

GOVP1200617021

T0008153

최 종
연구보고서

생명공학기법을 이용한 고품질 감귤품종 개발
Citrus Cultivar Improvement
Using Biotechnology

연구기관
난지농업연구소

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “생명공학기법에 의한 고품질 감귤품종 개발” 과제
(세부과제 “감귤 형질전환기법 개발”)의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 9 월 일

주관연구기관명 : 난지농업연구소

총괄연구책임자 : 김 창 명

세부연구책임자 : 김 창 명

연 구 원 : 강 성 구

연 구 원 : 안 현 주

연 구 원 : 윤 수 현

협동연구기관명 : 제주대학교

협동연구책임자 : 김 찬 식

연 구 원 : 김 인 중

협동연구기관명 : 충남대학교

협동연구책임자 : 허 윤 강

요 약 문

I. 제 목

생명공학기법을 이용한 고품질 감귤품종개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

감귤은 기후적 특성 때문에, 제주도를 중심으로 재배되어 왔으며, 우량품종의 확보는 일본을 비롯한 외국에서 종묘를 들여와 영양번식법으로 증식하는 도입육종이 중심이었다. 그러나 최근에는 식물의 경우에도 특허 또는 지적소유권 등의 문제로 외국에서 우량계통을 들여와 증식시키는 도입육종도 어려워지고 있다.

밀감의 경우, 품질을 결정하는 것에는 당도, 크기, 색깔 및 기능성 등 여러 가지 요소가 고려되고 있지만 무엇보다도 과일의 당도가 가장 중요한 요소이다. 그러나 현재 제주도에서 생산되고 있는 주요 감귤인 온주밀감의 당도는 환경적인 요소 등으로 인하여 8-11°Bx로서 일본산 온주밀감이나 미국산 오렌지에 비해 당도가 2-3° Bx 낮은 편이다. 그래서 과일의 당도를 상승시키기 위한 수단으로 수확기에 단수처리를 하거나 근역제한 재배 등 재배적 방법을 동원하고 있으나, 이들 재배적 방법은 매년 새로운 시설을 해야 하는 번거로움과 이에 소요되는 노동력 등 매년 300 억 원 이상의 경비가 소요되고 있다. 따라서 과일의 당도향상을 위하여 재배적 방법의 개발 이전에 고당도 계통의 감귤 품종 개발이 시급하다.

또한 최근 기능성 식품에 대한 관심이 높아지면서 기능성 물질 함유 여부가 품질의 주요 인자가 되고 있다. 기능성 물질 중 카로티노이드(carotenoids)는 terpenoid계의 2차대사산물로, 색소체의 틸라코이드막(Thylakoid membrane)을 구성하고 있는 지질 성분으로, 사람을 비롯한 동물에 필요한 vitamin A 및 retinol의 전구체로도 사용되는 인간의 필수적인 영양소이다. 이외에도 카로티노이드는 동물과 사람에 있어서 암억제

/예방 효과는 물론 성인성 질병에 대해 탁월한 예방 효과가 있다는 것이 최근에 알려지면서 이들 물질에 대한 인식이 크게 변하고 있다. 이러한 이유 때문에 카로티노이드의 함량과 성분을 제어하여 생리활성이 높은 특정 카로티노이드를 다량으로 생산하려는 연구가 시도되고 있다.

한편 생화학과 분자생물학의 발전으로 인해, 당 및 카로티노이드계의 대사 경로가 미생물 및 식물에서 규명되고 있다. 그 결과, 현재 특정 식물에서 당 및 카로티노이드 생합성과정에 관여하는 주요 유전자들의 분리와 그들의 발현 제어가 가능해졌으며, 이를 통해 경제적으로 가치가 높은 특정 카로티노이드를 생산하거나 당 함량을 제어한 식물도 개발할 수 있게 되었다. 베타-카로틴의 함량을 증가시킨 Golden rice가 그 대표적인 예라고 할 수 있다.

카로티노이드는 현재 600여종 이상이 알려져 있고, 최근 들어 몇몇 카로티노이드는 그것이 갖고 있는 생리 활성 때문에 그 중요성이 강조되고 있다. 즉 β -carotene, lycopene, β -cryptoxanthin 등 몇몇 카로티노이드는 free radical에 대한 항산화성 및 다양한 암 예방 효과는 물론 면역증진 효과 등과 같은 생리활성을 나타내는 것으로 보고되었다.

카로티노이드의 이런 생리활성과 영양학적 중요성 때문에 유전자조작이나 교잡에 의해 특정 카로티노이드의 함량이 증가된 작물을 육성하려는 시도가 몇몇 연구실에서 이루어지고 있다. 그러나 국내에서는 식물의 카로티노이드 생합성에 관련된 연구와 이의 응용에 대한 연구가 선진외국에 비해 상대적으로 미미한 수준에 있다.

온주밀감은 지금까지 주로 돌연변이체의 선발을 통하여 육종하고 있는데 이러한 방법으로는 그 변이의 폭이 적어 다양한 형질의 개선을 기대하기 어렵다. 그러나 전통적인 육종방법인 교배 육종은 주력품종인 온주밀감이 하나의 종자에 평균 embryo 수가 20개인 다배성이어서 교배실생 육성이 곤란하고 다른 과수류와 같이 주요 유전자가 대부분 hetero 상태이어서 교배육종으로 목적형질을 선택적으로 도입하기 곤란한 상태이다. 따라서 한 품종을 육성하는데 소요되는 기간도 길어 신품종 개발에 최소 20-30년이 소요되는 어려움이 있다.

이러한 어려움을 극복하기 위해서는 기존 우량 품종에 목적유전자를

선택적으로 도입할 수 있는 형질전환과 같은 기술개발과 개발된 기술에 이용할 수 있는 다양한 유전자의 확보가 필요하다. 그러나 현재 감귤류의 형질전환은 오렌지 등에서는 어느 정도 진보가 이루어졌으나 우리나라의 주요 재배품종인 온주밀감에 대해서는 형질전환의 기초가 되는 재분화체계도 확립이 되지 않은 상태이다.

따라서 본 연구에서는 온주밀감을 비롯한 다양한 감귤류의 재분화체계를 확립하고 확립된 재분화체계를 이용하여 형질전환기법을 확립하고자 한다. 동시에 감귤의 고품질화에 필요한 유용유전자를 확보하고 형질전환시스템에 이용할 수 있는 감귤 과실 특이발현 프로모터를 동시에 개발하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

생명공학기법을 이용한 고품질 감귤품종 개발을 위하여 본 연구는 1세 부과제(감귤 형질전환기법 개발), 2 협동과제(제1 협동과제: 당 및 기능성 대사관련 유전자를 클로닝, 제 2 협동과제: 감귤과실 특이발현 프로모터를 개발)로 구성하여 연구를 수행하였다.

제 1 세부과제에서는 크게 감귤류의 재분화 체계 확립과 주요 품종의 형질전환 기술 개발, 당 및 기능성 대사관련 유전자를 이용한 주요 품종의 형질전환을 수행하였다. 이를 위해서 다음과 같은 과정을 통하여 연구를 수행하였다.

감귤속은 품종에 따라 식물체 재분화능이 현저하게 차이가 나므로 현재 기내 재분화 체계가 확립되어 있는 오렌지를 대조로 하여 주요 품종별로 미숙조직을 배양하여 embryogenic callus를 유기, 증식하고 그 캘러스를 사용하여 식물체 재분화 체계를 확립한다.

배발생 callus를 균일하게 증식하기 위해서 생장조절 물질 및 기타 조건을 검토한다.

식물체 재분화 체계를 바탕으로 외래유전자의 도입을 위한 품종별

형질전환 효율을 극대화할 수 있는 적절한 조건과 형질전환방법 (*Agrobacterium*법)을 구명한다.

형질전환체의 기내1차 선발 기준을 확립함으로써 본 연구의 효율화를 도모한다.

*Agrobacterium*법을 이용한 형질전환 시 영향을 미치는 *Agrobacterium* strain, inoculation 시간 및 온도, Acetosyringone의 첨가농도, 선발배지 조성 등에 대하여 실험한다.

개선된 형질전환 체계를 바탕으로 기존에 클로닝 되어 있는 당합성 관련 유전자와 기능성 성분 합성 관련 유전자를 이용하여 형질전환을 시작한다.

감귤의 당합성과 기능성 성분의 합성에 관여하는 유전자의 클로닝과 조직특이 발현 프로모터를 개발하여 재조합된 유전자를 감귤 세포에 도입하여 형질전환 된 식물체를 육성한다.

제1협동과제에서는 당대사 및 카로티노이드 대사 관련 유전자의 클로닝을 수행하였다. 유전자클로닝을 위하여 감귤의 잎과 과육으로 cDNA library 제작한 후 RT-PCR과 subcloning을 통하여 관련 유전자를 분리하고 제어 유전자 선발 및 유전자 발현 제어 벡터를 제작하였다.

제2협동과제에서는 감귤 과실특이 발현 프로모터 개발을 위하여 다음과 같은 단계로 연구를 수행하였다.

proteomics 연구: 2-D 전기영동을 포함한 proteomics 연구를 통하여 과실과 잎 특이 발현 유전자를 찾아내고 이를 도구로 사용하여 프로모터를 탐색한다.

cDNA library differential screening을 통하여 과실 특이 클론을 확보한다.

확보한 과실과 잎 특이 프로모터를 분석한다.

GUS 유전자를 이용한 형질전환용 벡터제작

제작된 형질전환용 벡터를 이용하여 애기장대와 담배의 형질전환

체를 육성한다.

육성된 형질전환 식물체를 이용하여 프로모터 활성도를 분석한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구를 통해 감귤 germplasm별로 재분화능을 갖춘 embryogenic callus를 얻기 위하여 조직부위별, 배양배지조성에 따른 영향을 비교하여 cell line을 획득하였으며 특히 온주밀감의 캘러스로부터 식물체를 유기시키기 위하여 캘러스의 현탁배양, 현탁배양물의 전처리, 배유기배지의 조성과 유기된 배로부터의 유식물체 생산을 위한 배양조건, 기내 배양 식물체의 순화율 및 생존율 향상을 위한 순화방법 모색 등 캘러스 유기에서부터 기내 유식물체의 온실육묘에 필요한 조건들을 설정하였다.

그리고 전술한 감귤 캘러스로부터의 식물체 재분화 조건을 바탕으로 agrobacterium 접종법을 이용하여 식물 세포내로 외래유전자를 도입시키기 위한 기본 조건을 검토하고 감귤 형질전환 체계를 구축하였다. reporter 유전자를 이용하여 agrobacterium 접종 단계별로 접종효율을 높일 수 있는 조건들도 감귤 품종별로 검토하였다.

식물체 재분화 조건과 감귤 형질전환 기본 조건을 바탕으로 감귤에서 분리한 당 생합성 관여 유전자(SS, SPS, SUT)와 카로티노이드 생합성 관여 유전자(Ggps, Zds, Pds, Psy, Chx)가 삽입되어있는 agrobacterium을 접종하여 선발단계를 거친 세포들로부터 유식물체를 분화시켰다. 오렌지, 온주밀감, ponkan 품종을 시험재료로 카로티노이드 생합성 관련 유전자를 형질전환 한 시험에서 총 597개체의 형질전환 후보개체를 유기시켰으며, 당 생합성 관여 유전자를 사용한 시험에서는 총 96개체를 얻을 수 있었다. 이들 중 135개체가 온주밀감에서 재분화 된 개체들이다.

재분화 된 개체에 대하여 PCR 방법을 이용하여 삽입된 유전자를 검출한 결과, 홍진조생과 햅린 오렌지에서 Ggps 유전자를 coding하는 600bp의 단편이 증폭됨을 확인하였다. 이들 개체는 개체 생장이 진행된 후 southern blot analysis를 할 예정이다.

본 연구 결과로 온주밀감의 체세포배발생체계를 통한 식물체 재분화

조건이 확립되었으며 유용유전자의 형질전환을 위한 가능성이 확인되었을 뿐만 아니라 외래유전자가 삽입된 개체를 얻을 수 있었다. 또한 앞으로 감귤의 품질향상에 필요한 유전자들이 확보되면 감귤의 형질전환 특히 온주밀감의 형질전환도 실용화가 가능할 것으로 생각되어진다.

그리고 본 연구에서 확립한 감귤의 체세포배발생유도기술은 감귤 형질전환을 가능하게 할 뿐만 아니라 감귤의 원형질체 융합에 의한 체세포 잡종체를 생산하는데도 필요한 기본기술이다. 원형질체 융합에 의한 식물체 재분화는 단세포에서 식물체가 유기되는 장점이 있기 때문에 원형질체에 외래유전자를 도입시켜 식물체를 재분화 시킬 수 있다면 세포덩어리인 캘러스에 유전자를 도입시켜 식물체 재분화유도시 발생하는 escape의 발생을 줄일 수 있어 형질전환효율을 향상시킬 수 있을 것이다. 따라서 체세포 배유기 기술을 바탕으로 형질전환과 원형질체 융합기술을 접목하여 감귤 형질전환체를 육성할 수 있는 기술개발을 추진할 계획이다.

본 연구는 최종적으로 과실에서 발현되는 유전자를 확인할 수 있어야 하지만 수년 내에 개화, 결실이 현실적으로 불가능하다. 따라서 앞으로 유전자도입이 확인된 개체 및 재분화 된 식물체들의 형태적인 특성과 과실의 특성을 조사하기 위한 유식물체의 생육 촉진 및 조기 결실에 관한 육묘 시스템연구가 활발하게 진행되어야 할 것이다.

고당 함량 관련 분자마커개발을 위해 BSA-AFLP법을 온주밀감 계통을 이용하여 실험을 수행하였으나 고당 또는 저당 계통에 특이적으로 연관된 실효성 있는 polymorphic product를 검출하지 못했다.

당 및 기능성 대사관련 유전자 클로닝에 관한 연구를 통해 달성하고자 했던 목표인 카로티노이드 생합성 유전자의 확보(6종류), 당대사 관련 유전자의 확보(3종류), 카로티노이드 및 당 함량 핵심유전자 선발(4종류)은 계획대로 완수하였으며 유전자 발현 제어벡터 제작(4종류)은 초과달성하였다. 이를 통해 고기능성 또는 고당도 유전자변형 작물의 개발에 적용할 수 있을 것이다.

기능성 물질대사 관련 유전자들은 β -cryptoxanthin이나 lycopene 함량 변화뿐만 아니라 생리활성이 알려져 있는 다른 카로티노이드나 새로운 카로티노이드의 생성에 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 거의 모든 식품류에

도입 가능하다. 즉, 식품 내에 존재하는 카로티노이드의 함량증가나 특정 카로티노이드의 성분증가를 통해 비타민 A 등의 영양공급이나 암을 비롯한 성인병 예방에 기여할 수 있을 것이다. 그리고 당대사 관련 유전자들은 당도가 품질을 좌우하는 농산물의 개발에 활용될 수 있을 것이다.

감귤 과실 특이발현 프로모터 개발은 위한 연구에서 1차년도에 Proteomics 기법을 이용하여 과실특이 단백질을 분리하여 아미노산 서열을 결정하고, 그 아미노산 서열을 근거로 oligonucleotide를 만들어 과실로부터 작성한 cDNA library를 스크리닝하여 cDNA를 확보한 후 그 cDNA를 탐침으로 이용하여 genomic library를 스크리닝하여 프로모터를 확보하는 것으로 계획되어 있었다. 그러나 감귤로부터 단백질 분리하여 2D-전기영동으로 단백질 spot를 얻는데 어려움이 많아 8개월 이상의 시간을 낭비하였다. 결국 실험 방법을 바꾸어 앞으로부터 작성한 cDNA library와 과실로부터 작성한 cDNA library를 이용하여 differential screening을 통하여 과실 특이 발현되는 클론을 확보하게 되었다. 그리고 이들 클론이 과실 특이적으로 발현되는지를 확인하기 위하여 northern blot 분석을 실시하였다.

2차년도에는 애기장대와 담배에 형질전환하여 프로모터의 활성도를 탐색하는 것으로 되어 있었다. 그러나 1년차 연구의 변경으로 2차년도에 genomic library를 제작하여 프로모터 확보하는데 많은 시간을 할애하였다. 그리고 담배보다는 토마토가 과실이 확실하기 때문에 토마토에 형질전환하는 방향으로 연구의 방향을 전환하였다. 그러나 토마토 형질전환에 어려움이 많아 아직도 실험을 수행하고 있으며, 애기장대에 형질전환하여 형질전환체를 분석하고 있다. 그리고 프로모터 construct를 감귤에 넣도록 감귤 연구자에게 전달하였다.

본 연구 결과 프로모터의 가치가 증명되면 과실특이 프로모터로 특허출원은 물론 감귤과 기타 과수의 유전자 도입을 위한 유용한 프로모터로 상업적 가치가 매우 높다고 하겠다. 단, 연구 기간이 종료된 관계로 다른 연구자가 계속하여 후속 연구를 수행하였으면 하는 바람이다.

과실특이 프로모터를 개발하고자 여러 연구자들이 노력하여 왔으며, 에틸렌 생합성관련 유전자 프로모터 등이 주로 연구의 대상이 되었다. 본

연구에서 클로닝하여 분석하고 있는 *Lea promoter*는 비교적 과실이 성숙함에 따라 활성도가 높아 이용가치가 있다고 판단된다. 그러나 짧은 연구기간에 형질전환 식물체를 이용한 프로모터 활성도를 분석하고 상업화하기에는 불가능하다고 판단된다. 특히 감귤에 형질전환하여 그 기능을 탐구하기 위해서는 여러 해가 요구된다. 따라서 프로모터에 대한 연구는 보다 장기간 연구가 필요한 부분이라 하겠다. 그리고 본 연구의 과정에서 클로닝된 *TOM* (*target of myb*) 유전자도 그 프로모터를 찾아 연구해볼 가치가 매우 높다고 판단된다.

SUMMARY

In the last century, efforts through traditional plant breeding techniques have increased many agronomic aspects and nutritional values of food plant including fruit trees. The main drawback of traditional plant breeding is that it relies on the use of germplasm of the same or closely related species, which is sometimes a serious limiting factor. In addition, progress is time-consuming and relies on the extensive use of natural resources. Plant molecular breeding method, especially transgenic plant production, is an alternative option for plant improvement.

Transgenic plant production is a powerful technique for introducing new traits into plants. Its major advantage, rather than conventional cross-breeding, is that a specific advantageous trait could be added to a given cultivar or rootstock genome without avoiding burdens of sexual recombination and involvement of deleterious characteristics.

The process of transgenic plant production consists of an alien DNA introduction into plant cells, transformant screening, plant regeneration from transformed callus. The establishment of tissue culture system including callus induction, somatic embryogenesis or organogenesis, plant regeneration is prerequisite for successful transformation.

Transformation of woody plants is still quite rare. In particular, citrus is known to be recalcitrant species which are difficult to regenerate plants by cell or tissue culture. *Citrus unshiu*, the most important crop in Jeju, is especially recalcitrant among citrus species.

The goals of this study are 1) to develop regeneration transformation system for citrus species, 2) to produce a transgenic citrus plant, 3) to isolate genes which control pathways of

carbohydrate and carotenoid biosynthesis, and 4) to find fruit specific promoters.

In citrus, an embryogenic callus could be induced with an immature ovule tissue, embryos, hypocotyls, anthers, endosperm, and juice vesicles even with the low induction rate. In satsuma mandarin (*C. unshiu*), however, embryogenic callus induction has not been impossible until we had a successful embryogenic callus induction from immature ovules or aborted seeds in three satsuma mandarins including 'Okitsu wase' which is a representative mandarin cultivar in Jeju island. Immature seed of Fortunella and embryo of ponkan were also successfully used in callus induction.

To obtain a high frequency and simultaneous embryogenesis from callus, we used the sorted callus based on the size and weight. Calli suspension cultured in the media of MS with 0.1 M galactose and sorbitol were divided into 4 groups using 0.5 and 1.0mm sieve, and 40% and 50% percoll gradient. Each callus group transferred to the solid media containing MT with 0.14M lactose formed globular staged embryo about 1 month after culture. Moreover, globular embryos of 'Miyagawa wase' from 1.0mm-40% percoll callus group produced plantlets on the MT solid media supplemented with GA₃ on the solid media with 63% regeneration rate while those of 'Sugiyama unshiu' did not.

Callus suspension cultures of three satsuma mandarins and 2 oranges were divided into three size groups(0.5, 1.0, 2.0mm) and inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 carrying pBI121. The calli were screened in the 50mg/L and 100mg/L kanamycin and cultured in the globular embryo (MT supplemented with 0.14M lactose) and embryoid induction (MT supplemented with 0.1M galactose, 0.14M sorbitol and 3.7M adenine.) media. In 'Miyagawa

wase', the embryoids were successfully formed and have been cultured on the solid shooting media (MT supplemented with 1mg/L GA₃). On the transient GUS expression test of the antibiotics screened callus, those of mandarins and oranges showed cell line-dependently GUS activities.

To optimize agrobacterium-mediated transformation, some factors such as agrobacterium strain, inoculation time, acetosyringone (4'-Hydroxy-3,5-dimethoxyacetophenone), pretreatment of callus, and callus size were tested.

On transformation test with agrobacterium strain LBA4404 and EHA105, "Okitsu wase' callus inoculated with EHA105 produced green-coloured pro-embryos but not with LBA4404. And on agrobacterium inoculation of 30 minutes, the more callus formed on the antibiotics selection media in all cultivars tested. We also found that 50 or 100µM acetosyringone were more effective for the kanamycin-resistant callus induction than 200µM acetosyringone on the transformation of 'Yoshida navel orange'. The higher GUS gene expression was found in the callus having a particle bombardment treatment prior to the agrobacterium inoculation even though its vigor was low.

On the transformation with agrobacterium LAB4404 carrying pBII21 vector with carotenoid biosynthesis gene (Psy, Chx) and kanamycin resistant gene, the 0.5mm- or 1.0mm-mesh selected callus of 'Okitsu wase' inoculated with LBA4404 carrying Chx gene produced cotyledonary embryos and green-colored pro-embryos, respectively. The 0.5mm-mesh selected 'Yoshida navel orange' callus inoculated with LBA4404 carrying Psy gene also did green-colored embryo. However only nodular callus formation was found in the other transformation trials.

Carotenoid biosynthesis genes were introduced into satsuma

mandarins('Okitsu wase' and 'Miyagawa wase'), 'ponkan' and oranges('Hamlin' and 'Yoshida navel orange') using agrobacterium tumefaciens LBA4404 and EHA105 : agrobacterium EHA105 carries pCAMBIA1300 vector with carotenoid biosynthesis gene(*Ggps*, *Pds* or *Zds*) and hygromycin resistant gene, and agrobacterium LAB4404 carries pBI121 vector with carotenoid biosynthesis gene (*Psy*, *Chx*) and kanamycin resistant gene.

Besides *Chx* gene, about 502 putative transgenic orange plantlets with the other four genes were produced. 91 plantlets of 'Okitsu wase' with *Zds* or *Ggps* gene, and 'Miyagawa wase' with *Psy* gene were also regenerated. Ponkan had the plantlet with *Ggps* gene. In the putatively transgenic satsuma mandarin plantlets, the transformant of *Zds* gene was characterized with a round shaped leaf, yellowish petiole, and poor vigor while long leaf and good vigor in *Ggps* gene transformation.

Carbohydrates biosynthesis genes were introduced into satsuma mandarins('Okitsu wase'), 'ponkan' and oranges('Hamlin' and 'Yoshida navel orange') using agrobacterium tumefaciens EHA105: Agrobacterium EHA105 carries pCAMBIA1300 vector with carbohydrates biosynthesis gene(*SS*, *SPS*, *SUT*) and hygromycin resistant gene.

The putatively transgenic plants were regenerated in the 'Hamlin'(*SUT*) orange, 'Okitsu wase'(*SS* and *SUT*), and ponkan(*SS*) callus. In the transformation of *SS* gene, the regenerated embryos had a dark green color unlike in the carotenoid biosynthesis gene transformation.

In vitro grown putative transformants were transplanted into the culture container filled with steam sterilized vermiculite and first acclimatized in the culture room. one month after 1st acclimatization, the plantlets having much more lateral and hairy roots were

transplanted into the pot filled with the steam sterilized soil and second acclimatized in the culture room. Then the acclimatized plant were grown in the greenhouse.

Genomic DNA from the putatively transgenic and control plants was isolated for PCR analysis to detect the introduced genes. Presently, PCR analysis using specific primer for the introduced carotenoid biosynthesis gene Ggps amplified the expected 600bp fragment in two putative transformants of 'Hamlin' orange and in one of 'Okitsu wase'. Southern blot analysis also will be done soon.

To isolate the genes of carotenoid and carbohydrate biosynthesis, we have constructed a citrus fruit cDNA library containing titer of 2×10^6 pfu. By use of this cDNA library, we isolated cDNAs encoding phytoene synthase, beta-carotene hydroxylase, geranylgeranyl pyrophosphate synthase, phytoene desaturase, zeta-carotene desaturase, lycopene cyclase, sucrose synthase, sucrose phosphate synthase, and sugar transporter. In order to modify the contents of carotenoid and sugar in fruits, we constructed several plant transformation vector using pCAMBIA 2300 and the isolated cDNA

To clone fruit-specific promoter from *C. sinensis*, cDNA differential display has been carried out with cDNA libraries from fruits and leaves. Six clones were obtained and two of them seemed to be expressed specifically in fruit. Particularly, clone 6 appears to be homologous to late-embryogenesis protein *lea5* from sweet orange and increases its transcript levels with fruit development. The genomic clone corresponding to the clone 6 has been sequenced and about 600 bp fragment used to transformation. The Lea600=GUS construct was introduced into *Arabidopsis* and tomato plants and its activity will be assayed soon.

CONTENTS

I . INTRODUCTION	21
1. Research background	21
2. Goals and outline of the project	23
II. DEVELOPMENT OF CITRUS GENE TRANSFORMATION SYSTEM	26
1. Introduction	26
2. Research methods	27
2.1. Embryogenic callus induction of citrus	27
2.2. Improvement of embryogenesis system in citrus	27
2.3. Improvement of <i>agrobacterium</i> -mediated gene transformation system	28
2.3.1. <i>Agrobacterium</i> strain	28
2.3.2. Inoculation time	28
2.3.3. Acetosyringon(AS) concentration	28
2.3.4. Callus condition	29
2.3.5. Callus size	29
2.4. Transgenic citrus plant production	29
2.5. Acclimation of regenerated citrus plants	31
2.6. Screening of regenerated citrus plants using PCR analysis	31
3. Development of citrus regeneration system	32
3.1. Embryogenic callus induction of citrus	32
3.2. Improvement of embryogenesis system in citrus	35

4. Establishment of <i>agrobacterium</i> -mediated gene transformation system	37
4.1. Transgenic citrus plant production with GUS gene	37
4.2. Improvement of <i>Agrobacterium</i> -mediated gene transformation system	39
4.2.1. <i>Agrobacterium</i> strain	39
4.2.2. Inoculation time	40
4.2.3. Acetosyringone concentration	41
4.2.4 callus pretreatment	42
4.2.5 callus size	42
5. Transgenic citrus plant production	43
5.1. Transgenic plant with carotenoid biosynthesis gene	43
5.2. Transgenic plant with carbohydrates biosynthesis gene	43
5.3. Acclimatization and greenhouse growth	44
5.4. PCR analysis of the putative transformant	45
III. GENE CLONING OF CARBOHYDRATE AND CAROTENOID BIOSYNTHESIS	49
1. Introduction	49
2. Research methods	50
2.1. Total RNA extraction and mRNA isolation	50
2.2. Construction of citrus cDNA library	51
2.3. Design of probe	51
2.4. Isolation and sequencing of targeted genes	52
2.5. Vector construction	52
3. Isolation of carotenoid biosynthesis genes	53

4. Isolation of carbohydrate biosynthesis genes	58
5. Vector construction for citrus gene transformation	63
IV. DEVELOPMENT OF CITRUS FRUIT-SPECIFIC PROMOTER	68
1. Introduction	00
2. Proteomics	68
3. Fruit-specific gene cloning	70
4. Northern blot analysis	73
5. Genomic library screening	75
5.1. Plating, titering and plaque lifting	75
5.2. Hybridization	76
5.3. <i>In vivo</i> excision	76
5.4. Sequencing of Genomic clone and promoter analysis	78
6. Cloning of <i>Citrus TOM</i> gene	81
7. Establishment of <i>Arabidopsis</i> transformation system and transgenic plant production	86
7.1. Development of gene transformation system	86
7.2. Promotor cloning and transformation	87
8. Development of tomato gene transformation system and transgenic plant production	89
V. REFERENCES	91

목 차

제 1 장 서론	21
제 1 절 연구개발의 배경	21
제 2 절 연구개발의 내용 및 범위	23
제 2 장 감귤 형질전환 기법 개발	26
제 1 절 서언	26
제 2 절 연구개발 방법	27
1. 감귤 주요 품종의 embryogenic callus 유기	27
2. 캘러스 전처리에 의한 온주밀감 식물체 재분화율 향상	27
3. <i>Agrobacterium</i> 법을 이용한 형질전환 기술 개선	28
가. <i>Agrobacterium</i> strain	28
나. 접종시간	28
다. Acetosyringon(AS) 첨가 농도	28
라. callus 상처처리	29
마. callus 크기	29
4. 카로티노이드 및 당 생합성관련 유전자의 도입	29
5. 기내 재분화식물체 순화 및 온실 육묘	31
6. 형질전환후보개체 PCR analysis	31
제 3 절 감귤 regeneration 체계 확립	32
1. 감귤 germplasm별 plant regeneration 체계 확립	32
2. 캘러스 전처리에 의한 온주밀감의 식물체 재분화율 향상	35
제 4 절 감귤 형질전환 체계 확립	37
1. GUS 유전자를 이용한 감귤 형질전환	37

2. <i>Agrobacterium</i> 법 형질전환 기술 개선	39
가. <i>Agrobacterium</i> strain	39
나. 접종시간	40
다. Acetosyringon(AS) 첨가 농도	41
라. callus 상처처리	42
마. callus 크기	42
제 5 절 당 및 카로티노이드 생합성 관련 유전자 형질전환	43
1. 카로티노이드 생합성 관련 유전자 형질전환	43
2. 당 생합성 관련 유전자의 형질전환	44
3. 재분화 신초의 순화 및 육묘	45
4. 형질전환 후보개체 PCR analysis	46
제 3 장 감귤 당 및 기능성 물질 대사관련 유전자클로닝	49
제 1 절 서언	49
제 2 절 연구개발방법	50
1. RNA 추출 및 mRNA 분리	50
2. 감귤 cDNA library 제작	51
3. Probe 제작	51
4. 유전자(cDNA)의 분리 및 염기서열 결정	52
5. 감귤형질전환용 벡터의 제작	52
제 3 절 카로티노이드 생합성 유전자의 분리	53
제 4 절 당 합성 및 수송 관련 유전자의 분리	58
제 5 절. 감귤 형질전환용 벡터의 제작	63
제 4 장 감귤 과실효이 발현 프로모터 개발	68
제 1 절 서언	68

제 2절 Proteomics 연구	68
제 3절 cDNA subtraction에 의한 과실 특이 유전자 클로닝	70
제 4 절 Northern blot 분석	73
제 5 절 Genomic library screening	75
1. Plating, titering, plaque lifting	75
2. Hybridization	76
3. <i>In vivo</i> excision	76
4 Genomic clone의 염기서열 분석과 프로모터 분석	78
제 6 절 <i>Citrus TOM</i> 의 클로닝	81
제 7 절 <i>Arabidopsis</i> 형질전환 시스템 구축 및 유전자의 도입	86
1. 형질전환 시스템 구축	86
2. 프로모터의 클로닝과 형질전환	87
제 8 절 토마토 형질전환 시스템 구축	89
제 5 장 참고문헌	91

제 1 장 서론

제 1절 연구개발의 배경

감귤은 기후적 특성 때문에, 제주도를 중심으로 재배되어 왔으며, 우량 품종의 확보는 일본을 비롯한 외국에서 종묘를 들여와 영양번식법으로 증식하는 도입육종이 중심이었다. 그러나 최근에는 식물의 경우에도 특허 또는 지적소유권 등의 문제로 외국에서 우량 계통을 들여와 증식시키는 도입육종도 어려워지고 있다.

밀감의 경우, 품질을 결정하는 것에는 당도, 크기, 색깔 및 기능성 등 여러 가지 요소가 고려되고 있지만 무엇보다도 과일의 당도가 가장 중요한 요소이다. 그러나 현재 제주도에 생산되고 있는 주요 감귤인 온주밀감의 당도는 환경적인 요소 등으로 인하여 8-11°Bx로서 일본산 온주밀감이나 미국산 오렌지에 비해 당도가 2-3° Bx 낮은 편이다. 그래서 과일의 당도를 상승시키기 위한 수단으로 수확기에 단수처리를 하거나 근역제한 재배 등 재배적 방법을 동원하고 있으나, 이들 재배적 방법은, 매년 새로운 시설을 해야 하는 번거로움과 이에 소요되는 노동력 등을 감안한다면, 매년 300억원 이상의 경비가 소요되고 있다. 따라서 과일의 당도향상을 위하여 재배적 방법이 아닌 당도가 높은 감귤 품종의 개발과 같은 보다 근본적인 방법이 요망된다.

또한 최근 기능성 식품에 대한 관심이 높아지면서 기능성 물질 함유 여부가 품질의 주요 인자가 되고 있다. 기능성 물질 중 카로티노이드(carotenoids)는 terpenoid계의 2차대사산물로, 색소체의 틸라코이드막(Thylakoid membrane)을 구성하고 있는 지질 성분으로, 사람을 비롯한 동물에 필요한 vitamin A 및 retinol의 전구체로도 인간의 필수적인 영양소이다. 이외에도 카로티노이드는 동물과 사람에게 있어서 암억제/예방 효과는 물론, 성인성 질병에 대해 탁월한 예방 효과가 있다는 것이 최근에 알려지면서, 이들 물질에 대한 인식이 크게 변하고 있다. 이러한 이유 때문에 카로티노이드의 함량과 성분을 제어하여 생리활성이 높은 특정 카로티노이드를 다량으로 생산하려는 연구가 시도되고 있다.

한편 생화학과 분자생물학의 발전으로 인해, 당 및 카로티노이드계의

대사 경로가 미생물 및 식물에서 규명되고 있다. 그 결과, 현재 특정 식물에서 당 및 카로티노이드 생합성과정에 관여하는 주요 유전자들의 분리 및 그들의 발현 제어가 가능해졌으며, 이를 통해 경제적으로 가치가 높은 특정 카로티노이드를 생산하거나 당함량을 제어한 식물도 개발할 수 있게 되었다. 베타-카로틴의 함량을 증가시킨 Golden rice가 그 대표적인 예라고 할 수 있다.

카로티노이드는 현재 600여종 이상이 알려져 있고, 최근 들어 몇몇 카로티노이드는 그것이 갖고 있는 생리 활성 때문에 그 중요성이 강조되고 있다. 즉 β -carotene, lycopene, β -cryptoxanthin 등 몇몇 카로티노이드는 free radical에 대한 항산화성 및 다양한 암 예방 효과는 물론 면역증진 효과 등과 같은 생리활성을 나타내는 것으로 보고되었다.

카로티노이드의 이런 생리활성과 영양학적 중요성 때문에 유전자조작이나 교잡에 의해 특정 카로티노이드의 함량이 증가된 작물을 육성하려는 시도가 몇몇 연구실에서 이루어지고 있다. 그러나 국내에서는 식물의 카로티노이드 생합성에 관련된 연구와 이의 응용에 대한 연구가 선진외국에 비해 상대적으로 미미한 수준이다.

온주밀감은 지금까지 주로 돌연변이체의 선발을 통하여 육종하고 있는데 이러한 방법으로는 그 변이의 폭이 적어 다양한 형질의 개선을 기대하기 어렵다. 그러나 전통적인 육종방법인 교배 육종은 주력품종인 온주밀감이 하나의 종자에 평균 embryo 수가 20개인 다배성이어서 교배실생 육성이 곤란하고 다른 과수류와 같이 주요 유전자가 대부분 hetero 상태이어서 교배육종으로 목적형질을 선택적으로 도입하기 곤란한 상태이다. 따라서 한 품종을 육성하는데 소요되는 기간도 길어 신품종 개발에 최소 20-30년이 소요되는 어려움이 있다.

이러한 어려움을 극복하기 위해서는 기존 우량 품종에 목적유전자를 선택적으로 도입할 수 있는 형질전환과 같은 기술개발과 개발된 기술에 이용할 수 있는 다양한 유전자의 확보가 필요하다. 그러나 현재 감귤류의 형질전환은 오렌지 등에서는 어느 정도 진보가 이루어졌으나 우리나라의 주요 재배품종인 온주밀감에 대해서는 형질전환의 기초가 되는 재분화체계도 확립이 되지 않은 상태이다.

그래서 본 연구에서는 온주밀감을 비롯한 다양한 감귤류의 재분화 체계를 확립하고 확립된 재분화 체계를 이용하여 형질전환기법을 확립하고자 한다. 동시에 감귤의 고품질화에 필요한 유용유전자를 확보하고 형질전환시스템에 이용할 수 있는 감귤 과실 특이발현 프로모터를 동시에 개발하고자 한다.

제 2절 연구개발의 내용 및 범위

생명공학기법을 이용한 고품질 감귤 품종 개발을 위하여 본 연구는 1 세부과제(감귤 형질전환기법 개발), 2 협동과제(제1 협동과제: 감귤 당 및 기능성 물질 대사관련 유전자 클로닝, 제 2 협동과제: 감귤 과실 특이 발현 프로모터 개발)로 구성하여 연구를 수행하였다.

제 1 세부과제에서는 크게 감귤류의 재분화 체계 확립과 주요 품종의 형질전환 기술 개발, 당 및 기능성 물질 대사관련 유전자를 이용한 주요 품종의 형질전환을 수행하였다. 이를 위해서 다음과 같은 과정을 통하여 연구를 수행하였다.

감귤속은 품종에 따라 식물체 재분화능이 현저하게 차이가 있으므로 현재 기내 재분화체계가 확립되어 있는 오렌지를 대조로 하여 주요 품종별로 미숙조직을 배양하여 embryogenic callus를 유기, 증식하고 그 캘러스를 사용하여 재분화체계를 확립한다.

배발생 callus를 균일하게 증식하기 위해서 생장조절 물질 및 기타 조건을 검토한다.

식물체 재분화체계를 바탕으로 외래유전자의 도입을 위한 품종별 형질전환 효율을 극대화할 수 있는 적절한 조건과 형질전환방법(Agrobacterium법)을 구명한다.

형질전환체의 기내1차 선발 기준을 확립함으로써 본 연구의 효율화를 도모한다.

Agrobacterium법을 이용한 형질전환 시 영향을 미치는 Agrobacterium strain, inoculation 시간 및 온도, Acetosyringon의 첨가농도, callus 크기 등에 대하여 실험한다.

개선된 형질전환 체계를 바탕으로 기존에 클로닝 되어 있는 당합성 관련 유전자와 기능성 성분 합성 관련 유전자를 이용하여 형질전환을 시작한다.

감귤의 당합성 과 기능성 성분의 합성에 관여하는 유전자의 클로닝(제 1 협동과제)과 조직 특이 발현 프로모터를 개발(제 2 협동과제)하여 재조합된 유전자를 감귤 세포에 도입하여 형질전환된 식물체를 육성한다.

제1협동과제에서는 당 대사 및 카로티노이드 대사 관련 유전자의 클로닝을 수행하였다. 유전자클로닝을 위하여 감귤의 잎과 과육으로 cDNA library를 제작한 후 RT-PCR과 subcloning을 통하여 관련 유전자를 분리하고 제어 유전자 선발 및 유전자 발현 제어 벡터를 제작하였다.

제2협동과제에서는 감귤 과실 특이 발현 프로모터 개발을 위하여 다음과 같은 단계로 연구를 수행하였다.

proteomics 연구: 2-D 전기영동을 포함한 proteomics 연구를 통하여 과실과 잎 특이 발현 유전자를 찾아내고 이를 도구로 사용하여 프로모터를 탐색한다.

cDNA library differential screening을 통하여 과실특이 클론을 확

보한다.

확보한 과실과 잎 특이 프로모터의 분석한다.

GFP와 GUS 유전자를 이용한 형질전환용 벡터제작

제작된 형질전환용 벡터를 이용하여 애기장대와 담배의 형질전환체를 육성한다.

육성된 형질전환 식물체를 이용하여 프로모터 활성도를 분석한다.

제 2 장 감귤 형질전환 기법 개발

제 1 절 서언

온주밀감의 육종은 주로 주심배실생과 돌연변이(아조변이)의 선발에 의해 이루어져 왔다. 그러나 이들 방법은 변이의 폭이 좁아 다양한 형질을 개선할 수 있는 기회가 적다는 단점이 있으며 형질의 선택 또한 자유롭지 못하다. 선택의 폭을 넓히는 방법으로 사용할 수 있는 육종방법이 관행의 교배육종이 있으나 온주밀감도 다른 목본 과수류와 같이 주요 형질이 hetero 상태이며 유년성이 길어 원하는 품종을 육성하기 위해서는 20-30년이 걸리는 것이 현재의 육종현실이다. 더욱이 온주밀감은 교배육종에 결정적인 장애요소라 할 수 있는 다배성과 응성불임 특성을 가지고 있어 교배실생을 얻는 것 자체에 어려움이 있어 새로운 품종의 출현을 기대하기가 더욱 어렵다.

이러한 여러 가지 어려움을 극복하고 원하는 형질을 도입할 수 있는 방법이 최근 주목을 받고 있다. 분자생물학기법을 이용한 육종방법으로 유전자클로닝 등 분자생물학 기술이 급격하게 발전하여 교배육종에서 성취하기 어려운 내병, 내충성 등 소수형질 개량에 밝은 미래를 제시하고 있다. 이러한 유전자기술에 의한 신품종 육성은 목적하는 유전자가 개발되고 이를 식물조직의 계놈으로 전이시키며 이 전환된 조직 또는 세포에서 완전한 식물체를 유기시킨 후 목적하는 특성이 발현되는 개체를 선발하는 체계로 이루어진다. 그러므로 분자육종에 의한 신품종 육종기술의 실용화를 위해서는 유전자개발, 유전자전환기술(조직배양기술), 발현조절기술(프로모터 개발)이 완전하게 통합된 시스템이 필요하다.

그런데 과수의 경우 조직배양에 의한 증식 및 재분화가 어렵고 같은 과수에서도 품종 간에 반응에도 차이가 있다. 감귤 역시 종(species)에 따라 조직 및 세포배양 기술을 이용한 식물체 재분화 조건이 모두 다르다. 감귤의 조직배양은 1972년 이스라엘의 Kochba에 의해 Shamouti 오렌지의 배주를 배양하여 embryogenic callus를 유기시키고 배발생 과정을 거쳐 식물체를 얻는데 성공한 이래로 일본, 미국, 중국 등의 나라에서 감귤

속과 근연속의 품종들을 대상으로 somatic embryogenesis 체계를 확립하였다. 온주밀감의 경우 온주밀감이 주 재배품종인 일본에서 embryogenic callus 유기 및 배발생 과정을 통한 식물체 재분화 체계를 확립하고자하는 연구를 수행하였다. 그러나 일본에서도 궁천조생과 홍진조생의 배주를 절편체로하여 재분화능을 갖춘 캘러스를 유기하고 정상적인 배발생과정을 통한 식물체 재분화 체계는 확립하지 못하였다.

감귤 형질전환에 관한 연구는 미국과 스페인, 브라질을 중심으로 시작되었으며 90년대 후반부터 일본, 중국, 우리나라에서도 연구를 수행하기 시작했다. 대부분의 연구결과는 오렌지, grapefruit, lime, 금감, 탕자, swingle citrumelo와 같은 품종들의 조직(줄기, 배축)을 절편체로 하여 GUS, GFP, bar gene과 같은 reporter 유전자를 이용한 형질전환의 가능성을 검토하는 정도였다. 최근에 중국에서 ponkan의 embryogenic callus를 절편체로 한 형질전환 결과를 발표하였고, 미국에서는 원형질체를 이용한 감귤의 형질전환 기술 개발에 성공하는 등 감귤 형질전환 관련 기술 개발 및 실용화가 활발히 이루어지고 있다.

제 2 절 연구개발 방법

1. 감귤 품종의 embryogenic callus 유기

감귤속은 품종에 따라 식물체 재분화능이 현저하게 차이가 있으므로 현재 기내 재분화 체계가 확립되어 있는 오렌지를 대조로 하여 주요 품종별로 미성숙 배주, 배, 퇴화종자 등을 배양하여 품종별로 embryogenic callus를 유기, 증식하고 그 캘러스를 사용한 재분화 체계를 확립하였다.

2. 캘러스 전처리에 의한 온주밀감 식물체 재분화율 향상

배양세포에서 발생하는 체세포 배발생(somatic embryogenesis)은 보통 낮은 빈도로 일어나고, embryogenic cell 또는 세포괴에서 체세포배가 유기되었을 때 항상 발육단계가 다른 배들이 나타난다. 특히, 온주밀감의 경우 체세포배 유기가 극히 어려운 품종으로 동시에 고빈도의

embryogenesis가 일어날 수 있는 synchronous embryogenesis system을 확립하고자 하였다.

3. *Agrobacterium*법을 이용한 형질전환 기술 개선

궁천조생, 삼산온주, 구능온주 등의 온주밀감과 오렌지(길전네블오렌지, 발렌시아오렌지)의 현탁배양 캘러스를 크기별로 분리한 후 GUS유전자가 삽입되어있는 plasmid pBI121/LBA4404 agro 등을 공동배양한 후 일부 캘러스는 X-Gluc sol.으로 GUS 활성에 대한 발색반응 검정을 실시하였다.

그리고 *agrobacterium*을 이용한 형질전환에서 중요한 요인들을 검토하였다.

가. *Agrobacterium* strain

Agrobacterium strain별 형질전환 효율을 검정하기 위하여 GUS 유전자를 포함하고 있는 agro cell LBA4404 와 EHA105를 사용하여 *Agrobacterium*-mediated transformation방법으로 비교하였다. 길전네블 오렌지, 궁천조생과 홍진조생의 현탁배양 캘러스를 절편체로 하였다.

나. 접종시간

현탁배양한 후 cell size별로 캘러스를 구분하고 준비된 균주를 접종하였다. 이때 접종시간에 따른 유전자의 세포내 도입 효율을 비교하기 위해 10, 20, 30분간 접종처리하였다. 시험에 사용한 유전자는 제주대 김찬식 교수님으로부터 분양받은 카로티노이드 생합성에 관여하는 유전자 중 *Psy*(phytoene synthase)와 *Chx*(β -carotene hydroxylase)유전자를 사용하였다.

다. Acetosyringon(AS) 첨가 농도

*Agrobacterium*과의 접종시 세포내로 유전자 도입을 활성화시키는 acetosyringon(AS)의 첨가농도에 따른 형질전환 효율을 비교하여 보았다. AS 50, 100, 200 μ M의 농도로 첨가하여 형질전환을 시도한 후 AS 첨가농도별 kanamycin 내성 캘러스의 획득정도를 조사하였다.

라. callus 상처처리

세포내로의 유전자 도입을 증진시키기 위한 하나의 방법으로 세포 표면에 물리적인 상처를 주었다. 유전자 도입장치인 Biolistic PDS-1000/He(BioRad사)을 사용하여 gold입자를 microcarrier로 사용하여 현탁배양한 세포에 투사하는 방법으로 상처를 주었다. 상처를 받은 캘러스를 절편체로하여 GUS유전자를 포함하고 있는 *A. tumefaciens* LBA4404를 접종하였다.

마. 캘러스 크기

Psy, *Chx* 유전자를 포함하고 있는 LBA4404 strain을 길전 N.O.와 홍진조생 현탁배양 캘러스를 크기별(직경 0.5이하, 0.5, 1.0, 2.0mm)로 접종하여 유전자 도입 효율을 비교하여 보았다.

4. 카로티노이드 및 당 생합성관련 유전자의 도입

식물재료 : 길전 네블오렌지, 햄턴오렌지, 궁천조생, 홍진조생의 embryogenic 캘러스를 기 확립한 전처리 조건으로 현탁배양하고 세포 크기별로 분리한 후 절편체로 사용하였다.

Binary vector : 기본 vector는 pCAMBIA 1300에 각각의 유전자를 삽입하여 35S promoter와 NOS 3' terminator사이에서 이들의 조절에 의해 유전자들이 발현되도록 되어 있고 HPTII 유전자에 의해 형질전환 세포 및 식물체를 선별하도록 되어있다. 카로티노이드 합성 관련 유전자로는 *Pds*, *Zds*, *Ggps*가 삽입되었고, 당 합성 관련 유전자로는 *SS*, *SUT*, *SPS*가 삽입되었다. 이들 재조합된 vector를 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105에 삽입한 것을 접종에 사용하였다. 카로티노이드 생합성 유전자 중 *Psy* 와 *Chx* 유전자는 pBI121 vector의 T-DNA부분에 각각 *Psy* 와

Chx 유전자 및 NPTⅡ 유전자가 재조합된 vector를 *A. tumefaciens* LBA4404에 도입시킨 것을 접종에 사용하였다.

캘러스의 전처리 : 유용 유전자를 세포내로 도입하는 과정을 시도 하기 전에 실시하는 절편체의 전처리 및 유전자의 도입 과정은 다음과 같다. 증식배지에서 2주 간격으로 계대배양 하여 재분화능을 유지시킨 감귤 캘러스를 1/2MT기본배지에 500mg/ℓ malt extract , 3% maltose, 3% sucrose(1/2EMS)가 첨가된 액체배지에 100rpm의 속도로 2주 간격으로 2회 현탁배양 하였다. 4주간 현탁배양 한 후 MT기본배지에 0.1M galactose, 0.1M sorbitol이 첨가된 starvation 액체배지에서 1주간 현탁배양 한 후 시험재료로 사용하였다. 현탁배양 된 캘러스들은 직경이 0.5mm, 1.0mm인 sieve를 사용하여 세포의 크기가 동일한 캘러스만을 분별하여 *Agrobacterium* 접종에 사용하였다.

Agrobacterium 접종 : 카로티노이드 생합성관련 유전자의 도입은 *Agrobacterium*-mediated 방법을 이용하였으며, 본 실험실에서 설정한 감귤의 형질전환 적정 조건으로 각 단계별로 실시하였다.

Psy, *Chx* 유전자를 제외한 나머지 유전자들은 *Agrobacterium* 접종효율이 높은 것으로 나타난 EHA105 strain에 유전자를 도입시킨 후 감귤 세포에 접종 하였으며, 접종시간은 20~30분으로 하였다. 접종 시 100μM acetosyringone을 첨가하였고, 접종 후 MT기본 액체 배지로 세포에 둘러싸여 있는 *Agrobacterium*를 세척한 후 공동배양을 실시하였다. 공동배양은 암상태의 배양실에서 3일간 하였으며, 매일 MT기본 액체 배지로의 *Agrobacterium*을 세척하였다.

선발 및 신초 배발생 유기 : 공동배양이 끝난 캘러스는 1/2EMS배지에 0.2% gelrite가 첨가된 고체배지에 10mg/ℓ hygromycin 이 첨가된 배지에 치상한 후 3주간 배양한 뒤 증식되어져 나오는 캘러스만을 선발하여 20mg/ℓ hygromycin이 첨가된 배지에서 4주 간격으로 2회 배양하여 선발을 하고 최종적으로 40mg/ℓ hygromycin이 첨가된 배지에서 증식되는 캘러스를 선발하여 배유기 배지에 배양하여 배발생을 유도하였다. 완전한 자

엽형 배로 발육한 배는 신초 유기 배지에서 신초를 유기 시켰다.

5. 기내 재분화 식물체 순화 및 온실 육묘

재분화 된 식물체의 발근 상태는 매우 불량한 상태이다. 감귤은 작물 특성상 기내에서의 발근이 굵은 주근 한 개만이 자라나오고 측근이나 세 근의 발달이 안 되는 특성을 보인다. 따라서 이러한 특성에 의해 유식물체의 순화 후 생존율이 많이 저하되기 때문에 측근의 발달과 생존율의 향상을 위해 기내에서 바로 토양으로의 이식을 하지 않고 기내에서 vermiculite를 사용한 1차 순화단계를 거친 후 토양에 이식하여 2차 순화시킨 후 온실에서 육묘하는 방법을 시도하였다.

6. 형질전환후보개체 PCR analysis

형질전환 된 개체로부터 insert DNA의 삽입여부를 판별하기 위해 genomic DNA를 분리하였다. 선발배지를 통해 성장한 형질전환체 내에 카로티노이드 생합성 관여 유전자(*Psy*, *Chx*, *Pds*, *Ggps*, *Zds*)와 당합성 관여 유전자(*SS*, *SPS*, *SUT*)가 존재하는지 여부를 확인하기 위해 polymerase chain reaction(PCR)을 수행하였다. PCR조건은 94℃에서 5분간 변성 후 denaturation은 94℃에서 1분, annealing은 38℃에서 1분, extension은 72℃에서 2분의 조건으로 45회 수행하고 충분한 PCR산물을 얻기 위해 마지막에 72℃에서 5분간 extension을 수행하였다. 형질전환에 사용된 각 유전자의 삽입여부를 확인하기 위하여 사용한 primer의 염기서열은 표 1.과 같다.

표 1. 형질전환에 사용된 유전자의 primer 염기서열

primer 유전자	forward primer	reverse primer
carotenoid 생합성 관여 유전자		
<i>Psy</i>	CGGACTGCTGTGTTTAATTC	TGCAGCATCAAGCATATCAA
<i>Chx</i>	GCACCCAGATCGAGAGCTTTC	ACGAACATGTAGGCCATCCC
<i>Pds</i>	CTGACGTAAGGGATGACGCA	TCATAGAGTGCTCCTTCCAC
<i>Ggps</i>	"	AAGCATCTTCTACTCCATCA
<i>Zds</i>	"	TGCGCGAATCCCA'TGTAACG
당 생합성 관여 유전자		
<i>SS</i>	CTGACGTAAGGGATGACGCA	TATCGCTATATAGCCGACACC
<i>SPS</i>	"	CTTTCTGTTGACTAATCCATG
<i>SUT</i>	"	TTCCAGTCCCAACTACGAAC

제 3 절 감귤 regeneration 체계 확립

1. 감귤 germplasm별 plant regeneration 체계 확립

‘Shamouti’ sweet orange의 미성숙 배주배양에 의해 처음으로 embryogenic calli를 유기시키는데 성공(Kochba, et al., 1972)한 이래 *Citrus sinensis*, *C. aurantium*, *C. paradisi*, *C. reticulata*, *C. limon*과 *C. madurensis*와 같은 다배성 종(species)내의 많은 품종들에서 embryogenic calli 유기 및 somatic embryogenesis에 관한 연구결과들이 보고되었다. *Citrus*에서 embryogenic calli를 유기시키기에 가장 적당한 절편체는 개화 후 수 주일이 지난 어린 과실에서 채취한 미성숙배주이다. 또한 embryogenic calli는 embryo, hypocotyl, anther, endosperm, juice vesicle로부터 유기되기도 한다. 그러나 이들 절편체에서는 저빈도로 캘러스가 유기되고 안정적이지도 못하다. 온주밀감의 경우, Kunitake 등(1995)

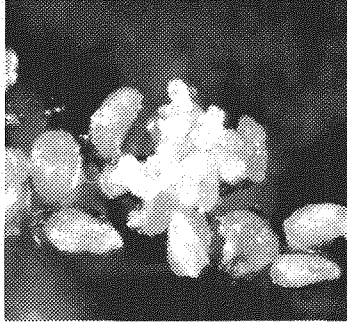
은 홍진조생의 미성숙배주를 배양하였으나 embryogenic calli를 얻지 못하였다. 그러나 본 실험실에서는 홍진조생을 비롯한 몇몇 품종의 미숙과(자방)를 생육시기별로 수확하여 자방으로부터 배주를 채취하여 embryogenic callus를 유기할 수 있었다.

감귤의 다양한 germplasm에 대하여 재분화능을 갖춘 embryogenic cell line을 확보하기 위하여 배주(ovule), 배(embryo) 그리고 퇴화종자(undeveloped seed)를 배양하여 embryogenic callus를 유기시키고, 증식 배양하였다(표2, 그림1).

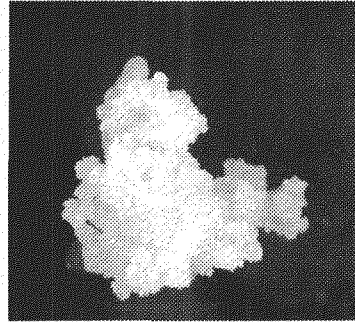
배주와 배의 배양으로 기확보하고 있었던 cell line(길전네블오렌지, 햄린오렌지, 홍진조생, 궁천조생)을 포함하여 총 9종류의 감귤 cell line을 배양하고 있으며, 신초 재분화능 유지를 위하여 2주 간격으로 캘러스를 새로운 배지로 계대배양하고 있다.

표 2. 감귤류 캘러스 유기에 사용된 배지 및 explant

품종명	배양재료	캘러스		캘러스 유기배지
		유기유무		
	배	x		-
금 감	미숙종자	○	MT + 10mg/ℓ kinetin + 7% sucrose	
병 감	배	○	MT + 10mg/ℓ kinetin + 7% sucrose	
부지화	배주	○	MT + 10mg/ℓ kinetin + 7% sucrose	
청도운주	퇴화종자	○	EME + 1.0mg/ℓ GA ₃ + 5% suc.	
	배주	x		-
십만운주	배주	○	EME+40mg/ℓ adenine +1.0mg/ℓ GA ₃ +5% suc.	
성진운주	배주	x		-
홍진조생	배주	○	1/2EME+500mg/ℓ malt extract+1550mg/ℓ glutamine	
청 건	배주	x		-

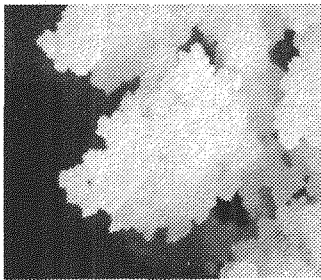


배주에서의 켈러스 유기

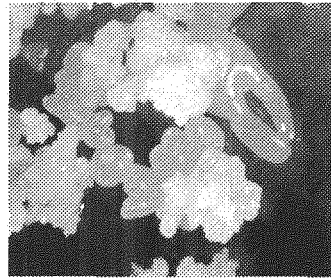


유기된 켈러스

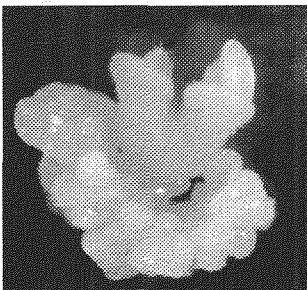
그림 1. 배주배양에 의한 켈러스 유기



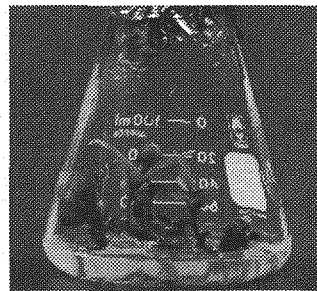
① 켈러스 증식
EME + mal./suc.



② 배유기
MT + lac.(or suc.)



③ 자엽형배유기
MT + lac.(or suc.)



④ 신초재분화
MT + suc

그림 2. 오렌지의 배유기 및 신초 재분화 과정

오렌지와 병감도 배유기 및 신초 재분화를 위한 조건을 확립하였다 (그림 2).

2. 캘러스 전처리에 의한 온주밀감의 식물체 재분화를 향상

세포 현탁배양 배지에서의 세포들은 heterogeneous한 세포들의 덩어리이다. 단세포들과 서로 다른 크기와 형태의 작고 큰 세포 덩어리들로 구성되어져 있다. 이들 배양물을 그대로 체세포 배유기 배지에 치상을 하면 globular형태의 배들이 아주 낮은 빈도로 형성되고, 항상 발육단계가 다른 배들이 나타난다. 그러므로 동시에 고빈도의 embryogenesis가 일어날 수 있는 체계를 갖추는 것이 필요하다.

고빈도의 배발생을 동시에 일어날 수 있도록 하기 위해서는 세포피의 크기와 형태적인 관점에서 그 덩어리들이 homogeneous하여야 한다 (Osuga K and Komamine A, 1994). 초기에 heterogeneous한 세포들의 덩어리를 sieving하여 크기별 같은 생육상태의 세포들을 모아 배양한 결과 배발생율이 낮은 온주밀감에서도 고빈도의 배발생을 동시에 유기시킬 수 있었다.

온주밀감 cell line 계통별로 캘러스를 크기와 무게로 선별하기 위해 고체 배지와 같은 조성의 액체 배지에 2주 간격으로 3회, MS + 0.1 M 의 galactose와 sorbitol을 함유한 액체에서 1주간 진탕배양 하였다. 그 후 직경 0.5mm와 1.0mm의 체를 사용하여 크기별로 선별하였다. 각 크기의 캘러스를 40%, 50% percoll 농도 구배를 사용하여 무게별로 선별하였다(그림 3). 각 조합의 캘러스는 MT + 0.14M lactose가 함유된 고체 배지에서 약 1 개월간 배양 하였을 때 구형의 부정배가 형성되었고, 식물체 재생배지(MT + GA₃)로 옮겨 식물체가 재생할 때까지 배양한 결과 삼산온주는 전혀 재생체가 없었으나 궁천조생 III 계통에서 선별된 1.0mm-40%의 배상체에서 63%의 식물체 재생율을 보였다(표 3, 그림 4).

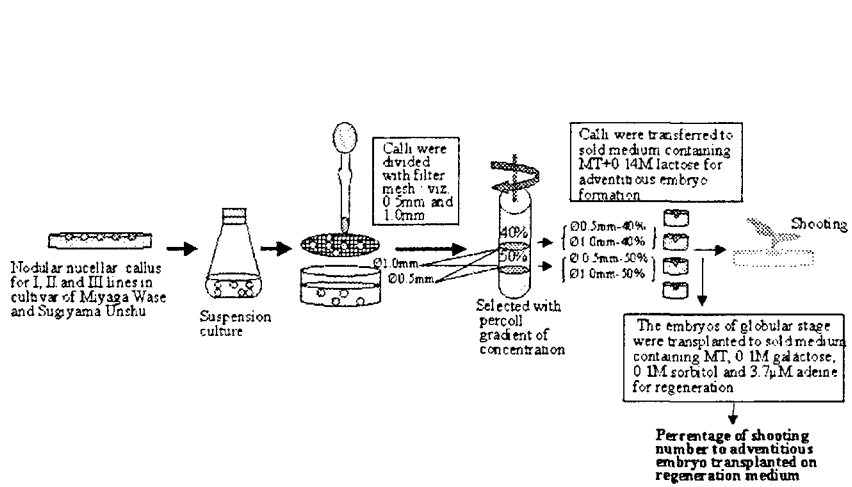


그림 3. 현탁배양 캘러스 크기와 무게별 분리 과정의 모식도

표 3. 온주밀감 캘러스의 크기 및 무게와 배유기의 관계

품 종	크기(mm)	percoll 농도(%)	유기된 배수
삼산온주	0.5	40	6.0±0.63
		50	1.6±0.41
	1.0	40	8.0±1.13
		50	6.0±1.63
궁천조생	0.5	40	2.0±0.41
		50	0.0±0.00
	1.0	40	13.3±1.13
		50	5.6±0.68

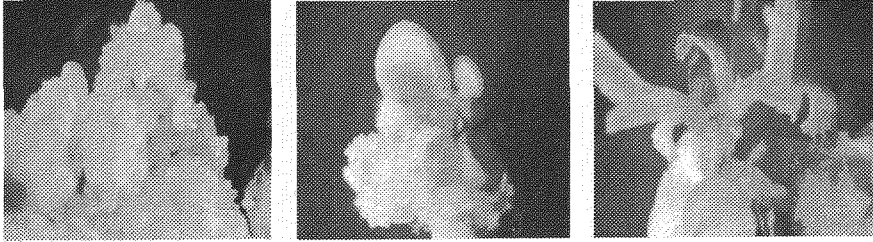


그림 4. 온주밀감 궁천조생의 배유기 및 신초 재분화 과정

삼산온주의 캘러스에서는 부정배가 형성 되었지만 식물체 재생은 전혀 되지 않았다. 이는 캘러스가 유기되어 증식, 배양되어온 기간이 오래 되어 재분화능이 저하된 것이 원인으로 생각된다. 그리고 보다 최근에 유기된 궁천조생의 캘러스에서도 계통에 따라 크기와 무게에 따른 재생율도 상이한 양상을 보였다. 이번에 선발된 캘러스III 계통은 1.0mm-40%로 선발된 경우 재생율이 상당히 높아 이 캘러스 계통을 이용하여 형질전환하면 안정된 형질전환이 가능하리라 생각 된다

제 4 절 감귤 형질전환 체계 확립

1. GUS 유전자를 이용한 감귤 형질전환

궁천조생, 삼산온주, 구능온주, 길전네블오렌지, 발렌시아오렌지의 현탁배양 캘러스를 0.5, 1.0, 2.0mm 이상의 크기로 분류한 후 reporter gene 인 GUS유전자가 삽입되어 있는 plasmid pBI121/LBA4404 *Agrobacterium*을 접종하였다.

접종한 캘러스는 공존 배양과 재균처리를 한 후 일부 캘러스는 X-Gluc solution으로 GUS 활성을 위한 발색반응 검정을 했고(그림 5), 나머지 캘러스는 카나마이신 50mg/ℓ 가 첨가된 선발배지에서 1 개월간 선발하고 다시 100mg/ℓ 카나마이신이 함유된 배지에서 2차 선발하였다.

선발된 캘러스를 MT + 0.14M lactose가 함유된 고체 배지에서 약 1

개월간 배양 후 구형의 부정배를 MT + 0.1M galactose + 0.1M sorbitol + 3.7M adenine이 첨가된 배지에 계대배양 하여 자엽형의 부정배를 유도하였다. 자엽형 부정배로부터 신초를 재분화 시키기 위해 MT + 1mg/l GA₃가 첨가된 고체 배지에 치상하였다.

표 4. 감귤 품종별 공존배양 3일 후 발현된 transient GUS gene 활성

품 종	cell line	GUS활성을 나타낸 calli수/plate ^x
궁천조생	3-1	0.00 ± 0.00 ^y
	5-1	3.67 ± 0.54
	6-1	0.00 ± 0.00
삼산온주	4-1	6.33 ± 0.61
	5-1	2.33 ± 0.43
구능온주		3.33 ± 0.48
길전네블오렌지	1-1	0.33 ± 0.23
	6-1	3.00 ± 0.52
발렌시아오렌지	3	7.00 ± 0.83
	3-1	3.33 ± 0.53

x : 웰러스 1.0ml당 positive GUS활성을 나타낸 calli 수

y : standard error(n=3)

온주밀감의 경우 같은 품종 내에서도 cell line에 따라 GUS의 활성이 다르게 나타남을 볼 수 있었다(표 4). 배유기 및 신초 재분화 처리에서는 궁천조생의 웰러스에서만 배가 유기되어 현재 자엽형의 부정배가 형성된 상태이며 신초를 재분화시켜 PCR방법으로 GUS gene 도입 여부를 확인할 예정이다.

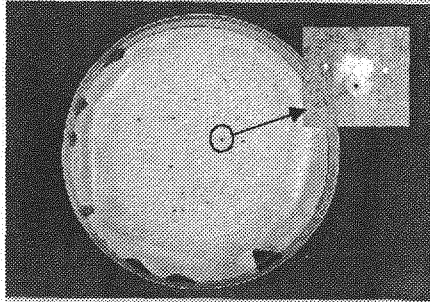


그림 5. positive GUS 활성을 나타내는 calli 상태

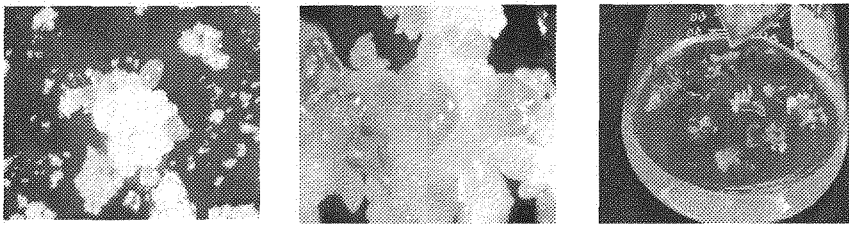


그림 6. GUS유전자 도입 후 선발된 궁천조생 켈러스의 배유기 과정

2. *Agrobacterium*법 형질전환 기술 개선

가. *Agrobacterium* strain

Bond 와 Roose(1998)는 *Agrobacterium* strain에 따라 형질전환체의 획득에 차이가 있음을 발표하였다. *Agrobacterium* strain C58C1, EHA101-5, LBA4404 등 3가지 strain별 워싱턴 네블오렌지의 형질전환체 획득을 비교해 본 결과 C58C1 strain에서 가장 높은 형질전환체 유기율을 얻었고, LBA4404 strain의 경우 형질전환체를 하나도 얻지 못하였다. 본 실험에서도 마찬가지로 GUS유전자를 가지고 있는 LBA4404와 EHA105 agro cell를 사용하여 길전네블오렌지, 궁천조생, 흥진조생 켈러

스에 접종하여 두 strain에 따른 차이를 비교한 결과 EHA105 strain으로 접종한 흥진조생의 처리구에서 녹색의 pro-embryo와 함께 자엽형의 배를 얻을 수 있었고, LBA4404 strain 처리구에서는 아직까지 embryo의 유기는 관찰되지 않고 있다.

나. 접종시간

기본적으로 감귤의 캘러스를 절편체로 한 유전자 도입 시 유전자를 포함하고 있는 *Agrobacterium*과 절편체의 배양시간(접종시간)은 15분을 사용하고 있다. 접종시간에 따라 접종시간이 짧을 경우엔 캘러스의 재분화능과 활력은 높게 유지되는 반면 형질전환효율이 극히 낮아지고, 반대로 접종시간이 길어질 경우엔 형질전환효율은 높아지는 반면 캘러스의 활력은 현저히 떨어짐을 볼 수 있다. 따라서 두 가지 요인에 있어서 최적의 결과를 얻을 수 있는 접종시간을 알아보기 위해 15분을 기준으로 해서 10분과 30분 동안 접종을 실시해 본 결과 선발마커에 대한 내성 cell line의 획득정도는 공시품종과 사용한 유전자의 종류와는 상관없이 모두 30분 처리에서 높게 나타났다(표 5).

표 5 접종시간과 km내성 cell line량의 관계

품 종	접 종 균 주	접종시간(분)		
		10	15	30
길전네블 오렌지	<i>Psy</i> /LBA4404	++	++	+++
	<i>Chx</i> /LBA4404	++	++	+++
궁천조생	<i>Psy</i> /LBA4404	++	++	+++
	<i>Chx</i> //LBA4404	++	++	+++

* 선발배지 : EME + 100mg/ℓ km + 500mg/ℓ cb + 0.8% agar

* Acetosyringon 200μM 첨가

다. Acetosyringone 첨가 농도

여러 형질전환 방법 중에서 *Agrobacterium*의 이용은 매우 안정적으로 외래 유전자를 식물체로 도입시키는 장점을 지닌다. 따라서 식물유전공학에서 운반체 *Agrobacterium*의 역할과 기능은 매우 중요한 부분을 차지하고 있으며, *Agrobacterium* 염색체내의 *chvA*, *chvB*, *pscA* coding region의 역할, Ti-plasmid내의 병원성 부위와 식물 세포의 상처 부위에서 생성되는 페놀 화합물의 상호작용에 의해 T-DNA가 식물 세포내로 전이되는 기작 등이 상당히 밝혀지고 있고, 이를 토대로 인위적으로 형질 전환율을 높일 수 있게 되었다(James et al. 1993; Pena et al. 1997). 식물 페놀성 화합 물질 중 acetosyringone은 *Agrobacterium* Ti-plasmid내의 *vir* 유전자 부위를 특이적으로 활성화시켜 T-DNA의 이탈과 T-DNA가 식물체 게놈 안으로 전이하는데 중요한 역할을 한다(Lipp Joao and Brown 1993).

따라서, 외래유전자를 효과적으로 감귤 세포내로 도입하기 위하여 효과적인 acetosyringone의 사용농도를 구명하기 위한 실험을 수행한 결과 감귤의 형질전환 시 지금까지 실험방법 상에서 사용된 200 μ M과는 달리 50과 100 μ M농도에서 km내성 cell line의 획득정도가 더 좋은 것으로 나타났다(표 6).

표 6. Acetosyringone 첨가농도와 km내성 cell line 발생량의 관계

처 리	Acetosyringone 첨가농도(μ M)			
	0	50	100	200
품 종				
길전네블오렌지	+ ^z	++	++	+

* ^z-, none; +, very poor; ++, poor; +++, good; +++++, very good

*선발배지 : EME + 100mg/ℓ km + 500mg/ℓ cb

* 접종시간 : 15분

라. 켈러스 상처처리

particle bombardment처리 방법으로 켈러스에 물리적인 상처를 가한 후 *Agrobacterium*-mediated 방법으로 접종 실시하여 그 효율을 조사해 본 결과 상처처리를 하지 않고 접종을 실시한 무처리구에 비해 처리구의 켈러스 활력은 떨어지는 경향을 보였으나 positive GUS 활성은 *Agrobacterium*단독 접종법보다 높은 경향을 보였다(그림 7).

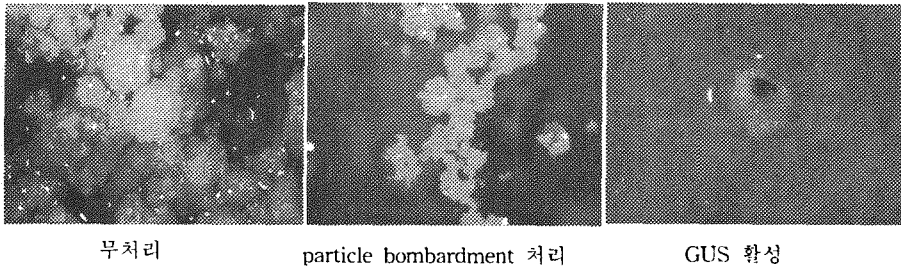


그림 7. GUS 활성에 미치는 particle bombardment에 의한 물리적인 상처의 처리효과

마. 켈러스 크기

Psy, *Chx* 유전자를 포함하고 있는 LBA4404 strain을 길전 N.O.와 홍진조생 현탁배양 켈러스를 크기별(직경 0.5이하, 0.5, 1.0, 2.0mm)로 접종하여 유전자 도입 효율을 비교하여 보았다.

홍진조생 0.5mm 크기의 켈러스에 *Chx*/LBA4404를 접종한 처리에서는 선발된 켈러스로부터 3개의 자엽형 배가 생성되어 신초 재분화배지에서 배양 중이며, 홍진조생 1.0mm 크기에 *Chx*/LBA4404를 접종한 처리에서는 녹색의 pro-embryo가 발달 중이다. 길전네블오렌지의 경우에도 0.5mm 크기의 켈러스에 *Psy*/LBA4404를 접종한 처리구에서 녹색의 embryo가 발생 중이다. 그러나 그 이외의 처리구에서는 embryogenesis 전단계라고

할 수 있는 nodular 상태의 캘러스만 관찰되고 있으며 분화도 매우 느리게 진행되고 있다. 따라서 agrobacterium법에 의한 형질전환 효율 및 배유기 과정을 거친 신초 유기를 위해서는 직경 0.5~1.0mm 크기의 캘러스를 사용하는 것이 좋을 것으로 생각된다.

제 5 절 당 및 카로티노이드 생합성 관련 유전자 형질전환

1. 카로티노이드 생합성 관련 유전자 형질전환

카로티노이드 생합성에 관여하는 유전자로 *Psy*, *Chx*, *Ggps*, *Pds*, *Zds* 5개의 유전자를 이용하였다. *Psy*, *Chx* 유전자는 pBI121 vector를 backbone으로 하고 *Agrobacterium* LBA4404 strain에 형질전환된 것을 실험에 사용하였다. kanamycin selection marker를 가지고 있는 pBI121 vector의 선발효율이 떨어지는 경향이 있어 *Ggps*, *Pds*, *Zds* 유전자는 hygromycin-resistant gene을 가지고 있는 plasmid pCAMBIA1300 vector를 기본벡터로 사용하고 EHA105 agro cell에 형질전환 시켜 감귤 세포내로의 도입을 시도하였다.

오렌지(길전 네블오렌지 및 햄린오렌지)의 캘러스에 카로티노이드 생합성 관련 유전자를 도입시켜 총 650여개의 자엽형 배를 얻었으며, 그들로부터 502개의 신초를 재분화 시켰다. 길전 네블오렌지에 *Ggps* 유전자를 도입시킨 처리에서 3개체, *Psy* 유전자를 도입시킨 처리에서 459개체, *Zds* 유전자를 도입시킨 처리에서 27개체를 얻었고, 햄린오렌지에 *Pds* 유전자를 도입시킨 처리에서 52개체, *Ggps* 유전자의 경우는 57개체를 유기 시켰다. 이들 재분화 된 신초들은 도입시킨 유전자에 따른 형태적인 차이는 나타나지 않았다.

표 7. 오렌지의 접종 후 재분화된 자엽형 배수와 형질전환 후보 개체수

유전자 \ 품종	길전네블 오렌지	햄린 오렌지	홍진 조생	궁천 조생	ponkan
<i>Zds</i> /EHA105	27	0	78	0	0
<i>Ggps</i> /EHA105	3	57	13	0	3
<i>Pds</i> /EHA105	0	52	0	0	0
<i>Psy</i> /LBA4404	459	0	0	1	0
<i>Chx</i> /LBA4404	0	0	0	0	0
총	462	40	91	1	3

온주밀감 홍진조생의 현탁배양 캘러스에 *Agrobacterium*을 이용하여 *Zds*, *Ggps*, *Pds* 유전자를 도입시킨 후 총 340여개의 완전한 자엽형 배를 유기시켰다. 이어서 자엽형 배중 *Zds*유전자를 도입시킨 처리에서 78개체, *Ggps* 도입처리에서 13개체의 신초가 재분화 되었다. 그러나 *Pds* 도입처리에서는 75개의 자엽형 배가 유기되었으나 신초는 재분화 되지 않았다. 궁천조생의 경우, *Psy* 유전자 도입 처리에서만 1개체를 유기시킬 수 있었다. 그 외에 ponkan의 캘러스에서도 *Ggps* 유전자를 도입시킨 처리에서 3개체를 얻을 수 있었다(표 7).

한편 오렌지의 경우 *agrobacterium*을 접종시켜 재분화 된 형질전환후보 개체들의 형태적인 차이는 없었으나 온주밀감의 경우에는 *Zds* 도입처리에서 재분화 된 형질전환 후보개체들이 다른 처리에서 재분화 된 개체들과 형태적인 차이를 나타냈다. 엽의 형태가 원형에 가깝고 크기가 커지지 않고 줄기와 엽병 부근이 황화 되고 생육이 억제되었다. 반면, *Ggps* 도입 후 재분화 된 개체는 엽이 길고 가는 특징을 보였다. 이들 중 일부 개체들은 순화 용도에 옮겨 간이 순화상태 중에 있다.

2. 당 생합성 관련 유전자의 형질전환

햄린오렌지 캘러스에 SUT유전자를 도입시킨 처리에서 21개체, 홍진

조생 캘러스에 SS 유전자 도입 처리에서 42개체, SUT 유전자도입 처리에서는 1개체의 형질전환 후보개체를 획득했다. SPS 유전자 도입을 위한 처리에서는 재분화 신초를 얻을 수 없었다. 그 이외에 ponkan을 절편체로 하여 SS유전자를 도입시킨 처리에서 32개체의 형질전환후보개체를 유기시킬 수 있었다(표 8).

SS 유전자를 도입시킨 후 선발된 캘러스로부터 재분화된 배(embryo)는 카로티노이드 합성관련 유전자의 도입 후 재분화된 배들과는 달리 자엽형 배까지 모든 단계의 배들의 색깔이 아주 진한 녹색을 띠는 특징을 나타냈으나, 재분화된 신초에서는 차이점을 볼 수 없었다.

표 8. 홍진조생의 접종 후 재분화된 형질전환 후보 개체수

품 종 유전자 명	길전네블오렌지	햄린오렌지	홍진조생	ponkan
SS/EHA105	0	0	42	32
SUT/EHA105	0	21	1	0
SPS/EHA105	0	0	0	0
총	0	21	43	32

3. 재분화 신초의 순화 및 육묘

조직배양을 통해 재분화 된 유식물체는 순화단계에서 고사되는 경우가 많다. 기내에서 형성된 뿌리는 순화과정 중에 유식물체의 생장에 중요한 역할을 담당하고 있으나 이식작업 도중에 뿌리를 꺼내고 미생물 증식방지를 위해 한천을 씻는 동안 뿌리에 많은 손상을 입게 되어 순화율이 낮아진다(Kunneman and Albers 1992). 더욱이 감귤은 굵은 주근 하나만 발생하고 측근과 세근이 전혀 발생하지 않는 종류로 기내에서 바로 토양에 이식할 경우 생존율이 급격히 떨어진다. 따라서 세근의 발달을 유도하여 이식 후 생존율을 높일 수 있는 방법이 필요하다. 본 연구에서는 온실 내 순화과정 전에 고압멸균한 vermiculite를 용토로 사용하여 기내 배양용기에 유식물체를 이식하여 1차 순화과정을 더 거쳤다(그림 8). 기내 한

천배지에서 생육중인 유식물체를 소독된 vermiculite에 옮겨 심고 배양실 내에서 1달 정도 더 생육을 시킨 결과 측근 및 세근이 생성되어 나오는 것을 관찰할 수 있었으며, 기내에서 1차로 순화되어 측근 및 세근이 발생된 개체들은 토양에 이식하여 2차 순화과정을 거쳐 격리온실에서 육묘하였다(그림 9).

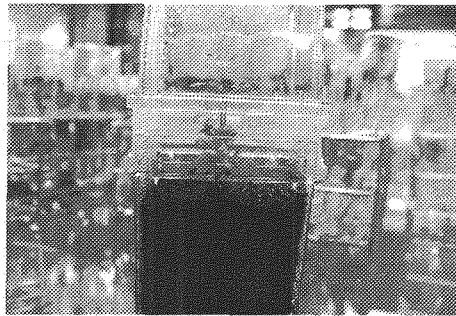


그림 8. 기내에서 vermiculite 용토에 간이 순화하고 있는 유식물

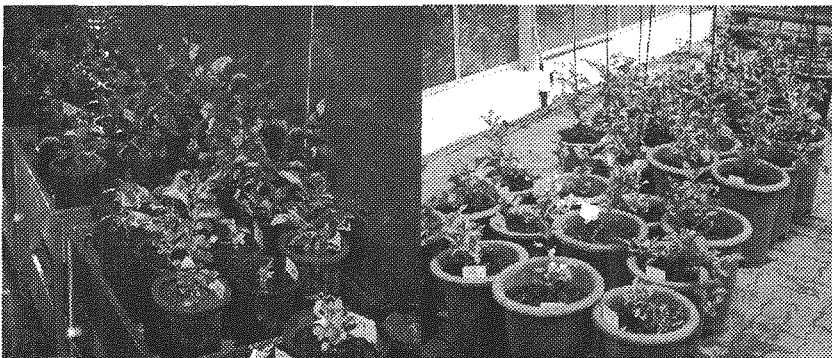


그림 9. 재분화 된 신초의 순화실(좌) 및 온실 육묘(우) 과정

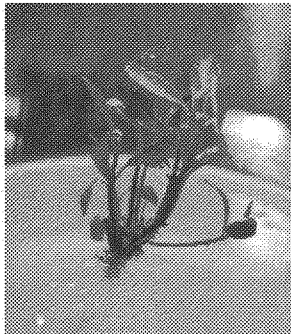
4. 형질전환 후보개체 PCR analysis

형질전환 된 개체의 genomic DNA내에 삽입된 카로티노이드 생합성 관여 유전자(*Psy*, *Chx*, *Pds*, *Ggps*, *Zds*)와 당합성 관여 유전자(*SS*, *SPS*, *SUT*)를 확인하기 위하여 각 유전자의 특이적 primer를 사용하여

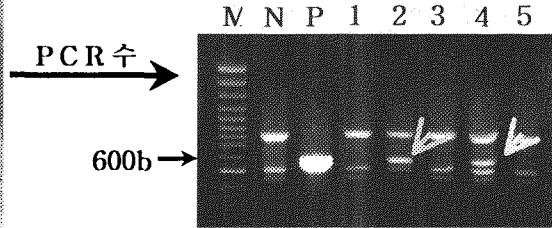
PCR을 수행하였다. 카로티노이드 생합성 관여 유전자로 형질전환한 후 재분화 된 길전네블오렌지 462 개체, 햐린오렌지 40개체, 홍진조생 91개체, 궁천조생 1개체, ponkan 3개체와 당 생합성 관여 유전자로 형질전환한 후 재분화 된 햐린오렌지 21개체, 홍진조생 43개체에 대하여 유전자 도입여부를 확인하였다. 형질전환하지 않은 켈러스의 genomic DNA를 negative control로하고 유전자가 삽입되어있는 plasmid DNA를 positive control로 사용하였다.

그 결과 햐린오렌지에 *Ggps*/EHA105를 접종시킨 처리에서 재분화된 2개체에서 600bp의 DNA 단편이 증폭되었으며(그림 10), 온주밀감의 경우 홍진조생에 *Ggps*/EHA105를 접종시킨 처리에서 재분화된 1개체에서 600bp의 DNA 단편이 증폭되었다(그림 11). 그러나 이들 개체가 아직 기내 배양중이며 southern blot 분석을 하기에는 아직 너무 어려서 micrografting을 시켜 생육을 촉진시킨 후 southern 분석을 진행할 계획이다.

또한 아직 기내배양중인 ponkan에 *SS*/EHA105를 접종시켜 재분화 된 32개체도 genomic DNA를 분리할 수 있을 정도로 유식물체가 생육한 후 PCR를 수행하여 유전자의 삽입여부를 확인할 계획이다.

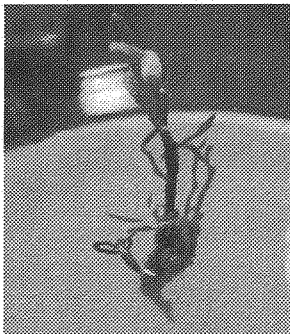


Ggps 도입후 재분
화된 햄린오렌지

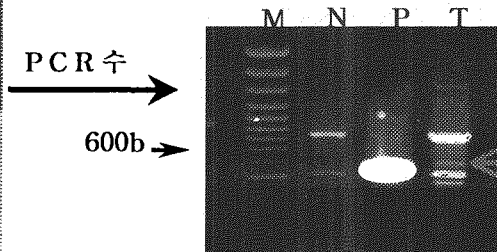


PCR analysis of 600-bp *Ggps* gene in *C. sinensis*. Lanes: *M* 100bp marker, *N* untransformed control, *P* plasmid DNA with *Ggps*, 1-5 independent transgenic plants.

그림 10. *Ggps*/EHA105 접종 후 재분화 된 햄린오렌지 식물체와 PCR 분석 결과



Ggps 도입후 재분
화된 홍진조생



PCR analysis of 600-bp *Ggps* gene. Lanes: *M* 100bp marker, *N* untransformed control, *P* plasmid DNA with *Ggps*, *T* independent transgenic plants.

그림 11. *Ggps*/EHA105 접종 후 재분화 된 홍진조생 식물체와 PCR 분석 결과

제 3 장 감귤 당 및 기능성 물질 대사관련 유전자클로닝

제 1 절 서언

최근에 생화학과 분자생물학을 식물조직배양기술에 접목시켜, 저장성이 강화된 토마토 (ethylene 대사제어)가 개발되어 시판되고 있으며, AGPase 및 invertase의 발현제어(당대사 제어)를 통한 고당도의 감자 및 토마토 생산 등이 보고되어 있으나 아직 일반화된 기술수준에 이르지 못하고 있다. 국내에서도 많은 대학과 연구소에서 외래유전자 도입에 의한 신기능성 작물의 개발에 대한 연구가 왕성하게 이루어지고 있으며, 그 결과 체초제 내성 식물과 Bt 유전자를 이용한 내충성 식물(Rhim and Kim, 1992) 및 항바이러스성 식물 등에 대한 연구가 세계적 수준에 이르고 있다.

유전자전환 기술을 이용한 신품종 육성을 위해서는 목적 유전자의 개발이 필수적이어서 유전자 전환기술과 유용유전자 개발은 불가분의 관계에 있다. 그런데 과수류에서는 사과, 오렌지, 포도 등에서 형질전환기술이 상당한 수준에 도달해 있음에도 불구하고 유용유전자의 개발 및 연구는 매우 부족한 실정이다. 이는 세대기간이 길고 수관점유면적이 커서 유전 연구 및 기초생리연구가 용이하지 않은 것이 그 원인이다.

최근에 카로티노이드의 약리/생리활성과 영양소로서의 필요성 때문에, 미생물(예; *E. coli*)을 이용한 특정 카로티노이드의 대량 생산 체계의 개발과, 유전자조작이나 교배육종을 통한 특정 카로티노이드의 함량이 증가/변화된 작물을 육성하려는 시도가 몇몇 연구실에서 이루어지고 있다. 이를 위해 많은 미생물에서 유전자의 분리가 이루어졌고, *Rhodobacter*와 *Erwinia*, *Mycobacter* 등의 몇몇 미생물에서는 카로티노이드 생합성 유전자 전체 pool이 클로닝 되었다. 이들 유전자들을 이용 특정 카로티노이드를 생산하는 체계가 대장균에서 잘 갖추어져 있다. 제주대 연구실에서도

카로티노이드계 생합성과 관련된 선행 연구로서 감귤과 감귤의 카로티노이드 성분과 함량을 분석하였으며, phytoene synthase(GeneBank accession No. AF220218)와 β -carotene hydroxylase(GeneBank accession No. AF296158)를 암호화하는 유전자를 감귤로부터 분리하여 GeneBank에 등록해 놓은 상태이다.

과수에서 당 증진과 관련된 유전자연구는 주로 사과를 중심으로 이루어지고 있다. 과실의 당 증진과 관련하여 sorbitol dehydrogenase, sorbitol-6-phosphate dehydrogenase, AGPase 등이 연구되고 있다. 감귤에서도 최근 Sucrose-6-phosphate 유전자에 대한 연구보고도 있었다. 제주대 연구실에서도 당도 제어와 관련된 연구로서 한국과학기술원의 연구팀과 당합성 관련 유전자의 하나인 ADP-glucose pyrophosphorylase를 이용한 고당도 참외 및 토마토를 개발한 바 있다.

제 2절 연구개발방법

본 연구에서는 당도가 증가되고 암예방 등의 생리활성이 보고되어 있는 특정 카로티노이드(β -cryptoxanthin과 lycopene)의 함량이 증가된 감귤을 개발하기 위한 유전자원을 확보하는 연구를 수행하고자 하였다. 이를 위해 카로티노이드 생합성 및 당합성과 수송에 관여하는 주요 유전자들을 감귤로부터 분리하여 확보하고자 하였다.

1. RNA 추출 및 mRNA 분리

Clontech의 Extract-A-Plant™ Kit의 방법을 변형시킨 hot-phenol method로 RNA를 분리하였다. 감귤을 채취하여 -70°C에 저장해두었다가 재료로 사용하였다. 즉, 두 개의 250mL centrifuge bottle에 Tris-HCl buffer로 equilibration된 phenol(pH 5.2)과 extraction buffer를 50mL 씩 넣어 섞고 80°C로 데워 놓았다. 그리고 저장해둔 감귤과육 40g을 취하여 액체 질소를 부어 가며 막자와 막자사발로 갈아 powder 상태로 만들고,

미리 데워 놓은 phenol과 extraction buffer가 들어있는 bottle에, bottle 당 20g씩 빠르게 옮겼다. 30초간 vortexing 하여 섞어준 다음, 같은 부피의 chloroform:isoamyl alcohol (24:1)을 넣고, 다시 30초간 vortexing 하였다. 4°C, 10,000×g에서 30분간 원심분리한 후, 상층액을 조심스럽게 분리하여 새 bottle로 옮기고, 1.1배 부피의 4M LiCl를 첨가하여 섞어준 다음, -70°C에서 한 시간 넣어두었다. 다시 4°C, 10,000×g에서 30분간 원심분리하여 RNA를 침전시키고 70% ethanol로 한 번 washing해서, 진공에서 잘 말린 다음 500ul의 DDW에 녹였다. TBE(0.09M Tris-Borate, 1mM EDTA) buffer로 만든 1.0% agarose로 전기영동하거나 spectrophotometer로 260nm에서 absorbance를 측정하여 정량하였다.

Total RNA로부터 Promega의 PolyATtract^k mRNA isolation system III kit을 이용하여 mRNA를 분리하였다.

2. 감귤 cDNA library 제작

Stratagene의 ZAP-cDNA^k synthesis kit와 ZA-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit를 이용하여 cDNA library를 제작하였다. First strand cDNA 합성은 위에서 분리한 5ug의 mRNA를 template로 하여, reverse transcriptase(100U/μl)을 첨가하고 37°C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 이렇게 만들어진 first strand cDNA에 RNase H(1.0U/μl), DNA polymerase I (5.6 U/μl), dNTP를 첨가하여 16°C에서 2.5hr 동안 second strand cDNA를 합성하였다. 그리고 이 cDNA에 blunting dNTP, pfu DNA polymerase를 첨가하고 72°C에서 30min. 반응시켜 blunted cDNA termini를 제작한 후, *EcoR* I adaptor를 ligation하고, T4 polynucleotide kinase(10U/μl)로 *EcoR* I adapter ends를 kination시켰다. 이 cDNA를 *Xho* I (4U/μl)로 절단한 후, column work을 통한 size fractionation에 의해 500bp 이상의 cDNA만을 분리하였다. 이틀동안 cDNA를 Uni-Zap XR vector에 연결한 후, Gigapack III Gold packaging extract를 사용하여 packaging시켜 cDNA library를 제작하였다. 안정적으로 library를 유지하기 위해 증폭과정을 거쳐 -70°C에 보관하였다.

3. Probe 제작

Promega의 Prime-a-Gene system을 사용하여 [α - 32 P]로 label 된 probe를 제작하였다. dCTP와 dDTP(dATP, dGTP, dTTP의 mix)를 nucleotide로 사용하였으며, Klenow fragment를 polymerase로 사용하여 probe를 합성하였다. 각 유전자의 subcloned DNA fragment를 다시 제한 효소로 이중 절단하고 elution 해서 그 중 25 μ g를 100°C에서 2분 가열하여 denaturation 시켰다. 여기에 labeling 5 \times buffer, mixture of unlabeled dDTP, acetylated BSA, [α - 32 P]dCTP를 첨가하고 Klenow enzyme으로 room temperature에서 1hr 동안 반응시켰다. 반응 후 100°C에서 2분 가열해 denaturation 시킨 다음 바로 얼음에 옮겨 두었다가 EDTA를 final 1mM 농도로 첨가하여 probe로 사용하였다.

4. 유전자(cDNA)의 분리 및 염기서열 결정

제작한 감귤 cDNA library로부터 각 유전자의 cDNA를 분리하기 위해 앞에서 만든 Probe를 사용하여 통상적인 방법으로 first screening과 second screening을 통해 각 유전자 클론을 갖는 plaque를 선별하였다. Stratagene의 ZAP-cDNA[®] kit에서 제공하는 방법대로 *in vivo* excision에 의해 선별된 plaque에서 plasmid 형태로 DNA를 분리하였다.

T3 univereal primer와 T7 univereal primer, 연속적인 oligomer의 합성을 통해 각 유전자의 전체 염기서열을 결정하였다. 이들의 서열을 GeneBank에 보고되어 있는 서열들과의 상동성 비교를 통해 ORF, 5'-UTR, 3'-UTR, 전사개시부위 등을 결정하였다.

5. 감귤형질전환용 벡터의 제작

항생제 내성 마커로서 kanamycin-resistant gene(NPTII)를 가지고 있는 pBI121을 기본 벡터의 backbone으로 사용하여, CaMV 35S promoter와 Nos terminator 사이에 sense 방향으로 감귤에서 분리한 phytoene synthase(Psy)와 β -carotene hydroxylase(Chx) 유전자를 sense 방향으로 삽입하여 카로티노이드 성분을 제어하기 위한 식물형질전환용 벡터를 제작하였다. 또한 감귤형질전환체의 유도효율이 kanamycin에 비해 높다고 알려진 hygromycin을 이용하기 위해 hydromycin 내성마커(hptII)를 가진

백터를 제작하기 위해 pCAMBIA-1300을 기본 백터로 사용하여 MCS사이트에 카로티노이드 생합성 유전자 및 당대사 관련 유전자를 sense(Ggps, Pds, Zds, SPS, SUT) 또는 antisense(SS) 방향으로 35S promoter와 Nos terminator 사이에 연결하여 삽입하였다. 제작된 백터는 대장균(*E. coli*)에서 증폭한 후, 추출하여 Freeze-thaw 방법에 의해 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 도입하였다.

위의 구체적인 분자생물학적인 실험 방법은 통상적인 방법(Sambrook 등, 1996, Molecular Cloning)에 따라 이루어졌으며, 실험실 환경에 맞게 수정하여 수행하였다.

제 3 절 카로티노이드 생합성 유전자의 분리

1차년도 연구를 통해 확보한 카로티노이드 생합성 관련 유전자인 Ggps(그림 1), Pds(그림 2), Zds(그림 3), Lcy(그림 4) 유전자의 염기서열을 결정하였다.

1 GCTCTGCTGAGTTCAGATGACTAACTAGTAATCTAAAATCATTITTTATTGCTTTCAAACGCGAAATTAAT
73 TCAACTTAATTTTGGTTTCACTGTTGTCAITGTTGGTCTTCAGTTTGATAAATAAAAAGGTTAAAAA
145 AAAAAGATGAGCCTTTGCTTCAGCGTTTCTGAAAGTCTTCAACTGCCGATATGGTTTCCGAGATAGTGAA
M S L C F S V S E S A F N L R Y G F R D S E
217 CCGATGGGTGAGAGCCTGAAAATTCGAGTTAAAACGGGGACAAGGAAGGGTTCTGTCTTCGAAAGTGGTT
P M G Q S L K I R V K T G T R K K G F C P S K V V
289 TGTGTGACTACCCAAGACCAGATATGATAATACATCTAATTTCTTGGAAAGTCTTACTTGTCTTCGTCA
C V D Y P R P D I D N T S N F L E A A Y L S S S
361 TTTGCTACTTCTCCTCGCTTCTAAGCCGTTGAAAGTTGTAATTTGCTGGTGCAGGTTGGCTGGTTATCA
F R T S P R P S K P L K V V I A G A G L A G L S
433 ACTGCAAAATATTTGGCAGATGCAGGCCACAAGCCTTGTACTGGAAGCAAGAGATGTTCTAGTGGAAAAG
T A K Y L A D A G H K P L L L L E A R D V L G G K
505 GTAGTGCCTGGAAAAGATGGGGACGGGAACCTGGTATGAGACAGGCCCTCATATTTTCTCGGGCTTACCCA
V A A W K D G D G N W Y E T G L H I F F G G A Y P
577 AATATACAGAACCCTGTTGGAGAACTGGTATTAATGATCGGTTGCAGTGGAAAGGAGCACTCATATTTTT
N I Q N L F G E L G I N D R L Q W K E H S M I F
649 GCAATGGCAAAACAGCCCGGAGAATTCAGCCGATTTGATTTTCTGAAAGTCTTCCGGCTCCGCTAAATGGG
A M P N K P G E F S R F D F P E V L P A P L N G
721 ATATTGGCCATTTTAAAGGAATAATGAAATGCTGACTTGGCCGGAGAAAGTGAAGTTTGAATTTGGACTGCTT
I L A I L R N N E M L T W P E K V K F A I G L L
793 CCAGCAATAATTTGGCCGACAGGCATATGTTGAAGCTCAAGATGGTTAACTGTCAGGAGTGGATGAGAAAAG
P A I I G G Q A Y V E A Q D G L T V Q E W M R K
865 CAGGGTGTACTGATCGAGTGCAGCAGAGGTTTATTGCCATGTCAAAGGCACTAAACTCATAAACCCCT
Q G V P D R V T T E V F I A M S K A L N F I N P
937 GATGAAGTGTCAATGCAATGTATATTGATTGCCCTTAAACCGATTTCTTCAGGAGAAGCATGGTTCGAAGATG
D E L S M Q C I L I A L N R F L Q E K H G S K M
1009 GCATTCCTAGATGGCAACCCCGAGAGACTTTGCTTGCCTATTGTTGAACACATTCAGTCACTGGGTGGT
A F L D G N P P E R L C L P I V E H I Q S L G G
1081 GAAGTCCGGCTTAAATCCCGAGTTCAGAAAATTGAGCTCAATGATGATGGAAGTGTGAAGAAATTTTTACTA
E V R L N S R V Q K I E L N D D G T V K N F L L
1153 ACTAATGGCAATGTGATTGACGGAGATGCTTATGATTTGCCACACCTGTTGATATCCTCAAGCTTCAGTTA
T N G N V I D G D A Y V F A T P V D I L K L Q L
1225 CCTGAAAACCTGGAAAAGAGATGGCATACTTCAAGAGATTAGAGAAAATTGGTGGGAGTCCAGTCATCAACATC
P E N W K E M A Y F K R L E K L V G V P V I N I
1297 CACATATGGTTTGCAGGAAATGAAAACACTTATGATCACCTACTCTTTAGCAGAAGTTCCTTCTAAGT
H I W F D R K L K N T Y D H L L F S R S S L L S
1369 GTGTATGCCGACATGCTTTAACTTGTAAAGGATTACAAACCCCAATCAATCCATGCTGGAGTTAGTTTTT
V Y A D M S L T C K E Y Y N P N Q S M L E L V F
1441 GCCCCGCTGAAGAGTGGATCTCATGSCAGTACTCAGAAATCATTGATGCTACAATGAAGGAGCTTGCAAAA
A P A E E W I S C S D S E I I D A T M K E L A K
1513 CTATTTCTGATGAAAATTTCTGCTGATCAGAGCAAAGCAAGATTTGTAAGTACCATGCTCAAAACGCCA
L F P D E I S A D Q S K A K I V K Y H V V K T P
1585 AGGTGTGATATAAAACCATCCCAAAATTTGAACTTGGCGTCCCTTCAAAGGTCTCCTGTAGAAGGGTTT
R S V Y K T I P N C E P C R P L Q R S P V E G F
1657 TATTTAGCCGGGATTACACAAAACAGAAGTATTTGGCTTCAATGGAAGGTGCTGTTTTGTGAGGAGGCTT
Y L A G D Y T K Q K Y L A S M E G A V L S G K L
1729 TGTGCACAAGCAATGTACAGGACTATGTGCTGCTTGCTGCACGGGGAAAGGGAGATTGGCTGAGGCAAGC
C A Q C A I V Q D Y V L L A A R G K G R L A E A S
1801 ATGTGTCCATAAGCTGGAGGCAAGGTTTATAATTTGGAGCTTGAATGTCAAAGGTAATTTAAACAATATAG
M C P
1873 ATATGATTTGTCAACTCGATTAAAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

그림 2. 감귤 cDNA library로부터 분리한 Pds 유전자의 염기서열

1 CTTTGTGATATCAAAGAAAATACTTTGTTATCGAAACAAAAGAGAGCAGAGCTGGGCTGAGCTGAATTGAGTCCGATTGAATTTCTT
91 GATTTTCAGCTCGGGATTTCAATATGGGTTCTTCAGTCTCTGTTCTCGCAACTTCAGTCACTGGTGTAGTTGGTCTCGGGTTCAAGAGA
M G S S V L F P A T S V T G V S W S R V Q E K
181 AGTGTGCAAGATTCTGTGTACGGGCTCTTTGGACGCTAATGTTTCTGATATGAGTGTTAATGCACCCAGGGTTGTTCCACCAGAAC
C R R F C V R A S L D A N V S D M S V N A P Q G L F P P E P
271 CAGAACATTATAGAGGACCAAAGCTGAAAAGTGGCTATTATTGGAGCTGGGCTTGGGGCATGTCAACGGCAGTGAATTTGTGGATCAAG
E H Y R G P K L K V A I I G A G L A G M S T A V E L L D Q G
361 GCCACGAGGTGGATATATAGTCAAGGCTTTTATTGGTGGTAAAGTGGGTTCAATTTGCGATAAACGTGAAAACCATATTGAAATGG
H E V D I Y E S R S F I G G K V G S F V D K R G N H I E M G
451 GCCTGCACGTTTCTTTGGATGCTACAATAATCTGTTCCGATTGATGAAAAGGTGGGCGGACAAAAAATTTACTGTGAAGGATCATA
L H V F F G C Y N N L F R L M K K V G A D K N L L V K D H T
541 CTCATACATTTGAAATCAGGGTGGTGAATGGTGAAGTGGTTCGAGTTCCCAATTGGAGCTCCGATGGGATCGCGCATTTT
H T F V N Q G G E I G E L D F R F P I G A P L H G I R A F L
631 TGTGCAAAATCAGCTTATGATAAAGCAAGAAATGCTCTTCTGCTGCTGAGTCTGTGTAAGGCAGTGTGTGATCCTG
S T N Q L K T Y D K A R N A L A L A L S P V V K A L V D P D
721 ATGGAGCCTTGAAAGACATCGAGATTGGATAGTATAAGCTTCTCTGATGGTITTTGTCAGGGTGGTACACAGAGCATTTCAAA
G A L K D I R D L D S I S F S D W F L S K G G T Q C T S I Q R
811 GAATGTGGGATCTGTTCCTATGCCCCITGGGTTATTGATTGTGATAACATCAGTCTGTTGTATGCTTACTATATTGCAGTGTG
M W D P V A Y A L G F I D C D N I S A R C M L T I F A L F A
901 CGACTAAGACTGAGCAAGGTTGCGGATGCTCAGGGTTCAGAGTGTITATTGAGTGGGCCCCAAGAAAATATATCACAGATA
T K T E A S L L R M L K G S P D V Y L S G P I R K Y I T D K
991 AAGGGGAGGTTCCATCTTAGTGGGGATCGAGAGATACTTTATGATAAAGCTGCTAATGCGGAAACATATGTCAAAAGGACTTGCCA
G G R F H L R W G C R E I L Y D K A A N A E T Y V K G L A M
1081 TGTCTAAGCCACTGACAAGAAGTGTGCAAGCTGATGATATGTTGCAGCATGTGATGCCCTGGAATTAAGAAATATATCACAGATA
S K A T D K K V V Q A D A Y V A A C D V P G I K R L L P S S
1171 CATGGAGGAAATGAAATTTTCAACAATATTATGCGCTAGTGGAGTTCCTGTTGTCACAGTGCAGCTTAGATAACAATGGTGGGTTA
W R E M K F F N N I Y A L V G V P V V T V Q L R Y N G W V T
1261 CTGAGTTGCAAGACCTAGAACGGTCAAGGCAATTGAGGCGAGCTCTGGGTTAGATAAACCTTTGTATACTCCAGATGCGAATTTCTCTT
E L Q D L E R S R Q L R R A L G L D N L L Y T P D A D F S C
1351 GCTTTGAGACTAGCAGTCACTTACCAGAAAGACTACTACAGAGAAGGGCAAGGTTCAATTAAGTGTGTTTACGCTGGCGATC
F A D L A L T S P E D Y Y R E G Q G S L L Q C V L T P G D P
1441 CITACATGCCCTTACCAAAATGATAAATCATAAAGGAGTGGCAAGCAGGTTTAGCTCTATTTCCATCATCCCAAGGTTTAGAAGTTA
Y M P L P N D E I I R R V A K Q V L A L F P S S Q G L E V I
1531 TTTGGTCTGTTGTCAAATCGGGCAATCTTTGACCGTAGGGACCTGGTAAAGACCCCTCAGACCTGATCAAAAAGACCTGTGA
W S S V V K I G Q S L Y R E G P G K D P F R P D Q K T P V K
1621 AGAATCTTCTTCTGCTGGCTATATACAAAACAGGATTACATAGATAGTATGGAAGGAGCAACTTTGTCTGGTAGACAAGCCCTCAGCCT
N F F L A G S Y T K Q D Y I D S M E G A T L S G R Q A S A Y
1711 ACATATGCAATGCCGGGAAGAATTAGTAGCACTGAGGAAGCAGCTTGCTGCCTTGAATCTCAAGAACAAATGGAAGCTCCAAGTACTA
I C N A G E E L V A L R K Q L A A F E S Q E Q M E A P T T T
1801 CTAACGATGAACCTAGTCTGTGTGATCACAATCTGTTTAGGCGCAGCGGAGGAGTAAAGTTTTCCACATCTAAAGCCCTTCACTT
N D E L S L V *
1891 TTTCAAGGATTACATTGATAGTATGGGATGAGCAATTTGCTGCCTTAATTTGAATCTCAAGAACAAATGGAATCCAGCTTTTACTGATG
1981 AGATGATGAGCTGGAGTAAGGGTTTTCCAATACCTATGTAATTTCAATGAGATAGCCAATTTTCATAAAAATTCATTATTAAGTT

그림 3. 감귤 cDNA library로부터 분리한 Zds 유전자의 염기서열

1 CAAGCTTCATCTTTACCAAAATATCCGTAAGCAACTTCTGGGCTGAAAAATGCTCCCATTTCTCTCTCTCG
73 CTTAATGTAAGTCATCACATCTCTCTTTGCAATAGATTGAACAATTATCCCTGAATTGACTCTCTCTGTTT
145 ATAACCTCAACAAGACCCATATTCATATTTGTAATTTCAAGGAGTCACGGATAACCCCTTAGGAAAAGCCATGG
M
217 ATACTGTACTCAAACTCATAACAAGCTTGAATTCTTGCCCAAGTTCACGGGGCTTTGGAAAAATCCAGTA
DTV L K T H N K L E F L P Q V H G A L E K S S
289 GTTTAAGCTCATTGAAGATTGAGAACCAGGAGCTTAGGTTTGGTCTCAAGAAGTCTCGTCAAAAGAGGAATA
S L S S L K I Q N Q E L R F G L K K S R Q K R N
361 TGAGTTGTTTCATTAAGGCTAGTAGTAGTGCTCTTTTGGAGCTAGTTCCTGAAACCAAGAAGGAAAAATCTTG
M S C F I K A S S S A L L E L V P E T K K E N L
433 AATTTGAGCTTCCCATGTATGACCCATCAAAGGGCCTTGTGTAGACCTAGCAGTGTGCGGTGGGCCAG
E F E L P M Y D P S K G L V V D L A V V G G G P
505 CTGGGCTTGTCTGCTCAGCAAGTTTCAGAGGGGGGCTTTCGGTGTGCTCGATTGATCCATCTCCCAAAT
A G L A V A Q Q V S E A G L S V C S I D P S P K
577 TGATTTGGCCAAATAAATTGCGTGTGGTGGATGAATTTGAGGCCATGGATTGCTTGGATTGCCCTTGATA
L I W P N N Y G V W V D E F E A M D L D C L D
649 CTACTTGGTCTGGTGTGTTGTGTCACATTGATGATAATACAAGAAGGATCTTGTAGACCTTATGGCAGAG
T T W S G A V V H I D D N T K K D L D R P Y G R
721 TTAATAGGAAGTTGCTGAAGTCGAAAATGCTGCAAAAATGCATAACCAATGGTGTAAAGTCCACCAAGCTA
V N R K L L K S K M L Q K C I T N G V K F H Q A
793 AAGTTAATGAAGTTAATTCATGAAGAGTCCAAATCTTTGTTGATTGCAATGATGGTGTGACAATTCAGGCTG
K V I K V I H E E S K S L L I C N D G V T I Q A
865 CCGTGGTCTTGTAGTGTACGGGATTCTCTAGTGTCTTGTGACGATGATAAACCCATAATCCAGTTACC
A V V L D A T G F S R C L V Q Y D K P Y N P G Y
937 AAGTGGCATAATGGAATACTAGCTGAGGTAGAAGAGCACCCGTTTGATTAGACAAGATGGTTTTCATGGATT
Q V A Y G I L A E V E E H P F D L D K M V F M D
1009 GGAGAGATTGCGATCTGAACAACAATTGCGAGCTCAAAGAGGCAAAATAGCAAAATTCCTACTTTTCTTTATG
W R D S H L N N N S E L K E A N S K I P T F L Y
1081 CCATGCCCTTTTCGTCAAAACAGGATATTTCTTGAAGAGACTTCGCTAGTGGCCGGCCCTGGAGTGCCAAATGA
A M P F S S N R I F L E E T S L V A R P G V P M
1153 AAGATATCCAGGAAAGAATGGTGGCTAGATTAAGCACTTAGGCATAAAAGTTAGAAGCATTGAAGAGGATG
K D I Q E R M V A R L K H L G I K V R S I E E D
1225 AGCATTGTGTCATTCGATGGGTGGGCCCTTCCAGTGTCTTCCCAAAGAGTTGTTGGAATAGGTGGTACCG
E H C V I P M G G P L P V L P Q R V V G I G G T
1297 CTGGATGGTGCACCCCTCAACTGGCTATATGGTGGCAAGGACTTAGCTGCGGCTCCTATTGTTGCAAAATG
A G M V H P S T G Y M V A R T L A A A P I V A N
1369 CGATCGTTCGAAGCCTCAGTTCGACAGAAGCAITTCAGGACACAATTTGTCTGCTGAAGTTTGGAAAGATT
A I V R S L S S D R S I S G H K L S A E V W K D
1441 TGTGGCCATAGAAGGAGAAGGCAAGGGAGTCTCTCTGTTTTGGTATGGATATCCTGCTCAAACCTTGACT
L W P I E R R R Q R E F F C F G M D I L L K L D
1513 TACCTGCCACTAGAAGTTTTTCGATGCTTTTTTTGATCTGGAGCCCCGTTATTGGCATGTTTCTTATCAT
L P A T R R F F D A F F D L E P R Y W H G F L S
1585 CGAGATTGTTTCTCCCGAGCTTTTAGTTTTGGGCTTTCTTATTCTCACATGCTCTAATACTTCTAGGC
S R L F L P E L L V F G L S L F S H A S N T S R
1657 TAGAGATCATGGCAAAGGGCACTTCTCCTTTGGTTAACATGATCAACAACCTTGGTACAAGATACAGATTAAG
L E I M A K G T L P L V N M I N N L V Q D T D -
1729 GTGACCACGATATTTAATGTGCTTAATAACTCATGCACTAATCGTTTATAAAAACACTCAAAAATTAGTTT
1801 TGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

그림 4. 감귤 cDNA library로부터 분리한 Lcy 유전자의 염기서열

제 4 절 당 합성 및 수송 관련 유전자의 분리

당 물질대사 관련 유전자들(SS와 SPS)의 probe를 확보하기 위해, 먼저 현재까지 보고된 식물체 유전자들에서 보존성이 높은 두 부위로부터 PCR용 primer를 합성하였다. 감귤 mRNA를 주형으로 RT-PCR을 수행하여 얻어진 PCR 산물을 pGEM-T easy vector에 연결(그림 5)한 후, 염기서열을 결정하여 각 유전자의 단편인지를 확인하였다. SUT 유전자의 probe는 예전에 확보하고 있던 것을 사용하였다. 이와 같이 얻어진 probe를 사용하여 SS, SPS, SUT 유전자들을 분리하였다. 유전자의 분리는 1차년도에 확보한 cDNA library와 각 유전자의 probe를 사용하여 두번에 걸친 plaque hybridization 방법에 의해 각 유전자의 클론을 분리하였다(그림 6). 제한효소 지도작성과 염기서열 분석(그림 7, 8, 9)을 통해 전체 ORF를 가지고 있는지를 확인하였다. 현재까지 보고된 유전자들과의 상동성을 GenBank에 등록되어 있는 서열들과 BlastN과 BlastX를 통해 비교하였다.

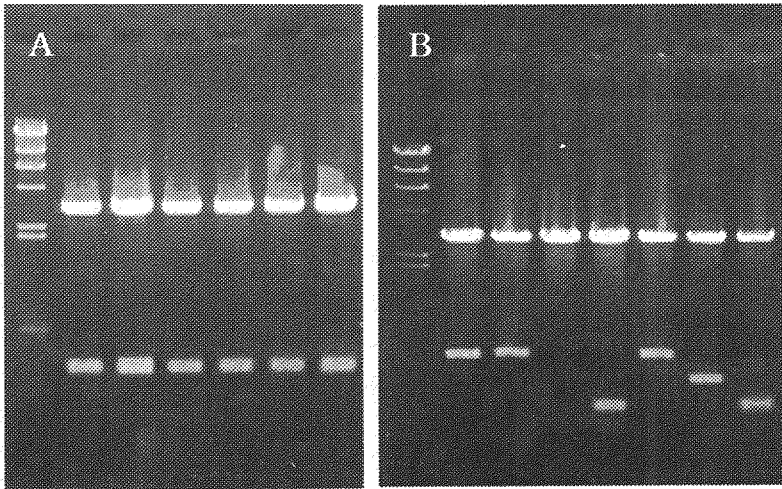


그림 5. SS(A)와 SPS(B) 유전자의 Probe 확보

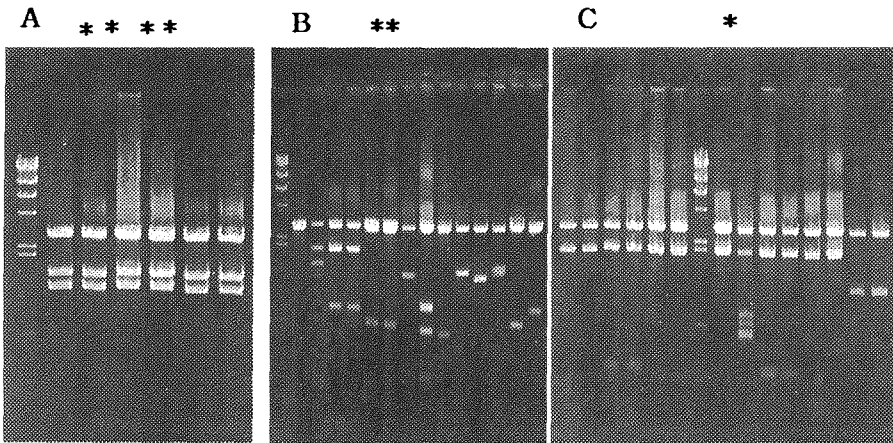


그림 6. Plaque hybridization을 통해 감귤 cDNA library로부터 분리한 SS, SPS, SUT 유전자 클론의 전기영동 양상. *In vivo* excision을 통해 전환된 phagemid DNA를 분리한 후, *EcoRI*과 *XhoI*의 두 제한효소로 이중절단하였다. DNA sample을 1% agarose gel에서 전기영동한 후, Ethidium bromide에 염색하여 관찰하였다. (*)는 염기서열을 통해 full cDNA를 가지고 있는 것으로 확인된 각각의 SS, SPS, SUT 클론을 나타낸다.

GACAGAACCGBAACTCTGATGCTTCGCGTACTGCCACGACTTGCACCTTGTCACTCCTT
TTTGCTAACTTTTCTCTTTTGGATCGTCACAGACTCTCTTTGAAACAAGATTCCGGTG
ATTCACGAGCAACAAAATCATGGCAGCCCTAAGCTAAGTCGGATTCCGAGCATCAGAGA
GCGCGTGGAGGACACTCTCTGTTTCATCGTAATGAACCTCGTTTCTCTCCTCCAGGTA
TGTGGCTCAAGGCAAGGGATTTGCAACCCGATGACTGATCGACGAGCTTGATAACAT
TTTTGGCAGCATGAAGGTCGGCAGAACCTTAGGGATGGTCCGTTTAGCGAAGTTATCAA
ATCTGCTCAGGAAGCGATAGTTCTGCCTCCGTTTGGGCTATAGCAGTCCGTCACAGACC
AGGTGTTTGGGAATATGTCCTGTTAATGTCTATGAACCTTAGCGTGGCAGCAACTAAGTG
TTTCTGAATACCTTCACTTCAAAGAAGAAGTGTAGATGCGGCGTTAATGAAAGATTG
TGCTTGAGCTTGATTTTGAACCAATCAATGCAACTTTTCTCGCCGAATCCGCTCTCAT
CAATGGTAATGGGGTTCAGTTCCTCAACCCGACCTTTCTCAAGTATGTTCCGCAACA
AAGACTGTTTGGAGCCCTTACTTGATTTCCCTCGAGCACAAAATATAAAGGGCATCTAT
TGATTTGAATGATCGGATTCAAAGCATTCCCGACTTCAGTCATCTCTGTCCAAGGCAG
AGGACCATCTTCCAGCTTCCACCTGATACACCTTTTCTCAGTTGAATATGTTTAC
AAGGAATGGGTTTGGAGAAAGTTGGGGAGTACTGCGAGCATGTGCTGGAGATGATG
ATCTCTCTTGGATATCCTTCAGGCTCCTGATCCCTCTACATTAGAGAAATCCTTGGAA
GATTACCGATGGGTTTAAATGTTGTTATCTTGTCCCCACATGGATATTTGGGCAAGCA
ATGTTCTAGGTCTCCCTGACACTGGTGGACAGGTTGTTTATATTCTGGACCAAGTGGCTG
CTCTGGAGAAATGAAATGCTTCTTGAATAAAGAGGCAAGGACTGGACATCTCTCCAAAA
TTCTTATCGTGACTAGGTTAATACCTGATGCAAAAGGGACTACCTGCAACCAAGGGCTG
AAAGAGTCAGTGGAAACAGAACACACCCATATTTCTGCGTGTTCCTTTTATAGATCAGAGAAAG
GCATTTCTCGTCAGTGGATCTCGAGATTCGATGCTGCGCTTACTTGGAGACCTTTACTG
AGGATGTAGGAAGCGAAATCACTGCTGAATGCGAGGTTTCCCTGATTTTATTATGGCA
ACTATAGTATGGAACCTTGTGATCTTTGTTAGCATATAAAATGGGAATTACCCAGT
GCACCATTGCACATGCATGGAGAAAACAAGTACCCAGATTCAGATATATATGGGAAGA
AGTTTATGAAAAATATCATTTCATGCCAATTCAGTCTGACCTGATAGCCATGAAACA
ATGCAGATTTTATCATCACCAGTACATACCAAGAGATTGCTGGAACGAAAAACTGTTGG
TCAGTATGAGAGCCACTGCATTCACCTTCCAGGCTTATATCGAGTGTTCATGGCAT
TGATGTTTTGATCCGAAGTTCAATATTGTTGCCCGGGGCGAGACATGGACATTTATTT
CCCATACTCTGAAAAGCAGAAAAGACTCACAGCCCTACATGGTTCTATAGAACAGTTGCT
GTTTATCCTGAAACAGAAATGATGAGCATGTTGGTACATTGAGTATCGGTGCGGAGCCCAT
TGTCTTTCCATGGCAGGCTTGACCATGTGAAAAACATGACAGGTTGGTTGATGCTA
TGGTAAGAATAGCCGACTGAGGGAACCTGGTTAACCTTGTAGTGGTAGCTGGTTACATAGA
TGTAATAAAGTCCAAAGACAGAGAAGAGATAGCAGAAAATTGAGAAGATGCATGAGCTTAT
GAAGACGTACAAGTTGGATGGTTCAGTTTCGTTGGATAGCAGCTCAAACAAATAGGGCAG
TAATGGTGAGCTCTATCGCTATATAGCCGACACCAAAGGTGCTTTTGTGACGCTGCTTT
TTATGAAGCTTTTGGATTAAACAGTTGTTGGAAGCTATGACTTGTGGACTTCCGACATTCGC
CACTTGGCATGGTGGCCCTGCAGAGATTATCGAGCATGGTGGCTCAGGGTTCCATATTGA
TCCATATCACCTGATCAAGCTGCTGAACCTCATGGCAGATTTCTTTGAAAGTGAAGGA
AAATCCAAAGCCATGGAAAAAATCTCTGACGGAGGGCTTAAAAGGATTTATGAAAGGTA
CACCTGGAAGATTTTCTGAAAGGCTAATGACATTGGCTGGGGTATATGGTTTCTGGAA
GTATGTTTCAAACCTTGAGAGGCGTGAGACCCGGAGTACCTTGAGATGTTCTACATCCT
AAAGTCCCGTATTTGGTGAAGTCTGTTCCCTTGGCAAGTGAGAACCAACATTAAGCTGC
TGGTACTCAAGGAACGCTAATAAATACCCAGCTACCTCCGGTAACTATAGTCAAAAAAT
AAAGAGTACTTTTGTATGTATATGTAATGCTTTATGTTGTATGGTTAAAAGGATATTCG
AGTCTCTCGACACTTAATCTCCTGTGCTATTGTGACAGGTGTTCAACATCGTGGCTGC
GTGAAAAATTTGATTGCTAAGCAATTTAATATTTATGTTTTCTTGGTAGCTGGACATT
TACTTTAGCAATTAACAACTATTGGGGTAAATTGAGAGAGGAATTCGAGTCCCTTCAAG
CCCGGCATAATA

그림 7. 감귤 cDNA library로부터 분리한 sucrose synthase(SS) 유전자의 염기서열

ATGGCAGGAAACGATTGGATAAACAGTTACCTCGAAGCAATACTTGATGTGGGCCCCGGTCTCGACGACGC
 TAAATCCTCGCTGCTCTTGCAGAGAGAGGGAGGTTACGTCGACGAGGTTACTTCGTGAGGAGGATCATCA
 CCGGATTCGATGAGACCGATCTCCACCGTTCCTGGGTTAAGGCTCAAGCGACGAGGAGTCCCTCAAGAGAGG
 AATACGCGGCTGGAGAACATGTGTTGGAGGATTTGGAACCTGGCTCGTCAGAAAAAGCAGCTTGAGGGAGA
 GGCAGCTCAGAGAATGCGGAAACGTGCTCTTGAACGTGAAAGAGGCCGGAGGGAAACACTGCTGATATGT
 CTGAAGACTTGTCTGAGGGAGAAAAAGGGACATTGTCAGCGATGTATCGGCTCATGGTGATAGTACTAGA
 AGCAGACTACCTAGAATAAGCTCTGTTGATGCAATGGAAACATGGATTAGTCAACAGAAAGGAAAAAAGCT
 ATATATTGTGTTAATAAGCATTATGGTCTCATACGAGGTGAAAATATGGAGTTGGGCCGTGATTCTGATA
 CTGGTGGTCAGGTTAAGTATGTTGTTGGAACCTGCAAGAGCCTTGGGCTCCATGCCAGGAGTTTATCGAGTT
 GATTTGCTCACTAGACAAGTATCGGCACCGGATGTAGATTGGAGTTATGTTGAAACCCACAGAGATGCTGAC
 TCCACGCAACTCAGATGATTTATGACGATATGGGGGAGAGCAGCGGTCTTATATCATTCGSAATACCAT
 TTGGACCAAAAAGATAAATATATCGCTAAAGAACTTTTATGGCTCACATCCCTGAGTTTGTGATGGTGCA
 CTCAACCATATCATAACGGATGTCCAATGTTCTAGGGGAGCAAAATGGTGGTGGGAAGCCAGTCTGGCCTGT
 TGCCATCCATGGGCAATTATGAGATGACAGGTGACTCAGCTGCCCTTCTATCCGGTGTCTTAAACGTGCCAA
 TGCTTTTTACTGGCCATTCACTGGCCGTGATAAGTTAGAGCAGCTTTTAAAACAAGCTCGATTACGAGG
 GATGAAATAAATGCTACGTACAAAATAATGCGTCGAATAGAGGCTGAGGAAATATCCCTTGATGCCCTGGA
 AATAGTGATAACTAGCAGTGGCAGGAGATAGAAGAGCAATGGCGTTTATATGATGGTTTGTGATCCTGTAC
 TAGAGCGTAAACTACGAGCCAGGATTAACGTAATGTGAGCTGTTATGGCAAGTTCATGCCCTCCGATGGCT
 ATAATTCCTCCTGGAATGGAGTCCATCATATTGTTCCCAAGATGGTGATAATGGATGGTGAACAGAAAGG
 AAATGAAGACAATCCTGCTCTCCAGATCCGCTATCTGGTCTGAGATAATGCGCTTCTTTACAAAACCCAC
 GTAAGCCTGTGATCTTGGCACTTGTAGCCGGATCCAAAAAGAAATATCACAACCTTTGGTTAAAGCATT
 GGAGAATGCTGCCATTAAAGAGAGCTTGTCTAATCTTACTCTGATTAATGGGTAACCCGAGATGGGATTGATGA
 AATGTCAGACACAAGTCTCTGTTCTTCTCAGTGTGAAGCTTATGACAAAATATGATCTGTATGGGC
 AAGTTGCATACCCGAAACATCATAAACAATCTGATGTTCCGTAATAATATCGTCTGGCAGCAAAAGACAAG
 GGTGTTTTCATAAATCCAGCTTTTATAGAGCCTTTTGGGCTTACTTTGATTGAGGACGCGCTCATGGTTT
 GCCCATTTGGGCCACTAAGAAATGGAGACCTGTTGATATACATCGGGTCTTGACAATGGTCTTCTGTGCG
 ATTCACAGGTGATTCCTTGAGAGATATACAGGATATATCTTTGAACTTGAAGTTTTCATTGGATGGAGAA
 AAGAGTGGAGCTAGTGGAAATGATGATCTTTAGACTCTGAAGGAAATGTTGCCGACAGAAAGAGTAGGTT
 GGAGAATGCTGTTCTGGCATGGTCAAAGGGTGTCTGAAAAGATACCCGAAAGTCTGGTTCCACAGATAAAG
 TGGACCAGAAATACAGGTGCTGCTAAGTTTCCAGCATTGAGGAGCGGGAAGCATATCTTTGTCAATTTCTGTG
 GATTGTGATAGCACTACAGGTCTTCTTGTATGCGACTAAGAAAGATCTGTGAGGCTGTGAAAAGGAAAGGAC
 TGAAGCTCTATAGGGTTCATATTTGCAACATCAATGACCATATCTGAGATTCACCTTTTCTGGTATCAG
 GTCACCTGAGCCCTAGTGATTTTGAATGCTTTAATTTGTAACAGTGGCAGTGATCTCTACTATTCACACTCTT
 AATTCAGGATGGCCCTTTCGTGGTTGACTTCTATTACCACTCACACATGAATATCGTTGGGGTGGGGA
 AGGACTGAGGAAGACTTTGGTCCGGTGGCATCTCAAGTTACTGATAAAAAGCGGAGATGGAGAAAAAG
 TTTTGACACCAGCTGAACAACCTTCAACCACTACTGCTATGCTTTTAGTGTGCAAAAAGCCTGGAATGACT
 CCCCCTGTTAAGGAGCTTCGGAAGGTGCTGAGAATTCAGCGCTTCGTTGTGATGTTATTTATTGCCAAAA
 TGGTAGCAGGTTAATGTAATTCAGTTTGGCATCAGTTCCAGGCTCTGAGGTATCTATATCTTCCGGT
 GGGGTGTGGAGTTGTCAAAGATGGTGGTTTTTGTGGGGAGTCTGGGACACGSACTACGAAGGATGCTT
 GGGGTGTGCAAAAACCTGTAATATTGAAGGGCAATTTGCAAGTGTCAAGCAATCAATCCATGCTAACCG
 AAGCTACCTCTCTCAGATGTCAATGCAATTTGACAGTCCCAACATTGTTGAGACGCTGAAAGATTGCACAA
 CTCTGATATCCGAGTCTTTGGAGCAATTAGGACTTCTTAAGGCTGAAAAGTTCCAGCCTTGTCTCGC
 TCCCTCCTATCCTTTGTTTAAATTCATCTGAGATCTTCTCATGCTGTGACATTTGATTTGGG
 TCTTCTGTGGCCCTTTATGCAAAAGCATTCTCTCAGTTTTTTA

그림 8. 감귤 cDNA library로부터 분리한 sucrose phosphate synthase(SPS) 유전자의 염기서열

CTGAATTCGCCAACTATTACGTGTTTCGGATCGTTGCTTAATTTTTCGA
 TAATCGAAGCTAAATCAAGTTGAGTCCGAGTAGTGAAGTCTCTGAATTTG
 GTCATTAGGATTAGAGCTAAGGTGGCTGCAGGTTGGCATGTGGGACGCC
 AACGGGAAGCATCTATGATGATAAGCGAACGTCATCAAGAGATCGTTCA
 AGTACTTTTGACGTAGAAGAAACCACAGCTCTGTACAGAACGGCACGGA
 AGTCGAGAATACAAATCCTTCATGGAAGTTGTCTTTCCACATGTAAGT
 TGGCAACCTTATCTTCATTCTGTGTTGGCTACCATCTAGGAGTAGTAAAT
 GAACCACTTGAAAGCATATCTCGGATCTTGGGTTCAATGGGAACCTT
 AGCAGAAGGTTGGTAGTAAAGTATGTGTCTGGGTGGGGCCTTCATTGGAT
 CCACACTTAGTGGCTGATAGCTGATGGGGTTGGCCGTCGTAGGGCTTTT
 CAGTTGTGTGCTTTGCTATGATCATTGGTCTTCAATAAGTGCAACAAC
 TAGAAACCTTATAGGCATGCTTTTGGGGAGGTTGCTAGTTGGGACTGGAA
 TGGGCTTGGTCCCACGTTGTCAGCTCTTATGTTACTGAGGTTTCTCCC
 CCTTTGTGAGGGGTACCTATGGAGCTTTCATCCAGATTGCAACTGTGTCT
 TGGACTTATGGGATCTCTTTTGATAGGAATCCCTGTCAAAGAAATGCTG
 GCTGGTGGCGCATTTGTTTTGGGTATCTATAGTTCCTGCTGCTATACTT
 TGTCTTGCTATGGTCTTTTGTGCTGAGAGTCCGCATTGGCTGTACAAGAA
 AGGAAGAAGTGTGAAGCTGAAGCTGAATTTGAGAAGCTTTTAGGTGGAT
 CACATGTCAAATCTTCTTGGCAGAGTTGTCCAAGTTAGACAGAGGGGAC
 GACGGAGATATTGTGAAGTTGAAGAATTGCTTTATGGCCGCCATTTTAG
 AGTTGTTTTATTGGATCAACCTCTTTGCTTTACAACAGCTATCTGGTA
 TAAATGCTATATTTTATTCTCTTCATCTGTATTTAAAAGTGCGGGACTA
 TCATCGGGCCTTGCAAATGCTTTCGTTGGAATTGCAAATTTATTAGGATC
 TGTGTGCGCAATGGTATTGATGGATAAACTAGGAAGGAAGGCCTCCTCC
 AGTGGAGTTTCTTCAGCATGGCAGTGTCAATGGCTATCCAAGTTGCTGCA
 TCAAGTTCTTATATACCGGCTCTGCATCTCTGTACCTCTCTGTTGGTGG
 TATGCTAATGTTTGTATTAACTTTGCTCTAGGAGCTGGTCCAGTCCCAA
 GTCTTCTCCTTCCTGAAATCTTCCCCAGTCGAATTAGAGCAAAAGCAATG
 GCAGTGTGTATGTCAGTACACTGGGTGATAAATTTCTTTGTTGGCCTGCT
 GTTTTTCGCACTGTGGAGCAACTAGGGCCACAGCTCTTGTATTCTATAT
 TTGGAACCTTTTGTCTAATGGCAGTGGCTTTTGTAAAAAGAAATGTTGTG
 GAAACCAAGGAAAATCACTCCAAGAAATTGAGATAGCTCTTCTTCCGCA
 GGAATAATGGAAGTTATTTTCTGTTTAAAGAACTTCAGTATAACAGAT
 GTAAGCAAGTGTGCTTATCTGATAAAAAGGTATTCGTGCGGCTGAAGCAA
 GATGAGATACCAGAAATGTTAGAATTGTCGATTGGAAAACCTTGCATATC
 TACAAATATGATCGGGTAAATGCTGCATATGAGTTCTAGTGGAGTGTGAT
 CTAGCCTTTATTTCACTGGTCAAATTTCAACACGGGCAGGCCTGGCCTTT
 TTGAAGCTTTGATTTGTGATTACATATAGTCTTAAATATGTAAGTCCCTT
 AATATTCATAACTGGTGTATGAAATGCATATTGTTCTATAAAAAAACC

그림 9. 감귤 cDNA library로부터 분리한 sucrose transporter(SUT) 유전자의 염기서열

제 5 절 감귤 형질전환용 벡터의 제작

pBI121을 기본 벡터의 backbone으로 사용하여, Psy와 Chx 유전자를 이용한 감귤형질전환용 벡터를 제작하였고, 이를 감귤연구소에 분양하였다(그림 10 & 그림 11). 그러나 이들 벡터는 kanamycin에 의한 selection이 가능한 것으로, 감귤 형질전환체의 유도시 문제가 있다는 감귤연구소의 보고에 의하여 다른 selection system을 가지고 있는 벡터를 제작하고자 하였다. 즉, 난지농업연구소의 의뢰에 의하여 감귤 형질전환체 유도시 hygromycin에 의한 selection이 가능하도록, hygromycin-resistant gene을 가지고 있는 plasmid(pCAMBIA-1300)를 확보하였고(그림 12), 각각의 유전자에 대한 primer를 합성하였으며, 앞에서 분리한 유전자들을 사용하여 감귤형질전환용 벡터를 제작 하였다(그림 13).

유전자를 도입하기 위해 우선, 유전자의 발현에 필요한 promoter와 terminator 부위를 pCAMBIA-1300 vector에 삽입하기 위해 pBI121의 GUS 유전자를 포함하는 HindIII-EcoRI fragment를 pCAMBIA vector에 삽입하였다. 그 뒤 카로티노이드 성분 및 당함량 관련 유전자를 BamHI-SacI site(Zds의 경우에는 XbaI-SacI site)에 삽입하였다. 제작된 벡터 DNA를 PCR 및 restriction map, 염기서열 결정에 의하여 도입의 정확성을 최종적으로 확인하였다. 이들 벡터를 *Agrobacterium*에 형질전환한 후, 난지농업연구소에 분양할 예정이다.

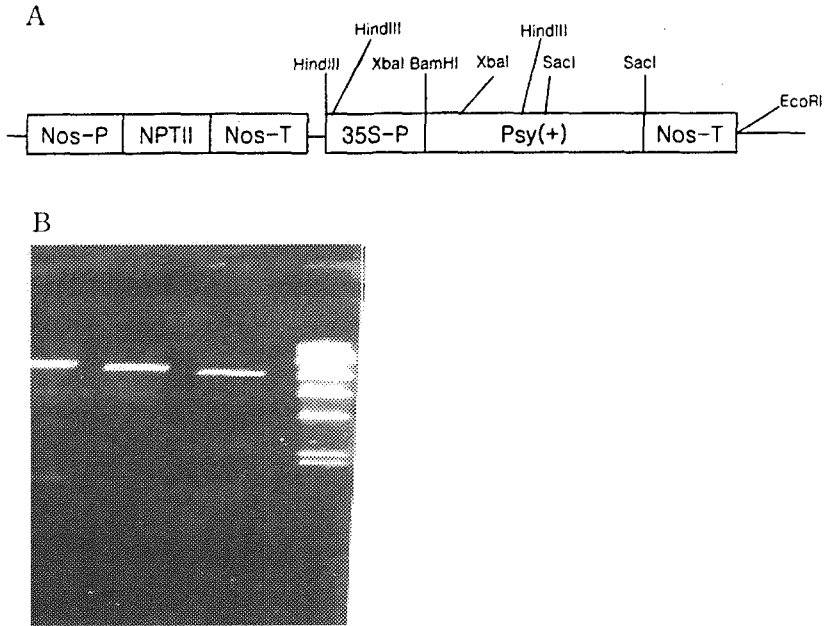


그림 10. Psy 발현 제어용 벡터 Map(A)과 확인(B). (*)는 Psy 유전자가
 맞게 들어간 클론(plasmid)을 나타낸다.

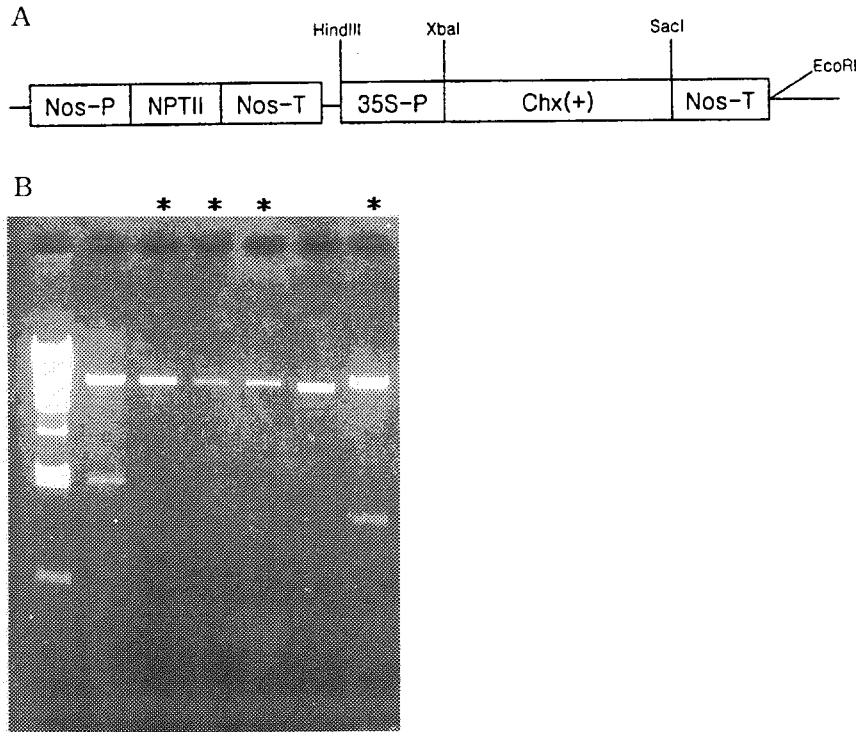


그림 11. Chx 유전자의 발현제어용 벡터 Map(A)과 확인(B). (*)는 Chx 유전자가 맞게 들어간 클론(plasmid)을 나타낸다.

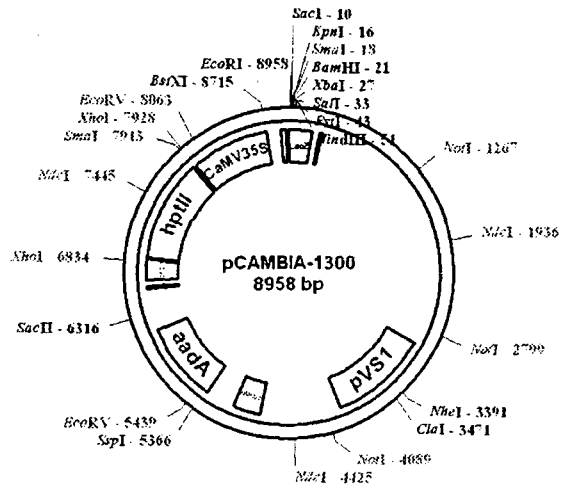


그림 12. pCAMBIA-1300 vector의 모식도. 35S promoter에 의해 발현이 유도되는 hygromycin resistant 유전자(hptII)를 가지고 있다.

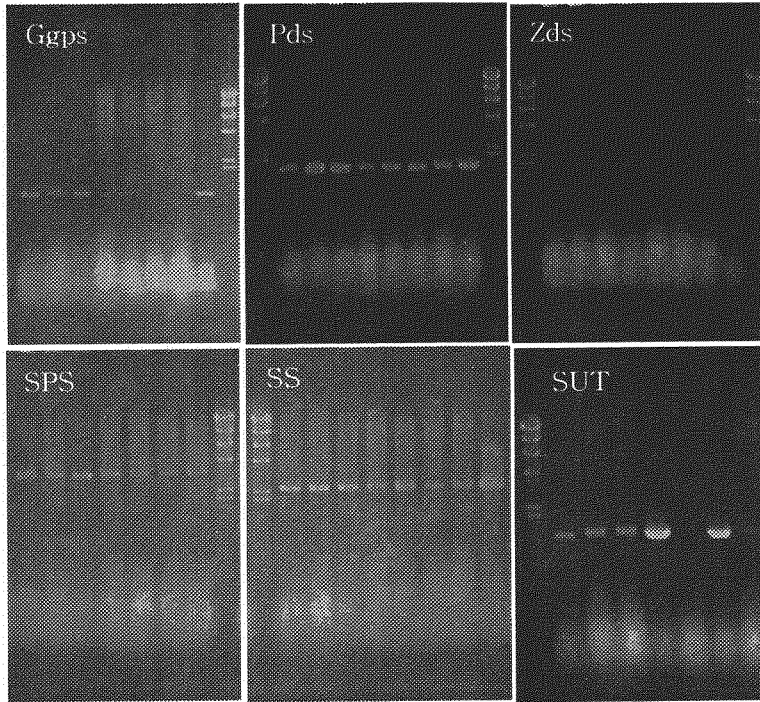


그림 13. 카로티노이드 성분 및 당 함량을 증진시키기 위한 감귤 형질전환용 벡터의 제작. pCABIA1300 plasmid를 기본 backbone으로 하여, 이 plasmid를 *Bam*HI과 *Sac*I으로 digestion한 후, 분리한 유전자들의 PCR 산물을 *Bam*HI과 *Sac*I으로 degestion하여 앞의 벡터에 연결하여 *E. coli*에 형질전환 하였다. 이로부터 얻어진 colony를 사용하여 직접 PCR을 수행하여 얻어진 DNA의 전기영동 양상을 나타낸다.

제 4 장 감귤 과실훈이 발현 프로모터 개발

제 1 절 서언

현재 식물의 형질전환에 사용되는 주 프로모터는 몬센토사가 그 특허권을 가지고 있는 Califlower mosaic virus의 strong promoter인 35S 프로모터이다. 최근 연구에 의하면, climacteric fruit인 바나나와 토마토에서는 ACC synthase promoter와 polygalacturonase promoter가 과실 특이적 발현을 유도하고 있는 것으로 나타났으나, non-climacteric fruit인 딸기에서는 과실훈이성을 보이지 않았다.

감귤의 형질전환에는 감귤의 프로모터와 같이 non-climacteric fruit 특이적인 프로모터를 사용하여야 하나, 감귤에서 찾아내 실용화된 프로모터는 없다. 따라서 감귤로부터 과실훈 특이적 프로모터의 탐색은 전 세계적으로 매우 시급한 과제이다.

제 2절 Proteomics 연구

식물로부터 단백질을 분리하여 2-D 전기영동을 수행할 경우, 식물에 따라 단백질 분리의 어려움이 많이 있다. 다음과 같은 조건을 확립하고 연구를 수행하고 있다.

- Protein extraction: Sample (대진 4호 잎 powder 1g / 과육 powder 4g)을 ice cold Mg/NP40 extraction buffer를 이용하여 (5ml / 20ml) homogenize 한후 acetone 침전시킴. Protein pellet은 정량 후 -70℃ 에 보관함.

↓

- IEF conditions
 - Rehydration: Pellet을 rehydration buffer (9M Urea, 4% CHAPS, 100mM DTT, 0.2% BioLytes, 0.001% Bromophenol blue)에 녹인 후

12,000rpm에서 5 min 간 녹지 않은 덩어리를 침전시킨 후 185 μ l (1 mg total proteins) 동안 active rehydration 시킴.

- Focusing condition

Conditioning step : 250V 15 min

Voltage Ramping step : 250V 2.5 hrs (ending voltage 5,000V)

Final Focusing step : 8,000V 4.3 hrs (volt hours 35,000V)

↓

● Second dimension gel electrophoresis: SDS-PAGE equilibration buffer (w/DTT, W/iodoacetamide)에 각각 10 min 씩 equilibration한 후 1.0 mm thick SDS-PAGE gel에 loading 함 (10% SDS-polyacrylamide, 10 mA, 7 hr 30min).

↓

● Staining: with coomassie blue for 20min

↓

● Result

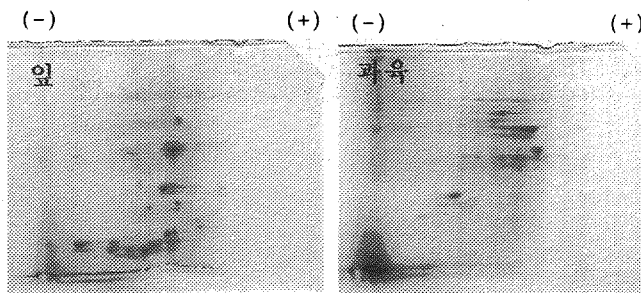


그림 1.. 엽(좌)과 과육(우)에서 추출한 단백질의 전기영동 패턴 (Coomassie blue 염색)

MALDI-TOF과정으로 가기 위한 조건을 확립하였으나 바람직한 결과는 얻지 못하였음.

제 3절 cDNA subtraction에 의한 과실 특이 유전자 클로닝

cDNA subtraction 결과 과육 특이 밴드로 판단되는 6개의 cDNA 클론을 얻었으며 (Fig.2), 이들의 염기서열은 다음 그림 (Fig. 3-8)에 나타났으며, Blast search결과 Table 1에 요약하였다.

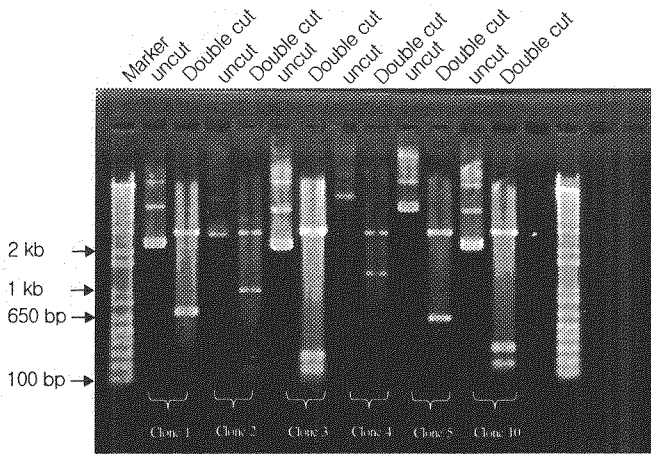


그림 2. 6개의 cDNA clone의 Agarose gel 전기영동 패턴 . 사용효소 (*EcoRI/XhoI*)

GCACGAGGTCGCGATCGGCTCAATAAGGAATCATCGGAGGTGACGTATGTGAGCACGGATAGCGTTCGCGTGACGGGGAGTATT
 GATTTTGAGGTTTTTTGACAAGGACATGGTTTTGTGTGGGTCGTTGGAGAGGATGGAGTCCACGTGGAATAATGGGAGTATTCG
 AGGACGCCGGGGTGGAGTATGGATTGTTATACGGCGATAGGGTCTGGTTCACAGCGTTTTTCAACCGAAGCTTGGGGTTTCG
 GCTCCGGCTATTGAGGTTTATATGCGGTTGTTGTGGAGGTGTGCCGGTGATTTTGACAAAAGACGATACAGGTGAGTCCAAGA
 AGGAAGGGGTACAGACACTGGATGCTGGACTCAATCCAGAGGATGAGGAGGTTGAGAAGAAATTTAAAGGGCGGTAAATGGGTTG
 GTTCGACAAAGGAAATTGCAGATTACAGAAAGCGGAGTTCAATGATTACGAGTTGGATGGAAAAATGGGGAGAAAACTACTCC
 GAAGACATGTAATAATGGTGGAGGATGGCCAACTTTCATGGTTAATGCTGGTGTAGAGTTGGTGTGGAATGGCTTANGGATG
 TGCCCTCGGAGTTGGAATTGGTGTGGTCTTCTAATGCGTTCAATCAAGCAGCTACTGGGAGGTTTAGGANGAGGTTTTCCTGA
 ACTTAATCAATTTCTTGGAAATTTGTTTTCTGGTTCAATGANAAANGGAAGTAAAATCTTGGGGATGCAATGGAACCTA +
 616 bp

그림 6. clone 4의 염기서열 (1,369 bp)

-134
 GCACGAGGCGAGCCGCTAGCTTTTGCCATAGCTACTGCAGGAGCAGAATCTTCTCTCTGTAGTAGCACTGTACAGAAACAT
 CCAGCTAGCTATCTTCATATCTATTAAGTCTATAAGTAAATAAAACAATGGCCCGTGTCTTCAAAGCTAAGCTTCTTCTT
 M A R C L F K A K L L L
 GCTCCTGTTGCTGATGGCATCTCGCTCTCCATTAGCAGGAGAGGATATGCTGCAGCAGCACCCCTTGGGGACCATATCTCGGACTG
 A P V A D G I S L S I S R R G Y A A A A P L G T I S R T G
 GTATCATGGAGAAAAATGATTGAGGCTGCGGTGAGAGAGGATCTGGGCGCTTCTGCTGGGCCCCAGATCCCATCACTGG
 I M E K N D L R P A V R E D S G A S S A W A P D P I T G
 GTACTACAGGCCGGAGAATCGGGCGGTGAGATTGATCCAGCAGAGCTTCGAGAGATTCTGTTGAACCAAAAGTCAGGGCACAC
 Y Y R P E N R A V E I D P A E L R E I L L N H K V R A H
 TAGGGAGTGGTCGCGCATGGCAGATCCTTGTGTAGCGGTGCTTTAACTTTTTAAGTGATGTTGTACAGTAGCAATTTTGA
 *
 CTCACTCTTAAGTCTTGTGTTGATTGATATCAACTGTTATTGACAACCTTTAATAGTGCATTCCATGATTTTGTCTAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

그림 7. clone 5의 염기서열과 amino acid 서열

GCACGAGTTAGGGTTGGATCTGTCTGTGTGTTCCCTCCCAATTGCTTAGCTTCTTCGAGTTCCTGTCGAAACCCTAATCACAG
 TTCCAGCCATGTCGTCGAAGCAAGGTGAAAAGGCCAAGCCTTTGAAGCAACCCAAAGCTGACAAGAAGGAGTATGACGAGCAA
 GATTTGGCCAACATCCAGAAAAAGAAAGGAGAGGAGGCCCTGAAGGAGCTCAGAGCCAAAGGCGCAACAGAAGGGATCATT
 GGAGGTTCAAGGCTCAAGAAAGAGCGGAAAGAAATGAGATTTTGAATCCCAAAATCAGAAATCAAACTATGAAATCTGTACCGT
 GGTATGAAATTTCAATGTTAGTGGGTGGACTTTGTTTAGTGTGATTAATCATGACATCAATTTGGTCAATGATGGTATATTCAT
 GTTAAGTATGGTTCTAAACTTTGGTTTAGTGTCTCCTGCTCCCATGTAANCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

그림 8. clone 6의 염기서열 (495 bp)

위 클론을 뉴클레오티드 수준(BlastN)과 단백질 수준(BlastX)에서 NCBI search를 하여 기존의 유전자와 염기서열의 상동성을 조사하였다. 그 결과는 표 1에 요약하였다. 표에서 보는 바와 같이 클론 5는 *Citrus sinensis*의 *Lea5* 유전자로 판명되었으며, 이는 배 발달의 후기에 주로 발현되는 유전자로 매우 흥미가 있는 클론이다. 또한 클론 4와 클론 10도 과실 특이적으로 발현이 가능한 유전자일 것으로 판단이 되며, 기타 클론 1과 2도 매우 흥미로운 유전자이다. 따라서 본 연구에서는 모든 유전자에 대한 프로모터를 확보하기 위하여 genomic library를 스크리닝하고 있다. 또한 모든 클론에 대하여 유전자 발현에 관한 연구도 병행하고 있다.

표 1. 선발된 6개 clone의 Blast search 결과

Clone No	Size (bp)	BlastN	BlastX	Remarks
1	698	<i>Arabidopsis thaliana</i> mRNA (AF367255/AY069894)	<i>Arabidopsis thaliana</i> pyruvate kinase (NP_566976 - AF367255)	Full
2	1,190	<i>Pisum sativum</i> signal recognition particle 54 kDa subunit precursor(Ffc) mRNA, nuclear gene encoding chloroplast protein (AF089724); <i>Arabidopsis thaliana</i> putative signal recognition particle 54CP protein precursor (A15g03940) mRNA, complete CDs (AY050999) 1,858 bp)	<i>Arabidopsis</i> signal recognition particle protein (AAC64139 NP_196014)	N-terminal 780 bp missing
3	496	<i>Arabidopsis thaliana</i> chromosome 2 clone CHIR2v12153001	<i>Arabidopsis thaliana</i> expressed protein (NP_565726)	Full-length
4	1,369	<i>Arabidopsis thaliana</i> DNA, 40 kb surrounding ACS1 locus (ATY12776). <i>Arabidopsis thaliana</i> mRNA for unknown protein (Y10087)	<i>Arabidopsis thaliana</i> expressed protein(NP_563628). Contains similarity to a dehydrogenase from <i>Arabidopsis thaliana</i> gb Y12776 and contains a D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenases PF:00389 and Myb-like DNA binding PF:00249 domains	T3 sequencing required
5	617	<i>C.sinensis</i> mRNA for <i>Lea5</i> protein (Z46824 Z46657: 599 bp)과 98% 일치	Late-embryogenesis protein <i>lea5</i> - sweet orange (S53501)(Z46824) <i>Lea5</i> protein [<i>Citrus sinensis</i>]	Full-length clone
6	495	<i>Arabidopsis thaliana</i> Unknown protein (AY062704 AY093387)	<i>Arabidopsis thaliana</i> expressed protein (NP_563969 NP_566533)	Full-length

제 4 절 Northern blot 분석

연구결과 과실특이적으로 발현될 것으로 판단되는 클론에 대하여 그 발현양상을 Northern blot 분석을 통하여 확인하였다. 이때 앞으로부터 분리한 RNA가 control이 되고 과실은 직경이 0.5 cm 이하인 것으로부터

3 cm에 달하는 것까지를 발달단계로 선택하였다. 모든 클론을 이용하여 northern 분석을 했으나 클론 3, 5, 6으로부터만 발현양상을 탐지할 수 있었고, 1, 2, 4번 클론은 그 transcript를 탐지할 수 없었다.



그림 9. clone 3의 Northern blot analysis. L, leaf RNA, 1-5, fruit RNA (1: less than 0.5 cm, 2: 1.0-1.5 cm, 3: 1.5-2.0 cm, 4: 2.0-2.5, 5: 2.5-3.0 cm diameter)

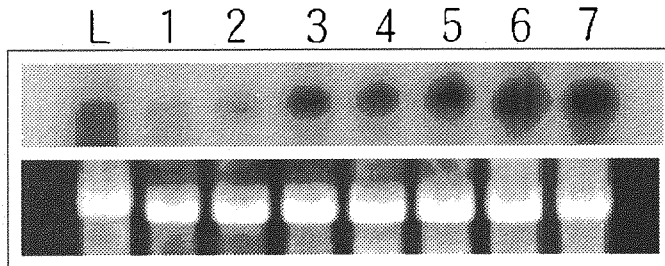


그림 10 clone 5의 Northern blot analysis. L, leaf RNA, 1-7, fruit RNA (1: less than 0.5 cm, 2: 1.0-1.5 cm, 3: 1.5-2.0 cm, 4: 2.0-2.5, 5: 2.5-3.0 cm, 6: 3.0-3.5 cm and 7: bigger tahn 4.0 cm in diameter).

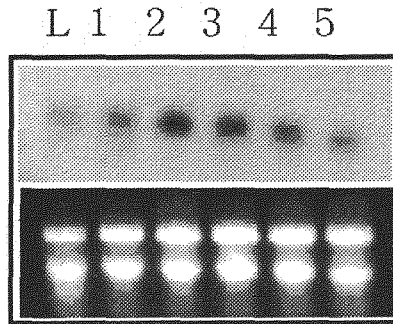


그림 11 clone 6의 Northern blot analysis. L, leaf RNA, 1-5, fruit RNA (1: less than 0.5 cm, 2: 1.0-1.5 cm, 3: 1.5-2.0 cm, 4: 2.0-2.5, 5: 2.5-3.0 cm diameter)

그림 9-11에서 보는 바와 같이 클론 3 과 6은 과실성장의 초 중반에서 주로 발현이 증가하는 것으로 나타나 genomic clone을 확보하는데 우선순위가 뒤로 밀렸다. 그러나 클론 5는 과실의 성장이 진행될수록 발현양상이 높아지는 것을 볼 수 있다. 따라서 클론 5가 프로모터를 확보하기 위한 가장 바람직한 유전자로 판단되어 genomic library screening을 수행하였다.

제 5 절 Genomic library screening

1. Plating, titering, plaque lifting

λ phage 숙주인 *E. coli* XL1-Blue MRF'를 OD₆₀₀에서 약 0.5의 값을 갖도록 cell stock을 준비하고, plate당 약 50,000개 정도의 phage plaque가 되도록 SM용액으로 희석한 phage 용액을 넣어주고 잘 섞은 뒤, 37°C에서 15분간 감염시킨 후 미리 액체상태로 녹여놓은 NZY top agar에 섞어 150mm지름의 NZY plate에 부어 평평한 곳에서 20분간 식힌 후 37°C

에서 7-8시간 배양하여 적당한 크기의 plaque를 형성시킨다. 형성된 plaque을 Nytran membrane (Schleicher & Schuell)에 transfer하여 UV cross-linking을 한다.

2. Hybridization

α -[³²P] dCTP로 labelling한 probe이용하여 protocol에 따라 수행한다.

3. *In vivo* excision

Host bacteria인 XL1-Blue MRF'와 SOLR을 10mM의 MgSO₄와 0.2%(w/v) maltose가 함유된 LB broth 5ml에 30℃에서 200rpm으로 16시간 동안 진탕배양하고, ExAssist helper phage (1×10^6 pfu/ μ l) 1 μ l을 넣고 37℃에서 15분간 감염시킨 후 여기에 3ml의 LB broth를 넣고 흔들어주면서 37℃에서 2-3시간 배양하고 ampicillin (50 μ g/ml)이 함유된 LB agar plate에 도말하여 37℃에서 16시간동안 배양한다. 그림 12는 1, 2, 3차 스크리닝의 과정을 설명하고 있다.

1st screening 결과 2개의 positive signal을 확보하였으며, signal을 보인 plaque를 희석하여 2nd screening을 실시하였으며 3rd screening을 통하여 재확인 하였다. 3rd screening 결과 확보한 plaque중 6개를 *In vivo* excision 하여 plasmid DNA를 분리하였다.

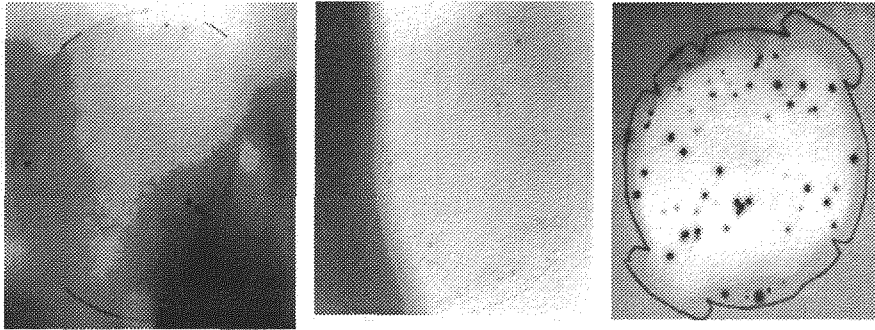


그림 12. 1차 screening (좌), 2차 (중), and 3차 screening (우)에서 positive signal을 보인 plaque

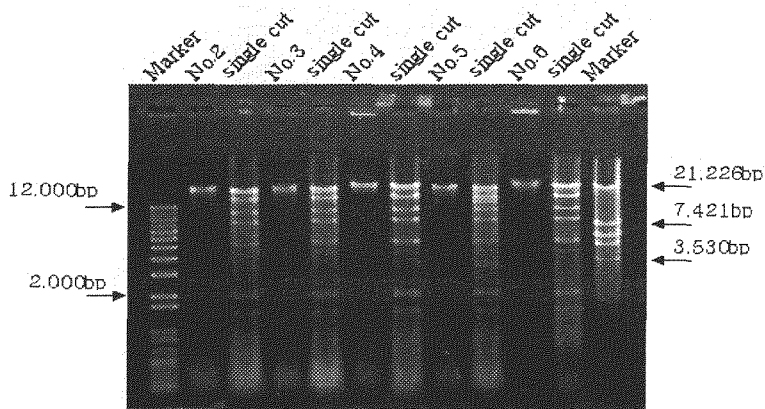


그림 13. 제한효소로 절단하지 않은 클론의 전기영동 패턴.

1, 1 kbp molecular weight marker, 2, clone 1, 3, clone 2, 4, clone 3, 5, clone 4, 6, clone 5, 7, clone 6, 8, Lambda DNA/*EcoR* I Markers

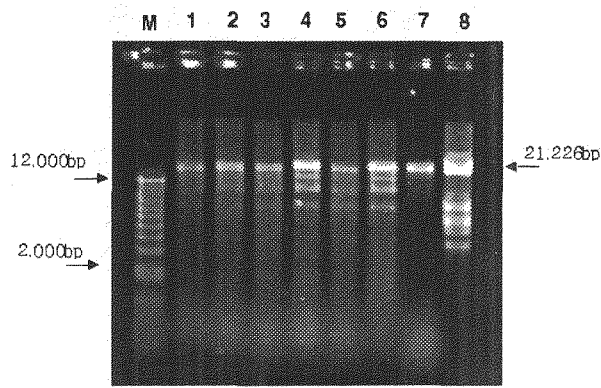


그림 14. XhoI.으로 절단한 클론의 전기영동패턴

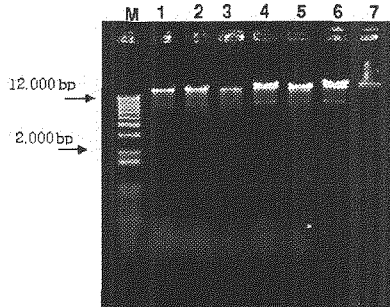


그림 16 SmaI.으로 절단한 클론의 전기영동패턴

그림 13-15의 결과 약 17 kbp genomic clone을 확보한 것으로 판단되어 양쪽 방향으로 염기서열 분석에 들어갔다.

4. Genomic clone의 염기서열 분석과 프로모터 분석

연속적인 염기서열 분석 결과 3,230 bp에 해당하는 클론5 (*Lea* gene)의 genomic DNA를 확보하였다 (Fig. 16). 이 genomic DNA는 *Lea* mRNA의 서열에 해당하는 모든 염기를 지니고 있으며, cDNA 클로에서

얻은 *Lea* 유전자의 coding 서열과 100% 일치하였다. 또한 이 genomic DNA는 약 1,505 bp에 해당하는 프로모터 부분을 가지고 있었다.

위 프로모터 부분을 TRANSFAC program를 이용하여 분석한 결과 표 2와 같이 여러 transcription factor가 binding하는 서열이 존재하였다.

표 2. *Lea* genomic DNA의 1,505 bp promoter sequence에 있는 transcription factor binding site(TRANSFAC program).

Transcription Factor	Description	Conserved sequence	No of matches
PSATHB1_01	<i>Arabidopsis thaliana</i> homeo box protein 1	----ATT(A)A----	14
PSDOF1_01	Dof1 / MNB1a - single zinc finger transcription factor	---AAAG---	23
PSDOF2_01	Dof2 - single zinc finger transcription		
PSDOF3_01	Dof3 - single zinc finger transcription		
PSGAMYB_01	GA-regulated <i>myb</i> gene from barley	NAAC----	10
PSGBP_Q6	G-box binding proteins	----ACGT---	7
PSMYBPH3_01	Myb-like protein of <i>Petunia hybrida</i>	-----GTTA-	1
PSPBF_01	PBF (MPBF)	----AAAG---	23
PSP_01	maize activator P of flavonoid biosynthesis	---AACC--	4
PSSBF1_01	SBF-1 (closely related to GT1)	-----TTAA----	20

CCCCCCCCCCCCCCCCCCAAAAAAAAAAATGCCACTGCGAGCTCTTTTGGTATTGGATGAATAATAACAATAATTAGTTA
 AGCTGGTGTTCCTCATTTGATTGAACAACACTAGGCATATTCATCAATCAACGGGAATAAAGACTGAATTGAAGCTCCGAAT
 TAGTGTTTACACACTCGGATCGCATTACGCAATGGTAATGGTAAAGAAGTACTGCTTGGTGGATGATGACGATGATGATGAT
 AATGGCCGACTTCATATGTTGGGCATCCATGAACCAAGAGACACGTAGAGGTTACGACTTACGATGGTTGCCAATTTGTTAAGCCT
 CATAATTAAGAGAGACGTTTAGTGCAAGAAAGTAGAAACTTTTTGAAGTCCAAAGGGAGGCCGCCACTGATCATGGCCCTTGC
 GGGCCATTATGAATCATCATTCGCTCGAGATTAACACCCGTCATCGCGATTCAAGACCGCCCCATACAAAAATATATATGTTT
 ATCAAAGCTTTCATGCAAAACGTGGACGGTTGTTATTTTCATACGCTTCGGTCTACCGACGAGCCACAAACTTTAGTCCGGCGGC
 AACAACTTCTTACGACTCTCTGTCTCTCCATATTTGATAAAAATAGAGCACTTATATTTAAATTAAGAAGATACTATT
 AAAATAAAATAGAGTACTATTTAACTACAGTAATTTTTGTGGTCATGGTAAAGAATTTATTAATTTGCATAACAATAT
 AATTAATGTCTATATAAAAATTTGTCTCAATAAATCAATTGTAATTTAATTAATAAATCAAAATCATAAAATTTGAGAATAACTCT
 AAATTAACCACATCCTTTTATATGATAGCTTATACTATATTCATAGTGGTGGTGGCGTTTTCACATTAATAAATTTCTTAAAA
 TAGAGCCAAATCAGAATTTATCAACATCTAATCTTTTTTAAACAATTAATAATTTCTCGAATTTTCTTCTTTCAAAG
 GAATATTCACACCACTCAATCCTTCCAATAATTTTAAAAAATAAAAACGAAAGTATCAAATTAATCGCATGAATACTTCTCA
 AAACAGTTACGTTATTTATTTATTTGCAATAAAGATGACAAGAGAAAGAATTTGAAATTAAGGAAAGATATTTCCGGGTTAA
 GTTGTATTTTCTTGTCTATGACCCGGACCCGATTAACAGACCAAGAGATAAGTTCAAGATGATTATTAATAACGCAT
 TAGTGGCCCTGAAAAATTTCTTGGATCAGATATCAGTACTATAATAATAAACAATTTGTGTCAGGATTCGATGAATCATCAAC
 TCCTAAGAAGACGTTGTCAGATTACTCAGACAAGATCTTTGTCTTCTGAAAGAACGGCCCAACCCAAATCCAACAAGTCGCTC
 TGCACAGTTTCTCGTTTCTTTATAAATAACAGAAAAACCCCTAAAGCCTTCTTCTCACAAGCACAGCACAAGAGAGCGAGCC
 GCTAGCTTTTGGCTATAGCTACTGACAGGACAGAACTTTTCTTCTCTGTAGTAGCTGTACAGAAACATCCGAGCTAGCTAT
 CTTTATATCTATTAAAGTTCTATAAGTAAATAAAACAATGGCCGCTGCTCTTCAAAGCTAAGCTTCTCTGCTGCTGCTGCT
 GATGGCCTCTGCTCTCCATTAGCAGGCTGTTTACAGAACTCTTTTTCTCTCTCTCTCTCTTTGGGTCTCTTTGAAATG
 ATAATTTTATCTGTTCTTGTCTACGTTGTGTCGCTTGATCTCATCATTCATTGAATCCTTASCTGTTTATATTGTTTCTTG
 ATCAATCTAAACATTTCTAGTACATTTTAGAAGAGATCAAGTACTCTCCAAATGTTTCTTTTTTTTCTTCTATAACTTA
 ACAAAACAACGAATTCAAAAAACAACAAAAACAACGAGTACGCTTCTGTAACTCGCCATGTGATTTTGTATCGACTTTCGTAT
 GTGAAAAATAAAATTTTTTAAATGATCGGATTCATCGAGGTTAGAACAATAAAATCATGAATACGAGGGGCCAAAAGGTAAA
 CTAACATTGGGACGGTCTCAATTTGGGCTAAAATATTTATTTGTACCCTTATCTTCTTAAATATTAAGGGACCTTGCATATTT
 GTTCCCTCGCAATACTTTGGAAAGCGGAAATCGCTTAATTTTGTTTTAAAGCATTCTTGAGACGCAATTAATTCATAAGCAC
 TTGCAGATTGATTATAGCCTTTTAGTAAATAGTAACACCTCGGTTTGCAGAACTTGAACCTTTTGTATGGCCAAATGAAC
 CTTTTCGCTACCTTGTGTCGCAAGCTAGCTAGATCATATGATTCGTTTCCACATGTGAATTAATAAACTCTTTAAAGTAATCT
 TTTCTTTGTTATATAATTCATTTCTTCCCTTATGATTAAATGATTTTTTTTTTAAAGAATAATTAATAATTTCTTAAATGGA
 CAGGAGAGGATATGCTGCGCAGCACCCTTGGGACCAATCTGAGCTGGTATCAAGGAGAAAAATGATTGAGGCTGCGGT
 GAGGAGGATCTGGGGCTCTCTGCTGGGCCAGATCCCATCACTGGGTACTACAGGCGGAGAAATCGGGCGGTGAGAT
 Tgatccagcagagcttcgagagattctgttgaaacacaaagtcagggcacactagggagtgctgcccctggcagatccctttgc
 tgttagcggctctttaaactttttaaagtgatgttggttacagtagcaattttgactcactttaaagcttttggctgttggat
 atcaactgttattgacaacttttaatagtgcatttccaigtatttggctattaaactgtcaatgaagtaaaagaaatctctgtat
 tgcAAAATTACTTTTATATAGGGGTTATGCTGTCTGGAATCCAGACTGTAATTAAGTCCAGGATGGGACCATGTGTAGCAG
 ATTAATAAATAAATAAATAAATCCAACGGCCCTCAGTCCGGATACTAGTTGGATAAATTAATCCCATATATACACACATACATA
 TAACATTGCAAGGTTGAGAATCAGTCAAACTGATTAAGAATCAACAAAGTATATGTCTTAATAGTGCATGACACGTAGTA
 TCTTGATTAGTTATCAATGTAAGAGTTTCAAGAGTTA
 (3,230 nt)

그림 16. *Citrus* *Lea* 유전자의 genomic DNA 염기서열. 음영처리된 부분은 *Lea* mRNA 부분을 나타낸다. 소문자는 *Lea* gene의 coding 염기서열을 나타낸다. 유전자의 Upstream 1,505 bp에는 프로모터가 포함되어 있다. primer sequences: *Sph*I (primer-I: 5'-ATCAAAGCTGCATGCAAACGTG-3'; primer-II: 5'-CTTTTATATGCATGCTTATACTATATTC-3) or *Bam*HI (5'-CTTGTGAGGATCCAGGCTTTAGG-3') site.

위 프로모터 부분을 TRANSFAC program를 이용하여 분석한 결과 표 2와 같이 여러 transcription factor가 binding하는 서열이 존재하였다.

제 6 절 *Citrus TOM*의 클로닝

Citrus Lea genomic clone를 클로닝하는 과정에서 같은 벡터 내에 *Lea* 유전자와 바로 인접하여 존재하는 유전자가 있었다. 염색체상에 서로 인접한 유전자 5-10개는 일반적으로 함께 발현하고 공통적인 기능을 담당하는 것으로 알려져 있어 매우 가치가 있다고 본다. 따라서 본 연구에서도 그 인접한 유전자를 클로닝하여 분석한 결과 애기장대의 *TOM*과 상동성이 매우 높은 유전자임에 밝혀졌고, 애기장대에서도 그 기능이 잘 알려져 있지 않기 때문에 더욱 가치가 있을 것으로 전망된다.

CGGTCTTTTTGTTTTAAATATCCTTCTCTTTCTTTCTTTAGCTTTACCTCTAATAATGTGATAAATTTCTTCTGATT
 TTGATGGCATGTATAGATTTCCAGTTGCCAGCATAACAATTTAAAAATTTTGTGCGTAGGATTTAAACCGTTGCAAAAGatgagt
 gataatttgatggagaaagttagtgcctttggtgaacgcctcaagatggaggggctgaagtggtcgtaaaatgagtgagga
 atgagccaaatgagcttcaagatgaaggagctctccaaggccaaaccagtgaaaaactgttgaggatgccacctctgag
 gcccttgaggagcctgattgggcatgaatctcgatctctgtgacatgatcaataccgagaaaaatcagcagtgattgattgac
 cgtggcataaaagaaaggatcatggtgaagagcccaggatcagtaattggccttggtactgctgaaacagtggttaaaaa
 tgtgagaaggcctctcggaggtggcagctgagagggctctgatgaaatggtcaagctgatgtagatcctcaaacgttgct
 aataataggaacaaggctttggtgatgatgaaagcttggggtgagctccacaagcgaactcgatacttgcccgtatagaagaa
 acatacaaGGTACCTGCGTAGTTTCTGTGTAGAATTTGATTCTTTGATTTATTGGTAAAAATGGGATAGGAAACAAATGATTTT
 AAATGTTATCTAAAATGCCACTGGTTTTATTGGAGAATGATGTATGTATCCAGTGATTGTTCCAGTCACAGTTTATAAA
 GAGATGTTTTCCACCTAAATTCATGTAGTGAATGTTTTAAGTCAAAATTTGTCACTTTGGATACAAAGGAACAAAATATTA
 TTGAATTTTTTTTTGTGGGAAATATGTTTATATTGCTTGGAGATTAATAATGATTGATAATCTTGTTCATTTTGTGCTACAA
 GTTCCAAATTTGCAGCTCTTTGACATCCAATTTGTATATGTTGGATAAACTGCCTTTTAAATTTTTGTGTGCAAGGCAAAATGT
 TCTGTGTAGTGTCTTTTACAGAATAAGTTTGTATTCTTGATAAATTCAGATTTTATAACTTTTGAGCTTTTCTTTGTATTGCA
 TTTGTATTAgagttaagatcaccggggcatccgggttccgggaagctgacaatgagagcttggcgctatttttacacctctc
 gttcagtttcagaaacagaagtgatgctactctctgtgagcagatcagcgtgatattcgtgggcaagctttaccaagacc
 aaacaaaggaagccttgatggtgcaagaacagtatcgagcttcttcacctggtctatcatcctcaccaccaagagcgtt
 tacaGGTATTTCTAATATCATACAGGTTGTCTGTTTGTATTATGTTTATGAATTTCTCTTCTTAATTTTATTGAATATATG
 GTCAGTTAGACCTACATGTGGTATTCTATGTAGTATATCAATTTCAATTTCAAAGTTCAGCTGGTCAAATTTGACTTTATC
 TTTTTTATTATTAACTCAGCAGTGAAGCTCGAACCAGGATCTAAGCCCTAGGAAAGCCTCTCCTTACCATTGGA
 GCTGTACCTTTGGCTCAAATGGCAAATCAAATAAGGTCGAATGACTTTTATAACAAGTCTGGTCTCAACCAAAACGTTCT
 GGACATATTTATCATCCAAGTAATCAAGTCTCTTCCAACCTGATAGTTAGTGGATTCTCAGTTTGTCTCGTAAAAACGTC
 CTGCTGCTCAGTTGTCATGAGCTCTATGAAAACTTAAAGGTGATTGGAGCAAGACTACCTCAGAAATATATTTATGATGCA
 TTCGACAGCTGTTTTACTGATAGGCTGGCCACCACATCTGAGCTGCAAGCTAAATTTCTTTTCTTTAGCTTGTGTTGGG
 AGATGGGAATAAGCCTAAAAGGTTTGTAGTATTGGCAAAGAAGAAGAGAGAAAAAGGGCAAAAGAAAAATTAATTTATGTT
 GATGGGATTTTTTGGTCAGAGAAAAATTTAGCATAAAAACTTATGGCTTGGGGTGGGCTAATGACTTTTTGAAATATTGGGG
 GTGATAGTCAATTTATTCGGGTGTCAGTGAATTTACCTTTTCTTAAATTAACAAGAAATGTTGTTCTATAACCTTCTGTCT
 CTGGACCTATAACCGATGTTCAATTTTCACTCTTTGGAACGATCATTGCTGTCTGCAGATCCTTCATTTTAAATGGGAGTACTA
 GACCGCTTTTTATTATATATTGACTAATGCGTCGGTGGATTGTCAATCAATTATATAAATTATTGACAGTTGACTTCCACGTGA
 TCTACAAATGGGGGATTTGATTAATTTGACTTATTTGTTACTCTGTAATAGTTAAGTTTAGTCGTTACAATGCGCATGTCTAT
 TTCTTTGTCATCTATTCTTTTTAGGGCGCAACCCTTTGTCATCTTGGGAATGTTTATGTTCTTGTGAGAACAAAATAATGA
 TCAGATTTTAAATGATGCTTGGCAggatgacttgacaactacactagtgcaacagtgctgctcagtcaccaattcactgtccaga
 gaataattgagactgcaggggataatgagcccttctcttgaagcttgaatggaatgatgagatccagaaggtctcaccac
 agtatgaggagctgaagaaacctcagggccctgctgagccagaacctgctatgatccagtgccagtgagcctgatgatt
 cacctcatcatgcaagaagaatgctctgttagaaaaccagcaggtctcagagtggaatccatggaatcaagcaacgatgaca
 tgatggatgatctcgaatgatgactttggtgaagaaaggggggtacgctgaagggggacatgactcgaagaagcagcaac
 caccaaaagatgatctcatcagctctcaagATGCCGTATGCAATTCATTAATTAAGGCGGTTAGACGGTGCCTGATGT
 GGGTCCAGGCTGTTTAGGTTTTGAAGACAATTAAGTTGATTTCAAATCTCAATGATCATATAAACACGGATGGGTACTTCT
 TCTTTGAAGTATAACTTTTCATTGGCTCTGAATTTTCT(3, 230nt)

그림 17. *Arabidopsis thaliana* TOM (target of myb1)-like protein (At5g16880) 유전자의 *Citrus* homolog genomic DNA 염기서열. 소문자는 exon 부위를 나타낸다.


```

ATGAGTGATAATTTGATGGAGAAAGTTAGTBCCCTTTGGTGAACGCCTCAAGATTGGAGGGGCTGAAGTGGGTCGTAAAATGAGTGAAGGAATGAGCCAAATG
M S D N L M E X V S A F G E R L K I G G A E V G R K M S E G M S Q M

AGCTTCAAGATGAAGSAGCTCTTCCAAGGCCAAACCAGTTGAAAACTTGTGAGGATGCCACCTCTGAGGCCCTTGAGGAGCCTGATTGGGCCATGAAT
S F K M K E L F Q G P N P V E K L V E D A T S E A L E E P D W A M N

CTCGATCTCTSTGACATGATCAATACCGAGAAAATCAGCAGTGTGATTTGATCCGTGGCATAAAGAAAAGGATCATGTTGAAGAGCCCTAGGATTCAGTAT
L D L C D M I N T E K I S S V D L I R G I K K R I M L K S P R I Q Y

TTGSCCTTGTACTGCTTGAACAGTTGTTAAAACTGTGAGAAGGCCTTCTCGAGGTGGCAGCTGAGAGGGTCTTGATGAAATGGTCAAGCTGATGAT
L A L V L L E T V V K N C E K A F S E V A A E R V L D E M V K L I D

GATCCTCAAACTGTTGTAATATAGGAACAAGGCTTTGGTGATGATTGAAGCTTGGGGTGAAGTCCACAAGGAACTTCGATCTGCCCGTATATGAAGA
D P Q T V V N N R N K A L V M I E A W G E S T S E L R Y L P V Y E E

ACATACAAGAGTTTAAGATCACGGGACCTCCGGTTCCGGGACGTGACAATGAGAGCTTGGCCCTATTTTTACACCTCCTCGTTCAGTTTCAGAAACAGAA
T Y K S L R S R G I R F P G R D N E S L A P I F T P P R S V S E T E

GTGATGCTACTTGTGAGCAGATTGAGCGTGATATTCGTGGGCAAGGCTTTACCAAGACCAAAACAAGGAAGCCCTTGTGATGTTGCAAGAAACAGTATC
V D A T L A E Q I Q R D I R G Q S F T K D Q T K E A F D V A R N S I

GAGCTTCTTCCACCTGCTATCATCCTCACCCCAACAGAGCGTTTACAGGATGACTTGACAACACTACTAGTGCAACAGTGTCTGTCAGTCCCAATTCAC
E L L S P G L S S S P Q Q D A L Q D D L T T T L V Q Q C R K Q S Q F T

GTCCAGAGAATAATGAGACTGCAGGGGATAATGAGGCCCTTCTCTTGAAGCTTGAATGTGAATGATGAGATCCAGAAAGTCTCACCAAGTATGAGSAG
V Q R I I E T A G D N E A L L F E A L N V N D E I Q K V L T K Y E E

CTGAAGAAACCATCAGGGGCCCTGCTGAGCCAGAACCTGCTATGATCCAGTGGCAGTGGAGCTGATGATTCACCTCATCGGAAAGAAGATGCTCTT
L K K P S G A P A E P E P A M I P V A V E P D D S P H H A K E D A L

GTTAGAAACCAGCAGGTTCTCGAGGTGGATCCCATGATCAAGCAACGATGACATGATGATGATCTCGATGATGATCTTGGTAAAGAAAGCGGGGGT
V R K P A G S R G G S H G S S N D D M D D L D E M I F G K K G G G

ACGCTGAAGGGGACATGACTCGAAGAAGCAGCAACCACCAAAAGATGATCTCATCAGCTTCTAA
T S E G G H D S K K Q Q P P K D D L I S F *

MSDNLMEKVSFAFGERLKGGAEVGRKMSEGMSQMSFKMKELFGPNPVEKLVEDATSEALEEPDWAMNLD'.CDMINTEKISSVDLIRGIKRIMLKSPRIQYLALVLETVV
KNCEKAFSEVAERVLDEMVKLIDDPQTVVNNRNKALVMI EAWGESTSELRYLPVYEETYKSLRSRGI RFPGRDNESLAPIFTP P R S V S E T E V D A T L A E Q I Q R D I R G Q S F T
DQTKAEFDVARNSEI L L S P G L S S S P Q Q D L Q D D L T T T L V Q Q C R G S Q F T V O R I E T A G E N E A L L F E A L N V N D E I Q K V L T K Y E E L K K P S G A P A E P E P A M I P V A V E P D D S P H H A K E D A L
EDALVRKPA G S R G G S H S S N D D M D D L D E M I F G K K G G G *

```

그림 19. *Arabidopsis thaliana* TOM. 유전자의 *Citrus* homolog genomic DNA 염기서열(3 exon을 결합한 것)

이 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 VHS domain을 지닌 것으로 밝혀져 연구의 가치가 더욱 높다. 애기장대와 아미노산 서열의 일치성을 분석한 결과는 그림 20과 같다. 그림 20에서 보는 바와 같이 애기장대의 단백질과 상당히 높은 상동성을 보이고 있다.

TOM MGDNLMDKVTAFGERLKIGGSEVS NKISAGVSSMSFKVKELFQGP NPTDKIVEDATTENL 60
citrus MSDNLMEKVS AFGERLKIGGA EVGRKMSEGSQMSFKMKELFQGP NPVEKLVEDATSEAL 60
* . **** : ** : ***** : ** . * : * * : * . **** : ***** : * : ***** : * *

TOM EEPD WDMNLEICDMINQETINSVELIRGIKKRIMMKQPRIQYLALV LLETVCVKNEKAFS 120
citrus EEPD WAMNLDLDCMINT EKISSVDLIRGIKKRIMLKS PRIQYLALV LLETVVKNCEKAFS 120
***** * : : ***** * * . * : : ***** : * . ***** *****

TOM EVAAERVLDEMVKLIDDPQTVVNNRNKALMLIEAWGESTSELRYLPVFEETYKSLKARGI 180
citrus EVAAERVLDEMVKLIDDPQTVVNNRNKALVMIEAWGESTSELRYLPVVEETYKSLRSRGI 180
***** : ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : *****

TOM RFPGRDNESLAPIFTPARSTPAPELNADLPQH VHEPAHIQYDVPVRSFTAEGTKEAFDIA 240
citrus RFPGRDNESLAPIFTPPRSVSETEVDATLAEQIQR-----DIRGQSFTKDQTKEAFDVA 234
***** . * : . * : : * * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *

TOM RNSIELLSTVLSSSPQH DALQDDLTTTLVQQCRQSQT TVQRIIETAGENEALLFEALNVN 300
citrus RNSIELLSPGLSSSPQDALQDDLTTTLVQQCRQSQFTVQRIIETAGDNEALLFEALNVN 294
***** . ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : *****

TOM DELVKTL SKYEEMNKPSAPLTSHEPAMIPVAE EPD SPIHGREESLVRKSSGVRGGFHGG 360
citrus DEI QKVLTKYEELKKPSGAPAEPEPAMIPVAVEPDDSPHAKEDALVRK PAGSRGGSHGS 354
* : *

TOM GSGDDMMDDLDEMIFGKKNGCDSSTNPDHDPKKEGSSSKNDDLIRF 407
citrus --SNDDMMDDLDEMIFGKKGGTSEG--GHDSKKQPP--KDDLISF 395
* . ***** : * * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

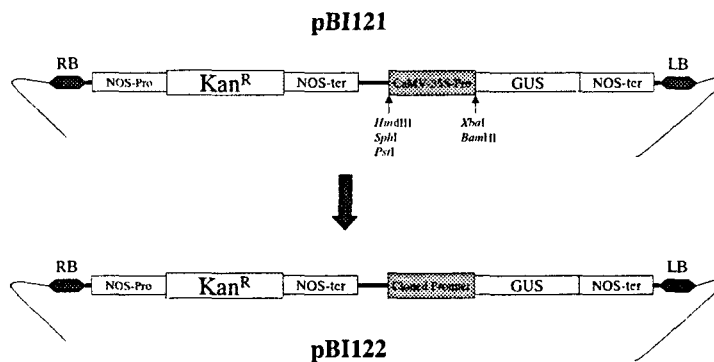
그림 20 *Citrus* TOM (citrus)과 *Arabidopsis thaliana* TOM (TOM)의 amino acid 서열 비교.

제 7 절 *Arabidopsis* 형질전환 시스템 구축과 프로모터-GUS 유전자의 도입

1. 형질전환 시스템 구축

클로닝한 프로모터를 분석하기 위한 *Arabidopsis* 형질전환 시스템 구축을 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 유전자 도입은 vacuum infiltration 방법을 사용하였으며, 선별은 kanamycin 배지를 이용하였다.

유전자를 *Arabidopsis* 형질전환을 하기 위해서 우선 agro cell (EHA105)에 형질전환용 vector (PBI 121: 다음그림 참고)에 삽입한 유전자를 agro-transformation방법 중 freeze and thaw method를 이용해 형질전환 하였다.



Agro-transformation시 PBI 121vector에 있는 kanamycin resistance gene과 agro cell (EHA105)에 있는 rifampicin resistance gene을 이용해서 LB고체배지에서 selection 한 후 생긴 colony를 LB 액체배지에서 다시 한번 selection함과 동시에 배양하였다.

LB액체배지에서 selection 후 colony PCR과 plasmid prep한 것을 DH 5a(competent cell)에 back transformation을 통해서

agro-transformation 유무를 확인하였다.

Arabidopsis 형질전환 (vacuum infiltration transformation)을 하기 위해서 selection된 LB액체배지에서 1 ml의 kanamycin과 rifampicin이 들어간 500ml LB액체배지에 OD값이 600에서 2.0이상이 될 때까지 기른 후 cell down해서 infiltration medium에 녹인 후 vacuum infiltration transformation을 위해 준비된 4~6주된 길이 15 cm 정도의 애기장대를 400 mmHg에서 7분동안 Vacuum을 걸어주었다.

Vacuum infiltration transformation된 식물은 2일 동안 cold처리 후 배양실에서 한 달 동안 기른 후 씨를 받아 kanamycin이 들어간 MS고체배지에서 다시 2일 동안 cold처리 후 배양실에서 10일정도 키운 후 kanamycin저항성을 갖는 T1식물들만 selection 하였다.

[현재 진행 단계]

Selection된 T1식물들을 개체별로 흙에 옮겨 심은 후 다시 한달 정도 키워서 씨를 받은 후 kanamycin이 들어간 MS고체배지에서 다시 2일 동안 cold처리 후 배양실에서 10일정도 T2세대를 키운 후 3(kan+):1(kan-)의 segregation을 살펴본다.

다시 3(kan+):1(kan-)로 segregation된 개체 중에서 8~9개체를 개체별로 한달 정도 키워서 씨를 받은 후 kanamycin이 들어간 MS고체배지에서 다시 2일 동안 cold처리 후 배양실에서 10일정도 T3세대를 키운 후 segregation된 식물들을 흙에 옮겨 심은 후 키우면서 wild type과의 차이점을 살펴본다.

유전자 발현 분석을 통하여 형질전환체를 검증한다.

2. 프로모터의 클로닝과 형질전환

그림 21과 그림 16에서와 같이 고안한 primer를 이용하여 transcription factor (TF)가 결합하는 부위를 PCR로 증폭하여 *SphI*-I와 *Bam*HI으로 절단한 후 pBI121 벡터에 삽입하였다. 이때 두 개의 construct를 만들었는데 하나는 963 bp를 지나는 것이고 다른 하나는 보다 짧은 614 bp promoter sequence를 지나는 것이었다. 이러한 재조합 construct는 앞에서 설명한 바와 같이 애기장대에 도입하고 형질전환체를

선별하였다.

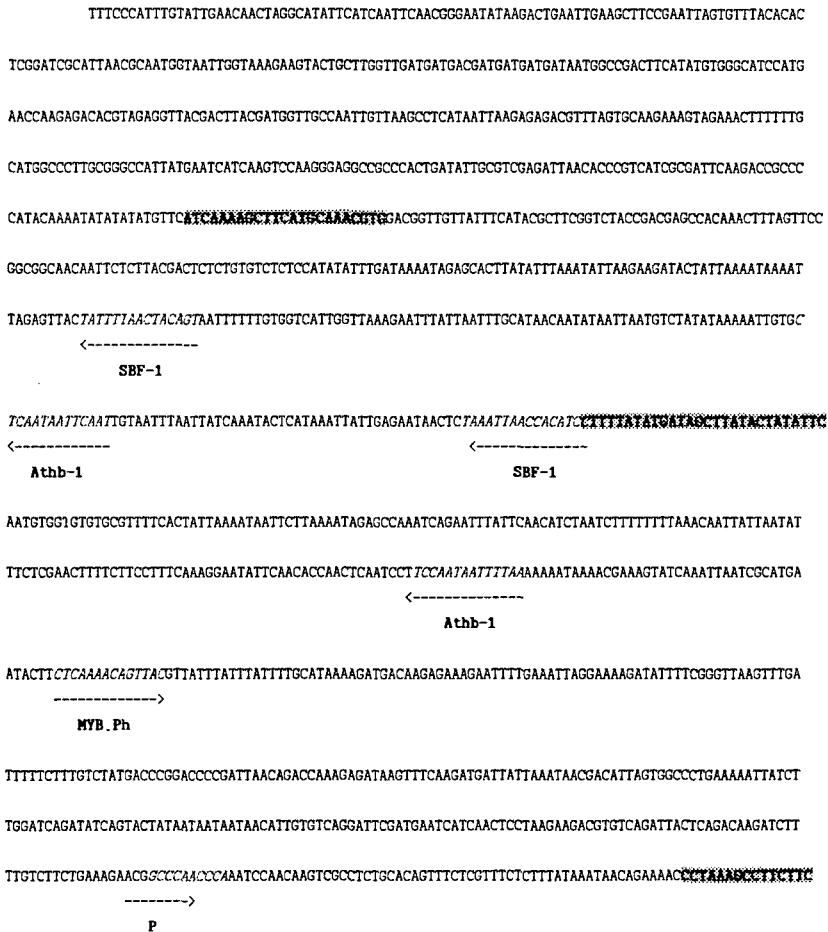
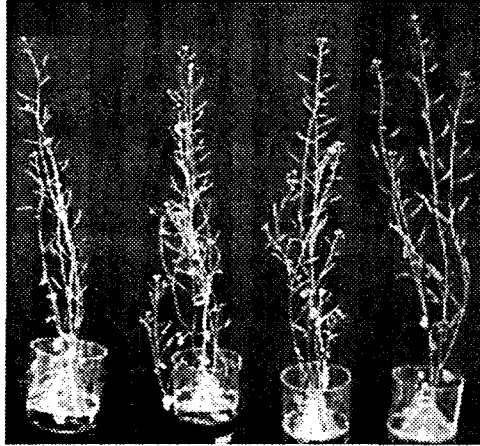


그림 21. *Citrus Lea* gene의 PCR cloning을 위한 transcription factor binding site와 primer region. *SphI*-I primer/*Bam*HI primer와 *SphI*-II primer/*Bam*HI primer로 각각 963 bp와 614 bp의 promoter sequence를 분리하였다. 음영부분: primer sites. TF binding sites는 TFMATRIX program으로 분석하였다..

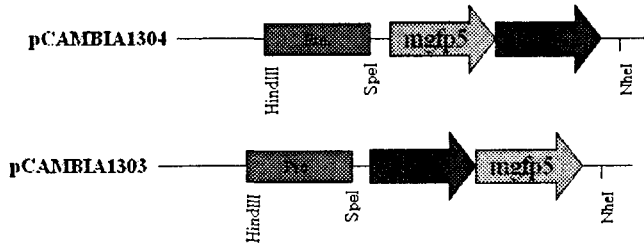
Leaf600 T1-11 Leaf600 T1-12 Wild Wild



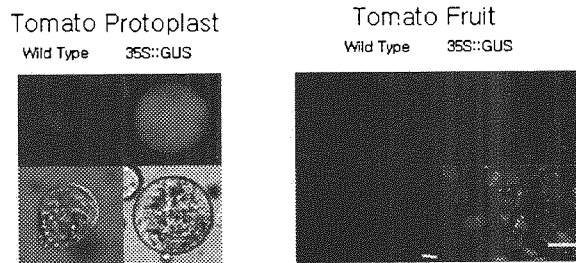
짧은 614 bp promoter 부분을 GUS 유전자 앞에 붙여 애기장대에 형질전환 하여 아래 그림과 같이 T1 세대의 씨를 확보하고 homozygote를 얻기 위하여 T2를 분석하고 있다. Homozygote T2를 이용하여 GUS staining 실험을 잎과 silique에서 수행할 계획이다.

제 8 절 토마토 형질전환 시스템 구축 및 프로모터-GUS 유전자의 도입

실험에 사용한 토마토는 내흔계 (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Ailsa Craig) 이배체이다. 프로모터 분석을 위해서 사용한 vector는 아래 그림과 같이 pCAMBIA1304와 1303이며 형질전환은 Particle bombardment를 이용하였다.



GUS activity는 Blume와 Grierson (1997)의 방법을 이용하여 0.5 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronic acid가 함유된 완충액을 이용하여 염색하였다. Vacuum infiltration 후 시료는 암소에서 37°C로 밤샘 배양하였다. 그리고 조직의 절편을 만들어 confocal and fluorescent microscopy를 이용하여 관찰하였다. 아래 그림은 이전에 만들어진 construct를 이용하여 예비실험을 수행한 결과이며, 현재 35S 프로모터 대신에 LeaP60 프로모터를 가지고 시험을 수행 중에 있으나 아직 만족할 만한 결과를 얻지 못하였다.



제 5 장 참고문헌

- Aglus, F., I. Amaya, M. A. Botella, and V. Valpuesta. 2005. Functional analysis of homologous and heterologous promoters in strawberry fruits using transient expression. *J. Exp. Bot.*, 56: 37-46.
- Ainley, W. M. and J. L. Key. 1990. Development of a heat shock inducible expression cassette for plants: characterization of parameters for its use in transient expression assays. *Plant Mol. Biol.*, 14: 949-966
- Aoyama, T., and N.-H. Chua. 1997. A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J.*, 11: 605-612
- Blume, B. and D. Grierson. 1997. Expression of ACC oxidase promoter-GUS fusions in tomato and *Nicotiana plumbaginifolia* regulated by developmental and environmental stimuli. *Plant J.*, 12: 731-746.
- Bond JE, Roose ML. 1998 *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. *Plant Cell Rep* 18:229-234
- Bramley, P.M. 2000 Is lycopene beneficial to human health? *Phytochemistry* 54: 233-236.
- Cunningham, Jr, F.X. and Gantt, E. 1998 Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 557-583.
- Digeon, J.-F., E. Guiderdoni, R. Alary, N. Michaux-Ferrère, P. Joudrier, and M. F. Gautier. 1999. Cloning of a wheat *puroindoline* gene promoter by IPCR and analysis of promoter regions required for tissue-specific expression in transgenic rice seeds. *Plant Mol. Biol.*, 39: 1101-1112.
- Dunn, M. A., A. J. White, S. Vural, and M. A. Hughes. 1998.

- Identification of promoter elements in a low-temperature-responsive gene (*blt,9*) from barley (*Hordeium vulgare* L.). *Plant Mol. Biol.*, 38: 551-564.
- Edge, R., McGarvey, D.J., and Truscott, T.G. 1997 The carotenoids as anti-oxidants-a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 41: 189-200.
- Fraser, P. D., S. Romer, C. A. Shipton, P. B. Mills, J. W. Kiano, N. Misawa, R. G. Drake, W. Schuch, and P. M. Bramley. 2002. Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 99: 1092-1097.
- Gallardo, K., C. Job, S. R. C. Groot, M. Puype, H. Demol. J. Vandekerckhove, and D. Job. 2001. Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming. *Plant Physiol.*, 126: 835-848.
- Ganapathi TR, Higgs NS, Balint-Kurti PJ, Arntzen CJ, May GD, Van Eck JM. 2001 *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic cell suspension of the banana cultivar Rasthali(AAB). *Plant Cell Rep* 20:157-162
- Hidaka T, Omura M, Ugaki M, Tomiyama M. (1990) *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of Citrus spp. from suspension cells. *Jpn J Breed* 40:199-207
- Hidaka T, Omura M. 1989 Control of embryogenesis in Citrus cell culture : Regeneration from protoplast and attempts to callus bank. *Bull. Fruit Tree Res. Stn. B* 16:1-17
- Hirschberg, J. 1999 Production of high-value compounds: carotenoids and vitamin E. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 186-191.
- James DJ, Uratsu S, Cheng J, Negri P, Viss P, Dandekar AM. 1993 Acetosyringon and osmoprotectants like betain or proline synergistically enhance *Agrobacterium*-mediated transformation of

- apple. *Plant Cell Rep* 12:559-563
- Kim, Y.S., Soh, W.Y., Suh, M.C. and Hong, C.B., 1993. Transformation of tobacco (*Nicotiana tabacum*) for hygromycin-resistance. *Korean J. Plant Tissue Culture* 20: 103-107.
- Kleines, M., R.-C. Elster, M.-J. Rodrigo, A.-S. Blervacq, F. Salamini, and D. Bartels. 1999. Isolation and expression analysis of two stress-responsive sucrose-synthase genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* (Hochst). *Planta*, 209: 13-24.
- Kochba J, Spiegel-Roy P, Saad S. 1972 Adventive plants from ovules and nucelli in citrus. *Planta* 106:237-245
- Kunitake H, Mii M. 1995 Somatic embryogenesis in Citrus species. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 30, Somatic embryogenesis and synthetic seed III. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp280-298
- Kunneman BPAM, Albers MRJ 1992 Effects of tissue culture and acclimatization conditions on the survival and growth of rooted and unrooted *Mallus* and *Pyrus* microcutting. *Acta Hort* 314:147-154
- Kwon, C.S., Paek, K.H. and Chung, W.I., 1997. Ribozyme mediated targeting of cucumber mosaic virus RNA1 and 2 in transgenic tobacco plants. *Molecules and Cells* 7(3): 326-334.
- Li DD, Shi W, Deng XX. 2002 *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calluses of Ponkan mandarin and the regeneration of plants containing the chimeric ribonuclease gene. *Plant Cell Rep* 21:153-156
- Lipp Joao KH, Brown TA. 1993 Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif::pGSFR1161 in the presence of acetosyringon. *Plant Cell Rep* 12:422-425
- Mett, V. L., L. P. Lockhead, and P. H. S. Reynolds. 1993. Copper

- controllable gene expression system for whole plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 4567-4571
- Müller-Röber, B., Sonnewald, U. and Willmitzer, L., 1992. Inhibition of the ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO J.* 11(4): 1229-1238.
- Narisawa, T., Fukaura, Y., Oshima, S., Inakuma, T., Yano, M., and Hishino, H. 1999 Chemoprevention by the oxygenated carotenoid beta-cryptoxanthin of N-methylnitrosourea-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Jan. J. Cancer Res.* 90(10): 1061-1065.
- O'Donovan, C., R. apweiler, and A. Bairoch. 2001. The human proteomics initiative (HPI). *Trends Biotechnol.*, 19: 178-181.
- Osuga K, Komamine A. 1994 Synchronization of somatic embryogenesis from carrot cells at high frequency as a basis for the mass production of embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 39:125-135
- Park, S.H. and Chung, W.I., 1998. Molecular cloning and organ-specific expression of three isoforms of tomato ADP-glucose pyrophosphorylase gene. *Gene* 206: 215-221.
- Park, S.H., Kahng, H.Y., Kim, I.J., Park, J.O. and Chung, W.I., 1998. Molecular cloning and characterization of small and large subunits of ADP-glucose pyrophosphorylase from oriental melon. *J. of Plant Research* 111: 59-63.
- Pena L, Cervera M, Juarez J, Navarro A. 1997 Genetic transformation of lime(*Citrus aurantifolia* Swing.):factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Reports* 16:731-737
- Quwerke†, P. B. F., D. Hallard, R. Verpoorte, and J. Memelink. 1999. Identification of UV-B light-responseveregions in the promoter of the tryptophan decarboxylase gene from *Catharanthus roseus*.

- Plant Mol. Biol., 41: 491-503.
- Rhim, S.L. and Kim, J.C., 1992. Expression of insecticidal δ -endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis* in Tobacco plants. *Korean J. Plant Tissue Culture* 19: 101-106.
- Rossi, V., M. Motto, and L. Pellegrini. 1997. Analysis of the methylation patter of the maize *Opaque-2 (O2)* promoter and in vitro binding studies indicate that the O2 B-zip protein and other endosperm factors can bind to methylated target sequences. *J. Biol. Chem.*, 272: 13758-13765.
- Springer. P. S. 2000. Gene traps: tools for plant development and genomics. *Plant Cell*, 12: 1007-1020.
- Stömvik, M., V. P. Sundararaman, and L. O. Vodkin. 1999. A novel promoter from soybean that is active in a complex developmental pattern with and without its proximal 650 base pairs. *Plant Mol. Biol.*, 41: 217-231.
- Urushibara S, Tozawa Y, Kawagishi-Kobayashi M, Wakasa K. 2001 Efficient transformation of suspension-cultured rice cells mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Breeding Science* 51:33-38
- Viveiros, M., Krubasik, P., Sandmann, G., Houssaini-Iraqui, M. 2000 Structural and functional analysis of the gene cluster encoding carotenoid biosynthesis in *Mycobacterium aurum* A+. *FEMS Microbiology* 187: 95-101.
- Williams, D. M. and P. A. Cole. 2001. Kinase chips hit the proteomics era. 2001. *Trends Biol. Sci.*, 26: 271-273.
- Yamagata, H., K. Yonesu, A. Hirata, and Y. Aizono. 2002. TGTCACA motif is a novel *cis*-regulatory enhancer element involved in fruit-specific expression of the *cucumisin* gene. *J. Biol. Chem.*, 277: 11582-11590.
- Yoshioka, H., R. G. Gregerson, D. A. Samac, K. C. M. Hoevens, G. Trepp, J. S. Gantt, and C. P. Vance. 1999. Aspartate

aminotransferase in alfalfa nodules: localization of mRNA during effective and ineffective nodule development and promoter analysis. *Mol. Plant-Microbe Interaction*, 12: 263-274.

Zhu, T. and X. Wang. 2000. Large-scale profiling of the *Arabidopsis* transcriptome. *Plant Physiol.*, 124: 1472-1476.