

## 열매납새와 과일나무육종에서 변혁을 일으키고있는 CRISPR게놈편집기술

허명식, 김순의

경애하는 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《과수연구부문에서는 과일생산을 과학화, 집약화, 현대화하며 정보당 과일생산을 훨씬 높이는데서 제기되는 과학기술적문제들을 원만히 해결하여야 합니다.》

과일은 세계적으로 섬유질과 비타민, 광물질의 주요원천이다.[4] 아시아와 아프리카, 남아메리카의 일부 지역에서는 바나나와 빵나무열매, 대추열매가 주식으로 리용되기도 한다. 과일나무는 기후변화로 하여 위협상태에 놓여있다. 사람들은 과일을 안정하게 보장하기 위한 대책으로서 야생식물종들을 재배종으로 전환시켜 재배하여왔다. 1900년에 멘델법칙이 재발견된 다음 육종가들은 우량식물을 선발하고 섞붙임시키기 시작하였다. 그러나 전통적인 육종법은 이미 있는 자연대립변이에 의존하고있기때문에 수만개의 유전자들을 우연적으로 섞어가지고서는 목적하는 형질을 얻을수 없다. 전통적인 육종법으로 비록 과일생산성이 높아졌으나 흔히 적합성이 없어지고 유전적다양성이 줄어들고있으며 육종에 시간이 너무 걸리는것으로 하여 세계적으로 급증하고있는 인구증가에 대처하여 과일을 충분히 공급할수 없다. 그러므로 소비자들의 늘어나는 요구를 만족시키자면 끊임없이 기술을 혁신하여야 한다.[3]

유전자공학기술이 열매납새와 과일나무의 육종에 수많은 적용되어 생물학적 및 비생물학적스트레스에 대한 견딜성과 열매의 질과 같은 중요한 형질들이 개선되었다. 지난 20년동안에 이 기술에 의하여 수많은 열매납새와 과일나무들이 개량되었다. 전통적인 육종방법과는 대조적으로 재조합DNA기술에 의하여 식물이나 미생물에 있던 유용한 유전자들이 열매납새와 과일나무에 전이되어 새로운 유전자형과 표현형을 가진 품종들이 육종된 결과 열매의 질이 개선되고 오래동안 저장할수 있게 되었다. 따라서 유전자공학기술은 농업뿐만아니라 과수업에서 가장 발전된 기술로 평가되었다. 재조합DNA기술에 의하여 얻어진 생물을 유전적으로 수식(GM)되었다고 한다. 1994년 어느 한 나라에서 유전자전이도마도 《Flavr Savr》에 대한 상업적재배가 허가되었는데 이 도마도에서는 유전자전이에 의하여 익기과정이 지연되고 도마도를 탄 다음 인차 물크러지지 않았다. 재배가 허용된 GM파파야는 환상반문비루스에 대하여 저항성을 나타냈으며 생산성이 높아졌다. 오늘날 일부 지역에서 생산되는 파파야의 80%는 유전자조작으로 만들어진것이다.[3, 6]

그러나 새로운 GM작물의 개발은 통제체계의 큰 영향을 받고있다. 그것은 그 통제체계의 목적이 사람들의 건강과 환경을 보호하며 경제적손실을 막는데 있기때문이다. 이 통제에 의하여 또한 GM작물안정성에 대한 소비자들의 신용이 떨어졌다. 결과 새로운 GM작물에 대한 허가를 받는 비용이 비싸지고 그 수속공정이 복잡하여 생산물을 시장에서 실현시키는 과정이 지연되었다. 이와 같이 엄격한 통제로부터 새로운 GM작물을 도입하는데 불필요한 장벽이 생겨났다[7]고 주장하는 사람들도 있다.

한편 2016년에 CRISPR(무리지어 규칙적으로 산재된 짧은 팔린드롬반복배열)기술을 리용하여 게놈편집된 버섯이 그속에 외래DNA가 없는것으로 하여 GM생물대상에서 제외되었으며 결국 GM생물과 같은 통제를 받지 않았다.[5] 2017년에는 우와 같은 기술로 기름함

표 1. 과일작물에서 CRISPR/Cas계가 처음으로 도입된 시간표

도입년도	CRISPR/Cas계가 도입된 열매남새 또는 과일
2014	도마도, 굴류
2016	오이, 사과, 포도
2017	수박
2018	키위열매, 바나나, 카카오, 딸기, 파파야, 땅파리

량이 높아진 아마와 가물견딜성콩이 육종되어 그것의 상업적재배가 승인되었으며 이것은 CRISPR에 의하여 편집된 작물이 전통적인 GM 작물과 같은 엄격한 통제를 받지 않으며 CRISPR기술이 작물육종의 속도를 단축하는데서 명백하게 커다란 변혁을 일으키고있다(표 1)는것을 보여주고있다.[10]

## 1. 현재 도마도에서 CRISPR/Cas9의 응용

2014년에 CRISPR/Cas9계가 처음으로 도마도에 적용되었다. *Argonaute 7*이 파괴되어 최출 표현형이 나타났다. 즉 변이체의 첫잎에서 잎꼭지가 없는 쪽잎이 생겼다.[16] 그때로부터 도마도에 CRISPR/Cas9기술을 적용한 수많은 결과가 발표되었다. 여기서는 그 성과들을 4가지 부류 즉 생물학적스트레스에 대한 저항성과 비생물학적스트레스에 대한 저항성, 도마도열매의 질 개선, 도마도의 재배성개선으로 나누어보기로 한다.

### 1) 생물학적스트레스에 대한 저항성

생물학적스트레스에는 식물을 공격하여 해를 주는 바이러스와 세균, 곰팡이, 곤충이 속한다. 2013년에 안정한 유전자전이체통이 성과적으로 얻어진 때로부터 CRISPR/Cas9기술을 리용하여 병저항성식물을 얻기 위한 연구가 시작되었다. 그때로부터 도마도에서 수확고에 심각한 손실을 주는 바이러스와 곰팡이, 세균의 감염을 막기 위한데 CRISPR/Cas9기술이 리용되었다.(표 2)

표 2. 열매남새와 과일나무에서 CRISPR/Cas9계의 적용실례[3]

작물종	표적유전자	표적형질	년도
<b>생물학적스트레스에 대한 저항성</b>			
도마도	바이러스의 CP 및 Rep	도마도황색잎말림병바이러스에 대한 저항성	2018
도마도	DCL2	감자바이러스X, 담배모자이크바이러스, 포티비루스에 대하여 감수성	2018
도마도	DMR6	떡잎병에 대하여 저항성	2016
도마도	MLO1	떡가루병에 대하여 저항성	2017
도마도	PMR4	떡가루병에 대하여 저항성	2017
도마도	Solyc08g075770	Fusarium시들병에 감수성	2018
도마도	MAPK3	회색곰팡이병에 감수성	2018
도마도	JAZ2	세균반점병에 저항성	2019
바나나	바이러스의 ORF영역	바나나줄무늬바이러스에 저항성	2019
오이	eIF4E	오이잎줄황색화바이러스와 주키니황색모자이크 바이러스, 파파야고리반점모자이크 바이러스에 대하여 저항성	2016
포도	MLO7	떡가루병에 저항성	2016
포도	WRKY52	회색곰팡이병에 저항성	2018
카카오	NPR3	Phytophthora tropicalis에 저항성	2018

작물종	표적유전자	표적형질	년도
파파야	<i>aIEPIC8</i>	<i>Phytophthora palmivora</i>	2018
굴	<i>LOB1</i> 프로모터	굴혹(암종)에 저항성	2016, 2017
사과	<i>DIPM1, DIPM2, DIPM4</i>	물커집병에 저항성	2016
<b>비생물학적스트레스에 대한 저항성</b>			
도마도	<i>BZR1</i>	열스트레스견딜성이 감소	2018
도마도	<i>CBF1</i>	랭스트레스견딜성이 감소	2018
도마도	<i>MAPK3</i>	가물스트레스견딜성이 감소	2017
수박	<i>ALS</i>	살초제에 저항성	2018
<b>열매질개선</b>			
도마도	<i>CLV3, Ic</i>	꽃가루집수가 많은 과일	2017
도마도	<i>PSY1</i>	황색도마도	2015
도마도	<i>MYB12</i>	분홍색도마도	2018
도마도	<i>ANT2</i> (유전자삽입)	자주색도마도	2015
도마도	<i>PL</i>	보관기일이 오랜 도마도	2016
도마도	<i>ALC</i>	보관기일이 오랜 도마도	2017
도마도	<i>MPK20</i>	당대사를 조절하는 유전자들이 억제	2018
도마도	<i>ANT2</i> (유전자삽입)	안토시아닌함량 증가	2015
도마도	<i>GAD2, GAD3</i>	GABA함량 증가	2017
도마도	<i>GABA-TP1, GABA-TP2, GABA-TP3, CAT9, SSADH</i>	GABA함량 증가	2018
도마도	<i>SGR1, LCY-E, B1c, LCY-B1, LCY-B2</i>	리코펜함량 증가	2018
도마도	<i>ALMT9</i>	말레인산함량 감소	2017
<b>열매남새와 과일나무재배화</b>			
도마도	<i>AGL6</i>	단위결실과일의 생산	2017
도마도	<i>IAA9</i>	단위결실과일의 생산	2017
도마도	<i>ARF7</i>	단위결실과일의 생성	2018
도마도	<i>MBP21</i>	“마더가 없는” 과일줄기의 생성	2017
도마도	<i>GAI</i>	키낮은 도마도식물의 생성	2019
도마도	<i>BOP1, BOP2, BOP3</i>	꽃차례가 단순하고 꽃이 빨리 핀다.	2016
도마도	<i>SP, SP5G, CLV3, WUS, GGP1</i>	형태와 꽃, 과일생산, 아스코르빈산 생합성과 연관된 형질의 유도	2018
도마도	<i>SP, OVATE, MULT, FAS, CycB</i>	형태와 꽃수, 도마도크기 및 수, 리코펜 생합성과 관련된 형질의 유도	2018
도마도	<i>SP5G</i>	낮길이감수성이 없는 도마도식물의 생성	
오이	<i>WIP1</i>	암꽃술식물의 생성	2017
땅파리	<i>SP, SP5G, CLV1</i>	형태와 꽃생성, 과일크기와 관련된 형질의 유도	2018
키위열매	<i>CEN4, CEN</i>	꽃과 열매가 빨리 피는 식물의 생성	2018

비루스에 대하여 두가지 방식이 리용되었다. 하나는 배렬상보성을 통하여 직접 비루스계놈을 표적으로 하는것과 다른 하나는 항비루스특성을 나타내는 도마도유전자를 수식하는것이다. 2018년에 CRISPR/Cas9계를 리용하여 비루스계놈의 캡시드와 레플리카제자리를 특이적으로 변이시켜 도마도황색잎말림병비루스에 저항성인 도마도식물을 얻었다. 유전자전이도마도에서는 비루스간섭이 뚜렷하였고 야생형(WT)보다 비루스계놈DNA가 더 적게 축적되었다. 이러한 면역성은 여러 세대에 걸쳐 유지되었으며 이것은 CRISPR/Cas9를 리

용하여 비루스에 대하여 장기적으로 저항성인 식물을 얻을수 있다는것을 보여주었다.[3] CRISPR/Cas9기술을 리용하여 또한 저항성경로에 참가하는 결정적인 유전자들을 파괴하여 이 유전자들이 실제로 비루스에 대한 면역을 부여하는가를 시험하였다. 도마도Dicer-like 2 유전자(*dcl2*)를 표적특이적으로 파괴하였을 때 *dcl2*변이체는 감자비루스X와 담배모자이크 비루스, 도마도모자이크비루스감염때 비루스감염증상을 나타냈으며 이것은 DCL2가 RNA 비루스에 대한 방어물림새에 참가한다는것을 시사해주었다.[14, 15]

곰팡이는 작물수확고와 질에 큰 손실을 주는 떡가루병과 감부기병, 녹병, 부패병을 비롯한 여러가지 병을 일으킨다.[17] 떡잎병과 떡가루병은 도마도에서 심각한 경제적손실을 준다. *Arabidopsis thaliana*에서 2-옥소글루타르Fe(II)-의존성옥시게나제초족에 속하는 downy mildew resistant 6유전자(*dmr6*)는 살리칠산항상성에 참가하며 그것이 과잉발현되면 떡잎병에 대한 감수성이 높아진다. 2016년에 CRISPR/Cas9계를 리용하여 도마도에서 *dmr6*종간상동유전자를 불활성화시켰을 때 *dmr6*변이체는 *Pseudomonas syringae*, *Phytophthora capsica*, *Xanthomonas* spp.를 비롯한 여러가지 병원성균에 대하여 병저항성을 나타냈으며 뚜렷한 부작용은 없었다.[16] 막관단단백질을 암호화하는 Mildew resistant locus 1(*mlo1*)은 떡가루병을 일으키는 곰팡이에 대한 감수성을 부여한다. 2017년에 CRISPR/Cas9기술을 리용하여 도마도에서 *mlo1*기능결실변이체를 만들고 변이체가 떡가루병곰팡이 *Oidium neolycopersici*에 완전히 저항성이라는것을 발견하였다. 더우기 T<sub>0</sub>형질전환체들을 자가섞붙임하여 전이DNA (T-DNA)를 분리시킨 후대들중에서 T-DNA가 없고 *mlo1*이 변이된 변이체를 동정하였는데 이것은 전이유전자가 없는 작물이라고 평가되었다.[17] 섬유소합성효소를 암호화하는 Powder mildew resistance 4유전자(*pmr4*)에 의해서는 또한 *O. neolycopersici*에 대한 저항성이 생겨난다. 또 다른 잘 알려진 도마도곰팡이병원성체는 *Fusarium*시들병을 일으키는 *Fusarium oxysporum*이다. 이 곰팡이에 심하게 감염되면 도마도열매를 한알도 수확하지 못한다. *Soylc08g075770*유전자가 *Fusarium*시들병견딜성에서 기능을 수행한다는것이 동정되고 CRISPR/Cas9로 이 유전자를 파괴하면 병감수성이 나타났다.[18] *Botrytis cinerea*는 회색곰팡이병을 일으켜 수확전 및 수확후단계에서 경제적으로 심한 손실을 입게 하는 공기전파성식물병원균이다. 도마도가 *B. cinerea*에 감염되면 수확후감염에 감수성을 나타낸다. 유사분열원에 의하여 활성화되는 단백질키나제3(MAPK3)이 CRISPR/Cas9기술에 의하여 *B. cinerea*에 대한 저항성을 부여한다는것이 증명되었다.[18]

식물병원성세균은 감염되어도 증상이 나타나지 않고 해당한 살균제가 없는것으로 하여 조정하기 어렵기때문에 유전적으로 이 병원성균에 대한 저항성을 가지게 하는것이 최선의 방도로 된다. *Pseudomonas syringae*는 도마도에서 세균성반점병을 일으키는 병원균으로서 그 생산성과 판매에 큰 영향을 미친다. Jasmonatezium도메인단백질2(JAZ2)는 애기장대에서 *P. syringae*에 대한 방어능에 기여하므로 CRISPR/Cas9기술을 리용하여 C말단자스몬산관련(Jas)도메인(JAZ2Δjas)이 결실된 도마도우성JAZ2억제인자를 만들었다. 이 JAZ2Δjas억제인자에 의하여 *P. syringae*에 대한 저항성이 생겨났으며 이것은 CRISPR/Cas9기술로 열매작물을 보호할수 있다는것을 보여주었다.[19]

## 2) 비생물학적스트레스에 대한 저항성

다윈의 진화론에 따르면 살아남았다고 하여 가장 좋거나 강한 종이 아니며 오히려 변하는 환경에 적응되고 그에 가장 잘 맞출수 있는것이 가장 강한것이다.[19] 가물과 큰물, 고온이나 저온과 같은 비생물학적스트레스 다시말하여 기후변화가 식물종 특히 작물에 가장 큰 위협으로 된다. 전통적인 육종기술에 의하여 작물의 수확고가 크게 높아졌지만 식량에 대

한 수요가 높아짐에 따라 작물생산성을 더 높이자면 새로운 기술이 요구되는데 여기에서 가장 유망한것이 CRISPR/Cas9기술이다.

Brassinazole resistant 1(BZR1)은 브라시노스테로이드(BR)응답을 조절하며 BR에 의한 발생과정에 참가한다. 도마도에 있는 그 중간상동유전자도 BR응답을 조절한다. BZR1은 또한 CRISPR-bzr1과 BZR1과잉발현계통에서 증명된바와 같이 *Feronia*유전자(*fer*)의 발현을 조절하여 열견딜성에 참가한다. 도마도는 저온감수성작물이므로 랭스트레스를 받으면 열매질이 쉽게 손상된다. 2018년에 CRISPR/Cas9기술로 만든 C-반복배열결합인자1(CBF1)변이체에서 야생형보다 전해질이 더 많이 류출되면서 랭손상피해가 더 심하였으므로 이 CBF1이 랭손상으로부터 식물을 보호한다는것을 알게 되었다.[9] 회색곰팡이병에 대한 저항성에 참가하는 MAPK3도 산화적손상으로부터 세포막을 보호하여 도마도의 가물응답에 참가한다.

### 3) 도마도열매의 질개선

열매질은 외부적 및 내부적인자에 의하여 규정된다. 외부적질인자는 열매크기와 색, 결이며 이 모든것은 맨눈으로 쉽게 알아볼수 있다. 영양성분의 수준(당과 비타민과 같은)과 생물활성물질(리코펜과 안토시아닌, 사과산)과 같은 내부적열매질인자는 기구를 리용하여서만 측정할수 있다.

도마도에서 암꽃술잎으로부터 생긴 꽃가루집의 수는 도마도열매크기에 가장 큰 영향을 미치는데 열매크기가 서로 다른것은 50%가 이 차이때문이다. 꽃가루집수는 여러가지 량적형질자리(QTL)에 의하여 조절되는데 그중의 일부가 동정되었다. 2015년에 CRISPR/Cas9기술을 리용하여 고전적인 *CLAVATA-WUSCHEL*(*CLV-WUS*)줄기세포의 대사경로를 파괴하여 열매가 큰 도마도를 만들어냈다.[20] *CLV3*유전자의 프로모터부위를 표적으로 하는 8개의 sgRNA를 설계하고 조작하였을 때 유전자전이식물은 야생형식물보다 더 많은 기관을 만들어내고 열매도 더 컸다. 또한 도마도에서 꽃가루집수가 더 많은 열매도 만들어냈다.[10] 소비자들은 주로 색과 결이 생긴한 도마도를 많이 요구한다. 지역마다 소비자들이 선호하는 색이 서로 다르다. 실례로 유럽과 아메리카소비자들은 붉은색도마도를 더 좋아하며 아시아에서는 분홍색도마도를 좋아한다. 2015년과 2017년에 이미 피토엔합성효소1(PHY1)과 MYB 전사인자12(MYB12), 안토시아닌2(ANT2)를 각각 표적화하여 노란색과 분홍색, 자주색도마도를 만들어냈다. 결특성을 변화시켜 보관기일을 오래 하는것도 육종가들에게 있어서 중요한 문제이다. CRISPR기술로 성숙저해인자(RIN)나 DNA탈메틸화효소2(DML2)를 불활성화시켜 보관기일이 오래고 천천히 익는 도마도를 만들어냈다. 그러나 이 도마도들은 보통 색이 온전하지 못하고 결과 맛이 좋지 못하며 영양가치도 떨어진다. 따라서 다른 질적측면에는 영향을 주지 않으면서도 보관기일이 오랜 도마도를 만들어내는것이 중요한것으로 제기되었다. 두 연구조가 도마도의 감각적질과 영양소질을 떨어뜨리지 않으면서도 펙틴산리아제(PL)와 알코바카(ALC)를 침묵시켜 열매유연함을 성과적으로 보장하였는데 이것은 CRISPR계가 열매작물의 질을 개선하는데서 훌륭한 도구로 된다는것을 보여주었다.

내부열매질과 관련하여 영양성분과 생물활성물질의 수준을 높이기 위하여 많은 노력을 기울이였다. 당질과 비타민은 에너지를 주는것으로 하여 결정적인 영양소로 된다. 당질과 카로티노이드(사람몸에서 프로비타민A인 카로티노이드는 흡수되어 비타민A로 전환됨.)의 합성과 대사에는 여러 유전자가 참가한다. 실례로 유사분열유도제활성화단백질키나제20(MPK20)을 파괴하면 전사와 단백질수준에서 당질대사를 조절하는 여러 유전자들의 발현이 억제된다. 생물활성물질이란 음식물에 미량으로 있는 추가적인 영양성분으로서 보통 심장혈관질병과 암을 예방하는 역할을 한다. 안토시아닌과 사과산,  $\gamma$ -아미노버터산(GABA),

리코펜은 생물활성물질이며 CRISPR/Cas9기술을 리용하여 그 대사경로에 있는 주요유전자들의 발현을 조절함으로써 안토시아닌과 GABA, 리코펜함량이 높은 도마도를 만들어냈다. 도마도에서 사과산함량을 결정하는 주요유전자인 알루미늄활성화사과산수송체9유전자(*almt9*)도 CRISPR/Cas9계를 리용하여 동정되었다.

#### 4) 도마도의 재배성개선

식물을 인공적으로 재배하게 되면 식물형태(종자크기와 분산물립새, 식물체의 모양)와 생리학(싹트기와 꽃피기, 성숙시기)을 조절하는 유전자들에 영향을 미치게 된다. 이상형을 얻기 위하여 고전육종법이나 현대육종법에서는 야생형으로부터 대립변이를 재배품종에 도입하여왔다. 그러나 이 기술들은 시간이 오래 걸린다. 다른 방법은 야생형작물을 유전자수준에서 직접 조작하여 그것들을 새로 재배화하고 불리한 환경에 적응시키는것이다. 이 새로운 재배화는 CRISPR/Cas9기술에 의하여 근본적으로 가속화되었다.

단위결실 즉 수정이 필요없고 씨가 없는 열매는 열매작물에서 중요한 형질로 보고있다. 그것은 첫째로, 변화되는 환경속에서 안정한 수확고를 유지하는데 유리하며 둘째로, 공업공정에서 가공된 산물에서 씨를 분리하는데 필요한 에너지를 절약하며 셋째로, 소비자들이 씨가 있는 과일보다 씨없는 열매를 더 좋아하기때문이다. 2017년에 agamous-like 6유전자(*agl6*)가 변이되면 열조건에서 단위결실열매가 만들어진다는것이 확증되었다.[11] 변이체의 질량과 모양이 정상이고 질적변화가 없으므로 *agl6*는 단위결실에서 유망한 유전자이다. 기베렐린이나 아옥신신호전달이 강화되면 수정이 없이도 단위결실이 이루어질수 있다. 아옥신신호전달경로에 참가하는 인돌-3-초산유도성인자9(IAA9)와 아옥신응답인자7(ARF7)을 파괴하여 만든 변이체에서는 씨가 없는 열매가 만들어졌으며 이것은 단위결실도마도의 특징이다.

마디점은 열매가 나무에서 떨어지는 줄기의 약한 부위이다. 야생종은 열매가 저절로 떨어지는것으로 하여 종자가 퍼지는데 유리하지만 재배업자들은 열매를 따야 하므로 열매가 매달리는 형태로 달리는것을 더 좋아한다. 육종가들은 꽃이 떨어지는 부위(이 부위가 있음으로 하여 수정되지 않은 꽃이나 다 익은 열매가 나무에서 떨어짐.)가 없고 마디점도 없이 열매줄기가 있는 변이체를 얻기 위해 노력하였다. 2017년에 CRISPR/Cas9기술을 리용하여 MADS-통단백질21(MBP21)이 기능결실된 *mbp21*변이체를 얻었는데 마디점이 없었다. 열매를 따기 더 쉬우며 정상식물에 비하여 키가 작아졌으므로 영양성분이 뿌리로부터 잎으로 더 짧은 거리를 이동하게 되었다.[12] 식물체의 키가 작아지면 또한 강한 바람이 불어도 피해를 적게 받는다. 유전적으로 키가 작은 도마도는 기베렐린산감수성유전자(*gai*)를 불활성화시켜 만들어졌는데 이 식물체는 바람이 부는 환경에서 유리할것으로 본다. 그러나 이 키작은 도마도에서 열매의 질량이 작아지고 종자수가 적어졌는데 이 문제가 해결되어야 한다. 열매의 생산성은 꽃에 의하여 좌우되며 꽃차례구조는 꽃이 생기는데서 중요한 역할을 한다. CRISPR/Cas9기술을 리용하여 도마도blade-onpetiole유전자(*bop*)를 침묵시켜 꽃차례구조에 영향을 주는 애기장대의 상동유전자와 똑같은 기능(잎복잡성과 기관떨어지기)을 수행하는가를 시험하였다. 명백히 CRISPR-bop1/2/3 3중변이체에서는 야생형보다 꽃이 빨리 폈으나 꽃차례는 매우 단순하였다.

야생형도마도를 상업적목적으로 재배하려면 열매달리기와 크기, 동시성숙, 꽃피기감수성, 낮길이감수성, 영양성분함량을 비롯하여 수많은 표현형이 달라져야 한다. 두 연구조는 2018년에 CRISPR/Cas9기술을 리용하여 농업적으로 중요한 형질과 야생형에 있는 유용한 형질을 결부시켰다. 한 연구조는 현존도마도체통의 생산성에 결정적인 5가지 유전자의 6개 자리를 표적특이적으로 파괴하여 야생형*Solanum pimpinellifolium*을 새로 재배화하여 식물체의 형태와 열매의 크기 및 수, 영양가치를 변화시켰다.[13] 다른 연구조는 이 식물체의 형

태와 꽃 및 열매생산, 아스코르빈산합성과 연관된 유전자들의 암호배열과 시스조절배열 혹은 상류ORF를 편집하는 방식으로 유용한 형질을 *S. pimpinellifolium*에 도입하였다.

낮길이에 대한 감수성에 의하여 작물의 지리적분포가 결정된다. 그러므로 빛주기응답을 변화시키면 작물재배화과정을 가속화할수 있다. Self-pruning 5G유전자(*sp5g*)를 파괴하여 만든 낮길이감수성이 없어진 도마도변이체에서는 꽃생성이 훨씬 당겨지고 따라서 열매를 일찍 수확하였다.

## 2. 현재 다른 열매남새와 과일나무들에서 CRISPR/Cas9의 응용

CRISPR/Cas9기술은 도마도에만 적용된것이 아니다. 이 기술은 딸기와 바나나, 포도, 사과, 수박, 키위열매를 비롯하여 다른 여러 열매남새와 과일나무들에도 적용되었다. 딸기는 흔히 모형생물로서 특정한 유전자의 기능분석에 리용된다. 실례로 R2R3 MYB전사인자10의 유전자(*myb10*)를 표적특이적으로 파괴하면 색이 없는 과일이 생긴다.[22] 2018년에는 CRISPR/Cas9를 리용하여 아욱신응답인자8유전자(*arf8*)를 표적특이적으로 편집하였는데 *arf8* 호모변이체는 야생형식물보다 모성장이 더 빨랐다.[21] 2013년에는 도마도*MADS-box6*유전자(*tm6*)가 수꽃술발생에서 결정적인 역할을 한다는것이 밝혀졌다. 딸기에서 그 기능을 확인하기 위하여 2019년에 CRISPR/Cas9계를 8배체종에 적용하고 *tm6*변이체의 표현형을 분석하였는데 꽃가루집이 심하게 파괴되었으며 이것은 TM6이 꽃발생에서 필수적인 역할을 한다는것을 보여주었다. 뿐만아니라 CRISPR/Cas9기술을 리용하여 딸기열매가 생기는 기간에 아욱신생합성에서 YUCCA10유전자(*yuc10*)가 노는 생물학적역할을 연구하였다. *yuc10*이 파괴되었을 때 *yuc10*변이체에서 유리아욱신이 현저히 줄어들었다. 딸기에서 기능연구가 진행되었을뿐만아니라 많은 연구자들이 다른 열매작물과 과일나무들을 개량하기 위하여 CRISPR/Cas9기술로 게놈을 편집하기 위한 연구를 진행하였다. 여기서는 다른 열매남새와 과일나무들에 CRISPR/Cas9기술이 최근에 어떻게 적용되고있는가를 보기로 한다.(표 2 참고)

### 1) 생물학적스트레스에 대한 저항성

열대 및 아열대나라들에서 바나나줄무늬비루스는 바나나육종에서 기본문제로 제기되고있다. 우에서 언급한바와 같이 비루스에 대한 저항성을 개선하기 위한 한가지 방도는 CRISPR/Cas9기술로 그 게놈을 표적특이적으로 파괴하는것이다. 2019년에 CRISPR/Cas9기술을 리용하여 바나나줄무늬비루스유전자를 불활성화시켰을 때 편집되지 않은 대조식물에 비하여 편집된 식물의 75%에서 감염증상이 나타나지 않았다.[6] 식물RNA비루스가 자기의 생활고리를 유지하자면 진행생물번역시작인자4E(eIF4E)와 같은 숙주의 인자가 있어야 하는데 이 인자가 불활성화되면 비루스감염성이 파괴된다. CRISPR/Cas9기술을 리용하여 *eIF4E*의 기능을 파괴한 비루스저항성오이변이체도 만들어졌다.[7] 예측한대로 *eIF4E*변이체는 오이잎줄황색화비루스와 황색모자이크비루스, 파파야고리반점모자이크비루스에 대하여 면역성을 나타내었다. 곰팡이병은 포도수확고와 포도질에 큰 손실을 준다. 두가지 유전자 즉 떡가루병저항성자리O7유전자(*MLO7*)와 WRKY전사인자52유전자(*WRKY52*)가 각각 *Erysiphe necator*와 *B. cinerea*저항성에 참가한다는것이 알려졌다.[8] 2016년과 2018년에 두 연구조가 CRISPR/Cas9기술을 리용하여 이 유전자들의 기능을 평가하였는데 두 유전자를 모두 기능결실시켰을 때 면역성을 나타냈다. 2018년에는 이 기술을 리용하여 *Phytophthora tropicalis*와 *Phytophthora palmivora*에 대하여 저항성이 높아진 카카오와 파파야가 만들어졌다. *Xanthomonas citri*에 의하여 생기는 굴혹(암종)은 가장 널리 재배되는 굴에 커다란 피해를 주

며 따라서 세계적으로 큰 경제적손실을 입고있다. 2016년과 2017년 두 연구조가 CRISPR/Cas9 기술을 리용하여 꺾의 lateral organ boundaries 1유전자(*lob1*)의 프로모터영역을 표적특이적으로 변이시켜 꺾속에 저항성인 꺾을 만들어냈다. 변이계통은 *X. citri*감염에 대하여 높은 저항성을 나타내었다. 이와 유사하게 2016년에 사과원형질체에서 DspA/E-호상작용단백질들을 암호화하는 유전자들(*DIPM1*, *DIPM2*, *DIPM4*)이 파괴되었을 때 *Erwinia amylovora*에 대한 저항성이 개선되었다.[8] 대추야자나무는 사막지대농업에서 중요한 과일나무이다. 대추야자나무의 게놈이 크고 복잡하며 한누클레오티드다형의 빈도가 높은것으로 하여 CRISPR/Cas9기술을 적용하기 힘들고 따라서 유전적으로 개량하기 위한 연구가 진행된것이 없다. 그러나 2017년에 대추야자나무에 CRISPR/Cas9기술을 적용하기 위한 기초연구가 진행되었다.

## 2) 비생물학적스트레스에 대한 저항성

수박은 잡초로 하여 큰 손실을 보고있지만 살초제를 쓰면 그 생장도 영향을 받는다. 그러므로 살초제저항성수박이 있어야 하지만 전통적인 육종법으로는 이것을 얻기 힘들다. 2017년에 CRISPR기술을 리용한 염기편집법으로 살초제저항성벼와 도마도가 만들어졌다.[11] 2018년에는 수박에 이 새로운 염기편집기술을 적용하여 아세토젯산합성효소유전자(*als*)를 편집하였다. 이 유전자가 변이되면 살초제에 대하여 높은 저항성을 나타낸다. 편집된 *als*변이체와 야생식물을 살초제인 트리베누론으로 처리하였을 때 모든 야생식물은 심한 피해를 받았지만 *als*변이체는 피해를 받지 않았으며 이것은 CRISPR염기편집기술을 도입하여 살초제저항성수박을 얼마든지 만들수 있다는것을 보여주었다.

## 3) 열매남새와 과일나무의 재배방법

암꽃술계통은 오이육종에서 매우 중요하다. 그것은 이 계통에서 잡종이 빨리 생기고 수확고가 높고 열매밀도도 높을뿐아니라 인공적으로 수꽃술을 제거하지 않아도 되고 암수한몸계통에 비하여 섞불임로력을 줄일수 있다. WIP도메인단백질1(WIP1)은 오이에서 암꽃술잎발달을 저해하며 *wip1*기능결실변이체는 암꽃술표현형을 나타내어 옷마디에 암꽃만이 생긴다. 2018년에 중앙 및 남아메리카에서 자라는 땅파리와 일부 식물을 재배화하였다. CRISPR/Cas9기술을 리용하여 식물의 형태와 꽃생성, 과일크기를 각각 조절하는 도마도의 *self-pruning(SP)*, *SP5G*, *CLV1*의 중간상동유전자를 땅파리에 도입하여 주요생산특성을 개선하였다.[14] 이것은 연이 먼 모형작물로부터 유용한 형질을 도입하여 일련의 작물들을 재배화할수 있다는것을 보여주었다. 키위열매는 개선잡재력이 큰 최근에 재배화된 과일나무이다. 2018년에 꽃피기의 억제인자인 *centroradialis* 4유전자(*cen4*)와 *CEN*을 불활성화시켰을 때 본래 기여오르는 여러해살이나마가 꽃이 빨리 피고 열매가 빨리 익는 식물로 전환되었다.[15]

## 맺 는 말

CRISPR/Cas9기술이 2013년에 처음 도입된 때로부터 작물육종에서는 변혁이 일어났다. 현재까지 달성된 주요성과는 병저항성 및 환경적응성열매남새와 과일나무가 만들어지고 열매질이 개선된것이다. 특히 DNA가 없이 CRISPR/Cas9리보누클레오단백질이 애기장대와 벼, 담배, 부루, 밀, 감자의 원형질체에 도입되었다.[1-3] 이 기술로 만들어진 식물은 유전자전이(GM)작물로 취급되지 않을것이다. 이런 특성으로 하여 우수한 형질을 가진 열매남새와 과일나무들을 개발할수 있는 길이 열리고 GM작물이 허용되지 않는 나라들에서도 상업화되고 판매될것이다.[20] 2016년 4월 어느 한 나라에서는 CRISPR로 편집하여 다쳐도 물



크러지지 않거나 색이 변하지 않게 만든 버섯이 GM작물이 아니므로 시장에 진출하여도 된다고 결정하였는데 이것은 정부로부터 승인을 받은 첫 CRISPR편집생물로 되었다.[8] 계속하여 2017년에는  $\omega$ -3지방산 함량이 높아진 아마와 가물견딜성콩이 승인되었으며 이것은 CRISPR로 편집된 식물이 GM작물과 같은 통제를 받지 않고 재배 및 판매될수 있으며 따라서 CRISPR 기술을 열매납새와 과일나무육종에 얼마든지 적용할수 있다는것을 명백히 보여주었다.

그러나 CRISPR기술로 편집된 작물은 아직도 일반소비자들의 접수와 정부의 통제를 비롯하여 사회제도전에 부딪치고있다. 어느 한 나라에서는 CRISPR/Cas9기술로 편집된 전이 유전자가 없는 생물이 통제밖에 놓였지만 다른 나라들에서는 CRISPR기술의 리용을 허용 하겠는가에 대하여 아직도 논의중에 있다. 2018년초 어느 한 법기관의 결정에 따르면 계놈편집된 작물은 일반적인 GM생물과 똑같은 엄격한 통제를 받아야 하는데 이것은 많은 과학자들을 포함하여 이 기술의 지지자들에게 큰 영향을 주었다. CRISPR기술이 더 발전하고 그 평가체계가 확립됨에 따라 더 많은 나라들이 CRISPR로 편집된 작물에 대하여 락관적이며 포괄적인 태도를 가지게 될것이다. CRISPR기술을 더 발전시켜 리익은 최대로 되게 하고 위험성은 최소로 줄여야 하는것외에 일반소비자들이 어떻게 접수하겠는가에 대하여서도 고려하여야 한다. 가장 중요한것은 이 기술의 기본측면이 충분히 설명되어 일반소비자들이 리성적으로 판단하도록 하고 CRISPR기술로 편집된 작물의 안정성과 우점에 대하여 일반소비자들이 믿음을 가지게 하여야 한다.

## 참 고 문 헌

- [1] J. Giovannoni et al.; Annu. Rev. Plant Biol., 68, 61, 2017.
- [2] P. K. Vayalil et al.; Crit. Rev. Food Sci., 52, 249, 2012.
- [3] A. S. Bawa et al.; J. Food Sci. Technol., 50, 1035, 2013.
- [4] J. Kim et al.; Nat. Biotechnol., 34, 1014, 2016.
- [5] Z. Shimatani et al.; Nat. Biotechnol., 35, 441, 2017.
- [6] A. S. Fister et al.; Front Plant Sci., 9, 268, 2018.
- [7] R. Gumtow et al.; Mol. Plant Microbe., 31, 363, 2018.
- [8] H. Jia et al.; Plant Biotechnol. J., 14, 1291, 2016.
- [9] L. Deng et al.; J. Genet. Genom., 45, 51, 2018.
- [10] T. Čermák et al.; Genome Biol., 16, 232, 2015.
- [11] M. V. G. Roldan et al.; Sci. Rep., 7, 4402, 2017.
- [12] A. Zsögön et al.; Nat. Biotechnol., 36, 1211, 2018.
- [13] E. Varkonyi-Gasic et al.; Plant Biotechnol. J., 16, 162, 2018.
- [14] T. Langner et al.; Annu. Rev. Phytopathol., 56, 479, 2018.
- [15] L. Arora et al.; Front. Plant Sci., 8, 1932, 2017.
- [16] V. M. G. Borrelli et al.; Front. Plant Sci., 9, 1245, 2018.
- [17] H. Li et al.; Front. Plant Sci., 8, 457, 2017.
- [18] Z. Lang et al.; Natl. Acad. Sci. USA, 114, E4511, 2017.
- [19] Y. Ito et al.; Biochem. Bioph. Res. Commun., 467, 76, 2015.
- [20] J. Zhou et al.; Plant Biotechnol. J., 16, 1868, 2018.
- [21] C. Nishitani et al.; Sci. Rep., 6, 31481, 2016.
- [22] A. Scheben et al.; Science, 355, 1122, 2017.

## **CRISPR Technology Revolutionizing the Improvement of Vegetables and Fruit Trees**

*Ho Myong Sik, Kim Sun Ui*

Fruits are major sources of essential nutrients and serve as staple foods in some areas of the world. An increase of human population and changes in climate experienced worldwide make it urgent to produce fruit crops with high yield and more adaptation to the environment, for which conventional breeding is unlikely to meet the demand. Fortunately, clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) technology paves the way toward a new horizon for fruit crop improvement and consequently revolutionizes plant breeding. In this review, the mechanism and optimization of the CRISPR system and its application to fruit crops, including resistance to biotic and abiotic stresses, fruit quality improvement, and domestication are highlighted. Controversies and future perspectives are discussed as well.

Keywords: CRISPR, fruit vegetable, fruit, tomato, apple