

GOVP1200505140

최 종
연구보고서

**유전적, 환경적 요인을 이용한 흑진주벼에서
안토시아닌(antho-cyanin)생합성 증대를
위한 기술개발에 관한 연구**

연 세 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “유전적, 환경적 요인을 이용한 흑진주벼에서 안토시아닌(antho-cyanin)생합성 증대를 위한 기술개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 12 월 6 일

주관연구기관명 : 연세대학총괄

연구책임자 : 이순희

세부연구책임자 : 이순희

연 구 원 : 곽수환

연 구 원 : 전 영

연 구 원 : 송민식

협동연구기관명 : 단국대학

협동연구책임자 : 이동진

연 구 원 : 류수노

연 구 원 : 박상구

연 구 원 : 이은정

요 약 문

I. 제 목

유전적, 환경적 요인을 이용한 흑진주벼에서 안토시아닌(anthocyanin) 생합성증대를 위한 기술개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

안토시아닌 (anthocyanins)은 항염증활성과 모세혈관의 약화를 막아주는 의학적 효능을 가지고 있을 뿐 아니라 항산화성질을 가지고 있기 때문에 성인병예방 및 치료효과가 탁월한 기능성 식품으로써의 유색미의 가치를 높여준다 즉 안토시아닌은 식품산업에서 자연색소로 사용하기에 적합한 수용성 색소임. 현재 국내·외에서 항산화성분을 함유하고 있는 농산품을 대상으로 물질분리 등 많은 연구가 수행되고 있으며 식물의 유용유전자 조작에 의한 고기능성 작물을 제조하는 것은 국가 경쟁력에서 반드시 이루어져야 될 사항이다 또한 천연 농산물에서 항산화 물질 등을 안정적이며 대량으로 분석하는 방법, 육종 및 재배기술 등은 각 나라별 연구소의 기술 노하우로서 기술이전이나 도입이 매우 어려우므로 우리나라에서 자체 개발하여야한다

III. 연구개발 내용 및 범위

현미에서 추출된 C3G 함량은 NPK처리구에서 100g 당 488mg으로 처리구중에서 가장 높은 것으로 나타났으며 DPPH radical 소거에 의한 항산화활성 변이는 C3G함량이 제일 높았던 기비중심 분시방법 처리구에서 높았다. 안토시아닌(C-3-G)함량은 NAA 10ppm처리구 539mg/100g 및 1000ppm 처리구, 53mg/100g에서 높은 경향이 있으며, 안토시아닌(C-3-G)함량은 에틸렌 10ppm처리구 및 2000ppm처리구에서 무처리에 비하여 비교적 높은 경향이였다. 항산화능은 무처리 (40%)에 비하여 10ppm 및 2000ppm처리구에서 각각 44, 47%로서 높게 나타났다.

안토시아닌(C-3-G)함량은 GA 1-10ppm 처리구에서 483-498mg/100g 으로 무처리 보다 높은 경향을 보였고, 항산화능은 10ppm 처리구가 무처리 보다 높은 것으로 나타났다 안토시아닌(C-3-G)함량은 카이네틴 50-1000ppm처리구에서 498-573 mg/100g으로 무처리에 비해 높은 경향을 보였다. 항산화능은 50-1000ppm 처리구에서 43-53%로서 무처리(40%)에 비하여 높은 활성을 나타냈다.

현미종실에 함유되어 있는 안토시아닌(Cyanidin-3-glucoside)의 함량은 형질전환체에서 100g 당 633mg으로 대조구인 흑진주벼 429mg 보다 유의하게 높은 것으로 나타났다. Free radical 소거능

(항산화력)에 있어서도 형질전환체의 증실이 대조구인 흑진주벼에 비해 높았다. 최근 항산화제로써의 기능이 매우 높아 노화방지제, 식료품첨가물, 의약품, 건강보조식품으로 사용되고있는 안토시아닌의 산업화를 추진하기 위하여 안토시아닌 생합성 과정에 관여하는 유전자들을 분리하고 이것들을 흑진주벼에서 과다발현시키으로써 기존의 안토시아닌보다도 더 많은 생합성량을 가지는 형질전환 흑진주벼를 제조한다. 궁극적으로 형질전환 흑진주벼를 농가의 고소득작물로써 개발하고 그 추출물들을 상품화 함으로써 생산자인 농가와 기업체의 이익을 도모하고자 한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

최종적으로 흑진주벼에서의 안토시아닌 함량증가시 항산화제로써의 기능이 매우 높은 안토시아닌의 산업화를 추진하기 위하여 안토시아닌 고함유 형질전환체의 특허화를 일차적으로 추진하며 건강보조식품, 식료품첨가제, 화장품, 의약품등의 재료로 사용하기 위하여 기업으로의 기술이전을 하여 상업화해야 할 것이다

SUMMARY

I. Title

Over-expression of anthocyanin in *Heukjinju*-rice by environmental and genetical factors

II. Background and Purpose of the research

It had been reported that anthocyanins display anti-inflammatory activity and suppress weakening of capillary vessels. Color rices is highly evaluated as healthl foods because anthocyanins have anti-oxidant properties. Also, anthocyanins are natural soluble pigments adequate to food industry. Currently, a number of researches containing materials extraction from agricultural plants are performed in Korea and other countries. Development of transgenic plants producing useful materials on a large scale thought to be very necessary for winning in international competition. Highthroughput of anti-oxidants, breeding and culture methods of useful transgenic plants must be developed by itself in Korea because transfer of knowhow and technology is very difficult.

III. Content of the research

Cyanidin-3-glucoside(C3G) content of brown rice of NPK application treatment was shown in 488mg/100g and the highest level among the several application treatments. The antioxidant activity by DPPH radical scavenging was the highest in basal fertilization treatment. C3G content at 10 ppm and 1000 ppm of NAA were 539mg/100g and 553mg/100g, respectively. C3G content in ethylene 10ppm and 2000 ppm were higher than that of control . Antioxidant activity was the lowest at the untreated (40%) and those of 10ppm and 2000ppm treatment were 44% and 47%, respectively. C3G content in 1-10ppm of GA teated was higher in 483-498mg/100g than untreated control plot. Antioxidant activity in 10ppm treated was higher than untreated control plot. C3G content in 50-1000ppm of kainetin was higher in 498-573mg/100g than control plot. Antioxidant activity was the lowest at the untreated (40%) and those of 50ppm and 1000ppm treated were 43%and 83% ,

respectively. C3G content in brown rice grain of transformant (633mg/100g) was significantly higher than Heukjinjubyeo(429mg/100g) which was the treated control. Radical scavenging activity in kernel of brown rice in transformant was higher than that of Heukjinjubyeo.

For industrialization of anthocyanins that have functions in prevention of aging, food additives, medicines and health foods, we have cloned genes involved in anthocyanin biosynthesis and introduced those genes into color rice(흑진주벼). Finally, we have developed transgenic rices producing anthocyanin on a large scale. Using we will extract anthocyanins from transgenic rice and contribute to income enlargement of agricultural economy.

IV. Results and suggestion for application

In order to industrialize anthocyanins functions as anti-oxidants, we will apply a patent of transgenic rice and transfer the technology to company for using raw materials for health foods, food additives, cosmetics and medicines.

CONTENTS

Chapter 1. Outlines of Research	8
Section 1. Aims of research	8
Section 2. Specific aims and description of research	10
Chapter 2. Technical status in domestic and foreign fields	15
Section 1. Status and problem in related domestic and foreign field	15
Section 2. Problem and prospect	16
Section 3. Feasibility of technology import	16
Chapter 3. Contents and results	17
Section 1. Contents and results of Sub-project I	17
1. Cloning of regulatory gene of Anthocyanin synthase	17
2. Cloning of glutelin promoter from <i>Heukjinju</i> -rice	20
3. Gaining C1 gene of maize	22
4. Construction of expression vector	22
5. Regeneration from transformed <i>Heukjinju</i> -rice callus which introduced C1 and R gene	23
6. Genetical analysis of transformants	28
7. Cloning of anthocyanin 5'-acyltransferase	34
Section 2. Contents and results of Sub-project II	36
1. Extract of anthocyanin pigment and analyze anti-oxidation	36
2. Effect of fertilization which exert to anthocyanin synthesis and ripening of <i>Heukjinju</i> -rice	38
3. Effect of treatment with plant growth regulators which exert to anthocyanin synthesis and ripening of <i>Heukjinju</i> -rice	44
4. Anthocyanin content and developmental specificity of transformed <i>Heukjinju</i> -rice	47
Chapter 4. Accomplishment and contribution to related field	49
Section 1. Yearly objective and key for the evaluation	49
Section 2. Accomplishment and contribution to technical development	51
Chapter 5. Application of result	54
Section 1. Necessity of continuing researches and application plan	54
Chapter 6. References	55

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	8
제 1 절	연구개발의 필요성	8
제 2 절	연구개발의 목표 및 내용	10
제 2 장	국내외 기술개발 현황	15
제 1 절	국내 외 관련기술의 현황과 문제점	15
제 2 절	앞으로의 전망	16
제 3 절	기술도입의 타당성	16
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	17
제 1 절	세부과제 수행내용 및 결과	17
1.	흑진주벼에서 안토시아닌 합성조절 유전자의 분리	17
2.	벼 glutelin promotor의 확보	20
3.	옥수수 C1 유전자의 확보	22
4.	복합 유전자 전달 벡터의 제작	22
5.	R, C1 안토시아닌 생합성 조절유전자가 도입된 흑진주벼 형질전환체 제작	23
6.	형질전환체의 유전자 분석결과	28
7.	안토시아닌 안정화 유전자 (Acyltransferase) 분리	34
제 2 절	협동과제 수행내용 및 결과	36
1.	안토시아닌 색소 및 항산화성 분석방법	36
2.	비료사용에 따른 안토시아닌 생합성 및 등숙에 미치는 영향	37
3.	식물생장조절제 처리가 안토시아닌 생합성 및 등숙에 미치는 영향	44
4.	흑진주벼 형질전환체의 생육특성 및 안토시아닌 함량	48
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	49
제 1 절	연차별 연구목표 및 평가의 착안점	49
제 2 절	연구개발 목표의 달성도 및 관련분야 기술에의 기여도	51
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	54
제 1 절	추가연구의 필요성 및 활용계획	54
제 6 장	참고문헌	55

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

가. 안토시아닌 (anthocyanins)은 인간 눈에 보이는 가장 중요한 수용성 색소이다. 안토시아닌은 항염증활성과 모세혈관의 약화를 막아주는 능력이 있기 때문에 최근 들어 의학적 관심이 높아지고 있다. 또한 안토시아닌은 항산화성질을 가지고 있고 식품산업에서 자연색소로 사용하기에 적합하기 때문에 더욱 관심이 모아지고 있다. 안토시아닌의 아글리콘인 안토시아닌 (anthocyanidin)은 그 배당체보다 오히려 더 강력한 항산화력을 가지고 있다. 하지만 안정성이 떨어진다는 것이 문제점이다.- 미국 농무성 농업 연구부

나. 식물에 있는 항산화성분은 색소류, 폴리페놀·플라본 배당체·리그난 배당체 등 여러 가지로, 종자 껍질이나 색소 및 식물 잎 표면의 왁스에 분포하는데 항산화물질을 함유한 종자는 예로부터 약용으로 이용되는 등 매우 중요한 자원으로 인식되어 왔음.

다. 쌀에 함유되어 있는 항산화성분 (토코페롤, 이소비텍신, 항산화천연색소, 오리자놀, 토코트리엔놀)은 생체내에서 산화억제를 통한 노화억제 및 암 예방기능이 있음이 밝혀지고 있음. 특히 대표적 항산화물질로서 안토시아닌 색소중 Cyanidin 3-glucoside(C3G)와 이소비텍신, 오리자놀 등은 성인병의 예방과 치료 효과가 탁월하며, 천연색소 공급 등 기능성 식품으로서 이용 가능성이 매우 높은 것으로 밝혀지고 있음.

라. 유색미의 부산물인 쌀겨에는 이소비텍신, C3G가 다량 함유되어 있기 때문에 이를 효율적으로 활용하는 것은 농산물의 부가가치를 높이고, 식품의 고급화 및 다양화, 그리고 환경보전적 차원에서 매우 중요함.

마. 체리로부터 분리된 안토시아닌 성분은 산화방지 정도가 상업적 산화방지제인 BHT(Butylated hydroxy toluene)에 버금가는 것으로 밝혀 졌다. 반면 HAAs생성을 억제하는 체리내의 성분은 알 수 없었으나 전문가들은 산화방지 효능을 동시에 갖는 어떤 물질이 있을 것으로 추측하고 있다는 것이다. Gray와 그의 동료들은 이 시큼한

맛의 체리를 이용하여 육류음식의 HAA_s 생성 억제를 위한 새로운 가능성으로 부각될 수 있으며 육류내에서 급속하게 진행되는 지방 및 콜레스테롤 산화의 방지제를 순수 자연으로부터 얻을 수 있다는 가능성을 제시하고 있다고 말한다.

바. 블루베리의 열매는 민간 치료약으로서 염증이나 감염증 치료, 괴혈병의 예방 및 요로 감염증의 치료에 이용되고, 낮은 항염증제 및 패혈증제, 당뇨병의 혈당치 조절에 이용되는 등 임상적으로 많이 이용되고 있다. 배양 세포에 의한 안토시아닌 등의 플라보노이드 생산에서 블루베리 배양 세포의 적색 세포가 과일의 색소량과 거의 같은 성분을 생산하는 것으로 나타났다. 적색 세포와 같은 기원을 갖는 비슷한 성질의 배양 세포의 조색소 추출액이 과일의 2배나 되는 항산화능을 나타내고, 식품 소재로서 이용 가능하다고 보고되었다.

사. 흑진주벼의 등숙율은 60%이하로서 일반벼(80%이상)보다 매우 낮아 수량감소 요인이 되고 있으며 수량증수를 위한 기초연구가 필요함.

아. 본 연구진은 이미 유색미에 함유된 안토시아닌 색소중 Cyanidin 3-glucoside 및 Peonidin 3-glucoside 등의 개별 색소를 체계적이고 신속한 방법으로 분리, 동정할 수 있는 기술을 개발하여 이용하고 있고 안토시아닌 생합성에 관여하는 유전자를 도입하여 안토시아닌의 생산성을 높이려 한다.

2. 경제·산업적 측면

가. 가공용 벼 도정시 부산물로 생산되는 대량의 쌀겨(약 407,760톤, '98년 생산량 5,097,000톤의 8%)에 들어 있는 유용 향산화물질을 추출, 분리하여 이용하면 경제적 부가가치를 크게 높일 수 있음.

나. 향산화, 향암 등 신기능성 벼 품종의 육성 보급은 농가의 수익 증대에 크게 기여할 수 있을 것임.

다. 벼 종자함유 향산화성분 및 천연색소의 대량 분리기술 개발은 식료품, 화장품 및 신약 개발의 재료로서 화학합성물을 대체할 수 있는 경제적 효과 및 수입 대체효과까지 얻을 수 있는 고부가가치 기술임.

3. 사회·문화적 측면

가. 성인병 및 건강과 관련된 유효성분을 천연물로부터 개발하려는 시대적, 사회적 요구에 부응함.

나. 천연소재로부터의 항산화성분 검색은 국가 사회적 관심사로 부각되어 활발한 연구를 촉발할 것임.

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발 목표와 내용

가. 환경적 요인과 유전적 요인을 이용한 흑진주벼(black-rice)에서의 안토시아닌(anthocyanin) 생합성량 증대

- 1) 흑진주벼에서의 안토시아닌 생합성 조절유전자 (Regulatory gene, R)분리
- 2) 흑진주벼에서의 안토시아닌 안정화 유전자 (Acyltransferase) 분리
- 3) 흑진주벼의 안토시아닌 생합성에 미치는 환경적 요인과 호르몬의 영향분석을 통한 흑진주벼 재배조건 확립
- 4) 안토시아닌 생합성 조절유전자를 도입시킨 흑진주벼 형질전환체 제작 및 분석
- 5) 분리된 흑진주벼의 acyltransferase유전자의 그 효소활성과 최적조건 확립
- 6) 전년도 실험을 통해서 확립된 최적의 재배조건에서 안토시아닌 고함유 형질전환체 재배

나. 환경적요인과 유전적 요인을 이용하여 흑진주벼에서 안토시아닌 생합성 촉진조건 확립

-> 안토시아닌 대량생산 -> 산업화 활용

다. 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년 도 (2002)	흑진주벼에서 안토시아닌 생합성조절 유전자 (Regulatory gene, <i>R</i> 유전자) 와 안토시아닌 안정화 유전자 (Acyltransferase 유전자) 분리	<ul style="list-style-type: none"> · 흑진주벼의 cDNA library 제작 · PCR을 통한 <i>R</i> 유전자의 부분염기서열 결정 · Library screening을 통한 <i>R</i> 유전자 전체 염기서열결정 및 유전자 확보 · PCR을 통한 acyltransferase 유전자의 부분염기서열 결정 · Library screening을 통한 acyltransferase 유전자 전체 염기서열결정 및 유전자 확보
	시비방법이 흑진주벼에서 안토시아닌 생합성 및 등숙에 미치는 환경적 요인의 영향 분석	<ul style="list-style-type: none"> · 삼요소 시용이 안토시아닌 생합성 및 등숙에 미치는 영향 분석 · 질소, 인산시용량이 안토시아닌 생합성 및 등숙에 미치는 영향 분석 · 질소분시방법이 안토시아닌 생합성 및 등숙에 미치는 영향 분석
2차년 도 (2003)	<i>R</i> 유전자가 도입된 흑진주벼 형질 전환체 제작 및 Acyltransferase 유전자에 대한 효소 활성 최적화 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> · Binary 벡터에 <i>R</i> 유전자를 sense 방향으로 삽입시킨 construct 제작 · 아그로박테리움(LBA4404)에 construct 도입 · 아그로박테리움을 이용하여 흑진주벼 형질전환 · southern blot을 통하여 형질전환체 분석 · 분리된 흑진주벼의 Acyltransferase 유전자를 이용한 <i>in vitro</i> transcription/translation · Acyltransferase 활성 및 기능 확인조사 · Acyltransferase의 최적효소활성 조건확립
	식물호르몬 처리가 흑진주벼에서 안토시아닌 생합성 및 등숙에 미치는 식물 호르몬의 영향 분석	<ul style="list-style-type: none"> · 옥신이 안토시아닌 생합성 및 등숙에 미치는 영향 분석 · Ethylene이 안토시아닌 생합성 및 등숙에 미치는 영향 분석 · GA가 안토시아닌 생합성 및 등숙에 미치는 영향 분석
3차년 도 (2004)	<i>R</i> 유전자가 도입된 흑진주벼 형질전환체에서 안토시아닌 생합성량 분석	<ul style="list-style-type: none"> · 선별된 형질전환체에서 안토시아닌 정량 · 안토시아닌 고함유 흑진주벼 형질전환체 선별
	최적재배조건에서 흑진주벼 형질전환체 재배 및 안토시아닌 생합성량 분석	· 시비방법 및 식물호르몬등 최적조건인 환경에서 안토시아닌 고함유 흑진주벼 형질전환체 재배 및 안토시아닌 분석

<R gene의 기능과 종자 특이적 promoter>

본 연구진은 흑진주벼 종자의 안토시아닌 함량의 극대화를 목표로 흑진주벼의 안토시아닌 조절 유전자 (R 유전자)를 분리, 흑진주벼에 도입하고자 한다. 흑진주벼에 도입된 흑진주벼 R 유전자는 흑진주벼에 내재된 안토시아닌 합성 유전자 (structural gene)들의 전사를 촉진하여 안토시아닌의 함량 증가를 초래할 것으로 기대된다. 또한 종자 특이적 프로모터인 벼의 Glutelin 유전자 (GluB-1)의 프로모터를 이용, 효과를 종자에 국한시켜 효율을 최적화하고 기대하지 않는 부수적 형질변이를 방지하고자 한다.

옥수수에서 처음 분리된 R 유전자는 S, B, Lc 등 여러 개의 gene family로 존재하는 basic helix-loop-helix (bHLH) motif를 가진 transcription activator로서 안토시아닌 합성을 담당하는 여러 structural gene들의 전사활성을 조절한다. 옥수수의 경우 S 유전자가 발현하는 낱알에서만 chalcone synthase와 dihydroquercetin reductase가 발현함이 확인되어 R 유전자와 안토시아닌 structural gene의 전사활성간의 관계가 밝혀지기 시작하였다 (Ludwig et al., 1989). 또한 옥수수의 R 유전자는 nuclear localization signal을 함유하여 그 발현 산물이 핵 속으로 이동함이 밝혀진 바 있다 (Shieh et al., 1993). 안토시아닌 합성 조절에 대한 연구는 옥수수에서 비롯하였는데, 근래의 연구결과 다른 현화식물에서도 옥수수와 유사한 조절 기구가 존재한다는 사실이 밝혀져 식물에서 안토시아닌 합성 조절 기작은 종간에 잘 보존되어 있는 것으로 나타났다. 더 나아가 종간의 pigmentation 변이, 심지어 동일 종 내 품종간의 pigmentation 변이는 R 유전자와 같은 조절 유전자 자체의 차이가 아니라 structural gene의 cis-element의 차이 또는 조절 유전자의 발현 패턴의 차이에 의한 것으로 여겨지고 있다 (Quattrocchio et al., 1998). 옥수수의 R, B 유전자는 sorghum (Casas et al., 1993), 밀 (Bilang et al., 1993), 담배와 애기장대 (Lloyd et al., 1992), 페튜니아 (Quattrocchio et al., 1993; Galway et al., 1994)에서도 pigmentation을 촉진하였으며, 벼, 애기장대, Gerbera, 금어초와 페튜니아의 R 유사 유전자 역시 안토시아닌 합성에 관여함이 밝혀졌다. 이들 식물에서도 R 유전자는 small gene family로 존재한다 (Goodrich et al., 1992). 옥수수의 R 유전자는 C1 유전자와 함께 모든 안토시아닌 structural 유전자들의 전사를 활성화하며, 페튜니아와 금어초 (*Antirrhinum majus*)의 경우에는 그들 중 일부의 전사 조절만 담당하는 것으로 보고되고 있다 (Quattrocchio et al., 1998).

옥수수의 R 유전자를 애기장대와 담배에 도입하여 발현시킨 연구에서 옥수수의 R 유전자의 과잉발현은 원래 야생종에서 pigmentation이 일어나는 조직에서 약 2 배에서 8 배의 안토시아닌의 함량 증가를 초래하였으며, 애기장대에 옥수수의 R 유전자와 CI 유전자를 함께 과잉 발현시켰을 때 비정상적인 pigmentation 양상을 보여 뿌리와 꽃잎에 안토시

아닌이 축적되었다 (Lloyd et al., 1992). 페튜니아의 *R* 유전자인 *jaf13*은 그 발현 양상이 안토시아닌 structural gene들의 발현 양상과 시기적으로나 공간적으로 일치하였으며, 페튜니아에 과잉 발현시켰을 때 꽃받침 잎맥, 꽃대, 어린잎의 가장자리 등에서의 pigmentation을 촉진하였다. 특히 이 유전자는 페튜니아에서 안토시아닌 생합성 경로를 구성하고 있는 dihydroxyflavonol 4-reductase (*dfr*) 유전자의 전사 촉진을 유도함이 밝혀졌다 (Quattrocchio et al., 1998). 페튜니아의 또 다른 *R* 유전자인 *an1* 역시 *dfr* 유전자의 전사를 촉진하였다 (Spelt et al., 2000). 국화과 식물인 *Gerbera hybrida*의 경우, bHLH factor인 *gmyc1*이 *dfr* 유전자의 발현을 조절하며, 결과적으로 꽃에서의 pigmentation 패턴을 조절한다는 사실이 보고되었다 (Elomaa et al., 1998). 애기장대의 옥수수 *R* 유전자 ortholog인 *TT8*의 전사체는 발달 중인 silique와 어린 묘조에서 발현되며 silique에서 *dfr*과 *Banyuls* 유전자의 발현에 필요했다. *tt8* 돌연변이의 종자는 노란빛을 띠어 야생종의 갈색과 쉽게 구별되었다 (Nesi et al., 2000).

벼의 경우에도 *R* 유전자는 *Ra1*, *Ra2*, *Rb1*, *Rb2* 등 small gene family로 존재한다. *Ra*와 *Rb* 유전자의 경우, 붉은 잎을 가진 purple522 품종에서 분리되었는데, 이 품종의 붉은 잎에서는 발현하고 있지만, 색소가 없는 품종의 잎에서는 그 전사체가 검출되지 않았다. Bombardment gene transfer 기법을 이용하여 벼의 *Ra* 유전자를 옥수수 호분층 세포에 도입한 실험에서 유전자 도입 후 48 시간 안에 pigmentation이 유도되었다. 그러므로 벼의 *Ra*가 옥수수의 *C1*과 상호 작용하여 옥수수의 안토시아닌 structural 유전자를 유도함을 알 수 있었다. 그러나 그 효율이 매우 낮았고 색소함량도 낮았다. 연구자들은 이를 벼의 *Ra*와 옥수수 *C1*과의 상호작용이 비효율적이었기 때문인 것으로 추측하고 있다. 반대로 옥수수의 *R* 유전자와 *C1* 유전자를 벼 배양세포에 도입하였을 때에도 pigmentation이 촉진된 바 있다 (Hu et al., 1996; Hu et al., 2000).

이러한 연구결과들은 흑진주벼의 *R* 유전자를 흑진주벼에 도입, 과잉 발현시켰을 때, 흑진주벼의 안토시아닌 함량이 증가할 가능성에 대한 근거를 제공하고 있다. 흑진주벼에 도입된 흑진주벼 *R* 유전자의 발현체는 흑진주벼에 내재하는 *C1* 단백질과 상호 작용하여 *dfr* 등의 안토시아닌 합성 유전자들의 발현을 효율적으로 촉진할 것으로 기대된다. 더욱이 *R* 유전자와 같은 조절 유전자의 차이보다는 안토시아닌 합성 유전자들의 cis-element의 차이에 의해 안토시아닌 합성 패턴이나 합성 조절의 차이가 초래한다는 사실은 흑진주벼의 *R* 유전자 도입에 의한 흑진주벼 안토시아닌 함량 증가의 가능성을 더욱 크게 하고 있다.

종자 저장 단백질의 발현은 종자의 발달에 따라 전사단계에서 활성화되며 휴면의 개시에 앞서서 억제된다. 이들 단백질은 쌍자엽 식물의 경우 배아와 자엽에서 생성되며 단자엽 식물의 경우 배젖에 생성, 축적된다. 저장 단백질은 발아할 때 탄소와 질소 원으로 사

용된다. Glutelin은 벼 씨앗 단백질의 약 80%를 차지하는 저장 단백질이며 (Li and Okita, 1993), 지금까지 6 개의 유전자가 보고되어 small gene family를 구성하고 있다. *GluA*, *GluB* 두 개의 그룹으로 나뉜다. 이들간의 유사성은 매우 높아 아미노산 수준에서는 약 80%, 염기 수준에서는 약 60%의 동일성을 나타낸다. Glutelin은 벼 씨앗의 배젓에 특이적으로 발현되며, 종자가 발달함에 따라 발현이 증가한다. Glutelin의 전사체는 5 ~ 6 day after flowering (daf)에 처음 발견되기 시작하여, 10 ~ 16 daf에 최대로 축적된 후 감소한다 (Takaiwa and Oono, 1990; Takaiwa et al., 1991). 벼 glutelin 단백질의 조직 특이적 발현은 glutelin 유전자의 프로모터에 존재하는 cis-element에 의한 것이다 (Takaiwa et al., 1996). 모든 벼 glutelin 유전자들은 프로모터에 GCN4 motif를 갖고 있으며, 그 외에 AACA motif, ACGT motif가 존재한다. *GUS* reporter 유전자와 벼를 사용한 Wu 등 (1998)의 실험에 의하면, 245 bp의 *GluB-1* 프로모터만으로도 배젓 특이적인 발현이 유도되었으며 그 안에 존재하는 GCN4 motif만으로도 gain-of-function이 성취되어 배젓에 *GUS* 유전자가 발현하였다. 245 bp의 프로모터를 더 세부적으로 고찰한 연구결과를 보면, 전사개시부위 -73 bp에서 -61 bp까지의 AACA motif와 -165 bp에서 -158 bp까지의 GCN4 motif가 종자 특이적 발현에 결정적인 역할을 하는 것으로 드러났으며, -81 bp에서 -75 bp의 ACGT motif와 -173 bp에서 -169 bp의 *skn-1*-like element 역시 종자 특이적 발현을 조절하는데 중요함을 알 수 있었다. 또한 이들 각각의 motif 부위만으로도 종자 특이적 발현이 일어나 AACA와 GCN4 motif를 포함하는 distal region (-245 bp ~ -145 bp), 그리고 ACGT와 AACA motif를 포함하는 proximal region (-113 bp ~ -46 bp)이 *GluB-1* 유전자의 종자 특이적 발현을 결정하는 중요한 cis-element임을 알 수 있었다 (Washida et al., 1999).

본 연구진은 *GluB-1* 프로모터를 이용하여 흑진주벼 *R* 조절 유전자의 과잉발현을 흑진주벼 종자에 국한시켜서 유도하고자 하며, 이를 위해 본 연구진은 흑진주벼로부터 *GluB-1*의 프로모터를 분리하였으며 전술한 motif들을 모두 포함하고 있음을 확인하였다. 흑진주벼 *R* 유전자는 흑진주벼 *GluB-1* 프로모터의 조절 하에 종자에 특이적으로 과잉 발현될 것으로 기대되며, 이에 따라 종자의 안토시아닌 함량에만 영향을 주어 안토시아닌 과다 생성에 따른 부작용을 방지하고 대사산물 이용의 효율을 확보하는 효과가 있을 것으로 사료된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 외 관련기술의 현황과 문제점

1. 우리가 섭취하는 식품 중에 안토시아닌 등 항산화성분이 노화억제 및 암예방 효과가 밝혀진 이후 이들 물질분석 및 대량생산에 관한 연구가 활발히 진행되고 있음.
(Osawa.T.et al. 1985, Ryu et al. 1998)
2. 항산화성분을 함유하고 있는 농산품을 대상으로 물질분리 등 많은 연구가 수행되고 있으나 안정적이며 대량으로 분석하는 방법은 각 연구소의 기술 노하우로서 공개되지 않고 있으며 우리 나라의 경우 식품이나 천연물화학에서의 화학구조, 기능평가 기술 등의 다양한 연구는 기능성분의 기초연구에 크게 기여하고 있으나 이들 연구결과는 농업적으로 이용할수 있는 기술개발로 응용되지 못하고 있는 실정임. (Ryu et al. 1998)
3. 일본 농림수산성의 “신수요 창출을 위한 생물기능 개발, 이용기술의 개발에 관한 종합 연구” 라는 대형프로젝트에서도 기능성물질 고함유품종의 탐색 및 개발을 위한 연구가 수행중이며 1992년부터 일본의 식품화학연구실에서는 “기능성식품의 해석과 분자설계” 라는 연구프로젝트로 항산화식품의 화학적 기능에 대하여 집중적인 연구가 수행되어 많은 결과가 도출되고 있음. (일본 농림수산성보고서. 1992)
4. 미국에서는 1990년부터 디자이너 후드계획(식물성 식품성분에 의한 암 예방)이 시작되어 항산화물질의 이용에 많은 기대가 모아지고 있음.
5. 벼잎에 있는 왁스성분, 벼종자와 왕겨가 가지고 있는 항산화적인 방어기구 또는 유색미, 야생벼 등에 다량 함유되어 있는 항산화색소의 안정성 등 항산화성분의 이용 및 개발가능성이 매우 높으나 우리 나라의 연구기술은 선진국에 비해 매우 미약함.
(Osawa et al. 1989)
6. 쌀에 함유된 이들 항산화물질중 유색미 일부 품종(15품종)의 구성색소체 특성변이체 및 화학적구조가 일부 밝혀지고 색소 추출물의 항산화활성 및 항암성기능이 일부 밝혀지고 있음. (Choi et al.1996)

7. 일반 쌀의 이소비텍신, 오리자놀, 폴리페놀화합물 등과 같은 항산화물질에 대한 연구도 일부 되었음.(Osawa and Namiki. 1985)
8. 본 연구진은 최근 여러 종자에 있는 항산화물질을 신속하게 분리 및 동정할 수 있는 방법을 확립해 왔으며 아울러 이의 항산화작용을 밝힌 바 있음.(in vitro)(Ryu et al. 1998)

제 2 절 앞으로 전망

1. 안토시아닌 생합성 유전자조작에 의한 안토시아닌 고생산 유색미는 산업화 가능성이 매우 큼.
2. 국내 뿐만 아니라 세계적으로 항산화성분 고함유 유전자원의 탐색, 수집 및 이용성이 증대될 것임.
3. 항산화성분의 신속, 대량 추출방법은 국가별 기업노하우로서 자체개발의 필요성이 높아질 것임.
4. 노화억제 및 암 예방차원의 식품개발은 국민 건강증진에 크게 기여할 것임.
5. 유색미 등 기능성 벼의 신수요 창출에 따라 농가의 재배면적과 소득증대에 영향을 줄 것으로 전망됨.
6. 안토시아닌색소 등 항산화성분 고함유 유색미를 육종의 교배친으로 활용하면 신기능성 유색미 육성이 가능할 것임.

제 3 절 기술도입의 타당성

1. 식물의 유용유전자 조작에 의한 고기능성 작물을 제조하는 것은 국가 경쟁력에서 반드시 이루어져야 될 사항임.
2. 천연 농산물에서 항산화물질 등을 안정적이며 대량으로 분석하는 방법, 육종 및 재배기술 등은 각 나라별 연구소의 기술 노하우로서 기술 이전이나 도입이 매우 어려움. 우리나라에서 자체 개발하여야 함.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 세부과제 수행내용 및 결과

1. 흑진주벼에서 안토시아닌 합성조절 유전자의 분리

PCR을 통해 흑진주벼로부터 안토시아닌 조절 유전자로 추정되는 OsR2 유전자의 cDNA 전체 클론을 분리하였다. 이 유전자는 안토시아닌 축적이 진행되고 있는 발달 중인 종자로부터 분리되었으며, 이 유전자를 도입한 흑진주벼의 캘러스에서 안토시아닌 축적이 관찰되어 이 OsR2 유전자가 안토시아닌 합성에 관련된 조절유전자라는 사실을 확인하였다.

가. Degenerated primer를 이용한 PCR

흑진주벼에서 bHLH 계열의 안토시아닌 합성조절 유전자를 분리하기 위해 옥수수, 벼, 페튜니아 등의 bHLH 아미노산을 비교 분석하여 degenerated primer를 선정하였으며 이들 primer를 이용하여 발달 중인 흑진주벼 종자에서 뽑은 cDNA를 주형으로 PCR을 수행하였다.

표 1 PCR 반응에 사용된 primers.

5'-GAT ACG GAA TGG TAT TAT G-3'	5'-AAA CAT TTC ATT GAA TTT TTC-3'
C A G C C	G C G A G C C
T	T
C	C

나. 3' RACE PCR

OsR2 PCR fragment의 염기서열 내에서 선정한 특이적 primer와 oligo-d(T) primer를 이용하여 유전자의 3' 부분을 증폭하였다.

다. 5' RACE PCR

OsR2의 5' 부분의 염기서열을 확인하기 위해 5' RACE를 수행하였다. 먼저 OsR2 특이적인 primer를 사용, 발달 중인 흑진주벼 종자의 RNA로부터 1st strand cDNA를 만든

다음, cDNA의 5' 쪽 끝단을 adenylation하였다. 이를 주형으로 하여 두 번째 유전자 특이적 primer와 anchor d(T) primer를 사용, PCR을 수행하였다. 이 PCR 반응물을 주형으로 다시 세 번째 유전자 특이적 primer와 anchor primer를 사용하여 nested-PCR을 수행하였다. 1 kb의 PCR 반응물을 얻어 염기서열을 확인한 결과, OsR2 유전자의 5' 부분임을 알 수 있었다.

라. 유전자 전체를 PCR 반응으로 증폭하여 유전자를 재확인

위와 같은 방법으로 얻어진 염기서열로부터 OsR2 유전자 전체를 증폭할 수 있는 primer를 선정하였다. 이들 primer에는 형질전환 벡터에 ligation하기 용이하도록 HindIII와 KpnI linker를 각각 부착하였다. 이들 primer와 발달 중인 흑진주벼의 종자에서 제작한 cDNA를 사용하여 OsR2 전체 클론을 증폭하였다. 그 결과 1847 bp의 PCR 결과물이 얻어졌으며, 염기서열을 확인한 결과 OsR2 유전자의 RACE 결과물들과 일치하고 또한 새로운 안토시아닌 합성조절 유전자중의 하나로 판명되었다 OsR2 유전자의 아미노산 서열은 다른 종의 R family 유전자들의 아미노산 서열과 50%에서 74%의 유사성을 보여 안토시아닌의 생합성에 관여할 것으로 보이며 (표 2, 그림 1), R 유전자들의 특징인 basic helix-loop-helix 부위 (bHLH domain)를 지니고 있었다

(그림 1).

표 2 OsR2와 다른 R 유전자들의 아미노산 서열 비교.

	Similarity	Identity
<i>OsB2</i> (AB021080, <i>OsR1</i>)	74%	67%
<i>OsB1</i> (AB021079)	64%	55%
<i>Ra</i> (U39860)	66%	57%
<i>JAF13</i> (AF020545)	54%	70%
<i>Lc</i> (M26227)	50%	61%

```

OsR2      1 ---MAGAPFVQEEALQPGTM--NFRSFLGAAAASINWYAIKFSISLPGVLTNDGGFYNGEYKTRKISHLEDGTAAGL
OsB2      1 ---MAGAPFVQEEALQPGTM--NFRSFLGAAAASINWYAIKFSISLPGVLTNDGGFYNGEYKTRKISHLEDGTAAGL
OsB1      1 ---MAGAPFVQEEALQPGTM--NFRSFLGAAAASINWYAIKFSISLPGVLTNDGGFYNGEYKTRKISHLEDGTAAGL
Ra        1 ---MAGAPFVQEEALQPGTM--NFRSFLGAAAASINWYAIKFSISLPGVLTNDGGFYNGEYKTRKISHLEDGTAAGL
mzLc      1 MALSAGRVQQAEEALQPAERQLHRSQGLAAAASINWYAIKFSISLPGVLTNDGGFYNGEYKTRKISHLEDGTAAGL
Petunia   1 ---MAGAPFVQEEALQPGTM--NFRSFLGAAAASINWYAIKFSISLPGVLTNDGGFYNGEYKTRKISHLEDGTAAGL
consensus 1      ss v ee lqp g nfrsqLAAa RsinWYaiKFSISL PGvLTW DgFYNGEvKTRKISHLEDGTAAGL

OsR2      76 VLQRSEQLKELYELLHQECNRRAS---NFVAALSPEDLDADTEWYVVVCHTYAFPGQGLPQKSFASNKVFLCNAQSA
OsB2      76 VLQRSEQLKELYELLHQECNRRAS---NFVAALSPEDLDADTEWYVVVCHTYAFPGQGLPQKSFASNKVFLCNAQSA
OsB1      69 VLQRSEQLKELYELLHQECNRRAS---NFVAALSPEDLDADTEWYVVVCHTYAFPGQGLPQKSFASNKVFLCNAQSA
Ra        69 VLQRSEQLKELYELLHQECNRRAS---NFVAALSPEDLDADTEWYVVVCHTYAFPGQGLPQKSFASNKVFLCNAQSA
mzLc      81 VLQRSEQLKELYELLHQECNRRAS---NFVAALSPEDLDADTEWYVVVCHTYAFPGQGLPQKSFASNKVFLCNAQSA
Petunia   72 VLQRSEQLKELYELLHQECNRRAS---NFVAALSPEDLDADTEWYVVVCHTYAFPGQGLPQKSFASNKVFLCNAQSA
consensus 81 vlQRseQLreLYdLLeHQEcDhRar IFVAALSPEDLDADTEWYVVVCHTYAF PGQGLPQKSFASnesvFLCNAQSA

OsR2      152 DSRFPAALDARSASIQTIICIFFTSQ-VLELSTTDFVLEDDPDLVRIANLTLKELFPDCCLEVLNSTS-----D
OsB2      152 DSRFPAALDARSASIQTIICIFFTSQ-VLELSTTDFVLEDDPDLVRIANLTLKELFPDCCLEVLNSTS-----D
OsB1      145 DSRFPAALDARSASIQTIICIFFTSQ-VLELSTTDFVLEDDPDLVRIANLTLKELFPDCCLEVLNSTS-----D
Ra        145 DSRFPAALDARSASIQTIICIFFTSQ-VLELSTTDFVLEDDPDLVRIANLTLKELFPDCCLEVLNSTS-----D
mzLc      159 DSRFPAALDARSASIQTIICIFFTSQ-VLELSTTDFVLEDDPDLVRIANLTLKELFPDCCLEVLNSTS-----D
Petunia   152 DSRFPAALDARSASIQTIICIFFTSQ-VLELSTTDFVLEDDPDLVRIANLTLKELFPDCCLEVLNSTS-----D
consensus 161 dsklF RaLlAKSASiqtivCiFFm g VLELStTdfvLeDDPdlVriAnlTLkELFPdCCleVLNStS-----D

OsR2      220 SSKETPADIVSEQLTQNH-----SISQDQVSEDECVSNAKEDPFACTDGLIYDGLDQNDG---SIVNLE
OsB2      219 SSKETPADIVSEQLTQNH-----SISQDQVSEDECVSNAKEDPFACTDGLIYDGLDQNDG---SIVNLE
OsB1      214 IYVQKGLDQAAATGATGIVVDFPFAVADGQVAGCPFMAGDLEQITDDEKGLYELCDELVVRFA---SIVNLE
Ra        214 IYVQKGLDQAAATGATGIVVDFPFAVADGQVAGCPFMAGDLEQITDDEKGLYELCDELVVRFA---SIVNLE
mzLc      235 IYVQKGLDQAAATGATGIVVDFPFAVADGQVAGCPFMAGDLEQITDDEKGLYELCDELVVRFA---SIVNLE
Petunia   231 KPDHNVLENDAYVLEHSEFPHSSSSGPAAGKIVYELMNVVVTSSVTSQAQSKKFTDDHNSGQVHNSD---SIVNLE
consensus 241 sp fealdh na veit ttm g aieggdvve e tdnal s it eide yslceald I d ds wav

OsR2      290 DSGPDPWSPSFLVIVDASFEAVLAAFAH-----DVGQATAGQVVCDAHNSAK-----SHEHAPVY
OsB2      286 ---SGLVPSLEETVAAAANR-----DVGQATAGQVVCDAHNSAK-----SHEHAPVY
OsB1      291 ADP-S---SGLVPSLEETVAAAANR-----DVGQATAGQVVCDAHNSAK-----SHEHAPVY
Ra        291 ADP-S---SGLVPSLEETVAAAANR-----DVGQATAGQVVCDAHNSAK-----SHEHAPVY
mzLc      312 DASHEVYFCSPFAPDQAAANR-----DVGQATAGQVVCDAHNSAK-----SHEHAPVY
Petunia   311 CEKLSPESSGKSTKAPLDHQRHQQKLLLDHQDDETQYQVSLTLKSGDQLLGGYFNTNKSQSCPSGKNDKRP
consensus 321 d v w siglvptss dea aseat vdgv s ssvfawkrt d vqavpvy

OsR2      348 VTPGKLLKLVYDQARRHETGRCR-----AALYDQVTKNNYVRRRRRRRKRKSENFLIKELVYVYIHKVDA
OsB2      338 AGLGKLLKLVYDQARRHETGRCR-----AALYDQVTKNNYVRRRRRRRKRKSENFLIKELVYVYIHKVDA
OsB1      361 IGFYKLLKLVYDQARRHETGRCR-----AALYDQVTKNNYVRRRRRRRKRKSENFLIKELVYVYIHKVDA
Ra        361 IGFYKLLKLVYDQARRHETGRCR-----AALYDQVTKNNYVRRRRRRRKRKSENFLIKELVYVYIHKVDA
mzLc      378 AGLGKLLKLVYDQARRHETGRCR-----AALYDQVTKNNYVRRRRRRRKRKSENFLIKELVYVYIHKVDA
Petunia   391 IGFYKLLKLVYDQARRHETGRCR-----AALYDQVTKNNYVRRRRRRRKRKSENFLIKELVYVYIHKVDA
consensus 401 sgeepKLLKLVYDQARRHETGRCR aas ttqgsaiknVasRRRRKRKSENFlIkELVYVYiHKVDA

OsR2      417 SILASTIAYLKEKRVLESSS-----EPHQKATGQQRCEITGRELVSRIQVGGDAKRENK
OsB2      411 SILASTIAYLKEKRVLESSS-----EPHQKATGQQRCEITGRELVSRIQVGGDAKRENK
OsB1      432 SILASTIAYLKEKRVLESSS-----EPHQKATGQQRCEITGRELVSRIQVGGDAKRENK
Ra        432 SILASTIAYLKEKRVLESSS-----EPHQKATGQQRCEITGRELVSRIQVGGDAKRENK
mzLc      449 SILASTIAYLKEKRVLESSS-----EPHQKATGQQRCEITGRELVSRIQVGGDAKRENK
Petunia   471 SILASTIAYLKEKRVLESSS-----EPHQKATGQQRCEITGRELVSRIQVGGDAKRENK
consensus 481 SILASTIAYLKEKRVLESSS p p p l trrrrr bei gkkvsag krkap s d g hh v

OsR2      483 N---VTTGDKVFLLEVQCWKKELSTRVFDKIKGLLDVLEVQAGAPDGLGLKIAKFA---GCHTIALQAA
OsB2      506 SENVVTIDNKEVLLVQCWKKELSTRVFDKIKGLLDVLEVQAGAPDGLGLKIAKFA---GCHTIALQAA
OsB1      506 SENVVTIDNKEVLLVQCWKKELSTRVFDKIKGLLDVLEVQAGAPDGLGLKIAKFA---GCHTIALQAA
Ra        529 SENVVTIDNKEVLLVQCWKKELSTRVFDKIKGLLDVLEVQAGAPDGLGLKIAKFA---GCHTIALQAA
mzLc      547 TDSIVTIDNKEVLLVQCWKKELSTRVFDKIKGLLDVLEVQAGAPDGLGLKIAKFA---GCHTIALQAA
Petunia   547 TDSIVTIDNKEVLLVQCWKKELSTRVFDKIKGLLDVLEVQAGAPDGLGLKIAKFA---GCHTIALQAA
consensus 561 s vv m skevllavqc wkelmstrvfdaiKgl ldlvleVqag dgligiki akfa sg v pgaieal kaig

OsR2      559 G--
OsB2      ---
OsB1      586 LAS
Ra        586 S--
mzLc      609 KR-
Petunia   627 KS-
consensus 641

```

그림 1 OsR2 유전자와 다른 R 유전자들 사이의 아미노산 서열 비교.

OsB2, 벼 (AB021080); OsB1, 벼 (AB021079); Ra, 벼 (U39860); mzLc, 옥수수 (M26227); petunia, 페튜니아 JAF13 (AF020545).

2. 벼 glutelin promoter의 확보

종자 특이적인 외래 유전자 발현을 유발하기 위해 벼의 종자에서 발현하는 저장 단백질인 glutelinB1의 promoter를 분리하였다. 흑진주벼의 genomic DNA를 주형으로 하고, Mangetsumochi 품종에서 보고된 glutelinB1 promoter 염기서열을 참조하여 결정한 primer를 사용하여 PCR 반응으로 흑진주벼의 glutelinB1 promoter sequence를 합성하였다. 그 결과 mangetsumochi 품종의 glutelinB1 promoter와 98%의 염기서열 동일성을 나타내었으며, 종자 특이적 발현을 결정하는 motif인 AACA-2, GCN4, endosperm motif들이 온전하게 존재하고 있었다. pGA1611 벡터의 ubiquitin promoter를 제거하고 이를 삽입하여 종자 특이적 발현을 유발하는 vector, pGAgluB1을 제조하였다.

```

흑진주벼:      1      gtccactgtctgcaaacacgattcacatagagcgggagcacgcggggagccgtcctaggt 60
                |||
Mangetsumochi: 328  gtccactgtctgcaaacacgattcacatagagcgggagcacgcggg-agccgtcctaggt 386

흑진주벼:      61      gcacgggaagcaaatccgtgcgcctgggtggatttgagtgacacgggcccacgtgtagcc 120
                |||
Mangetsumochi: 387  gcaccggaagcaaatccgt-cgctgggtggatttgagtgacacgg-cccacgtgtagcc 444

흑진주벼:      121     tcacagctctccgtggtcagatgtgtaaaaatatacataatagtgttttcaaatagtta 180
                |||
Mangetsumochi: 445  tcacagctctccgtggtcagatgtgtaaaaatatacataatagtgttttcaaatagtta 504

흑진주벼:      181     aataatataataggaagtatatgggtcaataagcagtaaaaaggcttatgacatggt 240
                |||
Mangetsumochi: 505  aataatataataggaagtatatgggtcaataagcagtaaaaaggcttatgacatggt 564

흑진주벼:      241     aaaattacttacaccaatatgccttactgtctgatataatattacatgacaacaaagttac 300
                |||
Mangetsumochi: 565  aaaattacttacaccaatatgccttactgtctgatataatattacatgacaacaaagttac 624

흑진주벼:      301     aagtacgtcatttaaaaatacaagttacttatcaattgtagtgtatcaagtaaatgacaa 360
                |||
Mangetsumochi: 625  aagtacgtcatttaaaaatacaagttacttatcaattgtagtgtatcaagtaaatgacaa 684
    
```

흑진주버: 361 caaacctacaaatttgctat t t t t gaaggaacact t aaaaaa t caataggcaagt t at at 420
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Mangetsumochi: 685 caaacctacaaatttgctat t t t t gaaggaacact t aaaaaa t caataggcaagt t at at 744

흑진주버: 421 agtcaataaactgcaagaaggct t at gacatggaaaaat t acatacaccaat at gct t t a 480
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Mangetsumochi: 745 agtcaataaactgcaagaaggct t at gacatggaaaaat t acatacaccaat at gct t t a 804

흑진주버: 481 t t g t c c g g t a t a t t t t a c a a g a c a c a a a g t t a t a a g t a t g t c a t t t a a a a t a c a a g t t 540
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Mangetsumochi: 805 t t g t c c g g t a t a t t t t a c a a g a c a c a a a g t t a t a a g t a t g t c a t t t a a a a t a c a a g t t 864

흑진주버: 541 a c t t a t c a a t t g t c a a g t a a a t g a a a c a a a c c t a c a a a t t g t t a t t t t g a a g g a a c a c 600
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Mangetsumochi: 865 a c t t a t c a a t t g t c a a g t a a a t g a a a c a a a c c t a c a a a t t g t t a t t t t g a a g g a a c a c 924

흑진주버: 601 c t a a a t t a t c a a a t a t a g c t t g c t a c g c a a a a a t g a c a a c a t g c t t a c a a g t t a t t a t c a 660
 |||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Mangetsumochi: 925 c t a a a t t a t c a a a t a t a g c t t g c t a c g c - a a a a t g a c a a c a t g c t t a c a a g t t a t t a t c a 983

흑진주버: 661 t c t t a a a g t t a g a c t c a t c t t c t c a a g c a t a a t a g c t t t a t g g t g c a a a a c a a a t a t a a 720
 |||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Mangetsumochi: 984 t c t t a a a g t t a g a c t c a t c t t c t c a a g c a t a a g a g c t t t a t g g t g c a a a a c a a a t a t a a 1043
 AACA-2

흑진주버: 721 t g a c a a g g c a a a g - - - - a t a c a t a t t a a g a g t a t g g a t a g a c a t t t c t t t a c a a a c t c c 776
 |||||||||||| |||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||

Mangetsumochi: 1044 t g a c a a g g c a a a g a t a c a t a c a t a t t a a g a g t a t g g a c a g a c a t t t c t t t a c a a a c t c c 1103
 GNC4

흑진주버: 777 a t t t g t a t t a c t c c a a a a g c a c c a g a a g t t t g t c a t g g c t g a g t c a t g a a a t g t a t a g t t 836
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Mangetsumochi: 1104 a t t t g t a t t a c t c c a a a a g c a c c a g a a g t t t g t c a t g g c t g a g t c a t g a a a t g t a t a g t t 1163
 endosperm

흑진주버: 837 c a a t c t t g c a a a g t t g c c t t t c c t t t t g t a c - - t g t t t t a a c a c t a c a a g c c a t a t a t t g 894
 |||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||

Mangetsumochi: 1164 caatcttgcaaagtgcctttccttttgactgtgttttaactacaagccatatattg 1223
A/G-box AACA-1 TATA

흑진주벼: 895 tctgtacgtgcaacaaactatatcaccatgtatccaagatgctttttattgctatata 954
|||||

Mangetsumochi: 1224 tctgtacgtgcaacaaactatatcaccatgtatccaagatgctttttattgctatata 1283

흑진주벼: 956 aactagcttggctctgtctttgaaactcacatcaattagcttaagttccataagcaagtac 1014
|||||

Mangetsumochi: 1284 aactagcttggctctgtctttgaaactcacatcaattagcttaagttccataagcaagtac 1343

흑진주벼: 1015 aaatagctatggcgagttccgttt 1038
|||||

Mangetsumochi: 1344 aaatagctatggcgagttccgttt 1367

그림 2. 흑진주벼 glutelinB1 promoter 염기서열과 종자발현관련 elements.

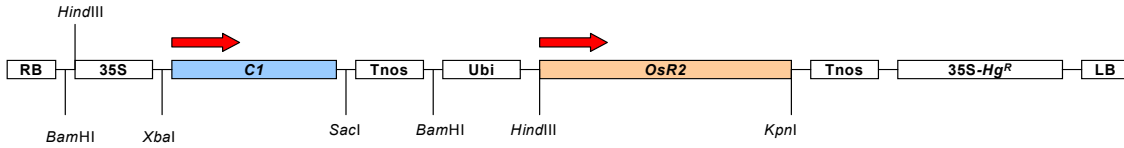
3. 옥수수 C1 유전자의 확보

R family 유전자 단독으로는 안토시아닌 합성 촉진 효과가 충분하지 못하며, C1 family 유전자와 합동으로 작용할 때 가장 효과적이라는 기존의 보고를 참고하여 옥수수의 C1 유전자를 OsR2와 함께 흑진주벼에 도입하고자 하였다. 이에 미국 애리조나 대학의 Vicki Chandler 박사로부터 옥수수 C1 cDNA를 분양 받아 복합 유전자 전달 벡터의 제조에 사용하였다.

4. 복합 유전자 전달 벡터의 제작

최종적으로 본 연구에서 분리한 OsR2 유전자의 coding region 전체를 포함하는 cDNA와 옥수수의 C1 cDNA를 한 벡터에 동시에 삽입하여 두 가지 유전자의 동시 과다 발현을 위한 벡터 construct를 완성하였다. 두 가지의 벡터 construct를 제작하였는데, OsR2 유전자의 발현은 ubiquitin promoter에 의해 constitutive하게 유도되거나 (pGA1611OsR2-35SC1), glutelinB1 promoter에 의해 종자 특이적으로 유도되도록 하였다 (pGAgluB1OsR2-35SC1). 옥수수 C1 유전자는 두 가지 construct에서 모두 CaMV 35S promoter의 지배를 받도록 하였다 (그림 5). 현재 이들 벡터가 도입된 Agrobacterium tumefaciens strain을 각각 확보하고 흑진주벼에 도입을 시도하고 있다.

A



B

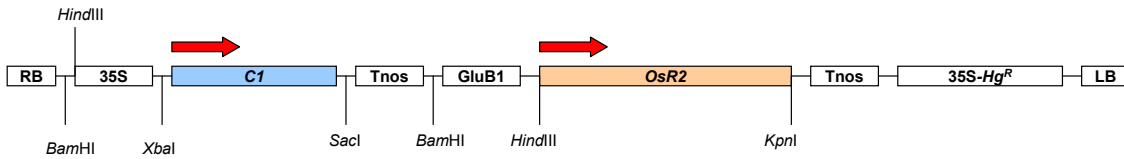


그림 3. 흑진주벼 안토시아닌 과다 축적을 유발하기 위한 외래 유전자 전달체 벡터의 모식도.

A, pGA1611OsR235SC1; B, pGAgIub1OsR235SC1; RB, right border; Tnos, nos terminator; Ubi, maize ubiquitin promoter; GluB1, 흑진주벼 glutelinB1 promoter; Hg^R, hygromycin resistance gene; LB, left border.

5. R, C1 안토시아닌 생합성 조절 유전자가 도입된 흑진주벼 형질전환체 제작

2차년도 연구에서는 1차년도에 흑진주에서 분리된 안토시아닌 생합성 조절유전자 R 유전자와 옥수수 C1 유전자를 흑진주벼에 도입시키고자 위에서 서술한 복합 유전자를 아그로박테리움을 이용한 방법을 통해 형질전환을 수행하였으며 흑진주벼의 재분화에 중점을 두었다

가. 아그로박테리움을 이용한 흑진주벼 형질전환과정

- 1) N6D 배지에 멸균된 흑진주 종자를 치상하여 캘러스의 발생을 유도한다
- 2) 30-40일 지난 후 형질전환하기 좋은 상태의 캘러스를 골라 preculture한다(4-6일)
- 3) 선별된 캘러스들을 Agrobacterium과 함께 2N6-AS(B) 배지에 co-culture 한다 (3-5 일)
(3일전에 벡터가 들어있는 Agrobacterium을 AB 배지에 접종해둔다, 28°C)
- 4) cefotaxim(250mg/L) 이 들어있는 증류수에 캘러스를 깨끗하게 세척하여 DH30배지에서 selection 한다(1-2 개월)

- 5) selection 배지에서 살아남는 callus 또는 pigmented callus를 재분화 배지(MSR)로 옮긴다
- 6) 1-3개월후 재분화되는 개체를 MS 배지로 옮긴다

◆ N6D배지 (per L)

N6 salt and vit.

i-inositol	100mg
2,4-D	2mg
casein	300mg
proline	2878mg
sucrose	30g
gelrite	4g
pH	5.8

◆ DH30배지 (per L)

N6D배지 와 동일한 조성

hygromycin 30mg과 cefotaxim 250mg을첨가

◆ MSR배지 (per L)

MS salt & vit.

NAA	0.1mg
kinetin	2 mg
casein	1 g
sucrose	50 g
sorbitol	20 g
agar	12 g
pH	5.8
antibiotics	(cefo/hygro)

나. 흑진주벼의 형질전환 결과

1) pigmented 캘러스의 확보

미색의 흑진주벼 캘러스와 Agrobacterium을 co-culture 함으로써 Agrobacterium 속에 들어있는 R gene과 C1 gene이 흑진주벼의 캘러스 속에서 유도되도록 하였으며, 그 결과

미색이 아닌 짙은 보라색을 나타내는 캘러스를 확보할 수 있었다

캘러스의 보라색은 pGA1611OsR2-35SC1으로 구성된 벡터와 pGAgclub1OsR2-35SC1으로 구성된 벡터를 가진 Agrobacterium에 접종된 캘러스 각각의 경우에서 모두 볼 수 있었다

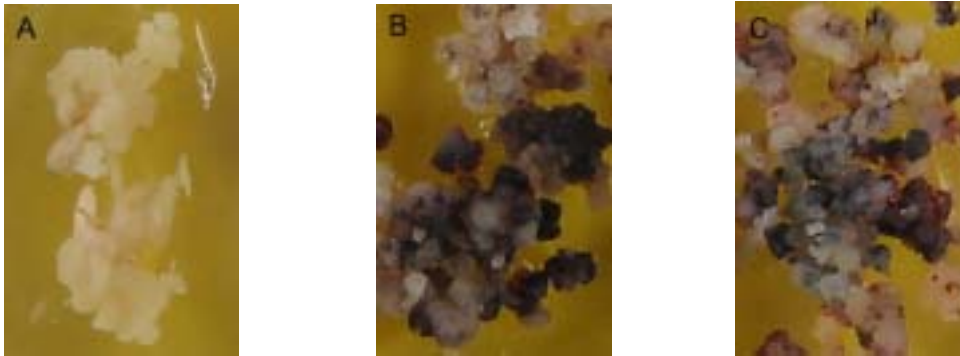


그림 4. 흑진주벼의 종자에서 유도된 w/t캘러스와 형질전환된 캘러스의 비교

- A, w/t 캘러스 B, pGA1611OsR2-35SC1 벡터가 형질전환된 캘러스(이하 HP1으로 표기)
- C, pGAgclub1OsR2-35SC1 벡터가 형질전환된 캘러스(이하 HP2로 표기)

2) 캘러스 유전자의 genomic southern blot analysis

Genomic southern blot analysis 결과, 형질전환에 이용된 복합유전자의 copy수가 HP1 과 HP2에서 각각 1개와 3개로 존재하는 것을 알 수 있었다 (그림 7).

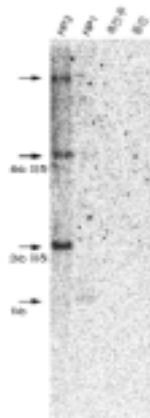


그림 5 HP1과 HP2의 genomic DNA southern blot analysis

제한효소 *EcoR* I 으로 자른 각각의 genomic DNA 50 μ g 을 전기영동 한 뒤 nylon membrane으로 옮겨 CaMV 35S promoter 유전자를 탐침으로 혼성화 하였다

대조구로써 w/t 동진벼와 흑진주벼의 캘러스 genomic DNA를 비교.

3) 캘러스 유전자의 northern blot analysis

OsR2 cDNA와 C1 cDNA를 각각의 탐침으로 사용하여 HP1과 HP2에서의 R gene 과 C1 gene의 전사체 발현수준을 대조구인 동진과 흑진주벼의 캘러스와 함께 조사하였다. 그 결과 예상외로 R gene의 전사체 발현은 HP1과 HP2에서 뿐만 아니라 대조구로 사용된 동진과 흑진주벼의 캘러스에서도 나타나고 있는 것을 볼 수 있었다

C1 gene의 전사체 발현은 HP1과 HP2에서만 나타나며 동진과 흑진주벼 캘러스에서의 발현은 볼 수 없었다

이와 같은 결과는 HP1과 HP2에서 나타나는 안토시아닌이 R gene 보다는 C1 gene에 의해 좀더 중요하게 조절될 수 있는 가능성을 보여주기도 한다.

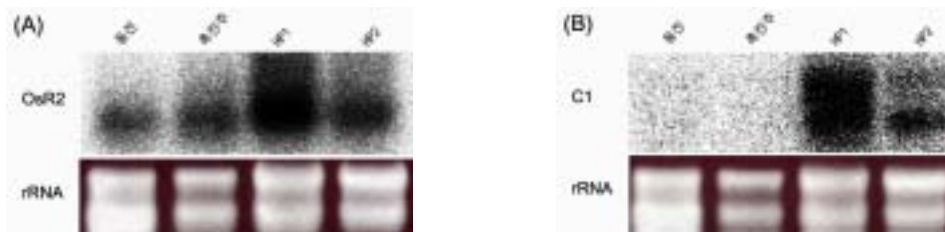


그림 6 HP1과 HP2의 northern blot analysis

각 샘플에서 분리한 30 μ g의 total RNA를 전기영동 하여 nylon membrane에 옮긴 후, 각각 OsR2 cDNA(A)와 C1 cDNA(B)를 탐침으로 하여 혼성화 하였다

Ethidium bromide로 염색된 ribosomal RNA를 loading control로 제시하였음.

4) Pigmented 캘러스로부터 재분화체 유도

Pigmented 캘러스 HP1과 HP2의 상태가 좋은 것을 선별하여 재분화 배지(MSR)에 계대배양 하였다. 배양 후 약 1달에서 3달 사이에 재분화체가 생성되기 시작했으며 재분화체의 shoot 과 root는 상당부분 보라색을 띄고있는 것이 관찰되었다

흑진주 w/t 캘러스의 재분화체 shoot가 초록색이고 root는 흰색이라는 사실과 비교해 볼 때 HP1과 HP2에서 발생된 재분화체는 외부에서 넣어준 복합유전자의 발현 효과로 식물체의 지상부와 뿌리부분에 안토시아닌이 축적되는 특성을 갖게 되었음을 예상해 볼 수 있다

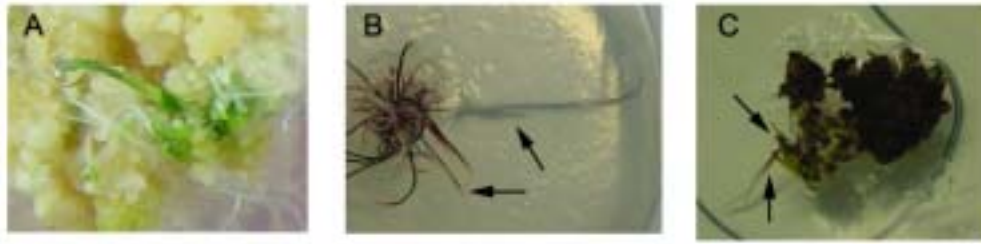


그림 7 w/t 캘러스(A)와 HP1(B), HP2(C)로부터 재분화중인 흑진주벼
화살표는 안토시아닌 축적이 나타난 shoot와 root를 가리킨다

성장하는 재분화체는 잎과 뿌리, 신초, 벼씨가 매달리는 줄기 등에 불규칙하게 안토시아닌이 축적되는 현상을 보였으며 이런 현상은 HP1과 HP2의 재분화체에서 비슷하게 나타났다

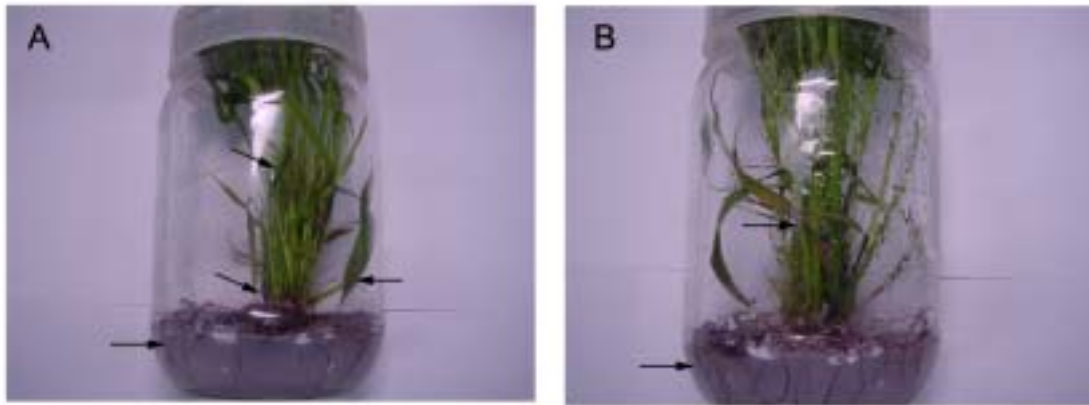


그림 8 배양병 속에서 성장중인 흑진주벼 형질전환체

A:HP1에서 분화된 재분화체(이하 HRP1으로 표시), B:HP2에서 분화된 재분화체(이하 HRP2로 표시), 화살표는 안토시아닌 축적부위를 표시함



그림 9 화분으로 육진 흑진주벼 형질전환체

A: HRP1, B: HRP2, 벼씨가 매달린 줄기부분(화살표)에서 안토시아닌이 축적된 것을 볼 수 있다

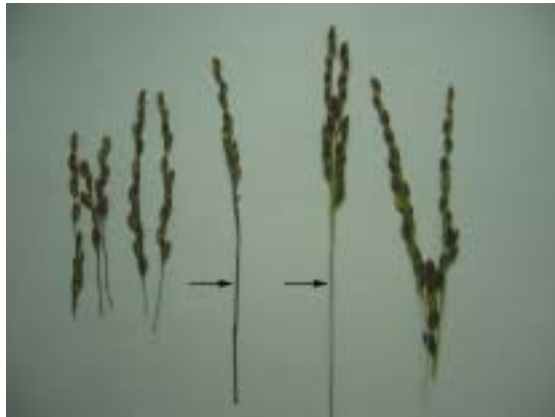


그림 10 w/t과 형질전환체 흑진주벼의 조직 비교

6. 형질전환체의 유전자 분석결과

가. 형질전환체 T₀ 세대의 HRP1과 HRP2 유전자의 northern blot analysis

OsR2 cDNA와 C1 cDNA를 각각의 탐침으로 사용하여 HRP1과 HRP2에서의 R gene과 C1 gene의 전사체 발현수준을 조사하였다. 이 실험에서는 대조구로써 w/t의 일품벼와 흑진주벼를 사용하였다.

northern blot analysis의 결과, 캘러스에서와 마찬가지로 R gene의 전사체 발현은 HRP1과 HRP2에서 뿐만 아니라 대조구로 사용된 일품과 흑진주벼 에서도 나타나고 있는 것을 볼 수 있었으며, 예상외로 C1 gene 전사체 발현도 HRP1과 HRP2 뿐 아니라 대조구에서도 약하게 발현되는 양상을 보였다

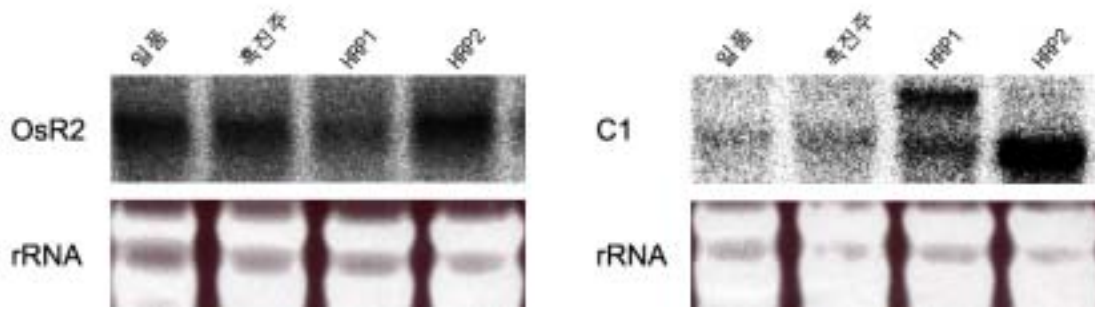


그림 11 HRP1과 HRP2의 northern blot analysis

각 샘플에서 분리한 30 μ g의 total RNA를 전기영동 하여 nylon membrane에 옮긴 후, 각각 OsR2 cDNA(A)와 C1 cDNA(B)를 탐침으로 하여 혼성화 하였다

Ethidium bromide로 염색된 ribosomal RNA를 loading control로 제시하였음.

- ※ HRP1: 외래 복합유전자 pGA1611OsR2-35SC1이 형질전환 된 캘러스
- HRP2: 외래 복합유전자 pGAglob1OsR2-35SC1이 형질전환 된 캘러스

- ※ HRP1: HRP1 으로부터 재분화된 형질전환체 식물
- HRP2: HRP2 으로부터 재분화된 형질전환체 식물

나. 형질전환체 HRP1과 HRP2의 T₁ 세대의 southern blot analysis

HRP1과 HRP2의 T₀ 에서 발현된 외래 유전자벡터들의 유전여부를 확인하기 위하여 T₁ 세대의 genomic southern을 실시하였다

Genomic southern blot analysis 결과, HRP1에 삽입된 pGA1611OsR235SC1벡터는 자손세대인 HRP1-4에 유전되었으나 HRP2에 삽입된 pGAglob1OsR235SC 벡터는 자손세대인 HRP2-3에 전달되어지지 않았다



그림 12 HRP1과 HRP2의 T₁ 세대의 southern blot analysis

제한효소 *EcoR* I 과 *Xba* I 으로 자른 각각의 genomic DNA 100 μ g 을 전기영동 한 뒤 nylon membrane으로 옮겨 CaMV 35S promoter 유전자를 탐침으로 혼성화 하였다
대조구로써 w/t의 동진벼와 흑진주벼의 genomic DNA를 비교.

다. 형질전환체 HRP1과 HRP2의 T₁ 세대의 northern blot analysis

T₁ 세대의 HRP1과 HRP2에서의 외래유전자 벡터의 발현 여부를 확인하기 위하여 OsR2 cDNA와 C1 cDNA를 각각의 탐침으로 사용하여 HRP1-4와 HRP2-3에서의 R gene 과 C1 gene의 전사체 발현수준을 조사하였다.

이 실험에서는 대조구로써 w/t의 일품벼와 흑진주벼를 사용하였다.

northern blot analysis의 결과, T₀ 세대에서의와 마찬가지로 R gene의 전사체 발현은 HRP1-4와 HRP2-3에서 뿐만 아니라 대조구로 사용된 일품과 흑진주벼 에서도 희미하게 나타나고 있는 것을 볼 수 있었다

그러나 C1 gene 전사체 발현은 HRP1-4에서만 뚜렷하게 나타났으며 HRP2-3에서의 발현은 대조구에서 나타나는 정도의 희미한 발현만 나타났다.

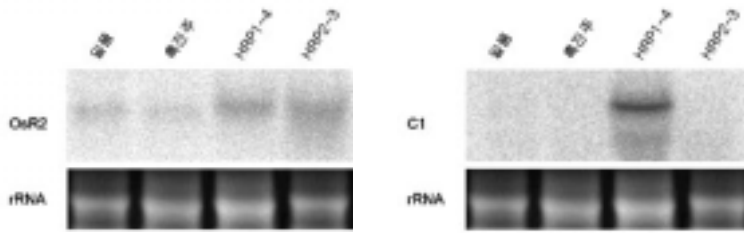


그림 13 HRP1-4와 HRP2-3의 northern blot analysis

각 샘플에서 분리한 10 μ g의 total RNA를 전기영동 하여 nylon membrane에 옮긴 후, 각각 OsR2 cDNA(좌)와 C1 cDNA(우)를 탐침으로 하여 혼성화 하였다

Ethidium bromide로 염색된 ribosomal RNA를 loading control로 제시하였음.



그림 14 T₁ 세대의 HRP1-4와 HRP2-3

- A. T₀ 세대와 비슷한 양상의 안토시아닌 축적 부위를 갖는 HRP1-4 (화살표는 안토시아닌 축적부위를 가리킴) B. w/t 흑진주벼와 같은 외양의 HRP2-3

T₁ 세대의 외형과 southern, northern 결과를 관찰한 결과 형질전환체중 pGAg1ub1OsR235SC1백터를 넣어준 HRP2 라인은 외부 유전자가 자손에 유전되지 않고 결손 되었음을 알 수 있으므로 pGA1611OsR235SC1백터를 넣어준 HRP1 라인이 안토시아닌 정량에 사용되었다

라. 안토시아닌 생합성 관련 구조유전자의 발현

흑진주벼의 안토시아닌 생합성에 관련하는 구조유전자중에 chalcon synthase(CHS)와 dihydroflavonol reductase(DFR)의 부분 염기서열을 PCR을 이용하여 확보하였으며, 이 염기서열을 탐침으로 사용하여 형질전환 T₁ 세대의 CHS 유전자와 DFR 유전자의 발현 여부를 조사하였다.

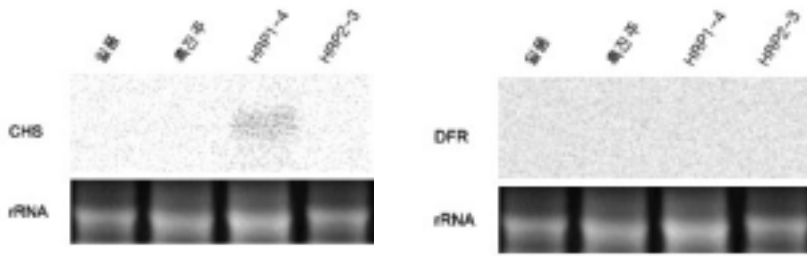


그림 15 HRP1-4와 HRP2-3의 northern blot analysis

각 샘플에서 분리한 10 μ g의 total RNA를 전기영동 하여 nylon membrane에 옮긴 후, 각각 CHS cDNA(좌)와 DFR cDNA(우)를 탐침으로 하여 혼성화 하였다

Ethidium bromide로 염색된 ribosomal RNA를 loading control로 제시하였음.

northern blot analysis 결과, w/t과 HRP2-3에서는 보이지 않는 CHS(chalcone synthase)유전자의 전사체 발현 현상이 HRP1-4에서 나타났으며 DFR(dihydroflavonol reductase) 유전자에 대해서는 어떤 샘플도 전사체 발현 현상을 나타내지 않았다

안토시아닌 생합성 조절 유전자를 외부에서 삽입시킨 형질전환체는 기존의 안토시아닌 색소가 축적되는 종자부위 이외에 엽초, 잎, 뿌리 등에 불규칙하게 안토시아닌 색소가 축적되는 현상(그림 10, 11, 12, 16)을 보였으며, 위의 그림 17의 결과로 보아 HRP1-4의 안토시아닌 축적 현상은 외래 복합 유전자 pGA1611OsR2-35SC1이 흑진주벼에 삽입되어 chalcone synthase의 전사단계가 과다발현 된 결과라고 추측해볼 수 있다

```

chs      1  ADYFPDYYPFRITKSEHMVELKEKFKRMCDKSQIRKRYMHLTEEILQENP-----AVIVGSD
894      1  ADYFPDYYPFRITKSEHMVELKEKFKRMCDKSQIRKRYMHLTEEILQENPNMCAAIVIVGSD

chs      56  PDEAVERPLFQMVSAQTILPDSEGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGLISKNIERALGDAF
894      61  PDEAVERPLFQMVSAQTILPDSEGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGLISKNIERALGDAF

chs      116  TPLGISDWN-----SIFWVAHPGGPAIDQVEAKVGLDKE
894      121  TPLGISDWN SINHIRGRLQVDEMGE LPTRWHSLSILCHLNSLASWSLFFWNCYPLTIPH

chs      151  RMRNTRHVLSEYGNMSSACVLFILDEMKRKSAEDGHATTGEGMDWQVLFPGFPGPLTVEIV
894      181  NTRAGSIKCKAMGAVSLTLIALRSLPAPQSGNLSLQHLHIGQRAGRGGIRIGRSSASSLTD

chs      211  VLMSVPITAGAAA-----
894      241  SLRSVVRLXXXAVSXHSXAVIXLSTMSMDNXXXNM
  
```

그림 16 northern blot analysis에 사용된 chalcone synthase(CHS) 아미노산 염기서열 비교 PCR로 찾은 partial CHS와 *Oriza sativa*(japonica cultivata)의 CHS의 아미노산 염기서열을 비교하여 도시하였다 상동성을 보이는 염기서열에는 검은색 box로 표시하였음.

```

dfr 1 NVISSKGGKVCVTGASGFVASWLIKRLLEAGYHVIGTVRDPNSNRDKVSHLWRLPSAKERLQ
801 1 ---SSKGGKVCVTGASGFVASWLIKRLLEAGYHVIGTVRDPNSNRDKVSHLWRLPSAKERLQ

dfr 61 LVRADLMEEGSPDDAVMACGVPHTASPVLAKESSNCKEEMLVPAINGTLNVLKSKCKNP
801 58 LVRADLMEEGSPDDAVMACGVPHTASPVLAKESSNCKEEMLVPAINGTLNVLKSKCKNP

dfr 121 FLKRVVLTSSSSSTVRIRESKHPEISLDETIMSSVALCEKLQLWYALAKISAEEAAWEFA
801 118 FLKRVVLTSSSSSTVRIRESKHPEISLDETIMSSVALCEKLQLWYALAKISAEEAAWEFA

dfr 181 KENNIDLVTVLPSFVIGPSSLSELSVTASDILGLLQGDTDRFISYGRMGYVHIDDVASCH
801 178 KENNIDLVTVLPSFVIGPSSLSELSVTASDILGLLQGDTDRFISYGRMGYVHIDDVASCH

dfr 241 ILVYEAPQATGRYLCNSVVDNNELVALLAKQPIFFPIPERSLRNPHYEKQSYELNTSKIQQ
801 238 ILVYEAPQATGRYLCNSVVDNNELVALLAITSEFAAACRSTIWESSQRVGCIAVFYSVT

dfr 301 LGFKFKGVQEMFGDCVESLKDQGHLLLECP
801 298 -----

```

그림 17 northern blot에 사용된 dihydroflavonol reductase(DFR) 아미노산 염기서열 비교 PCR로 찾은 partial DFR과 *Oriza sativa(japonica cultivata)*의 DFR의 아미노산 염기서열을 비교하여 도시하였다 상동성을 보이는 염기서열에는 검은색 box로 표시하였음.

식물체내에서 안토시아닌이 생합성 되는데 관여하는 구조유전자들은 CHS(chalcone synthase), CHI(chalcone isomerase), F3H(flavanone 3-hydroxylase), DFR(dihydroflavonol 4-reductase), ANS(anthocyanidin synthase)등의 발현 순서로 이루어지는 것이 여러 식물들의 관찰에서 확인 되었다

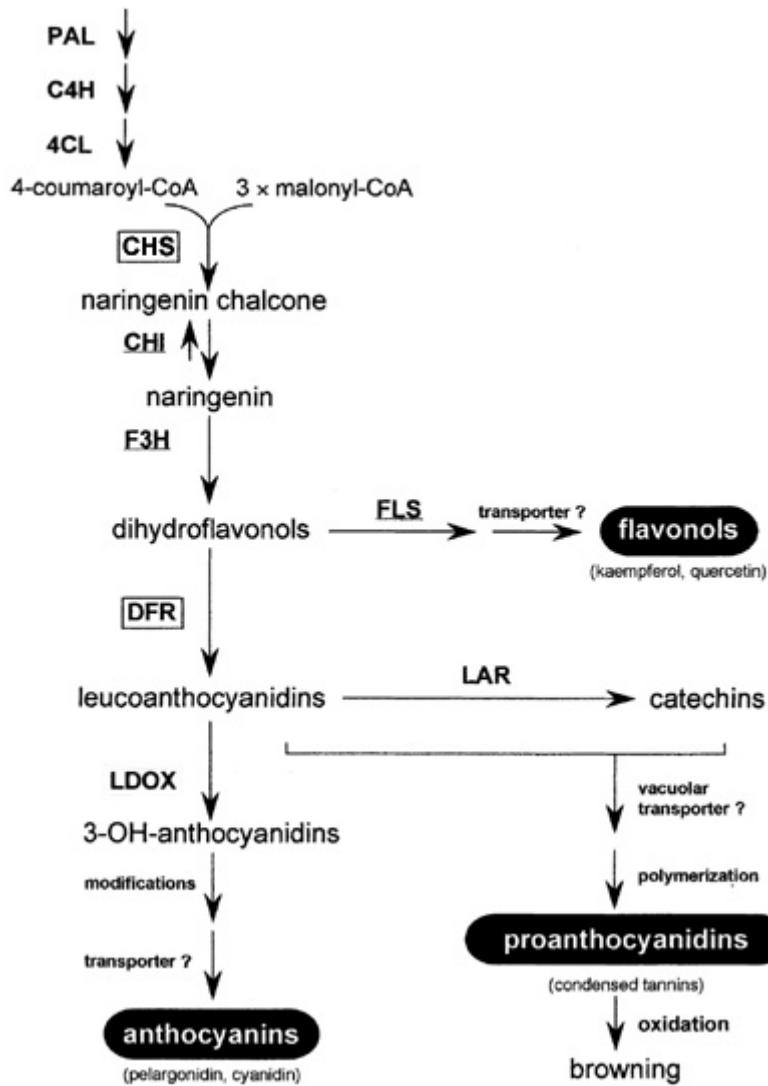


그림 18 Arabidopsis에서의 Flavonoid 생합성 경로를 나타낸 모식도
 생합성 반응의 결과로 안토시아닌, 플라보놀, 프로안토시아닌 등이 생성된다

7. 안토시아닌 안정화 유전자 (Acytransferase) 분리

부분분리된 흑진주벼의 anthocyanin 5'-acyltransferase는 *Oryza sativa* (japonica cultivar-group)과 부분분리된 구간에서 약96%의 아미노산 상동성을 나타냈다.

```

>
D           N           A           :
GCGTCCGGCGCTGCGTCCGGGGCGGCCGTCGGCGACCTGGCCGACGCCC
+3:  V R R C V A G A A V G D L A D A H
D           N           A           :
ACCGCGGCGTCCTGCACGCGCGAGGCGATCCGGGAGGCGATCGACGGGT
+3:  R G V L H A R E A I R E A I D G F
D           N           A           :
TCTTGGAGCACCCGATGGTGGAGGCGTTCGACGCGTGGATCGACGCCGTCG
+3:  L E H P M V E A F D A W I D A V A
D           N           A           :
CCGCGCTGGTCCGGCAGCCCGGGTTCGTGGCCGCGACCGCGTCGCCGCGGT
+3:  A L V R Q P G F V A A T A S P R F
D           N           A           :
TTCAGGTGTACGAGGTGGATTTAGGCTGGGGCCCCGAGAATCACTAAT
+3:  Q V Y E V D L G W G P P R I T N

```

CCGCGG: Ksp I ,Sac II ,Sst II CGATCG: Pvu I ,Ple19 I CCCGGG: Sma I
GGGCCC: Apa I

>gi|8467953|dbj|BAA96577.1| (AP002480) Similar to Gentiana triflora
Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase (AB010708) [Oryza sativa (japonica
cultivar-group)] Length = 594

Score = 120 bits (300), Expect = 5e-27 Identities = 77/80 (96%), Positives = 77/80
(96%)

Query: 1
VRRCVAGAAAGDLADAHRGVLRHAREAIREAIDGFLEHPMVEAFDAWIDAVAA
LVRQPGFV 60

V

R

CVAGAAAGDLADAHRGVLHAREAIREAIDGFLEHPMVEAFDAWIDAVAAALVR
QPGFV

Sbjct: 468

VRCCVAGAAAGDLADAHRGVLHAREAIREAIDGFLEHPMVEAFDAWIDAVAA
LVRQPGFV 527

Query: 61 AATASPRFQVYEVDLGGWPP 80

A TASPRFQVYEVDLGGW P

Sbjct: 528 AVTASPRFQVYEVDLGGWAP 547

제 2절 협동 연구과제 수행내용 및 결과

1. 안토시아닌 색소 및 항산화성 분석 방법

가. 안토시아닌 색소

곱게 분쇄된 현미가루 2g을 0.1% Trifluoroaceticacid(TFA) -95% Ethanol 용매 20ml로 4시간씩 3회에 걸쳐 상온에서 반복 추출하였다. 추출액을 여과지(Whatman No.2)를 이용하여 여과한 후 회전감압농축기로 농축하였으며, 최종 25ml로 정량하여 분석하였다. Cyanidin-3-glucoside(C3G)의 표준물질은 미국 Indo Fine Chemical Company Co.로부터 구입하여 검량선을 작성하여 계산하였다. C3G함량은 HPLC(Waters 501 pump, millipore gradient Controller, Waters 480 UV-Vis detector)로 분석하였다. HPLC 분석에서 컬럼은 ODS-5(4.6mm x 250mm, Nomura Chemical Co., Japan)를 사용하였고, 검량파장은 530nm 이었으며, 유속은 1.0ml/min.이었다. 실험의 모든 시약은 분석용 1급시약을 사용하였다.

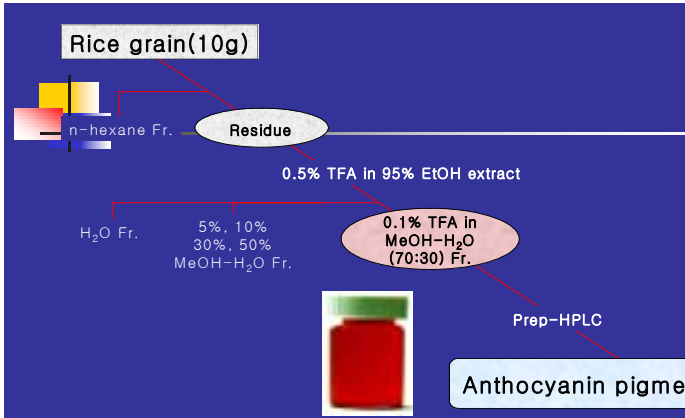


그림19. 안토시아닌 색소 추출

나. DPPH free radical 소거법에 의한 항산화활성 측정

시료는 100% Ethyl alcohol 에서 추출하였다. 추출액(약물)은 vacuum pump를 이용하여 건조시킨 후 용도에 따라 Methyl alcohol (DPPH assay) 또는 Dimethylsulfoxide (MTT assay)를 이용하여 적정 농도로 용해후에 사용하였다.

0.75 mg/mL 농도의 약물을 96 well plate의 각 well에 100 uL 씩 분주하고, 다시 여기에 150 uM DPPH (59.145 mg/mL in methanol) 용액 150 uL를 첨가하여 섞은 다음 37 °C에서 30분간 반응시키고 518nm에서 흡광도를 측정하였다. 평가기준으로는 각 well의 평균 OD₅₁₈값을 구하여 대조군의 평균 OD₅₁₈ 값에 대한 백분율 값을 산출하였다.

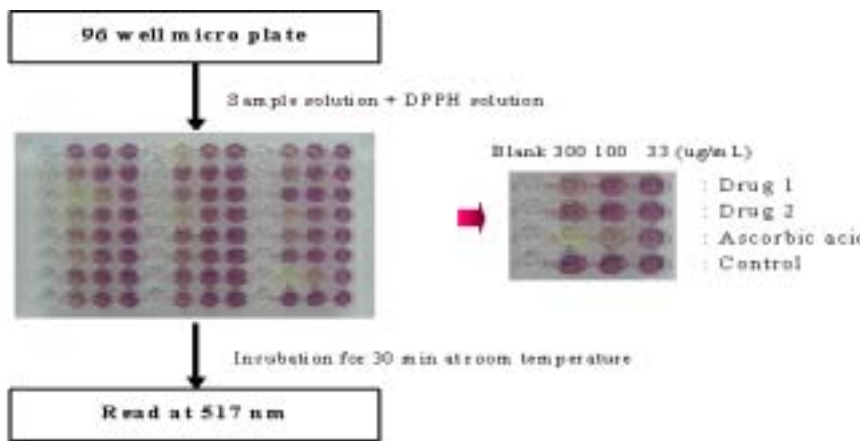


그림20. DPPH free radical 소거법에 의한 항산화활성 측정방법

2. 비료사용에 따른 안토시아닌 생합성 및 등숙에 미치는 영향

가. 삼요소 사용방법이 벼종실의 안토시아닌 색소 축적 및 등숙생리 연구

질소, 인산, 칼리 등 삼요소의 사용방법에 따른 주요생육형질 및 등숙율변이는 표1에서 보는 바와 같다. 생육형질인 간장, 수장, 주당수수 및 주간의 영화수는 N, NP, NK, NPK 처리구 등 질소처리구와 P, K, PK 등 질소결여구간에 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다. 간장의 경우 질소처리구들은 70.2 - 72.6cm 였으나 질소결여구들은 41.2-47.8cm로 짧은 것으로 나타났다. 수장, 수수, 영화수에 있어서도 간장과 같은 경향을 보였다. 등숙율에 있어서는 NPK처리구와 NP처리구는 각각 85.1% 및 88.3인데 비해 인산결여구인 NK처리구는 79.0%로 낮게 나타나 인산사용이 등숙에 영향을 주는 것을 알수 있었다.

표3. 삼요소 사용방법별 주요생육형질 및 등숙율

사용방법	간장 (cm)	수장 (cm)	수수 (개/주)	영화수 (개/수)	등숙율 (%)
N(질소구)	70.2a	20	10.4a	118.0a	83.1b
P(인산구)	47.8b	14.2b	3.0b	37.2b	98.4a
K(칼리구)	41.2b	11.7c	3.0b	22.2c	93.7a
NP(질소,인산구)	72.2a	20.2a	11.0a	126.4a	88.3b
NK(질소,칼리구)	72.2a	20.8a	10.2a	127.8a	79.0c
PK(인산,칼리구)	42.4b	14.9b	3.0b	33.3b	95.7a
NPK(삼요소구)	72.6a	20.7a	11.4a	133.8a	85.1b

* 5% 수준에서의 던칸다중검정

질소결여구인 P,K, PK처리구에서 등숙율이 삼요소구에 비해 높은 것은 질소부족으로 인해 1수영화수 착생이 적은데서 비롯된 것으로 해석되었음.

삼요소 시용방법별 안토시아닌계 색소 Cyanidin-3-glucoside 함량 및 DPPH radical 소거에 의한 항산화활성 변이는 표2에서 보는 바와 같다. 현미에서 추출된 C3G 함량은 NPK 처리구에서 100g 당 488mg으로 처리구중에서 가장 높은 것으로 나타났다. N 및 P처리구에서도 482mg 및 495mg으로 삼요소구와 비슷하였으나 인산결여구인 NK처리구에서는 408mg으로 가장 낮은 함량을 나타냈다. DPPH radical 소거에 의한 항산화활성 변이에 있어서도 C3G함량과 비슷한 경향을 나타냈다.

표4. 삼요소 시용방법별 안토시아닌계 색소 Cyanidin-3-glucoside 함량 및 DPPH radical 소거에 의한 항산화활성 변이

시용방법	Cyanidin-3-glucoside (mg/100g)	DPPH (%)
N (질소구)	482a	51.1a
P (인산구)	495a	53.3a
K (칼리구)	437bc	43.1b
NP (질소,인산구)	451b	45.4b
NK (질소,칼리구)	408c	33.0c
PK (인산,칼리구)	423bc	43.7b
NPK (삼요소구)	488a	51.9a

* 5% 수준에서의 던칸다중검정

나. 질소 및 인산 시용량 처리가 벼종실의 안토시아닌 색소 축적 및 등숙생리 연구

질소 및 인산 시용량 처리가 주요생육형질 및 등숙율에 미치는 영향은 표3에서 보는 바와 같다. 간장, 수장은 삼요소(표준구)에 비하여 질소소비구를 제외한 나머지 처리구에서는 비슷하였다. 주당 수수에서는 질소다비구가 표준구의 11.4개 보다 많은 14.0개를 나타냈으나, 질소소비구에서는 가장 낮은 4.8개인 것으로 나타났다. 수당영화수는 표준구에서

133.3개로 다른 처리구 보다 많았다. 등숙율에 있어서는 인산다비구가 88.9%를 나타내어 표준구보다 다소 높았다. 또한 표준구에 비해 인산소비구, 질소소비구 및 질소다비구에서도 낮은 등숙율을 나타내어 시비시용량에 따라 등숙율에 유의한 차이를 나타내는 것을 알 수 있었다.

표5. 질소 및 인산 시용량 처리가 주요생육형질 및 등숙율

시용방법	간장 (cm)	수장 (cm)	수수 (개/주)	영화수 (개/수)	등숙율 (%)
질소소비구	53.4b	17.2b	4.8c	73.2c	72.9c
질소다비구	75.2a	21.6a	14.0a	128.0b	81.9b
인산소비구	70.8ab	20.5a	10.2bc	120.0b	80.9b
인산다비구	72.8ab	20.6a	11.2b	121.2b	88.9a
표준구	72.6ab	20.7a	11.4b	133.8a	85.1ab

* 5% 수준에서의 던칸다중검정

질소 및 인산 시용량 처리가 안토시아닌계 색소 Cyanidin-3-glucoside 함량 및 DPPH radical 소거에 의한 항산화활성 변이는 표4에서 보는 바와 같다. C3G함량은 표준구에 비해 질소 및 인산 시용량 증가시 함량이 유의하게 높아졌으며, DPPH radical 소거에 의한 항산화활성 변이도 C3G함량과 비슷한 경향을 보였다.

표6. 질소 및 인산 시용량 처리가 안토시아닌계 색소 Cyanidin-3-glucoside 함량 및 DPPH radical 소거에 의한 항산화활성 변이

시용방법	Cyanidin-3-glucoside (mg/100g)	DPPH (%)
질소소비구	411c	42.8c
질소다비구	560a	62.4a
인산소비구	480b	49.3bc
인산다비구	547a	54.7b
표준구	488b	51.9bc

* 5% 수준에서의 던칸다중검정

다. 질소분시방법이 벼종실의 안토시아닌 색소 축적 및 등숙생리 연구

질소분시방법처리에 의한 주요생육형질 및 등숙율은 표5에서 보는 바와 같다. 등숙율은 실비중심의 추비처리구가 81.3-85.7%로서 미처리구의 73.4-75.3% 보다 높았다. 정조수량은 표준구인 T4처리구에서 5.20톤을 나타냈으나 T5처리구에서는 5.75톤을 나타냈다. 기비중점 처리구인 T6 및 T1,T2처리구는 4.94-5.08톤으로 수량성이 낮았다.

표7. 질소분시방법처리에 의한 주요생육형질 및 등숙율

분시비율 (기비-분얼비-수 비-실비)	간장 (cm)	수장 (cm)	수수 (개/주)	영화수 (개/수)	등숙율 (%)	천립중 (g)	정조수량 (ton/ha)
T1 (25-25-25-25)	80.1b	21.5a	14.2ab	74.3ab	81.3ab	24.7a	5.04b
T2 (30-20-30-20)	81.4ab	22.2a	12.0b	75.6ab	85.7a	25.0a	5.13ab
T3 (30-30-40-0)	82.1ab	22.3a	15.4a	67.9b	73.4b	25.3a	4.94b
T4 (50-20-20-10)	85.5a	22.3a	13.1b	77.1a	85.6a	25.1a	5.20ab
T5 (70-0-20-10)	82.9ab	22.1a	13.6ab	74.8ab	85.4a	24.7a	5.75a
T6 (100-0-0-0)	82.7ab	22.2a	12.8b	66.6b	75.3b	24.5a	5.08b

* 5% 수준에서의 던칸다중검정

질소분시처리에 의한 안토시아닌계 색소 Cyanidin-3-glucoside 함량 및 DPPH radical

소거에 의한 항산화활성 변이는 표6과 같다. C3G함량은 T4 및 T5처리구의 경우 530.0-533.3mg으로 다른처리구에 비해 낮은 함량을 나타냈다. 두처리구는 표5에서와 같이 수량이 높은 처리구였는데 항산화색소 함량은 낮게 나타나 이에 대한검토가 더 이루어져야 할 것으로 사료되었다. DPPH radical 소거에 의한 항산화활성 변이는 C3G함량이 제일 높았던 기비중심분시방법인 T6처리구에서 높았다.

표8. 질소분시처리에 의한 안토시아닌계 색소 Cyanidin-3-glucoside 함량 및 DPPH radical 소거에 의한 항산화활성 변이

분시비율 (기비-분얼비-수비-실비)	Cyanidin-3-glucoside (mg/100g)	DPPH (%)
T1 (25-25-25-25)	553.3a	55.0b
T2 (30-20-30-20)	551.7a	55.8b
T3 (30-30-40-0)	553.0a	55.7b
T4 (50-20-20-10)	530.0b	55.1b
T5 (70-0-20-10)	533.3b	55.5b
T6 (100-0-0-0)	563.3a	60.9a

* 5% 수준에서의 던칸다중검정

3. 식물생장조절제 처리가 안토시아닌 생합성 및 등숙에 미치는 영향

가. 옥신

NAA 10-50ppm처리에 따른 등숙율은 각각 94.3% 및 93.5%를 나타내 무처리의 84.3%보다 유의하게 높았다. 안토시아닌(C-3-G)함량은 10ppm처리구 539mg/100g 및 1000ppm처리구53mg/100g에서 높은 경향이였다. 항산화능은 1-10ppm 및 1000ppm에서 무처리에 비해 높은 것으로 나타났다.

표9. 옥신(NAA)처리에 의한 등숙율, 안토시아닌계 색소 Cyanidin-3-glucoside 함량 및 free radical 소거에 의한 항산화활성 변이

농도(ppm)	등숙율(%)	Cyanidin-3-glucoside (mg/100g)	Free radical 소거능
1	86.6 bc	480	42
10	94.3 a	539	51
50	93.5 a	453	32
100	93.1 ab	460	31
500	90.0 b	432	26
1,000	86.9 bc	553	52
무처리	84.3 c	475	40

* 5% 수준에서의 Duncan중검정

나. 에틸렌

에틸렌 1,000-2,000ppm처리시 등숙율은 각각 93.5% 및 91.4%를 나타내 무처리의 84.3% 보다 유의하게 높았다. 안토시아닌(C-3-G)함량은 10ppm처리구 및 2000ppm처리구에서 무처리에 비하여 비교적 높은 경향이였다. 항산화능은 무처리(40%)에 비하여 10ppm 및 2000ppm처리구에서 각각 44, 47%로서 높게 나타났다.

표10. 에틸렌처리에 의한 등숙율, 안토시아닌계 색소 Cyanidin-3-glucoside 함량 및 free radical 소거에 의한 항산화활성 변이

농도(ppm)	등숙율(%)	Cyanidin-3-glucoside (mg/100g)	Free radical 소거능
1	86.7 c	496	44
10	91.1 ab	487	42
50	90.9 b	461	34
100	91.0 b	433	30
500	90.9 b	425	25
1,000	93.5 a	430	29
2,000	91.4 ab	535	47
무처리	84.3 c	475	40

* 5% 수준에서의 던칸다중검정

다. 지베렐린

GA 10-100ppm 처리시 등숙율은 92.3-93.6%의 범위를 나타내 무처리의 84.3% 보다 유의하게 높았으나 500ppm 이상의 고농도에서는 감소되는 경향으로, 1000ppm에서는 75.9%로 낮아졌다. 안토시아닌(C-3-G)함량은 1-10ppm 처리구에서 483-498mg/100g 으로 무처리 보다 높은 경향이였다. 항산화능은 10ppm 처리구가 무처리 보다 높은 것으로 나타났다

표11. 지베렐린(GA)처리에 의한 등숙율, 안토시아닌계 색소

Cyanidin-3-glucoside 함량 및 free radical 소거에 의한 항산화활성 변이

농도(ppm)	등숙율(%)	Cyanidin-3-glucoside (mg/100g)	Free radical 소거능
1	88.3 b	483	41
10	93.6 a	498	44
50	92.8 a	441	21
100	92.3 a	438	25
500	88.5 b	422	16
1,000	75.9 c	412	14
무처리	84.3 b	475	40

* 5% 수준에서의 던칸다중검정

라. 카이네틴

카이네틴 10-50ppm처리시 등숙율은 각각 92.1% 및 91.2%를 나타내 무처리의 84.3% 보다 유의하게 높았다. 안토시아닌(C-3-G)함량은 50-1000ppm처리구에서 498-573 mg/100g으로 무처리에 비해 높은 경향을 보였다. 항산화능은 50-1000ppm 처리구에서 43-53%로서 무처리(40%)에 비하여 높은 활성을 나타냈다.

표12. 카이네틴처리에 의한 등숙율, 안토시아닌계 색소 Cyanidin-3-glucoside 함량 및 free radical 소거에 의한 항산화활성 변이

농도(ppm)	등숙율(%)	Cyanidin-3-glucoside (mg/100g)	Free radical 소거능
1	85.8 bc	459	37
10	92.1 a	468	39
50	91.2 a	567	52
100	90.5 b	510	46
500	90.1 b	498	43
1,000	90.4 b	573	53
무처리	84.3 c	475	40

* 5% 수준에서의 던칸다중검정

4. 흑진주벼 형질전환체의 생육특성 및 안토시아닌 함량

흑진주벼 형질전환체와 대조구인 흑진주벼와의 생육형질은 표 11에서 보는 바와 같다. 형질전환체의 출수기는 8.11일로 흑진주벼의 8월 10일에 비해 1일 늦었다. 생육형질인 간장, 수장, 및 수량관련형질인 1주당 수수, 일수 영화수, 등숙율 및 친립중은 형질전환체와 대조구와 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 정조수량에 있어서도 대조구와 차이가 없는 것으로 나타나 형질전환체는 흑진주벼와 형태 및 생육형질이 같은 것으로 판단되었다. 현미중실에

함유되어 있는 안토시아닌(Cyanidin-3-glucoside)의 함량은 형질전환체에서 100g 당 633mg 으로 대조구인 흑진주벼 429mg 보다 유의하게 높은 것으로 나타났다. Free radical 소거능 (항산화력)에 있어서도 형질전환체의 종실이 대조구인 흑진주벼에 비해 높았다.

표 13. 흑진주벼 형질전환체의 생육특성

	출수기 (월, 일)	간장 (cm)	수장 (cm)	수수 (개/주)	영화수 (개/수)	등숙율 (%)	천립중 (g)	정조수량 (ton/ha)
흑진주벼 형질전환체	8.11	82.3a	21.7a	14.5a	71.3a	84.7a	23.5a	4.55a
흑진주벼	8.10	83.0a	22.1a	14.8a	72.7a	85.5a	23.6a	4.60a

* 5% 수준에서의 던칸다중검정

표 14. 흑진주벼 형질전환체의 안토시아닌 함량 및 항산화성

	Cyanidin-3-glucoside (mg/100g)	Free radical 소거능
흑진주벼 형질전환체	633a	62a
흑진주벼	429b	41b

* 5% 수준에서의 던칸다중검정

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 연차별 연구목표 및 평가의 착안점

1. 연차별 연구목표
 - 다음 장(48 페이지)
2. 평가착안점

구분	평가의 착안점 및 척도	
	착안사항	척도(점수)
1차년도 (2002년)	○흑진주벼에서 안토시아닌 생합성 조절 유전자 (Regulatory gene, R 유전자)분리	30
	○Acyltransferase 유전자 부분 염기서열 결정	20
	○흑진주벼 재분화,형질전환 기법 세팅	20
	○시비방법이 흑진주벼에서 안토시아닌 생합성 및 등숙에 미치는 환경적 요인의 영향분석(삼요소,질소,인산,분시방법)	30
2차년도 (2003년)	○아그로박테리움에 R유전자가 도입된 식물형질전환용 벡터제작	30
	○아그로박테리움을 이용한 흑진주벼 형질전환	30
	○흑진주벼의 Acyltransferase 유전자 분리 및 활성/기능 조사	20
	○흑진주벼의 안토시아닌 생합성과 등숙에 영향을 미치는 식물호 르몬의 영향 분석(GA, Auxin, Ethylene)	20
3차년도 (2004년)	○R유전자가 도입된 흑진주벼 형질전환체 선별과 안토시아닌 정량 분석	40
	○안토시아닌 고함유 흑진주벼 형질전환체 선별	30
	○최적재배조건에서 흑진주벼 형질전환체 재배 및 안토시아닌 생합성량 분석	30
최종평가	○흑진주벼에서의 안토시아닌 합성조절 유전자 (R gene)확보	20
	○흑진주벼 형질전환체계 확립	20
	○R유전자 도입된 안토시아닌 고함유 흑진주벼 형질전환체 확보	20
	○식물색소(안토시아닌) 분리, 정제기술 확립	20
	○안토시아닌을 합성하는 흑진주벼 형질전환 캘러스 확보	20

구 분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년 도 (2002)	흑진주벼에서 안토시아닌 생합성조절 유전자 (Regulatory gene, <i>R</i> 유전자) 와 안토시아닌 안정화 유전자 (Acyltransferase 유전자) 분리	<ul style="list-style-type: none"> · 흑진주벼의 cDNA library 제작 · PCR을 통한 <i>R</i> 유전자의 부분염기서열 결정 · Library screening을 통한 <i>R</i> 유전자 전체 염기서열결정 및 유전자 확보 · PCR을 통한 acyltransferase 유전자의 부분염기서열 결정 · Library screening을 통한 acyltransferase 유전자 전체 염기서열결정 및 유전자 확보
	시비방법이 흑진주벼에서 안토시아닌 생합성 및 등숙에 미치는 환경적 요인의 영향 분석	<ul style="list-style-type: none"> · 삼요소 시용이 안토시아닌 생합성 및 등숙에 미치는 영향 분석 · 질소, 인산시용량이 안토시아닌 생합성 및 등숙에 미치는 영향 분석 · 질소분시방법이 안토시아닌 생합성 및 등숙에 미치는 영향 분석
2차년 도 (2003)	<i>R</i> 유전자가 도입된 흑진주벼 형질 전환체 제작 및 Acyltransferase 유전자에 대한 효소 활성 최적화 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> · Binary 벡터에 <i>R</i> 유전자를 sense 방향으로 삽입시킨 construct 제작 · 아그로박테리움(LBA4404)에 construct 도입 · 아그로박테리움을 이용하여 흑진주벼 형질전환 · southern blot을 통하여 형질전환체 분석 · 분리된 흑진주벼의 Acyltransferase 유전자를 이용한 <i>in vitro</i> transcription/translation · Acyltransferase 활성 및 기능 확인조사 · Acyltransferase의 최적효소활성 조건확립
	식물호르몬 처리가 흑진주벼에서 안토시아닌 생합성 및 등숙에 미치는 식물 호르몬의 영향 분석	<ul style="list-style-type: none"> · 옥신이 안토시아닌 생합성 및 등숙에 미치는 영향 분석 · Ethylene이 안토시아닌 생합성 및 등숙에 미치는 영향 분석 · GA가 안토시아닌 생합성 및 등숙에 미치는 영향 분석
3차년 도 (2004)	<i>R</i> 유전자가 도입된 흑진주벼 형질전환체에서 안토시아닌 생합성량 분석	<ul style="list-style-type: none"> · 선별된 형질전환체에서 안토시아닌 정량 · 안토시아닌 고함유 흑진주벼 형질전환체 선별
	최적재배조건에서 흑진주벼 형질전환체 재배 및 안토시아닌 생합성량 분석	· 시비방법 및 식물호르몬등 최적조건인 환경에서 안토시아닌 고함유 흑진주벼 형질전환체 재배 및 안토시아닌 분석

제 2 절 연구개발목표의 달성도 및 관련분야 기술에의 기여도

1. 1차년도 연구개발의 달성도 - 흑진주벼에서 안토시아닌 생합성조절 유전자 분리

가. degenerated primers를 이용한 PCR 기법으로 흑진주벼에서 안토시아닌 생합성을 조절하는 R family 유전자 OsR2를 분리하는데 성공하였다

나. 종자 특이적으로 발현하는 glutelin 유전자의 프로모터 부위를 안토시아닌 합성조절 유전자의 발현제어에 사용하기 위하여 PCR을 통해 흑진주벼에서 분리하였다

다. 흑진주벼에서 안토시아닌 생합성 및 등숙에 미치는 환경적 요인의 영향을 분석하고 최적화 방안을 확립하였다

- 1) 삼요소 시용방법에 따른 주요생육형질 및 등숙율(표3)
- 2) 삼요소 시용방법별 안토시아닌계 색소 Cyanidin-3-glucoside(C-3G)함량 및 DPPH radical 소거에 의한 항산화활성 변이(표4)
- 3) 질소 및 인산 시용량 처리가 벼종실의 안토시아닌 색소축적 및 등숙생리에 미치는 영향연구(표5)
- 4) 질소 및 인산 시용량 처리가 안토시아닌계 색소(C-3G)함량 및 DPPH radical 소거에 의한 항산화활성 변이(표6)
- 5) 질소분시방법이 벼종실의 안토시아닌 색소 축적 및 등숙 생리에 미치는 영향연구(표7)
- 6) 질소분시방법에 의한 안토시아닌계 색소(C-3G)함량 및 DPPH radical 소거에 의한 항산화활성 변이(표8)

라. 안토시아닌 안정화 유전자(Acyltransferase)분리...PCR을 통하여 anthocyanin 5'-acyltransferase 유전자의 일부분을 찾아냈으며, 이것은 *Oryza sativa*(japonica cultivar-group) 과 부분분리된 구간에서 약 95%의 아미노산 상동성을 나타낸다

: 1차년도 연구에서는 안토시아닌 안정화 유전자(Acyltransferase)분리의 완성이 이루어지지 않은바 약 80%의 연구달성도를 보였다

2. 2차년도 연구개발의 달성도- R 유전자가 도입된 흑진주벼 형질전환체 제작

가. 흑진주벼 안토시아닌 과다축적을 유발하기 위한 외래유전자 전달벡터 제작완성
(그림 3)

나. 아그로박테리움을 이용한 흑진주벼 형질전환 캘러스 확보

다. 흑진주벼 형질전환 캘러스로부터 형질전환 재분화체 유도 및 확보성공

라. southern, northern blot을 이용한 형질전환체 분석을 통해 HRP1과 HRP2가 각각 1개,
3개의 벡터 복합유전자를 가지고 있음을 확인 (그림5)

마. 흑진주벼의 안토시아닌 생합성과 등숙에 영향을 미치는 식물호르몬의 영향을 분석

- 1) 옥신처리에 의한 등숙율, 안토시아닌계 색소함량 및 free radical 소거에 의한 항산화활성변이 조사(표9)
- 2) 에틸렌처리에 의한 등숙율, 안토시아닌계 색소함량 및 free radical 소거에 의한 항산화활성변이 조사(표10)
- 3) 지베렐린처리에 의한 등숙율, 안토시아닌계 색소함량 및 free radical 소거에 의한 항산화활성변이 조사(표11)
- 4) 카이네틴처리에 의한 등숙율, 안토시아닌계 색소함량 및 free radical 소거에 의한 항산화활성변이 조사(표12)

바. 안토시아닌 안정화 유전자(Acyltransferase)분리....PCR을 통하여 anthocyanin 5'-acyltransferase 유전자의 일부분을 찾아냈으며, 이것은 *Oryza sativa*(japonica cultivar-group) 과 부분분리된 구간에서 약 95%의 아미노산 상동성을 나타낸다

: 2차년도 연구에서는 R 유전자가 도입된 흑진주벼 형질전환체 획득에 성공했으며, 예상외의 안토시아닌 합성 캘러스도 확보하는 결과를 얻었다 그러나 전년도에 이어 여전히 안토시아닌 안정화 유전자(Acyltransferase)분리에 실패 하였으므로 약 80%의 연구달성도 만이 이루어졌다

3. 3차년도 연구개발의 달성도- R 유전자가 도입된 흑진주벼 형질전환체에서 안토시아닌 생합성량 분석

가. 형질전환체 HRP1과 HRP2의 후대검정을 위한 T1 세대의 northern blot을 실시하여 외부 복합유전자의 후대로의 유전이 HRP2에서만 이루어졌음을 알았다(그림 17)

나. HRP2 라인의 형질전환체의 종자를 안토시아닌 정량에 이용하여 흑진주벼에 비해 약 1.5배의 함량과 free radical 소거능을 가지고 있는 결과를 얻었다 (표12)

다. 당초 예상과는 달리 안토시아닌을 합성하는 보라색의 형질전환 캘러스 세포라인(HP2)을 획득하였으며, HP2에서의 안토시아닌 색소(C-3G) 정량결과 162.2mg/100g의 높은 색소함량 수치를 얻을 수 있었다 이는 식물로부터 순수 천연색소의 안토시아닌 획득을 목적으로 두었을 때 유색미의 종자에서 안토시아닌을 추출해내는 방법에 비해 크게 생산 단가 절감의 효과를 얻을수 있는 방법을 제시할 수 있을 것이다

라. 식물색소(안토시아닌)의 분리, 정제기술 확립

: 3년차 연구 결과에서는 R 유전자가 도입된 안토시아닌 고함유 흑진주벼 형질전환체를 선별하고 보유하였으며 종자에서 안토시아닌 함량을 정량, 분석하며 그 후대까지 외부의 복합유전자 형질이 유전되어 지는지 확인하였다

또한 안토시아닌 생합성을 하는 형질전환 캘러스세포 라인을 확보하였으며, 특허출원(출원/등록번호 10-2004-0104011)중에 있다

비록 안토시아닌 안정화 유전자(Acyltransferase)분리/활성 및 기능조사의 결과는 얻지 못했으나 식물에서 안토시아닌을 합성하는데 관련되는 구조유전자들의 발현유무와 정도를 형질전환체 에서 비교, 조사하여 흑진주벼 에서의 안토시아닌 색소 합성 경로를 밝히 고자 하는 연구가 진행되고 있다

제 5장 연구개발 결과의 활용계획

제 1절 추가연구의 필요성 및 활용계획

1. 종자특이적인 glutelin 프로모터의 외부유전자(R gene) 발현 제어에도 불구하고 흑진주벼 형질전환체의 조직에 불규칙적으로 나타난 안토시아닌 축적형질을 파악하기위해 현재 재진행중인 안토시아닌 생합성 구조유전자의 분리, 확보에 따른 연구가 좀더 이루어져야 할 것이다
2. 추출된 안토시아닌 색소를 안정화시켜 산업 실용화에 도달하려면 흑진주벼의 안토시아닌 안정화 유전자(Acyltransferase)를 분리하여 효소의 활성 및 기능을 조사하고, 최적 활성 조건을 확립해야 할 것이다 또한 acyltransferase 유전자를 도입한 흑진주벼 형질전환체의 제작연구가 뒤따라야 할 것이다
3. 무공해 천연색소를 얻을수 있는 재료로써의 형질전환체 캘러스의 이용방안을 모색하여 산업화해야 할 것이다

* HP2 캘러스 세포라인의 온라인 특허출원등록

출원/등록번호: 10-2004-0104011

특허 제출명 : pGAgluB1OsR2-35sC1이 도입된 안토시아닌 발현 흑진주벼 캘러스 세포라인

제 6장 참고문헌

- Bilang, R., Zhang, S., Ledue, N., Iglesias, V.A., Gisel, A., Simmonds, J., Potrykus, I. and Sautter, C. (1993) Transient gene expression in vegetative shoot apical meristems of wheat after biolistic microtargeting. *Plant J.* 4: 735-744.
- Casas, A.M. Kononowicz, A.K., Zehr, U.B., Tomes, D.T., Axtell, J.D., Butler, L.G., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. (1993) Transgenic sorghum plants via microprojectile bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11212-11216.
- Chang, T. T. and Li, C. C. 1980. Genetics and breeding. In "Rice: Production and Utilization". pp. 87-146. Luh, B. B. ed. Avi Book, Westport, Connecticut, U. S. A.
- Cho, M. H., Yoon, H. H. and Hahn, T. R. 1996. Thermal stability of the major color component, cyanidin 3-glucoside, from a Korean pigmented rice variety in aqueous solution. *Agric. Chem. Biotech.* 39:245-248.
- Choi, S. W., Kang, W. W. Osawa, T. and Kawakichi, A. 1994. Antioxidative activity of crysanthemine in black rice hull. *Food Biotechnol.* 3:233-237.
- Choi, S. W., Kang, W. W., Osawa, T. 1994. Isolation and identification of anthocyanin pigments in black rice. *Food Biotechnol.* 3:131-136.
- Consonni G, Geuna F, Gavazzi G, Tonelli C. 1993. Molecular homology among members of the R gene family in maize. *Plant J.* 3(2):335-46.
- Consonni G, Ronchi A, Pilu R, Gavazzi G, Dellaporta SL, Tonelli C. 1997. Ectopic anthocyanin pigmentation in maize as a tool for defining interactions between homologous regulatory factors. *Mol Gen Genet* 256(3):265-76.
- Costantini, L., Albasini, A., Rastell, G. and Benvenuti, S. 1992. Activity of polyphenolic crude extracts as scavengers of superoxide radicals and inhibitors of xanthine oxidase. *Planta Med.* 58:342-344.
- Drenska, D., Banturova, I. and Ovcharov, R. 1989. Anticonvulsant effect of anthocyanins and antioxidants. *Farmatsiya (Sofia)* 39:33-40.
- Du, C. T. and Francis, F. J. 1973. A new anthocyanin from *Cornus mas* L. *Hort Sci.* 8:29-30.
- Durbin ML, McCaig B, Clegg MT. 2000. Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome. *Plant Mol Biol.* 42(1):79-92.

Review.

- Elomaa, P., Mehto, M., Kotilainen, M., Helariutta, Y., Nevalainen, L. and Teeri, T.H. (1998) A bHLH transcription factor mediates organ, region and flower type specific signals on dihydroflavonol-4-reductase (dfr) gene expression in the inflorescence of *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *Plant J.* 16: 93-99.
- Eric J. Wales. 1998. 2010년의 세계 쌀 수급 전망. *국제식량농업* 40(3): 42-60.
- Francis, E. J. 1989. Food colorants: Anthocyanins, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 28:273-314.
- Frankel, E. N., Kanner, J., German, J. B., Parks, E. and Kinsella, J. E. 1993. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341:454-457.
- Fujiwara H, Tanaka Y, Fukui Y, Nakao M, Ashikari T, Kusumi T. 1997. Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora*. Purification, characterization and its role in anthocyanin biosynthesis. *Eur J Biochem.* 249(1):45-51.
- Fujiwara H, Tanaka Y, Yonekura-Sakakibara K, Fukuchi-Mizutani M, Nakao M, Fukui Y, Yamaguchi M, Ashikari T, Kusumi T. 1998. cDNA cloning, gene expression and subcellular localization of anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora*. *Plant J.* 16(4):421-31.
- Furtsov, K. 1989. Stabilization of the red anthocyanins concentrate. *Enbagrín. Lozar Vinar.* 38:17-20.
- Gabar, E. 1998. Possible biological role of some anthocyanins in food. *Bull. Liaison Group Polyphenols* 14:130-133.
- Galway, M.E., Masucci, J.D., Lloyd, A.M., Walbot, V., Davis, R.W. and Schiefelbein, J.W. (1994) The *TTG* gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the Arabidopsis root. *Dev. Biol.* 166: 740-754.
- Goodrich, J., Carpenter, R. and Coen, E.S. (1992) A common gene regulates pigmentation pattern in diverse plant species. *Cell* 68: 955-964.
- Groose, R. W. and Palmer, R. G. 1991. Gene action governing anthocyanin pigmentation in soybean. *J. Hered.*, 82:498-501.
- Groose, R. W., Weigelt, H. D., and Palmer, R. G. 1988. Somatic analysis of an unstable mutation for anthocyanin pigmentation in soybean. *J. Hered.*,79:263-267.
- Grotewold E, Sainz MB, Tagliani L, Hernandez JM, Bowen B, Chandler VL. (2000) Identification of the residues in the Myb domain of maize C1 that specify the

- interaction with the bHLH cofactor R. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 13579-13584
- Hu J, Anderson B, Wessler SR. 1996. Isolation and characterization of rice R genes: evidence for distinct evolutionary paths in rice and maize. Genetics. 142(3):1021-31.
- Hu J, Reddy VS, Wessler SR. 2000. The rice R gene family: two distinct subfamilies containing several miniature inverted-repeat transposable elements. Plant Mol Biol. 42(5):667-78.
- Hu, J., Anderson, B. and Wessler, S.R. (1996) Isolation and characterization of rice *R* genes: evidence for distinct evolutionary paths in rice and maize. Genetics 142: 1021-1031.
- Hu, J., Reddy, V.S. and Wessler, S.R. (2000) The rice *R* gene family: two distinct subfamilies containing several miniature inverted-repeat transposable elements. Plant Mol. Biol. 42: 667-678.
- IFPRI. 1998. 최근의 세계 식량상황과 그 전망(1). 국제식량농업 40(1): 13-22.
- IFPRI. 1998. 최근의 세계 식량상황과 그 전망(2). 국제식량농업 40(2): 9-85.
- Igarashi, K., Takanashi, K., Makino, M. and Yasui, T. 1989. Antioxidative activity of major anthocyanin isolated from wild grape (*Vitis coignetize*). Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 36:852-856.
- Kubo H, Peeters AJ, Aarts MG, Pereira A, Koornneef M. 1999. ANTHOCYANINLESS2, a homeobox gene affecting anthocyanin distribution and root development in Arabidopsis. Plant Cell. 11(7):1217-26.
- Lanzarini. G., L. Morselli and P. G. Pifferi. 1977. Pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry for the identification of anthocyanins. J. Chromatography 130:261-266.
- Li, X. and Okita, T.W. (1993) Accumulation of prolamins and glutelins during rice development: a quantitative evaluation. Plant Cell Physiol. 34: 385-390.
- Liu Y, Alleman M, Wessler SR. 1996. A Ds insertion alters the nuclear localization of the maize transcriptional activator R. Proc Natl Acad Sci USA 23:93(15):7816-20.
- Lloyd AM, Walbot V, Davis RW. 1992. *Arabidopsis* and *Nicotiana* anthocyanin production activated by maize regulators R and C1. Science 11;258(5089):1773-5.
- Lloyd, A.M., Walbot, V. and Davis, R.W. (1992) *Arabidopsis* and *Nicotiana* anthocyanin production activated by maize regulators *R* and *C1*. Science 258: 1773-1775.
- Ludwig, S.R. Habera, L.F. Dellaporta, S.L. and Wessler S.R. (1989) *Lc*, a member of the maize *R* gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production,

- encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the *myc*-homology region. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7092-7096.
- Meunier, M. T., Durouz, E. and Bastide, P. 1989. Antioxidant activity of procyanidol oligomers and anthocyanins with regard to superoxide anion and lipid peroxidation. Plant Med. Phytother. 23:267-274.
- Nagai, I., Suzushino, G., and Suzuki, Y. 1960. Anthoxanthins and anthocyanin the aryzaceae, I. Jap. J. Breeding 10.
- Nagai, I., Suzushino, G., and Suzuki, Y. 1960. Anthoxanthins and anthocyanin the oryzaceae, II. Jap. J. Breeding 10.
- Nesi, N., Debeaujon, I., Jond C., Pelletier, G., Caboche, M. and Lepiniec, L. (2000) The *TT8* gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of *DFR* and *BAN* genes in *Arabidopsis* siliques. Plant Cell 12: 1863-1878.
- Osawa, T. and Namiki, M., 1985. Natural antioxidants isolated from Eucalyptus leaf waxes. J. Agric. Foods Chem., 33. 777.
- Osawa, T., Kumazawa, S., Kawakishi, S., and Namiki, M., 1989. Natural antioxidants isolated from plant leaf waxes in medical.
- Osawa, T., Ramarathanam, N., Kawakishi, S., Namiki, M., and Tashiro, T., 1985. Antioxidative defense systems in rice hull against damage caused by oxygen radicals. Agric. Bio. Chem., 49. 3085.
- Quattrocchio, F., Wing, J.F., Leppen, H.T.C., Mol, J.N.M. and Koes, R.E. (1993) Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes. Plant Cell 5: 1497-1512.
- Quattrocchio, F., Wing, J.F., Woude, K., Mol, J.N.M. and Koes, R.E. (1998) Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. Plant J. 13: 475-488.
- Rausher MD, Miller RE, Tiffin P. 1999. Patterns of evolutionary rate variation among genes of the anthocyanin biosynthetic pathway. Mol Biol Evol. 16(2):266-74.
- Reddy AR, Scheffler B, Madhuri G, Srivastava MN, Kumar A, Sathyanarayanan PV, Nair S, Mohan M. 1996. Chalcone synthase in rice (*Oryza sativa* L.): detection of the CHS protein in seedlings and molecular mapping of the *chs* locus. Plant Mol Biol. 32(4):735-43.
- Ryu, S, N., Park, S. Z. and Ho, C. T. 1998. High performance liquid chromatographic

- determination of anthocyanin pigments in some varieties of black rice. *Journal of Food and Drug Analysis* 6(4):729-736.
- Sakamoto W, Ohmori T, Kageyama K, Miyazaki C, Saito A, Murata M, Noda K, Maekawa M. (2001) The Purple leaf (Pl) locus of rice: the Pl(w) allele has a complex organization and includes two genes encoding basic helix-loop-helix proteins involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 42: 982-991.
- Shieh, M.W., Wessler, S.R. and Raikhel, N.V. (1993) Nuclear targeting of the maize R protein requires two nuclear localization sequences. *Plant Physiol.* 101: 353-361.
- Spagna, G. and Pifferi, P. G. 1992. Purification and separation of oenocyanin anthocyanins on sulphoxyethylcellulose. *Food Chem.* 44:185-190.
- Spelt, C., Quattrocchio, F., Mol, J.N.M. and Koes, R. (2000) *anthocyanin1* of petunia encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. *Plant Cell* 12: 1619-1631.
- Strack, D. and Wray, V. 1989. Anthocyanins. In "Methods in Plant Biochemistry. Vol. 1. Plant Phenolics". pp. 325-356. Harborne, J. B. ed. Academic Press, London, UK.
- Takahashi, K. and Yoshizawa, K. 1987. Red rice pigments and brewing of alcoholic beverages containing them. *J. Brew. Soc. Japan* 82:740-747.
- Takaiwa, F. and Oono, K. (1990) Interaction of an immature seed-specific *trans*-acting factor with the 5' upstream region of a rice glutelin gene. *Mol. Gen. Genet.* 224: 289-293.
- Takaiwa, F., Oono, K., Wing, D. and Kato, A. (1991) Sequence of three members and expression of a new major subfamily of glutelin genes from rice. *Plant Mol. Biol.* 17: 875-885.
- Takaiwa, F., Yamanouchi, U., Yoshihara, T., Washida, H., Tanabe, F., Kato, A. and Yamada, K. (1996) Characterization of common *cis*-regulatory elements responsible for the endosperm-specific expression of members of the rice glutelin multigene family. *Plant Mol. Biol.* 30: 1207-1221.
- Thomas, P. 1975. Utilization of plant pigments as food colorants. *Food Prod. Dev.*, 9:50.
- Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Norionbu, S., Choi, S. W., Kawakishi, S. and Osawa, T. 1994. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-β-glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.* 42:2407-2410.
- USDA-ERS. 1998. 세계 및 미국의 쌀 수급 전망. *국제식량농업* 40(8): 47-56.

- Vlaskovska, M., Drenska, D. and Ovcharov, R. 1990. Effect of antioxidant, alone and in combination on the inflammatory process. *Probl. Vutr. Med.* 18:13-19.
- Walker AR, Davison PA, Bolognesi-Winfield AC, James CM, Srinivasan N, Blundell TL, Esch JJ, Marks MD, Gray JC. 1999. The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell.* 11(7):1337-50.
- Wang L, Wessler SR. 1998. Inefficient reinitiation is responsible for upstream open reading frame-mediated translational repression of the maize R gene. *Plant Cell.* 10(10):1733-46.
- Wang, H., Cao, G. and Prior, G. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 45:304-309.
- Washida, H., Wu, C.-Y., Suzuki, A., Yamanouchi, U., Akihama, T., Harada, K. and Takaiwa, F. (1999) Identification of *cis*-elements required for endosperm expression of the rice storage protein glutelin gene *GluB-1*. *Plant Mol. Biol.* 40: 1-12.
- Wu, C.-Y., Suzuki, A., Washida, H. and Takaiwa, F. (1998) The GCN4 motif in a rice glutelin gene is essential for endosperm-specific gene expression and is activated by opaque-2 in transgenic rice plants. *Plant J.* 14: 673-683. Yonekura-Sakakibara K, Tanaka Y, Fukuchi-Mizutani M, Fujiwara H, Fukui Y, Ashikari T, Murakami Y, Yamaguchi M, Kusumi T. Molecular and biochemical characterization of a novel hydroxycinnamoyl-CoA: anthocyanin 3-O-glucoside-6"-O-acyltransferase from *Perilla frutescens*. *Plant Cell Physiol.* 41(4):495-502
- Yoon, H. H., Park, Y. S., Kim, J. B. and Hahn, T. R. 1995. Identification of anthocyanins from Korean pigmented rice. *Agric, Chem, Biotech.* 38:581-583.
- Yoshinaga, K., Yakahashi, K. and Yashizawa, K. 1986. Liquor with pigments of red rice. *J. Brew. Soc. Japan* 81:337-342.
- Yu O, Jung W, Shi J, Croes RA, Fader GM, McGonigle B, Odell JT. 2000. Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. *Plant Physiol* 124(2):781-94.
- 권태진, 김연중, 오세익. 1999. 환경친화적 벼농사의 적정 시비 수준과 정책방향
- 김광호 등. 1999. 식량 생산능력 향상을 위한 농작물 육종전략. 식량위기-우리의 나아갈 길 -. 한국육종학회, 작물학회, 토양비료학회 공동심포지엄 발표자료.
- 김명환, 김병률, 유남식. 1998. 농산물 품질인증제도와 안전성 조사제도의 발전방향. 한국농촌경제연구원.

- 김명환. 1999. 한국 식량산업의 전망과 과제. 경희대학교 심포지움 자료. -세계 식량 사정 및 통일 한국의 농업전략-. pp.17-39.
- 이문희, 정남진. 1998. 환경친화형 벼재배기술 개발 및 전망. 한국쌀연구회 총서 제6권 환경친화형 쌀산업의 발전방향 : 57-88.
- 이정환 외. 1999.1. 농업전망 1999. 한국농촌경제연구원.
- 채제천, 강양순, 이영호, 남중현. 1999. 식량 안정생산기술의 전망. 식량위기 -우리의 나아갈 길-한국육종학회, 작물학회, 토양비료학회 공동심포지엄 발표자료. 1999. 11. 20.
- 최진룡, 김정부, 조영손. 1998. 한반도에서 지속농업의 실천방안. 한국작물학회, 한국육종학회, 공동 심포지움 자료-21세기 한반도 농업전망과 대책. pp.288-312.
- 최해춘. 1996. 유색미 이용 천연색소 개발 및 산업적 활용. 과학기술처 특정과제보고서. p.109.
- 홍병희, 최해춘, 박문웅, 황영현, 이봉호. 1999. 작물연구 동향과 전망. 한국작물학회.

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.