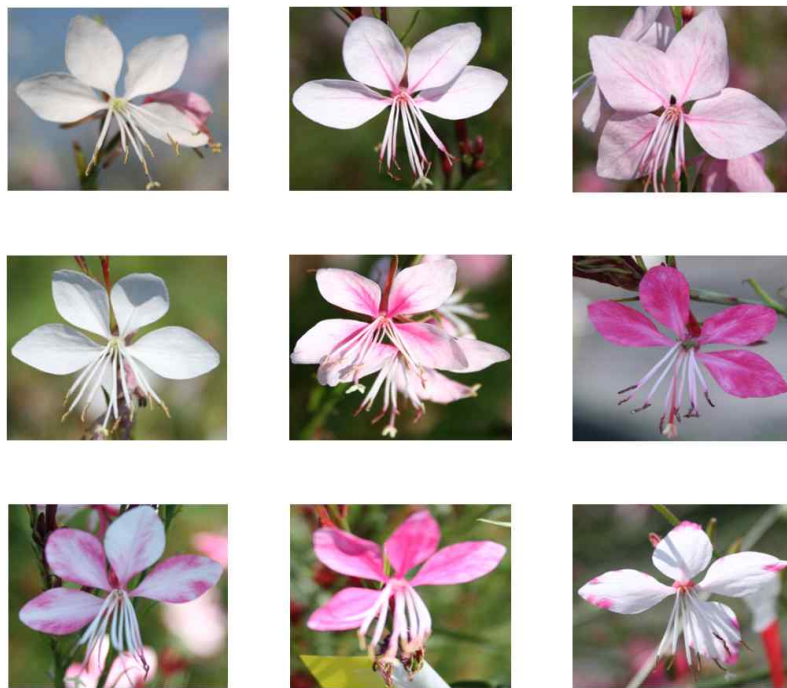


그림 40. 가우라 속 식물에서 나타나는 화색의 분리형태 관찰

3) 에키나세아

- ▶ 속명 : Echinacea
- ▶ 일반특성 : 에키나세아 속에는 약 9종이 있으며, 그 중 *Echinacea purpurea* 종은 조경용으로 가장 많이 쓰이고 있으며, 현재까지 수많은 품종이 개발되었음. 화색 범위가 흰색, 노란색, 주황색, 보라색, 분홍색, 초록색으로 선택의 범위가 넓고, 화형이 독특하며, 재배가 쉽기 때문에 소비자 선호도가 매우 높음. 하지만, 에키나세아가 가지고 있는 생육특성이 키가 크고, 잘 쓰러지는 경향이 있고 화단용, 분화용으로 소비자 요구도가 점차 커지고 있는 왜성 에키나세아도 현재까지는 키가 60~70 cm 정도로 분화용으로 크게 적합하지 않음. 최근 들어 특히 다양한 화색, 겹꽃, 왜성 품종에 대한 개발요구도가 매우 높아지고 있음.
- ▶ 특성조사 : 우리꽃에서 기 보유하고 있는 품종에서 교잡된 종자와 수집 품종을 약 3,000 평방미터의 노지에 과중하여 생육특성을 관찰하였음. 주요특성인 초장, 꽃색상 외에 쓰러지는 경향 및 꽃이 진 후의 경관가치를 조사하였음. 1차년도 결과, 100개체를 선발하였음. 특히 화서가 밀도있게 여러 개 올라오면서 마운딩되는 생육특성, 겹꽃 또는 통꽃, 화색이 여러톤으로 나타나는 개체들을 관찰하였음.

표 11. 특성표의 설명

	1	2	3
초장	<50 cm	>50cm, <90cm	>90cm
꽃의 크기	<7cm	>7cm, <12cm	>12cm
콘의 크기	<3cm	>3cm, <5cm	>5cm

표 12. 1차 선발 개체의 특성표

	초장	쓰러짐	꽃색	만개 후 색상	꽃의 크기	꽃잎모양	콘색	콘크기
1	1	o	진한분홍		1		노란색	
2	1	x		연한분홍	1		연노랑+ 녹색	
3	1	x		연한분홍	2		녹색	
4	3	x		연한분홍	2	겹꽃	주황	3
5	3	x	분홍		2	겹꽃	주황	1
6	3	x	분홍		2	겹꽃	주황	1
7	2	△					녹색	2
8	2	x	연녹색		3		녹색	3
9	3	x	흰색		2		샛노랑	2
10	2	△		연한분홍	1		빨강	2

11	2	△	분홍			통꽃	주황	2
12	1	x	분홍+ 끝녹색		2		가운데 녹색, 끝 주황	
13	1	△	흰색		1			
14	1	x	베이지				연두색	3
15	3	△	베이지			회전	노란색	
16	2	x	연분홍					
17	1		흰색					
18	1	x						1
19								1
20	3	x		연한분홍				
21	1	x	흰색		1		연두색 + 노란색	1
22	1	△				회전		
23	1	x					빨강 + 가운데 녹색	
24	2					작음, 겹꽃		
25	2	x	진다홍색		1		빨강	1
26		o	분홍				주황	
27		o	연분홍+ 녹색				주황 + 녹색	
28		o	연분홍				녹색	
29		△	연다홍색			통꽃	빨강	
30		△	노랑				노랑	3
31	2	x	진다홍색			꽃잎 매우짧음		
	2	x	진빨강색			꽃잎 뾰족		
32		△	다홍			통꽃		
33		△	다홍				노랑	
34	2	x	분홍				빨강	
35		x						
36		o		녹색으로 빠짐			주황	3
37			베이지			꽃잎 작고		3
38		x	흰꽃					
39	1	x	흰꽃				연두색	3
40	1	x	흰꽃				노랑색	3
41		o			3	꽃 잎 큼	녹색	
42		△	분홍색		2	꽃 잎 짧음	빨강	
43	1	x	노랑			통꽃	셋노랑	2
44	1	x	다홍					
45	3	△	노랑	상아색			셋노랑	3

46	3	x					빨강	3
47	1	x	진다홍색			통꽃		
48				연한분홍			녹색	3
49	3	o	분홍					1
50	3	o		연한분홍			그라데이션	3
51		o		연한분홍			녹색	3
52	1	x	분홍			꽃잎 작음	작음	
53		o		연한분홍			녹색	3
54	3	o	분홍				진한빨강	2
55	2	x	분홍				노랑	2
56	3	△		베이지	2	꽃잎 작음	노랑	3
57	2	x					빨강	2
58	1	o	흰색			꽃잎 작음	셋노랑	
59	2	x	분홍			큰에 꽃 펴		
60	1	x	흰색		1	겹꽃		1
61	2	x	매우연한분홍		1			1
62	2	△	연녹색		1	꽃 끝 갈라짐	녹색	2
63	2	△		녹색 + 분홍색		꽃잎 끝 말림	녹색 + 빨강	2
64	2	x	흰색		1	겹꽃		2
65	2	x	분홍			겹꽃	빨강	2
66		△					노랑	2
67	2	x				꽃 잎 짧음	노랑	3
68	2	△	분홍			겹꽃	주황	3
69	2	△	흰색		1			1
70	2	x		분홍 + 끝 색빠짐			빨강	3
71	2	x	노랑			겹꽃	셋노랑	2
72	3	x				꽃 잎 뒤로	노랑	>3
73	1	x	흰색			꽃 잎 떨어짐	노랑	
74	3	△	분홍 + 끝녹색			회전	녹색 + 노랑 + 빨강	3
75		△	연분홍			잎넓음	녹색+ 노랑	2
76	1	x					노랑	3
77	1	x	분홍		1	끝 갈라짐	빨강	1
78								
79	2	o					녹색	3
80	1	x				노란 통꽃		
81	2	△	분홍			꽃 잎 뒤로	밝은 주황	2
82	1	x	분홍			통꽃	빨강	1



83	2	x	진분홍(갈끔)		2		노랑 + 주황	2
84		△	다홍	녹색		꽃잎작음	빨강	3
85	2	x	연녹색			꽃잎작음	노랑	3
86		o	분홍+ 끝색빠짐			꽃 잎 뒤로	노랑	2
88		o	베이지			꽃 잎 뒤로	녹색	
89	3	x	분홍+ 녹색			잎 앞으로 말림	빨강 + 녹색	3
90	2	o	연한분홍			꽃 잎 매우김	녹색	2
91	1	x	베이지			회전	노랑	1
92	1	x	흰색		1			1
93	2	△	흰색				노랑	2
94	2	△	분홍				빨강	2
95	1	x	연한분홍		1		빨강	1
96	2	x	노란색(크림)				노랑	2
97	2	△	분홍				노랑	2
98	2	△	분홍	분홍 + 녹색		꽃 잎 짧음		>3
99	2	△	진한분홍			꽃 잎 떨어짐		2
100	2	△	분홍+ 끝 색빠짐			꽃 잎 떨어짐	진녹색	2

▶ 주요 수집 품종

*Echinacea purpurea*  
'Alaska'



*Echinacea purpurea*  
'Kim's Knee High'



*Echinacea purpurea* x  
*paradoxa* 'Sunset'



*Echinacea purpurea*  
'Starlight'



*Echinacea purpurea*  
'White lustre'



*Echinacea purpurea* x  
*paradoxa* 'Sunrise'





*Echinacea paradoxa*



그림 41. 에키나세아속 주요 수집 품종

4) 호스타 품종







그림 42. 호스타 속 주요 수집 품종

5) 코레옵시스 주요 수집종

현재 코레옵시스의 시험재배는 우리꽃에서 신품종 개발중인 실험개체 1,000여 개체와 해외신품종으로 이루어져있고 주요특성 검정은 2차년도 실험개체와 함께 실시함 (그림 43).







그림 43. 코레옵시스 속 주요 수집 품종

## (2) 신품종 수출화 (현지시장동향)

신품종 개발후 세계시장을 위한 수출 상품화를 진행하기 위해 관련 로열티 정보와 상품화를 위한 프로세스 구축을 위한 정보를 수집하였음.

해외 시장은 품종 개발에서 소비자에 이르는 프로세스가 단계별로 세분화되어 있음. 육종 업체는 무엇보다도 신품종의 재산권을 관리하는 신뢰할만한 파트너가 필요함. 해외에는 많은 로열티 관리업체들이 있으며, 이 업체들은 육종가와 생산자간의 연결 통로, 분쟁 조정 등의 역할을 수행함.

아래의 도표에서 보이듯이, 각 단계별로 세분화된 수많은 업체들이 있지만, Ball Horticultural사와 Proven winner사와 같이 개발, 로열티 관리, 품종생산 및 유통까지 포괄하는 큰 사업영역을 가진 대형종자업체들 또한 존재함.

대형 업체의 경우, 외부 육종가들로부터 들여온 신품종은 상품으로서 생명력이 짧다고 알려져 있음. 아래 열거한 업체들로부터 선호하는 신품종에 대한 조사를 실시하였음.

대형 품목군으로는 윈추리, 호스타, 패랭이, 에키나세아를 선호하는 경향이 높았으며, 윈추리의 경우 왜성이며 검정에 가까운 색상, 패랭이의 경우 우리꽃이 개발한 상록잔디패랭이와 같이 기능성이 뚜렷한 품종을, 에키나세아는 키가 작고 줄기생장이 짧고 밀도가 높으며 특이한 색상의 겹꽃 품종이 공통적인 개발 수요로 나타났음.

또한 개발 후 안정적인 대량생산을 위한 체계 확립도 중요한 것으로 나타났음. 조직배양

등을 통한 시설에서의 대량생산 프로그램이 확보되면, 국내 신품종의 상품화 기간은 매우 단축될 것으로 사료됨.



그림 44. 2013년 1월 독일 IPM 참가지 일본 하쿠산과 네덜란드 아르마다사와 함께 우리꽃 신품종 수출 회의 (좌로부터 하쿠산 품종관리담당 쿠사카박사, 하쿠산 해외품종담당 미즈노박사, 우리꽃 박공영 대표, 아르마다 제럴드 사장).

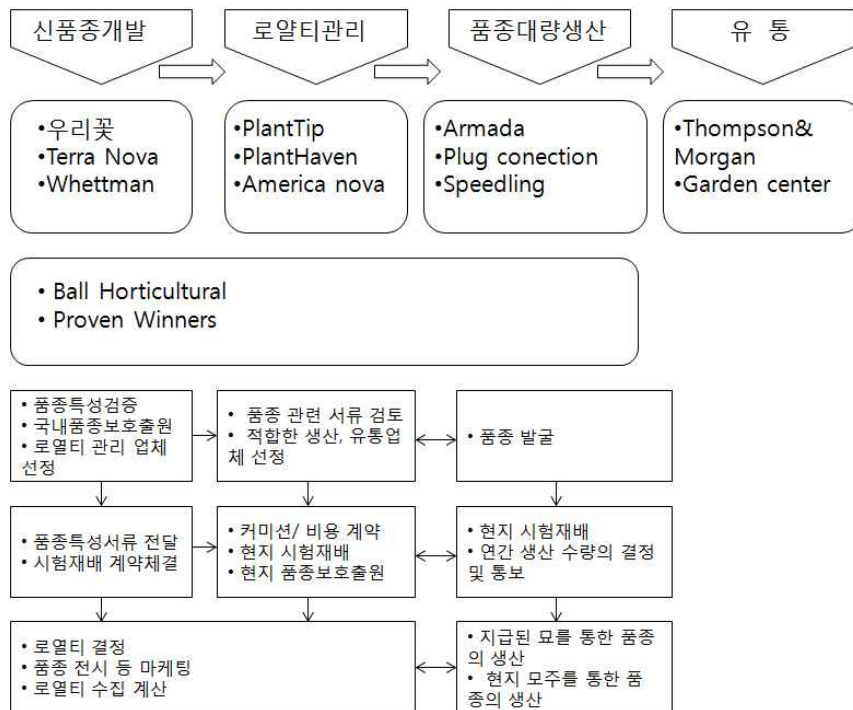


그림 45. 신품종 개발에서 상품화까지의 프로세스.

### 3-3. 2차년도 연구결과

#### 3-3-1. 제1세부과제 : 난쟁이 관련유전자 분리 및 기능 분석

##### 1. *EpDWF3* 유전자가 과 발현된 식물체 (식물세포) 확보 및 *EpDWF3* 유전자 기능 분석

##### ○ 식물 발현벡터 pPZP2Ha3/EpDWF3가 형질전환된 담배 식물체 확보 및 표현형 분석

*Echinacea DWF3* 유전자를 과 발현하는 형질전환 담배 식물체를 확보하기 위한 담배 형질전환 및 재분화 연구를 수행함. 토양에서 키운 담배 식물체 잎을 70% ethanol 용액에 2분, 1% NaOCl 용액에 4분간 침지시킨 후 멸균된 증류수로 4번 세척하였고 1 cm<sup>2</sup> 크기로 잘라 담배 잎 절편체를 확보하였음. 담배 잎 절편체는 MS 기본배지 (MS salts 4.4 g/L, 3% sucrose, 0.8% microagar, pH 5.7)에 치상한 후 일반 광조건에서 2일간 배양하였고 pPZP2Ha3/EpDWF3 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium* LBA4404을 이용한 형질전환 실험에 사용하였음. 재조합 *Agrobacterium* 세포는 50 µg/ml kanamycin, 25 µg/mL rifampicin 항생제가 포함된 LB 액상배지를 사용하여 28°C 암조건에서 2일 동안 배양하였음. 담배 잎 절편체를 재조합 *Agrobacterium* 세포 용액에 첨가하고 실온에서 10분간 방치한 후 멸균된 filter paper 이용하여 표면에 남아 있는 재조합 *Agrobacterium* 세포를 제거하였고 MS 기본배지에 침지한 후 암조건에서 2일 동안 배양하였음. 형질전환된 담배 식물체의 발생 및 선별을 위해 호르몬 및 항생제가 첨가된 MS 배지 [MS 기본배지 + 1.5 mg/L 6-benzylaminopurine (BA) + 2.5 mg/L hygromycin]에 담배 잎 절편체를 옮긴 후 16시간 명상태, 8시간 암상태, 24°C 배양 조건에서 배양하여 신초 (shoot)의 생성을 유도하였음. 4주에서 6주 후 신초의 생성을 확인할 수 있었고 신초에서 뿌리의 재분화를 유도하기 위해 MS rooting 배지 (MS salts 2.2 g/L, 1.5% sucrose, 0.3% gelrite, 1.5 mg/L indole-3-butyric acid (IBA), 250 mg/L cefotaxime, pH 5.7-5.8)에 치상한 후 16시간 명상태, 8시간 암상태, 24°C 배양 조건에서 배양하여 뿌리의 발달 유도하였음. 뿌리 생성 기간을 거친 후 토양에 옮겨 심어 형질전환 식물체의 성장을 유도하였음.

pPZP2Ha3/EpDWF3 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium* LBA4404 세포를 이용한 담배 형질전환 및 재분화 연구를 통해 확보한 형질전환 T0 세대의 개체 중 토양에 순화 중인 10개의 형질전환 개체 (그림 46, T0-1~10)에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 형질전환 담배 식물체의 genomic DNA에 *EpDWF3* 유전자 발현시스템의 도입 유무를 확인함. 형질전환 개체의 잎을 liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>)과 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하였고 GeneAll Exgene Plant SV Mini Kit (GeneAll Inc.)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였음. 250 ng genomic DNA, *EpDWF3* 유전자 및 담배 actin 유전자에 특이적으로 결합하는 PCR primer (그림 47)를 이용한 PCR를 수행하고 담배 식물체의 형질전환 유무를 판단함 (그림 48). T0-1, 3, 5, 6, 7, 8, 10 형질전환 개체의 genomic DNA에서 *EpDWF3* PCR 산

물이 존재하였고 이는 *EpDWF3* 유전자 발현시스템이 형질전환된 각각의 담배 식물체에 도입되었다는 것을 의미함.

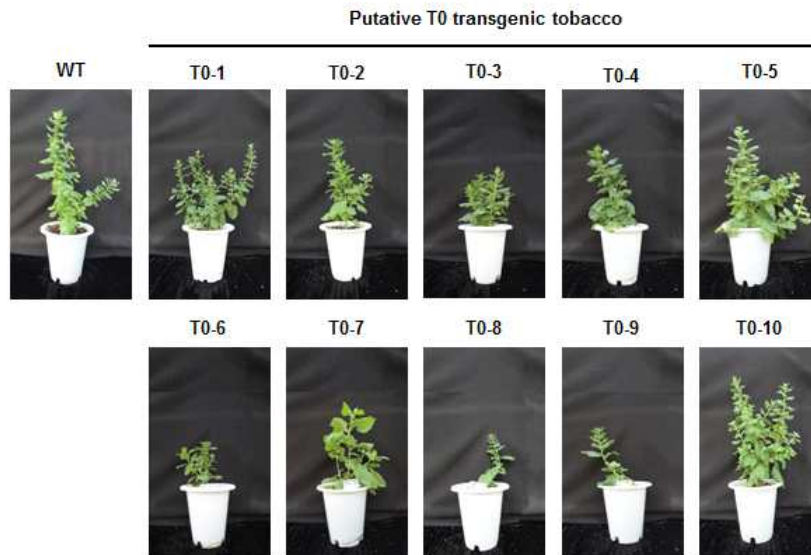


그림 46. 토양에 순화 중인 형질전환 T0 담배 식물체 (WT, wild-type 담배).

PCR primers		Sequence (5' → 3')
<i>EpDWF3</i>	Forward (Ep-3'RACE-F1)	GAAATTAGAAAGAAAAGGGTGCATCGGTG
	Reverse (c-myc-R)	AAGATCCTCCTCGCTAATAAG
<i>Actin</i>	Forward (Actin-F)	GATGAAGATACTCACAGAAAGAG
	Reverse (Actin-R)	GTGGTTTCAATGAATGCCAGCAG

그림 47. 형질전환 담배 식물체의 genomic DNA PCR을 위한 *EpDWF3* 및 *actin* primer의 염기서열.

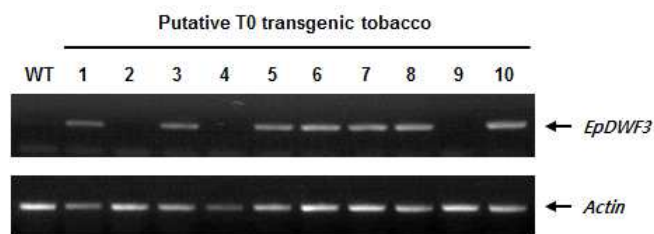


그림 48. 토양에 순화 중인 T0 세대 형질전환 담배 식물체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* 유전자 발현시스템의 도입 유무를 확인함.



*EpDWF3* 유전자 발현시스템이 도입된 것으로 확인된 형질전환 T0 세대 담배 식물체 (T0-1, T0-3, T0-5, T0-6, T0-7, T0-8, T0-10)에서 종자를 확보하였고 T0-10 형질전환 담배 식물체의 종자를 토양에 파종한 후 T1 세대 담배 식물체 24 개체를 확보함.

T1 세대 담배 식물체에서 genomic DNA를 추출하고 250 ng genomic DNA, *EpDWF3* 및 actin PCR primer를 이용한 PCR를 수행하여 *EpDWF3* 유전자 발현시스템이 도입된 형질전환 T1 담배 식물체를 선별함. 그림 49에서와 같이 24 개체 중 11개 T1 세대 담배 식물체 (T1-1, 2, 7, 9, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20)의 genomic DNA에서 *EpDWF3* PCR 산물이 존재하였고 이는 *EpDWF3* 유전자 발현시스템이 T1 세대 담배 형질전환 식물체의 genomic DNA에 안정적으로 전달되었다는 것을 의미함.

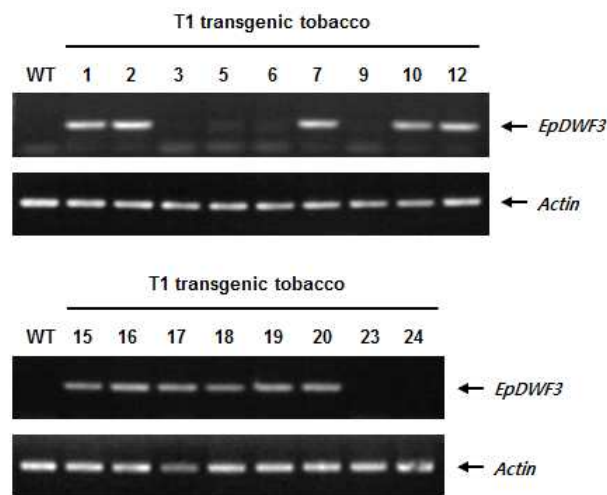


그림 49. 토양에 순화 중인 T1 세대 형질전환 담배 식물체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* 유전자 발현시스템의 존재 여부를 확인함.

T1 세대 담배 식물체에서 total RNA를 추출하고 RT-PCR 방법으로 *EpDWF3* 유전자의 발현을 확인함. 형질전환 개체의 잎을 LN<sub>2</sub>와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하였고 GeneAll Hybrid RNA Prep Kit (GeneAll Inc.)를 이용하여 total RNA를 추출하였으며 cDNA 합성 후 *EpDWF3*, *actin* 유전자에 특이적으로 결합하는 primer (그림 47)를 이용한 PCR을 수행하였고 대조군과 비교하여 *EpDWF3* 유전자의 발현을 확인함. *EpDWF3* 유전자 발현시스템이 도입된 T1 세대 담배 형질전환 식물체 중 T1-1, 2, 7, 9, 15, 16, 17, 18, 19, 20 식물체에서 *EpDWF3* 유전자가 발현되는 것으로 확인됨 (그림 50).



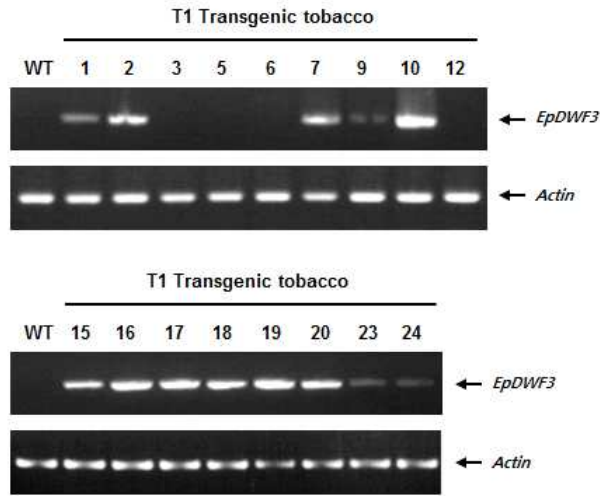


그림 50. 토양에 순화 중인 T1 세대 형질전환 담배 식물체에서 total RNA를 추출하고 RT-PCR을 통해 *EpDWF3* 유전자의 발현을 확인함.

*EpDWF3* 유전자를 발현하는 T1 세대 담배 형질전환체와 동일한 기간 동안 배양한 wild-type 대조군의 표현형을 비교 분석함 (그림 51). *EpDWF3* 유전자를 발현하는 T1 세대 담배 형질전환체는 wild-type 대조군과 유사한 크기로 성장하였고 (그림 51A) 동일 조건의 wild-type 대조군에 비해 잎과 절간 (internode)의 크기가 큰 것으로 나타남 (그림 51B). 또한 T1 세대 담배 형질전환체의 꽃의 수 및 크기는 wild-type 대조군과 유사하였지만 꽃받침 (receptacle)의 크기는 T1 세대 담배 형질전환체가 wild-type 대조군에 비해 큰 것으로 나타남 (그림 51C). T1 세대 담배 형질전환체의 꽃에서 회수한 종자는 wild-type 대조군에서 회수한 종자와 유사하였음.

이상의 결과는 T1 세대 담배 형질전환체에서 *EpDWF3* 유전자의 발현은 담배 식물체의 발달 과정에 영향을 미치며 *EpDWF3* 유전자의 발현에 의한 대표적으로 표현형 변화로는 잎, 절간, 꽃받침 크기 증가 등임.

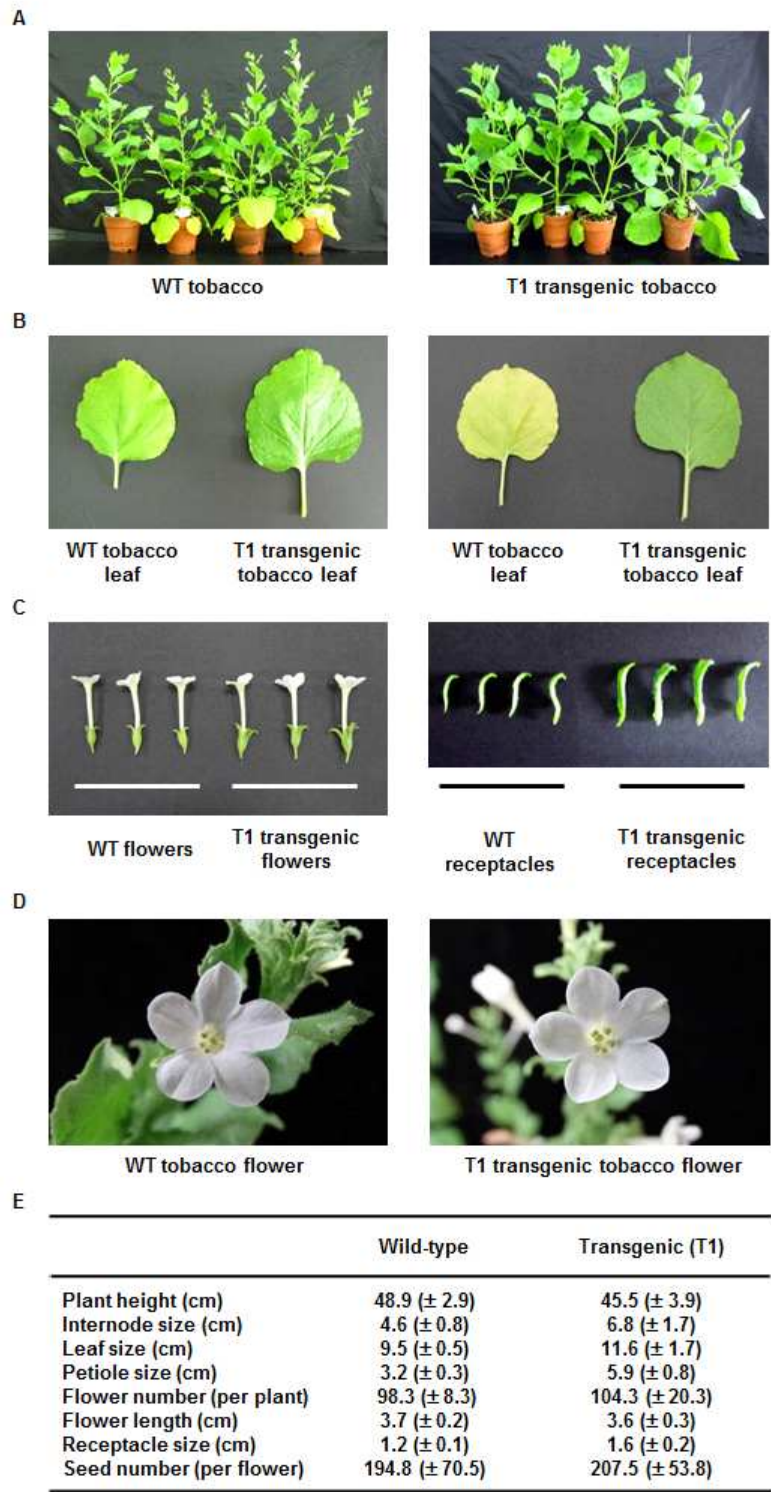


그림 51. *EpDWF3* 유전자를 발현하는 T1 세대 담배 형질전환체와 wild-type 대조군의 표현형 분석.

○ 식물 발현벡터 pPZP2Ha3/EpDWF3가 형질전환된 애기장대 식물체 확보 및 표현형 분석

- 형질전환된 애기장대 식물체 확보

*EpDWF3* 유전자가 과발현된 형질전환 애기장대 식물체를 확보하기 위한 애기장대 형질전환 및 재분화 연구를 수행함. pPZP2Ha3/EpDWF3 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium* GV3101 세포를 50 µg/ml kanamycin, 50 µg/mL gentamycin 항생제가 포함된 LB 액상배지를 사용하여 28°C 암조건에서 2일 동안 배양하였고 5% sucrose, 0.05% Silwet L-77 용액에 OD600 값이 0.8이 되도록 희석하였음. 꽃눈을 지나는 애기장대 식물체를 재조합 *Agrobacterium* 세포 희석액에 10초 동안 침지시키고 24°C 암조건에서 16시간 동안 배양한 후 12시간 명상태, 12시간 암상태의 광조건 배양하였음. 이 실험 과정을 5~6일 간격으로 3번 반복하여 애기장대의 형질전환을 유도함. 재조합 *Agrobacterium* 세포로 형질전환시킨 애기장대에서 종자를 회수하고 70% ethanol 용액에 5분, 0.8% NaOCl, 0.05% Triton X100 용액에 20초씩 5번 침지시킨 후 멸균된 증류수에 20번 세척하였고 2.5 mg/L hygromycin 항생제가 첨가된 애기장대 종자 배양 배지 (0.2% MS, 2% sucrose, 0.8% micro agar, 250 mg/L carbenicillin, pH 5.7~5.8)에 심은 후 4°C 암조건에서 3일 동안 배양한 후 12시간 명상태, 12시간 암상태의 광조건 조건에서 배양하였음. 2-3 주 후 4-6 개의 성체 잎이 생성된 애기장대 식물체를 토양에 옮겨 심어 형질전환된 애기장대 식물체의 성장을 유도하였음 (그림 52).

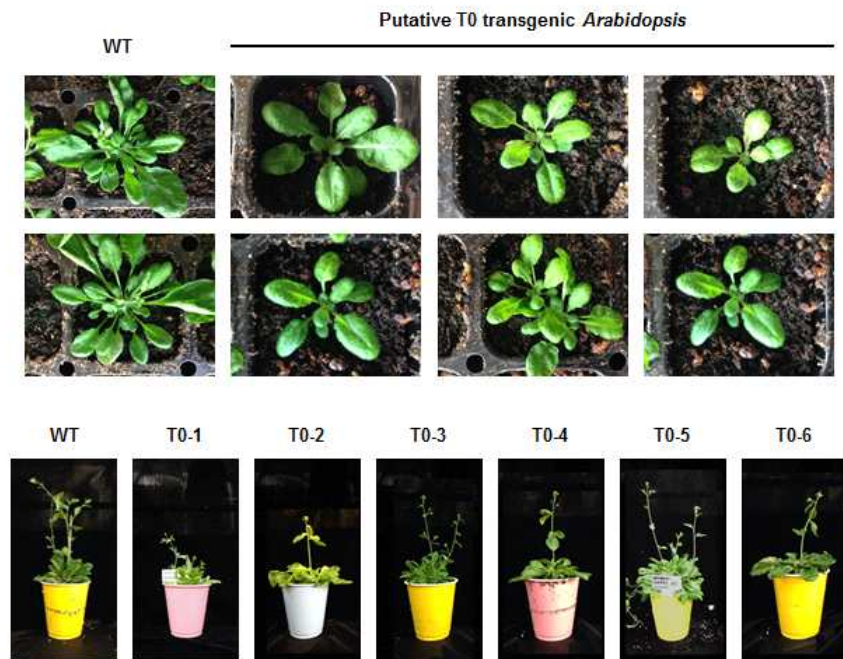


그림 52. 토양에 순화 중인 T0 세대 형질전환 애기장대 식물체.

- Genomic DNA PCR

pPZP2Ha3/EpDWF3 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium* 세포를 이용한 애기장대 형질전환 및 재분화 연구를 통해 확보한 형질전환 T0 세대의 개체 중 토양에 순화 중인 6개의 형질전환 개체 (그림 52, T0-1~6)에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 형질전환 애기장대 식물체의 genomic DNA에 *EpDWF3* 유전자 발현시스템의 도입 유무를 확인함. 형질전환 개체의 잎을 LN<sub>2</sub>와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하였고 GeneAll Exgene Plant SV Mini Kit를 이용하여 genomic DNA를 추출하였음. 250 ng genomic DNA, *EpDWF3* 유전자 및 애기장대 tubulin 유전자에 특이적으로 결합하는 PCR primer (그림 53)를 이용한 PCR를 수행하고 애기장대 식물체의 형질전환 유무를 판단함 (그림 54). T0-1, 2, 3, 4, 5 형질전환 개체의 genomic DNA에서 *EpDWF3* PCR 산물이 존재하였고 이는 *EpDWF3* 유전자 발현시스템이 형질전환된 애기장대 식물체에 도입되었다는 것을 의미함.

PCR primers		Sequence (5' → 3')
<i>EpDWF3</i>	Forward (Ep-3'RACE-F1)	GAAATTAGAAAGAAAAAGGGTGCATCGGTG
	Reverse (c-myc-R)	AAGATCCTCCTCGCTAATAAG
<i>Tubulin</i>	Forward (Tub-F)	AAGATCCGTGAAGAGTACCC
	Reverse (Tub-R)	GACTGTGAGGGAACGGTAC

그림 53. 형질전환 애기장대 식물체의 genomic DNA PCR을 위한 *EpDWF3* 및 *tubulin* primer의 염기서열.

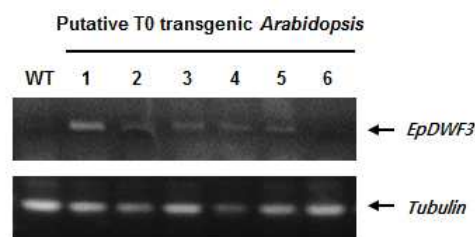


그림 54. 토양에 순화 중인 T0 세대 형질전환 애기장대 식물체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* 유전자 발현시스템의 도입 유무를 확인함.

- *EpDWF3* 유전자 발현 분석

pPZP2Ha3/EpDWF3 벡터가 형질전환된 애기장대 개체의 잎을 LN<sub>2</sub>와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하였고 protein extraction buffer (50 mM NaPO<sub>4</sub>, 10 mM EDTA, 0.1%

Triton X-100, 0.1% Tween-20, 8 mM  $\beta$ -mercaptoethanol)와 혼합한 후 단백질 추출물을 확보하였고 SDS-PAGE 후 anti-c-myc 항체를 이용한 Western blot 분석을 통해 EpDWF3 단백질의 발현을 확인함 (그림 55). *EpDWF3* 유전자 발현시스템이 도입된 것으로 확인된 애기장대 형질전환체 T0-2, 3, 4, 5 개체에서 EpDWF3 단백질은 약 60 kDa의 크기로 발현되었음.

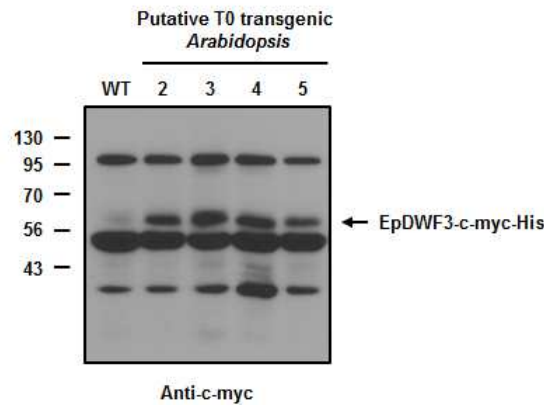


그림 55. 토양에 순화 중인 T0 세대 형질전환 애기장대 식물체에서 EpDWF3 단백질의 발현을 Western blot 분석으로 확인함.

- 형질전환 애기장대 식물체의 표현형 분석

*EpDWF3* 유전자 발현시스템의 도입 및 EpDWF3 단백질의 발현이 확인된 T0 형질전환 애기장대 식물체 (T0-2, T0-3, T0-4, T0-5, T0-8, T0-10)에서 종자를 확보하고 2.5 mg/L hygromycin 항생제가 첨가된 종자 배양 배지 (0.2% MS, 2% sucrose, 0.8% micro agar, 250 mg/L carbenicillin pH 5.7~5.8)에 파종한 후 *EpDWF3* 유전자를 과발현하는 T1 세대 애기장대 형질전환체를 확보하였음.

애기장대 형질전환체는 같은 기간 동안 배양한 wild-type 대조군에 비해 잎, 절간의 크기가 크며 wild-type 대조군은 긴 한가닥의 뿌리를 지니는 반면 애기장대 형질전환체의 뿌리는 짧으며 여러 가닥으로 존재하였음. 이상과 같이 *EpDWF3* 유전자 발현시스템이 도입된 T1 세대 애기장대 형질전환체는 wild-type 애기장대 대조군에 비해 빠르게 성장하는 것으로 확인됨 (그림 56 & 57).



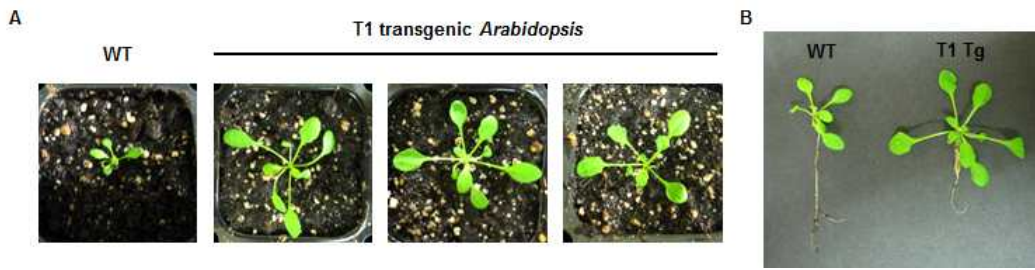


그림 56. 종자 배양 배지에서 발아된 T1 세대 형질전환 애기장대 식물체의 성장 분석 (WT, wild-type 애기장대).

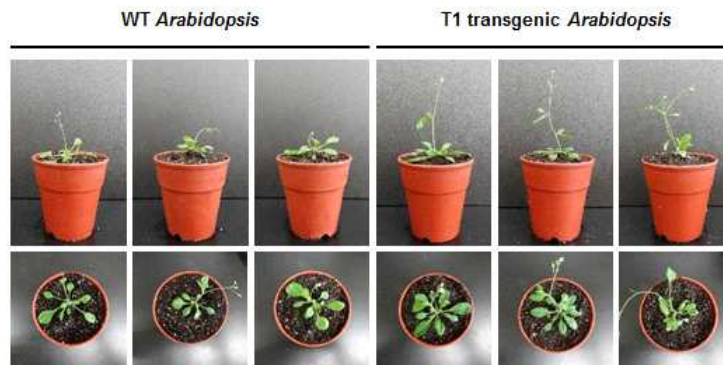


그림 57. 토양에 순화 중인 T1 세대 형질전환 애기장대 식물체.

○ 식물 발현벡터 pPZP2Ha3/EpDWF3가 형질전환된 식물체에서 BR 추출 및 GC 분석

*EpDWF3* 유전자 발현시스템의 도입된 형질전환 식물체에서 *EpDWF3* 유전자의 과 발현에 의한 BR 호르몬의 변화를 확인하기 위해 T1 세대 담배 형질전환체의 잎에서 BR 호르몬을 추출하고 GC 분석 연구를 수행함 (그림 58). Wild-type 담배 잎 5 g 및 T1 세대 담배 형질전환체 잎 5 g을 *n*-hexane (30 mL)으로 3번 반복 추출하여 hexane 추출물 (60 mg)을 확보하였고 추출물 3.4 mg 당 1 M KOH/EtOH 용매 1 mL을 첨가하여 1시간 동안 saponincation 반응을 진행하였음. 반응물에 동량의 *n*-hexane을 혼합한 후 hexane 분획물을 확보하였고 농축 후 pyridine 용매에 용해시켰으며 *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA)를 첨가하고 80°C에서 1시간 동안 trimethylsilylation (TMS) 반응을 유발시켜 GC (Shimadzu GC-MS-QP2010) 분석을 위한 BR 추출물 시료를 확보하였음. GC 분석에 사용한 column은 silica capillary column (DB-5: 30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m, USA)이었고 column 온도는 초기 온도가 60°C이었으며 2분간 유지하다가 1분에 15°C씩 320°C까지 올리고 320°C에서 10분간 유지하였음.

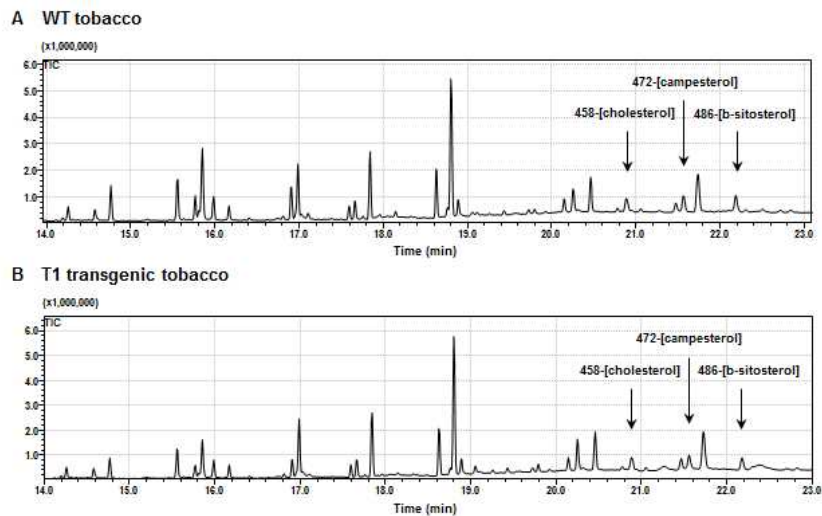


그림 58. *EpDWF3* 유전자 발현시스템의 도입된 형질전환 담배 식물체에서 BR 호르몬을 추출하고 GC 분석 연구를 수행함.

## 2. RT-PCR 및 RACE PCR을 통한 full length 관상작물 유래 난쟁이 표현형 유전자 확보

○ Degenerate RT-PCR, 5'-, 3'-RACE PCR을 통한 *Echinacea* 난쟁이 표현형 *DWF1* 유전자 확보 및 유전자 염기서열 분석

- Degenerate, 3'-RACE PCR

애기장대 (*Arabidopsis thaliana*), 옥수수 (*Zea mays*), 완두 (*Pisum sativum*), 백일홍 (*Zinnia elegans*)의 *DWF1* 유전자를 비교 분석하여 amino acid 서열에 유사성이 높은 부위 (그림 59)에서 degenerate PCR primer (그림 60A)를 제작하고 본 연구과제의 대상 작물인 *Echinacea*에서 확보한 cDNA를 주형으로 한 PCR 반응을 통해 약 500 bp의 *DWF1* degenerate PCR 산물을 확보함 (그림 60B). PCR 산물은 pGEM-T easy 벡터 (Promega)에 클로닝하였고 염기서열 분석을 통해 유전자 염기서열 정보를 확보함 (그림 60C).

*Echinacea DWF1* 유전자의 5', 3'-untranslated region (5'-UTR, 3'-UTR) 및 amino acid coding region의 유전정보를 확보하기 위해 5'-, 3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) PCR을 수행하였음. *Echinacea*에서 추출한 3 µg의 total RNA에 10 µM adaptor primer (AP, 5'-GGCCACGCGTCTGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') 1 µL를 첨가하고 70°C에서 10분간 두어 RNA를 변성시킨 후 ice에 5분 이상 식혀 AP의 결합을 유도하였음. 10x PCR buffer 2 µL, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 2 µL, 10 mM dNTP mixture 1 µL, 0.1 M



DTT 2  $\mu$ L를 첨가하고 42°C에서 3분간 둔 후, SuperScript™ II RT 1  $\mu$ L를 첨가하였고 42°C에서 50분 동안 반응시켜 3'-RACE cDNA의 합성을 유도하였음. 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA 합성을 종료하였으며 RNase H 1  $\mu$ L를 첨가하고 37°C에서 20분간 반응시켜 RNA를 제거하였고 *Echinacea DWF1* 3'-RACE PCR 산물을 확보하기 위한 cDNA로 이용하였음. *Echinacea DWF1* gene specific primer, abridged universal amplification (AUAP) primer (그림 61A), HotstarTaq PCR premixture kit (Qiagen)를 이용한 PCR을 수행하여 약 890 bp의 3'-RACE 산물을 확보하였음 (그림 61B). 3'-RACE 산물은 PCR 산물 결합 벡터인 pGEM-T easy 벡터에 결합시킨 후 미생물 DH5a strain에 형질전환시켰고 제한효소 절단 및 염기서열 결정법으로 3'-RACE PCR 산물의 유전자 정보를 확인함. 3'-RACE PCR 산물은 translation stop codon (TAG) 및 3'-UTR을 지니는 것으로 확인됨 (그림 61C).

```

AtDWF1 1 MSDLEQTPLVPRPKRKKVVDYFVKFRWIVVIFVVLPSATLQYFLIYLGDMWSESSKSEFKKRC
ZmDWF1 1 MADWHEPLVRRKRRKVVVDYFVKFRWIVVIFVVLPISTLLYFNILGLDMWSESSKSEFKKRC
PsDWF1 1 MSDLEAPLRPKRKKVVDYFVKFRWIVVIFVVLPSFTLYFLIYLGDMWSESSKSEFKKRC
ZedDWF1 1 MSDLEAPLVPRPKRKKVVDYFVKFRWIVVIFVVLPISTLYFLIYLGDMWSESSKSEFKKRC

AtDWF1 61 KEHDENVKQVVKRKLQSRNPSKDGSLVCTARKPWIAGVMRNVDYKRRARHFEVDLSAFRNILE
ZmDWF1 61 KEHDENVKQVVKRKLQSRNPSKDGSLVCTARKPWIAGVMRNVDYKRRARHFEVDLSAFRNILE
PsDWF1 60 KEHDENVKQVVKRKLQSRNPSKDGSLVCTARKPWIAGVMRNVDYKRRARHFEVDLSAFRNILE
ZedDWF1 61 KEHDENVKQVVKRKLQSRNPSKDGSLVCTARKPWIAGVMRNVDYKRRARHFEVDLSAFRNILE

AtDWF1 121 INKCEMIARVEPLVNMGOITRATVPMNLSLAVVAELDDLTVGGLINGYIEGSSHYGLF
ZmDWF1 121 IDKERMIARVEPLVNMGOITRATVPMNLSLAVVAELDDLTVGGLINGYIEGSSHYGLF
PsDWF1 120 IDKERMIARVEPLVNMGOITRATVPMNLSLAVVAELDDLTVGGLINGYIEGSSHYGLF
ZedDWF1 121 INKCEMIARVEPLVNMGOITRATVPMNLSLAVVAELDDLTVGGLINGYIEGSSHYGLF

AtDWF1 181 SDTVVAEIVLAGEKVVVRATKDNEYSDFYAI PWSQGLGLLVSAEIKLIPIKEYMKLTY
ZmDWF1 181 SDTVVAEIVLAGEKVVVRATKDNEYSDFYAI PWSQGLGLLVSAEIKLIPIKEYMKLTY
PsDWF1 180 SDTVVAEIVLAGEKVVVRATKDNEYSDFYAI PWSQGLGLLVSAEIKLIPIKEYMKLTY
ZedDWF1 181 SDTVVAEIVLAGEKVVVRATKDNEYSDFYAI PWSQGLGLLVSAEIKLIPIKEYMKLTY

AtDWF1 241 IPVCKDLQALAQYIDSFAPRDGDK---SKIPDFVEGMVYNBTEGMVMTGYASKEEAKK
ZmDWF1 241 IPVCKDLQALAQYIDSFAPRDGDK---AKVPDFVEGMVYNBTEGMVMTGYASKEEAKK
PsDWF1 240 IPVCKDLQALAQYIDSFAPRDGDKQDNDEKVPDFVEGMVMTGYASKEEAKK
ZedDWF1 241 IPVCKDLQALAQYIDSFAPRDGDK---NSKIPDFVEGMVYNBTEGMVMTGYASKEEAKK

AtDWF1 298 KGNKINNVGWVFKPWFYQHAQTALKKQKGEFVEYIPTREYYHRHTRCLYWEGKLLPFGDQF
ZmDWF1 298 KGNKINNVGWVFKPWFYQHAQTALKKQKGEFVEYIPTREYYHRHTRCLYWEGKLLPFGDQF
PsDWF1 300 KGNKINNVGWVFKPWFYQHAQTALKKQKGEFVEYIPTREYYHRHTRCLYWEGKLLPFGDQF
ZedDWF1 300 KGNKINNVGWVFKPWFYQHAQTALKKQKGEFVEYIPTREYYHRHTRCLYWEGKLLPFGDQF

AtDWF1 358 WFRFLLGWLMPPKVSLLKATQGEAIRNYYHDMHVIQDMLVPLYKVGDALEWVSRREMEVYE
ZmDWF1 358 WFRFLLGWLMPPKVSLLKATQGEAIRNYYHDMHVIQDMLVPLYKVGDALEWVSRREMEVYE
PsDWF1 360 WFRFLLGWLMPPKVSLLKATQGEAIRNYYHDMHVIQDMLVPLYKVGDALEWVSRREMEVYE
ZedDWF1 360 WFRFLLGWLMPPKVSLLKATQGEAIRNYYHDMHVIQDMLVPLYKVGDALEWVSRREMEVYE

AtDWF1 418 IWLCPHKLEKLPKTIWYYPEPGFEEHCRRQGDTEAQMNTDVGVIYAPGAVLGRGEEVFDGSE
ZmDWF1 418 IWLCPHKLEKLPKTIWYYPEPGFEEHCRRQGDTEAQMNTDVGVIYAPGAVLGRGEEVFDGSE
PsDWF1 420 IWLCPHKLEKLPKTIWYYPEPGFEEHCRRQGDTEAQMNTDVGVIYAPGAVLGRGEEVFDGSE
ZedDWF1 420 IWLCPHKLEKLPKTIWYYPEPGFEEHCRRQGDTEAQMNTDVGVIYAPGAVLGRGEEVFDGSE

AtDWF1 478 AVRRMEKWLIEHGFQPOYAVSELDEKSFWRMFCGLYECRKKYBAIGTFMSVYYKSKK
ZmDWF1 478 AVRRMEKWLIEHGFQPOYAVSELDEKSFWRMFCGLYECRKKYBAIGTFMSVYYKSKK
PsDWF1 480 AVRRMEKWLIEHGFQPOYAVSELNEKNFWRMFDAGLYEHCRRKYBAIGTFMSVYYKSKK
ZedDWF1 480 AVRRMEKWLIEHGFQPOYAVSELNEKNFWRMFDAGLYEHCRRKYBAIGTFMSVYYKSKK

AtDWF1 538 GRKTEKEVREAEQAHLTAYAEAE----
ZmDWF1 538 GRKTEKEVREAEQAHLTAYAEAE----
PsDWF1 540 GRKTEKEVREAEQAHLTAYAEAEVDFQPPD
ZedDWF1 540 GRKTEKEVREAEQAHLTAYAEAE----

```

그림 59. 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*), 옥수수 (*Zea mays*), 완두 (*Pisum sativum*), 백일홍 (*Zinnia elegans*) *DWF1* 유전자의 amino acid 서열 분석 (적선, degenerate PCR primer 제작 부위).

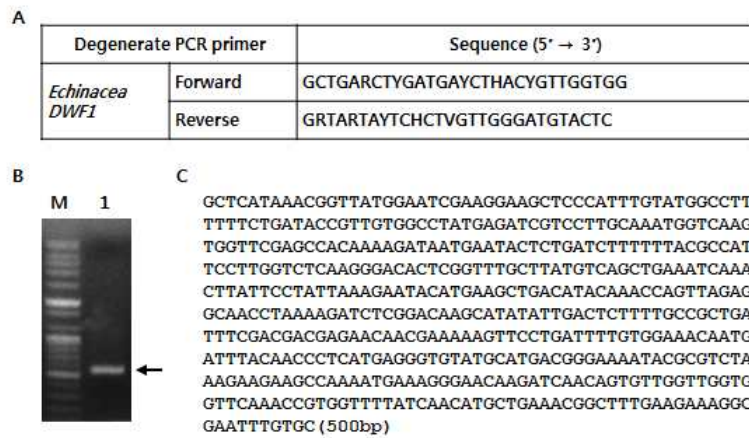


그림 60. *Echinacea* 식물체에서 degenerate PCR primer (A)를 이용한 PCR을 통해 *DWF1* PCR 산물 (B)을 얻고 염기서열을 분석함 (C) (M, 100 bp DNA ladder, 1, degenerate PCR product of *Echinacea*).

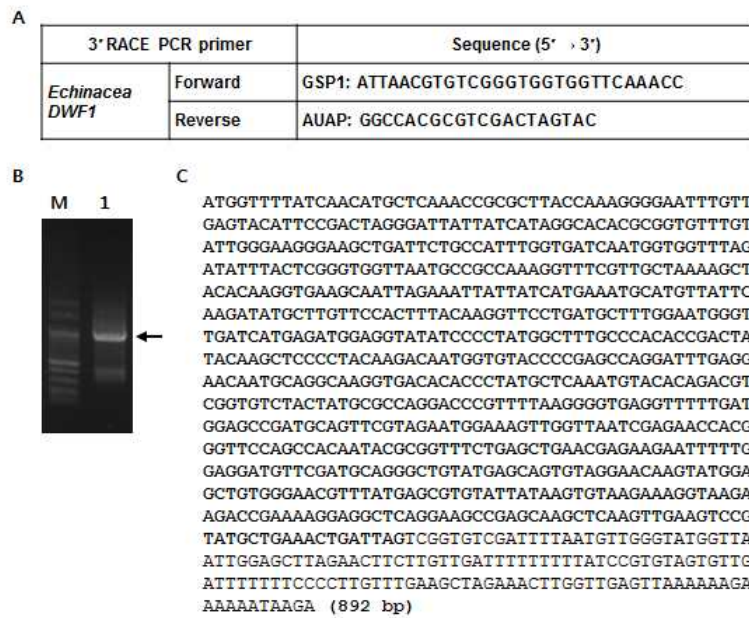


그림 61. *Echinacea DWR1* 3'-RACE PCR primer (A)를 이용한 PCR을 통해 *DWF1* 3'-RACE PCR 산물 (B)을 얻고 염기서열을 분석함 (C) (M, 100 bp DNA ladder; 1, 3'-RACE PCR product of *Echinacea DWF1*).

- 5'-RACE PCR

*Echinacea DWF1* 유전자의 5'-UTR 및 amino acid coding region의 유전정보를 확보하기 위해 5' RACE PCR을 수행하였음. *Echinacea*에서 추출한 3 µg의 total RNA에 2.5 µL GSP1 primer (1 pmole/µL)을 첨가하고 70°C에서 10분간 두어 RNA를 변성시킨 후 ice에 5분 이상 식혀 GSP1 primer의 결합을 유도하였음. 10x PCR buffer 2.5 µL, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 2.5 µL, 10 mM dNTP mixture 1 µL, 0.1 M DTT 5 µL를 첨가하고 42°C에서 3분간 둔 후, SuperScript™ II RT 1 µL를 첨가하고 42°C에서 50분 동안 반응시켜 5'-RACE cDNA의 합성을 유도하였음. 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA 합성을 종료하였으며 RNase H 1 µL를 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시켜 RNA를 제거하고 SNAP column을 이용하여 cDNA를 분리하였음. cDNA에 TdT를 tailing하기 위해 DEPC-treated water 6.5 µL, 5x tailing buffer 5 µL, 2 mM dCTP 2.5 µL, SNAP-purified cDNA를 섞어준 후, 94°C에서 3분간 반응시키고 ice에 넣어 1분 이상 식혀주었고 1 µL TdT 첨가 후 37°C에서 10분, 65°C에서 10분간 처리하여 dC-tailed cDNA를 확보하고 5' RACE PCR cDNA로 활용함. *Echinacea DWF1* 5'-RACE cDNA, AAP, *Echinacea DWF1* gene specific primer, HotstarTaq PCR premixture kit를 이용한 PCR을 수행하여 약 760 bp의 5'-RACE 산물을 확보하였음 (그림 62B). 5'-RACE 산물은 PCR 산물 결합 벡터인 pGEM-T easy 벡터에 결합시킨 후 미생물 DH5α strain에 형질전환시켰고 제한효소 절단 및 염기서열 결정법으로 5'-RACE PCR 산물의 유전자 정보를 확인함. 5'-RACE PCR 산물은 translation initiation codon 및 5'-UTR을 지나는 것으로 확인됨 (그림 62C).

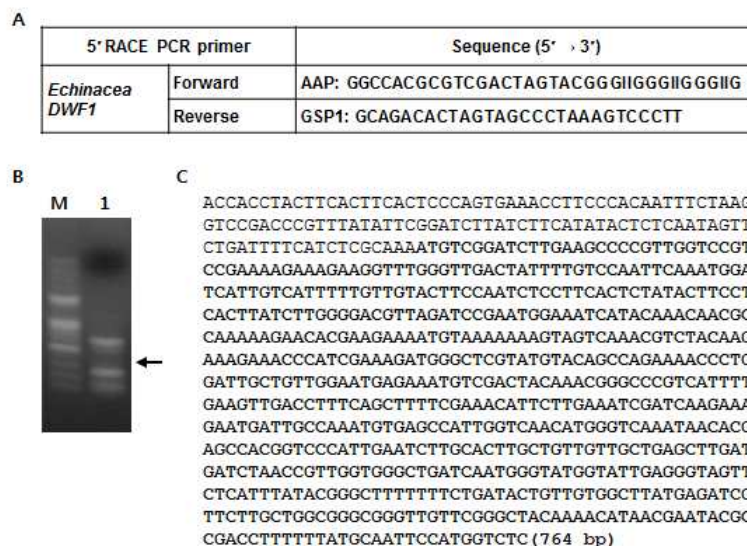


그림 62. *Echinacea DWR1* 5'-RACE PCR primer (A)를 이용한 PCR을 통해 *DWF1* 5'-RACE PCR 산물 (B)을 얻고 염기서열을 분석함 (C) (M, 100 bp DNA ladder; 1, 5'-RACE PCR product of *Echinacea DWF1*).



- Full length *Echinacea DWF1* 유전자 확보

Degenerate PCR, 5', 3'-RACE PCR을 통해 확보한 *Echinacea DWF1* (putative *DWF1*) 유전자의 염기서열 정보를 기초로 전체 유전자를 증폭시킬 수 있는 PCR primer를 디자인하고 PCR을 통해 *Echinacea DWF1* 유전자를 확보하였음. *Echinacea DWF1* PCR 산물은 pGEM-T easy 벡터에 결합시킨 후 미생물 DH5a strain에 형질전환시켰고 제한효소 절단 및 염기서열 결정법으로 *Echinacea DWF1* PCR 산물의 유전자 정보를 확인함. 확보한 *Echinacea DWF1* 유전자는 1,948 bp이었으며 117 bp의 5'-UTR, 139 bp의 3'-UTR, 1,692 bp의 amino acid coding region을 지니며 563개의 amino acid를 coding하는 것으로 예측됨 (그림 63).

```

1 ACCACCTACTTCACTTCCACTCCCACTGAAACCTTCCCAAAATTTCTAAGGTCCGACCGGTTTATATTCGGATCTATCTTT 80
      M S D L E A P L V R P K R K
81 CATATACTCTCAATAGTTCCTGATTTTCATCTCGCAAAAATGCTGATCTTGAAGCTCCATTTGGTCCGTCGCAAAAAGAAAG 160
      K V W V D Y F V Q F R W I I V I F V V L P I S F T L Y
161 AGGTTTGGGTTGACTATTTTGTCCAAATCAGATGGATCAITGTCATTTTGTGTACTTCCAAATCCCTTCACTCTATAC 240
      F L T Y L G D V R S E W K S Y K Q R Q K E H E E N V K
241 TTCTCCTCACTTATCTTGGCCACGTTAGATCCGAATGGAATCATACAAACAACGCCAAAAAGACACGAGAAAAATGTA 320
      K V V K R L Q E R N P S K D G L V C T A R K P W I A
321 AAAAGTAGTCAAACTGCTTACAAGAAAAGAAACCATCGAAAGATGGCTTCGTATGTACAGCCAGAAAACCTCGATTGCTG 400
      V G M R N V D Y K R A R H F E V D L S A F R N I L E I
401 TTGCAATGACAATGTCGACTACAAAACGGCCCGTCATTTTCAAGTTGACCTTTCAGCTTTTTCGAAACATTTCAAATC 480
      D Q E R M I A K C E P L V N M G Q I T R A T V P L N L
481 GATCAAGAAAGAAATGATGCCAAATGTAGCCATTTGTCACATGGTCAAAATACACGAGCCACGGTCCCATTTCAATCT 560
      A L A V V A E L D D L T V G G L I N G Y G I E G S S
561 TGCACCTGCTGTGTTGCTGAGCTTTCATGATCTAACCGTTGCTGGCTTCATCAATGGGTATGGTATTGAGGGTACTTCTC 640
      H L Y G L F S D T V V A Y E I V L A G G R V V R A T K
641 ATTTATACGGGCTTTTCTGATCTGTTGCTGCTTATGAGATCTTCTTCTGCTGCGGGGGTGTTCGGGCTACAAAA 720
      H N E Y A D L F Y A I P W S Q G T L G L L V S A E I K
721 CATAACCAATAACCGACCTTTTTCATGCAATTCATGGTTCACAGGGACTTTAGGGCTACTAGTGTCTGCTGAAATCAA 800
      L I P I K E Y M K L T Y T P V R G S V K E L G K A Y
801 ACTTATACCAATTAAGAATACATGAAGTTAATTCACACACCGCTAAGAGGTAGTGTAAAGAAGCTTGGAAAGCCATATA 880
      I D S F A P Q E G V D N S E E V P D F V E T M I Y N P
881 TCGACTCATTTGCTCCCAAATTCGGGTAGACACACAGTGAAGAGTTTCTGATTTTGTGAAACAATGATCTACAATCCT 960
      H E G V C M T G K Y A S K E E A K K K G N K I N S V G
961 CATCAAGCTGTTCGTATGACGGGAAAATACCGCTTAAAGAAGAAGCAAAAGAAAAAGCAAAATGAGATTAACAGTCTCG 1040
      R W F K P W F Y Q H A Q T A L T K G E F V E Y I P T
1041 CGGCTGTTCAAAACATGTTTATCAACATGCTCAAAACCGGCTTACCAAGGGCAATTTGTTGAGTACAATCCGACTA 1120
      R D Y Y H R H T R C L Y W E G K L I L P F G D Q W W F
1121 CGGATTTATCATAGGCACACGGCTGTTGATTTGGCAAGGAGCTGATTTCTGCCATTTGTTGATCAAATGGTGGTTT 1200
      R Y L L G W L M P P K V S L L K A T Q G E A I R N Y Y
1201 AGATAATTTACTCGGCTGTTAATGCCCAAGGTTTCTGTTGCTAAAAGCTACACAAGCTGAACCAATTAGAAAATTA 1280
      H E M H V I Q D M L V P L Y K V P D A L E W V D H E
1281 TCATGAAAATGATGTTATCAAGATAATGCTTTCACATTTACAAGGTTCTGATGCTTTGGAATGGTTCATGATGAGA 1360
      M E V Y P L W L C P H R L Y K L P Y K T M V Y P E P G
1361 TGGAGGTATATCCCTATGCGTTTCCCAACCGACTATACAGCTCCCTACAGACCAATGGTTCACCCGAGCCAGCA 1440
      F E E Q C R Q G D T P Y A Q M Y T D V G V Y Y A P G P
1441 TTTGAGGAACAATGAGGCAAGGTGACACACCCCTATGCTCAAAATGTACACAGACGTCGGTGTCTACTATGCCAGGACC 1520
      V L R G E V F D G A D A V R R M E S W L I E N H G F
1521 CGTTTAAAGGGTGAAGTTTTCATGAGCGGATGACGTTTCGTAAGTGAAGGTTTGGTAAATGAGAACCCAGGGTTC 1600
      Q P Q Y A V S E L N E K N F W R M F D A G L Y E Q C R
1601 AGCCACAATACGGGTTTCTGAGCTGAACGAGAAGAAATTTTGGAGGATGTTGATGCAAGGCTGTATGAGCAGTGTAG 1680
      N K Y G A V G T F M S V Y Y K C K K G K K T E K E A Q
1681 AACCAAGTATGGACTGTGGGACGTTTATGACGCTGATTTAAGCTGTAAGAAAGCTAAGACGCAAAAAGAGGCTCA 1760
      E A E Q A Q V E V P Y A E T D *
1761 GGAAGCCGAGCAAGCTCAAGTTGAAGTCCCGTATGCTGAAACTGATTAGTCCGTGTGATTTTAAATGTTGGGTAATGG 1840
1841 ATTTGAGCTTGAACCTTCTTGTGATTTTTCATCCGCTGATGTTTTCCTCCCTTGTTCGAGCTAAGAACT 1920
1921 TGGTTGAGTTAAAAAGAAAAATAACA 1948

```

그림 63. Degenerate PCR, 5', 3'-RACE PCR을 통해 확보한 *Echinacea DWF1* (putative *DWF1*) 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열 정보.

본 연구에서 확보한 *Echinacea DWF1* 유전자의 유전정보는 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 등록하였음 (GeneBank accession number : KJ833771) (그림 64).

```

LOCUS      KJ833771          1948 bp    mRNA    linear    PIN 15-MAY-2014
DEFINITION Echinacea purpurea EpDIM mRNA for sterol C-24 reductase.
ACCESSION Seq1
VERSION   .
KEYWORDS  .
SOURCE    Echinacea purpurea
ORGANISM  Echinacea purpurea
           Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
           Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae;
           Pentapetales; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae;
           Asteroideae; Heliantheae alliance; Heliantheae; Echinacea.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1948)
AUTHORS   Park, J.-H., Lee, J.-S., Zhao, J., Fu, Y.-Y., Lee, Y.H. and Chung, I.S.
TITLE     Echinacea purpurea EpDIM mRNA for sterol C-24 reductase
JOURNAL   Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1948)
AUTHORS   Park, J.-H., Lee, J.-S., Zhao, J., Fu, Y.-Y., Lee, Y.H. and Chung, I.S.
TITLE     Direct Submission
JOURNAL   Submitted (15-MAY-2014) Department of Genetic Engineering and
           Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University, 1732
           Deogyong-daero, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 446-701, Korea
COMMENT   Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:1.

           ##Assembly-Data-START##
           Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
           ##Assembly-Data-END##
FEATURES   Location/Qualifiers
           source          1..1948
                   /organism="Echinacea purpurea"
                   /mol_type="mRNA"
                   /db_xref="taxon:53751"
           CDS             118..1809
                   /codon_start=1
                   /product="Echinacea purpurea EpDIM for sterol C-24
                   reductase"
                   /translation="MSDLEAFLVRPKRKKVWVDYFVQFRWIVIFVWLPISFIFYFLI
                   YLGVSRSEKSKYKQKQKHEENVKVKVRLQERNPSKDLVCTARKFWIAGMNRNDY
                   KRARHFEVDLSARFNLEIDQERMIKACEPLVNMQSI TRATVPLNLALAWAELDEL
                   VGLINGYIEGSSSHLYGLFSDTUVAYEIVLAGGRVVRATKHNEYADLFYAI FWSQGT
                   LGLLVSAREIKLPIKEYMKLITYIPVRSVKELGKAYIDS FAPQFGVDSNEEVPDFVET
                   MIYNPHEGVCMIGKYASKEEAKKKGNKINSVGRWFKFVYQHAQTALIKGEFVEYIPI
                   RDIYHRHTRCLYWEKGLILPFGDQWVFRYLLGLWLMPPKVSLKATQGEAIPNYYHEMH
                   VIQMLVPLVKVDALEWVDHEMVEYPLWLICPHRLYKLPYKTMVYFEPGFEEQCRQGD
                   TPYAQMVTDVGVYYPAGPVLRGEVFDGADAVRRMESWLIENHGFQCPQYAVSEINERNF
                   WRMFDAGLYEQCRNKYGAVGTMSVYIKCKKGGKTEKEAQAQVQVVPYAEID"
BASE COUNT 569 a 362 c 457 g 560 t
ORIGIN
1 accacactact tcacttcact ccagtgaaa ccttcccaca atttctaagg tccgaccctg
61 ttatatctgg atcttatcct catatactct caatagtctt gattttcatc togcasaagt
121 tctgatcttg aagctccatt ggtccgtccg aaagaaaga aggtttgggt tgactatttt
181 gtccaattca gatggtatcat tgtcattttt gttgtacttc caatctcctt cactctatcc
241 ttctcacttt atcttgggga cgttagatcc gaatggaat catcaaaaca accccaataa
301 gaacacgaag aaatgtaaa aaagtatgc aaactgtcac aagaagaaga cccatcgaaa
361 gatggctctg tatgtacagc cagaaaacc ttgatgtctg ttggaatgag aaatgtcagc
421 tacaaaaggg cccgtcattt tgaagtgcac cttccagctt ttogaacat tcttgaatc
481 gatcaagaaa aaatgatgac caaatgtgag ccattggtca acatgggtca aataacacga
541 gccacggtcc cattgaatct tgcacttgct gttgtgctg agcttgatga tctaaccggt
601 ggtgggctga tcaatgggta tgggtatgag ggtagtcttc atttatccgg gctttttctt
661 gatactgttg tggcttatga gatcgttctt gctggcgggc ggggtggttg ggctacaaa
721 cataacgaat accgccgact tttttatgca attccatggt ctcaagggac tttagggcta
781 ctagtgtctg ctgaaatcaa acttatacca attaagaat acatgaagt aacttacaca
841 cccgttaagag gtagtgaata agaacttgga aaagcctata tgcactcat tgctccacaa
901 ttccgggtag acaacagtga agaagtctct gattttgtgg aaacaatgat ctacaatcct
961 catgaaggtg tttgtatgac gggaaaatcc gcctctaaga aagaagcaaa gaaaaaaga
1021 aataagatta acagtgtcgg gcggtggttc aaacctgggt tttatcaaca tgctcaaac
1081 gcgcttacca aaggggaatt tgttgaatc atccgacta gggattatta tcataggcac
1141 acgcygtggt tgtattggga agggaaactg atctcgccat ttggtgatca atggtggttt
1201 agatatttac tcgggtggtt aatgccgcc aaggtttcgt tgctaaaagc tacacaaggt
1261 gaagaatata gaaattatta tcatgaaatg catgtatcc aagatagtct tgttccactt
1321 tacaaaggtc ctgagtcttt ggaatgggtt gatcagaga tggaggatata tcccctatgg
1381 ctttgcccac accgactata caagctcccc tacaagacaa tgggtgacct agagccagga
1441 tttgaggaac aatgcagcca aggtgacaca cctatgctcc aatgtacac agacgtcgtt
1501 gctactatg cgcccaggacc cgttttaagg ggtgaggttt ttgagtgagc cgtatgagtt
1561 cgtagaatgg aaagtgggtt aatcagaac caaggttcc agcccaata cgcggtttct
1621 gagctgaacy agaagaatct ttggaggatg ttcagatcag ggcctgatga gcaagttagy
1681 aacaagtatg gagctgtggg aacgttatg agcgtgatt ataatgtaa gaaagttaa
1741 aagaccgaaa aggaagctca ggaagccag caagctcaag ttgaagctcc gtaatcgtaa
1801 actgattagt cgtgtcagat tttaatgtg ggtatggtta attgagcct agaactctt
1861 gttgattttt ttttatccgt gtagtgttga tttttttccc cttggttga gctagaact
1921 tgggtgagtt aaaaaaaga aataaga

```

그림 64. *Echinacea DWF1* 유전자의 유전정보를 NCBI에 등록함 (GeneBank accession number : KJ833771).



○ Degenerate RT-PCR, 5'-, 3'-RACE PCR을 통한 *Echinacea* 난쟁이 표현형 *DWF4* 유전자 확보 및 유전자 염기서열 분석

- Degenerate PCR

애기장대 (*Arabidopsis thaliana*), 옥수수 (*Zea mays*), 벼 (*Oryza sativa*), 백일홍 (*Zinnia elegans*)의 *DWF4* 유전자를 비교 분석하여 amino acid 서열에 유사성이 높은 부위 (그림 65)에서 degenerate PCR primer (그림 66A)를 제작하고 본 연구과제의 대상 작물인 *Echinacea*에서 확보한 cDNA를 주형으로 한 PCR 반응을 통해 약 800 bp의 *DWF4* degenerate PCR 산물을 확보함 (그림 66B). PCR 산물은 pGEM-T easy 벡터에 클로닝하였고 염기서열 분석을 통해 유전자 염기서열 정보를 확보함 (그림 66C).

AtDWF4	1	--MFETEHHHLLPFLLLPSSLLSLLLFILLKRRNRK-----IIFNLPPGKSG
ZmDWF4	1	MEAMMASITSELLFFLFFILLALLALYTTIVAKCHGTHQWR----RQKKRPNLPPGAR
OsDWF4	1	MEAMMASITSELLFFLFFILLALLTEYTTIVAKCHGCHWWRGGTTPAKRKRMLPPGAR
ZeDWF4	1	MCSTTLNMCLEFFELASCLLALFLILKLVKRRRT-----INGSTRNLPPGNMG
AtDWF4	46	WFLVGETIGYLKPYIATILIGDFMCOHWSKYGKIYRSNLFGEPTIVSADAGLNRIILQNEG
ZmDWF4	57	WFLVGETIGYLRAHPATSVGRFMERHWARYGKIYRSSLFGERIVVSADAGLNRYILQNEG
OsDWF4	61	WFLVGETIGYLRAHPATSVGRFMEQHARVYGKIYRSSLFGERIVVSADAGLNRYILQNEG
ZeDWF4	50	WFLVGETIGYLQPYSAITIGKFMEOHHSKYGKIYSSLFGEPTIVSADAGLNRYILQNEG
AtDWF4	106	RLFECSYPRSIGGILGKWSMLVLVGDHMRDMRSISLNFLSHARLRTILLKQVERHTLVL
ZmDWF4	117	RLFECSYPRSIGGILGKWSMLVLVGDHREMRAISLNFLSSVRLRAVLLPVEVHTLLVL
OsDWF4	121	RLFECSYPRSIGGILGKWSMLVLVGDHREMRAISLNFLSSVRLRAVLLPVEVHTLLVL
ZeDWF4	110	RLFECSYPRSIGGILGKWSMLVLVGDHMRDMRQISLNFLSNARLRTLLVNEVHTLVL
AtDWF4	166	DSWQQNSIFSAQDEAKKFTFNLMAKHIMSDPGEETEQLRKEYTFMKGVVSAPLNLF
ZmDWF4	177	RSWPPSDGTFSAQHEAKKFTFNLMAKNIMSDPGEETEERLEKEYTFMKGVVSAPLNLF
OsDWF4	181	RSWPPSSIFSAQDEAKKFTFNLMAKNIMSDPGEETEERLEKEYTFMKGVVSAPLNLF
ZeDWF4	170	DSWKENSIFSAQDEAKKFTFNLMAKHIMSDPGEETERLERLEKEYTFMKGVVSAPLNLF
AtDWF4	225	GTAYWKALKSRATILKFIERKMEERKLDIKEEDQEEEEVKTEDEAEISKSDVFKQRTDD
ZmDWF4	237	GTAYWKALKSRASILGVIERKMEER-----EKYSDESSVEED
OsDWF4	240	GTAYWKALKSRATILKFIERKMEER-----EKSDSDASVEED
ZeDWF4	229	GTAYWKALKSRATILKFIERKMEER-----IRMDEGNGLGKLDN
AtDWF4	285	DLLGWVLRKSNLSIQEQLDILLSLFFAGHETSSVAALAIFFLQACPKAVQLREEHLEIT
ZmDWF4	276	DLLGWALKQSNLSKEQIIDLILLSLFFAGHETSSMAALAIFFLECCPKAVQLREEHLEIT
OsDWF4	279	DLLGWALKQSNLSKEQIIDLILLSLFFAGHETSSMAALAIFFLECCPKAVQLREEHLEIT
ZeDWF4	268	DLLGWSMKNLSNLSKEQIIDLVLSSLLFAGHETSSVSLAVYFLEACPFAVRQLREEHLEIT
AtDWF4	345	ARRQRERGGKLSWEDYKEMVFTQCVINETLRLGNVVRFLHRRKAIKDVRYKGYDIPSGWK
ZmDWF4	336	ARRQRERGGKLSWEDYKEMVFTQCVINETLRLGNVVRFLHRRKVIDVRYKGYDIPSGWK
OsDWF4	339	ARRQRERGGKLSWEDYKEMVFTQCVINETLRLGNVVRFLHRRKAIKDVRYKGYDIPSGWK
ZeDWF4	328	VMKKNLIGEKYLITWEDYKEMVFTQCVINETLRLGNVVRFLHRRKAIKDVRYKGYDIPSGWK
AtDWF4	405	ILPVLSAVHLDSSLYDEPRFNPWRWKQNNCASSSGSGSFSSTWENNMPFGGGPRLCAG
ZmDWF4	396	ILPVLAHVHLDSSLYDEPRFNPWRWK-----SN-----APSSFMPVGGGGPRLCAG
OsDWF4	399	ILPVLAHVHLDSSLYDEPRFNPWRWK-----SSGSSGGLAQSSSFMPVGGGGPRLCAG
ZeDWF4	388	ILPVLAHVHLDSSLYDEPRFNPWRWK---SVAISSHCSTPPSSNFMPVGGGGPRLCAG
AtDWF4	465	SELAKLEMAVFIHHLVLRKFNWELAEDEKFAFPFVDFPNGLPIRVSRIL-----
ZmDWF4	442	SELAKLEMAVFIHHLVLRNFRWELAEPDQAFVMPFVDFPKGLPIRVQRVADIQGHRSVLIE
OsDWF4	452	SELAKLEMAVFIHHLVLRNFRWELAEPDQAFVMPFVDFPKGLPIRVHRIAQDEQ-----
ZeDWF4	445	SELAKLEMAVFIHHLVLRKFEWELVDSDEAFAPVPLDFPKGLPIRHRKQSC-----
AtDWF4	----	----
ZmDWF4	502	STRG
OsDWF4	----	----
ZeDWF4	----	----

그림 65. 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*), 옥수수 (*Zea mays*), 완두 (*Pisum sativum*), 백일홍 (*Zinnia elegans*) *DWF4* 유전자의 amino acid 서열 분석 (적선, degenerate PCR primer 제작 부위).



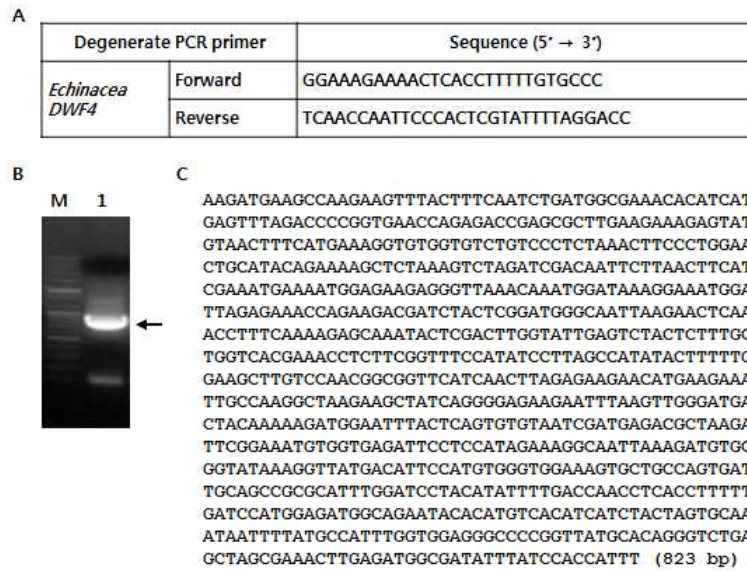


그림 66. *Echinacea* 식물체에서 degenerate PCR primer (A)를 이용한 PCR을 통해 *DWF4* PCR 산물 (B)을 얻고 염기서열을 분석함 (C) (M, 100 bp DNA ladder, 1, degenerate PCR product of *Echinacea*).

### - 3'-RACE PCR

*Echinacea DWF4* 유전자의 5', 3'-untranslated region (5'-UTR, 3'-UTR) 및 amino acid coding region의 유전정보를 확보하기 위해 5', 3'-RACE PCR을 수행하였음. *Echinacea*에서 추출한 3 µg의 total RNA에 10 µM adaptor primer 1 µL를 첨가하고 70°C에서 10분간 두어 RNA를 변성시킨 후 ice에 5분 이상 식혀 adaptor primer의 결합을 유도하였음. 10x PCR buffer 2 µL, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 2 µL, 10 mM dNTP mixture 1 µL, 0.1 M DTT 2 µL를 첨가하고 42°C에서 3분간 둔 후, SuperScript<sup>TM</sup> II RT 1 µL를 첨가하였고 42°C에서 50분 동안 반응시켜 3'-RACE cDNA의 합성을 유도하였음. 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA 합성을 종료하였으며 RNase H 1 µL를 첨가하고 37°C에서 20분간 반응시켜 RNA를 제거하였고 *Echinacea DWF4* 3'-RACE PCR 산물을 확보하기 위한 cDNA로 이용하였음. *Echinacea DWF4* GSP1 primer, AUAP primer, HotstarTaq PCR premixture kit을 이용한 PCR을 수행하여 약 500 bp의 3'-RACE 산물을 확보하였음 (그림 67B). 실험에 이용된 primer 염기서열은 그림 67A와 같음. 3'-RACE 산물은 PCR 산물 결합 벡터인 pGEM-T easy 벡터에 결합시킨 후 미생물 DH5α strain에 형질전환시켰고 제한 효소 절단 및 염기서열 결정법으로 3'-RACE PCR 산물의 유전자 정보를 확인함. 3'-RACE PCR 산물은 translation stop codon (TAG) 및 3'-UTR을 지나는 것으로 확인됨 (그림 67C).

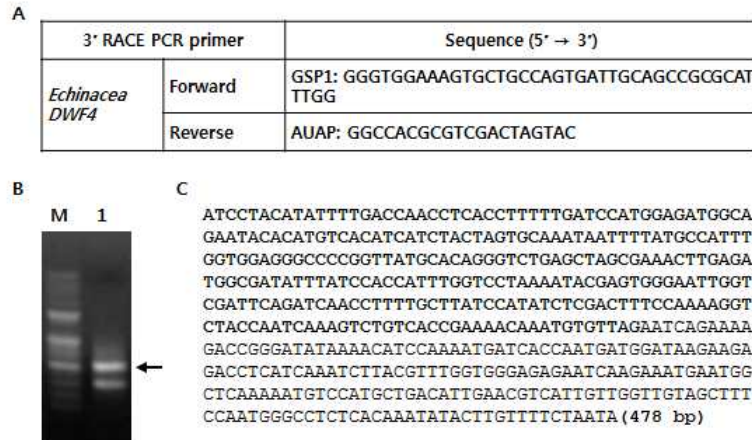


그림 67. *Echinacea DWF4* 3'-RACE PCR primer (A)를 이용한 PCR을 통해 *DWF4* 3'-RACE PCR 산물 (B)을 얻고 염기서열을 분석함 (C) (M, 100 bp DNA ladder; 1, 3'-RACE PCR product of *Echinacea DWF4*).

#### - 5'-RACE PCR

*Echinacea DWF4* 유전자의 5'-UTR 및 amino acid coding region의 유전정보를 확보하기 위해 5' RACE PCR을 수행하였음. *Echinacea*에서 추출한 3 µg의 total RNA에 2.5 µL GSP1 reverse primer (1 pmole/µL, 그림 25A)을 첨가하고 70°C에서 10분간 두어 RNA를 변성시킨 후 ice에 5분 이상 식혀 *Echinacea DWF4* GSP1 primer의 결합을 유도하였음. 10x PCR buffer 2.5 µL, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 2.5 µL, 10 mM dNTP mixture 1 µL, 0.1 M DTT 5 µL를 첨가하고 42°C에서 3분간 둔 후, SuperScript<sup>TM</sup> II RT 1 µL를 첨가하였고 42°C에서 50분 동안 반응시켜 5'-RACE cDNA의 합성을 유도하였음. 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA 합성을 종료하였으며 RNase H 1 µL를 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시켜 RNA를 제거하고 SNAP column을 이용하여 cDNA를 분리하였음. cDNA에 TdT를 tailing하기 위해 DEPC-treated water 6.5 µL, 5x tailing buffer 5 µL, 2 mM dCTP 2.5 µL, SNAP-purified cDNA를 섞어준 후, 94°C에서 3분간 반응시키고 ice에 넣어 1분 이상 식혀주었고 1 µL TdT 첨가 후 37°C에서 10분, 65°C에서 10분간 처리하여 dC-tailed cDNA를 확보하였고 5' RACE PCR cDNA로 활용함. *Echinacea DWF4* 5'-RACE cDNA, AUAP, *Echinacea DWF4* GSP1 primer, HotstarTaq PCR premixture kit를 이용한 PCR을 수행하여 약 600 bp의 5'-RACE 산물을 확보하였음 (그림 68B). 실험에 이용된 primer 염기서열은 그림 68A와 같음. 5'-RACE 산물은 PCR 산물 결합 벡터인 pGEM-T easy 벡터에 결합시킨 후 미생물 DH5α strain에 형질전환시켰고 제한효소 절단 및 염기서열 결정법으로 5'-RACE PCR 산물의 유전자 정보를 확인함.

5'-RACE PCR 산물은 translation initiation codon 및 5'-UTR을 지니는 것으로 확인됨 (그림 68C).

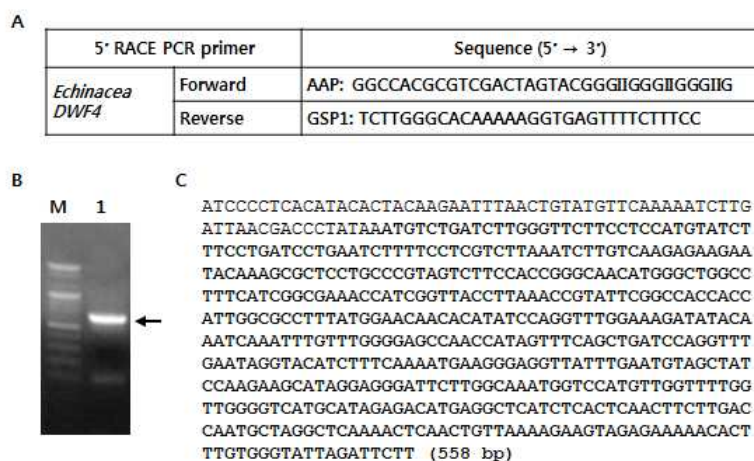


그림 68. *Echinacea DWF4* 5'-RACE PCR primer (A)를 이용한 PCR을 통해 *DWF4* 5'-RACE PCR 산물 (B)을 얻고 염기서열을 분석함 (C) (M, 100 bp DNA ladder; 1, 5'-RACE PCR product of *Echinacea DWF4*).

- Full length *Echinacea DWF4* 유전자 확보

Degenerate PCR, 5', 3'-RACE PCR을 통해 확보한 *Echinacea DWF4* (putative *DWF4*) 유전자의 염기서열 정보를 기초로 하여 전체 유전자를 증폭시킬 수 있는 PCR primer를 디자인하고 PCR을 통해 *Echinacea DWF4* 유전자를 확보하였음. *Echinacea DWF4* PCR 산물은 pGEM-T easy 벡터에 결합시킨 후 미생물 DH5a strain에 형질전환시켰고 제한효소 절단 및 염기서열 결정법으로 *Echinacea DWF4* PCR 산물의 유전자 정보를 확인함. PCR에 확보한 *Echinacea DWF4* 유전자는 1,718 bp이며 65 bp의 5'-UTR, 196 bp의 3'-UTR, 1,458 bp의 amino acid coding region을 지니며 485개의 amino acid를 coding하는 것으로 예측됨 (그림 69).

본 연구에서 확보한 *Echinacea DWF4* 유전자의 유전정보는 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 등록하였음 (GeneBank accession number : KJ833771) (그림 70).

M S D L E

```

1      AAATCCCTCACATACACTACAAGAATTTAACTGTAAGTTCAAAAATCTTGATTAAAGACCTATAAATGTCTGATCTTGA      80
      F F L H V S F L I L N L F L V L N L V K R R I Q S A
81     GTTCTTCCATGATCTTTCCATGATCCGAATCTTTTCCATGCTCTAAAATCTTGTCAGAGAGAAATACAAAAGGCTC      160
      P A R S L P P G N M G W P F I G E T I G Y L K P Y S A
161    CTGCCGCTAGTCTTCCACGGGGCAACATGGGCTGGGCTTTTCATCGGC GAAACCATCGGTACCTTAAACCGTATTCGGCC      240
      T T I G A F M E Q H I S R F G K I Y K S N L F G E P T
241    ACCACCATTCGGCCCTTTATGGAACAACACATATCCAGGTTTGAAAAGATATACAAAATCAAATTTGTTGGGGAGCCAAC      320
      I V S A D P G L N R Y I F Q N E G R L F E C S Y P R
321    CATAGTTTCAAGTATCCAGGTTTGAATAAGTACAATCTTTCAAAAATGAAGGAGGTTATTTGAATGTAGCTATCCAAAGAA      400
      S I G G I L G K W S M L V L V G D M H R D M R L I S L
401    GCATAGGAGGATCTTGGCAAAATGCTCATGTTGGTTTGGTTGGGACATGCATAGACATGAGGCTCATCTCACTC      480
      N F L T N A R L K T Q L L K E V E K N T L W V L D S W
481    AACTTCTTACCAATGCTAGGCTCAAACCTCAACTGTTAAAAGCAAGTTCAGAAAACACCTTTTGGGCTATTAGATCTTTC      560
      Q E N S P F C A Q D E A K K E T F N L M A K H I M S
561    CCAAGAAAACCTCACCTTTTGTGCCAAGATGAAGCCACAGCTTTACTTTCAATCTGATGGCAAAACACATCATGAGTT      640
      L D P G E P E T E R L K K E Y V T F M K G V V S V P L
641    TAGACCCCGTGAACCAAGACCGAGCCCTTGAAGAAAAGCTATGTAAGTTCATGAAAGGTTGGGCTCTGTCCTCTA      720
      N F P G T A Y R K A L K S R S T I L N F I E M K M E K
721    AACTTCCCTGCAACTGCATACAGAAAAGCTTAAAGTCTAGATCGACAATCTTAACTTCATCGAAATGAAATGGAGAA      800
      R V K Q M D K G N G L E K P E D D L L G W A I K N S
801    GAGGTTAAACAAAATGGATAAAGGAAATGGATAGAGAAAACAGAAAGAGATCTACTGGATGGCAATTAAGAAGCTCAA      880
      N L S K E Q I L D L V L S L L F A G H E T S S V S I S
881    ACCTTTCAAAAAGCAAAATACCTGACTTGATAATGAGTCTACTCTTTTCTGCTCACGAAACCTCTTGGGTTTCCATA      960
      L A I Y F L E A C P T A V H Q L R E E H E E I A K A K
961    TTAGCCATATACTTTTGAAGCTTGTCCAAAGGCGGTTCAATCAACTTAGAGAAGAACATGAAGAAATTTGCCAAGGCTAA      1040
      K L S G E K N L S W D D Y K K M E F T Q C V I D E T
1041   GAAGCTATCAGGGGAGAGAATTTAAAGTTGGATGACTACAAAAAGATGGAATTTACTCACTGTGTAAATGATGAGAGCC      1120
      L R F G N V V R F L H R K A I K D V R Y K G Y D I P C
1121   TAAGATTCGCAAAATGTGGTGAGATTCCTCCATAGAAAAGCAATTTAAAGATGTGGGCTATAAAGGTTATGACATTCATGT      1200
      G W K V L P V I A A A H L D P T Y F D Q P H L F D P W
1201   GGGTGGAAAGTCTGCCAGTGATTCAGCCCGCCTTTGGATCCCTACATAATTTGACCAACCCTCACTTTTGTATCCATG      1280
      R W Q N T H V T S S T S A N N F M P F G G G P R L C
1281   GAGATGGCAGAAATACACATGTACATCATCTACTAGTCAAATAAATTTATGCCATTTGGTGGAGGGCCCGGTTATGCA      1360
      T G S E L A K L E M A I F I H H L V L K Y E W E L V D
1361   CAGGCTCTGAGCTAGCGAAACTT GAGATGGGATAATTTATCCACCATTTGCTCCTAAAATACAGTGGGAAATGCTCGAT      1440
      S D Q P F A Y P Y L D F P K G L P I K V C H R K Q M C
1441   TCAGATCAACCTTTTGTCTATCCATATCTGACTTTCCAAAAGTCTACCAATCAAAGTCTGTACCCGAAAACAAATGTG      1520
      *
1521   TTAGAATCAGAAAAGCCGGGATATAAAAACATCAAAAATGATCAACCAATGATGGATAGAAAGAGACCTCATCAAATCTTA      1600
1601   CGTTTGGTGGGAGAGAAATCAAGAATGAATGGCTCAAAAATGTCATGCTGACATTCAGAGTCTGCTTGGTTGAGCTT      1680
1681   TCCAAATGGCCCTCTCAAAAATATACTTGTTTTCTAATA 1718

```

그림 69. Degenerate PCR, 5', 3'-RACE PCR을 통해 확보한 *Echinacea DWF4* (putative *DWF4*) 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열 정보.



LOCUS KJ833768 1717 bp mRNA linear PLN 29-APR-2014  
 DEFINITION Echinacea purpurea EpDWF4 mRNA for steroid 22-alpha-hydroxylase, complete cds.  
 ACCESSION Seq1  
 VERSION  
 KEYWORDS  
 SOURCE Echinacea purpurea  
 ORGANISM Echinacea purpurea  
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetalae; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae; Asteroideae; Heliantheae alliance; Heliantheae; Echinacea.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1717)  
 AUTHORS Zhao, J., Fu, Y.-Y., Park, J.-H., Lee, Y.H. and Chung, I.S.  
 TITLE Echinacea purpurea EpDWF4 mRNA for steroid 22-alpha-hydroxylase  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1717)  
 AUTHORS Zhao, J., Fu, Y.-Y., Park, J.-H., Lee, Y.H. and Chung, I.S.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (29-APR-2014) Department of Genetic Engineering and Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University, 1732 Deogyong-daero, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 446-701, Korea  
 COMMENT Bankit Comment: TOTAL # OF SEQs:1.

```

##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..1717
                        /organism="Echinacea purpurea"
                        /mol_type="mRNA"
                        /db_xref="taxon:53751"
     CDS                66..1523
                        /codon_start=1
                        /product="Echinacea purpurea EpDWF4 for steroid
                        22-alpha-hydroxylase"
                        /translation="MSDLEFFLHV/SFLILNLFVILNLRRIQSA PARSLPPGNMGWP
                        FIGETI GY LKPYSATT IGA FMEQHISRFGKIYKSNLFGPETIVSADPGINRYI FQNEG
                        RLFECSYPRSIG ILGKWSMLVIVGEMHRIMRLISINFLINRLKTLQLKEVERKTLW
                        VLDSWQENSPPFCAQDEAKKFT FNLMKHHMSLDGPEPETERLKKE YVTFMKGUVSVPL
                        NFPGTAYRKALKRSST IINFIEMKMKRVKQMDKGNLEKPEDDLLGWAIKNSNLSKE
                        QILDVLSLLFAGHETSSVSI SLAIYFLACPTAVHQLR EHEEITAKAKKLSGKKNLS
                        WDDYKMEPTQCVIDE TLRFGNVVRFHRKAIKDVRYKGYDIPCGWKVLEP IAAAHLD
                        PTYFDQHLFD FWRWQNIHVT SST SANNFMFPFGGSPRLCTGSEIAKLEMAI FIIHLVL
                        KYEWELVDSQFFAYPYLD FPKGLPIKVCHRKQMC"
  
```

BASE COUNT 539 a 341 c 365 g 472 t  
 ORIGIN

```

1 atccctcac atactactaca agaatttaac tgtatgttca aaaatcttga ttaacgaccc
61 tataaatgtc tgatcttgag ttcttctccc atgtatcttt cctgatcctg aatcttttcc
121 tcttcttaaa tcttgtcaag agaagaatac aaagcgtccc tgcccgtagt cttccaccgg
181 gcaacatggg ctggcctttc atcggcgaaa ccacgcgtta ccttaaaccc tattcggcca
241 ccaccattgg cgcctttatg gaacaacaca tatccaggtt tggaaagata tacaatcaa
301 atttgtttgg ggagccaacc atagtctcag ctgatccagg ttgaaatagg tacatctttc
361 aaatgaagg gaggttattt gaatgtagct atccaagaag cataggaggg atctctggca
421 aatggtccat gttggttttg gttggggaca tgcatagaga catgaggttc atctcactca
481 acttcttgac caatgctagg ctcaaaaact aactgtttaa agaatgtgag aaaaactctt
541 tgtgggtatt agattcttgg caagaaaact cacctttttg tgccaagat gaagccaaga
601 agtttacttt caatctgatg gcaaaacaca tcatgagttt agaccccggt gaaccagaga
661 cggagcgttt gaagaagag tatgtaactt tcatgaaagg tgtggtgtct gttcccttaa
721 acttccctgg aactgcatac agaaaagctc taaagtctag atcgacaatt cttaacttca
781 tcgaaatgaa aatggaagag agggtaaac aaatggataa aggaatgga ttagagaaac
841 cagaagacga tctactcgga tgggcaatta agaactcaaa cctttcaaaa gagcaaatac
901 tgcacttggt attgagtcta ctctttgctg gtcacgaaac ctcttcggtt tccatctctt
961 tagccatata ctttttgtaa gcttgtccaa cggcgggttca tcaacttaga gaagaacatg
1021 aagaatttgc caaggctaag aagctatcag gggagaagaa ttaagtggg gatgactaca
1081 aaaaagtgga atttactcag tgtgtaatcg atgagacgct aagattcggg aatgtggtga
1141 gattcctcca tagaaagcga attaaagatg tgcggtataa aggttatgac attcactgtg
1201 ggtggaaagt gctgccagtg attgacgccc cgcatttggg tctacatat tttgaccaac
1261 ctccaccttt tgatccatgg agatggcaga atacacatgt cacatcact actagtccaa
1321 ataatttat gccatttggg ggagggcccc ggttatgac agggctctgag ctagcgaaac
1381 ttgagatggc gatatttacc caccatttgg tctcaaaata ctagtgggaa ttggtcgatt
1441 cagatcaacc ttttgcctat ccatactcgg actttccaaa aggtctacca atcaaatgtc
1501 gtcaccgaaa acaaatgtgt tagaatcaga aaagaccggg atataaaca tcaaaatgga
1561 tcaccaatga tggataagaa gagacctcat caaatcttac gtttgggtgg agagaatcaa
1621 gaaatgaatg gctcaaaaat gtcctgctg acattgaacg tcattgtgg ttgtagcttt
1681 ccaatgggccc tctcaaaaat atactgttt tctaata
//
  
```

그림 70. *Echinacea DWF4* 유전자의 유전정보를 NCBI에 등록함 (GeneBank accession number : KJ833771).

○ Degenerate RT-PCR, 5'-, 3'-RACE PCR을 통한 *Echinacea* 난쟁이 표현형 SMT2 유전자 확보 및 유전자 염기서열 분석

애기장대 (*Arabidopsis thaliana*), 올리브 (*Olea europaea*), 옥수수 (*Zea mays*), 목화 (*Gossypium hirsutum*)의 SMT2 유전자를 비교 분석하여 amino acid 서열에 유사성이 높은 부위(그림 71)에서 degenerate PCR primer (그림 72A)를 제작하고 본 연구과제의 대상 작물인 *Echinacea*에서 확보한 cDNA를 주형으로 한 PCR 반응을 통해 약 300 bp의 SMT2 degenerate PCR 산물을 확보함 (그림 72B). PCR 산물은 pGEM-T easy 벡터에 클로닝하였고 염기서열 분석을 통해 유전자 염기서열 정보를 확보함 (그림 72C).

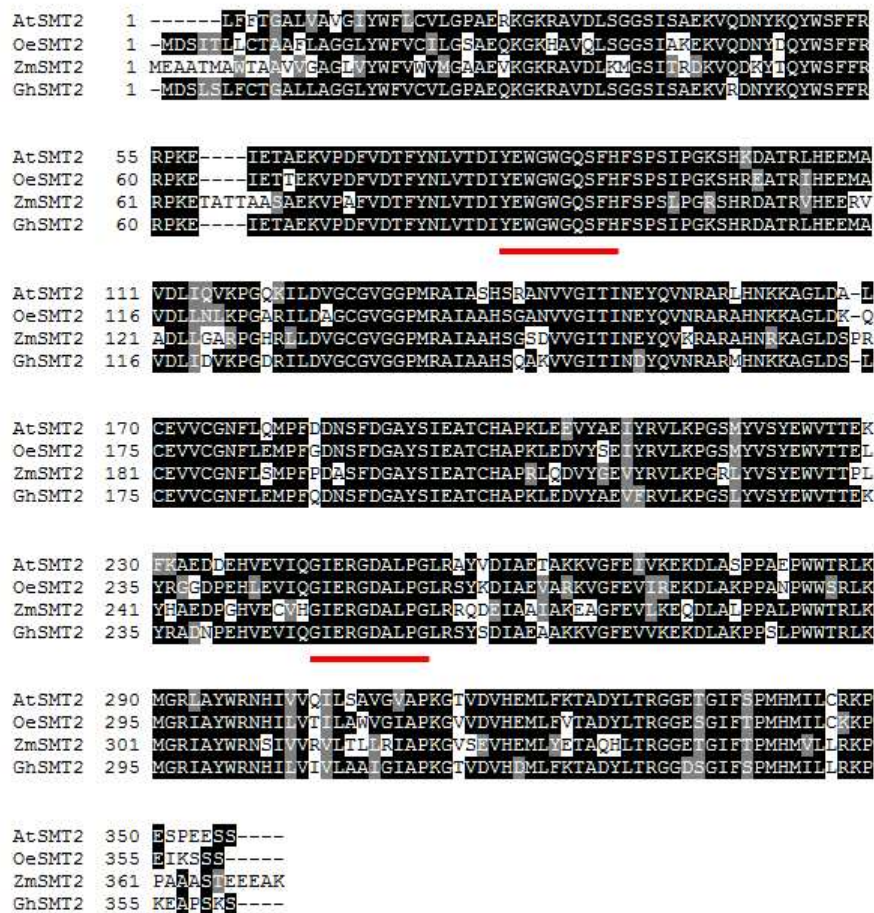


그림 71. 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*), 올리브 (*Olea europaea*), 옥수수 (*Zea mays*), 목화 (*Gossypium hirsutum*) SMT2 유전자의 amino acid 서열 분석 (적선, degenerate PCR primer 제작 부위).



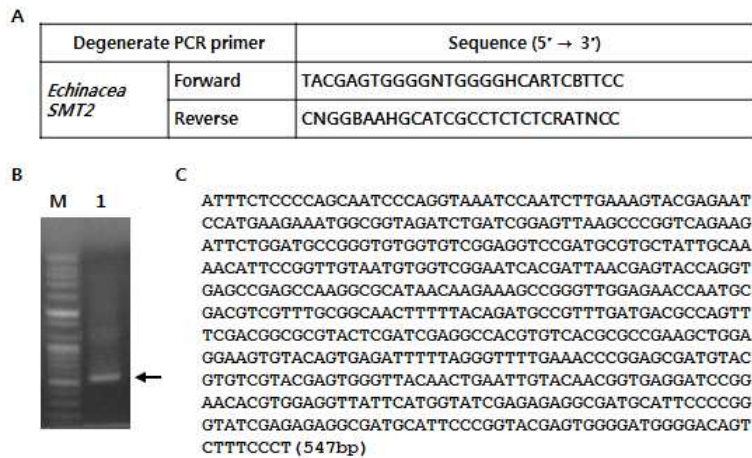


그림 72. *Echinacea* 식물체에서 degenerate PCR primer (A)를 이용한 PCR을 통해 *SMT2* PCR 산물 (B)을 얻고 염기서열을 분석함 (C) (M, 100 bp DNA ladder, 1, degenerate PCR product of *Echinacea*).

#### - 3'-RACE PCR

*Echinacea SMT2* 유전자의 5', 3'-untranslated region (5'-UTR, 3'-UTR) 및 amino acid coding region의 유전정보를 확보하기 위해 5', 3'-RACE PCR을 수행하였음. *Echinacea*에서 추출한 3 µg의 total RNA에 10 µM adaptor primer 1 µL를 첨가하고 70°C에서 10분간 두어 RNA를 변성시킨 후 ice에 5분 이상 식혀 adaptor primer의 결합을 유도하였음. 10x PCR buffer 2 µL, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 2 µL, 10 mM dNTP mixture 1 µL, 0.1 M DTT 2 µL를 첨가하고 42°C에서 3분간 둔 후, SuperScript<sup>TM</sup> II RT 1 µL를 첨가하였고 42°C에서 50분 동안 반응시켜 3'-RACE cDNA의 합성을 유도하였음. 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA 합성을 종료하였으며 RNase H 1 µL를 첨가하고 37°C에서 20분간 반응시켜 RNA를 제거하였고 *Echinacea SMT2* 3'-RACE PCR 산물을 확보하기 위한 cDNA로 이용하였음. *Echinacea SMT2* GSP1 primer, AUAP primer, HotstarTaq PCR premixture kit을 이용한 PCR을 수행하여 약 500 bp의 3'-RACE 산물을 확보하였음 (그림 73B). 실험에 이용된 primer 염기서열은 그림 73A와 같음. 3'-RACE 산물은 PCR 산물 결합 벡터인 pGEM-T easy 벡터에 결합시킨 후 미생물 DH5a strain에 형질전환시켰고 제한 효소 절단 및 염기서열 결정법으로 3'-RACE PCR 산물의 유전자 정보를 확인함. 3'-RACE PCR 산물은 translation stop codon (TGA) 및 3'-UTR을 지나는 것으로 확인됨 (그림 73C).

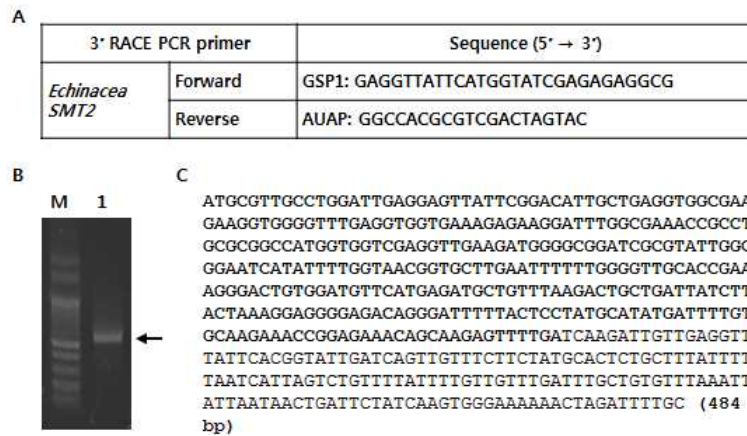


그림 73. *Echinacea SMT2* 3'-RACE PCR primer (A)를 이용한 PCR을 통해 *SMT2* 3'-RACE PCR 산물 (B)을 얻고 염기서열을 분석함 (C) (M, 100 bp DNA ladder; 1, 3'-RACE PCR product of *Echinacea SMT2*).

#### - 5'-RACE PCR

*Echinacea SMT2* 유전자의 5'-UTR 및 amino acid coding region의 유전정보를 확보하기 위해 5' RACE PCR을 수행하였음. *Echinacea*에서 추출한 3 µg의 total RNA에 2.5 µL GSP1 reverse primer (1 pmole/µL, 그림 31A)을 첨가하고 70°C에서 10분간 두어 RNA를 변성시킨 후 ice에 5분 이상 식혀 *Echinacea SMT2* GSP1 primer의 결합을 유도하였음. 10x PCR buffer 2.5 µL, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 2.5 µL, 10 mM dNTP mixture 1 µL, 0.1 M DTT 5 µL를 첨가하고 42°C에서 3분간 둔 후, SuperScript<sup>TM</sup> II RT 1 µL를 첨가하였고 42°C에서 50분 동안 반응시켜 5'-RACE cDNA의 합성을 유도하였음. 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA 합성을 종료하였으며 RNase H 1 µL를 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시켜 RNA를 제거하고 SNAP column을 이용하여 cDNA를 분리하였음. cDNA에 TdT를 tailing하기 위해 DEPC-treated water 6.5 µL, 5x tailing buffer 5 µL, 2 mM dCTP 2.5 µL, SNAP-purified cDNA를 섞어준 후, 94°C에서 3분간 반응시키고 ice에 넣어 1분 이상 식혀주었고 1 µL TdT 첨가 후 37°C에서 10분, 65°C에서 10분간 처리하여 dC-tailed cDNA를 확보하였고 5' RACE PCR cDNA로 활용함. *Echinacea SMT2* 5'-RACE cDNA, AUAP, *Echinacea SMT2* GSP1 primer, HotstarTaq PCR premixture kit를 이용한 PCR을 수행하여 약 300 bp의 5'-RACE 산물을 확보하였음 (그림 74B). 실험에 이용된 primer 염기서열은 그림 74A와 같음. 5'-RACE 산물은 PCR 산물 결합 벡터인 pGEM-T easy 벡터에 결합시킨 후 미생물 DH5α strain에 형질전환시켰고 제한효소 절단 및 염기서열 결정법으로 5'-RACE PCR 산물의 유전자 정보를 확인함. 5'-RACE PCR 산물은 translation initiation codon 및 5'-UTR을 지니는 것으로 확인됨 (그림 74C).

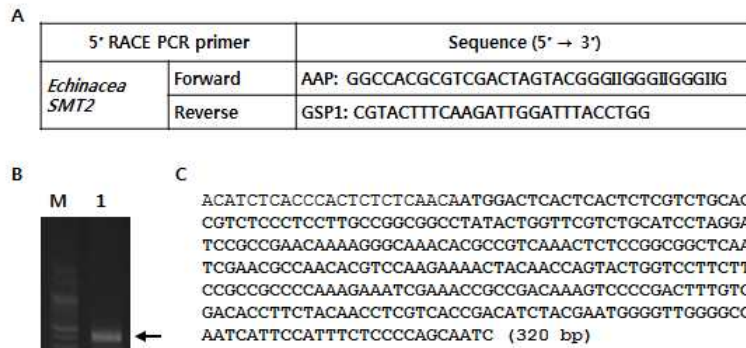


그림 74. *Echinacea SMT2* 5'-RACE PCR primer (A)를 이용한 PCR을 통해 *SMT2* 5'-RACE PCR 산물 (B)을 얻고 염기서열을 분석함 (C) (M, 100 bp DNA ladder; 1, 5'-RACE PCR product of *Echinacea SMT2*).

- Full length *Echinacea SMT2* 유전자 확보

Degenerate PCR, 5', 3'-RACE PCR을 통해 확보한 *Echinacea SMT2* (putative *SMT2*) 유전자의 염기서열 정보를 기초로 하여 전체 유전자를 증폭시킬 수 있는 PCR primer를 디자인하고 PCR을 통해 *Echinacea SMT2* 유전자를 확보하였음. *Echinacea SMT2* 유전자는 1,275 bp이며 23 bp의 5'-UTR, 170 bp의 3'-UTR, 1,083 bp의 amino acid coding region을 지니며 360개의 amino acid를 coding하는 것으로 예측됨 (그림 75).



그림 75. Degenerate PCR, 5', 3'-RACE PCR을 통해 확보한 *Echinacea SMT2* (putative *SMT2*) 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열 정보.



본 연구에서 확보한 *Echinacea SMT2* 유전자의 유전정보는 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 등록하였음 (GeneBank accession number : KJ833770) (그림 76).

```

LOCUS      KJ833770          1274 bp  mRNA  linear  PLN 29-APR-2014
DEFINITION Echinacea purpurea EpSMT2 mRNA for 24-methylenesterol
            C-methyltransferase 2.
ACCESSION  Seq1
VERSION
KEYWORDS
SOURCE     Echinacea purpurea
ORGANISM   Echinacea purpurea
            Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
            Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae;
            Pentapetalae; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae;
            Asteroideae; Heliantheae alliance; Heliantheae; Echinacea.
REFERENCE  1 (bases 1 to 1274)
AUTHORS   Lee, J.-S., Zhao, J., Fu, Y.-Y., Park, J.-H., Lee, Y.H. and Chung, I.S.
TITLE     Echinacea purpurea EpSMT2 mRNA for 24-methylenesterol
            C-methyltransferase 2
JOURNAL   Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 1274)
AUTHORS   Lee, J.-S., Zhao, J., Fu, Y.-Y., Park, J.-H., Lee, Y.H. and Chung, I.S.
TITLE     Direct Submission
JOURNAL   Submitted (29-APR-2014) Department of Genetic Engineering and
            Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University, 1732
            Deogyong-daero, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 446-701, Korea
COMMENT   Bankit Comment: TOTAL # OF SEQs:1.

            ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES   Location/Qualifiers
            source          1..1274
                                /organism="Echinacea purpurea"
                                /mol_type="mRNA"
                                /db_xref="taxon:53751"
            CDS             24..1106
                                /codon_start=1
                                /product="Echinacea purpurea EpSMT2 for 24-methylenesterol
                                C-methyltransferase 2"
                                /translation="MDSLILVCTVSVLLAGLWVFCILGSRAEQKQKHAVKLSGGSIER
                                QHVQENYNQYWSFFRRPKIEIETADKVPDFVDTFYNLVIDIYENGWQSFHFSIPAIPK
                                SNLESTRHEEMAVDLIGVKPQKILDAQCGVGGEMRAIAKHSQCNVNGITINEYQVS
                                RAKAHNKAGLENQCDVVCNFTLQMPFDASFDGAYSI EATCHAPKLEEVYSEIFRVL
                                KPGAMYVSYEWVITELYNGEDFERHVEVIHGIERGDALPGLRSYSDIAEVAKKVGFVV
                                KEKDLAKPPARFVWSRLKMGRIAYWRNHILVTVLEFPGIAPKSTVDVHEMLFKTADYLV
                                TRGGEGTGI FTBMHMLCKKPKQCES"
BASE COUNT 321 a 273 c 344 g 336 t
ORIGIN
1 acatctcacc cactctctca acaatggact cactcactct cgtctgcacc gtctcctccc
61 ttgcccggcg cctatactgg ttgctctgca tcttaggata ccgcgaacaa aagggcaaac
121 acgcccgtcaa actctcoggc ggctcaatcg aacgccaaca cgtccaagaa aactacaacc
181 agtactggtc cttctcccgc cgcgccaaag aatcgaaac ccgcgacaaa gtcccogact
241 ttgtcgacac cttctacaac ctgctcaccc acatctacga atggggttgg ggccaatcat
301 tccattttct cccagcaatc ccaggttaaa ccaatcttga aagtacgaga atccaagaag
361 aaatggcggt agatctgata ggagttaagc ccggtcagaa gattctggat gcgggtgtgt
421 gtgtcggagg tccgatgctg gctattgcaa aacattccgg ttgtaattgt gtoggaaatca
481 cgattaaoga gtaaccaggt agccgagcca aggcgcataa caagaaagcc gggttggaga
541 accaatgcga cgtcgtttgc ggcactttt tacaagatgcc gtttgaatgac gccagtttog
601 acgycgcgta ctcgatogag gccacgtgtc acgycgcgaa gctggaggaa gtgtacagtgt
661 agatttttag ggttttgaaa ccggagcoga tgtaactgtc gtaagagtgg gttacaactgt
721 aattgtacaa cggtaggat ccggaacacg tggaggttat tcaatggatt gagagggtgt
781 atgcgtgccc tggatgag agttattcgg acatgtctga ggtggcgaag aaggtgggtgt
841 ttgagatggt gaaggagaag gatttggcga aaccgccagc cggcccatgt ttgtcaggtt
901 tgaagatggg cgggatgcgc tattggcga atcatatttt ggtaacggtg ctgaaatttt
961 ttgggattgc accgaaaggg actgtggatg ttcattgagat gctgtttaag actgctgatt
1021 atcttactaa agggggggag acaggggatt ttactcctat gcatatgatt ttgtgcaaga
1081 aaccggagaa acagcaagag tcttgatcaa gatgttgag gtttatcacc ggtattgatac
1141 agttgtttct tctatgcact ctgctttat ttaatacatt agtctgtttt atttgtgtgt
1201 ttgatttgct gtgttaaat tattaataac tgattctatc aagttgggaa aaactagatt
1261 ttgcaatcac tagt

```

그림 76. *Echinacea SMT2* 유전자의 유전정보를 NCBI에 등록함 (GeneBank accession number : KJ833770).

○ Degenerate RT-PCR, 5'-, 3'-RACE PCR을 통한 *Echinacea* 난쟁이 표현형 *DET2* 유전자 확보 및 유전자 염기서열 분석

- Degenerate PCR

애기장대 (*Arabidopsis thaliana*), 가지 (*Solanum chacoense*), 옥수수 (*Zea mays*), 목화 (*Gossypium hirsutum*)의 *DET2* 유전자를 비교 분석하여 amino acid 서열에 유사성이 높은 부위 (그림 77)에서 degenerate PCR primer (그림 78A)를 제작하고 본 연구과제의 대상 작물인 *Echinacea*에서 확보한 cDNA를 주형으로 한 PCR 반응을 통해 약 300 bp의 *DET2* degenerate PCR 산물을 확보함 (그림 78B). PCR 산물은 pGEM-T easy 벡터에 클로닝하였고 염기서열 분석을 통해 유전자 염기서열 정보를 확보함 (그림 78C).

```

AtDET2 1  -----MEEIADKTEFFCYCLLTLLIFAGPPTAVLLKFLQAPYGKHNRTGWG-PTVSPPLAWF
ScDET2 1  -----MFSSDENLNFNIFFFILVMARPTFILCQFVTSSYGKHYTSDSGITISPPPLAWA
GhDET2 1  -----MASDQTLFFCYCLLTLYLIALPTWISLHYFLOAPYGKHNRPWG-PTISPPPLAWF
ZmDET2 1  MPDQTSAAAGGAAEDRCLLALYLIISPLIVLALRFHSAPYGKLSRPGWG-FVLPAPLAWF

AtDET2 55  VMESPTLWLTLLFFFCGR--HALNEKSLLESPYLIHYFRTIIYPLRLFRSSFPAGKNG
ScDET2 55  VMESPTLWLTLLVFRGK--NMINELAFLLISPYLFHYINRTIIYPLRLRSR---STKNN
GhDET2 53  LMESPTLWLTFFLFFSCQ--HYNKESLLEISPLFHYFNRTIYPLRLARN--TQTRG
ZmDET2 60  LMESPTLWLPPLMLLRWPPPLSGELAAIPAAIYAFHYVHRTLVHPLRLARLR--RFPAP

AtDET2 113  FPIITIAALAFIFNLLNCYQARWVSHYKIDYELGNWFWRFFVIGLVVFIIGMYINITSDR
ScDET2 110  FPLNIAVTIGFIFNLLNAYIQSRWVSHYAN-YEEDSEFWVREIIGLGLFGSGMIVNINADG
GhDET2 109  FPIVSAFMAFAGFNLLNCYQARWVSHYKIMYXNEELFWWRFLXGLLIFVVGMMVNVXADK
ZmDET2 118  VPLIITAAALGFNLLNAYIQARSFALHAGROASP----FRCLAGLALFAWGRNINBADK

AtDET2 173  TLVRLKKNRGGYVIPRGGWFDLVSCPNYFGEAWEWLGWAVMTWSWAGIGFFLYTCANLF
ScDET2 169  VLLGLKSSQG-GGYKIPRGGLEFDYVSSPNYIGEIMEWLGWALMTWSWAGLAFFLYTCANLV
GhDET2 169  VLVGLKKQGDGGYKIPRGGLEFDLVSCPNYFGEIMEWEGWAVMTWSWVGFVFFLYTCANLM
ZmDET2 174  ELRLKKEAC-GGYKIPRGGWFDLVSCPNYFGETWEWLGFAVVAWTEPAWVFFLYTCANLG

AtDET2 233  PRARASHKWTAKFKEIYPKRKAIVPFY
ScDET2 228  PRAVSNHKWYVEKFGDYPKRKKVVFPLY
GhDET2 229  PRARATRWYLEKFKDDYPRKRAVIPPFI
ZmDET2 233  PRARDHRRWYVQKFGIYPSRKAIVPFY

```

그림 77. 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*), 가지 (*Solanum chacoense*), 옥수수 (*Zea mays*), 목화 (*Gossypium hirsutum*) *SMT2* 유전자의 amino acid 서열 분석 (적선, degenerate PCR primer 제작 부위).





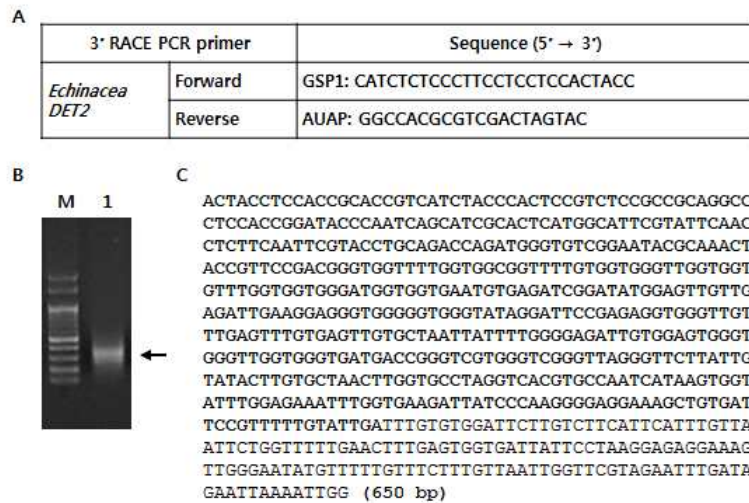


그림 79. *Echinacea DET2* 3'-RACE PCR primer (A)를 이용한 PCR을 통해 *DET2* 3'-RACE PCR 산물 (B)을 얻고 염기서열을 분석함 (C) (M, 100 bp DNA ladder; 1, 3'-RACE PCR product of *Echinacea DET2*).

#### - 5'-RACE PCR

*Echinacea DET2* 유전자의 5'-UTR 및 amino acid coding region의 유전정보를 확보하기 위해 5' RACE PCR을 수행하였음. *Echinacea*에서 추출한 3 µg의 total RNA에 2.5 µL GSP1 primer (1 pmole/µL)을 첨가하고 70°C에서 10분간 두어 RNA를 변성시킨 후 ice에 5분 이상 식혀 *Echinacea DET2* GSP1 primer의 결합을 유도하였음. 10x PCR buffer 2.5 µL, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 2.5 µL, 10 mM dNTP mixture 1 µL, 0.1 M DTT 5 µL를 첨가하고 42°C에서 3분간 둔 후, SuperScript™ II RT 1 µL를 첨가하였고 42°C에서 50분 동안 반응시켜 5'-RACE cDNA의 합성을 유도하였음. 70°C에서 15분간 반응시켜 cDNA 합성을 종료하였으며 RNase H 1 µL를 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시켜 RNA를 제거하고 SNAP column을 이용하여 cDNA를 분리하였음. cDNA에 TdT tailing하기 위해 DEPC-treated water 6.5 µL, 5x tailing buffer 5 µL, 2 mM dCTP 2.5 µL, SNAP-purified cDNA를 섞어준 후, 94°C에서 3분간 반응시키고 ice에 넣어 1분 이상 식혀주었고 1 µL TdT 첨가 후 37°C에서 10분, 65°C에서 10분간 처리하여 dC-tailed cDNA를 확보하였고 5' RACE PCR cDNA로 활용함. *Echinacea DET2* 5'-RACE cDNA, AAP primer, *Echinacea DET2* GSP1 primer, HotstarTaq PCR premixture kit를 이용한 PCR과 첫 번째 PCR 산물, AUAP primer, GSP2 primer를 이용한 nest PCR을 수행하여 약 300 bp의 5'-RACE 산물을 확보하였음 (그림 80B). 5'-RACE 산물은 PCR 산물 결합 벡터인 pGEM-T easy 벡터에 결합시킨 후 미생물 DH5α strain에 형질전환시켰고 제한효소 절단 및 염기서열 결정법으로 5'-RACE PCR 산물의 유전자 정보를 확인함. 5'-RACE PCR 산물은 translation initiation codon 및 5'-UTR을 지니는 것으로 확인됨

(그림 80C).

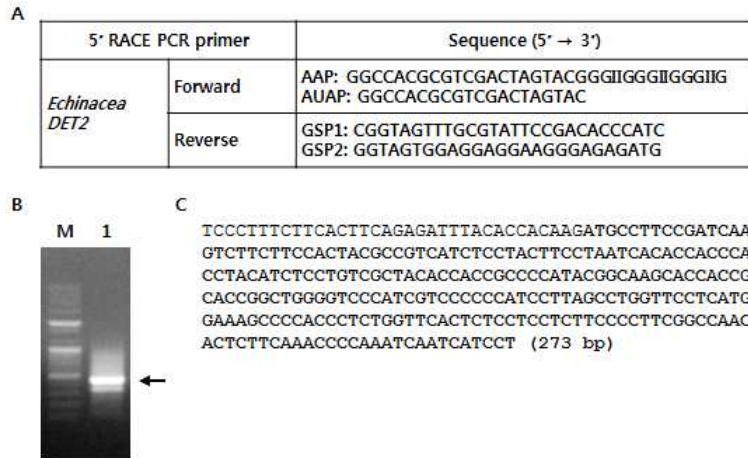


그림 80. *Echinacea DET2* 5'-RACE PCR primer (A)를 이용한 PCR을 통해 *DET2* 5'-RACE PCR 산물 (B)을 얻고 염기서열을 분석함 (C) (M, 100 bp DNA ladder; 1, 5'-RACE PCR product of *Echinacea DET2*).

- Full length *Echinacea DET2* 유전자 확보

Degenerate PCR, 5', 3'-RACE PCR을 통해 확보한 *Echinacea DET2* (putative *DET2*) 유전자의 염기서열 정보를 기초로 하여 전체 유전자를 증폭시킬 수 있는 PCR primer를 디자인하고 PCR을 통해 *Echinacea DET2* 유전자를 확보하였음. *Echinacea DET2* 유전자는 942 bp이며 34 bp의 5'-UTR, 144 bp의 3'-UTR, 765 bp의 amino acid coding region을 지니며 254개의 amino acid를 coding하는 것으로 예측됨 (그림 81).

```

M P S D Q V F F H Y A V I S Y F
1 TCCCTTCTTCACTTCAGAGATTTACACCACAAGATGCCTTCCGATCAA 80
L I T P P T Y I S C R Y T T A P Y G K H H R T G W G
81 CCTAATCACACCACCCACCTACA TCTCCTGTGCTACACCACCGCCCATADGGCAAGCACCACCGCACCGGCTGGGGTC 160
P I V P P S L A W F L M E S P T L W F T L L L L F P F G
161 CCATCTGTCGCCCACTCTTAGCCTGGTTCCTCATGCAAAGCCCAACCCTCTGGTTCCTCTCTCTTCCCTTTCGGC 240
Q H S S N P K S I I L I S P F L L H Y L H R T V I Y P
241 CAACACTCTTCAAACCCCAAATCAATCATCTCATCTCTCCCTTCTCCTCCTCACTACTCCACCGCACCGTCACTACCC 320
L R L R R R P S T G Y P I S I A L M A F V E N L F N
321 ACTCCGCTCCGCCGCAAGCCCTCCACCGGATACC CAA TCA GCA TCG CAC TCA TGG CAT TCG TAT TCA ACC TCT TCA AIT 400
S Y L Q T R W V S E Y A N Y R S D G W F W W R F C G G
401 CGTACCTCGAGACCAGATGGGTC TCG GAA TAC GCA AAC TAC CGT TCC GAC GGG TGG TTT TGG TGG GGG TTT TGT GGT GGG 480
L V V F G G G M V V N V R S D M E L L R L K E G G G G
481 TTGGTGGTGT TGGTGGTGGCATGGTGGTGAATGTGAGATCGCATATGCAATGTTGAGATTCAAGCAGGTGGGGTGG 560
Y R I P R G G L F E F V S C A N Y F G E I V E W V G
561 GTATAAGATTCCGAGAGGTGGTGT TGGACT TGT TCACT TGT TCACT TGT TCACT TGT TCACT TGT TCACT TGT TCACT 640
W V W M T G S W V G L G F L L Y T C A N L V P R S R A
641 GGTGGTGTGATGACCGGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG 720
N H K W Y L E K F G E D Y P K G R K A V I P F L Y *
721 AATCA TAA GTG GAT TTT GCA GAA AT TGG TGA A G A TTA TCC CAAGGGGAGGAAAGC TGT GAT TCC GTT TTT GTA TTT GAT 800
801 TGTGTGATTTCTCTCTCA TCA TCA TTTGT TAA TTTCTGG TTTTGAAC TTTGAG TGGTGA TTA TTTCTAAGGAGAGGAAAG 880
881 TTGGGAATATGTTT TGT TTTCTT TGT TAA TTTGG TTTCTG AATTTG A TAGAAT TAAAT TGG 942

```

그림 81. Degenerate PCR, 5', 3'-RACE PCR을 통해 확보한 *Echinacea DET2* (putative *DET2*) 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열 정보.

본 연구에서 확보한 *Echinacea SMT2* 유전자의 유전정보는 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 등록하였음 (GeneBank accession number : KJ833769) (그림 82).

```

LOCUS       KJ833769             943 bp    mRNA    linear   PLN 29-APR-2014
DEFINITION Echinacea purpurea EpDET2 mRNA for steroid 5-alpha-reductase.
ACCESSION  Seq1
VERSION
KEYWORDS
SOURCE     Echinacea purpurea
ORGANISM   Echinacea purpurea
            Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
            Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledons; Gunneridae;
            Pentapetales; asterids; campanulids; Asterales; Asteraceae;
            Asteroideae; Heliantheae alliance; Heliantheae; Echinacea.
REFERENCE  1 (bases 1 to 943)
AUTHORS   Park,J.-H., Lee,J.-S., Zhao,J., Fu,Y.-Y., Lee,Y.H. and Chung,I.S.
TITLE     Echinacea purpurea EpDET2 mRNA for steroid 5-alpha-reductase
JOURNAL   Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 943)
AUTHORS   Park,J.-H., Lee,J.-S., Zhao,J., Fu,Y.-Y., Lee,Y.H. and Chung,I.S.
TITLE     Direct Submission
JOURNAL   Submitted (29-APR-2014) Department of Genetic Engineering and
            Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University, 1732
            Deogyong-daero, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 446-701, Korea
COMMENT   Bankit Comment: TOTAL # OF SEQs:1.

            ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES   Location/Qualifiers
            source          1..943
                        /organism="Echinacea purpurea"
                        /mol_type="mRNA"
                        /db_xref="taxon:53751"
            CDS             35..799
                        /codon_start=1
                        /product="Echinacea purpurea EpDET2 for steroid
                        5-alpha-reductase"
                        /translation="MPSDQVFFHYAVISYFLITPPTYISCRYTTAPYGGKHHRTGWGPI
                        VPPSLAWFLMESPTLWFTLLFPFGQHSSNPKSILISPFLLHYLHRIVYPLRLRR
                        PSTGYPLISIALMAFVNLFNLSYLQTRWVSEYANYRSDGWFWWRFCGGLVVEGGGMVNI
                        VRSIMELRLRKEGGGYRI PRGELFEFVSCANYFGEIWEVWGWVMTGSWVGLGFLLY
                        TCANLVPRS RANHKWYLEKFGEDYPKGRKAVI PFLY"
BASE COUNT 185 a   228 c   236 g   294 t
ORIGIN
1 tccctttctt cacttcagag atttacacca caagatgcct tccgatcaag tcttcttcca
61 ctacgcgcgc atctcctact tctaatcac accaccacc tacatctct gtgcgtacac
121 caccgcccc tacgycaaag accaccgcac cggctggggt cccatgtcc ccccatcctt
181 agcctgggtc ctcatggaaa gccccaccct ctggttcact ctctctctc tccccttgg
241 ccaacctct tcaaacccca aatcaatcat cctcatctc cctctctcc tccactact
301 ccacgcacc gtcactacc cactccgtct ccgccgagg cctccaccg gataccacc
361 cagcatcgca ctcatggcat tegtattcaa cctctcaat tegtacctg agaccagatg
421 ggtgtcggaa tacgcaaac accgttccga cgggtggtt tggggcggg tttgtggtg
481 gttggtggg tttggtggg ggtggtggt gaatgtgaga tgggatatg agtgtgtgag
541 attgaaggag ggtgggggt ggtataggat tccgagaggt ggttgtttg agtgtgtgag
601 ttgtgcta tttttgggg agattgtgga gtgggtggg tgggtggtg tgaccgggtc
661 gtgggtcggg ttagggttct tattgtatc ttgtgctaac ttgggtccta ggtcacgtgc
721 caatcataag tggattttgg agaatttgg tgaagattat cccaagggga ggaagctgt
781 gattccgtt ttgtattgat ttgtgtggat tctgtcttc attcattgt taattctggt
841 ttttgaact tgaatggta ttattcctaa ggagagaaa gttgggaata tgtttttgt
901 tctttgtaa ttggtcgtg gaatttgata gaattaaat tgg
//

```

그림 82. *Echinacea DET2* 유전자의 유전정보를 NCBI에 등록함 (GeneBank accession number : KJ833769).



*Echinacea* 식물체에서 확보된 *DWF1*, *DWF4*, *SMT2*, *DET2* 유전자 계통 발생의 분석을 수행함 (그림 83).

- *DWF1* 단백질은 백일홍 *ZeDWF1*, 완두 *PsDWF1* 단백질과 높은 유사성을 지니며 5-sterol-24-reductase 활성을 지닐 것으로 예측됨.
- *DWF4* 단백질은 백일홍 *ZeCYP90B1*, 애기장대 *AtCYP90B1* 단백질과 높은 유사성을 지니며 steroid 22-alpha-hydroxylase 활성을 지닐 것으로 예측됨.
- *SMT2* 단백질은 올리브 *OeSMT2*, 애기장대 *AtSMT2*, 목화 *GhSMT2* 단백질과 높은 유사성을 지니며 24-methylenesterol C-methyltransferase 활성을 지닐 것으로 예측됨.
- *DET2* 단백질은 가지 *ScDET2*, 목화 *GhDET2* 단백질과 높은 유사성을 지니며 steroid 5-alpha-reductase 활성을 지닐 것으로 예측됨.

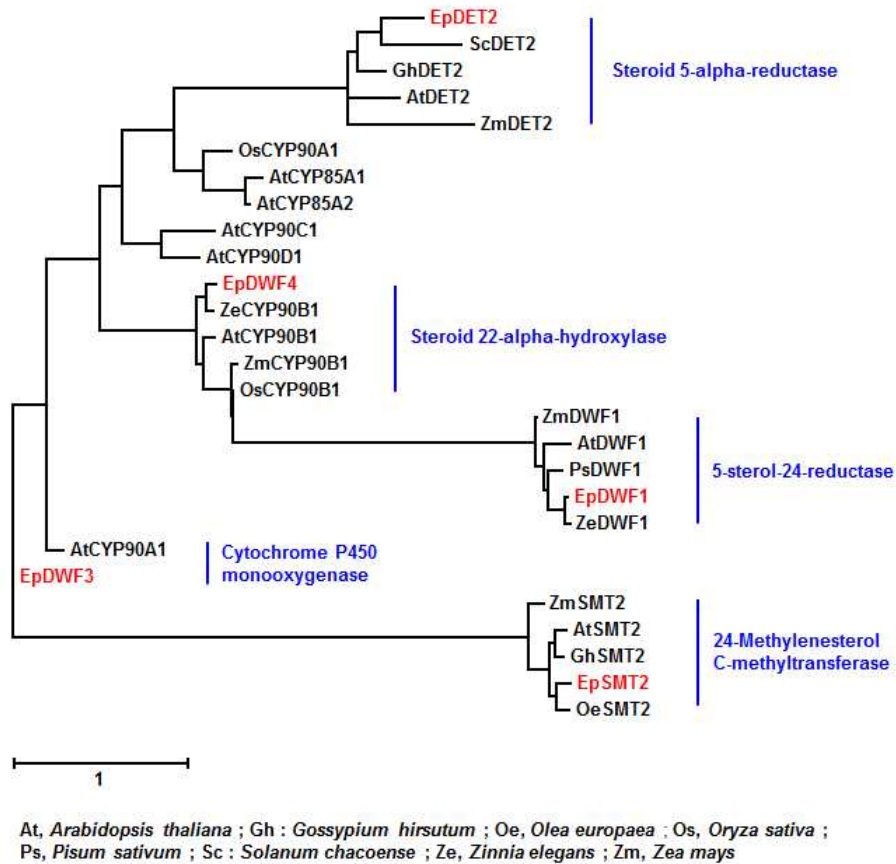


그림 83. *Echinacea* *DWF1*, *DWF4*, *SMT2*, *DET2*의 phylogenetic analysis.



3. 미생물 단백질 발현시스템을 통한 재조합 *Echinacea* BR 생합성 관련 단백질 발현 및 분리 정제

○ *Echinacea* BR 생합성 관련 단백질 발현 미생물 발현시스템 구축

*Echinacea* DWF1, DWF4, SMT2, DET2 단백질을 미생물 세포에서 발현시키기 위해 EcoRI, XhoI 제한효소 염기서열을 지니는 PCR primer (그림 84)를 이용한 PCR 방법으로 각각 증폭시키고 pGEM-T easy 벡터에 클로닝한 후 염기서열 분석을 통해 확인함. pGEM-T easy 벡터에 클로닝된 *EpDWF1*, *EpDWF4*, *EpSMT2*, *EpDET2* 유전자를 EcoRI, XhoI 제한효소로 절단하여 확보하고 미생물 발현벡터 pET-28a의 EcoRI, XhoI 제한효소 위치에 삽입하여 pET-28a/EpDWF1, pET-28a/EpDWF4, pET-28a/EpSMT2, pET-28a/EpDET2 벡터를 확보함 (그림 85).

PCR primer		Sequence (5' → 3')
<i>EpDWF1</i>	Forward	GAATTCATGTCTGATCTTGAAGCTCCATTGGTCCGTCCG
	Reverse	CTCGAGATCAGTTTCAGCATACGGGACTTCAAC
<i>EpDWF4</i>	Forward	GAATTCATGTCTGATCTTGAAGTCTTCTCTCCATGTATCTTTCCTGATCC
	Reverse	CTCGAGACACATTTGTTTTCGGTGACAGACTTTG
<i>EpSMT2</i>	Forward	GAATTCATGGACTCACTCACTCTCGTCTGCACCGTC
	Reverse	CTCGAGAGACTCTTGTCTGTTTCTCCGG
<i>EpDET2</i>	Forward	GAATTCATGCCTTCCGATCAAGTCTTCTTCC
	Reverse	CTCGAGATACAAAACGGAATCACAGC

그림 84. *Echinacea* DWF1, DWF4, SMT2, DET2 유전자를 증폭하기 위한 PCR primer의 염기서열.

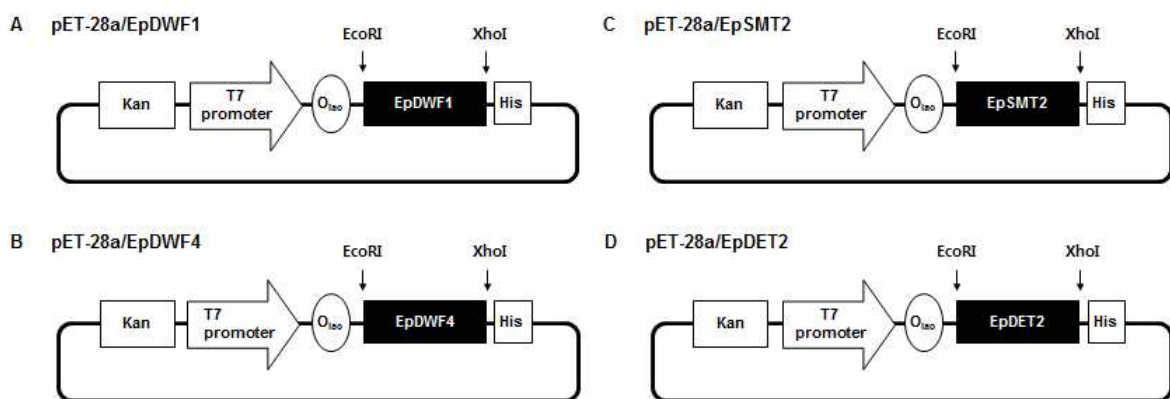


그림 85. *Echinacea* DWF1, DWF4, SMT2, DET2 단백질을 발현시키기 위한 미생물 pET-28a/EpDWF1, pET-28a/EpDWF4, pET-28a/EpSMT2, pET-28a/EpDET2 벡터의 모식도.

○ 미생물 세포에서 *Echinacea* DWF4, SMT2 단백질의 발현

pET-28a/EpDWF4, pET-28a/EpSMT2 벡터를 *E. coli* BL21(DE3) 세포에 형질전환시키고 50 µg/mL kanamycin이 포함된 LB 배지에서 선별하여 pET-28a/EpDWF4, pET-28a/EpSMT2 벡터가 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3) 세포주를 확보하고 재조합 DWF4, SMT2 단백질 발현에 이용함. *E. coli* BL21(DE3) 세포를 OD<sub>600</sub>가 0.6이 될 때까지 배양을 한 후, IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)를 최종 농도 1 mM이 되도록 첨가하고 3시간 동안 37°C에서 배양함. 세포 회수 후 PBS (pH 7.4)로 현탁하고 단백질 추출물을 확보하였으며 SDS-PAGE 후 Coomassie brilliant blue 염색 및 anti-His 항체를 이용한 Western blot 분석을 통해 재조합 EpDWF4 및 EpSMT2 단백질의 발현을 확인함 (그림 86). 미생물 세포에서 발현된 재조합 EpDWF4, EpSMT2 단백질은 각각 56, 47 kDa 이었고 *in vitro* 활성 측정을 위한 분리, 정제 연구를 진행함.

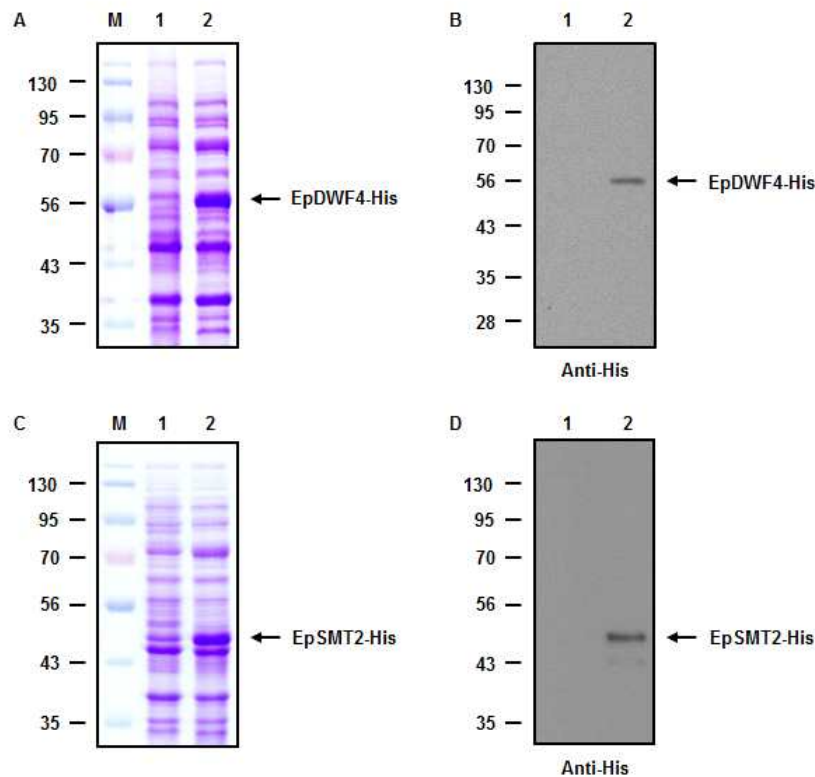


그림 85. pET-28a/EpDWF4, pET-28a/EpSMT2 벡터가 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3) 세포에서 *Echinacea* DWF4, SMT2 단백질의 발현을 Coomassie brilliant blue 염색 (A, C) 및 anti-His 항체를 이용한 Western blot 분석 (B, D) 을 통해 확인함 (M, prestained protein marker; 1, *E. coli* BL21(DE3) cells transformed with pET-28a; 2, *E. coli* BL21(DE3) cells transformed with pET-28a/EpDWF4 or pET-28a/SMT2).

#### 4. *in vitro* 활성 측정

미생물에서 발현시킨 *Echinacea* DWF4, SMT2 단백질의 *in vitro* 활성을 측정하기 pET-28a, pET-28a/EpDWF4, pET-28a/EpSMT2 벡터가 형질전환된 재조합 *E. coli* BL21(DE3) 세포에서 단백질 추출물을 확보함. 50 mL의 LB 배지에 pET-28a, pET-28a/EpDWF4, pET-28a/EpSMT2 형질전환된 재조합 *E. coli* BL21(DE3) 세포를 OD<sub>600</sub>가 0.6이 될 때까지 배양한 후, 0.25 mM IPTG를 첨가하고 20°C에서 18시간 동안 현탁배양하였음. 원심분리 후 세포를 회수하고 5 mL의 PBS (pH 7.4)에 현탁하였으며 sonication하여 세포를 파쇄한 후 원심분리하여 단백질 추출물을 확보함. 단백질 추출물 1 mg을 1 mg의 cholesterol 또는 campesterol과 혼합하고 실온에서 3시간 동안 반응한 후 1 M KOH/EtOH 용매 1 mL을 첨가하여 1시간 동안 saponincation 반응을 진행하였음. 반응물에 동량의 *n*-hexane을 혼합한 후 hexane 분획물을 확보하였고 농축 후 pyridine 용매에 용해시켰으며 BSTFA를 첨가하고 80°C에서 1시간 동안 TMS 반응을 유발시켜 GC (Shimadzu GC-MS-QP2010) 분석을 위한 추출물 시료를 확보하였음. 그림 86와 87에서와 같이 pET-28a/EpDWF4 및 pET-28a/EpSMT2 벡터가 형질전환된 재조합 *E. coli* BL21(DE3) 세포 단백질 추출물이 첨가된 경우 대조군과 다른 GC spectrum을 보였으며 이는 미생물에서 발현된 재조합 DWF4, SMT2 단백질의 활성에 의해 유도되는 것으로 생각되며 변형된 화합물의 종류 및 함량 분석을 위한 분석 연구를 진행함.

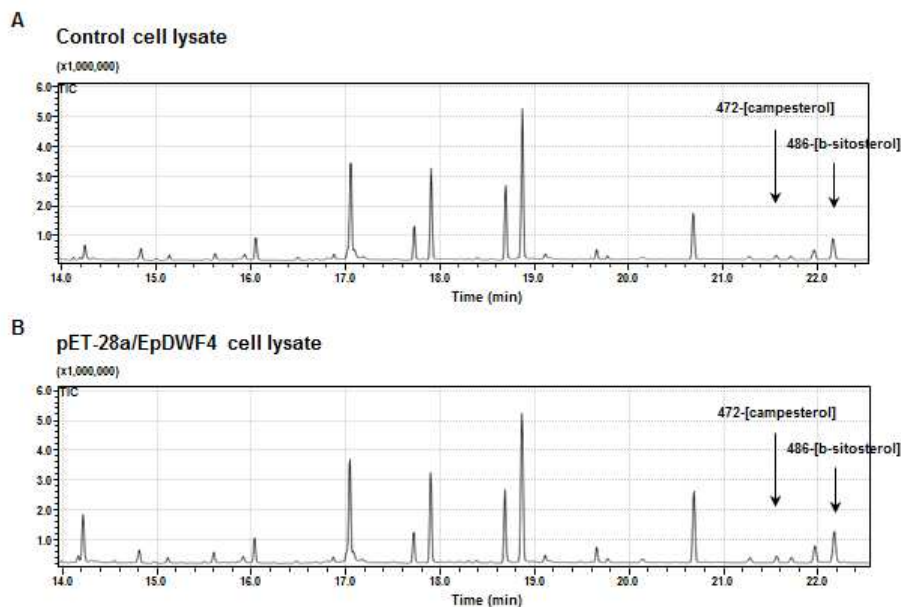


그림 86. pET-28a (A) 및 pET-28a/EpDWF4 (B) 벡터가 형질전환된 미생물 세포에서 단백질 추출물을 확보하고 cholesterol과 반응 후 spectrum 변화를 GC 분석을 통해 확인함.

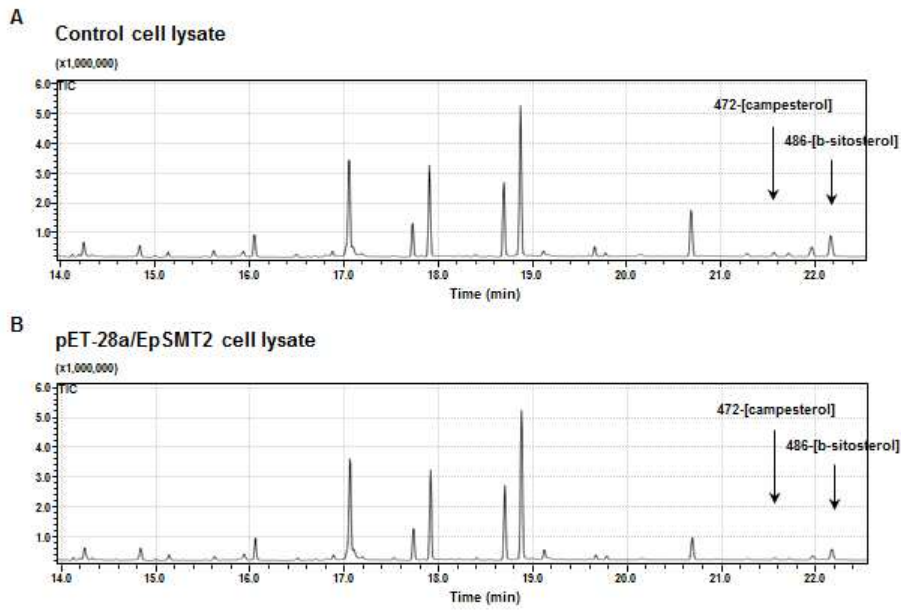


그림 87. pET-28a (A) 및 pET-28a/EpDWF4 (B) 벡터가 형질전환된 미생물 세포에서 단백질 추출물을 확보하고 campesterol과 반응 후 spectrum 변화를 GC 분석을 통해 확인함.

## 5. *DWF3* 유전자 발현 억제 관상작물 형질전환체의 환경위해성 평가심사서 작성 의뢰

### ○ *DWF3* 유전자의 발현이 억제된 관상작물 난쟁이 형질전환체의 유전정보 분석

제2세부과제에서 확보한 *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체 (T0-1 ~ T0-109)에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *Echinacea* genomic DNA에 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음. 형질전환 개체의 잎 (~ 1 g)을 LN<sub>2</sub>와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하였고 GenElute Plant Genomic DNA Prep Mini Kit (Sigma)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였음. 250 ng genomic DNA, pFGC9541/shEpDWF3 벡터의 CHSA intron 및 *Echinacea* 18s rRNA 유전자에 특이적으로 결합하는 primer를 이용한 PCR을 수행하고 CHSA intron PCR 산물의 존재를 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음 (그림 88-98).

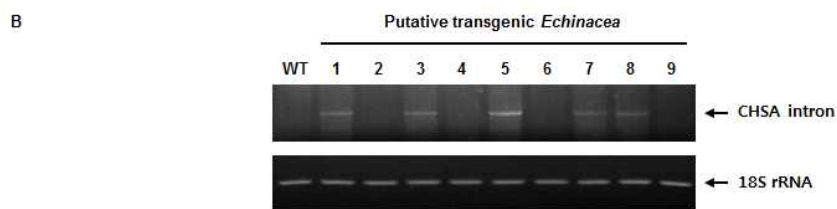
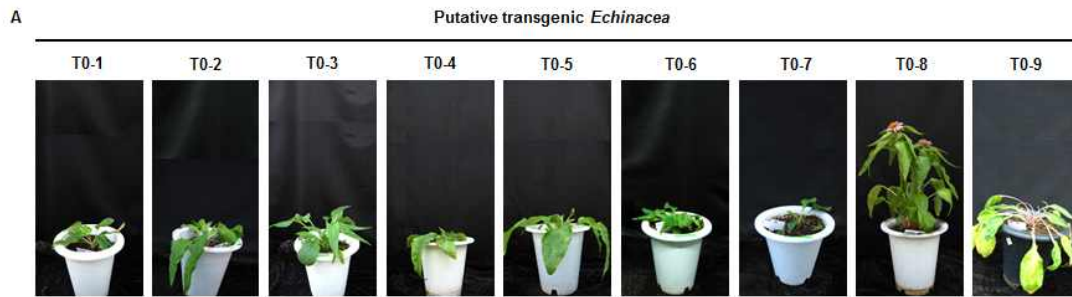


그림 88. 토양에 순화 중인 형질전환 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-1 ~ T0-9) (B) CHSA intron, 18s rRNA genomic DNA PCR 산물.

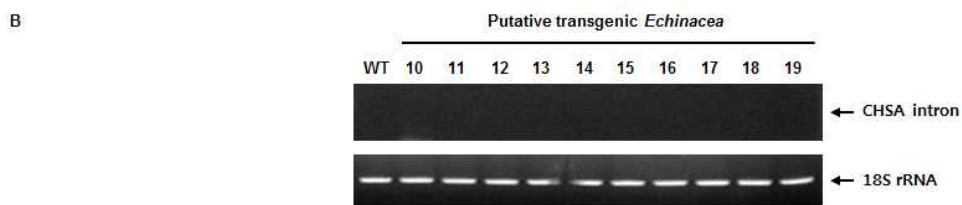
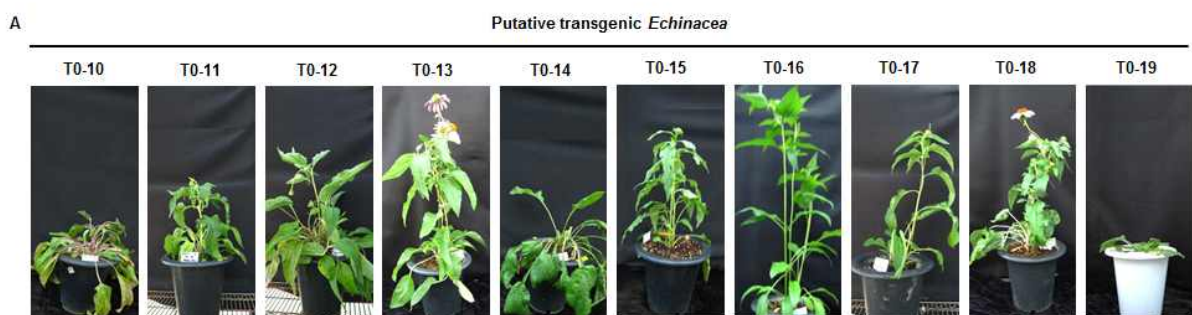


그림 89. 토양에 순화 중인 형질전환 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-10 ~ T0-19) (B) CHSA intron, 18s rRNA genomic DNA PCR 산물.



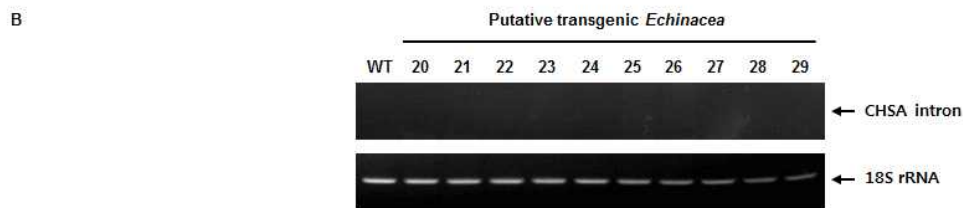
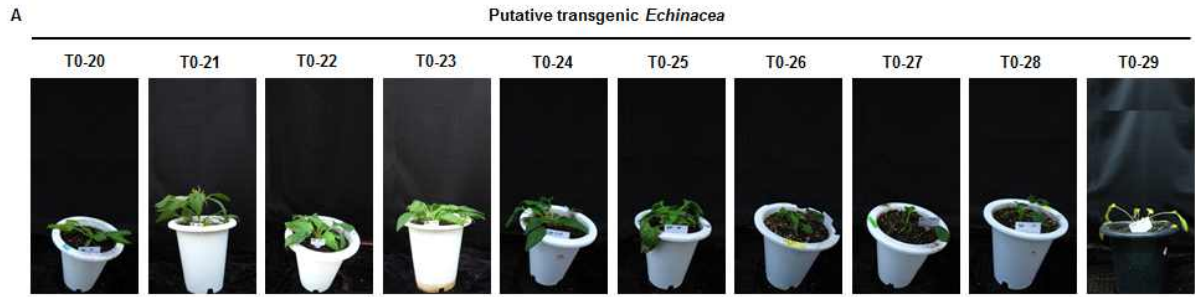


그림 90. 토양에 순화 중인 형질전환 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-20 ~ T0-29) (B) CHSA intron, 18s rRNA genomic DNA PCR 산물.

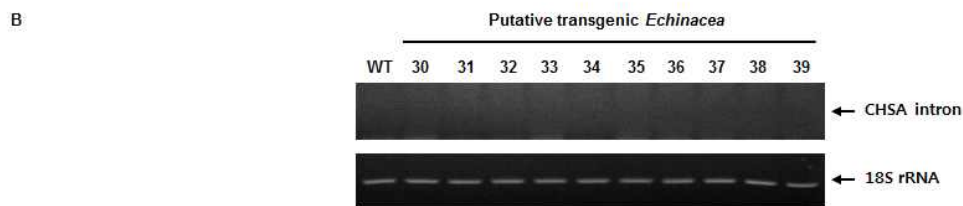
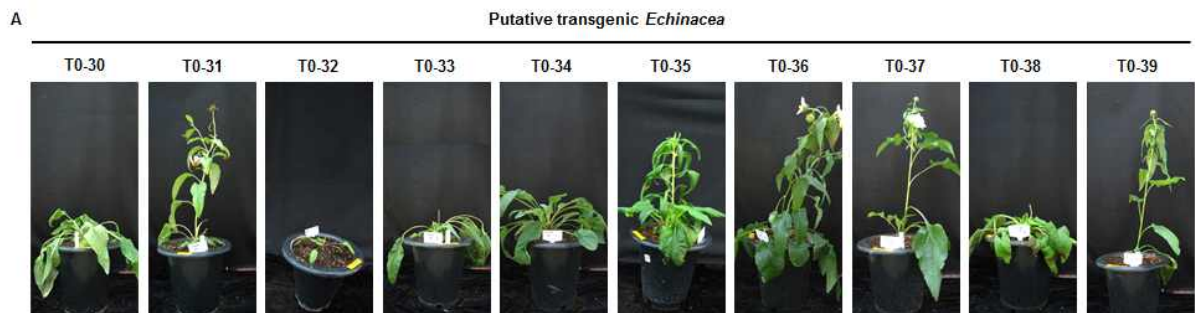


그림 91. 토양에 순화 중인 형질전환 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-30 ~ T0-39) (B) CHSA intron, 18s rRNA genomic DNA PCR 산물.

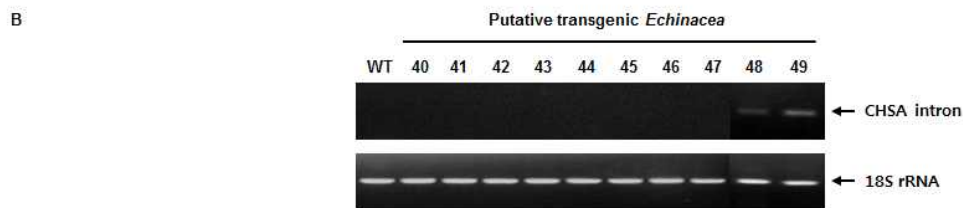
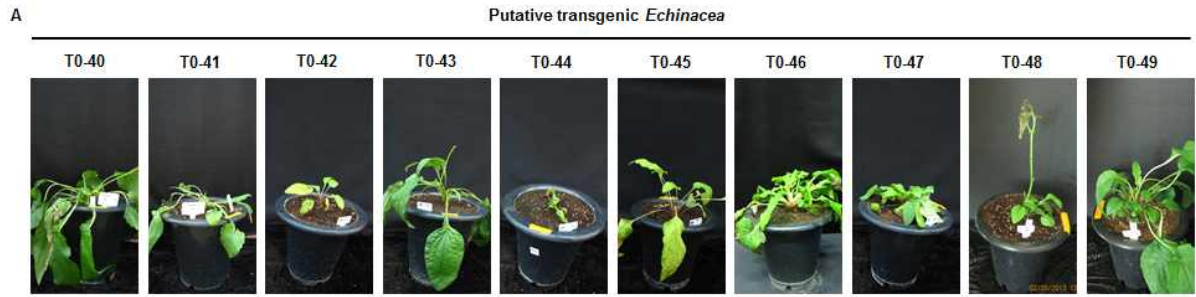


그림 92. 토양에 순화 중인 형질전환 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-40 ~ T0-49) (B) CHSA intron, 18s rRNA genomic DNA PCR 산물.

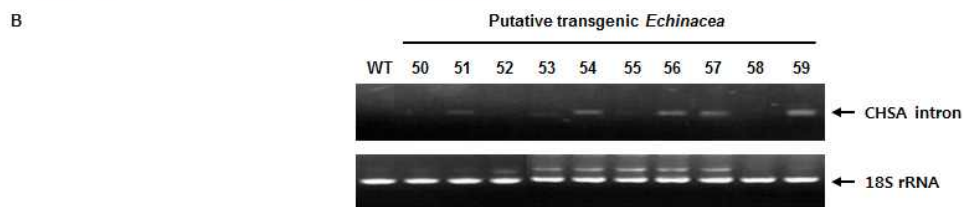
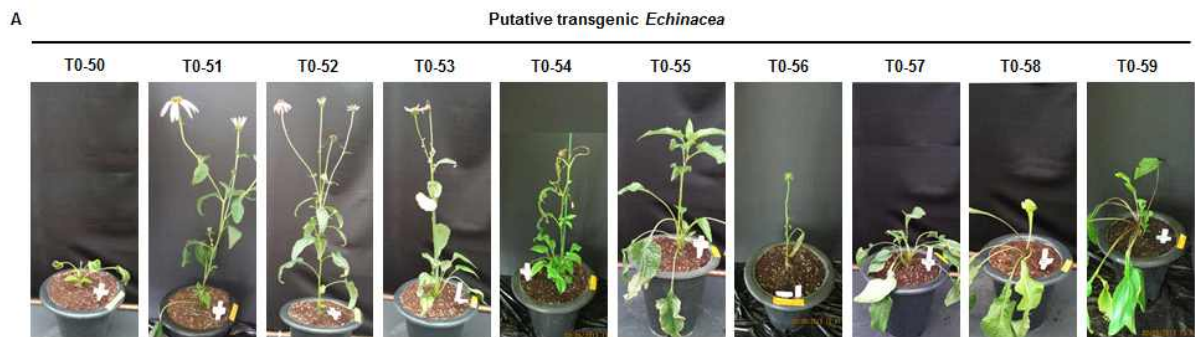


그림 93. 토양에 순화 중인 형질전환 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-50 ~ T0-59) (B) CHSA intron, 18s rRNA genomic DNA PCR 산물.

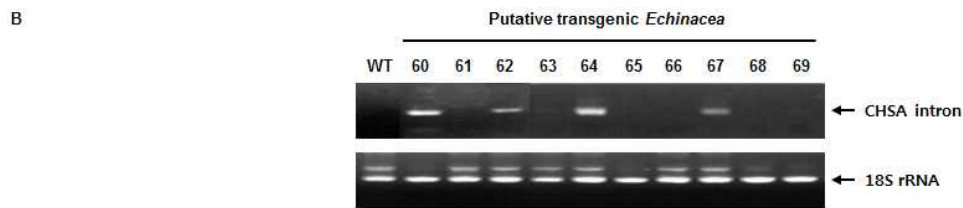
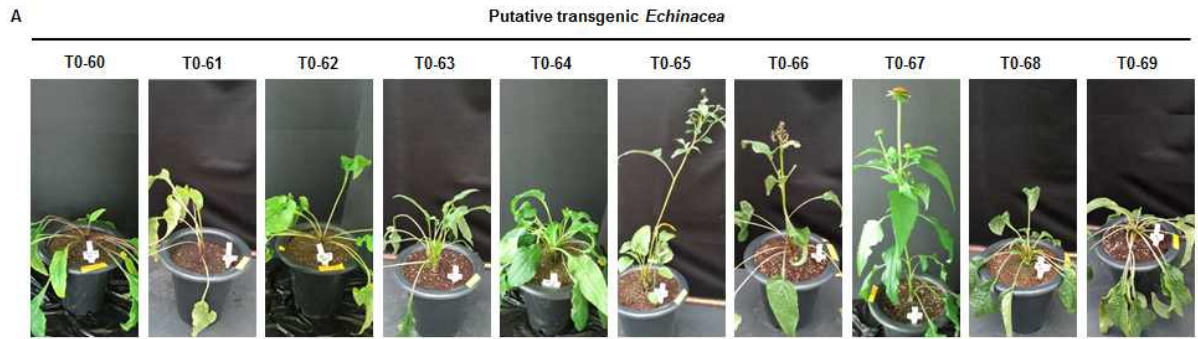


그림 94. 토양에 순화 중인 형질전환 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-60 ~ T0-69) (B) CHSA intron, 18s rRNA genomic DNA PCR 산물.

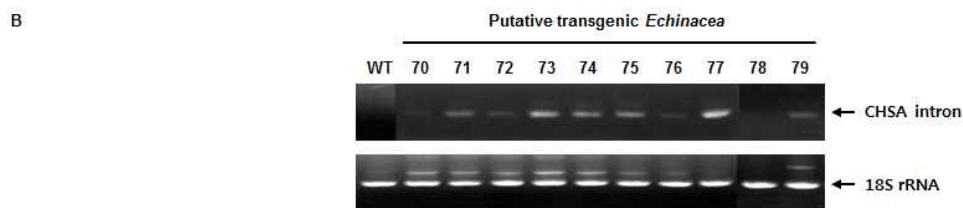
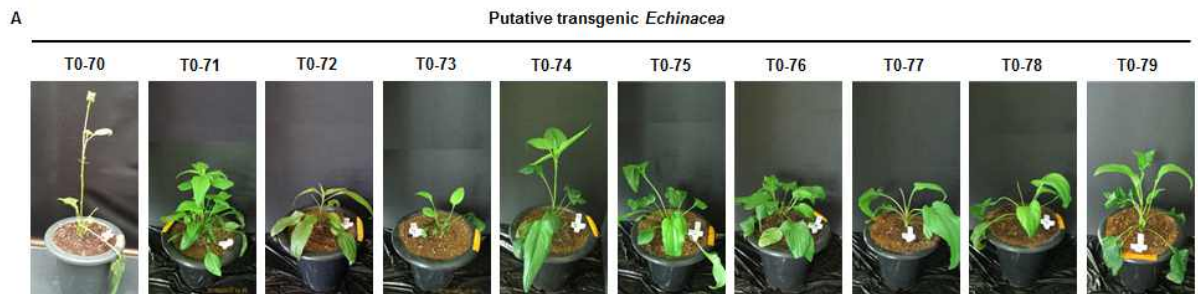


그림 95. 토양에 순화 중인 형질전환 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-70 ~ T0-79) (B) CHSA intron, 18s rRNA genomic DNA PCR 산물.

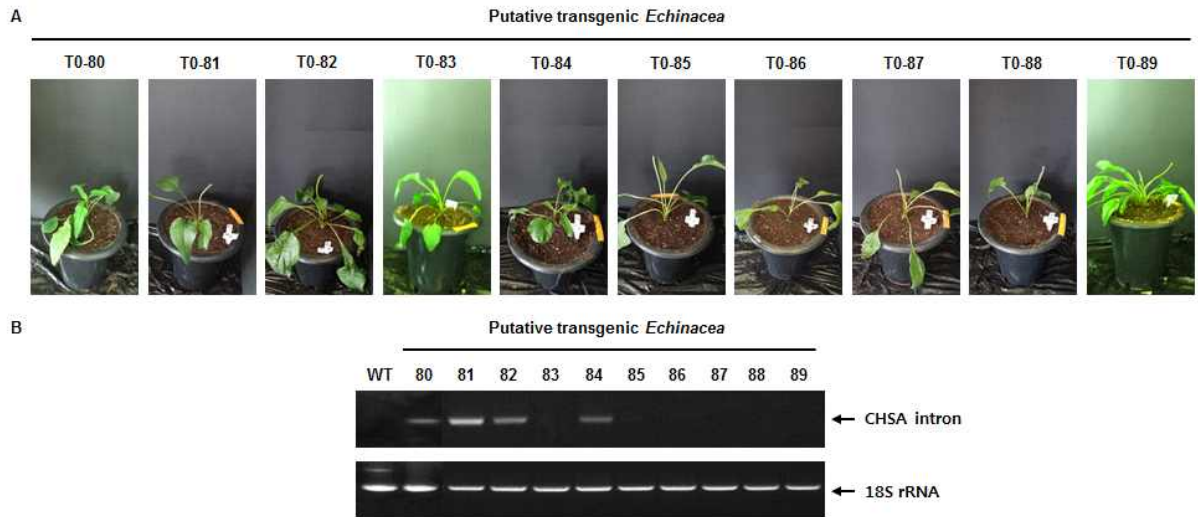


그림 96. 토양에 순화 중인 형질전환 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-80 ~ T0-89) (B) CHSA intron, 18s rRNA genomic DNA PCR 산물.

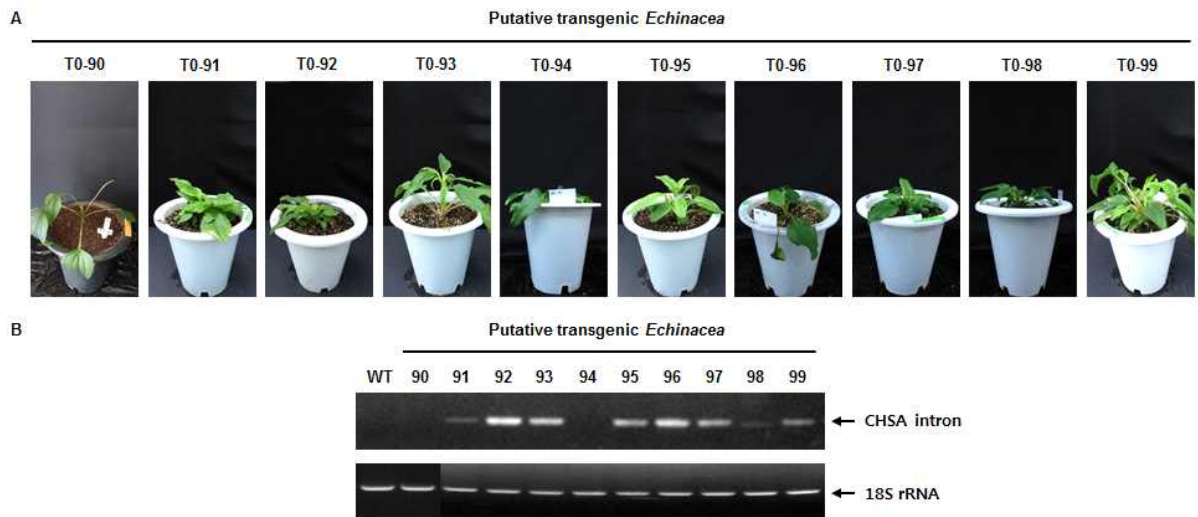


그림 97. 토양에 순화 중인 형질전환 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-90 ~ T0-99) (B) CHSA intron, 18s rRNA genomic DNA PCR 산물.



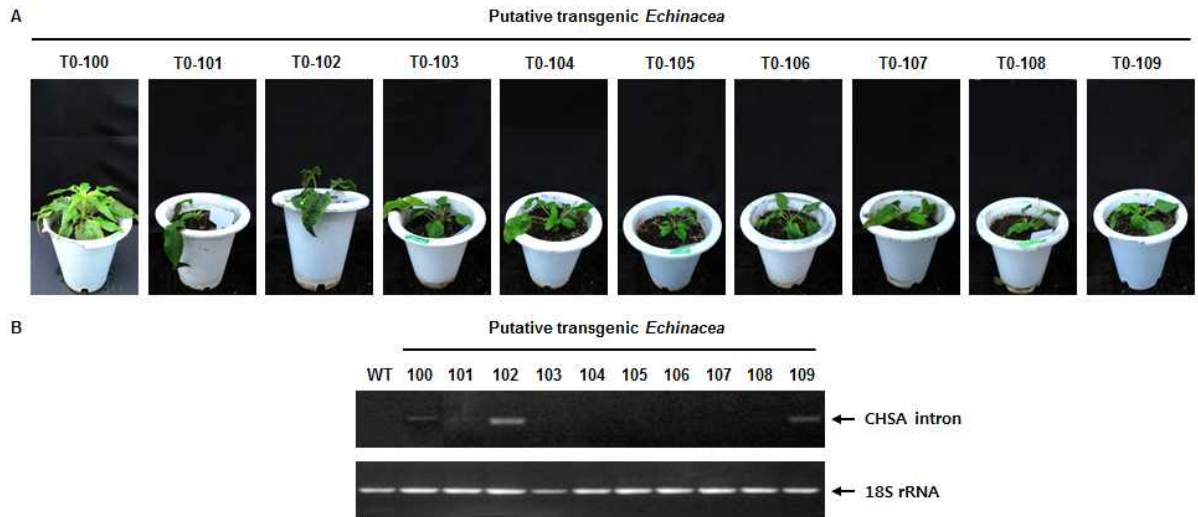


그림 98. 토양에 순화 중인 형질전환 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-100 ~ T0-109) (B) CHSA intron, 18s rRNA genomic DNA PCR 산물.

○ *DWF3* 유전자의 발현이 억제된 관상작물 난쟁이 형질전환체의 표현형 변화

*EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 유전정보 분석에서 *EpDWF3* RNAi 발현시스템이 도입되고 줄기 및 꽃을 형성한 개체의 초장 및 꽃의 크기는 야생형 wild-type 대조군에 비해 감소하는 것으로 나타남. 대조군 wild-type의 초장 및 꽃의 평균적인 크기는 약 100 cm, 9 cm 이었고 개체에 따라 약간의 차이를 보이기는 하지만 T0-8 개체의 경우 약 38 cm의 초장, 5 cm의 꽃의 크기를 보였음 (그림 99).



그림 99. 야생형 wild-type 대조군과 *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 T0-8 개체의 표현형 비교.



○ 환경위해성 평가심사서 작성 의뢰

제2세부과제에서 확보한 *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 유전정보 분석 결과 총 109 개체 중 *EpDWF3* RNAi 발현시스템이 도입된 개체는 43 개체 (T0-1, 3, 5, 7, 8, 48, 49, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 59, 60, 62, 64, 67, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 80, 81, 82, 84, 91, 92, 93, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 109)이었고 이중 11 개체 (T0-8, 48, 51, 53, 54, 55, 56, 67, 70, 71, 74)에서 줄기 및 꽃을 형성하는 성장을 보였음 (표 13). 이중 9 개체 (T0-8, 48, 51, 53, 54, 55, 67, 70, 71)의 증식을 위한 영양 번식을 제1협동과제 연구팀에 의뢰하여 진행하였고 추 후 환경위해성 평가심사서 작성 의뢰를 위한 작물로 사용할 것임.

표 13. 형질전환 *Echinacea* 개체의 유전정보 분석

형질전환 <i>Echinacea</i> 개체	<i>EpDWF3</i> RNAi 발현시스템 도입 유무	식물체 성장 정도 (줄기 형성 유무)	영양번식 시도 여부
T0-1	도입	-	-
T0-2	-	-	-
T0-3	도입	-	-
T0-4	-	-	-
T0-5	도입	-	-
T0-6	-	-	-
T0-7	도입	-	-
<b>T0-8</b>	<b>도입</b>	<b>줄기 형성</b>	<b>시도</b>
T0-9	-	-	-
T0-10	-	-	-
T0-11	-	줄기 형성	-
T0-12	-	줄기 형성	-
T0-13	-	줄기 형성	-
T0-14	-	-	-
T0-15	-	줄기 형성	-
T0-16	-	줄기 형성	-
T0-17	-	줄기 형성	-
T0-18	-	줄기 형성	-
T0-19	-	-	-
T0-20	-	-	-
T0-21	-	-	-
T0-22	-	-	-
T0-23	-	-	-
T0-24	-	-	-
T0-25	-	-	-
T0-26	-	-	-
T0-27	-	-	-

T0-28	-	-	-
T0-29	-	-	-
T0-30	-	-	-
T0-31	-	줄기 형성	-
T0-32	-	-	-
T0-33	-	-	-
T0-34	-	-	-
T0-35	-	줄기 형성	-
T0-36	-	줄기 형성	-
T0-37	-	줄기 형성	-
T0-38	-	-	-
T0-39	-	줄기 형성	-
T0-40	-	-	-
T0-41	-	-	-
T0-42	-	-	-
T0-43	-	-	-
T0-44	-	-	-
T0-45	-	-	-
T0-46	-	-	-
T0-47	-	-	-
<b>T0-48</b>	<b>도입</b>	<b>줄기 형성</b>	<b>시도</b>
T0-49	도입	-	-
T0-50	-	-	-
<b>T0-51</b>	<b>도입</b>	<b>줄기 형성</b>	<b>시도</b>
T0-52	-	줄기 형성	-
<b>T0-53</b>	<b>도입</b>	<b>줄기 형성</b>	<b>시도</b>
<b>T0-54</b>	<b>도입</b>	<b>줄기 형성</b>	<b>시도</b>
<b>T0-55</b>	<b>도입</b>	<b>줄기 형성</b>	<b>시도</b>
T0-56	도입	줄기 형성	- (고사)
T0-57	도입	-	-
T0-58	-	-	-
T0-59	도입	-	-
T0-60	도입	-	-
T0-61	-	-	-
T0-62	도입	-	-
T0-63	-	-	-
T0-64	도입	-	-
T0-65	-	줄기 형성	-
T0-66	-	줄기 형성	-
<b>T0-67</b>	<b>도입</b>	<b>줄기 형성</b>	<b>시도</b>
T0-68	-	-	-
T0-69	-	-	-
<b>T0-70</b>	<b>도입</b>	<b>줄기 형성</b>	<b>시도</b>
<b>T0-71</b>	<b>도입</b>	<b>줄기 형성</b>	<b>시도</b>
T0-72	도입	-	-

T0-73	도입	-	-
T0-74	도입	줄기 형성	보류
T0-75	도입	-	-
T0-76	도입	-	-
T0-77	도입	-	-
T0-78	-	-	-
T0-79	도입	-	-
T0-80	도입	-	-
T0-81	도입	-	-
T0-82	도입	-	-
T0-83	-	-	-
T0-84	도입	-	-
T0-85	-	-	-
T0-86	-	-	-
T0-87	-	-	-
T0-88	-	-	-
T0-89	-	-	-
T0-90	-	-	-
T0-91	도입	-	-
T0-92	도입	-	-
T0-93	도입	-	-
T0-94	-	-	-
T0-95	도입	-	-
T0-96	도입	-	-
T0-97	도입	-	-
T0-98	도입	-	-
T0-99	도입	-	-
T0-100	도입	-	-
T0-101	도입	-	-
T0-102	도입	-	-
T0-103	-	-	-
T0-104	-	-	-
T0-105	-	-	-
T0-106	-	-	-
T0-107	-	-	-
T0-108	-	-	-
T0-109	도입	-	-
계	43/109	11/43	9/11

### 3-3-2. 제2세부과제 : 관상작물 형질전환 체계 확립 및 난쟁이 관상작물 개발

#### 1. *Coreopsis*의 재조합 *Agrobacterium*을 이용한 *DWF3* RNAi 벡터시스템 형질전환

*Coreopsis rosea*의 형질전환은 전년도에 확립된 체계를 이용해 실시하였음. 재조합 pFGC9541/shEpDWF3 벡터를 포함하는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 LB 액체배지에 48시간 배양 후, 액체 MS 배지를 사용하여 현탁액 OD<sub>600</sub> 값이 0.7-0.8 정도의 농도로 조정된 *Agrobacterium* 현탁액을 접종에 사용하였음. 기내 배양을 통해 신선하게 유지되고 있는 *Coreopsis* 녹색 줄기를 마디를 포함하여 약 0.3 - 0.5 cm 정도의 절편체가 되도록 절단하여 이용하였음. 이 절편체들을 약 2-3분간 *Agrobacterium* 용액에 접종시킨 후, 멸균된 여과지에서 과다한 용액을 제거하고, BAP 2.0 mg/L + NAA 0.09 mg/L가 첨가된 MS 배지에서 3일간 공동배양하였음. 공동배양을 마친 절편체는 300 mg/L cefotaxime이 첨가된 액체 MS 배지로 절편체 표면에 묻어있는 재조합 *Agrobacterium*을 깨끗이 세척하였고 그 후 MS 배지에 BAP 2.0 mg/L, NAA 0.09 mg/L, PPT 2 mg/L, cefotaxime 300 mg/L이 함유된 1차 선발배지에 치상하여 신초를 유기하였음. 신초를 유기하기까지 약 2-3주일 정도가 소요 되었으며, 뿌리가 발생하기까지는 2-3주 정도가 더 소요되었음.

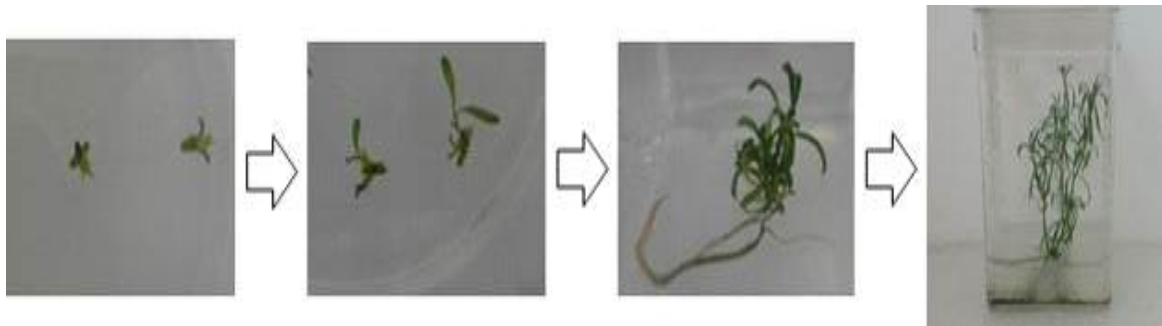


그림 100. Regeneration of *Coreopsis rosea* from selection media after co-cultivation with recombinant *Agrobacterium* carrying pFGC9541/shEpDWF3 vector.

- 형질전환 효율제고를 위한 추가실험: 마디를 포함하지 않는 줄기절편체의 재분화조건 확립

1, 2차년도에 마디를 포함한 줄기 절편체를 사용한바 신초 재분화율은 70% 이상으로 높았으나 형질전환율은 4% 이하로 매우 저조하여 이를 보완하기 위한 추가실험을 실시하였음.

NAA 0.5  $\mu$ M + BAP 10 $\mu$ M 가 첨가된 MS in vitamin (MSv) 배지에 마디를 포함한 줄기와 마디를 포함하지 않은 줄기를 이용하였는데, 마디를 포함한 절편체들은 직접 신초를 발생하였으나 마디를 포함하지 않은 절편체의 경우 캘러스를 형성한 후 신초가 재분화가 됨.

마디를 포함한 절편체들은 지상 후 3-4일 만에 신초를 발생하였으나 마디를 포함하지 않은 절편체들은 caulls를 형성하는 데에 15일 이상 걸렸으며 신초가 발생하기까지는 35일 이상 걸렸음 (표 14).

표 14. Regeneration efficiency depending on stem explant types in *Coreopsis rosea* 'Uridream'.

	No. of shoots/explant	No. of roots/explant	Stem length (cm)	Survival rate (%)
With Node	1.07	1.43	2.10	97.33
Without Node	0.10	0.04	0.00	25.29

또한 1차 년도에 Thidiazuron (TDZ)을 이용하여 재분화 조건을 구명하였으나 캘러스가 진한 녹색에서 까맣게 변하면서 고사하는 경우가 있어, 절편체의 캘러스 형성에 보다 효율적인 형질전환 시스템을 구축하기 위하여 IAA와 TDZ, NAA와 BAP를 혼용하여 검정하였음.

IAA의 농도는 0, 3, 6, 9  $\mu\text{M}$ , TDZ의 농도는 각각 0, 1, 2, 3, 4  $\mu\text{M}$ 로 혼용으로 사용하였고 NAA의 농도는 0, 0.5, 1.0, 2.0  $\mu\text{M}$ , BAP의 농도는 0, 10, 20  $\mu\text{M}$ 로 혼용으로 사용하였음.

IAA 3 $\mu\text{M}$  + TDZ 1 $\mu\text{M}$  조합과 NAA 0.5 $\mu\text{M}$  + BAP 10 $\mu\text{M}$  조합이 생존율도 높았고 캘러스 형성에 가장 효과적 이었으며 (표 15 & 16), 비교적 NAA + BAP를 사용하는 것이 IAA + TDZ를 사용하는 것 보다 크고 초록색이 선명한 캘러스를 획득하는데 유리하였음 (그림 101).

표 15. Effect of IAA and TDZ combination on callus formation from stem explants in *Coreopsis rosea* 'Uridream'.

IAA+TDZ ( $\mu\text{M}$ )	Survival rate (%)	Callus formation rate (%)	Callus formation	No. of roots
0.0+0.0	6.67	1.33	-	0
0.0+1.0	90.67	72	-	0.01
0.0+2.0	86.67	21.33	+	0.01
0.0+3.0	82.67	70.67	+	0
0.0+4.0	84	73.33	+	0
3.0+0.0	82.67	4	-	5.65
<b>3.0+1.0</b>	<b>97.33</b>	<b>97.33</b>	<b>+++</b>	<b>0.05</b>
3.0+2.0	93.33	92	+++	0.12
3.0+3.0	90.67	88	++	1.84
3.0+4.0	85.33	80	+	2.25
6.0+0.0	86.67	2.67	-	5.89



6.0+1.0	92	89.33	++	1.37
6.0+2.0	88	84	+	1.48
6.0+3.0	85.33	80	+	1.44
6.0+4.0	82.67	77.33	+	1.57
9.0+0.0	84	8	-	5.95
9.0+1.0	78.67	78.67	+	1.55
9.0+2.0	82.67	81.33	+	1.59
9.0+3.0	72	72	+	1.67

표 16. Effect of NAA and BAP combination on callus formation from stem explants in *Coreopsis rosea* 'Uridream'.

NAA+BAP ( $\mu\text{M}$ )	Survival rate (%)	Callus formation rate (%)	Callus formation	No. of roots
0.0+0.0	5.33	2.67	-	0
0.0+10	69.33	64	-	0.03
0.0+20	72	66.67	-	0.01
0.5+0.0	76	4.67	-	5.28
<b>0.5+10</b>	<b>98.67</b>	<b>98.67</b>	<b>+++</b>	<b>0.04</b>
0.5+20	97.33	96	+++	0.1
1.0+0.0	68	9.33	-	5.49
1.0+10	92	89.33	++	1.28
1.0+20	93.33	93.33	++	1.17
2.0+0.0	78.67	9.33	-	5.67
2.0+10	96	92	++	1.41
2.0+20	94.67	92.8	++	1.47

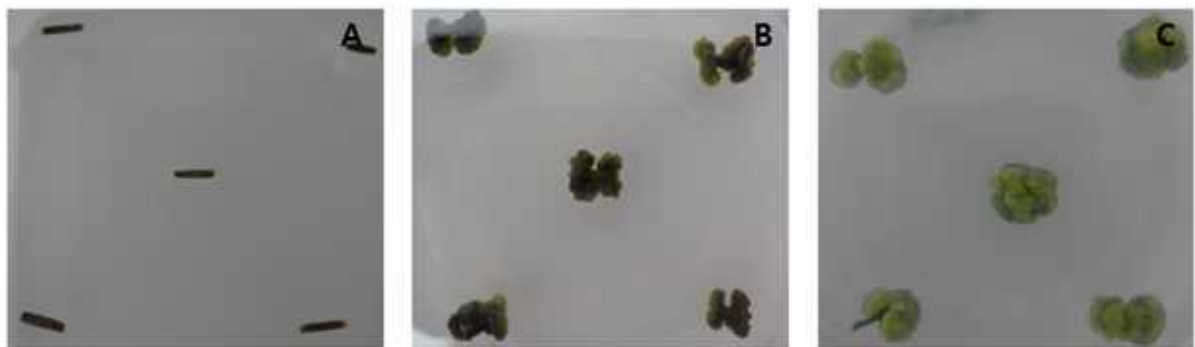


그림 101. Callus formation in *Coreopsis rosea* 'Uridream' as affected by combinations of auxin and cytokinin: control (A), IAA 3 $\mu\text{M}$  + TDZ 1 $\mu\text{M}$  (B), NAA 0.5 $\mu\text{M}$  + BAP 10 $\mu\text{M}$  (C).

캘러스로부터 신초 재분화 : 캘러스를 형성하는데 걸리는 기간은 보통 2주정도가 소요되었으며 신초가 발생하기까지는 2-4주의 기간이 더 걸렸는데 발생된 캘러스 중 신초형성은 10% 이내로 저조하였음 (표 14). 발생된 캘러스로부터 신초 재분화를 위해 IAA의 농도는

0, 1, 2  $\mu$ M, TDZ의 농도는 각각 0, 2, 4  $\mu$ M로 혼용으로 사용하였고 NAA의 농도는 0, 0.3, 0.5  $\mu$ M, BAP의 농도는 0, 10, 20  $\mu$ M로 혼용으로 처리하여 검정하였음.

## 2. DWF3 RNAi 유전자의 발현이 억제된 *Coreopsis* 형질전환체 유지

앞서 서술된 형질전환 과정에 따라 실시한 실험을 통해 선발배지에 치상한 절편체 중 약 45%에서 shoot가 발생되었으며, 이를 발근 시킨 재분화 식물체를 대상으로 순화, genomic DNA 분리 및 PCR 등을 진행하고 있음. 상처처리를 하지 않은 마디를 포함한 줄기 절편체 226개 중 50개가 고사하였고 살아남은 절편체 중 155개가 신초를 하나이상 발생시켰으며 이들 재분화 신초 중 6개가 PCR로 형질전환 개체로 확인되었음. 안정적으로 pFGC9541/shEpDWF3가 발현되는 형질전환체의 확보를 위해 지속적으로 선발 중임.

형질전환 효율을 높일 목적으로 절편체에 상처처리를 하여 형질전환 하였으나 생존율 및 재분화율이 떨어져 효과적이지 못하였음. 형질전환율을 높이기 위한 추가 실험이 요망되어 마디를 포함하지 않는 절편체를 이용하는 재분화 시스템이 검정 중임.

표 17. Induction of transgenic regenerants in *Coreopsis rosea* 'Uridream'

Wounding	No. of Dead explants	Survival ratio	No. of explant producing callus	No. of explnt producing shoot	Shoot Regeneration frequency	No. of Transgenic shoots	Total No. of explants
○	172	23.56	1	52	23.56	0	225
×	50	77.88	15	155	75.22	6	226



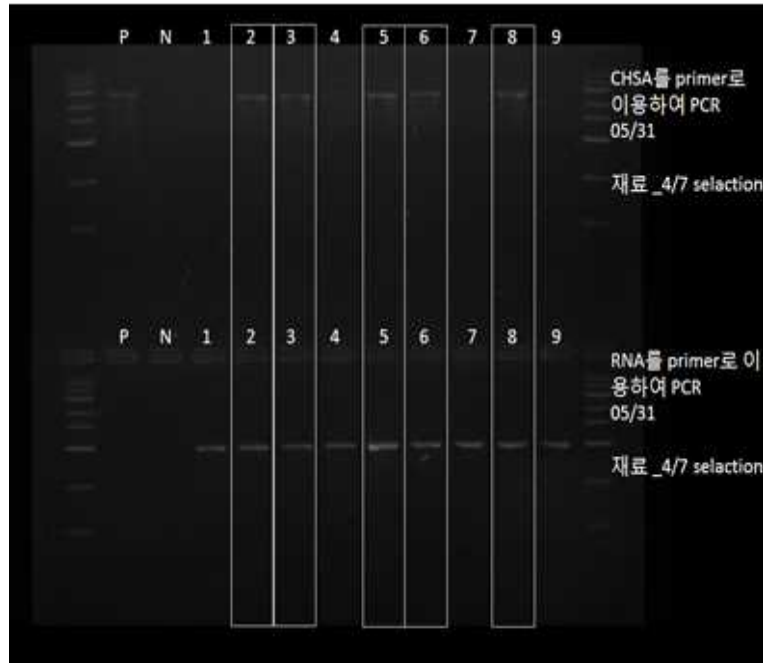


그림 102. Selection of transgenic regenerants using pFGC9541/shEpDWF3 specific primers: forward primer 5'-TCTAGAGCCACCATGGCAATGATTACCATAATACTCTCCCCTCTC-3', reverse primer 5'-CCCGGGCTCTACTACATCACGTTTTTGCAC-3'.

### 3. *DWF3* 유전자의 발현이 억제된 관상작물 *Coreopsis* 형질전환체 순화 및 특성조사

#### - 선발된 형질전환체 순화

1차 선발배지에서 재분화된 싌초들은 MS 배지가 담긴 Culture vessel (72×72×100 mm<sup>3</sup>)에 치상하여 발근을 유도하였음. 여러 차례의 계대배양을 거쳐 뿌리가 유기되고 성장한 개체들은 순화를 유도하였는데, 일단 용기에서 꺼내어 뿌리에 붙어있는 배지 성분을 흐르는 물에 씻어 제거하고 버미큘라이트와 펄라이트를 1:1 비율로 섞은 토양이 담긴 12 cm크기의 비닐화분에 옮겨 심은 후, 투명한 비닐봉투 (50×50 cm<sup>2</sup>)에 담아 밀봉하고, 16시간 일장, 22 ± 2°C로 유지되는 배양실에서 1차 순화시킨 후 온실로 옮겨져 유지되었음. 식물체가 담겨 있는 비닐봉투에는 순차적으로 구멍을 뚫어 각각의 개체들이 비교적 저습의 환경에 잘 적응하도록 하였으며, 식물체의 상태를 고려하면서 약 14-20일 후 비닐을 완전히 제거하고 유리온실로 옮겨주는 방식을 채택하였음. 거의 모든 재분화 개체는 고사하는 일 없이 100% 순화되었음.



그림 103. Processes of acclimatization of transgenic plants in a culture room.



그림 104. Three week (A) and eight week-old (B) transgenic plants acclimatized under a green house condition.

- 형질전환체 특성 조사

식물 재료로 사용하고 있는 *Coreopsis rosea* 'Uridream 10' 의 특성은 식물체 높이는 43.7 cm정도, 줄기 녹색정도는 중간, 안토시아닌 착색은 없고, 털은 있으며, 마디길이는 7.7 cm정도임. 잎 배열은 마주나기이며, 깃털모양 잎의 형태는 1회 깃털모양 잎이며, 윗면의 녹색

색 정도는 중간이며, 잎 모양은 선형이며, 윗면 및 아랫면의 털은 약함 꽃은 홑꽃이며, 설상화 윗면의 색은 2A, 아랫면의 색은 3B, 통상화 색은 노란색, 설상화 바깥쪽의 파인정도는 얇으며, 설상화 바깥쪽의 굽은 정도는 곧으며 설상화의 수는 8장, 포엽 총포외열의 굽은 정도는 안으로 굽음 약의 색은 오렌지색, 꽃자루의 굽기는 1.12 mm, 길이는 16.15 mm 정도임.

형질전환 통해 얻어진 재분화체는 식물체 초장이 20-30 cm 정도로 키가 작아지긴 하였으나 지속적으로 지켜보아야 초장에 대한 변화를 알 수 있고 삼목 후대에서의 초장의 변화를 확인한 후에 결론을 내릴 수 있음. 기타 잎의 모양이나 줄기의 모양은 크게 변화가 없는 것으로 나타났음.

- 화색변이체의 획득

‘Uridream’의 기존 노란색에서 꽃잎 윗부분은 흰색, 꽃잎 아랫부분은 보라색을 나타내는 화색과 전체적으로 보라색을 나타내는 화색 변이체가 형질전환 과정 중에 유기 되어 순화 후 유지되고 있음 (그림 105). 화형은 원형에서 불규칙한 모습을 보이거나 꽃잎이 삼각형과 비슷한 모습을 나타내거나 꽃잎이 말리는 현상이 일어남. 이들은 몇 세대 삼목 증식 후 고정된 변이체로 확인되면 품종등록이 가능 할 것으로 평가됨.



그림 105. Flower color change in regenerants obtained through the transformation processes: original color of ‘Uridream’ (A), flower color mutant 1, 2, 3 (B, C, D).



4. *Echinacea*에 재조합 *Agrobacterium*을 이용한 *DWF3* RNAi 벡터시스템 형질전환

*EpDWF3* RNAi 벡터시스템이 도입된 *Echinacea* 형질전환체를 확보하기 위한 형질전환 및 재분화 연구에서 뿌리의 생성이 확인되고 토양으로 옮겨 순화 중인 잎 절편체의 형질전환 실험이 진행되었던 2013년 7월부터 2014년 4월까지의 형질전환 실험의 재분화 연구결과는 표 18과 같음. 11개월 동안 7,150 개의 잎 절편체를 재조합 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 실험에 이용하였고 약 971 개의 신초가 생성된 개체를 확보하였고 뿌리 형성 배지에 옮긴 후 뿌리의 분화가 유도된 340개의 개체를 확보하였음 (신초 생성율 : 13.6%, 뿌리 생성율 : 35%). 이중 125여 개체를 토양에 옮겨 순화시켰고 109 개체의 *DWF3* RNAi 발현시스템의 도입 유무를 제1세부과제에 의뢰하여 확인함. 이중 *DWF3* RNAi 발현시스템이 도입된 개체는 43 개체였음 (형질전환율 : 39.4%).

표 18. 2013년 7월부터 2014년 4월까지 진행된 형질전환 *Echinacea* 실험 개체의 재분화 및 형질전환 결과.

잎 절편체	신초 생성 개체	뿌리 생성 개체	토양 순화 개체	유전자 도입 확인 개체	유전자 도입 개체
12,768	1,734	607	125	109	43

3-3-3. 제1협동과제 : 난쟁이 관상작물 실용화 연구

1. 관상용 유전자원의 수집 및 특성 검증

세계 각지에서 새로운 화훼작물을 수집하여 조사 관찰함으로써 앞으로 우리가 육성, 개발해야 할 품종의 방향을 예측하는 일은 매우 중요함. 우리꽃 연구소는 이번 왜성화 과제의 일환으로 2013-2014년 독일 (6), 일본 (16) 캐나다 (42)에서 약 64개의 품종을 수집하였음. 수집된 품종은 주로 화훼종인 관상용 식물이며, 일부는 임목도 포함되어 있음. 현재 세계 각국에서 수집된 유전자원 중 종자로 수집된 자원은 육묘장에서 재배되어 우리꽃 연구포장에 이식되어 적응 및 재배하고, 주기적으로 관찰, 조사하였음. 삽수로 수집된 유전자원은 육묘장에서 발근을 유도 중에 있으며, 후에 연구포장에 식재하여 재배적 특성을 조사하였음.

이는 품종개발에 필요한 다양하고 우수한 유전자원을 수집하여 관찰 조사함으로써 세계시장에서 요구하는 왜성화 관상식물개발을 위한 자료로 활용하고자 함임.

표 19. 2014 해외 수집자원 목록 (종자)

영명	학명	수집국가	수집자원 형태
Rudbeckia	<i>Rudbeckia laciniata L.</i>	CAN	seed
Agastache rugosa	<i>Agastache rugosa</i>	CAN	seed
Fountain Glass	<i>Pennisetum setaceum</i>	CAN	seed
Black Madras	<i>Oryza sativa</i>	CAN	seed
Prunella	<i>Prunella vulgaris</i>	CAN	seed
Astilbe	<i>Astilbe</i>	CAN	seed
Coreopsis tinctoria Roulette	<i>Coreopsis rosea</i>	CAN	seed
Pampas grass	<i>Cortaderia Selloana</i>	CAN	seed
Pink Pampas glass	<i>Cortaderia Selloana</i>	CAN	seed
Purple Fountain Glass	<i>Pennisetum setaceum</i>	CAN	seed
Blue Fescue glass	<i>Festuca ovina</i>	CAN	seed
Lace Flower	<i>Trachymene caerulea</i>	AUS	seed
Sweet Pea	<i>Lathyrus odoratus</i>	AUS	seed
Zinnia	<i>Zinnia elegans</i>	AUS	seed
Dianthus(Blush Pink, Double Pink)	<i>Dianthus caryophyllus</i>	AUS	seed

Bunny Tails grass	<i>Lagurus ovatus</i>	AUS	seed
Native Wisteria	<i>Hardenbergia comptoniana</i>	Jap	seed
Pink Paper Daisy	<i>Rhodanthe chlorocephala</i>	Jap	seed
Dwarf Wattle	<i>Acacia perangusta</i>	AUS	seed
Swan River Daisy	<i>Brachycome iberidifolia</i>	Jap	seed
Honesty Purple and White Mixed	<i>Lunaria annua</i>	AUS	seed
Waratah	<i>Telopea speciosissima</i>	Jap	seed
Godetia	<i>Clarkia grandiflora</i>	AUS	seed
Artichoke	<i>Cynara scolymus</i>	Jap	seed
Crimson clover	<i>Trifolium incarnatum</i>	Jap	seed
Zucchini(Eight Ball F1)	<i>Cucurbita pepo</i>	Jap	seed
Rhubarb	<i>Rheum palmatum</i>	Jap	seed

표 19는 2013-2014 해외수집 유전자원 중 종자로 수집된 자원의 목록임. 주로 캐나다와 호주, 일본에서 수집된 유전자원임. 수집자원의 식물학적 이름 및 학명이 모두 조사된 상태이며, 현재 육묘상과 연구포장에서 재배, 조사하였음.

표 20. 2014 해외 수집자원 목록(삽수) 및 삽목율

자원명	수집국가	수집자원 형태	삽목날짜	현 개체수	삽목율 (번식율)%
14Ge01	Ger	cutting	2014.02.03	47	43
14Ge02	Ger	cutting	2014.02.03	7	24
14Ge03	Ger	cutting	2014.02.03	43	23
14Ge04	Ger	cutting	2014.02.03	37	65
14Ge05	Ger	cutting	2014.02.03	21	36
14Ge06	Ger	cutting	2014.02.03	638	82
14Ca01	Can	cutting	2014.03.25	23	-
14Ca02	Can	cutting	2014.03.25	8	-
14Ca03	Can	cutting	2014.03.25	8	-
14Ca04	Can	cutting	2014.03.25	8	-
14Ca05	Can	cutting	2014.03.25	22	-
14Ca06	Can	cutting	2014.03.25	4	-

14Ca07	Can	cutting	2014.03.25	1	-
14Ca08	Can	cutting	2014.03.25	1	-
14Ca09	Can	cutting	2014.03.25	7	-
14Ca10	Can	cutting	2014.03.25	11	-
14Ca11	Can	cutting	2014.03.25	10	-
14Ca12	Can	cutting	2014.03.25	182	91
14Ca13	Can	cutting	2014.03.25	12	6
14Ca14	Can	cutting	2014.03.25	3	2
14Ca15	Can	cutting	2014.03.25	9	90
14Ca16	Can	cutting	2014.03.25	61	86
14Ca17	Can	cutting	2014.03.25	65	100
14Ca18	Can	cutting	2014.03.25	2	1
14Ca19	Can	cutting	2014.03.25	41	98
14Ca20	Can	cutting	2014.03.25	1	7
14Ca21	Can	cutting	2014.03.25	4	27
14Ca22	Can	cutting	2014.03.25	15	73
14Ca23	Can	cutting	2014.03.25	11	62
14Ca24	Can	cutting	2014.03.25	2	2
14Ca25	Can	cutting	2014.03.25	1	1
14Ca26	Can	cutting	2014.03.25	0	0
14Ca27	Can	cutting	2014.03.25	0	0
14Ca28	Can	cutting	2014.03.25	0	0
14Ca29	Can	cutting	2014.03.25	0	0
14Ca30	Can	cutting	2014.03.25	3	4
14Ca31	Can	cutting	2014.03.28	1	2

표 20은 2013-2014 독일과 캐나다에서 수집한 유전자원임. 모두 삽수로 수집된 자원이며 삽목법으로 개체수를 증식하였고 육묘상에서 발근을 유도하였음. 속근형과 같은 초화류 자원은 삽수로 번식시키기가 양호하지만, 임목류 자원은 발근의 유도가 쉽지 않았음. 특히 일반 초화류와는 달리 임목의 경화된 조직은 발근을 저해하는 주 요인이 됨. 따라서 초화류 보다는 발근에 많은 시간이 요구되기 때문에 발근이 유도되기 전에 고사되는 경우가 있었음. 우리꽃 연구소에서는 이러한 리스크를 줄이기 위해 터널법, 차광법, 미스트 사용 등으로 번식법을 체계화하였음.

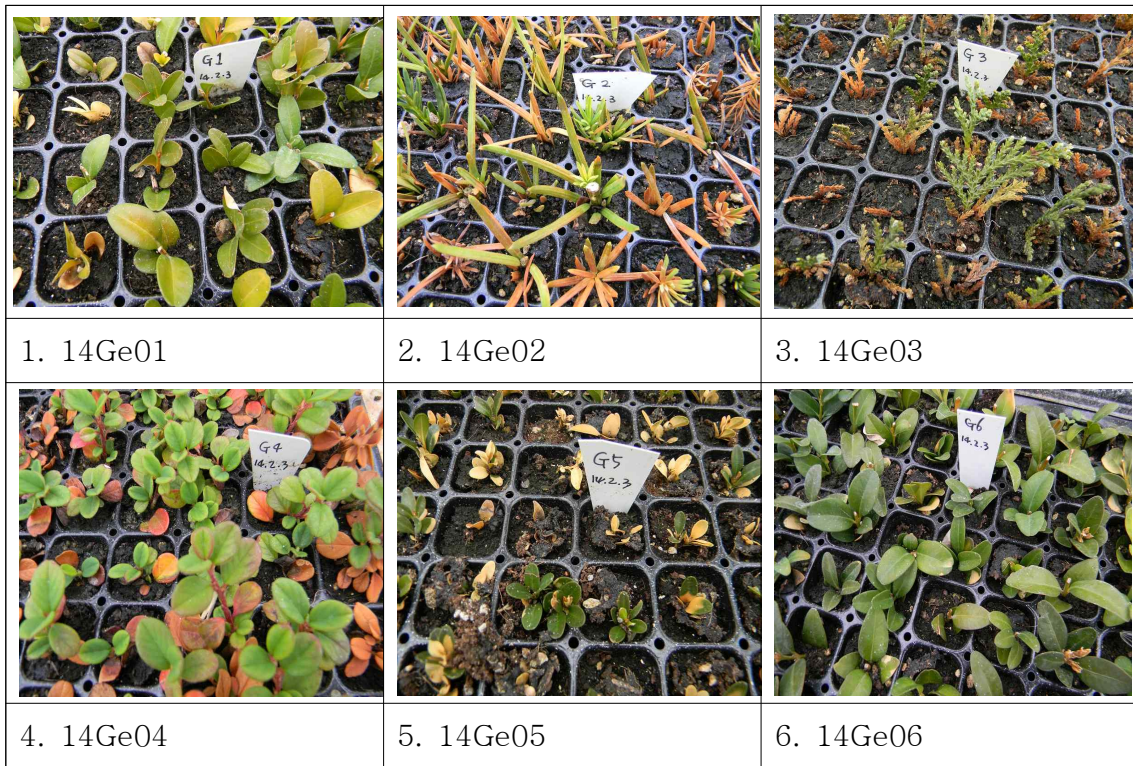
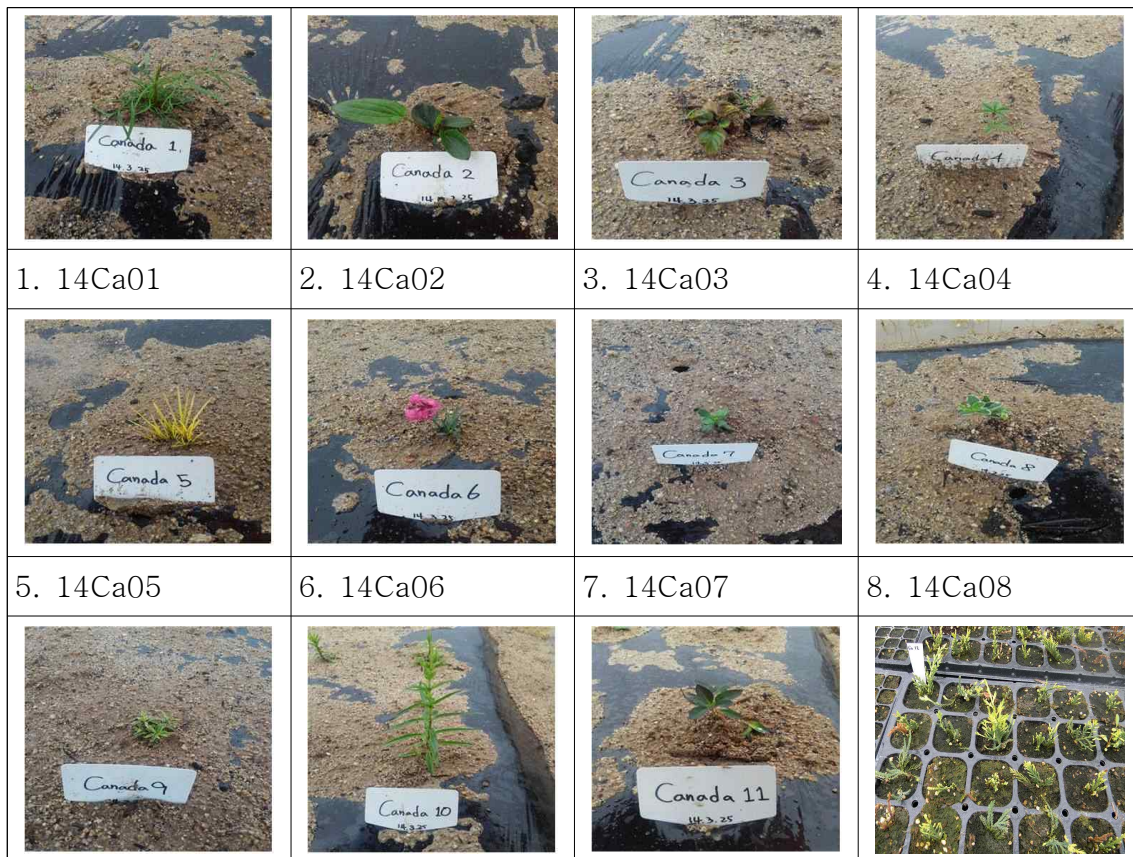


그림 106. 2014 독일에서 수집한 유전자원 (삽수).





9. 14Ca09	10. 14Ca10	11. 14Ca11	12. 14Ca12
			
13. 14Ca13	14. 14Ca14	15. 14Ca15	16. 14Ca16
			
17. 14Ca17	18. 14Ca18	19. 14Ca19	20. 14Ca20
			
21. 14Ca21	22. 14Ca22	23. 14Ca23	24. 14Ca24
			
25. 14Ca25	26. 14Ca26	27. 14Ca27	28. 14Ca28
			
29. 14Ca29	30. 14Ca30	31. 14Ca31	

그림 107. 2014 캐나다에서 수집한 유전자원 (삼수).











			
1. Lace Flower	2. Sweet Pea	3. Zinnia	4. Dianthus(Blush Pink, Double Pink)
			
5. Bunny Tails grass	6. Dwarf Wattle	7. Honesty Purple and White Mixed	8. Godetia

그림 108. 2014 호주에서 수집한 식물자원 (종자).

			
1. Native Wisteria	2. Pink Paper Daisy	3. Swan River Daisy	13. Artichoke
			
14. Crimson clover	Waratah		

그림 109. 2014 일본에서 수집한 식물자원 (종자).



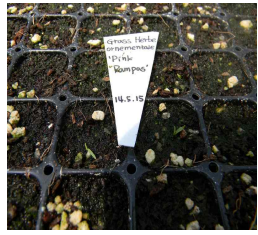


			
1. Rudbeckia	2. Agastache rugosa	3. Fountain Glass	4. Black Madras
			
5. Prunella	6. Astilbe	7. Coreopsis tinctoria	8. White Pampas grass
			
9. Pink Pampas grass	10. Purple Fountain grass	11. Blue Fescue grass	

그림 110. 2014 캐나다에서 수집한 식물자원 (종자).

그림 106~110은 우리꽃 연구소에서 2013-2014년 동안 해외에서 수집한 식물유전자원들임. 우리꽃 연구소내 육묘상과 연구포장에서 재배하고 모니터링하였음. 이번 수집된 품종은 각국에서 선호하는 품종들로 유전적, 관상적으로 가치가 높은 식물들임. 앞으로 육종재료로 이용될 경우 그 가치가 높다고 할 수 있음. 육묘묘상에서 활착을 유도시키고 그 중 발근된 묘들은 우리꽃 연구포장에 이식하여 재배적, 형태적 특성을 조사하였음.

표 21. 해외수집 식물 유전자원 특성조사

Flower	Plant type	Lodging	Plant height (cm)	Early bloom stage	Flower color	Flower forms	Life cycle
Lace Flower	strait	o	60-90	late May	pale purple	-	annual

Sweet Pea (red)	runner	o	20-40	early Jun	red	-	annual
Sweet Pea (pink)	runner	o	20-40	early Jun	pink	-	annual
Dianthus	strait	△	30-40	May-Sep	red,pink, purple mixed	double	annual
Bunny Tails grass	strait	△	30-50	late May	red	-	annual
Swan River Daisy	strait	△	35-50	May-Sep	white, blue	-	annual
Honesty Purple and White Mixed	strait	△	25-35	-	-	-	annual
Artichoke	strait	x	35-50	-	-	-	annual
Crimson clover	runner	o	25-35	late May	red	-	annual

표 21은 해외에서 수집한 유전자원의 특성을 조사한 표임. 금년 1월 말경에 파종하여 그 중 성숙한 식물체를 5월 중순경에 연구포장에 이식하였음. 레이스플라워의 경우는 꽃이 아름답고 화려하지만 초장이 길기 때문에 도보의 우려가 높음. 디안서스와 버니테일그라스, 스완리버데이지도 꽃이 아름답지만 도복의 위험이 큰 것으로 조사되었음. 스위트피는 꽃이 분홍색과 붉은색을 나타내며 일반 포복형 식물과는 달리 꽃이 아름답지만 성장속도가 매우 빠르기 때문에 관상용으로서의 한계가 있음.

## 2. 세계시장 동향 파악

우리꽃 연구소는 이번 왜성화 과제의 일환으로 해외 유명 전시회 및 세미나를 방문함으로써 앞으로 세계시장의 초화류 및 관목류 등 관상식물과 정원식물의 해외 주류동향을 파악을 그 목적으로 한다.

□ 해외시장 탐방 및 정보수집

● IPM (독일)방문

- 기간 : 2014. 1/28-31

- 목적 : 관목교목 시장 자료분석 및 품종개발 연구조사(Essen 지역 및 유럽 5개국 방문)

- 요약 : 국제 원예무역 박람회(IPM)은 국제적으로 공정한 원예무역박람회이다. 일반 꽃박



람회를 넘어서 국제적으로 전문 무역공정을 다루는 박람회이다. 또한 이 박람회에서는 재배기술, 정원의 특징과 관리, 생산과 판매, 다각적인 식물공정 무역 등을 포괄하는 비즈니스 시장을 형성 하고 있다. 약 50개국 1500전시장 참여와 약 100여 개국에서 방문객이 참여한다. 전시회 이외에도 세미나 개최 및 연구 활동에 대한 보고심사도 이루어지고 있다.

		
IPM로고	IPM 전시장 전경	IPM 신품종 전시 부스

● IFEX (일본) 방문

- 기간 : 2013. 10
- 목적 : 일본시장의 동향 과 아시아 지역의 신품종 및 신기술 연구 조사건
- 요약 : IFEX (International Flower Expo Tokyo)는 국제 꽃 박람회로 2013년에는 도쿄에서 개최되었다. IFEX는 아시아 지역에서 열리는 원예업계 최대 이벤트로 알려져 있다. 꽃집, 가든센터, 수입 도매, 재배, 가든설계 등 꽃과 관련 된 제품 다루는 업체들이 구매자와의 새로운 비즈니스 연결을 제공하는 마케팅이 궁극적인 목적이다.

		
IPEX 전시회장 전경	IPEX 회장과의 만찬회 미팅	IPEX 회장의 폐회식 선언사

● 미국 및 캐나다 방문

- 기간 : 2014.03
- 목적 : 북미지역 시장조사 및 식물유전자원 수집
- 요약 : 북미지역의 마케팅 관련 시장 조사 및 관목과 교목 시장의 신품종 조사, 연구 활



동이다. 이번 방문에서 약 42개의 식물유전자원을 수집하였다.

● 해외 농장 견학

- 기간 : 2013, 8-9월
- 호주 및 뉴질랜드 : 에덴 가든센타. Sprinter사

플러그 생산묘	호주 플러그묘 생산 전경	호주에서 판매되는 패랭이

● 잡지 및 전문도서 구매

- Armature Gardening magazine (UK)
- ELA (Environment Landscape Architecture)

□ 세계수출 전략을 위한 홍보 및 마케팅

● Armada 대표 방문

- 기간 : 2014.04.30.
- 요약 : 네덜란드에서 화훼농장 운영 및 유럽각지에 수출하는 회사  
네덜란드 아르마다대표 초빙하여 유럽의 화훼시장의 흐름에 대해 논의  
유럽시장에서의 수출에 관한 로열티에 관한 논의  
해외에서 선호하는 패랭이 연구 및 개발 품목 선정

Armada 대표와 미팅	연구포장에서 패랭이 관찰	우리꽃 연구소 연구동 견학

● Plaintiff 대표 방문

- 기간 : 2014.05.28.

- 요약 : 네덜란드 플랜티프 대표 방문

전세계를 다니며 꽃을 유통하는 전문 바이어.

해외시장과 미국시장의 독립품종에 대한 로열티 시장 논의 및 해외시장 5년내 로열티 부분에 관한 세계시장 비율 통보.

코레우리 및 가우라에 흥미를 둠.

		
<p>Plantiff 대표와 미팅</p>	<p>연구포장에서 코레우리 관찰</p>	<p>우리꽃 연구소 연구동 견학</p>

□ 해외 시장 동향 요약

해외에서도 고임금과 물류비용의 증가는 꽃의 선호도 타입에도 영향을 줌. 좀 더 작고, 선명한 색을 가지는 꽃의 선호도가 높아지고 있음. 또한 소비자들은 개화시 만발하게 피며 장기적으로 필 수 있는 꽃을 요구하고 있음. 물론 관리도 수월해야 함. 새로운 품종을 만들어 내는 것도 대책이지만 기존의 품종의 단점을 보완, 극복하여 새롭게 재탄생 시키는 것도 또 하나의 대책이 될 수 있으며 왜성화 과제도 이런 목적의 연장선에 있음.

3. *DWF3* RNAi 발현시스템이 도입된 형질전환 *Echinacea* 관상작물 영양 번식

제1세부과제에서 *DWF3* RNAi 발현시스템이 도입된 것으로 확인된 형질전환 *Echinacea* 관상작물을 노지에 옮겨 심어 줄기 (가지)의 분화를 유도하였음.

### 3-4. 3차년도 연구결과

#### 3-4-1. 제1세부과제 : 난쟁이 관련 유전자 분리 및 기능 분석

1. 관상작물 유래 난쟁이 표현형 *DET2*, *DWF4*, *SMT2* 유전자 발현 억제용 RNAi 벡터시스템 구축

○ *DET2*, *DWF4*, *SMT2* 유전자 동시 발현 억제용 RNAi 벡터시스템 구축

*Echinacea*, *Coreopsis* *DET2*, *DWF4*, *SMT2* 유전자의 발현을 동시에 억제시키기 위한 RNA interference (RNAi) 벡터를 구축하기 위해 *EpDET2* 유전자의 185 ~ 485 염기서열 부위, *EpDWF4* 유전자의 1,110 ~ 1,340 염기서열 부위, *EpSMT2* 유전자의 469 ~ 724 염기서열 부위 및 N-terminal 부위에 *Sma*I, *Asc*I 제한효소 염기서열, C-terminal 부위에 *Swa*I, *Xba*I 제한효소 염기서열을 지니는 DNA를 (주)바이오닉스에 의뢰하여 합성하였음 (그림 111A). 합성된 DNA를 *Asc*I/*Swa*I, *Xba*I/*Sma*I 제한효소로 절단하여 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense, anti-sense DNA를 확보하고 CaMV35S (*Cauliflower mosaic virus* 35S) promoter, CHSA intron, OCS (octopine synthase) 3' terminator와 BAR (phosphinothricin acetyl transferase gene) 선별유전자를 지니는 RNAi 벡터, pFGC5941의 *Asc*I/*Swa*I, *Xba*I/*Sma*I 제한효소 위치에 클로닝하여 pFGC5941/shEpDET2:DWF4:SMT2 벡터를 구축하였음 (그림 111B).

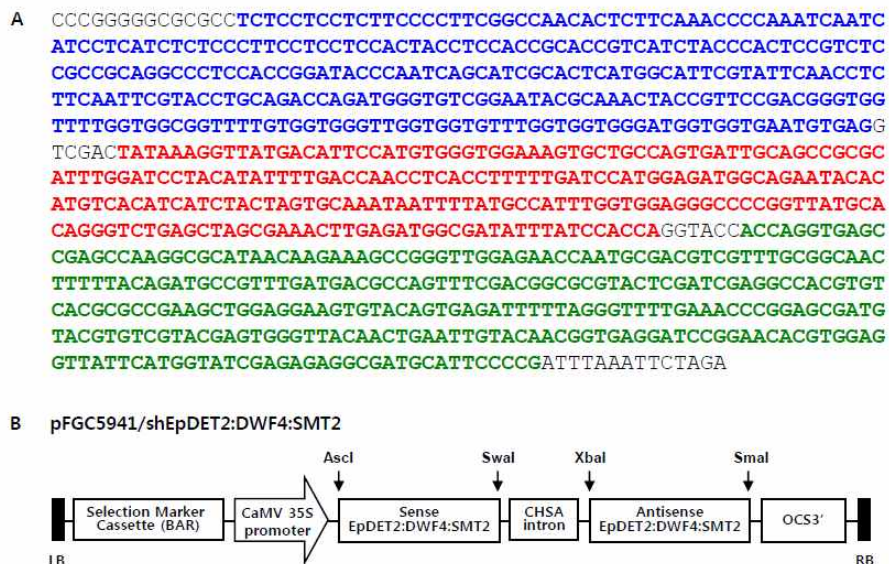


그림 111. *Echinacea* 및 *Coreopsis* *DET2*, *DWF4*, *SMT2* 유전자의 발현을 억제하기 위해 합성한 sense *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* 유전자의 염기서열 (청색, *EpDET2*; 적색, *EpDWF4*; 녹색, *EpSMT2*) (A) 및 pFGC5941/shEpDET2:DWF4:SMT2 RNAi 벡터 (B)의 모식도.

○ *DWF4* 유전자 발현 억제용 RNAi 벡터시스템 구축

*Echinacea*, *Coreopsis DWF4* 유전자의 발현을 억제하기 위한 RNAi 벡터를 구축하기 위해 *EpDWF4* 유전자의 1,110 ~ 1,343 염기서열을 증폭하기 위한 PCR primer를 디자인하고 sense, anti-sense PCR 산물을 확보함. Sense, anti-sense *EpDWF4* PCR 산물을 pFGC5941 RNAi 벡터의 *AscI*/*SwaI*, *XbaI*/*SmaI* 제한효소 위치에 클로닝하여 pFGC5941/shEpDWF4 벡터를 구축하였음 (그림 112).

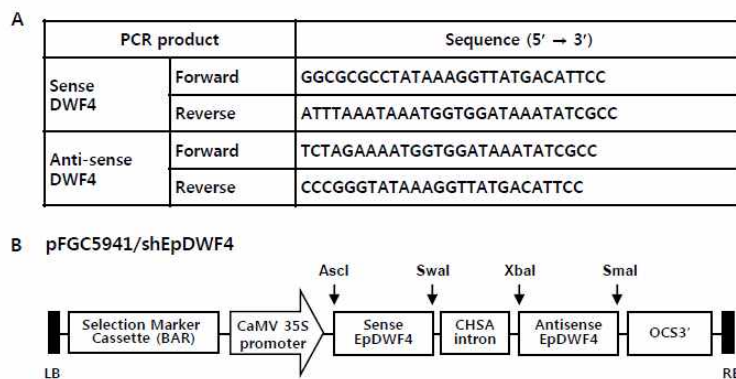


그림 112. *Echinacea DWF4* 유전자의 sense, anti-sense PCR 산물을 확보하기 위한 PCR primer (A) 및 *Echinacea*, *Coreopsis DWF4* 유전자의 발현을 억제하기 위한 pFGC5941/shEpDWF4 RNAi 벡터 (B)의 모식도.

2. *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자가 과 발현된 식물체 확보 및 유전자 기능 분석

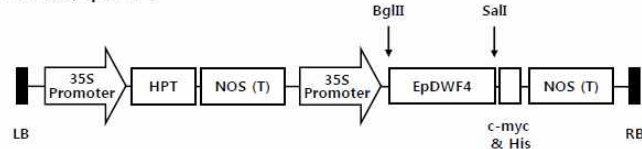
○ *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자가 과 발현된 식물체를 확보하기 위한 식물 발현시스템 구축

*Echinacea DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자를 과 발현하는 식물체를 확보하기 위한 식물 발현벡터를 구축하기 위해 제한효소 염기서열을 지니는 PCR primer (그림 113A)를 이용한 PCR 방법으로 *EpDWF4*, *EpDET2*, *EpSMT2* 유전자를 증폭시켰고 pGEM-T easy 벡터에 클로닝한 후 염기서열 분석을 통해 확인함. pGEM-T easy 벡터에 클로닝된 *EpDWF4*, *EpDET2*, *EpSMT2* 유전자를 *Bgl*III/*Sal*I 또는 *Xba*I/*Sal*I 제한효소로 절단하여 확보하고 cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter, *hygromycin phosphotransferase* (*HTP*) 선별유전자를 지니는 식물 발현벡터 pZP2Ha3 벡터의 *Bgl*III/*Sal*I 또는 *Xba*I/*Sal*I 제한효소 위치에 각각 삽입하여 pZP2Ha3/*EpDWF4*, pZP2Ha3/*EpDET2*, pZP2Ha3/*EpSMT2* 벡터를 확보함 (그림 113B-D). *EpDWF3*, *EpDET2*, *EpSMT2* 유전자의 삽입은 제한효소 절단 및 염기서열 결정을 통해 확인함.

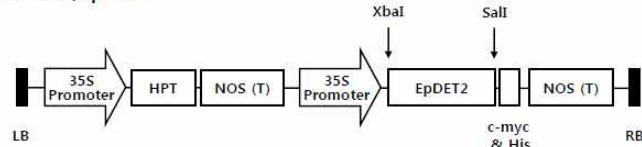


PCR product		Sequence (5' → 3')
<i>Echinacea</i> <i>EpDWF4</i>	Forward	AGATCTGCTATGGCTTCTGATCTTGAGTTCTTCCTCCATGT ATCTTTC
	Reverse	GTCGACACACATTTGTTTTCCGGTGACAGAC
<i>Echinacea</i> <i>EpDET2</i>	Forward	TCTAGAGCCACCATGCCTCCGATCAAGTCTTCTTCCACTA CGCC
	Reverse	GTCGACATACAAAAACGGAATCACAGCTTTCC
<i>Echinacea</i> <i>EpSMT2</i>	Forward	TCTAGAGCCACCATGGACTCACTCACTCTCGTCTGCACCG TCTCC
	Reverse	GTCGACAGACTCTTGCTGTTTCTCCGG

**B pPZP2Ha3/EpDWF4**



**C pPZP2Ha3/EpDET2**



**D pPZP2Ha3/EpSMT2**

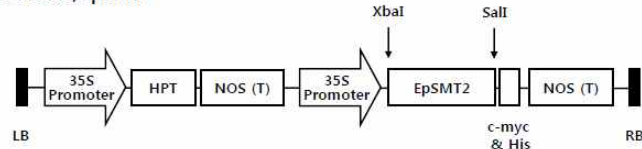


그림 113. *Echinacea DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자를 증폭하기 위한 PCR primer (A) 및 *EpDWF4*, *EpDET2*, *EpSMT2* 유전자를 과 발현하는 식물체를 확보하기 위한 식물 발현벡터 pPZP2Ha3/EpDWF4, pPZP2Ha3/EpDET2, pPZP2Ha3/EpSMT2 벡터의 모식도 (B-D).

○ 재조합 *Agrobacterium* 확보

pPZP2Ha3/EpDWF4, pPZP2Ha3/EpDET2, pPZP2Ha3/EpSMT2 벡터가 형질전환된 *Agrobacterium* 세포를 확보하기 위해 재조합 미생물에서 추출한 pPZP2Ha3/EpDWF4, pPZP2Ha3/EpDET2, pPZP2Ha3/EpSMT2 벡터 DNA를 electroporation 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, LBA4404 세포에 각각 형질전환시키고 50 µg/mL kanamycin, 50 µg/mL gentamycin 또는 50 µg/mL kanamycin, 25 µg/mL rifampicin 항생제가 포함된 LB 배지에서 선별하여 pPZP2Ha3/EpDWF4, pPZP2Ha3/EpDET2, pPZP2Ha3/EpSMT2 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, LBA4404 세포를 확보하였음. 재조합 *Agrobacterium* 세포를 각각의 항생제가 포함된 LB 액상배지에서 2일 동안 (28°C) 배양하고 pPZP2Ha3/EpDWF4, pPZP2Ha3/EpDET2, pPZP2Ha3/EpSMT2 DNA를 추출하였고 PCR을 통해 pPZP2Ha3/EpDWF4,



pPZP2Ha3/EpDET2, pPZP2Ha3/EpSMT2 벡터의 존재를 확인하였음 (그림 114).

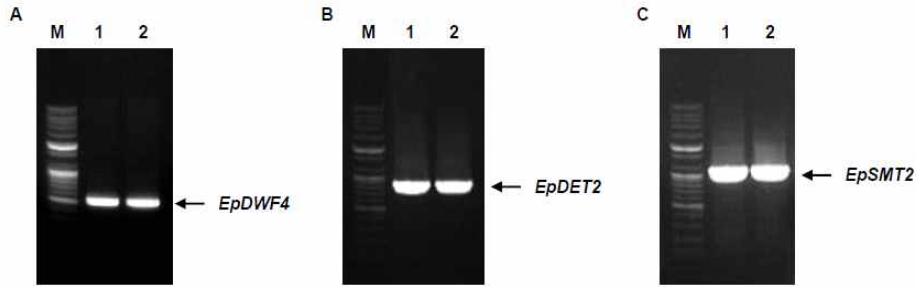


그림 114. 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, LBA4404 세포에서 plasmid DNA를 추출하고 PCR을 통해 pPZP2Ha3/EpDWF4 (A), pPZP2Ha3/EpDET2 (B), pPZP2Ha3/EpSMT2 (C) 벡터의 존재를 확인함 (M, DNA size marker; lane 1, 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 strain; lane 2, 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 strain).

○ *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자가 과 발현된 식물체 확보 및 형질전환 식물체의 표현형 분석

- *DWF4* 유전자가 과 발현된 식물체 확보 및 형질전환 식물체의 표현형 분석

*Echinacea DWF4* 유전자가 과발현된 형질전환 애기장대 식물체를 확보하기 위한 애기장대 형질전환 및 재분화 연구를 수행함.

pPZP2Ha3/EpDWF4 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 세포를 50 µg/ml kanamycin, 50 µg/mL gentamycin 항생제가 포함된 LB 액상배지를 사용하여 28°C 암조건에서 2일 동안 배양하였고 5% sucrose, 0.05% Silwet L-77 용액에 OD<sub>600</sub> 값이 0.8이 되도록 희석하였음. 꽃눈을 지나는 애기장대 식물체를 재조합 *Agrobacterium* 세포 희석액에 10초 동안 침지시키고 24°C 암조건에서 16시간 동안 배양한 후 12시간 명상태, 12시간 암상태의 광조건에서 배양하였음. 이상의 실험 과정을 5~6일 간격으로 3번 반복하여 애기장대의 형질전환을 유도하였고 재조합 *Agrobacterium* 세포로 형질전환시킨 애기장대에서 종자를 회수하고 70% ethanol 용액에 5분, 0.8% NaOCl, 0.05% Triton X100 용액에 20초씩 5번 침지시킨 후 멸균된 증류수에 20번 세척하였고 2.5 mg/L hygromycin 항생제가 첨가된 애기장대 종자 배양 배지 (0.2% MS, 2% sucrose, 0.8% micro agar, 250 mg/L carbenicillin, pH 5.7~5.8)에 파종한 후 4°C 암조건에서 3일 동안 배양한 후 12시간 명상태, 12시간 암상태의 광조건에서 배양하였음. 2-3 주 후 4-6 개의 성체 잎이 생성된 애기장대 식물체를 토양에 옮겨 심어 형질전환된 애기장대 식물체의 성장을 유도하였음 (그림 115).

T0 generates of putative transgenic *Arabidopsis* overexpressing *EpDWF4*

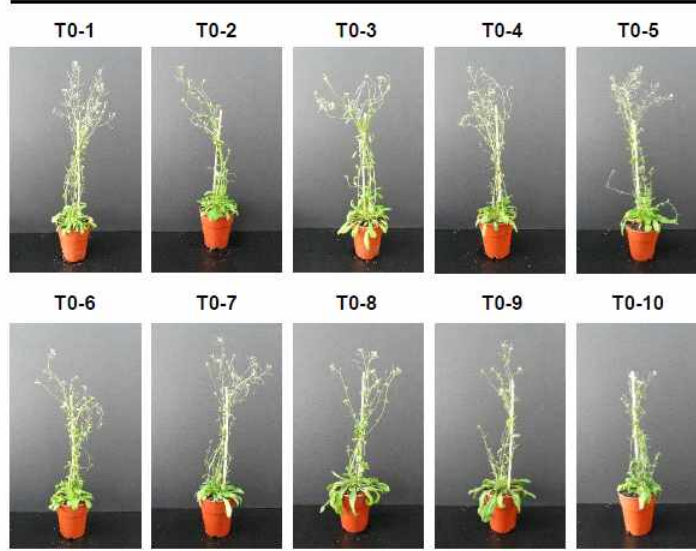


그림 115. pPZP2Ha3/EpDWF4 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium*으로 형질 전환된 후 토양에 순화 중인 T0 세대 형질전환 애기장대 식물체.

pPZP2Ha3/EpDWF4 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium* 세포를 이용한 애기장대 형질전환 및 재분화 연구를 통해 확보한 형질전환 T0 세대의 개체 중 토양에 순화 중인 12 개의 형질전환 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 형질전환 애기장대 식물체의 genomic DNA에 *EpDWF4* 유전자 발현시스템의 도입 유무를 확인함. 형질전환 개체의 잎을 LN<sub>2</sub>와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하였고 GeneAll Exgene Plant SV Mini Kit를 이용하여 genomic DNA를 추출하였음. 250 ng genomic DNA, *HTP* 유전자 및 애기장대 *Tubulin* 유전자에 특이적으로 결합하는 PCR primer (그림 116A)를 이용한 PCR을 수행하고 애기장대 식물체의 형질전환 유무를 판단함 (그림 116B). T0-1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12 형질전환 개체의 genomic DNA에서 *HTP* PCR 산물이 존재하였고 이는 *EpDWF4* 유전자 발현시스템이 형질전환된 애기장대 식물체에 도입되었다는 것을 의미함.

또한 *EpDWF4* 유전자 발현시스템이 형질전환된 T0 세대 애기장대 식물체에서 종자를 채취하고 hygromycin 항생제가 첨가된 애기장대 종자 배양 배지에 파종한 후 형질전환된 T1 세대 애기장대 식물체의 발생을 유도하였고 (그림 117) 토양에 옮겨 심어 개체를 성장시켰음.

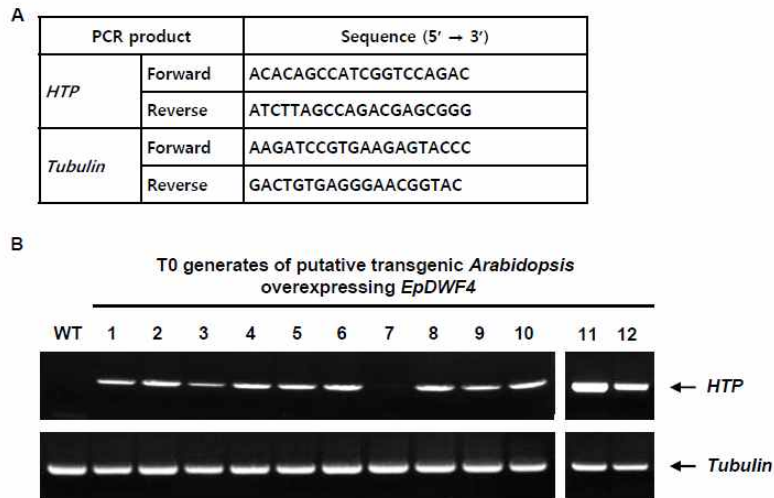


그림 116. (A) 형질전환 애기장대 식물체의 genomic DNA PCR을 위한 *HTP* 및 *Tubulin* primer의 염기서열. (B) 토양에 순화 중인 T0 세대 형질전환 애기장대 식물체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF4* 유전자 발현시스템의 도입 유무를 확인함.

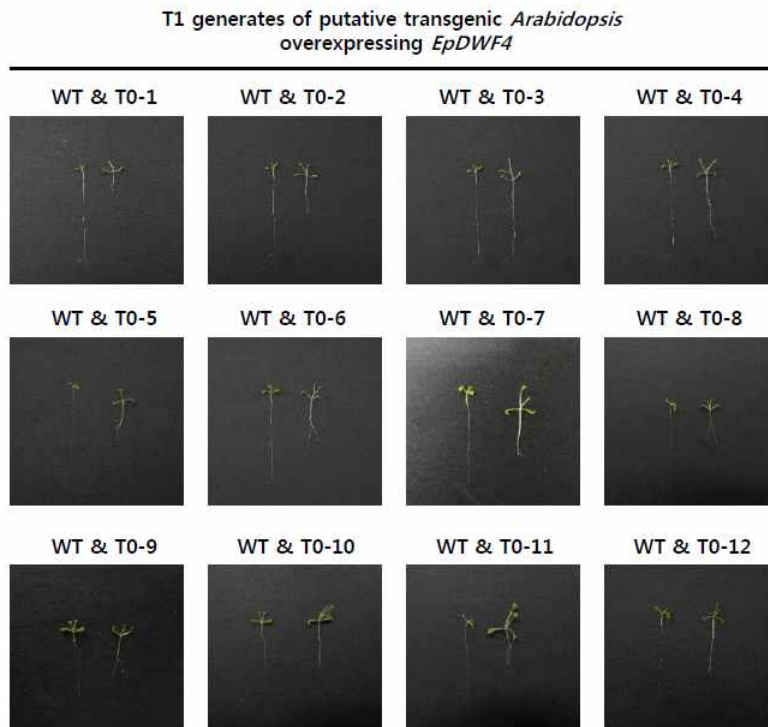


그림 117. *EpDWF4* 유전자 발현시스템이 형질전환된 T0 애기장대 식물체 종자를 파종한 후 T1 세대 형질전환 애기장대 식물체를 확보함.

- *DET2* 유전자가 과 발현된 식물체 확보 및 형질전환 식물체의 표현형 분석

*Echinacea* *DET2* 유전자의 기능을 확인하기 위해 애기장대 *DET2* mutant 식물체 CS6159 strain (TAIR)을 이용한 complementation assay 실험을 수행하였음. *EpDET2* 유전자가 과발현된 형질전환 애기장대 CS6159 식물체를 확보하기 위해 pPZP2Ha3/*EpDET2* 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 세포를 이용한 애기장대 CS6159 식물체 형질전환 후 종자를 회수하였고 2.5 mg/L hygromycin 항생제가 첨가된 애기장대 종자 배양 배지에 과종한 후 형질전환된 T0 세대 애기장대 CS6159 식물체의 발생을 유도하였음. 형질전환 실험에 이용된 애기장대 CS6159 식물체에서 총 10여개의 종자를 확보할 수 있었고 hygromycin 항생제가 첨가된 애기장대 종자 배양 배지에 과종하여 발생을 유도하였을 때 1개체만이 정상적으로 성장하였음. Wild-type 대조군과 비교하였을 때 성장 속도가 느리며 잎, 뿌리의 크기가 작은 *DET2* mutant CS6159 식물체와 다르게 hygromycin 항생제가 포함된 종자배양 배지에서 성장된 형질전환 CS6159 식물체는 wild-type과 유사한 속도로 성장하였고 wild-type의 표현형과 유사한 형태로 성장하였음 (그림 118A). 종자 배양 배지에서 발생이 유도된 wild-type 식물체, *DET2* mutant CS6159 식물체, 형질전환된 CS6159 식물체를 토양에 옮겨 심고 식물체의 성장을 유도하고 각 개체의 표현형을 비교하였음. 그림 118B에서와 같이 형질전환 CS6159 식물체는 wild-type과 유사한 크기와 형태를 지니는 표현형을 보였음. 이상의 연구결과는 애기장대 *DET2* mutant CS6159 식물체에서 *EpDET2* 유전자의 발현이 유도되었을 때 애기장대 *DET2* 유전자의 결핍에 의한 돌연변이가 보완되며 *EpDET2* 유전자가 애기장대 *DET2* 유전자와 동일한 기능을 수행한다는 것을 의미함.

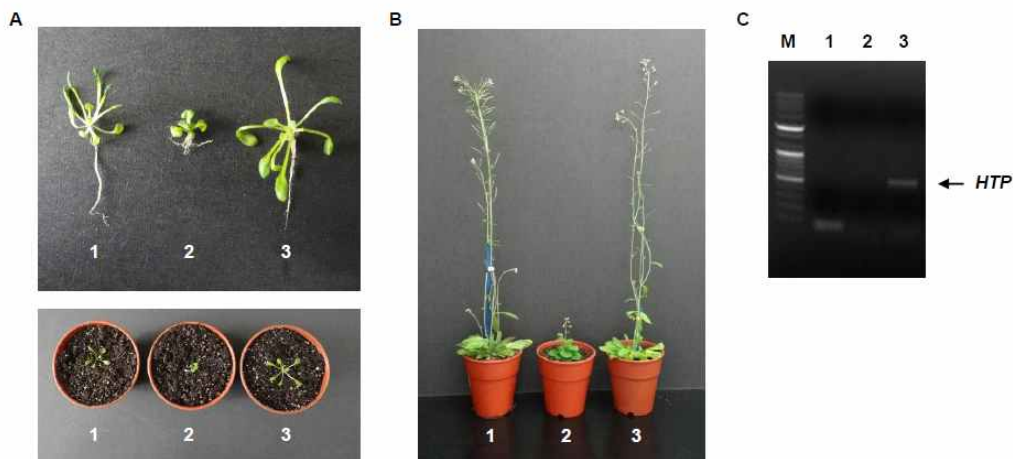


그림 118. *EpDET2* 유전자 발현시스템이 형질전환된 T0 세대 애기장대 *DET2* mutant CS6159 식물체를 확보하고 (A & B) genomic DNA PCR을 통해 *EpDET2* 유전자 발현시스템의 도입 유무를 확인함 (C) (1, wild-type 애기장대 식물체; 2, *DET2* mutant CS6159 애기장대 식물체; 3, *EpDET2* 유전자 발현시스템이 형질전환된 *DET2* mutant CS6159 애기장대 식물체).

또한 *EpDET2* 유전자 발현시스템이 형질전환된 T0 세대 애기장대 *DET2* mutant CS6159 식물체에서 종자를 채취하고 hygromycin 항생제가 첨가된 애기장대 종자 배양 배지에 과종한 후 형질전환된 T1 세대 애기장대 *DET2* mutant CS6159 식물체의 발생을 유도하였고 토양에 옮겨 심은 후 개체를 성장시킴 (그림 119).

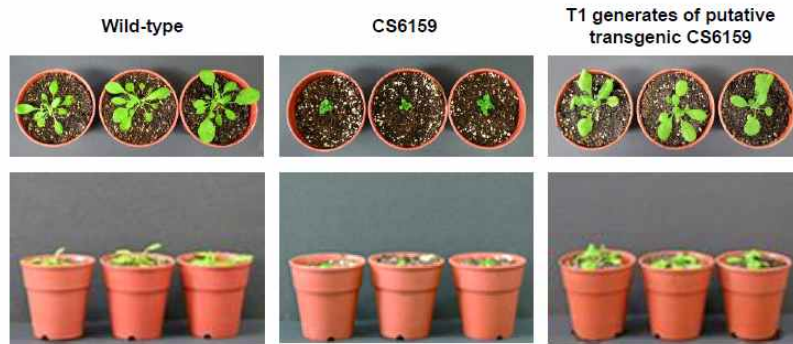


그림 119. *EpDET2* 유전자 발현시스템이 형질전환된 T1 세대 애기장대 *DET2* mutant CS6159 식물체를 확보하기 위해 식물체를 성장시킴.

*EpDET2* 유전자가 과 발현된 형질전환 애기장대 식물체를 확보하기 위해 pPZP2Ha3/*EpDET2* 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 세포를 이용한 애기장대 식물체 형질전환 후 종자를 회수하였고 2.5 mg/L hygromycin 항생제가 첨가된 애기장대 종자 배양 배지에 과종한 후 성장하는 애기장대 식물체를 확보하였음 (그림 110A). Hygromycin 항생제가 포함된 종자 배양 배지에서 성장된 형질전환 식물체는 wild-type 식물체에 비해 잎의 크기가 크고 뿌리의 길이가 작은 형태로 성장하였음. pPZP2Ha3/*EpDET2* 벡터가 형질전환된 식물체로 예측되는 식물체들을 토양에 옮겨 심어 성장을 유도 중임 (그림 110B).

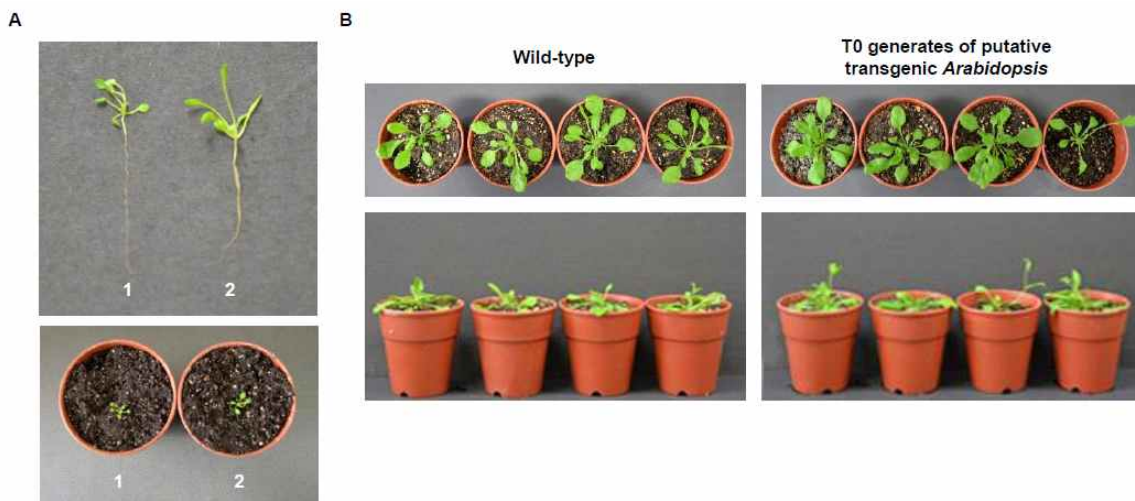


그림 110. *EpDET2* 유전자 발현시스템이 형질전환된 T0 세대 애기장대 식물체를 확보하고 (A) 토양에 옮겨 심은 후 성장을 유도함 (B).



- *SMT2* 유전자가 과 발현된 식물체 확보 및 형질전환 식물체의 표현형 분석

*Echinacea* *SMT2* 유전자가 과발현된 형질전환 애기장대 식물체를 확보하기 위해 pPZP2Ha3/Ep*SMT2* 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 세포를 이용한 애기장대 식물체 형질전환 후 종자를 회수하였고 2.5 mg/L hygromycin 항생제가 첨가된 애기장대 종자 배양 배지에 과종한 후 성장하는 애기장대 식물체를 확보하였음 (그림 111A). Hygromycin 항생제가 포함된 종자 배양 배지에서 성장된 형질전환 식물체는 wild-type 식물체에 비해 잎의 크기가 크고 뿌리의 길이가 작은 형태로 성장하였음. pPZP2Ha3/Ep*SMT2* 벡터가 형질전환된 식물체로 예측되는 식물체들을 토양에 옮겨 심어 성장을 유도 중이며 wild-type 대조군에 비해 성장 속도가 빠른 것으로 확인됨 (그림 111B).

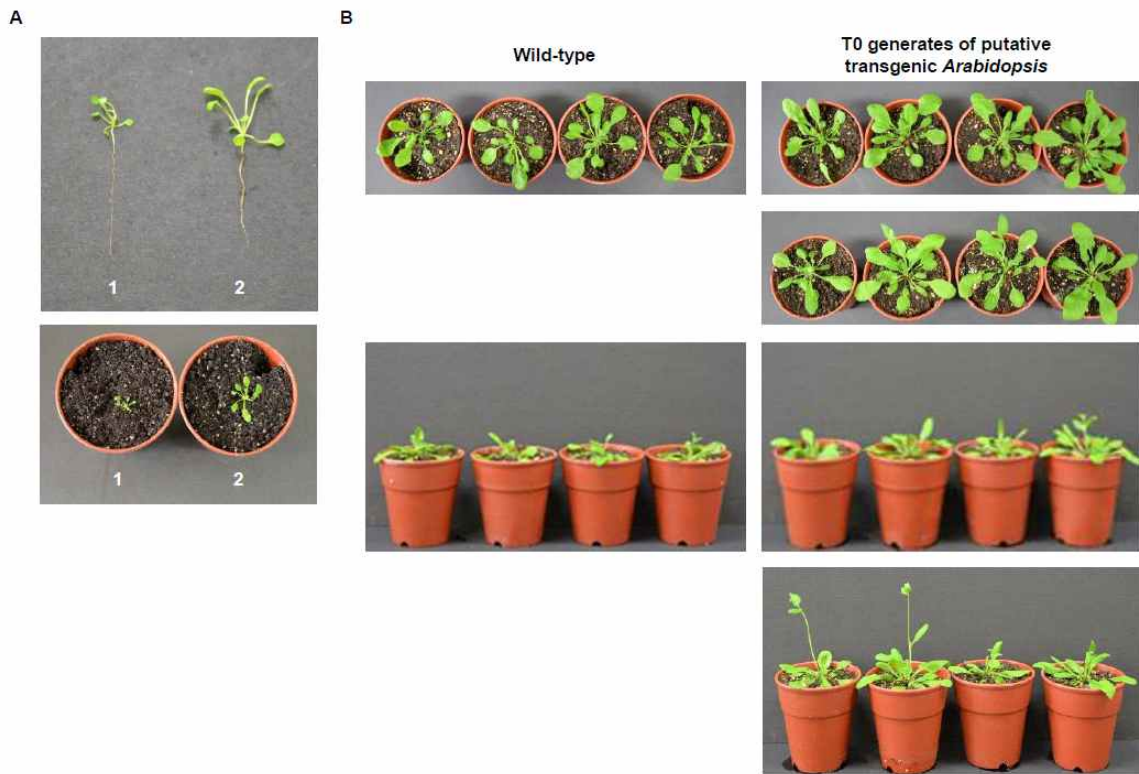


그림 111. *SMT2* 유전자 발현시스템이 형질전환된 T0 세대 애기장대 식물체를 확보하고 (A) 토양에 옮겨 심은 후 성장을 유도함 (B).

○ BR 추출 및 GC 분석

*Echinacea* *DWF4* 유전자 발현시스템이 도입된 형질전환 애기장대 T0 세대 식물체에서 *EpDWF4* 유전자의 과 발현에 의한 BR 호르몬의 변화를 확인하였음. Genomic DNA PCR에서 *EpDWF4* 유전자 발현시스템이 도입된 것으로 확인된 T0 세대 애기장대 형질전환체의

앞에서 BR 호르몬을 추출하고 GC 분석 연구를 수행함 (그림 112). Wild-type 애기장대 잎 및 T0 세대 애기장대 형질전환체 잎 5 g을 *n*-hexane (30 mL)으로 3번 반복 추출하여 hexane 추출물 (60 mg)을 확보하였고 추출물 3.4 mg 당 1 M KOH/EtOH 용매 1 mL을 첨가하여 1시간 동안 saponincation 반응을 진행하였음. 반응물에 동량의 *n*-hexane을 혼합한 후 hexane 분획물을 확보하였고 농축 후 pyridine 용매에 용해시켰으며 *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA)를 첨가하고 80°C에서 1시간 동안 trimethylsilylation (TMS) 반응을 유발시켜 GC (Shimadzu GC-MS-QP2010) 분석을 위한 BR 추출물 시료를 확보하였음. GC 분석에 사용한 column은 silica capillary column (DB-5: 30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m, USA)이었고 column 온도는 초기 온도가 60°C이었으며 2분간 유지하다가 1분에 15°C씩 320°C까지 올리고 320°C에서 10분간 유지하였음.

또한 *EpDET2*, *EpSMT2* 유전자 발현시스템이 도입된 형질전환 애기장대 식물체에서 *EpDET2*, *EpSMT2* 유전자의 과 발현에 의한 BR 호르몬의 변화를 확인하기 위한 BR 호르몬 추출 및 GC 분석 연구를 T0 또는 T1 세대 애기장대 형질전환체 확보 후 수행함.

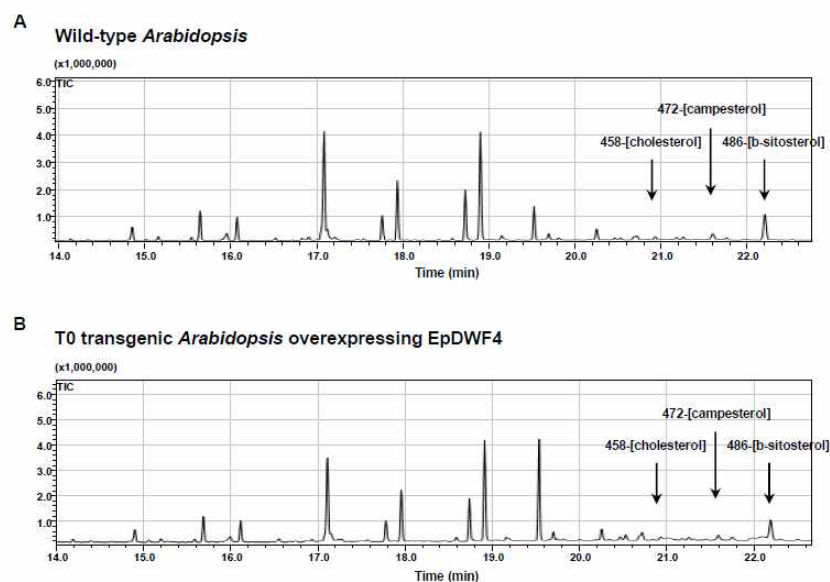


그림 112. *EpDWF4* 유전자 발현시스템이 도입된 형질전환 T0 세대 애기장대 식물체에서 BR 호르몬을 추출하고 GC 분석 연구를 수행함.

### 3. *DWF3* 유전자 발현 억제 관상작물 형질전환체의 환경위해성 평가심사서 작성 의뢰

*EpDWF3* 유전자의 발현이 억제된 관상작물 난쟁이 형질전환체의 유전정보 분석을 위해 노지에서 성장 중인 *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체 (T0-51, 52, 53, 54, 55, 70, 71)에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *Echinacea* genomic DNA에 *EpDWF3*

RNAi 벡터시스템의 존재 유무를 확인하였음. 형질전환 개체의 잎 (~ 1 g)을 LN<sub>2</sub>와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하였고 GenElute Plant Genomic DNA Prep Mini Kit (Sigma)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였음. 250 ng genomic DNA, pFGC5941/shEpDWF3 벡터의 *EpDWF3* sense 부위 및 *Echinacea* 18s rRNA 유전자에 특이적으로 결합하는 primer를 이용한 PCR을 수행하였고 *EpDWF3* sense PCR 산물의 존재를 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음. 그림 1-12B에서와 같이 노지에서 성장 중인 *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체 중 52번 형질전환개체만 genomic DNA에 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템을 지니는 것으로 확인됨 (그림 113).

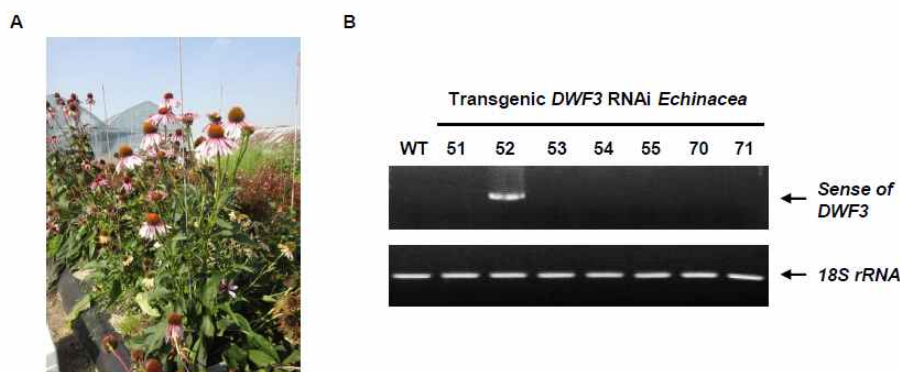


그림 113. 노지에서 성장 중인 *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체 (A)에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 존재 유무를 확인함.

또한 노지에서 성장 중인 *EpDWF3* RNAi *Echinacea* T52 형질전환 개체에서 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템에 의한 *EpDWF3* 유전자의 발현 억제를 확인하기 위한 RT-PCR 및 real-time PCR을 수행하였음. *EpDWF3* RNAi *Echinacea* T52 형질전환 개체의 잎 (~ 1 g)을 LN<sub>2</sub>와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하고 Hybrid-R™ Plant RNA Prep Mini Kit (GeneAll)를 이용하여 total RNA를 추출하였음. 2 µg의 total RNA, poly d(T) primer 및 ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega)를 이용한 reverse transcription 반응을 통해 cDNA를 합성하였고 RT-PCR 및 real-time PCR의 주형으로 사용하였음. *EpDWF3* 유전자 및 *Tubulin* 유전자를 증폭할 수 있는 PCR primer (forward of *EpDWF3*, 5'-GATTACAAGTCTATGCCTTTCACACAATGC-3'; reverse of *EpDWF3*, 5'-CTCGAGCTCTACTACATCACGTTTTTGCAC-3'; forward of *Tubulin*, 5'-CCACGTCTCCACTTCTTCATGGT-3'; reverse of *Tubulin*, 5'-CTCCATCTCATCCATTCCTTCACC-3')를 이용한 PCR을 통해 *EpDWF3* 유전자의 발현이 *EpDWF3* RNAi *Echinacea* T52 형질전환 개체에서 감소하는 것으로 확인되었음 (그림 114A). 또한 *EpDWF3* 유전자 및 *Tubulin* 유전자를 증폭할 수 있는 real-time PCR primer (forward of *EpDWF3*, 5'-ACCACCATGACTCTTGCCGT-3'; reverse of *EpDWF3*, 5'-AGAGTCACCGATGCACCCTT-3'; forward of *Tubulin*, 5'

-ATGATGTGTGCTGCTGACCC-3'; reverse of *Tubulin*, 5' -TCGTCAACTTCCTTGGTGCTCA-3') 및 SYBR Premix EX Taq™ II (Takara) real-time PCR kit를 이용하여 *EpDWF3* 유전자의 발현량을 비교한 결과 *EpDWF3* RNAi *Echinacea* T52 형질전환 개체의 *EpDWF3* 유전자 발현은 대조군에 비해 약 50% 정도 감소하는 것으로 확인됨 (그림 114B). *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 증식을 위한 영양 번식을 제1협동과제 연구팀에서 진행 중이며 영양번식을 통한 개체의 증식 후 환경 위해성 평가심사서 작성을 의뢰에 활용할 것임.

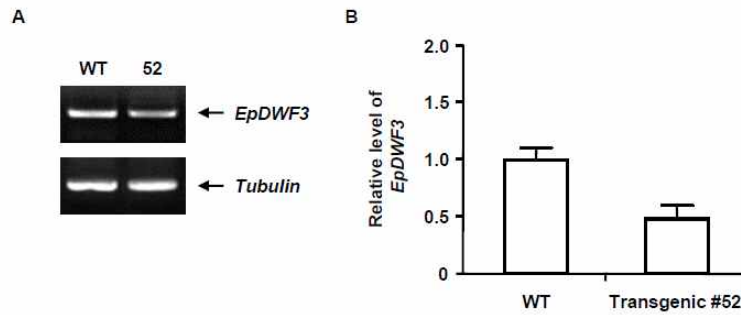


그림 114. 노지에서 성장 중인 *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체 (A)에서 total RNA를 추출하고 RT-PCR (A) 및 real-time PCR (B)을 통해 *EpDWF3* 유전자의 발현 억제를 확인함.

### 3-4-2. 제2세부과제 : 관상작물 형질전환 체계 확립 및 난쟁이 관상작물 개발

#### 1. *DWF3* 유전자의 발현이 억제된 관상작물 난쟁이 형질전환체 순화 및 특성조사

*EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 유전정보 분석에서 *EpDWF3* RNAi 발현시스템이 도입되고 줄기 및 꽃을 형성한 개체의 초장 및 꽃의 크기는 야생형 wild-type 대조군에 비해 감소하는 것으로 나타남. 대조군 wild-type의 초장 및 꽃의 평균적인 크기는 약 100 cm, 9 cm 이었고 개체에 따라 약간의 차이를 보이기는 하지만 *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 경우 약 38 ~ 50 cm의 초장, 5 ~ 7 cm의 꽃의 크기를 보였음.

1차 선발배지에서 신초 생성 후 뿌리의 재분화가 유도된 *Coreopsis* 신초들은 버미큘라이트와 펄라이트를 1:1 비율로 섞은 토양이 담긴 12 cm 크기의 비닐화분에 옮겨 심은 후, 투명한 비닐봉투 (50×50 cm<sup>2</sup>)에 담아 밀봉하고, 16시간 일장, 22 ± 2°C로 유지되는 배양실에서 1차 순화시킨 후 온실로 옮겨 유지하였음. 식물체가 담겨 있는 비닐봉투에 순차적으로 구멍을 뚫어 각각의 개체들이 비교적 저습의 환경에 잘 적응하도록 하였으며, 식물체의 상태를 고려하면서 약 14-20일 후 비닐을 완전히 제거하고 유리온실로 옮겨주는 방식을 채택하였음. 거의 모든 재분화 개체는 고사하는 일 없이 100% 순화되었음.



그림 115. 토양에서 순화 중인 *CrDWF3* RNAi *Coreopsis* 형질전환 개체.

*CrDWF3* RNAi 형질전환 실험에 이용된 *Coreopsis rosea* 'Uridream 10' 식물체의 크기는 대략적으로 43 cm 정도이며, 줄기 녹색정도는 중간, 안토시아닌 착색은 없고, 털은 있으며, 마디 길이는 7.7 cm 정도임. 잎 배열은 마주나기이며, 깃털모양 잎의 형태는 1회 깃털모양 잎이며, 윗면의 녹색 정도는 중간이며, 잎 모양은 선형이며, 윗면 및 아랫면의 털은 약함. 꽃은 홑꽃이며, 설상화 윗면의 색은 2A, 아랫면의 색은 3B, 통상화 색은 노란색, 설상화 바깥쪽의 파인정도는 얇으며, 설상화 바깥쪽의 굵은 정도는 곧으며 설상화의 수는 8장, 포엽 총포외열의 굵은 정도는 안으로 굵음. 약의 색은 오렌지색, 꽃자루의 굵기는 1.12 mm, 길이는 16.15 mm 정도임. *CrDWF3* RNAi 형질전환 재분화 개체는 식물체 초장이 20 ~ 30 cm



정도로 키가 작아지긴 하였으나 삼목 후대에서의 초장 변화 확인 후 *CrDWF3* RNAi 벡터시스템 형질전환에 의한 표현형 변화에 대한 결론을 도출할 수 있을 거라 생각됨. 기타 잎의 모양이나 줄기의 모양은 크게 변화가 없는 것으로 나타났음.

## 2. 관상작물 유래 *DWF4*, *DET2*, *SMT2* RNAi 벡터시스템이 형질전환된 *Agrobacterium* 확보

### ○ 관상작물 유래 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템이 형질전환된 *Agrobacterium* 확보

제1세부 연구과제에서 구축한 *Echinacea*, *Coreopsis* 관상작물 *EpDWF4*, *EpDET2*, *EpSMT2* 유전자 동시 발현 억제용 pFGC5941/shEpDET2:DWF4:SMT2 벡터가 형질전환된 *Agrobacterium* 세포주를 확보하기 위해 재조합 미생물에서 추출한 pFGC5941/shEpDET2:DWF4:SMT2 벡터를 electroporation 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, LBA4404 세포에 각각 형질전환시키고 50 µg/mL kanamycin, 50 µg/mL gentamycin 또는 50 µg/mL kanamycin, 25 µg/mL rifampicin 항생제가 포함된 LB 고형 배지에서 선별하여 pFGC5941/shEpDET2:DWF4:SMT2 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, LBA4404 세포를 확보하였음. 재조합 *Agrobacterium* 세포를 각각의 항생제가 포함된 LB 액상 배지에서 2일 동안 (28°C) 배양하고 pFGC5941/shEpDET2:DWF4:SMT2 plasmid DNA를 추출하였고 PCR을 통해 pFGC5941/shEpDET2:DWF4:SMT2 벡터의 존재를 확인하였음 (그림 116).

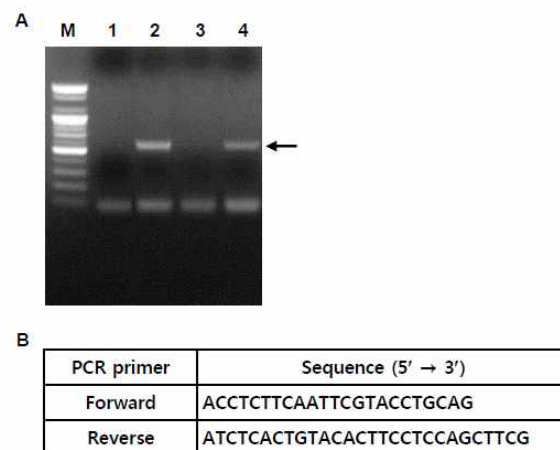
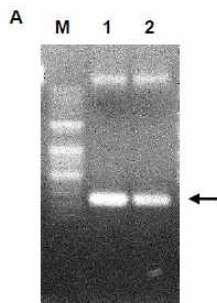


그림 116. (A) 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, LBA4404 세포에서 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 유전자의 존재를 확인함 (1, normal *Agrobacterium tumefaciens* GV3101; 2, *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 transformed with pFGC5941/shEpDET2:DWF4:SMT2; 3, normal *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404; 4, *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 transformed with pFGC5941/shEpDET2:DWF4:SMT2). (B) PCR에 이용된 primer 염기서열.

○ 관상작물 유래 *EpDWF4* RNAi 벡터시스템이 형질전환된 *Agrobacterium* 확보

제1세부과제 연구과제에서 구축한 *Echinacea*, *Coreopsis* 관상작물 *DWF4* 유전자 발현 억제용 pFGC5941/shEpDWF4 벡터가 형질전환된 *Agrobacterium* 세포주를 확보하기 위해 재조합 미생물에서 추출한 pFGC5941/shEpDWF4 벡터를 electroporation 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, LBA4404 세포에 각각 형질전환시키고 50 µg/mL kanamycin, 50 µg/mL gentamycin 또는 50 µg/mL kanamycin, 25 µg/mL rifampicin 항생제가 포함된 LB 고형 배지에서 선별하여 pFGC5941/shEpDWF4 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, LBA4404 세포를 확보하였음. 재조합 *Agrobacterium* 세포를 각각의 항생제가 포함된 LB 액상 배지에서 2일 동안 (28°C) 배양하고 pFGC5941/shEpDWF4 plasmid DNA를 추출하였고 PCR을 통해 pFGC5941/shEpDWF4 벡터의 존재를 확인하였음 (그림 117).



B

PCR primer	Sequence (5' → 3')
Forward	GGCGCGCCTATAAAGTTATGACATTCC
Reverse	ATTTAAATAAATGGTGGATAAATATCGCC

그림 117. (A) 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, LBA4404 세포에서 plasmid DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF4* sense 유전자의 존재를 확인함 (1, *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 transformed with pFGC5941/shEpDWF4; 2, *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 transformed with pFGC5941/shEpDWF4). (B) PCR에 이용된 primer 염기서열.

3. 관상작물에 *Agrobacterium*을 이용한 *DWF4*, *DET2*, *SMT2* RNAi 벡터시스템 형질전환

○ 관상작물 *Echinacea*에 재조합 *Agrobacterium*을 이용한 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템 및 *EpDWF4* RNAi 벡터시스템 형질전환

*EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 또는 *EpDWF4* RNAi 벡터시스템이 형질전환된 *Echinacea* 형질전환 개체를 확보하기 위한 형질전환 및 재분화 연구를 수행함.

*Echinacea*를 무균상태에서 기내 발아시키기 위해 *Echinacea* 종자의 외피를 제거하고 70% ethanol 용액에 1분, 1% NaOCl 용액에 20분간 침지시킨 후 멸균수로 10회 세척하여

남은 NaOCl 잔여물을 제거하였고 E1 고품 배지 (100 mg/L myo-inositol, 2 mg/L glycine, 1.5% sucrose, 0.7% micro agar, 2 ml/L plant preservation mix., pH 5.8)에 파종하였음. *Echinacea* 종자는 16시간 명상태, 8시간 암상태, 24°C 배양 조건에서 배양하였으며, 약 6주에서 8주 후 생성된 어린잎을 약 1 cm<sup>2</sup> 크기로 잘라 잎 절편체를 확보하고 재조합 *Agrobacterium*을 이용한 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터 및 *EpDWF4* RNAi의 형질전환 실험에 사용하였음. pFGC5941/shEpDET2:DWF4:SMT2 또는 pFGC5941/shEpDWF4 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium* LBA4404 세포를 50 µg/mL kanamycin, 25 µg/mL rifampicin이 포함된 LB 액상 배지에서 이틀간 배양한 후 세포를 회수하였고 3% sucrose가 함유된 MS (Murashige & Skoog medium) 액상 배지를 이용해 OD<sub>600</sub> 0.6 ~ 0.8 값으로 희석하여 사용하였음. 재조합 *Agrobacterium* 희석액에 잎 절편체를 10분간 침지시키고 여분의 재조합 *Agrobacterium* 희석액을 제거한 후 E1 고품 배지에 치상하였고 이틀 동안 암상태에서 배양하였음. 형질전환된 신초의 선별을 위해 잎 절편체를 식물 호르몬 6-benzylaminopurine (BAP), 1-naphthaleneacetic acid (NAA)와 DL-phosphinothricin (PPT)가 함유된 E8 고품 배지 (MS salts, 100 mg/L myo-inositol, 0.5 mg/L glycine, 2% sucrose, 0.7% microagar, 1.0 mg/L BAP, 0.01 mg/L NAA, 1 mg/L PPT)로 옮긴 후 16시간 명상태, 8시간 암상태, 24°C 배양 조건에서 배양하였음. 4주에서 6주 정도 지난 후부터 신초의 발생을 확인할 수 있었음.

뿌리 재분화를 위해 WPM 배지 (2.5 g/L Woody Plant Medium, 1.5% sucrose, 1.5 mg/L IBA, 0.4% phytagal)에 치상한 후 16시간 명상태, 8시간 암상태, 24°C 배양 조건에서 배양하여 뿌리의 발달을 유도하였음. 약 2달 정도의 뿌리 생성 기간을 거친 후 토양에 옮겨 심어 형질전환 식물체의 성장을 유도하였음.

○ 관상작물 *Coreopsis*에 재조합 *Agrobacterium*을 이용한 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템 형질전환

*EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템이 형질전환된 *Coreopsis* 형질전환 개체를 확보하기 위한 형질전환 및 재분화 연구를 수행함.

재조합 pFGC5941/shEpDET2:DWF4:SMT2 벡터를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 LB 액상 배지에 48시간 배양 후, 액상 MSV 배지 (4.4 g/L MSV powder, 30 g/L saccharose, pH 5.7)로 OD<sub>600</sub> 값이 0.6 ~ 0.8 정도가 되도록 희석하여 사용하였음. 기내 배양을 통해 신선하게 유지되고 있는 *Coreopsis* 녹색 줄기를 약 0.5 ~ 1 cm 정도의 절편체가 되도록 절단하고 재조합 *Agrobacterium* 희석액에 10분간 접종시킨 후 멸균된 여과지를 이용하여 여분의 재조합 *Agrobacterium* 희석액을 제거하였음. 재조합 *Agrobacterium* 희석액이 접종된 줄기 절편체를 0.5 mg/L indole-3-acetic acid (IAA), 0.2 mg/L thidiazuron (TDZ)가 첨가된 MSV 고품 배지 (4.4 g/L MSV powder, 30 g/L

saccharose, 0.7% microagar, pH 5.7)에 치상하였고 암상태에서 3일 동안 배양한 후 300 mg/L cefotaxim을 함유하는 MSV 액상 배지로 세척하였음. 형질전환된 신초의 선별을 위해 줄기 절편체를 0.5 mg/L IAA, 0.2 mg/L TDZ 및 300 mg/L cefotaxim, 1 mg/L PPT가 함유된 MSV 고형 배지에 치상한 후 16시간 명상태, 8시간 암상태, 24°C 배양 조건에서 배양하였음. 2주에서 3주 정도 지난 후부터 신초의 발생을 확인할 수 있었음.

형질전환 후 생성된 신초에서 뿌리의 재분화를 위해 신초를 300 mg/L cefotaxim, 1 mg/L PPT가함유된 1/2 MSV 고형 배지에 치상하였고 16시간 명상태, 8시간 암상태, 24°C 배양 조건에서 배양하여 뿌리의 발달을 유도하였음.

뿌리의 재분화가 유도된 형질전환 신초를 흐르는 물로 씻어 여분의 배지를 제거하였고 버미큘라이트, 펄라이트, 상토가 1:1:1 비율로 혼합된 토양에 옮겨 심고 비닐 랩으로 감싸 밀봉한 후 16시간 일장, 24 ± 2°C로 유지되는 배양실에서 1차 순화시킨 후 온실로 옮겨 개체의 성장을 유도하였음.

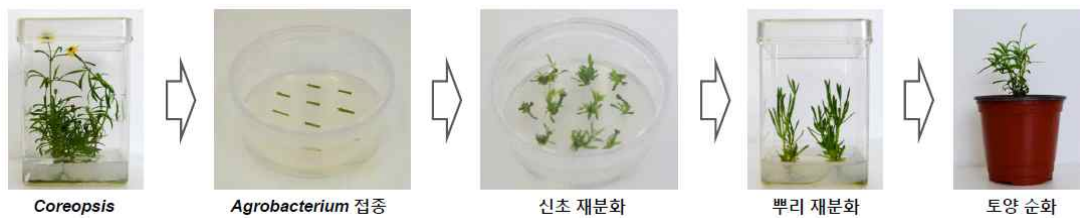


그림 118. *Coreopsis* 식물체 형질전환 및 재분화 과정

#### 4. *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자의 발현이 억제된 관상작물 형질전환체 확보

○ *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자의 발현이 동시에 억제된 관상작물 *Echinacea* 형질전환체 확보

관상작물 *Echinacea* 형질전환 및 재분화 연구에서 확보한 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음. 형질전환 개체의 잎 (~ 1 g)을 LN<sub>2</sub>와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하였고 GenElute Plant Genomic DNA Prep Mini Kit (Sigma)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였음. 250 ng genomic DNA, pFGC5941/shEpDET2:DWF4:SMT2 벡터의 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위 및 *Echinacea* 18s rRNA 유전자에 특이적으로 결합하는 primer를 이용한 PCR을 수행하고 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위 PCR 산물의 존재를 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함 (그림 119 ~ 128).

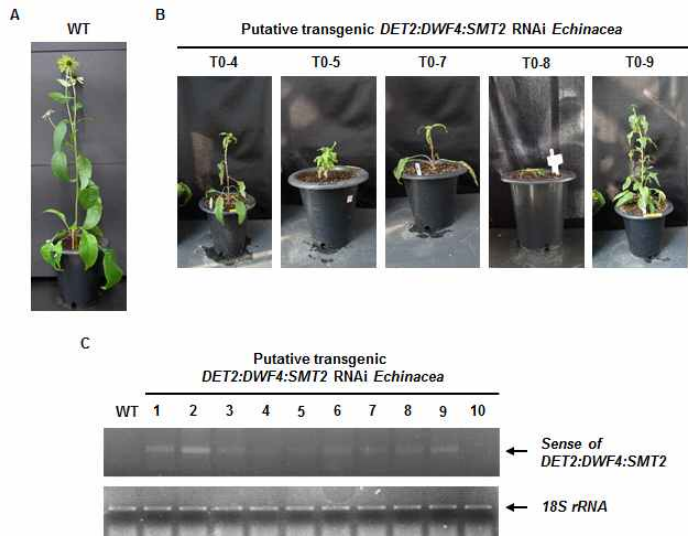


그림 119. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-1 ~ T0-10). (C) *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위, 18s rRNA genomic DNA PCR 산물.

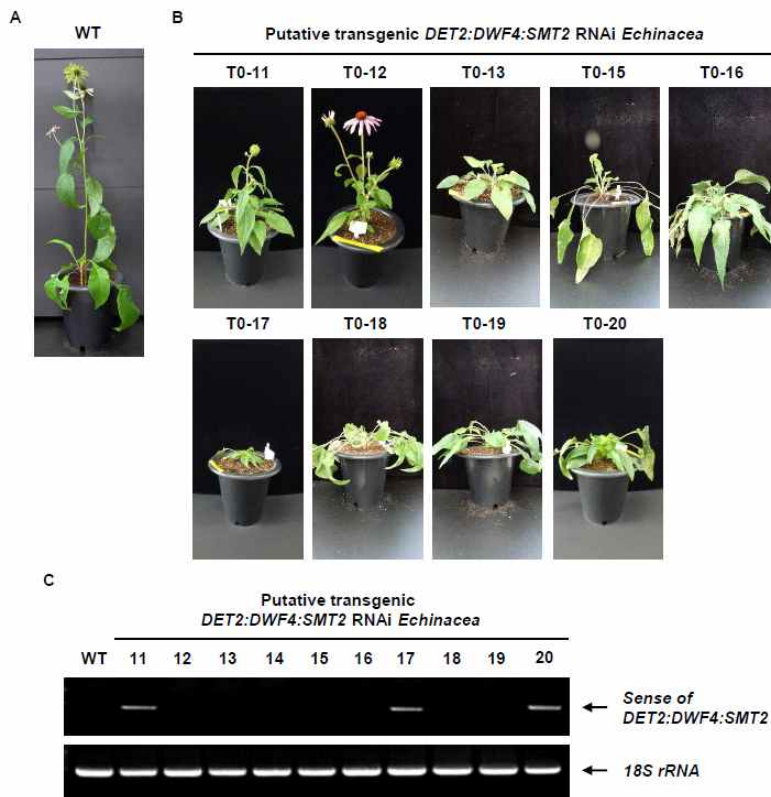


그림 120. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-11 ~ T0-20). (C) *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위, 18s rRNA genomic DNA PCR 산물.



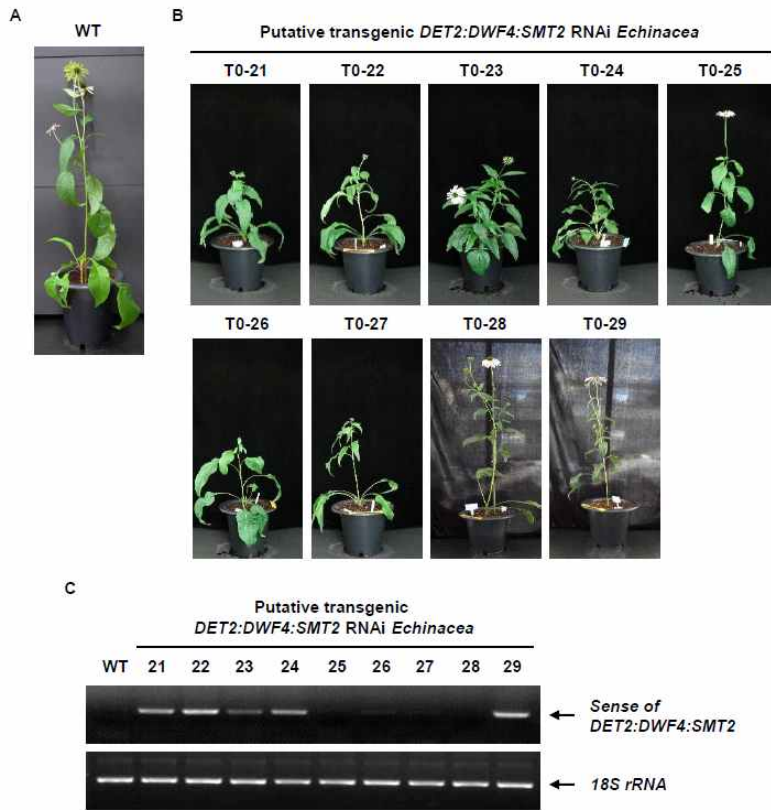


그림 121. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-21 ~ T0-29). (C) *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위, 18s rRNA genomic DNA PCR 산물.

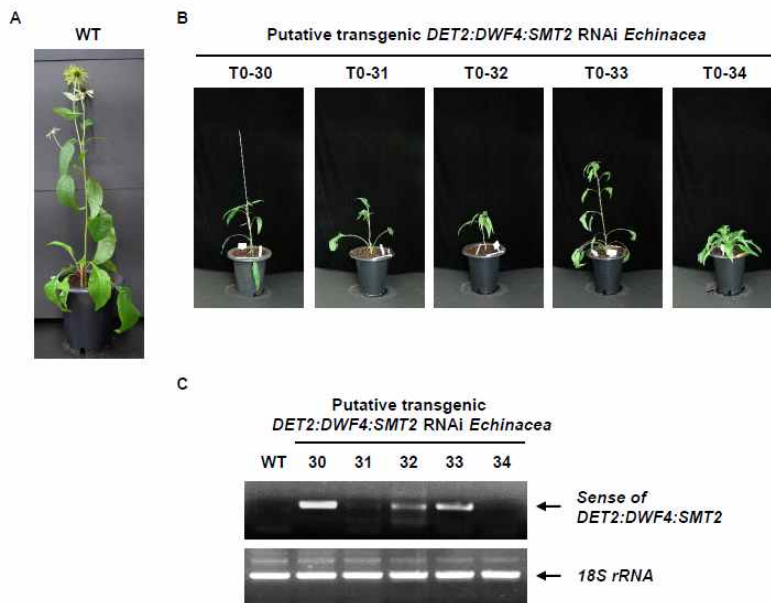


그림 122. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-30 ~ T0-34). (C) *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위, 18s rRNA genomic DNA PCR 산물.

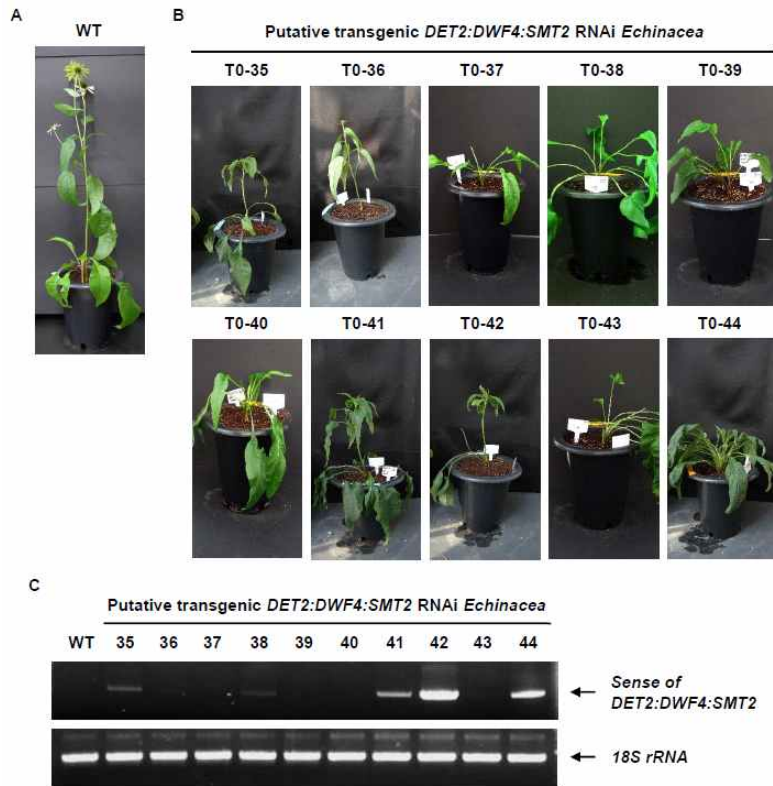


그림 123. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-35 ~ T0-44). (C) *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위, 18s rRNA genomic DNA PCR 산물.

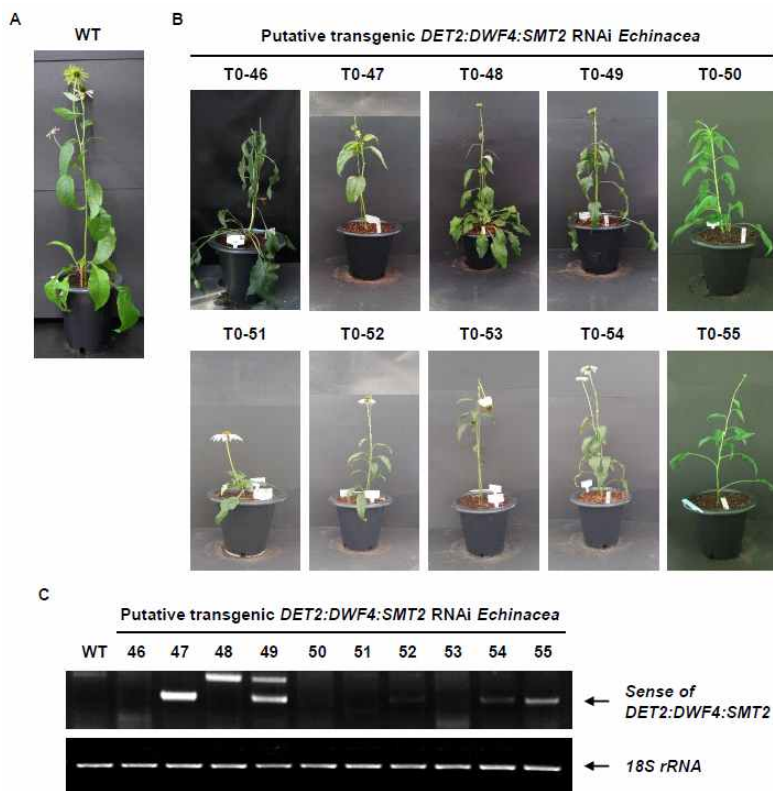


그림 124. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-46 ~ T0-55). (C) *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위, 18s rRNA genomic DNA PCR 산물.

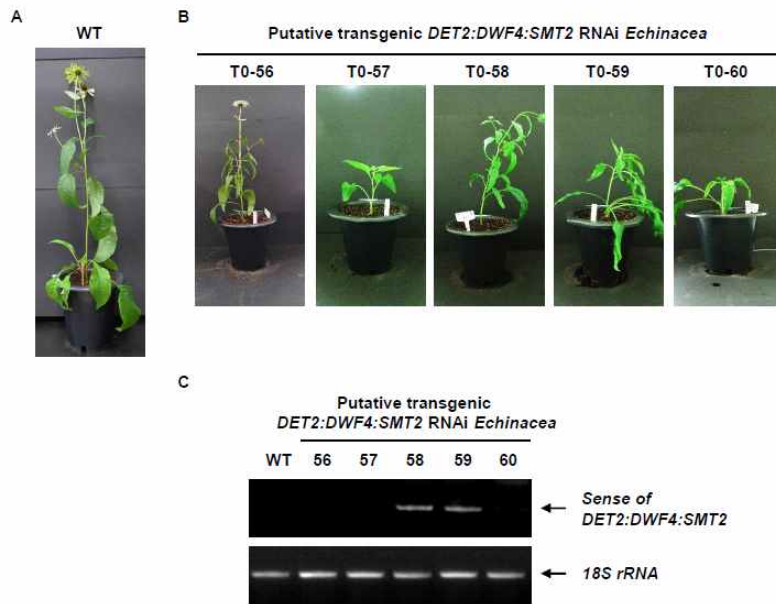


그림 125. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-56 ~ T0-60). (C) *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위, 18s rRNA genomic DNA PCR 산물.

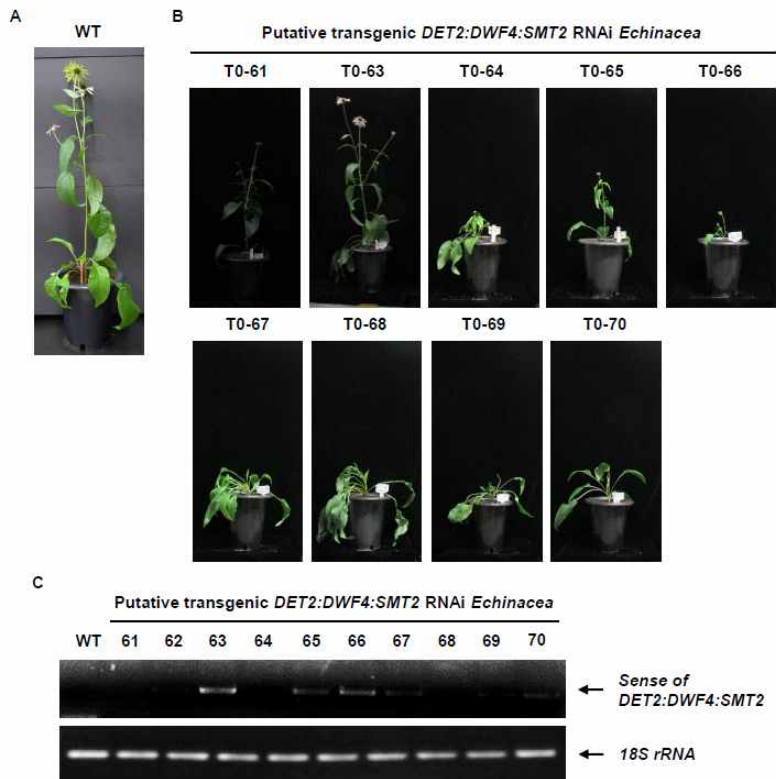


그림 126. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-61 ~ T0-70). (C) *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위, 18s rRNA genomic DNA PCR 산물.

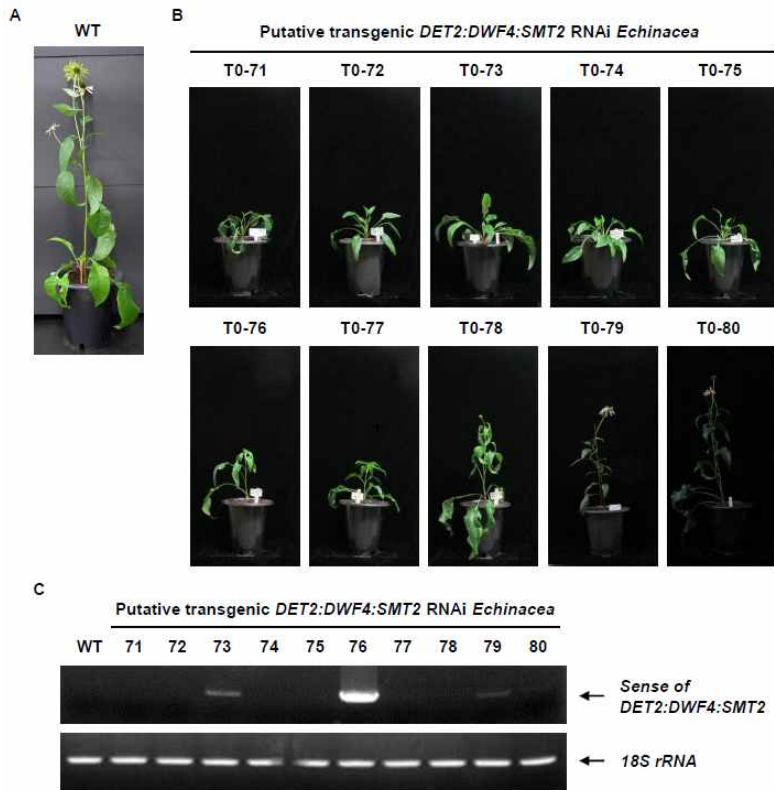


그림 127. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-71 ~ T0-80). (C) *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위, 18S rRNA genomic DNA PCR 산물.

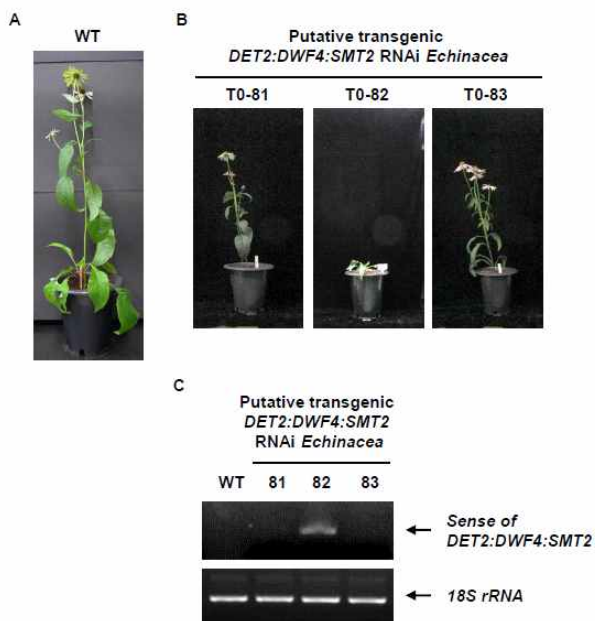


그림 128. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-81 ~ T0-83). (C) *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위, 18S rRNA genomic DNA PCR 산물.

토양에 순화 중인 형질전환 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 genomic DNA PCR 결과 총 83 개체 중 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 발현시스템이 도입된 개체는 42 개체 (T0-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 38, 41, 42, 44, 47, 49, 52, 54, 55, 58, 59, 63, 65, 66, 67, 70, 73, 76, 79, 82)이었고 이중 27 개체 (T0-4, 9, 11, 21, 22, 23, 24, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 41, 42, 47, 49, 52, 54, 55, 58, 59, 63, 65, 76, 79, 82)에서 줄기 및 꽃을 형성하는 성장을 보였음 (표 22). 이중 17 개체 (T0-4, 9, 11, 24, 29, 31, 32, 33, 35, 42, 55, 58, 59, 65, 76, 79, 82)의 증식을 위한 영양 번식을 제1협동과제 연구팀에 의뢰하여 진행하였음.

표 22. 형질전환 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체

형질전환 <i>Echinacea</i> 개체	<i>EpDET2:EpDWF4:EpSMT2</i> RNAi 발현시스템 도입 유무	식물체 성장 정도 (줄기 형성 유무)	영양번식 시도 여부
T0-1	도입	-	-
T0-2	도입	-	-
T0-3	도입	-	-
T0-4	도입	줄기 형성	시도
T0-5	도입	-	-
T0-6	도입	-	-
T0-7	도입	-	-
T0-8	도입	-	-
T0-9	도입	줄기 형성	시도
T0-10	-	줄기 형성	-
T0-11	도입	줄기 형성	시도
T0-12	-	줄기 형성	-
T0-13	-	-	-
T0-14	-	-	-
T0-15	-	-	-
T0-16	-	-	-
T0-17	도입	-	-
T0-18	-	-	-
T0-19	-	-	-
T0-20	도입	-	-
T0-21	도입	줄기 형성	-
T0-22	도입	줄기 형성	-
T0-23	도입	줄기 형성	-



T0-24	도입	줄기 형성	시도
T0-25	-	줄기 형성	-
T0-26	-	줄기 형성	-
T0-27	-	줄기 형성	-
T0-28	-	줄기 형성	-
T0-29	도입	줄기 형성	시도
T0-30	도입	줄기 형성	-
T0-31	도입	줄기 형성	시도
T0-32	도입	줄기 형성	시도
T0-33	도입	줄기 형성	시도
T0-34	-	-	-
T0-35	도입	줄기 형성	시도
T0-36	-	줄기 형성	-
T0-37	-	-	-
T0-38	도입	-	-
T0-39	-	-	-
T0-40	-	-	-
T0-41	도입	줄기 형성	-
T0-42	도입	줄기 형성	시도
T0-43	-	-	-
T0-44	도입	-	-
T0-45	-	-	-
T0-46	-	줄기 형성	-
T0-47	도입	줄기 형성	-
T0-48	-	줄기 형성	-
T0-49	도입	줄기 형성	-
T0-50	-	줄기 형성	-
T0-51	-	줄기 형성	-
T0-52	도입	줄기 형성	-
T0-53	-	줄기 형성	-
T0-54	도입	줄기 형성	-
T0-55	도입	줄기 형성	시도
T0-56	-	줄기 형성	-
T0-57	-	줄기 형성	-
T0-58	도입	줄기 형성	시도
T0-59	도입	줄기 형성	시도
T0-60	-	-	-
T0-61	-	줄기 형성	-

T0-62	-	-	-
T0-63	도입	줄기 형성	-
T0-64	-	-	-
T0-65	도입	줄기 형성	시도
T0-66	도입	-	-
T0-67	도입	-	-
T0-68	-	-	-
T0-69	-	-	-
T0-70	도입	-	-
T0-71	-	-	-
T0-72	-	-	-
T0-73	도입	-	-
T0-74	-	-	-
T0-75	-	-	-
T0-76	도입	줄기 형성	시도
T0-77	-	-	-
T0-78	-	줄기 형성	시도
T0-79	도입	줄기 형성	-
T0-80	-	줄기 형성	-
T0-81	-	줄기 형성	-
T0-82	도입	줄기 형성	시도
T0-83	-	줄기 형성	-
계	42/83	27/42	17/27

○ *DWF4* 유전자의 발현이 억제된 관상작물 *Echinacea* 형질전환체 확보

관상작물 *Echinacea* 형질전환 및 재분화 연구에서 확보한 *EpDWF4* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *Echinacea* genomic DNA에 *EpDWF4* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음. 형질전환 개체의 잎 (~ 1 g)을 LN<sub>2</sub>와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하였고 GenElute Plant Genomic DNA Prep Mini Kit를 이용하여 genomic DNA를 추출하였음. 250 ng genomic DNA, pFGC5941/sh*EpDWF4* 벡터의 *EpDWF4* sense 부위 및 *Echinacea* 18s rRNA 유전자에 특이적으로 결합하는 primer를 이용한 PCR을 수행하고 *EpDWF4* sense 부위 PCR 산물의 존재를 통해 *EpDWF4* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음 (그림 129 ~ 133).

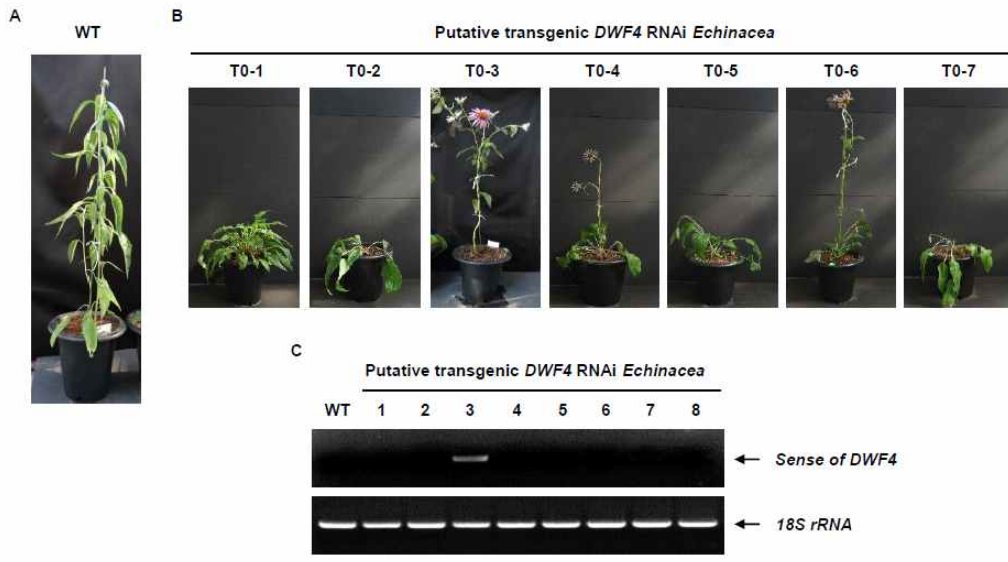


그림 129. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF4* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-1 ~ T0-8). (C) *EpDWF4* sense 부위, 18s rRNA genomic DNA PCR 산물.

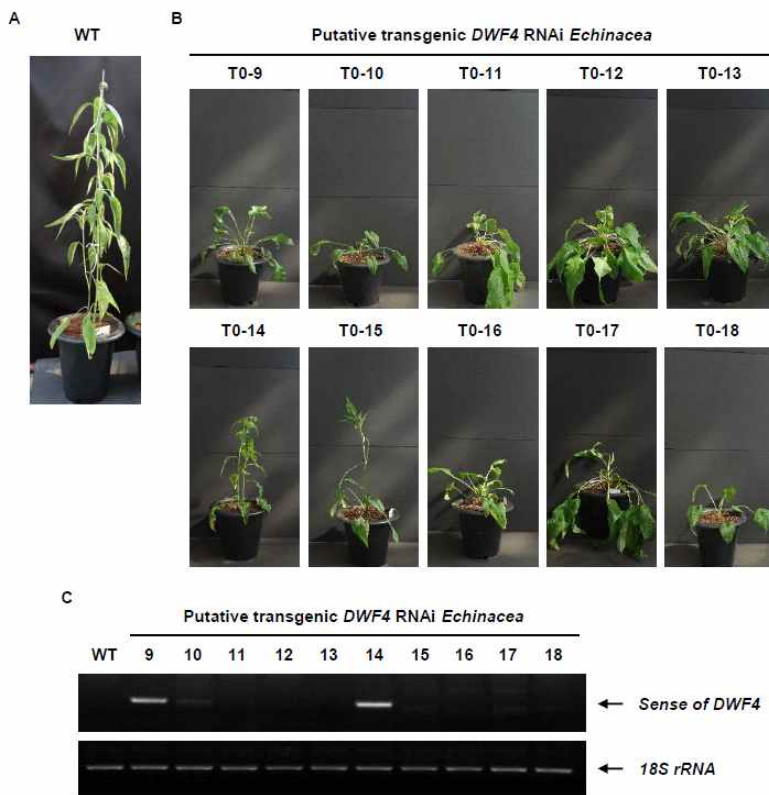


그림 130. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF4* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-9 ~ T0-18). (C) *EpDWF4* sense 부위, 18s rRNA genomic DNA PCR 산물.

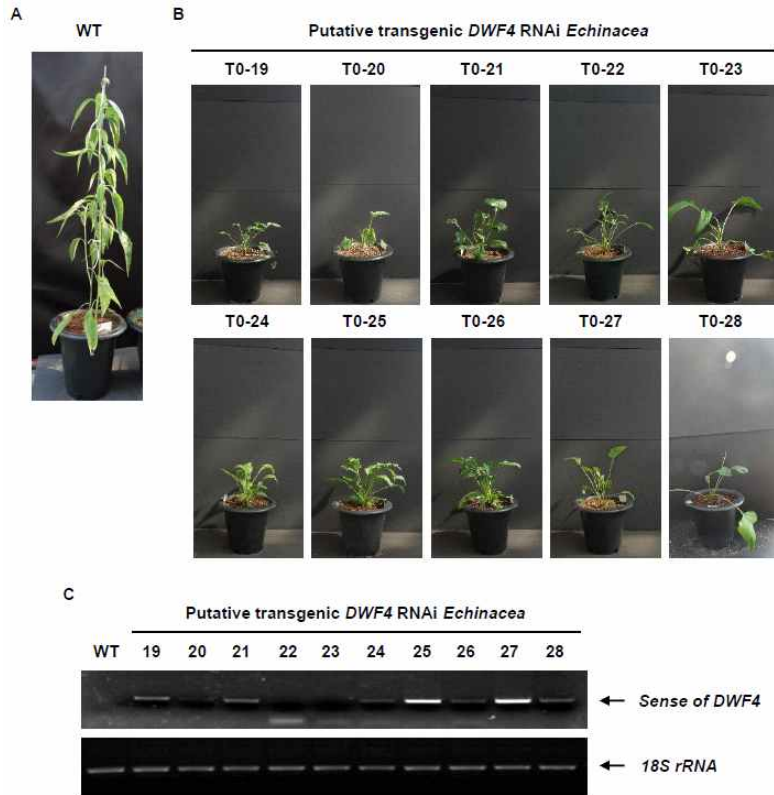


그림 131. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF4* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-19 ~ T0-28). (C) *EpDWF4* sense 부위, 18S rRNA genomic DNA PCR 산물.

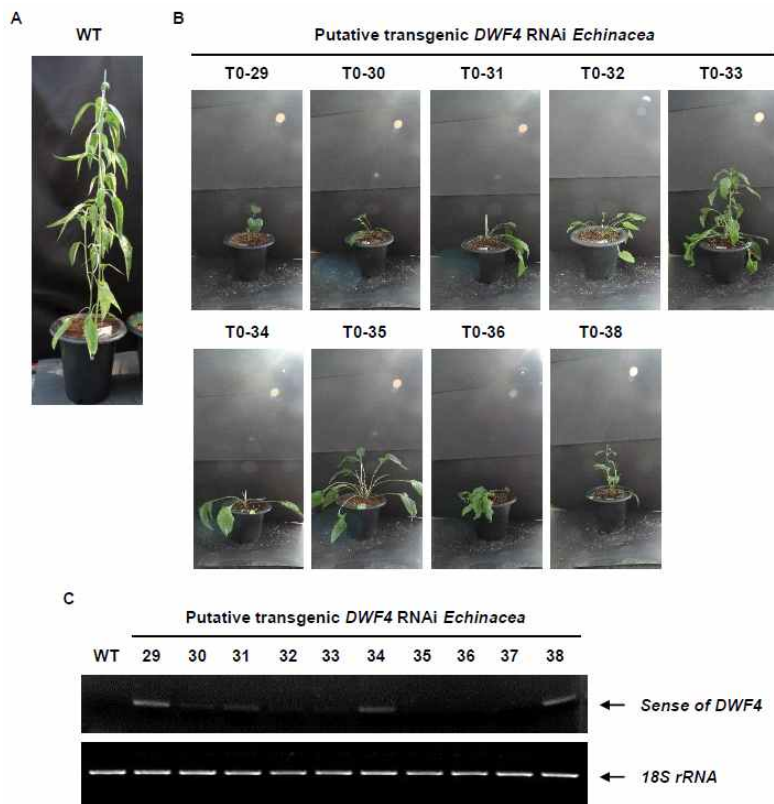


그림 132. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF4* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-29 ~ T0-38). (C) *EpDWF4* sense 부위, 18S rRNA genomic DNA PCR 산물.

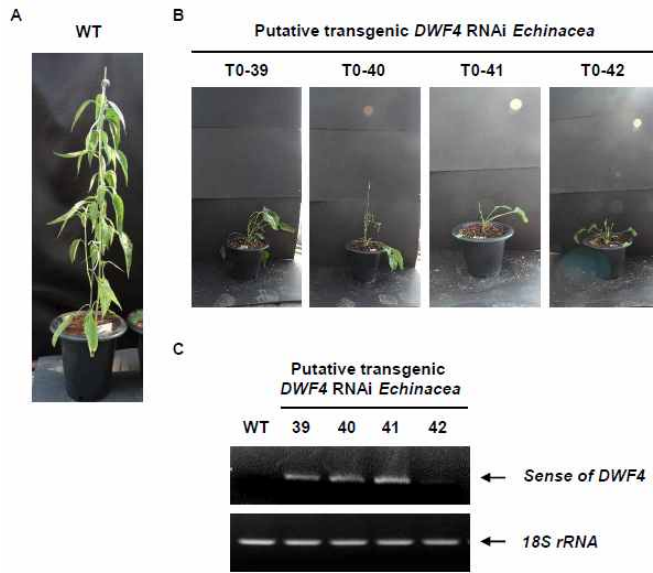


그림 133. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF4* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-39 ~ T0-42). (C) *EpDWF4* sense 부위, 18S rRNA genomic DNA PCR 산물.

토양에 순화 중인 형질전환 *EpDWF4* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 genomic DNA PCR 결과 총 42 개체 중 *EpDWF4* RNAi 발현시스템이 도입된 개체는 23 개체 (T0-3, 9, 10, 14, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 38, 39, 40, 41, 42)이었고 이중 5 개체 (T0-3, 14, 33, 38, 40)에서 줄기 및 꽃을 형성하는 성장을 보였음 (표 23). 이중 4 개체 (T0-3, 14, 38, 40)의 증식을 위한 영양 번식을 제1협동과제 연구팀에 의뢰하여 진행하였음.

표 23. 형질전환 *DWF4* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체

형질전환 <i>Echinacea</i> 개체	<i>EpDWF4</i> RNAi 발현시스템 도입 유무	식물체 성장 정도 (줄기 형성 유무)	영양번식 시도 여부
T0-1	-	-	-
T0-2	-	-	-
T0-3	도입	줄기 형성	시도
T0-4	-	줄기 형성	-
T0-5	-	-	-
T0-6	-	줄기 형성	-
T0-7	-	-	-
T0-8	-	-	-
T0-9	도입	-	-
T0-10	도입	-	-
T0-11	-	-	-
T0-12	-	-	-
T0-13	-	-	-



T0-14	도입	줄기 형성	시도
T0-15	-	줄기 형성	-
T0-16	-	-	-
T0-17	-	-	-
T0-18	-	-	-
T0-19	도입	-	-
T0-20	도입	-	-
T0-21	도입	-	-
T0-22	-	-	-
T0-23	-	-	-
T0-24	도입	-	-
T0-25	도입	-	-
T0-26	도입	-	-
T0-27	도입	-	-
T0-28	도입	-	-
T0-29	도입	-	-
T0-30	도입	-	-
T0-31	도입	-	-
T0-32	도입	-	-
T0-33	도입	줄기 형성	-
T0-34	도입	-	-
T0-35	-	-	-
T0-36	-	-	-
T0-37	-	-	-
T0-38	도입	줄기 형성	시도
T0-39	도입	-	-
T0-40	도입	줄기 형성	시도
T0-41	도입	-	-
T0-42	도입	-	-
계	23/42	5/23	4/5

○ *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자의 발현이 동시에 억제된 관상작물 *Coreopsis* 형질전환체 확보

관상작물 *Coreopsis* 형질전환 및 재분화 연구에서 확보한 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Coreopsis* 형질전환 개체 (그림 134)에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음. 형질전환 개체의 잎 (~ 0.1 g)을 지니는 1.5 ml microcentrifuge tube에 2-3 개의 glass bead (2 mm

diameter)와 LN<sub>2</sub>를 첨가하고 혼합한 후 TissueLyser (Qiagen)에서 파쇄하였고 GenElute Plant Genomic DNA Prep Mini Kit를 이용하여 genomic DNA를 추출하였음. 250 ng genomic DNA, pFGC5941/shEpDET2:DWF4:SMT2 벡터의 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위 및 *Coreopsis* 18s rRNA 유전자에 특이적으로 결합하는 primer를 이용한 PCR을 수행하고 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위 PCR 산물의 존재를 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음 (그림 135). T#28, 41, 42, 44, 45 개체의 genomic DNA에 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템이 도입된 것으로 확인되었고 개체 증식을 위한 영양 번식을 제1협동과제 연구팀에 의뢰하여 진행하였음.



그림 134. 토양 순화 중인 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 형질전환 *Coreopsis* 개체.

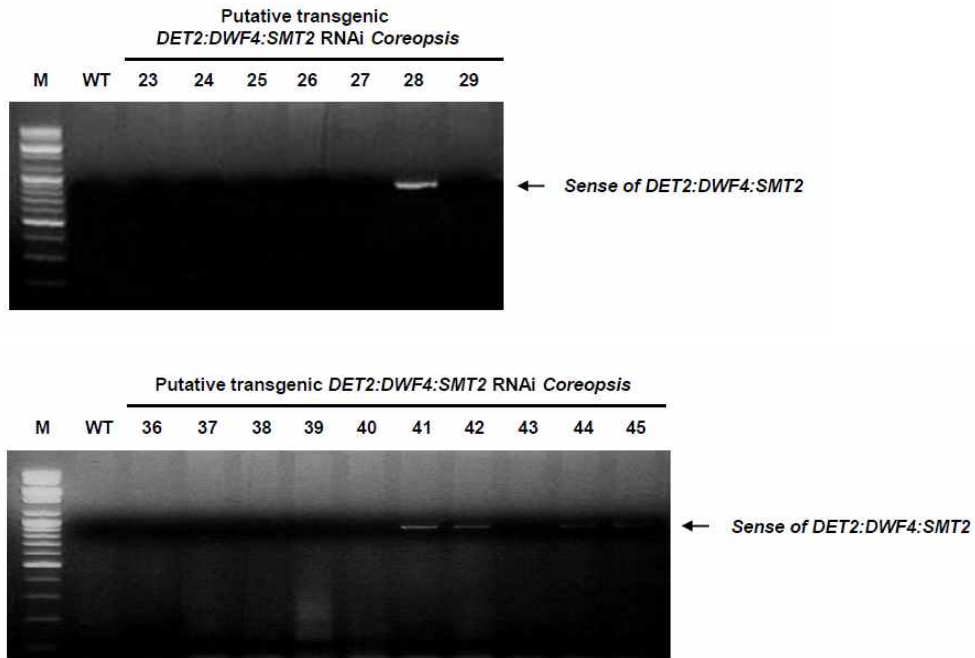


그림 135. 토양 순화 중인 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 형질전환 *Coreopsis* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함.

3-4-3. 제1협동과제 : 난쟁이 관상작물 실용화 연구

3차년도에는 지난 1, 2차년도에 수집한 품종의 재배적인 특성 조사, 증식 체계 확립 및 해외시장 진출 대비 로열티 관리체계 확립에 관한 연구를 수행하였음.

일반적으로 식물은 하우스에서 재배 시 그 본연적인 특성이 제대로 발현되기 어려움. 따라서 연구포장에 식재하여 자연 그대로의 상태에서 재배될 때 해당식물의 특성을 정확하게 파악하는데 유리함. 수집된 품종은 연구소 연구포장에서 재배시험을 실시하여 각 개체의 재배 특성을 조사하였음. 재배 기간은 품종에 따라 차이가 있지만 1~2년이며 이후에도 지속적인 모니터링을 실시하여 육종재료의 자료로 활용할 계획임.

에키네시아 형질전환체는 2014, 2015년에 걸쳐 우리꽃 연구소에서 재배적인 생육과 재배적인 특성이 조사 중이며, 코레옵시스 형질전환체는 2015년부터 우리꽃 연구소에서 재배 순화중임.

해외로열티 체계시스템을 구축하기 위해서 3개의 해외업체 또는 바이어와 상품판매와 로열티계약을 진행 중에 있음.

1. 해외수집자원의 재배 특성 조사

2013~2014년 세계 각국에서 수집한 수집자원 품종을 하우스 또는 연구포장에서 재배하여 특성을 조사하였음 (표 24). 표 24는 2차년도에 보고한 내용에 추가적으로 조사된 내용을 첨부하여 작성되었음.

표 24. 2014~2015년 해외 수집자원 재배 특성

Plant	Plant type	Lodging	Plant height (cm)	Early bloom stage	Flower main color	Life cycle	Propagation
Lace Flower	strait	○	60-90	late May	pale purple	annual	seed
Sweet Pea(red)	runner	○	20-40	early Jun	red	annual	seed
Sweet Pea(pink)	runner	○	20-40	early Jun	pink	annual	seed
Dianthus	strait	△	30-40	May-Sep	red,pink, purple mixed	-	seed/cutting plant
Bunny Tails	strait	△	30-50	late	red	annual	seed

grass				May					
Swan River Daisy	strait	△	35-50	May-Sep	white, blue	annual	seed/cutting plant		
Honesty Purple and White Mixed	runner	△	25-35	-	-	-	-		
Artichoke	strait	X	70-110	Aug-Sep	purple	annual	seed		
Crimson clover	runner	○	25-35	late May	red	annual	seed/cutting plant		
Coreopsis tinctoria roulette	strait	X	50-60	Sep-Oct	red	annual	seed/cutting plant		
Rudbeckia	strait	X	60-80	Aug-Sep	yellow	annual	seed/cutting plant		
Agastache rugosa	strait	X	50-60	Sep-Oct	violet	annual	seed/cutting plant		
Ornamental Pink Pampas glass	strait	X	130-150	-	gray pink	annual	seed/dividing plant		
Prunella	strait	X	25-35	Sep-Oct	violet	annual	seed/cutting plant		
Ornamental Purple Fountain Grass	strait	X	130-160	Oct	gray purple	annual	seed/dividing plant		
Black Madras	strait	X	40-60	-	-	-	-		
Ornamental Fountain grass	strait	X	130-160	Oct	red violet	annual	seed/dividing plant		
Blue Fescue glass	strait	X	30-40	-	gray green	annual	seed/dividing plant		

우리나라는 4계절이 뚜렷하여 해외에서 수집한 품종을 국내에서 재배 시 여러 가지 위험에 노출되며 겨울의 저온과 여름의 긴 장마가 대표적인 위험요소임. 버니테일 그라스는 강아지풀과 유사하나 매우 귀엽고 드라이플라워 재료로도 우수함. 하지만 포장에서 재배 시 긴 장마에 접하면 생육이 매우 저조해지며 고사하기도 함. 오너멘탈 파운데이션 그라스의 경우 억새와 유사하나 초형과 시각적인 면에서 부드럽고 화려하며 안정된 느낌을 줌. 따라서 조경 및 가든 등에 독특한 연출이 가능함. 하지만 국내에서는 월동이 어려운 품종으로 조사되었음. 종자와 포기나누기로 번식이 가능하여 연구 및 생산용으로 주목할 만함.





1. Lace Flower



2. Sweet Pea



3. Dianthus



4. Bunny Tails grass



5. Swan River Daisy



6. Honesty Purple and White Mixed



7. Artichoke



8. Crimson clover










 <p>9. Coreopsis tinctoria roulette</p>	 <p>10. Rudbeckia</p>	 <p>11. Agastache rugosa</p>
 <p>12. Ornamental Pink Pampas glass</p>	 <p>13. Prunella</p>	 <p>14. Ornamental Purple Fountain Grass</p>
 <p>15. Black Madras</p>	 <p>16. Ornamental Fountain grass</p>	 <p>17. Blue Fescue glass</p>

그림 136. 2014~2015년 해외 수집자원 재배 사진

그림 136은 표 24에서 조사된 수입품종의 재배사진자료임. 디안서스, 스완 리버 데이지, 코레옵시스 품종은 그 상품성 및 재배적 특성이 인정되어 현재 우리꽃 연구소의 신품종개발 재료로 이용되고 있음.

표 25. 2014~2015년 수집·도입자원 재배 특성

No.	수집종자(도입종자) 206종	모종개체수	수집형태	수집국 (도입국)
1	<i>Achillea millefolium</i> Colorado mixed	30	seed	NED
2	<i>Agastache mexicana</i> Blue and white mixed	27	seed	NED
3	<i>Ageratum mexicanum</i> dwarf Ball Ball mixed	30	seed	NED
4	<i>Alcea rosea</i> annual Majorette Double mixed	27	seed	NED
5	<i>Alchemilla mollis</i>	0	seed	NED
6	<i>Antirrhinum majus</i> maximum Mixed	30	seed	NED
7	<i>Aquilegia hybrida</i> McKana Giants mixed	0	seed	NED
8	<i>Aquilegia hybrida</i> Biedermeier mixed	2	seed	NED
9	<i>Aquilegia vulgaris</i> Double flowered tall mixed	0	seed	NED
10	<i>Arctotis hybrida</i> Harlequin mixed	29	seed	NED
11	<i>Arenaria montana</i>	1	seed	NED
12	<i>Armeria pseudarmeria</i> Mardi Grass (normal seed)	0	seed	NED
13	<i>Asarina scandens</i> Rose	29	seed	NED
14	<i>Aster alpinus</i> Mixed	29	seed	NED
15	<i>Aubrieta hybrida</i> mixed	25	seed	NED
16	<i>Begonia tuberosa</i> double Dark red	0	seed	NED
17	<i>Begonia tuberosa</i> double Formula mixed	2	seed	NED
18	<i>Begonia tuberosa</i> double Orange	7	seed	NED
19	<i>Begonia tuberosa</i> double Rose-pink	0	seed	NED
20	<i>Begonia tuberosa</i> double Salmon-pink	5	seed	NED
21	<i>Begonia tuberosa</i> double Scarlet-red	4	seed	NED
22	<i>Begonia tuberosa</i> double White	0	seed	NED
23	<i>Begonia tuberosa</i> double Yellow	0	seed	NED
24	<i>Bellis perennis</i> Monstrosa Double mixed	30	seed	NED
25	<i>Bergenia cordifolia</i>	4	seed	NED
26	<i>Brachycome iberidifolia</i> Blue Splendour	29	seed	NED
27	<i>Brachycome iberidifolia</i> White Splendour	-	seed	NED
28	<i>Cacti</i> All kinds and forms mixed	1	seed	NED
29	<i>Calendula officinalis</i> dwarf Gem Mixed	26	seed	NED
30	<i>Calendula officinalis</i> Pacific Beauty Mixed	30	seed	NED
31	<i>Callistephus</i> - various tall varieties China mixed	28	seed	NED
32	<i>Callistephus</i> tall crested Princess Mixed	30	seed	NED
33	<i>Callistephus</i> tall needle Unicom Mixed	19	seed	NED

34	<i>Campanula poscharskyana</i> Lilac-blue	1	seed	NED
35	<i>Campanula rotundifolia</i> Deep lavender	11	seed	NED
36	<i>Canna indica</i> Large flowered hybrids	21	seed	NED
37	<i>Celosia cristata nana</i> Jessica Mixed	30	seed	NED
38	<i>Celosia plumosa nana</i> Glitters Formula mixed	22	seed	NED
39	<i>Centaurea cyanus</i> tall double Ball Black	27	seed	NED
40	<i>Centaurea cyanus</i> tall double Ball White	21	seed	NED
41	<i>Centaurea cyanus</i> tall double Ball Blue	28	seed	NED
42	<i>Centaurea cyanus</i> tall double Ball Pink	28	seed	NED
43	<i>Centaurea cyanus</i> tall double Ball Red	30	seed	NED
44	<i>Chrysanthemum leucanthemum</i>	29	seed	NED
45	<i>Chrysanthemum maximum</i> Silver Princess	29	seed	NED
46	<i>Chrysanthemum maximum</i> Alaska	-	seed	NED
47	<i>Chrysanthemum multicaule</i> Golden yellow	28	seed	NED
48	<i>Chrysanthemum paludosum</i> Pure white	13	seed	NED
49	<i>Cineraria maritima</i> Candicans	29	seed	NED
50	<i>Cineraria maritima</i> Silverdust	4	seed	NED
51	<i>Clarkia pulchella</i> Arianne mixed	16	seed	NED
52	<i>Clarkia unguiculata</i> Double flowered mixture	30	seed	NED
53	<i>Cleome hassleriana</i> Cherry Queen	30	seed	NED
54	<i>Cleome hassleriana</i> Rose Queen	30	seed	NED
55	<i>Cleome hassleriana</i> Violet Queen	27	seed	NED
56	<i>Cleome hassleriana</i> White Queen	28	seed	NED
57	<i>Cobaea scandens</i> Mixed	4	seed	NED
58	<i>Coreopsis grandiflora</i> Golden Globe	25	seed	NED
59	<i>Coreopsis tinctoria</i> dwarf Amulet	30	seed	NED
60	<i>Cosmos bipinnatus</i> dwarf early Vega Mixture	13	seed	NED
61	<i>Cosmos sulphureus</i> Crest Formula mixture	15	seed	NED
62~66	<i>Dahlia variabilis</i> dwarf single Mignon	27	seed	NED
67	<i>Delphinium cultorum</i> tall Pacific mixed	3	seed	NED
68	<i>Dianthus barbatus</i> tall single Herald of Spring early mixed	30	seed	NED
69	<i>Dianthus superbus</i> Large flowered hybrids mixed	30	seed	NED
70	<i>Digitalis purpurea</i> Excelsior mixed	30	seed	NED
71	<i>Dimorphotheca sinuata</i> Mixed	24	seed	NED
72	<i>Dolichos lablab</i> Red leaved	22	seed	NED
73	<i>Echinacea purpurea</i> White Swan	17	seed	NED

74	<i>Echinops ritro</i>	-	seed	NED
75	<i>Erigeron karvinskianus</i> White/purple	1	seed	NED
76	<i>Eryngium planum</i>	25	seed	NED
77	<i>Eryngium alpinum</i> Superbum	0	seed	NED
78	<i>Euphorbia marginata</i> Mountain Snow	18	seed	NED
79	<i>Euphorbia marginata</i> Early Snow	29	seed	NED
80	<i>Festuca rubra</i> nigrescens	30	seed	NED
81	<i>Gomphrena globosa</i> (rubbed seed) Mixed	26	seed	NED
82	<i>Gomphrena globosa</i> dwarf (rubbed seed) Mixed	30	seed	NED
83	<i>Gomphrena globosa</i> dwarf (rubbed seed) Buddy	27	seed	NED
84	<i>Gomphrena globosa</i> dwarf (rubbed seed) Cissy	27	seed	NED
85	<i>Gomphrena globosa</i> dwarf (rubbed seed) Dolly	5	seed	NED
86	<i>Gomphrena haageana</i> (rubbed seed) Strawberry Fields	23	seed	NED
87	<i>Gypsophila pacifica</i> Pink	26	seed	NED
88	<i>Helianthemum mutabile</i> mixed	11	seed	NED
89	<i>Helianthus annuus</i> tall Autumn Beauty (Colour Fashion)	23	seed	NED
90	<i>Heliotropium arborescens</i> dwarf Marine	13	seed	NED
91	<i>Helipterum roseum</i> Brilliant rose	9	seed	NED
92	<i>Helipterum roseum</i> Goliath	30	seed	NED
93	<i>Helipterum roseum</i> Red Bonnie	-	seed	NED
94	<i>Helipterum roseum</i> White	25	seed	NED
95	<i>Helipterum roseum</i> Giant flowered mixture	27	seed	NED
96	<i>Hesperis matronalis</i> Mixed	27	seed	NED
97	<i>Hesperis matronalis</i> Violet	29	seed	NED
98	<i>Hesperis matronalis</i> White	29	seed	NED
99	<i>Heuchera sanguinea</i> Bressingham Hybrids	-	seed	NED
100	<i>Heuchera micrantha</i> Palace Purple	-	seed	NED
101	<i>Iberis</i> - perennial varieties Gibraltarica	28	seed	NED
102	<i>Iberis</i> - perennial varieties Sempervirens	15	seed	NED
103	<i>Iberis amara</i> Empress	30	seed	NED
104	<i>Iberis umbellata</i> Fairy mixed	-	seed	NED
105	<i>Iberis umbellata</i> Flash mixed	-	seed	NED
106	<i>Iberis umbellata</i> Mixed	29	seed	NED
107	<i>Iberis umbellata</i> White	20	seed	NED
108	<i>Impatiens walleriana</i> F2 Colour Parade mixed	21	seed	NED
109	<i>Impatiens walleriana</i> Baby series Mixed	19	seed	NED
110	<i>Impatiens walleriana</i> Baby series Orange	26	seed	NED



111	<i>Impatiens walleriana</i> Baby series Pink	29	seed	NED
112	<i>Impatiens walleriana</i> Baby series Scarlet	28	seed	NED
113	<i>Impatiens walleriana</i> Baby series White	26	seed	NED
114	<i>Ipomoea purpurea</i> Caprice	30	seed	NED
115	<i>Ipomoea purpurea</i> Seta	30	seed	NED
116	<i>Ipomoea purpurea</i> Shiva	29	seed	NED
117	<i>Ipomoea purpurea</i> Knowlians Black	30	seed	NED
119	<i>Lagenaria siceraria</i> Caveman's Club	18	seed	NED
120	<i>Lagenaria siceraria</i> Dipper gourd	9	seed	NED
121	<i>Lagenaria siceraria</i> Mixed forms	25	seed	NED
122	<i>Lathyrus odoratus</i> dwarf Cupid Mixed	11	seed	NED
125	<i>Lathyrus odoratus</i> Mammoth Lavender	22	seed	NED
126	<i>Lathyrus odoratus</i> Mammoth Rose pink	19	seed	NED
127	<i>Lathyrus odoratus</i> Mammoth Scarlet	5	seed	NED
129	<i>Lavandula angustifolia</i> Mustead strain	-	seed	NED
130	<i>Liatris spicata</i>	25	seed	NED
131	<i>Linaria maroccana</i> Fairy Bouquet mixed	30	seed	NED
132	<i>Linum grandiflorum</i> Mixed	28	seed	NED
134	<i>Lobelia pendula</i> Cascade series Mixed	30	seed	NED
135	<i>Lupinus polyphyllus</i> Russell strain Mixed	27	seed	NED
136	<i>Lupinus polyphyllus</i> Russell strain Chandelier	27	seed	NED
137	<i>Lupinus polyphyllus</i> Russell strain Chatelaine	24	seed	NED
138	<i>Lupinus polyphyllus</i> Russell strain The Governor	22	seed	NED
139	<i>Lychnis viscaria</i> splendens Rosett	28	seed	NED
140	<i>Lychnis arkwrightii</i> Vesuvius	30	seed	NED
141	<i>Malope trifida</i> Mixed	28	seed	NED
142	<i>Matthiola bicornis</i>	30	seed	NED
143	<i>Matthiola incana</i> Brompton Brompton or Winter mixed	29	seed	NED
144	<i>Mimosa pudica</i>	19	seed	NED
145	<i>Mina lobata</i> Lobata red white	-	seed	NED
146	<i>Mina lobata</i> Standard strain	-	seed	NED
147	<i>Mirabilis jalapa</i> Mixed	27	seed	NED
148	<i>Monarda didyma</i> Mixed	-	seed	NED
149	<i>Myosotis alpestris</i> Mixed	21	seed	NED
150	<i>Myosotis alpestris</i> dwarf Victoria Blue	0	seed	NED
151	<i>Myosotis alpestris</i> dwarf Victoria White	1	seed	NED
152	<i>Nepeta mussinii</i>	29	seed	NED

153	<i>Nicotiana alata</i> Sensation mixed	28	seed	NED
154	<i>Nigella damascena</i> Miss Jekyll Double mixed	17	seed	NED
155	<i>Oenothera speciosa</i> Silky orchid-pink	6	seed	NED
156	<i>Osteospermum ecklonis</i> White	2	seed	NED
157	<i>Osteospermum ecklonis</i> Ballade mixed	1	seed	NED
158	<i>Papaver nudicaule</i> Artist's Glory/Victory Giants mixed	28	seed	NED
159	<i>Papaver nudicaule</i> Kelmscott's Giants/Unwin's Hybrids	30	seed	NED
160	<i>Papaver nudicaule</i> F2 Wind Song mixed	25	seed	NED
161	<i>Papaver paeoniflorum</i> Double mixed	9	seed	NED
162	<i>Pelargonium zonale</i> F1 Border Formula mixture	19	seed	NED
163	<i>Pelargonium zonale</i> F2 Colorama Mixed	21	seed	NED
164	<i>Phlox drummondii</i> grandiflora Tall mixed	26	seed	NED
165	<i>Physostegia virginiana</i> Pink	7	seed	NED
166	<i>Platycodon grandiflora</i> Blue	20	seed	NED
167	<i>Portulaca grandiflora</i> Longbloom double mixed	30	seed	NED
168	<i>Potentilla nepalensis</i> Miss Willmott	27	seed	NED
169	<i>Primula malacoides</i> Mixed	19	seed	NED
170	<i>Pulsatilla vulgaris</i> (rubbed seed) Violet	1	seed	NED
171	<i>Pulsatilla vulgaris</i> (rubbed seed) Red	1	seed	NED
172	<i>Pulsatilla vulgaris</i> (rubbed seed) White	3	seed	NED
173	<i>Rhodochiton strosanguineus</i>	-	seed	NED
174	<i>Rudbeckia hirta</i> Green Eyes	28	seed	NED
175	<i>Salvia farinacea</i> Blue Victory	29	seed	NED
176	<i>Salvia nemorosa</i> West-Friesland	16	seed	NED
177	<i>Salvia pratensis</i> Blue	19	seed	NED
178	<i>Saponaria ocymoides</i> Rose-pink	29	seed	NED
179	<i>Scabiosa atropurpurea</i> Tall double flowered mixture	19	seed	NED
180	<i>Silene pendula</i> compacta Single flowered mixed	28	seed	NED
181	<i>Solanum pseudocapsicum</i> Red Giant	1	seed	NED
182	<i>Solidago canadensis</i> Yellow Springs	30	seed	NED
183	<i>Tagetes patulanana</i> double Bonita mixed	29	seed	NED
184	<i>Thunbergia alata</i> Fieldgrown mixed	24	seed	NED
185	<i>Thunbergia alata</i> Sunrise formula mixture	7	seed	NED
186	<i>Thymus serpyllum</i> Purple	27	seed	NED
187	<i>Tomato ornamental</i> Minibel	30	seed	NED
188	<i>Tropaeolum majus</i> lobbianum Single mixed	20	seed	NED
189	<i>Tropaeolum nanum</i> Top Flowering double Jewel mixed	11	seed	NED

190	<i>Tropaeolum peregrinum</i> Yellow	0	seed	NED
191	<i>Verbascum phoeniceum</i> Hybrids mixed	30	seed	NED
192	<i>Verbena bonariensis</i> Lilac	26	seed	NED
193	<i>Verbena hybridanana</i> compacta mixed	20	seed	NED
194	<i>Veronica longifolia</i> Lavender-blue	30	seed	NED
195	<i>Veronica spicata</i> Blue shades	30	seed	NED
196	<i>Vinca rosea</i> dwarf Little series mixed	30	seed	NED
197	<i>Viola cornuta</i> large flowered varieties Scotch Hybrids mixed	25	seed	NED
198	<i>Viola</i> hybrid (x <i>cornuta</i> ) Fun Eyes blue	18	seed	NED
199	<i>Viola</i> hybrid (x <i>cornuta</i> ) Fun Eyes tricolor	25	seed	NED
200	<i>Viola</i> hybrid (x <i>cornuta</i> ) Fun Eyes yellow	29	seed	NED
201	<i>Viscaria oculata</i> Blue Angel	28	seed	NED
202	<i>Viscaria oculata</i> Rose Angel	30	seed	NED
203	<i>Viscaria oculata</i> mixed	29	seed	NED
204	<i>Zinnia elegans</i> pumila Bordeaux mixed	28	seed	NED
205	<i>Impatiens walleriana</i> Baby series Carmine	24	seed	NED
206	<i>Echinacea purpurea</i> 'Starlight'	24	seed	CHN
207	Gauralindheimeri	5	seed	CHN
208	<i>Eschscholtzia californica</i> 'Mixed'	16	seed	CHN
209	<i>Eschscholtzia californica</i> 'Orange'	24	seed	CHN
210	<i>Eschscholtzia californica</i> 'white'	24	seed	CHN
211	<i>Eschscholtzia californica</i> 'Purple'	23	seed	CHN
212	<i>Eschscholtzia californica</i> 'Red'	19	seed	CHN
213	<i>Gypsophila elegans</i> 'white'	30	seed	CHN
214	<i>Papaver rhoeas</i> 'Red'	29	seed	CHN
215	<i>Papaver rhoeas</i> 'Mixed'	28	seed	CHN

표 25는 2015년 네덜란드와 중국등지에서 수집·도입한 야생화 및 화훼 자원의 목록임. 전체 200여종이 수집 또는 도입되었는데 목록에 제시된 종은 대부분이 유럽 등지에서 관심의 대상이 되는 종을 우리꽃연구소가 자체 조사하여 선발한 종들임. 현재 일부 종은 2015년 4월 하순경에 파종되어 우리꽃연구소 연구포장에 식재되어 있음. 미발아, 환경에 대한 스트레스로 인한 모주의 감소에 대비하여 2차로 재파종 되어 있으며 7월 하순경에 연구포장에 식재할 예정임. 1차, 2차 식재된 종에서 기본적인 생육조사는 물론 돌연변이 육종 등 다양한 육종소재가 가능한 종을 선발할 예정임.

## 2. 에키네시아, 코레옵시스 형질전환체 재배 특성 조사 및 증식

표 26. 2014~2015년 에키네시아 형질전환체 재배 특성

Plant (Transformant)	Generation	Plant height (cm)		Flower diameter (cm)	Corn size (cm)	Propagation (cm)
		Green house	Field			
Echi51	T0	74	70	7.2	2.0	seed/ cutting plant
Echi52	T0	71	57	5.3	1.8	seed/ cutting plant
Echi53	T0	64	67	9.0	2.6	seed/ cutting plant
Echi54	T0	53	82	9.0	3.0	seed/ cutting plant
Echi55	T0	55	96	10.5	2.8	seed/ cutting plant
Echi70	T0	48	110	11	2.9	seed/ cutting plant
Echi71	T0	28	86	9.0	1.6	seed/ cutting plant

형질전환된 에키네시아의 증식체계를 확립하기 위해 다양한 방법이 시도되었음. 포기나누기와 삽목법으로 에키네시아를 증식하였음. 포기나누기는 성공률은 높지만 에키네시아는 기부부분이 분열이 적은 식물로 모본으로부터 증식을 하기에는 그 한계가 있음. 삽목법은 초기 적은 모본으로 다량의 증식개체수가 가능하지만 삽목 후 생존율이 매우 떨어짐. 또한 조직배양법으로 에키네시아를 증식하는 방법도 시도하였음.

형질전환 에키네시아 (T0 세대) 중에서 Echi52 개체에서 목표로 하는 유전자가 정확하게 검증되었음. 에키네시아 형질전환체는 그 후대의 종자를 받아 조직배양실 내에서 증식 중임 (그림 137). 특히 Echi52 개체는 2014년에 포장에 이식되어 현재에도 모주가 보존되어 있으며 2015년 추가적인 에키네시아 형질전환체가 이식되어 모니터링 하였음.













		
<p>Echi transformants (Pot)</p>	<p>Echi transformants (Field 2014)</p>	<p>Echi transformants (in vitro)</p>
		
<p>Echi51</p>	<p>Echi52</p>	<p>Echi53</p>
		
<p>Echi54</p>	<p>Echi55</p>	<p>Echi70</p>
		
<p>Echi70</p>	<p>Echi transformants (Field 2015)</p>	

그림 137. 2014~2015년 에키네시아 형질전환체 생육사진



표 27. 2015년 우리꽃 연구소에서 순화중인 코레옵시스 형질전환체

Plant (Transformant)	Generation
Uridream Dwf4-28	T0
Uridream Dwf4-41	T0
Uridream Dwf4-42	T0
Uridream Dwf4-44	T0
Uridream Dwf4-45	T0



2015년 5월 우리드림 형질전환체 5개체를 우리꽃 연구소에서 순화하였음. 우리드림은 우리꽃 연구소에서 개발한 코레옵시스 품종의 상품명임. 우리드림의 초형은 반구형으로 자라나 자유롭게 줄기가 뻗어나가며 초장은 40~50 cm, 폭은 50 cm 정도로 개화기에는 매우 많은 꽃을 피우며 장일식물에 속함. 우리드림 형질전환체는 순화과정을 거쳐 지상부의 일부를 증식하여 동일 클론을 만들 계획에 있으며 모본은 외부 포장에 이식하여 전반적인 생육타입을 조사하였음.

### 3. 해외수출 대비 로열티 관리체계

우리꽃 연구소에서 개발된 품종은 국내뿐만 아니라 해외시장에도 진출하고 있음. 해외시장의 진출은 국내시장의 한계를 극복하고 새로운 시장의 개척이라는 점에 큰 의의가 있음. 새로운 품종을 육성하고, 보호 등록함과 동시에 해외시장 진출 시 로열티 계약은 조심스럽고 신중하게 진행되어야 될 사안임. 우리꽃 연구소는 초기 일본시장 진출을 토대로 유럽, 북아메리카, 호주 등으로 해외시장을 넓혀가고 있음.

우리꽃 연구소는 매년 해외 유명 전시회에 참석하거나 해외 현지시찰을 진행하고 있으며 해외의 바이어를 초빙하여 우리꽃 연구소의 신품종을 홍보하고 있음.

그림 138은 일본 하쿠산사가 매년 개최하는 봄 전시회의 관한 내용임. 하쿠산사는 일본의 화훼 생산/판매 전문업체로 우리꽃 연구소의 해외진출 시 첫 로열티계약을 맺은 회사이기도 함. 현재 일본에 하쿠산사를 통하여 우리드림 2품종이 품종 등록되었고 5품종을 재배심사하였음. 그림 139는 해외 화훼전문 바이어인 플랜티프 대표의 우리꽃 연구소 방문에 관한 내용임. 플랜티프는 유럽과 미국에 다양한 시장을 확보하고 있어 앞으로 우리꽃 연구소의 신품

중이 유럽과 미국으로 진출하는데 좋은 파트너가 될 것임.



그림 138. 일본 현지점검 및 하쿠산사의 봄 전시회 방문



그림 139. 플랜티프 대표 우리꽃 연구소 방문

● J&H. 하쿠산 (일본)

- <http://www.hakusan2.com/>
- 기간 : 2015. 05. 21~22
- 목적 : Hakusan Open house 2015 Spring 전시회 참석 및 로열티 점검
- 요약 : 하쿠산 (J&H)은 일본 내에서 화훼품종의 육성, 판매, 해외수출을 화훼전문회사임. 매년 봄 전시회를 개최하여 해외 유관업체 및 바이어를 초빙하여 자사의 품종을 홍보하고 있음. 현재 하쿠산을 통하여 우리꽃 연구소의 신품종인 우리드림 품종과 텃커벨품종이 로열티를 받고 일본시장을 공략하고 있음. 이번 하쿠산 봄 전시회 방문을 통하여 일본의 새로운 화훼 트렌드를 탐색하고 현재 하쿠산에서 판매 중인 우리꽃 연구소 품종의 로열티 계약을 점검하여 앞으로 해외시장 확대를 위한 로열티 체계 확립하는데 자료로 활용할 것임.

● Plantiff (네덜란드)

- <http://www.plantipp.eu/>
- 기간 : 2015. 06. 02
- 목적 : 우리꽃 연구소의 신품종 마케팅 및 로열티계약을 위한 해외 바이어 초빙
- 요약 : Plantiff는 전 세계를 무대로 하며 각국의 꽃의 생산과 판매를 연결하는 전문 바이어임. 작년 우리꽃 연구소의 방문에 이어 올해도 우리꽃 연구소의 신품종을 마케팅하기위해 방문하였음. 이번 방문을 통해 Plantiff사와 우리꽃 연구소는 유럽 및 북미시장을 목표로 계약이 체결되었으며 판매 목적으로 신품종 우리드림 시리즈와 텃커벨 시리즈, 코레우리 버티실라타 시리즈, 조팝 골든바가 현지 재배심사하기로 결정되었음.

● Armada (네덜란드)

- <http://www.armadayoungplants.nl/>
- 기간 : 2015-2016
- 목적 : 직접적인 계약을 통해 육성자의 권리와 합리적인 로열티계약 정립
- 요약 : Armada는 네덜란드에서 화훼 육종 및 생산, 판매를 전문으로 하는 회사임. 현재 우리꽃 연구소가 개발한 신품종 1호인 상록잔디패랭이 (Dianthus dianhuri twinkle)가 Armada사를 통하여 네덜란드 및 유럽에 판매되고 있음. Armada는 우리꽃 연구소가 일본의 하쿠산사에 수출한 패랭이를 하쿠산사가 네덜란드 Armada에 재수출한 경우로 로열티 문제에 있어 재점검이 요구되는 경우임. 따라서 하쿠산사를 경유하지 않고 Armada와 직접적인 로열티계약을 위해 현재 접촉 중임.

새로운 품종을 육성/육성하는 육종가에게 합리적인 권리를 부여하는 것이 로열티임. 신제품이나 신품종의 로열티는 시장성, 소요비용, 기대수입이 적절하게 조화를 이루는 상태에서 평가됨. 많은 로열티를 갖기 위해서는 제품을 원하는 시장이 필요하고 소요비용이 적어야 되며 상대적인 수입은 커야 됨. 어느 하나라도 요구도가 떨어지면 좋은 로열티를 기대하기 어려움.

### 로열티체계 타입

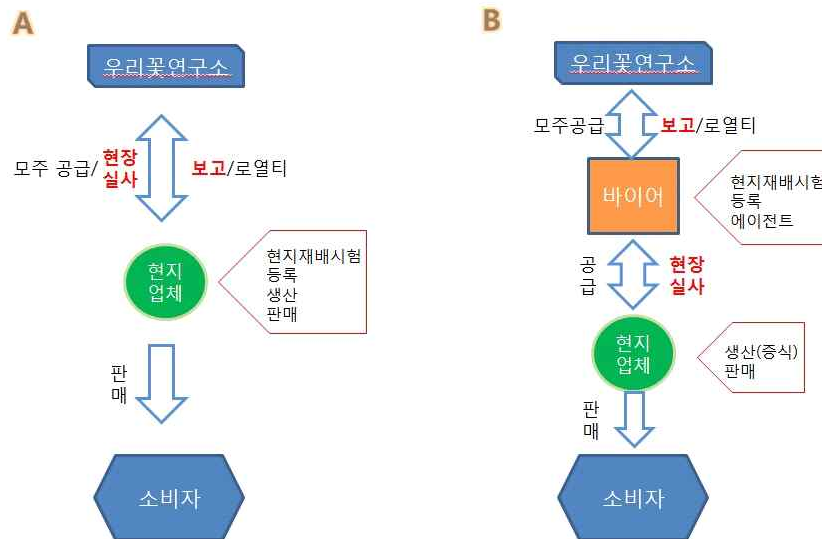


그림 140. 해외 수출을 위한 로열티 체계 타입

해외에 품종을 판매하기 위해서는 해당국가에 품종등록이 필요함. 이는 타국에서 진행되는 업무이기 때문에 현지 업체 또는 바이어가 그 업무를 대행하기도 함. 품종이 등록되면 일반 품종과는 달리 육종가의 권리가 부여된 품종은 해외수출시 로열티를 체결함. 그림 140은 해외수출 시 현지 업체와의 직접적인 계약 (A)과 바이어를 통한 계약 (B)의 두 가지 타입 나타낸 것임. 현지 업체와 직접 계약 시 바이어를 통한 것 보다는 높은 로열티를 기대할 수 있음. 그러나 신품종의 모주를 보낸 후 매년 현지에서 증식/생산/판매 되는 양을 확인, 관리하기 어려울 뿐만 아니라 계약이 종료된 후에는 새로운 업체를 다시 찾아야 하는 단점도 있음. 바이어를 통한 경우 로열티 수입이 줄어드는 것이 당연하지만 바이어는 다양한 판매망을 통해 여러 업체를 연결해주며 직접 생산/판매 현장에 가지 않더라도 바이어의 보고를 통해 관리가 수월해짐. 최근 새로운 품종의 기대감과 기술적 노하우를 바탕으로 신품종의 육성에 많은 관련분야의 사람들이 도전하고 있음. 해마다 많은 신품종이 출현하지만 시장에서 받아주는 품종은 많지 않음. 특히 다른 산업분야와는 달리 소규모의 업체가 많은 화훼분야는 좋은 품종을 개발하고도 해외시장의 벽을 넘지 못하여 그 진가가 제대로 알려지지 못하는 경우가 많다. 좀 더 안정된 해외시장의 개척을 위해서는 국가에서도 다양한 정보의 제공과 마케팅, 계약 시 발생하는 리스크에 대한 대비책 등 다양한 지원과정이 필요하다고 사료됨.



### 3-5. 4차년도 연구결과

#### 3-5-1. 제1세부과제 : 난쟁이 관련 유전자 분리 및 기능 분석

##### 1. *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자가 과 발현된 식물체 확보

##### ○ *DWF4* 유전자가 과 발현된 애기장대 식물체 확보 및 분자생물학적 검증

*Echinacea DWF4* 유전자가 과 발현된 형질전환 애기장대 식물체를 확보하기 위한 pPZPHa3/EpDWF4 벡터 형질전환 및 애기장대 재분화 연구를 통해 T3 세대 *EpDWF4* homozygote 형질전환 애기장대 식물체를 확보하고 *EpDWF4* 유전자 형질전환 검증을 위한 분자생물학 연구를 수행함.

##### - Genomic DNA PCR

T3 세대 *EpDWF4* 형질전환 애기장대 식물체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 형질전환 애기장대 식물체의 genomic DNA에 *EpDWF4* 유전자 발현시스템의 도입 유무를 확인함. 형질전환 애기장대 식물체의 잎을 LN<sub>2</sub>와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하였고 GeneAll Exgene Plant SV Mini Kit (Sigma)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였음. 250 ng genomic DNA, *EpDWF4* 유전자 및 애기장대 *Tubulin* 유전자에 특이적으로 결합하는 PCR primer (그림 141B)를 이용한 PCR을 수행하고 *EpDWF4* 유전자 발현시스템의 형질전환 유무를 판단함. 형질전환 애기장대 식물체의 genomic DNA에서 *EpDWF4* PCR 산물이 증폭되었고 (그림 141A) 이는 *EpDWF4* 유전자 발현시스템이 애기장대 식물체에 안정적으로 도입되었다는 것을 의미함.

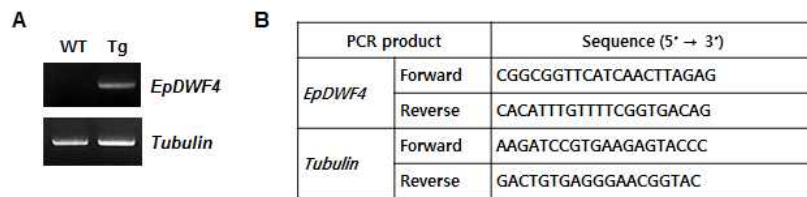


그림 141. (A) T3 세대 *EpDWF4* 형질전환 애기장대 식물체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF4* 유전자 발현시스템의 도입 유무를 확인함. (B) 형질전환 애기장대 식물체의 genomic DNA PCR을 위한 *EpDWF4* 및 애기장대 *Tubulin* PCR primer의 염기서열.

##### - Southern blot 분석



T3 세대 *EpDWF4* 형질전환 애기장대 식물체에서 확보한 genomic DNA의 Southern blot 분석을 통해 도입된 *EpDWF4* 유전자 발현시스템의 copy 수를 확인함. 50 µg의 genomic DNA를 제한효소 XbaI으로 절단한 후 1% agarose gel에서 전기영동함. 전기영동된 genomic DNA 절편을 nitrocellulose membrane에 transfer한 후 *HTP* (*hygromycin*) 유전자 probe와 *EpDWF4* 유전자 probe를 이용한 Southern blot 분석을 통해 genomic DNA에 존재하는 *EpDWF4* 유전자 발현시스템의 copy 수를 확인함. 그림 142에서와 같이 *HTP* 유전자 probe로 확인한 경우 약 7 kbp의 band가 1 개 검출되었고 *EpDWF4* 유전자 probe로 확인한 경우 약 1 kbp의 band 1 개가 검출되었음. 이는 형질전환된 애기장대 식물체에 도입된 *EpDWF4* 유전자 발현시스템의 copy 수가 1 개라는 것을 의미함.

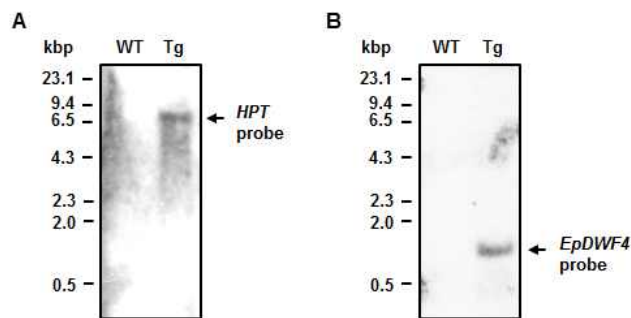


그림 142. T3 세대 *EpDWF4* 형질전환 애기장대 식물체에서 genomic DNA를 추출하고 *HTP* 유전자 probe (A) 및 *EpDWF4* 유전자 probe (B)를 이용한 Southern blot 분석을 통해 형질전환 애기장대 식물체의 genomic DNA에 도입된 *EpDWF4* 유전자 발현시스템의 copy 수를 확인함.

#### - Flanking sequence 분석

T3 세대 *EpDWF4* 형질전환 애기장대 식물체의 genomic DNA에 도입된 *EpDWF4* 유전자 발현시스템의 도입 위치를 확인하기 위한 flanking PCR (그림 143)을 수행하여 약 800 bp의 PCR 산물을 얻었고 T/A cloning vector, pGEM-T easy에 cloning한 후 flanking PCR 산물의 염기서열을 확인함 (그림 144).

염기서열 분석 결과 그림 145A에서와 같이 *EpDWF4* 유전자 발현시스템은 애기장대 1번 chromosome 4,587,511 위치에 도입된 것으로 확인됨. 또한 *EpDWF4* 유전자 발현시스템의 도입 위치 및 도입된 유전자가 homozygote 인지 heterozygote 인지를 검증하기 위한 genomic DNA PCR을 수행함. 그림 145B에서와 같이 애기장대 genomic DNA에 결합하는 LP, RP PCR primer를 이용한 PCR의 경우 wild-type의 genomic DNA에서만 약 800 bp의 PCR 산물이 증폭됨. 이는 T3 세대 형질전환 애기장대 식물체에 *EpDWF4* 유전자 발현시스템이 homozygote로 존재한다는 것을 의미함.

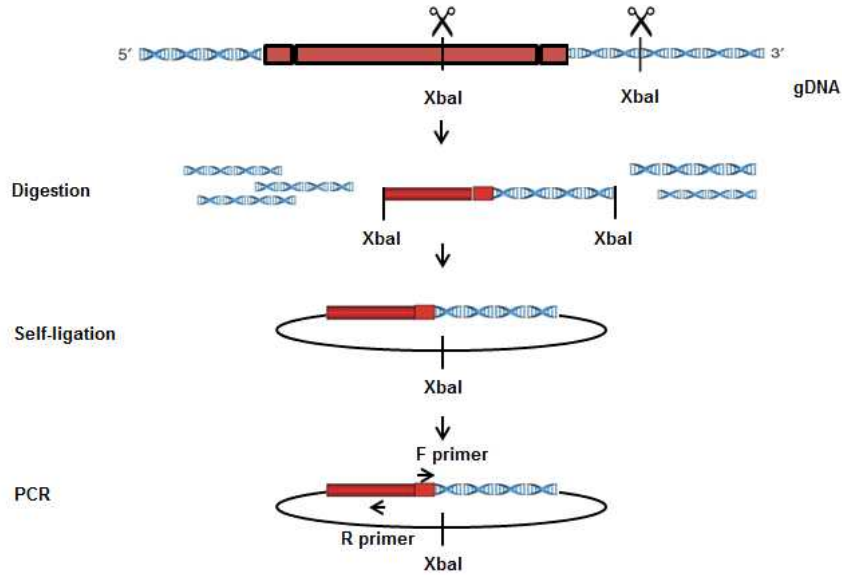


그림 143. *EpDWF4* 유전자 발현시스템의 도입 위치를 확인하기 위한 franking PCR 수행 방법.

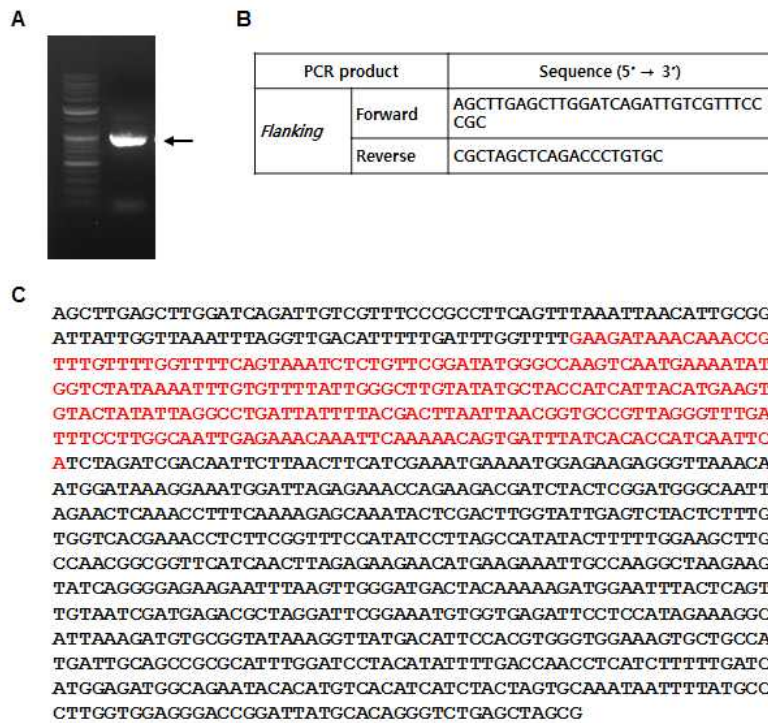


그림 144. T3 세대 *EpDWF4* 형질전환 애기장대 식물체의 genomic DNA에 도입된 *EpDWF4* 유전자 발현시스템의 위치를 확인하기 위한 franking PCR을 수행하고 염기서열을 분석함 (A, franking PCR 산물; B, flanking PCR primer; C, 적색-PCR 산물 염기서열, 검정색-genomic DNA flanking sequence 염기서열).

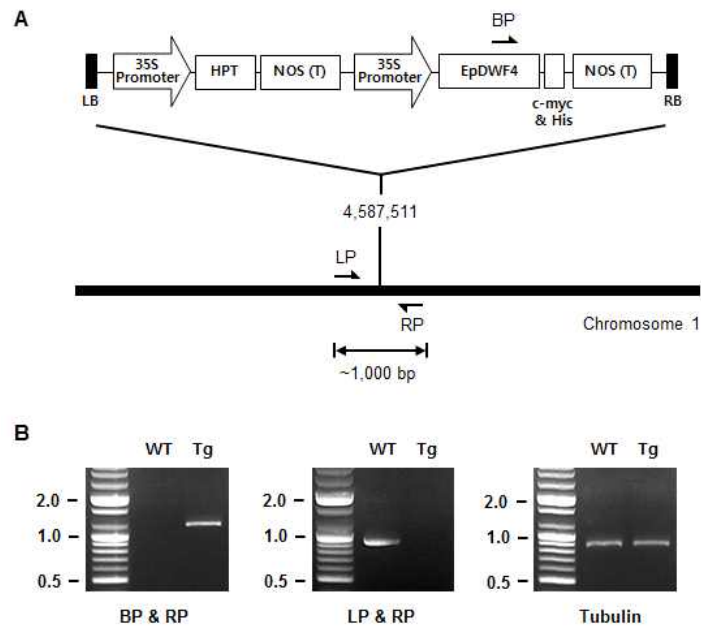


그림 145. T3 세대 *EpDWF4* 형질전환 애기장대 식물체에 *EpDWF4* 유전자 발현시 스템이 homozygote로 존재하는 것을 genomic DNA PCR을 통해 확인함.

- RT-PCR, Western blot 분석

T3 세대 *EpDWF4* 형질전환 애기장대 식물체에서 *EpDWF4* 유전자의 발현을 확인하기 위한 RT-PCR 및 Western blot 분석 연구를 수행함.

형질전환 애기장대 식물체 잎 (~ 1 g)을 LN<sub>2</sub>와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하고 Hybrid-R™ Plant RNA Prep Mini Kit (GeneAll)를 이용하여 total RNA를 추출하였음. 2 µg의 total RNA, poly d(T) primer 및 ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega)를 이용한 reverse transcription 반응을 통해 cDNA를 합성하였고 PCR의 주형으로 사용하였음. *EpDWF4* 유전자를 증폭할 수 있는 PCR primer (그림 141B)를 이용한 PCR을 통해 *EpDWF4* 유전자의 mRNA가 형질전환된 애기장대 식물체에서 발현되는 것을 확인함 (그림 146A). 또한 형질전환 애기장대 식물체에서 단백질 추출물을 확보하고 anti-His 항체를 이용한 Western blot 분석을 통해 약 56 kDa의 EpDWF4-His 단백질이 발현되는 것을 확인함 (그림 146B).

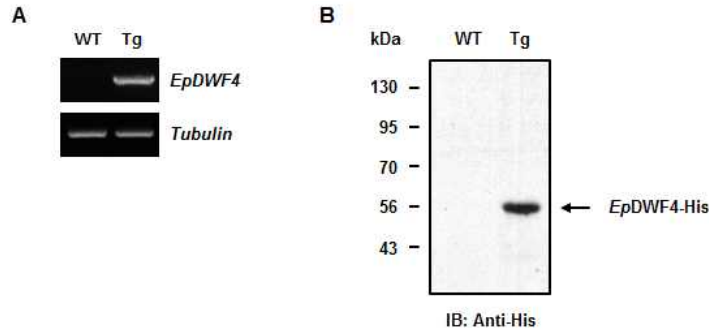


그림 146. T3 세대 *EpDWF4* 형질전환 애기장대 식물체에서 *EpDWF4* 유전자의 발현을 RT-PCR (A)과 Western blot 분석 (B)을 통해 확인함.

○ *DET2* 유전자가 과 발현된 애기장대 식물체 확보 및 분자생물학적 검증

*Echinacea DET2* 유전자가 과 발현된 형질전환 애기장대 식물체를 확보하기 위한 pZPHa3/EpDET2 벡터 형질전환 및 애기장대 재분화 연구에서 T3 세대 *EpDET2* 형질전환 애기장대 식물체를 확보하고 *EpDET2* 유전자 형질전환 검증을 위한 분자생물학 연구를 수행함.

- Genomic DNA PCR, Southern blot 분석

T3 세대 *EpDET2* 형질전환 애기장대 식물체 (Tg 1-4, 3-3, 4-3, 5-1)에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 형질전환 애기장대 식물체의 genomic DNA에 *EpDET2* 유전자 발현시스템의 도입 유무를 확인함. 형질전환 애기장대 식물체에서 genomic DNA를 확보하고 *EpDET2* 유전자 및 애기장대 *Tubulin* 유전자에 특이적으로 결합하는 PCR primer (그림 147B)를 이용한 PCR을 수행하여 *EpDET2* 유전자 발현시스템의 형질전환 유무를 판단함. 형질전환 개체의 genomic DNA에서 *EpDET2* PCR 산물이 존재하였음 (그림 147A).

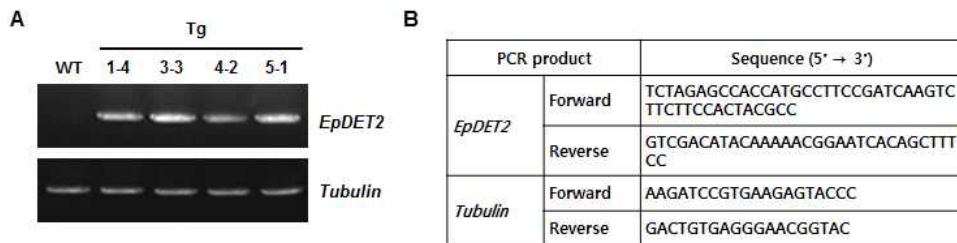


그림 147. (A) T3 세대 *EpDET2* 형질전환 애기장대 식물체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2* 유전자 발현시스템의 도입 유무를 확인함. (B) 형질전환 애기장대 식물체의 genomic DNA PCR을 위한 *EpDET2* 및 애기장대 *Tubulin* PCR primer의 염기서열.

T3 세대 *EpDET2* 형질전환 애기장대 식물체에서 확보한 genomic DNA의 Southern blot 분석을 통해 도입된 *EpDET2* 유전자 발현시스템의 copy 수를 확인함. 50 µg의 genomic DNA를 제한효소 XbaI으로 절단한 후 1% agarose gel에서 전기영동함. 전기영동된 genomic DNA 절편을 nitrocellulose membrane에 transfer한 후 *HTP* (*hygromycin*) 유전자 probe를 이용한 Southern blot 분석을 통해 genomic DNA에 존재하는 *EpDET2* 유전자 발현시스템의 copy 수를 확인함. 그림 1-8에서와 같이 형질전환 애기장대 식물체 3-3, 4-2, 5-1 개체에서 4.3 kbp, 2.1 kbp band가 각각 1 개씩 검출되었고 이는 형질전환된 애기장대 식물체에 도입된 *EpDET2* 유전자 발현시스템의 copy 수가 1 개라는 것을 의미함.

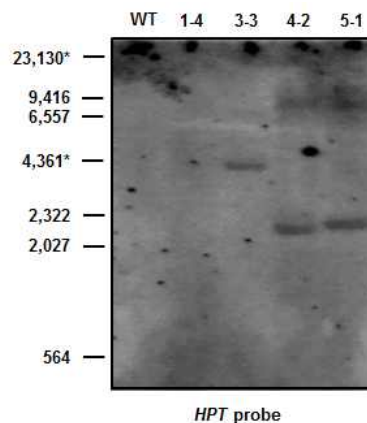


그림 148. T3 세대 *EpDET2* 형질전환 애기장대 식물체에서 genomic DNA를 추출하고 *HTP* 유전자 probe를 이용한 Southern blot 분석을 통해 형질전환 애기장대 식물체의 genomic DNA에 도입된 *EpDET2* 유전자 발현시스템의 copy 수를 확인함.

- RT-PCR 분석

T3 세대 *EpDET2* 형질전환 애기장대 식물체에서 *EpDET2* 유전자의 발현을 확인하기 위한 RT-PCR 분석 연구를 수행함. 형질전환 애기장대 식물체 잎에서 total RNA를 추출하고 poly d(T) primer 및 ImProm-II™ Reverse Transcription System을 이용한 reverse transcription 반응을 통해 cDNA를 합성한 후 *EpDET2* 유전자를 증폭할 수 있는 PCR primer (그림 147B)를 이용한 PCR을 통해 *EpDET2* 유전자의 mRNA가 형질전환된 애기장대 식물체에서 발현되는 것을 확인함 (그림 149).

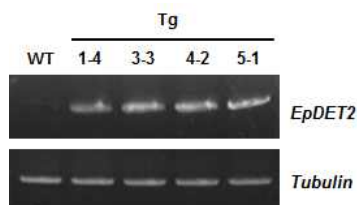


그림 149. T3 세대 *EpDET2* 형질전환 애기장대 식물체에서 *EpDET2* 유전자의 발현을 RT-PCR을 통해 확인함.



○ *DET2* 유전자가 과 발현된 *det2* mutant 애기장대 식물체 (CS6159) 확보 및 분자생물학적 검증

*EpDET2* 유전자가 과 발현된 형질전환 *det2* mutant 애기장대 식물체 (CS6159)를 확보하기 위한 pPZPHa3/*EpDET2* 벡터 형질전환 및 애기장대 재분화 연구에서 T3 세대 *EpDET2* 형질전환 애기장대 돌연변이 식물체를 확보하고 *EpDET2* 유전자 형질전환 검증을 위한 분자생물학 연구를 수행함.

- Genomic DNA PCR, Southern blot 분석

T3 세대 *EpDET2* 형질전환 애기장대 돌연변이 식물체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 형질전환 애기장대 식물체의 genomic DNA에 *EpDET2* 유전자 발현시스템의 도입 유무를 확인함. 형질전환 애기장대 돌연변이 식물체에서 genomic DNA를 확보하고 *EpDET2* 유전자 및 애기장대 *Tubulin* 유전자에 특이적으로 결합하는 PCR primer (그림 147B)를 이용한 PCR을 수행하여 *EpDET2* 유전자 발현시스템의 형질전환 유무를 판단함. 형질전환 개체의 genomic DNA에서 *EpDET2* PCR 산물이 존재하였고 (그림 150A) 이는 *EpDET2* 유전자 발현시스템이 애기장대 돌연변이 식물체에 안정적으로 도입되었다는 것을 의미함.

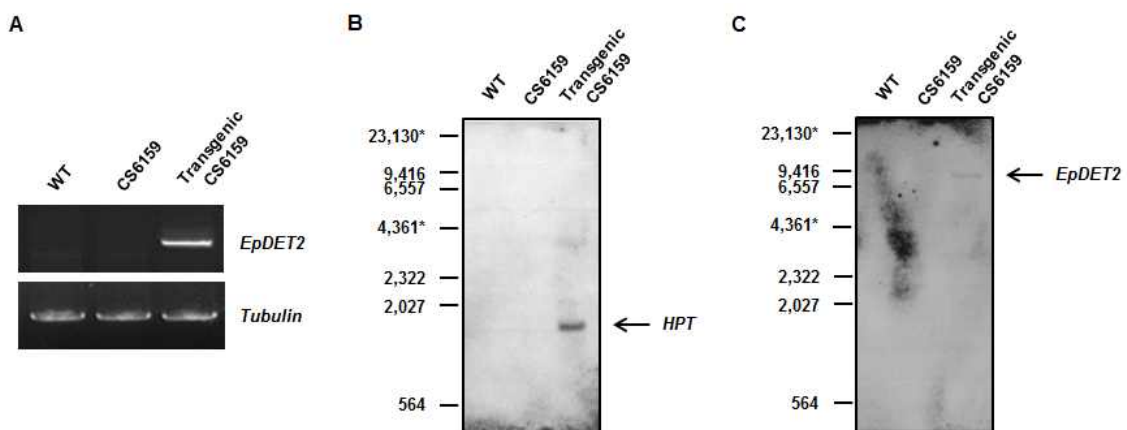


그림 150. T3 세대 *EpDET2* 형질전환 애기장대 돌연변이 식물체에서 *EpDET2* 유전자 발현시스템의 도입 유무를 genomic DNA PCR (A)을 통해 확인하고 *HPT* 유전자 probe (B) 및 *EpDWF4* 유전자 probe (C)를 이용한 Southern blot 분석을 통해 genomic DNA에 도입된 *EpDET2* 유전자 발현시스템의 copy 수를 확인함.

또한 T3 세대 *EpDET2* 형질전환 애기장대 돌연변이 식물체에서 확보한 genomic DNA의 Southern blot 분석을 통해 도입된 *EpDET2* 유전자 발현시스템의 copy 수를 확인함. 50 µg의 genomic DNA를 제한효소 *Xba*I으로 절단한 후 1% agarose gel에서 전기영동함. 전기

영동된 genomic DNA 절편을 nitrocellulose membrane에 transfer한 후 *HTP* (*hygromycin*) 유전자 및 *EpDET2* 유전자 probe를 이용한 Southern bolt 분석을 통해 genomic DNA에 존재하는 *EpDET2* 유전자 발현시스템의 copy 수를 확인함. 그림 150B & C에서와 같이 *HTP* 유전자 probe로 확인한 경우 약 1.5 kbp의 band가 1 개 검출되었고 *EpDET2* 유전자 probe로 확인한 경우 약 7 kbp의 band 1 개가 검출되었음. 이는 형질전환된 애기장대 식물체에 도입된 *EpDET2* 유전자 발현시스템의 copy 수가 1 개라는 것을 의미함.

- RT-PCR, Western blot 분석

T3 세대 *EpDET2* 형질전환 애기장대 돌연변이 식물체에서 *EpDET2* 유전자의 발현을 확인하기 위한 RT-PCR 및 Western blot 분석 연구를 수행함. 형질전환 애기장대 돌연변이 식물체의 잎에서 total RNA를 추출하고 poly d(T) primer 및 ImProm-II™ Reverse Transcription System을 이용한 reverse transcription 반응을 통해 cDNA를 합성한 후 PCR의 주형으로 사용하였음. *EpDET2* 유전자를 증폭할 수 있는 PCR primer (그림 147B)를 이용한 PCR을 통해 *EpDET2* 유전자의 mRNA가 형질전환된 애기장대 돌연변이 식물체에서 발현되는 것을 확인함 (그림 151A). 또한 형질전환 애기장대 식물체에서 단백질 추출물을 확보하고 anti-His 항체를 이용한 Western blot 분석을 통해 약 56 kDa의 EpDWF4-His 단백질이 발현되는 것을 확인함 (그림 151B).

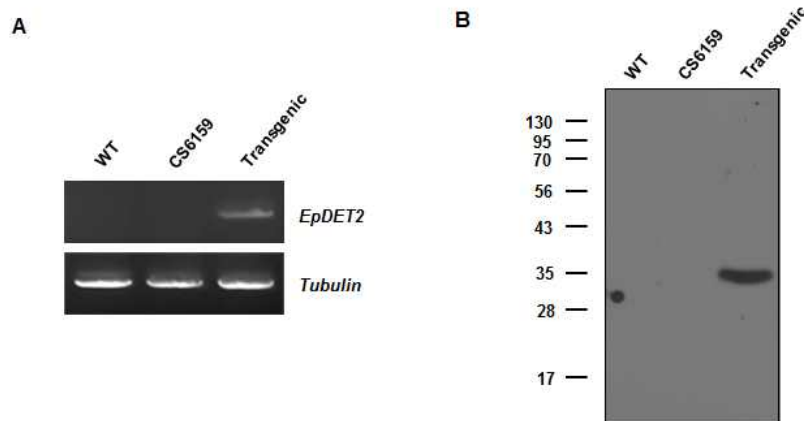


그림 151. T3 세대 *EpDET2* 형질전환 애기장대 돌연변이 식물체에서 *EpDET2* 유전자의 발현을 RT-PCR (A)과 Western blot 분석 (B)을 통해 확인함.

○ *SMT2* 유전자가 과 발현된 애기장대 식물체 확보 및 분자생물학적 검증

*Echinacea SMT2* 유전자 (*EpSMT2*)가 과 발현된 형질전환 애기장대 식물체를 확보하기 위한 pPZPHa3/*EpSMT2* 벡터 형질전환 및 애기장대 재분화 연구에서 T3 세대 *EpSMT2*

형질전환 애기장대 식물체를 확보하고 *EpSMT2* 유전자 형질전환 검증을 위한 분자생물학 연구를 수행함.

- Genomic DNA PCR

T3 세대 *EpSMT2* 형질전환 애기장대 식물체 (Tg 2-5, 4-4, 7-2, 8-4)에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 형질전환 애기장대 식물체의 genomic DNA에 *EpSMT2* 유전자 발현시스템의 도입 유무를 확인함. 형질전환 애기장대 식물체에서 genomic DNA를 확보하고 *EpSMT2* 유전자 및 애기장대 *Tubulin* 유전자에 특이적으로 결합하는 PCR primer (그림 152B)를 이용한 PCR을 수행하여 *EpSMT2* 유전자 발현시스템의 형질전환 유무를 판단함. 형질전환 개체의 genomic DNA에서 *EpSMT2* PCR 산물이 존재하였고 (그림 152A) 이는 *EpSMT2* 유전자 발현시스템이 애기장대 식물체에 안정적으로 도입되었다는 것을 의미함.

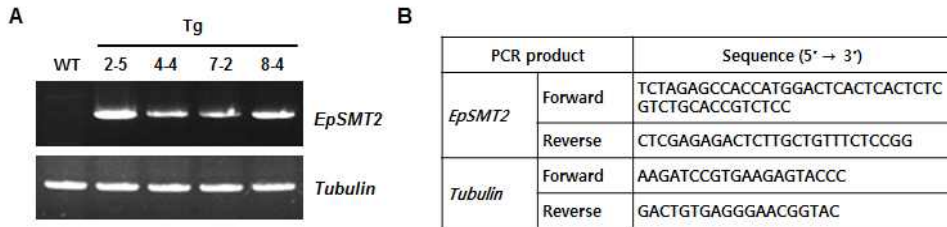


그림 152. (A) T3 세대 *EpSMT2* 형질전환 애기장대 식물체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpSMT2* 유전자 발현시스템의 도입 유무를 확인함. (B) 형질전환 애기장대 식물체의 genomic DNA PCR을 위한 *EpSMT2* 및 애기장대 *Tubulin* PCR primer의 염기서열.

- RT-PCR, Western blot 분석

T3 세대 *EpSMT2* 형질전환 애기장대 돌연변이 식물체에서 *EpSMT2* 유전자의 발현을 확인하기 위한 RT-PCR 및 Western blot 분석 연구를 수행함. 형질전환 애기장대 돌연변이 식물체의 잎에서 total RNA를 추출하고 poly d(T) primer 및 ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcription System을 이용한 reverse transcription 반응을 통해 cDNA를 합성한 후 PCR의 주형으로 사용하였음. *EpSMT2* 유전자를 증폭할 수 있는 PCR primer (그림 152B)를 이용한 PCR을 통해 *EpSMT2* 유전자의 mRNA가 형질전환된 애기장대 식물체에서 발현되는 것을 확인함 (그림 153A). 또한 형질전환 애기장대 돌연변이 식물체에서 단백질 추출물을 확보하고 anti-His 항체를 이용한 Western blot 분석을 통해 약 40 kDa의 *EpSMT2* 단백질이 발현되는 것을 확인함 (그림 153B).

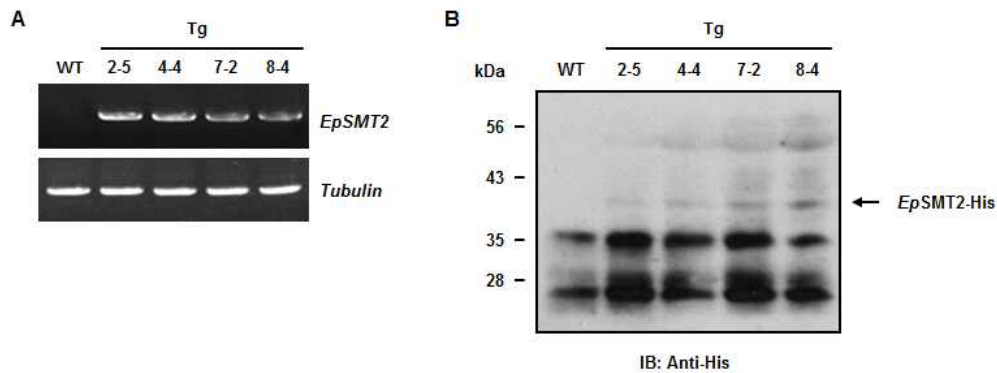


그림 153. T3 세대 *EpSMT2* 형질전환 애기장대 돌연변이 식물체에서 *EpSMT2* 유전자의 발현을 RT-PCR (A)과 Western blot 분석 연구 (B)를 통해 확인함.

## 2. 형질전환된 식물에서 *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자의 기능 분석

### ○ *DWF4* 유전자가 과 발현된 애기장대 식물체에서 *DWF4* 유전자의 기능 분석

*EpDWF4* 유전자가 과 발현된 형질전환 애기장대 식물체에서 *EpDWF4* 유전자의 기능을 예측하기 위한 형질전환 애기장대 식물체의 표현형 분석 및 BR 분석 연구를 수행함.

#### - *EpDWF4* 유전자가 과 발현된 애기장대 식물체의 표현형 분석

*EpDWF4* 유전자 발현시스템이 형질전환된 T3 세대 애기장대 식물체에서 종자를 채취하고 hygromycin 항생제가 첨가된 애기장대 종자 배양 배지 (0.2% MS, 2% sucrose, 0.8% micro agar, 250 mg/L carbenicillin, pH 5.7~5.8)에 과종한 후 4°C 암조건에서 3일 동안 배양하였고 12시간 명상태, 12시간 암상태의 광조건에서 배양하여 애기장대 형질전환 식물체의 발생을 유도하였음. 약 2-3 주 후 4~6개의 성체 잎이 생성된 애기장대 식물체를 토양에 옮겨 심어 형질전환된 애기장대 식물체의 성장을 유도하였고 같은 조건에서 발생이 유도된 wild-type 대조군과 비교하여 표현형을 분석하였음. 그림 1-14에서와 같이 hygromycin 항생제가 포함된 종자 배양 배지에서 발생한 애기장대 형질전환 식물체는 wild-type 식물체에 비해 잎의 크기가 크고 뿌리의 길이가 짧은 형태로 발생되었음. 완전하게 성장한 형질전환된 애기장대 식물체의 크기는 wild-type 대조군에 비해 약 36% 증가하였고 잎의 길이는 25% 증가하였음. 또한 형질전환된 애기장대 식물체 silique의 길이는 wild-type 대조군에 비해 약 36% 증가하였음 (그림 154, 표 28).

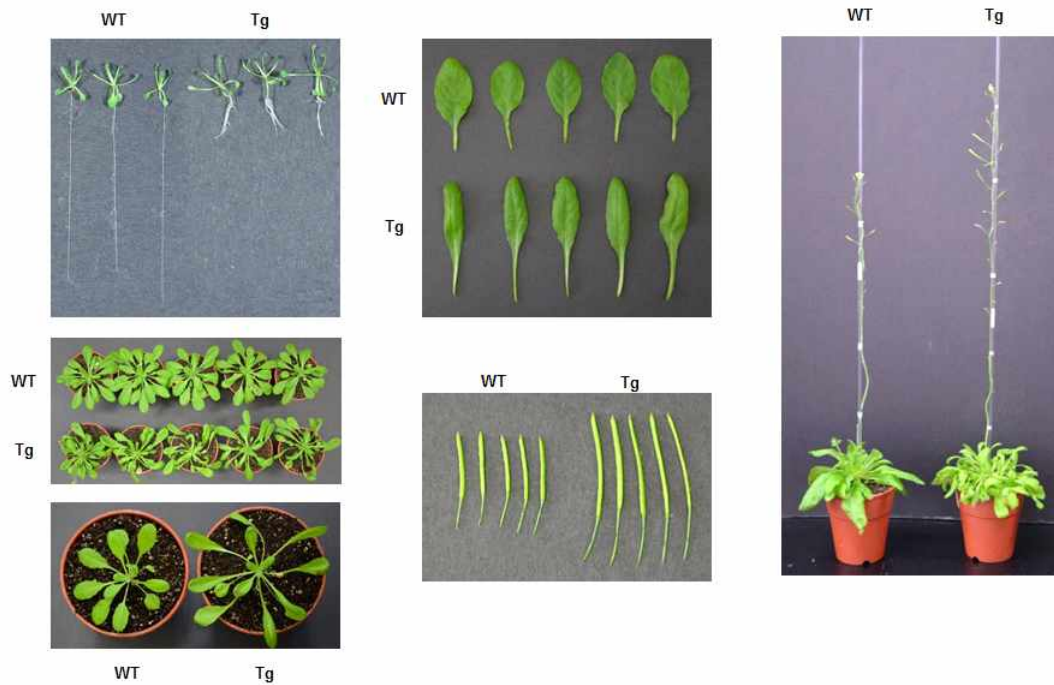


그림 154. *EpDWF4* 유전자가 과 발현된 형질전환 애기장대 식물체의 표현형 분석.

표 28. *EpDWF4* 유전자가 과 발현된 형질전환 애기장대 식물체의 표현형 분석.

	Wild-type	Transgenic ( <i>EpDWF4</i> )
Plant height (cm)	35.0 (±4.0)	47.6 (±3.9)
Leaf blade length (cm)	6.4 (±1.0)	8.0 (±0.7)
Leaf blade width (cm)	2.1 (±0.5)	2.2 (±0.5)
silique petriol length (cm)	0.8 (±0.2)	0.9 (±0.1)
Silique length (cm)	0.96 (±0.2)	1.31 (±0.1)

- *EpDWF4* 유전자가 과 발현된 애기장대 식물체의 BR 분석

*EpDWF4* 유전자 발현시스템이 도입된 T3 세대 형질전환 애기장대 식물체에서 *EpDWF4* 유전자의 과 발현에 의한 BR 호르몬 변화를 확인함. T3 세대 형질전환 애기장대 앞에서 BR 호르몬을 추출하고 gas chromatography (GC) 분석 (그림 155) 및 campesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol 정량 분석 연구를 수행함 (표 29).



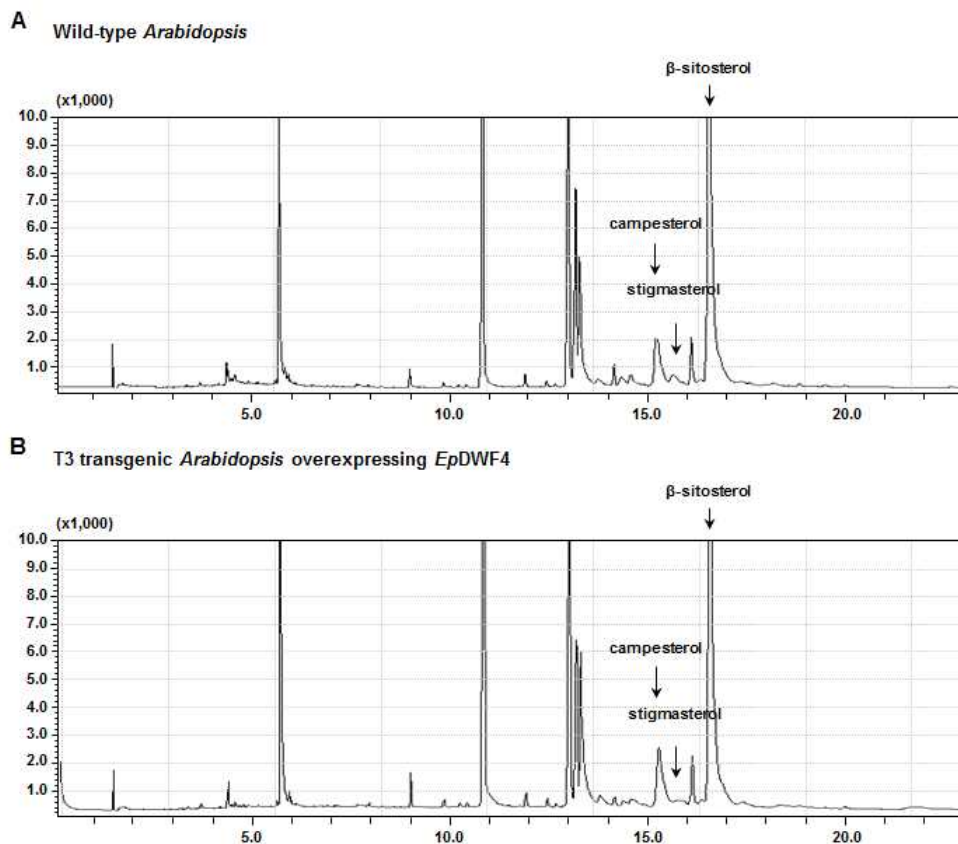


그림 155. *EpDWF4* 유전자 발현시스템이 도입된 형질전환 T3 세대 애기장대 식물체에서 BR 호르몬을 추출하고 GC 분석 연구를 수행함.

표 29. *EpDWF4* 유전자가 과 발현된 형질전환 애기장대 식물체의 campesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol 정량 분석 연구를 수행함.

	Wild-type (ppm)	Transgenic ( <i>EpDWF4</i> , ppm)
Campesterol	125.6	138.1
Stigmasterol	82.5	80.9
$\beta$ -sitosterol	481.1	857.7

Wild-type 애기장대 및 T3 세대 형질전환 애기장대 잎 (건조중량 2 g)을 *n*-hexane (30 mL)으로 3번 반복 추출하여 hexane 추출물을 확보하였고 추출물 3.4 mg 당 1 M KOH/EtOH 용매 1 mL을 첨가하여 1시간 동안 saponincation 반응을 진행하였음. 반응물에 동량의 *n*-hexane을 혼합한 후 hexane 분획물을 확보하였고 농축 후 chloroform 용매에 용해시켰으며 *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA)를 첨가하고 80°C에서 1시간 동안 trimethylsilylation (TMS) 반응을 유발시켜 GC (Shimadzu GC-MS-QP2010) 분석을 위한 BR 추출물 시료를 확보하였음. GC 분석에 사용한 column은 silica capillary column (DB-5: 30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m, USA)이었고 column 온도는 초기 온도가

60°C이었으며 2분간 유지하다가 1분에 15°C씩 320°C까지 올리고 320°C에서 10분간 유지 하였음.

○ *EpDET2* 유전자가 과 발현된 식물체에서 *EpDET2* 유전자의 기능 분석

*EpDET2* 유전자가 과 발현된 형질전환 애기장대 식물체에서 *Echinacea DET2* 유전자의 기능을 예측하기 위한 형질전환 애기장대 식물체의 표현형 분석 및 BR 분석 연구를 수행함.

- *EpDET2* 유전자가 과 발현된 애기장대 식물체의 표현형 및 BR 분석

*EpDET2* 유전자 발현시스템이 형질전환된 T3 세대 애기장대 식물체 (1-4, 3-3, 4-3, 5-1 개체)에서 종자를 채취하고 hygromycin 항생제가 첨가된 애기장대 종자 배양 배지에 파종한 후 애기장대 형질전환 식물체의 발생을 유도하였음. 약 2-3 주 후 4~6개의 성체 잎이 생성된 애기장대 식물체를 토양에 옮겨 심어 형질전환된 애기장대 식물체의 성장을 유도하였고 같은 조건에서 발생이 유도된 wild-type 대조군과 비교하여 표현형을 분석하였음. 그림 156에서와 같이 hygromycin 항생제가 포함된 종자 배양 배지에서 발생된 애기장대 형질전환 식물체는 wild-type 식물체에 비해 잎의 크기가 크고 뿌리의 길이가 작은 형태로 발생되었음. 완전하게 성장한 형질전환된 애기장대 식물 1-4, 4-3 개체의 경우 식물체의 크기는 wild-type 대조군에 비해 증가되었음.

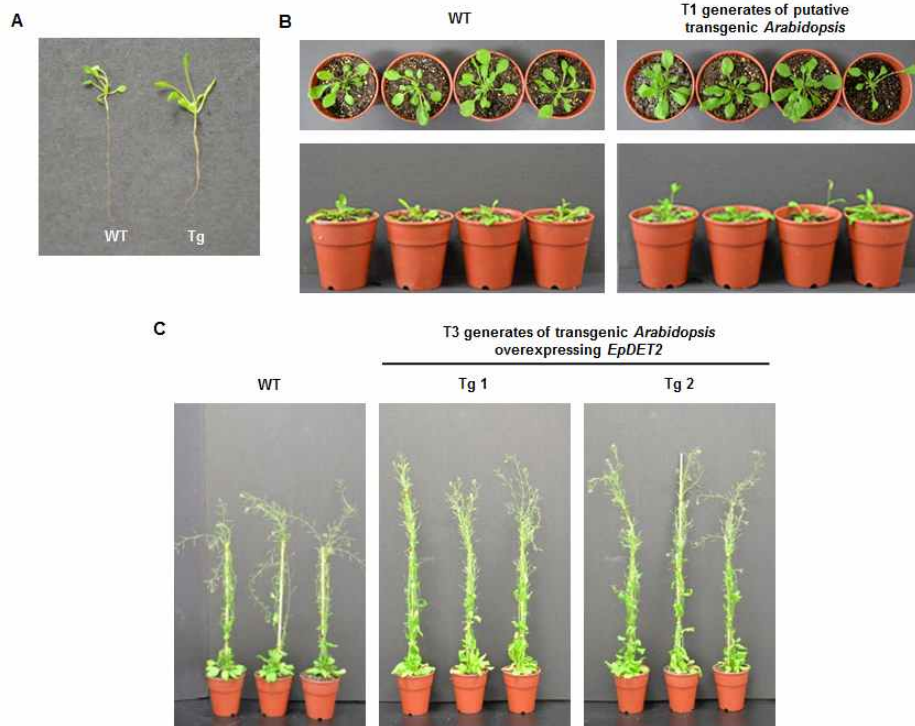


그림 156. *EpDET2* 유전자가 과 발현된 형질전환 애기장대 식물체의 표현형 분석

*Echinacea* *DET2* 유전자 발현시스템이 도입된 형질전환 애기장대 T3 세대 식물체 (1-4, 3-3, 4-3, 5-1 개체)에서 *DET2* 유전자의 과 발현에 의한 BR 호르몬 변화를 확인하기 위해 식물체의 잎에서 BR 호르몬을 추출하고 GC 분석 (그림 157) 및 campesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol 정량 분석 연구를 수행함 (표 30).

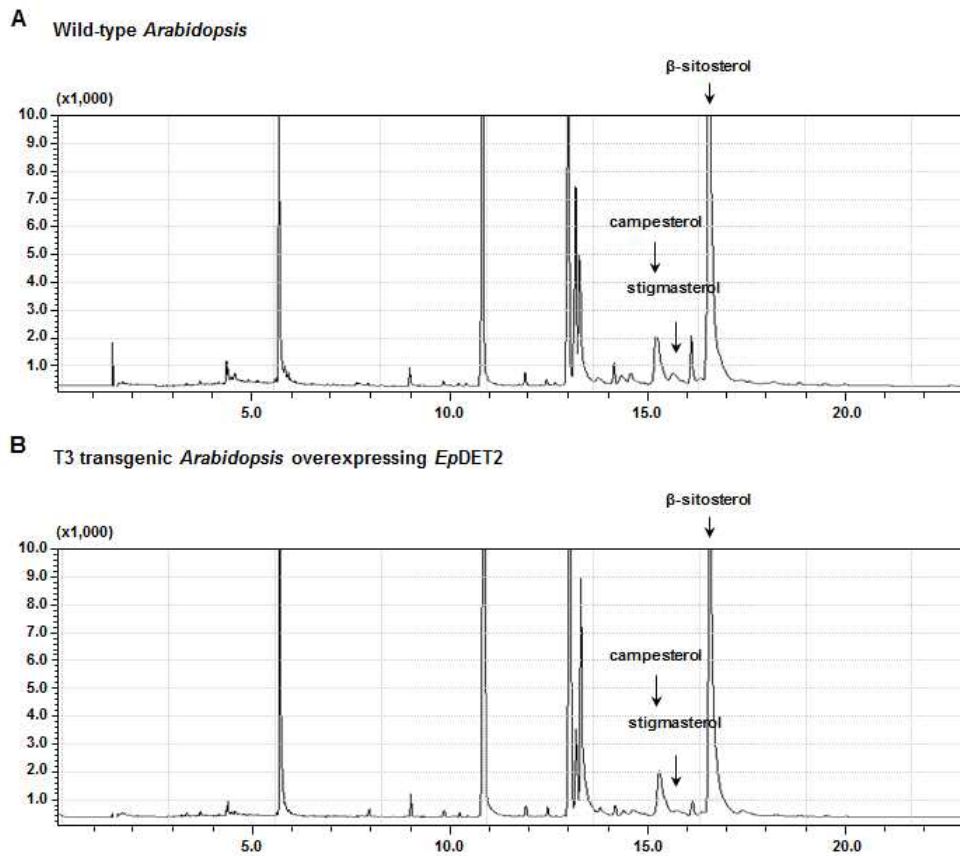


그림 157. *EpDET2* 유전자 발현시스템이 도입된 형질전환 T3 세대 애기장대 식물체에서 BR 호르몬을 추출하고 GC 분석 연구를 수행함.

표 30. *EpDET2* 유전자가 과 발현된 형질전환 애기장대 식물체의 campesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol 정량 분석 연구를 수행함.

	Wild-type (ppm)	Transgenic ( <i>EpDET2</i> , ppm)
Campesterol	125.6	120.1
Stigmasterol	82.5	62.8
$\beta$ -sitosterol	481.1	685.2

- *EpDET2* 유전자가 과 발현된 애기장대 돌연변이 식물체의 표현형 분석

*EpDET2* 유전자가 과 발현된 형질전환 애기장대 돌연변이 식물체에서 *EpDET2* 유전자의 기능을 예측하기 위한 형질전환 애기장대 돌연변이 식물체의 표현형 분석 연구를 수행함.

*EpDET2* 유전자 발현시스템이 형질전환된 T3 세대 애기장대 돌연변이 식물체에서 종자를 채취하고 hygromycin 항생제가 첨가된 애기장대 종자 배양 배지에 과종한 후 애기장대 형질전환 식물체의 발생을 유도하였음. 약 2-3 주 후 4~6개의 성체 잎이 생성된 애기장대 식물체를 토양에 옮겨 심어 형질전환된 애기장대 식물체의 성장을 유도하였고 같은 조건에서 발생이 유도된 wild-type 대조군 및 CS6159 돌연변이 대조군과 비교하여 표현형을 분석하였음. CS6159 돌연변이 식물체는 wild-type 대조군과 비교하였을 때 성장 속도가 느리며 잎, 뿌리의 크기가 작은 형태로 발생됨. Hygromycin 항생제가 포함된 종자배양 배지에서 성장된 형질전환 식물체는 wild-type과 유사한 속도로 성장하였고 wild-type의 표현형과 유사한 형태로 보였음 (그림 158). 종자 배양 배지에서 발생이 유도된 wild-type 식물체, CS6159 식물체, 형질전환된 식물체를 토양에 옮겨 심고 식물체의 성장을 유도하고 각 개체의 표현형을 비교하였음. 그림 158에서와 같이 형질전환 식물체는 wild-type과 유사한 크기와 형태를 지니는 표현형을 보였음. 이상의 연구결과는 애기장대 *DET2* mutant CS6159 식물체에서 *EpDET2* 유전자의 발현이 유도되었을 때 애기장대 *DET2* 유전자의 결핍에 의한 돌연변이가 보완되며 *EpDET2* 유전자가 애기장대 *DET2* 유전자와 동일한 기능을 수행한다는 것을 의미함.

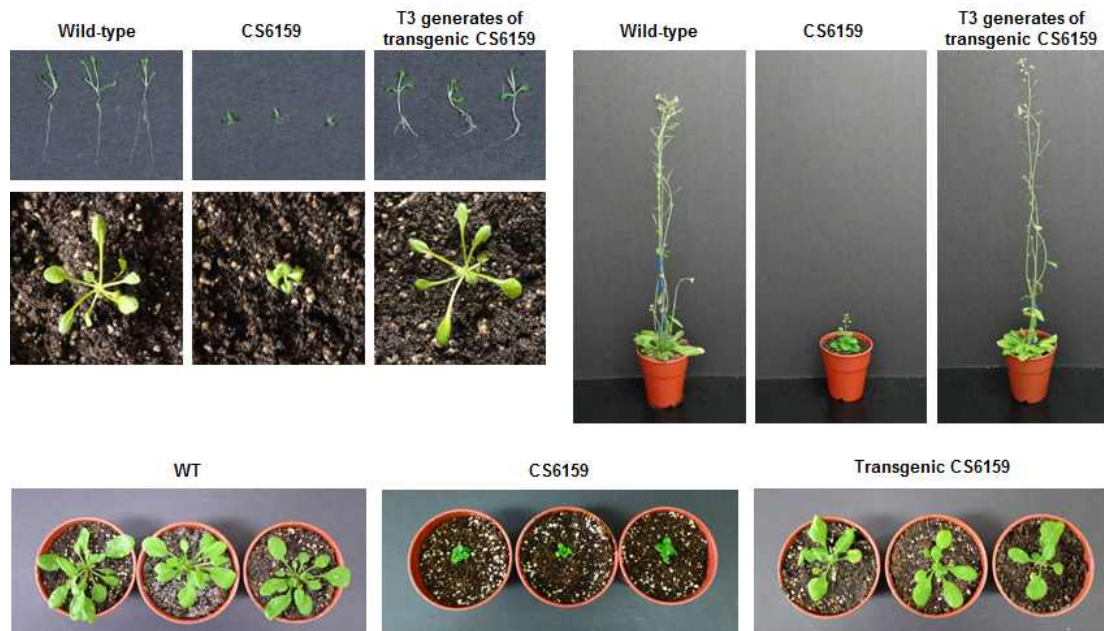


그림 158. *EpDET2* 유전자가 과 발현된 형질전환 애기장대 돌연변이 식물체의 표현형 분석

○ *SMT2* 유전자가 과 발현된 식물체에서 *SMT2* 유전자의 기능 분석

*EpSMT2* 유전자가 과 발현된 형질전환 애기장대 식물체에서 *EpSMT2* 유전자의 기능을 예측하기 위한 형질전환 애기장대 식물체의 표현형 분석 및 BR 분석 연구를 수행함.

- *EpSMT2* 유전자가 과 발현된 애기장대 돌연변이 식물체의 표현형 분석

*EpSMT2* 유전자 발현시스템이 형질전환된 T3 세대 애기장대 식물체 (2-5, 4-4, 7-2, 8-4개체)에서 종자를 채취하고 hygromycin 항생제가 첨가된 애기장대 종자 배양 배지에 파종한 후 애기장대 형질전환 식물체의 발생을 유도하였음. 약 2-3 주 후 4~6개의 성체 잎이 생성된 애기장대 식물체를 토양에 옮겨 심어 형질전환된 애기장대 식물체의 성장을 유도하였고 같은 조건에서 발생이 유도된 wild-type 대조군과 비교하여 표현형을 분석하였음. 그림 159에서와 같이 hygromycin 항생제가 포함된 종자 배양 배지에서 발생된 애기장대 형질전환 식물체는 wild-type 식물체에 비해 잎의 크기가 크고 뿌리의 길이가 작은 형태로 발생되었음. 완전하게 성장한 형질전환된 애기장대 식물체의 경우 식물체의 크기는 wild-type 대조군에 비해 약간 증가되었음.

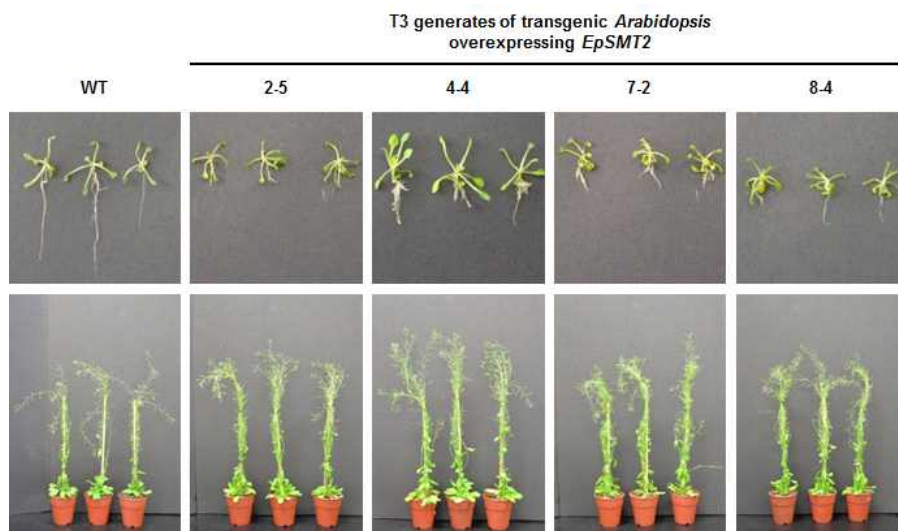


그림 159. *EpSMT2* 유전자가 과 발현된 형질전환 애기장대 돌연변이 식물체의 표현형 분석.

- *EpSMT2* 유전자가 과 발현된 애기장대 돌연변이 식물체의 BR 분석

*EpSMT2* 유전자 발현시스템이 도입된 형질전환 애기장대 T3 세대 식물체에서 *EpSMT2* 유전자의 과 발현에 의한 BR 호르몬 변화를 확인하기 위해 식물체의 잎에서 BR 호르몬을



추출하고 gas chromatography (GC) 분석 연구 (그림 160) 및 campesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol 정량 분석 연구를 수행함 (표 31).

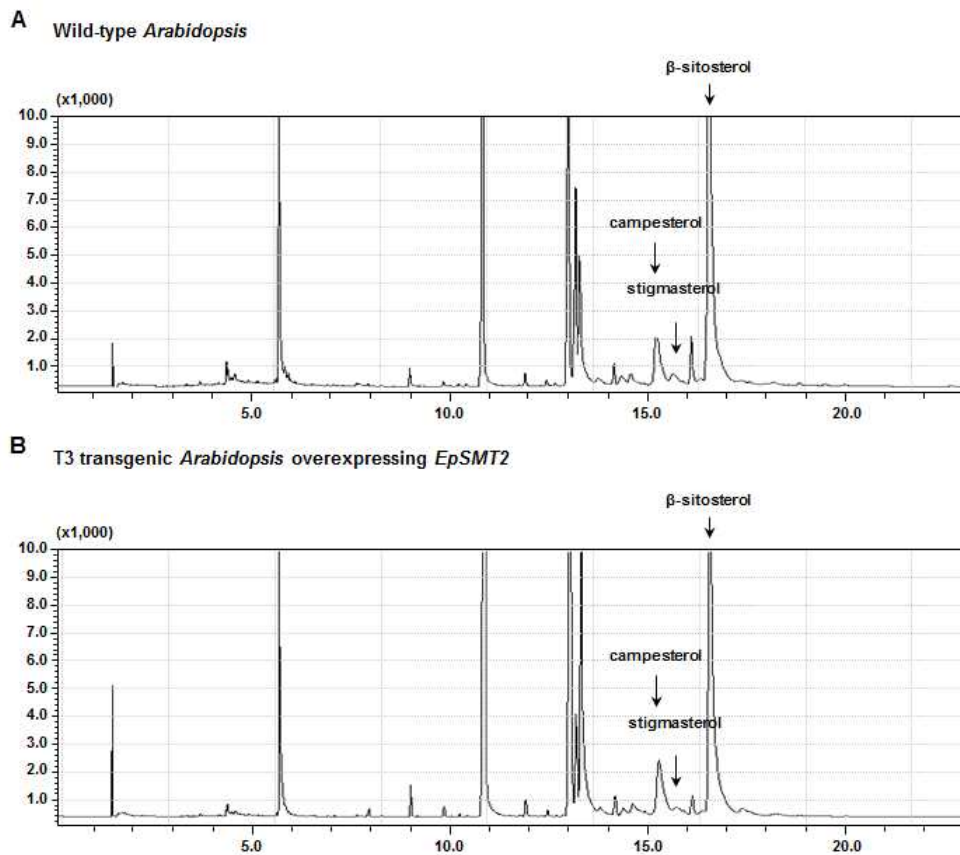


그림 160. *EpSMT2* 유전자 발현시스템이 도입된 형질전환 T3 세대 애기장대 식물체에서 BR 호르몬을 추출하고 GC 분석 연구를 수행함.

표 31. *EpSMT2* 유전자가 과 발현된 형질전환 애기장대 식물체의 campesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol 정량 분석 연구를 수행함.

	Wild-type (ppm)	Transgenic ( <i>EpSMT2</i> , ppm)
Campesterol	125.6	141.9
Stigmasterol	82.5	65.9
$\beta$ -sitosterol	481.1	732.4

3. *DWF3* 유전자 발현 억제에 의해 유도되는 난쟁이 관상작물 형질전환체의 유전분석 및 기능 분석

○ *DWF3* 유전자 발현 억제에 의해 유도되는 난쟁이 관상작물 형질전환체의 유전분석

- Genomic DNA PCR 분석

*EpDWF3* 유전자의 발현이 억제된 관상작물 난쟁이 형질전환체의 유전정보 분석을 위해 화분에서 성장 중인 *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *Echinacea* genomic DNA에 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 존재 유무를 확인하였음. 형질전환 개체의 잎 (~ 1 g)을 LN<sub>2</sub>와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하였고 GenElute Plant Genomic DNA Prep Mini Kit (Sigma)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였음. 250 ng genomic DNA, pFGC5941/shEpDWF3 벡터의 *EpDWF3* sense 부위 및 *Echinacea* 18s rRNA 유전자에 특이적으로 결합하는 primer를 이용한 PCR을 수행하였고 *EpDWF3* sense PCR 산물의 존재를 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음. 그림 161B에서와 같이 *DWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체들은 genomic DNA에 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템을 지니는 것으로 확인됨 (그림 161).

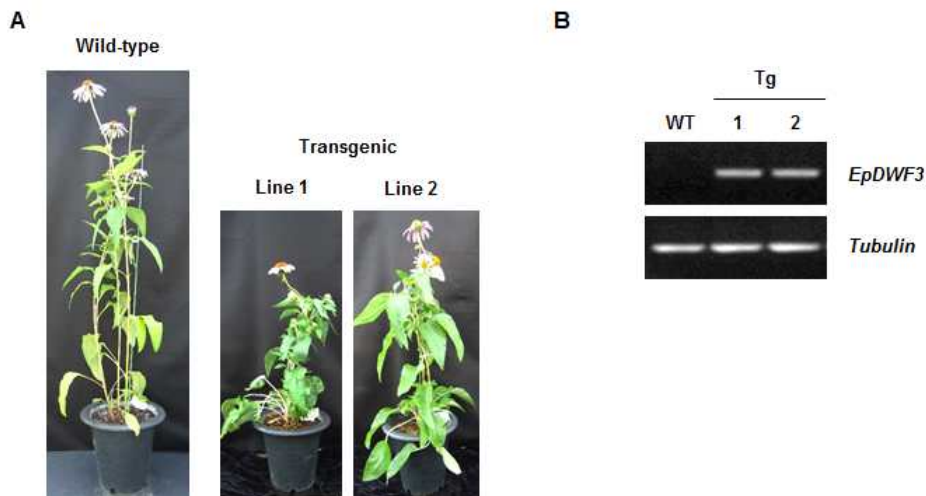


그림 161. *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체 (A)에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 존재 유무를 확인함.

- RT-PCR, real-time PCR 분석

*EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체에서 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템에 의한 *EpDWF3* 유전자의 발현 억제를 확인하기 위한 RT-PCR 및 real-time PCR을 수행하였음. *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 잎 (~ 1 g)을 LN<sub>2</sub>와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하고 Hybrid-R™ Plant RNA Prep Mini Kit (GeneAll)를 이용하여 total RNA를 추출하였음. 2 µg의 total RNA, poly d(T) primer 및 ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega)를 이용한 reverse transcription 반응을 통해 cDNA를 합성하였고

RT-PCR 및 real-time PCR의 주형으로 사용하였음. *EpDWF3* 유전자 및 *Tubulin* 유전자를 증폭할 수 있는 PCR primer (forward of *EpDWF3*, 5'-GATTACAAGTCTATGCCTTTCACACAATGC-3'; reverse of *EpDWF3*, 5'-CTCGAGCTCTACTACATCACGTTTTTGCAC-3'; forward of *Tubulin*, 5'-CCACGTCTCCACTTCTTCATGGT-3'; reverse of *Tubulin*, 5'-CTCCATCTCATCCATTCCTTCACC-3')를 이용한 PCR을 통해 *EpDWF3* 유전자의 발현이 *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체에서 감소하는 것을 확인하였음 (그림 162A). 또한 *EpDWF3* 유전자 및 *Tubulin* 유전자를 증폭할 수 있는 real-time PCR primer (forward of *EpDWF3*, 5'-ACCACCATGACTCTTGCCGT-3'; reverse of *EpDWF3*, 5'-AGAGTCACCGATGCACCCTT-3'; forward of *Tubulin*, 5'-ATGATGTGTGCTGCTGACCC-3'; reverse of *Tubulin*, 5'-TCGTCAACTTCCTTGGTGCTCA-3') 및 SYBR Premix EX Taq™ II (Takara) real-time PCR kit를 이용하여 *EpDWF3* 유전자의 발현량을 비교한 결과 *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 *EpDWF3* 유전자 발현은 대조군에 비해 약 50% 이상 감소하는 것으로 확인됨 (그림 162B).

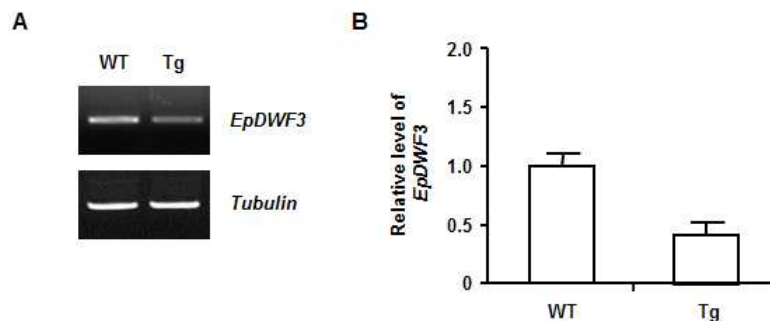


그림 162. *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체 (A)에서 total RNA를 추출하고 RT-PCR (A) 및 real-time PCR (B)을 통해 *EpDWF3* 유전자의 발현 억제를 확인함.

○ *DWF3* 유전자 발현 억제에 의해 유도되는 난쟁이 관상작물 형질전환체의 표현형 분석

화분에서 성장한 후 개화한 *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체를 wild-type 대조군과 비교하여 표현형을 분석하였음. 그림 163에서와 같이 *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 평균적인 크기는 약 53.5 cm이었고 wild-type 대조군에 비해 약 50% 이상 감소하였음. *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 평균적인 꽃의 직경은 약 5.7 cm이었고 wild-type 대조군에 비해 약 40% 감소하였음. 또한 internode 길이, 잎 길이 등이 대조군에 비해 감소한 것으로 나타났음 (그림 163C).

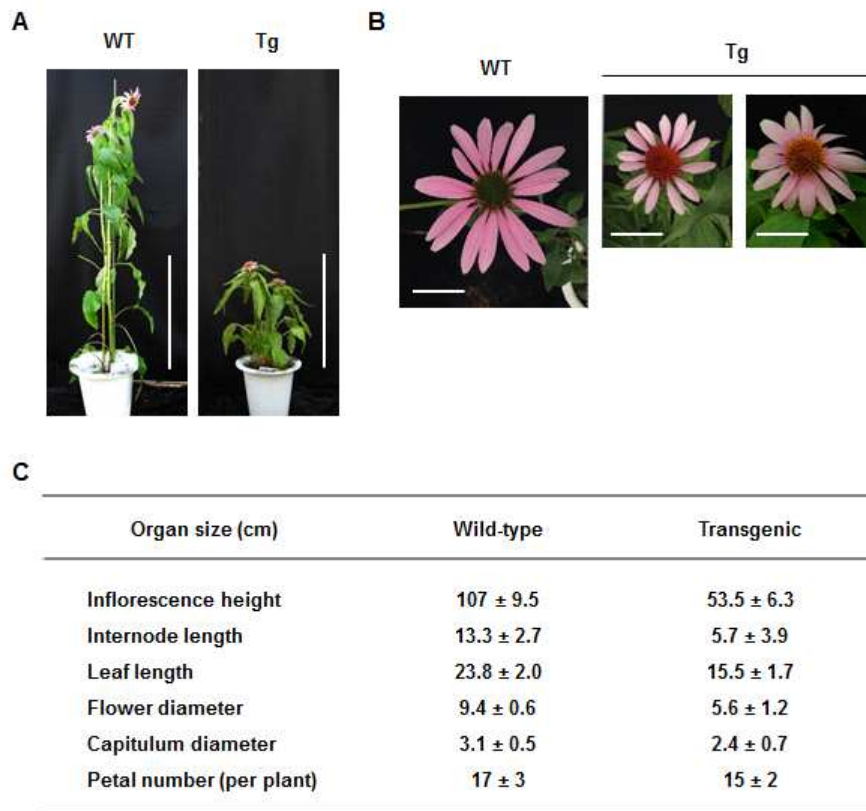


그림 163. *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 표현형을 대조군과 비교 분석함.

#### 4. *DWF4* 유전자 발현 억제에 의해 유도되는 난쟁이 관상작물 형질전환체의 유전분석 및 기능 분석

*EpDWF4* 유전자 발현 억제용 *EpDWF4* RNAi pFGC5941/sh*EpDWF3* 벡터가 도입된 것으로 확인되어 노지에서 증식 중인 *Coreopsis* 형질전환 개체 (그림 164; T-28, 41, 42, 45)에서 total RNA를 추출하고 *EpDWF4* RNAi 벡터시스템에 의한 *CrDWF4* 유전자의 발현 억제를 RT-PCR로 확인함. *Coreopsis* 형질전환 개체의 잎 (~ 1 g)을 LN<sub>2</sub>와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하고 Hybrid-R™ Plant RNA Prep Mini Kit를 이용하여 total RNA를 추출하였음. 2 µg의 total RNA, poly d(T) primer 및 ImProm-II™ Reverse Transcription System를 이용한 reverse transcription 반응을 통해 cDNA를 합성하였고 RT-PCR의 주형으로 사용하였음. *CrDWF4* 유전자 및 *Tubulin* 유전자를 증폭할 수 있는 PCR primer (그림 164C)를 이용한 PCR을 통해 *CrDWF4* 유전자의 발현이 *Coreopsis* 형질전환 개체에서 대조군에 비해 감소하는 것으로 확인되었음 (그림 164A). *Coreopsis* 형질전환 개체의 대량 증식을 위한 영양 번식 연구를 제1협동과제 연구팀과 진행하고 대량 증식 후 대조군과 비교한 표현형 분석 등의 연구를 수행함.

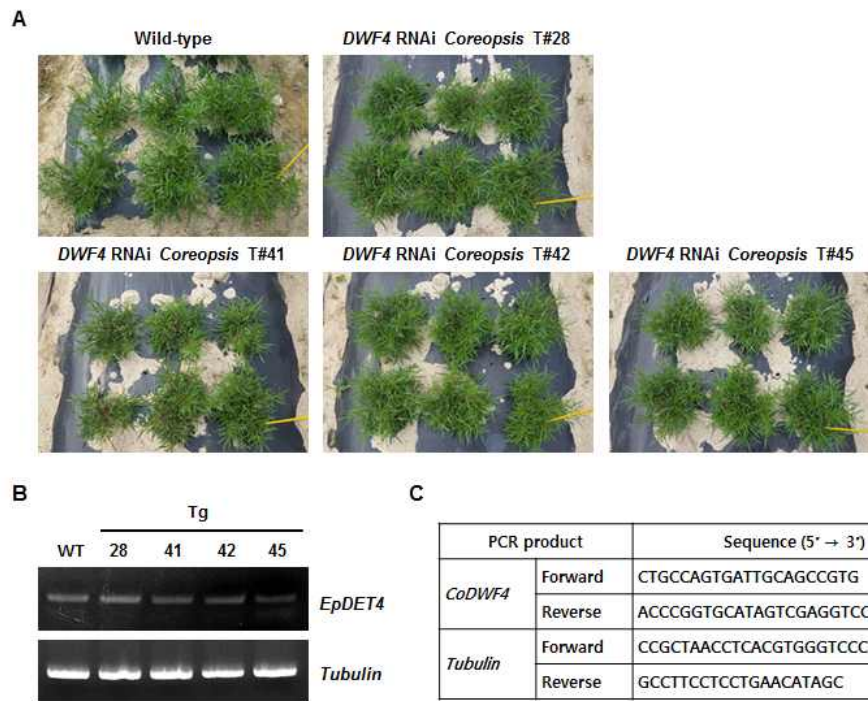


그림 164. 노지에서 성장 중인 *CrDWF4* RNAi *Coreopsis* 형질전환 개체 (A)에서 total RNA를 추출하고 RT-PCR (B)을 통해 *CrDWF4* 유전자의 발현이 억제되는 것을 확인함.



3-5-2. 제2세부과제 : 관상작물 형질전환 체계 확립 및 난쟁이 관상작물 개발

1. BR 생합성 관련 난쟁이 표현형 유전자 발현 억제 관상작물 *Echinacea* 난쟁이 형질전환체 확보 및 순화

○ *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자의 발현이 동시에 억제된 관상작물 *Echinacea* 형질전환체 확보 및 순화

*EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템 (pFGC5941/shEpDET2:DWF4:SMT2)이 형질전환된 *Echinacea* 형질전환 개체를 확보하기 위한 형질전환, 재분화 및 순화 연구를 수행함.

*Echinacea*를 무균상태에서 기내 발아시키기 위해 *Echinacea* 종자의 외피를 제거하고 70% ethanol 용액에 1분, 1% NaOCl 용액에 20분간 침지시킨 후 멸균수로 10회 세척하여 남은 NaOCl 잔여물을 제거하였고 E1 고형 배지 (100 mg/L myo-inositol, 2 mg/L glycine, 1.5% sucrose, 0.7% micro agar, 2 ml/L plant preservation mix., pH 5.8)에 과종하였음. *Echinacea* 종자는 16시간 명상태, 8시간 암상태, 24°C 배양 조건에서 배양하였으며, 약 6주에서 8주 후 생성된 어린잎을 약 1 cm<sup>2</sup> 크기로 잘라 잎 절편체를 확보하고 재조합 *Agrobacterium*을 이용한 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터의 형질전환 실험에 사용하였음. pFGC5941/shEpDET2:DWF4:SMT2 벡터가 형질전환된 재조합 *Agrobacterium* LBA4404 세포를 50 µg/mL kanamycin, 25 µg/mL rifampicin이 포함된 LB 액상 배지에서 이틀간 배양한 후 세포를 회수하였고 3% sucrose가 함유된 MS (Murashige & Skoog medium) 액상 배지를 이용해 OD<sub>600</sub> 0.6 ~ 0.8 값으로 희석하여 사용하였음. 재조합 *Agrobacterium* 희석액에 잎 절편체를 10분간 침지시키고 여분의 재조합 *Agrobacterium* 희석액을 제거한 후 E1 고형 배지에 치상하였고 이틀 동안 암상태에서 배양하였음. 형질전환된 신초의 선별을 위해 잎 절편체를 식물 호르몬 6-benzylaminopurine (BAP), 1-naphthaleneacetic acid (NAA)와 DL-phosphinothricin (PPT)가 함유된 E8 고형 배지 (MS salts, 100 mg/L myo-inositol, 0.5 mg/L glycine, 2% sucrose, 0.7% microagar, 1.0 mg/L BAP, 0.01 mg/L NAA, 1 mg/L PPT)로 옮긴 후 16시간 명상태, 8시간 암상태, 24°C 배양 조건에서 배양하였음. 4주에서 6주 정도 지난 후부터 신초의 발생을 확인할 수 있었음.

뿌리 재분화를 위해 WPM 배지 (2.5 g/L Woody Plant Medium, 1.5% sucrose, 1.5 mg/L IBA, 0.4% phytagal)에 치상한 후 16시간 명상태, 8시간 암상태, 24°C 배양 조건에서 배양하여 뿌리의 발달을 유도하였음. 약 2달 정도의 뿌리 생성 기간을 거친 후 토양에 옮겨 심어 형질전환 식물체의 성장을 유도하였음.

관상작물 *Echinacea* 형질전환 및 재분화 연구에서 확보한 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음. 형질전환 개체의 잎 (~ 1 g)을 LN<sub>2</sub>와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하였고 GenElute Plant Genomic DNA Prep Mini Kit (Sigma)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였음. 250 ng genomic DNA, pFGC5941/shEpDET2:DWF4:SMT2 벡터의 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위 및 *Echinacea Tubulin* 유전자에 특이적으로 결합하는 primer를 이용한 PCR을 수행하여 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음 (그림 165 ~ 170).

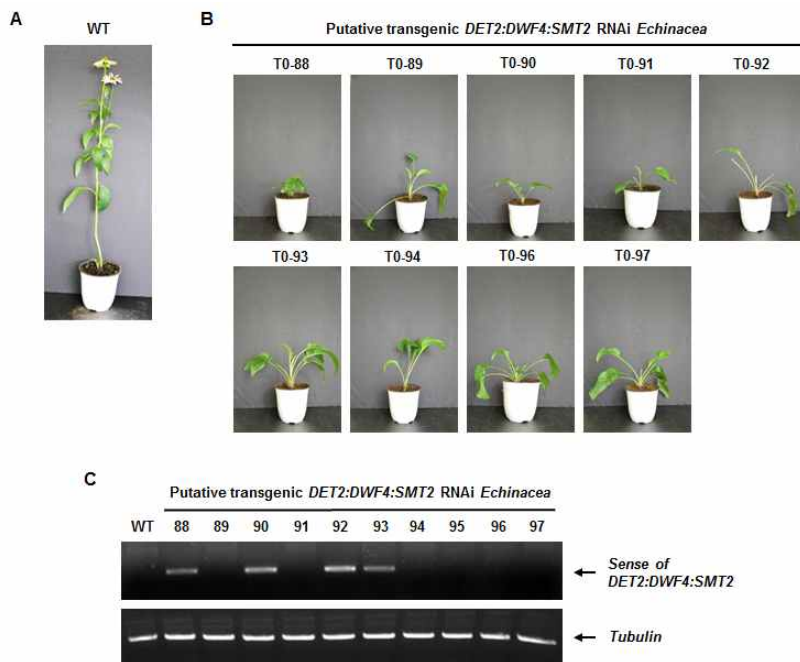


그림 165. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-88 ~ T0-97). (C) *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위, *Tubulin* genomic DNA PCR 산물.

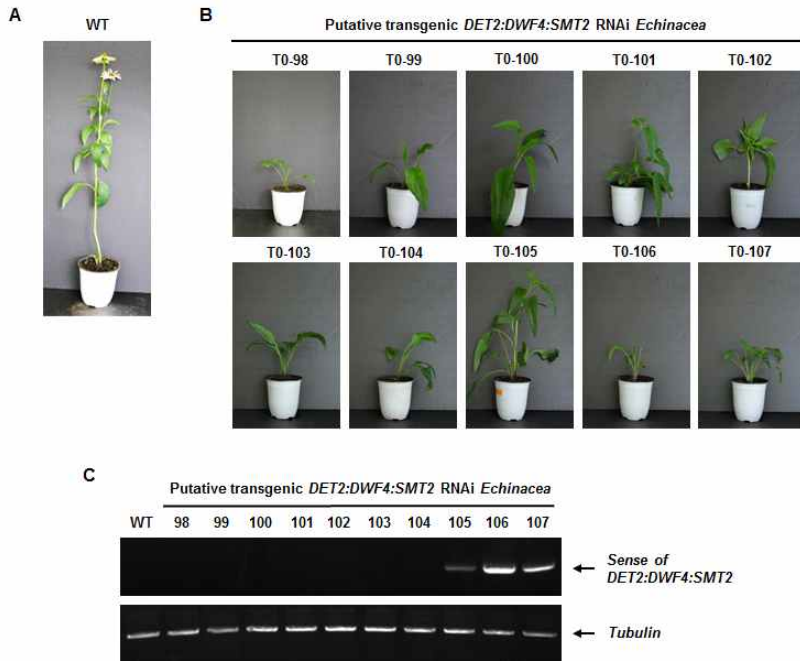


그림 166. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-98 ~ T0-107). (C) *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위, *Tubulin* genomic DNA PCR 산물.

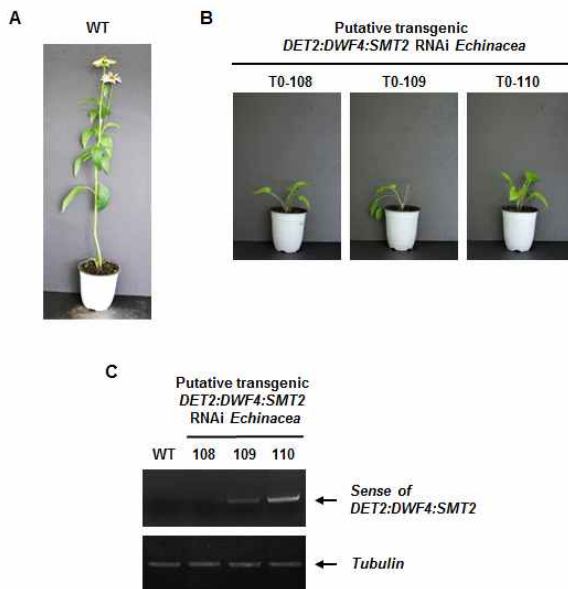


그림 167. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-108 ~ T0-110). (C) *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위, *Tubulin* genomic DNA PCR 산물.

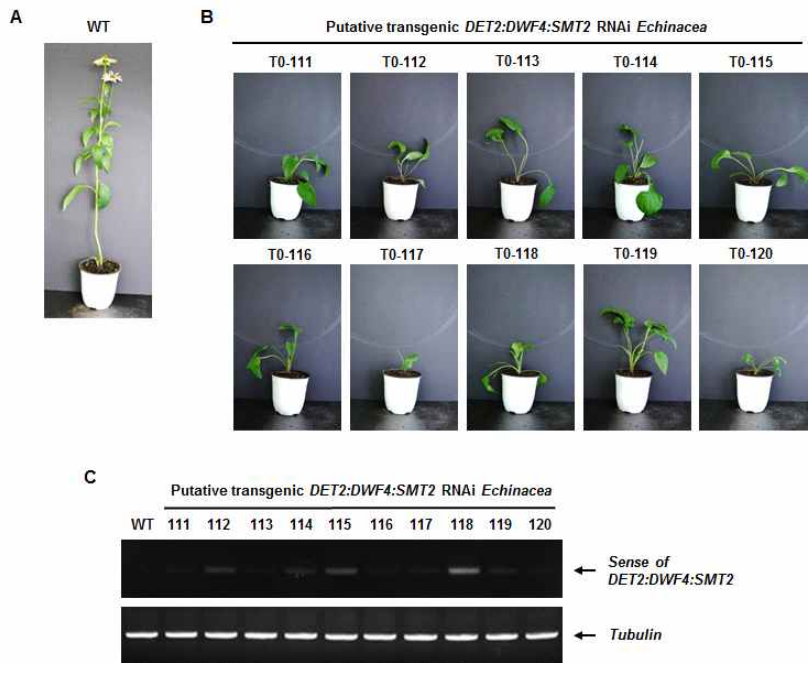


그림 168. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-111 ~ T0-120). (C) *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위, *Tubulin* genomic DNA PCR 산물.

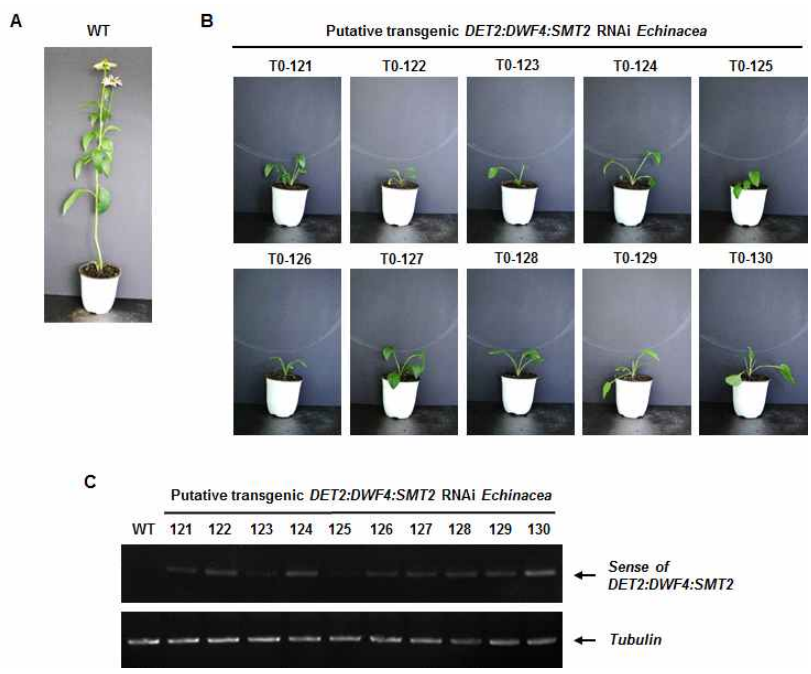


그림 169. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-121 ~ T0-130). (C) *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위, *Tubulin* genomic DNA PCR 산물.

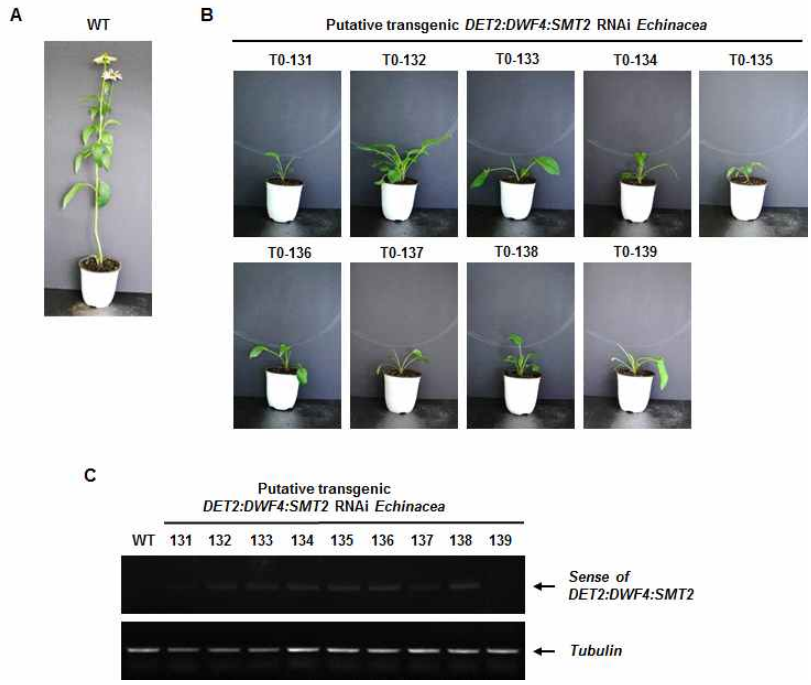


그림 170. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-131 ~ T0-139). (C) *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위, *Tubulin* genomic DNA PCR 산물.

토양에 순화 중인 형질전환 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 genomic DNA PCR 결과 총 52 개체 중 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 발현시스템이 도입된 개체는 29 개체 (T0-88, 90, 92, 93, 105, 106, 107, 109, 110, 112, 114, 115, 118, 121, 122, 123, 124, 126, 127, 128, 129, 130, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138)이었고 이중 5 개체 (T0-88, 90, 92, 93, 105)에서 줄기 및 꽃을 형성하는 성장을 보였음 (표 32). 화분에서 성장 중인 형질전환 개체의 경우 wild-type 대조군에 비해 약간 크기가 감소하는 것으로 보이지만 정확한 표현형 및 왜소화 정도는 노지에 옮겨 번식시킨 후 표현형 비교 및 분자생물학적 검증 연구 (유전자 발현 억제 비교 연구) 등을 통해 확인할 수 있을 것으로 생각됨. 형질전환체의 표현형 비교 및 분자생물학적 검증을 위한 개체를 확보하기 위해 5 개체 (T0-88, 90, 92, 93, 105)의 영양 번식을 제1협동과제 연구팀에 의뢰하여 진행함. 또한 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 발현시스템이 도입된 개체 중 줄기 및 꽃을 형성하는 개체를 확보한 후 제1협동과제 연구팀에 영양 번식을 의뢰함.

표 32. 형질전환 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체

형질전환 <i>Echinacea</i> 개체	<i>EpDET2:EpDWF4:EpSMT2</i> RNAi 발현시스템 도입 유무	식물체 성장 정도 (줄기 형성 유무)	영양번식 시도 여부
T0-88	도입	줄기 형성	시도
T0-89	-	-	-



T0-90	도입	줄기 형성	시도
T0-91	-	-	-
T0-92	도입	줄기 형성	시도
T0-93	도입	줄기 형성	시도
T0-94	-	-	-
T0-95	-	-	-
T0-96	-	-	-
T0-97	-	-	-
T0-98	-	-	-
T0-99	-	-	-
T0-100	-	-	-
T0-101	-	-	-
T0-102	-	-	-
T0-103	-	-	-
T0-104	-	-	-
T0-105	도입	줄기 형성	시도
T0-106	도입	-	-
T0-107	도입	-	-
T0-108	-	-	-
T0-109	도입	-	-
T0-110	도입	-	-
T0-111	-	-	-
T0-112	도입	-	-
T0-113	-	-	-
T0-114	도입	-	-
T0-115	도입	-	-
T0-116	-	-	-
T0-117	-	-	-
T0-118	도입	-	-
T0-119	-	-	-
T0-120	-	-	-
T0-121	도입	-	-
T0-122	도입	줄기형성 관찰 중	-
T0-123	도입	"	-
T0-124	도입	"	-
T0-125	-	"	-
T0-126	도입	"	-
T0-127	도입	"	-
T0-128	도입	"	-
T0-129	도입	"	-
T0-130	도입	"	-
T0-131	-	"	-
T0-132	도입	"	-
T0-133	도입	"	-
T0-134	도입	"	-

T0-135	도입	"	-
T0-136	도입	"	-
T0-137	도입	"	-
T0-138	도입	"	-
T0-139	-	"	-
계	29/52	5/29	5/5

○ *DWF3* 유전자의 발현이 억제된 관상작물 *Echinacea* 형질전환체 확보 및 순화

*EpDWF3* RNAi 벡터시스템 (pFGC5941/shEpDWF3)이 형질전환된 *Echinacea* 형질전환 개체를 확보하기 위한 형질전환, 재분화 및 순화 연구를 수행함. 형질전환 및 재분화 방법은 1-1항과 동일함.

관상작물 *Echinacea* 형질전환 및 재분화 연구에서 확보한 *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *Echinacea* genomic DNA에 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음. 형질전환 개체의 잎 (~ 1 g)을 LN<sub>2</sub> 와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하였고 GenElute Plant Genomic DNA Prep Mini Kit를 이용하여 genomic DNA를 추출하였음. 250 ng genomic DNA, pFGC5941/shEpDWF3 벡터의 *EpDWF3* sense 부위 및 *Echinacea Tubulin* 유전자에 특이적으로 결합하는 primer를 이용한 PCR을 수행하여 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음 (그림 171 ~ 172).

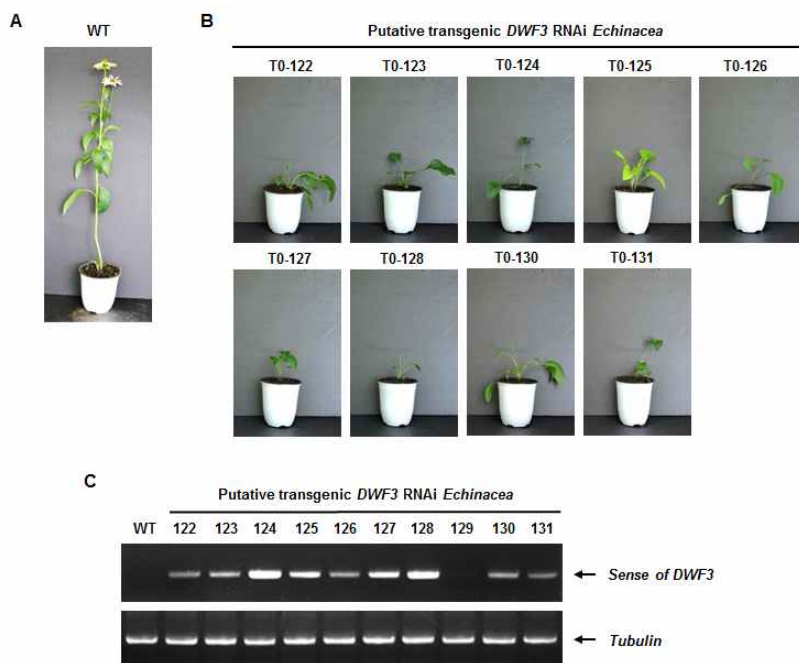


그림 171. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-122 ~ T0-131). (C) *EpDWF3* sense 부위, *Tubulin* genomic DNA PCR 산물.

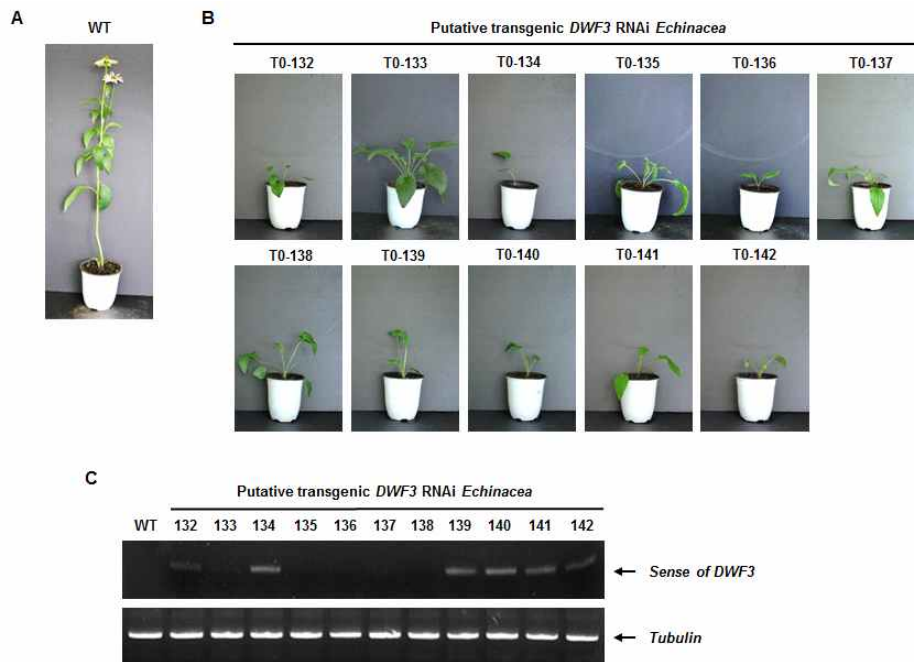


그림 172. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-132 ~ T0-142). (C) *EpDWF3* sense 부위, *Tubulin* genomic DNA PCR 산물.

토양에 순화 중인 형질전환 *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 genomic DNA PCR 결과 총 21 개체 중 *EpDWF3* RNAi 발현시스템이 도입된 개체는 15 개체 (T0-122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 130, 131, 132, 134, 139, 140, 141, 142) 이었고 줄기 및 꽃을 형성하는 개체를 확보하기 위해 각 개체를 증식시킴 (표 33).

표 33. 형질전환 *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체

형질전환 <i>Echinacea</i> 개체	<i>EpDWF3</i> RNAi 발현시스템 도입 유무	식물체 성장 정도 (줄기 형성 유무)	영양번식 시도 여부
T0-122	도입	줄기형성 관찰 중	-
T0-123	도입	"	-
T0-124	도입	"	-
T0-125	도입	"	-
T0-126	도입	"	-
T0-127	도입	"	-
T0-128	도입	"	-

T0-129	-	"	-
T0-130	도입	"	-
T0-131	도입	"	-
T0-132	도입	"	-
T0-133	-	"	-
T0-134	도입	"	-
T0-135	-	"	-
T0-136	-	"	-
T0-137	-	"	-
T0-138	-	"	-
T0-139	도입	"	-
T0-140	도입	"	-
T0-141	도입	"	-
T0-142	도입	"	-
계	15/21	0/21	0/21

2. BR 생합성 관련 난쟁이 표현형 유전자 발현 억제 관상작물 *Coreopsis* 난쟁이 형질전환체 확보 및 순화

○ *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자의 발현이 동시에 억제된 관상작물 *Coreopsis* 형질전환체 확보 및 순화

*EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템 (pFGC5941/shEpDET2:DWF4:SMT2)이 형질전환된 *Coreopsis* 형질전환 개체를 확보하기 위한 형질전환, 재분화 및 순화 연구를 수행함.

재조합 pFGC5941/shEpDET2:DWF4:SMT2 벡터를 함유하는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 LB 액상 배지에 48시간 배양 후, 액상 MSV 배지 (4.4 g/L MSV powder, 30 g/L saccharose, pH 5.7)로 OD<sub>600</sub> 값이 0.6 ~ 0.8 정도가 되도록 희석하여 사용하였음. 기내 배양을 통해 신선하게 유지되고 있는 *Coreopsis* 녹색 줄기를 약 0.5 ~ 1 cm 정도의 절편체가 되도록 절단하고 재조합 *Agrobacterium* 희석액에 10분간 접종시킨 후 멸균된 여과지를 이용하여 여분의 재조합 *Agrobacterium* 희석액을 제거하였음. 재조합 *Agrobacterium* 희석액이 접종된 줄기 절편체를 0.5 mg/L indole-3-acetic acid (IAA), 0.2 mg/L thidiazuron (TDZ)가 첨가된 MSV 고품 배지 (4.4 g/L MSV powder, 30 g/L saccharose, 0.7% microagar, pH 5.7)에 치상하였고 암상태에서 3일 동안 배양한 후 300 mg/L cefotaxim을 함유하는 MSV 액상 배지로 세척하였음. 형질전환된 신초의 선별을 위해

줄기 절편체를 0.5 mg/L IAA, 0.2 mg/L TDZ 및 300 mg/L cefotaxim, 1 mg/L PPT가 함유된 MSV 고형 배지에 치상한 후 16시간 명상태, 8시간 암상태, 24°C 배양 조건에서 배양하였음. 2주에서 3주 정도 지난 후부터 신초의 발생을 확인할 수 있었음.

형질전환 후 생성된 신초에서 뿌리의 재분화를 위해 신초를 300 mg/L cefotaxim, 1 mg/L PPT가 함유된 1/2 MSV 고형 배지에 치상하였고 16시간 명상태, 8시간 암상태, 24°C 배양 조건에서 배양하여 뿌리의 발달을 유도하였음.

뿌리의 재분화가 유도된 형질전환 신초를 흐르는 물로 씻어 여분의 배지를 제거하였고 버미큘라이트, 펄라이트, 상토가 1:1:1 비율로 혼합된 토양에 옮겨 심고 비닐 랩으로 감싸 밀봉한 후 16시간 일장, 24 ± 2°C로 유지되는 배양실에서 1차 순화시킨 후 온실로 옮겨 개체의 성장을 유도하였음.

관상작물 *Coreopsis* 형질전환 및 재분화 연구에서 확보한 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Coreopsis* 형질전환 개체 (그림 173)에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음. 형질전환 개체의 잎 (~ 0.1 g)을 지니는 1.5 ml microcentrifuge tube에 2-3 개의 glass bead (2 mm diameter)와 LN<sub>2</sub>를 첨가하고 혼합한 후 TissueLyser (Qiagen)에서 파쇄하였고 GenElute Plant Genomic DNA Prep Mini Kit를 이용하여 genomic DNA를 추출하였음. 250 ng genomic DNA, pFGC5941/shEpDET2:DWF4:SMT2 벡터의 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위에 특이적으로 결합하는 primer를 이용한 PCR을 수행하고 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위 PCR 산물의 존재를 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음 (그림 174). T#132, 135, 137 개체의 genomic DNA에 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템이 도입된 것으로 확인되었고 개체 증식을 위한 영양 번식을 제1협동과제 연구팀과 함께 진행함 (그림 175).



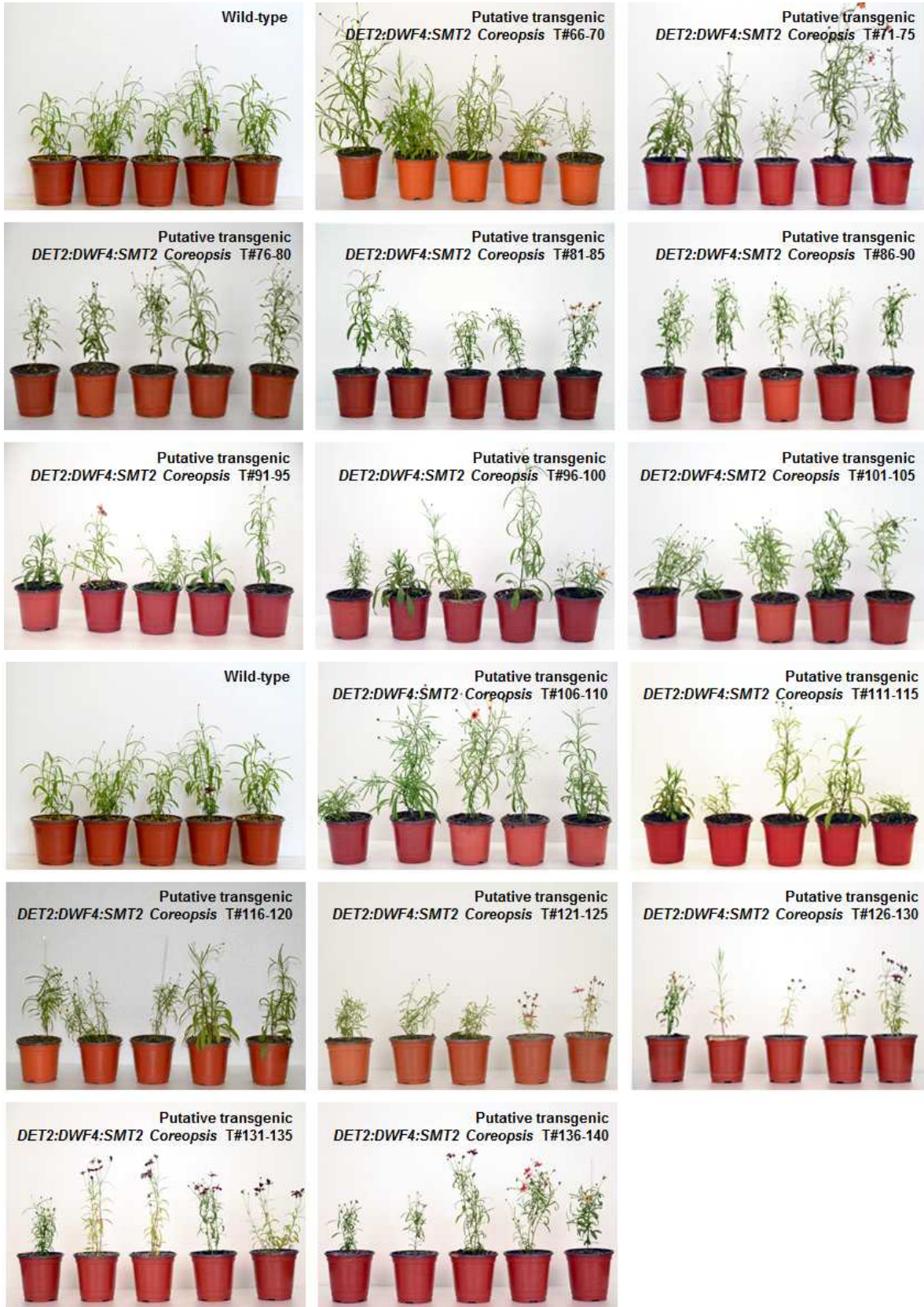


그림 173. 토양에서 순화시킨 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 형질전환 *Coreopsis* 개체.

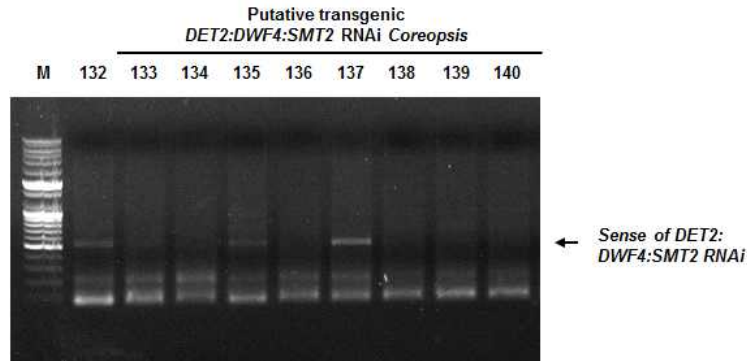


그림 174. 토양에서 순화 중인 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 형질전환 *Coreopsis* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함.



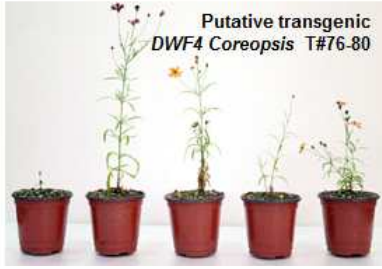
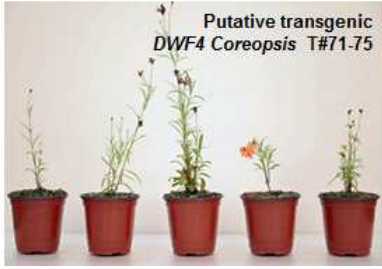
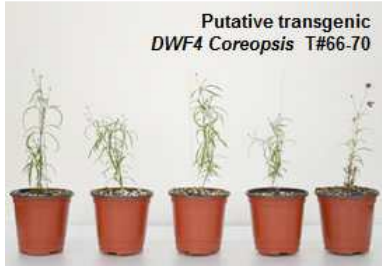
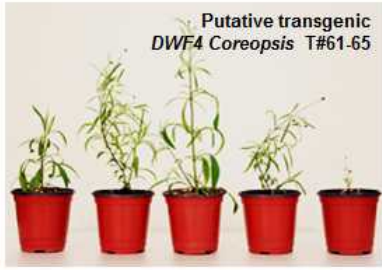
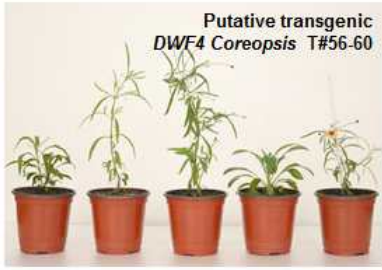
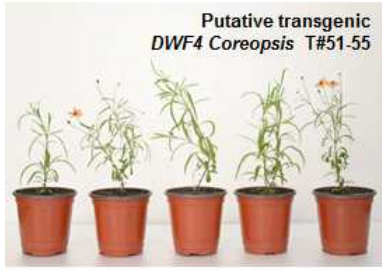
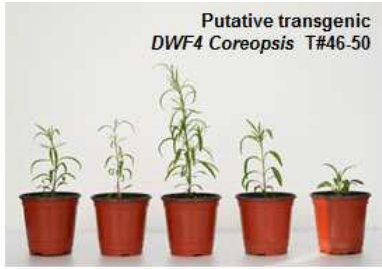
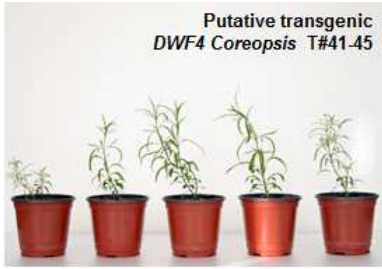
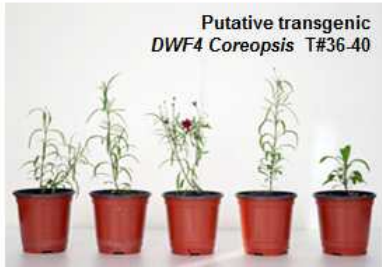
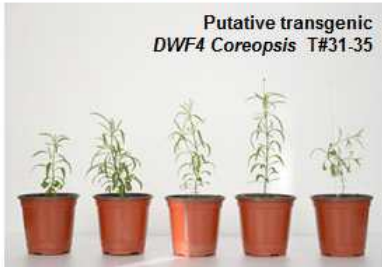
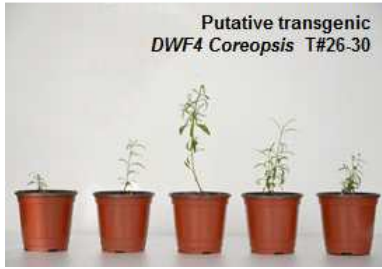
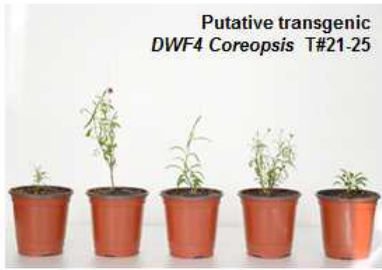
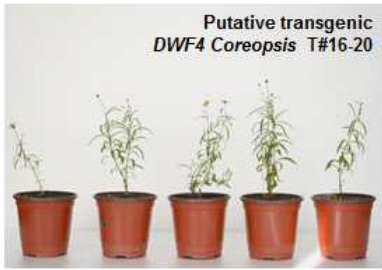
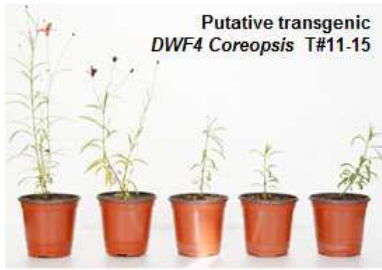
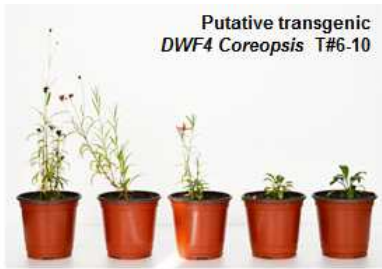
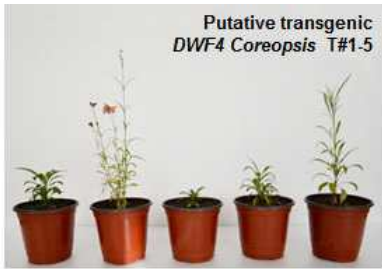
그림 175. *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템이 도입된 것으로 확인된 T#132, 135, 137 개체의 영양 번식을 통한 개체 증식을 시도함.

○ *DWF4* 유전자의 발현이 억제된 관상작물 *Coreopsis* 형질전환체 확보 및 순화

*EpDWF4* RNAi 벡터시스템 (pFGC5941/shEpDWF4)이 형질전환된 *Coreopsis* 형질전환 개체를 확보하기 위한 형질전환, 재분화 및 순화 연구를 수행함.

관상작물 *Coreopsis* 형질전환 및 재분화 연구에서 확보한 *EpDWF4* RNAi *Coreopsis* 형질전환 개체 (그림 176)에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *Coreopsis* genomic DNA에 *EpDWF4* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음. 형질전환 개체의 잎 (~ 0.1 g)을 지니는 1.5 ml microcentrifuge tube에 2-3 개의 glass bead (2 mm diameter)와 LN<sub>2</sub>를 첨가하고 혼합한 후 TissueLyser에서 파쇄하였고 GenElute Plant Genomic DNA Prep Mini Kit를 이용하여 genomic DNA를 추출하였음. 250 ng genomic DNA, pFGC5941/shEpDWF4 벡터의 *EpDWF4* sense 부위에 특이적으로 결합하는 primer를 이용한 PCR을 통해 *EpDWF4* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음 (그림 177). T#143, 145, 149 개체의 genomic DNA에 *EpDWF4* RNAi 벡터시스템이 도입된 것으로 확인되었고 개체 증식을 위한 영양 번식을 제1협동과제 연구팀과 함께 진행함 (그림 178).





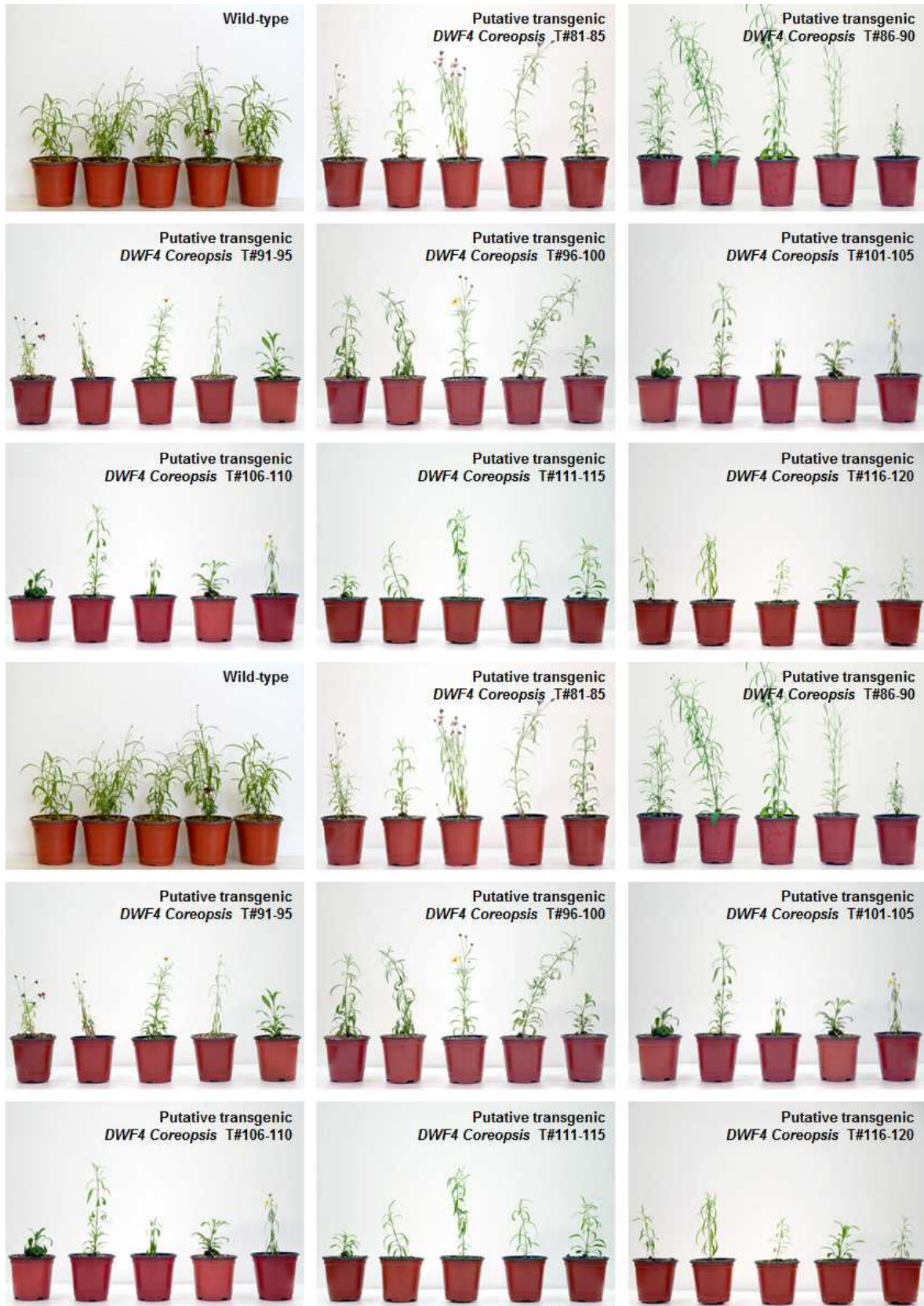


그림 176. 토양에서 순화시킨 *EpDWF4* RNAi 형질전환 *Coreopsis* 개체.



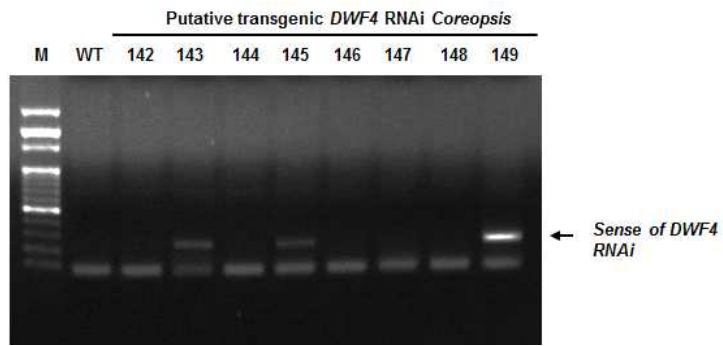


그림 177. 토양에서 순화 중인 *EpDWF4* RNAi 형질전환 *Coreopsis* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF4* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함.



그림 178. *EpDWF4* RNAi 벡터시스템이 도입된 것으로 확인된 T#143, 145, 149 개체의 영양 번식을 통한 개체 증식을 시도함.



3-5-3. 제1협동과제 : 난쟁이 관상작물 실용화 연구

1. 해외도입, 수집자원 목록

표 34와 같이 네델란드에서 관목, 과목류 및 화훼 자원을 수입함. 전체 192종이 도입되었는데 목록에 제시된 수목 및 초본류는 2016년 3월부터 검역 후 우리꽃연구소에 식재된 품종이며 국내에 도입 시 다양한 테마 정원 소재로 이용될 수 있음. 일부 품종은 육종소재로 사용되어 다양한 형질전환 원예식물 개발 및 해외시장 공략에 활용될 것임.

표 34. 2016년 해외도입 교목 및 관목류

번호	학문명	수량	한글명	수집국가명
1	Abeliophyllum distichum	10	미선나무	NED
2	Andromeda polifolia 'Blue Ice'	10	각시석남,애기진달래	NED
3	Andromeda polifolia 'Compacta'	10	각시석남,애기진달래	NED
4	Berberis media 'Parkjuweel'	10	매자나무	NED
5	Berberis media 'Red Jewel'	10	매자나무	NED
6	Berberis ott. 'Superba'	10	매자나무	NED
7	Berberis thunb. 'Atropurpurea Nana'	10	매자나무	NED
8	Berberis thunb. 'Bagatelle'	10	매자나무	NED
9	Berberis thunb. 'Coronita'	10	매자나무	NED
10	Berberis thunb. 'Erecta'	10	매자나무	NED
11	Berberis thunb. 'Harlequin'	10	매자나무	NED
12	Berberis thunb. 'Helmond Pillar'	10	매자나무	NED
13	Berberis thunb. 'Kobold'	10	매자나무	NED
14	Berberis thunb. 'Pink Queen'	10	매자나무	NED
15	Berberis thunb. 'Red Pillar'	10	매자나무	NED
16	Berberis thunb. 'Red Rocket'	10	매자나무	NED
17	Buddleja dav. 'Black Knight'	10	부들레아	NED
18	Buddleja dav. 'Empire Blue'	10	부들레아	NED
19	Buddleja dav. 'Fascinating'	10	부들레아	NED
20	Buddleja dav. 'Pink Delight'	10	부들레아	NED
21	Buddleja dav. 'Royal Red'	10	부들레아	NED
22	Buddleja dav. 'Silver Anneversary' PBR ®	10	부들레아	NED
23	Buddleja dav. 'White Profusion'	10	부들레아	NED
24	Buddleja 'Dreaming Orange' PBR ®	10	부들레아	NED
25	Buddleja 'Dreaming Purple' PBR ®	10	부들레아	NED
26	Buddleja 'Dreaming White' PBR ®	10	부들레아	NED
27	Buddleja 'White Ball'	10	부들레아	NED
28	Callicarpa bodinieri giraldii	10	작살나무	NED
29	Callicarpa japonica 'Leucocarpa'	10	작살나무	NED
30	Caryopteris cland. 'Hint of Gold' PBR ®	10	층꽃나무	NED
31	Caryopteris cland. 'Sterling Silver' PBR ®	10	층꽃나무	NED
32	Caryopteris cland. 'Worcester Gold'	10	층꽃나무	NED
33	Cornus alba 'Aurea'	10	흰말채나무	NED
34	Cornus alba 'Kesselringii'	10	흰말채나무	NED
35	Cornus alba 'Siberian Pearls'	10	흰말채나무	NED
36	Cornus alba 'Sibirica Variegata'	10	흰말채나무	NED
37	Cornus sang. 'Anny's Winter Orange'	10	층층나무과	NED

38	Cornus sang. 'Midwinter Fire'	10	층층나무과	NED
39	Cornus sang. 'Winter Beauty'	10	층층나무과	NED
40	Cornus siberian Pearls	10	층층나무과	NED
41	Cornus ser. 'Flaviramea'	10	층층나무과	NED
42	Cornus ser. 'Kelseyi'	10	층층나무과	NED
43	Cornus ser. 'White Gold'	10	층층나무과	NED
44	Cotinus cog. 'Golden Spirit' PBR ®	10	안개나무	NED
45	Cotinus cog. 'Royal Purple'	10	안개나무	NED
46	Deutzia gracilis	10	말발도리	NED
47	Deutzia gracilis 'Nikko'	10	말발도리	NED
48	Deutzia hybrida 'Strawberry Fields'	10	말발도리	NED
49	Deutzia purp. 'Kalmiflora'	10	말발도리	NED
50	Deutzia scabra 'Plena'	10	말발도리	NED
51	Deutzia scabra 'Pride of Rochester'	10	말발도리	NED
52	Escallonia 'Donard Seedling'	10	범의귀과	NED
53	Forsythia "Goldzauber"	10	개나리	NED
54	Forsythia int. 'Minigold'	10	개나리	NED
55	Forsythia int. 'Week-End'	10	개나리	NED
56	Hibiscus syr. 'Ardens'	10	무궁화	NED
57	Hibiscus syr. 'China Chiffon' PBR ®	10	무궁화	NED
58	Hibiscus syr. 'Duc de Brabant'	10	무궁화	NED
59	Hibiscus syr. 'Lavender Chiffon' PBR ®	10	무궁화	NED
60	Hibiscus syr. 'Oiseau Bleu'	10	무궁화	NED
61	Hibiscus syr. 'White Chiffon' PBR ®	10	무궁화	NED
62	Hibiscus syr. 'Red Heart'	10	무궁화	NED
63	Hibiscus syr. 'Woodbridge'	10	무궁화	NED
64	Hydrangea arb. 'Annabelle'	10	수국	NED
65	Hydrangea macr. 'Lavbla' (Blauer Zwerg)	10	수국	NED
66	Hydrangea macr. 'Libelle'	10	수국	NED
67	Hydrangea macr. 'Miss Hepburn'	10	수국	NED
68	Hydrangea macr. 'Mme E. Mouillère'	10	수국	NED
69	Hydrangea macr. 'Rotschwanz'	10	수국	NED
70	Hydrangea macr. 'Taube' (Teller Pink)	10	수국	NED
71	Hydrangea pan. 'Grandiflora'	10	수국	NED
72	Hydrangea pan. 'Pink Lady'	10	수국	NED
73	Hydrangea pan. 'Polar Bear' PBR ®	10	수국	NED
74	Hydrangea pan. 'Sunday Fraise' PBR ®	10	수국	NED
75	Hydrangea pan. 'Vanille Fraise' PBR ®	10	수국	NED
76	Hydrangea serr. 'Blue Deckle'	10	수국	NED
77	Kerria japonica 'Golden Guinea'	10	황매화	NED
78	Kolkwitzia amabilis 'Pink Cloud'	10	인동	NED
79	Lavandula ang. 'Dwarf Blue'	10	라벤다	NED
80	Lavandula ang. 'Hidcote'	10	라벤다	NED
81	Lavandula ang. 'Munstead'	10	라벤다	NED
82	Ligustrum 'Vicaryi'	10	당광나무	NED
83	Liquidambar styraciflua	10	미국풍나무	NED
84	Pachysandra term. 'Green Sheen'	10	수호초	NED
85	Physocarpus opulif. 'Dart's Gold'	10	자엽국수나무	NED
86	Physocarpus opulif. 'Red Baron'	10	자엽국수나무	NED
87	Potentilla f. 'Hopleys Orange'	10	물싸리	NED
88	Potentilla f. 'Marian Red Robin' (Marrob)	10	물싸리	NED
89	Potentilla f. 'McKay's White'	10	물싸리	NED

90	Potentilla tridentata 'Nuuk'	10	물싸리	NED
91	Ribes sang. 'King Edward VII'	10	까치밥나무	NED
92	Salix integra 'Hakuro-nishiki'	10	개키버들	NED
93	Spiraea betulifolia 'Tor'	10	조팝나무	NED
94	Spiraea cinerea 'Grefsheim'	10	조팝나무	NED
95	Spiraea japonica 'White Gold' PBR ®	10	조팝나무	NED
96	Spiraea nipp. 'June Bride'	10	조팝나무	NED
97	Spiraea nipp. 'Snowmound'	10	조팝나무	NED
98	Vinca minor 'Alba'	10	빙카	NED
99	Vinca minor 'Blue and Gold'	10	빙카	NED
100	Vinca minor 'Compacta'	10	빙카	NED
101	Weigela flor. 'Brigela' PBR ®	10	병꽃나무	NED
102	Weigela flor. 'Elvera' PBR ®	10	병꽃나무	NED
103	Weigela 'Bristol Ruby'	10	병꽃나무	NED
104	Weigela 'Red Prince'	10	병꽃나무	NED
105	Weigela 'Rumba'	10	병꽃나무	NED
106	Weigela 'Wings of Fire' PBR ®	10	병꽃나무	NED
107	Chamaecyparis l. 'Columnaris'	10	화백나무	NED
108	Chamaecyparis l. 'Ellwoodii'	10	화백나무	NED
109	Chamaecyparis l. 'Ivonne'	10	화백나무	NED
110	Chamaecyparis l. 'Van Pelt's Blue'	10	화백나무	NED
111	Cupressocyparis l. 'Green Rocket' PBR ®	10	렐란디나무	NED
112	Juniperus comm. 'Arnold'	10	두송실	NED
113	Juniperus comm. 'Gold Cone'	10	두송실	NED
114	Juniperus comm. 'Goldschatz'	10	두송실	NED
115	Juniperus comm. 'Hibernica'	10	두송실	NED
116	Juniperus comm. 'Suecica'	10	두송실	NED
117	Juniperus conferta 'All Gold'	10	두송실	NED
118	Juniperus hor. 'Limeglow'	10	두송실	NED
119	Juniperus hor. 'Pancake'	10	두송실	NED
120	Juniperus hor. 'Wiltonii'	10	두송실	NED
121	Juniperus pfitzeriana 'Gold Coast'	10	두송실	NED
122	Juniperus pfitzeriana 'Gold Star'	10	두송실	NED
123	Juniperus pfitzeriana 'Goldkissen'	10	두송실	NED
124	Juniperus squamata 'Blue Compact'	10	두송실	NED
125	Juniperus squamata 'Blue Star'	10	두송실	NED
126	Picea pungens 'Glauca' Majestic Blue	10	가문비나무	NED
127	Taxodium distichum	10	낙우송	NED
128	Thuja occ. 'Danica'	10	측백나무	NED
129	Thuja occ. 'Malonyana Aurea'	10	측백나무	NED
130	Thuja occ. 'Smaragd'	10	측백나무	NED
131	Thuja occ. 'Tiny Tim'	10	측백나무	NED
132	Thuja plicata 'Emerald' PBR ®	10	측백나무	NED
133	Thuja plicata 'Excelsa'	10	측백나무	NED
134	Carex morrowii 'Ice Dance'	10	사초	NED
135	Carex morrowii 'Variegata'	10	사초	NED
136	Luzula nivea	10	평의바풀	NED
137	BerberisThunb.Bagatelle	10	매자나무	NED
138	Berberis Thunb. Red Chief	10	매자나무	NED
139	Cornus Alba Kesselringii	10	층층나무	NED
140	Cornus Sangiunea Midwinter Fire	10	층층나무	NED
141	Cornus Stolonifera Flaviramea	10	층층나무	NED

142	Cytisus Scoparius	10	양골담초	NED
143	Populus Nigra Italica	10	서양사시나무	NED
144	Ribes Sanguineum 'King Edward'	10	범의귀과	NED
145	Rosa Rugosa	10	해당화	NED
146	Rosa Rugosa Alba	10	해당화	NED
147	Rosa Rugosa Rubra	10	해당화	NED
148	Salix Helvetica	10	버드나무과	NED
149	Sambucus Nigra Aurea	10	인동과	NED
150	Weigela Bristol Ruby	10	병꽃나무속	NED
151	Weigelia Florida Red Prince	10	병꽃나무속	NED
152	Weigela Florida Victoria	10	병꽃나무속	NED
153	Weigela Rumba	10	병꽃나무속	NED
154	Albizia julibr. 'Summer Chocolate®'	10	자귀나무	NED
155	Ginkgo biloba 'Fastigiata'	10	은행나무	NED
156	Liriodendron tulp. 'Fastigiatum'	10	백합나무	NED
157	Hibiscus syr. 'China Chiffon' PBR ®	10	무궁화	NED
158	Hibiscus syr. 'Lavender Chiffon' PBR ®	10	무궁화	NED
159	Hibiscus syr. 'Pink Chiffon' PBR ®	10	무궁화	NED
160	Hibiscus syr. 'Russian Violet'	10	무궁화	NED
161	Hibiscus syr. 'White Chiffon' PBR ®	10	무궁화	NED
162	Hibiscus syr. 'Woodbridge'	10	무궁화	NED
163	Philadelphus cor. 'Aureus'	10	고광나무	NED
164	Populus del. 'Purple Tower' PBR ®	10	사시나무	NED
165	Ribes sang. 'King Edward VII'	10	까치밥나무	NED
166	Ribes u.-c. 'Hinnonmäki Gul'	10	까치밥나무	NED
167	Betula utilis 'Doorenbos'	10	자작나무	NED
168	Carpinus betulus 'Lucas'	10	서어나무	NED
169	Clethra alnif. 'Hummingbird'	10	매화오리나무	NED
170	Clethra alnif. 'Pink Spire'	10	매화오리나무	NED
171	Clethra alnif. 'Rosea'	10	매화오리나무	NED
172	Cytisus 'Boskoop Ruby'	10	양골담초	NED
173	Cytisus decumbens	10	양골담초	NED
174	Cytisus 'Hollandia'	10	양골담초	NED
175	Cytisus praecox	10	양골담초	NED
176	Cytisus praecox 'Albus'	10	양골담초	NED
177	Cytisus 'Roter Favorit'	10	양골담초	NED
178	Escallonia 'Gold Ellen'	10	에스칼로니아	NED
179	Escallonia 'Apple Blossom'	10	에스칼로니아	NED
180	Exochorda 'The Bride'	10	가침박달나무	NED
181	Genista pilosa 'Vancouver Gold'	10	양골담초속	NED
182	Itea virginica 'Little Henry®'	10	버지니아스윗스파이어	NED
183	Itea virginica 'Marlot'	10	버지니아스윗스파이어	NED
184	Liquidambar styr. 'Slender Silhouette'	10	풍나무	NED
185	Liriodendron tulp. 'Fastigiatum'	10	백합나무	NED
186	Mahonia japonica 'Hivernant'	10	뿔납천	NED
187	Mahonia media 'Winter Sun'	10	뿔납천	NED
188	Perovskia atriplicif. 'Blue Spire'	10	페로브스키아	NED
189	Philadelphus cor. 'Aureus'	10	고광나무	NED
190	Philadelphus 'Minnesota Snowflake'	10	고광나무	NED
191	Ribes u.-c. 'Hinnonmäki Gul'	10	까치밥나무	NED
192	Sambucus nigra 'Obelisk' PBR	10	인동과	NED

2. 해외수집 자원의 신품종 육성

그림 179. 코레옵시스 버티실라타 개발 품종



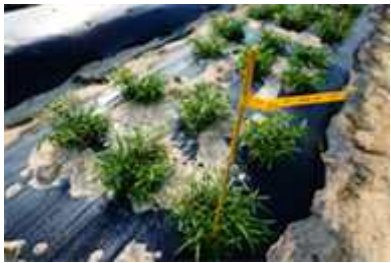



		
coreopsis verticillata 대조구	2015년 육성품종1	2015년 육성품종2
		
2015년 육성품종3	2015년 육성품종4	2015년 육성품종5
		
2016년 유전자원포장 식재	2016년 육성품종 개화	2016년 다른 유형의 성장모습

2014년 해외수집한 *Coreopsis verticillata* 자원을 육종하여 우리꽃연구소 유전자원 포장에 식재된 예비 품종 153 여종을 확보함. 이중 소비자의 선호에 따라 일부를 품종보호등록할 것이며 새로운 코레우리 품종들로 시장에 공급할 것임.



### 3. 코레옵시스 형질전환체 재배 특성 및 증식

그림 180. 우리꽃연구소에서 재배 중인 코레옵시스 형질전환체

		
Uridream Dwf4-41	Uridream Dwf4-42	Uridream Dwf4-45
		
Uridream Dwf4-28	Uridream Dwf4 전체사진	(좌)Uridream Dwf4-41과 (우)Uridream Dwf4-42 비교 사진

작년 인수인계 받은 우리드림 형질전환체 Uridream Dwf4-28, Uridream Dwf4-41, Uridream Dwf4-42, Uridream Dwf4-44, Uridream Dwf4-45를 우리꽃연구소 내 시설 온실에서 월동 후 2016년 4월 26일 우리꽃연구소 연구포장에 식재하였음. 동절기 시설 온실 안에서 일반 코레옵시스 보다 생육이 좋았으며 초형이 안정적이었음. 그러나 2016년 5월 1차 생육 조사에서 유난히 Uridream Dwf4-41 형질전환체의 초형이 낮아졌고 대조군에 비해 초장이 5 cm 더 작았으며 줄기가 지면과 가깝게 자랐음. 이후 2차 특성 및 개화 조사를 7월에 수행할 예정임.

그림 181. 대량번식체제 확립 코레옵시스 생산

	
코레옵시스 삼목	코레옵시스 포트생산

코레옵시스는 특성상 봄에 삽목이 잘되며 발근에 소요되는 기간은 7~10일 정도임. 그러나 바로 추대로 전환됨으로 이른 봄에 실시하는 것이 권장됨. 가을 번식은 9월 이후 커팅 후 새순을 받아서 삽목하는 것이 유리하며 가을 삽목은 튼튼하고 분지수가 많은 포기를 확보할 수 있으므로 가을 삽목이 권장됨.

코레옵시스는 영양번식으로 생산되기에 식물체의 줄기와 엽자루 사이 부위를 컷팅하여 200공 트레이에 삽목함. 이때 온도와 습도를 적절히 유지해야만 안정적으로 활착할 수 있음. 이후 발근이 된 코레옵시스를 포트나 매트에 식재하여 60일 정도 재배하면 상품으로 판매 할 수 있음.

4. 2016년 우리꽃연구소에서 순화 중인 에키네시아 형질전환체




		
DET2:DWF4:SMT2 RNAi T0-88	DET2:DWF4:SMT2 RNAi T0-90	DET2:DWF4:SMT2 RNAi T0-92
		
DET2:DWF4:SMT2 RNAi T0-93	영양번식 중인 DWF3 RNAi T0-52	

그림 182. 제1세부과제 연구팀에서 우리꽃연구소로 인계된 에키네시아 형질전환체



	
에키네시아 지재부 부위 채취	에키네시아 삼목 부위 조제
	
에키네시아 지재부 채취 부위에서 발생된 에키네시아 어린묘	에키네시아 종자 번식

그림 183. 대량번식체제 확립 및 에키네시아 생산 방법

형질전환 에키네시아의 증식체계를 확립하기 위해 유전자가 검증된 형질전환 에키네시아 (T0 세대) DWF3 RNAi T0-52 포기나누기와 삼목을 성공시켰음. 일반종 에키네시아는 종자와 영양번식이 가능함. 포기나누기의 경우 가을이 유리하고 봄에는 현장에서 근삽 (포기나누기)를 실시 함. 위 사진과 같이 2가지 방법으로 대량번식이 가능하며 첫 번째로 에키네시아의 지재부 부위를 채취 후 본밭이나 포트에 이식하면 활착율이 좋고 빠르게 번식 가능함. 두 번째로 종자 번식은 4계절 번식이 가능하여 어느 때나 상품화 하여 판매 할 수 있음. 하지만 형질전환된 유전자가 소실되는 경우가 많음. 위 방법의 정확한 데이터를 구축하여 대량번식체계를 확립함.

#### 5. 에키네시아 형질전환체 재배 특성 조사

		
Echi-DWF3-52	Echi-DET2:DWF4:SMT2-31	Echi-DET2:DWF4:SMT2-32



		
Echi-DET2:DWF4:SMT2-33	Echi-DET2:DWF4:SMT2-35	Echi-DET2:DWF4:SMT2-42
		
Echi-DET2:DWF4:SMT2-55	Echi-DET2:DWF4:SMT2-58	Echi-DET2:DWF4:SMT2-59
		
Echi-DET2:DWF4:SMT2-65	Echi-DET2:DWF4:SMT2-76	Echi-DET2:DWF4:SMT2-78
		
Echi-DET2:DWF4:SMT2-82	Echi-DWF4-3	Echi-DWF4-14
		
Echi-DWF4-25	Echi-DWF4-38	Echi-DWF4-40



Wild-type

그림 184. 형질전환 에키네시아 유전자원포장 식재 사진

표 35. 2015년 에키네시아 형질전환제 재배 특성

Plant (Transformant)	식물체 초장 (cm)	식물체 초폭 (cm)	분열 정도	특징
Echi-DWF3-52	80	35	적음	아랫잎이 길고 큼
Echi-DET2:DWF4:SMT2-31	30	12	적음	생육이 저조하며 초장이 낮음
Echi-DET2:DWF4:SMT2-32	80	62	적음	아랫잎이 길고 하부에 잎이 많이 발생
Echi-DET2:DWF4:SMT2-33	55	23	적음	초장이 낮고 개화가 늦음
Echi-DET2:DWF4:SMT2-35	76	65	적음	중간 초장에 잎분포도 중간
Echi-DET2:DWF4:SMT2-42	100	105	많음	분열이 많으며 생육이 좋음
Echi-DET2:DWF4:SMT2-55	80	60	적음	잎이 많고 꽃이 작음
Echi-DET2:DWF4:SMT2-58	53	38	중간	꽃이 작고 초장이 낮으며 화기가 길음
Echi-DET2:DWF4:SMT2-59	50	40	적음	초장이 낮고 생육이 좋지 않음
Echi-DET2:DWF4:SMT2-65	67	60	많음	꽃이 많이 피고 분열이 많음
Echi-DET2:DWF4:SMT2-76	10	40	중간	꽃이 안 피며 잎만 무성
Echi-DET2:DWF4:SMT2-78	95	47	중간	하부에 잎이 많으며 꽃이 큼
Echi-DET2:DWF4:SMT2-82	30	22	적음	생육이 나쁘고 왜성



Echi-DWF4-3	60	35	적음	도복 있음
Echi-DWF4-14	107	45	적음	초폭이 좁으며 식물이 곧게 위로 뻗음 상부의 잎이 작고 그 수가 적음
Echi-DWF4-25	90	40	적음	꽃대가 짧고 잎이 꽃대 바로 밑까지 무성함
Echi-DWF4-38	80	46	적음	하부의 잎이 크며 꽃대와 꽃이 모여 뭉침
Echi-DWF4-40	90	65	적음	잎이 무성하고 상부에 잎이 많으며 개화가 늦음

### 5. 해외수출 대비 로얄티 관리체계 확립

		
신품중에 대해 바이어와 상담	IPM박람회 중 바이어에게 신품중에 대해서 설명	Plantipp 피터와 로얄티 미팅 후 트윈클을 들고 기념사진
		
아르마다 육종가 Mark Boder가 생산 중인 트윈클을 보여줌	유럽에서 재배중인 트윈클	우간다에서 1차 생산 뒤 네덜란드에서 2차 생산하기 위해 들여온 코레우리 묘종

해외로얄티 체계시스템이 구축되어 올해 Plantipp, Armada (네덜란드)사와 계약 후 25품종의 샘플을 네덜란드 현지 테스트 시설로 보내 예정임. 2006년부터 육종을 시작하여 올해 처음 2,000만원의 로얄티 수출 시장을 확보하였음. 미국에서도 본격적인 실험재배에 돌입하여 실험재배가 완료되면 Lowes사와 HomDepot사에서 판매되기로 결정 되었음. 이들

매장은 미국전역에 3,000개가 넘는 대형 유통점을 가진 대기업임. 현재 년 2천만 원 정도인 해외 로열티 사업을 3년 내 30억 원을 목표로 하고 있음. 더욱 주목할 사항으로는 현재 코레옵시스의 연구 성과는 세계 최고 (약 50여종 등록)라 공언 가능하고 2006년 미국의 테라노바사가 코레옵시스의 로열티로 벌어들인 95억 원의 30%에 해당하는 금액으로 성공 가능성이 매우 높음. 그리고 2016년 CPVO를 획득한 패랭이 종류의 발전도 더욱 기대됨.

### 3-6. 5차년도 연구결과

#### 3-6-1. 제1세부과제 : 난쟁이 관련 유전자 분리 및 기능 분석

##### 1. *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자 발현 억제에 의해 유도되는 관상작물 난쟁이 *Echinacea* 형질전환체의 유전 및 기능분석

○ *DWF4* 유전자 발현 억제에 의해 유도되는 관상작물 난쟁이 *Echinacea* 형질전환체의 유전분석

- RT-PCR, real-time PCR 분석

*EpDWF4* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체에서 *EpDWF4* 유전자의 발현 억제를 확인하기 위한 RT-PCR 및 real-time PCR을 수행하였음. *EpDWF4* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 잎 (~ 1 g)을 LN<sub>2</sub>와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하고 Hybrid-R™ Plant RNA Prep Mini Kit (GeneAll)를 이용하여 total RNA를 추출하였음. 2 µg의 total RNA, poly d(T) primer 및 ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega)를 이용한 reverse transcription 반응을 통해 cDNA를 합성하였고 RT-PCR 및 real-time PCR의 주형으로 사용하였음. *EpDWF4* 유전자 및 *Tubulin* 유전자를 증폭할 수 있는 PCR primer를 이용한 PCR을 통해 *EpDWF4* 유전자의 발현이 *EpDWF4* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체에서 감소하는 것을 확인하였음 (그림 185A). 또한 *EpDWF4* 유전자 및 *Tubulin* 유전자를 증폭할 수 있는 real-time PCR primer 및 SYBR Premix EX Taq™ II (Takara) real-time PCR kit를 이용하여 *EpDWF4* 유전자의 발현을 비교한 결과 *EpDWF4* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체에서 *EpDWF4* 유전자의 발현은 대조군에 비해 약 40% 이상 감소하였음 (그림 185B).

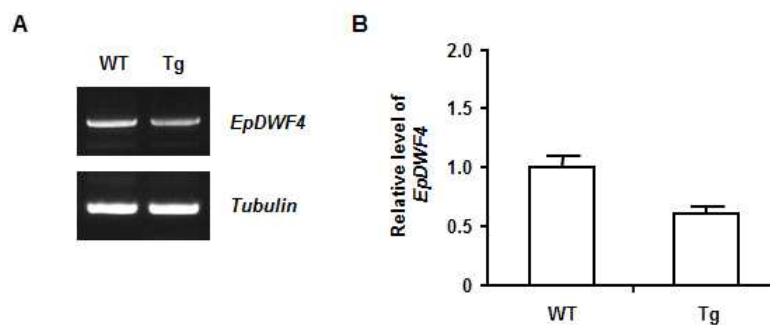


그림 185. *EpDWF4* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체 (A)에서 total RNA를 추출하고 RT-PCR (A) 및 real-time PCR (B)을 통해 *EpDWF3* 유전자의 발현 억제를 확인함.

○ *DWF4* 유전자 발현 억제에 의해 유도되는 관상작물 난쟁이 *Echinacea* 형질전환체의 기능분석

*EpDWF4* 유전자의 발현이 억제된 *EpDWF4* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 표현형 분석 및 BR 분석 연구를 수행함.

- *EpDWF4* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 표현형 분석

화분에서 성장한 후 개화한 *EpDWF4* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체를 wild-type 대조군과 비교하여 표현형을 분석하였음. *EpDWF4* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 평균적인 크기는 약 83.5 cm이었고 wild-type 대조군에 비해 약 20% 정도 감소하였음. *EpDWF4* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 평균적인 꽃의 직경은 약 8.6 cm이었고 wild-type 대조군에 비해 약 10% 감소하였음. 또한 internode 길이, 잎 길이 등이 대조군에 비해 감소한 것으로 나타났음 (그림 186).

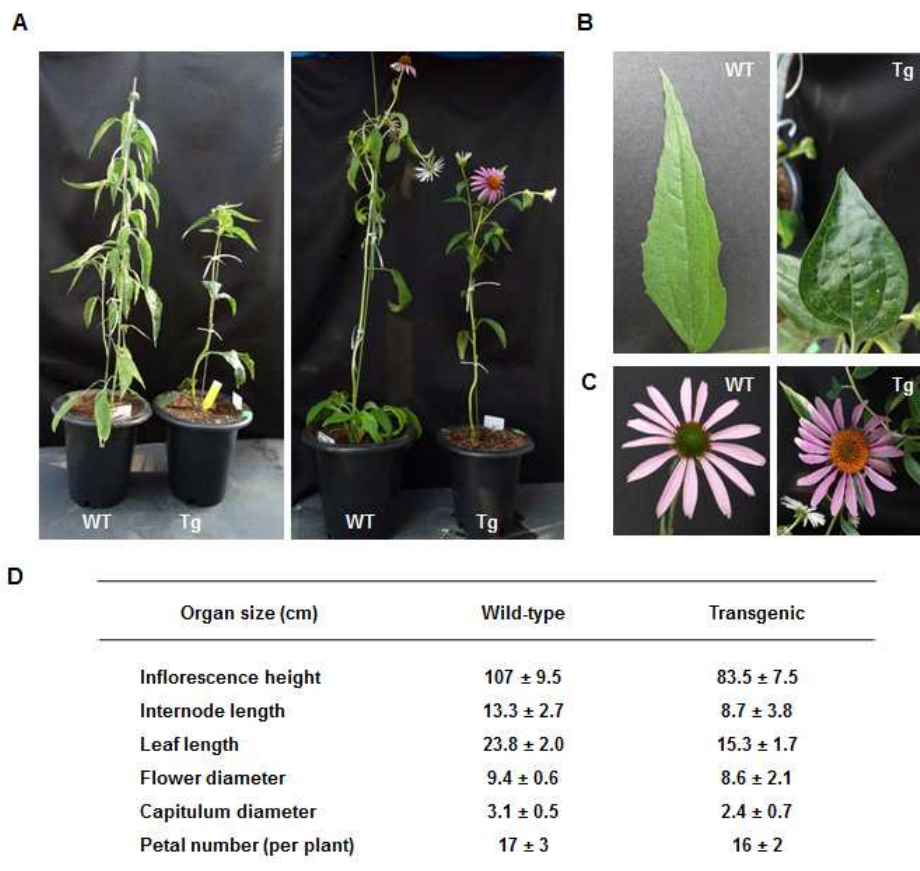


그림 186. *EpDWF4* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 표현형을 대조군과 비교 분석함.

- *EpDWF4* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 BR 분석

*EpDWF4* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체에서 *EpDWF4* 유전자의 발현 억제에 의한 BR

호르몬 변화를 확인하기 위해 식물체의 잎에서 BR 호르몬을 추출하고 GC 분석 (그림 187) 및 campesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol 정량 분석 연구를 수행함 (표 36).

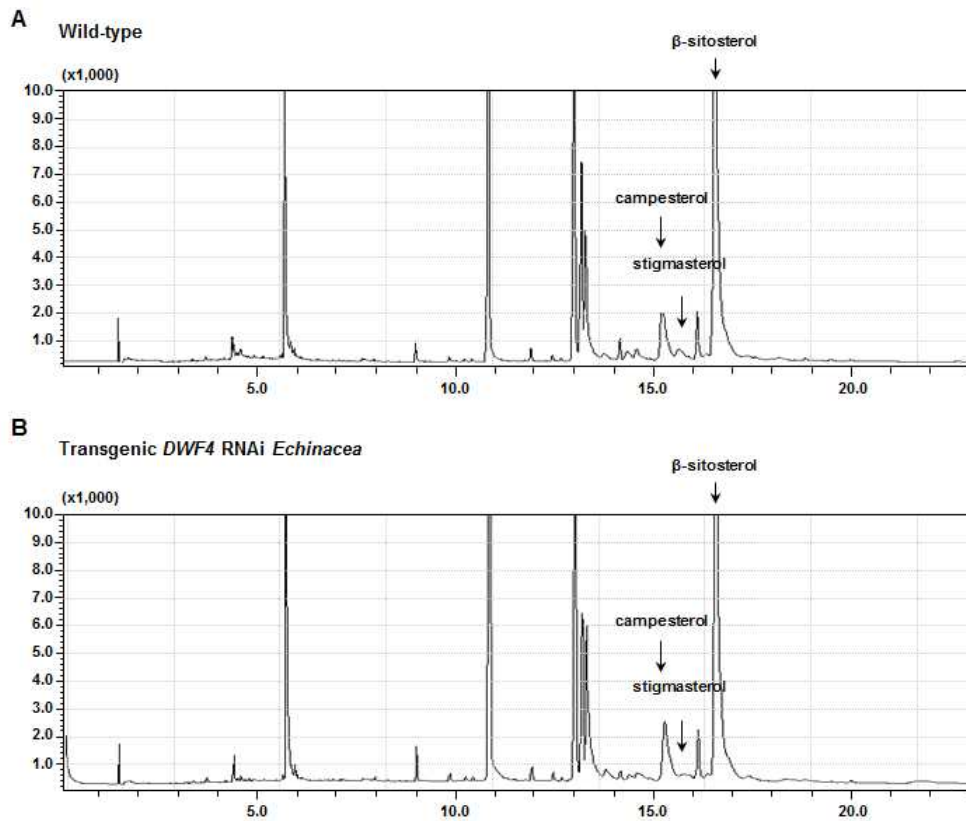


그림 187. *EpDWF4* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체에서 BR 호르몬을 추출하고 GC 분석 연구를 수행함.

표 36. *EpDWF4* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 campesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol 정량 분석 연구를 수행함.

	Wild-type (ppm)	Transgenic (ppm)
Campesterol	261.4	250.5
Stigmasterol	80.4	58.2
$\beta$ -sitosterol	1286.2	1853.9

○ *DET2*, *DWF4*, *SMT2* 유전자 동시 발현 억제에 의해 유도되는 관상작물 난쟁이 *Echinacea* 형질전환체의 유전분석



- Real-time PCR 분석

*EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체에서 *EpDET2*, *EpDWF4*, *EpSMT2* 유전자의 발현 억제를 확인하기 위한 real-time PCR을 수행하였음. *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 잎 (~ 1 g)을 LN<sub>2</sub>와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하고 Hybrid-R™ Plant RNA Prep Mini Kit (GeneAll)를 이용하여 total RNA를 추출하였음. 2 µg의 total RNA, poly d(T) primer 및 ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega)를 이용한 reverse transcription 반응을 통해 cDNA를 합성하였고 real-time PCR의 주형으로 사용하였음. *EpDET2*, *EpDWF4*, *EpSMT2* 유전자 및 *Tubulin* 유전자를 증폭할 수 있는 real-time PCR primer 및 SYBR Premix EX Taq™ II (Takara) real-time PCR kit를 이용하여 각각의 유전자 발현을 비교한 결과 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체에서 *EpDET2* 유전자의 발현은 대조군에 비해 약 60% 이상 감소하였고 *EpDWF4* 유전자의 발현은 약 30%, *EpSMT2* 유전자의 발현은 약 20% 감소하였음 (그림 188).

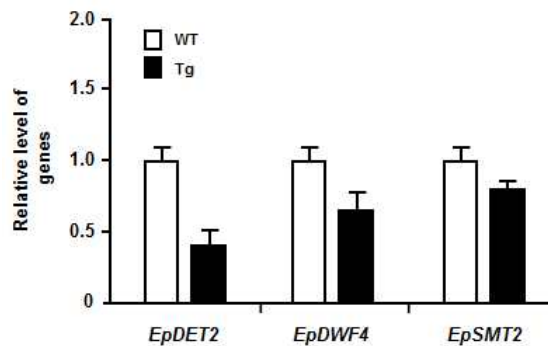


그림 188. *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체 (A)에서 total RNA를 추출하고 real-time PCR을 통해 *EpDET2*, *EpDWF4*, *EpSMT2* 유전자의 발현 억제를 확인함.

- *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자 동시 발현 억제에 의해 유도되는 관상작물 난쟁이 *Echinacea* 형질전환체의 기능분석

*EpDET4*, *EpDWF4*, *EpSMT2* 유전자의 발현이 동시에 억제된 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 표현형 분석 및 BR 분석 연구를 수행함.

- *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 표현형 분석

화분에서 성장한 후 개화한 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체를 wild-type 대조군과 비교하여 표현형을 분석하였음. *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 평균적인 크기는 약 77.8 cm이었고 wild-type 대조군에 비해

약 30% 정도 감소하였음. *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 평균적인 꽃의 직경은 약 7.9 cm이었고 wild-type 대조군에 비해 약 30% 감소하였음. 또한 internode 길이, 잎 길이 등이 대조군에 비해 감소한 것으로 나타났음 (그림 189).

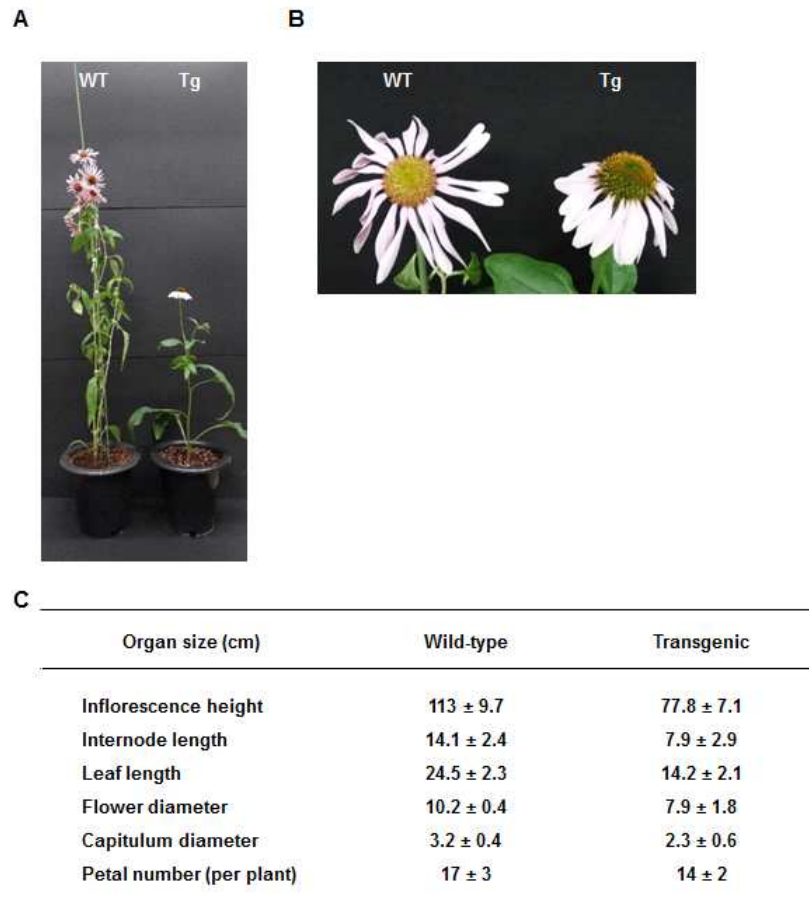


그림 189. *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 표현형을 대조군과 비교 분석함.

- *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 BR 분석

*EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체에서 *EpDET2*, *EpDWF4*, *EPSMT2* 유전자의 발현 억제에 의한 BR 호르몬 변화를 확인하기 위해 식물체의 잎에서 BR 호르몬을 추출하고 GC 분석 (그림 190) 및 campesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol 정량 분석 연구를 수행함 (표 37).

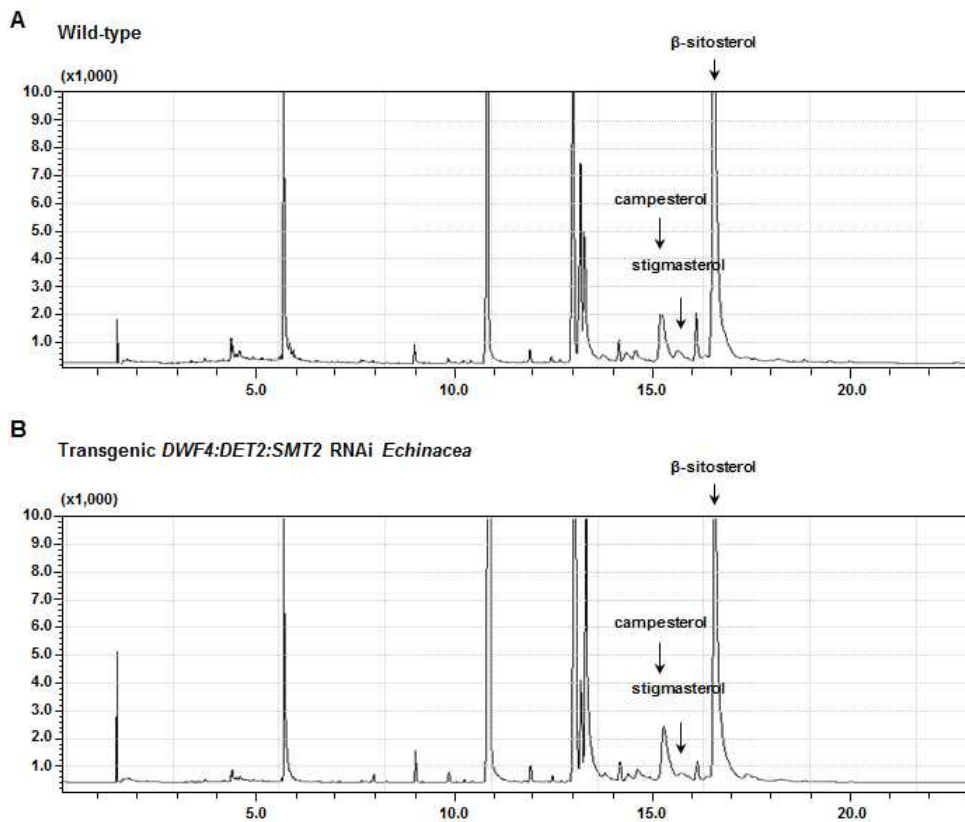


그림 190. *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체에서 BR 호르몬을 추출하고 GC 분석 연구를 수행함.

표 37. *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 campesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol 정량 분석 연구를 수행함.

	Wild-type (ppm)	Transgenic (ppm)
Campesterol	283.5	325.9
Stigmasterol	78.6	43.6
$\beta$ -sitosterol	1394.4	1643.2

2. *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자 발현 억제에 의해 유도되는 관상작물 난쟁이 *Coreopsis* 형질전환체의 표현형 및 유전분석

- *DWF4* 유전자 발현 억제에 의해 유도되는 관상작물 난쟁이 *Coreopsis* 형질전환체의 표현형 분석

화분에서 성장한 후 개화한 *EpDWF4* RNAi *Coreopsis* 형질전환 개체를 wild-type 대조군과 비교하여 표현형을 분석하였음. *EpDWF4* RNAi *Coreopsis* 형질전환 개체의 평균적인 크기는 약 15.3 cm이었고 wild-type 대조군에 비해 약 50% 정도 감소하였음. *EpDWF4* RNAi *Coreopsis* 형질전환 개체의 평균적인 꽃의 직경은 약 1.7 cm이었고 wild-type 대조군에 비해 약 40% 감소하였음. 또한 internode 길이, 잎 길이 등이 대조군에 비해 감소한 것으로 나타났음 (그림 191).

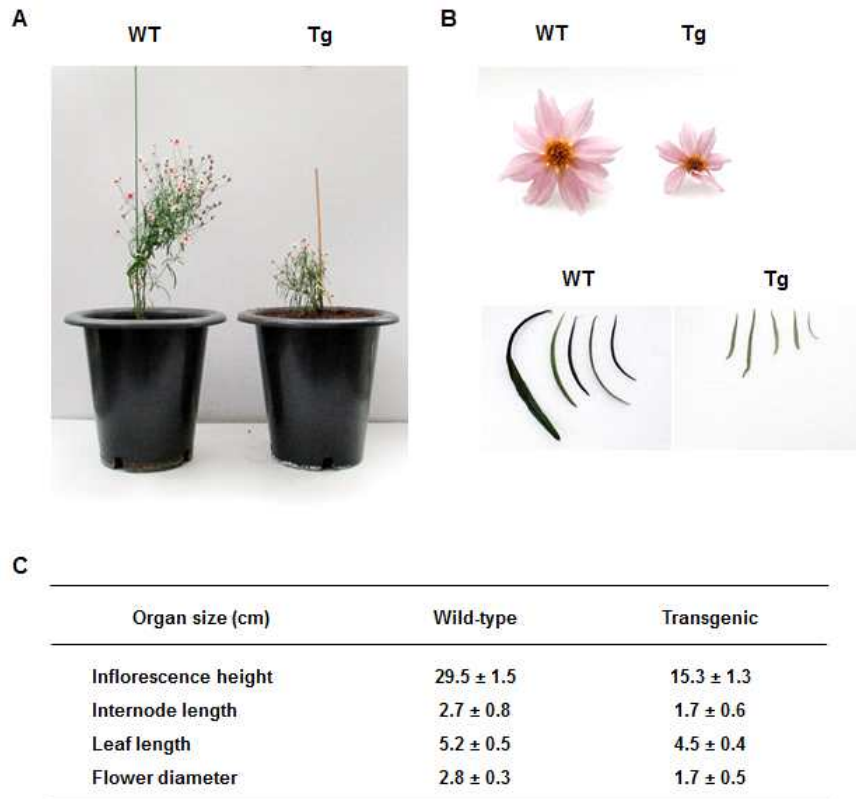


그림 191. *EpDWF4* RNAi *Coreopsis* 형질전환 개체의 표현형을 대조군과 비교 분석함.

○ *DWF4* 유전자 발현 억제에 의해 유도되는 관상작물 난쟁이 *Coreopsis* 형질전환체의 유전분석

- Real-time PCR 분석

*EpDWF4* RNAi *Coreopsis* 형질전환 개체에서 *CrDWF4* 유전자의 발현 억제를 확인하기 위한 real-time PCR을 수행하였음. *EpDWF4* RNAi *Coreopsis* 형질전환 개체의 잎 (~ 1 g)을 LN<sub>2</sub>와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하고 Hybrid-R™ Plant RNA Prep Mini Kit (GeneAll)를 이용하여 total RNA를 추출하였음. 2 µg의 total RNA, poly d(T) primer 및 ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega)를 이용한 reverse transcription

반응을 통해 cDNA를 합성하였고 real-time PCR의 주형으로 사용하였음. *CrDWF4* 유전자 및 *Tubulin* 유전자를 증폭할 수 있는 real-time PCR primer 및 SYBR Premix EX Taq™ II (Takara) real-time PCR kit를 이용하여 *CrDWF4* 유전자의 발현을 비교한 결과 *CrDWF4* RNAi *Coreopsis* 형질전환 개체에서 *CrDWF4* 유전자의 발현은 대조군에 비해 약 40% 이상 감소하였음 (그림 192).

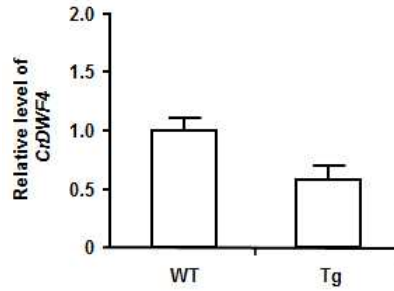


그림 192. *EpDWF4* RNAi *Coreopsis* 형질전환 개체 (A)에서 total RNA를 추출하고 real-time PCR을 통해 *CrDWF4* 유전자의 발현 억제를 확인함.

- *DET2*, *DWF4*, *SMT2* 유전자 동시 발현 억제에 의해 유도되는 관상작물 난쟁이 *Coreopsis* 형질전환체의 표현형 분석

화분에서 성장한 후 개화한 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Coreopsis* 형질전환 개체를 wild-type 대조군과 비교하여 표현형을 분석하였음. *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Coreopsis* 형질전환 개체의 평균적인 크기는 약 25.6 cm이었고 wild-type 대조군에 비해 약 10% 정도 감소하였음. *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Coreopsis* 형질전환 개체의 평균적인 꽃의 직경은 약 2.3 cm이었고 wild-type 대조군에 비해 약 20% 감소하였음. 또한 internode 길이, 잎 길이 등이 대조군에 비해 감소한 것으로 나타났음 (그림 193).



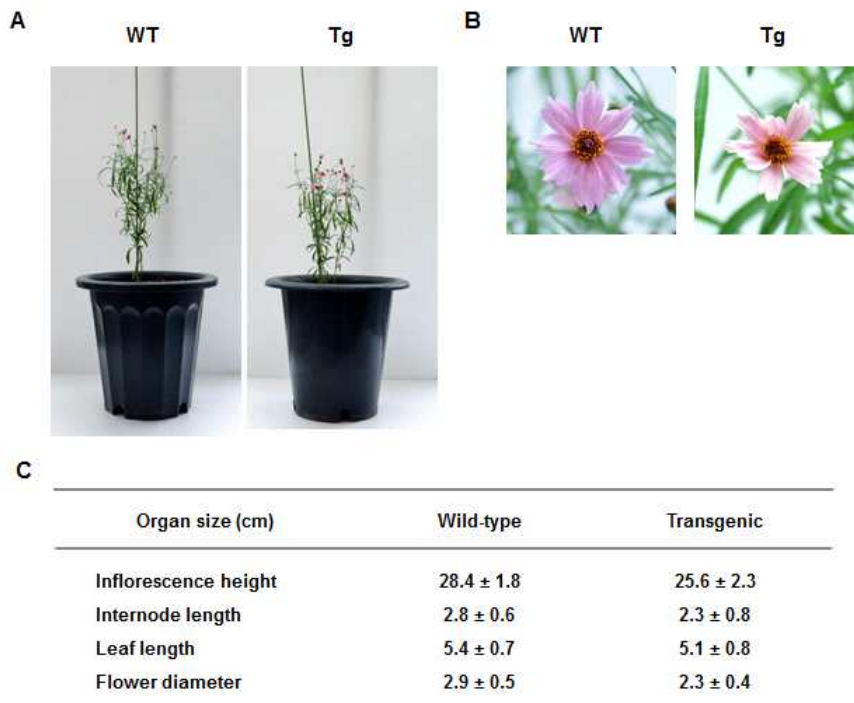


그림 193. *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Coreopsis* 형질전환 개체의 표현형을 대조군과 비교 분석함.

○ *DET2*, *DWF4*, *SMT2* 유전자 동시 발현 억제에 의해 유도되는 관상작물 난쟁이 *Coreopsis* 형질전환체의 유전분석

- Real-time PCR 분석

*EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Coreopsis* 형질전환 개체에서 *CrDET2*, *CrDWF4*, *CrSMT2* 유전자의 발현 억제를 확인하기 위한 real-time PCR을 수행하였음. *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Coreopsis* 형질전환 개체의 잎 (~ 1 g)을 LN<sub>2</sub>와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하고 Hybrid-R™ Plant RNA Prep Mini Kit (GeneAll)를 이용하여 total RNA를 추출하였음. 2 µg의 total RNA, poly d(T) primer 및 ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega)를 이용한 reverse transcription 반응을 통해 cDNA를 합성하였고 real-time PCR의 주형으로 사용하였음. *CrDET2*, *CrDWF4*, *CrSMT2* 유전자 및 *Tubulin* 유전자를 증폭할 수 있는 real-time PCR primer 및 SYBR Premix EX Taq™ II (Takara) real-time PCR kit를 이용하여 각각의 유전자 발현을 비교한 결과 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* 형질전환 개체에서 *CrDET2* 유전자의 발현은 대조군에 비해 약 40% 이상 감소하였고 *CrDWF4* 유전자의 발현은 약 20%, *CrSMT2* 유전자의 발현은 약 10% 감소하였음 (그림 194).

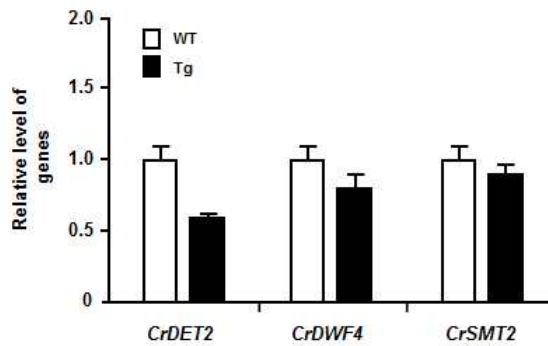


그림 194. *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Coreopsis* 형질전환 개체 (A)에서 total RNA를 추출하고 real-time PCR을 통해 *CrDET2*, *CrDWF4*, *CrSMT2* 유전자의 발현 억제를 확인함.

### 3. 환경위해성 평가심사서 작성 검토

난쟁이 표현형 *Echinacea*, *Coreopsis* 형질전환 개체의 환경위해성 평가를 위한 방안을 검토하였음. 현재 국내 형질전환 식물체에 대한 환경위해성 평가는 GMO 작물에 대한 부정적인 인식의 확산에 의해 거의 실시되고 있지 않음. 본 과제에서 확보한 난쟁이 표현형 형질전환체는 관상작물로 인체에 무해하며 주변 환경에 미치는 영향에 대한 긍정적인 평가가 이루어진다면 추 후 상업화 가능성이 매우 크다고 판단됨.

환경위해성 평가는 형질전환체에 도입된 유전자의 특성 규명 (위치, 작용기작 등), 자연계에서의 분포현황, 생물학적 특성, 유해물질 생산 가능성, 병원성, 생식, 번식양식, 유전적 특성, 주변 환경에 미치는 영향 검토 등의 종합적 검증을 필요로 하여 이를 위한 경제적 지출이 야기됨. 따라서 난쟁이 표현형 *Echinacea*, *Coreopsis* 형질전환 개체의 상업화 후 창출될 경제적 효과를 충분히 감안하여 추 후 환경위해성 평가 실시 여부를 판단해야할 것으로 여겨짐.

3-6-2. 제2세부과제 : 관상작물 형질전환 체계 확립 및 난쟁이 관상작물 개발

1. *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자 발현 억제에 의해 유도되는 관상작물 난쟁이 *Echinacea* 형질전환체 확보 및 순화

○ *DET2*, *DWF4*, *SMT2* 유전자의 발현이 동시에 억제된 관상작물 *Echinacea* 형질전환체 확보 및 순화

*EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템 (pFGC5941/shEpDET2:DWF4:SMT2)이 형질전환된 *Echinacea* 형질전환 개체를 확보하기 위한 형질전환, 재분화 및 순화 연구를 수행함.

관상작물 *Echinacea* 형질전환 및 재분화 연구에서 확보한 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음. 형질전환 개체의 잎 (~ 1 g)을 LN<sub>2</sub>와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하였고 GenElute Plant Genomic DNA Prep Mini Kit (Sigma)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였음. 250 ng genomic DNA, pFGC5941/shEpDET2:DWF4:SMT2 벡터의 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위 및 *Echinacea Tubulin* 유전자에 특이적으로 결합하는 primer를 이용한 PCR을 수행하고 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위 PCR 산물의 존재를 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음 (그림 195 ~ 200).

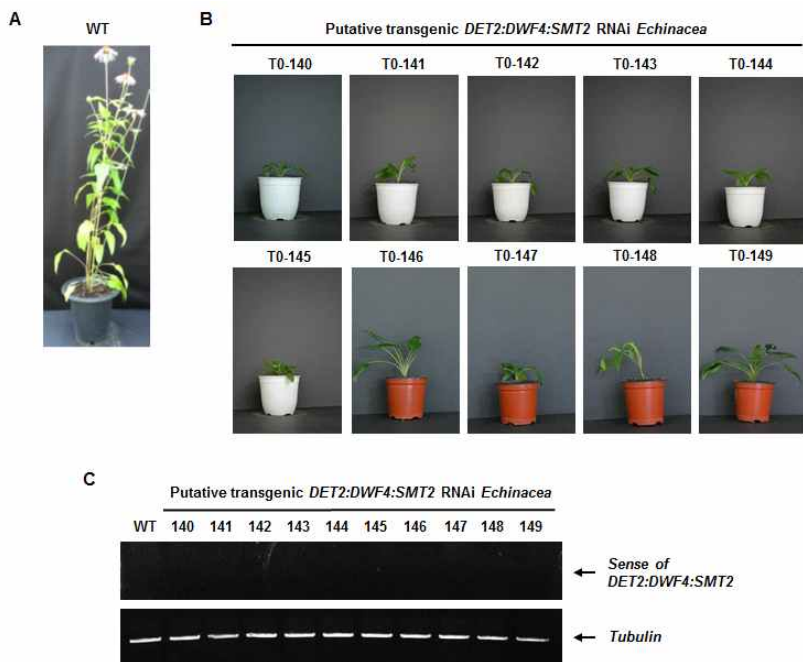


그림 195. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-140 ~ T0-149). (C) *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위, *Tubulin* genomic DNA PCR 산물.

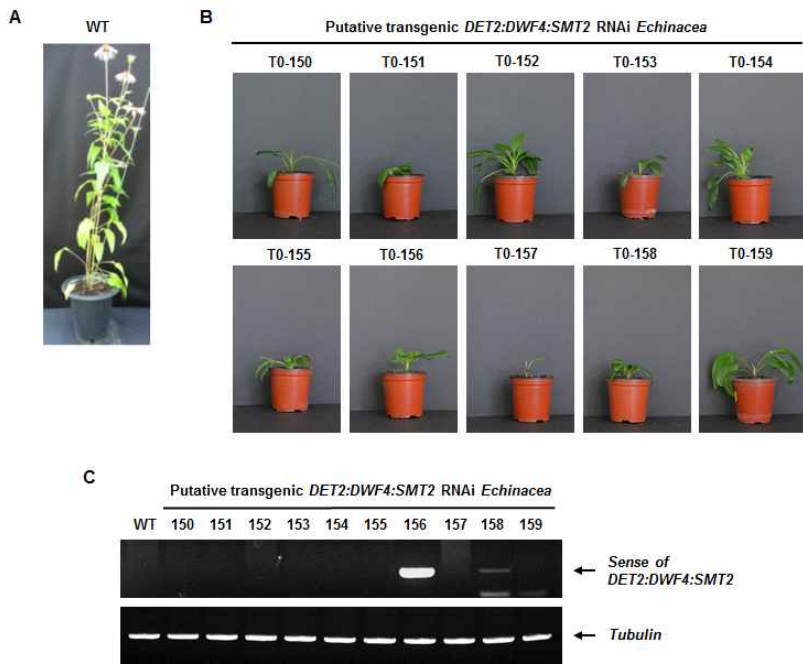


그림 196. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-150 ~ T0-159). (C) *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위, *Tubulin* genomic DNA PCR 산물.

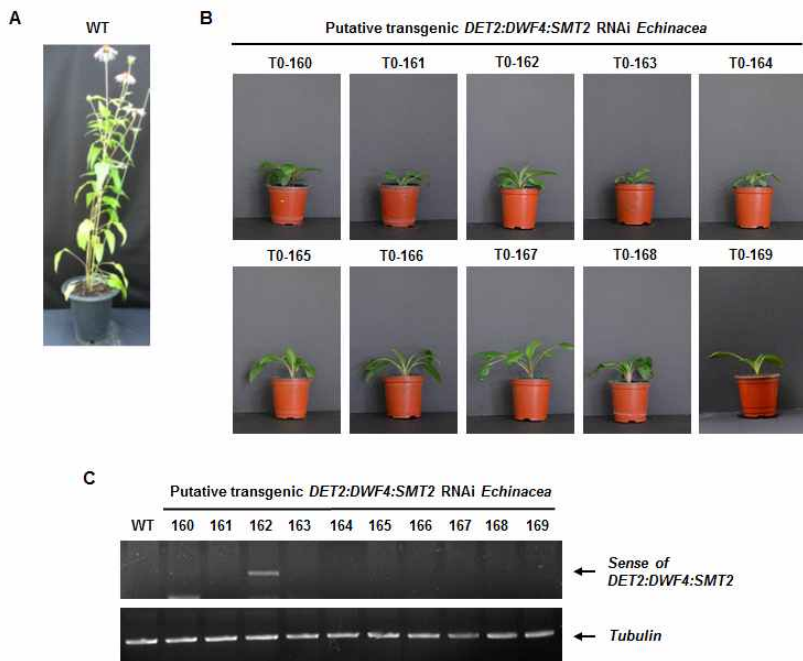


그림 197. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-160 ~ T0-169). (C) *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위, *Tubulin* genomic DNA PCR 산물.

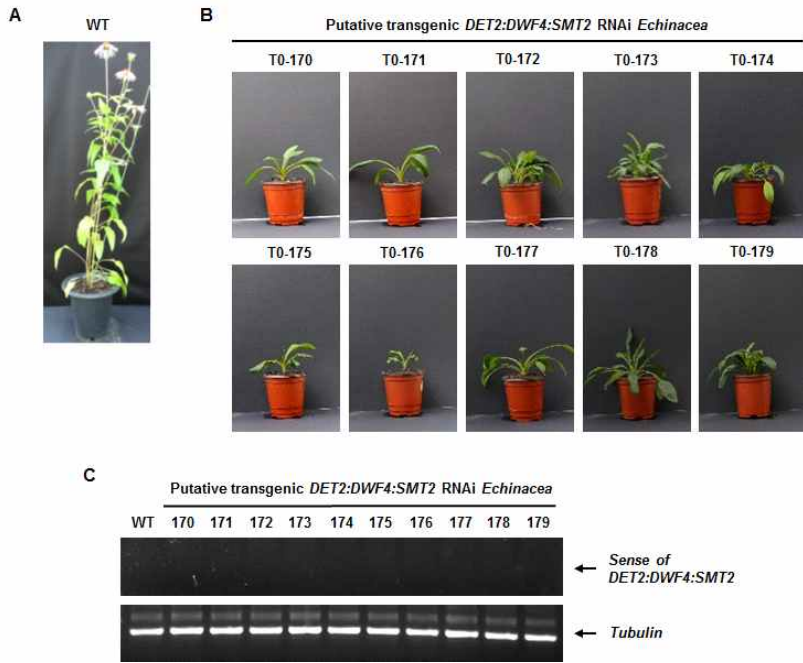


그림 198. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-170 ~ T0-179). (C) *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위, *Tubulin* genomic DNA PCR 산물.

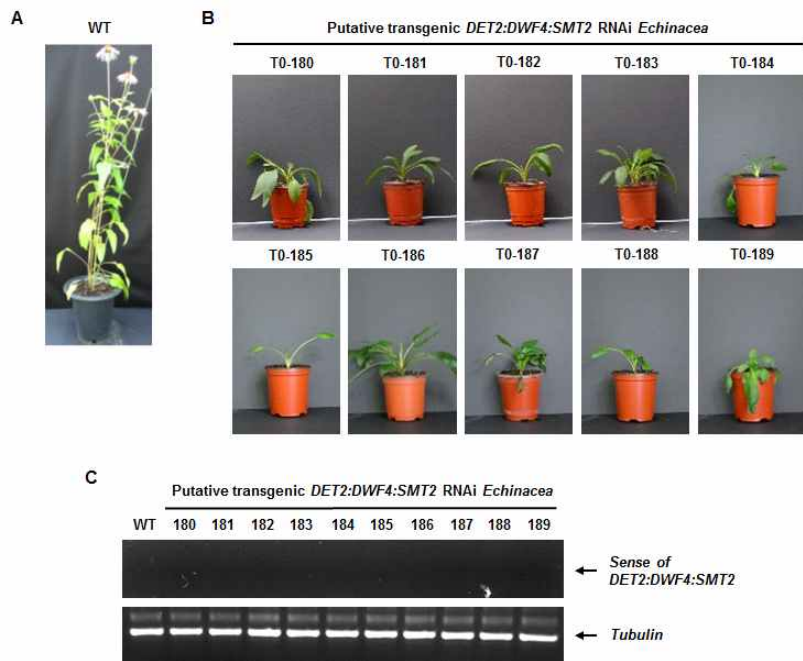


그림 199. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-180 ~ T0-189). (C) *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위, *Tubulin* genomic DNA PCR 산물.



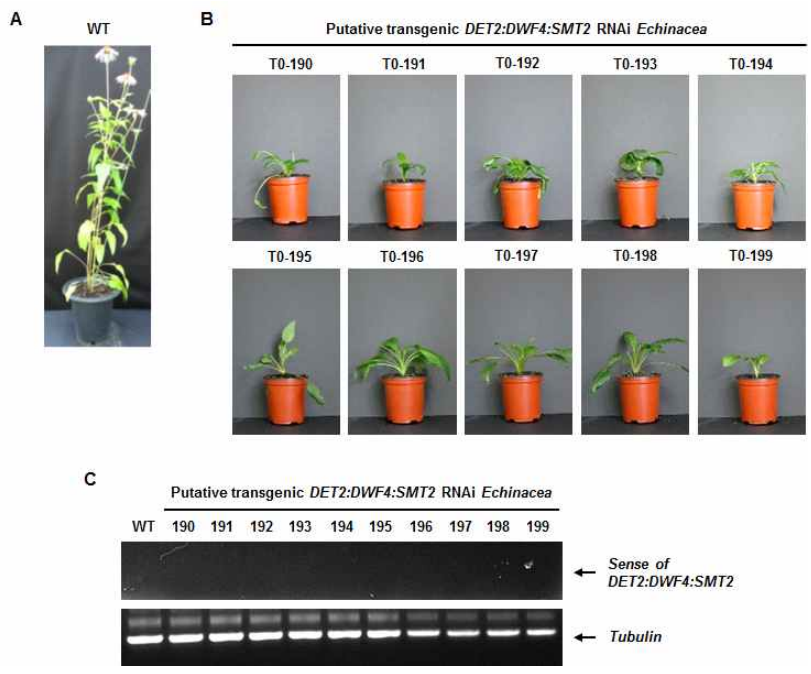


그림 200. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-190 ~ T0-199). (C) *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* sense 부위, *Tubulin* genomic DNA PCR 산물.

토양에 순화 중인 형질전환 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 genomic DNA PCR 결과 총 60 개체 중 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 발현시스템이 도입된 개체는 3 개체 (T0-156, 158, 162)이었음. 화분에서 성장 중인 형질전환 개체의 경우 wild-type 대조군에 비해 약간 크기가 감소하는 것으로 보이지만 정확한 표현형 및 왜소화 정도는 노지에 옮겨 번식시킨 후 표현형 비교 및 분자생물학적 검증 연구 (유전자 발현 억제 비교 연구) 등을 통해 확인할 수 있을 것으로 판단됨.

○ *DWF3* 유전자의 발현이 억제된 관상작물 *Echinacea* 형질전환체 확보 및 순화

*EpDWF3* RNAi 벡터시스템 (pFGC5941/shEpDWF3)이 형질전환된 *Echinacea* 형질전환 개체를 확보하기 위한 형질전환, 재분화 및 순화 연구를 수행함.

관상작물 *Echinacea* 형질전환 및 재분화 연구에서 확보한 *EpDWF3* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *Echinacea* genomic DNA에 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음. 형질전환 개체의 잎 (~ 1 g)을 LN<sub>2</sub> 와 혼합한 후 막자사발에서 파쇄하였고 GenElute Plant Genomic DNA Prep Mini Kit를 이용하여 genomic DNA를 추출하였음. 250 ng genomic DNA, pFGC5941/shEpDWF3 벡터의 *EpDWF3* sense 부위 및 *Echinacea Tubulin* 유전자에 특이적으로 결합하는 primer를 이용한 PCR을 수행하고 *EpDWF3* sense 부위 PCR 산물의 존재를 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음 (그림 201 ~ 205).

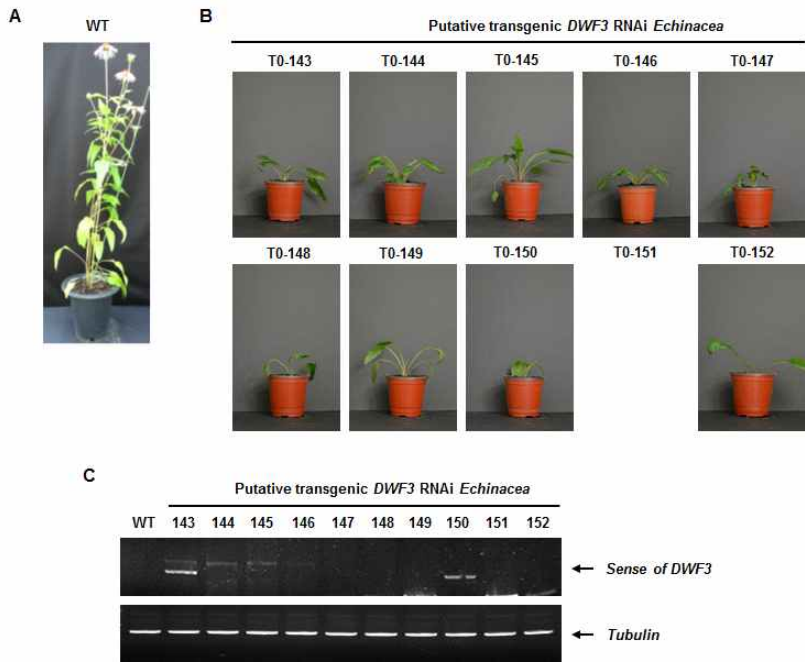


그림 201. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터 시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-143 ~ T0-152). (C) *EpDWF3* sense 부위, *Tubulin* genomic DNA PCR 산물.

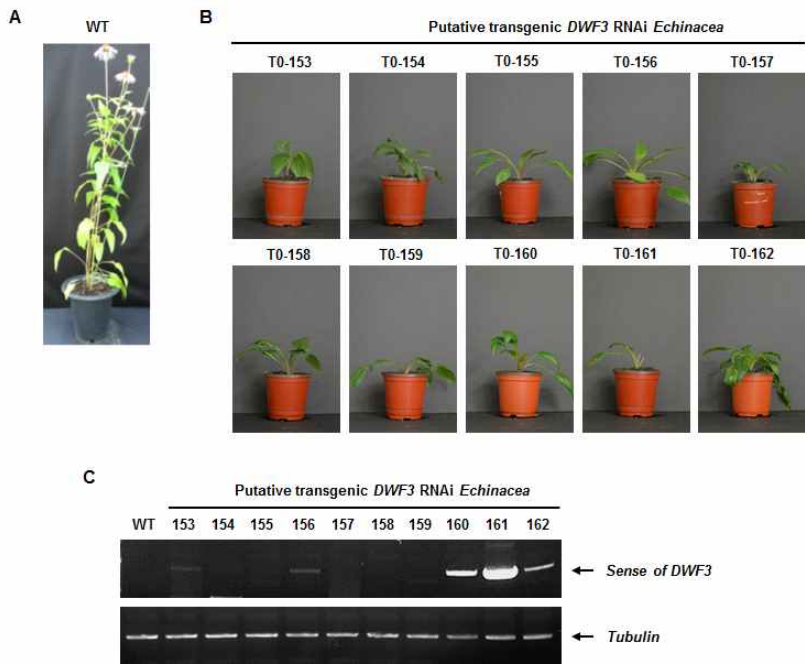


그림 202. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터 시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-153 ~ T0-162). (C) *EpDWF3* sense 부위, *Tubulin* genomic DNA PCR 산물.

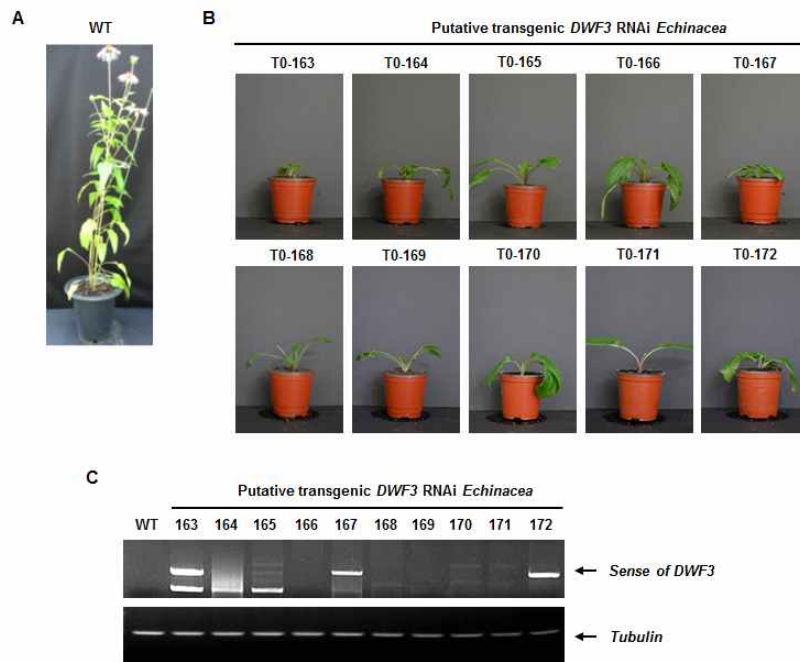


그림 203. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터 시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-163 ~ T0-172). (C) *EpDWF3* sense 부위, *Tubulin* genomic DNA PCR 산물.

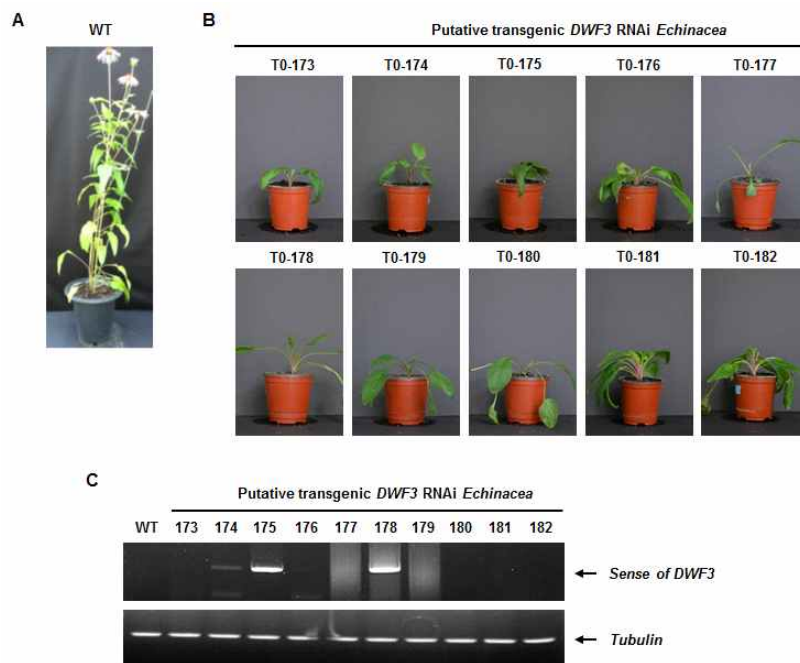


그림 204. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터 시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-173 ~ T0-182). (C) *EpDWF3* sense 부위, *Tubulin* genomic DNA PCR 산물.

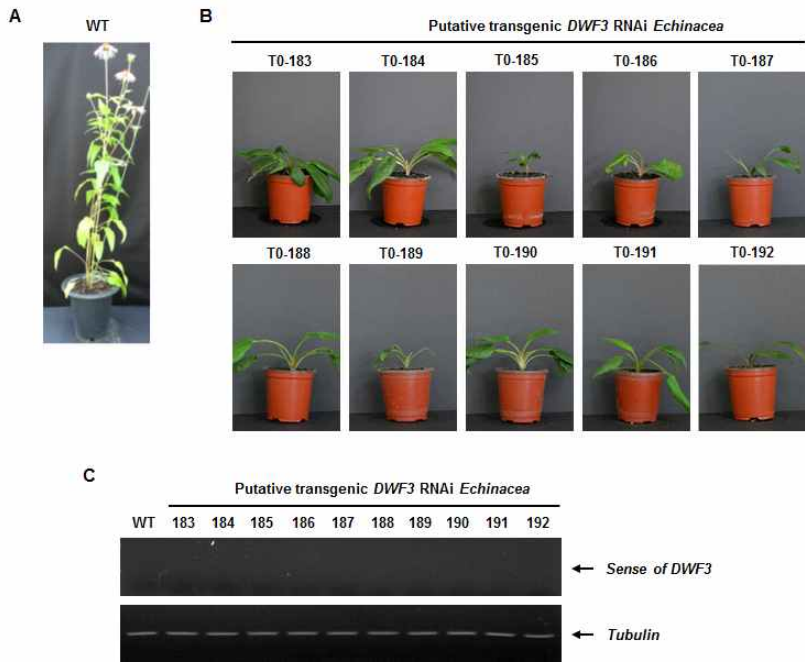


그림 205. 토양에 순화 중인 형질전환 *Echinacea* 개체에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDWF3* RNAi 벡터 시스템의 도입 유무를 확인함. (A) Wild-type *Echinacea*. (B) 토양에 순화 중인 형질전환 개체 (T0-183 ~ T0-192). (C) *EpDWF3* sense 부위, *Tubulin* genomic DNA PCR 산물.

토양에 순화 중인 형질전환 *EpDWF4* RNAi *Echinacea* 형질전환 개체의 genomic DNA PCR 결과 총 50 개체 중 *EpDWF4* RNAi 발현시스템이 도입된 개체는 13 개체 (T0-143, 150, 153, 156, 160, 161, 162, 163, 167, 172, 174, 175, 178)이었음. 화분에서 성장 중인 형질전환 개체의 경우 wild-type 대조군에 비해 약간 크기가 감소하는 것으로 보이지만 정확한 표현형 및 왜소화 정도는 노지에 옮겨 번식시킨 후 표현형 비교 및 분자생물학적 검증 연구 (유전자 발현 억제 비교 연구) 등을 통해 확인할 수 있을 것으로 판단됨.

2. *DWF4*, *DET2*, *SMT2* 유전자 발현 억제에 의해 유도되는 관상작물 난쟁이 *Coreopsis* 형질전환체 확보 및 순화

- *DET2*, *DWF4*, *SMT2* 유전자의 발현이 동시에 억제된 관상작물 *Coreopsis* 형질전환체 확보 및 순화

*EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템 (pFGC5941/shCrDET2:DWF4:SMT2)이 형질전환된 *Coreopsis* 형질전환 개체를 확보하기 위한 형질전환, 재분화 및 순화 연구를 수행함.



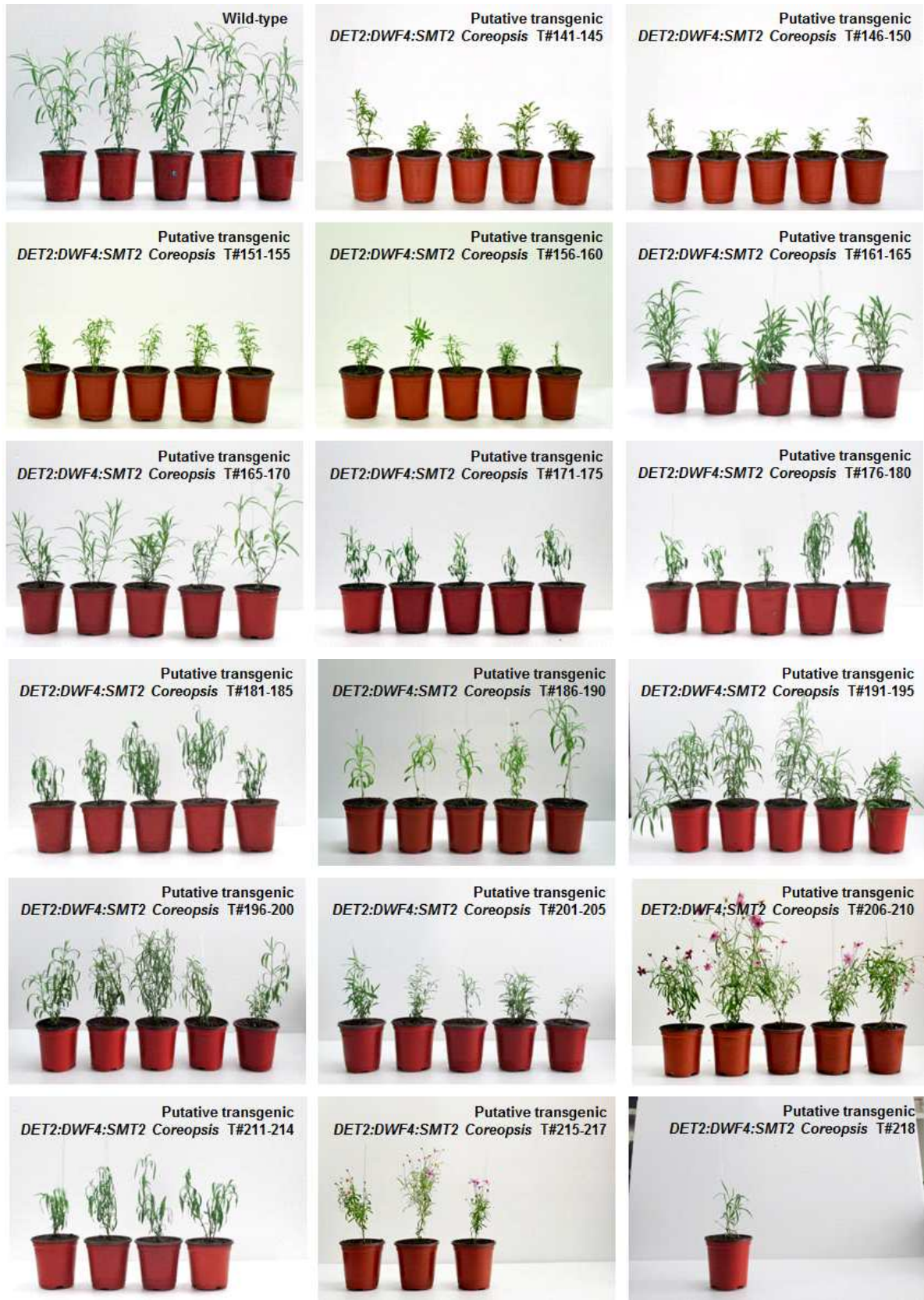


그림 206. *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 형질전환 *Coreopsis* 개체 (T141~218).



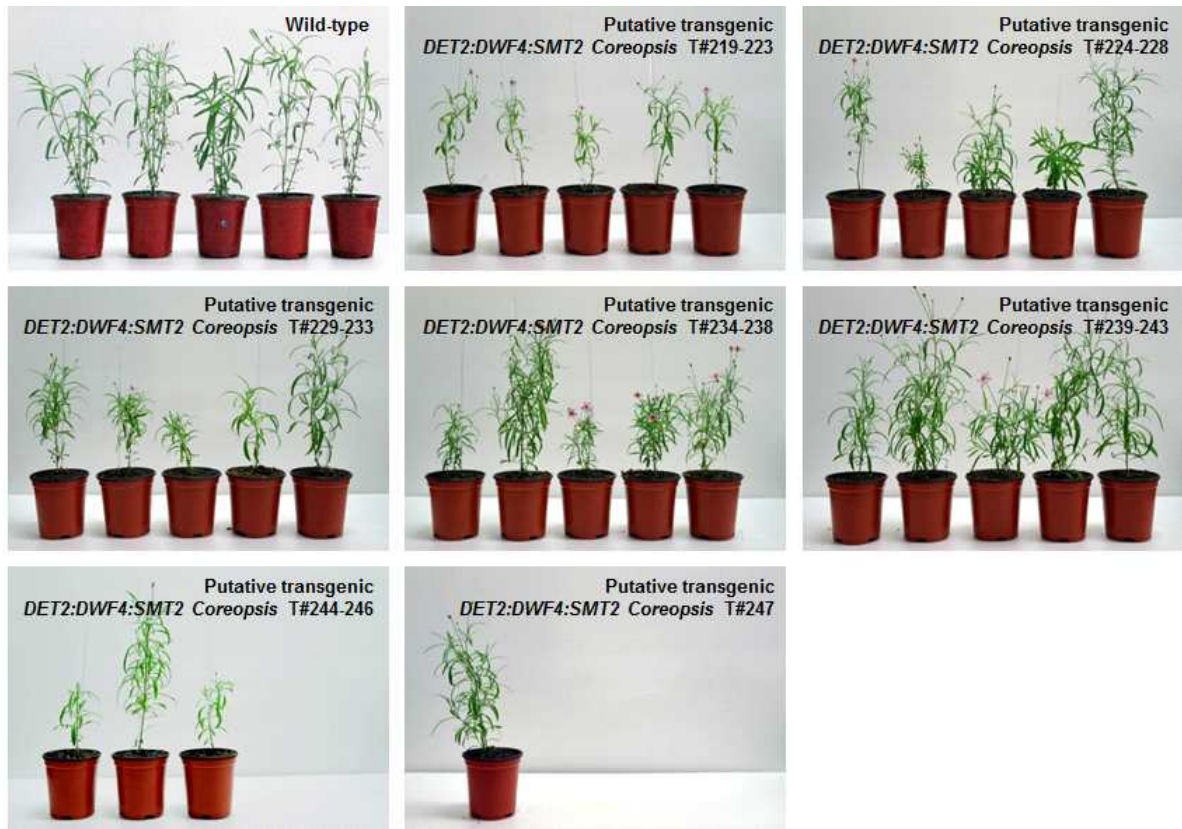


그림 207. *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 형질전환 *Coreopsis* 개체 (T219~247).

관상작물 *Coreopsis* 형질전환 및 재분화 연구에서 확보한 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi *Coreopsis* 형질전환 개체 (그림 206 & 207)에서 genomic DNA를 추출하고 PCR을 통해 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템의 도입 유무를 확인하였음. T#180 개체의 genomic DNA에 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템이 도입된 것으로 확인되었고 개체 증식을 위한 영양 번식을 통해 5개체를 확보하였음 (그림 208A). 또한 genomic DNA PCR을 통해 각각의 개체에 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템이 도입된 것을 확인하였음 (그림 208B).

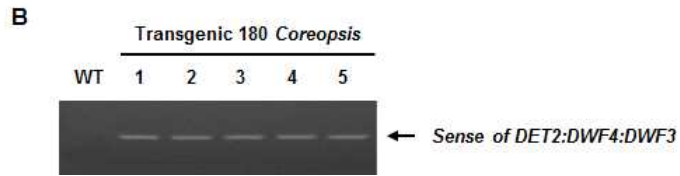


그림 208. *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 형질전환 *Coreopsis* 개체를 삼목으로 증식시키고 genomic DNA PCR로 *EpDET2:EpDWF4:EpSMT2* RNAi 벡터시스템이 도입된 것을 확인함.

3-6-3. 제1협동과제 : 난쟁이 관상작물 실용화 연구

1. 관상작물 난쟁이 형질전환체 특성 검정

(1) 형질전환 에키네시아

2016년 연구포지에 식재된 형질전환 에키네시아를 2017년 3월 신규 연구포지에 포기나누기하여 증식 식재하였음.



Knockdown #12 gDNA



Knockdown #14 gDNA



Knockdown #24 gDNA



Knockdown #29 gDNA



Knockdown #33 gDNA



Knockdown #38 gDNA



Knockdown #42 gDNA



Knockdown #55 gDNA



Knockdown #57 gDNA



Knockdown #58 gDNA



Knockdown #59 gDNA



Knockdown #60 gDNA





Knockdown #65 gDNA



Knockdown #69 gDNA



Knockdown #77 gDNA



Knockdown #79 gDNA



Knockdown #90 gDNA



Knockdown #92 gDNA



Knockdown DSD T0-48  
gDNA

그림 209. 형질전환 에키네시아.

형질전환 에키네시아 특성 조사 결과 대조구보다 키가 다 줄어들었으며 그 중 몇몇 개체는 식물체 높이가 33 cm, 41 cm로 눈에 띄게 줄어들었음. 키가 낮아 쓰러지는 경향이 없으며 분화용으로도 적합할 것으로 보임.

표 35. 에키네시아 난쟁이 형질전환체 특성 검정.

No	Plant (Transformant)	식물체 높이 (cm)	식물체 폭 (cm)	꽃 직경 (cm)	콘 크기 (cm)	쓰러짐	분얼 정도 (cm)
	대조구	104	68	9.5	4	○	많다
1	Knockdown #12 gDNA	77	93	11	4.5	○	많다
2	Knockdown #14 gDNA	67	70	8	3.5	○	중간
3	Knockdown #24 gDNA	70	75	9	4	○	중간
4	Knockdown #29 gDNA	56	70	11	4.5	○	많다
5	Knockdown #33 gDNA	53	95	12	4.5	○	많다
6	Knockdown #38 gDNA	52	41	9	4.5	○	중간

7	Knockdown #42 gDNA	33	40	7.5	3.5	×	적다
8	Knockdown #55 gDNA	41	18	9.5	4	×	적다
9	Knockdown #57 gDNA	64	67	11	4	○	많다
10	Knockdown #58 gDNA	57	63	10	4	○	중간
11	Knockdown #59 gDNA	86	74	11	4	○	적다
12	Knockdown #60 gDNA	62	57	10	4	○	중간
13	Knockdown #65 gDNA	49	55	9	4	○	중간
14	Knockdown #69 gDNA	42	50	8	3.5	○	적다
15	Knockdown #77 gDNA	65	74	11	3.5	○	중간
16	Knockdown #79 gDNA	61	75	9	4.5	○	많다
17	Knockdown #90 gDNA	63	56	9.5	4	○	많다
18	Knockdown #92 gDNA	64	66	11	4	×	많다
19	Knockdown DSD T0-48 gDNA	94	80	9.5	4	○	많다

## (2) 형질전환 코레옵시스

2016년 연구포지에 식재된 코레옵시스 DWF4-143, 145, 149를 2016년 11월 동절기 대비 삼목 증식 후 2017년 4월 연구포지에 다시 식재하였음. 식물체 높이는 51 ~ 54 cm로 대조구와 큰 차이가 없었음.



DWF4 143  
(식물체 높이 51cm)



DWF4 145  
(식물체 높이 54cm)



DWF4 149  
(식물체 높이 52cm)

그림 210. 형질전환 코레옵시스

## 2. 난쟁이 형질전환체 대량 번식

### (1) 에키네시아

2016년 12월 에키네시아 근삼 테스트를 진행하였으며 뿌리를 3cm 길이로 잘라 200구



트레이에 상부는 조금씩 나오도록 꽃앓음. 삽목 결과 대부분 고사하였고 잎이 붙어있던 뿌리만 잘 자랐음. 더 큰 사이즈의 트레이를 사용하는 등 다른 방법이 필요할 것으로 보임.



2016년 12월 에키네시아 근삽



2017년 5월에 우리꽃 연구포지에 이식 후 8월 모습

그림 211. 에키네시아 근삽 테스트

## (2) 후룩스

2017년 5월 후룩스 수입 묘목을 포트 작업하던 중 나온 잔뿌리들을 모아 땅에 근삽하였음. 잎이 많이 발생하였으며 나누어 포트작업하면 많은 수의 개체를 얻을 수 있을 것으로 생각됨. 이러한 방법을 에키네시아에도 적용시켜 대량번식체계를 확립하고자 함.



2017년 5월 후룩스 근삽



2017년 8월 모습

그림 212. 후룩스 근삽 테스트

### 3. 관상용 유전자원 수집

2017년 4월 네덜란드에서 화훼 및 관목 자원을 수입함. 전체 278종이 도입되었고 그 중 197종이 우리꽃연구소 전시포장에 식재되었음. 내년 2018년에 오픈될 예정이며 다양한 관상작물을 알리고 개인 및 다양한 정원에 정원 소재로 이용될 것이라 사료됨. 또, 앞으로 수집자원에 대한 특성조사가 이뤄질 예정이며 일부 품종은 새로운 육종 소재로 활용될 것임.

표 36. 2017년 해외도입 묘목

No	학명	국명	수량	수집국가명
1	Acanthusmollis	아칸서스	150	Netherlands
2	Acanthusspinus	아칸서스	150	Netherlands
3	Achillea'Moonshine'	톱풀	250	Netherlands
4	Achillea'RedVelvet'	톱풀	200	Netherlands
5	Aconitum carmichaeli 'Arendsii'	투구꽃	1,200	Netherlands
6	Actaea simplex 'Atropurpurea'	춧대승마	250	Netherlands
7	Alliumsenescens'SummerBeauty'	두메부추	250	Netherlands
8	Anemonehyb.'HadspenAbundance'	대상화	200	Netherlands
9	Anemonehyb.'HonorineJobert'	대상화	200	Netherlands
10	Anemonehyb.'Serenade'	대상화	200	Netherlands
11	Anemoneranunculoides	라눈쿨로이데스 아네모네	200	Netherlands
12	Anemonesylvestris	눈바람꽃	250	Netherlands
13	Aquilegia 'Alpina'	매발톱	500	Netherlands
14	Aquilegia 'Crimson Star'	매발톱	500	Netherlands
15	Aquilegia Double Blue	매발톱	500	Netherlands
16	Aquilegia Double Purple	매발톱	500	Netherlands
17	Aquilegia Double Red	매발톱	500	Netherlands
18	AquilegiaMcKanaHybrids	매발톱	2,500	Netherlands
19	Aquilegia 'Nora Barlow'	매발톱	500	Netherlands
20	Aquilegia vulgaris 'William Guinness'	매발톱	500	Netherlands

21	Aster dumosus 'Jenny'	아스타	250	Netherlands
22	Aster dumosus 'Kassel'	아스타	250	Netherlands
23	Aster dumosus 'Kristina'	아스타	250	Netherlands
24	Aster dumosus 'Lady in Blue'	아스타	250	Netherlands
25	Aster dumosus 'Peter Harrison'	아스타	250	Netherlands
26	Aster novi-belgii 'White Ladies'	우선국	250	Netherlands
27	Aster novi-belgii 'Marie Ballard'	우선국	250	Netherlands
28	Aster novi-belgii 'Patricia Ballard'	우선국	250	Netherlands
29	Aster novi-belgii 'Royal Ruby'	우선국	250	Netherlands
30	Aster novi-belgii 'Sarah Ballard'	우선국	250	Netherlands
31	Astilbe arendsii 'Amerika'	노루오줌	150	Netherlands
32	Astilbe arendsii 'Brautschleier'	노루오줌	150	Netherlands
33	Astilbe arendsii 'Burgundy Red'	노루오줌	750	Netherlands
34	Astilbe arendsii 'Fanal'	노루오줌	150	Netherlands
35	Astilbe arendsii 'Glut'	노루오줌	150	Netherlands
36	Astilbe arendsii 'Red Charm'	노루오줌	150	Netherlands
37	Astilbe 'Montgomery'	노루오줌	2,000	Netherlands
38	Astilbe 'Rock and Roll'	노루오줌	2,000	Netherlands
39	Begonia pendula Geel	베고니아	350	Netherlands
40	Begonia pendula Rood	베고니아	350	Netherlands
41	Begonia pendula Roze	베고니아	350	Netherlands
42	Begonia pendula Wit	베고니아	350	Netherlands
43	Campanula glomerata Pink	자주꽃방망이	250	Netherlands
44	Campanula glomerata White	자주꽃방망이	250	Netherlands
45	Campanula 'KentBelle'	초롱꽃	200	Netherlands
46	Campanula punctata 'Cherry Bells'	초롱꽃	150	Netherlands
47	Centaurea macrocephala	마크로케팔라 수레국화	400	Netherlands
48	Clematis 'Arabella'	으아리	250	Netherlands
49	Clematis 'Black Prince'	으아리	250	Netherlands
50	Clematis 'Dr Ruppel'	으아리	250	Netherlands
51	Clematis 'Etoile Nacrée'	으아리	250	Netherlands
52	Clematis 'Hagley Hybrid'	으아리	250	Netherlands
53	Clematis 'Jan Pawell'	으아리	250	Netherlands
54	Clematis 'Juuli'	으아리	250	Netherlands
55	Clematis 'Mevrouw Le Coultre'	으아리	250	Netherlands
56	Clematis 'Miss Bateman'	으아리	250	Netherlands
57	Clematis 'Omoshiro'	으아리	250	Netherlands
58	Clematis 'Prince Charles'	으아리	250	Netherlands
59	Clematis 'Rütel'	으아리	250	Netherlands
60	Clematis 'The President'	으아리	250	Netherlands
61	Clematis 'The Vagabond'	으아리	250	Netherlands

62	Clematis'Yukikomachi'	으아리	250	Netherlands
63	Convallaria majalis 'Bordeaux'	은방울꽃	1,000	Netherlands
64	Convallaria majalis 'Rosea'	은방울꽃	750	Netherlands
65	Crocsmia'RedKing'	애기범부채	5,000	Netherlands
66	Cytisus'BoskoopRuby'	양골담초	2,000	Netherlands
67	Cytisus'Hollandia'	양골담초	1,000	Netherlands
68	Cytisupraecox'Albus'	양골담초	1,000	Netherlands
69	Cytisus'RoterFavorit'	양골담초	1,000	Netherlands
70	Delphinium barbeyi 'Yellow Pearl'	제비고깔	200	Netherlands
71	Delphinium'GillianDallas'	제비고깔	200	Netherlands
72	Delphinium'Gossamer'	제비고깔	200	Netherlands
73	Delphinium peregrinum 'Magic Fountains'	제비고깔	1,000	Netherlands
74	Dicentraformosa'Luxuriant'	성주풀꽃	800	Netherlands
75	Dicentraspectabilis'Valentine'	금낭화	600	Netherlands
76	Dicentra'SpringGold'	금낭화	150	Netherlands
77	Dodecatheonmeadia'Aphrodite'	인디언앵초	750	Netherlands
78	Dodecatheonmeadia'QueenVictoria'	인디언앵초	750	Netherlands
79	Dodecatheonpulchellum'RedWings'	인디언앵초	750	Netherlands
80	Echinaceapurpurea'ColorShowtime'	자주루드베키아	200	Netherlands
81	Echinacea purpurea 'Double-Decker'	자주루드베키아	200	Netherlands
82	Echinacea purpurea 'Red Baron'	자주루드베키아	200	Netherlands
83	Eremurus 'Bungei'	에레무러스	150	Netherlands
84	Eremurus 'Himalaicus'	에레무러스	75	Netherlands
85	Eremurus 'Robustus'	에레무러스	75	Netherlands
86	Eremurus 'Romance'	에레무러스	75	Netherlands
87	Eucomis 'Autumnalis'	유코미스	400	Netherlands
88	Euphorbiagriffithii'Fireglow'	등대풀	150	Netherlands
89	Euphorbiapolychroma'Bonfire'	등대풀	400	Netherlands
90	Geumchiloense'MrsBradshaw'	뱀무	250	Netherlands
91	Helleborus'DoubleEllenGreen'	헬레보러스	550	Netherlands
92	Helleborus 'Double Ellen Picotee'	헬레보러스	400	Netherlands
93	Helleborus'DoubleEllenPink'	헬레보러스	400	Netherlands
94	Helleborus'DoubleEllenPinkSpotted'	헬레보러스	400	Netherlands
95	Helleborus'DoubleEllenPurple'	헬레보러스	400	Netherlands
96	Helleborus'DoubleEllenRed'	헬레보러스	550	Netherlands
97	Helleborus'DoubleEllenSpottedWhite'	헬레보러스	400	Netherlands
98	Helleborus'DoubleEllenWhite'	헬레보러스	550	Netherlands
99	Helleborus'DoubleEllenYellow'	헬레보러스	150	Netherlands
100	Helleborusniger	헬레보러스	850	Netherlands
101	Helleborusorientalis	헬레보러스	650	Netherlands
102	Helleborus'PrettyEllenPink'	헬레보러스	150	Netherlands

103	Hemerocallis'ArcticSnow'	원추리	150	Netherlands
104	Hemerocallis'BreedersMix'	원추리	150	Netherlands
105	Hemerocallis'DoubleRiverWye'	원추리	150	Netherlands
106	Hemerocallis'JoanSenior'	원추리	150	Netherlands
107	Hemerocallis'JockeyClub'	원추리	150	Netherlands
108	Hemerocallis'LittleAnnaRosa'	원추리	150	Netherlands
109	Hemerocallis'LittleFellow'	원추리	150	Netherlands
110	Hemerocallis'LittleMissy'	원추리	150	Netherlands
111	Hemerocallis'PeggyJeffcoat'	원추리	150	Netherlands
112	Hemerocallis'RubyStella'	원추리	150	Netherlands
113	Heuchera 'Mars'	휴케라	1,000	Netherlands
114	Heuchera 'Palace Purple'	휴케라	1,000	Netherlands
115	Heuchera 'Venus'	휴케라	500	Netherlands
116	Hosta 'First Frost'	옥잠화	500	Netherlands
117	Hosta'Antioch'	옥잠화	250	Netherlands
118	HostaAtlantis'	옥잠화	250	Netherlands
119	Hosta'AugustMoon'	옥잠화	250	Netherlands
120	Hosta 'Aureomarginata'	옥잠화	1,000	Netherlands
121	Hosta'BressinghamBlue'	옥잠화	250	Netherlands
122	Hosta'Carol'	옥잠화	250	Netherlands
123	Hosta'FortuneiHyacinthina'	옥잠화	250	Netherlands
124	Hosta'FragrantBouquet'	옥잠화	250	Netherlands
125	Hosta'GoldStandard'	옥잠화	250	Netherlands
126	Hosta'Moerheim'	옥잠화	250	Netherlands
127	Hosta 'Paul's Glorie'	옥잠화	500	Netherlands
128	Hosta sieboldiana 'Elegans'	옥잠화	650	Netherlands
129	Hosta sieboldiana 'Frances Williams'	옥잠화	1,250	Netherlands
130	Hosta 'Wide Brim'	옥잠화	1,000	Netherlands
131	Hosta'YellowRiver'	옥잠화	250	Netherlands
132	Incarvilleadelavayi	각호	950	Netherlands
133	Incarvillea delavayi 'Snowtop'	각호	950	Netherlands
134	Irisgermanica 'Harvest of Memories'	아이리스	150	Netherlands
135	Irisgermanica 'Party Dress'	아이리스	150	Netherlands
136	Iris germanica 'Babbling Brook'	아이리스	150	Netherlands
137	Iris germanica 'Bianca'	아이리스	150	Netherlands
138	Iris germanica Black	아이리스	600	Netherlands
139	Iris germanica 'Blessed Again'	아이리스	150	Netherlands
140	Iris germanica Blue / White	아이리스	600	Netherlands
141	Iris germanica Blue / Yellow	아이리스	600	Netherlands
142	Iris germanica 'Cherished'	아이리스	150	Netherlands
143	Iris germanica 'Cliffs of Dover'	아이리스	150	Netherlands
144	Iris germanica 'Constant Wattez'	아이리스	150	Netherlands



145	Iris germanica 'Immortality'	아이리스	150	Netherlands
146	Iris germanica Lila / White	아이리스	600	Netherlands
147	Iris germanica 'Maui Moonlight'	아이리스	150	Netherlands
148	Iris germanica Pink	아이리스	600	Netherlands
149	Iris germanica Purple / Lila	아이리스	600	Netherlands
150	Iris germanica Red	아이리스	600	Netherlands
151	Iris germanica 'Superstition'	아이리스	150	Netherlands
152	Iris germanica 'Vanity'	아이리스	150	Netherlands
153	Iris germanica White	아이리스	600	Netherlands
154	Iris germanica Yellow / Lila	아이리스	600	Netherlands
155	Iris germanica Yellow White	아이리스	600	Netherlands
156	Iris louisiana 'Pegaletta'	루이지애나아이리스	300	Netherlands
157	Iris louisiana 'Black Gamecock'	루이지애나아이리스	450	Netherlands
158	Iris louisiana 'Sea Wisp'	루이지애나아이리스	300	Netherlands
159	Iris louisiana 'Colorific'	루이지애나아이리스	300	Netherlands
160	Iris louisiana 'HerHighness'	루이지애나아이리스	450	Netherlands
161	Iris pumila 'Brassie'	푸밀라 아이리스	200	Netherlands
162	Iris pumila 'Cherry Garden'	푸밀라 아이리스	200	Netherlands
163	Iris pumila 'Yo-yo'	푸밀라 아이리스	200	Netherlands
164	Iris sibirica 'Welcome Return'	시비리카 아이리스	250	Netherlands
165	Iris sibirica 'Chartreuse Bounty'	시비리카 아이리스	250	Netherlands
166	Iris sibirica 'Gull's Wing'	시비리카 아이리스	250	Netherlands
167	Iris sibirica 'Papillon'	시비리카 아이리스	250	Netherlands
168	Iris sibirica 'Regency Belle'	시비리카 아이리스	250	Netherlands
169	Iris virginica 'Henry's Garnet'	이테아	2,000	Netherlands
170	Juniperus chinensis 'Blue Alps'	향나무	1,000	Netherlands
171	Juniperus communis 'GoldCone'	두송	135	Netherlands
172	Juniperus communis 'Hibernica'	두송	250	Netherlands
173	Juniperus scopulorum 'Blue Arrow'	고산향나무	250	Netherlands
174	Kniphofia 'Alcazar'	니포피아	250	Netherlands
175	Kniphofia 'IceQueen'	니포피아	750	Netherlands
176	Kniphofia 'LittleMaid'	니포피아	250	Netherlands
177	Kniphofia 'RedRocket'	니포피아	250	Netherlands
178	Kniphofia 'Royal Castle'	니포피아	500	Netherlands
179	Kniphofia 'Shining Sceptre'	니포피아	500	Netherlands
180	Kniphofia 'auvaria'	니포피아	3,000	Netherlands
181	Liatris spicata	리아트리스	5,500	Netherlands
182	Liatris spicata 'Alba'	리아트리스	6,000	Netherlands
183	Liatris spicata 'Kobold'	리아트리스	500	Netherlands
184	Lupinus Apricot Yellow	루피너스	300	Netherlands
185	Lupinus Blue	루피너스	300	Netherlands
186	Lupinus Blue / White	루피너스	300	Netherlands

187	Lupinus Purple Yellow	루피너스	300	Netherlands
188	Lupinus Red	루피너스	300	Netherlands
189	Lupinus Salmon / Red	루피너스	300	Netherlands
190	Lupinus White	루피너스	300	Netherlands
191	Lupinus Yellow	루피너스	300	Netherlands
192	Lythrum salicaria 'Blush'	털부처꽃	100	Netherlands
193	Nepeta 'Walker's Low'	개박하	300	Netherlands
194	Omphalodes 'All Summer Blues'	자반풀	250	Netherlands
195	Paeonia intermedia 'Yellow Doodle Dandy'	작약	75	Netherlands
196	Paeonia intermedia 'Bartzella'	작약	625	Netherlands
197	Paeonia intermedia 'Hillary'	작약	75	Netherlands
198	Paeonia intermedia 'Prairie Charm'	작약	75	Netherlands
199	Paeonia intermedia 'Yellow Crown'	작약	75	Netherlands
200	Paeonia intermedia 'Yellow Heaven'	작약	75	Netherlands
201	Paeonia lactiflora 'Inspecteur Lavergne'	작약	75	Netherlands
202	Paeonia lactiflora 'Big Ben'	작약	75	Netherlands
203	Paeonia lactiflora 'Laura Dessert'	작약	200	Netherlands
204	Paeonia lactiflora 'Alexander Fleming'	작약	75	Netherlands
205	Paeonia lactiflora 'Barbara'	작약	75	Netherlands
206	Paeonia lactiflora 'Catharina Fontijn'	작약	75	Netherlands
207	Paeonia lactiflora 'Felix Crousse'	작약	75	Netherlands
208	Paeonia lactiflora 'Louis van Houtte'	작약	200	Netherlands
209	Paeonia Pink	작약	200	Netherlands
210	Paeonia Red	작약	200	Netherlands
211	Paeonia White	작약	200	Netherlands
212	Papaver orientalis 'Aglaya'	양귀비	200	Netherlands
213	Papaver orientalis 'Bolero'	양귀비	200	Netherlands
214	Papaver orientalis 'Carnival'	양귀비	200	Netherlands
215	Papaver orientalis 'Snow Goose'	양귀비	200	Netherlands
216	Phlox paniculata 'Sweet Dreams'	플록스	500	Netherlands
217	Phlox paniculata 'Alexandra'	플록스	250	Netherlands
218	Phlox paniculata 'Amethyst'	플록스	250	Netherlands
219	Phlox paniculata 'Anastasia'	플록스	250	Netherlands
220	Phlox paniculata Blue	플록스	1,000	Netherlands
221	Phlox paniculata 'Blue Paradise'	플록스	750	Netherlands
222	Phlox paniculata 'Bright Eyes'	플록스	750	Netherlands
223	Phlox paniculata 'Danielle'	플록스	250	Netherlands
224	Phlox paniculata 'Green Expectation'	플록스	250	Netherlands
225	Phlox paniculata 'Grenadine Dream'	플록스	250	Netherlands
226	Phlox paniculata 'Juliglut'	플록스	500	Netherlands
227	Phlox paniculata Light Blue	플록스	1,000	Netherlands

228	Phlox paniculata 'Little Boy'	플록스	250	Netherlands
229	Phlox paniculata 'Miss Mary'	플록스	1,250	Netherlands
230	Phlox paniculata 'Pina Colada'	플록스	750	Netherlands
231	Phlox paniculata Pink	플록스	1,000	Netherlands
232	Phlox paniculata 'Purple Paradise'	플록스	250	Netherlands
233	Phlox paniculata Red	플록스	1,000	Netherlands
234	Phlox paniculata Red / White	플록스	1,000	Netherlands
235	Phlox paniculata 'Red Riding Hood'	플록스	250	Netherlands
236	Phlox paniculata 'Rembrandt'	플록스	500	Netherlands
237	Phlox paniculata 'Starfire'	플록스	750	Netherlands
238	Phlox paniculata 'Uspech'	플록스	500	Netherlands
239	Phlox paniculata 'Younique Old Blue'	플록스	250	Netherlands
240	Phlox paniculata 'Younique Old Cerise'	플록스	500	Netherlands
241	Phlox paniculata 'Younique Old Pink'	플록스	250	Netherlands
242	Phlox paniculata 'Younique Old Purple'	플록스	500	Netherlands
243	Phlox paniculata 'Younique White'	플록스	500	Netherlands
244	Primula denticulata 'Rubin'	프리물라 덴티쿨라타	500	Netherlands
245	Pulmonaria saccharata 'Mrs Moon'	폴모나리아사카라타	200	Netherlands
246	Salvia nemorosa 'Plumosa'	숙근샬비어	400	Netherlands
247	Salvia nemorosa 'Rose Queen'	숙근샬비어	400	Netherlands
248	Salvia nemorosa Blue	숙근샬비어	400	Netherlands
249	Salvia nemorosa 'Schneehugel'	숙근샬비어	400	Netherlands
250	Sanguisorba 'Little Angel'	오이풀	250	Netherlands
251	Sanguisorbatenuifolia 'Alba'	오이풀	250	Netherlands
252	Sedum 'Dark Magic'	세덤	150	Netherlands
253	Sedum spectabile 'Rosenteller'	세덤	300	Netherlands
254	Sidalcea 'Partygirl'	시달세아	250	Netherlands
255	Thalictrum delavayi	텔라바이 췘의다리	100	Netherlands
256	Thuja occidentalis 'Rheingold'	서양측백나무	250	Netherlands
257	Tradescantia andersoniana 'Charlotte'	자주달개비	200	Netherlands
258	Tradescantia andersoniana 'Merlot Clusters'	자주달개비	200	Netherlands
259	Tradescantia andersoniana 'Bärbel'	자주달개비	200	Netherlands
260	Tradescantia andersoniana 'Karminglut'	자주달개비	200	Netherlands
261	Tradescantia andersoniana 'Sweet Kate'	자주달개비	200	Netherlands
262	Trollius 'New Moon'	금매화	250	Netherlands
263	Veronica 'Atomic Amethyst Ray'	베로니카	300	Netherlands
264	Veronica 'Atomic Red Ray'	베로니카	150	Netherlands
265	Veronica 'Atomic Silvery Pink Ray'	베로니카	150	Netherlands
266	Veronica 'Atomic Sky Ray'	베로니카	150	Netherlands
267	Veronica 'Baby Doll'	베로니카	150	Netherlands

268	Veronica Blue	베로니카	1,000	Netherlands
269	Veronica'BlueIndigo'	베로니카	150	Netherlands
270	Veronica Pink	베로니카	1,000	Netherlands
271	Veronica'PlumosaBluePlume'	베로니카	150	Netherlands
272	Veronicaspicata'Heidekind'	베로니카	200	Netherlands
273	Veronicaspicata'Rotfuchs'	베로니카	1,200	Netherlands
274	Veronica'SunnyBorderBlue'	베로니카	200	Netherlands
275	Veronica'UlsterDwarfBlue'	베로니카	250	Netherlands
276	Veronica White	베로니카	1,000	Netherlands
277	Veronicastrum virginicum 'Fascination'	냉초	200	Netherlands
278	Veronicastrum virginicum 'Diana'	냉초	250	Netherlands

#### 4. 해외시장 동향 파악

##### (1) 독일, 벨기에, 네덜란드(2017.1.19.~2017.1.27.)

난쟁이과제의 일환으로 독일 ESSEN IPM 박람회와 재배농장, 가든센터들을 방문하였으며 관상작물에 대한 해외시장 동향 파악과 로열티 체계 확립을 목적으로 함.

##### - 2017 ESSEN IPM



2017 ESSEN IPM



IPM 전시장 전경



다양한 회사의 부스 방문

그림 213. 2017 ESSEN IPM

- Armada (농장, IPM) : 우리꽃연구소의 ‘상록잔디패랭이’를 유럽시장에 생산/판매하고 있으며 유럽 내에서 ‘상록잔디패랭이’의 서브 라이선스들을 관리하고 있는 회사. 또한 ‘상록잔디패랭이’는 미국의 Concept Plants를 통하여 미국시장에서도 판매가 이뤄지고 있음.



Armada 농장 방문



판매를 위해 생산되는 우리꽃연구소 '상록잔디패랭이'



ARMADA 부스에 걸려있는 '상록잔디패랭이'



Armada 대표 Gerard



이탈리아에서 '상록잔디패랭이'를 생산하는 재배자와 미팅

그림 214. Armada 농장 방문 및 IPM Armada 부스에서 미팅

- Plantipp (IPM) : Plantipp은 주로 우리꽃연구소의 코레옵시스와 가우라의 로열티를 관리하는 회사. 유럽 전역에서 활동하며 미국에 Concept Plants라는 자회사를 두고 있어 유럽뿐만 아니라 미국에도 다양한 시장을 확보하고 있음. 현재 우리꽃연구소의 신품종이 유럽과 미국으로 진출하는 데에 있어 좋은 파트너이며 앞으로 그 품종의 수가 늘어날 예정임.



Plantipp의 Peter와 Kim



독일 Kienzler의 재배자



Plantipp의 저녁 식사 초대 자리

그림 215. IPM Plantipp 부스에서 미팅 및 Plantipp의 저녁 식사 초대

- 가든센터 : 가든센터들을 방문하여 네덜란드, 독일 등 유럽시장의 동향을 파악할 수 있었으며 앞으로 육종소재로 이용될만한 품종들을 수집함.





De PlantenMarkt



GroenRijk



TerraFlair



OBI

그림 216. 유럽 출장 중 방문한 가든센터

## 5. 해외 로열티 관리 체계시스템 구축

현재 우리꽃연구소의 로열티 관리 체계는 아래 그림과 같이 구축되었으며 주요 파트너는 Plantipp (유럽)과 Hakusan (일본)임. 2017년 1월 Plantipp에 28품종을, 2017년 4월 Hakusan에 12품종을 시험재배를 위해 보냈으며 현재 시험재배 중에 있음. 2017년 1월 Armada에도 처음으로 7품종을 시험재배로 보냈으며 시험재배 계약도 완료하였지만 Armada 측에서 일방적인 계약 해지 통보가 있었음. 다시 한 번 신중한 로열티 관리 업체 선정의 중요성을 깨달았으며 계약 전 철저한 조사와 대화가 필요함. 또한 로열티에 대한 보고서를 로열티 관리 회사로부터 받지만 판매량이 제대로 조사되었는지 서브 라이선스 회사

측에서 판매량을 제대로 보고하였는지 알 수 없다는 문제점이 있음.

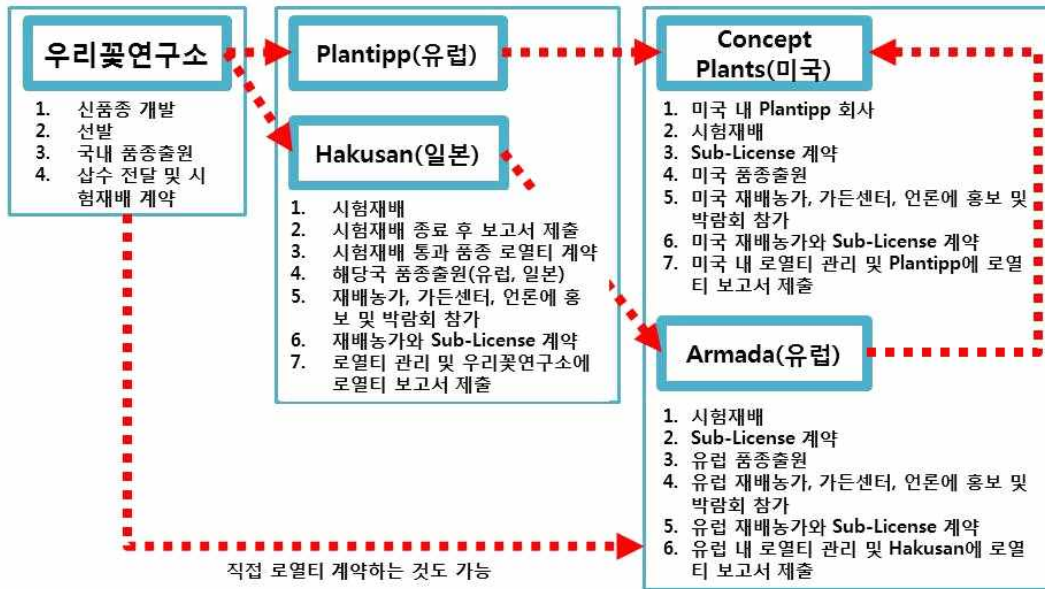


그림 217. 우리꽃연구소 로열티 관리 체계

### 3-6. 연구개발성과

국내외학술지 논문게재 8건, 특허 및 품종보호출원 8건, 기술이전 2건, 국외학술대회 발표 2건, 국내학술대회 발표 7건, 전시회 및 박람회 참가 6건, 홍보실적 5건, 유전자 등록 (NCBI) 9건의 연구개발성과를 도출함.

#### ○ 국내외학술지 논문게재 8건

1. Lee et al, Phenylpropanoids from red kohlrabi sprouts inhibits nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells, Food Science and Biotechnology, 2014, 23(3):965-969
2. Chung et al, Generation of a dwarf Arabidopsis thaliana plant by the suppression of DWF3 gene using RNA interference, 생명자원과학논문집, 2014, 33:67-71
3. Seo et al, Flavonoid glycosides from the flowers of Pulsatilla koreana Nakai, Natural Product Sciences, 2016, 22(1):41-45
4. Baek et al, Phenolic compounds from the leaves of eggplant (Solanum melongena L.), Journal of Applied Biological Chemistry, 2016, 59(2):103-106
5. Lee et al, Triterpenoids from the fruits of Prunus davidiana, Journal of Applied Biological Chemistry, 2016, 59(2):155-158
6. Fu et al, Synergistic effect of pomolic acid inducing apoptosis on doxorubicin-resistant human gastric carcinoma cells, Journal of Oncology and Research Therapy, 2017, J119
7. Fu et al, Human colorectal cancer antigen GA733-2-Fc fused to endoplasmic reticulum retention motif KDEL enhances its immunotherapeutic effects, Journal of Cancer Research and Therapeutics, in press
8. Zhao et al, Developing a dwarf Echinacea purpurea line by suppressing DWF3 expression via RNA interference, Horticultural science & Technology, in press

#### ○ 특허 및 품종보호출원 8건

1. 캄페스테롤 함량이 증가된 형질전환 식물체 (특허등록, 10-1251723, 2013.04.01.)
2. 형질전환 난쟁이 식물체 (특허등록, 10-1262451, 2013.05.02.)
3. 형질전환 난쟁이 식물 (특허출원, 10-2014-0065566, 2014.06.30.)
4. 형질전환 난쟁이 식물 (특허등록, 10-1609923, 2016.03.31.)
5. 레드링 (품종보호출원, 제2016-256호, 2016.04.12.)
6. 엘로우핀 (품종보호출원, 제2016-257호, 2016.04.12.)
7. 미니볼오렌지 (품종보호출원, 2017.09.08.)
8. 골드링 (품종보호출원, 2017.09.08.)

○ 기술이전 2건

1. 형질전환 난쟁이 식물 특허 (10-1609923) 실시 및 형질전환 식물체 개발 노하우 이전 (기술료 660만원, 2017.08.08.)
2. 관상작물 대량번식 방법 (참여기업 자체기술 활용, 2017.08.09.)

○ 국외학술대회 발표 2건

1. Zhao et al, Isolation of DWARF gene in Echinacea purpurea and generation of transgenic plants transformed with DWARF RNA interference construct. 2014 Plant & Animal Genome XXII, San Diego, CA, USA, January 11-15, 2014
2. Zhao et al, Development of ornamental dwarf Echinacea plants using RNA interference technique to down-regulate brassinosteroid-biosynthetic genes, The 13th Asian Congress on Biotechnology (ACB 2017), Khon Kaen, Thailand, July 23-27, 2017.

○ 국내학술대회 발표 7건

1. Zhao et al, Identification and characterization of DWARF in Echinacea purpurea, 2013 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC, Busan, Korea, June 27-29, 2013.
2. Jeong et al, Regeneration conditions depending on explants types in Coreopsis rosea, 2014 Annual Spring Conference of Korean Society for Horticultural Science, Pyeongchang, Korea, May 28-31, 2014
3. Zhao et al, Development of dwarf Echinacea plants using RNA interference construct to suppress the expression of constitutive photomorphogenesis and dwarfism (CPD) gene related to brassinosteroid (BR) biosynthesis. 2014 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC, Busan, Korea, June 19-21, 2014
4. Zhao et al, Down-Regulations of Brassinosteroid (BR) Biosynthetic Genes Leads to a Dwarf Phenotype in Echinacea purpurea, 2015 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC, Pyeongchang, Korea, August 17-19, 2015
5. Zhao et al, Isolation of DWARF4 (steroid 22-alpha-hydroxylase) Gene in Echinacea purpurea and Its Functional Characterization Using Transgenic Arabidopsis Plants, 2016 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC, Jesu, Korea, June 16-18, 2016
6. Zhao et al, Isolation of DET2 (steroid 5-alpha-reductase) gene from Echinacea purpurea and its functional characterization using transgenic Arabidopsis plants, 2017 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC, Busan, Korea,

June 15-17, 2017

7. Kim et al, Development of dwarf *Coreopsis rosea* plants using RNA interference technique to suppress brassinosteroid-biosynthetic genes, 2017 International Symposium and Annual Meeting of the KSABC, Busan, Korea, June 15-17, 2017

○ 전시회 및 박람회 참가 6건

1. IPM 국제원에 박람회 (독일, 2013)
2. IFEX 국제원에 박람회 (일본, 2013)
3. IPM 국제원에 박람회 (독일, 2014)
4. Hakusan Open House 2015 Spring 전시회 (일본, 2015)
5. IPM 국제원에 박람회 (독일, 2016)
6. IPM 국제원에 박람회 (독일, 2017)

○ 홍보실적 5건

1. 국내 신품종 ‘코레우리’ 로얄티 받고 유럽·중동 수출 (한국건설신문, 2014)
2. 왜성화과재 연구재료로 사용되는 우리드림품종 상품 홍보 (우리넷 정기간행물, 2014)
3. 왜성화과재 연구재료로 사용되는 우리드림품종 상품 홍보 (가든인 간행물, 2015)
4. 왜성화과재 연구재료로 사용되는 우리드림품종 상품 홍보 (가든인 간행물, 2016)
5. 우리꽃 품종 소개 및 독일 IPM 국제원에 박람회 소개 (가든인 간행물, 2017)

○ 유전자 (NCBI) 등록 9건

1. *Echinacea purpurea* steroid 23- $\alpha$ -hydroxylase (DWF3) mRNA (KF170019, 2013)
2. *Echinacea purpurea* steroid 5- $\alpha$ -reductase (DET2) mRNA (KJ833769, 2014)
3. *Echinacea purpurea* steroid 22- $\alpha$ -hydroxylase (DWF4) mRNA (KJ833768, 2014)
4. *Echinacea purpurea* 24-methylenesterol C-methyltransferase 2 (SMT2) mRNA (KJ833770, 2014)
5. *Echinacea purpurea* sterol C-24 reductase (DWF1) mRNA (KJ833771, 2014)
6. *Coreopsis rosea* steroid 23- $\alpha$ -hydroxylase (DWF3) mRNA (KX258229, 2016)
7. *Coreopsis rosea* steroid 5- $\alpha$ -reductase (DET2) mRNA (KX258230, 2016)
8. *Coreopsis rosea* steroid 22- $\alpha$ -hydroxylase (DWF4) mRNA (MF163390, 2017)
9. *Coreopsis rosea* 24-methylenesterol C-methyltransferase 2 (SMT2) mRNA (MF163391, 2017)



#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06
4-1. 목표달성도			
구분	평가의 착안점	달성도 (%)	
1차년도 (2012)	<ul style="list-style-type: none"> <li>관상작물 유래 난쟁이 표현형 유전자 1종 (<i>DWF3</i>) 확보</li> <li>재조합 <i>DWF3</i> 단백질 확보 및 활성 측정</li> <li>관상작물 <i>DWF3</i> 유전자 발현 억제용 RNAi 벡터 1종 구축</li> <li>관상작물의 재분화 및 형질전환 체계 확립 (재분화율 10%, 형질전환율 10% 이상)</li> <li>관상작물 <i>DWF3</i> 유전자 발현 억제용 RNAi 벡터시스템을 이용한 관상작물 형질전환</li> <li>1속 3종 이상의 관상용 유전자원의 수집 및 특성 검증</li> <li>국제시장 동향 정보화</li> </ul>	100	100
2차년도 (2013)	<ul style="list-style-type: none"> <li>관상작물 <i>DWF3</i> 유전자가 과발현된 식물체 (식물세포) 확보 및 <i>DWF3</i> 유전자 기능 분석</li> <li>관상작물 유래 난쟁이 표현형 유전자 3종 (<i>DWF3</i>, <i>DWF4</i>, <i>DET2</i>, <i>SMT2</i> 등) 확보, 재조합 <i>DWF4</i>, <i>DET2</i>, <i>SMT2</i> 단백질 확보 및 활성 측정</li> <li>관상작물 <i>DWF3</i> 유전자 발현 억제용 RNAi 벡터시스템을 이용한 관상작물 형질전환체 (10개체 이상) 확보 및 순화</li> <li><i>DWF3</i> 유전자 발현 억제 관상작물 형질전환체의 환경위해성 평가심사서 작성 의뢰 검토</li> <li>1속 3종 이상의 관상용 유전자원의 수집</li> <li>1종 이상 유전자원의 변식 체계 확립</li> </ul>	100	100
3차년도 (2014)	<ul style="list-style-type: none"> <li>관상작물 <i>DWF4</i>, <i>DET2</i>, <i>SMT2</i> 유전자 발현 억제용 RNAi 벡터 3종 구축</li> <li>관상작물 <i>DWF4</i>, <i>DET2</i>, <i>SMT2</i> 유전자가 과발현된 식물체 (식물세포)를 이용한 <i>DWF4</i>, <i>DET2</i>, <i>SMT2</i> 유전자 기능 분석 (50%)</li> <li>관상작물 <i>DWF4</i>, <i>DET2</i>, <i>SMT2</i> 유전자 발현 억제용 RNAi 벡터시스템을 이용한 관상작물 형질전환</li> <li>관상작물 유래 <i>DWF3</i> RNAi 벡터시스템이 형질전환된 난쟁이 형질전환체의 대량 변식 체계 확립</li> </ul>	100	100
4차년도 (2015)	<ul style="list-style-type: none"> <li>관상작물 <i>DWF4</i>, <i>DET2</i>, <i>SMT2</i> 유전자가 과발현된 식물체 (식물세포)를 이용한 <i>DWF4</i>, <i>DET2</i>, <i>SMT2</i> 유전자 기능 분석 (50%)</li> <li><i>DWF3</i> 유전자 발현 억제에 의해 유도되는 난쟁이 관상작물 형질전환체의 유전 분석</li> <li>관상작물 유래 <i>DWF4</i>, <i>DET2</i>, <i>SMT2</i> RNAi 벡터시스템이 형질전환된 난쟁이 관상작물 형질전환체 (각 10개체 이상) 확보 및 순화</li> <li>관상작물 유래 <i>DWF3</i> RNAi 벡터가 형질전환된 난쟁이 관상작물의 실용화 및 상품화 기초연구</li> </ul>	100	100
5차년도 (2016)	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>DWF4</i>, <i>DET2</i>, <i>SMT2</i> 유전자 발현 억제에 의해 유도되는 난쟁이 관상작물 형질전환체의 유전 분석</li> <li><i>DWF4</i>, <i>DET2</i>, <i>SMT2</i> 유전자 발현 억제에 의해 유도되는 난쟁이 관상작물 형질전환체의 환경위해성 평가심사서 작성 의뢰 검토</li> <li>관상작물 유래 <i>DWF4</i>, <i>DET2</i>, <i>SMT2</i> RNAi 벡터시스템이 형질전환된 난쟁이 형질전환체의 대량 변식 체계 확립</li> <li>관상작물 유래 <i>DWF4</i>, <i>DET2</i>, <i>SMT2</i> RNAi 벡터시스템이 형질전환된 난쟁이 관상작물의 실용화 및 상품화 기초연구</li> </ul>	100	100

4-2. 관련분야 기여도

- 본 연구과제에서는 관상식물 *Echinacea*, *Coreopsis*에서 BR 생합성 관련 유전자 *DWF3*, *DWF4*, *DET2*, *SMT2*를 최초로 동정하였고 RNAi 기술을 활용하여 이들 유전자의 발현을 억제시키고 난쟁이 표현형을 지니는 관상식물 *Echinacea*, *Coreopsis*를 최초로 확보하였음.
- *Echinacea*, *Coreopsis* 재분화에 관련된 배지 및 항생제 적정 농도 등의 조건에 대해 연구가 진행된 바 있으나 형질전환 기술 및 재분화 기술 등에 대해 체계적인 연구는 미진함. 본 연구과제에서는 *Echinacea*, *Coreopsis*의 형질전환, 재분화 및 적정 배양 조건 등을 확립하여 관상작물 형질전환 및 재분화 분야에 크게 기여함.
- 본 연구과제에서 BR 생합성관련 유전자를 관상작물에서 확보하고 이들 유전자의 변형 및 결핍에 의한 관상작물 BR 생합성 및 왜소화 연구를 진행하여 분자생물학적 연구가 미진한 관상작물에 대한 연구 발전에 기여함.
- 국내 및 국외시장에서 *Coreopsis* 속에 속하는 여러 품종들이 일본의 (주)하쿠산, 네덜란드의 다윈플랜츠, 미국의 테라노바, 쉐라이징농장 등과 같은 다국적 원예조경회사들에 의해 생산 및 판매가 이루어지고 있음. 하지만 화단용, 분화용으로 왜성화된 작물에 대한 소비자 요구도가 점차 커지고 있어 생명공학 기술로 형질전환된 난쟁이 표현형 관상작물 *Echinacea*, *Coreopsis*는 새로운 시장을 형성하여 국내 화훼 시장의 성장에 기여할 것임.
- 기존의 *Echinacea* 상품은 키가 크고, 잘 쓰러지는 경향이 있어 화단용, 분화용으로 적합하지 못하며 기존의 왜성 *Echinacea*도 현재까지는 키가 60 ~ 70 cm 정도로 분화용으로 크게 적합하지 않고 왜성으로 유통되는 품종임에도 불구하고, 재배환경에 따라 90 ~ 100 cm로 높이가 원종과 같이 복구되어 생장하는 비율이 매우 높음. 따라서 본 과제에서 확보한 난쟁이 표현형 관상작물은 기존의 왜성 작물에 비해 안정적인 왜성화 신품종으로 개발될 것임.
- 본 연구에서 개발한 기술의 국내외 연구개발현황에서 차지하는 수준은 다음과 같음.

개발기술명	관련기술 최고보유국	과제신청시 기술수준		현 기술개발 수준
		우리나라	연구수행팀	
관상식물에서 난쟁이 표현형 유전자 분리 : 브라시노스테로이드의 생합성 및 신호전달관련 돌연변이에 의한 난쟁이 유전자 분리 기술	미국, 일본	20%	80%	100%
장기개화형 관상용 식물의 재분화 및 형질전환 기술 : <i>Eschinacea</i> , <i>Coreopsis</i> 의 재분화 배지, 적정 성장조절제 및 적정 배양조건 등	미국	20%	80%	100%

## 5. 연구결과의 활용계획

	코드번호	D-07
<p>○ 본 과제에서 확보한 난쟁이 표현형 관상작물은 고품종, 고부가가치 특허작물로 증식되어 로열티를 받을 수 있는 수출 작물로 활용될 것임.</p> <p>○ 본 과제에서 확보한 연구 결과물 (난쟁이 표현형 <i>Echinacea</i>, <i>Coreopsis</i> 형질전환체, 해외 수입 식물 자원 등)의 산업화 방안은 다음과 같음.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 난쟁이 표현형 <i>Echinacea</i>, <i>Coreopsis</i> 형질전환체는 환경유해성 평가 후 품종 등록, 대량 생산, 현지 재재험 등을 통해 산업화될 수 있음</li> <li>- 해외 수입 식물 자원은 특성 검증, 육종을 통한 고품종, 고부가가치 작물 개발, 품종 등록, 대량 생산, 현지 재재험 등을 통해 산업화될 수 있음</li> </ul> <p>○ 형질전환된 <i>Echinacea</i>, <i>Coreopsis</i> 등의 난쟁이 식물들은 왜소화됨으로서 더욱 안정화된 조경 및 분화용 작물로 개발되어 수입대체 효과가 있고 해외 수출을 가능하게 할 것임.</p> <p>○ 본 과제에서 확보한 난쟁이 표현형 관상작물은 관상작물의 생합성 기작을 생명공학적으로 억제시킨 형질전환체로서 기존의 왜성 작물에 비해 더욱 안정적인 왜성화 신품종으로 개발되어 기존 왜성 작물시장을 대체할 것으로 기대됨.</p> <p>○ 본 과제의 참여기업인 ‘우리꽃’은 <i>Coreopsis</i> 등의 신품종 개발 및 상품화를 통해 일본, 유럽 등에 수출한 경험을 지니고 있고 본 과제에서 확보한 난쟁이 관상작물의 상품화 및 사업화를 위한 재반 기술을 확보하여 난쟁이 관상작물의 사업화 가능성 매우 큼.</p> <p>○ 국내의 고급화 추세에 맞는 관상식물의 창출로 농가소득의 증대와 조경소재의 다변화를 꾀할 수 있고 로열티 수출국으로 위상을 정립하여 관련 농가들의 큰 희망이 될 것으로 기대됨.</p> <p>○ 본 연구를 통해서 축적된 기술은 여러 식물관련 분야에 광범위하게 활용되어 관련 분야의 발전에 크게 기여할 것임.</p>		

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

		코드번호	D-08
연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황	
Salk Institute (Joanne Chory)	애기장대에서 브라시노 스테로이드 신호 전달 과정의 돌연변이인 <i>bzr1</i> , <i>bin1</i> 유전자와 브라시노 스테로이드 생합성 돌연변이인 <i>det2</i> 유전자의 발견 및 연구	애기장대에서 브라시노 스테로이드 신호 전달과 생합성에 관련된 돌연변이를 발견하고 난쟁이 표현형을 연구하였으나 실질적으로 관상용 식물에 적용하지는 않음	
S.D Clouse and K.A Feldmann	애기장대에서 브라시노 스테로이드 생합성 돌연변이인 <i>dwf5</i> , <i>dwf7</i> , <i>dwf1</i> , <i>dwf4</i> , <i>cpd</i> , <i>dwf8</i> 의 유전자들의 발견 및 난쟁이 표현형 연구	애기장대에서 브라시노 스테로이드 생합성 관련 난쟁이 표현형을 나타내는 돌연변이 유전자들을 찾았으나 실질적으로 관상용 식물에 적용하지는 않음	
Carnegi Institution (Zhiyong Wang)	애기장대에서 브라시노 스테로이드의 신호 전달에 관한 <i>BZR1</i> , <i>BZR2</i> , <i>BAK1</i> , <i>BIN2</i> , <i>BES1</i> 유전자들의 발굴 연구	애기장대에서 브라시노 스테로이드 신호전달과 세포발달 관계 연구만 하고 있음	
나고야 대학 생명농학 연구과 (Kitano Hidemi)	BR합성 유전자를 분리하여 antisense 기법으로 벼에서 발현 억제	왜성 초형을 갖는 도복 저항성 벼 개발	
서울대학교 (최성화)	애기장대에서 브라시노 스테로이드의 대사 및 신호 전달에 결함이 있는 난쟁이 및 키다리 표현형을 보이는 돌연변이의 분리 및 유전학 연구	난쟁이 및 키다리 표현형을 가지는 애기장대를 이용한 유전학적 연구는 하고 있으나 관상용 식물에 적용하지는 않음	

### 7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
일반과제		

### 8. 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

### 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11	
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 연구실내 실험복 착용을 원칙으로 하며 위험발생 요소가 있는 실험을 실시할 경우 적절한 보호구 (장갑, 고글 등)를 착용함.</li> <li>○ 연구실 출입문 (또는 눈에 잘 띄는 곳)에 비상시 비상연락망과 연구책임자, 출입가능 연구원 등의 기록을 표시하며 비상사태에 대비함.</li> <li>○ 연구책임자 및 연구원은 연구실의 출입과 실험을 실시하기 전에 필요한 생물안전 작업 요령 및 생물안전 사고 발생시 응급조치 등에 관한 사항을 사전에 충분히 숙지하고 해당 자료를 연구실에 비치하도록 함.</li> <li>○ 연구책임자는 실험 전에 실험 중 발생할 수 있는 위험요소에 대하여 사전 안전교육 및 정기적인 안전교육을 실시함.</li> <li>○ 연구실내 실험과 무관한 물품의 반입을 하지 않으며 실험구역에서 음식섭취, 식품보존, 흡연 등의 행위를 하지 않도록 함. 또한 연구실의 출입문은 닫아 두며, 허가받지 않은 사람이 임의로 연구실에 출입하지 않도록 함.</li> <li>○ 오염 폐기물은 별도의 안전한 장소 또는 용기에 보관하여 반드시 정해진 절차에 따라 폐기하도록 함.</li> </ul>			



## 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

							코드번호	D-12		
번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)	
1	특허	캄페스테롤 함량이 증가된 형질전환 식물체	경희 대학교		대한민국		2013.04.01			
2	특허	형질전환 난쟁이 식물체	경희 대학교		대한민국		2013.05.02			
3	특허	형질전환 난쟁이 식물	경희 대학교		대한민국		2016.03.31			
4	논문	Developing a dwarf Echinacea purpurea line by suppressing DWF3 expression via RNA interference	경희 대학교	참여 저자	Horticultural Science and Technology	0.365	in press	단독	SCIE	
5	기술 이전	형질전환 난쟁이 식물 특허 (10-1609923) 통상실시 계약	경희 대학교				2017.08.08			

## 11. 기타사항

		코드번호	D-13

## 12. 참고문헌

		코드번호	D-14

#### 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 아니됩니다.