

발간등록번호

11-1543000-002622-01

식물 분자육종 기술을 이용한 생산성 증대 및 녹기 연장 들잔디 및 국화 우수 계통 육성 최종보고서

2019. 03. 27.

주관연구기관 / 제노마인(주)
협동연구기관 / 제주대학교
상명대학교

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “식물 분자유종 기술을 이용한 생산성 증대 및 녹기 연장 들잔디 및 국화 우수 계통 육성”(개발기간 : 2016. 09. 05 ~ 2018. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 03. 27.

주관연구기관명 : 제노마인(주) (대표자) 김 동 수 (인)
협동연구기관명 : 제주대학교 (대표자) 도 양 회 (인)
협동연구기관명 : 상명대학교 (대표자) 박 상 순 (인)

주관연구책임자 : 이 동 희
협동연구책임자 : 이 효 연
협동연구책임자 : 형 남 인

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	116080-3	해당단계 연구기간	2016.09.05 ~ 2018.12.31	단계구분	1단계
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부과제명	식물 분자유종 기술을 이용한 생산성 증대 및 녹기 연장 들잔디 및 국화 우수 계통 육성			
연구책임자	이동희	해당단계 참여연구원 수	총: 55명 내부: 명 외부: 55명	해당단계 연구개발비	정부: 700,000천원 민간: 234,000천원 계: 934,000천원
		총연구기간 참여연구원 수	총: 55명 내부: 명 외부: 55명	총연구개발비	정부: 700,000천원 민간: 234,000천원 계: 934,000천원
연구기관명 및 소속부서명	제노마인(주)			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반 과제				

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	✓	✓									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

우리는 생산성 증대와 녹기 연장의 농업형질을 제공하는 확보 유용 유전자 8종과 신규 발굴한 유용 유전자 3종을 들잔디와 국화의 고효율 형질전환 시스템을 통한 들잔디 및 국화 형질전환체 생산에 적용하였다. 애기장대와 *Medicago truncatula*에서 신규 발굴한 유용 유전자 *AHL26*, *MtATPG3*, *MtATPG4*, 그리고 *MtATPG5* 모두는 정도의 차이는 있지만 생산성 증대와 녹기 연장이라는 공통적인 농업형질을 제공하여 들잔디 및 국화 형질전환체 생산에 3종의 신규 유전자를 적용하였다.

유전자 도입/발현 분석 등의 기능 분석을 통하여 선별된 들잔디 및 국화 형질전환체는 생산성 증대와 녹기 연장, 그리고 스트레스 저항성 등의 농업형질에 관한 분석을 통하여 들잔디에서 4종, 그리고 국화에서 4종의 우량 형질전환체를 개발하였다. 개발된 우량 형질전환체는 형질전환 계통 증식, 온실 증식을 통한 농업형질 규명 등을 통하여 들잔디에서 녹기 연장과 스트레스 저항성에 대한 농업형질을 가지는 2종, 그리고 국화에서 고생장과 녹기 연장의 농업형질을 가지는 2종의 우수계통을 선발/육성하고 있으며, 이들 우수계통은 GM 품종 등록을 위한 예비조사를 수행하고자 한다.

보고서 면수: 191

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>본 연구의 최종 목적인 생산성 증대 및 녹기 연장의 형질을 가진 고품질 GM 들잔디 및 국화 품종을 개발하고 실용화하기 위하여 본 연구기간 동안 다음의 연구개발 목표를 달성하고자 한다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 고효율 들잔디/국화 형질전환 시스템 확립. 2. 생산성 증대 및 녹기 연장의 목표형질관련 유용 유전자 확보 및 발굴(7종 확보 및 3종 발굴). 3. 확보 및 발굴된 유용 유전자를 들잔디 및 국화에 도입하여 8종의 들잔디 및 6종의 국화 형질전환체 생산(20 개체 이상/유전자). 4. 생산된 형질전환체를 대상으로 생산성 증대 및 녹기 연장의 목표형질에 대한 기능 분석을 실시하여 4종의 우량 형질전환체 개발(잔디 2종, 국화 2종). 5. 개발된 우량 형질전환체에 대한 포장시험을 통하여 고품질 농업형질 발현 우수 계통 2종을 육성하여(작물 당 1종, 농업형질: $\geq 120\%$ 생산성 증대 및 녹기 연장), GM 들잔디 및 국화 품종 개발에 적용. 6. 선별된 우수 계통에 대한 품종 개발은 추후 GM 작물 실용화 연구를 통하여 추진하며, 본 사업동안의 추진 단계는 우수 계통 육성까지를 수행.
<p>연구개발성과</p>	<p>가. 연구 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 우리는 확보하고 있는 유용 유전자 중 생산성 증대와 녹기 연장의 농업형질을 제공하는 <i>ORE15</i>, <i>ATHG1</i>, <i>ATPG3</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG6</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG8</i>, <i>ATPG10</i>를 들잔디 및 국화 형질전환체 개발에 적용하였으며, 또한 homology approach를 통하여 애기장대와 <i>Medicago truncatula</i>에서 신규 발굴한 유용 유전자 <i>AHL26</i>, <i>MtATPG3</i>, <i>MtATPG4</i>, 그리고 <i>MtATPG5</i> 모두는 정도의 차이는 있지만 생산성 증대와 녹기 연장이라는 공통적인 농업형질을 제공하여 들잔디 및 국화 형질전환체 개발에 이 중 3종의 신규 유전자를 추가 적용하였다. ○ 우리는 상기 유전자를 고효율 형질전환 시스템을 통하여 들잔디와 국화 형질전환체를 생산하였다. 생산된 형질전환체는 일차적으로 유전자 도입/발현 분석 등의 기능 분석을 통하여 선별하였으며, 이후 생산성 증대 및 녹기 연장에 대한 목표형질 분석을 통하여 우량 형질전환체를 선별하였다. 들잔디에서는 <i>ATHG1</i>, <i>ATPG3</i>, <i>ATPG7</i>, 그리고 <i>ATPG10</i>을 도입한 형질전환체에서 녹기 연장, 스트레스 저항성 등의 농업형질에 대한 우량 형질전환체를 선별할 수 있었으며, 국화에서는 <i>ORE15</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG7</i>, 그리고 <i>ATPG10</i>을 도입한 형질전환체에서 녹기 연장, 고생장성 등의 농업형질에 대한 우량 형질전환체를 선별할 수 있었다. ○ 개발된 우량 형질전환체는 형질전환 계통 증식, 온실 증식을 통한 농업형질 규명 등을 통하여 들잔디에서 농업형질 개선(160%의 녹기 연장과 300%의 스트레스 저항성 형질)을 가지는 <i>ATHG1</i>-#1과 120%의 녹기 연장과 200%의 스트레스 저항성 형질을 가지는 <i>ATPG7</i>-#3, 그리고 국화에서 약 125% 이상의 고생장성과 녹기연장 농업형질을 가지는 <i>ORE15</i>-#4와 약 125% 이상의 농업형질 개선(고생산성/녹기연장/스트레스 저항성)을 가지는 <i>ATPG10</i>-#5를 우수 계통으로 선발/육성하고 있으며, 이들 우수계통은 GM 품종 등록을 위한 예비조사를 수행하고자 한다.

성과목표		사업화지표										연구기반지표							
		재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과		교육지도	인력양성	정책·홍보		기타(타연구활용등)
		특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문	학술발표			정채활용	홍보전시	
최종	목표	4										3	1	6		2			
1차년도	목표	1												1					
	실적	1												2					
2차년도	목표	2										1	1	3					
	실적	3												4	1				
3차년도	목표	1										2		2		2			
	실적	1	5									2*		6		2			
소계	목표	4										3	1	6		2			
	실적	5	5									2*	0**	11		3			

*2건 accepted; **1건 게재예정

연구개발성과의 활용계획 (기대효과)

- GM 원예 작물의 개발에 있어서 생산성 증대와 녹기 연장의 목표형질 도입은 고품질 농업형질을 가지는 원예 작물의 개발에 많은 장점을 제공한다. 따라서 고품질 농업형질관련 유용 유전자에 대한 지적소유권의 확보는 미래원천기술의 확보로 특성에 맞는 다양한 작물의 개발이 가능하게 하고, 경제적으로 고부가 가치 창출이 가능하게 하며, 향후 국가 농업생명공학 산업화의 경쟁력을 가지는데 일조할 것이다.
- 우량 GM 들잔디 및 국화 품종 개발에 대한 우수품종 육성 기술 확립은 국내에서 확보하고 있는 생산성 증대, 스트레스 저항성, 대사물질 축적 등 농업형질 적용 가능 유전자의 도입을 통하여 기후 변화 대처, 생산 안정성, 생산성 증대, 신기능성 등과 같은 다양한 우량 GM 품종 개발을 가능하게 할 것이다.
- 형질전환 기술을 바탕으로 개발된 신품종은 교배 모본으로 활용이 가능하므로 교배를 통한 다양한 신품종 개발에 사용될 수 있을 것이며, 또한 유전자 발굴부터 형질전환체 생산, 재배 및 포장 검정에 이르는 완전한 일련의 분자유종체계를 확립하여 모델링함으로써 분자유종의 모델로 활용할 수 있을 것이다.
- 발굴된 유전자와 개발된 우수 계통에 대한 산업화는 우선 유전자 혹은 우수 계통에 대한 지적소유권을 확보한 후, 지적소유권의 기술이전이라는 단기 사업 전략과 신품종 생산을 통한 수익창출이라는 장기 사업 전략으로 진행하고자 한다.

국문핵심어 (5개 이내)

증대

녹기 연장

들잔디

국화

형질전환 식물

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

제 1 장. 연구개발과제의 개요	7
제 1 절. 연구개발 목적	7
제 2 절. 연구개발 필요성	9
제 3 절. 연구개발의 국내·외 현황	23
제 4 절. 연구개발 범위	31
제 2 장. 연구수행 내용 및 결과	39
제 1 절. 연구개발 추진 내용	39
제 2 절. 연구개발 성과	47
제 3 절. 연구개발 결과	50
제 3 장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	157
제 1 절. 목표	157
제 2 절. 목표 달성 여부	158
제 4 장. 연구결과의 활용 계획 등	162
제 1 절. 연구결과 활용방안	162
제 2 절. 연구결과의 사업화 추진 방안	163
제 3 절. 기대성과 및 파급효과	168
붙임. 참고 문헌	170
<별첨 1> 연구개발보고서 초록	178
<별첨 2> 주관연구기관의 자체평가의견서	182
<별첨 3> 연구성과 활용계획서	188

제 1 장. 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발 목적

- 국가에서 강력하게 추진하고 있는 녹색기술의 활성화와 더불어 국민 소득의 증가로 인한 다양한 문화생활에 대한 만족도 등의 이유로 원예 작물의 수요가 급격히 증가하고 있으며, 최근 국가 농업 경쟁력 확보 및 FTA 대응 수입대체, 그리고 글로벌시장 지향적 품종 개발의 측면에서 GM 원예 작물 실용화 연구가 집중되고 있는 실정이다.
- 이러한 GM 원예 작물의 개발에 있어서 생산성 증대 및 녹기 연장 등의 목표형질 도입은 고품질 농업형질을 가지는 원예 작물 개발에 많은 장점을 제공할 것이다.

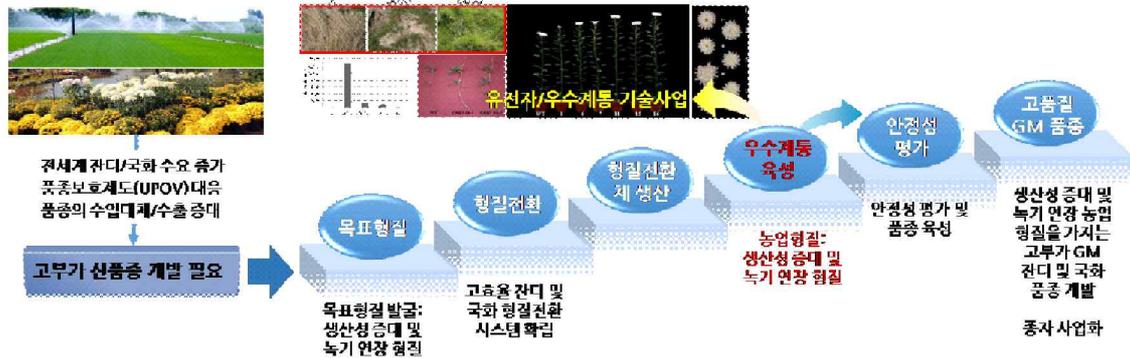


그림 1. 생산성 증대 및 녹기연장 잔디, 국화 우수계통 개발을 위한 연구개발 개요

- 본 연구개발의 최종 목적은 한국 자생 잔디인 들잔디(*Zoysia japonica*) 및 국화(*Chrysanthemum morifolium*)에 생산성 증대 및 녹기 연장 등의 목표형질관련 유용 유전자를 도입하여 고품질 농업형질을 가지는 GM 들잔디 및 국화 품종을 개발하고 이를 실용화하는 데 있다(그림 1).
- 본 연구개발을 위한 핵심 기술은 다음과 같다.
 - **고품질 농업형질 발현 기술:** GM 잔디 및 국화 신품종 개발에 있어서 생산성 증대 및 녹기 연장관련 유전자의 확보 및 발현은 고품질 잔디 및 국화 품종 개발에 범용적 응용이 가능한 핵심기술이다.
 - **잔디 형질전환 기술:** 잔디의 품종 개발은 전통적인 육종 방법을 이용하고 있으나, 최근 분자생물학적 방법을 이용하여 신품종 개발이 시도되고 있다. 그러나 전체적으로 아직 잔디에 대한 안정적인 형질전환에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 그러나 본 연구팀은 한국의 자생 잔디인 들잔디 및 한지형 잔디인 벤투그라스를 이용하여 아그로박테리움을 매개로 한 고효율의 안정적인 형질전환 기법을 확립하였다. 이러한 아그로박테리움 매개 잔디 형질전환 기법은 본 연구개발의 핵심기술이다.
 - **국화 형질전환 기술:** 국화의 품종 개발은 전통적인 교배 육종 방법에서 분자 육종 방법

으로 일부 시도되고 있으나, 여전히 형질전환 기술을 이용한 품종화에 대한 보고는 거의 없는 실정이다. 이는 국화의 안정적인 형질전환 기법의 미확보와 함께 국화에서 도입 유전자의 발현을 효율적으로 제어할 수 있는 기술이 확립되어 있지 않기 때문이라고 생각된다. 그러나 본 연구팀은 아그로박테리움을 매개로 한 형질전환을 통하여 간접 기관형성을 거쳐 형질전환 식물체를 재생시키는 안정적이고 재현성 있는 고효율 형질전환 기술을 확보하고 있다. 이러한 아그로박테리움 매개 국화 형질전환 기법은 본 연구개발의 핵심기술이다.

- 이러한 GM 원예 작물의 개발에 있어서 생산성 증대 및 녹기 연장 등의 목표형질 도입은 고품질 농업형질을 가지는 원예 작물 개발에 많은 장점을 제공한다. 따라서 고품질 농업형질관련 유용 유전자에 대한 지적소유권의 확보는 잔디와 국화 외에도 특성에 맞는 다양한 작물의 개발이 가능하게 하고, 경제적으로 고부가 가치 창출이 가능하게 하며, 향후 국가 농업생명공학 산업화의 경쟁력을 가지는데 일조할 것이다.
- 우량 GM 들잔디 및 국화 품종 개발에 대한 우수품종 육성 기술 확립은 국내에서 확보하고 있는 생산성 증대, 스트레스 저항성, 대사물질 축적 등 농업형질 적용 가능 유전자의 도입을 통하여 기후 변화 대처, 생산 안정성, 생산성 증대, 신기능성 등과 같은 다양한 우량 GM 품종 개발을 가능하게 할 것이다.

제 2 절. 연구개발 필요성

가. 배경

- 최근 국가에서 강력하게 추진하고 있는 녹색기술의 활성화와 더불어 국민 소득의 증가로 인한 다양한 문화생활에 대한 만족도 및 WTO 협상과 관련한 세계 무역 자유화로 잔디와 국화의 재배 면적 및 수요가 급격히 증가하고, 동시에 이들 작물에 대한 생산국간의 경쟁도 치열해지고 있다.
- **품종보호제도(UPOV) 전면시행(2012년)으로 종자산업의 무한 경쟁:** 우리나라의 UPOV (international Union for the Protection of New Varieties of Plants) 가입(2002년)과 품종보호제도 전면시행으로 로열티 지급의무 발생 품목이 급증하고 있으나 여전히 이에 대응하는 유전자원의 확보와 새로운 품종 개발은 미흡한 실정이다. 최근 FTA 타결 확대, DDA 진전 등에 따라 유전자원을 수집하기 위한 국가 간 경쟁이 치열해 지고 있으며, 각국은 우수하고 고유한 유전자원을 경쟁의 주요 수단으로 활용하고 종자주권을 강화하고 있다.
- 잔디의 경우, 이러한 UPOV 제도의 전면 시행으로 막대한 로열티를 지불해야 하는 불이익을 초래할 것이다. 대표적인 예로 외국 수입 잔디인 ‘제니스’, ‘미야코’ 등을 국내에서 생산·판매할 경우 로열티를 지불해야 될 우려도 있다. 이와 같은 문제는 우량 잔디 품종 개발을 통하여 해소될 수 있으리라 판단된다. 외래종 잔디 품종의 수입은 국내 환경 및 여러 가지 제약에 의해 국내 품종화 하기에는 보다 많은 시간이 소요될 것인 반면, 국내에서 우량 품종을 개발하면 이러한 시간적 제약을 줄일 수 있을 것이며, 또한 표현형이 우수한 우량 품종의 개발은 국외 시장 개척에도 많은 장점을 제공할 것으로 판단된다. 이러한 상황에 맞춰 국내에서도 ‘일동중지’, ‘용천’, ‘밀록’ 등과 같은 잔디 신품종 개발에 박차를 가하고 있으며, 최근 전남산림자원연구소에서 ‘장성새별’, ‘장성초록’ 한국잔디 신품종(2013년)을, 그리고 제일모직(삼성 에버랜드)에서 ‘그린에버’ 한국잔디 신품종(2014년)을 개발하였다. 하지만 여전히 현대의 다양한 소비자의 요구를 완전히 충족시키지 못하는 실정이다.
- 국화의 경우, 국내 재배품종의 다수가 외국의 도입품종으로 로열티 지불액이 32.4억원에 이르러, 외국 도입품종의 재배와 수출에 따른 로열티 부담이 증가되고 있어, 국내 개발 신품종의 육성과 보급이 시급한 실정이다. 현재까지 국내에서 84개 품종의 국화가 개발되었으나(1995-2010년), 대부분의 국내 육성 국화 품종은 스프레이 품종을 위주로 육성해왔으며, 재배 비중이 높은 스탠다드 품종의 경우 교배가 쉽지 않고 종자 생산량이 적으며 같은 혈통간의 불임률이 매우 높은 자가불화합성 작물로 품종 육성이 매우 어려운 실정이다.
- 따라서 잔디 및 국화에 대한 신품종 개발은 국가농업안보 차원 및 국가 경쟁력 확보에서 뿐만 아니라 사업의 고부가 가치화에 있어서도 필수적인 요인이라 확신한다.
- **GM 작물 개발을 통한 종자산업의 메가트렌드 변화:** 고전 육종을 통한 작물의 고품질화 속도는 1980년대를 정점으로 많은 노동력과 긴 연구기간, 교배 모본으로 사용되는 유전자원의 고갈 등으로 인해 크게 둔화되어 현재의 재배와 육종을 통한 생산량 증가에 의한 고품질 작물의 확보는 한계에 이르고 있다.

- 21세기 식물생명공학 산업은 다양한 식물로부터 유용 유전자를 발굴하고 그 유전자를 경제 작물에 도입하여 개량 형질의 우수 품종을 개발하는 것이 새로운 전략으로 대두되고 있다. 최근 기능성 유전체 연구를 통하여 유용 유전자의 대량 발굴이 세계적으로 확산되고 있으며, 이러한 유용 유전자의 경제작물로의 도입은 특수 목적 혹은 기능성 맞춤, 특히 고품질 작물의 개발을 통한 고부가 가치 창출이 가능하게 할 것이다.
- 2007년 세계시장에서 차지하는 GM 종자의 비중은 약 20%에 불과하였으나, 2010년 기준 세계 종자 시장의 40% 이상(160억달러)을 GM 종자 시장이 점유하고 있으며, 2015년 이후에는 50% 이상을 차지할 것으로 전망된다. 또한 GM 작물 재배규모가 1996년 이후 지속적인 성장세를 나타내고 있고 최근의 다양한 작물에서 GM 품종 개발이 급속히 진행되면서 그 시장 규모는 기하급수적으로 증가할 것으로 추정된다(그림 2).

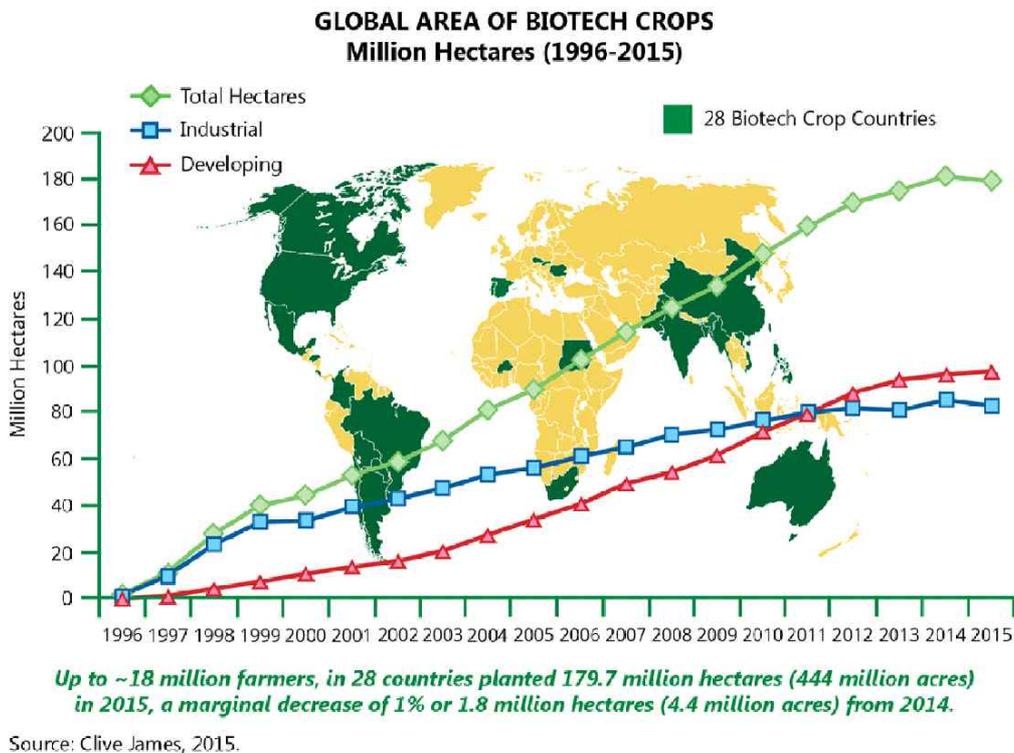


그림 2. Global Area of Biotech Crops (Clive James, Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2015, ISAAA)

- 잔디의 경우, 잔디 품종 개발의 많은 부분이 형질전환 기술을 통한 유전자 변형 잔디 품종 개발에 집중하고 있으며, 특히 제초제 저항성, biotic/abiotic 스트레스 저항성 등과 같은 기능성 잔디 품종 개발에 집중하고 있다. 또한 잔디 관리의 편리성을 제공하는 크리핑 벤트 그라스의 기능성 품종 개발에도 많은 연구를 집중시키고 있는 중이다.
- 국화에서 형질전환을 통한 유용 유전자 도입은 바이러스 저항성(Urban et al., 1994), 병저항성(Takatsu et al., 1998; Toguri et al., 2003), 해충 저항성(Dolgov et al., 1997; Shinoyama et al., 1997)에 대한 1세대 유전자 변형 국화 개발에 많은 연구가 집중되었으

며, 최근 화색 변화(Courtney-Gutterson et al., 1994), 생장형 변화(Petty et al., 2003), 벼의 *OsMADS1* 유전자 도입(Jeong et al., 2002) 등과 같은 2세대 유전자 변형 작물 개발이 시도 되고 있는 중이다.

- 그러나 아직 잔디와 국화에서의 GM 작물의 개발은 극히 제한적으로 연구가 되고 있는 실정이다. 따라서 본 과제를 통한 고품질 GM 잔디 및 국화 품종의 개발은 전 세계 잔디와 국화 시장에서 선도적 역할을 담당할 수 있고, 품종의 수입대체 효과 및 고부가 가치화를 가질 수 있을 것으로 생각된다.

나. 연구개발의 기반성

- 식물생명공학기법을 이용한 신품종 개발에 있어서, 잔디 및 국화는 영양번식성 작물로서 증식이 용이하고 여러 세대에 걸친 형질고정 과정이 필요 없으며 타 작물에 비해 조기에 품종 육성을 통한 실용화가 가능하다는 장점을 가지고 있다. 최근 국내에도 유전자 변형 작물의 개발 성과가 다수 보고되고 있으나, 먹거리에 대한 국민의 거부감이 생명공학 품종의 실용화에는 걸림돌로 작용하고 있는 상황이다. 그러나 유전자 변형 잔디 및 국화는 먹거리가 아닌 관상용으로 사용되어 환경 및 소비자 단체의 저항을 최소화할 수 있는 장점을 가지고 있어 상용화를 위한 유전자 변형 작물로 개발하기에 최적의 작물이다. 따라서 본 연구 과제의 특허권 확보가 가능한 고유 유전자와 경제적 가치를 지닌 잔디 및 국화의 형질전환기술을 접목하여 상업화 가능한 우수 계통을 육성하고, 궁극적으로 국제 경쟁력을 제고할 수 있는 고품질 GM 잔디 및 국화 신품종을 개발하고자 한다.
- 이러한 GM 작물 개발 및 산업화의 기술적 요소는 유전자 발굴 및 기능분석, 그리고 작물 형질전환 및 이벤투 육성 등의 기술이다. 최근 유용 표현형질을 지닌 유전자의 발굴 기법으로, 다량의 변이체를 생산하여 일차적으로 표현형 검정을 거쳐 이후 이들의 표현형 변화를 유발하는 원인이 되는 유전자를 다량으로 동정하는 기능성 유전체 연구가 유전자 발굴 및 기능분석 요소에 대한 핵심 기술로 적용되고 있다. 본 연구팀 중 주관 기관인 제노마인(주)은 최근 기능성 유전체 연구를 통하여 생산성 증대, 녹기 연장 및 스트레스 저항성의 복합 목표형질을 제공하는 유용 유전자를 다량 확보하고 있다. 그 중 잔디 및 국화 품종 개발 적용 유전자에 대한 예를 들어보면 주관기관에서 발굴한 AT-hook 유전자인 *ATPGs*(AT-hook proteins of Genomine) 유전자들은 식물의 chromatin architecture를 조절하여 작물의 다수성, 바이오매스 증대 등과 같은 생산성 증대와 녹기 연장에 대한 표현형적 특징을 제공할 뿐만 아니라 건조 등과 같은 기후변화 대응 조절도 제공한다고 증명하였다. 따라서 이와 같은 유용 유전자의 잔디 및 국화에 대한 적용은 고품질 농업형질을 가진 품종 개발에 있어서 많은 장점을 제공하리라 확신한다.
- 한편, 본 연구에서 개발하고자 하는 GM 들잔디 품종은 녹화 연장 및 스트레스 저항성의 목표형질 이외에 비선택적 제초제 저항성 유전자가 선발마커로 도입되어 있는데, 제주대학교에서 선발마커인 제초제 저항성 유전자만 도입된 들잔디의 포장 실험 결과, 야생형 잔디에 비해 잡초방제 및 관리비용이 연차별로 감소하여 재배 3년째부터는 약 25% 이상의 농약사용량 및 관리비용이 절감됨을 확인하였다. 이러한 결과는 비선택적 제초제 저항성 유

전자가 도입된 형질전환 잔디는 재배 관리 비용의 절감으로 인한 경제적 이득의 증가뿐만 아니라 제초제 사용량을 줄이는 효과도 있어 보다 환경친화적인 작물이 될 수 있음을 시사한다. 따라서 본 연구에서 개발하고자 하는 GM 들잔디 신품종은 제초제 저항성 유전자와 함께 녹화 연장, 스트레스 내성 조절 유전자 등이 도입되어 있으므로, 잔디 재배 관리 비용의 절감 및 경제적 이득 증가에 상승효과를 유발할 수 있을 것으로 생각된다.

- 개발된 GM 작물은 환경위해성 평가를 통해 환경방출 승인을 얻어야만 상업적 재배가 가능한데 여기에서 가장 중요한 항목이 유전자 이동에 의한 주변생태계에 대한 영향이다. 제주대학교의 제초제 저항성 들잔디의 경우, 3m 이상의 거리에서는 야생형 잔디로의 유전자 이동 가능성이 거의 없는 것으로 나타났고, 같은 *Zoysia*속에 속하는 야생 잔디는 금잔디, 갯잔디 등 두 종에 불과할 뿐만 아니라 교배 가능성도 매우 낮은 것으로 확인되었으며, 또한 들잔디의 자연 상태에서의 발아율은 약 4% 이내로 타 작물에 비해 매우 낮아 자연 상태에서 발아하였을 경우, 우점잡초에 의해 생육이 억제되어 보통 자연 소멸하는 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과로부터, 본 연구에서 개발되는 형질전환 들잔디는 현재까지 환경방출 승인된 타 GM 작물보다 주변 자연환경이 미치는 영향이 매우 적을 것으로 보여 GM 작물의 환경 위해성 평가를 통과하는 데에는 큰 문제가 없을 것으로 판단된다.
- 유전자 변형 작물 산업화의 기술적 요소의 두 번째인 작물 형질전환과 이벤트 육성에 있어서 협동기관인 제주대학교 이효연 교수 연구팀은 국내 들잔디의 형질전환 기법을 확립하고 있으며, 이를 통하여 ‘Transgenic zoysiagrass with reduced shade avoidance(7045680, 미국 특허등록)’과 ‘식물 광수용체 파이토크롬의 고효율 돌연변이의 개발 및 이를 이용한 유전자 조작 식물 개발(국내 특허등록 : 10-0475211)’에 대한 특허등록을 완료하였으며, 현재 이에 대한 안정성 평가가 진행 중에 있어 조만간 GM 품종 등록을 통한 실용화에 접어들 것으로 판단된다. 또한 협동기관인 상명대학교 연구팀은 국화 품종에 대한 고효율 형질전환 식물체 육성 및 특성 검정 시스템을 확립하였으며, 이를 통하여 최근 성장성 향상 및 녹기연장 특성을 보이는 우량 국화 품종 개발을 성공하였다. 이러한 국화 고효율 형질전환 시스템 확립 및 이벤트 육성 기술은 우량 국화 품종 개발에 공헌할 수 있는 핵심 기술이다.
- 따라서 이와 같은 고품질 잔디 및 국화 신품종 개발에 대한 주관기관과 협동기관의 기술력은 본 사업의 성공에 대한 초석이 될 것이다.

다. 연구개발의 핵심성

- 고품질 농업형질을 가진 들잔디와 국화 품종을 개발하기 위해서는 생산성 증대 및 녹기연장과 같은 목표형질을 제공하는 유전자의 확보 및 발굴과, 고품질 잔디 및 국화 품종 개발에 있어 핵심 기술인 고효율 형질전환 시스템 확립 및 우수 계통 육성 기술이 관건이다.
- 본 연구팀은 애기장대의 AT-hook 유전자중 주관기관에서 확보하고 있는 *ATPGs*가 그들의 발현 정도에 따라 생산성 증대 그리고/혹은 녹기연장의 표현형적 특징을 제공한다는 사실을 규명하였다. 이러한 유전자중 *ORE7*을 잔디에 도입한 결과, 그들의 발현 정도에 따라 tiller 생성 증가와 같은 생산성 증대와 녹기연장의 표현형적 특징을 가진다는 사실을 선

행 연구를 통해서 밝혔으며(그림 3), 국화에서는 녹기 연장이라는 대표적인 표현형적 특징을 제공한다는 사실을 알았다(그림 4). 이와 같은 사실은 *ORE7*과 같은 AT-hook domain을 가지는 *ATPGs*도 잔디 및 국화에서 고품질 농업형질을 제공하리라 생각된다. 따라서 이와 같은 선행연구는 본 사업을 통하여 우량 잔디 및 국화 품종 개발이 가능하게 할 것이며, 또한 실용화에 있어서도 성공 가능성이 높을 것으로 사료된다.

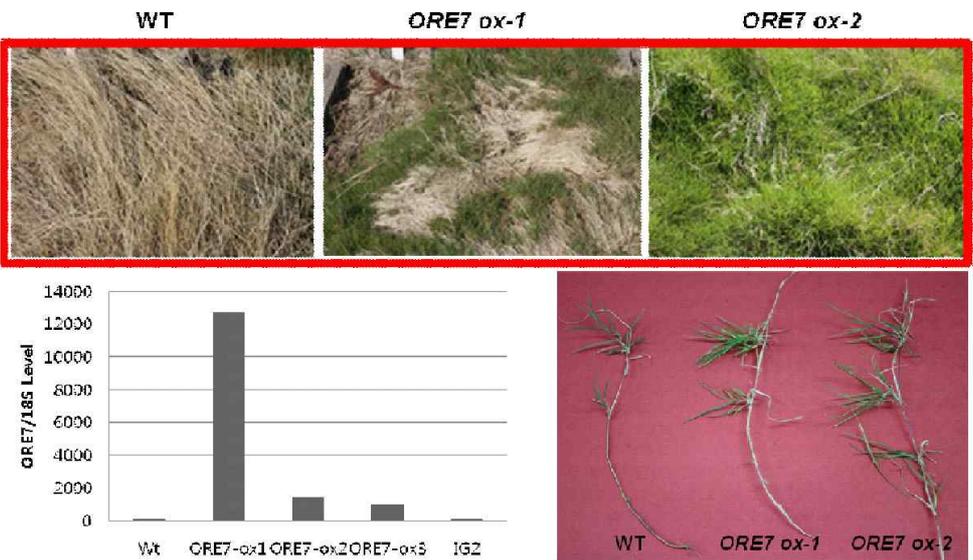


그림 3. Phenotype of transgenic turf-grass and change of the number of tillers by different level of *ORE7* gene expression in the transgenic turfgrass. WT: wild type, *ORE7 ox-1* and *ORE7 ox-2*. transgenic lines.

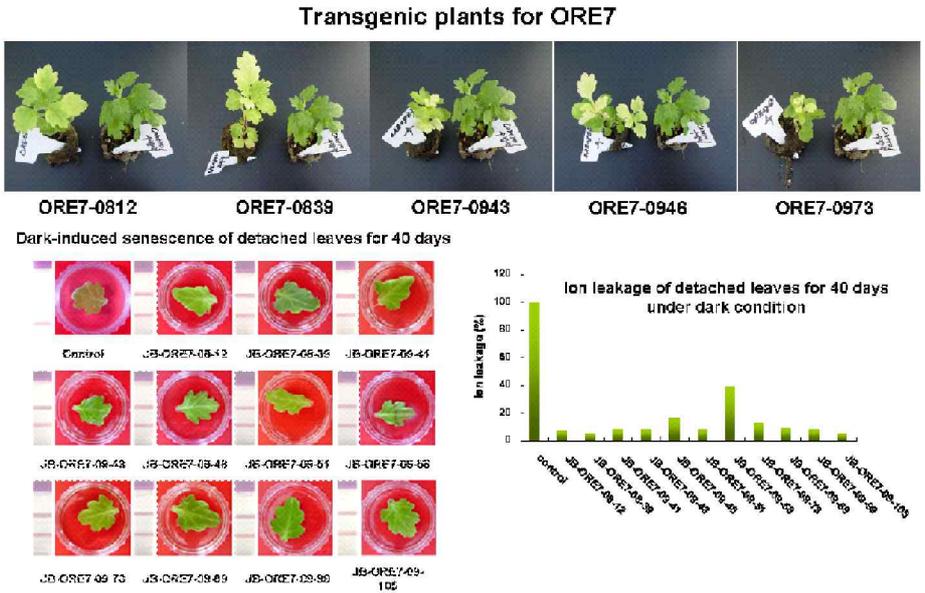


그림 4. *ORE7* 유전자가 도입된 국화 형질전환체의 수명연장에 대한 표현형적 특징

- 따라서 본 연구개발은 다양한 기능성 유전체 연구를 통하여 확보된 변이체로부터 바이오매스 증대, 종자 수확량 증가, tiller 생성 증가와 같은 생산성 증대, 그리고 녹기 연장의 목표형질관련 유용 유전자를 확보 및 신규 발굴하고, 들잔디 및 국화에서의 활용성을 연구하며, 기능 검정된 유용 유전자원을 들잔디 및 국화 품종 개발에 적용하여 생산성 증대와 녹기 연장의 목표형질을 통해 고품질 농업형질을 가지는 GM 들잔디 및 국화 신품종 개발을 목적으로 한다.
- 고품질 농업형질 발현 기술: GM 잔디 및 국화 신품종 개발에 있어서 생산성 증대 및 녹기 연장관련 유전자의 발굴 및 기능 검정은 고품질 잔디 및 국화 품종 개발에 범용적 응용이 가능한 핵심 기술이다. 본 연구팀은 고품질 잔디 및 국화 품종 개발의 연구 추진 속도를 가속화하기 위하여 일차적으로 기 확보된 유용 유전자를 잔디 및 국화 품종 개발에 적용하고자 하며(잔디: *ATHG1*, *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*, *ATPG8*, *ATPG10*, 국화: *ORE15*, *ATPG4*, *ATPG7*, *ATPG10*), 보다 다양한 그리고 보다 강력한 표현형질을 가진 품종을 개발하기 위하여 기능성 유전체 연구 혹은 확보 유전자에 대한 homology approach 등을 통하여 확보된 변이체로부터 신규 유용 유전자를 발굴하고, 그 기능을 검정하여 신품종 개발에 적용하고자 한다.
- 잔디 형질전환 기술: 잔디의 품종 개발은 전통적인 육종 방법을 이용하고 있으나, 최근 분자생물학적 방법을 이용하여 신품종 개발이 시도되고 있다. 그러나 전체적으로 아직 잔디에 대한 안정적인 형질전환에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 그러나 본 연구팀은 한국의 자생 잔디인 들잔디 및 한지형 잔디인 벤투그라스를 이용하여 아그로박테리움을 매개로 한 고효율의 안정적인 형질전환 기법을 확립하였다. 이러한 아그로박테리움 매개 잔디 형질전환 기법은 본 과제의 핵심기술이다.
- 국화 형질전환 기술: 국화의 품종 개발은 전통적인 교배 육종 방법을 통하여 활발히 진행되어 왔으며 이를 통하여 수천 개의 품종이 개발되었다. 그러나 국화는 교배 육종을 위한 유전자 pool이 제한되어 있으며 스탠다드 품종의 경우 교배가 쉽지 않고 종자생산량이 적고 품종 육성에 어려움이 많으므로 특정 형질의 품종 육성에서는 생명공학적인 기법을 이용한 신품종 개발의 가능성이 매우 크다고 생각된다. 현재까지 국화에서는 형질전환을 통하여 다양한 유용 유전자를 도입한 형질전환체 개발에 대한 연구가 시도되고 있음에도 불구하고 현재까지 형질전환 기술을 이용한 품종화에 대한 보고는 거의 없는 실정이다. 이는 국화의 안정적인 형질전환 기법의 미확보와 함께 국화에서 도입 유전자의 발현을 효율적으로 제어할 수 있는 기술이 확립되어 있지 않기 때문이라고 생각된다. 그러나 본 연구팀은 아그로박테리움을 매개로 한 형질전환을 통하여 간접 기관형성을 거쳐 형질전환 식물체를 재생시키는 안정적이고 재현성 있는 고효율 형질전환 기술을 확보하고 있다. 이러한 아그로박테리움 매개 국화 형질전환 기법은 본 과제의 핵심기술이다.

라. 선행연구 내용 및 결과

1) 고품질 잔디 및 국화 품종 개발용 유용 유전자 확보

- 주관 기관인 체노마인(주)은 식물의 기능성 유전체 연구를 통하여 생산성 증대, 녹기 연장, 스트레스 저항성 등 농업에 직접 이용 가능한 식물 유용 기능성 유전자의 대량발굴을 수행하고 있으며, 여기에 gene expression profiling 기법인 plant proteomics를 접목하여 생체 내 gene networking 등 유전자의 기능을 효율적으로 밝히고 있는 중이다. 본 사업에 적용할 확보 유전자는 다음과 같다.

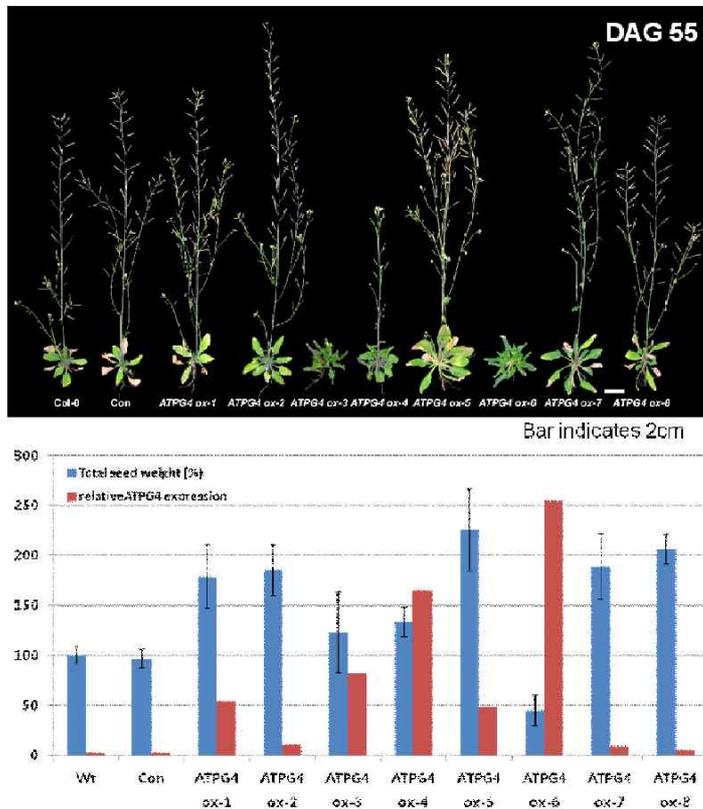


그림 5. The correlation between yield increase and senescence delay of plants by the level of *ATPGs* overexpression

- *ATPGs* (AT-hook proteins of Genome) - *ATHG1*, *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*, *ATPG8*, *ATPG10*. 본 연구팀이 발굴한 AT-hook 유전자들은 공통적으로 식물의 노화 진행 동안 chromatin의 안정성을 제공하여 식물의 바이오매스와 종자 수확량 증가와 같은 생산성 증대, 그리고 노화 지연의 표현형적 특징을 나타내었다. 흥미로운 점은 이러한 표현형적 특징은 적용 유전자의 발현 레벨에 따른다는 것이다. 적용 유전자의 발현이 강하면 강할수록 노화 지연의 표현형이 강력하게 나타나고, 적용 유전자의 발현이 낮은 수준을 유지하면 식물의 바이오매스 증대 및 종자 수확량 증가와 같은 생산성 증대에 대한 특징적인 표현형을 가졌으며, 유전자의 발현이 적절히 조절되면 노화 지연과 바이오매스 및 종자 수확량 증가

와 같은 생산성 증대의 복합형질을 가지는 것으로 나타났다. 이러한 생산성 증대와 녹기 연장의 복합 형질은 고품질 GM 들잔디 및 국화 품종 개발에 많은 장점을 제공할 것으로 판단된다(그림 5). 최근 식물의 cytokinin signaling pathway 분석을 통하여 *ATPGs*는 cytokinin receptor 중 *CRE1*의 발현을 비례적으로 조절하고, *AHPs*(histidine phosphotransfer proteins)의 발현을 조절하여 노화 지연 그리고/혹은 생산성 증대 형질을 제공하는 것으로 본 연구팀은 제안하고 있다. 노화 지연의 형질은 *AHP4/6*의 발현 감소에 의하여, 반면 생산성 증대의 형질은 *AHP4/6*의 발현 증가에 의하여 유도되는 것으로 나타났다. 이상의 연구 결과를 종합한 가설이 그림 6에서 제시되고 있다. 현재 이러한 가설에 대한 보다 정확한 기작 분석을 위하여 계속 연구를 진행되고 있다. 또한 본 기술은 건조 등과 같은 기후변화 대응에 있어서도 저항성을 제공하여 생산성 증대와 녹기 연장뿐만 아니라 다양한 환경에 대한 스트레스 저항성 형질 제공에 있어서도 보다 많은 장점을 제공할 것으로 확신한다.

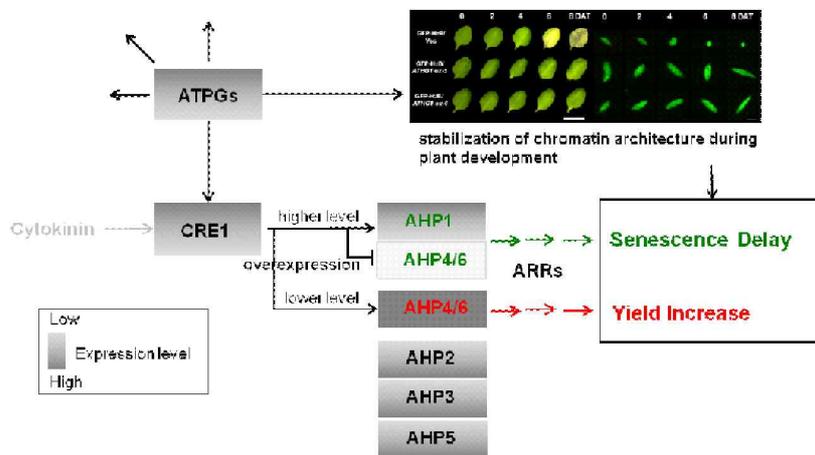


그림 6. Proposed model for the prominent role of *ATPGs* in the yield increase and senescence delay

- 우리는 본 기술이 고품질 작물 개발에 적용이 가능한지를 확인하기 위하여 콩과 잔디 그리고 국화에 본 기술과 관련된 유전자인 *ORE7*을 적용하여 생산된 형질전환체의 표현형적 특징을 조사하였다. 그 결과 콩, 잔디 그리고 국화 모두에서 기대했던 표현형적 특징, 즉 종자 수확량 증가, tiller 수의 증가 등과 같은 생산성 증대와 녹기 연장의 표현형적 특징이 나타남을 확인할 수 있었다. 따라서 본 기술이 잔디 및 국화의 고품질 품종 개발에 적용이 가능하리라 판단하고, 이러한 유전자의 적용은 본 사업의 성공에 대한 확신을 제공한다.
- 본 연구팀은 발굴한 AT-hook 유전자 중 6종을 본 사업에 적용하였으며, 기능성 유전체 연구 혹은 homology approach 등을 통하여 생산성 증대와 녹기 연장에 대한 강력한 형질을 제공하는 유전자들을 추가적으로 발굴하고 있는 중이다.

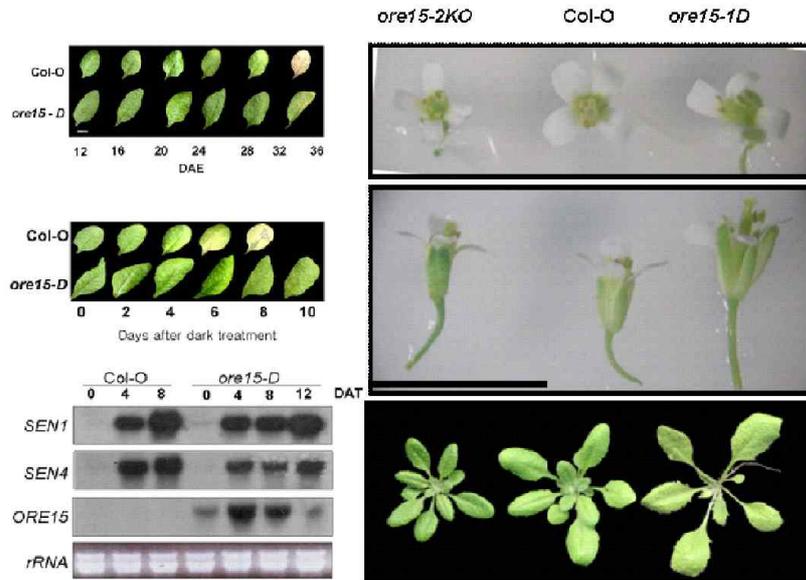


그림 7. *ORE15* 유전자의 과발현으로 인한 애기장대의 수명연장 및 개체 크기 신장에 대한 표현형적 특징

○ *ORE15* activation tagging 변이체 pool에서 노화지연 표현형을 가지는 변이체로부터 발굴된 유전자로, 흥미롭게도 앞선 AT-hook 유전자와 마찬가지로, 노화지연을 통한 식물의 수명연장이라는 표현형적 특징뿐만 아니라 biomass의 증가, 특히 개체 크기의 증가라는 표현형적 특징도 제공하였다(그림 7). 본 유전자는 zink finger domain을 가지는 전사인자이다. 따라서 *ORE15* 유전자의 국화 적용은 식물의 녹기 연장이라는 측면뿐만 아니라 개체 크기 신장이라는 측면에서 고품질 농업형질을 가진 국화 신품종 개발을 가능하게 하리라 판단된다.

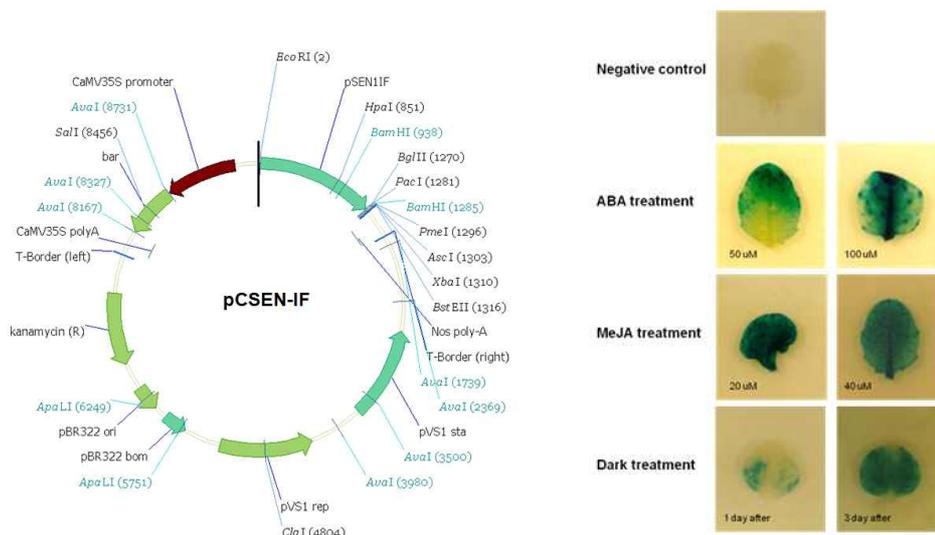


그림 8. pCSEN-IF vector map for soybean transformation and the vector activity against various stress conditions

2) GM 국화 실용화 연구를 위한 형질전환용 벡터 개발

- GM 국화 실용화 연구를 위하여 제노마인(주)은 SEN1 promoter를 이용한 pCSEN 벡터를 개발하였다. pCSEN 벡터의 SEN1 promoter는 포항공대 남홍길 박사가 발굴한 promoter로 특허출원 없이 국제 학술지에 논문으로 게재한 상태로 특허의 청구 범위에 있어서 자유롭고, 식물의 발달 단계 중 노화관련 및 부분적으로 스트레스 관련 promoter이기 때문에 식물의 발달 초기에는 정상적 생육을 유지할 수 있는 장점이 있고, 본 연구팀에서 발굴하는 유전자 그룹은 최고 발현 조건이 아닌 상대적으로 낮은 발현 조건에서 최적의 기능을 가지기에 본 벡터의 사용은 고품질 우량 국화 품종 개발에 보다 많은 장점을 제공하리라 판단된다(그림 8).

3) 잔디 형질전환 시스템 확립 및 형질전환체 개발

- 본 과제의 협동 기관인 이효연 교수 연구팀은 들잔디 형질전환 체계를 이미 확립하여 논문으로 발표한 바 있다(Toyama et al., *Molecules and Cells*, 2003) (그림 9). 또한 비선택성 제초제인 BASTA에 대한 저항성 유전자(*bar*)를 갖고 있는 제초제 저항성 들잔디를 개발하여 국제특허도 보유하고 있다. 이 잔디는 현재 '제주그린21'이라는 이름으로 환경위해성 평가 마무리 단계이며 상업화를 위한 준비를 하고 있다. 또한 이효연 교수 연구팀은 한국형 잔디인 들잔디 형질전환 시스템 확립과 더불어 한지형 잔디인 벤투그라스의 형질전환 시스템도 확립하여 애기장대의 건조/저온 스트레스 내성 유전자인 *ABF3*를 한지형 벤투그라스 중 하나인 *Agrostis mongolica* Roshev.에 도입시켜 스트레스 저항성 유도에 성공한 바 있다(Enkhchimeg et al., *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2006).

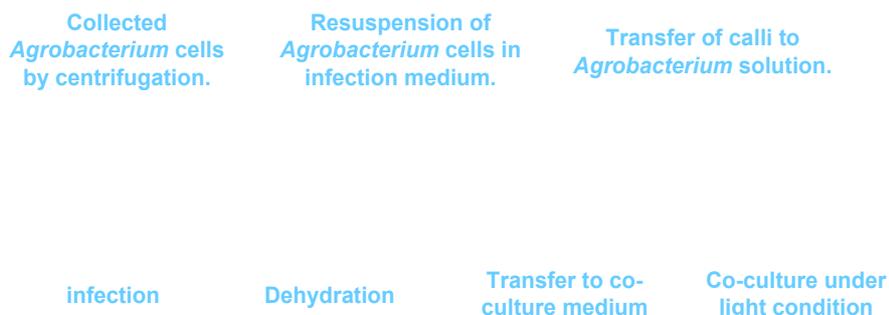


그림 9. 확립된 잔디 품종의 형질전환 기술 기법

협동 기관인 제주대는 우량 잔디 품종을 개발하기 위하여 주관기관이 확보하고 있는 5종의 애기장대 유전자를 잔디에 도입하여, *ATHG1*, *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7* 그리고 *ATPG8*이 삽입된 잔디 형질전환체 생산에 성공하였다(그림 10-14 참조). 현재 유전자당 보다 많은 개체를 확보하기 위하여 형질전환 및 형질전환체 생산을 계속 실시하고 있으며, 확보된 형질전환체는 분자생물학적 검증, 생리생화학적 특성 평가 및 포장시험을 통한 우수계통 선발을 수행하여 안정성 평가 진입을 위한 기반을 구축할 예정이다. 이와 같은 선행연구는 본 사

업의 성공에 대한 확신을 제공한다.

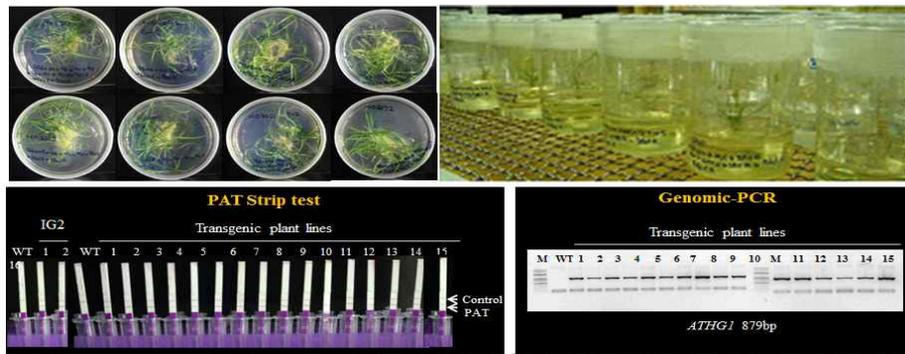


그림 10. *ATHG1* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 선발 및 유전자 도입 확인

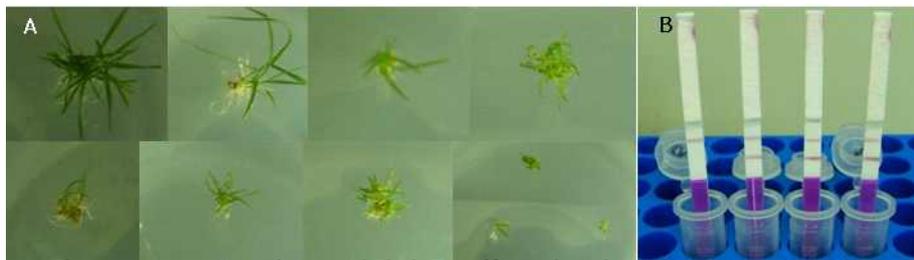


그림 11. *ATPG3* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 선발 및 유전자 도입 확인



그림 12. *ATPG4* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 선발 및 유전자 도입 확인

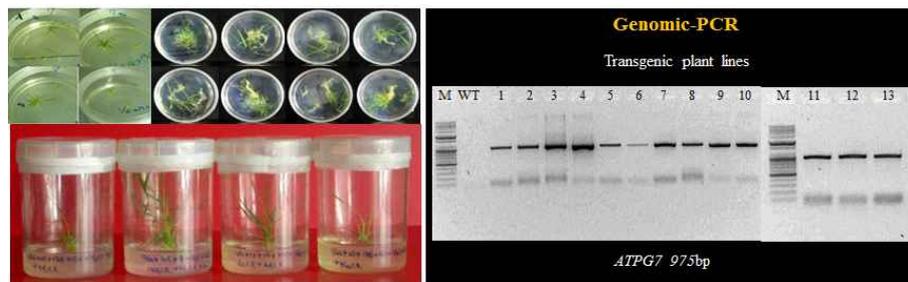


그림 13. *ATPG7* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 선발 및 유전자 도입 확인

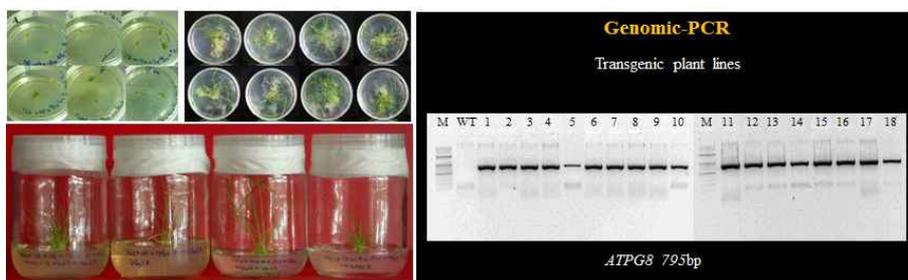


그림 14. *ATPG8* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 선발 및 유전자 도입 확인

4) 국화 형질전환 시스템 확립 및 형질전환체 개발

- 본 연구개발의 협동기관인 상명대학교 형남인 교수 연구팀은 다양한 국화 품종의 고효율 식물체 재분화 기술을 개발한 바 있다. 기내 배양된 배양체에서 얻어진 잎을 절단한 절편체로부터 기관형성 방식으로 고효율의 신초를 유도하고 발근 과정을 거쳐 성공적으로 식물체를 재생시킬 수 있었다. 재생 식물체는 온실에서의 재배를 거쳐 표현형 검정을 실시하였을 때 유전적으로 안정한 상태를 유지하였다(그림 15).

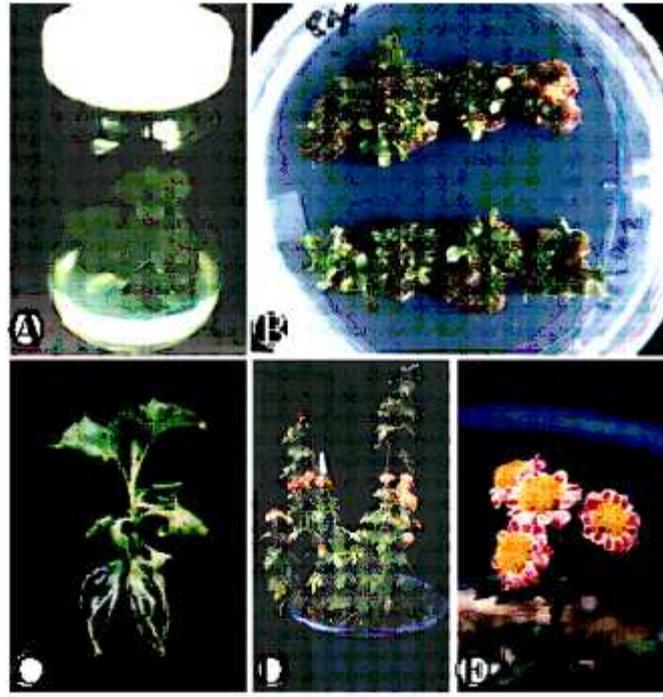


그림 15. 국화 잎 절편으로부터 식물체 재생

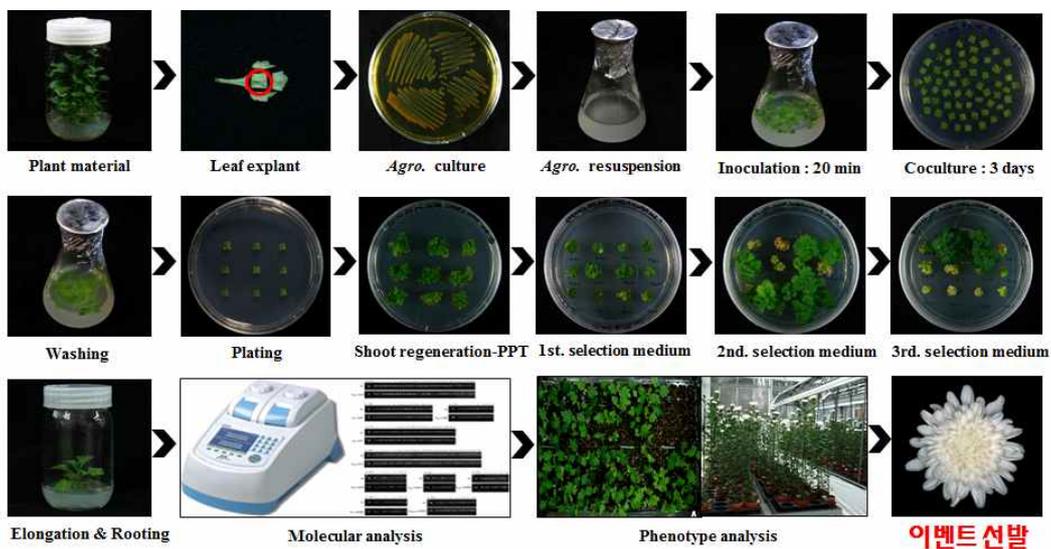


그림 16. 국화 형질전환 식물체 육성 및 특성 검정 시스템

- 또한, 본 연구팀은 이를 바탕으로 *Agrobacterium* 매개 형질전환 기술을 개발하였는데, 현재 국화 스탠다드 품종과 스프레이 품종의 *Agrobacterium* 매개 형질전환을 통하여 2~10%의 형질전환 효율을 얻을 수 있는 기술을 확보하고 있다. 특히 본 연구팀은 형질전환체 선발 시 기존의 논문이나 대다수의 연구팀에서 사용되는 선발제(Phosphinothricin)의 농도를 높게 유지한 상태에서 신초를 유도하여 국화 형질전환에서 많이 나타나는 escape의 발생을 최소화할 수 있는 효율적인 국화 형질전환 기술을 확보하고 있다. 기내 배양을 통해 신장과 발근이 이루어진 형질전환체의 분자분석을 통해 형질전환체를 선발한 후, 온실에 활착을 시켜 표현형 검정 및 목표형질 특성을 분석하여 우량 국화 형질전환체를 선발하는 시스템을 확보하였다(그림 16).
- 본 연구개발의 협동연구기관인 상명대학교는 주관기관과 공동으로 국화의 생산성 증대 및 녹기 연장 형질전환체 개발에 대한 연구를 수행하고 있으며, 이를 통하여 국화 스탠다드 품종인 '신마'에 각각 *ORE15*, *ATPG4* 그리고 *ATPG7* 유전자가 도입된 형질전환체 생산에 성공하였다(그림 17-19 참조). 현재 유전자당 보다 많은 개체를 확보하기 위하여 형질전환 및 형질전환체 생산을 계속 실시하고 있으며, 이들 형질전환체의 분자 분석 및 온실 재배를 통하여 고성장성 및 녹화 연장 특성을 분석하여, 고성장성 및 녹화 연장의 특성을 보이는 형질전환체를 선발하고자 한다. 그림 17은 *ORE15* 유전자가 도입된 국화 형질전환체 생산 및 기능 분석에 대한 요약이다. 이러한 형질전환 기술 및 형질전환체 생산 및 기능 분석 기술은 본 사업의 성공에 대한 초석이 될 것이다.

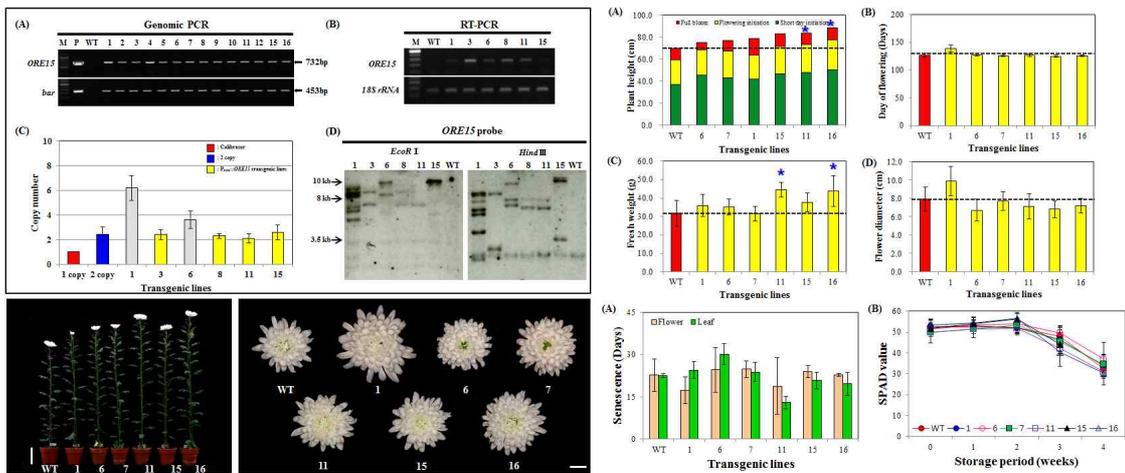


그림 17. 생산성 증대 및 녹기연장 유전자, *ORE15* 도입 국화 형질전환체의 분자 분석 및 표현형 검정

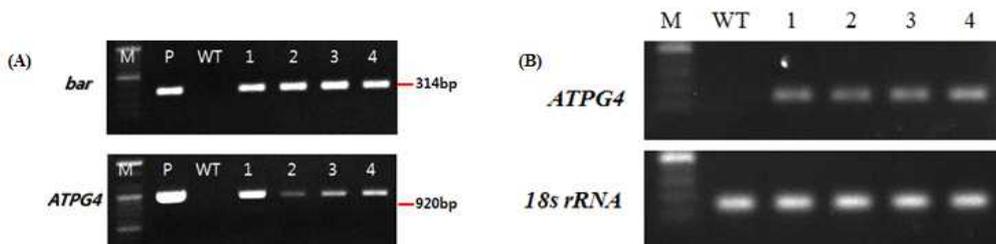


그림 18. *ATPG4* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 PCR과 RT-PCR을 통한 유전자 도입(A) 및 발현(B) 검정

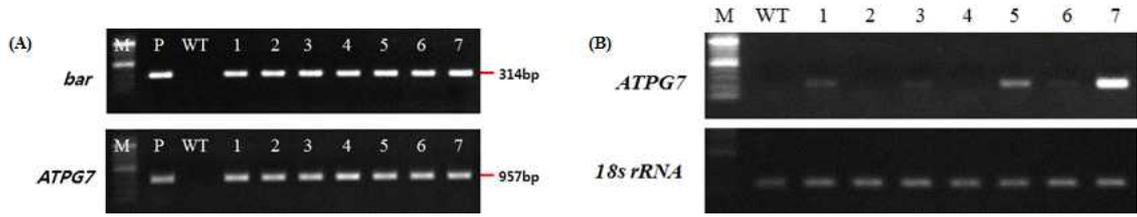


그림 19. *ATPG7* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 PCR과 RT-PCR을 통한 유전자 도입(A) 및 발현(B) 검정

제 3 절. 연구개발의 국·내외 현황

가. 국내외 시장 현황

○ **잔디**는 단위면적당 생산단가가 타 작물에 비해 월등히 높은 고부가 경제 작물이며(작물 평균 323불/acre, 잔디 3,300불/acre, 2007 Census of Agriculture Data Release), 세계 4대 작물 중 하나인 옥수수 다음으로 시장 규모가 크다. 이러한 잔디 시장은 약 50조원의 규모를 가지는 것으로 알려지고 있다. 미국의 경우, 잔디 시장 규모는 1974년 이후 지속적인 성장세를 가져 2002년 이후 안정적으로 10억불 정도의 시장규모를 가지는 것으로 나타났다. 그런 반면 우리나라의 경우, 2002년을 기준으로 잔디 산업 시장 규모는 약 7,500억원이며 이중 잔디 생산업은 2,000억원, 잔디 종자는 200억원, 그리고 떼 생산은 650억원으로 보고되고 있다(한국잔디학회, 2002년)(그림 20). 이러한 사실은 잔디 품종 개발이 매력적인 사업이며, 고부가 가치 창출이 가능한 사업이라 예측된다.

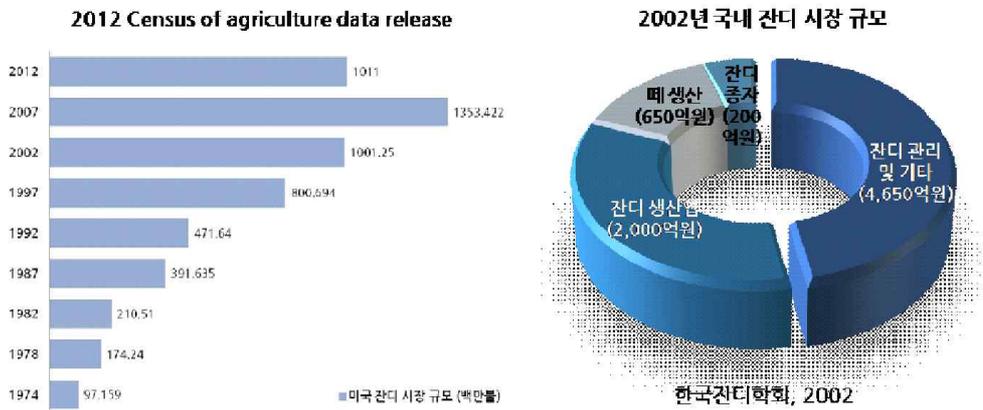


그림 20. 미국 잔디시장 규모 및 우리나라 잔디 시장 규모 (2012 Census of agriculture data release, 2012; 한국잔디학회, 2002)

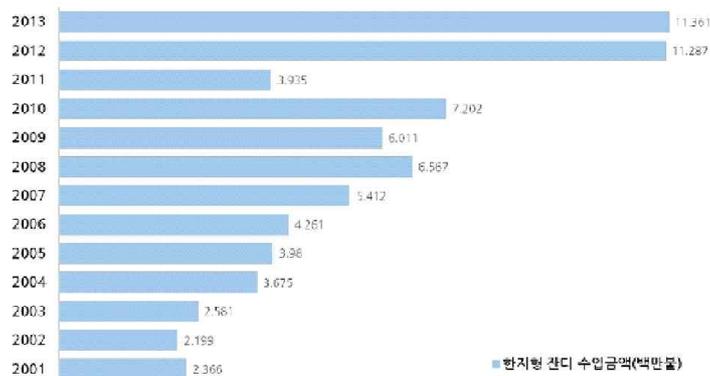


그림 21. 연도별 한지형 잔디 종자 총량 (관세청 무역통계 자료)

○ 이러한 시장 구조에 있어서 우리나라 잔디 생산 산업은 많은 부분을 잔디 수입에 의존하고 있으며 이러한 경제적 불균형은 국가 경제에 막대한 타격을 주고 있다. 일례로 연도별 한지형 잔디 수입 총량을 보면 1995년 약 80만불에서 2004년 350만불로 기하급수적인 증가세

를 보이는 것을 알 수 있다(그림 21).

- 한편, 화훼 작물가운데 국화는 세계 3대 절화 작물의 하나인 주요 작물의 위치를 확보하고 있는데, 전 세계 재배 현황은 그림 22와 같다. 주요 국가를 보면 일본과 네덜란드가 최대 생산 국가이며, 콜롬비아가 그 뒤를 잇고 있다.



그림 22. 국화의 2006년 전 세계 생산량 (Berkum, 2007)
<http://blog.maripositas.org/horticulture/world-chrysanthemum-production>

- 국내 화훼 산업에 있어서 절화 식물의 생산동향을 보면 재배면적 기준으로 국화는 장미와 함께 대표적인 작목으로서 전체 절화 재배면적의 약 30%를 차지하고 있다(그림 23).

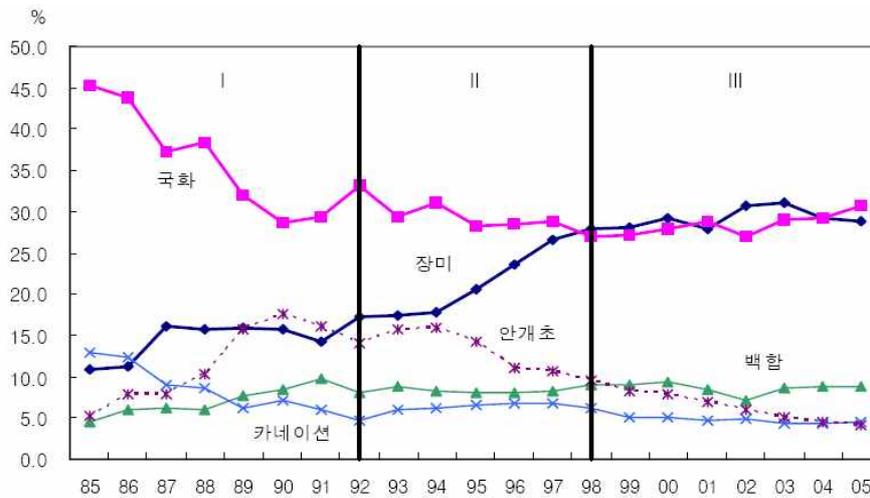


그림 23. 주요 절화류 작목별 재배면적 비중 변화 (농림부 화훼재배현황 참조)

- 우리나라에서 국화는 화훼류 단일 품목으로는 가장 많은 재배면적을 가지고 있다. 상업용으로 이용되는 국내 국화재배는 대부분 절화용으로서 2012년 기준 국내 전체 절화류 재배 면적 1,724ha 중 국화는 527ha가 재배되었으며, 이는 전체 절화 재배면적의 약 30%에 해당

된다(표 1 참조).

표 1. 우리나라 절화의 전체 및 국화 재배현황

(단위 : ha, 백만본, 백만원)

	2011			2012			증감율(%)		
	면적	판매량	판매금액	면적	판매량	판매금액	면적	판매량	판매금액
절화 전체	1,904	851	286,281	1,724	726	259,076	△9.5	△14.7	△9.5
국화	575	292	73,396	527	270	70,514	△8.3	△7.5	△3.9

(자료) 농림부 화훼재배현황

- 국내의 화훼수출은 1990년대 시설현대화 지원으로 고품질 수출품 생산기반을 마련한 이후 꾸준한 증가 추세를 나타내고 있다. 그러나 수출 초창기에는 수입이 수출을 초과하여 만성적인 무역수지 적자 품목으로 인식되어 왔다가, IMF 이후 환율 상승에 의한 수출경쟁력 향상으로 수입은 감소한 반면 수출은 크게 증가되었다. 그 결과, 1999년에 처음으로 무역수지 흑자를 기록하였으며, 2008년도 우리나라 화훼류 수출실적은 7,600백만불로서 10여년 사이에 약 700%나 증가하였다. 주요 수출 대상국은 일본, 중국, 네덜란드 등으로서, 현재 이들 3개국이 우리나라 전체 수출의 90% 이상을 차지하고 있으며, 특히 일본은 우리나라 수출의 50%를 상회한다.
- 2004년에 국내에서 개발된 국화 신품종인 백마 등의 대일 수출이 증가하는 추세를 보이고 있는 여건으로 보아 앞으로 지속적인 수출확대가 예상된다. 우리나라는 수출의욕이 매우 높지만 앞으로 인도, 중국, 베트남 등 노임이 낮고, 좋은 기후조건의 나라들과 경쟁하기 위해서는 고도의 첨단재배기술 및 식물특허제도 도입, 신유통 기술 확립, 육종기술력의 증가를 통한 신품종 개발 등 적극적인 대책이 필요하리라 생각된다.

표 2. 우리나라 국화 수출 현황

(단위 : kg)

품목	2011년	2012년	2013년	2014년
국화	1,445,907	1,397,799	1,186,789	829,344

(자료) 농수산물무역정보. www.kati.net

표 3. 우리나라 절화 국화 일본 수출 현황

구분	2013년		2014년		연간전년대비	
	중량(kg)	금액(\$)	중량(kg)	금액(\$)	중량(%)	금액(\$)
국화	1,185,164	6,881,598	823,857	4,701,198	-30.50	-31.70

(자료) 농수산물무역정보. www.kati.net

- 최근 일본의 전체적인 화훼류 수출의 감소와 중국의 난수출 감소가 화훼수출 감소의 원인이며, 특히 엔화하락에 따른 일본수출 감소가 화훼수출 감소의 주원인이 되고 있다. 이러한 현상은 국화에서도 같은 동향을 가지는 것으로 나타났다(표 2와 3). 따라서 이와 같은 수출 감소 현상을 극복하기 위해서는 고품질의 신품종 개발을 통한 수출 증대가 필수적일 것으로 판단된다.

나. 국내외 기술개발 동향 및 수준

1) 잔디

- 국내외 잔디의 품종 개발은 전통적인 육종 방법을 이용하고 있으나, 최근 분자생물학적 방법을 이용하여 신품종 개발이 시도되고 있다. 그럼에도 불구하고 전 세계적으로 벤트그라스 등 극히 몇몇 품종에서만 형질전환의 성공 사례가 보고되고 있을 뿐 아직 잔디에 대한 안정적인 형질전환에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 잔디 품종 개발에 있어서 유용 유전자 삽입이 가능한 형질전환 기법은 전 세계적으로 공통적인 기술 적용의 범위이며, 국내외에서 가지는 유전자 변형 작물에 대한 문제는 최근 GM 잔디의 안정성 평가 등의 방법을 통하여 부분적으로 해결되고 있는 실정이다. 따라서 이와 같은 유전자 변형 작물 문제 해결 능력은 이후 보다 좋은 품질의 신 기능성 우량 잔디 품종 개발에 크게 이바지할 것이며, 이러한 예측은 형질전환을 통한 잔디 신품종 개발에 있어서 보다 많은 기회를 제공할 것이다.
- **국내:** 지금까지 국내외 잔디의 품종 개발은 주로 전통적인 육종 방법을 이용해 왔으며, 현재까지 우리나라에서 육종된 품종으로는 중지(안양, 삼덕, 창원, 장성, 송원중지 등), 건희, 세늬, 밀룩이 있으며, 1965~1971년에 서울대학교에서 국내외 수집된 계통 중 63개의 우수 계통을 육성하여 그 중 들잔디(*Z. japonica*)와 갯잔디(*Z. sinica*), 왕잔디(*Z. macrostachya*) 자연교잡종인 중지를 선발하였다. 그 이후, 전국 각지에서 수집한 지역종의 유전자원을 확보하여 수집계통들의 형태적 특성을 조사하고 RAPD 분석 등을 통해 한국잔디의 기본 5종을 분류하여 이를 기본으로 최근까지 선발, 인공교배, 합성품종, 형질전환기술 등을 활용하여 한국잔디품종 개발/육성을 시도하고 있다(산림청연구보고, 2010).
- 최근 생명공학기술을 이용한 신품종 개발이 적극 시도되고 있지만, 전 세계적으로도, 벤트그라스 등 극히 몇몇 품종에서만 형질전환의 성공 사례가 보고되고 있을 뿐 아직 잔디에 대한 안정적인 형질전환에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.
- 국외에서는 잔디 신품종 개발에 있어서 애기장대 등 모델식물의 유전자를 활용한 연구개발이 활발한 반면, 국내의 잔디 품종 개량에 대한 애기장대 유용 유전자의 적용은 아직 미미한 실정이다. 최근 본 과제의 협동기관은 애기장대 유전자인 *phyA*를 잔디에 도입한 음지내성형 잔디뿐 만 아니라 애기장대 유전자인 *ORE7*을 통한 녹기연장 잔디 및 *AtSIZ*를 통한 염 스트레스 저항성 잔디 형질전환체 개발에 성공하였는데, 이는 애기장대 유전자 도입을 통한 잔디 품종 개발의 성공 가능성을 제시해주고 있는 매우 중요한 연구 사례이다.

- 본 연구개발의 협동기관인 제주대 연구팀은 <들잔디 형질전환> 분야에서는 다년간의 기술 축적으로 국내외적으로 독보적인 위치를 선점하고 있다.
- **국외:** 국외에서의 잔디 신품종 개발은 주로 미국을 중심으로 이루어지고 있는데, 미국은 한국, 일본, 대만, 필리핀, 중국 등에서 많은 한국잔디의 유전자원을 수집하여 대학과 종자회사에서 우수한 품종들을 육성, 보급하고 있다. 과거 아시아에서 한국잔디가 유입되어 미국에서부터 한국잔디의 품종육성이 시작되었고, 그 당시 미국의 잔디 육종가들은 들잔디(*Z. japonica*), 비단잔디(*Z. tenuifolia*), 금잔디(*Z. matrella*)가 잔디로서의 가능성이 있다고 판단, 들잔디로부터 선발된 'Meyer'가 내한성, 진한 녹색, 중엽형의 특성을 가진 우수한 잔디로 널리 이용되기 시작하였으며, 미국농무성에서 들잔디와 비단잔디를 인공교배해서 만든 최초의 교잡종인 'Emerald'가 개발되었으며, 녹병과 내건성이 강한 'El Toro' 등의 중엽형 잔디가 개발되었다(산림청 연구보고, 2010).
- 1998년 Pursley Sod Co.에서 최초로 특허권이 인정된 'Cashmere' 품종을 등록하여 한국잔디의 상업화를 시켰으며, 현재는 California 대학과 Texas A&M 대학에서 한국잔디의 육종에 힘쓰고 있으며, Engelke(1999)는 품질이 우수한 영양계 품종으로 금잔디(*Z. matrella*) 'Cavalier'을 선발하여 등록하였다(산림청 연구보고, 2010).
- 세계적으로 보면, 잔디 품종 개발의 많은 부분이 애기장대 등 모델식물의 유전자를 도입하는 형질전환 기술을 통한 유전자 변형 잔디 품종 개발에 집중하고 있으며, 특히 제초제 저항성, biotic/abiotic 스트레스 저항성 등과 같은 기능성 잔디 품종 개발에 집중하고 있다. 또한 잔디 관리의 편리성을 제공하는 크리핑 벤투그라스와 같은 기능성 품종 개발에도 많은 연구를 집중시키고 있는 중이며 이러한 품종 개발에 대한 국내외의 주요동향 및 대표사례를 아래 표 4에서 제시하였다.

표 4. 식물 생명공학 기법을 이용한 잔디 품종개발 동향

기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
미국 Rutgers 대학, Monsanto사, Scott사	왜소형 형질전환 잔디 개발 (크리핑벤투그라스)	판매 준비 중
Monsanto 사	제초제 저항성 잔디 품종 개발	마지막 승인 절차 준비 및 판매 준비 중
중국 Zhejiang 대학	제초제 저항성 벼류다 잔디 품종 개발	형질전환 성공 및 품종 개발
미국 캔사스 주립대학	크리핑 벤투그라스에서 T-DNA 융합의 특성 분석	연구 진행 중
제주대학교	제초제 저항성 잔디 품종 개발	품종의 안전성 평가 중
금호연구소, 제주대학교	음지 내성형 제초제 저항성 잔디 품종 개발	애기장대 유전자의 잔디 적용 가능성 제시

2) 국화

- **국화 절화 수명연장 연구:** 대부분 국화 품종의 절화 수명은 꽃보다 잎의 황화나 시들음에 의하여 지배되는 것으로 알려져 있어 다른 화훼류에 비하여 잎의 노화 지연에 대한 연구가 재배와 육종에 있어서 중요한 일이다. 그럼에도 불구하고 절화 수명의 재배와 육종 연구에 있어서 잎의 역할에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다.
- 최근 들어 절화 수명연장을 위하여 다양한 연구가 수행되고 있는데, 메탄올, 에탄올, benzyladenine(BA)과 paclobutrazol 등이 국화 절화의 수명을 연장시키고 생체중 감소를 줄여주고, 엽록소 함량을 증가시키는 것으로 알려졌다. 특히 BA는 꽃잎에서의 안토시안 형성을 다소 방지하여 천연의 색을 유지함으로써 절화 수명도 연장하는 효과를 보이기도 하였다. 국내에서도 에틸렌 생합성 억제제인 STS, sucrose, 그리고 열탕처리 등으로 처리하여 절화 수명을 연장하는데 효과를 얻었다. 그러나 다양한 처리를 통한 수명연장 기술과 함께 식물 생명공학 기술을 통하여 녹기연장을 기반으로 절화 수명이 연장된 신품종 개발이 병행되는 것이 최고의 효율을 얻게 될 것이라 생각된다.
- **생명공학기술을 이용한 국화 형질전환 연구:** 국화의 형질전환은 여러 연구 그룹에 의해 성공되었는데, 대부분 *Agrobacterium tumefaciens*가 사용되었으며(Lemieux et al., 1990; Ledger et al., 1991; Boase et al., 1998; Petty et al., 2003), 일부 biolistics가 이용되기도 하였다(Yepes et al., 1995). 국화의 형질전환 효율은 절편체 출처, 재생 과정, binary vector의 사용, 선발제의 선택 또는 유전자 도입 방법에 따라 차이를 보이며, 폐놀화합물로서 T-DNA의 유도인자인 acetosyringone은 삼입 유전자의 도입을 촉진시켰다(Boase et al. 1998; Bush and Pueppke 1991; Lowe et al. 1993).
- 국화에서 형질전환을 통한 유용 유전자 도입은 바이러스 저항성(Urban et al., 1994; Kumar et al., 2012), 병저항성(Toguri et al., 2003; Sen et al. 2013), 해충 저항성(Dolgov et al., 1997; Shinoyama et al., 1997)에 대한 1세대 유전자 변형 국화 개발에 많은 연구가 집중되었으며, 화색 변화(Courtney-Gutterson et al. 1994; Noda et al., 2013), 생장형 변화(Jiang et al., 2010, Huh et al. 2013), 개화 조절(Shuiga et al, 2011) 등과 같은 2세대 유전자 변형 작물 개발은 아직 제한적으로 연구가 되고 있는 실정이다.
- 국화는 재생 및 형질전환에 관하여 다양한 연구가 이루어졌음에도 불구하고 현재까지 개발된 국화의 형질전환 protocol이 낮은 형질전환 효율과 품종 특이성으로 인하여 일반적으로 사용되지 못하고 있다. 국화의 성공적인 형질전환을 위해서는 (1) *Agrobacterium*에 대한 반응성이 높으며, (2) 도입 유전자의 발현이 효율적으로 이루어지는 품종의 선택과 함께 (3) 선택된 품종에 적합한 재생 시스템의 확보가 필요하다.
- 국화의 형질전환 기술은 1990년대에 활발히 보고되어 이미 기술 확립이 완료된 상태이며, 최근에는 이를 이용한 유전자 도입 형질전환 식물체 개발에 대한 보고가 이루어지기 시작하고 있다. 국내에서도 화색조절유전자 도입을 통한 국화 신품종 개발 방법에 대한 특허가 등록되었으며(국내특허등록번호: 100726874), 형질전환 효율을 높이기 위한 프로모터 개발

에 대한 논문 보고가 뒤따르고 있어 분자생물학적 접근에 의한 신품종 개발 관련 특허 출원이 증가할 것으로 보이나, 여전히 식물 분자유종 기술을 이용한 국화 품종 개발은 지극히 제한적인 실정이다.

3) 고품질 농업형질관련 유용 유전자 발굴 및 작물 적용

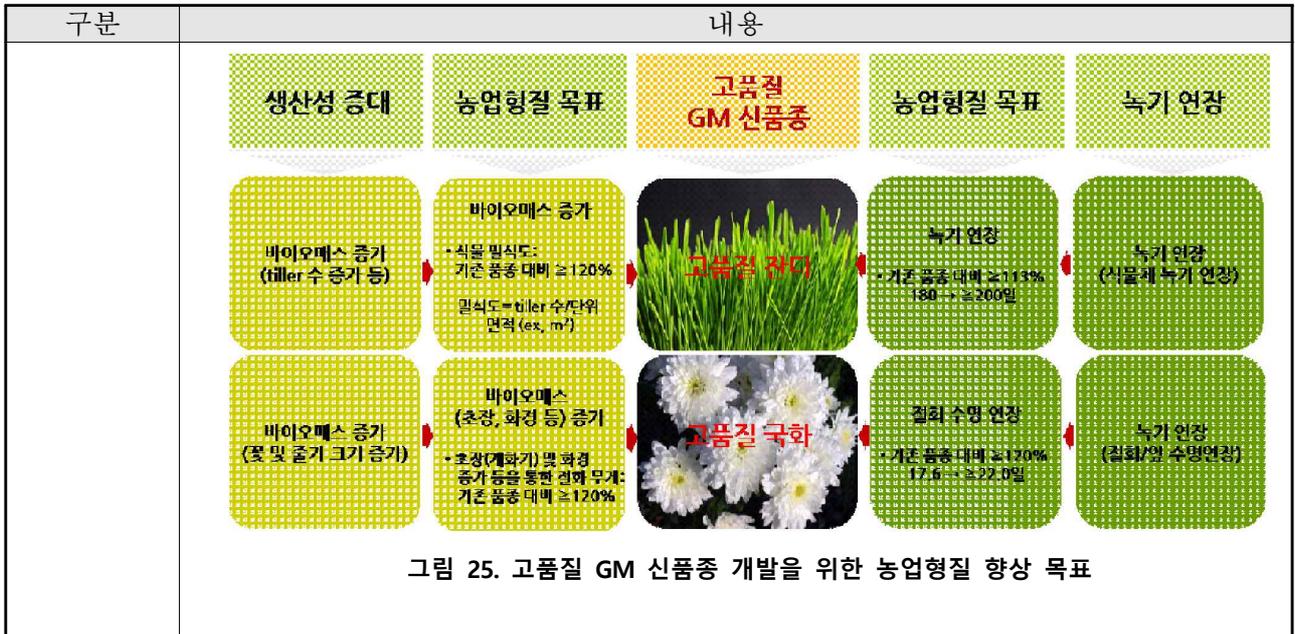
- 식물의 생산성 증대 및 녹기 연장 조절은 생물학적 중요성뿐만 아니라 작물의 생산성 조절 가능성 때문에 많은 생리학적, 생화학적 연구가 수행되어 왔으며 유전학적, 분자생물학적 연구는 최근 수년 사이에 많이 진행되고 있다. 최근 많은 연구팀들이 식물의 생산성 증대, 녹화 연장 혹은 다양한 환경 스트레스 조절 관련 유용 유전자를 이용한 생산성 증대 및 기능 강화 신품종 혹은 신기능성 작물의 개발에 연구를 집중하고 있으며, 식물 유용 유전자를 통한 우수 작물 개발을 여러 연구팀이 시도하고 있는 중이다.
- **생산성관련 성장발달 유전자에 대한 연구:** 세포 분열로의 진입을 유도하는 상위 조절 경로에 대한 연구- 기관 크기의 증대를 보이는 과발현 형질전환체 혹은 돌연변이체의 지속적인 발견과 원인 유전자의 클로닝 및 기능 해석을 통해 *Membrane Related Bigger 1 (AtMRB1)*, *Big Brother (BB)*, ribosomal protein 유전자들, *Spatula (SPT)*, *Arabidopsis Vacuolar Pyrophosphatase 1 (AVP1)* 등 다양한 유전자들이 꾸준히 보고되고 있다(Guan et al., 2009; Disch et al., 2006; Heisler et al., 2001; Li et al., 2005). 한편으로, 세포 분열 기간을 연장시키는 전사조절인자인 *AINTEGUMENTA(ANT)*를 주축으로 세포 분열의 상위 유전자들의 신호 전달 경로에 대한 연구들 또한 진행되고 있는데(Mizukami and Fisher, 2000), 그 결과, *ANT* 유전자는 세포 주기 조절 인자인 Cyclin D3;1과 결합하며 *ANT*의 발현에 옥신이 관여한다고 연구 결과가 최근 발표되었다(Fishcher et al., 2007). 이 밖에, *Gibberellin 20-oxidase 1 (GA20ox1)*을 이용한 지베렐린, *Brassinosteroid Insensitive 1(BRI1)*을 이용한 브라시노스테로이드 등 다양한 파이토호르몬 관여 유전자의 재조합을 통해 파이토호르몬이 세포 증식에 미치는 신호 경로를 밝혀 가고 있는 중이며, 또한 유전자 레벨에서의 트랜스크립토프로파일링과 함께 프로테옴 분석을 위한 데이터베이스 구축을 시도하고 있다.
- **식물 유용 유전자의 작물 적용:** 애기장대에서 발굴한 유용 유전자의 고부가가치 작물 개발에 대한 적용은 다양한 작물에서 알려지고 있다. 애기장대 *phyB* 유전자 도입으로 감자에서 광합성 효율 및 기공의 conductance 증가를 유발하여 high intensity 조건하에서 tuber number 및 yield의 증가가 유발된 고부가 형질전환 감자 품종 개발에 실시하고 있다(Boccalandro et al., 2003). 또한 미국의 Texas Tech. Univ.와 Univ. of California Davis 연구팀은 애기장대의 vacuolar sodium/proton antiporter 유전자인 *AtNHX1*을 면화에 도입하여 염 스트레스 내성뿐만 아니라 포장에서 보다 양질의 fiber 생산량 증가 표현형을 가지는 우수 면화 품종 개발에 실시하고 있다(He et al., 2005). 주관기관인 제노마인(주)는 생산성 증대와 녹기연장 형질을 제공하는 AT-hook 유전자를 집중적으로 발굴하고 이를 콩, 잔디, 국화 등의 작물 개발에 적용하고 있다.
- 최근 면화에서 분리된 cytokinin 조절 유전자인 GhCKX의 발현억제는 생산성 증대와 녹기

연장의 형질을 제공하는 것으로 알려졌다. 본 유전자의 극심한 발현 억제는 녹기연장의 형질을, 그런 반면 적절한 발현 억제는 fiber와 종자의 생산성 증대를 유도한다고 보고되고 있다(Zhao et al., 2015). 이러한 유전자의 기능은 발현 억제를 통한 목표형질을 제공한다는 점에서 앞서 언급한 AT-hook 유전자의 기능과 상반되기는 하지만, 발현 조절을 통해 생산성 증대 및 녹기 연장을 형질을 제공한다는 점에서 본 연구개발에서 적용하는 AT-hook 유전자의 발현 조절과 유사한 패턴을 가진다. 이러한 사실은 본 연구개발에서 적용하는 AT-hook 유전자의 발현 조절을 통한 생산성 증대, 그리고/혹은 녹기연장의 농업형질을 가지는 고품질 GM 작물 개발에 대한 중요한 단초를 제공하리라 판단된다.

제 4 절. 연구개발 범위

가. 연구개발의 최종 목표 및 내용

구분	내용
<p>최종목표</p>	<p>○ 연구개발의 최종 목적은 한국 자생 잔디인 들잔디(<i>Zoysia japonica</i>) 및 국화(<i>Chrysanthemum morifolium</i>)에 생산성 증대 및 녹기 연장의 목표형질관련 유용 유전자를 도입하여 고품질 농업 형질을 가지는 GM 들잔디 및 국화 품종을 개발하고 이를 실용화하는 데 있다(그림 24).</p> <div data-bbox="411 689 1321 1137" data-label="Diagram"> </div> <p style="text-align: center;">그림 24. 연구개발 목적</p> <p>○ 이를 위하여 본 연구기간 동안 다음의 연구개발 목표를 달성하고자 한다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 고효율 들잔디/국화 형질전환 시스템을 확립하고, 2. 생산성 증대 및 녹기 연장의 목표형질관련 유용 유전자를 확보 및 발굴하고자 한다(7종 확보 및 3종 발굴). 3. 확보 및 발굴된 유용 유전자를 들잔디 및 국화에 도입하여 8종의 들잔디 및 6종의 국화 형질전환체를 생산하고(20 개체 이상/유전자), 4. 생산된 형질전환체를 대상으로 생산성 증대 및 녹기 연장의 목표형질에 대한 기능 분석을 실시하여 4종의 우량 형질전환체를 개발하고자 한다(잔디 2종, 국화 2종). 5. 개발된 우량 형질전환체에 대한 포장시험을 통하여 고품질 농업형질 발현 우수 계통 2종을 육성하여(작물 당 1종, 농업형질: $\geq 120\%$ 생산성 증대 및 녹기 연장, 그림 24), GM 들잔디 및 국화 품종 개발에 적용하고자 한다. 6. 선별된 우수 계통에 대한 품종 개발은 추후 GM 작물 실용화 연구를 통하여 추진하며, 본 사업동안의 추진 단계는 우수 계통 육성까지를 수행한다.



세부목표	<p>○ 생산성 증대 및 녹기 연장 등의 목표형질 발현 유용 유전자 확보 및 발굴 (총 10종)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질 발현 유용 유전자 확보: <i>ORE15</i>, <i>ATHG1</i>, <i>ATPG3</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG8</i>, <i>ATPG10</i> (7종) <ul style="list-style-type: none"> - 들잔디 적용: <i>ATHG1</i>, <i>ATPG3</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG8</i>, <i>ATPG10</i> - 국화 적용: <i>ORE15</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG10</i> • 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검증 (3종) <ul style="list-style-type: none"> - 변이체 표현형 분석 및 분자·생리·생화학적 기능 조사 - 유용 유전자에 대한 loss-of-function, gain-of function 애기장대 변이체 표현형 및 기능 분석 - 생산성 증대 및 녹기 연장 관련 조사를 통한 목표형질 확인(모델 식물에서 목표형질 $\geq 130\%$ 개선) <p>○ 잔디 및 국화의 고효율 형질전환 시스템 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> • 들잔디 및 국화에 대한 고효율 재분화 시스템 확립 • 들잔디 및 국화에 대한 형질전환 시스템 효율 개선 <p>○ 형질전환 및 형질전환체 생산: 총 14종 (들잔디 8종, 국화 6종)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 형질전환용 벡터 construct 제작 및 형질전환 • 형질전환체 생산(20 개체 이상/유전자): 들잔디 8종, 국화 6종 • 형질전환체 1차 기능분석: 유전자 도입 및 발현 분석 <p>○ 형질전환체 기능 분석을 통한 생산성 증대 및 녹기 연장형질 발현 우량 형질 전환체 개발: 총 4종 (들잔디 2종, 국화 2종)</p>
------	--

구분	내용
	<ul style="list-style-type: none"> • 형질전환체 기능 분석 (총 12종: 들잔디 7종, 국화 5종) <ul style="list-style-type: none"> - 형질전환체 1차 표현형 분석 - 형질전환체의 도입 유전자 기능 확인을 통한 목표형질 규명 (목표형질 $\geq 120\%$ 개선) • 우량 형질전환체 개발 (총 4종: 들잔디 2종, 국화 2종) <ul style="list-style-type: none"> - 형질전환체의 온실 및 소규모 포장 검정을 통한 농업형질 규명 - 도입형질 고정 형질전환체 계통 육성 <p>○ 고품질 농업형질 발현 우수 계통 2종 육성: 들잔디 1종, 국화 1종</p> <ul style="list-style-type: none"> • 포장시험을 통한 고품질 농업형질 발현 우수 계통 2종 육성: 들잔디 1종, 국화 1종 <ul style="list-style-type: none"> - 농업형질(생산성 증대 및 녹기 연장) $\geq 120\%$ 개선 - GM 들잔디 및 국화 신제품 등록을 위한 예비 조사 <p>○ 특허 및 논문 등의 지적소유권 확보: 총 8건</p> <ul style="list-style-type: none"> • 특허 출원/등록: 4건 • 논문 게재: 4건 (SCI급, 3건)

나. 연차별 개발 목표 및 내용

. 기관별 연구개발 목표 및 내용

	연구 개발 최종 목표	연구 개발 내용
(주) (주관기관)	생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질 관련 유용 유전자 확보, 발굴 및 기능 검정	· 목표형질 발현 유용 유전자 확보: <i>ORE15, ATHG1, ATPG3, ATPG4, ATPG7, ATPG8, ATPG10</i> · 생산성 증대 및 녹기 연장 형질 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정
	유용 유전자가 도입된 잔디 및 국화 형질전환체 생산	· 유용 유전자의 잔디 및 국화 도입 및 형질전환체 생산 - 유용 유전자의 잔디 및 국화 도입을 위한 vector construct 제작
	목표형질 및 고품질 농업형질에 대한 잔디 및 국화 형질전환체 기능 분석	· 기능 분석을 통하여 고품질 농업형질을 가지는 우량 형질전환체 개발 - 형질전환체의 목표형질 분석 (목표형질 $\geq 120\%$ 개선) - 형질전환체의 농업형질 분석 (농업형질 $\geq 120\%$ 개선)
	우량 형질전환체의 GM 작물 실용화 탐색	· GM 작물 실용화 탐색: - 특허 회피 벡터 제작, 벡터 시스템 점검, 도입 유전자의 안정성 점검 등 - 형질전환체 실용화를 위한 국내 종자회사와의 협의 및 마케팅
	지적소유권 확보	· 특허출원 4건
제주대 (협동기관)	잔디 형질전환 및 형질전환체 생산	· 고효율 들잔디 형질전환 시스템 확립 · 유용 유전자의 잔디 도입 및 형질전환체 생산 - 잔디 형질전환 및 형질전환체 생산 (20 개체 이상/유전자) - 형질전환 잔디의 1차 기능 분석: 유전자 도입 및 발현 분석
	우량 잔디 형질전환체 개발	· 기능 분석을 통하여 농업형질을 가진 우량 잔디 형질전환체 개발 - 형질전환 잔디의 1차 표현형 분석 - 형질전환체의 도입 유전자 기능 확인을 통한 목표형질 규명 - 형질전환 잔디의 온실 및 포장시험을 통한 농업 형질 규명 - 도입형질 고정 형질전환체 계통 분석
	고품질 농업형질 발현 우수 이벤트 선발	· 포장시험을 통한 고품질 농업형질 발현 우수 이벤트 선발 - 농업형질 $\geq 120\%$ 개선 - GM 들잔디 신제품 등록을 위한 예비 조사
	지적소유권 확보	· 논문 게재 2건 (SCI급, 2건)
상명대 (협동기관)	국화 형질전환 및 형질전환체 생산	· 고효율 국화 형질전환 시스템 확립 · 유용 유전자의 국화 도입 및 형질전환체 생산 - 국화 형질전환 및 형질전환체 생산 (20 개체 이상/유전자) - 형질전환 국화의 1차 기능 분석: 유전자 도입 및 발현 분석
	우량 국화 형질전환체 개발	· 기능 분석을 통하여 농업목표 형질을 가진 우량 국화 형질전환체 개발 - 형질전환 국화의 1차 표현형 분석 - 형질전환체의 도입 유전자 기능 확인을 통한 목표형질 규명 - 형질전환 잔디의 온실 및 포장시험을 통한 농업 형질 규명 - 도입형질 고정 형질전환체 계통 분석
	고품질 농업형질 발현 우수 이벤트 선발	· 포장시험을 통한 고품질 농업형질 발현 우수 이벤트 선발 - 농업형질 $\geq 120\%$ 개선 - GM 국화 신제품 등록을 위한 예비 조사
	지적소유권 확보	· 논문 게재 2건 (SCI급, 1건)

. 1차년도 연구개발 목표 및 내용

구분	기관	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도 (2016년)	제노마인	증대 및 녹기 연장 목표형질 발현 유용 유전자 확보 및 발굴 (총 8종)	<ul style="list-style-type: none"> · 목표형질 발현 유용 유전자 확보: <i>ORE15</i>, <i>ATHG1</i>, <i>ATPG3</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG8</i>, <i>ATPG10</i> (7종) · 생산성 증대 및 녹기 연장형질 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 (1종) · 형질전환용 벡터 construct 제작 들잔디: <i>ATHG1</i>, <i>ATPG3</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG8</i>, <i>ATPG10</i> 국화: <i>ORE15</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG10</i>
	제주대	잔디의 고효율 형질전환 시스템 확립	· 들잔디에 대한 고효율 재분화 시스템 및 고효율 형질전환 시스템 확립
		잔디 형질전환 및 형질전환체 생산: 6종	<ul style="list-style-type: none"> · 들잔디 형질전환 및 형질전환체 생산 (6종) - 형질전환 및 형질전환체 생산: 6종 - 형질전환체 1차 기능분석: 유전자 도입 및 발현 분석 (PCR, RT-PCR, Southern blot 등)
		생산성 증대 및 녹기 연장형질 발현 우량 들잔디 형질전환체 개발	<ul style="list-style-type: none"> · 형질전환체 기능 분석: 3종 - <i>ATHG1</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG8</i> 도입 형질전환체 1차 표현형 분석: 녹기 연장 관련 형질 조사
	상명대	국화의 고효율 형질전환 시스템 확립	· 국화에 대한 고효율 재분화 시스템 및 고효율 형질전환 시스템 확립
		국화 형질전환 및 형질전환체 생산: 4종	<ul style="list-style-type: none"> · 국화 형질전환 및 형질전환체 생산 (4종) - 형질전환 및 형질전환체 생산: 4종 - 형질전환체 1차 기능분석: 유전자 도입 및 발현 분석 (PCR, qPCR, RT-PCR)
	제노마인	특허 및 논문 등의 지적소유권 확보: 1건	· 특허 출원: 1건

. 2차년도 연구개발 목표 및 내용

구분	기관	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2차년도 (2017년)	제노마인	증대 및 녹기연장 목표형질 발현 유용 유전자 발굴: 총 3종	<ul style="list-style-type: none"> · 생산성 증대 및 녹기 연장형질 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 (2종) · 형질전환용 벡터 construct 제작 · 들잔디: 신규 유용 유전자 2종 · 국화: 신규 유용 유전자 2종
	제주대	잔디 형질전환 및 형질전환체 생산: 총 8종	<ul style="list-style-type: none"> · 들잔디 형질전환 및 형질전환체 생산 (2종) - 신규 유전자 2종에 대한 형질전환 및 형질전환체 생산: 2종 - 형질전환체 1차 기능분석: 유전자 도입 및 발현 분석(PCR, RT-PCR, Southern blot 등)
	제주대/ 제노마인	생산성 증대 및 녹기 연장형질 발현 우량 들잔디 형질전환체 개발	<ul style="list-style-type: none"> · 형질전환체 기능 분석: 들잔디 5종 - <i>ATPG3</i>, <i>ATPG4</i> 도입 형질전환체 1차 표현형 분석: 녹기 연장관련 형질 조사) - <i>ATHG1</i>, <i>ATPG3</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG8</i> 도입 형질전환체 목표형질 규명 · 우량 형질전환체 개발: <ul style="list-style-type: none"> - 우수 잔디 형질전환체 계통들의 증식 및 포장 식재
	상명대	국화 형질전환 및 형질전환체 생산: 총 6종	<ul style="list-style-type: none"> · 국화 형질전환 및 형질전환체 생산 (2종) - 신규 유용 유전자 2종에 대한 형질전환 및 형질전환체 생산: 2종 - 형질전환체 1차 기능분석: 유전자 도입 및 발현 분석 (PCR, qPCR, RT-PCR)
	상명대/ 제노마인	생산성 증대 및 녹기 연장형질 발현 우량 국화 형질전환체 개발	<ul style="list-style-type: none"> · 형질전환체 기능 분석: 국화 3종 - 형질전환체 1차 표현형 분석 - 형질전환체의 목표 형질 규명 · 우량 형질전환체 개발: <ul style="list-style-type: none"> - 형질전환체의 온실 및 소규모 포장 검정을 통한 농업 형질 규명
	전 기관	특허 및 논문 등의 지적소유권 확보: 총 4건	<ul style="list-style-type: none"> · 특허 출원: 2건 · 논문 게재: 2건 (SCI급, 1건)

. 3차년도 연구개발 목표 및 내용

구분	기관	연구개발의 목표	연구개발의 내용
3차년도 (최종)	제노마인	증대 및 녹기 연장 목표형질 발현 유용 유전자 확보 및 발굴 (총 10종)	<ul style="list-style-type: none"> · 목표형질 발현 유용 유전자 확보: <i>ORE15</i>, <i>ATHG1</i>, <i>ATPG3</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG8</i>, <i>ATPG10</i> (7종) · 생산성 증대 및 녹기 연장형질 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 (최종 3종) · 신규 유용 유전자에 대한 형질전환용 벡터 construct 제작 (들잔디 및 국화 각 최종 3종)
	제주대	잔디 형질전환 및 형질전환체 생산: 8종	<ul style="list-style-type: none"> · 들잔디 형질전환 및 형질전환체 생산 (8종) - 형질전환 및 형질전환체 생산: 최종 8종 - 형질전환체 1차 기능분석: 유전자 도입 및 발현 분석
	제주대/ 제노마인	고품질 농업형질 발현 우량 들잔디 형질전환체 개발: 2종	<ul style="list-style-type: none"> · 형질전환체 기능 분석: 들잔디 7종 - 형질전환체 1차 표현형 분석 - 형질전환체의 목표 형질 규명 · 우량 형질전환체 개발: 들잔디 2종 - 우수 잔디 형질전환체 계통들의 증식 및 포장 식재 - 형질전환체의 온실 및 소규모 포장 검정을 통한 농업 형질 규명 - 도입형질 고정 형질전환체 계통 육성
	제주대	들잔디에 대한 고품질 농업형질 발현 우수 계통 1종 육성	<ul style="list-style-type: none"> · 포장시험을 통한 고품질 농업형질 발현 우수 계통 육성: 들잔디 1종 - GM 들잔디 및 국화 신품종 등록을 위한 예비 조사
	상명대	국화 형질전환 및 형질전환체 생산: 6종	<ul style="list-style-type: none"> · 국화 형질전환 및 형질전환체 생산 (6종) - 형질전환 및 형질전환체 생산 최종 6종 - 형질전환체 1차 기능분석: 유전자 도입 및 발현 분석
	상명대/ 제노마인	고품질 농업형질 발현 우량 국화 형질전환체 개발: 2종	<ul style="list-style-type: none"> · 형질전환체 기능 분석: 국화 5종 - 형질전환체 1차 표현형 분석 - 형질전환체의 목표 형질 규명 · 우량 형질전환체 개발: 국화 2종 - 형질전환체의 온실 및 소규모 포장 검정을 통한 농업 형질 규명 - 도입형질 고정 형질전환체 계통 육성
	상명대	국화에 대한 고품질 농업형질 발현 우수 계통 1종 육성	<ul style="list-style-type: none"> · 포장시험을 통한 고품질 농업형질 발현 우수 계통 육성: 국화 1종 - GM 국화 및 국화 신품종 등록을 위한 예비 조사
	전 기관	특허 및 논문 등의 지적소유권 확보: 총 9건	<ul style="list-style-type: none"> · 특허 출원/등록: 4건 · 논문 게재: 4건 (SCI급, 3건)

다. 연구개발의 창의성·혁신성 등

○ 연구개발의 기반성·창의성·혁신성



고품질 GM 들잔디 및 국화 품종 개발

기반성

생산성 증대 및 녹기 연장 형질 발현 유용 유전자의 확보, 고효율 잔디 및 국화 형질전환시스템 확립, 협동기관인 제주대의 GM 들잔디에 대한 안정성 평가 기술 확립은 추후 고품질 GM 품종 개발에 있어서 많은 장점을 제공.

창의성

생산성 증대와 녹기 연장의 목표형질을 모두 가지는 신규 유전자 확보 /발굴 및 고효율 들잔디 및 국화 형질전환 시스템을 통해 신규한 고품질 GM 들잔디 및 국화 품종 개발이 가능

혁신성

기존 품종에 비하여 $\geq 120\%$ 농업형질을 제공. 생산성 증대와 녹기 연장의 복합 농업형질의 향상은 개발 GM 품종의 고부가가치를 가능하게 함

○ 성능 향상: 핵심 경쟁요인

구분	형질			비고
	제초제 저항성	생산성 증대	녹기 연장	
유전자		○	○	$\geq 130\%$ 목표형질을 가진 유전자로 모델식물과 들잔디 그리고 국화뿐 만 아니라 식량작물 인공에서도 형질발현 가능
GM 들잔디 신품종	○	바이오메스 증가 • tiller 수 증가를 통한 식물 밀식도: 기존품종 대비 $\geq 120\%$	녹기 연장 • 기존품종대비 $\geq 113\%$ 180 → ≥ 200 일	제초제 저항성으로 작물 생산단가 절감. 고품질 농업형질 발현으로 기존 사업화 품종보다 고부가가치 창출 가능
GM 국화 신품종	○	바이오메스 증가 • 초장(개화기), 화경 증가 등을 통한 절화 무게: 기존 품종 대비 $> 120\%$	절화수명 연장 • 기존품종대비 $> 120\%$ 17.6 → ≥ 22 일	제초제 저항성으로 작물 생산단가 절감. 고품질 농업형질 발현으로 기존 사업화 품종보다 고부가가치 창출 가능

제 2 장. 연구수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구개발 추진 내용

가. 연구개발 추진전략

○ 식물 형질전환 기술을 이용한 고품질 GM 들잔디 및 국화 신품종 개발에는 모델식물에서 기능이 확인된 생산성 증대 및 녹기 연장형질 관련 유전자의 확보와 잔디와 국화에 대한 형질전환체 개발 기술이 필수적이다. 본 연구팀의 주관기관인 제노마인(주)은 기능성 유전체 연구 및 프로테옴 분석 분야의 세계적인 기술력을 바탕으로 기능성 유전자 발굴 및 활용 사업을 위한 연구개발 전문회사로서 유용 식물로부터 생산성 증대, 녹기 및 수명 연장 혹은 스트레스 저항성 목표형질에 관여하는 유전자를 다량으로 분리하여 확보하고 있다. 이렇게 기 확보된 유전자는 들잔디 및 국화 형질전환 식물체 개발기술에 있어 국내 최정상 의 연구결과를 보유하고 있는 제1협동기관인 제주대학교와 제2협동기관인 상명대학교로 전달하여 들잔디와 국화로의 유전자 도입 및 형질전환체 개발을 수행할 예정이다. 개발된 형질전환 계통은 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질 발현에 대한 기능 검정을 통해 경제적 가치가 증대된 고품질 농업형질을 가진 GM 들잔디와 국화 신품종으로 육성하고자 한다. 이와 같이 본 연구에 필수적인 유전자 및 형질전환 기술을 이미 확보하고 있는 세 기관의 협력체계는 빠른 시간 내에 연구 산물 최적화와 상업화를 이룰 수 있어 많은 장점을 제공할 것으로 보인다. 유용 유전자 발굴 및 기능 검정에 있어서 보다 효과적인 시스템을 구축 하기 위하여 녹기 연장 조절에 관해서는 DGIST 남홍길 교수팀과 협조 체제를 구축하여 연 구 결과에 대한 정확한 정보 분석을 수행하고자 하며, 외부 환경 스트레스 저항성 유전자 의 경우 포항공대 황인환 교수 연구팀과 협조 체제를 구축하여 보다 정확한 결과를 유도하 고자 한다(그림 26 참조).

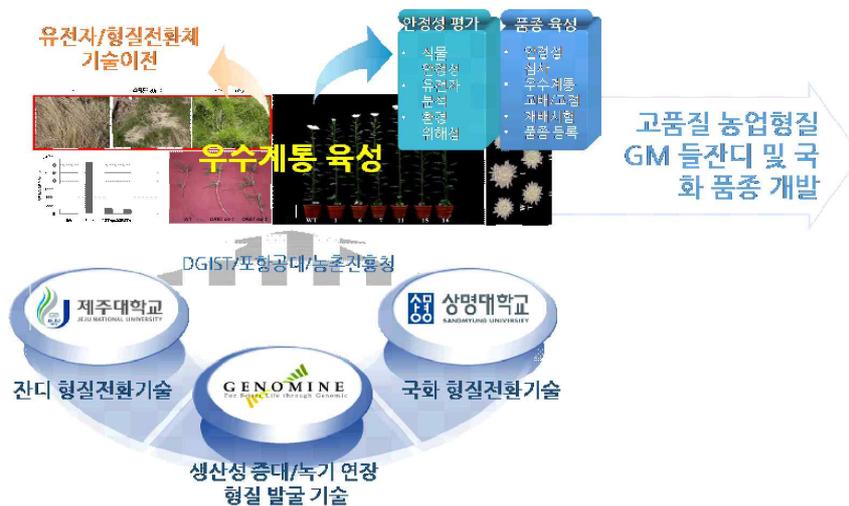


그림 26. 고품질 GM 들잔디 및 국화 품종 개발에 대한 추진 전략

나. 연구개발 추진방법

[생산성 증대 및 녹기 연장형질 관련 유전자 발굴 및 기능 검정]

- **식물의 생산성 증대 및 녹기 연장형질 관련 변이체 확보:** 모델 식물은 애기장대로 하며, activation tagging, promoter trap, advanced RAM approach 등과 같은 기능성 유전체 연구를 통하여 확보된 다량의 변이체로부터 생산성 증대 및 녹기 연장형질 관련 유용 표현형질을 지닌 변이체를 확보한다. 이때 activation tagging 기법을 통하여 확보된 변이체는 주로 gain-of-function 변이체로 고품질 농업형질에 관한 positive regulator와 관련된 유용 유전자의 발굴에 많은 장점을 가지고 있는 반면, advanced RAM approach와 promoter trap 기법을 통하여 확보된 변이체는 주로 loss-of-function 변이체로 고품질 농업형질에 관한 negative regulator와 관련된 유용 유전자의 발굴에 많은 장점을 가지고 있다. 이러한 민감성 유전자의 인위적 발현 억제는 작물의 스트레스 저항성 제공에 많은 기회를 제공할 것이다. 또한 확보한 생산성 증대 및 녹기 연장 유용 유전자의 homology approach를 통하여 애기장대뿐 만 아니라 다른 유용 식물의 유전자도 함께 분리하고자 한다.
- **유용 유전자 후보 기능 검정:** 확보된 목표형질 관련 변이체로부터 각 기법에 적절한 방법을 통하여 유전자 정보를 확보하고 고품질 농업형질과 관련된 신기능성 유용 유전자를 선별한다. 일반적으로 activation tagging 변이체 pool에서 확보된 변이체의 유전자 분리는 주로 TAIL-PCR을 수행하여 얻어지며, promoter trapping 변이체 pool에서 확보된 변이체의 유전자 분리는 plasmid rescue를 통하여, 그리고 advanced RAM 변이체 pool에서 얻어진 변이체의 유전자 분리는 inverse PCR을 통하여 얻어진다. 선별된 유전자의 기능을 재검정하기 위하여 reverse genetics를 적용한다. 이러한 연구를 통하여 얻어진 유전자의 gain-of-function과 loss-of-function 변이체의 표현형을 재확인하고, 그들의 표현 형질에 대한 생리.생화학적 현상을 구명한다. 특히 reverse genetics를 통하여 얻어진 변이체의 생리.생화학적 연구는 그 분야의 전문가에게 많은 자문과, 가능하면 공동연구를 통하여 유전자의 기능을 강화하고자 한다.
- **생산성 증대 및 녹기 연장형질 관련 변이체의 기능 검정은 일차적으로 엽록소 함량과 광합성 효율을 측정하여 변이체의 생육 활성을 조사하며 또한 분자생물학적 분석은 생육 활성에 관여하는 유전자를 indicator로 하여 유전자 발현을 분석하여 조사한다. 이와 더불어 yield parameter를 분석하여 생산성 증대 형질에 대한 기능 검정을 수행하고자 한다. 한편 변이체의 스트레스 저항성에 관한 기능 검정을 수행하기 위하여 oxidative stress (H₂O₂ 등), 건조 스트레스, 염 스트레스 등과 같은 다양한 환경 스트레스에 식물체를 일정기간 동안 방치한 후 그들의 표현형적 특징 및 생리.생화학적 특성을 조사하고자 한다.**
- **식물의 생산성 증대 및 녹기 연장형질 관련 신규 유용 유전자에 대한 지적소유권 확보:** 상기의 과정을 통하여 발굴된 생산성 증대 및 녹기 연장 형질관련 신규 유용 유전자는 고품질 GM 잔디 및 국화 신제품 개발에 적용과 함께 우선적으로 지적소유권을 확보하고자 한다. 이러한 유전자의 지적 소유권을 확보하기 위하여 주관 기관인 제노마인(주)가 기업체인 관계로 일차적으로 특허 출원을 원칙으로 하며, 이후 논문 게재를 행할 것이다.

[형질전환용 발현 벡터 construct 제작]

○ 기본적으로 쌍자엽 식물인 국화에 적용 가능하고 형질전환체 선별에 있어서 보다 용이한 제초제를 선발마커로 사용 가능한 pCAMBIA3301과 Gateway system의 pB2GW7을 사용하고자 한다. 이러한 기존 벡터는 constitute promoter인 CaMV 35S promoter를 적용하고 있다. 본 연구팀은 발아 혹은 발달 초기 특정 유전자 과발현에 의한 표현형적 변이가 나타나면, promoter의 활성이 보다 약하고 발달단계동안 조절이 가능한 스트레스 inducible promoter인 SEN1 promoter를 적용한 pCSEN 벡터를 사용하고자 한다. pCSEN 벡터의 SEN1 promoter는 DGIST 남홍길 박사가 발굴한 promoter로 특허출원 없이 국제 학술지에 논문으로 게재한 상태로 특허의 GM 작물 실용화 연구에 적용이 가능하다. 또한 SEN1 promoter는 식물의 발달 단계 중 노화관련 promoter이기 때문에 식물의 발달 초기에는 정상적 생육을 유지할 수 있는 장점이 있고, 본 연구팀에서 발굴하는 유전자의 활성은 최고 발현 조건이 아닌 최적 발현 조건을 요구하기 때문에 본 벡터의 사용은 우량 품종 개발에 보다 많은 장점을 제공하리라 판단된다(그림 27, left). 한편 본 연구팀은 전남대 김정일 박사가 개발한 단자엽 식물인 옥수수수의 ubiquitin promoter를 적용한 IG-2 벡터를 GM 잔디 품종 개발에 적용하고자 한다(그림 27, right).

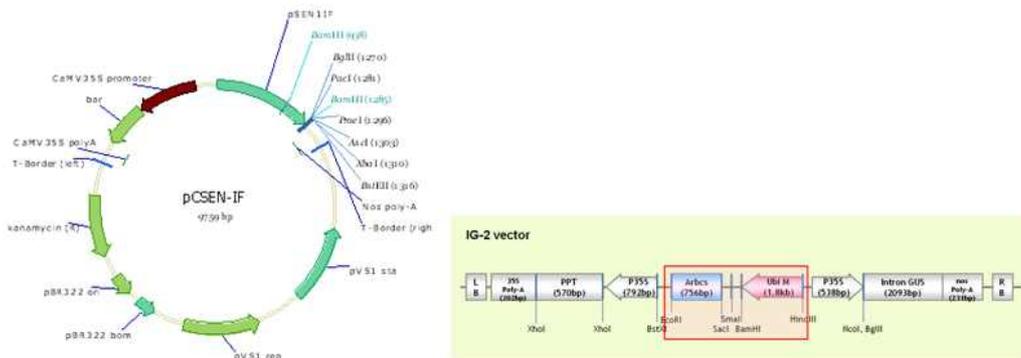


그림 27. 고품질 GM 국화 및 잔디 형질전환용 벡터. pCSEN-IF vector (left) and IG-2 vector (right)

[우량 잔디 품종 개발]

○ 형질전환용 캘러스의 유도 및 형질전환 방법: 이미 확립된 고효율의 재생력을 지닌 잔디의 종자유래 캘러스 분화조건으로 유전자 형질전환용 재료로서 유지, 증식한다. 유용 유전자가 포함된 플라스미드가 들어있는 아그로박테리움과 잔디 캘러스를 10일간 공동배양한 후 cefotaxime으로 agrobacterium을 제거시킨다. 균이 제거된 캘러스는 1 mg/L의 bialaphos가 첨가된 shoot 유도 배지에 치상하여 2주간 배양시킨 후 2.5 mg/L의 bialaphos가 첨가된 배지로 옮겨 다시 2주 간 배양시킨다. 매 2주 간격으로 새로운 shoot 배지로 옮기면서 shoot를 선발한다. 선발된 shoot는 3 mg/L의 bialaphos가 첨가된 뿌리 유도 배지에 치상하여 1-2개월 동안 배양시킨 후 순화과정을 거쳐 온실 내에서 재배한다.

- **형질전환 잔디의 개발:** 현재 주관연구기관에서는 생산성 증대와 녹기 연장을 유도하는 유전자를 모델식물인 애기장대에서 개발하고 탐색하고 있고 협동연구기관에서는 이러한 유전자들을 잔디로 도입하여 형질전환 잔디를 생산하고 있다. 현재 8종의 형질전환식물체가 생산된 상태이나, 유전자당 보다 많은 개체수를 확보하기 위하여 형질전환 및 형질전환체 생산을 계속 수행하고 있는 상태이며, 향후 신규 유용 유전자 1종을 추가 도입하여 형질전환 잔디를 생산할 계획이다.
- **형질전환 잔디의 표현형 검정 및 기능:** 개발된 형질전환 잔디는 온실실험, 포장실험을 통해 그 표현형(생산성 증대, 녹기 연장 등)을 분석하여, 실용화의 가능성을 탐색할 계획이다. 녹기 연장 표현형을 정량적으로 측정하기 위해 광합성 효율, 엽록소 함량, 개체 생존율 등을 분석하고, 생산성 증대의 표현형을 정량적으로 측정하기 위해 tiller 생성 수를 통한 식물 밀식도 등을 분석할 계획이다. 이와 같은 표현형 검정을 통해 선별된 품종들의 생리·생화학적 기능 분석을 통하여 우량 잔디 형질전환체를 개발하고자 한다.
- **형질전환 잔디 우수 계통의 산업화 기초연구:** 확보된 우량 형질전환체는 향후 상업화를 목표로 관련된 기반연구를 실시할 계획이다. 이를 위해 잔디 형질전환체 우수계통 1종을 최종 선발할 계획이며 선발된 계통은 환경위해성평가를 위한 포장내 대량 증식을 실시할 계획이다.

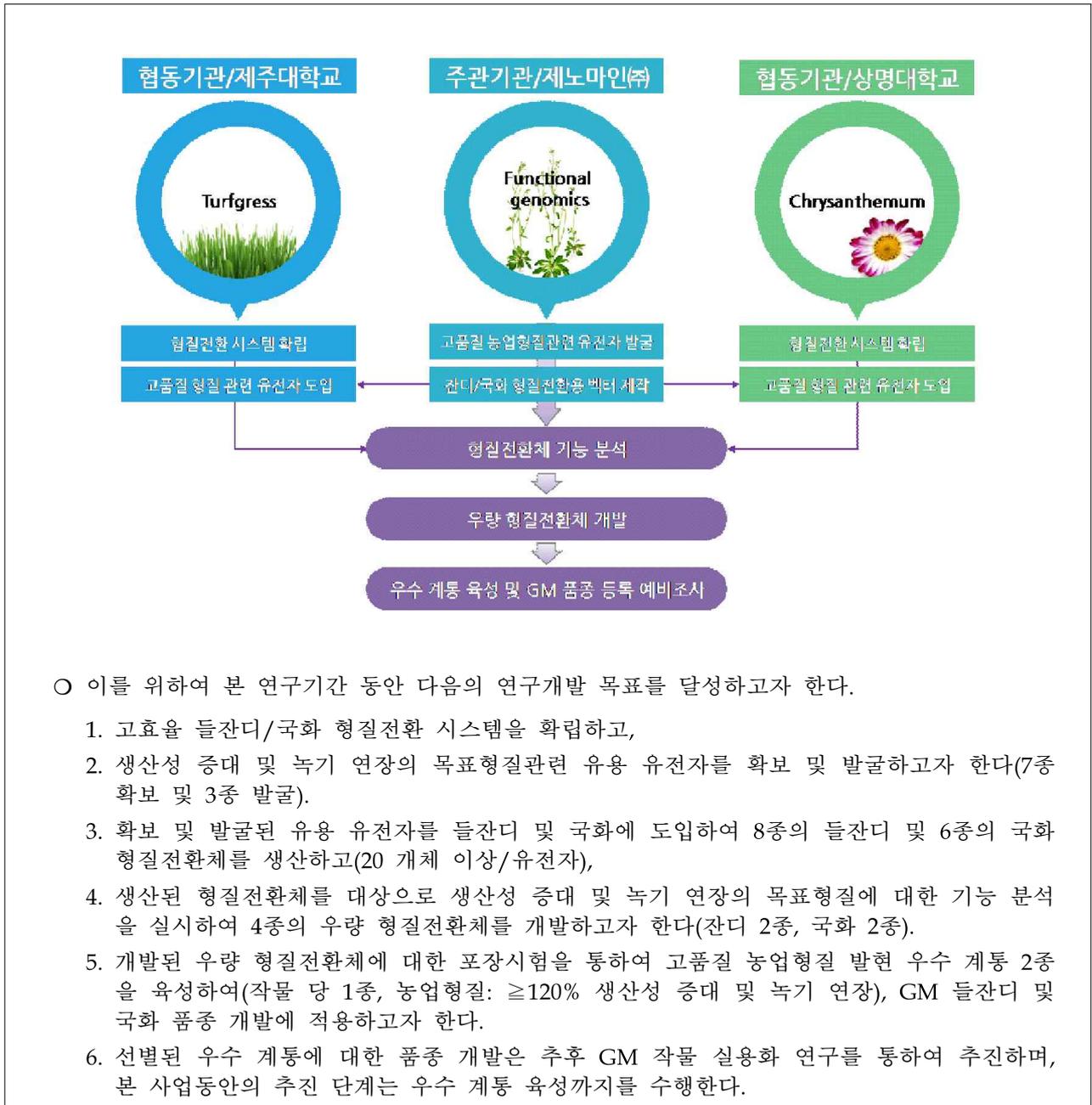
[우량 국화 품종 개발]

- **생산성 증대 및 녹기 연장형질 관련 유용 유전자 도입 국화 형질전환체 육성:** 확립된 국내 우량 국화 스탠다드 품종 '신마'의 고효율 식물체 재분화 기술을 바탕으로 *Agrobacterium*-매개 형질전환 실험을 수행한다. 기내 국화신초배양을 통해 얻어진 식물체로부터 잎 절편체를 절취하여 배양된 *Agrobacterium* 현탁액에 잎 절편체를 20분 동안 접종하고 3일간 공조 배양한 후 재생배지에 phosphinothricin(PPT) 2.0mg/L, cefotaxime(Cx) 250mg/L를 첨가한 선발배지에서 배양한다. 형질전환된 절편체를 4주 간격으로 3-4회에 걸쳐 선발배지에서 계대배양 한 후, 배양 하는 동안 형성된 신초의 길이가 0.5cm 이상 되었을 때, 신초를 절편체로부터 분리하여 MS배지에 PPT 2.0mg/L가 첨가된 신장배지로 옮겨주어 신장과 발근을 유도한다. 분자분석을 통해 유전자 도입이 확인된 형질전환체를 온실에 활착시켜 장일조건(8/16h)에서 6주간 재배한 후, 형질전환체의 초장이 40cm 이상이 되었을 때 단일처리(12/12h)를 시작하여 개화를 유도한다.
- **형질전환 국화의 개발:** 주관기관인 제노마인에서 전달받은 생산성 증대 및 녹기 연장형질을 제공하는 유전자들을 국화에 도입하여 형질전환 국화를 생산하고 있다. 현재 8종의 형질전환 식물체가 생산되었으며 보다 많은 개체수를 확보하기 위해 추가적인 형질전환 실험을 수행하고 있으며 신규 유전자인 *AMtATPG5*, 또한 형질전환체를 생산할 예정이다.
- **형질전환 국화의 표현형 검정 및 기능:** 개발된 형질전환체의 개화를 유도한 후, 초장, 개화 시기 등의 1차 표현형을 조사하고 생산성 증대 및 녹기 연장형질 발현을 확인하기 위해 생체중, 건물중 등의 바이오매스 특성 조사, 그리고 엽록소 함량 측정, 절화 수명, 건조 및 압

스트레스 등의 목표형질 및 농업형질 기능을 검정하여 생산성 증대 및 녹기연장의 목표형질을 우량 국화 형질전환체 2종을 개발할 것이다.

- **형질전환 국화 우수 계통의 육성 및 산업화 기초연구:** 확보된 우량 국화 형질전환체는 향후 상용화를 위한 기초연구를 통하여 최종적으로 우수 계통 1종을 최종 육성하고자 하며, 선발된 우수 계통은 추후 GM 실용화 연구를 통하여 GM 국화 품종으로 개발할 예정이다.

다. 연구개발 추진체계



라. 연구개발 추진일정

1																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	목표형질 발현 유용 유전자 확보								■	■					84,000	이동희 (제노마인)
2	신규 유용 유전자 발굴 및 기능 검증								■	■	■	■	■			
3	형질전환용 벡터 제작										■	■	■			
4	잔디 형질전환								■	■	■	■	■		25,000	이효연 (제주대)
5	잔디형질전환체 생산											■	■			
6	기확보 형질전환체 1차 표현형 분석								■	■	■	■	■			
7	국화의 형질전환 시스템 효율 개선								■	■	■	■	■		25,000	형남인 (상명대)
8	국화 형질전환 및 형질전환체 생산								■	■	■	■	■			
9	형질전환체 1차 기능분석: 유전자 도입 및 발현 분석												■			

2																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	신규 유용 유전자 발굴 및 기능 검정														250,000	이동희 (제노마인)
2	형질전환용 벡터 제작															
3	잔디 및 국화 형질전환체 목표형질 분석 (협동기관과 공동연구)															
4	잔디 형질전환 및 형질전환체 생산													75,000	이효연 (제주대)	
5	형질전환체에서의 발현 및 기능분석															
6	우량라인 선발 및 계통증식															
7	형질전환체의 격리포장 식재															
8	국화 형질전환 및 형질전환체 생산												75,000	형남인 (상명대)		
9	형질전환체 1차 기능분석: 유전자 도입 및 발현 분석															
10	형질전환체 1차 기능분석: 1차 표현형 분석															
11	형질전환체의 온실 재배 및 농업형질 검정															

3																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	신규 유용 유전자 기능 검정														250,000	이동희 (제노마인)
2	형질전환용 벡터 제작															
3	잔디 및 국화 형질전환체 목표형질 분석 (협동기관과 공동연구)															
4	잔디 및 국화 형질전환체 농업형질 분석 (협동기관과 공동연구)															
5	잔디 형질전환 및 형질전환체 생산														75,000	이효연 (제주대)
6	유전자 발현 및 목표형질 발현 규명															
7	우량라인 선발 및 계통증식															
8	형질전환체의 격리포장 식재															
9	격리포장 검정을 통한 농업형질 규명															
10	농업형질발현 우수 계통 1종 육성															
11	국화 형질전환 및 형질전환체 생산														75,000	형남인 (상명대)
12	형질전환체 1차 기능분석: 유전자 도입 및 발현 분석															
13	형질전환체 1차 기능분석: 1차 표현형 분석															
14	형질전환체의 온실 재배 및 농업형질 검정															
15	국화에 대한 고품질 농업형질 발현 우수 계통 육성															

제 2 절. 연구개발 성과

가. 연구개발 성과 목표 및 대비 실적

(단위: 건수)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍 보		기타 (타연구 활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표					
												SCI	비SCI				정책 활용	홍보 전시	
최종목표	4											3	1	6		2			
1차년도	목표	1												1					
	실적	1												2					
2차년도	목표	2										1	1	3					
	실적	3												4		1			
3차년도	목표	1										2		2		2			
	실적	1	5									2*		6		2			
소계	목표	4										3	1	6		2			
	실적	5	5									2*	0**	11		3			
종료 1차년도														1					
종료 2차년도		1																	
종료 3차년도		1														2			
종료 4차년도		1		1															
종료 5차년도																			
소계		3		1										1		2			
합계		4	3		1							3	1	7		4			

*2건 accepted; **1건 게재예정

나. 논문게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Overexpression of <i>ICE1</i> , a regulator of cold-induced transcriptome, enhances tolerance to cold stress in transgenic <i>Zoysia japonica</i>	Journal of Plant Biology	이효연		대한민국	Korean Society of Plant Biologists	SCI(E)	Accepted, 2018.12.17	
2	Plastidial and mitochondrial malonyl CoA-ACP malonyltransferase is essential for cell division, and its overexpression increases storage oil content	Plant Cell Physiol.	서미정		대한민국	Japanese Society of Plant Physiologists	SCI	Accepted, 2019.02.08	
3	Ectopic expression of AHL24 in chrysanthemum plants delayed senescence and enhanced stress tolerance	Plant Breed. Biotech.	형남인		대한민국	Korean Society of Breeding Science	비SCI	2019 (게재예정)	

다. 지적재산권: 특허

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	식물의 생산성 증대 ^{a)}	대한민국	제노마인(주)	2016.10	10-2016-0129693				50
2	식물의 생산성 증대 ^{b)}	국제(PCT)	제노마인(주)	2017.09	PCT/KR2017/010855				50
3	식물의 생산성 증대 ^{c)}	국제(PCT)	제노마인(주)	2017.09	PCT/KR2017/010859				50
4	식물의 생산성 증대 ^{d)}	대한민국	제노마인(주)	2017.12	10-2017-0168525				50
5	식물의 노화 지연 ^{e)}	대한민국				제노마인(주)	2018.04	10-1850003	90
6	식물의 생산성 증대 ^{f)}	대한민국				제노마인(주)	2018.04	10-1855135	90
7	식물의 생산성 증대 ^{g)}	대한민국				제노마인(주)	2018.04	10-1855134	90
8	식물의 생산성 증대 ^{h)}	대한민국				제노마인(주)	2018.04	10-1855136	90
9	식물의 생산성 증대 ⁱ⁾	대한민국				제노마인(주)	2018.04	10-1855137	90
10	애기장대 유래의 ^{j)}	대한민국	제노마인(주)	2018.03	10-2018-0030056				30

- a) 생산성 증대 기능과 노화 지연 기능을 갖는 MtATPG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도, 1차년도
- b) 식물의 생산성 증대 기능과 노화 지연 기능을 갖는 MtATPG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도, 2차년도
- c) 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 MtATPG2 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도, 2차년도
- d) 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 AHL26 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도, 2차년도
- e) 식물의 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATHG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도
- f) 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG3 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도
- g) 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 APTG4 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도
- h) 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG7 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

용도

- i) 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG8 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도
- ii) 애기장대 유래의 MCAMT 유전자를 이용한 식물의 성장, 발달 및 종자 저장 오일 함량이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 용도

라. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	20th EUCARPIA General Congress: Ectopic expression of AHL24 in chrysanthemum plants delayed senescence and enhanced stress tolerance	등	2016.08.29	Zurich	스위스
2	한국식물학회 정기학술대회: Regulated expression of <i>MtATPG1</i> regulates yield improvement and senescence delay in <i>Arabidopsis</i>	김국진 등	2016.11.03	부여	대한민국
3	한국식물생명공학회 정기학술발표회: Expression of <i>MtATPG2</i> regulates yield improvement and delayed leaf senescence in <i>Arabidopsis</i>	김국진 등	2017.06.08	대전	대한민국
4	한국식물생명공학회 정기학술발표회: Overexpression of <i>ABF3</i> confers enhanced water stress tolerance in transgenic chrysanthemum	박진선 등	2017.06.08	대전	대한민국
5	15th International Symposium on rice functional genomics: Overexpression of <i>ICE1</i> , a regulator of cold-induced transcriptome, enhances tolerance to cold stress in transgenic <i>Zoysia japonica</i>	강홍규 등	2017.09.25	수원	대한민국
6	한국식물생명공학회 정기학술발표회: <i>ATPG4</i> Confers Yield Improvement and Senescence Delay through the Regulation of Cytokinin and Auxin Signaling in <i>Arabidopsis</i>	김국진 등	2018.05.31	여수	대한민국
7	2018 한국육종학회 심포지움: 교배종 제초제내성 GM 잔디의 주변 생태계에 미치는 영향 평가	선현진 등	2018.07.11	제주	대한민국
8	2018 한국육종학회 심포지움: 교배종 제초제내성 GM 잔디의 육성 및 환경위해성 평가	선현진 등	2018.07.11	제주	대한민국
9	2018 한국육종학회 심포지움: 교배종 제초제내성 GM 잔디의 분자생물 및 유전학적 특성 평가	정하나 등	2018.07.11	제주	대한민국
10	30th International Horticultural Congress: Transgenic expression of <i>ATPG4</i> gene in chrysanthemum enhances plant growth and delays plant senescence	윤여진 등	2018.08.12	이스탄불	터키
11	2018 International Conference of the Korean Society of Plant Biologists: The basic helix-loop-helix transcription factor, <i>ZjICE1</i> , from Korean lawn grass confers tolerance to cold stress	Zhi-Fang Zuo 등	2018.11.08	부산	대한민국

마. 전문 연구인력 양성

No	분류	기준 년도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	학위 취득 (석사)	2017		1				1		1				
2	학위 취득 (학사)	2018			2			2		2				

제 3 절. 연구개발 결과

가. 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질 발현 유용 유전자 확보

○ 본 사업에 적용할 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질 발현 유용 확보 유전자는 다음과 같다.

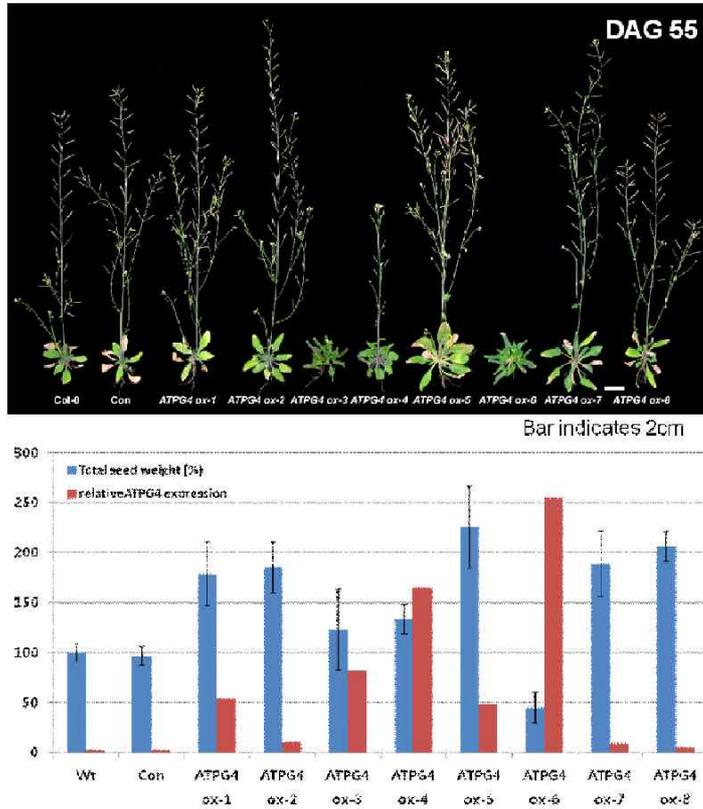


그림 5. The correlation between yield increase and senescence delay of plants by the level of *ATPGs* overexpression.

○ *ATPGs* (AT-hook proteins of Genome) - *ATHG1*, *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG6*, *ATPG7*, *ATPG8*, *ATPG10*. 본 연구팀은 발굴한 AT-hook 유전자들 중 *ATHG1*, *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG6*, *ATPG7*, *ATPG8* 그리고 *ATPG10*의 생산성 증대와 녹기 연장에 대한 형질을 확인한 결과, 선행연구의 그림 5에서 제시한 결과와 같이 식물의 노화 진행 동안 chromatin의 안정성을 제공하여 식물의 바이오매스와 종자 수확량 증가와 같은 생산성 증대, 그리고 노화 지연의 표현형적 특징을 재현하였다. 앞선 선행연구에서와 마찬가지로 중요한 점은 이러한 표현형적 특징은 적용 유전자의 발현 레벨에 따른다는 것이다. 적용 유전자의 발현이 강하면 강할수록 노화 지연의 표현형이 강력하게 나타나고, 적용 유전자의 발현이 낮은 상태에서 적정 수준을 유지하면 식물의 바이오매스 증대 및 종자 수확량 증가와 같은 생산성 증대에 대한 특징적인 표현형을 가졌으며, 유전자의 발현이 적절히 조절되면 노화 지연과 바이오매스 및 종자 수확량 증가와 같은 생산성 증대의 복합형질을 가지는 것으로 나타났다. 최근 식물의 cytokinin signaling pathway 분석을 통하여 *ATPGs*는 cytokinin receptor

중 *CRE1*의 발현을 비례적으로 조절하고, *AHPs*(histidine phosphotransfer proteins)의 발현을 조절하여 노화 지연 그리고/혹은 생산성 증대 형질을 제공하는 것으로 본 연구팀은 제안하고 있다. 노화 지연의 형질은 *AHP4/6*의 발현 감소에 의하여, 반면 생산성 증대의 형질은 *AHP4/6*의 발현 증가에 의하여 유도되는 것으로 나타났다. 이러한 cytokinin signaling에 관여하는 유전자 발현 결과는 선행연구의 그림 6에서 제시된 결과와 같은 양상을 나타내었으며, 현재 이러한 가설에 대한 보다 정확한 기작 분석을 위하여 계속 연구를 진행되고 있다. 또한 본 기술은 건조 등과 같은 기후변화 대응에 있어서도 저항성을 제공하여 생산성 증대와 녹기 연장뿐 만 아니라 다양한 환경에 대한 스트레스 저항성 형질 제공에 있어서도 보다 많은 장점을 제공할 것으로 확인하였다.

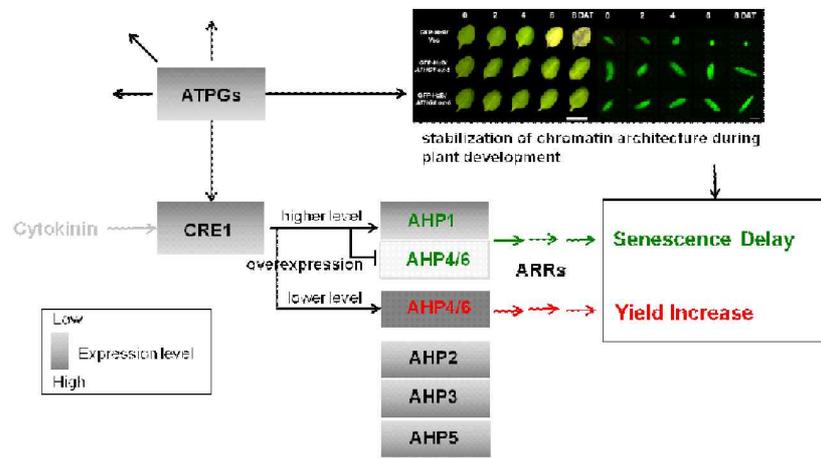


그림 6. Proposed model for the prominent role of *ATPGs* in the yield increase and senescence delay

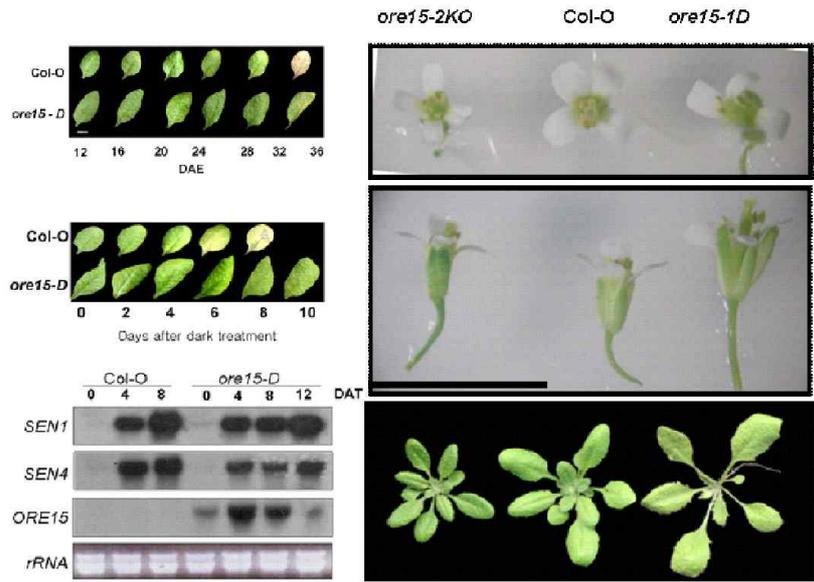


그림 7. *ORE15* 유전자의 과발현으로 인한 애기장대의 수명연장 및 개체 크기 신장에 대한 표현형적 특징

○ *ORE15*. activation tagging 변이체 pool에서 노화지연 표현형을 가지는 변이체로부터 발굴

된 유전자로, 흥미롭게도 앞선 AT-hook 유전자와 마찬가지로, 노화지연을 통한 식물의 수명연장이라는 표현형적 특징뿐만 아니라 biomass의 증가, 특히 개체 크기의 증가라는 표현형적 특징이 선행연구의 결과(그림 7)에서 제시되었던 것과 같은 양상을 나타내었다. 따라서 *ORE15* 유전자의 국화 적용은 식물의 녹기 연장이라는 측면뿐만 아니라 개체 크기 신장이라는 측면에서 생산성 증대 및 녹기 연장의 농업형질을 가진 국화 신품종 개발을 가능하게 하리라 판단하여 본 유전자를 국화 우수계통 개발에 적용하였다.

나. 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질 발현 신규 유용 유전자 발굴

○ 본 연구팀은 애기장대의 AT-hook motif를 함유한 많은 유전자들이 생산성 증대 및 녹기 연장에 대한 표현형적 특징을 가지고 있으며, 최근 또 다른 모델 식물인 *Medicago truncatula*의 AT-hook 유전자 또한 생산성 증대 및 녹기 연장에 대한 표현형적 특징을 가짐을 알 수 있었다. 우리는 애기장대의 AT-hook motif를 가진 유전자 중 *AHL26* (At4g12050) 유전자와 *Medicago truncatula*의 AT-hook 유전자 중 *MtATPG3* (MTR 5g011520), *MtATPG4* (MTR 5g080580) 그리고 *MtATPG5* (MTR 7g080980) 유전자를 유용 유전자 후보로 선별하고 이들에 대한 과발현 혹은 발현 벡터 제작 및 형질전환체 생산을 통하여 그들의 생산성 증대 및 녹기 연장에 대한 기능 분석을 수행하였다.

(1) AHL26 (AT4g12050): 식물의 생산성 증대 및 녹기연장 형질 제공

○ 우리는 *AHL26* 유전자의 과발현 벡터 제작 및 형질전환체 생산 등의 선행 연구를 통하여 본 유전자의 과발현은 식물의 생산성 증대 및 녹기 연장의 형질을 제공한다는 것을 알 수 있었다. 본 과제에서 우리는 *AHL26*의 생산성 증대 및 녹기 연장의 형질에 대한 기능 검증 및 유전자 발현과 식물 호르몬 신호전달에 있어서 *AHL26*의 역할 등에 대한 추가 연구를 계속 수행하고 있다.

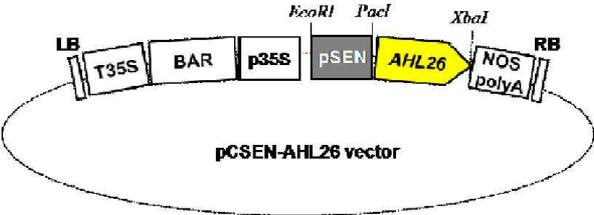


그림 28. 생산성 증대 및 녹기 연장 형질을 제공하는 *AHL26* 유전자의 과발현을 위한 pCSEN-AHL26 벡터 모식도

Ⓐ 식물의 생산성 증대 및 녹기연장 형질을 제공하는 애기장대 *AHL26* 유전자 분리: 애기장대의 *AHL26* (GeneBank accession number NP_192942.1)의 염기서열을 기초로 하여 제한효소 *PacI*의 서열이 포함된 정방향 primer (*PacI/AHL26-F*, 5'-TTA ATT AAA TGG ATC CAG TTC AAT CTC ATG G-3')와 제한효소 *XbaI*의 서열이 포함된 역방향 primer (*XbaI/AHL26-R*, 5'-TCT AGA TCA ATA CGG TGG CCG ACC CGT-3')를 합성하였다. 상기 primer를 사용하여 애기장대 cDNA로부터 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여

전장 cDNA를 증폭하고 분리하였다. 상기 분리된 cDNA의 분석 결과, *AHL26* 유전자는 애기장대의 DNA 결합 단백질 관련 단백질(DNA-binding protein-related)로 약 35.8 kDa의 분자량을 갖는 339개의 아미노산을 암호화하는 1,020 bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였다.

③ ***AHL26* 과발현 변이체의 표현형적 특징:** 상기 유전자가 식물의 생산성 증대 및 녹기연장의 기능을 갖는지를 확인하기 위하여 *AHL26* 유전자가 센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 *AHL26* 전사체의 발현을 변화시켰다. Inducible promoter인 *SEN1* 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pCSEN 벡터에 센스 방향으로 클로닝하여 *AHL26* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-AHL26 재조합 벡터를 제작하였다(그림 28). 그림 28에서 BAR는 바스타 제초제에 대한 저항성을 부여하는 *BAR* 유전자(phosphinothricin acetyltransferase gene)를 가리키고, RB는 오른쪽 경계(Right Border), LB는 왼쪽 경계(Left Border), P35S는 CaMV 35S 프로모터, 35S-A는 CaMV 35S RNA polyA, PSEN은 *SEN1* 프로모터, Nos-A는 노파린 합성 유전자(nopaline synthase gene)의 polyA를 가리킨다. pCSEN-AHL26 벡터로 형질전환된 T₁ 애기장대는 대조구(*AHL26* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대 혹은 야생형 애기장대)와 발아 후 60일째 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 놀랍게도 변이체 라인들은 생산성 증대와 녹기연장 형질에 대한 뚜렷한 표현형적 특징을 가졌다.

○ 우리는 이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T₁ 형질전환 애기장대로부터 T₂ 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 녹기연장에 대한 표현형을 조사하였다. 선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 표현형 확인은 일정 기간 생육 후 6일 동안의 암 처리 후 수행하였다. pCSEN-AHL26 구성체를 가지고 있는 과발현 변이체 라인들은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, T₁ 변이체와 마찬가지로 식물체의 개체 크기 증가와 같은 생산성 증대 및 잎의 녹기연장 형질이 뚜렷하게 나타났다. 따라서 본 연구팀은 *AHL26* 유전자의 과발현은 식물의 생산성 증대와 녹기연장이라는 뚜렷한 표현형적 특징을 제공한다는 것을 확인할 수 있었다.



그림 29. 생산성 증대 및 녹기연장 형질을 가지는 *AHL26* 과발현 애기장대 형질전환체의 발아 후 50일째와 70일째 표현형적 특징

표 5. *AHL26*과 tubulin 유전자에 대한 RT-PCR용 primer 정보

GENE	Primer Information
<i>AHL26</i>	Pacl/ <i>AHL26</i> -F, 5'-TTA ATT AAA TGG ATC CAG TTC AAT CTC ATG G-3' XbaI/ <i>AHL26</i> -R, 5'-TCT AGA TCA ATA CGG TGG CCG ACC CGT-3'
Tubulin	TUB-F: 5'-CTC AAG AGG TTC TCA GCA GTA-3' (21mer) TUB-R: 5'-TCA CCT TCT TCA TCC GCA GTT-3' (21mer)

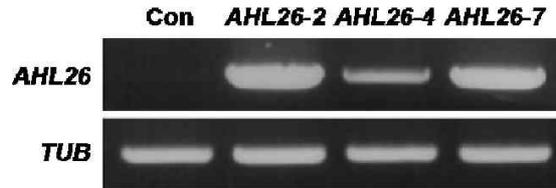


그림 30. *AHL26* 과발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 RT-PCR을 통한 *AHL26*에 대한 유전자 발현 양상. 양성 대조구는 tubulin(TUB).

- 이러한 생산성 증대와 녹기 연장에 대한 표현형적 특징을 가지는 변이체에서 선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 *in vivo* 표현형 확인은 발아 후 50일째, 그리고 70일째 수행하였다(그림 29). pCSEN-*AHL26* 구성체를 가지고 있는 *AHL26-2*, *AHL26-4*와 *AHL26-7* 변이체 라인들은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, T₁ 변이체와 마찬가지로 식물체의 녹기 연장 현상이 뚜렷하게 나타났으며, 아울러 이들 변이체들은 녹기 연장 표현형뿐만 아니라 녹기 연장 동안 개체 크기와 종자 생산량에서도 뚜렷한 증가 현상이 유발되었다. 이러한 노화 지연 현상과 생산성 증대는 라인마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 앞서 다른 AT-hook protein을 encoding하는 유전자와 마찬가지로 유전자의 과발현이 라인마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다. 이러한 표현형적 특징이 유전자의 과발현에 의해 유도되는 지를 확인하기 위하여 우리는 현재 자엽 형성 후 25일째의 대조구와 변이체 라인에 대한 유전자 발현 정도를 확인하였다(그림 30). *AHL26* 및 tubulin의 유전자 발현 분석을 위한 RT-PCR용 primer 정보는 표 5와 같다. 그 결과, 변이체 3라인 모두 애기장대 대조구에 비하여 *AHL26* 유전자의 발현이 라인마다 약간의 차이는 있지만 현저히 높게 나타남을 확인하였으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 *AHL26* 유전자가 과발현된 변이체임을 증명하고 있다. 이러한 변이체에서 *AHL26* 유전자 과발현의 차이는 변이체간의 노화 지연 현상과 생산성 증대 형질의 차이를 제공할 것으로 판단된다.
- 흥미로운 사실은 *AHL26* 유전자는 녹기 연장 형질이 앞선 애기장대의 다른 AT-hook 유전자에 비해 강하지 않은 것으로 나타난 반면, 종자 수확량 및 개체 크기 증가와 같은 생산성 증대에 보다 강한 효과를 가지는 것으로 나타났다. 따라서 AT-hook protein을 encoding하는 유전자에서도 그들의 특성에 따라 생산성 증대 혹은 녹기 연장의 표현형적 특징을 제공하는 차이가 있으리라 판단된다. 이러한 사실은 생산성 증대 우량 작물 개발에 있어서 대단히 중요한 요인이 될 수 있을 것이다. 작물의 특성에 따라 상기 유전자의 적용을 조절함으로써 생산성 증대 우량 작물 개발에 대한 핵심 기술이 될 것이다.

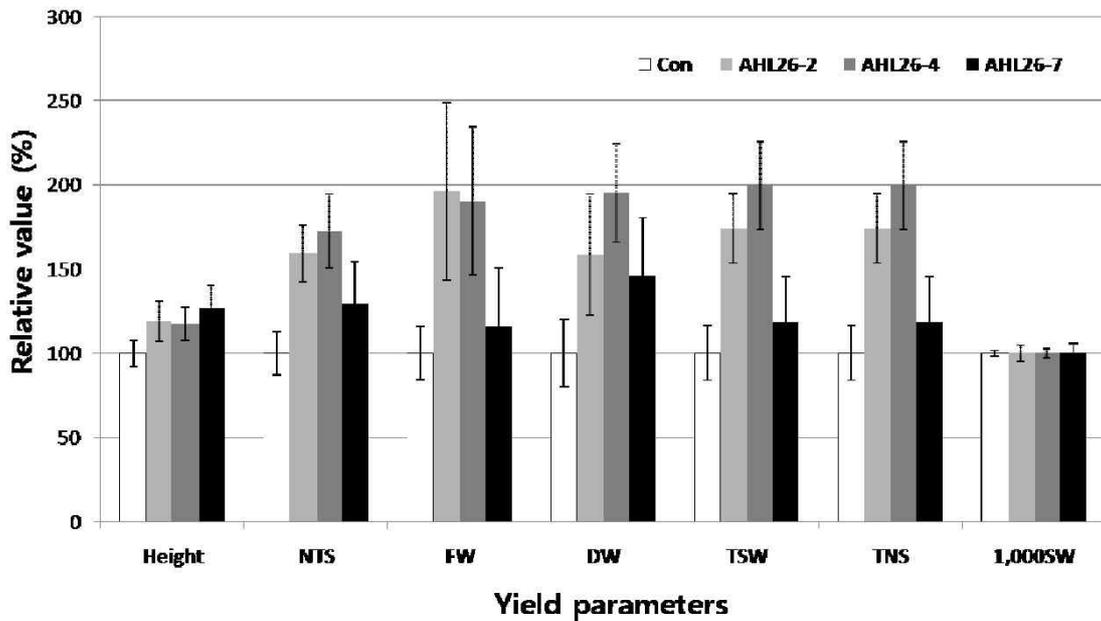


그림 31. *AHL26* 과발현 애기장대 T₂ 형질전환 라인의 생산성 증대 지표 분석(n=20). Height (cm); NTS, numbers of total silique per plants; FW, fresh weight of plant; DW, weight of plant after dry; TSW, total seed weight; TNS, total number of seeds; 1000SW, total number of seeds thousand seed weight.

◎ *AHL26* 과발현 변이체의 생산성 증대 형질에 대한 특성 분석: *AHL26* 유전자의 과발현을 통하여 얻어진 식물체가 생산성 증대 형질을 가지는 지를 과발현 변이체 라인 *AHL26-2*, *AHL26-4*와 *AHL26-7*에 대한 종자 수확량 등과 같은 생산성 증대 지표를 적용하여 애기장대 대조구와 비교해 보았다. 적용된 생산성 증대 지표는 식물의 키(height), 장각과(silique) 수(NTS), 생체량(FW), 생체건량(DW), 총 종자 무게(TSW), 총 종자 수(TNS), 그리고 1,000개의 종자 무게(1,000SW)이며, 결과는 라인별로 각 20개체의 평균값이다(그림 31). *AHL26-2*, *AHL26-4*와 *AHL26-7* 변이체 라인들은 모두 애기장대 대조구에 비하여 종자 무게 및 종자 수에 있어서 증가하는 하는 것으로 나타났으며, 특히 *AHL26-2*와 *AHL26-4* 변이체 라인은 1.8배 이상 증가한 것으로 나타났다. 그런 반면 종자 1,000개의 무게에는 대조구와 큰 차이가 없었다. 그리고 생체량과 생체건량에 있어서는 과발현 변이체 모두는 대조구에 비하여 약 1.4배 이상 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 사실은 *AHL26* 유전자가 개체 크기, 종자 생산량 등과 같은 작물의 생산성 증대를 유발하는 것으로 판단된다. 따라서 본 유전자의 들잔디와 국화 작물 적용은 바이오매스 증대와 같은 생산성 증대라는 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 생각된다.

◎ *AHL26* 과발현 변이체의 녹기 연장 형질에 대한 특성 분석

○ *AHL26* 과발현 변이체의 나이-의존적 녹기 연장 형질에 대한 특성 분석: *AHL26* 과발현 변이체의 나이-의존적 노화 지연 형질을 확인하기 위하여, T₂ 세대에서 자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽(rossette leaf)을 매 4일마다 표현형 관찰, 엽 엽록소 함량, 그리고 광합성 활성을 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다. 엽록소 함량은 663.2nm와 664.8nm의 흡광 계수를 이용하여 Lichtenthaler와 Wellburn의 방법(*Biochemical Society Transduction* 603:591~592, 1983)에 따라 측정하였으며, 광합성 효율은 오 등의 방법(*Plant Mol. Biol.*

30:939, 1996)에 따라 우선 각 DAE(day after emersion)의 잎을 15분간 암 처리한 후, 식물 효율 분석기(Plant Efficiency Analyzer)(Hansatech)를 이용하여 엽록소의 형광(Fv/Fm)을 측정하였다.

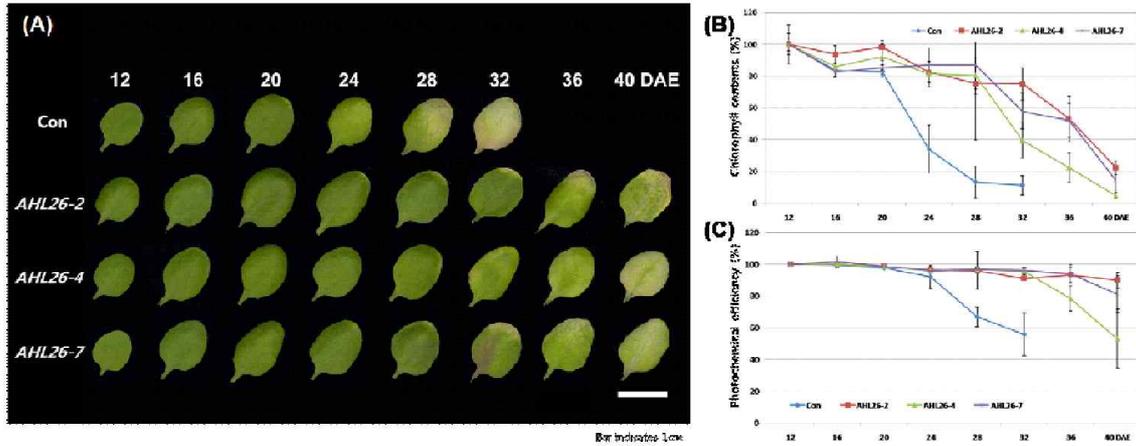


그림 32. *AHL26* 과발현 형질전환 라인의 나이-의존적 노화에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량 (n=6)(B), 그리고 광합성 효율 (n=6)(C).

○ 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 28일 이후 잎의 황화 현상이 급속히 진행되어 32일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *AHL26-2*, *AHL26-4*와 *AHL26-7*의 경우 잎의 황화 현상이 32일부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 40일째 일어남을 확인할 수 있었다(그림 32A). 이러한 사실로 미루어보아, *AHL26* 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다. 엽록소의 함량에 있어서는 그림 32B에 도시된 바와 같이 야생종의 경우 엽록소 함량이 자엽 생성 후 20일 이후부터 급격한 감소를 보이며 28일째 엽록소의 함량이 최소 수준에 도달하였으나, *AHL26-2*, *AHL26-4*와 *AHL26-7*의 경우 자엽 생성 후 28일이 되었을 때도 측정 초기의 80% 정도의 엽록소 함량을 보임을 확인할 수 있었다. 과발현 변이체의 광합성 효율 변화도 엽록소 함량 변화와 유사한 양상을 나타내었다. 야생종은 자엽 생성 후 24일 이후부터 급격히 감소하기 시작해 32일 이후부터 활성이 사라졌으나, *AHL26-4*를 제외하고 *AHL26-2*와 *AHL26-7*은 자엽 생성 후 40일까지 활성 변화가 거의 일어나지 않았다(그림 32C). 상기 결과로부터, *AHL26* 과발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 노화 지연의 효과는 *AHL26* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

○ *AHL26* 과발현 변이체의 암-유도 녹기 연장 형질에 대한 특성 분석: 식물 노화를 유도하는 요인으로 알려진 암 처리에 대한 *AHL26* 과발현 변이체 라인의 잎의 노화 지연 형질의 특성을 분석하기 위하여 T₂ 세대에서 발아 후 21일째 3-4번 좌엽(rossette leaf)을 detach하여 3mM MES 완충용액(2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid, pH 5.8)에 부유시킨 후, 암 상태를 유지하여 매 2일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 광합성 효율 및 노화관련 유전자 발현을 조사하여 야생종 애기장대와 비교하였다.

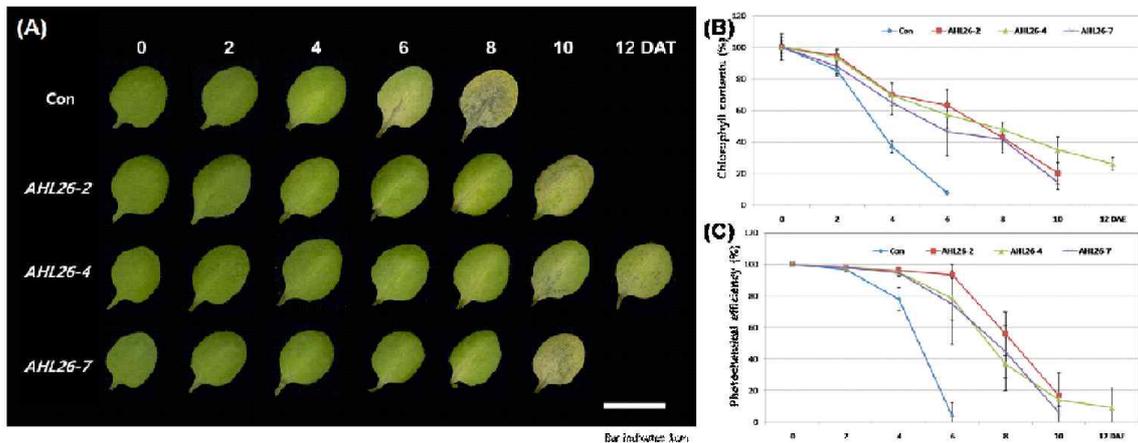


그림 33. *AHL26* 과발현 형질전환 라인의 암-유도 노화에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량 (n=6)(B), 그리고 광합성 효율 (n=6)(C).

○ 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암 처리 후 6일 이후부터 잎의 황화 현상이 급속히 진행되어 8일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *AHL26-2*, *AHL26-4*와 *AHL26-7*의 경우 잎의 황화 현상이 10일 이후부터 급속히 나타나고 있음을 확인할 수 있었다(그림 33A). 엽록소 함량에 있어서 야생종의 경우, 엽록소 함량이 암 처리 후 2일 이후 급격한 감소를 가져 6일 이후 최소 수준을 나타냈으나, *AHL26-2*, *AHL26-4*와 *AHL26-7*의 경우, 대부분 6일째에도 50% 이상의 엽록소 함량을 나타냈다(그림 33B). 암 처리에 의한 광합성 효율 변화는 엽록소 함량 변화 양상과 같이 *AHL26* 과발현 변이체에서 활성 감소가 현저히 지연됨을 알 수 있었다(그림 33C).

○ 상기 결과로부터, *AHL26* 과발현 변이체는 나이-의존적 노화와 마찬가지로 암-유도 노화에 있어서도 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 *AHL26* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

○ 상기 결과를 종합해 보면, *AHL26* 유전자는 식물의 생산성 증대뿐 만 아니라 녹기 연장의 형질을 제공하며, 이러한 형질의 복합성은 *AHL26* 유전자의 발현 차이에 기인하는 것으로 판단된다. 따라서 본 유전자의 들잔디와 국화 작물 적용은 바이오매스 증대와 같은 생산성 증대뿐 만 아니라 녹기 연장이라는 복합적인 농업형질의 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 생각된다.

© **Plant hormone signaling에 있어서 *AHL26* 유전자의 역할:** 우리는 애기장대에서 분리한 *AHL26* 유전자가 애기장대의 cytokinin 생합성에 관여하는지를 규명하기 위하여 애기장대 cytokinin 생합성 유전자 *IPT*(isopentenyltransferase) 유전자군 중 *IPT1*(AT1G68460), *IPT3*(AT3G63110), *IPT5*(AT5G19040), 그리고 *IPT7*(AT3G23630) 유전자 4종의 발현을 애기장대 야생형과 변이체 *AHL26-2*, *AHL26-4*, 그리고 *AHL26-7*을 대상으로 조사하였다(그림 34). 적용된 유전자 및 *AHL26*과 양성대조구인 tubulin에 대한 RT-PCR용 primer 정보는 표 6에서 제시하였다. 그 결과, 대조구에 비하여 변이체에서 *IPT1*과 *IPT3*은 발현 변화가 거의 없

는 반면, 변이체에서 *IPT5*와 *IPT7* 유전자의 발현 변화는 *AHL26*의 발현 변화와 같은 양상을 나타내었다. 이러한 사실은 *AHL26* 유전자가 *IPT5*와 *IPT7* 발현을 조절하여 cytokinin 생합성에 관여한다는 것을 의미한다.

표 6. Cytokinin 생합성에 관여하는 *IPT* 유전자군, *AHL26* 유전자, 그리고 양성 대조구인 *TUB* 유전자 발현을 위한 RT-PCR용 primer 정보

유전자명	정방향/역방향프라이머 (서열번호)
<i>IPT1</i>	5'-CGC TAC TCG TTT CCC TTC AG-3' 5'-TCG ACC CAG ATG AAA CAA CA-3'
<i>IPT3</i>	5'-CAA ACA ACC ATT GCC TCC TT-3' 5'-GGA CGG ATT CAA TGG AGA GA-3'
<i>IPT5</i>	5'-CAC TCC TGA GGA AAG CCT TG-3' 5'-TCG AGC TCT GGA ACT CCA AT-3'
<i>IPT7</i>	5'-TTG GGT CGA CGT TTC CTT AC-3' 5'-GAC GAT TCT CTC GCT TGG TC-3'
<i>AHL26</i>	5'-TTA ATT AAA TGG ATC CAG TTC AAT CTC ATG G-3' 5'-TCT AGA TCA ATA CGG TGG CCG ACC CGT-3'
Tubulin	5'-CTC AAG AGG TTC TCA GCA GTA-3' 5'-TCA CCT TCT TCA TCC GCA GTT-3'

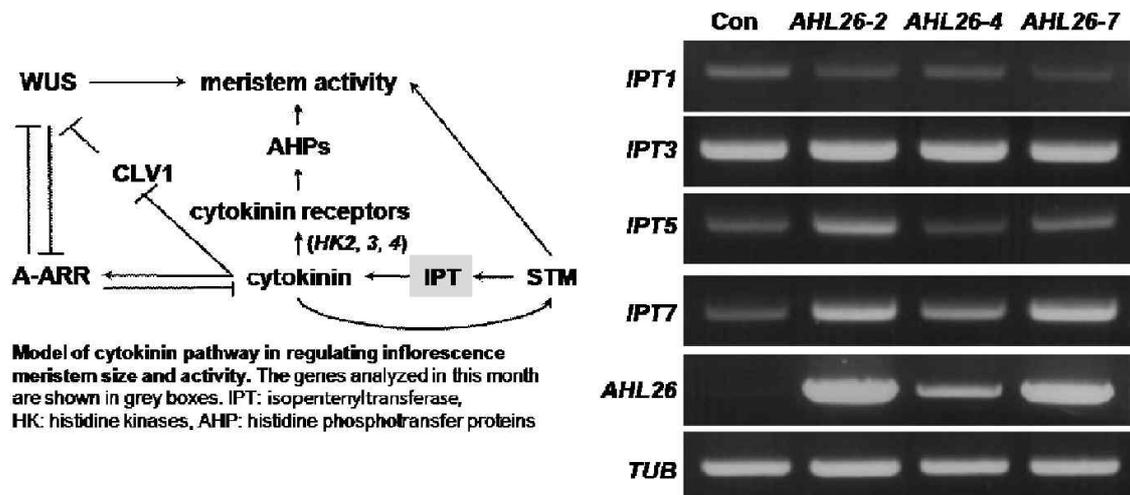


그림 34. *AHL26* 과발현 애기장대 T_2 형질전환체의 cytokinin biosynthesis pathway에서 *IPT* 유전자군 및 *AHL26* 유전자에 대한 RT-PCR 결과. 양성 대조구는 tubulin(TUB).

○ 우리는 선행연구를 통해서 애기장대 AT-hook family gene의 하나인 *ATPGA* 유전자가 cytokinin signaling에 있어서 cytokinin receptor인 HK(histidin kinase) gene family와 HP(histidine phosphotransfer protein) gene family의 발현을 조절하여 녹기연장 혹은/그리고 생산성 증대의 표현형적 특징을 제공한다는 가설을 세울 수 있었다. 현재 우리는 *AHL26* 유전자 또한 애기장대의 cytokinin signaling에 관여하는지를 규명하기 위하여 cytokinin signaling pathway 중 CLV1/WUS pathway에 관여하는 *CLV1* 유전자(receptor protein kinase CLAVATA1, AT1G75820)와 cytokinin receptor로서 기능을 가지는 histidine kinase 유전자군의 *HK2*(histidine kinase 2, AT5G35750), *HK3*(histidin kinase3, AT1G27320)

그리고 *CRE1*(*HK4*: histidine kinase 4, AT2G01830) 유전자의 발현을 애기장대 야생형과 변이체 라인을 대상으로 하였다(그림 35). 조사 대상 유전자 및 양성대조구인 tubulin에 대한 RT-PCR용 primer 정보는 표 7에서 제시하고 있다. 그 결과 흥미롭게도 *CRE1* 유전자의 발현은 약간의 차이는 있지만 *AHL26* 유전자 발현 정도와 비례하여 변이체에서 발현된 반면, *HK2*와 *HK3* 유전자의 발현은 대조구와 비교하여 변이체 모두에서 큰 차이를 나타내지 않았다. 또한 *CLV1* 유전자의 발현도 대조구와 비교하여 변이체 모두에서 큰 차이를 가지지 않았다. 따라서 *AHL26* 유전자가 cytokinin pathway 중 *CLV1*/*WUS* pathway에는 크게 관여하지 않으며, cytokinin receptor 중 *CRE1* 유전자의 발현에 비례적으로 관여한다는 것을 알 수 있다. 이러한 사실로 미루어보아 *AHL26* 유전자는 *IPT5*와 *IPT7* 유전자의 발현 조절을 통하여 cytokinin 생합성에 관여하고, cytokinin receptor 중 *CRE1* 유전자의 발현 조절을 통하여 cytokinin signaling에 관여하여 식물의 생산성 증대 및 노화 지연 현상을 유도하는 것으로 판단된다.

표 7. 애기장대 cytokinin signaling pathway에서 *CLV1* 유전자, histidine kinase (HK) 유전자군, *AHL26*, 그리고 양성대조구 tubulin 유전자에 대한 RT-PCR용 primer 정보

GENE	Primer Information
<i>CLV1</i>	CLV1-RT-F : 5'- ACT TAC CTC TGT CTC CCT CA -3' (20-mer) CLV1-RT-R : 5'- GAC CAC CTT TAG ATC CAT GC -3' (20-mer)
<i>HK3</i>	HK3-RT-F : 5'- CAA CAA CCA GCC CAT ATT CTC -3' (21-mer) HK3-RT-R : 5'- TTC CAA TAC CCA ATC CCC TC -3' (20-mer)
<i>CRE1</i>	WOL-RT-F : 5'- CTG AGG AGC AGT CAT TAT CG -3' (20-mer) WOL-RT-R : 5'- GGT TTT GTT GGG AGA GGA GA -3' (20-mer)
<i>HK2</i>	HK2-RT-F : 5'- GTA TGG CTC AGA AAT TGG GG -3' (20-mer) HK2-RT-R : 5'- GCC AGA GAG GAG AGA TGA AA -3' (20-mer)
<i>AHL26</i>	PacI/ <i>AHL26</i> -F, 5'-TTA ATT AAA TGG ATC CAG TTC AAT CTC ATG G-3' XbaI/ <i>AHL26</i> -R, 5'-TCT AGA TCA ATA CGG TGG CCG ACC CGT-3'
Tubulin	TUB-F : 5'- CTC AAG AGG TTC TCA GCA GTA -3' (21mer) TUB-R : 5'- TCA CCT TCT TCA TCC GCA GTT-3' (21mer)

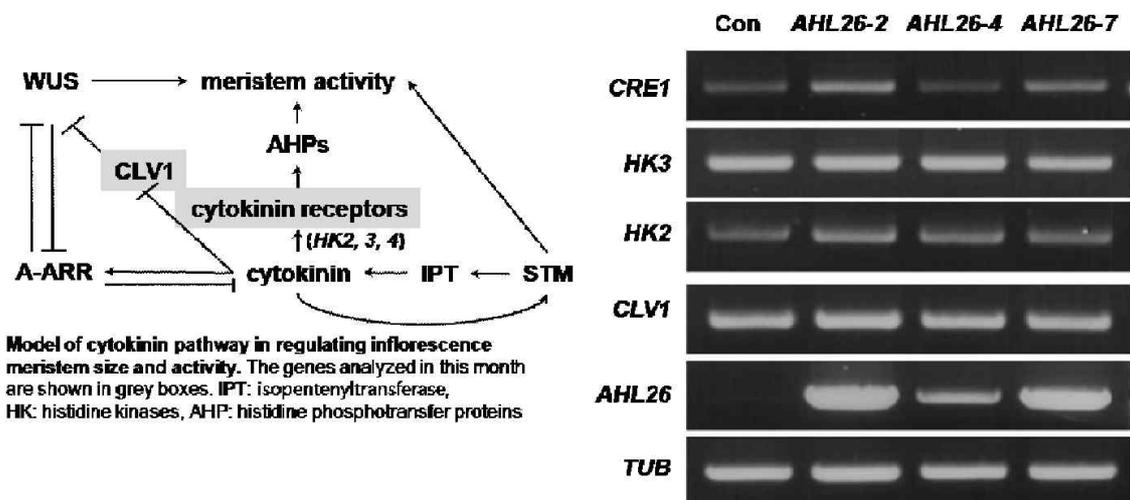


그림 35. *AHL* 과발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 cytokinin signaling pathway에서 *CLV1* 유전자, histidine kinase (HK) 유전자군, 그리고 *AHL26* 유전자에 대한 RT-PCR 결과. 양성 대조구는 tubulin(TUB).

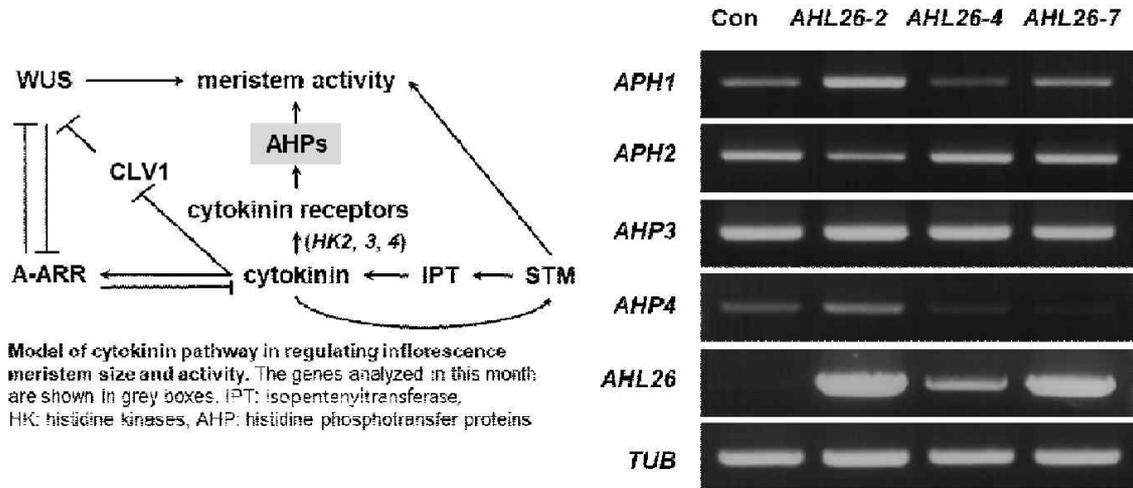


그림 36. *AHL* 과발현 애기장대 T_2 형질전환체의 cytokinin signaling pathway에서 histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군과, 그리고 *AHL26* 유전자에 대한 RT-PCR 결과. 양성 대조구는 tubulin(TUB).

○ 우리는 애기장대 대조구와 변이체를 대상으로 이러한 cytokinin signaling에 대한 보다 정확한 분석을 위하여 다음 단계인 histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군의 *AHP1*, *AHP2*, *AHP3*, *AHP4*, *AHP5*, 그리고 *AHP6* 유전자의 발현 양상 또한 조사하였다. 상기 유전자의 발현 양상은 RT-PCR을 통하여 분석하였으며, 이때 양성 대조구로는 tubulin을 사용하였고, 사용된 프라이머는 표 8에서 제시하였다. 그 결과, 변이체의 *AHL26* 유전자의 발현량과 비례적으로 발현한 유전자는 *AHP1*인 반면, 다른 *AHP* 유전자들은 변이체에서 *AHL26* 유전자의 발현과 같은 양상을 나타내지 않았다(그림 36). 이러한 사실은 *AHL26* 유전자 발현은 histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군 중 *AHP1* 유전자의 발현을 비례적으로 조절한다는 것을 시사한다.

표 8. Cytokinin signaling pathway에서 histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군, *AHL26*, 그리고 양성 대조구 tubulin 유전자에 대한 RT-PCR용 primer 정보

GENE	Primer Information
<i>AHP1</i> (AT3G21510)	AHP1-RT-F: 5'- ATGGATTTGGTTCAGAAGCAGAA -3' AHP1-RT-R: 5'- TCAAAATCCGAGTTCGACGGCC -3'
<i>AHP2</i> (AT3G29350)	AHP21-RT-F: 5'- ATGGACGCTCTCATTGCTCAGC -3' AHP21-RT-R: 5'- TTA GTT AAT ATC CAC TTG AGG AAC -3'
<i>AHP3</i> (AT5G39340)	AHP3-RT-F: 5'- GGACACACTCATTGCTCAGT -3' AHP3-RT-R: 5'- CTGCAAACATCTCACACACC -3'
<i>AHP4</i> (AT3G16360)	AHP41-RT-F: 5'- ATGCAGAGGCAAGTGGCACTCA -3' AHP41-RT-R: 5'- TTACTTGGGCCTACGTGCTGTC -3'
<i>AHP5</i> (AT1G03430)	AHP5-RT-F: 5'- GGTAGTAGCTCCAGTGTGC -3' AHP5-RT-R: 5'- CTAATTTATATCCACTTGAGGAAT-3'
<i>AHP6</i> (AT1G80100)	AHP6-3UTR-F: 5'- CAAGCCGACATCAACCGGCTC -3' AHP6-3UTR-R: 5'- AGGGTTTCGCTTCGGTAGCTT -3'
<i>AHL26</i>	PacI/AHL26-F, 5'-TTA ATT AAA TGG ATC CAG TTC AAT CTC ATG G-3' XbaI/AHL26-R, 5'-TCT AGA TCA ATA CGG TGG CCG ACC CGT-3'
Tubulin	TUB-F : 5'- CTC AAG AGG TTC TCA GCA GTA -3' (21mer) TUB-R : 5'- TCA CCT TCT TCA TCC GCA GTT-3' (21mer)

○ 이러한 분석을 통하여 우리는 다음과 같은 가설을 세울 수 있었다: *AHL26*은 1) cytokinin biosynthesis 유전자 중 *IPT5*와 *IPT7* 유전자의 발현을 비례적으로 조절, 2) cytokinin receptor 유전자 중 *CRE1* 유전자의 발현을 비례적으로 조절, 그리고 3) histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군 중 *AHP1* 유전자 발현을 비례적으로 조절하여 식물의 종자 수확량 증가, 바이오매스 증가와 같은 생산성 증대 그리고/혹은 녹기 연장의 형질을 제공한다.

표 9. Auxin biosynthesis pathway에서 YUC 유전자군, *AHL26*, 그리고 양성 대조구 tubulin 유전자에 대한 RT-PCR용 primer 정보

유전자명	정방향/역방향프라이머 (서열번호)
<i>YUC1</i> (AT4G32540)	YUC1-F: 5'-GTCCGACATAACGCATCTCC-3 YUC1-R: 5'-CAATCCTTTCCCTCCTCTCC-3
<i>YUC2</i> (AT4G13260)	YUC2-F: 5'-CGTTCCTTGCATAGCGTC-3 YUC2-R: 5'-CCACATCCTACAACCAAAATCTTC-3'
<i>YUC3</i> (AT1G04610)	YUC3-F: 5'-TCTCAAACCTCCATCTACCTAAACAG-3' YUC3-R: 5'-CACATCCCACCACCAAAACC-3'
<i>YUC4</i> (AT5G11320)	YUC4-F: 5'-AACCTACTCAAATCTTCGTTCC-3' YUC4-R: 5'-CACAACCAACCACCAAAACC-3'
<i>YUC5</i> (AT5G43890z)	YUC5-F: 5'-GAGCAGATTGCATAGCTTCAC-3' YUC5-R: 5'-ACATCCGACGACAAGAACAC-3'
<i>YUC6</i> (AT5G25620)	YUC6-F: 5'-GTAAACTAGCACATGACCACC-3 YUC6-R: 5'-AAACTTATCCATCCCCTCAAAC-3
<i>YUC7</i> (AT2G33230)	YUC7-F: 5'-TGAAACGCCAAGAAGTTCC-3 YUC7-R: 5'-ACCACCAAAATCTTCTAAACCC-3'
<i>YUC8</i> (AT4G28720)	YUC8-F: 5'-GCAAACCATTTGCTAAGCC-3' YUC8-R: 5'-CCTGTCTTCTTCCAACC-3'
<i>YUC10</i> (AT1G48910)	YUC10-F: 5'-ACCAACACTCAATCCCAAAC-3' YUC10-R: 5'-GCATAATCTCTCCCCAAAAG-3'
<i>YUC11</i> (AT1G21430)	YUC11-F: 5'-CCCTCAAACACTCCTACCTTC-3' YUC11-R: 5'-GTCTTCCCTTCTATACGCTTAATC-3'
<i>AHL26</i>	PacI/AHL26-F, 5'-TTA ATT AAA TGG ATC CAG TTC AAT CTC ATG G-3' XbaI/AHL26-R, 5'-TCT AGA TCA ATA CGG TGG CCG ACC CGT-3'
Tubulin	TUB-F : 5'- CTC AAG AGG TTC TCA GCA GTA -3' (21mer) TUB-R : 5'- TCA CCT TCT TCA TCC GCA GTT-3' (21mer)

○ 최근, Lee와 Seo(2017)는 애기장대에서 AT-hook motif를 가진 유전자인 *AHL29*는 *YUC* 유전자 발현 조절을 통해 auxin biosynthesis에 관여한다고 보고하고 있다. 본 연구팀은 애기장대에서 분리한 *AHL26* 유전자 cytokinin signaling뿐만 아니라 auxin biosynthesis에도 관여하는지를 규명하기 위하여 애기장대의 auxin biosynthesis에서 중요한 역할을 담당하는 *YUC* 유전자 10종에 대한 유전자 발현 양상을 애기장대 야생형과 변이체 라인을 대상으로 조사하였다(그림 37). 적용된 유전자 및 *AHL26*과 양성대조구인 tubulin에 대한 RT-PCR용 primer 정보는 표 9에서 제시하였다. 그 결과 애기장대 대조구 및 변이체에서 *YUC2*, *YUC3*, *YUC4*, *YUC5*, *YUC6*, *YUC7*, *YUC8*, *YUC10* 그리고 *YUC11*의 발현을 확인할 수 있어서, 이들 유전자에 대한 발현을 분석하였다. 흥미롭게도 애기장대 대조구와 변이체에서 *YUC4*와 *YUC11* 유전자의 발현이 정도의 차이는 있지만 *AHL26* 유전자의 발현 양상과 비례적으로 나타남을 확인할 수 있었던 반면, 다른 *YUC* 유전자들은 그 연관성을 찾기가 힘들었다. 이러한 사실로 미루어보아 *AHL26* 유전자는 *YUC* 유전자군에서 *YUC4*와 *YUC11*의

발현을 비례적으로 조절하여 auxin biosynthesis에 관여하는 것으로 추측된다. 우리는 auxin biosynthesis에 대한 보다 정확한 분자생물학적 기작을 규명하기 위하여 상기 유전자군에 대한 반복 실험을 수행하고 있는 중이다.

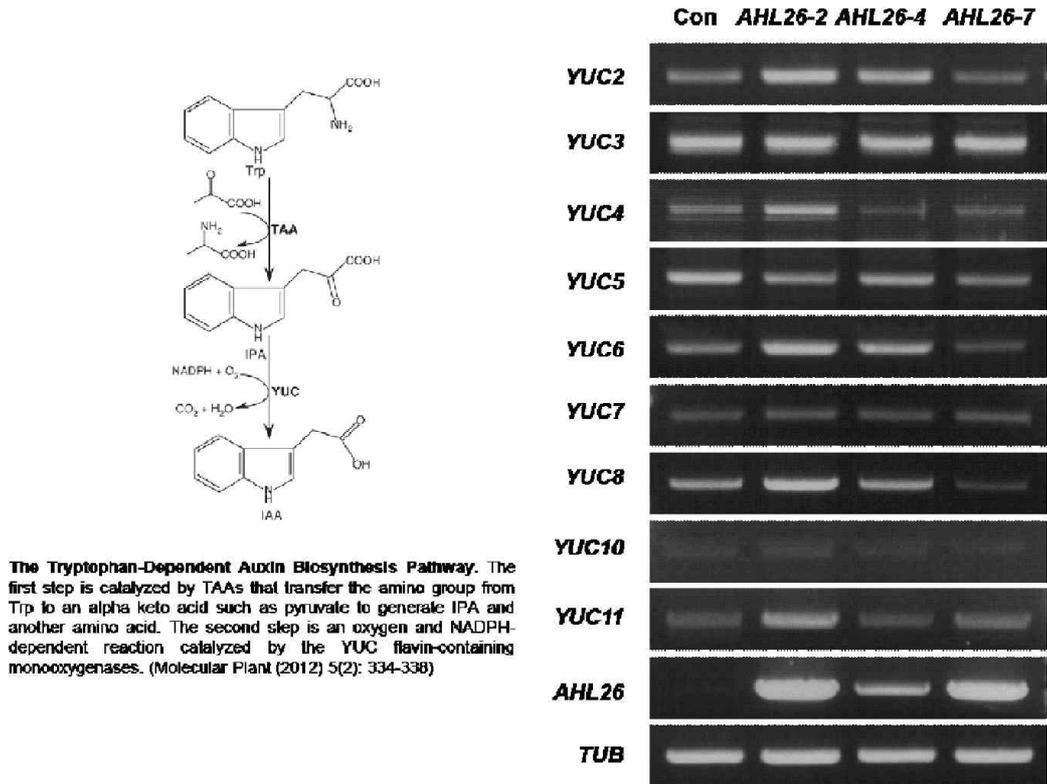


그림 37. AHL26 과발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 auxin biosynthesis pathway에서 YUC 유전자군, 그리고 AHL26 유전자에 대한 RT-PCR 결과. 양성 대조구는 tubulin.

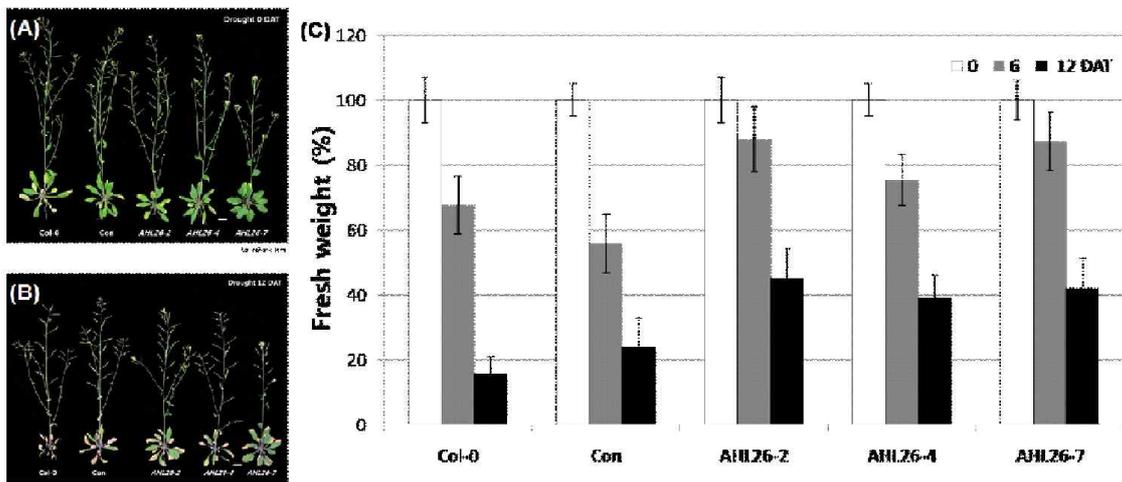


그림 38. AHL26 과발현 형질전환 라인의 건조 스트레스에 대한 표현형적 특징(A, B)과 잎의 무게 변화(C). (A) 발아 후 30일된 식물에 12일 동안 충분히 수분을 공급한 라인, (B) 발아 후 30일된 식물에 12일 동안 건조 조건하에 방치한 라인, n=15.

㉔ **AHL26 과발현 변이체의 스트레스 저항성 형질에 대한 특성 분석**

- **AHL26 과발현 변이체의 가뭄 저항성 형질에 대한 특성 분석:** AHL26 과발현 변이체에 대한 가뭄 저항성(drought tolerance) 분석은 발아 후 30일된 식물을 12일 동안 가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어나는 전체 식물의 표현형적 변화와 식물 개체당 잎의 무게 변화를 비교하여 가뭄에 대한 저항성 정도를 확인하였다. 그 결과는 그림 38에 제시되었다. 야생형 애기장대는 가뭄에 의해 잎의 황화 현상이 급속히 진행됨을 알 수 있었으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 가뭄에 의하여 현저히 감소함을 알 수 있었다. 그에 비하여 AHL26 유전자의 과발현 변이체 라인은 가뭄 처리에도 잎의 녹화가 여전히 진행되고 있으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 야생형에 비하여 월등히 높음을 알 수 있었다. 이러한 사실은 AHL26이 가뭄 스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.
- **AHL26 과발현 변이체의 산화 스트레스 저항성 형질에 대한 특성 분석:** AHL26 과발현 변이체의 산화적 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 3mM MES 용액에 50mM H₂O₂를 첨가하여 발아 후 25일 된 3, 4번 잎을 detach하여 floating한 후 매 3일 간격으로 6일 동안 엽록소 함량과 광합성 효율을 측정하여 H₂O₂ 스트레스에 대한 저항성 정도를 라인별로 각 6개체를 조사하였다. 엽록소 함량은 663.2 nm와 664.8 nm의 흡광 계수를 이용하여 Lichtenthaler와 Wellburn의 방법(*Biochemical Society Transduction* 603:591~592, 1983)에 따라 측정하였으며, 광합성 효율의 측정은 오 등의 방법(*Plant Mol. Biol.* 30:939, 1996)에 따랐다.
- 그 결과 애기장대 야생형에 비하여 AHL26 과발현 변이체, 특히 AHL26-2 과발현 변이체 라인에서는 잎의 황화 현상 지연과, 또한 엽록소 함량 및 광합성 효율의 감소, 특히 엽록소 함량의 감소가 지연됨을 확인할 수 있었다(그림 39). 앞선 가뭄 스트레스 저항성과 마찬가지로 AHL26-2 변이체 라인은 AHL26-4와 AHL-7 변이체 라인에 비하여 훨씬 높은 H₂O₂ 스트레스 저항성을 가지는데 이는 본 변이체들의 상대적 유전자 발현 정도의 차이에 기인하는 것으로 판단된다.
- 이러한 사실로 미루어보아 AHL26은 식물의 생산성 증대, 녹기 연장, 그리고 가뭄과 산화 스트레스와 같은 스트레스 저항성을 형질을 제공하여 고부가 작물 개발에 있어 중요한 역할을 할 수 있으리라 판단된다.

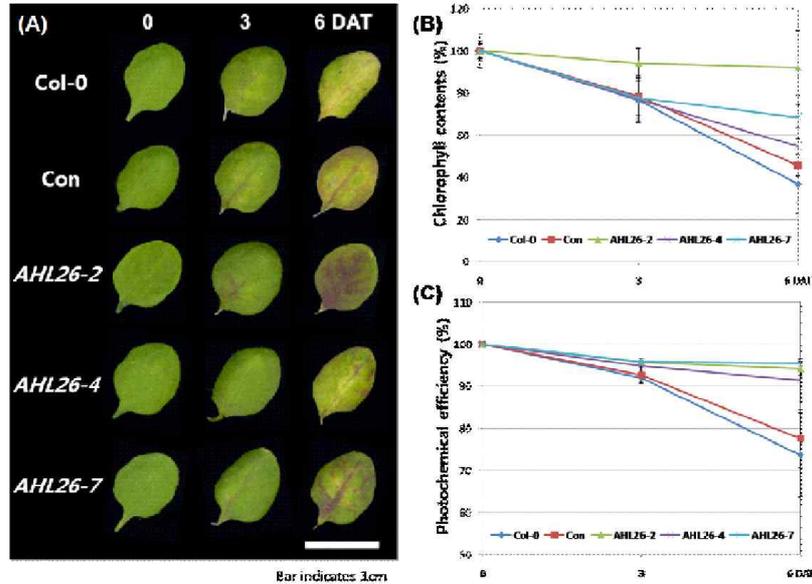


그림 39. *AHL26* 과발현 형질전환 라인의 산화 스트레스에 대한 표현형적 특징(A), 엽록소 함량 변화(B), 그리고 광합성 효율 변화(C), n=15.

㉔ SUMMARY

- *AHL26* 유전자는 애기장대의 DNA 결합 단백질 관련 단백질(DNA-binding protein-related)로 약 35.8 kDa의 분자량을 갖는 339개의 아미노산을 암호화하는 1,020 bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음.
- *AHL26* 유전자는 농업형질에 대한 생산성 지표를 분석한 결과 개체 크기, 종자 생산량 등과 같은 작물의 생산성 증대를 유발.
- *AHL26* 유전자는 나이-의존적 노화와 더불어 암-유도 노화에 있어서도 야생종에 비해 잎의 노화를 지연. 이러한 녹기 연장 효과는 *AHL26* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각됨.
- 상기 결과를 종합해 보면, *AHL26* 유전자는 식물의 생산성 증대뿐 만 아니라 녹기 연장의 형질을 제공하며, 이러한 농업형질의 복합성은 *AHL26* 유전자의 발현 차이에 기인하는 것으로 판단됨.
- *AHL26* 유전자는 *IPT5*와 *IPT7* 유전자의 발현 조절을 통하여 cytokinin 생합성에 관여하고, cytokinin signaling에 있어서 cytokinin receptor 중 *CRE1* 유전자의 발현 조절, 그리고 histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군 중 *AHP1* 유전자의 발현을 비례적으로 조절하여 식물의 생산성 증대 및 노화 지연 현상을 유도하는 것으로 판단됨.
- *AHL26* 유전자는 *YUC* 유전자군에서 *YUC4*와 *YUC11*의 발현을 비례적으로 조절하여 auxin biosynthesis에 관여.
- *AHL26* 유전자는 건조 스트레스뿐만 아니라 산화 스트레스에 대해서도 스트레스 저항성을 제공.
- 따라서 본 유전자의 생산성 증대, 녹기 연장 및 스트레스 저항성 농업형질은 들잔디와 국화에 적용하였을 때, 바이오매스 증대와 같은 생산성 증대뿐 만 아니라 녹기 연장 및 스트

레스 저항성이라는 복합적인 농업형질의 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 생각됨.

(2) *MtATPG4* (MTR 5g080580): 식물의 생산성 증대 및 녹기연장 형질 제공

- Ⓐ 식물의 생산성 증대 및 녹기연장 형질을 제공하는 *MtATPG4* 유전자 분리: *Medicago truncatula*의 *Medicago truncatula* AT-hook DNA-binding protein(GeneBank accession number XP_003616459.1)의 염기서열을 기초로 하여 제한효소 *BglIII*의 서열이 포함된 정방향 primer(*BglIII*/MTR5g080580-F, 5'-AGA TCT ATG TCG AAT CGA TGG TGG AGT G-3')와 제한효소 *BstEII*의 서열이 포함된 역방향 primer(*BstEII*/MTR5g080580-R, 5'-GGT GAC CTC AAT ATG GAG GTG GAT GTG GAC-3')를 합성하였다. 상기 primer를 사용하여 *Medicago truncatula* cDNA로부터 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 전장 cDNA를 증폭하고 분리하였다. 상기 분리된 cDNA의 분석 결과, 328개의 아미노산을 암호화하는 987 bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 2 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였고, AT-hook motif를 가지고 있어 이를 *MtATPG4* (*Medicago truncatula* AT-hook protein of Genome 4)로 명명하였다.

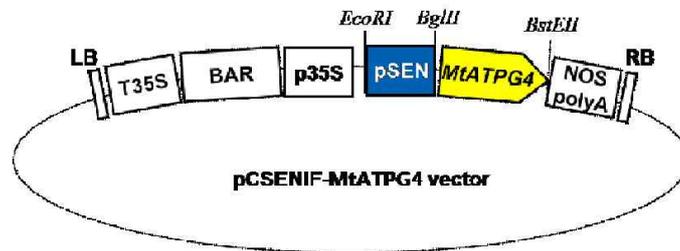


그림 40. 생산성 증대 및 녹기 연장 형질을 제공하는 *MtATPG4* 유전자의 발현을 위한 pCSENIIF-MtATPG4 벡터 모식도

- Ⓑ *MtATPG4* 발현 변이체의 표현형적 특징: 상기 유전자가 식물의 생산성 증대 및 녹기연장의 기능을 갖는지를 확인하기 위하여 *MtATPG4* 유전자가 센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 *MtATPG4* 전사체의 발현을 변화시켰다. Inducible promoter인 *SEN1* 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pCSENIIF 벡터에 센스 방향으로 클로닝하여 *MtATPG4* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSENIIF-MtATPG4 재조합 벡터를 제작하였다(그림 40). 그림 40에서 BAR는 바스타 제초제에 대한 저항성을 부여하는 *BAR* 유전자(phosphinothricin acetyltransferase gene)를 가리키고, RB는 오른쪽 경계(Right Border), LB는 왼쪽 경계(Left Border), P35S는 CaMV 35S 프로모터, 35S-A는 CaMV 35S RNA polyA, PSEN은 SEN1 프로모터, Nos-A는 노파린 합성 유전자(nopaline synthase gene)의 polyA를 가리킨다. pCSENIIF-MtATPG4 벡터로 형질전환된 T₁ 애기장대는 대조구(*MtATPG4* 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대 혹은 야생형 애기장대)와 발아 후 60일째 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 변이체 라인들은 생산성 증대와 녹기 연장에 대한 뚜렷한 표현형적 특징을 가졌다.

○ 우리는 이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T₁ 형질 전환 애기장대로부터 T₂ 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 녹기 연장에 대한 표현형을 조사하였다. 선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 표현형 확인은 일정 기간 생육 후 6일 동안의 암 처리 후 수행하였다. pCSENIIF-MtATPG4 구성체를 가지고 있는 변이체 라인들은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, T₁ 변이체와 마찬가지로 식물체의 개체 크기 증가와 같은 생산성 증대 및 녹기 연장 형질이 뚜렷하게 나타났다. 따라서 본 연구팀은 *MtATPG4* 유전자의 발현은 식물의 생산성 증대와 녹기 연장이라는 뚜렷한 표현형적 특징을 제공한다는 것을 확인할 수 있었다.

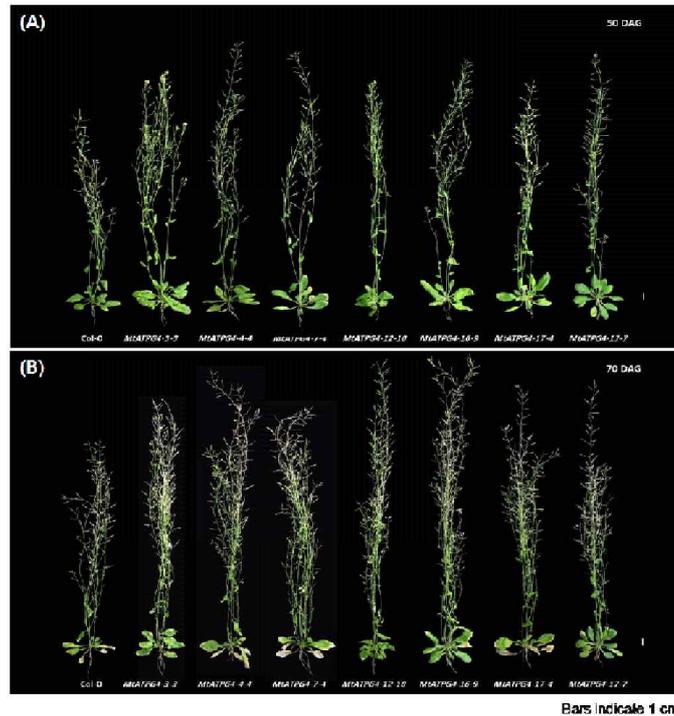


그림 41. 생산성 증대 및 녹기 연장 형질을 가지는 *MtATPG4* 발현 애기장대 형질전환체의 발아 후 50일째(A)와 70일째(B)의 표현형적 특징

○ 이러한 생산성 증대와 녹기 연장에 대한 표현형적 특징을 가지는 변이체에서 선별된 애기장대 T₃ 형질전환 호모라인들의 *in vivo* 표현형 확인은 발아 후 50일째, 그리고 70일째 수행하였다(그림 41). pCSENIIF-MtATPG4 구성체를 가지고 있는 변이체 라인 모두는 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, 식물체의 생산성 증대 현상이 뚜렷하게 나타났으며 흥미로운 점은 이들 변이체 중 *MtATPG4-3-3*과 *MtATPG4-12-10* 변이체 라인은 생산성 증대 현상과 더불어 녹기 연장 현상도 뚜렷하게 나타났다. 이들 라인들은 발아 후 50일 동안 생육하였을 때 *ORE7* 변이체와 같이 cytokinin-과발현 표현형을 가지고 있으며, 이후 70일 동안 생육하였을 때 녹기 연장 현상이 뚜렷하게 나타남을 확인 할 수 있었다. 한편 생산성 증대 형질에 있어서 *MtATPG4* 변이체 라인 모두는 발아 후 50일 동안 생육했을 때부터 개체 크기에 있어서 야생형에 비하여 증가하였으며, 발아 후 70일 동안 생육했을 때는 개체 크기 및 종자 생산량 증가와 같은 생산성 증대에 있어서 애기장대 야생형에 비하여 뚜렷한

증가 현상이 나타났다. 따라서 본 *MtATPG4* 유전자는 식물의 생산성 증대 및 녹기 연장 형질 제공에 있어서 강력한 유전자원으로 판단된다.

- 이러한 녹기 연장과 생산성 증대는 라인마다 차이가 있었는데 이는 본 유전자의 발현이 라인마다 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다. 이러한 표현형적 특징이 도입 유전자의 발현에 의해 유도되는 지를 확인하기 위하여 우리는 현재 자엽 형성 후 25일째의 대조구와 변이체 라인에 대한 유전자 발현 정도를 확인하였다(그림 42). *MtATPG4*, tubulin 및 BAR 유전자 발현 분석을 위한 RT-PCR용 primer 정보는 표 10과 같다. 그 결과, 애기장대 대조구에는 발현이 나타나지 않지만 변이체 라인 모두에서 *MtATPG4* 유전자의 발현이 라인마다 약간의 차이는 있지만 나타남을 확인하였으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 *MtATPG4* 유전자가 발현된 변이체임을 증명하고 있다. 이러한 변이체 중 *MtATPG4-3-3*과 *MtATPG4-12-10*의 높은 유전자 발현율을 가지는데 이러한 높은 유전자 발현율이 식물체의 노화 지연을 유발하는 것으로 판단되며, 이러한 유전자 발현의 차이는 변이체간의 노화 지연 현상과 생산성 증대 형질의 차이를 제공할 것으로 판단된다.

표 10. *MtATPG4*와 tubulin 유전자에 대한 RT-PCR용 primer 정보

GENE	Primer Information
<i>MtATPG4</i>	BglII/MTR5g080580-F, 5'-AGA TCT ATG TCG AAT CGA TGG TGG AGT G-3' BstEII/MTR5g080580-R, 5'-GGT GAC CTC AAT ATG GAG GTG GAT GTG GAC-3'
Tubulin	TUB-F: 5'-CTC AAG AGG TTC TCA GCA GTA-3' (21mer) TUB-R: 5'-TCA CCT TCT TCA TCC GCA GTT-3' (21mer)

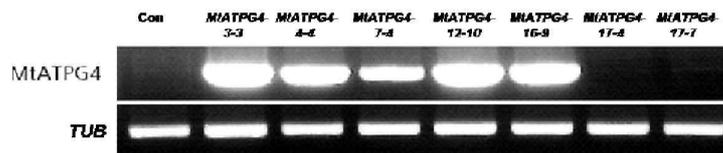


그림 42. *MtATPG4* 발현 애기장대 T₃ 형질전환체의 RT-PCR을 통한 *MtATPG4*에 대한 유전자 발현 양상. 양성 대조구는 tubulin(TUB).

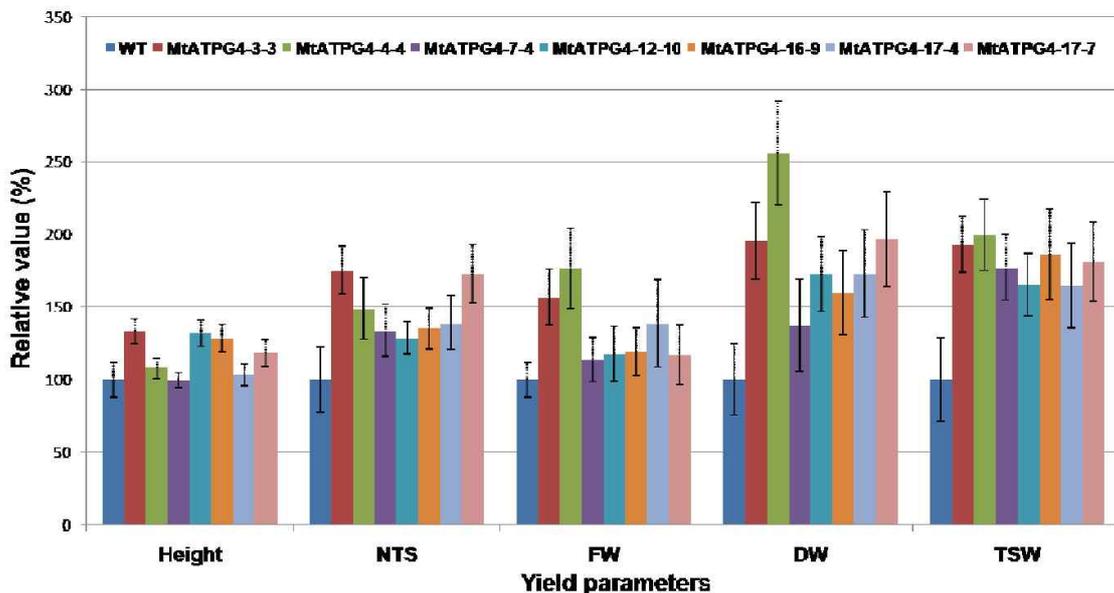


그림 43. *MtATPG4* 발현 애기장대 T₃ 형질전환 호모라인의 생산성 증대 지표 분석(n=20). Height (cm); NTS, numbers of total silique per plants; FW, fresh weight of plant; DW, weight of plant after dry; TSW, total seed weight; 1000SW, total number of seeds thousand seed weight.

◎ *MtATPG4* 발현 변이체의 생산성 증대 형질에 대한 특성 분석: *MtATPG4* 유전자의 발현을 통하여 얻어진 식물체가 생산성 증대 형질을 가지는 지를 정확히 분석하기 위하여 변이체 호모라인 *MtATPG4-3-3*, *MtATPG4-4-4*, *MtATPG4-7-4*, *MtATPG4-12-10*, *MtATPG4-16-9*, *MtATPG4-17-4* 그리고 *MtATPG4-17-7*에 대한 종자 수확량 등과 같은 생산성 증대 지표를 적용하여 애기장대 대조구와 비교해 보았다. 적용된 생산성 증대 지표는 식물의 키(height), 장각과(silique) 수(NTS), 생체량(FW), 생체건량(DW), 총 종자 무게(TSW), 총 종자 수(TNS), 그리고 1,000개의 종자 무게(1,000SW)이며, 결과는 라인별로 각 20개체의 평균값이다(그림 43).

○ 그 결과, 그림 43에서 보는 바와 같이 cytokinin-과발현 표현형질을 강하게 가지는 *MtATPG4-3-3*과 *MtATPG4-12-10*을 포함한 모든 형질전환 호모라인들은 야생종에 비하여 뚜렷한 생산성 증대 형질을 가지는 것으로 나타났다. 모든 형질전환 라인들은 야생형에 비하여 150% 이상의 종자 수확량을 나타냈으며, 그 중 형질전환 호모라인 중 *MtATPG4-3-3*과 *MtATPG4-4-4*는 대조구에 비하여 약 180% 이상의 종자 수확량의 나타내었다. 그런 반면 종자 1,000개의 무게는 변이체 라인과 대조구가 큰 차이가 없었다. 따라서 이러한 종자 생산의 증가는 변이체 라인들의 종자 크기와 관계없이 장각과 수의 증가에 기인하는 것으로 판단된다. 그리고 흥미로운 사실은 cytokinin-과발현 표현형을 가지는 *MtATPG4-3-3*과 *MtATPG4-4-4*를 제외한 대부분의 변이체 라인들은 야생형과 비슷한 수확 시기를 가진다는 것이다. 이러한 사실로 미루어보아 *MtATPG4* 유전자의 발현이 생산성 증대의 농업 형질을 제공하고, 이러한 생산성 증대 농업 형질이 세대진전에 있어서도 지속적이고 안정적으로 제공된다는 점에서 *MtATPG4* 유전자는 필드에서 적용 가능한 생산성 증대 농업형질로 적용될 수 있을 것이다. 상기 변이체들의 생산성 증대에 대한 표현형적 차이는 정도의 차이는 있지만 선행 연구에서 언급하였듯이 아마 *MtATPG4* 유전자의 발현 정도의 차이에 의해 나타나리라 판단된다.

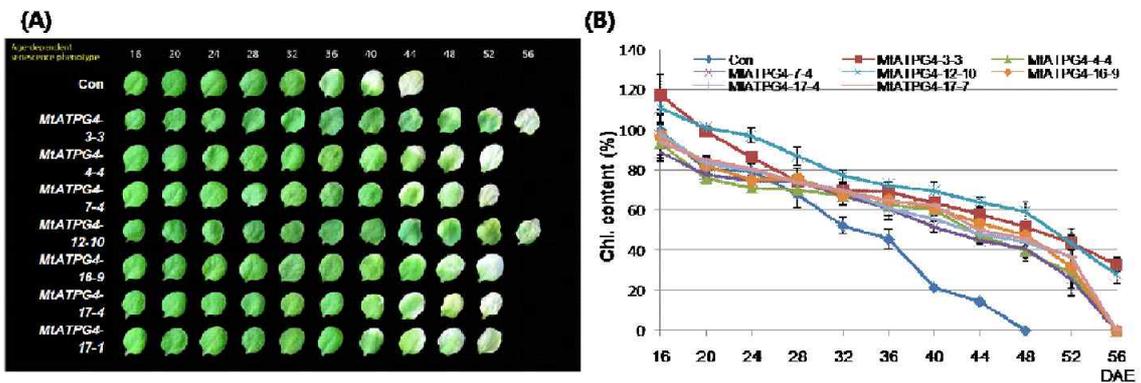


그림 44. *MtATPG4* 발현 형질전환 라인의 나이-의존적 노화에 대한 표현형적 특징(A)과 엽록소 함량 (n=6)(B).

① *MtATPGA* 발현 변이체의 녹기 연장 형질에 대한 특성 분석

- *MtATPGA* 발현 변이체의 나이-의존적 녹기 연장 형질에 대한 특성 분석: *MtATPGA* 발현 변이체의 나이-의존적 노화 지연 형질은 야생종 애기장대와 변이체의 T₃ 세대에서 자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 표현형 관찰 및 엽록소 함량을 측정하여 확인하였다. 이때 엽록소 함량은 663.2nm와 664.8nm의 흡광 계수를 이용한 Lichtenthaler와 Wellburn의 방법(*Biochemical Society Transduction* 603: 591~592, 1983)에 따라 측정하였다.
- 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 자엽 생성 후 36일째부터 잎의 황화 현상이 급속히 진행되어 44일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 변이체 라인 모두는 잎의 황화 현상 및 괴사 상태가 야생형 보다 지연됨을 볼 수 있었으며, 그 중 *MtATPGA-3-3*과 *MtTPGA-21-10* 변이체 라인은 44일부터 잎의 황화 현상이 진행되어 56일째 잎의 괴사 현상이 나타나 야생형에 비하여 강력한 노화 지연의 특성을 가지는 것으로 나타났다(그림 44A). 따라서 *MtATPGA* 유전자가 노화에 있어서 강력한 negative regulator 역할을 담당하는 것으로 판단된다. 야생형과 변이체 라인의 나이-의존적 노화 동안 엽록소 함량 변화는 그림 44B에 제시하였다. 도시된 바와 같이 야생종의 경우 엽록소 함량이 자엽 생성 후 16일 이후부터 지속적으로 감소하여 44일째 엽록소의 함량이 최소 수준에 도달하였으나, 변이체 라인들은 모두 야생형에 비하여 나이-의존적 노화 동안 엽록소 함량의 감소가 지연되었으며, 특히 *MtATPGA-3-3*과 *MtTPGA-21-10* 변이체 라인의 경우 엽록소 분해가 강력하게 지연되는 것으로 나타났다. 상기 결과로부터, *MtATPGA* 발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 노화 지연의 효과는 *MtATPGA* 유전자에 의한 엽록소 분해 억제 등으로 나타나는 광합성 효율 감소와 같은 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

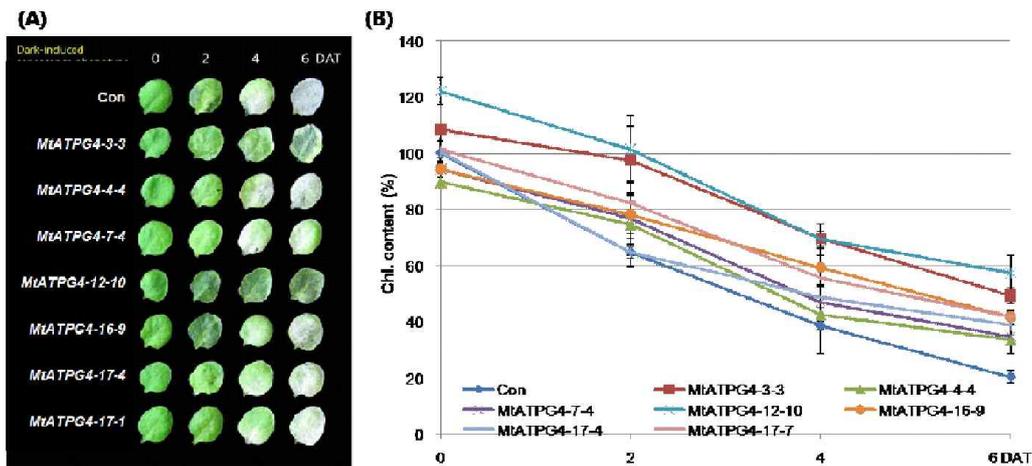


그림 45. *MtATPGA* 발현 형질전환 라인의 암-유도 노화에 대한 표현형적 특징(A)과 엽록소 함량 (n=6)(B).

- *MtATPGA* 발현 변이체의 암-유도 녹기 연장 형질에 대한 특성 분석: 식물 노화를 유도하는 요인으로 알려진 암 처리에 대한 야생종 애기장대와 *MtATPGA* 발현 변이체 라인의 잎의

암-유도 노화 형질의 특성을 분석하기 위하여 T₃ 세대에서 발아 후 21일째 3-4번 좌엽 (rosette leaf)을 detach하여 3mM MES 완충용액(2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid, pH 5.8)에 부유시킨 후, 암 상태를 유지하여 매 2일마다 표현형 관찰 및 엽록소 함량 변화를 조사하여 야생종 애기장대와 *MtATPG4* 변이체 라인들을 비교하였다.

- 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암 처리 후 4일 이후부터 잎의 황화 현상이 급속히 진행되어 6일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 변이체 라인들은 전체적으로 암-유도 노화 지연의 특징을 가지고 있었으며, 특히 *MtATPG4-3-3*과 *MtATPG4-21-10* 변이체 라인은 강력한 암-유도 노화의 특징을 가지고 있었다. 이러한 결과는 엽록소 함량 변화에서도 같은 경향을 나타내었다(그림 45). 따라서 *MtATPG4* 발현 변이체는 나이-의존적 노화와 마찬가지로 암-유도 노화에 있어서도 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 *MtATPG4* 유전자에 의한 엽록소 함량 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.
- 상기 결과를 종합해 보면, *MtATPG4* 유전자는 식물의 생산성 증대뿐 만 아니라 녹기 연장의 형질을 제공하며, 이러한 형질의 복합성은 *MtATPG4* 유전자의 발현 차이에 기인하는 것으로 판단된다. 따라서 본 유전자의 들잔디와 국화 작물 적용은 바이오매스 증대와 같은 생산성 증대뿐 만 아니라 녹기 연장이라는 복합적인 농업형질의 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 생각된다.

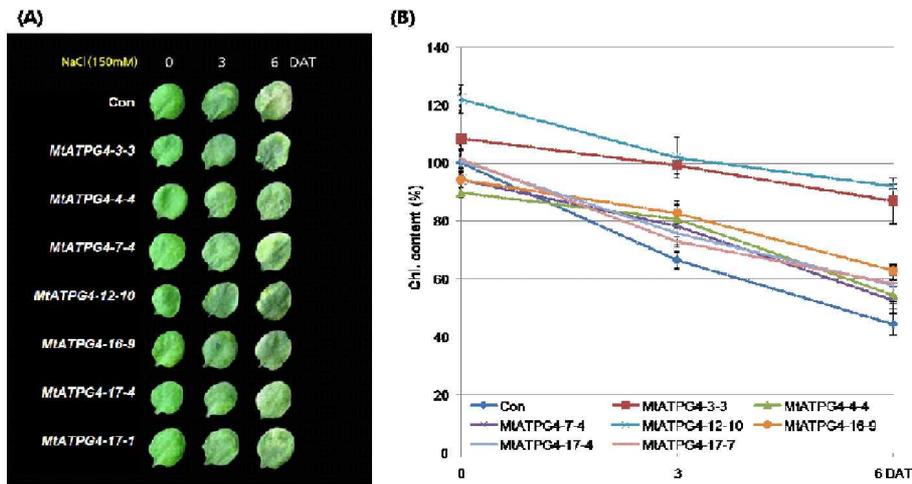


그림 46. *MtATPG4* 발현 형질전환 라인의 염 스트레스에 대한 표현형적 특징(A)과 엽록소 함량 변화(B), n=15.

㉔ *MtATPG4* 발현 변이체의 스트레스 저항성 형질에 대한 특성 분석

- *MtATPG4* 발현 변이체의 염 스트레스 저항성 형질에 대한 특성 분석: *MtATPG4* 발현 변이체에 대한 염(salt) 스트레스 저항성 분석은 3mM MES 용액에 150mM NaCl을 첨가하여 발아 후 25일 된 3, 4번 잎을 detach하여 floating한 후 3일 간격으로 6일 동안 잎의 표현형과 엽록소 함량 변화를 조사하여 염 스트레스에 대한 저항성 정도를 라인별로 각 15개체를 조사하였다. 엽록소 함량은 Lichtenthaler와 Wellburn의 방법에 따라 측정하였다. 그 결

과 대부분의 변이체 라인들이 염 스트레스에 대한 저항성을 가지고 있었으며, 특히 *MtATPG4-3-3*과 *MtTPG4-21-10* 발현 변이체는 6일동안의 염 스트레스 처리 후에도 약 80% 이상의 엽록소 함량을 가지고 있어, 애기장대 야생종의 40%대의 엽록소 함량과는 엄청난 차이가 나타내었다(그림 46). *MtATPG4-3-3*과 *MtTPG4-12-10* 발현 변이체 라인은 노화 지연에서도 강력한 형질을 나타내어, 염 스트레스 저항성 형질도 이와 연관이 있을 것으로 판단된다.

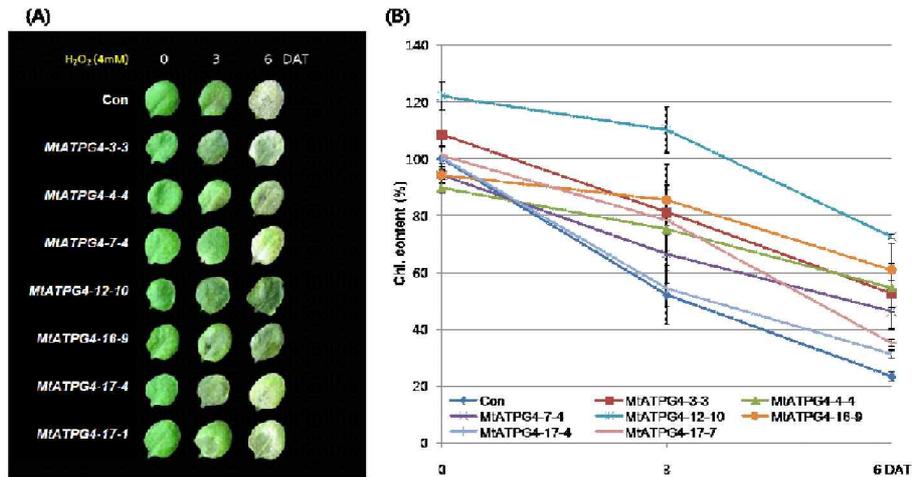


그림 47. *MtATPG4* 발현 형질전환 라인의 산화 스트레스에 대한 표현형적 특징(A)과 엽록소 함량 변화(B), n=15.

- *MtATPG4* 발현 변이체의 산화 스트레스 저항성 형질에 대한 특성 분석: *MtATPG4* 발현 변이체의 산화적 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 3mM MES 용액에 4mM H₂O₂를 첨가하여 발아 후 25일 된 3, 4번 잎을 detach하여 floating한 후 매 3일 간격으로 6일 동안 표현형과 엽록소 함량 변화를 조사하여 H₂O₂ 스트레스에 대한 저항성 정도를 라인별로 각 15개체를 조사하였다. 그 결과 애기장대 야생형에 비하여 *MtATPG4* 발현 변이체 라인에서 보다 높은 산화 스트레스 저항성을 가졌으며, 특히 *MtTPG4-12-10* 발현 변이체 라인에서는 6일 동안의 산화 스트레스 하에서도 약 70% 이상의 엽록소 함량을 보유했다(그림 47).
- 이러한 사실로 미루어보아 *MtATPG4*는 식물의 생산성 증대, 녹기 연장, 그리고 염과 산화 스트레스와 같은 스트레스 저항성을 형질을 제공하여 고부가 작물 개발에 있어 중요한 역할을 할 수 있으리라 판단되며, 녹기 연장의 형질은 스트레스 저항성의 형질과 연관되는 것으로 생각된다.
- ㉔ **Hormone signaling에 있어서 *MtATPG4* 유전자의 역할:** 우리는 *Medicago truncatula*에서 분리한 *MtATPG4* 유전자가 애기장대의 cytokinin 생합성에 관여하는지를 규명하기 위하여 애기장대 야생형과 변이체 *MtATPG4-3-3*, *MtATPG4-4-4*, *MtATPG4-7-4*, *MtATPG4-12-10*, *MtATPG4-16-9*, *MtATPG4-17-4* 그리고 *MtATPG4-17-7*을 대상으로 애기장대 cytokinin 생합성 유전자 *IPT*(isopentenyltransferase) 유전자군 중 *IPT1*(AT1G68460), *IPT3*(AT3G63110), *IPT5*(AT5G19040), 그리고 *IPT7*(AT3G23630) 유전자 4종의 발현을 조사하였다(그림 48). 적용된 유전자 및 *MtATPG4*와 양성대조구인 tubulin에 대한 RT-PCR용 primer 정보는 표 11

에서 제시하였다. 그 결과, 변이체에서 *IPT3*과 *IPT7* 유전자의 발현 변화는 *MtATPG4*의 발현 변화와 같은 양상을 나타낸 반면, *IPT1*과 *IPT5*는 *MtATPG4*의 발현 변화와 같은 양상을 찾기 힘들었다. 이러한 사실로 미루어 보아 *MtATPG4* 유전자가 *IPT3*와 *IPT7* 발현을 조절하여 cytokinin 생합성에 관여하는 것으로 판단된다.

표 11. Cytokinin 생합성에 관여하는 *IPT* 유전자군, *MtATPG4* 유전자, 그리고 양성 대조구인 *TUB* 유전자 발현을 위한 RT-PCR용 primer 정보

유전자명	정방향/역방향프라이머 (서열번호)
<i>IPT1</i>	5'-CGC TAC TCG TTT CCC TTC AG-3' 5'-TCG ACC CAG ATG AAA CAA CA-3'
<i>IPT3</i>	5'-CAA ACA ACC ATT GCC TCC TT-3' 5'-GGA CGG ATT CAA TGG AGA GA-3'
<i>IPT5</i>	5'-CAC TCC TGA GGA AAG CCT TG-3' 5'-TCG AGC TCT GGA ACT CCA AT-3'
<i>IPT7</i>	5'-TTG GGT CGA CGT TTC CTT AC-3' 5'-GAC GAT TCT CTC GCT TGG TC-3'
<i>MtATPG4</i>	5'-AGA TCT ATG TCG AAT CGA TGG TGG AGT G-3' 5'-GGT GAC CTC AAT ATG GAG GTG GAT GTG GAC-3'
Tubulin	5'-CTC AAG AGG TTC TCA GCA GTA-3' 5'-TCA CCT TCT TCA TCC GCA GTT-3'

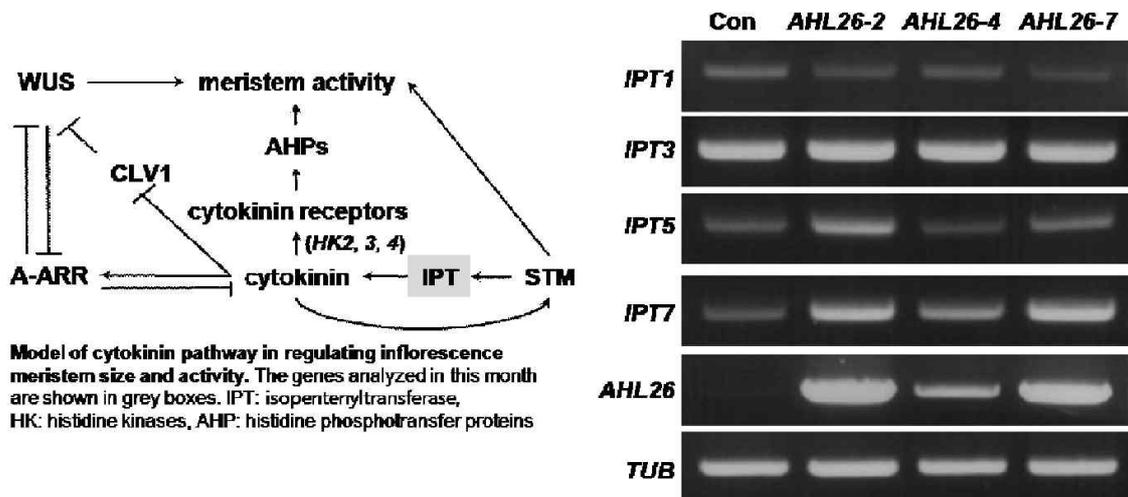


그림 48. *MtATPG4* 발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 cytokinin biosynthesis pathway에서 *IPT* 유전자군 및 *MtATPG4* 유전자에 대한 RT-PCR 결과. 양성 대조구는 tubulin(TUB).

○ 우리는 앞서 연구한 애기장대 AT-hook family gene이 cytokinin signaling에 있어서 cytokinin receptor인 HK(histidin kinase) gene family와 HP(histidine phosphotransfer protein) gene family의 발현을 조절하여 녹기연장 혹은/그리고 생산성 증대의 표현형적 특징을 제공한다는 가설을 세울 수 있었다. 우리는 *Medicago truncatula*에서 분리한 *MtATPG4* 유전자 또한 애기장대의 cytokinin signaling에 관여하는지를 규명하기 위하여 cytokinin signaling pathway 중 CLV1/WUS pathway에 관여하는 *CLV1* 유전자(receptor protein kinase CLAVATA1, AT1G75820)와 cytokinin receptor로서 기능을 가지는 histidine kinase 유전자군의 *HK2*(histidine kinase 2, AT5G35750), *HK3*(histidin kinase3, AT1G27320)

그리고 *CRE1*(*HK4*: histidine kinase 4, AT2G01830) 유전자의 발현을 애기장대 야생형과 변이체 라인을 대상으로 조사하였다(그림 49). 조사 대상 유전자 및 양성대조구인 tubulin에 대한 RT-PCR용 primer 정보는 표 12에서 제시하고 있다. 그 결과 *CLV1* 유전자의 발현은 대조구와 비교하여 변이체 모두에서 큰 차이를 가지지 않았다. 이러한 결과는 *MtATPG4* 유전자가 cytokinin pathway 중 *CLV1*/*WUS* pathway에는 크게 관여하지 않는다는 것을 의미한다. 한편, *CRE1* 유전자의 발현은 약간의 차이는 있지만 *MtATPG4* 유전자 발현 정도와 비례하여 변이체에서 발현된 반면, *HK2*와 *HK3* 유전자의 발현은 대조구와 비교하여 변이체 모두에서 이러한 경향성을 나타내지 않았다. 이러한 결과는 *MtATPG4* 유전자가 cytokinin receptor 중 *CRE1* 유전자의 발현에 비례적으로 관여한다는 것을 의미한다. 따라서 *MtATPG4* 유전자는 *IPT3*과 *IPT7* 유전자의 발현 조절을 통하여 cytokinin 생합성에 관여하고, cytokinin receptor 중 *CRE1* 유전자의 발현 조절을 통하여 cytokinin signaling에 관여하여 식물의 생산성 증대 및 노화 지연 현상을 유도하는 것으로 판단된다. 한편 생산성 증대와 노화 지연에 대한 상관관계는 좀 더 세밀한 분자생물학적 분석이 필요할 것으로 보인다.

표 12. 애기장대 cytokinin signaling pathway에서 *CLV1* 유전자, histidine kinase (HK) 유전자군, histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군, *MtATPG4*, 그리고 양성 대조구 tubulin 유전자에 대한 RT-PCR용 primer 정보

GENE	Primer Information
<i>CLV1</i>	CLV1-RT-F : 5'- ACT TAC CTC TGT CTC CCT CA -3' (20-mer) CLV1-RT-R : 5'- GAC CAC CTT TAG ATC CAT GC -3' (20-mer)
<i>HK3</i>	HK3-RT-F : 5'- CAA CAA CCA GCC CAT ATT CTC -3' (21-mer) HK3-RT-R : 5'- TTC CAA TAC CCA ATC CCC TC -3' (20-mer)
<i>CRE1</i>	WOL-RT-F : 5'- CTG AGG AGC AGT CAT TAT CG -3' (20-mer) WOL-RT-R : 5'- GGT TTT GTT GGG AGA GGA GA -3' (20-mer)
<i>HK2</i>	HK2-RT-F : 5'- GTA TGG CTC AGA AAT TGG GG -3' (20-mer) HK2-RT-R : 5'- GCC AGA GAG GAG AGA TGA AA -3' (20-mer)
<i>MtATPG4</i>	BglII/MTR5g080580-F : 5'-AGA TCT ATG TCG AAT CGA TGG TGG AGT G-3' BstEII/MTR5g080580-R : 5'-GGT GAC CTC AAT ATG GAG GTG GAT GTG GAC-3'
Tubulin	TUB-F : 5'- CTC AAG AGG TTC TCA GCA GTA -3' (21mer) TUB-R : 5'- TCA CCT TCT TCA TCC GCA GTT-3' (21mer)

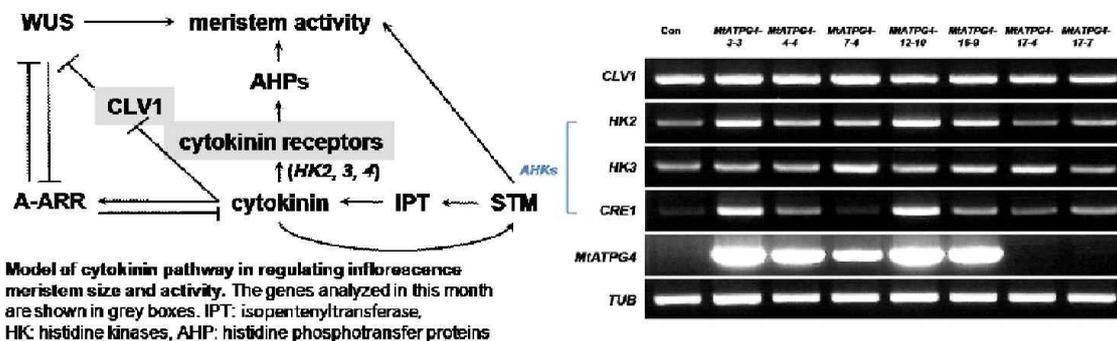


그림 49. *MtATPG4* 발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 cytokinin signaling pathway에서 *CLV1* 유전자, histidine kinase (HK) 유전자군, 그리고 *MtATPG4* 유전자에 대한 RT-PCR 결과. 양성 대조구는 tubulin(TUB).

○ 우리는 애기장대 대조구와 변이체를 대상으로 이러한 cytokinin signaling에 대한 보다 정확한 분석을 위하여 다음 단계인 histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군의 *AHP1*, *AHP2*, *AHP3*, *AHP4*, *AHP5*, 그리고 *AHP6* 유전자의 발현 양상 또한 조사하였다. 상기 유전자의 발현 양상은 RT-PCR을 통하여 분석하였으며, 이때 양성 대조구로는 tubulin을 사용하였고, 사용된 프라이머는 표 13에서 제시하였다. 그 결과, 변이체의 *MtATPG4* 유전자의 발현량과 비례적으로 발현한 유전자는 *AHP1*인 반면, 다른 *AHP* 유전자들은 변이체에서 *MtATPG4* 유전자의 발현과 같은 양상을 나타내지 않았다(그림 50). 이러한 사실은 *MtATPG4* 유전자 발현은 histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군 중 *AHP1* 유전자의 발현을 비례적으로 조절한다는 것을 시사한다.

표 13. Cytokinin signaling pathway에서 histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군, *MtATPG4*, 그리고 양성 대조구 tubulin 유전자에 대한 RT-PCR용 primer 정보

GENE	Primer Information
<i>AHP1</i> (AT3G21510)	AHP1-RT-F: 5'- ATGGATTTGGTTCAGAAGCAGAA -3' AHP1-RT-R: 5'- TCAAAATCCGAGTTCGACGGCC -3'
<i>AHP2</i> (AT3G29350)	AHP2I-RT-F: 5'- ATGGACGCTCTCATTGCTCAGC -3' AHP2I-RT-R: 5'- TTA GTT AAT ATC CAC TTG AGG AAC -3'
<i>AHP3</i> (AT5G39340)	AHP3-RT-F: 5'- GGACACACTCATTGCTCAGT -3' AHP3-RT-R: 5'- CTGCAAACATCTCACACACC -3'
<i>AHP4</i> (AT3G16360)	AHP4I-RT-F: 5'- ATGCAGAGGCAAGTGGCACTCA -3' AHP4I-RT-R: 5'- TTAAGTGGGCTACGTGCTGTC -3'
<i>AHP5</i> (AT1G03430)	AHP5-RT-F: 5'- GGTAGTAGCTCCAGTGTGCG -3' AHP5-RT-R: 5'- CTAATTTATATCCACTTGAGGAAT-3'
<i>AHP6</i> (AT1G80100)	AHP6-3UTR-F: 5'- CAAGCCGACATCAACCGGCTC -3' AHP6-3UTR-R: 5'- AGGGTTTCGCTTCGGTAGCTT -3'
<i>MtATPG4</i>	BgIII/MTR5g080580-F : 5'-AGA TCT ATG TCG AAT CGA TGG TGG AGT G-3' BstEII/MTR5g080580-R : 5'-GGT GAC CTC AAT ATG GAG GTG GAT GTG GAC-3'
Tubulin	TUB-F : 5'- CTC AAG AGG TTC TCA GCA GTA -3' (21mer) TUB-R : 5'- TCA CCT TCT TCA TCC GCA GTT-3' (21mer)

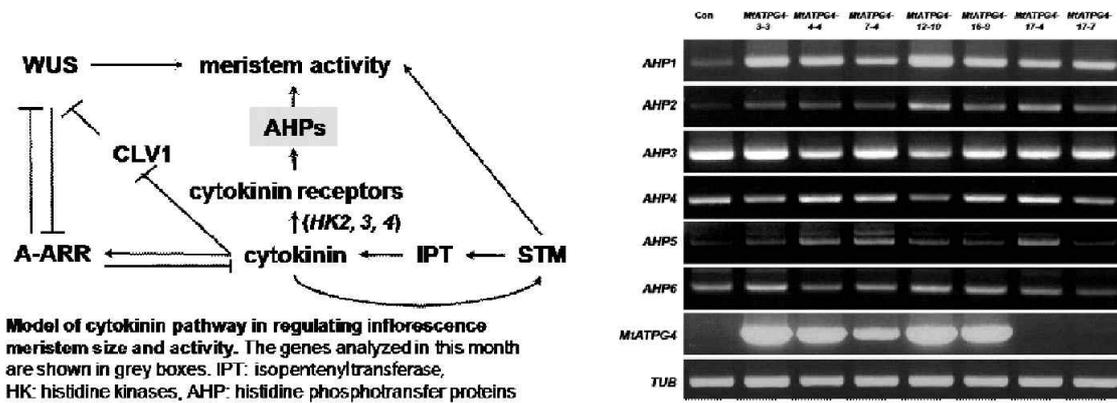


그림 50. *MtATPG4* 발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 cytokinin signaling pathway에서 histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군, 그리고 *MtATPG4* 유전자에 대한 RT-PCR 결과. 양성 대조구는 tubulin.

○ 이러한 분석을 통하여 우리는 다음과 같은 가설을 세울 수 있었다: *MtATPG4*는 1) cytokinin biosynthesis 유전자 중 *IPT3*과 *IPT7* 유전자의 발현을 비례적으로 조절, 2) cytokinin receptor 유전자 중 *CRE1* 유전자의 발현을 비례적으로 조절, 그리고 3) histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군 중 *AHP1* 유전자 발현을 비례적으로 조절하여 식물의 종자 수확량 증가, 바이오매스 증가와 같은 생산성 증대 그리고/혹은 녹기 연장의 형질을 제공한다.

표 14. Auxin biosynthesis pathway에서 YUC 유전자군, *MtATPG4*, 그리고 양성 대조구 tubulin 유전자에 대한 RT-PCR용 primer 정보

유전자명	정방향/역방향프라이머 (서열번호)
<i>YUC1</i> (AT4G32540)	YUC1-F: 5'-GTCCGACATAACGCATCTCC-3 YUC1-R: 5'-CAATCCTTTCCCTCCTCTCC-3
<i>YUC2</i> (AT4G13260)	YUC2-F: 5'-CGTTCCACTTGCATAGCGTC-3 YUC2-R: 5'-CCACATCCTACAACCAAAATCTTC-3'
<i>YUC3</i> (AT1G04610)	YUC3-F: 5'-TCTCAAACCTCCATCTACCTAAACAG-3' YUC3-R: 5'-CACATCCCACCACCAAAACC-3'
<i>YUC4</i> (AT5G11320)	YUC4-F: 5'-AACCTACTCAAATCTTCGTTCC-3' YUC4-R: 5'-CACAACCAACCACCAAAACC-3'
<i>YUC5</i> (AT5G43890z)	YUC5-F: 5'-GAGCAGATTGCATAGCTTCAC-3' YUC5-R: 5'-ACATCCGACGACAAGAACAC-3'
<i>YUC6</i> (AT5G25620)	YUC6-F: 5'-GTAAACTAGCACATGACCACC-3 YUC6-R: 5'-AAACTTATCCATCCCCTCAAAC-3
<i>YUC7</i> (AT2G33230)	YUC7-F: 5'-TGAAACGCCAAGAAGTTCC-3 YUC7-R: 5'-ACCACCAAAATCTTCTAAACCC-3'
<i>YUC8</i> (AT4G28720)	YUC8-F: 5'-GCAAACCATTTGCTAAGCC-3' YUC8-R: 5'-CCTGTCCTTCCTTCCAACC-3'
<i>YUC10</i> (AT1G48910)	YUC10-F: 5'-ACCAACACTCAATCCCAAAC-3' YUC10-R: 5'-GCATAATCTCTCCCCAAAAG-3'
<i>YUC11</i> (AT1G21430)	YUC11-F: 5'-CCCTCAAACACTCCTACCTTC-3' YUC11-R: 5'-GTCTCCCTTCTATACGCTTAATC-3'
<i>MtATPG4</i>	BglII/MTR5g080580-F : 5'-AGA TCT ATG TCG AAT CGA TGG TGG AGT G-3' BstEII/MTR5g080580-R : 5'-GGT GAC CTC AAT ATG GAG GTG GAT GTG GAC-3'
Tubulin	TUB-F : 5'- CTC AAG AGG TTC TCA GCA GTA -3' (21mer) TUB-R : 5'- TCA CCT TCT TCA TCC GCA GTT-3' (21mer)

○ 최근, Lee와 Seo(2017)는 애기장대에서 AT-hook motif를 가진 유전자인 *AHL29*는 *YUC* 유전자 발현 조절을 통해 auxin biosynthesis에 관여한다고 보고하고 있다. 본 연구팀은 *Medicago truncatula*에서 분리한 *MtATPG4* 유전자 cytokinin signaling뿐만 아니라 auxin biosynthesis에도 관여하는지를 규명하기 위하여 애기장대의 auxin biosynthesis에서 중요한 역할을 담당하는 *YUC* 유전자 10종에 대한 유전자 발현 양상을 애기장대 야생형과 변이체 라인을 대상으로 조사하였다(그림 51). 적용된 유전자 및 *MtATPG4*와 양성대조구인 tubulin에 대한 RT-PCR용 primer 정보는 표 14에서 제시하였다. 그 결과 애기장대 대조구 및 변이체에서 *YUC2*, *YUC3*, *YUC5*, *YUC6*, *YUC7*, 그리고 *YUC8*의 발현을 확인할 수 있어서, 이들 유전자에 대한 발현을 분석하였다. 흥미롭게도 애기장대 대조구와 변이체에서

*YUC2*와 *YUC3* 유전자의 발현이 정도의 차이는 있지만 *MtATPG4* 유전자의 발현 양상과 비례적으로 나타남을 확인할 수 있었던 반면, 다른 *YUC* 유전자들은 그 연관성을 찾기가 힘들었다. 이러한 사실로 미루어보아 *MtATPG4* 유전자는 *YUC* 유전자군에서 *YUC2*와 *YUC3*의 발현을 비례적으로 조절하여 auxin biosynthesis에 관여하는 것으로 추측된다. 우리는 auxin biosynthesis에 대한 보다 정확한 분자생물학적 기작을 규명하기 위하여 상기 유전자군에 대한 반복 실험을 수행하고 있는 중이다.

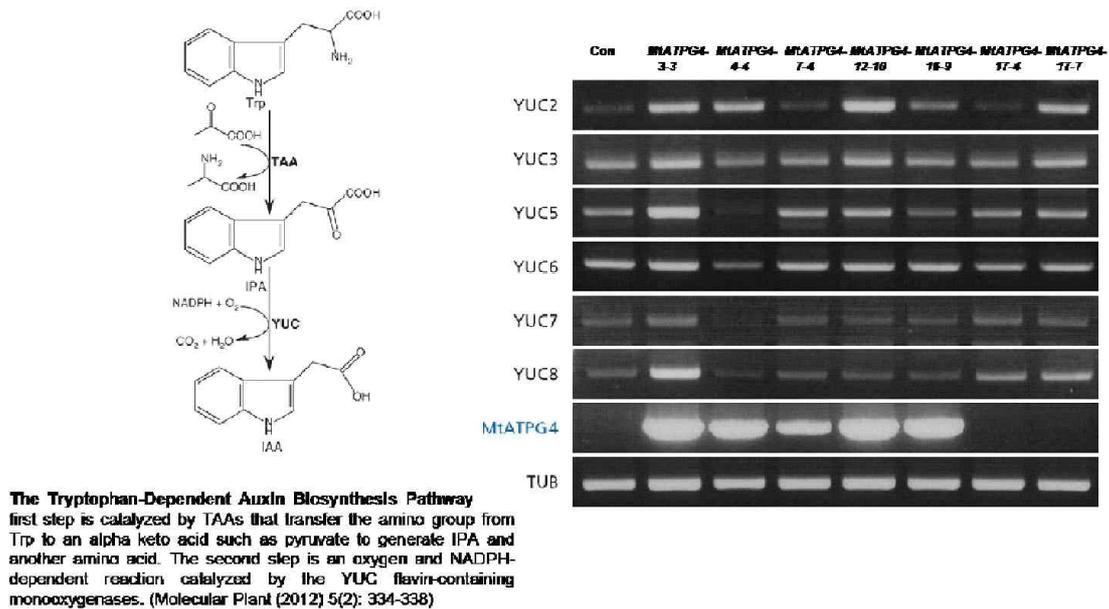


그림 51. *MtATPG4* 발현 애기장대 T₂ 형질전환체의 auxin biosynthesis pathway에서 *YUC* 유전자군, 그리고 *MtATPG4* 유전자에 대한 RT-PCR 결과. 양성 대조구는 tubulin.

㉔ SUMMARY

- *MtATPG4* 유전자는 *Medicago truncatula*의 *Medicago truncatula* AT-hook DNA-binding protein(GeneBank accession number XP_003616459.1)으로 328개의 아미노산을 암호화하는 987 bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 2 개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음
- *MtATPG4* 유전자는 농업형질에 대한 생산성 지표를 분석한 결과 개체 크기, 종자 생산량 등과 같은 작물의 생산성 증대를 유발, 그리고 나이-의존적 노화와 더불어 암-유도 노화에 있어서도 야생종에 비해 잎의 노화를 지연.
- 이러한 식물의 생산성 증대 그리고/혹은 녹기 연장의 복합형질 제공은 *MtATPG4* 유전자의 발현 차이에 기인하는 것으로 판단됨.
- *MtATPG4*는 cytokinin biosynthesis 유전자 중 *IPT3*과 *IPT7* 유전자, cytokinin receptor 유전자 중 *CRE1* 유전자, 그리고 histidine phosphotransfer proteins(HP) 유전자군 중 *AHP1* 유전자의 발현을 비례적으로 조절하여 식물의 종자 수확량 증가, 바이오매스 증가와 같은 생산성 증대 그리고/혹은 녹기 연장의 형질을 제공하는 것으로 판단됨.
- *MtATPG4* 유전자는 *YUC* 유전자군에서 *YUC2*와 *YUC3*의 발현을 비례적으로 조절하여 auxin biosynthesis에 관여

- *MtATPG4* 유전자는 염 스트레스뿐만 아니라 산화 스트레스에 대해서도 스트레스 저항성을 제공 염과 산화 스트레스와 같은 스트레스 저항성을 형질을 제공
- 따라서 본 유전자의 복합농업형질은 들잔디와 국화에 적용하였을 때, 바이오매스 증대와 같은 생산성 증대뿐 만 아니라 녹기 연장 및 스트레스 저항성이라는 복합적인 농업형질의 측면에서 매우 가치가 높을 것으로 생각됨

(3) *MtATPG3* and *MtATPG5*: 식물의 생산성 증대 및 녹기연장 형질 제공

- *MtATPG3* (*Medicago truncatula* AT-hook protein of Genomine 3, MTR 5g011520)과 *MtATPG5* (*Medicago truncatula* AT-hook protein of Genomine 5, MTR_7g080980) 유전자가 식물의 생산성 증대 및 녹기 연장의 형질을 제공하는 지를 확인하기 위하여 상기 유전자를 정방향으로 도입한 애기장대 형질전환체를 제조하여 *MtATPG3*과 *MtATPG5* 전사체의 발현을 유도하였다. 사용된 벡터는 pCSENIIF 벡터이며, 유전자를 센스 방향으로 클로닝하여 *MtATPG3* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSENIIF-MtATPG3 재조합 벡터와 *MtATPG5* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSENIIF-MtATPG5 재조합 벡터를 제작하였으며(그림 52), *Medicago truncatula*에서 유전자 분리 및 형질전환 벡터로 유전자 도입에 적용한 primer 정보는 표 15과 같다. 상기 pCSENIIF 벡터에 적용된 유도성 프로모터(inducible promoter)인 SEN1 프로모터는 식물의 성장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다.

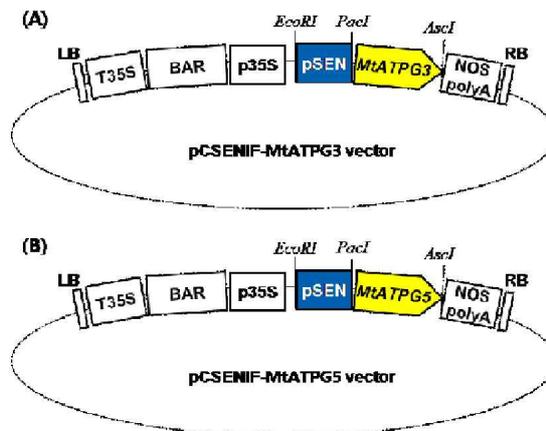


그림 52. *MtATPG3* 유전자의 발현을 위한 pCSENIIF-MtATPG3 vector (A) 및 *MtATPG5* 유전자의 발현을 위한 pCSENIIF-MtATPG5 vector (B)의 모식도

표 15. *Medicago truncatula*에서 *MtATPG3* 및 *MtATPG5* 유전자 분리 및 형질전환 벡터로 유전자 도입에 적용한 primer 정보

Gene	Primer Name	Sequence
MtATPG3	PacI/MTR5g011520-F	5'-TTA ATT AAA TGG ATC AAA TAA CAT CAC ATG GA-3'
	AscI/MTR5g011520-R	5'-GGC GCG CCT CAA TAC GGA GAA CGC CCG GTT-3'
MtATPG5	PacI/MTR_7g080980-F	5'- TTA ATT AAA TGG CCG GCA TAG ACT TG -3'
	AscI/MTR_7g080980-R	5'- GGC GCG CCT CAA TAA GAT TGT CTT CCA CCA GA -3'

- 상기 pCSENIIF-MtATPG3과 pCSENIIF-MtATPG5 재조합 벡터를 이용한 아그로박테리움-매

개 형질전환 기법을 통하여 형질전환체를 생산하여 라인당 20개체 이상에 대한 표현형적 특성을 분석하였다. 표현형적 특성 분석에 있어서 대조구로는 형질전환하지 않은 야생형 (wild type) 애기장대 또는 *MtATPG3* 혹은 *MtATPG5* 유전자가 포함되지 않은 벡터 (pCSENIIF 벡터)만으로 형질전환된 애기장대를 사용하였다.

○ pCSENIIF-MtATPG3과 pCSENIIF-MtATPG5 벡터로 형질전환된 T₁ 애기장대 라인들은 대조구와 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 흥미롭게도 변이체 라인들은 생산성 증대의 표현형적 특징뿐 만 아니라 녹기 연장과 표현형적 이상을 가지는 cytokinin 과발현의 표현형적 특징을 가졌다. 이러한 생산성 증대와 cytokinin 과발현의 표현형적 특징은 선행연구에서 애기장대의 AT-hook 유전자의 과발현으로 인한 대표적인 표현형적 특징으로 본 연구팀은 확인하였다. 즉 도입 유전자의 발현에 있어서 낮거나 중간 정도의 발현은 바이오매스 증대, 다수성과 같은 생산성 증대 형질을 제공하는 반면 높은 발현은 노화 지연과 같은 cytokinin 과발현 표현형을 제공한다는 사실과 일치하였다. 따라서 본 연구팀은 *MtATPG3* 과 *MtATPG5* 유전자 모두를 생산성 증대 및 녹기 연장 형질에 대한 후보 유전자로 선정하였으며, 이들에 대해 세대 진전을 통한 기능분석을 수행하고 있다. 본 연구팀은 바이오매스 증대의 형질과 cytokinin 과발현의 표현형을 가지는 *MtATPG3*과 *MtATPG5* 라인 일부를 그림 53과 54에서 제시하였다.

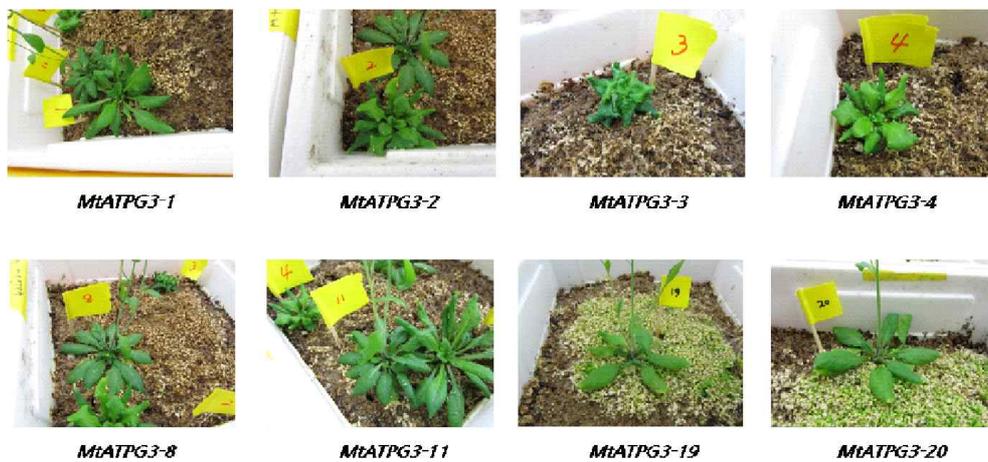


그림 53. *MtATPG3* 유전자 발현 애기장대 T₁ 형질전환체의 표현형적 특징.

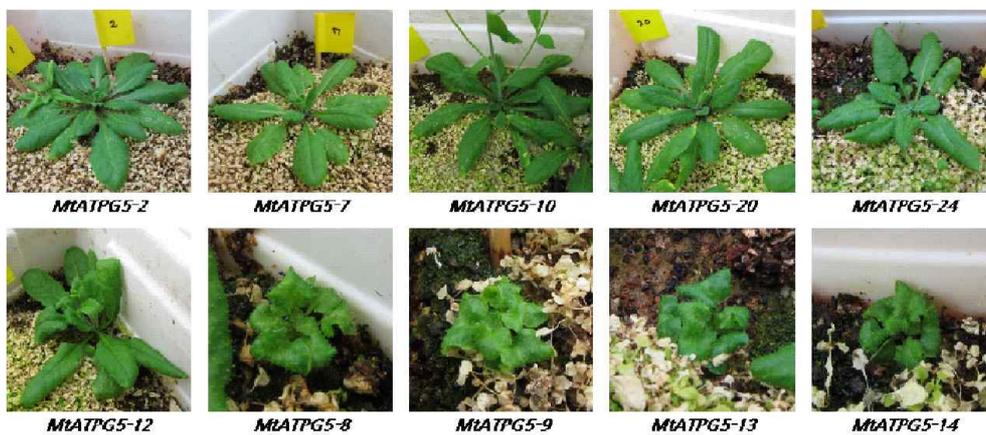


그림 54. *MtATPG5* 유전자 발현 애기장대 T₁ 형질전환체의 표현형적 특징.

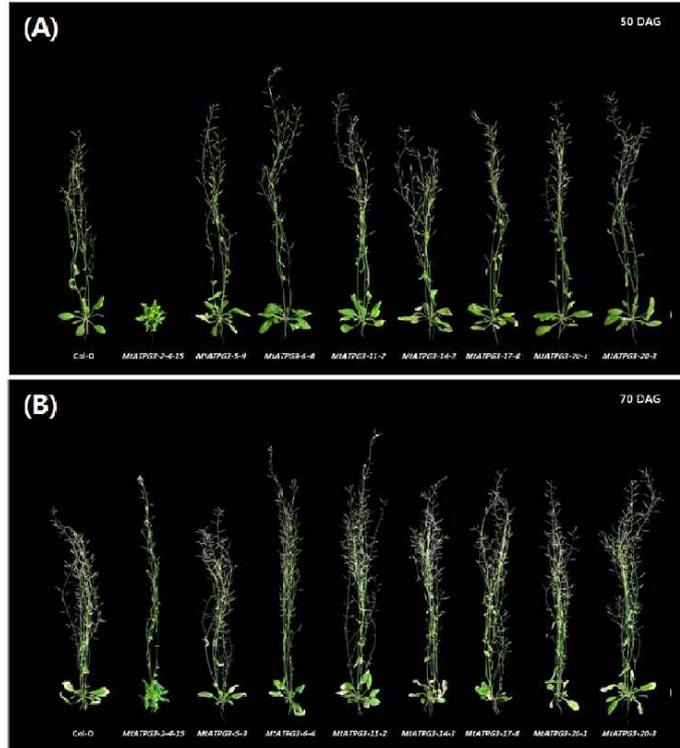


그림 55. 생산성 증대 및 녹기 연장 형질을 가지는 *MtATPG3* 발현 애기장대 형질전환체의 발아 후 50일째(A)와 70일째(B)의 표현형적 특징

○ *MtATPG3* 발현 변이체 라인의 표현형적 특징: 이러한 생산성 증대와 녹기 연장에 대한 표현형적 특징을 가지는 변이체에서 선별된 애기장대 T_{3~4} 형질전환 호모라인을 선별한 후 *in vivo* 표현형 확인은 발아 후 50일째, 그리고 70일째 수행하였다(그림 55). pCSENI-MtATPG3 구성체를 가지고 있는 변이체 라인 모두는 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, 식물체의 생산성 증대 현상이 뚜렷하게 나타났으며 흥미로운 점은 이들 변이체 중 *MtATPG3-2-4-15* 변이체 라인은 녹기 연장의 형질이 더욱 강하게 나타났다. 이 라인은 발아 후 50일 동안 생육하였을 때 *ORE7* 변이체와 같이 cytokinin-과발현 표현형을 가지고 있으며, 이후 70일 동안 생육하였을 때 녹기 연장 현상이 뚜렷하게 나타남을 확인할 수 있었다. 한편 생산성 증대 형질에 있어서 *MtATPG3-2-4-15* 변이체 라인을 제외하고 대부분의 *MtATPG3* 변이체 라인은 발아 후 50일 동안 생육했을 때부터 개체 크기에 있어서 야생형에 비하여 증가하였으며, 발아 후 70일 동안 생육했을 때는 개체 크기 및 종자 생산량 증가와 같은 생산성 증대에 있어서 애기장대 야생형에 비하여 뚜렷한 증가 현상이 나타났다. 따라서 본 *MtATPG3* 유전자는 식물의 생산성 증대 및 녹기 연장 형질 제공에 있어서 강력한 유전자원으로 판단된다. 이러한 녹기 연장과 생산성 증대는 라인마다 차이가 있었는데 이는 본 유전자의 발현이 라인마다 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다. 이러한 표현형적 특징이 도입 유전자의 발현에 의해 유도되는지를 확인하기 위하여 우리는 현재 자엽 형성 후 25일째의 대조구와 변이체 라인에 대한 유전자 발현 정도를 조사하고 있다.

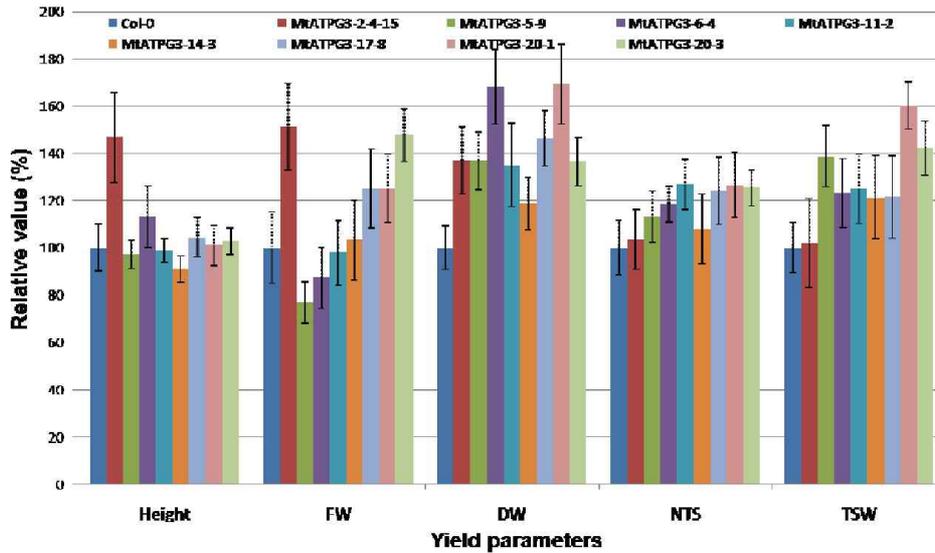


그림 56. *MtATPG3* 발현 애기장대 T_{3~4} 형질전환 호모라인의 생산성 증대 지표 분석(n=20). Height (cm); NTS, numbers of total silique per plants; FW, fresh weight of plant; DW, weight of plant after dry; TSW, total seed weight; 1000SW, total number of seeds thousand seed weight.

- *MtATPG3* 발현 변이체 라인의 생산성 증대 형질에 대한 특성 분석: *MtATPG3* 유전자의 발현을 통하여 얻어진 식물체가 생산성 증대 형질을 가지는 지를 정확히 분석하기 위하여 변이체 호모라인 *MtATPG3-2-4-5*, *MtATPG3-5-9*, *MtATPG3-6-4*, *MtATPG3-11-2*, *MtATPG3-14-3*, *MtATPG3-17-8*, *MtATPG3-20-1* 그리고 *MtATPG3-20-3*에 대한 종자 수확량 등과 같은 생산성 증대 지표를 적용하여 애기장대 대조구와 비교해 보았다. 적용된 생산성 증대 지표는 식물의 키(height), 장각과(silique) 수(NTS), 생체량(FW), 생체건량(DW), 총 종자 무게(TSW), 총 종자 수(TNS), 그리고 1,000개의 종자 무게(1,000SW)이며, 결과는 라인별로 각 20개체의 평균값이다(그림 56).
- 그 결과, 그림 56에서 보는 바와 같이 cytokinin-과발현 표현형질을 강하게 가지는 *MtATPG3-2-4-5*를 제외한 대부분의 형질전환 호모라인들은 야생종에 비하여 뚜렷한 생산성 증대 형질을 가지는 것으로 나타났다. 모든 형질전환 라인들은 야생형에 비하여 120% 이상의 종자 수확량을 나타냈으며, 그 중 형질전환 호모라인 중 *MtATPG3-20-1*은 대조구에 비하여 약 160% 이상의 종자 수확량의 나타내었다. 그런 반면 종자 1,000개의 무게는 변이체 라인과 대조구가 큰 차이가 없었다(data not shown). 따라서 이러한 종자 생산의 증가는 변이체 라인들의 종자 크기와 관계없이 장각과 수의 증가에 기인하는 것으로 판단된다. 그리고 흥미로운 사실은 cytokinin-과발현 표현형을 가지는 *MtATPG3-2-4-5*를 제외한 대부분의 형질전환 호모라인들은 야생형과 비슷한 수확 시기를 가진다는 것이다. 이러한 사실로 미루어보아 *MtATPG3* 유전자의 발현이 발현 정도에 따라 녹기 연장과 생산성 증대의 농업 형질을 제공하고, 생산성 증대 농업 형질을 가지는 라인들은 세대진전에 있어서도 지속적이고 안정적으로 생산성 증대 농업 형질을 제공한다는 점에서 *MtATPG3* 유전자는 산업적으로 생산성 증대 농업형질로 적용될 수 있을 것이다. 상기 호모라인들의 생산성 증대에 대한 표현형적 차이는 정도의 차이는 있지만 선행 연구에서 언급하였듯이 아마 *MtATPG3*

유전자의 발현 정도의 차이에 의해 나타나리라 판단된다.

- 우리는 *MtATPG3*과 *MtATPG5*의 생산성 증대와 녹기연장의 농업형질을 규명하기 위하여 확보한 변이체 호모라인을 통하여 *MtATPG3*에 대한 노화 지연, 스트레스 저항성 및 식물 호르몬 signaling에 대한 기능 분석을 진행하고 있으며, *MtATPG5*의 경우 선별된 호모라인 으로부터 생산성 증대, 노화 지연, 스트레스 저항성 및 식물 호르몬 signaling에 대한 추가 기능 분석을 진행하고 있다.

다. 들잔디와 국화 형질전환용 벡터 construct 제작

(1) 들잔디 형질전환용 벡터 construct 제작

- 들잔디에서 도입 유전자의 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질 발현을 위하여 본 연구팀은 항시 발현 promoter인 ubuquitin promoter를 적용한 IG-2 벡터를 들잔디 형질전환에 사용하였다. 확보 유전자인 *ATHG1*, *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*, *ATPG8*, 그리고 *ATPG10* 유전자는 Ubi 프로모터와 Arbcs 터미네이터 사이에 도입하여 들잔디 형질전환용 벡터를 제작하였다(그림 57).

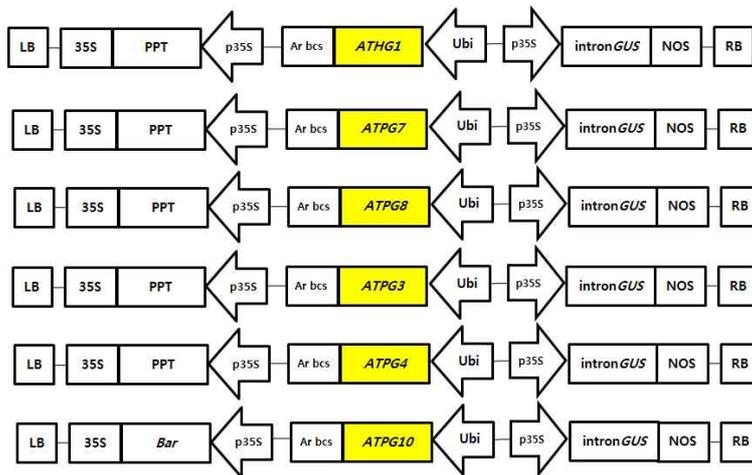


그림 57. 유용 유전자에 대한 들잔디 형질전환용 벡터 구축. IG-2 벡터의 Ubi 프로모터와 Arbcs 터미네이터 사이에 신규 유용 유전자를 도입하였음. *ATHG1*, *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*, *ATPG8* 그리고 *ATPG10*에 대한 벡터 구조. RB, right border; LB, left border; BAR, phosphinothricin resistant gene; 35S, CaMV 35S promoter; T35S, terminator; Ubi, ubiquitin promoter; Arbcs, terminator.

- 1-2차년도에 신규 발굴한 유전자 4종 중 *AHL26*, *MtATPG3*, 그리고 *MtATPG4* 유전자는 앞서 확보 유전자와 같이 항시 발현 promoter인 ubuquitin promoter를 적용한 IG-2 벡터의 Ubi 프로모터와 Arbcs 터미네이터 사이에 도입하여 들잔디 형질전환용 벡터를 제작하였다. 각 유전자에 대한 벡터 맵은 그림 58과 같다.

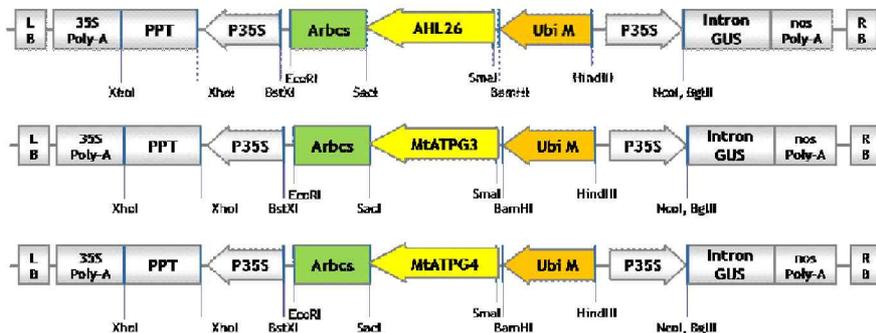


그림 58. 신규 유전자에 대한 들잔디 형질전환용 벡터 구축. IG-2 벡터의 Ubi 프로모터와 Arbcs 터미네이터 사이에

신규 유용 유전자를 도입. *AHL26*, *MtATPG3*, 그리고 *MtATPG4*에 대한 벡터 구조. RB, right border; LB, left border; BAR (PPT), phosphinothricin resistant gene; 35S, CaMV 35S promoter; T35S, terminator; Ubi, ubiquitin promoter; Arbc, terminator.

(2) 국화 형질전환용 벡터 construct 제작

○ 국화에서 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질 발현을 위하여 본 연구팀은 확보 유전자 중 *ORE15*의 경우, 항시 발현 프로모터인 35S의 조절을 받는 pCAMBIA3301 벡터를 이용하여 형질전환용 벡터를 제작하였으며, 확보 유전자 중 *ATPG4*, *ATPG6*, *ATPG7*, 그리고 *ATPG10* 유전자는 GM 작물 개발에 있어서 특히 최소 회피 가능 벡터로 발달 단계에 대한 인위적 조절이 가능한 pCSENIIF 벡터를 국화 형질전환체 생산에 이용하였다. 이러한 국화 형질전환용 벡터에 대한 모식도는 그림 59와 같다.

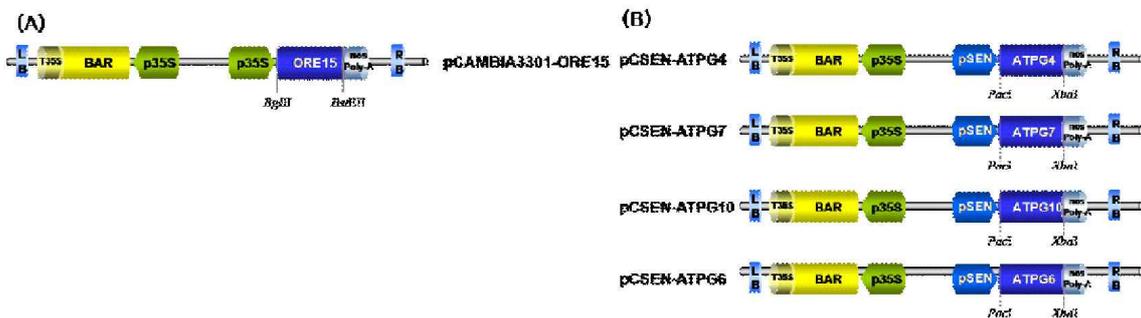


그림 59. 국화 형질전환용 벡터 construct 제작. (A) 35S promoter를 적용한 벡터 모식도, (B) SEN promoter를 적용한 벡터 모식도. RB, right border; LB, left border; BAR, phosphinothricin resistant gene; 35S, CaMV 35S promoter; pSEN, SEN promoter; T35S, terminator; nos Poly A; poly A signal of nos.

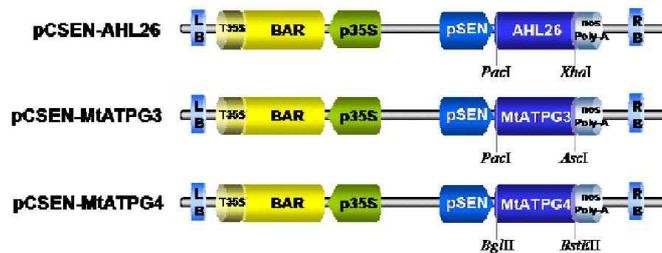


그림 60. 1-2차년도에 발굴한 신규 유전자 3종에 대한 국화 형질전환용 벡터 construct 제작. SEN promoter를 적용한 벡터 모식도. RB, right border; LB, left border; BAR, phosphinothricin resistant gene; 35S, CaMV 35S promoter; pSEN, SEN promoter; T35S, terminator; nos Poly A; poly A signal of nos.

○ 1-2차년도에 신규 발굴한 유전자 *AHL26*, *MtATPG3*, 그리고 *MtATPG4* 3종 또한 GM 작물 개발에 있어서 특히 최소 회피 가능 벡터로 발달 단계에 대한 인위적 조절이 가능한 pCSENIIF 벡터에 도입하여 국화 형질전환체 생산에 이용하였다(그림 60).

라. 들잔디 형질전환체 생산 및 기능 검증

(1) 들잔디의 고효율 재분화 시스템 및 형질전환 시스템 확립

○ 들잔디는 형질전환이 매우 어려운 식물의 하나로 들잔디의 안정적이고 효율적인 형질전환을 위해서는 재분화 효율이 높고 재분화능을 유지하는 기간이 긴 캘러스 계통의 확보가 가장 중요하다. 들잔디의 성숙종자에서 재분화 효율이 높은 배발생캘러스를 선발하기까지는 약 6-12개월이 소요되며 일단 선발된 캘러스도 일정기간이 지나면 재분화 효율이 낮아지거나 상실하게 된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 본 연구팀에는 매주 약 1만립 정도의 새로운 종자를 파종하여 캘러스를 유도하여 재분화 효율이 높은 캘러스를 선발하고 있다. 현재 본 연구팀은 재분화 효율이 90% 이상인 캘러스 3계통을 확보하고 있으며, 이들 캘러스 계통을 이용하여 들잔디의 형질전환 연구를 수행하였다(그림 61).

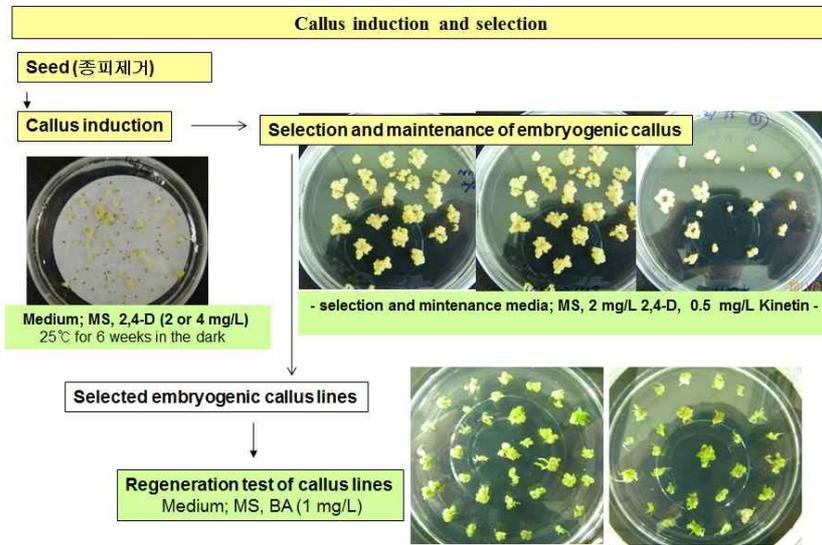


그림 61. 들잔디의 성숙종자 유래의 캘러스를 이용한 재분화계의 확립

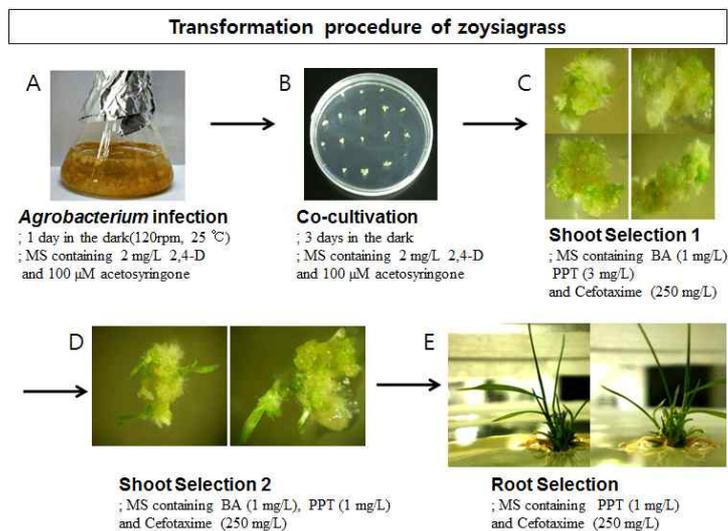


그림 62. 들잔디의 성숙종자 유래 캘러스를 이용한 형질전환체계의 확립

- 본 연구팀은 재분화 효율이 높은 캘러스 계통들을 이용하여 확립된 형질전환 시스템(그림 62)을 적용하여 생산성 증대 및 녹기 연장 유전자 8종에 대한 들잔디 형질전환을 수행하였다. 녹기연장 유전자가 도입된 형질전환체를 생산하기 위하여 성숙종자에서 재분화 효율이 높은 배발생캘러스를 사용하여 *Agrobacterium* 매개 형질전환을 실시하였다. 목적 유전자가 도입된 *Agrobacterium*에 들잔디 캘러스를 침지하여 24시간 접종시킨 후, 3일간의 공동배양을 거쳐 3 mg/L의 PPT(Phosphinothricin)가 첨가된 shoot 선발 배지1에 치상하여 2주간 배양시킨 후 1 mg/L의 PPT가 첨가된 shoot 선발 배지2로 옮겨 다시 2주 간 배양시켜 신초를 재생한다. 매 2주 간격으로 새로운 shoot 배지로 옮기면서 shoot를 선발한다. 선발된 shoot는 1 mg/L의 PPT가 첨가된 뿌리 선발 배지에 치상하여 1-2개월 동안 배양시킨 후 충분히 증식된 식물체는 순화과정을 거쳐 온실에서 재배하였다.

(2) 들잔디 형질전환체 생산

- 본 연구팀은 녹기연장 유용 유전자 8종에 대한 들잔디 형질전환을 수행하였다. 이 중, 선행 연구를 통하여 확보된 6종의 유전자(*ATHG1*, *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*, *ATPG8*, *ATPG10*)가 각각 도입된 들잔디 형질전환체를 확보하였다. 이들 6종의 유전자가 도입된 보다 많은 형질전환체를 얻기 위하여 형질전환을 계속 진행하였으며, 신규 유전자 3종(*AHL26*, *MtATPG3*, *MtATPG4*)의 도입을 위한 형질전환 실험 또한 수행하고 있으며, *MtATPG3*, *MtATPG4*의 도입 들잔디 형질전환을 그림 63에서 제시하였다.



그림 63. *MtATPG3*와 *MtATPG4* 유전자가 도입된 *Agrobacterium* 매개 들잔디의 형질전환

(3) 들잔디 형질전환체 기능 검정 및 우량 형질전환체 개발

- 본 연구팀은 녹기연장 유전자 6종(*ATHG1*, *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*, *ATPG8*, *ATPG10*)의 형질전환체를 대상으로 유전자 도입 분석을 위해 Trait LLtest Strips(Strategic Diagnostics Inc.)을 이용하여 선발마커 *bar* 유전자의 발현산물인 PAT 단백질의 발현여부를 확인하였다.

PAT 단백질의 발현이 확인된 형질전환체의 삽입 T-DNA copy 수를 확인하기 위하여 southern blot 분석을 실시하였다. 야생형과 형질전환체의 잎 절편으로부터 genomic DNA를 CTAB법(Murray and Thomson, 1980)에 따라 추출하였다. 추출한 genomic DNA 중 10 ug의 genomic DNA를 사용하여 *EcoRI*(Takara, Japan)으로 37°C에서 24시간 동안 처리하였다. 절단된 genomic DNA를 1% agarose gel에서 장시간 영동하여 절단된 게놈 DNA가 충분히 분리되도록 하였다. 탈퓨린화, 변성, 중화 과정을 거친 gel의 DNA는 20x SSC(0.3M Sodium citrate, 3M NaCl) 조건에서 nitrocellulose membrane(GE Healthcare)으로 blotting하였다. *bar*와 목적 유전자인 *ATHG1*, *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*, *ATPG8*, *ATPG10* 유전자 서열에 특이적으로 결합하는 probe는 Dig labeling system(Roche)을 이용하여 PCR 반응을 거쳐 합성되었으며 antibody는 Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments(Roche)을 사용하였다. Detection substrate는 CDP star(GE Healthcare)를 사용하였으며, LAS-4000을 사용하여 시그널을 검출하였다.

- Southern blot 분석에서 유전자의 도입이 확인된 독립된 형질전환체들의 목적 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 야생형과 형질전환체의 잎을 취하여 액체질소를 이용하여 분쇄한 후, Trizol(MRC)에서 제공하는 표준 방법을 변형하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA로 cDNA를 합성하고 각 유전자 특이적인 primer를 제작하여 RT-PCR을 수행하였다. Standard control로는 한국 들잔디 유래의 18s rRNA 유전자의 특이적인 primer를 제작하여 RT-PCR을 수행하였다(표 16). RT-PCR의 조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation 후, denaturation 94°C 30초, annealing 58.5°C 30초, extension 72°C 30초에서 25cycle을 수행하였고 2% agarose gel에서 전기영동 후 G-Box EF gel documentation system(Syngene)을 이용하여 영상화하였다.

표 16. 형질전환체의 유전자 발현 분석에 이용한 primer 정보

Gene	Primer Name	Sequence
18s rRNA	18s rRNA-F	5'-CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA-3'
	18s rRNA-R	5'-AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG-3'
ATHG1	AtATHG1-F	5'-CGT TAC GTT AAT CAC CAG CTC C-3'
	AtATHG1-R	5'-GCA ACA TTA GTA AAC GAA GCT GC-3'
ATPG3	ATPG3-F	5'-CAC CGC CCA GAA TCG GTA GTA-3'
	ATPG3-R	5'-GAT GCG GCG GCA TAT TGT AG-3'
ATPG4	ATPG4-F	5'-CTC GCG ATT CTC CAA ATG CT-3'
	ATPG4-R	5'-GCT AGG GTT TCG ATG ACG TCA GT-3'
ATPG7	ATPG7-F	5'-TGC AAC ATC AGC AAC AAG CTA TG-3'
	ATPG7-R	5'-GCT GCA ACT GAA CCG AAC CA-3'
ATPG8	ATPG8-F	5'-ATG CAA GAT GCG ACA TCG TTT-3'
	ATPG8-R	5'-ATA AGC TTC ACC TGG CAA CGA A-3'
ATPG10	ATPG10-F	5'-GCG GTG AAG AGT CAG GAC AGA-3'
	ATPG10-R	5'-CAC CCA TGT GGC AAC TGT ACA T-3'

- 형질전환 잔디의 특성 분석을 수행하기 위해 각 유용 유전자가 도입된 들잔디 형질전환체들은 순화 과정을 통하여 온실에서 증식하였다.

Ⓐ ATHG1-형질전환 들잔디

○ *ATHG1* 도입한 형질전환 들잔디의 생산 및 유전자 도입 확인: *ATHG1* 유전자를 들잔디에 도입하여 형질전환체를 선발하였다. 아그로박테리움에 감염 후, shoot 유도 및 선발 과정을 거쳐 총 25개체의 *ATHG1*-형질전환 들잔디를 확보하였으며(그림 64), 이 중 기내에서 충분히 증식하여 순화한 형질전환 잔디는 온실에서 순화하여 증식하였다. 증식된 형질전환체들은 Trait LL Test Strip 분석을 통하여 선발마커 유전자인 *bar* 유전자의 발현산물인 PAT 단백질의 발현을 확인하였으며(그림 64), genomic-PCR 분석을 통해 *ATHG1* 유전자의 도입을 확인하였다(그림 65). Genomic-PCR 분석에서 유전자의 도입이 확인된 형질전환 식물을 이용하여 Southern blot 분석을 수행한 결과, 대부분이 single copy 유전자가 도입되었음을 확인할 수 있었다(그림 66).

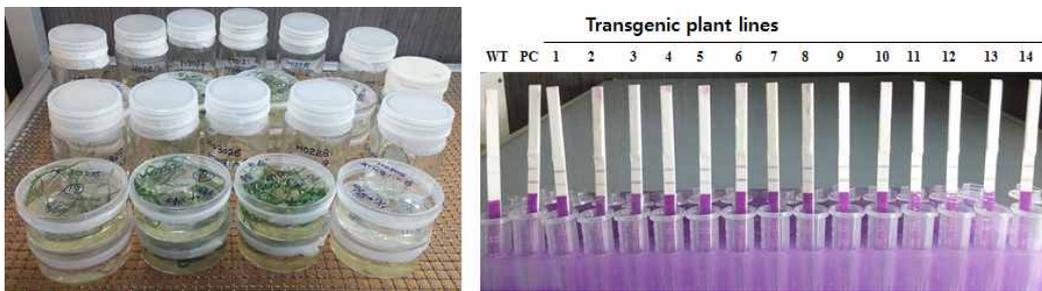


그림 64. *ATHG1* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 선발 및 선발마커 유전자의 발현 확인. 좌, 형질전환체의 선발; 우, Trait LL Test Strip 분석

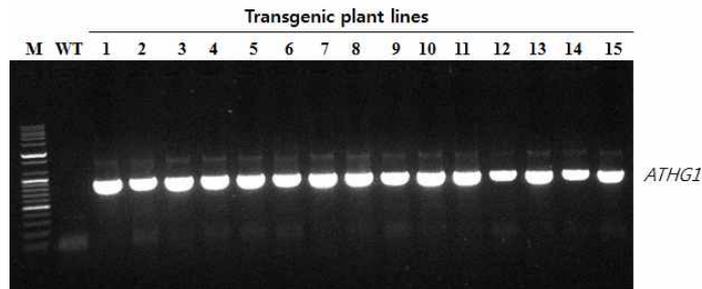
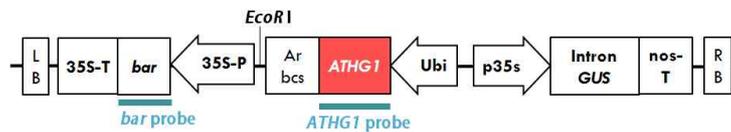


그림 65. *ATHG1* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 유전자 도입 확인. Genomic-PCR analysis for *ATHG1* gene; WT, Wild type; 1-13, transgenic plants



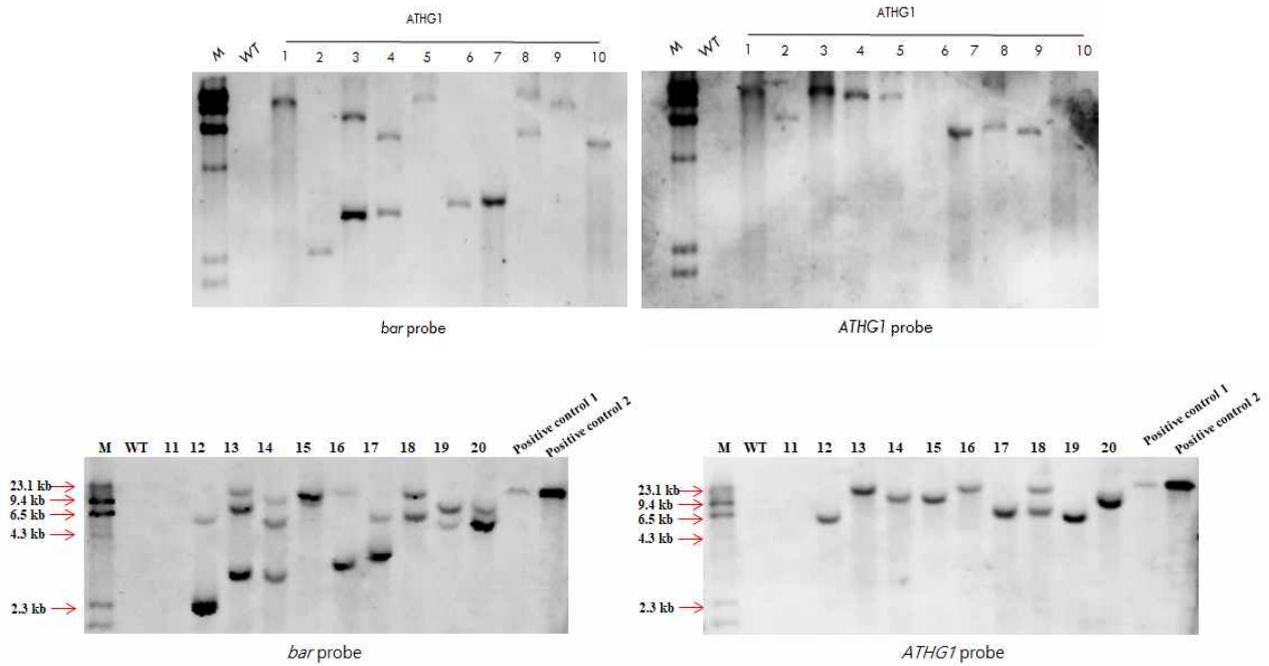


그림 66. *ATHG1* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 Southern blot 분석. M, DIG-labeled DNA molecular weight marker; WT, Wild type; 1-20, transgenic plants

○ Southern blot 분석에서 유전자의 도입이 확인된 형질전환 식물체에서 *ATHG1* 유전자의 발현 여부를 조사하기 위해 RT-PCR 분석을 수행하였다. *ATHG1* 유전자의 염기서열을 기초로 각 유전자의 특이 primer를 제작하였다. 야생형과 형질전환체의 잎 조직에서 total RNA를 추출한 다음, 추출한 total RNA를 이용하여 cDNA를 합성하고, 목적 유전자인 *ATHG1* 유전자와 들잔디 유래의 18s rRNA 서열에 특이적인 primer를 제작하여 RT-PCR을 수행하였다. 분석에 사용한 모든 형질전환체 계통에서 정상적으로 목적유전자가 발현되고 있음을 확인하였다(그림 67).

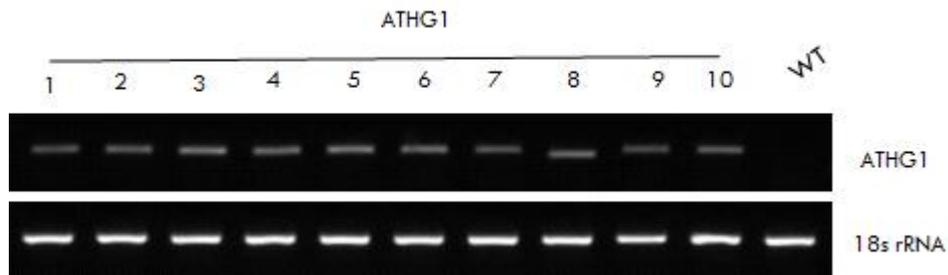


그림 67. *ATHG1* 유전자가 도입된 형질전환체의 도입 유전자의 발현 확인. WT, Wild type; 1-10, transgenic plants

○ *ATHG1* 도입한 형질전환 들잔디의 기능 분석: Southern blot 분석과 RT-PCR을 통하여 목적 유전자의 도입 및 발현이 확인된 *ATHG1* 형질전환체 10계통을 대상으로 노화지연 관련 1차 표현형 분석을 수행하였다. *ATHG1* 형질전환 들잔디의 노화지연 특성을 확인하기 위해 수

확 후 식물의 노화를 촉진시키는 원인의 하나로 잘 알려진 암 조건 처리에 따른 특성을 분석하였다. 형질전환 들잔디의 잎 절편을 3mM MES 용액 올려놓은 후, 플레이트를 호일을 씌어 암조건과 과산화수소를 처리 한 후 시간 경과에 따른 잎의 형태 변화를 관찰하였다. 그 결과, 10일째에서 야생형과 IG-2 공백터가 도입된 식물의 잎 절편에 비하여 형질전환 식물 중 1번, 2번, 4번, 5번과 7번 계통은 녹기를 유지하는 표현형적 특성을 나타내었다(그림 68). 또한 산화스트레스 저항성을 조사하기 위해 3mM MES와 10mM 과산화수소를 혼합한 용액에 온실에서 배양중인 야생형 및 형질전환 식물의 잎 절편을 처리 한 후, 잎의 형태변화를 관찰하였다(그림 69). 그 결과, 형질전환 식물 중 2번, 5번 계통에서 야생형과 IG-2 공백터가 도입된 식물에 비해 녹기를 유지하는 표현형적 특성을 나타내었다. 시험포장에서의 특성을 분석하기 위해 이들 형질전환체들은 온실에서 증식하였다(그림 70).

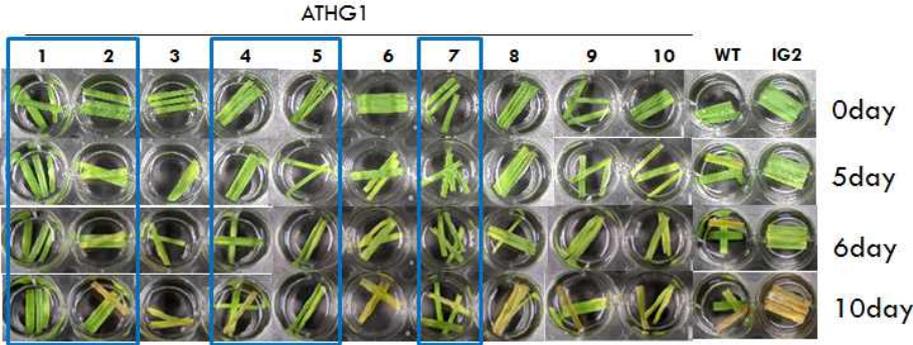


그림 68. *ATHG1* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 1차 표현형 분석. 식물의 잎 절편을 노화를 유도하는 암 처리 한 후, 시간 경과에 따른 표현형 변화를 관찰하였음. WT, Wild type; IG2, positive control; 1-10, transgenic lines.

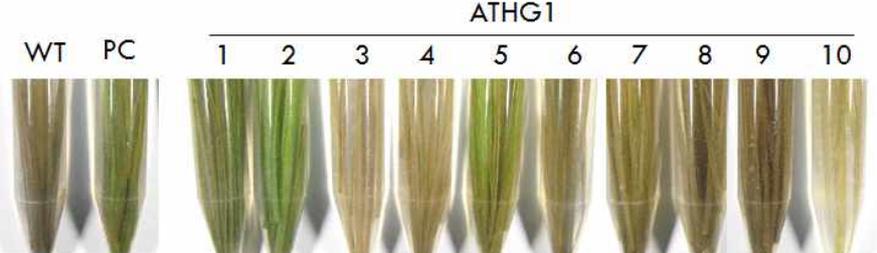


그림 69. *ATHG1* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 1차 표현형 분석. 식물의 잎 절편을 노화 및 산화 스트레스를 유도하는 과산화수소에 처리 한 후 14일이 된 잎 절편의 표현형 변화를 관찰하였음. WT, Wild type; PC, positive control; 1-10, transgenic lines.



그림 70. *ATHG1* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 시험포장에서의 특성분석을 위한 온실에서의 증식

- 온실에서 증식 중에 있는 10계통 중, 선발 유전자인 *bar* 유전자 및 목적 유전자인 *ATHG1* 유전자에 대한 Southern blot 분석을 통하여 single copy로 확인된 1번, 2번, 4번, 10번 계통을 대상으로 노화지연 관련 표현형 분석을 수행하였다. *ATHG1* 형질전환 들잔디의 노화지연 특성을 확인하기 위해 잎 절편을 수확 후 식물의 노화를 촉진시키는 요인으로 잘 알려진 염, 과산화수소, 메틸자스모네이트(MeJA, Methyl jasmonate), 구리 중금속 등의 처리에 따른 특성을 분석하였다. 형질전환 들잔디의 잎 절편을 증류수, 300mM NaCl, 50mM H₂O₂, 250uM CuSO₄, 10uM MeJA 용액에 올려놓고, 장일조건(16h light/8h dark)에서 시간 경과에 따른 잎 형태 및 녹기 변화를 관찰하였다. 처리 10일 후의 잎 절편의 변화를 관찰한 결과, 대부분의 조건 처리에서 형질전환 잔디의 잎 절편은 야생형에 비하여 녹기가 더 유지되는 것이 확인되었다(그림 71).

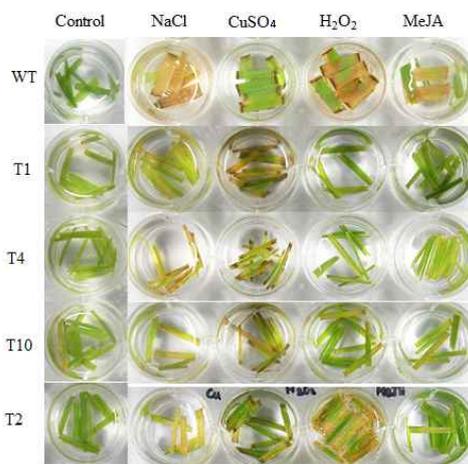


그림 71. *ATHG1* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 스트레스-유도 노화에 대한 표현형 분석. 식물의 잎 절편을 식물 노화를 유도하는 여러 조건(염, 중금속이온, 과산화수소, 메틸자스모네이트)에 처리하고, 10일 후에 잎 형태 및 녹기 정도를 야생형(WT)과 비교 관찰하였음. WT, Wild type; T1, transgenic line 1; T4, transgenic line 4; T10, transgenic line 10; T2, transgenic line 2.

- 이를 분자적 수준에서 분석하고자 chlorophyll content를 측정하였다. 위의 스트레스 조건에서 10일간 처리한 형질전환 잔디의 잎 절편을 액체질소로 동결 마쇄하고, 잎의 무게를 측정한 다음 80% 아세톤에서 하루 정도 색소를 추출하였다. 추출액을 원심분리하여 상층액만 취한 후 664nm와 647nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 추출액의 클로로필 함량은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Chlorophyll a} = (13.71A_{664\text{nm}} - 2.85A_{647\text{nm}}) / \text{gFW}$$

$$\text{Chlorophyll b} = (22.39A_{647\text{nm}} - 5.42A_{664\text{nm}}) / \text{gFW}$$

$$\text{Total chlorophyll} = (19.54A_{647\text{nm}} + 8.29A_{664\text{nm}}) / \text{gFW}$$

(A, absorbance; 클로로필 함량 단위는 $\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 임)

- *ATHG1* 형질전환 들잔디의 경우, 여러 스트레스 조건 중 과산화수소 및 메틸자스모네이트 처리구에서 2번 계통을 제외하고 야생형에 비하여 녹기가 연장되는 것을 관찰할 수 있었고 클로로필 함량도 높은 수준으로 유지되고 있음이 확인되었다(그림 72). 특히, 1번, 10번 계

통이 여러 스트레스 조건 하에서 야생형에 비해 높은 클로로필 함량을 보였다.

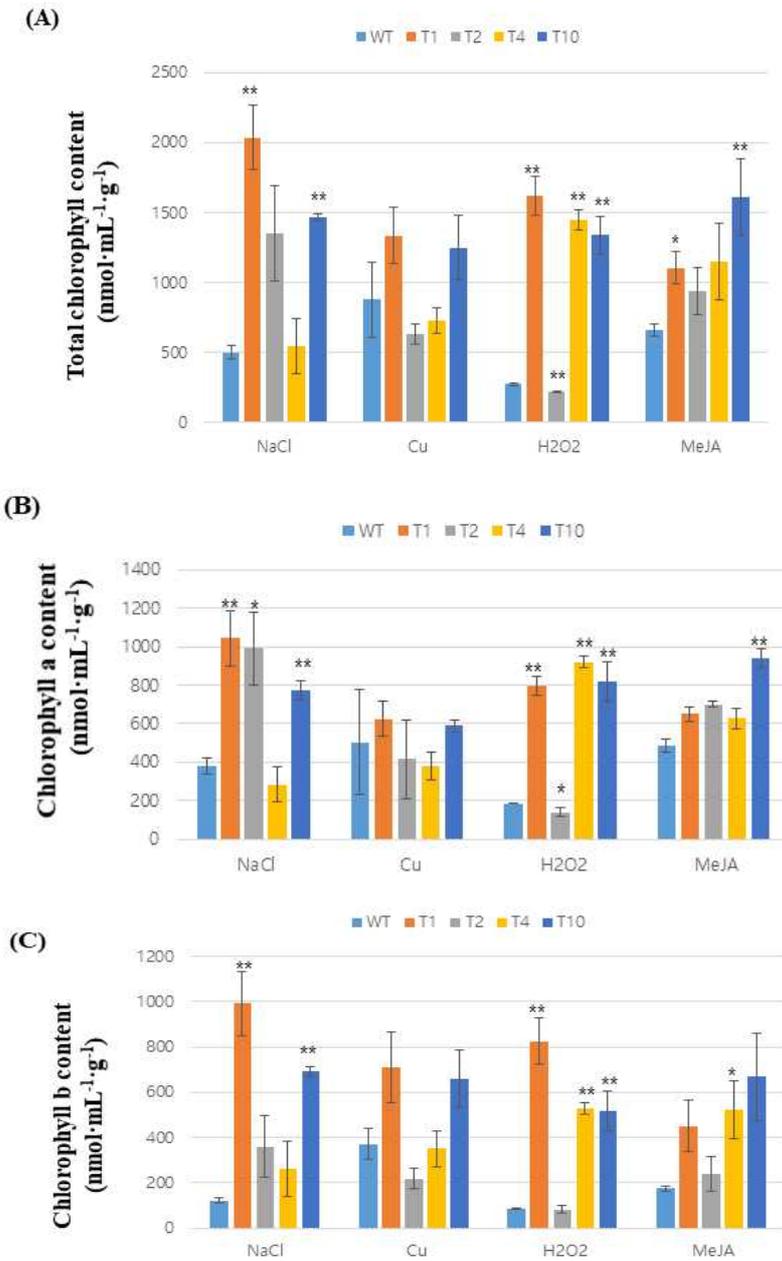


그림 72. *ATHG1* 유전자가 도입된 형질전환 들장디의 노화유도 조건(스트레스-유도 노화)에서의 클로로필 함량 측정. 식물의 잎 절편을 식물 노화를 유도하는 여러 조건(염, 중금속이온, 과산화수소, 메틸자스모네이트)에 처리하고 10일 후에 녹기 정도를 야생형(WT)과 비교하여 분자적 수준에서 분석함. WT, Wild type; T1, transgenic line 1; T4, transgenic line 4; T10, transgenic line 10; T2, transgenic line 2. (A) 잎 절편 1g 당 총 클로로필 함량 (B) 잎 절편 1g 당 클로로필 a 함량. (C) 잎 절편 1g 당 클로로필 b 함량. The *Values* represent the mean \pm SD from three replicates for each treatment. *Asterisks* in *each* column indicate significant differences in the transgenic lines compared to wild-type plants under the same condition as * $P \leq 0.05$ or ** $P \leq 0.01$ (Student's *t* test).

○ 다음으로 노화 촉진 스트레스 처리에 따른 활성산소종 제거 활성을 측정하였다. 스트레스 처리 10일 후의 샘플 0.5mg을 동결 파쇄하여 분말 상태로 시료를 얻은 후, 0.1M potassium phosphate buffer (pH7.5)에 0.2mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA),

1% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP), 1mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)가 첨가된 버퍼 800 μ L와 5분간 균일하게 혼합하였다. 혼합액을 원심분리하여, 상층액을 여과하여 조효소액으로 사용하였다. 추출한 조효소의 단백질 함량은 bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Thermo Scientific pierce, Rockford)의 방법에 따라 분석하였다. 표준 물질 bovine serum albumin(BSA)을 이용하여 검량선을 작성하고 단백질 함량을 산출하였다. 효소 활성 측정은 분광광도계를 이용하여 상온에서 단위 시간내 흡광도의 변화를 측정하는 방법으로 측정하였다. Catalase (CAT)의 활성은 조효소액 20 μ L을 11mM H₂O₂을 포함한 50mM potassium phosphate buffer (pH. 7.0) 600 μ L에 첨가하여 1분간 H₂O₂의 분해를 240nm에서 흡광도 감소로 측정하였다. Peroxidase (POD)의 활성은 pyrogallol을 기질로 활성을 측정하였고, 100mM phosphate buffer (pH7.5), 7.8mM H₂O₂, 15mM pyrogallole에 조효소액을 첨가하여 20초간 H₂O₂의 분해를 470nm에서 흡광도 감소로 측정하였다.

- 대표적인 활성산소종 제거 효소인 peroxidase(POD)의 활성을 측정한 결과, 모든 형질전환 계통에서 야생형에 비해 POD 효소 활성이 유의적으로 높음을 확인하였다(그림 73).
- 이상의 결과를 종합적으로 판단하여 ATHG1-형질전환 잔디 중 우량 형질전환체 후보로 1번 계통을 선발하였다.

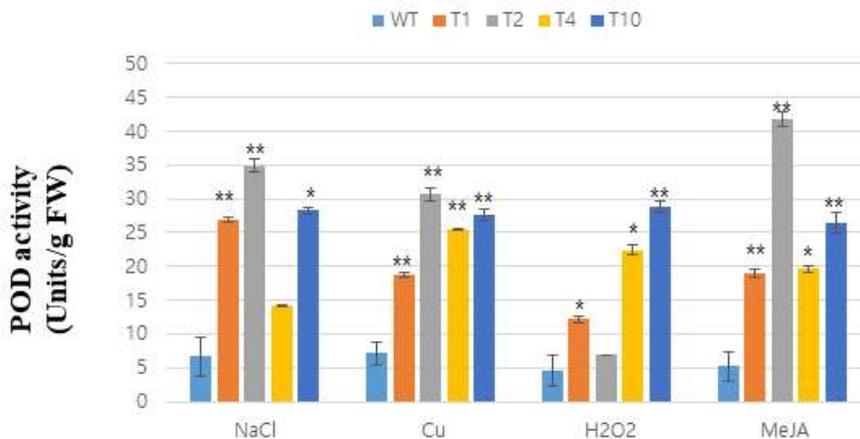


그림 73. *ATHG1* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 스트레스-유도 노화에 대한 활성산소종 제거 효소 활성 측정 (n=3). 식물의 잎 절편을 식물 노화를 유도하는 여러 조건(염, 중금속이온, 과산화수소, 메틸자스모네이트) 처리 후, 10일 후에 녹기 정도를 야생형(WT)과 비교하여 분자적 수준에서 분석함. WT, Wild type; T1, transgenic line 1; T2, transgenic line 2; T4, transgenic line 4; T10, transgenic line 10. (A) 1g 잎 절편에 포함된 총 peroxidase 활성(One unit of peroxidase will form 1.0 milligram of purpurogallin from pyrogallol in 20 seconds at pH 6.0 at 20 °C. This unit is equivalent to ~18 μ M units per minute at 25 °C). The *Values* represent the mean \pm SD from three replicates for each treatment. *Asterisks* in *each column* indicate significant differences in the transgenic lines compared to wild-type plants under the same condition as * $P \leq 0.05$ or ** $P \leq 0.01$ (Student's *t* test).

③ *ATPG3*-형질전환 들잔디

○ *ATPG3* 도입한 형질전환 들잔디의 생산 및 유전자 도입 확인: AT-hook family 유전자인 *ATPG3* 유전자를 들잔디에 도입하여 형질전환 식물을 선발하고 있으며, 현재까지 *ATPG3* 유전자가 도입된 형질전환 식물 22개체를 확보하였다(그림 74). 확보한 형질전환 식물체들은 선발마커 유전자의 단백질 수준에서의 발현을 확인하였으며(그림 74), Genomic-PCR을 통하여 *ATPG3* 유전자의 도입을 확인하였다(그림 75).



그림 74. *ATPG3* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 선발 및 선발마커 유전자 발현 확인(Trait LL Test Strip 분석).

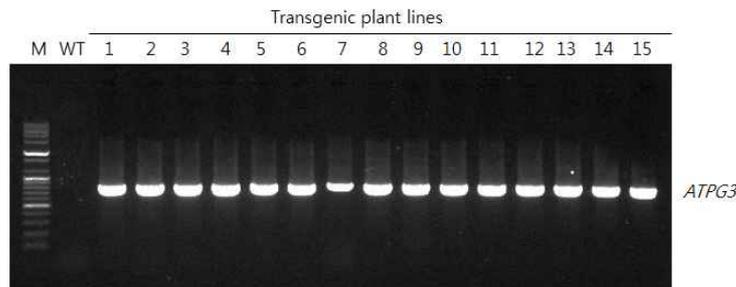


그림 75. *ATPG3* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 유전자 도입 확인. Genomic-PCR analysis for *ATPG3* gene; WT, Wild type; 1-15, transgenic plants

○ 이중 기내에서 충분히 증식한 14계통을 선발하여 순화시킨 후 화분에서 증식하였으며, 이들에 대한 유전자 도입 여부는 목적 유전자 *ATPG3*과 선발마커 유전자 *bar*에 대한 Southern blot 분석을 통하여 확인하였다. 그 결과 형질전환체에 도입된 유전자는 대부분 single copy임을 확인하였다(그림 76). 유전자 도입이 확인된 14개의 형질전환 계통의 유전자 발현 유무를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 야생형과 형질전환 계통의 잎 조직을 취하여 total RNA를 추출하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 주형으로 목적 유전자인 *ATPG3* 유전자와 들잔디 유래의 18s rRNA에 특이적인 primer를 제작하여

RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 형질전환체 14계통 중 13계통에서 유전자의 발현을 확인할 수 있었다(그림 77).

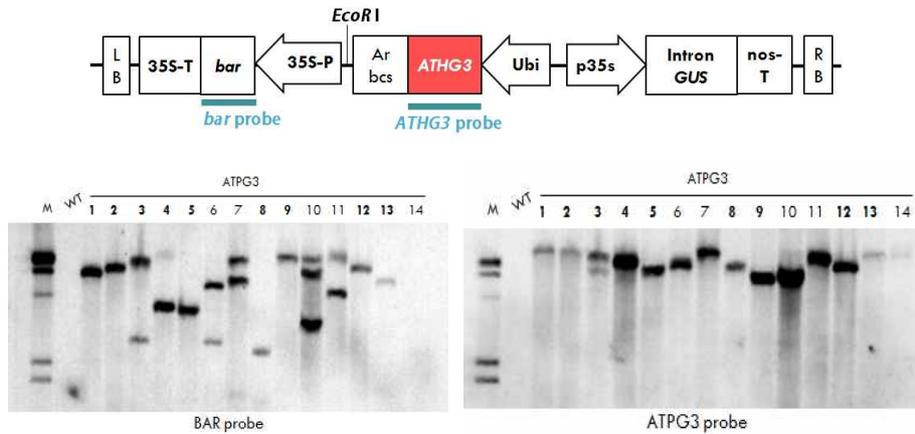


그림 76. *ATHG3* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 Southern blot 분석. M, DIG-labeled DNA molecular weight marker; WT, Wild type; 1-14, transgenic lines

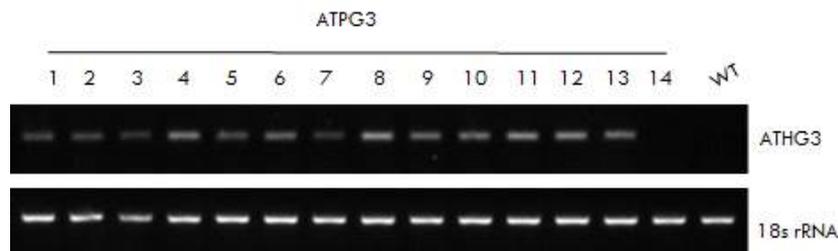


그림 77. *ATHG3* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 RT-PCR을 통한 유전자 발현 검정. WT, Wild type; 1-14, transgenic lines

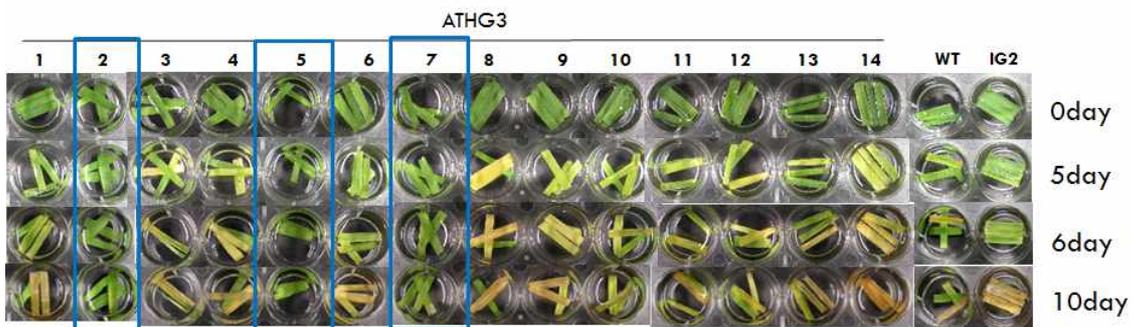


그림 78. *ATHG3* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 1차 표현형 분석. 식물의 잎 절편을 노화를 유도하는 암 처리한 후, 시간 경과에 따른 표현형 변화를 관찰하였음. WT, Wild type; IG2, positive control; 1-14, transgenic lines.

○ *ATHG3* 도입한 형질전환 들잔디의 기능 분석: 유전자의 도입과 발현이 확인된 14계통의 형질전환 잔디를 대상으로 노화를 유도하는 조건에서 어떤 특성을 보이는지 확인하기 위하여 식물의 잎 절편을 암조건 또는 과산화수소 조건에 처리하고 그 변화를 분석하였다. 야생형

과 형질전환체의 잎 절편을 암조건에 처리 한 후 시간 경과에 따른 잎의 녹기 변화를 관찰한 결과, 처리 후 10일째에 형질전환 식물 중 2번, 5번과 7번 계통이 야생형과 IG-2 공벡터가 도입된 식물에 비해 녹기를 더 유지하고 있음을 확인하였다(그림 78). 과산화수소를 혼합한 용액에 야생형 및 형질전환 식물의 잎 절편을 처리 한 후 잎의 녹기 변화를 관찰한 결과, 14일째에 형질전환 식물 중 4번, 10번 계통에서 야생형과 IG-2 공벡터가 도입된 식물에 비해 녹기를 유지하는 것을 확인하였다(그림 79). 시험포장에서의 녹기 연장 특성을 분석하기 위해 이들 형질전환체를 온실에서 순화하여 증식하였다.



그림 79. *ATPG3* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 1차 표현형 분석. 식물의 잎 절편을 노화 및 산화스트레스를 유도하는 과산화수소에 처리 한 후 14일이 된 잎 절편의 표현형 변화를 관찰하였음. WT, Wild type; PC, positive control; 1-14, transgenic lines.

○ 온실에서 증식하고 있는 14계통 중에 선발 유전자인 *bar* 유전자와 목적 유전자인 *ATPG3* 유전자에 대한 Southern blot 분석 결과에서 single copy인 것으로 확인된 계통 중 1번, 2번, 4번, 8번, 9번, 12번 계통을 대상으로 노화지연 관련 표현형 분석을 수행하였다. *ATHG3* 형질전환 들잔디의 노화지연 특성을 확인하기 위해 수확 후 식물의 노화를 촉진시키는 요인으로 잘 알려진 염, 과산화수소, 메틸자스모네이트(MeJA, Methyl jasmonate), 구리 처리 조건에서의 특성을 분석하였다. 형질전환 들잔디의 잎 절편을 증류수, 300mM NaCl, 50mM H₂O₂, 250μM CuSO₄, 10μM MeJA 용액에 올려놓은 후, 플레이트를 장일 조건(16h light/8h dark)에 방치하고 시간 경과에 따른 잎 형태 및 녹기 변화를 관찰하였다. 그 결과, 처리 후 10일째 대부분의 처리 조건에서 형질전환 계통이 야생형에 비하여 녹기가 연장되는 특성을 보유하고 있음이 확인되었다(그림 80).

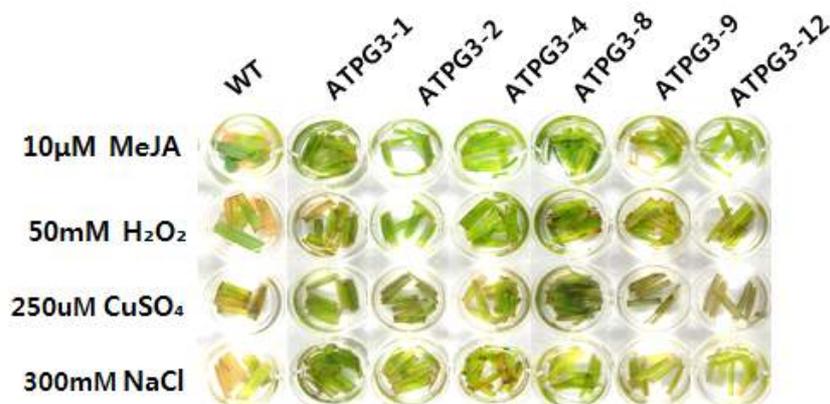


그림 80. *ATPG3* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 스트레스-유도 노화에 대한 표현형 분석. 식물의 잎 절편을 식물 노화를 유도하는 여러 조건(염, 중금속이온, 과산화수소, 메틸자스모네이트)에 처리하고, 처리 10일 후에 잎 형태

및 녹기 정도를 야생형(WT)과 비교 관찰하였음. WT, Wild type; ATPG3-1, *ATPG3*-expression transgenic line 1; ATPG3-2, *ATPG3*-expression transgenic line 2; ATPG3-4, *ATPG3*-expression transgenic line 4; ATPG3-8, *ATPG3*-expression transgenic line 8; ATPG3-9, *ATPG3*-overexpression transgenic line 9; ATPG3-12, *ATPG3*-expression transgenic line 12.

○ 다음으로 스트레스-유도 노화에 대한 형질전환식물의 광합성 효율 분석을 수행하였다(그림 81). 형질전환 계통의 잎 절편에 각종 노화 유도 스트레스 처리를 한 다음, 10일 후에 각 처리구들의 광합성 효율을 측정하였다. 메틸자스몬산을 처리한 야생형 들잔디와 형질전환 계통에서는 광합성 효율에 차이가 없었으나, 염 처리구에서는 *ATPG3* 발현 형질전환 계통이 야생형에 비하여 높은 광합성 효율을 보였다. 이는 *ATPG3* 발현 형질전환 잔디가 야생형에 비하여 염 스트레스에 강한 내성을 보임을 시사한다.

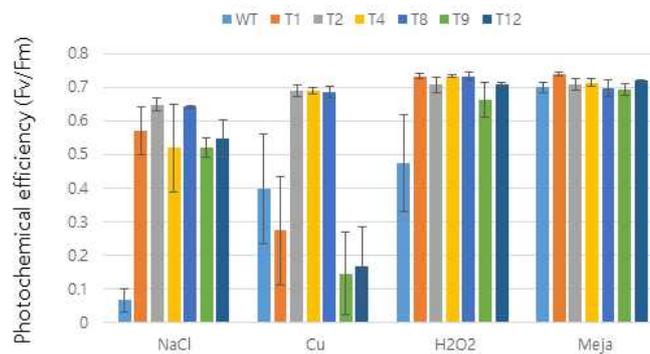
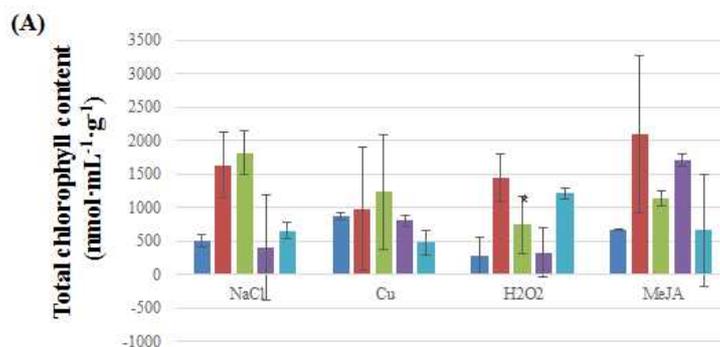


그림 81. *ATPG3* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 스트레스-유도 노화에 대한 광합성 효율(n=5). 식물의 잎 절편을 식물 노화를 유도하는 여러 조건(염, 중금속이온, 과산화수소, 메틸자스모네이트) 처리 후, 10일 후에 녹기 정도를 야생형(WT)과 비교하여 분자적 수준에서 분석함. WT, Wild type; T1, transgenic line 1; T2, transgenic line 2; T4, transgenic line 4; T8, transgenic line 8; T9, transgenic line 9; T12, transgenic line 12. The values represent the mean \pm SD from three replicates for each treatment.

○ 모든 스트레스 처리 조건에서 광합성 효율이 높았던 1번, 2번, 4번, 8번 계통의 잎 절편을 이용하여 Chlorophyll 함량을 분석하였다. 그 결과, *ATPG3* 형질전환 들잔디의 경우, 여러 스트레스 조건에서 대부분 야생형에 비하여 클로로필 함량이 높음을 확인할 수 있었다(그림 82). 특히, 1번과 2번 계통에서 야생형에 대비하여 클로로필 함량이 높은 수준으로 유지됨을 확인할 수 있었다.



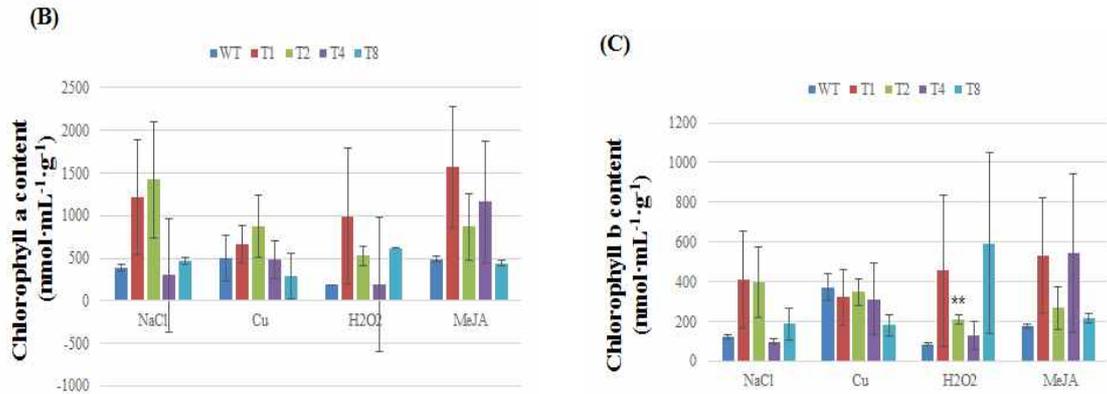


그림 82. *ATPG3* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 스트레스-유도 노화에 대한 클로로필 함량 측정(n=3). 식물의 잎 절편을 식물 노화를 유도하는 여러 조건(염, 중금속이온, 과산화수소, 메틸자스모네이트)에 처리하고, 처리 10일 후에 녹기 정도를 야생형(WT)과 비교하여 분자적 수준에서 분석함. WT, Wild type; T1, transgenic line 1; T2, transgenic line 2; T4, transgenic line 4; T8, transgenic line 8. (A) 잎 절편 1g 당 총 클로로필 함량 (B) 잎 절편 1g 당 클로로필 a 함량. (C) 잎 절편 1g 당 클로로필 b 함량. The *Values* represent the mean \pm SD from three replicates for each treatment. *Asterisks* in *each column* indicate significant differences in the transgenic lines compared to wild-type plants under the same condition as * $P \leq 0.05$ or ** $P \leq 0.01$ (Student's *t* test).

- 다음으로 노화 촉진 스트레스 처리에 따른 활성산소종 제거 활성을 측정하였다. 스트레스 처리 10일 후의 샘플 0.5mg을 동결 파쇄하여 분말 상태로 시료를 얻은 후, 0.1M potassium phosphate buffer (pH7.5)에 0.2mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP), 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)가 첨가된 버퍼 800 μ L와 5분간 균일하게 혼합하였다. 혼합액을 원심분리하여, 상층액을 여과하여 조효소액으로 사용하였다. 추출한 조효소의 단백질 함량은 bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Thermo Scientific pierce, Rockford)의 방법에 따라 분석하였다. 표준 물질 bovine serum albumin(BSA)을 이용하여 검량선을 작성하고 단백질 함량을 산출하였다. 효소 활성 측정은 분광광도계를 이용하여 상온에서 단위 시간내 흡광도의 변화를 측정하는 방법으로 측정하였다. Catalase (CAT)의 활성은 조효소액 20 μ L을 11mM H₂O₂을 포함한 50mM potassium phosphate buffer (pH. 7.0) 600 μ L에 첨가하여 1분간 H₂O₂의 분해를 240nm에서 흡광도 감소로 측정하였다. Peroxidase (POD)의 활성은 pyrogallol을 기질로 활성을 측정하였고, 100mM phosphate buffer (pH7.5), 7.8mM H₂O₂, 15mM pyrogallole에 조효소액을 첨가하여 20초간 H₂O₂의 분해를 470nm에서 흡광도 감소로 측정하였다.
- 대표적인 활성산소종 제거 효소인 catalase(CAT)와 peroxidase(POD) 두 개의 효소에 대한 활성을 확인하였다. 1번, 2번, 4번, 8번 계통의 형질전환식물은 야생형에 비하여 모든 효소 활성이 유의적으로 높음을 확인하였다(그림 83). 클로로필 함량이 야생형에 비하여 높았던 1번, 2번, 8번 계통은 모두 활성산소종 제거 효소의 활성이 높음을 확인하였고, 이들 결과를 통해 *ATPG3* 발현 형질전환 식물 1번과 2번 계통은 노화 지연 형질이 강할 것으로 예상되었다.
- *ATPG3*-형질전환 식물의 분석 결과를 종합하면, 2번 계통이 노화 지연 형질이 가장 강할 것으로 판단되어 이 계통을 우량 형질전환체 후보로 선발하였다.

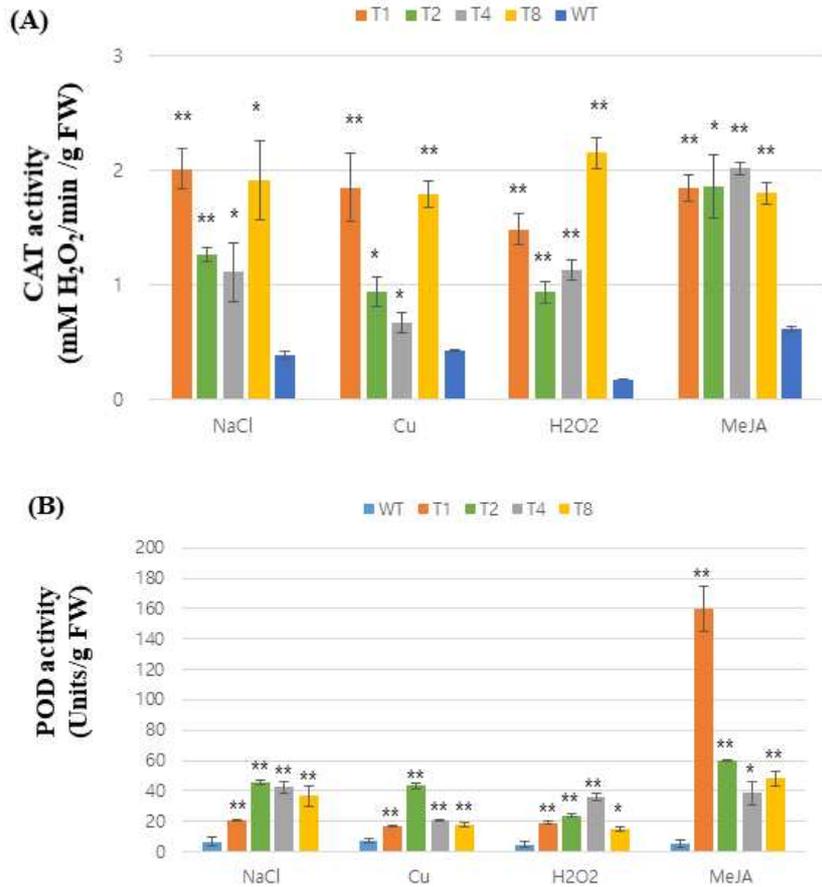


그림 83. *ATPG3* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 스트레스-유도 노화에 대한 활성산소종 제거 효소 활성 측정 (n=3). 식물의 잎 절편을 식물 노화를 유도하는 여러 조건(염, 중금속이온, 과산화수소, 메틸자스모네이트) 처리 후, 10일 후에 활성산소종 제거 효소의 활성을 측정함. WT, Wild type; T1, transgenic line 1; T2, transgenic line 2; T4, transgenic line 4; T8, transgenic line 8. (A) 1g의 잎 절편에 포함된 catalase의 활성(분당 1mM의 과산화수소의 변화를 측정) (B) 1g의 잎 절편에 포함된 peroxidase의 활성. One unit of peroxidase will form 1.0 milligram of purpurogallin from pyrogallol in 20 seconds at pH 6.0 at 20 °C. This unit is equivalent to ~18 μM units per minute at 25 °C. The *Values* represent the mean ± SD from three replicates for each treatment. *Asterisks* in *each column* indicate significant differences in the transgenic lines compared to wild-type plants under the same condition as * $P \leq 0.05$ or ** $P \leq 0.01$ (Student's *t* test).

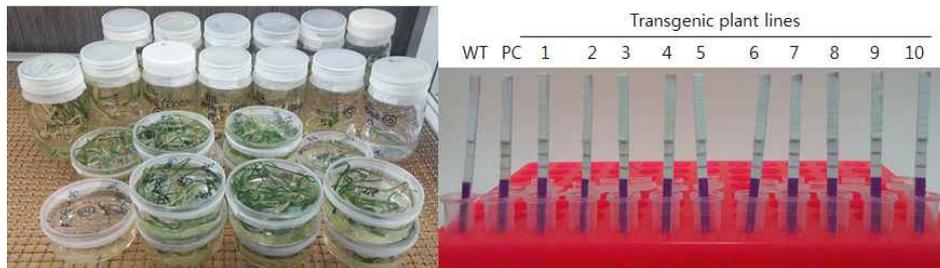


그림 84. *ATPG4* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 선발 및 선발마커 유전자의 발현 확인. 좌, 형질전환체의 선발; 우, Trait LL Test Strip 분석

© **ATPG4**-형질전환 들잔디

○ **ATPG4** 도입한 형질전환 들잔디의 생산 및 유전자 도입 확인: *ATPG3*과 같이 AT-hook family 유전자의 하나인 *ATPG4* 유전자를 들잔디에 도입하여 형질전환 식물을 제조하였다. *ATPG4* 유전자를 들잔디에 도입하여 형질전환 후보를 선발하였으며, 현재까지 총 22개체의 형질전환 후보체를 확보하였다(그림 84). 확보한 형질전환 식물체들은 선발마커 유전자의 단백질 수준에서의 발현을 확인하였으며(그림 84), Genomic-PCR 분석을 통하여 *ATPG4* 유전자가 도입되었음을 확인하였다(그림 85).

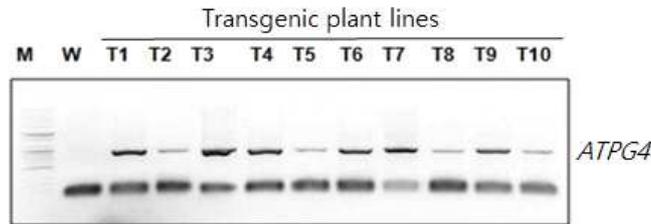


그림 85. *ATPG4* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 유전자 도입 확인. Genomic-PCR analysis for *ATPG4* gene; WT, Wild type; T1-T10, transgenic plants

○ 이들 중 12계통에 대해서 순화 후 온실에서 증식 중에 있으며, 이들 형질전환체들의 도입 유전자의 도입 유무 및 T-DNA 복제수의 확인을 위하여 Southern blot 분석을 수행하였다. *EcoRI*으로 절단된 10ug의 genomic DNA를 선발마커 유전자인 *bar* 유전자와 목적 유전자인 *ATPG4* 유전자에 특이적으로 결합하는 probe로 hybridization하여 Southern blot 분석을 수행한 결과, 야생형에서는 band가 검출되지 않았으나 형질전환체 계통들에서는 1개 이상의 band가 검출되었다(그림 86). 유전자의 도입이 확인된 독립된 형질전환체들의 *ATPG4* 유전자 발현 여부를 조사하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 야생형을 제외하고 모든 형질전환체에서 목적 유전자가 발현됨을 확인하였다(그림 87).

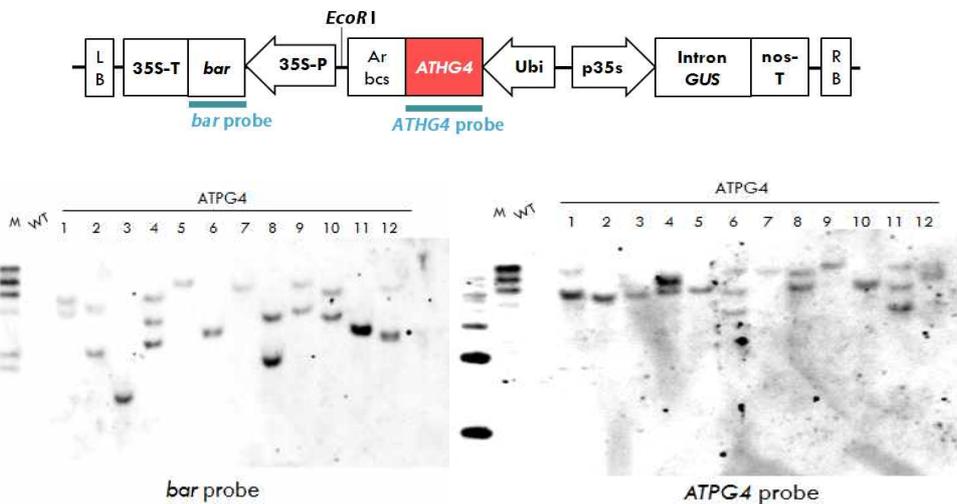


그림 86. *ATPG4* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 Southern blot 분석. M, DIG-labeled DNA molecular weight marker; WT, Wild type; 1-12, transgenic lines

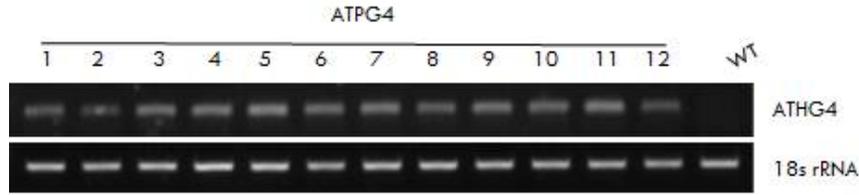


그림 87. *ATPG4* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 RT-PCR을 통한 유전자 발현 검정. WT, Wild type; 1-12, transgenic lines

○ *ATPG4* 도입한 형질전환 들잔디의 기능 분석: *ATPG4* 유전자의 도입 및 발현을 확인한 12 계통의 형질전환 잔디를 대상으로 노화 지연 특성을 분석하기 위하여 야생형과 형질전환체의 잎 절편에 식물의 노화를 촉진시키는 환경 자극의 하나로 알려진 암 조건과 또 다른 환경 자극인 과산화수소를 처리하여 표현형의 변화를 분석하였다. 야생형, 대조구인 IG-2 공벡터가 도입된 식물과 형질전환체의 잎 절편을 암조건에 처리한 후 시간 경과에 따른 잎의 표현형의 변화를 관찰 한 결과, 야생형과 대조구에 비하여 형질전환체들의 녹기가 시간이 경과하여도 유지됨을 확인하였고 그 중 1번, 4번, 5번, 6번, 7번, 11번, 12번 계통의 형질전환체는 처리 시간의 경과에도 녹기의 변화가 거의 없었다(그림 88). 과산화수소 처리 후 14일째에도, *ATPG4*-형질전환체 잎 절편은 야생형과 대조구에 비하여 현저하게 녹기가 유지됨을 확인하였다(그림 89). 이들 형질전환체들은 시험 포장에서의 녹기 연장 특성을 분석하기 위하여 온실에서 순화하여 증식하였다.

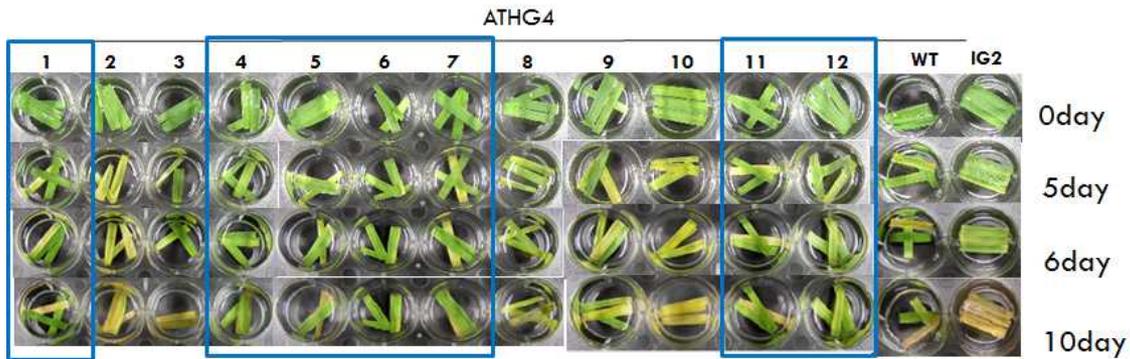


그림 88. *ATPG4* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 1차 표현형 분석. 식물의 잎 절편을 노화를 유도하는 암 처리한 후, 시간 경과에 따른 표현형 변화를 관찰하였음. WT, Wild type; IG2, positive control; 1-12, transgenic lines.

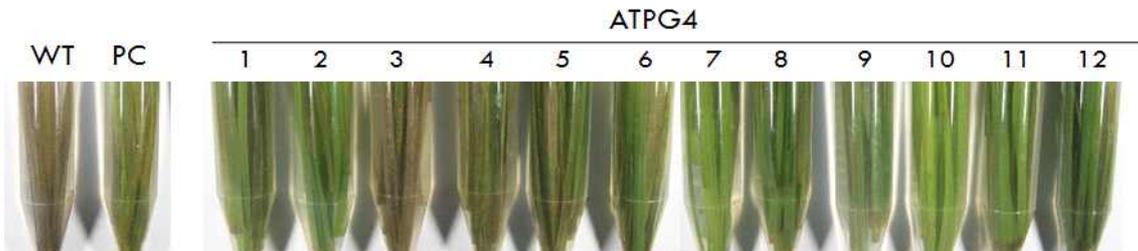


그림 89. *ATPG4* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 1차 표현형 분석. 식물의 잎 절편을 노화 및 산화스트레스를 유도하는 과산화수소에 처리 한 후 14일이 된 잎 절편의 표현형 변화를 관찰하였음. WT, Wild type; PC, positive control; 1-12, transgenic lines.

○ 온실에서 증식 중에 있는 12계통 중에 Southern blot 분석을 통하여 single copy로 확인된 계통 중 3번, 5번, 7번 계통을 대상으로 노화지연 관련 표현형 분석을 수행하였다. *ATPGA* 형질전환 들잔디의 노화지연 특성을 확인하기 위해 수확 후 식물의 노화를 촉진시키는 원인으로 잘 알려진 염, 과산화수소, 메틸자스모네이트(MeJA, Methyl jasmonate), 구리 중금속(Cu^{++}) 처리에 따른 특성을 분석하였다. 형질전환 들잔디의 잎 절편을 증류수, 300mM NaCl, 50mM H_2O_2 , 250 μM CuSO_4 , 10 μM MeJA 용액에 올려놓고 플레이트를 장일 조건 (16h light/8h dark)에 방치한 다음 시간 경과에 따른 잎 형태 및 녹기 변화를 관찰하였다 (그림 90). 그 결과 대부분의 처리 조건에서 형질전환 계통이 야생형에 비해 녹기가 연장되는 특성이 관찰되었다.

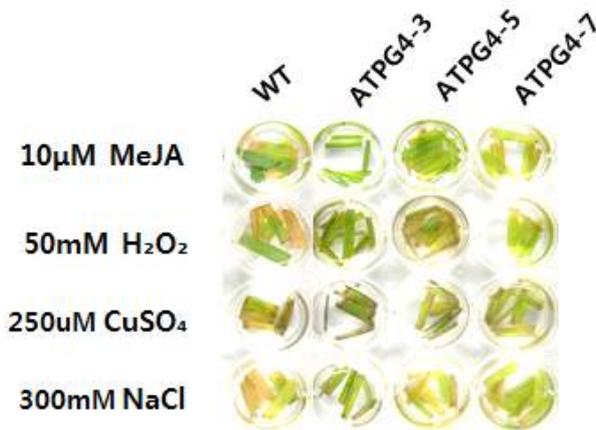


그림 90. *ATPGA* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 스트레스 유도 노화에 대한 표현형 분석. 식물의 잎 절편을 식물 노화를 유도하는 여러 조건(염, 중금속이온, 과산화수소, 메틸자스모네이트) 처리 후, 10일 후에 잎 형태 및 녹기 정도를 야생형(WT)과 비교 관찰하였음. WT, Wild type; T3, transgenic line 3; T5, transgenic line 5; T7, transgenic line 7.

○ 다음은 스트레스-유도 노화에 대한 형질전환 계통의 광합성 효율을 분석하였다(그림 91). 여러 스트레스 처리를 하고 10일 후에 각 처리구들의 광합성 효율을 측정하였다. 메틸자스몬산을 처리한 야생형 들잔디와 형질전환 계통은 광합성 효율에 차이가 없는 반면, 염 처리구에서는 *ATPGA* 발현 형질전환 들잔디가 야생형에 비하여 높은 광합성 효율을 갖고 있음이 확인되었다.

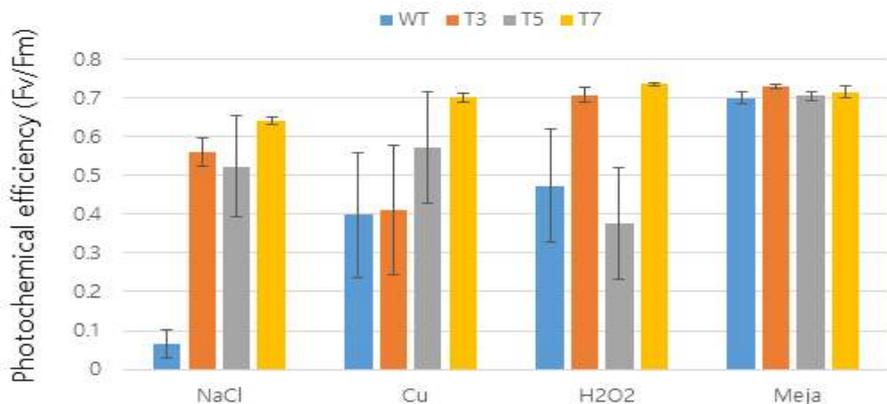
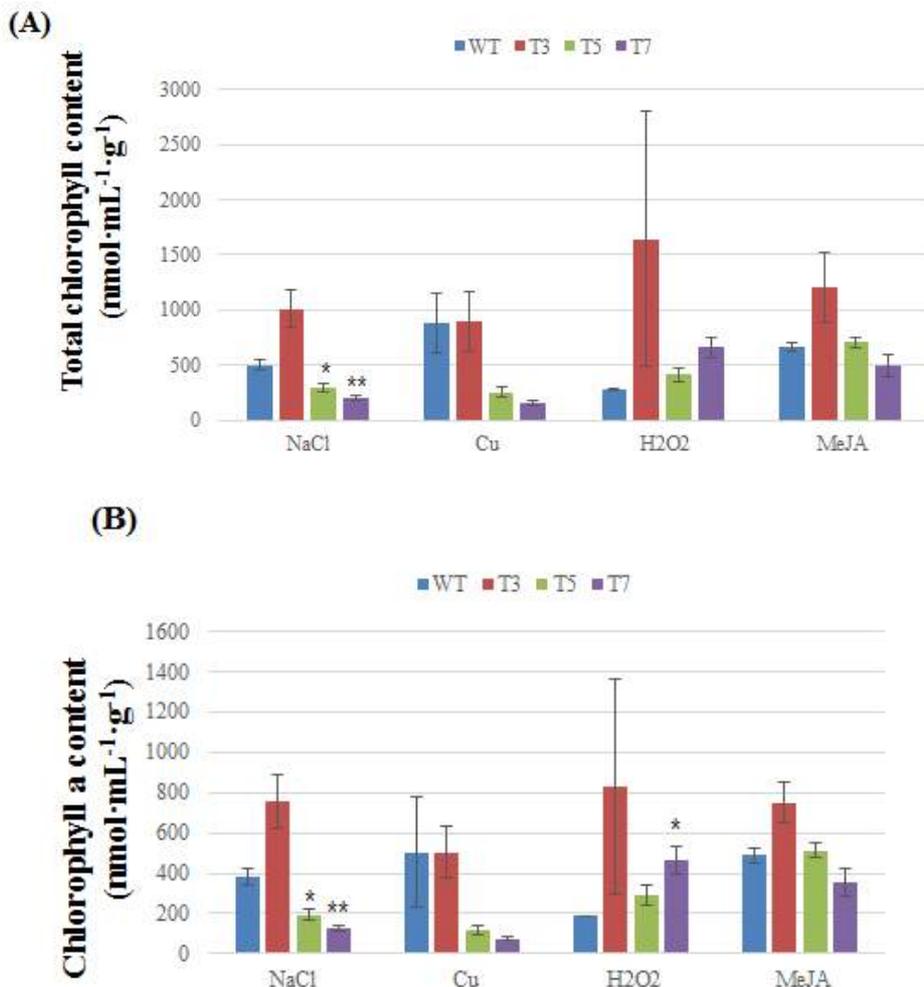


그림 91. *ATPG4* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 스트레스-유도 노화에 대한 광합성 효율(n=5). 식물의 잎 절편을 식물 노화를 유도하는 여러 조건(염, 중금속이온, 과산화수소, 메틸자스모네이트) 처리 후, 10일 후에 녹기 정도를 야생형(WT)과 비교하여 분자적 수준에서 분석함. WT, Wild type; T3, transgenic line 3; T5, transgenic line 5; T7, transgenic line 7. The *Values* represent the mean \pm SD from three replicates for each treatment.

- 다음은 스트레스 처리한 잔디 절편의 클로로필 함량을 비교 분석하였다. 각 조건에서 처리한 잔디의 잎 절편을 액체질소로 동결 마쇄한 후, 잎의 무게를 측정하고 80% 아세톤에 하루 정도 색소를 추출한 후, 원심분리하여 상층액만 취한 후 흡광도 664nm와 647nm에서 흡광도를 측정하여 클로로필 함량을 계산하였다. 그 결과, 3번 계통이 가장 높은 클로로필 함량을 나타내었다(그림 92).
- 이상의 분석을 통하여 *ATPG4* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디는 스트레스 조건하에서 노화가 지연되는 특성을 가짐을 알 수 있었고, 특히 3번 계통이 각종 스트레스 조건 하에서 야생형에 비하여 녹기가 길게 유지됨을 확인하였다. 이들 결과를 바탕으로 *ATPG4*-형질전환 잔디 중 3번 계통을 우량 형질전환체 후보로 선발하였다.



(C)

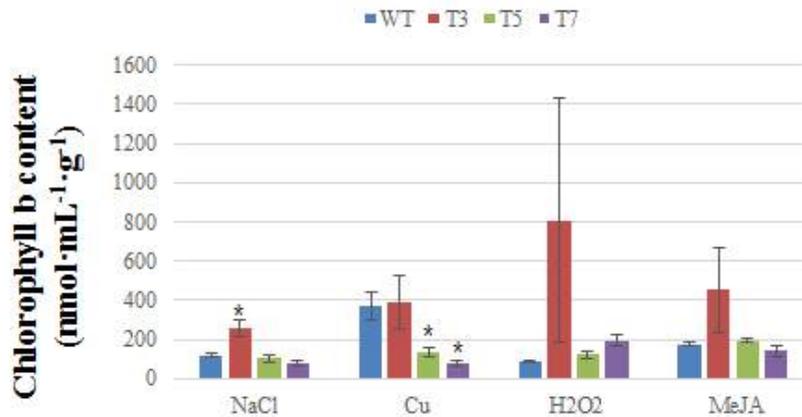


그림 92. *ATPG4* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 스트레스 유도 노화에 대한 클로로필 함량 측정. 식물의 잎 절편을 식물 노화를 유도하는 여러 조건(염, 중금속이온, 과산화수소, 메틸자스모네이트) 처리 후, 10일 후에 녹기 정도를 야생형(WT)과 비교하여 분자적 수준에서 분석함. WT, Wild type; T3, transgenic line 3; T5, transgenic line 5; T7, transgenic line 7. (A) 잎 절편 1g 당 총 클로로필 함량 (B) 잎 절편 1g 당 클로로필 a 함량. (C) 잎 절편 1g 당 클로로필 b 함량. The *Values* represent the mean \pm SD from three replicates for each treatment. Asterisks in each column indicate significant differences in the transgenic lines compared to wild-type plants under the same condition as * $P \leq 0.05$ or ** $P \leq 0.01$ (Student's *t* test).

㉔ *ATPG7*-형질전환 들잔디

○ *ATPG7* 도입한 형질전환 들잔디의 생산 및 유전자 도입 확인: 녹기 연장의 특성을 가진 들잔디의 개발을 목적으로 식물의 녹기 연장 기능과 관련이 있을 것으로 기대되는 *ATPG7* 유전자를 들잔디에 도입하여 형질전환 식물을 제조하였다. 최종적으로 총 19개체의 *ATPG7*-형질전환 들잔디를 확보하였다(그림 93). 형질전환체들은 Trait LL Test Strip 분석을 통하여 선발마커 유전자인 *bar* 유전자의 발현산물인 PAT 단백질의 발현을 확인하였으며(그림 93), genomic-PCR 분석을 통해 *ATPG7* 유전자의 도입을 확인하였다(그림 94). Genomic-PCR 분석에서 유전자의 도입이 확인된 일부 형질전환체를 이용하여 Southern blot 분석을 수행한 결과, 대부분이 single copy 유전자가 도입된 개체들임을 확인할 수 있었다(그림 95). Southern blot을 통하여 유전자의 도입 및 copy 수가 확인된 형질전환체 중 증식이 잘되는 12개통의 형질전환체에 대하여 도입 유전자의 발현을 분석하였다(그림 96). 그 결과 12번 개체를 제외한 모든 개체에서 목적유전자의 발현이 확인되었다.



그림 93. *ATPG7* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 선발 및 선발마커 유전자의 발현 확인. 좌, 형질전환체의 선발; 우, Trait LL Test Strip 분석

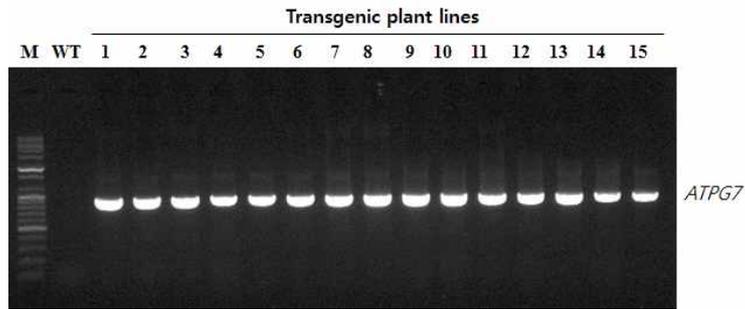


그림 94. *ATPG7* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 유전자 도입 확인. Genomic-PCR analysis for *ATPG7* gene; WT, Wild type; 1-15, transgenic plants

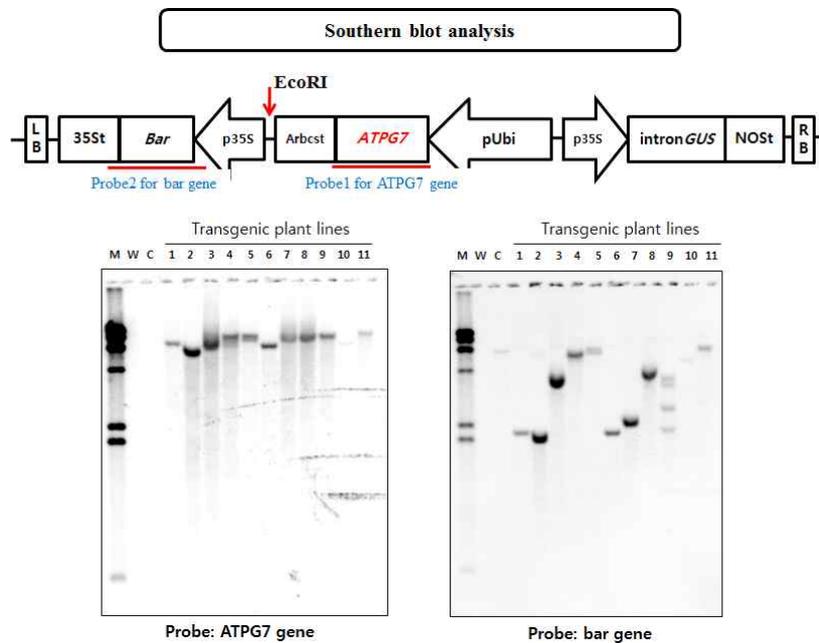


그림 95. *ATPG7* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 Southern blot 분석. W, Wild type; C, IG-2 vector control plant; 1-11, transgenic plants



그림 96. *ATPG7* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 RT-PCR을 통한 유전자 발현 검정. WT, Wild type; 1-12, transgenic lines

○ *ATPG7* 도입한 형질전환 들잔디의 기능 분석: Genomic-PCR 및 Southern blot 분석을 통하여 목적유전자의 도입이 확인된 12 계통의 형질전환 잔디를 대상으로 노화지연 특성을

분석하였다. 야생형, IG-2 공벡터가 도입된 식물과 형질전환체의 잎 절편에 식물의 노화를 촉진시키는 암조건 또는 산화스트레스 조건(과산화수소 처리)에 처리하고 시간 경과에 따른 잎의 노화 표현형 분석을 수행하였다. 암 조건 하에서 대부분의 형질전환체는 야생형 및 대조구와 크게 다르지 않은 표현형을 나타냈으나, 형질전환체 8번과 11번에서는 10일째에도 녹기를 유지하는 표현형을 관찰 할 수 있었다(그림 97). 과산화수소 처리 조건에서는 처리 14일 후에도 야생형과 대조구에 비하여 대부분의 형질전환체 계통에서 녹기가 유지됨을 확인하였다(그림 98). 시험포장에서의 특성 분석을 수행하기 위해 제조한 형질전환 식물을 온실에서 순화하여 증식하였다(그림 99).

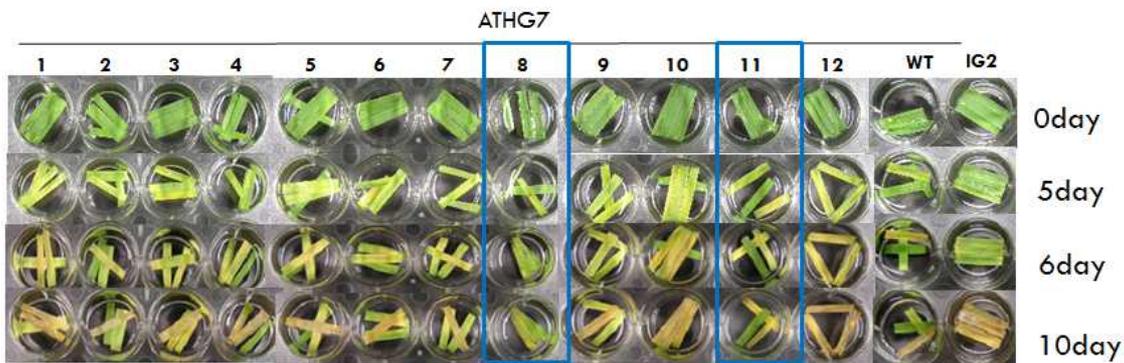


그림 97. *ATPG7* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 1차 표현형 분석. 식물의 잎 절편을 노화를 유도하는 암 처리한 후, 시간 경과에 따른 표현형 변화를 관찰하였음. WT, Wild type; IG2, positive control; 1-12, transgenic lines.



그림 98. *ATPG7* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 1차 표현형 분석. 식물의 잎 절편을 노화 및 산화스트레스를 유도하는 과산화수소에 처리한 후 14일이 된 잎 절편의 표현형 변화를 관찰하였음. WT, Wild type; PC, positive control; 1-12, transgenic lines.



그림 99. *ATPG7* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 특성분석을 위한 온실에서의 증식

○ 온실에서 증식한 12계통 중 1번, 2번, 3번, 4번, 5번, 6번, 7번, 8번 계통을 대상으로 노화지

연 관련 표현형 분석을 수행하였다. *ATHG7* 형질전환 들잔디의 노화지연 특성을 확인하기 위해 수확 후 식물의 노화를 촉진시키는 요인으로 잘 알려진 염, 과산화수소, 메틸자스모네이트(MeJA, Methyl jasmonate), 구리 중금속(Cu^{++})을 처리하고 형질전환식물의 특성을 분석하였다. 형질전환 들잔디의 잎 절편을 증류수, 300mM NaCl, 50mM H_2O_2 , 250uM CuSO_4 , 10uM MeJA 용액에 올려놓고, 플레이트를 장일 조건(16h light/8h dark)에 둔 후, 시간 경과에 따른 잎 형태 및 녹기 변화를 관찰하였다. 그 결과, 처리 후 10일째에 염과 과산화수소 조건 처리에서 야생형에 비하여 형질전환의 잎 절편의 녹기가 더 유지되고 있음이 확인되었고(그림 100) 이를 분자적 수준에서 분석하고자 chlorophyll 함량을 측정하였다(그림 101). 그 결과, 3번 계통이 여러 스트레스 조건 하에서 야생형에 대비하여 녹기 유기가 길게 유지됨이 관찰되었고, 클로로필 분석 결과에서는 모든 스트레스 처리구에서 대부분의 형질전환 계통이 야생형에 대비하여 클로로필 함량이 높은 수준으로 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

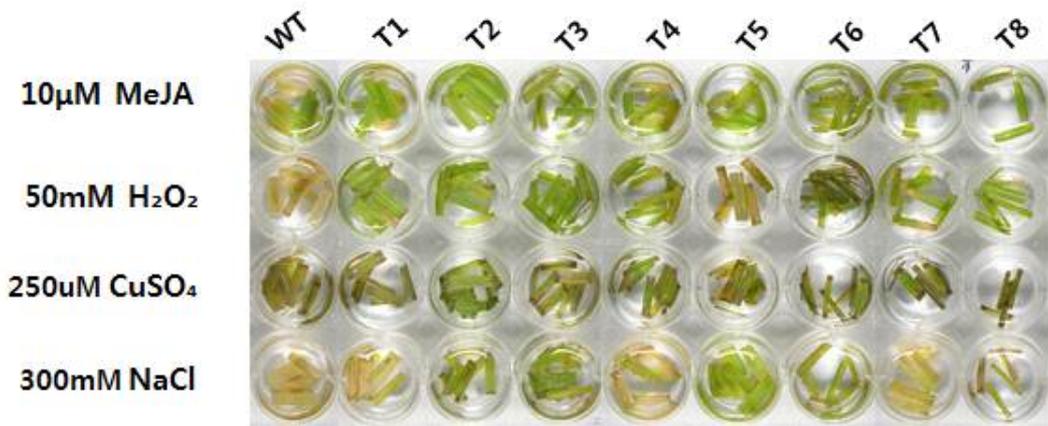
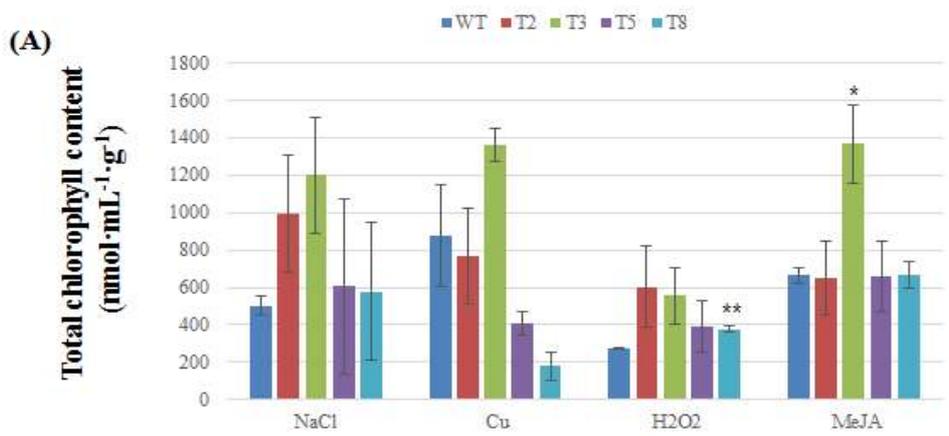


그림 100. *ATHG7* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 표현형 분석. 식물의 잎 절편을 식물 노화를 유도하는 여러 조건(염, 중금속이온, 과산화수소, 메틸자스모네이트) 처리 후, 10일 후에 잎 형태 및 녹기 정도를 야생형(WT)과 비교 관찰하였음. WT, Wild type; T2, Transgenic line 2; T3, Transgenic line 3; T4, Transgenic line 4; T5, ransgenic line 5; T6, Transgenic line 6; T7, Transgenic line 7, T8, Transgenic line 8.



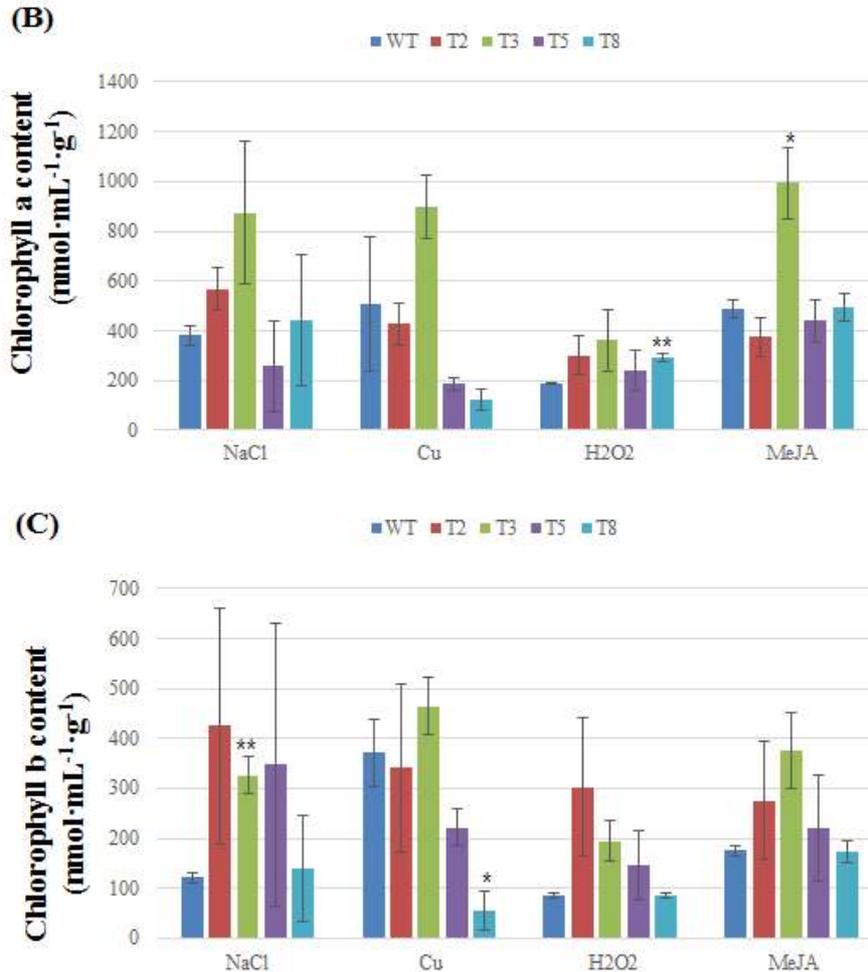


그림 101. *ATPG7* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 클로로필 함량 측정. 식물의 잎 절편을 식물 노화를 유도하는 여러 조건(염, 중금속이온, 과산화수소, 메틸자스모네이트) 처리 후, 10일 후에 녹기 정도를 야생형(WT)과 비교하여 분자적 수준에서 분석함. WT, Wild type; T2, transgenic line 2; T3, transgenic line 3; T5, transgenic line 5; T8, transgenic line 8. (A) 잎 절편 1g 당 총 클로로필 함량 (B) 잎 절편 1g 당 클로로필 a 함량. (C) 잎 절편 1g 당 클로로필 b 함량. The *Values* represent the mean \pm SD from three replicates for each treatment. *Asterisks* in each column indicate significant differences in the transgenic lines compared to wild-type plants under the same condition as * $P \leq 0.05$ or ** $P \leq 0.01$ (Student's *t* test).

- 노화 촉진 스트레스 처리에 따른 클로로필 함량이 높았던 2번, 3번, 5번 계통에 대해서 각각의 스트레스 처리에 따른 활성산소종 제거 활성을 측정하였다. 샘플 0.5mg을 동결 파쇄하여 분말 상태로 시료를 얻은 후, 분광광도계를 이용하여 상온에서 단위 시간내 흡광도의 변화를 측정하는 방법으로 catalase (CAT)와 peroxidase (POD)을 측정하였다. Catalase (CAT)의 활성은 1분간 H₂O₂의 분해를 240nm에서 흡광도 감소로 측정하였고, Peroxidase (POD)의 활성은 pyrogallol을 기질로 20초간 H₂O₂의 분해를 470nm에서 흡광도 감소로 측정하였다.
- 대표적인 활성산소종 제거 효소인 catalase(CAT)와 peroxidase(POD) 두 개의 효소에 대한 활성을 확인한 결과, 대부분의 형질전환식물의 경우, 야생형에 비하여 높은 효소 활성을 갖고 있었다(그림 102). 특히 3번 계통의 경우 클로로필 함량과 항산화효소(CAT, POD) 활성

이 높아 야생형에 비하여 여러 스트레스에 대해 내성을 보이는 것으로 판단되었다. 따라서 ATPG7-형질전환 잔디에서는 3번 계통을 우량 형질전환체 후보로 선발하였다.

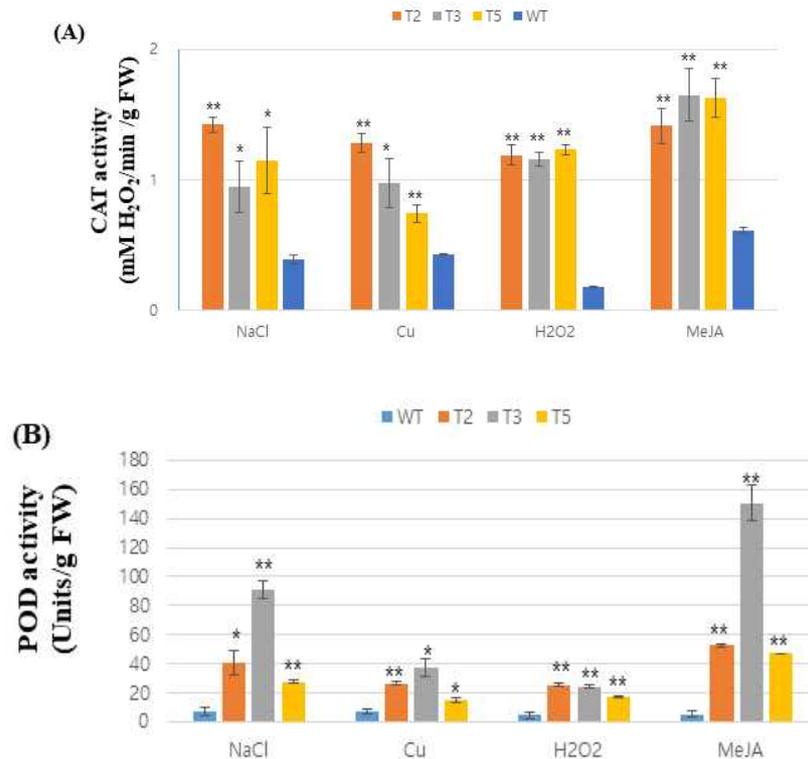


그림 102. *ATPG7* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 스트레스-유도 노화에 대한 활성산소종 제거 효소 활성 측정 (n=3). 식물의 잎 절편을 식물 노화를 유도하는 여러 조건(염, 중금속이온, 과산화수소, 메틸자스모네이트) 처리 후, 10일 후에 활성산소종 제거 효소의 활성을 측정함. WT, Wild type; T2, transgenic line 2; T3, transgenic line 3; T5, transgenic line 5. (A) 1g의 잎 절편에 포함된 catalase의 활성(분당 1mM의 과산화수소의 변화를 측정) (B) 1g의 잎 절편에 포함된 peroxidase의 활성. One unit of peroxidase will form 1.0 milligram of purpurogallin from pyrogallol in 20 seconds at pH 6.0 at 20 °C. This unit is equivalent to ~18 μM units per minute at 25 °C. The Values represent the mean ± SD from three replicates for each treatment. Asterisks in each column indicate significant differences in the transgenic lines compared to wild-type plants under the same condition as * P ≤ 0.05 or **P ≤ 0.01 (Student's t test).

㉔ ATPG8-형질전환 들잔디

○ *ATPG8* 도입한 형질전환 들잔디의 생산 및 유전자 도입 확인: *ATPG7*과 유사한 기능을 가질 것으로 예상되는 *ATPG8* 유전자를 들잔디에 도입하여 형질전환 식물을 제조하였다. 현재까지 총 21개체의 *ATPG8*-형질전환 들잔디를 확보하여 각종 분석을 수행하였다(그림 103). 형질전환체들은 Trait LL Test Strip 분석을 통하여 선발마커 유전자인 *bar* 유전자의 발현산물인 PAT 단백질의 발현을 확인하였으며(그림 103), genomic-PCR 분석을 통해 *ATPG8* 유전자의 도입을 확인하였다(그림 104). Genomic-PCR 분석에서 유전자의 도입이 확인된 일부 형질전환체를 이용하여 Southern blot 분석을 수행한 결과, 대부분이 single copy 유전자가 도입된 개체들임을 확인할 수 있었다(그림 105).

- 형질전환체의 지속적인 선발을 통하여 3계통을 추가로 선발하였고, 이들 3계통을 대상으로 선발마커 유전자의 단백질 수준에서의 발현을 확인하였으며(그림 106), 유전자 발현 분석을 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 3계통 모두에서 목적 유전자가 정상적으로 발현되고 있음을 확인하였다(그림 106). 현재 이들 형질전환체들의 T-DNA copy 수를 확인하기 위하여 Southern blot 분석을 수행하고 있다. 또한, 추가적인 형질전환을 통하여 8개체의 형질전환 후보체들을 확보하였으며(그림 107), 이들 계통에 대한 유전자 도입 및 발현 분석을 진행하고 있다.



그림 103. *ATPG8* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 선발 및 선발마커 유전자의 발현 확인. 좌, 형질전환체의 선발; 우, Trait LL Test Strip 분석

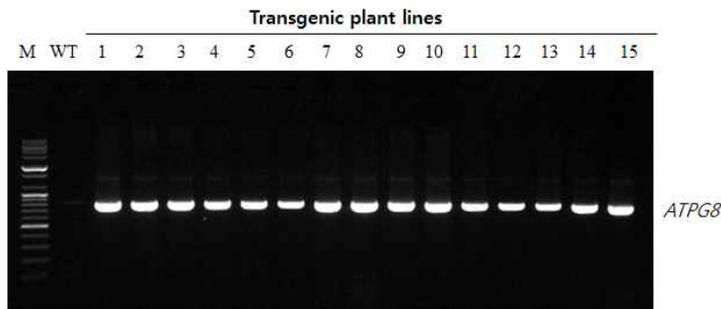


그림 104. *ATPG8* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 유전자 도입 확인. Genomic-PCR analysis for *ATPG8* gene; WT, Wild type; 1-15, transgenic plants

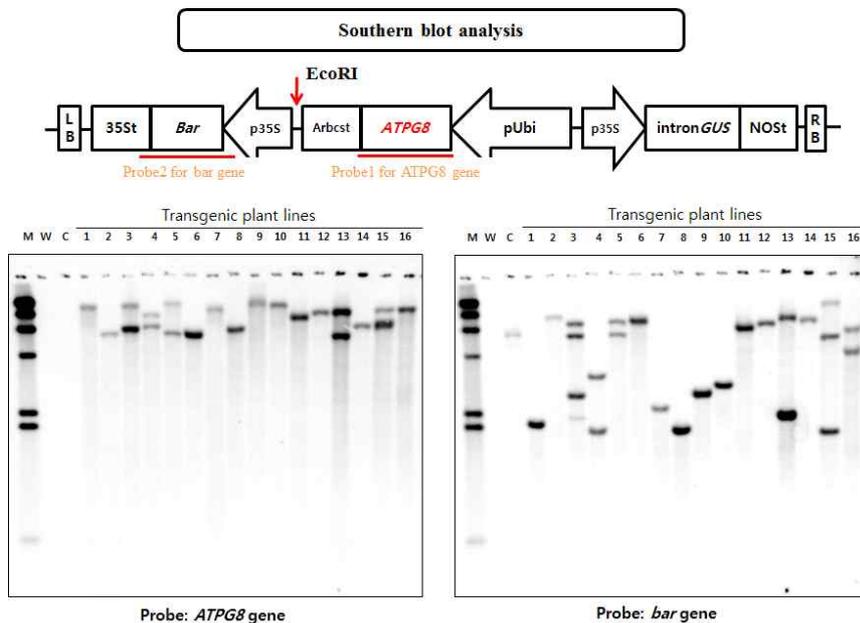


그림 105. *ATPG8* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 Southern blot 분석. W, Wild type; C, IG-2 vector control plant; 1-16, transgenic plants

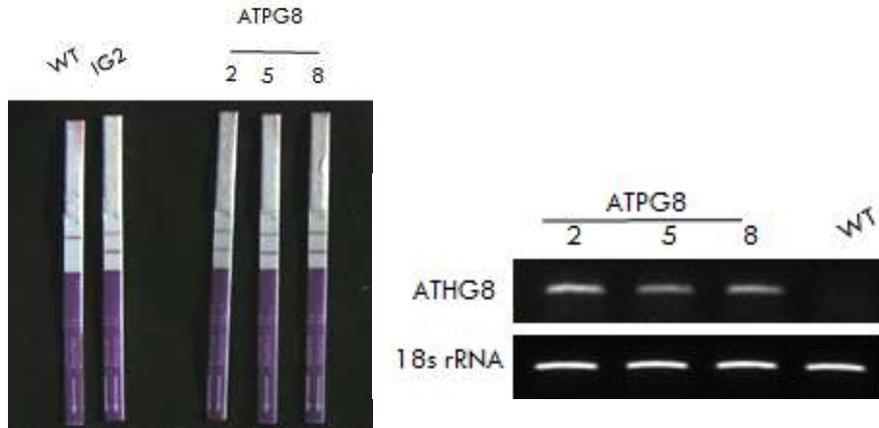


그림 106. *ATPG8* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 선발마커 유전자 발현 확인 (좌, Trait LL Test Strip 분석; 우, RT-PCR 분석). WT, Wild type; 2, transgenic line#2; 5, transgenic line#5; 8, transgenic line#8



그림 107. *ATPG8* 유전자가 도입된 후보 형질전환 들잔디의 선발(Trait LL Test Strip 분석). WT, Wild type; 1-8, transgenic lines

○ *ATPG8* 도입한 형질전환 들잔디의 기능 분석: Genomic-PCR 및 Southern blot 분석을 통하여 목적유전자의 도입이 확인된 일부 *ATPG8*-형질전환 들잔디를 대상으로 노화지연 관련 1차 표현형 분석을 수행하였다. *ATPG8*-형질전환 들잔디의 잎 절편을 암 조건에 처리하고 시간경과에 따른 표현형의 변화를 관찰한 결과, 형질전환 식물 2번, 3번 및 4번 계통은 대조구 및 타 형질전환 식물 계통들에 비해 노화가 지연되는 표현형적 특징을 나타내었다(그림 108). 형질전환 식물은 시험포장에서의 특성 분석을 수행하기 위해 온실에서 순화하여 증식하였다(그림 109). 순화한 형질전환 잔디 계통 중 과산화수소 처리 조건에서는 5번 계통이 처리 14일 후에도 야생형과 대조구에 비하여 강한 녹기를 유지하고 있음을 확인하였다(그림 110).

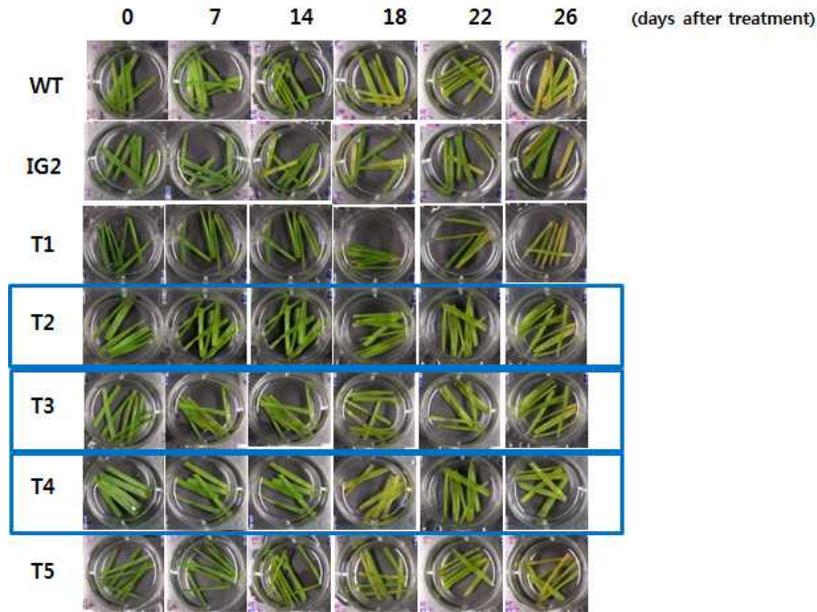


그림 108. *ATPG8* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 1차 표현형 분석. 식물의 잎 절편을 노화를 유도하는 암 조건에 처리 후 그 표현형의 변화를 관찰하였음.



그림 109. *ATPG8* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 특성분석을 위한 온실에서의 증식

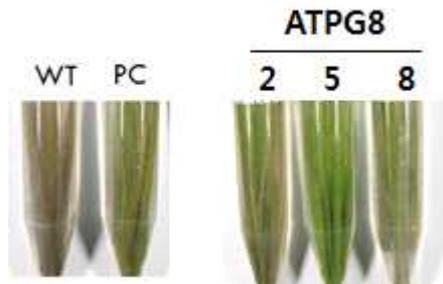


그림 110. *ATPG8* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 1차 표현형 분석. 식물의 잎 절편을 노화 및 산화스트레스를 유도하는 과산화수소에 처리 한 후 14일이 된 잎 절편의 표현형 변화를 관찰하였음. WT, Wild type; PC, positive control; 2, 5, 8, transgenic lines

㉔ ATPG10-형질전환 들잔디

○ *ATPG10* 도입한 형질전환 들잔디의 생산 및 유전자 도입 확인: AT-hook family 유전자의 하나인 *ATPG10* 유전자를 들잔디에 도입하여 형질전환 식물을 제조하였다. *ATPG10* 유전

자를 들잔디에 도입하여 형질전환 후보체를 선발 중에 있으며, 현재까지 총 12개체의 형질 전환 후보체를 확보하였고 계속 선발을 수행하고 있다(그림 111). 확보한 형질전환 식물체 들은 선발마커 유전자의 단백질 수준에서의 발현을 확인하였으며(그림 111), Genomic-PCR 분석을 통하여 *ATPG10* 유전자가 도입되었음을 확인하였다(그림 112). 이 중에서 기내에서 충분히 증식된 일부 형질전환체 6계통을 대상으로 순화시킨 후 온실에서 증식하고 있으며, 이들에 대한 목적 유전자의 발현 분석을 수행하였다. 야생형과 형질전환체의 잎으로부터 total RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행함으로써 도입 유전자가 정상적으로 발현됨을 확인 하였다(그림 113). 현재 이들 형질전환체들의 Southern blot 분석을 수행하고 있으며, 추후 노화 지연 특성분석을 위하여 온실 내에서 증식 중에 있다. 추가 실험을 통하여 선발된 총 7개의 *ATPG10*-형질전환 후보체들 또한 기내에서 배양 중이며(그림 114), 충분히 증식시킨 형질전환체 후보를 대상으로 목적 유전자의 도입 및 발현 분석을 진행하고 있다. 이들 계 통 중 1번과 6번에서는 과산화수소 처리 조건에서 처리 14일 후에도 야생형과 대조구에 비 하여 강한 녹기가 유지됨을 확인하였다(그림 115).

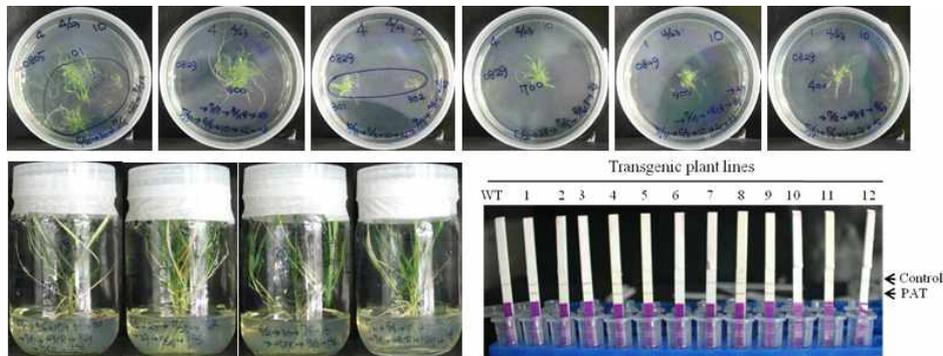


그림 111. *ATPG10* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 선발 및 선발마커 유전자 발현확인(Trait LL Test Strip 분석).

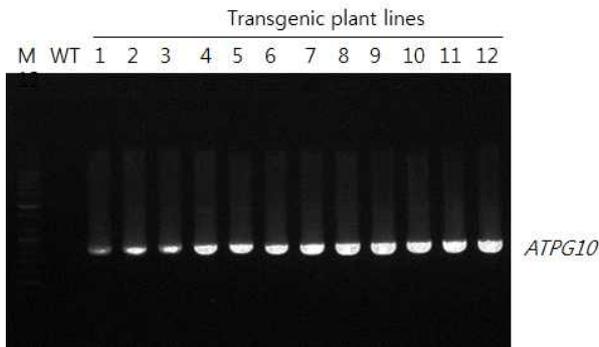


그림 112. *ATPG10* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 유전자 도입 확인. Genomic-PCR analysis for *ATPG10* gene; WT, Wild type; 1-12, transgenic plants

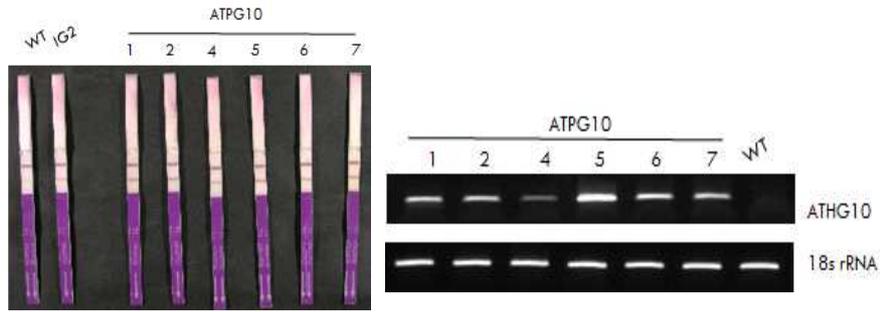


그림 113. *ATPG10* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 선발마커 유전자 발현 확인(좌, Trait LL Test Strip 분석; 우, RT-PCR 분석) WT, Wild type; 1, transgenic line#1; 2, transgenic line#2; 4, transgenic line#4; 5, transgenic line#5; 6, transgenic line#6; 7, transgenic line#7

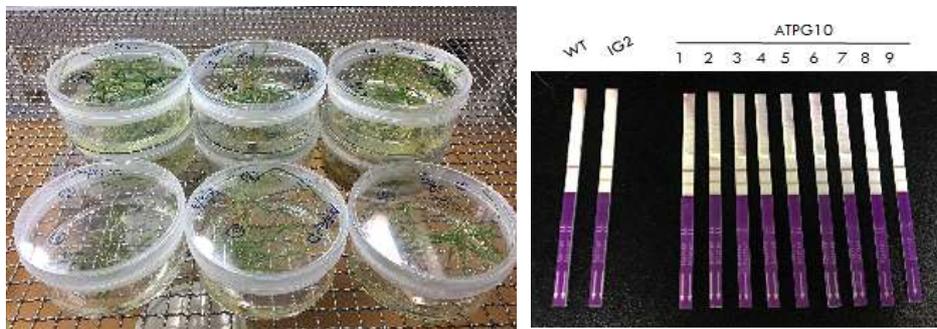


그림 114. *ATPG10* 유전자가 도입된 형질전환 후보 들잔디의 선발(Trait LL Test Strip 분석). WT, Wild type; 1-9, transgenic lines. 현재 이들 형질전환체들의 Southern blot 분석을 수행하고 있음.

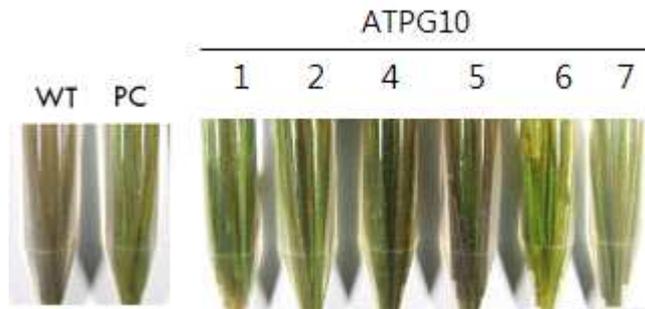


그림 115. *ATPG10* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 1차 표현형 분석. 식물의 잎 절편을 노화 및 산화스트레스를 유도하는 과산화수소에 처리 한 후 14일이 된 잎 절편의 표현형 변화를 관찰하였음. WT, Wild type; PC, positive control; 1-7, transgenic lines.

㉔ MtATPG3-형질전환 들잔디

- *MtATPG3* 도입한 형질전환 들잔디의 생산 및 유전자 도입 확인: AT-hook family 유전자의 하나인 *MtATPG3* 유전자를 들잔디에 도입하여 형질전환 식물을 제조하였다. *MtATPG3* 유전자를 들잔디에 도입하여 형질전환 후보체를 선발하였으며, 현재까지 총 30여개체의 형질전환 후보체를 확보하였고 계속 선발을 수행하고 있다(그림 116). 확보한 형질전환 식물체들은 선발마커 유전자의 단백질 수준에서의 발현을 확인하였고(그림 116), Genomic-PCR 분석을 통하여 *MtATPG3* 유전자가 도입되었음을 확인하였다. 현재 이들 형질전환체들의

Southern blot 분석을 수행하고 있으며, 추후 노화 지연 특성분석을 위하여 온실 내에서 증식 중에 있다.

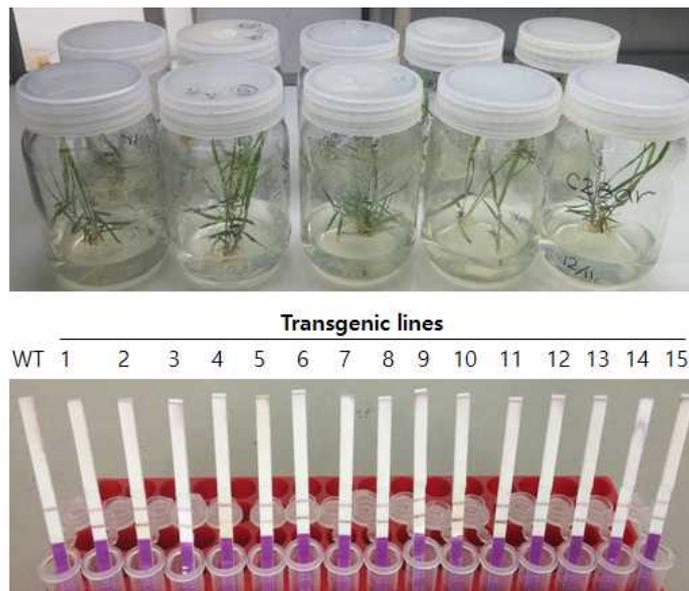


그림 116. *MtATPG3* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 선발 및 선발마커 유전자 발현확인(Trait LL Test Strip 분석).

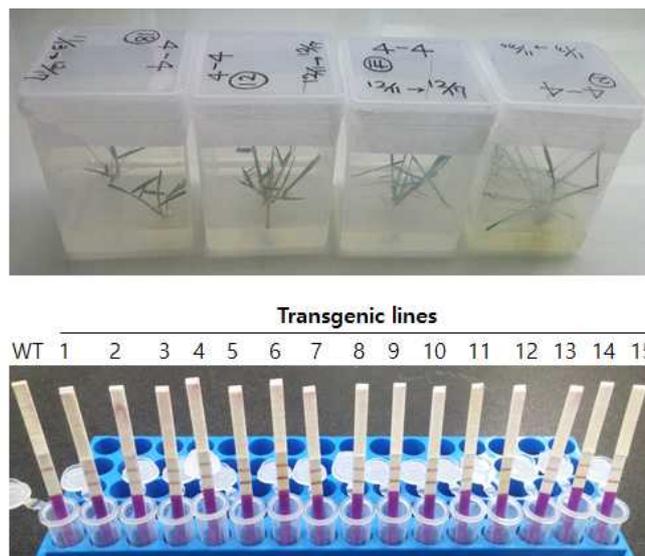


그림 117. *MtATPG4* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 선발 및 선발마커 유전자 발현확인(Trait LL Test Strip 분석).

㉞ *MtATPG4*-형질전환 들잔디

○ *MtATPG4* 도입한 형질전환 들잔디의 생산 및 유전자 도입 확인: AT-hook family 유전자

의 하나인 *MtATPG4* 유전자를 들잔디에 도입하여 형질전환 식물을 제조하였다. *MtATPG4* 유전자를 들잔디에 도입하여 형질전환 후보체를 선발 하였으며, 현재까지 총 22개체의 형질전환 후보체를 확보하였고 계속 선발을 수행하고 있다(그림 117). 확보한 형질전환 식물체들은 선발마커 유전자의 단백질 수준에서의 발현을 확인하였으며(그림 117), Genomic-PCR 분석을 통하여 *MtATPG4* 유전자가 도입되었음을 확인하였다. 현재 이들 형질전환체들의 Southern blot 분석을 수행하고 있으며, 추후 노화 지연 특성분석을 위하여 온실 내에서 증식 중에 있다.

(4) 농업형질 발현 들잔디 우수계통 육성

○ 본 연구팀은 녹기연장 유전자 8종(*ATHG1*, *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG7*, *ATPG8*, *ATPG10*, *MtATPG3*, *MtATPG4*)의 형질전환체를 대상으로 각종 기능 분석을 수행하여 총 4계통의 우량 형질전환체 후보 계통을 선발하였다. 이들 4개 계통을 온실에서 순화하여 증식하였고 들잔디의 노화가 시작되는 11월 초에 각 계통의 표현형을 조사하였다. 그 결과, 선발한 4개 계통은 모두 야생형 들잔디에 비해 노화가 지연되는 형질을 나타냈었고, 특히 *ATHG1*-형질전환 식물 1번 계통과 *ATPG7*-형질전환 식물 3번 계통이 노화 지연 표현형이 가장 우수하였다(그림 118). *ATHG1*-형질전환 식물 1번 계통과 *ATPG7*-형질전환 식물 3번 계통은 노화를 촉진하는 압조건에서 야생형에 비해 각각 약 160%와 120% 이상 노화가 지연되는 표현형적 특성을 나타내었고, 또한 노화를 촉진하는 4종의 스트레스 조건(염, 중금속이온, 과산화수소, 메틸자스모네이트)에서도 야생형에 비해 각각 평균 약 300%와 200% 이상의 클로로필 함량을 유지하고 있었다. 이들 계통의 포장에서의 노화지연 특성 및 스트레스 내성 형질을 재확인하기 위하여 현재 *ATHG1*-형질전환 식물 1번 계통과 *ATPG7*-형질전환 식물 3번 계통을 삼목하여 대량 증식 중에 있으며, 향후 이들 계통의 격리포장 시험재배 승인을 받아 이벤트 계통을 최종 선발한 다음 재배 승인을 위한 환경 및 인체위해성 평가를 수행할 예정이다.

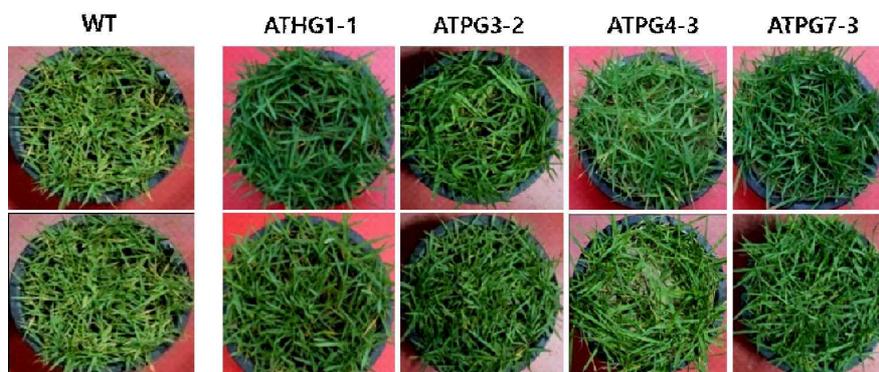


그림 118. 선발한 우량 형질전환 들잔디 계통의 노화지연 표현형 분석. WT, wild type; *ATHG1*-1, *ATHG1* 형질전환 잔디 1번 계통; *ATPG3*-2, *ATPG3* 형질전환 잔디 2번 계통; *ATPG4*-3, *ATPG4* 형질전환 잔디 3번 계통; *ATPG7*-3, *ATPG7* 형질전환 잔디 3번 계통. 2018년 11월 5일 관찰

마. 국화 형질전환체 생산 및 기능 검정

(1) 국화 스탠다드 품종의 형질전환 시스템 개선

○ 우리는 선행연구에서 국화 스탠다드 품종과 스프레이 품종의 기내 배양 식물체에서 절취한 잎 절편체의 *Agrobacterium*-매개 형질전환을 통하여 2~10%의 형질전환 효율을 얻을 수 있는 기술을 확보하였다. 특히 본 연구팀은 형질전환체 선발 시 기존의 논문이나 대다수의 연구팀에서 사용되는 선발제(phosphinothricin; PPT)의 농도를 높게 유지한 상태에서 신초를 유도하여 국화 형질전환에서 많이 나타나는 escape의 발생을 최소화할 수 있는 효율적인 국화 형질전환 기술을 확립하였다. 기내 배양을 통해 신장과 발근이 이루어진 형질전환체의 분자분석을 통해 형질전환체를 선발한 후, 온실에 활착을 시켜 표현형 검정 및 목표 형질 특성을 분석하여 우량 국화 형질전환체를 선발하는 시스템을 확립하였다(그림 119).

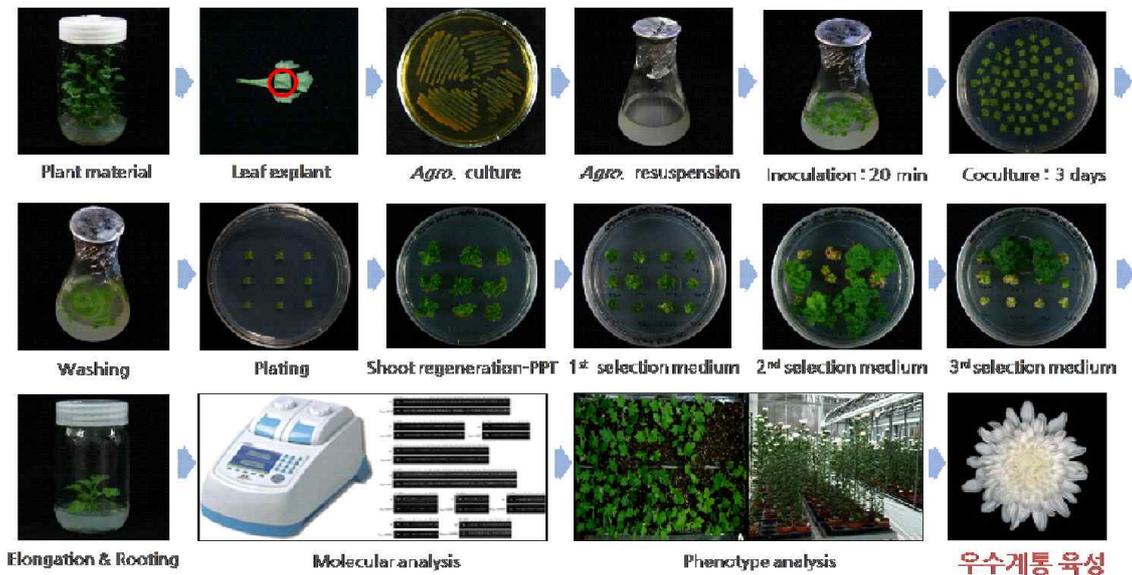


그림 119. 국화 형질전환 식물체 육성 및 특성 검정 시스템

(A) 암배양 5주

(B) 암배양 5주 + 명배양 3주

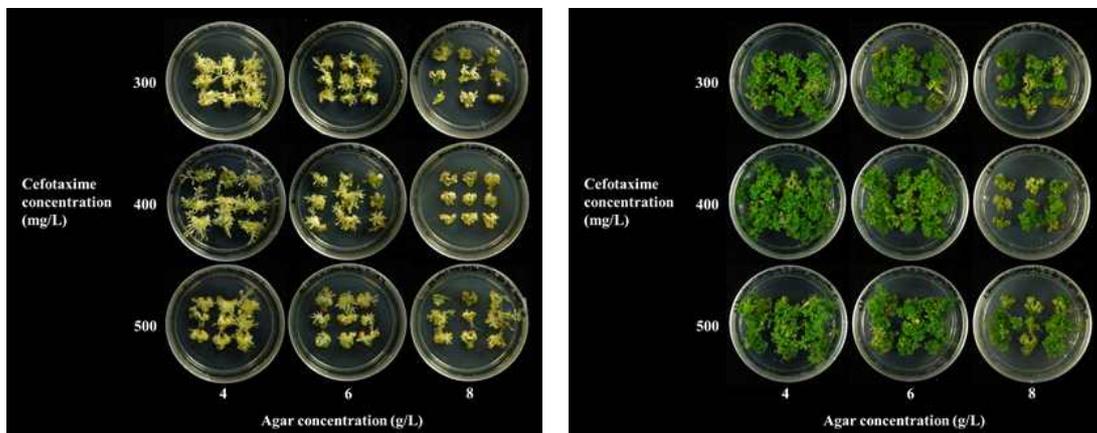


그림 120. Cefotaxime과 agar 농도에 따른 국화 '신마'의 신초 재생 비교. (A) 암조건에서 5주간 배양한 후의 모습, (B) 암조건에서 5주간 배양 후 명조건으로 옮겨 3주간 배양한 후의 모습.

- 본 연구팀은 국화 스탠다드 품종 '신마'의 식물체 재생 효율 증진을 통한 형질전환 시스템 개선을 위하여 다음의 연구를 수행하였다.
 - 기존의 기내 배양 식물체에서 절취한 잎 절편체로부터의 신초 기관형성 유도 체계를 기반으로, *Agrobacterium*-매개 형질전환에서 *Agrobacterium* 제거용 항생제인 cefotaxime(Cx) 및 agar 농도를 비교하여 신초 기관형성에 적절한 조건을 구명함으로써 식물체 재생 효율을 증진시키고자 실험을 수행하였다.
 - Cx과 agar의 농도를 각각 300 mg/L, 400 mg/L, 500 mg/L와 agar 4 g/L, 6 g/L, 8 g/L를 포함한 배지에 절편체를 치상한 후 암배양 5주, 명배양 2주 후 절편체로부터의 반응을 조사하였다.
 - 그 결과, 모든 처리구에서 신초형성이 이루어졌으나, agar의 농도가 일반적으로 사용하는 8 g/L에서 4 g/L로 낮아짐에 따라 신초형성이 증가하는 경향을 보여주었다. agar의 농도가 4 g/L에서 cefotaxime의 농도와 관계없이 신초 형성율과 재생 신초수가 높게 나타났다. Cx과 agar를 각각 400 mg/L와 4 g/L를 포함한 배지에서 절편체당 신초수가 가장 높게 나타났다(그림 120, 표 17).
 - 이로 보아 agar의 농도를 4 g/L로 낮추고 Cx의 농도를 기존의 500 mg/L에서 *Agrobacterium*을 제어할 수 있는 300-400 mg/L의 다소 낮은 농도를 사용하는 것이 신초 재생에 효과적이며, 이를 *Agrobacterium*-매개 형질전환에 이용한다면 보다 높은 형질전환 효율을 얻을 수 있을 것이라 판단된다.

표 17. 국화 '신마'의 잎 절편체로부터 신초 재생에 미치는 cefotaxime과 agar의 영향

Agar (g/L)	Cefotaxime (mg/L)	Callus formation (%)	Shoot formation (%)	No. of shoots/explants
4	300	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	7.4 ± 0.9
6	300	100.0 ± 0.0	88.9 ± 11.1	5.9 ± 2.2
8	300	100.0 ± 0.0	80.0 ± 18.3	5.0 ± 1.9
4	400	100.0 ± 0.0	95.6 ± 6.1	8.8 ± 1.7
6	400	100.0 ± 0.0	94.4 ± 6.4	8.3 ± 0.5
8	400	100.0 ± 0.0	83.3 ± 6.4	4.9 ± 1.4
4	500	100.0 ± 0.0	94.4 ± 7.9	8.2 ± 1.0
6	500	100.0 ± 0.0	91.7 ± 10.6	8.6 ± 1.8
8	500	100.0 ± 0.0	69.4 ± 10.6	4.2 ± 1.5

(2) 국화 형질전환체 생산 및 기능 검정

- 본 연구팀은 수명연장 확보유전자 5종, *ORE15*, *ATPG4*, *ATPG6*, *ATPG7*, *ATPG10*, 그리고 신규 유전자 3종, *MtATPG3*, *MtATPG4*, *AHL26*를 포함하여 총 8종의 유전자를 이용하여 국화 '신마' 형질전환을 수행하였다. 수명연장 유전자가 도입된 형질전환체를 생산하기 위하여 기내 배양 신초로부터 잎을 절취하여 만들어진 절편체를 사용하여 *Agrobacterium* 매개 형질전환을 실시하였다. 형질전환 실험에서 기본배지로 MS 염류와 비타민, sucrose 30 g/L, agar 6 g/L인 기본배지에 BA 2.0 mg/L, NAA 0.5 mg/L가 첨가된 신초재생배지 (SIM)를 사용하였다. 액체 MS 배지에서 배양한 세균 현탁액에 절단한 절편체를 침지하여

실온에서 20분간 접종한 후 신초재생배지(SIM)에 acetosyringone 100 μ M을 첨가한 공조 배양배지에서 3일간 배양하였다. 배양 후 신초재생배지(SIM)에 PPT 1.5 mg/L, Cx 250 mg/L가 첨가된 선발배지(TSM)에서 배양하면서 신초 재생을 유도 하였다.

- 본 연구팀은 8종의 유전자에 대하여 형질전환을 수행하였으며, 8종의 유전자가 각각 도입된 국화 형질전환체를 성공적으로 생산하였고, 이들 형질전환체들의 유전자 도입 및 발현을 분석하였다. 또한 유전자 도입 및 발현이 확인된 온실에서 재배하여 개화를 유도하였으며, 수확 적기에 초장, 잎 수, 꽃잎 수(통상화, 설상화), 생체중 등과 같은 기능 분석을 실시하였고, 절화를 수확하여 표현형, 엽록소 함량 등의 생리 특성을 분석하였다. 이어서 8종의 형질전환체의 잎을 재료로 H₂O₂ 처리를 통한 산화 스트레스 저항성 분석을 실시하였다.
- 국화 형질전환체의 유전자 도입 및 삽입 T-DNA copy 수를 확인하기 위해 genomic PCR 및 qPCR 검정을 각각 실시하였다. Genomic PCR의 경우, 국화 야생형과 형질전환체 신초의 잎을 액체질소에 넣어 분쇄한 후, Macherey-Nagel사의 Nucleospin Plant II Kit을 이용하여 DNA를 추출하였다. 선발 마커인 *bar* 유전자와 함께 목적 유전자인 *ORE15*, *ATPG4*, *ATPG6*, *ATPG7*, *ATPG10*, *AHL26*, *MtATPG3*, *MtATPG4* primer(표 18)를 이용하여 각각 PCR을 실시하였다. DNA 증폭은 95°C에서 5분 동안 초기 denaturation 한 후, 95°C 30초 denaturation, 60°C 30초 annealing, 72°C 30초 extension을 35cycle 반복한 후, 최종적으로 72°C에서 2분간 extension 하였다. 증폭된 DNA를 1% agarose gel을 이용하여 30분 동안 전기영동하고 UV로 확인하였다.

표 18. 형질전환체의 유전자 도입 분석에 이용한 PCR primer 정보

Gene	Primer name	Sequence
<i>bar</i>	bar-F	5'-GAA GTC CAG CTG CCA GAA AC-3'
	bar-R	5'-AAG CAC GGT CAA CTT CCG TA-3'
<i>ORE15</i>	ORE15-F	5'-TGG TTA GAG AAG GTG AAG AAG A-3'
	ORE15-R	5'-TTA TGA AAA AGG AGC CC ATG AG-3'
<i>ATPG4</i>	ATPG4-F	5'-TGG TGG ACA GGA CAA GTG AA-3'
	ATPG4-R	5'-GCT TGA GCC CAA CCA TAA GC-3'
<i>ATPG6</i>	ATPG6-F	5'-ACG GCC ACG ATA TAG ACC AG-3'
	ATPG6-R	5'-CCA AAC GAA GCT GCC ATA AT-3'
<i>ATPG7</i>	ATPG7-F	5'-AGT TCT TTG GTG AAA ATG AAG A-3'
	ATPG7-R	5'-GTC GTC CCG TTG ACC AAT AA-3'
<i>ATPG10</i>	ATPG10-F	5'-ACC ACC AGG TTC CAA AAA CA-3'
	ATPG10-R	5'-GTC CCT CTC TTT CCC CTG TC-3'
<i>MtATPG3</i>	MtATPG3-F	5'-CAC CTT TCC ACA CAG CAA GA-3'
	MtATPG3-R	5'-AAG GCA TCT GAC CGA GAA GA-3'
<i>MtATPG4</i>	MtATPG4-F	5'-ATC GCC CAT AGC ATT TCA TC-3'
	MtATPG4-R	5'-GAA CAC ATC GTG TCC GTG TC-3'
<i>AHL26</i>	AHL26-F	5'-ACC ATC ATC AGC AAC CAC AA-3'
	AHL26-R	5'-AGG ACC CGA ACA CAA CAA AG-3'

- PCR 분석을 통해 유전자 도입이 확인된 형질전환체의 삽입 T-DNA copy 수를 조사하기 위해 genomic PCR에서 유전자 도입이 확인된 형질전환체를 대상으로 *bar* 유전자의 primer 및 probe를 이용한 qPCR 검정을 수행하였다. 야생형과 형질전환체로부터 DNA를 추출한 후, Qiagen사의 Rotor-GeneTM Probe PCR Kit과 Rotor Gene Q을 이용하여 qPCR을

실시하였다. 도입 유전자의 copy 수를 분석하기 위해 *bar* 유전자의 염기서열을 기초로 primer 및 probe를 제작하였다(표 19). DNA 증폭은 95°C 에서 3분 동안 초기 denaturation 한 후 95°C 3초 denaturation, 60°C 10초 annealing을 40 cycle 반복하였다. qPCR을 이용한 copy수 분석은 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법 (Livak and Schmittgen, 2001)으로 분석하였고 같은 조건의 실험을 3반복 수행하였다.

표 19. 형질전환체의 T-DNA copy 수 분석에 이용한 qPCR primer 및 probe 정보

Gene	Primer name	Sequence
<i>bar</i>	bar-F	5'-CTG CAC CAT CGT CAA CCA CTA C 3'
	bar-R	5'-GGT CGT CCG TCC ACT CCT G 3'
	Probe	5' d FAM-CGG TTC CTG CGG CTC GGT AC -BHQ-1 3'
<i>18s rRNA</i>	18S-F	5'-ACT GCG GAA GGA TCA TTG TC-3'
	18S-R	5'-CAG GAG CTT GGT CCT CTC AC-3'
	Probe	5' d FAM-CAG ACG ACC CGT GAA CAC GTA AAC -BHQ-1 3'

○ PCR과 qPCR 분석에서 유전자 도입이 확인된 독립 형질전환 계통들의 목적 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 야생형과 형질전환체의 잎을 액체질소에 넣어 분쇄한 후, Qiagen사의 RNeasy Plant Mini Kit를 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 Invitrogen사의 SuperScript® First-Strand를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이후 *ORE15*, *ATPG4*, *ATPG6*, *ATPG7*, *ATPG10*, *AHL26*, *MTATPG3*, *MtATPG4* 유전자를 각각 도입한 형질전환 식물체의 RNA를 대상으로 선발마커인 *bar* 유전자와 reference gene인 *18S rRNA* 유전자로 사용하여 RT-PCR을 진행하였다(표 20). RNA 증폭은 95°C 에서 5분 동안 초기 denaturation 한 후, 95°C 30초 denaturation, 60°C 30초 annealing, 72°C 30초 extension을 30 cycle 반복한 후, 최종적으로 72°C 에서 2분간 extension 하였다. 증폭된 DNA를 1% agarose gel을 이용하여 30분 동안 전기영동하고 UV로 확인하였다.

표 20. 형질전환체의 유전자 발현 분석에 이용한 RT-PCR primer 정보

Gene	Primer name	Sequence
<i>bar</i>	bar-F	5'-GAA GTC CAG CTG CCA GAA AC-3'
	bar-R	5'-CAG GAG TGG ACG GAC GAC-3'
<i>18s rRNA</i>	18S rRNA-F	5'-CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA-3'
	18S rRNA-R	5'-AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG-3'
<i>ORE15</i>	ORE15-F	5'-CCC TTC TCA TCG CTC TCA TC-3'
	ORE15-R	5'-CAC CTT GCA AGA GAG GGA AC-3'
<i>ATPG4</i>	ATPG4-F	5'-AAC AAC AAC AAC GAC GAG GA-3'
	ATPG4-R	5'-CGA TGA CGT CAG TCC CAC TA-3'
<i>ATPG6</i>	ATPG6-F	5'-ATT ATG GCA GCT TCG TTT GG-3'
	ATPG6-R	5'-CAG CTG GCA ATT GAA CAG AA-3'
<i>ATPG7</i>	ATPG7-F	5'-TGT TTA CCT CGC TGG ACC AC-3'
	ATPG7-R	5'-GCA GTT GTT GTC CCA TCA T-3'
<i>ATPG10</i>	ATPG10-F	5'-ACC ACC AGG TTC CAA AAA CA-3'
	ATPG10-R	5'-GTC CCT CTC TTT CCC CTG TC-3'
<i>MtATPG3</i>	MtATPG3-F	5'-ACG GTT GTG ACG TTG TTG AA-3'
	MtATPG3-R	5'-CAG AAG CAA TCA AAG CAC CA-3'
<i>MtATPG4</i>	MtATPG4-F	5'-GGC CAT GTT AAC GAC GAA CT-3'
	MtATPG4-R	5'-CGC TGA GAA CTG AAA CAC CA-3'
<i>AHL24</i>	ATPG2-F	5'-ACC ATC ATC AGC AAC CAC AA-3'
	ATPG2-R	5'-TTC TCC ACT TCC TCC ACC AC-3'

- 국화 형질전환체의 온실에서 고생장성 특성 분석을 위하여, 8종의 유전자가 도입된 국화 형질전환체의 활착 과정을 거쳐 온실에서 재배하여 개화를 유도하였다. 먼저 제조체가 포함된 배지에서 성공적으로 발근된 식물체는 활착과정을 거쳐 온실로 옮겨 장일조건(16h:8h)에서 재배를 하여 30cm까지 영양생장을 유도한 후, 단일조건(8h:16h)에서 개화를 유도하였다. 절화가 수확 적기에 이르렀을 때 초장, 잎 수, 지상부 생체중, 꽃잎 수(설상화 수와 통상화 수) 등을 조사하였다.
- 국화 형질전환체 절화의 노화지연 특성 분석을 위하여, 수확 적기의 절화를 약 50cm 길이로 절취하여 하단부 10cm를 95°C의 water bath에 20초간 담가 열처리를 실시한 후, 열처리한 절화 하단부 10cm를 상온의 증류수에 담근 상태에서 절단하여 절화를 준비하였다. 그리고 준비된 40cm 길이의 절화를 증류수 30ml가 넣어진 시험관에 절화를 담근 후 시험관의 중앙에 호일을 이용하여 절화를 고정시켰다. 절화는 온도 14°C, 습도 70%, 광도 $22 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 하에서 12시간 광주기 조건의 꽃 냉장고에 저장하였다. 형질전환체 절화의 잎 노화 정도를 검정하기 위해 꽃 냉장고에 저장된 절화를 총 2주간 일주일 간격으로 엽록소 간 측정기(SPAD-502, Minolta)를 사용하여 엽록소 함량을 측정하였다. 엽록소 함량 측정은 절화에서 3장의 잎을 선택하여 잎의 주맥을 중심으로 좌, 우의 엽신 부분을 측정하였다.
- 또한 국화 형질전환체의 스트레스 저항성 분석을 위하여, H₂O₂ 처리를 통하여 산화스트레스에 따른 반응을 조사하였다. 기내 형질전환체의 완전히 전개된 3-5번째 잎을 채취하여 엽병을 잘라 낸 뒤, 12 well dish(SPL)에 3mM MES용액에 50mM H₂O₂를 넣은 용액 3ml씩을 분주 한 다음 잘라낸 잎을 용액에 완전히 담기도록 하였다. 6일 동안 3일 간격으로 엽록소 간 측정기를 사용하여 엽록소 함량을 측정하였다.

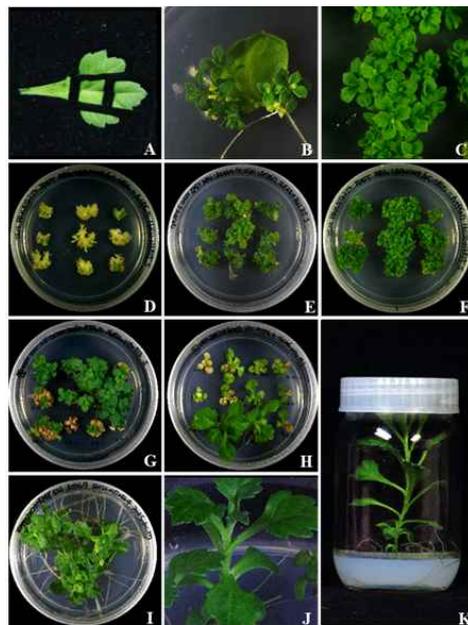


그림 121. *ORE15* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 선발

④ ORE15-형질전환 국화

○ **ORE15 도입한 형질전환 국화의 생산:** 연구팀은 *ORE15*가 도입된 국화 형질전환체를 확보하기 위하여 13회에 걸쳐 1,330개의 절편체를 사용한 형질전환을 실시하였으며, 3회에 걸친 선발과정을 거쳐 선발용 제초제 PPT가 포함된 배지에서 정상적으로 신장과 발근이 이루어진 25개 계통을 생산하였다(그림 121, 표 21).

표 21. *ORE15* 유전자 도입 형질전환 국화 생산

Target gene	No. of experiments	No. of explants	Shoot regeneration (%)	No. of shoots (subcultured on selection medium)			PCR	
				1st	2nd	3rd	<i>bar</i>	<i>ORE15</i>
<i>ORE15</i>	1	99	97.0	198	20	2	2	2
	2	100	67.0	136	5	0	-	-
	3	104	57.7	184	39	2	2	2
	4	77	66.2	97	18	1	1	1
	5	94	71.3	109	11	3	3	3
	6	100	92.0	130	5	2	2	0
	7	104	79.8	120	6	0	-	-
	8	98	41.8	40	6	3	3	3
	9	126	94.4	119	10	3	3	3
	10	120	81.7	109	24	2	2	2
	11	100	72.0	83	5	1	1	1
	12	100	75.0	48	8	3	3	1
	13	108	41.7	88	17	3	3	1
Total	1,330	72.1	1,461	174	25	25	19	

○ **ORE15 유전자를 도입한 형질전환 국화의 유전자 도입 확인 및 발현 분석:** 제초제 PPT가 포함된 배지에서 정상적으로 발근된 형질전환체 25계통을 대상으로 genomic-PCR을 통하여 *bar*와 *ORE15* 유전자의 도입 여부를 확인하여 *ORE15*와 *bar* 유전자 band가 모두 나타난 19개의 형질전환 계통을 선발하였다(그림 122). 이어서 유전자 도입이 확인된 19계통의 qPCR 검정을 통하여 19개 형질전환 계통 중 3개 이상의 copy 수를 가지고 있는 것으로 보여지는 5계통을 제외한 나머지 14개 형질전환 계통에서 T-DNA copy가 2개 이하로 도입된 것으로 판단된다(그림 123). 또한, *ORE15* 유전자와 *bar* 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여 형질전환체 19계통의 RT-PCR을 실시하였는데, *ORE15* 유전자는 1개 계통을 제외한 18개 계통에서 발현이 나타났으나 *bar* 유전자는 3개 계통을 제외한 15계통에서 발현을 확인할 수 있었다(그림 124).

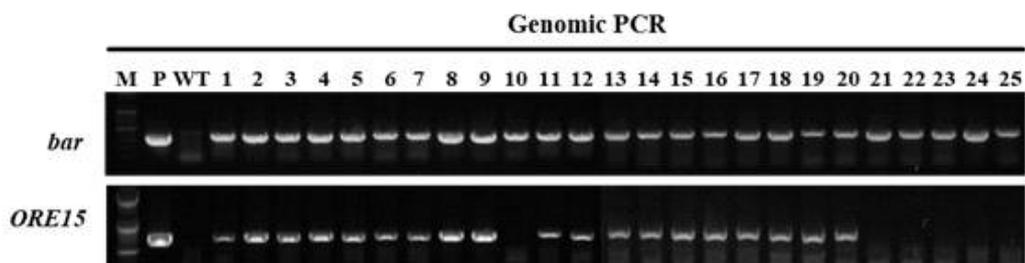


그림 122. *ORE15* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 유전자 도입 확인. Genomic-PCR analysis for *ORE15* gene; WT, Wild type; 1-25, transgenic plants

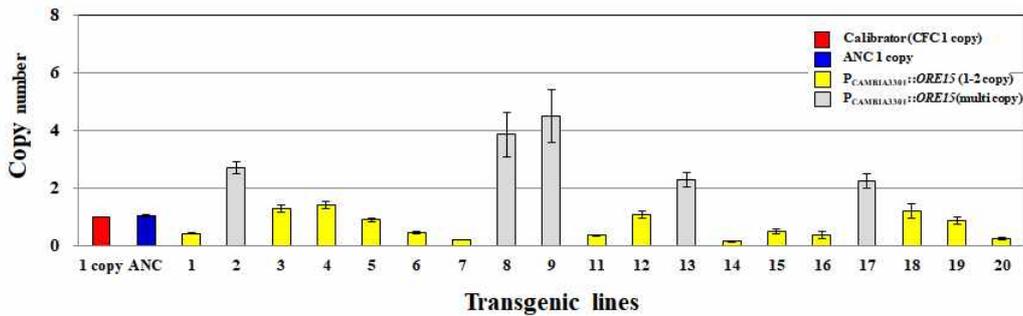


그림 123. *ORE15* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 도입 유전자 copy 수 분석. qPCR analysis for *ORE15* gene; 1 copy & ANC, 1 copy transgenic plants used as calculator; 1-25, transgenic plants

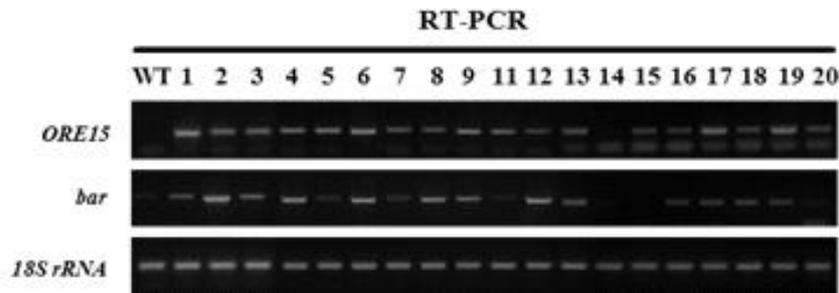


그림 124. *ORE15* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 유전자 발현 확인. RT-PCR analysis for *ORE15* gene; WT, Wild type; 1-20, transgenic plants



그림 125. *ORE15* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 온실재배에서 나타난 표현형적 특징

○ *ORE15* 도입한 형질전환 국화의 기능 분석: PCR과 RT-PCR을 통해 유전자 도입 및 발현이 확인된 *ORE15* 유전자 도입 국화 3개 형질전환 계통을 대상으로 온실에서의 특성분석

을 실시하기 위해 개화를 유도한 후 표현형 검정을 실시하였다. 선발된 3개의 형질전환 계통을 재배하여 개화를 유도한 후 초장, 지상부 생체중, 잎 수, 설상화 및 통상화 수 등의 성장 및 개화 특성을 조사하였다. 초장은 야생종과 비교할 때 다소 증가하거나 감소하는 경향을 보여 통계적 유의성이 인정되지 않았다. 생체중과 잎 수는 4번 계통에서 야생종에 비해 각각 26.7%와 14.4%가 각각 증가한 것으로 나타났다. 또한, 꽃잎 수는 4번 계통에서 늘어났는데, 설상화는 거의 차이가 없었으나 통상화는 14.4%가 증가하였다(그림 125, 126). 이로 보아 *ORE15* 유전자는 애기장대에서 검증된 바와 같이 국화에서도 성장성 증대 효과가 있다고 판단되며, 4번 계통은 고성장성 신품종으로 육성 가능성이 높다고 판단된다.

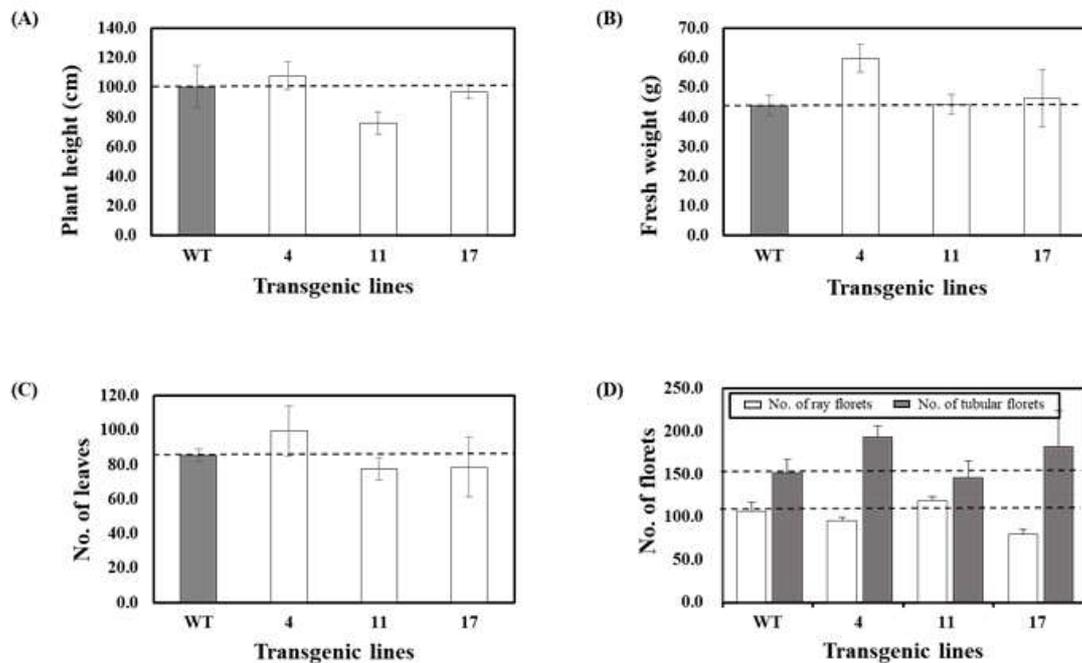


그림 126. *ORE15* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 성장 및 개화특성 검정. (A) 초장, (B) 생체중, (C) 잎 수, (D) 꽃잎 수(설상화 수와 통상화 수)

○ *ORE15* 도입한 형질전환체의 절화 생리 분석: 수명연장 유전자 *ORE15* 도입 형질전환 계통의 절화의 노화지연 특성을 검정하기 위해 온실에서 개화를 유도한 후 절화를 채취하여 꽃 냉장고에 저장하면서 엽록소 함량 변화를 관찰하였다. 절화 저장 1주차 이후부터 엽록소 함량이 점차 감소하기 시작하였으며, 2주차에는 야생형의 엽록소 함량이 67.0% 감소하였다. 반면 4번 계통은 24.2%로 가장 작게 감소되었고, 11번과 17번 계통은 각각 28.3%와 37.6% 감소한 것으로 나타났다(그림 127). *ORE15* 유전자가 도입된 국화 형질전환 계통에서는 야생형보다 엽록소가 오래 유지되는 것으로 보아 *ORE15* 유전자는 노화지연(녹기연장) 효과가 있다고 생각되며, 4번 계통은 국화 스탠다드 품종인 '신마'에서 매우 중요한 농업적 형질인 절화수명 연장 신품종으로 개발 가능성이 높다고 판단된다.

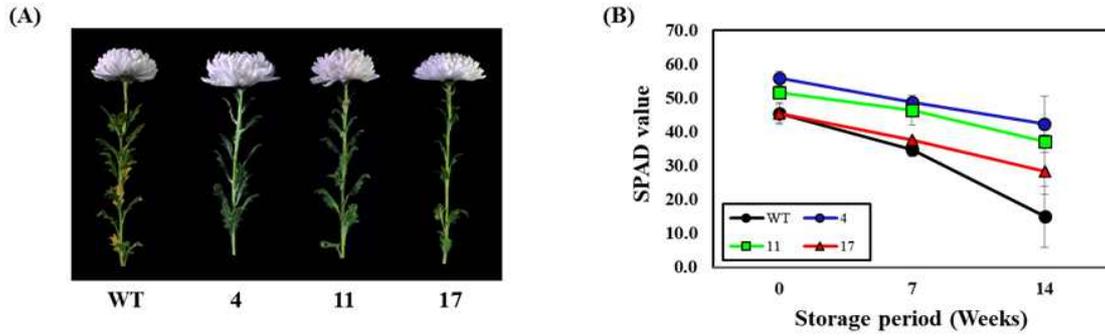


그림 127. *ORE15* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 절화 생리 검정. (A) 절화의 표현형, (B) 절화 앞의 SPAD value

○ *ORE15* 도입한 형질전환 국화의 스트레스 저항성 분석: *ORE15* 유전자 도입이 확인된 형질전환체 3계통을 대상으로 산화 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 3mM MES 용액에 50mM H_2O_2 를 첨가하여 잎을 절단한 후 3일 간격으로 6일 동안 엽록소 간이 측정기를 사용하여 엽록소 함량을 측정하였다. 야생형과 형질전환체 모두 3일차부터 엽록소 함량이 감소하는 것으로 나타났으나 야생형의 엽록소 함량 감소폭이 더 컸다. 6일차에는 대조구의 엽록소 함량이 초기 대비 92%이상 감소하였으나, 형질전환체 3계통 모두 엽록소 함량이 초기 대비 40%이상 상대적으로 높게 유지되는 것으로 나타났다(그림 128). 이로 보아 *ORE15* 유전자는 국화 '신마' 형질전환체에서 산화스트레스에 대한 저항성 형질을 보인다는 것을 확인 할 수 있었다.

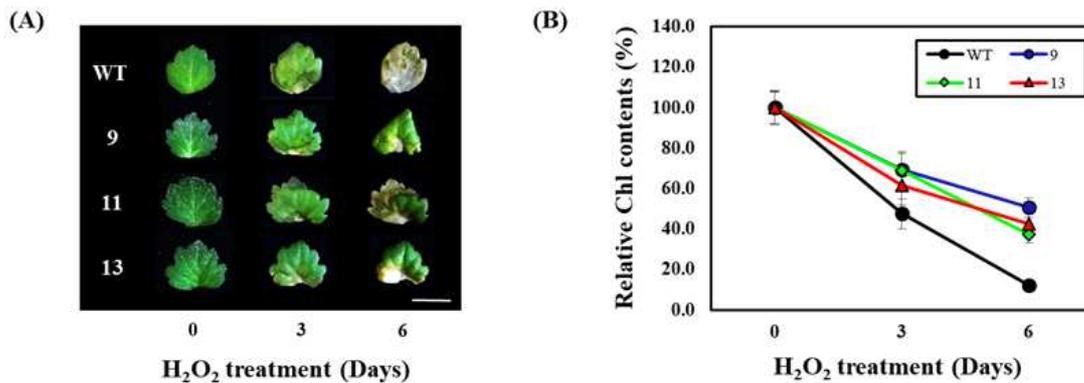


그림 128. *ORE15* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 산화 스트레스 저항성 분석. (A) 표현형적 특징, (B) 엽록소 함량 변화

② ATPG4-형질전환 국화

○ *ATPG4* 유전자를 도입한 형질전환 국화의 생산: *Agrobacterium*-매개 형질전환을 통한 *ATPG4* 유전자 도입 형질전환 식물체를 생산하였다(그림 129). 15회에 걸쳐 형질전환 실험을 실시하였는데, 1,580개의 절편체로부터 선발용 제조제 PPT가 포함된 1차 선발배지에서 1,724계통의 신초가 재생되었으며, 2차 선발배지에서 379개, 그리고 3차 선발배지에서 정상적으로 신

장과 발근이 이루어진 24계통의 형질전환 식물체를 선발하였다(표 22).

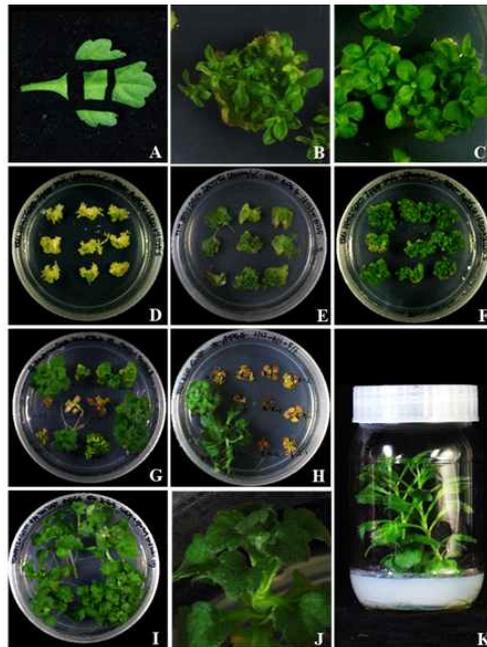


그림 129. *ATPG4* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 선발

표 22. *ATPG4* 유전자 도입 형질전환 국화 생산

Target gene	No. of experiments	No. of explants	Shoot regeneration (%)	No. of shoots (subcultured on selection medium)			PCR	
				1st	2nd	3rd	<i>bar</i>	<i>ATPG4</i>
<i>ATPG4</i>	1	100	88.0	166	66	1	1	1
	2	98	83.7	129	5	2	2	2
	3	109	89.9	216	96	3	2	2
	4	122	69.7	179	3	3	3	2
	5	100	87.0	107	6	3	3	3
	6	121	73.5	140	29	0	-	-
	7	103	64.1	40	10	1	1	1
	8	90	42.2	67	14	3	3	2
	9	90	33.3	54	5	0	-	-
	10	100	82.0	82	6	0	-	-
	11	108	70.0	72	8	1	1	1
	12	109	76.3	113	17	2	2	2
	13	110	72.7	120	58	3	1	1
	14	100	57.0	97	5	1	1	1
	15	120	68.3	142	51	2	2	2
Total		1,580	70.5	1,724	379	24	22	19

○ *ATPG4* 도입한 형질전환 국화의 유전자 도입 확인 및 발현 분석: 수명연장 유전자 *ATPG4* 도입 국화 형질전환을 통해 선발된 24계통 중 22계통을 대상으로 *ATPG4*와 선발마커 유전자 *bar* 도입 여부를 확인하기 위한 genomic-PCR을 실시하였다. 22계통 중 *bar* 유전자는 1계통을 제외한 21계통, *ATPG4* 유전자는 19계통에서 예상 크기의 band가 확인되어, 두 개의 유전자가 모두 도입된 것으로 확인된 19계통을 선발하였다(그림 130). PCR을 통해 유전자 도입을 확인한 *ATPG4*-형질전환 국화 19계통을 대상으로 유전자의 도입 copy 수를 qPCR을 통하여 확인한 결과, 형질전환 계통간의 다양한 차이를 보여주었으며, 이 가운데 2 copy 이하의 T-DNA가 삽입된 15계통을 선발하였다(그림 131). 또한 국화 형질전환체에 도입된 *ATPG4* 유전자의 발현을 확인하고자 19계통을 대상으로 RT-PCR 실험을 수행하였는데, *bar*는 10계통에서 발현이 나타났고 *ATPG4* 유전자는 7계통에서 발현이 나타났으며 두 개의 유전자가 모두 도입된 계통은 7개로 확인되었다(그림 132).

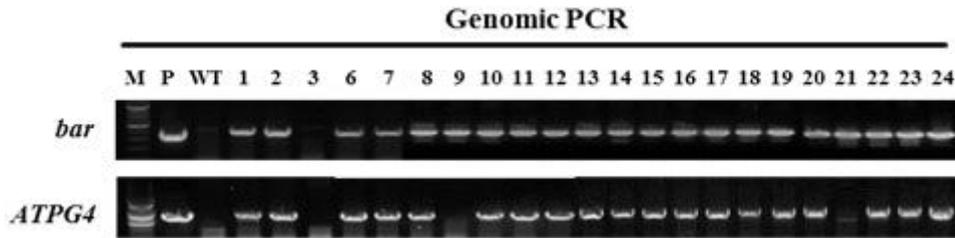


그림 130. *ATPG4* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 유전자 도입 확인. Genomic-PCR analysis for *ATPG4* gene; WT, Wild type; 1-24, transgenic plants

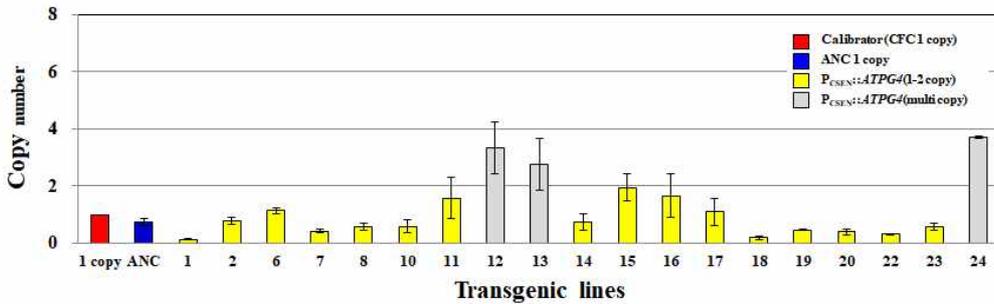


그림 131. *ATPG4* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 도입 유전자 copy 수 분석. qPCR analysis for *ATPG4* gene; 1 copy & ANC, 1 copy transgenic plants used as calculator; 1-24, transgenic plants

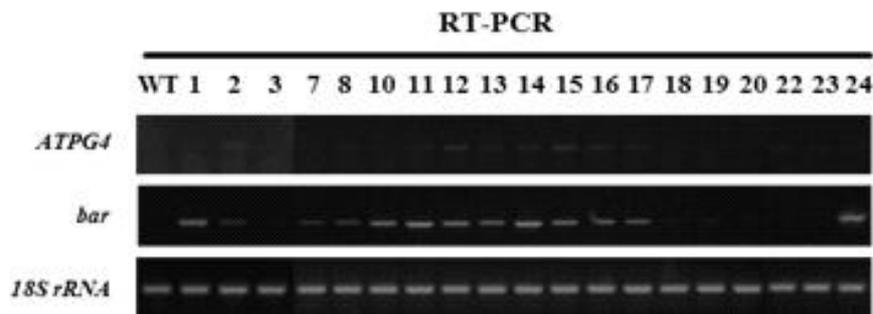


그림 132. *ATPG4* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 유전자 발현 확인. RT-PCR analysis for *ATPG4* gene; WT, Wild type; 1-24, transgenic plants



그림 133. *ATPG4* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 온실재배에서 나타난 표현형적 특징

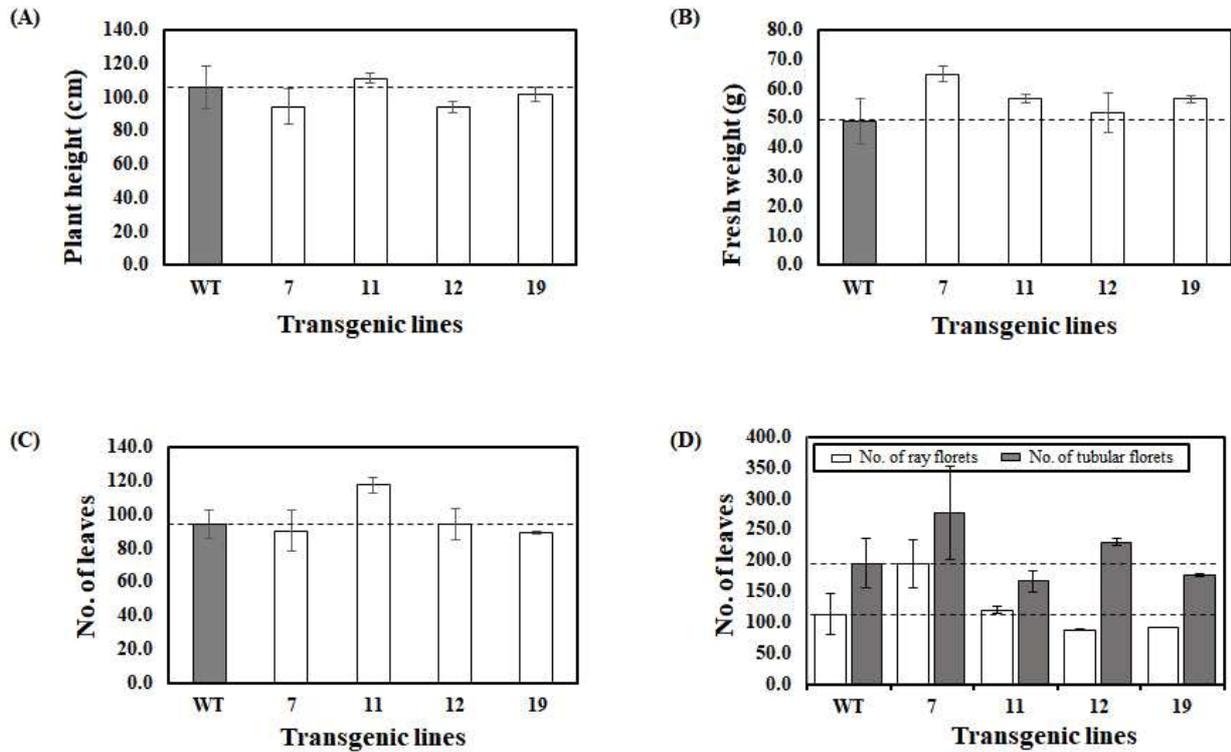


그림 134. *ATPG4* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 성장 및 개화특성 검정. (A) 초장, (B) 생체중, (C) 잎 수, (D) 꽃잎 수(설상화 수와 통상화 수)

○ *ATPG4* 도입한 형질전환 국화의 기능 분석: PCR과 RT-PCR 분석으로 유전자 도입 및 발현이 확인된 *ATPG4* 형질전환 국화 4개 계통을 활착시킨 후 온실에서 재배하여 성장 특

성을 분석하였다. 온실에서 재배한 *ATPG4* 형질전환 식물체 4계통 중 3개 계통은 야생형에 비해 초장에 있어서 큰 차이를 보이지 않았다(그림 133). 그러나 야생형에 비해 일부 형질전환 계통은 생체중과 잎수에 있어서 상당히 증가 하였는데, 생체중은 7번 계통에서 24.6% 증가하였으며, 잎 수는 11번 계통에서 19.9% 늘어났다. 설상화와 통상화의 수에 있어서 7번 계통은 42.0%와 29.4%가 각각 증가하였다(그림 134). *ATPG4* 형질전환 국화에서 생체중 및 설상화와 통상화 수가 20%이상 증가한 계통을 확보할 수 있었던 것으로 보았을 때, *ATPG4* 유전자는 절화용 국화에서 중요한 형질인 굵고 강한 줄기를 가진 우수한 국화 신품종 개발에 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

- *ATPG4* 도입한 형질전환체의 절화 생리 분석: *ATPG4* 유전자가 도입된 형질전환체 4계통과 야생형 식물체를 온실에서 재배하여 개화를 유도한 후 절화를 채취하여 꽃 냉장고에 저장하면서 표현형과 엽록소 함량 변화를 조사한 결과, 야생형에서 저장 1주 후 엽록소 함량 감소가 크지 않았으나 저장 2주 후 엽록소 함량 감소가 급격하게 나타나 초기 대비 61%가 감소하였다. 반면에 형질전환체 4계통은 모두 야생형에 비해 엽록소 함량의 감소가 현저하게 작게 나타났으며, 특히 11번과 19번 계통에서는 엽록소 함량이 2주간 20% 미만으로 소폭 감소하였다(그림 135). 이로 보아 *ATPG4* 도입 국화 형질전환체 11번 계통은 수명연장 효과가 매우 크며 우수한 생장을 보였으므로 추후 신품종 개발을 위한 우량 계통으로 선발할 가치가 충분하다고 보여진다. 이와 같이 *ATPG4* 유전자가 도입된 국화에서 농업적으로 매우 중요한 형질인 절화수명이 상당히 연장되는 우수한 효과가 있음을 확인하였다.

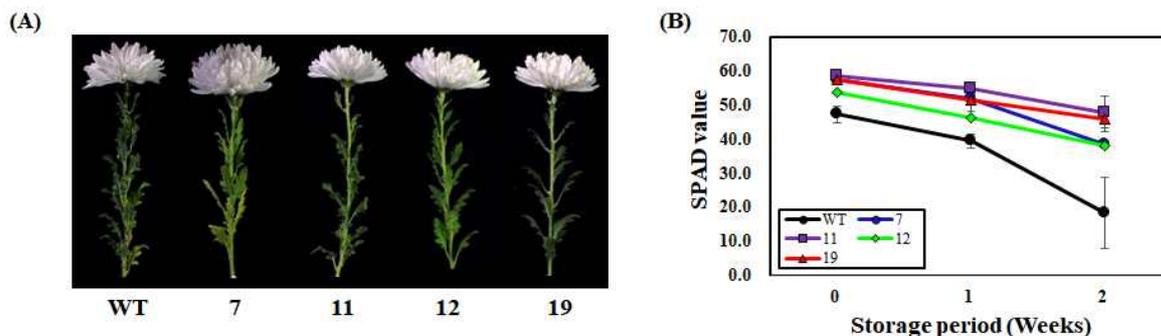


그림 135. *ATPG4* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 절화 생리 검정. (A) 절화의 표현형, (B) 절화 잎의 SPAD value

- *ATPG4* 유전자를 도입한 형질전환 국화의 스트레스 저항성 분석: *ATPG4* 유전자가 도입된 형질전환체 2계통을 대상으로 H_2O_2 처리를 통한 산화 스트레스 저항성을 조사하였다. 50mM H_2O_2 처리 후 엽록소의 함량은 시간이 경과함에 따라 야생종과 *ATPG4* 유전자 도입 형질전환체 모두 감소하는 경향을 보여주었으나 형질전환체 7번은 야생종에 비해 엽록소 감소가 처리 3일 후 40.2%, 처리 6일 후 64.6%로 작게 나타났다(그림 136). 이로 보아 *ATPG4* 유전자의 발현은 국화에서 스트레스 저항성을 증가시킨다고 판단된다.

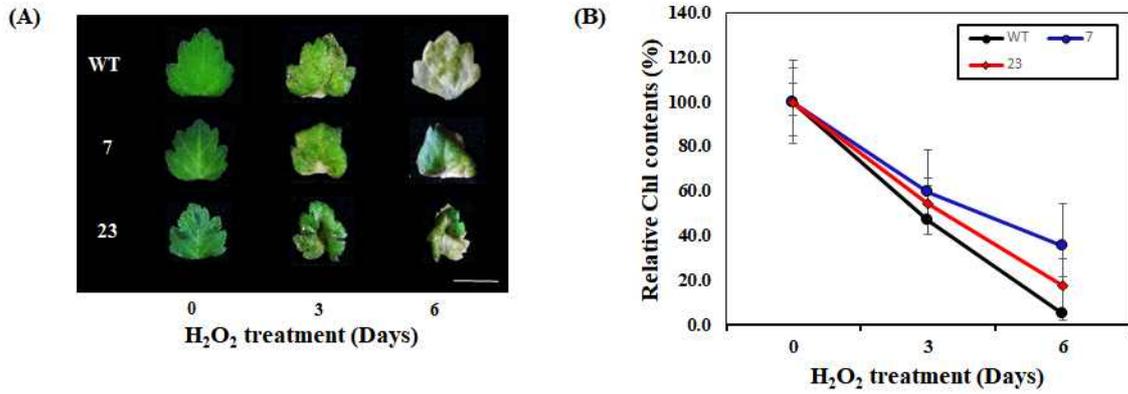


그림 136. *ATPG4* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 산화 스트레스 저항성 분석. (A) 표현형적 특징, (B) 엽록소 함량 변화

© *ATPG6*-형질전환 국화

○ *ATPG6* 유 도입한 형질전환 국화의 생산: *ATPG6* 유전자를 이용하여 국화 '신마'의 *Agrobacterium*-매개 형질전환을 실시하였다. *ATPG6* 유전자를 도입하기 위한 국화 형질전환 실험을 13회에 걸쳐 실시한 결과 1,380개의 절편체에서 재생된 다수의 신초 가운데 체초제 PPT가 포함된 1차 선발배지에서 784개의 신초가 생존되었으며, 2차 선발배지에서 299개, 3차 선발배지에서 정상적으로 발근이 이루어진 14계통의 형질전환 식물체를 생산하였다(그림 137, 표 23).

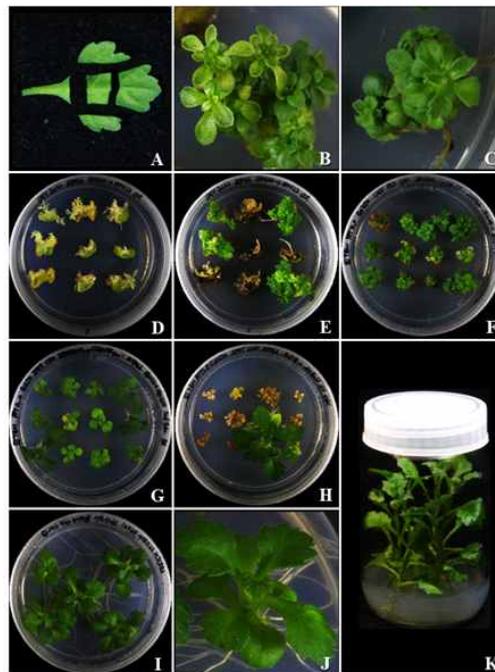


그림 137. *ATPG6* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 선발

표 23. *ATPG6* 유전자 도입 형질전환 국화의 생산

Target gene	No. of experiments	No. of explants	Shoot regeneration (%)	No. of shoots (subcultured on selection medium)			PCR	
				1st	2nd	3rd	<i>bar</i>	<i>ATPG6</i>
<i>ATPG6</i>	1	97	59.8	53	9	0	-	-
	2	108	74.1	80	37	4	3	3
	3	100	75.0	70	33	19	1	1
	4	144	64.6	34	19	19	1	1
	5	123	65.0	71	34	11	1	1
	6	110	67.3	57	10	7	-	-
	7	115	59.1	21	6	3	-	-
	8	141	72.3	73	24	2	1	1
	9	115	89.6	71	55	1	1	1
	10	112	59.8	27	5	1	-	-
	11	99	86.9	83	17	4	1	1
	12	116	83.6	144	50	12	5	5
Total	1,380	71.4	784	299	83	14	14	

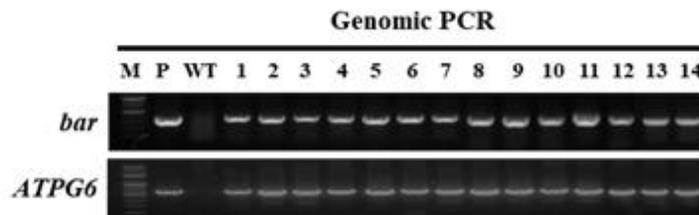


그림 138. *ATPG6* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 유전자 도입 확인. Genomic-PCR analysis for *ATPG6* gene; WT, Wild type; 1-14, transgenic plants

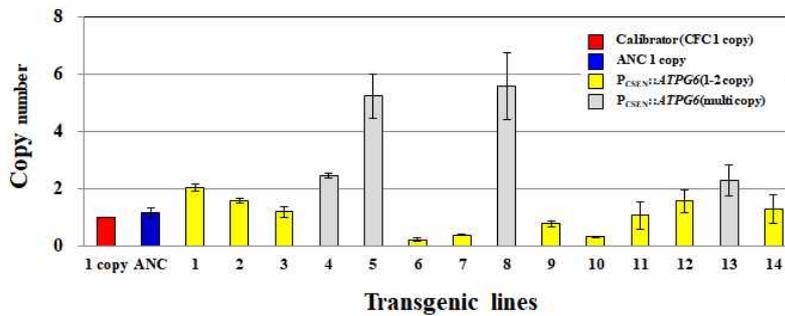


그림 139. *ATPG6* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 도입 유전자 copy 수 분석. qPCR analysis for *ATPG6* gene; 1 copy & ANC, 1 copy transgenic plants used as calculator; 1-14, transgenic plants

○ *ATPG6* 도입한 형질전환 국화의 유전자 도입 확인 및 발현 분석: *ATPG6* 도입 국화 형질 전환을 통해 선발된 14계통을 대상으로 *ATPG6* 유전자와 *bar* 유전자의 genomic-PCR을 실시하였다. 14계통 중 *bar* 유전자와 *ATPG6* 유전자가 모든 계통에서 band가 확인되어, 두 개의 유전자가 모두 도입된 것으로 확인된 14계통을 선발하였다(그림 138). 이어서 *ATPG6*-형질전환 국화 14계통을 대상으로 qPCR을 실시하여 2 copy 이하의 T-DNA가 삽입된 10계

통을 선발하였다(그림 139). 또한 국화 형질전환체에 도입된 *ATPG6* 유전자와 *bar* 유전자의 발현 여부를 확인하고자 RT-PCR을 수행하였는데, *bar*는 9계통에서 발현이 나타났고 *ATPG6* 유전자는 8계통에서 발현이 나타남을 확인하였다(그림 140).

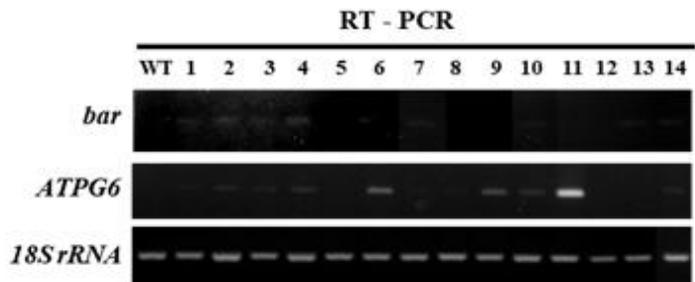


그림 140. *ATPG6* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 유전자 발현 확인. RT-PCR analysis for *ATPG6* gene; WT, Wild type; 1-14, transgenic plants

○ *ATPG6* 도입한 형질전환 국화의 기능 분석: PCR과 RT-PCR 분석을 통하여 *ATPG6* 유전자와 *bar* 유전자의 도입 및 발현이 확인된 *ATPG6*-형질전환 계통을 활착시켜 온실에서 재배하여 성장 및 개화특성을 분석하였다. 온실에서 재배한 *ATPG6*-형질전환 국화 계통은 야생형에 비해 초장, 생체중, 잎 수 등에서 비슷하거나 다소 저조하게 나타났으며, 통상화의 수는 대부분의 형질전환체에서 야생형에 비해 많았다(그림 141, 그림 142). 이로 보아 *ATPG6*-유전자는 애기장대의 결과와는 다르게, 국화에서는 성장 및 개화에 있어 효과가 없는 것으로 판단하였다.



그림 141. *ATPG6* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 온실재배에서 나타난 표현형적 특징

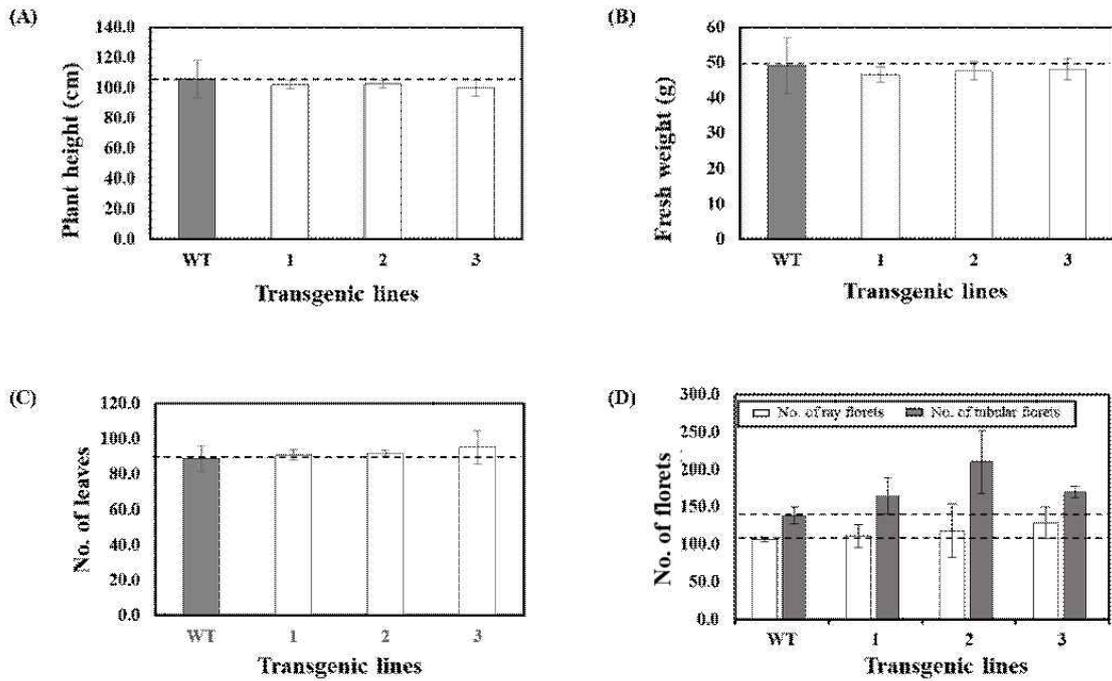


그림 142. *ATPG6* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 성장 및 개화특성 검정. (A) 초장, (B) 생체중, (C) 잎 수, (D) 꽃잎 수(설상화 수와 통상화 수)

○ *ATPG6* 도입한 형질전환체 절화 생리 분석: 수명연장 유전자 *ATPG6* 도입 형질전환 계통의 수명연장 특성을 검정하기 위해 온실에서 개화된 형질전환체의 절화를 채취하여 절화 수명을 분석한 결과, 엽록소의 함량은 저장 2주간 전반적으로 감소하는 경향을 보여주었으며, 형질전환체와 야생형의 엽록소 감소는 거의 차이가 나타나지 않았다(그림 143). 이로 보아 *ATPG6* 유전자는 국화의 절화 수명 연장 효과가 없는 것으로 판단된다.

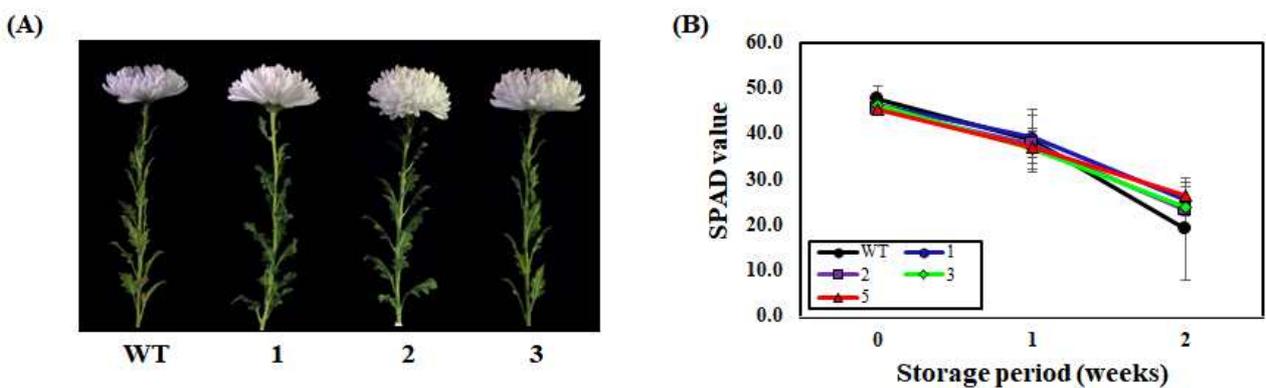


그림 143. *ATPG6* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 절화 생리 검정. (A) 절화의 표현형, (B) 절화 앞의 SPAD value

○ *ATPG6* 유전자를 도입한 형질전환 국화의 스트레스 저항성 분석: 수명연장 유전자 *ATPG6* 도입이 확인된 형질전환 계통을 대상으로 산화 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 3mM MES 용액에 50mM H_2O_2 를 첨가하여 잎을 절단한 후 3일 간격으로 6일 동안 엽록소 간이

측정기를 사용하여 엽록소 함량을 측정한 결과, 엽록소는 모든 절화에서 2주간 거의 시간에 비례하는 감소 경향을 보여주었다. 저장 2주 후 엽록소 함량 감소를 보면, 야생형은 저장 초기 대비 87.9%가 감소하였고, 형질전환 계통들은 56.4-61.3% 감소를 보였다. 이로 보아 형질전환 계통들이 엽록소 감소에 있어 야생형에 비해 다소의 저항성을 보이고 있으나 통계적 유의성은 인정되지 않는 수준이었다(그림 144). 이로 보아 국화에서 *ATPG6* 유전자는 스트레스 저항성을 제공하지 못하는 것으로 판단된다.

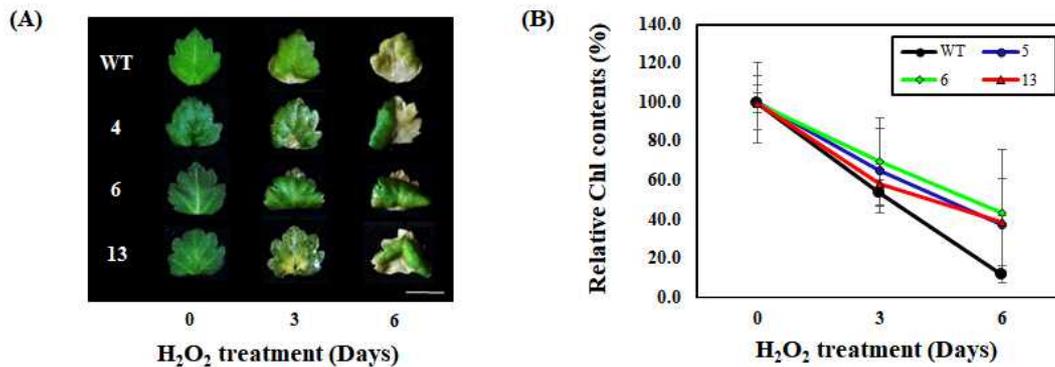


그림 144. *ATPG6* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 산화 스트레스 저항성 분석. (A) 표현형적 특징, (B) 엽록소 함량 변화

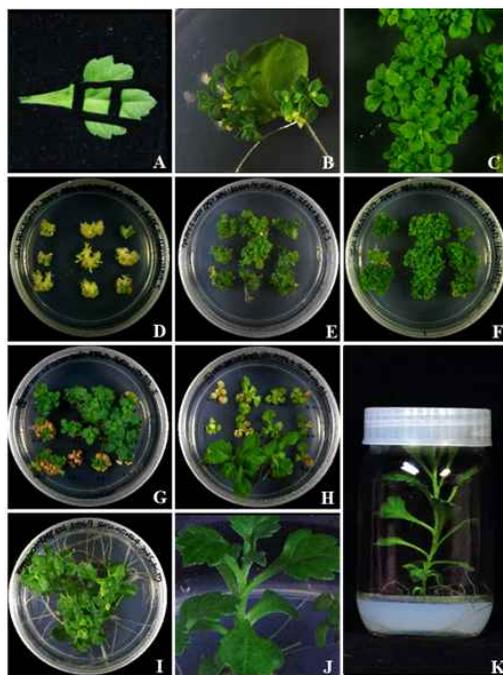


그림 145. *ATPG7* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 선발

④ *ATPG7*-형질전환 국화

○ *ATPG7* 유 도입한 형질전환 국화의 생산: *ATPG7* 유전자를 이용하여 국화 '신마'의 *Agrobacterium*-매개 형질전환을 실시하였다. *ATPG7* 유전자를 도입하기 위한 국화 형질전환 실험을 13회에 걸쳐 실시한 결과 1,459개의 절편체 중 1차 선발배지에 1,561개의 신초가 생존되었으며, 2차 선발배지에서 233개, 3차 선발배지에서는 26계통의 식물체가 제초제 PPT가 포함된 배지에서 정상적으로 성장하였다(그림 145, 표 24).

표 24. *ATPG7* 유전자 도입 형질전환 국화의 생산

Target gene	No. of experiments	No. of explants	Shoot regeneration (%)	No. of shoots (subcultured on selection medium)			PCR	
				1st	2nd	3rd	<i>bar</i>	<i>ATPG7</i>
<i>ATPG7</i>	1	100	96.6	201	4	2	2	1
	2	100	79.0	100	3	2	2	1
	3	104	85.6	195	55	3	3	3
	4	100	85.5	121	4	2	2	2
	5	106	60.4	71	1	0	-	-
	6	101	45.5	83	3	1	1	1
	7	102	78.4	91	12	1	1	1
	8	100	66.0	128	8	3	3	3
	9	104	63.0	74	6	0	-	-
	10	108	81.4	204	88	3	3	2
	11	222	49.1	82	4	2	2	2
	12	104	83.2	111	39	3	3	3
	13	108	73.1	100	6	4	4	4
Total	1,459	78.8	1,561	233	26	26	26	23

○ *ATPG7* 유전자를 도입한 형질전환 국화의 유전자 도입 확인 및 발현 분석: *ATPG7* 도입 국화 형질전환을 통해 선발된 26계통을 대상으로 *ATPG7* 유전자와 *bar* 유전자의 genomic-PCR을 실시하였다. 26계통 중 *bar* 유전자는 모든 계통에서 band가 나타났으나 *ATPG7* 유전자는 23계통에서 band가 확인되어, 두 개의 유전자가 모두 도입된 것으로 확인된 23계통을 선발하였다(그림 146). 이어서 *ATPG7*-형질전환 국화 21계통을 대상으로 qPCR을 실시하여 2 copy 이하의 T-DNA가 삽입된 15계통을 선발하였다(그림 147). 또한 국화 형질전환체에 도입된 *ATPG7* 유전자와 *bar* 유전자의 발현 여부를 확인하고자 RT-PCR을 수행하였는데, 형질전환체 21계통에서 모두 *bar*와 *ATPG7* 유전자의 발현을 확인할 수 있었다(그림 148).

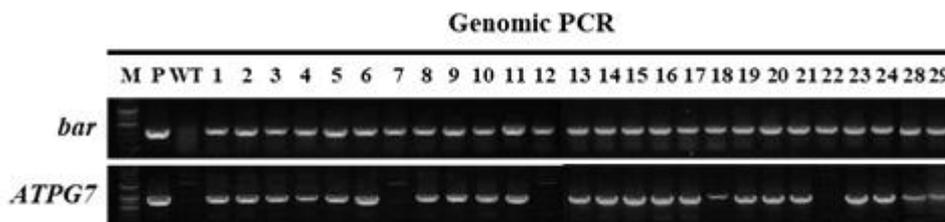


그림 146. *ATPG7* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 유전자 도입 확인. Genomic-PCR analysis for *ATPG7* gene; WT, Wild type; 1-24, transgenic plants

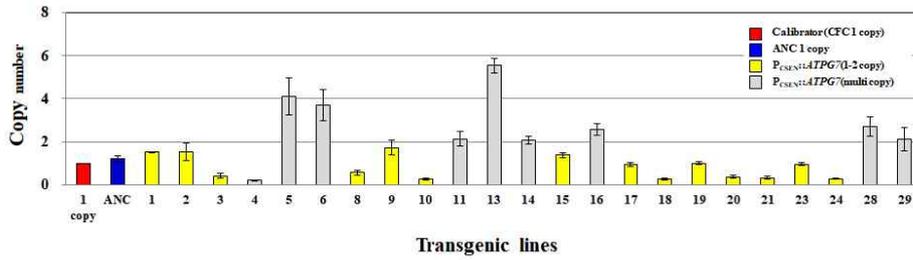


그림 147. *ATPG7* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 도입 유전자 copy 수 분석. qPCR analysis for *ATPG7* gene; ; 1 copy & ANC, 1 copy transgenic plants used as calculator; 1-12, transgenic plants

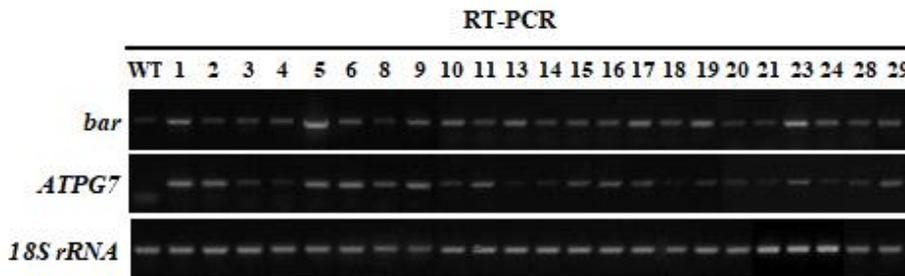


그림 148. *ATPG7* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 유전자 발현 확인. RT-PCR analysis for *ATPG7* gene; WT, Wild type; 1-24, transgenic plants



그림 149. *ATPG7* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 온실재배에서 나타난 표현형적 특징

○ *ATPG7* 도입한 형질전환 국화의 기능 분석: PCR과 RT-PCR 분석을 통하여 *ATPG7* 유전자와 *bar* 유전자의 도입 및 발현이 확인된 *ATPG7*-형질전환 국화 4계통(1번, 2번, 3번, 8번)을 활착시켜 온실에서 재배하여 성장 특성을 분석하였다. 온실에서 재배한 *ATPG7*-형질

전환 1번 계통에서는 생체중과 잎 수에서 야생형에 비해 각각 16.1%, 12.7% 증가하였으며, 나머지 계통은 야생형과 형질전환 계통간의 차이가 인정되지 않았다. 잎수는 1번 계통은 14.5% 증가하였고 나머지 형질전환체는 야생형에 비하여 6.8-10.9% 감소하였다. 설상화 수는 야생형과 형질전환 계통간의 차이가 인정되지 않았으나, 통상화 수는 모든 계통에서 36.5-87.7%로 증가하였다(그림 149, 그림 150).

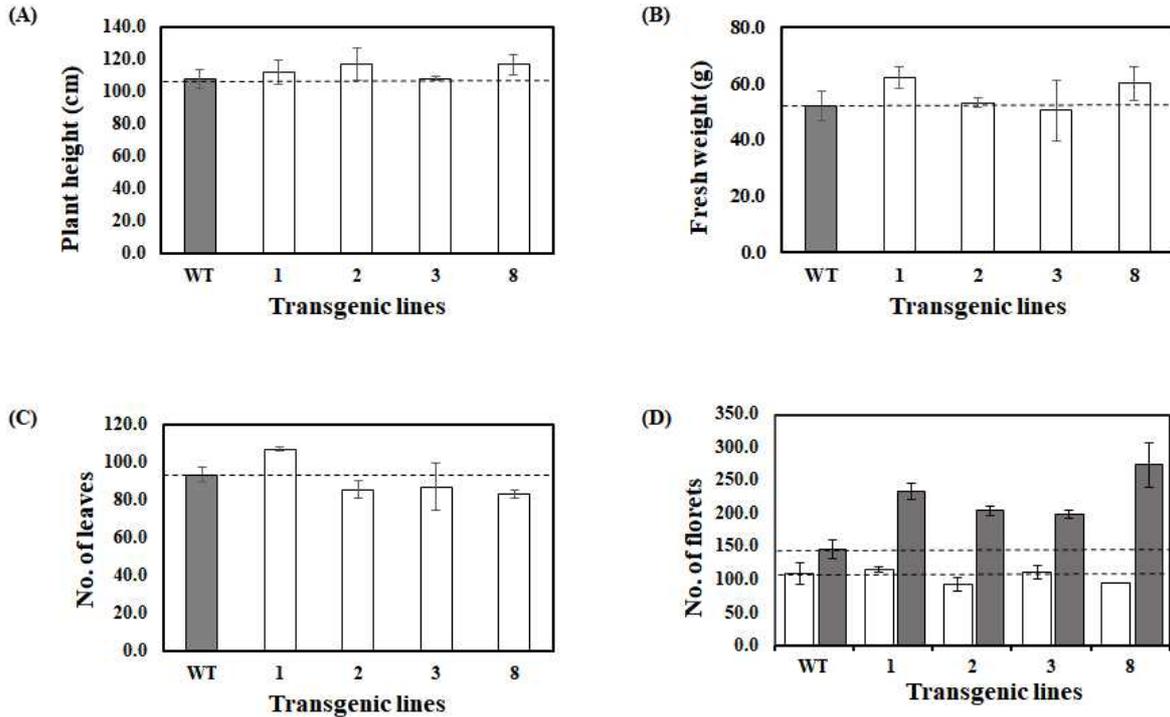


그림 150. *ATPG7* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 성장 및 개화특성 검정. (A) 초장, (B) 생체중, (C) 잎 수, (D) 설상화 및 통상화 수

○ *ATPG7* 도입한 형질전환체의 절화 생리 분석: 수명연장 유전자 도입 *ATPG7* 형질전환 계통의 수명연장 특성을 검정하기 위해 온실에서 재배된 *ATPG7* 도입 국화 형질전환체가 개화하였을 때 꽃을 포함한 줄기 30cm 부분을 절단하여 증류수가 채워진 시험관에 삽화하여 꽃 냉장고에 저장하여 1주 간격으로 절화 수명과 엽록소 함량 변화를 관찰하였다. 저장된 절화는 온도 12°C, 습도 70%, 광도 $22 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 하에서 12시간 광주기 조건의 꽃 냉장고에 저장하였다. 형질전환체 절화의 잎 노화 정도를 검정하기 위해 꽃 냉장고에 저장된 절화를 총 3주간 일주일 간격으로 엽록소 간이 측정기(SPAD-502, Minolta)를 사용하여 엽록소 함량을 측정하였다. 측정 위치는 증류수가 채워진 시험관에서부터 3장의 잎을 선택하여 잎의 주맥을 중심으로 엽맥이 포함되지 않도록 좌, 우 부분을 측정하였다. 절화 저장 1주차 이후부터 엽록소 함량이 감소하기 시작하였다. 2주차부터 대조구는 61.7% 감소한 반면, 1번 계통은 16.7% 감소되었고, 나머지 계통 역시 각 21.8-39.4%로 형질전환 계통은 대조구보다 엽록소가 오래 유지된다는 것을 확인할 수 있었다(그림 151). 이로 보아 *ATPG7* 유전자는 국화 형질전환체에서 녹기 연장 효과를 제공하며, 1번 계통은 녹기 연장 효과가 현저하게 뛰어나고 생장이 야생형에 비해 다소 우수하였기 때문에 절화 수명이 연장된 신품

종으로 육성 가능성이 높다고 판단된다.

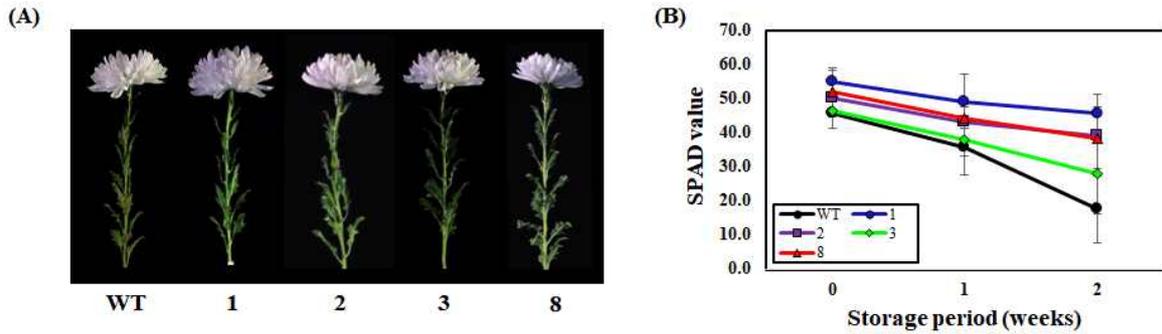


그림 151. *ATPG7* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 절화 생리 검정. (A) 절화의 표현형, (B) 절화 앞의 SPAD value

○ *ATPG7* 도입한 형질전환 국화의 기능 분석: *ATPG7* 유전자 도입이 확인된 형질전환체 3계통을 대상으로 산화적 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 3mM MES 용액에 50mM H_2O_2 를 첨가하여 잎을 절단한 후 3일 간격으로 6일 동안 엽록소 간이 측정기를 사용하여 엽록소 함량을 측정하였다. 3일차부터 엽록소 함량이 급격하게 감소하였으며, 6일차에는 야생형의 엽록소 함량이 92%이상 감소하여 8%만 남았다. 형질전환체에서는 3계통에서 모두 엽록소 함량 감소가 야생형에 비해 현저하게 작게 나타났고, 특히 29번 계통에서는 43.2% 감소하여 초기 대비 56.8%의 엽록소가 남아 있었다(그림 152). 이와 같이 *ATPG7* 유전자가 도입된 국화 형질전환체는 야생형에 비해 높은 산화스트레스 저항성을 보인다는 것을 확인할 수 있었다.

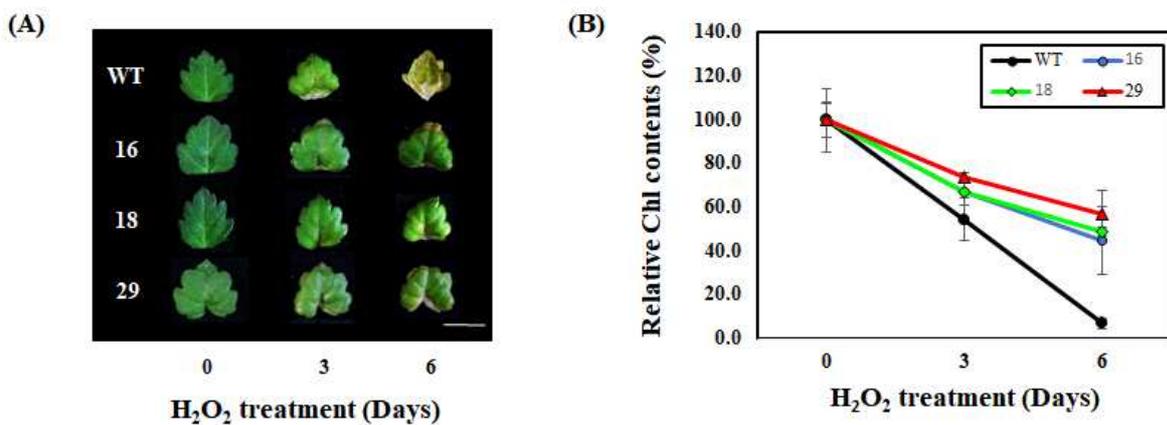


그림 152. *ATPG7* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 산화 스트레스 저항성 분석. (A) 표현형적 특징, (B) 엽록소 함량 변화

㉔ ATPG10-형질전환 국화

○ *ATPG10* 도입한 형질전환 국화의 생산: *ATPG10* 유전자 도입 형질전환 식물체 생산을 위하여 13회에 걸쳐 1,596개의 절편체를 대상으로 형질전환 실험을 실시하였다. 제조제 PPT가 포함된 1차 선발배지에서 787계통의 신초가 재생되었으며, 2차 선발배지에서 140개, 그리고 3차 선발배지에서 신장이 발근이 정상적으로 이루어진 19계통의 형질전환 식물체를 생산하였다(그림 153, 표 25).

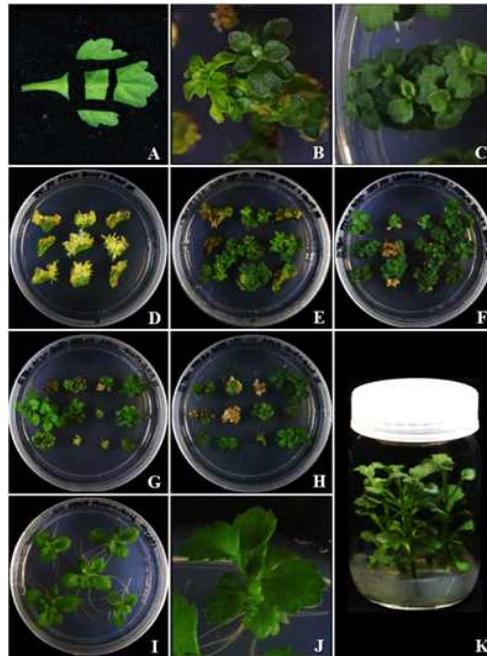


그림 153. *ATPG10* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 선발

표 25. *ATPG10* 유전자 도입 형질전환 국화의 생산

Target gene	No. of experiments	No. of explants	Shoot regeneration (%)	No. of shoots (subcultured on selection medium)			PCR	
				1st	2nd	3rd	<i>bar</i>	<i>ATPG10</i>
<i>ATPG10</i>	1	222	67.1	81	1	1	1	1
	2	150	36.7	82	20	3	1	1
	3	104	51.9	29	1	1	1	1
	4	171	92.9	111	4	1	1	1
	5	108	46.3	8	2	1	1	1
	6	99	46.5	21	4	2	2	2
	7	108	63.9	64	2	2	-	-
	8	108	74.1	49	2	2	1	1
	9	114	86.8	104	31	2	-	-
	10	99	78.8	10	3	1	-	-
	11	106	17.9	14	5	0	-	-
	12	104	61.5	92	36	2	-	-
	13	103	77.7	122	29	1	-	-
Total		1,596	61.7	787	140	19	8	8

○ *ATPG10* 도입한 형질전환 국화의 유전자 도입 확인 및 발현 분석: 수명연장 유전자 *ATPG10* 도입 국화 형질전환을 통해 선발된 19계통 중 8계통을 대상으로 *ATPG10*와 선발 마커유전자 *bar* 도입 여부를 확인하기 위한 genomic-PCR을 실시하여, 두 개의 유전자가 모두 도입된 것으로 확인된 8계통을 선발하였다(그림 154). PCR을 통해 유전자 도입을 확인한 *ATPG10*-형질전환 국화 8계통을 대상으로 유전자의 copy 수를 qPCR을 통하여 확인하였는데, 형질전환 계통간의 다양한 차이를 보여주었고, 2 copy 이하의 T-DNA가 삽입된 7계통을 선발하였다(그림 155). 또한 국화 형질전환체에 도입된 *ATPG10* 유전자의 발현을 확인하고자 8계통을 대상으로 RT-PCR 실험을 수행하였는데, *bar* 유전자와 *ATPG10* 유전자가 모두 8계통에서 발현이 나타났다(그림 156).

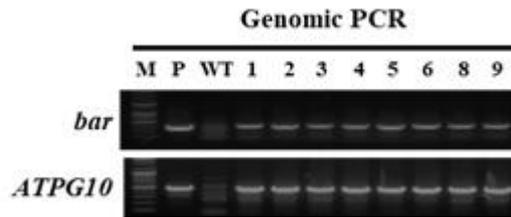


그림 154. *ATPG10* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 유전자 도입 확인. Genomic-PCR analysis for *ATPG10* gene; WT, Wild type; 1-9, transgenic plants

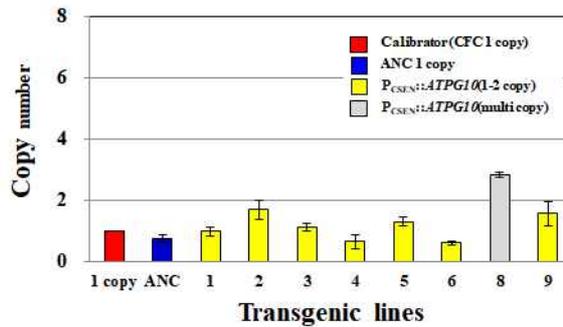


그림 155. *ATPG10* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 도입 유전자 copy 수 분석. qPCR analysis for *ATPG10* gene; 1 copy & ANC, 1 copy transgenic plants used as calculator; 1-9, transgenic plants

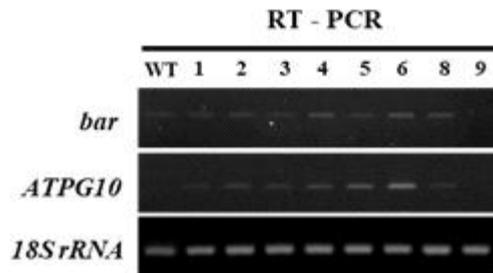


그림 156. *ATPG10* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 유전자 발현 확인. RT-PCR analysis for *ATPG10* gene; WT, Wild type; 1-9, transgenic plants

○ *ATPG10* 도입한 형질전환 국화의 기능 분석: PCR과 RT-PCR을 통해 유전자 도입 및 발현이 확인된 *ATPG10* 유전자 도입 국화 5개 형질전환 계통을 대상으로 온실에서 재배를 통해 개화를 유도한 후 초장, 지상부 생체중, 잎 수, 꽃잎 수(설상화 수 및 통상화 수) 등의 성장 및 개화 특성을 조사하였다. 초장은 야생형에 비하여 모든 형질전환 계통에서 다소 증가하는 것으로 나타났으며, 5번 계통은 11.0%로 가장 크게 증가하였다. 잎 수는 5번 계통에서만 야생형에 비해 11.9% 증가하였다. 생체중은 모든 형질전환 계통에서 상당히 높게 증가하였으며, 특히 2번과 5번 계통에서 야생형에 비해 27.2%와 24.3%로 매우 크게 증가하였다. 또한, 꽃잎 수에 있어서도 설상화의 수는 거의 차이가 없었으나 통상화는 모든 형질전환 계통에서 증가가 이루어졌으며, 2번 계통에서는 설상화 수는 17.0%, 통상화 수는 30.7% 증가하였다(그림 157, 그림 158). 이로 보아 *ATPG10* 유전자는 애기장대에서 나타난 성장량 증대와 유사하게 국화에서는 고성장성 특성을 부여한다고 판단되며, *ATPG10* 형질전환체 5번 계통은 고성장성 신품종으로 개발 가치가 매우 큰 우수계통이라고 생각된다.

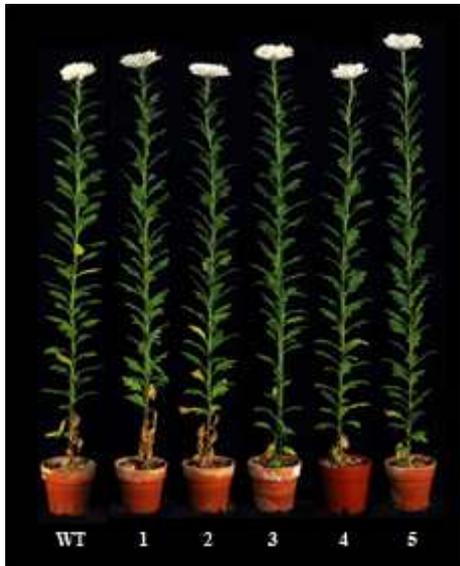


그림 157. *ATPG10* 도입 국화 ‘신마’ 형질전환체의 온실재배에서 나타난 표현형적 특징

○ *ATPG10* 유전자를 도입한 형질전환체의 절화 생리 분석: 수명연장 유전자 *ATPG10* 도입 형질전환 계통의 녹기연장 특성을 검정하기 위해 온실에서 재배하여 개화를 유도한 후 절화를 채취하여 삼수를 만들어 꽃 냉장고에 저장하면서 표현형과 엽록소 함량 변화를 관찰하였다. 야생형은 절화 저장 2주까지 엽록소 함량이 급격하게 감소하여 초기 대비 20% 미만의 엽록소가 남았으나, 형질전환 계통은 놀랍게도 5개 계통 모두 1주 후에 엽록소 함량이 거의 감소되지 않거나 소량의 감소가 있었으며 저장 2주 후에도 20%미만의 감소가 이루어져 절화 초기 대비 80%이상의 엽록소가 유지되었다(그림 159). 이와 같이 *ATPG10* 유전자는 국화에서 녹기 연장 증대에 상당한 효과를 나타냄을 확인하였고, 녹기 연장 효과가 크게 나타난 형질전환 계통 5번은 절화 수명 연장 신품종으로 개발할 수 있는 가능성이 매우 높은 우수계통이라고 판단된다.

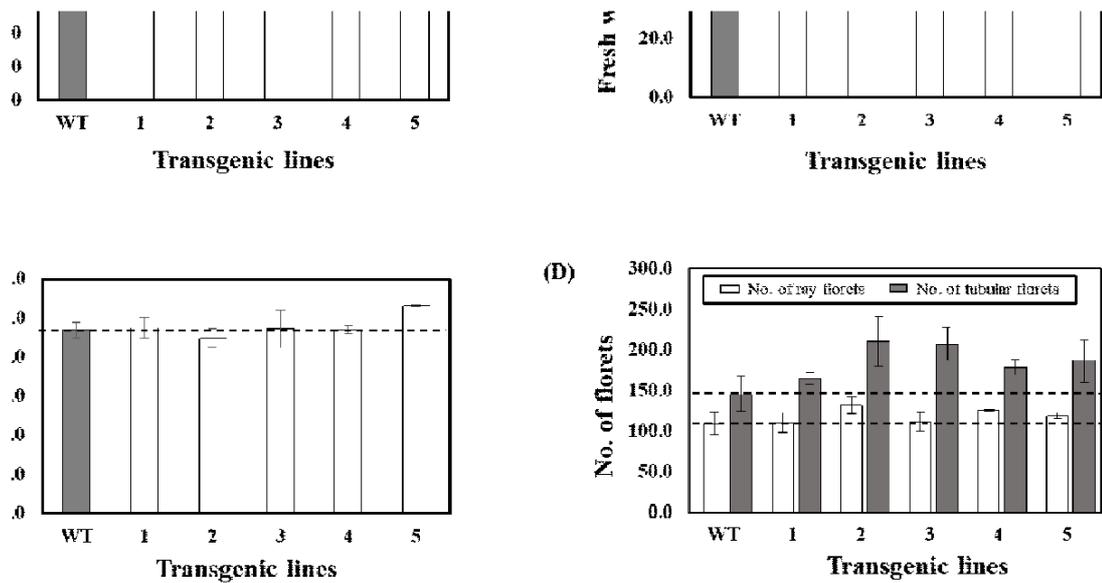


그림 158. *ATPG10* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 성장 및 개화특성 검정. (A) 초장, (B) 생체중, (C) 잎 수, (D) 꽃잎 수(설상화 수와 통상화 수)

그림 159. *ATPG10* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 절화 생리 검정. (A) 절화의 표현형, (B) 절화 앞의 SPAD value

○ *ATPG10* 도입한 형질전환 국화의 스트레스 저항성 분석: *ATPG10* 유전자 도입이 확인된 형질전환체 4계통을 대상으로 산화 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 3mM MES 용액에 50mM H_2O_2 를 첨가하여 잎을 절단한 후 3일 간격으로 6일 동안 엽록소 함량을 측정된 결과, H_2O_2 처리에 따라 야생종과 형질전환 계통 모두에서 급격한 엽록소 감소가 이루어졌다. 6일 후 야생종은 초기 대비 99.1%의 엽록소 감소가 이루어졌으며, 모든 형질전환 계통은 60% 이상의 엽록소 감소가 나타났다. *ATPG10* 형질전환체 5번 계통에서는 65.3%의 엽록소 감소가 이루어져 야생종 대비 엽록소 감소가 33.9% 작게 이루어졌다(그림 160). 이로 보아 *ATHG10* 유전자는 국화에 있어서 산화 스트레스 저항성을 증가시킬 수 있다고 판단된다.

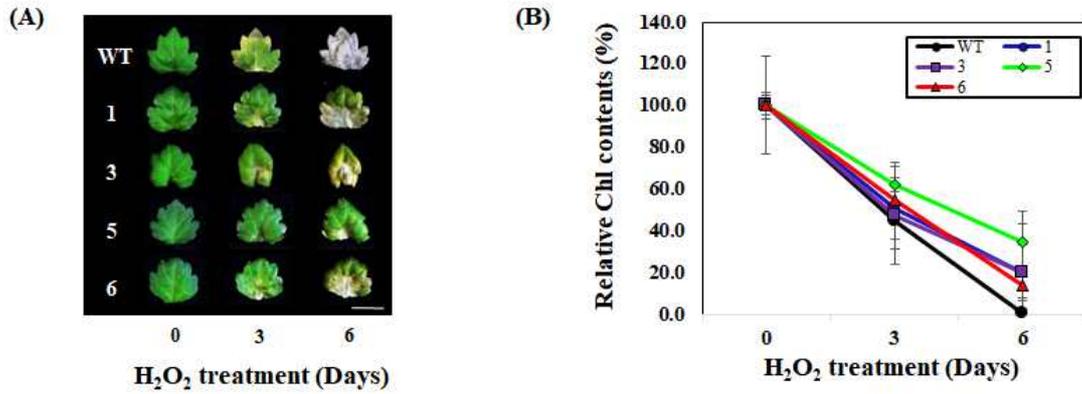


그림 160. *ATPG10* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 산화 스트레스 저항성 분석. (A) 표현형적 특징, (B) 엽록소 함량 변화

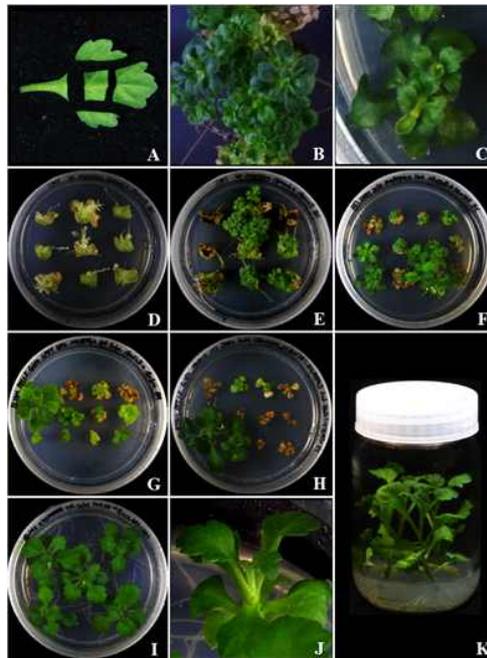


그림 161. *MtATPG3* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 선발

㉞ *MtATPG3*-형질전환 국화

○ *MtATPG3* 도입한 형질전환 국화의 생산: *Medicago truncatula*의 AT-hook DNA-binding protein 3를 암호화하는 *MtATPG3* 유전자 도입 형질전환 식물체를 생산하고자 형질전환 실험을 수행하였다. 11회에 걸쳐 실시한 형질전환 실험을 실시하였는데, 1,210개의 절편체로부터 선발용 제초제 PPT가 포함된 1차 선발배지에서 782계통의 신초가 재생되었으며, 2차 선발배지에서 253개, 그리고 3차 선발배지에서 생존한 계통중 정상적으로 신장과 발근이 이루어진 11계통의 형질전환 식물체를 생산하였다(그림 161, 표 26).

표 26. *MtATPG3* 유전자 도입 형질전환 국화의 생산

Target gene	No. of experiments	No. of explants	Shoot regeneration (%)	No. of shoots (subcultured on selection medium)			PCR	
				1st	2nd	3rd	<i>bar</i>	<i>MtATPG3</i>
<i>MtATPG3</i>	1	162	69.1	165	47	12	2	2
	2	51	41.1	9	7	3	-	-
	3	101	56.4	36	4	0	-	-
	4	112	67.9	78	22	10	1	1
	5	119	83.2	107	44	15	2	2
	6	107	67.3	59	20	5	2	2
	7	103	59.2	55	46	5	2	2
	8	129	69.0	75	20	4	1	1
	9	122	87.7	74	0	0	-	-
	10	99	84.8	117	43	3	1	1
	11	105	63.8	7	0	0	-	-
Total		1,210	68.1	782	253	57	11	11

○ *MtATPG3* 도입한 형질전환 국화의 유전자 도입 확인 및 발현 분석: 제조제 PPT가 포함된 배지에서 정상적으로 발근된 형질전환체 11계통을 대상으로 genomic-PCR을 통하여 *bar*와 *MtATPG3* 유전자의 도입 여부를 확인하여 *MtATPG3*와 *bar* 유전자 band가 모두 나타난 11개의 형질전환 계통을 선발하였다(그림 162). 이어서 유전자 도입이 확인된 11계통의 qPCR 검정을 통하여 11개 형질전환 계통 중 8개 형질전환 계통에서 copy 수가 2개 이하로 적은 T-DNA copy가 도입된 것으로 판단된다(그림 163). 또한, *MtATPG3* 유전자와 *bar* 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여 형질전환체 11계통의 RT-PCR을 실시하였는데, *MtATPG3* 유전자는 3개 계통을 제외한 8개 계통에서 발현이 나타났으나 *bar* 유전자는 4개 계통을 제외한 7계통에서 발현을 확인할 수 있었다(그림 164).

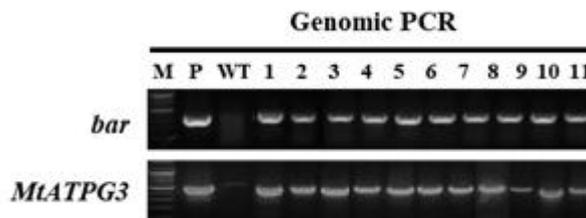


그림 162. *MtATPG3* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 유전자 도입 확인. Genomic-PCR analysis for *MtATPG3* gene; WT, Wild type; 1-11, transgenic plants

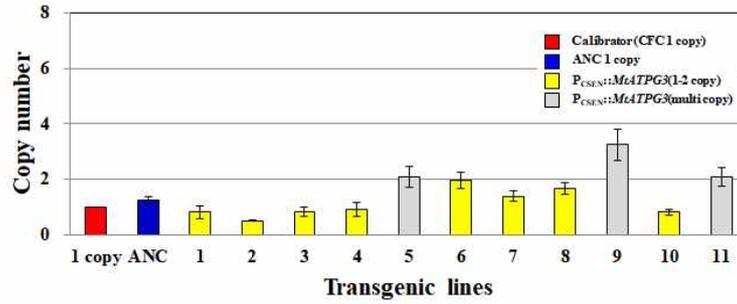


그림 163. *MtATPG3* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 도입 유전자 copy 수 분석. qPCR analysis for *MtATPG3* gene; 1 copy & ANC, 1 copy transgenic plants used as calculator; 1-11, transgenic plants

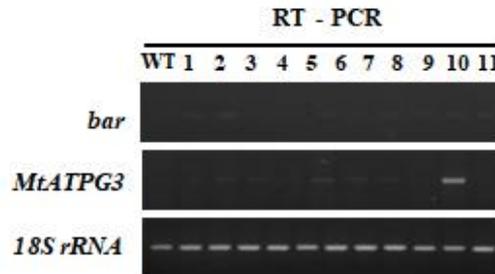


그림 164. *MtATPG3* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 유전자 발현 확인. RT-PCR analysis for *MtATPG3* gene; WT, Wild type; 1-11, transgenic plants



그림 165. *MtATPG3* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 온실재배에서 나타난 표현형적 특징

○ *MtATPG3* 도입한 형질전환 국화의 기능 분석: PCR과 RT-PCR을 통해 유전자 도입 및 발현이 확인된 *MtATPG3* 유전자 도입 국화 2개 형질전환 계통을 온실에서 재배하여 개화를 유도한 후 초장, 지상부 생체중, 잎 수, 설상화 및 통상화 수 등의 성장 및 개화 특성을 조사하였다. 야생형과 비교하여 형질전환체는 초장, 생체중, 잎 수, 설상화 수에 있어서 유

의성 있는 차이를 보여주지 못하였으며, 통상화 수에서만 차이를 보여주었다(그림 165, 166). 이로 보아 *MtATPG3* 유전자는 애기장대에서 검증된 바와 같은 생산성 증대 효과를 국화에서는 부여하지 못하는 것으로 판단된다.

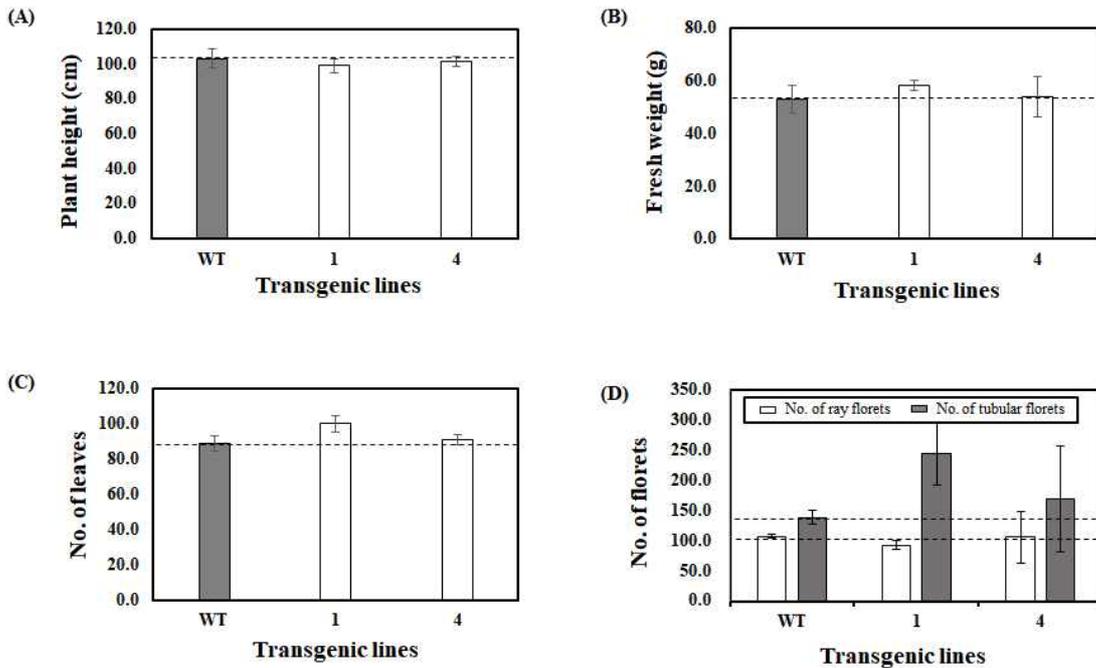


그림 166. *MtATPG3* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 성장 및 개화특성 검정. (A) 초장, (B) 생체중, (C) 잎 수, (D) 꽃 잎 수(설상화 수와 통상화 수)

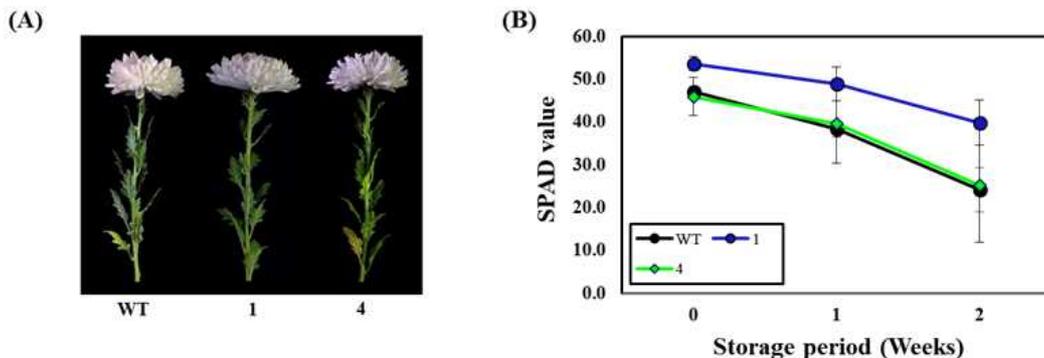


그림 167. *MtATPG3* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 절화 생리 검정. (A) 절화의 표현형, (B) 절화 앞의 SPAD value

○ *MtATPG3* 도입한 형질전환체 절화 생리 분석: *Medicago truncatula*의 *MtATPG3* 도입 형질전환 계통의 노화지연 특성을 검정하기 위해 온실에서 재배된 *MtATPG3* 도입 국화 형질전환체가 개화하였을 때, 절화를 채취하여 꽃 냉장고에 저장하면서 표현형과 엽록소 함량 변화를 관찰하였다. 절화 저장 1주 후 엽록소 함량이 점차 감소하기 시작하였고, 2주 후에는 엽록소 함량 감소 폭이 다소 증가하였다. 그러나 표현형과 엽록소 함량 감소에 있어서 야생종과 형질전환 계통간의 차이는 없는 것으로 나타났다(그림 167). 이로 보아 *MtATPG3* 는 국화에서 노화지연 효과를 나타내지 못하는 것으로 판단된다.

○ *MtATPG3* 도입한 형질전환 국화의 스트레스 저항성 분석: *MtATPG3* 유전자 도입이 확인된 형질전환체 2계통을 대상으로 산화 스트레스에 대한 저항성을 알아보기 위하여 50mM H₂O₂ 처리를 실시하여 경시적으로 엽록소 함량 변화를 조사하였다. 야생형과 형질전환체 모두 3일 후부터 6일까지 엽록소 함량이 급격히 감소하는 것으로 나타났으며, 처리 6일 후 야생형에서는 초기 대비 84.7%의 엽록소 감소가 이루어졌다. 형질전환체에서는 야생형에 비해 다소 감소 폭이 적었으나 통계적 유의성은 없었다(그림 168). 이로 보아 *MtATPG3* 유전자는 국화에서 산화스트레스 저항성을 부여하지 못하는 것으로 판단된다.

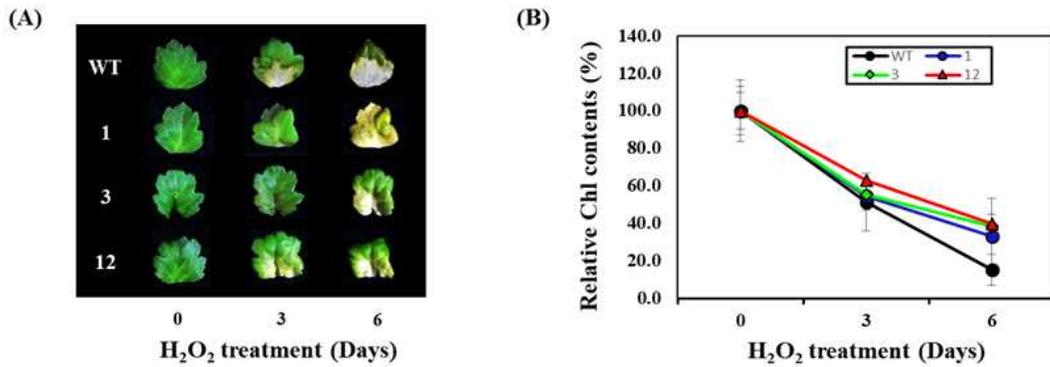


그림 168. *MtATPG3* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 산화 스트레스 저항성 분석. (A) 표현형적 특징, (B) 엽록소 함량 변화

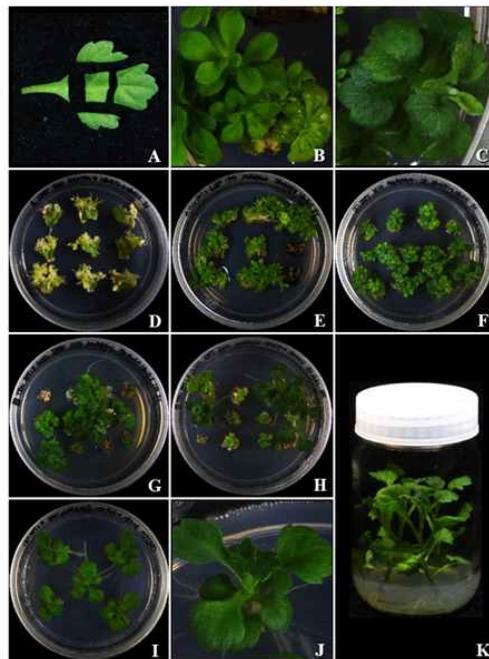


그림 169. *MtATPG4* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 선발

㉔ MtATPG4-형질전환 국화

○ *MtATPG4* 도입한 형질전환 국화의 생산: *MtATPG4* 유전자를 도입한 형질전환 식물체를 생산하고자 형질전환 실험을 수행하였다. 현재 11회에 걸쳐 1,116개의 절편체를 대상으로 형질전환 실험을 실시하였으며, 3회에 걸친 선발 과정을 거쳐 선발용 제조제가 포함된 배지에서 생존한 계통들 가운데 정상적으로 신장과 발근이 이루어진 12개 계통을 선발하였다(그림 169, 표 27).

표 27. *MtATPG4* 유전자 도입 형질전환 국화의 생산

Target gene	No. of experiments	No. of explants	Shoot regeneration (%)	No. of shoots (subcultured on selection medium)			PCR	
				1st	2nd	3rd	<i>bar</i>	<i>MtATPG4</i>
<i>MtATPG4</i>	1	98	72.4	87	44	3	1	1
	2	101	73.3	93	39	2	2	2
	3	104	74.0	89	22	2	2	2
	4	101	68.3	76	29	5	2	2
	5	99	64.6	84	31	4	1	1
	6	53	37.7	14	5	3	1	1
	7	99	48.5	22	0	0	-	-
	8	87	46.0	26	15	4	1	1
	9	150	81.3	92	41	20	1	1
	10	120	76.7	104	58	14	1	1
	11	104	65.4	99	8	3	-	-
Total	1,116	64.4	786	292	60	12	12	

○ *MtATPG4* 유전자를 도입한 형질전환 국화의 유전자 도입 확인 및 발현 분석: 제조제 PPT가 포함된 배지에서 정상적으로 발근된 형질전환체 12계통을 대상으로 genomic-PCR을 통하여 *bar*와 *MtATPG4* 유전자의 도입 여부를 확인하여 *MtATPG4*와 *bar* 유전자 band가 모두 나타난 11개의 형질전환 계통을 선발하였다(그림 170). 이어서 유전자 도입이 확인된 12계통의 qPCR 검정을 통하여 11개 형질전환 계통 중 8개 형질전환 계통에서 copy 수가 2개 이하로 적은 T-DNA copy가 도입된 것으로 판단된다(그림 171). 또한, *MtATPG4* 유전자와 *bar* 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여 형질전환체 12계통의 RT-PCR을 실시하였는데, *MtATPG4* 유전자는 11개 계통에서 발현이 나타났으나 *bar* 유전자는 1개 계통을 제외한 10계통에서 발현을 확인할 수 있었다(그림 172).

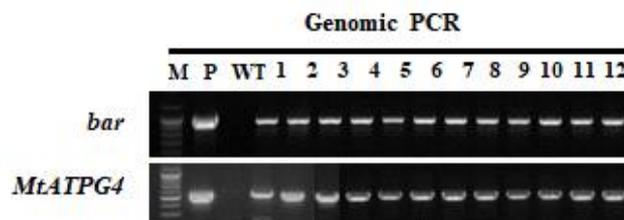


그림 170. *MtATPG4* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 유전자 도입 확인. Genomic-PCR analysis for *MtATPG4* gene; WT, Wild type; 1-12, transgenic plants

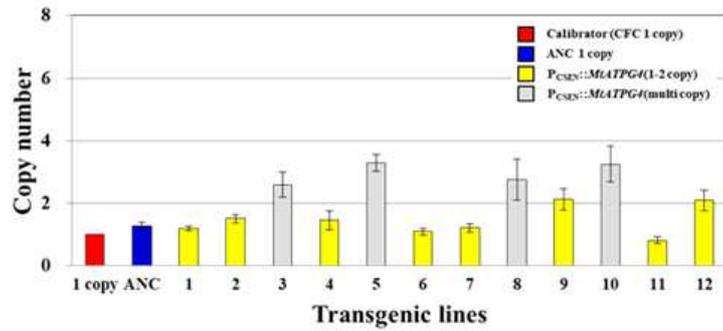


그림 171. *MtATPG4* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 도입 유전자 copy 수 분석. qPCR analysis for *MtATPG4* gene; 1 copy & ANC, 1 copy transgenic plants used as calculator; 1-12, transgenic plants

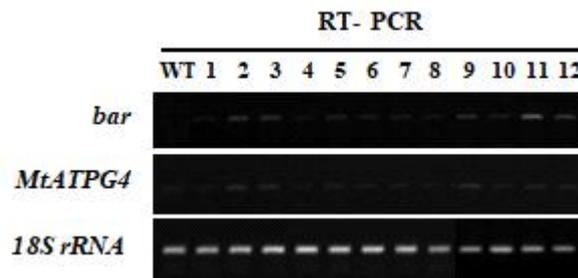


그림 172. *MtATPG4* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 유전자 발현 확인. RT-PCR analysis for *MtATPG4* gene; WT, Wild type; 1-12, transgenic plants



그림 173. *MtATPG4* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 온실재배에서 나타난 표현형적 특징

○ *MtATPG4* 도입한 형질전환 국화의 기능 분석: PCR과 RT-PCR을 통해 유전자 도입 및 발현이 확인된 *MtATPG4* 유전자 도입 국화 형질전환체 3계통을 온실에서 재배하여 개화를

유도한 후 초장, 지상부 생체중, 잎 수, 설상화 및 통상화 수 등의 성장 및 개화 특성을 조사하였다. 야생형과 비교하여 형질전환체는 초장, 생체중, 잎 수, 설상화 수에 있어서 거의 차이가 나타나지 않았으며, 일부 형질전환 계통에서 통상화 수가 증가하였다(그림 173, 그림 174). 이로 보아 *MtATPG4* 유전자 도입 국화 형질전환체는 성장과 개화에 있어 거의 효과가 없었다고 할 수 있다.

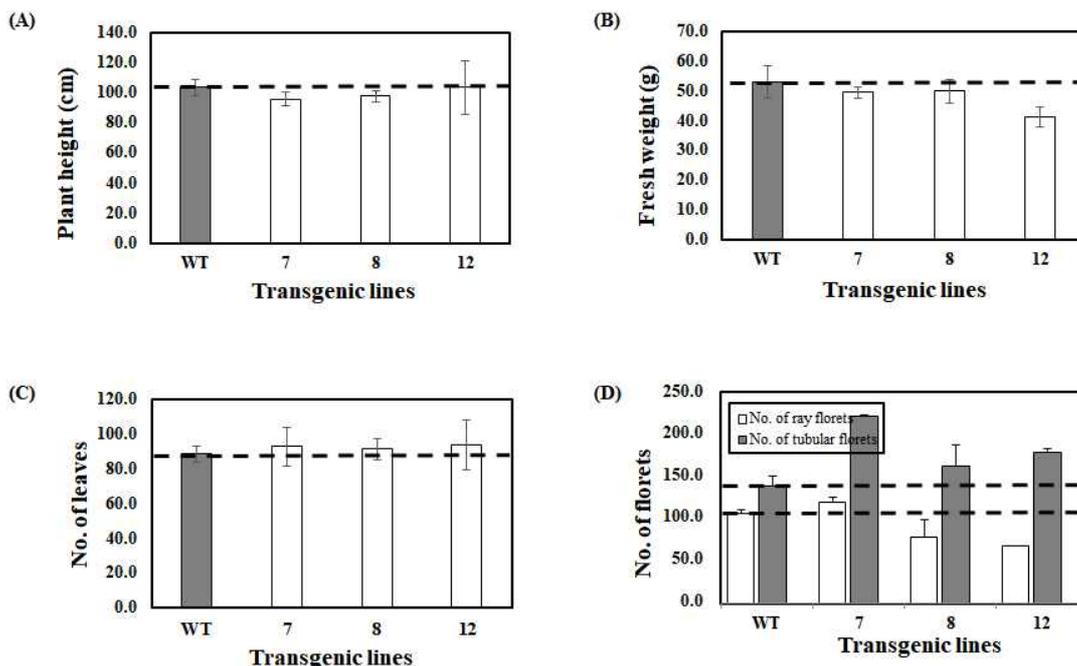


그림 174. *MtATPG4* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 성장 및 개화특성 검정. (A) 초장, (B) 생체중, (C) 잎 수, (D) 설상화 및 통상화 수

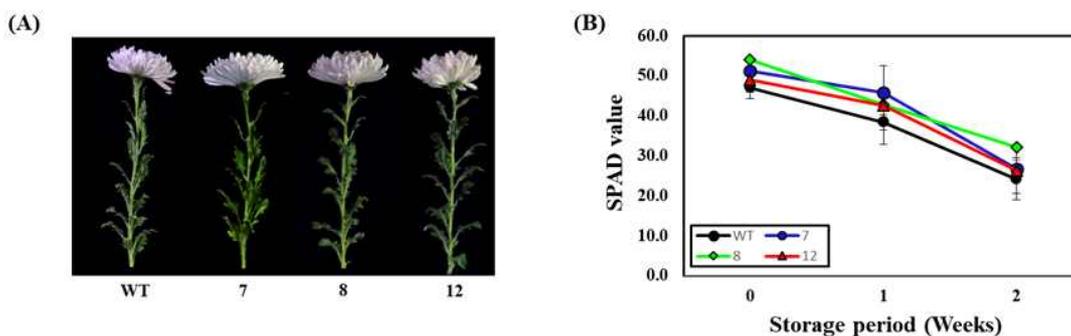


그림 175. *MtATPG4* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 절화 생리 검정. (A) 절화의 표현형, (B) 절화 앞의 SPAD value

○ *MtATPG4* 도입한 형질전환체의 절화 생리 분석: *MtATPG4* 유전자 도입 형질전환 계통의 노화지연 특성을 검정하기 위해 온실에서 재배하여 개화하였을 때, 절화를 채취하여 꽃냉장고에 저장하면서 표현형과 엽록소 함량 변화를 관찰하였다. 절화 저장 1주 후 엽록소 함량이 점차 감소하기 시작하였고, 2주 후에는 엽록소 함량 감소가 다소 크게 나타났다. 그

러나 표현형과 엽록소 함량 감소에 있어서 야생종과 형질전환 계통간에 거의 차이가 없었다(그림 175). 이로 보아 *MtATPGA*는 국화에서 노연지연 효과가 없다고 보여진다.

○ *MtATPGA* 도입한 형질전환 국화의 스트레스 저항성 분석: *MtATPGA* 유전자 도입이 확인된 형질전환체 2계통의 잎을 재료로 하여 H₂O₂ 처리를 통해 산화 스트레스에 대한 저항성을 알아보고자 표현형과 엽록소 함량 변화를 조사하였을 때, 야생형과 형질전환체 모두 3일 후부터 6일까지 엽록소 함량이 급격히 감소하는 것으로 나타났다. 처리 6일 후 야생형에서는 초기 대비 80%에 가까운 엽록소 함량 감소가 이루어졌으며, 이러한 변화 양상은 형질전환체에서도 유사하게 나타났을 뿐만 아니라 야생종과 형질전환체 사이의 크지 않았다(그림 176). 이로 보아 *MtATPGA* 유전자는 국화에서 산화스트레스 저항성을 부여하지 못하는 것으로 판단된다.

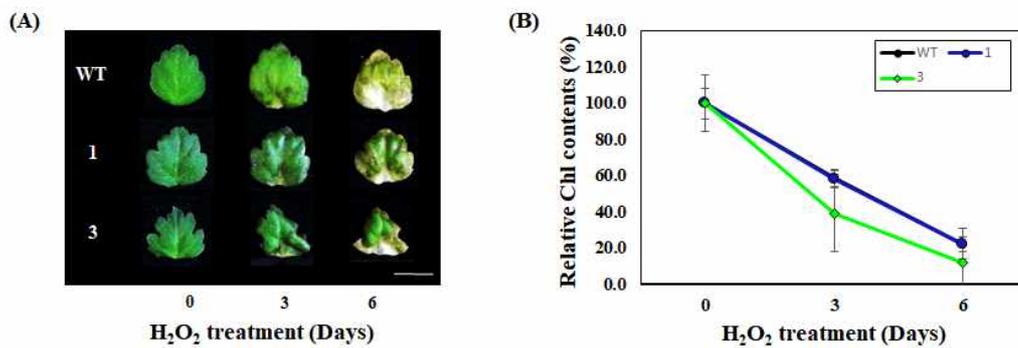


그림 176. *MtATPGA* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 산화 스트레스 저항성 분석. (A) 표현형적 특징, (B) 엽록소 함량 변화

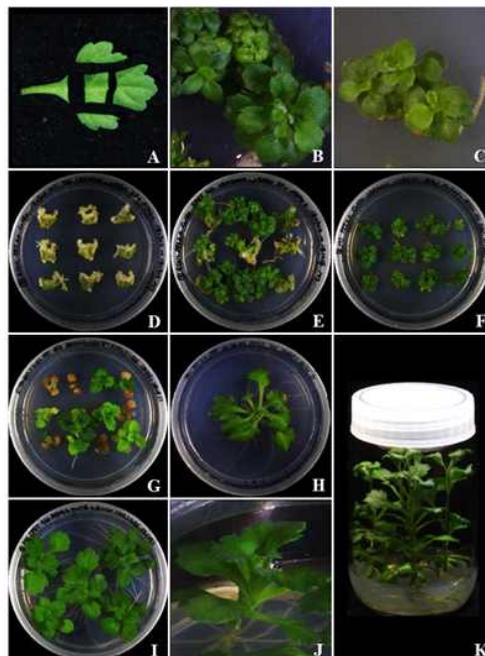


그림 177. *AHL26* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 선발

㉞ *AHL26* 형질전환 국화

○ *AHL26* 도입한 형질전환 국화의 생산: *AHL26* 유전자를 도입한 형질전환 식물체를 생산하고자 형질전환 실험을 수행하였다. 8회에 걸쳐 725개의 절편체를 대상으로 형질전환 실험을 실시하였으며, PPT가 포함된 1차 선발배지에서 438개가 생존하였고, 2차 선발배지에서 103개, 3차 선발배지에서 16개의 생존하였다. 총 3회에 걸친 선발과정을 통하여 정상적인 생장을 보이는 13개의 형질전환 식물체를 생산하였다(그림 177, 그림 표 28).

표 28. *AHL26* 유전자 도입 형질전환 국화의 생산

Target gene	No. of experiments	No. of explants	Shoot regeneration (%)	No. of shoots (subcultured on selection medium)			PCR	
				1st	2nd	3rd	<i>bar</i>	<i>AHL26</i>
<i>AHL26</i>	1	50	50.0	27	15	1	1	1
	2	50	86.0	48	13	1	1	1
	3	100	55.0	20	7	2	2	2
	4	114	71.0	30	11	2	2	2
	5	90	94.0	120	22	5	2	2
	6	119	21.0	25	6	3	3	3
	7	101	80.2	91	19	1	1	1
	8	101	59.4	77	10	1	2	2
Total		725	64.6	438	103	16	13	13

○ *AHL26* 유전자를 도입한 형질전환 국화의 유전자 도입 확인 및 발현 분석: 제초제 PPT가 포함된 배지에서 정상적으로 발근된 형질전환체 13계통을 대상으로 *bar*와 *AHL26* 유전자의 도입 여부를 확인하여 *AHL26*와 *bar* 유전자 band가 모두 나타난 13개의 형질전환 계통을 선발하였다(그림 178). 이어서 유전자 도입이 확인된 13계통의 qPCR 검정을 통하여 13개 형질전환 계통 중 8개 형질전환 계통에서 copy 수가 2개 이하로 적은 T-DNA copy가 도입된 것으로 판단된다(그림 179). 또한, *AHL26* 유전자와 *bar* 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여 형질전환체 13계통의 RT-PCR을 실시하였는데, *AHL26* 유전자는 1개 계통을 제외한 7개 계통에서 발현이 나타났으나 *bar* 유전자는 3개 계통을 제외한 5계통에서 발현을 확인할 수 있었다(그림 180).



그림 178. *AHL26* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 유전자 도입 확인. Genomic-PCR analysis for *AHL26* gene; WT, Wild type; 1-13, transgenic plants

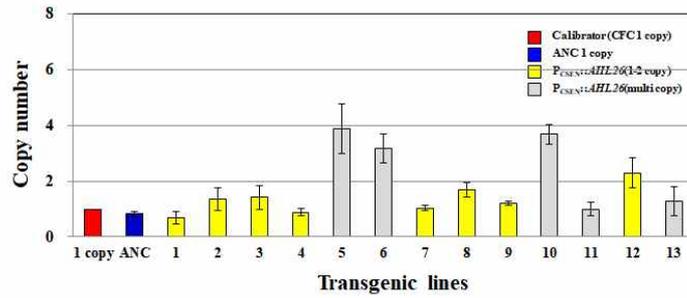


그림 179. *AHL26* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 도입 유전자 copy 수 분석. qPCR analysis for *AHL26* gene; 1 copy & ANC, 1 copy transgenic plants used as calculator; 1-13, transgenic plants

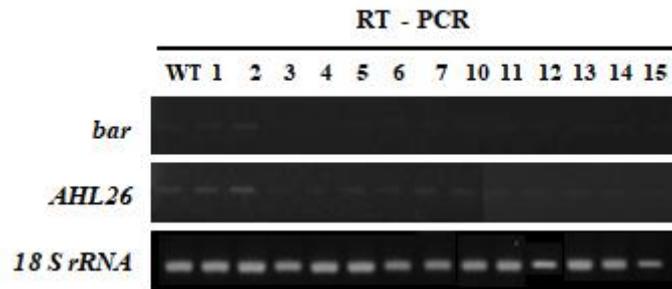


그림 180. *AHL26* 유전자가 도입된 형질전환 국화의 유전자 발현 확인. RT-PCR analysis for *AHL26* gene; WT, Wild type; 1-13, transgenic plants

○ *AHL26* 도입한 형질전환 국화의 기능 분석: *AHL26* 유전자 도입 및 발현이 확인된 국화 형질전환체 3계통을 온실에서 재배하여 개화를 유도한 후 성장 및 개화 특성을 조사한 결과, 야생형과 비교하여 형질전환체는 초장, 생체중, 잎 수, 설상화 수와 통상화 수에 있어서 거의 차이가 나타나지 않았다(그림 181, 그림 182). 이로 보아 *AHL26* 유전자는 국화 형질전환체에서 성장과 개화에 영향을 나타나지 못한다고 판단된다.



그림 181. *AHL26* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 온실재배에서 나타난 표현형적 특징

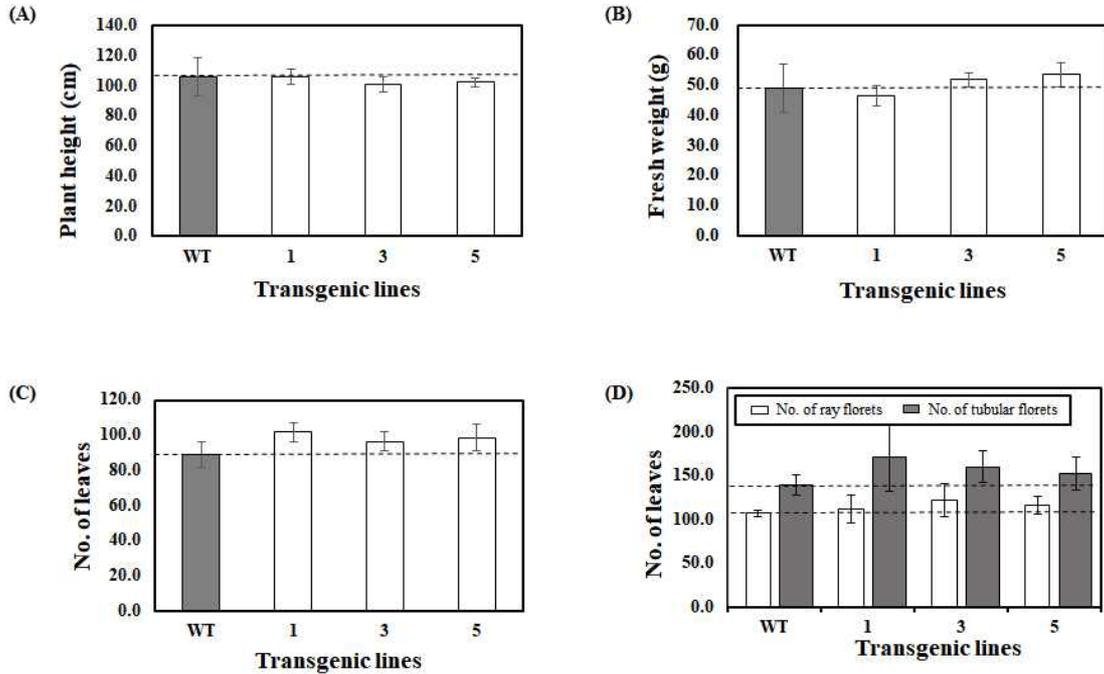


그림 182. *AHL26* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 성장 및 개화특성 검정. (A) 초장, (B) 생체중, (C) 잎 수, (D) 설상화 및 통상화 수

○ *AHL26* 도입한 형질전환체의 절화 생리 분석: *AHL26* 유전자 도입 형질전환 계통의 노화 지연 특성을 검정하기 위해 온실에서 재배하여 개화하였을 때, 절화를 채취하여 꽃 냉장고에 저장하면서 표현형과 엽록소 함량 변화를 조사하였다. 절화 저장 2주간 엽록소 함량이 지속적으로 비슷한 속도로 이루어지는 경향을 보여주었는데, 야생종과 형질전환 계통간에 거의 차이가 보이지 않았다(그림 183). 이로 보아 *AHL26* 유전자는 국화에서 노화 지연 효과가 없는 것으로 판단된다.

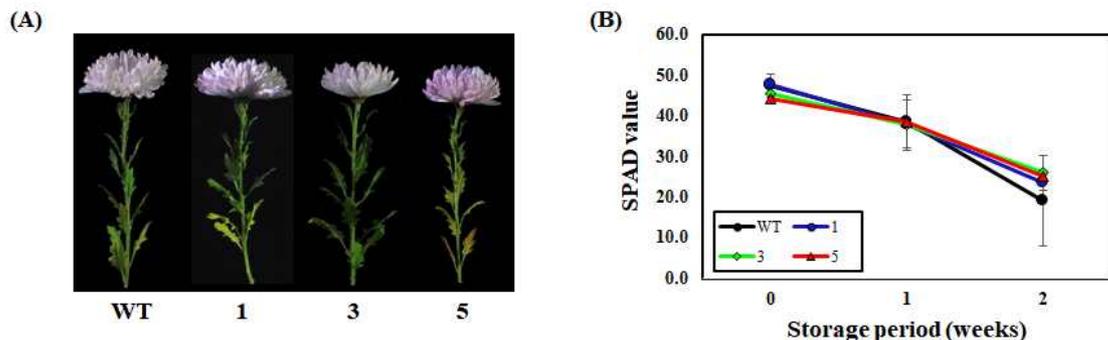


그림 183. *AHL26* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 절화 생리 검정. (A) 절화의 표현형, (B) 절화 앞의 SPAD value

○ *AHL26* 유전자를 도입한 형질전환 국화의 스트레스 저항성 분석: *AHL26* 유전자 도입이 확인된 형질전환체 1계통의 잎의 H_2O_2 처리를 통해 산화 스트레스에 대한 저항성을 알아보고자

표현형과 엽록소 함량 변화를 조사하였을 때, 야생형과 형질전환체 모두 3일 후부터 6일까지 엽록소 함량이 급격히 감소하는 경향을 보여주었으며, 야생형과 형질전환체 사이의 차이는 거의 없는 것으로 나타났다(그림 184). 이로 보아 *AHL26* 유전자는 국화에서 산화스트레스 저항성 증진 효과를 나타내지 못한다고 판단된다.

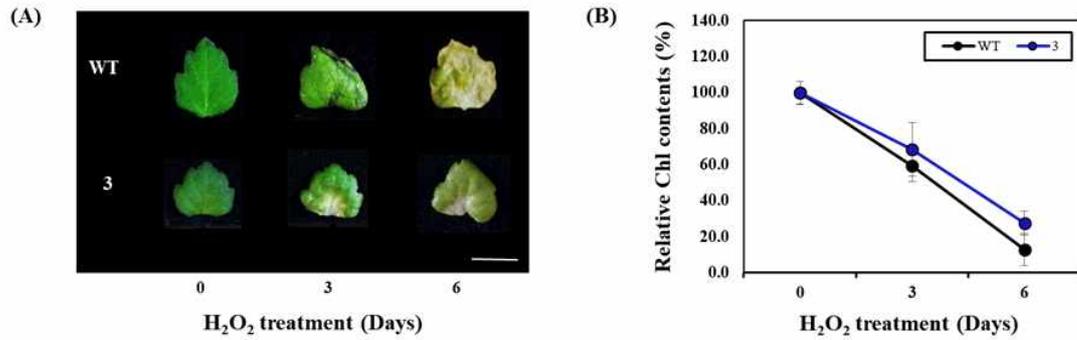


그림 184. *AHL26* 도입 국화 '신마' 형질전환체의 산화 스트레스 저항성 분석. (A) 잎의 표현형, (B) 엽록소 함량 변화

(3) SUMMARY

형질전환 라인 개발 및 우수계통 선발 요약:

유전자	구분	은실 식물체 성장			절화 및 엽록소 합량	스트레스 저항성 산화 스트레스	종합	
		초장	생체중	잎수			기능분석	우량 계통 선발
ORE15	전체		+++		+++	+++		고성장(#4)/ 녹기연장(#4)/ 스트레스저항성 -#4는 생체중이 26.7% 증가하여 고성장성이 면서, 녹기연장 효과 가 매우 크게 나타 나, 두가지 기능이 뛰어난 우수계통으 로 선발 -#9,#13계통은 스트레 스저항성이 크지만, 생장이 불량하여 우 량계통으로 선발 불 가
	우수계통		#4 +++		#4 +++	#9 +++ #13 +++		
	우수계통 야생종 대비 개선도(%)	#4 6.9% #9 -35.7% #13 -4.8%	#4 26.7% #9 -40.8% #13 -10.6%	#4 14.4%	#4 42.8%	#9 38.7% #13 30.6%		
ATPG4	전체		+++		+++			고성장성(#7)/ 녹기연장(#11) -#7은 생체중이 24.6% 증가하였으나, 초장 과 잎수가 감소하여 우량계통으로 선발 불가 -#11은 녹기연장 효과 가 매우 크고, 생장 이 다소 증가하여 녹 기연장 우량 형질전 환 라인으로 선발
	우량 형질전 환 계통		#7 +++	#11 +++	#11 +++	#7 ++		
	우량 형질전 환 계통 야 생종 대비 개선도(%)	#7 -12.2% #11 4.9% #19 -4.2%	#7 24.6% #11 13.5% #19 13.2%	#7 - 4.2%	#11 43.6% #19 41.1%			
ATPG7	전체				+++	+++		녹기연장(#1)/ 스트레스저항성 -#1은 녹기연장 효과가 매우 크고, 생장이 다소 증가하여 녹기 연장 우량 형질전환 라인으로 선발 -#16, #18은 스트레 스저항성 효과가 크나, 생장이 불량하여 우 량계통으로 선발 불 가 -#29은 스트레스저항성 이 매우 높으나, 기 내 상태로 추후 생장 분석 필요
	우량 형질전 환 계통				#1 +++	#16 +++ #18 +++ #29 +++(기 내)		
	우량 형질전 환 계통 야 생종 대비 개선도(%)	#1 3.9% #16 -33.6% #18 -15.9%	#1 16.0% #16 -13.1% #18 -19.7%	#1 12.7%	#1 42.7%	#16 37.9% #18 41.8% #29 49.8%		
ATPT10	전체		+++		+++	+++		고성장/ 녹기연장/ 스트레스저항성 (#5) -#5는 생체중이 24.3% 증가하였고, 녹기연 장 효과가 크고, 스 트레스저항성이 높은 것으로 나타나 3가지 기능이 모두 뛰어난 우수계통으로 선발
	우수계통		#2 +++ #5 +++	#5 ++	#5 +++	#5 +++		
	우수계통 야생종 대비 개선도(%)	#2 2.3% #5 11.0%	#2 27.2% #5 24.3%	#2 - 4.7% #5 11.9%	#5 37.1%	#5 33.9%		

* 표시 방법(야생형과 차이 비교: 0 (비슷), +, ++, +++, +++++ (매우 차이 큼))

바. 연구결과 요약

생산성 증대 및 녹기 연장 유용 유전자 발굴 및 기능 검정

- 기확보 유전자 기능 재검정: ORE15, ATHG1, ATPG3, ATPG4, ATPG6, ATPG7, ATPG8, ATPG10
- 신규 유용 유전자 발굴: AHL26, MtATPG3, MtATPG4, MtATPG5

들잔디/국화 형질전환체 생산 및 우수 계통 선발

유전자		기확보 유용 유전자								신규 유용 유전자			
		ORE15	ATHG1	ATPG3	ATPG4	ATPG6	ATPG7	ATPG8	ATPG10	AHL26	MtATPG3	MtATPG4	MtATPG5
백터 제작	들잔디		●	●	●		●	●	●	●	●	●	●
	국화	●			●	●	●		●	●	●	●	●
형질전환	들잔디		●	●	●		●	●	●	●	●	●	
	국화	●			●	●	●		●	●	●	●	
형질전환체 생산	들잔디		●	●	●		●	●	●	●	●	●	
	국화	●			●	●	●		●	●	●	●	
우량 형질전환체	들잔디		●	●	●		●			▲	▲	▲	
	국화	●			●		●		●	▲	▲	▲	
우수계통 선발	들잔디		1				1						
	국화	1							1				

●: 완료, ▲: 진행 중

제 3 장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1 절. 목표

구분	내용
<p>최종목표</p>	<p>○ 연구개발의 최종 목적은 한국 자생 잔디인 들잔디(<i>Zoysia japonica</i>) 및 국화(<i>Chrysanthemum morifolium</i>)에 생산성 증대 및 녹기 연장의 목표형질관련 유용 유전자를 도입하여 고품질 농업 형질을 가지는 GM 들잔디 및 국화 품종을 개발하고 이를 실용화하는 데 있다.</p> <div data-bbox="411 680 1321 1173" style="text-align: center;"> <p>연구개발 목적</p> </div> <p>○ 이를 위하여 본 연구기간 동안 다음의 연구개발 목표를 달성하고자 한다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 7. 고효율 들잔디/국화 형질전환 시스템을 확립하고, 8. 생산성 증대 및 녹기 연장의 목표형질관련 유용 유전자를 확보 및 발굴하고자 한다(7종 확보 및 3종 발굴). 9. 확보 및 발굴된 유용 유전자를 들잔디 및 국화에 도입하여 8종의 들잔디 및 6종의 국화 형질전환체를 생산하고(20 개체 이상/유전자), 10. 생산된 형질전환체를 대상으로 생산성 증대 및 녹기 연장의 목표형질에 대한 기능 분석을 실시하여 4종의 우량 형질전환체를 개발하고자 한다(잔디 2종, 국화 2종). 11. 개발된 우량 형질전환체에 대한 포장시험을 통하여 고품질 농업형질 발현 우수 계통 2종을 육성하여(작물 당 1종, 농업형질: $\geq 120\%$ 생산성 증대 및 녹기 연장, 그림 24), GM 들잔디 및 국화 품종 개발에 적용하고자 한다. 12. 선별된 우수 계통에 대한 품종 개발은 추후 GM 작물 실용화 연구를 통하여 추진하며, 본 사업동안의 추진 단계는 우수 계통 육성까지를 수행한다.

제 2 절. 목표 달성 여부

가. 목표 달성도

연구 개발 최종 목표	연구 개발 내용	(%)
생산성 증대 및 녹기 연장 등의 목표형질 발현 유용 유전자 확보 및 발굴 (총 10종)	<ul style="list-style-type: none"> · 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질 발현 유용 유전자 확보: <i>ORE15</i>, <i>ATHG1</i>, <i>ATPG3</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG6</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG8</i>, <i>ATPG10</i> (8종) <ul style="list-style-type: none"> - 들잔디 적용: <i>ATHG1</i>, <i>ATPG3</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG8</i>, <i>ATPG10</i> - 국화 적용: <i>ORE15</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG6</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG10</i> · 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 (4종) <ul style="list-style-type: none"> - 애기장대로부터 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질을 가지는 <i>AHL26</i> 발굴 및 기능 검정 - <i>Medicago truncatula</i>로부터 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질을 가지는 <i>MtATPG3</i>, <i>MtATPG4</i>와 <i>MtATPG5</i> 발굴 및 기능 검정 - 모델 식물인 애기장대에서 생산성 증대 및 녹기 연장 관련 조사를 통한 목표형질 확인 	>100
잔디 및 국화의 고효율 형질전환 시스템 확립	<ul style="list-style-type: none"> · 들잔디에 대한 고효율 재분화 시스템 및 고효율 형질전환 시스템 확립 · 국화에 대한 고효율 재분화 시스템 및 고효율 형질전환 시스템 확립 	100
형질전환 및 형질전환체 생산: 총 14종 (들잔디 8종, 국화 6종)	<ul style="list-style-type: none"> · 형질전환용 벡터 construct 제작 (총 17종-확보 11종, 신규 6종) <ul style="list-style-type: none"> 들잔디: <i>ATHG1</i>, <i>ATPG3</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG8</i>, <i>ATPG10</i> (확보), <i>AHL26</i>, <i>MtATPG3</i>, <i>MtATPG4</i> (신규) 국화: <i>ORE15</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG6</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG10</i> (확보), <i>AHL26</i>, <i>MtATPG3</i>, <i>MtATPG4</i> (신규) · 형질전환 및 형질전환체 생산: 들잔디 8종, 국화 8종 · 형질전환체 1차 기능분석: 유전자 도입 및 발현 분석 	>100
형질전환체 기능 분석을 통한 생산성 증대 및 녹기 연장형질 발현 우량 형질전환체 개발: 총 4종 (들잔디 2종, 국화 2종)	<ul style="list-style-type: none"> · 형질전환체 기능 분석 (총 14종: 들잔디 6종, 국화 8종) <ul style="list-style-type: none"> - 형질전환체 1차 표현형 분석 - 형질전환체의 도입 유전자 기능 확인을 통한 목표형질 규명 · 우량 형질전환체 개발 (총 8종: 들잔디 4종, 국화 4종) <ul style="list-style-type: none"> - 형질전환체의 온실 및 소규모 포장 검정을 통한 농업형질 규명 - 도입형질 고정 형질전환체 계통 육성 	>100
고품질 농업형질 발현 우수 계통 2종 육성: 들잔디 1종, 국화 1종	<ul style="list-style-type: none"> · 포장시험을 통한 고품질 농업형질 발현 우수 계통 4종 육성: 들잔디 2종, 국화 2종 <ul style="list-style-type: none"> - 생산성 증대 및 녹기 연장 농업형질 개선 - 스트레스 저항성 형질 개선 - GM 들잔디 및 국화 신품종 등록을 위한 예비 조사 	>100
특허 및 논문 등 지적 소유권 확보 (8건)	<ul style="list-style-type: none"> · 특허출원/등록 10건 (출원 5건, 등록 5건) · 논문: 2건 (SCI급 2건 accepted, 비SCI급 1건 게재 예정) 	>100

나. 연차별 목표 달성도

(1) 1차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
1 년도 (2016)	[1세부] 생산성증대 및 녹기연장 유전자 발굴	생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질 발현 유용 유전자 7종 확보 및 1종 발굴 (총 8종)	· 목표형질 발현 유용 유전자 확보: <i>ORE15</i> , <i>ATHG1</i> , <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG6</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i> , <i>ATPG10</i> (8종) · 생산성 증대 및 녹기 연장형질 관련 유용 유전 자 발굴 및 기능 검정 (3종 후보 선별 및 발굴 진행) · 총 8종 확보 및 3종의 후보 유전자로부터 유용 유전자 발굴 진행	>100
		형질전환용 벡터 construct 제작	· 형질전환용 벡터 construct 제작 들잔디: <i>ATHG1</i> , <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i> , <i>ATPG10</i> 국화: <i>ORE15</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG6</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG10</i>	100
	[1협동] 고품질 들잔디 우수계통 육성	들잔디의 고효율 형질전환 시스템 확립	· 들잔디에 대한 고효율 재분화 시스템 및 고효율 형질전환 시스템 확립	100
		들잔디 형질전환 및 형질전환체 생산: 6종	· 들잔디 형질전환 및 형질전환체 생산 (6종) - 형질전환 및 형질전환체 생산: 6종 - 형질전환체 1차 기능분석: 유전자 도입 및 발현 분석 (PCR, RT-PCR, Southern blot 등)	100
		생산성 증대 및 녹기 연장형질 발현 우량 들잔디 형질전환체 개발	· 형질전환체 기능 분석: 3종 - <i>ATHG1</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i> 도입 형질전환체 1차 표현형 분석: 녹기 연장 관련 형질 조사	100
	[2협동] 고품질 국화 우수계통 육성	국화의 고효율 형질전환 시스템 확립	· 국화에 대한 고효율 재분화 시스템 및 고효율 형질전환 시스템 확립	100
		국화 형질전환 및 형질전환체 생산: 4종	· 국화 형질전환 및 형질전환체 생산 (4종) - 형질전환 및 형질전환체 생산: 4종 - 형질전환체 1차 기능분석: 유전자 도입 및 발현 분석 (PCR, qPCR, RT-PCR)	100

(2) 2차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
2 년도 (2017)	[1세부] 생산성증대 및 녹기연장 유전자 발굴	생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질 발현 유용 유전자 2종 발굴 (총 3종)	· 목표형질 발현 유용 유전자 7종 확보: <i>ORE15</i> , <i>ATHGL</i> , <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG6</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i> , <i>ATPG10</i> (1차년도 완료) · 생산성 증대 및 녹기 연장형질 관련 유용 유전자 4종 발굴 및 기능 검증: <i>AHL26</i> , <i>MtATPG3</i> , <i>MtATPG4</i> , <i>MtATPG5</i> (1-2차년도)	>100
		형질전환용 벡터 construct 제작: 신규 4종 (들잔디: 신규 유전자 2종 국화: 신규 유전자 2종)	· 형질전환용 벡터 construct 제작 (총 17종-확보 11 종, 신규 6종) 들잔디: 확보 6종 <i>ATHGL</i> , <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i> , <i>ATPG10</i> (1차년도), 신규 3종 <i>AHL26</i> , <i>MtATPG3</i> , <i>MtATPG4</i> (2차년도) 국화: 확보 5종 <i>ORE15</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG6</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG10</i> (1차년도), 신규 3종 <i>AHL26</i> , <i>MtATPG3</i> , <i>MtATPG4</i> (2차년도)	>100
	[1협동] 고품질 들잔디 우수계통 육성	들잔디의 고효율 형질전환 시스템 확립	· 들잔디에 대한 고효율 재분화 시스템 및 고효율 형질전환 시스템 확립 (1차년도 완료)	100
		들잔디 형질전환 및 형질전환체 생산: 신규 2종	· 들잔디 형질전환 및 형질전환체 생산 (8종) - 형질전환 및 형질전환체 생산: 확보 6종 및 신규 2종 (총 8종) - 형질전환체 1차 기능분석 (6종): 유전자 도입 및 발현 분석 (PCR, RT-PCR, Southern blot 등)	100
		형질전환체 기능 분석 (5종) 및 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질 발현 우량 형질전환체 개발	· 형질전환체 기능 분석: 6종 - <i>ATHGL</i> , <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i> , <i>ATPG10</i> 도입 형질전환체 1차 표현형(녹기 연장 관련 형질) 및 목표형질 분석 · 우량 형질전환체 개발 - 우수 들잔디 형질전환체 계통들의 증식 및 포장 식재	>100
		국화의 고효율 형질전환 시스템 확립	· 국화에 대한 고효율 재분화 시스템 및 고효율 형 질전환 시스템 확립 (1차년도 완료)	100
	[2협동] 고품질 국화 우수계통 육성	국화 형질전환 및 형질전환체 생산: 신규 2종 (총 6종)	· 국화 형질전환 및 형질전환체 생산 (6종) - 확보 유전자 4종에 대한 형질전환 및 형질전환체 생산 - 신규 유전자 2종에 대한 형질전환 및 형질전환체 생산 - 형질전환체 1차 기능분석: 유전자 도입 및 발현 분석 (PCR, qPCR, RT-PCR)	100
		형질전환체 기능 분석 (3종) 및 생산성 증대 및 녹기 연장형질 발현 우량 국화 형질전환체 개발	· 형질전환체 기능 분석: 국화 3종 - <i>ORE15</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> 도입 형질전환체 1차 표 현형 분석 - 형질전환체의 목표 형질 규명 · 우량 형질전환체 개발: - 형질전환체의 온실 및 소규모 포장 검정을 통한 농업 형질 규명	100

(3) 3차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
3 년도 (2017)	[1세부] 생산성증대 및 녹기연장 유전자 발굴	생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질 발현 유용 유전자 확보 및 발굴 (총 10종)	· 목표형질 발현 유용 유전자 8종 확보: <i>ORE15</i> , <i>ATHG1</i> , <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG6</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i> , <i>ATPG10</i> · 생산성 증대 및 녹기 연장형질 관련 유용 유전자 4종 발굴 및 기능 검증: <i>AHL26</i> , <i>MtATPG3</i> , <i>MtATPG4</i> , <i>MtATPG5</i>	>100
		형질전환용 벡터 construct 제작	· 형질전환용 벡터 construct 제작 (총 17종-확보 11 종, 신규 6종) 들잔디: <i>ATHG1</i> , <i>ATPG3</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i> , <i>ATPG10</i> (확보), <i>AHL26</i> , <i>MtATPG3</i> , <i>MtATPG4</i> (신규) 국화: <i>ORE15</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG6</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG10</i> (확보), <i>AHL26</i> , <i>MtATPG3</i> , <i>MtATPG4</i> (신규)	>100
	[1협동] 고품질 들잔디 우수계통 육성	들잔디의 고효율 형질전환 시스템 확립	· 들잔디에 대한 고효율 재분화 시스템 및 고효율 형질전환 시스템 확립	100
		들잔디 형질전환 및 형질전환체 생산: 8종	· 들잔디 형질전환 및 형질전환체 생산 (8종) - 형질전환 및 형질전환체 생산: 최종 8종 - 형질전환체 1차 기능분석: 유전자도입/발현 분석	100
		고품질 농업형질 발현 우량 들잔디 형질전환체 개발: 2종	· 형질전환체 기능 분석: 들잔디 6종 - 형질전환체 1차 표현형 분석 - 형질전환체의 목표 형질 규명 · 우량 형질전환체 개발: 들잔디 4종 - 우수 잔디 형질전환체 계통들의 증식 및 포장 식재 - 형질전환체의 온실 및 소규모 포장 검정을 통한 농업 형질 규명 - 도입형질 고정 형질전환체 계통 육성	>100
		들잔디에 대한 고품질 농업형질 발현 우수 계통 1종 육성	· 포장시험을 통한 고품질 농업형질 발현 우수 계통 육성: 들잔디 2 계통 - GM 들잔디 및 국화 신제품 등록을 위한 예비 조사	>100
	[2협동] 고품질 국화 우수계통 육성	국화의 고효율 형질전환 시스템 확립	· 국화에 대한 고효율 재분화 시스템 및 고효율 형 질전환 시스템 확립	100
		국화 형질전환 및 형질전환체 생산: 총 6종	· 국화 형질전환 및 형질전환체 생산 (8종) - 확보 유전자 5종에 대한 형질전환 및 형질전환 체 생산 - 신규 유전자 3종에 대한 형질전환 및 형질전환 체 생산 - 형질전환체 1차 기능분석: 유전자 도입 및 발현 분석 (PCR, qPCR, RT-PCR)	>100
		형질전환체 기능 분석 (3종) 및 생산성 증대 및 녹기 연장형질 발현 우량 국화 형질전환체 개발: 2종	· 형질전환체 기능 분석: 국화 8종 - <i>ORE15</i> , <i>ATPG4</i> , <i>ATPG6</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG10</i> , <i>MtATPG3</i> , <i>MtATPG4</i> , <i>AHL26</i> 도입 형질전환체 1차 표현형 분석 및 목표형질 규명 · 우량 형질전환체 개발: 4종 - 형질전환체의 온실 검정을 통한 농업형질 규명	>100
		고품질 농업형질 발현 우수 계통 육성: 1 계통	· 형질전환체의 온실 검정을 통한 농업 형질 규명: 생산성 증대 및 녹기연장 농업형질 우수 계통 육성 (2계통)	>100

제 4 장. 연구결과의 활용 계획 등

제 1 절. 연구결과 활용 방안

- 식물 분자유종 기술을 이용한 고품질 GM 들잔디 및 국화 신품종 개발에는 모델식물에서 기능이 확인된 생산성 증대 및 녹기 연장형질 관련 유전자의 확보와 잔디와 국화에 대한 형질전환체 개발 기술이 필수적이다. 국가에서 강력하게 추진하고 있는 녹색기술의 활성화와 더불어 국민 소득의 증가로 인한 다양한 문화생활에 대한 만족도 등의 이유로 원예 작물의 수요가 급격히 증가하고 있으며, 최근 국가 농업 경쟁력 확보 및 FTA 대응 수입대체, 그리고 글로벌시장 지향적 품종 개발의 측면에서 GM 원예 작물 실용화 연구가 집중되고 있는 실정이다.
- 이러한 GM 원예 작물의 개발에 있어서 생산성 증대와 녹기 연장의 목표형질 도입은 고품질 농업형질을 가지는 원예 작물의 개발에 많은 장점을 제공한다. 따라서 생산성 증대와 녹기 연장의 농업형질관련 유용 유전자에 대한 지적소유권의 확보는 미래원천기술의 확보로 특성에 맞는 다양한 작물의 개발이 가능하게 하고, 경제적으로 고부가 가치 창출이 가능하게 하며, 향후 국가 농업생명공학 산업화의 경쟁력을 가지는데 일조할 것이다. 본 사업을 통해 개발된 생산성 증대 및 녹기 연장 농업 형질을 나타내는 우량 들잔디와 국화 형질 전환체와 우수 계통은 이후 우수계통 육성 및 안정성 평가 등을 추진하여 생산성 증대 및 녹기 연장의 농업형질을 가지는 GM 들잔디 및 국화 품종 개발을 완성하고자 한다.
- 한편 본 사업에 적용한 유전자는 생산성 증대 및 녹기 연장의 농업형질 제공에 있어서 폭넓은 식물 스펙트럼을 가지므로 타 경제작물 개발에도 적용이 가능하리라 기대된다. 이러한 사실에 근거를 두어, 본 연구팀은 본 사업에서 적용한 AT hook domain을 가지는 유용 유전자를 콩에 적용하여 생산성 증대 및 다수성 농업형질을 가지는 우량 형질전환체 및 우수계통을 선별하였다. 현재 선별된 다수성 형질전환체 및 우수계통은 GM 콩 품종 개발을 위하여 GM 실용화 연구를 일부 추진하고 있다.
- 우량 GM 들잔디 및 국화 품종 개발에 대한 우수품종 육성 기술 확립은 국내에서 확보하고 있는 생산성 증대, 스트레스 저항성, 대사물질 축적 등 농업형질 적용 가능 유전자의 도입을 통하여 기후 변화 대처, 생산 안정성, 생산성 증대, 신기능성 등과 같은 다양한 우량 GM 품종 개발을 가능하게 할 것이다.
- 형질전환 기술을 바탕으로 개발된 신품종은 교배 모본으로 활용이 가능하므로 교배를 통한 다양한 신품종 개발에 사용될 수 있을 것이며, 또한 유전자 발굴부터 형질전환체 생산, 재배 및 포장 검정에 이르는 완전한 일련의 분자유종체계를 확립하여 모델링함으로써 분자유종의 모델로 활용할 수 있을 것이다.
- 발굴된 유전자와 개발된 우수 계통에 대한 산업화는 우선 유전자 혹은 우수 계통에 대한 지적소유권을 확보한 후, 지적소유권의 기술이전이라는 단기 사업 전략과 신품종 생산을 통한 수익창출이라는 장기 사업 전략으로 나눌 수 있으며 그 내용은 사업화 추진 방안에서 제시하였다.

제 2 절. 연구결과의 사업화 추진 방안

가. 사업화 기대 효과

[단위: 백만원]

항 목	산업화 기준	개발종료후 1차년도	개발종료후 2차년도	개발종료후 3차년도	개발종료후 4차년도	개발종료후 7차년도	계
직접 경제효과					4,000 ¹⁾	30,000 ²⁾	34,000
경제적 파급효과						10,000 ³⁾	10,000
부가가치 창출액						20,000 ⁴⁾	20,000
합 계					4,000	60,000	64,000

¹⁾유전자 기술이전 2건 (2,000백만원/기술이전 1건): 들잔디 및 국화뿐 만 아니라 식량작물인 콩에서도 형질발현이 가능하여 유전자의 부가가치를 보다 높일 수 있으리라 판단됨

²⁾우량 품종(들잔디 및 국화) 개발완료로 7차년도 기준, 품종 개발을 통한 기술이전 혹은 사업화

³⁾우량 품종(들잔디 및 국화) 개발완료에 따른 농가소득 증대, 수송비용 절감, 수입 대체효과 (2종 개발에 따른 10%의 수입 대체 효과), 7차년도 기준

⁴⁾ 품종(들잔디 및 국화) 개발완료에 따른 수출효과, 브랜드 가치

나. 사업화 전략

구분	구체적인 내용
형태/규모	<p>형태 :</p> <p>1) 단기 사업: 생산성 증대 및 녹기 연장 형질 유전자/형질전환체 기술이전 Project package (기술이전+공동연구)- 장기 사업으로의 연계</p> <p>2) 장기 사업: 고품질 농업형질을 가진 GM 들잔디 및 국화 신품종</p> <p>○ 수요처 :</p> <p>1) 잔디: 국내 - 제일모직 등 국내 대기업이 소유하고 있는 잔디회사 국외 - Syngenta, 몬산토, BASF 등 거대 종자회사</p> <p>2) 국화: 국내 - 세미라이트, 로즈피아 등 국화 전문회사 국외 - 피테스, 세이코엔(일본), Deliflor(네덜란드) 등 국화 전문회사</p> <p>○ 예상 매출 :</p> <p>1) 단기 사업: 기술이전의 형태로 매출 산정이 어려우나 대략 유전자당 2백만불 수준+로얄티(영업이익의 25%)*), 종료 후 4차년도 이후</p> <p>2) 장기 사업: 고품질 잔디 신품종- ≥200억원/년**), 고품질 국화 신품종- ≥160억원/년***), 종료 후 7차년도 이후</p> <p>[*]) 모델식물과 들잔디 그리고/혹은 국화 형질뿐 만 아니라 작물인 콩에서도 형질을 확인함으로써 유전자의 가치를 보다 높게 인정받을 수 있으리라 판단됨</p> <p>^{**)} 우리나라 잔디 신품종인 '그린에버'의 시장 점유율 예측 참조 (우리나라 잔디 시장은 연간 약 1000억원 규모. 그린에버로 이 시장의 20%가량을 차지하는 양잔디의 수입 대체 효과, 2015년 3월 매일경제신문)</p> <p>^{***)} 우리나라 국화 품종인 '백마'의 연매출 참조: 10,000백만원 이상(국내)+6,000백만원(국외, 일본 집중), 2010년</p>

타당성 조사

1) 잔디 - 제초제 저항성 형질로 생산에 있어서 원가절감의 효과를 가지고, 생산성 증대와 녹기 연장의 농업형질로 품종의 고품질화를 통해 고수익성을 가지는 본 과제 개발 GM 잔디 품종은 전 세계적으로 독창성과 효율성 양쪽 모두를 가지고 있어, 전 세계 시장의 독점성을 가질 수 있는 품종이다.

잔디의 전세계 시장규모는 약 50조원, 미국 시장은 약 30조원, 한국 시장은 약 1,000억원으로 시장규모가 어떤 작물보다 더 크다.

최근 국내 개발 품종인 '그린에버'의 잠재 시장력은 약 200억으로 추정하고 있다. 따라서 본 사업을 통해 개발되는 GM 들잔디 품종은 국내뿐 만 아니라 국제적으로도 적용 가능하여 그 시장력은 200억원/년을 훨씬 상회할 것으로 기대된다.

2) 국화 - 제초제 저항성 형질로 절화 생산의 원가절감 효과를 가지고, 생산성 증대와 녹기 연장의 농업형질로 품종의 고품질화를 통해 고수익성을 가지는 본 과제 개발 GM 국화 품종은 현재 국내에서 각광받고 있는 '백마' 품종의 가치를 훨씬 상회할 것이다. '백마' 품종의 기술가치는 약 375억원이며 연간 매출액은 약 160억원이다.

그리고 본 사업을 통해 확보된 고품질 GM 국화 품종으로 유도되는 수입대체 효과를 포함한 사업 타당성 분석은 다음과 같다.

고품질 & 고생산성 농업형질을 가진 국화 형질전환체에 대한 사업화 타당성 (I)

국화 스탠다드 신품종 개발 로열티 수입

전세계 국화 스탠다드 품종 시장 : 1,525백만본, 7,730백만\$	Source: MAFF (Japan), 2009
일본 985백만본, 573백만\$, 0.6\$/본 (60엔/본)	Source: MAFRA (Korea), 2011
한국 240백만본, 100백만\$, 0.4\$/본 (433원/본)	Source: Kim (2011)
기타(중국, 대만 등) 300백만본, 100백만\$ (추정)	

국화의 국내 로열티
본당 15-33원(평균 20원) = 0.02\$
Source: Economy Chosun (Korea), 2010

로열티 대상 본수 150백만본일 경우(전세계 시장의 약10%)
 년 로열티: 0.02\$ X 150백만본 X year = 3백만\$/year
 총 로열티: 3백만\$ X 20 = 60백만\$ (품종 로열티 20년 기준)

**개발된 형질전환 신품종 국화가 전세계 시장의 약 10% 확보
20년간 매년 3백만\$, 20년간 총 60백만\$ 로열티 확보**

고품질 & 고생산성 농업형질을 가진 국화 형질전환체에 대한 사업화 타당성 (II)

전세계 국화 스탠다드 품종 시장 : 1,525백만본, 7,730백만\$	Source: MAFF (Japan), 2009
일본 985백만본, 573백만\$, 0.6\$/본 (60엔/본)	Source: MAFRA (Korea), 2011
한국 240백만본, 100백만\$, 0.4\$/본 (433원/본)	Source: Kim (2011)
기타(중국, 대만 등) 300백만본, 100백만\$ (추정)	

국화 스탠다드 기존 품종의 형질전환을 통한 고생산성 효과
 년중 3기작에서 4기작으로의 전환을 통한 생산량 증가

국화 4기작 가능 고생산성 스탠다드 품종의 가치
 단위면적당 생산량의 증가 : 현재 생산량의 약 30% 증수 효과

현재 생산량이 150백만본일 경우(전세계 시장의 약10%)
 생산량 증가분 : 150백만본/year X 30% = 45백만본/year
 생산 가치 증가분 : 45백만본/year X 0.4\$ = 18백만\$/year
 국화 수익율: 18.5% (2008년 기준)
 Source: Kim (2011)

순이익: (150백만본+45백만본)/year / X 0.4\$/본 X 18.5% = 14.43백만\$/year

**개발된 형질전환 신품종 국화가 전세계 시장의 약 10% 확보
순이익 14.43백만\$/year 확보 가능**

- 개발 기간 :
- 1) 단기 사업 - 사업 종료 후 4차년도까지
- 2) 장기 사업 - 사업 종료 후 7차년도까지

상용화 능력 및

○ 식물 유용 유전자 발굴 회사

자원보유	<p>사업: 본사 자체 혹은 제주대와 상명대 공동연구 개발을 통한 유전자와 형질전환체 개발 및 기술 사업화</p> <p>○ 장기 사업: 협동기관인 제주대 GM 작물 환경위해성 평가기관과의 공동연구를 통한 GM 품종 개발</p>
상용화 계획 및 일정	<p>[단기 사업]</p> <p>○ 생산성 증대 및 녹기연장 형질 유전자 및 들잔디/국화 형질전환체 개발을 통한 기술 사업화 준비: 사업종료 후 3차년도</p> <p>○ 유전자 및 형질전환체 기술이전: 사업종료 후 4차년도</p>

다. 사업화를 위한 비즈니스 모델

. BM 수립 배경

- 국가에서 강력하게 추진하고 있는 녹색기술의 활성화와 더불어 국민 소득의 증가로 인한 다양한 문화생활에 대한 만족도 등의 이유로 원예 작물의 수요가 급격히 증가하고 있으며, 최근 국가 농업 경쟁력 확보 및 FTA 대응 수입대체, 그리고 글로벌시장 지향적 품종 개발의 측면에서 GM 원예 작물 실용화 연구가 집중되고 있는 실정이다.
- 이러한 GM 원예 작물의 개발에 있어서 생산성 증대와 녹기 연장의 목표형질 도입은 고품질 농업형질을 가지는 원예 작물의 개발에 많은 장점을 제공한다. 따라서 고품질 농업형질관련 유용 유전자에 대한 지적 소유권의 확보는 미래원천기술의 확보로 특성에 맞는 다양한 작물의 개발이 가능하게 하고, 이를 통한 고품질 GM 품종 개발은 경제적으로 고부가 가치 창출이 가능하게 하며, 향후 국가 농업생명공학 산업화의 경쟁력을 가지는데 일조할 것이다.

나. BM 목표 및 핵심경쟁요인

(1) BM 목표

- 본 BM의 최종 목적은 한국 자생 잔디인 들잔디(*Zoysia japonica*) 및 국화(*Chrysanthemum morifolium*)에 생산성 증대 및 녹기 연장 등의 목표형질관련 유용 유전자를 도입하여 고품질 농업형질을 가지는 GM 들잔디 및 국화 품종을 개발하고 이를 사업화하는데 있다.

(2) 핵심경쟁요인

구분	형질			비고
	제초제 저항성	생산성 증대	녹기 연장	
유전자		○	○	≥120% 목표형질을 가진 유전자로 모델식물과 들잔디 그리고/혹은 국화뿐 만 아니라 식량작물인 콩에서도 형질발현 가능
GM 들잔디 신품종	○	바이오매스 증가 • tiller 수 증가 등을 통	녹기 연장 • 기존품종대비 ≥113%	제초제 저항성으로 작물 생산단가 절감.

		한 식물밀식도: 기존 품종 대비 $\geq 120\%$	180 \rightarrow ≥ 200 일	고품질 농업형질 발현으로 기존 사업화 품종보다 고부가가치 창출 가능
GM 국화 신품종	○	바이오매스 증가 • 초장(개화기), 화경 증가 등을 통한 절화무게: 기존 품종 대비 $\geq 120\%$	절화수명 연장 • 기존품종대비 $\geq 120\%$ 17.6 \rightarrow ≥ 22 일	제조제 저항성으로 작물 생산단가 절감. 고품질 농업형질 발현으로 기존 사업화 품종보다 고부가가치 창출 가능

. 목표 시장 구조

(1) 현황

본 기술사업 대상 품목이 유전자/형질전환체에 대한 지적소유권과 고품질 GM 품종인 관계로 국내의 경우 관련 기업들은 경쟁관계가 아닌 협동관계로 사업을 진행할 예정이며, 국외의 경우 대부분 GM 품종 개발을 진행하고 있으므로 전체적으로 경쟁기업으로 생각할 수 있다. 이러한 경쟁에서 이기기 위해선 기술의 독창성 및 농업형질에 대한 효능이 결정할 것이다. 본 기술은 주관기관이 확보하고 있는 유전자의 독창성과 주관과 협동기관의 공동연구를 통하여 확보된 GM 품종의 고품질화를 통해 이러한 경쟁요인을 극복하고자 한다.

○ 잔디 및 국화 관련 회사 현황:

- 1) 잔디: 국내 - 제일모직 등 국내 대기업이 보유하고 있는 잔디회사, 종자회사
국외 - Syngenta, 몬산토, BASF 등 거대 종자회사
- 2) 국화: 국내 - 세미라이트, 로즈피아 등 국화 전문회사
국외 - 피데스, 세이코엔(일본), Deliflor(네덜란드) 등 국화 전문회사

(2) 시장진입 장벽

- 식물생명공학기법을 이용한 신품종 개발에 있어서, 잔디 및 국화는 영양번식성 작물로서 증식이 용이하고 여러 세대에 걸친 형질고정 과정이 필요 없으며 타 작물에 비해 조기에 품종 육성을 통한 실용화가 가능하다는 장점을 가지고 있다. 최근 국내에도 유전자 변형 작물의 개발 성과가 다수 보고되고 있으나, 먹거리에 대한 국민의 거부감이 생명공학 품종의 실용화에는 걸림돌로 작용하고 있는 상황이다. 그러나 유전자 변형 잔디 및 국화는 먹거리가 아닌 관상용으로 사용되어 환경 및 소비자 단체의 저항을 최소화할 수 있는 장점을 가지고 있어 상용화를 위한 유전자 변형 작물로 개발하기에 최적의 작물이다.
- 우리나라에서는 아직까지 GM 식물의 재배승인이 1건도 없으나, 최근 협동기관인 제주대의 제조제 저항성 GM 들잔디에 대해 재배승인을 진행하고 있으며, 따라서 조만간 재배승인이 가능하리라 판단된다. 이러한 GM 들잔디 재배승인은 본 연구개발의 사업성을 높여 고부가가치 창출이 가능하게하고 국가 식물생명공학의 발전에 일조할 것으로 생각된다.

라. 수익 확보 전략

(1) 주요 고객군: 앞서 언급한 국내외 잔디 및 국화 관련 회사

(2) BM의 수익창출 방안

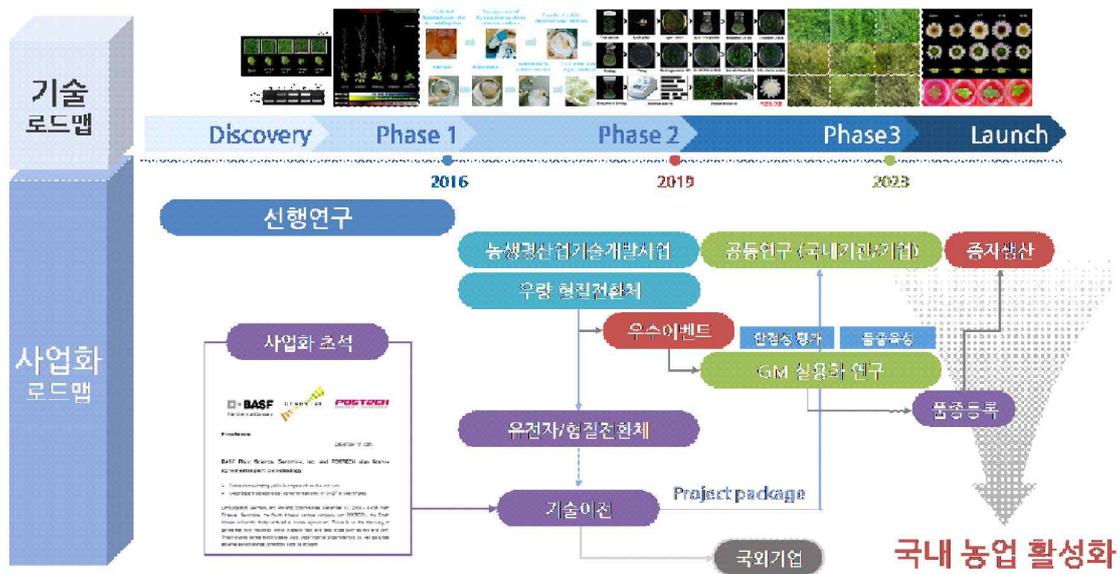
- ① 연구산물의 지적소유권 확보: 본 과제를 통해 확보되는 생산성 증대 및 녹기 연장 형질관련 유전자 혹은 이에 대한 고품질 농업형질을 가진 형질전환체에 대한 지적소유권의 확보를 우선으로 한다. 유전자에 대한 지적소유권은 본 사업에서 적용하는 들잔디 및 국화뿐만 아니라 타 작물-식량, 원예, 화훼 작물 등에 대해 폭 넓은 적용 스펙트럼을 가지므로 그 활용도 및 부가 가치는 엄청날 것으로 판단된다. 본 연구팀은 들잔디

국화에서의 농업형질 발현뿐 만 아니라 식용 작물, 특히 콩에서의 농업형질 발현 또한 제시함으로써 지적소유권에 대한 고부가가치를 이루고자 한다.

② 기술이전: 본 과제를 통하여 발굴된 생산성 증대 및 녹기 연장 복합형질관련 유전자와 고품질 농업형질을 가진 우량 형질전환체의 지적소유권에 대한 기술이전은 우선적으로 우량 형질전환체의 GM 품종화가 가능한 국내 원예 및 종자회사를 대상으로 한다. 국외로는 전문 원예작물 회사뿐 만 아니라 BASF, 몬산토, 신젠타 등과 같은 다국적 종자 기업도 대상으로 한다. 이와 같은 사업 대상의 다양화는 들잔디 및 국화뿐 만 아니라 식용 작물에서도 본 유전자의 적용이 가능하기 때문이다. 기술 사업은 GM 실용화 연구에 대한 공동 연구와 함께 기술이전이라는 package project로 추진하는 것이 보다 효율성이 높아 이에 대해 중점적으로 기술 마케팅을 수행할 예정이다. 주관기관인 제노마인(주)에서 진행한 다국적 기업인 BASF와의 유용 유전자에 대한 기술이전 건은 본 사업의 연구산물에 대한 기술 사업에 있어 훌륭한 모델이 될 것으로 확신한다.

③ 고품질 농업형질을 가진 GM 들잔디 및 국화 신품종 개발 및 생산: 본 사업에서 개발된 우수 계통은 GM 작물 실용화 연구를 통하여 GM 신품종 개발 및 생산 시스템까지 구축하고자 한다. 이러한 시스템의 구축까지는 장시간의 개발 기간이 소요되지만, 개발 성공 시 고부가 가치 창출과 국가 농업생명공학에 대한 경쟁력 확보 등 경제적 그리고 국가 경쟁력에 대한 효용가치가 높은 매력적인 산업이 될 것이다.

④ 이러한 사업화 계획을 종합해보면 지적소유권의 확보를 통한 기술이전과 더불어 공동연구를 추진하는 project package가 가장 타당한 형태의 사업화가 될 것이며, 이러한 사업화 로드맵은 아래 그림과 같다.



본 사업을 통한 기술 로드맵과 사업화 로드맵

제 3 절. 기대성과 및 파급효과

가. 기술적 측면

- 본 연구는 식물의 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질관련 유용 유전자를 발굴하고 이를 경제적 가치가 높은 들잔디와 국화에 적용함으로써, 식물의 생산성 증대 및 녹기 연장의 농업형질이 발현되는 고품질 들잔디 및 국화 신품종을 개발할 수 있으며 이를 바탕으로 다양한 유전자를 도입한 신품종 개발이 가능할 것으로 보인다. 이렇게 개발된 들잔디 및 국화 신품종은 식물의 복합적 농업형질 발현에 대한 유용 유전자의 잠재 가치를 보다 높여 이에 대한 지적 소유권의 잠재 시장성이 높아질 것으로 판단되며, 향후 국가별 생명공학 산업화의 경쟁력을 가지는데 기여할 수 있을 것이다.
- 형질전환 기술을 바탕으로 개발된 신품종은 교배 모본으로 활용이 가능하므로 교배를 통한 다양한 신품종 개발에 사용될 수 있을 것이다. 또한 형질전환 기술을 이용한 화훼류 신품종 개발은 다른 화훼작물의 신품종 개발에 대한 초석이 될 것이며, 식물의 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질 발현에 대한 분자적 해명의 전기를 만들 수 있을 것이다.
- 본 사업을 통하여 확보된 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질관련 유전자의 발굴 및 기능 검정, 그리고 고품질 농업형질을 나타내는 우량 들잔디 및 국화 우수 계통 개발은 지적소유권 확보 후 Science, Plant Cell, Plant J, Nature biotech 등과 같은 우수 논문 발표가 가능할 것이다.

나. 경제·산업적 측면

- 최근 20년간의 형질전환기술에 있어서 유전자 재조합 및 형질전환 식물체 개발에 대한 특허 출원 현황을 조사해 보면, 우리나라는 최근 많은 건수의 특허출원을 하였지만 여전히 미국의 약 10%정도에도 미치지 못하고 있는 실정이다. 따라서 본 과제의 고품질 농업형질 제공에 있어 탁월한 기능을 가지는 유용 유전자의 발굴 및 형질전환체의 개발은 일차적으로 식물 유전자를 독점하여 세계 식물 생명공학 사업을 독점적으로 운영하고자 하는 다국적 기업을 견제할 수 있으며, 식물 생명공학에 대한 국가 간의 경쟁력을 강화시키는데 일조할 것이다.
- 들잔디 및 국화에 적용 가능한 유전자가 다수 개발되었음에도 새로운 형질의 신품종 상업화는 매우 더디게 진행되는 것을 알 수 있다. 따라서 본 과제의 기 확보된 식물의 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질 발현 유전자 발굴 기술과 들잔디 및 국화 형질전환 기술을 바탕으로 국내의 생명공학기술과 전통육종 기술을 연계하여 연구를 수행한다면 조기에 세계적 수준의 화훼 신품종을 개발할 수 있을 것으로 사료된다. 특히 국화의 경우, 연간 32.4억 원(2003~2007년 통계, 농진청 국정감사자료)에 이르는 국화의 로열티 지급액을 줄여 농가 소득 증대는 물론 국외 수출을 통한 로열티 수입 또한 기대된다.
- 본 과제를 통한 고품질 농업형질을 가지는 들잔디 및 국화 품종 개발은 생산성 증대 및 녹

화 연장 형질 획득 ORE7-잔디와 녹기 연장 획득 ORE7-국화 형질전환체 개발 사례에서와 같이, ORE7과 같은 AT-hook domain을 가진 유전자의 적용도 가능하게 하였다. 따라서 확보 또는 본 사업을 통하여 발굴되는 이러한 특정 domain을 가지는 유전자들의 적용은 보다 형질이 우수하고 다양한 들잔디 및 국화 품종 개발을 가능하게 함으로써, 유전자에 대한 기술이전, 개발된 품종에 대한 해외시장 진출, 그리고 개발 품종의 기술이전 등 다양한 형태의 실용화가 가능하게 할 것이다. 이러한 실용화의 다양화는 고부가 가치를 창출하고 국익 창출에 일조할 것으로 판단된다.

- 우량 GM 들잔디 및 국화 품종 육성 기술 확립은 국내에서 확보하고 있는 생산성 증대, 스트레스 저항성, 대사물질 축적 등 농업 형질 적용 가능 유전자의 도입을 통하여 기후 변화 대처, 생산 안정성, 다수성 등과 같은 다양한 우량 GM 품종 개발을 가능하게 하며, 들잔디와 국화의 GM 품종 개발은 전 세계적으로도 아직 성공 사례가 거의 없어, 본 사업을 통한 성공은 전 세계 농업생명공학 분야에서의 선도적 역할을 담당하게 하여, 추후 GM 들잔디 및 국화 시장을 주도하게 할 것으로 판단된다.

붙임. 참고문헌

- Aebi, H** (1984). Catalase *in vitro*. In *Methods in Enzymol.* **105**, 121-126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Anderson NO, Ascher PD, Widmer RE and Ludy JJ** (1990) Rapid regeneration cycling of chrysanthemum using laboratory seed development and embryo rescue technique. *J Am Soc Hort Sci* **115**, 329-336
- Aravind L and Landsman D** (1998) AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* **19**, 4413-4421
- Ashman TL, Schoen DJ** (1994) How long should flowers live. *Nature* **371**, 788-791
- Bae, TW, E Vanjildorj, SY Song, S Nishiguchi, SS Yang, IJ Song, T Chandrasekhar, TW Kang, JI Kim, YJ Koh** (2008) Environmental risk assessment of genetically engineered herbicide tolerant *Zoysia japonica*. *J. Environ. Qual.* **37**, 207-218
- Boase MR, Bradley JM and Borst NK** (1998) Genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* of florists' chrysanthemum (*Dendranthema X grandiflorum*) cultivar 'Peach Margaret'. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* **34**, 46-51
- Boccalandro HE, Ploschuk EL, Yanovsky MJ, Sanchez RA, Gatz C and, Casal JJ** (2003) Increased phytochrome B alleviates density effects on tuber yield of field potato crops. *Plant Physiol* **133(4)**, 1539-46
- Broertjes C, Koene P and van Heen JWH** (1980) A mutant of a mutant of a mutant of an irradiation of progressive radiation induced mutants in a mutation breeding program with *Chrysanthemum morifolium* Ram. *Euphytica* **29**, 525-530
- Chance, B and Maehly, AC** (1955). Assay of catalase and peroxidases. In *Method in Enzymol.* **2**, 764-775. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8)
- Chen Y, Jiang J, Song A, Chen S, Shan H, Luo H, Gu C, Sun J, Zhu L, Fang W, Chen F** (2013) Ambient temperature enhanced freezing tolerance of *Chrysanthemum dichrum* CdICE1 *Arabidopsis* via miR398. *BMC Biol* **11**, 121
- Chen YT, Fang QS, Chiang CH, Yeh SD, Wu HW and Yu TA** (2010) Transgenic *Eustoma grandiflorum* expressing the bar gene are resistant to the herbicide Basta. *Plant Cell Tiss Org Cult* **10**, 347-356
- Chung B-C, Lee SY, Oh SA, Rhew TH, Nam HG, Lee C-H** (1997) The promoter activity of sen 1, a senescence-associated gene of *Arabidopsis*, is repressed by sugars. *J Plant Physiol* **151**, 339-345
- Courtney-Gutterson N, Napoli C, Lemieux C, Morgan A, Firoozabady E and Robinson K** (1994) Modification of flower color in Florist's chrysanthemum: Production of a white-flowering variety through molecular genetics. *Biotechnology* **12**, 268-271
- De Jong J, Rademaker W and Ohishi K** (1995) *Agrobacterium*-mediated transformation of

chrysanthemum. *Plant Tiss Cult Biotechnol* **1**, 38-42

De Jong J, Rademaker W and Wordragen MF (1993) Restoring adventitious shoot formation on chrysanthemum leaf explants following cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss Org Cult* **32**, 263-270

Disch S, Anastasiou E, Sharma VK, Laux T, Fletcher JC and Lenhard M (2006) The E3 ubiquitin ligase BIG BROTHER controls arabidopsis organ size in a dosage-dependent manner. *Curr Biol.*, **16(3)**, 272-279

Dolgov SV, Mitiouchkina TY and Skryabin KG (1997) Agrobacterial transformation of chrysanthemum. *Acta Hort* **447**, 329-333

Gallavotti A, Malcomber S, Gaines C, Stanfield S, Whipple C, Kellogg E, Schmidt RJ (2011) *BARREN STALK FASTIGIATE1* is an AT-hook protein required for the formation of maize ears. *Plant Cell* **23**, 1756-1771

Gan, S, Amasino, RM (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*, **270**, 1986-1988.

Guan H, Kang D, Fan M, Chen Z and Qu LJ (2009) Overexpression of a new putative membrane protein gene AtMRB1 results in organ size enlargement in Arabidopsis. *J Integr Plant Biol.*, **51(2)**, 130-139

Guo Y, Gan S (2014) Translational researches on leaf senescence for enhancing plant productivity and quality. *Journal of Experimental Botany* **65(14)**, 3901 - 3913

Gururani MA, Ganesan M, Song IJ, Han Y, Kim JI, Lee HY, Song PS (2016) Transgenic turfgrasses expressing hyperactive Ser599Ala phytochrome A mutant exhibit abiotic stress tolerance. *J Plant Growth Regul* **35**, 11-21

Gururani MA, Ganesan M, Strasser RJ, Han Y, Kim JI, Lee HY, Song PS (2015) In vivo assessment of cold tolerance through chlorophyll-a fluorescence in transgenic zoysiagrass plants expressing mutant phytochrome A. *PloS One* **10**, e0127200

Halevy AH, Mayak S (1979) Senescence and postharvest physiology of cut flowers, Part 1. *Hortic Rev* **1**, 204-236

Han BH, Lee SY and Choi SY (2009) *MdMADS2* - transgenic chrysanthemum (*Dendrathera grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) showing the reduction of the days to flowering. *J Plant Biotechnol* **36**, 366-372

He C, Yan J, Shen G, Fu L, Holaday AS, Auld D, Blumwald E and Zhang H (2005) Expression of an *Arabidopsis* vacuolar sodium/proton antiporter gene in cotton improves photosynthetic performance under salt conditions and increases fiber yield in the field. *Plant Cell Physiol.* **46(11)**, 1848-54

Heisler MG, Atkinson A, Bylstra YH, Walsh R and Smyth DR (2001) SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein. *Development* **128**, 1089-1098

- Heong JH, Chakrabart D, Kim SJ and Paek KY** (2002) Transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Kitamura) cv. Cheonsu by constitutive expression of rice *OsMADS1* gene. *J Kor Soc Hort Sci* **43**, 382-386
- Horn W** (2002) Breeding methods and breeding research. *In: Vainstein A* (ed) Breeding for ornamentals: Classical and molecular approaches. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 47-84
- Hudo S, Shibata N, Kanno Y and Suzuki M** (2002) Transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) via *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Hort* **572**, 139-147
- Jong JD, Rademaker W, van Wordragen MF** (1993) Restoring adventitious shoot formation on chrysanthemum leaf explants following cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **32**, 263-270
- Kanda T, Sullivan KF and Wahl GM** (1998) Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr. Biol.* **8**, 377-385
- Kant S, Burch D, Badenhorst P, Palanisamy R, Mason J, Spangenberg G** (2015) Regulated expression of a cytokinin biosynthesis gene IPT delays leaf senescence and improves yield under rainfed and irrigated conditions in canola (*Brassica napus* L.). *PLoS ONE* **10(1)**, e0116349
- Kay R, Chan A, Daiy M, McPherson J** (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* **236**, 1299-1302
- Kim HJ, Cho HS, Pak JH, Kim KJ, Lee DH, Chung YS** (2017) Overexpression of a Chromatin Architecture-Controlling *ATPG7* has Positive Effect on Yield Components in Transgenic Soybean. *Plant Breed. Biotech.* **5(3)**, 237-242
- Kim HJ, Ryu H, Hong SH, Woo HR, Lim PO, Lee IC, Sheen J, Nam HG and Hwang I** (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 814 - 19
- Kim JI, Shen Y, Han YJ, Park JE, Kirchenbauer D, Soh MS, Nagy F, Schawper E, Song PS** (2004) Phytochrome phosphorylation modulates light signaling by influencing the protein-protein interaction. *Plant Cell* **16**, 2629-2640
- Ledger SE, Deroles SC and Given NK** (1991) Regeneration and *Agrobacterium-mediated* transformation of chrysanthemum. *Plant Cell Rep* **10**, 195-199
- Lee DH, Lee IC, Kim KJ, Kim DS, Na HJ, Lee IJ, Kang SM, Jeon HW, Le PY, Ko JH** (2014) Expression of gibberellin 2-oxidase 4 from *Arabidopsis* under the control of a senescence-associated promoter results in a dominant semi-dwarf plant with normal flowering. *J. Plant Biol.* **57**, 106-116
- Lee KH, Seo PJ** (2017) Coordination of matrix attachment and ATP-dependent chromatin remodeling regulate auxin biosynthesis and *Arabidopsis* hypocotyl elongation. *PLoS ONE* **12(7)**, e0181804

- Li G, Hall TC, Holmes-Davis R** (2002) Plant chromatin: development and gene control. *BioEssays* **24**, 234-243
- Li JI, Yang H, Peer WA, Richter G, Blakeslee J, Bandyopadhyay A, Titapiwantakun B, Undurraga S, Khodakovskaya M, Richards EL, Krizek B, Murphy AS, Gilroy S and Gaxiola R** (2005) Arabidopsis H⁺-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. *Science* **310**, 121-125
- Li S, Yang Y, Zhang Q, Liu N, Xu Q, Hu L** (2018) Differential physiological and metabolic response to low temperature in two zoysiagrass genotypes native to high and low latitude. *PloS One* **13**, e0198885
- Lichtenthaler H and Wellburn AR** (1983). Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* **603**, 591 - 93
- Lim PO and Nam HG** (2005) The molecular and genetic control of leaf senescence and longevity in *Arabidopsis*. *Curr Top Dev Biol* **67**, 49 - 83
- Lim PO, Kim Y, Breeze E, Koo JC, Woo HR, Ryu JS, Park DH, Beynon J, Tabrett A, Buchanan-Wollaston V and Nam HG** (2007) Overexpression of a chromatin architecture-controlling AT-hook protein extends leaf longevity and increases the post-harvest storage life of plants. *The Plant Journal* **52**, 1140-1153
- Lim PO, Woo HR, Nam HG** (2003) Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* **8**, 272-278
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**, 402-408
- Lu H, Zou Y, Feng N** (2010) Overexpression of *AHL20* negatively regulates defenses in *Arabidopsis*. *J Int Plant Biol* **52**, 801-808
- Matsushita A, Furumoto T, Ishida S, Takahashi Y** (2007) *AGF1*, an AT-hook protein, is necessary for the negative feedback of *AtGA3ox1* encoding GA 3-oxidase. *Plant Physiol* **143**, 1152-1162
- Mizukami Y and Fischer RL** (2000) Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proc Natl Acad Sci* **97**, 942-947
- Morisawa G, Han-Yama A, Moda I, Tamai A, Iwabuchi M, Meshi T** (2000) AHM1, a novel type of nuclear matrix-localized, MAR binding protein with a single AT hook and a J domain-homologous region. *Plant Cell* **12**, 1903-1916
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**, 473-497
- Nam HG** (1997) Molecular genetic analysis of leaf senescence. *Curr Opin Biotechnol* **8**, 200-207
- Noda N, Aida R, Kishimoto S, Ishiguro K, Fukuchi-Mizutani M, Tanaka Y and Ohmiya A** (2013) Genetic engineering of novel bluer-colored chrysanthemums produced by accumulation of delphinidin-based anthocyanins. *Plant Cell Physiol.* **54**, 1684-1695

- Oh SA, Lee SY, Chung IK, Lee CH and Nam HG** (1996) A senescence-associated gene of *Arabidopsis thaliana* is distinctively regulated during natural and artificially induced leaf senescence. *Plant Molecular Biology* **30**, 739-753
- Oh, SA, Park, JH, Lee, GI, Paek, KH, Park, SK and Nam, HG** (1997) Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **12**, 527-535
- Oksman-Caldentey KM, Hiltunen R** (1996) Transgenic crops for improved pharmaceutical products. *Field Crops Res.* **45**, 57-69
- Petty LM, Harberd NP, Carré IA, Thomas B and Jackson SD** (2003) Expression of the *Arabidopsis gai* gene under its own promoter causes a reduction in plant height in chrysanthemum by attenuation of the gibberellin response. *Plant Sci* **164**, 175-182
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE** (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **975**, 384-394
- Pütter, J** (1974). Peroxidase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, H.U. Bergmeyer, ed. (Weinheim, USA: Verlag Chemie-Academic Press), p.685-690. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50033-5>
- Sauvadet MA, Brochard P and Boccou-Gibo J** (1990) A protoplast-to-plant system in chrysanthemum: differential responses among several commercial clones. *Plant Cell Rep* **8**, 692-695
- Seo SY, Choi DC, Kim JM, Lim HC, Kim HJ, Choi JS and Choi YG** (2003) Plant regeneration from leaf explants and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation system of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*). *Acta Hort* **620**, 333-338
- Sgarra R, Lee J, Tessari MA, Altamura S, Spolaore B, Giacotti V, Bedford MT and Manfioletti G** (2006) The AT-hook of the chromatin architectural transcription factor high mobility group A1a is arginine-methylated by protein arginine methyltransferase 6. *J Biol Chem* **281**, 3764-3772
- Shinoyama H, Kazuma T, Komano M, Nomura Y, Tsuchiya T** (2002) An efficient transformation system in chrysanthemum [*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] stable and non-chimeric expression of foreign genes. *Plant Biotechnol* **19**, 335-343
- Soh HS, Han YH, Lee GY, Lim JW, Yi BY, Lee YH, Choi GW and Park YD** (2009) Transformation of *Chrysanthemum morifolium* with insecticidal gene (*CryIAC*) to develop pest resistance. *Hort Environ Biotechnol* **50**, 57-62
- Street IH, Shah PK, Smith AM, Avery N and Neff MM** (2008) The AT-hook-containing proteins SOB3/AHL29 and ESC/AHL27 are negative modulators of hypocotyl growth in Arabidopsis. *Plant J* **54**, 1-14
- Strick R and Laemmli UK** (1995) SARs are cis DNA elements of chromosome dynamics: synthesis of a SAR repressor protein. *Cell* **83**, 1137-1148

- Su Y, Kwon CS, Bezhani S, Huvermann B, Chen C, Peragine A, Kennedy JF, and Wagner D** (2006) The N-terminal ATPase AT hook-containing region of the *Arabidopsis* chromatin-remodeling protein SPLAYED is sufficient for biological activity. *Plant J* **46**, 685–699
- Takatsu Y, Tomotsune H, Kasumi M and Sakuma F** (1998) Differences in adventitious shoot regeneration capacity among Japanese chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) cultivars and the improved protocol for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *J Jap Soc Hortic Sci* **67**, 958-964
- Tanaka K, Kanno Y, Kudo S and Suzuki M** (2000) Somatic embryogenesis and plant regeneration in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Ramat. Kitamura) *Plant Cell Rep* **19**, 946-953
- Teixeira da Silva JA** (2003) Chrysanthemum: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. *Biotechnol Adv* **21**, 715-766
- Teixeira da Silva JA** (2004) Ornamental chrysanthemums: improvement by biotechnology. *Plant Cell Tiss Org Cult* **79**, 1-18
- Teixeira da Silva JA and Fukai S** (2002) Change in transgene expression following transformation of chrysanthemum by four gene introduction methods. *Prop Ornament Plants* **2**, 28-37
- Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Cramer R, Davies JE, Lauwereys M, Botterman J** (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J* **6**, 2519-2523
- Toguri T, Ogawa T, Kakitani M, Tukahara M and Yoshioka M** (2003) *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*) plants with a disease resistant gene (*pac1*). *Plant Biotechnol* **20**, 121-127
- Toyama K, Bae CH, Kang JG, Lim YP, Adachi T, Riu KZ, Song PS, Lee HY** (2003) Production of herbicide-tolerant zoysiagrass by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol Cells* **16**, 19-27
- Urban LA, Sherman JM, Moyer JW and Daub ME** (1994) High frequency shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). *Plant Sci* **98**, 69-79.
- Van Leperen W, Nijse J, Keijzer CJ, van Meeteren U** (2001) Induction of air embolism in xylem conduits of pre-defined diameter. *J Exp Bot* **52**, 981-991
- Voleti SR, Singh VP, Ajay A, Narendra S, Kushwahara SR, Arora A, Singh N, Hemantaranjan A** (2000) Physiology of flower senescence in floricultural crops. *Adv Plant Physiol* **3**, 423-439
- Vom Endt D, Soares E, Silva M, Kijne JW, Pasquali G, Memelink J** (2007) Identification of a bipartite jasmonate-responsive promoter element in the *Catharanthus roseus* ORCA3 transcription factor gene that interacts specifically with AT-hook DNA-binding protein. *Plant Physiol* **144**, 1680-1689
- Watrud, LS, EH Lee, A Fairbrother, C Burdick, JR Reichman, M Bollman, M Storm, G King and KV Water** (2004) Evidence for landscape-level, pollen-mediated gene flow from genetically

modified creeping bentgrass with CP4 EPSPS as a marker. *PNAS* **101**, 14533-4538

Wei S, Du Z, Gao F, Ke X, Li J, Liu J, Zhou Y (2015) Global transcriptome profiles of 'Meyer' Zoysiagrass in response to cold stress. *PLoS One* **10**, e0131153

Xiao C, Chen F, Yu X, Lin C, Fu YF (2009) Over-expression of an AT-hook gene, AHL22, delays flowering and inhibits the elongation of the hypocotyl in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **71**, 39-50.

Xu L, Zhang M, Zhang X, Han LB (2015) Cold acclimation treatment-induced changes in abscisic acid, cytokinin, and antioxidant metabolism in zoysiagrass (*Zoysia japonica*). *HortScience* **50**, 1075-1080

Yun J, Kim YS, Jung JH, Seo PJ, Park CM (2012) The AT-hook motif-containing protein AHL22 regulates flowering initiation by modifying *FLOWERING LOCUS T* chromatin in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **287**, 15307-15316

Zhao J, Bai W, Zeng Q, Song S, Zhang M, Li X, Hou L, Xiao Y, Luo M, Li D, Luo X, Pei Y (2015) Moderately enhancing cytokinin level by down-regulation of *GhCKX* expression in cotton concurrently increases fiber and seed yield. *Mol Breeding* **35**, 60

Zhao J, Favero DS, Qiu J, Roalson EH, Neff MM (2014) Insights into the evolution and diversification of the *AT-hook Motif Nuclear Localized* gene family in land plants. *BMC Plant Biol* **14**, 266

남홍길, 김진희, 우혜련 (2005) 식물 잎 수명 조절 단백질, 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2005-0079892 (출원인; 포항공대, 제노마인(주))

이동희, 김국진, 이인철 (2010) 식물의 수명 연장 기능 및 스트레스 내성 기능을 가지는 GSDL2 단백질, 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2010-0030394, (출원인; 제노마인(주))

이동희, 김국진, 이인철, 김동수 (2010) 식물체의 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATHG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2010-0010652 (출원인; 제노마인(주))

이동희, 이인철, 김국진 (2011) 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2011-0038932, (출원인; 제노마인(주))

이동희, 이인철, 김국진, 김동수 (2011) 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG7 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2011-0038929, (출원인; 제노마인(주))

이동희, 이인철, 김국진, 김동수, 박경목 (2011) 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG4 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2011-0110593, (출원인; 제노마인(주))

이동희, 이인철, 김국진, 김동수, 박경목 (2012) 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG3 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2012-0016951 (출원인; 제노마인(주))

- 이동희 등 (2013) 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 ATPG6 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2013-0075018 (출원인; 제노마인(주))
- 이동희 등 (2013) 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 ATPG10 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2013-0075022 (출원인; 제노마인(주))
- 이동희 등 (2014) *ORE7* 유전자를 이용한 식물 생산성 증대 방법, 식물 스트레스 내성 강화 방법 및 식물 노화 지연 방법 (기여도 30%), 대한민국 특허출원 10-2014-0132324 (출원인; 제노마인(주))
- 이동희 등 (2015) 식물의 왜화 유도 기능을 가진 폴리펩티드, 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 이들의 용도. 대한민국 특허등록 10-1556927 (기여도 100%), 3차년도
- 이동희 등 (2016) 식물의 생산성 증대 기능과 노화 지연 기능을 갖는 MtATPG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2016-0129693
- 이동희 등 (2016) 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 MtATPG2 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2016-0129696
- 이동희 등 (2017) 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 AHL26 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도. 대한민국 특허출원 10-2017-0168525

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 식물 분자유종 기술을 이용한 생산성 증대 및 녹기 연장 들잔디 및 국화 우수 계통 육성 (영문) Development of <i>Zoysia japonica</i> and <i>Chrysanthemum morifolium</i> events with yield increase and delayed-senescence traits through the technology of plant molecular breeding				
주관연구기관	제노마인(주)		주 관 연 구	(소속) 첨단생명공학연구소	
참 여 기 업			책 임 자	(성명) 이 동 회	
총연구개발비 (934,000천원)	계	934,000천원	총 연 구 기 간	2016.09.05. ~ 2018.12.31.(2년 4월)	
	정부출연 연구개발비	700,000천원	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	55명
	기업부담금	234,000천원		내부인원	
	연구기관부담금			외부인원	55명

○ 연구개발 목표 및 성과

본 연구의 최종 목적인 생산성 증대 및 녹기 연장의 형질을 가진 고품질 GM 들잔디 및 국화 품종을 개발하고 실용화하기 위하여 본 연구기간 동안 다음의 연구개발 목표를 달성하고자 한다.

1. 고효율 들잔디/국화 형질전환 시스템 확립.
2. 생산성 증대 및 녹기 연장의 목표형질관련 유용 유전자 확보 및 발굴(7종 확보 및 3종 발굴).
3. 확보 및 발굴된 유용 유전자를 들잔디 및 국화에 도입하여 8종의 들잔디 및 6종의 국화 형질전환체 생산(20 개체 이상/유전자).
4. 생산된 형질전환체를 대상으로 생산성 증대 및 녹기 연장의 목표형질에 대한 기능 분석을 실시하여 4종의 우량 형질전환체 개발(잔디 2종, 국화 2종).
5. 개발된 우량 형질전환체에 대한 포장시험을 통하여 고품질 농업형질 발현 우수 계통 2종을 육성하여(작물 당 1종, 농업형질: $\geq 120\%$ 생산성 증대 및 녹기 연장), GM 들잔디 및 국화 품종 개발에 적용.
6. 선별된 우수 계통에 대한 품종 개발은 추후 GM 작물 실용화 연구를 통하여 추진하며, 본 사업 동안의 추진 단계는 우수 계통 육성까지를 수행.

○ 연구내용 및 결과

- 우리는 확보하고 있는 유용 유전자 중 생산성 증대와 녹기 연장의 농업형질을 제공하는 *ORE15*, *ATHG1*, *ATPG3*, *ATPG4*, *ATPG6*, *ATPG7*, *ATPG8*, *ATPG10*를 들잔디 및 국화 형질전환체 개발에 적용하였으며, 또한 homology approach를 통하여 애기장대와 *Medicago truncatula*에서 신규 발굴한 유용 유전자 *AHL26*, *MtATPG3*, *MtATPG4*, 그리고 *MtATPG5* 모두는 정도의 차이는 있지만 생산성 증대와 녹기 연장이라는 공통적인 농업형질을 제공하여 들잔디 및 국화 형질전환체 개발에 3종의 신규 유전자를 적용하였다.
- 우리는 상기 유전자를 고효율 형질전환 시스템을 통하여 들잔디와 국화 형질전환체를 생산하였다. 생산된 형질전환체는 일차적으로 유전자 도입/발현 분석 등의 기능 분석을 통하여 선별하였으며, 이후 생산성 증대 및 녹기 연장에 대한 목표형질 분석을 통하여 우량 형질전환체를 선별하였다. 들잔디에서는 *ATHG1*, *ATPG3*, *ATPG7*, 그리고 *ATPG10*을 도입한 형질전환체에서 녹기 연장, 스트레스 저항성 등의 농업형질에 대한 우량 형질전환체를 선별할 수 있었으며, 국화에서는 *ORE15*, *ATPG4*, *ATPG7*, 그리고 *ATPG10*을 도입한 형질전환체에서 녹기 연장, 고생장성 등의 농업형질에 대한 우량 형질전환체를 선별할 수 있었다.

○ 개발된 우량 형질전환체는 형질전환 계통 증식, 온실 증식을 통한 농업형질 규명 등을 통하여 들잔디에서 농업형질 개선(160%의 녹기 연장과 300%의 스트레스 저항성 형질)을 가지는 ATHG1-#1과 120%의 녹기 연장과 200%의 스트레스 저항성 형질을 가지는 ATPG7-#3, 그리고 국화에서 약 125% 이상의 고생산성과 녹기연장 농업형질을 가지는 ORE15-#4와 약 125% 이상의 농업형질 개선(고생산성/녹기연장/스트레스 저항성)을 가지는 ATPG10-#5를 우수계통으로 선발/육성하고 있으며, 이들 우수계통은 GM 품종 등록을 위한 예비조사를 수행하고자 한다.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

1. 연구성과 목표 및 대비 실적

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책·홍보		기타(타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책·홍보	홍보전시	
											SCI	비SCI							
최종 목표	4											3	1	6		2			
1차년도	목표	1												1					
	실적	1												2					
2차년도	목표	2										1	1	3					
	실적	3												4	1				
3차년도	목표	1										2		2		2			
	실적	1	5									2*		6		2			
소계	목표	4										3	1	6		2			
	실적	5	5									2*	0**	11		3			

*2건 accepted; **1건 게재예정

2. 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부(SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Overexpression of <i>ICE1</i> , a regulator of cold-induced transcriptome, enhances tolerance to cold stress in transgenic <i>Zoysia japonica</i>	Journal of Plant Biology	이효연		대한민국	Korean Society of Plant Biologists	SCI(E)	Accepted, 2018.12.17	
2	Plastidial and mitochondrial malonyl CoA-ACP malonyltransferase is essential for cell division, and its overexpression increases storage oil content	Plant Cell Physiol.	서미정		대한민국	Japanese Society of Plant Physiologists	SCI	Accepted, 2019.02.08	
3	Ectopic expression of AHL24 in chrysanthemum plants delayed senescence and enhanced stress tolerance	Plant Breed. Biotech.	형남인		대한민국	Korean Society of Breeding Science	비SCI	2019 (게재예정)	

3. 국내 및 국제학술대회 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	20th EUCARPIA General Congress: Ectopic expression of AHL24 in chrysanthemum plants delayed senescence and enhanced stress tolerance	등	2016.08.29	Zurich	스위스
2	한국식물학회 정기학술대회: Regulated expression of <i>MtATPG1</i> confers yield improvement and senescence delay in <i>Arabidopsis</i>	김국진 등	2016.11.03	부여	대한민국
3	한국식물생명공학회 정기학술발표회: Expression of <i>MtATPG2</i> regulates yield improvement and delayed leaf senescence in <i>Arabidopsis</i>	김국진 등	2017.06.08	대전	대한민국
4	한국식물생명공학회 정기학술발표회: Overexpression of ABF3 confers enhanced water stress tolerance in transgenic chrysanthemum	박진선 등	2017.06.08	대전	대한민국
5	15th International Symposium on rice functional genomics: Overexpression of <i>ICE1</i> , a regulator of cold-induced transcriptome, enhances tolerance to cold stress in transgenic <i>Zoysia japonica</i>	강홍규 등	2017.09.25	수원	대한민국
6	한국식물생명공학회 정기학술발표회: <i>ATPG4</i> Confers Yield Improvement and Senescence Delay through the Regulation of Cytokinin and Auxin Signaling in <i>Arabidopsis</i>	김국진 등	2018.05.31	여수	대한민국
7	2018 한국육종학회 심포지움: 교배종 제초제내성 GM 잔디의 주변 생태계에 미치는 영향 평가	선현진 등	2018.07.11	제주	대한민국
8	2018 한국육종학회 심포지움: 교배종 제초제내성 GM 잔디의 육성 및 환경위해성 평가	선현진 등	2018.07.11	제주	대한민국
9	2018 한국육종학회 심포지움: 교배종 제초제내성 GM 잔디의 분자생물 및 유전학적 특성 평가	정하나 등	2018.07.11	제주	대한민국
10	30th International Horticultural Congress: Transgenic expression of <i>ATPG4</i> gene in chrysanthemum enhances plant growth and delays plant senescence	윤여진 등	2018.08.12	이스탄불	터키
11	2018 International Conference of the Korean Society of Plant Biologists: The basic helix-loop-helix transcription factor, <i>ZjICE1</i> , from Korean lawn grass confers tolerance to cold stress	Zhi-Fang Zuo 등	2018.11.08	부산	대한민국

4. 지식재산권: 특허출원/등록

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	식물의 생산성 증대 ^{a)}	대한민국	제노마인(주)	2016.10	10-2016-0129693				50
2	식물의 생산성 증대 ^{b)}	국제(PCT)	제노마인(주)	2017.09	PCT/KR2017/010855				50
3	식물의 생산성 증대 ^{c)}	국제(PCT)	제노마인(주)	2017.09	PCT/KR2017/010859				50
4	식물의 생산성 증대 ^{d)}	대한민국	제노마인(주)	2017.12	10-2017-0168525				50
5	식물의 노화 지연 ^{e)}	대한민국				제노마인(주)	2018.04	10-1850003	90
6	식물의 생산성 증대 ^{f)}	대한민국				제노마인(주)	2018.04	10-1855135	90
7	식물의 생산성 증대 ^{g)}	대한민국				제노마인(주)	2018.04	10-1855134	90
8	식물의 생산성 증대 ^{h)}	대한민국				제노마인(주)	2018.04	10-1855136	90
9	식물의 생산성 증대 ⁱ⁾	대한민국				제노마인(주)	2018.04	10-1855137	90
10	애기장대 유래의 ^{j)}	대한민국	제노마인(주)	2018.03	10-2018-0030056				30

- a) 생산성 증대 기능과 노화 지연 기능을 갖는 MtATPG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도
- b) 식물의 생산성 증대 기능과 노화 지연 기능을 갖는 MtATPG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도
- c) 식물의 생산성 증대 기능, 스트레스 내성 기능 및 노화 지연 기능을 갖는 MtATPG2 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도
- d) 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 AHL26 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도
- e) 식물의 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATHG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도
- f) 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG3 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도
- g) 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 APTG4 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도
- h) 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG7 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도
- i) 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG8 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도
- j) 애기장대 유래의 MCAMT 유전자를 이용한 식물의 성장, 발달 및 종자 저장 오일 함량이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 용도

5. 전문 연구인력 양성

No	분류	기준 년도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	학위 취득 (석사)	2017		1				1		1				
2	학위 취득 (학사)	2018			2			2		2				

6. 연구성과 활용 계획

- GM 원예 작물의 개발에 있어서 생산성 증대와 녹기 연장의 목표형질 도입은 고품질 농업형질을 가지는 원예 작물의 개발에 많은 장점을 제공한다. 따라서 고품질 농업형질관련 유용 유전자에 대한 지적소유권의 확보는 미래원천기술의 확보로 특성에 맞는 다양한 작물의 개발이 가능하게 하고, 경제적으로 고부가 가치 창출이 가능하게 하며, 향후 국가 농업생명공학 산업화의 경쟁력을 가지는데 일조할 것이다.
- 우량 GM 들잔디 및 국화 품종 개발에 대한 우수품종 육성 기술 확립은 국내에서 확보하고 있는 생산성 증대, 스트레스 저항성, 대사물질 축적 등 농업형질 적용 가능 유전자의 도입을 통하여 기후 변화 대처, 생산 안정성, 생산성 증대, 신기능성 등과 같은 다양한 우량 GM 품종 개발을 가능하게 할 것이다.
- 형질전환 기술을 바탕으로 개발된 신품종은 교배 모본으로 활용이 가능하므로 교배를 통한 다양한 신품종 개발에 사용될 수 있을 것이며, 또한 유전자 발굴부터 형질전환체 생산, 재배 및 포장 검정에 이르는 완전한 일련의 분자유종체계를 확립하여 모델링함으로써 분자유종의 모델로 활용할 수 있을 것이다.
- 발굴된 유전자와 개발된 우수 계통에 대한 산업화는 우선 유전자 혹은 우수 계통에 대한 지적소유권을 확보한 후, 지적소유권의 기술이전이라는 단기 사업 전략과 신품종 생산을 통한 수익창출이라는 장기 사업 전략으로 진행하고자 한다.

자체평가의견서

1.

		과제번호	116080-3		
사업구분	농생명산업기술개발사업				
연구분야	원예작물 생명공학		과제구분	단위	
사업명	농생명산업기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	식물 분자유종 기술을 이용한 생산성 증대 및 녹기 연장 들잔디 및 국화 우수 계통 육성		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구기관	제노마인(주)		연구책임자	이동희	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016.09.05 - 2016.12.31	100,000	34,000	134,000
	2차연도	2017.01.01 - 2017.12.31	300,000	100,000	400,000
	3차연도	2018.01.01 - 2018.12.31	300,000	100,000	400,000
	4차연도				
	5차연도				
	계		700,000	234,000	934,000
참여기업					
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 :

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
제노마인(주)	연구소장	이동희

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	
-----------	--

I. 연구개발실적

다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

연구개발 목표:

신규 유용 유전자 3종 발굴, 우량 형질전환체 4종 개발, 우수계통 2종 육성

연구개발 결과:

신규 유용 유전자 4종 발굴, 우량 형질전환체 8종 개발, 농업형질 개선($\geq 120\%$ 생산성 증대 혹은 녹기 연장) 우수계통(event) 4종 육성

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

Chromatin architecture 조절기술을 통한 생산성 증대형질 관련 유용 유전자는 고생산성 등이 생산성 증대 및 녹기 연장 형질의 제공에 있어서 폭넓은 식물 스펙트럼을 가지므로 타 경제작물 개발에도 적용이 가능하리라 기대된다.

본 사업을 통해 개발된 생산성 증대 혹은 녹기 연장 농업 형질을 나타내는 우수계통은 이후 안정성 평가 등의 GM 실용화 연구를 통하여 생산성 증대 혹은 녹기 연장 GM 들국화 및 국화 품종을 개발하고자 하며 이러한 농업형질을 가진 GM 들국화 및 국화 품종 개발은 일본의 GM 국화 시장 개방 및 다국적기업의 최근 종자개발 전략과 일치하므로 해외 진출에 있어 많은 장점을 가질 수 있을 것이다.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

Chromatin architecture 조절기술을 통한 생산성 증대형질 관련 유용 유전자는 고생산성 등이 생산성 증대 및 녹기 연장 형질의 제공에 있어서 폭넓은 식물 스펙트럼을 가지므로 타 경제작물 개발에도 적용이 가능하리라 기대된다.

본 사업을 통해 개발된 우수계통은 이후 안정성 평가 등의 GM 실용화 연구를 통하여 생산성 증대 혹은 녹기 연장 GM 들잔디 및 국화 품종 개발에 적용하고자 한다. 개발되는 GM 들잔디 및 국화 품종은 벡터 및 유전자에 대한 지적소유권 확보로 특허에 대한 문제점을 최소화할 수 있어 작물의 실용화에 유익하게 활용할 수 있을 것이다.

우량 GM 들잔디 및 국화 품종 개발에 대한 우수품종 육성 기술 확립은 국내에서 확보하고 있는 생산성 증대, 스트레스 저항성, 대사물질 축적 등 농업형질 적용 가능 유전자의 도입을 통하여 기후 변화 대처, 생산 안정성, 생산성 증대, 신기능성 등과 같은 다양한 우량 GM 품종 개발을 가능하게 할 것이다.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 사업의 연구기간내 연구개발 수행 내용에 대한 정성적 연구개발실적 대부분이 100% 이상을 달성하였으며, 이를 통하여 정량적 연구개발 실적 또한 대부분 100% 이상의 목표 달성도를 가져 연구개발 수행노력의 성실도는 아주우수 등급으로 판단됨

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

연구개발성과 목표: 논문 게재 4건(SCI급 3건, 비SCI급 1건), 특허출원/등록 4건, 학술대회 발표 6건
연구개발성과 실적: 논문 게재 2건(SCI급 2건 accepted; 비SCI급 1건-게재 예정), 특허출원/등록 10건, 학술대회 발표 11건

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
생산성 증대 및 녹기 연장 등의 목표형질 발현 유용 유전자 확보 및 발굴 (총 10종)	30	>100	<ul style="list-style-type: none"> · 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질 발현 유용 유전자 확보: <i>ORE15</i>, <i>ATHG1</i>, <i>ATPG3</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG6</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG8</i>, <i>ATPG10</i> (8종) <ul style="list-style-type: none"> - 들잔디 적용: <i>ATHG1</i>, <i>ATPG3</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG8</i>, <i>ATPG10</i> - 국화 적용: <i>ORE15</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG6</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG10</i> · 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 (4종) <ul style="list-style-type: none"> - 애기장대로부터 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질을 가지는 <i>AHL26</i> 발굴 및 기능 검정 - <i>Medicago truncatula</i>로부터 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질을 가지는 <i>MtATPG3</i>, <i>MtATPG4</i>와 <i>MtATPG5</i> 발굴 및 기능 검정 - 모델 식물인 애기장대에서 생산성 증대 및 녹기 연장 관련 조사를 통한 목표형질 확인
잔디 및 국화의 고효율 형질전환 시스템 확립	10	100	<ul style="list-style-type: none"> · 들잔디에 대한 고효율 재분화 시스템 및 고효율 형질전환 시스템 확립 · 국화에 대한 고효율 재분화 시스템 및 고효율 형질전환 시스템 확립
형질전환 및 형질전환체 생산: 총 14종 (들잔디 8종, 국화 6종)	15	>100	<ul style="list-style-type: none"> · 형질전환용 벡터 construct 제작 (총 17종-확보 11종, 신규 6종) <ul style="list-style-type: none"> 들잔디: <i>ATHG1</i>, <i>ATPG3</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG8</i>, <i>ATPG10</i> (확보), <i>AHL26</i>, <i>MtATPG3</i>, <i>MtATPG4</i> (신규) 국화: <i>ORE15</i>, <i>ATPG4</i>, <i>ATPG6</i>, <i>ATPG7</i>, <i>ATPG10</i> (확보), <i>AHL26</i>, <i>MtATPG3</i>, <i>MtATPG4</i> (신규) · 형질전환 및 형질전환체 생산: 들잔디 8종, 국화 8종 · 형질전환체 1차 기능분석: 유전자 도입 및 발현 분석
형질전환체 기능 분석을 통한 생산성 증대 및 녹기 연장형질 발현 우량 형질전환체 개발: 총 4종 (들잔디 2종, 국화 2종)	15	>100	<ul style="list-style-type: none"> · 형질전환체 기능 분석 (총 14종: 들잔디 6종, 국화 8종) <ul style="list-style-type: none"> - 형질전환체 1차 표현형 분석 - 형질전환체의 도입 유전자 기능 확인을 통한 목표형질 규명 · 우량 형질전환체 개발 (총 8종: 들잔디 4종, 국화 4종) <ul style="list-style-type: none"> - 형질전환체의 온실 및 소규모 포장 검정을 통한 농업형질 규명 - 도입형질 고정 형질전환체 계통 육성
고품질 농업형질 발현 우수 계통 2종 육성: 들잔디 1종, 국화 1종	15	>100	<ul style="list-style-type: none"> · 포장시험을 통한 고품질 농업형질 발현 우수 계통 4종 육성: 들잔디 2종, 국화 2종 <ul style="list-style-type: none"> - 생산성 증대 및 녹기 연장 농업형질 개선 - 스트레스 저항성 형질 개선 - GM 들잔디 및 국화 신제품 등록을 위한 예비 조사
특허 및 논문 등 지적 소유권 확보 (8건)	15	>100	<ul style="list-style-type: none"> · 특허출원/등록 10건 (출원 5건, 등록 5건) · 논문: 2건 (SCI급 2건 accepted; 비SCI급 1건 게재 예정)
합계	100점	>100	

III. 종합의견

1. 대한 종합의견

연구개발 결과의 정성적, 그리고 정량적 목표에 대하여 100% 이상의 목표달성도를 가져 전체적으로 연구개발결과가 아주 우수한 것으로 판단됨.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

Chromatin architecture 조절기술을 통한 생산성 증대형질 관련 유용 유전자는 고생산성 등이 생산성 증대 및 녹기 연장 형질의 제공에 있어서 폭넓은 식물 스펙트럼을 가지므로 타 경제작물 개발에도 적용이 가능하리라 기대된다.

본 사업을 통해 개발된 생산성 증대 혹은 녹기 연장 농업 형질을 나타내는 우수계통은 이후 안정성 평가 등의 GM 실용화 연구를 통하여 생산성 증대 혹은 녹기 연장 GM 들국화 및 국화 품종을 개발하고자 하며 이러한 농업형질을 가진 GM 들국화 및 국화 품종 개발은 일본의 GM 국화 시장 개방 및 다국적기업의 최근 종자개발 전략과 일치하므로 해외 진출에 있어 많은 장점을 가질 수 있을 것이며, 개발되는 GM 들잔디 및 국화 품종은 벡터 및 유전자에 대한 지적소유권 확보로 특허에 대한 문제점을 최소화할 수 있어 작물의 실용화에 유익하게 활용할 수 있을 것이다.

IV. 보안성 검토

o 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 의견

--

2. 연구기관 자체의 검토결과

--

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	원예작물 생명공학	
연구과제명	식물 분자유종 기술을 이용한 생산성 증대 및 녹기 연장 들잔디 및 국화 우수 계통 육성			
주관연구기관	제노마인(주)		주관연구책임자	이 동 희
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	700,000천원	234,000천원		934,000천원
연구개발기간	2016.09.05 - 2018.12.31			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 생산성 증대 및 녹기 연장 등의 목표형질 발현 유용 유전자 확보 및 발굴 (총 10종)	<ul style="list-style-type: none"> · 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질 발현 유용 유전자 확보: <i>ORE15, ATHG1, ATPG3, ATPG4, ATPG6, ATPG7, ATPG8, ATPG10</i> (8종) <ul style="list-style-type: none"> - 들잔디 적용: <i>ATHG1, ATPG3, ATPG4, ATPG7, ATPG8, ATPG10</i> - 국화 적용: <i>ORE15, ATPG4, ATPG6, ATPG7, ATPG10</i> · 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질 관련 유용 유전자 발굴 및 기능 검정 (4종) <ul style="list-style-type: none"> - 애기장대로부터 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질을 가지는 <i>AHL26</i> 발굴 및 기능 검정 - <i>Medicago truncatula</i>로부터 생산성 증대 및 녹기 연장 목표형질을 가지는 <i>MtATPG3, MtATPG4</i>와 <i>MtATPG5</i> 발굴 및 기능 검정 - 모델 식물인 애기장대에서 생산성 증대 및 녹기 연장 관련 조사를 통한 목표형질 확인
② 잔디 및 국화의 고효율 형질전환 시스템 확립	<ul style="list-style-type: none"> · 들잔디에 대한 고효율 재분화 시스템 및 고효율 형질전환 시스템 확립 · 국화에 대한 고효율 재분화 시스템 및 고효율 형질전환 시스템 확립
③ 형질전환 및 형질전환체 생산: 총 14종 (들잔디 8종, 국화 6종)	<ul style="list-style-type: none"> · 형질전환용 벡터 construct 제작 (총 17종-확보 11종, 신규 6종) 들잔디: <i>ATHG1, ATPG3, ATPG4, ATPG7, ATPG8, ATPG10</i> (확보), <i>AHL26, MtATPG3, MtATPG4</i> (신규) 국화: <i>ORE15, ATPG4, ATPG6, ATPG7, ATPG10</i> (확보), <i>AHL26, MtATPG3, MtATPG4</i> (신규) · 형질전환 및 형질전환체 생산: 들잔디 8종, 국화 8종 · 형질전환체 1차 기능분석: 유전자 도입 및 발현 분석

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
④ 형질전환체 기능 분석을 통한 생산성 증대 및 녹기 연장형질 발현 우량 형질전환체 개발: 총 4종 (들잔디 2종, 국화 2종)	<ul style="list-style-type: none"> · 형질전환체 기능 분석 (총 14종: 들잔디 6종, 국화 8종) <ul style="list-style-type: none"> - 형질전환체 1차 표현형 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 형질전환체의 도입 유전자 기능 확인을 통한 목표형질 규명 · 우량 형질전환체 개발 (총 8종: 들잔디 4종, 국화 4종) <ul style="list-style-type: none"> - 형질전환체의 온실 및 소규모 포장 검정을 통한 농업형질 규명 - 도입형질 고정 형질전환체 계통 육성
⑤ 고품질 농업형질 발현 우수 계통 2종 육성: 들잔디 1종, 국화 1종	<ul style="list-style-type: none"> · 포장시험을 통한 고품질 농업형질 발현 우수 계통 4종 육성: 들잔디 2종, 국화 2종 <ul style="list-style-type: none"> - 생산성 증대 및 녹기 연장 농업형질 개선 - 스트레스 저항성 형질 개선 - GM 들잔디 및 국화 신품종 등록을 위한 예비 조사
⑥ 특허 및 논문 등 지적 소유권 확보 (8건)	<ul style="list-style-type: none"> · 특허출원/등록 10건 (출원 5건, 등록 5건) · 논문: 2건 (SCI급 2건 accepted; 비SCI급 1건 게재 예정)

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표	정책 활용			홍보 전시		
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종목표	4										3	1	6		2					
연구기간내 달성실적	5	5									2*	0**	11		3					
달성율(%)	125	500											183		150					

* 2 accepted; ** 1건 게재 예정

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	생산성 증대 및 녹기 연장 농업형질을 제공하는 chromatin architecture 조절관련 유전자
②	고효율 들잔디 형질전환 기술
③	고효율 국화 형질전환 기술
④	생산성 증대, 녹기 연장, 스트레스 저항성 농업형질을 가지는 우량 들잔디 및 국화 형질전환체 개발 및 우수계통 선발·육성

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복	외국기술 소	외국기술 개	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장에로 해	정책 자료	기타
①의 기술	v					v	v			
②의 기술					v	v	v			
③의 기술					v	v	v			
④의 기술	v				v	v	v	v		

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	- chromatin architecture 조절관련 유전자의 타 작물 개발에 적용 - 기술이전을 통한 기술사업화
②의 기술	- 국내 GM 들잔디 품종 개발에 있어서 분자유종에 대한 기반 기술 제공
③의 기술	- 국내 GM 국화 품종 개발에 있어서 분자유종에 대한 기반 기술 제공
④의 기술	- 생산성 증대, 녹기 연장, 스트레스 저항성 등의 농업형질을 가진 들잔디 및 국화 우량 형질전환체 개발, 그리고 선발된 우수계통 육성을 통한 GM 들잔디 및 국화 품종 개발 - 농업형질 개선 들잔디 및 국화 우수 품종에 대한 산업화 (국내 그리고 해외 조기 진출 가능) - 농업형질 개선 들잔디 및 국화 우수 품종에 대한 기술이전 혹은 공동연구를 통한 고부가 가치 창출

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실 시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문 SC I	비 SC I	논문 평균 IF			학술 발표	정책 활용	
단위	건	건	건	건	만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표	4										3	1		6	2				
연구기간내 달성실적	5	5									2	0		11	3				
연구종료 후 성과창출 계획		3		1										1	2				

주의

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.