

보안 과제( ), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개( ), 발간등록번호(O)

발간등록번호

11-1543000-002256-01

# 콩의 가뭄저항성 강화를 위한 스트레스 메모리 프라이밍 최종보고서

2018. 04. 10.

주관연구기관 / 서울대학교

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

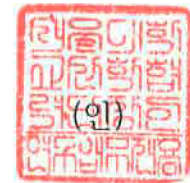
# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “콩의 가뭄저항성 강화를 위한 스트레스 메모리 프라이밍”(개발기간 : 2015.12. ~ 2017.12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 04. 10.

주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단장



주관연구책임자 : 정종주

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라  
보고서 열람에 동의 합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	115080-2	해당단계 연구기간	2015.12.18.- 2017.12.17	단계구분	1 / 1
연구사업명	중사업명				
	세부사업명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	콩의 가뭄저항성 강화를 위한 스트레스 메모리 프라이밍			
연구책임자	정종주	해당단계 참여 연구원 수	총: 6명 내부: 6명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부:160,000천원 민간: 천원 계:160,000천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 6명 내부: 6명 외부: 0명	총연구개발비	정부:160,000천원 민간: 천원 계: 160,000천원
연구기관명 및 소속부서명	서울대학교 식품바이오융합연구소			참여기업명	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
<b>요약</b> ○ 콩의 초기 재배 과정 중 가뭄에 대한 저항성을 인위적으로 유도(priming)하여, 기후변화에 따른 극심한 가뭄조건 하에서 강화된 저항성 형질이 발현되도록 하는 재배 기법을 개발하였다. ○ 프라이밍 처리한 콩 유묘를 특장은실에 이식하고 10회의 반복된 극심 가뭄 조건을 부여한 결과, 성장과 수확량이 무처리구보다 20% 이상 증가 되었다. ○ 180K 마이크로어레이 칩을 제작하고 사용함으로써, 콩의 스트레스 메모리 유전자 502종을 탐색하였다. ○ 실시간유전자증폭 실험을 통하여 콩의 가뭄스트레스 메모리 표지(marker) 유전자 4종을 선정하였다.				보고서 면수	50

## 요 약

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	콩의 초기 재배 과정 중 가뭄에 대한 저항성을 인위적으로 유도(priming)하여, 이때 저항성 유전자 프로모터들의 염색질 구성 상태를 기억(memory)하게 함으로써, 극심한 가뭄조건에서 강화된 저항성 형질이 발현되도록 하는 재배 기법을 개발한다. 그리고 이 과정을 유도하는 스트레스 메모리 유전자를 대량 탐색하고 이들의 프로모터 및 유전자 DNA에 형성되는 염색질재구성 양태를 분석하여 콩의 가뭄 스트레스 메모리 표지(marker) 유전자를 선정한다.					
연구개발성과	모종판에 파종 후 1주일 성장한 콩(대풍콩) 유묘에 4일 간 수분 공급을 중단하는 1차 가뭄조건을 부여하여, 극심한 2차 가뭄상황 하에서 강화된 저항성 형질이 발현되도록 하는 프라이밍 기법을 개발하였다. 한국생명공학연구원 바이오평가센터의 극심 가뭄상황을 모사한 특장은실에서 포장시험을 수행하였다. 6월초 파종하여 7일 성장한 후 1차 가뭄처리 된 유묘를 특장은실에 이식한 후, 2주에 한번 씩 식물 당 1 리터의 수분을 공급하였다. 수확 때까지 약 10회 이상의 극심한 가뭄 조건에 반복적으로 노출됨에 따라, 최종 생장이 정상적 재배의 경우의 50%에 미치지 못하는 25-35 cm에 불과하였고, 종자 형성 빈도가 현저히 낮았으나, 프라이밍 처리구가 무처리 대조구 보다 21% 향상된 수확량을 보였다. 콩 유묘에 1차 가뭄처리를 한 후 발현이 유발되는 유전자들 중, 정상 재배 조건으로 회복되면서 발현이 정지 되었다가, 2차 가뭄스트레스 하에서 폭발적으로 강화된 발현을 보이는 스트레스기억 유전자 502 종을 탐색하였다. 이 유전자들의 발현 수준은 3차 가뭄처리 시 두 번째 앞으로 전달되었다. 마이크로어레이 실험에는 180K 규모의 콩 유전자 DNA chip을 설계, 제작하여 사용하였다. 선발된 유전자들에 대하여 실시간유전자증폭실험(qRT-PCR)으로 발현패턴을 확인하고, 염색질변형 분석(ChIP) 실험을 실시하여 선발된 유전자들의 프로모터 및 유전자 DNA에 형성되는 염색질재구성 양태를 분석하여, 4종의 가뭄 스트레스 메모리 표지(marker) 콩 유전자를 선정하였다.					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	기후변화로 인한 재앙적 가뭄이 도래한 상황에 대비하여, 유묘에 손쉽게 저항성을 부여할 수 있는 기법을 교육과 홍보를 통하여 보급함으로써 실제 농가에서도 손쉽게 시행할 수 있도록 한다. 스트레스 메모리의 마커 유전자들을 저항성 표지로 하여, 파종 후 재배 중인 작물에 대하여 환경스트레스에 대한 저항성을 측정할 수 있다. 본 연구의 결과를 바탕으로 하여 옥수수, 감자 등 다른 발작물들의 가뭄 저항성을 유도하는 기술을 개발해 나갈 수 있다. 우리 자체의 생명공학 기술로 농작물들의 재배효율을 높임으로써, 세계적 기후변화의 재앙 시 국제 곡물시장에서의 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 기대 된다.					
중심어 (5개 이내)	콩	기후변화	가뭄저항성	스트레스 기억	프라이밍	

## < SUMMARY >

		코드번호	D-02			
Purpose& Contents	Goal of this research project is to develop a new strategy to cope with climate changes including severe drought in the future, by priming soybean seedlings with primary stress to technically induce tolerance to continuous drought stresses, and to screen out stress memory marker genes of which the promoter and gene regions are modified by chromatin remodeling for the drought tolerance memory.					
Results	We have developed a priming strategy to enhance drought tolerance of soybean (Daepoong) by expose 7-day-old seedlings to primary drought stress by 4 days of water deprivation. Field experiment in a specially devised green house revealed that the drought-primed soybeans showed higher survival rates and seed yield. In this experiment, soybean seeds were sowed in early June and drought-primed soybean seedlings were transplanted in the green house, and 1 liter of water was supplied every 2 weeks. Soybeans were repeatedly exposed about 10 times of severe drought condition, and thereby were grown to 25-35 cm, which is only 50% of soybeans grown under well-watered condition. Seeds were not well matured, but drought-primed soybean plants revealed 21% higher yield, when compared to non-primed control plants. Through the microarray analysis with newly designed and manufactured 180K-level of DNA chip, totally 502 soybean genes were identified as drought stress memory genes. Their expressions were induced by the primary drought treatment, reduced to basal level upon re-watering, and intensively increased by the second drought stress. Expression level of the genes was propagated into second leaves upon third drought treatment. Through the realtime PCR (qRT-PCR) experiment and chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis for the selected stress memory genes, 4 genes were selected as soybean drought stress memory marker genes.					
Expected Contribution	Farmers can easily applied the newly devised agronomic technology developed through this research project into practical use to enhance the tolerance of soybean seeds without extra expenses or labors. By applying such a strategy to other field crops such as corn and potato, we can overcome adverse agricultural conditions caused by climate changes and thereby cope with upcoming food crisis and thereby increase the international competitive power in the international food markets.					
Keywords	soybean	climate change	drought tolerance	stress memory	priming	

# CONTENTS

1. Outline of the research project .....	7
2. Current status of the related research area .....	10
3. Content and results of the research project .....	12
4. Accomplishments and contributions to the related research area	33
5. Prospective for the future .....	35
6. Overseas information collected during the research period .....	37
7. Security grade of outcome of the research project .....	41
8. Research facilities and equipments registered in the National Science and Technology Information System .....	41
9. Performance record of safety conduct for the research project ...	42
10. Representative achievement of the research project .....	44
11. The other subjects .....	44
12. References .....	45

<Supplement> Self Evaluation Documents

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	7
2. 국내외 기술개발 현황 .....	10
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	12
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	33
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	35
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	37
7. 연구개발성과의 보안등급 .....	41
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	41
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	42
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	44
11. 기타사항 .....	44
12. 참고문헌 .....	45

<별첨> 자체평가의견서

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

코드번호

D-03

## 제 1 절 연구개발 목적

- 콩의 초기 재배 과정 중 가뭄에 대한 저항성을 인위적으로 유도(priming)하여, 이때 저항성 유전자 프로모터들의 염색질 구성 상태를 기억(stress memory)하게 함으로써, 극심한 가뭄조건에서 강화된 저항성 형질이 발현되도록 하는 재배 기법을 개발한다. 그리고 이 과정을 유도하는 스트레스 메모리 유전자를 대량 탐색하고, 이들의 프로모터 및 유전자 DNA에 형성되는 염색질재구성 양태를 분석하여 스트레스 메모리 표지(marker) 유전자를 선정한다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

- 지구온난화로 인하여 세계 평균온도가 19세기 후반의 평균치보다 1.02도 높아졌다고 영국 기상청이 밝혔다. 이 추세를 감안하여 기상 예측 전문가들은 2060년경 지구 평균기온이 약 4도 상승할 것으로 전망하고 있다. 전문가들은 지구 평균기온이 2도 이상 상승하면 여름철 폭염으로 유럽에서만 수만 명이 사망하고 전 세계 생물의 3분의 1이 멸종위기에 내몰릴 것으로 예상하고 있다. 특히 불규칙한 강수로 인한 농작물에 대한 가뭄의 피해가 가장 클 것으로 예측된다.
- 이에 따라 현재의 적응력으로는 버틸 수 없을 만큼 강력한 농업환경의 재앙이 도래할 것을 우려하고 있다. 기후변화에 따른 작물재배 환경의 파괴는 우리나라 뿐 만 아니라 세계적인 추세로서, 긴박하게 해결책을 모색해야 하는 중대 과제로 부상하고 있다.
- 안전행정부 국립재난안전연구원의 발표에 의하면, 2020년대에 폭염이 한 달 이상 지속되는 이상고온현상이 발생하여, 장마철 무(無)강수일의 지속과 함께 일조량 증가로 ‘이른 폭염과 마른장마’의 비정상적인 패턴이 발생할 가능성이 증가하고 있다고 한다. 2030년경에는 세계적으로 심각한 식량위기가 도래할 것으로 예측되고 있다. 세계적 식량위기가 도래하면 각국은 식량 확보에 전력을 다 하게 되고, 이에 따라 무역 곡물가가 급증하게 될 것이다.
- 콩, 옥수수, 감자 등 밭작물의 경우에는, 약한 가뭄에도 생장에 치명적인 피해를 입게 된다. 벼의 경우에는 장시간 가뭄이 지속되어 토양의 수분이 완전히 사라질 때 비로소 피해가 일어날 수 있지만, 밭작물의 경우에는 정상 기후 하에서도 재배기간 중 강수가 일정 간격으로 공급되지 않기 때문에 주기적인 저수분 및 이에 수반하는 고염분 토양의 상황을 피할 수 없게 된다.
- 콩은 식물로서는 단백질과 지방의 독보적인 영양공급원이며, 특히 우리나라에서는 장류, 두부, 콩나물 등 다양한 식품, 그리고 사료 및 기타 산업재료로 널리 이용되고 있는 중요 식량작물이다. 그러므로 기후변화의 결과로 세계적 식량위기가 오면 가장 큰 타격이 예



상되는 작물이다.

- 전국 콩 생산량은 가격 불안정, 가공업체의 수입 콩 선호, 기타 곡물 소비확대 등으로 최근 10년간 7.0%씩 감소하고 있다(경기농업 FOCUS, 2017.03.). 2017년 국내 콩 생산량은 7.6만 톤이 될 것으로 예상하고 있다(농업관측 2017년 11월호, 한국농촌경제연구원). 국산 콩 평균 도매가격(상품기준) 평균 4,947원/kg으로 계산할 때 연간 총생산은 3,800억 원에 해당한다.
- 2017년도 수입량은 식용 콩이 28.7만 톤으로서, 식용 콩의 자급률이 21%에 미치지 못하고 있는 실정이다. 이에 더하여 2016년 식품용 유전자변형(GM, genetically modified) 콩의 수입량이 98.2만 톤(3.98억 달러)에 달하고 있다.
- 국내의 작물 가뭄저항성에 관한 연구는 주로 벼에 집중되어 왔다. 작물의 후성유전에 관한 국내의 연구가 주로 발달과정, 종자발달 과정을 대상으로 한 연구였으며, 가뭄 등 스트레스 저항성의 후성유전에 관한 연구는 없었다.
- 최근 생명공학 기법을 이용하여 유전자변형 작물(콩, 옥수수, 카놀라, 목화 등) 품종을 개발하는 연구가 세계적으로 활발히 진행되고 있다. 현재 재배 유통되고 있는 GM작물들을 형질 별로 보면 주로 제초제 저항성과 해충저항성 작물들이며, 환경 스트레스 저항성 작물이 상품화된 바는 현재까지 그 사례를 찾을 수 없다. 그리고 GM작물은 인체 및 환경 안전성 문제로 인하여 식품으로서 소비자들의 강한 거부감이 이미 현실적인 문제로 대두되어 있다. 그러므로 장시간을 요하고 미래가 불투명한 GM작물의 개발보다는 악천후 조건에서도 작물의 재배효율을 높일 수 있는 새로운 농생명공학적인 기법을 개발하는 일련의 연구가 필요하다.

### 제 3 절 연구개발 범위

- 식물들이 최초의 스트레스를 기억하여 동종의 스트레스에 대하여 강화된 저항성을 보이는 현상(stress memory)을 주요 발작물인 콩에 적용하여, 극심한 가뭄조건에서 강화된 저항성 형질이 발현되도록 미리 유도(priming)하는 기법을 개발한다.
- 연구대상 콩은 현재 국내에서 널리 재배 유통하고 있는 상품성 품종을 가지고 실험을 진행하여 결과를 농가 수준에서 쉽게 활용할 수 있도록 한다. 국립종자원에서 전국 보급용으로 2015년 가을에 수확한 콩 종자를 획득하여 사용한다. 대원, 대풍, 황금, 태광, 우람 등을 우선 고려하여 재배특성을 비교, 검토하고, 한 품종을 선택하여 실험에 착수한다.
- 1년차 연구에서는 콩의 유묘(seedlings)에 스트레스 메모리를 유도하기 위하여 스트레스(가뭄)의 시기, 강도 등을 달리하여 처리하고, 이 때 획득된 저항성이 이후 재배 과정까지 충분히 전달되도록 하는 조건을 확립한다. 이후 가뭄조건을 부여하여 각 생장시기 별로 저항성을 비교한다.
- 프라이밍 방법을 최대한 단순화하여 농가에서도 손쉽게 이행할 수 있도록 한다. 32-50구 묘판에 1종자/1구씩 파종하고 묘판을 급수판에 넣어 수분을 상향으로 공급하면서 발아, 생장 시킨다. 스트레스 메모리를 유도(priming)하기 위하여, 파종 후 5-7일 생장한 식물

을 대상으로 하여 급수를 중단한다(급수관 제거). 각 처리구를 각각 2-4일 간 방치하여 토양을 건조시킨 후, 식물뿌리가 포함된 토양덩이를 온실의 화분, 일반포장(밭), 그리고 극심한 가뭄조건을 실현할 수 있는 특장온실에 각각 옮겨 심고 급수를 재개 한다.

- 특장온실 포장시험은 충청북도 청주시 오창읍에 소재한 한국생명공학연구원 바이오평가센터에서 수행한다. 이 온실은 주변 보다 1 m 높아 측면에서 유입되는 수분공급을 차단할 수 있고, 우천 시 지붕이 자동개폐 되며, 물관을 통하여 각 식물체에 일정시간, 일정량의 수분을 공급할 수 있도록 제작되어 있다.
- 콩 파종 적기에 맞추어 6월초 파종 후 1차 가뭄처리 된 유묘를 특장온실에 이식한 후, 최소한의 수분을 공급하도록 한다.
- 각 처리구 별로 콩 식물의 성장 특성 및 종자의 최종 수확량을 측정한다. 결과를 종합하여 가뭄저항성 스트레스 메모리 반응을 특이적(specific)으로 유도(priming)하면서 동시에 최대화할 수 있는 조건을 확정한다.
- 가뭄 프라이밍 처리에 의하여 발현이 강화되어, 정상 재배조건으로 회복된 후에도 그 발현이 지속되는 콩 유전자들을 마이크로어레이(microarray)로 대량 탐색한다.
- 콩 유전체 전체 염기서열 정보(Phytozome; [www.phytozome.net](http://www.phytozome.net))를 이용하여 microarray (DNA chip)를 제작한다. 콩 유전체 1.1 Gb 중 분석이 완료된 950 Mb로부터 46,430개의 유전자가 예단(prediction) 되어 있다. 설계한 chip을 Agilent사에 custom microarray로서 제작 의뢰하도록 한다. Agilent array는 60 bp의 probe oligomer를 슬라이드 위에 유기합성하는 방식을 사용한다. Array를 4 x 180K로 만들 경우, 각 array 당 oligomer (probe) 180,000개를 합성 결합시킬 수 있으며, 각 슬라이드(chip) 당 4개의 array를 가지게 되어 4개의 각기 다른 시료를 동시에 분석할 수 있다.
- 기억 유전자로 선정된 10여 종 이상 유전자의 발현 패턴을 실시간유전자증폭(qRT-PCR) 실험을 수행하여 분석하고, 실험의 결과를 바탕으로 가뭄 스트레스 기억 표지(marker) 유전자 4 종을 선발한다한다. 각 유전자들의 프로모터에 형성되는 히스톤 변형 등 염색질 재구성 양태를 분석한다.
- 염색질변형 분석에는 이 분야 연구과제를 수행한 경험과 기 확보 되어 있는 관련 실험기재를 활용한다. 식물조직을 formaldehyde로 진공투과하고, 이로부터 세포추출액을 만든다. 유전체 DNA를 초음파로 shearing 함으로써 절편화한 후, 변형히스톤(H3K4me3, RNAPol II 등) 항체(antibody)를 가지고 침전을 시행한다. 침전한 DNA fragment들을 연구대상 유전자 프로모터 및 유전자 염기서열로 부터 design한 primer를 가지고 분석대상 DNA들을 PCR로 증폭한다. Histone modification assay에 사용할 변형히스톤들에 대한 항체는 상업적으로 쉽게 구할 수 있다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04
------	------

### 제 1 절 식물의 가뭄저항성에 대한 연구 현황

- 가뭄에 대한 식물의 저항성 메카니즘에 관한 연구가 오래 전부터 진행되어 왔다. 콩에 있어서도 저항성의 유발 전사인자(transcription factors)로서 DREB (drought response element binding protein), AREB (ABA-responsive element binding protein)을 위시하여 많은 MYB, NAC, bZIP, bHLH 계열의 전사인자가 발견되었다(Thao and Tran, 2012).
- 생물의 형질(traits)과 반응(responses)을 결정하는 유전자(gene)들은 세포 내의 염색체(chromosome)에 존재하는 유전체 DNA에 구성되어 있다. 유전체 DNA는 히스톤(histone)이라는 단백질들과 결합하여 염색질(chromatin)을 형성하고 있다.
- 유전자가 발현될 때 전사인자 등 발현조절 단백질들이 각 유전자 프로모터에 결합하면서 DNA 메틸화(methylation), 히스톤변형(histone modification) 등 염색질 재구성(chromatin remodeling)이 수반된다. 애기장대, 담배 등 연구모델 식물들을 대상으로 수행한 연구들을 통하여, 가뭄(drought), 염해(salinity), 고온(heat) 및 냉온(coldness) 등 스트레스 상황에서 매우 역동적인 염색질 재구성이 관찰되었다(Kim et al, 2015). 콩에 관련하여, 염색질재구성에 관여하는 히스톤 변형인자로서 24개의 histone deacetylases, 14개의 histone acetyltransferases 등이 발견되었다(Liew et al, 2013).
- 외부 자극이나 환경변화에 적응하는 과정을 경험한 식물체가 이 후 동일한 자극 및 환경에 대하여 더 큰 저항성을 가지는 현상이 관찰되었다(Kinoshita and Seki, 2014). 일반적으로 ‘stress memory’라는 용어를 쓰며, 최초 자극으로 저항성을 부여하는 과정을 ‘프라이밍(priming)’이라고 부른다. 병저항성의 경우 ‘defense priming’이라는 용어를 사용하며, 종피가 딱딱한 씨앗을 물에 침지하여 부푼 상태로 만들거나 약품을 녹인 용액 등에 침지하여 과중함으로써 발아율을 높이거나 기타 형질을 부여하는 기법을 종자 프라이밍(seed priming)이라 한다.
- 스트레스 메모리(stress memory)는 식물이 외부 자극이나 환경변화에 적응하는 과정에서 발현된 저항성 유전자 DNA에 염색질재구성 상태가 그 자극/변화가 없어진 후에도 계속 유지되어 있다가, 동일한 자극 및 환경에 대하여 더 신속하고 강도 높게 유전자를 발현시키는 것을 원리로 한다(Ding Y et al, 2012). 염색질 상태 및 유전자 발현을 유지함으로써 스트레스를 기억하게 하는 유전자들을 memory (epigenetic) markers라 한다(Avramova, 2015). 애기장대에서 1,963개(Ding et al, 2013), 옥수수에서 816개의 (Ding et al, 2014) 가뭄 스트레스 stress memory marker 유전자가 탐색되었다.

### 제 2 절 국내의 가뭄저항성 연구

- 국내에서 가뭄저항성 작물의 개발에 관한 연구는 주로 벼에 집중되어 왔다. 본 연구실에

서는 가뭄/염해 저항성 유전자변형 콩 및 벼 식물체를 개발하였다(Seo et al, 2012; Joo et al. 2017).

- 발달과정에서 획득된 형질 또는 stress memory가 감수분열(또는 일부 체세포분열)을 통하여 후대(next generation)으로 후성유전(epigenetic inheritance) 될 수 있다. 이 분야에 관한 국내의 연구는 주로 응용분야로서, 종자 및 뿌리혹 발달과정을 대상으로 한 연구들이며, 배추과 작물의 탈메틸화, RNA 결합단백질과 micro RNA의 기능에 관련한 연구가 진행되고 있다. 그러나 기후변화에 대응하여, 환경스트레스 등 외부 자극에 의하여 획득된 저항성 형질의 stress memory 또는 후성유전 메커니즘을 응용하는 연구는 수행된 바 없었다.

### 제 3 절 스트레스 메모리 응용 연구의 전망

- 현재에는 애기장대 등 연구모델 식물을 가지고 외부 환경스트레스의 종류, 강도, 반복, 간격 등에 의한 발현 유전자들을 profiling하고, 염색질 재구성 양태를 분석하여, 이에 관련하는 인자(factor)들을 발굴하는 연구가 활발히 진행 되고 있다(Avramova, 2015). 이를 통하여 이 때 획득된 형질이 후대에 전달되는 stress memory 및 후성유전의 메커니즘을 밝히기 위한 연구가 경쟁적으로 진행될 전망이다.
- Stress memory 및 후성유전의 기초적 원리를 연구하고, 이를 농업에 응용하고자 하는 연구가 일부 진행되기 시작하였다(Springer, 2012). 예를 들어, 환경스트레스 저항성에 관련하여, 콩(soybean)에 염분(salt)을 처리하고 이때 전사인자 유전자 프로모터에 발생하는 DNA 메틸화 및 히스톤 메틸화를 분석한 바 있다(Song et al, 2012).
- 최근에 발표된 바, 외부 스트레스 조건의 강도(strength)에 따라 이때 발현이 조절되는 유전자들의 패턴이 각기 다르게 나타났다(Clauw et al, 2016). 그러므로 식물체가 외부 환경스트레스의 종류, 강도, 반복, 간격 등에 의하여 각기 다른 세포 반응을 가질 수 있으며 이에 관련한 stress memory에 관련하여서도 발현유전자의 종류, 염색질 재구성 상태, 안정성 등에 대하여 다각적인 양상을 보일 수 있다는 추론이 가능하다.
- 가뭄 스트레스 기억 유전자(stress memory genes)로 탐색된 애기장대 유전자 중에는 29종(8%)의 저항성 유발 전사인자에 더하여, 3%에 해당하는 12개의 dehydrin (LEA; Late Embryogenesis Abundant proteins)이 발견되었다(Ding et al, 2013). Dehydrin들은 충분히 수분이 유지되는 상태에서는 무정형 단백질의 형태로 존재하다가 건조상태에서는 주로  $\alpha$ -helix 구조를 가지는 정형상태로 변환 된다는 사실이 알려져 있다. 그러나 dehydrin들의 이러한 성질이 어떻게 저항성 반응에 있어서 이들의 역할이 무엇인지를 밝히기 위한 연구가 세계 여러 연구실에서 진행 중이다.
- 최근 감자(potato)를 가지고 가뭄 stress memory를 유도하여 저항성을 강화함으로써 priming 하지 않은 대조구에 비하여 품종별로 11.9-20.1% 높은 수확량을 얻었다는 보고가 있었다(Ramírez et al, 2015). 향후 다른 작물들에 대하여 유사한 연구결과가 경쟁적으로 발표될 것으로 전망 된다.

### 제 3 장 연구수행 내용 및 결과

		코드번호	D-05
--	--	------	------

#### 제 1 절 실험대상 콩 품종 선발

##### 1. 국내 보급종 콩 종자의 수집

연구 대상 콩은 현재 국내에서 널리 재배 유통하고 있는 상품성 품종을 가지고 실험을 진행하여 결과를 단시간 내에 활용할 수 있도록 하였다. 국립종자원에서 전국 보급용으로 2015년 가을에 수확한 대풍, 태광, 대원, 우람콩을 국립종자원으로부터 각각 5 kg씩 구입하였다. 2015년 수확한 황금콩은 한국생명공학연구원 바이오평가센터 정순천 박사로부터 획득하였다.

국내에서 개발하여 현재 농가에서 활발히 재배하여 유통 중인 각 품종의 특성 및 정보를 인터넷 검색, 보고서 등을 통하여 수집하였다(표 1-1). 주로 농촌진흥청 및 국립종자원에서 정리하여 배포한 자료들이었다.

표 1-1. 보급종 콩 품종들의 재배 특성

		대원	태광	황금	우람	대풍
100립중	g	25.6	25.3	25.0	25.8	20.7
수량	kg/10a	273	266	206	327	326
경장	cm	78	75	50	79	56
성숙기	월.일.	10.10.	10.5.	10.2.	10.9	10.8.

자료: 국립종자원, 농촌진흥청 국립식량과학원

현재 전국에 가장 많이 보급하고 있는 대원콩은 성숙기가 10월 상순인 만생종이며 키는 78 cm, 100립중은 25.6 g, 생산량은 10a 당 273 kg 정도다. 현장평가 농가의 반응을 보면, 대원콩은 불마름병에 약하고 콩알의 크기가 작은 것이 가장 큰 문제점으로 지적되고 있어 이를 대체할 새로운 품종의 개발이 요구되어 왔다.

대원콩의 대안으로 2010년 개발되어 2014년부터 보급하기 시작한 우람콩은 기계화 작업이 용이하게 개발된 품종으로 첫 꼬투리가 달리는 위치가 19 cm로 높아 콤바인 수확 시 손실되는 콩을 줄일 수 있으며 생산량은 10a 당 327 kg 정도다. 병에 강하고 다수성 품종으로 알려져 있다.

본 연구의 초점이 극심한 가뭄 하에서 최대 수량을 수확할 수 있는 기술을 개발하는데 있으므로, 수량성에 가장 주목하였는데, 우람과 대풍콩이 320 kg/10a를 넘는 것으로 조사되었다. 대풍콩의 특징은 아래에 별도로 정리하였다.

## 2. 보급종 콩 품종 별 가뭄저항성 비교

수집한 5종의 보급종 콩들을 가지고 가뭄 저항성을 시험해 보았다. 50구 짜리 모종판에 원예상토와 모래를 1:1로 섞어 채워 놓고 각 품종의 콩 종자를 파종한 후 1주일간 재배하였다. 식물의 재배에는 본 연구소(서울대학교 203동, 농생명공학연구동) 건물 5층에 시설되어 있는 온실을 사용하였다.

첫 잎이 수평으로 펴지기 시작하는 시점에서 물이 들어 있는 수분공급용 받침판을 제거하였다. 3일 및 4일 후 성장상태를 비교하여 보았다. 육안으로 관찰한 바에 의하면, 품종간의 가뭄 저항성이 크게 차이가 나지는 않았으나, 대풍콩과 태광콩이 비교적 높은 저항성을 보이는 것으로 판단되었다(그림 1-1). 수량성과 가뭄저항성을 기준으로 하여 대풍콩을 본 연구의 실험대상 콩 품종으로 선정하였다.

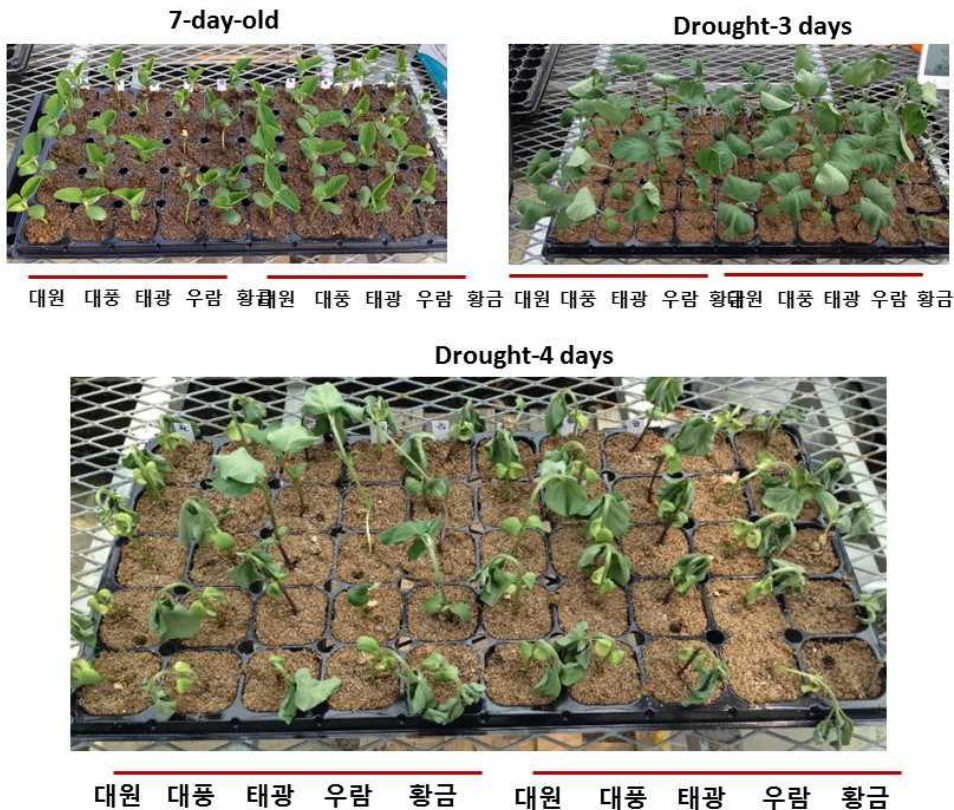


그림 1-1. 보급종 콩 품종의 가뭄저항성 비교.

## 제 2 절 콩 유묘의 가뭄저항성 priming 처리

콩 유묘의 가뭄저항성을 유도(priming) 하기 위하여, 모종판 크기, 토양조성, 수분공급 및 중단의 시기, 2차가뭄 부여 시기, 가뭄저항성 측정방법 등을 조사하였다. 여러 가지 조건에서 실험을 진행하고 그 결과를 비교하면서 다음과 같이 각 단계를 완성하였다. 식물의 재



배에는 본 연구소(서울대학교 203동, 농생명공학연구동) 건물 5층에 시설되어 있는 온실을 사용하였다.



그림 2-1. 대풍콩의 가뭄저항성 프라이밍

토양 중 수분함량은 Takemura electric Works, Ltd에서 제작한 토양수분측정기(모델 DM-18)를 사용하여 측정하였다. 엽록소 파괴 정도를 기준으로 가뭄에 대한 저항성을 측정하기 위하여 녹색도를 측정하였으나, 콩의 경우 잎이 시들면서 거의 변색 정도가 확인하지 않았다. 잎이 시들 때(wilting) 육안으로 식별하는 것이 가장 좋을 것으로 판단되었다. (그림 2-1). 확인한 대풍콩의 프라이밍 방법은 아래와 같다.

- 가. 토양은 원예상토(바로커, ㈜서울바이오)와 세척모래를 각각 4리터씩, 그리고 물 1.2리터와 함께 혼합하여 고르게 섞어 준다.
- 나. 50구 모종판에 토양을 넣고 복판에 1.5 cm 깊이, 지름 0.5 cm의 홈을 만든 후 1종자/1구씩 파종하고, 급수판(받침판)에 물을 넣지 않은 채로 온실에서 발아 시킨다. 파종 후 3일 후(+3d) 급수판에 물을 가득 공급한다. 이로써 수분을 상향으로 공급하면서 식물의 재배를 촉진한다.
- 다. 파종 7일 경(+7d)에 급수판에서 수분을 제거함으로써 1차 가뭄처리(프라이밍)를 시

작한다. 이 때 콩 유묘는 첫 잎(primary leaf)이 만개하기 시작하는 시점이다.  
 마. 가뭄처리 개시 4일 후(+11d) 프라이밍을 멈춘다. 첫 잎을 수확하여 액체 질소로 급  
 냉하고 -70°C 냉동고에 보관함으로써 시료를 채취한다(D1 및 무처리구 W1). 이  
 후 급수관에 수분을 공급함으로써 콩 유묘들을 가뭄조건에서 회복시킨 후, 계속  
 가뭄저항성 시험을 시행하거나 포장에 이식하여 재배를 계속한다.

### 제 3 절 프라이밍 처리 콩 식물체의 가뭄저항성 시험

#### 1. 일반 온실 시험

프라이밍 처리된 대풍콩의 가뭄저항성 시험을 본 연구소(서울대학교 203동, 농생명공  
 학연구동) 건물 5층에 시설되어 있는 온실에서 수행하였다. 가뭄 프라이밍 처리구(D1)와 무  
 처리 대조구(W1) 식물체(+11d) 각각 6 개씩을 바닥에 지름 2.5 cm의 배수구가 있는 화분  
 (25 cmD)에 옮겨 심고 온실에서 생장을 진행시켰다. 이 때 토양의 조성은 종자 파종 시와  
 동일하게 하여 이식 당시에는 일정량의 수분을 함유하고 있었다. 이 후 수분을 일체 공급하  
 지 않았다.

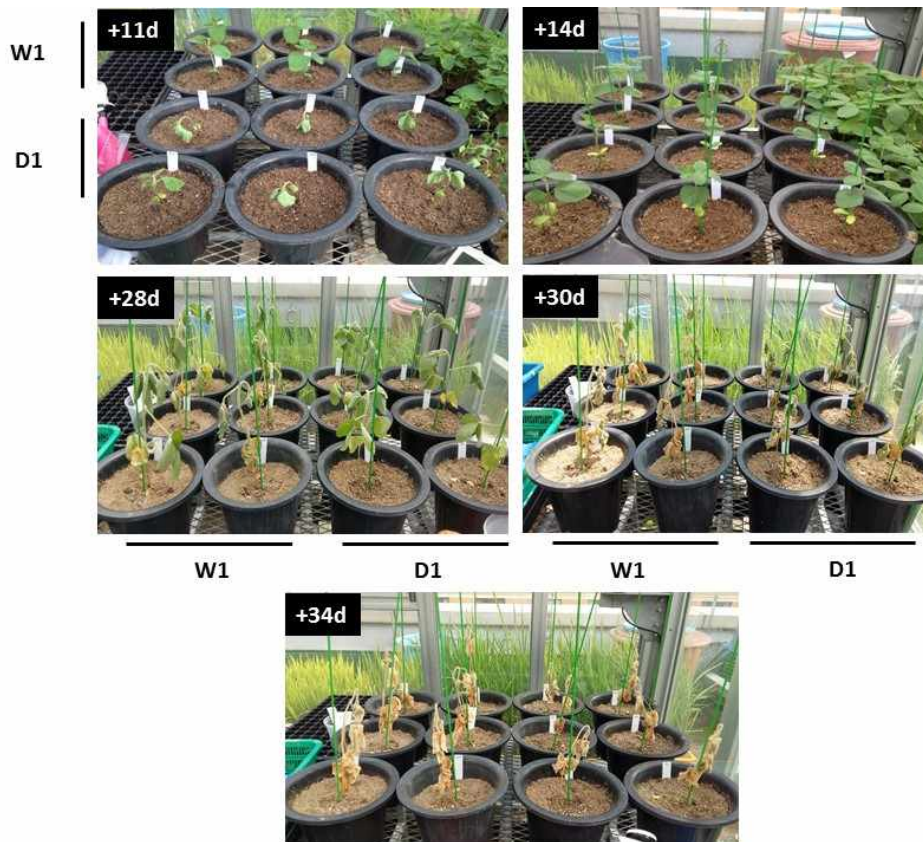


그림 3-1. 프라이밍 처리 대풍콩의 가뭄저항성 (온실 화분 실험)



이식 당시(+11d)에는 그림 3-1에서 보는 바와 같이 전장이 처리구가 상대적으로 매우 작았다. 그러나 이식 수 시간 내에 시들음이 회복되었고, 3일 후(+14d)에는 대조구와의 차이를 좁혀 외관이 거의 유사하였다. 화분이 모종판 보다 큰 관계로 토양 중의 수분 함량이 점진적으로 낮아져 이식 17일 후(+28d)에 이르러 서야 식물 상태의 차이 식별이 가능하였다. 19일 후(+30d)에는 대조구 무처리구는 모두 시들어 버린데 비하여, 가뭄 프라이밍 처리구는 녹색도를 4일간 더 유지하면서 시드는 속도가 확연히 낮았다. 이식 23일 후(+34d)에는 모두 시들었으며, 이때의 화분 토양 9 cm 깊이의 수분은 38-40% 수준이었다.

## 2. 일반 포장(밭) 시험

일반 포장 재배시험은 충청북도 청주시 오창읍 한국생명공학연구원 바이오평가센터의 포장(밭)에서 실시하였다. 가뭄 프라이밍 처리구(D1) 36주와 무처리 대조구(W1) 22주의 유묘에 하루 간 수분을 공급하여 회복시키고(+12d), 각각 2 그룹으로 나누어 미리 조성한 토양에 옮겨 심었다(2017년 6월 21일). 재배 중 잡초들을 제거할 목적으로 7월과 8월 중 농약을 2회 살포하였다.

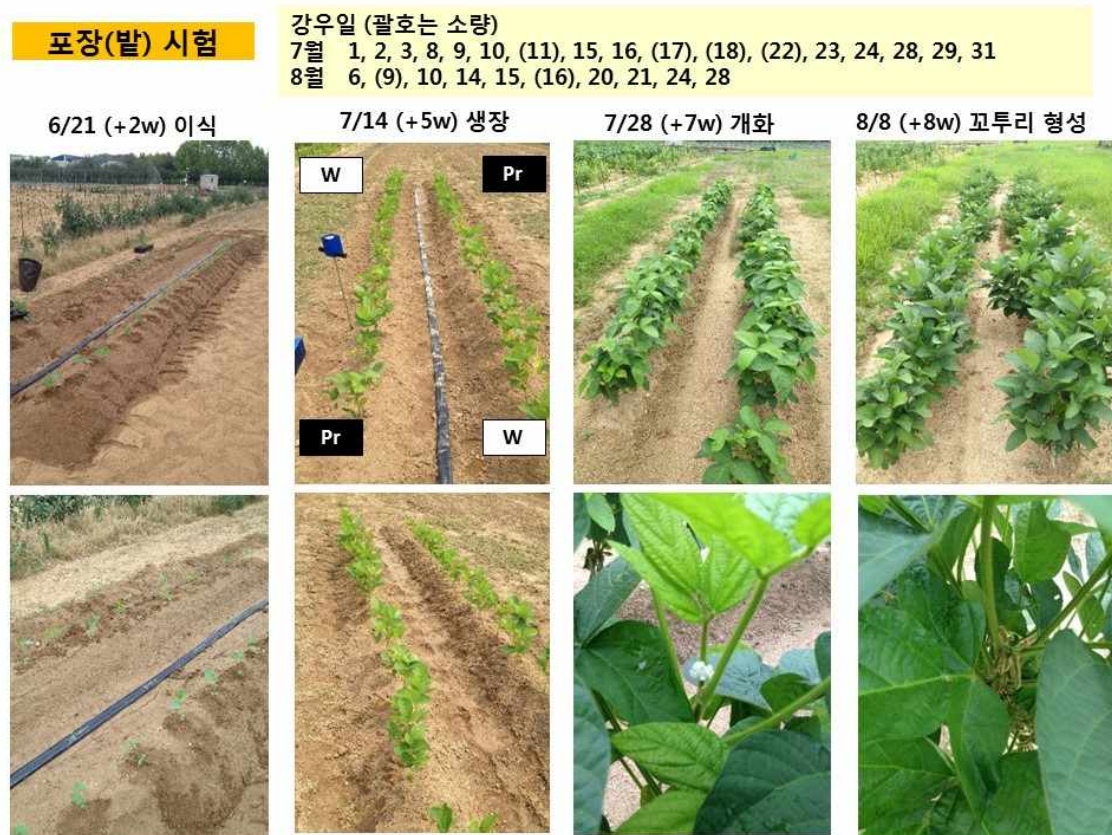


그림 3-2a 프라이밍 대풍콩의 포장(밭) 재배

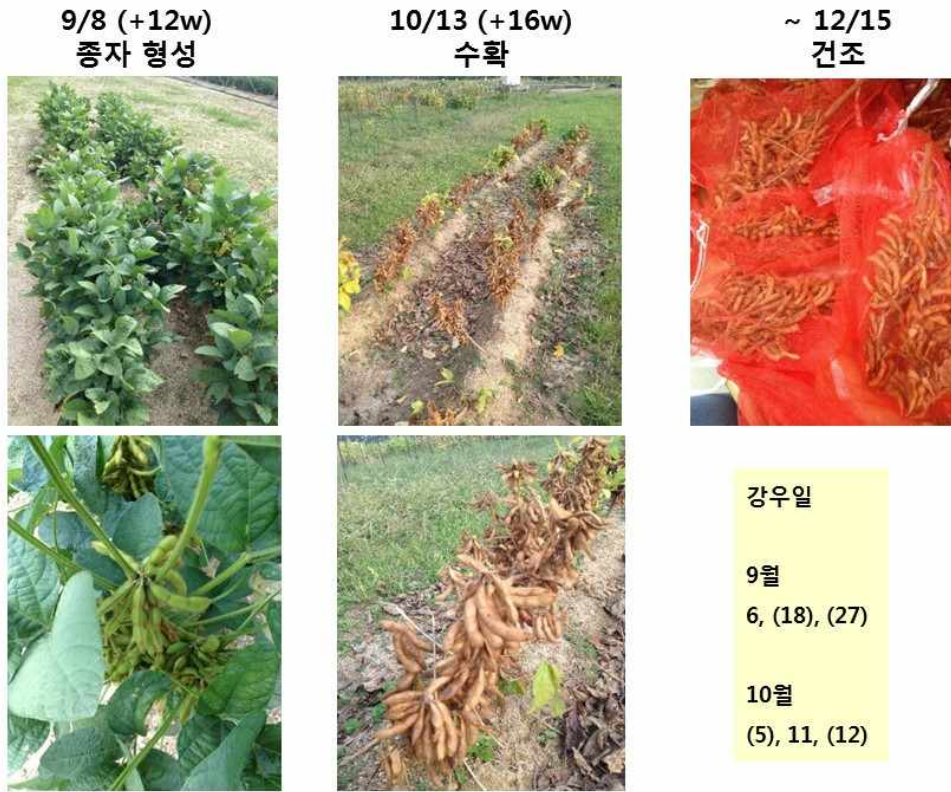


그림 3-2b 프라이밍 대풍콩의 포장(밭) 재배 및 수확

이식 당시에는 토양에 충분한 수분을 공급하였으나, 이후 인위적인 수분 공급은 일체 없이 천연적 강우에 만 의존하였다. 이는 재배하는 콩 식물체에 자연적 가뭄 상황을 부여하기 위함이었다. 그러나 이식 후 7월초부터 장마가 시작되어 수확 때까지 수분이 고르게 공급됨으로써 매우 양호한 재배조건이 조성되었다.

이식 당시 W1과 D1 식물체의 경장은 각각  $17.7 \pm 1.5$  및  $16.2 \pm 1.4$  cm였으나 이식 3주인 7월 14일에는  $34.2 \pm 3.1$  및  $34.0 \pm 3.4$  cm로서 거의 동일한 수준으로 성장하였다. 이 후 포장에서는 생장 중인 무처리 대조구(W1)와 가뭄 프라이밍 처리구(D1) 간에 유의성 있는 차이를 보이지 않았다(그림 3-2). 수확량에 있어서도 유의성 있는 차이를 관찰하지 못하였다(표 3-1). 그러나 프라이밍 실시로 인한 생장 및 수확량 감소는 없었으며, 이 결과로서 정상기후 하에서도 프라이밍 처리로 인한 손실 피해는 없을 것을 확인하였다.

표 3-1. 프라이밍 처리 대풍콩의 포장(밭) 재배 및 수확 특성

	경장 (cm)	꼬투리 수 (ea/plant)	종자 (ea/plant)
W1	$48.2 \pm 5.6$	$193.6 \pm 26.2$	$84.2 \pm 17.4$
D1 (primed)	$47.4 \pm 6.6$	$217.2 \pm 32.0$	$86.4 \pm 18.6$

### 3. 특장은실 시험

특장은실 시험은 충청북도 청주시 오창읍 한국생명공학연구원 바이오평가센터의 포장에서 실시하였다. 이 온실은 주변 보다 1 m 높아 측면에서 유입되는 수분공급을 차단할 수 있고, 우천 시 지붕이 자동개폐되며, 정교하게 제작된 물관을 통하여 각 식물체에 일정시간, 일정량의 수분을 공급할 수 있도록 제작되었다(그림 3-3).

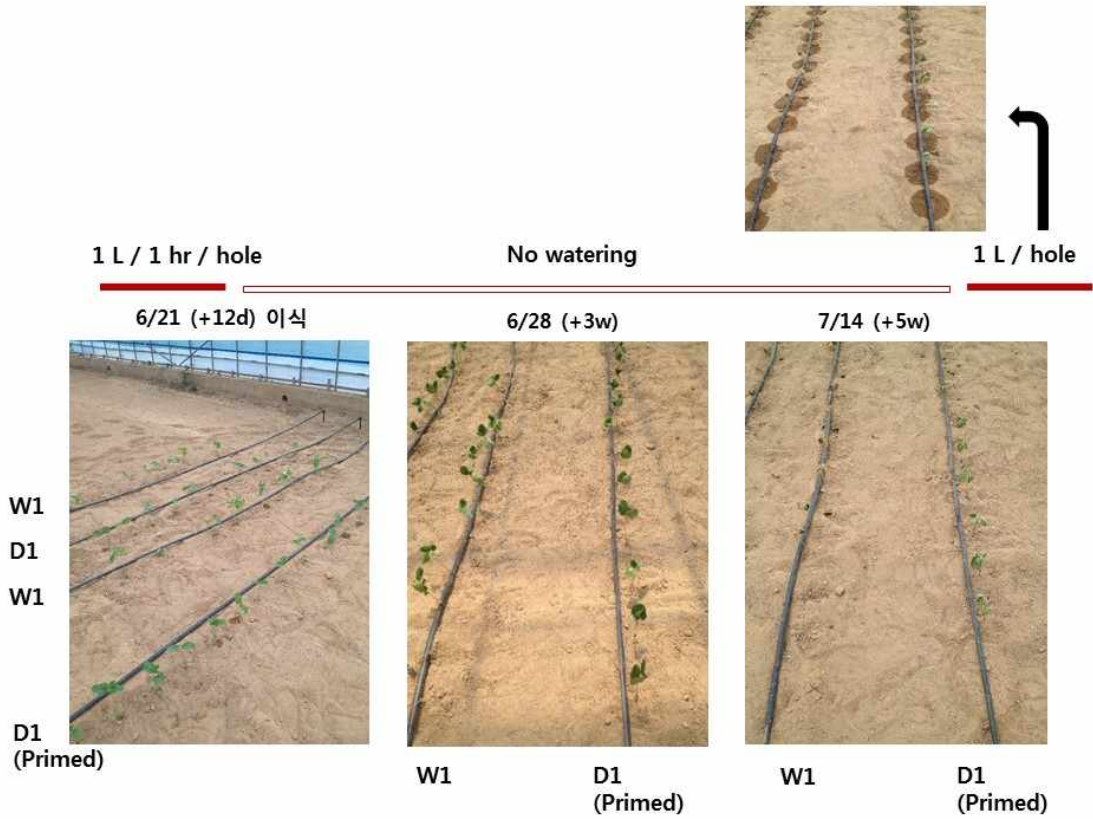


그림 3-3. 특장은실의 외관 및 내부

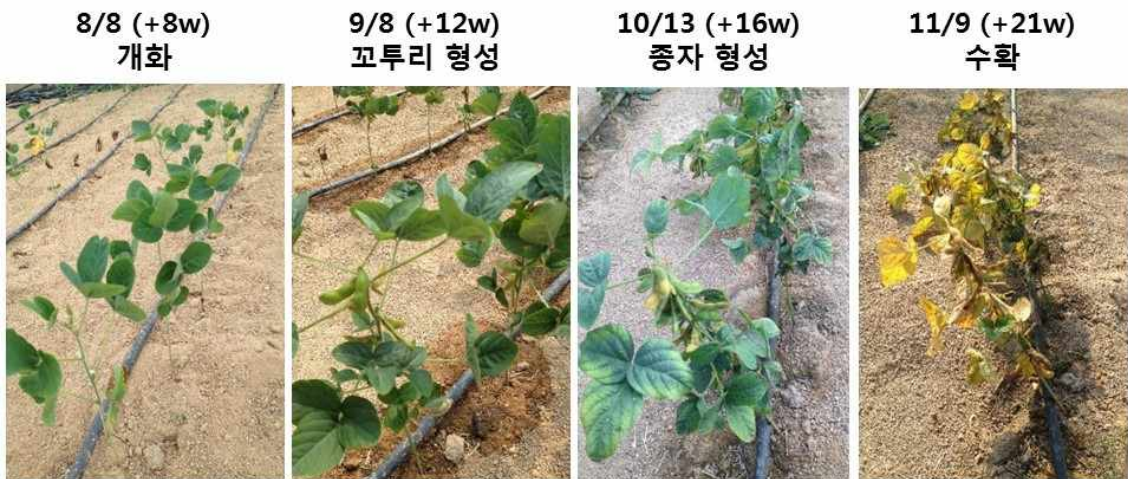
2017년 6월 9일에 파종하여 프라이밍 후 하루 회복시킨 식물체(+12d)를 이송하여(2017년 6월 21일), 가뭄 프라이밍 처리구(D1)를 첫 번째와 세 번째 라인에 각각 15주씩 총 30주의 식물체를 이식하였다(그림 3-4). 무처리 대조구(W1) 식물체는 두 번째와 네 번째 라인에 이식하였다. 이때의 토양은 작년 가을부터 일체 급수가 없었으므로 수분을 거의 함유하지 않아(30-40%) 적어도 봄가뭄 지표토양의 상황을 모사하고 있다고 판단되었다. 토양에 작은 홈을 15 cm 간격으로 만들고, 모종판의 식물체를 토양과 함께 가볍게 뽑아 각 홈에 집어넣었다. 이식 당시 식물 당 1리터의 수분을 공급하였고, 이후 3주간 (2017년 7월 14일까지) 일체 수분을 공급하지 않았다. 재배 중 제초제 등 농약 또는 비료 등을 살포하지 않았다.

이식 후 1주일 후, 처리구(D1)와 무처리 대조구(W1) 식물체 간의 전장이 비슷해졌다. 이식 당시 W1과 D1 식물체의 경장은 각각  $17.7 \pm 1.5$  및  $16.2 \pm 1.4$  cm였으나 이식 1주 후인 6월 28일에는 각각  $17.8 \pm 2.6$  및  $17.4 \pm 2.4$  cm로서 거의 동일한 수준으로 성장하였다. 이식 후 수분을 공급하지 않은 3주 후(7월 14일)에는 W1과 D1 식물체의 경장은 각각  $20.8 \pm 3.2$  및  $21.2 \pm 4.6$  cm로서 약간 역전되었음을 관찰하였다. 프라이밍 처리구(D1)는 모두 잎의 녹색도를 유지하고 있었으나, 무처리 대조구(W)는 잎의 녹색도가 눈에 띄게 낮았고 대부분이 시들고 잎조직의 발달이 미약하였다(그림 3-4).





1 L / 1 hr / hole / 2 weeks



- 이식 당시 수개월 건조 토양
- 10회 가뭄 반복 상황 부여
- 종자형성기 가뭄 상황 포함

그림 3-4. 프라이밍 대풍콩의 특장은실 재배

이식 후 3주 후 인 7월 14일부터 시작하여 2주에 한번 씩 식물 당 1 리터의 수분을 공급하였다. 이에 따라 수확 때까지 약 10-12회의 극심한 가뭄 조건에 반복적으로 노출되도록 하면서 생장을 관찰하였다.

특장온실의 극심 가뭄 조건 하에서도 각 식물체들은 8월 8일(+8w) 경에 개화하였으며, 꼬투리를 형성 시키고 종자를 생성하였다(그림 3-4). 최종 생장이 포장(밭)에서의 정상적 재배의 경우에 비하여 50%에 미치지 못하는 25-35 cm에 불과하였다. 개체차이가 크며, 종자 형성 빈도가 낮아 수확량은 현저히 낮았다, 야전 포장(밭)에서 재배한 식물체 보다 거의 1개월이 늦은 11월 초순에 2주에 걸쳐 식물체를 수확하여 종자를 모았다(표 3-2).

포장(밭) 및 특장온실에서 재배한 프라이밍 대풍콩의 생장 기록과 수확량을 표 3-2에 정리하였다. 그리고 그림 3-5는 특장온실에서 재배한 콩의 수확 후 꼬투리 및 종자들의 모습으로서, 꼬투리에 종자의 발생 빈도가 일정하지 않았으며, 개체 차이가 매우 심한 것으로 나타났다.

표 3-2. 프라이밍 처리 대풍콩의 특장온실 재배 및 수확 특성

	경장 (cm)	꼬투리 수 (ea/plant)	종자 (ea/plant)
W1	24.2 ± 8.8	10.4 ± 7.4	2.8 ± 2.4
D1 (primed)	30.1 ± 7.4	13.2 ± 8.3	3.4 ± 2.2



그림 3-5. 특장온실에서 재배한 콩의 수확 후 꼬투리 및 종자들의 모습

## 제 4 절 콩 가뭄 stress memory 유전자 탐색

### 1. 콩 유전자 마이크로어레이 DNA chip의 제작

저항성이 관찰되는 처리구를 가지고, 가뭄 프라이밍 처리에 의하여 발현이 유도되며, 정상 재배조건으로 회복된 후에는 원상태로 회귀하여 발현이 중지 되었다가, 2차 가뭄스트레스에 그 발현이 크게 강화되는 스트레스 메모리 유전자들을 마이크로어레이(microarray) 분석을 통하여 탐색하였다.

콩 유전체 전체 염기서열 정보(Phytozome; [www.phytozome.net](http://www.phytozome.net))를 이용하여 *Glycine max* Alternative Spliced Transcript Detecting Microarray (GmASDM) DNA chip을 제작하였다. *Glycine max* Wm82.a2.v1 ([phytozome.jgi.doe.gov/](http://phytozome.jgi.doe.gov/))에는 55,589 loci로부터 87,977 유전자 전사체(transcripts)가 annotation 되어 있다. 이 중 15,217 유전자(gene)가 선택적 변형 전사부위(alternative splicing sites)를 가지고 있어 이로부터 47,605 전사체가 생산 된다.

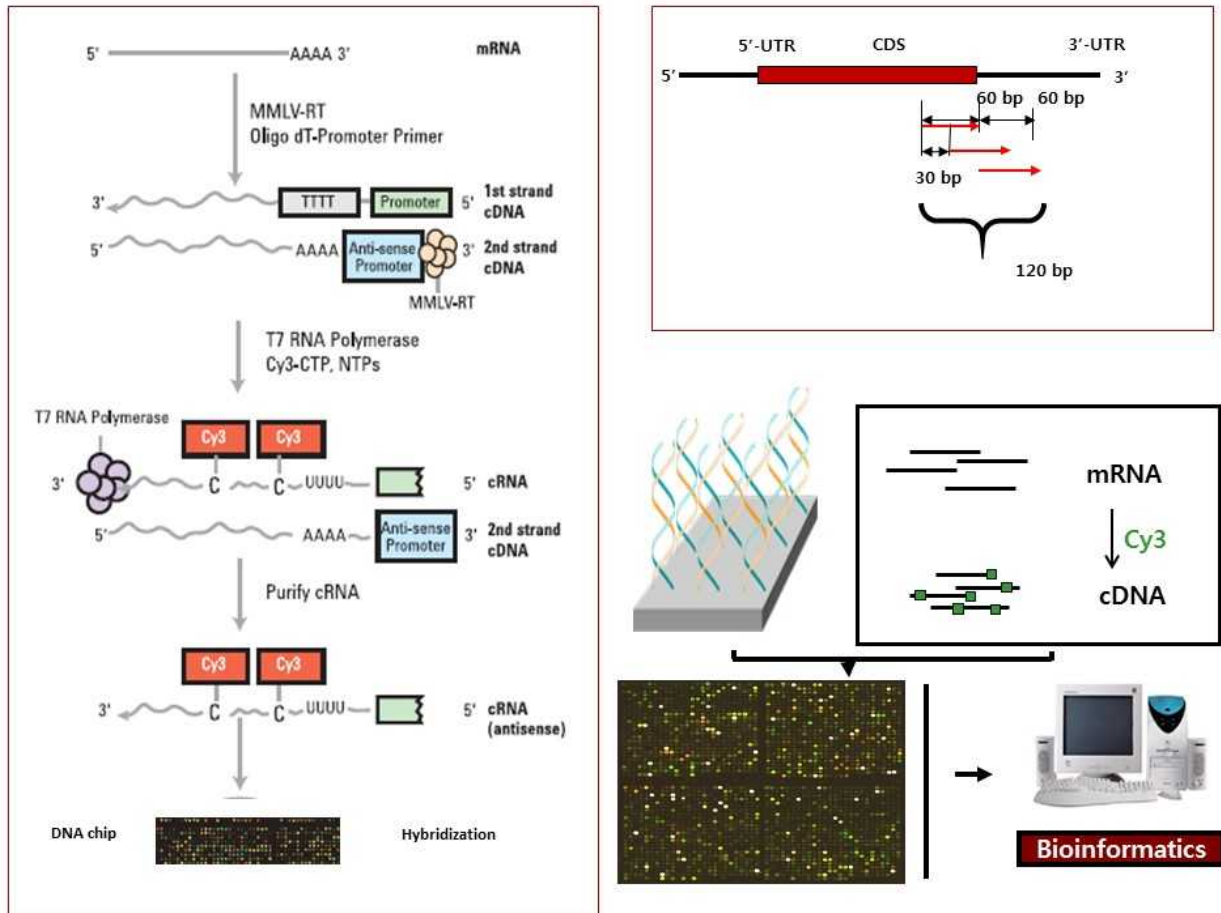


그림 4-1. 마이크로어레이 탐침 설계 및 실험과정

각 유전자의 정지코돈(stop codon)의 60 bp 앞부분을 시점으로 하고 이로부터 30 bp씩 shift를 적용하면서 60-nt 길이의 탐침(probe)을 설계하였다(그림 4-1). 따라서 3개의 탐침이 각 유전자의 말단 60bp와 3' 비전사 부분(untranslated region)을 포함하여 120 bp를 반영할 수 있도록 하였다. 선택적 변형 전사부위에 의하여 발현되는 전사체를 추가하여 175,391개의 탐침을 설계하였다. 엽록체(83), 미토콘드리아(88), 그리고 생명공학에서 자주 사용하는 선택적 마커(*gfp*, *gus*, *hyg*, *bar*, *kan*) 유전자들도 추가하였다. 총 탐침의 숫자는 180,000개였다.

설계한 chip을 Agilent사에 custom microarray로서 제작 의뢰하였다. Agilent array는 60 bp의 probe oligomer를 슬라이드 위에 *in situ* 합성하는 방식을 사용한다. Array를 4 x 180K로 만들 경우, 각 array 당 oligomer (probe) 180,000개를 합성 결합시킬 수 있으며, 각 슬라이드(chip) 당 4개의 array를 가지게 되어 4개의 각기 다른 샘플을 동시에 분석할 수 있다. 이 DNA chip를 사용하는 분석 실험에는 RNA 시료 200 ng으로 충분하다.

분석 실험방법을 요약하면, 그림 4-1에서 보는 바와 같이, 식물체 시료로부터 RNA를 추출하고, 역전사효소(reverse transcriptase)의 활성으로 oligo dT-promoter primer를 시점으로 하여 cDNA를 만든다. RNA 중합효소를 사용하면서 형광염료인 Cy3로 표지된 antisense cRNA를 얻는다. 이를 가지고 DNA chip과 반응하여 혼성결합(hybridization)을 시행한다. 혼성결합 반응을 완료한 DNA chip에서 형광 이미지를 얻어내고 각 탐침이 발광하는 형광 정도의 data를 추출한다. 시료 간 차이를 극복하기 위하여 control 탐침의 형광을 고려하여 data를 정상화(normalization) 한다.

## 2. 성장상 재배 및 프라이밍 처리

가뭄 스트레스 메모리 유전자 탐색 시험에 대상으로 사용할 식물체는 성장상(growth chamber)에서 일정한 조건 하에서 재배하였다. 성장상(한백과학 모델 HB-301S-3, 588 L)은 28°C, 8,000 Lux (16시간 빛/8시간 암 조건), 상대습도 50-60%의 조건을 유지하였다.

가. 토양은 원예상토(바로커, ㈜서울바이오)와 세척모래를 각각 4리터씩, 그리고 물 1.2리터와 함께 혼합하여 고르게 섞어 주었다.

나. 50구 모종판에 토양을 넣고 복판에 1.5 cm 깊이, 지름 0.5 cm의 구멍을 만든 후 1종자/1구씩 파종하고, 급수판에 물을 넣지 않은 채로 발아 시켰다. 파종 후 3일 후(+3d) 급수판에 물을 가득 공급한다. 수분을 상향으로 공급하면서 식물의 재배를 촉진하였다.

다. 파종 3일 후(+3d) 급수판에 물을 가득 공급한다. 수분을 상향으로 공급하면서 식물의 재배를 촉진하였다.

라. 파종 7일 경(+7d)에 급수판에서 수분을 제거함으로써 1차 가뭄처리(priming)를 시작하였다. 이 때 콩 유묘는 첫 잎(primary leaf)이 만개하기 시작하는 시점이다(그림 4-2).

마. 가뭄처리 개시 4일 후(+11d), 첫 잎을 수확하여 액체 질소로 급냉하고 -70°C 냉동고에 보관함으로써 시료를 채취하였다(D1 및 무처리구 W1). 이 때의 식물체를 급수판에 수분을 공급함으로써 가뭄조건에서 회복시켰다.

바. 수분공급 재개 1일 후(+12d), 첫 잎을 수확하고 (RW-D2), 급수판에서 다시 수분을



- 제거함으로써 2차 가뭄 조건에 돌입하였다.
- 사. 2차 가뭄처리 개시 4일 후(+16d), 첫 잎을 수확하여 액체 질소로 급냉하고 -70°C 냉동고에 보관함으로써 시료를 채취하였다(D3). 급수관에 수분을 공급함으로써 가뭄조건에서 회복시켰다.
- 아. 수분 재개 1일 후(+17d), 급수관에서 다시 수분을 제거함으로써 3차 가뭄 조건에 돌입하였다. 첫 잎을 수확하여 시료(RW-D4)을 채취하였다.
- 자. 3차 가뭄처리 개시 4일 후(+21d), 두 번째 잎(secondary leaf)을 수확하여 액체 질소로 급냉하고 -70°C 냉동고에 보관함으로써 시료를 채취하였다(D5).
- 차. 모든 과정의 시료는 4-8개의 식물체로부터 duplicate로 획득하여 분석에 사용하였다.

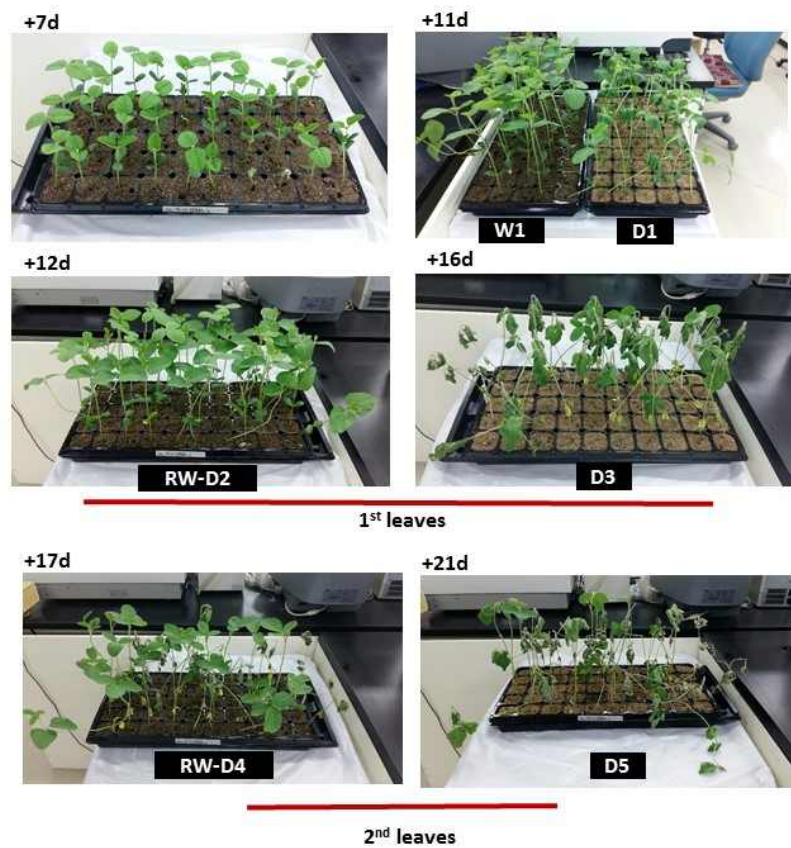


그림 4-2. 마이크로어레이 실험을 위한 성장상 재배 콩의 프라이밍 처리

### 3. RNA 시료 추출

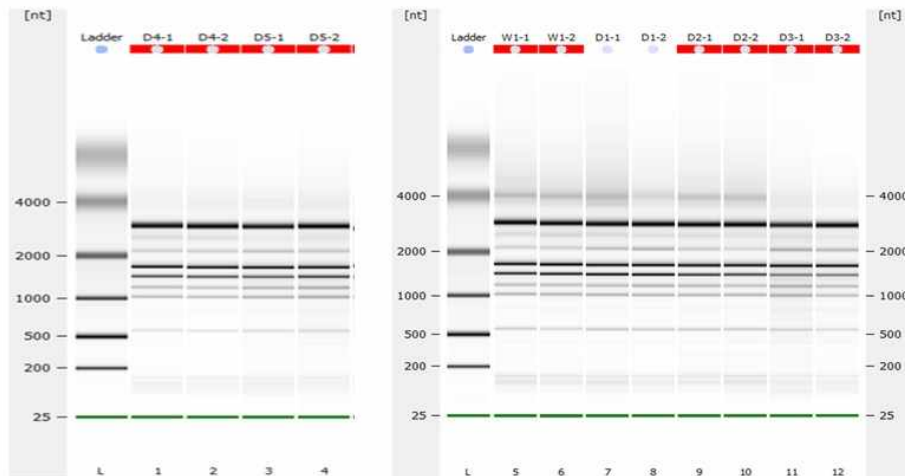
채취한 시료에서 양질의 total RNA를 추출하였으며, 분석 결과 준비한 모든 RNA 시료가 (1)  $OD_{260/280}$ : > 1.8 ,  $OD_{260/230}$ : > 1.6, 그리고 (2) 진핵생물의 경우, Ratio(28s/18s): >1.5, RIN value: >7.0로 나타나 필요한 기준을 모두 통과하였다.



표 4-1. RNA 시료의 질적 특성 분석

Sample	µg/µl	OD <sub>260/280</sub>	OD <sub>260/230</sub>	Total(µg)	Ratio (28s/18s)	RIN	Result
W1-1	2.3958	2.11	2.34	5.6851	1.4	N/A	Pass
W1-2	2.8204	2.09	2.31	2.6634	1.3	N/A	Pass
D1-1	2.7609	2.08	2.32	3.0486	1.6	8.0	Pass
D1-2	2.5369	2.09	2.22	9.9045	1.7	8.1	Pass
RW-D2-1	2.7324	2.09	2.27	19.1662	1.4	N/A	Pass
RW-D2-2	2.2840	2.12	2.31	22.5631	1.4	N/A	Pass
D3-1	1.9795	2.09	2.32	22.0874	1.4	N/A	Pass
D3-2	2.4491	2.08	2.35	20.2951	1.4	N/A	Pass
RW-D4-1	1.6726	2.07	2.05	21.8590	1.5	N/A	Pass
RW-D4-2	1.8710	2.13	2.29	18.2723	1.5	N/A	Pass
D5-1	2.2868	2.10	2.38	15.8362	1.4	N/A	Pass
D5-2	2.0649	2.10	2.33	19.5925	1.5	N/A	Pass

그림 4-3은 준비된 RNA시료를 전기영동(electrophoresis)로 분석하여 젤 상에서의 이동을 확인한 결과이다.



Lane	Sample Name	Lane	Sample Name
1	RW-D4-1	7	D1-1
2	RW-D4-2	8	D1-2
3	D5-1	9	RW-D2-1
4	D5-2	10	RW-D2-2
5	W1-1	11	D3-1
6	W1-2	12	D3-2

그림 4-3. 준비된 RNA시료의 전기영동(electrophoresis) 분석

#### 4. 스트레스 메모리 유전자 탐색

정상 재배 대조구(W1)과 비교하여 발현 정도에서의 유의성 있는 차이를 보이는 유전자의 선별기준을 ① Fold change : 4-fold 이상, ② P value < 0.05로 하여 분석을 진행하였다. 그 결과 아래 표 4-2와 같은 결과를 얻었다.

표 4-2. 시료별로 유의성 있는 발현량 증감을 보인 유전자 개수 (W1과 비교)

Sample set	Up regulation	Down regulation	전체 유의유전자수
D1_W1	2,160	2,378	4,538
RW-D2_W1	374	35	409
D3_W1	7,158	8,578	15,736
RW-D4_W1	1,235	838	2,073
D5_W1	3,855	5,279	9,134

Microarray 결과를 기준으로 하여, 첫 번째 가뭄처리(D1)에 의하여 그 발현이 4배 이상 증가한 가뭄반응 유전자 2,160개를 1차 대상선발 하였다. 이 중 스트레스 메모리 유전자의 특성으로서 재급수(RW-D2) 시 그 발현이 원점으로 감소되었다가, 2차 가뭄 처리 시(D3) 그 발현이 다시 증가하되 첫 번째 가뭄 처리 시에 비하여 그 발현이 크게 증가한 stress memory 유전자 502개를 선발하였다(data 생략).

이 502개의 유전자들에 대하여 유사 염기서열을 가진 애기장대 상용 유전자들을 찾아내어, 그 기능을 중심으로 그 동안의 많은 연구에서 가뭄저항성에 관련된 것으로 추론되는 전사인자와 가뭄 스트레스 반응 유전자를 선발하였다(표 4-3과 4-4).

표 4-3. 가뭄 처리에 의한 콩 유전자 발현량 비교 (수치: W1 시료 측정치와의 비율, 배)

Gene ID	D1	RW-D2	D3	RW-D4	D5	Domain
Glyma.06G204100-1	50.4	3.0	103.8	-1.2	88.0	PF16135.3 Jas Family
Glyma.10G071700-1	18.6	2.0	44.9	-1.1	59.3	PF00170.19 bZIP_1 Family
Glyma.11G067900-1	290.8	6.4	1080.9	1.3	1028.3	NA
Glyma.09G032900-1	54.9	3.0	485.1	1.3	150.2	PF01250.15 Ribosomal_S6 Domain
Glyma.20G155100-1	12.4	1.5	69.7	6.5	15.3	PF00847.18 AP2 Domain
Glyma.14G162100-1	112.1	6.2	148.2	1.8	177.4	PF00481.19 PP2C Family
Glyma.10G064400-1	98.6	4.6	381.4	1.3	114.2	PF02987.14 LEA_4 Repeat
Glyma.03G144400-1	1584.7	21.6	6458.6	3.4	3408.7	PF03760.13 LEA_1 Family
Glyma.08G042100-1	11.1	2.1	324.9	3.3	218.0	PF00249.29 Myb_DNA-binding Domain

Glyma.10G273000-1	4.3	1.5	40.0	2.2	23.7	PF00249.29 Myb_DNA-binding Domain
Glyma.04G042300-1	7.8	1.4	493.9	1.5	65.6	PF00249.29 Myb_DNA-binding Domain
Glyma.04G208300-1	4.6	1.3	73.1	16.3	15.2	PF02365.13 NAM Family
Glyma.12G221500-1	40.3	1.7	156.2	2.1	75.9	PF02365.13 NAM Family
Glyma.11G182000-1	4.9	1.1	24.6	2.4	5.2	PF02365.13 NAM Family
Glyma.16G151500-1	13.4	1.8	86.8	1.1	71.7	PF02365.13 NAM Family
Glyma.11G025600-1	4.2	1.2	437.8	1.3	22.8	PF00314.15 Thaumatin Domain
Glyma.14G195200-1_UE	5.9	1.1	105.6	13.0	21.7	PF00481.19 PP2C Family
Glyma.08G033800-1	37.6	2.5	110.4	-1.1	65.3	PF00481.19 PP2C Family
Glyma.12G116800-1	9.6	2.7	86.2	-2.9	31.1	PF00481.19 PP2C Family
Glyma.02G228200-1_UE	6.5	1.2	119.9	12.9	23.8	PF00481.19 PP2C Family
Glyma.U018200-1	13.7	1.5	268.0	-1.4	106.2	PF04927.10 SMP Family
Glyma.17G240100-1	10.5	1.6	51.4	-1.2	35.9	PF00847.18 AP2 Domain
Glyma.12G149100-1	79.9	2.2	1518.0	1.9	704.8	PF02365.13 NAM Family
Glyma.06G061900-1	9.0	1.3	79.2	-1.5	27.4	PF03106.13 WRKY Domain
Glyma.19G094100-1	6.8	2.7	88.8	2.3	35.7	PF03106.13 WRKY Domain
Glyma.13G158800-1	4.0	-1.3	20.4	1.1	7.7	PF00400.30 WD40 Repeat
Glyma.20G133200-1	10.0	1.4	126.2	3.2	37.4	PF13912.4 zf-C2H2_6 Domain

\* 502개의 스트레스 메모리 유전자들 중 기능 별로 유전자 분류

표 4-4. 콩 가뭄 스트레스 메모리 유전자들의 기능 유추

Gene ID	TAIR	Function [ <i>Arabidopsisthaliana</i> (thalecress)]	
Glyma.06G204100-1	AT3G29575	ABI five binding protein 3	SM1
Glyma.10G071700-1	AT2G36270	ABI5 Basic-leucinezipper (bZIP) transcription factor	SM2
Glyma.11G067900-1	AT5G66780	AT5G66780 late embryogenesis abundant protein	
Glyma.09G032900-1	AT1G47980	desiccation-like protein	
Glyma.20G155100-1	AT4G25480	DREB1A dehydration response element B1A	SM3
Glyma.14G162100-1	AT5G59220	HAI1 PP2C protein (protein phosphatases type2C)	SM4(-)

Glyma.10G064400-1	AT3G53040	late embryogenesis abundant protein, LEA protein	
Glyma.03G144400-1	AT5G06760	LEA4-5 Late Embryogenesis Abundant 4-5	SM5
Glyma.08G042100-1	AT1G25340	myb domain protein 116	
Glyma.10G273000-1	AT1G68320	myb domain protein 62	
Glyma.04G042300-1	AT4G37260	myb domain protein 73	SM6
Glyma.04G208300-1	AT1G01720	NAC (No Apical Meristem) transcriptional regulator	
Glyma.12G221500-1	AT3G15500	NAC domain containing protein 3	
Glyma.11G182000-1	AT5G22380	NAC domain containing protein 90	
Glyma.16G151500-1	AT3G04070	NAC domain containing protein 47	
Glyma.11G025600-1	AT4G11650	OSM34, osmotin34	SM7
Glyma.14G195200-1_UE	AT1G07160	Protein phosphatase 2C family protein	
Glyma.08G033800-1	AT4G26080	Protein phosphatase 2C family protein	
Glyma.12G116800-1	AT4G28400	Protein phosphatase 2C family protein	SM11
Glyma.U018200-1	AT1G03120	RAB28 responsive to abscisic acid 28	SM8
Glyma.17G240100-1	AT1G46768	RAP2.1 related to AP21	
Glyma.12G149100-1	AT4G27410	RD26 NAC domain transcriptional regulator	SM9
Glyma.06G061900-1	AT1G80840	WRKY DNA-bindingprotein 40	SM10
Glyma.19G094100-1	AT5G13080	WRKY DNA-bindingprotein 75	
Glyma.13G158800-1	AT3G15880	WUS-interacting protein 2	
Glyma.20G133200-1	AT3G19580	zinc-finger protein 2	SM12

##### 5. 가뭄스트레스 메모리 유전자 선정

Microarray 분석에서 선발한 유전자들 중 기능별로 각 유전자 군에서 12개의 stress memory gene (SM1-SM12)을 선정하고, 각각의 염기서열로부터 프라이머 set를 제작하여, 역전사 실시간유전자증폭(qRT-PCR) 실험을 시행함으로써, 각 처리 콩 잎 시료에서의 발현량을 측정하였다(그림 4-5). SM4(-)는 스트레스 기억 유전자가 아닌 것으로 추정하여 negative control로 추가하여 분석하였다. SM11과 SM12의 경우에는 2회의 반복 실험결과를 한 그래프에 모두 나타내었다. 결과 SM4(-)를 제외한 11개 모두 스트레스 메모리 유전자의 발현 특성을 잘 나타내고 있었다.

qRT-PCR

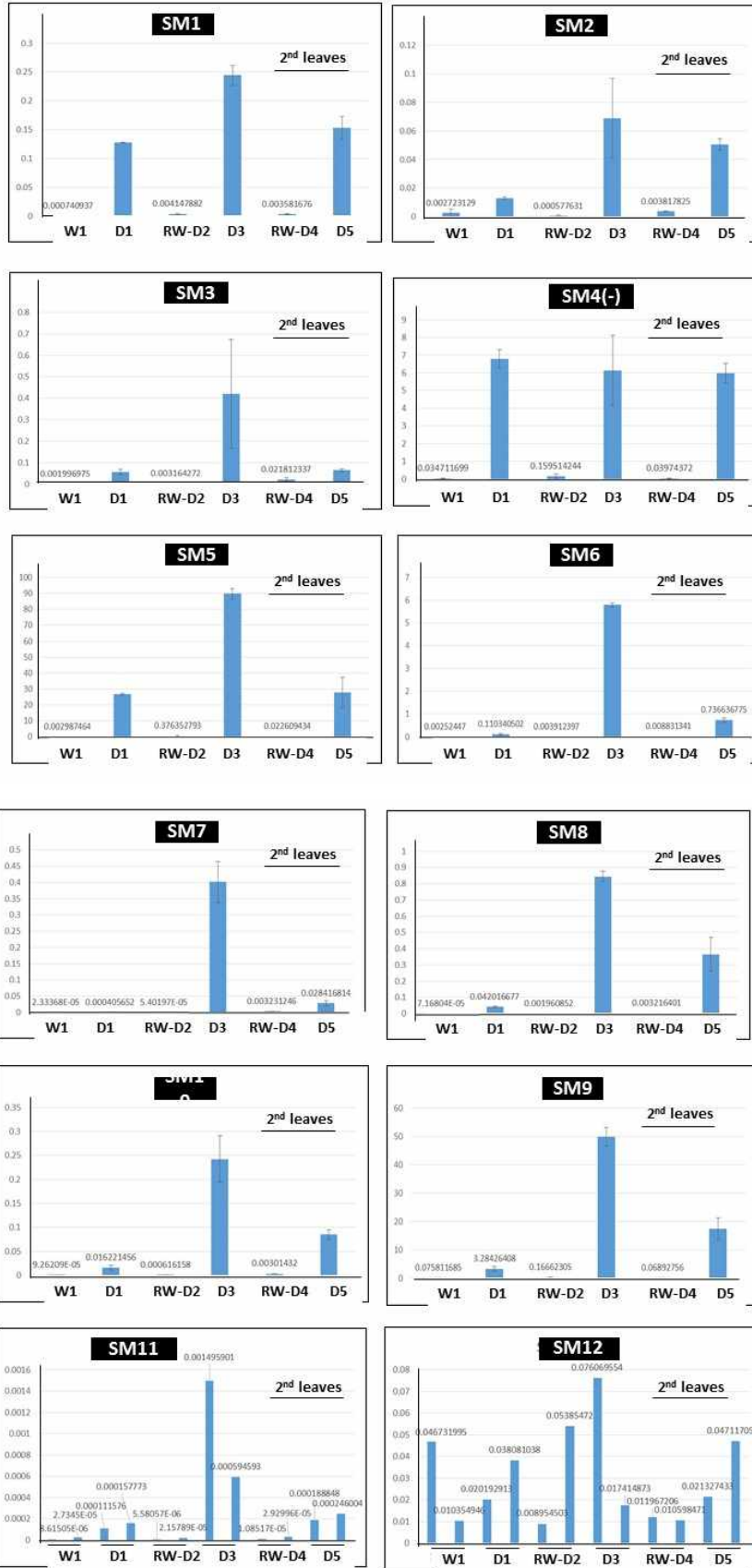


그림 4-4. 콩 가뭄 스트레스 메모리 유전자들의 발현량 (qRT-PCR)

이들 중 가뭄 스트레스 메모리 유전자의 특성을 가장 잘 보이고 있는 SM2, SM8, SM9, SM10 등 4개의 유전자를 표지 유전자로 선정하였다. 이 4 종의 표지 유전자를 포함하여, 실시간유전자증폭(qRT-PCR) 시험에 설계, 제작하여 사용한 프라이머들은 아래 표 4-5에 정리하였다.

표 4-5. qRT-PCR에 사용된 프라이머의 염기서열

Genes	qPCR primer	Sequence (from 5'-3')	PCR product size (bp)
SM1	SM1-F-qPCR	TTTCATCAGAGGCTGTGTCC	134
	SM1-R-qPCR	TGATAACTCCAACATCCTATTCACC	
SM2	SM2-F-qPCR	<b>CTGTGCTAGCTTTTGTGGCG</b>	<b>71</b>
	SM2-R-qPCR	<b>ATGGTGGCAGCACTTACACA</b>	
SM3	SM3-F-qPCR	TGGGACAAGTAGAATAGTGTCCG	70
	SM3-R-qPCR	TTTGGACACCTAAAATGAGCAACC	
SM4(-)	SM4-F-qPCR	ACTTGCCAGACGAAGATCCG	76
	SM4-R-qPCR	CAGAATCCACCGCCAGAAGT	
SM5	SM5-F-qPCR	AACCTAAGTGAGAAACAAAGAAAGG	136
	SM5-R-qPCR	GCCTTGGTTTTCTCCATGCC	
SM6	SM6-F-qPCR	TGCAAACCGATGCCATTAGG	139
	SM6-R-qPCR	ATCACTATTTCTCTGCGATTCACC	
SM7	SM7-F-qPCR	TTTGAAGGTCAGATTTATGTGCG	70
	SM7-R-qPCR	AACCAGTGCTGGATTGCTACA	
SM8	SM8-F-qPCR	<b>AAATGACGCCGATGCGATTG</b>	<b>121</b>
	SM8-R-qPCR	<b>TCGCATGACGTGACTGTTGA</b>	
SM9	SM9-F-qPCR	<b>GGGTCAGCAAGTTGAGTTCG</b>	<b>140</b>
	SM9-R-qPCR	<b>TGTGTCTAGCCGAAAAGAATGAC</b>	
SM10	SM10-F-qPCR	<b>TGATTACCGAAACACTACTTGGA</b>	<b>136</b>
	SM10-R-qPCR	<b>CCTATTGGAAGGACTGAGGCA</b>	
SM11	SM11-F-qPCR	GGCAAGTCACGTGCTCAAAA	200
	SM11-R-qPCR	TGGTGTCCAAACCCTGCTT	
SM12	SM12-F-qPCR	CCAAATTGAGGGAAGAAAATTC	135
	SM12-R-qPCR	CTAAATCATCGTGTGTGTGGG	
60S RNA (standard)	60S-F-qPCR	<b>AAAGTGGACCAAGGCATATCGTCG</b>	<b>125</b>
	60S-R-qPCR	<b>TCAGGACATTCTCCGCAAGATTCC</b>	

\* 빨간색, 굵은 글자의 4개 유전자를 콩 가뭄스트레스 메모리 마커 유전자로 선정하였다.

시료 중 RW-D4 및 D5는 두 번째 잎을 시료로 하여 RNA 발현량을 측정된 것으로서, 2번째 잎에서도 D5가 D1 보다 훨씬 높은 발현 정도를 보이는 것으로 나타나, 스트레스 기억 현상이 세대 내 생장 중 세포분열(cell division)을 통하여 새로운 세포에도 전달되고 있음을 나타낸다. 단, 이 때 발현 정도가 D3 보다 모두 다소 낮아지는 것으로 나타나, 스트레스 메모리가 발달과정을 통하여 차츰 소멸되고 있음을 예시하고 있다.

이 11개의 유전자 뿐만 아니라, 마이크로어레이 분석에서 나타난 502개의 가뭄 스트레스 기억 유전자 대부분이 2차 재급수 시(RW-D4) 두 번째 잎에서 그 발현이 원래 수준(W1)으로 낮아졌다가 3차 가뭄처리 시(D5) D1 보다 높은 증가를 보이고 있었다. 그러나 2차 가뭄 처리 시 1차 잎에서 보였던 발현량과 비교하여 보면 대부분 상대적으로 낮아지는 경향을 보였다.

그러므로 프라이밍 처리로 획득된 유전자 발현 능력이 메모리 되어 2차 잎으로 세포분열(cell division)을 통하여 새 조직으로 전달됨을 알 수 있으며, 단지 그 기억의 정도가 점차 약화되고 있음을 보인다. 연구 모델 식물인 애기장대(Arabidopsis)를 가지고 연구한 스트레스 메모리 유전자들의 경우에도 스트레스 기억 상태가 점차 감소하여 1주일 이내에 소멸된다는 사실이 최근 보고 되었다.(Lämke and Bäurle, 2017).

## 제 5 절 콩 가뭄 스트레스 메모리 유전자의 염색질재구성 분석

가뭄 스트레스 메모리 유전자로 선발된 11종의 유전자에 대하여 염색질면역침강(ChIP; chromatin immunoprecipitation) 실험을 실시하여, 각 유전자들의 프로모터 및 유전자 DNA 에 형성되는 히스톤변형(histone modification)의 염색질재구성(chromatin remodeling) 양태를 분석하고 무처리구(정상 급수) 경우와 비교하였다.

DNA와 히스톤의 결합상태를 고정하기 위하여, 식물조직을 formaldehyde로 진공투과하고, 이로부터 세포추출액을 만들었다. 유전체 DNA를 초음파로 shearing 함으로써 절편화한 후, 변형히스톤(H3K4me3) 및 RNA 중합효소(RNA polymerase II; RNAPolII) 항체(antibody)를 가지고 침전을 시행하였다. 침전한 DNA fragment들을 연구대상 스트레스 메모리 marker 유전자 프로모터 및 유전자 염기서열로부터 설계한 프라이머 set를 가지고 qRT-PCR로 정량하였다.

그 결과 각 유전자에서 변형히스톤(그림 5-1) 및 RNA 중합효소(그림 5-2)가 결합된 유전자 DNA가 검출되었다. 그러나 각 스트레스 메모리 유전자 발현 정도(그림 4-4)와는 상관관계가 낮았다. 특히 수분 공급을 정상적으로 시행한 식물체(W1)에서 그 값이 예상보다 높게 나타났다.

이 변형히스톤 및 염색질 변형은 토양 내에서 받아하면서, 또는 파종 후 3일 간의 저수분 상태의 뿌리발달 과정에서 생성된 것일 수 있다. 또는 전세대(previous generation) 모본에서 후성유전(transgenerational inheritance)된 염색질 변형이 후대(next generation)에 연계되고 있는 것으로도 추론할 수 있다.

ChIP-qPCR  
(H3K4me3)

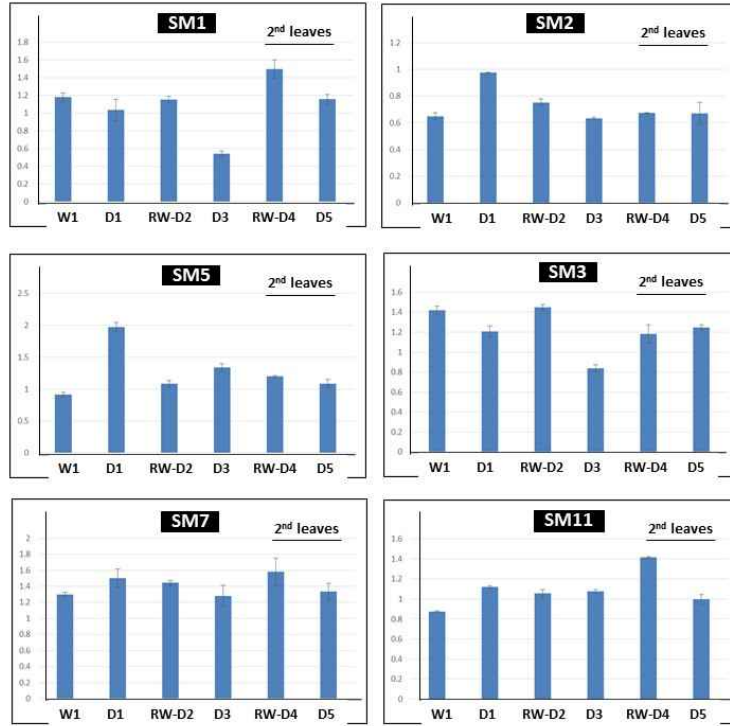


그림 5-1. 가뭄 스트레스 메모리 유전자들의 H3K4me3 변형 히스톤

ChIP-qPCR  
(RNA pol II)

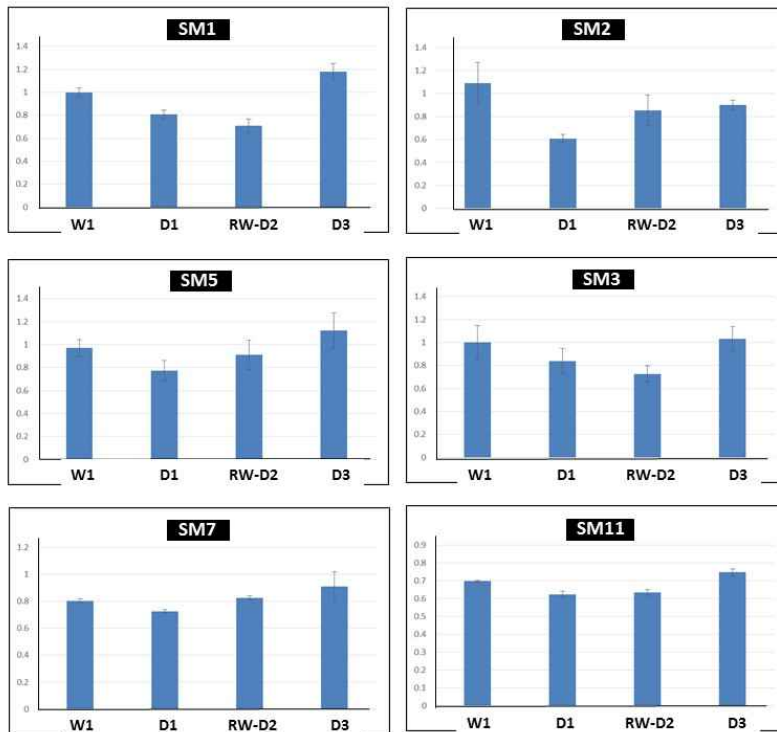


그림 5-2. 가뭄 스트레스 메모리 유전자들의 RNA 중합효소(RNAPol II) 결착(stall)



히스톤변형(H3K4me3)의 고정인 스트레스 메모리의 원리라는 추론(Kim et al., 2015)이 발표된 이후, 최근 다른 히스톤변형(H3K4me2, H3K27me3, H3K9ac, H2A.Z 등)이 관여할 것임을 제시하는 많은 연구 논문이 발표되고 있다. 그러므로 H3K4me3 및 RNA 중합효소의 항체를 가지고 스트레스 메모리 유전자들의 염색질변형 특성에 관한 실험을 계속하기 보다는, 향후 국제 학계의 연구결과를 계속 추이하면서 스트레스 메모리 유전자들의 기능 원리를 계속하는 향후 연구가 필요할 것으로 생각된다.

스트레스 메모리 유전자의 염색질재구성 분석을 위한 염색질면역침강 시험에 사용한 프라이머들의 염기서열은 표 5-1에 정리하였다.

표 5-1. 염색질변형(ChIP) 분석에 사용된 프라이머의 염기서열

Genes	ChIP primer	Sequence (from 5'-3')	Size (PCR product)
SM1	SM1-F-ChIP	TGGCGAAAGAAAGGTGTCGT	135
	SM1-R-ChIP	AAGCGTTTGAGAAGTTCCACG	
SM2	SM2-F-ChIP	CTGTGCTAGCTTTTGTGGCG	71
	SM2-R-ChIP	ATGGTGGCAGCACTTACACA	
SM3	SM3-F-ChIP	CATACCGTGGGACCAAACCT	194
	SM3-R-ChIP	ACGTGTGCAAAAGGGGTAGT	
SM4(-)	SM4-F-ChIP	TCTCAGATCTCGCAATCAAAC	140
	SM4-R-ChIP	CAGAACCACAGAAAACATCAC	
SM5	SM5-F-ChIP	AACCTAAGTGAGAAACAAAGAAAGG	136
	SM5-R-ChIP	GCCTTGGTTTTCTCCATGCC	
SM6	SM6-F-ChIP	ATCCGTTAGTTGGCGTCC	125
	SM6-R-ChIP	TCTTTGACTGCGACGATCCC	
SM7	SM7-F-ChIP	GTTTATCTTGGGGCCAGTCCT	134
	SM7-R-ChIP	ATGCTTGGCGAAATAAGTCACG	
SM8	SM8-F-ChIP	GTTGAGGGGAACAAGCTTATAC	188
	SM8-R-ChIP	CGTGTTGGTTTTGCAGAGAC	
SM9	SM9-F-ChIP	ATACACTGAACCGAATCCGCC	195
	SM9-R-ChIP	ACGAAGAGGTGGCGGTTATT	
SM10	SM10-F-ChIP	AGAGACCGTTTTCTCGGCCT	146
	SM10-R-ChIP	GGTTGAGGCCAAAACGAAGATT	
SM11	SM11-F-ChIP	TTGTTGTCAAAGAACGTGGGC	191
	SM11-R-ChIP	GCCAGTCATGATGCTACAATGC	
SM12	SM12-F-ChIP	CCAAATTGAGGGGAAGAAAATTC	135
	SM12-R-ChIP	CTAAATCATCGTGTGTGTGGG	
60S RNA	60S-F-ChIP	AAAGTGGACCAAGGCATATCGTCCG	207
	60S-R-ChIP	TCAGGACATTCTCCGCAAGATTCC	

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호

D-06

### 제 1 절 목표달성도

구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도  (2015 -2016)	실험 대상 콩 품종 선택	100	재배특성 및 가뭄저항성 비교, 대풍콩 선정
	가뭄 프라이밍 조건 확립	100	과중 7일 후 4일간 토양 건조 및 수분 제거
	마이크로어레이 제작	100	180K 콩 유전자 microarray chip 12장 제작
	메모리 유전자 탐색	100	가뭄스트레스 메모리 유전자 502개 탐색
	염색질변형 시험	100	H3K4me3, RNAPolIII 면역침강시험 수행
2차 년도  (2016 -2017)	프라이밍 효과 측정 (화분)	100	일반 온실(화분)에서 프라이밍 효과 관찰
	포장(밭) 실험	100	야외 포장(밭)에서 프라이밍 효과 관찰
	특장 온실 시험	100	가뭄 조건 특장온실에서 프라이밍 효과 관찰
	콩 수확량 비교	100	포장 및 특장 온실 재배 콩 수확량 측정
	표지 유전자 확정	100	가뭄스트레스 표지 유전자 4 종 선정

### 제 2 절 관련분야 기여도

- 본 연구과제에서 콩 종자를 대상으로 수행하여 얻은 연구 결과를, 향후 옥수수, 감자 등 다른 발작물들의 가뭄 저항성 프라이밍 기술의 개발에 응용할 수 있다.
- 콩 유묘에 손쉽게 가뭄 스트레스 저항성을 부여할 수 있는 프라이밍 기법은 일반적 농가에서 특별한 장비나 비용의 소모 없이 시행할 수 있다.

- 기후변화로부터 오는 각종 환경재해에 대응하여 식량위기에 대응할 수 있는 적절한 방안을 세움으로서, 예상되는 국가적 재난을 예방하고 식량산업에 대한 국제경쟁력을 유지할 수 있다.
- 기후변화의 피해가 극심하지 않은 때에도 콩 등의 발작물들은 토양수분의 불규칙한 건조 상태에 놓이게 되므로, 가뭄 상태가 지속적으로 반복된다. 개발되는 기법을 실용화하여 저항성 획득 형질의 콩 종자를 재배함으로써 단위 면적당 생산량을 최소한 20% 이상 증가시킬 수 있을 것으로 기대한다.
- 한국농촌경제연구원의 분석결과에 따르면 (농업관측 2017년 11월호, 한국농촌경제연구원), 2017년 국내 콩 생산량은 7.6만 톤이 될 것으로 예상하고 있다. 그리고 2017년도 수입량은 식용 콩이 28.7만 톤으로서, 식용콩의 자급률이 21%에 미치지 못하고 있는 실정이다. 이에 더하여 2016년 식품용 유전자변형(GM, genetically modified) 콩의 수입량이 98.2만 톤(3.98억 달러)에 달하고 있어 많은 양을 외국에서 수입하고 있다. 새로운 생명공학 기법에 기초한 생산기술의 개발로 증산하게 되면 특히 식용 콩의 수입을 감소시키는 효과를 기대할 수 있다.
- 2017년 10월 국산 콩 평균 도매가격(상품기준)은 평균 4,947원/kg으로서(농업관측 2017년 11월호, 한국농촌경제연구원) 이를 기준으로 계산할 때 연간 총생산은 3,800억 원에 해당하며, 20% 증산, 또는 피해 감소를 성취할 경우 연간 760억원의 가치를 부가할 수 있게 된다.
- 2016/2017년도 전 세계에서 생산되는 콩의 총생산량은 3.4억 톤으로 추정하고 있으며, 2016년 콩의 세계 총 재배면적 1억 1,700만 ha 중 GM콩의 재배면적은 78%에 이르는 9,140만 ha로 집계되었다 (2017 바이오안전성 백서, 한국바이오안전성정보센터). 새로운 생명공학 기법에 기초한 생산기술의 개발로 증산하게 되면 GM 콩의 수입을 감소시키는 효과를 기대할 수 있다.

## 제 5 장 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

### 제 1 절 연구개발결과의 활용방안

#### 1. 연구개발 결과의 발전과 확대

- 2년간의 단기 연구에서 얻은 연구결과를 더 세밀하게 검증하고 개선하는 향후 과제를 도출하고 수행함으로써, 기후변화로 인한 재앙적 가뭄 하에서 현저하게 향상된 저항성을 보일 수 있는 기법으로 발전시켜야 한다.
- 실제 농가에서는 각 지역의 기후, 토질, 병충해 문제 등 많은 요소들을 고려하여 파종할 품종을 선택하게 되므로 본 연구에서 개발한 프라이밍 기법을 각 품종에 적용할 수 있도록 확대하고, 조절하는 별도의 연구가 필요하다.
- 가뭄 저항성과 감수성 품종에 대한 비교 실험을 수행하여 가뭄저항성 발현에 대한 스트레스 메모리의 작용기작에 대한 계속된 연구가 필요하다.

#### 2. 프라이밍 기법의 실용화

- 콩 유묘에 가뭄 스트레스 저항성을 부여할 수 있는 프라이밍 기법을 교육지도, 세미나 등을 통하여 기술을 홍보함으로써 극심한 가뭄이 예상되는 시점에서 실제 농가에서 손쉽게 시행할 수 있도록 한다.
- 현재 콩은 국립종자원 전국 각 지원에서 품종별로 대량 재배한 종자를 전국에 보급하고 있다. 농민들이 표면을 소독 또는 미소독한 종자를 선택하여 2-3월에 단체(농협) 또는 개인적으로 국립종자원에 신청하고 4-5월에 파종용 종자를 확보하게 된다. 가격이 2018년 현재 5kg 당 22,000원 정도이다.
- 보급종 중 대원콩의 파종 적기는 5월 중순 이전이며, 대풍콩은 6월 초순이다. 그러므로 봄가뭄이 심하여 파종적기에도 토양이 건조하고 6월 중에도 가뭄이 계속 지속될 것으로 예상되는 경우 파종적기에 맞추어 프라이밍을 시행하여, 콩 유묘가 프라이밍 처리 기간 2주 및 저항성 최소 3주 등 최소 5주 정도를 견딜 수 있도록 한다. 기후변화가 가속되고 있어 장마전선의 형성도 불규칙하다는 예견이 있다. 파종적기에 가뭄상황이 오지 않을 경우 종래의 농사법을 그대로 실행한다.
- 프라이밍 기법의 적용에 경제적으로 큰 부담은 없을 것으로 생각된다. 현재(2018년 4월) 도매상에서 모종판은 800원/개, 관수상자 2,400원/개 정도가 소요된다. 수년간 수회에 걸친 재사용이 가능하다. 상토 12,150원/50L, 세척모래 16,400원/20kg가 소요되지만, 농가 자신의 밭흙을 대신 사용할 수도 있다.
- 노동력 추가 투입 최소화하기 위한 방안을 모색해 보아야 할 것이다. 실제로는 토양

표면에 작은 흠을 만들어 여기에 50구 모종관에서 식물체를 가볍게 흠 째 뽑아 이 식하게 되므로 큰 노동력을 요하는 것은 아니다. 토양에 일정한 흠을 만드는 소형 농기구들은 이미 개발된 것들은 이미 개발, 사용되고 있다. 그러나 규모가 큰 농가의 경우에는 작업의 기계화를 위한 방안을 강구해 볼 필요가 있다.

### 3. 스트레스 메모리 마커 유전자의 실용화

- 실재배 또는 품종개발 실험 중 가뭄상황 하에서 시료 잎을 채취하여, 선정된 스트레스 메모리 마커 유전자들의 프라이머(primer) set를 가지고 실시간유전자증폭시험을 시행함으로써 콩 식물체의 저항성 능력을 측정하는 방법을 구상해 본다. 스트레스 메모리 마커 유전자들과 standard로 사용하는 60S RNA의 발현량을 단순 비교함으로써 콩 식물체의 저항성을 측정한다.
- 실시간유전자증폭시험에 소요되는 real time PCR 기기는 최근 그 가격이 많이 저렴해져 있고, 유전체학 또는 분자생물학을 연구하는 농업기술원 또는 대학의 연구실에 의뢰하여 시행할 수 있을 것으로 본다.
- 지역 별 또는 품종별로 콩의 가뭄저항성을 측정함으로써 기후변화로 인한 극심 가뭄 상황 하에서 이에 대비하는 농업정책에 반영할 수 있을 것이다.

## 제 2 절 향후 연구 연계 구상

- 본 연구과제의 결과에 나타났듯이, 가뭄에 대한 스트레스 메모리가 콩의 성장 과정 중 세포분열을 통하여 2번 째 잎으로 전달되어 가지만, 그 강도가 점차 약해지고 있다. 연구모델 식물인 애기장대의 경우에도 가뭄 스트레스 메모리가 7일 정도 유지되었다는 보고가 있다. 그러므로 가뭄 스트레스 메모리와 저항성의 유지기간과 강도를 높일 수 있는 방법을 고안하기 위한 향후 연구가 필요하다.
- 과제 수행 중, 프라이밍 된 콩의 생장에 있어 개체차이가 심하였는데, 파종 후 1주일 성장한 유묘 조직의 각 세포에 후성유전 형질이 고르게 유도 되지 않은 것으로 판단되었다. 효과를 높이기 위하여, 소수 세포를 가진 발아 전후의 콩 조직에 후성유전 형질을 부여하는 기술의 개발을 목표로 한 연구가 필요하다.
- 콩 유묘가 아닌 종자(seed)에 프라이밍 하는 방법을 구상해 본다. 이 때 가뭄 스트레스를 모사할 수 있는 화합물로서 mannitol, 염분(salt) 등을 처리한다. 이 때 스트레스기억 반응을 통하여 획득된 환경스트레스 저항성이 성장 중 기간까지 식물체에 유지되도록 하는 최적의 조건을 확립하는 연구가 필요하다.
- 종자를 처리한 경우(seed priming)에는 종자에서 어린뿌리(radicle)가 출현하지 않는 상태에서 처리를 종료하고 팽윤된 종자를 건조시킨다. 국립종자원 등에서 처리, 건조 후 일정 기간 저장하다가 필요 시 농가에 보급하는 방안을 구상해 본다.

## 제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
------	------

### 제 1 절 기후변화

- 지구 온난화 등 기후변화와 이에 따른 작물재배 환경의 파괴는 우리나라 뿐 만 아니라 세계적인 추세로서, 긴박하게 해결책을 모색해야 하는 중대 과제로 부상하고 있다. 급격한 세계적 인구증가 추세에 반하여, 지구의 기후 및 생태환경 변화와 경지면적의 감소로 식량 확보는 점차로 심각한 위기에 처하게 되었다.
- 기상 예측 전문가들의 공통된 의견으로서, 2060년경 지구 평균기온이 4 °C 상승할 것으로 전망된다. 지구가 1,000만년 만에 가장 더워진다는 것을 의미한다. 또 2100년에는 해수면이 지금보다 1.8m 상승, 해안지대에 살던 수억 명의 주민들이 이재민이 된다. 바다의 상당부분은 데드존으로 변할 것이며 빙하와 산호초 대부분이 사라질 것으로 예측하고 있다. 현재의 적응력으로는 버틸 수 없을 만큼 강력한 환경 재앙의 도래를 우려하는 목소리가 높다.
- 다른 작물들과 마찬가지로, 콩 재배에 있어 수확량을 결정하는 가장 결정적인 요인은 가뭄, 냉해, 고온 등 기후조건과 염분, 토양 등 재배지역의 영양조건이다. 최적 환경조건을 인위적으로 조성하는 것은 불가능하기 때문에, 열악한 환경조건 하에서도 최대의 수량을 만들어 낼 수 있는 기법의 개발은 매우 중요하다.

### 제 2 절 유전자변형 콩 생산

- 동종 식물 간의 교배(intra-species cross)에 의존한 품종 개발 방법은 유전자원의 고갈로 한계에 이르렀다. 최근 유용유전자 이식을 통한 형질전환 기술의 적용이 식량작물에 대해서도 보편화 되어, 21세기 식량문제 해결에 밑거름이 될 것으로 전망된다. 이러한 추세에 편승하여, 생명공학 기법을 통하여 다양한 환경스트레스 저항성 유전자를 전이함으로써 한발, 염해 등 광범위한 환경재해에 대하여 그 영향을 최소화할 수 있는 품종을 개발하고자 하는 연구가 세계적으로 활발히 진행되고 있다.
- 생명공학을 통하여 개발된 일부 유전자변형(GM) 작물은 1996년부터 상품화되었고, 최근 들어 그 개발과 보급이 급진전을 이루어 2016년에는 세계적으로 1억8510만 (185.1 million) ha에 이르는 경지 면적에서 재배되었다(ISAAA Briefs, 2016). 이는 생명공학작물의 상업화가 처음 시작된 1996년의 170만 헥타르에서 100배 이상 증가한 수치이다.

구분	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
콩	33.3	36.5	41.4	48.4	54.4	58.6	58.6	65.8	69.2	73.3	75.4	80.7	84.5	90.7	92.1	91.4
옥수수	9.8	12.4	15.5	19.3	21.2	25.2	35.2	37.3	41.7	46.8	51.0	55.1	57.4	55.2	53.6	60.6
면화	6.8	6.8	7.2	9.0	9.8	13.4	15.0	15.5	16.1	21.0	24.7	24.3	23.9	25.1	24.0	22.3
캐놀라	2.7	3.0	3.6	4.3	4.6	4.8	5.5	5.9	6.4	7.0	8.2	9.2	8.2	9.0	8.5	8.6
전체	52.6	58.7	67.7	81.0	90.0	102.0	114.3	125.0	134.0	148.0	160.0	170.3	175.3	181.5	179.7	185.1

전체에는 alfalfa와 사탕수수 누락 (단위: million ha)

- 2016년 기준으로 전세계 26개국 1,800만 명의 농민들이 생명공학작물을 재배하고 있으며, 이 중 90%는 개발도상국의 영세한 농민들이 차지하고 있다. 특히 생명공학작물을 재배하는 국가 중 개발도상국의 성장세가 두드러졌으며 2015년에는 쿠바 대신 베트남이 여기에 가세하였다. 28개국 중 8개국은 미국 등 산업 국가였고 21개국은 개발도상국이다. 세계 인구의 60%에 이르는 약 40억의 인구들이 이들 30개의 개발도상국가에 살고 있다. 생명공학작물을 재배하는 상위 5개국은 미국, 브라질, 아르헨티나, 인도 그리고 캐나다의 순으로 조사되었다. 미국은 총 7,090만 헥타르에서 옥수수(93%), 콩(94%), 면화(96%)와 같은 주요작물이 90% 이상의 채택율을 보이며, 생명공학작물 재배를 선도하는 것으로 나타났다. 브라질과 아르헨티나는 각각 4,420만 헥타르, 2,450만 헥타르의 재배면적으로 미국의 뒤를 이었다. 특히, 2014년에는 기후변화 대응작물의 중요성이 인식되면서, 미국에서는 가뭄에 견디는 생명공학 옥수수가 전년도보다 약 5배 이상 증가한 27만 5천 헥타르의 농경지에서 재배되는 등 미국 농민들의 높은 관심도를 확인할 수 있었다.
- 2016년 유전자변형 작물별 재배 면적 현황을 보면, 콩이 9,140만 ha로서 세계 총 재배 면적 1억8,510만 ha 중 49%를 차지하였으며, 옥수수 6,060만 ha (33%), 면화 2,230만 ha (12%), 카놀라 860만 ha (5%)의 순서였다. 각 작목 별 세계 전체 재배면적 중 GM 품목이 차지하는 비중은 콩의 경우 78%, 면화가 64%, 옥수수는 33%, 그리고 카놀라는 24%로 나타났다.

작물	전체 재배면적* (A)	LMO 재배면적 (B)	비중(B/A) (%)
콩	117	91.4	78
면화	35	22.3	64
옥수수	185	60.6	33
유채(카놀라)	36	8.6	24
합계	373	182.9	49

자료 ISAAA Briefs, 2016

(단위: 백만 ha)

형질 별로 보면, 제초제 저항성은 콩, 옥수수, 캐놀라, 면화, 알팔파에 적용되어 2015년 세계 유전자변형 작물 총 재배면적의 47%인 8,650만 ha에서 재배되었다. 해충저항성 작물은 2,310만 ha (12%), 제초제 및 해충 저항성이 복합된 후대교배종 식물은 7,540만 ha (41%)를 차지하였다. 이 외 가뭄 및 염해 등 재배 환경 스트레스 저항성 품종을 개발하고자 하는 노력은 세계적 경쟁 속에서 꾸준히 진행 되어 왔으나, 현재 이러한 환경 스트레스 저항성 작물이 상품화된 바는 그 사례를 찾을 수 없다.

### 제 3 절 작물 환경스트레스 저항성에 관한 연구

- 가뭄(drought), 염해(salinity), 고온(heat), 냉해(coldness) 등 비생물적(abiotic) 환경스트레스에 대한 저항성은 앱사이신산(abscisic acid; ABA)이라는 식물 호르몬에 의하여 유발된다(Xiong et al., 2002). 이에 따라 이들 각 스트레스가 유도하는 발현유전자들이 중복 되는 경우가 매우 많으며, 이는 각 스트레스가 세포막의 물리적 변화를 유발하는 공통점이 있어서 일 것으로 추론된다.
- 외부 자극이나 환경변화에 적응하는 과정을 경험한 식물체가 이 후 동일한 자극 및 환경에 대하여 더 큰 저항성을 가지는 현상이 관찰되었다(Kinoshita and Seki, 2014). 일반적으로 ‘스트레스 메모리(stress memory)’라는 용어를 쓰며, 종자(seed) 또는 유묘(seedling, plant)에 최초의 자극으로 저항성을 부여하는 과정을 ‘프라이밍(priming)’이라고 부른다.
- 생물의 형질(traits)과 반응(responses)을 결정하는 유전자(gene)들은 세포 내 염색체(chromosome)에 존재하는 유전체 DNA에 구성되어 있다. 유전체 DNA는 히스톤(histone)이라는 단백질들과 결합하여 염색질(chromatin)을 형성하고 있다. 유전자가 발현될 때 전사인자 등 발현조절 단백질들이 각 유전자 프로모터에 결합하면서 DNA 메틸화(methylation), 히스톤변형(histone modification) 등 염색질 재구성(chromatin remodeling)이 수반된다(Avramova, 2015).
- 애기장대, 담배 등 연구모델 식물들을 대상으로 수행한 연구들을 통하여, 가뭄, 염해, 고온 및 냉해 등 스트레스 상황 하에서 매우 역동적인 염색질 재구성이 관찰되었다(Kim et al, 2015).
- 식물이 외부 자극이나 환경변화에 적응하는 과정에서 발현된 저항성 유전자들의 염색질 재구성 상태가 그 자극/변화가 없어진 후에도 계속 유지되어 있음으로써, 동일한 자극 및 환경에 대하여 더 큰 저항성을 가지는 현상이 곧 스트레스 기억의 원리이다(Ding et al, 2012). 애기장대에서 1,963개(Ding et al, 2013), 옥수수에서 816개(Ding et al, 2014)의 가뭄 스트레스 메모리 유전자가 탐색되었다.
- 콩에 관련하여, 염색질재구성에 관여하는 히스톤 변형인자로서 14개의 histone acetyltransferases, 24개의 histone deacetylases 등이 발견되었다(Liew et al, 2013).
- 애기장대(Arabidopsis) 유묘(seedlings)에 염분을 처리하여 가뭄 및 염해에 대한 저항성을 부여하였다는 보고가 있다(Sani et al., 2013).
- 애기장대 등 연구모델 식물을 가지고 외부 환경스트레스의 종류, 강도, 반복, 간격 등에



의한 발현 유전자들을 profiling하고, 염색질 재구성 양태를 분석하여, 이에 관련하는 인자(factor)들을 발굴하는 연구가 활발히 진행 되고 있다. 이들을 통하여 이 때 획득된 형질이 후대에 전달되는 스트레스 기억 및 후성유전의 메카니즘을 밝히기 위한 연구가 경쟁적으로 진행되고 있다.

- 스트레스 메모리 및 후성유전의 기초적 원리를 연구하고, 이를 농업에 응용하고자 하는 연구가 일부 진행되고 있다(Springer, 2012). 예를 들어, 환경스트레스 저항성에 관련하여, 콩(soybean)에 염분(salt)을 처리하고 이때 전사인자 유전자 프로모터에 발생하는 DNA 메틸화 및 히스톤 메틸화를 분석한 바 있다(Song et al, 2012).
- 최근 감자(potato)를 가지고 가뭄 스트레스 기억 반응을 유도하여 저항성을 강화함으로써 선처리하지 않은 대조구에 비하여 품종별로 11.9-20.1% 높은 수확량을 얻었다는 보고가 있었다(Ramírez et al, 2015). 향후 다른 작물들에 대하여 유사한 연구결과가 경쟁적으로 발표될 것으로 전망 된다.
- 최근 밀(wheat) 종자에 세대 간 가뭄 상황을 프라이밍 하여 염해 저항성을 높였다는 보고가 있다(Tabassum et al., 2017).
- 옥수수나 콩 등의 작물 종자를 프라이밍 처하여 발아율을 높인 사례가 여러 건 발표되었다(Chen and Arora, 2013). 특히 콩 종자에 자기력(magnetic field), 어류단백질분해물질(fish protein hydrolysates), 살충제(insecticide) 및 phenolic elicitor를 처리함으로써 종자의 활성력(vigour)을 증진시켜 발아율을 높인 연구사례가 있다(Baby et al., 2011; Horii et al., 2007a; 2007b).

## 제 7 장 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 특별히 보안을 요하는 내용은 없음.		

## 제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

## 제 9 장 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호

D-11

○ 기술적 위험요소 분석

- 일반적 생물학 및 생화학 실험으로서 특별히 기술적으로 위험한 요소는 없었다.
- 본 연구실 소속기관(서울대학교)의 안전조치 이행계획을 준수하였다.

○ 안전관리(서울대학교 2016, 2017년)

(1) 연구활동종사자 환경안전교육 실시

가. 신규교육 및 정기교육

- 석/박사 신규교육: 2016년, 2017년 2월, 8월 (매 학기 당 이틀 간 14시간)
- 석/박사 정기교육: 서울대학교 환경안전원 홈페이지와 교직원 홈페이지에 사고사례 및 안전교육 동영상 공개, 실험실안전 통합관리시스템에서 자체 교육 등록
- 학부생 신규교육: 신입생 오리엔테이션에서 환경안전교육 진행, 실험실 안전 동영상 제공
- 학부생 정기교육: 환경안전원 홈페이지를 통한 온라인 공개강좌 기반 시스템 정기교육에 활용

나. 수시교육: 수시(기관의 요청에 의해 실시)

다. 병원체 및 LMO 실험실 안전교육

- 내용: 생물안전에 관한 이론교육(3시간) 및 실무교육 병행
- 기간: 2016년, 2017년 2월 ~ 9월(200명/년)

라. 방사선 안전교육:

- 내용: 방사선안전이론교육(6시간)과 방사선취급 실습교육 병행
- 기간: 2016년, 2017년 2월, 8월(총 6회/년)

(2) 실험실 안전점검

- 실험 특성에 따라 유형별로 분류하여 일상점검, 정기점검, 특별안전점검, 정밀안전진단을 실시

[표1] 안전점검 실험실 수(2016년)

A유형 실험실	B유형 실험실	C유형 실험실	D유형 실험실	합계
410	433	133	278	1,254

\* 실험실 분류 기준 :

A형 : 미생물 및 동물(LMO), 방사성동위원소 물질 등을 사용하는 실험실

B형 : 화학약품 등을 사용하는 실험실

C형 : 기계·전기 설비 등을 사용하는 실험실

D형 : 실험·실습을 수행하지 않는 설계·컴퓨터 관련 등의 실험실

(3) 실험실 안전사고 대응 및 예방

- 가. 실험실 안전사고 대응조직을 설치하여 대응 및 처리 매뉴얼 보완 및 사고 대응 훈련 실시하여 유사사고 발생 시 대응능력 향상
- 나. 실험실 안전사고에 대한 경각심을 높이고 유사사고를 예방하기 위하여 사고사례를 이메일, 공문 등을 통해 전파
- 다. 실험실 사고처리 흐름도 및 비상연락스티커 제작 배포

(4) 실험실 안전환경 기반 조성 사업 실시

- 실험실 안전사고 예방과 실험종사자 보호를 위해 안정장비 확충, 시설 및 설비, 노후 기자재 교체 등 실험실 안전환경 기반 조성

(5) 실험폐기물관리 강화:

- 실험실에서 발생하는 실험폐수 관리를 위해 처리의뢰부터 반출까지의 이력을 추적 관리하는 실험폐수처리내역 프로그램 구축하고 실험폐기물 발생 저감을 위해 환경안전교육 실시

(6) 공기오염도 조사 실시(2016, 2017년 11월 ~ 12월)

- 내용: 미세먼지, 휘발성유기화합물, 포름알데히드, 이산화탄소 등 7가지 항목

(7) 연구활동종사자 상해보험 가입

- 가. 가입대상: 연구활동종사자(4대 보험 미가입자)
- 나. 보험명: 연구활동종사자 상해보험
- 다. 보험회사: 현대해상화재보험

(8) 연구활동종사자 건강검진 실시

- 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」 제18조 4항에 따라 「산업안전보건법 시행령」 제29조 및 동법 시행규칙 별표 12의2 「특수건강진단 대상 유해인자」 및 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구활동종사자를 모니터링하여 건강검진 실시

## 제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	코드번호		D-12		
					논문게재지/ 특허등록국가	Impact Factor	논문게재 일 /특허등 록일	사사 여부 (단독 사사 또는 중복 사사)	특기사 항 (SCI여 부/인 용횟수 등)
1	논문	Comparative analysis of chemical compositions between non-transgenic soybean seeds and those from plants over-expressing <i>AtJMT</i> , the gene for jasmonic acid carboxy methyltransferase	서울 대학교	공동 저자	Food Chemistry 196:236-241	4.529	2016. 04.01	사사 없음	SCI
2	논문	Intergenic transformation of <i>AtMYB44</i> confers drought stress tolerance in rice seedlings	서울 대학교	교신 저자	Applied Biological Chemistry 60:447-455	0.750	2017. 08.31	중복 사사	SCIE
3	특허	AtMYB44 유전자를 발현하는 가뭄 저항성이 강화된 벼 및 그 제조방법	서울 대학교	제1 발명 자	대한민국 특허출원 10-2017- 0087753	-	2017 .07.11	중복 사사	-

## 제 11 장 기타사항

	코드번호	D-13
○ 없음		

## 제 12 장    참고문헌

	코드번호	D-14
Avramova Z (2015) Transcriptional ‘memory’ of a stress: transient chromatin and memory (epigenetic) markers at stress-response genes. <i>Plant J.</i> 83: 149-159.		
Baby SM, Narayanaswamy GK, and Anand A (2011) Superoxide radical production and performance index of Photosystem II in leaves from magnetoprimed soybean seeds. <i>Plant Signal Behav.</i> 6: 1635-1637. Chen K and Arora R (2017) Priming memory invokes seed stress-tolerance (2013) <i>Environ Expt Bot</i> 94: 33-45.		
Chen K and Arora R (2013) Priming memory invokes seed stress-tolerance. <i>Environ Expt Bot</i> 94: 33-45.		
Clauw P, Coppens F, Korte A, Herman D, Slabbinck B, Dhondt S, Van Daele T, De Milde L, Vermeersch M, Maleux K, Maere S, Gonzalez N, Inzé (2016) Leaf Growth Response to Mild Drought: Natural Variation in <i>Arabidopsis</i> Sheds Light on Trait Architecture. <i>Plant Cell</i> 28: 2417-2434.		
Ding Y, Fromm M, and Avramova Z (2012) Multiple exposures to drought ‘train’ transcriptional responses in <i>Arabidopsis</i> . <i>Nature Commun.</i> 3: 740.		
Ding Y, Liu N, Virlouvet L, Riethoven J-J, Fromm M, and Avramova Z (2013) Four distinct types of dehydration stress memory genes in <i>Arabidopsis thaliana</i> . <i>BMC Plant Biol.</i> 13: 229.		
Ding Y, Virlouvet L, Liu N, Riethoven J-J, Fromm M, and Avramova Z (2014) Dehydration stress memory genes of <i>Zea mays</i> ; comparison with <i>Arabidopsis thaliana</i> . <i>BMC Plant Biol.</i> 14: 141.		
Horii A, McCue P, and Shetty K. (2007a) Seed vigour studies in corn, soybean and tomato in response to fish protein hydrolysates and consequences on phenolic-linked responses. <i>Bioresour Technol</i> 98: 2170-2177.		
Horii A, McCue P, and Shetty K.(2007b) Enhancement of seed vigour following insecticide and phenolic elicitor treatment. <i>Bioresour Technol</i> 98: 623-632.		
ISAAA Briefs (2016) BRIFEF 52, Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016		
Joo J, Oh N-I, Nguyen NH, Lee Y-H, Kim Y-K, Song SI, and Cheong J-J (2017) Intergenic transformation of <i>AtMYB44</i> confers drought stress tolerance in rice seedlings. <i>Appl Biol Chem</i> 60: 447-455.		

- Kim J-M, Sasaki T, Ueda M, Sako K, and Seki M (2015) Chromatin changes in response to drought, salinity, heat, and cold stresses in plants. *Front Plant Sci* 8: 114.
- Kinoshita T and Seki M (2014) Epigenetic memory for stress response and adaptation in plants. *Plant Cell Physiol.* 55: 1859-1863.
- Lämke J, Bäurle I (2017) Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. *Genome Biol.* 18: 124. doi: 10.1186/s13059-017-1263-6.
- Liew LC, Singh MB, and Bhalla PL (2013) An RNA-seq transcriptome analysis of histone modifiers and RNA silencing genes in soybean during floral initiation process. *PLOS ONE* 8: 10.
- Ramírez DA, Rolando JL, Yactayo W, Monneveux P, Mares V, and Quiroz R (2015) Improving potato drought tolerance through the induction of long-term water stress memory. *Plant Sci.* 238: 26-32.
- Sani E, Herzyk P, Perrella G, Colot V, Amtmann A (2013) Hyperosmotic priming of *Arabidopsis* seedlings establishes a long-term somatic memory accompanied by specific changes of the epigenome. *Genome Biol* 14: R59. doi:10.1186/gb-2013-14-6-r59.
- Seo JS, Sohn HB, Noh K, Jung C, An JH, Donovan CM, Somers DA, Kim DI, Jeong S-C, Kim C-G, Kim HM, Lee S-H, Choi YD, Moon TW, Kim J-H, and Cheong J-J (2012) Expression of the *Arabidopsis AtMYB44* gene confers drought/salt-stress tolerance in transgenic soybean. *Mol Breed.* 29: 601-608.
- Song Y, Ji D, Li S, Wang P, Li Q, and Xiang F (2012) The dynamic changes of DNA methylation and histone modifications of salt responsive transcription factor genes in soybean. *PLOS ONE* 7: 7.
- Springer NM (2012) Epigenetics and crop improvement. *Trends in Genet.* 29: 241-247.
- Tabassum T, Farooq M, Ahmad R, Zohaib A, and Wahid A (2017) Seed priming and transgenerational drought memory improves tolerance against salt stress in bred wheat. *Plant Physiol and Biochem* 118: 362-369.
- Thao NP and Tran L-SP (2012) Potentials toward genetic engineering of drought-tolerant soybean. *Crit. Rev. Biotechnol.* 32: 349-362.
- Xiong L, Schumaker KS, and Zhu JK (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14: S165-183.



[별첨]

## 자체평가의견서

### 1. 과제 현황

			코드번호	D-15	
			과제번호	115080-2	
사업구분	농생명산업기술개발사업				
연구분야			과제구분	단위	
사업명	농생명산업기술개발사업			주관	
총괄과제			총괄책임자		
과제명	콩의 가뭄저항성 강화를 위한 스트레스 메모리 프라이밍		과제유형	개발	
연구기관	서울대학교		연구책임자	정종주	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도		80,000		80,000
	2차년도		80,000		80,000
	계		160,000		160,000
참여기업					
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2018.04.10.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
서울대학교 식품바이오융합연구소	연구교수	정종주

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 약속하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	정종주
----	-----

## I. 연구개발실적

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

콩의 초기 재배과정 중 가뭄에 대한 저항성을 유전자변형 없이 인위적으로 유도(priming)하여, 이때 저항성 유전자 프로모터들의 염색질 구성 상태를 기억(memory)하게 함으로써, 극심한 가뭄조건에서 강화된 저항성 형질이 발현되도록 하는 생명공학적 재배기법을 개발하였다. 이 과정을 유도하는 스트레스 메모리 마커 유전자를 사용하여 가뭄저항성을 측정할 수 있게 되었다.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, **보통**, 미흡, 불량)

급격히 진행되고 있는 기후변화에 대비하여 우리 자체의 생명공학 기술로 가뭄에 의한 피해를 저감할 수 있다. 특히 세계적 위기가 도래할 상황에서 국제 곡물시장에서의 경쟁력 감소에 대한 우려를 저감할 수 있다. 우리나라에서 콩의 식품으로서의 중요성을 감안할 때, 특히 사회적으로 문제가 되고 있는 유전자변형 콩의 수입 증가에 대한 대안이 될 수 있다.

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, **보통**, 미흡, 불량)

밭아 종자 또는 유묘에 손쉽게 건조조건을 부여할 수 있는 priming 방법을 확립하고 개발된 기술을 홍보하여 실제 농가에서도 손쉽게 시행할 수 있다. 스트레스 메모리 마커 유전자들을 저항성 표지로 하여, 품종개발 주이 또는 파종 후 재배 중인 작물에 대하여 환경스트레스에 대한 저항성을 측정할 수 있다. 본 연구의 결과를 바탕으로 하여 옥수수, 감자 등 다른 발작물들의 가뭄 저항성을 유도하는 기술을 개발할 수 있다.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

콩의 가뭄 저항성 프라이밍의 효과를 측정하기 위하여 일반온실의 화분, 포장(밭)에서의 천연조건 재배실험, 그리고 극심한 가뭄을 처리할 수 있는 특장 온실 등 다각적으로 측정하였다. 특장온실 및 포장(밭) 실험은 충북 오창의 한국생명공학연구원 바이오평가센터까지 2주에 1번씩 출장하면서 현지 연구소의 여러 연구원들의 많은 협조 속에서 수행하였다.

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

과제신청 당시 계획서에 제시 하였던 성과를 모두 달성하였다. 연구과제 수행 기간 중 총 2편의 논문을 발표하였으며, 현재 1편의 논문을 작성하여 제출하고 심사 중이다. 과제 기간 중 국내특허 1편을 출원하였다.

## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
콩 가뭄저항성 프라이밍 기법 수립	30	100	유전자변형 없이 콩 유묘에 가뭄저항성 형질을 부여할 수 있는 생명공학적 기법을 개발하였다.
콩 가뭄스트레스 메모리 유전자 탐색	40	100	가뭄스트레스 메모리 유전자 502개를 탐색하고, 표지 유전자 4 종 선정 제시하였다.
콩 가뭄저항성 프라이밍 효과 측정	30	100	가뭄 조건 특장온실에서 프라이밍의 효과로서 무처리구보다 20% 이상 향상된 생장 및 수확량을 확인하였다.
합계	100점	100	

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

콩의 초기 재배 과정 중 가뭄에 대한 저항성을 인위적으로 유도(priming)하여, 이때 저항성 유전자 프로모터들의 염색질 구성 상태를 기억(memory)하게 함으로써, 극심한 가뭄조건에서 강화된 저항성 형질이 발현되도록 하는 재배 기법을 개발하면서, 이 과정을 유도하는 스트레스 메모리 유전자를 대량 탐색함으로써 콩의 가뭄스트레스 메모리 표지(marker) 유전자를 선정하였다. 유전자변형 없이 농가에서 현재의 농법을 크게 변화 시키지 않고 시행할 수 있는 기법을 개발하였다. 그리고 우리 자체의 생명공학 기술로 재배효율을 높임으로써 특히 세계적 기후변화의 재앙 시 국제 곡물시장에서의 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 기대한다.

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

콩의 가뭄 저항성 프라이밍의 효과를 측정하기 위하여 일반온실의 화분, 포장(밭)에서의 천연조건 재배실험, 그리고 극심한 가뭄을 처리할 수 있는 특장 온실 등 다각적으로 측정하였다. 특장온실 및 포장(밭) 실험은 충북 오창의 한국생명공학연구원 바이오평가센터까지 2주에 1번씩 출장하면서 현지 연구소의 여러 연구원들의 많은 협조 속에서 수행하였다. 국내 유일한 특장온실의 공간 사용에 제약이 있어 다양한 품종에 적용한 대규모의 실험이 불가능하였다.

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

콩 유묘에 가뭄 스트레스 저항성을 부여할 수 있는 프라이밍 기법을 교육지도, 세미나 등을 통하여 기술을 홍보함으로써 극심한 가뭄이 예상되는 시점에서 실제 농가에서 손쉽게 시행할 수 있도록 한다. 본 연구에서 얻은 연구결과를 더 세밀하게 확증하고 개선하는 향후 과제를 도출하고 수행함으로써, 기후변화로 인한 재앙적 가뭄 하에서 그 피해를 최소화할 수 있는 기법으로 발전 시켜야 한다. 가뭄에 대한 스트레스 메모리가 콩의 생장 과정 중 세포분열을 통하여 새 조직으로 전달되어 가지만, 그 강도가 점차 약해지고 있다. 그러므로 가뭄 스트레스 메모리와 저항성의 유지기간과 강도를 높일 수 있는 방법을 고안하기 위한 향후 연구가 필요하다.

## IV. 보안성 검토

○ 특별히 보안을 요하는 내용은 없음.

### 1. 연구책임자의 의견

### 2. 연구기관 자체의 검토결과