

최 종  
연구보고서

Virus 유전자 형질전환을 이용한 CGMMV  
저항성 수박 품종 개발  
Development of Transgenic Watermelon  
Resistant to CGMMV by Using Virus Gene

(주) 농우바이오  
(육종연구소 생명공학센터, 서울여자대학교)

농 립 부

# 최 종 보 고 서

2000년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 Virus 유전자 형질전환을 이용한 CGMMV 저항성 수박 품종 개발에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨부: 1. 최종보고서 10부  
2. 최종보고서 CD 1부

2003년 7월 31일

주관연구기관: (주)농우바이오

총괄연구책임자: 한 지 학 인

주관연구기관장: 조 대 현 인

농 립 부 장 관 귀 하

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Virus 유전자 형질전환을 이용한 CGMMV 저항성 수박 품종 개발” 과제 (세부과제 “Virus 유전자 형질전환을 이용한 CGMMV 저항성 수박 품종 개발관한 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 7월 31일

주관연구기관명 : (주)농우바이오

총괄연구책임자 : 한 지 학

세부연구책임자 : 한 지 학

연 구 원 : 허 남 한

연 구 원 : 신 윤 섭

연 구 원 : 한 상 렬

연 구 원 : 이 장 하

세부연구책임자 : 양 승 균

연 구 원 : 정 민

협동연구기관명 : 서울여자대학교

협동연구책임자 : 류 기 현

# 요 약 문

## I. 제 목

Virus 유전자 형질전환을 이용한 CGMMV 저항성 수박 품종 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 우리나라의 CGMMV (오이녹반모자이크바이러스) 저항성 수박 품종개발 관한 연구는 절실하다. CGMMV는 국내에서 1989년 처음으로 경남 함안, 진주의 수박 재배 농가들에서 보고되었으며 매년 지역별로 수박 피해가 증가하다가 1998년서부터는 수박뿐만 아니라 모든 박과 작물로 감염 폭이 넓어짐으로서 농가에서의 피해가 앞으로도 계속 증가할 수밖에 없다. 수박은 고추에 이어 국내 2번째로 큰 종자 시장이고 7000억원에 가까운 생산물 시장을 확보하고 있다. 대부분의 국내 수박 종자는 중국을 비롯 해외에서 채종되어 수입하는데 CGMMV의 경우 규제비검역병으로 규제되어 있어서 수입종자 검역결과 불합격 판정을 받을 경우 종자회사로서는 종자수급이 어려워진다. 이렇게 되면 약 250억원에 달하는 수박작물의 국내 종자시장에 타격을 줄뿐만 아니라 종자 및 생산품 값이 폭등하여 결국 농민, 서민의 부담이 커질 것으로 간주된다. 또한 CGMMV는 토양전염, 접촉전염, 종자 전염등 감염경로가 다양하고 뚜렷한 방제대책이 없기 때문에 일반적인 대책이나 규제비검역 규제만으로는 근본적인 해결이 되지 못한다. 그러므로 저항성 품종을 개발, 확보하여야 한다는 것은 필수적이며 이런 품종을 채종지서부터 파종하여 감염이 없는 종자수급을 유도하는 것이 본 연구개발의 필요성이다. 이를 위하여 관행육종을 통한 저항성 수박품종 개발은 CGMMV의 저항성 유전자가 없기 때문에 현재로서는 불가능하다. 따라서 유전공학을 이용한 저항성 품종개발을 하여야하며 따라서 본 과제 “Virus 유전자 형질전환을 이용한 CGMMV 저항성 수박 품종 개발”를 수행하게 되었다. 이 분야에 관해서는 선진국에서도 연구보고 된 바가 없어서 향후 GM작물의 자유 시장 체제 하에서는 막대한 외자를 벌 수 있는 주요 채소 품목이 될 수 있다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

형질전환을 위한 수박 재료는 대목으로 사용되는 수박공대와 수박 계통이었으나 지금까지 성공한 결과는 대목이었으며 계통의 형질전환은 아직 진행 중에 있다. 크게 3개 주제로 나누어 첫째, *CGMMV-CP* 유전자를 클로닝하고 식물형질전환벡터로 도입하는 과정, 둘째로 수박형질전환체계 구축 및 형질전환체 선발, 셋째로 *CGMMV*의 저항성 검정을 통하여 저항성 수박 형질전환체를 확보하였다. 이를 위하여 일년 차에 서울여대 류기현 교수팀이 협동과제를 담당하여 *CGMMV* 바이러스 동정과 *CGMMV-CP* 유전자를 확보하였다. 또한 수박재분화 조건 및 수박형질전환체계를 확립하였다. 2차년 차에는 자엽을 co-culture하는 방법과 정단분열조직하단부에 injection하는 방법을 구축하여 형질전환효율을 증가시켰다 (각각 0.1과 0.3%). 3차년 도엔 형질전환된 수박공대 (T1)를 *CGMMV*에 접종하여 저항성검정을 실시하였고 저항성 형질전환체를 확보하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

현재 *CGMMV* 저항성 수박대목 형질전환체를 다수 확보하였고 (T0) 그 중에서 2주를 선택하여 T1 개체 100주를 생산하여 *CGMMV*에 접종한바 6주의 형질전환체를 확보하였다. 이들은 현재 T2세대를 확보하기 위해서 격리하우스에서 재배중이다.

본 (주)농우바이오 육종팀에서는 차후 T세대의 육종을 통하여 계통으로 고정화시키면서 동시에 품종을 개발, 출원할 예정이다. 또한 T2 세대에서부터 안전성검정을 시작하여 향후 3년에 걸쳐 환경위해성, 인체위해성 검사를 받을 계획이다.

## SUMMARY

CGMMV (cucumber green mottle mosaic virus) is a group of Tobamovirus and composed of ssRNA. It had been identified in England in 1935 for the first time and has been spread all over countries so far. It is recognized especially in the Cucurbitaceous crops such as gourd, watermelon, cucumber, melon and oriental watermelon etc. It causes the fruit softening, pale color, and growth defect ending up the low quality product. The crop is easily infected by contact: water sprinkle, insect, wind and rain. In Korea, the virus was outbreaked in 1989 and it has been detected all of the region where the Cucurbitaceous crop grows, generating a huge economical loss.

Since the CGMMV infection is one of major diseases in Cucurbitaceous crops the development of protective measurement against virus outbreak is inevitable. Actually the means for the protection crops from CGMMV are not available except the hot and dry method of seed. Besides, the protection method is a limited prescription because the land itself has been contaminated by virus. The worsening situation is that the National Plant Quarantine Service does not allow CGMMV infected seeds and products to be imported. Therefore once the harvesting region is contaminated with CGMMV, the watermelon seed supply would be shortened. Because most of watermelon seeds that Korean seed companies bred are harvested in China and Indonesia, and imported back to Korea due to cheap labor. Recently, CGMMV contamination has been a serious problem in Chinese farm land, the present condition for seed business and supply is not perspective.

The best way to keep the plants away from CGMMV infection is to produce the CGMMV resistant cultivars. The classical breeding for this is not possible yet because of lack of genetic source. Presently the only way to generate the CGMMV resistant plant is to use the genetic engineering by transferring the related defensive

gene. The gene silencing mechanism by using virus gene such as coat protein gene has been successfully worked in many other plants. Therefore, we have set out a series of experimental plans to develop a CGMMV resistant watermelon cultivar since 2000. We have focused on watermelon because watermelon is the second ranked vegetable crop in Korea with a 22 million \$ seed market and 700 million \$ retail market of product. The objective of this research is to develop a CGMMV resistant watermelon cultivar. The transformation watermelon has been performed with two different watermelon samples: one for stock use and another for inbred lines.

Here we mainly report upon a successful development of watermelon stock (gongdae) which is resistant against CGMMV. Up to now, we have obtained T1 and T2 generation of gongdae. The watermelon stock is used for grafting the watermelon because of stronger viable root of stock. Using the CGMMV resistant stock for grafting watermelon is an excellent idea for protecting the 1st contamination of virus from the soil. Therefore, this work is a successful triumph in the arena of developing the value added crop by biotechnology.

# CONTENTS

Part I. Introduction of Research Project.....	9-13
Chapter 1. Research Background.....	9-11
Chapter 2. Need for Research and Development.....	11-12
1. Technical Aspects.....	11
2. Social and Economical Aspects.....	11-12
Chapter 3. Research Objectives and Scope.....	12-14
1. Research Objectives.....	12-13
2. Research Scopes.....	13-14
Part II. Present View of Technology in Domestic and Foreign Countries.....	14
Part III. Results and Discussion of Research Program.....	15-30
Chapter 1. Logical Background of Technical Development.....	15
Chapter 2. CGMMV Isolation and Cloning of <i>CGMMV-CP</i> Gene.....	16-21
1. CGMMV Identification and Isolation.....	16-17
2. <i>CGMMV-CP</i> Gene Isolation and Sequencing Analysis.....	17-20
1) RT-PCR Cloning of <i>CGMMV-CP</i> Gene from CGMMV Variants.....	17-18
2) Sequencing Analysis of <i>CGMMV-CP</i> Gene.....	18-19
3) RT-PCR Cloning of <i>CGMMV-CP</i> Gene from CGMMV-W Strain.....	19-20
3. Cloning of <i>CGMMV-CP</i> Gene into Transformation Vector.....	20-21
Chapter 3. Establishment of Regeneration and	



Transformation of Watermelon.....	21-28
1. Efficiency of Regeneration and Transformation from Watermelon Stock.....	21-26
1) Co-culture Conditions of Regeneration and Transformation from Watermelon Stock.....	21-22
2) Transformation Conditions of Watermelon Stock by Injection Method.....	22
3) Transformation rate of Watermelon Stock.....	22-24
4) Southern Blot Analysis of Transgenic Watermelon Stock.....	24-25
5) Growth Development of Transgenic Watermelon Stock.....	25-26
2. Efficiency of Regeneration and Transformation from Watermelon Lines.....	26-28
Chapter 4. CGMMV Resistant Test Transgenic Watermelon Stock.....	29-30
1. T1 Generation of Transgenic Watermelon Stock and CGMMV Resistant Test.....	29
2. Transgenic Watermelon Stock Resistant against CGMMV.....	30
3. Phenotypical Aspects of Transgenic Watermelon Stock.....	30
Part IV. Achievement and Contribution Levels of Results.....	31-32
Chapter 1. Achievement Levels of Results.....	31
Chapter 2. Contribution Levels of Results.....	32
Part V. Application of Results.....	33-35
Chapter 1. Importance of Results and Necessity of Follow-up.....	33-34
Chapter 2. Proposal for Cultivar.....	34
Chapter 3. Application to Other Research Direction.....	35

Part VI. Scientific and Technological Information  
Collection from Foreign Country.....35

Part VII. Reference.....36-38

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	9-13
제1절	연구배경.....	9-11
제2절	연구개발의 필요성.....	11-12
제1항	기술적측면.....	11
제2항	경제·사회적측면.....	11-12
제3절	연구개발목적과 범위.....	12-14
제1항	연구개발목적.....	12-13
제2항	연구범위.....	13
제 2 장	국내외 기술개발 현황.....	14
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....	15-30
제1절	기술개발의 이론적배경.....	15
제2절	연구결과 I: CGMMV 분리 및 CGMMV-CP 유전자 클로닝.....	16-21
제1항	CGMMV 동정 및 분리.....	16-17
제2항	CGMMV-CP 유전자 분리 및 염기배열분석.....	17-20
가.	CGMMV Variants의 CP 유전자의 RT-PCR, 클로닝 및 유전자 분석.....	17-18
나.	CGMMV-CP 유전자의 염기서열 결정.....	18-19
다.	CGMMV-W의 RT-PCR.....	19-20
제3항	CGMMV-CP 유전자의 형질전환벡터로의 클로닝.....	20-21
제3절	연구결과 II: 수박의 재분화율 조사 및 형질전환체계 확립.....	21-28
제1항	수박공대의 재분화율 및 형질전환효율.....	21-26
가.	수박공대의 재분화 및 형질전환조건 (co-culture).....	21-22
나.	Injection 방법에 의한 수박공대의 형질전환조건.....	22

다. 수박공대의 형질전환효율.....	22-24
라. 형질전환체의 Southern blot 분석.....	24-25
마. 수박공대 형질전환체 성장과정.....	25-26
제2항 수박계통의 재분화율 및 형질전환효율.....	26-28
제4절 연구결과 III: 수박공대 형질전환체의 CGMMV 저항성 검정.....	29-30
제1항 수박공대의 T1 세대 확보 및 CGMMV 저항성 test.....	29
제2항 CGMMV 저항성 수박공대.....	30
제3항 선발된 형질전환체의 원예적 변화 분석.....	30
제 4 장    목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	31-32
제1절 연구개발목표의 달성도.....	31
제2절 관련분야의 기술발전에의 기여도.....	32
제 5 장    연구개발결과의 활용계획.....	33-35
제1절 본 연구결과의 중요성 및 추가연구의 필요성.....	33-34
제2절 품종화 추진방안.....	34
제3절 타연구에의 응용.....	35
제 6 장    연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	35
제 7 장    참고문헌.....	36-38

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제1절 연구배경

식물 바이러스란 농작물을 포함하여 식물에 병을 일으키는 병원체의 일종이다. 일반 재배농가에서 바이러스 병을 쉽게 판별하기 어려운 이유는 바이러스에 감염될 경우 곰팡이나 세균병과는 달리 식물체 내에서 잠복기간이 비교적 길어서 초기에 감염유무를 알기 어렵기 때문이다. 또한, 생리장해와 비슷한 증상을 나타내는 경우도 많으며, 약제살포나 환경요인 등이 복합적으로 작용할 경우 원인을 알아내기가 쉽지 않다. 작물에 발생하는 바이러스 병의 종류는 세계적으로 800여종에 달하며, 국내에도 각종 작물에 약 100여종의 바이러스 병이 알려져 있다. 특히, 수박, 호박, 박, 오이, 메론, 참외 등 경제적 부가가치가 높은 시설재배 박과 작물에 피해가 늘어가고 있는 실정이다. 곰팡이나 세균병과는 달리 바이러스에 일단 감염되면 실질적으로 치료가 불가능하고 방제할 수 있는 약제가 없다. 수박, 호박 등의 박과 작물에서 발생하는 바이러스 병으로는 오이 모자이크 바이러스(cucumber mosaic virus; CMV), 오이 녹반 모자이크 바이러스(cucumber green mottle mosaic virus; CGMMV), 규리 녹반 모자이크 바이러스(kyuri green mottle mosaic virus; KGMMV), 수박 모자이크 바이러스(watermelon mosaic virus; WMV), 호박 모자이크 바이러스(zucchini yellow mosaic virus; ZYMV) 및 토마토 반점 위조 바이러스(tomato spotted wilt virus; TSWV) 병 등이 있다. 그 중에서도 CGMMV 병이 발생하는 분포지역이 가장 넓고 그 피해 또한 가장 크다.

CGMMV 병에 감염되면, 육묘기 때부터 잎에 모자이크 증상이 나타나는 경우가 있으나, 보통은 정식 후에 나타난다. 발병 초기에는 생장점에서 비교적 가까운 부분의 어린잎에 황색 반점이 나타나면서 녹색의 진한 부분이 약간 돌출되어 모자이크 증상을 나타낸다. 과일에는 꼭지부분에 갈색의 줄무늬가 나타나며 과피에 농녹색의 작은 흑과 모자이크가 나타나기도 한다. 과육은 씨앗의 주변이 적자색을 띠고 곳곳에 황색 섬유상의 줄이 생기면서 연화되어 산패 냄새를 낸다.

CGMMV 병에 걸리면 과육이 악변해서 출하할 수 없게 된다. 이는 바이러스가 잎과 과일 안에서 증식하기 때문이다. 육묘 온도가 25℃ 인 경우에는 감염된 지 10일 후면 잎에 모자이크 증상이 나타나나, 20℃ 이하에서는 발병하기까지 긴 시일이 걸린다. 따라서, CGMMV 병에 감염되어 있어도 바이러스의 증식이 보이지 않으면 모자이크 증상이 나타나지 않는다. 시설재배에서는 정식 직후가 모자이크 발생의 적온 조건이 되기 때문에 노지에 비해 잎의 모자이크 증상도 일찍 나타나고 그 정도도 심하다. 따라서, 과육의 악변도 심하다.

한편, CGMMV 병을 일으키는 CGMMV는 토바모바이러스 그룹(Tobamovirus group)의 일종으로서, ssRNA로 구성되어 있는 300nm의 막대기형 바이러스이다. 1935년 영국에서 처음 발견된 이래 미주와 아프리카를 제외한 전세계적으로 발생 분포되어 있다. 기주 범위는 호박, 오이, 멜론, 수박, 박 등이며 과색, 과실기형의 병증으로 상품가치가 떨어지는 결과를 초래한다. 이 바이러스는 종자, 토양전염이 쉽고 접촉에 의해 쉽게 감염되며 국내에서는 1989년 처음으로 경남 함안, 진주의 수박 재배 농가들에서 상기 바이러스에 의한 피해가 보고되었으며, 매년 지역별로 피해가 증가하다가 1998년 이후부터는 수박뿐만 아니라 오이, 호박에서도 심한 피해 현상이 나타났다. 지난 4-5년 간 한국 재배농가에서 수박, 오이, 호박에 심한 감염 피해가 발생하였다. 최근 중국의 산둥 지역을 포함하는 많은 지역이 CGMMV에 의해 몇 년째 상당한 피해를 입은 것으로 보고된 바 있다.

현재까지는 CGMMV에 특이적인 방제방법이 보고되어 있지 않다. 선진 외국에선 초기 방제대책으로 토양 관리나 무병종자생산 또는 관계기관의 지도 및 교육에 의존하고 있다. 채종지가 중국 또는 동남아에 의존하고 있는 한국에서는 항구적인 종합방제 대책이 필요하나 1999년 10월에야 비로소 농업진흥청, 종자관리소, 각 종묘회사서 대책협의회를 구성함으로써 방역대책을 위해 여러 연구과제를 시작한 실정이다. 앞으로 종합적 방제가 확립되기는 시간이 걸리고 또한 대책이 수립되었다 하더라도 채종지에서의 감염을 근절하기는 어려운 실정임으로 궁극적으로는 이 virus의 저항성 품종을 선발 또는 개발해야 한다.

국내외적으로 CGMMV 저항성 품종이 밝혀진 바가 없으며 이에 대한 선발 작업은 물론 이 virus의 저항성 품종 육종에 대한 대책 또한 전무하다. 1990년

대 초부터 유전공학 기술을 이용하여 virus 저항성 식물을 개발하는 연구가 많이 진행되었다. Virus 유전자의 일부를 식물 형질전환 벡터에 클론하고, *Agrobacterium*을 이용하여 식물에 형질전환시킴으로서 바이러스에 저항성을 갖는 형질전환 식물체를 획득하였다. 특히 TMV, CMV, PVY등의 coat protein (CP) 유전자를 형질전환한 경우 비교적 저항성 효율이 높게 나타났다.

본 연구과제의 개발대상기술은 CGMMV의 CP 유전자를 수박 작물에 형질전환 함으로서 오이녹반모자이크바이러스의 저항성 품종을 개발하려 함이다.

## 제2절 연구개발의 필요성

### 제1항 기술적측면

CGMMV의 저항성 유전자가 알려져 있지 않다. 따라서 유전공학을 이용한 오이녹반모자이크바이러스에 저항하는 품종 개발은 1999년도에 협의된 종합방제 대책에서 거론된 바 없다. 종합대책이 추구하는 방제기술개발이 방대하고 포괄적이기 때문에 기술적인 면이나 시간적으로 장기적인 반면 식물형질전환체를 통한 저항성 품종 개발이 오히려 더 효율적으로 판단된다. 그러므로 앞으로 이런 방법이 방제대체 기술개발과 함께 병행해야 하며 농림부에서 주관하는 종합 방제대책에 삽입되어야 한다.

현재 국제적으로 CP (외피단백질) 유전자를 이용하여 형질전환을 통한 저항성 품종들이 나와 있지만 오이녹반모자이크바이러스 관련해서는 세계적으로 전무상태이다. 따라서 저항성 품종이 개발이 되면 박과 작물의 국내 시장의 수확량 향상성에 커다란 기여를 하게 된다. 또한 복잡한 방제대책에 사용되는 비용을 절감할 수 있으며 해외 채종지가 감염될 때마다 무병 채종지를 확보할 필요가 없어 또한 원가 절감을 할 수 있다. 무엇보다도 이 기술로 특허출원을 하여 박과작물의 품종 기술료를 독점할 수 있는 장점이 있다.

### 제2항 경제·사회적측면

CGMMV는 국내에서 1989년 처음으로 경남 함안, 진주의 수박 재배 농가들에서 보고되었으며 매년 지역별로 수박 피해가 증가하다가 1998년서부터는 수박뿐

만 아니라 오이, 호박에서도 심한 피해 현상이 나타났다. 1998년 발병한 수박 피해 면적은 450ha 이며 이는 전 수박 재배지의 약 5%에 해당된다. 보고된 피해액은 약 65억 정도이지만 전 농가를 대상으로 발생 및 피해 실태를 조사한 것이 아니기 때문에 실제로는 이보다 훨씬 많은 100억원 정도로 추측하고 있다. 문제는 5%의 감염지가 25개 시, 군에 국한 조사한 것이지만 5개도에 걸친 지역 이기에 전 국토에 잠정적으로 감염되어 있을 수 있다는 점이다. 1999년에는 수박 재배지에서의 피해 상황에 대한 보고는 다소 줄었지만 경상, 전라도 12개 시, 군에서 주키니 호박 (CGMMV-ZU)과 오이에 대한 피해가 약 50억원 정도나 달했다. 2000년에도 모든 박과 작물로 감염 폭이 넓어짐으로서 뚜렷한 방제 대책을 형성하지 못한 우리 실정으로는 농가에서의 피해가 앞으로도 계속 증가할 수밖에 없다. 수박은 고추에 이어 국내 2번째로 큰 종자 시장이고 7000억원에 가까운 생산물 시장을 확보하고 있다. 이에 CGMMV의 저항성 수박 작물을 개발한다는 것은 국내 내수 시장의 안정성을 획기적으로 도울 수 있다. 또한 현재까지 유전공학을 이용한 CGMMV의 저항성 품종개량에 관해서는 선진국에서도 연구 보고 된 바가 없어서 향후 GM작물의 자유 시장 체제 하에서는 막대한 외자를 벌 수 있는 주요 채소 품목이 될 수 있다.

CGMMV에 저항성이 강한 수박공대에서 자라는 수박은 non-GMO 수박이다. 따라서 판매되는 수박은 현재 GMO 관련 사회적 물의와 전혀 무관하기 때문에 CGMMV 저항성 수박공대의 상업화는 빠른 속도로 진행될 수 있다. 또한 방제제의 사용 양이 줄어들기 때문에 친환경적이다.

### 제3절 연구개발목적과 범위

#### 제1항 연구개발목적

본 연구는 유전공학 방법을 이용하여 오이녹반모자이크바이러스에 저항하는 수박 품종을 개발하려 함이다. 최근 수년간 국내의 박과 작물 농가에서 이 바이러스의 발생 빈도가 급증하였고 또한 수박에 발병이 국한되었던 기주 범위가 오이, 호박, 참외에까지 번짐으로서 3조 5천억원으로 추정되는 박과 작물 총 생산량에 커다란 피해가 예상된다. 생명공학을 이용한 저항성 품종 개량은 종합방제



기술 못지 않은 효력과 함께 부가가치를 높이고 향후 국내외적으로 경제성에 매우 큰 기여를 할 것으로 판단한 바 먼저 CGMMV 유전자를 이용한 저항성 수박을 개발하고자 하였다. 형질전환을 위한 수박 재료는 대목으로 사용되는 수박공대와 수박 계통이었으나 지금까지 성공한 결과는 대목이었으며 계통의 형질전환은 아직 진행 중에 있다.

## 제2항 연구범위

1 단계 (2000 - 2001년) Virus 동정 및 virus 유전자 클로닝과 박과 작물의 재분화 시스템 구축

- 가. 박과 작물에 감염되는 CGMMV 또는 그 variants의 순수분리 및 동정
- 나. 각 virus의 CP 유전자의 RT-PCR 클로닝 및 유전자 분석
- 다. 수박 고효율 재분화 방법 개발
- 라. 수박 형질전환 방법 개발

2 단계 (2001 - 2002년) Virus 유전자의 식물형질전환 벡터 도입 및 박과작물 형질전환체계 구축

- 가. 식물형질전환 벡터로의 CP 유전자 클로닝
- 나. 수박공대와 inbred line들에 대한 형질전환체계 구축
- 다. 수박 CP 유전자의 형질전환체

3 단계 (2002 - 2003년) CGMMV에 저항성 박과작물 형질전환체 개발

- 가. PCR을 이용한 수박 CGMMV-CP 유전자 삽입 형질전환체 선발
- 나. 선발된 형질전환체의 CGMMV에 대한 저항성 검정
- 다. 선발된 형질전환체의 원예적 변화 분석

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

1990년대 초부터 유전공학 기술을 이용하여 바이러스 저항성 식물을 개발하는 연구가 많이 진행되었다. 그 예로는 바이러스 유전자의 일부를 식물 형질전환용 벡터에 클로닝하고, 이를 아그로박테리움(*Agrobacterium*)을 이용하여 식물에 도입함으로써 바이러스에 저항성을 갖는 형질전환 식물체를 제조하는 것이다. 바이러스의 외피 단백질(coat protein; CP)을 암호화하는 유전자를 이용하여 CMV, TMV(tobacco mosaic virus) 및 ToMV (tomato mosaic virus)에 저항성을 갖는 형질전환 담배나 형질전환 토마토 등에 대해서는 국내외적으로 많이 보고되었다(손성한 외, 식물조직배양학회지, 24(3): 153-160, 1998; 손성한 외, 식물조직배양학회지, 22(3): 149-155, 1995, Song et al., 1999; Powell-Abel et al., 1986; Shin et al., 2002; Baulcombe, 1996).

CGMMV의 분리 및 동정은 외국서 먼저 시작했지만 (Nozu et al, 1971; Francki et al, 1986; Ugaki et al, 1991), 최근 들어서 국외보다는 국내에서 활발히 이루어져 왔다 (Ryu et al, 2000). CGMMV의 variant로서 NS, Y, W등 최소한 3가지 type이 수박에서 동정되어 있고 최근에 추키니에서 발생한 CGMMV-ZU type (ZGMMV)은 새로운 strain으로 발견되었다. 본 연구과제의 협동연구팀으로 참여하였던 서울여대 류기현 교수팀은 1년차 과제수행동안에 각 type의 CP 유전자를 clone하였고 특성을 분석하였다.

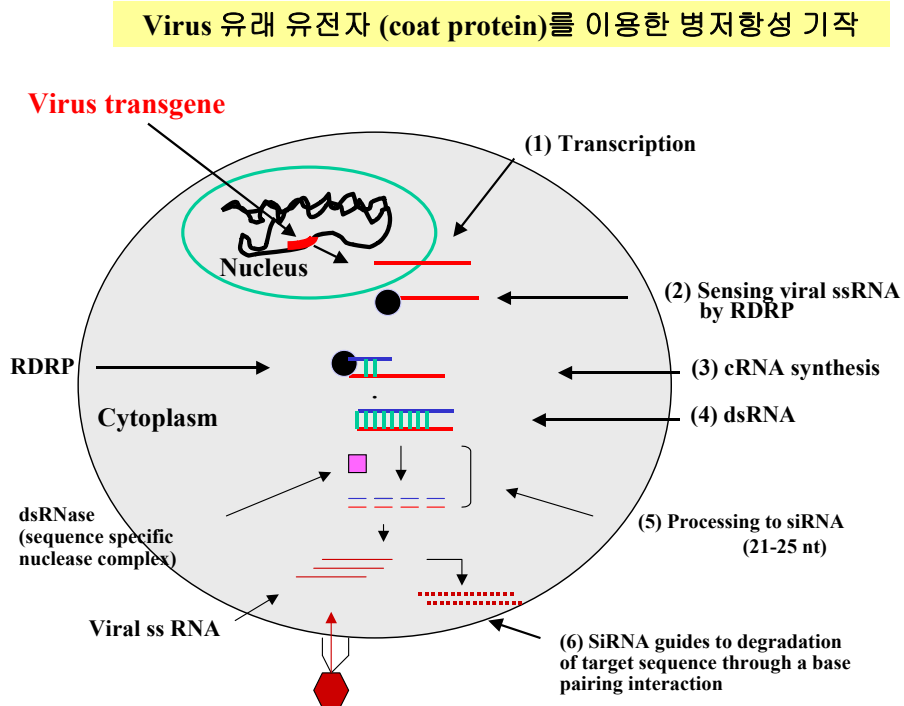
CGMMV의 유전자를 이용한 저항성 형질전환 식물체, 특히 경제적 부가가치가 높은 CGMMV-저항성 형질전환 박과 작물 및 이의 제조 방법에 대해서는 전혀 연구된 바 없다. 따라서, 이에 대한 개발이 절실히 요구되고 있다. 수박의 재분화 조건은 지난 10여년간 외국에서 많이 보고되어 왔다 (Srivastava et al., 1989; Dong and Jia, 1991; Compton and Gray, 1994; Compton and Gray, 1994 Compton et al., 1993 a & b; Compton et al., 1996). 수박 재료는 주로 품종이었으며 재분화는 성공적으로 조건이 구비되었고 순화과정도 확립이 되었다. 그러나 수박형질전환은 매우 어려워 국내외를 통틀어 지금까지 성공된 사례가 드물다 (Choi et al., 1994).

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 제1절 기술개발의 이론적 배경

Virus 유전자를 이용하여 virus에 저항성 획득하는 기작은 gene silencing으로부터 기인한다. 다음 그림 (Fig. 1)에서 보듯이 virus 유전자는 숙주에서 발현하여 ssRNA로 머물다가 RDRP (RNA dependent RNA polymerase)에 의해 dsRNA로 바뀐다. 이는 dsRNase에 의해 인식되어 21-25 nt 크기의 siRNA로 변하는데 이 siRNA가 침입해 들어오는 viral SS RNA (같은 염기배열)를 인식하여 SS RNA를 분해하여 virus의 증폭을 막는다.

Figure 1.



## 제2절 연구결과 I: CGMMV 분리 및 *CGMMV-CP*

### 유전자 클로닝

#### 제1항 CGMMV Variants의 순수분리 및 동정

*Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV)가 감염된 수박잎을 사용하여 국부병반 형성 기주인 붉은 명아주 (*Chenopodium amaranticolor*)에 접종하였다. 붉은 명아주에서 발현된 황반의 chlorotic spot을 다시 명아주에 계대 배양을 3회 반복 처리하여 재접종을 생물학적으로 virus를 순수 분리하였다. 분리된 바이러스원인 CGMMV-NS1 및 CGMMV-Y 계통은 기주범위 조사결과 기존의 CGMMV-W 계통과 동일한 기주범위를 가지고 있었다. 이들 CGMMV를 전신감염 기주인 박 (Fig. 1 e, f)에서 대량 증식시켜 바이러스 순화의 재료로 이용하였다. 접종방법은 감염 잎에 대해 10배량 (w/v)의 0.01M phosphate buffer (pH 7.0)를 넣고 마쇄한 이병즙액을 Carborundum (400 mesh)을 사용하여 오이 떡잎에 상처를 낸 후 접종하였으며, 바이러스 접종 후 10일경에 모자이크 병반이 뚜렷한 잎을 취하여 실험의 재료로 사용하였다.

투과전자현미경 (HITACHI-800 TEM SYSTEM, 150kv, magnification 20×1000)으로 바이러스의 형태 및 크기를 관찰한 결과, 300 x 18 nm 크기의 전형적인 tobamovirus 입자를 다수 관찰할 수 있었다 (Fig. 2). 평균크기 입자 외에도 coat protein (CP)의 subgenomic RNA를 encapsidation한 약 80 x 18 nm 크기의 작은 바이러스입자도 함께 관찰되어 (Fig. 2), 본 바이러스가 assembly origin을 CP 유전자 부위에 가지는 CGMMV임을 확인할 수 있었다.

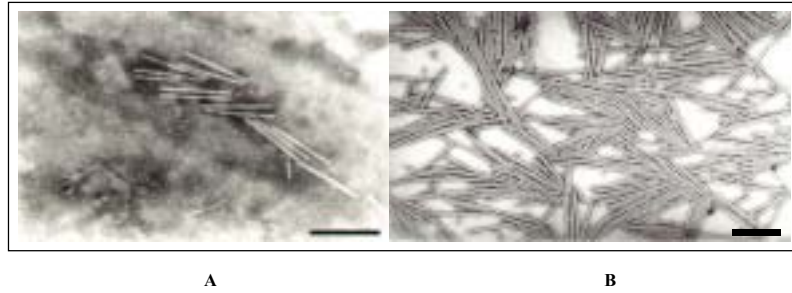


Fig. 2. Electron micrographs of CGMMV particles. A: dip method from infected leaf (bar represents 300 nm); B: purified virions of CGMMV (bar represents 150 nm).

## 제2항 CGMMV-CP 유전자 분리 및 염기배열분석

### 가. CGMMV Variants의 CP 유전자의 RT-PCR, 클로닝 및 유전자 분석

바이러스 특이적 primer를 사용하는 역전사 중합효소 연쇄반응법 (RT-PCR)을 개발하여 CGMMV에 적용하였다. 본 연구의 대상 바이러스인 CGMMV cp gene 특이적 primer (CGCP3: 5'-ACC CTC GAA ACT AAG CTT TC-3'; CGCP5: 5'-GAA GAG TCC AGT TCT GTT TC-3')를 제작하고 RT-PCR은 DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus, Model 480)을 이용하여 실시하였다. RT (reverse transcription) 반응은 RNA 시료 100 ng, MuLV reverse transcriptase 50 unit, RNase inhibitor 20 unit, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, down stream primer 100 pM, dCTP, dGTP, dTTP, dATP 각 1mM, KCl 50 mM, Tris-HCl (pH 8.3) 10 mM 농도로 42°C에서 30분, 99°C에서 5분간 반응시키고 4 °C로 냉각하였다. PCR 반응은 RT 반응이 끝난 후 DNA Thermal Cycler에서 전처리를 94 °C 5분간 처리하고, 94°C 30초, 46 °C에서 60초, 그리고 72 °C에서 60초의 cycle을 총 40회 실시하였다. 반응 후 72 °C에서 5분간 실시한 후 agarose gel에 전기영동으로 RT-PCR product를 확인하였다. RT-PCR 결과 product의 크기는 CGMMV-NS1와 CGMMV-Y에서 모두 0.8 kb의 밴드를 확인할 수 있었다 (Fig. 3). MgCl<sub>2</sub> 농도 결정에서는 2.0 mM, 2.5

mM, 5.0 mM, 7.5 mM, 10.0 mM에서 product의 양에 큰 차이를 보이지 않았다.

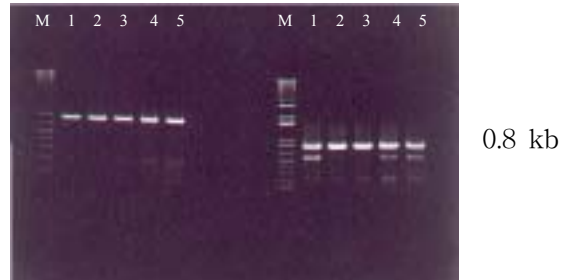


Fig. 3. Electrophoretic pattern of RT-PCR products (NS1, Y strain) in different MgCl<sub>2</sub> concentrations. Lane M: size marker DNA; 1: 2.0 mM, 2: 2.5 mM, 3: 5.0 mM, 4: 7.5 mM, 5: 10.0 mM MgCl<sub>2</sub>.

#### 나. CGMMV-CP 유전자의 염기서열 결정

RT-PCR을 이용하여 합성된 cDNA를 pGEM-T Easy vector (Promega)를 사용하여 *EcoR* I site로 클로닝한 다음 염기서열분석을 하였다. 염기서열 및 아미노산서열은 DNASTAR program을 이용하여 기존에 발표되었던 CGMMV-SH, CGMMV-W의 염기서열 및 아미노산서열과 비교하였고, 다른 tobamovirus와의 연관성을 분석하였다. CGMMV-NS1과 CGMMV-Y의 염기서열 및 아미노산 서열을 결정하여 CGMMV-SH와 CGMMV-W의 CP 유전자의 염기서열과 아미노산 서열을 비교한 결과, 매우 높은 homology를 나타내었다 (Fig. 4).

<b>NS-CP.PRO</b>	<b>MAYNPI TPS KLI AFS AS YVPVRTLLNFLVAS QGTA</b>	<b>35</b>
<b>Y-CP.PRO</b>	<b>MYNPI TPS KLI AFS AS YVPVRTLLNFLVAS QGTA</b>	<b>35</b>
<b>W-CP.PRO</b>	<b>MAYNPI TPS KLI AFS AS YVPVRTLLNFLVAS QGTA</b>	<b>35</b>
<b>SH-CP.PRO</b>	<b>MAYNPI TPS KLI AFS AS YVPVRTLLNFLVAS QGTA</b>	<b>35</b>
<b>NS-CP.PRO</b>	<b>FQTQAGRDS FRES LS ALPSS VVDI NSRFPDAGFYA</b>	<b>70</b>
<b>Y-CP.PRO</b>	<b>FQTQAGRDS FRES LS ALPSS VVDI NSRFPDAGFYA</b>	<b>70</b>
<b>W-CP.PRO</b>	<b>FQTQAGRDS FRES LS ALPSS VVDI NSRFPDAGFYA</b>	<b>70</b>
<b>SH-CP.PRO</b>	<b>FQTQAGRDS FRES LS ALPSS VVDI NSRFPDAGFYA</b>	<b>70</b>
<b>NS-CP.PRO</b>	<b>FLNGPVLRPI FVS LLS S TDTRNRVI EVVDPSNPTT</b>	<b>105</b>
<b>Y-CP.PRO</b>	<b>FLNGPVLRPI FVS LLS S TDTRNRVI EVVDPSNPTT</b>	<b>105</b>
<b>W-CP.PRO</b>	<b>FLNGPVLRPI FVS LLS S TDTRNRVI EVVDPSNPTT</b>	<b>105</b>
<b>SH-CP.PRO</b>	<b>FLNGPVLRPI FVS LLS S TDTRNRVI EVVDPSNPTT</b>	<b>105</b>
<b>NS-CP.PRO</b>	<b>AESLNAVKRTDDAS TAARAEI DNLI ESI SKGFDVY</b>	<b>140</b>
<b>Y-CP.PRO</b>	<b>AESLNAVKRTDDAS TAARVEI DNLI ESI SKGFDVY</b>	<b>140</b>
<b>W-CP.PRO</b>	<b>AESLNAVKRTDDAS TAARAEI DNLI ESI SKGFDVY</b>	<b>140</b>
<b>SH-CP.PRO</b>	<b>AESLNAVKRTDDAS TAARAEI DNLI ESI SKGFDVY</b>	<b>140</b>
<b>NS-CP.PRO</b>	<b>DRASFEAAFS VVWSEATTS KA</b>	<b>161</b>
<b>Y-CP.PRO</b>	<b>DRASFEAAFS VVWSEATTS KA</b>	<b>161</b>
<b>W-CP.PRO</b>	<b>DRASFEAAFS VVWSEATTS KA</b>	<b>161</b>
<b>SH-CP.PRO</b>	<b>DRASFEAAFS VVWSEATTS KA</b>	<b>161</b>

Fig. 4. Multiple alignment of amino acid sequence of *CP* gene of CGMMV. NS1 and Y was determined in this study.

#### 다. CGMMV-W의 RT-PCR

CGMMV-W strain을 (주) 농우바이오 병리부에서 제공받아 *CP* 유전자의 RT-PCR을 본 생명공학센터에서 수행하였다. PCR primer로는 5'-ccg gga tcc gaa gag tcc agt tct gtt-3'; 5'-gtg gga tcc cac cat cag aag acc ctc-3'를 각각 sense, antisense로 사용하였다. 이 PCR primer에는 *BamH* I site가 있어서 RT-PCR을 합과 동시에 식물형질전환 벡터로 ligation하도록 하였다. CGMMV-W *CP* 유전자의 sequencing을 통하여 염기배열을 확인하였고 NS1 *CP* 유전자를 이용하여 각 strain별 *CP* 유전자의 homology를 조사하였다. 결과적으로 CGMMV의 strain이 달라도 *CP* 유전자는 상동성이 매우 높아서 어떤 *CP* 유전자를 사용해도 gene silencing effect는 나타날 것으로 사료된다

(Table1).

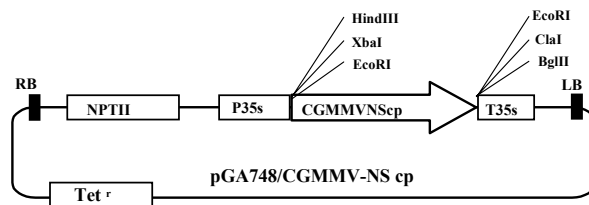
Virus	Nucleotide Homology (%)	Amino acid Homology (%)
CGMMV-Y	99.6	98.9
CGMMV-SH	99.6	100
CGMMV-W	98.9	100

Table 1. Percentage of sequence homologies of *CP* gene between CGMMV-NS1 and other CGMMV strains at the nucleotide and amino acid levels.

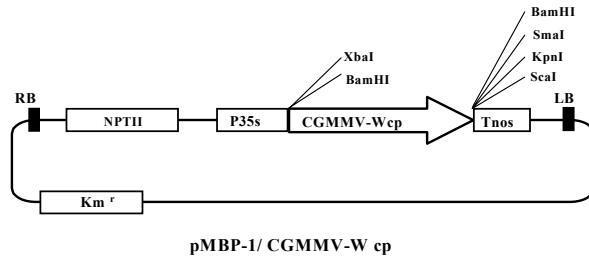
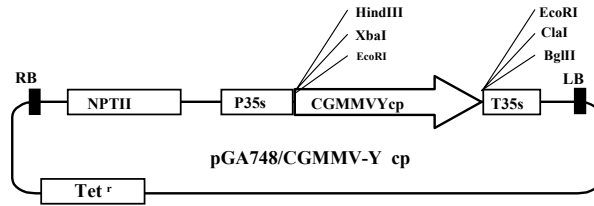
### 제3항 CGMMV-CP 유전자의 식물형질전환벡터로의 클로닝

pGEM-T easy vector에 들어있는 CGMMV-NS, CGMMV-Y의 *CP* 유전자를 *EcoR* I site로 잘라서 pGA748 vector로 subcloning을 하였다 (Fig. 5). 이들은 *agrobacterium* LBA 4404로 transformation 되었다.

CGMMV-W *CP* 유전자에는 *BamH* I site가 있어서 RT-PCR을 함과 동시에 식물형질전환 벡터인 pMBP-1에 ligation하도록 하였다. 이 벡터도 *agrobacterium* LBA 4404로 transformation 되었다.







## 제3절 연구결과 II: 수박의 재분화율 조사 및 형질전환 체계 확립

제1항 수박공대의 재분화율 및 형질전환효율

가. 수박공대의 재분화 및 형질전환조건 (co-culture)

수박공대에 CGMMV-W CP 유전자를 형질전환시키기에 앞서 수박의 재분화 조건과 kanamycin으로 도입된 유전자를 선별하기 위하여 kanamycin 농도별로 치상한 조직의 변화를 관찰하였다. 수박공대의 재분화 조건을 규명하기 위하여 성장조절제의 농도(0, 0.5, 1, 2, 4 mg/l BA와 0, 0.1, 0.5 mg/l NAA의 조합)에 B5, MS 기본배지에 치상한 결과 MS 기본배지에 2 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA의 조건이 가장 좋은 재분화율 (약 80 %)을 보였다.

Co-culture 경우 수박공대의 자엽을 절취하여 kanamycin 농도를 50, 100,

200, 300 mg/l 까지 처리하였다. 고농도의 kanamycin 항생제를 고체배지에 치상한 경우라도 치상한 조직이 kanamycin에 의하여 저해를 받지 않았으나 control에 비해서 callus의 발달 및 조직이 extend되는 정도가 둔감하였다. 가장 shooting율이 높은 경우는 100mg/l의 kanamycin을 기준으로 약 30% 정도이었다. 따라서 수박공대에 *Agrobacterim*을 이용하여 형질전환시키는 조건을 MS 기본배지 + 2 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA + 100 mg/l kanamycin로 설정하고 형질전환을 수행하였다.

나. Injection 방법에 의한 수박공대의 형질전환조건

Injection 방법으로는 수박종자를 imbibition 시킨 후 3-4일 지나 cotyledon을 확보하여 meristemic growing point주위에 *agrobacterium*을 묻힌 구리선으로 찔러주었다 (Fig. 6). 이 경우엔 hygromycin selection을 하였고 MS 기본배지 + 2 mg/l BA + hygromycin (7.5 mg/l) 설정하여 형질전환을 수행하였다.

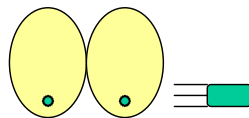


Figure 6: Injection 방법

다. 수박공대의 형질전환효율

Rooting 배지에서 성장하고 있는 plantlet를 대상으로 PCR을 수행하였다. PCR은 35S promoter region을 sense (5'-TCCGATCACACCTAGCAAAC-3')로 CP 유전자를 antisense (5'-GACCAGACTACCGAAAACG-3')로 사용하여 검정을 하였다 (Fig. 7A). 결과적으로 injection 방법의 효율이 co-culture보다 약33 배나 높았다 (Table 2).

Figure 7A. PCR 분석을 통해 형질전환체 3주에서 약 550 bp 크기의 band가 나타난 것을 확인하였다. P1, P2: positive control; N1, N2: non-transgenic; 1-8: transformed 수박공대.

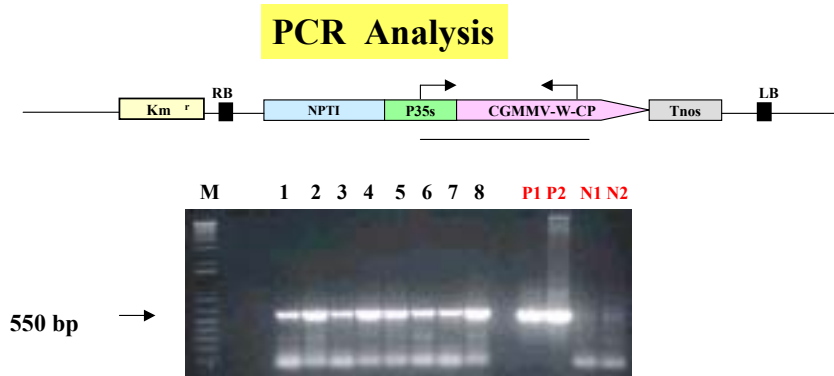


Table 2. 현재까지의 형질전환효율은 비교적 낮다 (0.1%, 0.3%). 그러나 현재 in vitro culture가 활발히 진행되고 있고 순화과정 중에 있는 개체들이 앞으로 계속 나오기 때문에 형질전환체는 대량으로 확보 될 것이다.

## Transformation Frequency

### Co-culture case (kanamycin selection)

Seed	Explant	PCR tested	Acclimation	House	Southern (T0)
1000	9000	21 (+)	12	11	9
		0.23%			0.1%
		(21/9000)			(9/9000)

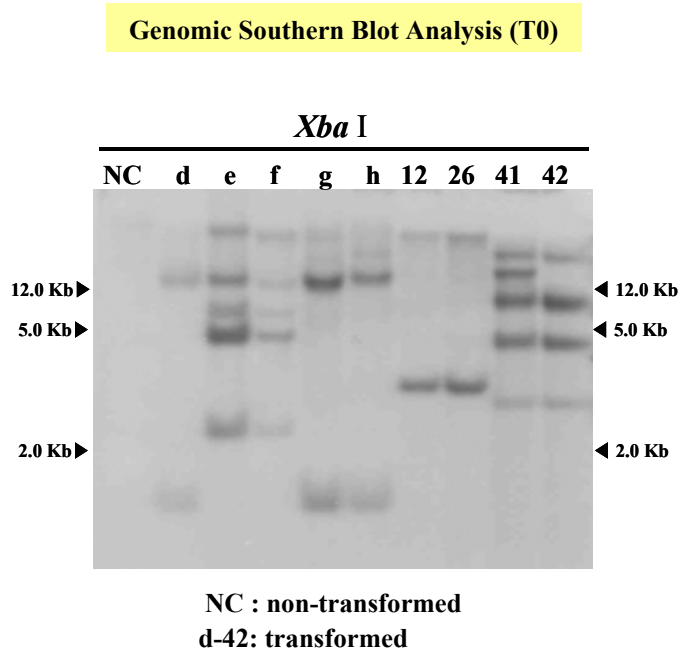
### Injection case (hygromycin selection)

Seed	Explant	PCR tested	Acclimation	House	Southern (T0)
320	640	50 (+)	10	5	2
		7.8%			0.3%
		(50/640)			(2/640)

라. 형질전환체의 Southern blot 분석

Southern blot을 수행하여 PCR positive 형질전환체를 재 검정하였다. 최종 Southern을 통해 형질전환체를 확보하는 비율은 일반 co-culture 방법이나 injection 방법상에 있어서 큰 차이가 나지는 않았다. Southern blot을 통해서 origin이 다른 형질전환체 (T0)를 다수 확보하였다 (Fig. 7B). T0 식물체는 CGMMV-CP 유전자가 한 copy 또는 여러 copy가 들어 있는 것들이 있으며 control에서는 예상대로 유전자가 들어있지 않았다.

Figure 7B



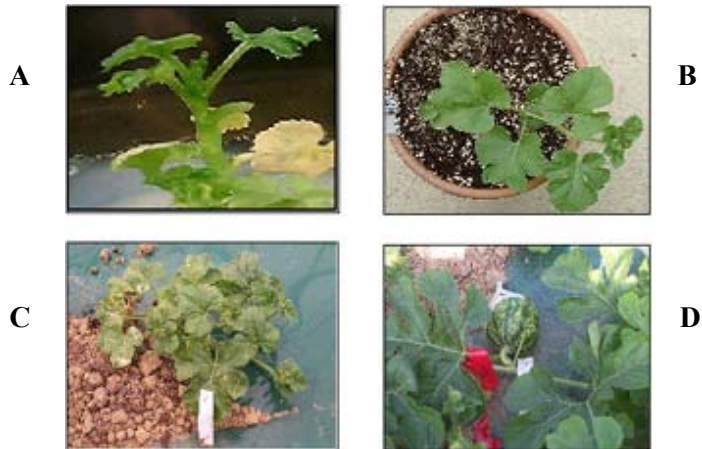
마. 수박공대 형질전환체 성장과정

MS, agar 8 g/L, sucrose 30 g/L, carbenicillin 400 mg/L의 elongation 조건에서 4-5주 지난 뒤 세균이 날 때 순화를 시작하였다. 두부판에 멸균 배합토를 넣고 배지를 잘 제거한 plantlet를 이식한 뒤 비닐로 약 3주간 밀봉하였고 순화 5주때 큰 pot으로 이식하였다 (Fig. 7C). 수박공대 형질전환체의 성장과정은 in vitro 과종한 이후부터 순화까지 약 5개월이 걸렸다.

Figure 7C

## Transformed Watermelon Stock

( T0 plants by kanamycin selection after co-culture )



- A. In vitro culture**
- B. Early developmental stage**
- C. On the ground stage**
- D. Fruit development**

제2항 수박계통의 재분화율 및 형질전환효율

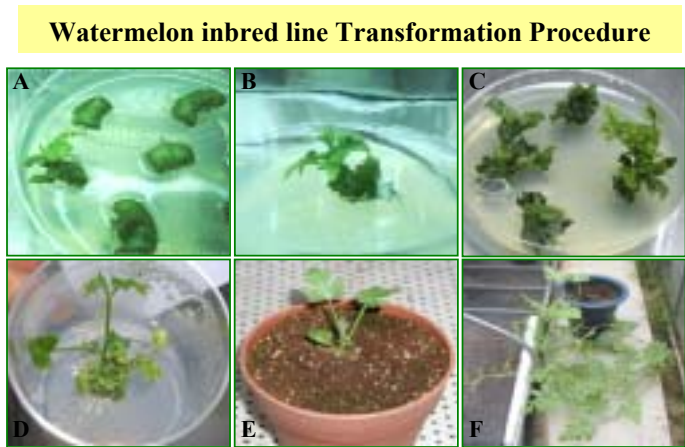
수박 상용 inbred line의 형질전환을 위해서 수박 공시재료 No 5, 6, 7, 8, 10, 11 (농우바이오)를 2 mg/l BA를 첨가한 배지에서 재분화율을 조사하였다 (Table 3). Inbred line #6, 8의 재분화율이 가장 높았다.

Table 3

Regeneration ratio of Watermelon inbred lines	
Inbred lines No.	Ratio of regeneration (%)
# 5	45/300 (15.0)
# 6	186/300 (62.0)
# 7	53/300 (17.7)
# 8	129/300 (43.0)
# 10	48/300 (16.0)
# 11	41/300 (13.7)

Shoot 유효율 = shoot 유효수 / 총 치상 떡잎수  
On the 2mg/l BA medium

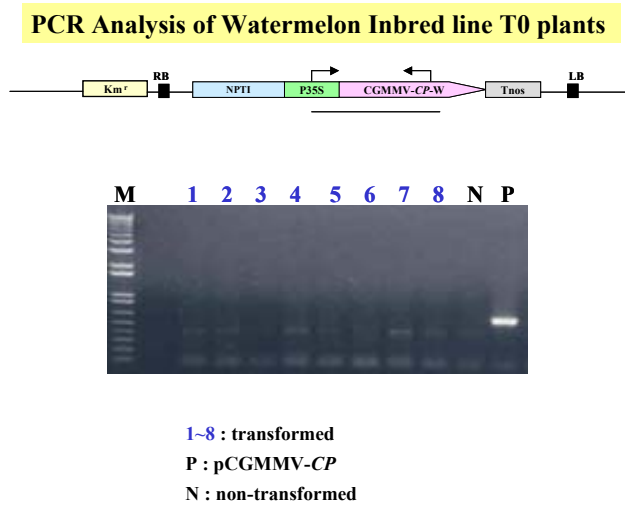
Figure 8A: 수박계통 #6번의 형질전환체 (putative)의 발달과정



A: After co-culture      B: Shooting media  
C: Elongation media      D: Rooting plant in vitro  
E: 3 weeks old plant for Acclimation      F: 3 months old (fruit development)

수박계통의 형질전환은 상기 수박대목의 형질전환방법과 동일하였다. Rooting된 형질전환체 8개를 PCR로 유전자 삽입의 유무를 조사하였는데 어느 것에도 유전자 band가 없었다 (Fig. 8B). 결과적으로 수박계통에 대해선 아직도 형질전환체를 선발하지 못하였다.

Figure 8B.



수박계통의 경우 총 2400개의 explant를 사용하여 rooting까지 확보한 개체가 8점이었다 (Table 4). 그러나 PCR을 통해 아직 형질전환체를 선발하기엔 부족한 pool 일 수도 있다. 또한 수박 계통의 형질전환은 selection 체계가 아직 형성되지 못한 것으로 사료된다. 또한 infection을 방해하는 기작이 있을 것으로 사료되어 infection을 용이하게 하는 연구가 행해져야 할 것이다.

Table 4.

**Transformation Frequency of Watermelon Inbred line by Co-culture**

Seedling	Explants	Shoot Formation	Elongation	Rooting	PCR test (+)
1200	2400	1080/2400 (45%)	20/1080 (1.9%)	8/20 (40%)	0/8 (0%)



## 제4절 연구결과 III: 수박공대 형질전환체의 CGMMV

### 저항성 검정

제1항 수박공대의 T1 세대 확보 및 CGMMV 저항성 test

2 점의 T0 (T0-a, T0-b)를 selfing 하여 T1을 확보한 뒤 그중 PCR로 유전자 삽입이 확인된 30점의 T1을 random하게 선택하여 CGMMV 저항성 검정을 위한 재료로 사용하였다. 저항성 검정은 수박대목을 파종하여 약 15일경 떡잎 2엽이 나왔을 시 바이러스를 carborundum으로 섞어서 붓으로 떡잎에 접종하였다. 일차 접종 후 약 2주 뒤에 2차 접종을 실시하였다. 이차 접종 일주일후 ELISA test를 하여 virus의 activity를 관찰하였고 일주일 후 ELISA test를 한번 더 실시하였다. 최종적으로 저항성을 갖는 수박공대 6점을 발굴하였다 (Table 5; 1S-3, 1S-7, 2S-1, 2S-3, 2S-6, 2S-7).

Table 5

#### CGMMV Resistance Test of T1 Plants by ELISA

T1 sample	육안 검정	Elisa test	T1 sample	육안 검정	Elisa test	Control	육안 검정	Elisa test
1S-1	×	O	2S-1	×	×	C-1	O	O
1S-2	×	O	2S-2	×	O	C-2	O	O
1S-3	×	×	2S-3	×	×	C-3	O	O
1S-4	O	O	2S-4	×	O	C-4	O	O
1S-5	×	O	2S-5	×	O	C-5	O	O
1S-6	O	O	2S-6	×	×	C-6	O	O
1S-7	×	×	2S-7	×	×	C-7	O	O
1S-8	×	O	2S-8	×	O	C-8	O	O
1S-9	O	O	2S-9	×	O	C-9	O	O
1S-10	O	O	2S-10	×	O	C-10	O	O
1S-11	O	O	2S-11	×	O			
1S-12	O	O	2S-12	O	O			
1S-13	O	O	2S-13	O	O			
1S-14	O	O	2S-14	O	O			
1S-15	O	O	2S-15	×	O			

× : 저항성

O : 이병성

제2항 CGMMV 저항성 수박공대

Figure 9.

Three Weeks after Inoculation with CGMMV (T1)



제3항 선발된 형질전환체의 원예적 변화 분석

선발된 T0들은 control (non-transformed) 식물체와 비교 시 외형적으로 큰 차이는 없었다. 다만 T0 또는 T1 중에서 polyploid 현상이 나타났다. 종자 크기나 잎의 크기가 control에 비교해서 좀 크며 잎면의 공편세포안에 엽록체 수가 증가되어 있다 (Fig 10A and B). 더욱이 T1이 selfing되어 T2를 형성할 시 착과가 잘 안되며 착과가 되었다하더라도 곧 과실이 떨어지는 현상이 있다.



Figure 10A

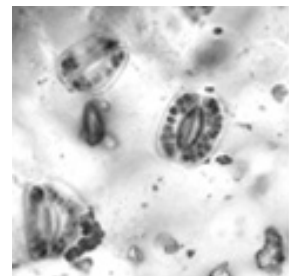


Figure 10B

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제1절 연구개발목표의 달성도

세부과제 및 주요내용	달성도 (%)
○ CGMMV의 동정과 CP 유전자분석 및 형질전환개발 착수	100
-CGMMV variants의 순수분리 및 동정	100
-각 variants CP 유전자의 RT-PCR 클로닝 및 유전자 분석	100
-식물형질전환 벡터로의 CP 유전자 클로닝	100
-수박 재분화 및 형질전환체 개발 착수	100
○ 수박 형질전환체계 확립과 형질전환체 선발	100
-수박 inbred line과 대목들에 대한 CP 유전자의 형질전환 수행	100
-PCR, Southern, northern을 이용한 형질전환체 선발	100
○ 수박의 형질전환체 저항성검증 및 육종체계확립	100
-선발된 수박 형질전환체의 T1 확보 및 CGMMV에 대한 저항성 검증	100
-형질전환체 계속 선발	100
-저항성 선발체의 육종체계 착수	100

## 제2절 관련분야의 기술발전의 기여도

박과작물의 T generation 유지는 실지 매우 어렵다. T1, T2 확보가 쉽지가 않으며 이유는 모르나 잦은 배수체형성으로 정상적인 종자 확보가 어렵다. 또한 한여름에 장마를 낀 노지재배는 많은 병에 노출될 어려움이 있다. CGMMV에는 내성이 있더라도 다른 pathogen에 약해서 종자 받기가 쉽지 않다. 본 연구과정을 통해서 많은 경험을 습득하였으며 이런 경험과 기술을 토대로 주위를 요한다면 박과작물의 형질전환체 재배가 처음보다는 용이할 것으로 본다.

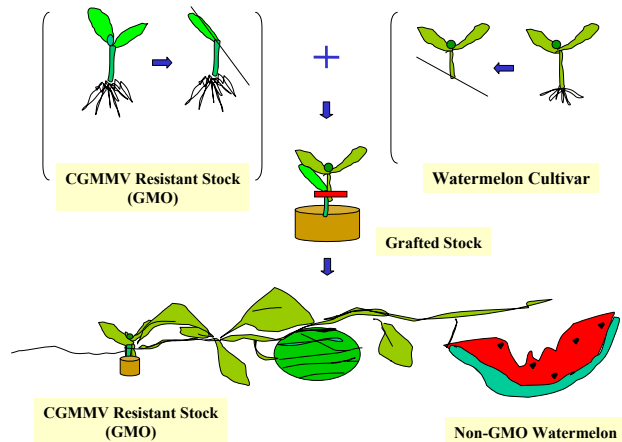
상기 형질전환 방법을 이용하여 저온저항성 박과작물을 개발할 수 있다. 박과작물이 일반적으로 추위에 약함으로서 저온저항성 유전자를 전이하여 저온저항성 박과작물을 개발하는데 상기 방법이 효과적으로 이용될 것이다.

대목의 수요가 점차 늘어가고 있는 채소 농가에서 CGMMV에 저항성 있는 형질전환 대목을 사용할 수 있다는 것은 토양 접촉에서 오는 virus의 감염을 억제할 수 있다. 또한 이런 형질전환대목 위에 수박을 접목 시켰을 때 이 수박은 GM작물이 아니면서도 토양 감염을 극소화 할 수 있기 때문에 현 GM 농산물의 사회적 문제 범주 안에서 벗어날 수 있는 이점이 있다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제1절 본 연구결과의 중요성 및 추가연구의 필요성

Figure 11.



수박공대는 대목용으로 본 연구를 통해서 CGMMV에 내성을 가진 형질전환체가 개발되었다. 이렇게 만들어진 대목은 형질전환 GM crop이다 (Fig. 11). 그러나 수확하는 수박은 형질전환체가 아니기 때문에 사회적으로 큰 문제가 없을 것으로 판단된다. 이 방법은 국외의 여러 학자들로부터 좋은 반응을 얻었고 독창적이기에 성공적인 사례로 남겨졌다.

추가적 연구로는 수박 inbred line의 형질전환이 성공적으로 이루어져야한다. 현재 연구 수행시간이 부족하여 결과를 보여주지 못하지만 많은 계통들이 형질전환중에 있다. 수박 inbred line에서 향후 marker free를 이용한 형질전환이 되어야하며 이 경우 대목에서 CGMMV에 강한 root를 제공하며 재배되는 수박은 CGMMV 접촉감염에서 내성을 가질 수 있기 때문에 CGMMV에 관련한 수박과

수박공대가 형질전환으로서 서로 엮어져야한다.

## 제2절 품종화 추진방안

본 과제는 오이녹반모자이크바이러스에 저항성을 갖는 수박 형질전환체를 선발하는 것이 주 목적이며 차후 농우종묘 육성부서에서 역교잡을 통해서 후대를 고정시키고 우수한 line과 교잡하여 F1 종자를 생산한 다음 품종을 등록하고 상품화 할 계획이다 (Fig. 12). 그 과정에 있어서 T2 세대를 이용하여 환경, 인체 위해성 평가를 실시 하고자 한다. 수박 대목시장규모는 날로 커지고 있다. CGMMV 저항성 대목이 완성되면 일반 F1를 수박에 접목하여 CGMMV에 저항성이 강한 대목에서 자라는 non-GMO 수박을 생산하고자한다. 이로서 GMO라는 사회적 물의를 피해가면서 CGMMV의 피해를 줄일 수 있는 수박 품종을 확보하면 상업화가 용이할 것으로 사료된다.

Figure 12: T generation 재배하고 있는 격리포장



### 제3절 타연구에의 응용

CGMMV 저항성 박과작물 개발은 시급한 상황이다. 만약 이렇게 수박공대에 서 성공한 형질전환방법 이 수박 inbred는 물론이고 참박, 참외, 메론등에 다 성공할 수 있으면 한다. 현재 참박과 수박 inbred의 형질전환이 어렵지만 조만간 가능할 것으로 본다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

관련 해외기술정보 없음.

## 제 7 장      참고문헌

Baulcombe, D. C. 1996. Mechanism of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *The Plant Cell* 8: 1833-1844.

Choi, P.S., Soh, W. Y., Kim, Y.S., Yoo, O.J. and Liu, J.R. 1994. Genetic transformation and plant regeneration of watermelon using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 13: 344-348.

Compton, M.E. and Gray, D.J. 1993. Shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid, triploid, and tetraploid watermelon. *J. Amer. Soc. Hort.Sci.* 118: 151-157.

Compton, M.E. and Gray, D.J. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature cotyledons of watermelon. *Plant Cell Reports* 12: 61-65.

Compton, M.E. and Gray, D.J. 1994. Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of tetraploid watermelon. *HortScience* 29: 211-213.

Compton, M. E., Gray, D.J. and Elmstrom, G.W. 1993. A simple protocol for micropropagating diploid and tetraploid watermelon using shoot-tip explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 211-217.

Compton, M. E., Gray, D.J. and Elmstrom, G.W. 1996. Identification of tetraploid



regenerants from cotyledons of diploid watermelon cultured in vitro. *Euphytica* 87: 265-172.

Dong, J. Z. and Jia, S.R. 1991. High efficiency plant regeneration from cotyledons of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.). *Plant Cell Reports* 9: 559-562.

Francki, R.I.B., Hu, J. and Palukaitis, P. 1986. Taxonomy of cucurbit-infecting tobamoviruses as determined by serological and molecular hybridization analyses. *Intervirology* 26:156-163.

Nozu, Y., Tochiara, H., Komuro, Y. and Okada, Y. 1971. Chemical and immunological characterization of cucumber green mottle mosaic virus (watermelon strain) protein. *Virology* 45: 577-585.

Powell-Abel, P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T. and Beachy, R. N. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232: 738-743.

Ryu, K.H., Min, B.E., Choi, G.S., Choi, S.H., Kwon, S.B., Noh, G.M., Yoon, J.Y., Choi, Y.M., Jang, S.H., Lee, G.P., Cho, K.H. and Park, W.M. 2000. Zucchini green mottle mosaic virus is a new tobamovirus: comparison of its coat protein gene with that of kyuri green mottle mosaic virus. *Archives of Virology* 145:2325-2333.

Shin, R., Han, J. H., Lee, G. J. and Peak, K. H. 2002. The potential use of a viral coat protein gene as a transgene screening marker and multiple virus resistance of pepper plants coexpressing coat proteins of cucumber mosaic virus and tomato mosaic virus. *Transgenic Research* 11: 215-219.

Song, E. K., Koh H. K., Kim J. K. and Lee S. Y. 1999. Genetically engineered transgenic plants with the domain 1 sequence of tobacco mosaic virus 126 kDa protein gene are completely resistant to viral infection. *Mol.Cells* 9: 569-575.

Srivastava, D.R., Andrianov, V. M. and Piruzian, E.S. 1989. Tissue culture and plant regeneration of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad. cv. Melitopolski). *Plant Cell Reports* 8: 300-302.

Ugaki, M., Tomiyama, M., Kakutani, T., Hidaka, S., Kiguchi, T., Nagata, R., Sato, T., Motoyoshi, F. and Nishiguchi, M. 1991. The complete nucleotide sequence of cucumber green mottle mosaic virus (SH strain) genomic RNA. *J Gen Virol* 72: 1487-1495.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.