

최 중
연구보고서

화기관련유전자 형질전환을 통한
고부가가치 거베라 신품종 육성에 관한 연구

Production of transgenic gerbera breeding lines by
genetic transformation of morphology changing genes

연구기관
경상남도농업기술원

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "화기관련 유전자 형질전환을 통한 고부가가치 거베라 신품종 육성에 관한 연구" 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 5월 25일

주관연구기관명 : 경상남도농업기술원

총괄연구책임자 : 정 용 모

세부연구책임자 : 정 용 모

연 구 원 : 박 여 옥

연 구 원 : 박 소 영

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 김 정 국

협동연구기관명 : 동아대학교

협동연구책임자 : 정 영 수

요 약 문

I. 제 목

화기관련유전자 형질전환을 통한 고부가가치 거베라 신품종 육성에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 개발 목표는 이미 애기장대 풀과 같은 식물유전자 기능연구 모델식물에서 알려진 형태변이 유전자와 기능이 아직 밝혀지지 않은 유사유전자를 클로닝하고 이들 유전자들을 형질전환하여 다양한 형태의 거베라 형태변이 유전자원을 육성하여 궁극적으로 신품종계통을 육성하는 데 있다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

구 분	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2004)	-거베라 신품종 육성 -형태변이 유전자 클로닝 -거베라 형질전환
2차년도 (2005)	-거베라 신품종 육성; 형질전환체 계통 육성 및 특성 조사 -형태변이 유전자 클로닝; 거베라 형질전환체 형태 변화의 현미경 조사 -거베라 형질전환
3차년도 (2006)	-거베라 신품종 육성; 거베라 형질전환체 계통 육성 및 대량 증식 -형태변이 유전자 클로닝; 거베라 형질전환체 분자생물학적 기능 규명 -거베라 형질전환

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

국내 거베라 품종에 대한 효율적인 형질전환체계를 확립하기 위하여 실험을 수행하였다. 형질전환 순응형 genotype 스크린을 위해 실험에 이용된 국내 거베라 품종 18개 품종의 GUS 발현에 대해 실험하였고, 효율적인 형질전환을 위하여 제균제로는 cefotaxime이 선택되었고, 효율적인 선발을 위하여 선발항생제로서 카나마이신이 선택되었다. 카나마이신 농도는 5ppm에서 10ppm이 효율적이었고, 접종할 때 절편체를 깨끗한 scalpel(#10 blade)로 절단하는 것보다 아그로박테리움의 농축액을 묻힌 scalpel(#10 blade)으로 절단하는 방법이 훨씬 높은 GUS positive 빈도를 나타냈다. 고효율 형질전환 체계 확립을 위하여 호르몬 농도는 BA 1ppm과, Zeatin 1ppm, IAA 0.1ppm,을 처리하였을 때, 후기 선발에서 높은 생존율을 보였다. Regeneration의 효율을 높이기 위해 CI(callus induction)배지에서 4주 암배양하고 Regeneration배지로 명배양하는 것이 shoot의 유도가 빨랐다. 또한 공배양중에 황화합물을 첨가하였을 때, GUS발현도 증가하였으며, 카나마이신 선발배지에서 왕성한 생육을 나타내었다. GUS분석과 PCR을 통하여 도입유전자를 확인하였으며, 현재 shoot 유도에 힘쓰고 있다.

본 연구의 결과로써 1) 발굴되고 기능이 확인된 형태변이 유전자들은 거베라 뿐 만 아니라 다른 화훼작물에서도 고부가가치 신품종육성에도 도입되어 사용될 수 있고, 2) 발굴된 유전자들이 거베라에 도입되어 다양한 종류의 형질전환체들이 생산되면 현재 국내 거베라 육종에 가장 약점인 유전자원 pool을 크게 확장할 수 있는 효과가 있다. 이와 같은 유전자원 pool의 확대는 앞으로 계속되는 거베라육종을 위해서 매우 중요한 모본으로 활용될 것이다. 그리고 3) 본 연구의 직접적 결과로써 생산될 형태변이 형질전환체들은 단기간에 선발되고 대량 증식되어 짧은 기간 내에 새로운 신품종으로 육성되어 국내 거베라 육종연구를 크게 활성화 시킬 것으로 생각된다. 마지막으로 4) 형태변이 형질전환체들에 대한 생리적, 분자생물학적 규명은 형태변이의 중요 매커니즘을 이해하고 창출하는데 커다란 학문적 기여를 할 것이다.

S U M M A R Y

Gerbera(*Gerbera hybrida*) is a valuable ornamental species grown as a potted plant and cut flowers. However genetic variability within the gerbera genus is very limited, so it is absolutely needed to introduce and widen genetic resources into breeding program.

In this study, 18 Korean gerbera lines were chosen as materials and 12 Korean gerbera lines were tested to establish *Agrobacterium* -mediated genetic transformation procedure.

In order to select of Korean gerbera lines which are amenable to *Agrobacterium*-inoculation, 12 Korean gerbera lines have been screened and 7 lines showed positive *Agrobacterium*-inoculation. Thiol-compounds addition in multiplication medium has been ineffective and washing reagent for removal of *Agrobacterium* had been chosen with cefotaxime. More callus were produced from BA 2ppm, Zeatin 2ppm, IAA 0.2ppm in pre-culture and regeneration medium but there were no difference in the number of GUS expression. So, in order to achieve highly efficient *Agro*-inoculation, petiole and leaf explants have been treated with four different pre-culture periods, two different co-culture periods and two different *Agrobacterium tumerfaciens*. As a result, high GUS expression have been showed from petiole and leaf explants treated no pre-culture period, with LBA4404 *Agrobacterium tumerfaciens*, 5 day co-culture period and dipping treatment.

C O N T E N T S

Chapter 1. Summary of research	7
Research of objective	
Research rationale and area	
Research rationale	
Research area	
Chapter 2. Current status of research area	13
Gerbera breeding status	
Research status on morphology gene	
Chapter 3. Results	17
Effect of hormone condition on plant generation	
Effect of hormone concentration for callus induction in regeneration media	
Effect of 3 different hormone concentrations for callus induction	
Effect of dipping treatment on genetic transformation	
Effect of 3 different periods of co-cultivation on genetic transformation	
Effect of 3 different dipping conditions on genetic transformation	
Effect of 2 different <i>Agrobacteria</i> strains on genetic transformation	
Effect of thiol-compound treatment on genetic transformation	
Effect of thiol-compound treatment on plant growth and callus induction	
Production of gerbera transgenic plant	
Construction of plant expression vectors	
Chapter 4. Achievements and contributions of results	61
Chapter 5. Application of results	63
Chapter 6. Scientific information from foreign research	65
Chapter 7. References	67

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	7
제 1절 연구개발의 목적	
제 2절 연구개발의 필요성 및 범위	
1. 연구개발의 필요성	
2. 연구개발의 범위	
제 2 장 국내외 기술개발 현황	13
제 1 절 거베라 육종 기술	
제 2 절 형태변이유전자 연구현황	
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	17
제 1 절 호르몬이 재분화에 미치는 영향	
제 2 절 전처리 배지에서 호르몬 농도가 callus유도에 미치는 영향	
제 3 절 재분화 배지에서 세 가지 다른 호르몬 농도가 callus 유도에 미치는 영향	
제 4 절 형질전환 효율에 있어서 dipping처리의 효과	
제 5 절 세 가지 다른 공배양 기간처리에 따른 GUS발현 비교	
제 6 절 세 가지 다른 dipping농도에 따른 GUS발현 비교	
제 7 절 두 가지 다른 Agrobacterium tumerfacience가 형질전환 효율에 미치는 영향	
제 8 절 공배양 배지에 황화합물 처리가 형질전환에 미치는 영향	
제 9 절 세 가지 다른 황화합물 첨가에 따른 식물 상태 및 callus형성 비교	
제 10 절 다양한 유전자 도입 형질전환체 생산	
제 11 절 거베라 형질전환 도입 유전자 발현벡터 제작	
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	61
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	63
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	65
제 7 장 참고문헌	67

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 연구의 개발 목표는 이미 애기장대 풀과 같은 식물유전자 기능연구 모델식물에서 알려진 형태변이 유전자와 기능이 아직 밝혀지지 않은 유사유전자를 클로닝하고 이들 유전자들을 형질전환하여 다양한 형태의 거베라 형태변이 유전자를 육성하여 궁극적으로 신품종계통을 육성하는 데 있다.

연구의 목표달성을 위하여 1) 애기장대 풀과 벼로부터 개화기 조절유전자를 확보 및 형질전환하여 영양생장기 단축을 통한 식물의 형태변화를 유도하는 연구를 수행하고, 2) 동시에 지베렐린 신호전달과정을 유전자조작을 통하여 실내 관상분화용 및 미니포트 거베라 식물을 육성하는 연구를 수행하는 것이다.

제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위

1. 연구개발 필요성

- 거베라의 품종보호대상작물지정이 2004년으로 예상되어 이에 따른 외국도입품종에 대한 로얄티 지급이 불가피한 실정임
- 2002년 현재 전국 214농가 78ha재배되고 있으며, 생산량은 85,263천본, 그리고 생산액은 162억원으로 추산되며 주재배지는 경남 김해, 부산 강서, 서귀포임
- 화란의 거베라 재배면적은 2001년도 256ha로 증가 추세이며, 일본은 2002년도 109ha로 재배면적이 최근 증가 추세에 있음
- 거베라의 국내재배에 대한 종묘는 연간 100만본 정도로 모두가 외국(화란)에서 육성한 품종으로 국내 육성 신품종의 종묘 자급이 절실히 요구됨
- 국내에서 육성된 품종은 원예연구소에서 '99년 4품종, 2000년 4품종을 등록한 실정이며, 현재 경남 화훼육종연구소에서도 2001년 6품종, 2002년 4품종, 2003년 4품종 모두 14품종을 육종하여 종자생산·판매신고를 통한 신품종

등록을 한 바 있으나, 외국 우수품종의 로열티지급 문제 및 묘 수입에 따르는 농가의 부담이 가중될 것으로 판단됨.

- 화란 등 거베라 육종을 하고 있는 외국에서는 이미 거베라 신품종 육성을 위하여 유전공학 기법을 적용하고 있어 국내에서도 생명공학기법 적용에 의한 고부가가치 신품종 육성이 시급함
- 국내의 거베라 육종은 짧은 역사와 극소수의 육종모본과 유전자원부족으로 소비자의 기호를 충족시키고 나아가서 일본수출시장을 겨냥한 다양한 품종을 만드는 데 여러 가지 어려움이 많음
- 따라서, 다양한 변이와 품종을 단시간에 창출하기 위하여 생명공학기법을 이용한 특정형질에 대한 개선과 품종육성기술개발이 매우 시급함

2. 연구개발 범위

구분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2004)	제 1 세부 과제 거베라 신품종 육성	<ul style="list-style-type: none"> - 거베라 식물재료 재배 및 관리: 적정재배환경조절 온실 내에서의 식물재배 및 관리 - 거베라 기내 대량 증식: 형질전환재료 확보를 위하여 거베라 무균, 기내 대량 증식 - 형질전환체 온실 순화 및 재배: 형질전환체의 온실 순화 및 형질전환체 재배 및 특성 조사
	제 1 협동 과제 형태변이 유전자 클로닝	<ul style="list-style-type: none"> - 애기장대와 벼의 개화시기조절 유전자 확보: 피토크롬을 포함하는 광수용체, LFY, FT (Flowering locus T) 유전자 확보 - 지베렐린 신호전달 경로 유전자 확보: 지베렐린 신호전달 기작에 관련하는 것으로 알려진 애기장대 유전자, SHI (short internodes), GAI (gibberellic acid insensitive), 확보 - 형질전환발현백터 작성: 확보된 유전자를 가지고 거베라 형질전환을 위한 발현백터 제작(pBI121 & pCAMBIA2301)
	제 2 협동 과제 거베라 형질전환	<ul style="list-style-type: none"> - 거베라 기내 증식: 형질전환을 위한 거베라 식물체 대량 증식 - 거베라 형질전환: 아그로박테리아를 이용한 거베라 형질전환 - 식물체 재분화 및 유전자 도입여부 확인; 형질전환체 재분화 및 유전자 도입 확인(GUS 분석 & PCR분석)

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2005)	제 1 세부 과제 거베라 신품종 육성	<ul style="list-style-type: none"> - 거베라 식물재료 재배 및 관리 계속: 적정재배환경 조절 온실 내에서의 식물재배 및 관리 - 거베라 기내 대량 증식 계속: 형질전환재료 확보를 위하여 거베라 무균, 기내 대량 증식 - 형질전환체 온실 순화 및 재배 계속: 형질전환체의 온실 순화 및 형질전환체 재배 및 특성 조사 - 형질전환체 계통 육성 및 특성 조사: 품종육성을 위한 특성 조사 및 분화가능 유전자형 선발
	제 1 협동 과제 형태변이 유전자 클로닝	<ul style="list-style-type: none"> - 애기장대와 벼의 개화시기조절 유전자 및 지베렐린 신호전달 경로 유전자 확보 계속: 수용체, LFY, FT (Flowering locus T) 유전자 확보 및 ANT(AINTEGUMENTA) 및 GAI (gibberellic acid insensitive), 및 벼 유사유전자(ANT homologue) 확보 - 형질전환발현백터 작성: 확보된 유전자를 가지고 거베라 형질전환을 위한 발현백터 제작(pBI121 & pCAMBIA2301) - 거베라 형질전환체 형태 변화의 현미경조사: 화기구조, 세포층 배열 및 기관분화의 정도를 현미경으로 관찰 및 조사
	제 2 협동 과제 거베라 형질전환	<ul style="list-style-type: none"> - 거베라 기내 증식 계속: 형질전환을 위한 거베라 식물체 대량 증식 - 거베라 형질전환 계속: 아그로박테리아를 이용한 거베라 형질전환 - 식물체 재분화 및 유전자 도입여부 확인 계속; 형질전환체 재분화 및 유전자 도입 확인(GUS 분석 & Southern & northern분석)

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2006)	제 1 세부 과제 거베라 신품종 육성	<ul style="list-style-type: none"> - 형질전환체 온실 순화 및 재배 계속: 형질전환체의 온실 순화 및 형질전환체 재배 및 특성 조사 - 거베라 형질전환체 특성 조사: 적정재배환경조절 온실 내에서의 식물재배 및 관리 - 거베라 형질전환체 계통 육성 및 대량 증식: 형질전환재료 확보를 위하여 거베라 무균, 기내 대량 증식
	제 1 협동 과제 형태변이 유전자 클로닝	<ul style="list-style-type: none"> - 거베라 형질전환체 형태 변화의 현미경조사 계속: 화기구조, 세포층 배열 및 기관분화의 정도를 현미경으로 관찰 및 조사 - 거베라 형질전환체 분자생물학적 기능 규명: 형질전환체에서 transgene들의 발현 양상과 형태적 변이정도의 상관관계를 비교 분석하고, 지베렐린 신호 전달 경로가 예상대로 억제되었는지를 확인하기 위하여 지베렐린처리에 대해 형질전환체의 반응을 조사
	제 2 협동 과제 거베라 형질전환	<ul style="list-style-type: none"> - 거베라 형질전환 계속: 아그로박테리아를 이용한 거베라 형질전환 - 식물체 재분화 및 유전자 도입여부 확인 계속; 형질전환체 재분화 및 유전자 도입 확인(GUS 분석 & Southern & northern분석)

여 백

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 거베라 육종 기술

현재 거베라의 신품종육성을 위하여 국내에서는 주로 교잡육성을 행하고 있으며, 화란 등 거베라 생산 선진국에서는 최근 유전공학적 기법을 적용한 신품종생산을 위하여 활발한 연구와 투자가 진행되고 있다. 현재 국내에서는 교잡육종과 DNA 분자마커를 이용한 분자유종의 제한된 기술로 신품종생산을 위한 연구가 본 연구의 주관기관인 경남농업기술원 화훼육종연구소를 중심으로 수행되고 있는데, 교잡육종만으로는 화란과 같은 선진국에 비해 거베라 육종모본과 유전자원이 크게 부족하여 단기간에 다양한 우수품종을 육성하는데 한계가 있다. 이는 가까운 일본에서 최근 연중 생산이 가능한 거베라의 수요가 점차 늘어가는 추세에 있고, 앞으로 그 이용도가 점차 늘어날 것이라는 전망을 고려할 때, 매우 안타까운 현실이다. 현재 국내 거베라 육종기술은 여러 가지 제약으로 매우 불리한 상황에 있지만 본 연구의 주관기관인 경남농업기술원 화훼육종연구소에서는 국제경쟁력에 뒤지지 않기 위해서 최근에 국내 재배품종 및 도입 신품종의 수집 및 이들의 유연관계분석을 완성하여 현재 교잡육종의 이론적 근거와 자료로 활용하여 거베라 육종을 수행하고 있으며, 2001년에서 2002년까지 1년간 네덜란드의 와게닝겐 UR소속의 국제식물연구소에서 거베라의 신품종육성을 위한 형질전환기법과 시스템개발을 위한 공동연구를 본 연구의 총괄책임자인 정용모박사가 수행한 바 있다. 또한 경남농업기술원 화훼육종연구소에서는 매년 자체예산을 들여 화란의 육종전문가를 초빙하여 세미나와 워크숍을 개최하여 선진육종기술과 시스템도입을 지속적으로 수행해 왔다. 또한 본 과제 참여연구팀의 제2협동과제 책임자로 참여하는 동아대 정영수교수 연구팀과 공동으로 지난 1년간 거베라의 형질전환체계확립을 위한 실험을 수행해 왔다. 이제 본 연구팀은 이번 과제를 통하여 3년의 연구기간동안 이미 수행된 기초실험을 바탕으로 국내 거베라의 형질전환을 통한 분자유종기술개발과 신품종육종에 관한 기술개발을 하려고 한다.

제 2 절 형태변이유전자 연구현황

장일식물이며 쌍자엽식물인 애기장대에 있어서 현재까지 밝혀진 개화시기 조절에는 크게 네 가지의 서로 다른 경로가 존재함이 밝혀졌다(Page et al., 1999).

첫번째는 피토크롬을 포함하는 여러 광수용체, GI (GIGANTEA), CO (CONSTANS), FT (Flowering locus T) 등이 관여하는 광주기 의존적인 경로 (photoperiod dependent pathway, 또는 long day pathway)이며 (Putterill et al., 1995; Lin, 2000), 두번째 경로는 주로 식물호르몬의 일종인 GA (gibberellic acid)가 필수적인 역할을 하는 단일조건에서 영향을 미치는 경로이다 (Meyerowitz et al., 1991; Blazquez and Weigel, 1999; Blazquez and Weigel, 2000). 그리고, FCA, FVE와 같은 유전자들이 영향을 미치는 자발적 경로(autonomous pathway)와 VRN1, VRN2등이 관여하는 춘화처리 경로(vernalization pathway)로 이는 장일조건이나 단일조건에 모두 영향을 미친다 (Macknight et al., 1997; Aukerman et al., 1999; Page et al., 1999; Schomburg et al., 2001). 이 두 경로의 신호는 개화시기 조절의 주요 repressor로 작동하는 MADS 유전자 FLC에 전달된다. 이렇게 전달된 신호는 최종적으로 meristem identity gene 인 LFY와 AP1에 전달되어 비로써 생식생장기로의 전환이 이루어진다. 이들 경로에 관여하는 새로운 유전자들이 계속 발견되고 있는 데 그중 하나가 SOC1(=AGL20)으로 FT와 FLC의 하위에서 작동하는 것으로 알려져 있다. 이들 애기장대유전자중 AP1와 LFY를 과다발현 시킴으로서 Aspen 나무, 오렌지나무, 벼에서 개화시기를 단축시킬 수 있었다. FT와 AGL20도 애기장대에서의 효과를 고려해 볼때, 비슷한 효과를 보일 것으로 보인다.

지금까지 지베렐린 신호전달 기작에 관련하는 것으로 알려진 애기장대 유전자들은 SPY (SPINDLY), SHI (short internodes), RGA (repressor of gal-3), GAI (gibberellic acid insensitive)등이 있다. SPY 유전자는 지베렐린 신호전달에 관여하여 클로닝된 첫 번째 유전자로 지베렐린 억제제를 첨가한 상태에서도 발아가 되는 돌연변이체로부터 발견이 되었다. SPY 단백질은 동물에서 신호전달에 관여하는 단백질에 당을 붙여주어 변경시키는 O-linked N-acetylglucosamine (OGlcNAc) 전이효소와 높은 상동성을 보이며, GAI 단백질이 핵내에 존재하는데 관여할 것으로 생각한다. SHI유전자는 잠정적인 zincfinger 전사인자이며, shi 돌연변이체에서 과다 발현되어 지베렐린에 반응하지 않는 중간형 난쟁이화를 야기한다. shi 돌연변이체는 지베렐린에 대한 개화반응에 있어서 gai 돌연변이체와 다른 표현형을 보이는 데, shi 돌연변이체에서는 고농도의 지베렐린을 처리했을 경우 개화가 늦어지는 것을 막을 수 있지만 gai돌연변이체에서는 반응이 없다. 따라서 SHI단백질은 GAI 단백질과는 다른 지베렐린 신호전달 경로에서 관여한다. RGA 유전자는 지베렐린이 결핍된 gal-3 돌연변이체의 난쟁이 표현형을 억제하는 돌연변이체에서 발견되었다. RGA 유전자는 GAI 유전자와 상동성이 있으며, 역할 또한 GAI 유전자와 같이 지베렐린 신호전달을 억제하는 역할을 하는

것으로 밝혀졌다. 지베렐린에 반응을 하지 않는 다른 식물 돌연변이체들의 경우에도 애기장대의 GAI유전자나 RGA유전자와 유사한 유전자가 관여하는 것으로 알려져 있다. 예를 들면 옥수수에서 d8 locus에 있는 돌연변이, 벼의 slender rice 1 (slr1) 돌연변이체나, 밀의 Rht-B1b and Rht-D1b 돌연변이가 비슷한 경우이다. 밀의 semi-dwarf 품종을 만들어낸 이들 유전자들(Rht-B1b, Rht-D1b)의 돌연변이는 녹색혁명에 크게 기여한 유전자들이다. GAI유전자를 벼에 도입해본 결과 애기장대에서와 유사한 현상을 보였다 (Fu et al., 2001). 이는 지베렐린 신호전달기작이 진화적으로 상당히 다른 두 식물사이에도 보존되어 있다는 것을 보여주는 결과이다. 최근 애기장대의 gai유전자를 GAI promoter을 이용하여 국화에 도입시켜, 발현시킨 결과, 키가 작고 꽃의 크기가 줄어 든 국화를 만드는데 성공하였다 (Petty et al., 2003).

여 백

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 호르몬이 재분화에 미치는 영향

1. 목적

고효율의 형질전환기술개발을 위한 다양한 처리조건 확립을 위하여 형질전환 과정 중, 효과적인 재분화를 위한 호르몬의 종류를 규명하는데 실험 목적이 있다.

2. 재료

이 실험을 하기 위하여 두가지 품종 052, 041의 엽병과 엽신을 이용하여 항생제를 첨가하지 않은 서로 다른 재분화 배지에 치상하였다.

3. 방법

가) 식물 재료 준비

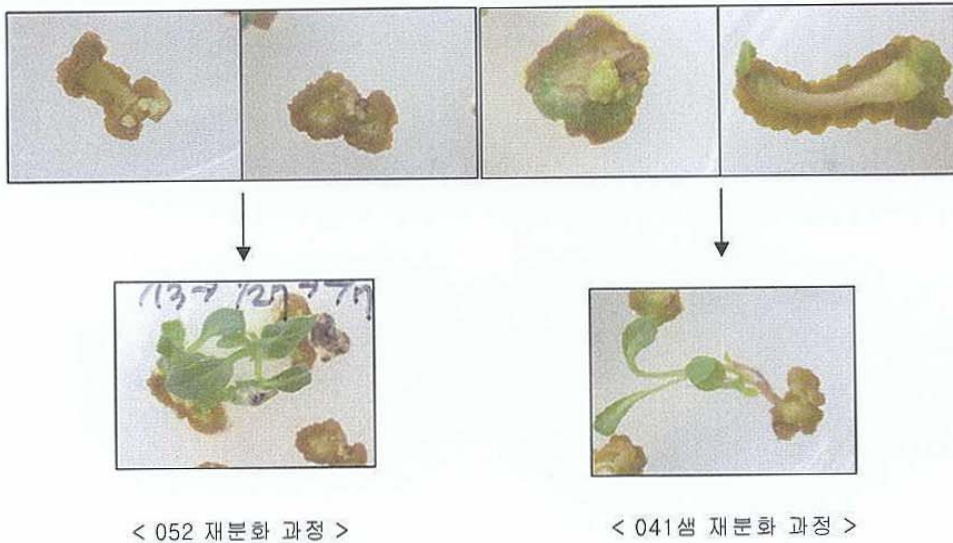
거베라의 엽병과 엽신을 1cm 정도의 크기로 자른다. 잘린 엽병과 엽신을 CI(callus induction:MS vitamin 4.4g/ℓ, sucrose 2%, TDZ 0.5mg/ℓ, NAA 0.1mg/ℓ, pH=5.8, Sigma Agar 1%)배지와 Re(regeneration:MS vitamin 4.4g/ℓ, sucrose 2%, IAA 0.2mg/ℓ, Zeatin 2mg/ℓ, BA(6-benzylaminopurine) 2mg/ℓ, pH=5.8, Sigma Agar 1%)배지에 각각 치상하였다.

나) 계대 배양

치상한 엽병과 엽신은 24℃ 명배양하였다. 그리고 2주마다 같은 배지로 계대 배양 하면서 결과를 관찰하였다.

4. 결과

실험을 위해 선택된 두 가지 배지는 우리의 예상과는 달리 많은 shoot를 생성하지 못하였고, 한 가지 배지만 선택하여 shoot을 유도하는 것 보다는 처음 4주 동안은 CI배지에 치상한 후, Re배지로 옮겨가는 조건에서 보다 많은 shoot가 유도되는 것을 알 수 있다.



제 2 절 전처리 배지에서 호르몬 농도가 callus에 미치는 영향

1. 목적

고효율의 형질전환기술개발을 위한 다양한 처리조건 확립을 위하여 형질전환 과정 중, 전처리 배지에서 두 가지 다른 호르몬 농도 처리가 callus 유도에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험을 수행하였다.

2. 재료

Agrobacterium 감염에 순응성이 확인된 011, 016, 022을 포함한 12가지 품종을 가지고 실험을 하였다.

3. 방법

가) 식물 재료 준비

접종할 거베라의 엽병과 엽신을 1cm정도로 자른다. 자른 엽병과 엽신을 PRE(pre-culture)배지에 치상한다. PRE(pre-culture)배지를 두 가지 종류를 사용한다. 이 PRE(pre-culture)배지에는 MS salt(+ vitamin) 4.4g/ml, Sucrose 2%, Sigma agar 1.0%, pH5.8을 기본으로 하고 두 가지 다른 호르몬 농도 BA 1ppm, Zeatin 1ppm, IAA 0.1ppm과 BA 2ppm, Zeatin 2ppm, IAA 0.2ppm에 치상한다.

이때 전처리 기간은 6일로 고정한다. Micropore로 봉한 뒤 25℃에 6일 동안 암배양하였다.

나) *Agrobacterium* preparation

거베라의 형질전환을 위하여 이용된 *Agrobacterium*은 expression vector PCAMBIA2301(kan^R 포함)포함하는 LBA4404를 사용하였다. 고체 YEP medium kanamycin 100mg/ℓ, rifampicin 25mg/ℓ, peptone 10g/ℓ, NaCl 5g/ℓ, yeast extract 5g/ℓ, 1.5%(w/v)agar (pH 7.0)에 streaking 한 후 25℃에서 배양하여 생성된 single colony를 같은 항생제가 들어 있는 액체 YEP medium 10ml에 넣고 OD600 0.6~0.8이 될 때까지 25℃에서 250rpm으로 shaking하였다. 다 자란 culture에 30% glycerol stock 10ml을 넣고 vortex한 뒤, 1.5ml tube에 1ml씩 분주하여 액체질소로 급속 냉각하여 -70℃에서 보관 하였다. 접종 하루 전에 항생제가 들어있는 액체 YEP medium 200ml에 -70℃에서 보관해 놓은 *Agrobacterium tumefaciens* stock(competent cell)을 1ml 넣고 OD600이 0.6~0.8이 될 때까지 25℃에서 250rpm으로 shaking하였다.

접종 당일에 액체 YEP medium 200ml을 50ml씩 나눠서 20℃, 7000rpm에서 15분 동안 centrifuge하였다. 각각의 tube에 있는 *A. tumefaciens* pellet에 액체 CCM(MS vitamin 4.4g/ℓ, sucrose 2%, IAA 0.1mg/ℓ, Zeatin 1mg/ℓ, BA(6-benzylaminopurine) 1mg/ℓ, Acetosyringone 100 μM, pH=5.8)을 액체 CCM을 10ml 넣어 만들었다.

다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

액체RE(MS vitamin 4.4g/ℓ, sucrose 2%, IAA 0.1mg/ℓ, Zeatin 1mg/ℓ, BA(6-benzylaminopurine) 1mg/ℓ pH=5.8)배지10ml과 *A. tumefaciens* pellet을 액체 CCM10ml 녹인 농축액 중에서 50-70ul을 따서 100ml삼각플라스크에 담는다. 만들어진 접종 용액에 PRE배지에 6일간 배양한 엽병과 엽신을 넣고 28℃, 50rpm에서 2일간 암배양 시킨다.

라) Wash-out and callus induction

co-cultivation 후에 제균을 위해서 액체 1/2 RE(regeneration medium)에 항생

제(cefotaxime500ppm) wash-out하였다. 엽병과 엽신을 filter paper위에 놓고 물기를 제거한 뒤 선발항생제가 없는 CI(callus induction:MS vitamin 4.4g/ℓ, sucrose 2%, TDZ 0.5mg/ℓ, NAA 0.1mg/ℓ, pH=5.8, Sigma Agar 1%, sulbenicilin500ppm)에 엽병과 엽신을 따로 치상하였다.

마) GUS expression assay

형질전환의 효율을 검정하기 위하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Jefferson(1987)의 방법을 사용하였다. 1ml의 GUS 발색용액을 만들기 위하여 3mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronie (X-Gluc)을 150μℓ dimethyl formamide에 녹인 후, 850μℓ의 solution B(1% Triton X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. 3일간 공배양 시킨 엽병과 엽신을 wash-out 하기 전에 GUS 발색 용액을 첨가한 후, 37°C incubator에서 overnight 처리 하였다. 처리 후 destaining solution (ethanol 2.5ml, 10% formaldehyde 5ml, 5% glacial acetic acid 2.5ml)을 첨가하여 4°C에 보관하며 GUS 발현 여부와 정도를 관찰하였다.

바) 계대배양

CI(callus induction:MS vitamin 4.4g/ℓ, sucrose 2%, TDZ 0.5mg/ℓ, NAA 0.1mg/ℓ, pH=5.8, Sigma Agar 1%, sulbenicilin500ppm)에 치상된 엽병과 엽신은 2주 뒤에 선별항생제(Kanmycin5ppm)이 첨가된 CI배지에 계대 배양한다.

4. 결과

callus의 발생율은 품종 간에 약간의 차이는 있었으나, 첫 번째 농도 처리에서는 041, 042 품종에서만 callus 생성이 잘되었고, 두 번째 농도 처리에서는 011, 022, 031품종을 제외한 나머지 9개 품종에서 callus가 잘 생성되었다. 전체적으로 품종을 비교하면 전반적으로 BA 2ppm, Zeatin 2ppm, IAA 0.2ppm의 농도에서 더 양호한 결과를 보였다. 그리고 GUS 발현 정도도 첫 번째 호르몬 농도 처리보다 두 번째 농도 처리가 더 많이 강하게 나타났고, callus의 부푼 정도도 두 번째 호르몬 처리 농도가 더 좋았다.

표 1. 전처리 배지에 서로 다른 호르몬 농도에서 callus 비교

line	1x growth hormone		2x growth hormone	
	petiole(%)	leaf(%)	petiole(%)	leaf(%)
011	1/19(5.3)	2/5(20.0)	26/26(100)	2/25(8.0)
016	7/10(70.0)	10/10(100)	49/50(98.0)	44/44(100)
022	12/33(36.4)	3/23(13.0)	42/43(97.7)	38/39(97.4)
023	4/13(30.8)	2/15(13.3)	11/11(100)	12/12(100)
024	2/7(28.6)	5/5(100)	33/33(100)	24/24(100)
031	3/26(11.5)	2/23(8.7)	17/19(89.5)	27/36(27.7)
041	5/5(100)	3/3(100)	31/31(100)	31/31(100)
042	4/4(100)	4/4(100)	50/50(100)	52/52(100)
043	2/27(7.4)	2/14(14.3)	27/27(100)	37/37(100)
051	1/12(8.3)	4/5(80.0)	30/30(100)	26/26(100)
052	15/20(75.0)	5/8(62.5)	38/38(100)	44/44(100)
053	6/7(85.7)	9/9(100)	28/28(100)	28/28(100)

제 3 절 재분화 배지에서 세 가지 다른 호르몬 농도 처리가 callus 유도에 미치는 영향

1. 목적

고효율의 형질전환기술개발을 위한 다양한 처리조건 확립을 위하여 형질전환 과정 중, 재분화 배지에서 세 가지 다른 호르몬 농도 처리가 callus 유도에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험을 하였다.

2. 재료

보다 많은 callus 유도를 위하여 011, 016, 022을 포함한 12가지 품종을 가지고 이 실험하였다.

3. 방법

가) 식물 재료 준비

접종할 거베라의 엽병과 엽신을 1cm정도로 자른다. 자른 엽병과 엽신을 PRE(pre-culture)배지에 치상한다. PRE(pre-culture)배지를 두 가지 종류를 사용한다. 이 PRE(pre-culture)배지에는 MS salt(+ vitamin) 4.4g/ml, Sucrose 2%, Sigma agar 1.0%, pH5.8을 기본으로 하고 두 가지 다른 호르몬 농도 BA 1ppm, Zeatin 1ppm, IAA 0.1ppm과 BA 2ppm, Zeatin 2ppm, IAA 0.2ppm에 치상한다. 이때 전처리 기간은 6일로 고정한다. Micropore로 봉한 뒤 25℃에 6일 동안 암배양하였다.

나) *Agrobacterium* preparation

거베라의 형질전환을 위하여 이용된 *Agrobacterium*은 expression vector PCAMBIA2301(kan^R 포함)포함하는 LBA4404를 사용하였다. 고체 YEP medium kanamycin 100mg/ℓ, rifampicin 25mg/ℓ, peptone 10g/ℓ, NaCl 5g/ℓ, yeast extract 5g/ℓ, 1.5%(w/v)agar (pH 7.0)에 streaking 한 후 25℃에서 배양하여 생성된 single colony를 같은 항생제가 들어 있는 액체 YEP medium 10ml에 넣고 OD600 0.6~0.8이 될 때까지 25℃에서 250rpm으로 shaking하였다. 다 자란 culture에 30% glycerol stock 10ml을 넣고 vortex한 뒤, 1.5ml tube에 1ml씩 분주

하여 액체질소로 급속 냉각하여 -70°C 에서 보관 하였다. 접종 하루 전에 항생제가 들어있는 액체 YEP medium 200ml에 -70°C 에서 보관해 놓은 *Agrobacterium tumefaciens* stock(competent cell)을 1ml 넣고 OD600이 0.6~0.8이 될 때까지 25°C 에서 250rpm으로 shaking하였다.

접종 당일에 액체 YEP medium 200ml을 50ml씩 나눠서 20°C , 7000rpm에서 15분 동안 centrifuge하였다. 각각의 tube에 있는 *A. tumefaciens* pellet에 액체 CCM(MS vitamin 4.4g/l, sucrose 2%, IAA 0.1mg/l, Zeatin 1mg/l, BA(6-benzylaminopurine) 1mg/l, Acetosyringone 100 μM , pH=5.8)을 액체 CCM을 10ml 넣어 만들었다.

다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

액체 RE(MS vitamin 4.4g/l, sucrose 2%, IAA 0.1mg/l, Zeatin 1mg/l, BA(6-benzylaminopurine) 1mg/l pH=5.8)배지 10ml과 *A. tumefaciens* pellet을 액체 CCM 10ml 녹인 농축액 중에서 50-70ul을 따서 100ml 삼각플라스크에 담는다. 만들어진 접종 용액에 PRE배지에 6일간 배양한 엽병과 엽신을 넣고 28°C , 50rpm에서 2일간 암배양 시킨다.

라) Wash-out and callus induction

co-cultivation 후에 제균을 위해서 액체 1/2 RE(regeneration medium)에 항생제(cefotaxime 500ppm) wash-out하였다. 엽병과 엽신을 filter paper 위에 놓고 물기를 제거한 뒤 선발항생제가 없는 CI(callus induction: MS vitamin 4.4g/l, sucrose 2%, TDZ 0.5mg/l, NAA 0.1mg/l, pH=5.8, Sigma Agar 1%, sulbenicilin 500ppm)에 엽병과 엽신을 따로 치상하였다.

마) GUS expression assay

형질전환의 효율을 검정하기 위하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Jefferson(1987)의 방법을 사용하였다. 1ml의 GUS 발색용액을 만들기 위하여 3mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronide (X-Gluc)을 150 μl dimethyl formamide에 녹인 후, 850 μl 의 solution B(1% Triton X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. 3일간 공배양 시킨

엽병과 엽신을 wash-out 하기 전에 GUS 발색 용액을 첨가한 후, 37°C incubator에서 overnight 처리 하였다. 처리 후 destaining solution (ethanol 2.5ml, 10% formaldehyde 5ml, 5% glacial acetic acid 2.5ml)을 첨가하여 4°C에 보관하며 GUS 발현 여부와 정도를 관찰하였다.

바) Regeneration 배지에 치상

12가지 품종 모두 전처리 기간은 6일로 고정하고 두 가지 다른 호르몬 농도 BA 1ppm, Zeatin 1ppm, IAA 0.1ppm과 BA 2ppm, Zeatin 2ppm, IAA 0.2ppm로 처리한 품종을 각각 접종한 후, 세 가지 다른 호르몬 농도 BA 1ppm, Zeatin 1ppm, IAA 0.1ppm과 BA 2ppm, Zeatin 2ppm, IAA 0.2ppm 그리고 BA 1ppm, Zeatin 1ppm, IAA 0.3ppm로 처리한 재분화 배지에서 엽병과 엽신을 각각 치상 하였다.

4. 결과

품종에 따라 다소간의 차이는 있으나 전반적으로 BA 2ppm, Zeatin 2ppm, IAA 0.2ppm로 처리한 전처리 기간 중에서 BA 2ppm, Zeatin 2ppm, IAA 0.2ppm를 처리한 재분화 배지에서 callus의 발생이 양호하였다. 그러나 이러한 처리 후 GUS expression를 비교하였으나 callus 발생률과는 달리 전체적으로 낮은 GUS expression을 나타냈다.

표 2. 재분화 배지에서 세 가지 다른 호르몬 농도에서 callus 비교

line	1x growth hormone						2x growth hormone					
	in the pre-culture media						in the pre-culture media					
	petiole(%)			leaf(%)			petiole(%)			leaf(%)		
	1x	2x	3x	1x	2x	3x	1x	2x	3x	1x	2x	3x
011	0/6 (0)	1/6 (16.7)	0/7 (0)	1/2 (50.0)	1/2 (50.0)	0/1 (0)	10/10 (100)	7/7 (100)	9/9 (100)	6/6 (100)	9/9 (100)	10/10 (100)
016	4/5 (14.3)	1/2 (50.0)	2/3 (66.7)	2/2 (100)	4/4 (100)	4/4 (100)	17/17 (100)	18/18 (100)	14/15 (93.3)	12/12 (100)	16/16 (100)	16/16 (100)
022	6/12 (50.0)	4/11 (36.4)	2/10 (20.0)	0/7 (0)	1/7 (14.3)	2/9 (22.2)	12/13 (92.3)	16/16 (100)	15/15 (100)	11/12 (91.7)	13/13 (100)	14/14 (100)
023	2/4 (50.0)	1/5 (20.0)	1/4 (25.0)	0/5 (0)	1/5 (20.0)	0/5 (0)	4/4 (100)	3/3 (100)	4/4 (100)	4/4 (100)	4/4 (100)	4/4 (100)
024	1/1 (100)	1/3 (33.3)	0/3 (0)	3/3 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	11/11 (100)	10/10 (100)	11/11 (100)	8/8 (100)	9/9 (100)	12/12 (100)
031	1/7 (14.3)	2/10 (20.0)	0/9 (0)	1/7 (14.3)	0/7 (0)	1/9 (11.1)	6/6 (100)	6/6 (100)	5/7 (71.4)	10/13 (77.9)	8/11 (72.7)	9/12 (75.0)
041	2/2 (100)	2/2 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	10/10 (100)	10/10 (100)	11/11 (100)	11/11 (100)	10/10 (100)	10/10 (100)
042	1/1 (100)	2/2 (100)	1/1 (100)	2/2 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	18/18 (100)	18/18 (100)	14/14 (100)	14/14 (100)	19/19 (100)	19/19 (100)
043	1/8 (12.5)	0/8 (0)	1/11 (9.0)	0/5 (0)	0/4 (0)	2/5 (40.0)	11/11 (100)	8/8 (100)	8/8 (100)	14/14 (100)	14/14 (100)	9/9 (100)
051	0/4 (0)	1/4 (25.0)	0/4 (0)	2/2 (100)	1/2 (50.0)	1/1 (100)	10/10 (100)	10/10 (100)	10/10 (100)	9/9 (100)	9/9 (100)	8/8 (100)
052	4/7 (57.1)	5/7 (71.4)	6/6 (100)	0/2 (0)	3/4 (75.0)	2/2 (100)	13/13 (100)	12/12 (100)	13/13 (100)	14/14 (100)	16/16 (100)	14/14 (100)
053	1/2 (50.0)	2/2 (100)	3/3 (100)	4/4 (100)	2/2 (100)	3/3 (100)	9/9 (100)	8/8 (100)	11/11 (100)	9/9 (100)	10/10 (100)	9/9 (100)

제 4 절 형질전환 효율에 있어서 dipping 처리의 효과

1. 목적

고효율의 형질전환기술개발을 위한 다양한 처리조건 확립을 위하여 형질전환 과정 중, dipping 처리가 형질전환빈도에 미치는 영향을 규명하는데 실험의 목적이 있다.

2. 재료

이 실험을 위하여 3가지 품종 041, 016, 033의 엽병과 엽신을 이용하여 형질전환을 수행하였다.

3. 방법

가) 식물 재료 준비

접종 시 dipping하기 전, agro가 묻지 않은 칼을 이용하여 식물체를 자른다. 이때, 접종하기에 알맞게 자란 petiole과 leaf만 절단한다. 생장점을 포함하여 더 자라야 할 petiole과 leaf은 새로운 MS(multi-shoot:MS salt(+ vitamin) 4.4g/ml, Sucrose 3% , BA 0.5mg/ml , Sigma agar 1.0%)배지에 치상 한다. 24℃ 배양실에서 16시간 광조건과 8시간 암조건으로 3주간 키운다.

나) *Agrobacterium* preparation

거베라의 형질전환을 위하여 이용된 *Agrobacterium*은 expression vector PCAMBIA2301(kan^R 포함)포함하는 LBA4404를 사용하였다. 고체 YEP medium kanamycin 100mg/l , rifampicin 25mg/l , peptone 10g/l , NaCl 5g/l , yeast extract 5g/l , 1.5%(w/v)agar (pH 7.0)에 streaking 한 후 25℃에서 배양하여 생성된 single colony를 같은 항생제가 들어 있는 액체 YEP medium 10ml에 넣고 OD600 0.6~0.8이 될 때까지 25℃에서 250rpm으로 shaking하였다. 다 자란 culture에 30% glycerol stock 10ml을 넣고 vortex한 뒤, 1.5ml tube에 1ml씩 분주하여 액체질소로 급속 냉각하여 -70℃에서 보관하였다. 접종 하루 전에 항생제가 들어있는 액체 YEP medium 200ml에 -70℃에서 보관해 놓은 *Agrobacterium tumefaciens* stock(competent cell)을 1ml 넣고 OD600이 0.6~0.8이 될 때까지 2

5°C에서 250rpm으로 shaking하였다.

접종 당일에 액체 YEP medium 200ml을 50ml씩 나눠서 20°C, 7000rpm에서 15분 동안 centrifuge하였다. 각각의 tube에 있는 *A. tumefaciens* pellet에 액체 CCM(MS vitamin 4.4g/l, sucrose 2%, IAA 0.2mg/l, Zeatin 2mg/l, BA(6-benzylaminopurine) 2mg/l, Acetosyringone 100µM, pH=5.8)을 고농도 농축액은 액체 CCM을 3ml을 넣어 만들었다.

다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

재료준비 단계에서 미리 잘라 놓은 shoot을 filter-paper가 깔려 있는 유리 petri-dish에 놓는다. shoot를 자르기 전에 3ml 농축액을 scalpel(#10 blade)끝에 묻힌다. 엽병과 엽신 사이를 자른다. 한번더 3ml 농축액을 scalpel 끝에 묻히고, 엽신을 절단한다. 이때 엽병과 엽신이 1cm 정도 되게 자른다. 절편체가 마르지 않게 하기 위해 임시로 MS배지에 치상한다. 그런 다음 접종이 끝나면 고체 CCM에도 filter paper를 한 장 깔고 자른 엽병과 엽신을 치상한다. Micropore로 봉한 뒤 25°C에 3일 동안 암배양하였다.

라) Wash-out and callus induction

3일간 co-cultivation 후에 재균을 위해서 액체 1/2 RE(regeneration medium)에 항생제(cefotaxime 500ppm)를 첨가하여 wash-out하였다. 엽병과 엽신을 filter paper위에 놓고 물기를 제거한 뒤 선발항생제가 없는 CI(callus induction)에 엽병과 엽신을 따로 치상하였다.

마) GUS expression assay

형질전환의 효율을 검정하기 위하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Jefferson(1987)의 방법을 사용하였다. 1ml의 GUS 발색용액을 만들기 위하여 3mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronide (X-Gluc)을 150µl dimethyl formamide에 녹인 후, 850µl의 solution B(1% Triton X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. 3일간 공배양 시킨 엽병과 엽신을 wash-out 하기 전에 GUS 발색 용액을 첨가한 후, 37°C incubator에서 overnight 처리 하였다. 처리 후 destaining solution (ethanol 2.5ml, 10% formaldehyde 5ml, 5% glacial acetic acid 2.5ml)을 첨가하여 4°C에 보관하며

GUS 발현 여부와 정도를 관찰하였다.

4. 결과

033 품종을 제외한 나머지 016, 041 품종에서는 dipping을 처리한 것이 각각 90%, 95%인데 반해 dipping을 처리하지 않은 것에서는 66%, 53%로 dipping 처리한 것이 dipping 처리 하지 않은 것보다 거의 두 배나 높은 GUS 발현을 나타냈다. 이와 관련하여 이들 품종의 접종 부위 GUS expression은 현미경 관찰에 의해 그 차이를 더 뚜렷이 알 수 있었다. dipping 처리를 한 것이 처리 하지 않은 것에 비하여 처리한 것은 우리가 원하는 엽병과 엽신의 접종 부위에 정확하게 GUS expression하는 것을 관찰 할 수 있었다. 따라서 dipping 처리는 dipping을 처리 하지 않은 것에 비해 훨씬 더 높은 *Agrobacterium* inoculation의 효율을 올리는 것으로 알 수 있었다. 그러나 033 품종의 경우에는 dipping을 처리한 것과 처리하지 않은 것에서의 차이를 발견 하지 못했고 이는 거베라 품종 간에 차이가 있음을 알 수 있었다.

표 3. Dipping 처리에 따른 거베라 형질전환 빈도

	041	016	033
dipping	95% [#]	90%	40%
non-dipping	53%	66%	40%

[#] Percentage of GUS positive response in all explants



<그림 2. Dipping 처리에 따른 형질전환 효율 비교>

제 5 절 세 가지 다른 공배양 기간 처리에 따른 GUS 발현 비교

1. 목적

고효율의 형질전환기술개발을 위한 다양한 처리조건 확립을 위하여 형질전환 과정 중, 공배양 기간이 GUS발현에 미치는 영향을 알아보고자 실험이 진행되었다.

2. 재료

*Agrobacterium*의 감염율을 높이기 위하여 품종 016, 041 품종을 가지고 실험을 수행하였다.

3. 방법

가) 식물 재료 준비

접종할 엽병과 엽신을 1cm 정도로 자른다. 자른 엽병과 엽신이 마르지 않도록 하기 위해 임시로 MS(multi-shoot:MS salt(+ vitamin) 4.4g/ml. Sucrose 2% , BA 0.5mg/ml , pH5.8, Sigma agar 1.0%)배지에 치상한다.

나) *Agrobacterium* preparation

거베라의 형질전환을 위하여 이용된 *Agrobacterium*은 expression vector PCAMBIA2301(kan^R 포함)을 포함하는 LBA4404를 사용하였다. 고체 YEP medium kanamycin 100mg/l , rifampicin 25mg/l , peptone 10g/l , NaCl 5g/l , yeast extract 5g/l , 1.5%(w/v)agar (pH 7.0)에 streaking 한 후 25℃에서 배양하여 생성된 single colony를 같은 항생제가 들어 있는 액체 YEP medium 10ml에 넣고 OD600 0.6~0.8이 될 때까지 25℃에서 250rpm으로 shaking하였다. 다 자란 culture에 30% glycerol stock 10ml을 넣고 vortex한 뒤, 1.5ml tube에 1ml씩 분주하여 액체질소로 급속 냉각하여 -70℃에서 보관 하였다. 접종 하루 전에 항생제가 들어있는 액체 YEP medium 200ml에 -70℃에서 보관해 놓은 *Agrobacterium tumefaciens* stock(competent cell)을 1ml 넣고 OD600이 0.6~0.8이 될 때까지 25℃에서 250rpm으로 shaking하였다.

접종 당일에 액체 YEP medium 200ml을 50ml씩 나눠서 20℃, 7000rpm에서 15분 동안 centrifuge하였다. 각각의 tube에 있는 *A. tumefaciens* pellet에 액체 CCM(MS vitamin 4.4g/l , sucrose 2%, IAA 0.1mg/l , Zeatin 1mg/l , BA(6-benzylaminopurine) 1mg/l , Acetosyringone 100 μM, pH=5.8)을 액체 CCM을 30ml 넣어 만들었다.

다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

접종을 위해 자른 절편체를 30ml로 녹인 *A. tumefaciens* tube에 넣어서 30분간 접종한다. 이때, 형질전환 효율을 높이기 위해 sonication을 10초간 해준다. 고체 CCM에도 filter paper를 한 장 깔고 tube에 있는 엽병과 엽신을 치상한다. Micropore로 봉한 뒤 25℃에 3일, 4일, 5일 동안 암배양하였다.

라) Wash-out and callus induction

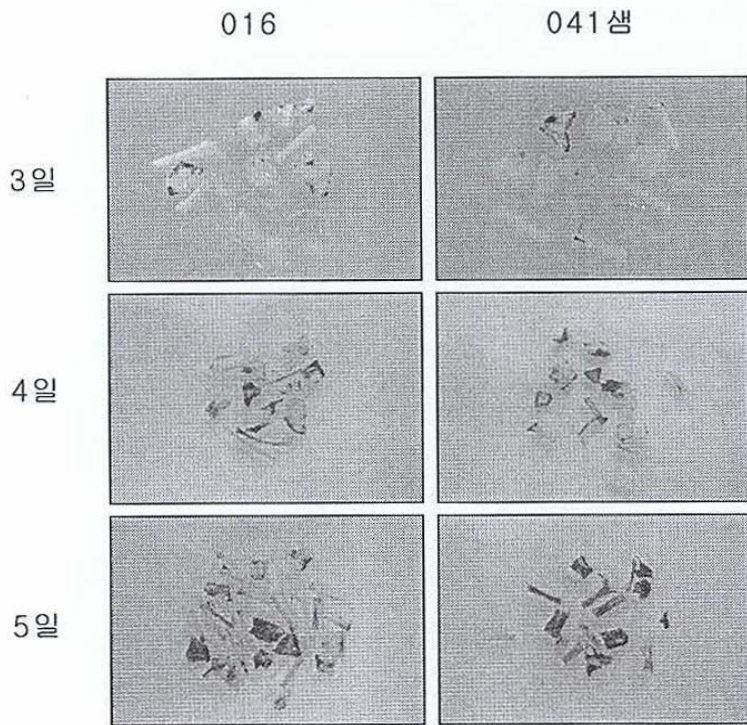
3, 4, 5일 동안 co-cultivation 후에 제균을 위해서 액체 1/2 RE(regeneration medium)에 항생제(cefotaxime 500ppm) wash-out하였다. 엽병과 엽신을 filter paper위에 놓고 물기를 제거한 뒤 선발항생제가 없는 CI(callus induction)에 엽병과 엽신을 각각 치상하였다.

마) GUS expression assay

형질전환의 효율을 검정하기 위하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Jefferson(1987)의 방법을 사용하였다. 1ml의 GUS 발색용액을 만들기 위하여 3mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronide (X-Gluc)을 150 μ l dimethyl formamide에 녹인 후, 850 μ l의 solution B(1% Triton X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. 3일간 공배양 시킨 엽병과 엽신을 wash-out 하기 전에 GUS 발색 용액을 첨가한 후, 37 $^{\circ}$ C incubator에서 overnight 처리 하였다. 처리 후 destaining solution (ethanol 2.5ml, 10% formaldehyde 5ml, 5% glacial acetic acid 2.5ml)을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에 보관하며 GUS 발현 여부와 정도를 관찰하였다.

4. 결과

GUS 발현을 상, 중, 하로 나누어서 조사하여 비교해 본 결과 품종 간 다소간의 차이가 있으나 전반적으로 공배양 기간 3일, 4일, 5일 중에서는 5일이 엽병과 엽신에서 더 높은 GUS 발현을 나타냈다.



<그림 3. 세 가지 다른 공배양 기간 동안 GUS발현 비교>

표 4. 세 가지 다른 공배양 기간에 따른 GUS발현 비교

	공배양 기간(일)		
	3	4	5
016	45%#	84	93
041 샘	55	99	100

Percentage of GUS positive response in all explants

제 6 절 세 가지 다른 dipping농도에 따른 GUS 발현 비교

1. 목적

고효율의 형질전환기술개발을 위한 다양한 처리조건 확립을 위하여 형질전환 과정 중, 세 가지 다른 dipping 처리가 형질전환빈도에 미치는 영향을 알아보고자 실험하였다.

2. 재료

이 실험을 위하여 011, 041품종의 엽병과 엽신을 이용하여 형질전환을 수행하였다.

3. 방법

가) 식물 재료 준비

접종 시 dipping하기 전, agro가 묻지 않은 칼을 이용하여 식물체를 자른다. 이때, 접종하기에 알맞게 자란 petiole과 leaf만 절단한다. 생장점을 포함하여 더 자라야 할 petiole과 leaf은 새로운 MS(multi-shoot:MS salt(+ vitamin) 4.4g/ml. Sucrose 3% , BA 0.5mg/ml , Sigma agar 1.0%)배지에 치상한다. 24℃ 배양실에서 16시간 광조건과 8시간 암조건으로 3주간 키운다.

나) *Agrobacterium* preparation

거베라의 형질전환을 위하여 이용된 *Agrobacterium*은 expression vector PCAMBIA2301(kan^R 포함)포함하는 LBA4404를 사용하였다. 고체 YEP medium kanamycin “100mg/l , rifampicin 25mg/l , peptone 10g/l , NaCl 5g/l , yeast extract 5g/l , 1.5%(w/v)agar (pH 7.0)에 streaking 한 후 25℃에서 배양하여 생성된 single colony를 같은 항생제가 들어 있는 액체 YEP medium 10ml에 넣고 OD600 0.6~0.8이 될 때까지 25℃에서 250rpm으로 shaking하였다. 다 자란 culture에 30% glycerol stock 10ml을 넣고 vortex한 뒤, 1.5ml tube에 1ml씩 분주하여 액체질소로 급속 냉각하여 -70℃에서 보관하였다. 접종 하루 전에 항생제가 들어있는 액체 YEP medium 200ml에 -70℃에서 보관해 놓은 *Agrobacterium tumefaciens* stock(competent cell)을 1ml 넣고 OD600이 0.6~0.8이 될 때까지 2

5°C에서 250rpm으로 shaking하였다.

접종 당일에 액체 YEP medium 200ml을 50ml씩 나눠서 20°C, 7000rpm에서 15분 동안 centrifuge하였다. 각각의 tube에 있는 *A. tumefaciens* pellet에 액체 CCM(MS vitamin 4.4g/l, sucrose 2%, IAA 0.2mg/l, Zeatin 2mg/l, BA(6-benzylaminopurine) 2mg/l, Acetosyringone 100µM, pH=5.8)을 고농도 농축액과 저농도 농축액을 만든다. 고농도 농축액은 액체 CCM을 5, 8, 10ml을 넣고 저농도 농축액은 30ml넣고 만들었다.

다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

재료준비 단계에서 미리 잘라 놓은 shoot을 filter-paper가 깔려 있는 유리 petri-dish에 놓는다. dipping 농도에 따라 개별적으로 실험을 진행하였다. shoot를 자르기 전에 5, 8, 10ml 농축액을 scalpel(#10 blade)끝에 묻힌다. 엽병과 엽신 사이를 자른다. 한번 더 5, 8, 10ml 농축액을 scalpel 끝에 묻히고, 엽신을 절단한다. 이때 엽병과 엽신이 1cm 정도 되게 자른다. 절편체가 마르지 않게 하기 위해 임시로 MS배지에 치상한다. 그런 다음 접종이 끝나면 저농도 농축액 30ml에 30분간 담군다. 그리고 나서, 고체 CCM에도 filter paper를 한 장 깔고 자른 엽병과 엽신을 치상한다. Micropore로 봉한 뒤 25°C에 3일 동안 암배양하였다.

라) Wash-out and callus induction

3일간 co-cultivation 후에 제균을 위해서 액체 1/2 RE(regeneration medium)에 항생제(cefotaxime500ppm)를 첨가하여 wash-out하였다. 엽병과 엽신을 filter paper위에 놓고 물기를 제거한 뒤 선발항생제가 없는 CI(callus induction)에 엽병과 엽신을 따로 치상하였다.

마) GUS expression assay

형질전환의 효율을 검정하기 위하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Jefferson(1987)의 방법을 사용하였다. 1ml의 GUS 발색용액을 만들기 위하여 3mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronide (X-Gluc)을 150µl dimethyl formamide에 녹인 후, 850µl의 solution B(1% Triton X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. 3일간 공배양 시킨 엽병과 엽신을 wash-out 하기 전에 GUS 발색 용액을 첨가한 후, 37°C incubator

에서 overnight 처리 하였다. 처리 후 destaining solution (ethanol 2.5ml, 10% formaldehyde 5ml, 5% glacial acetic acid 2.5ml)을 첨가하여 4°C에 보관하며 GUS 발현 여부와 정도를 관찰하였다.

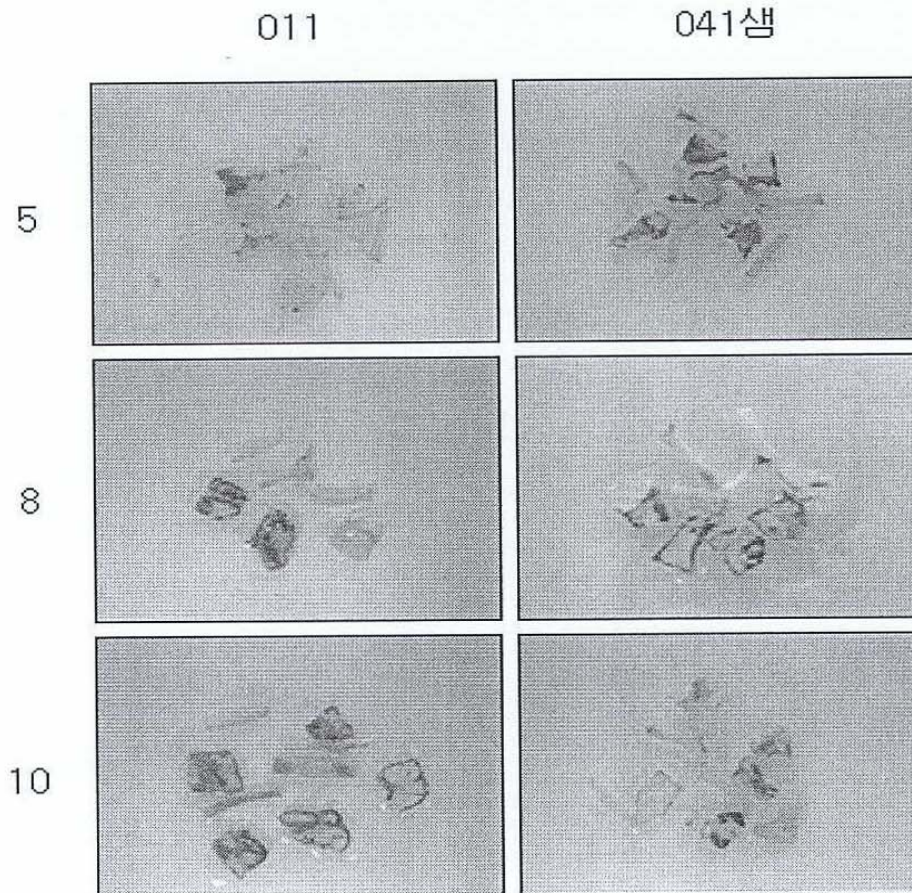
4. 결과

세 가지 다른 dipping농도 처리를 한 결과, 품종에 따라 다소간의 차이가 있으나 전반적으로 8ml농도에서 가장 GUS발현이 높게 나타났다.

표 5. 세 가지 다른 dipping 농도에 따른 GUS비교

	Dipping 농도(ml)		
	5	8	10
011	45 [#]	88	50
041샘	100	100	70

[#] Percentage of GUS positive response in all explants



<그림 4. 세 가지 다른 dipping 농도에 따른 GUS비교>

제 7 절 두 가지 다른 *Agrobacterium tumefaciens*가 형질전환 효율에 미치는 영향

1. 목적

형질전환체의 *Agrobacterium* inoculation에 적합한 *Agrobacterium tumefaciens*을 찾기 위한 실험을 수행하였다.

2. 재료

4 가지 품종 016, 033, 041, 052 품종을 가지고 실험을 수행하였다.

3. 방법

가) 식물 재료 준비

접종할 거베라의 엽병과 엽신을 1cm정도로 자른다. 자른 엽병과 엽신이 마르지 않도록 하기 위해 임시로 MS(multi-shoot:MS salt(+ vitamin) 4.4g/ml. Sucrose 3%, BA 0.5mg/ml, Sigma agar 1.0%)배지에 치상한다.

나) *Agrobacterium* preparation

거베라의 형질전환을 위하여 이용된 *Agrobacterium*은 expression vector PCAMBIA2301(kan^R 포함)포함하는 LBA4404와 EHA105를 사용하였다. 고체 YEP medium kanamycin 100mg/l, rifampicin 25mg/l, peptone 10g/l, NaCl 5g/l, yeast extract 5g/l, 1.5%(w/v)agar (pH 7.0)에 streaking 한 후 25℃에서 배양하여 생성된 single colony를 같은 항생제가 들어 있는 액체 YEP medium 10ml에 넣고 OD600 0.6~0.8이 될 때까지 25℃에서 250rpm으로 shaking하였다. 다 자란 culture에 30% glycerol stock 10ml을 넣고 vortex한 뒤, 1.5ml tube에 1ml씩 분주하여 액체질소로 급속 냉각하여 -70℃에서 보관 하였다. 접종 하루 전에 항생제가 들어있는 액체 YEP medium 200ml에 -70℃에서 보관해 놓은 *Agrobacterium tumefaciens* stock(competent cell)을 1ml 넣고 OD600이 0.6~0.8이 될 때까지 25℃에서 250rpm으로 shaking하였다.

접종 당일에 액체 YEP medium 200ml을 50ml씩 나눠서 20℃, 7000rpm에서 15분 동안 centrifuge하였다. 각각의 tube에 있는 *A. tumefaciens* pellet에 액체

CCM(MS vitamin 4.4g/ℓ, sucrose 2%, IAA 0.1mg/ℓ, Zeatin 1mg/ℓ, BA(6-benzylaminopurine) 1mg/ℓ, Acetosyringone 100 μM, pH=5.8)을 액체 CCM을 30ml 넣어 만들었다.

다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

접종을 위해 자른 절편체를 30ml로 녹인 *A. tumefaciens* tube에 넣어서 30분간 접종한다. 이때, 형질전환 효율을 높이기 위해 sonication을 10초간 해준다. 고체 CCM에도 filter paper를 한 장 깔고 tube에 있는 엽병과 엽신을 치상한다. Micropore로 봉한 뒤 25℃에 3일, 5일 동안 암배양하였다.

라) Wash-out and callus induction

3, 5일 동안 co-cultivation 후에 재균을 위해서 액체 1/2 RE(regeneration medium)에 항생제(cefotaxime 500ppm) wash-out하였다. 엽병과 엽신을 filter paper위에 놓고 물기를 제거한 뒤 선발항생제가 없는 CI(callus induction)에 엽병과 엽신을 따로 치상하였다.

마) GUS expression assay

형질전환의 효율을 검정하기 위하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Jefferson(1987)의 방법을 사용하였다. 1ml의 GUS 발색용액을 만들기 위하여 3mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronide (X-Gluc)을 150μl dimethyl formamide에 녹인 후, 850μl의 solution B(1% Triton X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. 3일간 공배양 시킨 엽병과 엽신을 wash-out 하기 전에 GUS 발색 용액을 첨가한 후, 37℃ incubator에서 overnight 처리 하였다. 처리 후 destaining solution (ethanol 2.5ml, 10% formaldehyde 5ml, 5% glacial acetic acid 2.5ml)을 첨가하여 4℃에 보관하며 GUS 발현 여부와 정도를 관찰하였다.

4. 결과

LBA4404를 사용한 형질전환체의 GUS 발현율이 25%에서 100%를 나타낸 반면에, EHA105를 사용한 형질전환체의 GUS 발현율은 0%에서 36%를 나타냈다. 이와 관련하여 전처리를 하지 않은 형질전환체를 두 가지 다른 *Agrobacterium*

*tumerfaciens*인 LBA4404, EHA105와 두 가지 다른 공배양 기간 3, 5일을 각각 처리한 후 GUS expression을 비교하였다. 그 결과 LBA4404를 사용한 것이 EHA105를 사용한 것보다 눈에 띄게 높은 GUS expression이 나타났다. 따라서 국내 거베라 품종의 형질전환에 적합한 *Agrobacterium tumerfaciens*은 EHA105보다 LBA4404가 훨씬 더 적합한 것으로 추정할 수 있다.

표 6. 두 가지 다른 *Agrobacterium*에 따른 GUS 발현 비교

line	LBA4404								EHA105							
	3-days				5-days				3-days				5-days			
	non	1	2	3	non	1	2	3	non	1	2	3	non	1	2	3
016	66 [#]	100	66	50	80	100	50	60	12	25	12	12	16	0	0	0
033	40	0	25	0	37	20	100	26	0	0	0	0	0	0	0	0
052	35	75	57	10	83	25	62	26	0	12	0	0	0	8	0	0
041	53	85	77	25	78	42	70	57	20	0	0	0	36	13	16	0

[#] Percentage of GUS positive response in all explants

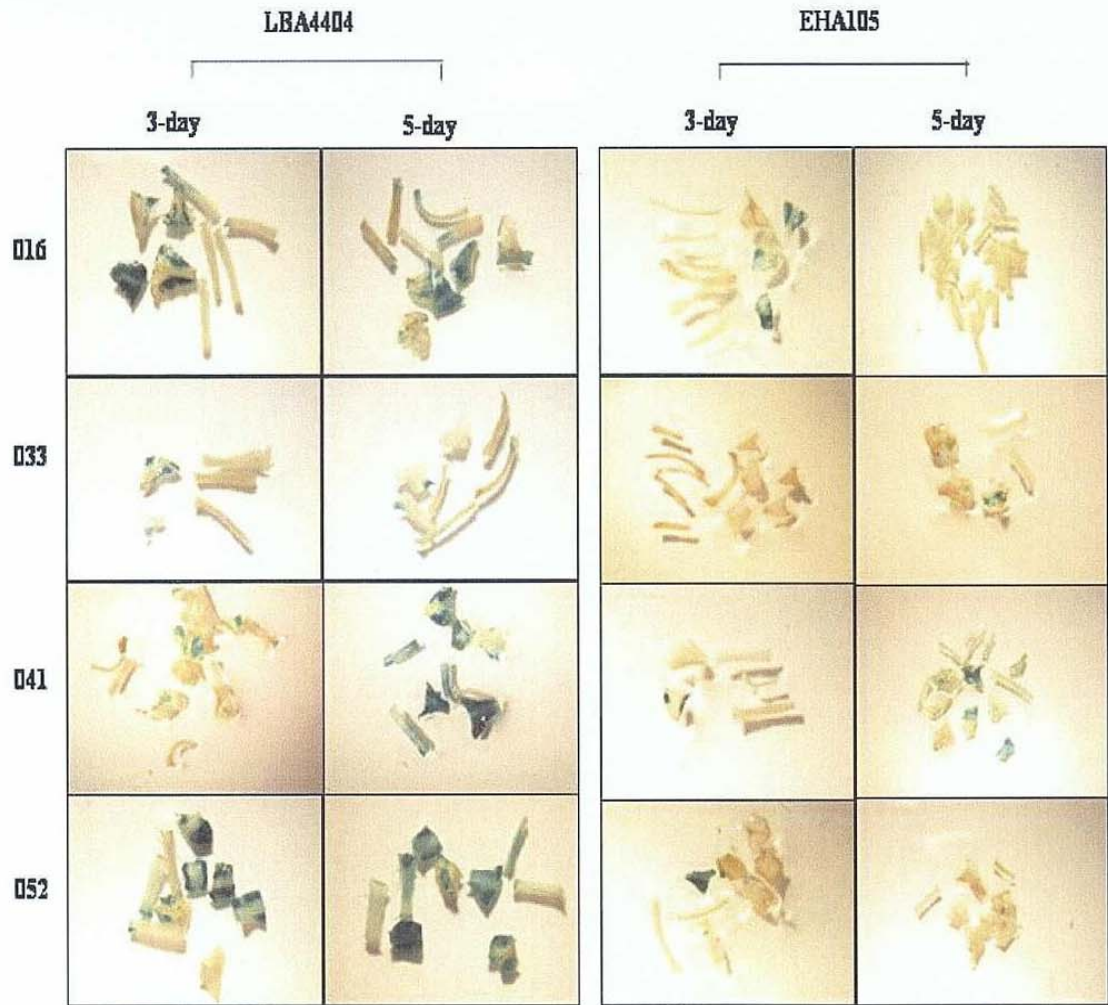


그림 5. 두 가지 다른 *Agrobacterium tumerfaciens*, LBA4404, EHA105의 형질 전환 효율 비교

제 8 절 공배양 배지에 황화합물 처리가 형질전환체에 미치는 영향

1. 목적

공배양 배지에 황화합물의 첨가가 거베라의 형질전환체에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험하였다.

2. 재료

041, 052, GM023 품종을 가지고 이 실험을 수행하였다.

3. 방법

가) 식물 재료 준비

접종할 거베라의 엽병과 엽신을 1cm정도로 자른다. 자른 엽병과 엽신이 마르지 않도록 하기 위해 임시로 MS(multi-shoot:MS salt(+ vitamin) 4.4g/ml. Sucrose 3% , BA 0.5mg/ml , Sigma agar 1.0%)배지에 치상한다.

나) *Agrobacterium* preparation

거베라의 형질전환을 위하여 이용된 *Agrobacterium*은 expression vector PCAMBIA2301(kan^R 포함)포함하는 LBA4404를 사용하였다. 고체 YEP medium kanamycin 100mg/l , rifampicin 25mg/l , peptone 10g/l , NaCl 5g/l , yeast extract 5g/l , 1.5%(w/v)agar (pH 7.0)에 streaking 한 후 25℃에서 배양하여 생성된 single colony를 같은 항생제가 들어 있는 액체 YEP medium 10ml에 넣고 OD600 0.6~0.8이 될 때까지 25℃에서 250rpm으로 shaking하였다. 다 자란 culture에 30% glycerol stock 10ml을 넣고 vortex한 뒤, 1.5ml tube에 1ml씩 분주하여 액체질소로 급속 냉각하여 -70℃에서 보관 하였다. 접종 하루 전에 항생제가 들어있는 액체 YEP medium 200ml에 -70℃에서 보관해 놓은 *Agrobacterium tumefaciens* stock(competent cell)을 1ml 넣고 OD600이 0.6~0.8이 될 때까지 25℃에서 250rpm으로 shaking하였다.

접종 당일에 액체 YEP medium 200ml을 50ml씩 나눠서 20℃, 7000rpm에서 15분 동안 centrifuge하였다. 각각의 tube에 있는 *A. tumefaciens* pellet에 액체

CCM(MS vitamin 4.4g/ℓ, sucrose 2%, IAA 0.1mg/ℓ, Zeatin 1mg/ℓ, BA(6-benzylaminopurine) 1mg/ℓ, Acetosyringone 100 μM, pH=5.8, 황화합물 L-Cystein 3.3mM, Sodium thiolsulfate 1.0mM, DTT(dithiothreitol) 1.0mM) 액체 CCM을 30ml 넣어 만들었다. 이때, 액체 CCM배지에 세 가지 황화합물을 첨가하지 않은 것, 콩에 첨가한 황화합물양의 1/2을 첨가한 것, 동량의 황화합물(황화합물 L-Cystein 3.3mM, Sodium thiolsulfate 1.0mM, DTT(dithiothreitol) 1.0mM)을 첨가한 것의 세 가지 공배양 배지를 가지고 실험을 수행하였다.

다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

접종을 위해 자른 절편체를 30ml로 녹인 *A. tumefaciens* tube에 넣어서 30분 간 접종한다. 이때, 형질전환 효율을 높이기 위해 sonication을 10초간 해준다. 고체 CCM(액체 CCM가 같이 세 가지 황화합물을 첨가하지 않은 것, 콩에 첨가한 황화합물양의 1/2을 첨가한 것, 동량의 황화합물첨가)에도 filter paper를 한 장 깔고 tube에 있는 엽병과 엽신을 치상한다. Micropore로 봉한 뒤 25℃에 3일 동안 암배양하였다.

라) Wash-out and callus induction

co-cultivation 후에 재균을 위해서 액체 1/2 RE(regeneration medium)에 항생제(cefotaxime 500ppm) wash-out하였다. 엽병과 엽신을 filter paper위에 놓고 물기를 제거한 뒤 선발항생제가 없는 CI(callus induction)에 엽병과 엽신을 따로 치상하였다.

마) GUS expression assay

형질전환의 효율을 검정하기 위하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Jefferson(1987)의 방법을 사용하였다. 1ml의 GUS 발색용액을 만들기 위하여 3mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronide (X-Gluc)을 150μl dimethyl formamide에 녹인 후, 850μl의 solution B(1% Triton X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. 3일간 공배양 시킨 엽병과 엽신을 wash-out 하기 전에 GUS 발색 용액을 첨가한 후, 37℃ incubator에서 overnight 처리 하였다. 처리 후 destaining solution (ethanol 2.5ml, 10% formaldehyde 5ml, 5% glacial acetic acid 2.5ml)을 첨가하여 4℃에 보관하며

GUS 발현 여부와 정도를 관찰하였다.

4. 결과

공배양 배지에 황화합물을 첨가한 후 형질전환체에서 갈변을 일으키지 않았던 콩과는 달리 국내 거베라의 경우 황화합물을 첨가한 공배양 배지에 치상한 엽병과 엽신은 3일 간의 공배양 기간 중에 모두 cell death를 일으키면서 타 죽은 반면에 황화합물을 첨가하지 않은 공배양 배지에 치상한 엽병과 엽신은 cell death를 일으키지 않은 것을 관찰 할 수 있었다. 이는 콩에서의 효과를 고려해 볼 때 국내 거베라의 경우에는 기대할 수가 없었다. 그러나 이들 황화합물은 콩에 맞추어서 조성된 양이고 이들의 효과를 고려해 볼 때 앞으로 좀 더 세부적으로 나누어 실험을 수행할 필요가 있다고 생각한다..

제 9 절 세 가지 다른 황화합물 첨가에 따른 식물 상태 및 callus 형성 비교

1. 목적

공배양 배지에 각각의 황화합물의 첨가가 거베라의 형질전환체에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험하였다.

2. 재료

016, 041 품종을 가지고 이 실험을 수행하였다.

3. 방법

가) 식물재료

접종 시 dipping하기 전, agro가 묻지 않은 칼을 이용하여 식물체를 자른다. 이때, 접종하기에 알맞게 자란 petiole과 leaf만 절단한다. 성장점을 포함하여 더 자라야 할 petiole과 leaf은 새로운 MS(multi-shoot:MS salt(+ vitamin) 4.4g/ml, Sucrose 3% , BA 0.5mg/ml , Sigma agar 1.0%)배지에 치상 한다. 24℃ 배양실에서 16시간 광조건과 8시간 암조건으로 3주간 키운다.

나) *Agrobacterium* preparation

거베라의 형질전환을 위하여 이용된 *Agrobacterium*은 expression vector PCAMBIA2301(kan^R 포함)포함하는 LBA4404를 사용하였다. 고체 YEP medium kanamycin 100mg/ℓ, rifampicin 25mg/ℓ, peptone 10g/ℓ, NaCl 5g/ℓ, yeast extract 5g/ℓ, 1.5%(w/v)agar (pH 7.0)에 streaking 한 후 25℃에서 배양하여 생성된 single colony를 같은 항생제가 들어 있는 액체 YEP medium 10ml에 넣고 OD600 0.6~0.8이 될 때까지 25℃에서 250rpm으로 shaking하였다. 다 자란 culture에 30% glycerol stock 10ml을 넣고 vortex한 뒤, 1.5ml tube에 1ml씩 분주하여 액체질소로 급속 냉각하여 -70℃에서 보관하였다. 접종 하루 전에 항생제가 들어있는 액체 YEP medium 200ml에 -70℃에서 보관해 놓은 *Agrobacterium tumefaciens* stock(competent cell)을 1ml 넣고 OD600이 0.6~0.8이 될 때까지 25℃에서 250rpm으로 shaking하였다.

접종 당일에 액체 YEP medium 200ml을 50ml씩 나눠서 20℃, 7000rpm에서 15분 동안 centrifuge하였다. 각각의 tube에 있는 *A. tumefaciens* pellet에 액체 CCM(MS vitamin 4.4g/ℓ, sucrose2%, IAA0.2mg/ℓ, Zeatin2mg/ℓ, BA(6-benzylaminopurine)2mg/ℓ, Acetosyringone 100μM, pH=5.8)을 기본으로 하여 황화합물 첨가에 따라 네 가지 서로 다른 종류의 액체 CCM을 만든다. 1/10, 2/10, 3/10, 1x-3.3 mM/ℓ L-cystein, 1/10, 2/10, 3/10, 1x-1.0 mM/ℓ DTT, 1/10, 2/10, 3/10, 1x-1.0 mM/ℓ Sodium thiosulfate을 *A. tumefaciens* pellet을 액체 CCM을 3ml과 30ml넣어 고농도 농축액과 저농도 농축액을 만들었다.

다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

재료준비 단계에서 미리 잘라 놓은 shoot을 filter-paper가 깔려 있는 유리 petri-dish에 놓는다. shoot를 자르기 전에 3ml 농축액을 scalpel(#10 blade)끝에 묻힌다. 엽병과 엽신 사이를 자른다. 한번 더 3ml 농축액을 scalpel 끝에 묻히고, 엽신을 절단한다. 이때 엽병과 엽신이 1cm 정도 되게 자른다. 절편체가 마르지 않게 하기 위해 임시로 MS배지에 치상한다. 그런 다음 저농도 농축액이 있는 tube에 넣고 10초간 sonication을 한다. 그리고 30분간 담궈 놓는다. 접종이 끝나면 고체 CCM(1/10, 2/10, 3/10, 1x-3.3 mM/ℓ L-cystein, 1/10, 2/10, 3/10, 1x-1.0 mM/ℓ DTT, 1/10, 2/10, 3/10, 1x-1.0 mM/ℓ Sodium thiosulfate)에도 filter paper

를 한 장 깔고 자른 엽병과 엽신을 치상한다. Micropore로 봉한 뒤 25℃에 4일 동안 암배양 하였다.

라) Wash-out and callus induction

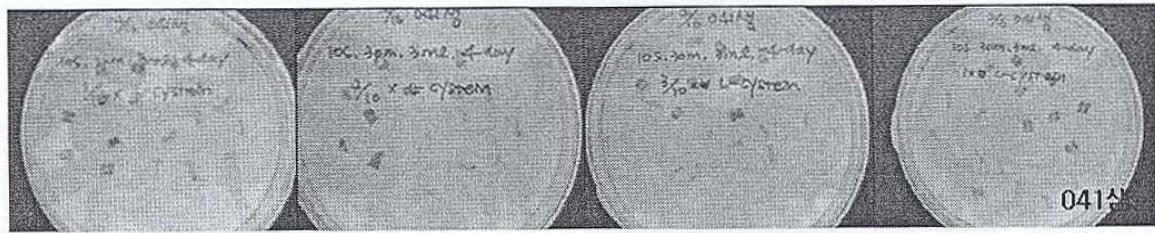
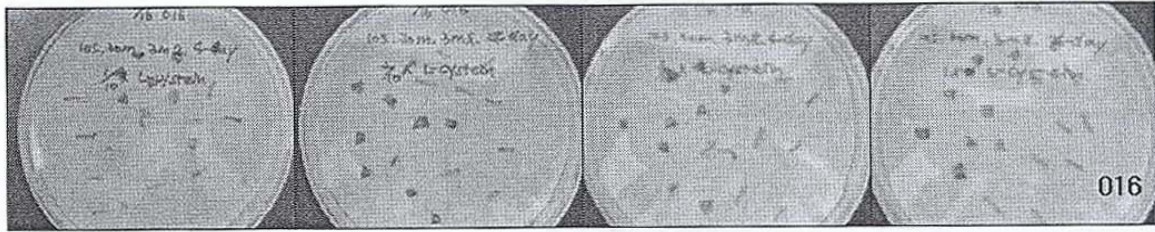
4일간 co-cultivation 후에 제균을 위해서 액체 1/2 RE(regeneration medium)에 항생제(cefotaxime 500ppm)를 첨가하여 wash-out하였다. 엽병과 엽신을 filter paper위에 놓고 물기를 제거한 뒤 선발항생제가 없는 CI(callus induction)에 엽병과 엽신을 따로 치상하였다.

마) GUS expression assay

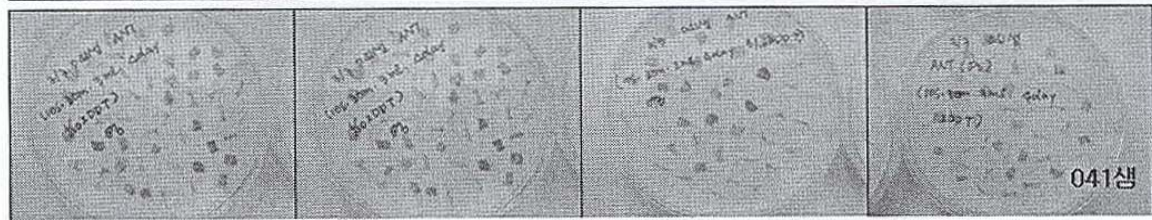
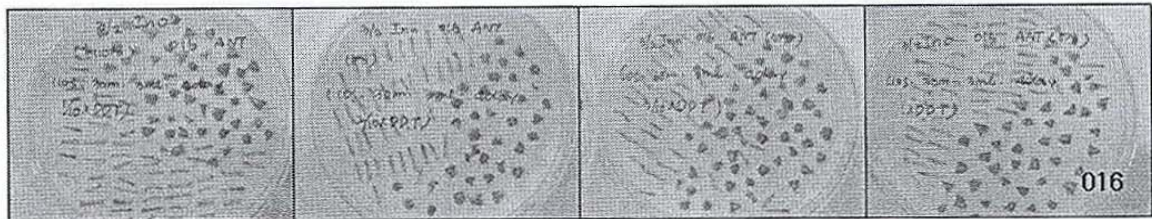
형질전환의 효율을 검정하기 위하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Jefferson(1987)의 방법을 사용하였다. 1ml의 GUS 발색용액을 만들기 위하여 3mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronide (X-Gluc)을 150 μ l dimethyl formamide에 녹인 후, 850 μ l의 solution B(1% Triton X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. 3일간 공배양 시킨 엽병과 엽신을 wash-out 하기 전에 GUS 발색 용액을 첨가한 후, 37℃ incubator에서 overnight 처리 하였다. 처리 후 destaining solution (ethanol 2.5ml, 10% formaldehyde 5ml, 5% glacial acetic acid 2.5ml)을 첨가하여 4℃에 보관하며 GUS 발현 여부와 정도를 관찰하였다.

4. 결과

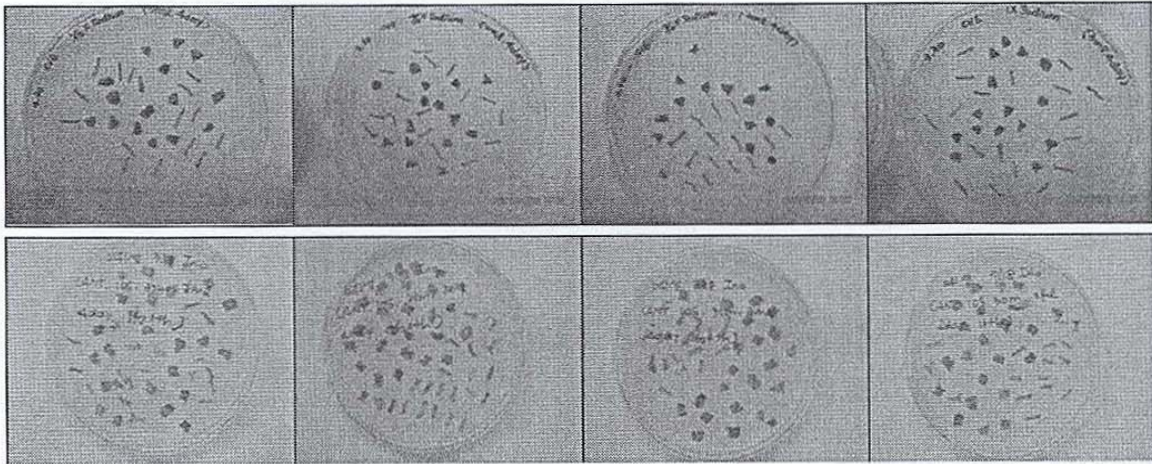
3.3 mM/l L-cystein의 실험에서 1/10 x 농도로 첨가한 것을 제외한 나머지는 4일간의 공배양 기간 후 전반적으로 cell death를 일으키는 것이 발견되었다. 그러나 황화합물 DDT과 Sodium thiosulfate 첨가는 3.3 mM/l L-cystein의 실험과 비교하여 볼 때, 4일간의 공배양 기간이 지난 뒤에도 절편체의 상태가 양호하였다.



<그림 6. 3.3 mM/ℓ L-cystein 첨가 비교>



<그림 7. 1.0 mM/ℓ DTT 첨가 비교>



<그림 8. 1.0 mM/l Sodium thiosulfate 첨가 비교>

제 10 절 다양한 유전자 도입 형질전환체 생산

1. 목적

앞서 수행한 고효율의 형질전환기술개발을 위한 다양한 처리조건 확립하는 과정 중, 국내 거베라에 다양한 유전자를 도입하여 형질전환체 생산하는 목적이 있다.

2. 재료

기초 실험의 결과를 바탕으로 011품종을 가지고 실험하였다.

3. 방법

가) 식물 재료 준비

접종 시 dipping하기 전, agro가 묻지 않은 칼을 이용하여 식물체를 자른다. 이때, 접종하기에 알맞게 자란 petiole과 leaf만 절단한다. 성장점을 포함하여 더 자라야 할 petiole과 leaf은 새로운 MS(multi-shoot:MS salt(+ vitamin) 4.4g/ml. Sucrose 3% , BA 0.5mg/ml , Sigma agar 1.0%)배지에 치상 한다. 24℃ 배양실에서 16시간 광조건과 8시간 암조건으로 3주간 키운다.

나) *Agrobacterium* preparation

거베라의 형질전환을 위하여 이용된 *Agrobacterium*은 expression vector

PCAMBIA2301(kan^R 포함)포함하는 LBA4404를 사용하였다. 고체 YEP medium kanamycin 100mg/ℓ, rifampicin 25mg/ℓ, peptone 10g/ℓ, NaCl 5g/ℓ, yeast extract 5g/ℓ, 1.5%(w/v)agar (pH 7.0)에 streaking 한 후 25℃에서 배양하여 생성된 single colony를 같은 항생제가 들어 있는 액체 YEP medium 10ml에 넣고 OD600 0.6~0.8이 될 때까지 25℃에서 250rpm으로 shaking하였다. 다 자란 culture에 30% glycerol stock 10ml을 넣고 vortex한 뒤, 1.5ml tube에 1ml씩 분주하여 액체질소로 급속 냉각하여 -70℃에서 보관하였다. 접종 하루 전에 항생제가 들어있는 액체 YEP medium 200ml에 -70℃에서 보관해 놓은 *Agrobacterium tumefaciens* stock(competent cell)을 1ml 넣고 OD600이 0.6~0.8이 될 때까지 25℃에서 250rpm으로 shaking하였다.

접종 당일에 액체 YEP medium 200ml을 50ml씩 나눠서 20℃, 7000rpm에서 15분 동안 centrifuge하였다. 각각의 tube에 있는 *A. tumefaciens* pellet에 액체 CCM(MS vitamin 4.4g/ℓ, sucrose 2%, IAA 0.2mg/ℓ, Zeatin 2mg/ℓ, BA(6-benzylaminopurine) 2mg/ℓ, Acetosyringone 100μM, 1/10DTT, pH=5.8)을 고농도 농축액은 액체 CCM을 15ml을 넣어 만들었다.

다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

재료준비 단계에서 미리 잘라 놓은 shoot을 filter-paper가 깔려 있는 유리 petri-dish에 놓는다. shoot를 자르기 전에 15ml 농축액을 scalpel(#10 blade)끝에 묻힌다. 엽병과 엽신 사이를 자른다. 한번 더 15ml 농축액을 scalpel 끝에 묻히고, 엽신을 절단한다. 이때 엽병과 엽신이 1cm 정도 되게 자른다. 절편체가 마르지 않게 하기 위해 임시로 MS배지에 치상한다. 그런 다음 접종이 끝나면 고체 CCM에도 filter paper를 한 장 깔고 자른 엽병과 엽신을 치상한다. Micropore로 봉한 뒤 25℃에 3일 동안 암배양하였다.

라) Wash-out and callus induction

3일간 co-cultivation 후에 제균을 위해서 액체 1/2 RE(regeneration medium)에 항생제(cefotaxime500ppm)를 첨가하여 wash-out하였다. 엽병과 엽신을 filter paper위에 놓고 물기를 제거한 뒤 선발항생제가 없는 CI(callus induction)에 엽병과 엽신을 따로 치상하였다.

마) GUS expression assay

형질전환의 효율을 검정하기 위하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Jefferson(1987)의 방법을 사용하였다. 1ml의 GUS 발색용액을 만들기 위하여 3mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronide (X-Gluc)을 150 μ l dimethyl formamide에 녹인 후, 850 μ l의 solution B(1% Triton X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. 3일간 공배양 시킨 엽병과 엽신을 wash-out 하기 전에 GUS 발색 용액을 첨가한 후, 37 $^{\circ}$ C incubator에서 overnight 처리 하였다. 처리 후 destaining solution (ethanol 2.5ml, 10% formaldehyde 5ml, 5% glacial acetic acid 2.5ml)을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에 보관하며 GUS 발현 여부와 정도를 관찰하였다.

바) Callus Induction 배지에 치상

wash-out이 끝난 엽병과 엽신을 처음 2주 동안 CI(callus induction:MS vitamin 4.4g/l, sucrose 2%, TDZ 0.5mg/l, NAA 0.1mg/l pH=5.8, Sulbenicilin 500ppm, Sigma Agar 0.8%)배지에 치상하여 24 $^{\circ}$ C 암배양한다. 그리고 다음 2주동안 선별 항생제(kanamycin 5ppm)을 첨가한 CI배지에 치상하여 24 $^{\circ}$ C 암배양한다.

사) Regeneration 배지에 치상

4주 동안 24 $^{\circ}$ C에서 암배양하여 충분히 callus가 생성되면 RE(regeneration:MS vitamin 4.4g/l, sucrose 2%, IAA 0.1mg/l, Zeatin 1mg/l, BA(6-benzylaminopurine) 1mg/l, Vancomycin 0.05g/l, Timentin 0.1g/l, Cefotaxim 0.2g/l, kanamycine 5ppm, pH=5.8 Sigma Agar 0.8%)배지에 계대하여 25 $^{\circ}$ C 명배양하여 재분화와 shoot형성을 관찰한다.

아) Gennomic DNA 추출

잠정적인 형질전환체들의 잎을 1g 정량한 후 액체질소로 얼리고 막자사발에 액체질소를 부어 사발을 차갑게 만든 후, 얼린 잎을 넣고 곱게 갈아 주었다. DNA extract Buffer [7M urea(210g/500ml), 0.3M Nacl(30ml/5M stock 500ml)] 를 6ml 첨가하여 잘 섞어 준 후, phenol/chloroform 6ml을 첨가하고 천천히 뒤집으면서 완전히 섞어 주었다. 12000rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상층액을 따서 새 tube에 옮겨주었다. 동일 volume의 chloroform첨가 후, 천천히 뒤집으며 섞고, 12000rpm으로 10분간 원심분리한 후 상층액을 따서 새 tube에 옮겨주었다. 1ml

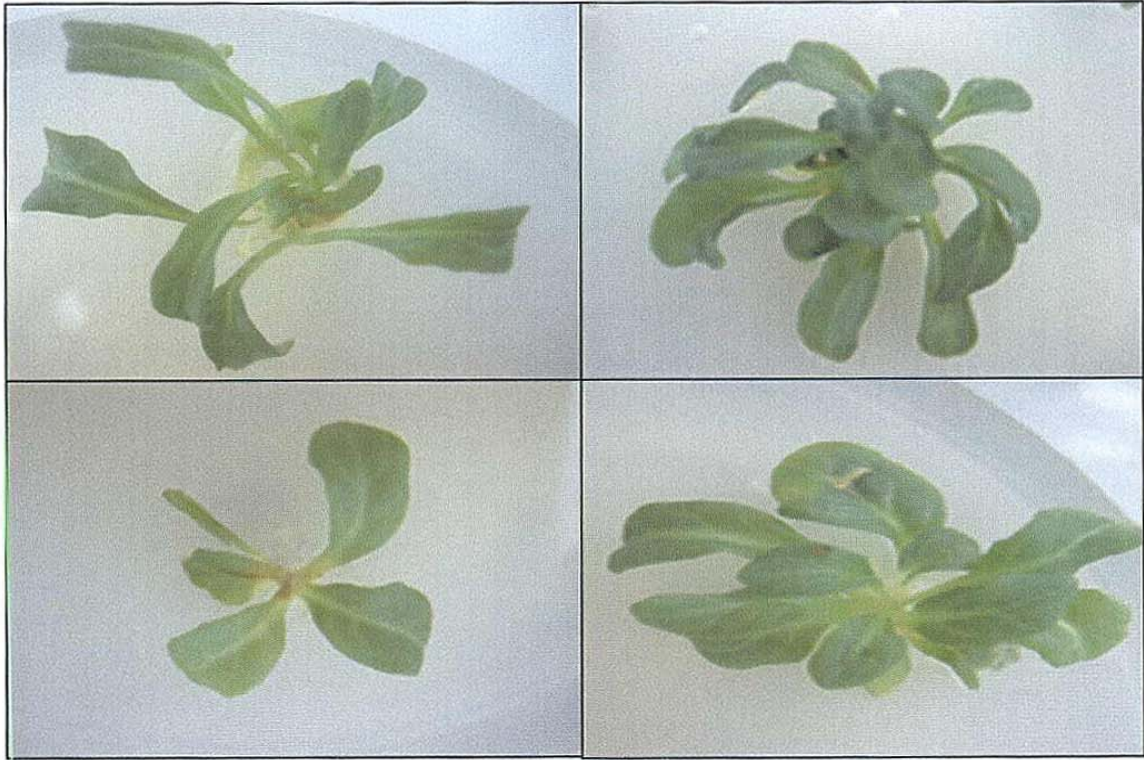
의 4.4M ammonium acetate(pH5.2)를 넣고, 2배 부피의 에탄올을 첨가한 후, 잘 교반하여, 냉동고에서 20분 이상 보관하였다. 12000rpm으로 15분간 원심 분리하여 pellet을 모으고, 상층액을 버린 후, pellet을 10분간 말렸다. TE buffer 0.5ml에 녹이고, RNase 1 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에 1시간동안 처리하였다. 처리 후, phenol/chloroform 0.5ml을 넣고 천천히 섞어 주었다. 용액을 12000rpm으로 10분간 원심분리 하였고 상층액을 따서 새 tube에 옮긴 후, 동일 volume의 chloroform첨가하여 서서히 교반을 진행하였다. 다시 12000rpm으로 10분간 원심 분리한 후, 상층액에 1/10 volume의 sodium acetate와 1ml의 100% ethanol을 넣어 냉동고에 20분 이상 보관하였다. 12000rpm으로 15분간 원심분리하여 DNA를 pellet으로 만든 다음 TE buffer 50 μ l에 DNA를 녹였다. 최종적으로 흡광도를 측정하여 DNA의 양을 측정하였다.

자) PCR분석

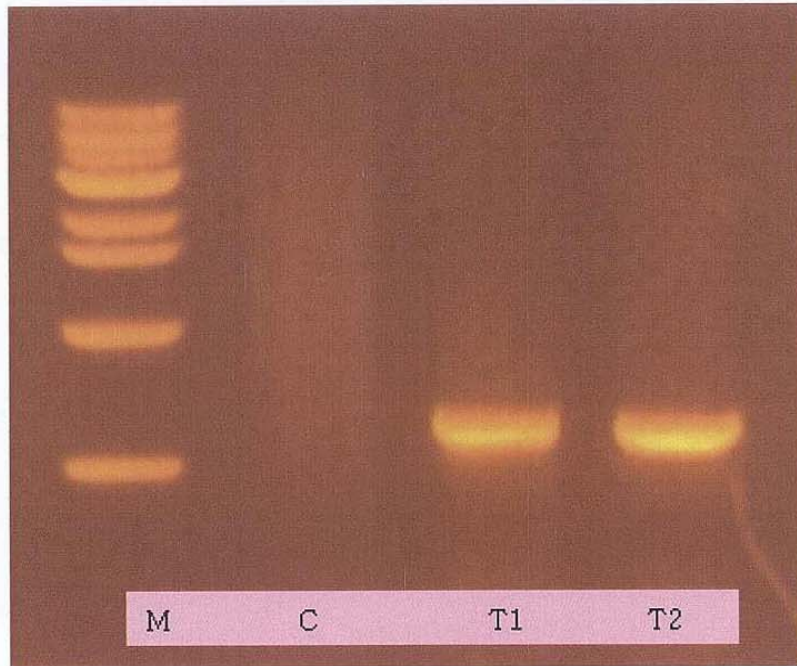
앞에서 뽑은 DNA를 Template로 PCR 분석을 하였다. 유전자의 도입여부를 알아보기 위하여 GUS 유전자의 sequence를 이용하여 PCR primer를 합성하였다. 작성한 primer(GUS forward 5' CTC GAC GGC CTG TGG GCA TTC AGT, GUS reverse 3' CGT CGT CTT TTC GGC GGC TGA AGC)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 45초, annealing을 위하여 55 $^{\circ}$ C에서 45초, extension을 위하여 72 $^{\circ}$ C 1분 30초 처리한 과정을 35회 반복하였다.



<그림 9. ser2 유전자 도입이 된 형질전환체>

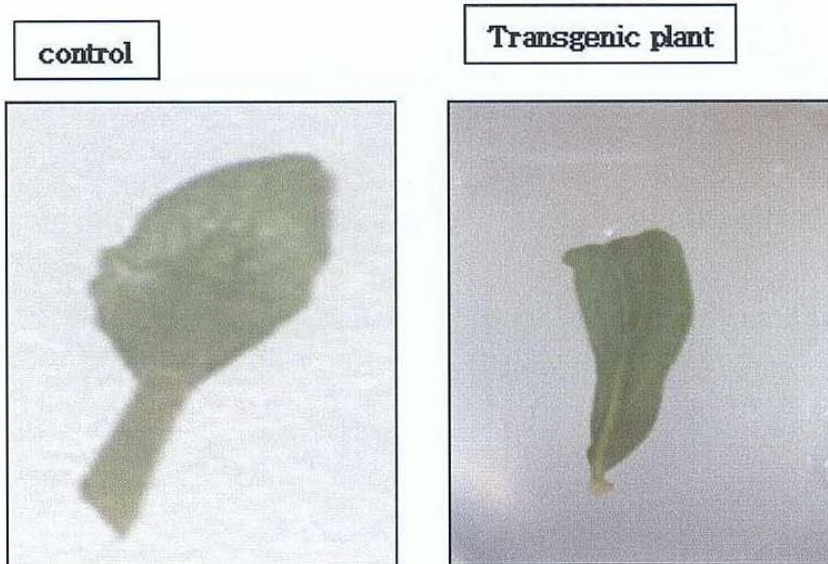


<그림 10. ser2 유전자 도입이 된 형질전환체>



GUS Primer

<그림 11. ser2 유전자가 도입된 형질전환체 PCR 그림>



<그림 12. ser2 유전자가 도입된 형질전환체의 Shoot 비교>

제 11 절 거베라 형질전환 도입 유전자 발현 벡터 제작

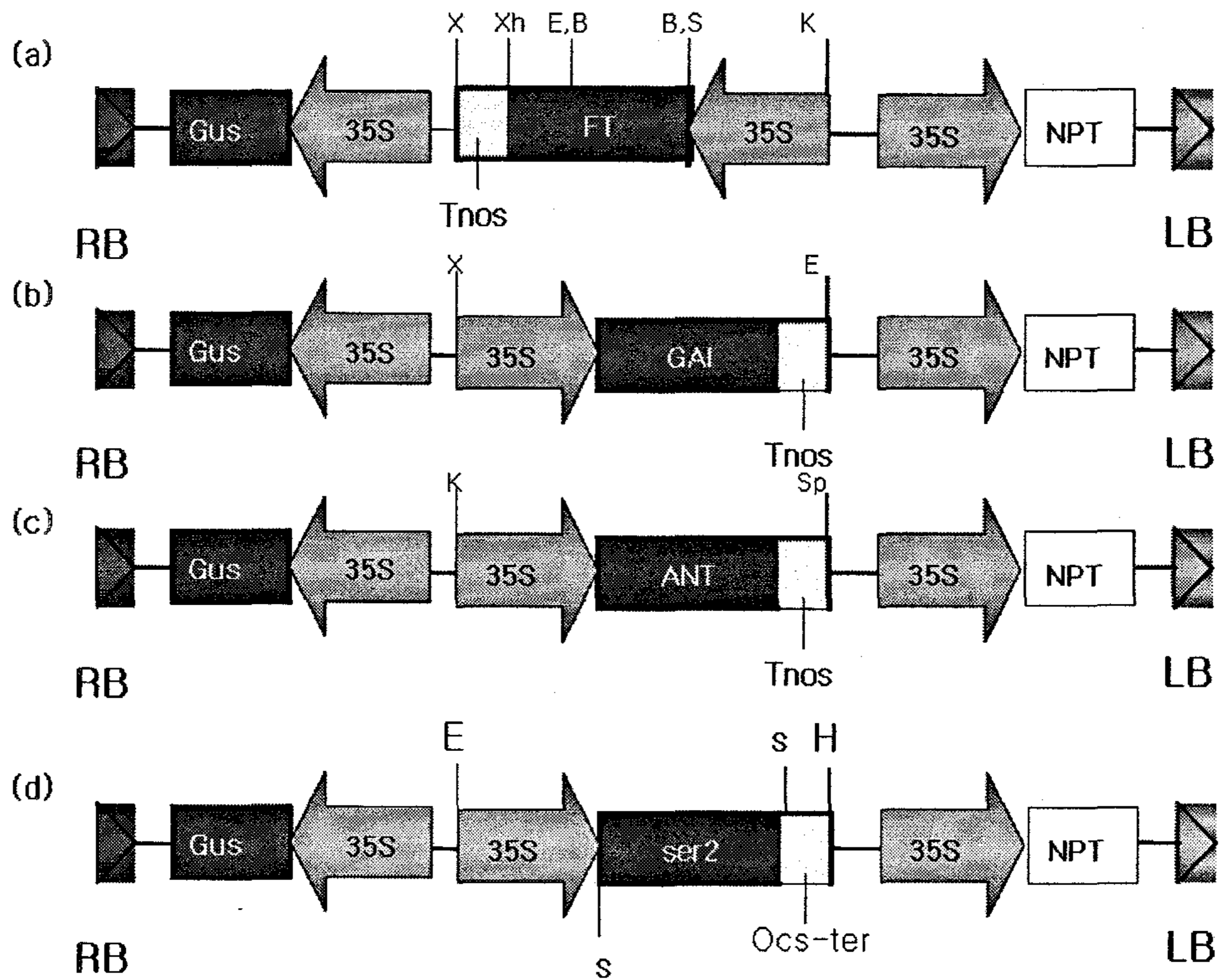


그림 13. 거베라 형질전환을 위하여 제작된 유전자 발현 벡터

(a) pCAMBIA2301-FT vector (b) pCAMBIA2301-GAI vector
 (c) pCAMB IA2301-ANT vector (d) pCAMBIA2301-SER2 vector.

BR, right border; BL, left border; NPT II, neomycin

phosphotransferamse: GUS, β -glucuronidase: 35S, CaMV 35S promoter

Tnos, Ocs-ter terminator of nopaline synthase; B, *Bam*H I; E, *Eco*R I;

K, *Kpn* I; S, *Sac* I; Sp, *Sph* I; X, *Xba* I; Xh, *Xho* I; H, *Hind*III

1. Plasmids와 배양조건

본 연구에 사용된 insert 유전자는 FT, GAI, ANT, SER2를 사용하였고, 형질전환을 위한 숙주균주는 *E. coli* DH5a를 사용하였으며, cloning을 위한 vector DNA로는 pCAMBIA2301을 사용하였고, *Agrobacterium*으로는 LBA4404를 사용하였다.

E. coli 배양에는 LB 배지(Yeast Extract 5g/ℓ, NaCl 5g/ℓ, Peptic peptone 10g/ℓ, Plant Agar 1.0%, pH=7.0)를 사용하였다. FT 와 GAI 유전자를 포함하고 있는 pBluescript SK(이하 pBS)는 LB 배지에 ampicillin 75ppm을 첨가한 배지에, ANT 유전자를 포함하고 있는 pCGN1547는 LB 배지에 gentamycin 25ppm을 첨가한 배지에, SER2 유전자를 포함하고 있는 pTEX는 LB 배지에 ampicillin 75ppm을 첨가한 배지에, pCAMBIA2301과 pCAMBIA3301은 LB 배지에 kanamycin 100ppm을 첨가한 배지에 37°C에서 250rpm으로 16시간 배양한 후 Accuprep[®] plasmid Extraction Kit(Bioneer)를 이용하여 DNA를 추출하였다. DH5a를 이용해 형질전환된 *E. coli* 세포는 100ppm kanamycin이 첨가된 LB 고체 배지에서 선별하였다. *Agrobacterium* 세포는 100ppm kanamycin과 25ppm rifampicin이 첨가된 YEP 고체 배지(Yeast Extract 10g/ℓ, NaCl 5g/ℓ, Peptic peptone 10g/ℓ, Plant Agar 1.0%, pH=7.0)에서 선별하였다.

2. pCAMBIA2301-FT vector의 제작

배양액을 원심분리하여 상등액을 제거한 후, Wizard[®] plus SV Minipreps DNA Purification System(Promega)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

추출한 DNA는 각각 Kpn I과 Xba I(Roche)으로 자른 후, Nucleo trap[®] Nucleic Acid Purification kit(Clontech)를 사용하여 Gel Elution하였다. Elution 후 vector와 insert의 비율을 1:1로 하여 DNA Ligation Kit Ver. 2.1(Takara)를 처리하여 16°C에서 30분 이상 반응시켜 ligation시켰다.

Ligation된 pCAMBIA2301-FT vector는 DH5a를 이용해 transformation시켰으며, 100ppm kanamycin이 첨가된 LB 고체 배지에서 37°C조건으로 16시간 동안 배양하여 선별하였다.

선별된 *E.coli* 세포는 PCR 분석을 하였다. PCR 분석 시 forward primer로는 35S promoter(5'-ATGGACCCCCACCCACGAGGA-3')의 sequence를 이용하고, reverse primer로는 nos terminator(5'-CCCGATCTAGTAAACATAGAGACACC-3')의 sequence를 이용하였다. PCR 조건은 denature를 위하여 94°C에서 45초, annealing을 위하여 55°C에서 45초, extension을 위하여 72°C 1분 30초 처리한 과정을 35회 반복하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

완성한 pCAMBIA2301-FT vector는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환시켰다. *Agrobacterium* 형질전환은 Gene Pulser (Bio-Rad)를 이용한 electro-transformation을 이용하였다.

Electro-transformation의 조건으로는 25 μ F, Controller 200, 1.5kv로 하였으며, 0.1cm Cuvettes를 사용하였다. *Agrobacterium* 세포는 100ppm kanamycin과 25ppm rifampicin이 첨가된 YEP 고체 배지에서 28°C조건으로 3일간 배양하여 선별하였다. 선별된 *Agrobacterium* 세포는 35S promoter primer와 nos terminator primer를 이용하여 PCR한 후, 1% agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

3. pCAMBIA2301-GAI vector의 제작

배양액을 원심분리하여 상등액을 제거한 후, Wizard[®] plus SV Minipreps DNA Purification System(Promega)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

추출한 DNA는 각각 EcoR I과 Xba I(Roche)으로 자른 후, Nucleo trap[®] Nucleic Acid Purification kit(Clontech)를 사용하여 Gel Elution하였다. Elution 후 vector와 insert의 비율을 1:1로 하여 DNA Ligation Kit Ver. 2.1(Takara)를 처리하여 16°C에서 30분 이상 반응시켜 ligation시켰다.

Ligation된 pCAMBIA2301-GAI vector는 DH5a를 이용 transformation 시켰으며, 100ppm kanamycin이 첨가된 LB 고체 배지에서 37°C조건으로 16시간 동안 배양하여 선별하였다.

선별된 *E.coli* 세포는 PCR 분석을 하였다. PCR 분석 시 forward primer로는 35S promoter(5'-ATGGACCCCCACCCACGAGGA-3')의 sequence를 이용하고,

reverse primer로는 nos terminator (5'-CCCGATCTAGTAAACATAGAGACACC-3')의 sequence를 이용하였다. PCR 조건은 denature를 위하여 94°C에서 45초, annealing을 위하여 55°C에서 45초, extension을 위하여 72°C 1분 30초 처리한 과정을 35회 반복하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

완성한 pCAMBIA2301-GAI vector는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환시켰다. *Agrobacterium* 형질전환은 Gene Pulser (Bio-Rad)를 이용한 electro-transformation을 이용하였다.

Electro-transformation의 조건으로는 25 μ F, Controller 200, 1.5kv로 하였으며, 0.1cm Cuvettes를 사용하였다. *Agrobacterium* 세포는 100ppm kanamycin과 25ppm rifampicin이 첨가된 YEP 고체 배지에서 28°C조건으로 3일간 배양하여 선별하였다. 선별된 *Agrobacterium* 세포는 35S promoter primer와 nos terminator primer를 이용하여 PCR한 후, 0.1% agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

4. pCAMBIA2301-ANT vector의 제작

배양액을 원심분리하여 상등액을 제거한 후, Wizard[®] plus SV Minipreps DNA Purification System(Promega)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

추출한 DNA는 각각 Kpn I과 Sph I(Roche)으로 자른 후, Nucleo trap[®] Nucleic Acid Purification kit(Clontech)를 사용하여 Gel Elution하였다. Elution 후 vector와 insert의 비율을 1:1로 하여 DNA Ligation Kit Ver. 2.1(Takara)를 처리하여 16°C에서 30분 이상 반응시켜 ligation시켰다.

Ligation된 pCAMBIA2301-ANT vector는 DH5 α 를 이용 transform ation을 시켰으며, 100ppm kanamycin이 첨가된 LB 고체 배지에서 37°C조건으로 16시간동안 배양하여 선별하였다.

선별된 *E.coli* 세포는 PCR 분석을 하였다. PCR 분석 시 forward primer로는 35S promoter(5'-ATGGACCCCCACCCACGAGGA-3')의 sequence를 이용하고, reverse primer로는 nos terminator(5'-CCCGATCTAG TAAACATAGAGACACC-3')의 sequence를 이용하였다. PCR 조건은 denature를 위하여 94°C에서 45초,

annealing을 위하여 55°C에서 45초, extension을 위하여 72°C 1분 30초 처리한 과정을 35회 반복하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

완성한 pCAMBIA2301-ANT vector는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환시켰다. *Agrobacterium* 형질전환은 Gene Pulser (Bio-Rad)를 이용한 electro-transformation을 이용하였다.

Electro-transformation의 조건으로는 25 μ F, Controller 200, 1.5kv로 하였으며, 0.1cm Cuvettes를 사용하였다. *Agrobacterium* 세포는 100ppm kanamycin과 25ppm rifampicin이 첨가된 YEP 고체 배지에서 28°C조건으로 3일간 배양하여 선별하였다. 선별된 *Agrobacterium* 세포는 35S promoter primer와 nos terminator primer를 이용하여 PCR한 후, 1% agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

5. pCAMBIA2301-SER2 vector의 제작

배양액을 원심분리하여 상등액을 제거한 후, Wizard[®] plus SV Minipreps DNA Purification System(Promega)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

추출한 DNA는 각각 EcoR I과 HindIII(Roche)으로 자른 후, Nucleo trap[®] Nucleic Acid Purification kit(Clontech)를 사용하여 Gel Elution하였다. Elution 후 vector와 insert의 비율을 1:1로 하여 DNA Ligation Kit Ver. 2.1(Takara)를 처리하여 16°C에서 30분 이상 반응시켜 ligation시켰다.

Ligation된 pCAMBIA2301-SER2 vector는 DH5a를 이용 transformation 시켰으며, 100ppm kanamycin이 첨가된 LB 고체 배지에서 37°C조건으로 16시간 동안 배양하여 선별하였다.

선별된 *E.coli* 세포는 PCR 분석을 하였다. PCR 분석 시 forward primer로는 35S promoter(5'-ATGGACCCCCACCCACGAGGA-3')의 sequence를 이용하고, reverse primer로는 nos terminator(5'-CCCGATCTAG TAAACATAGAGACACC-3')의 sequence를 이용하였다. PCR 조건은 denature를 위하여 94°C에서 45초, annealing을 위하여 55°C에서 45초, extension을 위하여 72°C 1분 30초 처리한 과정을 35회 반복하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel 전기영동으로 분석

하였다.

완성한 pCAMBIA2301-SER2 vector는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환시켰다. *Agrobacterium* 형질전환은 Gene Pulser (Bio-Rad)를 이용한 electro-transformation을 이용하였다.

Electro-transformation의 조건으로는 25 μ F, Controller 200, 1.5kv로 하였으며, 0.1cm Cuvettes를 사용하였다. *Agrobacterium* 세포는 100ppm kanamycin과 25ppm rifampicin이 첨가된 YEP 고체 배지에서 28 $^{\circ}$ C 조건으로 3일간 배양하여 선별하였다. 선별된 *Agrobacterium* 세포는 35S promoter primer와 nos terminator primer를 이용하여 PCR한 후, 0.1% agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

여 백

제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

○ 본 과제를 통해 국내 거베라 품종의 유전적 형질전환 가능 유전자형 스크린 완료 및 향후 연구에 도움.

○ 현재 국내 거베라는 최근의 육종 결과 일부 품종(20여 품종)이 가용한 상태이나, 아직도 외국의 도입품종(연간 100만본)에 의존도가 높고 거베라의 품종보호대상작물지정으로, 외국도입품종에 대한 로열티 지급이 불가피한 실정임.

○ 본 연구의 성공적 연구 결과로 거베라는 앞으로 고소득작물로서 재배와 생산이 계속 증가할 것으로 예상됨.

○ 성공적인 연구 결과로 분자육종이 이루어져 가시적인 결과가 지속적으로 나오게 되면, 품종육성에 큰 도움을 줘 외국 육성품종에 대한 로열티지급에 대한 대비책이 될 수 있음.

○ 분자육종 결과 우수한 품종 육성 시에 농가의 묘 수입에 따른 경제적 지출에 큰 도움을 줄 것으로 예상 됨.

○ 본 연구를 통해서 고부가가치 신품종 육성을 위한 기초연구가 이루어진다면 외국산 수입품종에 대한 로열티지급 대체효과(20억 이상)를 볼 수 있을 것으로 전망

○ 본 연구를 통해서 다양한 형태변이 유전자가 도입되어 다양한 종류의 형질전환체가 생산되면 이들은 현재 국내 거베라 육종에서 가장 취약한

빈약한 육종소재의 해결에도 매우 큰 도움이 될 것임.

○ 본 연구를 통하여 발굴되고 기능이 밝혀질 형태변이 유전자들은 다른 화훼작물로도 도입이 가능해 화훼분야의 분자육종의 폭을 매우 넓게 해주는 초석이 될 것임.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

○ 본 연구의 결과로써 발굴되고 기능이 확인된 형태변이 유전자들은 거베라 뿐 만 아니라 다른 화훼작물에서도 고부가가치 신품종육성에 도입되어 사용될 수도 있음.

○ 발굴된 유전자들이 거베라에 도입되어 다양한 종류의 형질전환체들이 생산되면 현재 국내 거베라 육종에 가장 약점인 유전자원 pool을 크게 확장할 수 있는 효과가 있음.

○ 유전자원 pool의 확대는 앞으로 계속되는 거베라육종을 위해서 매우 중요한 모본으로 활용될 것임.

○ 본 연구의 직접적 결과로써 생산될 형태변이 형질전환체들은 단기간에 선발되고 대량 증식되어 짧은 기간 내에 새로운 신품종으로 육성되어 국내 거베라 육종연구를 크게 활성화 시킬 것으로 생각됨.

○ 형태변이 형질전환체들에 대한 생리적, 분자생물학적 규명은 형태변이의 중요 매커니즘을 이해하고 창출하는데 커다란 학문적 기여를 할 것임.

여 백

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 관련기술인 거베라 형질전환을 이용한 분자육종기술은 현재 세계적으로 전무한 형편임.
- 거베라 형질전환의 경우 핀란드의 연구소에서 했다는 보고는 있으나, 유일하게 한 품종에 유전자를 도입한 보고만 있고, 형질전환의 어려움과 유럽의 문화적 배경 때문에 분자육종이 크게 진행되지는 못했음.
- 핀란드를 제외하고는 현재 어느 나라에서도 형질전환을 이용한 분자육종의 시도 되고 있지 않음, 따라서 기술정보의 확보가 매우 어려운 실정임.

여 백

제 7 장 참고문헌

Asen, S (1984) High pressure liquid chromatographic analysis of flavonoid chemical markers in petals from *Gerbera* flowers as an adjunct for cultivar and germplasm identification. *Phytochemistry*, 11, 2523-2526

Elomaa P (1996) Genetic modification of flavonoid pathway in ornamental plants. Ph D Thesis. University of Helsinki, Finland

Elomaa P, Honkanen, J, Puska, P, Suppanea, Y, Herariutta, M, Mehto, M, Kotilainen, L, Nevalainen and T. H. Teeri. (1993) *Agrobacterium*-mediated transfer of antisense chalcone synthase cDNA to *Gerbera hybrida* inhibits flower pigmentation. *Bio/Tech*. 11:508-511

Elomaa P, Y. Helariutta, M. Kotilainen, and T. H. Teeri. (1996) Transformation of antisense constructs of the chalcone synthase gene superfamily into *Gerbera hybrida*: differential effect on the expression of family members. *Mol Breed* 2:41-50

Elomaa P, M. Mehto, M. Kotilainen, Y. Helariutta, L. Nevalainen and T. H. Teeri. (1998) a bHLH transcription factor mediates organ, region and flower type specific signals on dihydroflavonoid-4-reductase(*dfr*) gene expression in the inflorescence of *Gerbera hybrida* (Asteraceae). *Plant J*. 16(1):93-99

Elomaa P, T. H. Teeri. (2001) Transgenic *Gerbera*. In YPS Bajaj, ed, *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Transgenic Crops III*, Vol 48. Springer Verlag, Berlin, pp 139-154

Grifing, B. (1959) Concept for general and specific combining ability in

relation to diallel crossing system, *Augt. J. Biological Sci.* 9:462-493

Hansen HV (1985) A taxonomic revision of the genus *Gerbera* (Compositae. Mutisieae) sections *Gerbera*, *Parva*, *Piloselloides* (in Africa), and *Lasiopus*. *Opera Bot* 78:5-36

Hedtrich CM (1979) Sprossregeneration aus Blättern und Vermehrung von *Gerbera jamesonii*. *Gartenbauwissenschaft* 44:1-3

Helariutta. Y, Elomaa P, M. Kotilainen, P. Suppanea, T. H. Teeri. (1993) Cloning of cDNA coding for dihydroflavonoid-4- reductase(*dfr*) and characterization of *dfr* expression in the corollas of *Gerbera hybrida* var. *Regina* (Compositae). *Plant Mol Biol* 22:183-193

Helariutta. Y, Elomaa P, M. Kotilainen, R. J. Griesbach, J. Schroder, T. H. Teeri. (1995) Chalcone syntase-like genes active during corolla development are differentially expressed and encode enzymes with different catalytic properties in *Gerbera hybrida* (Compositae). *Plant Mol Biol* 28:47-60

J.G.K. Williams, A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey, (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Res.*, 18: 6531-6535

J. Welsh, and M. McClelland, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, *Nucleic Acids Res*, 18: 7213-7218

John M. Dole, Harold F. Wilkins. (1999) *Floriculture Principles and species*. Prentice Hall. 356-361

Jerzy M, Lubomski M (1991) Adventitious shoot formation on ex vitro

derived leaf explants of *Gerbera jamesonii*. *Scirntia Hortic.* 47:115-124

K.M. Devos, and M.D. Gale (1992) The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat, *Theor. Appl. Gene.*, 84: 567-572

Kotilainen M, Helariutta Y, Elomaa P, Paulin L, Teeri TH (1994) A corolla- and carpel-abundant, non-specific lipid transfer protein gene is expressed in the epidermis and parenchyma of *Gerbera hybrida* var. Regina (Compositae). *Plant Mol Biol* 26:971-978

Kotilainen M, Albert VA, Elomaa P, Helariutta Y, Koskela S, Mehto M, Pollanen E, Uimari A, Yu D, Teeri TH (1999) Flower development and secondary metabolism in *Gerbera hybrida*, an Asteraceae. *FNL* 28:20-31

Ma H (1994) The unfolding drama of flower development : recent results from genetic and molecular analysis. *Genes Dev* 8:745-756

Mercurio, G. (2002) *Gerbra* cultivation in greenhous. Schreurs, The Netgerlands

Meynet J, sibi M (1984) Haploid plants from in vitro culture of unfertilized ovules in *Gerbera jamesonii*. *Z Pflnzenzucht* 93:78-85

Meynet J (1983) Effects of *in vitro* propagation on the further growth behaviour of some *Gerbera* varieties. *Agronomie* 3:839-846

Orlikowska T, Nowak E (1997) Factors affecting transformation of *Gerbera*. *Acta Hortic* 447:619-621

Orlikowska T (1999) Regeneration of adventitious shoots in process of genetic transformation. In Altman A, Ziv M & Izhar S (eds) : *Plant Biotechnology*

and *In Vitro* Biology in the 21st Century. (pp 185-188) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Penningsfeld F, Forchhammer L (1980) *Gerbera*. Ulmer Fachbuch, Zierpflanzenbau. Eugen Ulmer, Stuttgart, 342 pp

Pierik RLM, Steegmans HHM, Marelis JJ (1973) *Gerbera* plantlets from *in vitro* cultivated capitulum explants. *Sci Hortic* 1:117-119

Pierik RLM, Jansen JLM, Maasdam A, Binnendijk CM (1975) Optimization of *Gerbera* plantlet production from excised capitulum explants. *Sci Hortic* 3:351-357

Pierik RLM, Steegmans HHM, Verhaegh JAM, Wouters AN (1982) Effect of cytokinin and cultivar on shoot formation to *Gerbera jamesonii* *in vitro*. *Neth J Agric Sci* 30:341-346

Radojevic LJ, Djordjevic N, Manceva L (1987) Clonal multiplication of *Gerbera* by *in vitro* culture of different tissues. *Acta Hortic.* 218-223

Reynoird J-P, Chriqui D, Noin M, Brown S, Marie D (1993) plant regeneration from *in vitro* leaf culture of several *Gerbera species*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 33:203-210

Ruffoni B & Massabo F (1991) Tissue culture in *Gerbera jamesonii* hybrida. *Acta Hortic.* 289: 147-148

S.D. Tanksely and T.J. Orton, *Isozymes in plant genetics and breeding*, Elsevier, 12 (1983)

S. Martens, G. Forkmann (2000) Flavonoid biosynthesis in *Gerbera* hybrids : Enzymology and genetics. *Acta Hort*, 508, ISHS 2000

Tyrach A, Horn W (1997) Inheritance of flower colour and flavonoid pigments in *Gerbera*. *Plant breeding* 116, 377-381

T. Demeke, R.P. Adams, and R. Chibbar (1992) Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA(RAPD): *A case study in Brassic*, *Theor. App., Gene.*, 84: 990-994

Teresa Orlikowaka. Elzbieta Nowak, Agnieszka Marasek, Danuta Kucharska (1999) Effect of growth regulators and incubation period on *in vitro* regeneration of adventitious shoots from *Gerbera* petioles. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 59: 95-102

V. Nagaraju, G. S. L. Srinivas, G. Lakshmi Sita (1998) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Gerbera hybrida*. *Current Science*, Vol. 74, No. 7, 630-634

X.Yang, and C.Quiros (1993) Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers, *Theor. Apple. Genet*, 86: 205-212